

第27回NMR討論会

プログラム

日時：昭和63年9月22日(木)～24日(土)

会場：北海道大学学術交流会館

共催：日本化学会・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

9月22日(木)

一般講演 発表 12分
討論 3分
特別講演 発表 35分
討論 5分

9:15~11:00

座長 甲斐荘 正恒

1. 補酵素 C4' 位をエンリッチしたアスパラギン酸アミノ基転移酵素の ^{13}C -NMR による研究
(熊本大医短・熊本大医・Texas A & M Univ.) ○檜垣 強・棚瀬 純男・長島不二夫
森野 能昌・Neal J. Stelowich・Howard J. Williams
A. Ian Scott 1
 2. 低溶解性蛋白質 (ヒト IL-2) の ^1H -NMR
(味の素中研・東大薬) 宮野 博・○鈴木榮一郎・辻 尚志
澄川 弘美・永嶋 伸也・明石 知子
古屋 真美・平山 和雄・西村 善文
荒田 洋治 5
 3. アミノ酸変異黄色ブドウ球菌核酸分解酵素タンパク H 124 L (His at 124 to Leu) の芳香環水素
 ^1H -NMR 帰属と pH 滴定
(National Magnetic Resonance Center at Madison, Department of Biochemistry,
University of Wisconsin) ○因 正信・新宮 正久 9
- 座長 森島 績
4. α アミラーゼインヒビター HAIM の溶液構造
(蛋白工学研究所・阪大蛋白研) ○吉川 涉・福原 健一・好田真由美
中村 春木・小林 祐次 13
 5. ^1H NMR STUDY OF RECOMBINANT DESULFATOHIRUDIN FROM YEAST
(Institut für Molekularbiologie und Biophysik, ETH-Hönggerberg)
H. Haruyama and K. Wüthrich 17
 6. プロトン NMR によるハブ毒ホスホリパーゼ A₂ のトリプトファン残基の環境の解析
(群馬大工短・オランダユトレヒト大・鹿児島大医・九大理)
○遠藤斗志也・Robert Kaptein・木原 大
毛利 紀子・田中 修司・大野 素徳 21

7. ω -コノトキシンの溶液構造

(阪大蛋白研・蛋工研・住友化学愛媛研・奨励会ペプチド研・京大理)

小林 祐次・○西村 重徳・京極 好正

大久保忠恭・島田 健・美濃部正夫

西内 祐二・榊原 俊平・郷 信広……25

— 休 憩 —

11:15~12:00

座 長 荒 田 洋 治

特別講演-1. 全重水素化リン脂質ミセルに埋めこまれた生理活性ペプチドの構造と機能の相関

(都臨床医学総合研究所・東レリサーチセンター) ○稲垣 冬彦・嶋田 一夫・川口 謙

大竹 修子・平野 昌彦・寺沢 功……29

— 昼 食 —

13:00~14:45

座 長 稲 垣 冬 彦

8. ^1H NMR による免疫グロブリンの高次構造の研究

(東大薬) 田中 俊之・半沢 宏之・矢田 信久

高橋 栄夫・海老沢計慶・西村 善文

○荒田 洋治 ……33

9. 糖鎖構造と免疫グロブリン G の糖鎖多様性

(阪大医) ○藤井 茂・西河 淳・谷口 直之……37

10. NMR による金属ポルフィリン π ラジカルの特異な電子構造の解明

(京大工) ○森島 績・藤井 浩・城 宜嗣……41

11. ^1H 、 ^2H -NMR による金属ポルフィリン π アニオンラジカルの電子状態の研究

(京大工) ○山口 和也・藤井 浩・森島 績……45

座長 阿久津 秀雄

12. 遺伝子操作によるアミノ酸置換変異ヘモグロビンの NMR とその高次構造

(京大工・阪大医・阪大基礎工・MRC 分子生物研) ○石森浩一郎・森島 績・今井 清博
伏谷 建造・宮崎源太郎・D. Shih

J. Tame・K. Nagai ……49

13. ヘモグロビンのサブユニット間相互作用

(東工大工) ○山本 泰彦・井上 義夫・中條利一郎……53

14. エチオヘミンを含むミオグロビンの¹H-NMR スペクトル

(京薬大) ○根矢 三郎・舟崎 紀昭……57

— 休 憩 —

15:00~15:45

座長 永山 国昭

特別講演—2. HETERONUCLEAR POLARIZATION TRANSFER AND EDITING TECHNIQUES

(Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH—Zentrum)

Ole W. Sørensen……61

15:45~17:30

座長 小林 祐次

15. 主鎖カルボニル炭素シグナルを出発点とする蛋白質 NMR スペクトルの帰属拡張法の開発

(都立大理・Univ. Wisconsin—Madison) ○甲斐荘正恒・佐藤 晴哉・細谷 仁子
三宅 洋子・M. W. Westler

B. J. Stockman・J. L. Markley ……63

16. カルボニル炭素¹³C-NMR シグナルによる蛋白質の主鎖アミド水素の重水素交換速度の測定

(都立大理) ○内田 健一・甲斐荘正恒 ……67

17. DNA イミノプロトン交換と核酸—核酸相互作用

(東薬大・理研) ○神藤平三郎・福島 千晶・松本 潮
柴田 武彦 ……71

座長 神藤 平三郎

18. tRNA によるコドン認識の制御機構の2次元 NMR による解析

(東大理生化・横浜国大工物質工学) ○河合 剛太・宮澤 辰雄・横山 茂之……75

19. DNA の ^1H - ^{31}P 二次元シフト相関スペクトル

(阪大薬・蛋工研) ○廣明 秀一・小田 康司・上杉 晴一
池原 森男79

20. レシチン二重膜における極性基の構造解析

(横浜国大工) ○阿久津秀雄・長森 敏明・徳光 英之83

21. 交差緩和時間、スピン・エコー・スペクトルによるウシ血漿アルブミン構造転移の研究

(岐阜大学医学部第2生理・第1病理・生理学研究所分子生理・京大理)

惠良 聖一・○桑田 一夫・長岡 俊治

曾我美 勝・加藤 一夫・亘 弘

赤坂 一之87

18:30~20:30

— 懇 親 会 (クラーク会館) —

9月23日(金)

9:00~11:15

座長 安藤 勲

22. 固体高分解能 ^{13}C NMRによる液晶の研究(第3報)強誘電性液晶の ^{13}C NMRとX線解析
(化技研・お茶大理) ○早水紀久子・柳沢 勝・堀 佳也子
大橋 裕二 ……91

23. ゼオライトの細孔中のテトラアンモニウムイオンの運動
(化技研) ○林 繁信・鈴木 邦夫・清住 嘉道
早水紀久子 ……95

24. Quadrupole Echoによる ^2H NMR線形測定を利用した固体中ジメチルアンモニウムイオンの運動
の解析
(分子研・名大理・British Columbia大) ○池田 龍一・C. A. McDowell ……99

座長 池田 龍一

25. 重水素 NMRによるポリグルタメートの分子運動
(北大工) ○平沖 敏文・松尾 研吾・堤 耀廣 ……103

26. 固体高分解能 ^{13}C NMR. スピン格子緩和による固体ペプチド、蛋白質の分子運動の検出
(国立がんセンター研) ○斉藤 肇・横井もと子 ……107

27. 重水素 NMRによるトルエン・カリックスアレン包接化合物の運動に関する研究
(京大理) 田村 充・内藤 晶 ……111

座長 内藤 晶

28. SASS-NMR法による包接化合物におけるゲスト分子の動的構造
(京大理) ○今城 文雄・桑原 大介・北崎 信幸
中井 利仁・寺尾 武彦 ……115

29. 固体における2次元 powder patternの応用と、 ^{13}C - ^1H 間相互作用の新測定法
(京大理) ○中井 利仁・芦田 淳・寺尾 武彦 ……119

30. Magic Angle Spinning下における ^{13}C 及び ^{31}P NMRのspectral spin diffusion
(University of British Columbia) ○久保 厚・C. A. McDowell ……123

11:15~12:00

座長 寺尾武彦

特別講演-3. Two-stage Feature of Hartman-Hahn Cross Relaxation in Magic Angle Sample Spinning

(Department of Physics, East China Normal University)

Wu Xiaoling · Zhang Shammin · Wu Xuewen127

— 昼 食 —

13:00~15:00

座長 藤原英明

31. 粘土鉱物—有機物材料の固体高分解能 NMR 解析

(豊田中研・京大化研) ○田島 一郎・山本 豊・臼井 有光

福嶋 喜章・堀井 文敬129

32. 固体 CP-MAS NMR によるプロリン残基を含んだオリゴペプチドのコンホメーション

(東工大工・群大工短) ○安藤 慎治・松本 圭右・安藤 勲

荘司 顕・尾崎 拓男133

33. ポリエチレンの¹³C NMR 化学シフトと結晶構造

(東工大工・東工芸大工) 黒子 弘道・安藤 勲・山延 健137

34. 高純度直鎖アルカン一軸配向試料の VT/CP ¹³C NMR

(京大化研・九大工・熊本大教養) 中川 将・辻 秀人・堀井 文敬

北丸 竜三・高見澤徹一郎・占部 美子

小川 芳弘141

座長 堀井文敬

35. 長鎖 *n*-アルカンに於ける¹³C スピン緩和の結晶構造依存性

(名古屋工業技術試験所) ○岡崎 正治・鳥山 和美・布目 華一145

36. ポリオレフィンの¹³C NMR 立体規則性化学シフトとその帰属

(東京農工大) ○朝倉 哲郎・平野 幸喜149

37. ³¹P 固体 NMR による PM2 フェージと宿主の生体膜の動的の研究

(阪大蛋白研・横浜国大) ○小田原孝行・阿久津秀雄・京極 好正153

38. *n*-アルカンと芳香族化合物の分子間相互作用

(電通大) 仁木 國雄157

15:15~16:00

座 長 齊 藤 肇

特別講演— 4. Spin Echoes in Zero—and High—Field

(材料科学技術振興財団・Univ. California) 竹腰清乃理・T. P. Jarvie・D. Suter・A. Pines ……161

16:00~18:30

座 長 高 橋 憲 助

39. AUREOLIC ACID ANALOGUES の NMR 解析：構造、シグナル帰属、シフト挙動、特殊スピン結合などに関する知見

(塩野義研究所) ○照井 彬弘・高山 陽子・肥沼 三雄

松本 浩一 ……165

40. ^1H NMR による石英ガラス中のプロトンの定量

(東ソー) 戸井田良晴・○世良 朋子・岡田 忠司 ……169

41. ポリメタクリル酸メチル溶液の ^{13}C 磁気緩和の周波数依存性

(京大化研) ○堀井 文敬・中川 将・北丸 竜三

高分子学会 NMR 研究会会員 ……173

42. テストステロンの ^{13}C T_1 の測定と解析. とくに四級炭素の T_1 の温度及び磁場依存性と緩和機構について

(阪大薬・阪大産研) ○笠 永忠・藤原 英明・鄭 斗煥

佐々木喜男・高井 嘉雄・沢田 正実 ……177

座 長 朝 倉 哲 郎

43. プタジェン誘導体ジアニオンの NMR

(名工大工) ○高倉 裕・横山 幸弘・高橋 憲助 ……181

44. NMR のよる反応速度の研究(2)置換フェノール類の酸触媒水素交換反応への応用

(名工大工) ○吉野 明広・中島 康喜・高橋 憲助 ……185

45. アキラルなアミノ酸を中間に含む保護テトラペプチド・ジアステレオマーの溶液中でのコンホメーション

(神戸女薬大・甲南大理) ○杉浦真喜子・高尾 樽雄・山田 隆巳

中尾 正之 ……189

座長 平 沖 敏 文

46. 中 止

47. ^1H NMR からみた界面活性剤共存下での蛋白の水和特性

(北大低温研) ○花房 尚史……193

48. ポリビニルピロリドン—DMSO—水系の動的状態Ⅱ

(北大理・北大低温研) ○山本 勇一・花房 尚史・上平 恒……197

49. 蛋白質燐酸緩衝溶液の ^{31}P -NMR

(北大理) ○石村 美雪・上平 恒……201

9月24日(土)

9:00~10:15

座長 堤 耀 廣

50. ^{25}Mg 核磁気共鳴によるリン酸基移動反応における触媒作用の研究
(北大理) ○市川 和彦・和泉 光則……205
51. ^{113}Cd NMR. 溶液状態と固体状態におけるカドミウム(II) 錯体の構造の比較
(近畿大理工) ○宗像 恵・北川 進・田村 義隆……209
52. ^{51}V NMR を用いた3価バナジウムの化学
(近畿大理工) ○北川 進・宗像 恵・植田 昌伸……213
- 座長 北川 進
53. 多核 (^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{113}Cd) 固体高分解能 NMR. キトサンと鉍酸塩金属錯体生成効果
(国立がんセンター研・大阪府放射線研・日本ブルカー)
齊藤 肇・横井もと子・小川 広蔵
○恵良田智樹……217
54. 融塩中のイオンの緩和速度 (Li-Cs) NO_3 系の Li-7 と Cs-133
(北大理・北大工) ○中村 義男・舟木 淳・下川 繁三……221

一 休 憩 一

10:30~11:15

座長 宗 像 恵

特別講演-5. THE EFFECT OF SOLVATION ON THE PARAMETERS OF NMR SPECTRA AND THE STRUCTURE OF ORGANOMERCURY COMPOUNDS IN SOLUTIONS

(Department of Chemistry, Moscow State University)

○Yu. A. Ustynyuk・Yu. K. Grishin・D. V. Bazhenov……225

11:15~12:00

座長 高 橋 征 三

55. ラジオ波位相差の NMR による測定
(日本電子生体計測研) 藤原 敏道・永山 国昭……227

56. 差分 NMR の高分解能 NMR への応用

(電総研) ○亀井 裕孟・片山 義明……231

57. ^{23}Na の Nutation NMR

(阪大理) ○大木 寛・中村 亘男・千原 秀昭……235

一 昼 食 一

13:00~15:15

座 長 赤 坂 一 之

58. 軽水溶液の NMR 測定における $1\bar{1}$ パルス法の改良

(日本女家政・日本電子生体研) ○高橋 征三・永山 国昭……239

59. 選択的 INADEQUATE 法

(日本電子・日本ロシュ・東大応微研) ○大内 宗城・河野 静江・今成 司

児玉 佳子・瀬戸 治男 ……243

60. Selective HOHAHA-CH 法の構造解析への応用

(東大応微研) 降旗 一夫・瀬戸 治男……247

座 長 中 村 亘 男

61. リレード HMQC

(北大理) ○小椋 賢治・引地 邦男……251

62. NMR 温度ジャンプ装置の開発

(京大理・日本電子) ○赤坂 一之・内藤 晶・中谷 博

今成 司 ……255

63. 液体仕様分光器を改良した固体重水素 NMR 測定装置

(京大理・日本電子) ○内藤 晶・赤坂 一之・清水 章三……259

座 長 亀 井 裕 孟

64. オンライン GPC/NMR によるポリメタクリル酸エステルの構造解析

(阪大基礎工・日本電子) 畑田 耕一・○右手 浩一・西村 透

今成 司・藤井 直之 ……263

65. MEM の NQR 周波数の精密測定への応用

(阪大教養・阪大理・大阪市大) ○江口 太郎・中村 亘男・真野 倅一……267

66. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータベースによる検索同定システムの開発(I) 機能とアルゴリズム

(日立計測・日立那珂) 田中 保子・○橋本 正雄・笹淵 仁

服部 忠鐵271

— 休 憩 —

15:30~17:30

座 長 亘 弘

67. カイコの *in vivo* NMR

(東京農工大・東京都老人研・京都府立医大) 朝倉 哲郎・○出村 誠・小山内 実

西川 弘恭275

68. *In vivo* NMR における磁化移動法 — その意義と問題点 —

(国立公害研) 三森 文行279

69. ^{31}P -NMR スペクトル走査による筋線維に沿ったクレアチン・キナーゼ反応の測定

(京都府立医大生理) ○吉崎 和男・西川 弘恭283

座 長 西 川 弘 恭

70. ^{39}K NMR による細胞内 K イオンの動態計測

(生理研分子生理) ○村上 正隆・鈴木 英司・宮本 信一

瀬尾 芳輝・Martin C. Steward・亘 弘287

71. 高エネルギー磷酸化合物のスピン — 格子緩和時間 (T_1) の検討

(生理研分子生理) ○鈴木 英司・前田 宗宏・九鬼 覚

川上 剛・塚本 賢治・中山 晋介

瀬尾 芳輝・村上 正隆・亘 弘291

72. 心筋エネルギー代謝の酵素濃度依存性 — P31 NMR と光学測定

(北大医循環器・応電研・工) ○福田 洋之・安田 寿一・田村 守

下川 繁三295

座 長 三 森 文 行

73. $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間測定による正常および変性椎間板髄核内水分子の易動性と同組織の粘弾性特性の関係

(京都府立医大整形外科・第一生理) 日下 義章・三船 哲郎・茶谷 賢一

大友 啓資・山下 文治・榊田喜三郎

西川 弘恭299

74. 交差緩和時間による生体内水構造の検討—各種脳腫瘍への応用—

(岐阜大学医学部脳神経外科・第2生理・生理学研究所)

岩間 亨・山田 弘・恵良 聖一

桑田 一夫・曾我美 勝・亘 弘.....303

第 1 日

9 月 22 日(木)

補酵素 C4' 位をエンリッチしたアスパラギン酸アミノ基転移酵素の
 ^{13}C -NMRによる研究

(熊本大・医短) ○ 檜垣 強

(熊本大・医) 棚瀬 純男、長島 不二夫、森野 能昌

(Texas A&M Univ.) Neal J. Stolowich, Howard J. Williams

A. Ian Scott

CMR STUDY ON ASPARTATE AMINOTRANSFERASE WITH [4'- ^{13}C] PYRIDOXAL PHOSPHATE

T. Higaki, S. Tanase, F. Nagashima and Y. Morino (Kumamoto Univ.)

N. J. Stolowich, H. J. Williams and A. I. Scott (Texas A&M Univ.)

Apoenzyme samples of Aspartate aminotransferase (AspAT) purified from cytosolic fraction of pig heart were reconstituted with [4'- ^{13}C] pyridoxal 5'-phosphate. CMR spectra of AspAT samples thus generated established the chemical shift of 165.3 ppm for C4' of the coenzyme bound as an internal aldimine with lysine 258 of the enzyme at pH 5. In the absence of ligands the chemical shift of C4' was shown to be dependent on pH displaying a pK of 6.3. The chemical shift and pH dependency of C4' were also examined in the presence of ligands (succinate, α -methyl-aspartate, cysteinsulfinate) and upon reduction with sodium borohydride.

[序論] ブタ心筋細胞質局在アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (cAspAT) は同一のサブユニット (412残基) 2個から構成され (分子量 93,000) 各サブユニットに於て、1個の補酵素ピリドキサルリン酸 (PLP) がアポ酵素の Lys 258 と Schiff 塩基を作り活性中心を形成している (図 1)。本研究では、補酵素の C4' を ^{13}C でラベルした PLP で再構成した cAspAT と基質及び基質アナログとの反応に伴う変化を検索する目的で下記の NMR による実験を行った。

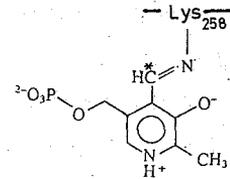


図 1

[実験方法] 材料: AspAT は哺乳動物において細胞質局在、ミトコンドリア局在の両アイソエンザイムの形で存在する。ブタ心筋から精製した cAspAT は $A_{430\text{nm}}/A_{340\text{nm}}(\text{pH}5) = 3.6 - 3.7$, S. A. = $290\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった (25°C)。cAspAT (200mg, 4.3 μmol /モノマー) のピリドキサル型を 0.1M リン酸バッファー 8ml (pH 8.0) 中で 1 mM のシステインスルフィオン酸との反応によりピリドキサミン型に変換した。補酵素ピリドキサミンリン酸を 1M リン酸バッファー (pH 5) の条件下で酵素から解離した。得られたアポ酵素を Sephadex G-50 カラムを用いて単離した。濃縮したアポ酵素を [4'- ^{13}C] PLP (Vandé Velde, V. W. et al.,

1985) と、室温下30分間インキュベーションしホロ酵素を再構成した。再構成度は元の酵素に対し96%であった。

^{13}C NMR測定: 装置はBruker WM-300 wide bore (75.46 MHz, 10mm ϕ), AM-500(125.76 MHz, 5mm ϕ)及びJeol GX-270 (67.8 MHz, 5mm ϕ)を用いた。ロックのために重水を用いたが、pHはメーターの読みそのものを記載した。ケミカルシフト値はTSPを外部基準として用いた。

[結果と考察] コハク酸存在下での native AspAT の natural abundance の ^{13}C NMR スペクトルを示す (図2A)。それは aliphatic carbons (10 - 70 ppm), aromatic carbons (120 - 135 ppm), carbonyl carbons (170 - 180 ppm), 160 ppm の アルギニンおよびチロシンの α carbons のシグナルから成る。184 ppm および 36 ppm のシャープなシグナルはコハク酸のカルボキシル及びメチレン炭素を示す。同様な測定条件での [$4'$ - ^{13}C] AspAT の ^{13}C NMR スペクトルは新たに 165.9 ppm にシグナルを与える (図2B)、 ^{13}C ラベルした AspAT と native AspAT との差スペクトル (図2C) から本シグナルは補酵素の $4'$ C に由来することが明かである。

pH 滴定: 透析によりコハク酸を除去し、リガンドフリーの状態での pH 滴定を行った (図3)。 $4'$ C に由来するシグナルは pH により化学シフト変化 (160 - 166 ppm) を示し、pK は 6.3 と算出された (●—●)。これは補酵素 Schiff 塩基のプロトンの解離状態を反映するものと考えられ、 ^1H NMR から得られた補酵素 $4'$ -H の化学シフトの pH 不感性と対比される結果である。pK 値 6.3 は分光学的観察のそれと良い一致を示し、CMR の有用性を示す結果と言える。

コハク酸の影響: コハク酸は本酵素の競争阻害剤として知られている。基質がないとき、AspAT は open conformation をとっているが、コハク酸と AspAT との強い結合は大きな構造変化 (closed conformation) をもたらず (Arnone et al., 1985)。CMR スペクトル

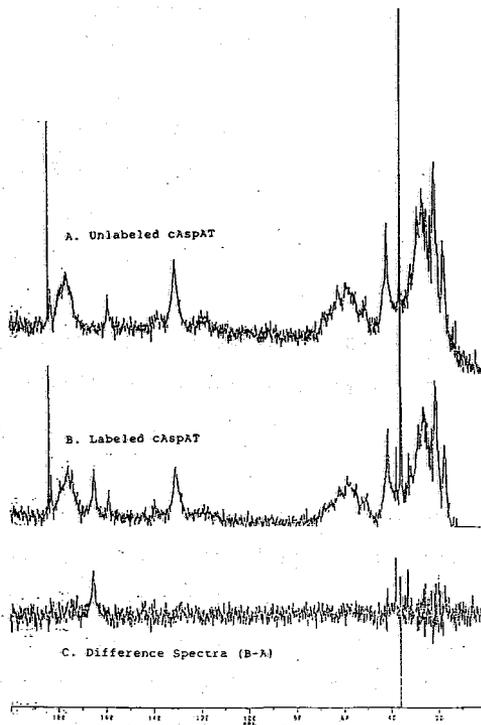


図 2

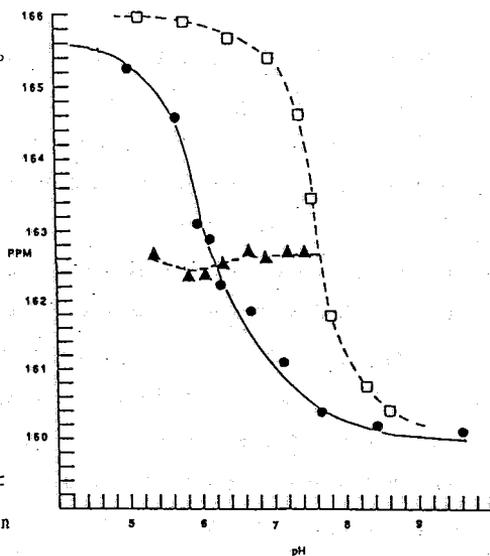


図 3

上でのコハク酸の影響を知るために、飽和濃度でのコハク酸の添加実験を行った結果、pH 7.5で補酵素4'Cはおよそ4 ppm低磁場シフトするのを観察した。そのtitration curve (図3、-□-□-)はpK 7.7を与えた。この値は分光学的に得られた結果(Jenkins & D'Ari, 1966b)に近い。

α -メチルアスパラギン酸 (α -MeAsp) :

基質アナログ α -MeAspとAspATとの反応は α -メチル基が存在するため、transaminationの次のステップに進むことが出来ず安定なexternal aldimine複合体を作り、反応中間体の良いモデルとなる。

α -MeAspの添加実験を行うと、pH 5.6で164.7 ppm(internal aldimine)のシフト値を示した4'Cは10 mMのDL- α -MeAspを加えることにより1.5 ppmだけ高磁場シフトした(163.2 ppm) (図4)。

α -MeAspを更に50 mMに増やすとpH 5.5で4'Cは162.7ppmと高磁場へシフトした。external aldimineの化学シフトはpH 5から9までの範囲で殆ど変化を示さなかった(図3、-▲-▲-)。これはinternal aldimineにおける4'CシグナルがpH滴定される事実と対比され、 α -MeAspとの複合体におけるaldimine結合が外界からシールドされた環境にあることを示唆している。

システインスルフィン酸 (CS) : CSとの反応はAspATをピリドキサル型からピリドキサミン型に変える。pH 5.15でCSを加えると165 ppmのinternal aldimineは消失し、aliphatic領域に新しいピークが現れる(39.6 ppm) (図5)。4'Cの線幅は125 ± 20 Hzから75 ±

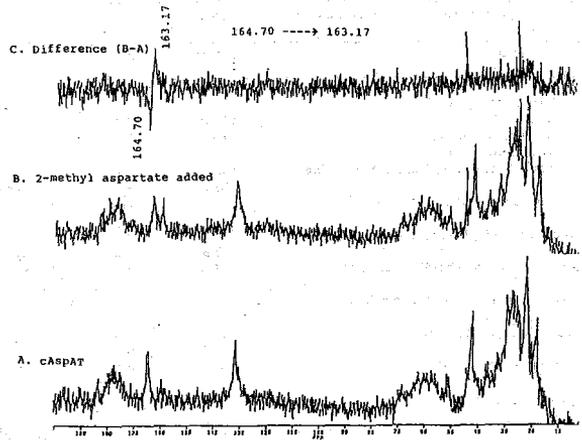


図4

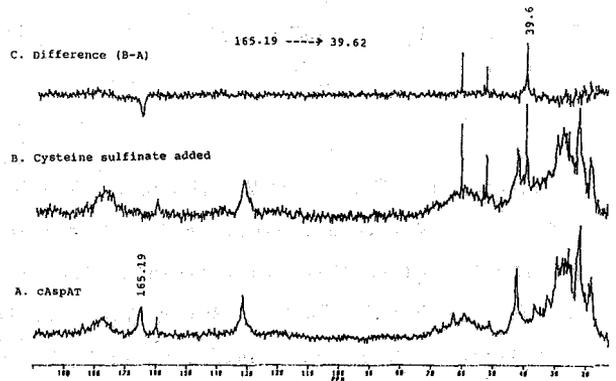


図5

Table Effect of ligands upon linewidth of pyridoxal C4' bound to AspAT

Ligand	$\omega_{1/2}$ (Hertz) ^a
None	125
Succinate	100-150 ^b
MeAsp	150-175 ^b
Cysteinesulfinate	75
NaBH ₄	250
MeAsp + NaBH ₄	200

^a Linewidth measured at half-height. ^b Variable with pH.

表1

Table Comparison of chemical shifts for C⁴ of various derivatives of phosphorylated B₆ in enzyme-bound and free form.

Compound	δ (ppm)	pH
Pyridoxal-5'-phosphate ^a		
(aldehyde)	197.3	8.4
(hydrated aldehyde)	88.4	8.4
Aldimine derivatives		
N-phosphopyridoxylidene-n-butylamine	165.8	7.4
N-phosphopyridoxylidene-valine ^b	163.8	3.1
	165.3	7.6
Pyridoxamine-5'-phosphate ^a	37.6	7.0
	37.6	12.5
N-n-butylpyridoxamine-5'-phosphate ^a	45.5	7.8
Enzyme-bound Pyridoxal Derivatives		
D-serine dehydratase ^a	167.7	7.8
	168.0	9.4
reduced with NaBH ₄	41.7	8.3
Cytosolic AspAT ^c		
pyridoxal form	165.3	5.1
	160.2	9.4
complex with succinate	165.9	5.5
	164.0	7.5
complex with 2-methyl-DL-aspartate	162.7	7.5
reaction with cysteinesulfinate		
(pyridoxamine form)	39.6	5.1
reduced with NaBH ₄	47.2	5.8

^a O'Leary and Payne (1976). ^b Dalling et al. (1976). ^c This study.

表 2

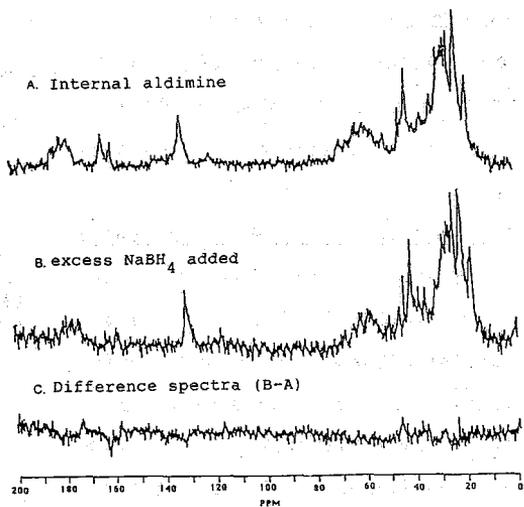


図 6

10 Hz に変化し (表 1)、運動の自由度の増加を示した。

NaBH₄: AspAT の internal aldimine および external aldimine に対して NaBH₄ による還元実験を試みた。pH 6.2 で internal aldimine (162.65 ppm) は NaBH₄ により消失し 47.4 ppm に新しいピークを現した (図 6)。その線幅は 250 ± 25 Hz であった。同様な方法で external aldimine に対しては、40.3 ppm, 200 ± 25 Hz であった。これは Schiff 塩基の還元による ¹³C-¹H 緩和の増大を反映している。

AspAT は広範囲にわたってその構造やメカニズムが研究されているにもかかわらず、CMR による活性中心に関する詳細な研究はなかった。以上の結果を PLP を要求する D-セリン脱水素酵素、アルドイミン誘導体に関するデータと共に表 2 に示す。今後、本酵素のアミノ酸置換による変異酵素について ¹³C のシグナルを指標にして補酵素の結合環境について検討を加えて行きたい。

2

低溶解性蛋白質 (IL-2) の $^1\text{H-NMR}$

(味の素・中研、*東大・薬) 宮野博, ○鈴木榮一郎, 辻尚志, 澄川弘美,
永嶋伸也, 明石知子, 古屋真美, 平山和雄,
西村善文*, 荒田洋治*

$^1\text{H-NMR}$ OF HUMAN INTERLEUKIN 2

Hiroshi MIYANO, Ei-ichiro SUZUKI, Takashi TSUJI, Hiromi SUMIKAWA, Nobuya
NAGASHIMA, Satoko AKASHI, Mami FURUYA, Kazuo HIRAYAMA (Ajinomoto Co.)

Yoshifumi NISHIMURA, Yoji ARATA (Faculty of Pharm. Sci., University of Tokyo)

The NMR signals of C2 protons of all three histidine residues in recombinant (N-methionylated) human interleukin 2 (IL-2) have been assigned by hydrogen-deuterium exchange rate analysis in combination with the fast atom bombardment mass spectrometry (FAB/MS). V8 protease digested IL-2 was used after incubation in deuterium oxide solution (pH 8.5, 37°C, 64 hr). The pKa values for each of the histidine residues have been determined (His-16: pKa 7.2, 8.64ppm at pH 4.5; His-55: pKa 3~4, 7.85ppm; His-79: pKa 6.4, 8.61ppm). Microenvironments of each of the residues were discussed and compared with those of an X-ray structure analysis (Science, 238, 1707(1987)). Assignments of all three tyrosine residues are also proposed on the basis of results obtained by using the CIDNP method.

【緒言】

ヒトインターロイキン 2 (IL-2) は、133 個のアミノ酸からなる、免疫応答に關与する蛋白質^{1) 2)}であり、その 3 次元構造に關しては、3 Å 分解能の X 線結晶解析が報告されている。³⁾ 一方、 $^1\text{H-NMR}$ の完全帰属は、分子量が 15000 以上でかつ低溶解性であるため、400 MHz 程度の分解能と感度の装置では難しい。

しかし、NMR による蛋白質の構造研究は極めて有用で、例えば、比較的抽出しやすいシグナルを与えるヒスチジン (His) 残基やチロシン (Tyr) 残基の帰属ができれば、それをプローブとして、他の分子やレセプターとの相互作用の機構等を直接的に捉えることが可能となる。我々はこの点に着目し、これまでに、IL-2 の 3 つの His 残基の C2 プロトンの滴定と縦緩和時間の測定を行い、それぞれの His 残基の静電的な環境、運動性の違いを明らかにした。⁴⁾

本研究の目的は、これらのプロトンの一義的な帰属である。His C2 プロトンの帰属には、このプロトンの塩基性の重水溶液中での H→D 交換速度の違いを利用した。この方法は既知であるが、今回は、その重水素化率の測定に大型質量分析計の利用を試みた。これにより、酵素消化後の試料の分離操作等を省略することが出来、微量試料での迅速な帰属が可

能となった。また、Tyr C3,5 プロトンの帰属も試みたが、これには IL-2 の溶解度の極めて低い pH 6 付近でも、CIDNP 法が有効であった。これらの帰属により、IL-2 分子内に互いに離れて存在する、これら 6 個のアミノ酸残基のミクロ環境が、ある程度論じられる段階に至ったので報告する。

【実験】

試料 N 末端に メチオニン(Met) のついた IL-2 (^aMet-IL-2) を用いた。

重水素交換と酵素消化 0.1M Na₂HPO₄ 軽水溶液 500 μl に IL-2 0.3 mg を溶解し (pH 8.45)、凍結乾燥した。これを、500 μl の 99.95 % D₂O に溶解した。この試料を、37 °C で 64 時間インキュベーションした後、DCI で pH4.5 に調整し、NMR 測定を行った。

MS 測定用試料は、無機塩を除くため、IL-2 試料 1 mg を 3 ml の 0.1 M (NH₄)₂CO₃ - (NH₄)HCO₃ - D₂O 溶液 (pH 8.5) に溶解し、37 °C で 64 時間インキュベーションを行った。これを凍結乾燥後 (塩が除去)、*S. aureus* V8 protease (Miles Scientific IL, U. S.A.) 20 μg を溶解した 50 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (軽水溶液 pH 4.0) 150 μl に溶かし、37°C で、48 時間インキュベーションし、凍結乾燥したものを試料とした。尚、対照として、重水素交換処理をしていない IL-2 についても同様の酵素消化を行った。

NMR 測定 主として、JEOL GX 400 FT-NMR (400MHz) を用いたが、CIDNP の実験は、Bruker の 400MHz 及びそのプローブによった。

MS 測定 用いた機種は、JMS-HX110/HX110 (JEOL) である。試料約 10 μg (IL-2 重量) を 1 N 塩酸 1 μl に溶解し、さらにグリセリン：チオグリセリン = 1:1 のマトリックス 1 μl を加えた後、FAB/MS を測定した (積算モード、分子量依存分解能)。

【結果と考察】

H→D 交換後の IL-2 の NMR スペクトル

まず、重水素交換前 (下) 後 (上) の NMR スペクトルを示す (図 1)。シグナル a は約 40% のプロトンが残っていたが、b はそのシグナルが消え、ほぼ完全に重水素化されていることがわかった。逆に、シグナル c は、ほとんど重水素化されないことが明らかとなった。

H→D 交換反応後の IL-2 の

S. aureus V8 protease 処理体の MS

分子量 2000 以下のペプチド断片について、明確な 1 マスユニットの区別が出来た。His-55 を含むペプチド Leu-53 ~ Glu-60 (MW.981.5) のスペクトルは、His 残基を

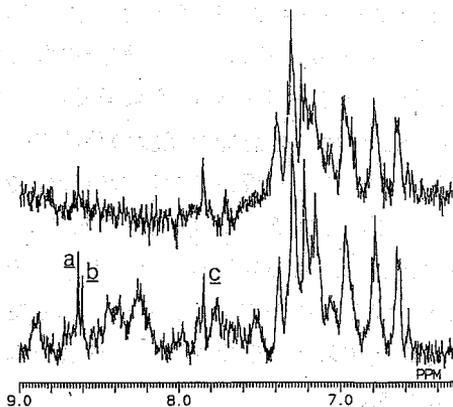


図 1. 重水素交換前 (下)、後 (上) の ¹H-NMR スペクトルの比較 (芳香族、及びアミド領域、pH 4.5、25°C、同一積算条件)

含まない他のペプチド断片のそれと同様、重水素交換前後での変化が全くなく、NMR シグナル c は、His-55 C2 プロトンに帰属できた。

また、His-16 を含むペプチド His-16 ~ Asp-20 の $[M+H]^+$ に関しては、 m/z 610.5 と 611.5 の 2 つのピークが検出され、その量比は、おおよそ 1:1 であり、この残基の約 50 % の C2 プロトンが重水素化を受けていることがわかった。これより、シグナル a が、His-16 に帰属できた。

最後に残ったシグナル b は、His-79 の C2 プロトンに帰属できた。実際には、His-79 を含むペプチドは、分子量が 3114.8 と大きく、定量的な考察には慎重を要するが、プラス 1 マスユニットの移動を十分認め得るものであった。

NMR からみた IL-2 の His 残基の存在環境と X線結晶解析との比較

IL-2 の $^1\text{H-NMR}$ における C2 プロトンシグナル a、b、c に対応する His 残基について pH 滴定、縦緩和時間の測定から、既に以下の知見が得られている。⁴⁾ 即ち、c (His-55, pK_a 3~4, T_1 1.4 s, 7.85 ppm at pH 4.5) は pH 4 以上では、分子の内部に埋もれていると推測されている。また、b (His-79, pK_a 6.4, T_1 3.4 s, 8.61 ppm) は、他の残基との相互作用は小さく、外部に露出していると考えられた。さらに、a (His-16, pK_a 7.2, T_1 2.2 s, 8.64 ppm) は酸性アミノ酸解離基との相互作用が示唆され、運動性または溶媒との接触性は、b、c との間であった。これらの知見と今回の重水素交換速度の結果は、よく符合している。

一方、B. J. Brandhuber らの X線結晶解析の結果³⁾ は、IL-2 は 6 つの α -helix、A (Gln-11~Leu-19), B(Asn-33~Leu-56), C(Leu-66~Phe-78), D(Arg-83~Thr-101), E (Tyr-107~Thr-113), F(Phe-117~Thr-133) から構成されていることを示している。His-79 は、X線結晶解析、及び構造予測⁵⁾ いずれの構造においても、ループ部位に位置しており、他残基との相互作用が少ないと推測されるが、NMR の結果もこれを強く示唆している。また、NMR による pH 滴定の結果から、His-16 と酸性解離基との相互作用が示唆されたが、X線結晶解析では、His-16 はヘリックス A の中ほどに位置している。IL-2 分子内のヘリックス A の近傍にあるのは、ヘリックス A と B をつなぐ残基とヘリックス B、F の N 末側の残基であるが、これらの中には、酸性アミノ酸残基は存在しない。故に、IL-2 の全体像が X線結晶解析で表される通りであれば、His-16 と近接している酸性アミノ酸の解離基は、Glu-15、或は Asp-20 の側鎖である可能性が高い。これは、3 Å 分解能の X線結晶解析では指摘されていないことである。

さらに、X線結晶解析によると、His-55 は、ヘリックス B 内の C 末部分に位置している。 $^1\text{H-NMR}$ から pH 4 以上では、運動性が小さく分子の内部に埋もれていると推測されたが、この側鎖は分子の内側に向いており、近くのジスルフィド結合をはさんで、対面する残基とともにかなり密な構造になっていると考えられる。

IL-2 の CIDNP と Tyr の帰属

pH 6.0 の CIDNP スペクトルを下に示す (図 2)。¹H-NMR スペクトル上の、Tyr シグナルの C2,6H、C3,5H の組合せは、COSY スペクトル (図 3) で明瞭に区別される。これより CIDNP 信号が Tyr C3,5H シグナルに観測されたのがわかる。一方、IL-2 の 3 つの Tyr 残基 (31,45,107) のうち、テトラニトロメタンによりニトロ化されるのは、Tyr-31 と Tyr-45 であり、Tyr-107 は、修飾され難いことが、Trypsin 消化から確認された。また X 線結晶解析の結果から、Tyr-31 だけが、比較的自由な環境にあり、Tyr-45,107 は、それぞれ、ヘリックス B, F に組み込まれていることが、分かっている。特に Tyr-107 は、上述した His-55 同様に S-S 結合近傍にあり、分子の内側に向いていると推測される。

これらの知見を総合的に勘案すると、明瞭で強い CIDNP 信号を与える 6.78 ppm (a) を、Tyr-31 に帰属するのが、最も自然と思われる。また、一応弱いながらも CIDNP が観測される 6.61 ppm (c) が Tyr-45、上記 6.78 ppm (a) の高磁場側の、明瞭な CIDNP を示さない 6.74 ppm (b) が Tyr-107 であると考えられるが、結論には化学修飾などによる確認を要するであろう。

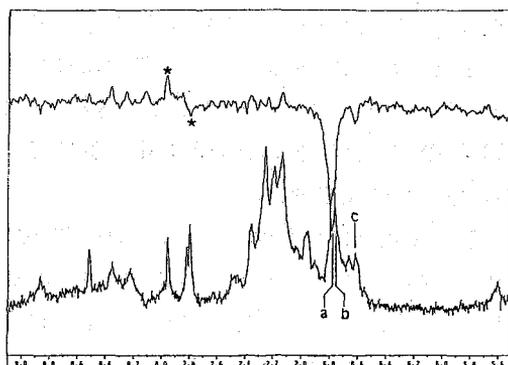


図 2. IL-2 の CIDNP スペクトル
通常のスベクトルと重ね描き
*フラビン色素(pH 6.0; D₂O)

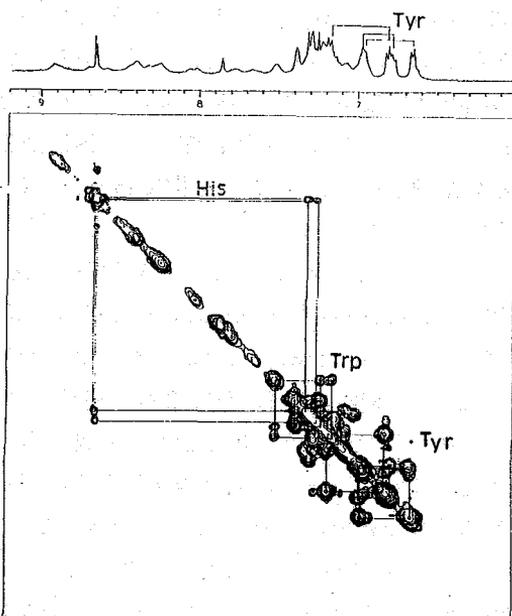


図 3. IL-2 の COSY スペクトル
(pH 4.5; D₂O)

参考文献

- 1) Morgan, D., Ruscetti, F., and Gallo, R., *Science*, **193** 1007 (1976)
- 2) Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., Hamuro, J., *Nature (London)*, **302** 305 (1983)
- 3) Brandhuber, B. J., Boone, T., Kenney, W. C., and McKay D. B., *Science*, **238** 1707 (1987)
- 4) 宮野, 鈴木, 辻, 永嶋 日本薬学会 108 年会 (1988, 広島)
- 5) Cohen, F., Kosen, P., Kuntz, I., Epstein, B., Ciardelli, T., and Smith, K., *Science*, **234** 349 (1986)

一アミノ酸置換黄色ぶどう球菌核酸分解酵素H124L(124位 His→Leu)の
一次元及び二次元 $^1\text{H-NMR}$ による pH 滴定。

因正信^{*、}、新宮正久^{*、} (久留米大医ウイルス^{*、}、ウイスコンシン大生化^{*、})

pH titration studies of a single amino acid substituted staphylococcal
nuclease H124L(His to Leu at 124) by one- and two- dimensional $^1\text{H-NMR}$.

Masanobu Chinami^{*、}, Masahisa Shingu[†]

Department of Virology^{*}, Kurume University School of Medicine,
Kurume 830, Japan, Department of Biochemistry[†], University of Wisconsin-
Madison WI 53706, USA

Abstract

pH titrations of staphylococcal nuclease H124L were made in the presence and/or absence of Ca^{2+} and an inhibitor deoxythymidine-3',5'-diphosphate. Based on the assignments by two dimensional $^1\text{H-NMR}$ (Wang et al., 1988)(1), almost of all peaks in aromatic region of the titration spectra were assigned. Of the ring protons of the three histidines, only the C_δH of His⁴⁶, shows a large chemical shift perturbation on formation of the ternary complex, (nuclease H124L)·pdTp· Ca^{2+} . In the ternary complex, the pKa values of Tyr⁸⁵ and other several tyrosines(Tyr⁵⁴, Tyr⁹³) were well above 11, which suggested their hydrogen-bonding formations. The chemical shift of Tyr¹¹⁵ $\text{C}_\epsilon\text{H}$ shifted to extremely high field as same as the prototype nuclease(Markley, 1970)(6), against the calculation value from ring current shift, which may be due to either the difference of the structure of the prototype with H124L or the difference of the structure between in crystal and in solution.

はじめに

黄色ブドウ球菌核酸分解酵素(st.nuclease)は分子量16800のS-S結合を有さない比較的安定な蛋白であり、古くから酵素活性の研究(2)及び蛋白質のfolding-unfoldingメカニズムの研究に用いられてきた。又蛋白質工学の面からsite-directed mutagenesis法の寄与により、多くの一及び二アミノ酸置換 st.nucleaseが作られ(4)、現在それら置換アミノ酸蛋白の構造及び機能に対する影響、物理化学的性状が調べられている。我々は今回、上記方法により作られたH124L(124位のHisをLeuに置換)をその二次元 $^1\text{H-NMR}$ の帰属(1)に基づき、H124Lのアミノの酸芳香環、特にヒスチジン及びチロシン水素核に注目しpH滴定をおこなった。

材料及び方法

nuclease H124L の遺伝子をコードしたプラスミッド pFOG405はDr.David Shortle (Johns Hopkins University)より分与を受けた。E.coli で産生した H124L 蛋白は文献の方法(4)で精製し、二度重水中で凍結乾燥し5ミリ径のNMR tube中で測定した。NMRはBruker-AM500を用いた。一次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは残存H₂Oをpresaturateし90度パルス照射して得た。二次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルはPhase-sensitive double quantum filtered correlated spectra(DQF-COSY)(Rance et al., 1983), 2D dipolar-correlated spectra(NOESY)(Kumar et al., 1980)を使用した。蛋白の濃度は3 mM, Ca^{2+} 20 mM, pdTp 10 mM を使い pH は DCl または NaOH で調整した。

結果及び考察

図 2

図 1 には H124L + Ca²⁺ + pdTp の pH 滴定スペクトルが示されている。
 (H124L のみ, H124L + Ca²⁺ は示されていない)。図 3 は H124L + Ca²⁺ + pdTp の pH 滴定スペクトルから Aspect-3000 で auto peak-picking した一部の芳香環水素核領域ピークをグラフィックプログラム (GOS system) を使いコンピュータでプロットしたものである。図中の矢印は Tyr⁸⁵C_εH を示す (後述)。このようなコンピュータプロットと Ca²⁺、pdTp の存在、非存在下での二次元 DQF-COSY, NOESY (pH 5.5, 8.2, 10.2) (ここでは DQF-COSY pH 8.2のみを図 2 に示した) 及び Alexandrescu et al. の報告 (5) を基にし図 1 のピークの帰属は行なった。

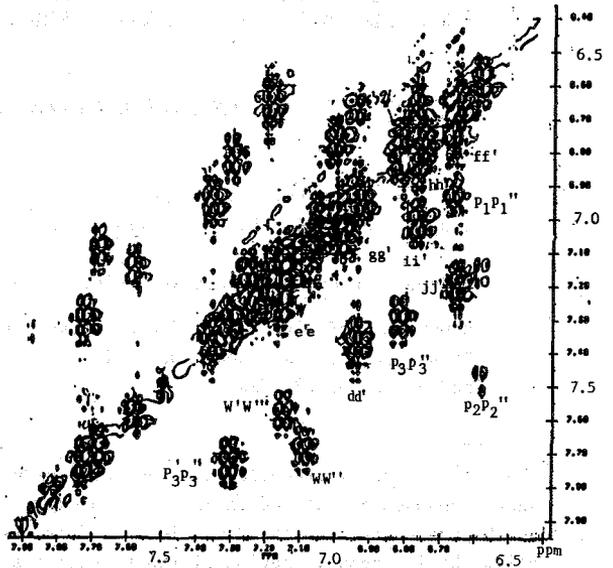
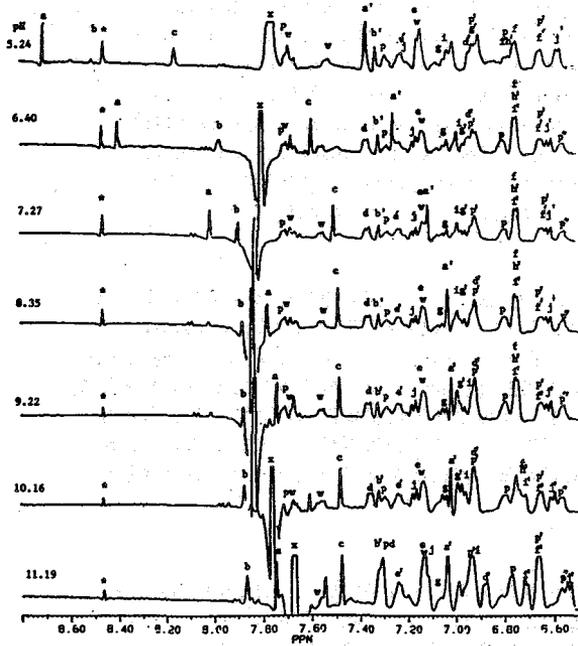


図 1



- i, Tyr¹¹³C_δH ; i', Tyr¹¹³C_εH
- j, Tyr¹¹⁵C_δH ; j', Tyr¹¹⁵C_εH
- p₁, phe³⁴C_εH ; p₁', phe³⁴C_εH
- p₂, phe⁶¹C_εH ; p₂', phe⁶¹C_εH
- p₃, phe⁷⁶C_εH ; p₃', phe⁷⁶C_εH ; p₃'', phe⁷⁶C_δH
- w, Trp¹⁴⁰C_εαH ; w', Trp¹⁴⁰C_εβH ; w'', Trp¹⁴⁰C_εγH ; w''', Trp¹⁴⁰C_ηH

図 3 : GOS プログラムによる
コンピュータプロット。

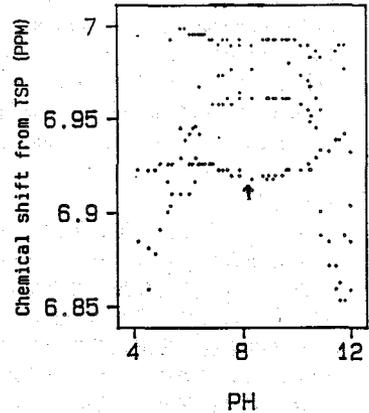


図 1 及び図 2 における：
一次元及び二次元
¹H-NMR の帰属。

- a, His⁸C_εH ; a', His⁸C_δH
- b, His⁴⁶C_εH ; b', His⁴⁶C_δH
- c, His¹²¹C_εH
- d, Tyr²⁷C_δH ; d', Tyr²⁷C_εH
- e, Tyr⁵⁴C_δH ; e', Tyr⁵⁴C_εH
- f, Tyr⁹³C_δH ; f', Tyr⁹³C_εH
- g, Tyr⁸⁵C_δH ; g', Tyr⁸⁵C_εH
- h, Tyr⁹¹C_δH ; h', Tyr⁹¹C_εH

図4 -a,b,c には His⁸ C₆H(a), His⁴⁶ C₆ H (b), His⁴⁶ C₆ H (c) のコンピュータプロットと non-linear least-square program (LSDA, Markley) による curve fitting を実線で示した。これらの図から解るように His⁸ 及び His¹²¹ (データは示されていない) では chemical shift, pKa 共に Ca²⁺、pdTp の影響を殆ど受けていないが これらの結果は His⁸ 及び His¹²¹ が prototype の X線解析において active site から離れていることと一致する。以下 X線解析のデータは全て prototype のものを参考にした。尚、H124L の ¹H-NMR スペクトルは他の変異株蛋白と異なり prototype のものと非常によく似ている (5)。一方、His⁴⁶ C₆ H, His⁴⁶ C₆ H では ligands の影響があり、特に後者では著しいパターンの変化が観察された。prototype を用いた His⁴⁶ C₆ H の minor peak の出現に関しては Ca²⁺ との 2nd binding site の可能性が示唆されていた (6)。しかし、His⁴⁶ C₆ H の Ca²⁺、pdTp 結合による著明な変化は deprotonation の抑制によるものが考えられる。His⁴⁶ が蛋白の表層に位置するにもかかわらず、このような影響を受ける原因は Ca²⁺ イオンよりもむしろ構造変化に帰因するものと筆者らは考えた。一つの可能性として、st.nuclease が 42, 56 位に 2つの proline を有して、その間がループを形成していることから (X線解析による)、我々は、両 proline 間において cis-trans interconversion による hinging mechanism が働き His⁴⁶ が active-site に近づき、pdTp の負電荷した磷酸基の影響で His⁴⁶ C₆ H の deprotonation が抑えられていると考えた。このことは現在、¹³C 及び ¹⁵N ラベル等を用い確かめつつある。

図4-b

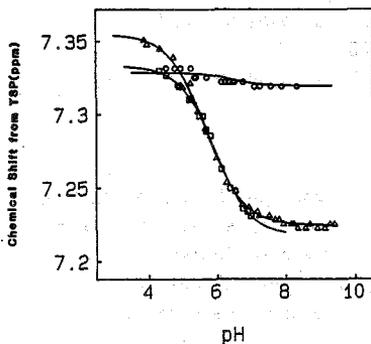


図4-a

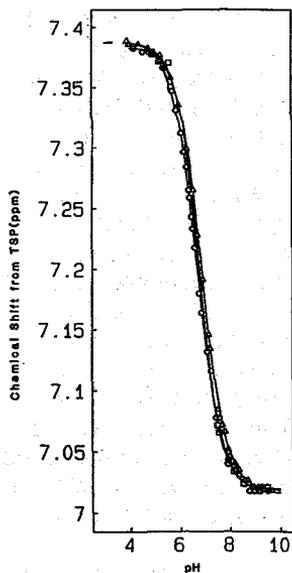


図4-c

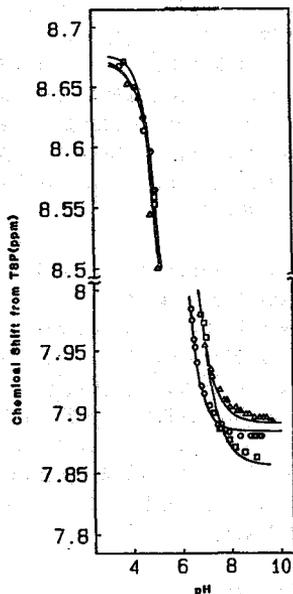


図4

- H124L only
- △ H124L+ Ca²⁺
- H124L+pdTp+Ca²⁺

図5-a,b,cにはCa²⁺、pdTp存在、非存在下におけるTyr^{27, 85, 115}のpH滴定パターンを示した。Tyr²⁷(a)においてはCa²⁺、pdTpの影響をほとんど受けておらずTyr²⁷がactive siteから離れて蛋白質の表層に位置すること一致する。Tyr⁸⁵(b)においては図2と一部重複したデータを示したものであるがCa²⁺とpdTpの存在下のみにおいて抑制されたフラットなパターンを示している。このことはCa²⁺とpdTp存在下でTyr⁸⁵の水酸基プロトンのdeprotonationが抑えられていることを表し、かつX線解析における3'-phosphateととの水素結合の存在の可能性と一致する。Tyr¹¹⁵(c)のCa²⁺存在下以外においてpH7以下でchemical shiftが極端に高磁場にshiftしており酸性基(pKaが5~6)のイオン化の影響が示唆された。又Ca²⁺とpdTp存在下におけるTyr¹¹⁵C_εH_βの高磁場shiftは以前にも報告されていたが(7)、近傍の環電流の影響が考えられ、X線解析で最も近いTyr¹¹³のものが可能性が高い。X線解析データを用いたPerkins等の方法による計算ではTyr¹¹⁵C_εH_βはCa²⁺とpdTp非存在下におけるよりも0.4 ppm低磁場すべきであるが、NMRデータでは逆に0.25 ppm高磁場shiftしている。この矛盾は結晶構造と溶液中の構造が異なる為であるのか、又はprototypeとH124Lの構造の違いかのどちらかが原因と考えられる。

参考文献

- (1) Wang, J., Ulrich, E. L., Chinami M., and Markley J. L. (1988) *Biochemistry*, submitted
- (2) Anfinsen B. C., Cuatrecasas P. and Taniuchi H. (1971) pp 177-204 in *Staphylococcal Nuclease, Chemical Properties and Catalysis*.
- (3) Shortle, D. (1986) *J. Cellular Biochem.* 30. 281-289
- (4) Shortle, D. (1983) *Gene* 22, 181-189
- (5) Alexandrescu, A., T., Mills, D.A., Ulrich, E.L., Chinami M., and Markley J. L. (1988) *Biochemistry* 27, 2158-2165
- (6) Markley, J. L. and Jardetzky, O. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 50 223-233

Acknowledgments

The authors thank Prof. John L. Markley for his support and Drs. Jinfeng Wang, Charles B. Grissom, Eldon Ulrich and other people of Markley's laboratory for their courtesy. This study made use of the National Magnetic Resonance Facility at Madison which is supported in part by NIH grant RR02301 from the Biomedical Research Technology Program, Division of Research Resources.

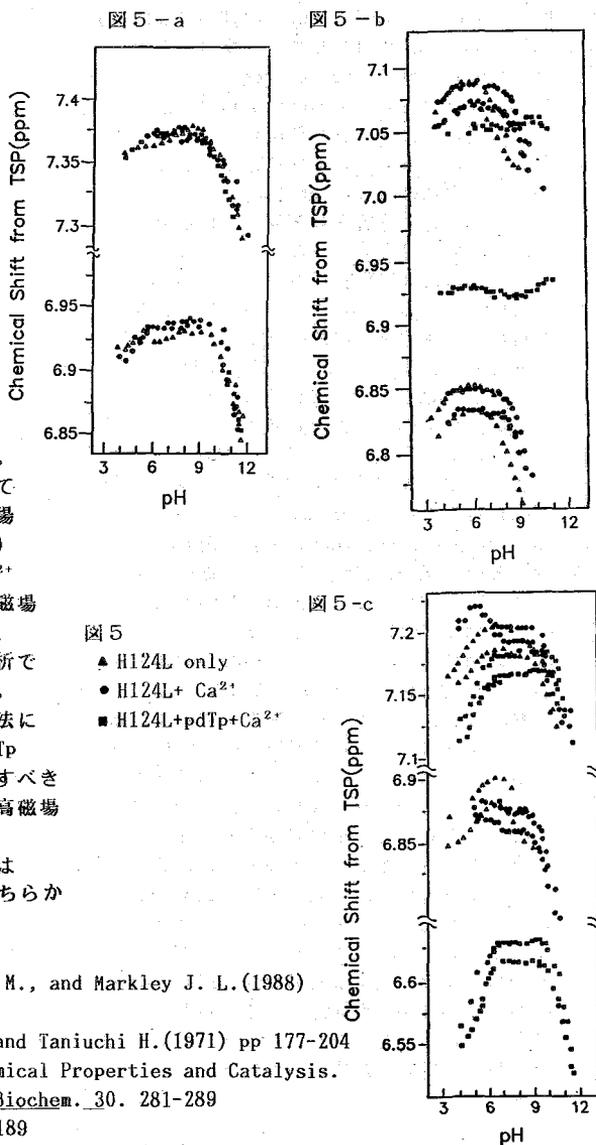


図5

- ▲ H124L only
- H124L+Ca²⁺
- H124L+pdTp+Ca²⁺

明によりさらに有用な情報が得られると考えて、2D NMRによる解析を試みた。

今回試料として用いたHAIMは、大阪府大・荒井研から提供された。そのアミノ酸配列をFig. 1に示す。テンダミスタットとのホモロジーは、約30%である。

〈実験〉 HAIMは非常に安定な物質で37℃、25時間処理してもpH2.5~10の範囲でその活性を完全に保持する。PIは3.80で、この付近で溶解度が著しく低下する。NMRの測定は、pH2.60、2~5mM濃度、温度30℃で行なった。

試料溶液は、① D₂O中に溶解直後 ② D₂O中70℃で約10分間処理して遊離のプロトンを完全にD置換 ③ D₂O/H₂O = 1/9 の3種類を用いた。

測定は、すべて Bruker AM-500 NMR分光器を用いた。

〈結果〉

(1) スピン系の解析

COSY及びHOHAHAの2次元NMRの測定により、各アミノ酸残基に特徴のあるスピン系を解析した。Fig. 2のD₂O中のHOHAHAスペクトルではαメチン-βメチン-γメチルのスピン系が、HAIMの8コのThr(破線)と3コのIle(実線)で追跡できる。HAIMの7コのVALのうちの5コについても、αメチン-γメチル間のリレーピークが観測できる(実線)。さらにαメチン-βメチレン-γメチレンのスピン系が、HAIMの4コのProのうちの3コ、1コのGluと4コのArgのうちの1コについて追跡できる(一点破線)。

スピン系の解析では、HOHAHAスペクトルが有効であった。COSY実験に比べてクロスピークがシャープなため、クロスピークの混み合った芳香族領域やメチル領域でのスピン系の識別に有効であった。またαメチン-βメチレンのスピン系でも、βメチレンが非等価な場合COSYスペクトルではしばしば片方のクロスピークしか観測できなかったが、HOHAHAスペクトルでは明瞭に2つのクロスピークが観測できた。

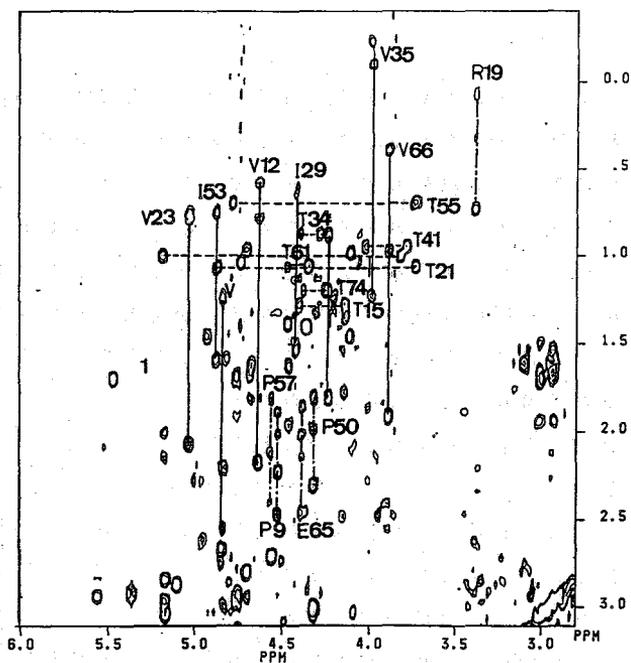


Fig.2 D₂O中のHOHAHAスペクトル

(2) 一次配列に基づく連続帰属

NOEがほとんど観測されなかったN末とC末の一部をのぞくIle-6からCys-72の間で、一次配列に基づく連続帰属ができた。

Fig. 3にその結果を示す。

この連続帰属の過程で、側鎖の帰属も明らかとなった。例えば、PROの δ メチレンはN末側に隣接するアミノ酸残基の α CHプロトンとの間に強いNOESY交叉ピーク

が観測されPRO側鎖の帰属に役立った。N末とC末以外では帰属の不明なプロトンは、Trp-18の α メチンと、Arg-46とLeu54の側鎖の一部である。

(3) 2次構造

Fig. 3で示した様に多数の隣接残基間で $d_{\alpha N}$ のNOE交叉ピークが観測され、ポリペプチド鎖の大部分が伸びた状態にある事がわかる。得られた帰属をもとに主鎖プロトン(α CH、NH)間のNOEを解析してHAIMの2次構造を調べた。Fig.

4に模式的に示す2組の β シート構造は、テンダミスタットとはほぼ一致する。テンダミスタットでは41から49番目の残基間で長い β ストランドを形成している(途中43-44残基目に β -バルジが存在する)。しかしHAIMではこの β ストランドが短くなっていて、 β ストランド間のNOEはCys-45からAsn-49までの間でしか観測されなかった。またThr-34とCys-45の間では、 α メチン間には弱いNOEしか観測されないがThrの β メチンとCysの α メチン間で強いNOEが観測された。この部分ですでに規則的な β シート構造のくずれている事を示唆する。またHAIMではテンダミスタットの56-57の部分でアミノ酸が一残基deletionしているため、この部分の β バルジが消失している。

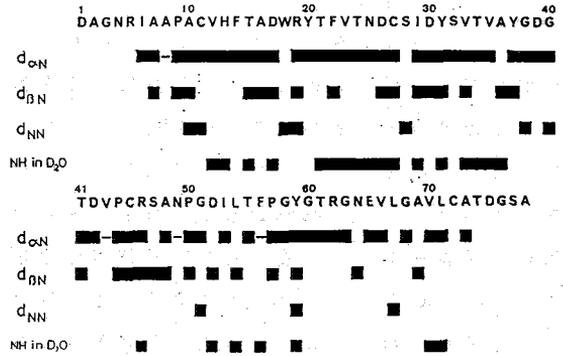


Fig.3 連続帰属の結果

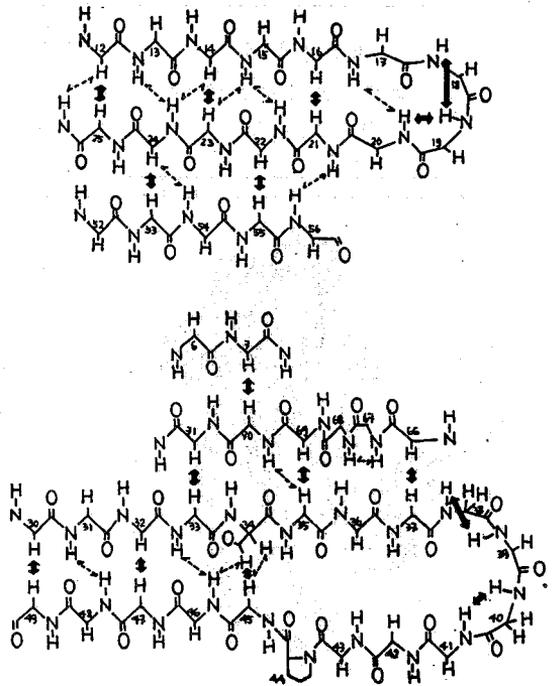


Fig.4 HAIMの2次構造

(4) 3D構造

Ile-6からCys-72の間の67コのアミノ酸残基部分について、DISGEOプログラムのコンピューター計算により立体構造を求めた。ミキシングタイム75 msecのNOESYスペクトルを用いてクロスピークを解析し、その強度に応じてS (2.5 \AA)、M (3.0 \AA)、W (4.0 \AA)の距離の制限をつけた。立体特異的な帰属をしていないので、Pseudo原子の表示を用いた。全部で301コの残基間距離の制限を用いた(表-1)。残基内の距離情報は考慮していない。

DISGEOプログラムにより、10通りの解を求めた。1つの立体構造を求めるのにCPUは約6時間であった(VAX8500)。

得られた10コの解の残基あたりのバイオレーション(バイオレーションの総和を残基数で割ったもの)は0.2~0.4 Åで、あたえた距離情報に対して矛盾しない解といえる。またバイオレーションの最も小さい構造に対する他の構造のRMSDは主鎖原子で1.5 Å程度、全原子では2.0~2.6 Åであった。Fig. 5は、バイオレーションの最も小さい解に他の構造をベストフィットした重ね図である。

表-1

	隣接残基間	非隣接残基間
主鎖-主鎖	55	33
側鎖-側(主)鎖	77	130
S-S架橋	0	6

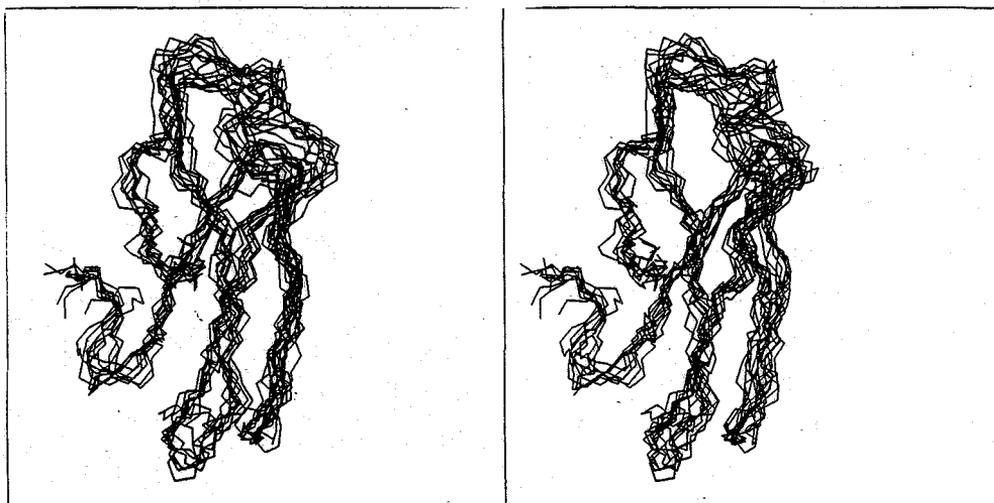


Fig. 5 DISGEOで求めたHAIMの立体構造

(Institut für Molekularbiologie und Biophysik, ETH-Hönggerberg)
8093 Zürich, Switzerland, H. Haruyama and K. Wüthrich

1. Introduction

Hirudin is a small protein of 65 amino acid residues, which was first isolated from the salivary glands of the leech *Hirudo medicinalis*.¹ Hirudin acts as a specific inhibitor of α -thrombin and appears potentially favorable for medical applications. However, until recently investigations of possible clinical applications had been restricted due to the limited availability of the protein from natural sources. Now the expression of desulfatohirudin in yeast provides sufficient amount of pure protein.² However, hirudin originating from the leech *H. medicinalis* contains a sulfated tyrosine residue at the position 63. The recombinant protein lacks this post-transcriptional modification, and its inhibitory activity is ten times weaker than that of native hirudin.³ Chemically desulfated natural hirudin showed a similarly reduced activity, which was taken as evidence that the recombinant protein folds up similar to the native hirudin conformation.⁴ This report describes the refined three-dimensional structure of recombinant desulfatohirudin determined by the combination of 2D-NMR techniques and distance geometry, which provides the basis for a direct structure comparison with native hirudin.⁵

2. Input Data Used for the Structure Calculations

Table 1 summarizes the distance constraints, which were prepared based on 600 MHz NOESY spectra recorded at 22° and pH 4.5 using a Bruker AM 600 spectrometer, and the torsion angle constraints, which were derived from the combined analysis of intra-residual and sequential NOE's and the vicinal coupling constants, $^3J_{\text{HN}\alpha}$ and $^3J_{\alpha\beta}$. 30 out of the total of 72 prochiral pairs of methylene and methyl groups were stereospecifically assigned using procedures described elsewhere.⁶ These procedures also yielded allowed ranges for the torsion angles ϕ , ψ , and χ_1 of most of the residues.

To relate the NOE data with intra-molecular $^1\text{H} - ^1\text{H}$ distances, approximate relative peak intensities of the cross peaks in NOESY spectra with $\tau_m = 70$ ms were evaluated by counting the number of contour levels. According to their intensities, the intra-residual and sequential NOE's were divided into three classes with different upper bounds, as indicated in Table 1. In most cases, upper bounds of 4.0 and 5.0 Å, respectively, were given to the medium-range and long-range backbone constraints, and to inter-residue constraints with sidechain protons (for the exceptions, see the legend of Table 1).

3. Results of the Structure Calculations

The three-dimensional structure was calculated using the distance geometry program DISMAN.⁷ Assuming standard ECEPP geometry for each amino acid residue, all

torsion angles about single bonds can be adjusted so that the violations of the experimental distance constraints and torsion angle constraints should be minimized. The polypeptide segment from Q49 to Q65 has only very few long-range NOE's to the rest of the molecule, whereas the polypeptide segment from V1 to P48 has a dense distribution of long-range NOE's. Independent calculations were made for the whole protein 1-65, and a partial structure 1-49, respectively, to investigate the influence of the polypeptide segment 50-65 on the core of the molecule. Out of fifty starting structures, five and four structures, respectively, converged in the calculations for the whole protein and the partial structure.

Residual constraint violations are given in Table 2. The structures obtained satisfy virtually all input data. Fig. 1 shows the superposition of the polypeptide segment from 1 to 49 of all nine structures. The C-terminal part beyond S50 is not shown, since the individual DISMAN solutions deviate largely because of the lack of effective distance constraints. The whole protein can be divided into a well defined core consisting of the residues from Y3 to L30 and from N37 to P48, and the disordered protruding loop from G31 to K36 and C-terminal segment from S50 to Q65.

Since independent calculations with and without the C-terminal segment from S50 to Q65 caused no significant structural differences in the DISMAN solutions for the core, it can be concluded that the conformation of the core is defined in itself and is little influenced by the C-terminal segment. The average of the pairwise RMSD's for the backbone atoms and all heavy atoms in the core part is 0.8 ± 0.2 Å and 1.7 ± 0.2 Å, respectively.

4. Global Polypeptide Fold of Recombinant Hirudin

The core part consists of two antiparallel β -sheets and a large, well defined loop which is closed by a disulfide bridge. In the presentation of Fig. 1, a long double stranded β -sheet consisting of the strands with residues N26-L30 and N37-T41 is in the foreground, and a short β -sheet consisting of the strands with residues L15-C16 and V21-C22 is in the back. The relative spatial orientation of the two β -sheets is largely fixed by the two disulfide bridges C16-C28 and C22-C39. The locations of these two disulfide bridges are unambiguously identified to be the same as in native hirudin.⁸ The polypeptide segment from D5 to C14, which contains the disulfide bridge C6-C14, is located on the right side of the β -sheets. The spatial arrangement of this loop relative to the β -sheets is defined by the hydrogen bonds C6(NH)-L15(O'), G10(NH)-C28(O'), and C28(NH)-Q11(O').

5. Comparison of Recombinant Desulfatohirudin with Native Hirudin

Previously the polypeptide backbone conformation in native hirudin was determined by NMR in solution,⁵ so that a comparison of the global fold with that of desulfatohirudin is possible. When using this comparison, one should keep in mind that the recombinant hirudin structure is more precise than that of native hirudin, as is evidenced for the core part from residues 1-48 by the smaller rms violations of distance constraints and the smaller RMSD's among the different conformers used to characterize the solution structure (See Table 1 and 2, and ref.5: The improved precision of the recombinant protein structure can be ascribed to the use of stereospecifically assigned resonances and the increased number of NOE and torsion angle constraints).

On the level of the backbone fold for the region of residues 1-48 and the location of the disulfide bridges, the two structures are closely similar, and no significant differences can be identified at the presently available resolution. In particular both molecules contain the same secondary structure elements. This is not really unexpected, since the site of the sulfonated tyrosine, Y63, is part of poorly defined C-terminal segment, which appears to make only few tight contacts with the core region. It would be interesting in the future to extend the comparison to the complete structures, including the amino acid sidechains, once such data become available for the native protein.

References

- 1) Markwardt, F. (1970) Method Enzymol. 19, 924-932.
- 2) Meyhack, B. et al. in : XIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Abstr. 33, Brusel, July 11, 1987.
- 3) Braun, P. J. et al. (1988) Biochemistry in press.
- 4) Bergmann, C. et al. (1986) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 731-740.
- 5) Clore, G. M. et al. (1987) EMBO J., 529-537.
- 6) (a) Kline, A. D. et al. (1988) J. Mol. Biol. submitted. (b) Güntert, P. et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. submitted.
- 7) Braun, W. & Gö, N. (1985) J. Mol. Biol. 186, 611-626.
- 8) Dodt, J. et al. (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 379-385.

Table 1. Constraints Used for the Three-Dimensional Structure Calculation of Recombinant Desulfatohirudin.

Category of Constraints	No. of Constraints	Upper/Lower Limit
1. NOE Distance Constraints		
a) Intra-residual	82	} 2.5/3.0/4.0 Å ^o or, 2.5/2.8/3.2 Å [§]
b) Sequential Backbone	62	
c) Medium/long-Range Backbone	37	
d) Intra-residue with Sidechain	244	
a) + b) + c) + d)	425	5.0 Å [¶]
2. Hydrogen Bond Constraints	26	1.8 < d _{NH-O} < 2.0 Å ^o 2.7 < d _{N-O} < 3.0 Å ^o
3. S-S Bridges	9	2.0 < d _{S^γ-S^γ} < 2.1 Å ^o 3.0 < d _{S^γ-C^β} < 3.1 Å ^o
4. Torsion Angle Constraints [§]	159	

^oThe shorter limits were applied to d_{αN} and d_{Nδ(i,1)}. The lower limits of NOE distance constraints were set to the repulsive core radii given in Table I of ref. 7

[¶]For 13 outstandingly strong NOE's, the upper limit was reduced by 1.0 Å.

[§]The range of torsion angles which satisfy the intra-residual and sequential NOE's and vicinal coupling constants, ³J_{HNα} and ³J_{αβ}, were determined by using the program HABAS.^{6b}

Table 2. Residual Constraint Violations in the 9 DISMAN Solutions for Desulfatohirudin.

	Upper Limit Violation [§]			Lower Limit Violation [§]		Torsion Angles [§]
	rms violation [¶]	0.3-0.5 Å	> 0.5 Å	rms violation [¶]	> 0.3 Å	> 5°
whole molecule calculation (1-65)						
I	0.06	5	0	0.08	0	1 (5.4°)
II	0.06	5	0	0.08	0	3 (11.7°)
III	0.06	7	0	0.08	0	2 (7.5°)
IV	0.07	6	1(0.51)	0.10	1(0.35)	5 (7.3°)
V	0.08	8	2(0.55)	0.10	0	2 (8.3°)
partial segment calculation (1-49)						
VI	0.06	4	0	0.04	0	3 (6.6°)
VII	0.07	7	0	0.08	0	4 (8.4°)
VIII	0.07	5	0	0.09	0	3 (7.5°)
IX	0.07	6	0	0.07	0	4 (7.3°)

[§]The number in parentheses indicate maximum violations for each category.

[¶]The rms violation (Å) for the upper and lower limits were calculated individually as,

$$\text{rms violation} = [\sum (d_{ij}^c - d_{ij}^{ul})^2 / n^{ul}]^{1/2}, \quad [1]$$

where d_{ij}^c is the interproton distance $H_i - H_j$ in the DISMAN structure, d_{ij}^{ul} the corresponding upper or lower limit, and n^{ul} the total number of upper or lower limit distance constraints. The summation was taken only for the $^1H - ^1H$ pairs which have a nonvanishing distance constraint violation.

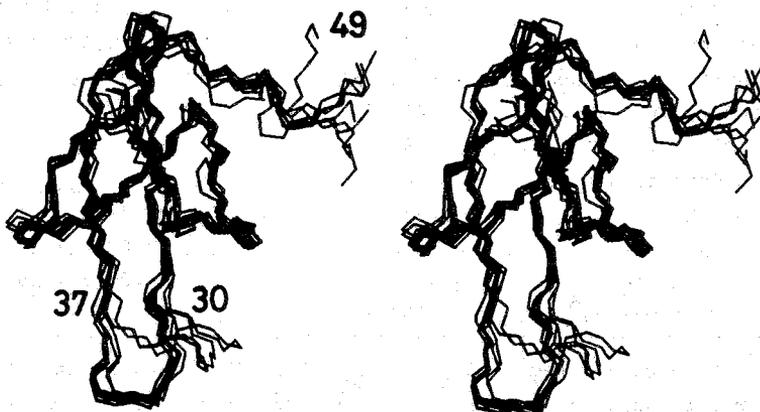


Fig. 1 Stereo view of the polypeptide chain from residue 1 to 49 for the nine DISMAN structures, whereby only the polypeptide segments from Y3 to L30 and from N37 to P48 were used for the superposition (see text).

プロトンNMRによるハブ毒ホスホリパーゼA₂のトリプトファン残基の環境の解析

(群馬大工短・オランダ、ユトレヒト大*・鹿児島大医⁺・九大理*)
 遠藤斗志也・Robert Kaptein*・木原大⁺・毛利紀子*・田中修司*・
 大野素徳*

Proton NMR Analyses of Environments of Tryptophan Residues in Phospholipase A₂ from Trimeresurus flavoviridis

Toshiya Endo, Robert Kaptein*, Hiroshi Kihara⁺, Noriko Mohri*, Shuji Tanaka* and Motonori Ohno* (Gunma University, University of Utrecht*, Kagoshima University⁺ and Kyushu University*)

Proton NMR spectra of a dimeric phospholipase A₂ from Trimeresurus flavoviridis have been recorded. N-1 proton resonances of tryptophan indole rings have been detected and assigned to specific positions, Trp-3/Trp-30, Trp-68 and Trp-108, by comparing the spectra of the enzyme derivatives with tryptophans oxidized to different extents. Photo CIDNP experiments have revealed that Trp-68 and Trp-108 are exposed while Trp-3 and Trp-30 are buried in the molecule. This is consistent with the X-ray crystal structure of a homologous phospholipase A₂ from Crotalus atrox where residues 3 and 30 are located at a dimer interface, but inconsistent with the results of stepwise oxidation of tryptophan.

ホスホリパーゼA₂は、ジアシル-sn-グリセロリン脂質の2位の脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素であり、細胞内で働くタイプと細胞外に分泌されるタイプの二種類がある。後者については、哺乳類の膵臓、ヘビ毒等から多くの酵素が単離されて1次構造が決められ、ウシとブタ膵臓のホスホリパーゼA₂、ガラガラヘビ (Crotalus atrox) のホスホリパーゼA₂について結晶構造が報告されている。C.atroxの酵素は dimer型であるが、不思議なことに結晶構造では、活性部位の入口が dimer の界面で塞がれた形になっている¹⁾。基質がどのようなメカニズムで活性部位に入りこむかは、謎である。

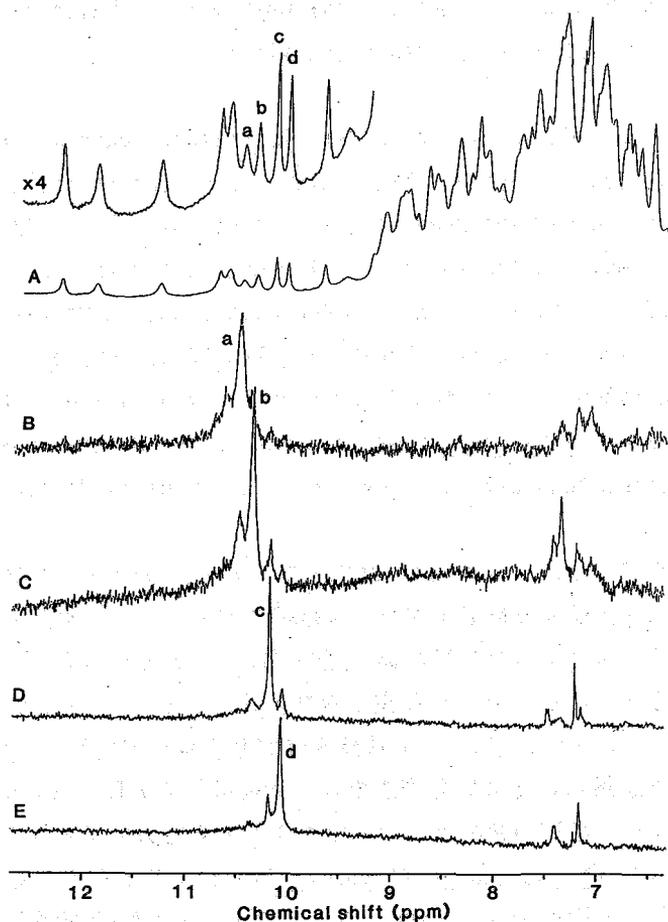
ハブ (Trimeresurus flavoviridis) 毒より単離されるホスホリパーゼA₂は dimer 型で²⁾、一次構造は C.atrox のホスホリパーゼA₂と相同性が高い³⁾。4つのトリプトファン残基についてNBS酸化により露出度が調べられ、C.atrox のホスホリパーゼA₂の結晶構造を仮定した場合、dimer のサブユニット間の界面に位置するトリプトファンの方が dimerの表面に位置するトリプトファンよりも酸化されやすいという一見矛盾した結果が

得られている⁴⁾。本研究では、ハブ毒のホスホリパーゼA₂のプロトンNMRスペクトルを測定し、4つのトリプトファン残基のシグナルの帰属を行った。そして photo C I D N P法により各トリプトファン残基の溶媒への露出度を調べ、NBS酸化の結果、C.atroxのホスホリパーゼA₂の結晶構造と比較した⁵⁾。

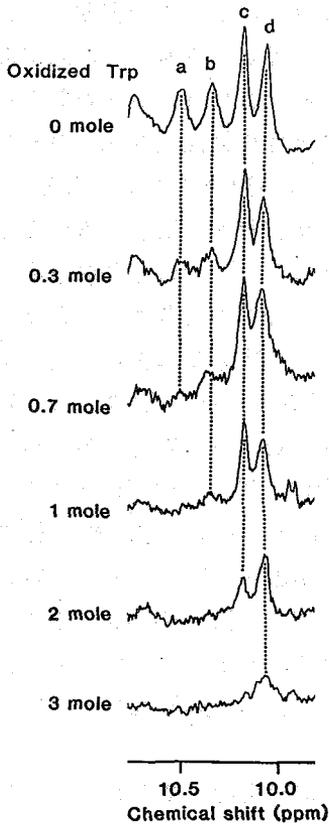
【方法】ホスホリパーゼA₂は、Trimeresurus flavoviridis 毒より精製した。NBS酸化は、pH 4.0 で報告された方法⁴⁾に従って行った。270-MHz及び400-MHz プロトンNMRスペクトルの測定は、Bruker WH-270、AM-400 分光計により、360-MHzにおける photo C I D N Pスペクトルの測定は Bruker HX-360 分光計を用いて行った。

【結果と考察】トリプトファン残基のシグナルの帰属 トリプトファンのインドール環のN1プロトンシグナルは、軽水中で 10 ppm 付近に観測され、C2, C7プロトンとの間に大きなNOEが期待される。

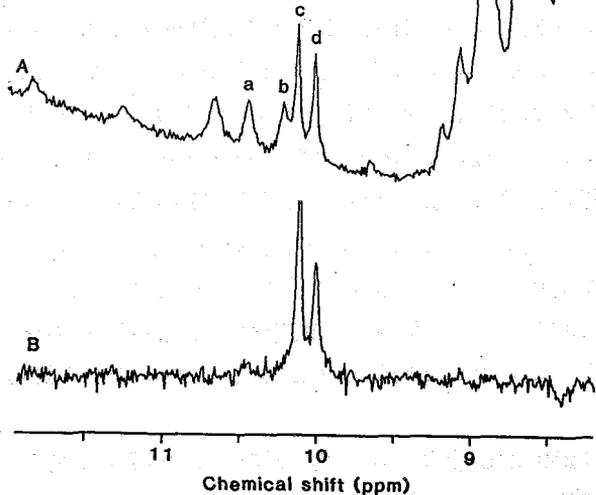
図1Aは、ハブ毒ホスホリパーゼA₂の軽水溶液の低磁場側のスペクトル(軽水のシグナルは1-1パルスによって suppress)である。6.4-9.2 ppmにある重なったシグナルは、芳香族プロトン及びアミドプロトンのシグナルである。10 ppm 付近のシグナルのうち、溶媒をラジオ波照射で suppress (溶媒の水素原子との交換速度が速いシグナルを除去する)してもなお観測されるシグナルについて順番にラジオ波を照射、NOEを観測した(図1B-1E)。その結果、トリプトファンのシグナルに特徴的なNOEのパターンを与えるN1プロトンシグナルの候補として、図中の a-dの4つのシグナルを見出した。次に、これらのN1プロトンシグナルを一次構造上の特定のトリプトファン残基に帰属するために、



<図1>ハブ毒ホスホリパーゼA₂の軽水中の 400 MHz ¹H-NMRスペクトル (pH 5.5, 0.1 M CaCl₂, 40°C) (A) 及びシグナル a-d を照射 (0.5 s) したときの NOE 差スペクトル (B-E)。



<図2> ハブ毒ホスホリパーゼA₂のNB S酸化体の 270 MHz¹H-NMRスペクトル (pH 5.4, 0.1M CaCl₂, 40℃)。図中のモル数は、サブユニットあたりの酸化されたトリプトファン残基数を示す。



<図3> ハブ毒ホスホリパーゼA₂の軽水中の 360 MHz¹H-NMRスペクトル (A) と photoCIDNP差スペクトル (B) (pH 4.7, 0.1 M CaCl₂, 40℃)。フラビン濃度は 0.1 mM、レーザー照射時間は 0.5 s。

各トリプトファンが異なる程度に酸化された標品のNMRスペクトルを比較した(図2)。酸化はまず Trp-3と Trp-30、続いて Trp-68、そして最後に Trp-108 と進むことが分かっているので、酸化と共にまず消失するシグナル a と b を Trp-3、Trp-30 に、次に強度が小さくなるシグナル c を Trp-68 に、最後まで残ったシグナル d を Trp-108 に帰属した。

photoCIDNPスペクトル 各トリプトファン残基の溶媒への露出度を調べるために軽水中で photoCIDNPスペクトルを測定した(図3)。すなわち、フラビン色素存在下で、レーザー光を当てたときと当てないときの差スペクトルをとれば、色素に接し得るトリプトファンやチロシンのシグナルのみを抽出することが出来る筈である。図3から明らかのように、Trp-68 と Trp-108 にのみ photoCIDNPシグナルが観測され、これらの残基が分子表面にあること、一方 Trp-3 と Trp-30 は分子内部に埋もれて色素と接触できない状態にあることが分かった。

これらの結果は、3番目の残基と30番目の残基がdimerのサブユニット間の界面に位置する C.atrox のホスホリパーゼA₂の結晶構造と良く対応している。したがって、水溶液中でも C.atrox のホスホリパーゼA₂の結晶構造と同様の dimer topology が保たれているものと考えられる。しかし一方で、NBSによる酸化のされ易さの結果（酸化され易い順から Trp-3 = Trp-30 > Trp-68 > Trp-108 ）とは対応しない。理由としては、NBSが dimer の界面に異常に高い親和性を持っている、NBSによる修飾が、高次構造の変化を引き起こしてしまう、等が考えられる。いずれにしても、トリプトファン残基の溶媒への露出度を議論するのに、一つの方法で得られた結果のみに基づくのは危険だと言えよう。

本研究により dimer の界面に位置する2つのトリプトファン残基に帰属されたN1プロトンシグナル及びC2プロトンシグナルは、dimer 型ホスホリパーゼA₂において基質が活性部位に入りこむ際、2つのサブユニットの四次構造がどのように変化するかを探るための、良いプローブとなるものと考えられる。例えば酵素の界面認識部位へのミセル状基質の結合、カルシウムイオンの結合等が、dimer topology を変え、基質が活性部位へ入り込めるようになるのではないかという speculation がある。いまのところ基質アナログ（アルキルホスホコリン）の存在は、4つのトリプトファン残基の photoCIDNP シグナルのパターンに変化を与えないことを確認しているが、中性 pH 付近でのカルシウムイオンの photoCIDNP シグナルへの影響等については、今後の課題である。

（270 MHz 及び 400 MHz プロトンNMRの測定に関して便宜を図って下さいました宮澤辰雄教授（横浜国大）に感謝いたします。）

【文献】

- 1) Keith, C., Feldman, D.S., Deganello, S., Glick, J., Ward, K.B., Jones, E.O. and Sigler, P.B. (1981) J.Biol.Chem. 256, 8602-8607; Brunie, S., Bolin, J., Gewirth, D. and Sigler, P.B. (1985) J.Biol.Chem. 260, 9742-9749.
- 2) Ishimaru, K., Kihara, H. and Ohno, M. (1980) J.Biochem. 88, 443-451.
- 3) Tanaka, S., Mohri, N., Kihara, H. and Ohno, M. (1986) J.Biochem. 99, 281-289.
- 4) Mohri, N., Tanaka, S., Miyajima, T., Kihara, H. and Ohno, M. (1986) J.Biochem. 100, 883-893.
- 5) Endo, T., Oya, M., Kaptein, R., Vuister, G.W., Kihara, H., Mohri, N., Tanaka, S. and Ohno, M. (1988) FEBS Lett. 230, 57-60.

（阪大蛋白研、蛋工研⁽¹⁾、住友化学愛媛研⁽²⁾、奨励会ペプチド研⁽³⁾、
京大・理⁽⁴⁾）小林祐次、西村重徳、京極好正、大久保忠恭⁽¹⁾、
島田健⁽²⁾、美濃部正夫⁽²⁾、西内祐二⁽³⁾、榊原俊平⁽³⁾、郷信広⁽⁴⁾

Solution Structure of ω-Conotoxin

Yuji Kobayashi, Shigenori Nishimura, Yoshimasa Kyogoku, Tadayasu Ohkubo,⁽¹⁾
Ken Shimada⁽²⁾, Masao Minobe⁽²⁾, Yuji Nishiuchi⁽³⁾, Shunpei Sakakibara⁽³⁾ and
Nobuhiro Go⁽⁴⁾

(Institute for Protein Research, Osaka University, ⁽¹⁾Protein Engineering
research Institute, ⁽²⁾Ehime research Laboratory, Sumitomo Chemical Co. Ltd.,
⁽³⁾Peptide Institute, Protein Research Foundation, ⁽⁴⁾Department of Chemistry,
Faculty of Science, Kyoto University)

We have reported a preliminary investigation of the solution structure of ω-conotoxin (ω-CGTX), a toxic peptide with 27 residues, using H-NMR and distance geometry. In order to add the informations of torsion angles for the refinement of the obtained structure, the stereospecific assignments suggested by S. G. Hyberts et al. were carried out. This was performed by combined analysis on J-coupling constants with simulations and peak-fitting of cross-peak multiplet structure in double quantum filtered COSY spectra, and on intensities of intraresidual NOE. The stereospecific assignments for β-methylene protons of 6 out of 17 residues with AMX symmetry were obtained.

[はじめに] ω-コノトキシシン (ω-CGTX) はイモ貝 (Conus Geographus) の産出する 27 残基からなるペプチドである。ω-CGTX は神経細胞の Ca⁺⁺チャンネルに結合し神経伝達を阻害する。我々は現在、NMR によって得られる距離情報を基に、種々のペプチドやタンパク質の立体構造を研究する方法を確立させつつあり、この手法を用いて ω-CGTX の構造を解析している。既に報告したように (日本生物物理学会年会'87) 重水及び軽水溶液において、DQF-COSY、HOHAHA、NOESY を測定し、連続掃統法により NMR シグナルの帰属を行った。次に、NOE 強度を換算して得られた距離の情報から DADA 法⁽¹⁾ を用いて三次元構造を求めた。しかしながら、距離の情報が充分ではなかったため、求められた構造の収束は悪く (RMSD (backbone) = 2.3 Å, RMSD (all) = 5.0 Å)、さらに S-S 結合のトポロジーの違うコンフォーマーも同時に求められ、これらから 1 つを選ぶのは困難であった。

今回、我々は、側鎖の局所構造、特に S-S 結合部位の構造を決定することが全体の構

造の精密化に有用であろうと考え、27残基中17個のAMXスピン系をもつ残基の側鎖β-methylene protonについてstereospecific assignmentと二面角φ、 χ^1 の決定を行った。
 [実験] ω-CGTXGVIAは液相法により合成し、空気酸化を行った後、3つのS-S結合が天然物と同じ様式(Cys¹-Cys¹⁶, Cys⁸-Cys¹⁹, Cys¹⁵-Cys²⁶)をもつ成分をHPLCによって単離精製した。NMR測定は、13mMの試料濃度で行った。重水溶液および軽水溶液を用い、測定はすべてpH=4.75、1℃で行った。

重水溶液中でのDQF-COSYの測定はBruker-AM-500で行った。t₁、t₂方向それぞれ、1K、4Kポイントのデータをサンプリングした。二次元フーリエ変換の前にt₁方向にゼロフィリングして4K×4Kポイントのデータマトリックスとし、また、t₁、t₂方向それぞれにshift sine square型のウィンドウ関数をかかけた。最終的なポイント分解能は両軸方向とも1.95 Hz/ptである。

軽水溶液中でのNOESY測定はJEOL-GX-500で行った。mixing timeは200msで、COSYピークの混入を避けるため第二パルスからt₁に比例した時間待った位置に180°パルスをおいたパルスシーケンスを用いた。t₁、t₂方向それぞれ、256、4Kポイントのデータをサンプリングした。t₁方向のデータポイントを512とした後、t₂方向にGaussian、t₁方向にshift sine bell型のウィンドウ関数をかかけた。

[結果と考察] S. G. Hybertsらの方法⁽²⁾に実際的な応用面で改良を施してStereospecific assignmentを行った。DQF-COSYクロスピークにあらわれるJはピーク間のcancellationのため正しい値を示さない。そこで、クロスピークの微細構造をシミュレートし、これを実験で得られたクロスピークと定量的にフィッティングしてJ_{αβ}をもとめた。得られたJ_{αβ}とKarplusカーブから χ^1 が決定されたが、1つの χ^1 についてHβがHβ₂、Hβ'がHβ₃の場合と、HβがHβ₃、Hβ'がHβ₂の場合がある。NH-Hβ間、NH-Hβ'間、NH-Hα間のNOEの相対強度を比較してどちらの場合かを決定し、同時にφをきめた。

1) DQF-COSY クロスピークの微細構造のシミュレーション

クロスピークのシミュレーションはSPHINX⁽³⁾、LINSHA⁽³⁾及びPLOTの3つのプログラムにより行った。J_{αβ}はKarplusカーブに従うと仮定し、係数はferricromeの測定によって得られた値⁽⁴⁾を用いた。またJ_{β₂β₃}はモデルペプチドから得られた値⁽⁵⁾を用いた。カップリングはHβ-HβのみStrongカップリングとし、Hα-HβはWeakカップリングとして計算した。得られるピークの形を定量化するために図1に示すパラメータを設定した。β-β strongカップリングに起因する各パラメータのΔδ(β-β')依存性、およびそれらの線巾

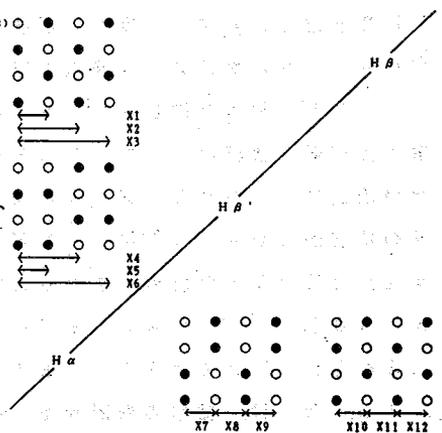


図1・各パラメータの定義

依存性をシミュレーションによって調べた。その結果、 $\Delta\delta$ に対しては $\Delta\delta \geq 0.01$ ppmの範囲ではほぼ一定なのに対し、線巾に対しては著しい変化を示した。そこで、今回は $\Delta\delta$ は0.5 ppmに固定し、線形は1D-スペクトルのピークフィティングからえた線巾9.15 Hzのローレンツ型を採用した。

2) 実験データとのフィッティング

ω -CGTXの17個のAMXスピン系のうちSer²、Ser¹²、Asn²⁰はノイズのため、Ser⁷、Ser¹⁰、Tyr²²はH β_2 、H β_3 が等価なために、クロスピークの微細構造をみることをできなかった。図2と表1に、残り11個の残基についてそれぞれ測定されたクロスピークと先に定義したパラメータを読みとった結果を示す。実験によって得られたクロスピークとシミュレートされたクロスピークのフィッティングをする為に次のようなエラー関数を導入した。

$$E_1(x^1) = \sum [X_i^{*pp} - X_i^{*1*}(x^1)]^2$$

x^1 を10°きざみに-180°から180°まで変化させた時の $X_i^{*1*}(x^1)$ を用いて $E_1(x^1)$ を計算し、そのうち $E_1(x^1)$ の最小値を与える x^1 を選んだ。こうして11個の残基について再現されたクロスピークとその時の x^1 を図2に示す。

3) Stereospecific Assignment と二面角 ϕ 、 x^1 の決定

H β がH β_2 、H β_3 のどちらに対応するかを決めるために、NHからH α 、H β 、H β' へのNOE強度を比較した。1.2倍ずつの高さで切ったcontour plotから、クロスピークの高さを読み、これをNOE強度として、次のような相対強度を計算した。

$$R_1^{*pp} = \text{NOE}_{N-\beta} / \text{NOE}_{N-\alpha}$$

$$R_2^{*pp} = \text{NOE}_{N-\beta'} / \text{NOE}_{N-\alpha}$$

$$R_3^{*pp} = \text{NOE}_{N-\beta'} / \text{NOE}_{N-\beta}$$

先に決定した x^1 の時 ϕ を変化させると各原子間距離がどうかかわるかをECEPP⁽⁶⁾で計算した。NOE強度は核間距離の6乗に反比例するから、残基内の相関時間が一定であると仮定すると、NOE強度比を算出することができる。

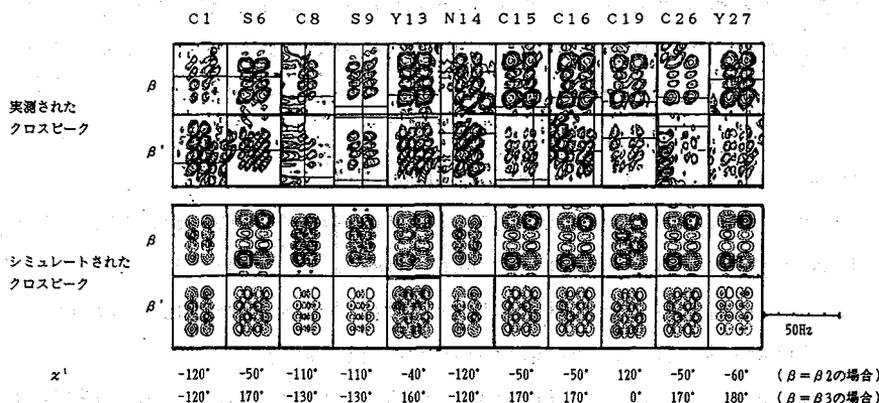


図2・11個のAMXスピン系残基のクロスピーク

表1 各パラメータの値と二面角 ϕ, α' の値

Residue	Chemical shifts				Parameters from DQF-COSY												Relative intensity of NOE's			Torsion angle (°)		Methylene protons		
	(ppm)				(Hz)												R1	R2	R3	ϕ	α'	β	β'	
	H α	H β	H β'	H β''	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12								
Cys1	8.13	4.41	2.86	3.04	—	—	7.8	4.0	2.2	6.2	6.2	9.5	8.0	7.8	11.8	—	0.2	0.7	4.0	10	-120	β_3	β_2	
Ser6	7.59	4.33	3.68	3.78	9.8	4.0	13.8	4.1	9.9	14.0	4.2	7.6	5.9	10.0	3.8	9.9	0.7	0.8	0.8	-20	170	β_3	β_2	
Cys8	8.26	4.80	2.77	2.91	—	—	6.0	—	—	—	6.5	6.8	6.3	6.8	6.6	6.8	—	—	—	—	—	—	—	—
Ser9	8.43	4.74	3.55	3.86	5.8	1.8	7.6	—	—	9.6	6.5	6.8	6.3	6.8	6.6	6.8	—	—	—	—	—	—	—	—
Tyr13	8.03	4.29	2.77	3.12	11.9	4.0	15.9	5.1	10.9	16.0	6.0	9.8	6.0	10.0	5.8	9.8	0.2	0.3	1.7	20	160	β_3	β_2	
Asn14	8.19	4.72	2.56	2.90	—	—	10.0	—	—	10.0	6.0	9.8	7.8	6.0	11.6	6.0	—	—	—	—	—	—	—	—
Cys15	8.69	4.48	2.31	2.82	11.8	1.6	13.4	4.0	9.8	13.8	8.0	8.0	7.5	11.5	4.1	11.8	3.0	2.0	0.7	-110	170	β_3	β_2	
Cys16	9.41	4.39	2.65	3.08	—	—	13.9	4.0	11.7	15.7	5.8	9.9	5.8	11.8	4.2	11.5	1.0	1.0	1.0	-30	170	β_3	β_2	
Cys19	8.84	4.60	2.65	2.79	9.7	3.9	13.6	4.1	11.8	15.9	5.7	9.5	6.0	9.9	5.8	9.8	—	—	—	—	—	—	—	—
Cys26	8.43	4.74	2.65	3.53	11.9	2.0	13.9	3.9	—	—	—	5.9	11.8	11.7	3.9	11.7	—	—	—	—	—	—	—	—
Tyr27	9.18	4.27	2.68	3.02	—	—	11.7	5.8	9.8	15.6	—	—	—	11.5	4.1	11.5	2.5	1.2	0.5	-60	-60	β_2	β_3	

$$R_{1\beta_3}(\phi) = r(N-\beta_2)^{-6} / r(N-\alpha)^{-6}$$

$$R_{2\beta_3}(\phi) = r(N-\beta_3)^{-6} / r(N-\alpha)^{-6}$$

$$R_{3\beta_3}(\phi) = r(N-\beta_3)^{-6} / r(N-\beta_2)^{-6}$$

各残基の ϕ を決定するため、 ϕ を変数とする次の様なエラー関数を導入した。

$$E_2(\phi) = \sum [R_{i\beta_3}^{exp} - R_{i\beta_3}^{calc}(\phi)]^2$$

求められた α' で H β が H β_2 に対応する場合と、H β が H β_3 に対応する場合について ϕ を 10° きざみに -180° から 180° まで変化させた時、最小の $E_2(\phi)$ を与える ϕ とその時の β, β' の対応を求めた。結果を表1に示す。 ϕ, α' が記されていない5残基はNOEピークのoverlappingやノイズのため正確なNOE強度を求められなかった。側鎖のコンフォメーションが決定された6残基のうち、Cys1がcis以外はTyr27がtg、他の4残基はgtと安定な構造をとっている。Cys1はCys19とS-S結合しておりCys19の側鎖もcis型であることからこのS-S結合はかなり歪んだ構造を持っていることが示唆される。

現在、更にNOESYを測定して残りのstererspecific assignmentを行うとともに、距離の情報に、今回得られた二面角の情報を加えてdistance geometryの計算を行いω-CGT Xの構造の精密化を行っている。

謝辞

2次元NMRデータの処理に協力して下さった日本Bruker社のWalchli氏に感謝します。またプログラム開発に協力して戴いた阪大蛋白研の菅田宏助教授に謝意を表します。

文献

- (1) Braun, W & Go, N. (1985) J. Mol. Biol., **186**, 611-626
- (2) Hyberts, S. G., Marki, W. & Wagner, G. (1987) Eur. J. Biochem, **164**, 625-635
- (3) Widmer, H. & Wuthrich, K. (1986) J. Magn. Reson, **70**, 270-279
- (4) Demarco, A., Llinas, M. & Wuthrich, K. (1978) Biopolymers, **17**, 617-636
- (5) Bundi, A. & Wuthrich, K. (1979) Biopolymers, **18**, 285-297
- (6) Momany, F. A., McGuire, R. F., Burgess, A. W. & Scheraga, H. A. (1975) J. Phys. Chem., **79**, 2361

特別講演 1 全重水素化リン脂質ミセルに埋めこまれた生理活性ペプチドの構造と機能の相関

(都臨床研、東レリサーチセンター)

○ 稲垣冬彦、嶋田一夫、川口謙、大竹修子、平野昌彦、寺沢功

はじめに メリチンは蜜蜂の毒液に含まれる26個のアミノ酸残基よりなる塩基性ポリペプチドである (G-I-G-A-V-L-K-V-L-T-T-G-L-P-A-L-I-S-W-I-K-R-K-R-Q-Q-CONH₂)。溶菌、溶血活性を示すことよりメリチンと生体膜の相互作用を明らかにすることは興味深い研究対象であり、物理化学的な手法により多くの研究がなされてきた(1)。CDスペクトルの解析より、メリチンは水溶液ではランダム構造を取るのに対し二重膜やミセルの中では α -ヘリックスをとることが知られており、高次構造形成には膜と水の界面が重要な役割を果たしていること、このようにして形成された高次構造は溶菌、溶血活性と関連づけられることが期待される。

NMRによりリン脂質と結合したペプチドの構造を解析する場合には、リン脂質由来のプロトンシグナルを消去してペプチド由来のプロトンシグナルのみを抜き出すことが必要である。全重水素化リン脂質の合成はこのような研究には必須となる。全重水素化リン脂質ミセルに埋めこまれたメリチンの高次構造に関する先駆的な研究がBrownらにより行われたが、帰属が不十分なこともあり明確な結論は得られていない(2)。一方、全重水素化リン脂質二重膜に結合したメリチンについてはTRNOE法を用いた研究が行われている(3)。本研究では全重水素化ドデシルホスホコリン(DPC)を合成し、そのミセルに埋め込まれたメリチンのプロトンNMRスペクトルを解析し全てのプロトンの帰属を行うとともに高次構造を明らかにしたので報告する。

実験 メリチンはシグマより購入し逆相HPLCにより精製した。メリチン5mMと50倍モルの全重水素化DPCを含む重水及び軽水(10%重水を含む)溶液を調製しNMR測定試料とした。pHは3.17、測定温度は30℃であり、化学シフトの内

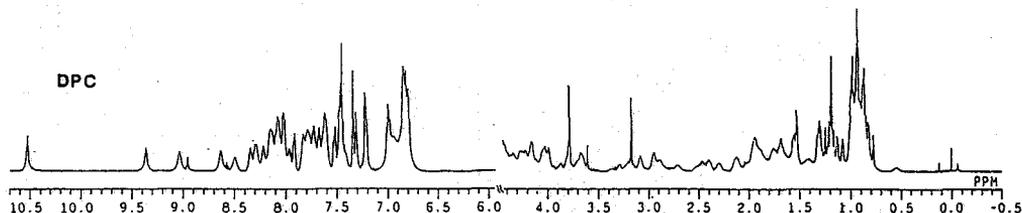


図1 DPCミセルに埋め込まれたメリチンの500MHz¹H NMRスペクトル。

部標準としてDSSを用いた。NMRの測定には日本電子製JNM-GX500を用いた。重水および軽水試料についてDQF-COSY、HOHAHA、NOESY (いずれも phase sensitive mode)の測定を行った。HOHAHAおよびNOESYの混合時間はそれぞれ45ms、150msに設定した。solvent suppressionにはDANTEパルスを用いた。

結果と考察 図1はDPCミセルに埋め込まれたメリチンの500MHz ^1H NMRスペクトルを示す(軽水溶液)。DPCは、既にBrownらにより報告されているように臨界ミセル濃度(1mM)以上では40分子会合したミセルを形成する。したがって、本実験条件下ではメリチンとミセルは1:1の複合体を形成していると考えられる。全重水素化リン脂質ミセルを用いるメリットは50倍モルDPCの存在にもかかわらずメリチンのシグナルを明瞭に観察できること、スピン拡散の効果を無視できる点である。図2は、メリチンの軽水溶液のNOESYスペクトルのうちアミドプロトン領域を示したものである。この領域には d_{NN} connectivityに基づくNOESY交差ピークが数多く観測されている。これらの交差ピークを順次接続することにより、図2に示すように、ほぼすべてのアミノ酸残基のつながりを求めることができた。これらのアミドプロトンの帰属を参照し、 $d_{\alpha\text{N}}$ 、 $d_{\beta\text{N}}$ connectivityおよび重水溶液のDQF-COSY、HOHAHAスペクトルを解析しDPCミセルに埋め込まれたメリチンのプロトンシグナルの帰属を完了した。この帰属に基づき軽水および重水におけるメリチンのNOESYスペクトルの交差ピークの帰属を行った。図3はDPCに埋め込まれたメリチンに見いだされた

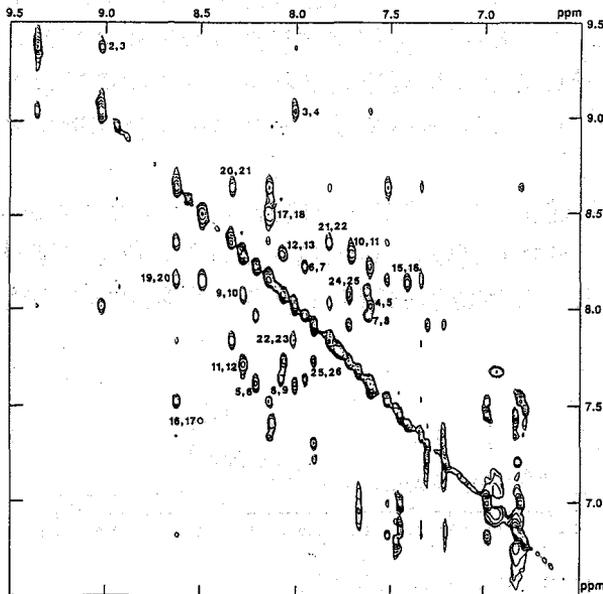


図2 メリチンのNOESYスペクトル.

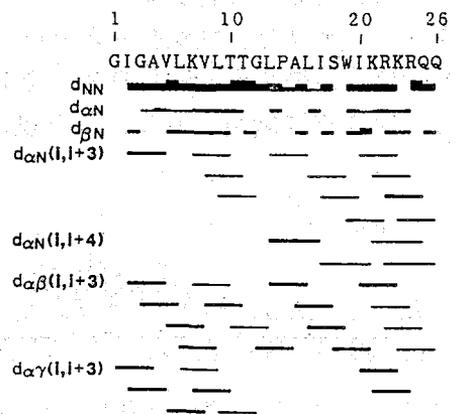


図3 メリチンのNOE connectivity.

NOE connectivity をまとめたものである。d_{NN} connectivity で強く結ばれていること、 α -ヘリックスに特徴的に見いだされる d _{α N}(i, i+3)、d _{α β} (i, i+3) connectivity が観測されていることよりメリチンは α -ヘリックス構造をとることがわかる。次に、NOESYの解析により求めた距離情報に従ってdistance

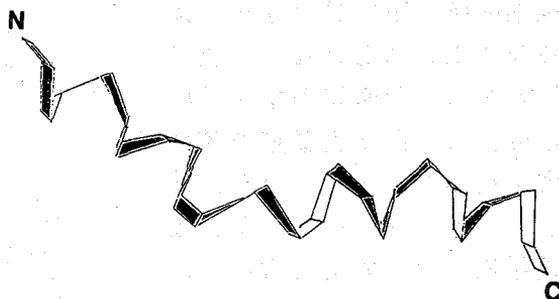


図4 distance geometryの計算により求めた DPCミセルに結合したメリチンの構造

geometryの計算を行い、DPCミセルに埋め込まれたメリチンの構造を明らかにした。なお、この計算は京都大学理学部化学教室郷研究室との共同で行った。計算には、残基内NOE 68個、隣接残基間NOE 93個、それ以外のNOE 70個、計231個のNOE情報を用いた。5残基以上離れたアミノ酸残基間にはNOEが観測されなかったことより、メリチンは比較的伸びた構造をとることが推測された。そこで、アミノ酸の重なりを含む5つのペプチド断片について求めた最適解を組み合わせて、最終的に target functionの値の小さな3つの解を得た。いずれの構造についても、G1-T11およびL13-Q26の2つの α -ヘリックス構造よりなり、2つの α -ヘリックスは30°~60°の角度をなすことがわかった。これはP14の存在によりregularな α -ヘリックス構造がとれないためである。最近メタノール中のメリチンの構造が報告されたが(4)、DPCミセルに埋め込まれたメリチンと同様な構造をとっている。しかし、両方の状態におけるNMRスペクトルは顕著な差異を示している。これはメタノール溶液は等方的な環境であるのに対し、DPCミセルの場合には水とリン脂質ミセルの界面が存在するためである。

DPCミセルおよびメタノール溶液におけるメリチンの主鎖のアミドプロトンの化学シフトを比較したのが図5である。K7, V8, T11, A15, L16, W19, R22, K23のアミドプロトンの化学シフトが大きく変化している。実際、これらのアミノ酸残基は α -ヘリックスの一方に集まっており、他方には疎水的なアミノ酸残基が集まっている。DPCミセルと水の界面にメリチンは存在し、疎水的な面をアルキル側鎖に埋めて存在していることがわかる。以上の結果を総合するとメリチンの溶血活性は図6のように考えられる。即ち

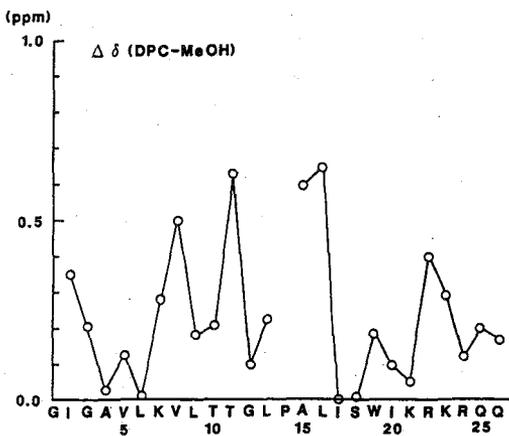


図5 DPCミセルおよびメタノール溶液におけるメリチンアミドプロトンの化学シフトの差異

生理的条件下ではメリチンはランダム構造をとるが、膜に結合すると同時に親水性領域を外側に、疎水性領域を膜に埋め込んだ α -ヘリックス構造をとる。 α -ヘリックスは膜電位に従って膜を貫通し、親水面を向けて会合しイオンチャンネルを形成する。イオンチャンネル形成は膜電位を形成する時にのみ起こることが報告されており、ここに示したモデルと対応する。

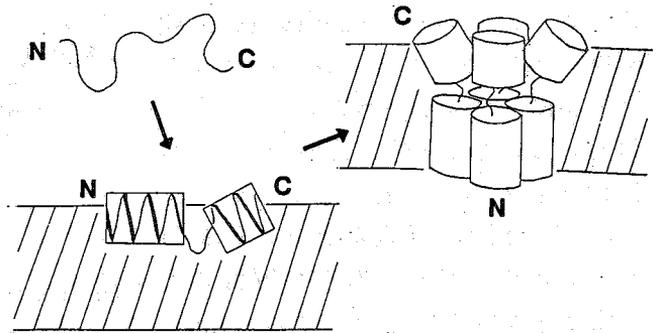


図6 メリチンによる溶血活性のスキーム

(本研究は昭和62年度科学技術振興調整費による”生体膜機能の解析、利用技術の開発に関する研究”の一環として行われたものである。)

文献

- (1) Bernheimer, A. W. et.al., Biochem.Biophys.Acta, 864, 123-141 (1986).
- (2) Brown, L. R., et. al., Biophys. J., 37, 319-328 (1982).
- (3) 岡田明彦ら、第24回NMR討論会講演要旨、p271-274,(1985).
- (4) Bazzo, R., et. al., Eur. J. Biochem., 173, 139-146 (1988).

^1H NMRによる 免疫グロブリンの高次構造の研究

(東大薬) 田中俊之 半沢宏之 矢田信久 高橋栄夫 海老沢計慶
西村善文 荒田洋治

免疫系を代表する糖タンパク質である免疫グロブリンは、異物の認識から排除に至る一連の生体防御反応の流れを担う。タンパク質分子の高次構造の構築という視点から見れば、免疫グロブリンは、異なる機能が、異なるドメインによって発現されている多機能タンパク質である。我々はこれまで、免疫グロブリンの高次構造が、その機能とどのようにかかわっているかについて、NMRによって解析を進めてきた。今回は、重水素ラベルマウスモノクローナル抗体 (MAb) を用いて、これまでに得られた成果について要約する。

《試料の調製》

重水素ラベル MAb の調製については、すでに報告した。現在までのところ、Tyr-2,6-d₂, Trp-2,4,5,6,7-d₅, Phe-2,3,4,5,6-d₅ によって、重水素ラベルを行っている。

表1：NMRによって解析を行っている MAb

Hybridoma	Specificity	Isotype		
27-44	dansyl	IgG1	@	#
27-13.6	dansyl	IgG2a	@	#
27-1B10.7	dansyl	IgG2a(short)	@ *	#
27-35.8	dansyl	IgG2b	@	#
7D7	17 α -OH-progesterone	IgG2b		
4B.223	17 α -OH-progesterone	IgG2a		
7.5.14.21	acetylcholine	IgG2a		#
Hyb.C1	HEW lysozyme	IgG1		#
14.1.1	SSI	IgG1		
14.2.3	SSI	IgG1		
14.3.3	SSI	IgG1		
14.4.1	SSI	IgG1		
57-2	SSI	IgG1		

【表1の脚注】

- @ L鎖 (VL, CL) および VH を共通にもつ "switch variant" MAb
- # VH, VL の一次構造が既知の MAb
- * ドメイン1個分 (恐らく CH1 ドメイン) が欠落した switch variant MAb

27-35.8 および 7D7 ハイブリドーマ由来の IgG2b については、パブリン消化により、均一な Fab および Fc フラグメントを得る条件を確立し、NMRの測定を行っている。

《IgG, Fab, Fc の ¹H NMR スペクトル》

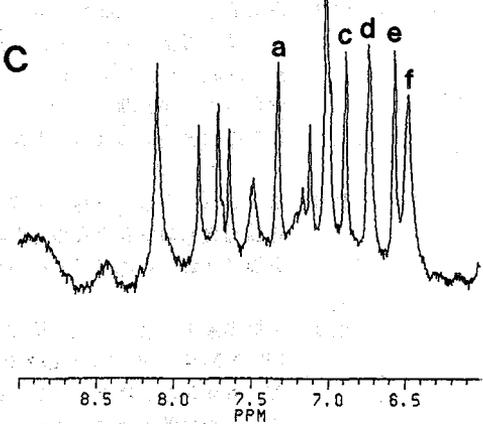
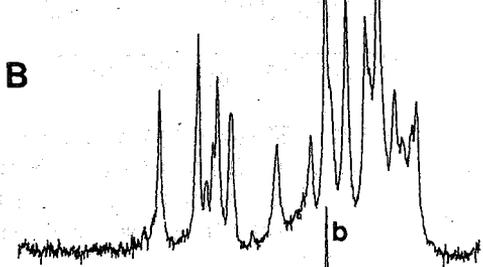
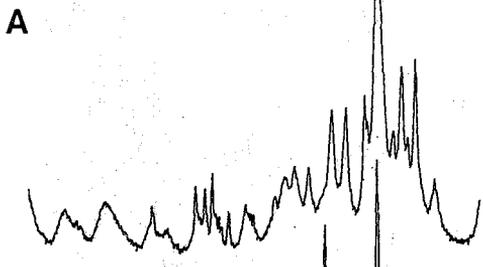
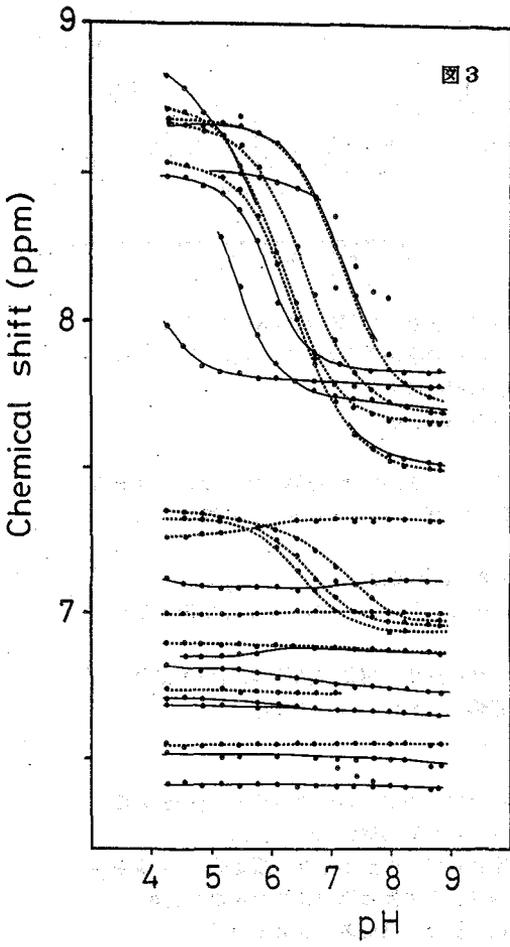
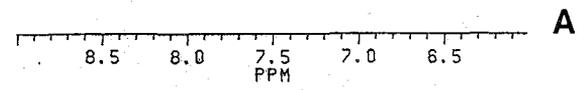
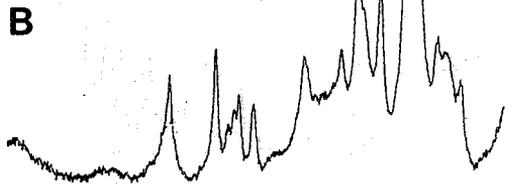
以下、27-35.8 ハイブリドーマ由来 抗 dansyl 抗体 (IgG2b) を用いて得た実験結果についてまとめる。

図1に示すように、通常の MAb では、His 残基のシグナルが一部分離しているだけである。これに対して、重水素ラベルを行うと、分解能に大きな改善が見られる。図2は、IgG, Fab, Fc のスペクトルを比較したものである。ここで、IgG のスペクトルは、スピンエコー法によって測定した。Fab は、明瞭に分離した Tyr および His 残基のシグナルを与える。種々の MAb の比較から、分離して観測可能なシグナルは、ほとんどが V 領域由来であることがわかる。

Fc フラグメントもまた、きわめて明瞭に分離した Tyr および His 残基のスペクトルを与える。シグナル a - f は、Tyr 残基由来である。シグナル b は、サブクラス異なるマウスの IgG を比較すると、IgG2a と IgG2b に存在するが、IgG1 では欠損している。IgG2a と IgG2b の場合には 296位が Tyr であるのに対し、IgG1 では Phe に置換している。このシグナルはまた、すでに林によって帰属が行われているヒト IgG1 Fc の Tyr-296 と化学シフトが一致する。これらの事実から、シグナル b を Tyr-296 に帰属することができる。そのほかの6本のシグナルはすべて CH3 ドメイン由来である。マウスの IgG2b の Fc には、全部で7個の Tyr 残基が含まれている。すなわち、シグナル f が恐らく2本重なっているほかは、すべてのシグナルが分離していることになる。

《抗体側より見た抗原抗体反応》

図4に MAb 27-35.6 由来の Fab に、抗原である ε-dansyl-L-lysine を添加した場合のスペクトルの変化をしめす。↓印を付した3本のピークに劇的な変化が観測される。すなわち、ピークの形はそのままにして、強度が減少し、遂に消失する。抗原が、Fab に対して過剰になると、dansyl 基の芳香環プロトンに由来するピーク (▽) が見え始める。このピークは、30°Cでは、化学シフトが遊離の dansyl 基の場合に比べて変化がなく、かつ線幅もシャープである。一方、測定温度を 45°C に上昇させると、線幅が広がり始める。すなわち、ここで用いている系においては、抗原は、遊離の状態と、抗体に結合している状態の間をゆっくりと交換しているのである。



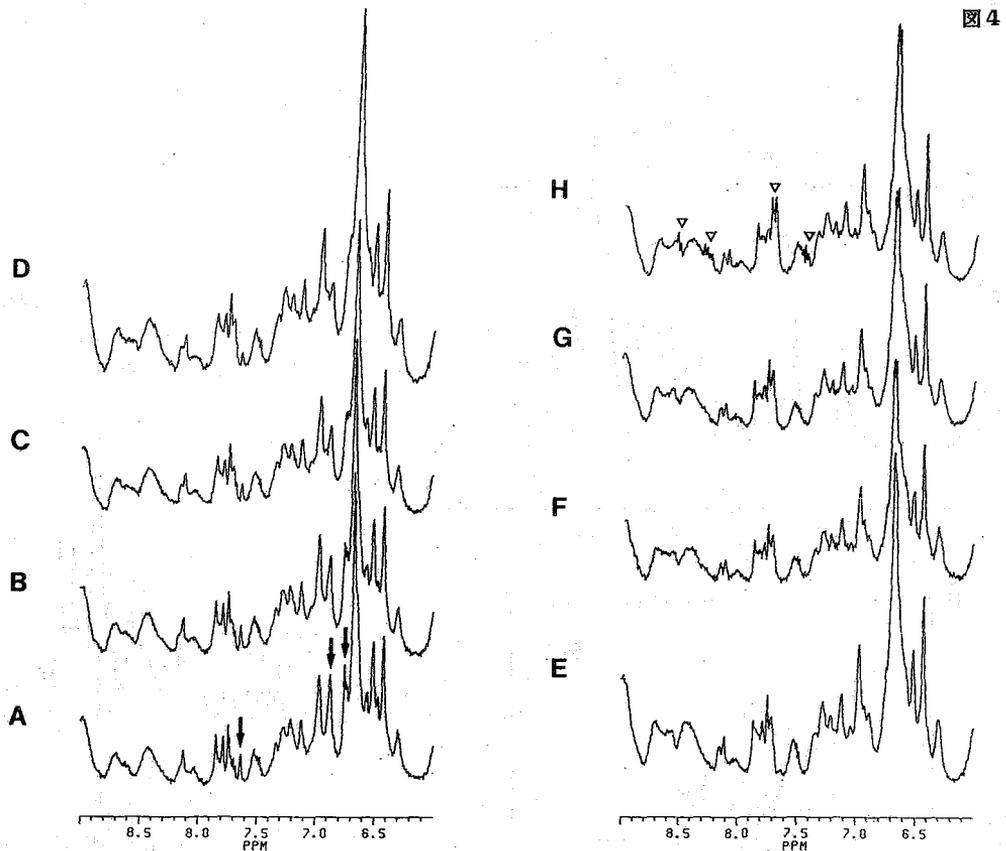


図4

図1：抗 dansyl マウスモノクローナル抗体 IgG2b の ^1H NMR スペクトル
 A, 重水素ラベルしていない場合；B, 重水素ラベルして、His C2-, C4-H
 および Tyr C3,5-H のシグナルを選択的に観測。
 測定条件：400 MHz, 30°C, pH = 7.3, $\mu = 0.2$.

