

第28回NMR討論会

プログラム

日時：1989年11月20日(月)～22日(水)

会場：全共連ビル

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

11月20日(月)

一般講演 15分 質問5分
総合講演(＃) 25分 質問5分
ポスター紹介 3分

9:00~10:20

座長 安藤 勲

- L 1. ^{13}C 固体高分解能 NMR による絹フィブロインの多形と側鎖分子のダイナミクス
(国立がんセンター研、農工大工) ○斎藤 肇・横井もと子・石田 みか
朝倉 哲郎 …… 1
- L 2. ^{15}N NMR によるポリペプチド・タンパク質の固体構造解析
(群馬大工短、日本電子、東工大工) ○荘司 顯・尾崎 拓男・藤戸 輝昭
出口 健三・安藤 勲 …… 5
- L 3. 固体重水素 NMR による poly (γ -benzyl L-glutamate) の運動
(北大工) ○平沖 敏文・松尾 研吾・下川 繁三・堤 耀広 …… 9
- L 4. 固体重水素 NMR による Thymidine ダイナミクス
(アップジョン、Bose Institute, NIH) ○檜山 行雄・Siddhartha Roy,
Dennis A. Torchia …… 13

— 休 憩 —

10:30~12:00

座長 斎藤 肇

- L 5. ^{31}P の1次元及び2次元マジックアングルスピンニング NMR — 磁気双極子相互作用の影響 —
(都立大理、ブリティッシュ・コロンビア大) ○久保 厚・C. A. McDowell …… 17
- L 6. 無機リン酸塩の固体高分解能 ^{31}P NMR におけるスペクトルスピン拡散
(化技研) ○林 繁信・早水紀久子 …… 21
- L 7. NaI・ポリエチレングリコール固体電解質の局所構造
(阪大理) ○上田 貴洋・大木 寛・中村 亘男
千原 秀昭 …… 25
- L 8#. 四極子核の固体高分解能 NMR 法の開発
(京大理) ○寺尾 武彦 …… 29

— 昼 食 —

13:30~15:00

座長 赤坂 一之

- L 9. Time-dependent NOE を用いたヘムタンパク質の動的構造解析
(東工大工、高知大理) ○山本 泰彦・井上 義夫・中條利一郎
鈴木 知彦 ……33
- L 10. ^{15}N -、 ^1H -NMR によるテトラゾール化ミオグロビンの構造の研究
(京大工) ○足立 伸一・森島 績 ……37
- L 11#. チトクロム c_3 における個々のヘムの性質
(横浜国大工、阪大蛋白研) ○阿久津秀雄・朴 璋洙・范 可君
古市 弘・京極 好正・仁木 克己 ……41
- L 12. ^{13}C -NMR によるアドレノドキシン還元酵素活性部位構造の研究 — ^{13}C -標識 FAD を用いて
(関西医大化、阪大医) ○藤井 茂・野中 泰樹・岡本 光弘
三浦 洸 ……45

— 休 憩 —

15:20~16:40

座長 荒田 洋治

- L 13. ^{15}N -HMQC 法による DNA 結合タンパク質の構造と相互作用の研究
(阪大蛋白研、蛋工研) ○白川 昌宏・松尾 浩・芹川 康治
京極 好正・吉川 渉 ……49
- L 14. DNA 結合タンパク質 HU および DNA-HU 複合体の NMR スペクトル
(東薬大、京都薬科大) ○神藤平三郎・柳田 顕郎・胡桃坂仁志
松本 潮・加納 康正・今本 文男 ……53
- L 15. 安定同位体をラベルしたタンパク質の異核種 3 次元 NMR
(日本電子、蛋工研、協和発酵) ○山崎 俊夫・永山 国昭・中村 春木
金谷 茂則・好田真由美 ……57

L16. GDP 結合型および GTP 結合型 ras タンパク質の高次構造

(東大理、横浜国大工、国立がんセンター研) ○伊藤 隆・山崎 和彦・河合 剛太
藤田 純子・武藤 裕・西村 暹
宮澤 辰雄・横山 茂之 ……61

— 休 憩 —

16:40~18:10

座 長 京 極 好 正

L17. エラプトキシン b の¹H および¹³C NMR シグナルの帰属と運動性

(都臨床研、東京家政学院大) ○稲垣 冬彦・須田亜紀子・嶋田 一夫
神田 大輔・田宮 信雄 ……65

L18. 酵母で発現するヒトリゾチームの¹⁵N ラベルと NMR への応用

(蛋工研) ○大久保忠恭・谷山 佳央・菊池 正和 ……69

L19. HIGH RESOLUTION ¹³C AND ¹⁵N NMR OF THE MEMBRANE PROTEIN
BACTERIORHODOPSIN SOLUBILIZED IN DETERGENT

(CEN-Saclay) ○ Michel Seigneuret, Jean-Michel Neumann, Daniel Lévy,

Jean-Louis Rigaud ……73

L20#. 安定同位体標識 NMR 法による免疫グロブリンの高次構造解析: 研究法とその成果

(東北大理、東大薬、日本ブルッカー、都立大理) 田中 俊之・矢田 信久・加藤 晃一
五十嵐貴子・海老沢計慶・高橋 栄夫
半沢 宏之・金 夏亨・中山 智紀
松永 千枝・尾高 麻乃・水谷 隆太
大和 澄江・○荒田 洋治
M. Waelchli・甲斐荘正恒 ……75

11月21日(火)

9:00~10:20

座長 稲垣冬彦

L21. ^{13}C 選択的 1D-HOHAHA

(北大理) ○小椋 賢治・竹腰清乃理・引地 邦男……79

L22#. Selective 2D-NMR の新手法について

(東大応微研) ○降旗 一夫・瀬戸 治男……83

L23#. RECENT AND COMING SOFTWARE ADVANCES FOR PROCESSING MULTI-DIMENSIONAL NMR SPECTRA. CHALLENGES AND POTENTIAL SOLUTIONS

(Syracuse University, New Methods Research, Inc.) ○George C. Levy,

Sophia Wang, Philip Borer, Mark Roggenbuck, Roy Hoffman,

Frank Delaglio, Hans Grahm……87

一休 憩一

10:30~12:00

座長 寺尾武彦

L24. 零磁場—高磁場相関二次元 NMR/NQR

(筑波人物工、Univ. of California)

○松井 茂・B. Q. Sun, A. Pines……89

L25. 状態相関二次元 NMR 分光法

(京大理、京大農、日本電子) ○内藤 晶・中谷 博・今成 司

赤坂 一之 ……93

L26. 高温 (1450°C) NMR 装置の試作とそのけい酸塩融体への応用

(北大工、北大理) ○前川 英己・下川 繁三・山田 英二

前川 尚・中村 義男・横川 敏雄……97

L27#. HIGH-FIELD SOLIDS PROBE DESIGN CONSIDERATIONS

(Doty Scientific, Inc.)

○F. David Doty, Shin-Il Cho,

Michael N. Clingan, J. B. Spitzmesser……101

- P 11. 選択励起法を利用した 1 次元 NMR による化学シフト異方性の分離測定
(京大理) ○芦田 淳・中井 利仁・寺尾 武彦……137
- P 12. NMR と拘束条件付き分子動力学による核酸の構造研究
(阪大蛋白研、阪大薬) 片平 正人・菅田 宏・○京極 好正・藤井 敏……141
- P 13. タンパク質表面構造解析法としての光 CIDNP
(東大薬、横浜市大総合理、帝人) ○西村 善文・加藤 晃一・荒田 洋治
松田 裕生・中村 聡 ……145
- P 14. ^{13}C -NMR による免疫グロブリンの高次構造と機能の解析
(東大薬、日本ブルッカー) ○加藤 晃一・五十嵐貴子・松永 千枝
金 夏亨・高橋 栄夫・尾高 麻乃
水谷 隆太・大和 澄江・Markus Waelchli
嶋田 一夫・荒田 洋治 ……149
- P 15. 遊離型 Ribonuclease F1 の立体構造解析
(蛋工研、東大理) ○吉川 渉・中井 孝尚・中村 春木・吉田 浩……151
- P 16. 安定同位体を用いた IL- 1β の NMR 解析
(都臨床研、大塚製薬) ○稲垣 冬彦・楯 真一・加瀬 良一・金子みどり
神田 大輔・榊井 美弘・菊本 芳和・平井 嘉勝……155
- P 17. タンパク質の立体構造と ^1H NMR 化学シフトの理論的計算
(農工大工、都臨床研) ○朝倉 哲郎・中村英二・浅川 晴美・稲垣 冬彦……157
- P 18. 部位特異的アミノ酸置換による SSI の立体構造変化
(都立大理、東大工) ○葦沢 輝美・佐藤 晴哉・甲斐荘正恒
小島 修一・三浦謹一郎 ……161
- P 19. ^{13}C -多重ラベルアミノ酸を用いる高分子タンパク質の NMR 解析手法
(都立大理、都臨床研) 細谷 仁子・加賀 一有・○三宅 洋子
甲斐荘正恒・稲垣 冬彦 ……163
- P 20. ^{13}C -ビシナル結合定数を用いるタンパク質の χ -angle の決定
(都立大理) ○吉田 美香・甲斐荘正恒……165
- P 21. 位相のそろった水消去法
(北大理) ○竹腰清乃理・津田 栄・引地 邦男……167
- P 22. 最適化した周波数・位相変調広帯域反転パルス
(日本電子) ○藤原 敏道・永山 国昭……169

- P23. 異種核三次元 NMR の考察 — 天然存在比下での同種核相関 NMR —
(日本電子) ○大内 宗城・河野 静江・今成 司……171
- P24. 特異値分解を伴う自己回帰モデル適合による NMR スペクトル推定
(慶応大理工) ○内山 孝憲・南谷 晴之・坂田 亮……175
- P25. 円管内乱流構造のイメージング
(筑波大物工) ○巨瀬 勝美・井上 多門……177

17:00~18:00

座 長 甲斐 莊 正 恒

特別講演

**MULTINUCLEAR MAGNETIC RESONANCE APPROACHES TO STUDYING PROTEIN
STRUCTURE AND FUNCTION.**

(University of Wisconsin-Madison) ○ J. L. Markley……181

11月22日(水)

9:00~10:20

座長 瀬戸治男

L28. ペプチド性抗生物質 Ro09-0198 と lysoPE との特異的複合体形成

(東大理、東大薬) 若松 馨・東島 勉・○宮澤 辰雄

丁 世栄・小林 哲幸・井上 圭三 ……183

L29. ROESY および T_1 による包接現象の研究: TXA₂ 受容体拮抗剤スロトロバン-シクロデキストリンについて

(塩野義研) ○高山 陽子・照井 彬弘・岩田 辰夫

斎藤 隆・山川 真透・大谷 光昭 ……187

L30. Ternatin D₂ の溶液中の三次元構造

(三共、明治学院大) ○依田 恵子・春山 英幸・桑野 晴光

斎藤 規夫 ……191

L31. 液晶 NMR 法及び ab initio 計算による 9H-Xanthen-9-one 及び類似の三環性化合物の構造研究

(阪大薬) ○村埜 賢司・高木 達也・藤原 英明 ……195

— 休 憩 —

10:30~12:00

座長 早水紀久子

L32. NMR および X 線結晶解析を用いたカルボン酸型合成イオノホアの構造解析

(東工大工、東工大理、神奈川大理) ○春日 紀子・中浜 精一・大橋 裕二

山口 和夫 ……199

L33. ²⁵Mg NMR によるイオンの水和と溶媒和

(北見工大) ○三浦 宏一・松田 弘喜・福井 洋之 ……203

L34. 金属原子間に直接結合をもつニオブ多核錯体の⁹³Nb NMR の化学シフト

(東大理) ○鎌田 敏宏・永澤 明・伊藤 翼 ……207

L35[#]. 固体及び溶液の高分解能⁵¹V NMR. バナジウム (I 及び V 価) 錯体の構造と化学シフト

(近畿大理工) ○北川 進・宗像 恵・植田 昌伸 ……211

— 昼 食 —

13:30~15:30 (ポスターセッション—II—)

座 長 高 橋 憲 助

引 地 邦 男

P26. プレニルフェノール類の ^{13}C NMR スペクトル

(東邦大薬) ○深井 俊夫・野村 太郎……215

P27. 2次元 NMR とシフト試薬による多脂環系化合物の異性体解析

(三菱油化) ○村田 美恵・森 輝雄・酒井 稔夫……219

P28. Galactosylceramide の糖 anomeric proton における virtual long-range coupling の性質

(帝京大医) ○石塚 稲夫・○田中 (飯田) 直子・永井 謙一……223

P29. 固定化酵素調製用新規架橋剤グルタルアルデヒドオリゴマーの NMR による構造に関する研究

(京大薬、丸石製薬中研) ○黒田 義弘・田嶋 敏男・今井 雅裕

八木 茂政・中川 照眞 ……225

P30. PA-48009 (Duramycin) の NMR 解析

(塩野義研) ○林 文晶・長島 一男・板崎 弘・照井 彬弘……229

P31. ホモ多糖類カードランの化学修飾：NMR 解析でみる残基種の多様化

(味の素中研、東大生技研) ○鈴木榮一郎・宮野 博・澄川 弘美

中川 隆祐・永嶋 伸也・瓜生 敏之……231

P32. 溶液中の立体化学における ^1H Selective, Biselective T_1 の利用 VI—環状ペプチドのコンフォメーション平衡について—

(神女薬大、大薬大、名市大薬) ○杉浦眞喜子・高尾 梢雄・石田 寿昌

大石 宏文・井上 正敏・加藤 伸治

浜田 康正・塩入 孝之 ……235

P33. テストステロン及びメチルテストステロンの 600-MHz ^1H NMR 及び固体高分解能 ^{13}C NMR スペクトル

(化技研、日本電子) ○早水紀久子・石井 哲子・柳沢 勝

鴨 修・今成 司 ……239

P34. インデニルスズ誘導体の ^1H 、 ^{13}C および ^{119}Sn -DNMR スペクトル

(芝浦工大工化) ○三重野 聡・近森 正博・永田 親清……243

- P 35. 固体金属カルボニルクラスター $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$ における ^{13}C および ^{59}Co NMR
 (阪大教養、阪大理、リバプール大) ○江口 太郎、武田 定・中村 亘男
 千原 秀昭・B. T. Heaton, S. Kernaghan……245
- P 36. 芳香族環炭素で観測される重水素同位体シフトの電子密度依存性
 (名工大) ○中島 康喜・中根 英樹・坂 貞徳・高橋 憲助……249
- P 37. 飽和移動法を用いた $\text{Pt}_4(\text{CH}_3\text{COO})_8$ の配位酢酸イオンの位置選択的交換反応の速度論
 (東北大理) ○山口 正・永澤 明・佐々木陽一・伊藤 翼……253
- P 38. 四級炭素の緩和時間に関する研究 — アミノ酸の解離状態と緩和機構について
 (阪大薬) ○伊藤 勝彦・筧 永忠・藤原 英明……257
- P 39. 溶媒 — 溶質の分子間 NOE — 常磁性緩和剤による誘起効果 —
 (日女大家政、日本電子) ○高橋 征三・永山 国昭……261
- P 40. NMR の緩和時間に対するゼロ磁場分裂の影響
 (北見工大) ○福井 洋之・三浦 宏一・松田 弘喜……263
- P 41. ^1H NMR からみた磷脂質の水和
 (北大低温研) ○花房 尚史……267
- P 42. 交差緩和時間 ($T_{1\rho}$) 測定による蛋白質ゲル、合成高分子ゲル内水構造の研究
 (岐阜大医、生理研、京大理) 桑田 一夫・恵良 聖一・曾我美 勝・岩間 亨
 山田 弘・加藤 一夫・藤井 裕子・天野 肇
 河合 憲司・北沢 克明・亘 弘・赤坂 一之……269
- P 43. ランタニド試薬を用いたイオンの人工生体膜透過速度の測定
 (京大理) ○内藤 晶・井本聡一郎……273
- P 44. 病原真菌 *C. albicans* 変異株におけるグルコース代謝の ^{13}C NMR
 (九大歯) ○河野 敬一・下川 修・中山 宏明……277
- P 45. 5-fluorouracil を用いた肝機能評価について — in vivo ^{19}F -MRS を使用して —
 (徳島大医、大塚製薬) ○原田 雅史・西谷 弘・古賀けい子
 三浦 巖 ……281

15:30~17:20

座長 亀井裕孟

L36. ラット水晶体の加齢と¹H-NMR

(明治鍼灸大、京都府立医科大眼科) ○西川 弘恭・森 和彦・貝塚由利子
照林 宏文・赤木 好男・糸井 素一
森山 祥彦 ……285

L37. カエル骨格筋におけるクレアチン・キナーゼ反応のフラックスと酸素消費の³¹P-NMRによる研究

(京都府立医大生理) ○吉崎 和男・横井 則彦・森本 武利……289

L38#. NMR STUDIES OF CARDIAC METABOLISM AND FUNCTION IN VIVO

(University of Minnesota) ○Kamil Ugurbil……293

L39. Rotating frame 法による¹H NMR スペクトルの局在化測定

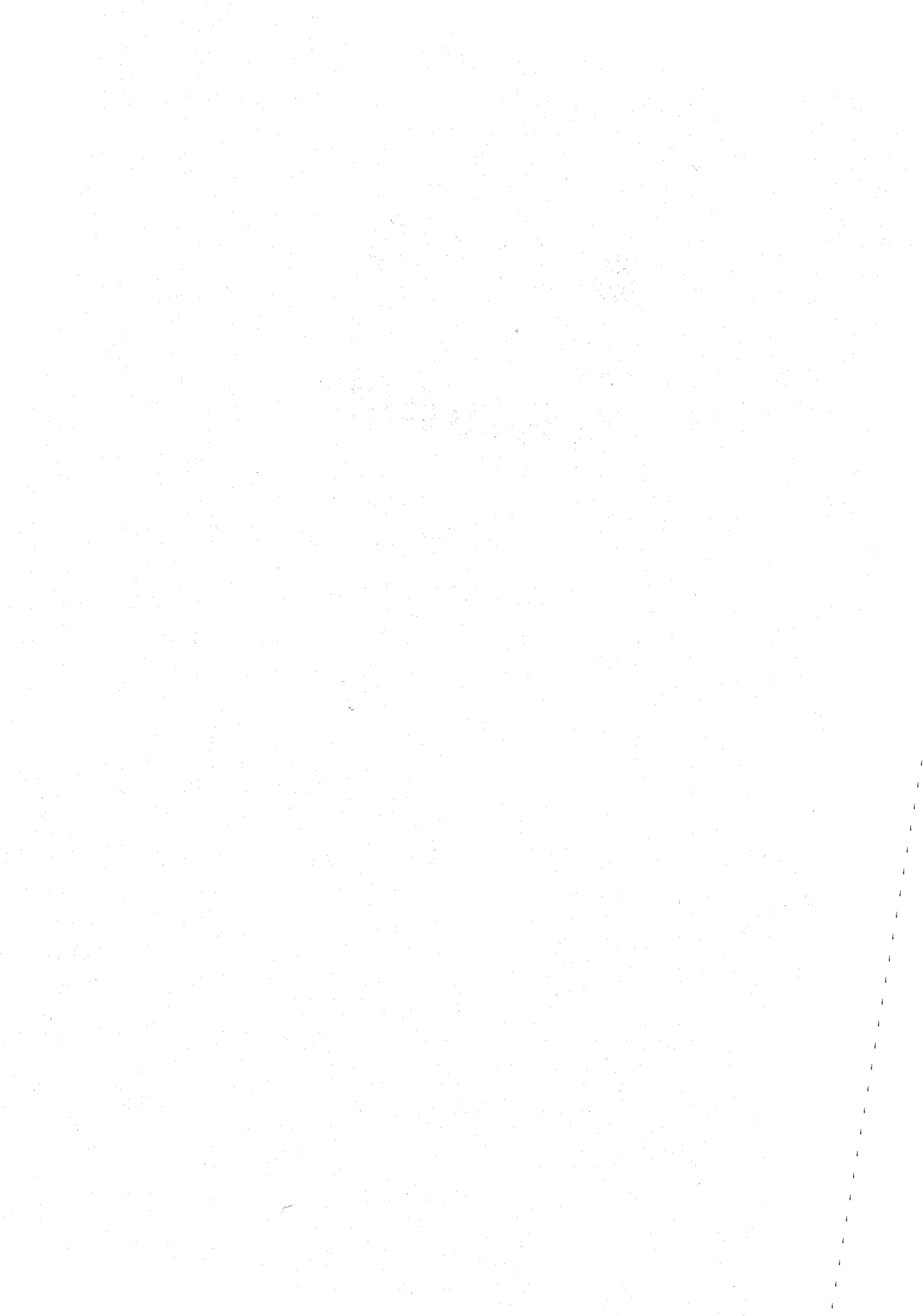
(国立公害研、MRC) ○三森 文行・Nicholas M. Bolas……294

L40. 二量子フィルターを用いた細胞内Kの測定

(生理研、日本電子) ○瀬尾 芳輝・村上 政隆・亘 弘・永山 国昭……298

第 1 日

11月20日(月)



L1 — L20

Polymorphs and Dynamic Features of Side-Chains in Silk Fibroins Studied by High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR

Hazime Saito, Motoko Yokoi, Mika Ishida and Tetsuo Asakura
Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute and Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology

We have recorded high-resolution ^{13}C NMR spectra of silk fibroins and model polypeptides in the solid state to gain insight into dynamic features of side-chain groups of Tyr and Ser residues. It turned out that the phenolic ring of Tyr residues undergoes flip-flop motion with rate constant $>10^{2}\text{s}^{-1}$. The aromatic side-chains of $(\text{Tyr})_n$ and $(\text{Phe})_n$, however, undergo rotational diffusion with correlation time $\sim 10^{-8}\text{s}$, as manifested by ^{13}C $T_{1\rho}$ values. The $T_{1\rho}$ of ser C β was discussed in terms of two different relaxation process; shorter and longer components.

1. はじめに

我々はこれまでの一連の研究から、ポリペプチド、蛋白質の固体における ^{13}C 化学シフトは、その二次構造を反映して最大 8 ppm におよぶ有意な変化を示すことを明らかにした。この二次構造を反映するシフト-コンホメーション依存 ^{13}C シフトは、問題とする残基がふくまれる部位の二次構造を検討する際の良い指標となることは明らかである^{1,2)}。実際、家蚕 (*B. mori*) における silk I, II, エリ蚕 (*P. C. ricini*) における α , β 構造の識別に用いることが出来ることを示した。この場合、できるだけ多数のピークが分離し、その帰属が明確になることが好ましい。今回、より良好な silk I 結晶が得られたこと、以前に比べてより良好な分解能条件でフィブロインの多形試料およびモデルペプチドの ^{13}C NMR を測定すると同時に、Tyr, Ser, Ala などのアミノ酸側鎖の動的構造を主として線形、 ^{13}C スピン-格子緩和時間の測定をもとに検討した³⁾。

2. 実験方法

B. mori フィブロインの結晶 (Cp) 部はキモトリプシン処理を行ない、沈澱部を集めた。高結晶 silk I 試料は、9 M LiBr 水溶液に溶解後 CH_3COOH をふくむ蒸留水で透析を行なった。 ^{13}C NMR 測定はブルカー-CXP-300 スペクトロメーターを用い、試料はジルコニアローターに充填した。 ^{13}C 化学シフトはグリシン COOH ピーク (173.06 ppm) をもとに TMS 基準で表した。

3. 実験結果と考察

さいとう はじめ, よこい もとこ, いしだ みか, あさくら てつお

A. 絹フィブロインの多形構造

図1, 2にそれぞれ家蚕, エリ蚕の¹³C NMRスペクトルを示す。前報告したスペクトルに比べて^{4, 5)}, スペクトルの分解能が改善されているが, 特にsilk IのC=Oピークが三種類のピークに分裂しているのが特筆に値する。エリ蚕のα-ヘリックス構造のピークも前回にくらべて2本に分裂している。アミノ酸残基の存在量, コンホメーションの割合を考慮し, 図1, 2に示す帰属を行なった。

図1にTyr残基に由来するピークが出現していないが, これは本来4.8%の含量がCp部のために2%に減少していることによる。実際, 全体のフィブロインとCp部のスペクトルパターンを比較すると(図3), 芳香族側鎖ピークおよびTyr CaがオーバーラップするSer Caピークに差異がみられる。

B. 側鎖のダイナミクス

固体中においても, Tyr側鎖は必ずしも一定のχ角度に固定されているとは限らない。もし, 固定化の状態にあれば, 図4 B, D-Fに示すようにCεまたはCγ, δがそれぞれ~5.4ppm, 0.9-4.3ppmの二本に分裂する。この分裂は, フェノール化合物あるいはそのメトキシ体一般にみられる現象で, O-Xに対してSyn, antiにある炭素の電子状態の不等価性に由来する⁶⁾。一方, (Tyr)_n, Ac-Tyr-OEtの場合はそれぞれ一本線であり, 側鎖の内部回転が少なくともその非等価シフトを平均化する時間尺度として>10²s⁻¹のフリップフロップ運動が存在することを示唆する。フィブロインのsilk II構造についても, 図3 Aにみられるように, Tyr側鎖のピークの分裂が観測されず, 上に述べた時間尺度でのフリップフロップ運動を仮定するのが合理的である。

一方, より速い時間尺度の運動は, ¹³C T₁測定によって検討することが可能である。図5に示すように, silk I構造をとる家蚕フィブロインの¹³Cピーク強度Mcp(t)とdelay tを半対数方眼紙にプロットすることにより, ¹³C T₁を得ることができる。

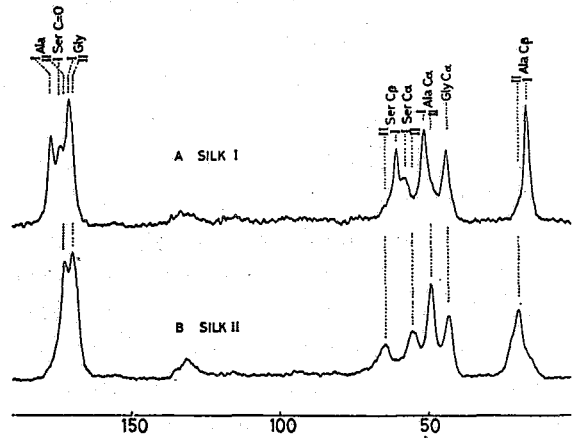


図1 *B. mori*フィブロインの¹³C NMRスペクトル
P. g. ricini fibroin

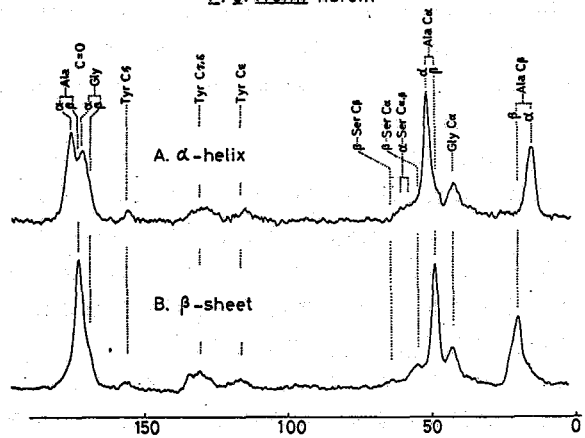


図2 *P. g. ricini*フィブロインの¹³C NMR
スペクトル

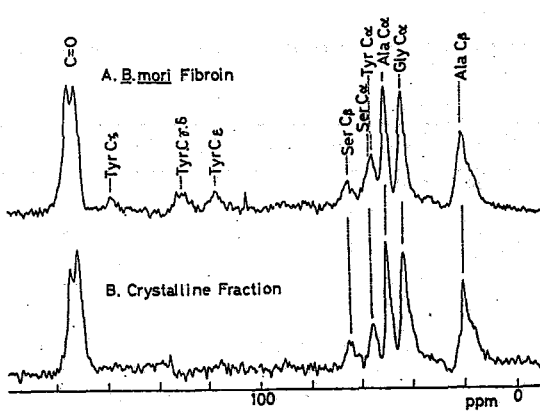


図3 家蚕およびCp部の ^{13}C スペクトル比較

フィブロインの他、各種モデルポリペプチドの ^{13}C T_1 を表I、IIにまとめる。Ser C β ピークに関しては、フィブロイン、(Ser)nとも T_1 は二成分に分けられるが、その他一成分のみであった。

表1で(Ala)nの α -ヘリックスと β -シート構造で、その T_1 に差異があるかどうかを検討したが、有意な差はみられなかった。フィブロインについても同様である。これは、 T_1 を決定する要因が、より局所的なメチル基の C_β 回転であるためである。いずれにしても、アミド骨格の C_α の T_1 値が10-17秒で一定であるのは興味深い。一方、(Tyr)nの C_ϵ および(Phe)nの $\text{C}_\delta \sim \text{C}_\epsilon$ 炭素の T_1 は2.4-4秒で、側鎖の芳香環が相関時間 $\sim 10^{-8}$ 秒の連続拡散状態にあることを示している。しかし、フィブロインの C_ϵ は28秒と、必ずしもホモポリペプチドの場合と一致せず、空間的なパッキング状態が両者によって大きく異なっていることがわかる。

フィブロインおよび(Ser)nの C_β ^{13}C T_1 は、すでに述べたように二成分からなる。Ala C β と同様、短い成分は側鎖のヒドロキシメチル基の速い内部回転状態に対応するが、長い成分はOHが隣接残基あるいは分子鎖間で水素結合状

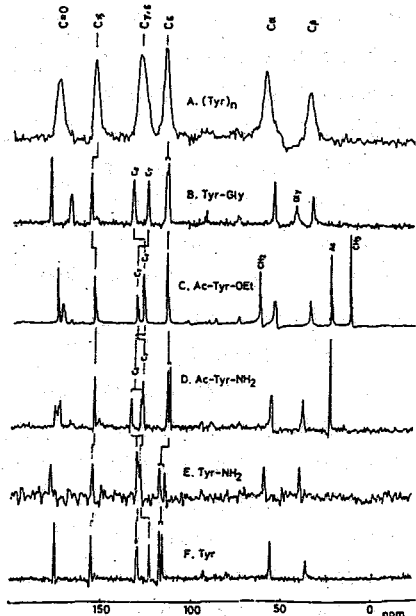


図4 TyrおよびTyrをふくむペプチドの ^{13}C NMRスペクトル

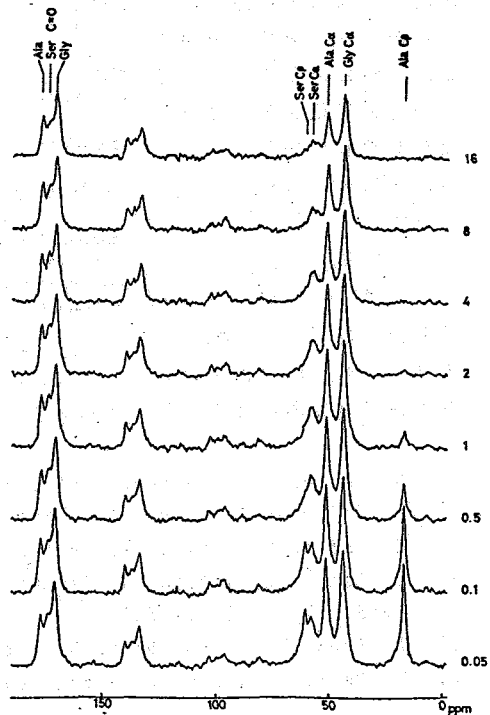


図5 silk I (Cp部)の T_1 測定

態にあることに対応する。多数の球状蛋白の場合、Ser 残基の70%はOH...Oの水素結合に参与していることが、X線回析データの調査から報告されている。また、以前に報告した〔Ser-²H-1〕フィブロインの²H NMRスペクトルから、125KHzの四極子分裂に参与しているCD₂OHは約70%、残りの30%は等方ピークを与えるフリーな回転状態にあることを示した。この事は、上で述べたT₁^Cの短い成分の存在を支持する。T₁^Cプロットから、この成分は約50%で若干異なるものの、両者の一致は興味深い。

このフリーなSerの存在は、水和に伴うフィブロインの構造変化など、種々の重要な性質に参与しているものと思われる。

4. 結論

フィブロインの¹³C NMR線形および¹³C T₁測定により、それぞれ側鎖の遅いおよび速い運動の存在に関しての知見を得ることが出来た。

Table I
¹³C Spin-lattice Relaxation Times of Laboratory Frame in Some Polypeptides (s) in the Solid State

	Conformation ^a	C _α	C _β	C _γ	C _δ	C _ε	C _ζ	C=O
(Ala) _n	α-helix	14	0.52					32
	β-sheet	13	0.84					46
(Ser) _n	β-sheet	16	0.63 6.1					33
(Tyr) _n	α-helix	10	8.7	b	b	4.1	20	b
(Phe) _n	α-helix	15	8	7.8	2.4 ^c	2.4 ^c	2.4 ^c	b

^a Determined by characteristic displacements of ¹³C chemical shifts (ref. 6).

^b Overlapped with spinning sidebands from quaternary carbons.

^c Not resolved.

Table II The Observed T₁^C Values of Silk Fibroins from Various Sources (s)

	C _α			C _β		C _ε	C=O		
	Ala	Gly	Ser	Ala	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser
<u>Silk I</u>									
Cp fraction	15	25	13	0.54	0.50 ^a 8.5 ^b		48	57	38
<u>Silk II</u>									
Cp fraction	14	20	11	0.53	0.56 ^a 31 ^b		20 ^c	46	20 ^c
Lyophilized	17	22	18	0.33	0.63 ^a 37 ^b	28	32 ^c	51	32 ^c
Boc(GSGAGA) ₂ OBzl ^d	11	15	12	0.38	1.1 ^a 25 ^b		14 ^c	36	14 ^c
<u>α-helix (P.c. ricini)</u>									
Cast Film	16	13		0.98			24	33	-
<u>β-sheet (P.c. ricini)</u>									
Cp Fraction	15	17		0.82			19 ^c	19 ^c	19 ^c

^a Shorter T₁^C component. ^b Longer T₁^C component.

^c Not detected. ^d Boc (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)₂OBzl.

- 1) H. Saitô, Magn. Reson. Chem., 24, 835 (1986)
- 2) H. Saitô and I. Ando, Ann. Rep. Magn. Reson., 21, 209 (1989)
- 3) H. Saitô, M. Ishida, T. Asakura, Macromolecules, in press
- 4) H. Saitô, R. Tabeta, T. Asakura, Y. Ianaga, A. Shoji, T. Ozaki and I. Ando, *ibid.*, 17, 1405 (1984)
- 5) T. Asakura, A. Kuzuhara, R. Tabeta and H. Saitô, *ibid.*, 18, 1841 (1985)
- 6) H. Saitô et al, Magn. Reson. Chem., 26, 155 (1988)

¹⁵N NMRによるポリペプチド
タンパク質の固体構造解析

(群馬大工短・日本電子*・東京工大**)

° 莊司 顯・尾崎拓男・藤戸輝昭*・出口健三*・安藤 勲**

Structural Analysis of Polypeptides and Proteins
in the Solid State by ¹⁵N NMR Method.

Akira Shoji, Takuo Ozaki, Teruaki Fujito†, Kenzo Deguchi† and Isao Ando‡
(Department of Industrial Chemistry, College of Technology, Gunma University,

†NM Group, JEOL Ltd., ‡Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology.)

Abstract: The relation between the chemical structures (primary structure and conformation) and the ¹⁵N chemical shift tensors (σ_{11} , σ_{22} and σ_{33}) as well as the isotropic chemical shift (σ_{iso}) of some solid polypeptides containing ¹⁵N-labeled glycine (Gly*) residues was studied by means of ¹⁵N NMR. It was found that the ¹⁵N chemical shift tensors of Gly* residues in polypeptides depend not only on conformation but also on amino-acid sequence, and that σ_{22} is very useful for conformational analysis of solid polypeptides. Further, it was found that σ_{iso} is useful for structural analysis of some natural fibrous proteins in the solid state.

1. 緒 論

我々は、すでに固体高分解能¹³C-及び¹⁵N-NMR法を用いて一連の合成ポリペプチドや天然タンパク質の固体構造に関する研究を行い、その有用性を明らかにしてきた。特に、¹³C化学シフトは着目するアミノ酸残基のコンホメーションに大きく依存し、隣接アミノ酸残基や高次構造による影響が小さいことから、¹³C-NMR法は固体コンホメーションの解析に極めて有効な研究手段となることを明らかにした。一方、¹⁵N核は¹³C核と異なり孤立電子対 (lone-pair electron) を有するため、¹⁵N化学シフトはコンホメーションの情報のほかに、隣接アミノ酸残基の影響、水素結合様式の影響及び高次構造など長距離相互作用などに関する情報を提供してくれる可能性を有する。最近、我々は種々のホモポリペプチド及び¹⁵N標識L-アラニン残基 (Ala*) を含む一連の合成ポリペプチド [Ala*, X]_n (XはL-アラニン以外のアミノ酸残基: 天然存在比¹⁵N) について、¹⁵N化学シフトと構造 (アミノ酸残基の種類、アミノ酸配列およびコンホメーションなど) との関係を明らかにした¹⁻³⁾。

本研究では、天然の繊維状タンパク質の構造を理解する上で重要なグリシン残基の構造に着目し、ポリグリシン [Gly]_n、及び¹⁵N標識グリシン残基 (Gly*) を含む一連のコポリペプチド [Gly*, X]_n (Xはグリシン以外のアミノ酸残基) を中心に、これらの固体構造とグリシン残基の¹⁵N化学シフトとの関係について報告する。さらに、グリシン残基を多く含むいくつかの天然繊維状タンパク質の¹⁵N-NMRスペクトルについても報告する。

2. 実 験

本研究で用いた、Gly* (MSDアイソトープ社;99.9%¹⁵N) と天然存在比アミノ酸からなるポリペプチド試料は、N-カルボキシアミノ酸無水物(NCA)法により合成した。

¹⁵N および ¹³C CP-MAS (cross polarization - magic angle spinning) NMR スペクトルはCP-MAS装置付属の JEOL GX-270分光計(日本電子)を用いて、それぞれ 27.4 MHz(¹⁵N核)及び 67.8 MHz(¹³C核)で測定した。¹⁵N-NMRの測定条件は、コンタクト時間: 3 ms, 繰り返し時間: 5 s, 90°パルス幅: 5.1 μs, スペクトル幅: 20 kHz, 及びデータポイント: 8 K であり、積算は40-13000回行った。¹⁵Nパウダーパターン(CP-static)スペクトルの測定は、試料管をマジック角に固定し静止状態で行った。¹⁵N化学シフト(σ_{150})及び¹⁵N化学シフトテンソル主値(低磁場側より σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} とする)は ¹⁵NH₄NO₃(飽和水溶液)を外部基準($\delta=0$ ppm)とし、グリシン-¹⁵Nの δ 値(11.59 ppm)を二次基準とした。¹⁵N化学シフトの実験誤差は σ_{150} と σ_{22} については±0.5 ppm, σ_{11} と σ_{33} については、±2 ppm以内である。

各試料の固体コンホメーションの解析は¹³C CP-MAS NMR、赤外吸収(IR)スペクトル法により行った。IRスペクトルは、JIR-FX 6160 フーリエ変換IR(日本電子)及び JASCO A702 IR(日本分光)分光計を用い、KBr disk法により 4000-300 cm⁻¹の波数範囲で測定した。

3. 結果及び考察

本研究で用いた、Gly*と天然存在比アミノ酸(X)からなる一連のポリペプチド[Gly*,X]_n試料のグリシン残基の各¹⁵N化学シフト値を図1に示す。参考のために、前に報告した[Ala*,X]_nのL-アラニン残基の¹⁵N化学シフト値も図1にまとめた。図1から明らかなように、Gly*の¹⁵N化学シフトはAla*より何れも約10-20 ppm 高磁場に現われるためこれらのピークは分離される。このことは、[Gly]_n以外のホモポリペプチドの σ_{150} (97.0-107.0 ppm)がAla*の値とほぼ等しいことがすでに明らかになっていることから、グリシン残基が不斉炭素原子を持たないことと関係あるものと思われる。従って、Gly*の¹⁵N化学シフトの研究はグリシン残基を含むポリペプチドやタンパク質の構造解明に重要である。

(1) ポリグリシン構造

ポリグリシン [Gly*]_n は、ポリグリシン I 形(PGI: 逆平行 β 構造)とII形(PGII: 分子間水素結合を持つ3₁-ヘリックス構造)をとる。両者の化学シフトを比較すると、図1にも示したようにPGIのすべての¹⁵N化学シフト値がPGIIより高磁場に現われている。この実測の結果は、分子軌道法による量子化学的¹⁵N化学シフト(遮蔽定数)の理論計算結果ともよく対応している。また、PGI形とPGII形間の¹⁵Nシフト差は σ_{22} では小さい(1.4 ppm)が σ_{11} では大きい(9 ppm)。 σ_{11} の主軸方向が水素結合の方向とほぼ平行にあることを考慮すると、この実験結果は大変興味深い。

(2) コポリペプチド $[\text{Gly}^*, \text{X}]_n$ の ^{15}N 化学シフト (σ_{150} , σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})

α -ヘリックスと β -シート構造をとる一連のコポリペプチドの ^{15}N 化学シフトを比較すると、グリシン残基の σ_{150} では両者の間でシフト差がほとんど見られないが、 σ_{11} と σ_{22} では大きく現れている。しかも、 σ_{11} では α -ヘリックス形の方が β -シート形よりも低磁場に現れる傾向が見られるが、 σ_{22} ではこの逆になっている。この傾向は、Ala*の場合と同一である。この理由は今のところ明らかになっていないが注目したい結果である。

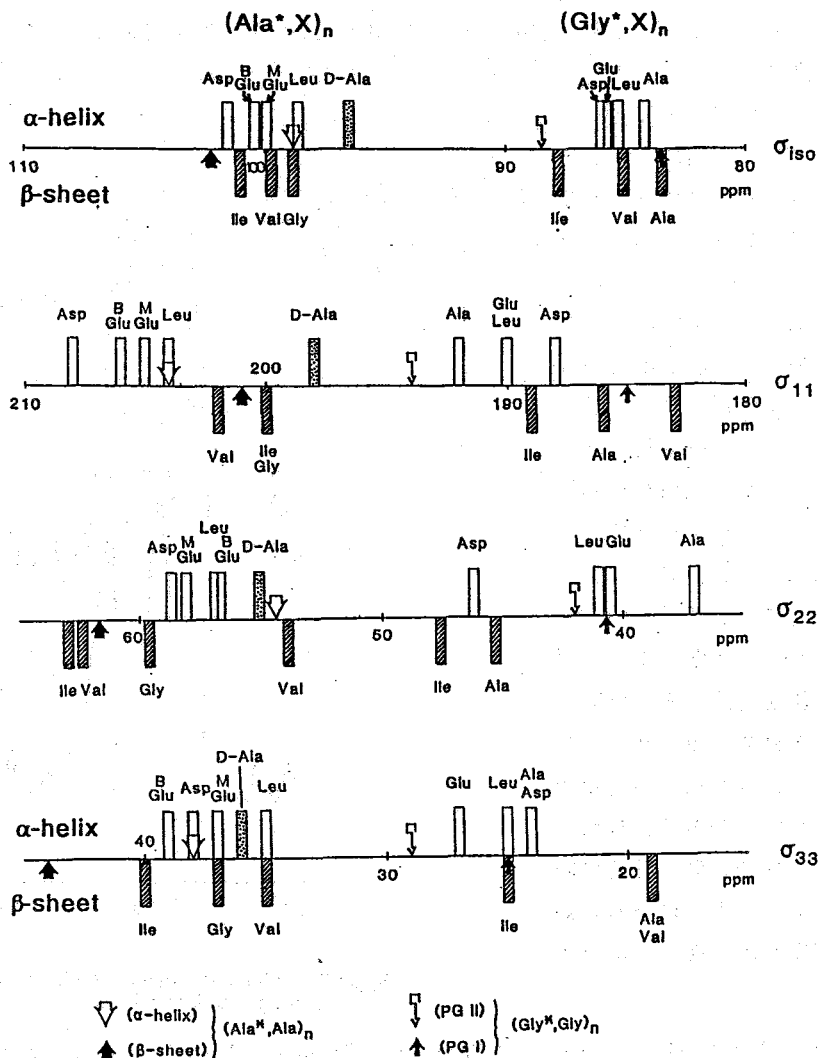


Figure 1. Isotropic ^{15}N chemical shift (σ_{150}) and chemical shift tensors (σ_{11} , σ_{22} and σ_{33}) of ^{15}N -L-alanine (Ala*) or ^{15}N -glycine (Gly*) residues in copolypeptides.

従って、 σ_{11} 及び σ_{22} は一応コンホメーション依存化学シフトであると言える。また、図1よりポリペプチド $[\text{Gly}^*, \text{X}]_n$ 中のグリシン残基の ^{15}N 化学シフトは、他のアミノ酸残基(X)の種類、含量などによっても大きく影響を受けていることが明らかである。このことは、 ^{15}N 化学シフトが少なくともアミノ酸配列に関する情報を含んでいることを示している。今後、この点を明らかにしたい。

(3) 天然タンパク質の ^{15}N CP-MAS NMRスペクトル

天然存在比のタンパク質の構造解析に ^{15}N CP-MAS NMRが果たしてどの程度まで応用できるか？：即ち、どの程度の分解能のスペクトルが測定できるか？ そこからどの程度の情報が得られるか？ という点を検討するために、いくつかの天然繊維タンパク質について測定を行った。

図2に、天然コラーゲン線維及びシークエンシャルポリペプチド $[\text{Pro-Ala-Gly}]_n$ の ^{15}N CP-MAS NMRスペクトルを示す。13000回の積算で分解能の良いスペクトルが得られた。各ピークのおおよその帰属は、コラーゲン状三重らせん構造をとるモデルペプチド $[\text{Pro-Ala-Gly}]_n$ のスペクトルを基に行った(図2)。このスペクトルからコラーゲン線維を構成する主要アミノ酸の種類、量、及びコンホメーションなどの情報が得られた。今後は、NMR装置の発達と測定技術の向上により、さらに詳しい知見が得られるものと期待できる。

COLLAGEN FIBRILS

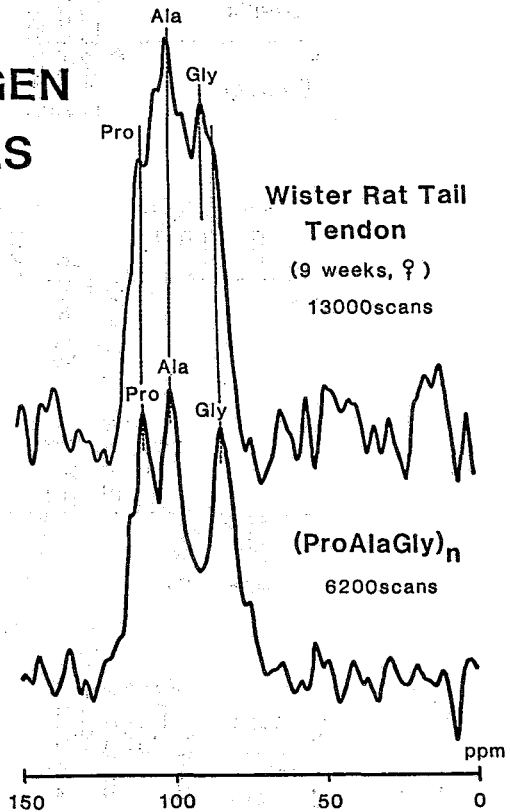


Figure 2. Natural abundance 27.4 MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectra of collagen fibrils.

- 文献：1) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; I. Ando, *Macromolecules* 1987, 20, 2441-2445. 2) 莊司、尾崎、藤戸、出口、安藤：第26回NMR討論会講演要旨集、(1987) 175-178. 3) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; S. Ando; I. Ando, *Macromolecules* 1989, 22, 2860-2863.

(北大工) 平沖敏文、松尾研吾、下川繁三、堤 耀広

Molecular Motion of Poly(γ -benzyl glutamate) by Solid Deuterium NMR

T. Hiraoki, K. Matsuo, and A. Tsutsumi

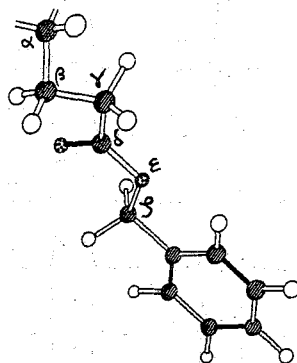
Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060

Deuterium quadrupole echo spectroscopy is used to study the dynamics of the side chain of deuterio γ , ζ , and phenyl ring positions in poly(γ -benzyl glutamate)s. Temperature-dependent line shapes, their intensities, τ dependence were employed to determine the rate and mechanisms of the side chain motion. The line shapes and τ dependence could be simulated quantitatively with the jump model. The C_{γ}^2H and C_{ζ}^2H bonds are immobile, but phenyl ring undergoes rapid twofold flip below room temperatures. These sites undergo twofold jumps and additional large amplitude motions above 40°C.

重水素 NMR スペクトルの線形は分子運動の速さとそのモードによって著しく変化する。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、分子間・分子内相互作用は無視できる。また、分子運動の速さが核四重極相互作用の大きさと同程度になると、スペクトルの線形は四重極エコー法の二つの 90°パルスの間隔 (τ) に依存して大きく変化する。 ^2H-NMR は固体状態における分子運動の詳細な情報を与えるので、重水素で標識された部位の局所的な運動を定量的に求めることが出来る。¹⁾ 本研究では固体状態におけるポリ(γ -ベンジルグルタメート)側鎖の運動を詳細に調べるため、側鎖の γ 、 ζ のメチレンとフェニル基水素の3つの部分をそれぞれ選択的に重水素化したポリグルタメートを用いて ^2H-NMR スペクトルを測定した。スペクトルの線形はジャンプモデルにより計算し、²⁾ 測定スペクトルと比較検討した。

実験

試料は γ 位のメチレン水素と ζ 位のベンジルメチレン水素をそれぞれ重水素化した poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG- γ d2) と PBLG- ζ d2、および、フェニル基水素を重水素化した poly(γ -benzyl D-glutamate) (PBDG-d5) を用いた。 ^2H-NMR スペクトルは Bruker HSL-200 (30.7MHz) を用いて、四重極エコー法により測定した。プローブインサートのコイル径を 5 mm に改造して用いた。90°パルスは約 1.7 μs で、パルス間隔は 25 μs である。T₁ は Inversion-recovery 四重極エコー法により求めた。



PBLGの側鎖構造

ひらおき としひみ, まつお けんご, しもかわ しげどう, つつみ あきひろ

結果と考察

(1) PBLG- γ d2

^2H -NMRスペクトルの温度依存性をFig.1(a)に示す。室温以下では約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、 $\text{C}\gamma$ - ^2H 軸の運動が非常に遅く、制限されており、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。40°Cでは115kHzの四重極分裂を示す。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ことが分かる。40°C以上になるとスペクトル強度が減少し、線形が変化し、この温度領域で核四重極相互作用の大きさ(-170kHz)と同程度の速さの運動が生じていることを示している。60°C以上からスペクトルの中央部の強度が増加し、さらに線形も変化して、122°Cでは分裂幅20kHzのdoubletスペクトルになる。このような線形の変化を定量的に扱うために、 $\text{C}\gamma$ - ^2H 軸の運動は $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$ 軸のまわりでトランス-ゴーシュ間で2-site jumpすると仮定してスペクトルを計算した。ここでsite populationは0.33 (T)と0.67 (G)と設定した。fig.1(b)に計算スペクトルとjump rateを示す。60°Cまでは良い一致を示した。50-65°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 $\omega_c \tau_c \approx 1$ (intermediate exchange region)になるためである。高温になると計算スペクトルに肩が残り、実測スペクトルからずれてくる。jump rateを1MHz以上にしても計算スペクトルは変化しない。これは高温では $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$ 軸のまわりの2-site jump運動に加えて、回転軸自体の運動が寄与してくるためと考えられる。Fig. 2に四重極分裂幅の温度依存性を示す。-98°Cで122kHzで、温度上昇に伴わずかに減少し、60°Cで115kHzになる。一方、理論値は128kHzである。これは $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$ 軸のまわりの回転に加えて、この分裂幅を少し変調する運動が存在することを示している。このような運動として $\text{C}\gamma$ - ^2H 軸が半頂角 θ_c のコーンの中で速くlibrationする運動を仮定すると、測定値 $\overline{\nu q}$ は次式で与えられる、

$$\overline{\nu q} = \nu q \cos \theta_c (\cos \theta_c + 1) / 2 \quad (1)$$

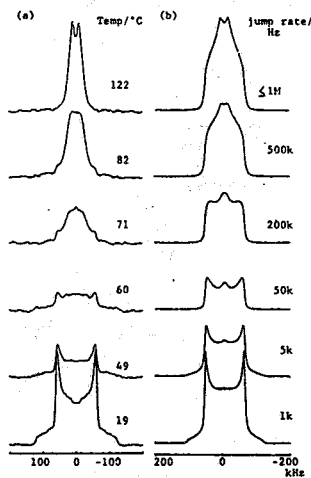


Fig. 1. Temperature dependence experimental spectra of PBLG- γ d2 (a) and simulated line shape using 2-site jump model (b).

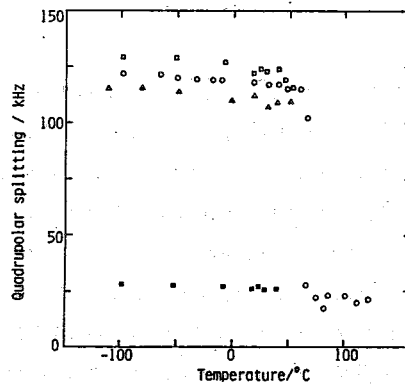


Figure 2. Temperature dependence of the quadrupolar splittings for PBLG- γ d2 (o), PBLG- γ d2 (Δ), PBDG-d5 inner splitting (\blacksquare), and PBDG-d5 outer splitting (\square).

ここで $\overline{\nu q}$ はメチレンに対しては128kHzである。温度とともに運動が激しくなり θc が大きくなると、 $\overline{\nu q}$ は減少する。(1)式を用いて得られた θc は -98°C で 14° 、 60°C で 21° とわずかに大きくなる。 70°C 以上になると測定値は20kHzに大きく減少し、回転ジャンプの速さが十分に速い場合の計算値19kHzと一致する。TとGが等しいpopulationの場合、計算スペクトルはsingletになるので、高温領域でも $C\gamma^{-2}H$ 軸の運動は $C\beta - C\gamma$ 軸のまわりの回転に支配され、site populationも大きく変化しないことを示唆している。Fig.3に 51°C におけるスペクトルの 90° パルス間の時間 τ 依存性を示す。 τ が長くなると線形が変化し、特にスペクトルの中心部の強度が減少する。固体では、 $C^{-2}H$ 軸の T_2 は静磁場とのなす角度に依存して変化する。運動により平均化されスペクトルの中心部に集まった成分は T_2 が短くなり、 τ の間に磁化が減衰する。スペクトル強度の減衰の時定数 T_2 はスペクトルの中心部で $20\mu\text{s}$ で、 σ_{\perp} 成分で $70\mu\text{s}$ である。

(2) PBLG- $\zeta d2$

スペクトルの温度依存性をfig.4に示す。室温以下ではほぼ軸対称なスペクトルを示すが、裾の部分(σ_{\parallel})がPBLG- $\gamma d2$ と比べると不明瞭である。分裂幅の温度依存性をfig.2に示す。分裂幅は115kHz(-111°C)から110kHz(18°C)へ減少する。これは理論値の128kHzやPBLG- $\gamma d2$ の値より小さく、librationが存在することを示している。(1)式を用いると θc は -111°C で 21° 、 18°C で 24° である。室温以下で $C\zeta^{-2}H$ 軸のlibrationの振幅が $C\gamma^{-2}H$ 軸よりも大きいことが分かる。 $30-65^\circ\text{C}$ では強度も線形も変化するintermediate exchange領域である。 80°C 以上ではsingletになり、PBLG- $\gamma d2$ の場合と異なる。Fig.5に計算スペクトルを示す。ここで、運動は $O\epsilon - C\zeta$ 軸のまわりにjump角度 120° で2-site jumpし、site populationは等しいと仮定した。 39°C までは一致するが、高温では一致しない。これはPBLG- $\gamma d2$ の場合と同様に他の大振幅の運動が寄与するためと考えられる。

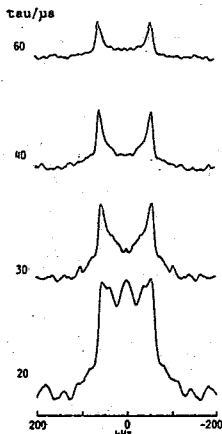


Figure 3. tau dependence of PBLG- $\gamma d2$ at 51°C .

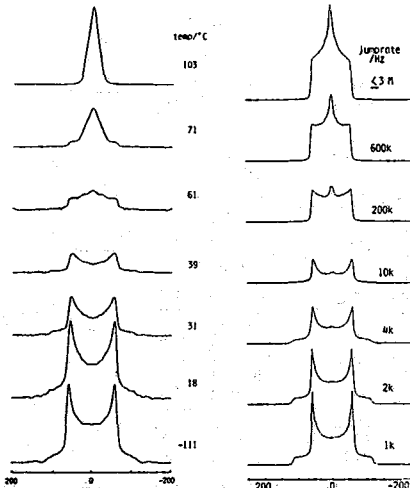


Figure 4. Temperature dependence experimental spectra of PBLG- $\gamma d2$.

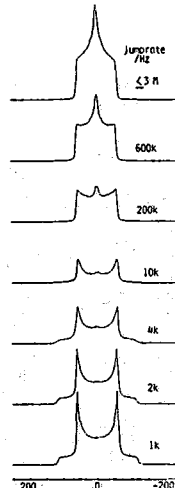


Figure 5. Simulated spectra of PBLG- $\gamma d2$.

3) PBDG-d 5

スペクトルと分裂幅の温度依存性をそれぞれfig.6(a)、fig.2に示す。-98°Cでは分裂幅129 kHzのスペクトルを示し、さらに中央部に分裂幅28kHzのシグナルが観測された。これはフェニル基がかなり運動していることを示している。昇温とともに、このシグナルの強度が増加する。40°Cから線形が大きく変化し、60°C以上でシャープなsingletになる。フェニル基がC5-C7軸のまわりに180° flip-flop運動すると仮定してスペクトルを計算した。この際o-位とm-位のC-Hのみ運動し、回転軸に平行なp-位は運動しない仮定とした。計算結果をfig.7(a)(b)に示す。Fig.7(b)でjump rateが遅い場合スペクトル強度が小さいのはintermediate exchangeのためである。(a)と(b)を加えたスペクトルがfig.6(b)である。計算スペクトルは40°Cまでは実測スペクトルと良く一致する。jump rateは-98°Cで10kHz、17°Cで400kHzと求まり低温でもかなり速く運動している。jump rateの温度依存性より求めた活性化エネルギーは16 kJ/molである。この値はこれまで報告されている芳香環の値よりもかなり小さい。³⁾ これはPBDGのフェニル基は剛直な α -helixの主鎖間にあり、しかも側鎖末端にあるため運動し易いためと考えられる。40°C以上の高温ではjump rateを上げて計算スペクトルは変化せず、実測スペクトルと合わない。これはflip-flop運動以外にフェニル環全体の大振幅の運動が生じているためと考えられる。Fig.8に-9°Cにおけるtau依存性を示す。得られた T_{20} は中心部で90 μ s、 σ_{\perp} 成分で145 μ sである。

文献1) H.W.Spiess, Adv.Polym.Sci., 66, 23(1985), S.J.Opella, Methods in Enzymology, 131, 327(1986). 2) R.J.Wittebort, et al., J.Chem.Phys., 86, 5411(1987). 3) D.M.Rice, et al., J.Am.Chem.Soc., 109, 1636(1987).

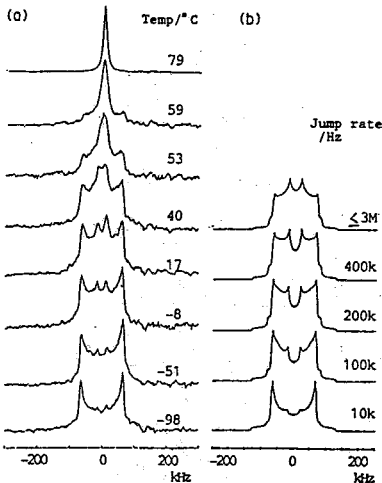


Figure 6. Temperature dependence experimental spectra of PBDG-d5(a) and simulated spectra using 180 flip-flop jump(b).

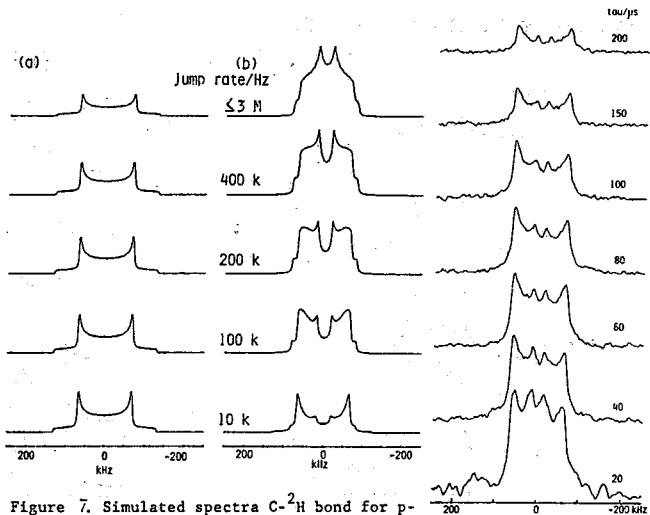


Figure 7. Simulated spectra C-²H bond for p-position(a) and o- and m-positions of phenyl ring using 180° flip-flop jump (b).

Figure 8. τ dependence of PBDG-d5 at -9 C.

(アッパ)ン, Bose Institute, NIH) O 檜山行雄
Siddhartha Roy Dennis A. Torchia

Solid State ^2H NMR Study of Thymidine.

Base Rigidity and Ribose Ring Flexibility in Deoxynucleosides

Yukio Hiyama¹, Siddhartha Roy², Dennis A. Torchia³

1. Control Research and Development, Upjohn Pharmaceuticals limited, 23 Wadai, Tsukuba 300-42 Japan, 2. Department of Biophysics, Bose Institute, C. I. T. Scheme VII M Calcutta, 700 054 India, 3. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892 USA

We have investigated the internal motions of the nucleoside thymidine in the solid state by deuterium NMR spectroscopy. The base position was found to be essentially rigid. On the other hand, T_1 measurements on 2', 2" deuterio thymidine indicated the presence of small amplitude motions on nanosecond time scale. In addition, spin-alignment and distorted echo experiments revealed the presence of large amplitude motion on millisecond to microsecond time scales. This motion is hypothesized to be 2' endo \leftrightarrow 3' endo interconversion.

It has been clear for a while that the three-dimensional conformation of biological macromolecules is the determinant of biological function. A molecule may have more than one such stable conformation available to it. If transitions between such conformations are kinetically possible, then more than one conformation can be utilized for more than one biological task. Thus a measure of dynamic flexibility (i. e., transitions between different conformations) can provide us with information about accessible conformations of a bio-molecule.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy has been widely used to measure motional properties in solution and solid state. Several types of nuclei can be utilized as probes for measuring dynamics in the solid state. Deuterium has been used to detect motions in the 10^5 - 10^{11} second range. Recently, spin alignment experiments were used to detect motions on very slow time scales and to determine type of motion. DNA in the cell nucleus spend most of its time in a solid like environment. There it undergoes many conformational changes, some of which involve changes in the conformations of the sugar residues (e.g. B to Z, B to A, etc). Energetics of such transitions have been reported in the solution, but very little is known in solid or solid like states.

We have focused our attention to characterize the motions of sugar rings of nucleosides in the solid-state. In solution, nucleosides are known to interconvert rapidly between 2'-endo and 3'-endo conformations. Such information about ring mobility of nucleosides in the solid state was not available before.

EXPERIMENTAL

(Methyl d_3) thymine was purchased from Merck, Sharp and Dohme Isotopes. 2-deoxyribose-1-phosphate and thymidine phosphorylase was from Sigma Chemical Co. Thymidine phosphorylase was dialysed twice against 2 liters of 0.01 M Tris-d, 0.05 M NaCl, pH 7.5 for 2 days, before use. 10 ml of 2-deoxyribose-1-phosphate in water was added to 500ml of 0.2M Tris-d, pH 7.5 containing 0.05 M NaCl. 10ml of 0.2 M (methyl d_3) thymine in 0.05 M NaOH was added. This was followed by addition of approximately 300 units of thymidine phosphorylase. Progress of the reaction was monitored by change in optical density at 295 nm. Since recrystallization of (d_3 -C2') thymidine was difficult because of the small amount, all samples for the solid state NMR work were lyophilized from H_2O or D_2O .

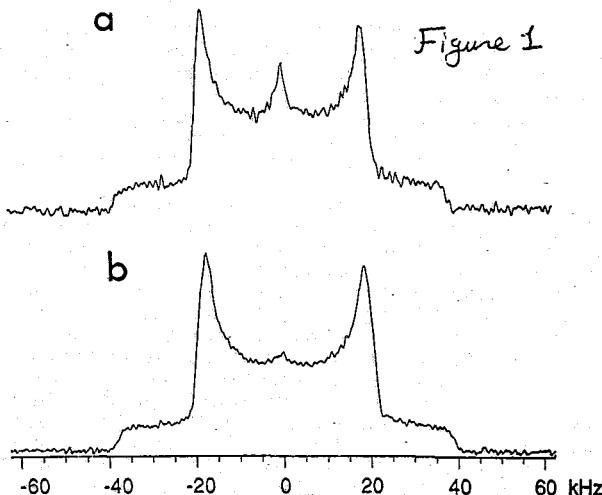
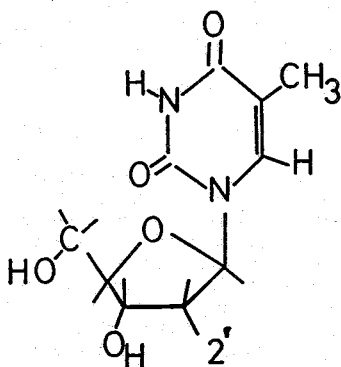
Solid state ^2H NMR spectra were observed at 38.45 MHz and at 76.76 MHz by a home-built and a modified NIC-500 spectrometer, respectively. 90° pulse length was 2.2 μs and 2.5 μs at 38.45 MHz and at 76.76 MHz. Anisotropic T_2 distortion was measured by changing delay time between the two pulses. Spin alignment echo experiments were performed at 76.76 MHz. Delay time between the first pulse and second pulse, T_1 , was 30 μs and delay time between the second pulse and third pulse, T_2 , varied from 500 μs to 100 ms.

ひやま ゆさお しだはた 3 () びにす こうし

Base Rigidity

Figure 1 shows ^2H NMR spectra of (d_3 -methyl)thymidine at +75 °C (a) and +22 °C (b), which have typical ^2H NMR line shapes for a reorientating methyl group. However it should be noted that (a) the asymmetry parameter of the spectra is about 6 %, unusually high for a methyl group powder pattern and that, (b) quadrupole splitting (between the two singularities) is only 35 kHz. These features are caused by the negative charge on the carboxyl oxygen¹ rather than by further motional averaging proposed by a recent study².

There was no substantial change in the methyl ^2H lineshape from -125 °C to +95 °C. No T_2 distortion was observed in this temperature range, which indicates that there is no slow (correlation time, τ_c , ranging 10^{-4} s to 10^{-6} s) motion. Above -50 °C, the spin-lattice relaxation time (T_1) was not field dependent (at the 38.45 MHz and 76.76 MHz) so correlation time of methyl reorientation is on the fast side ($\omega_0 \ll 1$) of the T_1 minimum. Echo heights of the spin alignment experiments showed no decay up to $\tau_2 = 50$ ms, which also suggests the absence of ultra slow motion at the methyl position.



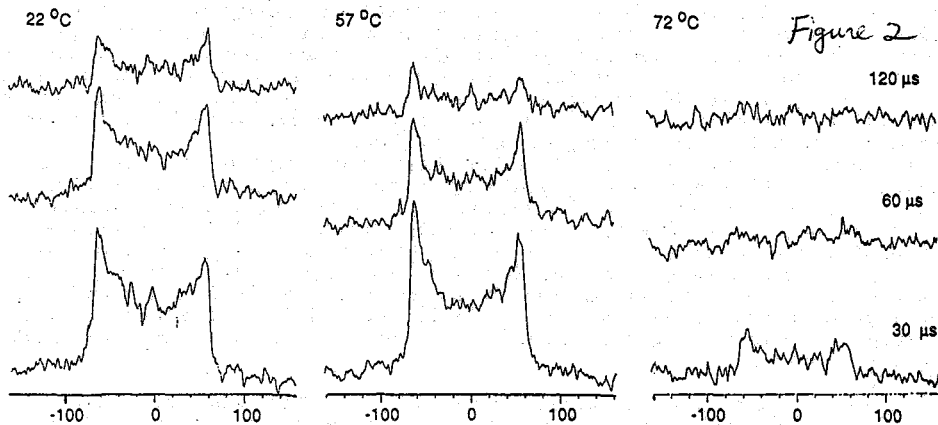
Deoxyribose Ring Flexibility

At -125 °C, ^2H NMR spectrum of (d_3 , C2')thymidine gave a Pake doublet with a quadrupole splitting of 125 kHz, which is a typical value for a rigid C-H bond. ^2H spin lattice relaxation time of 7 s also supports the idea that the C-H bond is rigid. Because the quadrupole splitting at +65 °C (122 kHz) is nearly identical to the 125 kHz splitting observed at -125 °C C-H bond undergoes only small amplitude motion, $\leq 5^\circ$ rms, in the -125 °C to +65 °C temperature range.

The ^2H spin lattice relaxation times of d_3 -thymidine were measured at the two field strength. At 22 °C, T_1 was 142 ms at 76.76 MHz and 114ms at 38.45 MHz. These values are surprisingly small considering the small reduction of the quadrupole splitting observed in the ^2H spectra from -125 °C to +22 °C. This shows that the small amplitude motion (rms angle of $\approx 5^\circ$) has a correlation time close to the T_1 minimum; 10^{-3} s. Below -30 °C, the field dependence became more significant, which suggests that correlation time of small amplitude motion increases and is on the slow side of T_1 minimum at low temperature. An Arrhenius plot of T_1 against $1/T$ yielded an apparent activation energy of 3.8 kcal/mol. This motion probably corresponds to a conformational change between substates such as between C3'-exo and C2'-endo modulating the C- ^2H bond vector by a small amplitude.

Above 68 °C total the intensity of ^2H NMR spectra in (d_3 , C2')thymidine decreased precipitously in the temperature range of 70 °C to 95 °C as shown in Figure 2. The loss of intensity was caused by a large amplitude rms 30 motion on the time scale of 10^{-5} s to 10^{-7} s, because T_1 became extremely short, less than 40 s for most orientations, from 68 °C to 72 °C (Figure 2). Note that no edge of the powder pattern survived, strongly suggesting that the slow motion is multisite jumping. It is interesting that this motion exists only at the deoxyribose ring positions, since the line shape and intensity of the methyl deuterons at 75 °C was

essentially identical to that observed at 22 °C (Figure 1 b).



In order to investigate if this large amplitude slow motion existed at temperatures below + 65 °C, we performed a series of spin alignment experiments^{8,9}. This measurement is sensitive to motions having correlation times as large as T_{10} . Because the T_1 of d₂-thymidine is more than 100 ms at 25 °C, motions having correlation times in the range of 10⁻²s to 10⁻⁴s can be studied.

In the case of jumps among N inequivalent sites, the correlation function for spin alignment $F(\tau_1, \tau_2)$, has a limiting value, $F(\tau_1 \gg \tau_c, \tau_2 \gg \tau_c) = \sum p_i^2$ (hereafter f), where τ_c is the correlation time of the motion and p_i is the normalized relative population of i th site.

Alignment echo height, $S(\tau_2)$, can be written as

$$S(\tau_2) \approx (1-f) \exp(-\tau_2/\tau_c - \tau_2/T_{10}) + f \exp(-\tau_2/T_{10})$$

At 25 °C, the echo intensity data taken with $\tau_1 = 30 \mu s$ (Figure 3) are accounted for with $f = 0.90$ (0.02), $\tau_c = 1$ ms (uncertainty in τ_c is an order of magnitude) and $T_{10} = 170$ (40) ms (Table 2). This means that population of the major conformation, is 95 %, if one assumes that there are only two conformations. We assign the major conformation as C3'-exo, because this conformation is found in the the X ray structure. At 46 °C, $f = 0.73$ (0.02), $\tau_c = 1$ ms and $T_{10} = 120$ (20)ms fit the data well. These parameters indicate that at 46 °C the population of the minor conformation has risen to 16 % while the population of the C3' exo conformation has fallen to 84 %. At 55 °C the two site jump model fails to account for the data because the fitted value for f is 0.4 (0.05) whereas the minimum value of f for the two site jump is 0.5. This result suggests that above 55 °C there are at least three conformations which have substantial populations.

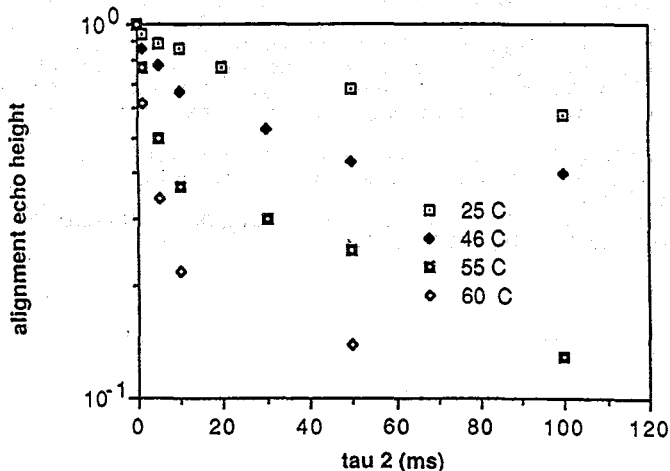


Figure 3

The large uncertainty of correlation times measured by the spin alignment experiment precluded determination of the activation energy of the slow motion in thymidine. However our spectra suggest that the motion observed by the spin alignment experiment becomes fast enough (10^{-4} s or smaller in τ_c) to show the T_2 distortion above 65 °C. We estimate an activation energy for the slow motion between 5 kcal/mol to 10 kcal/mol, because the time scale of this motion is substantially slower than that of the small amplitude nanosecond fluctuation which has an apparent activation energy of 3.8 kcal/mol.

In contrast with the spectrum of salt free thymidine, the spectrum of crystalline (d₂ C2')thymidine containing Tris (non-purified sample) showed significant T_2 distortion at 22 °C (Figure 8). This distortion indicates that a large amplitude (30° in rms), slow (correlation time - 10^{-6} s) motion exists in the thymidine Tris sample even at 22 °C. Since Tris does not bind covalently to thymidine, it is likely that differences in crystalline packing cause the difference in motion observed in the thymidine and thymidine tris sample. The T_1 of the thymidine Tris sample at 22 °C, 76.76 MHz and 38.45 MHz was about 120 ms, which suggests that the sugar ring also undergoes small fast(ns) motion in addition to the slow motion.

DISCUSSION

The major advantage of solid state NMR is that one can study internal molecular motions that are usually masked in solution by overall isotropic molecular tumbling. In the nucleoside crystals, overall molecular motion is absent as base positions are essentially rigid, although the ¹H NMR study by Kintanar et al² concluded that there is a fast small-amplitude libration of the base by showing a relatively short relaxation time at the C-6 deuteron. In contrast, there are two types of motions; at the C-²H position of the deoxyribose rings, (1) small amplitude (5° in rms) on the nanosecond time scale and (2) large amplitude (30° in rms) on the millisecond to microsecond time scale. The former motion can be attributed to small conformational change such as between either C3'-exo and C2'-endo, or C2'-exo and C3'-endo. This nanosecond motion does not exist at the 3' or 5' hydroxyl positions since these sites have large T_1 values at 22 °C.

The time scale of the large amplitude motion ranged from 1 ms in pure thymidine to 1 μ s in thymidine/Tris and in deoxyguanosine. Two possible sources that can change time scale (or activation energy) of this dynamic process are (a) crystalline packing and (b) hydrogen bonding. In phenylalanine crystals, activation energy of 180° phenyl ring flip varies from 5 kcal/mol to 11 kcal/mol. The L-methionine crystal unit cell contains two molecules which differ greatly in their internal flexibility. In the cyclic peptide one of the proline rings is flexible while the other is not. These results clearly showed that crystalline packing can affect the amplitude and activation energy of large amplitude internal molecular motions. Other studies show that the saturated five membered rings have the capability of changing conformation rapidly (nanosecond or faster) at room temperature. For instance proline ring in crystal shows large amplitude (30° in rms) and very rapid (picosecond) motion at 22 °C. Cyclopentane undergoes rapid internal motion between below -150 °C. The presence of hydroxyl groups enables the five membered ring to form hydrogen bonds that can add at least 2 kcal/mol to the activation energy associated with a conformational change. Several theoretical calculations on ribose ring dynamics have predicted a small activation energy ca. 2 kcal/mol for the C2'-endo \leftrightarrow C3'-endo interconversion and nearly no activation energy for small conformational change (e.g. C3'-exo \leftrightarrow C2'-endo). These calculations did not take account of crystalline packing or hydrogen bonding.

* To be published in the Journal of the American Chemical society.

1. Hiyama, Y.; Roy S.; Guo, K.; Butler, L. G.; Torchia, D. A. J. Amer. Chem. Soc., 1987, 109, 2525-2526.
2. Kintanar, A.; Alam, T. M.; Huang, W.-C.; Schindele, D. C.; Wemmer, D. E.; Drobny, G. J. Amer. Chem. Soc., 1988, 110, 6367-6372

L 5

1¹P O 1次元及び2次元マジックアングルスピニングNMR

- 磁気双極子相互作用の影響 -

久保 康, C. A. McDowell
(御立大理, プリンス・コロンビア大)

1-D and 2-D ³¹P CP-MAS NMR studies on the two spin systems with homonuclear dipolar coupling and J-coupling.

A. Kubo and C. A. McDowell (Tokyo Metropolitan Univ., Univ. of British Columbia.)

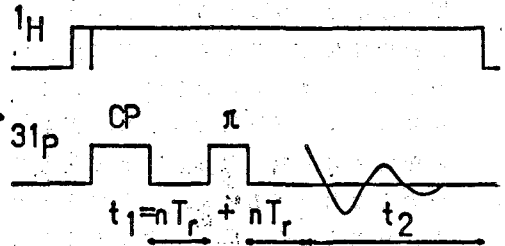
The effect of dipolar interactions on the solid state ³¹P CP-MAS 1D and 2D J-resolved NMR for the coupled two spin systems, sodium pyrophosphate decahydrate (SP) and Tetraphenyldiphosphine-1-oxide (TDP) have been investigated. The 1D CP-MAS spectra of SP shows spinning frequency dependent sideband splittings. 2D J-resolved spectra of SP have very different patterns. The 1D and 2D spectra were calculated based on a newly developed theory.