図2：重水素ラベル抗 dansyl マウスモノクローナル抗体 IgG2b および、それから
 パブリン消化によって得た Fab, Fc の ^1H NMR スペクトルの比較。
 A, Fab； B, IgG； C, Fc。
 測定条件：400 MHz, 30°C, pH = 7.3, $\mu = 0.2$ 。
 ここに示す IgG のスペクトルは、CPMG 法 (1 ms x 20) によって測定した。

図3：重水素ラベル抗 dansyl マウスモノクローナル抗体 IgG2b を用いて得た
 芳香環領域のシグナルの pH 滴定曲線。 30°C, $\mu = 0.2$ 。
 実線は Fab, 点線は Fc に由来。

図4：抗原の添加による Fab (抗 dansyl マウスモノクローナル抗体 IgG2b) の
 ^1H NMR スペクトルの変化。 pH = 7.3, 30°C, $\mu = 0.2$ 。
 A, 抗原がない場合； B, モル比にして、Fab あたり抗原を約 1/6 量添加；
 C, B の倍量の抗原を添加； D~H, 以下同様に倍量ずつ抗原を追加。
 G の段階で、Fab の抗原結合部位は、抗原でほぼ飽和されている。

(阪大・医・生化) 藤井 茂、西河 淳、谷口直之

The heterogeneity of sugar chains in bovine immunoglobulin G based on structures of sugar chains in solution

Shigeru Fujii, Atsushi Nishikawa and Naoyuki Taniguchi

(Department of Biochemistry, Osaka University Medical School)

The asparagine-linked sugar chains of bovine immunoglobulin G were separated by reversed phase HPLC and their structures were determined by ^1H NMR spectroscopy. In biantennary complexes without bisecting GlcNAc, a monogalactosylated sugar chain at the $\text{Man}\alpha 1-3$ branch was a larger component than that at the $\text{Man}\alpha 1-6$ branch. On the other hand, in bisected biantennary complexes, the monogalactosylated one at the $\text{Man}\alpha 1-6$ branch was a larger component than that at the $\text{Man}\alpha 1-3$ branch. The difference in the above sugar structures can be well explained by the branch specificity of bovine milk galactosyltransferase and the substrate specificity of bovine kidney N-acetylglucosaminyltransferase III.

[序論]

高磁場 NMRの登場やHOHAHAなどのパルス系列の開発により、NMRは糖タンパク質や糖脂質などの糖鎖構造の決定においても非常に有効な手段となっている。また、糖鎖の溶液中での立体構造に対する研究もNMRを用いて盛んに行なわれつつあり、これらの糖鎖構造に対する研究は、糖鎖の生合成過程に対する有効な情報を与えてくれるものと期待される。

糖タンパク質の一つである免疫グロブリンGのアスパラギン結合型糖鎖には、図1に示した様な多様性が存在することが、ヒトの場合に示されている¹⁾。またウシの免疫グロブリンGでは、bisecting GlcNAc(GlcNAc 9)を含まず、Fucを有する二本糖鎖糖で、非還元末端がともにGalであるものと、図1の $\text{Man}\alpha 1-3$ 分枝のGalが欠如したものが主なものであると報告されていたが、我々は、NMR解析によりGalが欠如しているのは、 $\text{Man}\alpha 1-3$ 分枝ではなく $\text{Man}\alpha 1-6$ 分枝であることを示した。²⁾

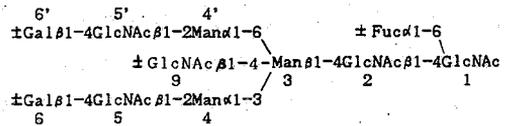


図1 ±を付けた単糖は、それぞれ単糖を含有する糖鎖および含有しない糖鎖が存在することを示す。

免疫グロブリンGのアスパラギン結合型糖鎖は、H鎖に一ヶ所しか存在しないにもかかわらず、上に示した様に糖鎖に多様性が見られることにわれわれは注目し、ウシ免疫グロブリンGの糖鎖の多様性を明らかにするとともに、これらの多様性の原因を溶液中での糖鎖構造との関連において糖転移酵素の基質特異性から解析を行った。

〔方法〕

ウシ免疫グロブリンGのアスパラギン結合型糖鎖は、ヒドラジン分解によりタンパク質部分より切断し、糖鎖の分離・精製を容易にするため還元末端を2-アミノピリジンで修飾し、蛍光およびUVでの検出を可能にした³⁾ これらの修飾された糖鎖は、東ソーのTSKgel ODS-80TMを用いたHPLCにより分離・精製した。精製した糖鎖はD₂Oによる凍結乾燥を数回くり返した後、D₂O溶液にてNMR測定を行った。測定は、日本電子社製GX-500にて行った。測定温度は30°Cで、外部標準としてTSP溶液を用いた。

糖転移酵素の活性測定には、NMRにより構造を同定した糖鎖を受容体基質として用いた。ガラクトシルトランスフェラーゼの活性測定には、ウシのミルクより精製したのものを用い、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの活性測定には、ウシの腎臓のホモジネート900gの上清を用いた。

〔結果と考察〕

ウシの免疫グロブリンGのアスパラギン結合型糖鎖のHPLCでの溶出パターンを図2に示した。図中にローマ数字で示した様に、ウシの免疫グロブリンGにも十二種類もの糖鎖が含まれており、主成分の糖鎖は、ピークVIIおよびVIIIであり、その糖鎖のNMRスペクトルは図3に示した。図3(b)のスペクトルからピークVIIIの糖鎖は非還元末端がともにGalである糖鎖であることがわかる。ピークVIIの糖鎖では、一つのGalが欠如していることが図3(a)のスペクトルにおいて6で示したGalのC-1プロトンからの面積強度が一個分のプロトンに相当することから明らかとなる。また、欠如しているGalはMan α -1-6分枝の方のものであることが、Man 4のC-1プロトンの化学シフトは変化していないが、Man 4'のC-1プロトンの方は変化していることにより明らかとなる。

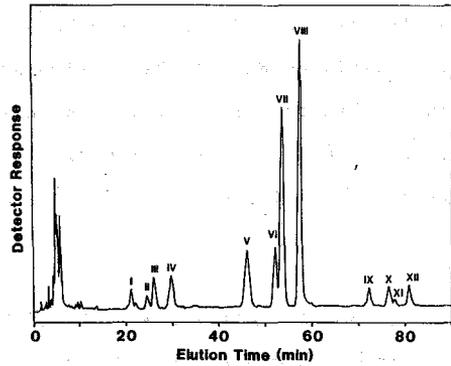


図2

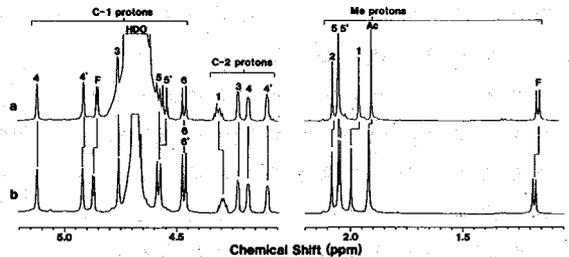


図3 a, bはそれぞれ図2のピークVII、VIIIの糖鎖のNMRスペクトルを示す。

また、他の糖鎖の NMR スペクトルは図 4 に示し、これらの NMR スペクトルからの化学シフト値を表 I にあわせて示した。これらの NMR のデータおよび糖鎖のフコシダーゼなどによる酵素消化などの結果から、それぞれの糖鎖構造が図 5 に示したように決定された。これらの結果から、ウシの免疫グロブリン G の糖鎖において、bisecting GlcNAc を含まない糖鎖では Man α 1-6 分枝に Gal を含まない糖鎖の方 (図 2 のピーク III および VII) が Man α 1-3 分枝に Gal を含まない糖鎖 (図 2 のピーク II および VI) よりも多くの割合を占めていることが明らかとなった。一方、bisecting GlcNAc を有する糖鎖に関しては、逆に Man α 1-6 分枝に Gal を含まない糖鎖 (図 2 のピーク X) の方が、Man α 1-3 分枝に Gal を含まない糖鎖 (図 2 のピーク XI) よりも少ない糖鎖成分があった。

これらの糖鎖成分の割合の差異の一つの原因は、糖鎖に Gal を転移するガラクトシルトランスフェラーゼの活性が bisecting GlcNAc を持たない糖鎖に対して、Man α 1-3 分枝の方が Man α 1-6 分枝よりも約 3 倍大きいのが、bisecting GlcNAc を有する糖鎖に対する場合その活性がともに低下するが、Man α 1-3 の分枝に対する活性の低下の方が著しく、それぞれの分枝に対する活性がほぼ同等になることにある。

このガラクトシルトランスフェラーゼの活性の変化は、NMR 解析により明らかにされている糖鎖の溶液中での構造によりよく説明される。bisecting GlcNAc を有する図 5 (IX) で示した糖鎖の溶液中での構造の模式図を図 6 に示した。この図から明らかのように、

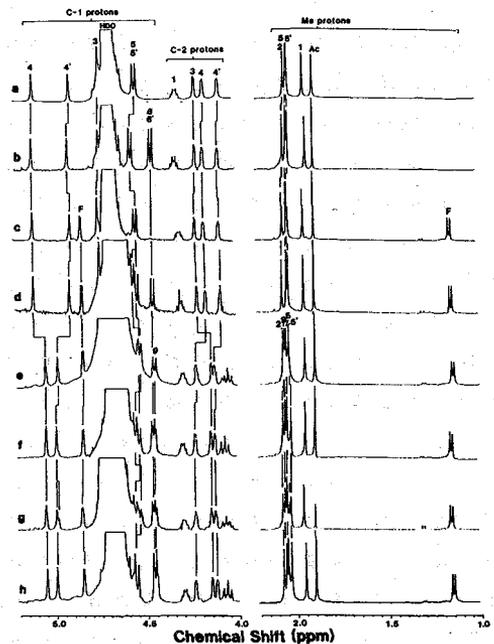


図 4 a, b, c, d, e, f, g はそれぞれ図 2 のピーク I, IV, V, VI, IX, X, XI, XII の糖鎖の NMR スペクトルを示す。

Table I. The chemical shifts of individual components of sugar chains of bovine immunoglobulin G

No. of peak in Fig. 2	Anomeric (C-1) protons							
	Man3	Man4	Man4'	GlcNAc5	GlcNAc5'	Gal6	Gal6'	Fuc ^a GlcNAc9
I	4.760	5.120	4.916	4.557	4.557	4.472	4.475	
IV	4.762	5.123	4.927	4.585	4.585	4.472	4.475	
V	4.767	5.122	4.917	4.559	4.559			4.858
VI	4.763	5.122	4.925	4.559	4.584	4.474	4.474	4.857
VII	4.766	5.125	4.918	4.586	4.558	4.472	4.472	4.857
VIII	4.765	5.126	4.925	4.586	4.586	4.474	4.474	4.876
IX		5.062	4.996	4.552	4.547			4.857 4.468
X		5.063	5.006	4.554	4.576	4.476	4.476	4.866 4.468
XI ^b		5.063	4.996	4.576	4.576	4.476	4.476	4.866 4.468
XII		5.063	5.006	4.576	4.576	4.475	4.475	4.861 4.469

No. of peak in Fig. 2	C-2 protons			Methyl protons				
	Man3	Man4	Man4'	GlcNAc1 ^a	GlcNAc2 ^a	GlcNAc5	GlcNAc5'	Fuc ^a GlcNAc9
I	4.233	4.186	4.106	1.967	2.071	2.057	2.051	
IV	4.233	4.189	4.111	1.952	2.075	2.055	2.048	
V	4.235	4.189	4.108	1.910	2.081	2.057	2.052	1.171
VI	4.234	4.188	4.107	1.964	2.082	2.057	2.048	1.169
VII	4.236	4.191	4.108	1.910	2.081	2.055	2.053	1.170
VIII	4.237	4.193	4.107	2.003	2.087	2.056	2.049	1.189
IX	4.163	4.245	4.144	1.962	2.079	2.063	2.050	1.166 2.071
X	4.163	4.248	4.142	1.963	2.084	2.062	2.041	1.165 2.071
XI ^b						2.062	2.049	1.172 2.072
XII	4.166	4.250	4.140	1.909	2.084	2.061	2.041	1.164 2.070

a) These chemical shifts were pH-dependent, due to the neighboring imino group.

b) The ¹H NMR spectrum of this sugar chain was obtained with a mixture with the sugar chain of peak X.

bisecting GlcNAcとMan α 1-3 分枝のGlcNAcとが非常に隣接した位置に存在している。このbisecting GlcNAcからの立体障害のため、ガラクトシルトランスフェラーゼのMan α 1-3 分枝に対する活性が著しく低下したものと考えられる。この推測は、bisecting GlcNAcにガラクトシルトランスフェラーゼによりGalが導入されないことによっても支持される。また、Man α 1-8 分枝側に対する活性の低下も、この分枝のGlcNAcがGlcNAc2に近づいた位置に存在するためと予想される。

もう一つの原因は、bisecting GlcNAcを導入するN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIIの基質特異性に基づくものと考えられる。この糖転移酵素の基質特異性を図5(V)から(VIII)で示した4種類の糖鎖を受容体基質をして調べた結果、図5(V)で示した糖鎖が最もよい基質となり図5(VII)および(VIII)で示した糖鎖は、我々が用いた反応条件では基質とはなり得なかった。N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ

IIIがbisecting GlcNAcを導入する際には、基質である糖鎖のMan α 1-3 分枝とMan α 1-8 分枝とが図6に示した様に互いに広がった状態で反応部位に結合し、GlcNAcの導入を容易にしているものと予想される。この際、Man α 1-3 分枝の方が、この酵素との結合により必要であると考え、得られた結果を十分に説明することができる。すなわち、Man α 1-8 分枝にGalを有する糖鎖はこの酵素との結合に大きな影響を及ぼさないが、Man α 1-3 分枝にGalを有する糖鎖では、このGalが大きな立体障害となり酵素と結合できなくなるものと予想される。

以上の結果および考察から、bisecting GlcNAcを持たない糖鎖においては、Man α 1-3 分枝にGalを有するものがより多くの割合で存在し、bisecting GlcNAcを有する糖鎖においては逆にMan α 1-8 分枝にGalを有するものがより多くの割合で存在するのは、糖鎖合成過程におけるガラクトシルトランスフェラーゼおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIIが持つ基質特異性をよく反映したものである。

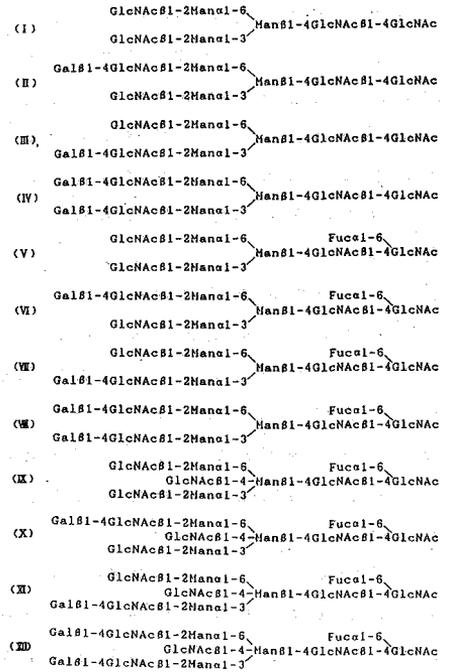


図5

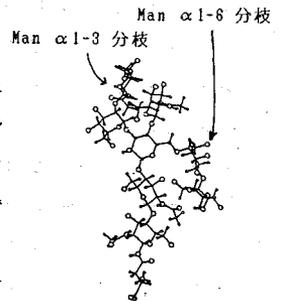


図6 図5 (IX)で示した糖鎖の模式図

[文献]

- 1) T. Mizouchi et al., J. Immunol. (1982) 129, 2016; N. Takahashi et al., Biochemistry (1987) 26, 1137
- 2) 藤井ら、生化学 (1987) 59, 834: 投稿中
- 3) S. Hase et al., J. Biochem. (1984) 95, 197

(京大・工) 森島 績 藤井 浩 城 宜嗣

NMR STUDIES OF UNUSUAL ELECTRONIC STRUCTURES OF METALLOPORPHYRIN

-RADICALS

Isao Morishima, Hiroshi Fujii and Yoshitsugu Shiro (Kyoto University)

We have studied the paramagnetic NMR of some metalloporphyrin π -radicals which afford broadened or no distinct ESR signals due to enhanced electron relaxation and exhibit the unbroadened hyperfine shifted NMR spectra. Experimentally, two different cases are distinguished for such radicals in which (a) the unpaired electrons of the metal and the porphyrin are more or less magnetically interacted and (b) the metal center is in a diamagnetic state but the π -radical orbitals (a_{1u} and a_{2u} for D_{4h} symmetry and a_2 and b_2 orbitals for C_{2v} symmetry) are nearly degenerate. Ru(II) and Co(III) porphyrin π -cation radicals are the typical examples of the case (b). Meso-oxyporphyrin π -neutral radical is also another example of the case (b). As an example of case (a) we have studied Fe(III)-chlorin π -cation radicals which afforded an extraordinarily large H shift of 650 ppm. Some implications of the electronic structures of these metalloporphyrin π -radicals are discussed in relation to their biological significance.

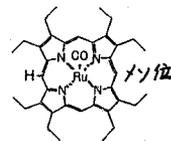
[序論] 我々は、 γ -ム蛋白質、 γ -ム酵素の重要な反応中間体のモデルとして金属ポルフィリン π ラジカル (π -カチオンラジカル, π -中性ラジカル, π -アニオンラジカル) の電子構造を主としてNMRを用いて解明してきた。すなわち、こゝで金属ポルフィリンラジカルの中で特異な電子構造をもつために、電子スピンの磁気緩和が著しく、ESRがブロード化し、NMRがミセープに観測し難い系に注目して、その常磁性NMRスペクトル(コントラスト)からこゝのラジカルの電子状態を明らかにしてきた。今回は今回他の討論会で報告したものを含めて、Ru^{II}ポルフィリン π -カチオンラジカル(中心金属は $S=0$)、Fe^{II}オキソプロリン π -中性ラジカル(中心鉄は $S=0$)ならびにFe^{III}クロリン π -カチオンラジカル(中心鉄 $S=5/2$ または $3/2$ の π -カチオンラジカル)の常磁性NMRによる特異な電子構造の解明の研究結果をまとめて発表する。

[本論]

(1) Ru(II)ポルフィリン π -カチオンラジカル

オクタエチルポルフィリン(OEP)ルテニウムカルボニル錯体を π -電子酸化したポルフィリン π -カチオンラジカル(P_0^+)は77Kでは $g=2.00$ の典型的なフリーラジカル

のESR吸収が観測されたのに対し、室温ではそのような吸収が観測されない。そこで、 $[\text{OEP} \text{Ru}^{\text{II}} \text{CO}] \text{PO}_4^+$ のプロトンNMRスペクトルを測定したところ、図1に示すように強磁性プロトンシフトが観測された。また、ポルフィリンの最高被占π軌道は図2に示すような電子分布をもつ a_{1u} , a_{2u} 軌道の二重がである。MgあるいはZn-ポルフィリン(OEP)の PO_4^+ はESRの超微細結合定数の観測



値から a_{1u} 軌道がラジカル軌道であると断定されている。本研究における $[\text{OEP} \text{Ru}^{\text{II}} \text{CO}] \text{PO}_4^+$ は、図1に示すメソ位のプロトンシフトが高温シフトである(すなわちメソ炭素πスピン密度は0.026の正值を有する)ことから a_{2u}

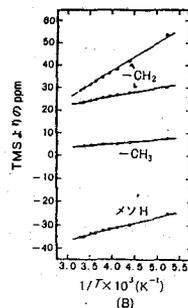
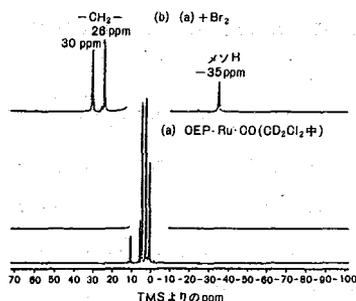
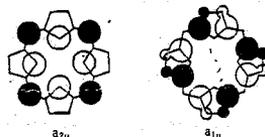


図1. OEP-Ru-CO(c)のポルフィリンメソ位カチオンラジカルの ^1H NMRスペクトル(A)とその温度依存性(B)⁶⁷⁾

ラジカル軌道を有する一見考えられるが、SCFによるMO計算値0.193に較べて著しく小さい。また、図1(B)のキュリープロットから、メソ位プロトンシフトはキュリー則に従っている。さらにこのラジカル。UV-visibleスペクトルは温度変化を示し、等吸収点を有する。これらのことを考え合わせると、 $[\text{OEP} \text{Ru}^{\text{II}} \text{CO}] \text{PO}_4^+$ は図3に示すように、 a_{1u} , a_{2u} 軌道が接近し(くた)2種のラジカル状態が熱的に混ざっていると考えられる。電子スピン密度分布の異なる2種のラジカルが熱的に混ざっているため、超微細結合定数がモジレートされ、電子スピンの緩和時間が短くなり、NMRシグナルが観測されなくなり解像される。このことは、パラ置換テトラフェニルポルフィリンのルテチウム錯体のπ-カチオンラジカルの結果(図4)からも支持される。この場合は a_{2u} 軌道がHOMOとなり置換基効果を受ける。p-アミノ置換体では a_{2u} , a_{1u} の両軌道のエネルギー差は右下に較べ大きく、もはや両ラジカルが熱的に混ざらない。従ってこのESRは室温でも観測され、NMRはブロードアウトしてしまう。



●と○は符号(+-)の相違を示している。ポルフィリンの二つの最高被占π軌道(a_{1u} 軌道と a_{2u} 軌道)のスピンドensity分布

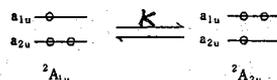


図3.

$[(p\text{-X})\text{TPP} \text{Ru} \text{CO}]^+$

	p-Cl	p-H	p-OCH ₃	p-N(C ₂ H ₅) ₂
Ev	0.95	0.82	0.78	0.50
ESR at r.t.	X	X	X	○
NMR(shift)	small	large	large	large
NMR(width)	sharp	sharp	wide	wide

図4. TPP-Ru-COのポルフィリンπ-カチオンラジカルの置換基効果

(2) メソヒドロキシポルフィリン(フロリン)鉄錯体

ポルフィリンのメソ位が水酸化されるメソヒドロキシポルフィリン錯体はハムメット状態中間体として従来から注目されてきたが、その極端に高い反磁性(O_2 に対して)が何に由来するかが不明であった。この化合物のESRスペクトルが77Kでは観測されるのに対し、室温では完全にブロードアウトしてしまう事に着目して、その常磁性NMRの測定を行ない、これよりその特異な電子構造の解明を試みた。脱気下で、鉄(III)ポルフィリン

(OEP)メソエステルを加水分解して1を得た。そのNMRスペクトルを図5に示す。

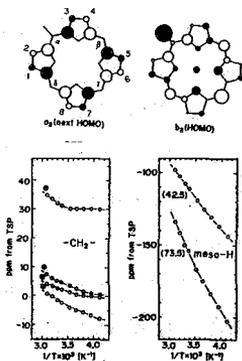
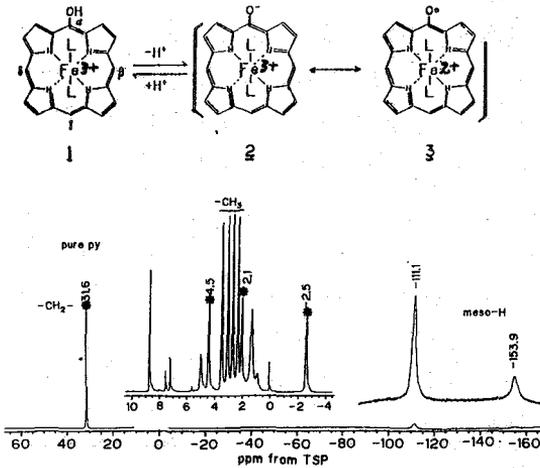


図5. メソヒドロキシOEP Fe³⁺ 錯体の¹H NMR スペクトル(ピリジン溶液)とその温度依存性

そのメソ位にアースペクトル磁化率の測定から、Fe³⁺錯体から去架したにもかかわらずFe²⁺, S=1/2の状態であった。図5のNMRスペクトルからメソ位の大きな常磁性シフトは鉄の常磁性ではなく、πラジカルスピンは基質と共有される。この結果より、上記のスキームに示すように、1は脱プロトン化したメソオキシアオンFe³⁺(2)となり、O⁻からFe³⁺への分子内電子移動によりFe²⁺(S=0)メソオキシラジカル(3)となる2.1.3と示唆される。一方図6に示すように、溶媒(配位子)を塩基性のピリジンから大きい2,4

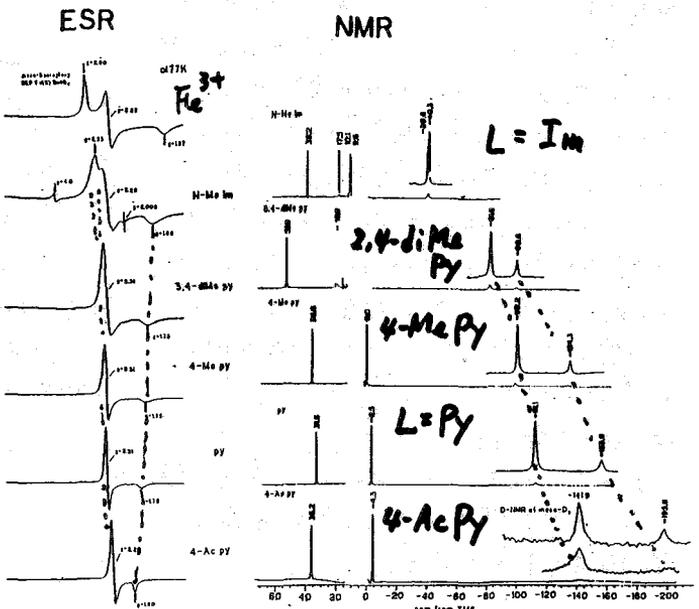
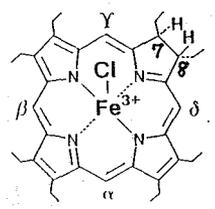


図6. メソヒドロキシOEP Fe³⁺(L)₂のNMR, ESRスペクトルに及ぼす配位子の効果。

ジメチルピリジン, ± 3 にイミダゾールへと変ると, π 位置プロトンの常磁性シフトは
 この順に従って小さくなり, 77K の ESR シグナルも非等方性・特徴が著しく, 鉄
 3価低スピン状態のシグナルに類似するように変化する。このことより, ± 3 は共鳴播
 造イ状態にあり, ± 1 が相対寄与は配位子によるコントロールによると考へられる。
 また ± 1 は $L = Im$ (イミダゾール) では ± 1 の寄与が, $L = py$ (ピリジン) では ± 3 の寄与
 である。したがって ± 3 の寄与が支配的である。したがって示すメチオキシホルマリン
 中性ラジカル性で存在することが, O_2 に対する高い反応性の要因と考へられている。事実 $L = Im$
 は O_2 への反応性は低く, 逆に $L = 4-Ac-py$ の場合は反応性は極めて高い。更に図5に示
 すように, ± 1 の常磁性 NMR シグナル ($-CH_2$) はキリー則に従わない。この事実も前節
 に述べた2種のラジカル状態 (A_2, b_2 軌道ラジカル) が熱的に混ざっているためと解釈さ
 れる。また同様の理由により中に鉄が $S=0$ の π ラジカルであるにもかかわらず NMR シ
 グナルがキリー則に観測されたと思われ。

(3) 鉄(III) クロリンπ-カチオンラジカル

ホルマリン環の一部が飽和されたクロリンを含むハム酸素ミエロ
 ペルオキシダーゼの酸化反応中間体のモデルとして, オクタエチルクロ
 リン鉄(III) ($OECFe(III)Cl$) の一電子酸化生成物であるπ-カチオン
 ラジカルの電子構造も常磁性 NMR を用いて研究した。



OECFe(III)Cl

このラジカルは中心鉄が常磁性であるため
 鉄上の電子スピンと π ラジカルスピンの相互
 作用により, ESR は観測されず, 図
 7に示すように, 2H NMR が観測された。
 7, 8 位の飽和炭素に結合した D の常磁性
 シフトは低磁場側 480 ppm に達し,
 A_2 ラジカル π 軌道の π スピン密度分布
 により合理的に説明される。また配位子
 イミダゾール (Im) から ClO_4^- に変ると
 中心鉄は $S=5/2$ となりラジカルスピン
 と ferromagnetic coupling し, 7, 8-D
 は低磁場 640 ppm にシフトした。
 いずれも A_2 ラジカルである。講演の際には
 これらの電子構造, 生化学的意義について
 議論する予定である。

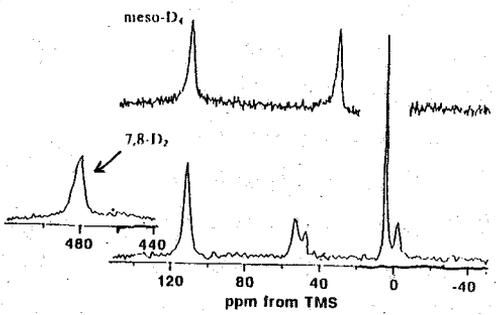
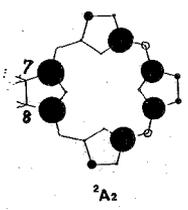


図7. 部分重水素化した $OECFe(III)Im_2$
 の π -カチオンラジカルの
 2H NMR スペクトル



(京大・工) ○山口 和也・藤井 浩・森島 績

An NMR Evidence for Metalloporphyrin π Anion Radical Character
 Kazuya YAMAGUCHI, Hiroshi FUJII and Isao MORISHIMA (Kyoto University)

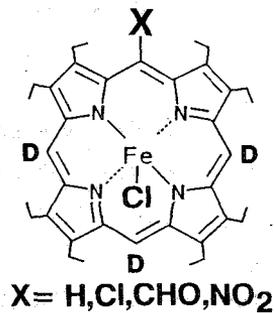
In order to solve the question of whether a redox reaction has occurred at the iron atom or at the porphyrin ring in highly reduced complexes, we studied the meso-substituted Octaethylporphyrin (OEP) by NMR spectroscopy. In the one electron reduction products of Iron(II) OEP and Iron(II) meso-Chloro OEP, the meso-deuterium resonances exhibited downfield hyperfine-shifts (15 ppm) and could be assigned to Iron(I) porphyrins. However, far hyperfine-shifts (30 ~ 210 ppm) were observed in singly reduced Iron(II) meso-Nitro OEP and Iron(II) meso-Formyl OEP. Such a large paramagnetic NMR shifts are attributable to resonance structures of Iron(I) porphyrin and Iron(II) porphyrin π anion radical.

1. はじめに ヘム蛋白質は、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリンを持っておりこれが活性の中心となっている。生体エネルギーを生成する一連の酸化還元反応の酵素であるチトクローム及びチトクロームオキシダーゼ、過酸化酸素を分解する酵素カタラーゼやペルオキシダーゼは、金属ポルフィリンが関与する重要な蛋白質であることが知られている。これらのヘム蛋白質の反応機構を理解する基礎として、高酸化状態または低原子価状態の鉄ポルフィリン錯体の電子構造を解明する必要がある。そこで我々は、これまで研究対象とされることの少なかった低原子価状態について取り扱った。この電子状態は、酸素の活性化反応やヘム蛋白質の還元機構に関して重要である。特に、鉄2価ポルフィリンを1電子還元した化合物は、鉄1価ポルフィリンか鉄2価ポルフィリンアニオンラジカルか、もしくはこれらの共鳴構造をとるのかが、議論の対象となっている。これらの電子状態は、ポルフィリンのメソ位の炭素上のスピン密度に、鋭敏に反映されることが示唆される。しかし、メソプロトンシグナルは、鉄やラジカルの常磁性の影響で広幅化して、¹H-NMRスペクトルでは、観測は、困難なことが多い。しかし、²H-NMRシグナルは¹H-NMRのものとは比べ線幅が減少し分解能が上がるということが知られている。これを

利用して、メソプロトンを重水素化したポルフィリンを合成し、その $^2\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、低原子価状態にある金属ポルフィリンの電子構造を明らかにした。

2. 実験 オクタエチルポルフィリン(OEP)のメソプロトンの重水素化は、Bonnettらの方法によった。OEPのメソ位にニトロ基、ホルミル基、クロル基を一つ導入したモノ置換体を合成した。合成方法は、文献に従った。

また、従来の方法で鉄をいれてメソ置換OEP鉄3価高スピン錯体を得た[図1]。これら化合物を乾燥テトラヒドロフラン(DRY THF)溶媒中でナトリウムミラー接触還元法(真空下)または、ナトリウム-アントラセン還元剤(アルゴン雰囲気下)で化学的還元を行い、目的の2



[図1]

電子還元生成物を得た。NMRスペクトルは、NICOLET NT-300を用いた。

シフト値は、TMS基準である。併せて、UV-VIS, ESR測定及び分子軌道計算も行い検討を加えた。

3. 結果と考察 a. 鉄1価ポルフィリン

鉄1価ポルフィリンの研究は、今日までにOEP鉄錯体、TPP(テトラフェニルポルフィリン)鉄錯体について、UV-VIS, NMR, ESR, ラマン等で報告されている。

OEP鉄錯体の還元生成物のメソプロトンの化学シフトは、14.7 ppm低磁場側に見られる[図2]。この生成物のESRスペクトルでは、 g 値が2.30と1.93を示し、中心金属の鉄が1価であることがわかる。

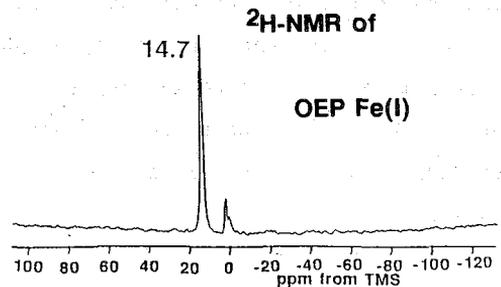
また、OEPのメソ位の一つをクロル基で置換したメソクロルOEP鉄錯体を測定した。

他のメソプロトンの常磁性シフトは、15.0 ppm低磁場側にみられ、無置換OEP錯

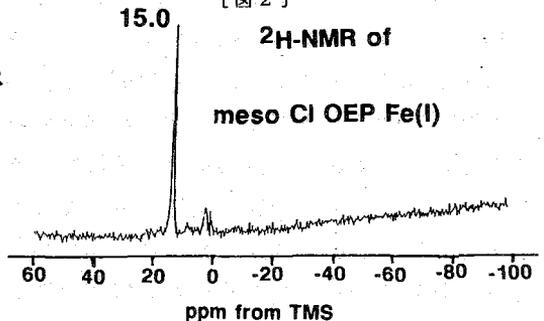
体と殆ど同じであった。ESRでも、 g 値が2.31と1.93を示し、これもまた無置換OEP錯体と同じであった[図3]。UV-VISスペクトルも類似を示した。

これらの結果よりメソクロルOEP鉄錯体の還元生成物は、鉄1価ポルフィリンであることが明かとなった。

b. 鉄2価ポルフィリン π アニオンラジカル アニオンラジカルの研究は、TPP亜鉛錯体のESRやTPP(CN)₄鉄錯体のラマン等が行われている。OEP亜鉛錯体の



[図2]



[図3]

1 電子還元生成物について ESR 測定をすると、通常の有機ラジカルのように $g = 2.001$ にシャープなシグナルが得られた。この生成物の NMR スペクトルは、測定したが観測されなかった。これは、電子スピンによる強い局所磁場のため大きくブロードしたためと思われる。OEP のメソ位をふたつニトロ基で置換したメソニトロ OEP 鉄錯体の還元生成物では、OEP 亜鉛錯体と同様に $g = 2.001$ の ESR スペクトルが得られ、NMR スペクトルは観測されなかった。また、UV-VIS スペクトルが、無置換 OEP 鉄錯体のものとは大きく異なり長波長側にブロードな吸収がみられることから、この鉄ポルフィリン錯体の還元生成物は、鉄 2 価ポルフィリン π アニオンラジカルであると思われる。

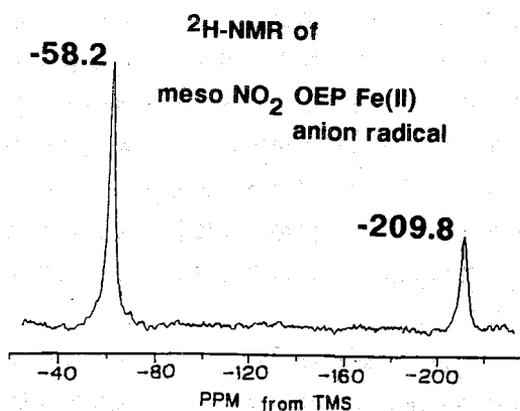
c. 共鳴構造をとるポルフィリン

上で挙げたふたつの他にこれら極限構造の共鳴状態にあるものも考えられる。

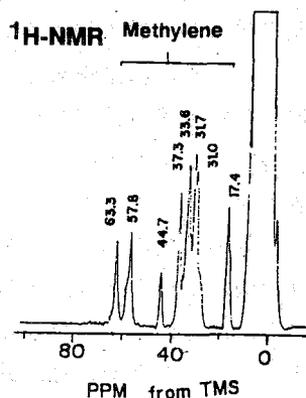
というのは、アニオンラジカルラジカルの分子軌道と鉄の d 電子のうちの d_{xz} , d_{yz} 軌道が共に同じ対称性 (e_g) を持つからである。これらの軌道のエネルギー準位が近くなり、混合するとラジカル電子は、非局在化するため、鉄 1 価ポルフィリンでもなく鉄 2 価ポルフィリン

π アニオンラジカルでもなくて、これらの共鳴構造をとることが考えられる。しかし、これまでその様な共鳴構造についての実験の報告はない。そこで、我々は OEP のメソ位にニトロ基をひとつ導入したメソニトロ OEP 鉄錯体について検討した。この還元生成物のメソプロトンの NMR スペクトルは、 -58.2 と -209.8 ppm という異常に大きな高磁場シフトを示した [図 4]。このシフト大きさは、単なる鉄の常磁性の影響だけでは説明できない程大きいものである。この様に大きな常磁性シフトは、ポルフィリンカチオンラジカルやニュートラルラジカルなどではみられる。よって、これはポルフィリンの π ラジカル性によるものであると考えられる。

実際に、分子軌道法 (CNDO/2-UHF) によってメソ位の炭素のスピンドensityを求め、それを McConnell の関係式に代入してシフトの大きさを見積るとおよそ 200 ppm となり測定値とよい一致を示している。また、メチレンプロトンを $^1\text{H-NMR}$ で測定すると 17.4 ~ 63.3 ppm という比較的大きな低磁場シフトを示した [図 5]。これもまた分子軌道計算から見積ることができる。このシグナルの本数から中心金属である鉄は、5 配位構造をと



[図 4]



[図 5]

っていることもあわせてわかる。さらに、NMRのエバンス法により磁化率を測定すると $\mu_{eff} = 5.8 \mu_B$ となり、スピン $S = 5/2$ であることがわかった。ESRでは、上述の二つの極限構造のいずれのものとも異なり、 $g = 5.63, 2.00$ という非常に大きな異方性を示すスペクトルが得られた。これは、純粋なラジカルでは説明できない。UV-VISスペクトルでは、ラジカルのものでよく似ていて長波長側に大きなブロードな吸収が現れる。これらの結果から、メソニトロOEP鉄錯体の還元生成物は、鉄1価ポルフィリンと鉄2価ポルフィリン π アニオンラジカルとの共鳴構造をとっていることがわかる。その共鳴は、 π アニオンラジカル性の性質が強い。また、OEPのメソ位にホルミル基をひとつ導入したメソホルミルOEP鉄錯体の還元生成物について検討した。

このメソプロトンのNMRシグナルは、 $-30 \sim -40$ ppm高磁場にみられた。ラジカル性のもののシフト値が -200 ppmで、鉄1価のものシフト値は 15 ppmを考慮すると、この生成物はちょうど中間の共鳴構造をとっている可能性があるが、あるいは、まったく別の反応が起こって何か他の化合物になっているとも考えられる。このESRスペクトルは、有機ラジカルのもと同じで $g = 2.001$ を与える。UV-VISスペクトルでは、他のメソ置換体とは異なるようにみられるパターンを示している。従って、このメソホルミルOEP鉄錯体の還元生成物については更に詳細な検討をしなければならない。

d. 総括 鉄2価ポルフィリンを1電子還元した生成物の電子構造について、主に 2H -NMRを用いて議論した。メソ位に電子吸引力の異なる各種の置換基を導入したOEP鉄錯体を合成し、メソプロトンの常磁性シフトを測定することによって、その還元生成物の電子構造が、鉄1価かアニオンラジカルかまたはこれらの共鳴構造をとるかを決定できた。これらの結果をまとめたものが、表1である。これを見ると、メソ位に導入する置換基の電子吸引力が強いほど、鉄1価からアニオンラジカルへと移っていくことが、NMRの常磁性シフトの大きさを見積ることによって分かる。即ち、鉄1価のとき小さな低磁場シフトしていたのに対し、電子吸引力基を導入すると、中心金属の鉄に比べポルフィリン環の軌道の準位が下がり鉄とポルフィリンの軌道が混ざり共鳴構造をとり、ポルフィリン環にラジカル性が生じ、大きな高磁場シフトがみられるようになる。以上の結果から、NMRシグナルは、純粋なラジカルでは観測困難であるが、メソニトロOEP鉄錯体のように非常にラジカル性の強いものでも共鳴構造をとっているため観測可能となっていると思われる。このように特殊な場合ではあるが、ラジカル種の共鳴構造を研究するうえで、NMRは有用な知見を与えてくれることが本研究から期待される。

表 1

	メソプロトン(ppm)	電子構造
OEP Fe	14.7	Fe(I) PORPHYRIN
meso Cl OEP Fe	15.0	Fe(I) PORPHYRIN
meso CHO OEP Fe	-30, -40	-----
meso NO ₂ OEP Fe	-58.2, -209.6	RESONANCE(ANION RADICAL)
meso (NO ₂) ₂ OEP Fe	NOT	Fe(II) ANION RADICAL
OEP Zn	NOT	Fe(II) ANION RADICAL

遺伝子操作によるアミノ酸置換変異ヘモグロビンのNMRと
その高次構造

(京大工・阪大医・阪大基礎工・MRC分子生物研)

○石森 浩一郎・森島 績・今井 清博・伏谷 建造・宮崎 源太郎

D. Shih^{***}・J. Tame^{***}・K. Nagai^{***}

NMR Study of Human Mutant Hemoglobins Synthesized in
Escherichia coli

K. ISHIMORI^{*}, I. MORISHIMA^{*}, K. IMAI^{**}, K. FUSHITANI^{**},

G. MIYAZAKI^{**}, D. SHIH^{***}, J. TAME^{***} and K. NAGAI^{***}

(^{*}Kyoto University, ^{**}Osaka University, ^{***}MRC Laboratory of
Molecular Biology)

Two artificial human mutant hemoglobins in which a key amino acid residue, $\alpha 42(C7)$ tyrosine, was substituted for phenylalanine or histidine were synthesized in Escherichia coli. Since the hydroxy group of $\alpha 42$ tyrosine is bonded to the carboxylate of $\beta 99$ Asp in the deoxygenated state, the effect of these mutations of the hydrogen bond on the structure and function could be examined by NMR spectra and oxygen equilibrium curve. We found that the formation of the specific hydrogen bond between α and β subunit are critical for the structure and function of human hemoglobin.

[序論] ヘモグロビン(Hb)は、生体内での酸素運搬体として重要な役割を果たしており、特に、その酸素化過程における協同的な酸素結合は、代表的な酵素のアロステリック効果として興味深い。そのアロステリック効果の分子論的メカニズムの解明のためには、どのようなアミノ酸残基がどのような構造的、機能的役割を持っているのかを詳細に検討することが必要である。Hbには幸いにも、600種を超えるアミノ酸の置換等を有する天然の変異体(異常Hb)が報告されており、そのうちのいくつかについては、詳細な構造的、機能的異常が明らかになっている。しかし、研究上、重要と考えられる変異が必ずしも存在しているわけではなく、また、今後そのような変異体が出現するという保証もない。そこで、近年発達してきた遺伝子操作の手法を応用し、天然にない蛋白質を大腸菌の蛋白質合成系を用いて発現させ、自由にアミノ酸置換した蛋白質を得ることが試みられてきたが、NMR測定のように比較的試料を大量に必要とする測定手法には応用が困難であった。しかし、今回、Nagaiらの開発した効率のよい発現系¹を用いることによって、人工

的にアミノ酸置換したHbのNMRを初めて測定することに成功したのでここに報告する。

〔材料と方法〕 アミノ酸の置換位置としては、Hbの高次構造や機能の維持に対して大きな役割を持っていると考えられるにもかかわらず、現在まで、天然にその置換体が報告されていない $\alpha 42$ Tyrを選んだ。このTyrは $\alpha_1\beta_2$ 界面に存在し、天然のHbAではデオキシ状態(「T」状態)のときに $\beta_2 99$ Aspとの間に水素結合を形成し、そのNMRシグナルは「T」マーカーシグナルとして、NMRによる高次構造解析のための重要なシグナルの一つとして利用されている。このTyrの位置に、Tyrと比較的立体障害のよく似てはいるものの、水酸基がないために水素結合できないと予想されるPheやHisを導入し、Nagaiらの開発した発現ベクターpLcIFXglobinを用いて、大腸菌内で置換グロビン鎖を発現させた。置換グロビン鎖の精製は既報¹に従い、アミノ酸置換はDNAの配列と発現したグロビンのマスペクトルから確認した。

〔結果と考察〕 1. アミノ酸置換HbのNMRスペクトル 図1A,BにHb($\alpha 42$ Tyr→Phe)、Hb($\alpha 42$ Tyr→His)、HbAのO₂体、CO体のNMRスペクトルを示す。天然のHbAでは、水より低磁場側に $\alpha_1\beta_1$ 界面の水素結合に由来する2個のシグナル(7.4ppm, 8.3ppm)とO₂体では5.8ppm、CO体では5.9ppmに「R」状態特有の水素結合($\alpha_1 94$ Asp- $\beta_2 102$ Asp)に由来するシグナルが観測され、その高次構造が「R」状態であることを示している。一方、高磁場側には、ヘムの環電流によって高磁場シフトしたシグナルが観測され、これらのシグナルのうち、O₂体で-7.2ppm、CO体で-6.6ppmに観測されるシグナルは、ヘムポケットの遠位His側にあるValE11の γ_1 -メチル基と帰属されている。

Hb($\alpha 42$ Tyr→Phe)O₂体の場合、5.8ppmに「R」状態特有のシグナル、-7.2ppmにValE11のシグナルが観測され、その高次構造は天然HbO₂体とほぼ同じであることを示している。CO体の場合にも、5.9ppmに肩が観測され、これが「R」マーカーと考えられる。高磁場側の-6.7ppmのシグナルは、わずかに分離しているが、これは α サブユニットと β サブ

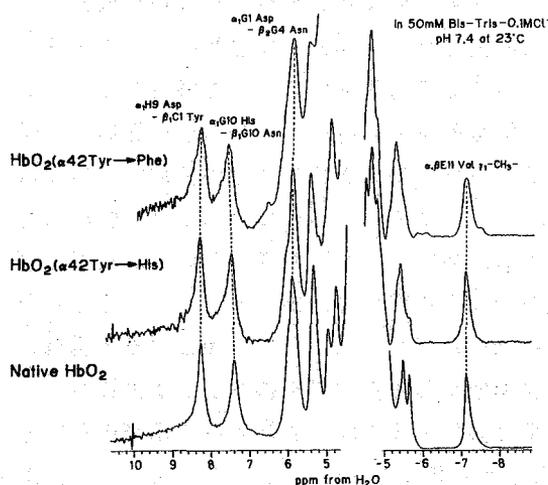


図1A O₂体のNMRスペクトル

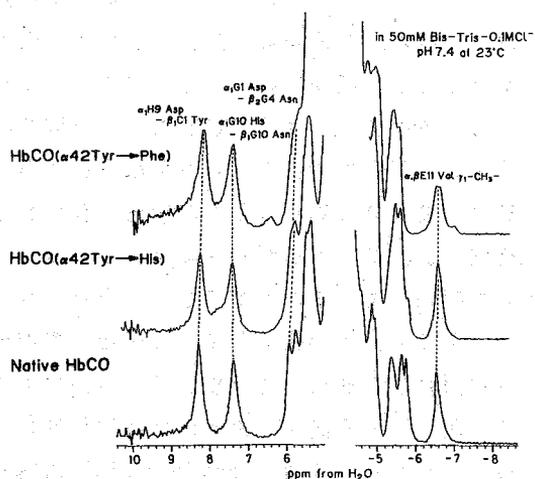


図1B CO体のNMRスペクトル

ブユニットのValE11のメチル基が分離してきたものと思われ、CO体の場合も局所的な構造変化は認められるものの、その高次構造としてはほぼ天然Hbと一致するものと考えられる。Hb($\alpha 42\text{Tyr} \rightarrow \text{His}$)の場合でも、特徴的なシグナルパターンは天然の場合と一致しており、O₂体、CO体とも天然Hbとよく似た高次構造をとっているということがわかった。つまり、 $\alpha 42\text{Tyr}$ のPheやHisへの置換はヘム鉄に配位子が結合した「R」状態ではその高次構造に大きな影響を与えないことを示している。

一方、ヘム鉄から配位子が解離し、デオキシ状態のNMRスペクトルを図2に示す。天然HbAの場合、鉄の常磁性により、水から72ppm、60ppmにそれぞれ近位HisのN₁Hシグナルが、5から20ppmにはヘムに結合したメチル基のシグナルが観測される。また、水から5から10ppmにはO₂体と同様、サブユニット界面に存在する水素結合のシグナルが観測されるが、9.4ppmと6.4ppmのシグナルは、「T」状態特有のシグナルで、「T」マーカーシグナルとよばれている。特に、9.4ppmのシグナルは、 $\alpha 142\text{Tyr}$ と $\beta 299\text{Asp}$ の水素結合に由来しており、この水素結合は「T」状態の高次構造維持のため重要な役割を果たしていることがX線構造解析の結果などから示唆されている。

この $\alpha 42\text{Tyr}$ をPheに置換したHb($\alpha 42\text{Tyr} \rightarrow \text{Phe}$)では9.4ppmのシグナルが完全に消失しており、アミノ酸置換が完全に起こっていることと共に、シグナルの最終的な帰属が証明できたことを示している。更に、この水素結合の消失は、単にそのNMRシグナルの消失だけではなく、常磁性シフトしたNMRのスペクトルパターンも大きく変化させた。まず、近位Hisのシグナルは、天然のHbAに比べ、 α サブユニット、 β サブユニットともに大きく低磁場側へのシフトを示している。このことは、鉄の対電子がHisのイミダゾール環に伝わり易くなったことを示しており、鉄-Hisの結合が「T」状態のHbAのように歪がかかっているのではなく、歪がかかっていない「R」状態に近いと考えられる。ヘムメチル基のスペクトルパターンも天然のHbAとは異なって、デオキシ状態でも「R」状態しかとれない化学修飾Hbの場合に類似している。以上の結果はHb($\alpha 42\text{Tyr} \rightarrow \text{Phe}$)では、酸素が解離し、デオキシ状態となっても $\alpha 142\text{Tyr}$ - $\beta 299\text{Asp}$ の水素結合が形成されないため通常の高次構造、「T」状態をとることができないものと解釈できる。しかし、「R」状態

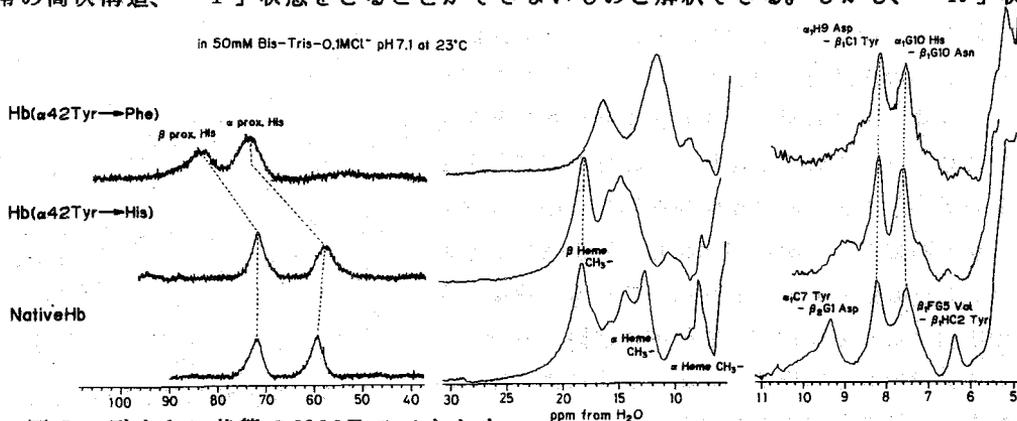


図2 デオキシ状態のNMRスペクトル

特有の水素結合に由来するNMRシグナル(5.8ppm)も観測されていないことから、配位子が解離することによって「R」状態からある程度高次構造変化が誘起されるものの、「T」というよりは「R」状態に近いままで固定されているものと考えられる。

もう一つのアミノ酸置換Hbである、TyrがHisに置換したHb($\alpha 42\text{Tyr}\rightarrow\text{His}$)では、アミノ酸が完全に置換されているにもかかわらず、9ppm付近に交換性のシグナルが観測された。これは、Tyrの水酸基の代わりにHisのNHを用いて、 β サブユニットの99Aspとある程度水素結合が形成されていることを示している。更に注目すべきことは、常磁性シフトしたNMRシグナルのパターンはHb($\alpha 42\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$)とは異なり、天然HbAのものとはほぼ一致したことである。これは、 $\alpha_1\text{His}$ と $\beta_2\text{Asp}$ との間に水素結合ができることによって、近位Hisやヘムメチル基周辺の高次構造が「T」に近い状態へと構造変化を起こしたものと考えられる。つまり、立体障害が多少異なっても、サブユニット間の特定の位置に水素結合さえあればある程度「T」状態は安定化するものと結論できる。

2. アミノ酸置換Hbの酸素親和性 Hb($\alpha 42\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$)、Hb($\alpha 42\text{Tyr}\rightarrow\text{His}$)、天然HbAの酸素親和性を図3に示した。いずれのアミノ酸置換Hbも天然HbAより高い親和性を示し、協同性を示すHill定数もほぼ1であった。この結果は、このアミノ酸置換Hbの機能が「R」状態ではほぼ固定されていることを示しており、NMRによる高次構造の結果と一致している。他方、Hb($\alpha 42\text{Tyr}\rightarrow\text{His}$)の酸素親和性はそれほど高くなく、またHill定数

も1より大きく、協同的な酸素結合が認められた。これは、配位子結合によるアロステリック効果が存在することを示しており、酸素の結合によって、高次構造や機能が変化することを意味している。NMRからみた高次構造も、デオキシ状態で「T」に近い状態に変化することが前項で明らかであり、この場合も構造変化と機能変化を対応づけることができる。

以上、本研究の結果から、サブユニット界面のわずか1個の水素結合の有無によって、Hbの高次構造、機能いずれもが大きな変化を受けることが明らかとなった。このことはHbにおける安定な「T」状態の形成、つまり高い協同性発現のためにはサブユニット間の特定の場所が水素結合によって固定されることが必要であることを示している。今後、従来の研究によって構造的、機能的に重要とされているアミノ酸残基を本研究と同様な手法によってその意義を的確に評価できるものと考えられる。

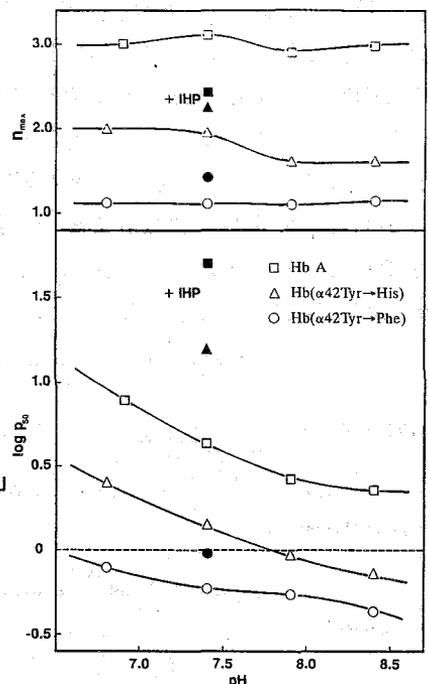


図3 酸素親和性とHill定数

(東工大工) ○山本 泰彦、井上 義夫、中條 利一郎

INTERSUBUNIT INTERACTION IN HEMOGLOBIN A: INFLUENCE OF SUBUNIT ASSOCIATION ON THE SPIN EQUILIBRIUM OF MET-AZIDO HEMOGLOBIN A

Yasuhiko YAMAMOTO, Yoshio INOUE, Riichirō CHŪJŌ

(Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology)

^1H NMR analyses of the influence of the subunit association, $2\alpha + 2\beta \rightarrow \alpha_2\beta_2$, on the low spin \rightleftharpoons high spin equilibrium of the individual subunits of paramagnetic met-azido hemoglobin A have demonstrated that the formation of the intersubunit contacts leads to a decrease and increase in the amount of high spin characters for the α and β chains, respectively, leaving the average position of the spin equilibrium approximately maintained during the association. The observed shift in the spin equilibrium dictates small strengthening and substantial weakening of the axial His F8 - heme iron bond in the α and β chains, respectively, upon forming the tetramer. Thus the incorporation of the α and β chains into the tetramer tends to equalize the structural property of their cavities as well as their heme magnetic/electronic properties.

常磁性ヘムタンパク質のNMRスペクトルで、タンパク質のシグナルからは分離して観測される超微細シフトしたシグナルは、ヘムタンパク質の活性中心部位であるヘム(図1)及びヘムキャビティの分子構造・電子構造変化に対して非常に敏感である。したがって、ヘムタンパク質の構造と機能との関係を研究するために広く用いられてきた。今回は、ヒト正常ヘモグロビン(Hb A)のサブユニット間の接触が、それぞれのサブユニットの活性中心部位の分子構造・電子構造に対してどのような影響を与えるかを ^1H -NMRにより解析した結果を報告する。

Hb Aは、 α 、 β サブユニットそれぞれ2コが集合して形成された四量体(分子量約64000)として存在している。 α 鎖及び β 鎖の活性部位の構造(図2)は、基本的にはHb Aのサブユニットとして存在してい

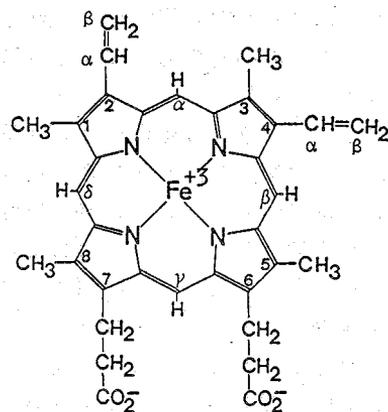


図1:ヘムの分子構造。

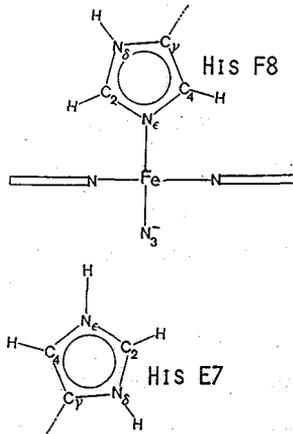


図2：メトアジド体ヘムタンパク質のヘムと近傍に存在する遠位ヒスチジン (His E7) と近位ヒスチジン (His F8) のイミダゾール環の位置関係。

る状態とはほぼ同様であるが、四量体形成、 2α 鎖+ 2β 鎖- $\alpha_2\beta_2$ (Hb A)、によって初めて、酸素を肺から末端組織へ効率的に運搬するために必要な協同的酸素結合性が発現すると同時に自らの酸素親和性は著しく減少する。そこで、Hb Aのサブユニット間の接触が、それぞれのサブユニットの活性部位に与える影響を解析するために、Hb Aのサブユニットを単離してヘム鉄(酸化数+3の状態)にアジドイオン(N_3^-)が結合した状態(メトアジド体)で ^1H-NMR を測定し、そして解析した。それらのNMRスペクトルをHb Aのもの、 H_2O (約20% D_2O を含む)と D_2O 中でそれぞれ比較したものを図3に示した。まず、 H_2O 中メトアジドHb Aのスペクトルで14ppmより低磁場側にヘムのメチルプロトンに由来する6本のシグナル($A_i, B_i, i=1, 5, 8$)、 A_i, B_i は、それぞれHb Aの α と β サブユニットを示し、数字はヘムのメチル

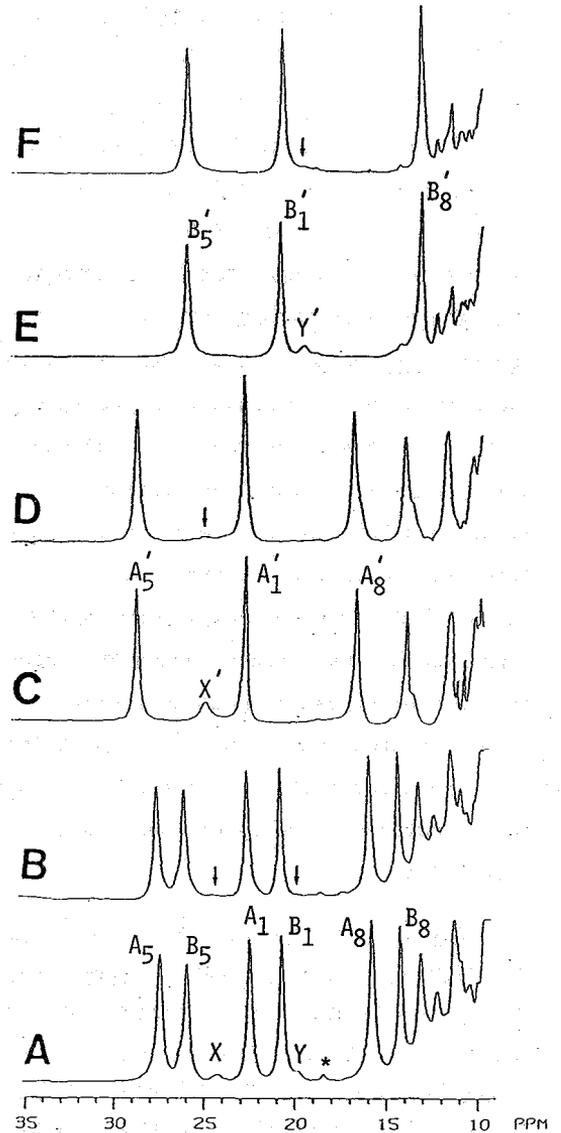


図3：メトアジド体の ^1H-NMR スペクトルで観測される低磁場に超微細シフトしたシグナル (pH7.2, 35°C)。 (A) Hb A in H_2O , (B) Hb A in D_2O , (C) α 鎖 in H_2O , (D) α 鎖 in D_2O , (E) β 鎖 in H_2O , (F) β 鎖 in D_2O 。 D_2O 中サンプルのスペクトルで完全に消失したシグナルを↓で示した。溶媒の水と交換可能なプロトンに由来するシグナルX、Yは、それぞれ α 、 β サブユニットのHis F8 $N_\epsilon H$ プロトンに帰属され、単離された α 鎖、 β 鎖のスペクトル(CとE)ではXとYに対応する。

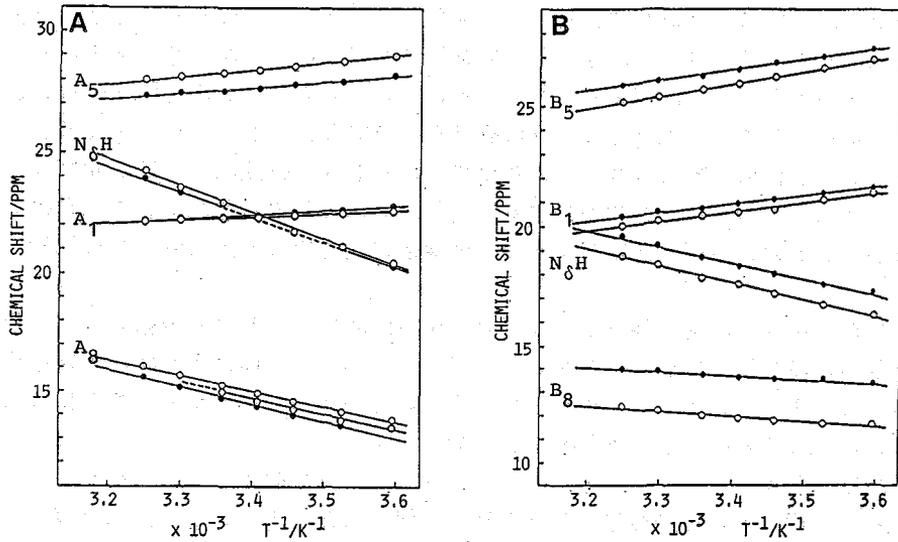


図4：ヘムメチルとHis F8 $N_{\delta}H$ プロトンシグナルのCurieプロット（ケミカルシフト値 V.S. 温度の逆数）。 α ・ β 鎖とHb Aの α ・ β サブユニットの状態それぞれに対応するシグナルについてCurieプロットを比較した。○と●は、単離鎖の状態とHb Aのサブユニットの状態のデータを示す。 α 鎖の8-メチルプロトンのシグナルは2本に分裂する。

基の番号（図1）を示す。なお、シグナル帰属は、メチルプロトンの特異的にD核でラベルしたヘムとアポタンパク質との再構成により得られたHbのスペクトルを用いて行った¹。）とシングルプロトン以下の強度を持つシグナルX、Y、*が、観測される。ここで、X、Yは、溶媒のプロトンと交換可能なプロトンシグナルであることは、Bに示した D_2O 中のスペクトルからそれらのシグナルが完全に消失していることからわかる。なお、スペクトルAでのXとYのシグナルの強度が、シングルプロトン以下なのは、溶媒として約20%含まれる D_2O の影響と共にNMR測定時に H_2O のシグナルをホモゲート法で照射したことに起因する飽和移動のためである。また、*で示されたシグナルは β サブユニットのヘムが、

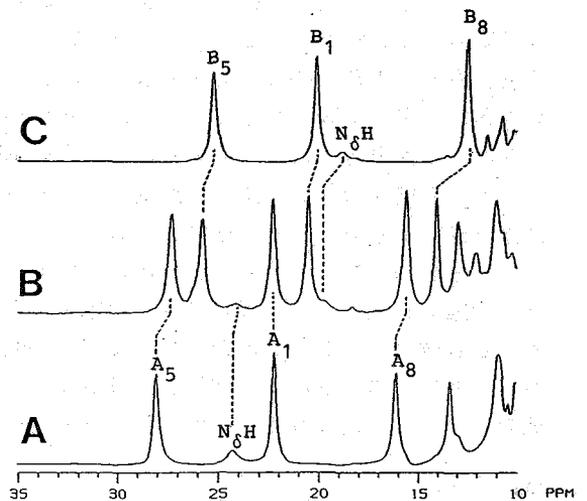


図5： α 鎖（A）、Hb A（B）、 β 鎖（C）の 1H -NMRスペクトル（pH7.2, 35°C）。単離鎖の状態とHb Aのサブユニットの状態のスペクトルで対応するシグナルを破線で示した。

まわりのタンパク質部分に対して、 α 、 γ -メソプロトンの軸に関してX線結晶解析より示された配向と比べて180°回転した配向を持つヘムの4-ビニル基の α プロトンに由来するシグナルである²。Hb Aより単離した α 鎖と β 鎖のスペクトル(図3のCD、EFにそれぞれ示す。)にも、それぞれ1つの化学交換可能なプロトンシグナル(X、Y)が観測され、シフト値の比較よりX、Yの各サブユニットへの帰属は、Xは α サブユニットYは β サブユニットのプロトンに由来するシグナルであると帰属される。これらのプロトンは、そのシフト値、線幅、及びシフト値の温度依存性(図4)から考えてHisF8 N_εHに帰属できる。

また、アジドイオンの配位場はそれほど強くないために、メトアジド体のスピン状態は低スピン状態と高スピン状態間でのスピン平衡として存在し、両スピン状態の存在比は温度に依存する。そのことは、図4に示したようにいくつかのシグナルのシフト値の温度依存性がCurie 則に従わないという現象に表れている。

次に単離された α 鎖、 β 鎖のシグナルのシフト値をHb Aでの対応するシグナルのものと比較してみた(図5)。その結果、単離された α 鎖のシグナルは、それぞれHb Aでの対応するシグナルに対して低磁場シフトしていることがわかる。一方、 β 鎖の場合は逆に、単離された状態のものは、Hb Aでの対応するシグナルより全体的に高磁場シフトしている。これらのシグナルの全体的なシフトは、 α 鎖、 β 鎖のヘムのスピン平衡が四量体形成によりどちらかのスピン状態(高スピン状態か、あるいは低スピン状態)の方にずれた結果であると考えることができる。根矢と船崎³によって決定されたメトアジド体Hb Aの各サブユニットのヘムのスピン平衡に関するパラメーターを用いると、四量体形成により高スピン状態の量は、 α 鎖では約2%減少し、 β 鎖では逆に約10%増加すると計算される。ヘム錯体のスピン状態は、配位子により2組の軌道群に分れるヘム鉄のd軌道の分裂(配位子場分裂)の大きさによって決まる。ヘムタンパク質のヘムで、ヘム鉄の配位子場分裂の大きさを制御する因子としては、ヘム鉄とHisF8 N_εとの結合の強さの程度の変化が考えられ、今回観測された四量体形成による両単離鎖のスピン平衡のシフトは、直接的に、Fe-N_εの結合の強さに関して解釈することができる。つまり、 α 鎖のFe-N_ε結合は四量体形成により僅かに強くなり、反対に β 鎖での結合は弱くなったと推測される。また、スピン平衡のシフトの方向が、 α 鎖と β 鎖で、逆方向であることから四量体形成は、単離鎖の状態で存在していた両鎖のヘムの電子構造及びヘムキャビティーの分子構造の差を減少させる結果になる。したがって、 α 鎖・ β 鎖活性部位の分子構造は、四量体形成により生じるサブユニット間相互作用により変化し、その結果として単離鎖とサブユニットの機能の差が、うみだされっていると推測される。

REFERENCES

- 1) G.N.La Mar, T.Jue, K.Nagai, K.M.Smith, Y.Yamamoto, R.J.Kauten, V.Thanabal, K.C.Langry, R.K.Pandey, and H.-K.Leung, *Biochim.Biophys.Acta* 952, 131-141(1988).
- 2) Y.Yamamoto and G.N.La Mar, *Biochemistry* 25, 5288-5297(1986); G.N.La Mar, Y.Yamamoto, T.Jue, K.M.Smith, and R.K.Pandey, *Biochemistry* 24, 3826-3831(1985).
- 3) S.Neya and N.Funasaki, *Biochemistry* 25, 1221-1226(1986).

(京薬科大)〇根矢 三郎・舟崎 紀昭

Proton NMR Study of the Myoglobin Reconstituted with Etiohemin.

〇Saburo Neya and Noriaki Funasaki (Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina, Kyoto 607)

Sperm whale myoglobin was reconstituted with a synthetic hemin, etiohemin. Incorporation of the hemin into the heme pocket was confirmed with the electronic absorption and proton NMR spectra. The NMR spectra show that all of the four heme-methyl peaks are observed in the paramagnetic region with much smaller heme-methyl spread as compared with that of natural myoglobin. The results indicate that in-plane magnetic anisotropy is much reduced in the reconstituted myoglobin. The decreased magnetic anisotropy was interpreted as arising from the equivalence of the four pyrrole rings of etiohemin.

天然のハムたんぱく質は補欠分子族としてプロトハムをもつことが多い。ハムとグロビンとの相互作用が機能発現に深く係わる事から、プロトハムを除去し別種ハムにてたんぱく質を再構成してハム-グロビン相互作用が如何に変わって来た。今回、私達がミオグロビン(Mb)と再構成を試みたエチオハミン(図1)は化学合成で得られるが、このハミンによる再構成および構造研究はあまり例がない。

エチオハムがハムポケットに入るに際して、ウラ-オモチの入れ違いが起るのか、またエチオハム含有Mbの配位環境はどうなっているのか?といった事が不明である。エチオハムにはメチル基が4個あり、¹H-N

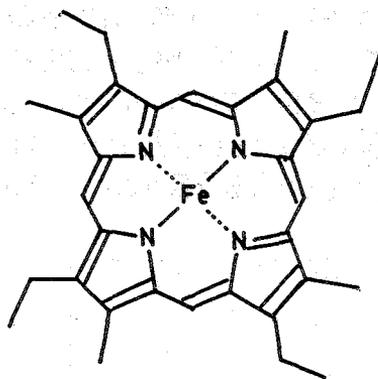


図1 エチオI型ハミン。4つのハムメチル基をもつのが特徴的。可能な4種の異性体(I~IV)のうちの一つ。

MRスペクトルではピーク強度が大きく同定もしやすい。このためにハムメチルピークは再構成Mbの構造を調べるうえで良いプローブとなる。私達はハムメチルピークに注目し、エチオハムを含むMbの構造を調べた。

[材料と方法]

エチオハムは従来法にて合成し、ジメチルホルムアミド中で $FeCl_2$ 共存下で還流し鉄錯体とした。エチオハミンとアポMbとの結合は文献にしたがった。 ^1H-NMR スペクトルはVarian XL-300分光器(300 MHz)で得た。化学シフトの基準物質には2,2-ジメチル-2-シラパンタン-5-スルホン酸ナトリウム(DSS)を用いた。UV-visibleスペクトルはShimadzu MPS-2000分光光度計にて記録した。

[結果]

ミオグロビンの再構成——アポMbとエチオハミンとの分光滴定により両者の1:1結合を正確に求めた。カラムクロマトグラフィにより精製したサンプルの紫外-可視吸収スペクトルで、たんぱく質由来の280nmピークとハムに基づく393nm吸収の吸光度比 A_{393nm}/A_{280nm} は6.2以上と大きく、サンプルによる変動も無い。この結果から、精製サンプルの純度が良好であると判る。エチオハミン含有Mbの可視吸収スペクトルは酸化型たんぱく質の場合pH(7-10)に依存して大きく変わり、等吸収点486, 509nmなどをもつ。この変化は $pK_a \approx 8.4$ で説明ができた。酸化型たんぱく質(Feが3価となっている)は CN^- , N_3^- などのイオン性配位子と結合する。その結合定数は天然Mbでの値と同程度である。強い配位力をもつ CN^- を大過剰に加えても2分子目の CN^- 結合はみられずエチオハム含有Mbでの配位構造は天

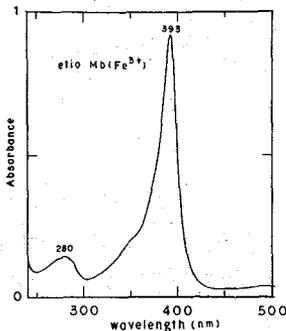


図2 再構成したミオグロビンのUV-可視吸収スペクトル。

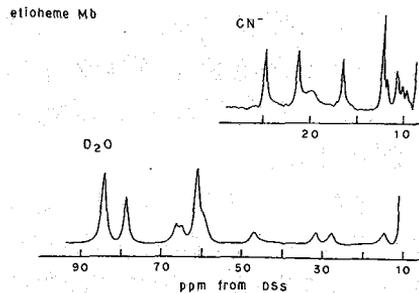


図3 エチオハム含有Mbの ^1H-NMR スペクトル

然Mbのプロトラムと同様であると思われる。

¹H-NMRスペクトル —— 八ム鉄が2個の還元型デオキシMbの¹H-NMRスペクトルをみると79 ppm 近傍に1個のみの交換性プロトンが観られ、八ム鉄ヒアホたんぱく質との相互作用がランダムではなく特異的であることを示している。八ム鉄が3個の酸化型 Mb⁺の高スピン(S=5/2)型錯体(Fe₂Oが配位すると思われる)のNMRスペクトルでは八ムメチル基が83, 83, 77 and 60 ppmに存在する。低スピン(S=1/2)型錯体であるCN⁻結合同型Mbでは4本の八ムメチルピークが25-12 ppmにかけて見られる(図3)。低スピン型Mbでの結果は天然Mbと比べて対象的であり、天然Mb⁺・CN⁻では八ムメチル基の1つは反磁性領域にかくれて見えないことが多い。エチオラム含有Mb⁺・CN⁻での結果は八ムメチル基の広がり小さい事を示し、八ム平面よでのスピン密度分布の差異が4つのピロール環上で減少していると考えられる。同様な結果はMb⁺・Fe₂Oでも認められ、4つの八ムメチル基の広がり(〜23 ppm)は天然Mb⁺・Fe₂Oと比べて約半分である。

スピン平衡解析 —— 酸化型Mb⁺のアジド(N₃)錯体で八ム鉄は高スピンと低スピン状態の磁気的平衡系(S=5/2 ⇌ 1/2)であることが知られている。この平衡の位置は八ム鉄に配位した近位ヒスチジン(His F8)の配位カをもとに反映している。私達はエチオラムを含むMb⁺・N₃⁻のFe-N(His F8)結合について知るためにスピン平衡解析を試みた。スピン平衡の存在は¹H-NMRスペクトルでは八ムメチルピークの異常な温度依

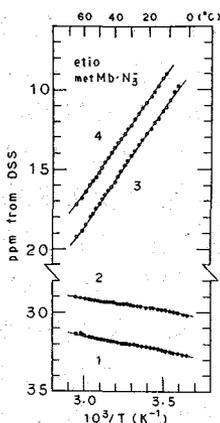


図4 エチオラム含有の酸化型Mb⁺・N₃⁻の八ムメチルピークの温度依存性。

存性となって反映される。図4では、八ムメチルピーク3と4のCurieプロットの傾きが、期待されるものどちか正の値となっている。またピーク1と2の温度依存性も異常に小さい。これらの結果は高温での高スピン状態の混入による。八ムメチルピークを用いたスピン平衡解析には次のVan't Hoff式

$$\ln \frac{H - T(\delta - 3.6)}{T(\delta - 3.6) - L} = -\left(\frac{\Delta H}{R}\right) \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}$$

を使った。ここでHとLは温度によらない定数、T=絶対温度、R=気体定数、 δ =八ムメチルシフトの観測値である。HとLの最適値から、スピン平衡の熱力学パラメータとして $\Delta H = -3270$ cal/mol, $\Delta S = -9.1$ e.u.を得た。図4での実線は計算によるシミュレーション曲線である。

得られた熱力学パラメータは天然 $Mb^+ \cdot N_3^-$ のものとよく一致し、両者での $Fe-N(His F8)$ 結合強度には大差がないと考えられる。

[議論]

再構成 Mb —— アポタンパク質とエチオハミンとの結合は1:1で特異的である。再構成 Mb で大過剰の CN^- 存在下でも1分子の CN^- 結合しか起らなかった事より Λ 4鉄の第5配位座はタンパク質残基に占められていると思われる。デオキシ Mb で交換性プロトン (79 ppm シグナル) が1個のみ見られたことより Λ 4鉄-クロベン相互作用はランダムでは無い。この79 ppm シグナルは天然 Mb での結果より考え、 Λ 4鉄に配位した近位ヒステジン (His F8) と考えるのが妥当である。以上の結果はエチオハミンの Λ 4ポケットへの導入を支持する。

酸化型 Mb での配位子結合力が天然 Mb の値と比べて大差ないこと、酸-アルカリ転移 ($H_2O \rightleftharpoons OH^-$) の様子も似ることより、 Λ 4鉄には水分子が存在すると思われる。

エチオハミンは対角上にある2個のメソ位炭素を結ぶ軸に関して対称でないので Λ 4ポケットに入るに際して天然 Mb (特にデューテロ Λ 4を含む Mb) でみられるようなラ-オモテの混在したろう入状態が考えられる。しかし、図3で CN^- や H_2O の錯体のスペクトルをみると4本の Λ 4メチルシグナルが1組みられたことから、主に1つのオリエンテーションで Λ 4ポケットに入ることが判る。この解釈は、デオキシ Mb の NH (His F8) シグナル (79 ppm) が単一の吸収線型を示すことから支持される。エチオ Λ 4の様な合成 Λ 4がクロベンで特異的に認識されることはクロベンがかなり多様な Λ 4を取込みうる事を示している。スピニ平衡解析やデオキシ Mb の NH (His F8) シグナルの化学シフトより考え、エチオ Λ 4での $Fe-N(His F8)$ 結合の性質はプロト Λ 4のものと余り違わない。

Λ 4メチル基の広がり —— Λ 4メチル基の NMR スペクトルでの広がり方は Λ 4面での電子スピニ密度分布の尺度となるが、エチオ Λ 4含有 Mb $^+ \cdot CN^-$ では Λ 4メチルピークの広がり13 ppm と小さい。低スピニ型 Λ 4のピロール炭素では π 軌道を通じたスピニ密度分布が起り、近位ヒステジンの配向性が大きく影響を与えると言われる。小さな Λ 4メチル基の広がりには σ 型のスピニ密度分布が支配的な高スピニ型 Λ 4でも見受けられるので、低スピニ Λ 4でみられた Λ 4面内の磁気的異方性の小さは単に近位ヒステジンの配向性だけでは説明できない。エチオ Λ 4は天然のプロト Λ 4とは対称的で4つのピロール環が等価である。 Λ 4鉄のスピニ状態に依らない面内異方性の小さはピロール環の等価性に由来すると考えた方が妥当である。低スピニ型 Λ 4タンパク質で4つのメチルピークがすべて常磁性領域に見られるエチオ Λ 4 Mb は Λ 4-クロベン相互作用研究のための新しい有力手段を提供するであろう。

特別講演 2 HETERONUCLEAR POLARIZATION TRANSFER AND EDITING TECHNIQUES

Ole W. Sørensen

Laboratorium für Physikalische Chemie

ETH-Zentrum

8092 Zürich, Switzerland

This lecture intends to throw new light on the efficiency of heteronuclear polarization transfer in liquid state NMR, and to present new ^{13}C editing techniques.

Conservation of entropy during reversible transfer leads to an upper limit for the total amount of polarization transferable from a number n of I spins to one S spin. This upper limit can be achieved in practice under certain circumstances including non-equivalence of the I spins.

On the other hand, no pulse sequence is known which achieves the entropy limit in case of magnetic equivalence of the I spins. However, the hitherto most efficient non-selective pulse sequence, INEPT, is for $n > 2$ less effective than experiments employing appropriate selective pulses. Two approaches have been employed to obtain pulse sequences superior to INEPT: (i) A formal analogy between refocusing of antiphase multiplets and composite pulses for compensation of rf inhomogeneity; (ii) combined use of single transition and Cartesian product operators allowing a direct derivation of pulse sequences.

In case of ^{13}C editing, entropy considerations also makes it clear that established editing techniques like DEPT and SEMUT do not take advantage of the full polarization available. New editing methods are presently under investigation with this fact in mind.

Finally, selected new 2D or 3D pulse experiments will be described.

(都立大理, Univ. Wisconsin-Madison *) ○甲斐荘正恒・佐藤晴哉・
細谷仁子・三宅洋子・W. M. Westler *・J. L. Markley *

EXTENSION OF PEPTIDE BACKBONE CARBONYL CARBON ASSIGNMENTS TO OTHER NMR SIGNALS
OF THE PROTEIN

Masatsune Kainosho, Haruya Sato, Yosiko Hosoya, Yoko Miyake, William M. Westler *
John L. Markley *

(Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, Univ. Wisconsin-Madison *)

Backbone carbonyl carbon resonances, which can be assigned unambiguously by a C-13, N-15 double-labeling strategy in proteins as large as Mr 23,000, have been used as versatile conformational probes for a protein in solution. They also can serve as starting points for extending assignments to other parts of the protein molecule. In this symposium, various one- and two-dimensional NMR approaches, which we have been developing over the last several years, will be discussed.

(序) 我々は過去数年間にわたり、インヒビター蛋白 S S I をモデルとして、NMR による高分子量蛋白質の高次構造研究に真に有効な種々の解析手法の開発に努力してきた。これらの多様なアプローチにおいて共通した原点となるものは、蛋白質主鎖ペプチド結合のカルボニル炭素 ^{13}C -NMR シグナルの一義的帰属とそれらの構造化学的利用である。既に明らかにしたように、高分子量蛋白質において主鎖カルボニル炭素 NMR シグナルこそ、アミノ酸配列を前提とする最も確実な帰属が可能な部位である。我々は安定同位体ラベル法の徹底した利用により、S S I の殆ど全てのカルボニル炭素シグナルの帰属を完了した。従って、今後の研究の重点はこれら帰属の確定した NMR シグナルを利用する高次構造の研究手法の開発に向けられる。カルボニル炭素シグナルの利用は大別して二つある。第一には、それらが蛋白質主鎖ポリペプチドの構造(変化)に直接的情報を提供するのみに止まらず、側鎖の構造に対しても鋭敏なプローブとなることを利用するものである。つまり、帰属の確定したカルボニル炭素シグナルの蛋白質の高次構造(変化)プローブとしての直接的利用である。我々は多くの事例により、この種の応用技法の有効性を示してきた。本討論会においても、S S I の主鎖ポリペプチドの揺らぎの研究について報告する予定である。第二の利用法としては、本報告で示すような、カルボニル炭素シグナルを出発点とする、蛋白質の他の構成原子の NMR シグナルを帰属手法の開発がある。多くの生化学的興味を持たれる機能が、主鎖カルボニル炭素以外の部分において果たされていることを考慮するならば、高分子量蛋白質の側鎖原子団の構造情報の選択的取得方法を開発することの重要性は明瞭であろう。

〔実験〕本研究で用いた安定同位体ラベル 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行った。ラベルアミノ酸類は有機化学的、或いは醗酵・酵素反応などを適宜組み合わせることにより合成した。種々の一次元、二次元-NMRスペクトルは X L - 3 0 0、V X R - 3 0 0 (バリアン社製)、A M - 4 0 0、A M - 5 0 0 (ブルカー社製)を用いて行った。実験の詳細は紙数の都合上省略する。

〔結果と考察〕(i) 特定種類のアミノ酸のみを均一に ^{13}C -ラベルした蛋白質を利用した帰属拡張手法：この手法は既に我々が第 2 4 回 NMR 討論会において一部紹介した。その内容は、高濃度に均一 ^{13}C -ラベルしたリジンを取り込ませた S S I を用い、帰属の確定したカルボニル炭素 NMR シグナルと側鎖原子団の ^{13}C -シグナルとの関連を直接に ^{13}C 、 ^{13}C -C O S Y から確定する方法であった。側鎖の ^1H -NMR シグナルは、帰属が確定した側鎖の ^{13}C -シグナルを利用して ^1H 、 ^{13}C -C O S Y により決定可能である。この方法の最大の問題点は測定時間と実験労力・費用である。従って、できれば比較的安価に合成可能な低い濃縮度の均一 ^{13}C -ラベルアミノ酸を用い、しかも ^1H -検出による感度向上、種々のパルス技術による選択性の増大など今後改良すべき多くの点がある。ここではその一例として、S S I に 9 ヶ含まれる Leu を均一 ^{13}C -ラベルした (85% u ^{13}C -Leu) S S I を利用した二次元 NMR 実験について示す。図-1 は A M - 5 0 0 (^1H : 5 0 0、 ^{13}C : 1 2 5. 7 7 M H z) を用い 1 0 0 m g / 2 m l (0. 0 5 M 重水素化リン酸緩衝液)、p H = 7. 3 の試料について行ったものである。二次元 2 量子相関スペクトル (^{13}C - ^{13}C) D Q C) により、カルボニ

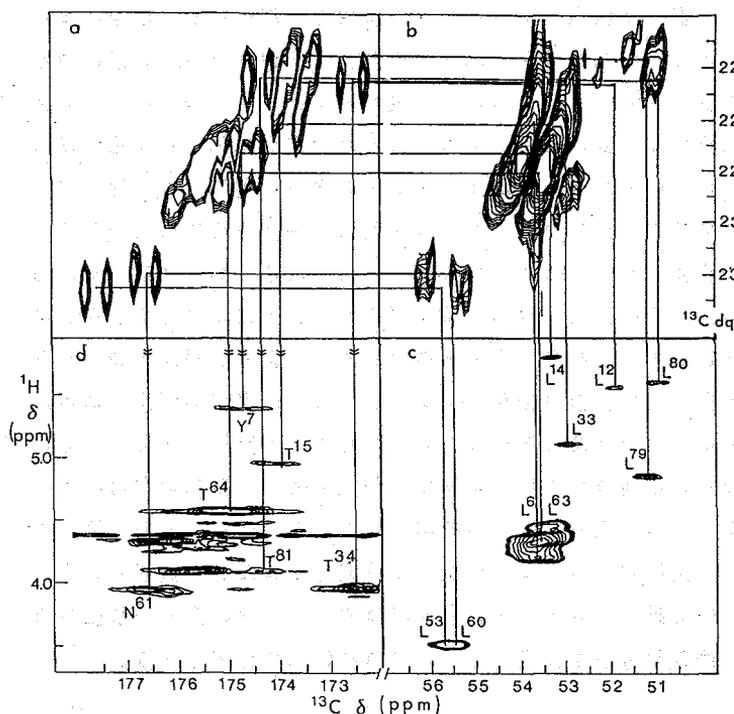


図-1 (85% u ^{13}C -Leu) S S I の二次元 NMR スペクトル (A M - 5 0 0 ; ^1H , 5 0 0 M H z ; ^{13}C 1 2 5. 7 7 M H z) 。 試料は 1 0 0 m g のラベル S S I を 2 m l の重水素化リン酸緩衝液 (0. 0 5 M) にと内部分子標準デキサン- d_6 の化学シフトを 6 7. 8 p p m (T M S) に換算した。1 a 及び 1 b は それぞれ 2 D ^{13}C - ^{13}C D Q C N M R スペクトルにおける $^{13}\text{C}_\alpha / (^{13}\text{C}_\alpha + ^{13}\text{C}_\beta)$ と $^{13}\text{C}_\alpha / (^{13}\text{C}_\alpha + ^{13}\text{C}_\gamma)$ 領域に対応する。1 c は ^1H -検出 H E T C O R (a c q u i s i t i o n 中) は ^{13}C -b r o a d b a n d d e c p l.) により測定した ^1H (^{13}C) H S B C の $\text{C}_\alpha / ^{13}\text{C}$ α 領域。試料は 0. 5 m l 溶液を用い広幅デカップリングコイル (^{13}C に同調) を付属した 5 m m ^1H -N M R プローブを用いて測定した。1 d は 2 D ^1H - ^{13}C H M B C スペクトルの $\text{C}_\alpha / ^{13}\text{C}$ α 領域を示す。詳しい測定条件については文献 (J A C S, 1 1 0, 4 0 9 3 - 4 0 9 5 (1 9 8 8)) 参照。

ル炭素の帰属を同一残基内の α -炭素に拡張した。図-1 aは $C_0 / ({}^{13}C_0 + {}^{13}C_\alpha)$ 領域、1 bは ${}^{13}C_\alpha / ({}^{13}C_0 + {}^{13}C_\alpha)$ 領域をそれぞれ示す。既に確定している9ヶのLeuカルボニル炭素の帰属は1 dを仲介して、図示したように α -炭素、水素の帰属に結びつけられる(図-1 c)。二次元 ${}^1H ({}^{13}C)$ HMBCスペクトルの $\alpha - {}^1H / {}^{13}C_0$ 領域(図-1 d)は、幾つかの明瞭なcross peakを示し、これらは各Leuのカルボニル炭素とC-末端側の隣接残基の α -水素との間のスピン結合に由来する。我々は現在種々の濃度に ${}^{13}C$ -ラベルしたアミノ酸をSSIに組み入れたものを用いて、さらに有用な帰属拡張手法の開発に努めている。

(II) 選択的に側鎖を ${}^{13}C$ - (多重)ラベルしたアミノ酸を利用する手法： ${}^{13}C - {}^{13}C$ スピン結合は直接に結合した炭素間(${}^1J_{CC}$) 或いは結合3ヶを隔てた炭素間(${}^3J_{CC}$)に観測される。従って、 ${}^3J_{CC}$ を利用すれば、均一にラベルすることなくカルボニル炭素シグナルの帰属を側鎖原子団に拡張することが可能と思われる。さらに、よく知られているように、ビシナルスピン結合定数(${}^3J_{CC}$)は結合二面角に依存することを利用して、例えば側鎖部分の α -angleの決定が実現できる。我々はこの目的のために、立体選択的な重水素化を含む、種々の手の込んだ手法を開発中であるが、ここではSSIに9ヶ含まれるAsx (Asp, 6; Asn, 3)の1位と4位の炭素をダブルラベルしたAsxを取り込ませたSSI、 $(1,4-{}^{13}C_2-B)$ SSI, の利用について報告する。先ず、スピン結合による複雑化を避けるために、アスパラギン酸の1、4位のカルボキシル基を99%に ${}^{13}C$ -交互ラベルしたものを取り込ませたSSI、 $(1 \text{ or } 4-{}^{13}C_2-B)$ SSI,の一次元の ${}^{13}C$ -NMRは図-2(下)のように18本のシングレットシグナルからなる。既に、我々は $(4-{}^{13}C_2-B)$ SSIのスペクトルを測定しており、側鎖カルボキシル基

(Asp, 6ヶ)とカルボキシアミド基(Asn, 3ヶ)の帰属は確定している(クサビで示したシグナル; 低磁場の6本がAspのカルボキシル基に由来)。従って、残りの9本のシグナルが主鎖に由来する。我々はこれらの主鎖カルボニルシグナルを ${}^{15}N, {}^{13}C$ -ダブルラベル法で帰属した。しかしながら側鎖のシグナルの帰属はこのままではできない。 $(1,4-{}^{13}C_2)$ SSIのNMRスペクトルでは多くの

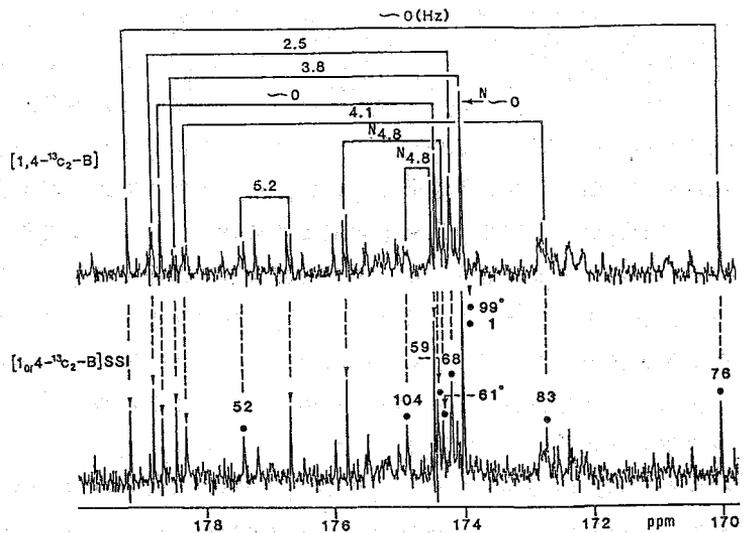


図-2 75. 2MHz ${}^{13}C$ -NMRスペクトル(XL-300)。20mg/2mL重水素化リン酸緩衝液、60℃、 1H -照射。上図は1位、4位のカルボキシル炭素を同時に、下図は交互に99% ${}^{13}C$ ラベルしたAspを組み入れたSSIを示す。▼は γ 位、●は α 位(数字は帰属)。NはAsn、 ${}^3J_{CC}$ はINADEQUATE値

ピークにスピン結合が観測された。次元 INADEQUATE によりスピン結合定数を正確に測定したところ、スピン結合が観測された 10 本のシグナルの内 6 本については一義的に組み合わせが確定した。残りの 2 組を含めて全ての組み合わせについて、 ^{13}C 、 $^{13}\text{C}-\text{COSY}$ 法により、明らかとなった。スピン結合の殆ど観測されない ($\sim 0\text{ Hz}$) 3 組についても、化学修飾法などを併用して完全に決定することができた。このようにして各残基の $^3J_{\text{CC}}$ が求まるとともに、これらの残基の α -angle についての情報が得られる。

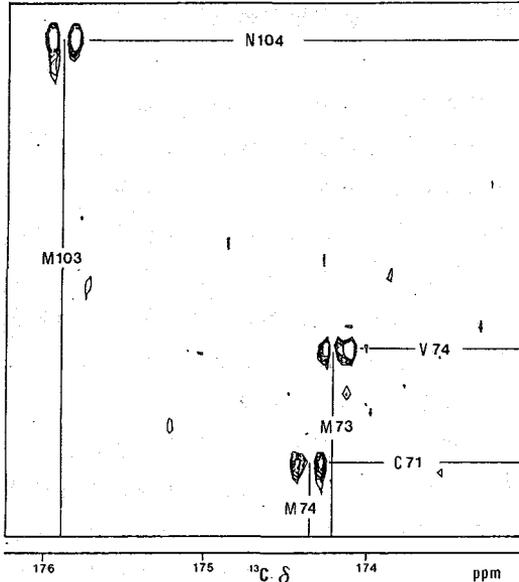


図-3 (60% $u1-^{15}\text{N}$, 60% $1-^{13}\text{C}\text{-Met}$) SSI の ^{13}C (^{15}N) HSBC スペクトル。16mg/1.2mL 0.05M リン酸緩衝液, pH 7.3, 90% $^1\text{H}_2\text{O}/10\% ^2\text{H}_2\text{O}$ 。10 ϕ 用マイクロセル(1.2mL)使用、温度 61 $^\circ\text{C}$ 。AM-400, BSV3 X-nucleus decoupler 使用。

(今後の展開) 以上、概略を紹介したようにカルボニル炭素の ^{13}C -NMR シグナルの帰属を出発点として、高分子量蛋白質の NMR シグナルの帰属が可能である。もし必要とあれば全てのシグナルの完全帰属も不可能ではない。しかし、蛋白質の構造と機能の関わりを追求するためには、より選択的な、より高度な構造情報を必要とする場合が多い。本報告で述べるピシナルスピン結合による α -angle の決定などはその例である。このような蛋白質の NMR 解析技術にとって、“tailored labeling”とも呼ばれるべき選択的な安定同位体ラベル技術とラベル蛋白質からの構造情報の抽出のためのパルス技術の調和のとれた進展が今後増々重要となろう。

(文献) (1) *Biochemistry*, 21(1982), 6273-6279; (2) *J. Mol. Str.*, 126(1985), 549-562; (3) *Biochemistry*, 26(1987), 1068-1075; (4) *J. Amer. Chem. Soc.*, 110(1988), 4093-4095; (5) *J. Amer. Chem. Soc.*, 投稿中; (6) 蛋白質・核酸・酵素, 27(1982), 1556-1569; (7) 蛋白質・核酸・酵素, 別冊 No. 32, 40-55; (8) “生物物理のフロンティア”, 培風館、印刷中; (9) 日本農芸化学会誌、印刷中。

(III) 均一 ^{15}N -ラベル蛋白質の特定の
アミノ酸のカルボニル炭素を選択的 ^{13}C
-ラベルして得られる ($u1-^{15}\text{N}$, X) SS

I の応用手法: この手法は我々の開発したカルボニル炭素 NMR シグナルの帰属手法 (“ ^{15}N , ^{13}C -ダブルラベル法”) の変法である。最も有効な応用は、 ^{13}C (^{15}N) HSBC (COSY) である。この手法によりカルボニル炭素 NMR の帰属を直接に ^{15}N -NMR の帰属につなげることができる。図-3 は均一に ^{15}N -ラベルしたアミノ酸混合物に ($1-^{13}\text{C}$) Met を加えて調製した SSI, ($u1-^{15}\text{N}$, Met) SSI, の ^{13}C (^{15}N) HSBC スペクトルである。

見事にそれぞれのカルボニル炭素に結合しているアミド窒素の化学シフトとスピン結合定数 ($^1J_{\text{CN}}$) が測定できる。

(都立大・理) ○内田健一、甲斐荘正恒

AMIDE HYDROGEN EXCHANGE RATES AS STUDIED BY CARBONYL CARBON NMR SPECTROSCOPY

Kenichi Uchida and Masatsune Kainosho

(Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University)

Two different approaches for measuring the amide hydrogen exchange rates by using the assigned carbonyl ^{13}C NMR signals have been developed by us. One is the steady state method, which we have denoted the DEALS method. This method utilizes the line shapes, due to deuteration induced isotope shifts, of the individual carbonyl resonances of a protein dissolved in 50% $^2\text{H}_2\text{O}$. The other new method utilizes non-steady state signal changes, due also to deuteration of amide nitrogens, of carbonyl signals dissolved in 100% $^2\text{H}_2\text{O}$. These two methods are complementary in nature to each other in their time resolutions. We will discuss the conformation features of SSI by using these two methods.

〔はじめに〕 蛋白質の溶液内における構造の揺らぎは、その機能発現との関連からその機構について以前から研究されている。この種の動的構造に関する情報を得る手段としては、蛋白質に含まれる交換性のプロトンの交換速度を測定する方法が重要である。特に主鎖アミド水素の交換速度から得られる情報は、蛋白質の広い範囲にわたる動的揺らぎの情報を得ることができる点において近年でも、種々の蛋白質に関して研究されている。これらの多くは、高磁場の装置を用いた2次元 ^1H -NMRを用いたものである。しかしながら、この手法は従来から言われているようにシグナルの分離の点で高分子量の蛋白質には適用できない。我々は以前からこの様な問題の本質的な解決のために、安定同位体標識法を駆使した手法を用い、蛋白性セリンプロテアーゼインヒビター(SSI)を対象として広範な研究を行ってきた。¹⁾蛋白質の溶液内における動的構造を研究する上で、主鎖カルボニル炭素 ^{13}C -NMRシグナルから得られる情報は有用であり、昨年の本討論会に於いては、主鎖カルボニル炭素を選択的に ^{13}C で標識したSSIの立体構造の揺らぎに関して報告したが、今回は更に、主鎖アミド水素の交換に関して詳細に検討したので報告する。

〔方法〕 主鎖カルボニル炭素の ^{13}C -NMRシグナルを利用するアミド水素の交換速度の測定法の原理は、隣接アミド水素が軽水素か重水素かによって生ずる同位体シフトを利用するものである。^{1, 2, 3)} i 番目のカルボニル炭素シグナルの同位体シフトを与えるアミド水素は $(i+1)$ 番目の残基のもの(β 位)と、 i 番目のもの(γ 位)の2箇所がある。 β 位の水素が重水素に置換されることによる同位体シフト(β シフト)は約4-7Hz、 γ 位のそれは

約2Hzあるいはそれ以下である。この様に1つのカルボニル炭素シグナルを観測することによって同時に2箇所のアミド水素の交換に関する情報が得られる。この同位体シフトを用いて実際にアミド水素の交換速度を求める方法には2つの手法があり、一方は定常状態での測定法(DEALS法),他方は非定常状態による方法である。以下、それぞれの方法について説明する。

1) DEALS (Deuterium-hydrogen Exchange of Amide on the Line-Shapes)法^{2,3)} 蛋白質のサンプルを50% ²H₂O中に溶解し十分に平衡化させるとβ位、γ位にはそれぞれ1:1の割合で軽水素と重水素が存在することになる。この状態で¹³C-NMRシグナルはそれぞれのサイトの交換速度によって多彩な線形変化を与える。実際に観測される典型的な線形を図-1に示す。即ちβ位、

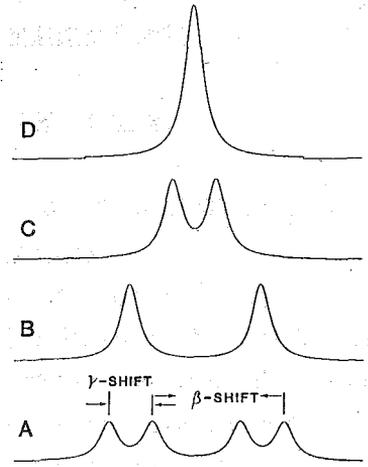


図-1 DEALS法により観測される代表的な線形

γ位ともにその交換速度が遅い極限の場合:A、γ位のみが速い極限の場合:B、β位のみが速い極限の場合:C、β位、γ位ともに速い極限の場合:D、である。 $\Delta\nu_\beta=5\text{Hz}$ 、

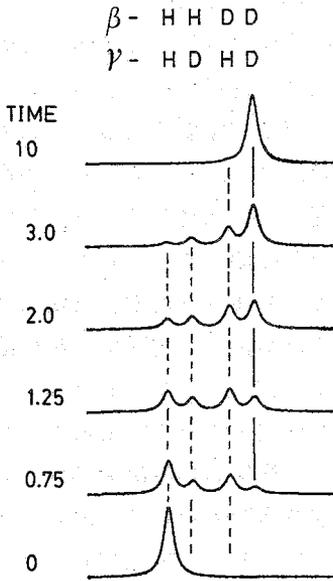


図-2 非定常状態法によるカルボニル炭素シグナルの線形変化のシミュレーション。 $k=2k'$ の場合について示した。時間はHHの種の半減期を1としたスケールで示してある。

$\Delta\nu_\gamma=2\text{Hz}$ とすると、それぞれのサイトが平均化されて観測されるときに交換速度は、 $k=\sqrt{2}\pi\Delta\nu$ であるから、 $k_\beta=22\text{sec}^{-1}$ 、 $k_\gamma=9\text{sec}^{-1}$ と極めて速い時間領域であることがわかる。このDEALS法は定常状態における方法なので、時間分解能はサンプル調製や、測定時間による影響は全く受けない。また、¹H-NMRによる飽和移動を利用する方法と比べてスピン拡散による影響もないという利点がある。

2) 非定常状態法 これは、凍結乾燥したサンプルを重水に溶解し、NMRスペクトルを経時的に測定し、シグナルの減少あるいは増加の速度により交換速度を求めるものである。さきに述べたように、β位、γ位の同位体効果が同時に観測される。β位、γ位のプロトンの状態をHH,HD, DH,DDと表すことにする。例えば、HDとはβ位が軽水素、γ位が重水素である状態を示す。非定常状態に於ける重水素交換の過程は、比較的簡単な式で表される。これをPC-9801を使ってシミュレートした結果が、図-2である。このように時間とともにカルボニルシグナルは一見複雑な変化を見せるが、DDのピークの出現過程を時間と共に追跡し、非線形の最小二乗法等を用いてパラメーターを推定することにより、 k_β 、 k_γ を独立に決定することが可能である。こ

の手法はDEALS法とは反対に、数分あるいはそれ以上かかる遅い交換の過程に対しては強力な武器となる。

〔実験〕 主鎖カルボニル炭素のみを選択的に標識したSS Iはアミノ酸培地中の必要なアミノ酸のみを[1-¹³C]アミノ酸に置き換え、*S. albogriseolus* S-3253を培養し、常法により精製し凍結乾燥標品とした。¹³C-NMRの測定はすべてXL-300(Varian社)を用い、75.2MHzにて測定した。DEALS法は標識SS Iを50%重水に20mg/0.5ml,あるいは60mg/2mlの濃度に溶解、pHを調製し、60°C,3時間以上インキュベートしたものを、測定サンプルとした。非定常状態法による測定は、凍結乾燥標品60mgを軽水2mlにとかし、pHを調整した後、再度凍結乾燥し、氷浴中で重水2mlを加え溶解し、50°Cで測定を行った。サンプルを調製し、測定を開始するまでの時間は10分以内であった。各時間のスペクトルは繰り返し時間1.984秒で1024回積算した。よって時間分解能は約34分である。

〔結果と考察〕 SS Iには2つの α ヘリックスと、5重鎖の逆平行 β シートがある。今回はこれらの2次構造とアミド水素の交換速度との関係について考察を行った。

1) α ヘリックスについて。 図-3にアラニン残基のカルボニル炭素のみを¹³Cで標識したSS I、[A]SS IのDEALSの結果を示した。 α_1 ヘリックスは3.5ターンで46番-57番の12残基より形成されている。このうちAlaは46,49,51,54,55番に存在している。低pHにおいては、 α_1 ヘリックスに存在する各シグナルはそれぞれ2本線を示しているが、pHの上昇にともなって46,54番のシグナルは1本線になる。即ちこれらの残基のカルボニル炭素の β 位つまり47,55番のアミド水素の交換が他に比べきわめて速くなることを示している。また⁵⁸Cys、⁵⁶Valについても同様なDEALSの測定を行った結果、これらのシグナルも高pHに於て1本線となることが判った。三井等のX線構造解析の結果によると47,51,55,57番のアミド水素は分子表面の溶媒に接する方向に並んでいる。すなわち α_1 ヘリックスに存在するアミド水素は分子表面に位置するものが交換が速いことが明かとなった。また α_1 ヘリックスのアミド窒素のB因子との関係についても検討したが、交換速度との相関はみ

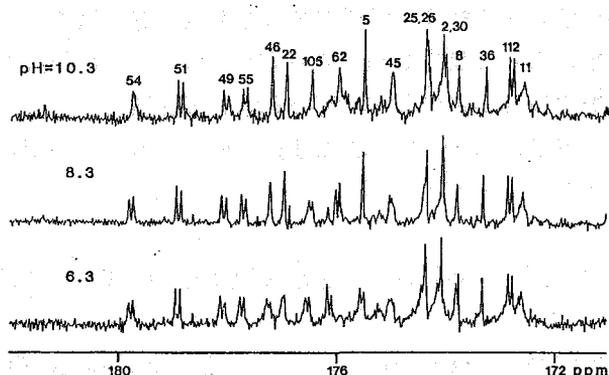


図-3 [A]SS IのDEALS. サンプル濃度は60mg/2ml, 60°Cで40960回積算. 75.2MHz.

られなかった。これはこの速い交換を示すアミド水素の交換は、局所的な運動により支配されているのではなく、むしろ α_1 ヘリックス全体の構造が揺らぐことによって起こっていると考えられる。

2) β シートについて。 図-4に[L]SS Iの非定常状態におけるアミド水素の重水素化の過程の一例を示した。60,63,6番のシグナルはサンプル調製の間に既に完全に重水素交換しているのに対

して他のシグナルはそれぞれ異なった速度で重水素交換している。これらの交換の遅いものは、53番は α_1 ヘリックス、他は β シートを構成する残基由来のシグナルである。これらの遅い交換を示すシグナルについて種々のpH下隣接アミド水素の交換速度を求めた(図-5)。pH 6.5からpH 9.7の範囲内でこれらのアミド水素の交換速度定数の対数はpHに対してほぼ直線関係にあり、50℃では β シートを構成するアミド水素はEX₂機構で交換していると考えられる。またX線構造解析によれば、⁸⁰Leu、⁸¹Thrのアミド水素のうち水素結合しているのは⁸¹Thrだけであるが、今回の結果は、これら2つのアミド水素の交換速度は比較的近く、交換速度に影響を与えるのは水素結合の有無だけではないと考えられる。現在、この

SSIの β シートの揺らぎについて更に検討するため、Val、Thr残基等についても交換速度の測定を進めており、より詳細な知見が得られるものと期待している。

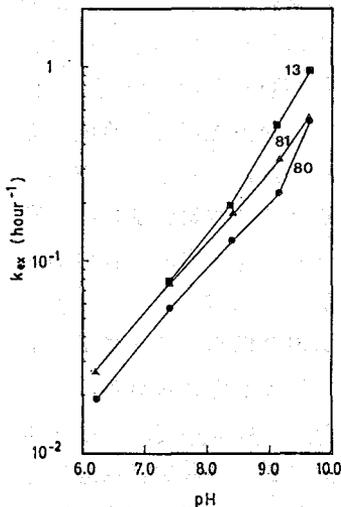


図-5 [L] SSIの非定常状態法によって得られた交換速度のpH依存性。

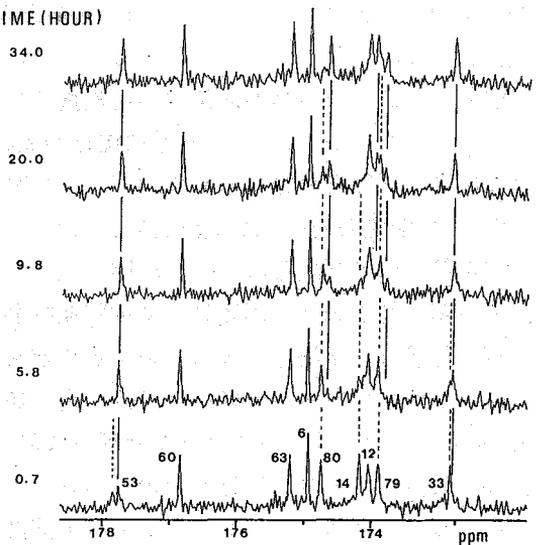


図-4 [L] SSIの非定常状態法による測定。サンプル濃度は60mg/2ml。実線は出現してくるDDによるもの。破線は消失するHHによるもの。12番のシグナルも変化しているが、14番のDDによるピークと重なるため図示しなかった。

【まとめ】 以上のように主鎖カルボニルシグナルに現れる同位体シフトを利用した2種の新しいアミド水素の交換速度の測定法は、互いに極めて異なった時間領域に関する知見を得ることができる点に於て、有用な手法である。特にDEALS法は、これまで困難であった非常に速い時間領域での交換に対して強力な手法である。これら2つの相補的な手法を用いることにより、高分子量の蛋白質についても溶液内の揺らぎに関して貴重な情報が得られることが明らかとなった。

【文献】

- 1) Kainosho, M., Tsuji, T.: *Biochemistry*, 24, 6273-6279 (1982)
- 2) Kainosho, M., Nagao, H., Tsuji, T.: *Biochemistry*, 26, 1068-1075 (1987)
- 3) 甲斐荘正恒、内田健一、長尾洋昌: 蛋白質・核酸・酵素 別冊32, 40-55 (1987)

(東薬大・理研) *神藤平三郎、福島 千晶、松本 潮、柴田 武彦

Iminoproton Exchange in DNA and Nucleic Acid-Nucleic Acid Interaction

Heisaburo Shindo, Chiaki Fukushima, Ushiho Matsumoto and Takehiko Shibata*
(Tokyo College of Pharmacy, and Riken Institute of Physical and Chemical Research)

Transiently occurring base-pair breakage in DNA, so-called "breathing" is of very interesting and thought to be relevant to biological function of DNA. Many studies on iminoproton exchange have been made by means of H-1 NMR, and have led to conclude that iminoproton exchange occurs through base-pair breakage along a few base-pairs or probably at a base-pair level due to local fluctuations of DNA and that the frequency is an order of milliseconds. If this is the case, it is plausible that iminoprotons thus exposed in bulk water interact with other base-pair acceptors in solution. We investigated the effect of the presence of ssDNA on the iminoproton exchange rate of dsDNA and demonstrated that there exists detectable nucleic acid-nucleic acid interaction.

遷移的に起こる二重鎖 DNA の塩基対の開裂は、いわゆる "Breathing" と呼ばれ、興味ある性質であり、DNA の機能と密接な関係があると考えられている。この塩基対の開裂を調べる目的で、古くから UV や ^1H NMR によるプロトン交換の研究が為されてきた。とりわけ ^1H NMR によるイミノプロトンの交換速度は多くの重要な知見を提供する。これらの研究によれば、二重鎖 DNA のイミノプロトン交換は DNA の局所的な運動に基づいており、数塩基対、おそらく塩基レベルで起こっていることを示唆している。その理由は各塩基対が固有の交換速度を持っていること、また交換に要する活性化エネルギーが 50~80 kJ/mol の範囲にあって、比較的小さいという事実である。

最近 Guéron¹⁾らは、いくつかのオリゴ核酸についてイミノプロトンの交換速度に関する詳細な研究から、塩基対の寿命(その逆数は開裂頻度に当たる)が、これまで考えられたものより著しく短く、数 ms~10 ms であること、また二重鎖の解離定数が 10^{-7} オーダーの合理的な値となることを示した。このように高い頻度で塩基対、特に A-T 塩基対が解裂し、その水素結合部位を露にすることが事実であるとすれば、バルク中に存在する他の水素結合受容体と二重鎖 DNA が相互作用する可能性は充分考えられる。結果として、イミノプロトンの交換速度がその影響を受けることが予想される。本研究の目的は、二重鎖 DNA のイミノプロトンの交換速度が相同な塩基配列をもつ単鎖 DNA の存在によってどの様に影響されるか、さらに核酸-核酸相互作用の定量化のための速度論的な解析を試みることである。

試料および実験方法

自己相補的な塩基配列をもつ 16-mer [I]、d(GGCCGGTTAACCGGCC) および 10-mer [II]、d(CGTGTACACG) を固相合成法により得た。これらのオリゴ DNA のイミノプロトンの交換速度を ^1H NMR により検討した。イミノプロトンの観測には、JEOL FX-200 NMR 装

置を用い、軽水中（10% 重水）、アンモニア緩衝液（pH = 8.3~8.8）中で、1331パルス、または 11パルスを用いて行った。交換速度は、イミノプロトンの緩和時間 T_1 または線幅から求め、アンモニア緩衝液の濃度および温度の関数として測定した。また、単鎖 DNA の存在下におけるプロトン交換速度についても同様に行った。

結果と考察

1. 二重鎖 DNA とヘアピンループとの相互作用

自己相補的なオリゴ DNA は、一般にヘアピンループを生じ易く、DNA 濃度が希薄であるとか、イオン強度が低く、高い温度ほど、その平衡はヘアピンループが生成する方向に向かう。ステム部分が比較的長いものにおいては、ループと二重鎖との間の障壁が高く、常温では平衡に達するのに数日を要する。図 1 は 16-mer [I] の溶液を、初め 75°C に保ち、25°C まで徐々に冷却したものの ^1H NMR スペクトル (A)、および 0°C まで急冷した後、25°C で測定したスペクトル (B) を示す。矢印で示した一对の thymidine methyl ピークがヘアピンループ分子に帰属できることは明らかである。スペクトル B では、ヘアピンループが 0.3~0.4 のモル比で存在することが分かる。

ヘアピンループの存在割合を変えて、イミノプロトン交換時間 τ_{ex} または半値幅 $\Delta\nu$ を測定した。プロトン交換時間 τ_{ex} はつぎのいずれかの式を用いて求めることができる。

$$1/T_1^{obs} = 1/T_1^{dd} + 1/\tau_{ex} \quad (1)$$

$$\pi\Delta\nu^{obs} = \pi\Delta\nu^{dd} + 1/\tau_{ex} \quad (2)$$

ここで、上付きの添字 obs と dd はそれぞれ観測値および双極子-双極子の項を意味する。

表 1 には、それぞれの試料に対する緩和時間 T_1 および式 (1) を用いて計算した τ_{ex} の値を示す。表から明らかなように、ヘアピンループの割合が高くなればなるほど、交換時間が短くなっている。この結果は、二重鎖中の TTAA 部分がヘアピンループの TTAA 部分と相互作用していることを示唆している。

2. 二重鎖 DNA と単鎖 DNA の相互作用

イミノプロトンの交換はつぎのような反応スキームで起こっている。

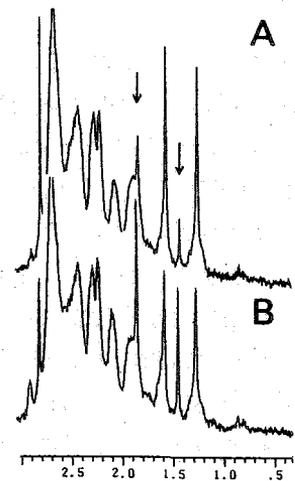
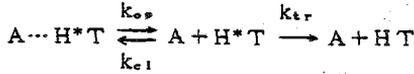


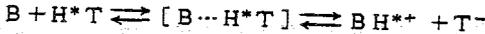
図 1 16-mer [I] のメチル、メチレン領域の ^1H NMR スペクトル (0.1M NaCl, 10mM リン酸緩衝液, pH=7.5)

表 1 16-mer, T7 と T8 のイミノプロトンの緩和時間と交換時間 (ms) に及ぼすヘアピンループ分子の影響, 25°C

Hairpin mol. ratio	T7		T8	
	T_1^{obs}	τ_{ex}	T_1^{obs}	τ_{ex}
0	74	355	56	87
0.1	61	145	50	73
0.3	51	99	43	60



まず、塩基対 $A \cdots H^*T$ は $k_{o,p}$ の頻度で解離し、プロトン H^* は交換されないで、 k_{e1} の速度で元に戻るか、または $k_{t,r}$ の速度で交換される。中性 pH の領域では塩基 B (OH^- または緩衝剤) によるプロトン引き抜きによってプロトン交換が触媒される。



交換速度の逆数、すなわちプロトンの寿命 τ_{ex} は次式で与えられる。

$$\tau_{ex} = \tau_0 (1 + k_{e1}/k_{t,r})$$

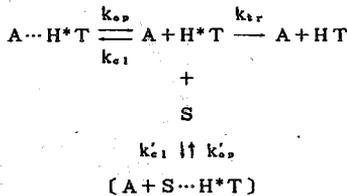
$$= \tau_0 + \frac{\tau_0 \cdot k_{e1}}{k_R / (1 + 10^{-\Delta pK})} \cdot \frac{1}{[B]} \quad (3)$$

ただし、 $k_{t,r} = k_R [B] / (1 + 10^{-\Delta pK})$ の関係を用いた。ここで k_R は二次反応に対する速度定数であり、 ΔpK は触媒 B と HT の pK_a の差である。式 (3) から明らかなように、 τ_{ex} は触媒濃度 $[B]$ の逆数に比例する。 τ_{ex} vs $1/[B]$ の直線と縦軸との交点から塩基対の寿命 τ_0 が得られる。

10-mer[II] について 5' 端より 5 番目のチミジン T5 のイミノプロトンの半値幅から求めた τ_{ex} をアンモニア緩衝液濃度の関数として測定した。予測されるように、 τ_{ex} vs $1/[B]$ のプロットは直線を与える。この A-T 塩基対の寿命 τ_0 は ms オーダーであることが分かる。

次に、相同的な塩基配列を持つ単鎖 DNA が存在することによる、イミノプロトン交換に及ぼす影響について考察しよう。この場合二つの反応スキームが考えられる。

(case I)



(case II)

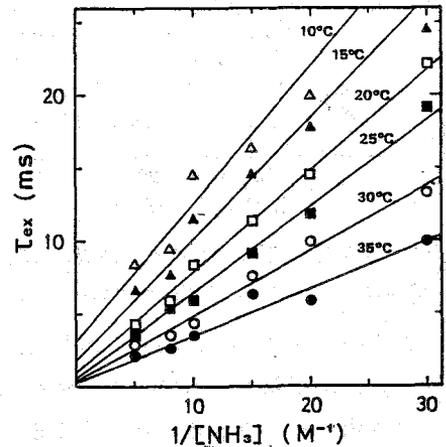
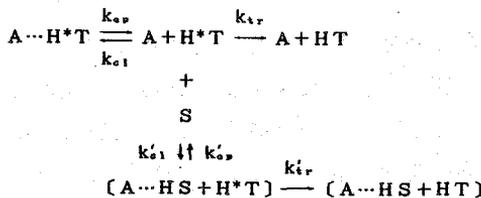


図2 10-mer, T5 のイミノプロトンの、アンモニア緩衝液濃度の逆数に対する τ_{ex} のプロット

上の反応で、S は単鎖 DNA であり、 $[A \cdots HS + H^*T]$ は三次複合体と見なすことができるだろう。

case I に対して、プロトンの寿命 τ_{ox} は、近似的に、

$$\tau_{ox} = \tau_0 \{ 1 + (k_{ci}/k_{tr}) (1 + C_s \cdot k'_{ci}/k_{ci}) \} \quad (4)$$

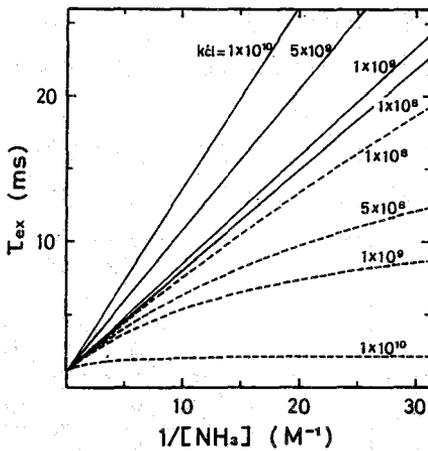
case II に対して、 $k_{tr} = k'_{tr}$ 、 $k'_{ci} \ll k_{tr}$ とすると、

$$\tau_{ox} = \frac{\tau_0 \{ 1 + (k_{ci}/k_{tr}) (1 + C_s \cdot k'_{ci}/k_{ci}) \}}{1 + k'_{ci} C_s / k_{tr}} \quad (5)$$

case I と II の違いは、前者では三次複合体 $[A + S \cdots H \cdot T]$ からはプロトン交換が起こらないが、後者では交換が起こることである。

式 (4) は τ_{ox} vs $1/[B]$ のプロットが直線になることを示しており、一方式 (5) は曲線を与える (図 3)。

図 4 は、10-mer[II] に部分的に相同な塩基配列を持つ単鎖 4-mer、d(TGTA) を加えたとき、25°C におけるイミノプロトンの寿命をアンモニア濃度に対してプロットしたものである (黒丸)。4-mer が存在しない場合 (白丸) に比べて寿命は短くなっており、アンモニア濃度に対して曲線的な挙動を示す。この結果は、この混合系においては case II が正しいことを示している。図 4 の破線は、データを最もよく再現するように (5) 式のパラメータを選んで描いたものである。



$C_s = 8.3 \times 10^{-4} (M)$
 $\tau_0 = 1.0 (ms)$
 $k_{ci} = 10^7$
 $A = 1.45 \times 10^7$
 $(k_{tr} = A \cdot [NH_3])$

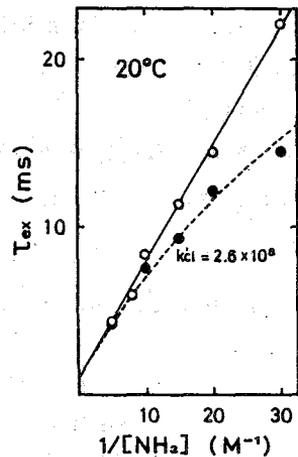


図3 触媒濃度の逆数に対する τ_{ox} の理論曲線の例；
 実線はcase I に対応し、破線はcase II に対応する

図4 4-merを加えた場合の、 $1/[NH_3]$ に対する τ_{ox} のプロット(黒丸)、4-merが存在しない場合(白丸)

これらの結果より、case II で示した三次複合体の寿命はきわめて短いものであり、他の手段では検出困難であるが、その形成はイミノプロトンの交換速度には敏感に反映していることが明らかとなった。第1節で述べたヘアピンループの効果も、ループ部分と二重鎖DNAの相同な塩基配列間の相互作用から容易に説明できる。これらの結果は、また、イミノプロトンの交換が塩基対の開裂を通して起こることを実証するものである。

文献1) Guéron et al., Nature, 328, 89 (1987)

(東大・理・生化, 横浜国大・工・物質工学*)

○河合剛太, 宮澤辰雄*, 横山茂之

TWO-DIMENSIONAL $^1\text{H-NMR}$ STUDY ON THE CONFORMATION OF THE ANTICODON OF tRNAGota Kawai¹, Tatsuo Miyazawa² and Shigeyuki Yokoyama¹(¹Faculty of Science, University of Tokyo; ²Faculty of engineering, Yokohama National University)

The functions of tRNA are closely related with the dynamic structure of tRNA. In order to recognize the correct codon, the conformation of the anticodon is regulated. Specially, the uridine residues in the first position of the anticodon are always modified and their conformational characteristics are regulated by the modifications. We have analyzed the conformation of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine ($\text{mnm}^{\text{5s}2}\text{U}$) residue in the first position of anticodon of tRNA^{Glu} from *E. coli*, and found that $\text{mnm}^{\text{5s}2}\text{U}$ takes C3'-endo form in the tRNA^{Glu}. Further, we assigned the proton signals of uridine in the second position of the anticodon of tRNA^{Glu} and analyzed the conformation of the two residues.

tRNAは、タンパク質の生合成において、mRNA上のコドンに正しいアミノ酸を対応させる重要な分子である。tRNAは、その3'末端にアミノ酸を結合し、アンチコドンによってコドンを認識する(図1)。これら3'末端およびアンチコドンは1本鎖であり、tRNAの他の部分に比べて運動性が高いと考えられる。昨年の本討論会において、2次元NMRなどの手法を用い、これらの運動性の高い部分のシグナルを選択的に取りだし、その動的構造解析の可能性を示唆した。本研究では、NOESYスペクトルをさらに

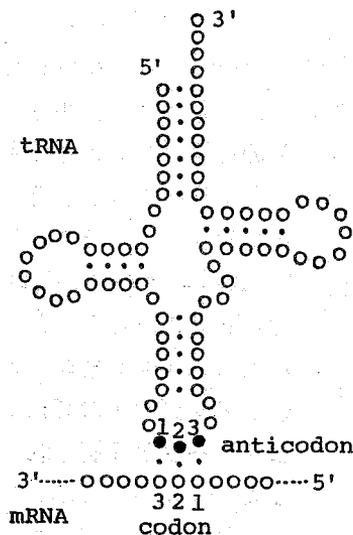


図1 tRNAの構造

詳細に解析し、アンチコドンループの残基に由来するシグナルの帰属およびその構造解析を試みた。

tRNAのアンチコドンの3つの残基のうち、2, 3字目は、コドンの2, 1字目とワトソン・クリック型の塩基対のみを形成すると考えられている。他方、アンチコドンの

ロスピークが観測されている。後者の3つのシグナルは、2D-HOHAHAの実験から1つのスピン系に属することがわかり、 mnm^5s^2U のリボースプロトンのシグナルであると帰属された（昨年の本討論会）。今回のNOESYスペクトルにおいて、この mnm^5s^2U の塩基の6位のプロトンシグナル（8.07ppm）と7.67ppmのシグナルとの間に弱いクロスピークが観測された。さらに、この7.67ppmのシグナルと4.48ppmおよび4.27ppmのシグナルの間に強いクロスピークが観測された。また、7.67ppmと5.71ppmシグナルの間にも強いクロスピークが観測された。これらのことから、7.67ppmおよび5.71ppmのシグナルは、それぞれU(35)の塩基の6位、5位のシグナルであると考えられた。そして、となりあった塩基のプロトン間にNOEが観測されること、および、2つの塩基に挟まれたリボースの2位および3位のプロトンにいずれの塩基のプロトンからも強いNOEが観測されること（図5）から、この2つの残基はtRNA中においてRNAのA型のordered structureをとっていることがわかった。

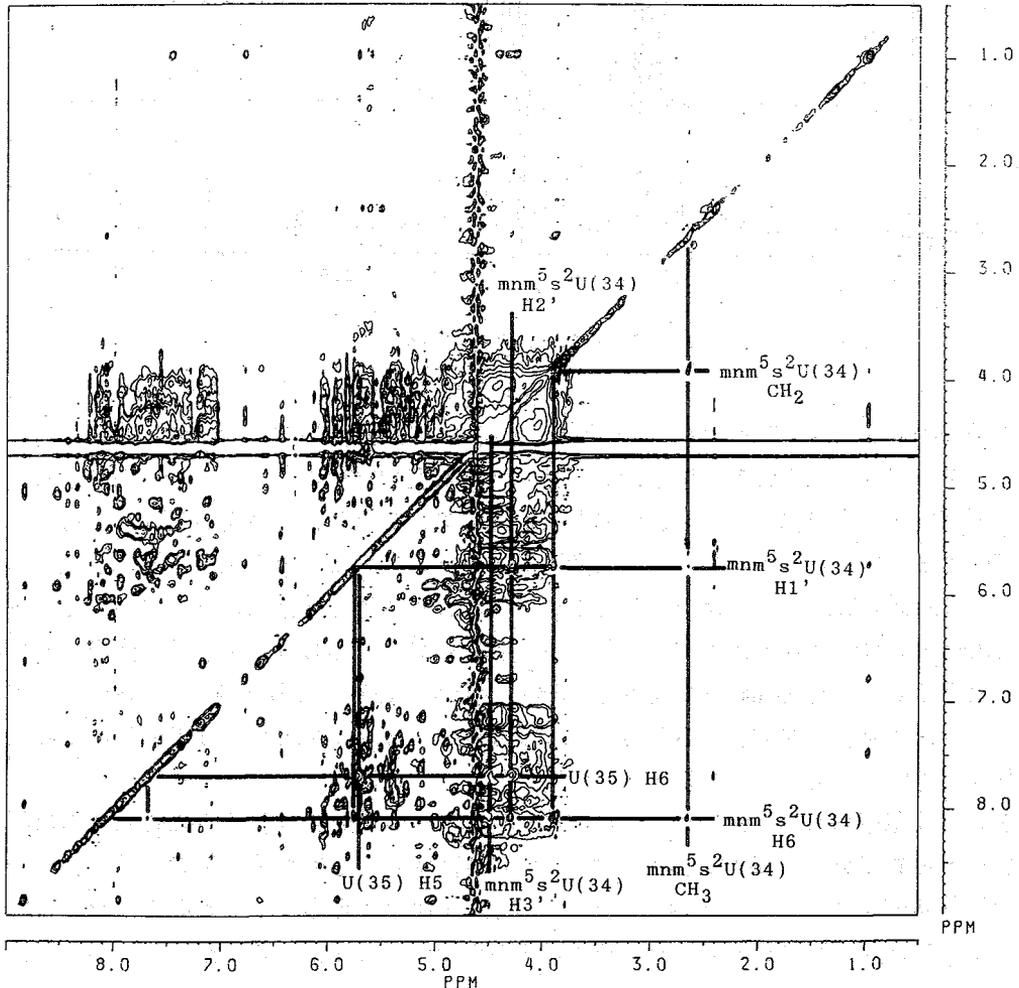


図3 大腸菌tRNA^{Phe}のNOESYスペクトル

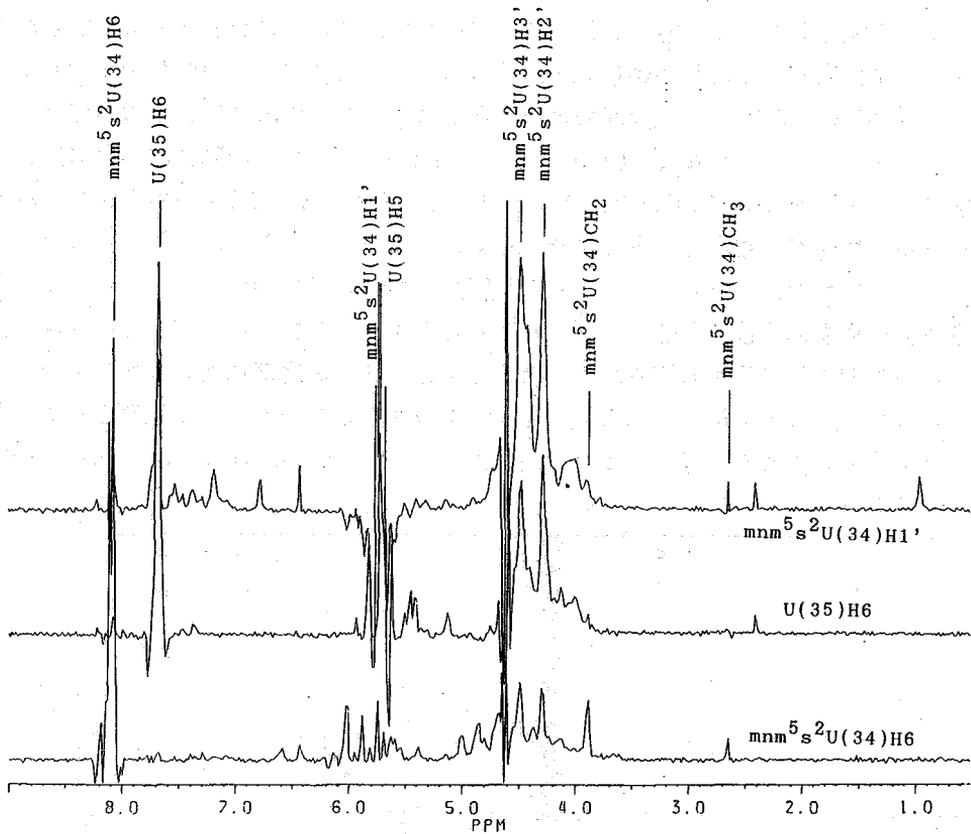


図5 NOESYスペクトルのサブスペクトル

大腸菌の $tRNA^{G1u}$ は、コドン3字目としてAのみを認識する。従って、この $tRNA$ のアンチコドンは、その1字目を含めて RNA のA型のコンホメーションに固定されている必要がある。本研究の結果は、この $tRNA$ のアンチコドン1字目および2字目が、水溶液中において、たしかに RNA のA型の構造をとっていることを示している。私たちはすでに、 mnm^5s^2U がヌクレオシドとして $C3'$ -endo形を非常にとりやすいこと、およびこの mnm^5s^2U が $tRNA$ のアンチコドン1字目においても $C3'$ -endo形をとっていることを示した。この mnm^5s^2U のコンホメーション特性は、 $tRNA^{G1u}$ において、アンチコドンの1字目と2字目が RNA のA型のordered structureをとっていることに大きく寄与していると考えられる。

現在、大腸菌の $tRNA^{G1u}$ についてアンチコドンの構造を解明するためにさらに詳しい解析を進めている。また、アンチコドン1字目に mo^5U をもつ枯草菌のバリン、スレオニンに特異的な $tRNA$ 、アンチコドン1字目に $cmnm^5U$ をもつ枯草菌のグリシンに特異的な $tRNA$ などについても、それぞれのアンチコドンの構造解析も進めている。

(阪大・薬) © 廣明秀一、上杉晴一 (蛋工研) 池原森男

2D $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ Coherence Transfer Spectroscopy of Short DNA FragmentHidekazu Hiroaki, Seiichi Uesugi, Morio Ikehera^o(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ^oProtein Engineering Research Institute)

$^1\text{H}-^{31}\text{P}$ heteronuclear correlation transfer spectroscopy is very useful for conformational study of nucleic acids. On the other hand, MLEV-17 spin locking pulse, that is a new technique for 2D-HOHAHA, is effective to resolve many complex proton spin-spin connectivities.

We used 2D $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ coherence transfer spectroscopy with proton spin locking, and assigned phosphorus and sugar proton resonances of deoxyribonucleotide d(ApGpA). Using this pulse technique, 3', 4' and 5' proton resonances of each residue can be traced "sequentially" along the chain on the 2D-NMR chart.

[序]

オリゴ核酸 (DNA, RNA) の $^1\text{H}-\text{NMR}$ による研究は、それらの溶液中の構造解析に非常に重要な手法である。これらオリゴ核酸のプロトンの帰属については、専ら塩基部プロトン (Purine-H8, Pyrimidine-H6) と糖部 1' (及び 2', 3') プロトン間の NOE を観測し、それを連鎖的に追跡する "Sequential Assignment" 法 [1-4] により進められている。しかしこの "Sequential NOE" は、次の二つの問題を内在している。すなわち、

(1) 右巻構造 (とくに B 型様構造) をとっていることを前提とした帰属法である。そのため例えば Loop 構造や B/Z 境界部位のように局所的に乱れた構造について、そのまま適用することはできない。構造未知の核酸を測定した場合に本当に正しい帰属ができるかという疑問が残る。

(2) NOE が常に観測可能とは限らない。例えば単一の構造を取っていない一本鎖の核酸や、部分的に運動性の高い Loop 構造などでは残基間 NOE が出ないことが多い。また温度や、塩濃度、分子量なども大きく影響する。

このことは、主に核酸のプロトンのスピン系が残基毎に途切れてしまい、NOE 以外に各残基の間をつなげる手法がないことに起因している。ところで、核酸には一残基に一つずつリン酸基が存在するため、この ^{31}P の磁荷を効果的に用いれば、核酸分子全体をスピンネットワークで連続させることができる。

また、これら核酸のリン原子は duplex の糖-リン酸骨格の局所構造についての情報を与える。また、核酸と蛋白質や薬物の相互作用を調べる上でも、重要なプローブとなる。これらの帰属は、 ^{31}P -detected の $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ シフト相関スペクトルや、HMQC 法などによって行われている。[5,6]

今回演者は、 ^1H -スピンロックを用いた HOHAHA-CH 法を $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ 間に応用し

て核酸の帰属を試みたところ、本法が短鎖核酸に極めて有効であることを見いだしたので、報告したい。

【実験】

(1) パルスシーケンス

図1AはINEPT型の $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ シフト相関法のパルス、図1BはAのプロトン側にスピロックを入れたHOHAHA-CH法のパルスであり、いずれもJEOL-PLEXUS ver 1.5に収められている。今回演者らは、標準版のパルスのスピロック部分(図1C、古典的x,xスピロック)をより効率のよいMLEV-17(図1D)[7,8]に改良して、S/Nの改善を試みた。以下このパルスをMLEV-CH法と略す。

(2) 試料の調製

トリヌクレオチドd(A-G-A)を液相トリエステル法により合成し、7500を400ulの D_2O (0.1M NaCl, 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.8)に溶解したものを用いた(ca. 5.3mM)。

またA-dGfI-A(dGfI: 2'-deoxy-2'-fluoroguanosine)の帰属も本法により行った。これは、RNase T1との相互作用を研究するために当研究室で合成された、同酵素で水解を受けない基質アナログであり、そのリンの帰属は重要である。

(3) 測定

測定は日本電子JNM-GX500を用いて行った。 $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ 二次元スペクトルは5φのリンのプロープを用いた。d(A-G-A)の二次元NMRの測定は30℃で各々16回の積算を行った。

【結果と考察】

まず同一残基内のconnectivityをHOHAHA(MLEV-17)により明らかにした(図2)。混合時間70msで、同じ糖に属する1'~5'のプロトンの組が与えられるが、この段階ではそれがどの残基かはわからない(図ではribose-1,2,3と表してある)。

ついでMLEV-CH法スペクトルを測定した(図4)。今回、混合時間を30ms, 80ms, 130msと変化させて測定したところ、リンならびに3つのデオキシリボースをチャート上で"Sequential"に帰属することが出来た。すなわち混合時間80msでは

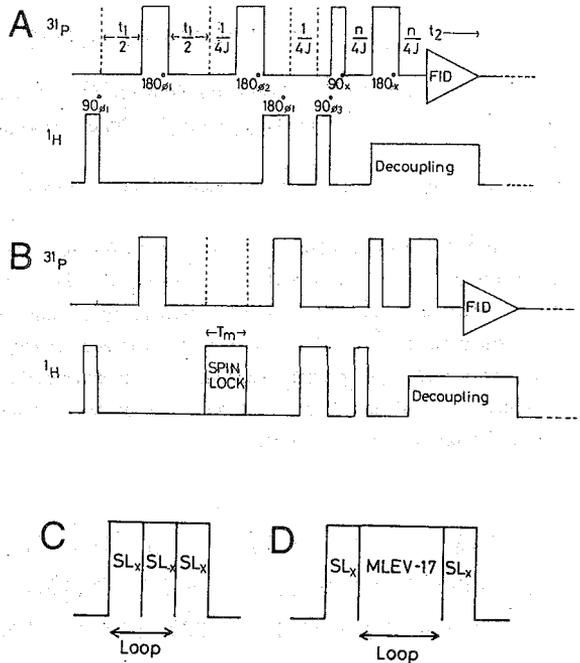


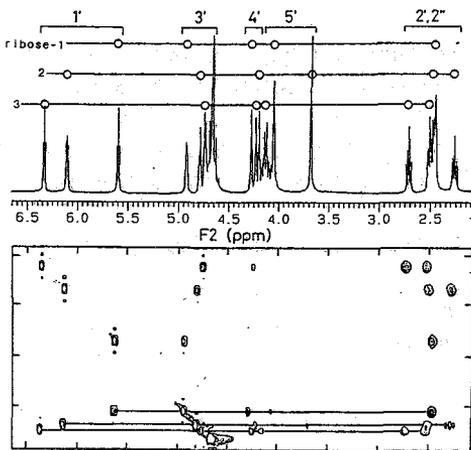
図1 パルスシーケンス A; INEPT型CH-シフト相関パルス B; HOHAHA-CH法 C; Bの古典的(x,x)スピロック D; MLEV-17によるスピロック

(図4B) 3'、4'、5'のそれぞれのプロトンが、3'側と5'側の両方のリンとの相関ピークを与える。そのためこれら3つの領域各々で、 $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ のconnectivityが連続的に帰属できる。とくにわかりやすいのは3'プロトンで、近い側のリンとは強く、遠い側のリンとは弱い相関を与えるため、5'末端から、強-弱-強-弱と追っていくことができる(図3)。

さらに図4Bでは、1'プロトンと3'側のリンとの間に明確な相関が観測された(図中星印)。この5ボンド隔たった原子間の相関ピークは、複雑な核酸のリンのシグナルを帰属する上で、とりわけ有利である。というのは一般にDNAのプロトンNMRスペクトルにおいて、糖の4'、5'プロトンシグナルは分離がきわめて悪く、個々を正確に帰属することはしばしば困難である。逆に塩基部プロトンや1'プロトンは、それらに較べてかなり分離がよい。こうした分離のよい(言い替えれば帰属の容易な)プロトンシグナルをリンの帰属にも援用できるということで、より正確を期すことができる。

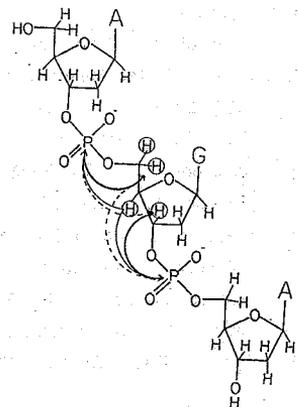
混合時間130msのスペクトルは、80msとほとんど変化しなかった。これよりd(A-G-A)のような短鎖核酸には80~130ms程度の混合時間が適当であると思われる。また古典的スピンロックを用いたパルス(図1C)で同じ80msの混合時間で比較したのが図4Cである。リン専用プローブではプロトン側のコイルは外側に巻いてあり、その分出力も弱いため、少しでも効率のよいMLEV-17を用いたパルスのほうが、目的にかなっていると考えられる。事実、リンから遠い1'との相関に於いては、S/Nもよいようである。

d(A-G-A)のような低分子一本鎖核酸については、残基間のNOEに頼る従来の帰属方法では帰属は不可能であるため、MLEV-CH法は極めて有力な手法である。しかし本法にもいくつかの欠点があるので、最後にそれについて述べたい。まず第一にINEPT様のパルスであるため、パラメーターにJ(の逆数)を含んでいることである。リンと直接カップリングしている3'~5'プロトンとの結合定数は6~10Hzであり、構造未知の核酸を測定する場合、Jの設定如何によっては相関が得られない可能性がある。また第二に、分子量が大きくなるにしたがって、横緩和による磁化の減衰が重大となる。F2軸側をデ



← 図2
d(A-G-A)の2D-HOHA
HAスペクトル(70ms)

図3 →
d(A-G-A)の相関スキ
ーム。



カップリングするために最後の 180° パルスの前後に $1/4 J$ の時間がとってあるが、 $J = 8 \text{ Hz}$ としたときにこれは 31.25 ms となり無視できない。実際約 5 mM の 8mer duplex では 176 回の積算の後でも、不完全なスペクトルしか得られなかった。

これらを克服するためには次の二つの方法での改良が考えられる。一つには、横磁化の減少を起こさないように、デカップリングを行わずすぐにFIDの取り込みを始めて、パラメーターに J を含まないパルスにするということ、もう一つには、 ^1H -detectionにして感度の向上をはかるということである。現在、両者について検討中である。

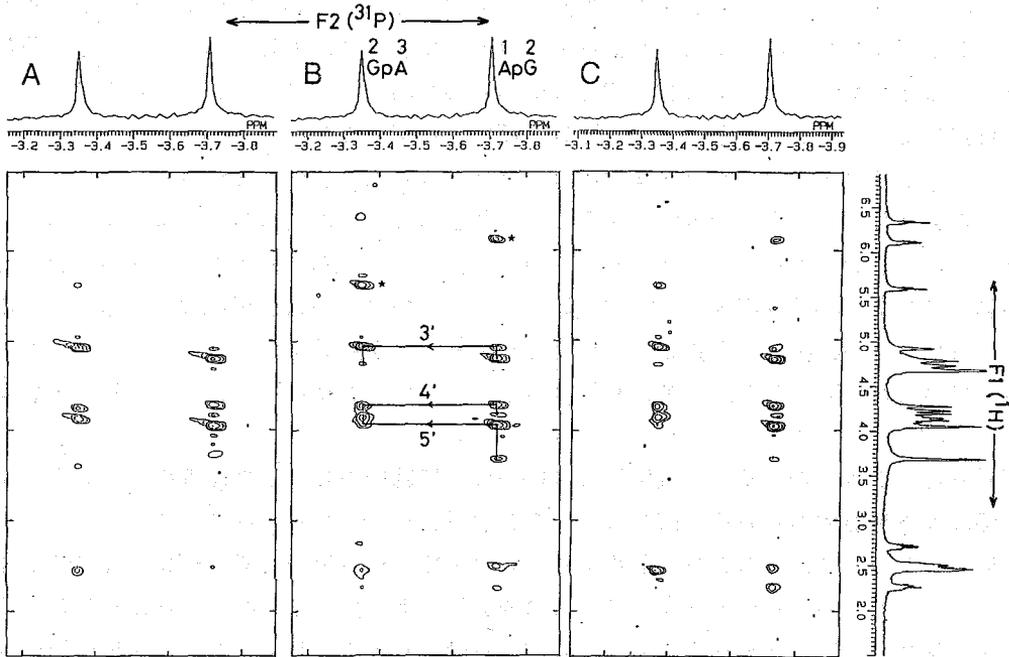


図4 d(A-G-A)のMLEV-CH法スペクトル。混合時間は A; 30ms B, C; 80ms
Cは古典的のスピンロックを使用。

(References)

1. Wüthrich, K. "NMR of Proteins and Nucleic Acids", John Willey and Sons, New York, p236, (1986)
2. Scheck, R. M., Russo, N., Boelins, R., Kaptein, R., van Boom, J. H. (1983) J. Am. Chem. Soc. **105**, 2914
3. Hare, D. R., Wemmer, D. E., Chau, S. H., Drobny, G., Reid, B. R. (1983) J. Mol. Biol. **171**, 319
4. Haasnoot, C. A. G., Westerink, H. P., van der Marel, G. A., van Boom, J.H. (1984) J. Biomolecul. Struct. Dynam. **2**, 345
5. Frey, M. H., Leupin, W., Sørensen, O. W., Denny, W. A., Ernst, R. R., Wüthrich, K. (1985) Biopolymers **24**, 2371
6. Sklenar, V., Bax, A. (1987) J. Am. Chem. Soc. **109**, 7525
7. Levitt, M. H., Freeman, R., Frenkiel, T., (1982) J. Magn. Resn. **47**, 328
8. Bax, A., Davis, D. G. (1985) J. Magn. Resn. **65**, 355

(横浜国大工) O阿久津秀雄、長森敏明、徳光英之

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF THE POLAR GROUP IN THE LECITHIN BILAYER

Hideo AKUTSU, Toshiaki NAGAMORI, Hideyuki TOKUMITSU (Yokohama National University, Faculty of Engineering)

Conformational analysis has been carried out for the polar group of phosphatidylcholine in the liquid-crystalline state by the use of the data of ^2H NMR, ^{31}P NMR and Raman spectroscopy. From Raman scattering it turned out that the torsion angle of the choline group is in the region of the gauche conformation both in the absence and presence of cations. Under this restriction ten solutions were found from the analysis of deuterium quadrupole splittings at the α , β and γ positions for in the absence of cations. Only two of them were found to be appropriate by referring to phosphorus chemical shift anisotropy. These conformations are similar to each other and also similar to one of the crystal structures. The analysis was carried out also for the phosphorylcholine group in the presence of cations and the glycerol backbone.

1. はじめに

リン脂質極性基とカチオンの相互作用は古くて新しい問題である。極性基は疎水性領域と水相との界面にあるために水相中の様々な分子と相互作用する。又、生体膜が生体内で発生する電場と相互作用する際、脂質二重膜部分で電場に対して反応するのは極性基であると考えられる。このような相互作用が3次構造的にどのようなものであるかを明らかにすることは相互作用が引き起こす物理化学的影響を理解する上で重要である。しかし、液晶状態にある脂質二重膜の構造を原子レベルの分解能で明らかにできる単独の方法はない。重水素NMRはそのような可能性を持つものの一つであるが、運動のモデルを導入する必要があり、解析する際に多価関数を取り扱うことになるので一意的に解を求めることはできない場合が多い。以前われわれはフォスファチジルコリン(図1)のコリン基について、一つの構造のみをとること、及びカチオンとの相互作用によりその構造は連続的に変化すると

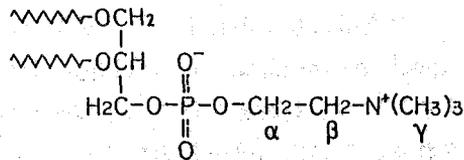


Fig. 1 Phosphatidylcholine

報告した。今回、同じコリン基について、重水素及びりんのNMRとラマン散乱の結果を合わせることによりほぼ全面的な解析を行うことができたので報告する。

2. 解析の方法

i) 運動のモデル

解析の対象は液晶状態にある二重膜中のフォスファチジルコリン分子の極性基である。従って、極性基全体は軸対称な運動をしている。更に、極性基の構造が a) 一つに固定されている場合、b) 鏡面对称な二つの構造の間を速い交換をしている場合、について解析を行った。極性基の無秩序な運動は実測結果と矛盾する。

i i) 重水素NMR

CD結合を持つ試料の重水素NMRのパウダーパターンからもとまる四重極分裂 $\Delta\nu_0$ は

$$\Delta\nu_0 = (3/4) (e^2 q Q / h) S_{CD}^{obs} \dots (1)$$

で表される。ここで、 S_{CD}^{obs} 、 $(e^2 q Q) / h$ は実測配向秩序パラメータ、静的四重極定数である。いま、分子軸の配向秩序パラメータを S_{m01} 、分子軸に対するCD結合の配向秩序パラメータを S_{CD} とする。分子軸とCD結合の揺らぎに相関がなければ

$$S_{CD}^{obs} = S_{m01} \times S_{CD} \dots (2)$$

となる。分子軸とCD結合のなす角を θ' とすると

$$S_{CD} = (3 \cos^2 \theta' - 1) / 2 \dots (3)$$

である。従って、 S_{m01} が既知であれば四重極分裂より分子軸とCD結合のなす角を知ることができる。本研究では S_{m01} としてグリセロール骨格の C_2-C_3 軸の揺らぎを用いた。又、分子内配向パラメータとしては図2のような三つの角度を用いた。ここで (ξ, ρ, ζ) は α 位に固定された分子内座標であり、 Z は分子軸を示す。 α_5 は $O-C-C-N$ の内部回転角である。

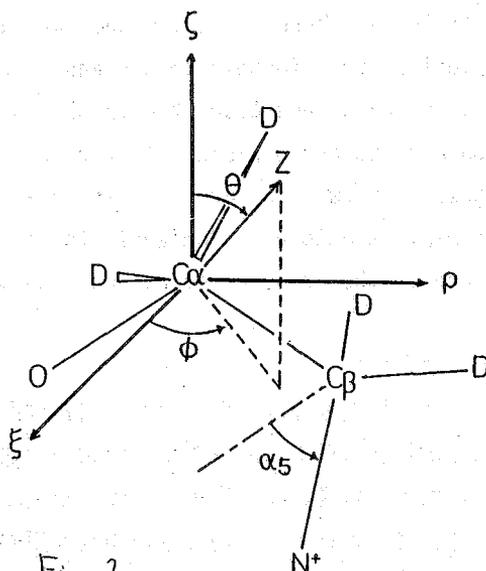


Fig. 2

Definition of angles θ , ϕ and α_5 .
Z: the director axis

i i i) ^{31}P NMR

リン脂質のリンの化学シフトテンソルの主値は幾つか報告されている。ここでは $\sigma_{11} = -81\text{ppm}$ 、 $\sigma_{22} = -25\text{ppm}$ 、 $\sigma_{33} = 110\text{ppm}$ を用いた。軸対称な運動をしている分子では化学シフトテンソルが対称軸の周りに平均化され、化学シフトの異方性 $(\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})$ が観測される。この値も分子軸の揺らぎとリン酸基の配向によって決まる。本研究では様々な配向について化学シフトの異方性を計算して実測値と比較した。

i v) ラマン散乱

われわれの帰属したコリン基のC-N全対称伸縮振動の波数より、フォスファチジルコリン二重膜中のコリン基はカチオンの存在の有無に関わらずゴーシュ型をとることがわかった。従って、本解析ではその内部回転角 (α_5) を $40^\circ - 90^\circ$ の範囲内にあるとした。この制限は解析を著しく容易にした。

3. 結果

運動モデル a については以前近似的方法によって解析したときとほとんど同じ結果が得られた。

運動モデル b についてはコリン基の3カ所を重水素化した試料の四重極分裂値を同時に満足する構造を調べた。まず、図2から明らかかなように α 位の四重極分裂は θ と ϕ のみによって決まる。そこで、図3 a のようにここでの実測

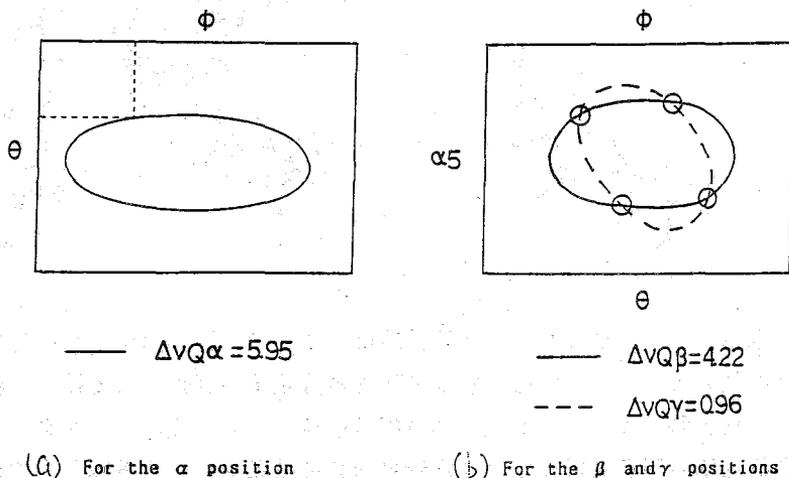
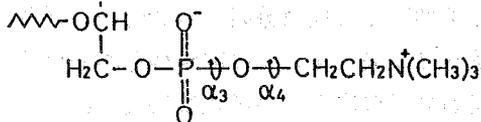


Fig. 3 Schematic view of the analysis

値を満たす θ と ϕ の関係を得ることができる。この関係を使うと β 及び γ 位の四重極分裂値は α_5 と ϕ の2変数だけで計算できる。図3 a のような等高線を β と γ の実測値に対してもかくことができ、その交点から三つの実測値を満足する角度を得ることができる (図3 b)。その結果、10個の解が得られた。これらのうちリンの化学シフトの異方性の実測値を満足するものは2個であった。その結果を表1に示す。この二つの構造は非常によく

Table 1 Solutions obtained from ^2H - and ^{31}P -NMR data in the absence of cation (degree)

α_3	α_4	α_5	ϕ	θ
51	120	83.2	6.3	22.7
-59	-150	83.2	6.3	22.7
56	130	89.5	161.6	154.7

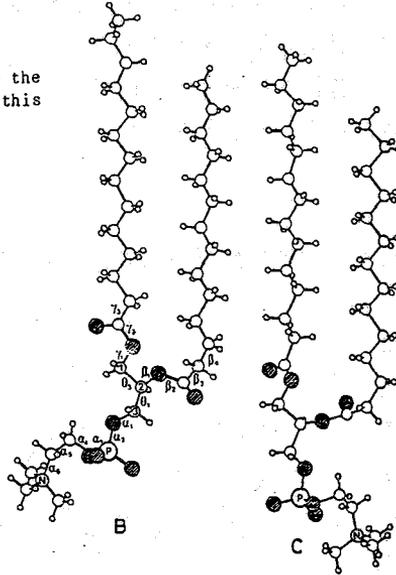
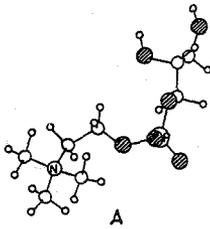


似通っており、極性基はほぼ膜面に平行に配向している。

1,2 dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholineの結晶構造が報告されており、二つの構造が存在することが見いだされた。本解析で得られた構造はそのうちのひとつで極性基がより膜面に平行に配向している構造と非常によく似て

Fig. 4

- A A polar group conformation of DPPC in the liquid-crystalline state obtained in this work
 B,C Crystal structures of DMPC



いる。図4に本解析で得た構造の一つと結晶構造二つを示す。液晶状態では分子間の距離が結晶よりも大きくなるので、コリンのように大きな基でも膜面に平行な配向が可能になるものと思われる。

水相にイオンが存在すると極性基はそれとの相互作用により構造を変えることをわれわれは見いだした。これは重水素の四重極分裂値の変化として検出されている。そこで、イオン結合時の α 、 β 、 γ 位の四重極分裂値を -3.0 、 7.92 、 0.85 kHzとして同様な構造解析を行った。重水素NMRの結果を満足する解としては7組得られた。その

Table 2 Solutions obtained from ^2H - and ^{31}P -NMR data in the presence of cation (degree)

α_3	α_4	α_5	ϕ	θ
-75	140	58.1	132.9	84.5
-60	120	54.7	132.9	97.5
-67	170	54.7	132.9	97.5
-60	128	30.6	132.7	108.8

内、リンの化学シフトの異方性の結果と矛盾しないものは3組であった。それを表2に示す。この場合、極性基の構造にはカチオンとの結合型と非結合型が存在し、そのあいだには速い交換があることを意味する。カチ

オンとの結合型の構造では極性基が膜面に対して大きく傾いて水相に突き出している。このような構造は局所的膜電位に対して大きな影響を与えるものと考えられる。

グリセロール骨格には5個のプロトンが付いている。これらを重水素に置き換えるとすべて異なる四重極分裂値を与える。従って、コリンの場合と異なり、メチレン基の二つのプロトンは非等価である。この場合は内部回転角についての情報はないのでそれについての制限は設けられない。ただし、結晶構造から考えて、 C_2-C_3 軸は分子軸から大きくは外れないとの制限を設けた。このような条件下で四重極分裂についての解析を行ったところ、2組の解が得られた。結晶解析ではかなり異なる二つの解が得られているが、われわれが液晶状態の二重膜を解析して得た構造はその内の一つに比較的近い。

交差緩和時間, スピン・エコスペクトルによるウシ血漿アルブミン構造転移の研究

(岐阜大・医・2生理, *1病理, **生理研, ***京大・理・化学) 恵良聖一,
○桑田一夫, 長岡俊治, 曾我美勝, 加藤一夫*, 巨弘**, 赤坂一之***

¹H-NMR STUDIES ON STRUCTURAL TRANSITIONS OF BOVINE PLASMA ALBUMIN BY CROSS-RELAXATION MEASUREMENTS AND SPIN-ECHO-SPECTRA

Bovine plasma albumin(BPA) and/or bovine mercaptalbumin(BMA) showed a characteristic two-step transition in acidic region, one corresponding to the N→F transition (pH 4.40 to 3.75, 0.10 M NaCl and the other to the acid-expansion (the F→E transition, pH 3.60 to 2.80), and an one-step transition in alkaline region, the N→B transition (pH 7.0 to 9.0). These transitions were studied by measuring CD-resolved secondary structure, ¹H-NMR spectra, spi-echo spectra obtained using a $[\pi/2 - (\tau - \pi - \tau)_n]$ spin-echo pulse sequence with $\tau = 0.001$ sec and $n = 5$ or 10 (0.010 sec or 0.020 sec CPMG spectra, Tanaka et al (1987)) and cross-relaxation times (T_{IS}) between irradiated and observed protons, obtained by the inversion recovery method of Akasaka (1981). In acidic region in 0.10 M NaCl, CD-resolved secondary structure, such as $f(\alpha)$ showed a two-step decrease in the N→F and F→E transitions. T_{IS} values of various side chain protons, obtained by f_2 -irradiation at desired frequency, such as 7.13, 4.72, 0.40, -2.45 p.p.m. at $\gamma H_2/2\pi$ of 20~107 Hz showed increases in the N→F and F→E transitions, indicating that the rigidity in intramolecular structure is partly lost and the internal motion is liberated in the F- and E-forms. Changes in 0.010 or 0.020 sec CPMG spectra in these transition were in agreement with increases in T_{IS} values. In alkaline region, changes in $f(\alpha)$, T_{IS} values and 0.010 or 0.020 sec CPMG spectra in the N→B transition with no added were similar to those in the N→F transition in acidic region, indicating that the B-form with no added salt is mobile structure. However, in the N→B transition in 0.10 M NaCl, there were not significant changes in $f(\alpha)$, T_{IS} and CPMG spectra.

分子量66 Kのウシ血漿アルブミン(BPA), ウシ・メルカプトアルブミン(BMA)は酸性側においてN→F転移(pH 4.40→3.75), 酸膨潤(F→E転移, pH 3.60→2.80)の2段階構造転移を示す。また、中性領域で、N→B転移(pH 7.0→9.0)なる構造変化を示す。筆者等は、二次構造($f(\alpha)$, $f(\beta)$, $f(R)$), スピン・エコ・スペクトル(CPMGスペクトル), 交差緩和時間(T_{IS})を測定し、上述の構造転移における分子の「固さ」の変化を測定した。

[実験材料及び方法]

市販BPAは微量のプロテアーゼを含み、この酵素はF型のみ、Gln-392とCys-435の間で1~2箇所加水分解し、BPA*, BPA**と呼ばれる構造になる。このため酸性側の実験ではSE-Sephadexを用いて精製した酵素を含まぬBMAを使用した。中性、アルカリ側の実験では、分子内SH, S-S交換反応を防ぐため、SH基をヨードアセトアミドで化学修飾したIA-BPAを使用した。

二次構造($f(\alpha)$, $f(\beta)$)はJasco J-40S円二色性分散計を用い、Chen等(1972)の方法により求めた。CPMGスペクトルは $[\pi/2-(\tau-\pi-\tau)]_n$ スピン・エコ・パルス系列で、 $\tau = 0.001$ 秒、 $n = 5$ または10 (0.010秒または0.020秒CPMGスペクトル)を用いて測定した(田中等 1987)。交差緩和時間(T_{IS})はAkasaka(1981)のinversion recovery法を用い、8.65, 7.13, 4.72, 0.40, -2.45 p.p.m.を $\gamma H_2/2\pi$, 20~107Hzで f_2 照射して測定した。

[結果と考察]

1. N→F転移, F→E転移 —— BMAは酸性側において、N→F転移, 酸膨潤(F→E転移)の2段階構造転移を示す。N, F, E型の分子容の指標となる固有粘度は、それぞれ3.8, 4.4, 8.3 ml/g (0.15 M KCl)である(Tanford et al, 1955)。N(pH 4.5), F(pH 3.7), E(pH 2.8)型の $f(\alpha)$, $f(\beta)$ はそれぞれ、0.68, 0.13 ; 0.58, 0.20 ; 0.48, 0.25であった(0.10 M KCl)。従来、N→F転移では、分子容、二次構造の変化が少なく、主として三次構造変化であると説明されていた。N→F転移におけるBMA分子の「固さ, rigidity」の変化を見るためTable 1に示すように、交差緩和時間(T_{IS})を測定した。一般に、N型の T_{IS} 値に比し、F型の T_{IS} は1.5~2倍、E型の T_{IS} 値はさらに長くなった。この結果は、N→F, F→E転移により、BMAの固さの減少、側鎖、セグメント等の動きの増加を示唆している。また、Fig. 1の0.010秒CPMGスペクトルも、 T_{IS} の増加に対応して、側鎖の動きの増加を示している。

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)とBMAの複合体(AD_m , m はSDS/BMAモル比, $0 \leq m \leq 12$)のN→F転移について研究した。 $AD_{1.0}$ の分子容(固有粘度), 二次構造($f(\alpha)$, $f(\beta)$)がN→F転移で変化しなかった。 T_{IS} 値(Table 1)は、 AD_0 , 即ちBMAと同様に、N→F転移で増加し、0.010秒, 0.020秒のCPMGスペクトルも、側鎖の動きの増加を示した。 $AD_{1.0}$ のF型はDolgikh et al (1981), Ohgushi & Wada (1983)により報告された「molten-globule state」に類似した構造であろう。

2. N→B転移 —— IA-BPA, BPAはpH 7.0→9.0において、N→B転移と呼ばれる構造転移を示すことが $[\alpha]_{513}$, $[\alpha]_{233}$, $[\theta]_{233}$, $[\theta]_{232}$ などのpHプロファイルより見出された。最初に、低イオン強度($\mu < 0.025$)におけるN→B転移を説明し、ついで0.10 M NaCl, KCl中における転移

について説明する。

低イオン強度 ($\mu < 0.025$) における N→B 転移 —— $f(\alpha)$, $f(\beta)$ の pH プロフィールは pH 7.0→9.0 にわたってあきらかに N→B 転移を示した。N 型 (pH 6.8), B 型 (pH 9.0) の $f(\alpha)$, $f(\beta)$ はそれぞれ 0.70, 0.12 ; 0.62, 0.18 であった。N→B 転移 ($\mu \sim 0$) において T_{1S} 値が増加した (Table 2)。即ち, B 型構造で, 分子の固さが減少した。0.010 秒 CPMG スペクトル (Fig. 2) も, B 型の側鎖の動きの増加を示唆した。 $\mu \sim 0$ で B 型が $f(\alpha)$ も減少し, $^1\text{H-NMR}$ 的により mobile な状態にあることは, N→B 転移が, 酸性側の N→F 転移に類似していることを示唆している。

$\mu = 0.10 \sim 0.20$ における N→B 転移 —— 0.10 M KCl または NaCl 中における N→B 転移は $[\alpha]_{513}$, $[\theta]_{268}$, $[\theta]_{262}$ 等の pH プロフィールにおいてのみ観測される。 $f(\alpha)$, $f(\beta)$ は N→B 転移において, 殆ど変化しなかった。N, B 型の T_{1S} 値 (Table 2), 0.010 秒または 0.020 秒の CPMG スペクトル (Fig. 2) も殆ど変化しなかった。しかしながら, 薬物等に対する結合能は B 型で大きく増加することが報告されている。N→B 転移における結合能増加の機序は, 次のように説明し得るだろう。BPA は 3 個のドメインをもち, 各ドメインはヒンジ部位でつながった 2 個のサブドメインよりなっている。各サブドメインの二次構造, NMR により観測される固さ, 側鎖の動きが N→B 転移で大きく変化しなくともヒンジを介するサブドメイン間の動きが増加すれば, 結合能は増加するだろう。

Fig. 1

Fig. 2

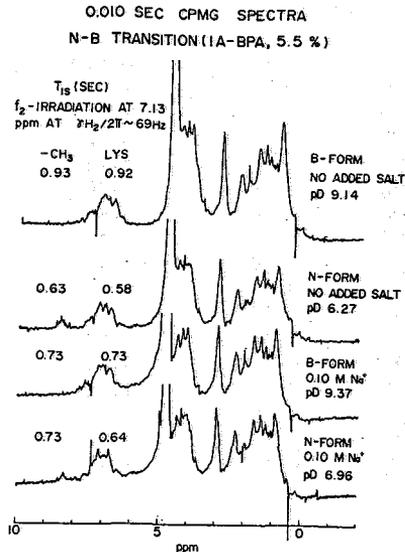
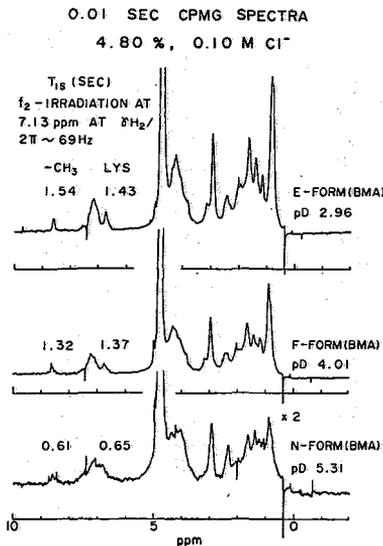


Table 1. Cross-relaxation times (T_{IS}) of side chains ($-\text{CH}_3$, ϵ - CH_2 of Lys and aromatic protons (7.13 p.p.m.)) of BMA and sodium dodecyl sulfate-BMA complex (ADm ; m, molar ratio of added sodium dodecyl sulfate to BMA) in 0.10 M Cl^- .

pD (form)	f_2 (p.p.m.)	$\gamma H_2/2\pi$ (Hz)	T_{IS} (SEC)		
			$-\text{CH}_3$	ϵ - CH_2	Arom
5.31 (N)	8.65	107	0.67	0.53	0.78
4.00 (F)	8.65	107	1.01	0.87	0.74
2.96 (E)	8.65	107	1.75	1.59	3.45
5.31 (N)	7.13	69	0.61	0.65	
4.00 (F)	7.13	69	1.32	1.37	
2.96 (E)	7.13	69	1.54	1.43	
5.31 (N)	4.72	20	1.16	1.32	1.45
4.00 (F)	4.72	20	1.37	1.39	1.37
2.96 (E)	4.72	20	2.04	2.08	1.70
5.31 (N)	0.40	39	0.74	0.44	0.81
4.00 (F)	0.40	39	0.82	0.80	1.01
2.96 (E)	0.40	39	1.21	1.52	1.35
5.31 (N)	-2.45	107	0.73	0.73	0.89
4.00 (F)	-2.45	107	1.24	1.21	1.03
5.40 (AD ₁₀ , N)	7.13	69	0.58	0.53	
3.91 (AD ₁₀ , F)	7.13	69	1.11	1.01	
5.40 (AD ₁₀ , N)	4.72	20	1.54	1.54	1.28
3.91 (AD ₁₀ , F)	4.72	20	1.54	1.47	1.59
5.40 (AD ₁₀ , N)	0.40	39	0.39	0.39	0.39
3.91 (AD ₁₀ , F)	0.40	39			
5.36 (AD ₄ , N)	7.13	69	0.61	0.51	
3.96 (AD ₄ , F)	7.13	69	0.84	0.74	
5.36 (AD ₄ , N)	0.40	39	0.44	0.29	0.54
3.96 (AD ₄ , F)	0.40	39	0.65	0.65	0.76

Table 2. Cross-relaxation times (T_{IS}) of side chains ($-\text{CH}_3$, ϵ - CH_2 of Lys and aromatic protons (7.13 p.p.m.)) of IA-BPA (iodoacetamide-blocked BPA) with no added salt or 0.10 M Na^+ .

pD (form)	Salt (M)	f_2 (p.p.m.)	$\gamma H_2/2\pi$ (Hz)	T_{IS} (SEC)		
				$-\text{CH}_3$	ϵ - CH_2	Arom
6.27 (N)	~ 0	7.13	69	0.63	0.58	
9.14 (B)	~ 0	7.13	69	0.93	0.92	
6.27 (N)	~ 0	4.72	20	0.95	0.95	0.94
9.14 (B)	~ 0	4.72	20	1.21	1.24	1.10
6.27 (N)	~ 0	0.40	39	0.37	0.41	----
9.14 (B)	~ 0	0.40	39	0.57	0.60	0.48
6.27 (N)	~ 0	-2.45	107	1.02	1.04	1.28
9.14 (B)	~ 0	-2.45	107	1.49	1.96	1.28
6.96 (N)	0.10	7.13	69	0.73	0.64	
9.27 (B)	0.10	7.13	69	0.73	0.73	
6.96 (N)	0.10	0.40	39	0.52	0.65	0.58
9.27 (B)	0.10	0.40	39	0.64	0.63	0.82
6.96 (N)	0.10	4.72	20	1.41	1.30	1.37
9.27 (B)	0.10	4.72	20	1.33	1.35	1.22
6.96 (N)	0.10	-2.45	107	0.75	0.74	0.53
9.27 (B)	0.10	-2.45	107	0.78	0.68	0.87

第 2 日

9 月 23 日(金)



(化技研) ○早水紀久子、柳沢 勝、(お茶大理) 堀 佳也子、大橋裕二

High Resolution Solid-State ¹³C NMR Studies on Liquid Crystals

3. ¹³C NMR spectra and X-ray Analysis of Some Chiral Smectogens

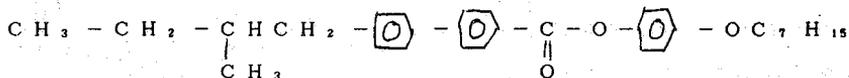
K.Hayamizu and M.Yanagisawa (National Chemical Laboratory for Industry) and K.Hori and Y.Ohashi (Department of Chemistry, Ochanomizu University)

Variable-temperature high-resolution solid-state ¹³C NMR spectra were observed for chiral smectogenic compounds 5*BBC00B07 and 70BBC00B5* of which crystal structures were studied by X-ray analysis. In the solid state, the lower-field shifts for the biphenyl carbons adjacent to the inner bond were observed for the twisted configuration, while the upper-field shifts for the coplanar configuration. The 180° flip of the benzene ring with the activation energy 4 kcal/mol was clearly observed for 5*BBC00B07. The disappearance of the particular spectral lines depending on the temperature is related to the molecular motions.

カイラルな側鎖を持ちスメクチック C 相 (S_m^{*}C) を形成する液晶は強誘電性を示すので、実用化を目的とする研究が行われているが、その構造についてはまだ明確に説明されていない。S_mC 相はネマチック相に比べれば高い秩序性があり、構造的には固体により近いと考えられる。一方、液晶中で配向している小さな分子の構造決定等に関する研究の報告例は多いが、液晶そのものの研究としては重水素置換した化合物の ²H NMR, ¹H NMR の研究がみられる程度で、¹³C NMR の研究は少ない。液晶物質の固体高分解能 ¹³C NMR スペクトルでは、特定の炭素原子に対して線幅が広がったり、シグナルが見えなかったり、また分裂がみられたりするが、これらは明瞭に説明されていない。本報告では X 線回折法によって結晶構造が決められている 2 つのスメクチック液晶の固体高分解能 ¹³C NMR の温度変化を測定し、分子運動について明らかにした。

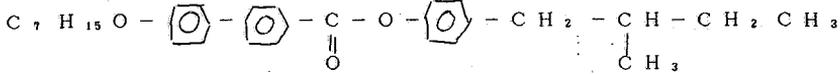
本研究で用いた液晶の構造式、省略名及び相転移温度を示す。

省略名: 5*BBC00B07



固体 → 80°C → S_m^{*}C → 87°C → コレスティック相 → 176°C → 等方相

略名：70BBCC00B5*



固体 → 92 °C → S_m*C → 128 °C → S_mA → 169 °C → コレステリック相 → 176 °C → 等方相

実験 固体高分解能 ¹³C NMRは CP/MAS 法により、JEOL FX-200 を用いて 50.10 MHz で測定した。MAS 回転数は約 3.7 KHz, CP 時間は 3 ms で約 200 回の積算を行った。Dipole Dephasing スペクトルの測定における遅延時間は 40 μs である。化学シフト値は外部基準としてアダマンタンの CH シグナルを 29.5 ppm として得た。温度変化におけるサンプル温度は、融点温度による一点補正で決定した。

結果 X線回折から 5*BBC00B07 は単位格子内に形の異なる 2 種の分子が逆平行の形で存在するが、70BBCC00B5*では単位格子内に 1 個の分子が存在する。前者では 2 種類の分子はカイラルな側鎖のコンフォメーションが非常に異なるが、他の部分の構造は似ており、ビフェニルの 2 つのベンゼン環のねじれ角は約 60° である。一方後者のビフェニルのベンゼン環の間のねじれ角は小さく平面に近いことがわかっている。5*BBC00B07 の ¹³C NMR スペクトルについては去年の液晶討論会で一部を報告してあるので、ここでは 70BBCC00B5* を中心に述べる。図 1 に CDCl₃ 溶液と、融点

直下 (約 90 °C) における CP/MAS, dipole dephasing スペクトルを示す。溶液スペクトルの帰属は化技研で構築している NMR スペクトルデータベース、SDBS-NMR を参考にして行った。dipole dephasing スペクトルでは四級炭素と速い運動のあるメチル炭素のシグナルが測定されるが、液晶転移点直下では数多くのシグナルが観測されており、速い分子運動があることを示唆している。常温付近では四級炭素とメチル炭素及びセグメント運動の速い位置にある側鎖の炭素シグナルだけが観測される。液晶相における ¹³C NMR スペクトルは線幅が広がり固体及び溶液状態のスペクトルとは異なったパターンを示す。固体状態でのスペクトルは溶液のスペクトルにはほぼ対比できるので、帰属を付けたうえで固体状態と溶液状態でのシフト値の差を Table 1 に示す。

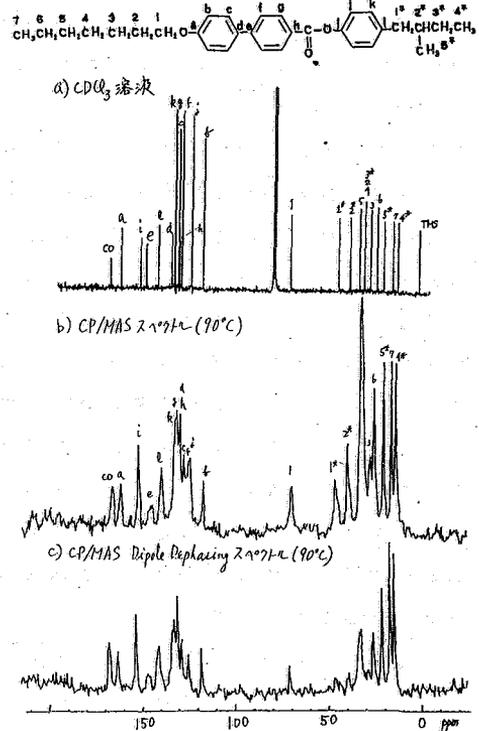


Fig. 1 ¹³C NMR spectra of 70BBCC00B5*

Table I. The Induced ^{13}C shifts in the solid state (ppm)

5 BBCC00B07 (45 °C)					70BCC005* (90 °C)						
Aromatic		Heptoxy		Chiral	Aromatic		Heptoxy		Chiral		
CO	0.2	1	-0.8	1*	0.1	CO	-0.4	1	0.4	1*	2.2
a	1.0	2	2.4	2*	-0.7	a	0.7	2	1.4	2*	1.5
b	-0.4	3	3.7	3*	0.5	b	0.6	3	-0.1	3*	1.4
c	2.5	4	0.6	4*	-0.6	c	-2.5	4	1.2	4*	1.1
d	2.3	5	2.6	5*	0.4	d	-3.7	5	-0.7	5*	0.2
e	2.3	6	2.4			e	-2.0	6	1.5		
f	2.5	7	0.2			f	-3.0	7	0.7		
g	1.1					g	0.5				
h	1.3					h	0.5				
i	0.5					i	1.6				
j	-0.3					j	0.6				
k	-					k	0.3				
l	-					l	-0.9				

Table I から分かるように、構造的には非常によく似ているこの2種類の化合物において、芳香族炭素では低磁場方向(5*BBCC00B07)と高磁場方向(70BCC00B5*)に2~3 ppmの大きなシフトがビフェニル環の内部結合に接している炭素シグナルにみられる。溶液状態においては、ビフェニル環の内部回転を仮定できるので、固体状態において生じた化学シフトは、固体における内部回転の停止に由来し、2つの化合物のねじれ角の相違によってシフトの方向が決まるものと思われる。このような現象がビフェニル化合物に一般的かどうかについてはデータの蓄積が必要であろう。また芳香族炭素の化学シフト値は固体状態で温度変化をしても大きく変わらず、ビフェニル環は固定したままであると考えられる。一般に側鎖炭素の固体状態におけるシフトは小さいが、5*BBCC00B07の2,3,5,6の炭素では2.5~3 ppmの大きな低磁場シフトが見られる。この化合物では、ヘプトキシ基が伸びた形で配向し、単純なジグザク構造をとらないことがX線解析から明らかになっているのでこのために大きな低磁場シフトがみられたものと考えられる。

5*BBCC00B07の常温の固体スペクトルには芳香族炭素のj,kのシグナルは測定されず、低温にすることによって溶液状態のjとkに対応した位置に2本のシングレットが現れ、続いてブロードになり、それが2組のダブルットに変化するパターンがみられる。温度変化のパターンは、溶液状態の2-サイト間の化学交換の系と良く似ている。パターン解析することによって、活性化エネルギー約4 Kcal/molを得た。側鎖炭素のシグナルの温度変化

等を考察した結果、ベンゼン環が 180° フリップしていると解析できる。この場合ベンゼン環は $\text{—O—}\langle\bigcirc\rangle\text{—O—}$ の構造をとっており、環の反転は容易と考えられる。X線解析の結果からも十分な空間的余裕があることが分かっている。このような現象はフェニルアラニン、ポリマーなどの固体中でも観測されている。

ここでは70BBC00B5*の固体状態のスペクトルの温度変化をFig. 2に示す。Fig. 1から明らかのように、 90°C のスペクトルではヘプトキシ基のオルト位の炭素bのシグナルは溶液状態と同様に1本であり、2個の炭素は等価になっている。一般にはメトキシ基やOH基のオルト位炭素は2本のシグナルを与える。温度が下がると(70°C 付近)このシングレットは観測されなくなり、 60°C 付近から小さなシグナルが現れ、 40°C 付近ではブロードなシグナルとしてみえるようになる。更に温度を下げると 20°C 付近ではダブルットになる。炭素bに隣接した炭素cのシグナルは分離しないので、明確な変化を観測できない。シグナルbの変化が見られる原因としては5*BBCO0B07の場合のようにビフェニル環の一方のベンゼン環の 180° フリップあるいはヘプトキシ側鎖のセグメント運動の両方が考えられる。

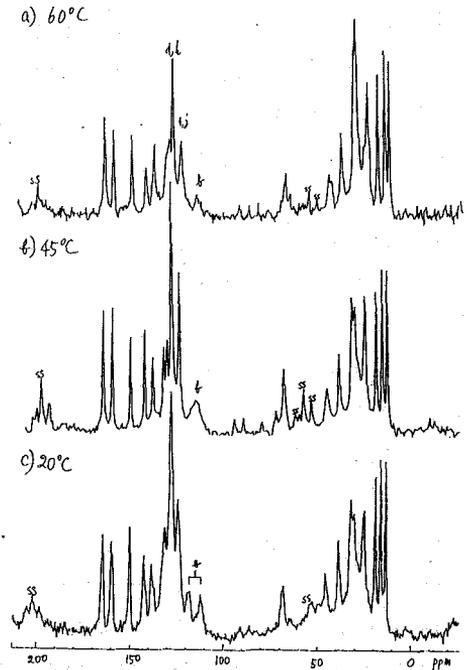


Fig.2 Temperature dependent spectra

化学シフトの議論で述べたように、ビフェニル環の内部回転はないものと考え、さらにビフェニル環全体が内部回転なしにフリップすることは考えにくいので、側鎖のセグメント運動が重要であるといえよう。事実側鎖炭素シグナルにおいて線幅やピーク強度の温度依存性が見られ、予備的な実験から側鎖炭素の T_1 は非常に短い。従ってシグナルbの温度変化はヘプトキシ基のセグメント運動による効果と考えられるが、詳細な解析を現在行っている。また特定のシグナルがある温度領域で見られなくなる現象がある。一般には相関時間が 10^{-6} 秒のオーダーの分子運動が存在する時にプロトンの結合している炭素シグナルの線幅が広がることが理論的に示されている。本研究で見られた現象がこの理論に対応するか否かについては未だ検討の余地があるように思われる。70BBC00B5*においても $\text{—O—}\langle\bigcirc\rangle\text{—C—}$ タイプのベンゼン環がフリップする可能性がある。 ^{13}C NMRにおいて炭素jとkの各々2個の炭素は化学シフトの差がないために、スペクトルパターンからの解析はできず、シグナルが重なることもあって、現在のところ明確な知見は得ていない。

(化技研) 林 繁信・鈴木 邦夫・清住 嘉道・早水 紀久子

Motion of the tetramethylammonium ions trapped in zeolite

(National Chemical Laboratory for Industry) Shigenobu Hayashi,
Kunio Suzuki, Yoshimichi Kiyozumi, and Kikuko Hayamizu

High-resolution solid-state ^{13}C NMR spectra have been measured for various types of zeolites trapping tetramethylammonium ions in their cages. Various modes of pulse sequence were used to indicate that the ions move rather freely in the cage. ^{13}C spin-lattice relaxation times have been measured as well, which can be related to the size of the cage as well as the ^{13}C chemical shift. The site occupancy of the ions in the zeolite framework has been discussed quantitatively.

ゼオライトは結晶性アルミノシリケートであり、 AlO_4 、 SiO_4 四面体が3次元的につらなつた多孔性の構造をしている。種々のゼオライトが有機塩基を用いて合成されている。有機分子はゼオライト生成過程においてテンプレートの役割を果たしていると考えられているが、その機構についてはよくわかっていない。ゼオライト骨格中に閉じ込められた有機塩基の構造や位置を知ることはゼオライトの結晶化過程を明らかにする上で非常に重要と考えられる。

有機塩基としてテトラメチルアンモニウム (TMA) イオンを用いて種々のゼオライトをアルミノシリケートゲルから合成することができる。結晶化過程においてトラップされたTMAイオンはゼオライト骨格内の特定のサイトに存在していると考えられる。前回の報告において、我々は種々のゼオライト中に閉じ込められたTMAイオンの ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルの測定を行ない、 ^{13}C ケミカルシフトがTMAイオンが閉じ込められている細孔のサイズによって変化することを報告した。¹

本研究では、固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルを種々のパルス系列を用いて測定し、TMAイオンが細孔中でかなり自由に動きまわっていることがわかった。また、 ^{13}C 核のスピン-格子緩和時間の測定を行ない、緩和時間が細孔のサイズによって変化することを見いだした。これらの結果から、細孔中でのTMAイオンの運動について考察するとともに、TMAイオンの各細孔への入り方を定量的に議論する。

【実験】 TMAイオンを含んだゼオライト試料は前回用いたものと同じである。

固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルはブルカー社MSL-400を用いて測定した。 ^{13}C 核の周波数は100.62 MHzであり、測定は室温で行なった。ケミカルシフトはアダマンタンの高磁場側ピークを29.50 ppmとして決めた。 ^{13}C スピン-格子緩和時間の測定には反転回復法を用い、シグナル取り込みの間だけ ^1H デカップリングを行なった。

【結果及び考察】

1. ^{13}C NMRスペクトル

図1にAタイプゼオライト中のTMAイオンの ^{13}C NMRスペクトルを示した。図1Aは ^1H デカップリング(DD)を行ない通常のシングルパルスで測定したスペクトルである。線幅の広いシグナルが得られる。図1Bはクロスポーラリゼーション(CP)とマジック角回転(MAS)法を併用して測定したスペクトルである。58.6、56.8、56.0 ppmに3つのピークが観測された。このスペクトルは、前回報告した50-10 MHzで測定したスペクトルとシフト値、相対強度比とも一致している。Aタイプゼオライトにはソーダライト(β)ケージ及びそれより大きい α ケージがあり、観測されたピークはそれぞれ、ソーダライト(β)ケージ、 α ケージ、外表面のTMAイオンに帰属される。コンタクト時間を増加させてスペクトルの測定を行なったところ10~20 msecで強度が増加しなくなった。図1Bのスペクトルではコンタクト時間を18 msecにしている。アダマンタンで6 msec前後で最大強度が得られたことを考えるとAタイプゼオライト中のTMAイオンではCP効率がかなり悪いと言える。即ち、TMAイオンはゼオライト中でかなり速い分子運動をしていると考えられる。図1Cは ^1H デカップリングとMASを併用し、CPを用いないで測定したスペクトルである(DD/MAS)。BとCでは積算回数が異なるので単純にSN比を比較できないが、積算回数を考慮しても(Bは400回、Cは1800回)、CにおいてかなりのSN比の向上がみられる。ピーク位置はBと全く同じであるが、3本のピークの相対強度比は大きく異なっている。即ち、一番高磁場側のピーク強度の増加が著しい。

図2にオフタイト2種とZSM-4の ^1H デカップリングMASスペクトルを示した。オフタイトでは2本のピークが観測された。低磁場側のピークはグメリナイトケージ、高磁場側のピークは管状のスーパーケージ(γ ケージ)内のTMAイオンに帰属される。ZSM-4では57.8 ppmにグメリナイトケージ内のTMAイオンが観測された。

表1にNMRの結果をまとめた。DD/MASスペクトルにおいては、各ピークの面積強度は各ケージ内のTMAイオン量に比例している。一方、TMAイオンの全量はTGの結果から求められる。これらの結果から、各ケージ1個当りのTMAイオンの個数を計算した(表1の占有率)。Aタイプゼオライトでは β ケージ、オフタイトとZSM-4ではグメリナイトケージにおいて1に近い占有率を示している。これらの細孔がTMAイオンによって型どられていると考えられる。

図3に ^1H デカップリングしないでMASのみで測定したスペクトルを示した。Aタイプゼオライトでは56.0 ppmを中心とした4重線が線幅の広いピークの上に重なって観測され

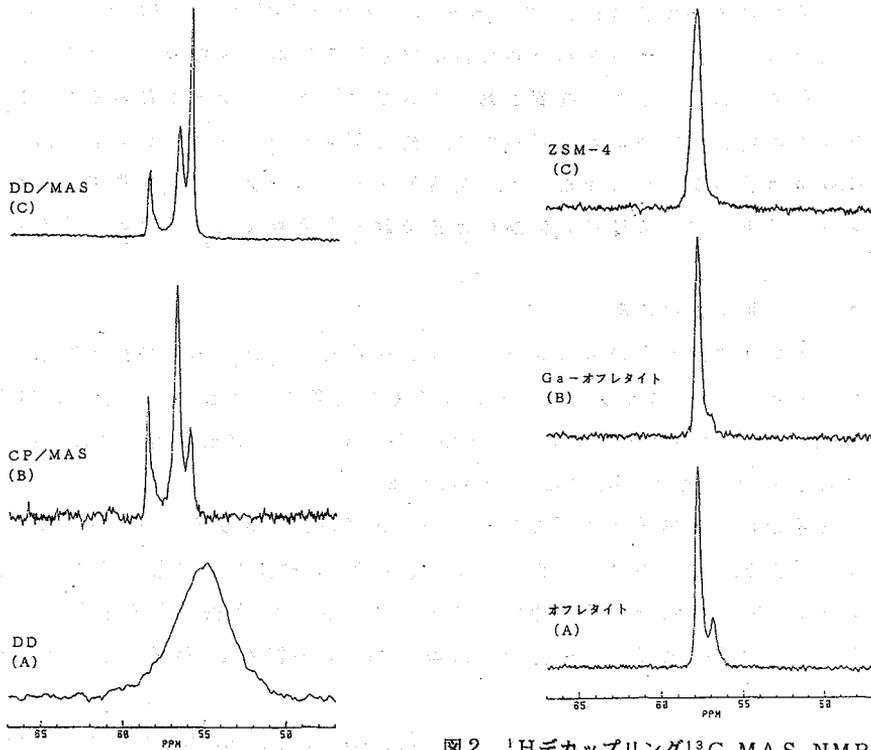


図2. ^1H デカップリング ^{13}C MAS NMRスペクトル

図1. Aタイプゼオライトの ^{13}C NMRスペクトル

表1. ^{13}C NMRの結果及び細孔の占有率

試料	シフト値 (ppm)	割合 (%)	T_1 (s)	ケージ (細孔)	占有率
A	58.6	16	8.9	β	1.17
	56.8	37	0.9	α	2.72
	56.0	47	0.5	外表面	
オフレタイト	57.7	80	3.3	グメリナイト	0.76
	56.7	20	3.8	γ	0.19
Ga- オフレタイト	57.8	93	3.1	グメリナイト	0.69
	57.0	7	約3	γ	0.05
ZSM-4	57.8	100	2.5	グメリナイト	1.07

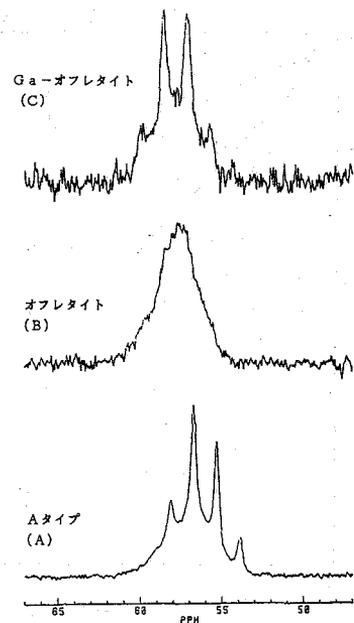


図3. ^1H デカップリングをしない ^{13}C MAS NMRスペクトル

た。TMAイオンのメチル基のCH₃スカラーカップリングパターンであり、Aタイプゼオライトの外表面のTMAイオンがかなり自由に運動していることを示している。同様のパターンがGa-オフレタイトでも観測され、グメリナイトケージ内においてもTMAイオンがかなり自由に運動していることがわかる。同じグメリナイトケージでも普通のオフレタイトでは線幅の広いシグナルが得られ、ZSM-4ではシグナルが観測されなかった。Ga-オフレタイトにおいてはGa置換の効果で細孔が大きくなっていると考えられる。

2. ¹³Cスピン-格子緩和時間

図4にAタイプゼオライトのスピン-格子緩和曲線を示した。単一の指数関数的減衰を示していないのは¹H核とのカップリングによるものと考えられる。 τ の小さい部分を用いてT₁値を決定した。他の試料についても測定を行ない、その結果を表1にまとめた。細孔の大きさによりT₁が大きく変化することがわかる。

細孔の内接球の直径で細孔サイズを表わすと、 β 6.8、グメリナイト 7.6、 γ 8.7、 α 11.1Åとなる。図5に¹³C核のケミカルシフト及びT₁の細孔サイズ依存性を示した。細孔が小さくなるにつれ、共鳴周波数が低磁場側にシフトし、T₁が長くなる傾向にある。細孔が小さくなるにつれTMAイオンの運動が束縛され、その結果T₁が長くなったものと考えられる。

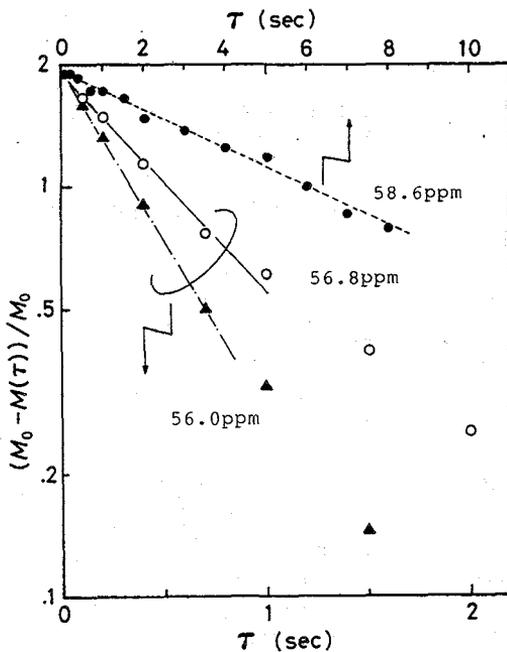


図4. Aタイプゼオライトの¹³Cスピン-格子緩和曲線

【文献】1) 林、鈴木、新、早水、山本:

第23回NMR討論会(1984).

S.Hayashi, K.Suzuki, S.Shin,

K.Hayamizu, and O.Yamamoto:

Chem. Phys. Lett. 113 (1985)

368.

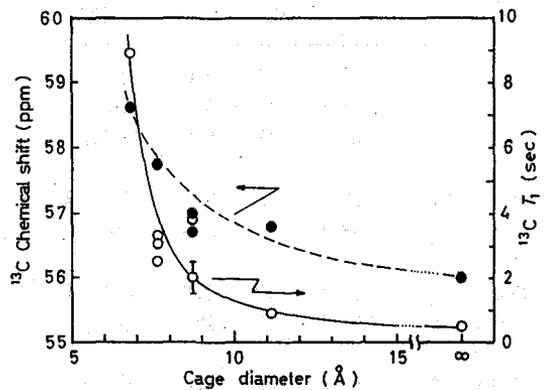


図5. ¹³CケミカルシフトとT₁の細孔サイズ依存性

Quadrupole Echo法による ^2H NMR 線形測定を利用した
 固体中ジメチルアンモニウムイオンの運動の解析

(分子研、名大理、British Columbia 大)

○池田 龍一、C. A. McDowell

STUDIES ON MOTIONAL PROCESSES OF DIMETHYLAMMONIUM IONS IN SOLIDS BY MEASUREMENT OF ^2H NMR SPECTRA DERIVED FROM QUADRUPOLE ECHO SIGNALS

Ryuichi IKEDA, C. A. McDowell (Institute for Molecular Science, Nagoya University, University of British Columbia)

^2H NMR powder spectra obtained by Fourier transform of quadrupole echo signals were recorded for $[(\text{CD}_3)_2\text{NH}_2]_2\text{MCl}_6$ (M:Sn, Te) to elucidate motional effects on the lineshape. Observed spectra were analyzed by comparing with lineshapes calculated for various motional modes, their rates, and interpulse spacing times. Both complexes showed narrowing of the spectra around room temperature due to a new motional process of the cations, which was determined to be 180° flip of the cation about its C_2 axis. From the lineshape analysis, CNC and DND bond angles, and activation energies as well as correlation times of the 180° flip were determined.

1. はじめに

^2H NMR 粉末スペクトルは、分子の運動によってその線形が著しい変化を示すことから、分子運動のモードおよびその速さを決定するための優れた情報を提供することが明らかにされている。また、これらのスペクトルを四極子エコー法を用いて測定する場合、得られた線形が加えた二つの 90° パルスの間隔(τ)に強く影響されることが指摘されている。このことは、スペクトルの解析をより複雑にするという欠点になるが、同時に、運動についての新しい情報源として利用できる。従来、分子運動の研究に広く用いられてきた ^1H NMR は主として原子間や分子間に働く陽子磁気双極子相互作用に着目してきたのに対し、 ^2H NMR では、 ^2H 核近傍の電子分布によってスペクトルがほとんど決定されるので、 ^1H NMR と違った観点から分子運動を眺められるという利点がある。本研究では、大きな錯イオン(SnCl_6^{2-} , TeCl_6^{2-})を対イオンとした $(\text{CD}_3)_2\text{NH}_2^+$ (以下DMA- d_6 と略記)および $(\text{CH}_3)_2\text{-ND}_2^+$ (DMA- d_2 と略記)イオンの結晶内の運動の温度変化を ^2H 核を通して眺め、 ^1H NMR によって明らかにされなかったジメチルアンモニウムイオンの新しい運動をどこまで明確にできるかに焦点を合せた。

2 実 験

^2H NMRスペクトルはBruker CXP-200分光器を用いて、 90° - 90° パルス法により30.7MHzで観測した四極子エコーをFourier変換して得た。Phase Alternating Pulse Sequenceを

採用して系統的雑音を排除した。測定した試料は(DMA-d₆)₂SnCl₆ (以下 Sn-d₆ と略記)、(DMA-d₆)₂TeCl₆ (Te-d₆ と略記) と(DMA-d₂)₂SnCl₆で、いずれも多結晶粉末である。

3. 結果と考察

200-360Kで測定されたSn-d₆, Te-d₆ の²Hスペクトルの例を図1に示す。いずれもパルス間隔 25 μsで測定した。200Kのスペクトルはどちらも電場勾配の非対称定数 η = 0 で、四極子結合定数(QCC)は52.0 kHz(Sn-d₆)、49.5 kHz(Te-d₆)となり、¹H NMRの結果から予想されるように、CD₃基の N-C結合軸回りの 120° jump運動が十分速いというモデルでよく説明される。室温付近で観測されたスペクトルの尖鋭化は、新しい運動の励起が進行していることを示している。図1の 360K (Sn-d₆) と 320K (Te-d₆) のスペクトルはこの新しい運動によって十分に尖鋭化していると考えられる。これらのスペクトルは η ≠ 0 の典型的な例で、スペクトル幅から求めた QCCと η は、それぞれ 25.4kHz, 0.70 (Sn-d₆)、24.3kHz, 0.63 (Te-d₆) となった。運動の対称性から

推定すると、このような大きな η を与える運動は 2-site jumpと考えられる。この運動が十分遅い時と十分速い時の電場勾配の主軸の方向を、それぞれ (x, y, z), (X, Y, Z) とし、十分速く回転している CD₃基が Z 軸に対して θ の角度をなす二方向の間を jumpしているとすると (図2参照)、電場勾配の主軸成分(q)は

$$q_{xx} = (1/2)q_{zz} (3\sin^2\theta - 1)$$

$$q_{yy} = (-1/2)q_{zz}$$

$$q_{zz} = (1/2)q_{zz} (3\cos^2\theta - 1)$$

となる。η および、jumpが十分遅い時と速い時での QCCの比 |e²Qq_{av}/e²Qq₀| について、角度依存性 (関係する η の範囲内のみ) を図3に示した。

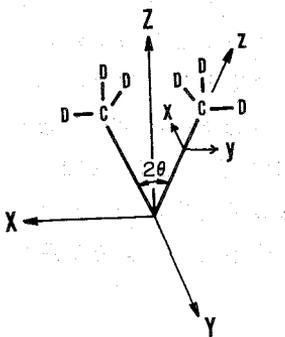


図2 電場勾配主軸系と CD₃基の 2θ jump

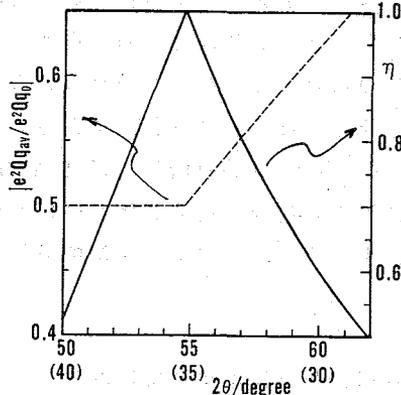
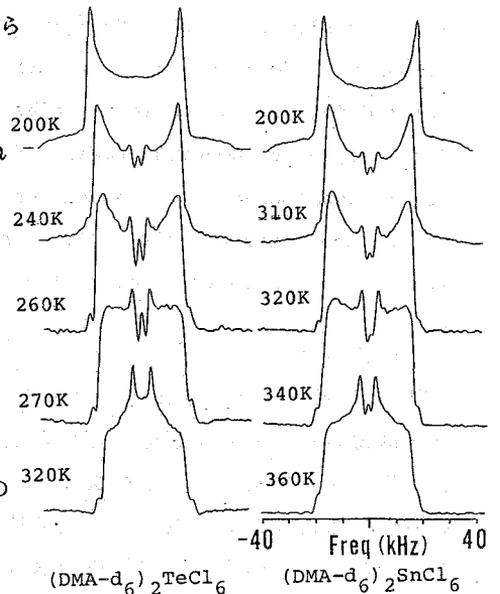


図3 η と QCC の比の角度依存性



(DMA-d₆)₂TeCl₆ (DMA-d₆)₂SnCl₆

図1. 測定された²Hスペクトル積算 400回、繰り返し時間0.5s

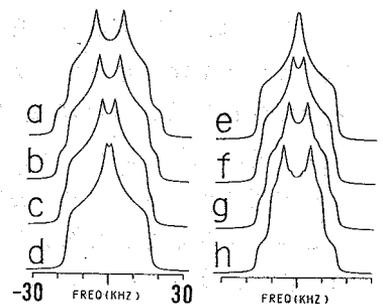


図4 計算スペクトルの角度依存性
a:124° b:120° c:116° d:112°
e:108° f:104° g:100° h:96°

この図を用い、測定した η から jump 角度 2θ を求めると、四つの 2θ の可能性がでてくる。即ち、Sn-d₆ では 103.6° (又は 76.4°) と 116.8° (又は 63.2°) となった。カッコ内外の角度でのスペクトルは同一になり区別できない。これら四つの角度のどれが正しいかは、運動の両極限状態でのスペクトルからだけでは決定できないが、スペクトルの角度依存性は非常に顕著であるので (図4参照、QCC=43kHz, $\tau=25\mu\text{s}$ で計算)、 η の実測値から精度よく jump 角度が求められる。jump が中間的速さ ($10^4 \sim 10^6$ Hz) の場合、スペクトルの形はパルス間隔 (τ) に依存する。QCC=43kHz の場合を例に取って、 $\tau=25\mu\text{s}$ と $\tau=100\mu\text{s}$ でのスペクトルを種々の jump 周波数について計算し図5に示す。又、Sn-d₆ が取りうる二つの角度について、中間的 jump 周波数でのスペクトル (QCC=43kHz, $\tau=25\mu\text{s}$) の計算結果を図6に示す。図1の実測スペクトルは jump 角度 116.8° (又は 63.2°) でよく説明されることがわかる。スペクトル解析からだけでは、角度についての二つの任意性 (116.8° と 63.2°) が残る。(DMA)₂SnCl₆ の X 線構造解析によると、DMA⁺イオンの CNC 結合角は 115.9° 又は 116.9° と報告されている。これらの値が一方の jump 角度に非常によく一致していることを考えると、jump は、CNC の 2 回軸回りに二つの CD₃ 基が 180° flip しているというモデルでよく説明される。炭素の位置に乱れがないという X 線回折の結果はこのモデルを支持している。同様にして、Te-d₆ の jump 角度は 119.0° となった。

$2\theta=116.8^\circ$ を用いて計算したスペクトルと実測を比較することにより、各温度での jump 周波数を決定した。Sn-d₆ について 300K と 350K で測定されたスペクトルと計算スペクトルとの比較をそれぞれ、図7と図8に示す。この比較により jump 周波数は 310K で 15kHz、350K で 200kHz となった。図9に Sn-d₆ と Te-d₆ について、jump 周波数 (k) から求めた jump の相関時間 τ_D ($k=2/\tau_D$) の温度変化を示す。¹H NMR の実験から求めた (CH₃)₂NH₂⁺ イオンの相関時間 (τ_H)、塩素 NQR から求めた

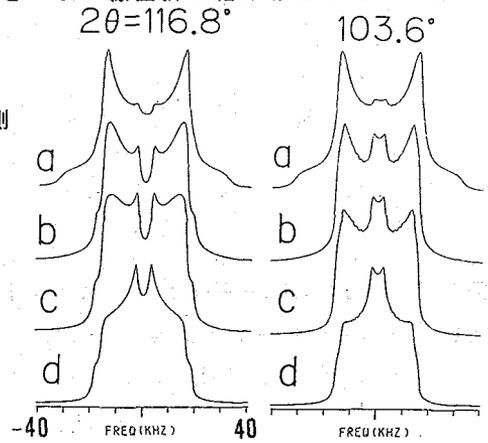


図6 Sn-d₆ について計算した線形
a:10kHz b:50kHz c:100kHz d:500kHz

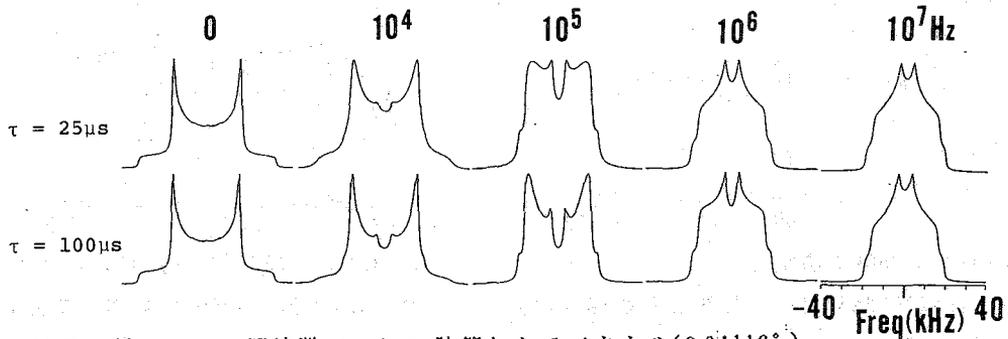


図5 種々の jump 周波数について計算したスペクトル ($2\theta:116.8^\circ$)

正八面体型錯イオンの90° jumpの相関時間(τ_{Cl})も合わせて示した。

以上で述べたジメチルアンモニウムイオンの運動を確かめる目的で(DMA-d₂)₂SnCl₆の²Hスペクトルを350Kで測定した。その結果を図10(a)に示す。スペクトルから $\eta=0.70$ が求められ、それに対応するjump角は103.6°(76.4°)と116.8°(63.2°)となった。CD₃についてこの温度で決定したjump周波数200kHzを用いて、これら二つの角度について計算したスペクトルを図10(b,c)に示す(このspectrum simulationにはパルス幅(6 μ s)に対する補正が加えられている)。明らかにjump角103.6°のモデルにより実測のスペクトルはよく説明される。jump角76.4°の可能性は、ND₂⁺基中のD...D距離が異常に短くなり、¹HNMRにおける陽子間磁気双極子相互作用を説明できないため除外できる。この結果からND₂⁺基の結合角として、103.6°が得られた。

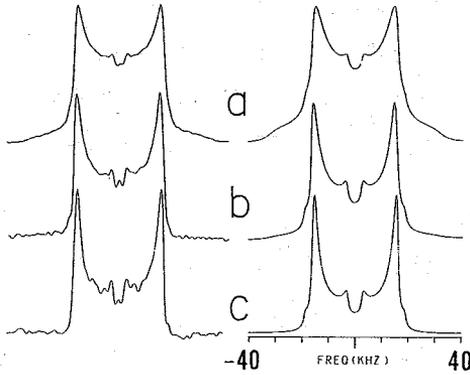


図7 Sn-d₆: 300Kで測定されたスペクトル(左), $k=15$ kHzを用いて計算した線形(右)
a : $\tau=25\mu$ s, b : 100μ s, c : 200μ s

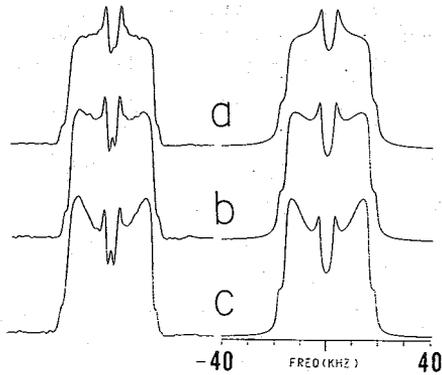


図8 Sn-d₆: 350Kで測定されたスペクトル(左), $k=200$ kHzを用いて計算した線形(右)
a : $\tau=25\mu$ s, b : 50μ s, c : 100μ s

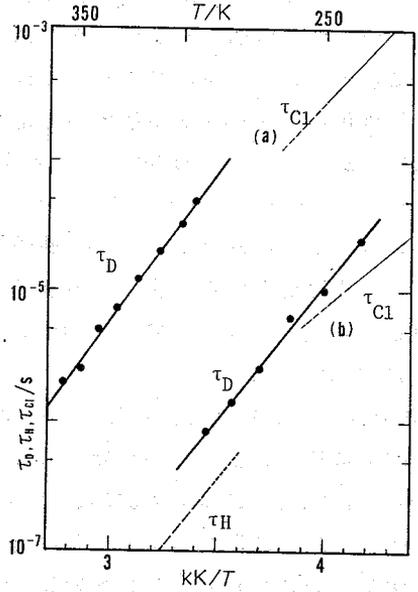


図9 180° flipの相関時間の温度変化
a : Sn、b : Te、 τ_H : DMA-h₆、 τ_p : DMA-d₆、 τ_{Cl} : MCl₆イオンの90° jump

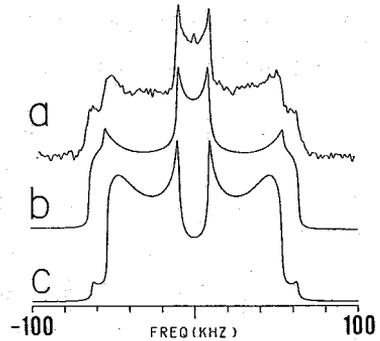


図10 Sn-d₂: 350Kで測定されたスペクトル(a)、 $k=200$ kHzを用いて計算した線形(b): 103.6° (c): 116.8°

(北大工) 平沖敏文、松尾研吾、堤耀広

Side Chain Reorientation of Solid Poly(glutamate)s studied by ^2H NMR
 Toshifumi HIRAOKI, Kengo MATSUO, and Akihiro TSUTSUMI (Department of Applied Physics,
 Hokkaido University)

^1H spin-lattice relaxation times and line shapes were measured at various temperatures for poly(γ -[methyl- $^2\text{H}_3$]methyl-L-glutamate)(PMLG-d3), and poly(γ -benzyl-L-[γ - $^2\text{H}_2$]glutamate)(PBLG- γ d2). In PMLG-d3 the orientation dependence of T_1 calculated by using a three-site jump model is in good agreement with that measured at a temperature range of -120 to -70°C . Correlation times derived from the analysis of data show the activation energy of 6.1 kJ/mol for methyl reorientation. Increasing temperature, T_1 and line shape change remarkably, showing the rapid motions for the C_β axis in addition of the C_α rotation. The $\text{C}\gamma$ - ^2H bond axes of PBLG- γ d2 are nearly rigid and execute only small amplitude librations at below 25°C . At higher temperatures the rapid orientation about the $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$ axis is observed from the analysis of using a two-site jump model.

重水素NMRは固体における分子の運動状態の詳細な情報を与えるので、重水素で標識された分子の局所的な運動を定量的に求めることが出来る。 $\text{C}-^2\text{H}$ 結合の $^1\text{H}-\text{NMR}$ スペクトルの線形はおもに核四重極相互作用によりきまり、運動の速さにより変化し、分子間・分子内相互作用は無視できる。この結果線形は分子運動を反映して特徴的なパターンを示す。運動の相関時間 τ_c が 10^{-8} sより長く、軸対称の粉末平均スペクトルは約128kHzの四重極分裂を示す。相関時間が 10^{-8} s $<$ τ_c $<$ 10^{-4} sでは、核四重極相互作用の大きさが170kHzなので線形は運動のモードと速さに依存して著しく変化する。 τ_c が 10^{-8} sよりも速くなり運動が単一モードの時には線形は変化せず、 τ_c はスピン-格子緩和時間から求められる。本研究ではポリグルタメート側鎖の分子運動を詳細に調べるため、側鎖の一部を選択的に重水素化したポリグルタメートの $^2\text{H}-\text{NMR}$ スペクトルとスピン-格子緩和時間(T_1)を測定した。スペクトルの線形および T_1 はジャンプモデルにより解析した。¹

重水素の緩和機構は核四重極モーメントと電場勾配の揺らぎの相互作用による四重極緩和のみで説明される。固体においては重水素の T_1 は方向に依存する。メチル基では $\text{C}3$ 回転軸と外部磁場とのなす角を θ とすると、 T_1 は $\theta=0^\circ$ 、 90° の場合に次のようになる。²

(i) three-site model

$$\frac{1}{T_1} = \frac{8\omega_a^2}{81} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} + \frac{8\tau_c}{1 + 4\omega^2\tau_c^2} \right), \quad \theta = 0^\circ \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{12\omega_a^2}{81} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2\tau_c^2} \right), \quad \theta = 90^\circ \quad (2)$$

(ii) free-diffusion model

$$\frac{1}{T_1} = \frac{8\omega_a^2}{81} \left(\frac{\tau_1}{1 + \omega^2\tau_1^2} + \frac{8\tau_2}{1 + \omega^2\tau_2^2} \right), \quad \theta = 0^\circ \quad (3)$$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{4\omega_B^2}{8I} \left(\frac{\tau_1}{1+\omega^2\tau_1^2} + \frac{2\tau_2}{1+\omega^2\tau_2^2} + \frac{4\tau_1}{1+4\omega^2\tau_1^2} + \frac{2\tau_2}{1+4\omega^2\tau_2^2} \right), \theta=90^\circ \quad (4)$$

ここで $\omega_B = 3e^2qQ/4h$, $\tau_i = 1/(3k)$ (k : jump rate), $\tau_1 = 1/D$ (D : diffusion const.), $\tau_2 = \tau_1/4$ である。図1に30.7MHzにおける T_1 の fast motion 側を示す。free diffusion では $\theta = 0^\circ$ と 90° とで同一の T_1 を与えるが、3-site jumpでは T_1 が異なり $T_1(\theta = 90^\circ)$ が $T_1(\theta = 0^\circ)$ の2倍になる。運動によって平均化された粉末型スペクトルの四重極分裂 $\overline{\nu}_q$ は $\omega_B \tau \ll 1$ の条件下で、

$$\overline{\nu}_q = \nu_q S \quad (5), \quad S = (3\cos^2\theta - 1)/2 \quad (6)$$

ここで ν_q は運動がないときの四重極分裂、 θ は $C-H$ 軸と C_3 軸とのなす角である。四面体角 ($\theta = 70.5^\circ$) では $S = 1/3$ になり四重極分裂は1/3に減少する。更に、 C_3 軸が semiangle θ_c の円錐中を librate する場合には線形は軸対称を維持して(5)式は次のようになる。

$$\overline{\nu}_q = \nu_q S \cos\theta_c (1 + \cos\theta_c) / 2 \quad (7)$$

θ_c が温度とともに大きくなると、 $\overline{\nu}_q$ は減少する。

実験

poly(γ -[methyl- 2H_3]methyl L-glutamate)(PMLG-d3)はPMLG溶液に重水素化メタノールを加えてエステル交換反応により得た。 γ 位を重水素化したL-グルタミン酸はGrisoliaとBurrisの方法に従って得た。² これをベンジルエステル化し、NCA法によってpoly(γ -benzyl L-[γ - 2H_2] glutamate)(PBLG- γ d2)を得た。固体 2H -NMRスペクトルはBruker MSL-200 (30.7MHz)で、composite pulseを用いた四重極エコー法により得た。⁴ 90° パルスは4.0-4.5 μ sで、パルス間隔は20 μ sである。スピン-格子緩和時間 T_1 はInversion-recovery四重極エコー法により得た。

結果と考察

図1に20°Cにおけるポリグルタメートの 2H -NMRスペクトルを示す。PBLGの主鎖のアミド基、 $C\gamma$ 、ベンゼン環水素をそれぞれ重水素化した試料(PBLG-Nd, PBLG- γ d2, PBLG-d5)のスペクトルはいずれも約120kHzの四重極分裂と、スソに幅の広い約200kHzの成分からなる。これらは、 $C-H$ 軸又は $N-H$ 軸の運動が止まっていることを示している。一方、PMLG-d3のスペクトルでは四重極分裂は34kHzに減少しており、メチル基が運動していることを示している。以下、PMLG-d3とPMLG- γ d2について述べる。

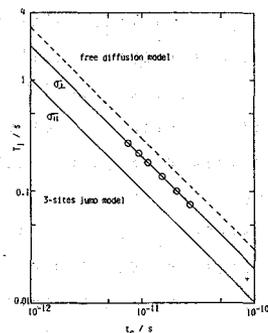


Fig.1. Calculated curve as a function of correlation time. The solid line is a 3-site jump motion. The dot line is a free diffusion. The circles are experimental results.

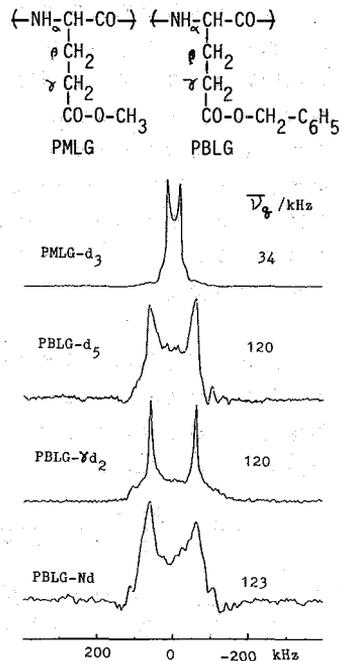


Fig.2. 2H -NMR spectra of poly(glutamate)s at 20°C.

PMLG-d3

図3にPMLG-d3の ^2H -NMRスペクトルの温度依存性を示す。 -120°C では37kHzの四重極分裂をもつ典型的な軸対称の粉末型スペクトルが観測され、メチル基が C_3 軸のまわりで速い回転をしていることを示している。温度上昇と共に四重極分裂幅は少し減少し、スペクトルのエッジ部分が不明瞭になる。図4に四重極分裂幅 $\overline{\nu}_q$ の温度依存性を示す。 -130°C での $\overline{\nu}_q$ は37kHzで C_3 軸回転の四重極分裂の推定値42.7kHzより小さい。これは低温においても小さい振幅のlibrationが生じていることを示唆している。このlibrationが(7)式に従うとすると、 $\overline{\nu}_q=37\text{kHz}(T<-80^\circ)$ では $\theta_c=25^\circ$ 、 $\overline{\nu}_q=32\text{kHz}(T=-40^\circ)$ では $\theta_c=35^\circ$ である。室温以上になると四重極分裂は測定できなくなる。これは室温付近から四重極分裂幅34kHzを変調するMHzオーダーの C_3 軸の運動が大きく寄与することを示している。図5に T_1 の温度依存性を示す。低温領域では、スペクトルの平行成分(σ_{\parallel})と垂直成分(σ_{\perp})の T_1 の値が異なり、 T_1 に異方性が存在する。特に -80°C 以下になると $T_1(\sigma_{\perp})$ は $T_1(\sigma_{\parallel})$ の2倍になる。これは上に示したようにメチル基の C_3 回転が一様ではなく3-サイト間でジャンプしているモデルと一致する。相関時間 τ とjump rate k の間には $\tau=1/3k$ の関係があるので、 T_1 から k を求めることができる。 -130°C における k は $1.2 \times 10^{10}\text{s}^{-1}$ である。 k の温度依存性より求めた C_3 回転の活性化エネルギーは6.1kJ/molである。この値は他の低分子結晶のメチル基の回転の活性化エネルギーよりかなり低く、メチル基が動き易いことを示している。これはPMLGではメチル基は酸素原子に結合しており($-\text{O}-\text{CH}_3$)、炭素に結合している時よりも運動の自由度が大きく、しかも剛直な α -helixの主鎖間にある非晶領域の側鎖末端にメチル基が存在するためと考えられる。 -80°C より高温になると T_1 の異方性が小さくなる。 T_1 は 0°C 付近で最大となり高温になると減少し 130°C 付近で最小になる。これらの結果は -80°C 以上の高温になるとメチル基は C_3 回転の運動に加えて C_3 軸自体の運動が始まることを示している。誘電分散の測定は室温付近で1kHzの運動が側鎖カルボニル基に存在することを示している。⁵このような運動は室温以上からMHzのオーダーの運動になり、スペクトルの線形と T_1 に大きく寄与するようになる。130°Cで極小値をとるので $\omega\tau \sim 1$ の条件から求めたこのような運動の相関時間は $6 \times 10^{-9}\text{s}$ である。一方この温度における C_3 回転の相関時間は $8.2 \times 10^{-13}\text{s}$ であり、 T_1 には寄与しない。

PBLG- γ d2

PBLG- γ d2の ^2H -NMRスペクトルの温度依存性を図6(A)に示す。室温以下では120kHzの四重極分裂をもつ軸対称な粉末平均スペクトルを示し、運動していない $\text{C}\gamma$ - ^2H 軸のスペクトルに類似している。これは、大振幅の $\text{C}\gamma$ - ^2H 軸の運動は生じていないことを示している。50°Cまでは約115kHzの四重極分裂を示し軸対称は保たれているので、 $\text{C}\gamma$ - ^2H 軸の運動はかなり制限されている。

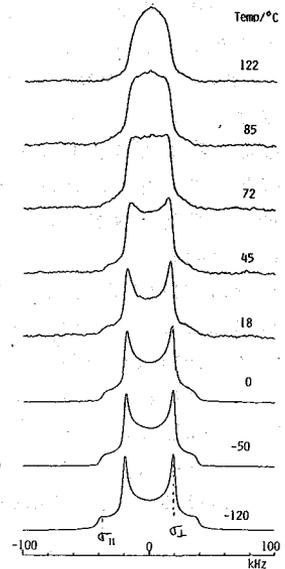


Fig.3. Temperature dependence of ^2H -NMR spectra of PMLG-d3.

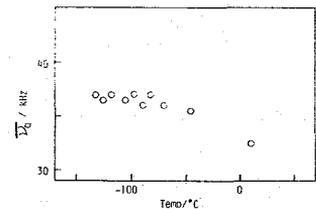


Fig.4. Temperature dependence of quadrupolar splitting for PMLG-d3.

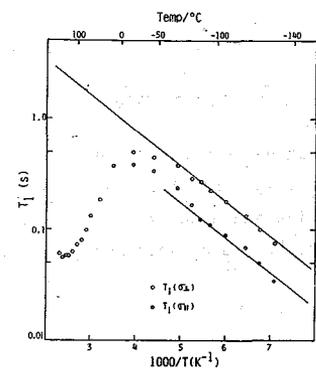


Fig.5. Temperature dependence of T_1 for PMLG-d3. The curve is a theoretical prediction for a 3-site jump motion. Circles are experimental results: \circ , $T_1(\sigma_{\perp})$; \bullet , $T_1(\sigma_{\parallel})$

このような運動に対して、 $C\gamma - ^2H$ 軸が $C\beta - C\gamma$ 軸のまわりで trans-gauche間の 2-site jumpをするモデルを適用した。図6(B)にこのモデルによる計算スペクトルと jump rate k を示す。55°Cまでは良い一致を示した。50-62°Cのスペクトルは他に比べ s/n 比が悪い。これはこの温度領域で運動の速さが $\omega_e \tau_c \approx 1$ (intermediate exchange region)になるためである。更に高温になると計算スペクトルと実測スペクトルのずれは大きく、一致しなくなる。これは他の運動が寄与してくるためと推定される。これらの結果は側鎖カルボニル基が55°Cで100kHz、90°Cで1MHzの誘電分散があることと一致している。⁶

references

1. R.J.Wittebort, E.T.Olejniczak, and R.G.Griffin, *J.Chem.Phys.*, **88**, 5411(1987).
2. D.A.Torchia and A.Szabo, *J.Magn.Reson.*, **49**, 107(1982).
3. S. Grisolia and R.H. Burris, *J. Biol. Chem.*, **210**, 109(1954)
4. M.H.Levitt, D.A.Suter, and R.R.Ernst, *J.Chem.Phys.*, **80**, 3064(1984).
5. A.Tsutsumi, K.Hikichi, T.Takahashi, Y.Yamashita, N.Matsushima, M.Kanke, and M.Kaneko, *J.Macromol.Sci.-Phys.*, **B8**, 413(1973).
6. T.Takahashi, A.Tsutsumi, K.Hikichi, and M.Kaneko, *Macromolecules*, **7**, 806(1974).

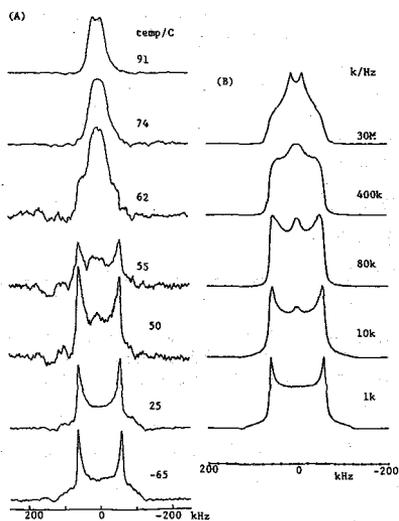


Fig.6. Temperature dependence experimental spectra of PBLG- γ d2 (A) and simulated line shape using 2-site jump rate indicated for each spectrum (B).

(国立がんセンター研究所)

齋藤 肇, 横井もと子

High-resolution Solid-state ^{13}C NMR. Molecular Motions in Solid Peptides and Proteins Studied by ^{13}C Spin-lattice Relaxation Measurements

Hazime SAITÔ and Motoko YOKOI (Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute)

^{13}C spin-lattice relaxation times of the laboratory frame were measured to study plausible molecular motion in the solid and to apply the results for confirmation of peak-assignments. We found that puckering motion of Pro residue occurs in for a number of peptides and collagen.

1. はじめに

演者らはこれまでの一連の研究で、固体ポリペプチド、蛋白質の二次構造が、関与するアミノ酸残基のペプチド結合炭素 $\text{C}\alpha$ 、 $\text{C}=\text{O}$ および $\text{C}\beta$ に関するコンホメーション依存 ^{13}C シフトと関係づけることにより決定可能であることを示した¹⁻⁵⁾。したがって、 ^{13}C シフトがペプチド、蛋白質の二次構造の intrinsic なプローブとして使用することが出来る。一方、溶液 NMR の場合と異なり、スピン格子緩和時間 ($T_{1\rho}$) の有用性は、固体試料に対してはそれほど大きくない。それは、結晶状態では主鎖の運動が $T_{1\rho}$ に鋭敏な MHz 領域の相関時間を大抵の場合には持たないからである。しかし、Ala、Leu などのアミノ酸側鎖の場合のように、分子内に運動性の大きい置換基があれば、それとの距離の r^{-6} 依存性による $T_{1\rho}$ 勾配が生じることを利用すると、スペクトルピークの帰属に有用である^{6,7)}。

本研究では、トリペプチド、ポリペプチド、コラーゲン等の ^{13}C 緩和時間を詳細に測定し、アミノ酸側鎖の内部運動の検出とその意義、およびスペクトルピーク帰属への応用について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

^{13}C CP-MAS NMR の測定 (75.46 MHz) はブルカー CXP-300 スペクトロメーターを用いた。 ^{13}C シフトの基準はグリシン-カルボキシルピーク (176.03 ppm) によった。試料は、シリンダー型のセラミックローターに充填した。 $T_{1\rho}$ 測定は、スピン温度反転、CP⁸⁾ 法によった。

3. 実験結果と考察

3-1. トリペプチド

図 1 に、 $T_{1\rho}$ 測定のためのトリペプチド Gly-Pro-Ala のスタックプロットを delay 時間 t とともに示す。各ピーク強度 $2\text{Mcp}(0)$ から (1) によって減衰する。

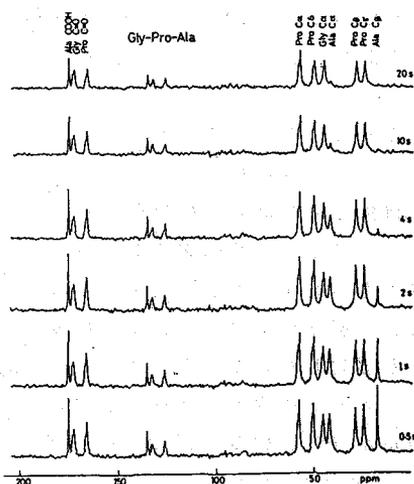


図 1 Gly-Pro-Ala の ^{13}C $T_{1\rho}$ 測定

$$M(t) = 2Mcp(0) \exp(-t/T_1^c) \quad (1)$$

明らかに、メチル基のC₃回転が存在する Ala C_βの減衰が最も大きく、次いでAla C_αとなることがわかる。(1)式からのT₁^c値を二、三のトリペプチドとともに表1にまとめる。これから明らかなように、Ala、LeuそれぞれC=O < C_α < C_β、C_α < C_β < C_γ < C_δのT₁値の勾配が出現する。

これは、MHz領域でのペプチド内部の運動が存在しないとき、¹³C緩和は末端のメチルのCH₃回転に由来し、問題の炭素への距離 r の r⁻⁶に依存して順々に緩和して行くことによる。

Table 1. ¹³C Spin-lattice Relaxation Times of Some Tripeptides (s)

	Gly-Pro-Ala	Ala-Gly-Gly	Ala-Pro-Gly	Pro-Leu-Gly-NH ₂
Ala C _β	1.7	1.1	1.5	
C _α	6.8	5.0	6.0	
C=O	20	17	29	
Pro C _δ	30			63
C _γ	20		2.0	17
C _β	23		2.4	28
C _α	31		32	750
C=O	25		31	-
Leu C _δ				1.0
C _γ				13
C _β				35
C _α				750
Gly C _α	29	29, 17 (C-term.)	34	130
C=O	33	25, 11 (")	19	

第二に興味ある点は、Gly-Pro-Alaの場合のPro残基にくらべて、Ala-Pro-GlyのC_γ、C_β炭素の¹³C T₁^cが極めて短縮していることである。Pro-Leu-Gly-NH₂もC=O、C_δにくらべて特異的T₁^cの短縮がみられる。これは、Pro環の内部反転によって、C_β、C_γ炭素の部分的なゆらぎが生ずるためと考えられる。実際、Torchiaら²⁾は〔²H₆〕-Proおよび〔²H₆〕-Pro-HClの²H NMRスペクトルの線型解析から、C-²H結合のゆらぎの角度を30°している。このようなProの内部反転の存在は、結晶のパッキングの程度に依存するものと思われる。

3-2 ポリペプチド、

蛋白質

前節で述べた側鎖の内部運動、Proの反転がポリペプチド、蛋白質でも存在することが期待できる。特に、図2に示すようにすでに我々が報告したコラーゲンの¹³C NMRピークの帰属を確認するのに利用出来る。図3、図4にそれぞれ(Pro-Gly-Pro)₁₀・9H₂O、ウシ皮膚コラーゲンの¹³C T₁^c測定用のスタックプロットを示す。

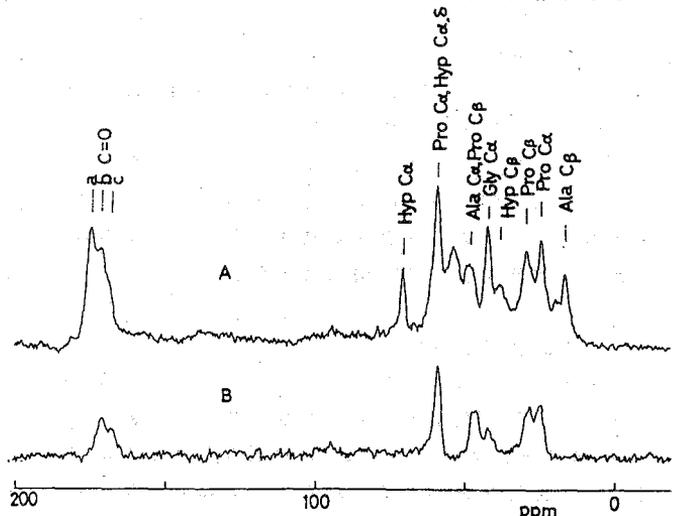


図2 ウシ・皮膚・コラーゲン (A) および (Pro-Gly-Pro)₁₀・9H₂O (B) ¹³C NMR

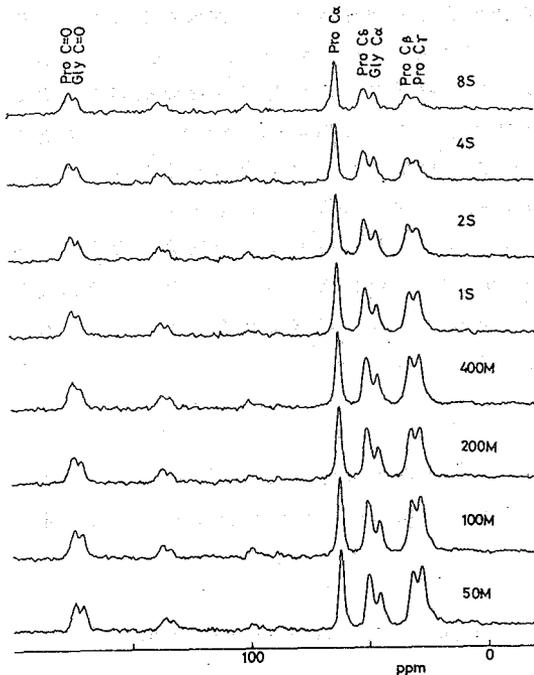


図3 (Pro-Gly-Pro)₁₀ · 9H₂Oの¹³C
T₁測定用スタックプロット

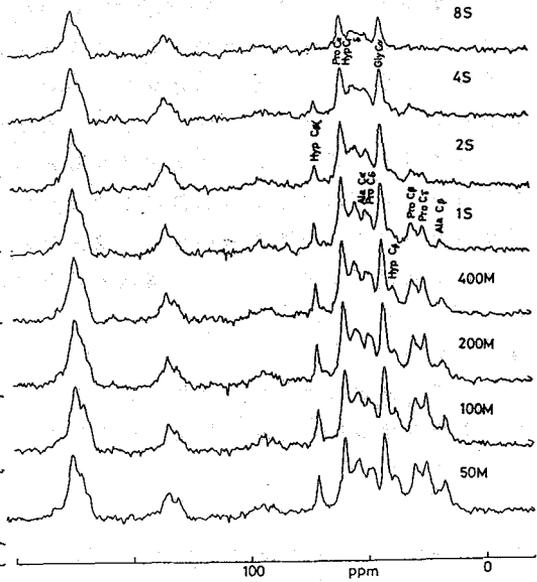


図4 ウシ・皮膚・コラーゲンの¹³C
T₁測定用スタックプロット

Table 2. ¹³C Spin-lattice Relaxation Times of Some Polypeptides and Collagen (s)

	3 ₁ -helix			Triple helix	
	(Gly) _n	(Pro) _n	(Hyp) _n	(Pro-Gly-Pro) ₁₀ · 9H ₂ O	Collagen(skin)
Gly	C _α	6.7		6.6	4.8
	C=O	12			17
Ala	C _α				7.1
	C _β				0.64
	C=O				22
Pro	C _α	11		11	8.7
	C _β	2.8		2.8	1.4
	C _γ	2.3		2.4	2.4
	C _δ	4.8		6.8	5.5
	C=O	14		17	22
Hyp	C _α		16		7.0
	C _β		1.2		2.0
	C _γ		1.3		4.9
	C _δ		5.5		7.0
	C=O		16		-

表2にまとめたように、 ^{13}C $T_{1\rho}$ 値とアミノ酸残基との関係はすでに述べたトリペプチドの場合と極めて類似していることがわかる。すなわち、コラーゲンにおいても Ala 残基の $T_{1\rho}$ 勾配が存在すること、Pro および Hyp の C β 、C α 炭素の $T_{1\rho}$ の特異的な短縮がみられること等である。パッキングの異なるコラーゲンフィブリルと (Pro-Gly-Pro)₁₀ 10 量体でも大きな差異が見られないのは興味ぶかい。3,1あるいはコラーゲン型の三重ヘリックスとは異なる (Pro)₃I でも C β 、C α はそれぞれ 4.0、3.0秒であることを考慮すると、内部回転の有無は高次構造によって規定されるというよりは、むしろ残基特有の効果と考えるべきであろう。いずれにしても側鎖のこのような“やわらかさ”が、スーパーコイルリングを通じて三重ヘリックス形成のための重要な要因であることは、十分に理解出来ることである。なお、表1の結果は図2の ^{13}C シフト帰属の妥当性をうらづける。

4. 結論

^{13}C $T_{1\rho}$ 測定によって、ペプチド、ポリペプチド、線維蛋白質のパッキング効果、アミノ酸残基の側鎖運動の有無の検出、ならびにスペクトル帰属への応用が可能であることを示した。

- (1) T. Taki, S. Yamashita, M. Satoh, A. Shibata, T. Yamashita, R. Tabeta and H. Saitô, Chem. Lett., 1803 (1981).
- (2) H. Saitô, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki and I. Ando, Macromolecules, 16, 1050 (1983).
- (3) H. Saitô, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, and T. Asakura, in "Magnetic Resonance in Biology and Medicine", ed. by G. Govil, C. L. Ketherapal, and A. Saran, Tata McGraw-Hill, New Delhi, pp. 195-215 (1985).
- (4) H. Saito, Magn. Reson. Chem., 24, 835 (1986).
- (5) H. Saitô and I. Ando, Ann. Rep. NMR Spectrosc., in press.
- (6) H. Saitô and R. Tabeta, "Peptide Chemistry: 1987", ed. by T. Shiba and S. Sakakibara, Protein Research Foundation, pp. 53-58 (1988).
- (7) H. Saitô, R. Tabeta and M. Yokoi, Magn. Reson. Chem., in press.
- (8) D. Torchia, J. Magn. Reson., 30, 613 (1978).
- (9) S. K. Sarkar, P. E. Young, and D. A. Torchia, J. Am. Chem. Soc., 198, 6459 (1986).

(京大・理) ○田村 充 内藤 晶

Deuterium NMR study on molecular motion of toluene included by calixarene
in solid stateMitsuru Tamura, Akira Naito
(Faculty of Science, Kyoto University)

Deuterium powder spectra of selectively deuterated toluenes included by calix[4]arene were observed. The results indicate that the toluene molecule is apparently rotating nearly about its molecular axis in the host calixarene. However, the spectral pattern for m- and o- deuterium cannot be explained by assuming a simple fast rotation. Temperature dependent spectrum at dry ice temperature (-80°C) was also measured and the results suggest it contains rather 180° flip-flop type motion at this temperature.

[はじめに]

重水素核はスピン数 $I = 1$ で核四極子モーメントをもっており、その NMR 吸収線スペクトルは外部静磁場と電場勾配のなす角度に依存した周波数に現われる。重水素の固体粉末スペクトルは、軸対称分子での 2 本の「角」の間隔から四極子結合定数を測定することが可能であることや、線形の解析から固体状態での分子運動に関する知見を与えてくれる点で有用である。

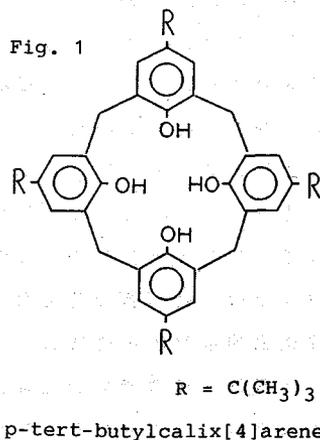
今回、われわれは、包接化合物中ゲスト分子の運動性に関する情報を得るために、選択的重水素化トルエンをカリックス[4]アレンに包接させた 5 種類の固体粉末試料を用意し、重水素の NMR 吸収スペクトルを測定した。

[実験]

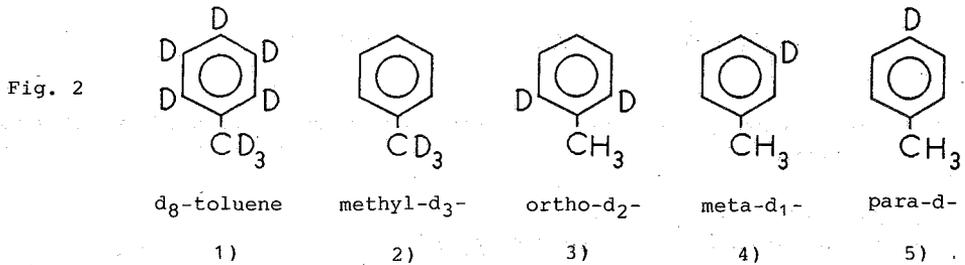
カリックス[4]アレンは右図に示すような、p-置換フェノールの β -炭素をメチレンで架橋した構造をもつ環状化合物である。^{i) ii)}

トルエンから再結晶したものは、固体結晶 X 線回折から、その分子空孔内にトルエンのメチル基を取り込んだ状態で 1:1 結晶を構成していることが知られている。ⁱⁱⁱ⁾

この結晶を粉砕し、 $130^{\circ}\text{C} \cdot 1\text{mmHg}$ の下で 24 時間減圧して得られた無包接のカリックスアレン(トルエン 10% 未満)を用い、選択的重水素化トルエン溶媒中、



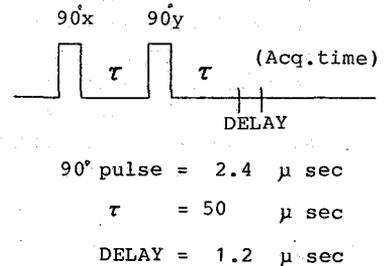
100°C・15分，放冷，室温3日間の再結晶を行なって各目的試料を得た。包接させたトルエンの構造式を Fig. 2 に示す。



測定には日本電子製 JNM GX-400，および重水素用固体プローブを使用し，送信機側に Henry Radio 社 (U.S.A.) 製 61.25MHz 高周波電力増幅機を追加した。

測定に使用した Quadrupole Echo パルス・シーケンスと測定条件を右に示す。

Fig. 3 Quadrupole Echo Sequence
Sequence Cycle = 10.0 sec



〔結果・考察〕

各粉末吸収スペクトルを Fig. 4 に示す。選択的に重水素標識した試料の重水素 NMR スペクトル (2) ~ (5) を比較することにより， d_8 -toluene の重水素 NMR スペクトルは外側から p-，メチル，o-，m- 重水素によるものと帰属され，その分裂周波数は Table I. に示すように決定された。

(1) d_8 -toluene 試料のスペクトルは，(2) から (5) までの各成分を単純に足し合わせた線形にはなっておらず，中心付近の約 10 kHz の分裂に相当する成分を分離同定できない。試料コイルにドライアイス (-80°C) を接触させて取り込んだスペクトルでは，この成分は大幅なブロードニングを起こしており，温度で運動状態に大きな変化があることがわかった。(3) (4) に対して，同様に低温測定を行なった結果，スペクトル両サイドのすそ野の広がり観測された。同じ室温下の測定条件で， d_8 -toluene 試料のみに，約 10 kHz の成分が見られる原因については，現在検討中である。

(5) の p- に対して，(3) (4) の o-，m- の分裂は約 20% にスケーリングされており，分子軸にほぼ等しい回転軸まわりの運動によって，部分的な平均化が起こっていることがわかる。しかし同時に，o- と m- の線形は，25 kHz 以内のブロードな成分を持ち合わせており，包接されたトルエン分子のアロマティック部分の運動性に非連続的な挙動が含まれていることを示唆する。

1 軸回りの連続的な回転運動では，核四極子テンソルの主値の，静磁場と平行な成分に由来するスペクトルの「ショルダー」が現われるはずであるが，これは (3) (4) では観測されなかった。(2) では，メチル基自身が独自に C 3 回転軸をもつために通常の軸

Fig. 4 ^2H -NMR spectrum of each samle (room temperature)

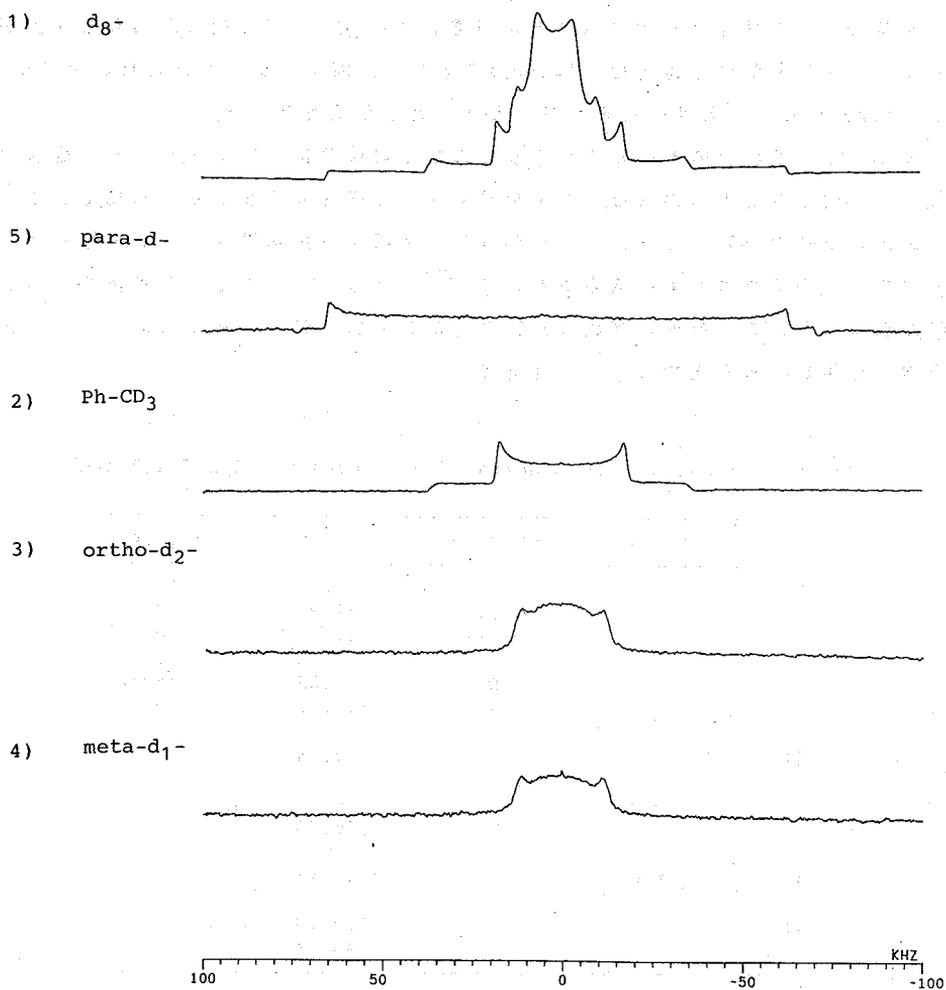
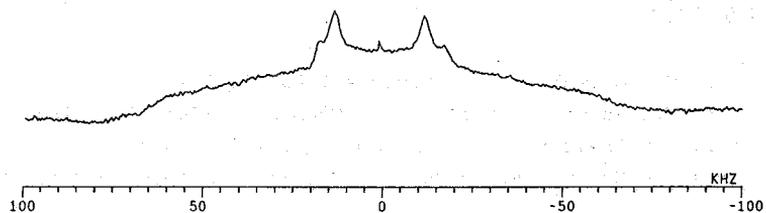


Fig. 5 ^2H -NMR spectrum of d_8 -toluene (dry ice temperature)



対称パターンが得られている。

メチル基の分裂の中心周波数に対して、トルエンの各アロマティック重水素の中心周波数はそれぞれ Table I. のようにシフトしていた。このため、 d_8 -試料の低磁場側では、メチル基とアロマティックのスペクトルが重なり合い、高磁場側よりも強度が上がる結果となった。シフト量は低磁場側へ約10ppmであり、溶液中プロトンNMRの化学シフト量(4.8ppm)と、方向は一致するが、より大きな値を示した。

また、 d_8 -試料中の10kHzの成分の中心周波数は、アロマティック重水素のものと等しく、化学シフト値からは、この成分をアロマティック重水素に帰属できる。

フェニル基の180°フリップ・モーションに起因する重水素スペクトル線形についてはすでにフェニルアラニンでの報告例がある。^{iv)} (3)(4)は、周波数の違いなどに相違がみられるものの、それと類似した線形を示しているが、詳細な議論は、厳密な温度可変実験を今後行なった上でしたいと考える。

Table I : Observed Frequencies of d-toluene in Calix[4]Arene

No.	toluene	component	$\Delta \nu$ [kHz]	$\Delta \delta$ [ppm]
1)	d_8		10.40	11
		o-,m-	21.97	9
		o-,m-	24.35	10
		o-,m-	25.43	10
		CD3	34.82	reference
		p-	127.12	10
2)	Ph-CD3		34.84	
3)	o- d_2		19.80	
			25.25	
4)	m- d_1		22.41	
5)	p- d_1		132.10	
			143.14	

(room temperature)

[参考文献]

- i) C.D.Gutzche ; Acc.Chem.Res(1983),16,161
- ii) C.D.Gutzche, et al ; J.Am.Chem.Soc.(1981),103,3782
- iii) G.D.Andretti ; J.C.S.Chem.Comm.(1979),1004
- iv) C.M.Gall, J.A.DiVerdi, S.J.Opella ; J.Am.Chem.Soc.(1981),103,5039

(京大理) 今城 文雄・桑原 大介・北崎 信幸・中井 利仁・寺尾 武彦

SASS NMR STUDIES OF GUEST MOTION IN SOME INCLUSION COMPOUNDS

Fumio IMASHIRO, Daisuke KUWAHARA, Nobuyuki KITAZAKI, Toshihito NAKAI, and Takehiko TERAO (Kyoto University)

We measured the ^{13}C chemical-shift powder spectra of ferrocene included in deoxycholic acid or β -cyclodextrin using the chemical-shift SASS (switching-angle sample spinning) NMR method. The orientation of the ferrocene was found to be fixed in the former, but two different orientations are present in the latter; one is fixed, whereas the other is rotating. We also measured the CH dipolar spectra for some short-chain *n*-alkanes in urea inclusion compounds using the dipolar SASS NMR method. To simulate the observed spectra scaling of the dipolar coupling was needed. The scaling factors are well interpreted by assuming dynamic disorder of various conformers for the included *n*-alkanes.