<序論> Magic-angle-spinning (MAS) NMRスペクトルにおける磁気双極子相互作用の影響については、初期の頃から研究があるが [1, 2] 最近これを定量的に解析することにより核間距離、化学シフトテンソルの相対的な方向を決定しようという試みが行なわれてきた。 [3, 4] 我々は2スピン系としてみなせる試料、 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (SP) と $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{PP}(\text{O})$ (C_6H_5)₂ (TDP) を用いて、1次元マジックアングルスピニング

マジックアングルスピニング (CP-MAS) ³¹P NMRスペクトルのスピニング周波数依存性、及び2次元J分解スペクトルの測定を行った。

<実験> SPは市販の試料を水から再結晶して測定に用いた。 TDPは

A. H. Johnson氏 (Dept. of Chemistry) により合成されたものを測定に用いた。測定はCXP200を用いて³¹P O共鳴周波数 90.90 MHzで行った。 SPについてはCXP100を



T_r : THE ROTATIONAL PERIOD

図1: 2次元J分解スペクトルの測定に用いたパルス系列

くほ あつし・ C. A. McDowell

図2; SFの ^{31}P CP-MAS NMRスペクトルのスピニング周波数依存性。(a-c)は実測のスペクトル、(d-f)は計算より得たスペクトル。

用いて ^{31}P の共鳴周波数40.54 MHzにおいて1次元スペクトルのスピニング周波数依存性を測定した。図1に2次元J分解スペクトルの測定に用いたパルス系列を示した。 ν_1 を回転周期 T_r の

$2n$ 倍としながら $n = 1 \sim 64$ と変化させてFIDを集めた。絶対値モードの2次元フーリエ変換を行った。[5]
 <結果>図2に ^{31}P の共鳴周波数80.98 MHzで測定したSFの ^{31}P CP-MASスペクトルのスピニング依存性を示した。サイドバンドの分裂はスピニング周波数が約2 kHzの時最大となり約150 Hzであった。スピニング周波数を2 kHzから増加させる、または減少させるとサイドバンドの分裂は減少した。サイドバンドの分裂が最大となるスピニング周波数は40.54 MHzの測定では80.98 MHzの場合の半分の1 kHzであった。図3にSFとTDPの2次元J分解スペクトルを示した。SFは $\nu_1 \sim 0$ Hzのあたり幅広いピークをみられた。TDPでは $\nu_1 = \pm 105$ Hzにピークがみられた

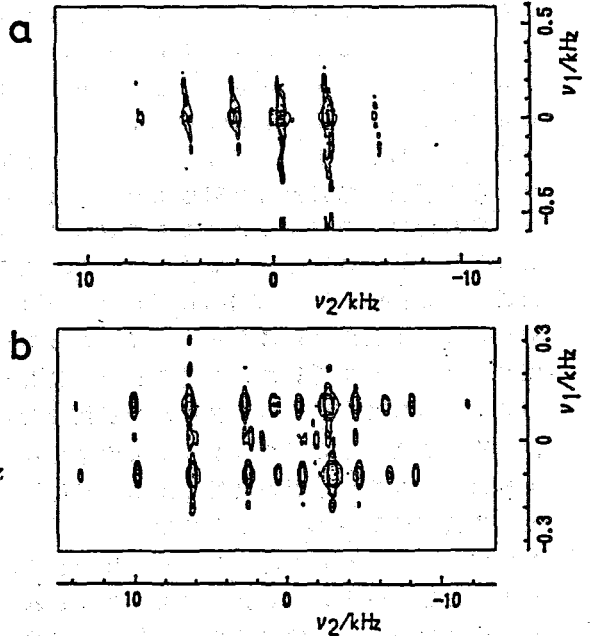
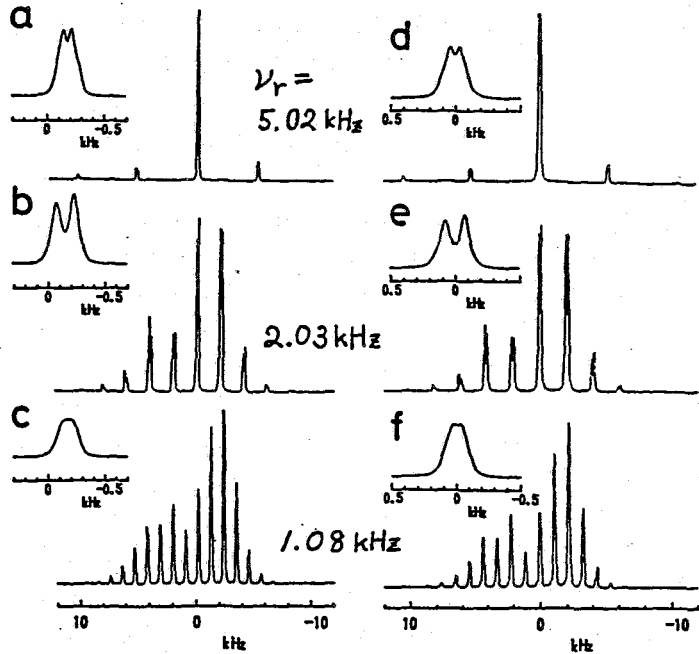


図3; SF (a)とTDP (b)の2次元分解Jスペクトル。

<理論と解析> 2スピン系のハミルトニアンは double quantum operator 及び zero quantum operator を導入して [5] (1) 式で与えられる。

$$H = (\omega_1 + \omega_2) I_x^2 + (\omega_1 - \omega_2) I_x^2 + (2d + J) I_{1z} I_{2z} + (J - d) I_x^2 \quad (1)$$

ここで I_{1z} と I_{2z} が可換でない唯一の operator の組である。MAS によりスピン 1, 2 の共鳴周波数 ω_1 , ω_2 及び磁気双極子相互作用 d は時間に依存するようになる。Maricq と Waugh は ^{13}C を二重にラベルした $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ の ^{13}C CP-MAS NMR の線形の解析を行っており、ふたつのスピンの化学シフトテンソルの等方値が等しいがその方向が異なる時、磁気双極子相互作用に由来するサイドバンドの線幅の広がりが見測されることを示した。[2] 彼らは式 (1) のハミルトニアンに Average Hamiltonian Theory を適用して磁気双極子相互作用によるサイドバンドの分裂の幅が式 (2) の $2K$ で与えられることを示した。

$$2K = \frac{1}{2T_r} \int_0^{T_r} dt_2 \int_0^{t_2} dt_1 [\{\omega_1(t_1) - \omega_2(t_1)\}d(t_2) - \{\omega_1(t_2) - \omega_2(t_2)\}d(t_1)] \quad (2)$$

この式は $|\omega_1 - \omega_2|$ または $|d|$ がスピニング周波数 ω_r より大きくなる条件では良い近似とならなくなることが予想される。我々は (1) のハミルトニアンのなかで $H_1 = \{J - d(t)\} I_x$ を摂動項として取り扱った。 $H_0 = H - H_1$ による時間依存性を H_1 に取り込むと次式の H_1^* が得られた。

$$H_1^*(t) = \exp\left\{i \int_0^t H_0(t_1) dt_1\right\} H_1(t) \exp\left\{-i \int_0^t H_0(t_1) dt_1\right\} \quad (3)$$

この式に Average Hamiltonian Theory を適用して次式で与えられる時間に依存しない部分をもとめた。

$$\bar{H}_1^* = 2|B_0| (I_x^A \cos \chi + I_y^A \sin \chi) \quad (4)$$

ただし $2|B_0|$ はサイドバンドの分裂で次式で与えられる。

$$|B_0| e^{-i\chi} = \frac{1}{T_r} \int_0^{T_r} \frac{1}{2} \{J - d(t)\} \exp\left[i \int_0^t \{\omega_1(t_1) - \omega_2(t_1)\} dt_1\right] dt \quad (5)$$

式 (5) の exponential の項を zero quantum sideband に分解する。[4]

$$\exp\left[i \int_0^t \{\omega_1(t_1) - \omega_2(t_1)\} dt_1\right] = \sum_n Z_n^A \exp(in\omega_r t) \quad (6)$$

Z_n は zero quantum sideband intensity である。

SP の場合、 J の値は 0 とした。 $d(t)$ は $\pm\omega_r$ と $\pm 2\omega_r$ で振動する成分を含むから式 (5) の積分には $Z_{\pm 1}^A$ と $Z_{\pm 2}^A$ を含む項のみが残ることがわかる。 $Z_{\pm 1}^A$ と $Z_{\pm 2}^A$ は $|\omega_1 - \omega_2| \sim \omega_r$ となる条件で極大値を取るから、サイドバンドの分裂もこの条件で極大値をとることが予想される。この説明が定量的にも正しいことを確認するために、式

(4) のハミルトニアンを使って SP の線形のスピニング周波数依存性を計算した。計算には単結晶の ^{31}P NMR により決定した化学シフトテンソルと磁気双極子相互作用テンソルの値を使用した。計算結果を図 2 の右側に示した。

計算によって得られたスペクトルは実測のスペクトルのスピニング周波数依存性を良く再現している。スピニング周波数を減少させた時の分裂の減少は式 (2) の Maricq と Waugh のあまたたハミルトニアンでは説明できない。最近、林と早水は SP で 161 MHz の ^{31}P CP-MAS NMR スペクトルのスピニング周波数依存性を測定しており我々が 80.98 MHz 及び 40.54 MHz で観測したのと同様なスピニング周波数を減少させた時のサイドバンドの分裂の減少を観測している。

[6] 次に 2 次元 J 分解スペクトルの解析について述べる。式 (4) の振動ハミルトニアンで $J=0$ として計算すると単一の配向を持つ ^{31}P スピンの組に対し図 4 に示す位置にピークを持つ 2 次元 J 分解スペクトルが得られた。図 5 に SP の単結晶 ^{31}P NMR より得たパラメータをもとに計算した粉末試料の 2 次元 J 分解スペクトルを示した。図 4 及び 5 のスペクトルは実測のスペクトルの特徴を良く再現している。これらのスペクトルは $\nu_1 \sim 0$ にダブルットを示しその左上と右下に肩を持っている。

一方 TPP の 2 次元 J 分解スペクトルは $\nu_1 = \nu_2 = \pm J/2$ にピークを持ち、溶液状態で化学シフトの異なるスピン間に J 結合が存在する時に観測される 2 次元 J 分解スペクトルと同じ形となっている。異なる原因 (J 結合及び磁気双極子相互作用) による 1 次元 ^{31}P CP-MAS NMR スペクトルの分裂は 2 次元 J 分解スペクトルにより区別できることがわかった。

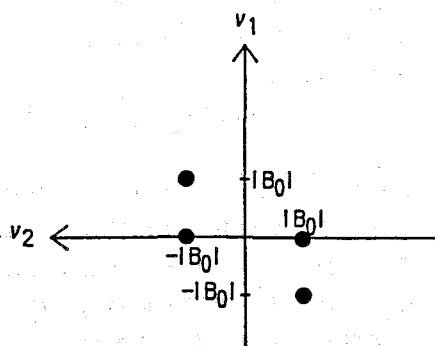


図 4; 理論から予想される 2 次元 J 分解スペクトル

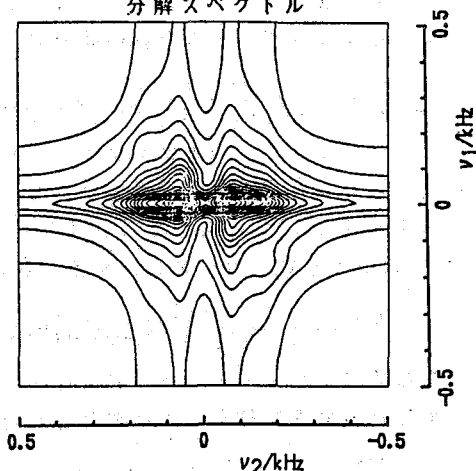


図 5; 計算により求めた SP の 2 次元 J 分解スペクトル

- (1) E.A. Andrew, *Progr. NMR Spectrosc.*, **9**, 1 (1971). (2) M.M. Maricq and J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.*, **70**, 3300 (1979). (3) D.P. Raleigh et al., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1**, **84**, 3691 (1988). (4) A. Kubo and C.A. McDowell, *ibid.*, **84**, 3700 (1988). (5) R.R. Ernst et al., *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions* (Clarendon Press, Oxford, 1987). (6) S. Hayashi and K. Hayamizu, *Chem. Phys. Letters*, **161**, 158 (1989).

無機リン酸塩の固体高分解能³¹P NMRにおける
 スペクトルスピンドiffusion
 (化技研) ○林 繁信・早水 紀久子

Spectral spin diffusion in high-resolution solid-state ³¹P NMR in inorganic phosphates

Shigenobu Hayashi and Kikuko Hayamizu

(National Chemical Laboratory for Industry, Tsukuba, Ibaraki 305)

We have found that the line shape in ³¹P magic-angle-spinning NMR spectra is dependent on the spinning rate of the sample for pyrophosphates and metaphosphates such as Na₄P₂O₇, Na₄P₂O₇·10H₂O, Ag₄P₂O₇, K₄P₂O₇, and (KPO₃)_n. These materials have two chemically inequivalent P atoms with slightly different chemical shifts. As the spinning rate decreases, the signals of the two sites coalesce, as if there were chemical exchange. This phenomenon can be explained by spectral spin diffusion between ³¹P spins through dipole-dipole interaction.

マジック角回転法(MAS)を用いた固体高分解能NMR測定は種々の分野で使用されている。無機リン酸塩の³¹P MAS NMRスペクトルも既にいくつかの報告がなされている。ピロリン酸塩では、2つのPO₄ユニットが連なっているが、その2つのPO₄が異なる化学シフト値を示すことが報告されている。また、メタリン酸塩においても2つの非等価なサイトが存在している。我々は、種々の無機リン酸塩の³¹P NMRスペクトルの測定をしている際、ある種のピロリン酸塩及びメタリン酸塩において2つのPO₄ユニットの信号の化学シフト値の差が試料の回転数によって変化することを見いだした。見かけ上、化学シフト値が回転数に依存する現象である。

MAS NMRスペクトルにおいて線幅が回転数によって変化することは通常よく観測されることであるが、シフト値が回転数に依存することは無いと信じられている。上記に示した現象は、双極子-双極子相互作用で結合しているスピンの間のスピンドiffusionによって説明することができる。本報告では、観測結果を紹介するとともに、その機構について考察を行なう。

【実験】 試料は市販のものを用いた。

NMRスペクトルは主にブルカー社製MSL400を用いて測定した。測定周波数は 161.98 MHzである。また、磁場依存性の測定のために、日本電子製FX200(測定周波数 80.76 MHz)も用いた。化学シフト値は85% H₃PO₄水溶液を0 ppmと、低磁場側を正として表わした。通常のシングルパルスを用い、水和物に対しては¹H核の双極子デカップリングを行なった。

【結果】 図1にNa₄P₂O₇の³¹P MAS NMRスペクトルを示した。化学シフトの異方性に起因する多くのスピニングサイドバンドが観測される。図1 Aでは、3.0 ppmと2.1 ppmとに2

はやし しげのぶ ・ はやみず きくこ

つのセンターピークが観測される。一方、試料の回転数を2.51 kHzに下げると、センターピークは一本しか観測されない(図1C)。化学シフト値は2.6 ppmである。図1Bは、図1Aと図1Cの間であり、2つのピークの存在が辛うじてわかる。このように、2つのピークの分裂が回転数に依存している。同様のことが、センターピークばかりではなく、スピニングサイドバンドにおいても見られる。図1Aにおける分裂幅は、0.86 ppm (140 Hz)であり、水溶液中で観測されるP-O-P結合のスカラーカップリング定数(約20 Hz)に比べるとはるかに大きい。X線回折の報告では、 $P_2O_7^{4-}$ の2つの PO_4 ユニットが非等価であることが示されており、NMRで観測された2つのセンターピークは非等価なサイトに帰属することができる。

スペクトルを詳細に検討するために、図2にセンターピークの部分を拡大して示した。回転数の減少にとともに、2つのピークが合体していく様子がわかる。コンピュータシミュレーションによって、スペクトルの分離を行なった。各ピークはガウス型でよく近似できた。分離して得た2つのピークのシフト値の差と平均線幅とを図3に●印でプロットした。回転数の減少にとともに、シフト値の差が減少し、線幅が増加している。

同様の測定を約半分の磁場強度(80.76 MHz)で行なった。この低い磁場強度では、回転数を4.60 kHzまであげても2つのピークは観測されず、2.4 ppmに線幅290 Hzのピークが一本だけ観測された。次に、温度依存性の測定を161.98 MHzで行なった。温度を293Kから353Kまで変化させたが、回転数に対する依存性に変化は見られなかった。

他の無機リン酸塩においても同様の現象が起きるかどうかを調べたところ、 $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ 、 $Ag_4P_2O_7$ 、 $K_4P_2O_7$ 、 $(KPO_3)_n$ で回転数に依存する現象が観測された。いずれも2つの非等価なサイトが存在し、その化学シフト差が3 ppm以下であった。 $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ のスペクトルを図4に示した。回転数が4.01 kHzの時は -1.4 ppmと-2.3 ppmとに2つのピークが観測される。ところが、回転数が2.0 kHzになると一本のピークになってしまう。スペクトル分離を行なうと、各ピークはローレンツ型でよく近似できた。2つのピークの

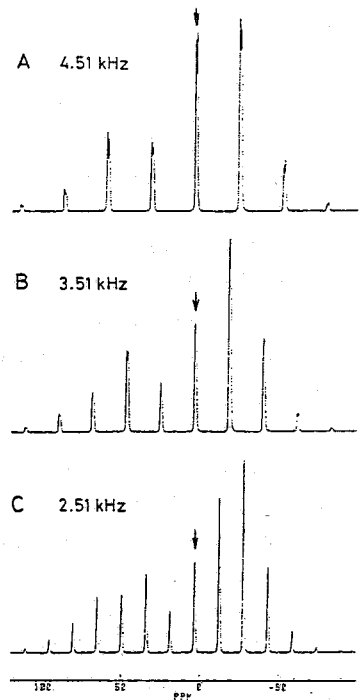


図1. $Na_4P_2O_7$ の ^{31}P MAS NMRスペクトル。161.98 MHzで測定。図中の数字は試料の回転数。矢印がセンターピーク。

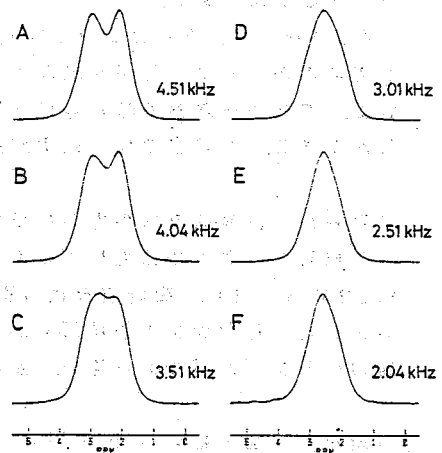


図2. 161.98 MHzで測定した $Na_4P_2O_7$ の ^{31}P MAS NMRスペクトルのセンターピーク。

シフト差及び平均線幅を図3に○印で示した。無水物の場合と傾向は同じであるが、シフト差や線幅の回転数に対する依存度が異なっている。一方、同じピロリン酸塩でも、 $Mg_2P_2O_7 \cdot 3H_2O$ では-5.4 ppmと-11.5 ppmにシグナルが観測され、回転数を変化させてもスペクトルは全く変化しない。

【考察】 以上報告した現象は、回転数を上げることによって双極子相互作用に起因する線幅が減少しピークが分離が良くなったということでは説明しきれない。なぜなら、各ピークの位置、即ち、化学シフトが見かけ上変化しているからである。上記の現象は化学交換している系におけるスペクトルの温度変化に似ている。化学交換の場合、温度の上昇にともなって化学的に非等価なサイトにある化学種間の交換速度が速くなると、スペクトル上2つにわかれていたシグナルが1つになってしまう。今回の現象では、温度の上昇が回転数の減少に対応しているが、温度とは無関係であるから、化学交換そのものでは説明できない。

最も可能性が高い機構は、 ^{31}P スピン間の双極子相互作用を通じたスペクトルスピン拡散である。スピン拡散が化学交換と同じような現象を引き起こしていると考えられる。スピン拡散の速度は試料の回転数に依存している。化学交換との類推から、化学シフト差が $\Delta\delta$ である時2つのシグナルが一本になるためにはスピン拡散速度が $\Delta\delta/\sqrt{2}$ より速くなる必要がある。逆に、マジック角回転法で2つのシグナルを分離するためにはスピン拡散速度を $\Delta\delta/\sqrt{2}$ より遅くする必要がある。

スピン拡散は全体のエネルギー量が変わらない過程であり、2つのスピンが同じゼーマンエネルギーを持っている場合、即ち、化学シフト値が等しい場合は問題なく起きる。ところが、今回の場合のように化学シフト値の異なる場合は、エネルギー変化を補償する何らかの機構が介在しないとスピン拡散は起こり得ない。従来、 1H のようなアバダントスピンがエネルギーのバッファーとして働く場合や、回転数がシフト差にちょうど一致してスピニングサイドバンドと重なる場合のスピン拡散は報告されているが、今回の系ではそのよう

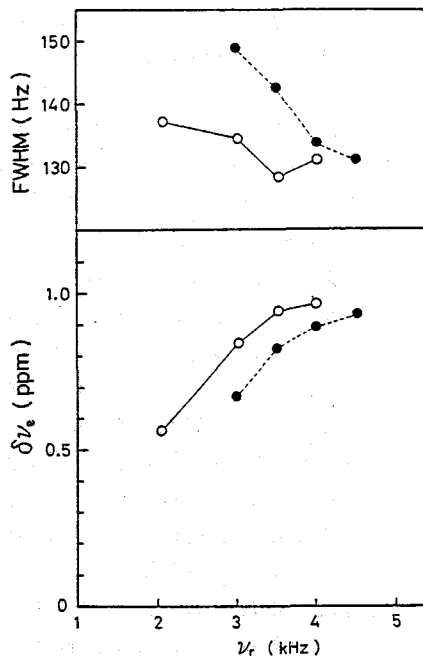


図3. $Na_4P_2O_7$ (●) と $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ (○) のセンターピークのシフト差と平均線幅の回転数依存性。

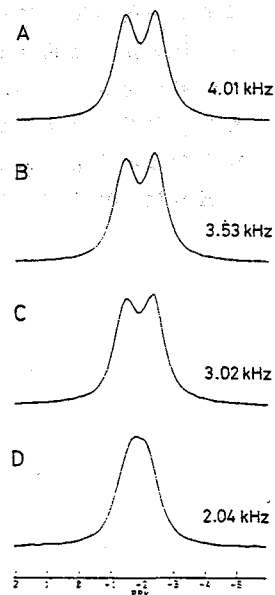


図4. 161.98 MHzで測定した $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ の ^{31}P MAS NMR スペクトルのセンターピーク。

な機構は働いていない。水和物の場合も、 ^1H スピンをデカップリングしており、 ^1H スピンは ^{31}P スピンの間のスピン拡散に何ら寄与していないと考えられる。

無機リン酸塩では、P原子がO原子を介して結合しており、 ^{31}P 間の双極子結合はリン酸塩によらずほぼ一定である。結晶構造から計算すると、スペクトルの半値全幅にして約1.2 kHzの大きさになる。ピロリン酸塩では、化学シフト値の異なる2つの PO_4 ユニットが他のスピンの孤立している。一方、メタリン酸塩では、化学シフト値の異なる2種類の PO_4 ユニットが交互に結合して直鎖を形成している。即ち、スペクトル上に観測される2つのシグナル間には約1.2 kHzの双極子相互作用が働いている。

マジック角回転法は原理的に双極子相互作用を平均化することができる。実際、MASスペクトルの線幅は100~300 Hzであり、上記の双極子相互作用はほぼ平均化されていると考えられる。即ち、スピン拡散がかなり抑制されている。たとえば、 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ではシフト差が大きいため、2つの PO_4 ユニットのシグナルが完全に分離されており、スピン拡散が凍結されている。しかし、化学シフト差の小さい場合は、スピン拡散が必ずしも凍結されない。これらの場合は、2つのピークが部分的に重なることによって、スピン拡散によるエネルギー変化が無くなる。即ち、 ^{31}P の化学シフトの違いがスピン拡散速度を決める重要なファクターとなる。シフト差が小さいほど、スペクトルの重なりが増え、スピン拡散速度が増加する。回転数を減少すると、各成分の線幅が増加しスペクトルの重なりが増加する。すると、スピン拡散速度が増加し、あるところでスペクトル線の合体が起きる。

低磁場にするとHz単位で表わしたシフト差は減少する。双極子相互作用は磁場に依存しないから、Hz単位で表わしたシフト差が重要となる。即ち、低磁場にすると、シフト差が減少しスペクトルの重なりが増加する。すると、スピン拡散速度も増加して、高い磁場では分離していても低磁場では分離できなくなる。このことは、ピーク分離に対する磁場の効果が単に化学シフトのスケールの拡大・縮小だけではないことを示している。

今回の現象は、 ^1H や ^{19}F 核のMAS NMRにおいてはもつと一般的に見られるものと考えられる。化学シフト差が小さいものを分離する場合、双極子相互作用の大きさに匹敵する回転数では不十分であることを今回の結果は示している。

当日は、数式化して定量的な考察を行なう予定である。

(阪大理)

○上田 貴洋・大木 寛・中村 亘男・千原 秀昭

Local structure of NaI-polyethyleneglycol solid electrolyte
 Takahiro UEDA, Hiroshi OHKI, Nobuo NAKAMURA, and Hideaki CHIHARA
 (Osaka University)

^{13}C CP/MAS NMR, ^{23}Na powder NMR and ^{23}Na two dimensional nutation NMR were applied to complexes of NaI with polyethyleneglycol (PEG) and tetraethyleneglycol (TEG) to study the conformation of polyethers and local structure around the Na^+ cations. ^{13}C chemical shift data indicate that the polyether chains assume the gauche conformation in the complexes. ^{23}Na NMR spectrum of TEG-NaI complex gave a broad asymmetric line; simulation of the line shape led to $e^2\text{Qq}/\hbar = 2.6\text{MHz}$ and $\eta = 0.7$. No significant temperature dependence of the line shape was observed between 200K and room temperature. For PEG-NaI complex $e^2\text{Qq}/\hbar$ was found to be smaller than 1MHz from the nutation spectrum. On the basis of the above results, structure models of these compounds will be presented.

緒言

NaI とポリエチレングリコール (PEG) との間で形成される錯化合物はイオン伝導性を有し、高分子電解質として固体膜電極や固体電池等に応用されている。しかしながら、その構造や他の物性に関する研究はまだ、ほとんど行われておらず、IR や Raman スペクトルを中心に伝導機構を説明するためのモデルがいくつか提案されているにすぎない。

本研究では、この高分子固体電解質における Na イオンのまわりの PEG 分子の配位および配列に関するミクロな情報を得るために、Na:O がほぼ 1:4 の錯化合物と PEG のオリゴマーであるテトラエチレングリコール (TEG; $\text{OH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{H}$) と NaI との 1:1 錯化合物を合成し、 ^{23}Na の 2 次元 Nutation NMR と ^{13}C CP/MAS NMR の実験を行った。

実験

PEO-NaI 錯化合物の合成には NaI とポリエチレングリコール #4000 (いずれも半井テスク) を用いた。NaI は真空中 100°C にて 48h 乾燥した。また、PEG についても真空中、室温にて 48h 乾燥した後合成に使用した。錯体は NaI と PEG を、Na:O \approx 1:4 とするようメタノールに溶解し、一昼夜加熱攪拌した後、減圧乾固することにより合成した。一方、TEG-NaI 錯化合物については、テトラエチレングリコールの市販品をそのまま合成に用いた。TEG と NaI を等モルずつ THF に溶解し、加熱攪拌を行った後、冷暗所にて結晶生成を行った。得られた結晶は THF より 2 回再結晶した後、真空中で十分に乾燥し測定に用いた。尚、得られた TEG-NaI 錯体

うえだ たかひろ・おおき ひろし・なかむら のぶお・ちはら ひでおき

の組成は元素分析により C: 27.95% (27.92) H: 5.51% (5.27) I: 36.88% (35.30) (カッコ内の数字は 1:1 錯体に対する計算値) であった。

NMR スペクトルの測定には Bruker-MSL 200 型 NMR スペクトロメーターを用い、粉末試料を用い、 ^{13}C および ^{23}Na 共鳴周波数がそれぞれ 50.323, 52.938 MHz でスペクトルを測定した。また、 ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル測定については試料の spinning rate 3~5 kHz で行った。Chemical shift の外部標準には、 ^{13}C および ^{23}Na に対し、それぞれ TMS (0 ppm), NaI (-3.25 ppm)¹⁾ を用いた。

結果および考察

• ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル

PEG-NaI 錯体の CP/MAS スペクトルおよび PEG の DD/MAS スペクトルを Fig. 1 に示す。

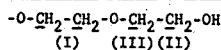
PEG では 2 つのピークが観測され、2 種類のコンホメーションが存在するが、線幅が広く結晶性が悪い。一方、PEG-NaI 錯体では 1 本のシャープなピークが観測された。これから ^{13}C はすべて等価であることがわかる。

一方、Fig. 2 に示した TEG と TEG-NaI 錯体のスペクトルでは、TEG に対し 3 本、錯体に対し 2 本のピークが観測された。末端 OH 基と結合している炭素の chemical shift は TEG と TEG-NaI とともに 58.8 ppm で一致した。このことは錯形成に末端 OH 基は関係していないことを意味する。

得られた chemical shift の値を Table. 1 にまとめた。

Table. 1 ^{13}C chemical shifts of TEG and PEG, complexed with NaI (ppm from TMS)

Sample	I	II	III
PEG (solid)	70.6 64.0	----	----
PEG-NaI	67.2	----	----
PEG (soln.)	69.6	60.6	72.0
TEG-NaI	63.7	58.8	----
TEG (liq.)	66.0	58.8	70.3



I のピークを与える炭素のコンホメーションについてはクラウンエーテルおよび非環状ポリエーテルと CdCl_2 , HgCl_2 との錯体に対する Saito の研究結果²⁾ を参照

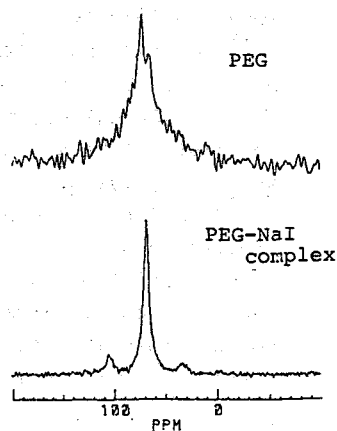


Fig. 1 ^{13}C NMR spectra of PEG and PEG complexed with NaI

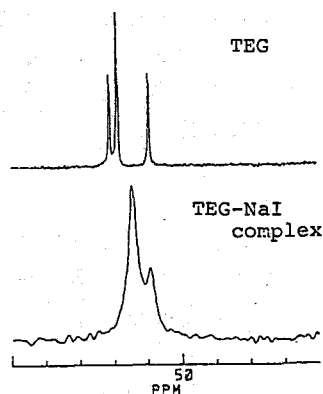
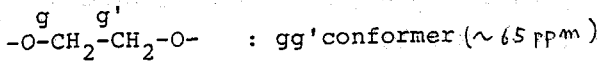
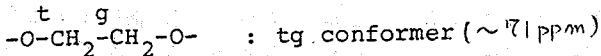


Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of TEG and TEG complexed with NaI

することにより、次のtgおよびgg' conformer に帰属した。



この帰属によれば、PEG-NaI錯体では、すべての結合が gauche 配置をとっていると思われる。また、PEGにおいては tg コンホメーションと gg' コンホメーションとがランダムに混っているため、結晶性が悪くなると考えられる。TEG-NaI錯体に対しては末端CH基に結合している炭素以外はすべて gauche 配置にあるものと思われる。

・²³Na 広幅NMRスペクトルおよび2次元Nutation NMR スペクトル

TEG-NaI錯体について得た²³Na広幅NMRスペクトルをFig.3に示す。核四極相互作用による構造が現れている。

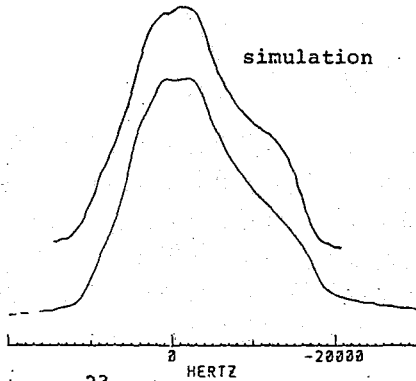


Fig.3 ²³Na NMR spectra of TEG-NaI complex and simulation of the line shape

Simulationによりこの線形を再現することにより e^{2q}/h と η を決定した。その結果 $e^{2q}/h \approx 2.6 \text{ MHz}$, $\eta \approx 0.7$ が得られ、Naイオンは対称性の低い site にあることがわかる。一方、PEG-NaI錯体について得た²³Na広幅NMRスペクトルは、先にGreenbaumにより報告されたスペクトル²⁰⁾同様、ほとんど構造のないピークを与える。したがって、このスペクトルからは e^{2q}/h がゼロであるように思われるが、2次元Nutation NMRの結果、Fig.4に示す通り、小さいながらも有限の e^{2q}/h を有することがわかった。2つの2次元Nutation NMRスペクトルを比較するとPEG-NaI錯体の e^{2q}/h は1 MHz以下であることがわかった。 η については、その値を決定できなかった。

この e^{2q}/h の値よりPEG-NaI錯体において、Naイオンはかなり対称性の高い site にいることがわかる。

・PEG-NaI および TEG-NaI 錯体の局所構造モデル

¹³C および ²³Na NMR測定より得た結果に基づいて、PEG-NaI および TEG-NaI 錯体に対し、Naイオンまわりの局所構造のモ

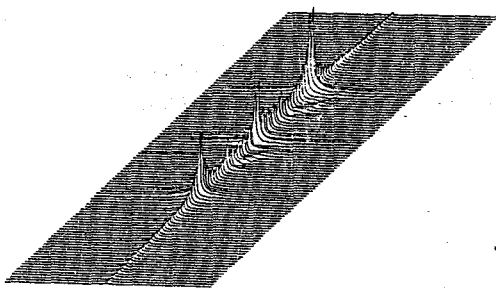


Fig.4 ²³Na two dimensional nutation NMR spectra of PEG-NaI complex

モデルを考えた。¹³C NMR のデータより PEG および TEG は Na イオンとの錯形成によりすべての結合が gauche 配置をとること、また、TEG においては末端の H 基は錯形成に関与しないこと、PEG-NaI 錯体では、Na イオンが対称性の高い位置にいることなどを考慮して、それぞれ次に示すモデルを考えた。

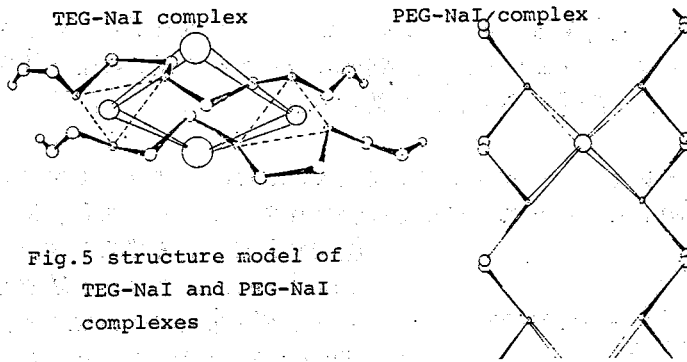


Fig.5 structure model of TEG-NaI and PEG-NaI complexes

PEG-NaI 錯体に関して、Na イオンは4つのエーテル酸素により作られた四面体の中にあることは、これまでに提案されてきたモデルと一致した見方であるが、PEG 鎖のコンホメーションはこれまでに提案されてきた TG TG とは異なっている。エネルギー的には TG TG (すなわち、らせん構造) の方が GG よりもかなり安定ではあるが、おそらくは、錯形成により Na...O の相互作用がこれまでに見積られてきたものよりも強く、この鎖のエネルギー的な不安定さを補い、錯体全体としては安定化されているのではないかと考えられる。

一方、TEG-NaI 錯体では、かなり大きな $e^{2\sigma}/h$ とりをもつことから、1本の TEG 鎖が Na イオンをとりこんだ、いわゆるクラウンエーテル風な構造をとっているのではなく、2本の TEG 鎖と2つの NaI とで錯形成を行っていると思われる。そして、2つの Na イオンに対し、2つのイオンが橋かけをした構造をとっていると考えられる。

References

- 1) S.HAYASHI and K.HAYAMIZU, Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 2429(1989).
- 2) R.TABETA and H.SAITO, Bull. Chem. Soc. Jpn., 58, 3215(1985).
- 3) S.G.GREENBAUM, Solid State Ionics., 15, 259(1985).

寺尾武彦 京大理

High Resolution Solid-State NMR of Quadrupolar Nuclei

Takehiko Terao Kyoto University

A novel method is proposed which allows us to obtain high resolution NMR spectra of quadrupolar nuclei in solids. In this method the second order quadrupolar broadening, which limits the resolution for the central transition in quadrupolar nuclei with half integer spin, is removed by employing evolution at discrete orientations of the spinner axis. Practical applications are demonstrated with ^{23}Na and ^{17}O spectra in some inorganic compounds.

[はじめに]

今日、CPMAS法が普及し、 ^{13}C などの希薄スピンの固体高分解能NMRは容易に行える。また、 ^1H などの豊富スピンのそれはCRAMPS法により可能である。しかし、これらの方法はスピン1が $\frac{1}{2}$ のときのみ有効であり、 $1 > \frac{1}{2}$ の四極子核の線幅はMASを用いても一般に完全には先鋭化されない。これまで四極子核のNMRでは半整数スピンの中央の遷移 ($m = \pm \frac{1}{2}$) が観測されてきた。これは、図1に示すように中央の遷移が1次摂動の範囲内で四極子相互作用の影響を受けないからである。しかし、同図に示されるように2次のシフトが生じ、粉末試料においてはシフトのみならず、線幅を生じることになる。この2次摂動による線幅は図2に示すようにMASを用いても完全には消去されない。マジック角度以外の方向でより線幅が先鋭化されることが知られている (VASS) が、それでもかなりの幅が残り、高分解能スペクトルは得られない。

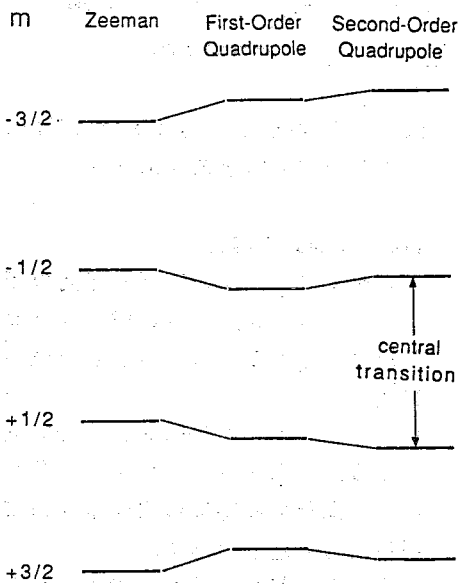


図1 $I=3/2$ の核のゼーマン準位の四極子相互作用による1次と2次のシフト

[†] この予稿は著者が1987年11月から1988年4月までCalifornia大Berkeley校のA. Pines教授の研究室に客員教授として滞在中に参加した研究とそれ以後の同研究室における研究をまとめた論文1～3に基づいており、これらの論文の著者との協同研究によるものです。

てらお たけひこ

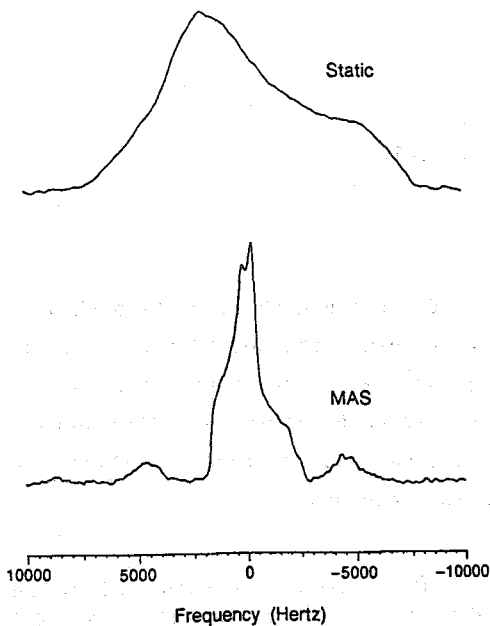


図2 多結晶 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ における ^{23}Na の中央遷位の静止及びMASスペクトル

side bands を与える。

しかるに、2次の四極子相互作用による共鳴周波数の時間平均項は

$$\omega_q = \omega_q^{iso} + Q_2(\alpha, \beta)P_2(\cos \theta) + Q_4(\alpha, \beta)P_4(\cos \theta) \quad (3)$$

となり、もう1つの異方性項が現われる。ここで $P_4(\cos \theta)$ は4次の第一種ルジャンドル関数

$$P_4(\cos \theta) = (35\cos^4 \theta - 30\cos^2 \theta + 3)/8 \quad (4)$$

である。したがって、マジック角度では式(3)の第2項が消えても第3項がきえないのみならず、両項を同時に消去する θ の値は存在しない。これが単純な回転では2次の四極子幅が消えない理由である。

単純な回転では不可能であるならば、回転軸を動かすことによって θ に時間依存性をもたせ、横磁化を推進させる時間にわたる積分値として $P_2(\cos \theta)$ と $P_4(\cos \theta)$ を同時に消去しよう、というのが本研究の考え方である。これには多くの解が考えられるが、ここでは最も単純な解、すなわち θ が不連続な2つの値 θ_1, θ_2 しかとらず、しかも横磁化がこの2つの θ 値を等しい時間経験する場合を考える。この場合は

$$P_2(\cos \theta_1) + P_2(\cos \theta_2) = 0, \quad P_4(\cos \theta_1) + P_4(\cos \theta_2) = 0 \quad (5)$$

となる θ_1, θ_2 を選べば(3)において異方性をもたない第1項のみが残り、高分解能が達成

ここでは、SASSと同様の試料回転軸をフリップさせるテクニックを用いて四極子相互作用の2次摂動による線幅を消去し得ることを明らかにし、実験例として2,3の無機物における ^{23}Na および ^{17}O のスペクトルを示す。¹⁻³

[理論]

試料回転下での化学シフト相互作用による共鳴周波数の時間平均項は

$$\omega_c = \omega_c^{iso} + C(\alpha, \beta)P_2(\cos \theta) \quad (1)$$

と表される。ここで ω_c^{iso} は化学シフトの等方平均値であり、 $C(\alpha, \beta)$ は異方性の寄与で化学シフトテンソルの主軸系と回転軸系との間の変換を表すオイラー角 (α, β) に依存している。後者は粉末試料では一般に大きな線幅を与える。 $P_2(\cos \theta)$ は2次の第一種ルジャンドル関数

$$P_2(\cos \theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2 - 1) \quad (2)$$

であり、 θ は静磁場と回転軸のなす角である。

したがって、 $P_2(\cos \theta)$ を0とするいわゆるマジック角度で式(1)の第2項は消え、等方平均値のみによる高分解能スペクトルが得られることになる。なお共鳴周波数の時間依存項はspinning

される。式(5)の解は $\theta_1 = 37.38^\circ$ 、 $\theta_2 = 79.19^\circ$ で与えられる。

したがって実験は図3に示すように行えばよい。すなわち、角度 θ_1 をなす回転軸の周りに試料を回転させた状態で時間 τ_1 の間、横磁化を時間推進させる。次に角度を θ_2 に切り替える。その間は 90° パルスを用いて磁化を静磁場方向に保持する。その後、再び 90° パルス

を照射し、横磁化を θ_2 方向の回転下で推進させると、 τ_1 後に化学シフトと四極子の異方性による decay が echo として回復する。いろいろな $t_1 = 2\tau_1$ に対して echo の振幅をサンプリングするとそれは両相互作用の等方平均値の和 $\omega_c^{iso} + \omega_q^{iso}$ によって時間推進する。これをフーリエ変換することにより、高分解能スペクトルが得られる。または echo の頂点からの decay を (t_1, t_2) の関数として記録し、2次元フーリエ変換すれば、等方平均値と異方性がそれぞれ ω_1 、 ω_2 軸上に現われる2次元スペクトルが得られる。これらの方法を Dynamic Angle Spinning (DAS) と呼ぶ。

[結果と議論]

測定は400MHzの装置を用いて行った。試料の回転速度は約3KHz、回転軸の切り替えに要する時間は36msである。

図4に多結晶 Na_2SO_4 における ^{23}Na の2次元DASスペクトルを示す。スペクトルの分解能はこの場合、 ^{23}Na 間の双極子相互作用で決まっている。化学的に異なる site がいくつかある場合にはこのような2Dスペクトルによって、個々の powder pattern を分離測定することができる。図5にクリストバル石 (SiO_2) の ^{17}O に対するDASのスペ

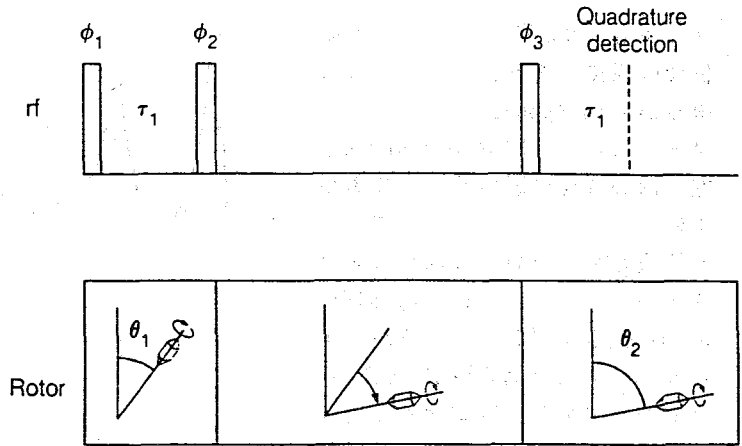


図3 パルス系列と回転軸方向。パルス幅はすべて 90°

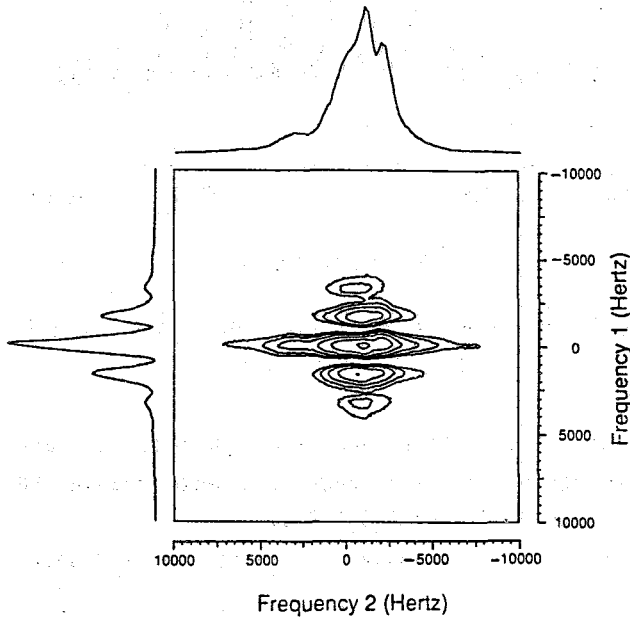


図4 Na_2SO_4 の ^{23}Na の DAS 2次元スペクトル

クトルを示す。等方平均シフトの位置は原点にあり、 H_2O の ^{17}O の共鳴点から14.4ppmだけ低磁場側にシフトしている。MASやoff-angle回転では分解能が悪いうえ、等方平均値はスペクトルのピーク値から直接決定できない。これらのスペクトルにおいて、spinning side bandが数多く現われているが、かなり遅い回転(約3 KHz)を用いているためであり、改善することは容易である。

今後のDASの発展としては、さらに3次以上の四極子幅の除去、他の相互作用への適用など方法論の開発とともに、鉱物、触媒、セラミックス、半導体、酸化物超伝導体、合成・生体高分子などへの応用が考えられる。

[謝辞]

この研究の機会を与えていただいたA. Pines教授(U. C. Berkeley)とその他の多くの共同研究者に感謝致します。

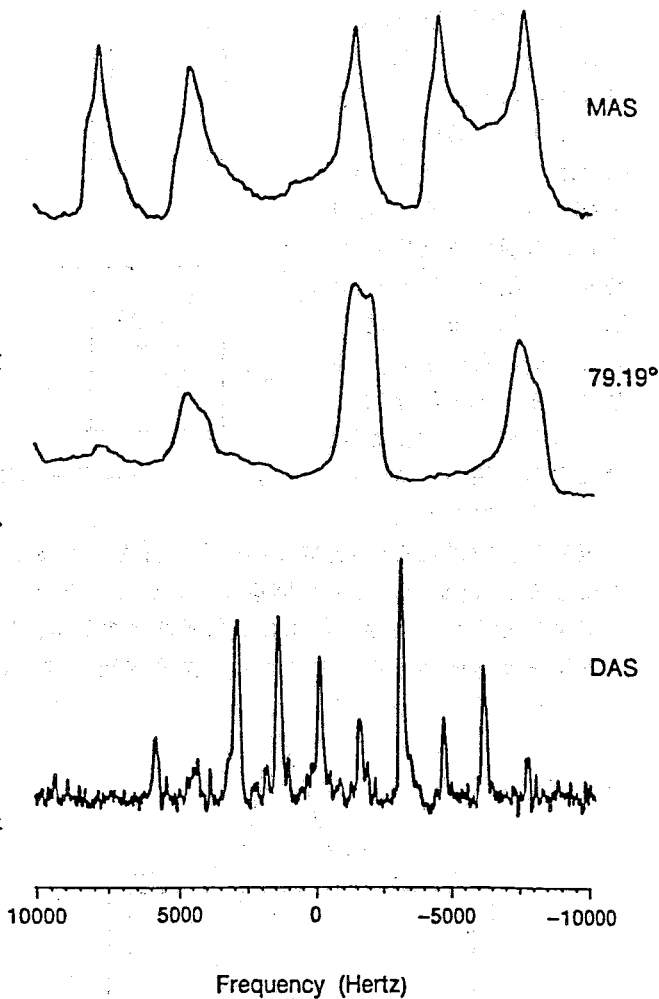


図5 クリソバル石(SiO_2)の ^{17}O のMAS, VASおよび1次元DASスペクトル

[文献]

- (1) G. C. Chingas, C. J. Lee, E. Lippma, K. T. Mueller, A. Pines, A. Samoson, B. Q. Sun, D. Suter, and T. Terao in "Proceedings of the XXIV Congress Ampere, Poznan, 1988" (eds. J. Stankowski, N. Pislewski, and S. Idziak), D62 (1988).
- (2) K. T. Mueller, B. Q. Sun, G. C. Chingas, J. W. Zwanziger, T. Terao, and A. Pines, J. Magn. Reson., in press.
- (3) C. J. Lee, A. Samoson, B. Q. Sun, T. Terao, and A. Pines, Proc. Natl. Acad. Sci., to be published.

(東工大、高知大理*) ○山本泰彦、井上義夫、中條利一郎
鈴木知彦*

DYNAMIC STRUCTURE OF Galeorhinus japonicus MYOGLOBIN AS STUDIED BY TIME-DEPENDENT NOE MEASUREMENTS

Yasuhiko YAMAMOTO, Yoshio INOUE, Riichirō CHŪJŌ, and Tomohiko SUZUKI*

(Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology and

* Department of Biology, Kochi University)

Time-dependent NOE build-up behavior for the α -CH₂ protons of the heme propionate groups has been studied to elucidate their mobility in the active site of the ferric high-spin form of Galeorhinus japonicus myoglobin. A large chemical shift inequivalence of the heme propionate α -CH₂ resonances allows a selective irradiation of a desired resonance by a high-power decoupler pulse in spite of its fast relaxation rate. NOE build-up for a methylene proton resonance upon saturating the other pair proton resonance essentially follows the theoretical prediction derived using the two-spin approximation. The cross-relaxation rates were quantitatively determined and then the correlation-time for the mobility of the internuclear vector connecting the α -CH₂ protons was calculated from the obtained cross-relaxation rate. The values of ~11 ns were obtained for the correlation times of both propionate α -CH₂'s and these values strongly suggest the immobile heme in the active site of this myoglobin.

<はじめに>

¹H - ¹H 核間 NOE は、分子の立体構造研究において距離の関数として解析され、多くの有用な情報を与えている。一方、核 i のシグナルを照射しながら、双極子相互作用する核 j のシグナルに誘起される NOE を観測する場合、観測される NOE の照射時間依存性 (Time-dependent NOE) を既知の核間距離を有する i j 間ベクトル r の運動性に関して解析することにより、分子運動についての情報を得ることができる。そこで、time-dependent NOE を測定することにより、ミオグロビン (Mb) の活性部位であるヘム (図 1) の側鎖のプロピオ

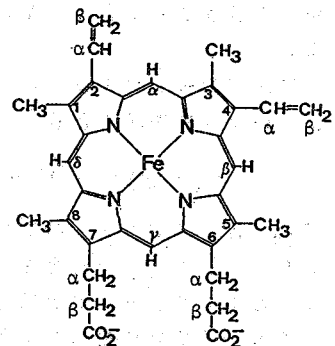


図 1. ヘムの分子構造。

やまもとやすひこ、いのうえよしお、ちゅうじょうりいちろう、すずきともひこ

ン酸基の α -メチレン基の運動性を評価したので報告する。

<方法>

双極子相互作用を持つ ^1H 核の緩和は、次式で示される。

$$\dot{M}_z = R \Delta M_z \quad (1)$$

ここで、 ΔM_z は、 M_z の熱平衡状態からのずれ、 R は緩和行列である。 R の対角要素(ρ_{ii})及び非対角要素(σ_{ij})は、それぞれ対応する核固有のスピン格子緩和速度(intrinsic spin-lattice relaxation rate)及び i, j 核間の交差緩和速度

(cross-relaxation rate)であり、エネルギー準位間の遷移確率に関して次のように表現される。

$$\rho_{ii} = \sum_{j \neq i} (w_0^{ij} + 3w_1^{ij} + 6w_2^{ij}) + \rho^* \quad (2)$$

$$\sigma_{ij} = 6w_2^{ij} - w_0^{ij} \quad (3)$$

$$w_n^{ij} = \frac{\hbar^2 \gamma_i \gamma_j}{10x_{ij}^4} J(n\omega) \quad (4)$$

$$J(n\omega) = \frac{\tau_c}{1 + (n\omega\tau_c)^2} \quad (5)$$

ρ^* は、双極子相互作用以外の緩和機構からの寄与を示し、その他のパラメータは、いつもの意味を持つ。注目しているシグナルの ρ は、そのシグナルに対して選択的にInversion-recovery法(あるいは、Saturation-recovery法)を行うことにより、実験的に測定可能である。

二スピン近似により、time-dependent NOEは、次式のように表現できる。

$$\text{NOE}_i = \frac{\sigma_{ij}}{\rho_{ii}} (1 - e^{-\rho_{ii} T_{\text{IRR}}}) \quad (6)$$

T_{IRR} は、スピン j を照射している時間を示す。式6より、 T_{IRR} を変化させてNOEを測定することにより、 ρ 、 σ を同時に決定することができる。(すでに述べたように ρ は、独立した実験からも決定可能である。)

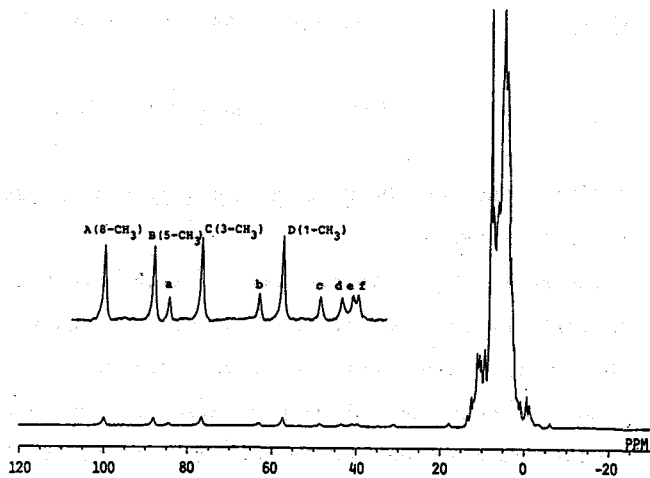


図2. 鉄三価高スピン状態のエイラクブカMbの500 MHz ^1H NMRスペクトル。

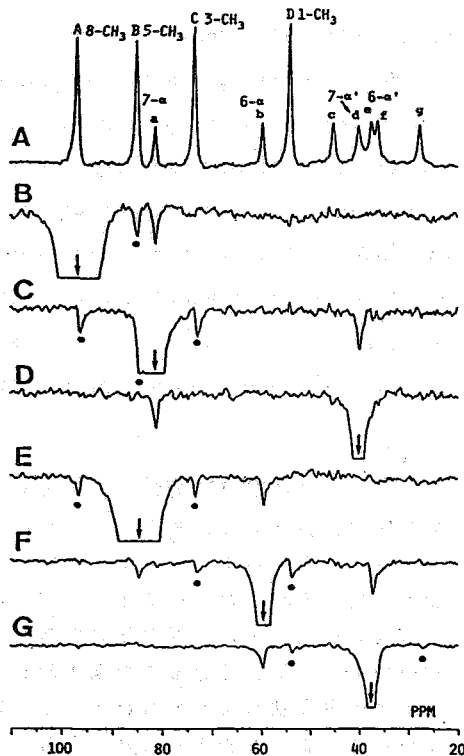


図3. NOE差スペクトル。照射されたシグナル(↓)、●はパワーもれ。

<結果と考察>

鉄三価高スピン状態のエイラクブカHb(35℃、pH7)の500MHz¹H NMRスペクトルを図2に示す。ヘム側鎖のいくつかのプロトンに由来するシグナルが、低磁場に大きく超微細シフトして観測される。ヘムメチルプロトンシグナル(A~D)の帰属については、エイラクブカHbの活性部位の構造が、マッコウジラHbのものと同様であることを示していることから、マッコウジラHbでのシグナル帰属をもとにして、A、8-メチル; B、5-メチル; C、3-メチル; D、1-メチルと決定された。

次に、NOEを用いて6-, 7-プロピオン酸基の α -CH₂プロトンの帰属を行った(図3)。まず、8-メチルのシグナルを照射(20ms)することにより、ピークaにNOEが観測される(図3-B; 8-メチルを照射するために用いたデカップラーパルスの影響もピークaにまで及んでいると考えられるが、5-メチルに対するデカップラーパルスの影響を考慮すると、ピークaに対して明らかにNOEが誘起されていることがわかる。)次に、ピークaを照射することにより、ピークdに約-10%のNOEが観測された(C)。後述のように、これらのプロトンの ρ は、100s⁻¹以上なので、-10%のNOEはプロトン核間距離が、2Å以内でなければ観測されない。したがって、ピークa, dは、7-プロピオン酸基の α -CH₂プロトン(それぞれ、7- α 、7- α')であると帰属できる。また、両シグナル間での大きな化学シフト差は、 α -CH₂がC7-C α 結合に関して自由回転していないことを示している。さらに、8-メチルからのNOEの大きさを比較すると、7- α は、7- α' よりも8-メチルの近くに存在している事がわかる。そして、7- α 、7- α' の化学シフトの差を、ヘム平面上の π -システムよりそれぞれのプロトンにしみ出す不対電子スピン密度の量に関して解析すると7- α -CH₂プロトンのヘム平面に対する配向は、マッコウジラHbでのものと同様に、図4のようになっていると考えられる。同様に5-メチルからの

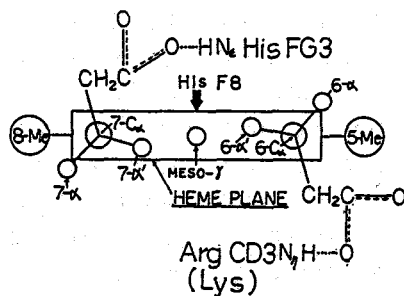


図4. X線により示されたマッコウジラHbでのプロピオン酸基 α -CH₂のコンフォメーション。エイラクブカHbは、Lys CD3を有する。

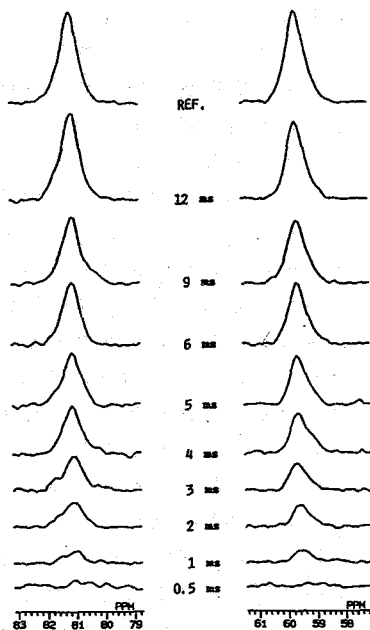


図5. 選択的Saturation-recovery法によるT₁^{int}の測定。
6- α (右) 7- α (左)。

NOEコネクティビティー (E~G) により、6- α 、6- α' のシグナル帰属、そして化学シフトの解析により6- α -CH₂のヘム平面に対する配向も決定された。次に、6- α 、7- α の ρ を実験より求めた。選択的saturation-recovery法をそれぞれのシグナルに適用して得られた一連のスペクトルを図5に示した。飽和されたシグナルの強度は、時間 t に関して指数関数的に回復しており、その時定数($T_1^{int} = \rho^{-1}$)を求めた。 T_1^{int} は、7.7ms(6- α)、6.5ms(7- α)となった。次に、6- α' (または、7- α')に対する T_{IRR} の変化が、6- α (または、7- α)に観測されるNOEの大きさに与える影響を測定した。6- α と6- α' 間のtime-dependent NOEを図6に示した。そして、 T_{IRR} に対して観測されたNOEを図7にプロットした。NOEは、 T_{IRR} と共に増加し、 $T_{IRR} \sim 35$ msではほぼ一定値(6- α 、-12.5%; 7- α 、-15%)に達する結果となった。式6を使って、フィットした結果も同時に示してある。実験値と理論値の良い一致は、ここで対象としている系に対して、二スピン近似の適用が可能であることを示している。

Time-dependent NOEの実験結果より、 σ 値は、 19.5 s^{-1} (6- α -CH₂プロトン間)、 19.2 s^{-1} (7- α -CH₂プロトン間)とそれぞれ求めた。そこで、式3を用いて τ_c 値を計算すると、両方の α -CH₂に対して $\sim 11 \text{ ns}$ となった。 r 線相関スペクトル(Marshall et al., J. Am. Chem. Soc., 102, 1460(1981))により、マッコウクジラHb(濃度 10^{-12} M 、温度 12°C)の τ_c は、 16 ns であることが報告されている。両方のプロピオン酸基の α -CH₂のプロトン核間ベクトルの運動の τ_c 値が、比較的大きく、両者ではほぼ等しい値である事は、ヘム平面の運動が、まわりのタンパク質の全体としての運動と同程度の速さであることを示している。つまり、ヘムは、まわりのタンパク質部分に対して固定されているということがわかる。このように、time-dependent NOEを解析することにより、ヘム近傍のある特定のプロトン核を結ぶベクトルの運動性の定量的評価が可能になる。

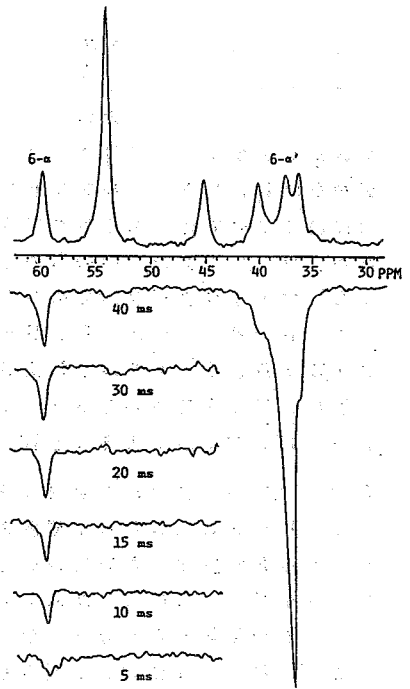


図6. 6- α' に対する T_{IRR} 変化させた時に6- α で観測されるNOE。

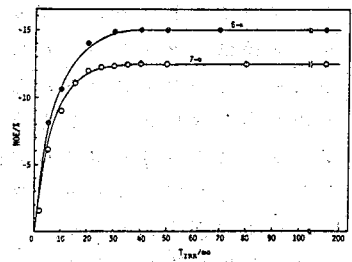


図7. T_{IRR} vs. NOEのプロット。

(京大・工) ○足立 伸一、 森島 績

 ^{15}N -、 ^1H -NMR Study of Tetrazolated Myoglobin
S. Adachi and I. Morishima (Kyoto University)

Addition of cyanogen bromide (BrCN) to aquomet myoglobin (Mb) caused site-specific cyanation of the distal histidyl imidazole NH, as previously reported by us. This distal histidyl N-CN reacted with added azide (N_3^-) to form a N-tetrazole ring by cycloaddition rather than a simple iron-bound azide form, which was confirmed by ^{15}N NMR using ^{15}N -labeled BrCN and azide. The iron-bound distal His linked tetrazole came off from the heme iron upon reduction to the ferrous state and formed a stable CO form. ^1H -NMR and kinetic studies were also performed for the distal His modified Mbs.

1. はじめに ミオグロビン (Mb) は筋肉中に存在し、酸素の貯蔵の働きをするヘム蛋白質であるが、結晶構造がすでに明らかにされており (図1)、また補欠分子に鉄ポルフィリン錯体 (ヘム) を含むために各種分光法を用いることができるという利点がある、ミオグロビンの機能発現に重要である構造因子を明らかにするための多くの研究がなされてきた。特にミオグロビンは酸素を可逆的に吸脱着できるのに対して、活性中心のヘムだけの状態では安定な酸素体ができず、ヘム鉄がすぐに自動酸化されてしまうこと、毒物である一酸化炭素の親和性はヘムだけの状態より、ミオグロビンの方が低くなるがよく知られており、このようなミオグロビンの配位子に対する特異性には活性部位であるヘム鉄の近傍に位置するヒスチジンのイミダゾール基が重要であることが示唆されてきた (図2)。そこで本研究では、次のような方法により、ヒスチジンのイミダゾール基の部位の構造変化が機能の及ぼす効果について検討した。

我々は先に、ミオグロビン (Mb) に臭化シアン (BrCN) を1:1で加えることにより、遠位ヒスチジン (遠位His) の

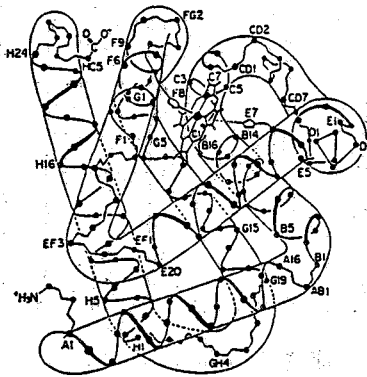


図1 ミオグロビンの結晶構造

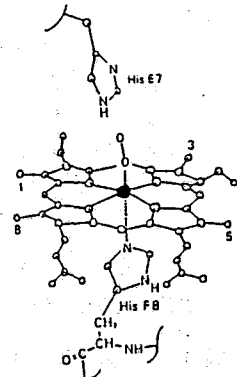


図2 ヘム近傍構造

イミダゾール基が選択的にN-シアノ化されたMb (BrCN-Mb) が生成することを見だし(図3(B))、その構造と配位子結合能について検討してきた。^{1,2)} 今回我々は、このBrCN-Mb(ferric)にアジド(N₃⁻)を1:1で加えた場合、

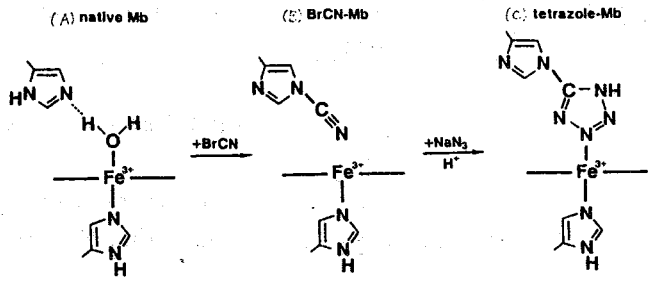


図3 ミオグロビンのBrCN化とテトラゾール化

イミダゾールに結合したN-CN がさらにアジド1分子と環化反応をして、N-テトラゾール化したMb (tetrazole-Mb) が得られることを、¹⁵Nで標識したアジドを用いた¹⁵N-NMRによって明らかにしたので(図3(C))、まずテトラゾール環の生成の証拠となる¹⁵N-NMRスペクトルを示し、さらにtetrazole-Mbについての配位子結合定数の結果と、¹H-NMRから得られたヘム近傍構造の結果から、ヒスチジンのイミダゾール基の部分の構造と機能との関係について考察した。

2. 方法 ミオグロビンにはSigma Type II (Sperm Whale Mb)を用いた。¹⁵Nで標識されたアジド(Na¹⁵N₃)および臭化シアン(Br¹⁵CN)はCambridge Isotope Laboratories社から購入した。MbとBrCNの反応は既報の方法で行った。¹⁾ またテトラゾール化はBrCN-Mbに1.5-2倍量のアジドを加え、室温で約20分間放置した後、余分のアジドをShephadex G-25で除去することにより行った。¹⁵N-NMR、¹H-NMR測定はNicolet NT-300(300MHz)を用いて行った。laser flash photolysisはユニソク社マイクロ秒測光システムを用いて測定及び解析を行った。測定は0.1M K-Phosphate buffer pH7, 20Cで行った。

3. 結果と考察 (1) ¹⁵N-NMRによるテトラゾール化の確認 BrCN-Mb(ferric)にアジドを加えると、その¹H-NMRは典型的な鉄3価低スピン型のスペクトルを示す(図4(A))。その¹H-NMRシグナルの温度変化がキューリー則に従うことから(図4(B))天然Mbのアジド体のようなスピン平衡系ではなく、完全な低スピン状態にあることが分かった。またBrCN-Mbとアジドを加えてできた生成物の赤外吸収スペクトルを測定すると、天然Mbで観測される、鉄に結合したアジドの伸縮振動に由来するピークが観測さ

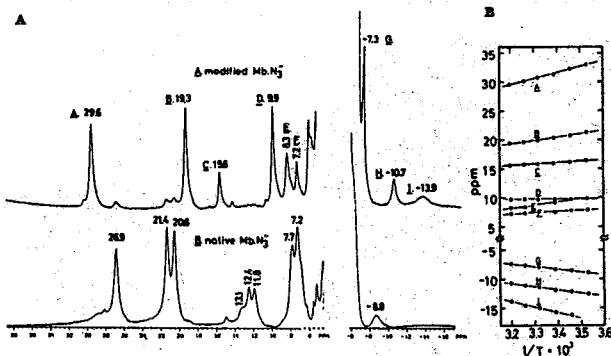


図4 BrCN-Mb + N₃⁻の生成物の¹H-NMR (A上)とそのキューリープロット (B)

れた生成物の赤外吸収スペクトルを測定すると、天然Mbで観測される、鉄に結合したアジドの伸縮振動に由来するピークが観測さ

れないこと、アジドとBrCN-Mbとの解離速度を測定すると、ほとんどゼロであることからBrCN-Mbに結合したアジドはヘムポケット内で反応して別の構造になっていることが示唆されていた。そこでヘムポケット内の配位子構造について知見を得るために ^{15}N で標識したBrCNおよびアジドを用いて ^{15}N -NMRを測定した。図5に、BrCN-Mbと3個のNのうち2個が ^{15}N に標識されたアジド($^{15}\text{N}=\text{N}=\text{N}^-$) (A)、BrCN-Mbと1個のNが標識されたアジド($^{15}\text{N}=\text{N}=\text{N}^-$) (B)、BrCN-Mbと標識されてないアジド (C) がそれぞれ反応した生成物の ^{15}N -NMRスペクトルを示す。native Mbに1つ及び2つのNが標識されたアジドを結合させた場合、鉄に結合したアジドに由来する ^{15}N のシグナルは、Nの位置に対応してそれぞれ2本及び3本観測される。それに対して、tetrazole-Mbではどちらのアジドを使用しても3本のシグナルが45、-106、-366ppmに

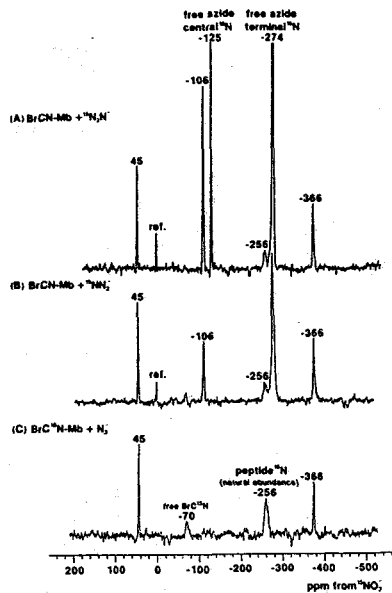


図5 BrCN-Mb + N_3^- の生成物の ^{15}N -NMR

観測され、そのシグナル強度比は ^{15}N が1つの時は1:1:1、2つの時は1:3:1となる。この結果はBrCN-Mbにアジドが配位しているモデルでは解釈できず、BrCN-Mbを用いたtetrazole-Mbの ^{15}N -NMRの結果を合わせて考えると、図6に示した機構によってイミダゾール基がN-テトラゾール化されていることが分かった。

reaction scheme

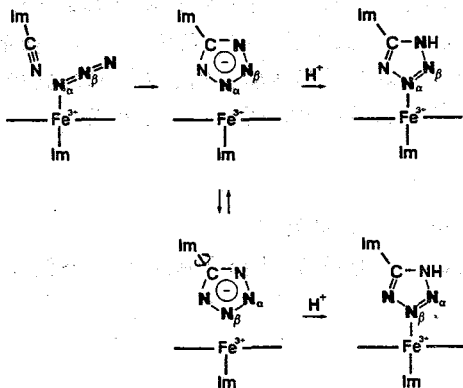


図6 テトラゾール化の反応機構

signal assignment

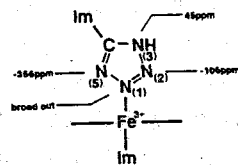


図7 図5の ^{15}N -NMRシグナルのアサインメント

まずヒスチジンのイミダゾール基 (Im) に結合したN-シアノ基とアジドが1,3-dipole additionによって環化し、イミダゾールに結合したテトラゾール環が生成する。このテトラゾール環はイミダゾールとテトラゾールの炭素を結ぶ軸に対して対称なので、この軸に対して回転するとアジドに由来するNは4ヶ所に配置される。4ヶ所のNのうち鉄に直接結合したNは鉄の常磁性によってブロードニングしていると考え、後

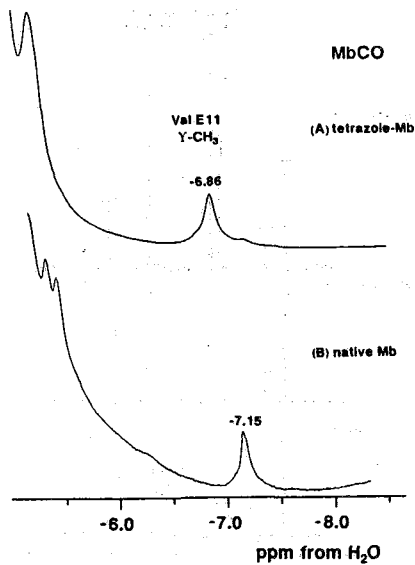


図8 一酸化炭素体の¹H-NMR

	native Mb	tetrazole-Mb
$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	5.0×10^5	7.7×10^6
$k_{off} (s^{-1})$	0.015	0.5

表1 CO結合の速度定数

の3つのNに対応して¹⁵N-NMRシグナルが観測され、¹⁵Nがそれぞれの位置に来る確率とシグナル強度比は一致する。シグナルのアサインを図7に示す。

(2) テトラゾールMbの一酸化炭素体、酸素体の検討 tetrazole-MbはNa₂S₂O₄で還元され鉄2価高スピンのdeoxy体が生成するから、鉄2価ではテトラゾールは鉄に結合していない。このdeoxy体にCOを加えると安定なCO体を得られる。tetrazole-MbのCO体の¹H-NMRを図8に示した。ポルフィリンの環電流効果によってシフトするバリン68

のγ-メチル基のシグナルのシフトが小さくなることから、このメチル基はヘム面から遠ざかり、ヘムポケットが天然Mbよりも広がっていることが予想された。この結果はtetrazole-MbのCO体のNOESYスペクトルからも支持された。一方COの再結合速度(k_{on}) (表1)はtetrazole-Mbでは約10倍になり、外部配位子がヘムに近づきやすくなっていることが分かった。この結果はヘムポケットが広がったMbとして知られているAplysia MbなどのCO結合速度と同様な傾向を示しており、¹H-NMRから得られた結果とよい対応を示した。またtetrazole-Mbでは酸素体はすぐに自動酸化され、安定な酸素体は得られなかった。以上の結果からMbをtetrazole化することによってヒスチジンのイミダゾールに置換基をつけると、Mb本来の配位子特異性がなくなり、ヘムだけの状態と同じように酸素が安定に結合しなくなり、逆に一酸化炭素は結合しやすくなることが明らかとなった。

4. 参考文献

- 1) Shiro, Y.; Morishima, I. Biochemistry 1984, **23**, 4879
- 2) Morishima, I.; Shiro, Y.; Adachi, S.; Yano, Y.; Orii, Y. Biochemistry 1989, in press

チトクロム c₃における
個々のヘムの性質

(横浜国大工、阪大蛋白研¹) ○阿久津秀雄、朴璋洙、范可君、
古市弘、京極好正¹、仁木克己

Properties of each heme in a tetraheme protein, cytochrome c₃

Hideo Akutsu, Jang-Su Park, Ke-jun Fan, Hiroshi Furuichi, Yoshimasa Kyogoku¹ and
Katsumi Niki

Faculty of Engineering, Yokohama National University, Institute for Protein
Research, Osaka University¹

In order to elucidate the biological and physicochemical properties of cytochrome c₃ (*D. vulgaris* Miyazaki), heme methyl signals were partially assigned by NOE measurements. They also allowed us to assign the hemes classified in NMR to particular hemes in the crystal structure. In the light of crystal structure, the chemical shifts of heme methyl signal, redox potentials, spin-lattice relaxation times of heme methyl signals, and the electron transfer rates were discussed for each hemes.

1. はじめに

チトクロム c₃ は分子量約 13,000 のポリペプチド鎖に 4 つのヘムを持つ特異なヘムタンパク質である。これは絶対嫌気性菌である硫酸還元菌のマーカータンパク質で、その酸化還元電位は著しく低い (全体的酸化還元反応の中間点が約 -300 mV)。生体内にあっては硫酸呼吸にカップルする電子伝達に関係している。今までに 6 種類のアミノ酸配列が決定されているが、いずれも 4 つの C 型ヘムの結合サイトを持つことを除いては相同性は低い。これらの蛋白質の等電点は pH 5.2 から 10.5 の間に分布している。結晶構造は *Desulfovibrio desulfuricans*, Norway からのものが 2.8 Å の分解能 (1) で、*Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F からのものが 1.8 Å (2) の分解能で報告されている。チトクロム C₃ はその高いヘム密度の為に特異な物理化学的性質を示すことが知られている。例えば、その固体膜は還元状態で非常に高い伝導性を示す。これらの性質の為に、チトクロム C₃ は生体電子デバイスの材料としても注目を集めている。しかし、チトクロム C₃ の生体内での役割、及びその特異な物理化学的性質を理解する為には、何故 4 つのヘムが存在するのか、個々のヘムはどのような役割を果たしているのかを知らねばならない。本研究においてはこのような目的の下に、精度の高い結晶構造の確立している *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F のチトクロム C₃ を用いて、4 つのヘムの個々の性質を調べた。

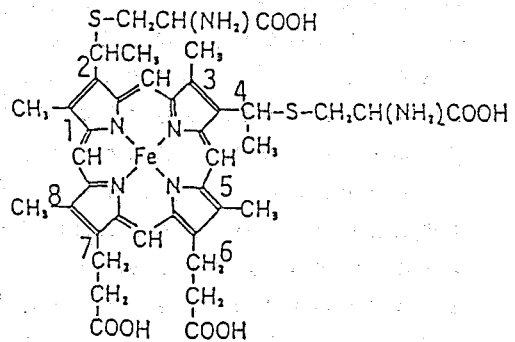


Fig. 1 C 型ヘムの構造

あくつひでお、ばくじゃんすう、はんかくん、ふるいちひろし、きょうごくよしまさ、
にきかつみ

2、NOEによるヘムメチル基の部分的帰属

常磁性のヘムタンパク質においても、ヘム内の1位と8位 (Fig. 1) のメチルの間にNOEが観測されていることがLa Marらにより報告され、幾つかのヘムタンパク質に適用されている(3)。われわれはこの方法をチトクロムC₃に適用した。完全酸化型チトクロムC₃の¹H-NMRスペクトルでは14本のメチルシグナルが低磁場領域に確認され、その還元過程の飽和移動法による解析からTable 1のように4つのヘムにクラス分けされている。ここでヘムメチル基には低磁場側から順番にアルファベットの名がつけられている。アラビア数字は主に還元されていく順番を示している。NMRではこの番号を用いて4つのヘムを区別する。これらのヘムメチル基を完全酸化状態で順次照射していくと、Fig. 2に示すように、AとH、BとF、IとJの間に明確なヘムメチル間のNOEが確認された。Table 1からわかるように、AH間とBF間のNOEは同一ヘム内のものであり、これらが1位あるいは8位のメチルであることを示している。一方、IJ間のNOEは明かにヘム間のものである。チトクロムC₃の結晶構造を調べてみると、ヘム間のメチル炭素の最短距離はヘムIの5位とヘムIVの1位の間で4.17Åである。ここでローマ数字は結晶構造中でのヘムの番号づけを示す。その順に近いものはヘムIIの1位とヘムIIIの5位で5.34Åである。IJ間の強いNOEは明かに前二者の間のものであることを示している。更に、ヘム1ではA、Hが1位、8位であることがわかっているので、Iはこれらであることはできない。従って、IはヘムIの5位に、JはヘムIVに1位に帰属することができる。こうして、ヘム1と3は結晶構造中のそれぞれヘムIとIVであることが明かとなった。これらの帰属の結果をTable 1にまとめた。結晶構造上のヘムと還元順位との対応は、

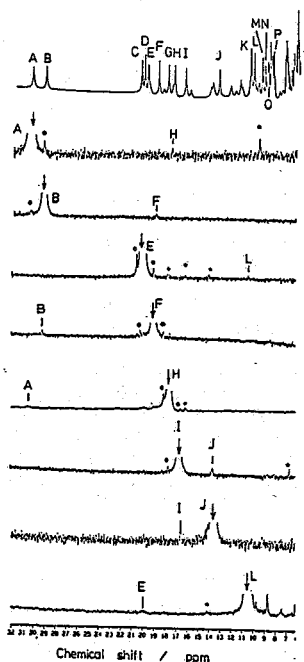


Fig. 2 ヘムメチル基のNOE
差スペクトル
*: パワーの漏れ

Table 1 ヘムメチル基の帰属と性質

order of major reduction	Methyl signals	chemical shift (ppm)	assignment	T ₁ (ms)	Heme number in the crystal
1	A	30.51	8 or 1	51	I
	H	17.53	1 or 8	60	
	I	16.45	5	57	
	K	10.62	3		
2	B	29.31	8 or 1	53	(III)
	F	18.98	1 or 8	80	
	G	18.07	3 or 5	67	
	M	9.62	5 or 3		
3	C	20.51	3 or 5	139	IV
	D	20.24	5 or 3	116	
	J	13.52	1		
4	E	19.90		48	(II)
	L	10.35			
	N	8.47			

(): assigned by flash photolysis

ヘム 1 に関してはわれわれの結果は、*Desulfovibrio desulfuricans*, Norway のチトクロム C₃ における化学修飾による帰属 (4) と一致している。しかし、ヘム 3 に関しては ESR による帰属 (5) と一致していない。最近、われわれは Cusanovich (アリゾナ大) らとの共同で行なった還元過程の速度論的解析と結晶構造の対応により、Table 1 の帰属を確認すると共に、残りの 2 つについても帰属を行なった。それを括弧で示してある。

3、各ヘムの構造と還元順位、及び化学シフト

Fig. 3 にわれわれの見積った各ヘムの微視的酸化還元電位を示す。このように、各ヘムの酸化還元電位はまわりのヘムの酸化状態により変化する。この中で特にヘム 2 と 3 の間では正の相互作用 (ヘム 2 が還元されるとヘム 3 はより還元され易くなる) が存在する。これが -1 電子還元過程と四電子還元過程で、ヘム 4 とヘム 2、3 の酸化還元電位が入れ変わる原因となっている。Table 1 の帰属に

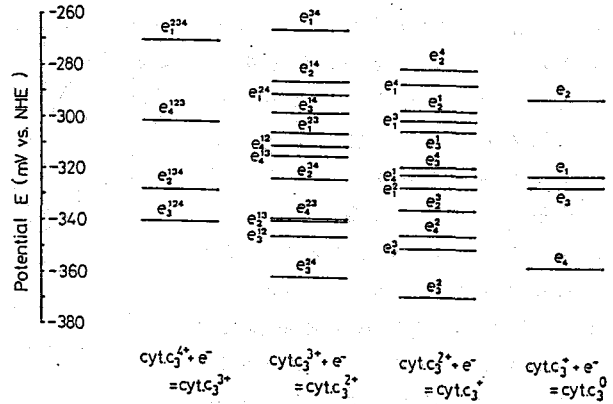


Fig. 3 32個の微視的酸化還元電位のダイアグラム

によるとヘム 2、3 はそれぞれ結晶構造中のヘム III、IV に対応する。この 2 つのヘムは特異な構造を形成していることが知られている。2 つのヘム面はほぼ直角に配位し、中心鉄間の距離は最短である。又、このヘムの間には全てのチトクロム c₃ で保存されているフェニルアラニンが存在し、その芳香環はヘム 3 のポルフィリン環及びヘム 4 に配位している His のイミダゾール環にはほぼ平行に配位している。今回の帰属と微視的酸化還元電位解析の結果は、ヘム 2、3 間の正の相互作用が特異な構造による 2 つのヘム間のカップルによることを強く示唆している。ヘム 1 は最も高い正の電荷密度をまわりにもっており、ヘム 4 は最も溶媒への露出度が高い。

もう一つの興味深い点は、ヘムメチル基の化学シフトとヘムの主な還元順位の間に関連が見られることである。各ヘムの内、一番低磁場に現われるメチルの化学シフトを比較すると、より低磁場で共鳴するもの程早く還元される。更にこれはヘム鉄と 5、6 位配位窒素間の平均距離に対応が見られる。即ち、平均距離が短いもの程、ヘムメチルシグナルの常磁性シフトは大きい。

4、中間状態におけるヘムメチルシフトの pH 依存性

現在われわれは微視的酸化還元電位の pH 変化を調べる目的で、各巨視的酸化状態でのヘムメチルシグナルの化学シフトの pH 依存性を調べている。それを Fig. 4 に示す。この結果はヘム 1 と 2 で各ヘムに属するメチル基に共通した変化が見られる。これらの事実はこの pH の前後で、微視的酸化還元電位に変化が起きていることを示唆する。この 2 つのヘムは結晶構造中ではヘム I、III に当り、両者の共通点はヘム近傍に結晶水を持つことである。このことは水溶液中においても、水分子がここまで入れることを示しており、溶媒

の pH がヘムメチルのシフトに反映する経路になっていると考えられる。微視的酸化還元電位を変えるメカニズムについては現在検討中である。

5、完全酸化状態におけるヘムメチル基のスピン-格子緩和時間

各ヘムの物理化学的性質を調べる一環として、完全酸化状態 45 °C でのヘムメチル基 A-I のスピン格子緩和時間を測定した。その結果を Table 1 に加えてある。ほとんどのメチル基は 50-80 ms の T₁ を示し、顕著な部位依存性はみられなかったが、ヘム 3 (IV) のメチルのみは 100 ms 以上の

長いものと 32 ms の短いものに分かれている。これはヘム 3 (IV) の特異な性質を示すものと考えられるが、今の所、これを説明しうる構造的特徴は結晶構造の中に見られない。

6、個々のヘムの分子間電子移動速度

われわれは、NMR と flash photolysis を用いて、分子間の電子移動速度を調べた。NMR ではヘム間に大きな変化は見られなかったが、flash photolysis ではヘム I が大きな電子移動速度を示した。この差異は速い分子内電子移動と方法論的問題によると考えられる。

7、まとめ

以上の結果は個々のヘムがそれぞれ特徴的な性質をもっており、電子授受において、パートナーの選択を含めてそれぞれ独自の役割を果たしている可能性が示唆された。

謝辞

本研究における NMR の測定の一部にご協力いただいた横山茂之博士 (東大理) 及び日本電子機に深く感謝します。

参考文献

- (1) M. Pierrot, R. Haser, M. Frey, F. Payan and J.R. Astier, *J. Biol. Chem.*, **257**, 14341-14348 (1982)
- (2) Y. Higuchi, M. Kusumi, Y. Matsuura, N. Yasuoka and M. Kakudo, *J. Mol. Biol.*, **172**, 109-139 (1984)
- (3) For example, S. Ramaprasad, R.D. Johnson and G.N. La Mar, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 3632-3635 (1984)
- (4) A. Dolla, C. Cambillan, P. Bianco, J. Haladjan and M. Bruschi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **147**, 818-823 (1987)
- (5) J.P. Gayda, T. Yagi, H. Benosman and P. Bertrand, *FEBS Letters*, **217**, 57-61 (1987)

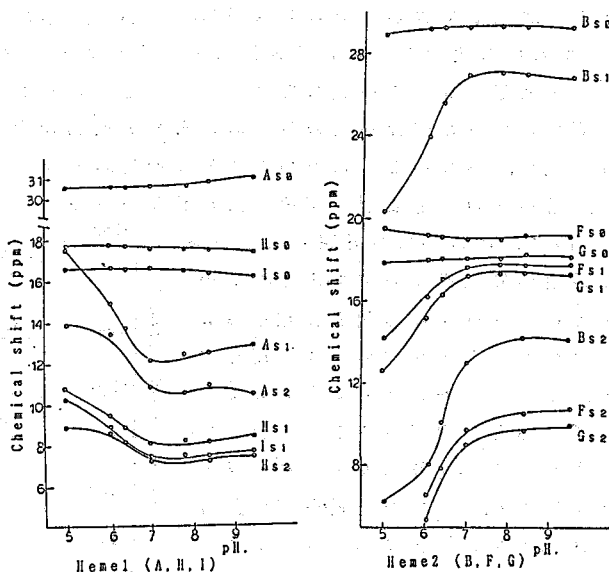


Fig. 4 ヘムメチルシグナルの化学シフトの pH 依存性

^{13}C -標識 FAD を用いて

○藤井 茂、野中 泰樹、岡本 光弘、三浦 洵

(関西医大、阪大医)

^{13}C NMR study on the active site structure of adrenodoxin reductase reconstituted with ^{13}C -enriched FADs

Shigeru Fujii, Yasuki Nonaka*, Mitsuhiro Okamoto*, Retsu Miura

(Kansai Medical University, *Osaka University Medical School)

Adrenodoxin reductase (AdR) from bovine adrenal cortex was reconstituted with FADs which were enriched with ^{13}C at the 2-, 4-, 4a-, and 10a-positions of the isoalloxazine moiety. In free AdR, the ^{13}C -NMR signals of these positions were observed at 160.6, 165.1, 136.6 and 152.4 ppm, respectively. In the complex of AdR with 2',5'-ADP, the chemical shifts of these signals were found to be identical to those in free AdR. In its complex with NADP⁺, however, the signals due to 4- and 10a- ^{13}C shifted to higher fields by 1.9 and 0.7 ppm, respectively, and the 2- ^{13}C signal shifted to a lower field by 1.4 ppm. These results can be interpreted in terms of the flavin-substrate interaction and hence the reaction mechanism of AdR.

フラビン酵素は、非常に広い範囲にわたる酸化還元反応に関与しているが、個々のフラビン酵素に注目すると、その触媒する反応は極めて特異的である。この特異的な反応の制御機構は、タンパク質・フラビン分子・基質間個々の相互作用によっていると考えられる。そこで、我々はこれらの相互作用に注目し、C-13 標識したフラビン分子で再構成した種々の酵素を用いて、基質およびその類似体との結合の結果誘導される、フラビン分子の環境変化を観測し、どのように反応様式が制御されているかを明らかにすることを目的として、実験を行っている。

今回用いたアドレノドキシシン還元酵素 (AdR, EC.1.18.1.2) は、460 個のアミノ酸残基から成り、1 分子あたり 1 分子のフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補酵素に持つ酵素である。この AdR は、副腎皮質におけるステロイドホルモン産生系酵素群の一つで、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (NADPH) からアドレノドキシシンへの電子伝達を行う。我々は、NADP⁺ および 2',5'-ADP との結合による AdR のフラビン環上の電子状態の変化を C-13 NMR により観測した。また、異なった種類の酸化反応を触媒するフラビン酵素である D-アミノ酸酸化酵素および旧黄色酵素について得られている結果との比較を行い、反応制御機構についても考察する。

【実験】 図 1 に示したように、2-, 4-, 4a-, 10a- の炭素をそれぞれ C-13 で標識した 3 種類のリボフラビンを文献記載の方法で化学合成した (●は標識された位置を示す)。

ふじい しげる、のなか やすき、おかもと みつひろ、みうら れつ

これらのリボフラビンから、部分精製した FAD 合成酵素（細菌由来）を用いて C-13 標識された FAD を得た。

AdR は、ウシの副腎皮質からアドレノドキシニアフィニティーカラムを用いて精製した。精製した AdR は、2 M の KBr 溶液での透析により FAD を遊離させた後 C-13 標識 FAD で再構成した。過剰の FAD の除去および重水溶液への置換は、セントリーフロー・コーン CF25 を用いて行った。

C-13 NMR 測定は、Varian XL-200 および JEOL GX-400 を用いて行った。プローブには、Varian XL-200 では 10 mm 多核用プローブを、JEOL GX-400 では 5mm C-13 専用プローブを用いた。測定に用いた酵素は、0.1 M リン酸緩衝液（重水溶液）、pH 7.4 に溶解され、その濃度は、0.2 mM であった。化学シフトは、外部標準として TSP のメチルシグナルを用いた。測定温度は、22~24 °C であった。

【結果と考察】 AdR は、NADP⁺ および 2',5'-ADP とそれぞれ 1 対 1 で結合し、その解離定数はそれぞれ 25 μM および 200 μM であることをすでに P-31 NMR なびに可視分光法で明らかにしてきた。今回、これらの基質類似体との結合による AdR のフラビン分子への影響を観測した。

図 2 に [4,10a-¹³C₂] - FAD で再構成された AdR の C-13 NMR スペクトルを示す。タンパク質の天然存在比 C-13 に由来するアルキルおよびカルボニル炭素のシグナルがそれぞれ 20~80 ppm と 180 ppm 付近に観測された。さらに、152.4, 159.7 および 165.1 ppm に 3 つのシグナルが観測された。このうち 159.7 ppm に観測されるシグナルは、他の C-13 標識 FAD で再構成した AdR においても観測されることより、AdR のアルギニン残基の Cα に由来するシグナルであると考えられる。

152.4 および 165.1 ppm のシグナルの帰属は、遊離の FAD および他のフラビン酵素の化学シフトとの比較から行い、それぞれ図 2 に示したように FAD の 10a および 4 位の炭素に由来するシグナルであると同定した。

図 3 の (a)、(b)、(c) には、それぞれ [2-¹³C], [4a-¹³C], [4;10a-¹³C₂] - FAD で再構成した AdR の 130~170 ppm の範囲の C-13 NMR スペクトルを示す。図に示したように 2, 4, 4a, 10a の炭素のシグナルは、それぞれ 160.6, 165.1, 136.6, 152.4 ppm に観測された。これらの化学シフト値は、遊離の FAD と比較して 2, 4a, 10a の炭素につい

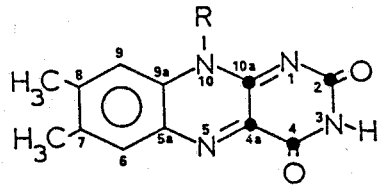


図 1. FAD のフラビン環の構造
●は、C-13 で標識された部位を示す。

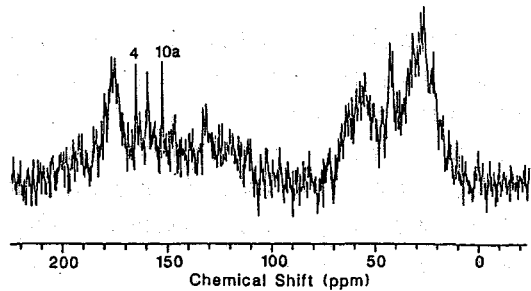


図 2. [4,10a-¹³C₂] - FAD で再構成したアドレノドキシニン還元酵素の 100 MHz C-13 NMR スペクトル

ては、それぞれ 0.4, 0.7, 0.8 ppm 高磁場側に、4位の炭素については 0.3 ppm 低磁場側にシフトしていた。

さらに、AdR と基質結合に伴うフラビン分子上の環境変化を明らかにするために、NADP⁺および 2',5'-ADP との複合体での C-13 NMRスペクトルをそれぞれ測定した。2',5'-ADP との複合体においては、それぞれのシグナルの化学シフトは、遊離の AdR と同じであったが、NADP⁺との複合体形成により、それぞれのシグナルの化学シフトに特異的な変化が、観測された。これらの結果は、フラビン部分の電子状態の変化に、ニコチン酸アミドの部分が大きく関与していることを示している。

図 4 に、[4,10a-¹³C₂] - FAD で再構成した遊離および NADP⁺との複合体形成した AdR の C-13 NMR スペクトルを示す。両者のスペクトルにおいて 159.7 ppm に観測される AdR のアルギニン残基に由来するシグナルはほとんど変化していないが、4位の炭素のシグナルは、165.1 から 163.0 ppm へ、また 10a位の炭素のシグナルは 152.4 から 151.7 ppm へとそれぞれ 1.9 および 0.7 ppm 高磁場側にシフトしている。特に、4位の炭素のシグナルの大きな変化は、NADP⁺との複合体形成に伴い 4位のカルボニル基とタンパク質部分との水素結合が弱められた結果、4位の炭素の電子密度が、相対的に高くなったものと考えられる。

他の 2位および 4a位の炭素のシグナルの複合体形成に伴う変化なども合わせて表 1 に示した。先に示したように 4位のカルボニル基の炭素には NADP⁺との複合体形成に伴う大きな変化が観測されるのであるが、2位のカルボニル基の炭素には変化が観測されなかった。この差異は、これらのカルボニル基、タンパク質部分および基質との水素結合の有無あるいはその結合の強弱を基質と

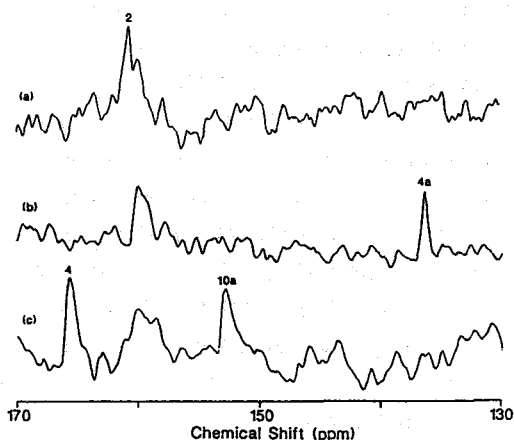


図 3. 種々の C-13 標識した FAD で再構成したアドレノドキシ還元酵素の 50 MHz C-13 NMR スペクトル
(a) [2-¹³C] - FAD で再構成した AdR
(b) [4a-¹³C] - FAD で再構成した AdR
(c) [4,10a-¹³C₂] - FAD で再構成した AdR

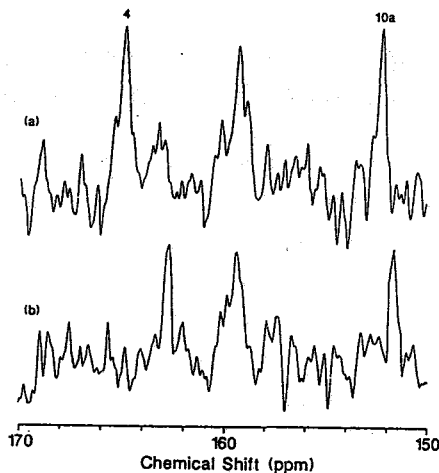


図 4. [4,10a-¹³C₂] - FAD で再構成した AdR の NADP⁺との複合体形成による 100 MHz C-13 NMR スペクトルの変化
(a) AdR
(b) AdR-NADP⁺複合体

の結合で調節することにより、フラビン
 酵素の反応様式を制御していることを
 示唆するものと考えられる。

また、4a位の炭素のシグナルは、 NADP^+
 との複合体形成に伴い、136.6 ppm から
 138.0 ppm へと大きく低磁場側に変化し
 ている。この結果は、酸化酵素である
 D-アミノ酸酸化酵素および旧黄色酵素に
 おける基質などとの結合に伴う 4a位の
 炭素のシグナルの高磁場側へのシフトと
 異なっている。

酸化酵素におけるフラビン分子の 4a位は、
 酸素との反応部位であることを考慮すると、
 4a位の電子密度は酸素との反応を制御する
 重要な因子である。AdR は、酸素を電子受
 容体にはせず、酸素との反応は抑制されて
 いる。AdR- NADP^+ 複合体形成に伴う 4a
 位の炭素シグナルの特異的な変化は、
 酸素との反応性の制御の観点から特に興
 味深い。

なお、反応機構および反応様式の制御
 機構を明らかにしていく上においても、
 還元型 AdR での変化および炭素原子の
 みならず窒素原子における変化も観測す
 ることが重要であると思われるので、
 N-15 標識した FAD で再構成した AdR
 についても今後測定を行う予定である。

最後に、JEOL GX-400 にて測定する
 機会を与えて下さいました京都大学理
 学部放射線化学教室の赤坂一之先生に
 深く感謝の意を表します。

表1. 2',5'-ADP および NADP^+ との複合体形成に伴う
 AdRの FAD C-13 NMR シグナルの化学シフトの変化

	C-13 部位			
	2	4	4a	10a
FAD	161.0	164.8	137.3	153.2
AdR	160.6	165.1	136.6	152.4
ADP-AdR	160.7	165.1	136.5	152.3
NADP^+ -AdR	160.7	163.0	138.0	151.7

L13

^{15}N -HMQC法によるDNA結合タンパク質の構造と相互作用の研究

○白川昌宏、松尾 浩、芹川康治、京極好正（阪大蛋白質研）
吉川 渉（蛋工研）

^{15}N -HMQC Studies of Structure and Interaction of DNA Binding Protein's

M. Shirakawa, H. Matsuo, K. Serikawa, Y. Kyogoku (Institute for Protein Research, Osaka University; W. Yoshikawa (Protein Engineering Research Institute)

HMQC and its modified techniques have been applied to the study of the interaction between λ phage cro protein and DNA. The cro protein and its mutants have been labeled with ^{15}N -Lys, with ^{13}C -Leu and ^{15}N -Lys and uniformly with ^{15}N , and adapted to HMQC, HMQC-COSY and HMQC-NOESY measurements. These spectra enabled the sequential assignments of the amide proton signals of the protein. The complexes of the labeled cro proteins with DNA were also analysed, and the DNA binding surface of the cro protein was figured out.

[序]

近年の遺伝子工学・蛋白質工学の進歩にともない、クローニング技術を用いて従来、大量な調製が不可能であった蛋白質が、大腸菌や酵母で大量に産生させることが出来るようになってきた。さらにこの技術を用いれば、 ^{15}N や ^{13}C によるアミノ酸残基の特異的、或はuniformなラベルも容易になっている。又、近年のHMQC法の開発によって、 ^{15}N 核や ^{13}C 核を、 ^1H 核を通して間接的に検出できるようになったため、 ^1H 核の周波数に対して ^{15}N 核や ^{13}C 核の周波数で2次元に展開でき、感度と共に分離能も飛躍的に向上した。これらの技術の開発と普及により従来解析が極めて困難であった、蛋白質-蛋白質、蛋白質-核酸複合体の複雑なスペクトルから、特定の情報のみを取り出せることが可能となった。今回、我々はこの手法をスファージcro proteinとDNAの相互作用の系に応用した。

[実験]

(1) 試料の調製: スファージcro proteinは、cro遺伝子をtacプロモーター、或はrecAプロモーターを持つ発現ベクターにクローニングする事による大腸菌で大量に調整したものをを用いた⁽¹⁾。GAL4蛋白質のDNA結合ドメインは、GAL4のN末110残基をコードするDNA断片を用いて大量産生系を構築した⁽²⁾。Croの32番目のアミノ酸残基LysをGlnに変えたmutant (Cro KQ32)及び55番目のValをCysに変えたmutant (cro VC55)をコードする遺伝子は、oligonucleotide directed mutagenesis法を利用して作成した⁽³⁾。uniformな ^{15}N labelingは、上記のtacプロモーターをもつベクターを保持する大腸菌株TG1を $^{15}\text{N}\text{H}_4\text{Cl}$ を含むM9最少培地で生育させることで

しらかわ まさひろ、まつお ひろし、せりかわ やすはる、きょうごく よしまさ、よしかわ わたる

調製した。 ^{15}N -Lysラベルは同様に宿主としてJE7543 (F⁻, Lys, ilv, thy, Leu) を用い、 ^{15}N -LysをM9培地に加えた。 ^{13}C -Leu、 ^{15}N -Lysダブルラベリングには、菌株JE5776 (F⁻ lac1103 mal5 lys leu str) を用いた。DNAは化学合成した λ cro proteinの特異的結合部位O_R3の17塩基対、及び大腸菌CRP結合部位22塩基対等を用いた。測定は20mMリン酸カリウム、300mMKCl、pH6.0又はpH5.8溶液中で、蛋白質濃度が、0.75-2.7mMの範囲で行った。

(2) パルスシーケンス: 図1に、通常のHMQC法、1-1パルスを用いたHMQC法⁽⁴⁾、HMQC-COSY法、HMQC-NOESY法⁽⁵⁾のパルスを示す。 ^{15}N のデカップリングには、ホモゲイト・デカップリングの他、より効率の良いGARPパルスを用いた。

Fig. 1.

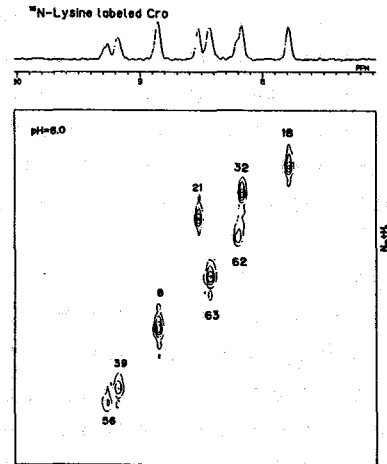
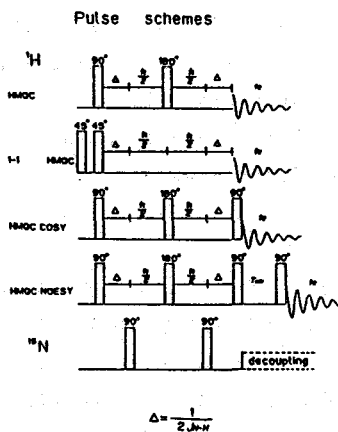


Fig. 2. ^{15}N - ^1H -HMQC Spectrum of ^{15}N -Lys labeled wild cro protein.

[結果と考察]

(1) Cro 及びそのmutantの ^{15}N -Lysラベル

^{15}N -Lysでラベルされたwild croの1-1パルスを用いたHMQCスペクトルを図2に示す。8個あるLys残基全てのアミドプロトンが観測された。これに特異的結合部位であるO_R3 17塩基対DNAを加えると、Lys 32、Lys 39、Lys 56、及びLys 62のシグナルは著しくbroadeningを起こし消失する。原因としては、強い相互作用のため、運動性が著しく抑制されたか、Cro二量体が非等価になり異なる化学シフトを与えるためと思われる。

Cro KQ32は、コンフォメーションはwild typeと同じで、O_R3 DNAへの特異的結合能を失っている。 ^{15}N -Lysラベルされたものの1-1HMQCスペクトルを、図3に示す。wild typeのもの比べて、Lys 32のシグナルがない以外は、他の7つは全く同じ位置にある。帰属法としては今回、このmutantによる解析と共に ^{13}C Leu- ^{15}N Lysダブルラベリングも行った。

^{15}N -LysでラベルしたCro KQ32とO_R3 17塩基対DNAの複合体のスペクトルを図3(a)(b)にfreeのものに並べて表示する。Lys 56、62のシグナルは大きく、Lys 39、Lys 63のシグナルは小さく低磁場シフトしている。これらの残基の位置をcroの結晶構造を元にしたDNA結合のモデルの上にしたのが図4である。croのDNAと接触する”顔”が、浮かび上がっている。新たな知見としては、従来、DNAリジン酸backboneと非特異的に接触していたとされる α 2 helix (残基16-23)が、それ程DNAの近くにないことと、Lys 62は非特異的相互作用の際に、Lys 63は特異的相互作用の際に、DNAと強く相互作用しているという、C末端アーム構造の使い分けが示唆される。

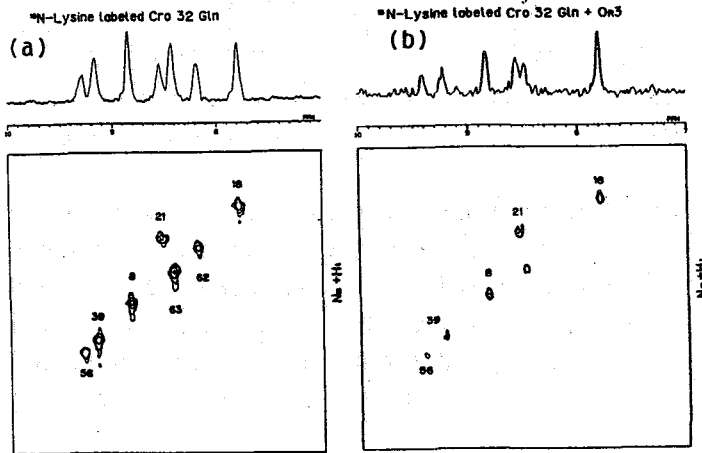


Fig. 3. (a) ^{15}N - ^1H -HMQC spectrum of cro KQ32 mutant.
(b) ^{15}N - ^1H -HMQC spectrum of its complex with the operator DNA

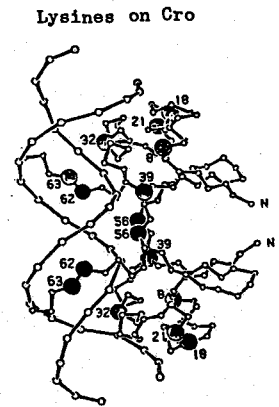


Fig. 4. Location of Lysine residues of λ cro protein.

(2) Cro のuniform ラベル

^{15}N H_2C 1 でuniform ラベルされたCroのHMQCスペクトルを図5(HMQC-NOESY)、図6(HMQC-COSY)に示す。サブユニット当り66残基のほとんどの主鎖アミドプロトンに加え、GlnやAsnの側鎖アミドプロトンが観測されている。LysとArgの側鎖アミノプロトンは、溶媒との交換が速いため検出されなかった。HMQC-COSYでは、50個近くの主鎖 α -プロトンとのクロスピークが検出され、HMQC-NOESYでも多数のクロスピークが観測されている。現在、この2つのスペクトルを使って連続帰属を進行させている。

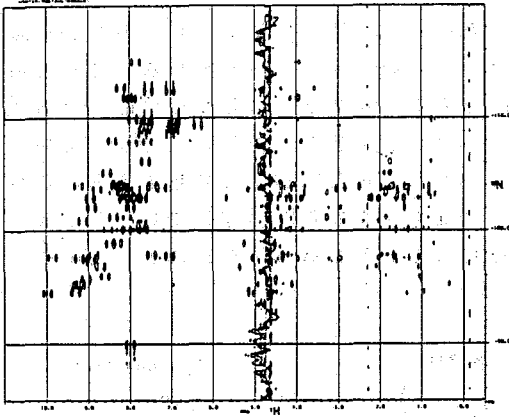


Fig. 5. HMQC-NOESY spectrum of ^{15}N uniformly labeled cro protein.

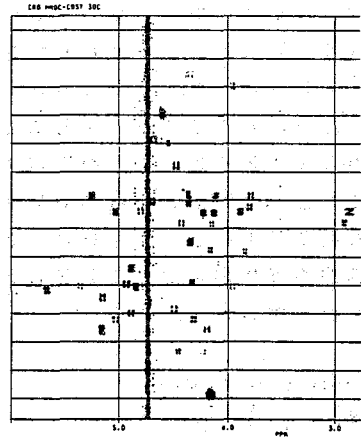


Fig. 6. HMQC-COSY spectrum of ^{15}N uniformly labeled cro protein.

以上、バクテリアで産生出来る蛋白質の局所的な情報を特定のアミノ酸ラベルによって、全体的な情報を uniform ラベルによって、感度・分解能共、優れた条件下で取り出せる事ができた。とりわけ DNA・蛋白質の相互作用のように、生体高分子同士の複合体解析のように一般に非常に複雑で、解析が困難な場合には、蛋白質のシグナルだけを、或はある特定のアミノ酸残基のシグナルだけを効率よく検出できる HMQC 法は有効である。現在解析を進めつつある酵母 GAL4 protein の DNA 結合ドメインについても議論したい。

[文献]

- (1) M. Shirakawa, S. J. Lee, K. Yamamoto, M. Takimoto, H. Akutsu and Y. Kyogoku Structure & Expression, Vol 1, pp167-179, Adenine Press (1988)
- (2) Y. Serikawa, M. Shirakawa, H. Matsuo and Y. Kyogoku, Protein Engineering, 印刷中
- (3) M. Shirakawa, H. Matsuo and Y. Kyogoku, Protein Engineering, 投稿準備中
- (4) V. Sklenak and A. Box, J. Magn. Reson., 74, 469-479 (1987)
- (5) A. M. Gronenborn, A. Bax, P. J. Wingfield and G. M. Clore, FEBS Lett., 243, 93-98 (1989)

L 14

DNA結合タンパク質HUおよびDNA-HU複合体のNMRスペクトル

東薬大 ○ 神藤平三郎、柳田 顕郎、胡桃坂仁志、松本 潮
 京都薬大 加納 康正、今本 文男

NMR Study of DNA binding Protein HU and DNA-HU complex

H. Shindo, A. Yanagida, H. Kurumizaka, U. Matsumoto (Tokyo College of Pharmacy)
 and Y. Kanou, F. Imamoto (Kyoto Pharmaceutical University)

^1H NMR study of HU protein and its complex with oligonucleotide will be presented. There were several lines of evidence that HU protein has a high order structure in solution but it exhibited an equilibration between the structural and somewhat disordered states at 25 C. As for HU-DNA complex, histidine residue^{was} involved in HU binding and HU protein was stabilized while DNA appeared destabilized by the complex formation.

HUタンパク質は大腸菌の核様体に最も豊富に存在する。それは比較的小さい塩基性のタンパク質であり、DNAに非特異的に結合できる。それ故、それは真核細胞中のヒストンタンパク質と同様に、原核細胞の核様体の形成に役割を果たしているものと考えられている。それはまた、部位特異的なDNA組換えやDNA複製などの過程で、促進因子であることも明らかにされている。しかし、その真の機能は特定されておらず、DNAとの複合体の性質についてはいまだ明かでない。

HUタンパク質の ^1H NMRの研究はすでにいくつか報告されているが、その後の進展はほとんど見られていない。その理由は、おそらくHUが溶液中で多量体を形成し、高分子量になること、および演者らの知見では、常温での不安定性にあると思われる。今回演者らは、天然に存在する2種の類似HUタンパク質のうち、HU α に関してその高次構造の安定性およびHU-DNA複合体についてNMRによって検討した。

試料と方法

HU β 非産生株にHU α 産生プラスミドを導入した大腸菌株より、Yaniv と Crois の方法を改良してHU α を得た。細胞質を遠心除去した上清よりDNA-Celloseカラム Sephadex G-100カラム、DEAE-Toyopearlカラムに続いて Affi-gel blue カラムによって精製HU α を得た。得られたHU α は SDS-15%polyacrylamide 電気泳動クロマトにおいて単一のバンドを示した。NMR測定には、凍結乾燥した試料を 0.1M NaCl, 10mM 磷酸緩衝液 (pH 7.5) に溶かし、用希調製した。

^1H NMRの測定には Bruker製 AM-400 および AM-500 装置および Aspec-3000コンピュータを使用した。化学シフトに及ぼす環電流効果を計算するプログラムを作成し、HUタンパク質のフェニル基による磁気遮閉値を見積った。計算には NEC PC-9801 パーソナルコンピュータを使用した。

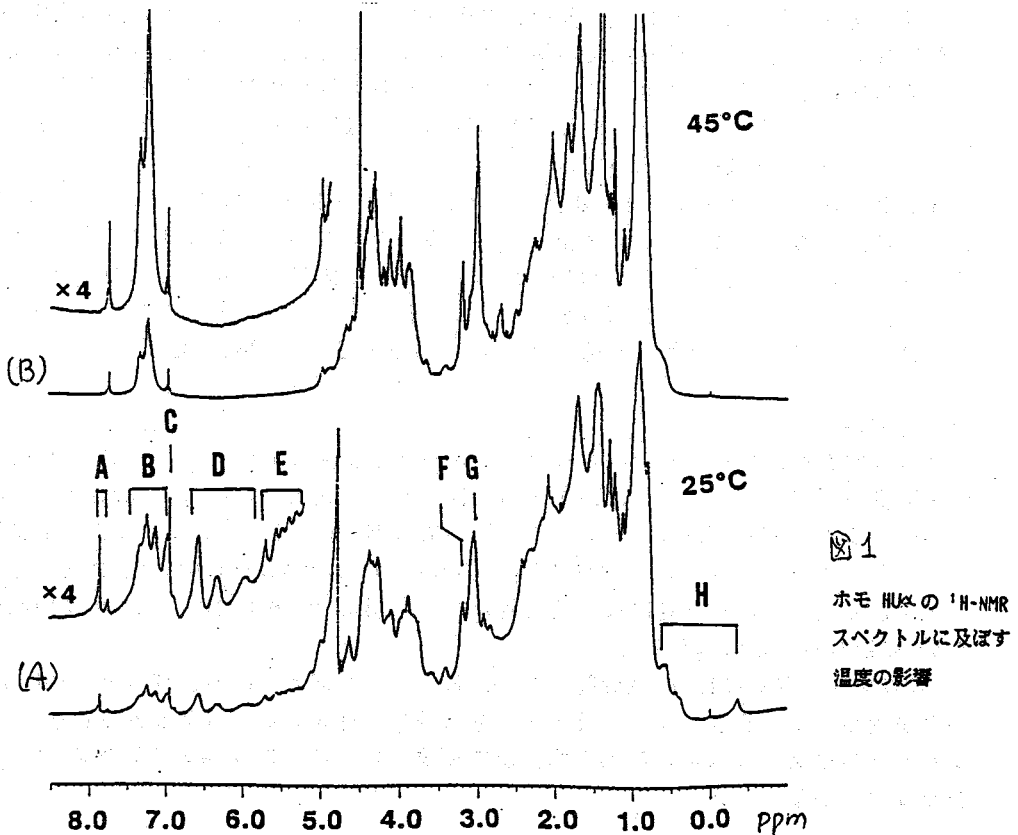
しんどう へいさぶろう、やなぎだ あきお、くるみざか ひとし、まつもと う
 しほ、かのう やすき、いずもと ふみお

結果と考察

1) スペクトルの帰属と高次構造 HU α は90個のアミノ酸残基から成っており、塩基性アミノ酸残基(1 His, 3 Arg, 11 Lys)、酸性アミノ酸残基(3 Asp, 7 Glu)、芳香族アミノ酸残基として1個のHistidineのほかにも3個のPhenylalanineを含む。

図1に2つの異なった温度でのHU α の¹H-NMRスペクトルを示す。HUタンパク質は低分子量(9500 Dalton)であるが、25°Cでは主として4量体として存在するため、各スペクトル線はかなり幅広くなっている。低磁場側より、7.9 ppmに観測される2本のピーク(A)は、そのpH変化より、His C2プロトンに、ピーク(C)はHis C4プロトンに帰属された。BとD領域のスペクトルはPheの環プロトンに帰属される。特に、D群は異常な高磁場シフトを示している。ピーク群Eは β -sheet構造に参与するアミノ酸残基のC α プロトンに由来するものと思われる。FとGは、それらの化学シフト値より、それぞれArg C δ 、Lys C ϵ プロトンに帰属される。ピーク群HはLeuおよびValのメチルプロトンに帰属された。特に、Leu85のメチルプロトンは異常な高磁場シフトを示しており、これはphenyl環による磁気遮蔽効果によるものと思われる。

以上、25°Cのスペクトルからいくつかの注目すべき点が見られる。a) His C2プロト



ンに由来する非等価な2本線が現れたこと、b) Phe 環プロトンに由来するD群のスペクトルが通常的位置(7.0-7.4 ppm)から高磁場側(5.9-6.9 ppm)に異常なシフトを示していること、c) Leuメチルが異常な高磁場シフトを示していること、d) いくつかのC α プロトンが低磁場シフトを示していることである。a)の結果は、HUの溶存状態には2つの状態があること、b)の結果は、Phe同志の重なり合いがあること、c)の結果は、このメチル基とPhe残基のphenyl基とが隣接していることを示す。d)の結果は、 β -sheet構造の存在を示唆している。

温度を25 Cから45 Cに上げると、図1Bから明らかなように、His C2プロトンのピークは高磁場側のピークにすべて移行する。同時に、DとH群のスペクトルは消失する。図2にHis C2プロトン(7.8および7.7 ppm)、Phe芳香環プロトン(6.5 ppm)およびLeuメチルプロトン(-0.3 ppm)のスペクトル相対強度を温度に対してプロットした。いずれも状態間の転位現象を示唆するシグモイダル曲線を示した。その転位中点は、His54に対して36度、PheおよびLeuに対して2度高い38度であった。また、van't Hoffのプロットから得られたエンタルピー変化は、前者に対して181 kJ/mol、後二者に対して210 kJ/molであった。これらの結果は、His45の部位がpheおよびLeu85のそれに比して不安定であることを示唆している。HUタンパク質とホモロジーの高いHBsタンパク質のX線構造によれば、HUタンパク質のHis残基は、いわゆるHBsのArmの部分の位置に対応し、Phe残基は β -sheetのstem部分に、Leu85は α -coreの部分に対応することが分かる。安定性はarm < stem, coreであると考えられるので、NMRの結果はHUとHBsタンパク質の構造上の類似性を示唆している。

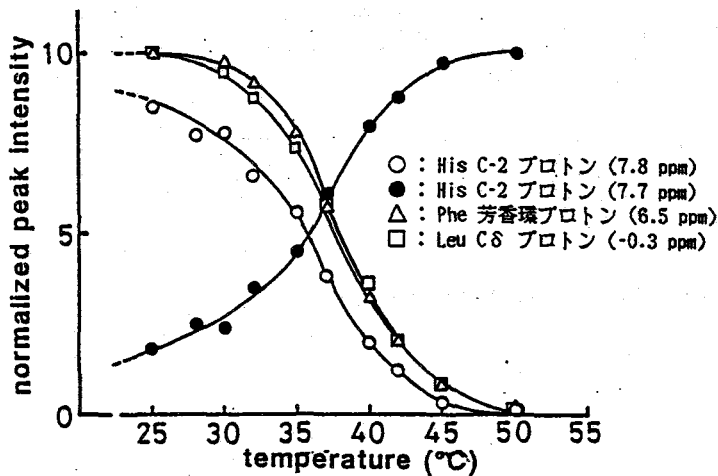


図2
ピーク強度の温度依存性

討論会では、¹H NMRのHU濃度依存性、塩濃度依存性からHUの自己会合性についても報告する。

2) HU-DNA複合体 図3はオリゴDNA、10-mer(CGACTAGTCG)₂ とHUとの複合体のスペクトル (8.5 ppm - 5.0 ppm) である。それぞれ単独のスペクトルとの比較から、HUとDNAとの結合によって、a) DNAに由来するスペクトル線幅が増大する、b) *印で示したように、アデニン C8 プロトンの低磁場シフト、c) ↓印で示したように、His C2 プロトンが低磁場側にシフトする。また、温度変化の実験から、複合体の形成によってHUタンパク質は安定化するが、DNAは不安定になることが分かった。

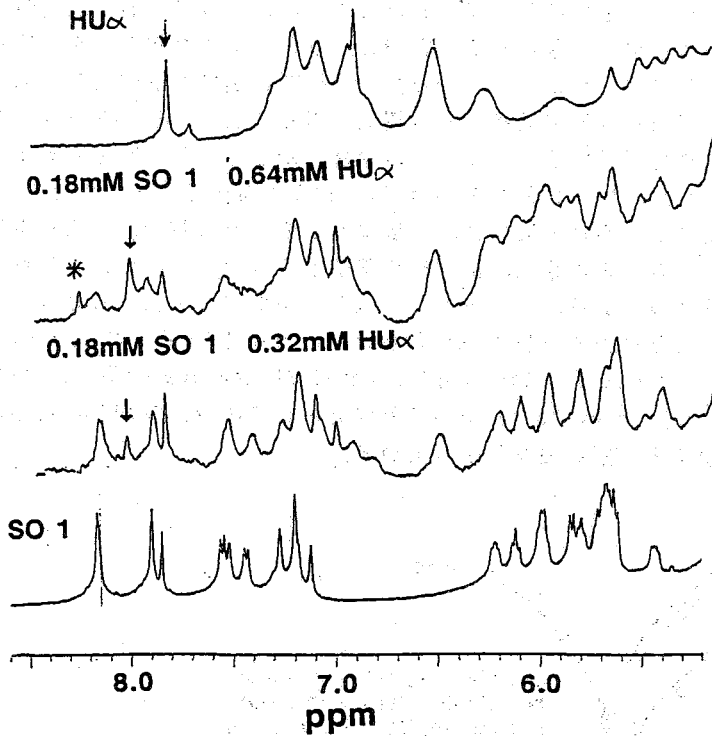


図3 HU α -オリゴ DNA 複合体の ¹H-NMR スペクトル

○山崎俊夫 永山国昭 (日本電子)、中村春木 金谷茂則 (蛋白工学研究所)、好田真由美 (協和発酵工業)

Heteronuclear Three Dimensional NMR of a Protein Labeled with Stable Isotopes

Toshio Yamazaki, Kuniaki Nagayama, (JEOL), Haruki Nakamura, Shigenori Kanaya (Protein Engineering Research Institute), Mayumi Yoshida (Kyowa Hakkō Kogyō)

Recent development in NMR methodology have made it possible to determine structure of smaller proteins (<10kD) in aqueous solution. In order to extend the applicability to larger proteins. We have to overcome the first hurdle, individual and sequential assignment of enormous amount of resonance peaks. Our target is ribonuclease H from *E. coli* which consists of 155 amino acid residues. In this meeting the assignment of backbone atoms will be reported. The most important breakthrough in our experiments has been heteronuclear three dimensional NMR with isotope labeled samples. Pulse sequences and experimental conditions will be discussed in detail.

分子量が大きくなるとそれに比例して共鳴ピークの数が増す。更に共鳴ピークの線幅も分子量の大きな領域では分子量に比例する。分子量 1 万あたりでこの共鳴ピークのオーバーラップのため帰属が困難になってくる。この問題を解決するために新しい次元を導入する。大きく分けて異種核¹⁾と同種核²⁾の 3 次元 NMR があるが、感度の良さと解析の容易さに勝る異種核 3 次元 NMR を用いた。異種核 3 次元 NMR とは従来の ¹H 間の 2 次元 NMR に HMQC を組合せ、2 次元 ¹H スペクトルを更にその ¹H が付いている ¹⁵N または ¹³C のケミカルシフトで展開するものである。基本的には NOESY または TOCSY の前または後ろに HMQC を連ねるものである。

まずバックボーンの配列特異帰属を行う上で、残基内の H_N と H_α の間の J 結合と H_α と次の残基の H_N または H_N と次の残基の H_N の間の NOE による結合が必要になる。これらの情報は COSY または TOCSY と NOESY によって得られるが H_N、H_α のケミカルシフトが重なると可能性がネズミ算式に増えてそのネットワークの中から正しい単結合のシーケンスを見つけることが不可能に陥る。そこでケミカルシフトの重なった H_N、H_α をさらにそれが付いているアミド N、C_α のケミカルシフトで分ける必要がでてくる。リボヌクレアーゼ H は高生産化された *E. coli* によって 1 リットルの培養で約 10 mg 採れる。最小倍地に ¹⁵N H₂C₁ または ¹³C - グルコースを用いることによって均一に 100% ラベルされた ¹⁵N - リボヌクレアーゼ H と ¹³C - リボヌクレアーゼ H 作った。

我々は次の 4 種類の新しい 3 次元 NMR を用いた。

- (1) NOESY - (¹⁵N) HMQC
- (2) TOCSY - (¹⁵N) HMQC
- (3) (¹³C) HMQC - NOESY
- (4) (¹³C) HMQC - TOCSY

詳しくは表を参照。次にその特徴を述べる。共通して比較的短い測定時間で (1~4 日) で感度の高いスペクトルが得られた。全ての実験で Δt シフトディファレンス³⁾を用いて、水からの分散形のシグナルが覆い被さるのを消した。(1)(2)では 1 I エコーを用いた。水の下にあるピークが消される事なく観測できた。(3)(4)では DANTE によるプリサチュレーションによって水を消去した。(3)(4)では ¹³C α を観測領域にとり、t₁ 期にカルボニル ¹³C をデカップルした。¹³C β もかなりデカップルされ、分解能の範囲ではシングレットに近いピークが得られた。(2)(4)のアイソトロピックミクシングでは ROESY 消去付きの MLEV 17⁴⁾を用いた。

水消去の問題：水の消去が不完全な場合、水の分散形のシグナルが観測したいピークに被さってくるが、Δt シフトディファレンスによって消すことができる。Δt 間隔でサンプリングされた j 番目のシグナルを s_j とすると

$$s'_j = s_j - s_{j+1}$$

$$S'(\omega) = FT\{s'; j\}$$

$$S''(\omega) = S'(\omega) \exp(-i\omega \Delta t/2) / (-2i \sin(\Delta t \omega/2))$$

$S''(\omega)$ は ω が 0 に近くない時、水のシグナルに邪魔されないきれいなスペクトルを与える。 $\Delta t/2$ だけ遅れてサンプリングされたと同じ効果になるのであらかじめ $\Delta t/2$ さきにサンプリングしなければならない。

ベースラインの問題：サンプリングの初期時刻はサンプリング間隔の半分にしなければならない。さもないと強いピークのリッジが現われる。これは 3 次元 NMR では t_1 , t_2 に当てはまる。 t_3 はフィルタによる影響があるので次の処方で解決する。

- a) フィルタはベッセルを使う。
- b) ベッセルフィルタによるシグナルの遅延時間は t_d 一定である。4 次ベッセルでは $t_d = 2.1/\omega$ 。

カットオフ周波数 ($\omega_c/2\pi$) は -3 dB になる周波数である。

- c) 最後はエコーパルスを使う。
- d) レシーバのゲートは時間原点より遅延時間以上早く開ける。
- e) サンプリング開始時刻 (t_0) は

$$t_0 = t_d + \Delta t/2$$

にあわせる。 Δt シフトディフアレンスを用いるときは

$$t_0 = t_d$$

にあわせる。

パルス列の問題：一般に 1 I エコーの π パルスに相当する 2 つのパルスは $(x, -x)$, $(y, -y)$, $(-x, x)$, $(-y, y)$ の 4 サイクル回さなければならないが、HMQC の場合は $(x, -x)$, $(y, -y)$ の 2 サイクルでよい。

HMQC 1 I エコーの場合、 1H の Z 磁化を初期状態として次のパルス列を加え、

$$(^1H, x, \pi/2), d, (^1H, -x, \pi/2), \tau/2, (^{15}N, x, \pi/2), t_1/2, (^1H, y, \pi/2), 2d, (^1H, -y, \pi/2), t_1/2, (^{15}N, -x, \pi/2), \tau/2$$

(括弧でくくってあるのはパルス、そうでないのは時間である)

1H の X 磁化を実成分、Y 磁化を虚成分として観測すると

$$\sin^2(\omega d) + (\sin^2(\omega d) - \sin(\omega d)) \exp(i\omega(t_1 + \tau))$$

(次の条件が仮定されている。緩和は無視してある。 $Jd \ll 1$, $J\tau = 2\pi$, $\omega_N = 0$)

次に第 2 のパルス列を加え、

$$(^1H, x, \pi/2), d, (^1H, -x, \pi/2), \tau/2, (^{15}N, x, \pi/2), t_1/2, (^1H, x, \pi/2), 2d, (^1H, -x, \pi/2), t_1/2, (^{15}N, x, \pi/2), \tau/2$$

同様に観測すると

$$-\sin^2(\omega d) + (\sin^2(\omega d) - \sin(\omega d)) \exp(i\omega(t_1 + \tau))$$

2 式の差をとると位相の乱れないシグナルが得られる。

パルス幅有限性の問題： $\pi/2$ パルスのオフレゾナンス効果を考慮にいれないとパルス幅が大きくなるに従って、1 次の位相の補正が必要になってくる。1 次の位相が $-\pi$ からずれるとリッジがでてくる。 $\pi/2$ パルス幅を τ とする。 $\pi/2$ パルスのオフレゾナンス効果を簡単に補正するには、 $(2/\pi)\tau$ の時間が理想的な $\pi/2$ パルスの前後にあるとみなせばよい。例えば、 t_1 の初期値は $(4/\pi)\tau$ だけ少なくすべきである。

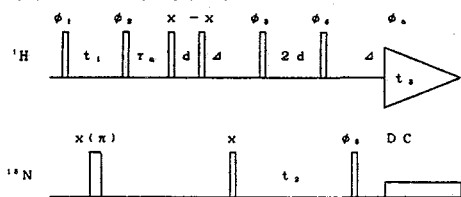
$^1J_{CC}$ 結合の問題：均一に 100% に ^{13}C でラベルされたサンプルの HMQC をとるとカルボニル ^{13}C と $^{13}C \beta$ との間の J 結合により、 $^{13}C \alpha$ は 4 つに分裂する。これは感度の低下、分解能の低下を起こすのでデカップルするべきである。 (^{13}C) HMQC の部分は $^{13}C \alpha$ を観測領域にとり、カルボニル ^{13}C をデカップルしている。 t_1 期の真真中にカルボニル ^{13}C にとって π パルス、 $^{13}C \alpha$ にとって 0 度パルスになるように設定した 1 I パルスの応用を用いた。このパルスはカルボニル ^{13}C のケミカルシフトと同じ強度で $\pi/2$ の $\sqrt{2}$ 倍の幅である。このパルスによりカルボニル ^{13}C は $\pi/2$ 倒れる。その後ちょうど 1 周した時に次のパルスが逆の位相ではいる。それによって反転する。

このパルスは $(x, -x)$ 、 $(y, -y)$ の2サイクルの和。 $^{13}\text{C } \beta$ に対しては $\pi/2$ 程の効果である。 $^{13}\text{C } \alpha$ に対してはパルスの間は $\cos(\sqrt{2}\pi/2)$ 倍の速度で時間が過ぎていく。つまりこの間、約0.6倍の角速度で逆方向に回っている。 t_1 の初期値はその分の補正をしなければならない。

References

- 1) C. Griesinger, O. W. Sørensen and R. R. Ernst, J. Magn. Reson. **73** (1987)
H. Oschkinat, et al. Nature **332** (1988)
- 2) S. W. Fesik, E. R. P. Zuiderweg, J. Magn. Reson. **78** (1988)
D. Marion, et al. J. Am. Chem. Soc. **111** (1989)
- 3) Y. Kuroda, T. Yamazaki, K. Nagayama, J. Magn. Reson. in press.
- 4) C. griesinger, G. Otting, K. Wüthrich and R. R. Ernst, J. Am. Chem. Soc. **110** (1988)
- 5) C. counsell, M. H. Levitt, and R. R. Ernst, J. Magn. Reson. **63** (1985)

(1) NOESY- (^{15}N) HMQC



compound pulses
DC : decoupling by WALTZ16

phase cycling

common

ϕ_2	ϕ_3	ϕ_4	ϕ_5	ϕ_1	ϕ_5	ϕ_1	ϕ_5	ϕ_1	ϕ_5	ϕ_1	ϕ_5
-x	y	-y	x	x	-x	x	-y	y	-x	y	-y
-x	y	-y	-x	x	x	x	y	y	x	y	y
x	y	-y	-x	x	-x	x	-y	y	-x	y	-y
x	y	-y	x	x	x	x	y	y	x	y	y
-x	x	-x	-x	x	-x	x	-y	y	-x	y	-y
-x	x	-x	x	x	x	x	y	y	x	y	y
x	x	-x	x	x	-x	x	-y	y	-x	y	-y
x	x	-x	-x	x	x	x	y	y	x	y	y

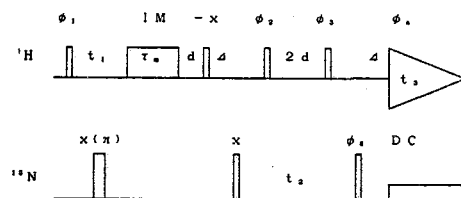
times

- t_1 : running variable of the first dimension (^1H).
- τ_a : mixing time for NOE.
- d : $\omega_0 d = \pi/2$, ($\omega_0/2\pi$) is the most sensitive frequency.
- Δ : $^1J_{\text{NH}} \Delta = \pi$, ($^1J_{\text{NH}}/2\pi$) is the coupling frequency.
- t_2 : running variable of the second dimension (^{15}N).
- t_3 : running variable of the third dimension (^1H).

experimental conditions

- points : $128 \times 32 \times 256$
- width(ppm) : $12 \times 50 \times 15$
- total time : 2 days

(2) TOCSY- (^{15}N) HMQC



compound pulses
DC : decoupling by WALTZ16

IM : isotropic mixing by (spin lock(y), ROESY-free MLEV17(y), spin lock(y))

phase cycling

common

ϕ_2	ϕ_3	ϕ_4	ϕ_1	ϕ_4	ϕ_1	ϕ_4	ϕ_1	ϕ_4	ϕ_1	ϕ_4
y	-y	x	x	-x	x	-y	y	-x	y	-y
y	-y	-x	x	x	x	y	y	x	y	y
x	-x	-x	x	-x	x	-y	y	-x	y	-y
x	-x	x	x	x	x	y	y	x	y	y

times

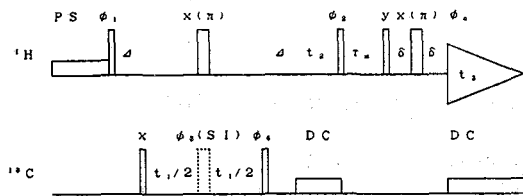
- t_1 : running variable of the first dimension (^1H).
- τ_a : mixing time for total coherence transfer.
- d : $\omega_0 d = \pi/2$, ($\omega_0/2\pi$) is the most sensitive frequency.

experimental conditions

- points : $128 \times 32 \times 256$
- width(ppm) : $12 \times 50 \times 15$
- total time : 1 day

Δ : ${}^1J_{CH}\Delta=\pi$, (${}^1J_{CH}/2\pi$) is the coupling frequency.
 t_2 : running variable of the second dimension (${}^{13}C$).
 t_3 : running variable of the third dimension (1H).

(3) (${}^{13}C$) HMQC-NOESY



compound pulses

PS : presaturation of water magnetization by DANTE
 SI : selective inversion by the following two pulses
 $(\sqrt{2}\pi/2, \phi)$, $d, (\sqrt{2}\pi/2, -\phi)$
 $\omega_c d = 2\pi, (\omega_c/2\pi)$ is offset frequency of carbonyl carbon.
 $\omega_1 = \omega_c, (\omega_1/\gamma_c)$ is strength of r.f. pulses.

DC : decoupling by WALTZ16.

phase cycling

common	RR	RI	IR	II
ϕ_2	ϕ_3	ϕ_4	ϕ_1	ϕ_4
-X	y	x	x	-x
-x	y	-x	x	x
x	y	-x	x	-x
x	y	x	x	x
-x	x	x	x	-x
-x	x	-x	x	x
x	x	-x	x	-x
x	x	x	x	x

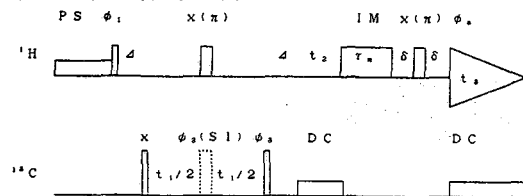
times

Δ : ${}^1J_{CH}\Delta=\pi$, (${}^1J_{CH}/2\pi$) is the coupling frequency.
 t_1 : running variable of the first dimension (${}^{13}C$).
 t_2 : running variable of the second dimension (1H).
 τ_m : mixing time for NOE.
 δ : time longer than filter delay.
 t_3 : running variable of the third dimension (1H).

experimental conditions

points : $64 \times 128 \times 256$
 width(ppm) : $50 \times 12 \times 15$
 total time : 4 days

(4) (${}^{13}C$) HMQC-TOCSY



compound pulses

PS : presaturation of water magnetization by DANTE
 SI : selective inversion by the following two pulses
 $(\sqrt{2}\pi/2, \phi)$, $d, (\sqrt{2}\pi/2, -\phi)$
 $\omega_c d = 2\pi, (\omega_c/2\pi)$ is offset frequency of carbonyl carbon.
 $\omega_1 = \omega_c, (\omega_1/\gamma_c)$ is strength of r.f. pulses.

IM : isotropic mixing by (spin lock(y), ROESY-free MLEV17(y), spin lock(y))

DC : decoupling by WALTZ16.

phase cycling

common	RR	RI	IR	II
ϕ_2	ϕ_3	ϕ_1	ϕ_3	ϕ_1
y	x	x	-x	-y
y	-x	x	x	x
x	x	x	-x	-x
x	-x	x	x	x

times

Δ : ${}^1J_{CH}\Delta=\pi$, (${}^1J_{CH}/2\pi$) is the coupling frequency.
 t_1 : running variable of the first dimension (${}^{13}C$).
 t_2 : running variable of the second dimension (1H).
 τ_m : mixing time for total coherence transfer.
 δ : time longer than filter delay.
 t_3 : running variable of the third dimension (1H).

experimental conditions

points : $64 \times 128 \times 256$
 width(ppm) : $50 \times 12 \times 15$
 total time : 2 days

やまざき としお、ながやま くにあき、なかむら はるき、かなや しげのり、よしだ まゆみ

GDP結合型およびGTP結合型rasタンパク質の高次構造

○伊藤 隆, 山崎和彦, 河合剛太*, 藤田純子, 武藤 裕

西村 暹**, 宮澤辰雄*, 横山茂之

(東大・理, *横浜国大・工, **国立がんセンター)

TERTIARY STRUCTURES OF GDP-BOUND AND GTP-BOUND FORMS OF RAS PROTEIN

Yutaka Ito¹, Kazuhiko Yamasaki¹, Gota Kawai², Junko Fujita¹, Yutaka Muto¹, Susumu Nishimura³, Tatsuo Miyazawa², and Shigeyuki Yokoyama¹ (¹Faculty of Science, University of Tokyo, ²Faculty of Engineering, Yokohama National University, ³Biology Division, National Cancer Center Research Institute) Products of ras gene (ras proteins) are bound with GDP or GTP, and GTP-bound proteins are active while GDP-bound proteins are inactive. The conformations of guanine nucleotides bound to a truncated human c-Ha-ras gene product [ras(1-171) protein] were elucidated; the conformation of bound GDP was the C2'-endo-anti form, while those of bound GTP analogues (GTPγS and GMPPNP) were the C3'-endo-anti form. In the GDP-bound form of ras(1-171) protein, an antiparallel β-sheet which consists of residues 38-44 and residues 51-57 was found. In the GTPγS-bound form, the conformations around Ser-39 and Leu-56 were found to be distorted.

ヒトのras遺伝子は、Ha-ras, Ki-ras, N-rasの3つが知られている。その産物であるrasタンパク質は、細胞の増殖や分化に関与していると考えられており、点突然変異によってがん化を引き起こすことも知られている。rasタンパク質の正常細胞における役割と、点突然変異から細胞がん化にいたるメカニズムを探るために、様々なアプローチから研究が行われてきたが、最近、rasタンパク質の高次構造解析が注目を集めている。

ras遺伝子産物は、アミノ酸189残基からなる分子量約21Kのタンパク質である。GDPあるいはGTPを一分子結合しており、GTPase活性をもつ。またC端に近い186番のシステイン残基にパルミチン酸が結合することにより、細胞膜の内側に局在している。rasタンパク質の作用機構については、図1のようなモデルが立てられている。このモデルによれば、rasタンパク質は結合しているGDPがGTPに交換されることにより活性化され、ターゲットと相互作用する。その結果、自身のGTPase活性が上昇し、結合しているGTPを加水分解して、不活性なGDP結合型に戻る。

このモデルで最も重要と考えられるのは、rasタンパク質の活性が、結合しているグアニンヌクレオチドがGDPであるかGTPであるかによって、厳密に制御されている点である。我々はこの活性制御のメカニズムを解明するために、結合しているグアニンヌクレオチドのコンホメーション、グアニンヌクレオチドの交換により引き起こされるタンパク質側のコンホメーション変化などについて、¹H NMRを用いた解析を行っている(文献1, 2, 3)。今回はこれまでの解析により得られた知見を報告する。

400MHz ¹H NMRの測定は、c-Ha-ras遺伝子産物の

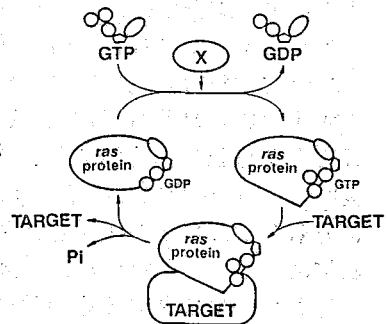


図1 rasタンパク質の作用機構のモデル

いとう ゆたか, やまさき かずひこ, かわい ごうた, ふじた じゅんこ, むとう ゆたかにしむら すずむ, みやざわ たつお, よこやま しげゆき

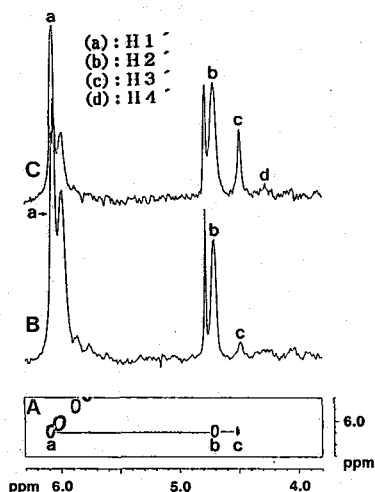


図2 GDP結合型rasタンパク質の
(A) 2D HOHAHA (混合時間 44ms, 37°C)
(B) 1D HOHAHA (混合時間 35ms, 25°C)
(C) 1D HOHAHA (混合時間 71ms, 25°C)
※(B), (C)はリボースのH1' (a)を選択的励起

C端18残基を除いた短鎖rasタンパク質について行った。短鎖rasタンパク質は、完全長rasタンパク質に比べて安定であり、長時間のNMR測定に適している。ras

タンパク質は、合成遺伝子を導入した大腸菌を用いて大量発現させ精製した。精製されたrasタンパク質はGDPを結合しており、さらにD₂O緩衝液(20mM 重水素化トリス, 10mM MgCl₂, 150mM NaCl, pH7.5)に置換して、GDP結合型のrasタンパク質の測定用試料を得た。またGDP結合型のrasタンパク質を、EDTA存在下でGTPの非水解のアナログ(GTPγS, GMPPNP)とインキュベートし、さらにD₂O緩衝液に置換することによりGTP結合型のrasタンパク質の測定用試料を得た。同様の条件で、グアニン環のH8を重水素化したGDPを用い、[8-²H]GDP結合型rasタンパク質の測定用試料を得た。

rasタンパク質に結合しているGDPのコンホメーションは、以下のように決定した。まず1Dおよび2D HOHAHAによって、リボースのH1', H2', H3'およびH4'を帰属した(図2)。続いてGDP結合型rasタンパク質および[8-²H]GDP結合型rasタンパク質について、リボースのH1', H2', H3'のシグナルを0.9秒選択的に照射してNOEを観測し、グアニン環のH8を帰属した。さらにこのH8を照射することによりH5'を帰属した(図3, 図4)(文献1)。

これらの帰属されたGDPの各プロトンの選択的照射による、Time-Dependent NOEの結果を図5に示す。実測値に最も良く適合するGDPのコンホメーションをカーブ・フィッティングによって求めた。最適なGDPのコンホメーションはリボースのパッカリング

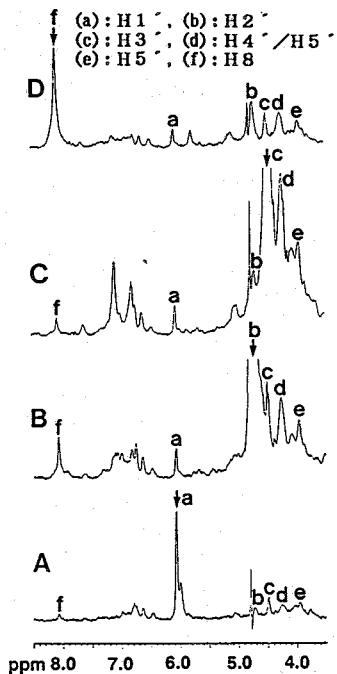


図3 GDP結合型rasタンパク質の
NOE差スペクトル
(0.9秒照射, 25°C)
(A) H1' 照射, (B) H2' 照射
(C) H3' 照射, (D) H8 照射

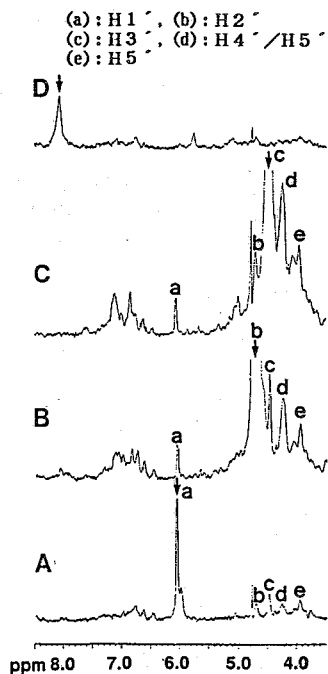


図4 [8-²H]GDP結合型rasタンパク質の
NOE差スペクトル
(0.9秒照射, 25°C)
(A) H1' 照射, (B) H2' 照射
(C) H3' 照射, (D) H8 照射

が C2'-endo, N-グリコシル結合のまわりの回転角が -124° となった (図6)。

rasタンパク質に結合しているGTPのコンホメーションについては, GTP γ S結合型のrasタンパク質, およびGMPPNP結合型のrasタンパク質を用いて, GDP結合型と同様の測定を行った。その結果, リボースのH2', H3'とグアニン環のH8との間の Time-Dependent NOE から, 結合しているGTP γ S, およびGMPPNPは, C3'-endoをとっていることを示唆する結果が得られた。

GTPアナログのコンホメーションについては, 現在定量的な解析を行っているが, グアニンヌクレオチドのコンホメーションが, GDPとGTPで異なることは, rasタンパク質の活性制御を考える意味で極めて興味深い。

ターゲットと相互作用するrasタンパク質の領域 (エフェクター部位) は, 改変体を用いた研究から, 32番から40番のアミノ酸残基付近と推定されている。GDP結合型からGTP結合型に活性化されることにより生じる, このエフェクター部位の構造変化を調べることは極めて重要である。GDP結合型rasタンパク質のX線結晶解析の結果 (文献4) によると, このエフェクター部位は前半はループになっており, 後半は逆平行の β シートに含まれている。逆平行の β シートでは, 対面する β ストランドに存在する α プロトン同士が1残基おきに接近しNOEを生ずることが知られている。図7には, GDP結合型のrasタンパク質のHOHAHA(A), およびNOESY(B)スペクトルを示した。NOESYスペクトルにおいて, 3つの顕著な α プロトン間のクロスピークが存在し, 逆平行 β シートの存在を裏づけている。この3つのクロスピークを生じさせる合計6つの α プロトンのうち, 5.20ppm, 5.65ppmの化学シフトにあるものは, セリン・アスパラギンなどのタイプ, 5.35ppmのものは, グルタミンなどのタイプに分類された。5.88ppmのものは選択的重水素化によりアルギニンであることが確認され, 4.62ppm, 4.94ppmのものは選択的重水素化によりロイシンであることが確認された。図8には, ロイシンの α, β プロトンを選択的重水素化したGDP結合型rasタンパク質の, HOHAHA(A), およびNOESY(B)スペクトルを示した。NOESYスペクトルにおいて, 3つの α プロトン間のクロスピークのうち2つが消失している。以上の結果とrasタンパク質のアミノ酸配列より, この逆平行 β シートは図9に示すアミノ酸

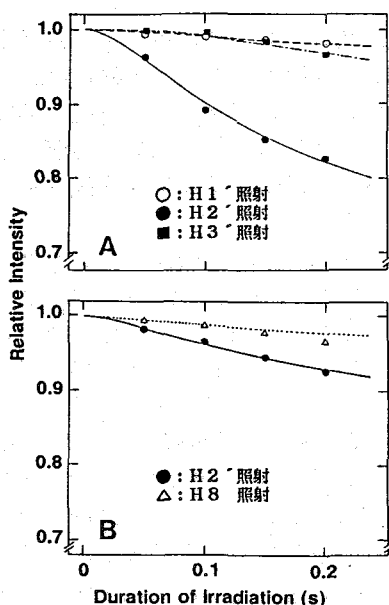


図5 TIME-DEPENDENT NOE (25°C)
(A)H8観測, (B)H1'観測

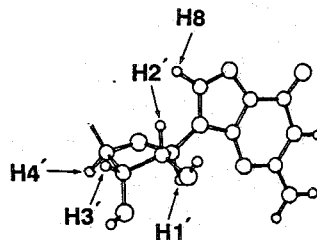


図6 rasタンパク質に結合しているGDPのコンホメーション

残基からなることが確定した(文献3)。この逆平行 β シートの帰属は、最初のGDP結合型rasタンパク質のX線結晶解析(文献4)とは異なるが、最近訂正されたX線結晶解析(文献5)とは一致している。

図10に示したのは、GTP γ S結合型のrasタンパク質のNOESYスペクトルである。図7の3つのクロスピークのうち、4.62ppmと5.65ppmの α プロトン間のクロスピークが消失している。この4.62ppmと5.65ppmの α プロトンは、図9のロイシン-56とセリン-39であり、セリン-39はエフェクター部位に含まれている残基である。このようにヌクレオチドの交換により逆平行 β シートが構造変化を起こすことを示唆する結果が得られ、しかもその構造変化が、活性上重要であるエフェクター部位に起こっていることは極めて重要である(文献3)。

^1H NMRによって明らかになった、GDP、GTPのコンホメーションの差、およびGDP結合型とGTP結合型の間の、セリン-39付近のエフェクター部位の構造の差異は、GMPPNP結合型rasタンパク質のX線結晶解析(文献6)では明らかになっていない。現在これらの構造の差異と活性との関係を、改変体などを用いて検討している。

文献

1. Ha, J.-M. et al. (1989) *Biochemistry* (in press)
2. Hata-Tanaka, A. et al. (1989) *Biochemistry* (in press)
3. Yamasaki, K. et al. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 1054-1062.
4. de Vos, A. M. et al. (1988) *Science* 239, 888-893.
5. Tong, L. et al. (1989) *Science* 245, 244.
6. Pai, E. F. et al. *Nature(London)* (in press)

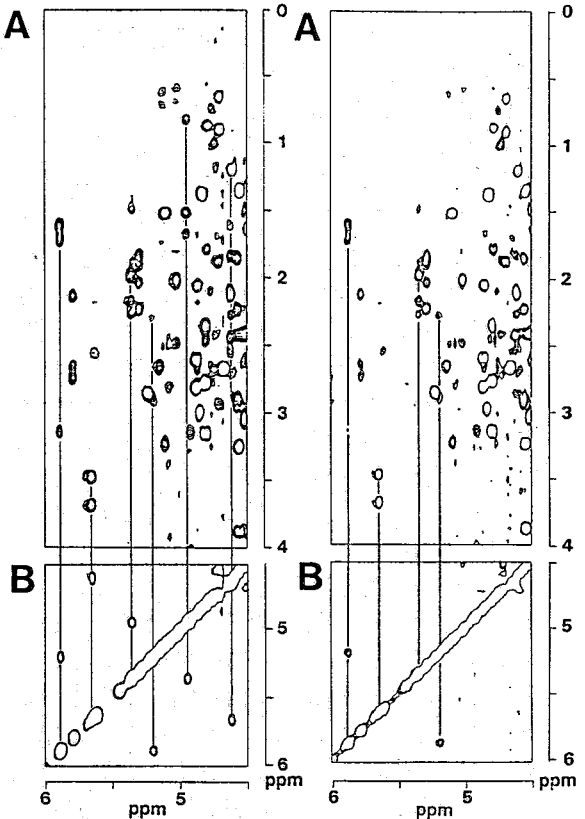


図7 GDP結合型rasタンパク質の
(A)HOHAHAスペクトル
(B)NOESYスペクトル

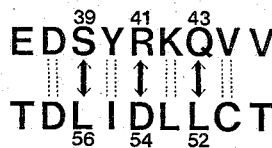


図9 GDP結合型rasタンパク質の
逆平行 β シート構造

図8 Leu残基の α , β プロトンを ^2H 化した
GDP結合型rasタンパク質の
(A)HOHAHAスペクトル
(B)NOESYスペクトル

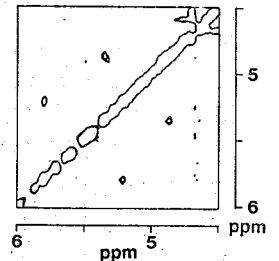


図10 GTP γ S結合型rasタンパク質の
NOESYスペクトル

(都臨床研、東京家政学院大*) 稲垣冬彦、須田亜紀子[†]、嶋田一夫[‡]
 神田大輔、田宮信雄*

Assignments of ^1H and ^{13}C NMR signals and dynamics of erabutoxin b
 Fuyuhiko Inagaki, Akiko Suda[†], Ichio Shimada[‡], Daisuke Kohda
 (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)
 Nobuo Tamiya*
 (Tokyo Kasei Gakuin University)

Almost complete assignments of ^1H NMR resonances were made by sequential resonance assignment method. On the basis of those assignments, ^{13}C NMR resonances were assigned by correlating the chemical shifts of ^1H and ^{13}C NMR resonances. Relaxation time analysis of ^{13}C signals of methyl groups was subsequently made, showing that the methyl groups on the loop part are more mobile. Flexibility of the loop part may be essential for the specific binding of erabutoxin b to acetylcholine receptors.