§ 1. 包接化合物においてはゲストとホストとの間の相互作用は一般に弱いため、ゲスト分子はそれ自身の固体状態とは異なって様々な分子運動が可能となっている。ところでホストのつくる環境は通常異方的なのでゲスト分子が球状でない場合、包接化合物内でのゲスト分子の配向や運動の様式は制限をうけることになる。一方、NMRに現われる ^{13}C 化学シフトテンソルやCH間双極子相互作用などの相互作用も一般に異方的であるので、ゲスト分子のNMRパラメーターを測定することにより、その運動の様式などを明らかにすることができる。しかしながら、化学シフトの異なる核が多く存在するような粉末試料については、通常の一次元NMR法でのゲスト分子のパラメーターの測定は困難を伴う。SASS-NMR法¹⁾は粉末状態で例えば ^{13}C CPMA Sスペクトルで分離された個々の炭素位置でのNMRパラメーターの分離測定を可能とした。ここではSASS-NMR法によって調べることのできた尿素包接化合物中の*n*-アルカン、*n*-アルケンといくつかのホストに包接されたフェロセンをとり上げてその挙動についてまとめて報告する。

§ 2. フェロセンをゲスト分子とする包接化合物はチオ尿素(TU)、デオキシコール酸(DCA)、シクロデキストリン(CD)類などがある。フェロセン分子の大きさは、vertical(5回軸)方向、lateral方向とも6 Å強であって、包接化合物中でのフェロセン分子の

配向や運動についてはホストとの相互作用が大きく影響することになる。

TUとの包接化合物ではフェロセンとホストTUとの ^{13}C 化学シフトの差が大きいので、既に報告したように通常の測定で ^{13}C 粉末スペクトルが測定できる(図1)²⁾。常温で等方的であった ^{13}C 化学シフトテンソルは、低温では軸対称となった。このときの異方性の大きさ76ppmは、フェロセン自身がその結晶中で5回軸まわりに回転しているときの値に一致していて、フェロセンはTU格子内にきつちりと包接されていることを示している。配向試料を用いた測定により、低温でフェロセンはchannelに沿って交互にverticalとlateralの配向をとっていることがわかった。

DCAはゲスト分子の形に応じて適当な包接空間を提供することが知られている。X線でフェロセン分子はDCA包接化合物中で特定の配置をとって静止しているように観測されている。³⁾ この系にSASS法を用いて図2に示した ^{13}C 化学シフト粉末スペクトルを得た。ここで ^{13}C 化学シフトテンソルは軸対称ではあるが、その異方性の大きさは68.3ppmであった。DCAに包接されたフェロセンは常温でも特定の配向をとっているが、そのシクロペンタジエン(CP)環は5回軸のまわりに回転していることを示して

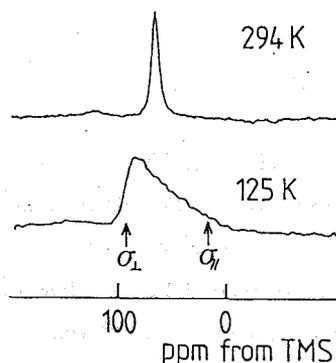


図1. チオ尿素包接化合物におけるフェロセンの ^{13}C 化学シフト粉末スペクトル。²⁾

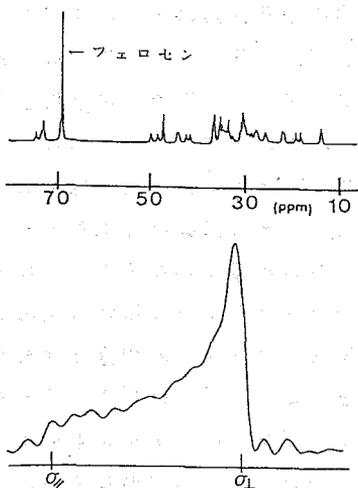


図2. フェロセン-デオキシコール酸包接化合物のNMRスペクトル。
(a) ^{13}C CP MASスペクトル。カルボキシル炭素の吸収は省略した。
(b) SASS法により得られたフェロセンの ^{13}C 化学シフト粉末スペクトル ($S_{\theta} = -0.303$)。

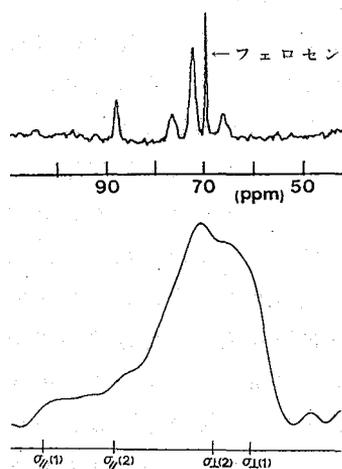


図3. フェロセン- β -シクロデキストリン包接化合物のNMRスペクトル。
(a) ^{13}C CP MASスペクトル。
(b) SASS法により得られたフェロセンの ^{13}C 化学シフト粉末スペクトル ($S_{\theta} = -0.303$)。

いる。また異方性の減少は、フェロセン分子の5回軸に垂直な軸に関する libration の存在によって説明できる。

CD類では α 、 β 、 γ の3つのCDがフェロセンを包接することが知られている。⁴⁾ ここでは β -CDとの包接化合物に対してSASS法を適用してフェロセンの ^{13}C 粉末スペクトルを測定した(図3)。 β -CDの空孔の大きさ(6.2Å)からフェロセンは vertical に包接されていると考えられている。⁴⁾ しかしながら、CPMASスペクトルでは1本の吸収線しか与えなかったフェロセンは、SASSによる粉末スペクトルでは、異方性の著しく異なる(75 および29ppm)2つの軸対称な ^{13}C 化学シフトテンソルをもつことを示した。

スペクトルの強度比から2種類のフェロセンの存在比は5:2であった。 β -CDに包接された2種類のフェロセンは、いずれもその5回軸のまわりに回転していること、存在比の大きい方のフェロセンの配向は β -CD内で固定していること、一方小さい方のフェロセンでは5回軸自身がさらに運動していることを示している。

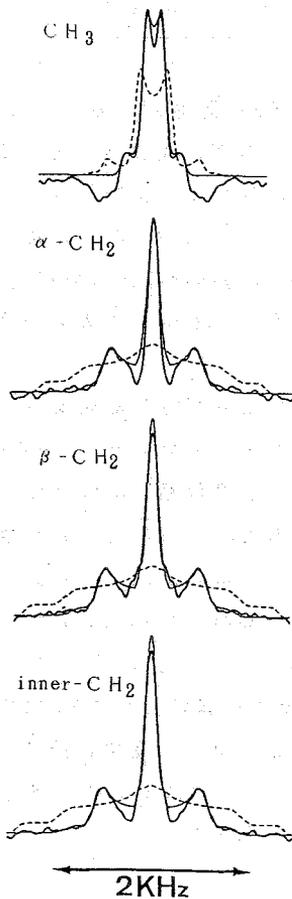


図4. SASS法により得られた尿素包接化合物中のn-デカン(10)の各炭素位置におけるCH双極子スペクトル。太線は実測、細線はシミュレーション、破線はchannel軸まわりの回転のないときのスペクトルを表す。

§3. 尿素包接化合物におけるn-アルカン($\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$)の ^{13}C 化学シフトは鎖長に依存すること、特に鎖長の短いアルカンでの ^{13}C 化学シフトが著しく高磁場側にシフトしていることから、⁵⁾ 尿素中でもn-アルカンの配座には、従来考えられてきたall-anti以外の配座が存在する可能性が示唆された。SASS法により尿素に包接されたヘプタン(7)からデカン(10)までのn-アルカンの各炭素位置でのCH双極子スペクトルを測定したところ、測定されたスペクトルは、 CH_2 基では一軸まわりに、また CH_3 基ではさらに C_3 軸まわりに速い回転を行っているときの線形を与えた。⁶⁾ そこでall-anti配座のn-アルカンがその長軸をchannel軸に一致させて回転している(CH_3 基では C_3 回転も含む)ときのCH間双極子相互作用の大きさを基準として実験値を再現するスケールリング因子 S_c を求めると表1に示したような結果となった。一方、MM2分子力場計算を行なってn-アルカンについて2つ以下のgauche結合を含む種々の配座の存在比とgeometryを求めた。尿素中でこれらの配座をもつアルカン分子がchannel軸の

表 1. 尿素包接化合物中のn-アルカン (C_nH_{2n+2}) のCH間双極子相互作用のスケーリング因子 (Sc)

n		7	8	9	10
CH ₃	exptl	0.73	0.85	0.75	0.88
	calcd	0.76	0.81	0.79	0.75
α -CH ₂	exptl	0.75	0.78	0.77	0.81
	calcd	0.81	0.82	0.85	0.85
β -CH ₂	exptl	0.81	0.86	0.91	0.91
	calcd	0.89	0.90	0.93	0.95
in-CH ₂	exptl	0.85	0.86	0.98	0.96
	calcd	0.92	0.94	0.96	0.98

まわりに回転し、かつ配座間の交換も速いと仮定して求めた Sc の計算値も表 1 に示した。CH₂ 基に関して見られる Sc の特徴は、鎖の中央に行くほどその値は大きい、また同じ炭素位置では鎖が長くなるほど大きいことである。この傾向は計算でよく再現されていて、尿素中でn-アルカン分子はgauche結合を含む様々な配座の"dynamic disorder"にあることを示している(例えばn-デカン(10)でのa·a·a·a、g·a·a·a、a·g·a·a各配座の存在比は、58, 25, 10%である)。また実験値が計算値よりなお少し小さいことはアルカンの分子振動に基づく双極子相互作用の減少に帰着することができる。

表 2. 尿素包接化合物中のトランス-4-オクテンのCH間双極子相互作用のスケーリング因子 (Sc)

	exptl	calcd
CH ₃	1.00	1.05
α -CH ₂	0.75	0.73
β -CH ₂	0.85	0.81
CH	0.88	0.92

以前SASS法により測定した尿素包接化合物中のn-アルケンとしてのトランス-4-オクテンのCH間双極子相互作用¹⁾についても力場計算を用いて考察した。計算による尿素中のオクテンの配座の代表例は、a·ac[±]·ac[±]·a(36%)、a·ac[±]·ac[±]·a(34%)、a·ac[±]·sp·a(10%)である。n-アルカンに対応して、存在しない配座ではあるが、all-anti配座を基準として Sc 求めると表 2 のような結果となった。実験と計算との対応は極めてよく、n-アルケンはn-アルカンにく

らべて尿素格子にきつちりと取まって分子振動も小さいことを示唆している。

1) 寺尾ら Chem. Phys. Lett., 1984 (107) 145; J. Chem. Phys., 1986 (85) 3816.

2) 中井, 寺尾, 今城, 雑賀 Chem. Phys. Lett., 1986 (132) 554.

3) K. Miki, N. Kasai, H. Tsutsumi, M. Miyata, and K. Takemoto, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1987) 545.

4) A. Harada and S. Takahashi J. Inclusion Phenom., 1984 (2) 791.

5) 今城, 前田, 中井, 雑賀, 寺尾 J. Phys. Chem., 1986 (90) 5498.

6) 今城, 桑原, 中井, 寺尾, 雑賀 日本化学会第55秋季年会, 1987, 1V15.

(京大理) ○中井利仁、芦田淳、寺尾武彦

APPLICATIONS OF TWO-DIMENSIONAL POWDER PATTERNS
AND DEVELOPMENT OF A NOVEL SLF METHOD

Toshihito NAKAI, Jun ASHIDA, and Takehiko TERA0 (Kyoto University)

^{13}C - ^1H dipolar / ^{13}C chemical shift two-dimensional (2D) powder patterns in rotating solids have been measured for isotactic-polypropylene; the chemical shift tensors have been determined for the individual ^{13}C nuclei. The 2D powder patterns for calcium formate reported previously have been simulated in consideration of CH anisotropic bending motions. A novel method for obtaining ^{13}C - ^1H dipolar powder patterns in rotating solids is proposed. By observing the magnetization of ^1H coupled with ^{13}C , sharp dipolar powder patterns can be obtained even for compounds with high proton density. An extension of this method to 2D powder patterns is also reported.

< I > . 序論

原子核間双極子相互作用は分子の幾何学的因子によって決まるため、分子の構造や運動に関して直接的な知見をもたらす。また、異方的化学シフト相互作用を双極子相互作用に関して展開した2次元NMR法は、両相互作用の主軸の相対的な方向を与え、電子状態と分子構造の関係などを明らかにする。我々は高速回転させた粉末試料に対して ^{13}C - ^1H 双極子 powder pattern¹、 ^{13}C - ^1H 双極子/ ^{13}C 化学シフト2次元 powder pattern^{2,3}を測定する方法を開発してきた。これらの方法では単結晶を用いることなく、豊富で重要な情報が得られる。試料回転はスペクトルの縮小によりS/N比を向上させ、cross polarization (CP)の異方性によるスペクトルの歪みを軽減し、さらにswitching-angle sample-spinning (SASS)法⁴の導入により非等価な ^{13}C に帰属するスペクトルの分離測定を可能にする。

今回、2次元 powder pattern測定の応用として、アイソタクティック・ポリプロピレンを調べ、各 ^{13}C の化学シフト異方性に関する興味深い知見を得た。また、ギ酸カルシウムに対する2次元 powder patternが、CH結合の異方的変角振動 (bending motion) を反映していることを見出した。

これまで我々が開発してきた方法は、 ^{13}C などの希少核が周りの多くの ^1H からうける平均的な局所場を観測するseparated local field (SLF)法を基にしている。今回、 ^{13}C 核に隣接した ^1H 核がその ^{13}C 核からうける局所場を観測することにより、より高い分解能をもつ双極子 powder pattern、2次元 powder patternを測定することにも成功した。この方法をギ酸カルシウム、ポリプロピレンに適用した結果を報告する。

〈Ⅱ〉. ポリプロピレンに対する2次元 powder pattern

静止したポリプロピレン粉末試料に対する¹³C化学シフトスペクトル(図1. a)は、CH₂、CH、CH₃基に帰属する powder patternの多くの部分が重なり、静止試料に対する2次元 powder patternから個々の¹³Cに関する情報を精度良く得ることは困難である。しかしながら、magic angle (θ_m)以外の方向のまわりに試料を回転させる我々の方法では、各2次元 powder patternがほとんど分離して観測された(図1. b)。計算スペクトルとのfittingによる解析の結果、化学シフトの主値(表1)に加え、主軸方向に関して次のような知見を得た。

・CH₂: σ₃₃方向はHCH平面に垂直であるが、σ₁₁、σ₂₂方向はCH₂基の対称軸に一致しない。σ₂₂方向は∠HCHの2等分線と約30°なす方向であり、これはポリプロピレン主鎖のもつらせん軸と炭素原子を結ぶ方向にほぼ一致する。すなわち、メチレン炭素の電子状態は分子の他の部分の影響を強く受けているといえる。

・CH: 化学シフト異方性はσ₁₁方向の周りに軸対称である(σ_∥ = σ₁₁、σ_⊥ = σ₂₂ = σ₃₃)。2次元 powder patternはσ₁₁方向がCH結合方向に一致することを示しており、CH基に隣接する2つのCH₂基およびCH₃基が、メチン炭素に等しく電子遮蔽の効果をもたらしている。しかし、イソブタンのメチン炭素ではσ₃₃方向の周りに軸対称であり、この系とは逆になっている。

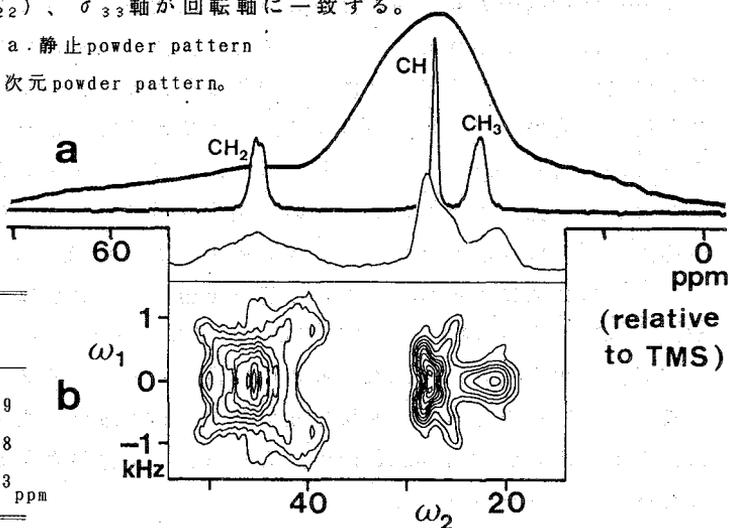
・CH₃: 基の3回対称軸まわりの回転によって化学シフト異方性は軸対称になっており(σ_∥ = σ₃₃、σ_⊥ = σ₁₁ = σ₂₂)、σ₃₃軸が回転軸に一致する。

図1. ポリプロピレンに対する a. 静止 powder pattern およびCPMASスペクトル、 b. 2次元 powder pattern.

ω₁: ¹³C-¹H双極子相互作用。
ω₂: ¹³C化学シフト相互作用。
ω₁、ω₂測定時の試料回転軸と静磁場のなす角度はそれぞれ
θ₁ = θ_m + 4°, θ₂ = θ_m + 14°.

表1	σ ₁₁	σ ₂₂	σ ₃₃	$\bar{\sigma}$
CH ₂	64.7	43.9	25.8	44.9
CH	37.6	21.4	21.4	26.8
CH ₃	32.0	32.0	2.9	22.3

ppm



〈Ⅲ〉. ギ酸カルシウムに対する2次元 powder pattern

前回、化学シフト主軸方向は、ほぼσ₁₁軸がCH結合方向に一致しσ₃₃軸がギ酸イオン平面に垂直である(図2挿画)が、イオンの対称軸からのわずかなずれがあることを報告した。計算スペクトル(図2. b)は概ね測定スペクトル(図2. a)を再現するものの、後者に現われるσ₂₂、σ₃₃方向における双極子分裂の大きさの違いは再現されない。また、1次元双極子 powder pattern(図2. ω₁方向 projection)を再現するためにはCH間距離

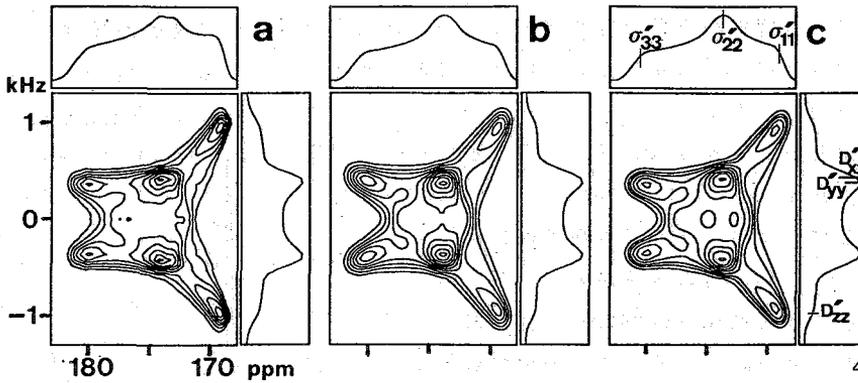


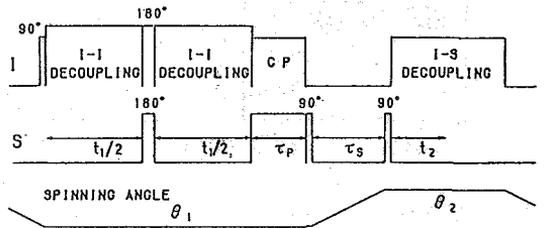
図2. 碳酸カルシウムに対する測定 (a) および計算 (b, c) 2次元 powder pattern. $\theta_1 = \theta_2 = \theta_m + 4^\circ$. σ'_{ii} , D'_{ii} は縮小された主値を表す。

を約1.13Åと仮定せねばならず、この値は中性子散乱実験の与える1.08~1.09Åと有為な差をもつ。今回、これらの不一致を、異方的なCH変角振動の影響によるものとして解決した。自乗平均振幅が $\langle \theta_1^2 \rangle$ 、 $\langle \theta_0^2 \rangle$ で与えられるCH in-plane, out-of-plane 変角振動により双極子相互作用テンソルは次のように変化する。

$$D \begin{pmatrix} -\frac{1}{2} & & \\ & -\frac{1}{2} & \\ & & 1 \end{pmatrix} \rightarrow D \begin{pmatrix} -\frac{1}{2} (1 - 3 \langle \theta_1^2 \rangle) & & \\ & -\frac{1}{2} (1 - 3 \langle \theta_0^2 \rangle) & \\ & & 1 - \frac{3}{2} (\langle \theta_1^2 \rangle + \langle \theta_0^2 \rangle) \end{pmatrix}$$

すなわち、主軸方向は変化しないが、振動が異方的である限り ($\langle \theta_1^2 \rangle \neq \langle \theta_0^2 \rangle$) テンソルは非軸対称になる。このような振動の効果を考慮することによって、CH距離を1.09Åに保ったままで測定スペクトルをより良く再現することができた (図2.c)。変角振動の振幅は2種類のギ酸イオンに対してそれぞれ $\sqrt{\langle \theta_1^2 \rangle} = 6^\circ$, $\sqrt{\langle \theta_0^2 \rangle} = 14^\circ$ および $\sqrt{\langle \theta_1^2 \rangle} = 6.5^\circ$, $\sqrt{\langle \theta_0^2 \rangle} = 12^\circ$ となり、out-of-plane変角振動の力定数がin-plane変角振動の力定数より小さいという Raman, IR実験の結果とconsistentである。運動の方向に関する情報は、粉末試料に対するいかなる1次元NMR法によっても得られない。このように2次元 powder patternは、小振幅の運動の研究にも有効であるといえる。

〈IV〉. 回転粉末試料に対する ^{13}C - ^1H 双極子/ ^{13}C 化学シフト correlation スペクトル natural abundance または ^{13}C をわずかにrandomにenrichした試料では、一つの ^{13}C と多くの ^1H の間に双極子相互作用が生じており、 ^{13}C 吸収線は多くの ^1H スピン配置に対応して多重分裂またはbroadeningを示す。しかし、 ^{13}C 核と結合した ^1H 核の吸収線を観測した場合、つねにその ^{13}C との双極子相互作用によるdoubletしか現われず、より高い分解能が期待できる。双極子 powder patternを結合に関与する非等価な ^{13}C に関して分離測定するために、直接に結合した ^{13}C へ ^1H 磁化を選択的に移行させた後、magic angle spinningの下で ^{13}C 等方シフト信号として間接的に観測する2次元NMR法を採用した。



実験に用いたパルス系列を図3に掲げる。 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用測定のための新しいパルス系列。

^1H - ^1H decouplingとしてMREV-8 multiple pulse (MP) を用い、時間 t_1 の increment幅はMPの cycle timeおよび試料回転の周期の整数倍とした。 ^1H 磁化の ^{13}C への選択的移行が、短い mixing time (100 μs) で CPを行うことによって実現されることは、前回報告した通りである。

同方法を用いて測定した、ギ酸カルシウムに対する ^{13}C - ^1H 双極子 powder patternを、図4. aに示す。ギ酸カルシウムはC-H対が結晶中で比較的孤立しているが、それでも従来の方法によるスペクトル(図4. b)と比べ、約2.5倍の分解能の向上が認められた。スペクトルの分解能を決定する線幅(約60Hz)は主にMPおよび 180° パルスの不完全性に帰せられる。スペクトル中央の吸収線は ^{13}C と直接には結合していない ^1H の磁化が、CP時に ^1H - ^1H spin diffusionを介して ^{13}C へ移行したものである。この吸収線は、上記の線幅より大きな線幅をもち(半値幅92Hz)、shoulderさえ見られる。このshoulderは孤立している第2近接 ^{13}C - ^1H 対(核間距離約2.9 \AA)に由来すると考えられる。スペクトルの分解能を支配している線幅は、図3において ^{13}C 180° パルスを省略したパルス系列を用いて、実験的に求めることができる。その結果、 $\omega_1=0$ Hzに半値幅53Hzの吸収線が得られ、これを図4. aの powder patternから差し引くことによって、第2近接 ^{13}C - ^1H 対による双極子 powder patternが得られた(図4. c)。

ポリプロピレンのような高い水素原子密度をもつ化合物に対して、SLF法は構造に乏しい双極子 powder patternしか与えないが、新しい方法ではPake doubletおよび中央に多くの速隔 ^{13}C - ^1H 対による吸収線が観測された。結果は紙面の関係上、割愛する。

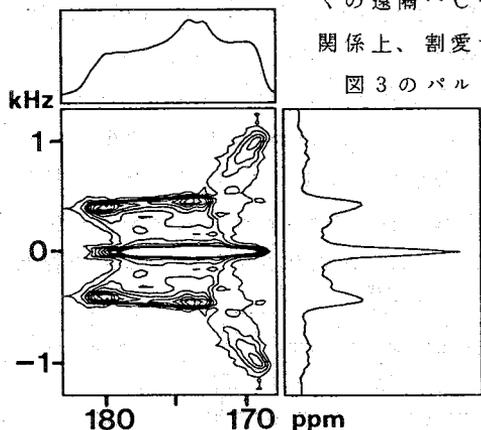


図5. ギ酸カルシウムに対する新しい方法による2次元 powder pattern. $\theta = 0, \theta = 4^\circ$

図4. ギ酸カルシウムに対する双極子 powder pattern. a. 新しい方法によるもの、b. 従来の方法によるもの。c. 第2近接 ^{13}C - ^1H 対の双極子 powder pattern.

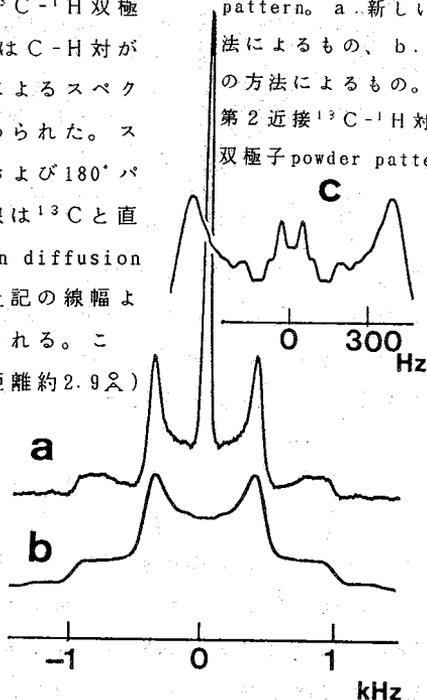


図3のパルス系列を用いて、 ^{13}C の信号をoff-magic angle spinningの下で観測すると、2次元 powder patternが得られる。ギ酸カルシウムに対する結果は、双極子軸方向に分解能の飛躍的な向上を示し、再び変角振動の存在をあらわにしている(図5)。

1. T. Terao, H. Miura, and A. Saika, JCP, **85**, 3816(1986).
2. T. Nakai, J. Ashida, and T. Terao, JCP, **88**, 6049(1988).
3. T. Nakai, T. Terao, and H. Shirakawa, CPL, **145**, 90(1988)
4. T. Terao, T. Fujii, T. Onodera, and A. Saika, CPL, **107**, 145(1984).

Magic Angle Spinning 下における ^{13}C 及び ^{31}P NMR の Spectral Spin Diffusion

(University of British Columbia)

○久保 厚、C. A. McDowell

Spectral Spin Diffusion in Polycrystalline Solids under Magic-Angle Spinning
Atsushi Kubo and C. A. McDowell (University of British Columbia)

Spectral spin diffusion in ^{13}C NMR of double ^{13}C -labelled sodium acetate and zinc (II) bis(0,0'-diethyldithiophosphate) has been studied under magic-angle spinning conditions. Spin diffusion time constants, T_{SD} , were determined from the intensities of the spinning sidebands by rotation synchronized DANTE pulse sequences at several different spinning frequencies. The theory of Suter and Ernst, developed for spectral spin diffusion in single crystals was extended to the case of polycrystalline samples rotating under magic-angle spinning conditions.

〈序〉 最近、固体内の Chemical Shift の値の異なる Spin 間の Spin Diffusion (Spectral Spin Diffusion) の測定が、二次元 Exchange NMR 法と、固体高分解能 NMR 法を組み合わせることにより可能となった。(1, 2) Spin Diffusion は主に異極子相互作用によることから、Spin Diffusion Time Constant (T_{SD}) の値から、核間距離についての情報を得ることが可能と考えられる。Suter と Ernst (3) 及び Henrichs ら (4) は単結晶を用いて T_{SD} の角度依存性を測定し、理論的解析を行った。我々も dipotassium glucopyranose-1-phosphate dihydrate と triphenylphosphine の単結晶を用い、 ^{31}P NMR の T_{SD} の測定を行い、理論的解析を行った。(2a) Magic Angle Spinning (MAS) は粉末試料の固体高分解能 NMR を測定する場合の常套手段である。MAS 下の Spectral Spin Diffusion については、理論的解析があまりなされていない。(5, 6) ^{13}C ^{13}C COONa (SAC) 及び、 $\text{Zn}[(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{PS}_2]_2$ (ZNP) の粉末結晶を用い、 ^{13}C NMR 及び、 ^{31}P NMR の T_{SD} を試料の回転周波数 ν_r の関数として測定し、理論的解析を行った。(2b)

〈実験及び結果〉 CPMAS NMR の実験は、Bruker CXP 200 FT NMR spectrometer と Doty-double air bearing MAS probe を用いて行った。試料の回転周波数 ν_r は、 N_2 ボンプを使って、一定のガスを probe に供給し、各々の測定において ± 50 Hz 以内で制御した。SAC の ^{13}C CPMAS NMR spectrum 及び ZNP

の ^3P CPMAS NMR spectrum は二本の isotropic peak より成っている。 T_{SD} の測定は、図1の Rotationally Synchronized DANTE Sequence (ア) を用いて、一方の side bands を選択的に励起することにより行った。 mixing time t_m を変化させながら、二本の isotropic peak の強度比 $r(t_m)$ を測定した。 $t_m \gg T_{SD}$ の条件下での r の値、 r_{eq} で規格化し、 $r(t_m) = r'(t_m) / r_{eq}$ と求めた。 試料が単一の T_{SD} を持つと仮定すれば、 $r(t_m)$ の T_m 依存性は次式で与えられる。(8)

$$\ln \frac{(1+r(t_m))}{(1-r(t_m))} = \frac{t_m}{T_{SD}} + \ln \frac{(1+r(0))}{(1-r(0))} \quad [1]$$

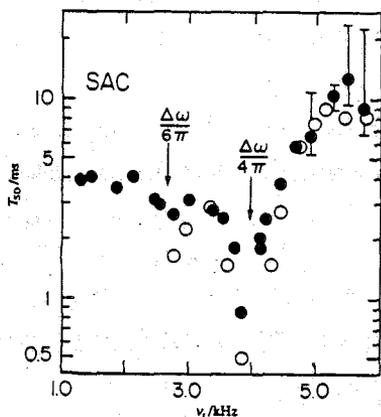


図2 SACの T_{SD} の ν_r 依存性。黒丸は実験値を、白丸は計算値を表わす。

後述べる様に T_{SD} の解析に用いるために、 ^1H decoupler off の条件で CP MAS spectrum を幾つかの ν_r の値で測定した。(図4) ZNPでは二種の共鳴周波数が接近しているので、Rotationally Synchronize DANTE Sequence で一方の side bands を取り除いた後、Decoupler off の条件で signal を観測した。
 <理論及び解析> spectral spin diffusion の観測量は、二種の spin の Z 磁化の差 $\langle S_{1z} - S_{2z} \rangle$ である。 $\langle S_{1z} - S_{2z} \rangle$ は二つの状態、 $|S_{1z} S_{2z}\rangle = |+\frac{1}{2} - \frac{1}{2}\rangle, |-\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\rangle$ の分布の差に比例する。 双極子相互作用のうち flip-flop term $d(S_{1+}S_{2-} + S_{1-}S_{2+})$

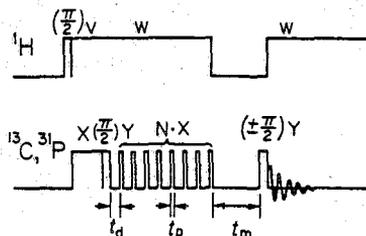


図1 Rotationally Synchronized DANTE Sequence (ア) 測定条件; $t_d = \nu_r^{-1}$; $N \cdot t_p = \frac{\pi}{2}$ pulse length; isotropic peak の一方に r. f. 周波数を設定した。

T_{SD} は $\ln[(1+r)/(1-r)]$ を t_m に対し plot した時の直線部分の傾きより得られる。 SAC の $\nu_r \geq 4.9 \text{ kHz}$ 以外の場合、この plot はほぼ直線となった。 図2に SAC の T_{SD} の ν_r 依存性を示した。 $\nu_r \geq 4.9 \text{ kHz}$ のデータについては、黒丸で平均の値を示すとともに縦線で誤差を示した。 T_{SD} は試料の回転周波数 ν_r が、二つの isotropic peak の共鳴周波数の差 $\frac{\Delta\omega}{2\pi}$ の半に一致した時、深い極小を、 $\frac{1}{3}$ に一致した時、浅い極小を示した。 図3は ZNP の T_{SD} の ν_r 依存性である。 ZNP では isotropic peak の周波数の差は、約 300 Hz ほど、測定を行った ν_r のいずれの値よりも小さい。 T_{SD} は ν_r を増加させた時、単調増加した。

は、 $S_{1z}-S_{2z}$ と可換でない。 d は双極子相互作用の強度を表わす因子で

$$d = \frac{\gamma_S^2 \hbar}{r^3} \frac{1}{2} (3\cos^2\theta - 1) \quad [2]$$

で与えられる。ただし r は S_1 と S_2 の核間距離、 θ は核間ベクトルと静磁場の成す角である。この flip flop term が spin diffusion を誘起する。 $|+\frac{1}{2}-\frac{1}{2}\rangle$ と $|-\frac{1}{2}+\frac{1}{2}\rangle$ の二つの状態は chemical shift interaction の差 $\hbar c_{s_1} - \hbar c_{s_2}$ により分裂し、多数の ^1H spin I_j との双極子相互作用 $\hbar c_{s_j I_j}$ によりエネルギーの幅を持っている。

$\langle S_{1z}-S_{2z} \rangle$ の時間依存性は、次式で与えられる。

$$\frac{\langle S_{1z}-S_{2z} \rangle (t)}{\langle S_{1z}-S_{2z} \rangle (0)} = \frac{\text{Tr}\{(S_{1z}-S_{2z})U(t)(S_{1z}-S_{2z})U^\dagger(t)\}}{\text{Tr}\{(S_{1z}-S_{2z})^2\}} \quad [3]$$

ただし $U(t)$ は time evolution operator である。

^1H spin との双極子相互作用によるエネルギーのゆらぎが充分大きい場合には、式 [3] は指数関数 $e^{-t/T_{SD}}$ で近似できる。 T_{SD} は、式 [3] の $U(t)$ を $(S_{1z}-S_{2z})$ と可換な項 $U_0(t)$ と可換でない項 $U^*(t)$ の積に分け、積分

$$U^*(t) = T \exp(-i \int_0^t dt \mathcal{H}^*(t)) \quad [4]$$

を展開し、 t に対して一次の項を求めることにより得られる。

$$\frac{1}{T_{SD}} = \int_0^\infty \frac{\text{Tr}\{[(S_{1z}-S_{2z})\mathcal{H}^*(t)][\mathcal{H}^*(t+\tau)(S_{1z}-S_{2z})]\}}{\text{Tr}\{(S_{1z}-S_{2z})^2\}} d\tau \quad [5]$$

ここで $\mathcal{H}^*(t)$ は flip flop term の時間依存性を表わす。

$$\mathcal{H}^*(t) = U_0(t) d(S_{1+}S_{2-} + S_{1-}S_{2+}) U_0^\dagger(t) \quad [6]$$

MAS 下では d は $\pm 2\nu_r$ 及び $\pm 2\nu_r$ の周波数で変調される。式 [5] は t の関数として $e^{\pm 2\pi i \nu_r t}$, $e^{\pm 4\pi i \nu_r t}$ で変化する項を含んでいるが、これらの項は取り除く。 zeroquantum transition operator $R_z = \frac{1}{2}(S_{1z}-S_{2z})$, $R_x = \frac{1}{2}(S_{1+}S_{2-} + S_{1-}S_{2+})$, $R_y = \frac{1}{2i}(S_{1+}S_{2-} - S_{1-}S_{2+})$ を導入し powder 平均を行えば次式が得られる。(2b, 5)

$$\frac{1}{T_{SD}} = \frac{d'^2}{15} \{ K_{Ry}(2\pi\nu_r) + K_{Ry}(-2\pi\nu_r) + \frac{1}{2} K_{Ry}(4\pi\nu_r) + \frac{1}{2} K_{Ry}(-4\pi\nu_r) \} \quad [7]$$

ここで $K_{Ry}(\omega)$ は zeroquantum line shape function である。 d' は双極子相互作用の強さを表わす因子で $d' = \gamma_S^2 \hbar / r^3$ で与えられる。

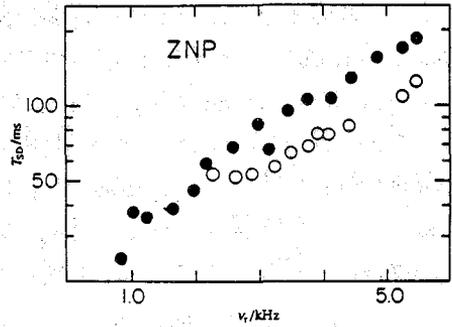


図3 ZNPの T_{SD} の ν_r 依存性。黒丸は実験値、白丸は計算値を表わす。

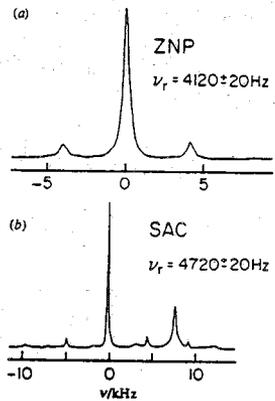


図4 ^1H decoupler off で観測した single quantum spectrum

T_{SD} の値より d あるいは核間距離 r を求めるには、zeroquantum line shape function $K_{Ry}(\omega)$ の $\omega = \pm 2\pi\nu_r, \pm 4\pi\nu_r$ の値を見積もらねばならない。zeroquantum line shape function は zeroquantum coherence の decay function $G_{Ry}(t)$ の Fourier 変換で与えられる。Henrichs ら (4) が単結晶の解析で行った様に、 S_1 spin のまわりの 1H spin と S_2 spin のまわりの 1H spin の coherence を無視すれば、 $G_{Ry}(t)$ は single quantum coherence の decay function $f_{\pm}^{(k)}(t)$, $k=1, 2$ を使って書き表わされる。

$$G_{Ry}(t) = \frac{1}{2} [f_{+}^{(1)}(t)f_{-}^{(2)}(t) + f_{-}^{(1)}(t)f_{+}^{(2)}(t)] \quad [8]$$

図4より、single quantum spectrum は良い近似で Lorentzian の side bands で表わせる。 l 番目の side bands の強度を $J_l^{(k)}$, isotropic peak の周波数を $\omega^{(k)}$, 線幅を $T_2^{(k)}$ とすれば

$$f_{\pm}^{(k)}(t) = \sum_l J_l^{(k)} \exp[\mp i(\omega_r l + \omega^{(k)}, t)] \exp(-t/T_2^{(k)}) \quad k=1, 2 \quad [9]$$

式 [8] と [9] より zeroquantum line shape function $K_{Ry}(\omega)$ は

$$K_{Ry}(m\omega_r) = \frac{1}{2} \sum_l I_l \left(\frac{T_R}{1 + i[\omega_r(l+m) + \Delta\omega]T_R} + \frac{T_R}{1 - i[\omega_r(l-m) + \Delta\omega]T_R} \right) \quad [10]$$

と書ける。 ≥ 2 でパラメータ、 $I_l, T_R, \Delta\omega$ は次式で与えられる。

$$\frac{1}{T_R} = \frac{1}{T_2^{(1)}} + \frac{1}{T_2^{(2)}} \quad \Delta\omega = \omega^{(1)} - \omega^{(2)}$$

$$I_l = \sum_m J_{m+l}^{(1)} J_m^{(2)} \quad [11]$$

図3及び図4の白丸は式 [7] [10] [11] により、結晶構造から求めた d の値と、single quantum spectrum より求めた $T_2^{(1)}, T_2^{(2)}, \omega^{(1)}, \omega^{(2)}, J_l^{(1)}, J_l^{(2)}$ のパラメータを使って計算した T_{SD} の値である。 T_{SD} の計算値は 実験値を良く再現している。

1. J. Jenner, B. H. Meier, P. Bachman and R. R. Ernst, J. Chem. Phys., 71, 4546 (1979)
- 2a A. Kubo and C. A. McDowell, J. Chem. Phys., 89, 63 (1988)
- 2b. A. Kubo and C. A. McDowell, to be published on J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 84
3. D. Suter and R. R. Ernst, Phys. Rev. B32, 5608 (1985)
4. P. M. Henrichs, M. Linder and J. M. Hewitt, J. Chem. Phys., 85, 7077 (1986)
5. E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades and V. T. Wynn, Phys. Lett., 4, 99 (1963)
6. M. G. Colombo, B. H. Meier and R. R. Ernst, Chem. Phys. Lett., 14b, 189 (1988)
7. P. Caravatti, M. H. Levitt and R. R. Ernst, J. Magn. Reson., 68, 323 (1986)
8. C. Connor, A. Naito, K. Takegoshi and C. A. McDowell, Chem. Phys. Lett., 113, 123 (1985)

特別講演 3

Two-stage Feature of Hartmann-Hahn Cross Relaxation in Magic Angle Sample Spinning

Wu Xiaoling, Zhang Shanmin and Wu Xuewen

Department of Physics, East China Normal University,
Shanghai 200062, P.R.China

Abstract

In magic angle sample spinning (MAS) experiments the Hartmann-Hahn cross relaxation between protonated ^{13}C and protons usually proceeds in two stages, except in fast internal rotating $^{13}\text{CH}_3$: the protonated ^{13}C magnetization of powder samples changes very rapidly during the first tens of microseconds due to the fast energy exchange between each protonated ^{13}C and its directly bonded ^1H spins; then it approaches at a much slower rate to a quasiequilibrium value via the energy exchange between these $^{13}\text{CH}_n$ subsystems and the remaining ^1H spins. This fact means that the whole ^1H spin system is not in a quasiequilibrium state and is not describable by a single spin temperature at least during the first stage of the cross relaxation. The two-stage feature has been obviously revealed by the depolarization experiment for ^{13}C magnetization. The expression for protonated ^{13}C magnetization as a function of depolarization time has been deduced, which reaches agreement with the experiments semi-quantitatively. The depolarization experiment offers a reliable approach to distinguishing between ^{13}CH and $^{13}\text{CH}_2$ signals in organic solids.

(豊田中研) 田嶋一郎・白杵有光・福嶋喜章・山本 豊
(京大化研) 堀井文敬

Characterization of clay minerals and their inclusion compounds
by high-resolution solid-state NMR

Ichiro Tajima, Arimitu Usuki, Yoshiaki Fukushima, Minoru Yamamoto

(Toyota Central Research and Development Laboratories, Inc.)

Fumitaka Horii (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

The frameworks or layered structures of clay minerals have been studied by high resolution solid-state NMR spectra of ^{29}Si and ^{27}Al nuclei, using magic angle spinning system. Chemical shifts and half widths were discussed for various clay minerals: Saponite, Hectorite, and Montmorillonite (Kunipia, Wyoming, and Cheto). The use of CP/MAS techniques enabled ^{15}N and ^{13}C -NMR to be obtained for investigations of interface structures between clay minerals and organic compounds. In respect of inclusion compounds of ^{15}N or ^{13}C labelled glycine ^{15}N -chemical shifts and ^{13}C spin-lattice relaxation times were effective informations about molecular interaction.

1. 粘土鉱物であるサボナイト、ヘクトライト、およびモンモリロナイト等は、層状構造を有することで知られている。この層状構造を有効に利用して、層間への有機物のインターカレーション、酸塩基性層間での有機反応、あるいは層間での重合等を行い新しい材料の開発が行われている。このような粘土鉱物の化学構造および粘土鉱物と有機物との界面の物性解析に関する研究は、必要であるにもかかわらず少ない。これまでに ^{15}N 、 ^{13}C および ^{29}Si 核固体高分解能 NMR 手法を用いた種々の固体材料の物性解析を報告してきた。^{1~3} ここでは、これら多核固体高分解能 NMR 手法の粘土鉱物およびその包接化合物への応用について検討した。

2. 粘土鉱物：粘土鉱物としては、合成サボナイト (Sumecton)、スペイン産サボナイト (Saponite)、カリフォルニア産ヘクトライト (Hectorite)、山形産モンモリロナイト (Kunipia)、ワイオミング産モンモリロナイト (Wyoming) およびアリゾナ産モンモリロナイト (Cheto) を使用した。これら粘土鉱物は、水中分散させ、粒子径 $2\ \mu\text{m}$ 以下になるように水簾法で精製した。さらに、イオン交換樹脂 (室町化学 Muronac HCR-W2) で Na^+ 置換

して試料とした。これらの粘土鉱物の化学組成は、化学分析法 (SiO_2)、I・C・P 発光分析法 ($\text{MgO}, \text{Al}_2\text{O}_3, \text{Fe}_2\text{O}_3, \text{CaO}$)、原子吸光分析法 ($\text{Na}_2\text{O}, \text{K}_2\text{O}$) で、結晶構造は X 線回折法で確認した。包接化合物：粘土鉱物としては、Sumecton および Kunipia を用いた。有機物としては ^{15}N あるいは、 ^{13}C 置換グリシンを用いた。粘土鉱物と有機物とを水中分散させ、ろ過した後凍結乾燥を行って包接化合物を得た。固体高分解能 NMR：粘土鉱物については、 ^{29}Si および ^{27}Al - MAS - NMR を測定し、一方包接化合物については、 ^{15}N および ^{13}C - CP / MAS - NMR を測定した。測定条件としては、 ^{29}Si 核 (59.62 MHz) は、 90° パルス幅 $4.5\mu\text{s}$ 、取込時間 $16\mu\text{s}$ 、待ち時間 6s、一方 ^{13}C 核 (75.47 MHz) は、 90° パルス幅 $4.8\mu\text{s}$ 、取込時間 $16\mu\text{s}$ 、接触時間 1ms、待ち時間 6s で行った。 ^{13}C および ^{29}Si 核は TMS、 ^{15}N 核は NH_4NO_3 、および ^{27}Al 核は $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を基準 (0ppm) とした。

3.1 粘土鉱物

表 1 には、種々の粘土鉱物の化学組成についてまとめた。

Table 1 Chemical Composition of Various Clay Minerals

Clay mineral	Chemical composition
	$(\text{Tetrahedral})_8 (\text{Octahedral})_6 \text{O}_{20} (\text{OH})_4 \cdot (\text{X})$
Sumecton	$(\text{Si}_{7.20} \text{Al}_{0.80})(\text{Mg}_{5.97} \text{Al}_{0.03})\text{O}_{20}(\text{OH})_4 (\text{Na}_{0.49} \text{Mg}_{0.14})$
Saponite	$(\text{Si}_{7.60} \text{Al}_{0.40})(\text{Mg}_{5.59} \text{Al}_{0.14} \square_{0.27})\text{O}_{20}(\text{OH})_4 (\text{Na}_{0.30} \text{Ca}_{0.07} \text{K}_{0.06})$
Hectorite	$(\text{Si}_{7.85} \text{Al}_{0.15})(\text{Mg}_{5.10} \text{Al}_{0.04} \square_{0.86})\text{O}_{20}(\text{OH})_4 (\text{Na}_{1.11} \text{Ca}_{0.04} \text{K}_{0.01})$
Kunipia	$(\text{Si}_{7.71} \text{Al}_{0.29})(\text{Al}_{3.33} \text{Mg}_{0.67} \square_{2.00})\text{O}_{20}(\text{OH})_4 (\text{Na}_{0.96} \text{Ca}_{0.04} \text{K}_{0.01})$
Wyoming	$(\text{Si}_{7.84} \text{Al}_{0.16})(\text{Al}_{3.22} \text{Mg}_{0.40} \square_{2.38})\text{O}_{20}(\text{OH})_4 (\text{Na}_{0.50} \text{Ca}_{0.15} \text{K}_{0.01})$
Cheto	$(\text{Si}_{7.86} \text{Al}_{0.14})(\text{Al}_{2.80} \text{Mg}_{1.00} \square_{2.20})\text{O}_{20}(\text{OH})_4 (\text{Ca}_{0.46} \text{K}_{0.03} \text{Na}_{0.02})$

トリオクタヘドラル型スメクタイト (Sumecton, Saponite, Hectorite) の化学組成上の特徴は、四面体の Si および八面体の Mg の一部が Al で同形置換されている。これに対してジオクタヘドラル型スメクタイト (Kunipia, Wyoming, Cheto) の化学組成は八面体の Mg の多くが Al で同形置換されている。^{4~5} これらの X 線回折線の $2\theta(001)$ から求めた層間距離は、それぞれ 12.4\AA (Sumecton), 14.9\AA (Saponite), 12.7\AA (Hectorite), 12.5\AA (Kunipia), 11.6\AA (Wyoming), および 13.7\AA (Cheto) であった。Saponite と Cheto の層間距離が大きいのは、おそらく Na に対して Ca および K イオンの割合が大きいためと考えられる。このような粘土鉱物の化学構造の相違を調べるため ^{29}Si - MAS - NMR スペクトルを測定した。

図 1 には種々の粘土鉱物の ^{29}Si - MAS - NMR スペクトルを示した。Sumecton および Saponite においては、 -95ppm および -90ppm 付近にシグナルが観察できた。これは、四面

体構造の Si に八面体構造の Mg が配位した化学結合 [(Tetrahedral)Si(Octahedral): (SiO)₃Si(O Mg)] および四面体構造の Si に四面体構造の Al と八面体構造の Mg が配位した化学結合 [(AlO)(SiO)₂Si(O Mg)] にそれぞれ対応すると考えられる。これに対して Hectorite の場合には、同形置換が少ないため -94.7 ppm にのみシグナルが観察できた。また、Sumecton では -84 ppm 付近に Si と同形置換した Al が 2 配位した化学結合 [(AlO)₂(SiO)Si(O Mg)] と考えられるピークも含まれていることがわかった。一方、Kunipia、Wyoming および Cheto においては、-94 ppm 付近に比較的線幅がひろいシグナルが観察された。これは四面体構造の Si に八面体構造の Al が配位した化学結合 [(SiO)₃Si(O Al)] によるシグナルと考えられる。同形置換が少ない Cheto では線幅は比較的小さいことがわかる。また Kunipia および Wyoming では、より低磁場 (-91 ~ -87 ppm) に Si と同形置換した Al および八面体構造の Al が配位した化学結合 [(AlO)(SiO)₂Si(O Al) ~ (AlO)₂(SiO)Si(O Al)] と思われるピークが存在することが確認できた。

図 2 には種々の粘土鉱物の ²⁷Al-MAS-NMR スペクトルを示した。Sumecton, Saponite, および Hectorite では 65 ppm 付近に四面体構造の Al シグナルのみが現れた。一方、Kunipia, Wyoming, および Cheto では、3 ppm に八面体構造の Al シグナルが強く観察され、四面体構造の Al シグナルはスピニングサイドバンド (43 および 83 ppm) の間に見いだすことができる。しかし八面体構造の Al の化学シフトの異方性が大きく四面体構造の Al と八面体構造の Al との割合を定量することはかなりの誤差を生じると思われる。ただし Kunipia および Wyoming では四面体構造の Al のピークが相対的に大きく観測できた。このことは、²⁹Si-NMR スペクトルにおける低磁場側のシグナルの帰属を支持している。

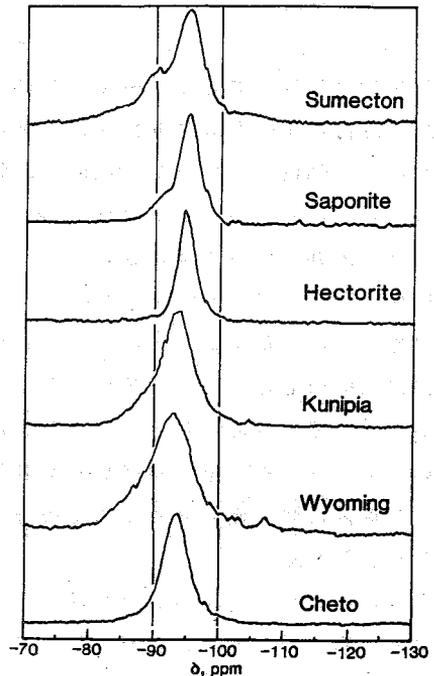


Fig. 1 ²⁹Si-MAS-NMR Spectra of Various Clay Minerals

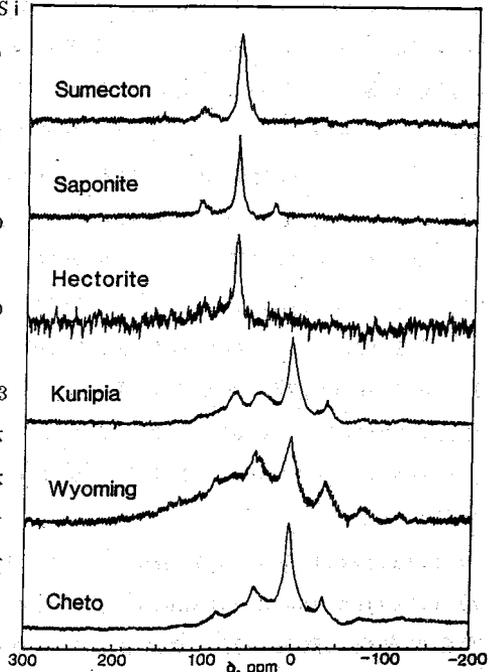


Fig. 2 ²⁷Al-MAS-NMR Spectra of Various Clay Minerals

3.2 包接化合物

グリシンと粘土鉱物の層間にインターカレートした包接化合物のNMR解析を行った。図3には、グリシン(Gly),グリシン/Kunipia包接化合物(Gly/Kunipia),グリシン塩酸塩(GlyHCl),およびグリシン/Sumecton包接化合物(Gly/Sumecton)の ^{15}N -CP/MAS-NMRスペクトルを示した。それぞれの化学シフト値は15.6, 11.2, 10.9および8.6ppmであり、この順序で窒素上の分極(δ +性)が減少していると考えられる。Sumectonではプレーンステズ酸性が強いため H^+ イオンがケイ酸塩層に強く吸着され窒素上の分極が抑えられたと思われる。

図4には、グリシンおよびグリシン/粘土鉱物包接化合物の ^{13}C -CP/MAS-NMRスペクトルを示した。Kunipia中にインターカレートされたGlyのメチレン炭素シグナルは観察できなかった。この理由については、まだ不明であるがKunipia中に含まれる水あるいは空孔がなんらかの影響を及ぼしていると思われる。一方Sumecton中にインターカレートされたGlyのメチレン炭素(^{13}C ラベル)の化学シフトは42.8ppmであり、43.0ppmとほとんど差は見られなかった。しかしスピン-格子緩和時間(T_1)を測定した結果、GlyHClおよびGlyのメチレン炭素の T_1 が4.95sおよび3.69sであるのに対して、Sumecton中のGlyのそれは0.25sであり顕著な差が見られた。また、Sumecton中のGlyでは、シグナルの線幅も広がっており、その分子運動性がかなり異なることがわかった。

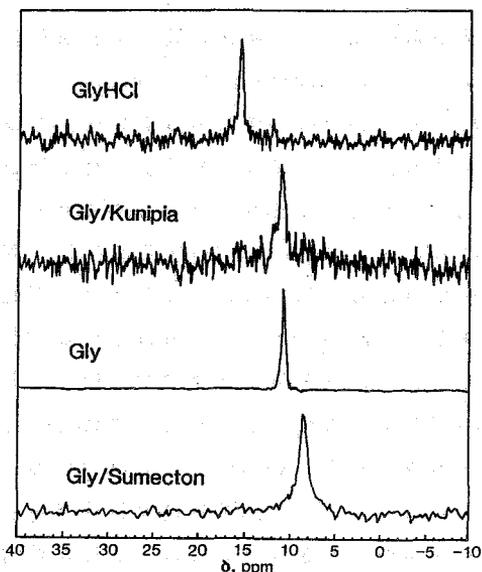


Fig.3 ^{15}N -CP/MAS-NMR Spectra of Gly and Gly Inclusion Compounds

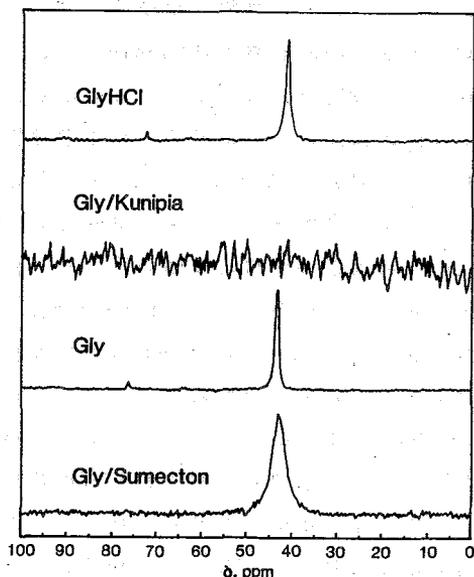


Fig.4 ^{13}C -CP/MAS-NMR Spectra of Gly and Gly Inclusion Compounds

- 1) I.Tajima, T.Suda, M.Yamamoto, K.Satta, H.Morimoto, The 25th NMR Symposium, 44(1986).
- 2) I.Tajima and M.Yamamoto, J.Polym.Sci.Part A, Polym.Chem., 25, 737(1987).
- 3) 白杵有光、岡田 茜、福嶋喜章、田嶋一郎、倉内紀雄, 日本化学会予講集, 1, 708(1988)
- 4) Mineralogy of CMS Source Clays from van Olphen and Fripiat(1979).
- 5) W.F.Jaynes and J.M.Bigham, Clays and Clay Minerals, 35, 440(1987).

(東京工大) ○安藤慎治・松本圭石・安藤 勲

(群大工短大) 荘司 顕・尾崎拓男

Conformational Study of Proline containing Oligo-peptides by ^{13}C CP/MAS NMR
S.Ando¹, I.Ando¹, A.Shoji² and T.Ozaki²

1) Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

2) College of Technology, Gunma University

Using the conformation dependent ^{13}C chemical shifts of polypeptides and hydrogen bond length dependence of Gly C=O chemical shift determined by ^{13}C CP/MAS NMR, we obtained useful information about the local conformation of oligopeptides such as antiparallel β -sheet, 3_1 helix and β -turn in the solid state. We also examined the secondary structure of the peptides whose conformation have not been determined by X-ray studies. It was revealed that ^{13}C CP/MAS NMR is an effective tool to characterize the local conformation of oligopeptides.

1. はじめに

固体高分解能 CP/MAS NMR より得られる ^{13}C 化学シフトはポリペプチドの二次構造に依存して変化し、その値が主鎖コンホメーションに固有であることが既に明らかとなっている¹⁾。ペプチドを構成する各炭素の化学シフトは、核の周囲のローカルな電子構造により決定されることが遮蔽定数の量子化学計算から示唆されているので²⁾、ポリペプチドから得られたコンホメーション依存の化学シフトは、結晶中のオリゴペプチドの構造決定にも利用できる可能性がある。加えて、我々は Gly 残基 C=O 炭素の ^{13}C 化学シフトが水素結合距離と明確な相関にあることを既に明らかにしており³⁾、ポリペプチドやオリゴペプチドにおいては水素結合距離と二次構造の間にある程度の相関があることから、C=O 炭素の化学シフトが水素結合の有無やその距離のみならずコンホメーションに関する情報も与えることが期待される。

本研究では逆平行 β -シート、 3_1 ヘリックス、 β -ターンなどペプチドによく見られる二次構造の存在がすでに X線回折により知られている Z-Gly-Pro シーケンスを含むオリゴペプチドに注目し、その ^{13}C CP

	略記	化合物	結晶構造
/MAS NMR を測定して、化学シフトのコンホメーション依存性やそこからひきだすことのできる情報の種類について検討するとともに、結晶構造が未だ知られていないオリゴペプチドの	Z-GPLGP	Z-GlyProLeuGlyPro	○ (β -turn)
	Z-GPLG	Z-GlyProLeuGly	○ (β -turn)
	Z-GPL	Z-GlyProLeu	○ (3_1 -helix)
	Z-GP	Z-GlyPro	○ (β -sheet)
	Z-GPGG	Z-GlyProGlyGly	×
	Z-GPAG	Z-GlyProAlaGly	×
	Z-GPVG	Z-GlyProValGly	×
	Z-GPAA	Z-GlyProAlaAla	×

[表-1] 観測に用いたオリゴペプチド

結晶中の構造予測も行った。

2. 実験

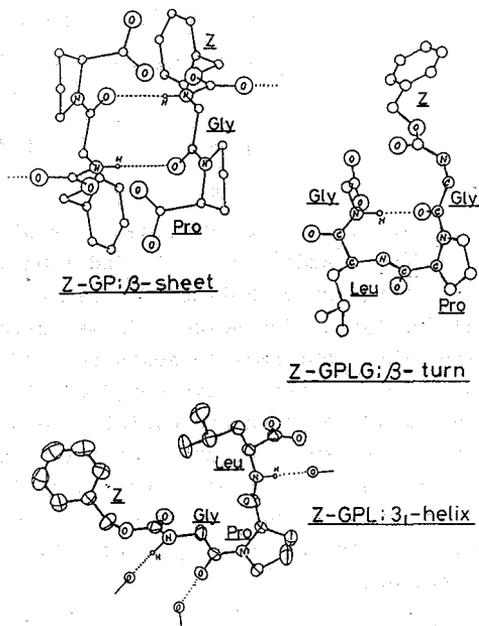
表-1に本研究で用いた試料とそのX線解析データの有無、結晶中の構造を掲げる。図-1にはオリゴペプチドの結晶中に見られる分子のコンホメーションを図示する。分子内水素結合により構造が安定化している β ターンを除いて、オリゴペプチド結晶中においてもポリペプチド二次構造(β シート、 3_1 ヘリックス)に対応した構造が現れ、局所的にはほぼ等しい主鎖構造(二面角; ϕ と ψ)をとっている。

これらの試料はすべてDCCを縮合剤として用いた液相法(活性エステル法)により合成し、結晶化をあわせて行った。Gly残基のC=O炭素については帰属を容易にするため ^{13}C で5%のラベルを行った。 ^{13}C CP/MAS NMRはJEOL GX-270分光計を用い、67.7MHz、室温にて測定を行った。コンタクトタイムは2msec繰り返し時間は5secである。十分な分解能が得られるまで100~500回の積算を行い、必要に応じてTOSSE法(Total Suppression of Side Bands)を併用した。

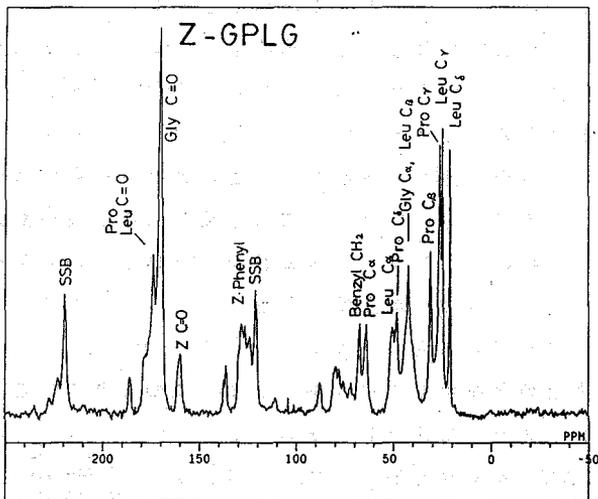
3. 結果と考察

[3-I] 図-2にZ-GPLGについて得られたスペクトルを示す。帰属は既に得られている固体ポリペプチドの化学シフトおよび溶液 ^{13}C N

MRの結果を参考にして行った。図-3は得られたGly C=O炭素の化学シフトとその水素結合距離($\text{N}\cdots\text{O}$ 間)を、既に本討論会で発表した種々のオリゴペプチドともに示したものである。このように分子間の $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ 型水素結合では、結合距離の減少が ^{13}C 化学シフトの低磁場シフトを引き起こすが、 β ターン構造のZ-GPLGP、Z-GPLGは、 β シート構造のZ-GPや 3_1 ヘリックス構造のZ-GPLに比べて相関直線からやや外



【図-1】 オリゴペプチド結晶中に現れるコンホメーション



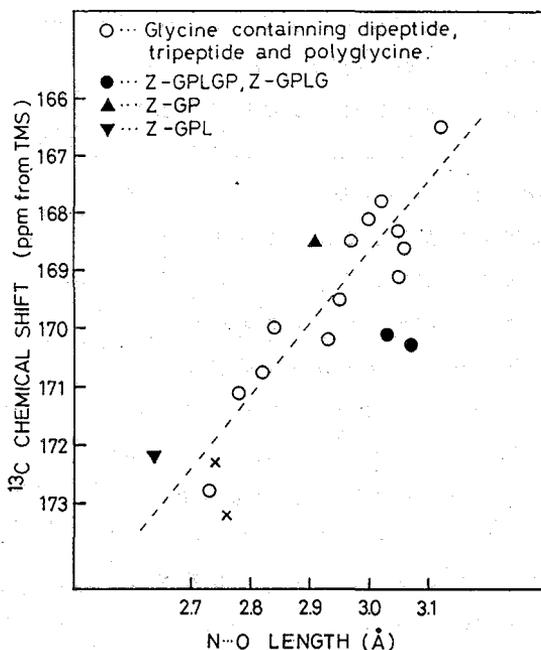
【図-2】 67.7MHz ^{13}C CP/MAS NMRスペクトル

れている。この原因としては、 β ターン構造がかなりコンパクトな折り返し構造のためその分子内水素結合 ($GlyC=O$ と $GlyN-H$ の間)が折れ曲がり、プロトドナーである窒素原子がアクセプターであるカルボニル酸素の非共有電子構造対に近づいたことが考えられる。図中○で表したオリゴペプチドにおいては $C=O \cdots N$ の角が最大 20° のばらつきはあるものの平均 150° であるのに対し、2つの β ターンペプチドにおいてはどちらも 120° と、水素結合がおおきく屈曲していることがX線による結晶構造解析より明らかとなっている。

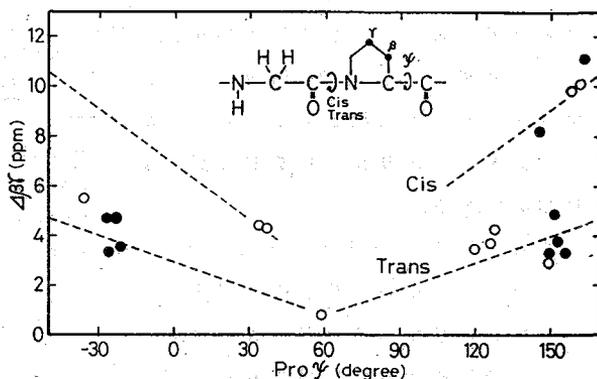
[3-II] Pro残基の $C\beta$ と $C\gamma$ の化学シフト差 ($\Delta\beta\gamma$) が、X-Pro間のアミド結合における cis/trans 異性を反映することはよく知られている。一般に、 $\Delta\beta\gamma$ が 6 ppm 以下の時、X-Pro結合は trans、8 ppm 以上の時は cis と言われている。しかし従来の測定の多くは溶液のものでありコンホメーションが固定された状態ではなかった。固体についてはポリプロリンおよび環状オリゴペプチドについていくつかの CP/MAS NMR の測定例が報告されているが、コンホメーションとの関係をまとめた例はない。図-4 に示すように、すべてのペプチドについて、 $\Delta\beta\gamma$ による X-Pro 結合の cis/trans 異性の判断は X 線の結果と一致しており、 $\Delta\beta\gamma$ を cis/trans 異性の評価基準とすることの妥当性を裏づけている。Siemion⁴⁾ は加えてこの $\Delta\beta\gamma$ が Pro の ψ にも依存して変化することを見だし、図の点線に示すような関係を提案したが、固体中での測定結果もほぼその直線上に乗っていることがわかる (ここで、本研究で新たに測定した点は ● Opella, Torchia らによって報告された点は ○ で示した)。

特に Opella らによる環状ペプチド γ ターンにおける $\Delta\beta\gamma = 0.7$ ppm は、 $\Delta\beta\gamma$ の Pro ψ に対する依存性を強く裏づけている。

[3-III] 第3残基の $C\alpha, C\beta, C\gamma$ 炭素化学シフトも局所的な構造に関する情報を与えると期



【図-3】 $GlyC=O$ 炭素化学シフトと水素結合距離の相関



【図-4】 Pro残基 $\Delta\beta\gamma$ と二面角 ψ の相関

待される。第2残基であるGlyには側[表-2]ポリペプチド¹³C CP/MAS NMR化学シフト (ppm from TMS)

鎖がなく、そのC α 炭素の化学シフトはコンホメーション変化に対して敏感でない。一方、Ala, Leu, Val等のC α , C β 炭素化学シフトは、ポリペプチドの2次構造に依存して大きく変化することが明らかとなっている(表-5に得られたポリペプチドのコンホメーション依存化学シフトの参照値を示す)。

Z-GPLGPとZ-GPLGにおいてLeu残基の化学シフトは、C α 炭素が β シートのそれに近く、C β 炭素は α ヘリックスと β シートのちょうど中間の値となっている。 β ターン第3残基の(ϕ , ψ)はポリペプチドのどの二次構造とも異なる位置にあるので、これらの化学シフトはこの構造に固有のものであると考えられる。この他にVal, Ala残基のC α , C β も局所的なコンホメーションの指標となっており、ポリペプチドとオリゴペプチドの間により相関がある。

これら¹³C NMR化学シフトから得られる情報を用い、結晶構造が知られていないオリゴペプチドのコンホメーション予測を行った結果が表-3(括弧内に示したコンホメーション)である。固体のNMRの観測結果は概ね通りの結晶構造を示唆しており、データ間に矛盾は生じていない。

以上のデータは固体のNMRがペプチドの固体状態でのコンホメーションを探るための有力な手法であることを示している。

4. 参考文献

- 1) H.Saito and I.Ando, 'High resolution Solid State NMR Studies on Synthetic and Biological Macromolecules', Ann.Rep.NMR Spectr. in press
- 2) I.Ando, H.Saito, R.Tabeta, A.Shoji and T.Ozaki, Macromolecules, 1984, **17**, 1405
- 3) S.Ando, I.Ando, A.Shoji and T.Ozaki, J. Am. Chem. Soc., 1988, **110**, 3380
- 4) I.Z.Siemion, T.Wieland, K.H.Pook, Angew. Chem., 1975, **19**, 712

Sample	Conformation	Gly		Pro	Ala		Leu		Val	
		C=O	C α	$\Delta\beta$	C α	C β	C α	C β	C α	C β
[Gly] _n	β sheet	169.5	44.2							
	3 β helix	172.8	44.2							
[Pro] _n	3 β helix(cis)			9.3						
	3 β helix(trans)			2.4						
[Ala] _n	α helix				53.4	15.9				
	β sheet				49.2	20.9				
[Leu] _n	α helix						56.7	40.5		
	β sheet						51.5	44.3		
[Val] _n	α helix								66.5	29.7
	β sheet								59.4	33.4
[Ala, Gly] _n	α helix	172.7					53.2	15.6		
[Leu, Gly] _n	α helix	172.4					56.4	40.0		
[Val, Gly] _n	β sheet	169.5							59.0	33.0
[Ala-Gly-Gly] _n	3 β helix	172.1	43.0		48.7	17.4				
[Pro-Ala-Gly] _n	Triple	168.2	43.5	4.6	48.3	17.6				
[Pro-Gly-Pro] _n	Triple	167.2	43.0	4.0						

[表-3]オリゴペプチド¹³C CP/MAS NMR化学シフト (ppm from TMS)

Sample	Conformation	Gly		Pro	Ala		Leu		Val	
		C=O	C α	$\Delta\beta$	C α	C β	C α	C β	C α	C β
Z-GPLGP	β turn	170.3	43.0	4.7			51.1	41.6		
Z-GPLG	β turn	170.1	42.0	4.7			50.4	41.6		
Z-GPGG	(3 β helix)	172.7	43.6	4.0						
Z-GPAG	(3 β helix)	172.1	43.3	7.6	48.7	18.7				
				9.9						
Z-GPAA	(Triple)	167.6	43.1	4.9	47.5	18.4				
						19.3				
Z-GPVG	(β sheet)	169.7	42.4	4.9					59.1	33.5
				10.1						
Z-GPL	3 β helix	172.2	43.2	9.1			53.3	38.5		
Z-GP	β sheet	168.5	45.1	3.3						
PLG-NH ₂	β turn	175.0	44.7	3.8			53.4	40.8		

(東工大^{*}・東工芸大工^{*}・群馬大工^{**}) ○黒子弘道・山延 健^{*}・
甲本忠史^{**}・安藤 勲

^{13}C NMR Chemical Shift and Crystal Structure of Polyethylene.

Hirokichi Kurosu, Takeshi Yamanobe*, Tadashi Komoto**, Isao Ando

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, *Department of Industrial Chemistry, Tokyo Institute of Polytechnics and **Department of Polymer Chemistry, University of Gunma)

In an X-ray diffraction study it was reported that polyethylene(PE) exists in two crystallographic forms, one is the orthorhombic PE and the other is monoclinic PE. In order to understand the relationship between the ^{13}C NMR chemical shift and crystal structure of PE, quantum-chemical calculations were carried out by using tight-binding MO theory with 7 chains model and were compared with the experimental data. The chemical shift difference between orthorhombic form and monoclinic form was theoretically verified to be caused by interchain interaction difference in the orthorhombic form and monoclinic form.

1. はじめに

固体高分解能 NMR によって得られる化学シフトは固体状態では分子運動が制限されているため特定のコンホメーションやその環境に対応している。この化学シフト変化は電子構造の変化に伴うものであり、これらをより深く理解し、多くの情報を引き出すには量子化学計算によるアプローチが必要となる。

これまで 1 本鎖による tight-binding(TB)-SOS 計算によって化学シフトを評価し、多くの高分子の ^{13}C NMR 化学シフトの挙動を合理的に説明してきた¹⁾。この 1 本鎖モデルは鎖内のコンホメーションおよび鎖内の長距離相互作用を考慮することができ、低分子モデル計算に比べ高分子性を取り入れられるという大きな利点を持っているが、現実には 1 本の高分子鎖が真空中に孤立していることはなく、鎖間相互作用が存在するはずであるが、1 本鎖モデルでは鎖間相互作用を考慮することができない。これらの効果も考慮するためには 7 本鎖モデルを用いた結晶構造の評価が必要である。

この 7 本鎖モデル計算を、我々はポリオキシメチレン (POM)、ポリアセチレン (PA) に対して行い、POM の結晶型の違いや PA のシス、トランスの異差による化学

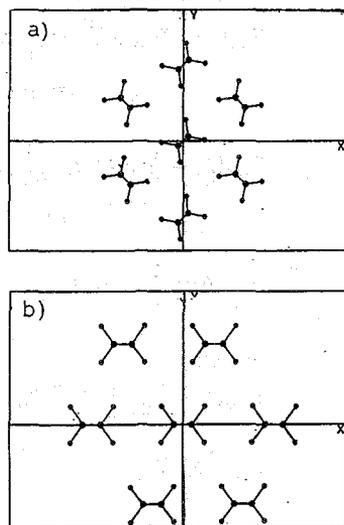


Fig. 1 7 chains model of PE
a) orthorhombic b) monoclinic

シフト差を再現している²⁾。しかし、POMは結晶型の変化に伴い分子のコンホメーションも変化するため、純粋に鎖間相互作用の効果のみを考慮しているわけでない。そこで本研究では結晶型が変化してもコンホメーションが変化しないPEの斜方晶と単斜晶(両者ともall-trans)について7本鎖モデル(Fig. 1(a),(b))によるTB-INDO/S-SOS計算を行い、結晶状態における鎖間相互作用と化学シフトとの関係を議論する。

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

$$\varphi_n(k,r)=\frac{1}{\sqrt{N}}\sum_j^N \exp(ikj)C_{jn}(k)\psi_\nu(r-ja) \quad (2)$$

と表される。ここで、kは波数、 ν はj番目のセル内の軌道、nは単位セル中の原子軌道、Nは全セル数、 $\psi_\nu(r-ja)$ 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。

$$E=\int_{-\pi}^{\pi} \sum_n^{\text{occ}} \langle \varphi_n(k) | H | \varphi_n(k) \rangle dk \quad (3)$$

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INDO/S法ではFock行列の要素は次式で与えられる。

$$F_{\mu\mu}(k)=U_{\mu\mu}+\sum_\nu^{(A)} P_{\nu\nu} \left[\langle \mu\mu | \nu\nu \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\mu | \nu\nu \rangle \right] + \sum_{j=-M}^M \sum_{B(\neq A \text{ in } \text{oth cell})} (P_B - Z_B) \gamma_{AB}^{\nu\mu} \\ + 2\beta_A \sum \gamma_{AA}^{\nu\mu} \cos(kj) - \sum_{j=1}^M \gamma_{AA}^{\nu\mu} \cos(kj) P_{\mu\mu}^{-jR} \quad (\mu, \nu \text{ on } A)$$

$$F_{\mu\nu}(k)=\frac{1}{2}(\beta_A+\beta_B) \sum_{j=-M}^M \exp(ikj) S_{\mu\nu}^{0j} - \frac{1}{2} \sum_{j=-M}^M P_{\mu\mu}^{-jR} \exp(ikj) \gamma_{AB}^{\nu\mu} \\ + P_{\nu\nu} \left[\frac{3}{2} \langle \mu\nu | \nu\nu \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\mu | \nu\nu \rangle \right] \quad (\mu \neq \nu, \mu, \nu \text{ on } A)$$

$$F_{\mu\nu}(k)=\frac{1}{2}(\beta_A+\beta_B) \sum_{j=-M}^M \exp(ikj) S_{\mu\nu}^{0j} - \frac{1}{2} \sum_{j=-M}^M P_{\mu\mu}^{-jR} \exp(ikj) \gamma_{AB}^{\nu\mu} \\ (\mu \neq \nu, \mu \text{ on } A, \nu \text{ on } B)$$

where

$$P_{\mu\mu}(k)=2 \sum_{k=0}^{2\pi} \sum_s^{\text{occ}} C_{s\mu}^*(K) C_{s\mu}(K)$$

$$P_B = \sum_{\mu}^{on B} P_{\mu\mu}$$

$$P_{\mu\mu}^{\pm jR} = 4 \sum_{k=0}^{\pi} \sum_s^{\text{occ}} \text{Re}[\exp(\pm ikj) C_{s\mu}^*(K) C_{s\mu}(K)]$$

$$U_{1s,1s} = -\frac{1}{2}(I+A)_{1s} - \frac{1}{2}\gamma_{HH}$$

$$U_{2s,2s} = -\frac{1}{2}(I+A)_{2s} - \left(Z_A - \frac{1}{2}\right)F^0 + \frac{1}{6}\left(Z_A - \frac{3}{2}\right)G^1$$

$$U_{2p,2p} = -\frac{1}{2}(J+A)_{2p} - \left(Z_A - \frac{1}{2}\right)F^0 + \frac{1}{3}G^1 + \frac{2}{25}\left(Z_A - \frac{5}{2}\right)F^2$$

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-state(SOS)法により、次式に従って遮蔽定数を求めた。

$$\sigma_A^d(k) = \frac{\mu_0 e^2}{6\pi m_0^2} \sum_{\nu}^A \sum_{\nu'}^A P_{\nu\nu'}(k) \langle \varphi_{\nu}(r) | r^{-1} | \varphi_{\nu'}(r) \rangle$$

$$\begin{aligned} \sigma_{A,\omega}^p(k) = & -\frac{\mu_0 h^2 e^2}{4\pi m_0^2} \sum_m^{occ} \sum_n^{unocc} \sum_j^A \langle r^{-3} \rangle_{2p} ({}^1E_m^n - {}^1E_0)^{-1} \\ & \sum_{\beta}^B \sum_{\gamma}^B (X(j,m,n,\beta,\gamma)X(l,n,m,\gamma,\alpha) \\ & - Y(j,m,n,\beta,\gamma)Y(l,n,m,\gamma,\alpha) \\ & - X(j,m,n,\gamma,\alpha)X(l,n,m,\beta,\gamma) \\ & - Y(j,m,n,\gamma,\alpha)Y(l,n,m,\beta,\gamma)) \end{aligned}$$

where

$$P_{\nu\nu'}(k) = \sum_m^{occ} C_{\nu m}^* C_{\nu' m}(k)$$

$$X(j,m,n,\beta,\gamma) = C_{jm}^{R\beta} C_{jn}^{I\gamma} + C_{jn}^{R\beta} C_{jm}^{I\gamma} - C_{jn}^{R\gamma} C_{jm}^{I\beta} - C_{jm}^{R\gamma} C_{jn}^{I\beta}$$

$$Y(j,m,n,\beta,\gamma) = C_{jm}^{R\beta} C_{jn}^{R\gamma} - C_{jm}^{R\gamma} C_{jn}^{R\beta} + C_{jm}^{I\beta} C_{jn}^{I\gamma} - C_{jm}^{I\gamma} C_{jn}^{I\beta}$$

$$({}^1E_m^n - {}^1E_0)^{-1} = \varepsilon_n - \varepsilon_m - J_{nm} + 2K_{nm}$$

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、 $C_{n\nu}$ 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. 結果および考察

PE の電子構造の実測及び理論計算については関らが報告³⁾しており、そこでは CNDO/2 法などの半経験的 MO を用いた場合は拡張ヒュッケル法を除いて $C_{2p} + H_{1s}$ バンドと C_{2s} バンドが重なり、実測の 2 eV のギャップが存在するという結果を再現していないが、本研究で用いた INDO/S 法ではこれらのバンドのギャップは存在し、実測の傾向を再現している。

Table 1 Comparison of observed and calculated valence energy of PE (in eV).

Model	Upper band (C2p+H1s)			Gap	Lower band (C2s)			T.V.B.W ^{a)}	Band Gap	Total Energy ^{b)}
	top	bottom	width		top	bottom	width			
experiment	8.8	15.5	6.7	2.0	17.5	24.7	7.2	16.2	-	-
single	9.23	21.87	12.64	0.79	22.66	42.59	19.93	33.36	10.13	-13.568
seven										
orthorhombic	9.28	21.69	12.42	1.19	22.88	42.38	19.50	33.11	10.12	-95.205
monoclinic	9.26	22.04	12.78	0.75	22.79	42.48	19.69	33.21	10.11	-95.199

a) Total valence band width

b) in a.u

これは化学シフトをより良く再現するようパラメトリゼーションされたMOを用いているためと考えられる。また、通常PEは斜方晶をとり、単斜晶に比べエネルギー的に安定であるが、7本鎖モデル計算によってこの傾向が再現された。これらの計算結果を実測値と共にTable 1に示すと共に、7本鎖斜方晶モデルによるエネルギーバンド構造をFig.2に示す。

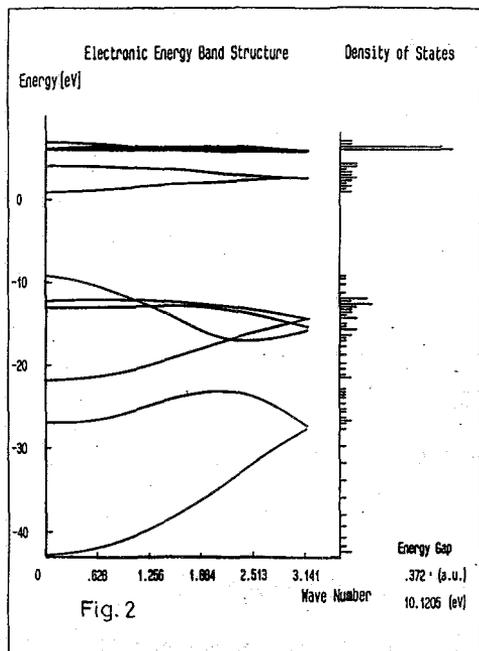


Table 2 Geometrical Data of PE

	orthorhombic	monoclinic
a(Å)	4.946	4.260
b(Å)	7.418	4.530
c(Å)	90	90
α(deg)	90	90
β(°)	90	111
γ(°)	43	0

Table 3 The observed and calculated ¹³C NMR chemical shift of PE

	Calculated ^{a)}	Observed ^{b)}
orth.	-61.44	32.9
mono.	-61.59	34.3

a) in ppm
b) in ppm from TMS

一方、化学シフトについてはPEには斜方晶と単斜晶があり、これらに対する¹³C NMR化学シフトが観測されており、約1 ppmの化学シフト差がある。斜方晶、単斜晶のコンホメーションは両者ともall-transであり、この化学シフト差は鎖間相互作用によるものであると考えられ、この効果を考慮するために7本鎖モデルを用いてTB-INDO/S-SOS法によって化学シフトを評価した。用いた幾何パラメータをTable 2に示し、計算結果を実測値と共にTable 3に示す。なお、計算される値は遮蔽定数であるので小さいほど(負の値が大きいほど)低磁場側であることを示している。

このように7本鎖モデルを用いた計算によって、斜方晶の単斜晶に対する高磁場シフトを再現しており、異なる結晶型の化学シフトの挙動は鎖間相互作用を考慮した計算によって理解できることが示された。

4. 参考文献

- 1) T.Yamanobe and I.Ando, J.Chem.Phys., 83, 3154(1985).
- 2) H.Kurosu, T.Yamanobe, T.Komoto and I.Ando, in press.
- 3) K.Seki, N.Ueno, U.Karlsson, R.Englhardt and E.Koch, 105, 247(247).

京大化研 中川 将、堀井文敬、北丸竜三
 九大工 高見沢徹一郎、占部美子
 熊本大教養 小川芳宏

VT/CP ^{13}C NMR Study of Uniaxially Oriented n-Alkane Crystals with High Purity

Masaru Nakagawa, Fumitaka Horii, Ryoza Kitamaru (Institute for Chemical Research, Kyoto University), Kanichiro Takamizawa, Yoshiko Urabe (Department of Applied Science, Faculty of Engineering, Kyushu University), and Yoshiro Ogawa (Faculty of General Education, Kumamoto University)

CP/DD ^{13}C NMR spectra and ^{13}C spin-lattice relaxation times $T_{1\rho}$ have been measured at different temperatures for uniaxially oriented n-C₂₇H₅₆ crystals with the purity of 99.98% by setting the orientation axis parallel or perpendicular to the static magnetic field B_0 . On the basis of the changes in the lineshapes and $T_{1\rho}$ values in phases A, A', B, and H below the melting point, molecular motions such as rapid local fluctuation and chain rotation about the chain axis are discussed in the respective phases.

1) 緒言

直鎖パラフィン結晶の融点以下での相転移現象についてはこれまで多くの研究がなされてきたが¹⁾、A、B、C、H各相における分子運動についてはまだ十分明らかではない。最近、Möllerらは種々の長さの直鎖パラフィンについて variable temperature/magic angle spinning (VT/MAS) 法により各相における defect構造や分子運動について調べた結果を報告している²⁾。しかし、詳細な運動モードを知る上では、配向状態でNMR測定を行なうことは重要である。今回、我々は高純度のn-ヘプタコサン(n-C₂₇H₅₆)の単結晶配向マットについて、配向下で ^{13}C NMRスペクトルおよび ^{13}C スピナー格子緩和時間($T_{1\rho}$)を測定し、各相における分子運動を検討した。

2) 試料

n-C₂₇H₅₆は高純度のn-テトラデカン酸からケテン二量体反応により合成した³⁾。純度は99.98%である。単結晶配向マットは1% n-ヘキサン溶液から2°Cで3日間等温結晶化することにより得た。50 MHz 固体高分解能 ^{13}C NMR測定はJEOL JNM-FX200 NMR装置を用い、CP/MAS法および試料の配向軸を静磁場 B_0 に平行または垂直にセットすることにより行なった。 ^{13}C および ^1H の回転磁場強度 $\gamma B_1/2\pi$ は69.4 kHzで dipolar-decoupling (DD)時のみ ^1H のそれを59.5 kHzとした。

3) 結果および考察

図1には昇温速度15°C/hで測定した試料のDSC曲線を示す。本試料は昇温に伴い、A→A'→B→Hと相転移する。特にA→A'の相転移は今回用いた高純度の試料に新しく見出された転移である³⁾。図2には室温で測定したCP/MASスペクトルを示す。図中には1本の大きな共

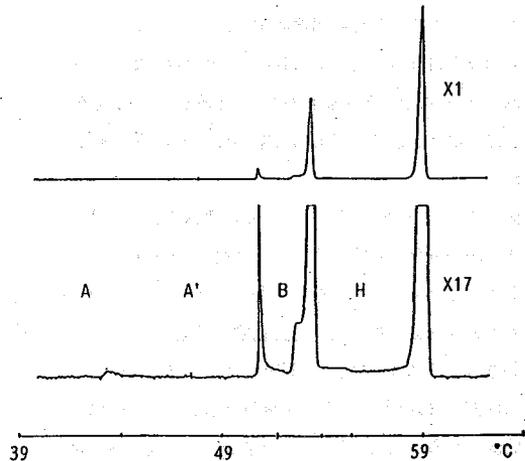


Fig.1 DSC curves for n-C₂₇H₅₆ crystals

鳴線 (line I) および数本の小さな共鳴線 (line II, III, IV) が観測される。その化学シフトからそれぞれ β -CH₂ (line I)、内部CH₂ (line II)、 α -CH₂ (line III)、末端CH₃ (line IV) に帰属できる。表1に各炭素の T_{1c} を測定した結果を示す。 β -CH₂ の T_{1c} は130s で内部CH₂ の T_{1c} の160s とほぼ同程度の値を示すのに対し、 α -CH₂ の T_{1c} は53s と少し短い。一方、末端CH₃ の T_{1c} は1.4s とかなり短い。このことから末端CH₃ は相関時間 τ_c が 10^{-8} s 以下の速い回転運動を行なっているものと思われる。

図3には試料の配向軸を静磁場 B₀ に平行または垂直にセットして室温で測定したCP/DDスペクトルを示す。B₀//配向軸の条件で測定したスペクトルには1本の大きな共鳴線 (line I) およびその高磁場側に小さな共鳴線 (line II) が観測される。それぞれの共鳴線の T_{1c} は180s, 30s (line I)、1.45s (line II) であることから表1の結果との比較により、line Iは分子鎖が B₀ に平行なCH₂炭素の σ_{33} 成分⁴⁾、line IIは末端のCH₃炭素に帰属される。又line Iの T_{1c} が30sの成分はそのCH₂炭素全体に対する成分比が温度の変化にもかかわらず16%前後と一定であることから、末端近傍の α 、 β -CH₂炭素に帰属できる。一方、B₀⊥配向軸の条件で測定したスペクトルには2本の線幅の狭い共鳴線 (line III, IV) およびその高磁場側に線幅の広い共鳴線 (line V) が観測される。それぞれの共鳴線の T_{1c} は260s (line III)、280s, 30s (line IV)、1.4s (line V) で line IIIおよびline IVはそれぞれ分子鎖軸が B₀ に垂直なCH₂炭素の σ_{11} および σ_{22} 成分、line Vは末端のCH₃炭素に帰属される。

図4には A→A'→(B)→H の相変化によるCP/DDスペクトルの変化を示す。A→A'の変化においてはスペクトルはほとんど変化しない(図4 c, g)。一方、H相に入るとスペクトルは大きく変化する(図4 d, f)。すなわち B₀⊥配向軸の条件で測定したスペクトルにおいては内部CH₂炭素による共鳴線が2本から1本の鋭い共鳴線になる (line III)。この場合、この共鳴線の化学シフトは室温で観測された2本の共鳴線の化学シフトの平均値にほぼ等しい。このことからH相においては、分子鎖は鎖軸のまわりを 10^3 Hz 以上の速さで回転運動をしているものと思われる。一方、B₀//配向軸の条

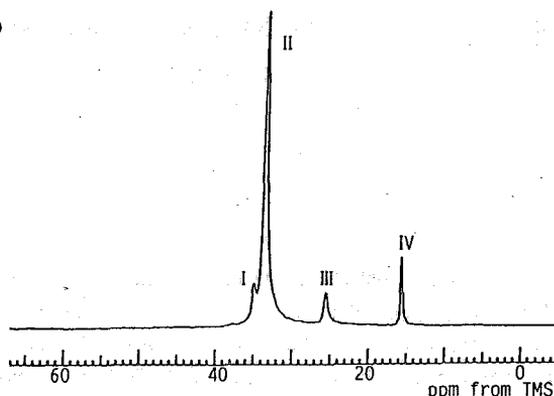


Fig.2 50MHz CP/MAS ¹³C NMR spectrum of n-C₂₇H₅₆ crystals at ambient temperature.

Table 1 ¹³C spin-lattice relaxation times of the respective carbons of n-C₂₇H₅₆ crystals

	β -CH ₂	internal-CH ₂	α -CH ₂	CH ₃
T _{1c} /s	130	160	53	1.3

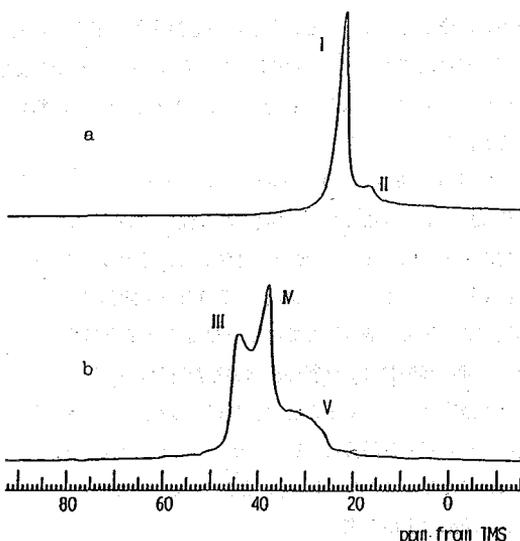


Fig.3 50MHz CP/DD ¹³C NMR spectra of n-C₂₇H₅₆ crystals. a: B₀//orientation axis b: B₀⊥orientation axis

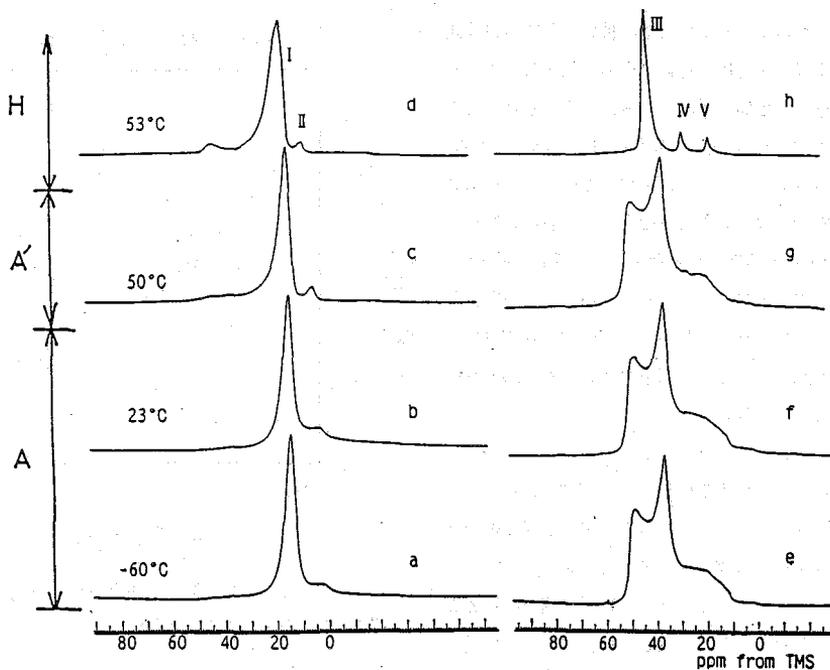


Fig.4 50MHz CP/DD ^{13}C NMR spectra of $n\text{-C}_{27}\text{H}_{56}$ crystals at different temperatures. a~d: $B_0 //$ orientation axis e~h: $B_0 \perp$ orientation axis

件で測定したスペクトルにおいては内部 CH_2 の共鳴線は低磁場シフトするとともにその線幅が広がる。この低磁場シフトは結晶構造が斜方晶系から六方晶系に変化した結果生じたものであり、線幅が広がる原因は分子鎖の配向が少し悪くなったためであると考えられる。又その強度および化学シフトから 図4 f中の line IVは $\alpha\text{-CH}_2$ 炭素に、line Vは末端 CH_3 に帰属できるが、いずれのピークも線幅がシャープになっていることからこれらの炭素は内部 CH_2 炭素と同様、 10^3Hz 以上の速さで回転運動しているものと思われる。しかし $B_0 //$ 配向軸の条件で測定した場合と $B_0 \perp$ 配向軸の条件で測定した場合の各共鳴線の化学シフトが異なることから、この運動は異方性を持った運動であると考えられる。

図5には $B_0 //$ 配向軸の条件で種々の温度で測定した CH_2 炭素の $T_{1\rho}$ を示す。温度の増大とともに末端近傍の α 、 $\beta\text{-CH}_2$ 炭素の $T_{1\rho}$ は徐々に減少する。一方、内部 CH_2 炭素の $T_{1\rho}$ は 0°C 以下ではほとんど変化しないが、 0°C 以上では温度の増大とともに急激に減少し、A相に入ると末端近傍の α 、 $\beta\text{-CH}_2$ 炭素の $T_{1\rho}$ とほぼ同じ値になる。このことから低温においては末端部に

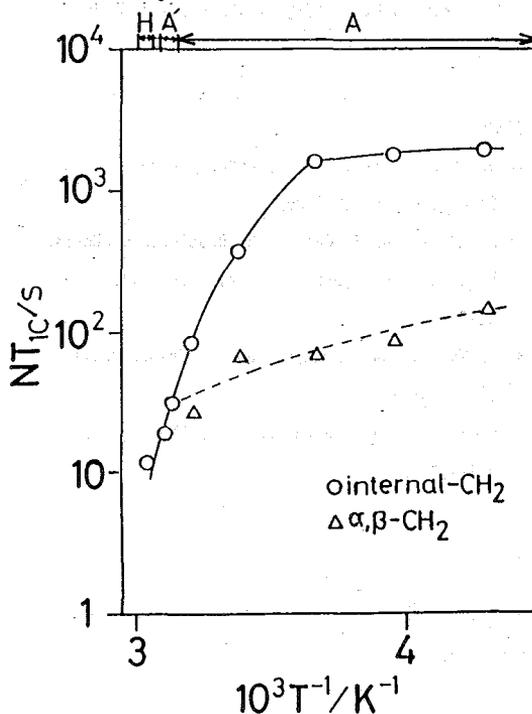


Fig.5 NT_{10} vs. $1/T$ for CH_2 carbons of $n\text{-C}_{27}\text{H}_{56}$ crystals

のみ起っていたポテンシャルの極小付近での速い揺動運動が温度の上昇とともにしだいに内部に伝播し、A'相において全体として同じ運動をするようになると考えられる。又、A'相からH相への変化においては T_{10} は急激な変化を示さない。従って、両相においては T_{10} に関する速い揺動運動に大きな差はない。図6には末端 CH_3 炭素の T_{10} の温度変化を示す。この場合、温度の減少とともに T_{10} の値は減少する。しかし、その変化がまだ極小に達していないことから -60°C においても末端 CH_3 炭素は τ_c が 10^{-8}s 以下の速い回転運動を行っているものと思われる。

4) 結論

以上の結果をまとめて図7に示す。 -60°C においても末端 CH_3 炭素は τ_c が 10^{-8}s 以下の速い回転運動を行っている。又末端近傍の α 、 β - CH_2 炭素は -60°C において既にポテンシャルの極小付近での速い揺動運動を行っているが、この運動はしだいに内部に伝播し、A'相では全体として同程度の運動をするようになる。一方H相に入ると、これらの速い揺動運動に加えて 10^3Hz 以上の速さで鎖全体が鎖軸のまわりを回転運動する。

文献

- 1) B. Ewen, G. Strobl, D. Richter, Faraday Discuss. Chem. Soc. 69, 19 (1980)
- 2) M. Müller, H. J. Cantow, H. Drotloff, D. Emeis, K. S. Lee, G. Wegner, Makromol. Chem. 187, 1237 (1986)
- 3) K. Takamizawa, Y. Nagao, and Y. Urabe, Polym. J. 19, 981 (1987)
- 4) Opella, St. J., Waugh, J. S., J. Chem. Phys. 66, 4919 (1979)

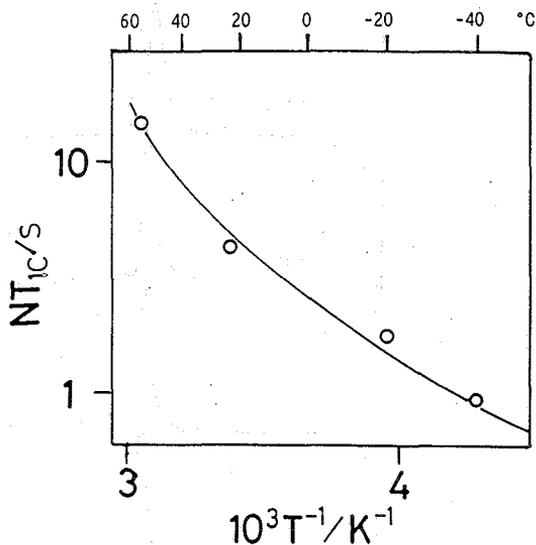


Fig.6 NT_{10} vs. $1/T$ for the CH_3 carbons of $n\text{-C}_{27}\text{H}_{56}$ crystals

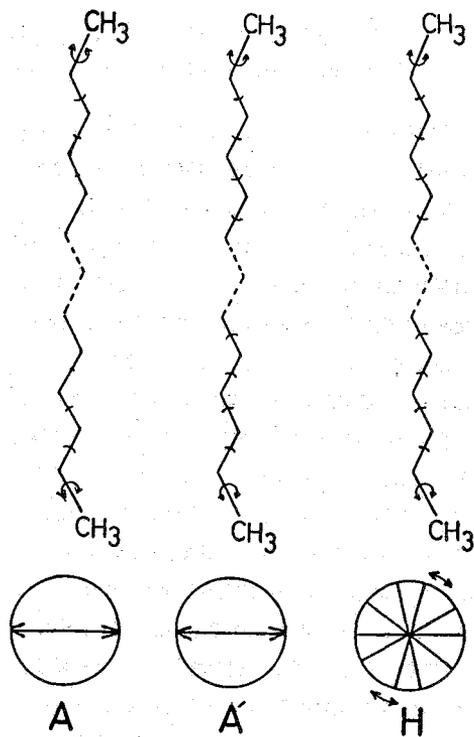


Fig.7 Schematic diagrams for the molecular motion of $n\text{-C}_{27}\text{H}_{56}$ chains in each phase.

(名工試) 岡崎正治、鳥山和美、布目華一

SPIN LATTICE RELAXATION TIMES OF LONG-CHAINED NORMAL ALKANES DEPENDENT ON THE CRYSTAL STRUCTURE

Spin lattice relaxation times of carbon and proton nuclei were obtained for long-chained n-alkanes, i. e. C₂₀H₄₂, C₂₁H₄₄, C₂₂H₄₆, C₂₃H₄₈, C₃₁H₆₄, and the urea inclusion complexes of the first three compounds with the saturation recovery technique at room temperature. Odd alkanes, which take orthorhombic crystal structures, show much shorter T₁'s for both the β- and the internal methylene carbons than those of even alkanes which take triclinic structures. Motions of these molecules in the crystalline state are discussed based on these relaxation times.

1. 序

n-アルカンは基本的な有機化合物であり、その化学的性質の解明自身が興味ある研究テーマである他、鎖状合成ポリマーや生体分子（例えば脂質）のモデル化合物としても重要な位置を占めている。なかでも、n-アルカンの化学的物性的性質、例えば融点や結晶構造、がその炭素数の偶奇に依存することは興味ある現象である。我々は、n-アルカン結晶の放射線化学反応において、フリーラジカルの収率及び種類が炭素数の偶奇により大きく異なる事を見だし(1)、その原因を結晶系の違いに帰した。

今回、上記の興味の下に長鎖アルカンの動的性質をNMR緩和の面から検討した結果、スピン格子緩和時間の著しい鎖長（偶奇）依存性を見いだした。尚、固体高分解能NMR法を用いたアルカン結晶の化学シフトの鎖長（偶奇）依存性の研究はVanderHartにより既になされており、その原因を結晶系の違いに帰属しているがその詳細については不明である。(2)

2. 実験

n-アルカンは東京化成製標準試薬（純度98%以上）をそのまま用いた。尿素及びメタノールは和光純薬特級試薬をそのまま用いた。n-アルカンの尿素包接錯体はメタノール

おかざきまさはる、とりやまかずみ、ぬのめけいち

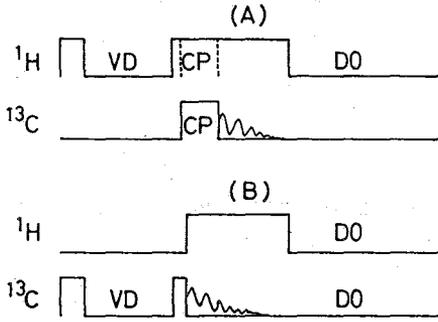


図1. プロトン(A)及びカーボン(B)の T1測定用パルス系列

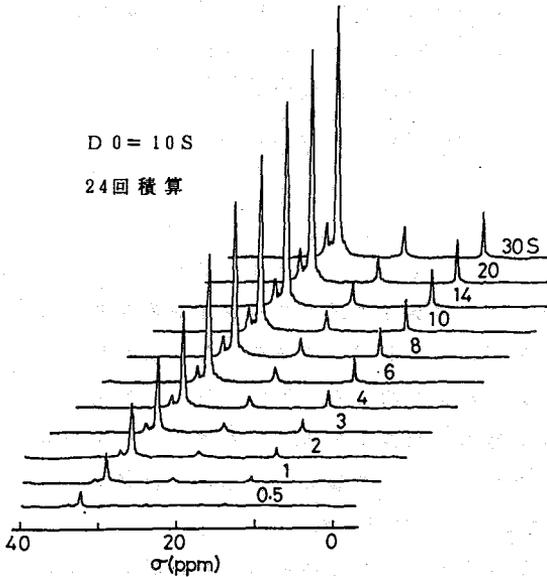


図2. パルス系列(A)によるプロトンの T1測定 (C₂₂H₄₆)

の尿素飽和溶液から結晶化させる事により得た。NMR測定はBRUKER MSL-200を用い、室温(21±1℃に制御)下で行った。水素核及び炭素核の共鳴周波数はそれぞれ200.13, 50.33MHzであり、回転磁場としては62kHz(90° pulse=4.0μs)を用いた。炭素核のスピン格子緩和時間(T1C)の測定は飽和回復法を用い、水素核のそれは飽和からの回復をCP(交差分極)法で炭素の磁化に移して観測した。パルス系列を図(1)に示す。

3. 結果

図(2)に水素核の飽和からの回復をCP法を用い炭素核の信号に変えて観測した結果をdocosane(C₂₂H₄₆)について示した。FIDのacquisitionとsaturation pulseとの間のdelay time(D0)として10秒をとった。すべての炭素の信号の増加は同一かつ単一の指数関数で表わされることにより、水素核間のスピン拡散がT1プロセスよりもずっと速く、水素磁化は分子全体で同一のスピン温度を保っていることがわかる。

図(3)に炭素核の飽和からの回復をdocosaneについて示す。FIDのacquisitionとsaturation pulseとの間の遅延時間として10秒を用い、Saturation pulseとしてはpulse trainまたはhigh power pulse(3ms)をもちいた。メチル炭素の飽和回復

過程には過渡的NOE効果の存在を示すovershootが両方の系にみられる。水素と炭素が結合した系における緩和はSolomonの式(3)によってあらわされる。我々の系の場合炭素スピンの熱容量が水素スピンのそれに比べて無視できる点を考慮して、図(1)-Bのパルス系列について積分すると、

$$S_z = S_0 [1 - \exp(-t/T_1^C)] + R \cdot [\exp(-t/T_1^H) - \exp(-t/T_1^C)] \dots \dots \dots (1)$$

$$R = I_0 \cdot T_1^C \cdot T_1^H / T_X (T_1^H - T_1^C) \cdot \exp(-D_0/T_1^H) \dots \dots \dots (2)$$

$$I_z = I_0 \cdot [1 - \exp\{(-D_0 + t)/T_1^H\}] \dots \dots \dots (3)$$

となる。ここに、 S_z, I_z は炭素及び水素のz-方向の磁化、 S_0, I_0 はそれらの熱平衡値である。以上の理論式より、炭素の飽和からの回復の際のOver Shootは 1) $T_{1C} \ll T_{1H}$, 2) $D_0 < T_{1H}$, 3) T_x が小さい時、より強くみられることがわかる。このOver Shootの解析により交差緩和時間が求められる。また、 $T_{1C} < T_{1H}$ の場合、 T_{1C} の測定の際 D_0 を T_{1H} よりもずっと大きくしなければならない。この様にして求めたスピン格子緩和時間及び交差緩和時間を表(1)にしめす。

Table (1) RELAXATION PARAMETERS FOR NORMAL ALKANES

	T_{1H}	$T_1(CH_3)$	$T_x(CH_3)$	$T_1(\beta)$	$T_1(\text{main})$	crystal str.
C 2 0	8.0	1.2	3.2	41	99	triclinic
C 2 1	5.1	1.2	4.7	10.7	21	orthorhombic
C 2 2	8.2	1.2	2.9	80	184	triclinic
C 2 3	7.3	1.2	2.8	13	34.4	orthorhombic

C 3 1	9.4	1.3	2.9	14	103	monoclinic

U - C 2 0 ^a	3.4	4.1	-	10.5	18.4	hexagonal
U - C 2 1	3.4	4.2	-	9.5	16.0	hexagonal
U - C 2 2	3.4	4.0	-	10.3	18.2	hexagonal

a) "U-" indicates urea inclusion complex

アルカン結晶においてプロトンの緩和がメチル基のカーボンの緩和よりはるかに長いことはプロトンの緩和が主としてメチル基のみで起こり、それがスピン拡散でプロトン系全体に伝達されるためと考えられる。これとは対照的に、尿素包接錯体の場合メチル水素の T_1 の方がメチル炭素のそれより短く、分子全体として尿素のチャンネル中で運動していることを示している。しかし、メチル炭素の T_1 は尿素中の方が大きいことからメチル基については運動が結晶中よりも束縛されていることがわかる。

メチル基の T_{1C} はアルカン結晶全て

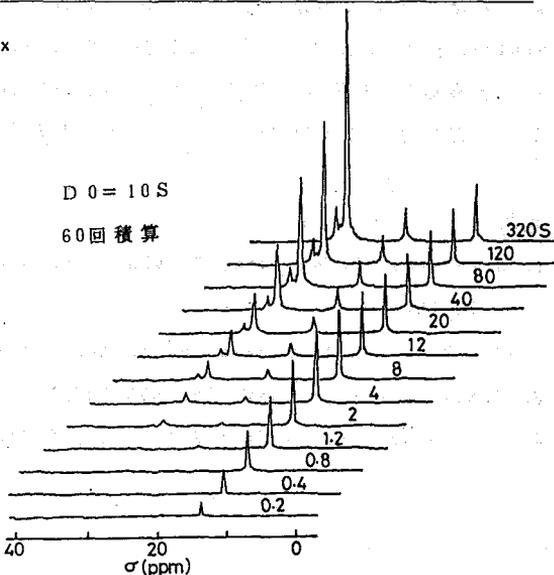


図3. パルス系列(B)によるカーボンの T_1 測定 (C 22H 46)

でほぼ同じ値をとっていることは、メチル基そのものの運動はこれらの間でほとんど差がない事を示している。一方、 β -炭素及び骨格メチレン炭素においては奇数の炭素を含む heneicosane と tricosane では偶数の炭素を含む eicosane と docosane に比べてかなり短い T1 が観測された。このような大きな T1 の変化 (奇偶性) は尿素包接錯体の場合には観測されず、従って結晶構造の違いによると考えられる。炭素数が 6 から 30 の n-アルカンの場合、奇数の炭素数のアルカンでは orthorhombic を、偶数のものでは triclinic を結晶系としてとる。アルカン結晶の密度は炭素数の偶奇 (結晶系) に従って変化し、偶数の炭素原子からなる結晶では、奇数の炭素からなる隣のアルカンより密度が大きい。従って、余分の free volume を持つ奇アルカンの方が運動性が大きいと考えられる。さらに、分子軸まわりの対称性を考えると、orthorhombic では 2 回対称をもつものに対して triclinic では対称性がない。従って、分子軸まわりの振動の振幅が orthorhombic つまり奇の炭素原子からなるアルカンのほうが大きいと考えられる。

奇のアルカン (ここでは heneicosane と tricosane) は融点の少し下で rotator 相 (tricosane の場合、39.5-47°C) をもち、その相では分子は長軸に垂直な面内で回転できる。偶数の炭素からなる eicosane や docosane では rotator 相の温度範囲はあってもきわめて狭く、rotator 相への転移熱は奇アルカンに比較してはるかに大きい。rotator 相からの溶解熱は炭素数の偶奇に関係なく炭素数増に関して regular な変化を示すので、奇アルカン結晶 (orthorhombic) の enthalpy は偶アルカン結晶 (triclinic) のそれに比べてかなり大きくなる。(4) このことも奇アルカンの大きな運動性を説明する。

Table (1) の実験結果と以上の考察から C-30 までのアルカンを考えると、奇アルカンのほうが結晶状態での運動性が偶アルカンの運動性に比べてかなり大きいと結論できる。hentriacontane (C-31) になると結晶系が monoclinic にかわり、 β -炭素の T1 と内部のメチレン炭素の T1 の差がかなり大きくなり、chain の端のほうで運動がかなり許容されているが中央部ではかなり束縛されているとかがえられる。

文献

1. M. Iwasaki, K. Toriyama, M. Fukaya, H. Muto, and K. Nunome, J. Phys. Chem. 89, 5278 (1983).
2. D. L. VanderHart, J. Magn. Reson. 44, 117 (1981).
3. I. Solomon, Phys. Rev. 99, 559 (1955).
4. W. M. Maze, Analyt. Chim. Acta., 17, 97 (1957).

(東京農工大工) ○朝倉 哲郎・平野 幸喜

Assignment of ¹³C NMR Resonance of Poly(olefin)s to the Tacticity

Tetsuo ASAKURA and Kôki HIRANO

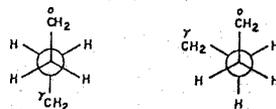
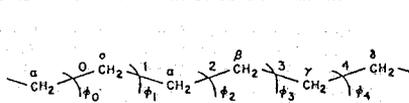
(Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

The ¹³C chemical shift calculation of poly(olefin)s on the basis of ¹³C NMR γ -effect and the rotational isomeric state model is very useful for the purpose of the tacticity assignments including the conformation analysis. In this study, the methylene carbons of poly(1-olefin)s $\text{-(CH}_2\text{-CH(CH}_2\text{))}_x\text{-}$ $x=2-6$ are assigned to the tacticity in pentad or hexad level from both the chemical shift calculation and the peak intensity calculation by assuming "2-site model" for the polymerization mechanism. The validity of the assignments is supported from the 2D-INADQUATE correlation spectrum of the poly(1-olefin)s experimentally.

【緒言】¹³C NMR 法は、ポリオレフィンの立体規則性の情報を得るうえで、現在最も有力な方法である。しかしながら、ポリ(1-ブテン)より長い側鎖を持つ場合や、異種結合が存在するような試料では、試料間の比較あるいは低分子モデル化合物の利用等の従来の方法では、その¹³C NMRの帰属は事実上不可能であった。我々は、¹³C NMR γ 効果と回転異性状態近似に基づく化学シフトの計算によって、従来、報告されていないポリ(1-ブテン)¹⁾ならびに異種結合部²⁾の立体規則性に基づく詳細な帰属に成功し、この計算が新しい帰属法となることを示してきた。

本報告では、この計算をポリ(1-ペンテン)以上の長い側鎖を持つポリオレフィンの主鎖ならびにそれに付いた側鎖メチレンの立体規則性ピークの帰属に適用したので報告する。なお、比較のために、2D-INADQUATEの測定も行なったが、現在、その分解能は不十分ながら、得られた結果は理論的な帰属を支持していた。

【計算】着目した炭素(O印)と γ 位にある炭素のコンホメーションが、ゴーシュ状態(g, \bar{g})にあるとき、着目炭素の化学シフトは、トランス状態(t)に比べて数 ppm高磁場シフトする(γ 効果)。従って、このゴーシュ状態の確率を、Suter-Floryの回転異性状態マトリックス³⁾を用いて計算し、 γ 効果の値をかけ合わせて、立体規則性化学シフトの評価をおこなった。計算方法の詳細は既報を参照していただきたい。^{1) 2)}

NO γ -EFFECT ($\phi_2 = 1$) γ -EFFECT ($\phi_2 = 90$)

【NMR測定】三井石油化学工業㈱から提供されたいくつかのアタクチックポリオレフィンを試料とし、JEOL GX-270分光計 (^{13}C 共鳴周波数 67.8MHz) にて、 $128(t_1) \times 2048(t_2)$ 、繰り返し2-3sec、積算1024timesで信号を得たのち、 2×2 のゼロフィリング、フーリエ変換をして二次元INADEQUATEスペクトルを得た。適時、平均減算処理、対称処理を施した。アインタクチックポリオレフィンのデータは既に報告したものである。⁴⁾

【結果と考察】ポリ(1-ペンテン)からポリ(1-ノネン)まで一連のポリオレフィンの側鎖メチレンC3炭素のスペクトルをFig.1に示した。 γ 効果と回転異性状態モデルを適用して計算した化学シフト(棒スペクトル)と、主鎖メチンC2炭素のトリアドレベルの相対強度を参考にして行なったペンタッドレベルの帰属を図中に示した。各立体規則性ピークの線形がガウス型であるとしてピークシミュレーションに

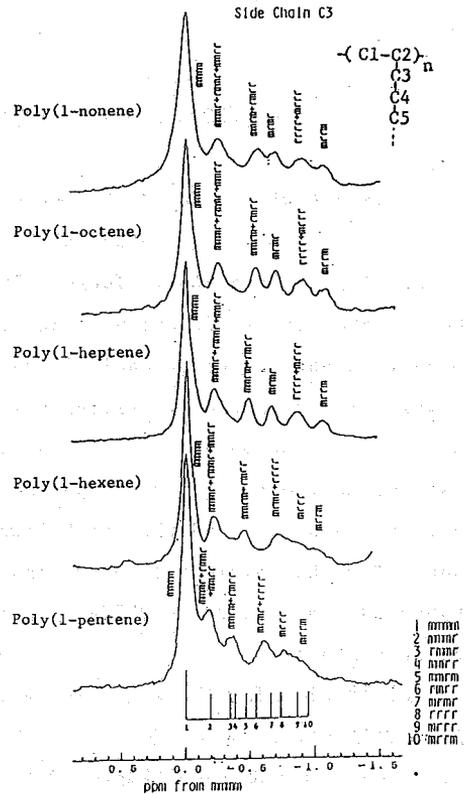


Fig.1 Pentad assignment of the C3 peaks in the ^{13}C NMR spectra of isotactic poly(1-olefins).

Tab. Relative peaks intensities of the carbons of isotactic poly(1-olefins) in pentad level. The parameters, α , σ and ω in the 2-site model were also shown.

Pentad	Polypropylene	Poly(1-butene)	Poly(1-pentene)	Poly(1-hexene)	Poly(1-heptene)	Poly(1-octene)	Poly(1-nonene)
mmmm	0.304	0.583	0.505	0.478	0.481	0.442	0.541
mmr	0.118	0.079] 0.158] 0.185] 0.196] 0.186] 0.185
mmrr	0.032	0.007					
mmrrr	0.124	0.078] 0.109] 0.096] 0.116] 0.143] 0.114
mmrrrr	0.131	0.036					
mmrrrrr		0.042					
mmrrrrrr	0.037	0.032] 0.109] 0.119] 0.058] 0.071] 0.057
mmrrrrrrr	0.089	0.055					
mmrrrrrrrr	0.089	0.045	0.077	0.077	0.104	0.119	0.088
mmrrrrrrrrr	0.076	0.043	0.038	0.046	0.044	0.039	0.035
α	—	—	0.974	0.942	0.968	0.992	0.988
σ	—	—	0.389	0.313	0.465	0.480	0.495
ω	—	—	0.572	0.640	0.541	0.429	0.546
Catalyst	A	A	B	A	A	A	B

Catalyst A: $\text{Ti}(\text{O}i\text{Bu})_2 - \text{MgCl}_2 - \text{AlEt}_3$, Cl B: $\text{TiCl}_3 - \text{MgCl}_2 - \text{SiO}_2 - \text{AlEt}_3$ (polymerization temperature: 65°C)

2 Sites Model

$$\begin{aligned}
 \text{mmmm} &= (\alpha^4 + (1-\alpha)^4) \omega + \sigma^4 (1-\omega) & \text{mmrr} &= 2(\alpha^2 (1-\alpha)^2 + \alpha^2 (1-\alpha)^2) \omega + 2\sigma^2 (1-\sigma)^2 (1-\omega) \\
 \text{mmr} &= 2(\alpha^3 (1-\alpha) + \alpha (1-\alpha)^3) \omega + 2\sigma^3 (1-\sigma) (1-\omega) & \text{mmrrr} &= 2(\alpha^2 (1-\alpha)^2 + \alpha^2 (1-\alpha)^2) \omega + 2\sigma^2 (1-\sigma)^2 (1-\omega) \\
 \text{mmrr} &= (\alpha^2 (1-\alpha)^2 + \alpha^2 (1-\alpha)^2) \omega + \sigma^2 (1-\sigma)^2 (1-\omega) & \text{mmrrrr} &= (\alpha^2 (1-\alpha)^2 + \alpha^2 (1-\alpha)^2) \omega + (1-\sigma)^2 (1-\omega) \\
 \text{mmrrr} &= 2(\alpha^3 (1-\alpha) + \alpha (1-\alpha)^3) \omega + 2\sigma^3 (1-\sigma) (1-\omega) & \text{mmrrrrr} &= 2(\alpha^2 (1-\alpha)^2 + \alpha^2 (1-\alpha)^2) \omega + 2\sigma^2 (1-\sigma)^2 (1-\omega) \\
 \text{mmrrrr} &= 2(\alpha^3 (1-\alpha) + \alpha (1-\alpha)^3) \omega + 2\sigma^3 (1-\sigma) (1-\omega) & \text{mmrrrrrr} &= (\alpha^2 (1-\alpha)^2 + \alpha^2 (1-\alpha)^2) \omega + \sigma^2 (1-\sigma)^2 (1-\omega)
 \end{aligned}$$

よって、その相対強度を求め、さらに本研究で用いたアイソタクチックポリオレフィン試料の重合機構が2-サイト重合モデルに従うとして重合のパラメータ α 、 σ および ω の値を最小二乗法により決定した (Tab.)。つづいて、主鎖メチレン C1 炭素の立体規則性に基づく帰属を行なった。すでに、ポリプロピレンとポリ(1-ブテン)の著しいスペクトルの違いは、ポリ(1-ブテン)以上で新たに側鎖 CH₂ からの γ 効果が加わったことで説明できた。しかしながら、ポリ(1-ペンテン)以上についてポリ(1-ブテン)と同様の考え方は、主ピークの低磁場側のピークが、側鎖が長くなるにつれて次第に低磁場側にシフトしていくという傾向は説明できない (Fig. 2)。そこで、Fig. 3 に示したように、側鎖が長くなるにつれて側鎖からの γ 効果の割合が減少すると仮定して計算すると実測値をよく再現することがわかった。ポリ(1-ペンテン)では側鎖からの γ 効果の割合は約 0.6、側鎖炭素が更に1個増えるにつれて、その値は約 0.1ずつ減少するものすれば、分裂幅を説明できる。さらに、ピーク強度からの情報を加味して帰属を進めるために、Tab. に示した2-サイトモデルのパラメータ α 、 σ および ω の値を用いて、ヘキサッドレベルでのピーク強度の計算を行なった (Fig. 2)。尚、棒スペクトルのピーク位置な

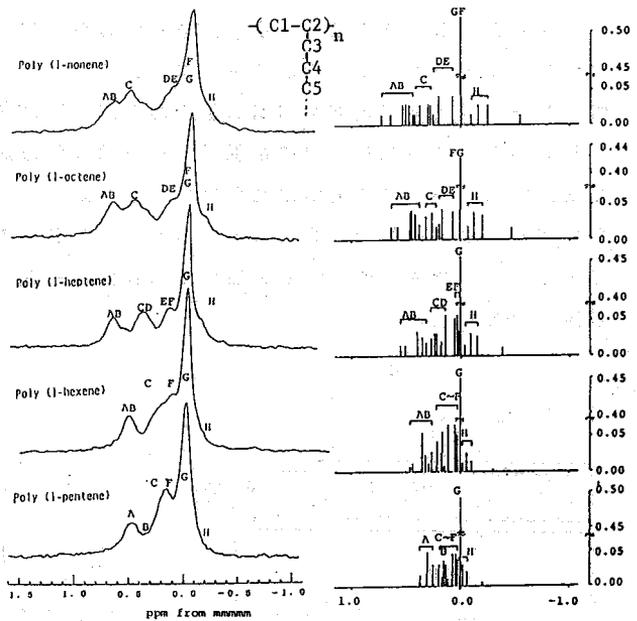


Fig. 2 A: mmmmm, mmmmm, mmmmm, mmmmm, mmmmm
 B: mmmmm
 C: mmmmm, mmmmm, mmmmm, mmmmm
 D: mmmmm, mmmmm
 E: mmmmm
 F: mmmmm, mmmmm
 G: mmmmm
 H: mmmmm, mmmmm, mmmmm
 Hexad assignment of the C1 peaks in the ¹³C NMR spectra of isotactic Poly(1-olefins). The peak intensities calculated from "2-sites model" were also shown.