エラプトキシン b はエラウミヘビの毒腺にふくまれる神経毒タンパク質である。神経接合部において、シナプス後膜に存在するアセチルコリンレセプターに特異的に結合し、神経伝達をブロックする事が知られている。図 1 はエラプトキシン b の一次構造を結晶構造解析より得られた立体構造のスキームのうえに重ねて示したものであり、三本のループ部分とそれらを束ねるコア部分からなる。化学修飾ならびに一次構造上のホモロジーより、中央のループ部分がアセチルコリンレセプターに結合する事が示唆されている (1)。既に稲垣らにより、メチルおよび芳香環シグナルを用いてエラプトキシン b の構造、運動性および機能との関連が研究されてきたが (2-4)、本研究ではこれらの問題を解剖学的な見地より解明することを目的とした。すなわち、プロトンシグナルの帰属を確立し、高次構造上の特徴を明らかにするとともに、プロトン検知による ^{13}C 測定を行い、 ^{13}C

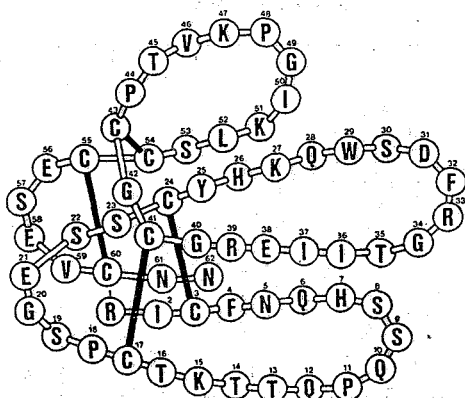


図 1 エラプトキシン b の立体構造 (結晶解析) のスキームと一次構造

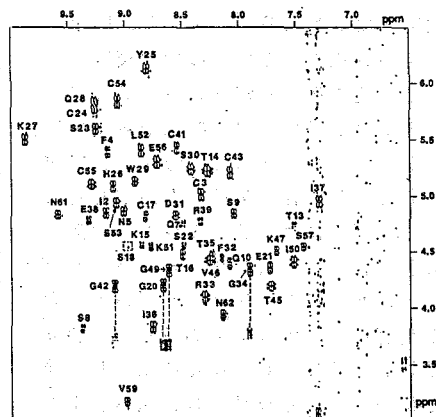


図 2 エラプトキシン b の軽水の DQF-COSY スペクトル (指紋領域)

いながき ふゆひこ、すだ あきこ、しまだ いちお、こうだ だいすけ、たみや のぶお

*現日本電子輸入販売、[†]現東京大学薬学部

シグナルの帰属を確立する。これら帰属の確立した ^{13}C シグナルを用い、エラプトキシンbの運動性の詳細な解析を行う。

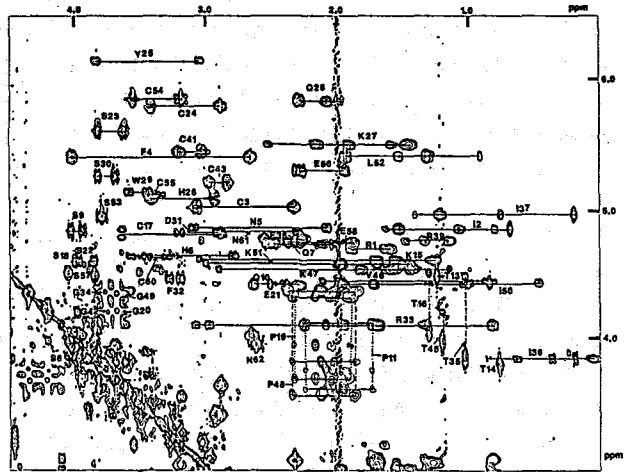
実験

エラプトキシンb、5mM溶液（重水；100% D_2O 、軽水；90% H_2O 、10% D_2O ）をNMR試料として用いた。測定温度は37度C及び50度C、pHは5.5に調整した。測定にはJEOL GX400およびGX500を用いた。DQF-COSY、Relayed DQF-COSY（待ち時間30ms）、HOHAHA（混合時間45ms、85ms）およびNOESY（混合時間80ms、150ms）の測定を純吸収モードにより行った。軽水シグナルのsuppressionにはDANTEパルスおよびスピロックを用いた。プロトン検知による ^{13}C 核の測定は、Wagnerらによるパルス系列を用いて行った。 ^{13}C 核の緩和時間の測定はinversion recovery法によった。

結果

エラプトキシンbの連鎖帰属

Wuthrichらの開発した連鎖帰属法（sequential resonance assignment）に従い、エラプトキシンbのプロトンシグナルの帰属を行った。連鎖帰属は(i) スピン系の同定とアミノ酸タイプへの帰属、(ii) 距離情報に基づくアミノ酸残基の接続の二つのステップよりなる。このうち(i)のステップが完全に行われていることが完全帰属には不可欠となる。図2はエラプトキシンbの軽水におけるDQF-COSYスペクトルのうち指紋領域を示している。軽水シグナルの照射により、軽水近傍のシグナルがブリーチされているが、測定温度をかえることにより、軽水シグナルに重なっていた5個の交差ピークを同定することができた。アミドプロトンと α プロトンの相関を側鎖のプロトンにつなげるには、軽水および重水のHOHAHAスペクトルが有効である。図3はエラプトキシンbの重水のHOHAHAスペクトルのうち α プロトンとアリファティックプロトンとの交差領域を示したものである。アミノ酸タイプに応じて特徴的なスピ系を持つから、HOHAHAスペクトルのパターンよりアミノ酸のタイプ別の帰属を行える。特にリジン残基につい



では α プロトンより ϵ メチレンプロトンまで磁化移動ピークが観測されている。既に化学修飾と組み合わせることにより ϵ メチレンプロトンの帰属は行われているので、これを参照してK15, K27, K47, K51のスピンの帰属を確定した。DQF-COSY, Relayed DQF-COSYのスペクトルの比較も行いアミノ酸のタイプ別の帰属は完了した。次にこれらのアミノ酸をNOEより求められる距離情報に従って接続していく。図4はエラプトキシンbの軽水のNOESYスペクトルのうち、アミドプロトンと α プロトンの交差領域を示したものである。DANTEパルスとスピンロックパルスによる軽水シグナルの suppression により軽水近傍のNOE交差ピークも明瞭に観測されている。dNN, d β Nも考慮し、アミノ酸のタイプを確認しながら最終的にほぼすべてのプロトンの帰属を完了した。図5に連鎖帰属で確認したNOE connectivityをまとめて示す。d α Nで強く結ばれており、エラプトキシンbは β シート構造を取っていることが推定される。

エラプトキシンbの三次構造

連鎖帰属に基づく帰属にしたがい、NOESYの交差ピークの帰属を行った。図6はNOESYスペクトル(重水)の α プロトン領域を示している。 α プロトン間に10個の交差ピークが観測されている。これらのピークは β シートの内側で向かい合った α プロトンに由来するものである。アミドプロトンの交換速度も考慮にいれ、エラプトキシンbには図7に示す β シート構造が含まれていることが明らかとなった。また図8にNOESYの解析より求められた距離マップを示す。結晶構造に基づいて計算した距離マップとよく対応しており、溶液中でも結晶構造と類似した構造をとっている。現在 distance geometry の計算を行い溶液中のエラプトキシンbの構造を検討している。

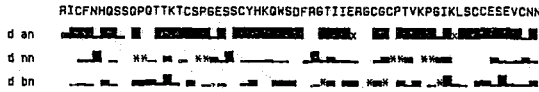


図5 エラプトキシンbのNOESY connectivity

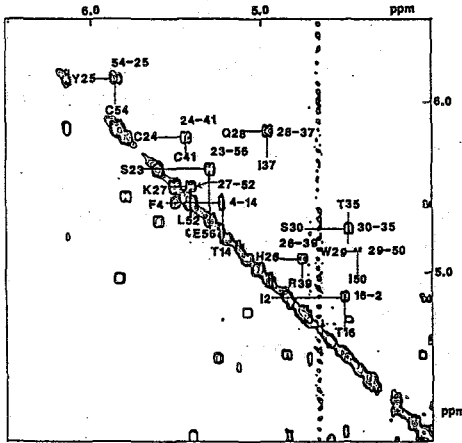


図6 エラプトキシンbの α プロトン領域のNOESYスペクトル

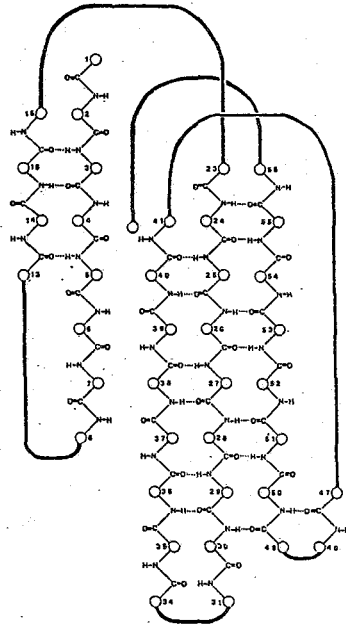


図7 エラプトキシンbに見いだされた β シート構造

¹³Cシグナルの帰属とアミノ酸側鎖の運動性

¹H検知による¹³Cの測定を行い、C-H間のシフト相関より¹³Cの帰属を行った。天然存在比の¹³Cシグナルの測定を行うため、¹²C結合由来のプロトンシグナルの suppression に効率の良いWagnerらのパルス系列を用いて測定を行った(5)。図9はメチルプロトンとメチル炭素との相関領域を示したものであり、プロトンの化学シフトを参照することにより図9に示すように¹³Cシグナルの帰属を行った。次に緩和時間の測定を行い、一次元スペクトルでよく分離したメチルシグナルについて側鎖の内部運動も考慮して緩和時間の解析をおこなった。ループ部分に含まれるI36, I37, I50はコア部分に含まれるI2に比較して大きな振幅を持った内部運動を行っていることが明らかになった(Cβ-Cγ軸周りに±50度以上の振幅)。このことはループ部分が運動性に富み、この運動性がレセプターへの結合を有利にしている事が期待される。現在他の残基についても解析を進めている。

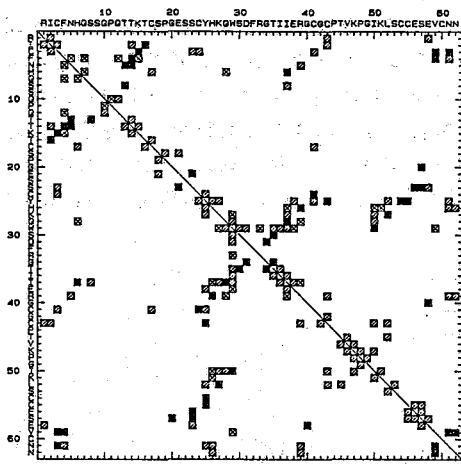


図8 NOESYスペクトルの解析より求めた距離マップ

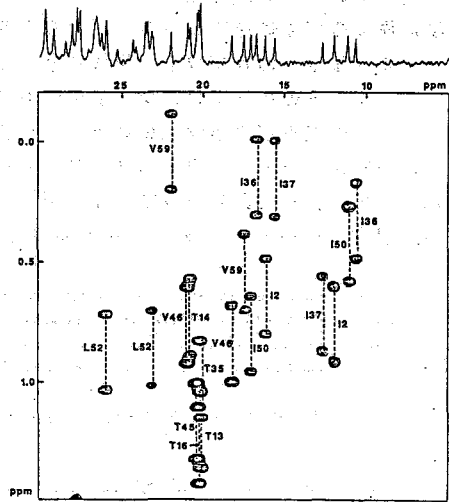


図9 エラプトキシンbの¹H検知¹³C NMRスペクトル(メチル領域)

文献

- (1) Kimball, M. R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88, 950-959 (1979).
- (2) Inagaki, F. et al., *Eur. J. Biochem.*, 109, 129-138 (1980).
- (3) Inagaki, F. et al., *Eur. J. Biochem.*, 123, 275-282 (1982).
- (4) Inagaki, F., *Toxin Reviews*, 5, 105-123 (1986).
- (5) Bruhwiler, D. et al., *J. Magn. Reson.*, 69, 546-551 (1986).

(蛋白工学研) °大久保 忠恭, 谷山 佳央, 菊池 正和

NMR study of uniformly ^{15}N labeled human lysozyme

T. Ohkubo, Y. Taniyama and M. Kikuchi (Protein Engineering research Institute)

Abstract: ^1H NMR was used to investigate the structure and properties of the human lysozyme, an enzyme of 130 amino acid residues. ^1H resonances of 82 amino acid residues were assigned in a sequence specific manner on the basis of conventional ^1H homonuclear and ^1H -detected heteronuclear NMR experiments using ^{15}N labeled protein. The uniformly ^{15}N labeled human lysozyme was prepared from *Saccharomyces cerevisiae* grown with $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$ and $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the nitrogen sources. Two β -sheets and three α -helices could be identified in the protein by qualitative analysis of sequential and medium range NOEs.

[序] ヒトリゾチーム(hLZM)は4組のS-S結合を持つアミノ酸130残基よりなる溶菌酵素で、細菌の細胞壁を構成する糖鎖の β -1,4結合を加水分解する。菊池らは遺伝子工学的手法を用いてヒトリゾチームを酵母より大量に分泌させる系を確立し、蛋白工学的手法により立体構造の形成過程と酵素反応機構の解明を行っている。

最近の装置の向上と測定法の進歩により分子量1万を越えるような蛋白質でも ^1H -NMRピークの帰属が可能となってきた。ひとたびNMRピークの帰属が得られたなら溶液中での蛋白質の詳細な構造解析により蛋白工学的研究に関する重要な情報を得ることが可能となる。現在 ^1H ピークの帰属を中心にNMRスペクトルの解析を行っているがピークの重なり合いのため、通常の ^1H -2次元NMRスペクトルより得られる情報だけではピークの帰属が困難であった。この問題に対処するためにヒトリゾチームの ^{15}N ラベル化を菊池らの系を用いて行い、 ^{15}N - ^1H 異種核2次元、及び3次元NMRスペクトルの測定を行った。この ^{15}N ラベル化した蛋白質を用いた ^1H ピークの帰属と高次構造解析の結果について報告する。

[実験] ヒトリゾチームは酵母より分泌されたものをHPLCにより精製した。Uniform ^{15}N ラベル化は $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$ と $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を唯一の窒素源として酵母を培養することにより行った。 $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$ は培養液のpHを調節するために用いた。ヒトリゾチームの産出量は培養液1ℓ当り5mgで通常の産出量と大きな変化はなかった。この方法により酵母で発現する蛋白質の ^{15}N ラベル化に初めて成功した。NMR測定試料として蛋白濃度2~4 mM, pH4.0の軽水溶媒の試料溶液を調製した。 ^1H 2次元NMR測定はBruker AM600

装置を使用して、 $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ 2次元NMR測定はインバースプローブを備えたBruker AM500装置を使用して、温度40 °Cで行った。通常の ^1H 2次元NMRと $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ HMQC, HMQC-COSY, HMQC-NOESY, 3次元NMR法の3D NOESY-HMQCのスペクトルをTPPI法を用いて純位相モード

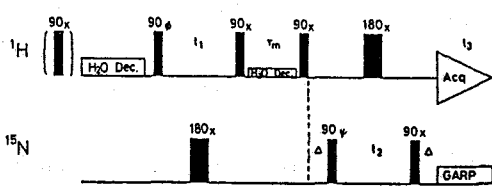


図1 3D NOESY-HMQCパルス系列

で測定した。図1に3D NOESY-HMQCのパルス系列を示す。軽水ピークの除去は通常のpre-saturation法を用いた。3D NOESY-HMQCは $128(t_1) \times 32(t_2) \times 512(t_3)$ 語のデータを測定しゼロ付加により最終的に吸収領域で $256(F_1) \times 64(F_2) \times 512(F_3)$ 語の3次元スペクトルを得た。 F_1, F_2, F_3 は各々 ^1H 全域, ^{15}N 領域, NH領域に対応する。3次元フーリエ変換はGriesingerのプログラムで行った。

[結果] (1) ピークの帰属 各アミノ酸残基のスピンの同定はRelayed-COSY, DQF-COSY, HMQC, HMQC-COSYスペクトルの解析により行った。隣接した残基間のNHを介したNOEを利用する連続帰属はNOESY, HMQC-NOESY, 3D NOESY-HMQCスペクトルを用いて行った。 ^{15}N とNHの化学シフトの散らばり方が違うため ^1H スペクトル中でNHピークが重なり合っている場合でも ^{15}N の化学シフトの違いにより $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ スペクトルでは分離して観測でき帰属等に有用であった。図2にHMQC-COSYスペクトルのfinger print領域を示す。軽水ピークがよく除去されているのが判り、これはHMQC関連の測定法の特徴である。図3はHMQC-NOESYスペクトルでA90からV100のペプチド鎖においてNH-NH間のNOEにより連続帰属した様子を太線で示している。3D NOESY-HMQCは全測定を約40時間で行ったがスペ

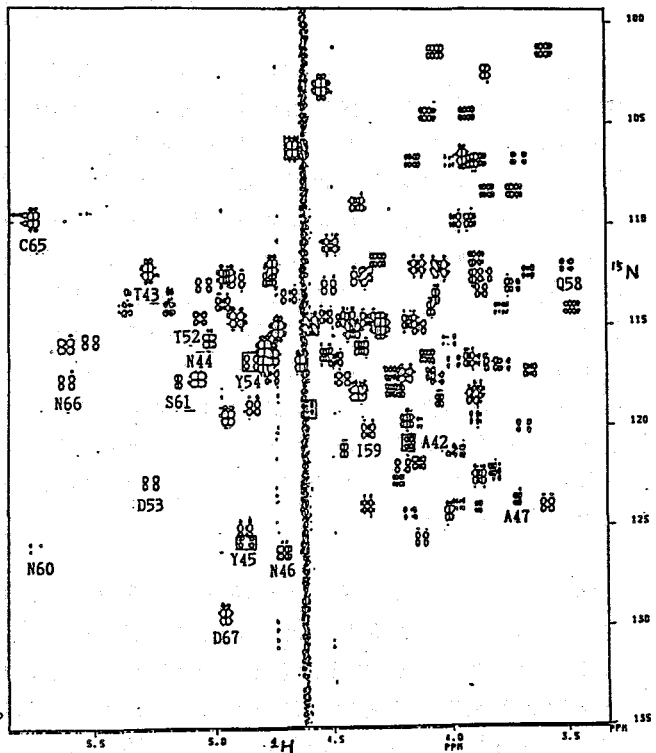


図2 HMQC-COSYスペクトル

クトルの S/N は同時間測定した 2 次元スペクトルと比べて大きな差は生じていなかった。問題点としてはまだスペクトルの分解能が低いという事が挙げられる。しかし新たな次元の導入によりピークの重なり合いの問題に対しては有効であった。図 4 は 3D NOESY-HMQC スペクトルの $\delta(F_2) = 118.6$ と 108.1 (^{15}N) ppm の位置での F_1 - F_2 断面を 2 次元スペクトルで表示したものである。NH の化学シフトが一致して NOESY スペクトルでは NH 由来の交差ピークの解析が困難な G72 と K33 がその ^{15}N の化学シフトの違いにより 3D NOESY-HMQC スペクトル中では明瞭に分離しているのが判る。以上のスペクトル解析の結果 82 残基の帰属を一義的に決定した。

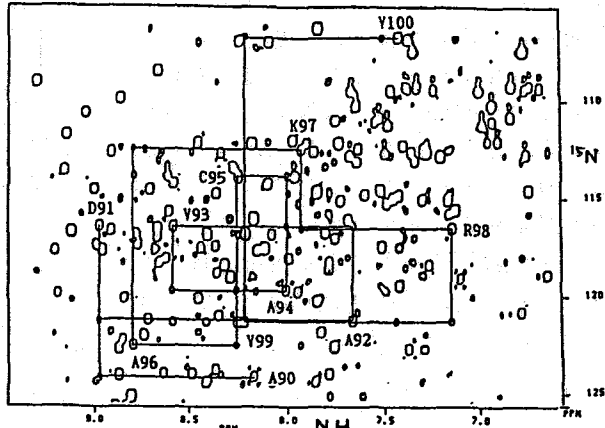


図 3 HMQC-NOESY スペクトル

(2) 2次構造の同定 得られた帰属をもとに NOE パターン (図 5) の解析からヒトリゾチームの溶液中における 2 次構造を決定した。

A42-N46, S51-G55, I59-S61 の 3 本のペプチド鎖は隣接残基の C^{*}H-NH 間の強い NOE と各ペプチド鎖間の NOE 特に C^{*}H 間の NOE により 3 本鎖の反平行 β シート構造をとっていることが判った。

同様にして V2-F3, N39-T40 の部分が 2 本鎖の反平行 β シート構造を形成している。隣接残基の NH 間の連続する強い NOE と 3 残基離れた残基間の NOE により R5-L15, A26-E35, A90-V100 の 3 個の α ヘリックス構造を同定した。今回同定した 2 次構造の位置は X 線結晶解析の結果とよく一致している。

(3) 基質との結合 ヒトリゾチームと基質との結合の様子を HMQC 法により調べた。HMQC 法は感度がよくまた線幅の減少により分解能が向上しており NH の挙動を調べるのに最適な方法の一つである。基質はヒトリゾチーム中に 6 個ある糖鎖結合サイトのうち

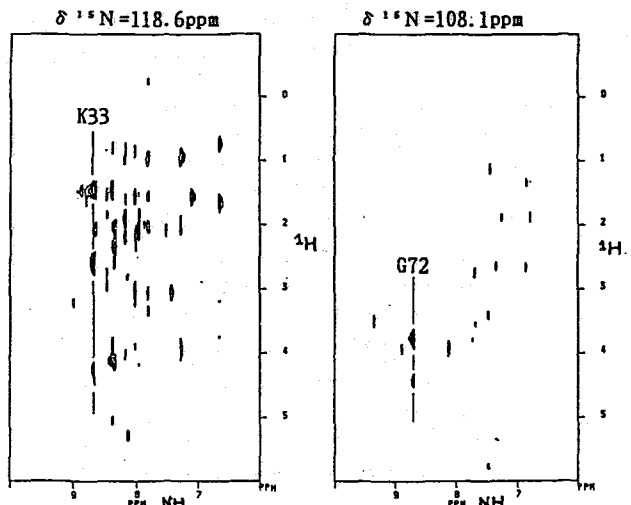


図 4 3D NOESY-HMQC の slice

サイトA, B, Cに結合する(NAG)₃を用いた。図6は蛋白質と基質を1:1の比で混ぜた時のスペクトルの変化をHMQCのprojectionスペクトルで比較したものである。基質との結合に伴って多数のNHピークがシフトしてる。また10 ppm 付近にある4本のTrp ringNHのうち3本が線幅の増大により観測出来なくなっている。更に詳細な解析を現在進めている。

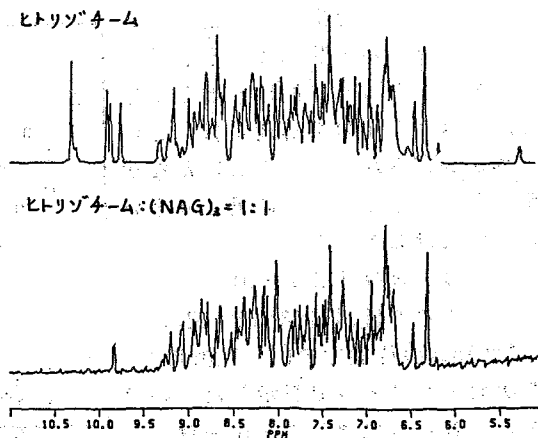
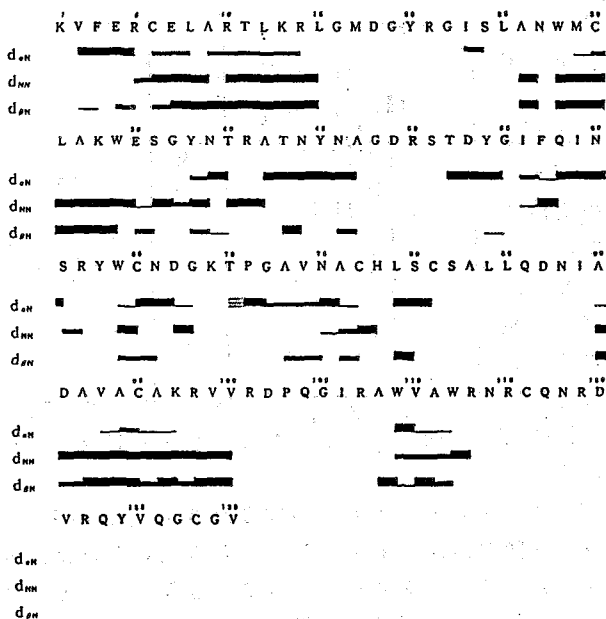


図6 (NAG)₃との結合

図5 Amino acid sequence of the human lysozyme with a summary of sequential connectivities



[謝辞] 酵母の培養を行って下さった武田薬品工業(株)の北野一昭氏に感謝致します。またNMR測定に際し貴重な助言を戴きましたBruker社のWaelchli博士に感謝します。

HIGH RESOLUTION ^{13}C AND ^{15}N NMR OF THE MEMBRANE PROTEIN
BACTERIORHODOPSIN SOLUBILIZED IN DETERGENTMichel Seigneuret, Jean-Michel Neumann, Daniel Lévy
and Jean-Louis Rigaud.

CEN-Saclay, Département de Biologie, 91191 Gif sur Yvette, France

High-resolution NMR has been fewly applied to large membrane proteins due to the difficulties in obtaining the latter in a suitable solubilized state. We present a high-resolution NMR study of a 27 kD membrane protein : the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. A procedure was developed to obtain delipidated, detergent-solubilized, monomeric bacteriorhodopsin at high-concentration. The final solubilization medium was optimized with regards to size of protein-detergent complex (measured by HPLC), stability at high temperature and viscosity, in order to yield a short correlation time for the protein. The suitability of such solubilization procedure for high-resolution NMR studies was demonstrated with bacteriorhodopsins biosynthetically labeled with [met, ^{13}C] Met, [1, ^{13}C] Phe or [ϵ , ^{15}N] Lys. In all three cases, several resonances corresponding to single amino-acid residues could be observed by ^{13}C -NMR at 75.4 and 150.8 MHz or ^{15}N -NMR at 30.4 MHz. In the case of [met, ^{13}C] Met-labeled bacteriorhodopsin, which was studied in detail, resonances from internal and external Met residues could be partially discriminated by proteolysis and paramagnetic broadening experiments. T_2 measurements were performed by CPMG spin echo for the protein in detergent, in the native membrane and in reconstituted liposomes. The results indicated that the local mobility of Met sidechains and thus the protein internal dynamics strongly depend upon the fluidity of the hydrophobic environment. Additionnaly, [met, ^{13}C] Met biosynthetic labeling allowed us to evidence by NMR a previously unnoticed low molecular weight methylated component associated with bacteriorhodopsin.

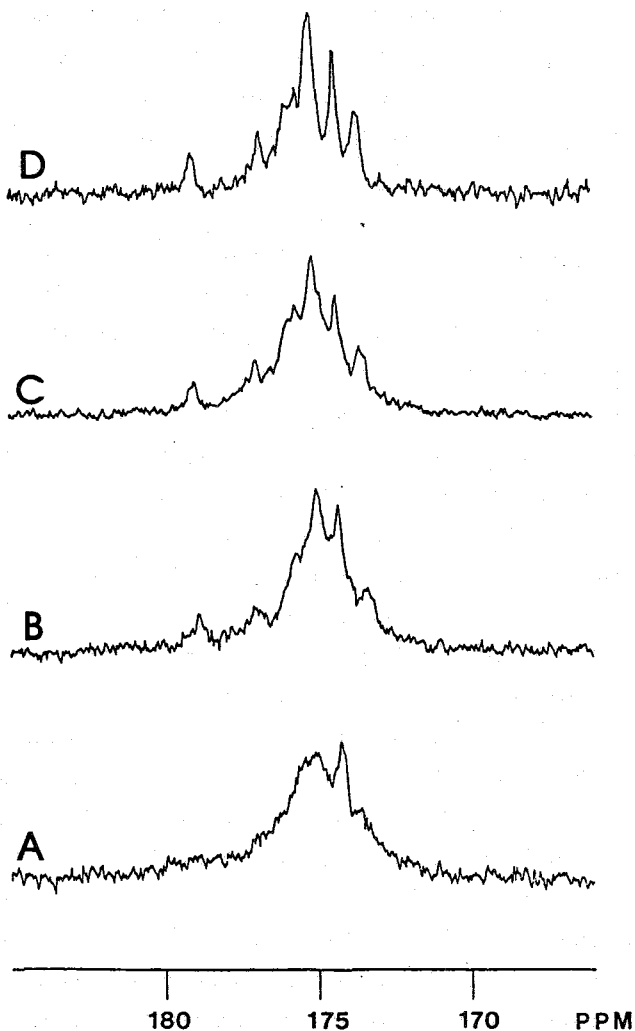


Fig.1. Influence of detergent on the 75.4 MHz ^{13}C -NMR spectrum of delipidated, solubilized bacteriorhodopsin biosynthetically labeled with L-[1, ^{13}C] Phe. Each spectrum was taken at the maximum temperature yielding stability of the protein (i.e. less than 5% denaturation in 15h): (A) Triton X100 5% (w/v), 40°C; (B) β -octylthioglucoside 5% (w/v), 25°C; (C) β -octylthioglucoside 5% (w/v), n-dodecylmaltoside 2.5% (w/v), 40°C; (D) n-dodecylmaltoside 5% (w/v), 50°C.

安定同位体標識NMR法による免疫グロブリンの高次構造解析：
研究法とその成果

東北大・理¹，東大・薬，日本ブルカー²，都立大・理³

田中俊之¹，矢田信久，加藤晃一，五十嵐貴子，海老沢計慶，
高橋栄夫，半沢宏之，金夏亨，中山智紀，松永千枝，尾高麻乃，
水谷隆太，大和澄江，荒田洋治，M.Waelchli²，甲斐荘正恒³

Stable-isotope aided NMR analyses of the structure of antibody molecules
T.Tanaka,¹ N.Yada, K.Kato, T.Igarashi, K.Ebisawa, H.Takahashi, H.Hanzawa,
H.Kim, T.Nakayama, C.Matsunaga, A.Odaka, R.Mizutani, S.Yamato, Y.Arata,
M.Waelchli,² and M.Kainosho³ (Department of Chemistry, Tohoku University,¹
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Bruker Japan,² and
Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University³)

Stable-isotope aided NMR has been used for the molecular structural analyses
of antibody molecules. A panel of anti-dansyl mouse monoclonal antibodies
with the identical light chain and the V_H domain have been extensively used
for the present study. Site-specific assignments of the carbonyl carbon reso-
nances of Met residues have been made using the double-labeling method devel-
oped by Kainosho and coworkers. The results obtained will be used for the
discussion of domain-domain interactions in the antibody molecules.

多数のドメインからなる多機能巨大タンパク質である免疫グロブリンの高次構造解析
の方法論の開発を続けている。現在は、安定同位体 (²H, ¹³C, ¹⁵N) によるラベル、
帰属、およびその応用について、集中的に、実験を行っている。本講演では、現時点
までに我々のグループが達成した成果と今後の問題点について要約する。

I. モノクローナル抗体の安定同位体ラベル

抗体産生ハイブリドーマを無血清培地中において培養し、望みのモノクローナル抗体
を得る。これまでのところ、色々な組み合わせの芳香環の重水素ラベル¹⁾、メチオニン
およびトリプトファンのカルボニル炭素の¹³Cラベル²⁾を行っている。メチオニン残
基はタンパク質分子中の色々な部分に散らばって存在する。これに対して、トリプト
ファン残基は、免疫グロブリンに特徴的なコアの中心、およびその周辺に各ドメインに

共通に存在するほか、さらに抗原結合部位に位置するものもある。

1) [1-¹³C] IgG, Fab, Fc

抗ダンシルマウスモノクローナル抗体（スイッチバリエーション（後述）のメンバーでサブクラスIgG2b）のMet残基のカルボニル炭素を¹³Cによってラベルして[1-¹³C] IgGを調製し、さらにこのタンパク質をプロテアーゼ消化してFab, Fcを得た。図1において三者のスペクトルを比較する。この抗体には、Fabに6個、Fcに3個、合計して9個のMet残基がそれぞれのドメインに分布する。図2には、それぞれのMet残基の、隣りのアミノ酸残基が何であるかを示してある。

この実験結果は、分子量15万の抗体に含まれるすべてのMet残基のカルボニル炭素の¹³C NMRシグナルが観測できることを示している。

2) ダブルラベル法による帰属

[¹⁵N] Lysによってダブルラベルした抗体のスペクトルを図3に示す。ピークdが明瞭に2本に分離している。図1から明らかのごとく、ピークdはFcに由来する。従って、図2から、ピークdはMet-412（H鎖）に帰属できる。図2が示すように、Met-18（H鎖）も隣がリジン（Lys-19）である。この点を明らかにするために、[¹⁵N] Thrを用いて、Fabのダブルラベル体を調製し、NMRスペクトルを測定した結果を図4に示す。この結果、[1-¹³C] IgGの与えるシグナルb（2個分）の一方のシグナルはMet-175（L鎖）に帰属できる。図1から明瞭なように、もう一方のシグナルbはFc由来である。このことから、リジンによって、分裂の観測されなかったMet-18（H鎖）は、シグナルg（2個分）の一方であることがわかる。

3) 現時点での問題点

a) 安定同位体標識アミノ酸の取込み ここで報告した安定同位体標識アミノ酸に関しては、その取込み効率に問題は見られなかった。しかし、今後、さらに議論の対象となる残基を拡張しようとする際には、細胞内のアミノ酸代謝（とくにトランスアミナーゼによるアミノ基転移反応）による安定同位体の希釈をいかに防ぐかが大きな課題である。この問題は、培養時に適当な代謝阻害物質を共存させることによって解決されるものと期待している。

b) アロタイプの違いによる一次構造の不確実性 NMRによる構造解析の基盤となるシグナルの帰属は、一次構造データに完全に依存している。定常領域に関しては、アロタイプの違いによる不確実性が存在する。異なるアロタイプのアミノ酸配列は、未だ決定されていない場合が多い。今後のプロジェクトには、この点を考慮する必要がある。逆に、抗体の¹³C NMRは、限られた数のアミノ酸置換に基づくアロタイプの差を敏感に検知するのである。

II. モノクローナル抗体の ^{13}C NMRの応用：ドメイン間相互作用のプロープ

L鎖 (V_L , C_L), V_H を共有し, 残りのC領域 (のサブクラス) が異なるマウス抗ダンシルスイッチバリエーション抗体: IgG1, IgG2a, IgG2a(s), IgG2bを用いて解析を進めている. IgG2a(s)は, IgG2aから, C領域のドメイン C_{H1} だけが脱落した抗体である. これら一連の抗体は, ドメイン間の相互作用を論じるにあたって, 理想的な系であると考えている.

[$1-^{13}\text{C}$] Metを用いてラベルしたこれら一連の抗体の ^{13}C NMRスペクトルを図5に示す. 完全に同一のアミノ酸配列をもつ C_L に属するMet-175の化学シフトが, サブクラスによって変化することがわかる. Met-175は, C_{H1} と合い接するペプチドセグメント上に存在する. このことは, Met-175がドメイン間の相互作用の敏感なプロープとなることを示している.

C_{H1} を欠損したIgG2a(s)を用いて実験すると, この点に関して興味深い結果が得られる. すなわち, Met-175の化学シフトは, IgG2aの場合に比べて, 約1.5 ppm低磁場側にシフトする. これは, C_{H1} の欠落によって相互作用の相手を失ったため, サブクラスによる化学シフトの差を大きく越える変化が観測されたものと考えられる. これらの実験結果は, C_{H1} の欠落が, 抗体分子の形に大きな影響を及ぼすことを示している. 事実, X線小角散乱データの解析³⁾により, IgG2aがY形の分子形をとるのにたいして, C_{H1} ドメインが欠落したIgG2a(s)では, ヒンジ角が著しく狭まって, 棒状の形をとっていることが明らかになった. 現在, 抗体分子とさまざまな分子との相互作用を, ^1H , ^{13}C NMRを組合わせて解析している.

[文献]

- 1) Kato, K., Nishimura, Y., Waelchli, M., and Arata, Y. (1989) J. Biochem. 106, 361-364.
- 2) Kato, K., Matsunaga, C., Nishimura, Y., Waelchli, M., Kainosho, M., and Arata, Y. (1989) J. Biochem. 105, 867-869
- 3) Igarashi, T., Sato, M., Katube, Y., Takio, K., Tanaka, T., Nakanishi, M., and Arata, Y. submitted

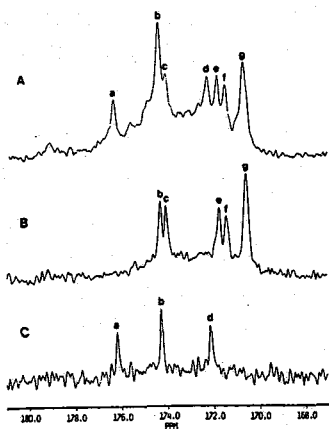


Fig. 1. Carbonyl ^{13}C NMR spectra at 100 MHz of a mouse anti-dansyl IgG2b monoclonal antibody and its proteolytic fragments, Fab, and Fc. The proteins are labeled with $[1-^{13}\text{C}]\text{Met}$. (A) $[\text{M}]\text{IgG}$, (B) $[\text{M}]\text{Fab}$, and (C) $[\text{M}]\text{Fc}$. Chemical shifts are given in ppm from dioxane. The probe temperature was 30°C . $\text{pH}=7.2$.

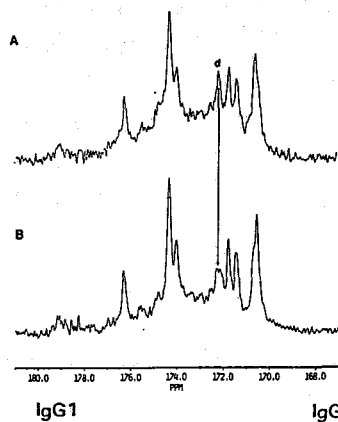


Fig. 3. Carbonyl ^{13}C NMR spectra at 100 MHz of (A) $[\text{M}]\text{IgG}$ and (B) $[\text{M}, \text{K}]\text{IgG}$. Chemical shifts are given in ppm from dioxane. The probe temperature was 30°C . $\text{pH}=7.2$.

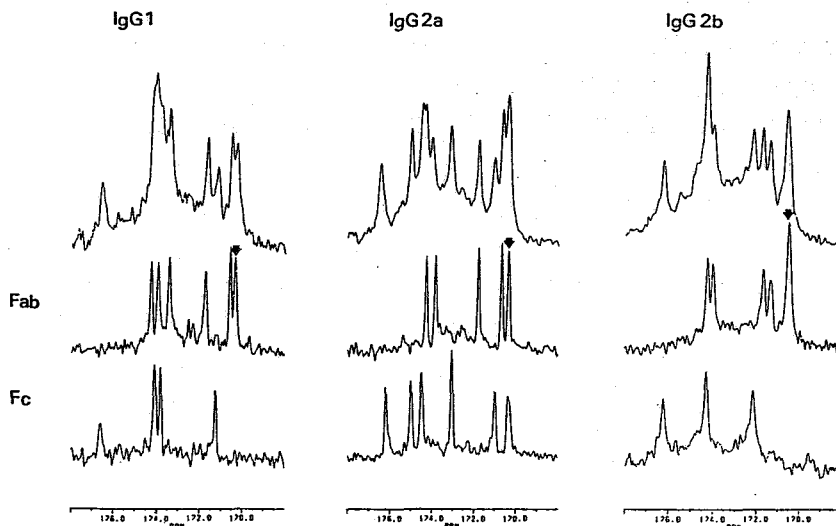


Fig. 5. Carbonyl ^{13}C NMR spectra at 100 MHz of the intact, Fab, and Fc proteins of the switch variant IgG1, IgG2a, and IgG2b antibodies. In each of the Fab spectra, the Met-175(CL) resonance is marked by the arrow.

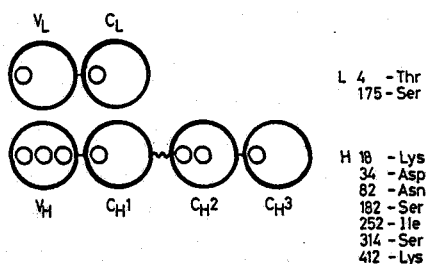


Fig. 2. Distribution of Met residues in the heavy (H) and light (L) chains of the mouse anti-dansyl IgG2b monoclonal antibody used in the present work. The heavy chains consist of four homology units, V_H , C_{H1} , C_{H2} , and C_{H3} , whereas the light chains are divided into two homology units, V_L and C_L . Amino acid residues linked directly to the carbonyl group of each of the Met residues are also shown in the figure.

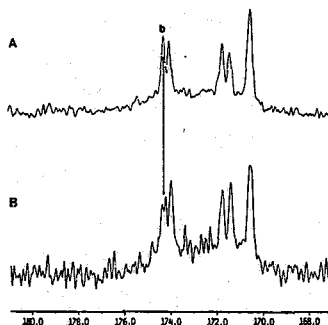


Fig. 4. Carbonyl ^{13}C NMR spectra at 100 MHz of (A) $[\text{M}]\text{Fab}$ and (B) $[\text{M}, \text{T}]\text{Fab}$. Chemical shifts are given in ppm from dioxane. The probe temperature was 30°C . $\text{pH}=7.2$.

第 2 日

11月21日(火)

L21 — L27



(北大理) ° 小椋賢治, 竹腰清乃理, 引地邦男

A ^{13}C selective 1D-HOHAHA experiment

Kenji OGURA, K. TAKEGOSHI, and Kunio HIKICHI (Faculty of Science, Hokkaido University)

We propose a ^{13}C -selective 1D-HOHAHA experiment. This is a 1D analogue of the 2D CH-RELAY experiment, which enable us to unlabel overlapped ^1H -RELAY peaks by using the well-resolved ^{13}C signals. Among many possible experimental combinations of "units", we chose the DANTE method for selective excitation, the inverse INEPT for ^{13}C to ^1H coherence transfer, and the HOHAHA for RELAY. Experimental details and some examples are described.

(I) はじめに

^1H -NMR スペクトルを帰属するためのパルス・テクニックとしては COSY, RELAY, 2D-HOHAHA, 1D-HOHAHA 等の ^1H の相関をみる手法が挙げられる。これらの手法により、スピン結合した ^1H 間の磁化移行を観測することができ、その結果スピン系のつながりを解析することが可能である。それらの手法のうち、1D-HOHAHA 法では、いくつかの混合時間 (mixing time) で測定をおこなうことによって、ある注目している ^1H についてスピン系の情報を得ることができる。それに対して 2D 法では全ての共鳴線についてスピン系の情報を得ることができる。ゆえに、測定者が目的に応じて 1D 法と 2D 法を使い分けることが帰属作業の能率を上げるためには重要なのである。

実際の実験では、 ^1H -NMR スペクトルの共鳴線は本数が多くて互いに重なり合っているので、 ^1H 間の相関をみるだけでは帰属が困難な場合が多い。その場合には、 ^{13}C の共鳴周波数で ^1H スペクトルを展開し単純化する 2D の手法、すなわち C-H COSY, HMQC, C-H RELAY 等を用いると有効である (一般に、 ^{13}C のスペクトルは ^1H のそれよりも分離が良好である)。しかし、これら C-H 相関法においては 1D-HOHAHA のような特定の ^1H のスピン系のつながりの情報を得るための 1D の手法は提案されていない。C-H 相関法でも ^1H 相関法のように 1D 法と 2D 法の両手法を使い分けられれば、帰属の能率はさらに向上するはずである。そこで我々は、こみいった ^1H スペクトルのなかの注目した ^1H のスピン系のみを ^{13}C の共鳴周波数を利用して分離、抽出する 1D-HOHAHA 法を開発し、検討した。

おぐら・けんじ, たけごし・きよのり, ひきち・くにお

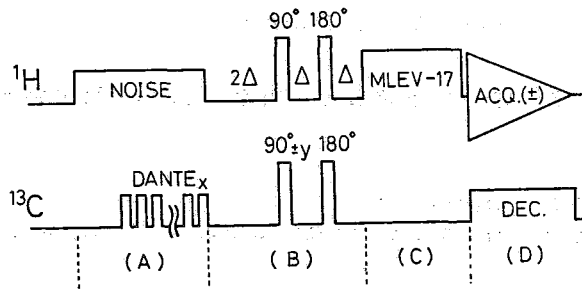


Fig.1 Pulse sequence of the ^{13}C selective 1D-HOHAHA experiment. Δ is set to be $1/4J_{\text{CH}}$. It consists of the following four steps; (A) ^1H pre-saturation and NOE establishment, and selective excitation on ^{13}C carrier frequency using DANTE pulse with ^1H noise decoupling (B) magnetization transfer from ^1H to coupled ^1H by HOHAHA mechanism (C) ^1H FID detection with ^{13}C on-resonance decoupling. The ^{13}C 90° pulse and receiver phase are cycled, so that the uncoupled ^1H signals are canceled.

(II) 原理

図1に ^{13}C 選択的1D-HOHAHAの脉冲・シーケンスを示す。このシーケンスは4個の部分からなっている。各部分の働きを以下に記す。(A) ^1H のノイズ照射により、不要な ^1H シグナルを消去すると同時にNOEにより ^{13}C シグナルの強度を増大させる。それからDANTEパルスにより、ある共鳴周波数の ^{13}C 磁化のみを励起する。(B)逆INEPTシーケンスにより、 ^{13}C 磁化をそれに直接結合した ^1H に移す。(C)MLEV-17シーケンスにより、 ^1H 間でハートマン・ホーン機構による磁化移行を起こす。(D) ^1H のFIDを取り込む。このとき、選択励起された ^{13}C はCWでデカップルされる。通常の ^{13}C デカップルを必要とする実験では、 ^{13}C の広い周波数帯域をカバーするだけの強いデカップル出力および厳密に設定されたデカップル法(WALTZなど)が不可欠である。しかし、この実験では選択励起した ^{13}C だけデカップルされればよく、そのため弱いパワーのCWで充分なのである。(A),(B),(D)からなるシーケンスはShaka¹⁾らによって発表されている。(A)部として、ガウス形パルスやロング・パルスを使用することもできる。(B)部として、逆DEPTシーケンスを使用することもできる。(C)部として、RELAYまたはNOESYタイプの磁化移行シーケンスを使用することもできる。

(III) 実験と結果

サンプルは、ガラクトース(Gal)とキシロース(Xyl)それぞれ30mgずつの0.5ml D_2O 溶液である。温度は60℃に設定した。測定には日本電子JNM-GX270スペクトロメーター(共鳴周波数は270MHz(^1H), 68MHz(^{13}C), 41MHz(^2D))を使用した。図2はこのサンプルの通常の ^1H および ^{13}C スペクトルである。GalとXylの1βは ^1H スペクトルでは重なって

いるが、 ^{13}C スペクトルでは約15 Hz分離している。このサンプルの 1β ^1H に通常の1D-HOHAHAを適用すると、HOHAHA磁化移行によって生じたシグナルは、GalとXylのどちらの 1β ^1H からの磁化移行シグナルなのか区別することができない。このような場合に ^{13}C 選択的1D-HOHAHA法を適用すると有効なのである。

DANTEパルスとして、RF強度を280 Hzに弱められた $2\mu\text{s}$ のパルスが $70\mu\text{s}$ 毎に450回繰り返された。このDANTEパルスの励起特性を図3に示す。我々のNMR装置では ^{13}C デカップルが静磁場ロック系に影響を及ぼすために、55 MHzローパスフィルターを自作し、ロック回路に付加した。図4にGalとXylの 1β ^{13}C 選択的1D-HOHAHAスペクトルを示す。測定に要した時間は1点につき2.5時間であった。通常の1D-HOHAHA法では観測の困難なGalとXylの 1β から4 β までの ^1H の磁化移行のようすが図4からは明瞭にみてとれる。このように、 ^{13}C 選択的1D-HOHAHA法の適用によって、重なり合った ^1H （のうちの1個の ^1H ）のスピンの帰属が簡便に行える。

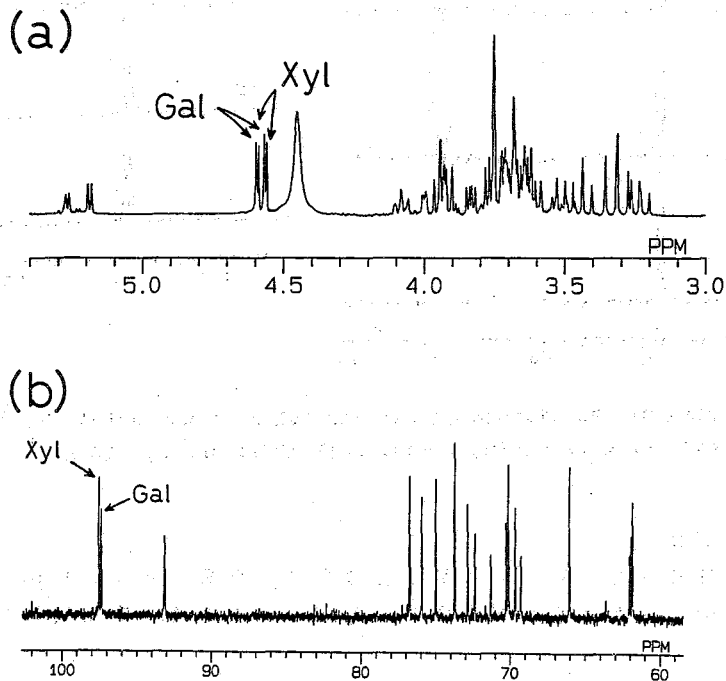


Fig.2 ^1H (a) and ^{13}C (b) normal spectrum of the mixture of galactose(Gal) and xylose(Xyl) in D_2O at 60°C . Arrows indicate 1β of Gal and Xyl.

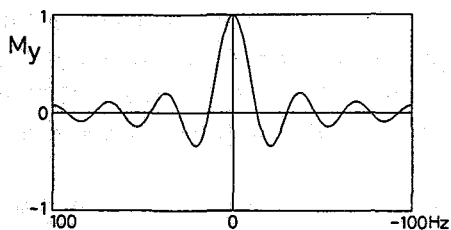
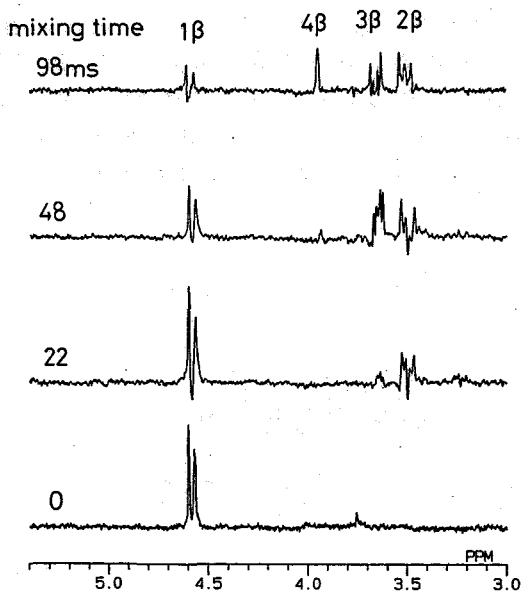


Fig.3 Calculated excitation profile of the DANTE pulse under experimental conditions: $\gamma B_1/2\pi=280\text{Hz}$, $2\mu\text{s}$ pulses are repeated for 450 times with $70\mu\text{s}$ intervals.

(a) galactose



(b) xylose

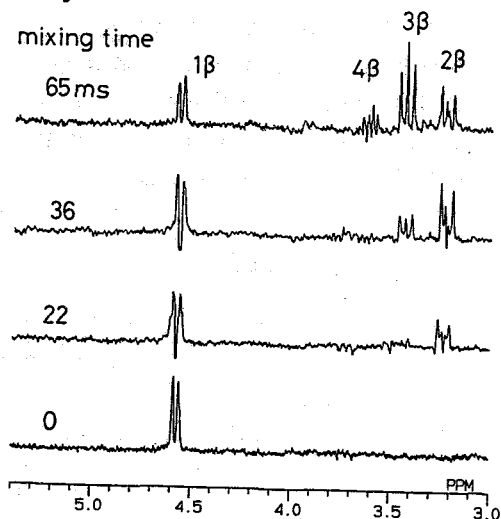


Fig.4 Spectra of the mixture of Gal and Xyl obtained using the ^{13}C -selective 1D-HOHAHA with several mixing times. Gal 1β (a) and Xyl 1β (b) ^1H are selectively excited.

(IV) さいごに

この手法は C-H RELAY や HMQC (RELAY)²⁾ のスライス・データと同等のデータを 1D で測定することができるので、測定時間短縮に役立つと思われる。

(文献)

- 1) A. J. Shaka and R. Freeman, J. Magn. Reson., 50, 502 (1982).
- 2) 小椋賢治, 引地邦男, 第27回 NMR 討論会講演要旨集 (1988).

東大応微研 ○降旗一夫 瀬戸治男

New alternative techniques of selective 2D-NMR spectroscopy

Kazuo Furihata and Haruo Seto

(Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

New alternative techniques of selective 2D-NMR are proposed. One is an amplitude modulation method and the other is a saturation difference spectral method. Both techniques utilize selective irradiation frequency instead of selective exciting pulses.

These methods enable to observe coherence transfer of protons in the crowded regions of the proton NMR spectra and to reveal proton systems connected by small coupling constants. Their applications to structural analysis of complicated natural products are presented.

はじめに

有機化合物の構造解析の有効な手段として2D-NMR法が非常に広く使用されている。この2D-NMR法の問題点の1つは、データに対し高い分解能が要求される場合、測定時間を多く要し、大メモリー容量が必要となることである。またプロトンの多い化合物ではスペクトルが複雑となり、解析が困難となる場合がある。従って構造解析の観点からは、必要とする情報を保持しつつスペクトルを単純化することが望ましい。

このような問題点の解決策として、最近¹⁾semi-selectiveパルスを使用した2D-NMR法が報告されている。この場合、励起範囲の選択性を高める為に、特殊なソフトパルスが使用されており、ハード面での改良が要求される。

我々はこのソフトパルスの代りに照射磁場によるsaturation差スペクトル法の検討を行ってきた。²⁾この方法を用いてselective 2D-NMR法の実験を行なった結果、選択的パルス法に比較して、高感度であり、かつ良好なデータを得る事が出来る事が判明したので報告する。

1. 強度変調 2D-NMR

selective 2D-NMR法の一つのアプローチとして、選択的な強度変調2D-NMR法を考案した(図1)。この方法では、mixing timeの間にスピン展開をさせ、evolution timeの間に照射磁場をあてることにより、照射磁場を受けたシグナルとスピン結合したプロトンシグナルのみを2D-NMRとして取り出すことができる。

本方法では、照射磁場の振幅が重要なポイントとなる。図2は照射磁場の展開とそのFT変換スペ

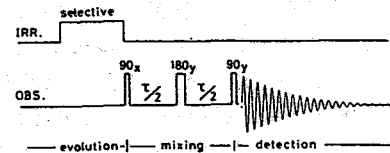


図1. 強度変調法のパルス系列 (cosy type)。

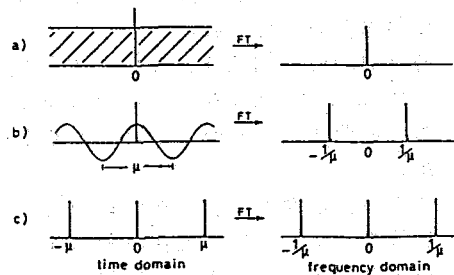


図2. 照射磁場の展開とフーリエ変換図。

- continuous wave mode.
- cosin wave mode.
- comb function mode.

ふりはたかずお、せとはるお

クトルを示したものである。図2-aのように照射磁場を同一強度で連続的にあてた場合は、照射磁場の影響を受けたシグナルも、受けないシグナルも、 F_1 軸の中心に δ 関数として現れ、2つのシグナルを分離できない。この場合、両者の差スペクトルをとることになる。

照射磁場がsineあるいはcosine曲線状の振幅の場合、そのFT変換スペクトルは、照射を受けないシグナルに対し、対称なサイドバンドシグナルとなって現れる。これにより、照射を受けたシグナルと受けないシグナルを分離して測定する事が可能となる(図2-b)。

照射磁場を楕関数状に入れた場合は、照射を受けたシグナルのみが楕関数状のサイドバンドとなって現れる(図2-c)。この場合は t_1 軸に対しての照射回数がポイントになる。

a) selective COSY スペクトル

図3は抗生物質ポートミシンのselective強度変調2D-NMRスペクトル(COSYタイプ)である。14位のプロトンとスピン結合した13位及び15位a, bの2つのプロトンがサイドバンドシグナルとして観測されている(図3-b)。またサイドバンドシグナルのcross sectionスペクトル(図3-c)から分るように、データはphase sensitiveモードでの処理が可能であり、非常に小さなスピン結合のシグナルから、結合定数を読取る事も可能である。照射磁場の影響を受けない他のシグナルはスペクトルの中心に観測される。このシグナルは非常に強度が強いが δ 関数タイプで観測されるため、サイドバンドシグナルに対しtailing等の悪影響を与えない。

b) selective HOHAHA-CHスペクトル³⁾

図4は抗生物質SS49のselective HOHAHA-CHスペクトルである。この化合物の構造決定における問題点の一つは $C_{11} \sim C_{13}$ あるいは $C_{24} \sim C_{26}$ のメチレン炭素の結合様式の証明にあった。

この化合物では、たまたま分離よく観測された13位のメチレンプロトンの一つを照射し、12位のプロトンには磁化移動しないHartman-Hahn条件下でselective HOHAHA-CH法の測定を行なった。この場合は13位と関係したシグナルのみが観測され、11、12、13の結合が容易に判明した。なお、C-4炭素に由来するシグナルが観測されているが、これはH-4のサテライトピークがH-13と重なっているためである。

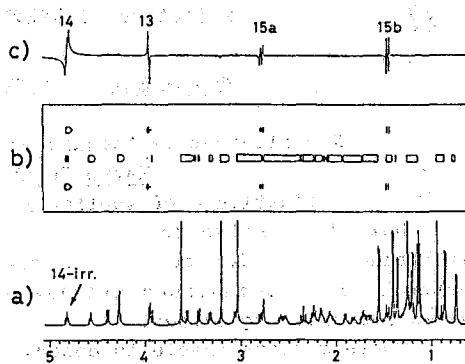


図3. a) ポートミシン 1H -NMRスペクトル。
b) selective COSYスペクトル(cosin mode).
 $t_1 \times t_2 = 8 \times 4096$. mixing time=130msec.
 H_{14} (4.8ppm)照射. $\gamma H_2 / 2\pi = 10\text{Hz}$.
 $J_{12, 14} = 6.2\text{Hz}$, $J_{14, 15a, b} = 8.8\text{Hz}$, 2.2Hz
c) sideband cross section スペクトル。

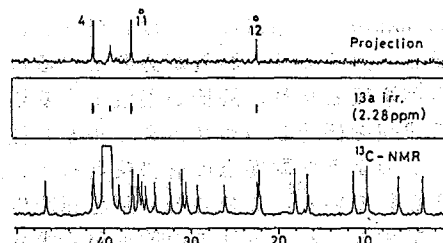


図4. 抗生物質SS49のselective HOHAHA-CHスペクトル。
(continuous wave mode). $t_1 \times t_2 = 8 \times 4096$
mixing time:70msec. $\gamma H_2 / 2\pi = 10\text{Hz}$.

2. saturation差スペクトル

selective 2D-NMR法の要点はシグナルの励起を制限し、観測したいシグナルのみを取り出すことにある。例えばF₁軸の部分領域測定の場合は、2D-NMRのパルス系列において、その第一パルス semi-selectiveパルスで置換し、観測したい領域のみを選択的に励起することである。

このselectiveパルス励起法に対し、saturation差スペクトル法は、1次元差スペクトル法と同一の原理に基づき、saturation照射磁場を用いて測定したいシグナルのみを飽和させ、照射磁場のある場合とない場合の差をとることにより、目的とするシグナルのみを取り出すことができる。²⁾

a) selective HOHAHA-COSY

2D-HOHAHAスペクトルでは、スピン結合で結ばれたプロトンが同一軸に現れる。しかしそのスピン系の結合順序についての情報は含まれていない。一方COSYスペクトルにより、プロトン-プロトンの結合順序は明らかになるが、複雑なスペクトル領域では、解析が不可能になる場合が多い。この二つの問題の一解決法として、selective HOHAHA-CHスペクトルが有力な方法となる。

図5は、抗生物質SS49のselective HOHAHA-CHスペクトルである。H-14を選択的に照射し、H-14に関係したスピン系の解析を行ったものである。図5よりC₁₃からC₁₉およびC₁₆から分岐したC₃₄までの部分構造を明らかにすることができた。

b) selective transfer-COSY

ポリケタイド系抗生物質において、-CHa-CHb(CH₃)-CHcというスピン系で、J_{ab}が大きく(約10Hz程度) J_{bc}が小さい(約2Hz以下)という例が非常に多く存在する。しかも¹H-NMRでは、この系に由来するシグナルが1~2.5ppmの領域に集中しスペクトルの解析を困難にする。

このような化合物では、メチル基の結合したスピン系を明らかにできれば、構造決定は容易になる。今やこのようなスピン系は、long range COSY法やrelayed-COSY法等により容易に解決できるようになった。しかし、シグナルが重なったりして解析が困難であったり、relay timeのミス設定によりクロスピークが観測されない場合がある。

我々はこの問題を selective 2D-NMR法の応用測定の一つとして、selective transfer-COSY法(図6)によりメチル基からの磁化移動を選択的に取り出す事を試みた。

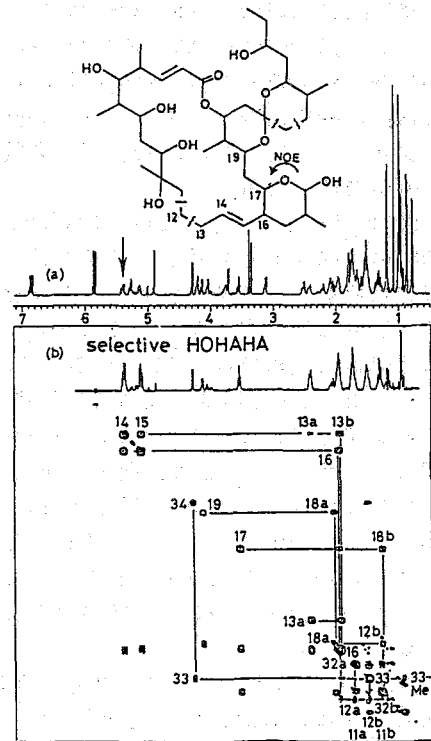


図5. 抗生物質SS49のselective HOHAHA-COSYスペクトル。
 $t_1 \times t_2 = 256 \times 512$, mixing time=130msec.
 H_{14} (5.39ppm)照射, $\gamma H_2 / 2\pi = 10\text{Hz}$.

図6はselective transfer-cosyのパルス系列で、2D relayed-COSYのパルス系列をmodifyしたものである。evolution timeとrelay timeを入替え、更にlong rangeカップリングに対して、delay timeを設定するのが特徴である。

図7はポートミシン selective transfer-COSYのスペクトルである。メチル領域を選択的に照射し、メチルプロトンの磁化移動を選択的に取り出したものである。メチル基は通常二重線ではぼ7Hzに分裂するので、transfer timeを容易に最適値に設定することが可能である。このtransfer timeの間に、プロトン3個分の磁化をメチル基のつけ根のプロトン Hbに移動させる。次にevolution timeによりこの強度の強い磁化をメチル基とHaおよびHcに振り分けることにより、このメチル基からのスピン系が明らかになる。

図7から分るように、クロスピークは対角ピークに対し対称には観測されず、スピン結合のあるシグナルがF₂軸にそって一列に観測され、しかも、メチル基のつけ根のプロトンは対角軸上に現れるため、メチル基に隣接するプロトンとその隣に位置するプロトンシグナルを容易に区別することができる。このスペクトルによりポートミシンの2位から8位までの構造は一義的に決定される。

まとめ

ここに明らかにしたselective 2D-NMR法は2D-NMRの一つの変法であり、任意の注目したシグナルからの関係を選択的に明かにする手法である。天然物の構造解析の過程で、僅か一つか二つのプロトン間の関係の証明が障害となって全構造の決定ができない場合が多いが、そのような際にはこのようなselective 2D-NMR法を適用してみるのも有効であると考えられる。

- 1) R. Bruschiweiler, J. C. Madsen, C. Griesinger, O. W. Sorensen and R. R. Ernst: J. Magn. Reson., 73, 380 (1987)
- 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) 降旗一夫、瀬戸治男、第27回NMR討論会要旨集、247(1988)札幌

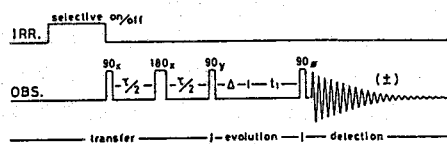


図6. selective transfer-COSY法のパルス系列。

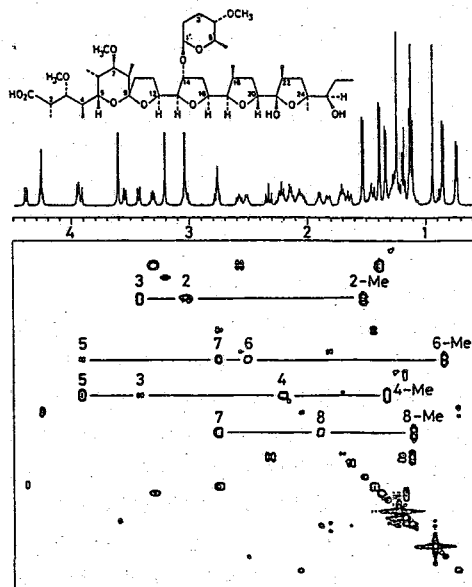


図7. ポートミシン selective transfer-COSYスペクトル。
 $t_1 \times t_2 = 256 \times 512$. メチル基領域(0.7ppm-1.6ppm)照射。
 $\gamma H_2 / 2\pi = 330\text{Hz}$, transfer time: 71.4msec, $\Delta = 60\text{msec}$.

RECENT AND COMING SOFTWARE ADVANCES FOR PROCESSING MULTI-DIMENSIONAL NMR SPECTRA. CHALLENGES AND POTENTIAL SOLUTIONS

George C. Levy, Sophia Wang, Philip Borer, Mark Roggenbuck and Roy Hoffman, NIH Resource, Syracuse University & Frank Delaglio and Hans Grahn, New Methods Research, Inc., Syracuse, New York.

Two and higher dimensional NMR spectroscopies offer extraordinary power for molecular elucidation and other applications. New methods of data processing, emphasizing advanced and intelligent algorithms, indicate that chemists should be able to easily abstract increasing amounts of information from these experiments. One example is in determination of three dimensional structure of biomolecules from NOESY experiments. There remain substantial challenges to broad realization of the method:

Experimental Challenges - (1) 2D NMR and spectra of higher dimensionality must achieve potential resolution of sufficient distance-related cross peaks and (2) other information (e.g., sequence, NMR shieldings and spin-spin couplings, where available) must be brought to bear.

Data Processing Challenges - (3) computers and their associated mass storage devices will require greatly increased speeds to make practical FFT or alternative processing of large multi-dimensional arrays, (4) improved methods will be required for separation and quantitation of individual spectral peaks, (5) spectral assignment methodologies must be augmented by new "intelligent" automatic techniques which further achieve error detection and potential correction, (6) highly efficient algorithms must become available for initial calculations of geometry and for refinement to a unique and accurate structure and (7) the software must have overall fault recover and should further allow reconciliation of small geometrical differences determined from various experimental methods or theoretical calculations. The foregoing describes an Expert System of unprecedented complexity¹ which will require 1991-93 computer technology (at least!), significant advances in NMR instrumentation and, of course, a very large software design effort - almost certainly combining the efforts of many laboratories. The reward will be worth it.

¹G.C. Levy, *J. Molecular Graphics*, 4, 170-177. (1986)

筑波大物工、カリフォルニア大*

○松井 茂、B. Q. Sun*、A. Pines*

Zero-Field and High-Field Correlation 2D NMR/NQR

S. Matsui, B. Q. Sun,* and A. Pines*

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba and *Department of Chemistry
and Lawrence Berkeley Laboratory, University of California, Berkeley

Two-dimensional (2D) correlation between zero-field (ZF) and high-field (HF) NMR/NQR spectra leads to a new type of separation of HF powder patterns. Such 2D experiments are analyzed theoretically and simulated numerically. The analysis shows that the correlation spectra can provide information about relative orientation between the ZF and HF Hamiltonians. The simulation was performed on ZF NQR and HF NQR correlation for a spin $I=1$, and on ZF NMR dipolar and HF NMR chemical shift correlation for homonuclear two spins $I=1/2$.

< はしめに >

Pinesらにより開発されたtime-domain 零磁場NMR,NQR法 [1, 2] によれば、信号の時間推進中に静磁場が存在しないため共鳴周波数が結晶の配向に依存せず、粉末試料においても異方性によるスペクトルの広がりのない高分解能スペクトルを得ることができる。このため零磁場法は、粉末あるいは無定形固体の新しい構造解析手段として注目されている。

本方法では図 1 a に示すように、試料を零磁場—高磁場間でshuttleさせることにより、図 1 b に示す様な磁場を経験させ、高磁場での信号を t_1 の関数として測定することにより間接的に零磁場のFID信号を観測する。この際、高磁場での信号は高感度化のため通常 pulsed spin-locking 下で測定されてきた。このため高磁場でのスペクトル情報は従来ほとんど無視されてきた。しかし今回我々は、高磁場においてもFID信号、あるいは種々のrfパルス系列下でFID信号を t_2 の関数として観測し (図 1 b)、このFID信号と零磁場FID信号とを2次元的に相関させることにより新しいタイプの2次元相関スペクトルが得られることを見い出したので報告する。

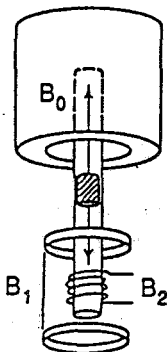
このような相関をとることにより、零磁場の高分解能スペクトルに基づいて、通常の高磁場粉末パターンを更に分解することが可能となる。これは、高磁場においては共鳴周波数が結晶の配向に依存するのに対して、零磁場では結晶の配向により影響されるのは信号の強度であるということに起因している。

< 理論解析 >

一般に静磁場を非断熱的にスイッチングすることにより零磁場時間推進が開始、終了されるような零磁場—高磁場2次元 (t_1 , t_2) 実験において (図 1 b)、静磁場に対する配向 μ を持つ微結晶に対するスピン密度行列は実験室系において

まつい しげる、ほう きん さん、あれつくす ばいんず

(a)



(b)

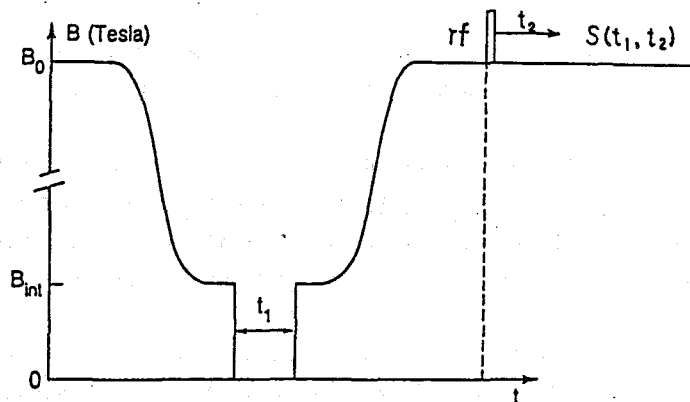


図1 零磁場-高磁場相関法の模式図。(a)粉末試料の高磁場(B_0)零磁場(B_1, B_2)間での shuttling。(b)shuttlingと B_1, B_2 の適切な switchingにより試料の経験する磁場。従来は無視されていた高磁場のスワッチ情報(t_2)を零磁場スワッチ(t_1)と二次元的に相関させる。

$$P_L^n(t_1, t_2) = \exp[-i\mathcal{H}_{HF}^L t_2] U_{rf} \exp[-i\mathcal{H}_{ZF}^L t_1] I_{zL} \times \exp[i\mathcal{H}_{ZF}^L t_1] U_{rf}^{-1} \exp[i\mathcal{H}_{HF}^L t_2] \quad (1)$$

のように書くことができる。ここで、 U_{rf} は高磁場時間推進を始めるためのrfパルスの印加を示している。すなわち $U_{rf} = \exp[-i\omega_{HF} t_2 I_{zL}] \exp[i\frac{\pi}{2} I_y] \exp[i\omega_{HF} t_2 I_{zL}]$ 。また、 \mathcal{H}_{ZF}^L および \mathcal{H}_{HF}^L は各々実験室系における零磁場および高磁場ハミルトニアンを示しており、それらの主軸系におけるハミルトニアン \mathcal{H}_{ZF}^P および \mathcal{H}_{HF}^P と次のように関係づけられる(右=1)。

$$\mathcal{H}_{ZF}^L = R_1^{-1} \mathcal{H}_{ZF}^P R_1 \quad (2)$$

$$\mathcal{H}_{HF}^L = \{R_1^{-1} R_2^{-1} \mathcal{H}_{HF}^P R_2 R_1\}_{zz} - \omega_{HF} I_{zL} \quad (3)$$

{ }_{zz}は変換されたテンソル相互作用ハミルトニアンのzz成分を取ることを示している。 $R_1(\varphi, \theta)$ および $R_2(\alpha, \beta, \gamma)$ はハミルトニアンを

$$\text{実験室系} \xrightarrow{R_1} \mathcal{H}_{ZF}^P \text{主軸系} \xrightarrow{R_2} \mathcal{H}_{HF}^P \text{主軸系}$$

のように変換する[3]。(1)式を用いて、実験室系すなわち位相敏感検波前の2次元

信号 $S^{\hat{z}}(t_1, t_2)$ は

$$S^{\hat{z}}(t_1, t_2) = \text{Tr} \{ I_{xL} \rho_L^{\hat{z}}(t_1, t_2) \} \quad (4)$$

で与えられる。ただし $I_{xL} = \exp[i\omega_{HF}t_2 I_{zL}] I_x \exp[-i\omega_{HF}t_2 I_{zL}]$ 。(4)式を結晶の配向 $\Omega = (\varphi, \theta)$ について平均化することにより粉末の信号が得られる。このような解析から、零磁場、高磁場の相互作用ハミルトニアン間の相対的な配向を定義している $R_2(\alpha, \beta, \gamma)$ はすべての微結晶において同一であり、相関スペクトルにはその情報が含まれていることが解る。

スピン $I = 1$ に対する零磁場 NQR - 高磁場 NQR の場合

最も単純な例としてスピン $I = 1$ に対する零磁場 - 高磁場 2 次元 NQR 実験を取り上げる。この場合の零磁場コヒーレンスは (1) 式より $t_2 = 0$ として、実験室系において 8 種類の項に展開できる [2]。しかし、非断熱的に静磁場をスイッチングする実験においては後半のスイッチング直前に静磁場方向に残っている信号成分だけを観測するので I_{zL} に比例する項だけを考慮すれば十分である。この実験においては零磁場と高磁場の相互作用は同一であるので $R_2 = 1$ である。そうすると (1) 式は

$$\rho_L^{\hat{z}}(t_1, t_2) = \exp[\pm i\pi A \{ (3\cos^2\theta - 1) + \eta \sin^2\theta \cos 2\varphi \} t_2] \{ \cos^2\theta \cos(2\pi\nu_0 t_1) + \sin^2\theta \cos^2\varphi \cos(2\pi\nu_+ t_1) + \sin^2\theta \sin^2\varphi \cos(2\pi\nu_- t_1) \} I_{xL} / 3 \quad (5)$$

となる。ここで $A = e^2 g Q / 4h$ であり、 η は非対称パラメータ、零磁場共鳴周波数は各々 $\nu_0 = 2\eta A$, $\nu_- = (3 - \eta)A$, $\nu_+ = (3 + \eta)A$ である。通常の高磁場共鳴周波数の結晶配向依存性すなわち粉末パターンは零磁場共鳴によって 3 つの成分に分離され、更に各成分 ν_0, ν_+, ν_- に対応して $\cos^2\theta, \sin^2\theta \cos^2\varphi, \sin^2\theta \sin^2\varphi$ のファクターがかかっている。これにより 3 成分の粉末パターンは各成分に特有に変形されることがわかる。
<シミュレーション結果と議論>

(5) 式を用いて 2 次元 NQR スペクトルの数値シミュレーションを行った。結果を図 2 に示す。非対称パラメータ η を 0 から 1 まで変化させた。零磁場共鳴周波数に応じて高磁場粉末スペクトルが分離され、その分離の様子は非対称パラメータに依存しているのがわかる。このような新しい分離は、物理的に興味深いばかりでなく、零磁場 NQR において結晶内に化学的に非等価な site が複数存在する場合の共鳴線の帰属にも有用である。シミュレーションは数値的に行ったが $\eta = 0$ の場合、(図 2 a) には解析的な表現が存在している。すなわち、Pake doublet の一方の成分について

$$I^{\nu_0}(\omega) = f(\omega) / 3\sqrt{3}A \quad (6)$$

$$I^{\nu_{\pm}}(\omega) = \{ \sqrt{3}/f(\omega) - f(\omega)/\sqrt{3} \} / 3A \quad (7)$$

ここで $f(\omega) = \sqrt{1 + (2\omega/A)^2}$ である。

この他にも $I = 1/2$ の同種 2 スピン系における零磁場双極子スペクトル - 高磁場化学シフトスペクトルの場合についてもシミュレーションを行った。これは互いに isolate され

た結晶水のプロトンNMRの場合である。実験結果が得られればシミュレーションと比較することにより、双極子ベクトルに対する化学シフトテンソルの主軸方向が粉末試料でも簡単かつ精度良く得られる。

実験はBerkeleyで進行中であり、講演で発表する予定である。

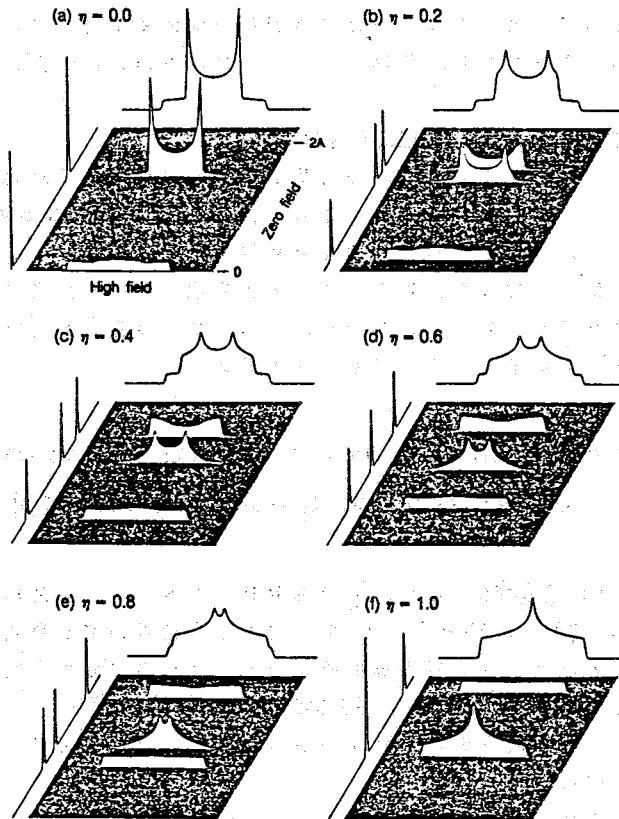


図2 スピン $I=1$ に対するシミュレーション零磁場-高磁場相関NMRスペクトル。従来の高磁場粉末スペクトルが非対称パラメータに依存して分解されている。(a)のスペクトルに対しては解析的な表現が存在している(本文参照)。

<文献>

- [1] D.P. Weitekamp, A. Bieleki, D. Zax, K. Zilm, and A. Pines, Phys.Rev.Lett. **50**, 1807 (1983).
- [2] D. Zax, A. Bieleki, K.W. Zilm, A. Pines, and D.P. Weitekamp, J.Chem.Phys. **83**, 4877 (1985).
- [3] See, for example, M. Mehring, "Principles of High Resolution NMR in Solids". 2nd ed., (Springer-Verlag) 1983.

(京大理、京大農*、日本電子**) ○内藤 晶、中谷 博*、
今成 司**、赤坂一之

State-Correlated Two-dimensional NMR Spectroscopy

Akira Naito, Hiroshi Nakatani, *Mamoru Imanari, and Kazuyuki Akasaka
(Kyoto University, *JEOL Ltd.)

A new type of two-dimensional NMR experiment, state-correlated two dimensional NMR spectroscopy, is proposed. In this experiment, correlation of NMR resonances between two chemically and/or physically different states is obtained. To perform this experiment, a micro wave heating was used to jump up temperature in a short time. As an example, state-correlated ^1H 2D NMR spectrum of water was examined between two states at different temperatures. The results indicate that the correlation of two different chemical shifts corresponding to the different temperatures was successfully obtained.

(序論) 二次元NMR分光法によって単に分解能が向上しただけでなく、従来の一次元NMR法では得られなかった、スピン状態間の相関や動的過程のマッピング等、の新しい情報が得られるようになった。今回、これまでにない新しい二次元NMR測定法として、状態相関二次元NMR分光法を提唱する。これは分子の二つの広い意味での化学的あるいは物理的状態の異なる状態間で、NMRスペクトルの相関を実験的に表す方法である。実際には、いかに短時間で状態を変換させ得るかという問題がある。なぜならば、磁化記憶が消失する前に状態変化を完了させる必要があるからである。今回は温度により状態変化を起こし、状態変化前後の温度での状態間の相関を観測することを試みた。この温度変化には昨年の討論会で報告した温度ジャンプNMR装置を用いて実験を行った。^{1,2}この装置ではパルスプログラマーからのパルスによって電磁弁を駆動させ、低温から高温の空気を短時間で切り替え温度ジャンプを行うものであった。今回、これをさらに改良して、マグネトロンにより発生したマイクロ波を併用することにより、非常に短時間で温度ジャンプを実現することに成功した。この装置を用いて、水の異なる二つの温度の間の状態相関を二次元NMRにより測定することを試みたので報告する。

(実験) NMR温度ジャンプ装置のブロック図を図1に示す。この装置では恒温槽により設定したT1, T2, T3の三種の気流パルスを切り替えて試料の温度をT1からT3にジャンプさせる。T2気流パルスは最終設定温度T3よりかなり高い温度に設定した。このT2気流パルスの挿入は温度ジャンプに要する時間を短縮するのに有効である。さらに温度ジャンプ時間を短縮するため、T2の間に短時間のマイクロ波パルスを同時に照射した。図2に今回使用したパルス系列を示す。このパルス系列は基本的には2D-NOE

パルス系列である。最初の 90° パルスで横磁化を準備し、 t_1 時間展開した後、2番目の 90° パルスによって磁化をZ方向に向ける。その後 τ 時間、間隔をあけ3番目の 90° パルスを照射して t_2 時間検出する。この τ 時間に温度ジャンプを起こさせるが、 $\tau <$ 緩和時間、の条件を満たさない場合は感度が大幅に減少する。そこで、 τ 時間の間に3つの気流パルスとマイクロ波を組み合わせて、温度ジャンプの短縮を計った。NMR測定には日本電子製GX-400分光器を使用し、東京電子技研製2.45GHz、最大出力1.3kWのマグネトロンによりマイクロ波を発生した。マイクロ波照射用コイルは銅箔で作製し、ラジオ波コイルの外側に位置する温度可変用ガラス管の上に装着した。

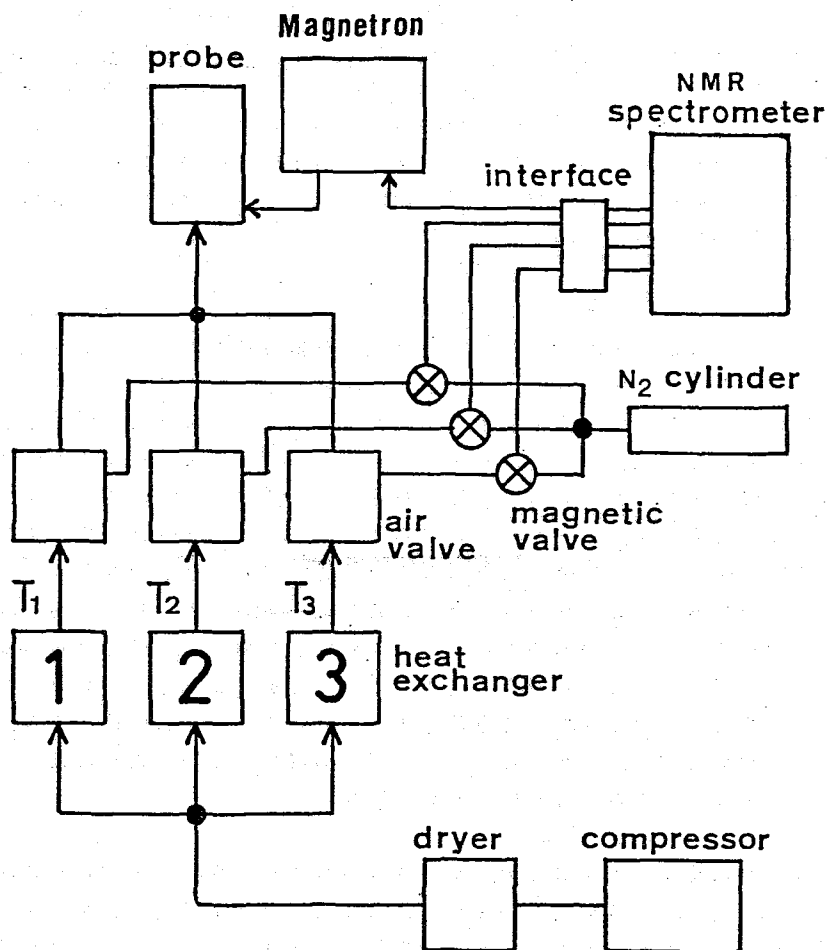


図1 状態相関2D-NMR装置のブロック図

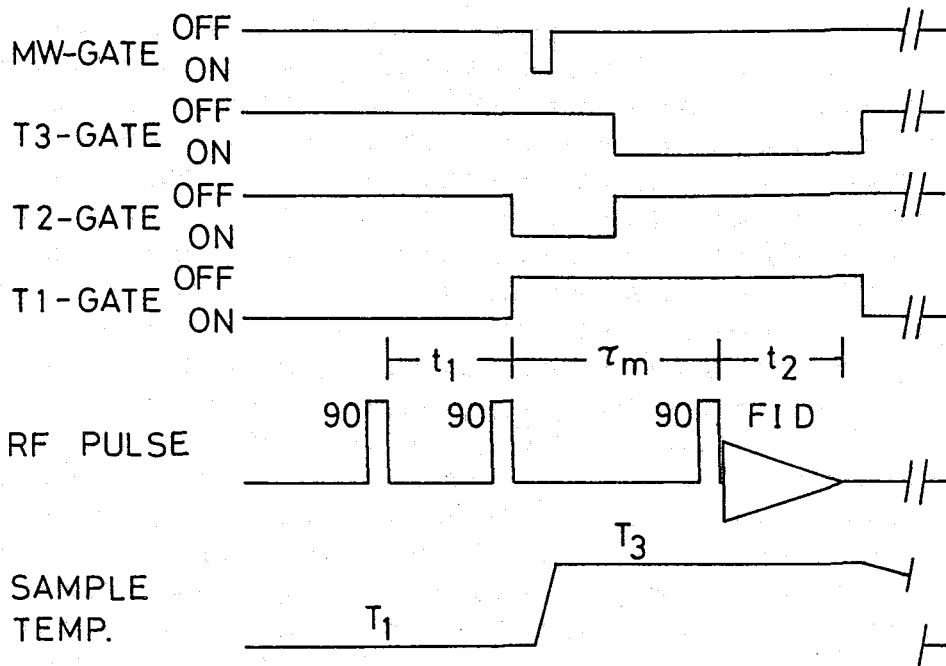


図2 状態相関二次元NMRのパルス系列

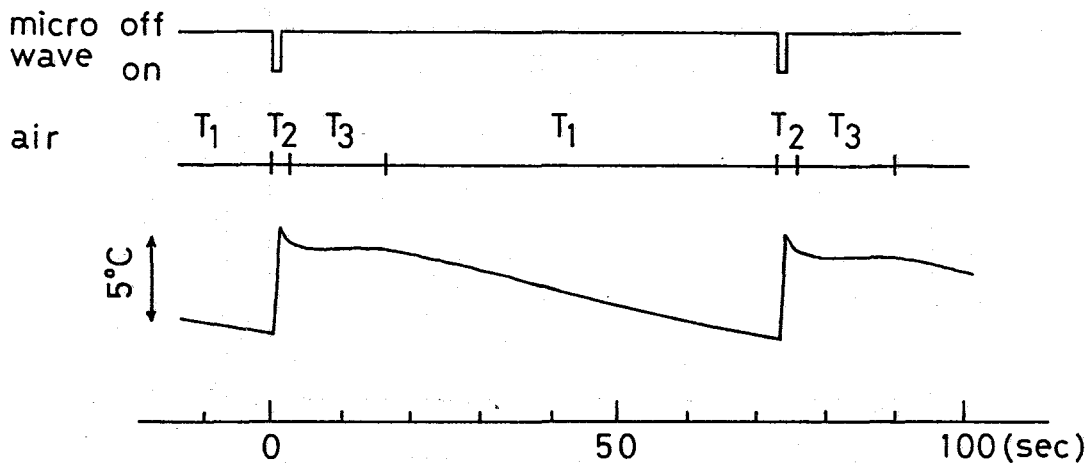


図3 水の温度ジャンプにおける温度変化

(結果と考察) マイクロ波による水の温度上昇の効率を見積るため、熱電対を挿入した試料管をプローブに設定して、温度上昇の曲線を記録した(図3)。この結果、0.5秒のプレヒーティング、0.5秒のマイクロ波照射、1.0秒のボウストヒーティングによって1秒以内に6°Cから30°Cの温度ジャンプを達成することができた。実際、水の温度はマイクロ波の出力に比例して上昇することが判明したが、ガラス管の温度はマイクロ波によつてはあまり上昇しない。従つて、T₂気流パルスの挿入はガラス管の温度を上昇し、水からガラス管への熱の移動を防ぐためにも重要である。このように短時間で温度ジャンプが達成できたので、図2のパルス系列を用いて水における状態相関2次元NMRの観測及び解析を試みた。水の化学シフト値は温度によって大きく変化することが知られている。例えば、低温から高温へ温度ジャンプすることによって水の信号は高磁場へシフトする。即ち、温度によって水の状態が変化するわけである。水の温度を30°Cから50°Cへ変化させることによって化学シフト値は0.18ppm高磁場側へシフトした。そこで、t₁時間では30°C、t₂時間では50°Cの温度になるようマイクロ波出力等の設定を調整し2Dデータを収集した。このデータの2次元フーリエ変換によって得られたスペクトルの等高線プロットを図4に示す。水のピークは対角線上に現れず、低温の水と高温の水のピークの結ばれる位置に現れているのが分かる。さらにF₁軸の水の線幅に比べてF₂軸の水の線幅はかなり広いことが観測された。このことは温度ジャンプ後の水の温度に多少の分布があることを意味している。これらの結果は、今回提唱した水の状態相関NMRスペクトルが観測されたことを意味している。

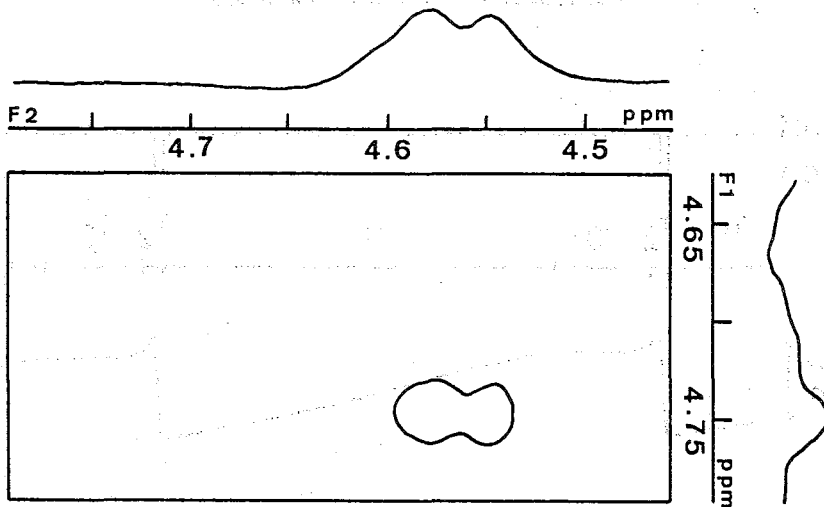


図4 水の30°Cと50°Cにおける状態相関二次元NMRスペクトル

(文献)

- (1) 赤坂一之、内藤 晶、中谷 博、今成 司、第27回NMR討論会要旨集255頁 (1988)札幌
- (2) K. Akasaka, A. Naito, H. Nakatani, and M. Imanari, Rev. Sci. Ins., in press.

高温 (1450°C) NMR 装置の試作と そのけい酸塩融体への応用

(北大工・北大理) ○ 前川英己、下川繁三、山田英二、前川 尚、
中村義男、横川敏雄

A new high temperature (1450°C) probe for NMR instrument
and its applications to silicate melts

*Hideki Maekawa, Shigezo Shimokawa, Eiji Yamada
*Takashi Maekawa, *Yoshio Nakamura, *Toshio Yokokawa
(Fac. of Eng. and *Fac. of Sci. Hokkaido Univ.)

A high temperature NMR probe was developed and applied to the measurement of ^{29}Si nucleus in silicate melts. Stabilized dc current was supplied to the heating element of Pt-wire during the measurement. Maximum temperature of the furnace was 1450°C. The line width of silicate became narrower with increasing temperature due to the exchange reactions among Qn species.

〔序〕 けい酸塩などの酸化物融体の物理化学は、マグマ溜りの性質、材料としてのガラス、セラミックスの熔融過程の性質等、液体—固体間の種々の相転移を含む構造変化、動的性質の解明に役立てられる。今日までこれらの系に対する熱力学的な測定は、数多くなされてきた。それら融体中では、イオン性と共有結合性の混在した結合が生じ、且つ、特徴的な網目構造をとることから、簡単な構造モデルではうまく説明できなかった。また、ミクロの原子スケールでの構造と動的性質の理解は甚だ不十分である。高温における実験技術の困難さ、理論的取扱いの難しさ等がその障害となっていた。この種の融体は、急冷すると容易にガラス化するので、これを融体の凍結されたものと仮定する場合もあった。この仮定は正しくない。それゆえ、融体を直接観測することが是非とも望まれる。

分光学的な立場からみると赤外やラマンによる測定が行われているが、その時間スケールは格子振動の程度で、拡散や粘性などに関係した時間スケールのイオンの動きは観測できない。また X 線回折法でも、長距離秩序を持たない融体では得られる情報に限界がある。

NMR 法は緩和や線形の解析から固体や液体の動的性質、構造を議論できる最も優れた分光法と言える。さらに現在では NMR 装置の高磁場化により感度が格段に向上した。また、固体に適用された高分解能の手法により、その解析は随分と容易になった。けい酸塩ガラスについても、固体の MAS-NMR により、いくつかの構造単位が同定されている。

本研究の目的は高温における NMR 測定の技術的問題を克服するとともに、けい酸塩融体の固体から熔融状態（温度にして室温から 1100°C）に至るスペクトルを観測し、そのガラス状態での構造単位が温度と共にどのように変化するか、又、融体（液体）ではどの様な寿命でその構造単位が存在するかを明らかにすることである。

まえかわひでき、しもかわしげぞう、やまだえいじ、まえかわたかし
なかむらよしお、よこかわとしを

【装置】 1000℃以上を目指した高分解能型のNMR装置は、現在迄に2グループ、Pines, Stebbinsら⁽¹⁾の試料を上下する方法(1985)、Coutures, Massiotら⁽²⁾の強いレーザー光で試料を溶解させる方法(1988)が報告されている。我々は、彼らとは異なり、直接ヒーターを磁石の中に置く方法を取った⁽³⁾⁽⁴⁾。NMR装置は、Bruker MSL200(WB)を用いた。自作の高温プローブの概略をFig1に示す。0.4mmの白金抵抗線を用いてヒーターを作製した。ヒーターは2本互いに反対方向に電流を流す様に消磁型で巻き、これを共振コイルより離すことで、電気的ノイズの発生を極力抑えた。耐熱材はSiを含まないアルミナを用い、ヒーターとコイルの前後をセメントで固めてチタン合金の板で炉を固定した。加熱には直流安定化電源を用い、実験中は常時電流を供給したが電流による雑音の影響は無視できる程度であった。高温域(900℃以上)では、共振コイルの抵抗の増大によりQの低下が著しい。炉の温度が1450℃の時、ヒーター電流の値は20Aでおよそ800Wである。電気炉の外筒は銅と砲金より成り、室温の循環水により冷却されている。実験中炉芯の様子は磁石上部におかれた反射鏡等で監視する事ができる。検出部分は高分解能型を用い、共振回路のコンデンサーは冷却板により断熱されている。試料容器は六方晶窒化ほう素製で、酸化を防ぐために窒素ガスを流している。このプローブは室温シムを取り外して磁石の中に挿入する。大きなヒーター電流による磁場のドリフトは、認められなかった。溶融

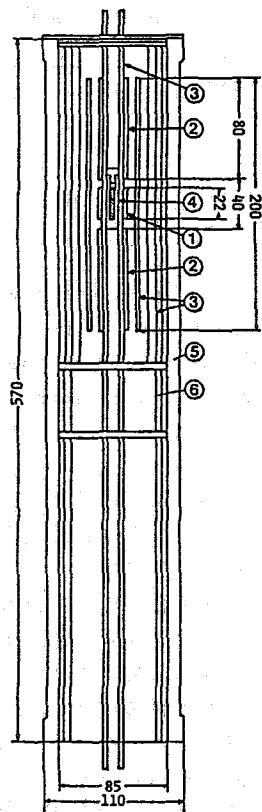


Fig 1

- 1 rf coil
- 2 Pt-heater(0.4mm-diam)
- 3 Al₂O₃ tube
- 4 h-BN sample holder
- 5 Cu-brass water jacket
- 6 Ti-alloy stand

温度でのけい酸塩融体の線幅は、100 Hz、室温での標準溶液の線幅は、40 Hzであった。化学シフトの標準としては、けい酸エチルを用いている。

【けい酸塩の構造】 けい酸塩の基本構造単位は、酸素が4配位したSi四面体である。融体及びガラスは、その四面体

が頂点で酸素を共有して無秩序な網目構造をとる。アルカリイオンは、その網目を切断し、架橋していない酸素を生成する。²⁹Si NMRでは、ガラス、溶液中の架橋酸素の数の違うSiサイトが分別定量される。それらは、*n*を架橋酸素の数として、*Q_n* (*Q₄* ~ *Q₀*)の記号で表す。アルカリけい酸塩について、*Q_n*種を疑似的な化学種と見立て、



の平衡から構造を論ずる試みがなされている。例えば、けい酸塩ガラスについて、アルカリの種類をK, Na, Liと変えていくと、(1)式の平衡は順に右にずれる。

温度上昇にともない、その平衡はどう変わるのか、また融体では*Q_n*種の寿命はどの程度の長さなのか、これが興味を中心となる。

〔測定結果〕 39.76MHzにて ^{29}Si の測定を行った。対象は、ナトリウムけい酸塩の組成を変えた6種類で、いずれもガラス状態から出発した。スペクトルの一例として、 $\text{Na}_2\text{O}\cdot 3\text{SiO}_2$ についての結果を示す(Fig2)。スペクトルは、 Q_3 と Q_4 サイトからの2つのピークからなっている(破線)。室温(ガラス状態)から550℃(ガラス転移温度付近)でそれぞれのピークで線幅の減少が起こり始める。670℃(過冷却液体)になると、 Q_3 、 Q_4 間の交換反応により、事実上一本のピークとなり、1150℃(融体)では、非常に幅のせまいLorentz型のピークとなる。同じ組成のガラスで観測される Q_3 及び Q_4 ピークのケミカルシフト差480Hzから、670℃での交換反応の相関時間は470 μs 、その活性化エネルギーは、約200kJと見積られた。これは、粘性流動の活性化エネルギー⁽⁶⁾に近い。

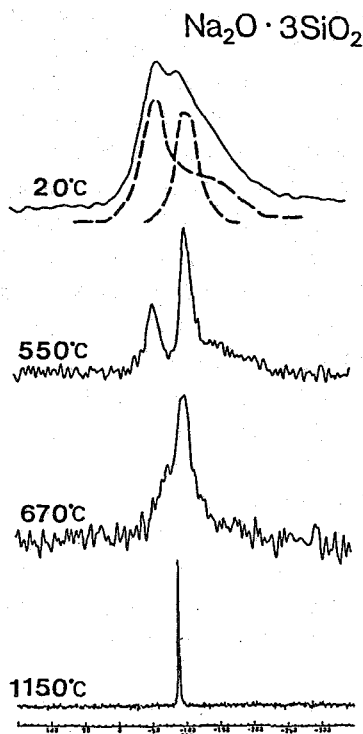


Fig 2

温度上昇により、線幅は800℃付近まで直線的に減少し、それ以上の温度で一定値を示している(Fig3)。また、その変化のしかたは組成によらず、同様の傾向を示している。 Q_n 種間には、 $2Q_3 = Q_2 + Q_4$ 、 $2Q_2 = Q_3 + Q_1$ など、何種類かの交換反応が考えられるが、この結果は、それらの交換反応の相関時間が組成に依存しないことを示唆する。しかし、さらによくわしい議論のためには、 T_1 、 T_2 の測定が必要となる。これからの課題である。

溶融温度(1050℃)での、融体の化学シフトを、室温でMAS-NMR法で得られたガ

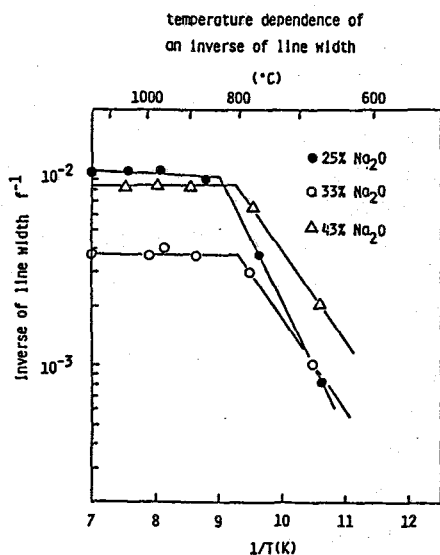


Fig 3

ラスのピークの加重平均の化学シフトと比較して Fig4 に示した。Na₂O 10 mol%の組成では、1050℃は固液共存の領域であり、液相線上の組成の融体が観測された。ガラスの平均値は、組成に対し直線的な変化を示している。一方、融体は、ガラスと比較してよりプラス側で、またNa₂O量増加に伴い、組成依存性が小さくなる傾向を示した。この事は、ガラスと融体の間に、なんらかの構造の違いがある事を示していると考えられる。X線回折の結果などから、ガラスに比べ融体では、Si-O 第一配位距離が短くなると同時に、Si-O-Si角度が大きくなる事が知られている。また、一般に化学シフトはSi-O距離が増すほど低磁場側（プラス側）になることが多くの結晶で認められている。今回の結果を結合距離の違いだけで説明しようとする、融体の方がSi-O距離が長くなることになり、X線回折の結果と合わない。ガラスと融体ではQ_n種の分布も異なっており、それらの効果も取り入れた解析が必要であると考えられる。

[今後の課題]

本装置の改良すべき点として、① 試料部分の温度勾配の解消（中心で1℃、1cmの処で15℃）、② 緩和測定のための高出力型プローブの製作（コンデンサーの入手）、③ 試料ホルダーからの不純物（B₂O₃）の混入の防止、の3点があげられる。

マグネシウムけい酸塩融体等の測定のためにはさらに高い温度（>1800℃）が必要であり、酸化雰囲気嫌うモリブデンなどをヒーターに用いた装置を計画している。

また、粘性などの物性をより直接的に反映する、酸素イオンの動的な性質を調べる必要がある。¹⁷Oは感度が低く、その測定のためには、窒化物等を耐熱材とした、さらに信号/雑音比の高い装置を作製しなければならない。

- 参考文献 (1) Stebbins et al. Rev.Sci.Inst. 39 57(1986)
 (2) J.P.Coutures et al. Bruker Report(1988)
 (3) Defries and Jonas J.Magn.Res. 111 35(1979)
 (4) Shimokawa and Yamada J.Magn.Res 103 51(1983)
 (5) P.Richet et al. Geochim.Cosmochim.Acta 471 48(1984)

本研究は文部省科学研究費 63470026 により行ったものであることを付記する。

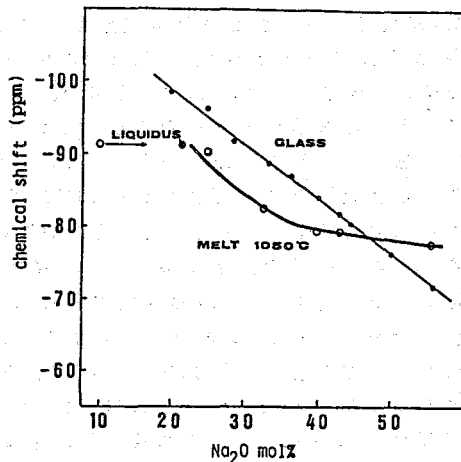


Fig 4

(Doty Scientific, Inc.) F. David Doty, Shin-Il Cho,
Michael N. Clingan, J. B. Spitzmesser

Linear, nonlinear, and spurious noise sources are analyzed from the perspective of high-power double-tuned solid NMR probes.¹ Overcoupling is shown to be an effective method of achieving more than an order-of-magnitude reduction in ring-down with relatively little effect on S/N.² Progress and hardware limitations in various applications of high-speed sample rotation are discussed, including Dynamic Angle Spinning (DAS),³ low temperature (8 K) MAS, and high temperature (600°C) MAS.⁴

1. F. D. Doty, T. J. Connick, X. Z. Ni, M. N. Clingan, J. Magn. Reson. 77, 536 (1988).
2. R. K. Harris, P. Jackson, P. J. Wilkes, J. Magn. Reson. 73, 178 (1987).
3. C. J. Lee, A. Samoson, B. Q. Sun, T. Terao, and A. Pines, Proc. Nat. Acad. Sci., (1989).
4. J. F. Stebbins, E. H. Williams, private communication, Dept. of Geology, Stanford University and Varian Associates, Palo Alto, CA, 1989. Presented at ENC, Asilomar, CA, 1989.

F. David Doty

Doty Scientific, Inc., 600 Clemson road, Columbia, S. C. 29223

P1 — P25

固体高分解能 ^{15}N NMRによるグリシン残基を含むオリゴペプチドの水素結合の研究

(東工大工) ○黒木重樹・安藤慎治・安藤 勲
(郡大工短) 庄司 顕・尾崎拓男

Hydrogen-Bonding Effect on ^{15}N -NMR Chemical Shift of the Glycine Residue in Oligopeptides as Studied by High-Resolution Solid-State ^{15}N NMR/Spectroscopy

Shigeki Kuroki, Shinji Ando, Isao Ando, (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152), Akira Shoji, Takuo Ozaki, (College of Technology, Gunma University, Kiryushi, Gunma 376)

The experimental ^{15}N chemical shifts of glycine residue in X-Gly-Gly are plotted against the N-H bond length ($R_{\text{N-H}}$) associated with the hydrogen bond. It is shown that the decrease of $R_{\text{N-H}}$ leads to a linear upfield shift. Further, the ^{15}N chemical shift calculation was carried out using a model compound by the FPT-INDO method, in order to understand further clearly the nature of hydrogen bond. The calculated results explain reasonably the experimental ones.

1. 緒言

近年、固体状態でのペプチドの構造研究に固体高分解能 ^{13}C NMRが用いられるようになってきた。この手法により、グリシン残基をもつオリゴペプチドにおいて、そのカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトが水素結合と明確な相関をもつことなどが明らかにされている²⁾。

本報告では水素結合に直接関与するもう一つの原子、アミド窒素の ^{15}N 化学シフトに注目し、それが水素結合に対してどのような情報を含んでいるかを議論する。 ^{15}N 核は天然存在比0.36%であり、 ^{13}C 核に対する相対感度は0.0214とかなり低感度である。しかし、現在ではこのような低感度の核種も交差分極法などの新手法の開発や、NMR検出感度と分解能の向上により天然存在比でも測定が可能になった。すでに庄司らにより、アラニン、ロイシン等のホモポリペプチドで α -ヘリックスが β シート構造よりも ^{15}N シグナルが高磁場側に出ることが示され、 ^{15}N 化学シフトにコンホメーション依存性があることが明らかに示されている³⁾。また、この研究においてアミド窒素の ^{15}N 化学シフトの挙動に水素結合が重要な役割を演じていることを示唆している。本報告では水素結合とペプチドの ^{15}N 化学シフトの関係を明らかにし、また ^{15}N 化学シフトが水素結合についてどのような情報を与えるかを報告する。

2. 実験

1) 試料

くろき しげき, あんどう しんじ, あんどう いさお,
しょうじ あきら, おざき たくお,

試料として、グリシルグリシンシーケンスをもつオリゴペプチドを調製した。ペプチドにおいて窒素の化学シフトを議論するとき、注目しているアミノ酸残基の ^{15}N 化学シフトは、N端についている前のアミノ酸残基の影響を受けて変化する。今回試料として用いたものはすでにX線回折等で構造が明らかになっている。それをTable 1に示す。試料はSIGMA社より購入し、既に報告されている方法で再結晶をおこなった。

Table.1 Geometrical parameters of X-Gly-Gly peptides

sample	Dihedral Angle/degree		Hydrogen bond length and angle			
	ϕ	ψ	N \cdots O length(Å)	H \cdots O length(Å)	N-H length(Å)	N-H \cdots O angle(degree)
Gly \cdot GlyOH	157.1	10.7	2.94	1.97	1.02	158
Gly \cdot Gly \cdot H $_2$ O \cdot HCl	-80.0	3.3	^a 3.30	2.30	0.79	162
Gly \cdot GlyOH \cdot HNO $_3$	165.6	176.9	3.12	2.38	0.76	165
ValGly \cdot GlyOH	-146.6	-4.3	3.05	2.19	0.93	152
ProGly \cdot GlyOH	-110.5	175.1	2.89	2.07	0.69	165
AlaGly \cdot GlyOH	170.9	175.2	3.00	2.19	0.84	160
SarGly \cdot GlyOH	-85.4	-177.5	3.06	2.23	0.85	167
TyrGly \cdot GlyOH	-103.9	-152.6	2.93	1.94	0.86	163
BocGlyGly \cdot GlyOBzl	-77.8	-178.4	2.92	2.10	0.92	157

These values are ^aglycine residue's.

#is that glycine residue participates in H \cdots Cl type hydrogen bond.

2) 固体 ^{15}N NMR測定

固体高分解能 ^{15}N NMRスペクトルは、CP-MASアクセサリを付属した日本電子製GSX-270 NMR分光器(27.25 MHz)を用い、室温で測定を行った。積算回数は200~600回である。化学シフトの基準としては外部基準として固体 ^{15}N グリシンを用い、その化学シフトを11.59 ppmとして、 ^{15}N H $_2$ Oの水溶液基準に換算した。

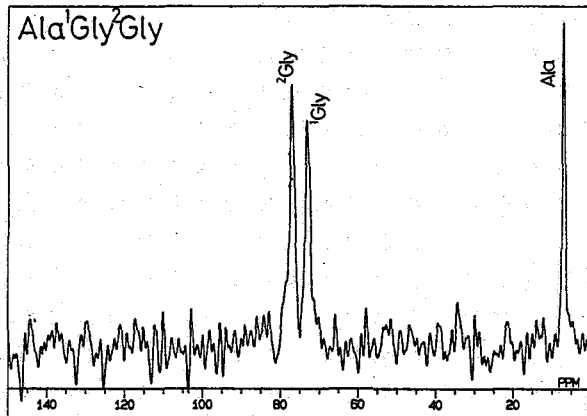


Fig.1 27.25MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectrum of L-alanylglycylglycine in the crystalline state

3. 結果と考察

代表的なオリゴペプチドの ^{15}N CP/MAS NMRスペクトルを Fig.1に示した。天然存在比でも大変S/N比のよいスペクトルが得られている。ピークの帰属はスペクトル中に示した。

Fig.2において $^1\text{Gly}-^2\text{Gly}$ シーケンスの第二番目のグリシン残基の ^{15}N 化学シフトをX線回折で決定されているN-H結合距離に対してプロットした。N-H結合距離の増加にともない、化学シフトが直線的に低磁場シフトしている。X線回折から得られたデータでは、水素結合距離(N...O距離)が増加すると、N-H結合距離は減少している⁹⁾。つまり、N-H距離の増加はN...O距離の減少を意味している。しかし、N...O距離に対し化学シフトをプロットしても明確な関係は得られない。このことから、水素結合の角度($\angle\text{N-H}\cdots\text{O}$)の効果も相当に大きいのではないかということが予想できる。これら二つの効果が重なりあってN-H距離に反映していることが考えられる。

水素結合距離(N...O距離)とN-H距離の関係を、N-メチルアセトアミドの2分子モデルを用いて、ab-initio MO計算(STO-3G法)で計算した。その結果をFig.3に示す。それによると、N...O距離が2.97ÅまではN-H距離は増加しているが、N...O距離がそれ以上になるとN-H距離は減少していく。また、エネルギーの極小はN...O距離が2.97Å、N-H距離が極大(1.02Å)のと

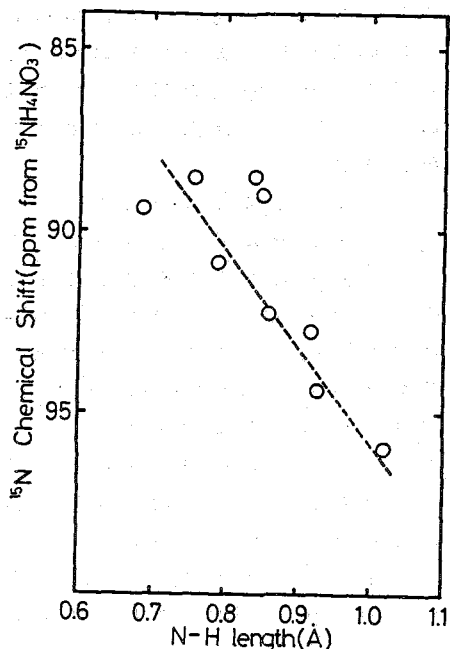


Fig.2 Plots of the observed ^{15}N chemical shift in the crystalline state against the N-H bond length

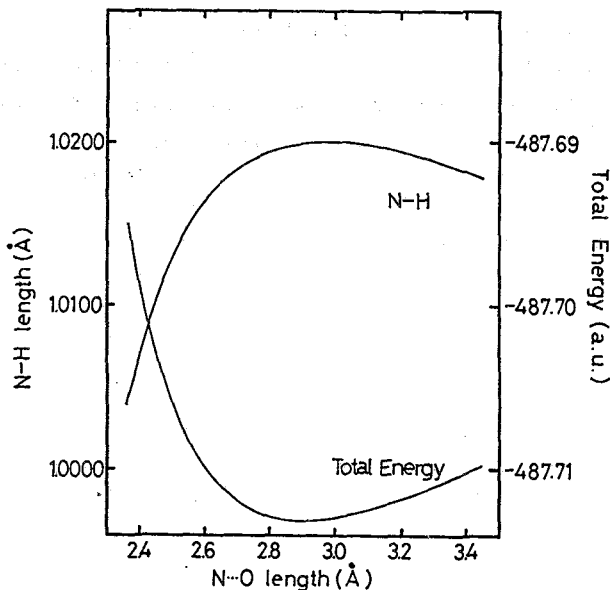


Fig.3 Plots of the calculated N-H bond length and total energy against the hydrogen bond length(N...O)

ころにある。今回用いた試料のN...O距離は2.85Å~3.30Åであるので、理論計算においてもX線の結果と同様に水素結合距離の増加に伴い、N-H距離が減少するという結果が得られた。

FPT-INDO法により、N-アセチル-N'-メチルグリシンアミドをモデルとして、N-H結合距離を変化させて、窒素の化学シフトを計算した。計算結果は遮蔽定数なので、絶対値の大きい方が低磁場である。その結果をFig.4に示す。N-H距離の増加に伴い、低磁場側に大きくシフトしていることがわかる。これは前述の実験結果と一致し、 ^{15}N 化学シフトの挙動はN-H距離に支配されていることがわかった。

以上述べたように、アミド窒素の ^{15}N 化学シフトを解析することにより水素結合に関する情報が得られることがわかった。

参考文献

- 1) Saito, H and Ando, I, Ann. Repts. NMR Spectroscopy, vol. 21, 209 (1989)
- 2) Ando, S, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 3380 (1988)
- 3) Shoji, A, et al., Macromolecules, 20, 2441 (1987)
- 4) Taylor, R, et al., Acta Cryst. B40, 280 (1984)

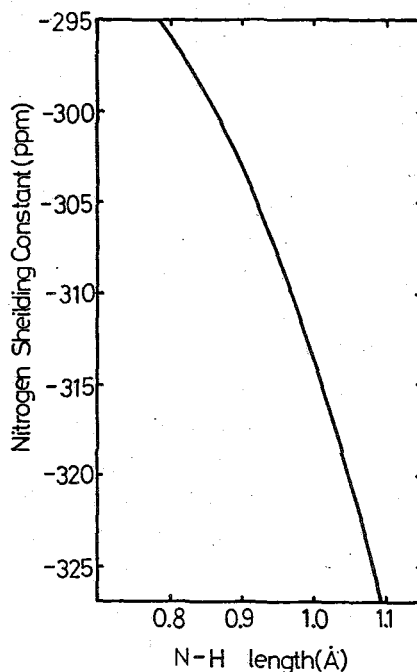


Fig. 4 Plots of the calculated ^{15}N shielding constant against N-H bond length

(徳山 曹達、農工大工*)・青木 明良、林 哲男、朝倉 哲郎

 ^{13}C NMR Spectral Analysis of Olefin Copolymer

Akira Aoki, Tetsuo Hayashi, and Tetsuo Asakura* (Polymer Development Laboratory, Tokuyama Soda Co. Ltd., *Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Complicated split peaks arising from differences in long range comonomer sequences are observed in the ^{13}C NMR spectrum of 1-butene-propylene copolymer. The chemical shift differences among these comonomer sequences were predicted by the calculation of ^{13}C chemical shifts due to the γ -effect using rotational isomeric state (RIS) model modified for 1-butene-propylene copolymer. Further, carbon-carbon connectivities of 1-butene-propylene copolymer were verified from the ^{13}C 2D-INADEQUATE spectrum. On the basis of predicted chemical shift differences and verified carbon-carbon connectivities, ^{13}C NMR chemical shift assignments were provided.

1. はじめに

^{13}C -NMRはオレフィン共重合体の材料特性を決定する重要な構造因子である共重合組成や共重合連鎖分布を解析する最も有力な手段である。オレフィン共重合体の ^{13}C -NMRスペクトルでは異なる共重合連鎖に起因した分裂ピークが観測されるが、我々は、これらのピークを帰属するため、 ^{13}C -NMR化学シフトの γ 効果と回転異性状態(RIS)モデルに基づく化学シフト計算を行ってきた。^{1),2)} エチレン-プロピレン共重合体については、この方法によりヘキサッド共重合連鎖の差に起因する分裂ピークの帰属が可能となった。^{1),2)} 一方、1-ブテン含有共重合体では主鎖結合のコンホメーション状態に応じて1-ブテンユニット中の側鎖エチル基は種々のコンホメーションをとり得る。そのため、1-ブテン含有共重合体の回転異性状態を評価するには、RISモデルに1-ブテンユニット中の側鎖コンホメーションの考慮を加える必要がある。そこで本研究では、1-ブテン-プロピレン共重合体について、側鎖コンホメーションを考慮したRISモデルを用いて γ 効果による化学シフトを計算し、共重合連鎖の差に基づくピークの分裂を予測した。さらに、 ^{13}C -2次元INADEQUATEスペクトルから骨格炭素のつながりを確認することによりスペクトルの帰属を行った。

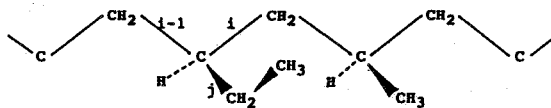


Figure 1. Planar zigzag conformation of an isotactic 1-butene-propylene copolymer.

あおき あきら、 はやし てつお、 あさくら てつお

2. 化学シフト計算

Fig.1に1-ブテン-プロピレン共重合体の構造を示す。側鎖エチル基の結合jは主鎖の状態に応じて種々のコンホメーションをとり、側鎖エチル基のメチル炭素と主鎖の炭素の間には反発相互作用が存在する。この反発相互作用の主鎖回転異性状態への影響を評価するには、主鎖の統計重率マトリックスの各要素に、各々に対応する側鎖コンホメーションの重率を掛け合わせるとよい。³⁾この方法によりエチレン-プロピレン共重合体に関するMarkの統計重率マトリックスを改良した。得られた1-ブテンユニットに対するinter-dyad統計重率マトリックスをTable.1に示す。統計重率は $\eta = 1$ として τ (ブタン相互作用) 及び ω (ペンタン相互作用) は $E\tau = 2100 \text{ J mol}^{-1}$, $E\omega = 6300 \text{ J mol}^{-1}$ とおき温度の関数として特性化した。化学シフト計算は、低ブテン含有量の高立体規則性1-ブテン-プロピレン共重合体を簡略化したモデルであるアイソタクチックポリプロピレン分子鎖中に1-ブテン-プロピレンペンタッド共重合連鎖が孤立した構造に対して行った。

3. ^{13}C -NMR測定

測定に使用した試料は、 $\delta\text{-TiCl}_3/\text{Et}_2\text{AlCl}$ 触媒系を用いて重合した高立体規則性1-ブテン-プロピレン共重合体である。 ^{13}C -NMR測定は日本電子製JEOLOGSX270を用い、観測周波数67.8MHz、測定温度120℃で行った。用いた溶媒は、 o -ジクロロベンゼンと C_6D_6 を9:1の容量比で混合したものであり、サン

Table 1. Matrix for inter-dyad bond pair of 1-butene unit (A) and statistical weights corresponding to the conformation of the side chain of 1-butene unit (B).

$$(A) \quad U'_{ij} = \begin{vmatrix} \eta \times a & b & \tau \times c \\ \eta \times c & d & \tau \omega \times e \\ \eta \times b & \omega \times f & \tau \times d \end{vmatrix}$$

$$(B) \quad \begin{aligned} a &= \tau + 2\omega & d &= \tau\omega + 2 \\ b &= \tau + \omega + 1 & e &= \tau\omega^2 + 2 \\ c &= \tau\omega + \omega + 1 & f &= \tau + 2 \end{aligned}$$

Table 2. The observed and calculated chemical shift differences in propylene methyl region of the ^{13}C NMR spectrum of 1-butene-propylene copolymer.

No.	comonomer sequences	chemical shift calcd.	differences ^a obsd.
1	BBPBB	- 0.40	- 0.31
2	BBPBP	- 0.36	- 0.27
3	PBPBP	- 0.32	- 0.25
4	BBPFB	- 0.24	- 0.17
5	BBPPP	- 0.20	- 0.13
6	PBPFB	- 0.19	- 0.13
7	PBPPP	- 0.15	- 0.10
8	BFPFB	- 0.07	- 0.05
9	BFPFP	- 0.03	- 0.03
10	PPPPP	0.00	0.00

^a Chemical shift differences are expressed by ppm relative to that of the peak appearing at the lowest field, set to be 0.00 ppm.

ル濃度は $0.1\text{g}(\text{polymer})\text{cm}^{-3}(\text{solvent})$ に調製した。1次元スペクトルは、パルス幅 90° , ^1H broad band noise decoupling 下、5000回の積算で得た。分解能向上のため FID に sine-bell型ウィンド関数を乗じた後、フーリエ変換を行った。2次元 INADEQUATE スペクトルは $(\pi/2)_{x-t_1} - (\pi)_{x-t_2} - (\pi/2)_{x-t_3} - (3\pi/4)_{x-t_4}$ のパルス系列を用いて得た。 $(\tau = 1/4J, J^{13\text{C}-^{13}\text{C}} = 34.8\text{Hz})$ パルス繰り返し時間 4.0秒で各 t_i につき 512個の FID を積算した。4096 \times 128のデータマトリックスを 4096 \times 512 にゼロフィリングで拡張した後、フーリエ変換を行った。スペクトル幅は、それぞれ 3300Hz (ω_2), 6600Hz (ω_1) である。

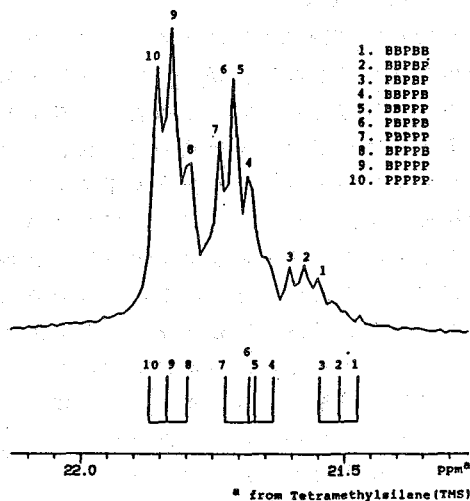


Figure 2. Propylene methyl region in ^{13}C NMR spectrum of 1-butene-propylene copolymer.

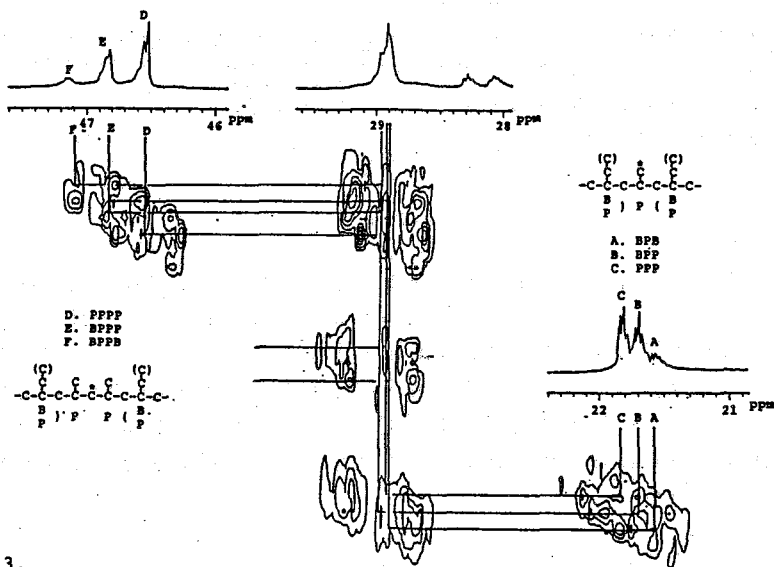


Figure 3. 2D-INADEQUATE spectrum of stereoregular 1-butene-propylene copolymer. Connectivities among methyl, methine, and methylene carbons in propylene units.

4. 結果と考察

Table.2 Fig.2にそれぞれ1-ブテン-プロピレン共重合体のプロピレンメチル炭素領域の化学シフト計算結果と ^{13}C -NMRスペクトルを示す。Fig.2中の棒スペクトルは化学シフト計算値を示す。このように計算値は実測値とよい一致を示す。図に示すように、まずトリアッド共重合連鎖の差で大きく分裂し、さらにペンタッド共重合連鎖の差で比較的小さく分裂するという傾向をよく再現している。Fig.3に1-ブテン-プロピレン共重合体の2次元INADEQUATEスペクトルで観測されたプロピレン炭素骨格のつながりを示す。この結果よりプロピレンメチル炭素領域においてトリアッド共重合連鎖の帰属を確認することができる。この2つの方法を相補的に用いることにより、他の領域についてもペンタッドあるいはヘキサッド共重合連鎖の差による分裂ピークを正確に帰属できる。

化学シフト計算に用いたブテンユニットの統計重率マトリックスから主鎖結合*i*-1, *i* (Fig.1) のコンホメーションの組合せごとに側鎖コンホメーションの確率が計算される。側鎖コンホメーションの定義は、Fig.4に示すように安部³⁾の表示に従った。この値は、1-ブテンユニットのメチル炭素から γ 効果を受ける1-ブテンと1-ブテン、または1-ブテンとプロピレンにはさまれたメチレン炭素の化学シフトを計算する上で重要になる。

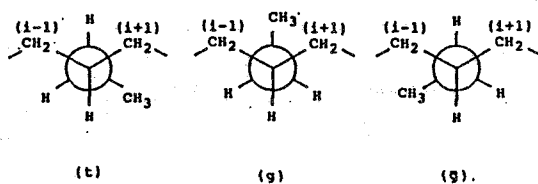


Figure 4. Three conformations (*trans*(*t*), *gauche*(*g*), and another *gauche*(\bar{g})) of bond *j* are represented by Newman projections along bond *j*.

5. おわりに

側鎖コンホメーションを考慮したRISモデルを用いて γ 効果による化学シフトを計算すると、1-ブテン-プロピレン共重合体の複雑な分裂ピークの出現順序及び分裂幅が予測される。2次元INADEQUATEスペクトル解析から得られた炭素骨格の情報は、この化学シフト計算による予測の妥当性を支持する。これらの手法を相補的に用いた ^{13}C -NMRスペクトルの解析方法は、1-ブテン-プロピレン共重合体に限らず、エチル基以上の側鎖を持つ高級 α -オレフィン共重合体の構造解析にも非常に有用である。

- 1) T. Hayashi, Y. Inoue, R. Chujo, and T. Asakura, *Polym. J.*, **20**, 107(1988)
- 2) T. Hayashi, Y. Inoue, R. Chujo, and T. Asakura, *Polymer*, **29**, 138(1988)
- 3) P. J. Flory 著、安部 明廣 訳 「鎖状分子の統計力学」 10章 培風館(1971)

(東工大・工) ○黒子 弘道・安藤 勲

 ^{13}C NMR Chemical Shift and Molecular Motion of Poly(Ethylene Oxide) in the Solid State

Hiromichi Kurosu and Isao Ando / Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo

It was observed that ^{13}C NMR chemical shift of poly(ethylene oxide) (PEO) in the solid state moves downfield with decreasing temperature. We have carried out calculations of the ^{13}C NMR chemical shift of PEO chains taking into account the interchain interaction and the rotation along the chain axis to understand the relationship between the chemical shift displacement and molecular motion of PEO. The displacement of the chemical shift of PEO was reproduced by this quantum chemical calculations.

1. はじめに

近年、温度可変 (VT) 固体高分解能 CP/MAS NMR による研究が発展してきた。VT・CP/MAS を用いて固体 NMR スペクトルを得ることの利点は例えば、相転移の影響や再配向の障壁などの情報を得ることができるなどの他に、室温では運動や短い $T_{1\rho}$ のために十分な CP 効果が得られない試料に対しても温度を下げることによって分子運動が制限され、十分なスペクトルを得ることが可能となることがあげられる。

ポリエチレンオキシド (PEO) (ガラス転移温度: $\sim -40^\circ\text{C}$) は Connorらが報告¹⁾しているように、室温では $T_{1\rho}$ は最小値 (100 μs 程度) をとり、通常の CP 条件では十分な C の磁化を得ることは困難であった。このような運動性の良い試料に対しては Pulse Saturation Transfer (PST) 法を用いることにより、ブロードではあるがスペクトルを得ることができた。PST/MAS 法を用いて室温から -28 , -67 , -106°C (すべて補正温度) と温度を下げるに従って PEO のメインピークは Table 1 に示すように、低磁場側にシフトしている。そして、この -106°C での 72.6 ppm は低温下での通常の CP 条件で観測された値と一致していることから、運動が制限されたことによって、PEO の化学シフトが低磁場シフトしたことがわかる。本研究ではこの低磁場シフトがどのような機構で生じたかをより深く洞察するために、私共が開発した長距離相互作用および分子間相互作用を考慮できる tight-binding (TB)-INDO/S 法により理論的に研究することを目的としている。

2. 計算

くろす ひろみち, あんどう いさお

この低磁場シフトはPEOでもポリメチレンオキシド(POM)にみられるような鎖の回転によるものと考え、回転による化学シフト変化を評価をした。分子軌道法としてTB-INDO/Sを用い、化学シフト評価の方法としてSOSを用いて以下の式に従い計算を行った²⁾。

$$\Psi_n(k) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_r \sum_j^N \exp(ikj) C_{vn}(k) \phi_{\sqrt{r-ja}}$$

$$\sigma_A^d(k) = \frac{-\mu_0 2e^2}{4\pi 3m_e^2} \sum_v \sum_v^A P_{vv'}(k) \langle \phi_{\sqrt{r}} | r^{-1} | \phi_{\sqrt{r'}} \rangle$$

$$\sigma_{A,\alpha\beta}^p(k) = \frac{-\mu_0 \hbar^2 e^2}{4\pi m_e^2} \sum_m \sum_n^{occ \text{ unocc}} \sum_j^A \langle \sigma^{-3} \rangle_{2p} (1E_m^n - 1E_0)^{-1} \\ \times \sum_j^B \sum_l^B [X(j,m,n,\beta,\gamma)X(l,m,n,\gamma,\alpha) - Y(j,m,n,\beta,\gamma)Y(l,n,m,\gamma,\alpha) \\ + X(j,m,n,\gamma,\alpha)X(l,n,m,\beta,\gamma) - Y(j,m,n,\gamma,\alpha)Y(l,n,m,\beta,\gamma)]$$

$$P_{vv'}(k) = \sum_n^{occ} C_{vn}^*(k) C_{v'n}(k)$$

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

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

$$F_{\mu\mu}(k) = U_{\mu\mu} + \sum_v^{(A)} P_{vv} [(\mu\mu, vv) - \frac{1}{2}(\mu\nu, \mu\nu)] + \sum_{j=-M}^M \sum_{B \text{ (wt in cell)}} (P_B - Z_B) \gamma_A^{0j} \\ + 2\beta_A \sum_{j=1}^M S_{\mu\mu}^{0j} \cos(kj) - \sum_{j=1}^M \gamma_{AA}^{0j} \cos(kj) P_{\mu\mu}^{-jR} \quad (\mu, \nu \text{ on } A)$$

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

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

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

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

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

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

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

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

3. 結果および考察

回転状態のPEOの化学シフトを評価するため、7本のPEO鎖 (Fig. 1) を使い、格子定数 a を 8.05, 8.5, 9.0, 10.0, 12.0 Å と変化させ、これに伴い、格子定数 b も比例して変化させた。それぞれの鎖間距離モデルに対して、中央の鎖の相対角度を 0 度から 330 度まで 30 度ごとに計算を行った。この結果を Fig. 2, 3 に図示した。自由回転による平均化学シフトを計算し、結果を Table 2 に示した。

室温での化学シフトは鎖の回転による影響を受けていると考えられるのに対し、-106°C ではこの運動がかなり制限されていると考えられる。従って、自由回転平均の化学シフト値は室温での化学シフト値に対応し、エネルギー的に安定なところの化学シフト値が低温下での化学シフト値に対応すると考えられる。計算の結果は、定量的には過大に評価されているが、定性的には実測の傾向を再現している。

このように、TB-INDO/S 計算でPEOの常温での鎖の回転運動を仮定した計算によって、回転による化学シフト変化を評価できることが示された。このような計算結果から、分子運動がかなり制限され

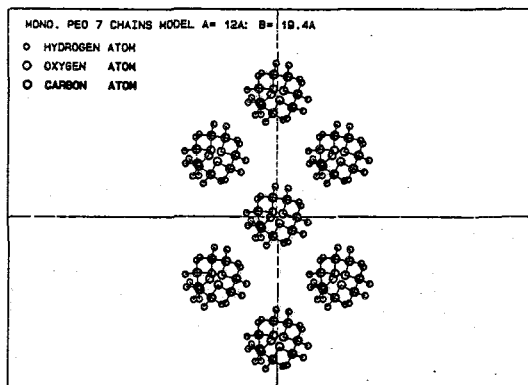


Figure 1. The 7 PEO chains model ($a=12.0$ Å).

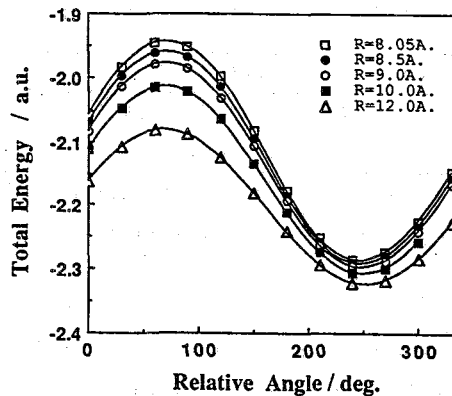


Figure 2. The calculated total energy for 7 chains PEO model on relative rotation angle and interchain distance.

ている (NMR的に運動が凍結している) 低温に比べ、室温で観測された高磁場シフトはPEO鎖に沿っての回転によることが明らかとなった。

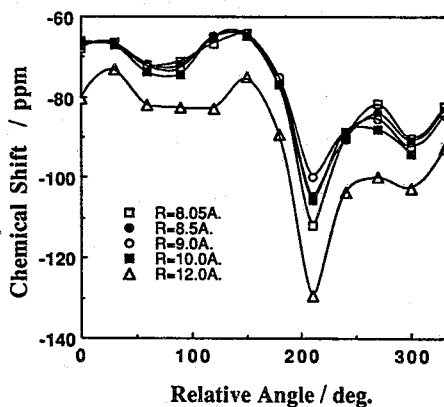


Figure 3. The calculated ^{13}C NMR chemical shift for 7 chains PEO model on relative rotation angle and interchain distance.

Table 1 The observed ^{13}C NMR chemical shift of poly(ethylene oxide) in the solid state

Temperature(°C)	Room Temp.	-28	-67	-106
PST/MAS	71.1	71.9	72.4	72.6
CP/MAS	-	72.6	72.6	72.6

(ppm from TMS)

Table 2 The calculated ^{13}C NMR chemical shift of PEO using 7 chains model

R(Å)	8.05	8.5	9.0	10.0	12.0
$\sigma_{\text{min.}}^{\text{a)}$	-94.42	-90.56	-88.55	-88.73	-103.65
$\sigma_{\text{av.}}^{\text{b)}$	-75.18	-72.07	-71.74	-79.24	-86.66

a) $\sigma_{\text{min.}}$ is for frozen rotation model.

b) $\sigma_{\text{av.}}$ is for free rotation model.

(ppm from TMS)

4. References

- 1) T.N.Connor and A.Hartland, J. Polym. Sci., 7, 1005 (1969)
- 2) H.Kurosu, T.Yamanobe and I.Ando, J. Chem. Phys., 89, 5216 (1989).

(ハンブルグ大, 高分子化学研, 神奈川大理) G. Scholtyssek,
G. H. Zachman, 相馬純吉

Detection of Molecular Motional mode in Polymers by Using MAS-NMR.

G. Scholtyssek, H.G. Zachmann (Inst. of Macromol. Chem., Hamburg University)

J. Sohma (Faculty of Science, Kanagawa University)

Polymers have various molecular motional modes because of higher degrees of freedom. Under given spinning frequency ω_r of MAS-NMR rapid modes of molecular motion shows narrow components and others appear a broader components. Thus, ω_r gives a kind of window in time scale. By changing ω_r , the changes of fractions of the observed three components were traced. The quantitative analyses of the observed results provide us information on the modes in molecular motions in polyethylene and cross linked polyethylenes. The effects of cross links was discussed.

I. はじめに. MAS のスピニング周波数 ω_r を大きくすれば, NMR 線中は狭くなることはよく知られている. 自由度の大きい系, 例へば高分子, では相関時間が分布し, 観測される線中は種々の線中の重畳したものと考える. この場合, 一定の ω_r を与えれば或る線中の成分は狭化し, 他の成分の線中は変化しない. 従つて, ω_r を次第に増加すれば, 狭化成分は増加する. 即ち, ω_r は 1 つの time window を与え, これを通じて高分子の分子運動のモードに関する知見を得ることが出来る.

II. 理論. 高分子の分子運動に異方性があると考える. 単純なミクロブラウン運動では異方性はないが, 高分子鎖のからみ合い, 架橋があれば分子運動に異方性が生ずる. その異方性を表す因子 a を導入する. 完全等方性では $a=0$, 最大異方性の場合 $a=1$ である. $\omega_r \tau_c \ll 1$, $(1-a)M_2 \tau_c^2 \ll 1$ (τ_c は相関時間, M_2 は線中二次能率) の場合には横磁化 M_{\perp} は次式を表される. ここで, $\tau_c a$ は異方的運動, 例へばからみ合い, の相関時間である. この式でおける

$$M_{\perp}(t) = \exp \left\{ -(1-a)M_2 \tau_c t \right. \\ \left. - aM_2 \tau_c^2 \left[\frac{t}{\tau_c a} \left(\frac{2}{3} \frac{1}{1+\omega_r^2 \tau_c^2} + \frac{1}{3} \frac{1}{1+4\omega_r^2 \tau_c^2} \right) \right. \right. \\ \left. \left. - \frac{2}{3} \frac{1-\omega_r^2 \tau_c^2}{(1+\omega_r^2 \tau_c^2)^2} + \frac{1}{3} \frac{1-4\omega_r^2 \tau_c^2}{(1+4\omega_r^2 \tau_c^2)^2} \right] \right\} \\ + e^{-t/\tau_c a} \left\{ \frac{2}{3} \frac{(1-\omega_r^2 \tau_c^2) \cos \omega_r t - 2\omega_r \tau_c \sin \omega_r t}{(1+\omega_r^2 \tau_c^2)^2} \right. \\ \left. + \frac{1}{3} \frac{(1-4\omega_r^2 \tau_c^2) \cos 2\omega_r t - 4\omega_r \tau_c \sin 2\omega_r t}{(1+4\omega_r^2 \tau_c^2)^2} \right\}$$

係に, 指数関数が $\omega_r \tau_c$ で変調される項を含み, これは MAS のスピニングによるサテライトに対応する. 又異方性が小さく, 速い分子運動の場合には, この式は $M_{\perp}(t) = \exp \left\{ -[aM_2 \tau_c + (1-a)M_2 \tau_c] t \right\}$ と異方性項と τ_c でない項とは分離される.

G. ショルティセック, G. H. ツァハマン, ソ)まじゆんきち

III. 実験 ¹³C核のMAS NMRはBruker CXP100を用いて観測した。MAS用のProbeは特別に著者の一人(G.S.)によって設計作製された。試料は高密度ポリエチレン(HDPE)Sholex 6050及びUBE C400である。又、架橋度を変える為γ線照射した。

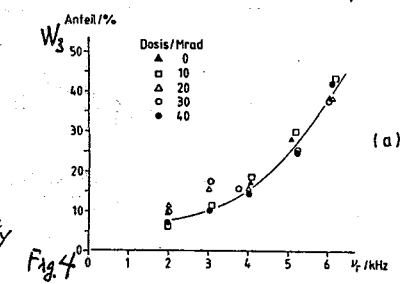
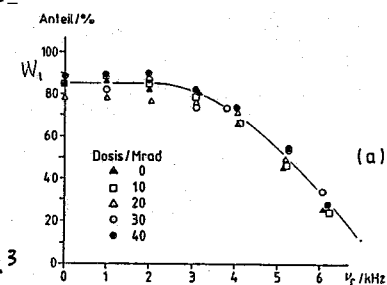
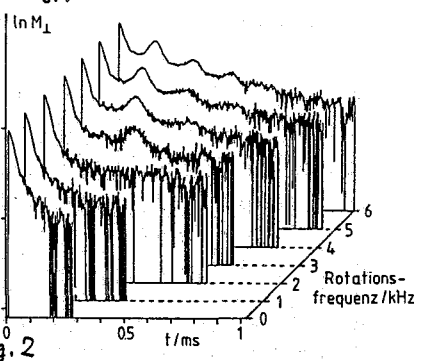
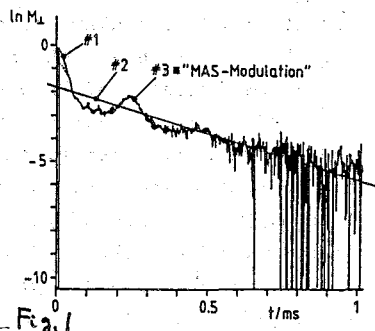
IV. 実験結果及び考察。ω_r=6 KHzの時の観測FIDを図1に示す。観測曲線はガウス型(#1), 単純指数関数型(#2)及びω_r変調型(#3)の3成分に分離され、次式で近似される。

$$M_1(t) = W_1 \exp\left(-\frac{t}{T_2^1}\right) + W_2 \exp\left(-\frac{t}{T_2^2}\right) + W_3 \exp\left(-\frac{t}{T_2^3}\right) \sum P_n \cos(n\omega_r t)$$

実測FIDを上式にfitさせることにより各成分の分率W₁, W₂, W₃及び各成分のT₂¹, T₂², T₂³を決定することが出来る。又、ω_rを変化させた時のFIDの変化を図2に示す。MASのスピンの回転数が増すにつれて、ω_rで変調された成分は増加して行く。この変化を定量的に示したのが、図3, 図4である。図3ではω_r増加と共に広中成分に相当する成分が3 KHzあたりから急激に減少し、6 KHz以上では殆んど存在しないことを示している。又、窄成分は図4に示される様に、2 KHzより明瞭に現れ、以後急激に増加し、50%になる。ω_r=6 KHzでは窄成分の分率W₂は約40%になるので、このスピンの回転数では狭中成分は約90%になる。

又、γ線照射して架橋させたポリエチレンでも図3, 図4に示す様に、著しい相異は見受けられない。架橋はこうした成分の分率には影響を与えないと云える。しかし、各成分のT₂は架橋によって影響を受けることが見出された。更に、分子運動の異方性パラメータαが一様に分布していると仮定すれば、αの分布範囲を決定することが出来る。HDPEの場合には0.005から0.5迄、照射して架橋させたHDPEでは0.01から0.5迄であった。この結果は、異方性の小さい分子運動は架橋により影響を受けるが、もとも異方性の大きい分子運動は架橋でも影響を受けないことを意味する。これは異方性の大きい分子運動は元来凍結を受けている為と思われる。

- 1) H.W. Spiess: NMR- Basic Principles Vol.15 (1978)
- 2) G. Scholtyseck: Dissertation, Hamburg University (1988)



(旭化成解析センター) 木村恒久、根木一弥、田村亘弘
(京大化研) 中川 將、堀井文敬、小谷 壽

^1H Spin Diffusion Measurements of Polymeric Multi-Phase Systems Using CP/DD ^{13}C -NMR

Tsune-hisa Kinura, Neki Kazuya, and Nobuhiro Tamura (Analytical Research Center, Asahi Chemical Industry Co. Ltd.), Masaru Nakagawa, Fumitaka Horii, and Hisashi Odani (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

An analytical method of the phase structure of solid polymers have been developed for the combined process of ^1H spin diffusion and longitudinal relaxation. The method is based on the monitor of the ^1H spin decay by ^{13}C -NMR using cross polarization technique. The experimental data obtained for uniaxially oriented polyethylene films, which have crystalline, interfacial and amorphous phases, is compared with the numerical analysis of the ^1H spin diffusion equation with the relaxation term in order to evaluate the ^1H spin diffusion coefficients and longitudinal relaxation times.

1) 緒言： ^1H スピン拡散の現象は、高分子のミクロ相構造について多くの知見を与えるものと期待されるが、定量的な議論を行なうためには各相でのスピン拡散係数Dおよびスピン-格子緩和時間 $T_{1\rho\text{H}}$ の値を知っておくことが必要となる。しかし、拡散と緩和は同程度のタイムスケールで進行するので、Dや $T_{1\rho\text{H}}$ を分離して解析するのは通常、困難である。我々は、 ^1H 磁化の時間変化をCP法による ^{13}C -NMRでモニターすることにより各相の ^1H 磁化の変化を個別に観測し、更に、実験データを緩和項を含む拡散方程式の数値解と比較することにより、各相のDおよび $T_{1\rho\text{H}}$ を評価する方法を検討した。結晶相、界面相、無定形相よりなる配向ポリエチレン試料に対し、この方法を適用し、各相のDおよび $T_{1\rho\text{H}}$ が評価できたので報告する。

2) 方法：配向ポリエチレン試料の調製法については既に報告した(1)。この試料についてはX線小角散乱法およびDD ^{13}C スペクトルの解析により、結晶相、界面相、無定形相の3つの相よりなるラメラ構造を取っていることが分かっており、各相の厚みは各々、320, 100, 120Åである。測定はJEOL JNM-FX200 NMR分光計を用い、試料の延伸方向を静磁場方向に取り、magic angle spinning なしで測定温度30℃で行なった。

用いたパルスシーケンスを図1に示す。シーケンスは ^1H 磁化の生成(preparation)、 ^1H 磁化の拡散、緩和(evolution)、CPによる磁化移動と ^{13}C -NMRの観測(detection)よりなる。preparationでは各相の $T_{1\rho\text{H}}$ の差を利用し、結晶相により多くの磁化を残す。evolutionでは、 ^1H 磁化は(a)では 90°_{-x} パルスにより静磁場と平行に向けられ、(b)では、 90°_{+x} パルスにより静磁場と逆平行に向けられ、拡散時間 τ の間スピン拡散と $T_{1\rho\text{H}}$ 緩和を行なう。detectionではCPにより ^1H 磁化を ^{13}C に移し、

^{13}C -NMRを測定する。本研究では、シークエンス (a) のみによる測定 (シークエンス I)、および (b) の FID から (a) の FID を減算した測定 (シークエンス II)、の二種類の測定を行なった。I は saturation recovery 法に、II は Torchia の CP-T₁ 法に対応する。 ^{13}C -NMR スペクトルは最小 2 乗法により 3 つの Lorentz 曲線に分離し、各相の磁化量を求めた。

各相の D および T_{1H} は ^{13}C -NMR スペクトルの各相に対応する積分強度より求めた ^1H 磁化濃度の時間変化と、次式の拡散方程式の数値解とを比較することにより評価した。

$$dM/dt = D(x) d^2M/dt^2 + (M - M(\infty)) / T_{1H}(x) \quad (1)$$

$$dM/dt = D(x) d^2M/dt^2 - M / T_{1H}(x) \quad (2)$$

式 (1)、(2) は各々、パルスシークエンス I、II により得られる結果に対応する。D(x)、T_{1H}(x) は各相で異なる値を取る。実験データに合うようにこれらの値を変化させ、各相の D と T_{1H} を決めた。

3) 結果: 図 2 にパルスシークエンス I による測定結果を示す。ここでは、 $\tau^{1/2}$ に対し、 ^1H 磁化の濃度変化をプロットした。図中の実線は結晶、界面、無定形の緩和時間および拡散係数を、各々 2000、870、330 (ms)、90、90、25 ($\text{\AA}^2/\text{ms}$) とした時のシミュレーション結果である。パルスシークエンス II による解析では、緩和時間、拡散係数に対し、各々 1300、400、200 (ms)、80、80、50 ($\text{\AA}^2/\text{ms}$) を得た。両方法を比較すると各相とも大小の傾向は一致しているが、絶対値自体はかなり異なる。原因としては、パルスシークエンス II の場合がシグナル強度が小さいため誤差が大きいこと等が考えられるが、詳細については現在検討中である。

(1) M. Nakagawa, F. Horii, R. Kitamaru, Polymer, in press

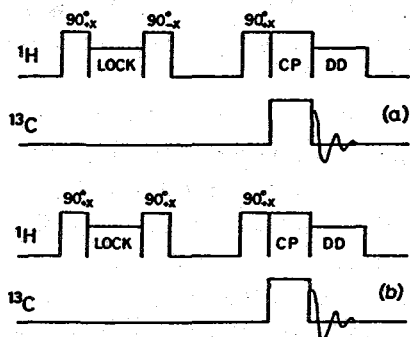


Fig.1 Pulse sequences used in the present work: Only (a) is used for sequence I, and (a) and (b) are combined for sequence II.

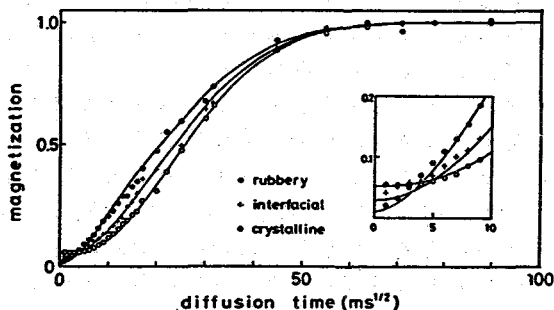


Fig.2 ^1H spin diffusion rates of the respective components with the expansion of small diffusion time region. Lines represents result of simulation.

(国立がんセンター研) ○齊藤 肇, 横井もと子, 吉岡佑子

Hydration of Gel-forming Polysaccharides as Studied by High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR Spectroscopy

Hazime Saitô, Motoko Yokoi and Yuko Yoshioka

Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute

^{13}C NMR spectra of a variety of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans were recorded in hydrate and gel states. Hydration of curdlan resulted in conversion from the single-chain form to the single helix, as demonstrated by substantial displacement of peaks. We found that major conformation of a linear (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, curdlan, in the gel state is the single-helix, whereas that of branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans is the triple helix. Gelation mechanism of both types of glucans was proposed based on these findings.