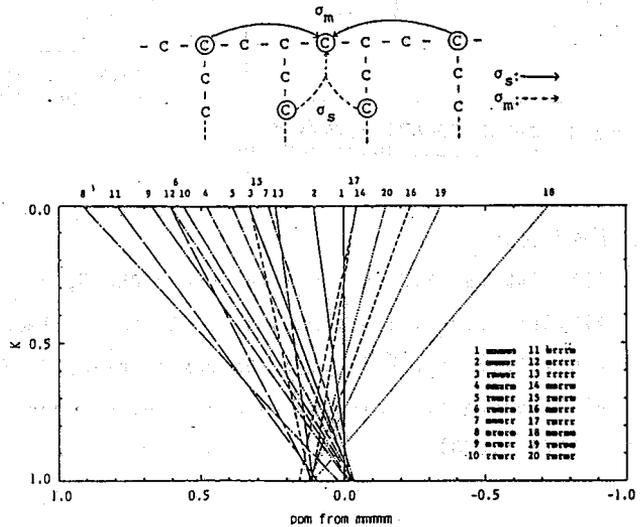


Fig. 3

The calculated ¹³C NMR chemical shifts of the C1 carbons of poly(1-olefins) when 0.5 is adopted for τ^* . The value of the mmmmm peak is assumed to be 0 ppm. The C1 carbon chemical shifts are represented as a sum of two chemical shift contributions, σ_m and σ_s , and the calculated results are shown in this Figure as a function of K, where K is represented as $\sigma_m + K\sigma_s$.

らびに強度は計算値である。一方、理論的帰属の妥当性を実験的に検討するため、2D-INADEQUATEスペクトルを測定した。Fig.4 は一例として示したアタクチックポリ(1-ヘキセン)の2D-INADEQUATEスペクトルの全体図である。主鎖C2-側鎖C3炭素間の相関の拡大図をFig.5 に示した。分解能が不十分等の問題が残るものの、クロスピークの出現パターンは理論的帰属結果から予想されるものと一致した。すなわち、理論的帰属において、C3炭素ピークは低磁場側からmm, mr, rr中心、C2ピークは高磁場側からmm, mr, rr中心と帰属されているが、二次元INADEQUATEピーク上でもそのような相関が得られた。また、他のポリオレフィン試料についても同様であった。

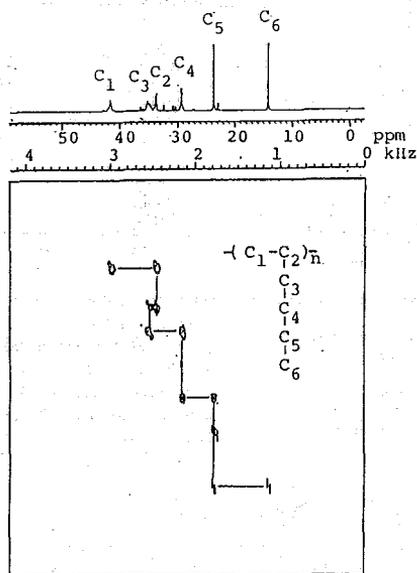


Fig.4 2D-INADEQUATE spectrum of atactic poly(1-hexene)

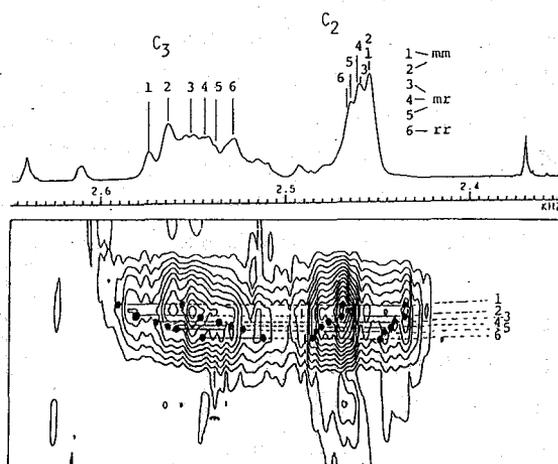


Fig.5 C2-C3 correlations of 2D-INADEQUATE spectrum of atactic poly(1-hexene).

【参考文献】

- 1) T.Asakura, K.Ômaki, S.N.Zhu and R.Chûjô, *Polymer J.*, **16**, 717 (1984)
- 2) T.Asakura, Y.Nishiyama and Y.Doï, *Macromolecules*, **20**, 616 (1987)
- 3) U.W.Suter and P.J.Flory, *Macromolecules*, **8**, 765 (1975)
- 4) T.Asakura Y.Nishiyama and K.Hirano, *Polymer Preprints, Japan*, **37**, 1154 (1988)

(阪大 蛋白研) 小田原孝行, (横浜国大 工) 阿久津秀雄,
(阪大 蛋白研) 京極好正

Dynamic behaviors of the biomembranes in a lipid-containing bacteriophage, PM2, and its host bacterium studied by ³¹P solid-state NMR

Takayuki Odahara, Hideo Akutsu*, Yoshimasa Kyogoku (Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Osaka; *Faculty of Engineering, Yokohama National University, Hodogaya-ku, Yokohama)

A lipid containing bacteriophage, PM2, which infects a marine bacterium, *Alteromonas espejiana*, is a suitable system for the study of intact biomembranes, because of its simple structure and chemical compositions. By using the ¹H-³¹P cross-polarization method, phosphorus resonances in different dynamic states can be measured separately by choosing proper contact times between the proton and phosphorus spin systems. The ¹H-³¹P cross-polarization pulse technique was applied to intact PM2 phage, which has only phospholipids and DNA as phosphorus compounds. ³¹P NMR spectra of lipid bilayers and DNA were measured with the contact times of 6 msec and 0.7 msec, respectively. The resonance of the intact bacterial biomembrane was observed with the contact time of 7 msec. Temperature dependence of the chemical shielding anisotropy ($\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$) was examined for these selectively measured spectra. The results showed that the motion of the lipid bilayer of the intact phage is more suppressed than that of the extracted-lipid bilayers and that the dynamic state of the lipid bilayer of PM2 phage is related to the efficiency of its infectivity. The direct correlation between the dynamic state of the bacterial biomembrane and the infectivity of the phage was not observed.

(序) 生体膜の基本構造は、脂質二重層に蛋白質が組み込まれた構造、いわゆる“Singer-Nicolsonの流動モザイクモデル”である。生体膜の構造及び動的状態とその機能とが、どのように関係するかは興味ある点である。海洋性バクテリア *Alteromonas espejiana* に感染するファージPM2は、図1に示すように表在性蛋白質、内在性蛋白質に相当する蛋白質を含む

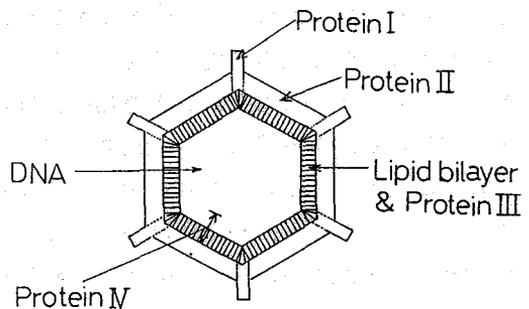


図1 PM2ファージの模式図

脂質二分子膜を持っている。しかも僅か4種類の蛋白質しか含まない為、このウイルスは intactな生体膜の研究の良いモデルとなる。高次の分子集合体を形成している生体膜を研究

する上で、 ^{31}P 固体NMR法は、分子構造や運動性に関する情報を与える有力な手段の一つである。特に、スピン系の熱接触を利用して運動性の異なる成分を分離観測できる交叉分極法は、運動性の異なる複数のリン化合物を含むintactな系の研究に対して有効である。先に、宿主バクテリアについてintactな系の生体膜とその抽出脂質のモデル膜系とでは、その動的状態にかなりの違いが認められることを報告した。そこで、本研究では、PM2 フェージと *A. espejiana* の系に対して交叉分極法を適用し、これらのintactな生体膜の動的挙動とそれらの相異についての知見を得たので報告する。

(実験) PM2 フェージの精製は、CsCl step wise遠心法、平衡密度勾配遠心法により行ない、CsClを除くためbuffer B (1M NaCl, 20mM Tris, 10mM CaCl_2 , pH 7.2) + 2M NaCl に十分透析した。NMR測定用試料は、フェージ粒子の安定性を増し、粒子の回転を押え、濃縮の目的のために10% → 30% → 60% (w/v) ショ糖を含む同じ緩衝溶液に透析したものをを用いた。純度の検定にはポリアクリルアミドゲル電気泳動、260nmと280nmの吸光度の比 $A_{260}/A_{280} = 1.42$ を用いた。

測定に用いた宿主バクテリアは、Q medium (0.7g KCl, 26g NaCl, 12g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.47g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10g Bacto Tryptone, 5g Yeast extract, pH 7.4) でKlett濁度100まで培養したものを、10000gで15分間遠心して沈澱した菌体を用いた。資料が新鮮であることがintactな条件となるので、15°C以下の低温で24時間、それ以上の高い温度で12時間を測定時間の限度とし、測定毎に新たに培養した試料を使用した。

^{31}P NMRスペクトルの測定は、JEOL FX-100 NMR分光装置に固体用高出力増幅器、温度制御可能な高出カプローブヘッドを接続させて行なった。プロトン照射による温度上昇は、校正曲線により補正した。

(結果と考察) 5°Cにおいて、シングルパルス法と交叉分極法によって得たintactなPM2 フェージの ^{31}P NMRスペクトルを図2に示す。シングルパルス法のスペクトルは化学シフトの異方性が異なる2種類の成分が重なっている。交叉分極法で得られるスペクトルはスピン系の熱接触時間を変えるとパターンが変わる。接触時間0.7 msecのスペクトルは異方性($\Delta\sigma = \sigma_{33} - \sigma_{11}$)が-137 ppmの運動の押えられた非対称パウダーパターンを示している。接触時間6 msecのスペクトルは異方性($\Delta\sigma = \sigma_{33} - \sigma_{11}$)が-44 ppmで軸対称な運動に特有なパウダーパターンを示している。この間の接触時間では、この両者が重なったパターンである。シングルパルス法で得られたスペクトルと対応させてみると、0.7 msecのスペクトルはシングルパルス法のスペクトルの幅の広い成分に対応している。一方、6 msecのスペクトルは幅の狭い成分に対応してい

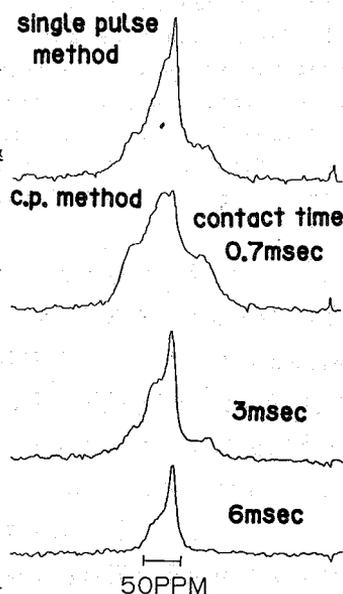


図2 intactなPM2の ^{31}P NMRスペクトル

る。ファージ粒子内のリンを含む化合物は脂質二分子膜中のリン脂質とコア内のDNAだけであるから、交叉分極法で観測された0.7msecと6msecのスペクトルは、そのいずれかに由来している。これらの帰属を行なうために、脂質二分子膜としては宿主から抽出したものについて、DNAについてはリン化合物としてDNAだけを携入 phage のスペクトルパターンとその強度の接触時間依存性を調べた。図3に後者を示す。実線は非線形最小二乗法を用いてフィットさせた理論曲線である。リン脂質は、PM2 から抽出したのも、宿主からのものもゲル-液晶混合状態であることを熱測定で調べてある。DNAは1msecで極大を示し、6msecでは1/4の強度に減少している。膜系では長時間側にシフトし、6msecではさほど強度の減少はない。更に、スペクトルのパターンと異方性の大きさを考えあわせると、接触時間0.7msecではファージのコア内のDNA、6msecでは脂質二分子膜由来のスペクトルを分離観測できた、と結論できる。宿主 *A. espejiana* の生体膜については、7msecで得られることを、既に本討論会で報告している。

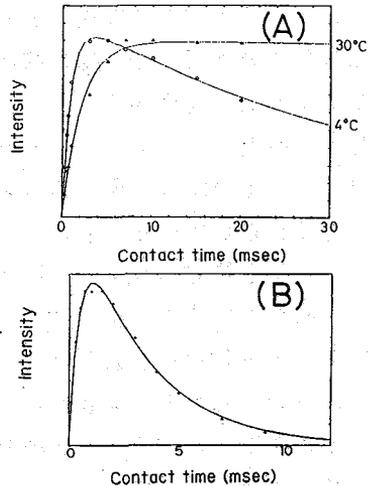


図3 スペクトル強度の接触時間依存性
(A) *A. espejiana* 抽出脂質
(B) λ phage

これらの帰属と条件に基づき、異方性の温度依存性を調べた。図4は intact な *A. espejiana* の膜系とこれより抽出した脂質の二分子膜系についての結果である。intact な膜系では4°Cで異方性-44.7ppm、これより10°C付近まで徐々に変化してゆき-42.2ppmで落ちついた後、20°C付近まではほとんど変化が認められない。抽出脂質の膜系では、0°C付近から24°C付近まで異方性が徐々に変化し、これより高い温度では異方性が-42 ppmで大きな変化がない。24°Cは抽出脂質膜系の相転移終了温度であることが示差熱測定の結果からわかっている。intact な膜系と抽出脂質膜系の結果を比較すると、intact な *A. espejiana* の生体膜の10°C付近から20°C付近までの動的状態は、液晶状態にある抽出脂質膜系と同様な状態であると考えられる。このような動的挙動の違いは、intact な膜系に存在する数多くの蛋白質との相互作用によるものであろうが、

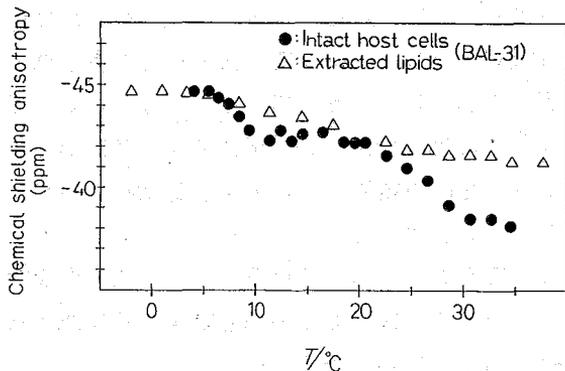


図4 intact *A. espejiana* と抽出脂質の化学シフトの異方性の温度変化。

その理由はまだわかっていない。

intact なPM2の膜系について測定された異方性の温度依存性を図5に示す。intact なPM2の膜系では0°C付近で異方性が-44ppm、これより17°C付近まで徐々に変化していく。この温度付近で変化の様子が変わり、25°C付近で落ちついている。宿主の抽出脂質でみられたような相転移終了に伴う異方性の变化の落ちつきは25°C付近に認められる。PM2から抽出した

膜系の³¹P NMRスペクトルの異方性の温度依存性はまだ調べていないが、熱測定により相転移終了温度は17°Cであることがわかっている。この結果は、*A. espejiana*の場合とは逆に、PM2では、protein I, II, III, IVの存在によってintactな状態での脂質二分子膜の構造が安定化されることを示唆する。PM2では酸性リン脂質であるフォスファチジルグリセロールが脂質二分子膜の外側の層

Chemical shielding anisotropy (ppm)

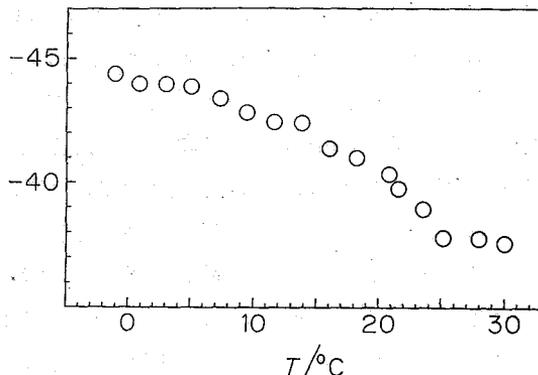


図5 intact PM2脂質二重膜の化学シフトの温度変化

に多く分布していることが知られている。又、コート蛋白質であるprotein IIが塩基性であるので、両者の静電的相互作用が膜構造を安定化させている一因かもしれない。

以上のことから、抽出脂質とintactな膜系では、その挙動に差があることがわかった。PM2の感染の機構はまだ明らかになっていない。しかし、ファージ粒子あるいは宿主の膜系は感染に何らかの形で関係しているものと考えられる。

Yield of PM2 (PFU/10⁸ ml)

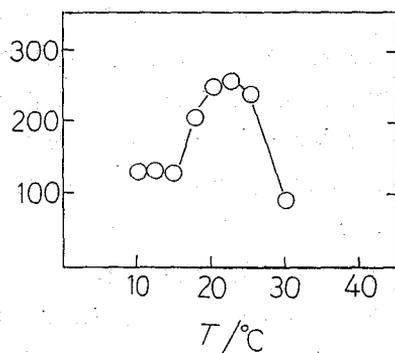


図6 PM2の*A. espejiana*への感染初期温度依存性

そこで、PM2の*A. espejiana*への感染の分子機構

を調べるためには、intactな状態での膜系の動的挙動を比較しなければならない。膜系の運動性と感染との関係を見るため、阿久津らによって報告されているファージPM2の感染効率の感染初期温度依存性を図6に示す。intactなファージの膜系の異方性の変化している15°C付近に近いところから感染効率が上がりはじめ、異方性の変化が落ち着く25°C付近でピークに達している。これは、PM2の感染性がPM2の脂質二重膜の動的状態と密接に関係していることを示している。即ち、感染性が発現されるためには、PM2の膜系の流動性がある程度高い状態になければならないと考えられる。一方、intactな*A. espejiana*の生体膜では、15°Cと25°Cの付近に対応する状態の変化は認められない。従って、15°C以上で見られる感染効率の上昇には宿主の膜系の状態変化が直接関係しているとは考えられない。ここで見ている感染初期過程とは、バクテリアに吸着したPM2が何らかの機構を通じてDNAをバクテリアの細胞内に放出する過程を含んでいる。上述の結果は、このようなDNAの放出には、ファージ粒子の脂質二重膜が液晶状態をとることが、あるいはそれによって引き起こされるファージ粒子の動的構造の変化が必須であることを示している。又、PM2の感染効率の変化に直接関係していないとはいえ、バクテリアの細胞がこの温度領域で常に液晶状態をとっていることも感染の為の重要な前提である可能性がある。

(電気通信大) 仁木 國 雄

INTERMOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN n-ALKANES AND AROMATIC COMPOUNDS

Kunio NIKKI (University of Electro-Communications)

The NMR solvent effects of a series of alkanes were studied in benzene, 1-Cl-naphthalene and 9-Br-phenanthrene. In benzene, end hydrogens and carbons of n-alkane chains show the decreasing solvent effects slightly and inner hydrogens and carbons show the decreasing solvent effects markedly as the chain length increases. In 1-Cl-naphthalene or 9-Br-phenanthrene, hydrogens of short chains show high field shifts (n-octane shows the highest shift) and the magnitude of the solvent effects depend on the size of aromatic solvents. The solvent effect of carbons near chain ends show high field shifts. The structure of alkane chains in solution and solute-solvent interactions will be discussed.

n-アルカンの芳香属溶媒中におけるプロトンNMRスペクトルに関する系統的研究はLiu¹⁾、安藤・西岡²⁾、Winnik³⁾らによって行なわれてきた。特にn-アルカンの1-Cl-ナフタレン(Cl-Naph.)溶液中の¹H NMRスペクトルは、炭素原子数が16以上でメチレン基プロトンのシグナルが2本に分裂するために注目され、沢山の研究が行なわれた。また、この現象と関連して、安藤・西岡は、n-ペンタンのメチル-メチレン基間の化学シフトに関してneatとCl-Naph.中における温度依存性を詳しく検討し、Cl-Naph.中では、40℃付近に屈曲点があること、また40℃以下では勾配が大きいことを報告している。そして、その原因はn-ペンタンのトランスとゴーシュ間の構造変化であると仮定してその間のエネルギー差を計算し(約1500cal/mol)、40℃以下ではn-ペンタンはneatの場合よりもCl-Naph.中で伸びた構造を取っていると結論付けている²⁾。この計算では、鎖状分子のNMR溶媒効果を単純化し、溶媒の磁気異方性効果や溶媒との分子間相互作用は無視して、鎖状分子における回転の自由度の問題としてこれらのスペクトルの解釈を行なっている。

一方、割合小さな分子に関しては、分子内の置換基間相互作用の検討がなされており、分子内回転において、図1 a)のt-ブチル基がフェニル基とゴーシュになる配座が安定で

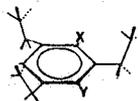
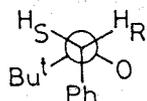


図1 a) スルホオキサイドの優位配座

b) 1,3,5-t-C₆H₃-C₆H₅の優位配座

あることや⁴⁾、1,3,5-トリネオペンチルベンゼンの側鎖がかなり大きな確率でベンゼン環の同じ方向に集まる配座を取ることも⁵⁾などが報告されている。これらは、特定のグループ間に引力が働いていると仮定しなければ理解できず、液体中の優位配座がいわゆる立体障害だけでは説明できない場合があることを示している。

また、*n*-アルカンの溶液中における立体的構造は、やや fold したランダムコイル状であろうと予想されている。その fold の程度は、炭素原子数が数十以下の場合、溶媒のファン・デル・ワールス力によって異なる (Org. Magn. Reson., 21, 552(1983))。

従って、*n*-アルカンの溶液中における平均的立体構造は、鎖の自由度の数と、分子内メチレン基間相互作用と、*n*-アルカンと溶媒との相互作用の3者の競合で決まると考えられる。

ところで、¹Hおよび¹³C NMRスペクトルは、芳香属溶媒中では、その磁気異方性のために溶媒との特別な相互作用が無くとも高磁場シフトしている。即ち、*n*-アルカン分子に直接接触することのできる位置の芳香属溶媒分子は、溶質分子に高磁場シフトを与えるが、それ以外の溶媒分子の磁気異方性効果は回転のためにキャンセルされる。磁気異方性効果の大きさは、よく知られているように溶媒分子の中心から注目している核までの距離の3乗に反比例する。従って同一分子上でも、溶媒から遠くなるに従い急激に磁気異方性効果は減少することになる。

ところで、*n*-アルカンの¹H NMRスペクトルから、それぞれの水素原子を識別することはできない。すなわち、水素原子の空間的分布に関する情報が得られるだけである。一方、¹³C NMRの場合、スペクトルが6本に分裂しており、メチル基から5ヶ目の炭素原子まで同定されているので、¹H NMRよりも分子内の環境に関する情報が多い(プロープが多い)。そこで今回は、大きさの異なる芳香属溶媒中で、*n*-アルカンのシリーズ(炭素原子数 $n=5-15$)の¹Hおよび¹³C NMR溶媒効果($\Delta\delta = \delta(\text{aromatic solvents}) - \delta(\text{CDCl}_3 \text{ or } \text{CCl}_4)$)を測定し、その磁気異方性効果から*n*-アルカンの平均的立体構造および*n*-アルカンと芳香属溶媒分子との分子間相互作用について検討を行なった。

Results and Discussion

図2は、*n*-アルカンの炭素原子数(N_c)とベンゼンによる¹H NMR溶媒効果($\Delta\delta$)の関係を示したものである。*n*-ペンタンの溶媒効果の値を基準としてプロットした。メチル基とメチレン基の溶媒効果(ベンゼン分子の磁気異方性による高磁場シフト)は、どちらも炭素原子数が大きくなるに従い減少する。とくにメチレン基の溶媒効果は、その傾向が激しい。この現象から、メチレン基の溶媒分子からの平均距離は、炭素原子数(N_c)が多いほど遠くなると推測した。一方メチル基は、炭素原子数が10程度で一定の環境に達すると考えた。

図3は、*n*-アルカンの炭素原子順位(両端のメチル基炭素を $C_{n=1}$ として順位をつけた。)とベンゼンによる¹³C NMR溶媒効果($\Delta\delta$)の関係を示したものである。メチル基($N_c=1$)の溶媒効果の値を基準としてプロットした。プロトンNMR溶媒効果の結果と

同様に、メチレン基の溶媒効果は炭素原子数が大きくなるに従い減少する。また、メチル基から遠い炭素原子ほど溶媒効果が小さい。

これらの結果から、*n*-アルカンは鎖が長くなるに従ってfoldして行くこと、およびそのfoldの状態としては、鎖の中心部が溶媒から最も遠い位置になることが示唆される。

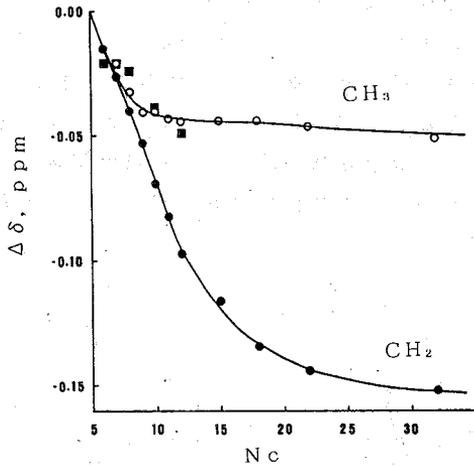


図2. *n*-アルカンのベンゼンによる¹H NMR溶媒効果 (■: cyclo-alkane)。

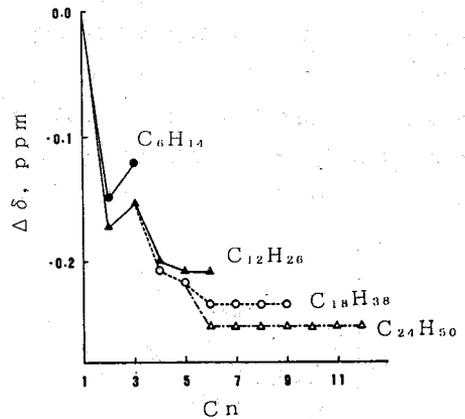


図3. *n*-アルカンのベンゼンによる¹³C NMR溶媒効果。

図4は、*n*-アルカンの炭素原子数とCl-Naph.によるプロトン NMRの溶媒効果の関係の温度依存性を示したものである。

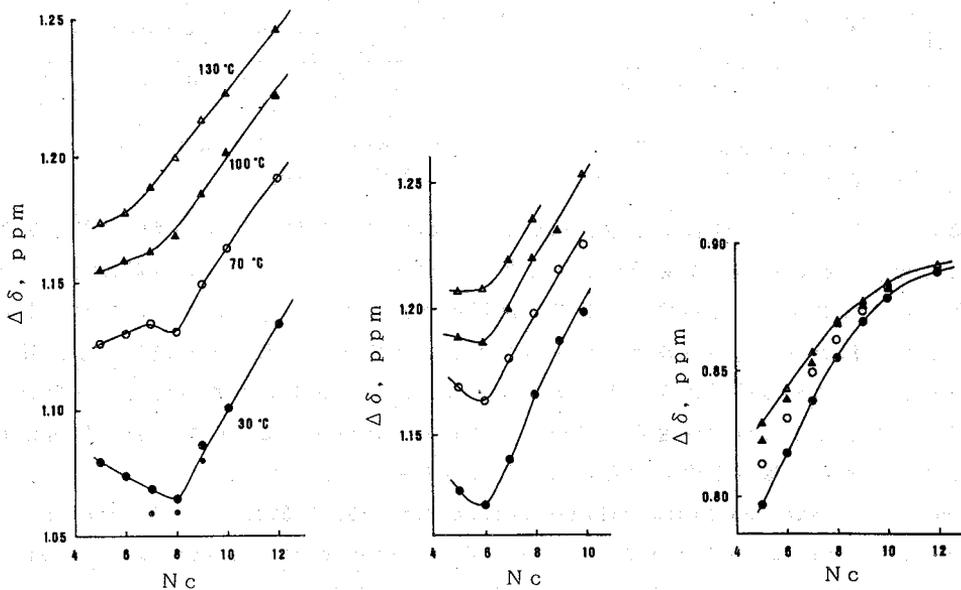


図4. a) CH₂ メインピーク b) CH₃ の隣のCH₂ c) CH₃

メチル基の溶媒効果は、炭素原子数が増加するに従い単調に減少するが、メチレン基の場合は、低い温度では炭素原子数増加に伴いまず溶媒効果は増加し、その後急激に減少する。メチレン基のメインピークは、*n*-オクタンのときに一番高磁場シフトをしめす。短いメチレン鎖に見られる高磁場シフトは、100℃程度でほとんど見られなくなる。さらに、温度依存性（温度上昇に伴う高磁場シフトの減少）は、鎖の内側が大きい。

図5は、*n*-アルカンの炭素原子数と9-Br-フェナントレン (Br-Phenan.) による ^1H NMR の溶媒効果の関係の温度依存性（メチレン基メインピーク）を示したものである。全体的プロファイルは、Cl-Naph. を溶媒とした場合とほとんどかわらない。*n*-オクタンを中心とした高磁場シフトは、Cl-Naph. よりも大きい。大きな高磁場シフトを示す領域のメチレン基メインピークは低温では、線巾が広くなるか、2本に分裂する。短いメチレン鎖に見られる高磁場シフトは、160℃を超えても消失しない。

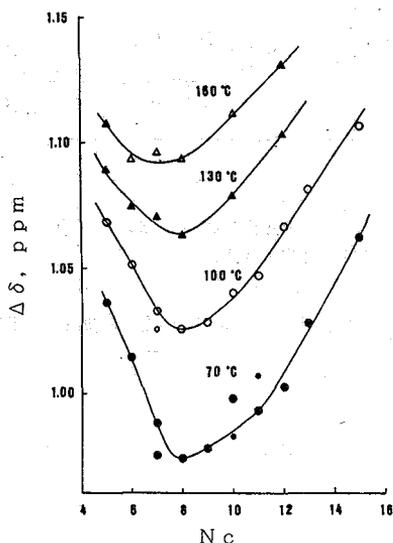


図5. *n*-アルカンのBr-Phenan. による ^1H NMR 溶媒効果 (小記号はサブピーク)。

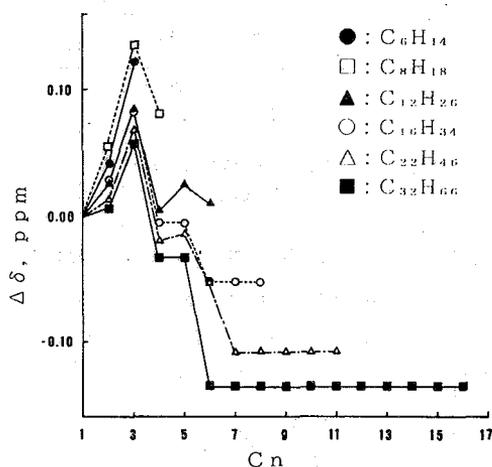


図6. *n*-アルカンのCl-Naph. による ^{13}C NMR 溶媒効果。

図6は、*n*-アルカンの炭素原子順位 (Cn) と Cl-Naph. による ^{13}C NMR 溶媒効果の関係を示したものである。ベンゼンを溶媒とした場合 (図3) と異なり、メチル基に近い位置の炭素原子は高磁場シフトを示す。そして、炭素原子数が小さいときに、高磁場シフトは大きい。また、鎖の中心部の溶媒効果は、ベンゼンを溶媒とした場合と同様に、鎖が長いほど小さい。これらの結果から、短いメチレン鎖、或いはメチレン鎖の両端の5ないし6コのメチレン基と縮合多環芳香属溶媒分子の平面方向との間には、引力的相互作用が存在し、そのエネルギーは芳香環が大きいほど大きいと考えた。

References 1. Kan-Jen Liu: J. Polymer Sci., A-2, 5, 1209 (1967), 2. I. Ando and A. Nishioka: 高分子化学, Vol. 29, No. 325, 306 (1972), 3. M. A. Winnik et. al.: Macromolecules, 12, 257 (1979), 4. Y. Kodama, K. Nishihata, M. Nishio and N. Nakagawa: Tetrahedron Lett., 24, 2105 (1977), 5. R. E. Carter, B. Nilsson and K. Olsson, J. Am. Chem. Soc., 97, 6155 (1975)

特別講演 4 ゼロ磁場, 及び, 高磁場におけるスピネコー

(北海道大学 理学部, *カリフォルニア大)

竹腰 清二郎, * T.P. Jarvie, * D. Suter, * A. Pines

SPIN ECHOES IN ZERO- AND HIGH-FIELD

K. Takegoshi, *T.P. Jarvie, *D. Suter, and *A. Pines

(*Univ. of California, Hokkaido University)

Recently a new area of NMR, time-domain zero-field NMR was developed. This technique is particularly useful for the investigation of polycrystalline samples in which most of the interactions show orientational dependence in high-field. The introduction of spin-echo techniques may widen the range of applications of the zero-field NMR, as that did for the high-field. A general strategy for the formation of spin echoes using a density-operator approach is given, and its application to the zero-field NMR is discussed.

高磁場を用いるパルス法NMRにおいては, 強いrfパルスでスピネ系を位相のそろった状態にし, そろった位相がばらばらになつてゆく過程を観測している。では, 一旦ばらけた状態を再び元の位相のそろった状態に戻すことは出来るだろうか? この一見熱力学の法則に反する過程は, 量子力学的にも重要で, さう, NMRにおいては非常に重要な手法となっている。例えば, Carr-Purcell法, WAHHA法, Quadrupole Echo法等は, いわゆるスピネコーの組み合わせで成立している。これらのスピネコーはすべて高磁場中で量子化されたスピネ系で行なわれている。近年, いわゆるゼロ磁場NMRという方法が提唱されて, 特に固体の粉末試料での分子構造や分子運動の研究に役立っている。この方法は, 高磁場中で量子化したスピネ系のゼロ磁場における時間変化を観測している。磁場が無い為に, 高磁場下では, 磁場に対する角度依存を示す相互作用が単純化されて, 線形が単純になるといった特徴をもっている。ここでは高磁場を用いたNMRにおいて非常に役立っているスピネコーがゼロ磁場NMRにおいても起こるかどうかに検討した。

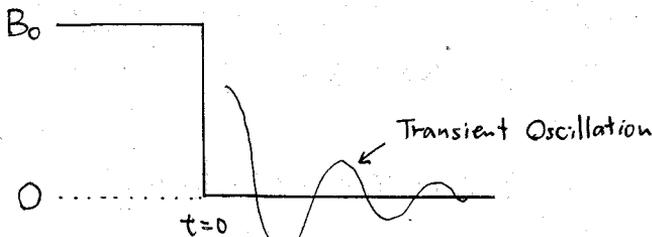


図1-a ゼロ磁場 NMR法模式図

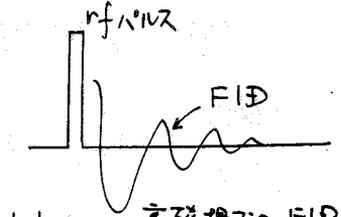


図1-b 高磁場での FID

((エコー生成 (一般的取り扱))

問題

ゆかにして、 $t=0$ における密度行列 ρ_0 を $t=t_0$ だけハミルトニアン \mathcal{H} の下で時間推進した密度行列 $\rho_A(t_0)$ を作り出すか。

$$\rho_A(t_0) = U(t_0) \rho_0 U^\dagger(t_0)$$

$$U(t_0) = \exp(-i\mathcal{H}t_0)$$

(解-1)

時刻 $t=t_0$ でハミルトニアン \mathcal{H} の符号を変える。

$$\mathcal{H} \longrightarrow -\mathcal{H} \quad \text{i.e.} \quad -i\mathcal{H}t \longrightarrow i\mathcal{H}t$$

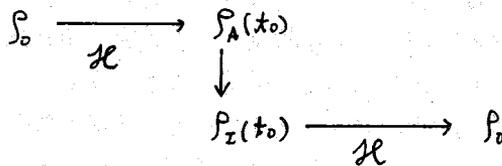
$$\rho(2t_0) = U(-t_0) \rho_A(t_0) U^\dagger(-t_0) = U^{-1}(t_0) U(t_0) \rho_0 U^\dagger(t_0) U(t_0) = \rho_0$$

(例) . Rotational echo : $\mathcal{H}_1 = \omega, I_x \rightarrow \mathcal{H}_2 = \omega, I_z$

. Magic echo : $\mathcal{H}_1 = \mathcal{H}_d^{(0)}$
 $\mathcal{H}_2 = e^{-i\frac{\pi}{2}I_x} \mathcal{H}_d^{(0)} e^{i\frac{\pi}{2}I_x} = -\frac{1}{2}\mathcal{H}_d^{(0)} + \mathcal{H}_d^{(2)}$

(解-2)

時刻 $t=t_0$ で密度行列 $\rho_A(t_0)$ を、あと t_0 時間推進した ρ_0 に作る密度行列 $\rho_I(t_0)$ に変える



$$\rho_0 = U(t_0) \rho_I(t_0) U^\dagger(t_0)$$

$$\rho_I(t_0) = U^{-1}(t_0) \rho_0 U(t_0) = U(-t_0) \rho_0 U^\dagger(-t_0) = \rho_A(-t_0)$$

既知、 $\rho_A(t_0)$ から $\rho_A(-t_0)$ を作り出す。

(例)

. Hahn echo $\rho_A(t_0) = I_x \cos \omega t + \underline{I_y \sin \omega t}$

. Quadrupole echo $\rho_A(t_0) = I_x \cos \omega t + \underline{(I_z I_y + I_y I_z) \sin \omega t}$

双波線部を rf パルスで回転して負にする。

((ゼロ磁場における 2 スピン ($I = \frac{1}{2}$) 系))

この場合 ρ_0 は高磁場 $B_0 = (0, 0, B_0)$ 中で作る

$$\rho_0^L = I_z^L - I_{z1}^L + I_{z2}^L \quad ; \quad L \text{ は 実験室座標系 } B_0 // Z \text{ を表わす}$$

ゼロ磁場で ρ_0^L は双極子相互作用で時間推進される

$$H^M = -(2/3)\omega_D(3I_{z1}^M I_{z2}^M - I_1^M I_2^M) \quad ; \quad M \text{ は スピン } 1, 2 \text{ に 固定した}$$

分子座標系を表わす.

(スピネコ -)

解-1の方法は, 分子座標系の H^M を実験室系でのパウル演算子ではさんで計算せよばならず難しなので, ここではまず解-2の手段でエコ-生成を試みた.

時刻 $t = t_0$ における密度行列 $\rho_A(t_0)$ は

$$\rho_A^L(t_0) = U(t_0)\rho_0^L U^{-1}(t_0) = \sum a_i(t_0) Q_i^L$$

で表わされる

ここで

$$U(t) = R^{-1} \exp(-iH^M t) R,$$

$$R = \exp(i\alpha I_{z2}) \exp(i\beta I_{y1}) \exp(i\gamma I_{z2})$$

; $M \xleftarrow{R} L$ を行なう Wigner 回転 op.

簡単な計算で 以下を得る.

$a_1(t) = \sin\beta \cos\beta \cos\gamma (1 - \cos\omega_D t)$	$Q_1^L = I_x^L$
$a_2(t) = \sin\beta \cos\beta \sin\gamma (1 - \cos\omega_D t)$	$Q_2^L = I_y^L$
$a_3(t) = \cos^2\beta + \sin^2\beta \cos\omega_D t$	$Q_3^L = I_z^L$
$a_4(t) = \sin\beta \cos\beta \cos\gamma \sin\omega_D t$	$Q_4^L = I_{x1}^L I_{z2}^L + I_{z1}^L I_{y2}^L$
$a_5(t) = -\sin\beta \cos\beta \sin\gamma \sin\omega_D t$	$Q_5^L = I_{x1}^L I_{z2}^L + I_{z1}^L I_{x2}^L$
$a_6(t) = \sin^2\beta \cos 2\gamma \sin\omega_D t$	$Q_6^L = I_{x1}^L I_{y2}^L + I_{y1}^L I_{x2}^L$
$a_7(t) = 0$	$Q_7^L = 3I_{z1}^L I_{z2}^L - I_1^L I_2^L$
$a_8(t) = -\sin^2\beta \sin 2\gamma \sin\omega_D t$	$Q_8^L = I_{x1}^L I_{x2}^L - I_{y1}^L I_{y2}^L$

この ρ_A^L から ρ_I^L を作りたい

$$\rho_I^L(t_0) = \rho_A^L(-t_0) = a_1 Q_1^L + a_2 Q_2^L + a_3 Q_3^L - a_4 Q_4^L - a_5 Q_5^L - a_6 Q_6^L - a_8 Q_8^L$$

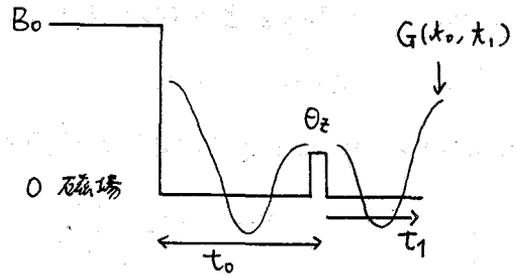
この変換は, 回転演算子のつかい組合せでも不可能. よって, ゼロ磁場における 2 スピン $-\frac{1}{2}$ 系の粉体試料のスピネコ-は不完全なものとなる.

(高磁場での不完全スピネコ-の例) 多スピン $-\frac{1}{2}$ 系の Solid echo.

(実験結果 (1例) θ_z パルス)

$\rho_A^L(t_0)$ に θ_z パルスをかける。

$$\rho_B^L(t_0) = \exp(-i\theta I_{z2}^L) \rho_A^L(t_0) \exp(i\theta I_{z2}^L)$$



パルス後 t_1 までの信号 $G(t_0, t_1)$ は

$$\begin{aligned} G(t_0; t_1) &= (1/4\pi) \int G^R(t_0; t_1) d(\cos\theta) d\gamma \\ &= \frac{1}{5} + \frac{2}{15}(\cos\omega t_0 + \cos\omega t_1) + \frac{8}{15}\cos\omega t_0 \cos\omega t_1 \\ &\quad + \frac{2}{15}(1 - \cos\omega t_0)(1 - \cos\omega t_1)\cos\theta \\ &\quad - \frac{2}{15}\sin\omega t_0 \sin\omega t_1(\cos\theta + 4\cos 2\theta) \end{aligned}$$

$$\text{ここで } G^{RB}(t_0; t_1) = \text{Tr}\{\rho_I^L(t_1) \rho_B^L(t_0)\}$$

$t=t_0$ のエコーの強度 $M(2t_0)$ は

$$\begin{aligned} M(2t_0) &= \frac{1}{15}(7 + 2\cos\theta - 4\cos 2\theta) \\ &\quad + \frac{4}{15}(1 - \cos\theta)\cos\omega t_0 \\ &\quad + \frac{2}{15}(2\cos 2\theta + \cos\theta + 2)\cos 2\omega t_0 \end{aligned}$$

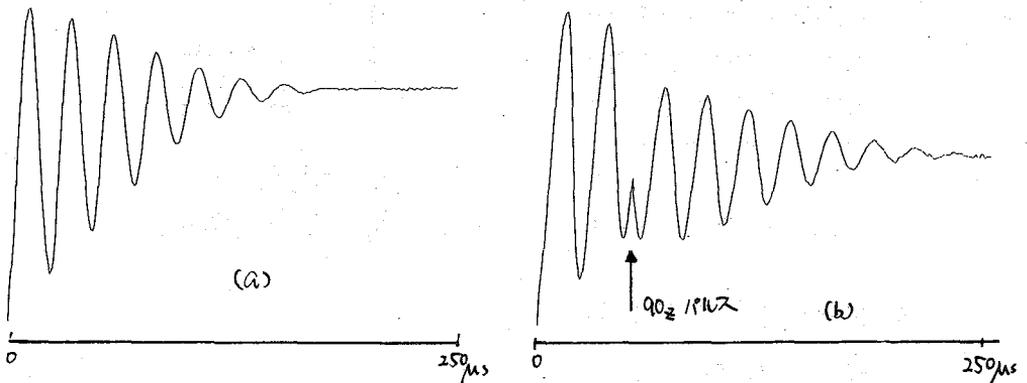


図2. $Ba(ClO_3)_2 \cdot H_2O$ のゼロ磁場における 1H の信号

(a) 通常のゼロ磁場 NMR 信号

(b) 矢印の所に 90_z パルスを挿入した際の応答

構造, シグナル帰属, シフト挙動, 特殊スピンの結合などに関する知見

(塩野義研究所) ○照井 彬弘, 高山 陽子, 肥沼 三雄, 松本 浩一

NMR ANALYSIS OF AUREOLIC ACID ANALOGUES

Yoshihiro TERUI, Yohko TAKAYAMA, Mitsuo KOENUMA and Koichi MATSUMOTO
(Shionogi Research Laboratories)

Detailed studies on the 1- and 2-dimensional NMR spectra of antitumor antibiotic aureolic acid assigned all the ^1H and ^{13}C signals and clarified the structure in question. The ROESY experiments on the aureolic acid analogues detected the inter-ring NOEs among the sugar units and aglycone, which were useful to analyze the saccharide sequence and conformation. Based on the information on conformation, the glycosylation shifts depending upon the combination of sugars are discussed. An interesting spin-spin coupling, which may result from the interaction through the hydrogen bond, is also reported.

〔序〕 Aureolic acid (≡ Mithramycin) は抗腫瘍作用を示す物質として古くから (1952年) 知られ clinical use にと採されたが, 一応の推定構造しか出たのは1968年である¹。これと前後して Chromomycins, Olivomycins などの同系統物質の構造も報告された。1980年代に入り, 高磁場NMRの利用によりそれらの構造の再検討が行われ, Chromomycin A₃ と Olivomycin A の糖周結合様式の一部が訂正された^{2,3}。Aureolic acid は糖周結合様式のみならず糖配列もろかう可能性のある事が示されたが³, 明瞭な結論は得られていない。我々も菌代謝産物として新物質を含む一連の同系統物質を得て, それらのNMR解析を行ってきたが^{4,5}。今回, 構造未解決の Aureolic acid をとり上げ 2D-NMR を主とする詳細解析を行う。シグナル帰属と構造の全容を明らかにした。構造はこれまで考えられていたのと最も異なるものであった。また Chromomycin A₃ の ROESY スペクトルから糖周NOEが検出され, これをもとに糖結合まわりの立体配座と glycosylation shift の関係を検討してみた。また aglycone 部の特殊な水素結合系にある水酸基プロトン間にスピンの結合が存在する事が確かめられたので それらについて報告する。

〔Aureolic acid の構造とシグナル帰属〕

これまで Aureolic acid に対して与えられていた構造は Fig. 1 に示す I, IIa, IIb の三種であった^{1,3}。我々の Aureolic acid について得た NMR スペクトル群の一部を Fig. 2,

Fig. 3, Fig. 4 に示す。こからのスペクトルの解析から aglycone 部と Olivose (3個), Olioise (1個), Mycarose (1個), 計 5 個の糖に相当する ^1H シグナルが確認され, この data をそれと支持する γ -アノメリックプロトンの J 値は全ての糖が β 結合である事を示し (ca. 9.8 & 2.2 Hz), I 式の構造は否定される。次に, ROESY による NOE data から IIa, IIb の構造と妥当なものである。

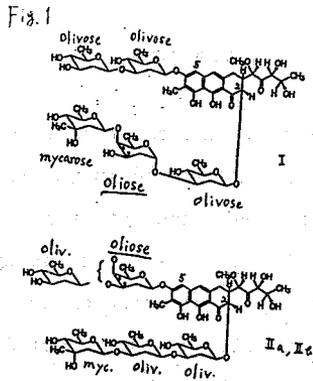


Fig. 2 COSY

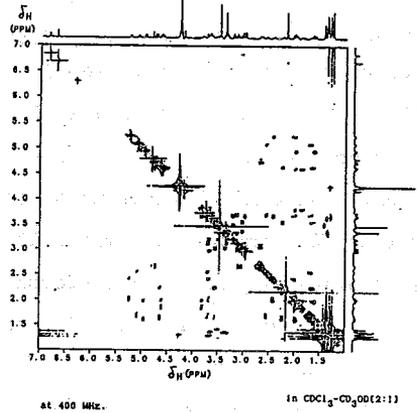


Fig. 3 RELAYH (2)

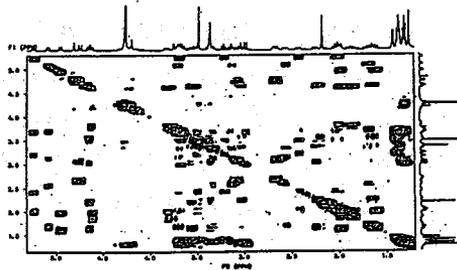
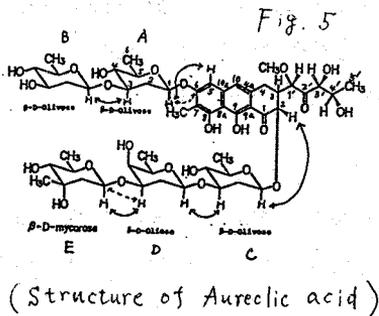
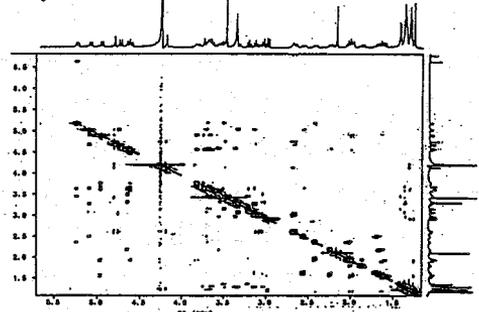


Fig. 4 ROESY



れる。即ち, Olioise の γ -アノメリックプロトンは aglycone 部との γ -プロトンと NOE は無く, Olivose の 3 位の γ -プロトンとの間に NOE が認められる。残りの得た NOE と H-C long-range coupling の data は Fig. 5 に示す構造があるとの結論に導く。構造解明の鍵となった NOE (\leftrightarrow) と long-range coupling (\leftrightarrow) を Fig. 5 に示してある。Table 1 に示す ^1H の全シグナルは COSY, RELAYH (1&2), およ

の Decoupling によりプロトン間のつながりが確かめられ ROESY による NOE の位置関係の保障を得る事により確立された。¹³C 帰属は ¹H 帰属に基づき HETCOR で、まぎらわしい 4 級炭素の帰属は Selective decoupling による long-range coupling の発生により行われた。なお、実験は Varian XL-400 を用いて行われた。

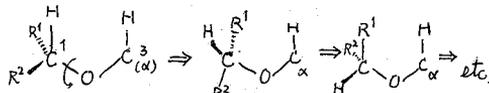
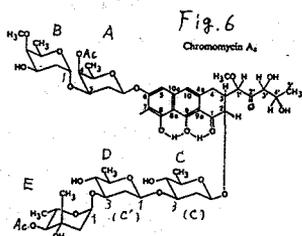
Table 1. ¹H and ¹³C data of aurelic acid : in CDCl₃-CD₃OD (2:1) at 24°C

No.	¹³ C	¹ H (J)	No.	¹³ C	¹ H (J)	No.	¹³ C	¹ H (J)
	(Aglycone)			(Sugar A) Olivose			(Sugar D) Olivose	
1	203.2		1	97.1	5.24 (9.8, 2.3)	6	18.2	1.36 (6.1)
2	77.2	4.74 (11.6)	2	37.4	2.02 (12.4, 11.9, 9.8)	1	99.7	9.61 (9.9, 2.3)
3	43.0	2.67 (7.4, 11.6, 3.8, 1.8)			2.43 (12.4, 5.2, 2.3)	2	32.4	1.86 (12.4, 12.2, 9.9)
4	27.3	3.08 (17.4, 1.3)	3	81.0	3.68 (11.9, 8.7, 5.2)			2.00 (12.4, 4.8, 2.3)
		2.67 (17, 3.8)	4	75.4	3.21 (9.0, 8.7)	3	76.8	3.82 (12.2, 4.8, 3.3)
4a	135.8		5	72.8	3.51 (9.0, 6.2)	4	69.2	3.74 (3.3, 1.1)
5	101.4	6.68 (br.s)	6	18.3	1.43 (6.2)	5	71.3	3.64 (6.4, 1.1)
6	159.8			(Sugar B) Olivose		6	16.7	1.38 (6.4)
7	112.3		1	99.7	4.65 (9.6, 2.2)		(Sugar E) mycarose	
7a	8.3	2.17 (s)	2	39.6	1.66 (12.5, 12.0, 9.6)	1	98.1	4.96 (9.6, 2.3)
8	164.5				2.25 (12.5, 5.1, 2.2)	2	44.2	1.62 (13.9, 9.6)
8a	108.3		3	71.3	3.56 (12.0, 8.8, 5.1)			1.99 (13.9, 2.3)
9	156.1		4	77.2	3.03 (9.5, 8.8)	3	71.2	
9a	108.6		5	72.9	3.37 (9.5, 6.2)	3a	26.9	1.26 (s)
10	117.5	6.83 (1.3)	6	177	1.37 (6.2)	4	76.9	2.98 (9.5)
10a	138.9			(Sugar C) Olivose		5	71.2	3.68 (9.5, 6.2)
1'	82.2	4.81 (1.8)	1	101.1	5.09 (9.8, 2.1)	6	18.4	1.30 (6.2)
1'a	59.3	3.48 (s)	2	37.5	1.70 (12.6, 12.1, 9.8)			
2'	212.4				2.56 (12.6, 5.2, 2.1)			
3'	79.1	4.18 (2.6)	3	81.0	3.69 (12.1, 8.7, 5.2)			
4'	68.6	4.26 (6.3, 2.6)	4	75.6	3.13 (9.0, 8.7)			
5'	19.6	1.32 (6.3)	5	72.6	3.33 (9.0, 6.1)			

[Chromomycin A₃ の直鎖糖と ¹³C glycosylation shift]

Chromomycin A₃ の全 ¹³C シグナル帰属は既に報告して 11.3 か、その後に糖を段階的に切断した誘導体に関する ¹³C data との比較を行った。glycosylation shift の値を算出して 11.3。構造は Fig. 6 に示す通りである事は今回行われた ROESY の実験から得られる NOE data によっても確認された。B 糖が A 糖に α-1→3 結合した時の glycosylation α-shift (GSα) は +3.0 (ppm), D 糖が C 糖に β-1→3 結合した時の GSα は +10.0, E 糖が D 糖に α-1→3 結合

した時の $GS\alpha$ は +6.8 となっている。糖の組合せにより $GS\alpha$ は大、中、小とバラエティにとんでいる。Chromomycin A₃ の糖のつなかり方は全て 1→3 結合であるが、ROESY スペクトルにおいて、とてなりあう糖の 1 位と 3 位のプロトン間の NOE が一着強く現れるのは [D1, C3] で決まり [E1, D3], [B1, A3] の順であった。この data は glycosyl bonds に因する rotation のもとで各種 conformers の間の平衡関係において、D1 と C3 のプロトンが互に近い位置関係にある存在確率が大きい事を意味する。逆に、NOE の小さいものは、近い位置関係の存在確率は小さい。glycosyl bond の回転と NOE, さらに ^{13}C shift に影響を及ぼす Steric γ -effect の関係を模式的に書き表してみると次の様になる。



NOE	大	中	小
γ -effect	小	中	大
$GS\alpha$	大	中	小

R^1 や R^2 が α -H と 1,3 平行の場合は Steric γ -effect は大きく $C(\alpha)$ への高磁場シフトを誘起し、結果として $GS\alpha$ を小にする。1-H と α -H が平行の場合は NOE が大きくなり $GS\alpha$ も大となる。この関係は NOE の大なる時は $GS\alpha$ も大の関係となる。C-O 軸まわりの回転もあり、ダイアモンド格子からはずして配座を組む事もできるから、上の関係は厳密なものでないが、ここで見られる $GS\alpha$ の順と NOE の現れ方との対応関係の説明にはなっている。

[Aglycone 部の Phenolic-OH に見られるスピン結合について]

Chromomycin A₃ の誘導体などの $CDCl_3$ soln. において、Fig. 6 に示す aglycone 部の 8-OH と 9-OH の間に 0.7 Hz ~ 0.4 Hz のスピン結合が観測された。水素結合を除いて考えると、両プロトン間の結合角は 6° である。これは 6-bonds を介して long-range coupling が観測された例は或々の知る範囲には無い、おそらくは強力な水素結合の関与する二つの間に特有の現象と思われる。6-bonds を介して伝わるスピン相互作用の項は negligible small とすれば、この J 値は強力な水素結合を介しての相互作用により発現されたものと考え事ができる。

[References]

1. Yu. A. Berlin, O. A. Kiseleva, M. N. Kolosov, M. M. Shemyakin, V. S. Soifer, I. V. Vasina, I. V. Yartseva, and V. D. Kuznetsov, *Nature*, 218, 193 (1968); G. P. Bakhaeva et al. *Tetrahedron*, 3595 (1969).
2. J. Thiem and B. Meyer, *JCS Perkin II*, 1331 (1979)
3. J. Thiem and B. Meyer, *Tetrahedron*, 37, 551 (1981)
4. Y. Yoshimura, M. Koenuma, K. Matsumoto, K. Tori, and Y. Terui, *J. Antibiotics*, 41, 1.53 (1988)
5. M. Koenuma, Y. Yoshimura, K. Matsumoto and Y. Terui, *J. Antibiotics*, 41, 1.68 (1988).

(東ソー化学研) 戸井田 良晴、○世良 朋子、岡田 忠司

1. 序論

石英ガラス (SiO₂) はその優れた耐酸性、耐熱性、耐弾性履歴、絶縁性、気密性、低熱膨張率、高軟化温度さらに近赤外からUVまで広範囲にわたっての高い光透過性を有することなどから光学/照明機器、電気機器、理化学機器や半導体工業などの広い分野で使用されている。

この石英ガラスの製法としては天然の水晶を電熱または酸水素炎で溶融するもの、四塩化珪素を原料に酸水素炎やプラズマを用いて下記の反応をおこないこれによって生じるSiO₂ガラスとする方法等がある。



このうち後者の製法によるガラスは化学的に極めて高純度なため真空紫外領域から2 μm付近まで高い透過率を示すほか、放射線による着色が少ない、蛍光を発しにくい、また、ソーラリゼーションを起こしにくいなどの理由で広く光学用途に利用されている。

しかし、この方法は反応中に水素を含むためSiOH、SiH、HClさらにH₂などの副生成物生じ、かつ残留しガラス強度の低下やUV領域の特異吸収を生じる原因となると考えられている。しかしながら、これら不純物が実際に含まれているのか、またその場合どの程度の量が含まれているのかを直接検出する方法は少ない。実際赤外分光法によるSiOHおよびラマンスペクトルによるSiHの同定が行なわれているのみであり他の分子がガラス中に存在することを直接確認する方法は知られていない。さらに、ラマン法では測定時の光行路が一定とならないので定量は困難である。また、赤外分光法でのSiOH量の定量ではその基準となる吸光定数の値がその求め方によって77.5~186 (cm⁻¹/モル・cm)まで様々な値が報告されているため量的な取扱に問題がある。さらに赤外法ではガラス中や表面に水が存在する場合にその信号とSiOH信号が重なり合い正確な吸光度を求めることが困難で、その結果OHの定量に大きな誤差を生じる。このため本報告では近年著しく感度の向上したプロトンNMRを用いて、石英ガラス中のこれら微量プロトン残留物質の検出/同定/定量を試みた。

2. 実験

高純度石英ガラス中に含まれるプロトン量は重量比で1.0~1000 ppm程度の微量と推定される。このためソレノイド型コイルを自立させプロトン残留信号を減少するようにしたプローブ・ヘッドを自作して測定を行なった。このプローブ・ヘッドの残留プロトン

量は H_2O 換算で約 $20\mu g$ 、即ち測定試料重量に対する残留水分量として約 $10ppm$ 程度である。しかし測定時の温度/湿度によりプローブ・ヘッドへの水の吸着量が変動するため一定の値とはならず、また、化学シフト値も変化した。スペクトロメータは日本電子社製GX270を用いた。本ヘッドと組み合わせた時の 90° パルス幅は約 6μ 秒、また、デッド・タイムは 20μ 秒以下であった。

プロトンMAS測定はブルカー社製AM250用CP/MASプローブ・ヘッドでデカップリング・チャンネルを $270MHz$ にチューニングし、さらにプロトン・バックグラウンド信号を低下させるためプラスチック部品をセラミックス製に変えたもので行なった。MASスピナーはケルーフ容器にケルーフ製、または、デルリン製のキャップの物を用いた。回転数は前者で約 $3000Hz$ 、後者で約 $5000Hz$ であった。 90° パルス幅は約 6μ 秒である。また、一部のMAS測定は日本電子社製FX60にDoty社のプローブ・ヘッドを組合わせた物を用いた。

測定パルス系列はMAS、スターティック測定とも信号の線幅が狭いためパルス幅 $45\sim 60^\circ$ のシングル・パルスを用いた。繰り返し時間は 60 秒 ~ 425 秒で積算回数は 64 回から 200 回である。

測定に用いた試料は $Si(OH)_4$ を水溶液中で縮合重合したシリカ微粉末(試料1) $SiCl_4$ を H_2/O 。ガスのモル比 $=2.0, 2.3$ および 2.6 の雰囲気下で反応させて作った石英ガラス(試料2, 3, 4)、試料4を大気中で $1200^\circ C/10$ 時間アニールしたもの(試料5)、試料2を粉碎したもの(試料6)、粉碎によって約 $100ppm$ (モル比)生じたラジカルを消滅させるため $400^\circ C$ で約 30 分アニールしESR信号の出なくなった事を確認したもの(試料7)、天然水晶を電気炉で溶融したもの(試料8)の8種類である。

これらのうち塊状ガラスは外形 $10mm\phi$ 長さ $10\sim 20mm$ の円柱状に削りだしプローブのコイル内にそのまま挿入して測定した。粉体試料は外形 $10mm\phi$ のテフロン製NMRチューブを $30mm$ に切った物を容器として用い測定を行なった。

3. 結果および考察

図1に試料1の $270MHz$ プロトンMASスペクトルを示す。本試料は約 $3.5ppm$ の位置に比較的シャープな信号と約 $2ppm$ の位置にブロードな信号が存在する。このうち前者の位置の信号はH.Eckertらによりガラス中の $SiOH$ と同定されている^(2,3)が本測定では試料の乾燥状態によって信号強度/位置とも変化する事からガラス粉表面に物理吸着した水と推定した。試料6および7についてもプロトンMAS測定を行なったが上記2種以外シャープな信号は存在しなかった。

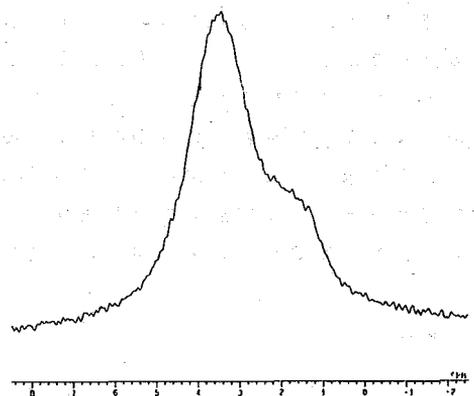


図 1.

次にスターティックで測定した結果を示す。図2は試料4および試料4の信号から試料1の信号を引いた差スペクトルである。また、図3は試料4, 5のスペクトルおよび試料5と試料4の差である。これら各試料のスペクトルおよび差スペクトルから試料毎に見出された信号、また、赤外分光法によるSiOHの有無並びにラマンスペクトルによるSiH信号の有無の結果を下表にまとめて示す。

試料番号	試料履歴	IRのOHピーク	ラマンのSiHピーク	NMRの信号位置				
				-2.0	1.3	2.0	6.5	11.0
1	湿式シリカ粉末	強	無	不明	無	有	大	不明
2	酸水素比2.0の合成石英	強	有	小	有	有	大	小
3	酸水素比2.3の合成石英	強	有	中	有	有	大	中
4	酸水素比2.6の合成石英	強	有	大	有	有	大	大
5	試料4を1200°C/10hrアニール	強	有	無	有	無	大	無
6	試料2の粉碎物	強	有	—	有	大	大	—
7	試料6を400°C/30分アニール	強	有	—	有	大	大	—
8	天然水晶の溶融ガラス	無	無	無	無	無	無	無

この結果でまず試料7のMASとスターティック・スペクトルを比較すると、前者では約2ppmの信号強度が強いが後者では6.5ppmの所に最も大きな信号が存在する。また、試料7を乾燥させて測定したものとその粉碎前の試料2のスターティックでの差を求めると2ppm信号のみが現れる。また、この信号のT₂は約100ミリ秒とガラス中の他の信号のT₂値60~100秒と比べ著しく短い。この事から本信号はガラス表面に化学吸着した水によるものと考えられる。また試料7のスターティック・スペクトルでは2ppmの信号と比べ6.5ppmの信号の面積強度が1桁以上大きく、また、MASの回転速度も本信号の線幅約3kHzより大きいにも係わらずMASスペクトルで6.5ppmの信号が観測されなかった。これは、本信号の線幅がMAS法でシャープとならないため、MAS用スピナー中やプローブ・ヘッド内の他の部品中に含まれる残留プロトンからのブロードな信号に埋れてしまい信号

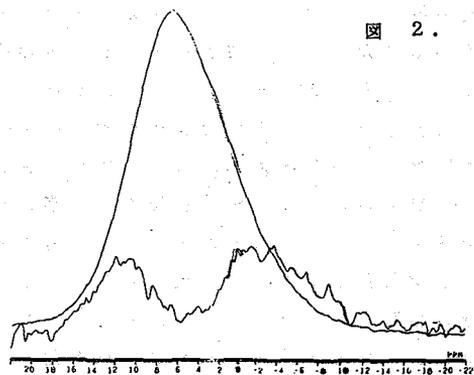


図 2.

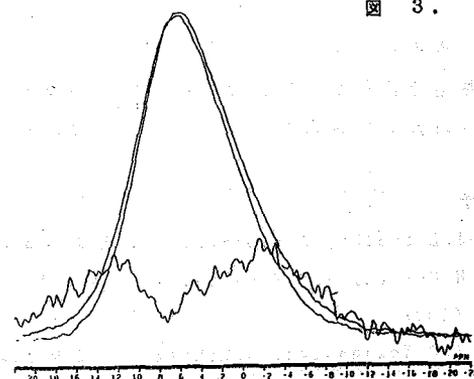


図 3.

が分離しなかったためと考えられる。さらに試料を粉碎した事により約100ppmのE'センター・ラジカルが生じた試料6およびこれをアニーリングしてラジカルを消滅させた試料7の間でスペクトルの形が全く変化しない事、今回用いた試料は8番以外他の常磁性不純物が全く含んでいない事、また、試料中に含まれるプロトンの量が多いものでも1000ppm程度でありこれがガラス中に均一に分布しているとして計算した磁気双極子相互作用による線幅は高々10Hz、また珪素-プロトン間双極子相互作用による幅も200Hz程度である事から、この6.5ppm信号の線幅のはMAS法で細くする事が出来る磁気双極子相互作用や電子スピンの相互作用に由来するのではなく化学シフトの分布(または異方性)によって定まっていると考えられる。

次に水素/酸素比の異なる条件下で合成したガラスのスペクトルの差異を見ると比が大きい試料では11ppmおよび-2ppmの信号が大きい。水素が多い条件で合成するとSiH、Si(OH)₂の結合やSiOHのクラスターが生成しやすいと考えられており、更に、H₂が分子の形でガラス・マトリックス中に取り込まれ易いことなどから、この2種の信号はこれらの何れかのプロトンに帰属されると推定される。

ガラスを1200°Cでアニールした前後の試料を比べると、前者では後者にあった-2および11ppmの信号が消えている。この温度でガラスを処理するとガラス中から水素分子が出て来ること、また、赤外のSiOHの信号強度が小さくなるがこれは近接して存在する2個のSiOHは縮合して水が飛び去と考えられていること、更に、アニール後の試料には赤外スペクトルのSiOHおよびラマン・スペクトルのSiHの信号が残っている事から、11および-2ppmの信号はH₂及び、SiOHのクラスターによるものと推定される。-2ppmの信号は化学シフトの値から塩酸の可能性もあるが、ESCAの測定ではガラス中の塩素は共有結合状態として存在している事からイオン結合である塩酸では無いと考えられる。次に最も大きい6.5ppmの信号は、この信号強度と赤外から求められるOH量に相関がある事、また線幅がMASによって変化しないのでH₂OやSi(OH)₂など双極子相互作用が強いもので無いことから、孤立したSiOHのプロトンと同定できる。最後に1.3ppmの信号は、これの存在とラマンのSiHの信号に相関がある事からSiHのプロトンと同定した。

以上によってガラス中に見出された各信号の同定が出来たので、現在これら各信号の分割/定量を行ない各信号の量的確認ならびに他の分析手段との関連を検討中である。

4. 謝辞

本測定を行なうにあたりプローブ・ヘッドをお貸し頂きました日本ブルカー(株)および60MHzのMASスペクトルを測定頂きました徳島大学多木教授に感謝いたします。

文献

- 1) J.E. Shelby, J. Vitko, Jr., and R.E. Benner J. Am. Ceram. Soc. Comm C-59 (1982)
- 2) H. Eckert, J.P. Yesinowski, L.A. Silver and E.M. Stolper J. Phys. Chem. 92, 2055 (1988)
- 3) J.P. Yesinowski, H. Eckert and G.R. Rossman J. Am. Chem. Soc. 110, 1367 (1988)
- 4) D.L. Griscom Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 61 213 (1986)

京大化研 堀井文敬、中川 将、北丸竜三
高分子学会NMR研究会会員

Frequency Dependences of ^{13}C Spin Relaxation of Poly(methyl methacrylate) Solution

F. Horii, M. Nakagawa, R. Kitamaru, and Members of Research Group on NMR of the Society of Polymer Science, Japan
(Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611)

As a series of NMR measurements of identical polymers by round robin method, Research Group on NMR collected ^1H and ^{13}C spin-lattice relaxation times T_1 and nuclear Overhauser enhancement (NOE) of poly(methyl methacrylate) in solution. In this paper the frequency dependencies of ^{13}C T_1 and NOE values have been analyzed in terms of different motional models. As a result, it has been found that 3 τ model, in which three kinds of independent superposed motions are assumed for the motion of the C-H internuclear vector, is most suitable for describing the frequency dependencies.

1. 緒言

高分子学会のNMR研究会では、同一PMMA溶液試料について種々のNMR分光計を用い種々の測定者による ^1H および ^{13}C の T_1 および ^{13}C NOEの測定を行なった^{1,2)}。本報告では、これらの結果のうち ^{13}C T_1 およびNOEの周波数依存性について種々の分子運動モデルにより解析した結果を述べる。

2. 種々の分子運動モデルと ^{13}C 磁気緩和

^{13}C - ^1H 双極子相互作用が ^{13}C 磁気緩和の主要因である場合、 ^{13}C 核の T_1 、 T_2 、およびNOEはC-Hベクトルのランダムな時間変動を表わす相関関数、あるいはその周波数 ω に関するフーリエ変換であるスペクトル密度

$$J_q(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} \langle F_q^*(t+\tau) F_q(t) \rangle e^{-i\omega\tau} d\tau, \quad q=0,1,2 \quad (1)$$

により表わされる。ここで

$$F_0 = 1 - 3n^2, \quad F_1 = (l + im)n, \quad F_2 = (l + im)^2 \quad (2)$$

であり、 l 、 m 、 n はそれぞれC-Hベクトルの実験室座標系の x 、 y 、 z 軸に対する方向余弦である。既に、多くの分子運動モデルを用い $J_q(\omega)$ が計算されているが、ここでは次の各モデルについて検討した。

2.1. 単一相関時間モデル

C-Hベクトルが等方ランダム運動をする場合 $J_q(\omega)$ は次式で表わされる。

$$J_q(\omega) = K_q \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad K_0 = 4/5, \quad K_1 = 2/15, \quad K_2 = 8/15, \quad (3)$$

2.2. 相関時間 τ_c の分布

系を τ_c の異なる種々のスピンの集合とみなし、 τ_c の分布を表わす関数 $P(\tau_c)$ を導入する。この場合、

$$J_q(\omega) = K_q \int_0^\infty \frac{2P(\tau_c)\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} d\tau_c \quad (4)$$

となる。ここでは、箱型分布³⁾および $\log-x^2$ 分布⁴⁾について検討した。

2.3. 多相関時間モデル

我々が多相関時間モデルと呼ぶモデルでは、(2)式の l 、 m 、 n で表わされるC-Hベクトルの時間変動をいくつか

の独立なランダム運動の重なりとみなす。今、たとえば小さな運動単位から大きな運動単位の順でそれぞれが属する直交座標系を S_1, S_2, \dots, S_p とし S_p が実験室座標系と一致するとする。また、 S_{j-1} 座標系においてオイラ角 (ϕ_j, θ_j, ψ_j) により表わされるとすれば、 l, m, n は

$$\begin{bmatrix} l \\ m \\ n \end{bmatrix} = T_1^{-1} \dots T_{j-1}^{-1} T_j^{-1} \begin{bmatrix} l_j \\ m_j \\ n_j \end{bmatrix} \quad (5)$$

で表わされる。ここでは T_j は S_j 座標系を S_{j-1} 座標系に座標変換するための行列であり、 l_j, m_j, n_j は S_j 座標系における C-H ベクトルの相当する方向余弦である。したがって、各座標系の運動モードが決れば $J_q(\omega)$ を計算できる。

Woessner⁵⁾ は $p=2$ に相当するモデル (2σモデル) を提出した。この場合、C-H ベクトルは S_1 座標系の z_1 軸のまわりを回転拡散し、 z_1 軸自身は実験室座標系に対して等方ランダム運動をする。一方、Howarth⁶⁾ は $p=3$ に相当するモデル (3σモデル) を提出した。このモデルでは、図1に示したように C-H ベクトルは S_1 座標系の z_1 軸の周りを回転拡散するが、 z_1 軸は S_2 座標系の z_2 軸の周りのコーンの内部を libration する。さらに、 S_2 座標系自身は実験室座標系に対して等方ランダム運動する。Howarth⁶⁾ は経験的な近似法により $J_q(\omega)$ を誘導したが、我々⁷⁾ は厳密な取り扱いにより $J_q(\omega)$ に対して次式を誘導した。

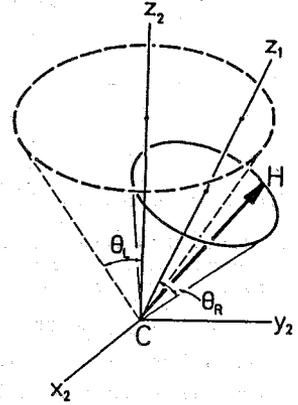


Fig. 1 Schematic diagram of the 3- σ model for the motions of the C-H internuclear vector

$$J_q(\omega) = K_q \left\{ A_R A_L \frac{2\tau_1}{1+\omega^2\tau_1^2} + A_R (1-A_L) \frac{2\tau_1}{1+\omega^2\tau_1^2} + B_L B_L \frac{2\tau_2}{1+\omega^2\tau_2^2} + B_R (1-B_L) \frac{2\tau_3}{1+\omega^2\tau_3^2} + C_L C_L \frac{2\tau_4}{1+\omega^2\tau_4^2} + C_R (1-C_L) \frac{2\tau_5}{1+\omega^2\tau_5^2} \right\} \quad (6)$$

ここで、

$$K_0 = 4/5, K_1 = 2/15, K_2 = 8/15,$$

$$(\tau_1)^{-1} = (\tau_I)^{-1} + (\tau_L)^{-1}, (\tau_2)^{-1} = (\tau_I)^{-1} + (\tau_R)^{-1}, (\tau_3)^{-1} = (\tau_I)^{-1} + (\tau_L)^{-1}$$

$$+ (\tau_R)^{-1}, (\tau_4)^{-1} = (\tau_I)^{-1} + 4(\tau_R)^{-1}, (\tau_5)^{-1} = (\tau_I)^{-1} + (\tau_L)^{-1} + 4(\tau_R)^{-1},$$

$$A_L = \cos^2\theta_L (1 + \cos\theta_L)^2/4, B_L = \sin^2\theta_L (1 + \cos\theta_L)^2/6,$$

$$C_L = (2 + \cos\theta_L)^2 (1 - \cos\theta_L)^2/24, A_R = (3\cos^2\theta_R - 1)^2/4,$$

$$B_R = 3\sin^2\theta_R \cos^2\theta_R, C_R = (3\sin^4\theta_R)/4$$

である。また、 τ_R, τ_L, τ_I はそれぞれ回転拡散、libration および等方運動の相関時間で、 θ_R および θ_L は相当する運動のコーンの頂角である。(6)式はHowarthが導いた式とは若干異なるが、通常の固体状高分子系で成立すると考えられる $\tau_R \ll \tau_L \ll \tau_I$ の条件下ではいずれの場合も次式となり一致する。

$$J_q(\omega) = K_q \left\{ A_R A_L \frac{2\tau_1}{1+\omega^2\tau_1^2} + A_R (1-A_L) \frac{2\tau_1}{1+\omega^2\tau_1^2} + B_R \frac{2\tau_R}{1+\omega^2\tau_R^2} + C_R \frac{2(\tau_R/4)}{1+\omega^2(\tau_R/4)^2} \right\} \quad (7)$$

この式で明らかなように、第4項の寄与を無視すれば、各運動モードの寄与は独立のLorentz関数の和で表される。このことは、(6)式を誘導するために図1に示したような特定のモデルから出発したが、得られた結果は互に独立な相関時間が著しく異なる3種の運動モードの重なりに対する、モデルに依存しない一般的な式となることを示している。

3. 結果および考察

3. 1. CH_2 (rrr)

図2および3には、 2τ モデル、 3τ モデルおよび τc に分布を導入した場合の NT_1 およびNOEの静磁場依存性を示す。なお、丸印で示した実験結果は数個のデータを平均化したもので、非線形最小2乗法によるコンピュータ解析を行なった。 NT_1 に対する場合低周波数側および高周波数側でわずかにモデルの相違が現れるが、いずれのモデルの結果も実験曲線とはほぼ良く一致する。これに対して、NOEの場合、モデル間の相違は明瞭であり 3τ モデルがこれらのモデルの中では最も妥当と考えられる。

3. 2. $\alpha\text{-CH}_3$ (rr)

図4および5に $\alpha\text{-CH}_3$ (rr) の NT_1 およびNOEの解析結果を示す。この場合、 CH_2 (rrr) の場合に比べて実験値のバラツキがかなり大きい。このため、 NT_1 の静磁場依存性についてもモデル間の相違は少しは認められるが、いずれのモデルでもほぼ実験値との一致は良い。一方、 CH_2 (rrr) の場合と同様、NOEの結果に対してはモデルによる相違が著しい。 $\alpha\text{-CH}_3$ 基の場合、主鎖 CH_2 基に比べて少なくとも1つ余分の独立の回転運動が存在するが、 3τ モデルにより一応解析が可能である。

3. 3. OCH_3

図6および7に OCH_3 の NT_1 およびNOEの 2τ および 3τ モデルによる解析結果を示す。この場合、 NT_1 は少なくとも1s以上で、このような T_1 の周波数依存性は τc に分布を導入するモデルでは説明不可能であった。これに対して、図6に示すように 2τ および 3τ モデルの結果は T_1 の実験値とはほぼ一致するようにみえる。しかし、NOEの結果に対しては 2τ モデルは全く不適当である。 $\alpha\text{-CH}_3$ 基同様、 OCH_3 基も

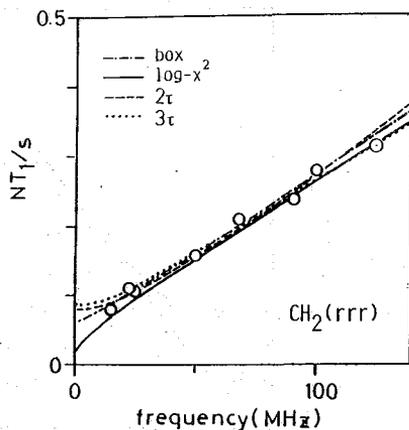


Fig. 2

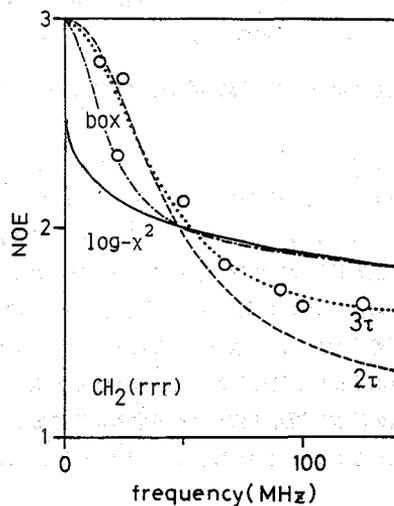


Fig. 3

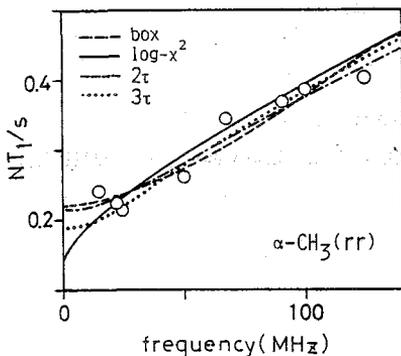


Fig. 4

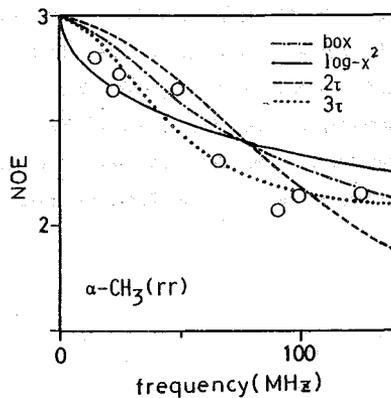


Fig. 5

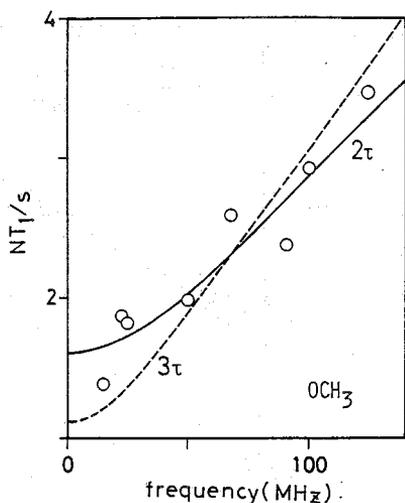


Fig. 6

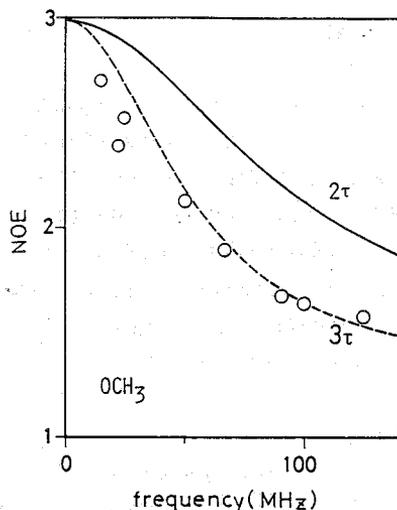


Fig. 7

主鎖とは独立の内部運動が可能であるためと考えられ、少なくとも3τモデルの導入が必要であることがわかる。

4. まとめ

以上、3種の¹³C核に対するNT₁およびNOEについて幾つかの分子運動モデルによる解析を行なった。この結果、CH₂(rrr)およびα-CH₃のNT₁の周波数依存性についてはいずれのモデルでもほぼ説明可能であるがNOEの周波数依存性についてはモデルによる相違が著しくより精密なモデルを用いる必要があることが判明した。より内部自由度の高いOCH₃基ではこのようなモデルの相違はより顕著で、分布を導入したモデルではNT₁の周波数依存性も説明不可能であった。以上のことは詳細な分子運動の研究に周波数依存性を測定することが極めて重要であることを示し、主鎖および側鎖運動に対して少なくとも3種の運動モードの重なりを考慮する必要があることが判明した。しかし、側鎖の独立な運動を厳密に研究するためにはさらに1種以上の運動モードを導入する必要があり、解析はかなり任意性が高くなる。したがって、T₁、NOEの温度依存性を合せて測定することは極めて重要と考えられる。

文献

- 1) 畑田耕一、中條利一郎、86/1 NMR研究会要旨、13頁。
- 2) 堀井文敬、中川 將、北丸竜三、Poly. Prepr., Japan, 36, 3151(1987).
- 3) A.W. Nolle and J.J. Billings, J. Chem. Phys., 30, 84(1959).
- 4) J. Schaefer, Macromolecules, 6, 882(1973).
- 5) D.E. Woessner, J. Chem. Phys., 36, 1(1962).
- 6) O.W. Howarth, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 11, 75, 863(1978).
- 7) K. Murayama, F. Horii, and R. Kitamaru, Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., 61, 229(1983).

テストステロンの¹³C T₁の測定と解析。特に四級炭素のT₁の温度及び磁場依存性と緩和機構について

(阪大、薬) 〇 宜 永忠、藤原英明、鄭 斗煥、佐々木喜男
(阪大、産研) 高井嘉雄、沢田正実

Analysis of ¹³C Relaxation times in Testosterone. Relaxation Mechanisms of Quaternary Carbons Studied from the T₁ Dependencies on Temperature and Magnetic Field
Y-Zh. Da, Hideaki Fujiwara, D-H. Zen, Yoshio Sasaki, Yoshio Takai* and Masami Sawada*
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University and
The Institute of Scientific and Industrial Research,* Osaka University)

¹³C T₁ data of Testosterone in solution were measured at variable temperatures and fields, and the T₁ contributions other than the dipole-dipole mechanism were derived. They are discussed for quaternary carbons in relation to the relaxation via the mechanisms of spin-rotation interaction and chemical shift anisotropy.

1. 序論

溶液状態での分子の動的性質を調べる方法の一つとして、NMRスピンの格子緩和時間T₁の測定と解析がある。通常、プロトンが直接付加した炭素(一級、二級及び三級)の緩和には双極子-双極子緩和機構が優勢であることが知られており、この時の¹³C T₁は次式で表わされる。

$$\frac{1}{T_{1,CD}} = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^n \frac{Y_C^2 Y_H^2 r_{CH}^2}{Y_{C-Hi}^6} \left[J(\omega_C - \omega_{Hi}) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_C + \omega_{Hi}) \right] \quad (1)$$

$$J(\omega) = \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (\text{単方モデルの場合}) \quad (2)$$

スペクトル密度J(ω)は種々の分子運動モデル(単方モデル、軸対称楕円体モデルなど)において、回転振散定数Dと幾何学パラメータ(θ、φの角度など)により表現できる。

しかし、プロトンが付加していない四級炭素では、単にD-D緩和のみと仮定することができず、緩和機構の究明が意義深いと思われる。これまで、四級炭素についてT_{1,DD}以外の寄与、T_{1,other}としてスピン-回転相互作用及び化学シフトの異方性などが重要なことが知られている。¹⁾

著者はこれまで²⁾ ストリキネーネ、ストレプトマイシンの¹³C T₁データの解析には異方性モデルが最適であることを報告した。²⁾ 今回はテストステロンについて¹³C T₁の温度と磁場依存性を含めて検討した。テストステロンは男性ホルモンの一種であり、図1に示すようにステロイド類の基本骨格をもつ。また、T₁値を用いて四級炭素の帰属への応用を試みた。

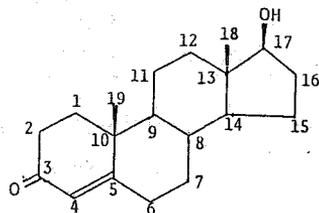


図1. テストステロン

2. 実験

^{13}C T_1 の温度依存性は JEOL FX-100 型 FTNMR 装置で $T-180^\circ\text{C}-90^\circ\text{C}$ の系列で完全 π 照射に π 照射により測定した。観測周波数は 25 MHz、取り込み幅は 200 ppm、 90° π の照射時間は 14 μsec であり、8 k 点で π 照射を交換した。試料は DMSO- d_6 溶媒に溶かし、0.48 M、10 mm 試料管を用い、脱ガスした。

磁場依存性を調べるため、JEOL GX-500 型 FTNMR 装置により、125 MHz で測定した。この時の溶媒は CDCl_3 、濃度 0.58 M、 90° π の照射は 12 μsec 、16 k 点で π 照射を交換した。

T_1 の解析は、等方モデル及び軸対称楕円体モデルについて π グラマ TRANSOC³⁾ を使用した。また、原子の座標として結晶構造解析データ⁴⁾ を利用した。但し、H の位置に関しては、C-H 距離を標準値に一定とした。

3. 結果と考察

Table 1. ^{13}C T_1 Analysis of Testosterone in DMSO- d_6 (25 MHz)

Shift /ppm	Assign-ment	40°C				70°C				100°C			
		$T_{1,obsd}$	$T_{1,calcd}^{DP}$		$T_{1,obsd}$	$T_{1,calcd}^{DP}$		$T_{1,obsd}$	$T_{1,calcd}^{DP}$				
			Mod. 1	Mod. 2		Mod. 1	Mod. 2		Mod. 1	Mod. 2			
196.78	3	11.66 ± 0.26	16.63	14.13	19.24 ± 1.36	32.28	27.29	29.10 ± 2.40	55.24	45.88			
171.99	5	8.42 ± 0.24	12.30	9.11	14.68 ± 0.28	23.87	17.98	23.37 ± 0.60	40.84	31.13			
122.57	4	0.94 ± 0.02	0.94	1.07	1.89 ± 0.01	1.82	2.07	3.19 ± 0.09	3.11	3.62			
79.52	17	0.82 ± 0.04	0.87	0.80	1.67 ± 0.02	1.70	1.57	2.77 ± 0.07	2.90	2.62			
53.22	9	0.83 ± 0.02	0.88	0.80	1.67 ± 0.02	1.71	1.58	2.75 ± 0.05	2.93	2.66			
49.86	14	0.81 ± 0.03	0.88	0.79	1.65 ± 0.02	1.71	1.55	2.68 ± 0.10	2.93	2.60			
42.08	13	6.57 ± 0.23	7.62	6.69	11.30 ± 0.31	14.79	12.84	17.93 ± 0.53	25.30	21.85			
37.85	10	7.18 ± 0.25	8.73	7.52	12.66 ± 0.24	16.94	14.37	18.74 ± 0.71	28.98	24.17			
36.10	12	0.49 ± 0.01	0.47	0.49	0.91 ± 0.02	0.92	0.96	1.62 ± 0.08	1.57	1.65			
34.93	1	0.62 ± 0.01	0.47	0.56	1.26 ± 0.02	0.92	1.04	1.94 ± 0.13	1.57	1.73			
34.93	8	0.62 ± 0.01	0.87	0.79	1.26 ± 0.02	1.69	1.55	1.94 ± 0.13	2.89	2.59			
33.28	2	0.47 ± 0.01	0.47	0.47	0.93 ± 0.01	0.92	0.91	1.63 ± 0.04	1.58	1.61			
31.72	6	0.46 ± 0.01	0.47	0.47	0.90 ± 0.02	0.92	0.91	1.53 ± 0.05	1.57	1.58			
31.09	7	0.45 ± 0.02	0.47	0.43	0.88 ± 0.06	0.91	0.85	1.52 ± 0.02	1.56	1.49			
29.63	16	0.50 ± 0.02	0.47	0.51	0.92 ± 0.04	0.91	0.97	1.60 ± 0.04	1.56	1.67			
22.68	15	0.48 ± 0.01	0.47	0.48	0.86 ± 0.01	0.91	0.91	1.53 ± 0.04	1.56	1.49			
20.05	11	0.44 ± 0.02	0.47	0.43	0.88 ± 0.02	0.91	0.85	1.55 ± 0.02	1.56	1.49			
16.79	19	1.51 ± 0.04			2.45 ± 0.06			3.67 ± 0.18					
10.81	18	2.19 ± 0.08			3.93 ± 0.20			5.74 ± 0.11					
SD:		0.090	0.078		0.162	0.151		0.311	0.280				
$D_2/10^9 \text{sec}^{-1}$:		3.81	1.06		7.39	2.16		12.64	3.69				
D_1/D_2 :			14.7			13.2			13.1				
θ :			27.6°			25.5°			20.0°				
ϕ :			-42.3°			-45.9°			-52.7°				

Mod. 1: Isotropic Model; Mod. 2: Symmetric Top Model. The unit of T_1 is sec.

SD means the standard deviation between the observed and calculated values of T_1 .

^{13}C T₁の温度依存性及び溶液中におけるテストステロンの運動性

Table 1 にテストステロン (0.48 M in DMSO-d₆) の 40°C、70°C と 100°C における ^{13}C T₁ 値及び回転力学的パラメータを示す。温度が上昇すると分子運動が速くなり、溶媒の粘度が小さくなるため、全体として ^{13}C T₁ 値は温度と共に増大する傾向が見られる。また、標準偏差からこの化合物の ^{13}C T₁ の解析には軸対称橋円体モデルの方が球モデルより都合が良く、テストステロンの異方性運動が支持された。

温度による四級炭素の緩和時間の変化

Table 2. ^{13}C T₁ Analysis of Testosterone in DMSO-d₆. (25MHz) 産標データからプログラム

Shift/ppm	196.78	171.99	42.08	37.85	
Assignment	3	5	13	10	
T _{1,obsd}	40°C	11.7	8.4	6.6	7.2
	70°C	19.2	14.7	11.3	12.7
	100°C	29.1	23.4	17.9	18.7
T _{1,calcd} ^{DD}	40°C	14.1	9.1	6.7	7.5
	70°C	27.3	18.0	12.8	14.4
	100°C	45.9	31.1	21.9	24.2
T _{1,obsd} ^{other}	40°C	68.7	109.2	366.3	180.0
	70°C	65.2	80.0	96.4	106.4
	100°C	79.6	93.75	99.9	83.4
T _{1,obsd}	40°C	0.83	0.92	0.98	0.96
T _{1,calcd} ^{DD}	70°C	0.71	0.82	0.88	0.88
	100°C	0.63	0.75	0.82	0.78

TRANSOC2" 四つの四級炭素の T₁^{DD} を計算し、T_{1,obsd} と比較した結果を Table 2 に示す。3 と 5 位の四級炭素 (SP² 型) の T₁^{DD} の割合が 40°C において約 80% であるが、100°C になると約 60% まで減った。この T₁^{DD} の割合の減少は他の緩和機構 T_{1,other} (T₁^{SR}、T₁^{CA} など) が温度と共に有効となることと同質である。13 と 10 位の四級炭素 (SP³ 型) の T₁ についても同じ傾

The unit of T₁ is sec.

向が見られる。また、隣りの炭素に付加した H の数を比べると、四級炭素と言、2 も、それらの緩和は α 位の H (正確には、空間的に近い H) との D-D 相互作用による支配が大きいことがわかる。例えば、13 と 10 位の炭素 (それぞれ α 位の H の数は 7 と 6 個) の緩和はほぼ 100% T₁^{DD} による。

NOE 因子を利用した T₁^{DD} の評価

40°C に 2 テストステロンの NOE 因子を測定した。一級、二級、三級炭素の η は測定の誤差を考えると、理論値と見なされるが、四級炭素についてはそれより小さい。四級炭素については η の実測値より T₁^{DD} が求められる (式 (4))。これに

Table 3. ^{13}C NOE Factors of Testosterone in DMSO-d₆. (25MHz, 40°C)

ppm	NOE	ppm	NOE	ppm	NOE
196.78	1.53 ± 0.07	42.08	1.41 ± 0.09*	31.09	2.04 ± 0.10
171.99	1.65 ± 0.09	37.85	_____*	29.63	2.01 ± 0.10
122.57	1.80 ± 0.12	36.10	1.70 ± 0.12	22.68	1.87 ± 0.09
79.52	1.83 ± 0.09	34.93	1.92 ± 0.10	20.05	1.92 ± 0.08
53.22	1.86 ± 0.10	33.28	1.95 ± 0.07	16.79	1.92 ± 0.11
49.86	1.86 ± 0.10	31.72	1.96 ± 0.11	10.81	1.88 ± 0.09

* 溶媒 1-7 と重なる。

$$\eta = \frac{1.988 \times T_{1,obsd}}{T_{1}^{DD}} \quad (3)$$

$$T_{1}^{DD} = \frac{1.988}{\eta} T_{1,obsd} \quad (4)$$

より得られた T_1^{DD} の計算値は Table 4 のシミュレーションで得られた T_1^{DD} と矛盾が見られなかった。

四級炭素の緩和時間の磁場依存性

Table 4. ^{13}C T_1 Analysis of Testosterone in CDCl_3 .
(125MHz, 25°C)

Assignment	Shift ppm	$T_{1, \text{obsd}}$ sec	$T_{1, \text{calcd}}^{DD}$ sec	$T_{1, \text{other}}$ sec	$\frac{T_{1, \text{obsd}}}{T_{1, \text{calcd}}^{DD}}$
3	199.91	8.57	29.65	12.05	0.29
5	171.83	6.09	19.46	8.86	0.31
13	42.84	10.48	13.90	42.59	0.75
10	38.70	12.69	16.12	59.64	0.78

Table 4 はテストステロン (0.58M in CDCl_3) の 125 MHz における四級炭素の T_1 の実測値と解析結果である。 T_1^{DD} の割合から見れば、3位と5位の方が磁場による影響が大きく、25 MHz のデータと比較すると、50% 減少している。

一方、13位と10位の炭素では約20%しか減少していない。これは3位と5位の sp^2 型炭素の方が高磁場のもとで、化学シフトの異方性による緩和の影響が大きいためである。

4. 考察とまとめ

$$\frac{1}{T_1^{SR}} = (2IKT^0/3k^2)(2C_H^2 + C_H) \tau_J \quad (5)$$

$$\tau_c \cdot \tau_J = I/6kT^0 \quad (6)$$

$$\frac{1}{T_1^{CA}} = \frac{2}{15} \gamma^2 B_0^2 (\sigma_{11} - \sigma_H)^2 \left[\frac{2\tau_c}{1 + (2\pi\nu_0)^2 \tau_c^2} \right] \quad (7)$$

スピニ-回転と化学シフトの異方性の緩和時間はそれぞれ式(5)と式(7)で表わせる。⁵⁾ (5)式より、 T_1^{SR} は τ_c に比例するので、温度と共に小さくなり、スピニ-回転の寄与は大きくなる。一方、 T_1^{CA} の方は式(7)からわかるように磁場強度の2乗と τ_c に反比例するので、温度と共に大きくなり、磁場と共に小さくなる。Table 2 において、 $T_{1, \text{other}}$ は13位と10位について2温度と共に減少し、3位と5位ではおよそ一定であることから、25 MHz では13位と10位の sp^3 炭素ではスピニ-回転相互作用が、また3位と5位の sp^2 炭素ではスピニ-回転と化学シフトの異方性の両者がそれぞれ $T_{1, \text{other}}$ の中で優勢であることがわかる。これに対し、125 MHz の磁場では T_1^{CA} の寄与は25 MHz の時の25倍に大きくなるため、3位と5位の sp^2 炭素ではシフトの異方性が $T_{1, \text{other}}$ に支配的となる。13位と10位の sp^3 炭素でも、125 MHz の磁場ではシフトの異方性が $T_{1, \text{other}}$ の中で優勢であるが、シフトの異方性が ν_0 が小さいため、この寄与は全体の T_1 の中では小さい(20%程度)。

References

- 1). G. C. Levy, "Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy". Vol. 2, 356 (1976).
- 2). 渡辺、藤原、佐々木, "第26回NMR討論会講演要旨集", 5 (1987).
- 3). H. Fujiwara et al., J.C.S. Perkin Trans. H, 903 (1983).
- 4). P. J. Roberts et al., J.C.S. Perkin Trans. H, 1978 (1973).
- 5). D. Shaw, "Fourier Transform N.M.R. Spectroscopy", 310 (1976).

(名工大) ○高倉 裕 ・ 横山 幸弘 ・ 高橋 憲助

AN NMR STUDY OF THE DIANIONS PRODUCED FROM PHENYLBUTADIENES

Yutaka TAKAKURA, Yukihiro YOKOYAMA and Kensuke TAKAHASHI

(Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology)

The dianions (1 and 2) produced from 1,1,4,4-tetra- and 1,4-diphenylbutadienes (1a and 2a) were investigated by means of the ^1H and ^{13}C NMR techniques. Large upfield shifts of the proton and carbon signals caused by conversions of the hydrocarbons into the dianions were observed. Such shifts were used for evaluating the excess charge distributions in the dianions. From the coupling constants obtained it is concluded that the configuration of the central bond of the anion is the trans one for 1 but the cis one for 2. Thermodynamical parameters were obtained for the restricted rotation of the phenyl group of the lithium salt of 2.

〔序〕

フタジエンは共役不飽和炭化水素の最も簡単な例であり、これから誘導されるジアニオンは構造化学的に興味ある対象である。奇数個の炭素骨格を持つアニオンのNMR研究はこれまでに多数報告されている。¹⁾ これに反して偶数個の炭素骨格を持つアニオンの研究例は少ない。これは後者のアニオンが前者のアニオンに比較してその生成が困難である事に起因すると思われる。我々はこれまでフタジエン骨格を持つジアニオンをアルカリ金属による還元によって生成させることを試みてきたが²⁾ 最近2の生成に成功したので³⁾、これらのアニオンについて過剰電荷の分布、構造等について報告する。

〔実験〕

出発物質(1aまたは2a)は市販品を用いた。出発物質は乾燥脱気した溶媒THF($\text{THF}-d_6$)あるいはDMFに濃度 $0.1-0.2\text{mol dm}^{-3}$ になるように調整された。この溶液を真空中、室温でアルカリ金属と接触させた。約2日間反応後、濾過してNMR試料管に封入した。

生成したジアニオンを確認するために、2のNa塩を D_2O または H_2O でクエンチした。 H_2O でクエンチした時の生成物の、 ^1H NMRパラメーターを次に示す。クエンチ物は2種類得られた。生成比が90%の1,4-diphenyl-2-Butene ($\delta_{1\text{H}}=3.51$, $\delta_{2\text{H}}=5.71$, $\delta_{\text{C}_6\text{H}_5}=7.19-7.30$, $J_{1\text{H},2\text{H}}=4.9$ 、

$J_{2H,3H} = 11.4$) および生成比が約10%の1,4-diphenyl-1-butene ($\delta_{1H} = 6.40$, $\delta_{2H} = 6.24$, $\delta_{3H} = 2.51$, $\delta_{4H} = 2.78$, $\delta_{C6H5} = 7.03$ - 7.33 , $J_{1H,2H} = 16$, $J_{2H,3H} = 7$, $J_{3H,4H} = 8$) の2種類である。NMRスペクトルの測定はVarian XL-200, 一部VXR-300 FT NMR分光計で行った。DNMRスペクトルの測定は -40°C から 60°C の温度範囲で行った。

[結果と考察]

NMRシフトと過剰電荷

2の ^1H -NMRスペクトルを図1に示す。 α , β プロトンおよびベンゼン環プロトンは、ジアニオン化に伴って、中性分子種よりすべて高磁場シフトしている(表1)。特にその差が大きいのは α プロトンで、Na塩に対しては3.2 ppm, Li塩に対しては3.4 ppmでありLi塩の方が大きい。対イオンの相違によるベンゼン環プロトンのシフト差を見ると、オルト位で0.08 ppm, メタ位で0.15 ppm, パラ位で0.15 ppmだけNa塩のジアニオンの方がLi塩のそれより高磁場シフトしている。2のLi塩とNa塩では、過剰電荷が前者ではよりアタジエン骨格に多く後者では少ない。また、これはフェニル基では逆になっていると結論され ^{13}C NMRスペクトルから得られた結論と一致する。分子内電荷分布を評価するには、 ^1H NMRより ^{13}C NMRの方がより直接的であるとされているので、 ^{13}C 化学シフトからジアニオンの過剰電荷分布を見積った。1(1a)と、2(2a)の ^{13}C NMRスペクトルを図2, 3に示す。また、 ^{13}C 化学シフトを表2に、計算した過剰電荷を表3に示す。過剰電荷は中性分子とジ

Table 1 Proton NMR Data of The Carbanions and Their Precursors at 200 MHz and 23°C

Comp./Metal / Solv.	Chemical Shifts/ppm					Couplings/Hz	
	H _O	H _M	H _P	H _{α}	H _{β}	J _{$\alpha\beta$}	J _{$\beta\beta'$}
1/Na/A ^{a)}	7.23	6.70	5.96	---	5.99	---	15.4 ^{b)}
2/Li/A	6.03 ^{c)}	6.38 ^{c)}	5.33	3.61	4.95	12.2	7.7
2/Li/A ^{d)}	5.92	6.21	5.22	3.66	4.91	e	e
	5.96	6.38					
2/Na/A	5.94	6.18	5.18	3.79	4.96	11.6	9.4
	5.96	6.37					
1a/B	(7.43	~	7.08)	---	6.79	---	e
1a/C	(7.45	~	7.15)	---	6.79	---	11.1 ^{b)}
2a/B	7.44	7.28	7.17	7.01	6.68	15.5	10.6
2a/C	7.41	7.30	7.21	6.92	6.64	15.7	10.3

a) Abbreviations: A, THF-d₆; B, THF; C, CDCl₃

b) Measured from the ^{13}C satellite spectrum.

c) Broad. d) Measured at -60°C . e) Not available.

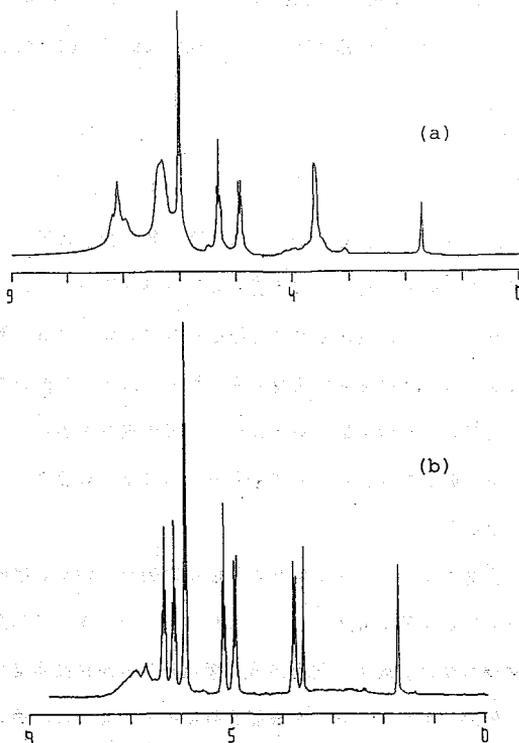


Fig. 1. ^1H NMR spectra of 2 in THF-d₆ with the counter ion of (a) lithium and (b) sodium.

アニオンとの ^{13}C 化学シフト差を用いて得られる。炭素原子の電荷の見積りはfraenkel⁴⁾らの提案した経験式により算出した。2のLi塩のベンゼン環の過剰電荷は0.265となり、Na塩(0.283)より小さい値になる。一方、

α 炭素原子の過剰電荷は、Na, Li塩の順に増加しており、 β 炭素原子についてもK, Na, Li塩の順に増加している。1のベンゼン環の過剰電荷はベンゼン環1つ当たり0.189となり、2よりもその値は小さい。さらに2の場合、 β 炭素原子の過剰電荷が0.207-0.227になり、1の場合の約2倍の値を示している。つまり α , β 炭素原子上の過剰電荷の減少は、ベンゼン環の過剰電荷の増加と関係している。したがって、これらの結果は ^1H 化学シフトから説明された結果と一致する。

NMRスペクトルの温度依存性

α 炭素に結合している2つのフェニル基は、1では等価になっているが、1aでは非等価である(図2)。この事実は、1の $\text{C}_\alpha - \text{C}_\beta$ 結合軸回りには自由回転が存在することを示している。また、2のLi塩では室温で、メタ位のシグナルの融合とオルト位シグナルの広幅化が観測された(図3a)。一方、Na塩では非等価な C_0 と C_m の吸収が観測される。これはLi塩と比較した場合、Na塩の方が

Table 2 Carbon-13 Chemical Shifts of The Carbanions and Their Precursors

Comp./Metal	Assignment					
	C_i	C_o	C_m	C_p	C_α	C_β
<u>1</u> /Na/THF	145.12	121.94(152)	128.67(151)	112.33(158)	87.31	109.21(139)
<u>2</u> /Li/THF	146.65	118.53(149)	128.45(149)	104.86(157)	65.74(146)	97.42(146)
		110.60(149)				
<u>2</u> /Na/THF	146.03	118.32(153)	129.56(146)	103.01(157)	67.73(b)	98.06(146)
		109.69(149)	128.00(148)			
<u>2</u> /K/DME	144.50	118.23(b)	130.05(b)	103.10(b)	b	100.59(b)
		108.60(b)	128.07(b)			
<u>1a</u> /THF	143.40	129.74(160 ^b)	131.47(159 ^b)	128.4 ^b (158 ^b)	145.13	126.61(154)
	140.91	128.36(158 ^b)	128.93(160 ^b)	128.17(160 ^b)		
<u>2a</u> /THF	138.51	127.18(158 ^b)	129.35(159 ^b)	128.21(160)	130.22(158 ^b)	133.66(156)
<u>2a</u> /DME	138.43	127.15(b)	129.36(160)	128.23(161)	130.12(b)	133.66(156)

a) The values in parentheses are the $^1\text{J}_{\text{CH}}$ in Hz. b) With large error or not available because of overlapping or low intensity of the signal.

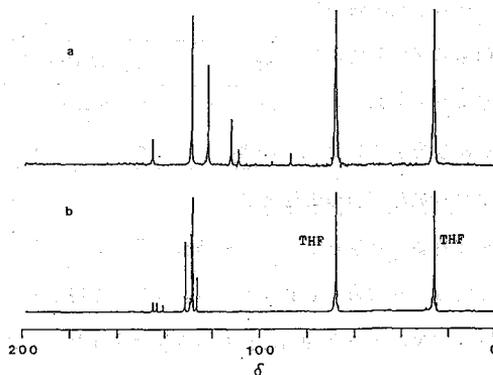


Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of 1 and 1a in THF. (a) 1, sodium salt, (b) 1a

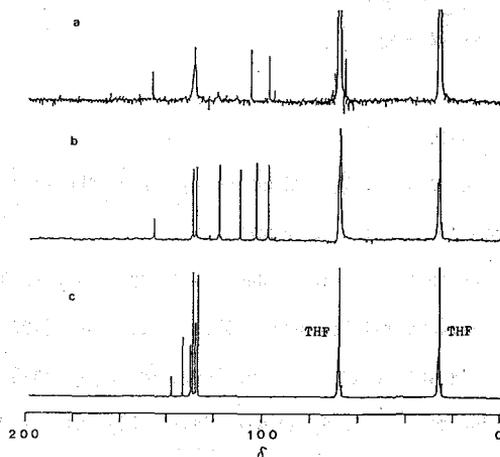


Fig. 3. ^{13}C NMR spectra of 2 and 2a in THF. (a) 2, lithium salt, (b) 2, sodium salt, (c) 2a.

$C_{\alpha}-C_{\beta}$ 結合軸回り Table 3 Comparison of charge distributions of 1 and 2
 の回転障壁が高いため in unit of the absolute value of the charge of an electron

である。この非等価性

Anion/Metal

は、これらの炭素原子

間の $p\pi-p\pi$ 共役により

よって引き起こされる。

そこで、2 の Li 塩に

ついて ^{13}C -DNMR

スペクトルから、オル

ソ位とメタ位の炭素の

吸収の線形解析を行い

$C_{\alpha}-C_{\beta}$ 結合軸回り

の回転に関する活性化

パラメータを求めた。

その結果を表 4 に示す。

/Solvent	q_i	q_o	q_m	q_p	q_{ring}	q_{α}	q_{β}
<u>1</u> /Na/THF	-0.019	0.044	0.010	0.100	0.189	0.361	0.109
<u>2</u> /Li/THF	-0.051	0.079 ^a	0.006	0.146	0.265	0.403	0.227
<u>2</u> /Na/THF	-0.047	0.082 ^a	0.004 ^a	0.158	0.283	0.391	0.223
<u>2</u> /K/DME	-0.037	0.086 ^a	0.002 ^a	0.157	0.296	b	0.207

a) Average values of two positions. b) Not available.

Table 4. Thermodynamical Parameters for the Hindered Rotation of the Phenyl Group of the Lithium Salt of 2

site	$E_a/kJmol^{-1}$	$\log A$	$\Delta H^{\ddagger}/kJmol^{-1}$	$\Delta S^{\ddagger}/JK^{-1}mol^{-1}$
ortho	62.7 ± 1.2	13.0 ± 0.3	60.3 ± 1.1	-3.0 ± 4.0
meta	61.6 ± 1.4	12.7 ± 0.3	59.2 ± 1.4	-10.0 ± 5.0

アニオンの溶液内の骨格構造

出発物質 2a は $J_{\alpha, \beta} = 15.5 \text{ Hz}$ でトランス型になっている (表 1)。また $C_{\beta}-C_{\beta}$ 単結合回りは $J_{\beta\beta} = -10.6 \text{ Hz}$ であって、s-トランスの値を示している。アニオン 2 の $J_{\beta\beta}$ は Li 塩では 7.7 Hz であり、Na 塩では 9.4 Hz という値であった。これらの値から 2 の $C_{\beta}-C_{\beta}$ 二重結合は明らかにシス型を示している。ここで得られた溶液中での構造は、理論計算や X 線結晶解析の構造と一致している。^{5,6)} 一方、1 は $J_{\beta\beta} = 15.4 \text{ Hz}$ という値からは $C_{\beta}-C_{\beta}$ の二重結合の位置ではトランス型をとることが明らかとなった。

References

- 1) D.H. O'Brien, "Comprehensive Carbanion Chemistry," ed. by E. Buncl and T. Durst, Elsevier, New York (1980), 271-322.
- 2) Ushio et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 44, 2559 (1971)
- 3) Yokoyama and Takahashi, Chem. Lett., 589 (1987)
- 4) Fraenkel et al., J. Am. Chem. Soc., 82, 5846 (1960)
- 5) Kos et al., J. Organomet. Chem., 280, C1 (1985)
- 6) Wilhelm et al., J. Organomet. Chem., 280, C6 (1985)

(名工大工) ○吉野 明広、中島 康喜、高橋 憲助

Kinetic Studies by Means of the NMR Technique

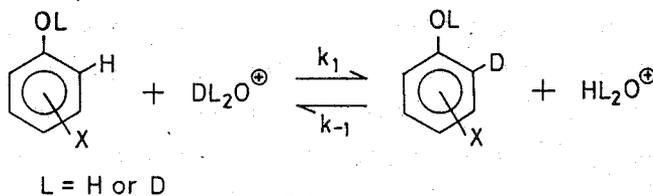
Acid-catalyzed Proton-exchange Reactions of Some Substituted Phenols.

Akihiro YOSHINO, Yasuki NAKASHIMA, and Kensuke TAKAHASHI (Nagoya Inst. of Tech.)

A kinetic study was conducted on the acid-catalyzed proton-deuteron-exchange reactions of several substituted phenols. The rates of the exchange were determined by using the two-bond isotope shifts ($^2\Delta$) on the carbons and the pattern-fitting analyses for the ^{13}C NMR signals. The observed reaction rates can be expressed additively with substituent parameters. The parameters of the para positions are linearly correlated to the σ_p^+ with $\rho = -3.6$.

1. はじめに

水素交換反応は、イオン反応の最も基本的な反応である。したがって、その研究は、様々なイオン反応の有用な指標と与える。水素交換反応を研究するには、水素と重水素の同位体比率(D%)を正確に知る必要が生じる。筆者らは、以前の研究において、 ^1H NMRでの二次の同位体シフト($^2\Delta$)を利用してD%を正確に求める方法について報告した。¹⁾本研究では、スキームに示されるような反応を取り上げ、置換ベンゼンの異なる反応サイトの反応速度を同時に測定する方法について述べる。今回は、20種のフェノール類の環の反応サイトについて反応速度を観測した。さらに、求めた反応速度に対し、置換基に関する加減性があるものとして、これらより置換基パラメータを決定し、良好な結果を得たので報告する。



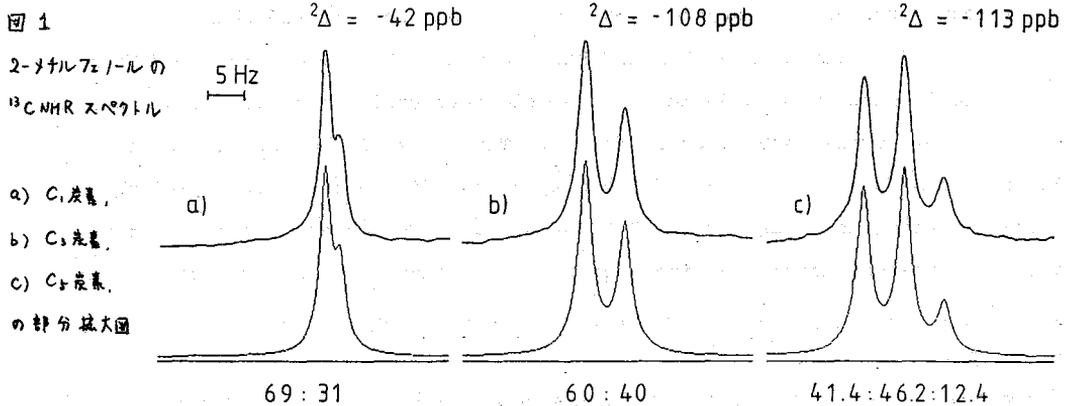
Scheme 1

2. 実験方法

薬品はすべて市販のものをそのまま使用した。反応容器は、手製のパイロックス製アンプルを使用した。試料は、0.01 mol のフェノールに 1g の $\text{HCl}/\text{D}_2\text{O}$ (0.1 wt%) 溶液を加え、その混合物を攪拌子とともにアルアル内に密封して作製した。これを $20 \pm 1^\circ\text{C}$ の空気恒温槽中に保持し、反応が 5-50 D% に達したのを、水で冷やして油相(すは固相)と水相に分離し、前者を NMR 測定に使用した。 ^{13}C NMR 測定は、バリオン XL-200 分光計を 50.3

MHzで操作し、NOE無しのゲート付きデカップリングの方法によって行った。測定条件は、フリップ角 45° 、積算回数24-128回、データポイント32000点、ディレイタイム40秒、スペクトル中2600-3500Hzであった。同位体比率(D%)は、ローレンツ型の線型を仮定し、シャープMZ-80B型パソコンを利用してパターンフィッティングにより決定した。置換基パラメータを求めるlinear regressionは、日立M-260Hコンピュータ(名工大計算機センター)を利用して、倍精度で計算を行った。

3. 結果と考察



D%と反応速度定数の決定

図1は、 ^{13}C NMRスペクトルの測定例である。図の上が実測、下が計算スペクトルを表わしている。スペクトル上の数字は Δ の値を表わし、下の数字は、計算によって求められた強度比を%で表わしている。この例では、反応サイトが2ヶ所あり、観測される C_1 と C_3 の吸収線は二次の同位体シフト(${}^2\Delta$)によって2本となり、一方、 C_5 は3本となる。一般に、フェニール置換体の場合、重水素交換されうるサイトは、 C_2 , C_4 , C_6 のみであるので、それらのD%をp, q, rとすれば、 C_1 , C_3 , C_5 の吸収線の分裂のパターンは、低磁場側より次の式に表わされる比率となる。

$$C_1 \text{ に対して } (100-p)(100-r) : (100-p)r + p(100-r) : pr \quad \dots (1)$$

$$C_3 \text{ に対して } (100-p)(100-q) : (100-p)q + p(100-q) : pq \quad \dots (2)$$

$$C_5 \text{ に対して } (100-q)(100-r) : (100-q)r + q(100-r) : qr \quad \dots (3)$$

もし、 C_2 , C_4 , C_6 のいずれかが置換されていた場合には、対応するサイトの同位体比率を零と定義する。2-メチルフェニールでは、 $p=0$ とし、q, rについてのみ決定する。q, rに対して種々の値を仮定し、計算スペクトルを得、目視によって実測スペクトルと比較し、正しいD%を得る。図1の場合、 $q=40\%$, $r=31\%$ であった。この値は、ウィンドウ処理しないスペクトルより求めて使用した。この方法により、各サイトのD%は、 $\pm 0.5\%$ の精度で決定できた。反応速度定数は、各時間におけるD%の値より算出できる。本実験系は、スキームに示す過程で進むため、D%を用いて反応速度式を表現すると、以下のような式となる。

$$((a+b)/ab)kt = \ln(D_e / (D_e - D)) = -\ln(1 - (D/D_e)) \quad \dots (4)$$

但し、(4)式において、 $k = k_1 + k_{-1}$ 、 D_0 は平衡時の濃度を、 a 、 b はそれぞれ、フェノールと重水の濃度を表わしている。もし、 $k_1 = k_{-1}$ であれば、 D_0 は反応前の初期設定量に一致するために、計算で求めることができる。しかし、 k_1 と k_{-1} の時には、 D_0 は実測されなければならず、この時は、平衡定数 K により次のように k_1 、 k_{-1} を求めることができる。

$$k_1 = k / (1 + 1/K), \quad k_{-1} = k_1 / K \quad \dots (5)$$

測定の結果、3-tentアールフェノール以外のものはすべて $k_1 = k_{-1}$ となった。3-tentアールフェノールの平衡定数 K は、2, 4, 6位に対し、それぞれ、0.0671, 0.206, 0.119であった。表1に20種のフェノール類の38のサイトについて求めた反応速度定数 k_1 を示す。

置換基パラメータ

もしここで、置換フェノール類の反応速度定数が置換基に関し加減性

を持つ、置換基定数の和として現わされると仮定すると、以下の式が成立するはずである。

$$\log k_x = \log k_H + \sum n_i S_i + \sum n_{jab} S_{jab} \quad \dots (6)$$

但し、 k_x は、フェノール類に対し測定された k_1 を表わし、右辺の $\log k_H$ は、linear regressionにより求められる定数項である。 $S_i(X)$ は置換基 X に対し、 i 番目の位置の置換基パラメータである。 $S_{jab}(X, Y)$ は置換基 X 、 Y がそれぞれ a 、 b の位置にある時の反応サイト j の位置の反応速度に及ぼす相乗効果を補正するパラメータである。

これらはすべて置換基間の相互作用に対する補正項であり、 n_i や n_{jab} は、 S_i や S_{jab} に対する係数である。表1のデータのうち、14, 17, 20を除いてlinear regressionを行なった結果が表2に示してある。標準偏差は0.096とより反応速度の誤差より $\log k_1$ の誤差を見積ると、0.03となることより非常により相関が成立している。時に計算により求めた $\log k_H(\text{ortho})$ と $\log k_H(\text{para})$ の値は、フェノールの反応速度定数の実測値と誤差範囲内で一致した。これらのことより、(6)式が成立していると結論される。

表1. 反応速度定数 k_1 (80°C)

Compd. No.	Substituent	Site of Exchange		
		H-2	H-4	H-6
1	H	8.97	16.7	8.97
2	2-CH ₃	---	7.51	5.83
3	3-CH ₃	53.5	156	77.0
4	4-CH ₃	7.94	---	7.94
5	2-OCH ₃	---	0.250	0.153
6	3-OCH ₃	823	4120	4580
7	4-OCH ₃	2.65	---	2.65
8	2-t-C ₄ H ₉	---	1.23	2.12
9	3-t-C ₄ H ₉	13.6	43.7	32.2
10	4-t-C ₄ H ₉	1.60	---	1.60
11	2-Cl	---	0.019	0.019
12	3-Cl	1.56	2.64	2.43
13	4-Cl	0.235	---	0.235
14	2,3-(CH ₃) ₂	---	133	94.3
15	2,4-(CH ₃) ₂	---	---	6.45
16	2,5-(CH ₃) ₂	---	77.1	38.2
17	2,6-(CH ₃) ₂	---	0.668	---
18	3,4-(CH ₃) ₂	53.7	---	61.3
19	3,5-(CH ₃) ₂	546	1370	546
20	2,3-(OCH ₃) ₂	---	132	87.6

表2. 式(6)における置換基パラメータ

Parameter	Substituent			
	CH ₃	CH ₃ O	t-C ₄ H ₉	Cl
$S_0(X)$	0.991	2.403	0.429	-0.791
$S_2(X)$	-0.031	-0.510	-0.730	-1.563
$S_3(X)$	0.941	2.727	0.574	-0.549
$S_{213}(\text{OH}, X)$	-0.171	-0.421	-0.228	0.052
$S_{435}(X, X)$	-0.055	---	---	---
$S_{412}(\text{OH}, X)$	-0.295	-1.303	-0.393	-1.382
$S_{612}(\text{OH}, X)$	-0.113	-1.239	0.124	-1.103
log $k_H(\text{ortho})$ =		-5.056		
log $k_H(\text{para})$ =		-4.788		
Standard Deviation =		0.096		
Probable Error =		0.011		
Calculated from 33 data with 27 parameters.				

(6) 式の計算方法について、改めて具体例をあげて説明する。3,5-ジメチルフェニールを例にとると、(6)式は、次のように表わされる。

$$2,6\text{位の反応速度} : \log k_1 = \log k_H (\text{ortho}) + S_0 + S_p + S_{213}$$

$$4\text{位の反応速度} : \log k_1 = \log k_H (\text{para}) + 2S_0 + S_{435}$$

補正項 S_{213} や S_{435} は、観測サイトが2つの置換基の間にある場合に適用され、それぞれ、OH基と置換基(メチル基)、置換基と置換基が相互作用して反応サイトに及ぼす影響を補正するものである。

ここで、各置換基パラメータの意味について考察する。 S_0 は共役効果と誘起効果に加え立体効果も含んだパラメータである。 S_m と S_p は共役と誘起効果の2つの効果を含み、ハメットの σ_m^+ , σ_p^+ にそれぞれ対応するものである。一方、 S_{213} は、メタ置換体の場合に現われ、2つの置換基が反応サイトに対して立体的に相互作用する効果を表わし、本質的に負の値を示すものである。置換基の大きさの順で考えると、 S_{213} の絶対値は、 $t\text{-C}_6\text{H}_9 > \text{CH}_3\text{O} > \text{CH}_3 > \alpha$ となるはずであるが、実際には、特に CH_3O 基だけがこの序列からはずれて大きな負の値となっている。 S_{435} と S_{213} と同様に2つのメチル基にはさまれた場合の相互作用を示している。しかし、 S_{435} はほぼ零となっている。また、 S_{412} と S_{612} は、オルソ置換体の場合に存在する。表2によれば、 $S_{412} < S_{612}$ であり、2位の置換基の効果は4位に対するほうが6位のそれよりも大きいことがわかる。特に S_{412} と S_{612} は、 CH_3O 基と α 基に対しては大きな絶対値を与えているので、共鳴効果の影響が強いと推察される。

表2に求められた置換基パラメータ S_0, S_m, S_p は、

ハメットの定数に深い関係がある。 S_0 の場合には σ_p^+ の値がないため、代わりに σ_p^+ を用いるとすれば、それは、

非常によい相関を示した。(rは相関係数)

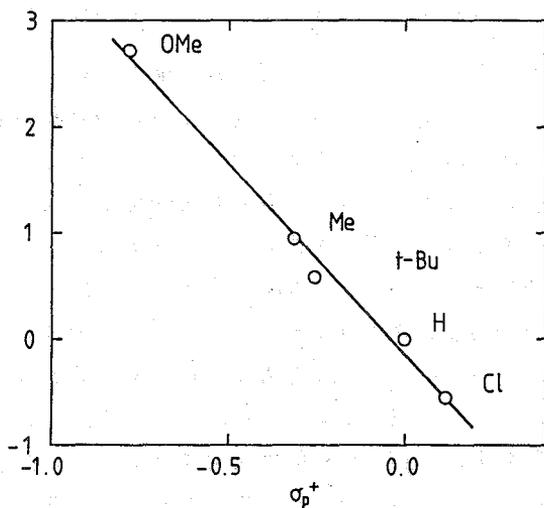
$$S_0 = -3.4\sigma_p^+ - 0.2 \quad (r=0.986)$$

$$S_m = -3.4\sigma_m^+ - 0.2 \quad (r=0.979)$$

$$S_p = -3.6\sigma_p^+ - 0.1 \quad (r=0.995)$$

S_0 がよい相関を示すことより、反応試薬が小さいプロトンの場合には、オルソ位においても立体的な影響を受けにくく、それだけ他の小ささを寄与について議論できると結論される。したがって、本研究によって求められた反応速度定数が、置換基パラメータにうまく分離できたのは、反応試薬の大きさが小さいためであり、それだけこの結果が純粋なデータを示していると言える。

図2 S_p と σ_p^+ の関係



参考文献 1) 吉野他、日本化学会年会秋季年会講演予稿集 p517 (1987), 1K29

(神戸女薬大、甲南大・理) ○杉浦眞喜子 高尾楯雄 山田隆己
中尾正之

CONFORMATIONAL STUDIES OF DIASTEREOMERS OF PROTECTED TETRAPEPTIDES
CONTAINING ACHIRAL AMINO ACIDS AS THE MIDDLE RESIDUES IN SOLUTION

Makiko SUGIURA, Narao TAKAO, Takashi YAMADA, and Masayuki NAKAO

(Kobe Women's College of Pharmacy and Department of Chemistry, Konan University)
The conformational differences of diastereomers of the protected tetrapeptides (1) in CDCl_3 solution have been investigated using ^1H and ^{13}C chemical shifts and ^1H T_1 . These peptides are classified into three groups (A, B, and C) according to the differences of NMR parameters and HPLC separation. The peptides of group A contain the bulky amino acid such as Aib as X, and their diastereomers show the large HPLC separation and some differences on NMR parameters in CDCl_3 . These differences are due to their conformational changes and cannot be observed in $\text{DMSO}-d_6$. The β structure as shown in Fig.2 has been proposed for one LL isomer (I-LL).