1. はじめに

X線回折によれば、ゲル化多糖であるアガロース、カラゲenanの場合は二重ヘリックスが、カードランの場合は三重ヘリックスが、ゲル化に重要な役割を果たすことが明らかにされている。上記の構造は、ゲル構造のうち少なくとも架橋構造を説明するものの、ゲル全体がどうなっているか、明らかではない。実際、これらの弾性構造を説明するには、少なくともやわらかい部分の存在が必要であり、カードランゲルの場合は通常の高分解能 NMR で検出し得る $< 10^{-9}$ 秒の相関時間をもつネットワーク構造、つまり一重ヘリックス構造がドミナントでなければならないことを、我々の一連の研究で主張してきた¹⁾。このことは、X線構造解析の基礎をなすエネルギー計算で、一重ヘリックスは不安定構造と除外されてきた事実と相反する結果となる。

今回、水和およびゲル状態で直鎖および分岐型の (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンの ^{13}C NMR 測定を試み、この結果それぞれゲルネットワークでは一重および三重ヘリックス構造が安定形であることを見出した^{2, 3)}。一重ヘリックスの存在は、水和状態で安定化し得ると同時に、高分子量のグルカンが一本鎖として存在し得る場合に、三重ヘリックスの転換が溶解度の関係で十分でないことによることがわかった。

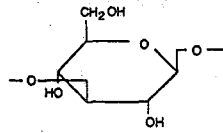
2. 実験方法

カードラン (I), レンチナン (IIa), HA- β -グルカン (IIb) の水和は、96% R. H. 雰囲気中のデシケータ内に8時間以上放置することによって行なった。ゲルの作製は10%の懸濁液を加熱冷却することによって得た。これらの試料はジルコニアローターにつめ、MAS NMR 測定を行なった。 ^{13}C NMR 測定は、ブルカー CXP-3000 スペ

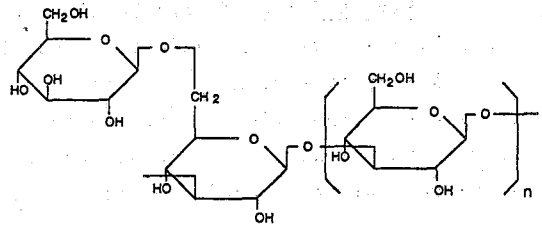
さいとう はじめ, よこい もとこ, よしおか ゆうこ

クトロメーター
 によった。水和
 およびゲル試料
 の場合、標準の
 ブルカープロセ
 ンプでは¹Hチャ
 ネルのチューニ
 ングが十分でな
 く、1オームの
 抵抗を追加する
 ことによってコ
 イルのQを下げ
 た。

I Curdlan



IIa Lentinan : n=1.5



IIb HA-beta-glucan : n=3

3. 結果および考察

A. 直鎖(1→3)-β-D-グルカン-カードラン²⁾

図1にカードランの無水物の水和の効果を示した(B)。水和によってピークの線巾が鋭くなると同時に、C-3ピークのみならず、C-2, C-4, C-5ピークの位置および形状まで異なる。これは、無水状態にくらべて、水和によってコンホメーション変化を受けたためである。水和物のスペクトルパターンは、図2A, Bに示すように、すでに報告したゲル中でみられる高分解能NMR(ブロードバンド・デカップリング)のパターン¹⁾と一致し、一重ヘリックス構造に帰着することができる。

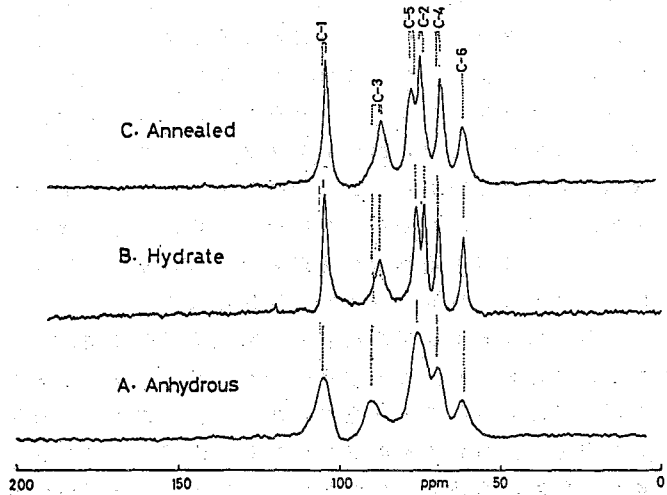


図1. カードランの¹³C CP-MAS NMR

一方、図1Cに示す熱処理物
 はすでに報告したように¹⁾三重ヘリックス構造をとるが、明らかに水和物とはそのNMRパターンが異なる。興味あることに、この三重ヘリックス構造の水和における変化を調べてみると、一重ヘリックスのような顕著な変化はみられなかった。これは、三重ヘリックスに含まれる水和はもしあるとしても三重ヘリックスの安定性とは関係のない位置にあることを示している。

一方、ゲルのMASおよび、CP-MAS NMRスペクトルは図2C, Dに示すように、いずれも水和物の一重ヘリックスパターンと同じスペクトルを示す。ブロードバンドデカップリングによるスペクトルとは異なり、CP-MASの場合はより構造がrigidな部分(図3C)を、MASの場合は比較的運動性に富むが、なおかつ双極子相互作用が完全には分子運動によって平均化されていない部位(図3B)を選択的に検出することになるが、いずれにしても検出されている構造が一重ヘリックスである点は興味深い。しかし、三重ヘリックス構造がまったく存在しないわけではなく、図2DのC-5ピークの肩(矢印)に三重ヘリックスピークが出現している。このことは、カードランゲルのネットワーク構造の大部分は一重ヘリックスで、一部に三重ヘリックスが架橋部位として存在するという、これまでの我々の主張を支持する。

B. 分岐(1→3)-β-D-グルカン³⁾

レンチナンやHA-β-グルカンの作るゲルはカードランとは異なり、弾性は小さく脆い。さらに、ブロードバンドデカップリングのみで検出するピークは全く検出されない。このことは、ネットワーク構造がカードランとは異なることを示唆している。図4にレンチナンの¹³C NMRスペクトルを示すが、ゲル状態の¹³C NMRパターンは三重ヘリックス構造をとる。レンチナンの場合、無水物は一本鎖構造を示しているにもかかわらず、水和物では一重ヘリックス構造を経由することなく、ゲ

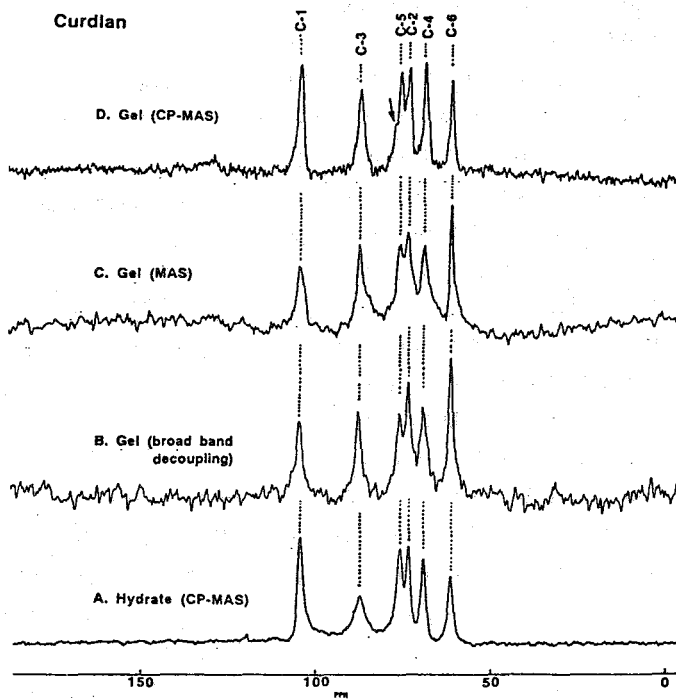


図2. カードランゲルの水和物のCP-MAS NMR (A), ゲルの高分解能NMR (B), および MAS, CP-MAS NMR (C, D)

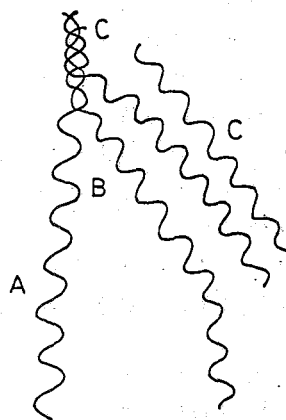


図3. カードランゲルのネットワーク構造

ルで三重ヘリックスに転換しているのは興味深い。HA- β -グルカンは、無水物が三重ヘリックス構造をとっているので、図5AのようにDMSO溶液からの凍結乾燥により一本鎖を作っても水和で一重ヘリックスに転換することなくゲルで三重ヘリックスをとる。これらの結果は、分岐グルカンのように水に溶解性の高い多糖では、ゲルでは最安定形の三重ヘリックス構造に直ちに転換し、カードランでみられたような一重ヘリックス構造は存在しない。したがって、この場合のゲルネットワークは三重ヘリックスとその会合による。

4. 結論

水和物、ゲルの ^{13}C NMRスペクトルを測定することによって、ゲルネットワークを形成する多糖のコンホメーションとゲル化機構の知見が得られた。カードランでは、ゲルはブロードバンドデカップリング、MAS、CP-MASのそれぞれの方法でピークが検出できるような、運動性に大きな巾を持つネットワーク構造をとることがわかる。

プローブの改良にあたられた恵良田知樹博士に謝意を表します。

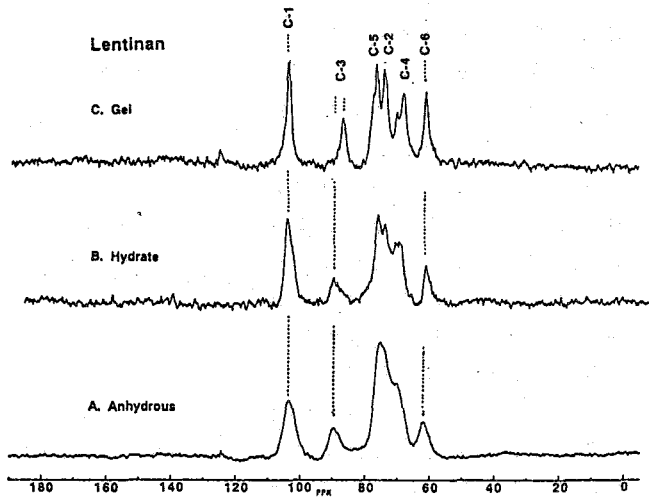


図4. レンチナンの無水、水和物、ゲルの ^{13}C NMRスペクトルの比較

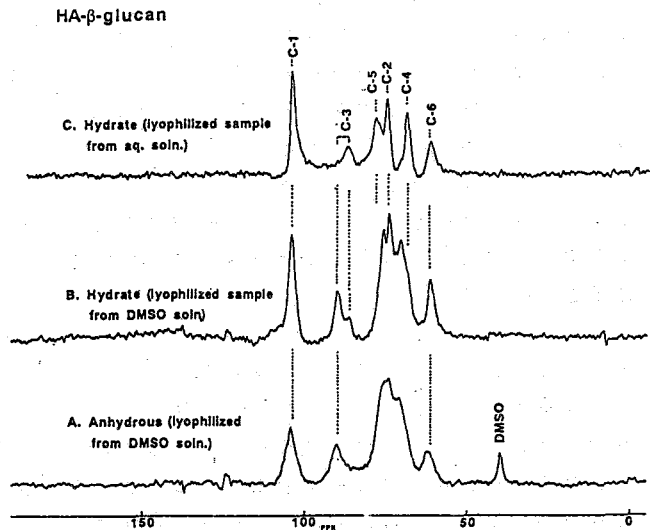


図5. HA- β -グルカンの ^{13}C NMRスペクトル

- 1) H. Saitô, ACS Symp. Ser. 150, 125 (1981)
- 2) H. Saitô, M. Yokoi and Y. Yoshioka, *Macromolecules*, in press
- 3) H. Saitô, Y. Yoshioka, M. Yokoi and J. Yamada, *Biopolymers*, submitted
- 4) H. Saitô, R. Tabeta, M. Yokoi and T. Erata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, 4259 (1987)

名古屋工業技術試験所 岡崎正治、鳥山和美、布目華一

A Solid State High Resolution NMR Study on the Defects Formed by γ -irradiation of Solid n-Alkanes

Masaharu Okazaki, Kazumi Toriyama, and Keichi Nunome.

(Government Industrial Research Institute, Nagoya)

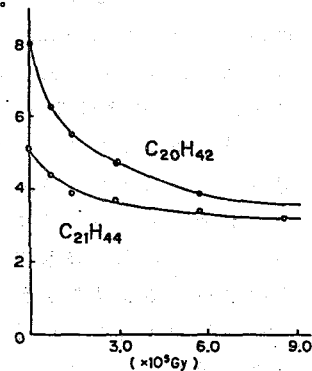
An amorphous region was found in γ -irradiated n-alkanes (C20-C24) in the crystalline state by the high resolution solid state NMR technique. The amorphous peaks shift upfields by about 2-4 ppm and 0-2 ppm (depending on the peak) from the corresponding crystalline peaks for even- and odd-numbered alkanes, respectively. Besides, the carbon and the proton relaxation times are shortened with increasing the dose. A model of the defect formed in the irradiated alkanes is proposed based on these observations.

はじめに 固体高分解能NMR法は固相放射線照射に伴う化学過程と、材料物性の変化との相関を研究する上で最良の方法である。現在まで ^{13}C 固体高分解能NMR法を用いて固体炭化水素(ポリマー)をそのまま照射前後で測定し、クロスリンク等の検出を試みた例はかなりあるが¹⁾、必ずしも大きな成果を収めたとは言いがたい。今回我々は、固体直鎖アルカンを例にとり γ 線照射に伴う物性変化を緩和時間の変化を手がかりに検討した。²⁻⁴⁾その結果、C20-C24の長鎖アルカンにおいて照射に伴う著しい緩和時間の減少を見出した他、結晶中にアモルファス領域が新たに生じることが明らかになった。尚、このアモルファス領域は短いCP-時間で観測すると見落としてしまう可能性が高い。

実験 n-アルカンは東京化成製標準試薬を用いた。n-アルカンの単結晶は4-5 ϕ のガラス管(または石英管)中で引き下げ法でつくった。 γ 線照射は特にことわらない限り脱ガスした試料を用い室温にて行った。NMR測定はBruker MSL-200(200MHz for ^1H)にて室温(25 $^{\circ}\text{C}$)で行った。 B_1 は ^{13}C で60gauss、 ^1H で15 gaussである。緩和時間は非線型最小二乗法にて求めた。

結果と考察

図(1)にアイコサン(C20)とヘンアイコサン(C21)とを例にとり γ 線照射によるプロトンの T_1 の変化についての測定結果を示す。いずれの場合も照射に伴い著しく T_1 が減少する。また、照射線量の増加にともない、飽和からの回復が単一の指数関数であらわされなくなる。これは、結晶内又は結晶粒間の境界領域に、分子の非常にmobileな成分があらわれてくることを示している。C21のプロトンの場合は、もともと $T_1(\text{H})$ が短いこともあって、飽和回復曲線はsingle exponentialからあまりずれなかった。炭素の信号に於いては、C21でもC20の場合と



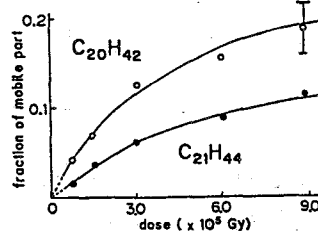
図(1) γ 線照射による T_1 の変化(秒単位)

おかざきまさはる、とりやまかずみ、ぬのめけいち

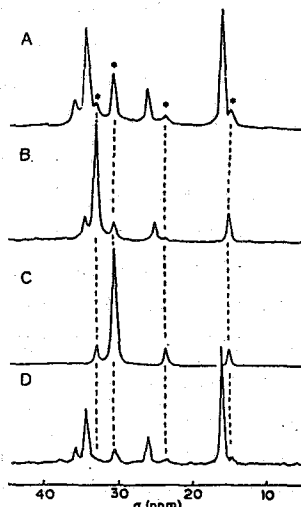
同様 double exponential で飽和回復曲線をよく再現でき、 T_1 (C) の速い成分の fraction は図(2)に示すように照射線量に従って増加する。以上の結果から γ 線照射により、結晶中又は結晶粒の界面に、その中の分子が極めて mobile な領域が出来たことがわかる。さらに、図(3)に示したのは、飽和から系が十分回復しきらない状態で測定した ^{13}C -NMR である。mobile な成分も観測出来るように、CP法ではなく単なる 90度パルスと decoupling pulse のみのパルス系列を用いた。A は C20 のスペクトルであり、* 印で示したのは照射により新たに生じたピークである。このピークは、スペクトル B に示すように C21 の場合も同様に照射により現れ、スペクトル C に示したように溶液の直鎖アルカンとほぼ同一の化学シフト値を示す。このことにより、我々は * 印ピークを照射により生じたアモルファスな領域に存在する主として無傷のアイコサン分子と同定した。その証拠の一つとして示したのがスペクトル D である。5-メチルデカンを 5% 加え固化した C20 の NMR スペクトルには、結晶状態の C20 のピークとともに * 印ピークも同時にあらわれる。これは、5-メチルデカンの添加により系にアモルファス領域が生じ、そこに存在する無傷のアイコサンがスペクトル A の * 印ピークを与えることを示している。

以上照射による T_1 (C), T_1 (H) の変化とスペクトルの変化とを総合して考察すると、照射による系の変化として、図(4)のようなモデルに到達した。中心に示した形の変化した分子は、放射線照射により生じた新たな分子またはその集合を示す。(A) は、そのために結晶系が崩れて生じたアモルファスな領域 (図3の * 印ピークに対応)、(B) はアモルファス部分に近接した結晶領域であり、その外側に於けるより分子が mobile である (図2の mobile part に相当)。さらに、以上の現象が結晶中で生じることなのか、それとも結晶粒間の界面でのみ生じることなのかを確認するため C20-C22 の単結晶をつくり、 γ 線照射前後の固体高分解能 NMR を測定した。その結果照射後も単結晶状態を保っており、且つアモルファス領域由来のピークも観測された。従って、上記の現象は結晶中でも生じることが分かった。

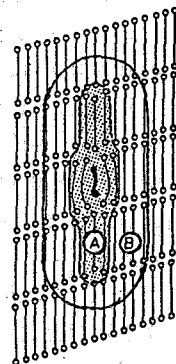
- 文献 (1) a. J. H. O'Donnell, A. K. Whittaker, Brit. Polym. J. **17**, 51 (1985). b. I. Ando, T. Sorita, T. Yamanabe, T. Komoto, H. Sato, K. Deguchi, M. Imanari, Polymer, **26**, 1864 (1985). c. R. Kitamaru, F. Horii, and K. Murayama, Macromolecules, **19**, 636 (1986). d. E. Perez, D. L. VanderHart, J. Polym. Sci. **26B**, 1979 (1988). (2) M. Okazaki, K. Toriyama, J. Phys. Chem. **93**, 2883 (1989). (3) M. Okazaki, K. Toriyama, Chem. Phys. Lett. **160**, 21 (1989). (4) K. Toriyama, M. Okazaki, K. Nunome, K. Matuura, Rad. Phys. Chem., in press.



図(2) T_1 よりもとめた γ 線照射により生じた Mobile な部分の生長



図(3) γ 線照射後の固体アルカンの ^{13}C -NMR



図(4) γ 線照射により生じた欠陥のモデル

The Study of Motions of Alkyl-chains in peculiar circumstances by means of ¹³C 2D-Dipolar dephasing Solid State NMR spectroscopy

Hiroshi Ohe, Atushi Kubo, Motomi Katada, and Hirotoishi Sano

The dipolar dephasing technique of ¹³C-CP/MAS Solid State NMR spectroscopy were applied in order to investigate the chain motions of fatty acids in urea inclusion compounds, and cation motions of alkylammonium hexachlorostannates. Strong and rotational sidebands were observed in the dipolar spectra, especially in the urea inclusion compounds.

The computer simulations, assuming the rotation along the molecular axis and no intermolecular interaction, provided the features very close to the experimental ones of the urea inclusion compounds.

1. ¹³C-CP/MAS法では、双極子デカップリング及びマジック角度回転により、双極子相互作用や化学シフトの異方性に関する情報は失われてしまい、一つの高分解能スペクトルだけから分子運動を詳しく評価することは出来ない。そこで種々の緩和時間の測定から分子運動の評価が行われている。

演者らはMunowitzらが提案した手法¹⁾にならい、図1.に示すパルスシーケンスを用い交差分極後、炭素シグナル観測前に一定時間水素の双極子デカップルを停止することにより、各炭素核が感じる水素の双極子磁場の大きさからアルキル鎖の分子運動の評価を試みた。

尿素アダクトは尿素チャンネルの単結晶構造解析がなされており²⁾、²D-NMR法や³⁾SAS法⁴⁾によりゲストであるアルカンの分子運動が評

価され近年再び興味を集めている。演者らはアルカンに比べ報告例の少ない脂肪酸をゲストとして選び、飽和脂肪酸としてステアリン酸、及び比較のため分子鎖が屈曲しており尿素チャンネル内の自由回転が阻害されると期待されるオレイン酸との尿素アダクトを合成し双極子ディフェーシング法を適用した。

またNQR⁵⁾や演者らによるMoessbauer分光法による研究により、活発な分子運動の存在が予想される塩化錫アルキルアンモニウム層間化合物群についても観測した。

2. 尿素アダクトは脂肪酸1molに対し尿素が14.2

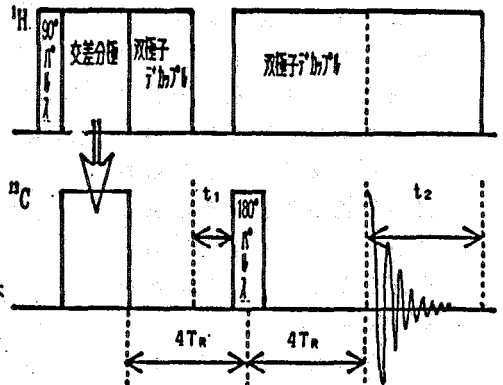


図1.双極子ディフェーシングパルスシーケンス

molになるように秤量し、アルコール溶液から結晶化した。元素分析より仕込量どおりの、尿素チャンネルに対し脂肪酸が飽和量包接したアダクトの生成が確認された。X線回折図上には遊離の脂肪酸及び尿素のピークは観測されなかった。

塩化錫アルキルアンモニウム化合物は塩化第二錫五水和物と二当量のアルキルアンモニウム塩化物とから、塩酸酸性アルコール溶液から結晶化した。同定は元素分析、 ^{119}Sn のMoessbauerにより行った。Moessbauer強度の温度依存性の異常から激しい分子運動の存在が予想されたエチルアンモニウム塩、比較対象としてプロピル、ブチルアンモニウム塩についてNMRの測定を行った。

スペクトルは日本電子製JNM FX-200スペクトロメーター(^{13}C の共鳴周波数50.1MHz)及び付属のCP/MAS固体用アタッチメントを用い室温で測定した。MAS周波数は3.4kHz程度とし、双極子ディフェージングの測定に先立ちマレイン酸アンモニウムを内部標準としてMAS周波数を測定した。スピンエコーインターバルをMAS周期 T_R の4倍とすることにより双極子ディフェージング時間 t_1 を T_R の4倍の1200 μSEC .程度まで20 μSEC .刻みで変化させ、各 t_1 毎に128回積算した。測定中のMAS速度の変動は最大5%以内であった。

3. ステアリン酸-尿素アダクトについての結果を示す。

図2. はディフェージング時間に対するメチレンシグナル

の強度変化(□)、挿入はディフェージング時間 t_1 に対しフーリエ変換した双極子スペクトル(オレイン酸とのアダクトも併せて)を示す。いずれの図にもMAS周波数による明瞭なサイドバンドが確認される。

ステアリン酸、オレイン酸双方のアダクトのシグナル強度の変化、双極子スペクトルは良く類似しており、どちらのメチレン炭素も同様の双極子相互作用を感じている、すなわち同様の分子運動を行っていることを示している。

しかし双極子スペクトルを比較すると、オレイン酸とのアダクトの方がメインシグナル、サイドバンドともにややブロードである。これはステアリン酸アダクトの炭素骨格がすべてトラ

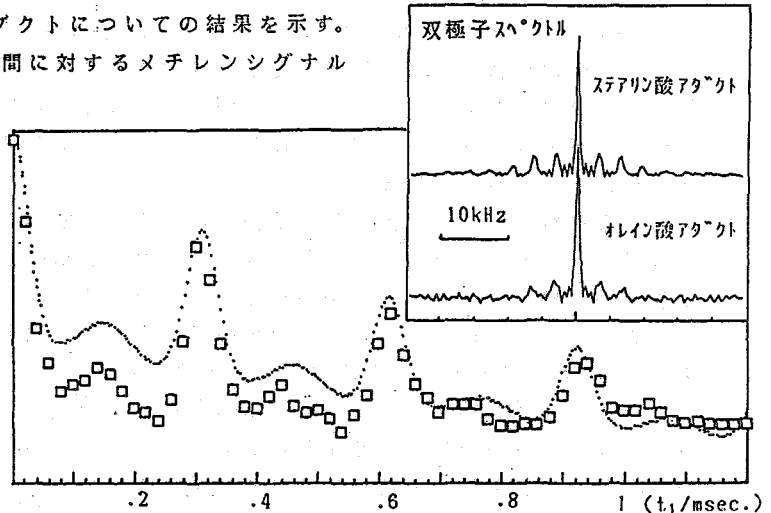


図2.ステアリン酸-尿素アダクトのシグナル強度の t_1 依存性

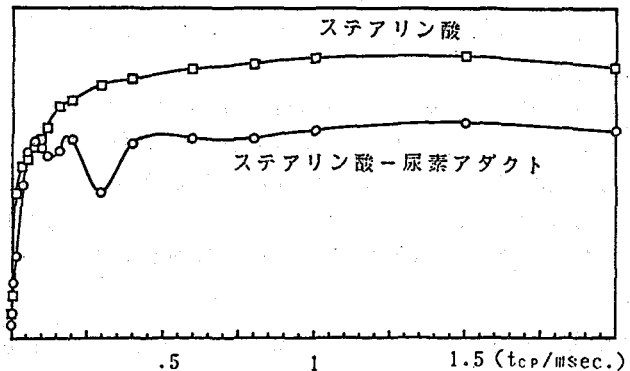


図3.CP/MASシグナル強度の接触時間依存性

ンスジグザグ構造であるのに対し、オレイン酸アダクトではメチン炭素に隣接する部位にゴーシュ結合が存在し、ゲスト分子の回転運動に対するエネルギー障壁が上昇し、回転の周期が遅くなったためと解釈されるが更なる検討が必要と思われる。なおオレイン酸アダクトの方がサイドバンドの分裂間隔が広がっているが、ステアリン酸アダクトのMAS周波数が3.25Hzであるのに対しオレイン酸アダクトのMAS周波数が3.39Hzであることによる。

双極子ディフェージングがメチレン炭素に直接結合した二つの水素核によるものと仮定し、3スピン系でのハミルトニアンから、長軸を中心にした分子の回転運動がMAS周波数により変調されるとした計算結果を図2.中に点線で示す。サイドバンドの発現をよく再現し、上記の仮定を支持しているが、サイドバンド間の谷の落込み部分の強度など細かい点では不一致がみられる。これは双極子ディフェージングが直接結合する二つの水素核にのみ依るとした仮定に原因があると考えられる。すなわち直接結合する水素からの相互作用以外の分子内相互作用、あるいは分子間相互作用を考慮しなければならない。

CP/MASスペクトルで接触時間を変化させたときのシグナル強度の変化は、交差分極時間 T_{CP} で記述される。ステアリン酸-尿素アダクト及びステアリン酸そのもののメチレンシグナルの強度変化を図3.に示す。ステアリン酸の交差分極挙動には変曲点が見られることから、二つの T_{CP} の存在、すなわち直接結合する水素核からの遠い分極経路と、周囲からの緩やかに移動する分極経路との存在を示唆する。

尿素アダクトはMAS周期によりおおきく変調されているが、1msec.以下の立ち上がりの部分は単純な指数関数的に増加している。したがって分極移動の経路は分子内の一種類と考えられる。

尿素アダクトでは分子間の相互作用は非常に弱いと考えられるので、図2.のシュミレーションについて分子内の両隣の炭素に結合した水素核を含めた7スピン系のハミルトニアンを計算し、更なる検討を加えている。

図4.に塩化錫エチル、図5.にブチルアンモニウム化合物のそれぞれの炭素のシグナル強度の T_1 依存性及び双極子スペクトルを示す。

Moessbauerの面積強度は、格子振動がデバイ振動子で記述できる系であれば温度の上昇に対し指数関数的に減少するため、相対強度の対数をとれば温度に対し直線的に減少するはずである。上記三種の塩化錫アルキルアンモニウム化合物の中でも、プロピル化合物のMoessbauer強度の温度依存性は直線であるが、エチル及びブチル化合物では温度に対しS字を描く。特にエチル化合物は温度に対する強度減少の割合が激しい。塩化錫層の構造はアルキルアンモニウムが異なっても同一であるから、アルキル炭素数の差による変化はアルキルアンモニウム基の分子運動によると考えられる。

図4.と5.とを比較する。同じメチル炭素でも、エチル化合物の方がシグナル強度の減少の割合が少ない。それだけ炭素核が感じる双極子磁場が小さいことを示している。メチレン炭素を比較しても、エチル化合物の方が強度減少の割合が小さく、またMASによるサイドバンドが明瞭に観測されている。

ブチル化合物の各メチレン炭素を比較すると、メチルに隣接するメチレンが最も速くディフェージングされている。双極子スペクトルを見てもこのもののスペクトルだけが幅の広い構造を示している。ブチル鎖全体が大きく揺動し、ちょうどメチルに隣接するメチレンが節になるような分子鎖の回転運動が起きていると説明することも可能だが、多数のブ

チル鎖が無秩序に大きな揺動運動をしているとも考えにくい。ブチル鎖が分子鎖軸を中心に直線状に回転していても、回転軸と炭素核と水素核との結合軸とのなす角により、炭素核の感じる双極子磁場の大きさは変化する。すなわちこの角がマジック角に近くなれば双極子磁場の大きさはゼロに近づく。

現在塩化錫アルキルアンモニウム化合物についても、尿素アダクトの系と同様の、分子鎖軸を中心とする回転運動を仮定しての検討を試みている。

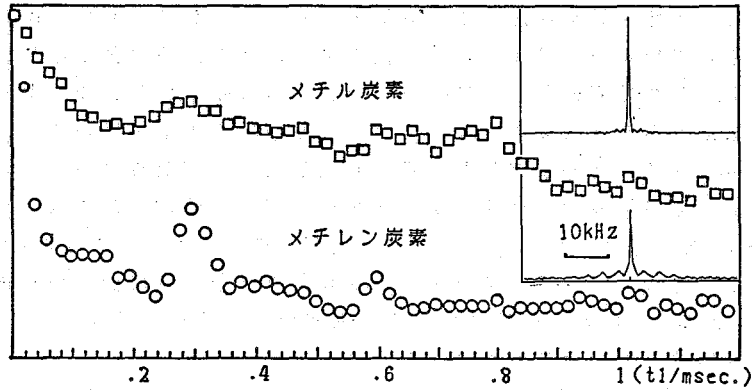


図4. エチル化合物のシグナル強度の t_1 依存性

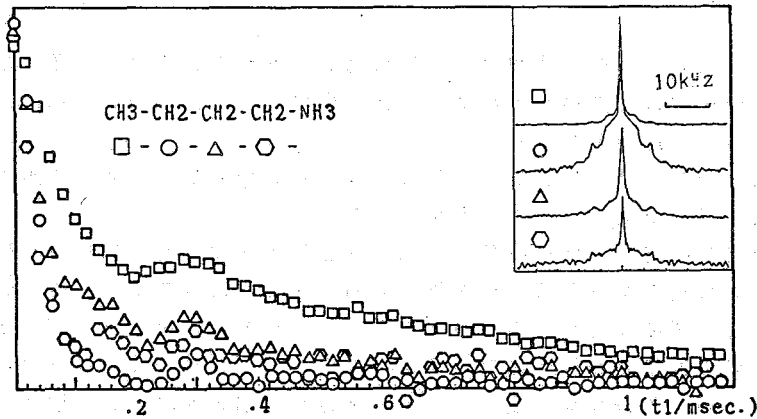


図5. ブチル化合物のシグナル強度の t_1 依存性

- 1) M.G.Munowitz, R.G.Griffin, G.Bodenhausen, T.H.Huang, J. Am. Chem. Soc. 103, 2529 (1981)
- 2) A.E.Smith, Acta Crystallogr. 5, 224 (1952).
- 3) H.L.Casal, and D.G.Cameron, J. Chem. Phys. 80, 1407 (1984)
- 4) F.Imashiro, D.Kuwahara, T.Nakai, and T.Terao, J. Chem. Phys. 90, 3356 (1989)
- 5) Y.Furukawa, H.Kiriyama, and R.Ikeda, Bull. Chem. Soc. Jpn. 50, 1927 (1977)

$^1\text{H MAS-NMR}$ によるシクロホスファゼン結晶内における
ゲスト分子の運動の解析

(都立大・理)

関根 素馨 久保 厚 佐野 博敏

$^1\text{H MAS-NMR}$ Studies on the Motion of Guest Molecules in
Cyclophosphazene Crystal.

Sokei Sekine Atushi Kubo Hirotooshi Sano

(Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University)

Tris(o-phenylenedioxy)tricyclophosphazene(CPP) forms crystalline inclusion compounds, which construct a channel structure in a solid. Guest molecules included in the channel show anisotropic rotation, if they are not spherical. Obtained by means of $^1\text{H MAS-NMR}$ based on the information on the dipolar interaction. The orientation of the guest molecules were determined.

<序論>

シクロホスファゼン三量体(CPP)は、結晶化する際に、円筒状の空孔を生じる。このCPPは、それ自身が単独で存在するよりはむしろその空孔内に、溶媒等をゲスト分子として取り込ませた方が安定な化合物である。そしてこのゲスト分子が球状でない場合はCPPの円筒に対して配向するために、分子運動に異方的な性質が生まれてくる。その動的な性質を調べるために、 $^1\text{H MAS-NMR}$ を用いた。その理由として、粉末試料を使用するから、Rigidなホスト分子CPPの $^1\text{H NMR}$ シグナルは観測されずに、運動性のあるゲスト分子のスペクトルのみが得られたこと、およびH-Hの磁気双極子相互作用が強いため異方的な分子運動についての情報が得られるためである。今回は磁気双極子相互作用から生じたスピニングサイドバンド(SSB)の強度の2次モーメントを解析することにより、ゲスト分子の回転運動の軸の方向を決定した。

<実験>

ホスト分子であるCPPはFig 1の合成方法¹⁾によって得られた。

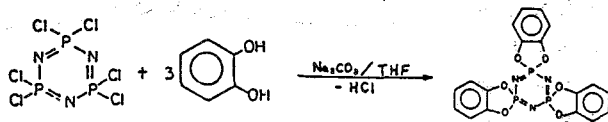


Fig. 1

さらにこのCPPを2度昇華精製したものを原料として用い、包接化合物を作った。ゲスト分子が液体でp-キシレンのような有機溶媒では、その中でCPPを再結晶することにより、p-キシレンがゲストとして取り込まれた。固体のp-ジクロロベンゼンのような場合は、それをメタノールにとかし、そこにCPPをまぜることで得られた。

せきね そけい くぼ あつし さの ひろとし

今回の実験はこのp-キシレン、p-ジクロロベンゼンの他に、ベンゼン、スチレン、4-ブロモスチレンを包接させ、200MHzの¹H MAS-NMRのシングルパルス法を用い測定した。

<結果および考察>

固体のp-ジクロロベンゼンをメタノールを用いて包接させるのは、CPPは単に立体的に、取り込むだけであるために、メタノールのような小さな分子は、骨格の孔から抜け落ちてしまうためである。さらにそれよりも大きな四塩化炭素のような場合、CPPと包接化合物を作るが、真空乾燥をさせると、ホストの骨格から引き出されてしまった。そしてゲストと包接しているときCPPの結晶構造はFig 2⁽²⁾であり、六角形の空孔にゲスト分子が取り込まれている。そこで今回測定したCPP包接化合物の¹H-NMRスペクトルが、Fig 3 (a)-(e)である。骨格を構成しているCPPホスト分子はrigidなものであり、motionのあるゲスト分子のスペクトルのみが得られた。しかし、スチレンと4-ブロモスチレンの比較において、よりbulkyな4-ブロモスチレンの方がbroadになった。それからゲスト分子は、H-H磁気双極子相互作用の影響で、センタースペクトルを中心として両側に対称な大きさのSSBが、回転周波数の整数倍の位置に生じた。次に各々のスペクトルのSSBの強度の2次モーメントを解析して運動性を論ずる。2次モーメントM₂は(1)式で与えられる。⁽²⁾

$$M_2 = W r^2 \sum N^2 I_N / \sum I_N \quad (1)$$

W r: 回転周波数

I_N: N番目のSSBの強度

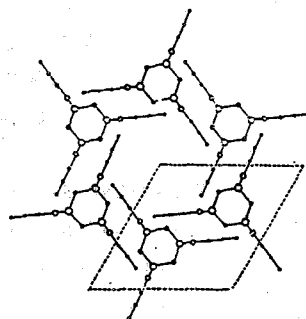


Fig. 2

¹H NMR

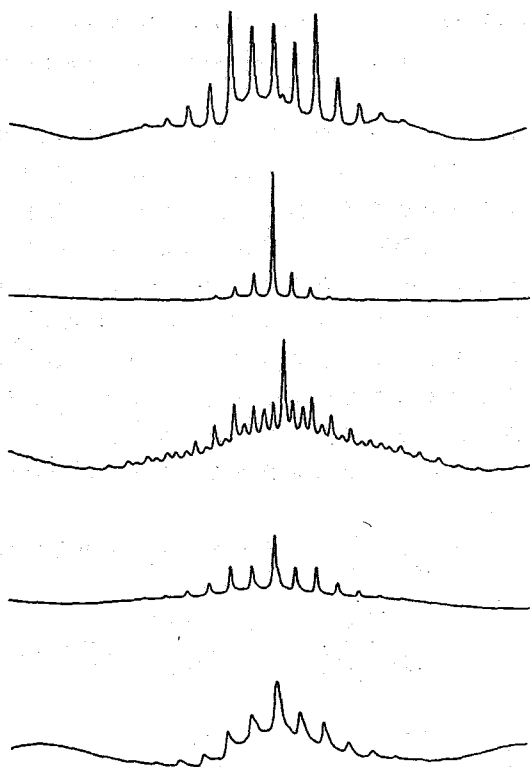


Fig. 3 (a)p-Dichlorobenzene, (b)Benzene, (c)p-Xylene, (d)Styrene, (e)4-Bromostyrene

(1) で求めた 2 次モーメントは次の式で与えられる。(4) ゲストが固定格子のとき、

$$M_2^{(1)} = 3/4 \gamma^4 h^2 I(I+1) \Sigma (1-3\cos^2 \theta_{jk})^2 / r_{jk}^6 \quad (2)$$

ゲストが回転していると次のようになる。

$$M_2^{(1)} = 3/4 \gamma^4 h^2 I(I+1) \Sigma (1-3\cos^2 \theta_{jk})^2 (3\cos^2 \phi_{jk} - 1)^2 / 4 r_{jk}^6 \quad (3)$$

γ : 磁気回転比, h : プランクの定数, I : 核スピン, r_{jk} : P-P間の距離

ここで (2) 式の $(1-3\cos^2 \theta_{jk})^2$

および (3) 式の $(1-3\cos^2 \theta_{jk})^2$

は、粉末試料のために、空間平均をとることにより、 $4/5$ の値を得る。分子の回転軸と P-P (H-H) ベクトルのなす角 ϕ_{jk} を含む項

$$1/4 (3\cos^2 \phi_{jk} - 1)^2$$

は reduction factor となり、結局

$$M_2^{(1)} = 1/4 (3\cos^2 \phi_{jk} - 1)^2 M_2^{(1)} \quad (4)$$

となるために (1) で求めた M_2 を $M_2^{(1)}$ に代入することで、 ϕ_{jk} の角が得られる。

p-ジクロロベンゼンのシグナルと p-キシレンのメチル基のプロトンシグナルをそれぞれ 2 スピンおよび 3 スピン系で近似し双極子相互作用の主軸と分子の回転軸とのなす角 ϕ_{jk} を求めた。その結果 ϕ_{jk} は、

p-ジクロロベンゼンでは 17.4° , p-キシレンでは 23.9° であった。次にベンゼンの場合は、球状に近いために、まず初めに 6 回転に回転し、次にその軸に対して直角な向きの回転を考えると、 $M_2^{(1)}$ と $M_2^{(1)}$ の比が $16:1$ となる。そこで実測値の場合、 $14.6:1$ なのでほぼそれに近いために、両軸の回転が考えられる。

これらの結果をより確かにするために、p-ジクロロベンゼンのようなもので 2 スピン系の H-H dipole interaction のハミルトニアンを考えることにより、理論的な NMR のスペクトルを求めてみた。そこで dipole interaction のハミルトニアンは、次のように表される。(5)

$$H_d = d(t) (3 I_{1z} I_{2z} - \Pi_1 \Pi_2) \quad (5)$$

これより、FID を求めると、

$$S(t) = \cos \{ 3/2 \int d(t') dt' \} \quad (6)$$

分子の回転軸と H-H 軸とのなす角 ϕ_{jk} および P-P ベクトルのなす角 θ_{jk}

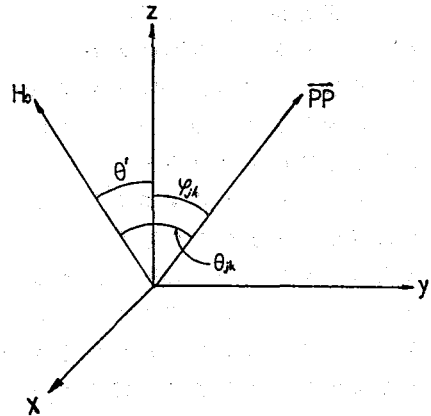


Fig. 4

となる。 $d(t') = \gamma^2 h / 2 r^3 (1 - 3 \cos^2 \theta(t))$
 はMAS下で時間依存し、かつマジック角 (54.7°)
 も考慮して計算すると、

$$d(t') = \gamma^2 h / 2 r^3 \left(-\sin^2 \theta_2 / 2 W r \cdot \right. \\
 \left. (\sin(2Wrt - 2\phi_2) - \sin(-2\phi_2)) - \sqrt{2} \sin 2\theta_2 \right. \\
 \left. / W r \cdot (\sin(Wrt - \phi_2) - \sin(-\phi_2)) \right) \quad (7)$$

(6) (7) を使って Herzfeld と Berger⁽⁵⁾ 及び Mehring
 の方法に従ってSSBの強度を計算した。さらに分子
 に回転運動がある場合には、(7)の $\gamma^2 h / 2 r^3$ に
 reduction factor $(3 \cos^2 \phi_{jk} - 1) / 2$ をかければ
 よい。そしてp-ジクロロベンゼン
 について回転角 $\phi_{jk} = 17.4^\circ$ を
 代入してシュミレートしてみた。

Fig 6には、実測値上にその理論
 値をプロットしたものである。この
 比較より、ほぼ近い値を示してい
 る。したがってこのような単純な系で得
 られた値は、分子の回転運動の傾き
 を2次モーメントの解析から求めら
 れたデータよりほぼ決定することが
 できた。さらに3スピンまたはそれ
 以上を考えればより正確な情報が得

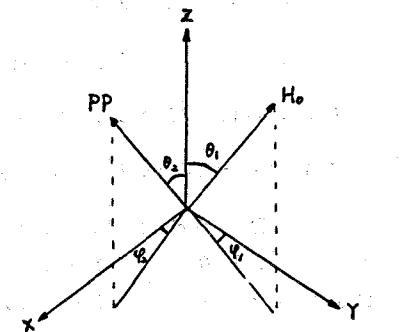


Fig. 5 PP: H-Hベクトル, H₀: 静磁場

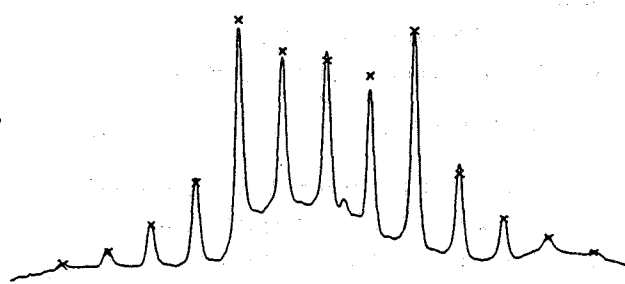


Fig. 6 p-Dichlorobenzene スペクトル と理論値(x)

Reference

- (1) H. R. Allcock and E. J. Walsh, Inorg. Chem., 10, 1643 (1971).
- (2) L. A. Siegel and J. H. van den Hende, J. Chem. Soc. A, 817 (1967).
- (3) M. Matti Maricq and J. S. Waugh, J. Chem. Phys., 70, 3300 (1979).
- (4) Charis P. Slichter, "PLINCPLE OF MAGNETIC RESONANCE",
 Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1978.
- (5) Michael Mehring, "PLINCPLE OF HIGH-RESOLUTION NMR IN SOLID",
 Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1983.

(日本電子) °樋岡克哉、今泉醇二郎、藤戸輝昭
 (北大理、京大理*) 竹腰清乃理、寺尾武彦*

Improvement of CP efficiency under high speed MAS

(JEOL Ltd) Katsuya Hioka, Junjiro Imaizumi, Teruaki Fujito,
 (Hokkaido Univ, Kyoto Univ*) Kiyonori Takegoshi and Takehiko Terao*

Higher speed spinning is desired for high field CPMAS-NMR in order to reduce the SSB signals. In such cases, however, CP efficiency is also reduced due to the suppression of dipolar interactions by high speed MAS. We report a new method containing CP using an amplitude or pulse width modulation to prevent the degradation of CP efficiency under high speed MAS without using any complicated mechanical techniques.

1. はじめに

近年、SCM-NMRの高磁場化の達成によって溶液試料では種々の高度の情報が得られている。固体高分解能NMR装置もこれに対応するため、試料の回転速度の高速化が図られてきた。たとえば、 ^{13}C 測定時のベンゼン環のケミカルシフトの異方性は $\pm 130\text{ppm}$ におよぶから、 400MHz (^1H)の装置では2次のサイドバンド(SSB)を消去するためには、回転速度は 6.5kHz 以上($100 \times 130 / 2 = 6500$)必要となる。現在ではスピニング機構の改良によって、 10kHz 以上の回転速度も可能になってきた。だが、高速で試料を回転することによって双極子相互作用が減少するためにCP効率が低下し、感度(S/N)が低下するという問題が生じている^{1), 2)}。この問題を克服する手段としてCP時に回転を止める"stop-and-go"法³⁾や、回転軸をmagic angleからずらす手法⁴⁾が提唱されているが、プローブの機械的構造が複雑となる欠点がある。

今回我々はCPパルスに振幅またはパルス幅変調をかけることによって、複雑な機構を必要とせずに、高速試料回転の際に起きるCP効率の低下を防ぐ方法を開発したので報告する。

2. 実験と結果

実験はJEOL JNM-GSH270 およびGSH400 固体高分解能NMR装置を使用した。 ^{13}C 測定には、試料としてヘキサメチルベンゼンを用い、コンタクトタイムは 5msec とした。また、 ^{15}N 測定には、 $25\%^{15}\text{N}$ エンリッチした $^*\text{NH}_4\text{Cl}$ を用い、コンタクトタイムは 8msec とした。

① 高速回転によるCP効率の低下

図1は回転速度を 5kHz , 6kHz , 7kHz とし、 ^1H のRFパワーを一定($B_{1\text{H}} = 50\text{kHz}$)にし

ひおかかつや いまいずみじゅんじろう ふじとてるあき
 たけごしきよのり てらおたけひこ

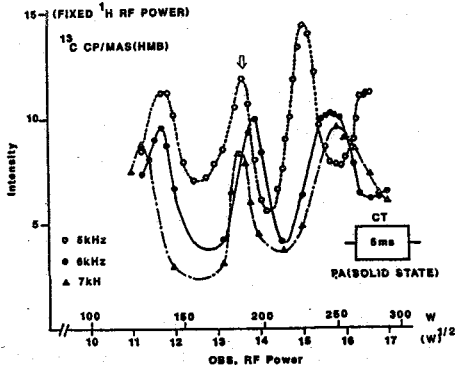


図1 ヘキサメチルベンゼンのピークの高速回転によるCP効率の低下

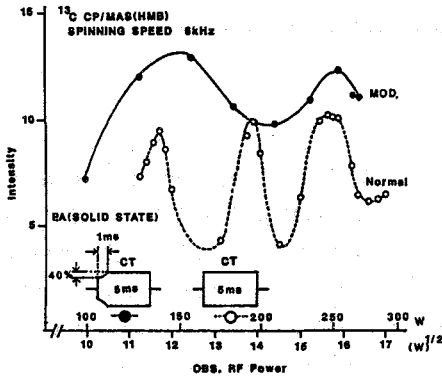


図2 振幅変調されたCPパルスによるCP効率の改善

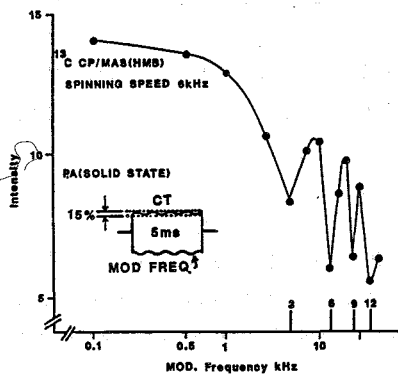


図3 振幅変調周波数とCP効率

て、 ^{13}C のRFパワーを変化させた際のメチル基の相対信号強度である。観測周波数は100MHzである。図中、矢印の位置がハルトマン・ハーン条件を満たすパワーで、回転による変調がかかることによって、回転速度に相当するパワー分だけずれた位置でもマッチングがとれることがわかる。また、回転速度が上がると信号強度が下がっていることがわかる。信号強度が下がったのは、CPの担い手である双極子相互作用が、高速回転によって弱められ、CP効率が減少するためと考えられる。

② 振幅変調の効果

図2はCP効率の低下を防ぐために ^{13}C 側のCPパルスの立ち上がり部分に振幅の変化を与えて、図1と同じ測定をしたものである(黒丸)。回転速度は6kHzである。従来の矩形のCPパルス(白丸)の場合、(i)マッチング条件の幅が狭い、(ii)CP効率が低下する、の2つの問題があったが、この方法を使用すると、(i)マッチング条件が広くなるとともに、(ii)CP効率の低下が防げることがわかった。

図3は、 ^{13}C のCPパルスに低周波の振幅変調をかけ、その変調周波数を変化させた場合の信号強度の変化である。変調周波数が1kHzを超えると(周期が1msec以下)信号強度の急激な減少がみられ、回転速度の1/2の整数倍において極小点が観測される。変調周波数がある周波数以下にすることによってCP効率の低下を防ぐことができる。

観測側と ^1H 側のいずれか、または両方に振幅変調をかけても同様の結果が得られる。

高速回転によるCP効率の低下は ^{15}N 観測($^*\text{NH}_4\text{Cl}$)にも見られる(図4)。 $^*\text{NH}_4\text{Cl}$ では、最適コンタクトタイムは8msecとヘキサメチルベンゼンよりも長い。この場合、パルスの立ち上がり部分の振幅変化の時定数 t_c は1msecでは不十分で3msec以上必要である。4kHzから

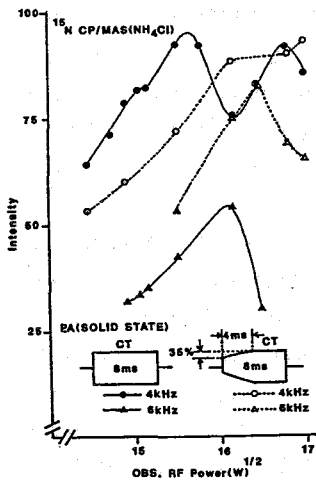


図4 ^{15}N CP/MAS(NH_4Cl)の変調されたCPパルスの効果

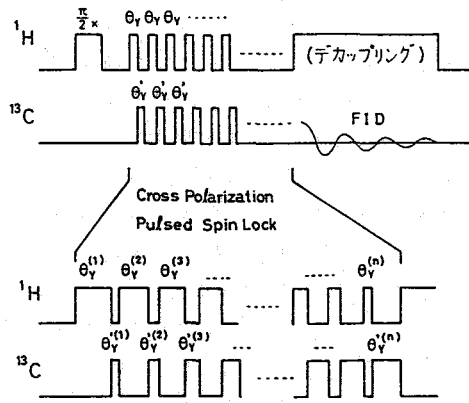


図5 パルス幅変調されたCP法

6kHzに回転速度が上がると、矩形波パルスでは、効率が半分近くに下がるが、CPパルスに振幅変化をかけることにより、大幅に、CP効率の低下が防げることがわかる。また変調度は10%以上あればCP効率の低下が防げることがわかった。

③ パルス幅変調法

ヘキサメチルベンゼンと ^{15}N CP/MAS(NH_4Cl)の例からわかるように、パルスの立ち上がり部分の振幅変化の時定数 t_c は、試料によって変える必要がある。図5は振幅を変化させる代わりにパルス幅に変調をかけることによってCP効率の低下を防ぐ方法で、振幅変調のように特別な回路を必要としない利点がある。パルス間隔は T_2 よりも十分に短くしておき、パルス幅を徐々に変化させることによって、振幅変調と同様の結果を得ることができる。ここで、パルス幅の増加速度は振幅変化の時定数に対応するものである。また、 ^1H 側を連続波にすれば、 ^1H がデカップリングされて T_2 による制約が緩和されるので、rigidな試料にも用いることができ、より実用的となる。

3. 考察

以上の結果から、CPパルスに変調をかけることにより、なぜCP効率の低下を防止されるか考察する。

① 高速MASの効果

マッチング条件は静止状態または低速回転時には非常に幅広く、高速になるにつれて狭くなる。それは、 ^1H スペクトルにおける双極子相互作用による線幅の変化に対応している¹⁾。 ^1H の線幅は、試料によって異なり、分子運動の速い試料、例えばヘキサメチルベンゼンや NH_4Cl では、回転速度が比較的低速でも鋭くなるが、グリシンのようなrigidな試料では、高速(10kHz程度)にならないと ^1H の線幅は狭くならない。

静止状態または低速回転では、 ^1H スピン系は強い双極子相互作用によって結合しているためにエネルギー準位がゆらぎをもち、マッチング条件は幅広くなり、CP効率も高い。回転速度を高速にすると、H-H双極子相互作用が弱められ、即ち ^1H スピン系が切り離され、それぞれのエネルギー準位が異なるために同時にすべてのH-Cスピン系のハルトマン・ハーン条件を満たすことが困難となり、マッチングがとりにくくなる。

② CP効率向上のメカニズム

高速回転の場合には、すべてのスピン系のハルトマン・ハーン条件を満たすことは困難となる。そこで、CP時に高周波磁場 B_1 の強度を連続的に変化させると、エネルギー準位のばらつきをカバーすることができるため、それぞれのスピン系のハルトマン・ハーン条件が満たされ、マッチング条件が幅広くなるために、CP効率が向上すると考えられる。

③ 振幅変化速度について

振幅の変化によるCP効率の向上は、溶液NMRでのJ-cross polarizationの実験で報告されている⁵⁾。この場合、 B_1 の変化は、スピンの高周波磁場の変化に追従できる程度の遅い速度であることが必要で、これは“断熱条件”とよばれている。本実験では、時定数 t_c が T_{CH} (C-H間の分極移動時間)に比較して十分に長いことが必要と考えられる。

このように、CPパルス変調法は、分子運動の速い系に対して、高速回転時のCP効率低下防止に有効であることがわかった。今後、rigidな試料に対しても、さらに高速の回転状態で同様な効果があるか否かの検証、詳細なCPメカニズム、および時定数 t_c とC-H間の分極移動時間 T_{CH} との関連の解明をおこなう予定である。

文献

- 1) R.A.Wind, S.F.Dec, H.Lock and G.E.Maciel, J. Magn. Reson., 79, 136 (1988).
- 2) H.J.Jakobsen, P.Daugaard and V.Langer, J. Magn. Reson., 76, 162 (1988).
- 3) R.C.Zeigler, R.A.Wind and G.E.Maciel, J. Magn. Reson., 79, 299 (1988).
- 4) M.Sardashti and G.E.Maciel, J. Magn. Reson., 72, 467 (1987).
- 5) A.N.Garroway and G.C.Chingas, J. Magn. Reson., 38, 179 (1980).

(京大理) ○芦田淳、中井利仁、寺尾武彦

ONE-DIMENSIONAL SEPARATION OF CHEMICAL SHIFT ANISOTROPIES
USING SELECTIVE INVERSION

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

A novel 1D NMR method for separating overlapping chemical shift powder patterns using selective inversion and switching-angle sample-spinning (SASS) is described. This method considerably saves time compared with 2D SASS spectroscopy. The essential idea can also be used for simultaneously obtaining multiple cross sections of a general 2D spectrum.

<序論>

今日広く用いられているCPMAS法では、溶液のNMRと同様、化学シフトテンソルの等方平均値のみが測定され、固体特有のきわめて有用な情報源である異方性は高分解能を達成するためにMASにより消去されている。粉末試料を静止した状態で測定すれば、powder pattern (以下においてPPと略す) と呼ばれる特異なスペクトルが現われ、異方性を求めることができるが、一般に試料中には化学的に非等価な核が存在するため、通常の方法ではPPが重なり合い、核ごとに化学シフトテンソルの主値を求めることはきわめて困難である。そこで、当研究室では以前に個々のPPの分離測定を可能にするswitching-angle sample-spinning法 (SASS法)¹⁾を開発した。この方法はきわめて効果的であるが、2次元NMR法を用いているため非常に長い測定時間を必要とする。

今回我々は、選択反転と試料回転軸のswitchingを組み合わせて1次元NMR法で、非等価な¹³C核が存在する試料に対して、全ての核に対する化学シフトPPを同時に分離測定する方法を開発した。この方法は2次元NMR法を用いていないため、測定時間は相当短縮される利点がある。またこの方法は、一般の2次元NMRにおいて、いくつかの断面を一挙に得ることに用いることができる。この方法の詳細と、p-ジアセチルベンゼンに適用して5個の非等価な¹³C核の化学シフトPPを分離測定し、テンソルの主値を求めた

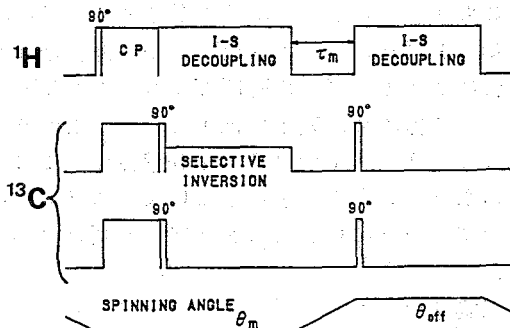


図1 実験に用いたパルス系列。

あしだ じゅん、なかい としひと、てらお たけひこ

実験結果を報告する。

<方法>

実験に用いた基本的なパルス系列を図1に示す。選択反転パルスでは、PPが重なり合っているスペクトルの中から特定のPPを反転させることはできないので、MASにより異方性を除去した状態で特定の核の磁化を反転させる。続いて、試料回転軸をoff magic angleにして測定を行なうと、反転された特定の核のPPと反転されていない他の核のPPが重なったスペクトルが観測される。この場合、求めるPP数nが3より大きいときは、以下に述べるように複数の選択反転パルスが必要である。

表1に、nが6以下のときどのPPを反転すべきかを示す。この方法を用いた例として、4つのpowder pattern $P_1 \sim P_4$ を得る場合について説明する。表1に従い、次の4つのスペクトルを測定する。

		PPの数					
		1	2	3	4	5	6
実験回数	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	-	+	-	+	+
	3	+	+	-	-	+	-
	4	+	-	-	+	+	-
	5	+	+	+	+	-	-
	6	+	-	+	-	-	-
	7	+	+	-	-	-	+
	8	+	-	-	+	-	+

表1 nが6以下のとき、どのPPを反転させるか（-が反転、+が非反転）。

$$\begin{aligned}
 S_1 &= +P_1 + P_2 + P_3 + P_4 \\
 S_2 &= +P_1 - P_2 + P_3 - P_4 \\
 S_3 &= +P_1 + P_2 - P_3 - P_4 \\
 S_4 &= +P_1 - P_2 - P_3 + P_4
 \end{aligned} \tag{1}$$

Pの前の負符号は反転していることを意味している。これらのスペクトルより個々のPPは次のように求められる。

$$\begin{aligned}
 +S_1 + S_2 + S_3 + S_4 &= 4P_1 \\
 +S_1 - S_2 + S_3 - S_4 &= 4P_2 \\
 +S_1 + S_2 - S_3 - S_4 &= 4P_3 \\
 +S_1 - S_2 - S_3 + S_4 &= 4P_4
 \end{aligned} \tag{2}$$

この式(2)より、実験に要するすべての時間が個々のPPのS/Nの向上に寄与していることがわかる。これは、1つの選択励起パルスを用いてn個のPPを1つずつ求める場合に比べて1/nの時間で済むことを意味する。

この方法で、表1を拡張してPP数が6より多い一般の場合について考えると、2mもしくは2m-1個のPPを分離測定するには、2^m個のスペクトルを測定すればよいことになる。さらに、重ならないようなPP—たとえばカルボニル炭素とメチル炭素—を1つのグループにいれてしまえば、必要なスペクトルの数を減少させることができる。

<実験>

測定は自作の装置を用いて常温で行った。共鳴周波数は¹³Cに対して22.6MHzである。選

択反転パルスはパルス幅10ms.のsoft pulseを用いた。rf磁場の強度の切り替えに数 μ s.、周波数の切り替えには40 μ s.、試料の回転軸の切り替えには50ms.を要している。観測時の θ offは $\theta_m + 20^\circ$ に設定している。

<結果>

p-ジアセチルベンゼンのCP/MASスペクトル、静止PPスペクトルおよび分子構造を図2に示す。メチル炭素とカルボニル炭素の化学シフトが大きく離れていてPPが重ならないことより、5つの非等価な核を次の4つのグループ $P_1 \sim P_4$ に分けることができる。

- P_1 : カルボニル炭素とメチル炭素
- P_2 : ベンゼン環の C_1 炭素
- P_3 : ベンゼン環の C_2 炭素
- P_4 : ベンゼン環の C_3 炭素

図3に、さきに述べた方法を用いて得られるp-ジアセチルベンゼンの4つのスペクトル $S_1 \sim S_4$ を示す。

図4に、図3および式(2)から得られるp-ジアセチルベンゼンの個々の炭素に対して分離されたPPを示す。この様に、個々のPPは非常によく分離されて得られ、各々の化学シフトテンソルの主値を決定できる。得られた化学シフトテンソルの主値 σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} 、それから得られる等方平均値 $\bar{\sigma}$ 、ならびにCP/MASスペクトルから得られる等方平均値 σ_{iso} を表2に示す。

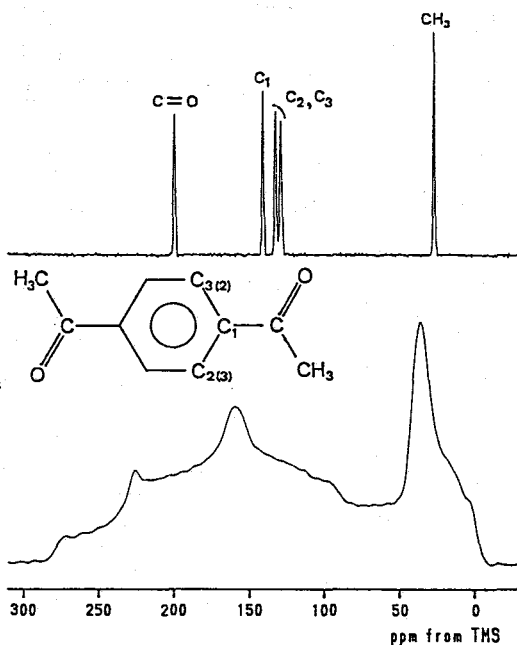


図2 p-ジアセチルベンゼンのCP/MASスペクトル、静止PPスペクトルと分子構造。

	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	$\bar{\sigma}$	σ_{iso}
カルボニル炭素	275.7	226.6	94.1	198.8	198.8
C_1	230.9	163.2	29.1	141.0	140.4
C_2	224.1	158.2	15.2	132.4	132.0
C_3	225.2	157.0	5.0	129.0	128.4
メチル炭素	39.7	39.7	0.3	26.6	26.5

ppm from TMS

表2 p-ジアセチルベンゼンの化学シフトテンソルの主値。

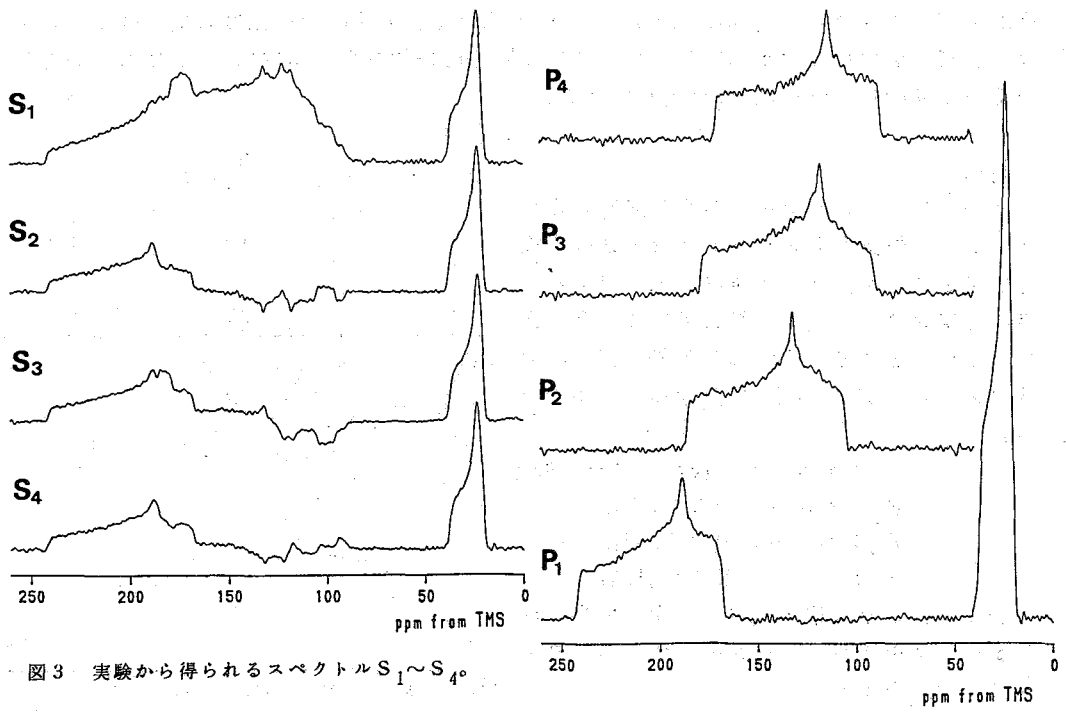


図3 実験から得られるスペクトル $S_1 \sim S_4$ 。

図4 p-ジアセチルベンゼンの個々の炭素に対して分離されたPP。

- 1) 寺尾、藤井、小野寺、雑賀、第22回NMR討論会(1983); T. Terao, T. Fujii,
T. Onodera, and A. Saika. Chem. Phys. Lett. 107, 145 (1984)

(阪大蛋白研) 片平正人、菅田宏、京極好正
(阪大薬) 藤井敏

Determination of a Conformation of the Deoxyribonucleic Acid by $^1\text{H-NMR}$ and Restrained Molecular Dynamics

Masato Katahira, Hiromu Sugeta, Yoshimasa Kyogoku and Satoshi Fujii*
(Institute for Protein Research and *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

The conformation of the deoxyribonucleic acid duplex $d(\text{GGAAATTTCC}) \times 2$, which results in a macroscopic bending when it repeats, is studied by $^1\text{H-NMR}$ and restrained molecular dynamics. Independent of initial conformations (the rmsd between them is 5.5 \AA), the conformations obtained by restrained molecular dynamics are very similar to each other. (the rmsd between them is 0.8 \AA). On the other hand, the conformations obtained by free molecular dynamics or restrained energy minimization depend intensely upon their initial conformations, and convergence to a similar conformation is not achieved. The conformation obtained by restrained molecular dynamics exhibits a few remarkable characteristics, and as a result the helical axis is bent.

(序)

デオキシアデノシン残基が連続したオリゴ(dA)配列を持つDNAは曲がった構造をとる事が生化学的実験から示唆されている。このDNAの曲がり、遺伝情報の発現に際して重要な役割を担っていると考えられている。しかし曲がった構造の詳細については数々の研究にも拘らず依然明らかにはされていない。そこで本研究ではオリゴ(dA)配列を持つ自己相補的二重鎖DNA、 $d(\text{GGAAATTTCC}) \times 2$ を取り上げ、その溶液中における構造をプロトンNMRと拘束条件付き分子動力学⁽¹⁾⁽²⁾によって詳細に研究した。

(方法)

イミノプロトン、アミノプロトン及びアデニンの2位のプロトンの帰属は、11エコーバルスを用いて軽水中で測定したNOESYスペクトル⁽³⁾に基づいて行った。他のプロトンの帰属は重水中で測定したNOESY、DQF-COSY、HOHAHAスペクトルに基づいて行った。この結果H5'/H5"の一部を除く全てのプロトンの帰属が得られた。

短い混合時間(60, 90, 100, 120, 150ms)で測定した一連のNOESYスペクトルに基づいて182個のプロトン-プロトン距離を算出した。その際の内部基準としてはシトシンのH5-H6距離(2.5 \AA)及びチミンのCH₃-H6距離(2.7 \AA)を用いた。DQF-COSYスペクトルの定性的解析に基づいて各残基の糖のバックリングを決め、ねじれ角に関する情報を得た。

分子動力学計算はAMBER⁽⁴⁾を改良したもので行った。実験から得られたプロトン-プロトン距離及び内部回転角に関する拘束を以下のような疑似エネルギー項(E_{NOESY}及びE_{COSY})として表現し、これを経験的エネルギー項E_{empirical}(結合に関するエネ

ルギー、結合角に関するエネルギー、ねじれ角に関するエネルギー、非結合相互作用のエネルギー、静電的エネルギー及び水素結合に関するエネルギー)に加えたものを系の全エネルギー E_{TOTAL} とした。

$$E_{NOESY} = W \cdot k_{NOESY} (r - (r_{NOESY} - a_1))^2 \quad r < r_{NOESY} - a_1$$

$$= 0 \quad r_{NOESY} - a_1 < r < r_{NOESY} + a_2$$

$$= W \cdot k_{NOESY} (r - (r_{NOESY} + a_2))^2 \quad r_{NOESY} + a_2 < r \quad (1)$$

(W: ウェイト、 k_{NOESY} :力の定数 r : プロトン-プロトン距離
 r_{NOESY} :実験から求められたプロトン-プロトン距離、 a_1 と a_2 :定数)

$$E_{COSY} = k_{COSY} (\phi - \phi_{COSY})^2 \quad (2)$$

(k_{COSY} :力の定数、 ϕ : ねじれ角、 ϕ_{COSY} : 実験から求められた
 ねじれ角)

$$E_{TOTAL} = E_{empirical} + E_{NOESY} + E_{COSY} \quad (3)$$

表1 a_1 、 a_2 及び k_{NOESY} の値

距離(Å)	a_1 (Å)	a_2 (Å)	k_{NOESY} (kcal/molÅ ²)
2.5-3.0	0.20	0.25	4.0
3.0-3.5	0.25	0.30	4.0
3.5-4.0	0.30	0.35	4.0
4.5-	0.40	0.50	4.0

表2 計算手順

時間(ps)	温度(K)	ウェイト W
0-4.0	100-200	0.25
4.0-8.0	200-400	0.25-6.25
8.0-16.0	400	6.25
16.0-18.4	400-300	6.25
18.4-34.4	300	6.25
34.4-68.0	300	8.35

a_1 、 a_2 及び k_{NOESY} は表1の様に設定した。

NOESYスペクトルから求められるプロトン-プロトン距離には、スピン拡散等に由来する誤差が含まれる。これを考慮して⁽⁵⁾ a_1 及び a_2 の設定を行っている。

AMBERにおいては、一重及び二重結合に関する力の定数は各々300と600Kcal/molÅ²である。一方(1)式の k_{NOESY} は表1に示した様に4.0 kcal/molÅ²に設定してある。計算の最終段階において(1)式のWは最大値8.35まで引き上げられるが(表2)、それでも実効の力の定数は4.0 x 8.35 = 33.4 kcal/molÅ²であり、比較的緩い拘束条件となっている。

(2)式における k_{COSY} は16.2 kcal/molrad²に設定してある。これはAMBERにおける結合角の力の定数の約1/5である。

初期構造としては、核酸の代表的構造であるA型⁽⁶⁾及びB型⁽⁶⁾を選んだ(IniA, IniB)。⁽⁶⁾。二つの構造間のrmsdは5.5Åである。手順としては表2に示すように系の温度を10Kから400Kまで徐々に上げてアニーリングした後、再び300Kまで冷やし、この温度で長時間の分子動力学計算を行った。ウェイトWも0.25から8.35まで徐々に重くしていった。

最後の2psにおける座標を平均し、拘束条件付き分子動力学によって得た構造とした（初期構造がA型なのかB型なのかによって各々RDA、RDB）。

上記とは別にさらに二通りの計算を行った。一つ目は $E_{\text{empirical}}$ のみで上記と全く同様な計算（free molecular dynamics）を行うもので、これによって得られた構造をFDA、FDBとする。二つ目は(3)式の E_{TOTAL} のエネルギー最適化であり、これによって得られた構造をRMA、RMBとする。

(結果と考察)

図1に各種計算法によって得られた構造を示す。また表3に各構造間のrmsdを示す。

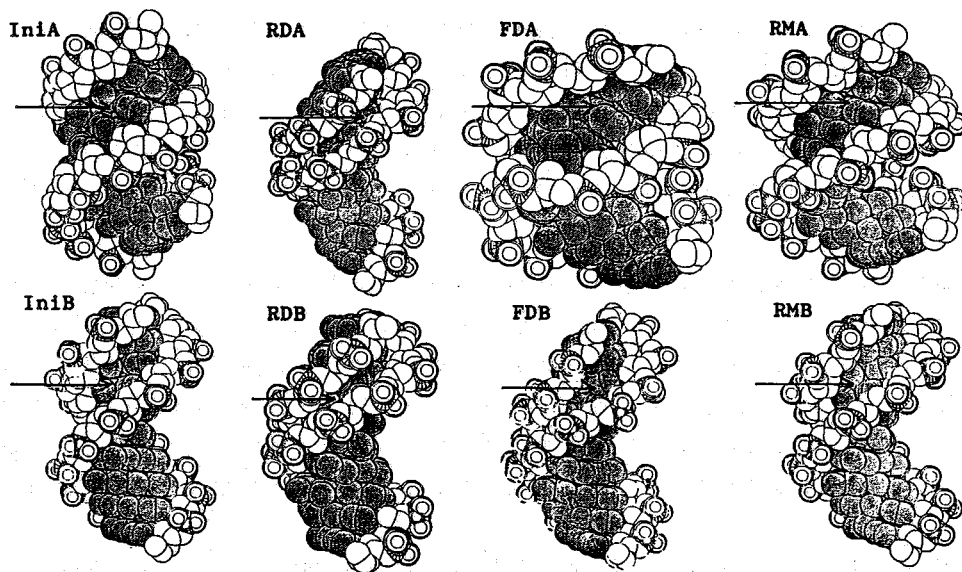


図1 各種計算法によって得られた構造

表3 各構造間のrmsd(Å)

	In1A	RDA	FDA	RMA	In1B	RDB	FDB	RMB
In1A	—	5.8	3.4	1.7	5.5	6.1	6.1	5.1
RDA		—	6.4	5.1	1.7	0.8	1.7	1.2
FDA			—	3.5	6.3	6.6	6.6	6.3
RMA				—	5.1	5.4	5.5	4.9
In1B					—	1.9	1.8	1.0
RDB						—	1.8	1.5
FDB							—	1.5
RMB								—

表3より、拘束条件付き分子動力学を行った場合には、初期構造によらず一つの構造に収束している事がわかる(RDAとRDBのrmsd 0.8\AA)。それに対して拘束条件を入れない分子動力学や、たとえ拘束条件を入れても単なるエネルギーの最適化を行ったのでは、得られる構造は初期構造に強く依存したものとなり、収束した構造は得られない(FDAとFDBのrmsd 6.6\AA , RMAとRMBのrmsd 4.9\AA)。この事は図1を見ても明らかであり、RDAとRDBは非常によく似た構造であるのに対し、FDA, FDB, RMA, RMBはDNA鎖全体の膨らみ具合や、矢印で示した副溝の広さ等に関して、各々の初期構造の性質を強く残している。これは拘束条件を入れないで分子動力学計算を行った場合には構造位相空間が大きすぎて、通常実行可能な計算時間内には全ての範囲を探索し尽くすことが出来ない為、又たとえ拘束条件を入れても、単なるエネルギー最適化では極小値を見つけることしか出来ない為だと考えられる。これに対して拘束条件付き分子動力学では、実験から得られた情報と合わない構造に対してはE_{NOESY}あるいはE_{cosy}が著しく大きな値となる為、エネルギー的に非常に不利となり、その結果実効の構造位相空間はせばめられ、分子動力学計算の本来持つ極小点からの脱出の効果と相まって、短時間の内にE_{TOTAL}の最小点に至る事ができたのだと考えられる。

拘束条件付き分子動力学で得られた構造の特徴として以下のものが挙げられる。①オリゴ(dA)配列部において副溝が著しく狭い。②2番目のグアノシン残基がBII構造である(他の残基は通常見られるBI構造)。③糖のバックリングが1から8番までの残基と9番及び10番とは異なる。②及び③は各々オリゴ(dA)配列部の前後における曲がりを引き起こしている。一方①はオリゴ(dA)配列部内における曲がりを引き起こしている。これらの曲がりとは皆同一方向であり、その為二重鎖全体としても曲がった構造をとっている。

- (1) Kaptein, R., Zuiderweg, E. R. P., Scheek, R. M., Boelens, R. and Gunsteren, W.F. (1985) *J. Mol. Biol.* **182**, 179-181.
- (2) Clore, G., Gronenborn, A. M., Brunger, A. T. and Karplus, M. (1985) *J. Mol. Biol.* **186**, 435-455.
- (3) Sklenar, V. and Bax, A. (1987) *J. Magn. Reson.* **74**, 469-479.
- (4) Weiner, S. J., Kollman, P. A., Nguyen, D. T. and Case, D. A. (1986) *J. Comp. Chem.* **7**, 230-252.
- (5) Nilson, L., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Brunger, A. T. and Karplus, M. (1986) *J. Mol. Biol.*, **188**, 455-476.
- (6) Arnott, S. and Hukins, D. W. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1504-1509.

○西村善文, 加藤晃一, 荒田洋治, 松田裕生, 中村聡
(東大・薬, 横浜市大・総合理, 帝人・東京研)

Photo-CIDNP Studies on Surface Structures of Proteins

Yoshifumi Nishimura, Koichi Kato, Yoji Arata, Hiroo Matsuda, Satoshi Nakamura

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Teijin Tokyo Research Institute

It is well established that method of photo-chemically induced dynamic nuclear polarization (Photo-CIDNP) is very powerful to obtain surface structures of proteins. However cancellation of polarization of flavine dye used in the cyclic experiment for proteins is not well understood. In this paper we have investigated the cancellation mechanism of the dye polarization by changing the dye concentrations, laser pulse width, and the delay time of acquisition of NMR signals after the laser irradiation. We could obtain a good experimental condition to cancel the dye polarization keeping the protein signals strong. And also we have found a specific laser irradiation effect on some proteins used for the photo-CIDNP experiment.

光CIDNPは、タンパク質表面に存在する Tyr, His, Trp の環境を鋭敏に検出する手段として広く用いられてきた。特に免疫グロブリン分子のように、分子量が15万と大きくても、選択的に表面構造が解析できるので、その有効性は大きい。フラビン系色素を用いた、環状光化学反応については、Kaptein 5F によってその機構もかなり説明されている(1, 2)。特に N-アセチルトリプトファンと N-アセチルチロシンとイッテ、アミノ酸と N-カルボキシメチルピフラビンとの反応については、色素の分極の時間変化などが検討され、何故、チロシンやトリプトファンの分極が観測されるのか、色素の分極は見かけ上観測できないのかについて反応機構が検討されている。それに対してタンパク質中のチロシンやトリプトファンと色素との反応については、定性的な事が議論され、機構について不明な点が多い。特に光CIDNPの測定はタンパク質に対して破壊的な方法だが、タンパク質がどのように変化しているのかについての知見も少ない。ここではそういう機構に関して、いくつかのタンパク質について検討したので報告する。

○実験. 色素は合成した 3-N-カルボキシメチルピフラビンを用いた。タンパク質は、リソチム、 β -ラクトグロブリン、免疫グロブリン、およびその Fab, Fc フラグメントを用いた。NMR はブルッカー AM-400F CIDNP 用プロローブをつけて測定した。プロローブは約 $\phi = 5\text{mm}$ 程度のライトパイプがついていて、ライトパイプの端面は、フラットになっていて、そこからレーザー光を導入し、上端は斜めにカットされ、反射するようになっている。レーザーは NEC の Ar レーザー (GLG3300, 全出力 4W) を用いた。測定にあたっては、488nm, 出力 0.8W 程度で発振させた。分光器からの TTL レベルでオプティカルシャッターを開閉した。光照射のスペクトルと非照射のス

クリスタル よしほみ, かとう こういち, あさた ようじ, まつだ ひろお, なかむら さとし

シフトを測定し、別々のファイルに収納し、FIDの差をとり、差スペクトルとして表示した。

結果 図1に免疫グロブリン分子のFcフラグメントの光CIDNP差スペクトルを示す。今レーザー照射時間とFIDの取り止め時間の間を変化させて測定した。Tyrの3.5Hの負のピークとHisの2Hの正のピークは、時間間隔を変化させても、ほとんど変化しない。なおかつβCH₂, αCHの強度が時間とともに増大している。この事は交差分極による。ところがフラビン色素に由来する負のピーク(A, B, C, D, E, F)は、時間とともに強度が減少している。特にA, Fのピークについては著しい。これは、時間とともに、色素の分極がキャンセルされている事に相当する。ここで示したのと同じ様な現象は、FIDの取り止め時間までのデレイタイムを0にして、照射時間のみを変化させても得る事ができる。図2に、レーザー照射時間変化を示す。レーザー照射時間が50 msecの時は色素の負のピーク強度が異常に強い。Tyr, Hisの強度は、レーザー照射時間が長くなると、S/Nが良くなっているのは、この時間のオーダでは、タンパク質のTyr, Hisの分極はあまり大きく緩和しないという図1の結果と対応している。

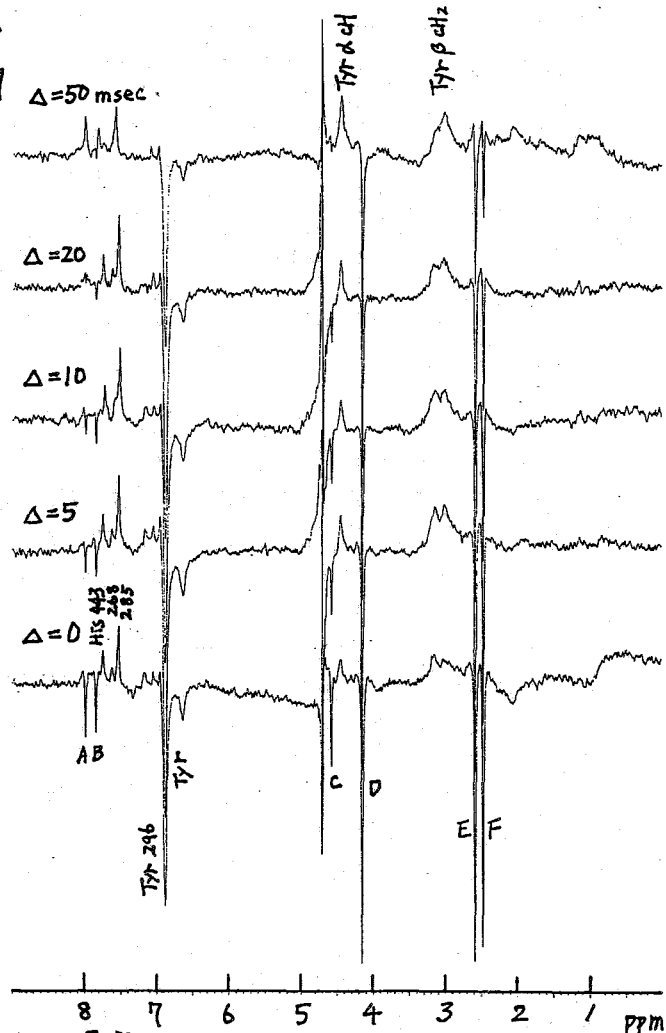


図1 免疫グロブリンFcフラグメントの光CIDNP差スペクトル。タンパク質濃度0.3mM, 色素濃度0.2mM。レーザー照射時間100msec。Δはレーザー照射とFIDの取り止め時間のデレイタイムである。D₂O中。

それに対して、色素の強度が減
 っているのは、この時間のオーダで
 キャンセルされている事を示して
 いる。よってレーザー照射時間を
 長くすると、図1で示したディレイ
 タイムが長い成分の寄与が大き
 く、特にA, Fのシグナルのキャン
 セルの効果が大きい。しかし、図
 1の時と同じく、交差分極の寄
 与も大きくなってきているので、Tyr
 のシグナルの強度変化が判別
 できなくなるとも、免疫グロブリンの
 Fcフラグメントに関しては、
 タンパク質表面の Tyr, His
 のシグナル強度をそのよう
 なく、かつ色素の強度が減少
 している条件としては、図3
 に示すように、ある程度長いレ
 ーザー照射時間でかつ、若干
 の時間差をFIDの取込み開始
 までにおいた方がよいという
 事が判った。この事は、今まで
 調べた種々のタンパク質
 (リゾチーム, β -ラクトグロブ
 リン, 免疫グロブリン分子,
 そのFabフラグメント等)で
 も同様であった。

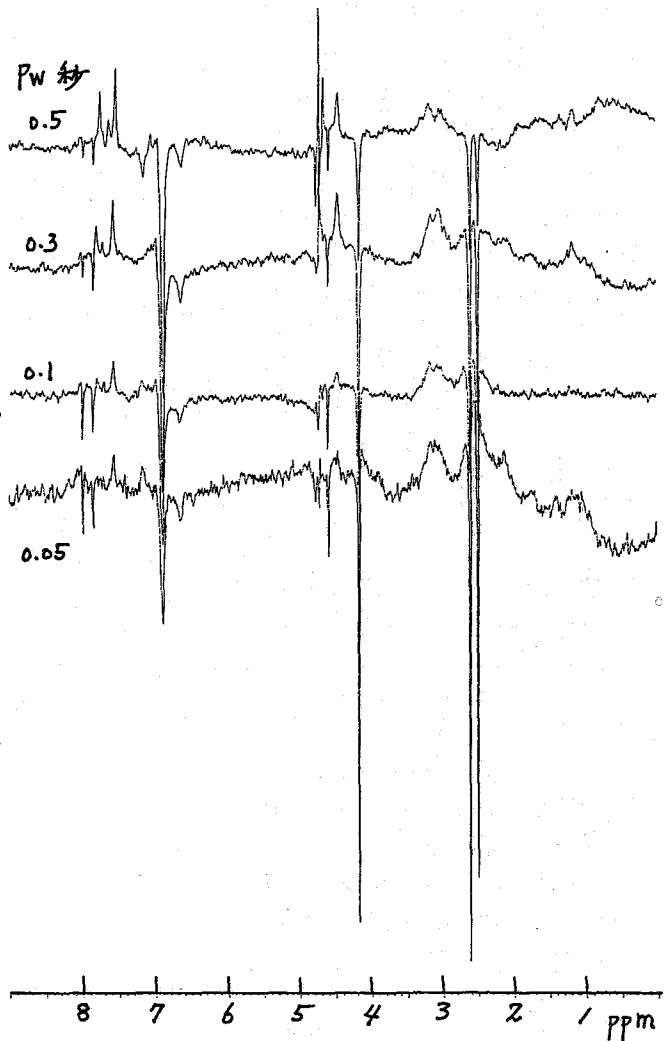


図2 免疫グロブリンFcフラグメントの光CIDNP
 差スペクトルのレーザー照射時間変化。レーザー光強
 度を一定にして、照射時間を0.05秒, 0.1秒,
 0.3秒, 0.5秒と変化させた。レーザー照射後
 すぐにFIDの取込みを行った。タンパク質濃
 度0.3mM, 色素濃度0.2mMでD₂O中の測
 定である。

光CIDNPによるタンパク
 質の変化。

今回の実験下では、環状
 光化学反応による、長時間
 積算に伴なうスペクトルの
 変化が判った事を確認し、も
 ののみをかかげた。しかし、積
 算回数を長くすると、S/Nが
 悪くなるのも確かである。

(東大薬、*日本ブルカー)

○加藤晃一、五十嵐貴子、松永千枝、金 夏亨、高橋栄夫、尾高麻乃、
水谷隆太、大和澄江、Markus Waelchli*、嶋田一夫、荒田洋治

Applications of ^{13}C -NMR Spectroscopy to Molecular Structural Analyses of Antibody Molecules

K.Kato, T.Igarashi, C.Matsunaga, H.Kim, H.Takahashi, A.Odaka, R.Mizutani, S.Yamato, M.Waelchli**, I.Shimada, Y.Arata
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, **Bruker Japan)

A ^{13}C NMR study of a mouse anti-dansyl monoclonal antibodies is reported. The antibody molecules were specifically labeled with $[1-^{13}\text{C}]$ methionine and $[1-^{13}\text{C}]$ tryptophan by growing hybridoma cells in serum-free medium. It was possible to observe all the labeled carbonyl carbon resonances of the antibodies. The Fab and Fc fragments have been obtained from the antibodies and used successfully for the assignments of each of the carbonyl resonances to either the Fab or Fc regions. It has been shown that site specific assignments of the carbonyl resonances can be made by means of a double labeling technique developed by Kainosho and coworkers. It has been revealed that these resonances can be useful probes to trace the interaction of antibodies with various molecules including antigens.

1. 序

生物学的に興味深い蛋白質の多くは、分子量10万を越える巨大なものであり、これを通常のNMRによる構造解析の対象とすることは極めて困難である。我々は、各種安定同位体標識法を用いて、この問題を克服することを試みている。今回は、特定のアミノ酸残基の主鎖カルボニル炭素をエンリッチした免疫グロブリン(分子量15万)を対象に、 ^{13}C -NMRによる解析を行った結果を報告する。特にここでは、ダブルラベル法によるシグナルの帰属を基盤に、抗体の高次構造と抗原分子等の認識機能との関わりについて議論する。

2. 実験

L鎖(V_L,C_L)およびV_Hを共通に持ち、他の定常領域の一次構造のみが異なる一連の抗ダンシルマウスモノクローナル抗体(switch variant antibodies)の各サブクラス(IgG1,IgG2a,IgG2bおよびIgG2a(s)(IgG2aからCH1が欠落した変異体))を材料として用いた。これらの抗体を産生するハイブリドーマを、適当な安定同位体標識アミノ酸を含む無血清培中にて培養し、特定部位の ^{13}C あるいは ^{15}N をエンリッチしたモノクローナル抗体を得た。トランスアミナーゼによる ^{15}N の希釈を防ぐために必要

かとう こういす

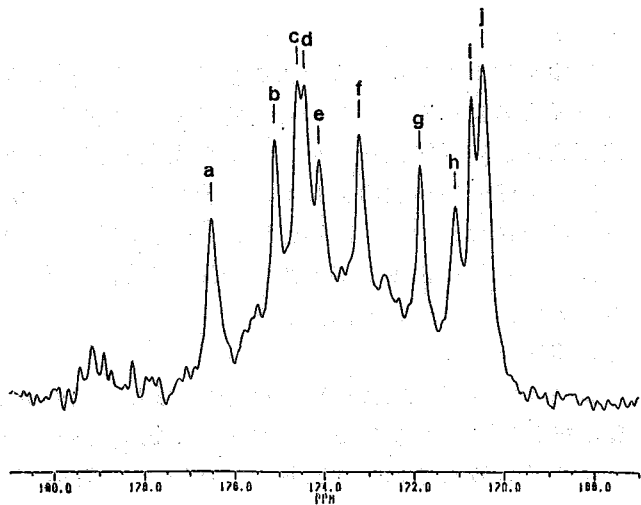
に応じて培地中に代謝阻害物質（例えばβ-クロロアラニン）を添加した。NMRの測定には、Bruker AM-400を用いた。既に、報告したように¹⁾、パパイニンによる限定分解と、¹³C-¹⁵Nダブルラベル法を併用することによって、観測したシグナルの帰属を行った。

3. 結果と考察

Metのカルボニル炭素をエンリッチして、各サブクラスの抗体の¹³C-NMRを測定した。一例として、IgG2aのスペクトルを図1に示す。この抗体に存在する11個のMet残基に由来するシグナルが全て観測されている。シグナルaは、C_H2ドメインのMet-314に帰属される。この残基は、ヒトFcの場合、黄色ブドウ球菌由来プロテインAのフラグメントBとの相互作用部位に位置することがX線構造解析の結果から示されている²⁾。シグナルaの化学シフトのpHあるいは温度依存性は、この相互作用部位の微視的環境を反映している。シグナルeは、V_Hドメインに割り当てられ（位置特異的帰属は未確定）、特異的抗原であるε-dansyl-L-lysineとの結合に伴って選択的にシフトした。今後、より詳細に帰属が進行すれば、抗体分子中で抗原との結合に関与する部位をスペクトルの変化から特定できる。シグナルjは、2個分のピークが重なったもので、その一方は、C_LドメインのMet-175に帰属される。この残基に由来するシグナルの化学シフトはサブクラス間で異なっていた。上述した通り、C_Lドメインは、いずれのサブクラスでも共通な一次構造を持つことから、この違いは、四次構造上のC_H1ドメインとの相互作用を反映しているものと考えられる。

図1

[1-¹³C]Metで標識した抗ダ
ンシルマウスモノクローナルIgG2a
の¹³C-NMRスペクトル
測定条件：100MHz、30°C、pH 7.2



[文献]

- 1) Kato, K., Matsunaga, C., Nishimura, Y., Waelchli, M., Kainosho, M., and Arata, Y. (1989) *J. Biochem.* 105, 867-869
- 2) Deisenhofer, J. (1981) *Biochemistry* 20, 2361-2370

○吉川 渉、中井 考尚、中村 春木、*吉田 若 (番工研、*東北大理)

STRUCTURE OF AN INHIBITOR-FREE RIBONUCLEASE F1

Wataru Yoshikawa, Takahisa Nakai, Haruki Nakamura, *Hiroshi Yoshida

Protein Engineering Research Institute, *Tohoku University

ABSTRACT

Two-dimensional ^1H NMR studies at 600 MHz have been performed on a guanine specific ribonuclease, RNase F1, which is composed of 106 amino acid residues. The sequence specific assignments were obtained for the back-bone protons of 98 amino acid residues and most of its side-chain protons. The tertiary structure of RNase F1 was constructed from 530 of inter-residue distance restraints. The global folding of RNase F1 was similar to that of a homologueous protein, RNase T1, although the marked deviation was found in the N-terminal segments. Furthermore, the conformations from Ile-89 to Val-100 should be almostly same between the two enzymes, since the ^1H chemical shifts of back-bone and side-chain protons are well conserved.

はじめに

リボヌクレアーゼF1 (RNase F1) は、カビ *F. moniliforme* の生産する分子量11000、106残基のアミノ酸からなる酵素である。⁽¹⁾ グアニン塩基に特異的に作用し一本鎖RNAを加水分解する。類縁の蛋白質RNase T1とはアミノ酸配列上58%の相同性がある。RNase T1に関しては、2'GMPおよび3'GMPとの複合体の結晶構造解析が報告されている。^(2,3) 当研究所ではRNase F1に関して、リガンドと結合しない遊離型および2'GMP複合体の両方の結晶化に成功している。酵素と基質との相互作用を詳細に調べる目的で、二相結晶によるX線構造解析が團野らによって進められている。我々はさらに、この酵素と基質との相互作用をNMRで調べる目的で、遊離型RNase F1の解析に着手した。

通常のプロトン 2D-NMRを測定し、106残基中98コのアミノ酸残基の主鎖と大部分の側鎖プロトンについてアミノ酸配列特異的に帰属した。二相の帰属に基づき約530コのアミノ酸残基間の距離情報を集め、ディスタンスジオメトリ法によりRNase F1の立体構造を解析した。本討論では、二相の結果から (1) 分子量1.1万の蛋白質の立体構造をNMRによってどの程度まで決定できるか (2) 類縁の蛋白質RNase T1との構造の比較 (3) 遊離のRNase F1の結晶構造との比較 等について報告する。

よしかわ わたる, なかい たかひさ, なかむら はるき, よしだ ひろし

実験 2DNMR測定のため、軽水および重水中、2mM、pH2.60にタンパク質を調製した。測定は、28℃、バルカ-社AM600NMR装置を用いた。プロトン2D-NMRスペクトル(COSY, NOESY, relayed-COSY)は、すべて純位相モードで測定した。

結果 1. 帰属 図1は、H₂O中で測定したCOSYスペクトルのフィンガープリント領域を示す。94個のクロスピークについて図に示す様に帰属された。2つのクロスピークについては帰属できなかった。この領域にクロスピークをあげたのは、N末端のピログルタミン酸および30個のアロリン残基も帰属できた。帰属できなかったのは、38、44-45、68-72の8残基である。これらはすべてループのまん中に位置している。NHプロトンと水との交換速度が速く観測しにくい残基と考えられる。

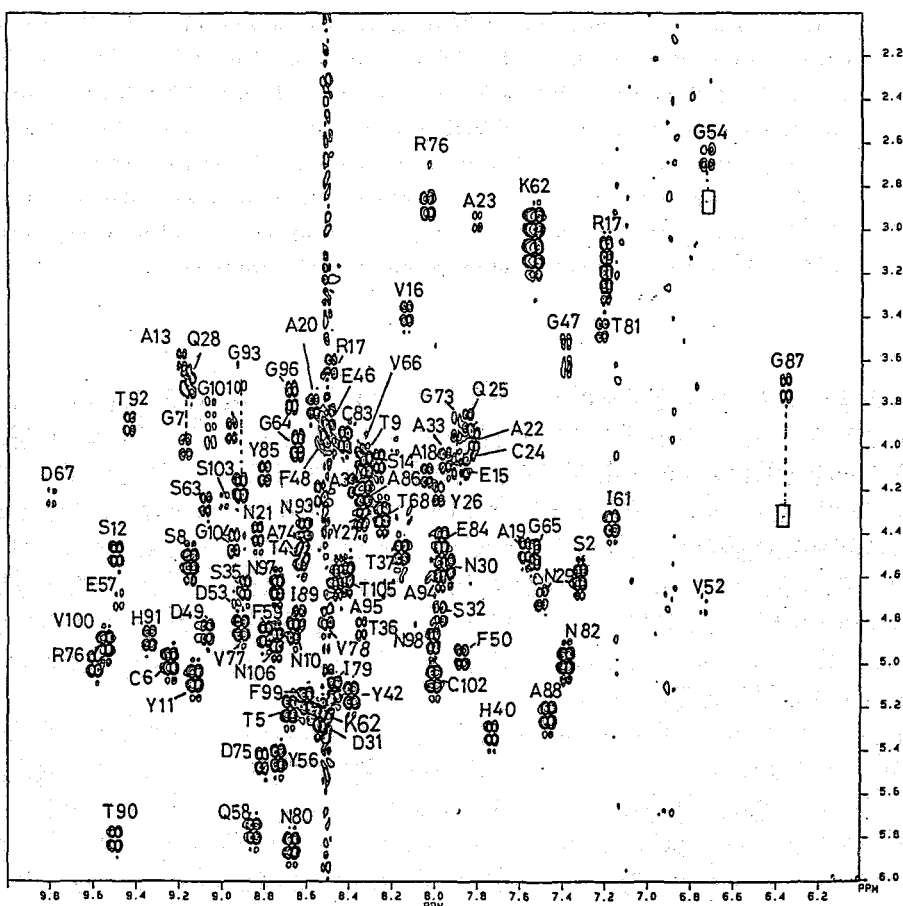


図1. H₂O-COSYスペクトル(フィンガープリント領域)

2. 二次構造 RNase F1の二次構造は、1本の長い α -ヘリックス (Ala13 - Asn29)と、2組の β -シートで構成されている。

図2は、 β シート構造を示す。実線の矢印は強いNOE、破線の矢印は弱いNOEクロスピークが観測されたことを示す。

この二次構造は、類縁の酵素RNase T1についての報告されているのとはほぼ同様であった。

図中、丸で囲んだNHプロトンは重水中で観測された交換速度の遅いプロトンである。全部で39コのNHプロトンが重水中で観測され、大部分が二次構造を構成する水素結合に関与している。 α -ヘリックス

2部分では、Val16からTyr27までのNHプロトンであった。例外はVal52とLys62のNHプロトンで、こちらも水素結合していることを示される。

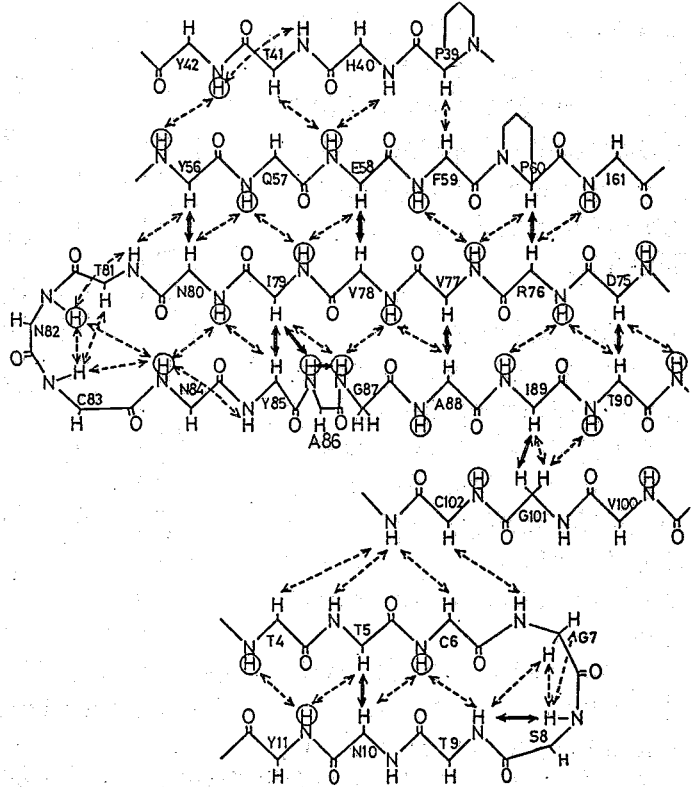


図2. RNase F1の β シート構造

3. RNase F1とRNase T1のプロトン化学シフトの比較

RNase T1の連続帰属は、既にRuterjansらによって報告されている⁽⁴⁾。RNase T1とF1のアミノ酸配列の相同性は58%である。相同性のあるアミノ酸が連続する配列もある。例えば、42~50, 69~78, 89~100である。62コの相同性のあるアミノ酸残基について、プロトン化学シフトを比較した。結果を図3に示す。

図3は、2組の β シートと α -ヘリックスのトポロジーを示す。数字は残基番号である。丸で囲った残基番号は、RNase F1とT1のアミノ酸配列に相同性があり、かつプロトン化学シフトが両者をよく一致(0.1 ppm以内)した残基である。丸のついた残基は明らかに、62~74および92~98のループ付近に局在している。特に89~100残基のセグメントでは、側鎖を含めたほとんどすべてのプロトンシグナルが0.1 ppm以内を占めた。この部分のポリペプチド鎖は、RNase F1とT1とでまったく同

βコンホメーションまたは動的構造をとっていることを示す。ニからループ部分でアミノ酸配列の相同性が高く立体構造も保存されていることは、酵素の機能上の重要な役割を示唆している様で、興味深い。

4. 立体構造の解析

ディスタンスジオメトリー法による立体構造解析のため、NOESYスペクトル(mixing time=100 msec)から、約5300の残基間距離情報を得た。立体特異的に帰属はできていない。このため、pseudo 原りの表示を用いた。

Metric Matrixの方法で立体構造をつくり、Simulated Annealing法でリファインした。

その結果、RNase T1と同様のポリペプチド鎖の folding LT 立体構造が得られた。ループ部分では帰属できていない残基もあり、また NOE 距離情報も少ないため、収束した構造を得るのはむづかしいであろう。現在さらに解析を進めていて、ニからの結果は本討論会で報告したい。

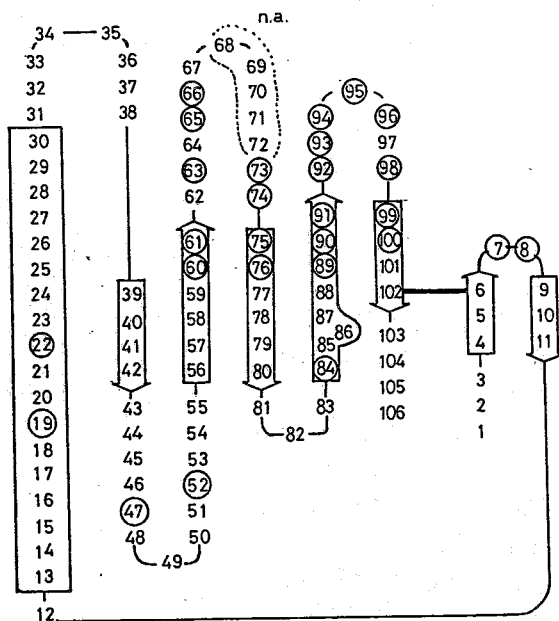


図3. RNase F1のトポロジー および RNase F1とT1の化学シフトの比較結果

REFERENCES

- 1 Hirabayashi, J. and Yoshida, H. (1983) *Biochem. Int.*, 7, 255-262.
- 2 Heinemann, U. and Saenger, W. (1982) *Nature(Lond.)* 299, 27-31.
- 3 Sugio, S., Oka, K., Ohishi, H., Tomita, K. and Saenger, W. (1985) *FEBS Lett.* 183, 115-118.
- 4 Hoffmann, E. and Ruterjans, H. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 539-560.

(都臨床研, 大塚製薬[®]) 稲垣冬彦、楯真一、加瀬良一、金子みどり、
神田大輔、榎井美弘[®]、菊本芳和[®]、平井嘉勝[®]

Structural Study of IL-1 β by Stable Isotope Aided NMR

F. Inagaki, S. Tate, R. Kase, M. Kaneko, D. Kohda
(Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

Y. Masui, Y. Kikumoto and Y. Hirai
(Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd)

Specifically labelled IL-1 β s with stable isotopes were produced in E.coli expression system. Comparison of the DQF-COSY spectra of IL-1 β , containing [²H]Leu, [²H]Phe or [²H]Val with that of non-labelled IL-1 β , made the assignments to the specific type of amino acids. These assignments were further supported by the ¹H-¹⁵N HMQC spectra of [¹⁵N]Leu, [¹⁵N]Phe, or [¹⁵N]Val labelled IL-1 β s. Three connectivities of Phe-Val were confirmed using IL-1 β labelled with both [¹³C]Phe and [¹⁵N]Val. Many MCD patterns which are characteristic to antiparallel pleated β -sheet structure were found, which is consistent with the results of the low resolution crystal structure.

IL-1 β は、感染や炎症、種々の免疫反応にさいして主としてマクロファージ (M ϕ)より産生される分子量17.5K、等電点7、アミノ酸残基153よりなるポリペプチドホルモンである。近年遺伝子工学の発展により、リコンビナント標品を用いて機能の解析が行われるようになり、IL-1 β は造血、神経、内分泌系を含む広義のインターロイキン-サイトカインネットワークの一員として理解されるようになった。このようなIL-1 β の持つ多彩な機能を理解する上で、また蛋白工学的な研究を展開する上で、溶液における立体構造を明らかにすることは重要な課題と言えよう。しかしIL-1 β のように比較的高分子量タンパク質の場合には、従来の二次元NMR法のみでは解析は困難である。そこで本研究では安定同位体を利用した種々のNMR法の検討を行い、高分子量タンパク質の構造解析のための方法論の検討を行うことを目的とした。

実験 大腸菌中でIL-1 β を発現させ、常法に従い精製した(1)。NMR測定には非ラベル体のほかに、ロイシン、バリン、フェニルアラニンをそれぞれ一種類だけ重水素あるいは¹⁵NでラベルしたIL-1 β および(¹³C-F、¹⁵N-V)ダブルラベル体を作製した。非ラベル体および重水素ラベル体についてはDQF-COSY、HOHAHA、NOESYの測定を行った。また¹⁵Nラベル体およびダブルラベル体については¹H-¹⁵N HMQCスペクトルの測定をおこなった。試料濃度は0.6-1.1mM、測定温度28度C、pH7.2である。

結果 15K以上の高分子量タンパク質の場合には、線幅の広がりによりスピン結合を通じての磁化移動の効率は極端に悪くなる。このため従来のDQF-COSYやHOHAHAに基づくアミノ酸タイプの同定は困難となる。一方NOEの効率は分子量の増大に対し

いながき ふゆひこ、たて しんいち、かせ りょういち、かねこ みどり、
こうだ だいすけ、ますい よしひろ、きくもと よしかず、ひらい よしかつ

むしろ向上するから、同位体ラベルを組合せ、重なりあったシグナルを分けるとともに、アミノ酸のタイプを同定する事が不可欠となる。そこで本研究ではアミノ酸タイプの同定を目的として、 ^{15}N あるいは重水素でラベルしたアミノ酸を取りこませたIL-1 β を調製し、アミノ酸タイプの同定を行い、シグナルの帰属を行った。図1は非ラベル体のIL-1 β の指紋領域を示している。ロイシン、フェニルアラニン、バリンをそれぞれ重水素でラベルしたIL-1 β のDQF-COSYおよびこれらのアミノ酸の ^{15}N ラベル体を含むIL-1 β の ^1H - ^{15}N HMQCスペクトルと比較することにより、ロイシン14個、フェニルアラニン8個、バリン10個について、(NH、C α)交差ピークの帰属をおこなった。次にこれらのアミノ酸の中で、一次構造上隣りあった残基を同定するため(^{13}C -F, ^{15}N -V)ダブルラベル体を調製した。IL-1 β にはF-Vの組合せは、F46-V47, F99-V100, F150-V151の三組存在する。実際ダブルラベル体の ^1H - ^{15}N HMQCスペクトルには、 $^{13}\text{C}=\text{O}$ により分裂した3個のピークが観測されている。F-Vの並びに対応するVの交差ピークを出発点として、sequentialな帰属を進めた。またMCD(main chain directed)法を適用した結果(2)、IL-1 β には逆平行型の β シートに対応するパターンが多数見いだされた。IL-1 β は β シート構造に富んだ構造を取ることを示しており、低分解能の結晶構造解析の結果とも一致する(3)。

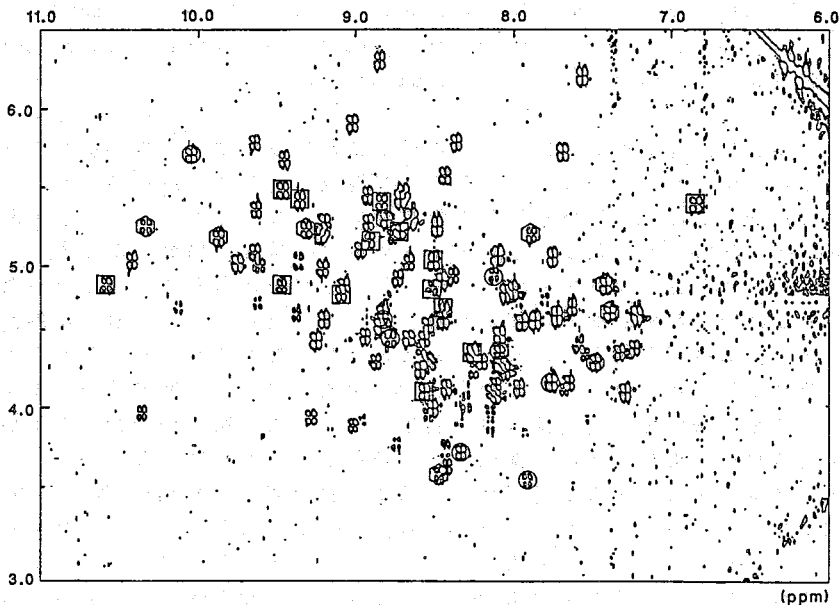


図1 IL-1 β のDQF-COSYスペクトルの指紋領域。□はロイシン残基、○はバリン残基、⬡はフェニルアラニン残基の交差ピークをしめす。

文献

- (1) Y. Kikumoto et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 315-321 (1987).
- (2) S. W. Englander and A. J. Wand, *Biochemistry*, 26, 5953-5958 (1987).
- (3) J. P. Priestle et al., *EMBO Journal*, 7, 339-343 (1988).

(東京農工大工) ○朝倉哲郎 中村英二 浅川晴美
(都臨床研) 稲垣冬彦

Protein Structure
and the Theoretical Calculation of ¹H NMR Chemical Shift
Tetsuo Asakura, Eiji Nakamura, Harumi Asakawa
(Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)
Fuyuhiko Inagaki
(The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

In order to obtain the correlation between ¹H NMR chemical shift and protein structure, the theoretical calculation of the ¹H NMR chemical shifts of proteins using the atomic coordinates is very important. In this study, we calculated α -CH proton chemical shifts of BPTI (Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor) by taking into account both the magnetic anisotropy effect of the C=O bonds and the ring current effect. The calculated ¹H NMR chemical shifts of BPTI are in good agreement with the observed data.

NMR法は、溶液中のタンパク質の構造を知るうえで最も有力な分析手段の一つである。現在、高分解能NMRスペクトルを与えるタンパク質の場合、NMR核オーバーハウザー効果(NOE)のデータにNMRカップリング定数、重水素交換などのデータやエネルギー計算の結果を加味してその溶液構造を提案しようとする試みが報告されてきている。¹⁾これらの解析において、タンパク質の¹H NMRスペクトルの帰属を行なうことにはかなりの労力がはらわれていることを考えると、構造 ⇔ ¹H NMR化学シフト間の相関が得られれば、タンパク質のNMR構造解析は飛躍的に進むことが予想される。

そこで我々は、原子座標の決定と¹H NMRピークの帰属が完了しているタンパク質としてBPTIを選び、構造 ⇔ ¹H NMR化学シフト間の相関を得るために、その α CHプロトンの化学シフトを、カルボニル基の磁気異方性効果、環電流効果に着目して評価した。

計算方法

¹H NMR化学シフトに影響を与える因子は、反磁性効果、磁気異方性効果、環電流効果などが考えられる。^{2,3)} そのうちタンパク質の空間的情報を与えるしゃへい効果として、本研究では、カルボニル基の磁気異方性効果と、芳香環による環電流効果に着目してその効果を評価した。

あさくら てつお なかむら えいじ あさかゆ はるみ
いながき ふゆひこ

(1) 磁気異方性効果

BPTI中の主鎖と側鎖のカルボニル基からの α CHプロトン化学シフトへの磁気異方性効果の寄与をすべて評価し、加えた。その評価は、ApSimon⁴⁾の方法に従った。磁化率は、Zürcher⁵⁾の値($\Delta\chi_1 = -25.7 \times 10^{-30}$, $\Delta\chi_2 = -13.5 \times 10^{-30}$ cm³)を用い磁気双極子はカルボニル基の結合上で、炭素側から1 Åのところにおいた。

(2) 環電流効果

¹HNMR化学シフトは、フェニルアラニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン芳香環からの α CHプロトンへの環電流効果の寄与を評価した。特に、メチル基の¹HNMR化学シフトの著しい高磁場シフトは環電流効果による寄与であることはよく知られている。¹⁾ JohnsonとBovey⁶⁾、HaighとMallion⁷⁾、Pople⁸⁾らによるその評価式が提案されているが、BPTIのメチル基プロトンについて環電流効果の評価を行ない、比較したPerkinsとWüthrichの文献⁹⁾に従い、JohnsonとBoveyの評価法を α CHプロトンの化学シフト評価にも採用した。

結果と考察

BPTI (Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor) は、ウシ膵臓中に含まれるトリプシン阻害物質であり、アミノ酸残基数58、分子量6,500である。構造は、Fig.1で示したように17~36残基間で逆平行 β シート、2~6, 47~56残基間で短い α ヘリックスを形成している。¹⁰⁾また、三本のジスルフィド結合があり、非

常に安定な球状コンホメーションを形成しており、8 M尿素中でも変性しない安定な塩基性タンパク質である。本研究では、このBPTIの α CHプロトンの¹HNMR化学シフトをカルボニル基の磁気異方性効果に環電流効果を加えて評価した。

Fig.2に、個々の残基の α CHプロトンへの各主鎖カルボニル基からの磁気異方性効果の寄与 ($>|0.05|$ ppm以上)を二次元表示した。これから、 β シートと α ヘリックス領域と α CHプロトン化学シフトの相関がよく再現されていることがわかる。すなわち二次

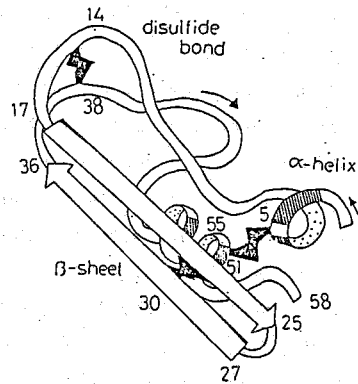


Fig.1 The structure of BPTI

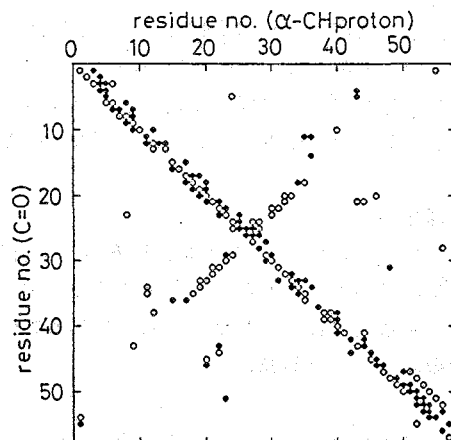


Fig.2 2-dimensional chemical shift map of BPTI ($>|0.05|$ ppm)
 ○ ; deshielding contribution from C=O group
 ● ; shielding contribution from C=O group

元表示において、対角線に垂直方向のパターンは β シートの領域である。これらの残基のカルボニル基は、低磁場シフトの寄与が多いことがわかる。 α ヘリックスの領域は、逆に対角線に沿ってそのパターンが現れている。

更に一例として、Tyr21の α CHプロトン(β シート内)と、Met52の α CHプロトン(α ヘリックス内)をとりあげて、周囲のカルボニル基からの磁気異方性効果の寄与をピックアップした。(Fig.3) β シート内の α CHプロトン(Fig.3(a))への主鎖カルボニル基の磁気異方性効果の寄与の特徴として、 β ターンの場合を除いて自分自身の残基のカルボニル基に加えて、水素結合を形成した対の鎖のうち、空間的に近いカルボニル基から大きな低磁場シフトの寄与を受ける。また、鎖上において着目プロトンの前後の残基のカルボニル基からは高磁場シフトを受けるが、その値は小さいので、和をとると低磁場シフトとなる。一方、 α ヘリックス内の α CHプロトン(Fig.3(b))の多くは、自分自身の残基のカルボニル基から高磁場シフトを受ける。

一般に β シート内の α CHプロトンは低磁場シフトし、ヘリックス内では高磁場シフトするが、このように主にカルボニル基からの磁気異方性効果によってそのシフトを説明することができる。Fig.4(B)に各残基の α CHプロトンに対する主鎖と側鎖のカルボニル基の磁気異方性効果の寄与の和と実測結果を示した。カルボニル基の磁気異方性効果によって、BPTIの α CHプロトンの化学シフト

をおおむね評価することができることがわかる。しかしそれでもなお、説明のつかない場合もある。例えば、実測のCys-51などは、大きな高磁場シフトをしている。これは、明らかに環電流効果によるものである。そこで、Cys-51の近傍に芳香環があるかを調べたところPhe-45が非常に空間的に近いことがわかった。

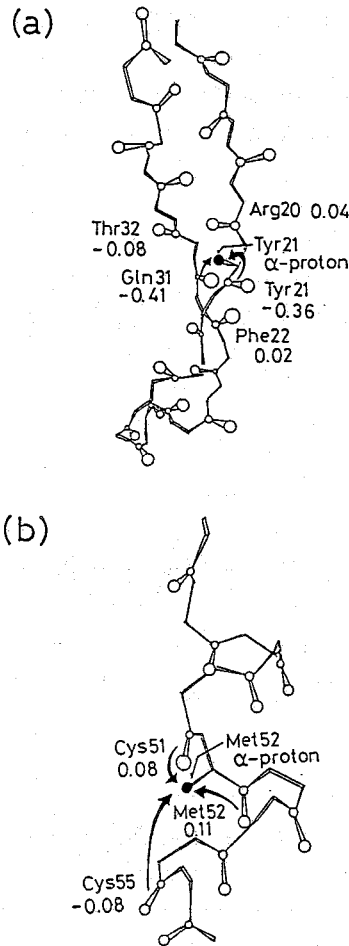


Fig.3 The secondary structures of BPTI and the magnetic anisotropy effect
(a) β -sheet (residue 17-36)
(b) α -helix (residue 47-56)

そこで、Phe-45からの環電流効果を計算すると Cys-51 は 3ppm にもおよぶ高磁場シフトを受けていることがわかった。その様子を Fig.5に示した。すべての α CHプロトンの化学シフトへの環電流効果の寄与の計算結果は、Fig.4(c)にまとめた。さらに、磁気異方性効果と環電流効果の和をFig.4(a)に示したが、最終的に実測値と計算値はよい一致を示した。

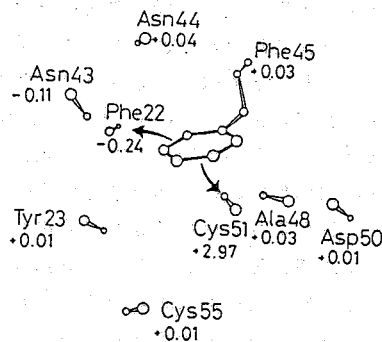
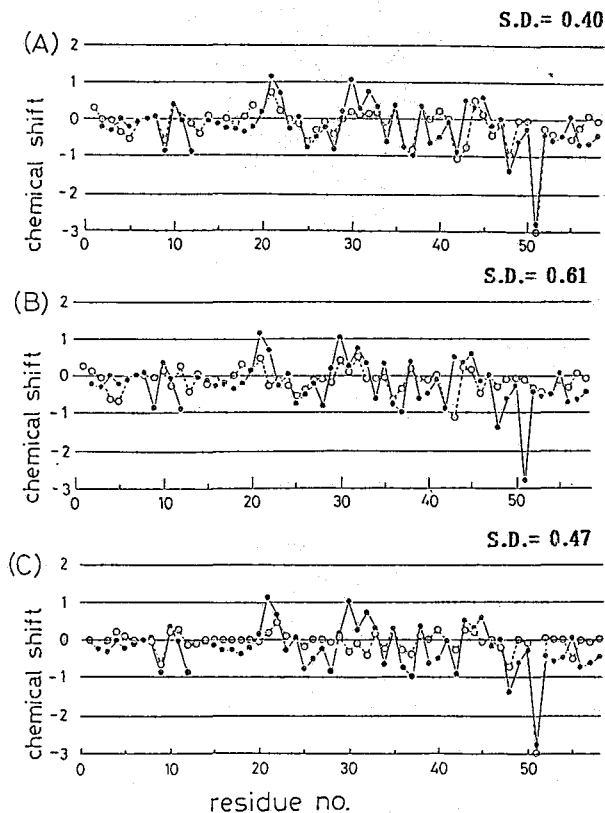


Fig.5 The local structure in BPTI near Phe 45 and the ring current effects.

Fig.4 The plots of calculated $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts and observed ones vs. the residue no. of BPTI (ref.Glu-7)
 (a) $\sigma_{\text{ani}} + \sigma_{\text{ring}}$ VS. σ_{obs}
 (b) σ_{ani} VS. σ_{obs}
 (c) σ_{ring} VS. σ_{obs}
 ● ; observed ○ ; calculated
 S.D. : Standard Deviation

References

- 1) K.Wüthrich, "NMR of Proteins and Nucleic Acids", Jhon Wiley & Sons.N.Y. (1986)
- 2) T.Asakura, Makromol.Chem., 182, 1097(1981)
- 3) D.C.Dalgarno, B.A.Levine and R.J.P.Williams, Bioscience Rep., 3, 443(1983)
- 4) J.W.ApSimon, W.C.Craig, P.V.Demarco, D.W.Mathieson and L.Saunders, Tetrahedron, 23, 2357(1967)
- 5) R.F.Zürcher, Prog.NMR Spectroscopy, 2, 205(1967)
- 6) C.E.Johnson and F.A.Rovey, J.Chem.Phys., 29, 1012(1958)
- 7) C.W.Haigh and R.B.Mallion, Org.Magn.Reson., 4, 203(1972)
- 8) J.A.Pople, J.Chem.Phys., 24, 1111(1956)
- 9) S.J.Perkins and K.Wüthrich, Biochem.Biophys.Acta, 576, 409(1979)
- 10) R.Huber, Symposia on Quantitative Biology, 36, Plate10(1971)

○ 葦沢輝美・佐藤晴哉・甲斐荘正恒・小島修一*・三浦謹一郎*

(都立大理、東大工*)

Conformational Changes in SSI by Site-directed Mutagenesis

Terumi Nirasawa, Haruya Sato, Masatsune Kainosho, Shuichi Kojima*,

Kin-ichiro Miura* (Faculty of Science, Tokyo Metropolitan Univ., and Faculty of Engineering, Tokyo Univ.*)

A site-directed mutagenesis of the interior amino acid residues has been found to induce global conformational changes. We have extensively studied the effect of the Leu103 replaced for Met103 on the native SSI conformation by using a series of the SSIs whose carbonyl carbons of each one amino acid type were specifically labeled with ^{13}C . The results indicate that the conformational changes are limited to the residues belong to a certain region, which is qualitatively the same where structural changes have been observed by Met103 sulfoxidation. The structural consequences due to the other type of amino acid replacement will also be discussed.

(序)我々は数年間に渡り蛋白性プロテアーゼインヒビターSSIをモデルとして、高分子量タンパク質の ^{13}C -NMRシグナルの一義的帰属手法の開発と、構造化学的応用について研究してきた。本報では、帰属の確定したカルボニルシグナルの構造化学的応用の一端として、タンパク質工学により特定部位のアミノ酸のみを置換した変異体SSIを用いたタンパク質のアミノ酸置換と立体構造の関係を明らかにしようと試みた。SSI内部の疎水的環境に存在するMet103を酸化し、それに伴いSSIの立体構造は広範に変化する。その構造変化の様子とMet103→Leuの変異体(M103LSSI)における構造変化を比較した。第2に、SSI表面の解離性残基の静電的相互作用の影響として、Lys18とAsp76の塩結合を取り上げた。Lys18及びAsp76の様々な変異体を用いてSSIの局所的、全体的構造変化を詳細に調べた。特に不均一的に ^{13}C でラベルしたLys残基を利用することによりこれらの影響がより明確になったので報告する。

(結果と考察) 1) Met103の不斉酸化及び遺伝子組み換え Met103→LeuによるSSIの立体構造変化: SSIサブユニット中には分子表面70、73番、分子内部に103番、計3残基のMetが存在する。表面の2残基は当量の H_2O_2 により酸化されR、S比が、1対1のジアステレオマーになる。 H_2O_2 を過剰に加えることでMet103も酸化されるが、R、S比は1対1ではなく約1対3を示した。これは、分子内部103の周囲は立体構造を保ったまま揺らいているので、酸化反応も周囲の不斉な環境を反映し立体選択的に行われたものと解釈できる。さらにMet103の酸化に伴いMet(0)、70、73のシグナルが若干低磁場シフトし、SSIの立体構造に何らかの変化を生じた可能性がある。そこで、Met、Phe、Val、Leu、Cys、Ala、Pro、Trp、Tyr、His、の10種のアミノ酸主鎖カルボニル炭素の ^{13}C -NMR

にらさわてるみ、さとうはるや、かいのしょうまさつね、こじましゅういち、
みうらきんいちろう

をプローブとして、誘起シフトの観測される部位を実験的に決定した。さらに、タンパク質内部残基の化学修飾の影響による構造変化と、遺伝子組み換えによるものを比較するため Met103→Leu S S I についても同様に 7 種のアミノ酸についての主鎖カルボニルの誘起シフトを調べた。その結果、Fig. 1 に示すように誘起シフトが観測された領域にかなりの相関性が見られた。現在までの多くの実験事実より、S S I 前半のドメイン 1 と比べ、この領域は S S I とプロテアーゼとの複合体形成において柔軟に変化する動的性質を持つ部分ドメイン 2、と考えている。

2) 表面に存在する解離性残基間の静電的相互作用 - Lys18 と Asp76 の遺伝子組み換えと立体構造変化: 内部残基の組み換えにより、S S I 後半部分ドメイン 2 に誘起シフトが観測されたことは既に述べた。我々は、Asp76 と Lys18 の塩結合は、このドメイン 2 を前半のドメイン 1 に固定する役割をしていると考えている。この推察は、 $^1\text{H-NMR}$ による Lys の pH titration により Lys が異常に高い pK_a を示すこと、また、Lys18 の化学修飾による Asp76 への影響などにより裏付けられている。これをさらに明確にするため、Asp76→Asn、Asp76→Ala に改変した S S I を調製した。これら Asp76 についての、変異体での Lys18 の pK_a は、およそ 1 pH ユニット低い値を示した。これは、Asp がチャージを失うことにより両残基間の塩結合がわれたことを意味する。さらに、2、3、5、6 位のみを高濃度に ^{13}C でラベルした Lys を取り込ませた [2, 3, 5, 6- $^{13}\text{C}_4$ -K]-S S I、-D76N S S I および、-D76A S S I の測定により、各々の Lys 側鎖の χ -angle を決定した。

その結果、WT S S I では $^3\text{J}_{\text{C}_2\text{C}_5}$ より G、 $^2\text{J}_{\text{C}_3\text{C}_6}$ より G、一方、D76N S S I では、

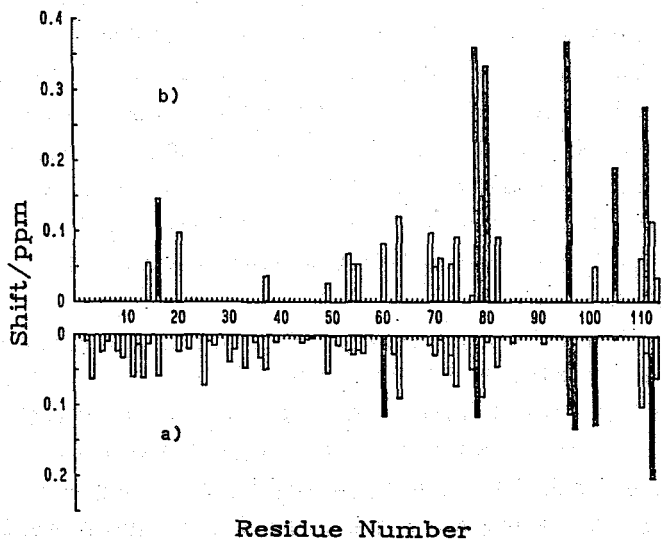


Fig. 1 Comparison of the induced chemical shifts between (a) and (b).

(a); Met103→Leu S S I (b); Met103 oxidized S S I

$^3\text{J}_{\text{C}_2\text{C}_5}$ より T、 $^2\text{J}_{\text{C}_3\text{C}_6}$ より T、となった。つまり、Asp76 と相互作用が存在する WT S S I の Lys 側鎖は折たたまれた状態であるのに対し、相互作用を失った D76N S S I では伸びた状態にあることが明らかになり、このことから両残基間の塩結合の存在が支持された。現在、Lys18 の変異体についての実験からも S S I における 76 番と 18 番の塩結合の影響について、さらに考察を進めている。

細谷仁子、加賀一有、○三宅洋子、甲斐荘正恒、稲垣冬彦
(都立大理、都臨床研)

Various Methods for the NMR Spectral Analysis of a Large Protein by using the Multiply ^{13}C -Labeled Amino Acids

Yoshiko Hosoya, Kazunari Kaga, Yoko Miyake, Masatsune Kainosho and Fuyuhiko Inagaki (Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University and Tokyo Metropolitan Institute for Medical Science)

Stable isotope assisted 2D-NMR methods have been developed for assigning the NMR signals of Streptomyces subtilisin Inhibitor (SSI), whose molecular weight is 23,000 as a dimer. The carbonyl carbon resonances which have been assigned by the ^{13}C , ^{15}N -double labeling technique have been found to be ideal starting points for the total assignment of the NMR signals due to the rest of the molecule. For example, the SSI which was selectively labeled with a $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ amino acid lead us to extend the carbonyl assignments to those of the α -carbons in the same residues either by COSY or INADEQUATE. The α -carbon assignments can then be extended to the protons directly attached to them and then to the other protons by HOHAHA or DQF-COSY. The 15% uniformly ^{13}C -labeled amino acids have been conveniently used to observe most, if not all, of the ^{13}C and ^1H signals of the ^{13}C -enriched residues by using proton-detected HMQC.

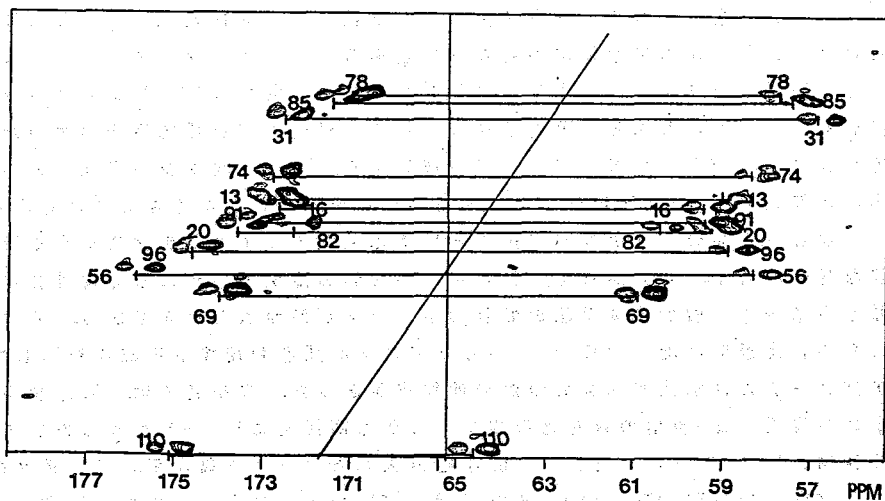
〔序〕 分子量一万程度の低分子量タンパク質では、2次元 ^1H -NMRの逐次帰属手法などによるシグナルの完全帰属が可能な場合も多い。しかしながら、シグナルが重なり合うことが障害となるような、より高分子量のタンパク質では ^1H -NMRスペクトルを直接に帰属することはほとんど不可能となり、他の一般性の高い帰属手法の開発が必要となる。すでに我々は、 ^{13}C 、 ^{15}N ダブルラベル法により、高分子量タンパク質においても主鎖カルボニル炭素の ^{13}C -NMRシグナルを確実に帰属することができることを明らかにしている。すなわち、高分子量タンパク質においては主鎖カルボニル炭素こそ最も確実な帰属が可能な部位である。したがって、カルボニル炭素の帰属をいかにして確実に側鎖原子団に拡張しうるかに一般的帰属手法の開発のポイントが解かれるべきである。我々は、この目的のために高濃度に均一 ^{13}C -ラベルしたアミノ酸類を利用する手法を検討してきたが、このアプローチには解決すべき幾つかの問題点があった。本研究では、残基特異的に主鎖カルボニル炭素と α -炭素のみを選択的に、しかも高濃度に ^{13}C -ラベルしたアミノ酸、及び15%均一 ^{13}C -ラベルしたアミノ酸を組み入れたタンパク質を用いて、種々の2D-NMR法(COSY、INADEQUATE、HMQC及びDQF-COSYなど)により、すでに確定しているカルボニル炭素の帰属を側鎖全域へと効率よく拡張できることを明らかにした。

〔実験〕 $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ Leu は $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ 酢酸とグルコースの混合培地を用いた
ほそやよしこ、かがかずなり、みやけようこ、かいのしょうまさつね、いながきふゆひこ

微生物発酵により、 $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ Val は $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ 酢酸をスタートとした有機合成により得た。バリン残基のみを $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ ラベルしたタンパク質 S S I は、バリンのみを $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ Val に置き換えたアミノ酸培地中で培養することにより調製した。残基特異的に 15% 均一ラベルした S S I は同様に調製した。NMR 測定は、 ^{13}C 2D-COSY 及び ^{13}C 2D-INADEQUATE については、Varian XL-300 により、また、proton detection による ^1H 、 ^{13}C COSY (HMQC) 及び 2D-HOHAHA は、Jeol GX-400 により行った。

【結果及び考察】 バリン残基のシグナルの帰属を例として述べる。 $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ Val を組み入れた S S I では、 ^{13}C 、 ^{13}C のカップリングはほぼバリン残基の C_α と C_β の間だけに観測される。したがって ^{13}C の間の correlation が観測される 2D-NMR 法 (INADEQUATE (下図)、COSY) を用いて C_α と C_β の相関を見ることにより、カルボニル炭素の帰属を α -炭素に確実に拡張することに成功した。 α -炭素が確実に帰属されると、 ^1H 、 ^{13}C -COSY (HMQC) 測定により、各 ^{13}C と ^1H の相関から α -プロトンの帰属へと拡張できた。このときはバリン残基のみを 15% 均一 ^{13}C ラベルした S S I を用いるのが最も確実である。 α -プロトンの帰属が確実になると、2D-HOHAHA などにより β 、 γ -プロトンまで拡張できた。このようにして主鎖カルボニル炭素を起点として、バリン残基側鎖のすべての ^1H および ^{13}C シグナルを完全に帰属することができた。

このように、シグナルの重なり合いのために逐次帰属が不可能な高分子量タンパク質においては、残基特異的に、選択的、高濃度にあるいは均一に低濃度に ^{13}C ラベルし、それに適した 2D-NMR 法との組合せによって、主鎖カルボニル炭素を起点として側鎖の ^{13}C 及び ^1H の確実な完全帰属が可能であることが明らかになった。



(図) $[1, 2-^{13}\text{C}_2]$ Val を組み入れた S S I の 2D-INADEQUATE スペクトル (Temp. = 60 °C)

○吉田美香, 甲斐荘正恒 (都立大理)

Determination of the χ -Angles of the Amino Acid Residues in Proteins by Using Vicinal Spin Couplings between ^{13}C and ^1H

Mika Yoshida, Masatsune Kainosho (Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University)

The side chain conformations of three phenylalanyl residues in SSI have been determined by the stereospecific determination of two vicinal coupling constants among prochiral β -methylene protons and carbonyl carbons of Phe residues. This experiments need a complex isotope labeling techniques, which will be described in detail, but can be extended to the other amino acid types. The effect of amino acid replacements on the χ -angles of Phe residues will also be discussed.

はじめに. 蛋白質の機能はポリペプチド鎖の三次元的折れ曲がり構造の結果、立体的に近接して存在する幾つかの側鎖官能基(活性部位)により果たされる場合が多い。従って、蛋白質が機能を果たす場-溶液-においてこれらの側鎖の構造、例えば $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ 間の二面角(χ)、を決定することができれば極めて有用であろう。本報は、蛋白質の側鎖において二面角 χ を決定するためにビシナル結合定数の角度依存性 (Karplus式) を利用する一般的手法を開発することをめざしたものである。

手法の開発にあたっては、アミノ酸残基数 113 からなるサブユニット 2 ケを持つ蛋白性プロテアーゼインヒビター SSI を用い、その中に 3 残基含まれる Phe 残基の χ の決定をモデルケースとして取り上げた。 χ の一義的な決定に必要なビシナル結合定数は 2 種の gauche 型を区別するために次に示すような 2 組の値が必要である: $^3J(^1\text{H}_\alpha - ^1\text{H}_\beta)$ と $^3J(^1\text{H}_\alpha - ^1\text{H}_{\beta'})$ 、或は $^3J(^{13}\text{C}_\alpha - ^1\text{H}_\beta)$ と $^3J(^{13}\text{C}_\alpha - ^1\text{H}_{\beta'})$ 等。我々は、既に Phe 残基のカルボニル炭素 (C_α) の NMR シグナルの帰属を完了していること、及びカルボニル炭素シグナルの線幅が鋭いことを考慮し、後者のビシナル結合定数の測定による χ の決定を試みた。

実験. ^{13}C -ラベルした N-アセチルグリシンを原料として、カルボニル炭素を ^{13}C 、プロキラルな β 位の水素を立体特異的に重水素化した Phe を合成した。さらに、カルボニル炭素シグナルにスピン結合を生じる可能性のある Phe 残基の α 位 (H_α) の重水素化が必要であった。また、これらのラベルアミノ酸を培地中に加え SSI を生産する際に α 位の重水素が軽水素に戻ることを防ぐために、80% 重水中での培養を行った。

^{13}C -NMR の測定は XL-300 (Varian 社) を用い、75.2 MHz にてプロトンデカップルしない条件で測定した。

結果. 図 1 に ^{13}C -NMR の測定結果を示す。[F] SSI、すなわち Phe 残基のカルボ

よしだみか、かいのしょうまさつね

ニル炭素のみを ^{13}C -ラベルした S S I の ^1H -Coupled ^{13}C -NMR スペクトルにおいては複雑な ^1H - ^{13}C スピン結合により β プロトンとカルボニル炭素との間のビシナルスピン結合を決定することは不可能である(図-1a)。i番目残基の主鎖カルボニル炭素とスピン結合を生じる可能性のあるプロトンとしては β 位の prochiral メチレンプロトン以外に、i及び(i+1)番目残基の α プロトンがある。すでに述べたように α -angleの決定には β 位の prochiral メチレンプロトンとカルボニル炭素とのビシナルスピン結合を立体選択的に決定する必要がある。したがってこのためには β 位のメチレンの立体選択的重水素化及びこれらの α プロトンの重水素化が必要となる。 α プロトンの重水素化はトランスアミナーゼによる培養中の α プロトンの交換反応を考慮すると単に必要なアミノ酸の α プロトンの重水素化だけでは不十分であり、培養中起り得る交換反応を防ぐために、培養そのものを重水中で行う必要がある。我々は、このようにして厳密にコントロールされた条件下で(2S,3S)-[1- ^{13}C :2,3-D $_2$]Phe及び(2S,3R)-[1- ^{13}C :2,3-D $_2$]Pheを取り込ませた S S I を調製した。これらの培養では、C-末端側残基に位置するアミノ酸残基は、 α プロトンをD化したものを用いて完全に重水素化した、これらの S S I の ^1H -coupled ^{13}C -NMR スペクトルは図1b,c のようであった。 $^3\text{J}_{\text{C}_\alpha\text{H}_\beta}$ の測定結果を表1に示す、これらの結果からPhe-97,111は gauche (-)型、Phe-113は gauche (+)型と決定した。このような手法を用いていくつかの mutant S S I について α -angleの決定を行っているのでそれらの結果も含めて報告する。

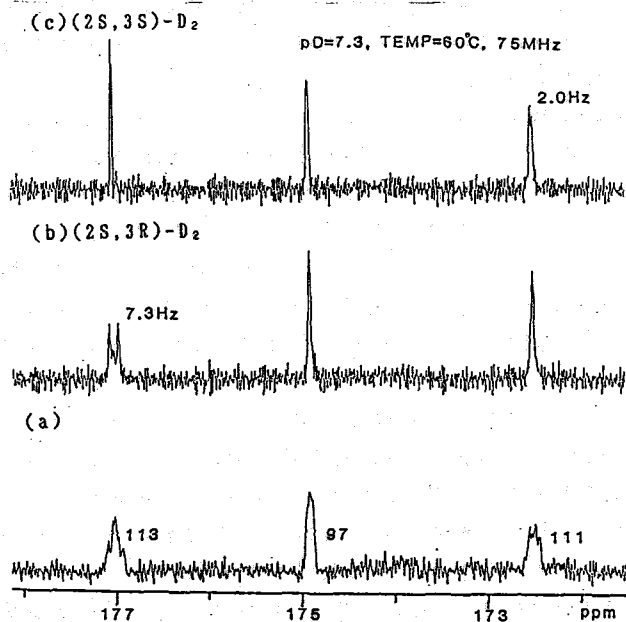


図1. [F] S S I の ^1H -Coupled ^{13}C -NMR スペクトル

Phe	$\text{C}_\alpha\text{H}_\beta^h$	$\text{C}_\alpha\text{H}_\beta^s$ (Hz)
97	2.0	~ 1.2
111	~ 1.2	< 1
113 (C-terminus)	~ 0	7.3

表1. ビシナル結合定数 $^3\text{J}_{\text{C}_\alpha\text{H}_\beta}$ の測定結果

まとめ. カルボニル炭素の ^{13}C ラベルと β -水素の立体特異的ラベルを組み合わせる新しい手法により、S S I 中に3残基含まれる Phe残基の α -angleの高精度の決定が可能となった。今後、この手法をさらに他の残基へと発展させれば、例えば酵素の活性部位残基の詳細な構造化学的研究への新しいアプローチが確立されることになる。

(北大 理)

○竹腰 清乃理、津田 栄、引地 邦男

Phase-distortion-free water-suppression sequence

K. Takegoshi, Sakae Tsuda, and Kunio Hikichi

(Faculty of Science, Hokkaido University)

Abstract: We report a simple modification to the popular 1331 water-suppression sequence(1) that minimizes the phase problems associated with the original 1331. Further, its application to the two-dimensional phase-sensitive NOESY is demonstrated.

水溶液中の分子のNMRスペクトルを精度良く測定するためには、溶媒の水の信号のみを選択的に消去する必要がある。我々は良く知られた1331法(1)の簡単な改良により位相特性の良い水消去パルス法を得た(2)。

図1にSR-1331と名づけられたパルス系列を示す。図2aにこのパルスにより励起される横磁化の周波数依存の計算結果を示す。このパルス系列の大きな特徴は最後の(4番目の)パルスの後に待時間があることであり、励起された横磁化はこの時間中で再結像する(図2b)。得られる横磁化には周波数に依存した位相のずれはほとんど無く、零次の位相補正のみでスペクトルの位相を合わせることが可能である。従って、一次の位相補正によるスペクトルのbaselineのうねりはなく、質の良いスペクトルが得られる。但し、図3bで示されたように、正負のoffsetに対して異なった零次の補正が必要である。このような位相補正は従来の市販のNMRプログラムでは出来ないため、我々は今のところ、零、及び、一次の補正を用いて位相補正を行っている。図3に例を示す。

図 1

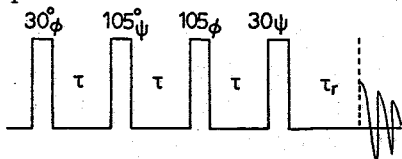


図 1: SR-1331パルス系列

$\phi = X, -X, Y, -Y$; $\psi = -X, X, -Y, Y$; 受信系 = $-Y, Y, X, -X$. $\tau = (\Delta\nu)^{-1}$, $\Delta\nu$ は励起したい周波数、 $\tau_r \sim \tau/4$.

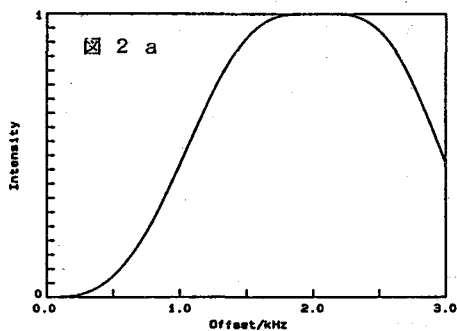


図 2: SR-1331パルス系列により励起される横磁化の計算結果。rf強度 = 20 kHz、 $\tau = 230 \mu s$ 、緩和を無視して計算した。

(a) 横磁化強度 (τ_r には依存しない);
(b) 横磁化の位相、実線: $\tau_r = 0 \mu s$, 破線: $\tau_r = 60 \mu s$.

図 3: 90% H₂O / 10% D₂O 中の 5 mM リゾチームの ¹H-NMR (500 MHz)。 $\tau = 230 \mu s$, $\tau_r = 60 \mu s$ を用いた。零次と一次の位相補正を用いた。

たけごし きよのり、つだ さかえ、ひきち くに お

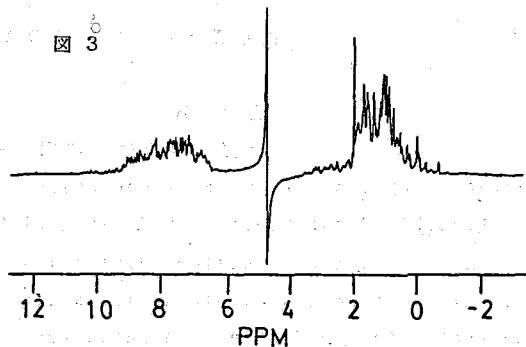
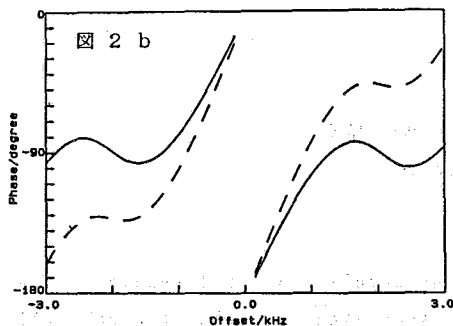


図3で示されたように位相の乱れのない良好なスペクトルが得られる。なお、SR-1331における水信号の消去の度合は各々のパルスの位相の乱れに敏感である。パルスの位相をきちんと合わせることや、または、主パルスより90度位相のずれた短いトリムパルスによる補正が必要である。図4にはSR-1331をBax(3)の方法で使用して得られた純位相NOESYである。

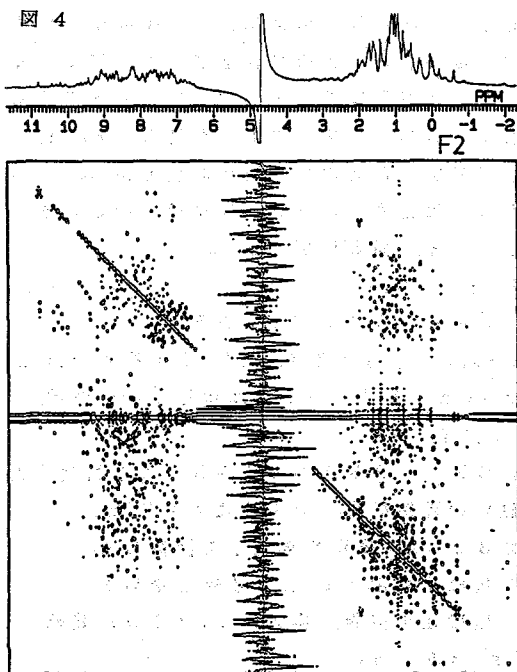


図4: 90% H₂O / 10% D₂O中の5 mMのリゾチームのNOESYスペクトル。(40°C、pH=5.5、200 mM KCl、ミキシング時間=200 ms、 $\tau = 150 \mu\text{s}$ 、 $\tau_r = 102 \mu\text{s}$) Ref.3の"1-1"エコーパルスをSR-1331で置き換えたパルス系列で測定した。1つの t_1 に対し32回積算して $2 \times 256 \times 2048$ データマトリクスを $2 \times 512 \times 2048$ にzero fillしてフーリエ変換した。

Reference

- (1) D.L. Turner, J. Magn. Reson. 54, 146 (1983); P.J. Hore, *ibid.* 54, 539 (1983); 55, 283 (1983).
- (2) K. Takegoshi, S. Tsuda, and K. Hikichi, J. Magn. Reson. in press.
- (3) V. Sklénár and A. Bax, J. Magn. Reson. 74, 469 (1987).

(日本電子(株) 生体計測学研究室) ○藤原敏道, 永山国昭

Optimized Frequency/Phase-Modulated Broadband Inversion Pulses

Toshimichi Fujiwara and Kuniaki Nagayama

Biometrology Lab, JEOL Ltd. 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196, Japan

A series of composite inversion pulses using coherent frequency switching was shown (J. Magn. Reson. 77, 53 (1988)) to provide rough inversions over broad offset ranges for a $1/2$ spin system. We present improvements of the inversion pulses: the component pulses were divided into shorter rectangular pulses, whose pulse widths, radio frequencies and phases were determined with numerical optimization. In high resolution NMR where an RF field is rather homogeneous, these pulses provide more than 99% average inversions with shorter total pulse widths compared with other frequency sweeps and composite inversion pulses.

はじめに

オフレゾナンス効果やラジオ波強度 B_1 の不均一性などによって生じる 180° パルスの不完全さを補うために、多くの複合パルスや RF 位相が変調されたパルスが提案され、緩和時間測定、広帯域デカップリング、スピン・エコー実験などに応用されている。'86年の本討論会で私達は $1/2$ スピン系についてコヒーレントな RF 周波数切り換えを使用した一連の広帯域反転パルスを提案した⁽¹⁾。そのパルス中は他の反転パルスに比べ短い、反転された磁化の z 成分の平均は $\langle M_z \rangle = -0.90 M_0$ (M_0 : 平衡磁化) であった。今回はその不完全性を相殺するよう、RF 位相を互いに変えてその反転パルスを5つ続けて照射し、反転を改善した。しかし、この方法では全パルス中が5倍になるため、装置的な負担が増え、試料によっては温度上昇やパルス照射中に生じる緩和やスピン間相互作用が無視できなくなる。今回は、数値的最適化法で周波数切り換え反転パルスを改善し、他のパルスと比較した。

周波数切り換えパルスの最適化

最適化の出発点になるのは反転パルス F_n (RF 周波数を約 $1.5 \gamma B_1$ づつ切り換えながら近似的な 180° パルスを n 個つなげて作った複合パルス⁽¹⁾) である。RF 強度一定の条件で、

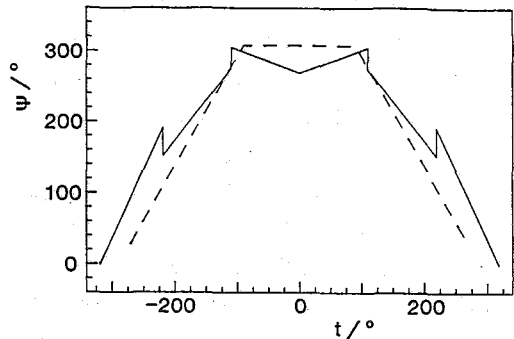


図1. FPI3 (実線) と F3 (破線) の時間に依存した RF 位相。時間は共鳴時のフリップ角で表わす。全パルス中は 640° (FPI3) と 540° (F3)。

ふじわら としみち、 ながやま くにあき

$\langle M_z \rangle$ が最小になるように準ニュートン法などによりパルス最適化した。求められたパルス (FPI n) は、 $2n$ 個の矩形波パルスから成っており、各矩形波パルスの位相と周波数、パルス巾が決める。 $n=3$ の場合について、パルスの時間依存した RF 位相と、磁化反転を図 1、2 に示す。 F n パルスを $\langle M_z \rangle = -0.90 M_0$ から $-0.99 M_0$ に改善するためには、パルス巾を大きく増加させる必要はなく、RF 位相制御を細かくすれば十分であることがわかる。また、RF 位相を FPI n よりさらに細かく制御しても、これ以上の大きな改善は得られなかった。

断熱反転パルスなどとの比較

RF 周波数変調を用いる反転パルスとしては、断熱条件を満たしながらゆっくり周波数掃引を行うものがある。その中でも tan 形にすると効率がよくなることが知られている⁽²⁾。

図 3 に FPI5 と同じパルス巾、同じ目的開数で最適化して得た tan 形周波数変調パルスの位相を示す。 FPI5 と tan 形変調パルスで反転される磁化は、それぞれ $\langle M_z \rangle = -0.99 M_0$ と $-0.95 M_0$ であり、FPI5 の方がすぐれている。これは断熱的なパルスはパルス巾が短いと断熱条件が満たされないようになり反転が不完全になるためである。図 3 のように両パルスは似ており、FPI n はパルス巾の短い領域で断熱パルスを最適化したものと解釈できる。

また、既存の複合パルスの中にも FPI n と RF 位相の時間依存性が似ているものを見つげられる。他の複合パルスと比べ FPI n は短い全パルス巾で良い磁化反転を行うことができる。

文献

- (1) T. Fujiwara and N. Nagayama, J. Magn. Reson. 77, 53 (1988)
- (2) C. J. Hardy, W. A. Edelstein and D. Vatis, J. Magn. Reson. 66, 470 (1986)

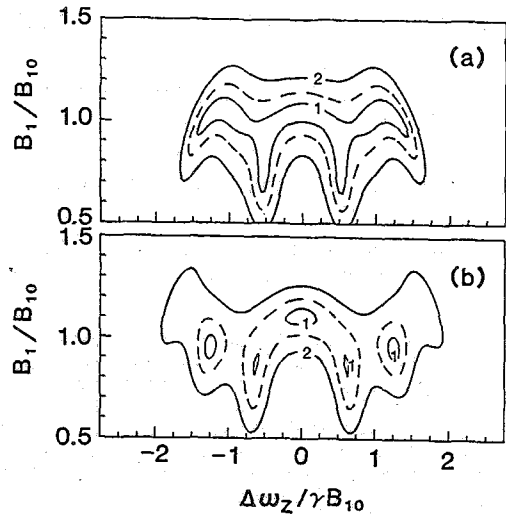


図 2. FPI3 (a) と F3 (b) 照射後の磁化の z 成分。等高線は $-0.98 M_0$ (実線 1)、 $-0.90 M_0$ (破線)、 $-0.70 M_0$ (実線 2) である。

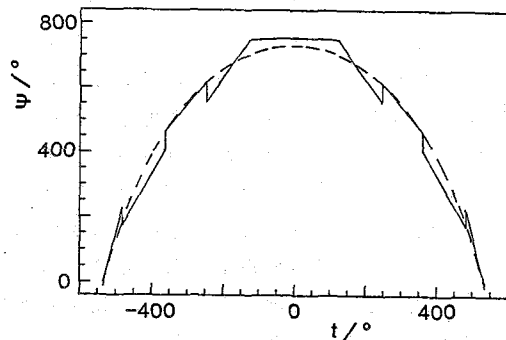


図 3. FPI5 (実線) と最適化した tan 形周波数変調パルス (破線) の時間に依存した RF 位相。

Investigation of Heteronuclear Three-Dimensional NMR Spectroscopy.

¹³C Chemical Shift Editing of COSY and HOHAHA Spectra at Natural Abundance.

○ Muneki Ohuchi Sizue Kohno and Mamoru Imanari (JEOL)

Three-dimensional NMR spectroscopy has been shown to be an effective method of resolving spectral overlap observed in two dimensional NMR experiments. A heteronuclear three-dimensional experiment is combined a heteronuclear shift correlation and a homonuclear 2D NMR experiment. Homonuclear 2D experiments (eg. COSY, HOHAHA) can be simplified with this technique by editing with respect to the heteronuclear chemical shift in a third dimension.

We investigate heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of natural product with ¹³C at natural abundance, and demonstrate HOHAHA-HMQC, HMQC-HOHAHA, COSY-HMQC, and HMQC-COSY methods.