[はじめに] 一般にペプチドの立体化学に関する研究は、水溶液など極性溶媒中での議論が多くなされている。しかし、非水溶媒中でのペプチドの挙動も、例えば膜との相互作用などとの関連から興味を持たれるところである。演者らは、



(1) 式で示されるような二個のアキラルなアミノ酸 (X 及び Y) を中間に含む保護テトラペプチドのジアステレオマーを合成し、その HPLC による分離と構造との関係を検討して来たが¹⁾、 CDCl_3 中での NMR の挙動と HPLC による分離との間に興味ある相関が見られ、それは主としてコンフォメーションに関係している様に思われた。そこで今回は、 ^1H 、 ^{13}C 化学シフト ^1H T_1 及び NOE などから、主としてその CDCl_3 中でのコンフォメーションについて検討を加えた。

[実験] ペプチドの合成は、主に WSCD-HOBt 法によった。HPLC による分離の条件は以前に報告した通りである。¹⁾ NMR の測定は主に Varian XL-200 (^1H :200.06MHz, ^{13}C :50.31 MHz) を用いた。 ^1H T_1 、NOE の測定には、濃度 0.06 M に調整し、脱ガス、溶封して測定サンプルとした。又これらの測定はすべて 2 又は 3 回行いその平均値を観測値とした。

[結果と考察]

X、Y の違いによるジアステレオマーの差について

(1) 式の X、Y にそれぞれ表 1 に示されるアミノ酸を含む、9 種類のジアステレオマーについて、HPLC の測定及び、 ^1H 、 ^{13}C 化学シフト、 ^1H T_1 の測定を行なった。表 1 には、それらの内、HPLC の分離係数 α と、 CDCl_3 中での Val, NH の化学シフト差 $\delta_{\text{Val, NH}}$

(LL - DL) 及び、Val.NH、OMe の $^1\text{H T}_1$ の比 $T_1(\text{LL/DL})$ を示した。

この表から明らかなように、これらのジアステレオマーは3つのグループに分けることが出来る。すなわち X に Aib などかさ高いアミノ酸の入ったもの (I-IV: グループ A) は、大きな α を示しており、特に V-VII (グループ B) のそれとは顕著な違いを見せている。しかし X に加え Y にもかさ高いアミノ酸が入ると (VIII, IX: グループ C)、 α はむしろ小さくなり A と B の中間の値になっている。 $\delta_{\text{Val.NH}}$ も、 α と同じ様な傾向がみられ、B ではほとんど差がみられないのに対し、A では大きな差を示している。C はその中間

表1 いくつかのパラメーターにおける LL 体、DL 体の差

グループ	ペプチド		α	$\delta_{\text{Val.NH}}/\text{ppm}$ (LL-DL)	$T_1(\text{LL/DL})$	
	X	Y			Val.NH	OMe
A	I	Aib Gly	1.78	0.52	1.35	0.95
	II	Aib Sar	1.83	1.12	1.21	0.94
	III	Ac ₆ C Gly	1.93	0.64	1.78	0.99
	IV	Ac ₅ C Gly	1.91	0.54	1.15	0.94
B	V	Gly Aib	1.10	0.08	1.04	1.03
	VI	Gly Sar	1.01	0.01	0.94	1.03
	VII	Sar Aib	1.10	-0.04	0.96	0.99
C	VIII	Aib Aib	1.27	0.25	1.66	1.02
	IX	Aib Ac ₆ C	1.17	0.31	0.99	1.01

Aib : L-Aminoisobutyric acid

Ac₆C : L-Aminocyclohexanecarboxylic acid

Ac₅C : L-Aminocyclopentanecarboxylic acid

表2 I-LL, I-DL の ^1H , ^{13}C 化学シフト及び $^1\text{H T}_1$

H	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$				$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$		$^1\text{H T}_1/\text{sec}$			
	(in CDCl ₃)		(in DMSO)		(in CDCl ₃)		(in CDCl ₃)		(in DMSO)	
	LL	DL	LL	DL	LL	DL	LL	DL	LL	DL
Z CH ₂	5.09	5.10	5.00	4.94	67.38	67.34	0.89	0.83	0.48	0.45
	5.14	5.11	5.09	5.06			0.89	0.83	0.48	0.45
C=O					157.40	157.13				
Val NH	5.91	5.39	---	7.42			0.62	0.46	---	---
α CH	3.57	3.86	3.88	3.86	61.54	61.38	0.59	0.45	0.34	0.32
β CH	2.10	2.12	1.96	1.98	30.23	30.48	0.69	0.58	0.34	0.32
γ CH ₃	0.99	0.98	0.84	0.88	18.61	18.33	0.30	0.40	0.26	0.25
γ CH ₃	1.02	1.01	0.87	0.88	19.14	19.20	0.37	0.40	0.26	0.25
C=O					172.13	172.03 ^{b)}				
Aib NH	6.65	6.65	8.38	8.43			0.35	0.28	0.20	0.19
α C					57.20	57.12				
β CH ₃	1.46	1.50	1.33	1.35	23.92	24.96	0.30	0.31	0.21	0.21
β CH ₃	1.58	1.51	1.38	1.39	26.44	25.41	0.37	0.31	0.24	0.23
C=O					173.84	174.20				
Gly NH	7.02	---	7.87	7.81			0.36	---	0.24	0.22
α CH ₂	3.56	3.85	3.59	3.65	43.07	43.24	0.35	---	0.20	0.19
	4.11	3.93	3.63	3.65			0.34	0.33	0.20	0.19
C=O					169.38	169.64				
Phe NH	7.50	7.42	8.05	8.05			0.59	---	0.27	0.26
α CH	4.81	4.76	4.41	4.39	53.88	54.09	1.41	1.35	0.79	0.69
β CH ₂	3.13	3.10	2.98	2.98	37.81	37.58	0.39	0.40	0.22	0.22
	3.26	3.15	3.02	3.02						
C=O					172.51	172.08 ^{b)}				
OMe	3.57	3.65	3.52	3.52	52.02	52.07	1.06	1.11	0.62	0.68

a) 他のシグナルと重なって測定不能。

b) 互いに入れ替わる可能性有り。

である。又 T_1 (LL/DL)を見ると、末端の OMe 基では、いずれもその比が 1 に近いのに比べ、Val.NH については、グループ C 以外では、 α や $\delta_{\text{Val.NH}}$ と似た挙動となっている。

ここでは示さないが、グループ B のものは、他のシグナルについても ^1H 化学シフト、 T_1 及び ^{13}C 化学シフト全て、LL、DL 体間でほとんど大きな差がみられない。このことから、グループ B に属するものは少なくとも CDCl_3 中では特定のコンフォメーションを取ることなくランダムな運動をしており、その為平均的に見て LL 体と DL 体に顕著な差がみられないと考えられる。それに対し、グループ A のものは、Val.NH などに差が見られることから水素結合の関与が予想され、水素結合によって LL 体又は DL 体あるいはどちらもが、それぞれある特定のコンフォメーションをとり、それが α の差、化学シフト、 T_1 の差又は比に反映されていると考えられる。さらにその水素結合を作りやすくしているのは、X のかさ高さによる立体的な要因と思われる。一方グループ C のものは、X に加え Y にもかさ高いアミノ酸が入った為 A で出来ていた水素結合はむしろ作りにくくなり、又二つのかさ高い基によってかなり複雑な状態になっていると考えられる。今回はグループ C についてはこれ以上検討を加えることをせず、以後主にグループ A の I についてより詳細な検討を加える。

I-LL、-DL の CDCl_3 中でのコンフォメーションについて

表 2 に、I の LL 体、DL 体 (I-LL, I-DL) の主な ^1H 、 ^{13}C 化学シフト及び ^1H T_1 を示した。 CDCl_3 中の ^1H 化学シフトでは、Val.NH の大きな差を初めいくつかのシグナルに LL 体と DL 体でのシフト差が見られるが、 DMSO-d_6 中ではほとんど差が見られない。又 CDCl_3 中の ^{13}C 化学シフトにも Aib の二つの Me 基及び、Phe.C=O などに比較的大きなシフト差が見られる。 ^1H T_1 では、10% 程度の実験誤差を考慮に入れても、 CDCl_3 中では Val.NH 初め Val α CH, β CH, Aib.NH などに有意な差が見られるのに対し、 DMSO-d_6 中では、 ^1H 化学シフト同様ほとんど差を観測出来ない。このように DMSO-d_6 で化学シフト、 T_1 に変化がなくなるのは、 DMSO-d_6 の強い水素結合性のため、ペプチド自体での水素結合が切れ、LL 体、DL 体共にランダムな

構造となる為と考えられる。

このことから、 CDCl_3 中での差は水素結合によるコンフォメーションの違いによることが支持される。

^1H 化学シフトにおける Val.NH の大きなシフト差は、この基の水素結合への関与の有無を示唆し、それに伴う電子的あるいは立体的な変化が Val. α CH の化学シフト差に反映されてい

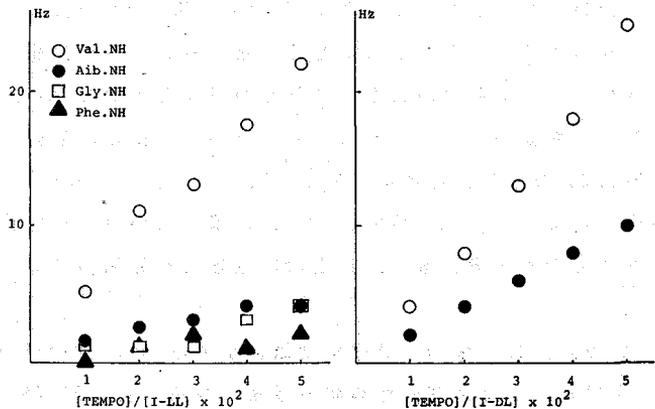


図 1 TEMPO 添加による NH 基の線巾の変化

表3 I-LL, -DL の NOE 値 (%)

Sat.	Obs.	I-LL	I-DL
Val NH	Val α CH	3.3	3.0
	Val β CH	6.4	2.8
Val α CH	Val NH	2.0	3.0
	Val β CH	6.0	4.9
	Aib NH	6.6	5.5
Val CH ₃ x2	Val NH	4.9	5.6
	Val α CH	8.7	7.2
	Val β CH	18.6	19.0
	Aib NH	0	2.5
Aib NH	Val α CH	13.0	10.0
Phe NH	Phe α CH	9.4	12.3
	Phe β CH ₂	2.7	3.2

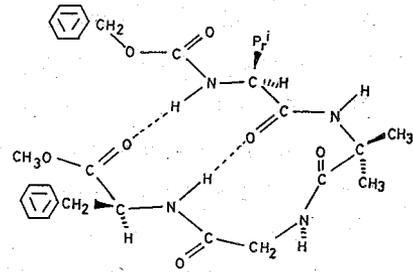


図2 I-LL に予想される

コンフォメーション

ると考えられる。又 Phe.NH は、LL 体、DL 体共にグループ B,C のものに比べ低磁場シフトしていることより、LL、DL 体共 Phe.NH は水素結合に預かっていることが予想される。

これらのことを確かめる目的で、CDCl₃ 溶液中に、常磁性ラジカル 2,2,6,6-テトラメチルピペリジノオキシ (TEMPO) を加える実験を行なった。結果を図1に示したが、LL 体では、Aib.NH のみが半値幅の大きな巾広化を起こし、他の3個の NH は大きな変化を示さなかった。一方 DL 体では、Aib.NH に加え Val.NH もいくらかの巾広化を示した。DL 体では他の2つの NH (Gly.NH, Phe.NH) は芳香族プロトンのシグナルに重なって観測できなかった。この結果から、LL 体では、Aib.NH 以外の NH 基は分子内水素結合に預かっているかあるいは立体的に試薬が近づきにくい位置にあるかのいずれかであることが示唆され、それを満足するコンフォメーションとしては、図2に示すような2個の水素結合を有する β 構造が考えられる。この構造では Val.NH、Phe.NH がそれぞれ水素結合に預かり、Gly.NH は Aib.Me の影響で比較的試薬の近づきにくい位置にある。DL 体では、Val.NH に巾広化が起こることより Val.NH...Phe.C=O の水素結合が切れていることが示唆される。Phe.NH は LL 体と同程度の低磁場シフトを示しているので、Phe.NH...Val.C=O の水素結合は依然残っていると考えられるが、Gly.NH、Gly.CH₂、Aib.Me などの ¹H 化学シフトに変化の見られることからこのあたりの構造もいくらか変化している可能性も示唆される。表3に示したNOEの結果も、これらの予想と矛盾しない。

Xにかさ高いアミノ酸が入ると、そのかさ高い基を分子の外側に向けるように Val.C=O...Phe.NH の水素結合が出来やすくなり、LL 体の場合にはさらに Val.NH...Phe.C=O の水素結合が出来、一方 DL 体では Val.Pr¹基と Aib.NH の立体障害の為、第2の水素結合は作りづらくなると考えると、以上の結果をよく説明出来る。

1) 山田ら、日化第 52 春季年会講演予稿集 II, P1023 (1986).

山田ら、日化第 56 春季年会講演予稿集 II, P1048 (1988).

T.Yamada, et al., Peptide Chemistry 1987, P97 (1988).

北大 低温研 花房尚史

THE CHARACTERISTICS OF HYDRATION WATER OF PROTEIN WITH SOME SURFACE ACTIVE AGENTS USING ¹H-NMR. Naofumi HANAFUSA (Inst. of Low Temp. Sci., Hokkaido Univ.)

At our previous meetings, I reported about the mechanism of protection of sugars and amino acids against protein denaturation due to freeze-thawing and freeze-drying in relation to the behavior of hydration water of protein using ¹H-NMR. As the results, effective protectants reduced unfrozen water of protein extremely and increased remarkably the extent of interaction of hydration water and protein.

This report concerns about the effects of surface active agents on the interaction of hydration water and protein. Doi reported non-ionic surfactant could protect protein against freeze-thawed denaturation, but ionic surfactants did not show such effect. This mechanism on the basis of experimental results were not clarified.

I examined the alterations of unfrozen water and the extent of the interaction of ovalbumin and its hydration water with non-ionic or ionic surfactants measuring the areas of spectrum, molecular correlation time τ_c and translational diffusion coefficient D obtained by relaxation times T_1 and T_2 , respectively using ¹H-NMR to clarify the mechanism. The results were similar as those of sugars and amino acids. Non-ionic surfactants reduced extremely the volume, reduced the value of D , increased remarkably τ_c of unfrozen water of ovalbumin, respectively. Ionic surfactant did not show such effects. From these results, it seems the mechanisms of protection are the same with that of sugars and amino acids. It is considered that the molecules of protectant are substituted with a part of hydration water of protein and form "quasi"hydration layer and protect protein against denaturation.

[始めに] これまで本討論会で、凍結融解、凍結乾燥で変性する蛋白があること、糖類やアミノ酸の添加によりこの変性を防御出来ること、DSC, ¹H-NMR などによる測定で、蛋白溶液の不凍水(水和水)について調べると、有効な防御剤はどれも水含量を著しく減少させると共に、緩和測定から得られる分子相関時間 τ_c を非常に増加させ、水和水-蛋白間の相互作用を強化させている事を示し、その作用機作について論議した^{1,2)}。最近、土井³⁾により、非イオン性の界面活性剤が非常に低濃度でウ¹アルブミン等の凍結変性、失活を防御するが、イオン性の活性剤にはこのような効果が全く見られない事が報告されている。しかしその作用機作についての実験的証明は無い。今回は、前回と同様の方法により、蛋白としてウ¹アルブミン、数種の非イオン性、イオン性界面活性剤を用い、¹H-NMRによりアルブミンの不凍水について各種活性剤を加えた時の量的変化、相互作用の程度を示すと考えられる分子相関時間 τ_c 、並進の拡散係数 D を調べ、先の糖類などとの結果と比較し、その作用機作について論議する。

[材料と方法] 蛋白としては2回結晶ウ¹アルブミンの0.8%水溶液(遠心して不溶成分を除く)、界面活性剤は非イオン性、イオン性各三種類の界面活性剤を用いた。

¹H-NMRはJEOL-FX100(PVT、スピ¹ン ロッキング装置付き)を用いた。90°パルス幅は4 μ sec、観測幅は20KHzである。不凍水量は前回同様、水分量既知の24% LiCl+0.01M MnCl₂(48.5M H₂O)溶液のツッパ¹ルパ¹ルスのNMRスペクトルの面積を基準にして、面積比から求めた。分子相関時間 τ_c は、温度可変して、反転回復法で T_1 を求め、緩和機構がdipole-dipole interactionのみと仮定して、 T_1 の最小値からスピ¹ン間距離 r を求め、近似計算により求めた。拡散係数 D は、スピ¹ン ロッキング法でロッキングパ¹ル¹ W₁を変えて T_2 を測定し、Burnet等⁴⁾の方法で求めた。このとき、界面活性剤自身の水和水の寄与を除くため、活性剤のみの水溶液について同一温度でその不凍水量を求め、ウ¹アルブミンに活性剤を加えた時の見掛け上の測定値から算術的に差し引いた。このとき、各々の分率 f が求めら

Fig.1

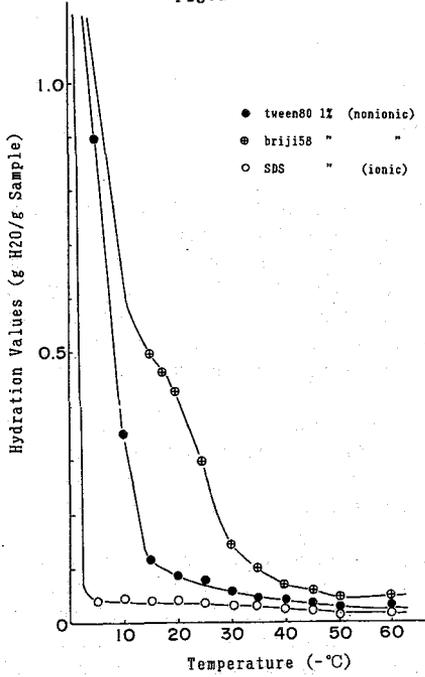
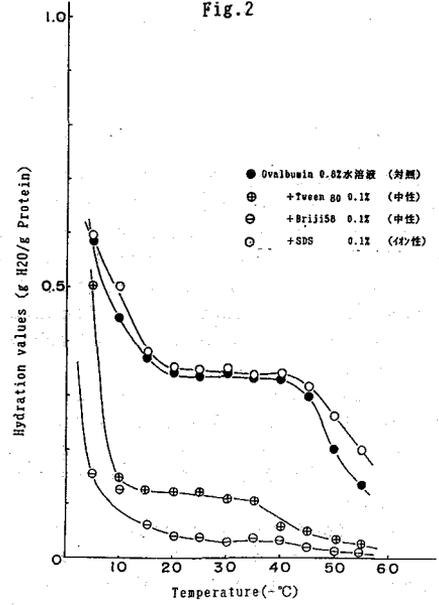


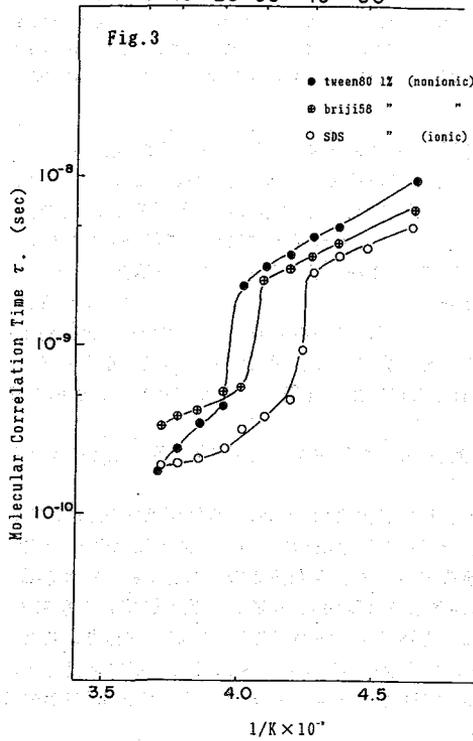
Fig.2



Temperature (-°C)

0 10 20 30 40 50

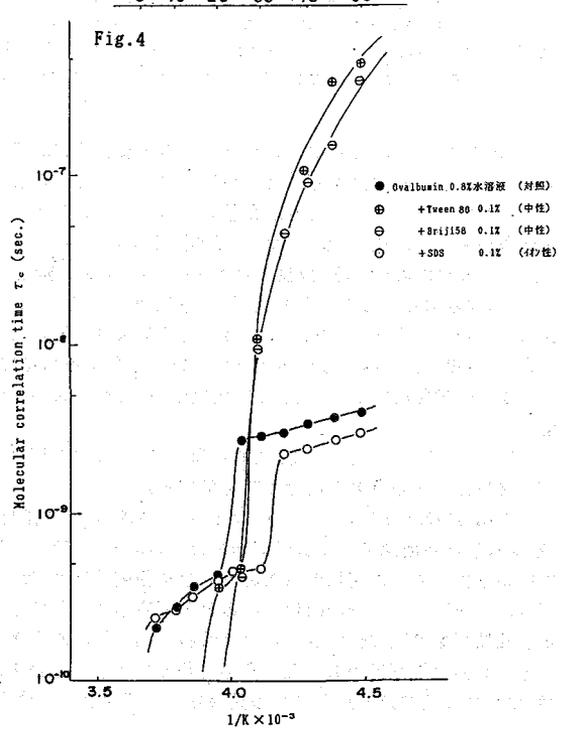
Fig.3

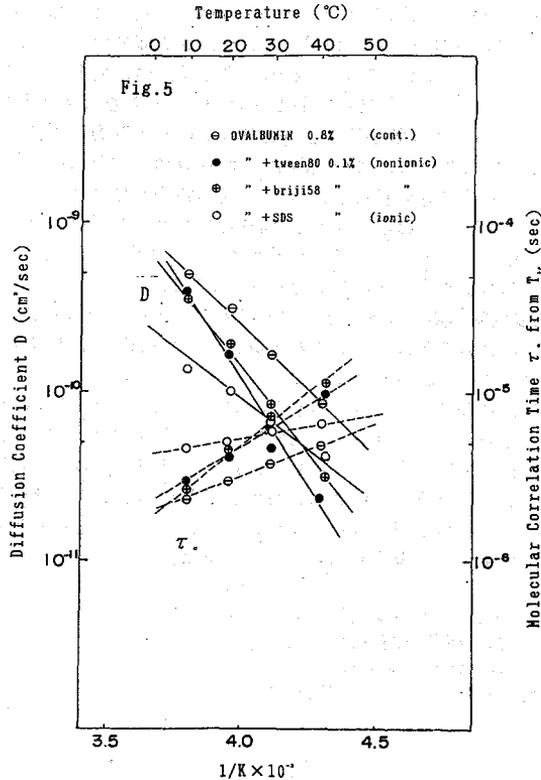


Temperature (-°C)

0 10 20 30 40 50

Fig.4





れるので、緩和と拡散の見掛け上の測定値から、よく知られているように、 $R_{obs} = fR_{pw} + (1-f)R_{aw}$ 、 $D_{obs} = fD_{pw} + (1-f)D_{aw}$ の式を用い、蛋白の不凍水のみのものである値 R_{pw} 、 D_{pw} を求めた。したがって、以下に示すのはワグアルブミン自身の不凍水(水和水)の値である。

【結果と論議】 Fig.1とFig.2はそれぞれ非イオン性の活性剤としてTween80とBrij158、イオン性活性剤としてSDSを用いた時の活性剤のみと蛋白にこれらを加えた時の凍結温度による不凍水量の変化である。測定の都合上、活性剤濃度は変性防御のための有効最小濃度よりかなり高く、勿論C.M.Cよりかなり高い濃度である。Fig.1に見られる様に、非イオン性活性剤に比較して、イオン性活性剤の不凍水量は、溶液が凍結すると非常に少ない。凍結下での様な、言わば「非水的」環境の中では疎水結合は存在し得ないと考えられるので、ミセルは当然崩壊してワグアルブミンの単分子に近くなっていると考えられるが、イオン性の活性剤では、カホソチオンには勿論親水性水和は成り立たず、極性基の数も少なく、水分子はほとんどが静電的結合でチャージしたヘッドグループの周辺に水和すると考えられるが、その数が非常に少ないだろうと言うことは容易に想像される。非イオン性活性剤では、ヘッドグループに極性基の数は多く、水分子とは容易に水素結合で親水性の水和するであろう。蛋白溶液にこれらの活性剤を加えた時の不凍水量を示した例がFig.2であるが、勿論、見掛け上の不凍水量は遙かに大きな値を示し、この結果はFig.1の結果を本にして活性剤自身の水和を差し引いて補正した値である。明らかに、非イオン性の活性剤が共存すると、不凍水量は非常に減少するが、イオン性活性剤では対照の値とほとんど変わらない。

さらに、Fig.3とFig.4は、これらの活性剤の溶液のみと、蛋白にこれらを加えた時の不凍水の回転の分子相関時間を示した例である。Fig.3にみられるように、活性剤溶液のみの場合、やはりイオン性の活性剤の τ は非イオン性のそれよりやや小さな値を示す、即ち比較的相互作用が小さな事を示しているが、特に比較的高温側では非イオン性とイオン性の両者の不凍水の τ の値にそれほど大きな差は無い。しかし、Fig.4に示すように、ワグアルブミン溶液にこれらを加えると、はっきりとした違いを示す。イオン性のSDSを加えたものは、何も加えない対照

の値とほとんど変わらないに拘らず、非イオン性のTween80やBrij58を加えたものでは、 -25°C 以上の温度ではむしろ前二者より τ は小さいが、それ以下の温度では急激に大きな値を示し、不凍水と蛋白間の相互作用が大きくなっていることを示している。更に、 $T_{1\rho}$ から計算した並進運動の拡散係数 D と、同時に求められる $T_{1\rho}$ からの τ の値をFig.5に示す。やはり、比較的高温側では D も τ もそれ程相関は見られないが、 -25°C 以下では非イオン性の方が D は小さく、 τ は大きな値を示し、並進運動も回転の運動と同様、非イオン性活性剤の存在により非常に拘束されていることを示している。この傾向は、TritonX100(非イオン性)を始めとする他の三種の活性剤についてもいずれも同様で、変性防御に有効とされている非イオン性活性剤はいずれも蛋白の不凍水(水和水)量を極度に減少させ、蛋白との相互作用の程度を示す τ を増加させ、 D を減少させるが、イオン性活性剤ではこのようなことは見られない。更に、このような効果が増大する -25°C 以下の領域は、前の討論会でも触れたように、蛋白分子の単層水和、即ち水和第一層のみが存在する温度領域である。そしてこの結果は、以前に報告した、糖類、アミノ酸等の凍結変性防御剤の結果と全く同様である。水と第一層において、水和量を減少させ、蛋白との相互作用を増大させるという事は、bulkの水の凍結により崩壊したミセルの活性剤分子が、そのヘッドグループの極性基で、蛋白表面の極性基に水素結合で結合した水和水の一部と、立体的配置の許す限り置換されこれと結合し、蛋白-水和水-活性剤分子の三者間で水素結合のネットワークを形成して蛋白分子の立体構造を安定化させ、凍結変性から保護するものと考えられる。イオン性の活性剤に関しては、活性剤自身の水和が静電的な水和のため、蛋白の極性基に結合している水分子と容易に置換結合出来ないで、相互にネットワークを形成して擬似的な水和層を形成出来ないで保護作用を示さないものと考えられる。これは糖類などと比べ、inorganicな塩類が、その水和が静電的な水和であるが、全く防御効果が無いのと同じと思われる。即ち、その作用機作に関しては、糖類と界面活性剤のそれとは全く同じと言うことが出来る。

文献

- 1) 花房尚史 (1981) 第20回NMR討論会要旨集
- 2) 花房尚史 (1983) 第22回NMR討論会要旨集
- 3) 土井悦四郎(1986) *New Food Industry* 28,6,7.
- 4) Burnett, et al (1972) *J.Chem.Phys.*, 57, 1293.

(北大理・北大低温研) 山本 勇一・花房 尚文・上平 恒

The dynamic state of polyvinylpyrrolidone-DMSO-water system II

Yuichi YAMAMOTO, Naofumi HANABUSA and Hisashi UEDAIRA (Hokkaido University)

The self-diffusion coefficients of each component for DMSO-water and DMSO-PVP-water systems were measured by the pulsed gradient method at 25°C. For DMSO-water system, the values of self-diffusion coefficients of DMSO and water showed the minimums at $X_{\text{DMSO}} \approx 0.35$ and $X_{\text{DMSO}} \approx 0.4$, respectively, where X_{DMSO} is the mole fraction of DMSO. The self-diffusion coefficients of water and DMSO decrease with increasing the concentration of DMSO in PVP-DMSO-water system. The concentration dependence of the self-diffusion coefficients of water and DMSO is greater at low DMSO concentration.

1. はじめに

先に我々は、疎水基をもつ水溶性高分子であるポリビニルピロリドン (PVP) や、疎水性をもち水の構造形成分子であるジメチルスルホキシド (DMSO) の水溶液について、各系の水やDMSOのメチル基のD核についてスピン格子緩和時間 (T_1) を測定した。その結果、DMSO-水系では、DMSOのモル分率が 0.4 付近で水の運動が最も強く束縛されていて、最も強い水の構造化が起こっていること、DMSO-PVP-水系では、PVPとDMSOの間に疎水性相互作用が働き、DMSO-水系やPVP-水系よりも水分子の回転運動が強く束縛されていることを明らかにした¹⁾。今回は同じ系で、水およびDMSOの自己拡散係数を測定し、各系における水分子やDMSO分子の並進運動がどのように変化するかを調べた。

2. 実験

DMSOは試薬特級品、H₂Oは脱イオン水、PVPは平均分子量 24,500 のものを用い、測定は JEOL JNM-FX 100 FT-NMR を使用した。DMSO-水系、PVP-水系、PVP-DMSO-水系で、パルス磁場勾配法 (PGSE法) により、各々の成分比を変え、水およびDMSOの自己拡散係数を測定した。自己拡散係数、磁場勾配強度は次の式によって計算した。

$$\ln(A_\infty/A_0) = -\gamma^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3) G^2 \quad (1)$$

ここで、 A_0 は磁場勾配がないときのエコーシグナル強度、 A_1 は磁場勾配があるときのエコーシグナル強度、 D は自己拡散係数 ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)、 G は磁場勾配強度 (G cm^{-1})、 γ はプロトンの磁気回転比 ($26752 \text{ rad G}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、 δ は磁場勾配パルス幅 (s)、 Δ は磁場勾配パルス間隔 (s)である。最初に水の自己拡散係数 $D = 2.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ²⁾を基準にして磁場勾配パルス強度 G の値を決定し、次に試料の自己拡散係数 D を測定した。実験はすべて 25°C で行った。

3. 結果

DMSO-水系、PVP-DMSO-水系のNMRスペクトルは、水の ^1H のピークとDMSOの ^1H のピークの二本に分かれ、DMSOの ^1H のピークが水の ^1H のピークよりも高磁場側に現れた。また、PVP-水系のNMRスペクトルは、水の ^1H のピーク一本のみが認められた。図1は、DMSO-水系で、DMSOのモル分率に対してDMSOと水の自己拡散係数をプロットしたものである。水とDMSOの自己拡散係数は、それぞれ $X_{\text{DMSO}} \approx 0.4$ および $X_{\text{DMSO}} \approx 0.35$ で極小値を示す。また、全濃度範囲にわたってDMSOの自己拡散係数は、水の自己拡散係数より小さくなっている。この挙動は、K.J. Packerら ³⁾が測定したDMSO- D_2O 系での D_2O の、また d_6 -DMSO- H_2O 系での d_6 -DMSOの自己拡散係数の挙動に極めてよく一致している。

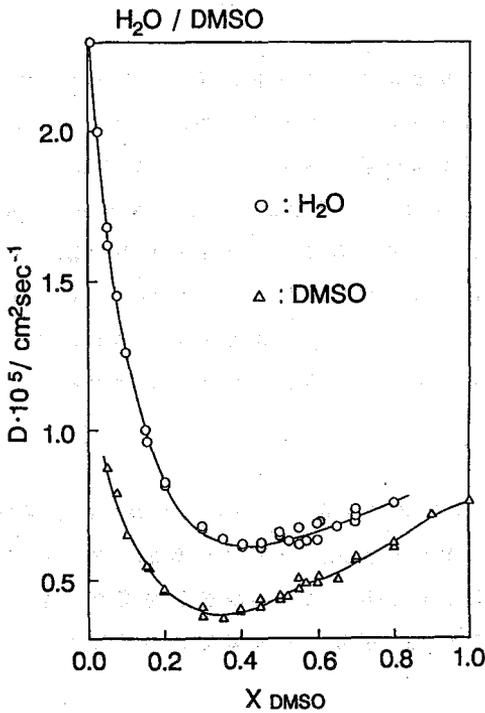


図 1

図1 DMSO-水系での、 H_2O とDMSOの自己拡散係数のDMSO濃度に対する変化

図2 PVP-DMSO-水系での、各DMSO濃度における、 H_2O の自己拡散係数のPVP濃度依存性

図3 PVP-DMSO-水系での、各DMSO濃度における、DMSOの自己拡散係数のPVP濃度依存性

PVP-水系では、PVPの濃度の増加とともに水の自己拡散係数が減少した。図2は、PVP-DMSO-水系で、PVPの濃度に対して水の自己拡散係数をプロットしたものである。また、図3は同じ系でDMSOの自己拡散係数をプロットしたものである。PVP濃度の増加にしたがって、DMSO、水ともに自己拡散係数は減少したが、DMSOのモル分率が大きいほどその減少の程度は小さい。ここで、 X_{DMSO} は、水に対するモル分率であり、 $[PVP]$ は溶液全体に対するPVPのwt.%である。なお、PVPはDMSO濃度が $X_{DMSO} \approx 0.2$ 以上では、DMSO水溶液にほとんど溶けない。

4. 考察

図1で、各濃度において水に比べてDMSOの自己拡散係数の値が小さいのは、水分子に比べてDMSO分子が大きいためである。また、DMSOに比べ、水のほうが高DMSO濃度側で自己拡散係数の極小値を示す。これは、 $X_{DMSO} \approx 0.35$ では、DMSOの周りの水と水のほかに、自由な水分子も存在しているためであると考えられる。DMSO水溶液中の水は、フリーな水と水和している水との二状態からなると仮定すると、水溶液中で測定された水の自己拡散係数 D と水和している水の自己拡散係数 D_w の関係は次の式によって与えられる。

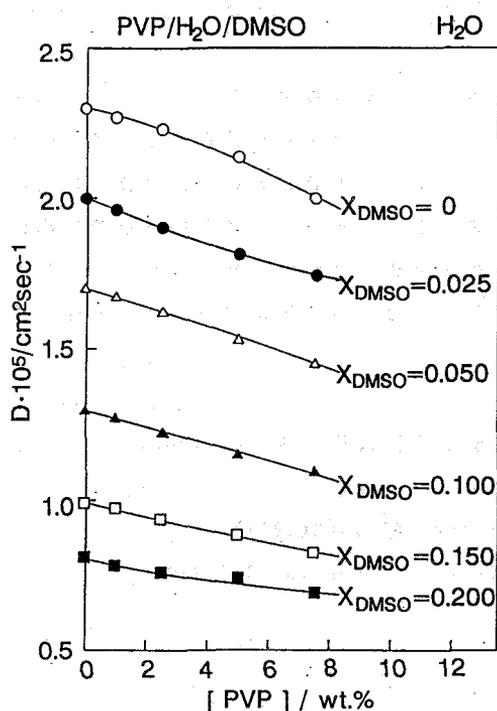


図 2

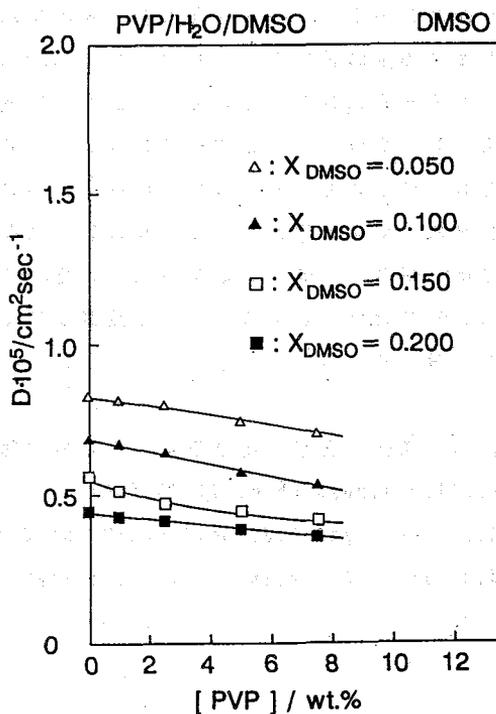


図 3

$$D/D_0 = 1 + n_h (D_h/D_0 - 1) m/n \quad (2)$$

ここで、 D_0 は純水の自己拡散係数で $2.30 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 、 n_h は溶質1分子当りの水和数、 m は溶質の重量モル濃度、 n は純水1kgのモル数である。DMSO-水系でDMSOの低濃度範囲で、DMSOの重量モル濃度 m に対して D/D_0 をプロットし、その一次の係数を(2)式の傾きとして計算すると $D_h = 1.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ が得られる。先に我々は¹⁾、純水の回転の相関時間 $\tau = 2.5 \times 10^{-12} \text{ s}$ に対し、DMSO-水系での水の水の回転の相関時間 $\tau = 4.0 \times 10^{-12} \text{ s}$ という値を得た。したがって、DMSO分子のまわりの水は、並進運動と回転運動は同程度に束縛され、疎水性水和がおこっていることがわかる。ここで n_h は、DMSO分子の水和数がDMSO分子の表面積に比例すると仮定して求めた値 25 mol^{-1} を用いた。

高分子水溶液中の水の自己拡散の減少をWangは、障害効果と水和効果の二つの効果を考へて説明している。PVP-水系での我々の結果は、Wangらが提出した式では説明できなかったので、(2)式を適用した。PVPのモノマー単位の重量モル濃度 m に対し D/D_0 をプロットし、DMSO-水系と同様に計算すると、 $D_h = 1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ となり、先にPVP-水系で我々が得た値 $\tau = 5.2 \times 10^{-12} \text{ s}$ とあわせて、疎水性水和によりPVPのまわりの水の運動が、純水に比べ束縛されていることが分かる。 n はモノマーあたりの水和数であり、 15 mol^{-1} とした。

PVP-DMSO-水系では、三つの成分がそれぞれに相互作用をして、PVP-水系の水、DMSO-水系の水やDMSOの回転運動に比べ、より強く束縛されている¹⁾。図2と3に示されているようにこの系では、PVPに対する水とDMSOの自己拡散係数のPVPに対する濃度依存性は、DMSO濃度が小さいほど大きい。DMSO-水の二成分系ではDMSOのモル分率が0.35付近で最も水の構造化の程度が大きく(図1)、このためPVPによる水やDMSOの熱運動束縛の効果が、DMSO濃度が小さいほど強く現れると考えられる。

1)山本、花房、上平; 高分子学会北海道支部研究発表会講演要旨集, p47(1988)

2)R.Mills, J.Phys.chem., 77, 685(1973)

3)K.J.Packer and D.J.Tomlinson; Trans. Faraday soc., 67, 1302(1971)

4)D.D.Eley, M.J.Hey, and B.L.Winterringham; J.Solution Chem., 5, 787(1976)

(北大、理)°石村 美雪、上平 恒

³¹P-NMR of Phosphate ion in α-Chymotrypsin phosphate buffer solution.

° Miyuki Ishimura and Hisashi Uedaira (The University of Hokkaido)

The spin-lattice relaxation times T_1 of ³¹P of phosphate ion in sodium phosphate buffer and its α-Chymotrypsin solution were measured at room temperature. It was found that the relaxation rates ($1/T_1$) of ³¹P in phosphate buffer increased with increasing its concentration but decreased in α-Chymotrypsin solution. By use of the two state model, we calculated the number of the absorption site and the absorption equilibrium constant of phosphate ion to the surface of protein as 42 and 66, respectively. The number of the absorption site is in good agreement with the numbers of side groups having positively charged or amide groups on the surface of α-Chymotrypsin molecule reported by the X-ray analysis.

1. 序

先に我々はα-Chymotrypsin溶液の塩化ナトリウム溶液及び燐酸緩衝溶液(ナトリウム塩)に対してタンパク質の部分比容 v_2 ・部分比断熱圧縮率 β_2 ・不凍水量 w などの物性値が溶媒のイオン強度に依存し、その変化の仕方が二つの溶媒で異なることを見いだした¹⁾²⁾。二つの系でナトリウムは共通のカチオンなので、これら物性値の違いはタンパク質とアニオンとの相互作用に強く依存していると考えられる。この考えを確かめるために、今回燐酸緩衝液系について燐酸の³¹P核のスピン-格子緩和時間 T_1 をタンパク質濃度一定で溶媒の濃度を変えて、室温で測定した。緩和速度($1/T_1$)の溶媒のイオン強度に対する依存性をα-Chymotrypsinに対する燐酸イオンの吸着反応によって検討した。

2. 実験

溶媒の燐酸緩衝液には市販の特級の燐酸1ナトリウム塩と2ナトリウム塩を1:2のモル比で混合した溶液を用いた。水は蒸留水をイオン交換カラムに通した脱イオン水を使用した。α-ChymotrypsinはSigma社の3回再結晶体をそのまま使用した。タンパク質の濃度は1%である。

測定にはVarian XL-200を使用した。共鳴周波数は80.96MHzであ

る。また、試料は2重管にした10mmサンプル管の外管側に入れ、内管側にはロック用のD₂O(99.5%)を入れた。測定は室温でInversion-Recovery法を用いデカップラーをかけて行った。また、溶媒のイオン強度を変えて、溶媒のみの系とタンパク質を加えた系の双方について各々T₁の測定を行った。今回の測定では得られたシグナルは1本であり、磷酸1イオンと2イオンは区別できなかった。

3. 結果及び考察

[緩和速度のイオン強度依存性]

図に溶媒のみの系とタンパク質を加えた系双方に付いて得られた緩和速度(1/T₁)の溶媒のイオン強度依存性を示す。図で、○と□はそれぞれタンパク質溶液系と磷酸緩衝液系で得られた実験点を示している。図から明らかなように、緩和速度(1/T₁)は溶媒のイオン強度Iの増加に対して溶媒のみの系では直線的に増加しているが、タンパク質を加えた系では、下に凸の2次曲線的变化を示している。図の実線はこれらの実験点からそれぞれ最小自乗法で計算した次の実験式をプロットしたものである。

磷酸緩衝液系:

$$1/T_1 = 1/T_{1,0} + K \cdot I = 0.0706 + 0.3864 I \quad (1)$$

タンパク質溶液系:

$$1/T_1 = 1/T_{1,0} + K_1 \cdot I + K_2 \cdot I^2 \\ = 0.4260 - 2.092 I + 11.128 I^2 \quad (2)$$

(1)式と(2)式でIは溶媒のイオン強度を、添え字のfとbはそれぞれタンパク質に結合していない(free)磷酸イオンとタンパク質に結合した(bound)磷酸イオンの緩和時間であることを示している。

[磷酸イオンの回転の相関時間]

³¹Pのようなスピン量子数が $\frac{1}{2}$ の核では緩和速度は分子間の相互作用による部分(inter)と分子内の相互作用による部分(intra)の和で表される。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1,intra}} + \frac{1}{T_{1,inter}} \quad (3)$$

$$\frac{1}{T_{1,intra}} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{T_1} = \frac{3 \mu_0^2 \hbar^2 r_i^4 \tau_c}{2 (4 \pi)^2 R^6} \quad (4)$$

$$\frac{1}{T_{1,inter}} = \pi r_i^4 \hbar^2 N_i \tau_c \left(1 + \frac{2 a_0^2}{5 D \tau_c} \right) \frac{1}{a_0^3} = \frac{\pi r_i^4 \hbar^2 N_i}{3 D R} \quad (5)$$

ここで、 μ_0 は真空の透磁率、 \hbar はプランク定数、 r_i は核の磁気能率、 τ_c は回転の相関時間、 N_i は観測される核種の数、 D は拡散定数、 R は分子半径であり、それぞれ次のような値をとる。

$$\mu_0 = 4 \pi \times 10^{-7} \text{ /mKgs}^{-2} \text{A}^{-2}; \quad \hbar = h / 2 \pi = 1.054 \times 10^{-34} \text{ /m}^2 \text{Kgs}^{-1}$$

$$R(P-O) = 1.55 \text{ \AA} : r : (^{31}\text{P}) = 10.83 \times 10^7 / T^{-1} \text{ s}^{-1}$$

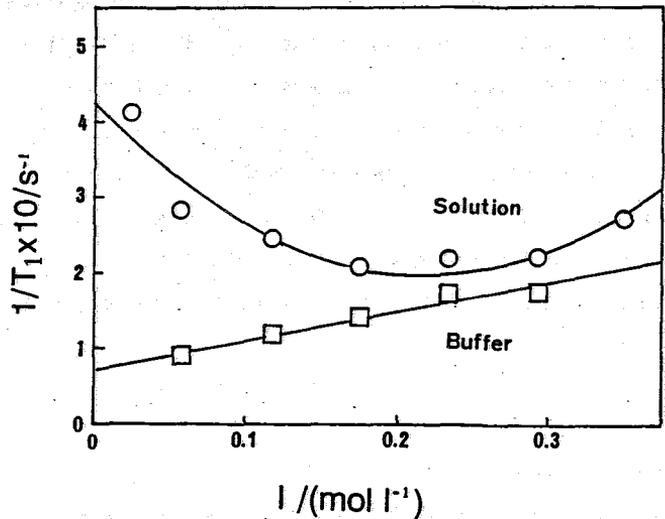
(1)・(4)式と、これらの定数を用いて τ_c の値を計算すると、

$$\tau_c = \frac{1}{T_{1, \text{intra}}} \times \frac{2(4\pi)^2 R^6}{3 \mu_0^2 \hbar^2 r^4} = 4.3 \times 10^{-11} / \text{s}$$

となった。 H_3PO_4 に対してMcCainとMarkleyは $\tau_c = 1.0 \times 10^{-11} / \text{s}$ と
言う値を報告している³⁾。今回我々が得た $4.3 \times 10^{-11} / \text{s}$ という値は彼らの値と良く一
致しているといえる。

【 燐酸イオンの吸着 】

図に示す様なタンパク質の存
在によって生じた緩和速度の挙
動の大きな違いは燐酸イオンが
 α -Chymotrypsin分子に吸着し
たためと考えられる。その理由
として; ①各々の $I = 0$ への外
挿値、 $1/T_{1r}$ と $1/T_{1b}$ 、で
 $1/T_{1r}$ は $1/T_{1b}$ の約6倍と
大きく異なる②タンパク質溶液
系の緩和速度が全測定範囲にわ
たって燐酸緩衝液系よりも大き
い③緩和速度の溶媒のイオン強



Figure

度に対する依存性が大きく異なる、と言う3点が上げられる。①~③の挙動の原因として
吸着以外には溶液の粘性の増加の寄与が考えられる。タンパク質による溶液の粘度の増加
はEinsteinの式を用いて見積ることが出来る:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2.5\psi = 1 + 2.5C\bar{v} \quad (3)$$

ここで η は溶液の、 η_0 は溶媒の粘度、 ψ は等価体積分率、 C はタンパク質の濃度、 \bar{v} はタ
ンパク質の部分比容である。(本来は \bar{v} ではなく、見かけの比容 v であるが、タンパク質
見かけの比容 v は数%程度の濃度範囲ではほとんど濃度依存性がないため \bar{v} で十分に近似
できる。)先に我々が溶媒の各イオン強度で測定した結果から、 α -Chymotrypsinの \bar{v} はイ
オン強度 I の増加と共に増す事が判っている¹⁾。 I が高い程、溶液の粘度の寄与は大きく
なるが、実験の濃度範囲内で(3)式から計算した η の増加は最大で10%程度であった。
すなわち、粘度の寄与だけでは明らかに①と③の挙動を説明できない。Norneらは、

³⁵Cl-NMRから α -Chymotrypsinには塩化物イオン Cl^- 等のアニオンを吸着するサイト
があると報告している⁴⁾。以上の考察より、今回得られた緩和速度の挙動は燐酸イオンの
吸着によるものであると結論した。

タンパク質溶液中の燐酸イオンはタンパク質に結合した状態で、あるいはバルクの溶媒

中に自由な状態で存在していて、その2つの状態の間で十分に速い交換が行われているとする(2状態モデル)。また、今回の実験のように十分に磷酸イオンの濃度が薄い場合には、磷酸イオンの吸着はLangmuir型の単分子層吸着であると考えられる。このような条件に対してNorneらは次の吸着式を示した⁴⁾。

$$\Delta \frac{1}{\Gamma_1} = \frac{1}{\Gamma_{1, \text{sol}}} - \frac{1}{\Gamma_{1, \text{buf}}} = \frac{n K C_p}{1 + K C_p} \frac{1}{\Gamma_{1,0}} \quad (4)$$

ここで、添え字のsolはタンパク質溶液系を、bufは磷酸緩衝液系を示している。またnはタンパク質1分子当りの飽和吸着サイト数、Kは吸着反応の見かけの平衡定数、C_pはタンパク質濃度(mol/l)、C_sは磷酸イオンの濃度(mol/l)である。(4)式を用いて計算した結果、n = 42、K = 66という値が得られた。

α-ChymotrypsinはX線解析の結果⁵⁾、タンパク質表面に20個の正の荷電基(Arg 3個, His 2個, Lys 14個, アミノ末端)と22個のアミド基(Asn 13個, Gln 9個)を持つ残基側鎖計42個が露出していることが判っている。今回の実験から得られた42個という磷酸イオンの吸着数は妥当な値であると言える。

Reference

- 1) 石村 美雪、上平 恒、日本生物物理学会 第24回年会講演予稿集、p.61 (1986)。
- 2) 石村 美雪、上平 恒、日本生物物理学会 北海道支部例会要旨集、(1988)。
- 3) D.C.McCain and J.L.Markley, J. Am. Chem. Soc. 102, 5559 (1980)。
- 4) J.E.Norne, H.Lilja, B.Lindman, R.Einarsson and M.Zeppezauer, Eur. J. Biochem. 59, 463 (1975)。
- 5) J.J.Birktoft and D.M.Blow, Biopolymers 25, 1623 (1986)。

第 3 日

9 月 24 日(土)

(北大理)○市川和彦・和泉光則

Magnesium-25 Nuclear Magnetic Resonance in ATP+Mg²⁺ Solutions—Catalysis of Mg²⁺ in Transfer Reaction of Phosphate Ion—

Kazuhiko Ichikawa and Mitsunori Izumi

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

NMR spectroscopy of ²⁵Mg is applied to a study of conformation and chemical bond of Mg²⁺ binding to ATP. ²⁵Mg NMR spectra have been measured as a function of temperature between -2°C and 36°C at a ratio R=0.25 of Mg²⁺ to ATP. They have been obtained for 0 ≤ R ≤ 10 at room temperature at a constant Mg²⁺ concentration of 25 mM with various ATP concentrations. (1) The observed full width at half maximum intensity $\nu_{1/2}$ of ²⁵Mg is significantly broadened for R < 1. (2) The temperature dependence of logarithmic spin-spin relaxation rate, which has been calculated as $\pi\nu_{1/2}$, shows the deviation from Arrhenius equation below ca. 15°C. The results of (1) and (2) demonstrate that ATP-bound Mg²⁺ has two sites of Mg²⁺ binding to ATP: ATP-bound Mg²⁺, (Mg²⁺)_{ind} separated from ATP by water molecule and tightly site-bound Mg²⁺, (Mg²⁺)_{dir} which loses the water molecule from the first coordination sphere.

各種のリン酸塩の加水分解を触媒する酵素は顕著な活性を示す為にはマグネシウムを必要とする。マグネシウムイオンがリン酸残基に結合する事は、リン酸残基を分極してそのリン原子への溶媒分子による求核置換を促進させるといわれている。リン酸基移動反応におけるMg²⁺の触媒的役割は、(1)結合部位に基づくリン酸塩の結合開裂部位の選択と(2)相互作用に基づく生体分子の立体配向の設立である。(1)が反応速度増進効果にかならずしも機能せず、第三者の化学物質として例えば酵素の存在が必要となる。(2)の因子はリン酸を持つ生体分子が酵素の活性部位との配位構造に重要な働きを示すと考えられる。

溶液内での結合部位の決定が、結晶構造の場合から議論可能であろうか。たとえば、結晶解析データから、アデノシン三リン酸(ATP)へのMg²⁺の結合部位と立体配向が推定された。溶液中での局所構造と結晶中での構造はそれぞれに影響を及ぼす因子が異なる故、この考え方には、問題点が指摘される事になろう。溶液系では短範囲秩序しか

持たない故、長周期規則性を持つ結晶とは Gibbs の自由エネルギー安定化の条件は異なってくるはずである。更に、水溶液中の金属イオンは並進の自由度を持っている故、そのイオンの局所構造及び生体分子の立体配向がゆらいでいて、いわゆる“ゆらぎ”という現象が生体系水溶液中において存在している。Mg²⁺のATPへの配位構造と共に、金属イオンと生体分子の結合・解離の動力学的性質も又明らかにする必要がある。

本研究においては、Mg²⁺の触媒的役割の解明を目的に、²⁵Mg核磁気共鳴(NMR)によるATPへのMg²⁺の結合様式の決定と配位構造に関する研究成果を主に報告する。

<実験> 試料: ATP (Adenosine-5'-Triphosphoric Acid, Fluka) 及び ²⁵MgO (85.8 at. % ²⁵Mg の同位体置換体, MSD) を用いて、Mg²⁺濃度を 25 mM 一定とし、ATP との濃度比 R (= [Mg²⁺] / [ATP]) が 0.25, 1, 2, 3, 6 及び 10 の pH = 7.3 の水溶液を作製。

方法: [核磁気共鳴] Bruker MSL-400 を用いて ²⁵Mg NMR スペクトル (共鳴周波数約 24.5 MHz) の R 依存性及び R = 0.25 にあける温度依存性を測定。測定温度範囲は -2°C から 36°C。前遅延時間 (delay time) $t_d = 150 \mu s \sim 250 \mu s$, 積算回数は $1.5 \cdot 10^4 \sim 4 \cdot 10^5$, 周波数幅は 2 KHz \sim 20 KHz, D₂O 内部ロック方式を行った。尚、これまでの ATP + Mg²⁺ 系の NMR 測定には、JEOL GX-500 に用いた ³¹P NMR スペクトル (共鳴周波数約 202.5 MHz) 及び反転磁化回復法によるみかけのスピナー格子緩和速度 R_1^{obs} がある。*) [粘性係数] 改良オスワルド型毛細管粘度計 (動粘度測定範囲 0.9 \sim 2 cst) を用いて粘度の精密測定を行った。恒温槽には水冷式電子恒温装置を用いて、 $\pm 0.15^\circ C$ の温度制御精度で行った。

<結果> 室温における ²⁵Mg スペクトルの R 依存性を 1 より小さい場合も含め図 1 に示す。R が 1 以下の場合の ²⁵Mg NMR スペクトル測定はこれまで報告されていない。室温ではすべての R に対して Lorentz 型を示したので、非線型最小二乗法を用いて Lorentz 関数の全半値幅 $\nu_{1/2}$ を求めた。よって $\nu_{1/2}$ の R 依存性を図 2 に示す。(1) R = 1 \sim 2 で $\nu_{1/2}$ の急激な増加が認められる。(2) ATP が入っていない場合 (R = ∞) の $\nu_{1/2} = 40$ Hz に対し、 $10 \geq R > 6$ の範囲で $\nu_{1/2} = 60$ Hz 程度の値を示している。(3) R ≤ 1 では、 $\nu_{1/2}$ は約 $300 s^{-1}$ 以上で、アコ錯体 Mg²⁺ の場合と比較し 1 ケタ余りも大きい。観測値のスピナー格子緩和速度 R_2^{obs} を $\pi \nu_{1/2}$ として与え、R = 0.25 にあける R_2^{obs} 及び $\eta / \rho T$ (η : 粘性係数, ρ : 密度, T: 絶対温度) の温度依存性を図 3 に示す。(1) 約 15°C 以上では、アレニウス型の温度依存性を示し、 $\eta / \rho T$ の温度依存性と類似している。(2) 低温側では、0°C で極大値を持ち、10°C で鞍部を示す特異な温度依存性を示す。

*) 市川和彦・神隆・和泉光則, 日本化学会誌, 1988, (4), p 648 \sim 653.

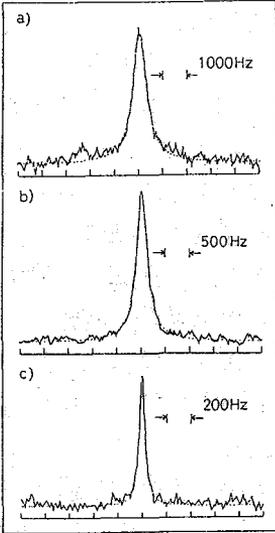


Fig.1 Effects of $R=([Mg^{2+}]/[ATP])$ on the ^{25}Mg spectra at room temperature and a constant Mg^{2+} concentration of 25 mmol dm^{-3} . (a) $R=0.25$, (b) $R=1$, (c) $R=10$. The dotted purely Lorentzian line simulated the experimental spectra

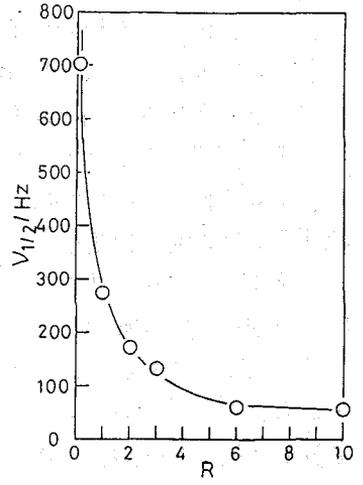


Fig.2 ^{25}Mg Line widths $\nu_{1/2}$ at room temperature as a function of R

<考察> ATPは $pH=7\sim 8$ の溶液中でリン酸の水素のうち3つを放出し、残り1個の水素(γ位の非橋頭酸素の1個に配位)を70~100%解離している。 $0 < R < 5$ で $pH=7$ 以上の水溶液中でのATPと Mg^{2+} との錯体の生成定数 $K_f (= [MgATP^{2-}]/[Mg^{2+}][ATP^{4-}])$ は、吸収スペクトル, ^{31}P NMRのケミカルシフト及び電位差測定法から $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ と決定されている。 よって $K_f=10^4$

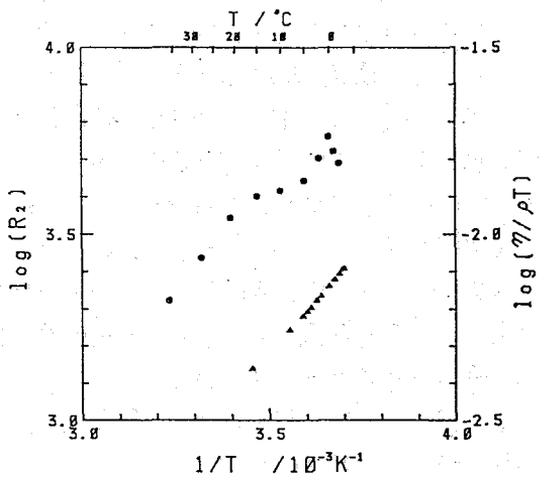


Fig.3 Spin-Spin Relaxation Rates R_2^{obs} obtained from $\pi\nu_{1/2}$ of ^{25}Mg in $ATP + Mg^{2+}$ (25 mmol dm^{-3}) at $R=0.25$ as a function of the reciprocal temperature

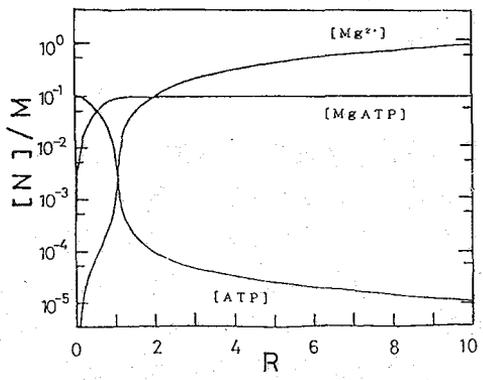


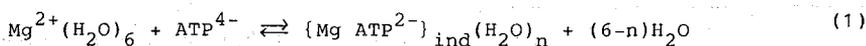
Fig.4 Concentrations of Chemical Species in $ATP + Mg^{2+}$ Solutions at $K_f=10^4$ as a function of R

の場合、各化学種の濃度のR依存性を図4に示す。 $R \leq 1$ では $[Mg ATP^{2-}] \gg [Mg^{2+}]$ であって、 Mg^{2+} の水和イオンの状態ではほとんど存在していないことがわかる。

〔 Mg^{2+} の ATP への結合部位 〕 ^{31}P NMR の測定から、(1) $R > 0$ に対し、 α 位および δ 位 ^{31}P では 1 ppm 以下のケミカルシフトに対し、 β 位 ^{31}P のみ为数 ppm である。
 (2) $R = 0.25$ で $0^\circ C$ で β 位 ^{31}P NMR スペクトルの低磁場にサブピークを示している。
 (3) β 位 ^{31}P のスピン-格子緩和速度 βR_1^{obs} (反転磁化回復法) の温度依存性は、 α 、 δ 位 ^{31}P のそれ等と相異なって $10^\circ C$ 以下で減少している。 ^{31}P ($I = 1/2$) の場合、同種スピン間のカップリングを伴う磁気的雙極子-雙極子相互作用による緩和機構の理論からは ^{31}P の R_1 が温度減少と共に増大すると結論され、 α 、 δ 位 ^{31}P の場合の結果と一致する。
 (1) ~ (3) の結果から、 Mg^{2+} は β 位 P に結合している非橋かけ酸素原子間 (X 線結晶解析からは原子間距離 2.7 \AA) に位置し、それ等の酸素原子と配位結合している。よって β 位と δ 位のリン酸基にある非橋かけ酸素原子 1 個ずつと (この場合の酸素原子間距離 $3.3 \text{ \AA} \sim 5 \text{ \AA}$)、またがって結合している状態は存在しない。しかも、前者の配位形態の方が結合開裂部位の選択性を高めると考えられる。

〔 Mg^{2+} と ATP^{4-} との結合様式 〕 下記に示す実験的検証から、いわゆる錯体 $Mg ATP^{2-}$ を分子レベルで構造・結合様式を考察すると、 Mg^{2+} と ATP の非橋かけ酸素との間に水分子を介する場合と、介さない場合の外圏錯体 $\{Mg ATP^{2-}\}_{\text{ind}}$ と内圏錯体 $\{Mg ATP^{2-}\}_{\text{dir}}$ が存在する。(1) 図4で、 $R \leq 1$ で $[Mg ATP^{2-}] \gg [Mg^{2+}]$ であって、アコ錯体 $Mg^{2+} (H_2O)_6$ がほとんど存在しない。然しながら、 $R < 1$ で ν_2 が顕著に増加している (図2参照)。(2) $R = 0.25$ における $R_2^{\text{obs}} (= \pi \nu_2)$ が非アレニウス型温度依存性を示している (図3参照)。 ^{25}Mg NMR の ν_2 に異なる Mg^{2+} の化学種からの寄与があって、温度効果によって一つの化学種 (内圏錯体からくる広幅の成分) のスペクトルへの寄与が急激に変化するからである。

〔 Mg^{2+} の ATP^{4-} との結合・解離反応 〕 ^{25}Mg に対して3種類の溶存状態が存在する故、結合・解離反応は



(2) 式の反応は、溶媒分子である水分子が β 位 P の非橋かけ酸素に配位結合している Mg^{2+} に求核反応をおこし、その結果水分子をとあして非橋かけ酸素と相互作用することになる。 Mg^{2+} からみれば (2) の反応は配位子置換反応といえる。よって反応式 (2) の動力学的・平衡論性質を決めるのは溶媒効果である。その効果によって $\{Mg ATP^{2-}\}_{\text{dir}}$ の寿命と濃度分率を大きくする事が可能であろう。その結果、アルコール分子が共存していれば、RO基の β 位 P への求核反応がより容易になる。選択的な P-O 結合開裂が進行する。 Mg^{2+} の結合部位は、金属イオンの寸法効果が重要になると考えられる。

(近畿大・理工) ○宗像 恵・北川 進・田村 義隆

 ^{113}Cd NMR. A COMPARISON IN THE STRUCTURE OF CADMIUM(II) COMPLEXES BETWEEN SOLUTION AND SOLID STATES.

Megumu MUNAKATA, Susumu KITAGAWA, and Yoshitaka TAMURA (Kinki University)

^{113}Cd NMR studies were carried out on the cadmium(II) complexes with halide ions and phosphine ligands in solution and solid states. The chemical exchange rates of labile Cd complexes in methanol solution were successfully reduced by the use of low temperature (-90°C) and ^{113}Cd resonances of CdI_n^{2-n} ($n=0-3$), CdBr_n^{2-n} ($n=0-2$) and $\text{CdI}_2(\text{PPh}_3)$ were observed in solutions and assigned. It was found that the drastic difference in the chemical shifts between CdI_2 and CdI_3^- are attributable to the change from octahedral to tetrahedral geometries. The solid ^{113}Cd NMR resonance of $\text{Cd}_2\text{I}_2(\text{PPh}_3)_2$ was observed at 600 ppm.

(1) カドミウムは4d軌道に10個の電子をもち、最外殻軌道5sに2個を有する電子構造 $4d^{10}5s^2$ である。2価状態の d^{10} 電子構造が最も安定で、1価及び3価状態は確認されていない。すなわちカドミウムは限られた酸化状態しかとらない及び2配位構造をとることができるという点では非遷移金属に近い。一方、アンチモン、アミン類、ハロゲン、シアンなどの配位化合物を生成しやすくしかも4,5,6配位構造もとることができ、遷移金属と類似の性質を示す。このようにカドミウムは遷移金属と非遷移元素の両方の性質を有する極めて特異的な元素である。特に四面体と八面体は錯体の主要な配位多面体であるが、どのような条件下で四面体あるいは八面体をとるのか興味を持たれる。一方、NMRの最大の利点の一つは固体と溶液の両方の構造を知ることができることである。溶液内構造として結晶構造をそのまま用いて論じる場合が多い。両者の構造が違う可能性があることはしばしば指摘されている。演者らは結晶状態ではバックリングによって溶液状態とは異なる可能性があることをCu(I)錯体のX線結晶構造から指摘してきた¹⁾。このような観点から本研究ではハロゲンのCd錯体において四面体と八面体の構造変化を明らかにすること及びCd(II)錯体の溶液と固体 ^{113}Cd NMRから両者の構造を比較することを目的として行った。

(2) Cd(II)にハロゲン錯体はメタノール溶媒中、Ar雰囲気下で CdX_2 ($\text{X}=\text{Br}^-, \text{I}^-$)及び $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ にNaXを加えて合成した。溶液の ^{113}Cd NMRの測定はJeol GSX-270 FT-NMRスペクトロメータを用いて測定した。1.0 M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ の重水素溶液をシフトの基準とした。含リン配位子を有するCd(II)のヨウ素錯体はアセトン又はクロロホルム溶媒中、Ar雰囲気下で CdI_2 及び $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ に含リン配位子(Triphenyl Phospine(= PPh_3)と1,2-Bis

(diphenylphosphino)ethane(= dppe))を加えて合成した。固体NMRのサンプルは上記の方法で合成した沈澱を口通し減圧乾燥後、測定した。固体高分解能 CP/MAS ^{113}Cd NMR (59.9MHz)はJeol NM-G27MU多核種観測装置付き GSX-270 を用いて測定した。すべてのスペクトルは、コンタクトタイム(交差分種時間) 5 ms, パルス繰り返し時間 13.5 s, 観測幅 50 KHz にて得た。使用した試料量は、約300 mg でマジック軸での試料回転数は3.9~4.7 KHz であった。各化学シフト値は1.0 M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ の水溶液を脱脂綿にしみこませたものを固体試料管(セル)に挿入し、Gated Decoupling 法によって得られた吸収線の位置を 0 ppm として表示した。

(3) 置換活性の $\text{Cd}(\text{II})$ イオンは化学交換が速く、溶液中に複数の化学種が存在していても(1式)、 ^{113}Cd NMRスペクトルは個々の化学種に対応したシグナルを与えず平均した一本のシグナルのみを与える。



このため、溶液 ^{113}Cd NMRスペクトルはしばしば困難を伴う。

Fig. 1 に1 M CdI_2 のメタノール中における ^{113}Cd NMR スペクトルの温度依存性を示す。23°Cでは線幅の小さい一本のシグナルを与えるが、-60°Cでは線幅が増大し、-75°Cでは二本に分裂する。-85°C以下では二本のシグナルの化学シフト値は変化しなかった。これは -85°C以下では $\text{Cd}(\text{II})$ のヨウ素錯体の化学交換反応がNMRのタイムスケールより遅くなったことを示している。この二本のシグナルの帰属については後で述べるが高磁場のシグナルが CdI^+ 、低磁場のシグナルは CdI_2 に対応するものである。

メタノール溶媒中、-90°Cにおいて $[\text{I}^-]/[\text{Cd}^{2+}]$ のモル比を変えて ^{113}Cd NMRスペクトルを測定した結果をFig. 2 に示す。 $[\text{I}^-]/[\text{Cd}^{2+}] = 1$ では Cd^{2+} と CdI^+ に帰属される二本のシグナルが観測された。 $[\text{I}^-]/[\text{Cd}^{2+}] = 2$ では Cd^{2+} のシグナルが消失し、代わりに CdI_2 のシグナルが現れた。 $[\text{I}^-]/[\text{Cd}^{2+}]$ のモル比が増大すると CdI^+ のシグナルが減少し、 CdI_3^- に帰属されるシグナル(75 ppm)が観測された。 $[\text{I}^-]/[\text{Cd}^{2+}] = 4$ では一本のシグナルしか観測されなかった。これは $[\text{CdI}_3^- + \text{I}^- \rightleftharpoons \text{CdI}_4^{2-}]$ の化学交換反応が-90°CでもNMRタイムスケールより速いことを示

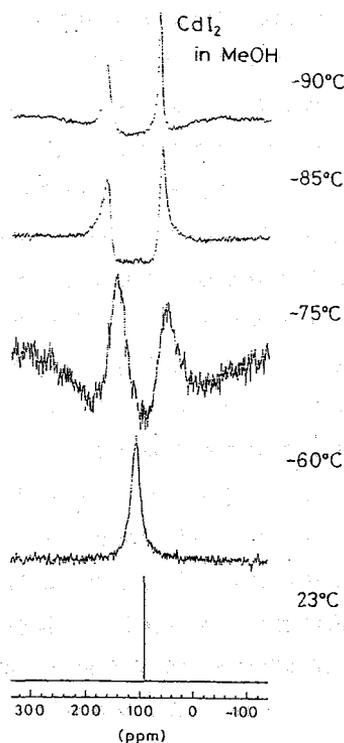


Fig. 1 メタノール溶媒中におけるヨウ化カドミウム(II)錯体の ^{113}Cd NMRスペクトルに及ぼす温度効果

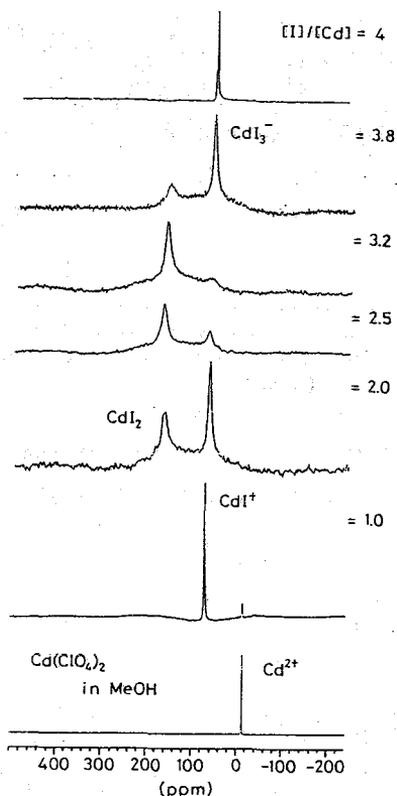


Fig. 2 ヨウ化カドミウム(II)錯体の¹¹³Cd NMRスペクトル
 溶媒, メタノール; 温度, -90°C

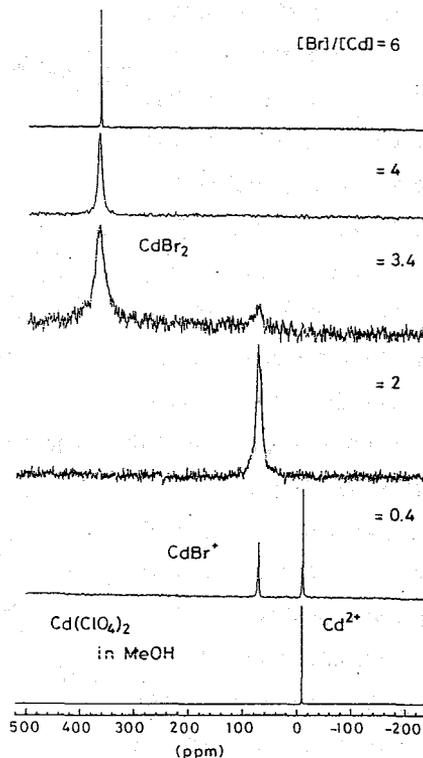


Fig. 3 臭化カドミウム(II)錯体の¹¹³Cd NMRスペクトル
 溶媒, メタノール; 温度, -90°C

している。ここで興味あることは¹¹³Cd NMRシグナルがCd²⁺, CdI⁺, CdI₂の順に低磁場シフトし、CdI₃⁻では逆に高磁場シフトすることである。これは八面体構造から四面体構造に変化するためと考えられる。八面体構造の場合、配位数の違いによるこのような逆転は生じず、配位数の増加によって単純に低磁場シフトする²⁾。八面体構造をとるか四面体構造をとるかは一つの要因で決まるのではなく、立体条件、電気的中性原理、結晶場の安定化エネルギーなどの要因が、絡み合っている。立体条件についてのべると金属イオンと配位子のイオン半径をそれぞれR_M, R_Lとすると、R_M/R_L > 0.414では八面体、R_M/R_L > 0.225では四面体構造をとることになる。Cd²⁺(R_M=0.97Å)とI⁻(R_L=2.10Å)ではR_M/R_L=0.46となり、立体的には両方の構造をとることは可能である。従ってヨウ素錯体としては[CdS₆]²⁺(S = solvent), [CdI₅S]⁺, [CdI₂S₄]が八面体構造、[CdI₃S]⁻, [CdI₄]²⁻が四面体構造であると結論される。

Cd(II)の臭素錯体の¹¹³Cd NMRスペクトルをFig. 3に示す。溶媒はメタノール、温度は

-90℃である。低磁場から Cd^{2+} , CdBr^- , CdBr_2 のシグナルに帰属される。ヨウ素錯体との違いは CdBr_3^+ のシグナルが分離して観測されないことである。すなわち、臭素錯体はヨウ素錯体より化学交換反応が速いことを示している。このようにCdのハロゲン錯体のいくつかの化学種について ^{113}Cd NMRシグナルが分離されて観測された例は初めてであり、今後固体NMRを測定し、両者を比較検討する予定である。

CdI_2 の結晶は典型的な立方最密構造をとっており Cd^{2+} のまわりには6つの I^- が配位している。アセトン中で CdI_2 と PPh_3 をモル比1:1で反応させたときの ^{113}Cd NMRをFig. 4に示した。300ppm付近に ^{31}P とカップリングした2本のシグナルを与える。明らかにCdにP原子が1コ配位した錯体 $\text{CdI}_2(\text{PPh}_3)$ が生成したことを示している。 $J(\text{Cd}-\text{P})$ は1000 Hzである。 CdI_2 と PPh_3 を反応させると白色の沈澱を生ずる。この白色沈澱の固体NMRスペクトルはFig. 5に示すように600ppmに線幅の大きい一本のシグナルを与えた。 CdI_2PPh_3 より約300ppmも低磁場にあることからこれは PPh_3 が2分子配位した $\text{CdI}_2(\text{PPh}_3)_2$ であると考えられる。

References

- 1) M. Munakata, S. Kitagawa, A. Asahara and H. Masuda, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1987, **60**, 1927.
- 2) M. Munakata, S. Kitagawa and F. Yagi, Inorg. Chem. 1986, **25**, 964.

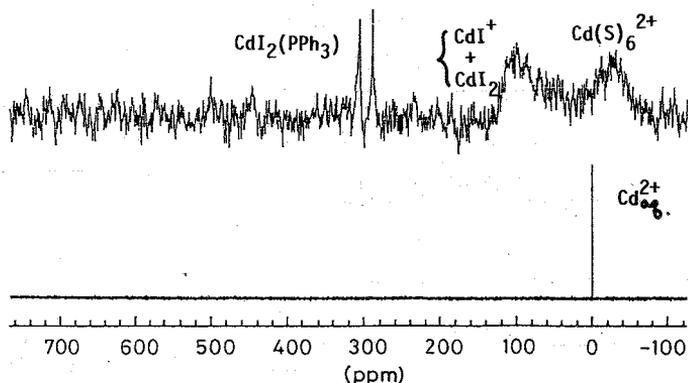


Fig. 4 アセトン(S)中における CdI_2PPh_3 の ^{113}Cd NMRスペクトル(-90℃; 基準, 1.0 M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$)

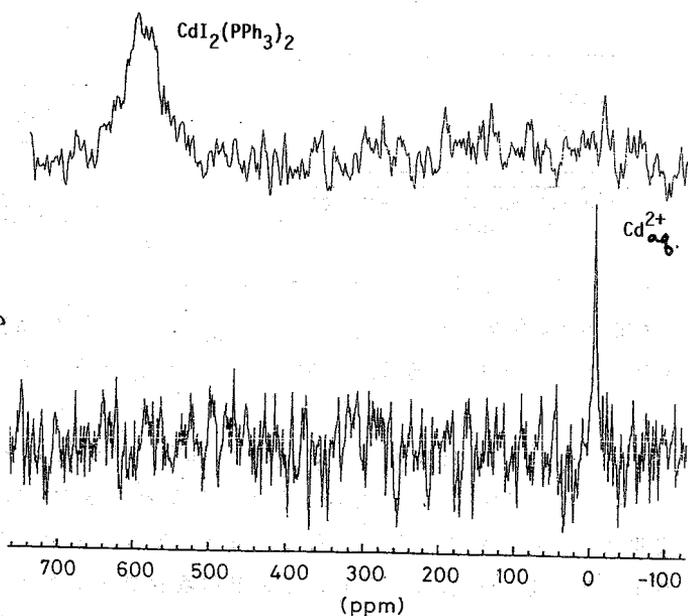


Fig. 5 固体 $\text{CdI}_2(\text{PPh}_3)_2$ の ^{113}Cd CP/MAS スペクトル (23℃; 基準, 1.0 M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 水溶液)

(近畿大・理工) ○北川 進・宗像 恵・植田昌伸

Synthesis of Vanadium(III) Complexes and Their ^{51}V NMR Spectra

Susumu KITAGAWA, Megumu MUNAKATA and Masanobu UEDA (Kinki University)

Various vanadium(III) complexes have been synthesized and isolated as microcrystalline or single crystals. ^{51}V NMR spectra have been measured for their aqueous solution. The observed chemical shift ranges from 340 to -1284 ppm, while the linewidth at half height falls within 3.6 KHz. $[\text{V}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO})]^-$ (L= trisethanolamine and its derivatives) gives various species by the substitution of CN^- , which are equilibrated in aqueous solution containing an excess amount of CN^- . The equilibria are successfully characterized by ^{51}V NMR spectra.

I. ^{51}V 核は天然存在比が99.76%であり濃縮する必要がないことから、金属核の中では最も感度の良い核種に属している(表1)。これまで数多くのバナジウム化合物についての ^{51}V NMRスペクトルの観測が行われてきた。ところでバナジウムは5価から-1価までの酸

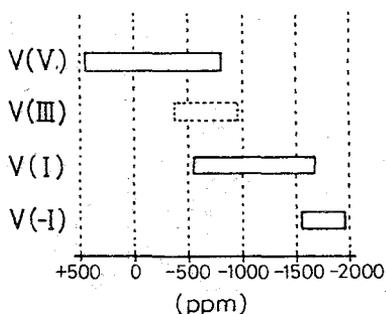


図1 ^{51}V NMR化学シフトとバナジウム錯体の酸化数

化状態をとりうる金属であることはよく知られている。

その各酸化状態における価電子数を表2に示した。

d電子数が奇数の場合には常磁性であるためNMR法の対象とはなり得ないが偶数の場合には可能性がある。

これまでV(V), V(I), V(-I)については ^{51}V NMRスペクトルが観測され、図1のようにバナジウムの価数に対する化学シフトの傾向および範囲が示されている¹⁾。しかしながらV(III)については基底状態がS=1の場合が多く、ほとんど観測が行われていない。

さらに、V(III)錯体そのものについても合成例は数少なく ^{51}V NMRの測定をさらに困難なものとしている。近年このV(III)がホヤ類のバナジウム濃縮機構と密接に関連していることが報告され注目されている²⁾。本研究ではこのV(III)錯体の合成をおこない、その ^{51}V NMRスペクトルを観測し、錯体の構造と化学シフトとの関連性について検討した。

表1 NMR Parameters

Nucleus	⁵¹ V	⁹³ Nb	¹³ C
	Resonance Freq.(MHz)	71.00	66.03
Natural Aband.(%)	99.76	100	1.11
Spin(I)	7/2	9/2	1/2
Receptivity*	2150	2740	1
Quadrupole moment(ex10 ⁻²⁴ cm ²)	-4×10 ⁻²	-0.2	-

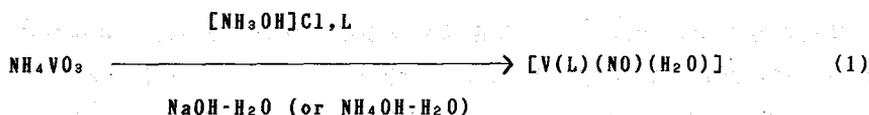
* relative sensitivity including natural abundance

表2バナジウムの酸化数と価電子数

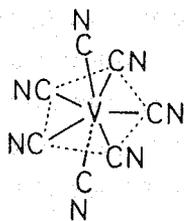
V(V)	d ⁰
V(IV)	d ¹
V(III)	d ²
V(II)	d ³
V(I)	d ⁴
V(0)	d ⁵
V(-I)	d ⁶

II. (実験方法) バナジウム化合物の合成 合成及びNMRサンプルの調製はすべてアルゴンガス雰囲気下でおこなった。 Group I ([V(acac)₃], [VCl₂(H₂O)₄]Cl, [VCl₃(THF)₃], [V(PS₂(OEt)₂)₃]), Group II (K₄[V(CN)₇]), Group III (Na[V(tha)(NO)(H₂O)], NH₄[V(dipic)(H₂NO)(NO)(H₂O)]) の合成は文献³⁾に従いおこなった。

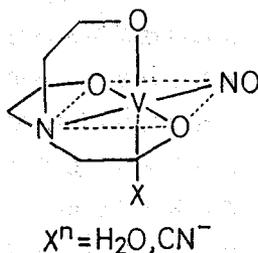
配位子 L (L=trisetanolamine (tea), tris(2-hydroxypropyl)amine (tha), nitrilotriacetic acid (nta), 2,6-dicarboxypyridine (dipic))を用いて次に示すスキーム(1)に従い合成し、得られたものは単結晶または微結晶として単離した。



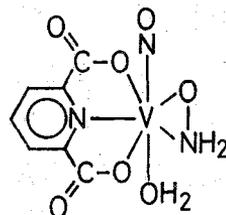
他の系についても同様の方法で行った。



[V(CN)₇]⁴⁻の構造



[V(tea)(NO)(X)]ⁿ⁻¹の推定構造



[V(dipic)(H₂NO)(NO)(H₂O)]⁻の構造

(測定方法)

Jeol GSX-270 NMR spectrometerを用い、観測周波数 71.00MHz, 観測幅 160KHz, パルス幅 4.5 μs, 温度 23℃で測定した。⁵¹V NMRのシフトの外部基準にはneat VOCl₃を用いた。サンプルチューブは全て10mmφのものを用いバナジウム濃度を20mMに調製して測定した。

III. (結果及び考察) Group I (通常の六配位八面体型錯体).

次の V(III) 錯体,

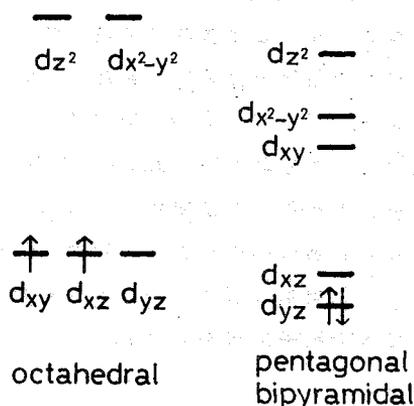


図2 d 軌道のエネルギー準位図

[V(acac)₃], [VCl₂(H₂O)₄]Cl, [VCl₃(THF)₃], [V(PS₂(OEt)₂)₃]について⁵¹V NMRの測定を行ったがシグナルは得られなかった。これはおそらく図2に示したように正八面体型の配位子場ではd軌道の縮退がとけていないか、もしくはエネルギー的に近接しスピン交換相互作用エネルギーより下回るため、S = 1の基底状態を持つためと考えられる。

そこで常磁性 (S = 1) を反磁性系とするため低対称性構造の以下のバナジウム(III)錯体をデザインし、合成した。

Group II (その他の立体構造を持つ錯体). 五角両

錐型 [V(CN)₇]⁴⁻錯体は図3に示すように49ppmに半値幅678Hzのシグナルを1本与えた(図1)。

Group III (NOが配位した錯体).

八面体型構造ではあるがNO⁻が配位した [V(tea)(NO)(H₂O)]⁻, [V(tha)(NO)(H₂O)]⁻, [V(нта)(NO)(H₂O)]⁻, [V(dipic)(H₂NO)(NO)(H₂O)]⁻らは図3

に示すように δ 340 ~ -70ppm, ν_{1/2} 3600 ~ 1300Hzのシグナルを与えた。いずれも検出されたシグナルは、出発物質 NH₄VO₃ (δ -536ppm, ν_{1/2} 40Hz)のシグナルとは異なる。

これらの錯体は低対称の構造を持ち、d軌道の縮退がとけS = 0の基底状態をとるため、V(III)核のものと考えられるが、これらの錯体中のV(III)-NO⁻部分がV(I)-NO⁺の構造をとることも考えられ、一箇の可能性も否定できない。しかし図1におけるV(I)のシフトには全く対応しない。

また、[V(tea)(NO)(H₂O)]⁻についてはこの溶液にCN⁻を加えた。r (= [CN⁻]/[V(tea)(NO)(H₂O)]⁻)の増加につれて⁵¹V NMRシグナルから容易に判定できる新しい種がいくつか生成した。図4におけるように第一段階では183ppmに新たなシグナルが現れ、このシグナルの強度の増加と反対に340ppmのシグナルの強度が減少した。第二段階では-1284ppmにまた新たなシグナルが出現した。183ppmのシ

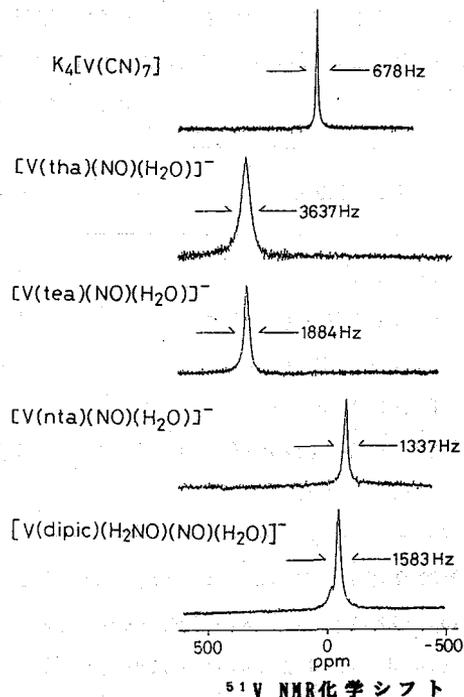


図3 ⁵¹V NMRスペクトルの例

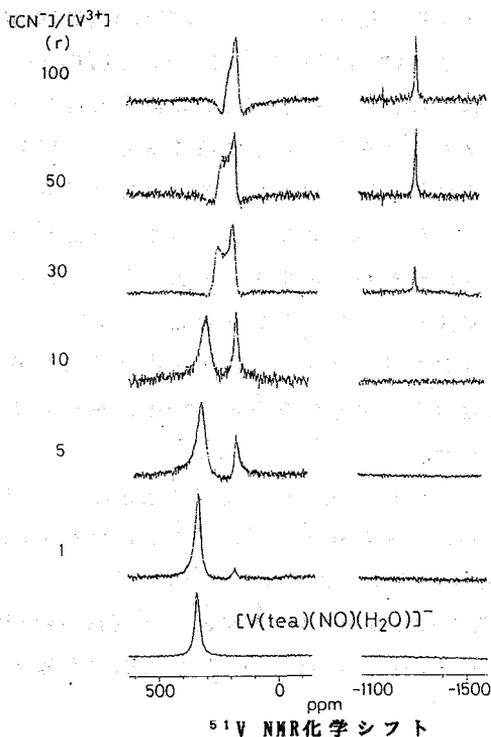


図4 $[\text{CN}^-]/[\text{V}^{3+}]$ を変化させた水溶液中の ^{51}V NMRスペクトル ($[\text{V}^{3+}] = 20 \text{ mM}$; 23°C)

表3 ^{51}V の化学シフト

V (III) 錯体	溶媒	δ (ppm)	$\nu_{1/2}$ (Hz)
$[\text{V}(\text{CN})_7]^{4-}$	H_2O	49	678
$[\text{V}(\text{tha})(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})]^-$	H_2O	341	3637
$[\text{V}(\text{tea})(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})]^-$	H_2O	340	1884
$[\text{V}(\text{nta})(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})]^-$	H_2O	-67	1337
$[\text{V}(\text{dipic})(\text{H}_2\text{NO})(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})]^-$	H_2O	-48	1583
$[\text{V}(\text{tea})(\text{NO})(\text{CN})]^{2-}$	H_2O	183	1339

(参考文献) 1) D. Rehder, *Magnetic Resonance Review* 1984, **9**, 125. 2) P. Frank, *Inorg. Chem.* 1988, **27**, 118. 3) F. Rohrscheid, et al, *Inorg. Chem.* 1967, **7**, 1315.; W. F. Donovan, et al, *J. C. S. Dalton*. 1974, 894.; F. A. Cotton, et al, *J. C. S. Chem. Commun.* 1983, 1377.; C. Porta, et al, *J. C. S. (A)*. 1970, 2929.; A. Muller, et al, *Chem. Ber.* 1972, **105**, 2419.; K. Wieghardt, et al, *Z. anorg. allg. Chem.* 1979, **457**, 75.; D. Rehder, et al, *Z. Naturforsch.* 1981, **36b**, 1251.

(国立がんセンター研, 大阪府放射線研, 日本ブルカー)

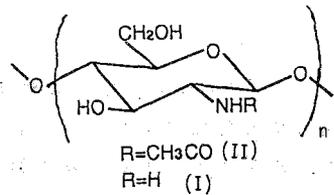
斎藤 肇, 横井もと子, 小川宏蔵, 恵良田智樹

MULTINUCLEAR (^{13}C , ^{15}N and ^{113}Cd) SOLID-STATE NMR STUDY ON CHITOSAN, ITS SALTS AND METAL COMPLEXES
 Hazime SAITÔ¹, Motoko YOKOI¹, Kozo OGAWA², and Tomoki ERATA³ (Nat'l Cancer Ctr. Res. Inst.¹, Radiation Center of Osaka Pref.², Bruker Japan³)

High-resolution solid-state NMR spectra of chitosan, its salts and metal complexes were recorded to study conformational feature of chitosan molecules, the manner of metal-polysaccharide interaction, and formation of acid salts.

1. はじめに

キトサン (I) は、 β -(1 \rightarrow 4) 結合 2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコースのポリマーで、キチン (II) の脱アセチル化によって得られる。繰り返し構造あたり 1 個のアミノ基を存することから、鉍酸との塩あるいは金属塩を容易に生成し、産業廃棄物からの重金属の回収や酸の捕捉への利用



という観点からも、多大の関心が集められている。さらに、多糖の部分構造のモディフィケーションによる高次構造変化が可能で、X線回折、 ^{13}C NMR による両面からの追跡により、多糖一般の高次構造への理解が深まることはいうまでもない。これは、キトサンは大抵の溶媒に不溶という性質に基いているわけであるが、一方では構造研究に対しては溶液 NMR の手法が使用出来ないことを意味している。

演者らはすでに、 ^{13}C 固体高分解能 NMR がキチン、キトサンの多型の識別、鉍酸塩、金属塩生成反応の解析に使用出来ることを示した¹⁻⁴⁾。これは、これらの過程がコンホメーション変化をひき起こすためである。この目的で ^{13}C NMR スペクトルを用いる場合、コンホメーション依存 ^{13}C シフトが存在することが必要であるが、実際ペプチド、多糖など多くの系で存在することが確かめられている⁵⁻⁷⁾。

2. 実験方法

^{13}C 、 ^{113}Cd 固体高分解能 NMR はブルカー CXP-300 スペクトロメーターでそれぞれ 75.46 MHz、66.57 MHz で測定を行った。 ^{15}N -NMR はブルカー MSL-300 スペクトロメーターで 30.42 MHz で測定を行った。試料調製はすでに報告した方法に従った^{3,4)}。試料はいずれもシリンダータイプのローターに充填した。 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{113}Cd NMR 化学シフトは、それぞれ TMS、 NH_4NO_3 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 基準によった。

3. 実験結果と考察

3-1 ^{13}C NMR による解析

鉍酸塩のアニオンのソフト、ハード性と生じる構造変化はすでに報告した^{3,4)}。キトサンと種々の金属錯体生成にともなう ^{13}C NMR スペクトル変化は図 1 にしめす。いずれも、出

発のエビキトサンの ^{13}C NMRスペクトルから大きく変化しており、金属錯体生成を示している。しかし、詳細にみてみると、 ZnCl_2 、 ZnSO_4 、 CdCl_2 錯体の ^{13}C NMRシグナルは鋭いものに対して、 CdCl_2 、 CdSO_4 、 HgCl_2 錯体はよりブロードである。実際X線粉末回析から ZnCl_2 、 CdCl_2 錯体の結晶性が良好であるのに対し HgCl_2 はアモルファスである。このことは、金属錯体が NH_2 に対して1:1のコンプレックス生成の可能性のほかに、図1Gにみられる熱処理キトサン(無水物)とのスペクトルパターンが類似していることから、金属イオンの存在の効果は、キトサン試料の脱水効果に由来する可能性を示唆している。

3-2 ^{15}N NMRによる解析

図2に三種類のフリーのキトサンの ^{15}N NMRスペクトルを示す。エビ、カニ腱、カニ甲羅熱処理キトサンはそれぞれ“L-2”、“tendon”、“Annealed”の多型をとり、X線回析、 ^{13}C NMRスペクトルから容易に識別される。とくに、“tendon”、“L-2”はC-1またはC-4 ^{13}C ピークが2本に分裂し、二種類の異なる分子鎖が存在することを意味している。これは、 H_2O が分子鎖にlooseに結合していることに対応するが、 ^{15}N NMRデータは無水の“Annealed”に較べて変化はなく(表1) H_2O 分子の存在場所が NH_2 付近であるとの見方は否定できる。

一方、フリーにくらべて鉍酸塩生成によって6~12 ppmの低磁場シフトがみられる(表1)一般には、 $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$ 変化によって ^{15}N 核に deshieldingが生じ、これが低磁場シフトに導くことは容易に理解できる。低磁場シフトの程度は、 HBr 、 HI を除き Type IIの塩(HCl 、 H_2SO_4 、 H_3PO_4 、 HIO_4)の方がType Iの塩(HNO_3 、 HClO_4)よりも大きい。ここで、Type I、Type IIの違いは前者の場合アニオンに水和が起こりやすくキトサン塩の構造を大きく変化させることである^{3,4)}。このことは、Type II塩の正電荷のアニオンの電荷による遮蔽効果と関連づけると興味深い。

金属錯体形成によっても ^{15}N 化学シフトの低磁場シフトが起こる。とくに HgCl_2 錯体の場合は鉍酸塩の場合と同程度のシフトである。しかし、最も結晶性のよい ZnCl_2 、 CdCl_2 の場合は、それぞれ-352.0、-350.3 ppmで出発原料のエビキトサン-352.7 ppmとほとんど変化がみられない。このことは、(1)金属イオンの1個の配位子が NH_2 に置き換わっているものの ^{15}N シフト変化が少ないか、あるいは(2) $\text{NH}_2 \cdots \text{M}$ のような結合様式をとるよりはむしろ単に分子鎖間にトラップされている可能性のいずれかである。小川らはX線回析データから(1)の可能性を示唆しているが、後述の ^{113}Cd NMRのデータは CdSO_4 の場合は(2)の可能性が強い。 CdSO_4 の場合、 ^{15}N ピークはきわめてブロードな-342.5~-356.6 ppmにわたっており、この

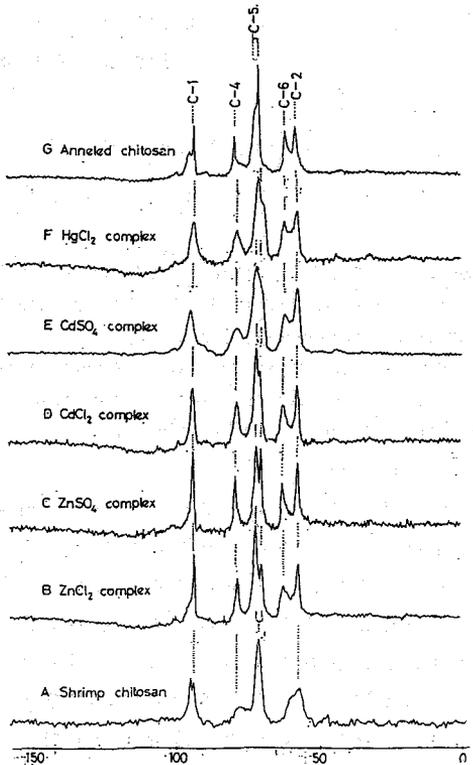


図1 キトサン金属錯体の ^{13}C NMR

表1 キトサンおよびその鉍酸塩、金属錯体の¹⁵N化学シフト*

	フリー	鉍酸塩	金属錯体
フリー キトサン			
エビ		-352.7	
カニ甲羅熱処理物		-352.2	
カニ腱		-351.6	
Type I 鉍酸塩			
HNO ₃		-345.1	
HClO ₄		-345.1	
HBr		-338.3	
HI		-338.5	
Type II 鉍酸塩			
HCl		-339.6	
H ₂ SO ₄		-343.0	
H ₃ PO ₄		-342.6	
HIO ₄		-344.0	
金属錯体			
CdSO ₄			-342.5, -350.7, -356.6
CdCl ₂			-350.3
ZnSO ₄			-354.1
ZnCl ₂			-352.0
HgCl ₂			-337.7

*NH₄NO₃ 基準

考の妥当性を示している。また¹³C NMRもCdSO₄錯体が最もブロードである。

3-3 ¹¹³Cd NMRによる解析

¹¹³Cdはスピン1/2の核種で、CP-MAS NMRは高感度で測定することが出来る。図4にCdCl₂、CdSO₄およびキトサンとの錯体の¹¹³Cd NMRスペクトルを示す。錯体の場合でも積算回数は1,000回以下である。CdCl₂の場合は、無水、水和物で化学シフト変化がみられ、このことは錯体形成によるCdカチオン周囲の電子状態変化の目安を与える。しかし、錯体の線巾の広がり著しく、固相反応から得た錯体は必ずしも単一の化学種とは考えにくいことを示している。一方、CdSO₄の場合は、錯体形成によってもスペクトルパターンは変化しない。因みに低磁場側を調べたものの、新しいピークは出現していない。このことはキトサンとの錯体内でCdSO₄のまま存在し、NH₂との選択的な相互作用は考えにくいことを示す。

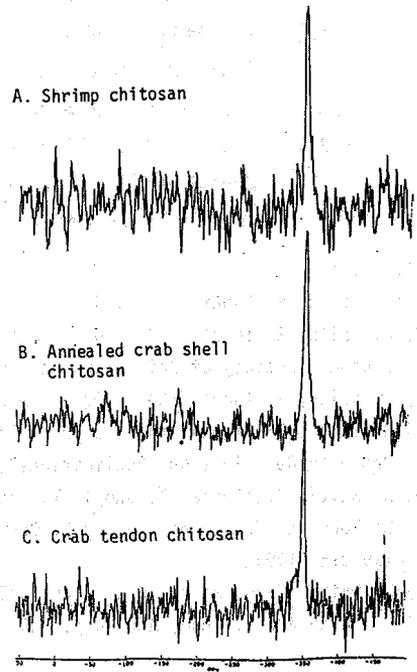


図2 キトサンの¹⁵N CP-MAS NMR

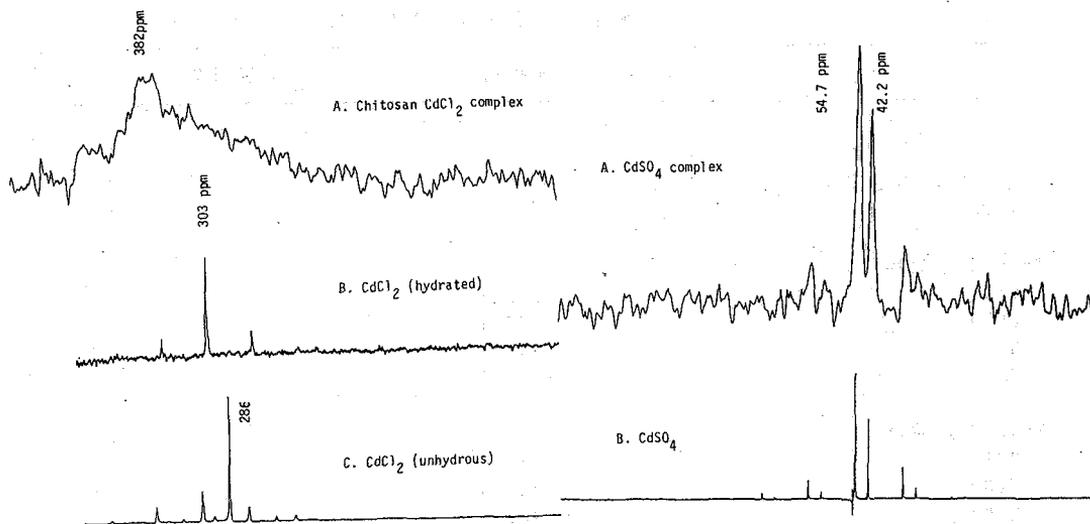


図3 CdCl_2 、 CdSO_4 およびそのキトサンとの錯体の ^{113}Cd CP-MAS NMRスペクトル
ただし、原子吸光分析結果は両者で変わらずほぼ化学量論的に存在することを示唆する。

4. 結論

以上、多核NMRアプローチによって、キトサン、キトサン硫酸塩、金属錯体の構造に関して次の知見を得た。

- (1) 金属錯体生成によって、 ^{13}C NMRからキトサン骨格のコンホメーション変化が誘起されることがわかる。
- (2) Type I IIの硫酸塩生成反応は、 ^{15}N 化学シフト変化からも検出できる。
- (3) ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{113}Cd NMRデータの総合的な解析の結果、ここで取り上げた錯体は必ずしも $\text{NH}_2 \cdots \text{M}$ の形で存在するとは限らない。単純に分子鎖間にトラップされた状態もあり得る。

References

- (1) H. Saitô, R. Tabeta and S. Hirano, *Chem. Lett.*, **1981**, 1479.
- (2) H. Saitô, R. Tabeta and S. Hirano, "Chitin and Chitosan", ed. by S. Hirano and S. Tokura, Japanese Society of Chitin and Chitosan, pp. 71-76 (1982).
- (3) H. Saitô, R. Tabeta and K. Ogawa, *Macromolecules*, **20**, 2424 (1987).
- (4) H. Saitô, R. Tabeta and K. Ogawa, "Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications", ed. by M. Yalpani, Elsevier, pp. 267-280 (1987).
- (5) H. Saitô, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, and T. Asakura, "Magnetic Resonance in Biology and Medicine", ed. by G. Govil, C. L. Kheterapal and A. Saran, Tata McGraw-Hill, pp. 195-215 (1985).
- (6) H. Saitô, *Magn. Reson. Chem.*, **24**, 835 (1986).
- (7) H. Saitô and I. Ando, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, in press.

NMR RELAXATION RATE IN MOLTEN SALTS:

Li-7 AND Cs-133 IN THE (Li-Cs)NO₃ SYSTEM

Yoshio NAKAMURA, Jun FUNAKI and Shigezo SHIMOKAWA (Hokkaido University)

In this paper we present experimental results on the NMR relaxation rate of Li-7 and Cs-133 in the molten (Li-Cs)NO₃ system. The relaxation rates for Cs decrease with increase of LiNO₃ concentration, while those for Li-7 increase with increase of CsNO₃ content. The results are explained in terms of the anion polarization model, in which we attribute the change in the electric field gradient at the nuclei under study to the polarization of the electron cloud of anions toward the smaller cations, Li⁺.

[緒 言] われわれは先に2成分溶融塩中のTl-205の化学シフトの組成依存性を測定して、Tl⁺イオンがこのイオンのまわりの化学的な環境を調べる良いプローブであること示した[1]。特にTl⁺イオンの化学シフトがそれを取り囲むアニオンの電子雲の分極に強く支配されていることが分った。すなわちTl⁺よりもイオン半径が小さいカチオンを導入すると、その間にはさまれたアニオンは小さいカチオンの方に向って分極する。このことによりTl⁺イオンとアニオンの軌道の重なりが減少し、Tl⁺の化学シフトは反磁性の方向に変化する。もしTl⁺よりもイオン半径が大きなイオンを導入したときには、シフトは逆の方向になる。このアニオンの分極効果はまた核4重極モーメントをもつ核種のイオンの緩和速度に現われることが期待される[2]。本報告では2成分溶融塩(Li-Cs)NO₃系の中のLi-7(I=3/2)とCs-133(I=7/2)のスピナー格子緩和速度の組成および温度にたいする依存性を測定し、アニオン分極を考慮したモデルによって解析した結果について述べる。この系を選んだ理由は、2種のカチオンがそれぞれ核4重極モーメントと十分なNMRの感度を有し、かつ両者のイオン半径の差が極めて大きいため、上述のアニオンの分極効果が顕著に現われるとが期待されるからである。

[実験] 試料は市販(和光純薬)の LiNO_3 (99.9%)、 CsNO_3 (99%)をそのまま用いた。所定の量の両成分を秤りとり混和したのち、 110°C で真空乾燥した。ついで内径6mmのバイレックスガラス製の測定管の中で、融解・凝固のサイクルを繰返して、試料を脱気したのち封管した。

NMRの測定にはBruker社のCXPパルスFT分光計を用いた。測定周波数は、 Li -7に対しては11.66MHz、 Cs -133に対しては5.017MHzであった。スピナー格子緩和時間の測定には通常の $180^\circ - \tau - 90^\circ$ 法を用いた。高温NMRアローブの概略を図1に示す。温度制御の精度は $\pm 1^\circ\text{C}$ であった。

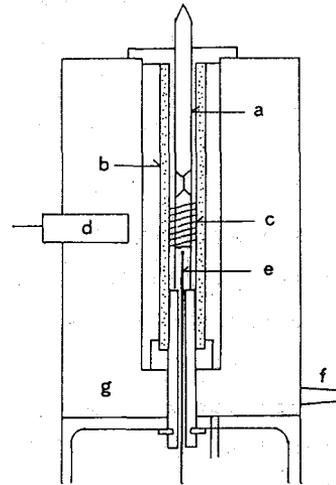


図1 高温用NMRアローブ

- a) sample cell; b) furnace; c) rf coil;
 d) external lock; e) thermocouple;
 f) water inlet; g) water jacket of Al.

[結果と考察]

図2に $(\text{Li}-\text{Cs})\text{NO}_3$ の中の Cs -133のスピナー格子緩和時間 T_1 の組成と温度による変化を示した。 T_1 の値は温度の上昇とともに増加し、また LiNO_3 の濃度の増加とともに T_1 の値は増加している。図3に 325°C における Cs -133の緩和速度 $1/T_1$ の組成変化を示す。この値は相手のイオン(Li^+)の濃度の増加とも

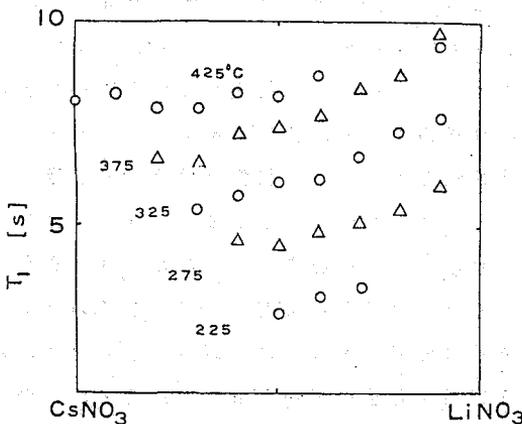


図2 $(\text{Li}-\text{Cs})\text{NO}_3$ 中の Cs -133のスピナー格子緩和時間

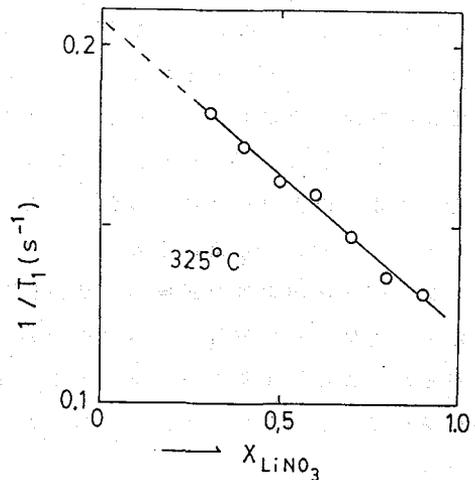


図3 $(\text{Li}-\text{Cs})\text{NO}_3$ 中の Cs -133の緩和速度の組成依存性

に減少している。これに対して図4に示すように、溶融(Li-Cs)NO₃系[2]および(Li-K)NO₃系[3]のLi-7の緩和速度は相手イオンの濃度と増加とともに増加している。

溶融塩の中のLi-7とCs-133の緩和では核4重極相互作用が支配的である。緩和速度は電場勾配qの大きさと、その無秩序なゆらぎの相関時間によって決まる。溶融塩の中の注目するイオンのまわりのqの値とその動的挙動を理論的に求めることは極めてむづかしい。Wolneyらは[4]最近接のイオンが作る電場勾配が重要であるとして溶融塩の中の電気4重極相互作用によるスピナー格子緩和速度、 $(1/T_1)_q$ 、を次の式で表わしている。

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_q \sim \left(\frac{3}{10}\right) f(1) \left(\frac{e^2 Q}{\pi}\right)^2 (1-r_\infty)^2 \frac{\zeta}{d^6} \tau_c \quad (1)$$

ここでf(1)はスピン因子、 $f(1)=(2I+3)/I(2I-1)$ 、Qは電気4重極モーメント、dは最近接イオン間の距離、 $(1-r_\infty)$ はイオンの電子殻の分極による効果を表す因子、 ζ は1のオーダーの定数である。 τ_c は電場勾配のゆらぎの運動の相関時間である。この式を用いてそれぞれの塩の融点近くでの相関時間の求めると、 10^{-12} s程度の値となり、イオン間の距離に対する拡散時間に比べると1桁短い[2, 4]。このことは、電場勾配のゆらぎが注目するイオンをとり囲む反対符号のイオンの振動的な運動によって生ずるものであることを示唆している。

2成分の混合系に対して(1)式を適用するとき、簡単のためにわれわれは τ_c と ζ が組成とともにほとんど変化しないと仮定し、緩和速度の変化は、もっぱらdの変化によるものとした。dの変化、 Δd 、はアニオン分極モデルによれば[5]、

$$\Delta d \sim +2 \alpha \Delta R_{cat} X / d_0^3 \quad (2)$$

で表される。ここで α はアニオンの分極率、 ΔR_{cat} は2種のカチオンのイオン半径の差、 d_0 は純粋状態($X=0$)のときの注目するカチオンとアニオンとの間の距離である。イオン半径の異なるカチオンにはさまれたアニオンはイオン半径の小さいイオンの方に分極

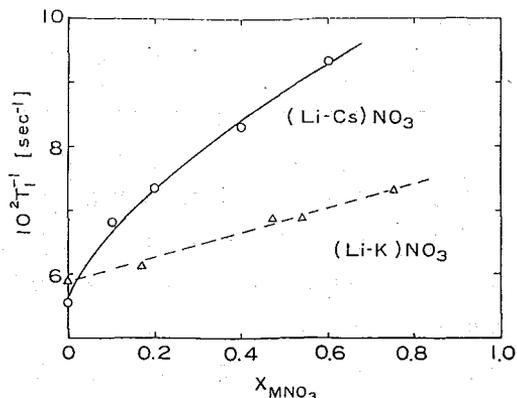


図4 (Li-Cs)NO₃系[2](285℃)および(Li-K)NO₃系[3](283℃)のLi-7の緩和速度

する [5]。したがって注目するイオンより相手イオンが小さいときは Δd は正、逆の場合は負である。このことを考慮すると、純粋状態での緩和速度、 $(1/T_1)_{X=0}$ 、に対する相手イオンのモル分率が X であるときの緩和速度、 $(1/T_1)_X$ 、の比は次式で表される。

$$\frac{(1/T_1)_X}{(1/T_1)_{X=0}} = \frac{d_0^6}{(d_0 + \Delta d)^6} \approx 1 \pm 12 \alpha \Delta R_{\text{cat}} X / d_0^4 \quad (3)$$

ただし $(\text{Li}-\text{Cs})\text{NO}_3$ 系において Cs 核に対しては負の符号、Li 核に対しては正の符号をとる。 $\alpha = 3.7 \times 10^{-30} \text{ m}^3$ [6]、 $d_0(\text{Cs}) = 0.325 \text{ nm}$ 、 $d_0(\text{Li}) = 0.270 \text{ nm}$ [7] として計算した値を図 5 に示し実験値と比較した。ここでは構造を持つ硝酸イオンを球形とみなしていること、 τ_c が組成によらないとしていることなどの粗い近似を用いているが、図 5 の結果はアニオンが共通の混合溶解塩系のイオンの 4 重極緩和の組成変化がアニオン分極モデルで良く説明できることを示している。

この系の Cs-133 の共鳴周波数 ν の組成による変化も観測した。すなわち $d \ln \nu / dX = -5.6 \times 10^{-5}$ の値が得られている。 LiNO_3 の濃度が増大すると共鳴は高磁場へシフトする。このシフトの量は $(\text{Li}-\text{Li})\text{NO}_3$ 系の Li^+ イオンのときの約 10 分の 1 であるが、シフトの方向は同一である [1]。この観測結果もまた、イオン半径のより小さい Li^+ イオンの導入によって Cs^+ イオンとアニオンとの軌道の重なりが減少するというアニオン分極モデルによって説明することができる。

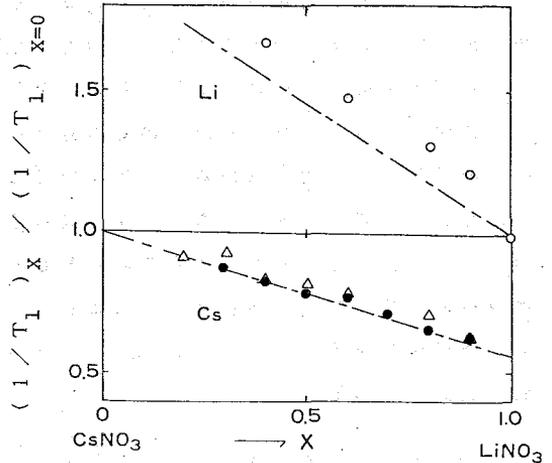


図 5 (3) 式による計算値と実験値との比較

○ 285°C ; ● 325°C ; △ 375°C

文 献

- [1] Y. Nakamura, Y. Kitazawa, H. Shimoji and S. Shimokawa, *J. P. C.* **87**, 5117 (1983).
- [2] Y. Nakamura and S. Shimokawa, *Ber. Bunsenges.* **89**, 371 (1985).
- [3] D. Harold-Smith, *J. C. P.*, **60**, 1405 (1974).
- [4] W. Wolney-Filho, R. L. Havill and J. Titman, *J. Physics C*, **15**, 3614 (1982).
- [5] S. Hafner and N. H. Nachtrieb, **40**, 2891 (1964).
- [6] K. Furukawa, *Disc. Faraday Soc.*, **32**, 53 (1962).
- [7] H. Ohno and K. Furukawa, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **74**, 297 (1978).

特別講演 5

THE EFFECT OF SOLVATION ON THE PARAMETERS OF NMR SPECTRA AND THE STRUCTURE OF ORGANOMERCURY COMPOUNDS IN SOLUTIONS

Yu.A.Ustynyuk, Yu.K.Grishin and D.V.Bazhenov

(Department of Chemistry, Moscow State University

Lenin Hills, Moscow 119899, USSR)

Analysis of extensive literature and proper experimental data concerning the effect of solvents on the chemical shift of mercury-199 and spin-spin coupling constants $^{199}\text{Hg} - ^{13}\text{C}$, $^{199}\text{Hg} - ^{19}\text{F}$ and $^{199}\text{Hg} - ^1\text{H}$ of symmetric organomercury compounds and organomercury salts has been conducted. A set of parameters of solvents, adequately describing the observed solvent effects within the range of linear model has been determined by a method of complete factor analysis. The connection of these parameters with those in the scales of Taft-Kamlet, Palm et al. is discussed. The nature of intermolecular interactions in the solutions of organomercury compounds are touched upon. The geometry of dimethylmercury and bis(trifluoromethyl)mercury has been investigated in several nematic liquidcrystal solvents using the NMR technique. The nature of the obtained geometry variations are discussed.

(日本電子(株) 生体計測学研究室) 藤原敏道, 永山国昭

Measurement of Radiofrequency Field Phase by Pulse NMR

Toshimichi Fujiwara and Kuniaki Nagayama (Biometrology Lab. JEOL Ltd.)

A method for measurement of an RF field phase difference using a multipulse sequence is presented. The pulse sequence consists of two kinds of 180° pulses whose phases and field strengths are arbitrary. This sequence mainly amplifies the phase difference, and transforms the phase difference into a rotation angle about the z axis. By eliminating a systematic deviation arising from the RF field inhomogeneity using a phase cycle, we can determine the phase difference with accuracy of 0.1° . We have also applied this method to measurement of RF field phase differences of decoupling fields which can not be directly measured through detectable magnetization.

はじめに

パルスNMRの実験では、ラジオ波の位相を正確に知る必要がある。それは、広帯域デカップリングやH O H A H A、溶媒シグナル除去などに使う多重パルスでは、ラジオ波位相が 1° 程度ずれても結果に大きな影響を与えることがあり、また、通常の実験でもラジオ波強度を変えるとその位相が大きく変わることがあるからである。このような場合に、NMRによるラジオ波位相の測定法としては、単一パルスで励起したスピンの位相を通じて測定する方法と、多重パルスがスピンに与える合成回転からラジオ波間の位相差を測定する方法がある。前者の方法では、その測定精度は 2° 程度であり位相の粗い測定に適しており、後者はラジオ波間の位相差を増幅できるので精密な測定が可能となる。後者に関しては、多重パルスで位相差を増幅できることは知られているが(1)、そのままではラジオ波強度の不均一性などパルスの不完全さのため精密な測定はむずかしい。

今回は、ラジオ波強度の不均一性などの影響を除いて位相差を測定するための多重パルス法を述べ、それより位相差を高精度で決めることが可能なことを示す。また、この多重パルス系列を用いて、非観測核デカップリング用のラジオ波間の位相差を測定できることを示す。

1. 多重パルスによるラジオ波位相差の測定

2つのラジオ波パルスの位相差を測定するパルス系列は、その位相差を増幅し、かつラ

ラジオ波強度の不均一性の影響を除き、測定精度を向上させる必要がある。このような要求を満たすパルス系列の中で単純なのは、

$$90_y^\circ (180_a^\circ 180_b^\circ)_n \text{ Acquisition} \quad [1]$$

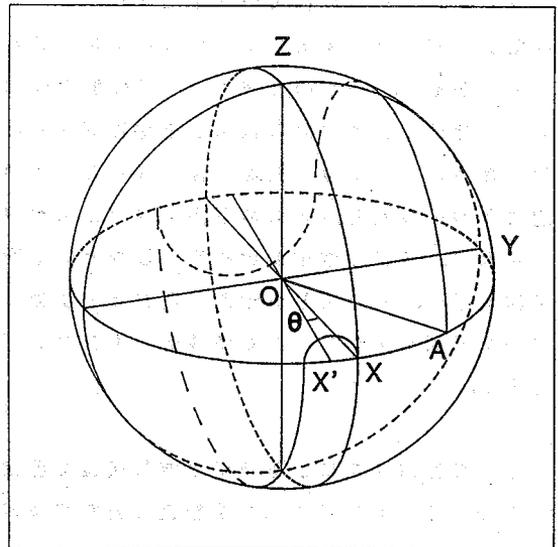
である。ここで a と b はラジオ波の位相で $(b - a)$ が測定する位相差である。2つの 180° パルス、 180_a° と 180_b° は、フリップ角が同じなら磁場強度は異なってもよい。このパルスの $(180_a^\circ 180_b^\circ)_n$ の部分は、オフセットが 0 Hz の場合 $1/2$ スピンに対して回転軸が z 軸方向で回転角が $2(b - a)$ の回転を与える。この回転から位相差を決めるためには、パルス系列 [1] のように 90_y° パルスで作った横磁化の n に依存した位相を測定する。さらに、 0.1° 程度の精度で位相差を決めるためには、ラジオ波強度の不均一性やパルス幅の設定誤差を考慮した解析を行う。

以下では、このパルス系列の応用例として、定常的な誤差を含んだ「 90° 位相シフト」の実際の大きさを決める方法を述べる。

[1] のパルス系列で $b - a = 90^\circ + \theta$ 、(θ : 90° シフトの定常的誤差) とすると、観測される位相 ϕ は、

$$\phi = -2n\theta + c \quad (c: \text{任意定数、} n: \text{偶数}) \quad [2]$$

図1. パルス系列 [1] により、磁化ベクトルが回転する様子。この図では、パルス系列 [1] は、 $90_y^\circ (180_x^\circ 180_y^\circ)_2$ である。 z 方向を向いた熱平衡磁化は最初のパルスで、 $+x$ 方向を向く。続く4つの 180° パルスで磁化は図のように $O A$ 軸上へ移動する。この時、 $\angle A O X$ の大きさは、 $\angle X O X'$ の4倍つまり 4θ である。このように $(180_a^\circ 180_b^\circ)_2$ のパルス系列は、位相差の 90° からのずれを表す角 θ を増幅する働きがある。



となる(図1参照)。ラジオ波振幅の不均一性などがある時は、[2]式中の θ を次式の θ' で置き換えねばならない。

$$\theta' \approx \sin^{-1} \{ \bar{\epsilon}^2 / 4 + (1 - \bar{\epsilon}^2 / 4) \sin \theta \} \quad [3]$$

$\theta \ll 1$ なら

$$\approx \bar{\epsilon}^2 / 4 + \theta \quad [3]'$$

ここで $\bar{\epsilon}^2 / 4$ はラジオ波不均一性の大きさを表す量である。[3]式はハミルトンの4元数

図2. パルス系列[1]を用いて測定した時、パルスの繰り返し n に依存してシグナルの位相が変わる様子。この時のラジオ波位相差は $b - a = 91^\circ$ つまり $\theta = 1^\circ$ である。測定はJ E O L - G X 4 0 0 (^1H の共鳴周波数400MHz)で行い、位相シフトはD(digital)-OFFSET UNITで行った。試料は5% $\text{D}_2\text{O} / \text{H}_2\text{O}$ 、ラジオ波振幅は2.4kHz、オフセット周波数は0kHz。

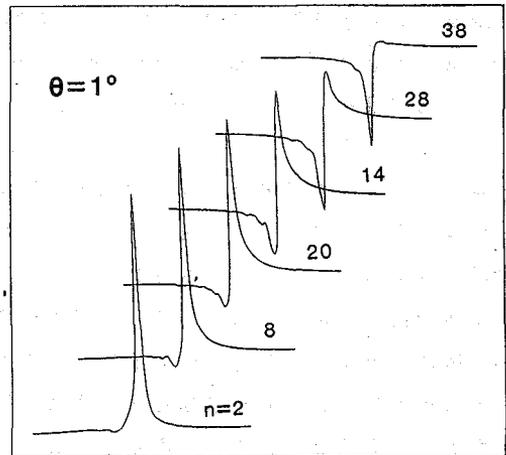
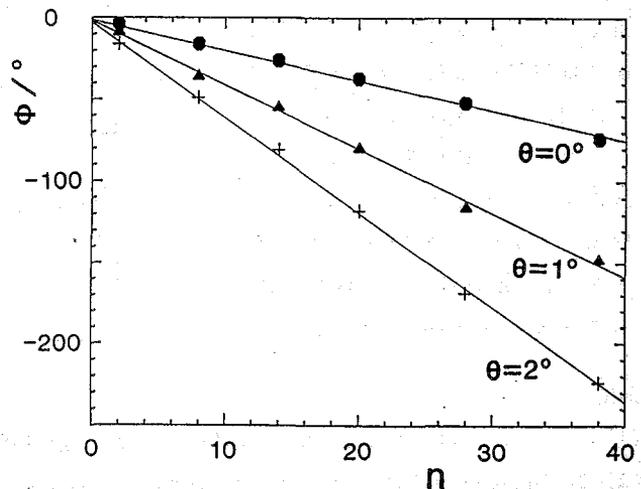


図3. パルス系列[1]で測定した時、シグナルの位相がパルスの繰り返し n に依存する様子。図2は $\theta = 1^\circ$ と同じ実験である。 $\theta = 0^\circ, 1^\circ, 2^\circ$ に対応する位相差は $b - a = 90^\circ, 91^\circ, 92^\circ$ 。グラフの傾きは $2\theta' = 2(\theta + \bar{\epsilon}^2 / 4)$ である([1],[2]式参照)。従って $\theta = 0^\circ$ の時の傾きはラジオ波強度の不均一性などによる。



を用いると簡単に求められる(2)。 $[3]'$ の近似式は、10%程度のラジオ波強度の不均一性があっても位相差 0.1° 程度の精度で成り立つ。図2と図3に $[2]$ 式と $[3]'$ 式の関係が成り立つことを示す。

次に、 $[3]'$ 式で $\bar{\epsilon}^2/4$ と θ を分離する解析法を示す。 $\bar{\epsilon}^2/4$ を求めるために、定常的な誤差を含んだ4つの 90° シフトつまり $(a, b) = (0^\circ, 90^\circ + \theta_1)$ 、 $(90^\circ + \theta_1, 180^\circ + \theta_1 + \theta_2)$ 、 $(180^\circ + \theta_1 + \theta_2, 270^\circ + \theta_1 + \theta_2 + \theta_3)$ 、 $(270^\circ + \theta_1 + \theta_2 + \theta_3, 0^\circ + \theta_1 + \theta_2 + \theta_3 + \theta_4)$ について測定し、傾きより求まる θ' (図3参照)をそれぞれ θ_1' 、 θ_2' 、 θ_3' 、 θ_4' とする。この4つの位相差の和は、定常的誤差があっても $360^\circ = 0^\circ$ なので、つまり $\theta_1 + \theta_2 + \theta_3 + \theta_4 = 0^\circ$ なので、

$$\sum_{i=1}^4 (90^\circ + \theta_i') = \bar{\epsilon}^2 \quad [4]$$

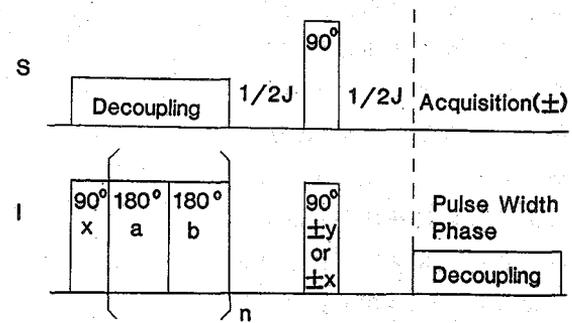
となる。この $\bar{\epsilon}^2$ を用いて $[3]'$ 式より、定常的な4つの位相差の誤差を求めることができる。

また、ラジオ波の位相差が 90° からもっと離れている場合には、上述のようにして求めた $\bar{\epsilon}^2$ と測定量 θ' より、 $[3]$ 式を用いて正しい位相差($90^\circ + \theta$)を知ることができる。

2、非観測核照射用ラジオ波の位相差測定

デッカプリング用ラジオ波のように、励起した信号を直接観測できない場合には、図4のパルス系列を用いて、デッカプリング用ラジオ波の照射で展開した横磁化をJの相互作用で観測核Sに移して測定する。ただし測定は、AXスピン系を用いて行い、ラジオ波の周波数オフセットは 0 Hz になるように設定する。図4中 $(180_a, 180_b)_n$ の直後でのIスピンの横磁化のy成分とx成分は、Iスピンへの 90° パルスの位相をそれぞれ $\pm y$ と $\pm x$ にすることにより、S磁化の強度として測定できる。こうして得られたIスピンの向き(位相)から、前節と同じように解析して正確なラジオ波位相差を求めることができる。

図4. デッカプリング用ラジオ波の位相差を測定するためのパルス系列。このパルス系列は、リフォーカスINEPTから 180° パルスをすべて除き、その最初の励起パルスの直後に $(180_a, 180_b)_n$ のパルスを挿入したものと同一である。



文献

(1) W.-K. Rhim and D.D. Ellman, J.Chem.Phys. 60,4595 (1974)
 (2) C.Counsell, M.H.Levitt and R.R.Ernst, J.Magn.Reson. 63,133 (1985)

(電総研) ○亀井裕孟, 片山義朗

Application of Differential Detection Method in NMR Spectroscopy

Hirotake Kamei and Yoshiro Katayama

(Electrotechnical Laboratory)

A method to eliminate the solvent signal and to detect the minute change in the signal intensity by the use of conventional digital wave form memory was developed. The solvent signal suppression was found to be -57dB.

1. はじめに

生体あるいは生体物質の NMR 測定では、巨大な信号と共存する微弱な信号の検出や、微少な信号強度変化の検出が要求される場合が多い。これらの信号強度あるいはその変化量が A/D あるいは D/A 変換時に 1 ビット内に入ってしまう場合には信号あるいはその変化を検出することができない。測定系のダイナミックレンジを十分に大きくすればこの問題は解決するが、それには限界があるため、特殊なパルス列や差分法などを用いることによって、微弱な信号や微少な信号強度変化を検出することが行なわれている。

われわれは既に大脳の活動にともなう局所血流量の微少な変化を検出する手法として差分 NMR 法を開発し、人間の脳半球機能差の測定を行ない、脳機能に関していくつかの新しい知見を得ている。今回は差分 NMR 法をスペクトロスコーピに適用することを試みた。この手法は市販の高分解能 NMR スペクトロメータに若干の改造と付加装置を加えるだけで、簡単に巨大信号と混在する微弱信号や微少な信号強度変化を検出可能とするものである。まだ予備的な実験の段階であるが、一応の結果を得たので報告する。

2. 差分法

A/D 変換器のダイナミックレンジの狭さを補うためには、アナログ信号においてなんらかの方法で不要な巨大信号を除去してやればよい。これには差分法を用いればよい。差分法としては、1) 差動コイルの使用、2) 平衡検出器の使用、3) 基準信号と差動増幅器の使用などが考えられる。1) の方法は検出コイルの幾何学的寸法精度および電気的特性を十分に揃える必要があり、これらが十分でない、巨大信号を大幅に低減させることが困難であるとともに、基準信号を与える試料、例えば溶媒、の信号も同時に測定しな

ればならないので、測定試料の作成が煩雑である。また、磁場の不均一性の影響を受け易いといった欠点もある。2)の方法は不要信号の抑圧率を大きくできる利点があるが、試料作成の煩雑さおよび磁場不均一性の影響は1)の方法と変わらない。試料作成の容易さおよび手法の汎用性を考慮してここでは3)の手法を採用した。

3. 実験

母体となるNMR装置としてJEOL GX-270型スペクトロメータを用いた。差分NMRシステムのブロック図を図1に示す。データの取り込みおよび書き出しのための

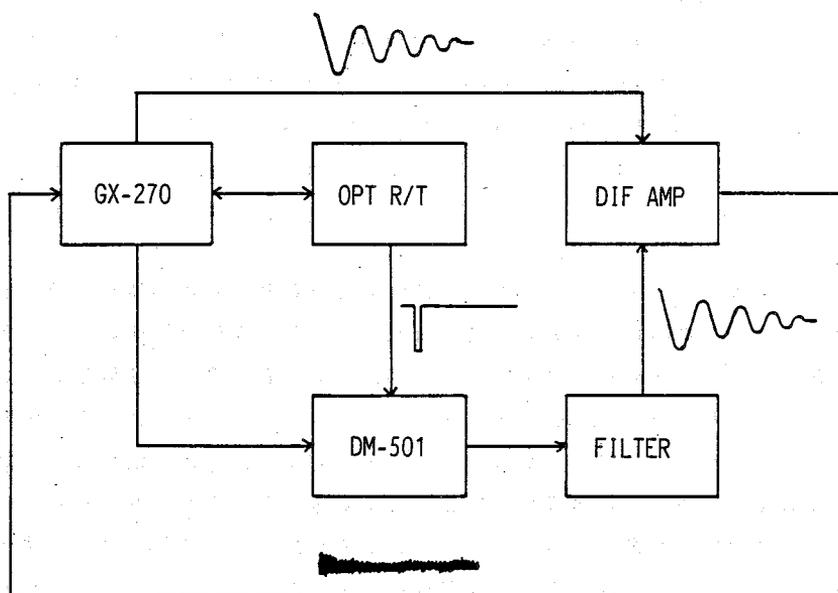


図1. 差分NMRシステムのブロック図。

同期信号はGX-270スペクトロメータから光ファイバ・デジタル・レシーバを介して取り出して用いるとともに、光ファイバ・デジタル・トランスミッタを介してスペクトロメータに戻している。抑圧すべき信号あるいは基準となる信号は一旦デジタル波形記憶装置に格納する。これらの信号は観測パルスに同期させて読みだし、アクティブフィルタを通してスムージングする。これと観測パルスに伴うFID信号とを、差動増幅器に入力し、それらの差信号を取り出す。差動増幅器の利得を調整して出力信号が最小になるように調整する。溶媒が巨大信号を与える場合における微弱信号の検出には、基準信号として純溶媒の信号を用いることができる。デジタル波形記憶装置としては岩通DM-501型を用いた。差動増幅器およびアクティブフィルタは自家製である。差動増幅器の出力はスペクトロメータに戻しフーリエ変換など通常のスペクトル観測と同様の操作を行

なう。

4. 結果

巨大信号抑圧の様子を図2に示す。試料は蒸留水で信号の右半分だけが示してある。図

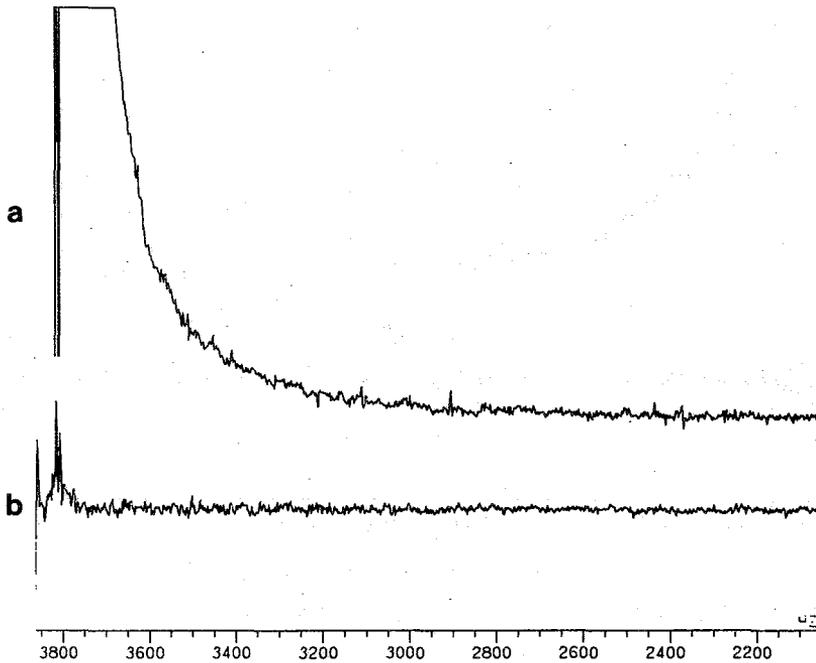


図2. 水のプロトンスペクトル。 a) 通常のスぺクトル, b) 差分スペクトル, 信号抑圧比は約 -57 dB.

2 a は通常の信号である。信号中央部における落込みはGX-270の演算部への信号取り込みを1チャンネルのみで行なった結果である。図2 b は差分スペクトルで、水の信号は約 $1/700$ (-57 dB) に抑圧されている。差動増幅器の利得を調整することによって、この程度の抑圧比は容易に得ることができる。この結果は観測系のダイナミックレンジを700倍に広げたことに匹敵する。

微弱信号検出の例を図3に示す。試料はエタノールの0.04モル%水溶液である。図3 a は通常のスぺクトル, b は差分スペクトルで基準信号としては水を用いている。積算回数は10回である。S/Nは十分ではないが辛うじてエタノールのメチルプロトンの信号を認めることができる。メチレンプロトンの信号は確認できない。

以上、高分解能NMRにおける差分法の適用の初歩的な実験結果について述べた。この結果はデジタル波形記憶装置を用いた差分法が十分実用になるものであることを示している。現在、4チャンネル測定への拡張を進めておりその結果についても報告する予定で

ある。

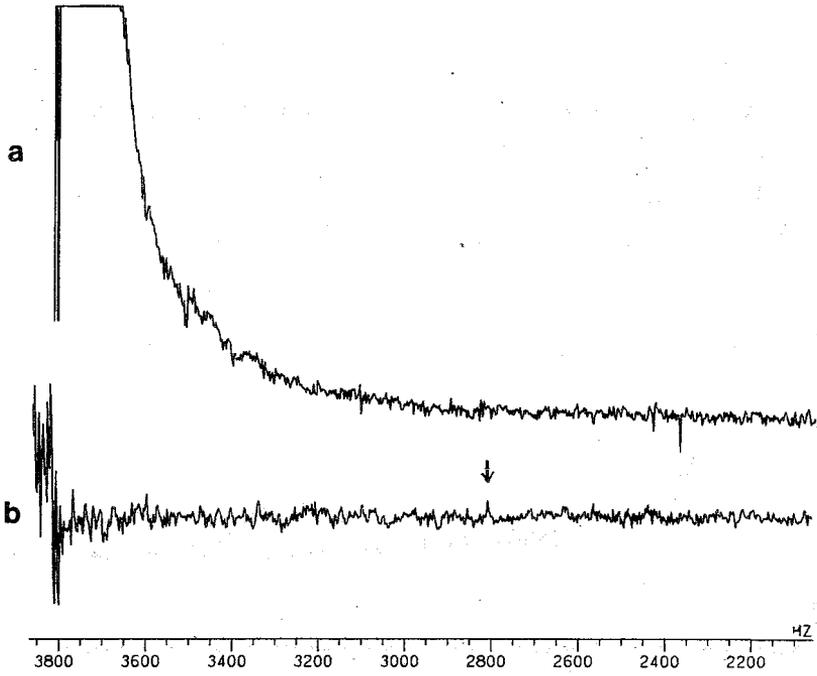


図 3. エタノール水溶液のプロトンスペクトル. a) 通常のスペクトル, b) 差分スペクトル, ↓印がメチルプロトン.

(阪大・理) 大木 寛・中村 巨男・千原 秀昭

NUTATION NMR OF ^{23}Na

Hiroshi OHKI, Nobuo NAKAMURA, and Hideaki CHIHARA (Osaka University)
 Nutation NMR is a promising technique for examining quadrupole interactions of nuclei particularly when more than one nonequivalent sites exist for a quadrupolar nucleus and it undergoes hopping motion. One may then expect that different quadrupole interaction will cause the spectrum to split in one dimension thus giving a clue to separate different motions. As a step toward such studies, we attempted to apply this new method to $I=3/2$ and derived the explicit formulae for the nutation 2D spectra and prepared a computer simulation program. The program was tested by fitting the spectrum with experimental one for ^{23}Na in polycrystalline NaNO_2 and $\text{NaHgCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, in which e^2qQ/h and η were estimated.

緒言> スピンが1以上の核は四極モーメントを持つ。従って粉末試料の場合には、核四極相互作用により、NMRスペクトルに構造が現れたり、極端な場合には吸収線が broad out してスペクトルが観測できないこともある。しかし原理的にはスペクトルの形から核四極結合パラメータ (e^2qQ/h , η) に関する情報を取り出すことができ、これにより、核の周囲の電子環境など有意な知見が得られる筈である。

近年、SamosonとLippman¹⁾により、提案されたNutation (2次元) NMR法は、スピンの半整数の核種においてはそのcentral transition ($-1/2 \leftrightarrow 1/2$) の1次摂動の範囲内で核四極相互作用に依らず、従って殆ど常に観測できることから、逆にcentral transitionだけを観測することにより、同様な情報を引き出そうというものである。この方法の利点として実験が容易であること、従来の方法では困難な e^2qQ/h と η の同時決定ができること、また、nonequivalent siteにある核の信号を分離できること、等を挙げられる。

そこで今回我々はNutation NMR用のsimulation programを開発し、 NaNO_2 , $\text{NaHgCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 等の試料について実験・解析を行った。

理論> $I=3/2$ について、できるだけ厳密な式の導出を試みた。

0rfパルス照射中 強磁場中に置かれた独立な核スピンの系のハミルトニアンは、

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_Q + \mathcal{H}_{rf} \quad (1)$$

$$\mathcal{H}_Z = \omega_0 I_z \quad : \text{Zeeman}$$

$$\mathcal{H}_Q \sim \mathcal{H}_Q^{(1)} = \left(\frac{e^2qQ}{4h} \right) (3\cos^2\theta - 1 + \eta \sin^2\theta \cos 2\varphi) (I_z^2 - 5/4) \quad \begin{array}{l} \theta, \varphi \text{ は EFG 主軸と} \\ \text{外部磁場のなす角} \end{array}$$

$$= \omega_Q^{(1)} (I_z^2 - 5/4) \quad : \text{Quadrupole Interaction (first order)}$$

$$y_{rf} = \omega_1 (I_x \cos \omega_0 t + I_y \sin \omega_0 t) \quad : \quad rf$$

$$\omega_1 = \gamma H_1$$

但し、 $y_{rf} \gg y_{rf}^{(1)}$ として 2 次以上の核四極相互作用を無視している。これを相互作用表示で表わすと、

$$\tilde{y} = \omega_a^{(1)} (I_x^2 - 5/4) + \omega_1 I_x \quad (2)$$

\tilde{y} は次の直交行列で対角化できる：

$$Z = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \cos \theta & -\sin \theta & -\sin \theta & \cos \theta \\ \sin \theta & \cos \theta & \cos \theta & \sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta & -\cos \theta & -\sin \theta \\ \cos \theta & -\sin \theta & \sin \theta & -\cos \theta \end{pmatrix} \quad (3)$$

$$\tan 2\theta_{\pm} = \sqrt{3} (2\omega_a^{(1)}/\omega_1 \pm 1)^{-1} \quad (\text{複号同順})$$

また、その固有値は

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= \omega_1/2 + (\omega_1^2 + \omega_a^{(1)2} - \omega_1 \omega_a^{(1)})^{1/2} \\ \lambda_2 &= \omega_1/2 - (\omega_1^2 + \omega_a^{(1)2} - \omega_1 \omega_a^{(1)})^{1/2} \\ \lambda_3 &= -\omega_1/2 - (\omega_1^2 + \omega_a^{(1)2} + \omega_1 \omega_a^{(1)})^{1/2} \\ \lambda_4 &= -\omega_1/2 + (\omega_1^2 + \omega_a^{(1)2} + \omega_1 \omega_a^{(1)})^{1/2} \end{aligned} \quad (4)$$

となる。当初、熱平衡状態にあった核スピニ系は、幅 τ_p の rf パルスによってスピニ状態が混合され、 τ_p の長さによって混合状態が変化する。密度行列で表わすと、

$$\tilde{\rho}(\tau_p) = Z \exp(-i\tilde{y}\tau_p) Z^{-1} \tilde{\rho}(0) Z \exp(i\tilde{y}\tau_p) Z^{-1} \quad (5)$$

$$\tilde{y}^d = Z^{-1} \tilde{y} Z$$

$$\tilde{\rho}(0) = \rho(0) \sim 1/4 - (\hbar\omega_0/4kT) I_z \quad : \quad \text{高温近似}$$

が rf パルス照射直後の状態である。

② パルス後の FID パルス後のハミルトニアンは、相互作用表示で

$$\tilde{y} = y_a^{(1)} + y_a^{(2)} \quad (6)$$

$$y_a^{(2)} : \text{second order quadrupole interaction}$$

と表わされるから、パルス後 t 時間の密度行列は

$$\tilde{\rho}(\tau_p, t) = \exp\{-i(y_a^{(1)} + y_a^{(2)})t\} \tilde{\rho}(\tau_p) \exp\{i(y_a^{(1)} + y_a^{(2)})t\} \quad (7)$$

であるが、 $y_a^{(2)}$ は時間変化に寄与しないので central transitionのみを考えると、結局

$$\tilde{\rho}'(\tau_p, t) = \tilde{\rho}'(\tau_p) \exp(i\omega_a^{(2)}t) \quad (8)$$

ここで $\tilde{\rho}'$ は $m = -1/2, 1/2$ で張られる密度行列の小行列であり、 $\omega_a^{(2)}$ は central transition の核四極相互作用による 2 次のシフトである。

③ NMR 信号 信号強度 $S(\tau_p, t)$ は、(3), (4), (5), (8) より、

$$\begin{aligned} S(\tau_p, t) &\propto \text{Im} \left[\text{Tr} \{ \tilde{\rho}'(\tau_p, t) I_+ \} \right] \\ &= \{ 3 \sin 2\theta_+ \sin 2\theta_- - (1 + \cos 2\theta_+) (1 - \cos 2\theta_-) \} \sin(\lambda_3 - \lambda_1) \tau_p \\ &\quad + \{ 3 \sin 2\theta_+ \sin 2\theta_- - (1 + \cos 2\theta_+) (1 + \cos 2\theta_-) \} \sin(\lambda_3 - \lambda_2) \tau_p \\ &\quad + \{ -3 \sin 2\theta_+ \sin 2\theta_- - (1 - \cos 2\theta_+) (1 - \cos 2\theta_-) \} \sin(\lambda_4 - \lambda_1) \tau_p \end{aligned}$$

$$+ \{3\sin 2\theta_+ \sin 2\theta_- - (1 - \cos 2\theta_+) (1 + \cos 2\theta_-)\} \sin(\lambda_+ - \lambda_-) T_p \} \\ \times \cos \omega_a^{(2)} t \quad (9)$$

$$\omega_a^{(2)} = (\sigma_a Q / \tau_1)^2 / 192 \omega_0$$

$$\times \{ 9 \sin^2 \theta - 6 \eta (1 - \cos^2 \theta) \cos 2\varphi + \eta^2 (1 + \cos^2 \theta)^2 \cos^2 2\varphi \\ + 4 \eta^2 \cos^2 \theta (1 - \cos^2 2\varphi) \\ - 72 \sin^2 \theta \cos^2 \theta - 48 \eta \sin^2 \theta \cos^2 \theta \cos 2\varphi \\ - 8 \eta^2 \sin^2 \theta \cos^2 \theta \cos^2 2\varphi - 8 \eta^2 \sin^2 \theta (1 - \cos^2 2\varphi) \}$$

実験> NaNO2 は市販のものをそのまま用いた。NaHgU3.5H2O は市販の NaU と HgU2 を水に溶かし、水を蒸発させて得た。

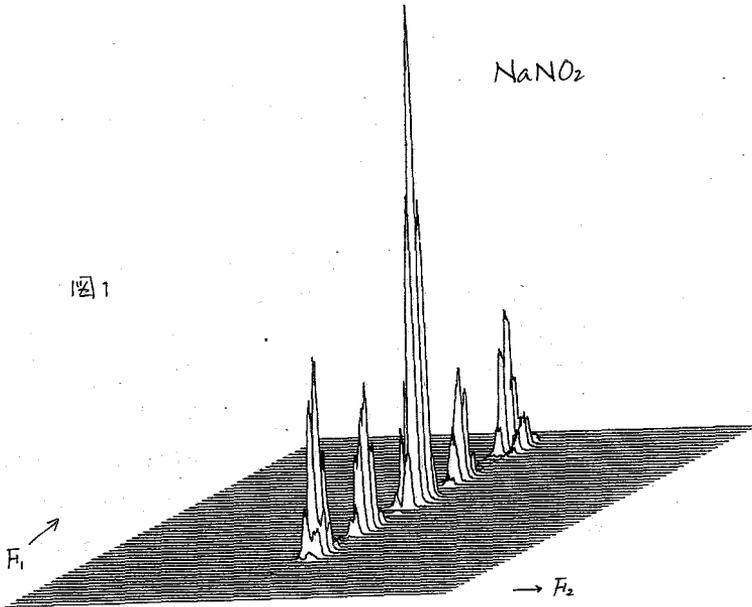
測定には BRUKER 社製の MSL 200 システムを使用し、夫々の試料について ^{23}Na の central transition を 52.938 MHz (at resonance) で観測した。 T_p は $1 \mu\text{s}$ 毎に $64 \mu\text{s}$ まで変化させた。一方 τ_1 は $0.5 \mu\text{s}$ 間隔で 4096 乗 sampling し、これを T_p と τ_1 について 2次元

フーリエ変換したものをスペクトルとした。

図1, 図2に結果を示す。

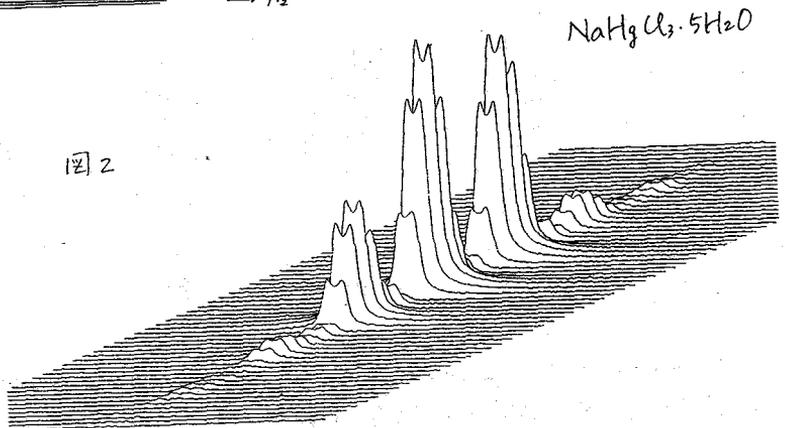
90°パルス幅は約 $3.0 \mu\text{s}$ であつた。 T_2 は $2 \sim 3 \mu\text{s}$ 程度、 $\omega_1 \sim 250 \text{ kHz}$ と推定される。

図1

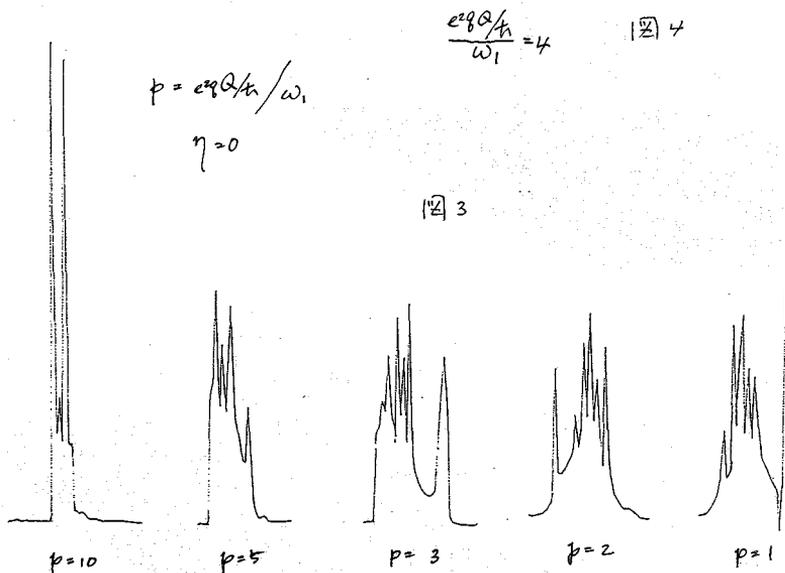
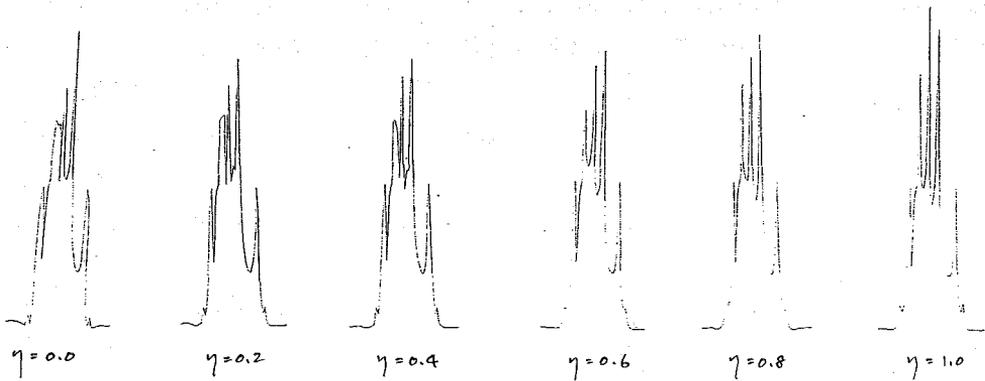


計算> powder平均をとるために θ, φ を $8000 \times$ に分割し、(9)の和を計算した。次にこれをフーリエ変換してスペクトルを得た。計算は FORTRAN, 作図は BASIC を用いた。

図2



考察) 2Dスペクトルの T_p による軸を F_1 , t_1 による軸を F_2 とすると、(7)から明らかになるように F_2 投影図は通常の核四極相互作用の2次シフトの powder pattern のものである。一方、 F_1 軸はいわゆる Nutation pattern を示す。これは、核四極相互作用が ω_1 に比べて充分小さければ($\omega_1 \ll \omega_{Hf}$) ω_1 の位置に、逆に $\omega_1 \gg \omega_{Hf}$ ならば $(I+1/2)\omega_1 = 2\omega_1$ の位置に唯一本の peak を示す筈のものである。数本の peak が見られることから、simulation によって、 e^2qQ/h を決定できる。図3は e^2qQ/h と ω_1 の比に対してスペクトルがどのように変化するかを表す。 e^2qQ/h が大きくなるにつれてスペクトル幅、peak 数が変わることになる。従って NaNO_2 , $\text{NaHgU}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 共、 $e^2qQ/h \sim 1\text{MHz}$ であることがわかる。また、図4は η のスペクトルに及ぼす影響を示す。 η の増加と共に intensity が減少する peak がある。このことから $\text{NaHgU}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ では $\eta \sim 0.5$ と求まった。



$$\frac{e^2qQ/h}{\omega_1} = 4 \quad \text{図4}$$

このように、Nutation NMR は核四極相互作用を調べるのに有用である。現在、site hop がある系について、simulation program を開発することを検討している。

- 1) A. Samoson and E. Lippmaa: Chem. Phys. Lett. 102 (3), 1983, 205
- 2) L. Pandey, S. Towta, and D. G. Hughes: J. Chem. Phys. 85 (12), 1986, 6923

(日本女大家政・日本電子生体研) ○高橋 征三・永山 国昭

A Novel $1\bar{1}$ Pulse Method for the NMR Measurement of Aqueous Solution.

Seizo Takahashi and Kuniaki Nagayama (Japan Women's Univ. & JEOL Ltd.)

A new method was proposed by means of a linear combination of $1\bar{1}$ pulse train with asymmetric pulse width. The conventional $1\bar{1}$ pulse method suffers from two main drawbacks, namely (1) rather poor solvent resonance suppression and (2) base line rolls due to the remaining solvent water resonance. We found that the radiation damping substantially hampers the selective excitation and that the curved baseline was resulted from the dispersion component of the solvent resonance. They were effectively cancelled by taking a linear combination of the spectra with different phase in the solvent resonance. The resulting spectra give flat baseline keeping the filter characteristics of $1\bar{1}$ pulses, and the suppression efficiency of the solvent resonance is quite often better than that from the $1\bar{3}\bar{1}$ pulses.

水素結合や分子の溶媒との相互作用は分子構造を考える上できわめて重要である。その意味で軽水中で測定される exchangeable proton のNMRスペクトルは生体高分子の構造や運動の研究にしばしば貴重な情報をもたらす。しかし現在のところ軽水溶液の測定はそれほど普及していない。その理由は通常 10mM 以下の試料濃度に対して軽水の濃度は 110M に相当するので、溶媒の信号だけを選択的に $1/1000$ 程度に抑制する必要があるが、現実にはそれほど簡単でないからである。

パルスFT法における選択的溶媒信号抑制法として主に選択的照射法や選択的励起法が使われる。選択的照射法は測定が簡単であり、この方法が有効なときは常に好ましい選択肢とされる。しかしこの方法で測定できるのは比較的溶媒との交換速度の遅い proton の信号だけであり、実験対象に限られる。その点、選択的励起法はより一般的である。選択的励起法としては昔から数多くの方法が提唱されてきたし、現在でも毎月のように新しい方法が提唱されている。この事実は、どの方法も一長一短があり、まだ決定的な方法がないことを意味している。

選択的励起法とは、パルスと短いdelayを組み合わせた、一連のパルス列で励起する方法である。普通そのパルス列は時間軸に対して(反)対称の形にする。そして最後のパルスで溶媒の磁化ベクトルはZ軸に戻るが、溶媒と異なる化学シフトの信号は、一連のパルス列の間に、XY面に展開されるようにするのである。これは溶媒信号の周波数にスペクト

ルの穴を作ることに相当する。当然構成するパルスが多いほど flat で sharp な穴が作れるし、穴の幅が大きいほど溶媒信号抑圧比は大きくなる。しかしパルス列が複雑になればなるほど、周波数ごとの位相回りが複雑になり、高次の位相補正が必要になる。そして位相補正が大きいと、どうしても付加的なベースラインのうねりが避けられない。従って選択的励起法とは、最も少ない数のパルス列で、フィルタ特性と位相変化を満足させる、妥協点を捜す問題に帰着する。

[$1\bar{1}$ パルス法の特徴]

$1\bar{1}$ パルス法は最も単純で位相特性も素直であるが、溶媒信号抑圧は通常 $1/300$ 程度であり、最悪の場合 $1/50$ 以下のことも珍しくない。従って残存する溶媒信号の影響は他の方法に比べて最も強く、そのままでは低濃度の試料の測定には適していない(図2a)。しかし $1\bar{1}$ パルス法だけが、 $\sin\omega$ のフィルタ特性を持つので、溶媒のごく近傍の信号でも励起できる。さらにこの方法は励起スペクトル幅が最も広く、常磁性スペクトルなどを測定するとき、これ以外の方法は実用的でない。従って溶媒信号抑圧比が高くて $1\bar{1}$ パルス法の長所を持つ選択的励起法が、一つの望ましい方向として追求されるべきである。

[溶媒信号の残る理由]

H_2O の線幅は 2H_2O 中よりもかなり大きく、しかも flip angle によって線幅は顕著に変化する。軽水溶液中では radiation damping (放射減衰) が効くからである。もし $1\bar{1}$ パルスで設定する、 100μ 秒オーダの短時間の delay の間でも、放射減衰が影響するならば、その間に図1の②の分だけ Z 軸に近づくため、2番目のパルスが1番目のパルスと同じ長さだと、溶媒の磁化ベクトルは決して Z 軸に戻らないことになる。図1の場合、溶質の信号は X 軸方向に展開されるので、溶媒は溶質に対し位相が 90° ずれ、溶媒の分散スペクトルが溶質の吸収スペクトルにかぶってくる(図2a)。そして1番目のパルス幅を多少大き目にする、信号抑圧比は向上する(図2b)。ただし放射減衰の影響②は Y 軸面内に必ずしも限られるわけではない。事実、X 方向の成分を補正するために、第2パルスの位相を 6° ずらすと信号抑圧比はさらに向上した。理論的には、 $1\bar{1}$ パルス以外の例えば $1\bar{3}\bar{3}\bar{1}$ パルスでは放射減衰の影響は大部分打ち消されるはずであるが、実際は図2dに示すように分散成分が少なからず残る。一般に最後の delay やパルス幅の微調で信号抑圧の程度は顕著に向上するし、溶媒信号の位相は倒す角度やオフセット位置など、測定条件に著るしく左右される。 $1\bar{1}$ パルスの場合、パルス幅やパルスの位相の微調だけで、信号抑圧比を1桁

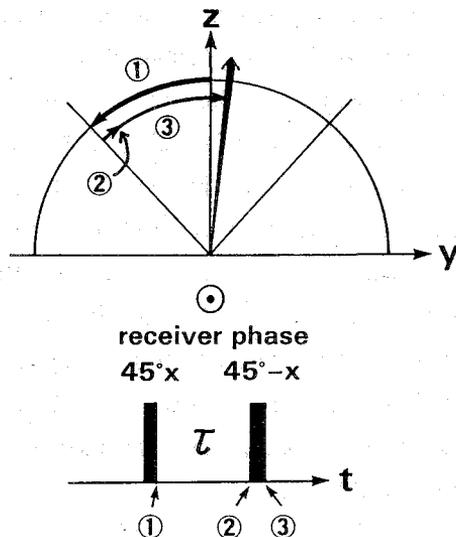


図1 磁化ベクトルに及ぼす放射減衰の影響：放射減衰②があるので2番目のパルスの直後では②の分だけ Y 軸方向に傾く

以上向上させることは極めて難しいようだ。

〔測定上の問題〕

選択的照射法や励起法で残る溶媒の大きさは、50Hz以上離れた磁場の不均一成分をいかに小さくするかによって決まる。したがって半値幅やspinningの有無はほとんど関係しない。試料ごとに毎回高次のシムまで丁寧に合わせることを肝要であるが、実際はなかなか難しく熟練を要する。実際、種々の理由で²H-Lockを使う現在の装置は軽水溶液の測定に使い易くない。

〔複合パルス結合法〕

溶質の信号に対して、溶媒の信号の位相が異なる2種類のスペクトルがあれば、それらを足し合わせて、溶媒からの分散スペクトル成分を打ち消し合うことができる。この方法を複合パルス結合法と呼ぶことにする。以前、本討論会でJRとSJRパルスや $1\bar{1}$ と $1\bar{2}1$ パルスの組み合わせが有効なことを報告した^{1,2)}。しかしこれらの方法は必ずしも $1\bar{1}$ パルスのフィルタ特性が生かされていなかった。今回、上述の考えに基づいて、 $1\bar{1}$ パルスだけで2種類のスペクトルを構成することに成功した。つまり $1\bar{1}$ パルスの最初のパルスの幅を徐々に大きくしていくと、ある時点で溶媒信号の位相が逆転するものが得られる(図2b)。そのス

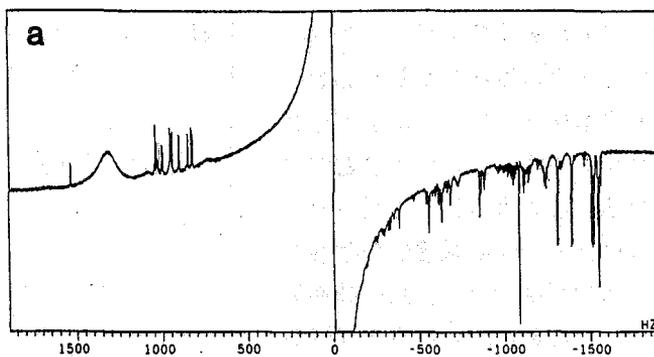


図2a 従来の対称 $1\bar{1}$ パルスによる400MHz ¹H-NMRスペクトル：試料はアミノ酸分析用標準溶液(15mM)を重水で10%希釈したもの。パルス幅7.0/7.0 μ s(45°), delay time 250 μ sの条件下で4回積算した。

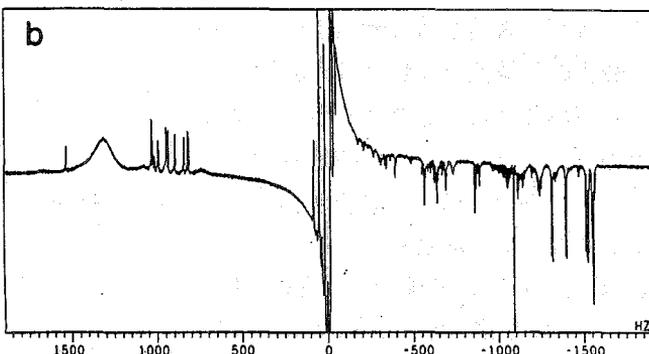


図2b 非対称 $1\bar{1}$ パルス(パルス幅7.1/7.0 μ s)によるスペクトル：溶媒信号が小さく位相が上図と逆転する。溶媒の位相は第1パルスの微調で自由に調整できる。

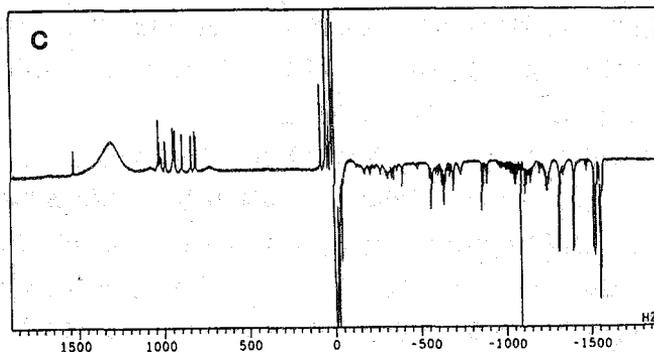


図2c 2aと2bのFIDを1:3.5の比率で加えて得た結合スペクトル：2bの場合、パルスの微調で信号抑圧比が3.5倍向上した。比率は条件によって異なり、毎回試行錯誤によって求める。中心付近のスパイクはspinning side bandである。

ベクトルを元のスペクトル(図2a)と一定の量比で足し合わせると平坦なベースラインを持つスペクトル(図2c)にすることができる。このようにして得られたスペクトルは溶媒信号の強度が1/5000程度になり、同一条件で測ったとき、 $133\bar{1}$ パルス(図2d)を凌駕していることが分かる。このように $1\bar{1}$ パルスの結合法で容易に1/1000~1/5000の信号抑圧比を得ることができる。

【複合パルス結合法の特徴】

最大の特徴は flat な baseline が得られることであろう。元の対称 $1\bar{1}$ パルスでは水の近傍に α プロトンの信号が観測されるはずなのに、湾曲した baseline のせいで、明確でない(図2a)。つまり結合法によって初めて $1\bar{1}$ パルスの特徴を活用できるようになったといえる。

溶媒信号からの分散成分を除去するだけならパルス幅の微調だけで可能である(図3)。パルス幅だけでなく、パルスの位相

も微調できればさらに簡単である。パルスの位相を変えることは、スペクトルのオフセットを変えること、等価なので、溶媒信号の位相は磁場や電気系の変動で鋭敏に変動する。今の装置の性能から考えて、この方法では結果が不安定になる可能性が高い。

複合パルス結合法は、今までのアプローチと全く発想が異なり、できるだけ単純なパルス列に回帰することを求める。原理的にはどのパルス列との組み合わせも可能であるが、その効果は $1\bar{1}$ パルスが一番大きい。実際、 $1\bar{1}$ パルス結合法の溶媒信号抑圧効果は、決して選択的照射法に劣らないし、大部分の生体分子の測定に必要な十分だからである。 $1\bar{1}$ パルス結合法は、選択的励起法として、現状における最善の妥協策であろう。

- 【文献】 (1) 高橋征三, C. ホー : 第23回NMR討論会講演要旨集 13 (1984)
 (2) 高橋征三, 永山国昭 : 第26回NMR討論会講演要旨集 67 (1987)

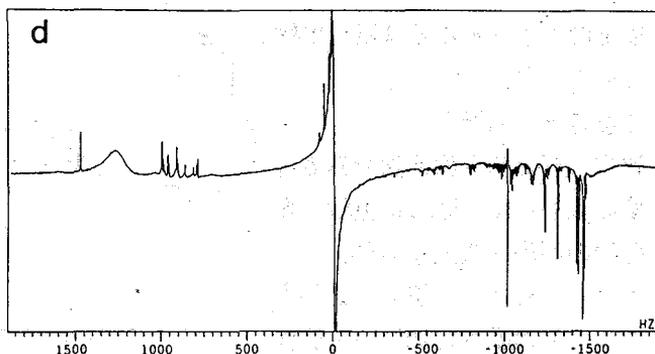


図2d 同一条件で測定したときの $133\bar{1}$ パルスの結果 : 溶媒信号抑圧率が 2c より多少劣るだけでなく、水から 500 Hz 以内の proton 信号がほとんど消えている。溶質信号の位相も位置により微妙にずれる。

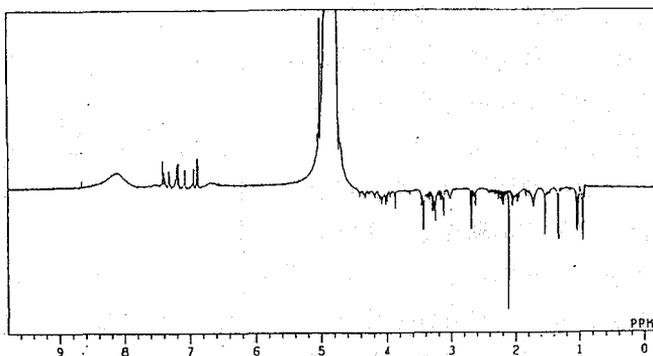


図3 単独の非対称 $1\bar{1}$ パルスによって得られるスペクトル:パルス幅をうまく微調すれば $1\bar{1}$ パルスだけでも分散成分をなくすことができる。ただし 溶媒信号の抑圧効果やbaselineの平坦さは複合パルス結合法より劣る。

日本電子、日本ロシュ^{*}、東大応微研^{**}、

○大内宗城、河野静江、今成司、児玉佳子^{*}、瀬戸治男^{**}

The INADEQUATE experiment gives responses only from homonuclear-coupled spins, such as the $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ satellites; one form of this experiment is the ultimate method so far as tracing the skeletons of organic molecules is concerned.

Unfortunately it is also just about the least sensitive experiment.

It is very difficult to measure 2D-INADEQUATE spectrum, sometimes.

Then we propose new selective INADEQUATE method.

< はじめに >

有機化合物の構造解析において種々の NMR 測定法が使用されている。水素核等の同種核間のスピン解析においては、COSY, Relayed COSY, HOHAHA 等の二次元 NMR 法が、異種核間のスピン解析においては、H-C COSY 等の二次元 NMR 法が使用されている。最近、水素核を観測する異種核間の二次元 NMR の開発により数 mg の試料量でも構造解析が可能となった。しかし、縮合環を持つ化合物で水素核と直接結合していない炭素においては、異種核間のスピン結合がない、または、小さい ($^n J_{\text{XH}}$ が 1 ~ 2 Hz 以下) ことがあり、このような場合種々の二次元 NMR 法が利用できない。

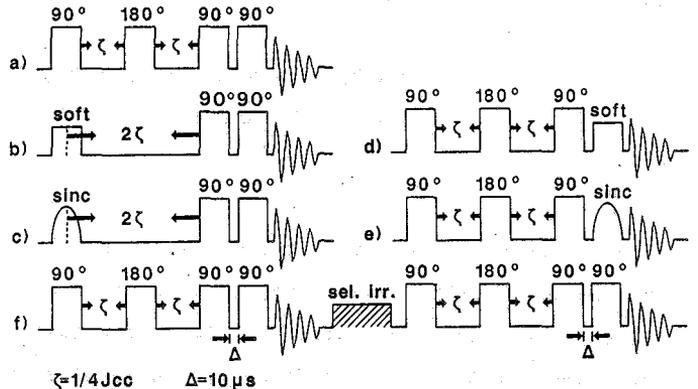
この場合、唯一、多量の試料を使用した INADEQUATE 法の利用が考えられる。この INADEQUATE 法は、 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ サテライトのような同種核スピン結合の相関を得て有機化合物の炭素骨格のつながりの情報を得る上で強力な手段である。しかし、天然存在比約 1% のサテライト信号を検出するため最も感度の悪い測定法の一つでもある。この INADEQUATE 法には、一次元 NMR 法と二次元 NMR 法の二種類がある。数百 mg 以上の多量の試料量を使用できる場合、二次元 INADEQUATE 法は、炭素骨格のつながりを得るために非常に有効な方法であるが、数十 mg の試料量では検出不可能である。このため一次元 INADEQUATE 法のスペクトルより $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ のスピン結合定数を測定し、 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ のスピン結合定数の違いによりスペクトルの解析を行うと良い。しかし、縮合環を持つ化合物や炭化水素化合物では、 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ のスピン結合定数がほぼ同じであり、結合定数によるスペクトルの解析が不可能となることが多い。これらの欠点を補う目的で新しく選択的 INADEQUATE 法を開発した。今回、この選択的 INADEQUATE 法を 2-オクタノールおよびケルセチンに応用したので報告する。

< 方法 >

この選択的 INADEQUATE 法には、Kessler らや降旗らを使用している選択的励

起パルス応用、および降旗らの
 選択的飽和の応用が考えられる。
 このパルス系列を図1に示す(な
 お、水素核のスピンは完全デカッ
 プリングしている)。

図1 aは、通常の一次元INA
 DEQUATE法で使用されるパ
 ルス系列であり、図1 b~fは選
 択的INADEQUATE法で使
 用されるパルス系列である。図1



b, cは、最初の非選択パルスを
 長方形およびsinc関数の選択パルスで置き換えたものである。図1 d, eは、最後の
 非選択的パルスを長方形およびsinc関数の選択パルスで置き換えたものである。図1
 fは、二つのINADEQUATE法のパルス系列の間である特定のスピンを飽和させ、
 飽和と非飽和の間で差を取る方法である。図1 b, dの選択パルスの出力が90°パルス
 幅で5 msecとなるようにRF減衰器で低下している。

図1 選択的INADEQUATE法のパルス系列
 $\tau = 1/4 J_{cc}$ $\Delta = 10 \mu s$

< 結果 > a. 2-オクタノールへの応用

¹³C-¹³Cスピン結合定数がまったく同じ例として2-オクタノールを取り上げ、図1
 bのパルス系列を使用した2-オクタノールの結果を図2に示す。図2 aは通常の¹H完
 全デカップリング¹³C NMRスペクトルである。図2 bは、通常のINADEQUATE
 のスペクトルである($\tau = 7 \text{ msec}$)。このINADEQUATEスペクトルから1
 位と2位の炭素間のスピン結合を除き、他のスピン結合定数は約35 Hzであることが読
 み取れるが、このようにほぼ同じスピン結合定数を持っている系において、有機化合物の
 骨格のつながりについての情報を得ることは困難である。そこで、図1 bのパルス系列
 を使用し、5位の炭素を選択的に励起した選択的INADEQUATEのスペクトルを図
 2 cに示す($2\tau = 15 \text{ msec}$)。このス
 ペクトルでは、選択的に励起した
 5位および5位とスピン結合した
 4位および6位のみ信号が残って
 いる。このように、目的の信号の
 みの検出が可能となり解析が容易
 となる。なお図2 b, cのスペク
 トルの測定に要した時間は約1.5
 時間であった。2-オクタノール
 の二次元INADEQUATEの
 スペクトルは省略するが、その測

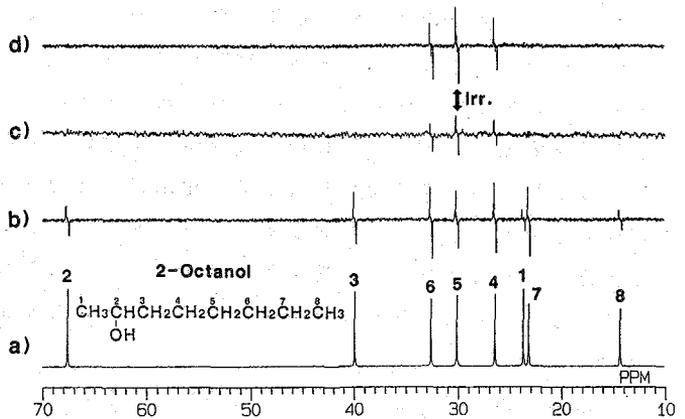


図2 2-オクタノールの選択的INADEQUATE法のスペクトル

定に要した時間は約12時間であった。この選択的INADEQUATE法の使用によって、このように大幅な時間の短縮がはかられた。図1cのパルス系列を使用し5位を選択的に飽和した2-オクタノールの選択的INADEQUATEのスペクトルを図2dに示すが、同様の結果が得られた。

b. ケルセチンへの応用

異種核間のスピン結合のない例として、ケルセチンを取り上げ説明を行う。この化合物は水素が少なく構造解析を行う場合、 $^1J_{CH}$ のスピン結合定数の測定や異種核二次元NMRスペクトルの測定が非常に重要な手段となる。図3bに示すようにCOLOCスペクトルにおいて、水素核とスピン結合のない3位と4位の二個の炭素に相関ピークが検出できず、骨格炭素のつながりが不明確である。また、感度の良いHMQC及びHMBBC法を使用しても3位と4位の二個の炭素に相関ピークが検出されず、骨格炭素のつながりは不明確である。この理由は、図4bのケルセチンの水素核とカップルした ^{13}C NMRスペクトルよりわかるように、水素核とスピン結合がない炭素が二個存在しているためである。一次元INADEQUATE法で $^{13}C-^{13}C$ スピン結合定数を測定したスペクトルを図4cに示すが、スピン結合定数は57~70Hzの範囲であり、しかも4位と10位のように同じスピン結合定数を持つ炭素が多く、スペクトル解析が非常に困難である。約一日を要し二次元INADEQUATE法の測定を行ったが目的の炭素に相関ピークが検出できずスペクトル解析が不可能であった。そこで図1eに示すパルス系列を使用し176.3ppmの4位の炭素について選択的INADEQUATE法($\tau=4.1\text{ msec}$)で測定したスペクトルを図5cに示す。このスペクトルよりわかるように4位の炭素と結合している3位および10位の炭素のみに信号が検出され、確実な解析ができた。二次元INADEQUATE法で検出が困難な試料でもこの選択的INADEQUATE法を使用することにより構造解析が可能となった。

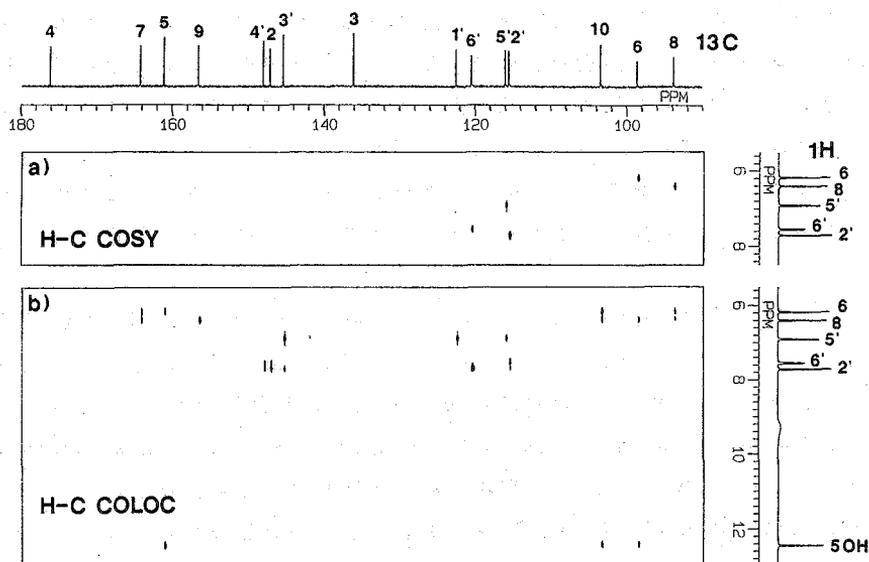


図3 ケルセチンの異種核間相関二次元NMRスペクトル

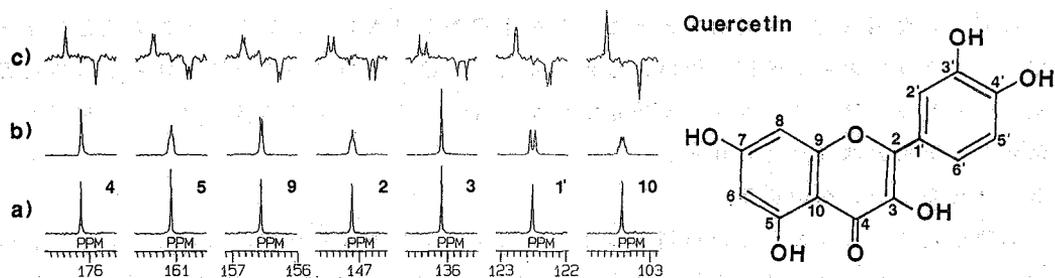


図4 ケルセチンの ^{13}C NMRおよび一次元INADEQUATE法のスペクトル

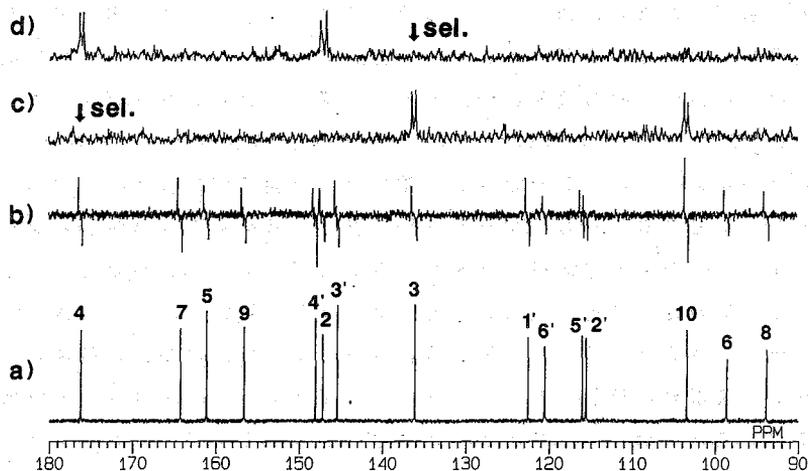


図5 ケルセチンの選択的INADEQUATE法のスペクトル

< まとめ >

多数の炭素のつながりを同時に測定する場合は二次元INADEQUATE法が非常に有効であるが、単一の炭素のつながりを測定する場合にはこの選択的INADEQUATE法の方が有効であり情報を短時間で得ることができる。この選択的INADEQUATE法を数個の炭素について繰り返して測定すれば複数の炭素のつながりの情報を得るうえでも有効な手段となる。さらに、二次元INADEQUATE法で測定できない数十mgの試料量でもこの選択的INADEQUATE法では信号を検出することが可能である。

1. A.Bax, S.P.Kempell, R.Freeman, J.Am.Chem.Soc. 102 4849 (1980)
2. A.Bax, R.Freeman, T.A.Frenkiel, J.Am. Chem. Soc. 103 2102 (1981)
3. 降旗一夫、瀬戸治男、大内宗城、第24回NMR討論会要旨集 1985 (筑波)
4. H.Kessler, H.Oschkinat, C.Griesinger, W.Bermei J.Magn.Reson., 70 106 (1986)
5. 降旗一夫、瀬戸治男、大内宗城、第25回NMR討論会要旨集 1986 (東京)
6. 降旗一夫、瀬戸治男、大内宗城、第26回NMR討論会要旨集 1987 (大阪)
7. J.Y.Lalmond and M.Duteil. Org. Magn. Reson. 9 179 (1977)

(東大応微研)[○] 降旗一夫 瀬戸治男

Application of selective HOHAHA-CH method to structure studies of complex molecules
Kazuo Furihata and Haruo Seto

(Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

Two 1D NMR techniques, selective HOHAHA C-H method and semiselective HOHAHA C-H method are proposed which are based on obtaining 1D difference spectra. The former method uses a modified pulse sequence of HOHAHA C-H COSY with selective ^1H irradiation and MLEV-17 spin locking pulse. In the latter method, MLEV-17 spin locking pulse is replaced by alternative phase spin locking pulse to facilitate the excitation of the narrow ^1H region.

These techniques are advantageous in cases where a limited amount of information is required for detecting proton-proton connectivities in the crowded regions of the proton NMR spectra. Their application is highly promising in the structural analysis of complicated natural products.

はじめに

二次元NMRの出現により、天然有機化合物の構造解析は非常に容易になってきた。特にHOHAHAやHMBC法は、今まで構造研究の対象になりえなかった化合物に対してもNMRによる構造解析を可能にしてきた。しかし、NMRによる複雑な化合物におけるメチレン間の結合の証明は依然として困難な問題として残っている。その原因の一つは、 T_2 の速いメチレンシグナルのクロスピークの観測がS/Nの低下のために困難となることであり、もう一つは、メチレン間の化学シフトが近接しているため、解析が不可能となるためである。このような問題を解決する方法の一つとして、二次元HOHAHA-CH法¹⁾の一次元化を試み非常に良好なデータを得ることが出来たので報告する。

方法

図1に Selective HOHAHA-CH法のパルス系列を示す。この方法の原理はプロトンNMRのsaturation差スペクトル法²⁾と同様であり、ある特定のプロトンを飽和した場合と、しない場合の差をとることにより、プロトン-プロトンの磁化移動を分離の良い ^{13}C -NMRで観測するものである。

Spin lock パルス

HOHAHA法において、spin lock パルスは非常に重要なパラメータである。図2はCW-spin lock パルス、 alternative phase spin lock パルス³⁾ 及び MLEV-17⁴⁾ について、励起範囲の検討を行なったものである。CW-spin lockパルスは励起範囲が非常に狭く、強い吸収は一点のみである。alternative phase spin lock パルスの励起範囲は2000Hz、MLEV-17は4000 Hz以上にも及ぶ事が明らかになった。従って、HOHAHA法ではMLEV-17を使用することが一般的であり、プロトンの化学シフトに依存せず全てのプロトンを励起することが可能である。また alternative phase spin lock パルスは、励起範囲が限られるために、部分励起 spin lock パルスとして優れていることが判明した。

スペクトル強度

HOHAHA法では delay time に依存して励起プロトンの磁化がスピン結合により次々と移動していく。図3は、n-ヘキシルプロマイドについて、メチルプロトンを選択的180パルスで励起し、delay time に依存するメチレンシグナルの強度の変化をプロットしたものである。6位のメチル基から短いdelay time の間で 5位、4位と次々とシグナルが立上がるのがわかる。こ

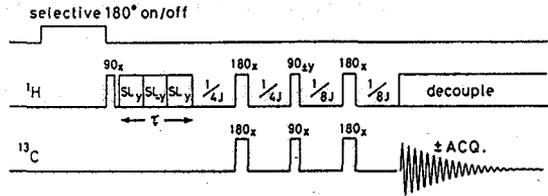


図1. selective HOHAHA-CH法の pulse 系列。

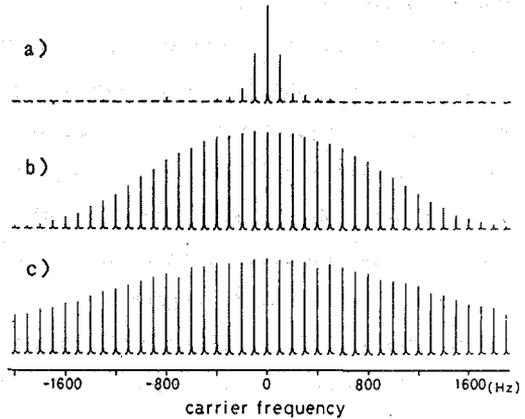


図2. spin locking pulseの励起範囲。

- 2-ジクロロエタノール, $J=5.6\text{Hz}$, $\Delta\delta=726\text{Hz}$,
 $\gamma H_2/2\pi=7000\text{Hz}$, spin lock period=60ms.
a) CW spin lock pulse.
b) alternative phase spin lock pulse.
(phase alternation=5ms)
c) MLEV-17 spin lock pulse.
(trim pulse=2ms)

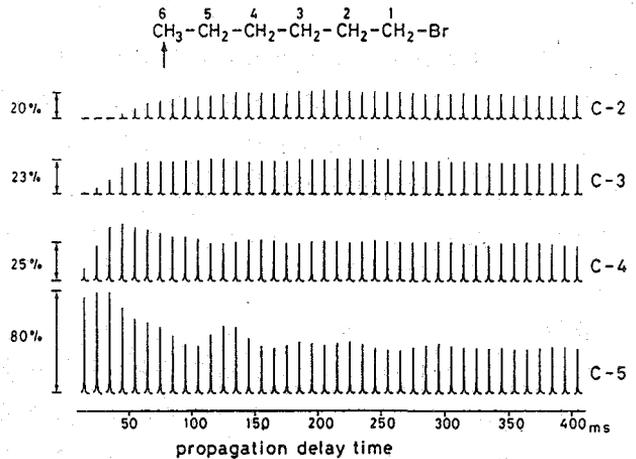


図3. n-ヘキサプロマイドにおけるメチレンシグナルの強度変化(下からC-5,4,3,2位)。強度変化しないシグナルを100%とする。

の際、メチル基に隣接した5位のシグナルは最大約80%の強度変化を示し、時間と共に減衰して20~30%ぐらいの強度変化となる。また3位、4位のシグナルは20~30%の強度で検出されることがわかる。なおプロトンの磁化が遠距離まで移動するに従い、シグナル強度が低下することが予想される。

コレステロールの側鎖メチレン炭素の帰属

コレステロールの側鎖メチレンプロトンは化学シフトが近接しており、プロトンNMRによる解析はほとんど不可能である。このような場合 selective HOHAHA-CH法は有効な解析手段である。図4はコレステロールの26,27ジメチル基からの磁化移動を、delay timeを可変して測定したものである。シグナルの強度の変化により25、24、23、と側鎖のシグナルの帰属が容易に行なえることが分る。

しかし、本方法では S/Nが低下するため、微量の試料については、ある一定のdelay timeのもとで測定し、観測されるシグナルについて解析を進める事となる。

部分励起法

HOHAHA法では delay time を長く設定すれば、非常に遠距離まで磁化移動が生ずる。例えばリノール酸のような化合物(図5)では

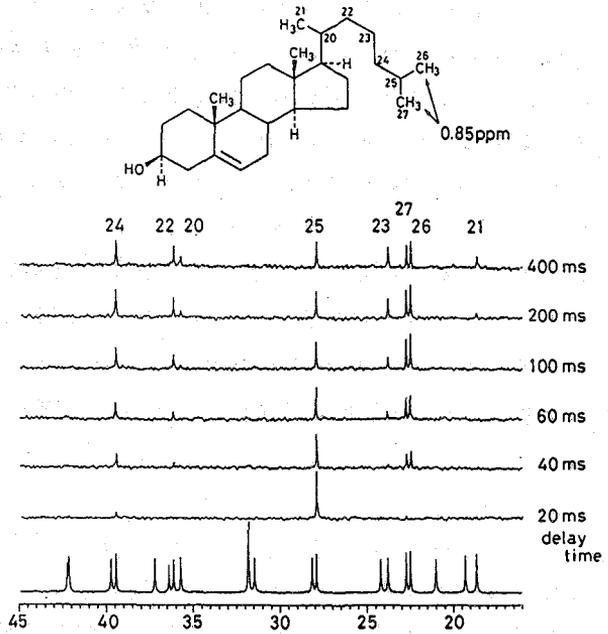


図4. コレステロールのselective HOHAHA-CHスペクトル。
メチル基 26,27位(0.85ppm)を照射。

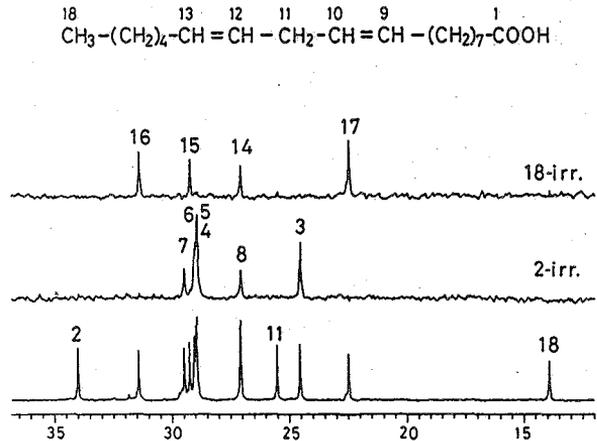


図5. リノール酸の部分励起スペクトル。
180° pulse=50ms, spin lock period=300ms,
メチル18位(上),メチレン2位(中)を照射。

メチル基から C-2位のメチレンまで観測が可能である。しかしこのような化合物ではメチル基とオレフィンプロトンの間に存在するメチレンの数を知らることが構造解析の上で非常に重要となる。この目的のためにはオレフィンプロトンを decoupling して磁化移動を止めればよいが、spin locking の状態では decoupling は不可能である。この場合、部分励起法は非常に有効な方法となる。図5にリノール酸の部分励起スペクトルを示す。測定は alternative spin lock パルスを使用し、アリファチックプロトン領域のみが Hartman-Hahn 条件を満たすようにキャリア周波数を設定する。この場合、オレフィンプロトンについては磁化移動が起こらず decoupling したのと同等の結果となる。このことから図5に示すように、メチル基の励起により C-14, C-15, C-16, C-17 の4本のメチレン炭素が観測され、オレフィン炭素は、メチル基から5番目に位置することが容易にわかる。また2位のメチレンプロトンからは、メチレン6本 (C-3, 4, 5, 6, 7, 8) が観測され、C-9位がオレフィンであることが容易に決定される。

まとめ

selective HOHAHA-CH法は¹H-NMRでは解析不可能な複雑に重なりあったプロトン領域の関係を明らかにする。しかも一次元化したために、特定のプロトンのみについて積算回数を高めることが出来るため、試料の少ない化合物に対しても測定が可能である。

- 1) Ad Bax, Donald G. Davis, Susanta K. Sarkar; J. Magn. Reson., 63, 230 (1985)
- 2) 降旗一夫、瀬戸治男、大内宗城; 第26回NMR討論会要旨集、57 (1987) 大阪
- 3) Donald G. Davis, Ad Bax; J. Am. Chem. Soc., 107, 2820 (1985)
- 4) Ad Bax, Donald G. Davis; J. Magn. Reson., 65, 355 (1985)

(北大理) 小椋賢治、引地邦男

RELAYED HMQC

Kenji OGURA and Kunio HIKICHI (Faculty of Science, Hokkaido University)

Various proposed relayed HMQC pulse sequences were examined using JEOL GX spectrometers. It was found that the use of the sequence proposed by Bax and Lerner gives the most satisfactory results.

(1)序論

Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy (HMQC) は、 ^1H とそれに直接結合した感度の低い核 (^{13}C 、 ^{15}N など) の両方を励起して 2 量子コヒーレンスを発生、展開させた後、再び ^1H の 1 量子コヒーレンス (磁化) に戻すことにより低感度核を間接的に検出する方法である。HMQC の変形としてリレード HMQC が考えられる。これは HMQC のシーケンスの最後に、 ^{13}C に直接結合した ^1H から 3 ボンド・カップリングした ^1H に磁化を移すもので、磁化を移された ^1H と ^{13}C のあいだに相関ピークが生じる。

リレード HMQC のパルス・シーケンスは既に Wagner らと Bax らによって発表されている。Fig. 1 にこれらのパルス・シーケンスを示す。これらのシーケンスには 2 箇所の

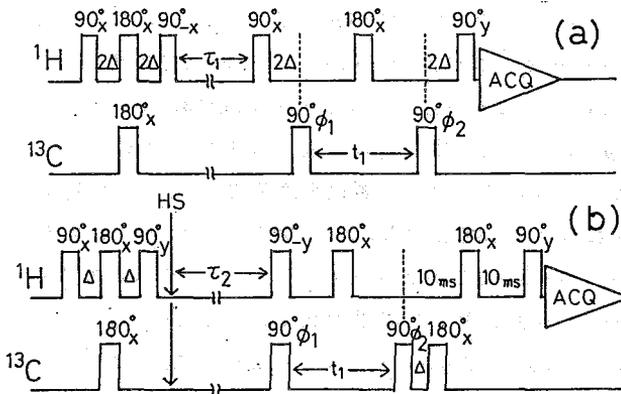


Fig.1 The pulse sequences of Relayed HMQC. $\Delta=1/4J_{\text{CH}}$. Phase cycling: $\phi_1=x, x, -x, -x, \phi_2=x, y, x, y$. Acq. = $x, y, -x, -y$. (a) The pulse sequence proposed by A. Bax. (b) The pulse sequence proposed by G. Wagner.

の違いがある。第一の相連点は ^{13}C と結合していない ^1H による大きなシグナルの消去法である。リレード HMQC では、 ^{13}C と直接結合した ^1H から 3 ボンド・カップリングした ^1H にリレーされた磁化は、メインピークと同じ位置に共鳴線を与える。そのためメインピークを完全に消去しなければならない。それには位相まわしによる消去だけでは不十分である。

Bax らは実験の最初に、メインピークを与える磁化を $-Z$ 軸方向に、 ^{13}C - ^1H サテライトピークを与える磁化を $+Z$ 軸方向に配向させ (BIRD パルス) たのちメインピーク磁化が縦緩和によりゼロ点を通過する瞬間まで待

ち、それからHMQCの準備期を始めている。一方、Wagnerらはメインピーク磁化をXY平面上に、サテライトピーク磁化を±Z軸方向に配向させ(縦スピンオーダー)、ある短い時間磁場を乱す(ホモスポイルパルス)ことにより横磁化を消去し、磁場が安定するまで待ってから2量子コヒーレンスを発生させている。

第二の違いはシーケンスの最後の ^1H から ^1H へのリレーの方法である。Baxらは ^1H へ磁化を移すHMQCの最後の ^{13}C 90° パルスの後、 $1/2J_{\text{CH}}$ だけ待ってから、 ^1H 90° パルスをかけ、 ^1H から ^1H への磁化移行を起こしている。 $1/2J_{\text{CH}}$ 待つのは、そのとき2量子コヒーレンスから移された磁化が最大値をもつからである。一方、WagnerらはHMQCの最後の ^{13}C 90° パルスの後20ms待ってから ^1H 90° パルスをかけ、磁化移行を起こしている。そして化学シフト依存性をなくすためにこのインターバルの中央に ^1H 180° パルスを挿入している。BaxらとWagnerらのシーケンスの間には以上2点の違いがあるが、どちらのシーケンスがより使いやすく、またスペクトルの質が高いか客観的に評価する必要がある。また、二種のシーケンスをミックスしたものが良好な結果をもたらすかもしれない。本研究は、日本電子製NMRスペクトロメーターを使用した場合にどのようなシーケンスが実用性があるかをメインピーク消去法とリレー方法について個別に検討することにより調べた。

(2) 実験

サンプルとして市販品セロピオース8mgの0.5ml D_2O 溶液を用いた。日本電子JNM-GX400にはC5プローブを装着し、第2照射osc unitにC/H OSC unitを使用して ^1H を励起し、MULTI OSC unitでシグナルを観測した。またGX270にはC/H5プローブを装着し、MULTI OSCで ^1H を励起し、C/H OSCで観測した。パルス・シーケンスはPLEXUS(Ver.1.41)PEGSで作成した。BIRDパルス後の待ち時間はサンプルの ^1H の T_1 値のうち最も短い値の0.35倍(330ms)に設定した。また、ホモスポイルパルスは $200\mu\text{s}$ に加え、20ms待ってから次のパルスを加えた。シグナルの検出中に ^{13}C デカップルは行わなかった。いずれの実験も4回のダミーパルスの後、256種の異なる t_1 値(初期値20ms)について96回積算し 1024×256 のデータマトリックスを得た。実験に要した時間はいずれの実験も約12時間であった。 F_2 , F_1 データをどちらも2倍にゼロフィルし、 F_2 データにはウィンドウ関数として指数関数またはサインベル関数を、 F_1 データにはコサインベル関数をかけた後、2次元フーリエ変換を行った。

(3) 結果

(i) メインピーク消去法の比較

Baxらの提案するBIRDパルスとWagnerらの提案するホモスポイルパルスの有効性を比較するためFig.2に示すパルス・シーケンスを作成した。このシーケンスはFig.1(a)のシーケンスとはリレー方法が同じでメインピーク消去法が異なっている。したがって、BIRDパルスとホモスポイルパルスでどちらが優れているか決定できる。各々のシーケンスについてJNM-GX270で2次元スペクトルを測定した。 F_2 データには指数関数ウィンドウをかけた。Fig.3にスペクトルを示す。横軸は ^1H スペクトルに対応し、縦軸は ^{13}C スペクトル

に対応する。これより、BIRDパルスを使った方がホモスボイルパルスよりスペクトルの質がよいことがわかった。

Fig.2 The combined pulse sequence of Fig.1(a) and (b). The main peaks are eliminated using HS pulse. The magnetization of ^1H is transferred by last 90°_y pulse.

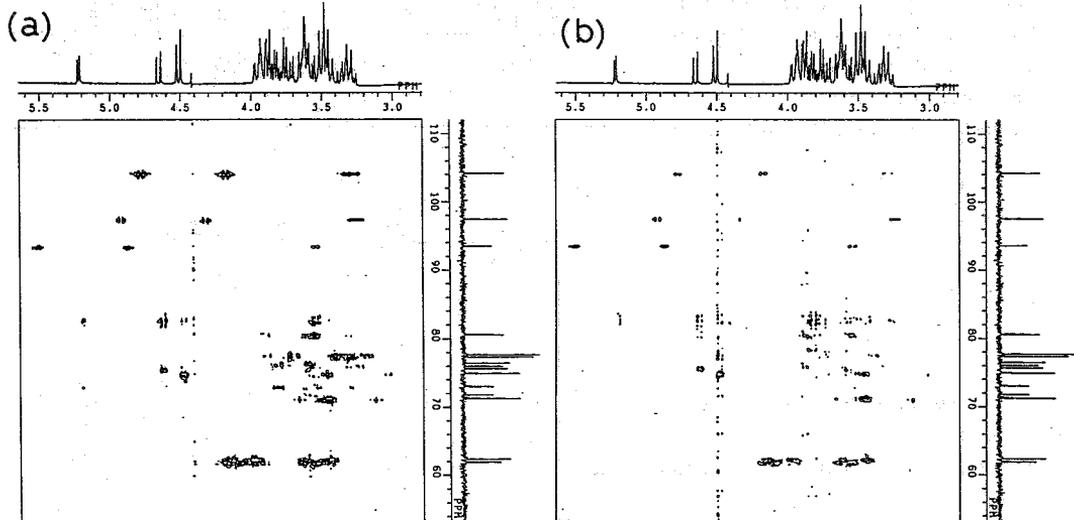
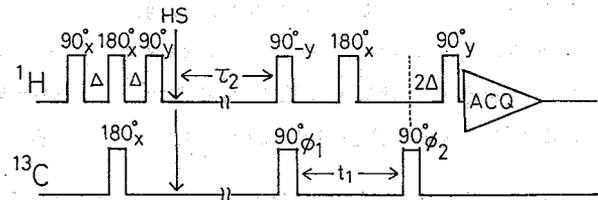


Fig.3 Relayed HMQC spectra of Cellobiose.

(a) Spectrum obtained by the pulse sequence of Fig.1(a).
 (b) Spectrum obtained by the pulse sequence of Fig.2.

(ii)リレー方法の比較

Baxらの方法とWagnerらの方法とを比較するためにFig.4に示すパルス・シーケンスを作成した。このシーケンスはFig.1(a)のシーケンスとはリレー方法のみ異なっている。各々のシーケンスについてJNM-GX400で2次元スペクトルを測定した。F₂データにはサインベル関数ウィンドウをかけた。Fig.5にスペクトルを示す。これより、Baxらのリレー方法の方が優れていることがわかった。以上の結果を総合するとBaxらの発表したパルス・シーケンスFig.1(a)が最も優れていることがわかる。

(iii)リレードHMQCによる ^{13}C 帰属の実際

Fig.5のスペクトルをもとにセロビオースの ^{13}C の帰属をした。1'位のHは2'位のCの位置にリレーのピークを与えるので2'Cが簡単に帰属できる。また、2'Hは3'Cの位置にピークを与える。さらに、3'Hは4'Cの位置に、4'Hは5'Cの位置に、5'Hは6'αCおよび6'βCの位置にそれぞれピークを与える。このようにリレーのピークをたどっていけば糖環内のすべての ^{13}C を帰属できる。1βHや1αHからたどっても同様である。

(4)まとめ

2次元NMRの実験をする場合、パルス幅などのパラメータを正確に決定することが重

要である。ホモスボイルパルスを使う場合の問題点は、磁場を乱す時間と、その後の待ち時間の設定が難しいことである。今回、ホモスボイルパルスを用いた実験で良いデータが得られなかったのはパラメータに最適値を設定していなかったからかもしれない。BIRDパルスを使う場合は T_1 値を測定するだけで済むので簡単かつ正確である。パラメータの設定においてBaxらの方法はWagnerらの方法よりも優れているといえよう。

Fig.4 The combined pulse sequence of Fig.1(a) and (b). The main peaks are eliminated using BIRD pulse. The magnetization of ^1H is transferred by 180° - 90° pulses.

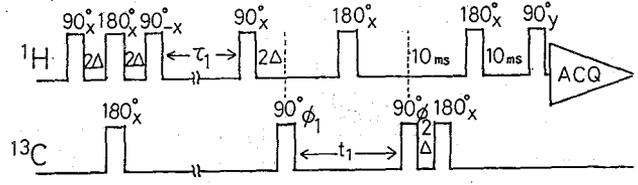
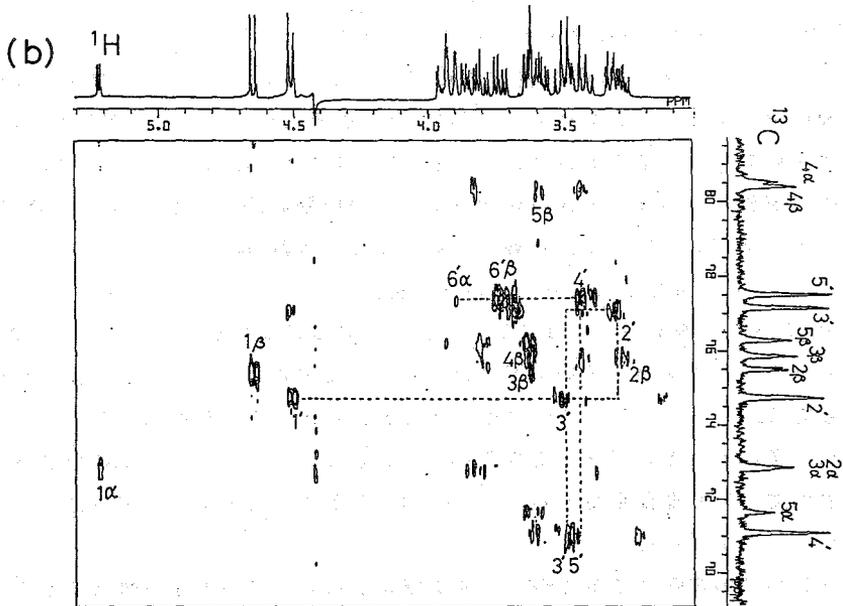
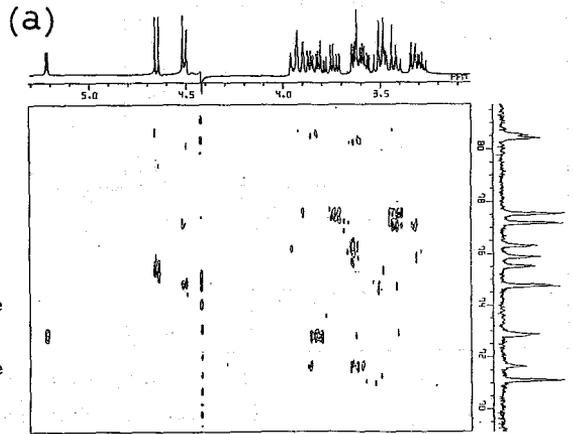


Fig.5 Relayed HMQC spectra of Cellobiose
 (a) Spectrum obtained by the sequence of Fig.4 .
 (b) Spectrum obtained by the sequence of Fig.1(a) .



(京大理、日本電子) ○ 赤坂一之、内藤 晶、中谷 博、今成 司

CONSTRUCTION OF AN NMR TEMPERATURE-JUMP APPARATUS.

K. Akasaka, A. Naito, H. Nakatani, and M. Imanari*

(Kyoto University and *JEOL Company)

An NMR temperature-jump apparatus was constructed, which uses three channels of pressurized gas flow as a means for controlling the temperature of the sample placed in a capillary tube. The system works under computer control of an NMR spectrometer, and is capable of temperature-jump DOWN by as much as 20 C within several seconds. This technique will, in general, widen NMR capability to the field of kinetics. Its utility will be demonstrated in the study of protein folding, with ribonuclease A as an example.

要旨

通常の高分解能NMR装置(例えばGX-400)に付属して使用することができる、温度ジャンプNMR装置を試作した。ガス流により試料温度を変化し保持する方法を採用しているため、既成のNMR検出器に殆ど変更を加えずに使用できる利点をもつ。また、ガス流の切り替えは電磁弁と空気弁を組み合わせで行うため、強磁場下でも働き、且つNMR制御用コンピューターの制御下のパルスプログラムによって、ほぼ完全自動化されている。約20Cの温度降下を6-8秒で達成することができる。この方法は従来構造解析に強いNMRをキネティクスにも有用なものとするのに役立つだろう。特に、タンパク質の巻戻りの過程の研究、中間体の構造の研究などに有効であることをRNase Aを例として示す。

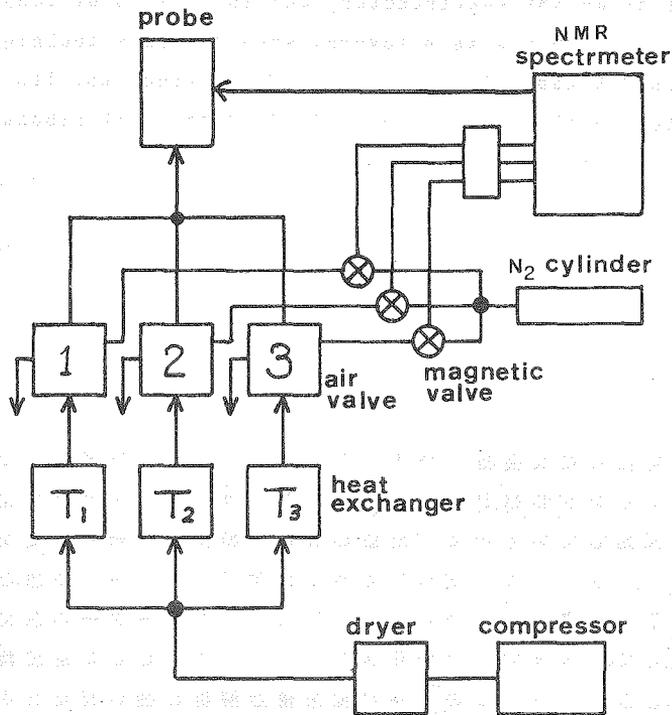
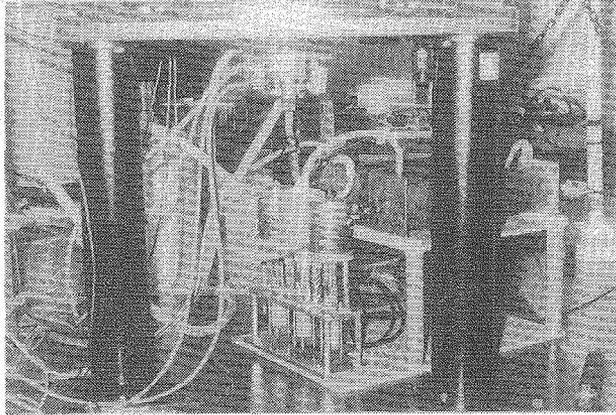


図 1. 装置の構成

空気圧縮機、恒温槽、温度ジャンプ制御用コンピュータプログラム、それによって働く電磁弁とそのインターフェース、空気弁などよりなり、NMRのコンピュータ制御のもとで働く。

PULSE SEQUENCE FOR T-JUMP

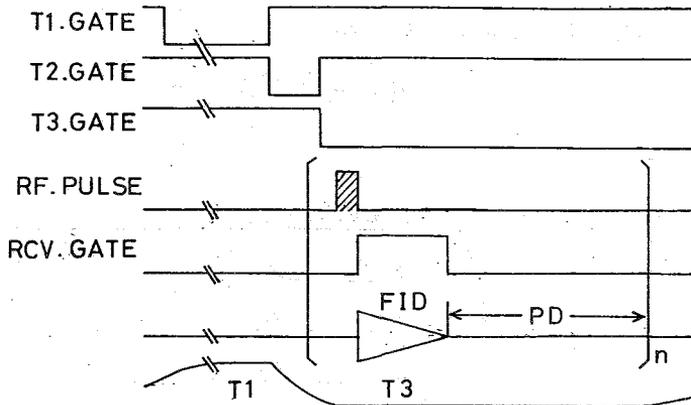


図 2. 温度ジャンプの方式

基本的に NMR 装置パルスプログラムのもとで働き、一温度サイクルで n 回の FID サンプリグを繰り返すことにより、時間変化の“スナップショット”を秒単位で記録し、後でフーリエ変換する。温度サイクルは繰り返すことができ、積算により、 S/N を向上させることができる。

試料はピラリール（外径 3 mm）に容れ、その量は 40 マイクロリットルである。

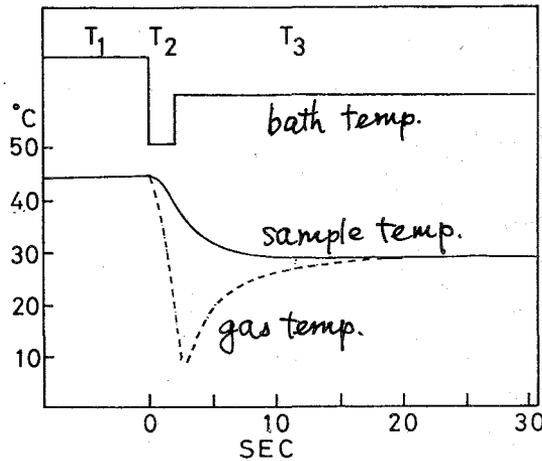


図 3. 温度ジャンプ速度

オフラインで熱電対で特定した温度特性をしめす。T1 と T3 の中間に T2 を短時間（1.3 - 2.5 秒）導入することにより、ジャンプ温度を著しく短くすることができた。図では 10 秒以内におよそ 15 C の温度変化が達成されている。

図4. NMRの信号そのものによる温度測定

メタノールの化学シフトから温度の時間変化が直接測定できる。図では6秒程度でほぼ一定温度に達していることがわかる。

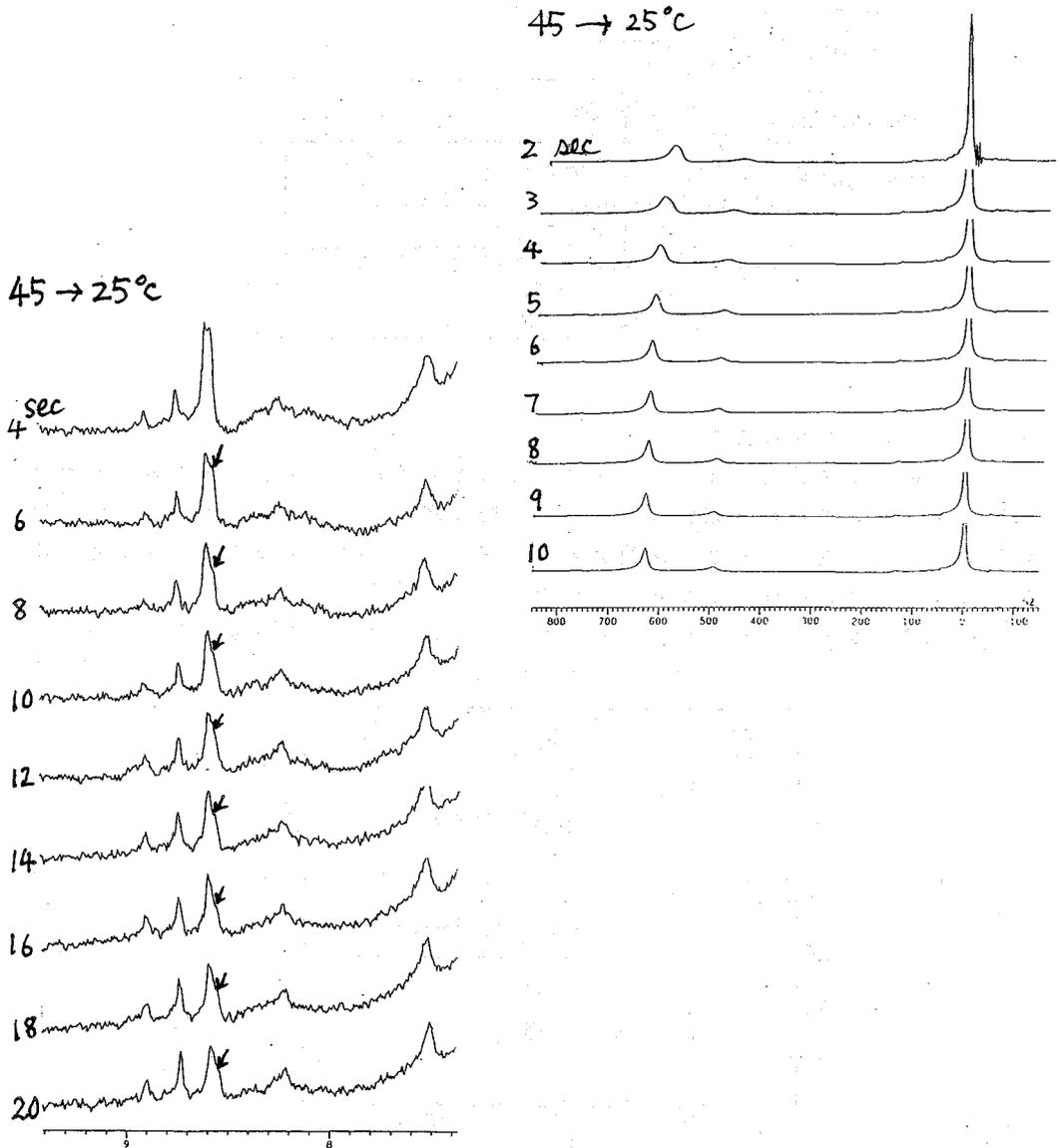


図5. RNase A の巻戻り過程のスナップショットNMR (ヒスチジンの信号)

(10%、pH 1.2、 $T_m = 37^\circ\text{C}$)

巻戻り中間体が検出され、その生成、消失の速度がわかる。

(↓)

(京大理) ○内藤 晶, 赤坂一之

Development of a deuterium NMR instrument for solids based on a commercial high resolution NMR spectrometer

Akira Naito and Kazuyuki Akasaka

(Faculty of Science, Kyoto University)

Deuterium NMR instrument for solids was developed based on a commercial high resolution NMR spectrometer for liquid, which is equipped with a probe and duplexer designed for solids, and additional power amplifier. Informative NMR signals were obtained in the powder samples of amino acids of which amino groups were deuterated using this instrument. It turned out that the amino deuterium nuclei were rotating rapidly to show narrow deuterium NMR signals and they were not quite axially asymmetric at room temperature.

【はじめに】

固体における重水素NMRは分子運動に関する情報を多く含んでいるので、分子運動を見るよいプローブとして利用されている。また重水素は分子の特定の部位を標識することができるので、分子の局所的な運動を定量的に見積るのに適している。固体における重水素NMRの線幅を決定しているのは核四極子相互作用であり、線幅は200kHzになることがある。この重水素NMRを溶液仕様の装置で観測してもスペクトルの歪が大きく、十分に情報が得られない。今回J E O L - G X 4 0 0 N M R 分光器の受信部を変えることなく、これに固体用プローブ、パワーアンプなどを装備して固体重水素NMRスペクトルが測定できるように改良した。この装置を用いて重水素標識したアミノ酸の重水素NMRスペクトルを観測したところ比較的良好なスペクトルが得られたので報告する。

【固体重水素NMR装置の検討】

図1に固体重水素NMR装置のブロック図を示す。図において斜線部が今回固体重水素NMRを測定するために追加したり取り替えた部分である。ここで用いたプローブは固体専用でありその回路図を図1bに示す。パワーアンプにはHenry Radio社製2006A型を

追加してパワーの強化を計った。

まず固体重水素専用プローブを用いて試料に照射されるラジオ波出力について検討した。

直径10mmのソレノイドコイルを使用した場合、90°パルス長は9.5μsであった。このパルス長ではパワースペクトルの幅が狭く、固体の重水素NMRスペクトルを観測するにはパワーが不十分である。そこで直径5mmのソレノイドコイルに変更して出力の強化を計った。この結果、90°パルス長は6.5μsに減少した。

この時回転系でのラジオ波周波数は38.5kHzであった。さらに出力を増大するため、パワーアンプをもう一段分光器のトランスミッターとプローブの間に接続してラジオ波出力の増幅を試みた。この結果、90°パルス長は2.4μsに減少した。この時マッチングがずれるとアーキングが起こり易くなるが、高圧固定コンデンサーに放電防止剤を塗ることによってこれを防ぐことができた。

次にラジオ波パルスの波形について検討した。図2aに示すブロック図の結線によってパルスの波形を観測した。この結果、図2bに示すようにパルス波形が大きく歪んでいることが観測された。このパルスの波形は分光器内部の減衰器によって歪を受けていることが判明した。そこで分光器内部の減衰器を使用せずに外部に減衰器

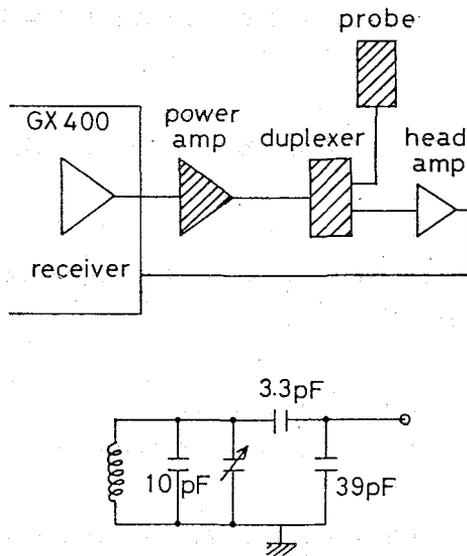


図1 液体仕様NMR装置に組み込んだ固体専用部(斜線部)のブロック図およびプローブの回路図

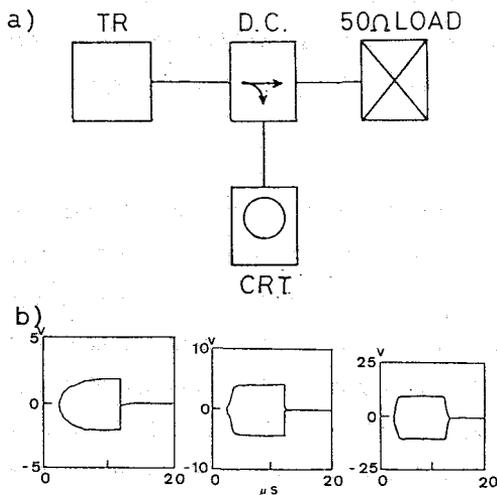


図2 トランスミッター出力波形の測定ブロック図およびパルス波形

- a) 出力波形測定ブロック図
- b) PW1 = 10 μs, OB ATN = 100
- c) PW1 = 10 μs, OB ATN = 0
- d) PW1 = 10 μs, OB ATN = 0
追加パワーアンプ使用

を接続したところ図 2 c に示すように波形の歪は大幅に減少した。このパルスを追加のパワーアンプでさらに増幅しても波形はあまり歪まなかった(図 2 d)。

16種の位相循環をともなった Quadrupole echo パルスシーケンスを用いて NMR スペクトルの測定を行なった。2つの 90° パルスの間隔を $50 \mu\text{s}$ に固定し、サンプリングの開始時間は Delay time で調節してスペクトルの歪を最小にした。

【固体アミノ酸の重水素 NMR】

分光器の性能を検討し、タンパク質の内部運動を定量的に解析するための基礎データの集積を目的として選択的に重水素標識した各種アミノ酸の重水素 NMR の測定を行なった。

アミノ基を重水素標識したグリシン、リシン、プロリンの重水素 NMR スペクトルの測定を行なった。この結果、図 3 に示すようにアミノ基は室温において C_{α} 軸回りの回転によつて重水素 NMR スペクトルは平均されて線幅が狭くなっているのが観測された。図 4 において 90° パルス長が $6.5 \mu\text{s}$ と $2.4 \mu\text{s}$ の場合のリシンの重水素 NMR スペクトルを示している。短いパルス長を使用したスペクトルでは両端の成分の強度が増加してより歪の小さいスペクトルが得られた。さらにこのパウダーパターンは完全に軸対称ではなかった。アミノ基の重水素は3種類の位置の間をジャン

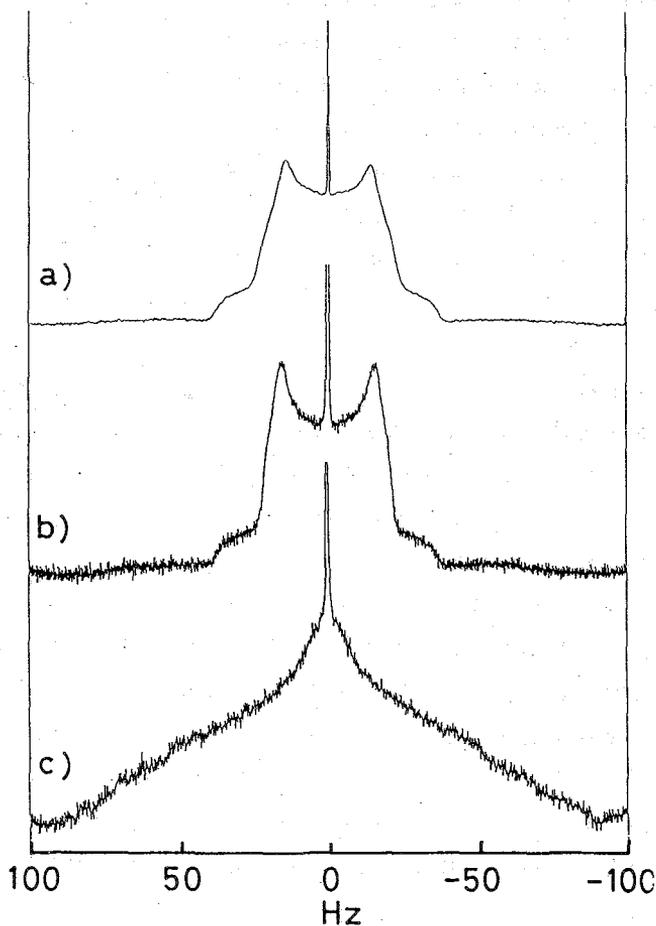


図 3 アミノ基を重水素標識した固体アミノ酸の重水素 NMR スペクトル。 a) グリシン。 b) L-リシン。 L-プロリン。

ブする事によってスペクトルが平均されるが、この3種類の位置の重水素の核四極子結合テンソルの主値はそれぞれ異なっていることが報告されている。この場合には3種類の位置での寿命が異なっていることから、3サイトジャンプによって平均された後もテンソルは軸対称でなくなると考えられる。

プロリンのアミノ基はC₃対称軸を持たないが、緩和時間の測定から分子内に速い運動があることが知られている。プロリンのアミノ基の運動はC₃回転軸を持つアミノ基の運動とは違い、より異方性の大きな運動の存在が予想される。

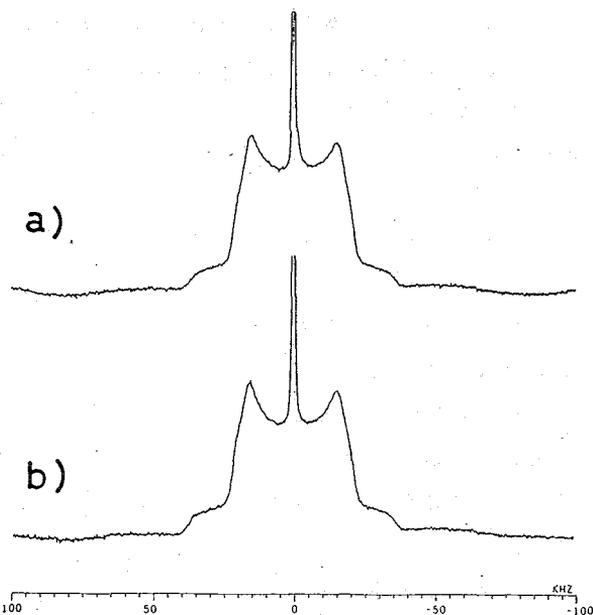


図4 アミノ基を重水素標識した固体L-リシンの重水素NMRスペクトル。

a) 90°パルス長6.5 μs。

b) 90°パルス長2.4 μs。

【まとめ】

液体仕様のNMR分光器においてプローブとデュウプレキサーを固体専用にしてパワーアンプを追加することにより歪の小さい固体重水素NMRスペクトルが得られることが判明した。特

に分子運動が存在して線幅が狭くなっている場合には十分情報量の多いスペクトルの観測が可能である。今後の課題はパルス形のなまりを減少させることと、より高速のA/Dコンバーターを備え付けることである。

【謝辞】

固体プローブに関して種々の助言をいただいた日本電子株式会社清水章三氏に厚く感謝します。

(阪大基礎工) 畑田 耕一・○右手 浩一・西村 透
(日本電子㈱) 今成 司・藤井 直之

Structural Analysis of Polymethacrylates by On-line GPC/NMR

Koichi HATADA, Koichi UTE, Tohru NISHIMURA

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

Mamoru IMANARI, Naoyuki FUJII (JEOL Ltd.)

GPC analyses of polymethacrylates have been performed by ^1H NMR on-line detection (500 MHz). ^1H NMR spectra of good resolution and high S/N ratio were collected over the entire chromatographic peak. Mn of the PMMA could be directly determined by intensity measurements of the proton signals due to the end-group and monomeric units, since the PMMA samples used were prepared by the living polymerization initiated with $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{MgBr}$. The molecular weight dependence of tacticity of several PMMA samples prepared with anionic initiators such as $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{C}(\text{Ph})_2\text{Li}$ and $\text{C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$ were also investigated.

1 はじめに

超伝導磁石の普及によってNMR分光計の感度と分解能は飛躍的に向上し、NMRを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の検出器として用いる試みも、実用の域に達しつつある¹⁻³⁾。従来のHPLC用検知器に比べると、NMRはまだ感度が低く、現状では使用できる溶離液にも制約があるが、得られる情報ははるかに豊富である。本研究では、500MHz ^1H NMR装置をゲルパーミエーションクロマトグラフにオンラインで接続し、ポリメタクリル酸エステルおよびその共重合体の分析を行った。化学構造の明確なポリマーの場合は、末端基定量法により、較正曲線を用いることなく分子量とその分布を求めることができた。また、ポリマーの立体規則性ならびに共重合組成の分子量依存性について、精度の高い情報が容易に得られた。

2 実験

図1に示す内径2mm、長さ13cmの石英製NMRセル(検知容量約0.06mL)を、液体クロマトグラフィー用に設計した ^1H NMRプローブ中に装填した。NMR装置は、JEOL JNM-GX500を用いた。GPCカラム Shodex KF-802.5 (0.46 × 25 cm、排除限界 2×10^4) または Shodex A-80M (0.46 × 50 cm、排除限界 5×10^7) を付した JASCO TRIROTAR-V 高速液体クロマトグラフを NMR分光計から約 1.5 m の位置に設置し、NMRセルとGPCカラムの間を内径0.3mm、長さ3mのテフロンチューブで接続した。溶離液には、重クロロホルムを用い、流速は0.2 mL/minとした。溶離液の重水素の信号により、磁場の内部ロックおよびシム調整を行った。表1にその他の測定条件を示す。示差屈折率検出

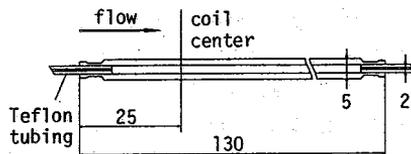


Fig.1 The 5 mm quartz tubing used for the NMR observation flow-cell (in mm).

Tab.1 Conditions for On-line GPC/NMR

	A	B	C
Maximum Porosity [$\times 10^4$]	2	5000	5000
Injected Sample [mg]	2	0.25	0.25
Spectral Width [Hz]	4500	4500	4500
Data Point	8192	8192	4096
Broadenig Factor [Hz]	0.55	0.55	1.10
Pulse Width [deg]	45	60	45
Pulse Repetition [sec]	3.00	1.00	0.50
Scans per File	8	24	24

Tab.2 Isotactic PMMAs Prepared by the Living Polymerization with $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{MgBr}$ in Toluene

Mna	Mw/Mnb	Tacticity (%)		
		mm	mr	rr
5260	1.13	96.9	3.0	0.1
3160	1.19	95.3	4.3	0.4

a Determined by ^1H NMR.

b Determined by GPC.

器(RI)は、Shodex RI SE-61を用いた。測定は、いずれも室温で行なった。

3 結果と考察

3-1 リビング重合で得られた*it*-PMMAの分子量分布の測定³⁾ ポリマーの分子量とその分布をGPCで測定するためには、通常、標準ポリスチレン等を用いて溶出時間と分子量との校正曲線を作成する必要がある。しかし、分析するポリマーによっては、適当な標準試料を入手することが必ずしも容易ではない。以下に述べるように、ポリマーの化学構造が明確で、主鎖と末端基をNMRで観測することが可能ならば、GPC/NMRを用いて、溶出時間ごとの数平均重合度を直接求めることができる。

$t\text{-C}_4\text{H}_9\text{MgBr}$ を開始剤とするリビング重合で得られたポリメタクリル酸メチル(PMMA)は、分子鎖の α -末端に $t\text{-C}_4\text{H}_9$ 基を1個有するので、 $t\text{-C}_4\text{H}_9$ 基とモノマー単位の OCH_3 基との ^1H NMRシグナル強度比を測定することにより、数平均重合度が正確に求まる⁴⁾。表2に実験に用いたPMMAの分子量と立体規則性を示す。測定は、排除限界 2×10^4 のGPCカラムに $2 \text{ mg}/0.100 \text{ mL}$ のサンプルを注入

して行なった。 $t\text{-C}_4\text{H}_9$ と OCH_3 水素の T_1 は、それぞれ 0.51 s および 1.02 s であったので、 45° パルス($2.8 \mu\text{s}$)、繰返し時間 3.00 s の条件で ^1H NMRデータを取得した(表1A)。8回の積算で24秒ごとに得られるスペクトルを1ブロックとし、64ブロック(25.6分間)を1つのデータマトリックスとした。

図2は、 $M_n = 3160$ のPMMAのGPC/NMRデータである。3.60 ppmでクロスセクションをとると、PMMAの OCH_3 水素のシグナルでモニターしたGPC曲線が得られる(図3実線)。比較のために、同じ測定をRI検出器で行なった結果を図3破線で示した。 ^1H NMRで検知した溶出曲線は、RI検出器で得た溶出曲線に比べて半値幅がわずかに広がっているが、 S/N 比およびベースラインの安定性ではRI検出器と同程度であった。なお、 ^1H NMRで検知した溶出曲線とRI検出器によるそれとの溶出時間のずれは、カラムの出口と両検出器との接続部の長さが異なるためである。

図4は、図3の斜線で示した溶出時間帯で得られた ^1H NMRスペクトル(1ブロック)である。 $t\text{-C}_4\text{H}_9$ 基のシグナルの S/N 比は48.5、 OCH_3 基と $t\text{-C}_4\text{H}_9$ 基とのシグナル強度比は21.3であった。従って、この溶出時間帯で得られたPMMAの数平均分子量は6450と算出される。このようにして各データブロックで検出された

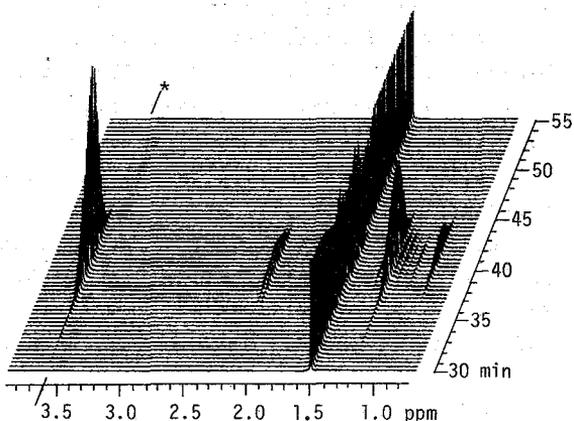


Fig.2 The on-line GPC/NMR data of the *it*-PMMA ($M_n=3160$).

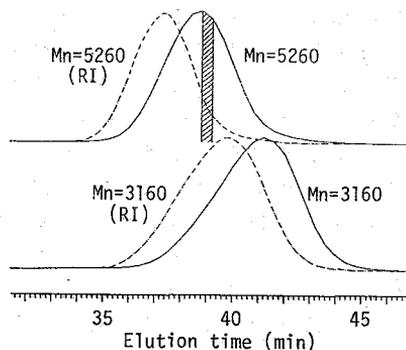


Fig.3 The ^1H NMR-detected (solid lines) and RI-detected (broken lines) GPC curves of the isotactic PMMAs.

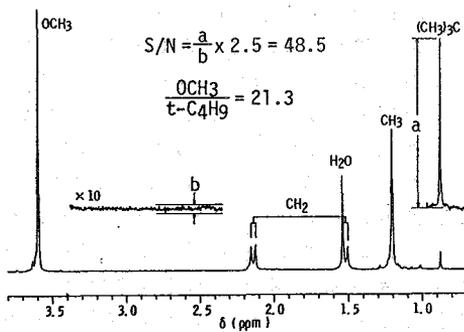


Fig.4 ^1H NMR spectrum of the isotactic PMMA ($M_n=5260$) stored as a single file at the elution time from 38.8 to 39.2 min(see Fig.2).

P M M A の M_n を求め、その対数をプロットしたところ良好な直線関係が得られた(図5実線)。この際 $t-C_4H_9$ 基の S/N 比が 9.0 に満たないデータブロックは、前後の数ブロックを加算して 9.0 より大きくなるように処理した。図5実線の勾配は、標準 P M M A と R I 検出器とを用いて作成した校正曲線(図5破線)の勾配に比べるとやや小さい。また、 $M_n=5260$ と $M_n=3160$ の P M M A では、データをプロットして得られた直線が相互にずれている。これは、GPC カラムに対するサンプルの注入量、ならびに、NMR セル内での溶出液の拡散が原因と考えられるので、現在、実験条件を詳しく検討するとともに、フローセルの改良を行なっている。

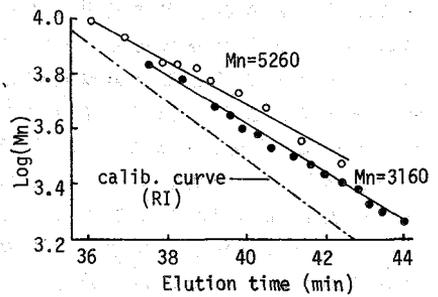


Fig.5 Plots of $\log(M_n)$ of isotactic PMMAs determined from the intensity ratio for the 1H NMR signal of CH_3O- to $t-C_4H_9-$ against elution time.

3-2 P M M A の立体規則性と分子量分布の測定

アニオン重合系には、生長速度や立体規制能の異なる重合活性種が共存するために、複雑な分子量分布をもつポリマーの生成する場合が少なくない。このようなポリマーの立体規則性と分子量分布との関係を明らかにすることができれば、ポリマーの物性の理解に役立つだけでなく、重合反応の機構に関する情報が得られる。

図6は $t-C_4H_9Li/(C_8H_{17})_3Al$ ($[Al]/[Li] = 1.5 \text{ mol/mol}$) を開始剤とする、トルエン中 $-78^\circ C$ のアニオン重合で得られた P M M A の G P C / N M R データである。図3と同様にして 3.60 ppm でクロスセクションをとると、 OCH_3 水素の N M R シグナルでモニターした G P C 曲線が得られ(図6c)、このポリマーの分子量分布が bimodal であることがわかる。また、溶出時間ごとの 1H N M R スペクトルから明らかのように、低分子量側(図6a)はシンジオタクチックであるのに対し、高分子量側(図6b)はイソタクチックが高い。この様子はデータ全体の等高線表示で見ると、一層明瞭である。 $t-C_4H_9Li$ によるトルエン中の重合では分子量分布の広いイソタクチック P M M A が生成するのに対し、 $t-C_4H_9Li/(C_8H_{17})_3Al$ ($[Al]/[Li] > 3.0 \text{ mol/mol}$) による重合では分子量分布の狭いシンジオタクチック P M M A が得られることが最近見出された⁵⁾。図6の G P C / N M R の結果は、 $[Al]/[Li]$ 比が 1.5 のとき $t-C_4H_9Li$ と $t-C_4H_9Li/(C_8H_{17})_3Al$ 錯体の両活性種が重合系に共存し、高分子量側のイソタクチックポリマーは前者から、低分子量側のシンジオタクチックポリマーは後者から生成することを示唆している。

このようにして、種々の重合法で得られた P M M A の G P C / N M R を表1Bの条件で測定し、 α メチル水素の 1H シグナルをもとにして立体規則性の定量を行った。ただし、標準 P M M A による分子量の校正曲線は、時間分解能の高い測定条件(表1C)で作成した(図7a)。図7b~dはそれぞれ、 $t-C_4H_9MgBr$ ($[Mg]/[t-C_4H_9]=0.87$) (b)、 $C_8H_{11}C(C_6H_5)_2Li$ (c)、 C_4H_9MgCl (d) を開始剤とするトルエン中の重合で得

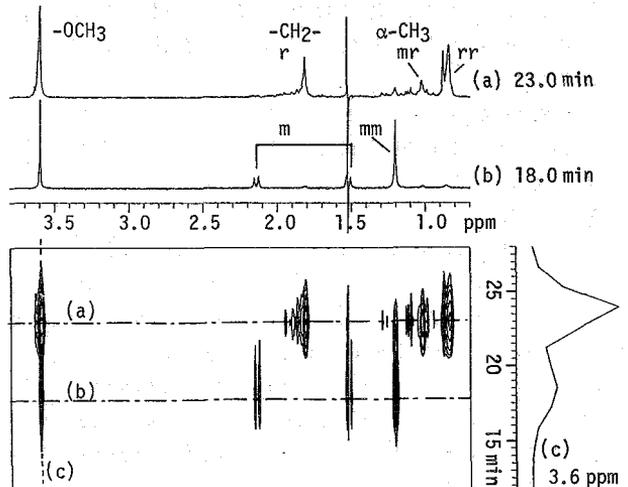


Fig.6 Contour plot and cross sections (a-c) of the on-line GPC/NMR data for the PMMA prepared with $t-C_4H_9Li/(C_8H_{17})_3Al$ ($Li/Al=1/1.5$) in toluene at $-78^\circ C$.

られたPMMAの測定結果である。trimodalな分子量分布をもつ(b)では、そのピークごとに立体規則性が全く異なる。また、(c)のイソタクチシチーは、高分子量側[1]と低分子量側[2]とで微妙に異なっている。一見unimodalな分布をもつように見える(d)でもやはり立体規則性は分子量で異なることがわかる[3, 4]。以上のように、GPC/NMRを利用することにより、ポリマーの立体規則性の分子量依存性を少ないサンプル(0.25mg)で短時間(60分以内)に測定でき、その多角的なデータ処理が可能となった。

3-3 メタクリル酸エステル共重合体の組成分布の測定

GPC/NMRのもうひとつの応用例として、共重合組成の分子量依存性について検討した。t-C₄H₉MgBrによるMMAとメタクリル酸エチル(EMA)の共重合([MMA]/[EMA]=1/1)をトルエン中で行くと、-40℃では分子量分布の狭い、高度にイソタクチックなランダム共重合体が生成する。一方、この重合を-78℃で行くと、図8のようなbimodalな分子量分布をもつ共重合体を得られた。MMAモノマー単位のOCH₂基とEMAモノマー単位のOCH₃基の¹H NMR強度比を測定したところ、高分子量側[1]と低分子量側[2]とでは、共重合組成比がわずかに異なることが明らかになった。-78℃では重合反応性の異なる複数の活性種が存在していることがわかる。

本講演で述べた例以外にも、オンラインGPC/NMRはポリマーの異種構造の測定など、広い範囲にわたる応用が期待できる。

参考文献

- 1) H.C.Dorn, Anal.Chem., **56**, 747A(1984), and references therein.
- 2) D.A.Laude Jr., C.L.Wilkins, Trends Anal.Chem., **5**, 230(1986), and references therein.
- 3) K.Hatada, K.Ute, Y.Okamoto, M.Imanari, N.Fujii, Polym.Bull., in press.
- 4) K.Hatada, K.Ute, K.Tanaka, Y.Okamoto, T.Kitayama, Polym.J., **18**, 1037(1986).
- 5) T.Kitayama, T.Shinozaki, M.Yamaguchi, E.Masuda, S.Ishii, K.Hatada, IUPAC MACRO88, 3-3-21(1988).

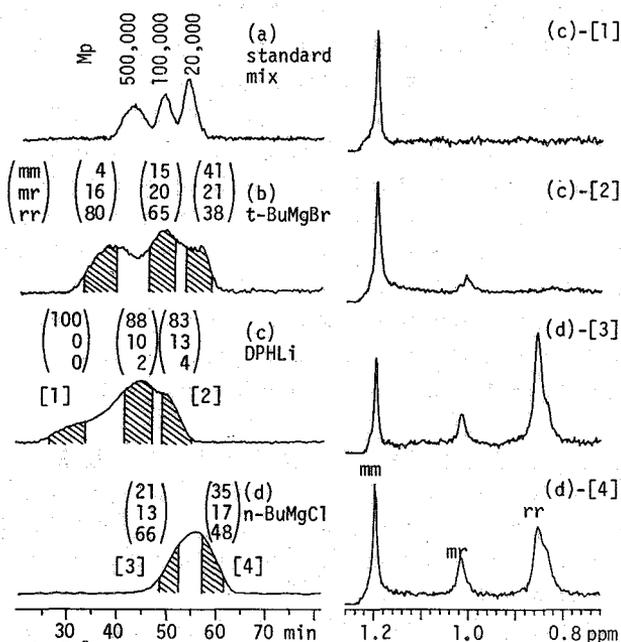


Fig.7 ¹H NMR detected GPC curve of standard PMMA mix (a), and on-line GPC/NMR data of the PMMA prepared with t-C₄H₉MgBr (b), C₅H₁₁(C₆H₅)₂Li (c), and n-C₄H₉MgCl (d) in toluene. Triad tacticities of the fractions were determined from the α-CH₃ proton signals (eg. [1~4]).

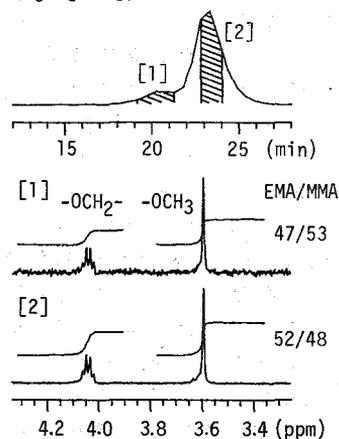


Fig.8 On-line GPC/NMR data of the P(MMA-co-EMA) prepared with t-C₄H₉MgBr in toluene at -78°C, and molecular weight dependence of the copolymer composition.

(阪大教養, 阪大理, 大阪市大)

○江口太郎, 中村亘男, 真野倅一

Application of Maximum Entropy Method (MEM) to the Precise Determination of NQR Frequencies

Taro Eguchi^{*}, Nobuo Nakamura^{a)}, and Koichi Mano^{b)}(College of General Education, Osaka University, ^aFaculty of Science, Osaka University, and ^bResearch Institute for Atomic Energy, Osaka City University)

³⁵Cl NQR lines of hexachlorobenzene and ¹⁴N NQR lines of trans-azobenzene were measured by using both FFT and MEM to examine the applicability of the MEM to the precise determination of NQR frequencies. The closely located three ³⁵Cl resonance frequencies in C₆Cl₆ could be distinguished accurately by the MEM around room temperature. Very complicated temperature dependence of ¹⁴N NQR spectra in C₆H₅N:NC₆H₅ near the transition point was obtained more clearly by the MEM than by the FFT. Since the careful adjustment of MEM parameters is needed to get reliable spectra, it seems to be practical to use the MEM in combination with the FFT.

最大エントロピー法 (MEM) を使えば, 共鳴吸収線の線形は必ずむけれども, S/N比と周波数分解能が著しく向上する. これらの特徴を生かした高分解能NMRへの応用例がいくつか報告されている.¹⁾

核四極共鳴 (NQR) の共鳴周波数は, 核の四極モーメント (Q) とその核のまわりの電場勾配 (q) によって決められており, 通常は十分離れた位置に観測される場合が多く, FFT法で正確に周波数を測定できる. しかし, S/N比が非常に悪い場合や, 狭い周波数領域に何本もの共鳴線がある場合, あるいは, 離れていた共鳴線が温度変化で近づいたり, 相転移の影響で微細に共鳴線が分裂したりする場合などがある. NQRでは, NMRと違って, 磁場を強くしてS/N比や分解能を向上させることができないので, そのような時にFFT法では正確な周波数測定が非常に困難になる.

そこで, MEMのNQR周波数の精密測定への適用を試みるため, ヘキサクロロベンゼン (HCB) とトランスアゾベンゼン (t-AZB) を試料とし, ³⁵Clと¹⁴NのNQRスペクトルを測定した.

^{35}Cl ($I = 3/2$) の NQR 周波数は、 $\nu = e^2 Q q (1 + \eta^2/3)^{1/2} / 2h$ で与えられる。ここで、 $e^2 Q q / h$ が核四極結合定数で、相互作用の強さを表し、 η が非対称定数で、核のまわりの電場勾配の軸対称性からのずれを表す。

測定では、励起周波数 38 MHz, RFパルス出力約 700 W, サンプル時間 2 μ s, データ点数 1k で FID 信号を積算し、PC9801VX コンピュータの BASIC で FFT と MEM をおこなった。MEM プログラムは Burg のアルゴリズムのものを利用した。²⁾ MEM の次数はデータ点数の 1/2 ~ 1/5 の範囲で動かし、最適なスペクトルを得た。

HCB 結晶中では、3 種類の塩素核に対応して、 ^{35}Cl 共鳴線は 3 本観測される。³⁾

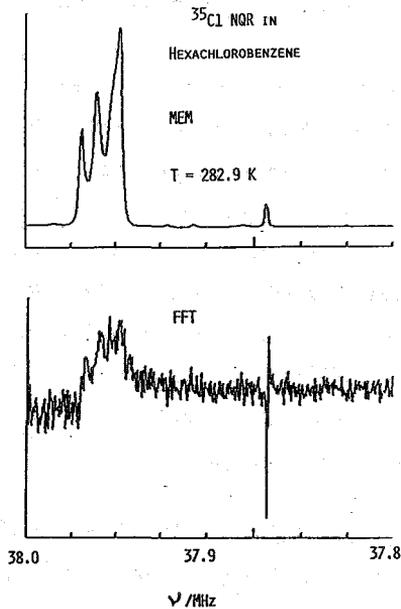


Fig.1: Comparison between MEM and FFT spectra. The datapoints used for the analyses are 256 and 1024 for MEM and FFT, respectively. The number of signal averaging (N_{av}) = 4. A peak at 37.869 MHz was caused by a shot noise.

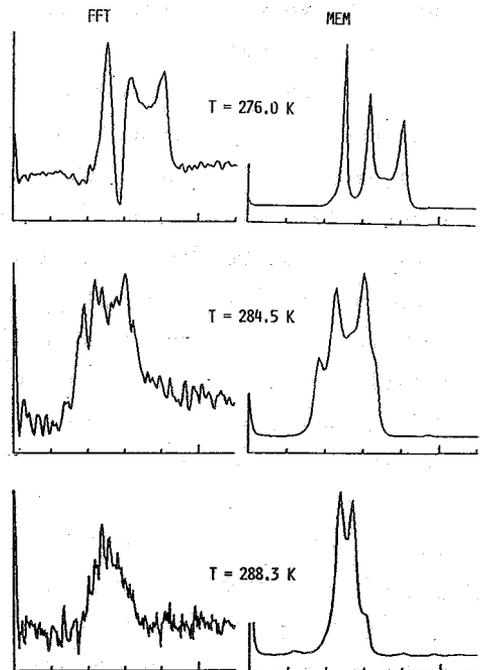


Fig.2: Temperature dependence of ^{35}Cl NQR spectra in C_6Cl_6 . Each spectrum has a band width of 90 kHz. $N_{av} = 512, 128, \text{ and } 256$ in the order from the top to the bottom spectra.

Fig. 1 に 282.9 K での FFT と MEM スペクトルを示す。積算 4 回の FFT のばあい、 S/N 比が小さく、共鳴線の位置を確定するのが非常に困難である。一方、MEM のばあい、3 本の共鳴線がはっきり分裂している様子がわかる。

Fig. 2 にスペクトルの温度変化を示す。Fig. 3 には 276 K から 291 K まで

の共鳴周波数の温度変化の結果を示す。MEMの利用による測定精度の向上が明らかである。

t-AZB結晶中には、室温で2種類の分子が存在する。一方は安定サイト(A)上の、他方は乱れをもったサイト(B)上の分子である。この物質は90Kで高次の相転移現象を示し、 ^1H NMRによる研究では、スピン-格子緩和時間 T_1 の小さなくぼみが転移点近傍で観測されている。⁴⁾

^{14}N NQRの測定は、約15gの多結晶試料を使用し、 $T = 54 \sim 150\text{K}$ の範囲で、サンプリング時間 $20\mu\text{s}$ 、データ点数1kでスピネコー信号を積算した。

^{14}N ($I = 1$)の共鳴周波数は、 $\nu_{\pm} = e^2Qq(3 \pm \eta) / 4h$ で与えられる。A、B両サイト上の分子の窒素核に対応して、 $\nu_{+} = 4.2\text{MHz}$ と $\nu_{-} = 3.2\text{MHz}$ 附近に、それぞれ2本ずつの微細構造をもった共鳴線が観測される。⁵⁾

FFTスペクトルから、これらの微細構造が転移点で複雑に変化することがわかったので、MEMを応用した。 ν_{+} 共鳴スペクトルの温度変化の結果をFig. 4に示す。MEMスペクトルでは90Kで ν_{+} (B)がはっきり3本に分裂している様子がよくわかる。このような複雑な共鳴線の変化は、既存の理論では説明できず、相転移の微視的機構は未解明である。⁵⁾

以上、FFTと比べるとMEMではS/N比と分解能の著しい向上が認められる。MEMのNQR周波数の精密測定への有効性が明瞭に示された。しかしながら、使用に際しての問題点も出てきた。

MEM次数の決定にかなりの任意性がある。たとえば、次数を上げすぎると、余分な分裂を示したりする。また、データ点数ばかりでなく、信号のS/N比も次数に関連しており、スペクトルごとに最適次数が少し変化する。

したがって、現段階では、MEMとFFTを併用して、共鳴周波数を決めるのが妥当である。

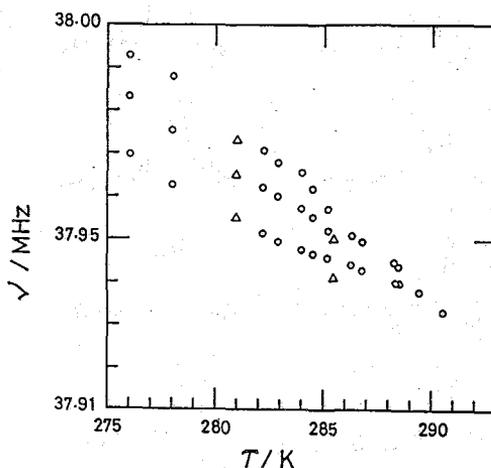


Fig.3: Temperature dependence of ^{35}Cl NQR frequencies in C_6Cl_6 . o; this work, Δ ; Yoshino et al. Ref.3.

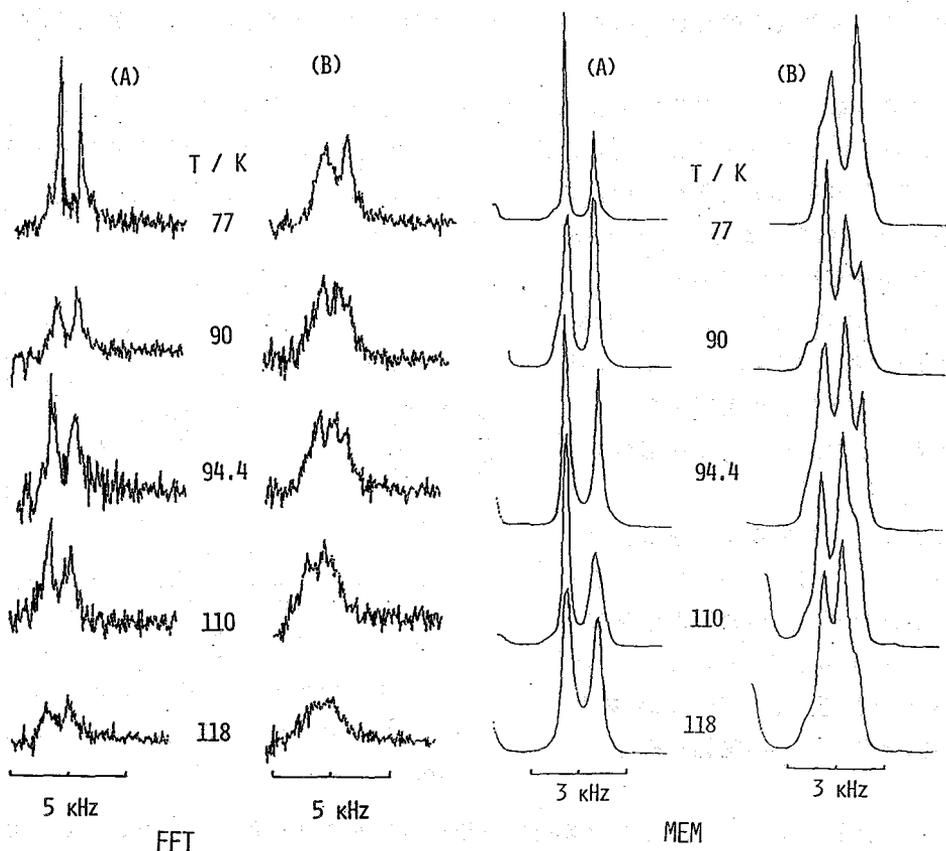


Fig.4: Temperature dependence of the fine structures of the ^{14}N NQR lines (ν_+) in trans-azobenzene. A and B denote the NQR lines for ordered and disordered molecular sites in the crystal. All the FFT spectra were taken after 1024 times signal averaging with the sampling interval of 20 μs and the datapoints of 1024. The datapoints for MEM are 256.

参考文献

- 1) 高井, 沢田, 山田, 福田, 田中, 花房: 第26回NMR討論会要旨集, pp.63-66 (1987) 大阪.
S.Sibisi, J. Skilling, R.G. Brereton, E.D. Laue, and J. Staunton: Nature (London) 311, 446 (1984).
- 2) M. Hino: "Spectrum Analysis", Asakura-syoten, Tokyo, p.210 (1986).
- 3) H. Yoshino, N. Nakamura, and H. Chihara: unpublished results.
- 4) Y. Ueda, N. Nakamura, and H. Chihara: submitted in J. Phys. Soc. Jpn.
- 5) T. Eguchi, M. Kishita, N. Nakamura, and H. Chihara: submitted in J. Phys. Soc. Jpn.

(日立計測、日立那珂*) 田中保子、○橋本正雄、笹淵 仁*、
服部忠鐵*

QUALITATIVE ANALYSIS OF CARBON-13 AND PROTON NMR SPECTRA BY COMPUTER-ASSISTED STRUCTURE ELUCIDATION

Yasuko TANAKA and Masao S. HASHIMOTO (Hitachi Instrument Engineering Co.Ltd.)
Hitoshi SASABUCHI and Chutetsu F. HATTORI (Hitachi Ltd.)

The basic idea in our previous report for ^{13}C -NMR spectral retrieval identification system was extended so that it is applicable to ^1H -NMR spectral case. These systems were unified as one system after a little modification on the computer program. The basic applicability of the new system was examined for steroids compounds regarding a few reference compounds as the unknowns.

§ 1. はじめに

有機化合物の同定を目的としたスペクトルのコンピュータによる検索システムの開発研究は新しいテーマとは云えないが、近年のパーソナルコンピュータの発展によりグラフィック画面による視覚化と補助記憶装置の操作が分析研究者でも容易に行なえるので、大型コンピュータに依存することなく検索同定システムの開発研究が可能である。このようなシステムは入力された未知化合物のスペクトルとデータベース中の参照化合物のスペクトルを比較し、両者の類似の度合い(合致度と定義)を数値化することを基本としている。

^{13}C -NMR スペクトルの検索同定システムについて云えば多数の化合物より求めたある特定の領域に化学シフトが出現する確立に基づく方法¹⁾と化学シフトの分布パターン(着目するピークの周囲に何本のピークがあるか)に基づく方法²⁾とが提唱されていて、データベースの質(未知化合物と一致或いは類似する化合物のデータをたまたま含んでいるか否かという意味で)に依存するという弱点は有するが有効であることがわかっている。

^1H -NMR スペクトルの検索同定システムについては報告例³⁾は少なく、 ^{13}C -NMR スペクトルの場合とは異なって ^1H -NMR は主として部分構造の解析の方に主眼を置いて使用されていることが窺える。しかし、過去測定されている ^1H -NMR スペクトルの数は ^{13}C -NMR スペクトルに比して数倍多いし、共鳴核の天然存在比から考えて感度的に有利であることから ^{13}C -NMR の場合と同様なデータベースの検索による同定システムを前報³⁾で開発したことは大きな意義がある。

本報では前述の ^{13}C - および ^1H -NMR スペクトルのデータベースによる検索同定システ

Δ^2, Δ^3 を一体化し、検索同定の精度を高める工夫をした。

§ 2. 合致度判定のアルゴリズム

図1で未知化合物の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは横軸に化学シフトをとり、縦軸にピーク強度をとった場合、横軸上のピークの分布密度に化合物毎の特徴がある。同様に記憶媒体中の参照化合物のスペクトルも横軸上のピークの分布密度に特徴を有する。分布密度の特徴の数値化は着目するピークの前後、 $\pm\sigma$ 以内に何本のピークが存在するかによってなされる。図1の例では未知化合物のスペクトルに相当する上部の特徴は“1311131”で参照化合物のスペクトルに相当する下部の特徴は“121131”で表現される。以下このような数値列をパターンと呼ぶことにする。未知化合物と参照化合物のスペクトルの特徴の類似性は即、パターン間の類似性に反映されているはずである。上記の例では“1131”の数値列が両パターンに共通で、この部分で両者は類似しているとみなされる。これらパターンの共通部分が多ければ多いほど両者は類似しているとみなされる。共通部分 α に属するピーク的位置に関して、両者の相関係数 r_α を求める。共通部分は一個とは限らないので複数個の場合はそれらの平均値をとる。共通部分が互いに近い距離にある時、相関係数は合致度の良い指標となるが、距離が大きくなった場合、本来互に対応づけられない原子団をパターンが同じと云う理由だけで対応させ、比較的高い合致度を与えてしまうという欠点がある。換言すると距離の大小に応じた補正が必要である。この補正係数として共通部分 α に属するピーク間の距離の平均 γ_α の関数 $k(\gamma_\alpha)$ を導入する：

$$k(\gamma_\alpha) = 1 / (f_\gamma \times \gamma_\alpha + 1) \dots \dots \dots (1)$$

ここで f_γ は実験により定められるパラメータである。

未知化合物と参照化合物のピーク数の差も両者の合致度の一つの指標であることは自明である。この様にして両者の最終的な合致度 R は相関係数 r_α 、距離に関する補正係数及び両者のピーク数の比 β により、次式のように表現される：

$$R = r_\alpha \times k(\gamma_\alpha) \times \beta \dots \dots \dots (2)$$

未知化合物と参照化合物が一致する場合は定義により $r_\alpha, k(\gamma_\alpha), \beta$ はいずれも1となり $R=1$ となる。便宜上、これを100%の合致度と呼ぶ。両者が完全に一致するものがない場合は一定の閾値 R_0 以上のものを部分的に類似したものとみなす。 σ 及び f の導入により、単純に相関係数しか考慮しない場合に比較してパターンの類似の度合と構造上の類似の度合の対応が良くつくようになった。

図2で未知化合物及び参照化合物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは化学シフトを横軸に、ピーク強度を縦軸に取った場合、 $^{13}\text{C-NMR}$ の場合と同様に横軸上のピークの分布密度に化合物固有の特徴が表れるがさらにピークの相対強度にも化合物固有の特徴が現れる。従って $^1\text{H-NMR}$ スペクトルではこれら二種類の特徴が類似度判定に使用できる。これらの特徴の数値化は以下のようになされる。先ず横軸上のピークの分布密度は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルの場合と同様に着目するピークの前後 $\pm\sigma$ 以内に何本のピークが存在するかによって多重度をもった一つのグループ(パターン化されたピーク)に属すると考える。この際、多重度が5以上の

グループについてはグループ内の最大強度のピークの3/4以上の強度をもつピークは一つのグループとして扱う(図2.c参照)。このようなピーク群の強度はスペクトル全領域の中の最大ピーク強度を1として規格化した場合のグループ内の最大強度を4段階に分けたもの(I_i)で表す。ピーク群はこのような最大強度と多重度を要素とした長方形にパターン化する。多重度は5以上のものを1とし、以下、減少する順に増加する幅パラメータ(W_i)で表す(図2.d参照)。パターン化されたピーク群 i 及び j を夫々未知及び参照化合物のものとするれば、両者の合致の度合は次式で表される。:

$$R(\beta, \gamma) = \sum_{m=1}^M R_{ij}^m \times (M/B) \times 100 \quad (\text{in } \%) \quad \dots \quad (3)$$

$$R_{ij}^m = R_{ij}^{W_i} \times R_{ij}^{\delta} \quad \dots \quad (4)$$

$$R_{ij}^{W_i} = [1/(|W_i - W_j| \times f_w + 1)] \times [1/(|I_i - I_j| \times f_I + 1)] \quad \dots \quad (5)$$

$$R_{ij}^{\delta} = 1/(|\delta_i - \delta_j| \times f_{\delta} + 1) \quad \dots \quad (6)$$

ここで f's は実験結果定まるパラメータであり、 δ はグループ内の最大強度を与える化学シフト値である。M は (i, j) の粗の数であり、B は参照化合物のパターン化されたピークの数である。但し、B は未知化合物のパターン化されたピーク数 A よりも小さいとし、逆の場合は B のかわり A を用いる。これらの比 $\beta = M/B$ が合致度に寄与することは ¹³C-NMR の場合と同様である。

§ 3. 実験

参照化合物の化学シフト、パターン化した多重度、強度パラメータは日立 B16-MXII パーソナルコンピュータシステムの 20MB ハードディスクに格納しておき、前節アルゴリズムによる BASIC プログラム上で、未知化合物との比較が行なわれる。プログラムの流れ図を図3に示した。合致度は参照化合物のピーク数(B)が未知化合物のピーク数(A)よりも小さいとした場合、ピーク数(M)/Bを含んだ部分的な合致度で先ず計算する。類似化合物が多く検索されてきてより類似性の高いものに絞る時など必要に応じてBのかわりにAを用いた全体的な合致度を計算する。データベースに関しては ¹H と ¹³C が対で得られるとは限らないので夫々補助記憶部の異なる場所に化合物群毎に格納して ¹H と ¹³C の検索同定を別個に行なう。¹H 又は ¹³C により化合物群の推定がつく場合には互いに検索範囲を限定することができる。

§ 4. 結果と考察

約100種のステロイド化合物について、コレステロール及びテストステロンを未知化合物とみなした場合の ¹H-NMR スペクトルによる部分的な合致度(%)を表1, 2に示す。 σ の選択如何により、合致度の順位が変化してくるが、コレステロールの5, 6位炭素間の二重結合及び17位炭素の鎖状炭化水素基、テストステロンの3位炭素のカルボニル基及び4, 5位炭素間の二重結合に着目すると $\sigma = 0.13$ を設定した場合が妥当である。分布パターンに基づく手法である所から、データベースの差はあるが、¹³C-NMR の場合と対応した結果が得られ、両者による結果を総合すると検索同定の精度が高まることがわかった。

文献 省略

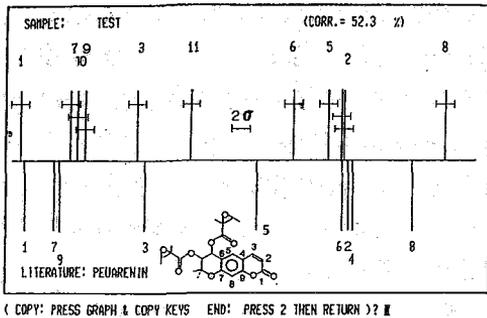


図1 ¹³C-NMR パターンの比較例

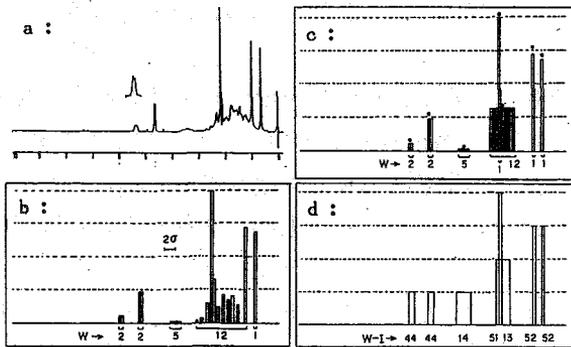


図2 ¹H-NMR パターン化手順

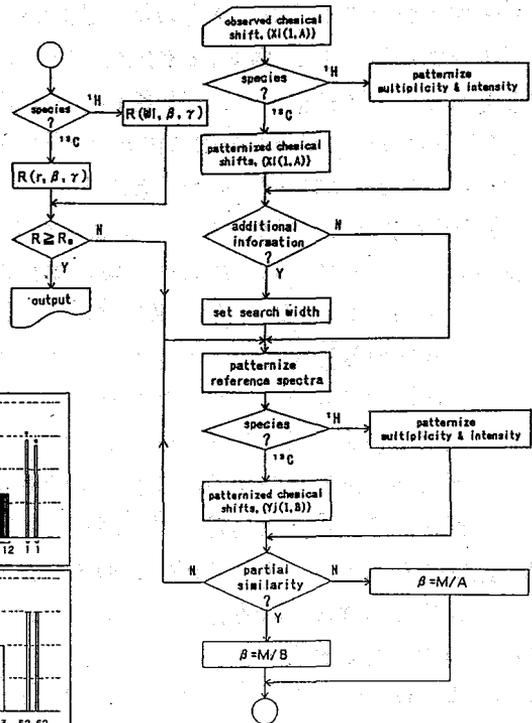


図3 プログラム流れ図

表1 コレステロールに対する合致度(%)

$\sigma: 0.11$	$\sigma: 0.13$	$\sigma: 0.15$
87.7	90.4	86.2
87.7	86.4	85.9
86.4	84.7	85.9
79.4	80.5	84.8
77.5	78.9	84.3
75.6	78.5	83.0
74.2	78.4	78.5

表2 テストステロンに対する合致度(%)

$\sigma: 0.11$	$\sigma: 0.13$	$\sigma: 0.15$
88.7	88.4	95.5
85.9	88.3	89.4
83.4	83.5	86.6
82.6	79.0	86.2
79.0	78.8	84.8
78.2	77.9	82.6
77.7	74.4	77.5

農工大 朝倉哲郎・出村誠

東京都老人研 小山内実

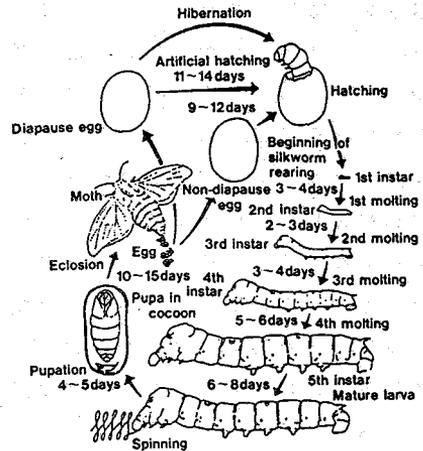
京都府立医大 西川弘恭

In vivo NMR of SilkwormTetsuo ASAKURA, Makoto DEMURA (Tokyo University of Agriculture and Technology),
Minoru OSANAI (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology) and
Hiroyasu NISHIKAWA (Kyoto Prefectural University of Medicine)

Studies were made on *in vivo* ^{13}C and ^{31}P NMR in the larva of silkworm, *Bombyx mori*, to determine the pathways of glucose utilization, especially glucose to amino acids as components of silk fibroin in larva and to examine the change of the pathway among the larva, pupa and moth. It was monitored in larva that the ^{13}C nucleus of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose administered orally into the 5th instar larvae of the silkworm was incorporated in turn into glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate and trehalose and finally the silk fibroin components through the amino acids. Time course of the incorporation was influenced by the starvation. On the basis of ^{13}C and ^{31}P NMR data, we proposed the detailed pathway of the glucose metabolism to amino acid in the silkworm. Cultivation condition of the posterior silkgland with artificial medium was examined by ^{13}C and ^{31}P NMR in order to produce the silk fibroin continuously. For the purpose, the presence of sorbitol-6-phosphate in the medium was required.

1. 緒言

カイコ幼虫は、ふ化後、5令まで成長し、吐糸後、さなぎ、成虫へと変態していく (Fig. 1 参照)。我々は、このライフサイクルの中で、幼虫期から、さなぎにかけて、 ^{13}C および ^{31}P NMR スペクトルを測定し、絹フィブロインの生産性との関連について検討している¹⁾。本発表では、特に、絹フィブロイン生成過程における炭素源の代謝に着目し、 ^{13}C ラベル法によるグルコース-アミノ酸-絹フィブロインの生成過程を *in vivo* NMR で解析した。さらに後部絹糸腺の器官培養の結果とあわせてカイコの絹フィブロイン合成能について考察した。

Fig. 1. Life cycle of *Bombyx mori*.

2. 実験

カイコ、*Bombyx mori* (朝日 × 東海) は、人工飼料を与え、25℃で飼育した。[1- ^{13}C]グルコース (エンリッチ率 99 at m%) は 2.5 mg を生理食塩水に溶解し、カイコに経口投与した²⁾。 *in vivo* ^{13}C NMR 測定は、10 mm φ の NMR 管を用い、JEOL GX270、FX90Q でそれぞれ、67.8、22.5 MHz にて、また、 ^{31}P NMR 測定は、FX90Q を用い、36.3 MHz にて行った。

3. 結果と考察

3-1. 生育に伴う *in vivo* NMRスペクトルの変化

Fig. 2に、幼虫期(5令)から、さなぎ、成虫にかけての *in vivo* ^{31}P -NMRスペクトルの生育に伴う変化を示した。いずれのスペクトルも sugar phosphate (Sugar-P) と inorganic phosphate (Pi) ピークが非常に大きく、また adenosine triphosphate (ATP)、phosphoenolpyruvate (PEP)、uridine diphosphoglucose (UDPG)、arginine phosphate (Arg-P) が観測された。これらのピークの出現パターンは、成長とともに大きく変化し、P化合物の代謝調節にともなう生理状態の変化が示唆される³⁾。また、 ^{31}P NMRスペクトルの雌雄差は、さなぎ期で顕著に現れるが、絹フィブロインを生産している幼虫期では、観測されなかった。同様に、幼虫からさなぎにかけての *in vivo* ^{13}C NMR測定結果では、幼虫期においては、絹フィブロインおよびトリグリセリド由来のピークが主であるが、さなぎに変態すると、後者のピークのみとなる⁴⁾。このような一連の ^{31}P および ^{13}C NMRスペクトルの変化と代謝経路の関連について、現在検討中である。

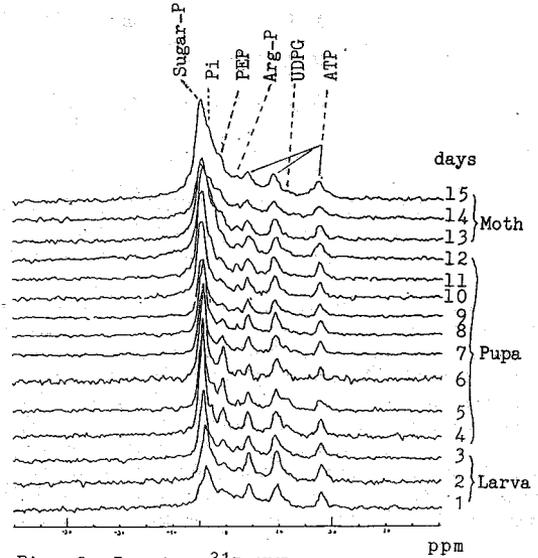


Fig. 2. *In vivo* ^{31}P NMR spectra of *B.mori* during larva, pupa and moth.

絹フィブロインを生産している幼虫期では、観測されなかった。同様に、幼虫からさなぎにかけての *in vivo* ^{13}C NMR測定結果では、幼虫期においては、絹フィブロインおよびトリグリセリド由来のピークが主であるが、さなぎに変態すると、後者のピークのみとなる⁴⁾。このような一連の ^{31}P および ^{13}C NMRスペクトルの変化と代謝経路の関連について、現在検討中である。

3-2. [1- ^{13}C]グルコースの絹フィブロインへの取り込み²⁾

カイコ5齢5日目の幼虫に [1- ^{13}C]グルコース (2.5 mg) を経口投与し、最初の5-15分後の *in vivo* ^{13}C -NMRスペクトルを Fig. 3, Aに示した。絹フィブロイン由来のチロシン、セリ

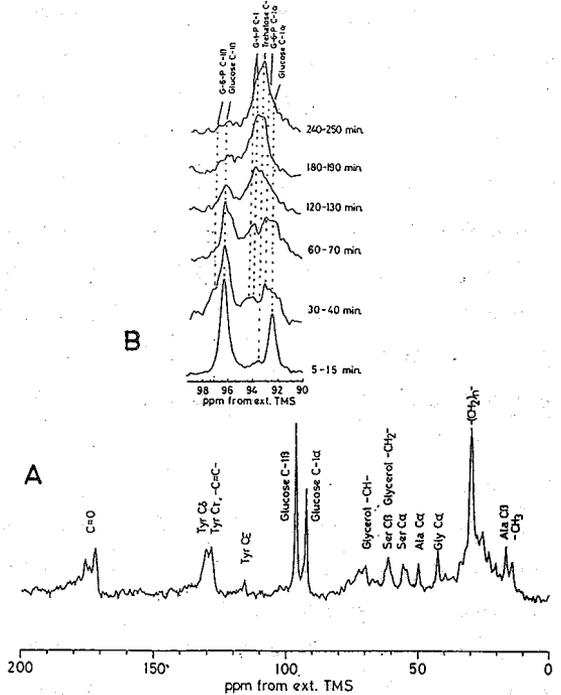


Fig. 3. *In vivo* ^{13}C NMR spectra of larva of *B.mori* (A) and the expanded spectra (B).

ン、アラニン、グリシン、およびグリセロールの $-CH-$ 、 $-CH_2-$ などがシャープなピークを与える。投与されたグルコースC-1は、 α 、 β のアノマーとして観測された。10分ごとのブロック積算で経時変化を測定した結果、9.0から9.8 ppmの拡大スペクトル (Fig. 3, B) にみられるように、グルコースC-1は、速やかに消費された。30-40分後、新たに、glucose-6-phosphate (G6P)、glucose-1-phosphate (G1P)のそれぞれのC-1ピークが出現し始めるが、最終的に、trehalose C-1のピークへと移行していった。同様な方法でエリ蚕、*Philosamia cynthia ricini*の $[1-^{13}C]$ グルコースの取り込みを測定した結果、G6Pの消費速度が*B. mori*と異なっていることがわかった²⁾。

$[1-^{13}C]$ グルコースの絹フィブロインへの取り込みをさらに検討するために、5令3日目のカイコ幼虫に $[1-^{13}C]$ グルコースを投与してから2日目に、同一個体の ^{13}C -NMRを観測し、さらに、その差スペクトルを測定した (Fig. 4)。グリシンC α 、セリンC α 、C β のピークに比べ、アラニンC β のラベル率が非常に高い。これらの結果の他、 $[1-^{13}C]$ グルコースを投与後、一定時間ごとに得た体液のスペクトル変化のデータも加味して、最終的にFig. 5に示したグルコース代謝経路を考えた²⁾。なお、絶食に伴ってこのようなグルコースの投与初期の代謝回転は、著しく変化する (Fig. 6)。

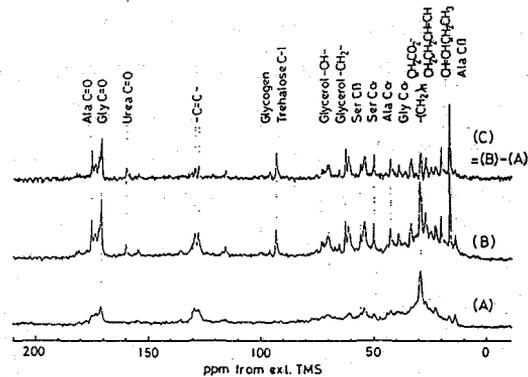


Fig. 4 *In vivo* NMR spectrum of ^{13}C fixed in a *Bombyx* larva after oral administration of $[1-^{13}C]$ glucose. The ^{13}C NMR spectrum (A) at 22.5 MHz of a normal living 3-day-old, 5th instar larva was measured. Then 2.5 mg of $[1-^{13}C]$ glucose was administered orally and 2 days later, its spectrum was remeasured without additional treatments (B). The difference spectrum (C), which is that of labeled-metabolites of glucose 2 days after its administration, was obtained as the difference between spectrum B and spectrum A.

3-3. 後部絹糸腺の器官培養
絹フィブロイン合成能の高い5齢4日目の幼虫より絹糸腺を摘出し、器官培養を行った。合成培地中に $[1-^{13}C]$ グリシンを添加し、絹フィブロインへの取り込みを ^{13}C -NMRで追跡

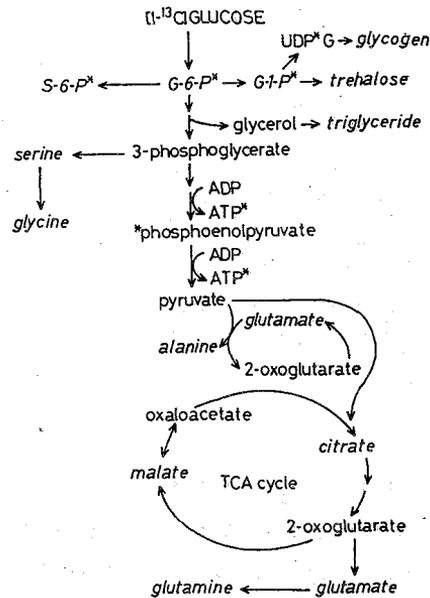


Fig. 5. Pathway of the glucose metabolism of *B. mori*.

した結果を Fig. 7 に示した。培養時間とともに、グリシンから絹フィブロインシークス中に取り込まれる様子が観測される¹⁾。この絹フィブロイン合成能は、培地組成により著しく変化する⁵⁾。たとえば、糖リン酸成分のうち、G6P と sorbitol-6-phosphate (S6P) の効果を比較すると、絹フィブロイン中へのグリシンの取り込みは、S6P を含む培地の方が良好であった (Fig. 8)。さらに、³¹P-NMR による追跡データも加え、NMR によるモニターを行いつつながら、最適な培養条件を検討し、カイコ体外での絹フィブロイン生産の可能性を探っている。

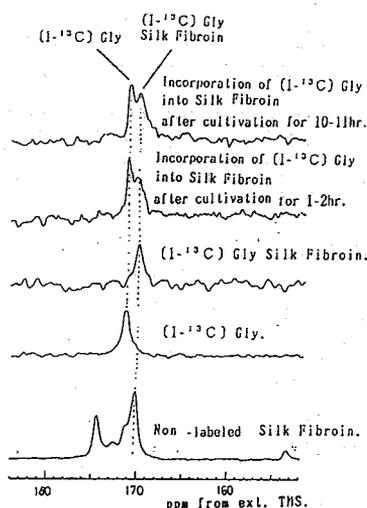


Fig. 7. $^{13}\text{C}=\text{O}$ NMR spectra of *B.mori* silk fibroin and $[1-^{13}\text{C}]$ glycine in aqueous solution.

参考文献

- 1) T. Asakura, JEOL News, **23A**, 2 (1987).
- 2) T. Asakura, Y. Kawaguchi, M. Demura and M. Osanai, Insect Biochemistry, in press
- 3) 荒田洋治、甲斐荘正恒、通和夫、化学の領域、**34**, 961 (1980)
- 4) T. Asakura and Masahiko Ando, Makromol. Chem., Rapid Commun, **3**, 723 (1982).
- 5) Y. Ikariyama, M. Aizawa and S. Suzuki, J. Solid-Phase Biochem., **4**, 69 (1979).

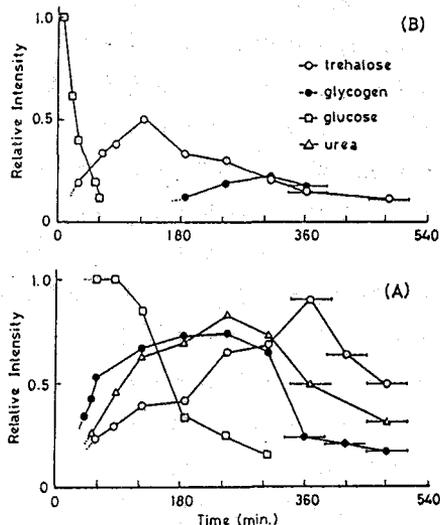


Fig. 6 Transfer of label from $[1-^{13}\text{C}]$ glucose to trehalose, glycogen and urea in starved and normally fed *Bombyx* larvae. The ^{13}C NMR spectra at 22.5 MHz of normally fed (A) and starved (B) larvae were measured at the indicated times after oral administration of 2.5 mg of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose. A 5-day-old, 5th instar larva of *Bombyx mori* was starved for 1 day for the data in (B). The spectra were collected in 10-min-blocks during 300 min and in 60-min-blocks during 300-480 min after $[1-^{13}\text{C}]$ glucose administration.

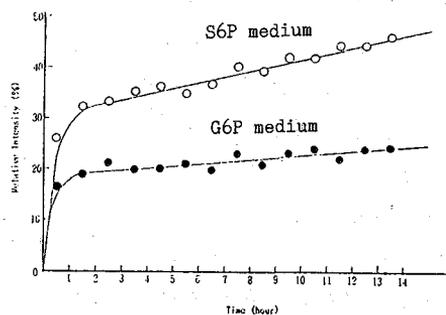


Fig. 8. Incorporation of $[1-^{13}\text{C}]$ glycine in the silk fibroin sequence.

(国立公害研) 三森文行

Magnetization transfer technique in in vivo NMR. Its advantage and pitfall.
Fumiyuki MITSUMORI (National Institute for Environmental Studies)

Recently the application of the magnetization transfer technique has been increased to measure the flux of enzyme reaction in vivo. The author applied the saturation transfer method to measure the ATP formation rate in *E. coli* cells, *Chlorella* cells and molluscan smooth muscles. Through the above applications the advantage and the pitfall of the technique will be discussed.

《はじめに》 飽和移動法が化学交換系の速度論的解析に有効であることが示されて以来30年になるが、近年生体系での応用が増加している。演者らはこれまで数年間にわたって、大腸菌細胞(第24回討論会で報告)、クロレラ細胞(第25回討論会で報告)、二枚貝の平滑筋(未発表)などの生体細胞内におけるATPの生成反応を、飽和移動法を用いて測定してきた。純粋化合物の溶液系では問題にならないが、本法をin vivo系に適用した場合、重大な問題となるような点があることが明らかになった。本報告では、in vivo NMRの測定における、飽和移動法の利点と問題点について、特に後者に焦点をあてて、論議することとする。

《結果と考察》

I. in vivo NMRにおける飽和移動法の利点

I-1 代謝物の量に変化しない定常状態においても反応の単方向速度が得られる。

定常的な代謝状態では代謝物の量的な変化はみられない。代謝速度を解析する一つの方法は、生体に運動負荷などのperturbationを加え、代謝物の定常状態からのずれを観測するものである。しかし、生体内でのATPは定常レベルが厳しく維持されており、上記の方法は適当でない。従って、定常状態でのATPの生成、分解反応の単方向速度が得られる飽和移動法は、この場合極めて有効である。

好気条件下における大腸菌細胞では、解糖系の平衡状態にあるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素/ホスホグリセレートキナーゼ(GAPDH/PGK)部位での $P_i \rightarrow ATP$ の反応速度が得られた(図1、2)。また、貝筋(ABRM筋)の好気条件下での収縮→弛緩サイクルでは、ATPレベルは一定に保たれている(図3)。このような場合にもアルギニンキナーゼの触媒するアルギニンリン酸(ArgP) \rightarrow ATPの反応速度が求められた(図4)。

I-2 測定される反応速度領域が感度で限定されない

飽和移動法では磁化移動の起きている定常状態を測定するため、測定にかかる反応速度の範囲は、測定に要する時間で直接限定されない。そのかわりに、反応の出発物質 ($P_i \rightarrow ATP$ 反応では P_i 、 $ArgP \rightarrow ATP$ 反応では $ArgP$) の緩和速度によって限定される。この緩和時間が1秒の場合、測定にかかる反応速度定数の範囲はおおよそ $0.1 \sim 10 \text{ s}^{-1}$ である。共鳴線強度の変化を追跡する方法 (通常、時間分解能は1分程度が限度) に比べてかなり速い反応速度を測定することができる。

II. 飽和移動の測定、解析の問題点

II-1 反応速度の帰属

選択的な反応系のみを含む溶液での測定では起こり得ないが、多くの反応が同時に進行している生体系では、代謝物が複数の反応系に関与していることはしばしば起こる。ATPのように生体内でかなり普遍的に用いられる代謝物では、測定された反応速度がどの反応に由来するのかという点は、重要な問題となる。エネルギー産生系では5か所の反応系でATPが関与する。このうち、 $P_i \rightarrow ATP$ の交換系に限定すると、これに関与するのは、ATP合成酵素と、解糖系のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素/ホスホグリセレートキナーゼ (GAPDH/PGK) の2か所である。大腸菌で観測された $ATP \rightleftharpoons P_i$ の飽和移動は、ATP合成酵素部位での反応に由来すると考えられていたが、阻害剤や遺伝子操作により酵素活性を変化させた変異株を用いた実験から、解糖系のGAPDH/PGK反応に由来するものであることが明らかにされた。

一方、生体内においては解糖系、TCA回路、酸化的リン酸化、光リン酸化などの反応系は、細胞内のコンパートメントに局在している。したがって、コンパートメントごとの飽和移動を個別に観測できれば、反応系の帰属に極めて有効である。光照射下のクロレラ細胞では、光リン酸化サイトである葉緑体と、細胞質の P_i が個別に観測され、 $ATP \rightleftharpoons P_i$ の飽和により両 P_i への飽和移動が個別に観測された (図5)。この結果と明暗条件下や、阻害剤を用いた測定結果を総合すると、葉緑体コンパートメントで観測された飽和移動は、光リン酸化反応によるものである可能性が高い。

II-2 測定条件

飽和移動の解析は、磁化の平衡状態を前提として行なわれるので、測定も通常 90° パルスと、磁化の平衡状態への復帰を保証するような十分長いパルス間隔とをもって行なわれる。しかし、このような測定条件は、測定時間に制約のある *in vivo* 系での測定で、少しでも感度を改善したいという要求と相容れない。たとえば筋の静止 \rightarrow 収縮 \rightarrow catch収縮 \rightarrow 弛緩の各ステージでの飽和移動を測定しようとする、静止状態を除いて、5分程度の測定時間しか許容されず、磁化の完全緩和と条件を満足させることは不可能である。この問題を考察するために、 0° パルスを用い、速いパルス繰り返しを行なった場合に、飽和移動の結果にどのような影響がみられるかシミュレーションによる検討を行なった。

A Bの交換反応では、それぞれの磁化は次のような、Bloch方程式に交換反応をつけ

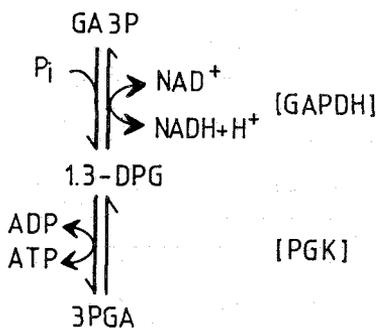
加えた式で記述される。

$$\frac{dM_A}{dt} = \frac{M_{0A} - M_A}{T_{1A}} - M_A k_1 + M_B k_2 \quad (1)$$

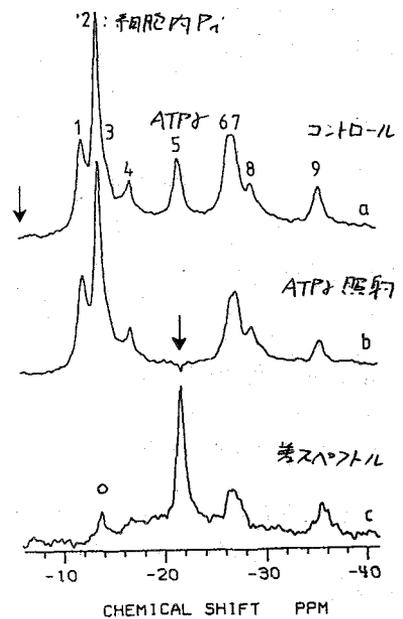
$$\frac{dM_B}{dt} = \frac{M_{0B} - M_B}{T_{1B}} - M_B k_2 + M_A k_1 \quad (2)$$

ただし、 M_{0A} 、 M_{0B} はA、Bの平衡磁化、 T_{1A} 、 T_{1B} はA、Bの緩和時間である。Bの照射を行わないコントロール測定では、A、Bの磁化は(1)、(2)に従って部分飽和の定常状態に達する。Bを選択飽和した場合には、Bの磁化は照射中は0、データ取り込み中は(2)に従って磁化が回復するという過程を経て、これも定常状態に達することになる。ここでは大腸菌での測定結果に対応したパラメータを設定し、(1)、(2)を各パルスごとに数値解析することにより定常磁化のシミュレーションを行なった。設定パラメータは、 $M_{0A}=1.0$ 、 $M_{0B}=0.2$ 、 $T_{1A}=0.44s$ 、 $T_{1B}=0.2s$ 、 $k_1=0.14s^{-1}$ 、 $\theta=45^\circ$ 、データ取り込み0.23s、パルス待ち時間0.2sである。この結果、Bの飽和の有無両条件で、それぞれ表1に示すように5パルス後に M_A 、 M_B ともに定常状態に達することがわかった。この値より、観測される $M_A/M_{0A}=0.0528$ である。完全緩和条件下では $M_A/M_{0A}=0.058$ であるので、速いパルスの繰り返しの影響はこの条件下では、飽和移動の9%の過小評価になることが明らかになった。このシミュレーション結果から、速いパルス繰り返しの場合の飽和移動の測定結果を補正してやることが可能であり、これにより測定のS/N比を改善することができる。

《謝辞》大腸菌細胞の測定はオックスフォード大学生化学研究室との共同研究、ABRM筋での測定は東京大学動物学教室、石井直方博士、高橋景一教授との共同研究によるものである。ここに記して謝意を表する。



↑ 図1. GAPDH/PGK部位に於ける P_i , ATP交換反応。
 → 図2 大腸菌細胞に於ける ^{31}P NMR saturation transfer スペクトル。



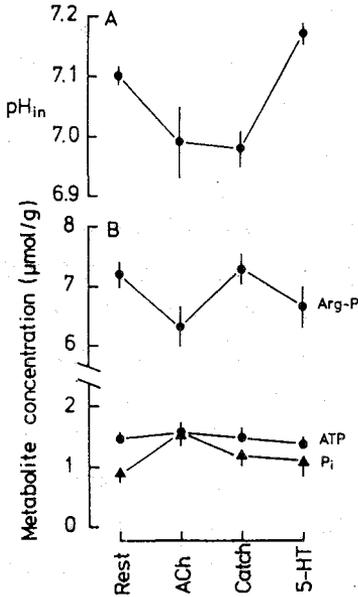


図3 ABRM筋, 静止→収縮
→catch収縮→弛緩→弛緩
代謝物, pHの変化

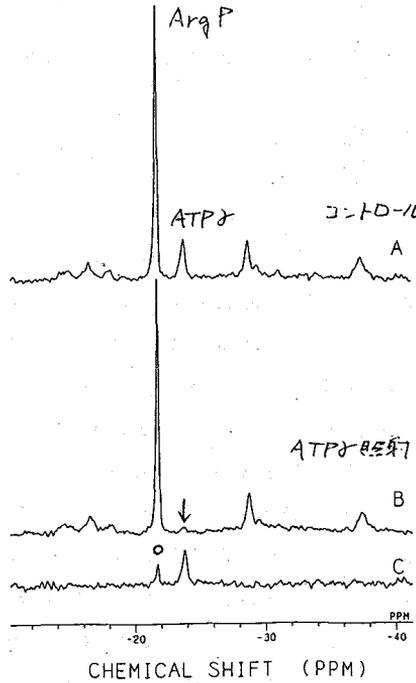


図4
ABRM, 静止
弛緩→弛緩
ATP→ArgP
の saturation
transfer
7トール
○: 弛緩移動

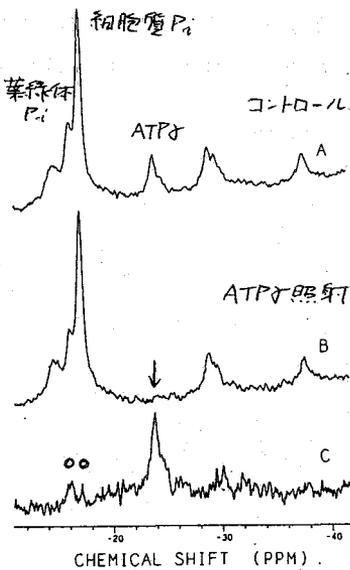


図5 光照射下での70L→細胞
31P NMR saturation transfer
7トール

Table 1a. Magnetization before next pulse without saturating B

pulse No.	A	B
equilibrium	1.0	0.2
1	0.893	0.194
2	0.866	0.193
3	0.859	0.193
4	0.857	0.193
5	0.857	0.193

Table 1b. Magnetization before next pulse with B saturated

pulse No.	A	B
equilibrium	1.0	0.2
1	0.859	0.0
2	0.823	0.0
3	0.814	0.0
4	0.812	0.0
5	0.812	0.0

(京都府立医大・生理) ○吉崎和男、西川弘恭

DEVELOPMENT OF ³¹P-NMR SCANNING METHOD TO MEASURE THE FLUX OF CREATINE KINASE REACTION ALONG MUSCLE FIBERS.

Kazuo YOSHIZAKI and Hiroyasu NISHIKAWA (Dept. Physiol., Kyoto Pref. Univ. Med.)

³¹P-saturation transfer NMR was applied on muscles to measure the flux of creatine kinase reaction, and the flux was 4 mM/s on resting bullfrog muscles. ³¹P-NMR scanning spectroscopy was successfully developed together with the saturation transfer method, and the flux of the creatine kinase reaction was obtained along muscle fibers.

〔はじめに〕

昨年、骨格筋の線維軸に沿った ³¹P-NMR スペクトルの走査（次元化学シフト・イメージング）が可能になったことを報告した。今回、³¹P-NMR 飽和移動法を併用することにより筋繊維に沿ったクレアチン・キナーゼ反応のフラックスが測定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・ポアの超伝導磁石を用い、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を用いた。

³¹P-NMR スペクトルの測定には市販の 10mm のプローブおよび自作の 9 ターンの内径 10mm のソレノイド・コイルを用いた。クレアチン・キナーゼ反応のフラックスの測定には ³¹P-飽和移動 NMR 法を用い、ゲーティド・デカップリング法で 10-20Hz の雑音変調で γ -ATP の共鳴線を照射した。スペクトル走査にはスピン・エコ法を用い、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、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。

よしざき かずお、 にしかわ ひろやす

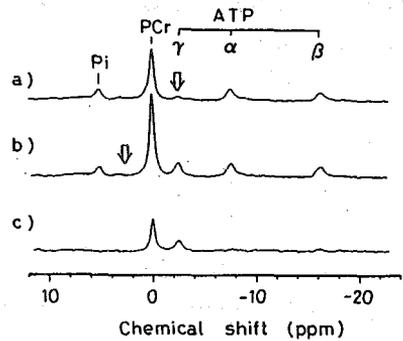


図1 カエル骨格筋の ³¹P-飽和移動 NMR 法によるクレアチン・キナーゼ反応のフラックス測定。
a) γ -ATP の共鳴線を照射・飽和（矢印）したスペクトル。
b) PCr の対照位置を照射した（矢印）スペクトル。
c) γ -ATP から PCr への磁化の飽和移動スペクトル（差スペクトル (b-a)）。

試料は単離したウシガエルの大腿二頭筋を用い、空気飽和したリンゲル溶液に一晩、冷蔵庫で放置したのち、NMRの測定(室温)に用いた。

〔結果および考察〕

1. カエル骨格筋におけるクレアチン・キナーゼ(CPK)反応のフラックスの測定。

カエル骨格筋の³¹P-NMRスペクトルからクレアチンリン酸(PCr, 21 mmol/kg 湿重量、以下mMと略す)、ATP(4.5 mM)、無機リン酸(Pi, 6.7 mM)を定量した。また細胞内pHは7.3であった。次に³¹P-飽和移動NMR法を用い、 γ -ATPの共鳴線を照射すると、PCrの共鳴線の面積は $58 \pm 3\%$ (n = 5)に減少した(図1)。 γ -ATPの共鳴線を飽和させた条件下に、PCrのスピン・格子緩和時間(T_{1m})を飽和回復法で求めると、 2.6 ± 0.3 sとなった。これらから計算したPCrのintrinsic T_1 は 4.4 ± 0.5 sとなり、CPK反応の正反応方向(PCr + ADP \rightarrow Cr + ATP)のみかけの速度係数kは0.17 /sとなった。PCrの濃度を乗算して、静止状態の骨格筋のCPK反応のフラックスは3.6 mM/sとなった。

2. クレアチン・キナーゼ反応の静止筋における嫌気的な条件下での変化。

静止筋を嫌気的な条件下で室温で放置すると酸素欠乏のためにPCrが徐々に減少し、細胞内pHの酸性化が生じる(図2)。このPCrの分解速度は上記のCPK反応のフラックスよりもはるかに遅いので、CPK反応はほぼ定常状態であるとみなしえる。嫌気的な条件下におけるCPK反応のフラックスを測定し、PCrの濃度の減少や細胞内pHの酸性化の影響を調べた。

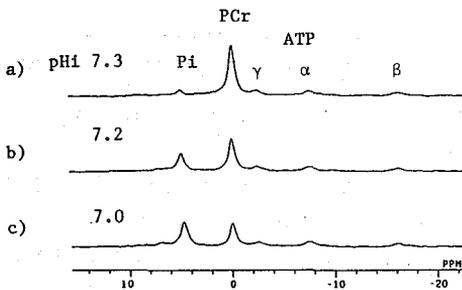


図2 カエル骨格筋の³¹P-NMRスペクトルの経時変化。

(嫌気的条件)

- a) 0 hr
- b) 4.2 hr
- c) 8.4 hr

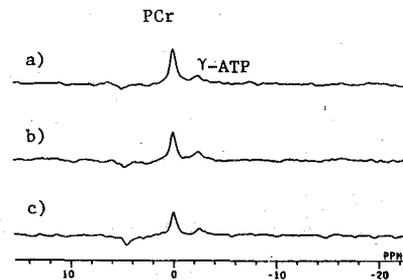


図3 カエル骨格筋の γ -ATPからPCrへの磁化の飽和移動スペクトル。

(差スペクトル: 図1cに相当する)

試料は図2と同一であり、各スペクトルは図2の各々の時間に対応する。

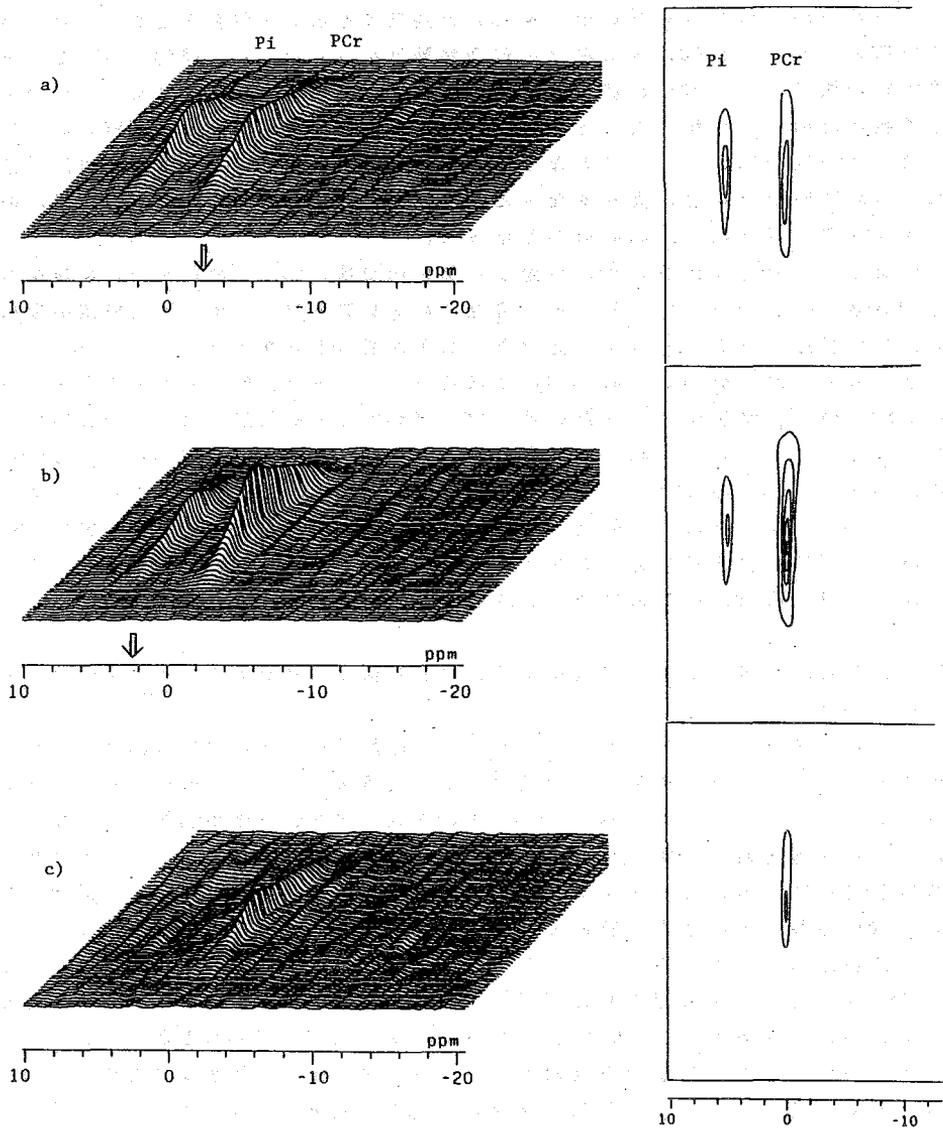


図4 カエル骨格筋の筋線維に沿ったクレアチン・キナーゼ反応のフラックス測定。
 カエル骨格筋の筋線維に沿った ^{31}P -NMR スペクトル走査法に飽和移動法を応用した。
 a) γ -ATPの共鳴線を照射・飽和(矢印)した走査スペクトルとその等高線図。
 b) PCrの対照位置を照射(矢印)した走査スペクトルとその等高線図。
 c) γ -ATPからPCrへの磁化の飽和移動の走査スペクトル(差スペクトル(b-a))とその等高線図。

^{31}P -飽和移動NMR法を用いて γ -ATPの共鳴線を照射・飽和させると、PCrの濃度が低いほど、ATPからPCrへの磁化の飽和移動は小さくなった(図3)。しかし、 γ -ATPの共鳴線の照射によるPCrの面積の相対的減少度はむしろ大きく、また、PCrのスピン・格子緩和時間 T_{1m} は短くなった。これらの各々の値から計算すると、PCrのintrinsic T_1 はほぼ一定で $3.8 \pm 0.2 \text{ s}$ となった。一方、CPK反応の正反応方向の速度係数 k は、PCrの濃度が低いほど、大きくなったが、PCrの濃度を乗算すると、CPK反応のフラックスはほぼ一定で $4.2 \pm 0.6 \text{ mM/s}$ となった。

すなわち、静止筋において、測定した範囲内では、PCrの濃度が1/2に減少し、細胞内pHが酸性化(7.3 \rightarrow 7.0)しても、細胞内のクレアチン・キナーゼの酵素活性は変化せず、その反応のフラックスは一定であることが明らかとなった。

ところで、PCrのintrinsic T_1 はほぼ一定であった。PCrの減少にともない、測定したPCrの T_{1m} が短かくなったのは、PCrがATPとCPK反応により交換反応をしているためである。すなわち、ATPの濃度は一定であり、ATPのintrinsic T_1 はPCrよりも短かいから、PCrの減少にともない相対的にPCrの T_{1m} が短くなったことを示している。このことは一般に、生体試料でのリン化合物の濃度の変化の定量の際に、微量な変化の議論には飽和因子の変化を考慮しなければいけないことを示している。また、速度係数 k の増加はADPや H^+ の増加を反映していると考えられる。

3. ^{31}P -NMRスペクトル走査法による筋線維に沿ったクレアチン・キナーゼ反応のフラックス測定。

骨格筋をソレノイド・コイル内に置き、筋線維軸に沿った磁場勾配パルスを加え、そのスピン・エコ・シグナルの二次元フーリエ変換によって ^{31}P -NMR走査スペクトルが得られる。その走査スペクトルではPCrと P_i が検出でき、両者の化学シフト差から筋線維に沿った細胞内pHの分布も求まることをすでに報告した。ATPはスピン・スピン緩和時間 T_2 が短かいため検出できなかったが、その γ -ATPの共鳴線の位置を照射することにより、PCrの共鳴線の減少が認められ、CPK反応のフラックスの測定が可能となった。測定は長時間となるため、対照となる走査スペクトルと γ -ATPの共鳴線を照射した走査スペクトルとを同時に測定した(図4)。PCrのintrinsic T_1 は4.4 sであるとして計算した結果、筋線維に沿ったCPK反応のフラックスは3~4 mM/sとなった。

以上の様に ^{31}P -NMR飽和移動法をスペクトル走査法に応用することにより筋線維に沿ったクレアチン・キナーゼ反応のフラックスが測定可能となった。

(謝辞)

種々の御助言を頂きました日本電子の小川、大津氏に感謝します。なお、本研究の一部は日本心臓財団の研究奨励ならびに文部省科学研究費補助金の援助による。

(生理研・分子生理) 村上政隆、鈴木英司、宮本信一、瀬尾芳輝、

Martin C. Steward, 亘 弘

Measurement of intracellular K movement in the isolated perfused salivary gland by 39K NMR.

Masataka MURAKAMI, Eiji SUZUKI, Sin-ichi MIYAMOTO, Yoshiteru Seo, Hiroshi Watari (National Institute for Physiological Sciences)

39K NMR spectrum of the perfused rat salivary gland consists of two components: broad resonance with short T1 and T2 values (ca. 3 ms) and sharp resonance with long T1 and T2 values (ca. 50 ms). These components were assigned to extra- and intra-cellular K(Kin) by chemical shift reagent, Dy (TTHA). Based on this property, a modified inversion-recovery pulse sequence was applied to measure Kin. Kin decreased by 30% of the resting value during secretion with 1 μ M ACh. Addition of 1 mM ouabain decreased Kin by additional 40 % of the resting level. These changes were comparable to the amount of K loss obtained from K concentration and flow rate of the effluent and saliva.

Kイオンは細胞内液中最も高濃度に存在する陽イオンであり、細胞の興奮、運動、吸収、分泌などの基本機能にとり重要な役割をはたす。しかし39KはNMRにとり最も低感度の核種のひとつであり、Naにたいし、 3×10^{-3} と低く、細胞内のKの共鳴線が幅広であることとあいまって、S/Nの低下をきたし、精度よい測定を短時間に行うことは非常に困難であった。今回、唾液腺の血管灌流標本を用い、39K NMR法により、細胞内Kの動態を計測することが可能になったので報告する。(Seo et al., 1987; Murakami et al., 1988)。

<材料および方法>

ウイスター系オス、ラット(180-350 g 体重)をpentobarbital sodium 麻酔下に手術し、顎下腺(180-300 mg)を摘出し、2.0 ml/min の灌流速度で動脈より定流灌流した。灌流液の組成は (mM; Na 146, K 4.3, Ca 1, Mg 1, inorganic phosphate 1, 148.3 Cl, 5 glucose, 10 mM HEPES でpH 7.4 に調整し、O₂ 100% で飽和し用いた。灌流腺は10mm径の試験管に設置し、腺の外部を等張sucrose液(300 mM)にて表面灌流し、静脈流出液中の Kによるcontaminationを防いだ。

39K NMRスペクトルWM360wb(Bruker, 8.45T)をもちい、39K専用プローブ(16.8 MHz)にて測定した。灌流液と唾液中のK濃度はフレイムフォトメータ(Corning 480)にて測定し、流出速度の値とあわせてKの移動量をもとめた。

<結果と考察>

図1に37°Cで得られた灌流顎下腺の39K NMRスペクトルを示す。T1を求めるために行ったInversion recovery 実験(D - 180° - VD - 90° -(acquire))の結果である。Recovery time (VD)を1-20 msec, 400 msec について測定した。39K NMR スペクトルのT1は2成分にわかれ、速い成分は ca. 2 msec

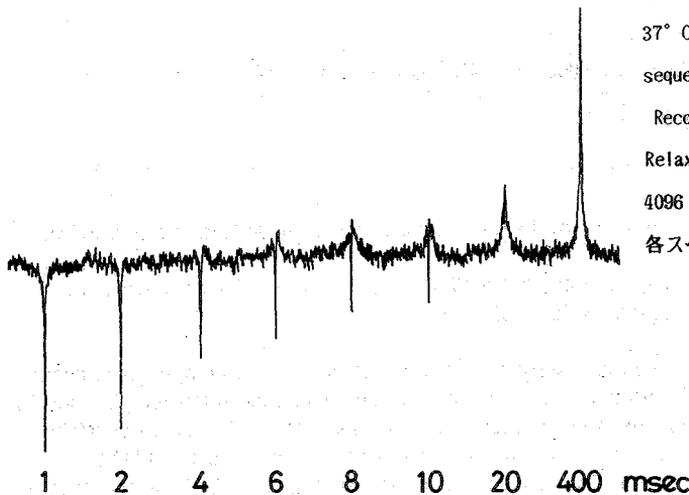


図1 灌流ラット顎下腺のT1測定結果。

37° C, Inversion recovery pulse sequence(D-180° -V0-90° -acquire).

Recovery time(V0)は図に数字でしめした。

Relaxation delay (D)は500 msec,

4096 accumulations, 5 Hz line-broadning.

各スペクトルは100ppm rangeで図示した。

secでnull point を通過し、約 3 msec のT1をもつことが推定された。一方、長いT1成分は約50 msecの値が得られ、これは灌流液のT1値(55 msec)と一致した。このことは長いT1の成分は細胞外由来のものであり、短いT1の成分は細胞内のものであることを強く示唆している。

両成分の帰属をあきらかにするために、水溶性化学シフト、Dy(TTHA)を用い、細胞外の成分をシフトさせた(図2)。single pulse sequence(D - 60° -(acquire))をもちい、24° Cで測定した。図2-aはシフト試薬を用いず測定したスペクトルをしめす。波形解析により、2つのLorentzianに分離された(2-c)。120 Hz の半値幅をもつ成分と10Hzの半値幅の成分である。10 mMのシフト試薬をもちい、細胞外成分は5 ppm 低磁場側にシフトした(図2-b)。波形解析の結果(2-d)、幅広い成分はシフトせず、共鳴面積も変化しなかった。一方、シャープな成分は 5 ppmシフトし、半値幅が増大しピーク高が減少したが、共鳴面積は変化しなかった。このことにより、幅広い成分は細胞内、シャープな成分は細胞外であることが確定した。これは細胞内KのT1緩和時間が細胞外Kのそれに比べ、非常に短いことを意味しており、Inversion recovery を用いて、細胞外Kの信号がnull point を通過する時点で得られたKスペクトルは十分に回復した細胞内のKを表す。すなわち、180° パルスの後、細胞内Kの磁化は15msecでもとにもどる。細胞外Kの磁化は40 msec後に0であり、このときsampling pulse として2番目のパルスをかけると細胞内Kのスペクトルのみを得ることができた。

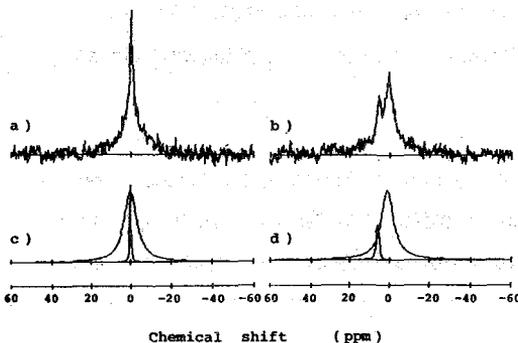


図2 灌流ラット顎下腺の39K NMRスペクトル。

24° C, single pulse sequence (D-60° -acquire).

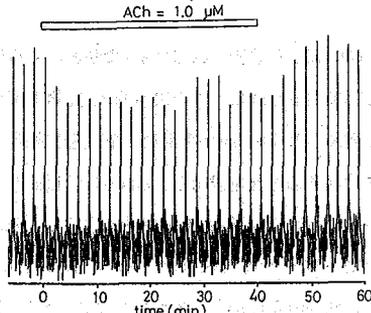
a) control spectra of the resting gland,

b) 10 mM Dy(TTHA). The sharp resonance was shifted.

c) line shape analysis of spectrum a).

d) line shape analysis of spectrum b).

図3
a



b

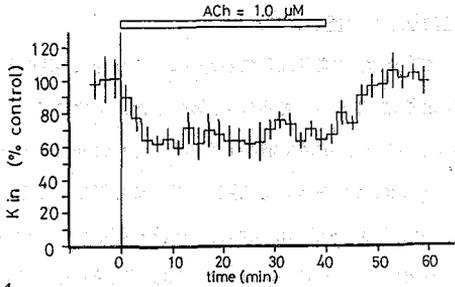
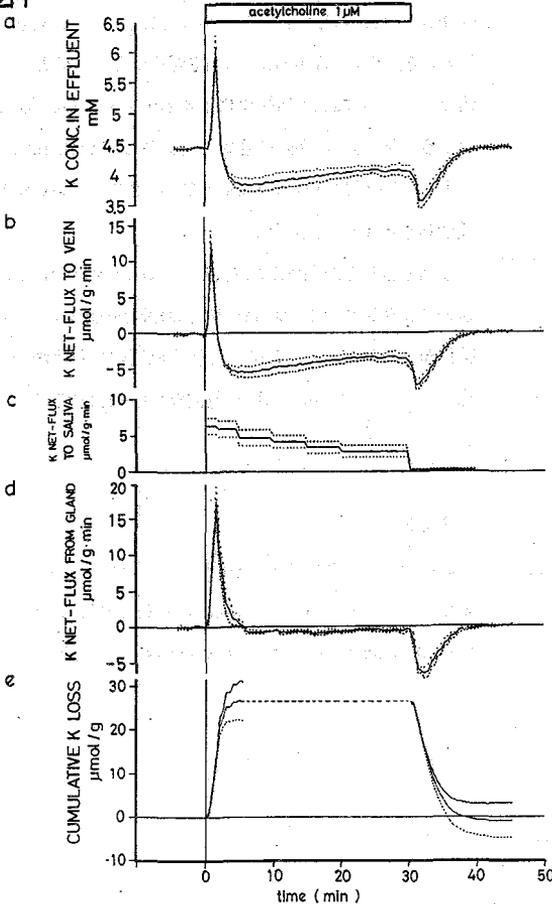


図4
a

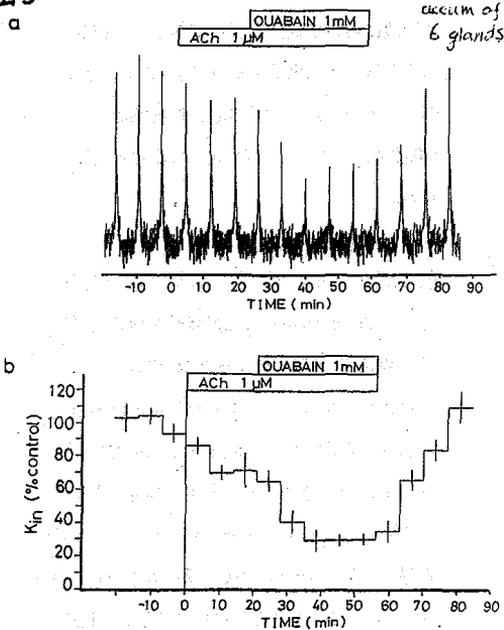


唾液腺においては分泌時に細胞から血管側および唾液中に大量のKが放出されることが知られているが、両者の放出量を測定し、NMR法で測定された細胞内K量の変化と比較した。

図3は ^{39}K NMRにより測定された細胞内K量の $1\ \mu\text{M}$ acetylcholine投与時の変化である。細胞内Kは静止時から29%減少し、プラトーレベルをたもった。図3-aは40 min acetylcholine を投与する実験を11個の腺で同じプロトコールで繰り返し測定し加算した結果である。約2分の時間分解が得られた。共鳴面積よりK content の変化量を追跡した。(図3-b) noise部分の面積を測定し、今回のNMR測定系の誤差をbarで示した。acetylcholine を洗い流すと細胞内K levelは速やかにもとにもどった。

静脈流出液のK濃度(図4-a)と流速より流出液中へのK loss(図4-b)を測定し、唾液中へのK lossも同様に測定した(図4-c)。両者をあわせて細胞よりの正味の移動量を求めた(図4-d)。正味の移動の積分により、細胞よりのK lossの累積値の計時変化が求められた(図4-e)。その結果、分泌初期に最大 $12.6 \pm 1.8\ \mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$ (SE, n=7)の血管側へK loss が起こり、持続分泌中には等量のKを取り込み、唾液に分泌し、正味の移動は0であった。刺激を止めると、最大 $7.2 \pm 0.7\ \mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$ でKを取り込んだ。累積K lossは持続分泌中プラトーをとり、分泌刺激終了とともに0にもどっていった。この変化パターンは ^{39}K NMRで測定した細胞内Kの変動と一致した。

図5

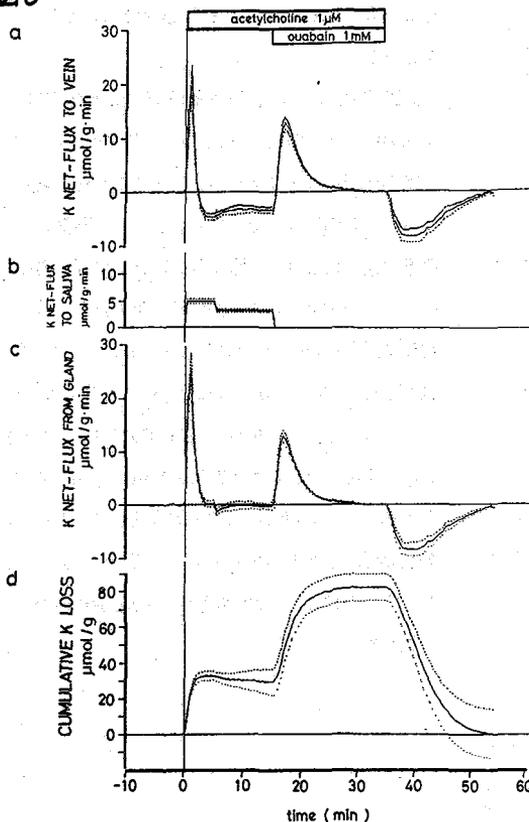


NMRにより観測されているK量がどのくらいであるかを評価するために、さらに細胞内のK量を減少させると考えられるouabainを用い、2段階に細胞内Kを変化させ、その量比を求めた。ouabainは細胞内にKを取り込むNa/K ATPaseを特異的に阻害し、細胞内Kを増加する。acetylcholine 1 μMをあらかじめ投与し、K leak outを増加させておいてから、ouabain 1 mMを添加した(図5, 6)。

39K NMRの結果を図5に示す。ouabain 1 mMの添加により細胞内のKはさらに42%減少した。すなわち、acetylcholineのみで減少したKは、acetylcholineとouabainにより減少した細胞内K量の4.2%であった。一方、1 mM ouabainは唾液の分泌を停止させ、血管側へ最大 $12.8 \pm 1.1 \mu\text{mol/g-min}$ でKの流出を起こさせた。ouabainとacetylcholineの洗い流しにより、Kの取りこみが最大 $6.5 \pm 0.7 \mu\text{mol/g-min}$ で起こった。このとりこみはNa/K ATPaseの活性化によるものであるが、図6-dのように細胞内Kは完全に回復した。ここでacetylcholineによるK lossはtotal K lossの38%であり、39K NMRの観測結果とよく一致した。

今回報告した結果は細胞内KのうちtransportableなK量の変化率について39K NMR法と直接K移動量を測定した結果がよく対応した。このことは今回報告した手法が化学シフト試薬を用いない細胞内K測定法として有効であることを示している。

図6



参考文献

- 1) Seo et al. (1987) J Magn Reson 75: 529-533
- 2) Murakami et al. (1988) Exocrine Secretion. (ed. by Wong & Young) Hong Kong Univ Press: 126-128

○鈴木英司、前田宗宏、九鬼 寛、川上 剛、塚本賢治、中山晋介、
瀬尾芳輝、村上政隆、亘 弘 (生理学研究所、分子生理)

^{31}P spin-lattice relaxation time measurements in biological systems:
rat heart, liver, kidney, erythrocytes and guinea-pig smooth muscles.

Eiji Suzuki, Munehiro Maeda, Satoru Kuki, Tsuyoshi Kawakami, Kenji Tsukamoto,
Shinsuke Nakayama, Yoshiteru Seo, Masataka Murakami and Hiroshi Watari
(Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological
Sciences, Myoudaiji-chou, Okazaki 444, Japan)

Spin-lattice relaxation time (T_1) of phosphorus compounds in the perfused
rat heart, liver, kidney, erythrocytes and guinea-pig smooth muscles
(stomach and taenia caeci) were measured by DESPOT (Driven-equilibrium single-pulse observation of T_1) method. This method is a rapid and accurate
technique for the measurement of T_1 values. T_1 values of phosphomonoester
(PME), 2,3-DPG (diphosphoglyceride), inorganic phosphate (P_i), phosphodiester
(PDE), phosphocreatine (PCr) and ATP phosphate groups were ranged from 0.15 ± 0.02 sec (β -ATP of liver) to 8.50 ± 1.57 sec (PDE of kidney). T_1 values of
 β -ATP increased in the sequence of the organs: liver < smooth muscles (stomach
and taenia caeci) < heart, erythrocytes, kidney.

灌流臓器を用いて燐化合物のスピン-格子緩和時間 (T_1) を測定するためには、測定時間を短くする必要がある。従来の反転回復 (IR) 法や、飽和回復 (SR) 法による測定では測定時間が長くなるため灌流臓器を用いた生体試料の測定には適していない。Homer (1985)、Seo (1987) の報告した DESPOT 法 (Driven-equilibrium single-pulse observation of T_1 Relaxation) を用いて、生体試料 (ラット心臓、肝臓、腎臓、赤血球、モルモット平滑筋) の燐化合物の T_1 値を測定した。従来の測定方法に比べて、測定時間を $1/10$ 程度に短縮することができ、灌流時間の短い臓器も良好な条件下で測定することができた。また、計算機実験を行い、測定の対象となる臓器または燐化合物により、最適パルス繰り返し時間を選択して、精度の高い T_1 値を得ることができた。さらに、これら灌流臓器の燐化合物の T_1 値を比較した。

Data analysis of DESPOT method.

$$\frac{M(\theta)}{\sin\theta} = \frac{\cos\theta \cdot M(\theta)}{\sin\theta} \cdot \exp(-t/T_1) + M_0 [1 - \exp(-t/T_1)]$$

θ : Flip angle, T_1 : Spin-lattice relaxation time,

t : Pulse repetition time, M_0 : Equilibrium magnetization.

T_1 values can be obtained from a slope $\exp(-t/T_1)$ of linear regression.

式1 DESPOT法による T_1 値の測定

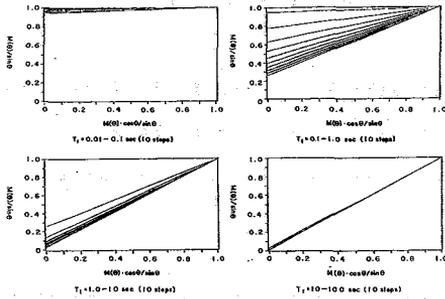


Fig. Linear regressions of $M(\theta)/\sin\theta$ vs $M(\theta) \cdot \cos\theta/\sin\theta$ for the evolution of the T_1 values using the DESPOT method. A pulse repetition time of 0.3 sec and equilibrium magnetization of 1.0 were used.

図1 パルス繰り返し時間 $\tau = 0.3$ 秒、
 $M_0 = 1$

表1 PME、2、3-DPG、Pi、
PDEの T_1 値

Table T_1 values of PME, 2,3-DPG, Pi and PDE in the perfused organs were determined by using the ^{31}P -NMR DESPOT method.

contents	T_1 values	organs
PME	1.10 ± 0.07 (5)	liver
	3.42 ± 0.36 (5)	stomach, PME-1
	4.13 ± 0.45 (5)	kidney
	4.39 ± 0.61 (5)	taenia, PME-2
	4.47 ± 0.43 (5)	taenia, PME-1
4.97 ± 0.43 (5)	stomach, PME-2	
2,3-DPG(3-P)	1.50 ± 0.02 (5)	erythrocyte
2,3-DPG(2-P)	1.76 ± 0.03 (5)	erythrocyte
Pi	0.57 ± 0.01 (5)	liver
	3.85 ± 0.68 (5)	stomach
	3.95 ± 0.44 (5)	taenia
PDE	8.50 ± 1.57 (5)	kidney

Data are the mean \pm SE (sec) of T_1 values.

(n), number of subjects.

PME-1 and PME-2 indicate PME(6.8 ppm) and PME(6.3 ppm), respectively.

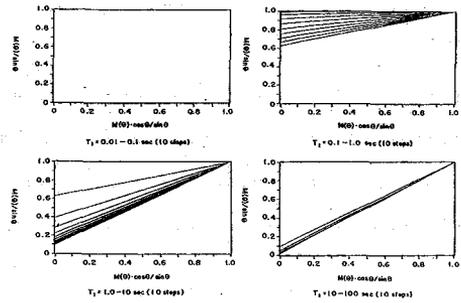


Fig. Linear regressions of $M(\theta)/\sin\theta$ vs $M(\theta) \cdot \cos\theta/\sin\theta$ for the evolution of the T_1 values using the DESPOT method. A pulse repetition time of 1.0 sec and equilibrium magnetization of 1.0 were used.

図2 パルス繰り返し時間 $\tau = 1.0$ 秒、
 $M_0 = 1$

表2 高エネルギー燐化合物 (PCr、
ATP) の T_1 値

Table T_1 values of phosphocreatine (PCr) and ATP in the perfused organs were determined by using the ^{31}P -NMR DESPOT method.

contents	T_1 values	organs
PCr	2.65 ± 0.14 (5)	stomach
	3.00 ± 0.56 (5)	heart, 300/min
	3.20 ± 0.12 (5)	taenia
	3.29 ± 0.33 (5)	heart, arrest
γ -ATP	0.19 ± 0.01 (5)	liver
	0.67 ± 0.07 (5)	stomach
	1.06 ± 0.07 (5)	erythrocyte
	1.06 ± 0.12 (5)	kidney
	1.12 ± 0.10 (5)	taenia
	1.20 ± 0.17 (5)	heart, 300/min
1.21 ± 0.05 (5)	heart, arrest	
α -ATP	0.24 ± 0.02 (5)	liver
	0.71 ± 0.06 (5)	stomach
	0.84 ± 0.04 (5)	taenia
	0.95 ± 0.06 (5)	erythrocyte
	1.08 ± 0.16 (5)	heart, 300/min
	1.10 ± 0.18 (5)	kidney
	1.13 ± 0.02 (5)	heart, arrest
β -ATP	0.15 ± 0.02 (5)	liver
	0.80 ± 0.10 (5)	stomach
	0.88 ± 0.06 (5)	taenia
	1.04 ± 0.13 (5)	heart, 300/min
	1.05 ± 0.07 (5)	erythrocyte
	1.12 ± 0.09 (5)	heart, arrest
	1.13 ± 0.09 (5)	kidney

Data are the mean \pm SE (sec) of T_1 values.

(n), number of subjects.

Arrest and 300/min indicate arrested heart with 19.2 mM potassium and paced heart at 300 beat/min, respectively.

(測定方法)

^{31}P -NMR測定は、ブルッカー-WM-360wb (8.45 T)、測定周波数145.8 MHz、測定周波数幅10 kHzを用いた。対象臓器はラットの赤血球 (37°C)、肝臓 (37°C)、心臓 (33°C)、腎臓 (31°C)、モルモットの平滑筋 (胃、盲腸紐) (32°C)を灌流し、外径10または15 mmのNMR試料管内に設置した。Flip角 (θ)は15°、30°、45°、60°、75°、90°を用いた。パルス繰り返し時間 (τ)は、従来報告されている T_1 値と計算機実験の結果より、0.3、0.6、1.0秒より選択した。従って、肝臓は $\tau = 0.3$ 秒、平滑筋と赤血球は $\tau = 0.6$ 秒、心臓と腎臓は $\tau = 1.0$ 秒を用いた。また、赤血球については、高エネルギー磷酸化合物であるATPの T_1 値を比較するために、他臓器と同一条件 (測定温度、パルス繰り返し時間)の測定も行った。積算回数はS/N比および臓器の灌流時間により決めた。測定から得られた磷化合物の信号強度 $M(\theta)$ を用いて T_1 値を求めた。

(測定結果)

DESPOT法では、フリップ角 (θ)とスピン-格子緩和時間 (T_1)との関係が式1の様に、 $Y = M(\theta) / \sin \theta$ 、 $X = \cos \theta \cdot M(\theta) / \sin \theta$ 、 A (slope) = $\exp(-\tau / T_1)$ 、 B (Y-intercept) = $M_0 [1 - \exp(-\tau / T_1)]$ とすることにより $Y = AX + B$ で表される。この関係式を用いて、 $M(\theta)$ と T_1 値 (0.01~100秒)及び θ (0~90°)の関係について計算機実験を行った。DESPOT法では、パルス繰り返し時間 (τ)を変えることにより T_1 値を精度良く測定することができるため、従来報告されている磷化合物の T_1 値を参考にして $\tau = 0.3$ 、0.6、1.0秒の場合について、コンピュータ・シミュレーションを行った。結果を、図1 ($\tau = 0.3$ 秒、 $M_0 = 1$)、図2 ($\tau = 1.0$ 秒、 $M_0 = 1$)に示した。

DESPOT法を用いることにより、 T_1 値の測定時間は45~120分と、従来のIR法やSR法に比べて約1/10の時間で行うことができ、灌流時間の短い生体試料でも短時間で良好な条件下で測定することができた。測定により得られたPME (phosphomonoesters)、2,3-DPG (diphosphoglyceride)、Pi (inorganic phosphate)、PDE (phosphodiester)、PCr (phosphocreatine)、ATPの磷化合物の T_1 値を表1、2に示した。磷化合物の T_1 値は臓器により大きく異なることがわかった。今回用いた生体試料の磷化合物は、 $T_1 = 0.15 \pm 0.02 \sim 8.50 \pm 1.57$ 秒に分布していた。計算機実験の結果より、 $\tau = 0.3$ 秒の測定 (図1)では $T_1 = 1.0$ 秒付近、 $\tau = 1.0$ 秒の測定 (図2)では $T_1 = 0.1$ 秒付近の測定精度が低くなるため、 $\tau = 0.6$ 秒の測定が生体試料を用いた磷化合物の測定に適していた。しかし、磷化合物の T_1 値の短い肝臓は、 $T_1 = 0.15 \pm 0.02 \sim 1.10 \pm 0.07$ 秒に分布するため $\tau = 0.3$ 秒の測定、 T_1 値の長い腎臓は、 $T_1 = 1.06 \pm 0.12 \sim 8.50 \pm 1.57$ 秒に分布するため $\tau = 1.0$ 秒の測定を行うことにより、より精度の高い T_1 値が得られることが確かめ

られた。また、表2の結果より、高エネルギー-リン酸化合物であるATPは、 $T_1 = 0.15 \pm 0.02 \sim 1.13 \pm 0.09$ 秒に分布するため、 $\tau = 0.3$ 秒の測定を行うことにより、良好な灌流条件下で精度良く T_1 値を測定することができる。DESPOT法は、測定の対象となる臓器またはリン酸化合物により τ を変えることで、より精度の高い T_1 値を得ることができる。

さらに、各種灌流臓器のリン酸化合物の T_1 値を、測定により得られた回帰直線と散布図で比較した。赤血球のリン酸化合物の T_1 値は、単一成分より成り、他の生体試料の比較物質として用いることができた。各種灌流臓器の高エネルギー-リン酸化合物であるATPの T_1 値は、同一条件下で測定した赤血球との比較により、赤血球(T_1 値=約1秒)よりも早い成分と遅い成分に分けられることがわかった。

(参考文献)

1. J. Homer, and M. S. Beevers, J. Magn. Reson. 63, 287 (1985)
2. Y. Seo, M. Murakami, E. Suzuki, M. Maeda, and H. Watari, Magn. Reson. Med., 6, 430 (1988)

(北大医.循環器内科¹、北大応電研.生体物理²、北大工³)福田 洋之¹、安田 寿一¹、田村 守²、下川 繁三³

THE OXYGEN DEPENDENCE OF THE ENERGY STATE OF CARDIAC TISSUE.

P-31NMR AND OPTICAL MEASUREMENT OF MYOGLOBIN IN PERFUSED RAT HEART.

Hiroyuki FUKUDA, Hisakazu YASUDA, Mamoru TAMURA*, and Shigezo SHIMOKAWA**
 (Cardiovascular Div., School of Medicine, Biophysics Div., Research Institute
 of Applied Electricity*, and NMR Laboratory, Faculty of Engineering**, Hokkaido
 University

The relationship between the energy state and intracellular oxygen concentration was established with cardiac tissue, where the former could be monitored by P-31 NMR and the latter by optical method for myoglobin absorption. The ratio of creatine phosphate to inorganic phosphate, PCr/Pi, started to fall at 40 μ M of intracellular oxygen, in contrast to oxygen consumption (10 μ M). The pH decrease measured by chemical shift of Pi paralleled the increase of lactate release, of which half maximum was 3 μ M. The critical oxygen concentrations differed nearly 5-fold in each other when determined with energy state or oxygen consumption.

心筋は、その正常な機能を維持するために冠動脈からの酸素の供給を不可欠とする。心筋の収縮に必要なエネルギーは、心筋細胞内ミトコンドリアにおける酸化的磷酸化によって産生されるアデノシン三磷酸(ATP)であることはよく知られている。Hypoxiaでは、この酸化的磷酸化が障害され、ATP産生能の低下などの種々の代謝異常が生ずる。

現在まで、心筋エネルギー代謝と酸素濃度に関しては多くの研究がなされているが、その関係については、まだまだ不明な点は少なくない。今回われわれは非侵襲的方法であるP-31NMRと光学的測定を同時に行なうことにより、心筋エネルギー代謝と細胞内酸素濃度の関係について、新しい知見を得たので報告する。

〔方法〕

<灌流方法>

Wistar Albino rat(250~300g)をベントバルビタール(10mg/100g)で麻酔後、ヘパリンを静注し、心臓を摘出し、Langendorff法にて灌流した。灌流液は10mM グルコースを含む Krebs-Henseleit bicarbonate液を用い、灌流圧80cm水柱、灌流温30Cとした。95%O₂+5%CO₂あるいは95%N₂+5%CO₂の混合ガスで平衡させた系を二つ作成し、両者を混合させることにより、灌流液の酸素濃度を変化させた。

<P-31NMR>

装置はBruker製4.7Teslaを用いた。Sample tubeは外側に25mm管、内側に20mm管の二重管とし、外側に重水(D₂O)を入れ、磁場のロックを行なった。観測周波数は81.075 MHz、パルス幅50μsec、Acquisition time,1secとし、一つのスペクトルは300回積算で求めた。Proton-decouplingは用いなかった。クレアチンリン酸(PCr)と無機リン(Pi)の比、PCr/Piを求め心筋組織のエネルギー状態とし、Piのchemical shiftより細胞内pHを求めた。

<光学的測定>

心筋細胞内酸素濃度を求めるために、光学的測定により、ミオグロビン(Mb)の酸素化-脱酸素化を観察した。フィルターを透過した500nm以上の可視光を5mのlight fiberを通し、ラット心臓の左室前壁に照射し、その反射光のうち620nmと580nmの差スペクトルをもとめ、ミオグロビンの酸素化-脱酸素化を観察した。

実験全体図を図1に示す。

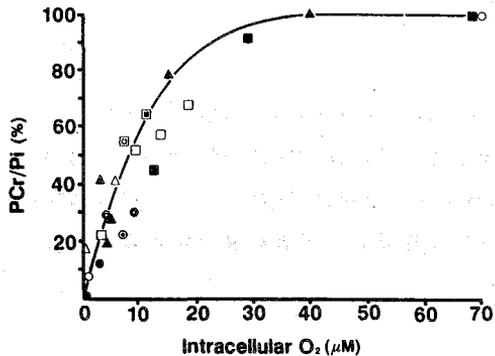


図 3

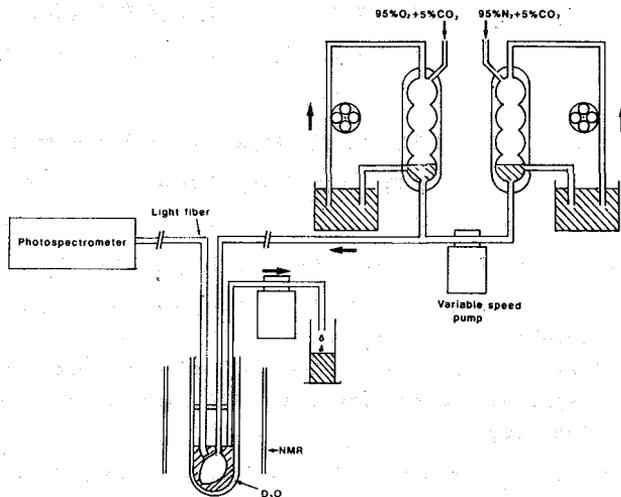


図 1

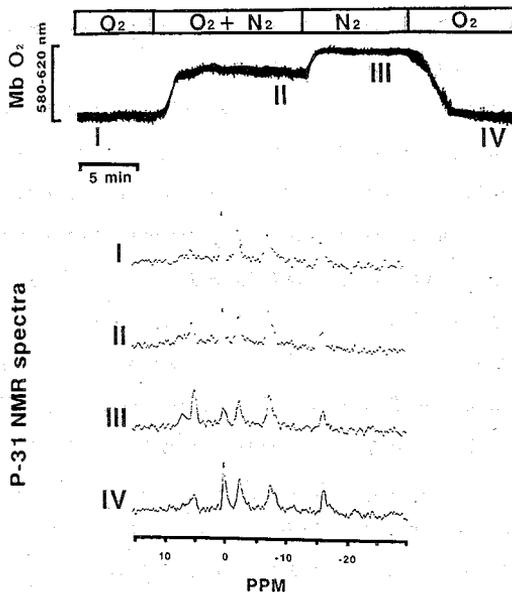


図 2

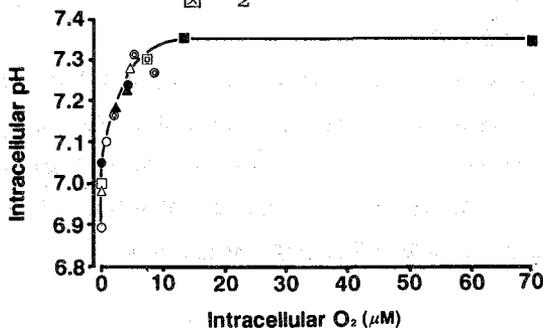


図 4

【結果】

図2は同時に記録された、P-31NMRスペクトルとミオグロビンの酸素化-脱酸素化曲線である。好气的状態であるIでは、P-31NMRにおいて、PCr/Pi比は十分に大きい、低酸素状態であるIIおよび無酸素状態であるIIIでは、Mbの脱酸素化とともに、Piの増加PCrの減少が観察された。IVで再び好气的状態にすると、Mbの酸素化状態もIのレベルまでもどり、P-31スペクトルもほぼIの状態にまで回復した。

同様の実験を他のラットから得た灌流心でも行ない、心筋細胞内酸素濃度とPCr/Pi、pHの関係をまとめたのが図3、図4である。

PCr/Piは、細胞内酸素濃度が40 μM付近より徐々に低下しはじめ、20 μM以下では急激に低下した。一方、細胞内pHは10 μMまではほぼ一定であったが、それ以下で急激にアシドーシスへ傾き、無酸素状態では6.8~6.9の値を示した。

【考察】

心筋エネルギー代謝が細胞内酸素濃度に深く依存していることはよく知られており、現在まで数多くの研究がなされている。今回われわれがP-31NMRを用い、心筋ミトコンドリアのエネルギー状態の一つの指標であるPCr/Piから観察されたcritical oxygen concentrationは40 μMと考えられるが、この値は以前に発表されたpyridine nucleotide、O₂ consumption、lactate releaseなどから求められた10 μMという値と4倍の差がある。図5は今回の結果と以前の研究を比較したものである。この図から明らかのように、細胞内酸素濃度が低下

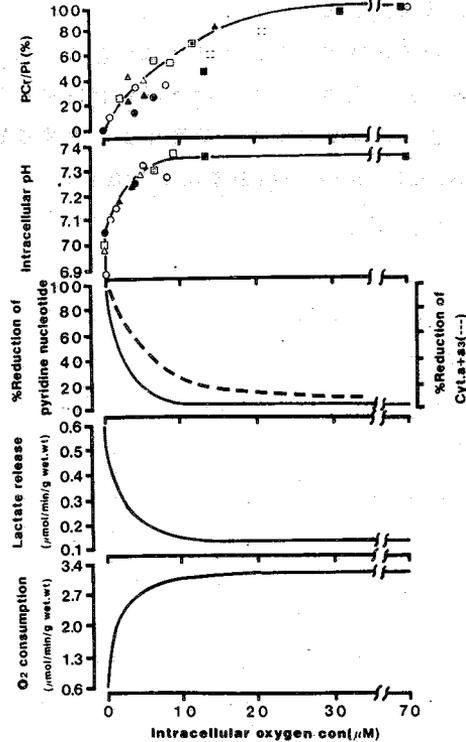


図 5

すると、PCr/Pi比が最も早期に低下し始めるが、cytochrome a₃の還元状態もほぼ同様の变化を示す。また、pyridine nucleotideの還元状態、酸素消費速度は、約10 μMまでは一定であるが、それ以下で急速に変化している。

呼吸速度は
$$-\frac{dO_2}{dt} = k_i (\text{Cyt. a}_3^*) (O_2)$$

と書ける。また、酸化的磷酸化と呼吸鎖の酸化還元レベルは平衡に近いと考えられるので

$$K_{eq} = \frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]} \left[\frac{[\text{Cyt. a}_3^*]}{[\text{Cyt. a}_3]} \right]^2 \left[\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP} \cdot \text{Pi}]} \right]^2$$

とすると、呼吸速度は

$$-\frac{dO_2}{dt} = k_i \cdot K_{eq}(\text{Cyt. a}_3^{++}) \left(\frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}]} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP} \cdot \text{P}_i]} \right)^{-\frac{3}{2}} \cdot (O_2)$$

となる。この式と今回の結果を比較すると、酸素濃度が低下すると、 $[\text{ATP}/\text{ADP} \cdot \text{P}_i]^{-3/2}$ が増加し、同時に「 Cyt. a_3^{++} 」が低下することにより呼吸速度が一定に保たれていると考えられる。しかし、酸素濃度が $10 \mu\text{M}$ 以下になると、これらの平衡状態による制御では追いつかなくなり、呼吸速度が低下し、解糖系の亢進、乳酸放出が生じるものと思われる。細胞内pHの低下と、乳酸産生量の増加は、平衡であるので、アシドーシスの原因は乳酸産生によるものと考えられた。

今回の研究で、無酸素状態にいたる過程で、ミトコンドリアの呼吸鎖において、呼吸速度を一定に保つような平衡状態が存在する可能性が示唆された。

今後、心機能に対する酸素濃度依存性を調べ、主要な制御因子が呼吸速度か、あるいはphosphate potentialかを決定したい。

¹H-NMR 緩和時間測定による正常及び変性椎間板内水分子の易動性と
同組織の粘弾性特性の関係

(京都府立医科大学 整形外科 第一生理*) ○日下義章、茶谷賢一
大友啓資、三船哲郎、山下文治、榊田喜三郎、西川弘恭*

MOBILITY OF WATER IN NORMAL AND DEGENERATED INTERVERTEBRAL DISC ANALYZED BY
¹H-NMR RELAXATION TIMES AND VISCOELASTICITY

Yoshiaki KUSAKA, Kenichi CHATANI, Satoshi OHTOMO, Tetsuro MIFUNE,
Fumiharu YAMASHITA, Kisaburo SAKAKIDA and Hiroyasu NISHIKAWA* (Department of
Orthopaedic Surgery and Physiology*, Kyoto Prefectural University of Medicine)

Mobility of water in normal and degenerated intervertebral disc (ID) were analyzed by means of ¹H-NMR relaxation times. The relationship between ¹H-NMR relaxation times and viscoelasticity in the nucleus pulposus was examined. Water in the nucleus pulposus of normal ID showed larger value of ¹H-NMR relaxation times than those in any other part of ID. However, those values in the degenerated ID were small and were almost the same in any part of ID. ¹H-NMR relaxation times and water content in nucleus pulposus had correlation with its viscoelasticity. These facts suggest that measurements of ¹H-NMR relaxation times and water content in ID may make it possible to estimate its degeneration and function as a shock absorbing system.

正常椎間板は細胞成分に乏しい無血管組織であり、その固形成分は湿重量の約20-30%を占める collagen と約5%を占める glycosaminoglycan (GAG) より成る。脂質の含有率はきわめて少ない。正常椎間板は Fig 1 に示すような構造を持ち、大きく髄核と線維輪にわけられる。collagen は弾性を有する強靱な線維であり線維輪に多く存在し、そこで輪状の層板構造を形成して椎体間を結合し椎間板における骨格としての役割を持つ。GAG は髄核部に多く存在し、繊細な線維構造中に多量の固定された陰性荷電を有するムコ多糖類である。この陰性荷電により正常椎間板は組織外液に比して高濃度のナトリウムをはじめとする陽イオンを保持し、高い浸透圧を持つため重量比で60-80%と多量の水分子を保持する¹⁾。保持された水分子は椎間板内において collagen, GAG の形成する網目構造間でこれらとの相互作用に依存した運動性を持つ。このため椎間板は適度な粘弾性を有し身体に加わる外力に対して衝撃吸収装置として働く。変性椎間板では GAG が減少するため水分含有率の低下、水分子の運動性の変化が生じ、これに伴う粘弾性の変化は椎間板機能の低下をもたらすと考えられる。以上のごとく、椎間板において水分子はその機能に直接関与する重要な役割を担っていると考えられている。

本研究では $^1\text{H-NMR}$ により椎間板変性の定量的診断を可能とするために正常、および変性椎間板を成牛尾椎、ヒトより得、その部位別の $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間、水分含有率に検討を加えた。さらに、椎間板髄核における GAG 含有量の変化がそこに含まれる水分子の T_1 、 T_2 と粘弾性の関係に与える影響について検討した。

試料および方法

正常椎間板試料として屠殺直後の成牛尾椎椎間板を用いた。ヒト椎間板試料として剖検時(死亡時年齢 36-79才)に得られたヒト椎間板(第4、5腰椎間)を用いた。ヒト椎間板には変性を認めその変性度を Levin の分類²⁾に従い肉眼的所見より分類した。ウシ椎間板の部位別水分含有率、 T_1 、 T_2 その他の測定に関しては髄核、線維輪内層、外層に分けて試料とした。同様にヒト椎間板に関しては Fig 1 に示すごとく髄核、前方および後方線維輪、側方線維輪外層および内層の 5ヶ所より試料を摘出した。粘弾性測定にはウシ椎間板髄核を用い、ヒアルロニダーゼ処理群(HA-ase処理群)と非処理群(HA-ase非処理群)の2群を作成した。HA-ase処理群の髄核は羊睾丸ヒアルロニダーゼ(Sigma Chemical Co.)を 1.5mg/ml 含む緩衝液中にて 37°C、2時間処理し、GAG を分解除去した。各群の髄核に加水、または脱水操作を加えることにより約 65-95% の種々の水分含有率を有する2群の髄核試料系を作製した。

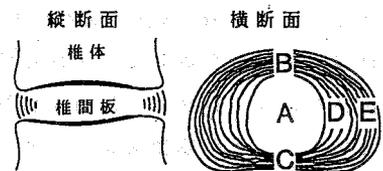
椎間板試料(300-1000mg)の $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間を日本電子製 JNM-FSE 60B型スピネコー NMR 装置(^1H : 60Mz)にて測定した。 T_1 緩和時間測定は inversion recovery 法によった。 $180^\circ - 90^\circ$ pulse 間隔は $100 \times N$ msec($N=1-20$)、pulse 系列の繰り返し時間は 25 sec とした。 T_2 緩和時間測定は Carr-Purcell-Meiboom-Gill 法によった。 180° pulse を 4msec 間隔にて 100回照射し、pulse 系列の繰り返し時間は 25sec とした。測定はすべて 25°C の一定室温にて行なった。

試料の乾燥重量および湿重量より水分含有率を測定した。乾燥重量測定後のウシ椎間板試料を湿性灰化した後蒸留水にて溶解し、炎光光度計にて Na^+ 含有量を測定した。一部のウシ椎間板試料について Urban らの tracer cation method³⁾により試料中の GAG 密度を示す Fixed Charge Density (PCD) を測定した。

岩本製作所製粘弾性 SPECTROMETER (VS-S型)にて粘弾性を測定した。10mm 径のジグ間に試料を固定し 10Hz、100g の負荷を加えて動的複素粘弾性の指標となる動的複素弾性率 ($|E^*|$) を測定した。HA-ase 処理群、非処理群のウシ椎間板髄核について水分含有率と T_1 、 T_2 および $|E^*|$ の関係を求め、これから T_1 、 T_2 と $|E^*|$ の関係を明らかにした。

結果と考察

Fig. 1 椎間板の断面図



- A: 髄核
- B: 前方線維輪
- C: 後方線維輪
- D: 側方線維輪内層
- E: 側方線維輪外層

1) ウシ正常椎間板の部位別測定: ウシ椎間板髄核、線維輪内層、外層の各部位における FCD と Na^+ 含有率、 Na^+ 含有率と水分含有率の関係をそれぞれ Fig 2-A, B に示す。FCD, Na^+ , 水分含有量はすべて髄核、線維輪内層、外層の順に多く、FCD と Na^+ 含有量、水分含有量それぞれの間には正の相関が存在した。すなわち、正常椎間板では中央部に向かうに従い GAG 含有量は多く、これがもたらす高い陰性荷電密度により Na^+ が、さらにこれに従い水が椎間板中央部に多く保持されることが明らかになった。Fig 3-A, B にウシ椎間板の水分含有率と T_1 または T_2 の関係をそれぞれ部位別に示す。 T_1, T_2 は髄核、線維輪内層、外層の順に高い値をとり水分含有率と高い相関を有していた。以上より正常椎間板では部位による組成の差が明らかであり、これがそこに含まれる水分子の量および運動性に反映される事が示された。

Fig. 2 ウシ椎間板における (a) Na^+ 濃度と FCD, (b) 水分含有率と Na^+ 濃度の関係

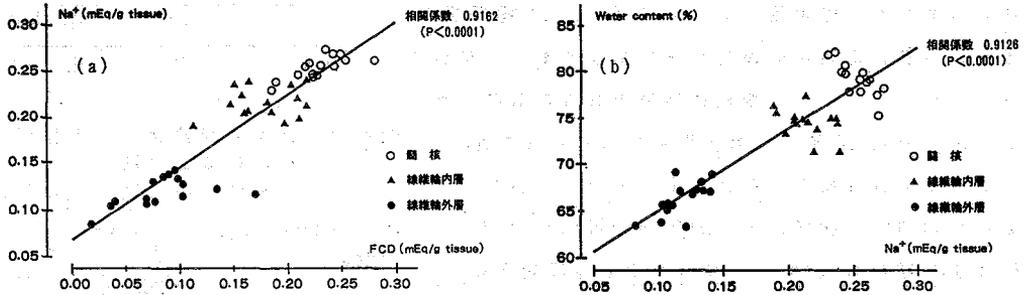
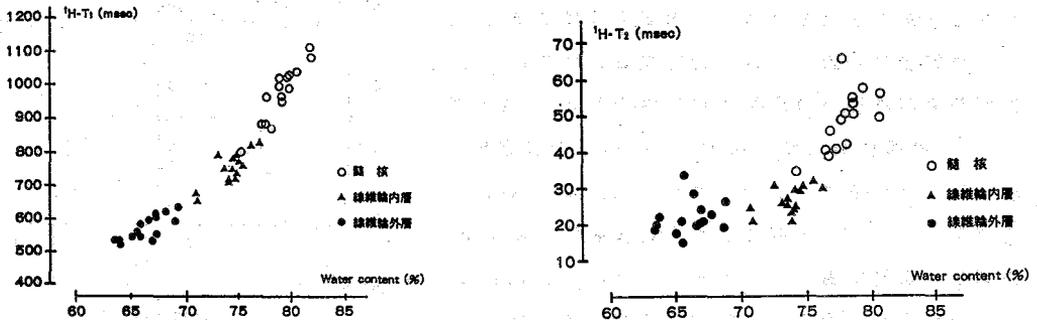


Fig. 3 ウシ椎間板における T_1, T_2 と水分含有率の関係



2) ウシ椎間板髄核の動的複素弾性率と T_1, T_2 の関係について: HA-ase 処理群の FCD は非処理群の約 45%に低下していた。このように FCD の減少した髄核は変性椎間板のモデルと考えることが出来る。HA-ase 処理群と非処理群のウシ椎間板髄核における動的複素弾性率 $|E^*|$ と T_1 および T_2 の関係を Fig 4 に示す。HA-ase 非処理群の T_1, T_2 と $|E^*|$ の間には測定した範囲内では一次の負の相関関係が存在した。髄核の粘弾性変形の際水分子は collagen, GAG が形成する網目状構造の間を移動する。このとき水分子がこれら高分子化合物との間に持つ相互作用が $|E^*|$ に関与するために T_1, T_2 と $|E^*|$

の間にこのような相関が見られたと考えられる。これに対して HA-ase 処理群では両者の関係は非線形であり、 T_1 , T_2 が低い値を取る場合 $|E^*|$ はきわめて高い値を取った。これはヒアルロニダーゼ処理により GAG の減少した髄核では水分子の移動よりはむしろ残存するコラーゲン線維自身が持つ弾性がその力学的特性に影響を与えたためであると考えられる。

3) ヒト変性椎間板の部位別測定: 試料としたヒト椎間板の変性度は Levin の分類により 1 度 (軽度) 2 例、2 度 (中等度) 5 例、3 度 (高度) が 2 例であった。これらの椎間板における T_1 , T_2 と水分含有率との関係を代表例につきその変性度別に Fig 5 に示す。Levin 分類 1 度の椎間板髄核の水分含有率、 T_1 , T_2 はすべて高く、線維輪のそれらは低く、ウシ椎間板の場合と同様に椎間板の部位の違いによりそれらは広く分布した。しかし、変性に伴いそれらの分布は狭くなり、Levin 分類 3 度の椎間板ではこれらを示すプロットはほぼ 1ヶ所に集中していた。従来の組織学的、生化学的研究結果から椎間板の変性により髄核の GAG 含有量は減少し線維輪との間における GAG の量的差異は減少し、これにともない水分含有量およびその部位別差異も減少することが知られている。本研究結果ではこれらの報告に一致し、水分含有量およびその部位別差異が椎間板の変性に伴い減少した。さらに T_1 , T_2 の部位別差異の減少より水分子の存在環境も均一化することが示された。以上より水分含有率、 T_1 , T_2 の関係より椎間板変性度の定量的判定が可能であることが示された。Levin 分類 3 度の高度に変性した椎間板髄核では GAG 含有量は少なく Fig 4 における HA-ase 処理群の髄核に近い状態にあると考えられる。このような椎間板では $|E^*|$ は高い値を取りその衝撃吸収装置としての機能低下が示唆される。

文献 1) Urban, J., et al., Clin. Rheum. Dis., 6, 51, 1980.
 2) Levin, T., Acta. Orthop. Scand. (Suppl), 73, 1, 1964.
 3) Urban, J., et al., Biochim. Biophys. Acta., 586, 166, 1979.

Fig. 4 HA-ase 処理群、非処理群の椎間板髄核における $|E^*|$ と T_1 , T_2 の関係

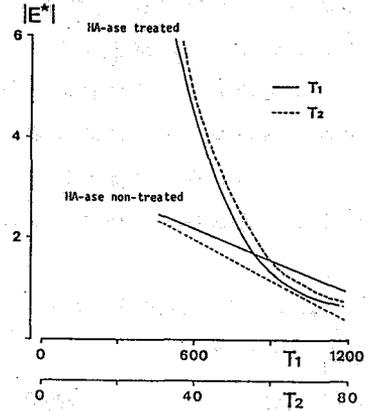
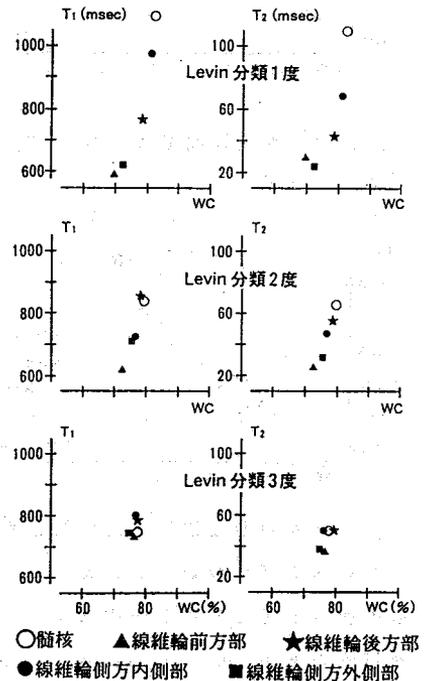


Fig. 5 種々の変性度のヒト椎間板における部位別水分含有率と T_1 , T_2 の関係



(岐阜大・脳外科) 岩間 亨、山田 弘、(同・生理) 恵良 聖一、
桑田 一夫、曾我美 勝、(生理研・分子生理) 亘 弘

¹H-NMR STUDIES ON WATER STRUCTURE IN RAT BRAIN BY CROSS-RELAXATION MEASUREMENTS
Toru IWAMA, Hiromu YAMADA (Dep. of Neurosurg., Gifu Univ. School of Med.),
Seichi ERA, Kazuo KUWATA, Masaru SOGAMI (Dep. of Physiology, Gifu Univ. School
of Med.), Hiroshi WATARI (Dep. of Molecular Physiology, National Institute for
Physiol. Sciences)

Spin-lattice relaxation time (T_1), spin-spin relaxation time (T_2) and cross-relaxation time (T_{1s}) between irradiated protein protons and water protons of bovine plasma albumin in the solution state were far longer than those in the gel state. T_{1s} values of rat brain tissues in edema and ischemia were significantly shorter than those of normal rat brain and far shorter than those of brain tumor, indicating a large amount of hydration of macromolecules in edematous and/or ischemic rat brain tissues. Also, T_{1s} values of aged rat brain were shorter than those of young one. T_{1s} measurements might be useful to study changes in water structure in various cerebral disorders.

1、蛋白質ゾル・ゲル変換における水構造変化

〔試料の作製〕市販ウシ血漿アルブミン(BPA)は微量のプロテアーゼを含み、pH 3.8で、BPAがF型と呼ばれる構造にあるとき、1~2箇所のペプチド鎖が切られ、BPA*と呼ばれる構造になる。重水(D₂O)中で、このBPA*を7%以上の濃度とすることにより透明なゲル状態にすることができる。一方、精製したウシ・メルカプトアルブミン(BMA)は1分子当たり1個のSH基を持ち、しかも上述のプロテアーゼを殆ど含まず重水中でゲル化しないため、BMA-D₂O溶液をゾル状態(溶液状態)の基準とした。

〔NMR測定〕試料を5mmφNMR試料管にいれ、360MHz FT-NMRを用い、BPA*ゲル及びBMA溶液中のH₂Oの T_1 をinversion recovery法、 T_2 をCarr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)法にて測定した。 T_{1s} はAkasaka(1981,1983)に従い、蛋白質の芳香族側鎖にあたる7.13 p.p.m.を γ H₂/2 π ~ 69Hzで f_2 照射しながらinversion recovery法で見かけの縦緩和時間(T_1^*)を測定し、この T_1^* と T_1 とから T_{1s} を求めた。

〔結果〕H₂Oの T_1 、 T_2 は共にゲル状態で溶液状態に比し、それぞれ約1/3、約1/2に短縮した(Fig.1, 2)。一方、蛋白質分子から水分子への分子間交差緩和時間(T_{1s})は約1/5に短縮し(Fig.3)、水構造の差を最も鋭敏に反映した。

2、生体系への応用

〔動物モデルの作製〕Bendaらにより確立され、当教室にて継代培養している脳腫瘍株 Tumor (T9)を16% FCS 添加 RPMI-1640 中に 10^6 個/0.01 mlとなるように調製し、6週齢の Fisher 344 雄ラットの頭蓋正中より右方2mm、冠状縫合より後方2mmに穿った骨窓からハミルトンシリンジを用いて、半定位的に右基底核内に移植して担脳腫瘍ラットを作製した。このモデルの平均生存日数は 12.7 ± 3.0 日で、移植後10~12日目にNMR測定を行った。コントロールとしては8週齢の Fisher 344雄ラットを用いた。

脳虚血モデルとしては Stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) の両側総頸動脈結紮 (bilateral carotid artery occlusion: BCAO) モデルを用いた。NMR測定の前1~2日前に10~23週齢の雌雄ラットの両側総頸動脈をエーテル麻酔下に露出しナイロン糸をかけ、NMR測定当日エーテル浅麻酔下にBCAOを行った。BCAOの時間は30分、60分、120分、180分とし、コントロールにはsham operationを施した同週齢のラットを用いた。一部のコントロールラットでは、麻酔の影響を検討するためBCAO施行と同等のエーテル浅麻酔後30分に断頭し、NMR測定を行った。

〔NMR測定〕ラットを無麻酔下に断頭後、速やかに脳組織(約皮質90%、白質10%)を取り出し、内径1.1mmのNMR用ガラス毛细管に入れ両端をペーストで封をした後、スパーサーを用いて D_2O を入れた5.0mm ϕ NMR用試料管に挿入し、25°Cにて360 MHz FT-NMRを用いて行った。蛋白質溶液・ゲルと同様に、 T_1 はinversion recovery法、 T_{1s} はAkasaka (1981、1983) に従い、蛋白質の芳香族側鎖にあたる7.13 p.p.m.を $\gamma H_2/2\pi \sim 69Hz$ で f_2 照射しながらinversion recovery法を用いて見かけの緩和時間 T_1^* を測定し、この T_1^* と T_1 とから T_{1s} を求めた($T_1^{*-1} = T_1^{-1} + T_{1s}^{-1}$)。また、測定した試料は湿重量を求めた後、110°Cにて24時間乾燥し乾燥重量を測定した。差の検定にはunpaired Student's t testを用いた。

〔結果〕(1)担脳腫瘍ラットモデル(Fig. 4)：正常脳組織、T9周辺の浮腫脳組織の水分子プロトンの T_1 は共に1成分で、それぞれの平均値は $1.81 \pm 0.17sec$ ($n=14$)、 $1.87 \pm 0.056sec$ ($n=18$)と差を認めなかった。一方、蛋白質分子から水分子へのスピン拡散速度の指標となる T_{1s} は、それぞれ $1.69 \pm 0.31sec$ ($n=11$)、 $1.32 \pm 0.29sec$ ($n=16$)と、正常脳組織に比し浮腫脳組織において統計学的に有意な短縮を認めた($P < 0.01$)。乾燥重量法によって求めた含水量はそれぞれ $79.2 \pm 1.3\%$ 、 $79.7 \pm 0.7\%$ と浮腫脳組織において増加傾向を示したが有意の差は認められなかった。また、T9の T_1 も1成分で、その平均値は $2.02 \pm 0.051sec$ と正常脳組織に比し有意に延長し、 T_{1s} 値も $1.98 \pm 0.26sec$ と延長を認めた。

(2)SHRSP、BCAOモデル：コントロール群を週齢によりA群(10~13週)、B群(18週)、C群(22~23週)の3群に分けた。各群の T_1 はいずれも1成分で、その平均値はA群 $1.86 \pm 0.037sec$ 、B群 $1.86 \pm 0.071sec$ 、C群 $1.78 \pm 0.041sec$ と週齢が進むにつれ短縮し、A群とC群との差は統計学的に有意であった($P < 0.05$)。一方、各群の T_{1s} 値はA群 $1.69 \pm 0.20sec$ 、B群 $1.35 \pm 0.13sec$ 、C群 $1.39 \pm 0.13sec$ と、やはり週齢が進むにつれ短縮したが、その程度は T_1 より大きく、A群とC群との差を検定すると、 $P < 0.001$ で有意であった。また、

T_1 値はA群とB群とで差を認めなかったが、 T_{1s} 値はB群より短縮していた。含水量の平均値はA群 $79.1 \pm 0.4\%$ 、B群 $80.1 \pm 1.1\%$ 、C群 $78.9 \pm 0.6\%$ で、週齢が進むに従い低下したが、群間に有意差は認められなかった(Fig.5)。以上の結果より、BCAO後の各時点における T_1 、 T_{1s} 、含水量の測定値を、週齢の対応するコントロール群の平均値を100とした相対値に換算し、経時の変化を検討した。BCAO後、30分、60分、120分、180分の T_1 の相対値は、それぞれ 103.7 ± 5.5 、 99.0 ± 7.8 、 103.0 ± 4.2 、 106.5 と明らかな差は認められなかった。一方、 T_{1s} の相対値は、それぞれ 85.0 ± 10.3 、 97.9 ± 6.8 、 101.2 ± 11.4 、 111.6 とBCAO後30分でのみ短縮し、以後はコントロール値に戻る傾向を示した。エーテル浅麻酔のみを施したコントロールラットでも、 T_1 、 T_{1s} 共に他のコントロールラットと差を認めなかった。含水量はBCAO後、180分まで明らかな変化は認められなかった(Fig.6)。

3、考察

脳腫瘍周囲の浮腫脳組織、虚血後早期の脳組織において、含水量の変化が僅かであるにもかかわらず、スピン拡散の指標となる蛋白質分子から水分子への交差緩和時間(T_{1s})が短縮したことは、これらの組織における水構造の変化、おそらくは蛋白質分子近傍に存在する水分子(結合水)量の増加を示すと考えられる。一方、脳腫瘍においては含水量の増加と共に T_1 、 T_{1s} が延長し、正常脳組織に比し構造化された水が少なく、ゾル状態に近いと想像される。

これらのことは種々の病態、例えば脳浮腫形成における膠質浸透圧上昇の成因としての蛋白質分子の構造変化などを考える上で、 T_{1s} の測定が有用な情報を与えてくれることを示しており、さらには画像診断の領域でも T_1 、 T_2 モードの画像と同様に、あるいはそれら以上に T_{1s} モードの画像が有用であろうと期待される。

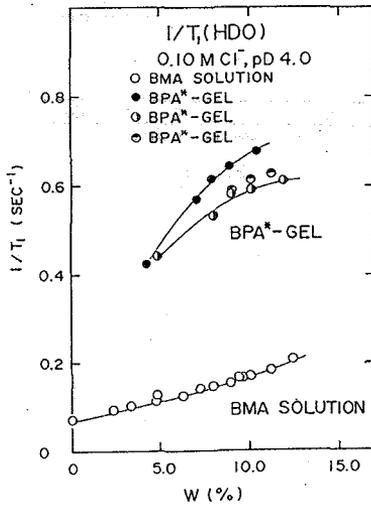


Fig.1

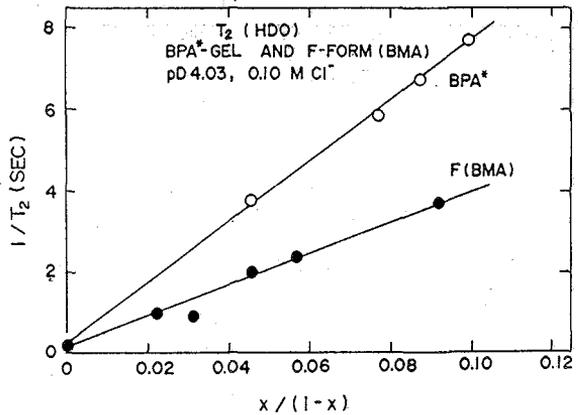


Fig.2

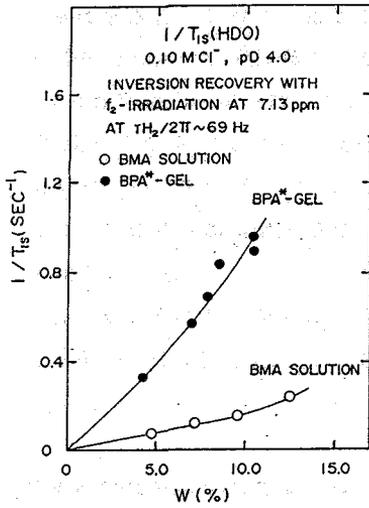


Fig. 3

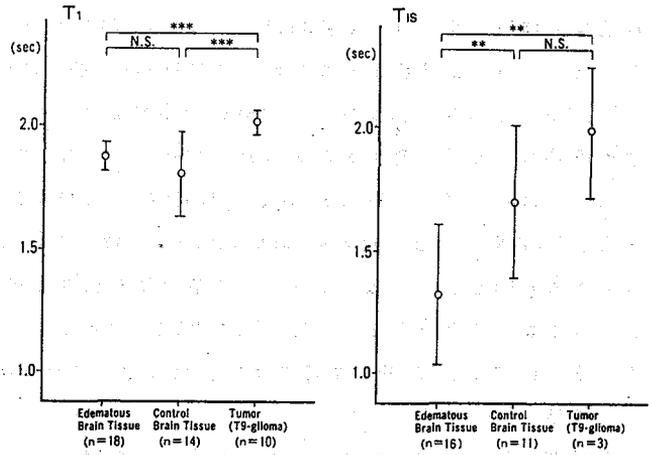


Fig. 4

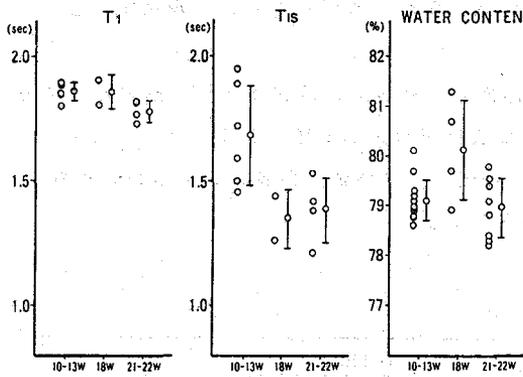


Fig. 5

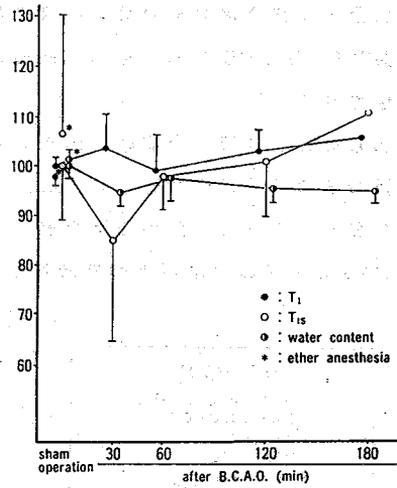


Fig. 6

索引

氏名	ページ
A	
明石 知子	5
赤坂 一之	87, 255, 259
阿久津秀雄	83, 153
安藤 勲	133, 137
安藤 慎治	133
荒田 洋治	5, 33
朝倉 哲郎	149, 275
芦田 淳	119
B	
Bazhenov, D. V.	225
C	
茶谷 賢一	299
因 正信	9
千原 秀昭	235
中條 利一郎	53
D	
出村 誠	275
E	
海老沢 計慶	33
江口 太郎	267
遠藤 斗志也	21
恵良 聖一	87, 303
恵良田 智樹	217
F	
藤井 浩	41, 45
藤井 直之	263

氏名	ページ
藤井 茂	37
藤原 英明	177
藤原 敏道	227
福嶋 喜章	129
福島 千晶	71
福田 洋之	295
福原 健一	13
舟木 淳	221
舟崎 紀昭	57
降旗 一夫	247
古屋 真美	5
伏谷 建造	49
G	
郷 信広	25
Grishin, Yu. K.	225
H	
花房 尚史	193, 197
半沢 宏之	33
春山 英幸	17
橋本 正雄	271
畑田 耕一	263
服部 忠鑑	271
早水 紀久子	91, 95
林 繁信	95
檜垣 強	1
引地 邦男	251
平野 幸喜	149
平野 昌彦	29
平沖 敏文	103
平山 和雄	5

廣明 秀一	79	清住 嘉道	95
堀 佳也子	91	小林 祐次	13, 25
堀井 文敬	129, 141, 173	児玉 佳子	243
細谷 仁子	63	高分子学会 NMR 研究會員	173
I		久保 厚	123
市川 和彦	205	九鬼 覚	291
池田 龍一	99	黒子 弘道	137
池原 森男	79	日下 義章	299
今井 清博	49	桑原 大介	115
今成 司	243, 255, 263	桑田 一夫	87, 303
今城 文雄	115	肥沼 三雄	165
稲垣 冬彦	29	京極 好正	25, 153
井上 義夫	53	M	
石森 浩一郎	49	前田 宗宏	291
石村 美雪	201	真野 倅一	267
岩間 亨	303	Markley, J. L.	63
和泉 光則	205	松本 潮	71
J		松本 圭右	133
Jarvie, T. P.	161	松本 浩一	165
K		松尾 研吾	103
甲斐 荘正恒	63, 67	McDowell, C. A.	99, 123
亀井 裕孟	231	三船 哲郎	299
Kaptein, Robert	21	美濃部 正夫	25
片山 義明	231	三森 文行	279
加藤 一夫	87	三宅 洋子	63
川口 謙	29	宮本 信一	287
河合 剛太	75	宮野 博	5
川上 剛	291	宮崎 源太郎	49
河野 静江	243	宮澤 辰雄	75
木原 大	21	毛利 紀子	21
北川 進	209, 213	森野 能昌	1
北丸 竜三	141, 173	森島 續	41, 45, 49
北崎 信幸	115	宗像 恵	209, 213
		村上 正隆	287, 291

N			
Nagai, K.			149
長森 敏明			83
長岡 俊治			87
永嶋 伸也			5
長島 不二夫			1
永山 国昭		227, 239	
内藤 晶	111, 255, 259		
中川 将		141, 173	
中井 利仁		115, 119	
中島 康喜		185	
中村 春木		13	
中村 亘男		235, 267	
中村 義男		221	
中尾 正之		189	
中谷 博		255	
中山 晋介		291	
根矢 三郎		57	
仁木 國雄		157	
西川 弘恭	275, 283, 299		
西河 淳		137	
西村 重徳		25	
西村 透		263	
西村 善文		5, 33	
西内 祐二		25	
布目 華一		145	
O			
小田 康司		79	
小田原 孝行		153	
小川 広蔵		217	
小川 芳弘		141	
小椋 賢治		251	
大野 素徳		21	
大橋 裕二		91	
大竹 修子		29	
大友 啓資		299	
大内 宗城		243	
岡田 忠司		169	
岡崎 正治		145	
大木 寛		235	
大久保 忠恭		25	
小山内 実		275	
尾崎 拓男		133	
P			
Pines, A.			161
S			
斉藤 肇		107, 217	
神原 俊平		25	
神田 喜三郎		299	
笹淵 仁		271	
佐々木 喜男		177	
佐藤 晴哉		63	
沢田 正実		177	
Scott, A. I.		1	
瀬尾 芳輝		287, 291	
世良 朋子		169	
瀬戸 治男		243, 247	
柴田 武彦		71	
Shih, D.		49	
島田 健		25	
嶋田 一夫		29	
清水 章三		259	
下川 繁三		221, 295	
神藤 平三郎		71	
新官 正久		9	
城 宜嗣		41	
荘司 顕		133	
杉浦 真喜子		189	
曾我美 勝		87, 303	

Sorensen, Ole W. 261
 Steward, Martin C. 287
 Stockman, B. J. 63
 Stolowich, N. J. 1
 澄川 弘美 5
 鈴木 榮一郎 5
 鈴木 英司 287, 291
 鈴木 邦夫 95
 Suter, D. 161
 T
 田島 一郎 129
 萱 永忠 177
 高橋 憲助 181, 185
 高橋 征三 239
 高橋 栄夫 33
 高井 嘉雄 177
 高倉 裕 181
 高見澤 敏一郎 141
 高尾 樽雄 189
 高山 陽子 165
 竹腰 清乃理 127
 Tame, J. 49
 田村 充 111
 田村 義隆 209
 田村 守 295
 田中 保子 271
 田中 修司 21
 田中 俊之 33
 棚瀬 純男 1
 谷口 直之 37
 鄭 斗煥 177
 寺尾 武彦 115, 119
 寺沢 功 29
 照井 彬弘 165
 戸井田 良晴 169

徳光 英之 83
 鳥山 和美 145
 辻 尚志 5
 辻 秀人 141
 塚本 賢治 291
 堤 耀廣 103
 U
 内田 健一 67
 植田 昌伸 213
 上平 恒 197, 201
 上杉 晴一 79
 占部 美子 141
 Ustynyuk, Yu. A. 225
 臼井 有光 129
 右手 浩一 263
 W
 亘 弘 87, 287, 291, 303
 Westler, M. W. 63
 Williams, H. J. 11
 Wu Xiaoling 127
 Wu Xuewen 127
 Wuthrich, K. 17
 Y
 矢田 信久 33
 山田 隆巳 189
 山田 弘 303
 山口 和也 45
 山本 泰彦 53
 山本 豊 129
 山本 勇一 197
 山下 文治 299
 柳沢 勝 91
 山延 健 137

安田	寿一	295
横井	もと子	107, 217
横山	茂之	75
横山	幸弘	181
吉川	渉	13
吉野	明広	185
吉崎	和男	283
好田	真由美	13
Z		
Zhang	Shanmin	128

— M E M O —

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.