1987年ENCにて、Ernstらのグループが溶液試料の三次元NMR法を発表して以来、溶液試料の三次元NMR法は飛躍的な発展をしようとしている。三次元NMR法は、二次元NMR法で得たスペクトルのピークに重なりがあり解析が困難な場合、ピークの重なりを効率よく分離するために、発展したものである。溶液試料の三次元NMR法は同種核三次元NMR法と異種核三次元NMR法に大別できる。前者はVuiSTERらやOschkinaらのグループ等により、後者はErnstらやBaxらのグループなどにより精力的に研究がされている。同種核三次元法は分離を良くするために測定時間を比較的長く費やして測定するか、または、特定のスピンのグループを選択的に励起して測定している。異種核三次元NMR法は、異種核二次元NMR法と同種核二次元NMR法を組合せたものであり、第三軸にケミカルシフトの広い異核種(例えば¹⁵N核など)を導入することによりスペクトルの単純化を行い、比較的短時間で分離を良くしている。さらに、短時間に測定するため、試料を¹⁵N核で同位体ラベル(エンリッチ)した同位体フィルタ法が用いられている。しかし、天然物などの構造解析をする場合、同位体フィルタ法を使用することは困難なので、天然存在比下で三次元NMRスペクトルを測定する必要がある。しかし、天然存在比下での三次元NMR法の報告は一、二報しかなく、しかも、HMQC-COSY法のみである。おそらく天然存在比下での三次元NMR法は、¹³Cのサテライト信号を観測するため感度が低いこと、および、¹²Cと結合した水素の信号を取り除く必要があることの困難さのためであろう。天然物の構造解析を容易にするため天然存在比での異種核三次元NMR法の実験条件の確立および天然物構造解析に必要な他の情報(HOHAHA)の新しい三次元NMR法の開発を行った。さらに、二次元NMRで ω_1 フィルタ、 ω_2 フィルタなどと呼ばれている方法を三次元NMRにも応用し、HOHAHA-HMQC、HMQC-HOHAHA、HMQC-COSY、COSY-HMQC法について比較検討を行った。

○ おおうち むねき こうの しずえ いまなり まもる

< 実験 >

HMQC法の測定可能なGSX400を使用し三次元NMRの測定を行った。サンプルは市販トマチン20mgを C_5D_5N 0.5mlに溶解した。図1に使用したパルス系列を示した。図1aはHMQC-COSY法、図1bはCOSY-HMQC法、図1cはHMQC-HOHAHA法、図1dはHOHAHA-HMQC法のパルス系列で、すべてのパルス系列にバードパルスを付加して異種核三次元NMRスペクトルを測定した。測定に要した時間は、HMQC-COSY、COSY-HMQCで約1.5日、HMQC-HOHAHA、HOHAHA-HMQCで約3日であった。三次元NMRデータの測定および処理は、自動測定/処理プログラムで行った。たとえばHMQC-COSY法の測定は図2aに示すように、それぞれの t_1 に対してHMQC(t_2, t_3)データを採集する自動測定プログラムで行った。三次元NMRデータの処理は、まず、それぞれのデータに対し、 t_2, t_3 軸のフーリエ変換を行ない図2bのデータを得た。次に目的のスライスデータに対し図2cのようにデータを並べ替え、図2dのように t_1 軸のフーリエ変換を行ない、吸収波形で表示した。すべての方法の最終結果は図3の模式図に示したようなデータの並びにした。

図1 パルス系列

図3 三次元NMRデータの並び

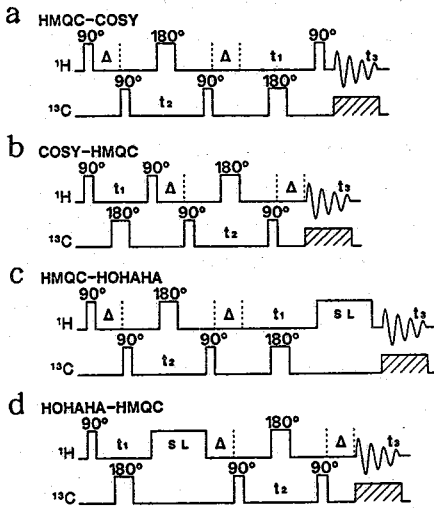
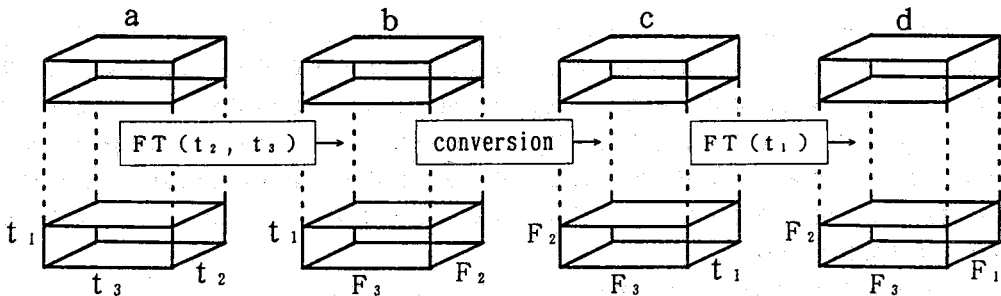
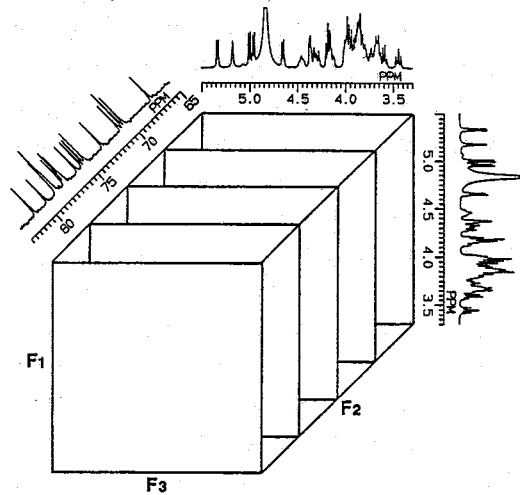


図2 データ処理の流れ



< 結果および考察 >

図4にHMQC-COSYの最初のデータの二次元HMQCのスペクトルを示した(積算時間約20分、積算回数16回)。図5にHMQC-COSYの異種核三次元NMRデータのF₂軸に垂直なスライススペクトルを示した。図5のF₂軸に垂直なスライススペクトルは図4と矢印で結び付けた位置に対するスライスデータである。トマチンのDQF-COSYおよびHOHAHA(ミキシング時間35 msec)の二次元スペクトルを図6 a, bに示した(次ページ)。図6 aのDQF-COSYスペクトルで4.65ppmの水素の信号は4.18ppmの水素に相関ピークを生じている。また図5 aのスライススペクトルでも、4.18ppmのプロトンと相関ピークを形成している。さらに複雑な部分3.8ppm付近および2.2, 2.8ppm付近のピークのスライススペクトルである図5 b, cについても同様なことが言える。

図7は図4に*で示した位置のHMQC-HOHAHA、HOHAHA-HMQC法の異種核三次元NMRデータのF₂軸に垂直なスライススペクトルである。図7より明かなようにHMQC-

図4 HMQC-COSYスペクトル

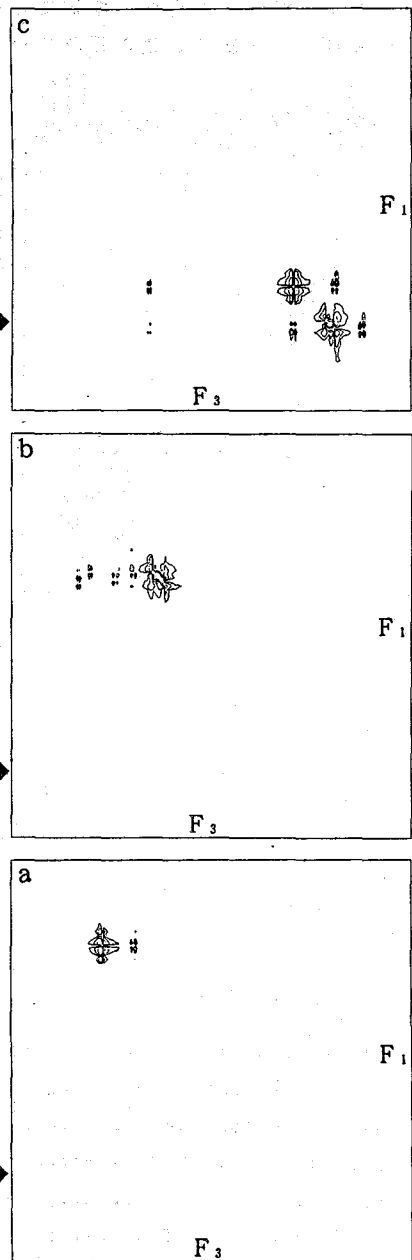
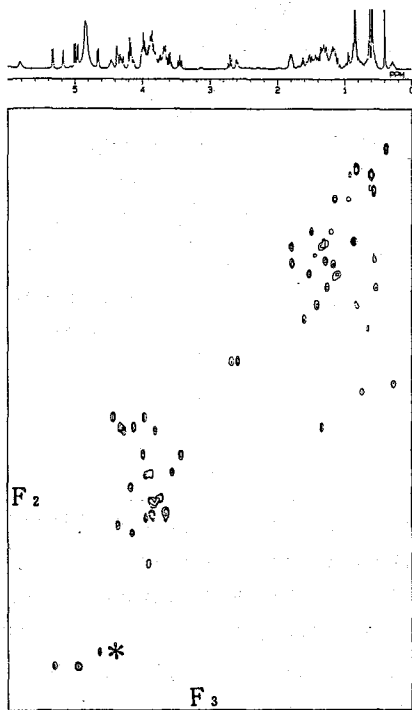


図5 F₂軸に垂直なスライススペクトル

HOHAHAのスライススペクトルはいわゆる二次元NMRの ω_2 フィルタ型で、 F_3 軸に平行にクロスピークが現われる。HOHAHA-HMQCのスライススペクトルはいわゆる二次元NMRの ω_1 フィルタ型で F_1 軸に平行にクロスピークが現われる。天然存在比で異種核三次元NMRスペクトルを測定する場合、同一測定時間で F_3 軸のポイントを大きくすることが可能でありHMQC-COSY法やHMQC-HOHAHA法での測定が適当と思われる。また、同位体でラベルしたペプチドやタンパク質の異種核三次元NMRスペクトルを測定する場合、溶媒である水の信号の影響が少ないCOSY-HMQC法やHOHAHA-HMQC法が優れていると思われる。

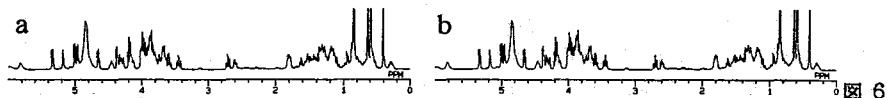
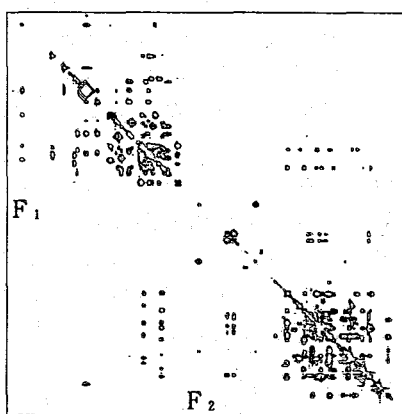
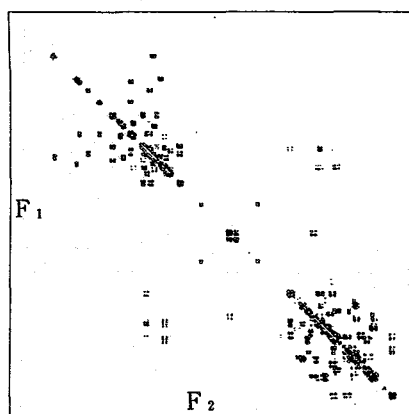


図 6



二次元スペクトル
a DQF-COSY
b HOHAHA

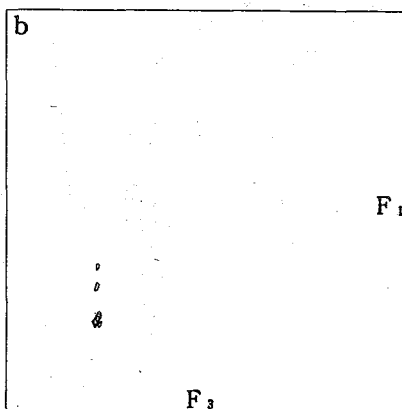
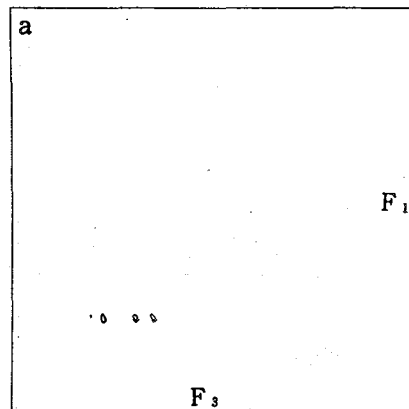


図 7
 F_2 軸に垂直な
スライススペクトル
a HMQC-HOHAHA
b HOHAHA-HMQC

参考文献

- 1) C.Grinsinger, O.W.Sorensen and R.R.Ernst J. Magn. Reson., 73 574 (1987)
- 2) H.Oschkinat, C.Griesinger, P.J.Kraulis, O.W.Sorensen, R.R.Ernst, A.M.Gronenborn and G.M.clore Nature, 332 374 (1988)
- 3) G.W. Vuister, P.Waard, R.Boelens, J.F.G.Vliegenthart and R.Kaptein J. Am. Chem. Soc., 111 772 (1989)
- 4) D.Marion, L.E.Kay, S.W.Sparks, D.A.Tochia and A.Bax ibid, 111 1517 (1989)
- 5) S.W.Fesik, R.T.Gampe, and E.R.P.Zuiderueg J. Am. Chem. Soc., 111 770 (1989)

(慶大・理工) ○内山孝憲, 南谷晴之, 坂田亮

Estimation of NMR spectra by AR model fitting with singular value decomposition

Takanori Uchiyama, Haruyuki Minamitani, Makoto Sakata

(Faculty of Science and Technology, Keio University)

Autoregressive model fitting with singular value decomposition (SVD) method was applied to FID signals of phosphorus solution and mung bean root tips. The SVD method provided low noise spectra with sharp resonant peaks compared with conventional fast Fourier transform. The SVD method produce much higher resolution than MEM, because the SVD method allows us the high order estimation due to the insensitiveness to the autoregressive model order. In the case of the high order estimation, MEM produce a lot of weak superiors peaks and some of these peaks is as strong as a signal peak. However these superiors peaks are easily distinguished by the SVD method.

1. はじめに

生体の³¹P NMRスペクトルは、生体内のpHやリン化合物とくにATPの濃度を見積ることができるなど極めて重要な情報を与える。しかし、³¹Pは¹³CやHに比較すると感度が低い上に、さらに生体は不均質で粘性の高い媒質で満たされているなど、測定に不利な条件が多い。そこで、本研究では、最近報告されているスペクトル推定法のうち、特異値分解を伴う自己回帰モデル適合による推定法(SVD)を³¹P NMRスペクトルに適用した。

2. 方法

試料にはリン化合物溶液とマメ科植物の一種であるモヤシマメ(*Vigna mungo* L.)幼植物の根端を用いた。リン化合物溶液は、細胞内pHを見積もるために用いるpH-化学シフト曲線を作成するために調整した試料(5mM KH₂PO₄, 5mM G6P, 100mM KCl, 0.5mM MgCl₂, pH7.0未滴25mM MES-Tris, pH7.0以上 25mM HEPES-KOH)とモヤシマメ根端のリン化合物濃度を推定するために細胞のリン化合物組成に類似させた試料(2mM G6P, 1mM F6P, 3mM KH₂PO₄, 1mM ATP, 0.5mM ADP, 1mM UDPG, 100mM KCl, 2mM MgCl₂, 25mM HEPES-KOH(pH7.3))を用いた。

³¹P NMRスペクトルの測定には、JEOL GX400を使用した。測定条件は共鳴周波数161.8MHz, パルス幅20μs(フリップ角45°)データポイント16384, 測定温度22±1°Cとした。モヤシマメ根端は、酸素を通気した溶液(100mM Glucose, 0.05mM CaCl₂, 15mM MES-Tris(pH 6.5))で灌流した。

スペクトルは、FIDを(1)式の自己回帰モデルで表して、自己回帰係数を特異値分解によって求めてから(2)式を用いて計算した。

$$x_i = \sum_{k=1}^M a_{Mk} x_{i-k} + n_i \quad (1)$$

うちやまたかのり みなみたにはるゆき さめたまこと

ここで、 $a_{Mk}; k=1, \dots, M$ はM次のARモデルの自己回帰係数、 n_i は白色ノイズである。

$$S(f) = \frac{P_M \Delta t}{\left| 1 - \sum_{i=1}^M a_{M,i} \exp(j2\pi f i \Delta t) \right|^2} \quad (2)$$

3. 結果と考察

図1に示したのは、pH-化学シフト曲線を作成するための溶液のスペクトルである。(a)はFFT, (b), (c)はMEMによって推定したスペクトルで次数はそれぞれ150, 200次である。(d), (e)がSVDによるスペクトルで、次数はそれぞれ150, 200次、ランクは3である。MEM, SVDともにFFTに比べて高分解のスペクトルが推定されているが、MEMでは次数が大きくなると分解能は高くなり、むしろベースライン上にノイズが現れてくる。一方、SVDではピークの線幅はMEMよりさらに狭く、またベースライン上のノイズもさらに抑制されている。

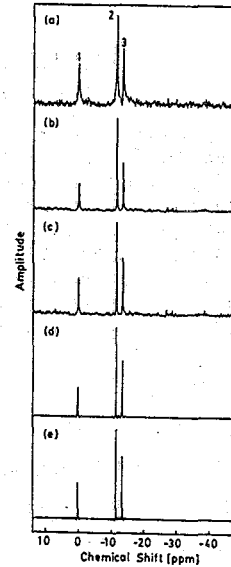


図1. pH-化学シフト曲線用試料

図2に示したのは、モヤシマメ根端のリン化合物濃度を推定するために用いたリン化合物溶液のスペクトルである。(a)はFFT, (b)はMEM(200次), (c)はSVD(200次, ランク20)によるスペクトルである。MEM, SVDともにFFTより分解能は高い。ところがMEMではピーク3はベースライン上のノイズと大きさがあまり変わらず、ノイズと誤認する可能性がある。しかし、SVDではピーク3は容易にノイズと区別ができる。

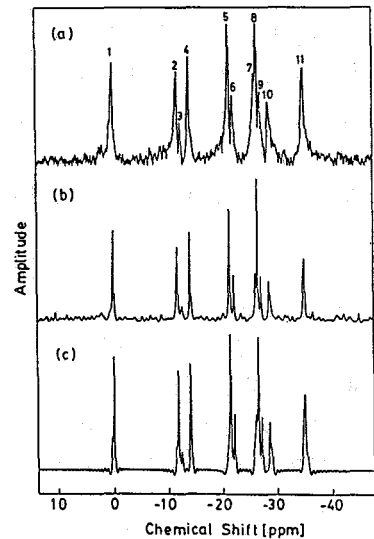


図2. 定量用試料

これらのことから、SVDはFFTより高分解能にスペクトルが推定できるだけでなく、MEMより次数に鈍感でさらにノイズと信号を容易に区別できるので低感度核種のNMRスペクトル推定に有効な方法であると考えられる。

文献

- 1) K. Minami, S. Kawata and S. Minami, Appl. Opt., 24, 162 (1985)

円管内乱流構造のイメージング

○巨瀬勝美、井上多門（筑波大学物理工学系）

NMR Imaging of Turbulent Structures in a Circular Pipe

Katsumi Kose and Tamon Inouye,

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

One shot NMR imaging with very short data acquisition time (20 msec) is used to reveal the structure of a turbulent equilibrium puff in transitional pipe flow. Longitudinal vortices in the downstream region of a puff are very clearly visualized in the NMR images. The structure of a puff derived from the NMR images agrees very well with that suggested by the flow visualization experiment done before. The NMR images have furthermore enabled a quantitative evaluation of the motion of longitudinal vortices.

<はじめに>

円管の中を流れる流体は、レイノルズ数 $Re = DU/\nu$ (D は管の直径、 U は平均流速、 ν は動粘性係数)が約2300をこえると、層流から乱流へと遷移するが、 Re が2000から2700の遷移領域においては、パフと呼ばれる乱流の塊と層流が流れの中に共存することが、最近注目されるようになってきた。このパフに関しては、70年代の初め頃、Wignanski [1]らによる熱線流速計を用いた精力的な研究があり、統計的手法によりパフの基本的な性質が明らかにされたが、その具体的構造については、ほとんど不明であった。その後80年代半ばに、詳細な流れの可視化実験が行われ [2]、パフの上流域における旋回流と横渦の湧きあがりが見られ、下流域における縦渦の存在が示唆された。しかしその縦渦の存在は、必ずしも明瞭でなく、またその実験上の限界から、定量的な評価は全く行われていなかった。

ところで、速い時間変化を伴う現象のNMRによる映像化には、Mansfieldに始まるエコー・プランナー流のワンショット法 [3] が有望であると考えられてきたが、これまでその技術的困難さなどのために、乱流現象の計測にこのような方法を用いた例は報告されていなかった。本研究では、このワンショット法を用いて、20msecという非常に短い画像データ収集時間を実現することにより、上に述べたパフの構造を画像化することに成功した。そして縦渦と旋回流の存在を明瞭に描出し、それらの回転角速度などを定量的に求め、パフの力学的構造をさらに明確にすることができた。

<方法>

静水圧により、水平においた内径9mm、長さ180mm (=200D、 D は内径)のポリカーボネート管内に定常水流をつくり、管の入口より135mm (150D)における4mm厚の横断面の映像化を行った。管の入口には、開口5mmのオリフィスを設け、流れに攪乱を導入した。なお、パルスシーケンスの繰り返し時間を短くするため、水に硫酸銅を溶かし、 T_1 を約60msecに調製した。映像化に用いた装置は、ギャップ66mm、磁場強度1Tの鉄心磁石を使用した自作の

イメージングシステムである。

用いたパルスシーケンスは、図1に示すもので、基本的には二次元Fourier変換のみで画像再構成が可能な、エコー・プラナー流のシーケンスである。読み出し、エンコードの勾配磁場強度はそれぞれ約18G/cm、0.9G/cm、データのサンプリングレートは10 μ s、全データ収集時間は20.48msecである。なお画像再構成は、このようにして得られた2048点のデータのうち、読み出し勾配磁場が平坦で、しかもエンコード勾配磁場が印加されていない部分のデータ（1024点：32点 \times 32エコー）のみを用いて行った。得られた画像の画素数は32 \times 32、画素のサイズは0.4mm \times 0.4mmである。

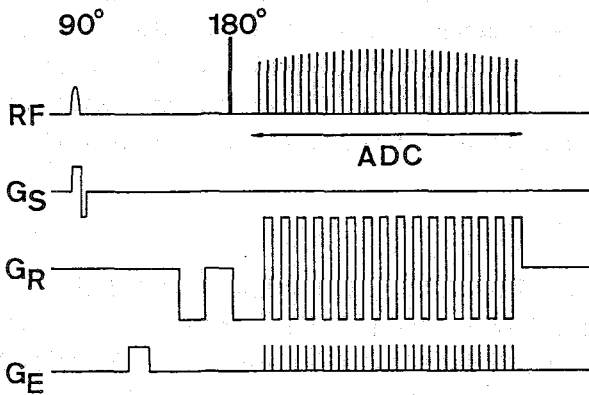


図1 使用したパルスシーケンス

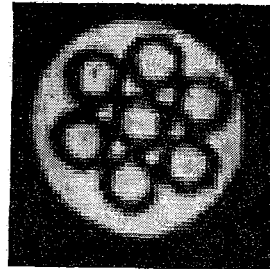


図2 ファントム画像。内径10mmのアクリル管の中に、肉厚0.5mm、外径3mmのガラス管7本を挿入し、水を満たしたもの。

<結果と考察>

図2に、上に述べたシーケンスで映像化したファントムの画像を示す。これからわかるように、画素サイズ程度の空間分解能が充分に実現されている。図3に、 $Re=2000$ において、繰り返し時間150msecで連続的に映像化した16枚の画像（実部画像）を示す。このように、層流が実現されている場合には、均一な画素濃度を示すことがわかる。図4に、 $Re=2250$ において、同様の条件で撮影した画像を示す。均一な濃度を示す部分は、層流の部分であり、濃淡のパターンがある部分はパフであると考えられる。このパフは、時間的に全くランダムに発生し、その画像は必ずしも同一ではないが、これらの例からもわかるように、共通

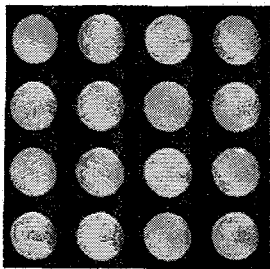
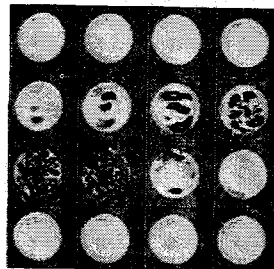
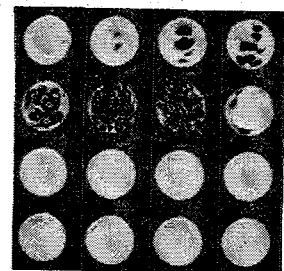


図3 層流 ($Re=2000$) の画像。150msecの間隔で連続的に撮影した画像を、左上から右下へと、時間的に並べて表示した。



(a)



(b)

図4 $Re=2250$ におけるパフの画像。表示法は図3と同様である。

した性質がみられる。その性質とは、まずバフの先端のしかも管の中央部分に黒い斑点が現れはじめ、つぎにその黒い斑点は特徴的なパターンをつくりながら増大し、やがて管内全体に広がって画素強度がほとんどゼロになる領域にまで成長し、その後急に強度を回復し、再び層流が現れるという性質である。このパターンを、流れの可視化実験によって提案されたバフの構造に従って解釈すると、図5に示すように、バフの全長は約20Dで、上流の長さ約3Dの部分に横渦の湧き上がりがあり、その下流の長さ約5Dの部分に発達した乱流があり、さらにその下流に長さ約12Dの縦渦の領域があるものと考えられる。

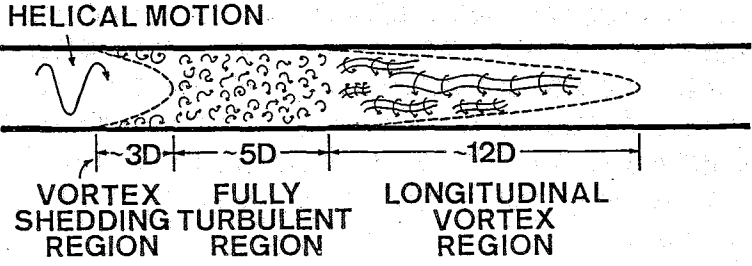


図5 NMR画像から推定されるバフの構造

図4に示した画像においては、図5に示したバフの下流域に、多くの縦渦と思われるパターンがみられるが、一般に、それらの縦渦は断層面に対して垂直であるとは限らず、しかも渦そのものも、様々な形状を持つものと考えられる。さらに、断層面に垂直な渦度をもつ縦渦がどのように映像化されるかも、必ずしも自明ではない。そこで、この実験で用いたパルスシーケンスで映像化を行った場合の、断層面内の流体の運動の画像への影響を調べるために、ゼラチンを内径10mmのアクリルパイプに詰めたファントムを一定の速度で回転させ、その横断面の映像化を行った。なおこれは、剛体的な回転を行っている縦渦のモデルになるものである。図6に、回転速度を変化させて撮像した画像を示す。これからわかるように、断層面内の速度成分を v_x 、 v_y とすると、流れによる画素値の位相変化 ϕ は、 α 、 β を定数として、 $\phi = \alpha v_x + \beta v_y$ と表すことができる。なお、流れの加速度、およびそれより高いオーダーの時間変化成分は、この実験の範囲では、位相の変化にほとんど寄与しない。

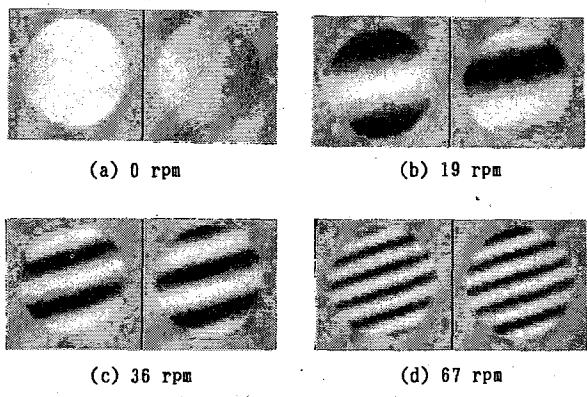


図6 回転速度を変化させて撮像したファントム画像
右は実部画像、左は虚部画像。

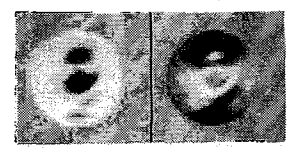


図7 縦渦(右上)と思われる画像。
図4(b)における3番目の画像。右は実部画像、左は虚部画像。

このように、円形の二次元的な渦で、そのなかの渦度 ω が一定の渦（剛体回転を行っている）が、断層面に垂直な場合には、その渦核は、縞状のパターンを示すことがわかる。このような特徴的なパターンは、まえに述べた縦渦の領域にいくつかみられるが、その代表的な例を図7に示す。しかし、実際に見られるものは、縞状のパターンでなく、孤立した島状の領域をもっている。これは、渦核の外側のポテンシャル流的な領域からの寄与があるものと思われる。そこで、図8に示すような、渦度分布と動径方向の流速分布をもつ二次元渦（Oseenの減衰渦）に対して、実験から求めた位相シフトの比例定数 α 、 β （それぞれ4.5rad/(cm/s)、1.1rad/(cm/s))を用いて数値シミュレーションを行うと、図9に示すように、実際の渦と同様のパターンを再現することができる。また、渦核の大きさと位相変化のパターンから、この渦核の回転の角速度は、約5rad/secと評価できる。このとき渦核の最も外側における流速は約1cm/secであり、主流の平均流速（約20cm/sec）に比較すると、1桁小さい流速である。なお、パフの下流域の縦渦領域ばかりでなく、パフの直後にも、図10に示すような水の旋回運動が存在することが観測された。この場合、回転の角速度は約1.2rad/secである。

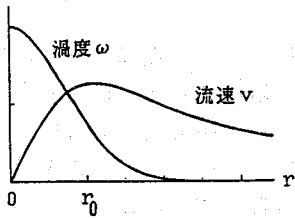


図8 Oseenの減衰渦の渦度 ω と流速 v の動径方向への変化。 r_0 は渦核半径。



図9 シミュレーションで求めた減衰渦のNMR画像。

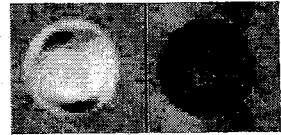


図10 パフのすぐ上流にみられる旋回流。

<むすび>

20msecという非常に短い画像データ収集時間のパルスシーケンスにより、遷移領域における円管内の乱流パフの映像化を達成した。NMRで映像化されるパフの構造は、従来の流れの可視化実験とよく一致するものであるが、下流域の縦渦と、上流域の旋回流に関しては、その存在をより明確にできただけでなく、その定量的な評価にも成功した。このような、NMR映像法におけるエコー、プラナー流のワンショット法は、縦渦などの主流に垂直な乱流内の秩序構造を映像化し、さらにその定量的評価することにおいて、きわて有力な手法であり、従来の流体計測法では不可能であった新しい計測手段を提供することになるものと思われる。

References

1. Wygnanski, I. J., Sokolov, M & Friedman, D 1975 On transition in a pipe. Part 2. The equilibrium puff. J. Fluid Mech. 69, 283-304.
2. Bandyopadhyay, P. R. 1986 Aspects of the equilibrium puff in transitional pipe flow. J. Fluid Mech. 163, 439-458.
3. Mansfield, P. 1977 Multi-planar image formation using NMR spin echoes. J. Phys. C10, L55-L58.

特別講演

特別講演

MULTINUCLEAR MAGNETIC RESONANCE APPROACHES TO STUDYING PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION

John L. Markley

National Magnetic Resonance Facility at Madison and Biochemistry Department,
University of Wisconsin-Madison, 420 Henry Mall, Madison, WI 53706, U.S.A.

Stable isotope labeling has been in use since the early days of protein NMR spectroscopy as an adjunct to the analysis of protein structure and function. Despite this, its considerable potential is only now becoming evident as the result of recent technological advances in high-field, two- (and higher-) dimensional NMR spectroscopy coupled with the economy and ease of using biotechnological methods to produce labeled proteins of interest. It is now possible to observe, along with the usual homonuclear $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ multiple-bond correlations, homonuclear $^{13}\text{C}\{^{13}\text{C}\}$ single-bond correlations and single- and multiple-bond heteronuclear correlations among all three of the major NMR active nuclei in a protein (^1H , ^{13}C , and ^{15}N).

The early stable isotope assisted NMR studies of proteins used high-level deuterium labeling to simplify ^1H NMR spectra or specific ^{13}C labeling to provide signals only from sites of interest. The spectral dispersion resulting from multidimensional NMR methods eases the requirement for spectral simplification; thus uniform labeling approaches, with their inherently higher information content, have become more practical. Currently, the most promising labeling patterns are: uniform ^{13}C labeling at 30-40% isotope for the analysis of carbon spin systems and carbon-directed analysis of proton spin systems, uniform ^{15}N labeling to >95% isotope for $^1\text{H}\{^{15}\text{N}\}$ experiments, dual uniform ^{13}C (30% isotope) / uniform ^{15}N (>95% isotope) for $^{13}\text{C}\{^{15}\text{N}\}$ correlations, random fractional deuteration at 50-75% isotope for higher resolution of $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ two-dimensional NMR spectra, and chiral deuteration for efficient stereospecific assignments. Specific labeling has distinct advantages when uniform labeling methods fail to provide needed assignments or in cases where the protein undergoes a reaction that changes the environment (chemical shift) of a group under observation.

My coworkers and I currently are using the new stable isotope assisted NMR methodology to make assignments in proteins in the 10-23 kDa range. The clarity and redundancy of information present in multinuclear two-dimensional NMR spectra facilitate the semi-automated analysis of protein NMR data. Structural information still comes primarily from interproton dipolar cross-relaxation (NOEs). Stable isotope assisted NMR methods result in more reliable ^1H NMR assignments, particularly with larger proteins, and they support isotope-directed and isotope-edited strategies for obtaining NOE information. We are just beginning to exploit the heteronuclear coupling information inherent in these spectra. Carbon-13 enrichment leads to more accurate determination of ^{13}C relaxation rates and hence assists in studies of protein dynamics through the determination of correlation times and order parameters.

第 3 日

11月22日(水)

L28 — L35



Complex formation between peptide antibiotic Ro09-0198
and lysophosphatidylethanolamine

Kaori Wakamatsu, Tsutomu Higashijima, Tatsuo Miyazawa,

Se-Young Choung, Tetsuyuki Kobayashi, & Keizo Inoue (Univ. Tokyo)

Ro09-0198 is a peptide antibiotic of 19 amino acid residues. This peptide is considered to exert its antibiotic activity through complexing specifically with (lyso)phosphatidylethanolamine molecules in the cell membrane of target cells, leading to pore formation. In the present study, the interaction is analyzed of this peptide with lysophosphatidylethanolamine in DMSO solution. Intra- and inter-molecular NOE peaks indicate that upon complexing the folded structure of free peptide molecule opens and accommodates the glycerophosphoethanolamine head group of lysophosphatidylethanolamine.

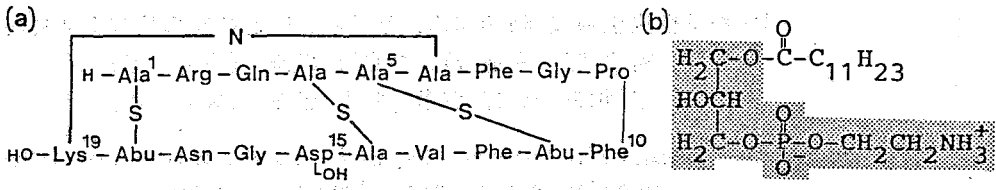
【はじめに】Ro09-0198はStreptovercillium griseovercillatumの産生するペプチドで抗生物質活性と免疫増強活性を持つ。このペプチドは19アミノ酸残基からなり、図1aに示すように lantionine, β -methyllanthionine, β -hydroxyaspartic acid, lysinoalanine などの異常アミノ酸を数多く含む。またこのペプチドは (lyso)phosphatidylethanolamineと特異的かつ強力で結合し、細胞膜に穴をあけることがわかっている。この特異的結合には、glycero-phospho-ethanolamine (図1bの網掛け部分)が必要で、ethanolamine部分にメチル基が1つでも付くと結合能を失う。アミノ酸19残基の低分子ペプチドがなぜ厳密な分子認識を行なうのかを調べるために、今回 Ro09-0198 と lysophosphatidylethanolamine との相互作用を主にNOESYによって解析した。

【実験】ペプチドは4mM DMSO溶液とし、2次元NMR測定は45℃で行なった。HOHAHA, NOESY, ROESYのmixing timeはそれぞれ、60ms, 300ms, 100msに設定した。横緩和スペクトルはspin lockをかけることにより測定した。

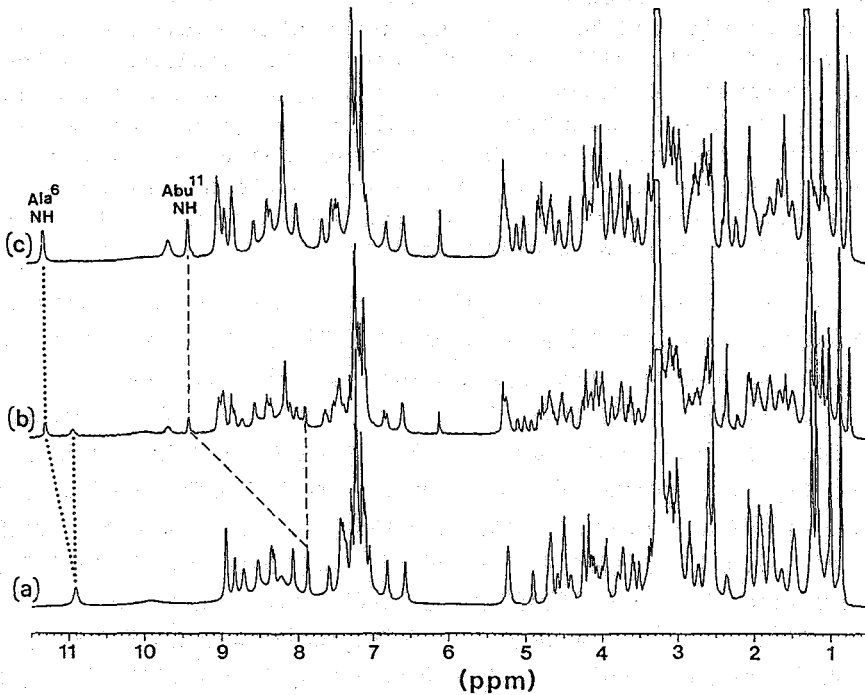
【結果】1. Titration: Ro09-0198を dodecanoyllysophosphatidylethanolamine (以下 C12-LPE と略す) でtitrateした結果を図2に示す。C12-LPEの添加に伴い、フリーの分子に由来するシグナル強度が減少し、新たに complex(1:1)由来のシグナルがもう1組現われる。フリーの分子と complex との交換速度が slow region にあることは Ro09-0198 と C12-LPE との結合がきわめて強いことと対応している。

2. シフト変化: フリーの Ro09-0198 シグナルはすでに Kessler らによって帰属されているが、実験条件が多少異なるので今回フリーと C12-LPE complexの両方についてHOHAHAとNOESYを用いて連鎖帰属を行なった。その結果、Ala(N)⁶~HO-Asp¹⁵の中央部分の残基のシフト変化が大きいことがわかった(図3)。特にGly⁸のC α プロトン、HO-Asp¹⁵のhydroxyプロトンのシフト変化が大きい。また、lysinoalanine^{19/6}の2級アンモニウム

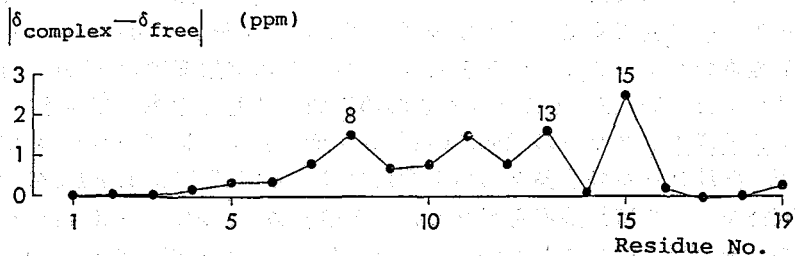
わかまつ あり、ひがしじま つとむ、みやざわ たつお
ちよん せよん、こばやし まつゆき、いのうえ けいどう



(図1) Ro09-0198(a) と C12-LPE(b) の構造



(図2) Ro09-0198 の C12-LPE による titration
peptide:C12-LPE = 1:0 (a), 1:0.5 (b), and 1:1 (c)



(図3) C12-LPE との結合による Ro09-0198 のアミノ酸残基のシフト変化
(各残基の中で最大のシフト変化をしめすプロトンについてプロット)

プロトンはフリーでは観測されないが、 complex では観測される。

3. 分子内および分子間NOE: 図4a,bにフリーペプチドと complex のNOESYスペクトル (aliphatic/aliphatic 領域) を示す。フリーの状態では(a) Val¹³ と Gly⁸、Pro⁹ との間に分子内NOEが観測される (GV,PVで示す)。一方、C12-LPEとの結合状態では(b)これらのNOEは消失し、Gly⁸ とethanolamine (Ge)、Pro⁹ とglycerol/ethanolamine (Pg/Pe)、Val¹³ とglycerol (Vg) などの分子間NOEが現われる。このことは、“フリーのペプチド分子のもつ Gly⁸-Pro⁹ と Val¹³ との接触が、C12-LPE との結合によって離されて、その間に ethanolamine head group が割り込んだ”ことを示している。また、HO-Asp¹⁵ のhydroxy proton と ethanolamineの CH₂N (De)、NH₃ (not shown) との間にも分子間NOEが観測されることから、ethanolamine(+) と HO-Asp(-) とがイオンペアを形成していることがわかる (labile proton の関与する NOEは ROESYで確認した)。さらに、これら分子間NOEは Gly⁸~HO-Asp¹⁵の残基のシフト変化の大きいこととよく対応している。また、「フリー分子では観測できなかった lysinoalanine^{19/6}の二級アンモニウムのプロトンがC12-LPE と結合することによって観測されるようになる」ことから、C12-LPE のリン酸基(-)は lysinoalanine^{19/6}の二級アンモニウム(+)とイオンペアを形成していると思われる。一方、C12-LPE の脂肪酸側鎖については、分子内の NOEすら観測されないこと、spin-lockingによる横緩和スペクトルでは脂肪酸側鎖がうきあがってくる、からペプチド分子とは相互作用せずフラフラしていることがわかる。

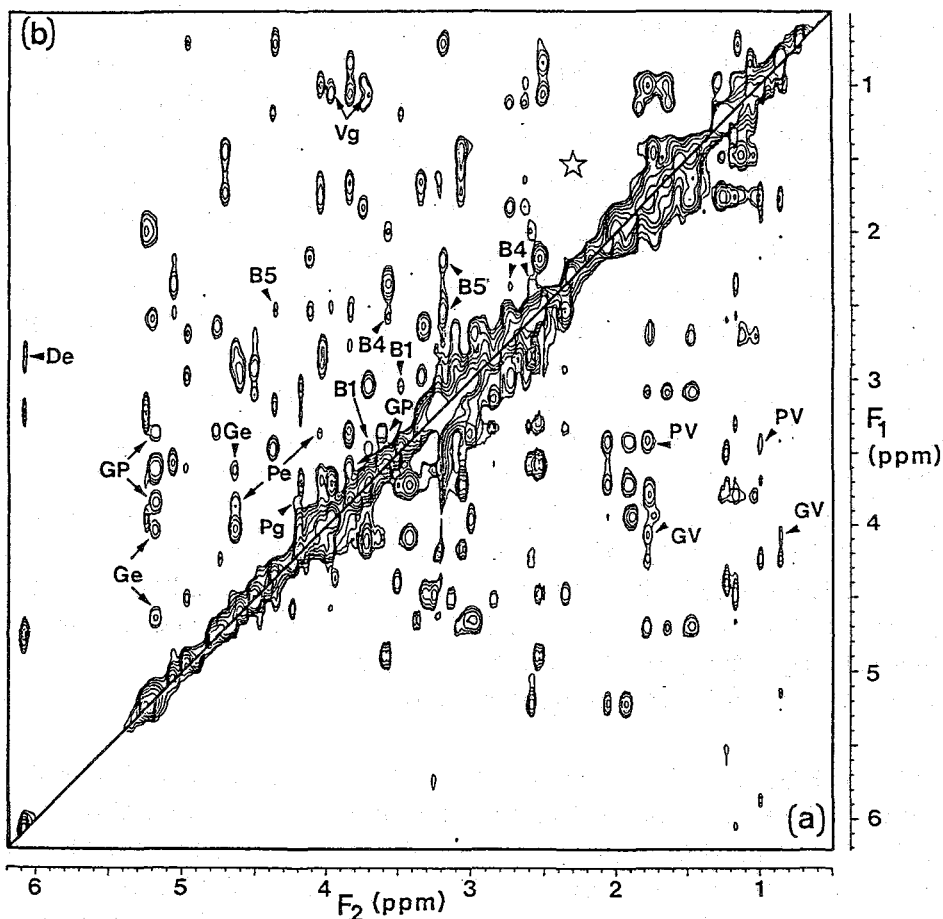
Ro09-0198 と C12-LPEとの相互作用の様式を図5に模式的に示した。

Ro09-0198 は分子量2,000と小さいにもかかわらず、(lyso)phosphatidylethanolamine の厳密な認識機構と膜に穴を開ける機能とを合わせ持っているきわめて興味深い分子である。今回行なったような解析は、膜タンパクとリン脂質との相互作用に関する情報を与えるだけでなく、人工的な “mini-enzyme” のデザインにも役立つと期待される。

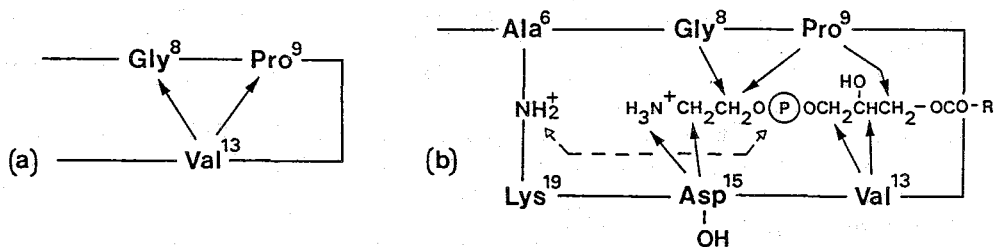
【謝辞】 Ro09-0198 を提供していただきました日本ロッシュの竹本憲司博士に感謝いたします。

REFERENCES

1. Choung, S.-Y., Kobayashi, T., Inoue, J., Takemoto, K., Ishitsuka, H., & Inoue, K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 940, 171-179.
2. Choung, S.-Y., Kobayashi, T., Takemoto, K., Ishitsuka, H., & Inoue, K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 940, 180-187.
3. Kessler, H., Steuernagel, S., Gillessen, D., & Kamiyama, T. (1987) *Helv. Chim. Acta* 70, 726-741.
4. Kessler, H., Steuernagel S., Will, M., Jung, G., Kellner, R., Gillessen, D., & Kamiyama, T. (1988) *Helv. Chim. Acta* 71, 1924-1929.
5. Wakamiya, T., Fukase, K., Naruse, N., Konishi, M., & Shiba, T. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29, 4771-4772.
6. Wakamatsu, K., Choung, S.-Y., Kobayashi, T., Inoue, K., Higashijima, T., & Miyazawa, T. (1989) *Biochemistry*, in press.



(図4) Ro09-0198 の NOESY スペクトル: (a) free, (b) + C12-LPE ($\tau_m = 300$ ms)



(図5) C12-LPE との結合による Ro09-0198 の構造変化

STUDY OF THE INCLUSION PHENOMENA BY ROESY AND T_1 MEASUREMENTS: THE INCLUSION COMPLEXES OF A TXA₂ RECEPTOR ANTAGONIST, SULOTROBAN SODIUM SALT, WITH CYCLODEXTRINS.

Y. Takayama, Y. Terui, T. Iwata, T. Saito, M. Yamakawa, and M. Ohtani (Shionogi Res. Lab.)

Applying ROESY method to the study of the host-guest interactions between α -, β -, and γ -cyclodextrins (CyD) and sulotroban sodium salt (2), we succeeded in detecting inter- and intramolecular NOEs. The NOE, T_1 , and chemical shift data showed the following results: The α -CyD rarely forms inclusion complexes with sulotroban. On the other hand, the β - and γ -CyD form inclusion complexes with sulotroban which is extended in the former cavity and takes on a "hairpin-like" conformation in the latter.

アラキドン酸から Prostaglandin H₂ を経て生合成される Thromboxane A₂ (TXA₂) (1) は、生理活性を有し、生体内で重要な役割を演じているが、その増加は、心筋硬塞、気管支喘息などの原因ともなっている。これらの治療薬として、TXA₂ 受容体拮抗剤の一つである Sulotroban・Na 塩 (2) がある。(2) の生体内における活性配座を推測するため、包接体を形成することでよく知られている Cyclodextrin (CyD) (3) と TXA₂ 受容体のモデルとして用いて、¹) 包接体内における (2) の立体構造を NMR 法により検討した。

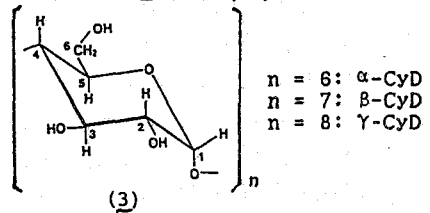
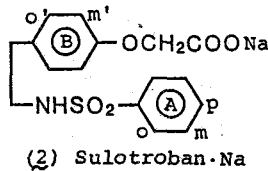
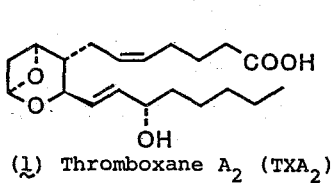
NMR 法による分子包接現象の研究は、化学シフトやスピン格子緩和時間 (T_1) の変化をもとに、すでに数多くなされているが、¹⁾²⁾ 包接体構造に最も直接的な証明を与える ¹H-¹H 間 NOE の観測例は少ない。今回、ROESY 法³⁾ および T_1 値を用いて、CyD 中の Sulotroban (2) の立体配座を含む包接体全体の構造を解明したので報告する。

[実験方法] Varian XL-400 NMR 分光器 (¹H 399.942 MHz, ¹³C 100.577 MHz) にて、重水中、TMS を外部基準とし、濃度 5 (5), 10 または 20 mM (NOE, T_1) にて、24°C (δ , T_1) または 4°C (NOE) にて測定した。 T_1 は Inversion recovery 法により測定した。Induced CD による Job の連続変化法の結果より、(2) と β - および γ -CyD の包接体は、1:1 であるので、NMR 測定には、1:1 混合物を用いた。NOE および T_1 測定は、 10^{-5} Torr にて脱ガスした試料を用いた。¹H および ¹³C シグナル帰属は、¹H-¹H および ¹³C-¹H COSY スペクトルより行なった。

[結果と考察]

1. ¹H 化学シフト (δ_H) の変化

(2) と CyD との 1:1 混合物の δ_H と free 分子の δ_H の差を包接体形成による ¹H 誘起



○たかやまようこ・てるいよしひろ・いわたなつお・さいとうたかし・やまかわすみ・おたにみつあき

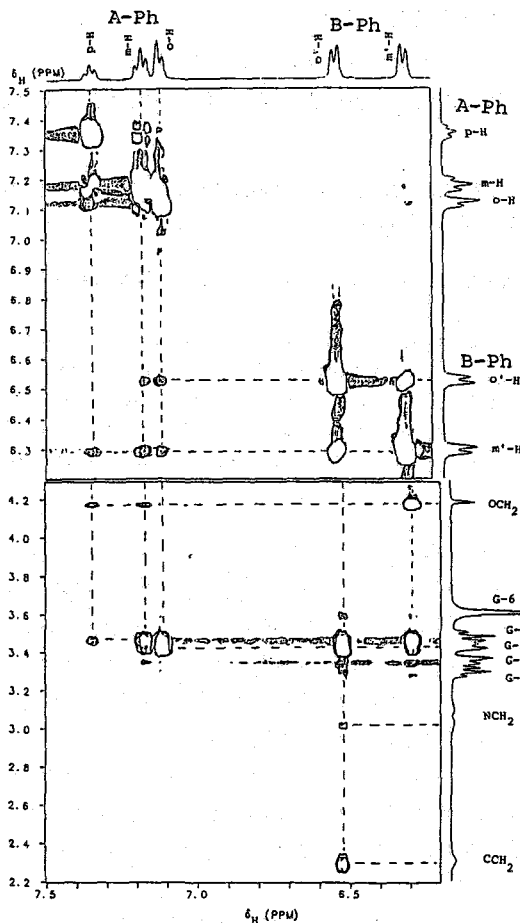


図1. 2と γ -CyD の ROESY スペクトル (4°C)

シフト値 ($\Delta\delta_H$) として表1および表2に示した。

a) (2)と γ -CyD: γ -CyD内側のH-3およびH-5に大きな高磁場シフトが観測された。(2)部分の $\Delta\delta_H$ は、OCH₂以外は非常に大きく、NCH₂以外はすべて高磁場シフトである。これらにより、強い包接体形成が予想され、これらの高磁場シフトは、(2)の二つのPh基の相互の磁気異方性効果のためと考えられる。また、N-CH₂CH₂の4個のHは、free分子の場合とは異なり、それぞれ異なった δ_H を与え、包接体中では、この結合の回転が凍結されたことを示している。

b) (2)と β -CyD: β -CyD内側に存在するH-5とH-3に大きな高磁場シフトが観測され、(2)部分の $\Delta\delta_H$ も大きく、包接体形成を示している。

c) (2)と α -CyD: すべての $\Delta\delta_H$ は1.0.02以内であり、包接体形成は非常に少ない。

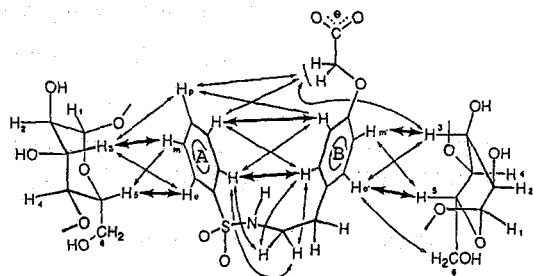


図2. 2と γ -CyD の NOE 相関図

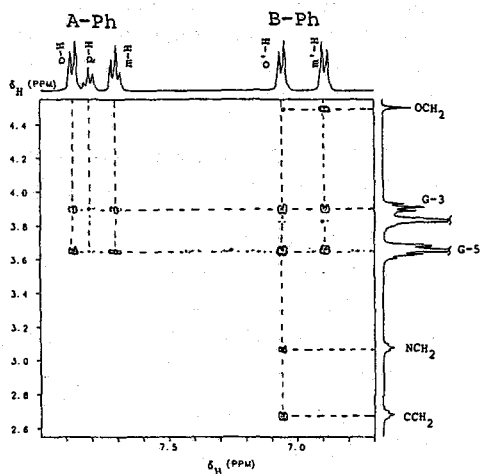


図3. 2と β -CyD の ROESY スペクトル (4°C)

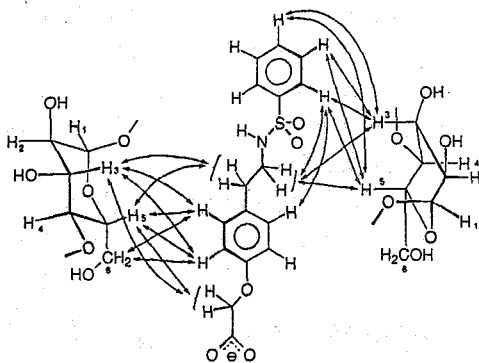


図4. 2と β -CyD の NOE 相関図

Table 1. ¹H Chemical shifts (δ_H in ppm) of sulotroban.Na (2) and the induced shifts ($\Delta\delta_H$) by addition of CyDs at 5mM in D₂O at 24°C

Compds		p-H	m-H	o-H	N-CH ₂	C-CH ₂	o'-H	m'-H	O-CH ₂
2	δ_H	7.680	7.577	7.750	3.195	2.663	7.036	6.794	4.444
2 + α -CyD	$\Delta\delta_H$	+0.012	+0.022	+0.018	0.000	+0.004	+0.011	+0.017	+0.008
2 + β -CyD	$\Delta\delta_H$	+0.070	+0.077	+0.070	-0.129	-0.025	-0.024	+0.048	+0.001
2 + γ -CyD	$\Delta\delta_H$	-0.080	-0.139	-0.312	+0.094	-0.100	-0.226	-0.208	-0.035
					+0.067	-0.111			

2. H-H間NOE

分子間NOE

は、NOESY法ではほとんど観測されなかったが、ROESY法³⁾特に4°Cにおける測定では多くのNOEシグナルが観測された。

a) (2) と γ -CyD: 図1のROESYスペクトルで明らかのように, benzen sulfon amide (A-Ph)部の p-Hは, phenoxy (B-Ph)部の m'-HとNOEが観測され, A-Phの m-Hは, B-Ph部の o'-Hと o'-Hとの間でNOEが観測された。しかも, それらのNOEの中で, m-Hと m'-H間, o-Hと o'-H間のNOE強度が他のものより大きい。OCH₂と A-Ph部の p-Hおよび m-H間にもNOEが観測された。このことより, 包接体中の Sulotroban分子の立体配座は, 図2に示されるように, A-Ph部と B-Ph部が向き合ったU字型配座であると考えられる。また図1で明らかのように, A-Ph部および B-Ph部と γ -CyDの内側の H-3および H-5の間で大きなNOEが観測された。しかも, その中でも, m-Hおよび m'-H

Table 2. ¹H Chemical shifts (δ_H in ppm) of CyDs and the induced shifts ($\Delta\delta_H$) by addition of sulotroban.Na (2) at 5mM in D₂O at 24°C

Compds		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
α -CyD	δ_H	5.053	3.633	3.981	3.590	3.840	3.868	3.913
2 + α -CyD	$\Delta\delta_H$	+0.002	-0.004	-0.011	+0.002	+0.008	0.000	0.000
β -CyD	δ_H	5.070	3.648	3.965	3.583	3.865	3.870	3.885
2 + β -CyD	$\Delta\delta_H$	-0.026	-0.018	-0.100	-0.003	-0.190	-0.080	-0.081
γ -CyD	δ_H	5.113	3.656	3.937	3.593	3.865	3.868	3.883
2 + γ -CyD	$\Delta\delta_H$	-0.072	-0.060	-0.192	-0.061	-0.180	-0.040	-0.042

Table 3. ¹³C NT₁ values (in s) of sulotroban.Na (2) and the mixtures with CyDs at 20mM in D₂O at 24°C

Compds	p-C	m-C	o-C	N-CH ₂	C-CH ₂	o'-C	m'-C	O-CH ₂
2	1.07	1.63	1.62	1.20	1.22	1.05	1.08	1.95
2 + α -CyD	0.77	1.14	1.10	1.00	0.96	0.87	0.90	1.70
2 + β -CyD	0.33	0.55	0.56	0.58	0.62	0.46	0.46	1.02
2 + γ -CyD	0.27	0.35	0.36	0.34	0.38	0.34	0.34	0.94

Table 4. ¹³C NT₁ values (in s) of CyDs and the mixture with sulotroban.Na (2) at 20mM in D₂O at 24°C

Compds	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	Cav ^{a)}
α -CyD	0.241	0.255	0.257	0.249	0.255	0.300	0.251
2 + α -CyD	0.240	0.250	0.255	0.245	0.248	0.290	0.248
β -CyD ^{b)}	0.223	0.234	0.239	0.230	0.230	0.274	0.231
2 + β -CyD ^{b)}	0.215	0.227	0.234	0.230	0.227	0.268	0.227
γ -CyD	0.223	0.233	0.236	0.228	0.232	0.274	0.230
2 + γ -CyD	0.213	0.218	0.222	0.213	0.217	0.254	0.217

a) Averaged ¹³C NT₁ values for C-1~C-5. b) 10 mM

Table 5. Rotational correlation times τ (10⁻¹¹s) of sulotroban.Na (2), CyDs, and the mixtures at 20mM^{a)}

	Sulotroban.Na (2)		CyD	
	overall	Ph internal	overall	CH ₂ OH internal
	τ_{eff}	τ_g	τ_{eff}	τ_g
2	4.7	2.8	—	—
α -CyD	—	—	20	40
2 + α -CyD	6.4(1.4)	4.5(1.6)	20(1.0)	49(1.2)
β -CyD	—	—	21 ^{b)}	48 ^{b)}
2 + β -CyD	15(3.2)	6.5(2.3)	22(1.0) ^{b)}	50(1.0) ^{b)}
γ -CyD	—	—	21	46
2 + γ -CyD	18(3.8)	18(6.4)	23(1.1)	56(1.2)

a) The ratios of τ of the mixtures to that of (2) or CyDs in parentheses. b) 10 mM

とH-3の間のNOE, O-HおよびO'-HとH-5の間のNOEが特に大きい。その他観測されたNOEも図2に示した。ただし、当然観測されるべき隣接¹H間NOE相関は省略した。図2に示されるように、(2)は、U字型配座で、 γ -CyDに包接され、しかも、(2)のU字型が γ -CyDの2級アルコール側から包接されている構造であることが判明した。

b) (2)と β -CyD: (2)のほゞすべての¹H核と、 β -CyD内側のH-3およびH-5の間に、分子間NOEが観測され(図3参照), 包接体形成を示している。得られたNOE相関図を図4に示した。Sulotroban分子は、 β -CyD中で、extended型も含めいくつかの立体配座をもつ包接体として、それらの平衡状態で存在していると考えられる。

3. ¹³Cスピン格子緩和時間T₁と相関時間T_c

得られた¹³CNT₁値を表3および表4に示した。すべての場合、CyD部分(表4参照)のC-1~C-5の¹³CT₁値は、ほゞ等しく(±0.01s), 等方性運動をしており、C-6の¹³CT₁値は、それらより長いので、CH₂OH基は、自由回転をしておると考えられる。Sulotroban部(表3参照)のA-Ph部は、p-Cの¹³CT₁値より、m-Cおよびo-Cの¹³CT₁値が長いので、Ph基の自由回転運動が考えられる。(2)と γ -CyDとの混合物では、OCH₂基の¹³CNT₁値以外の¹³CNT₁値は、ほゞ等しいので、OCH₂COO部分以外の分子運動は、同程度に束縛されていると考えられ、図2に示したU字型包接体構造を支持している。

¹³CT₁値を用いて、分子全体の回転相関時間T_{eff}を、 $1/T_{eff} = \sum_i \rho_i^2 \gamma_i^2 \tau_{CH}^{-1} T_{eff}$ の式より求め、得られたT_{eff}値と内部回転している¹³C核のT₁値より、内部回転の相関時間T_cを求めた^{2a)}。得られたT_{eff}およびT_cを表5に示した。T_{eff}およびT_cは、[(2)のみ] < [(2)+ α -CyD] < [(2)+ β -CyD] < [(2)+ γ -CyD]の順に増加しており、この順に(2)の回転運動が束縛されていることがわかる。Sulotroban部分のT_{eff}は、 β -および γ -CyDの存在下、約3~4倍の大きさであり、(2)の分子が包接されたため、束縛されていることを示している。また、孔径の内径の大きい γ -CyDに包接されたPh基のT_cが、内径の小さい β -CyDの場合と比較すると、約3倍の大きさであり、 β -CyD中よりも、 γ -CyD中で、(2)の自由回転が妨げられている。このことは、図2のU字型包接体構造を支持している。(2)の分子の包接により、CyD部分のT_{eff}およびT_cはほとんど変化していないので、包接体全体の運動性は、ほとんど変化していないと考えられる。

以上述べたように、Sulotroban Na塩(2)は、 β -CyD中、図4で示されたextended型を含むいくつかの立体配座で包接されている。 γ -CyD中では、図2のようなU字型配座で、 γ -CyDの2級アルコール側から包接されていることが、ROESY法によるNOE測定およびT₁測定により、判明した。このように、非プロスタノイド系TXA₂受容体拮抗剤であるSulotroban Na塩(2)の γ -CyD包接体中の立体配座が、プロスタノイドの受容体結合部位における活性配座仮説として、Andersenら⁴⁾により提案されているhairpin型配座と類似していることは興味深い。

References)

- 1) M. L. Bender and M. Komiyama, "Cyclodextrin Chemistry". Springer-Verlag, 1978.
- 2)a) Y. Inoue, Y. Katono, and R. Chujo, Bull. Chem. Soc. Japan, 52, 1692 (1979).
- b) M. Suzuki, et al. J. Incl. Phenom., 5, 459 (1987).
- 3)a) A. A. Bothner-By, et al. J. Amer. Chem. Soc., 106, 811 (1984).
- b) A. Bax and D. G. Davis, J. Magn. Resonance, 63, 207 (1985)
- 4) N. H. Andersen, et al. Adv. Prostag. Thrombox. Res., 1, 271 (1976).

(三共・分析代謝研) ○依田 恵子・春山 英幸・桑野 晴光
(明治学院大・化学) 齊藤 規夫

Three-Dimensional Structure of Ternatin D2 in Solution.

Keiko Yoda*, Hideyuki Haruyama*, Harumitsu Kuwano*, and Norio Saito**

*Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co.,

**Chemical Laboratory, Meiji-Gakuin University

As a stabilization mechanism of anthocyanin in weakly acidic media, T. Goto et al. proposed a model that anthocyanidin and the aromatic rings involved in anthocyanin would form an intramolecular sandwich type stacking complex. To characterize the structural details of the proposed complex, the conformation of ternatin D2 (1), one of the anthocyanins isolated from *Clitoria ternatea* L., was analyzed in acidic methanol-d₄ solution by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. After the complete assignment of ¹H signals by the combination of several 2D NMR techniques involving P.E.-COSY and mixed mode HMBC spectra, the three-dimensional structure model of 1 was proposed based on the distance constraints from ROESY spectra, the ring current effects on the ¹H chemical shifts, and J coupling constants.

(緒言) 橙、赤～青の花色の本体はアントシアニン配糖体であり、その発色本体はアグリコン部分であることが知られている。アントシアニンは、強酸性条件では橙～赤色のフラビリウムイオンとして存在するが、弱酸性条件では容易に水和し無色のアソイド塩基となる。一方、花卉細胞液は弱酸性であることから、水和を阻止して花卉の色調を保つ何らかの機構が存在するものと考えられてきた。その様な機構のひとつとして、後藤らは、ヘブンリーブルーアントシアニン(HBA)に対して、アントシアニン環平面の上下に色素を構成するコーヒ酸がスタッキングし、その周囲をグルコース分子が取り巻くことによって安定化されるとするモデルを提案している。¹⁾我々は、HBAと同様の機構によって安定化が実現されていると考えられる、チョウマメ(*Clitoria ternatea* L.)から抽出単離された青色色素 ternatin D2 (分子量 1476) 1 について、2D-NMR の種々の手法を用いて ¹H-NMR の完全な帰属を行い、次いで、ROE、芳香族性環電流効果、及びカップリング定数から溶液中のコンホメーションについて検討し、ternatin D2 が実際に分子内会合していることを見出したので報告する。

(実験) NMR スペクトルは、JEOL JNM-GX500 (500 MHz) 分光計、及び JEOL JNM-GX400 (400 MHz) 分光計を用いて測定した。試料には、ternatin D2 のトリフルオロ酢酸塩約 10 mg を重メタノール約 0.5 ml に溶解し、色素の安定化と水シグナルのシフトのためにトリフルオロ酢酸を溶媒の約 3～8% 添加した。測定温度は 30℃とした。化学シフト値の比較を行うためのデータとして、ternatin D2 の脱アシル塩酸塩、及び p-クマル酸、マロン酸、1-o-methyl-β-D-glucopyranoside の ¹H-NMR スペクトルを Ternatin D2 と同様の条件で測定した。2D NMR スペクトルは、SUN4/110 コンピュータにデータを転送後、NMR2 ソフトウェアを用いて処理を行った。尚、化学シフト値は TMS を内部標準として算出した。

よだけいこ・はるやまひでゆき・くわのはるみつ・さいとうのりお

(結果及び考察)

1. ternatin D2 の NMR シグナルの帰属と平面構造の決定

主に、P.E.-COSY²⁾、Relayed COSY、二量子スペクトルの解析から、ternatin D2 の ¹H シグナルの帰属を完了し、HMQC、HMBC スペクトルの解析から ¹³C シグナルの帰属を行った。

ternatin D2 はデルフィニジン骨格を持ち、側鎖に 4 つの β-グルコース、3 つの p-クマル酸、1 つのマロン酸を含有することが確認できた。

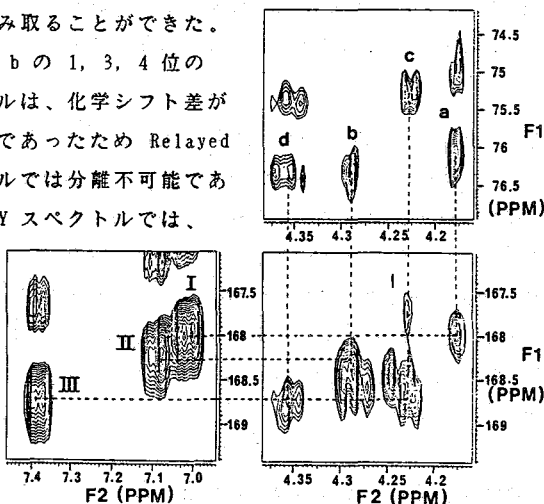
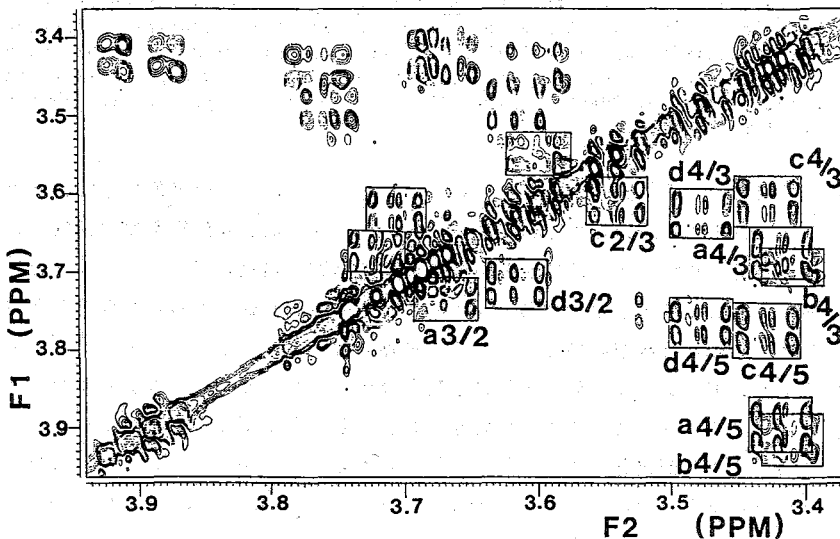
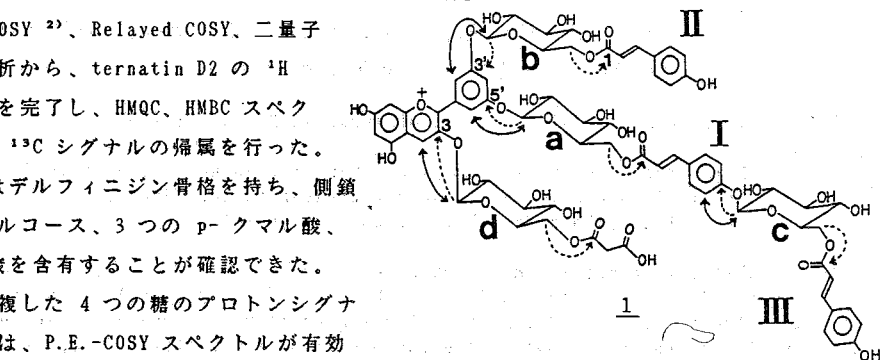
シグナルの重複した 4 つの糖のプロトンシグナルの完全帰属には、P.E.-COSY スペクトルが有効

であった (図 1)。

P.E.-COSY スペクトル上では、クロスピークのパターンが単純化されるため、対角ピーク付近のシグナル、及びオーバーラップの非常に厳しい (0.01 ppm = 5 Hz 以下) シグナルでも、その化学シフト値とカップリング

定数を明確に読み取ることができた。特に、糖 a と糖 b の 1, 3, 4 位のプロトンシグナルは、化学シフト差が 0.01 ppm 以下であったため Relayed COSY スペクトルでは分離不可能であった。P.E.-COSY スペクトルでは、

図 1 示す様に a と b の糖の 3, 4, 5 位のつながりが一見して判別できた。



(図 1) ternatin D2 の P.E.-COSY スペクトル (500 MHz) 溶媒は CD₃OD + 3% TFA F1, F2 とも shifted sinebell window ($\pi/4$) 処理を行い、分解能を F2 側 0.39 Hz、F1 側 1.56 Hz とした。
(図 2) ternatin D2 の mixed mode の HMBC スペクトル

次に、単位構造間のつながりを mixed mode の HMBC スペクトル³⁾、及び ROESY スペクトルを用いて決定した。mixed mode の HMBC スペクトルでは、absolute mode の HMBC スペクトルに比べ分解能が向上するため、4 つの糖の 6 位の高磁場側プロトンシグナルと、p-クマル酸またはマロン酸の 1 位カルボニル炭素との間のクロスピークをそれぞれ分離して観測することが可能となった (図 2)。その結果、I の p-クマル酸と a の糖、II の p-クマル酸と b の糖、III の p-クマル酸またはマロン酸と c または d の糖のつながりを直接的に証明できた。III の p-クマル酸とマロン酸の 1 位カルボニル炭素は、化学シフト値が 0.08 ppm と接近しているため、正確な帰属が不可能であったが、3', 5' 位側鎖が同一で対称性のある類似の色素、ternatin D1 の構造⁴⁾から、3 位側鎖にマロン酸が結合すると推定した。観測されたロングレンジカップリング及び ROE シグナルの内、平面構造の決定に役立つデータを構造式 1 上に示した。これらのデータより、ternatin D2 の構造を 1 と決定した。ternatin D2 の ¹H 化学シフト値とカップリング定数を表 1 中に示し、¹³C シグナルの帰属を表 2 にまとめた。

< 表 2 > ternatin D2 の ¹³C 化学シフト値

assignment	δ (ppm)	assignment	δ (ppm)
aglycon		p-coumaric acid-II	
2	160.74	1	168.29
3	145.75	2	115.40
4	135.42	3	145.66
4a	113.86	1"	126.47
5	156.79 or 158.77	2", 6"	130.78
6	95.8 * or 104.11	3", 5"	116.91
7	161.39	4"	161.02
8	95.8 * or 104.11	p-coumaric acid-III	
8a	156.79 or 158.77	1	168.75
1'	119.78	2	114.89
2', 6'	114.1 *	3	146.92
3', 5'	147.53	1"	126.68
4'	146.76	2", 6"	131.00
p-coumalic acid-I		3", 5"	117.2 *
1	168.02	4"	161.39
2	117.2 *	malonic acid	
3	144.79	1	168.83
1"	129.20	2	56.4 *
2", 6"	130.42		
3", 5"	117.96		
4"	160.06		

* : HMBC スペクトルから得られた値

< 表 1 > ternatin D2 の ¹H 化学シフト値とカップリング定数

assignment	δ (ppm)	coupling constant (Hz)	*2
aglycon			
4	8.256		-0.883
6 or 8	6.668	1.3	-0.413
6 or 8	6.594	2.1	-0.087
2' and 6'	7.994		-0.297
glucose-a			
1	5.321	7.2-J ₁₂	1.129
2	3.722	9.8-J ₂₃	0.530
3	3.670	7.9-J ₃₄	0.284
4	3.419	10.5-J ₄₅	0.098
5	3.891	2.9-J _{56a}	0.594
6 (a)	4.859	9.2-J _{56b}	0.970
(b)	4.190	12.1-J _{6a6b}	0.487
glucose-b			
1	5.313	7.2-J ₁₂	1.121
2	3.70 *3		0.50
3	3.68 *3	7.8-J ₃₄	0.29
4	3.413	10.4-J ₄₅	0.092
5	3.905	2.8-J _{56a}	0.608
6 (a)	4.789	8.9-J _{56b}	0.900
(b)	4.258	12.0-J _{6a6b}	0.555
glucose-c			
1	4.836	7.3-J ₁₂	0.644
2	3.541	10.0-J ₂₃	0.349
3	3.604	7.8-J ₃₄	0.218
4	3.429	10.4-J ₄₅	0.108
5	3.765	2.9-J _{56a}	0.468
6 (a)	4.698	8.1-J _{56b}	0.809
(b)	4.239	11.9-J _{6a6b}	0.536
glucose-d			
1	4.668	7.3-J ₁₂	0.476
2	3.708	9.9-J ₂₃	0.516
3	3.618	8.2-J ₃₄	0.232
4	3.478	10.3-J ₄₅	0.157
5	3.757	2.7-J _{56a}	0.460
6 (a)	4.649	7.5-J _{56b}	0.760
(b)	4.346	11.9-J _{6a6b}	0.643
p-coumaric acid-I			
2	5.704	16.1	-0.579
3	7.017	16.1	-0.596
2", 6" and 3", 5"	6.76		-0.69
			-0.06
p-coumaric acid-II			
2	5.880	15.9	-0.403
3	7.105	15.9	-0.508
2", 6"	6.826	8.5	-0.621
3", 5"	6.526	8.6	-0.293
p-coumaric acid-III			
2	6.170	15.9	-0.113
3	7.397	15.9	-0.216
2", 6"	7.102	8.8	-0.345
3", 5"	6.658	8.5	-0.161
malonic acid methylene	3.745		0.404

* : 糖部分のカップリング定数は、P.E.-COSY スペクトルより計測した。

* 2 : 各構成成分が溶液中に単独で存在する場合の化学シフト値からの差

* 3 : 二量子スペクトルから求めた値

2. ternatin D2 の溶液中の コンホメーションの検討

ternatin D2 の ¹H 化学シフト値を、各構成成分が単独で溶液中に存在する場合の値と比較した所、p-クマル酸及びアグリコンのプロトンシグナルは高磁場シフトしていることが認められた(表 1)。この現象は、p-クマル酸及びアグリコンの芳香環が互いに重なり合っており、環電流効果による高磁場シフトを生じたためと考えられ、前述のスタッキングによる分子内会合の存在を支持した。更に、ternatin D2 のアグリコンの 6, 8 位プロトンは、溶媒中の重水素とゆるやかに交換(数ヶ月で交換)するのに対し、脱アシル体では ternatin D2 よりも非常に速く、約 24 時間で完全に交換することが観測された。これは、アシル基による色素の安定化の機構が確かに存在することを示している。

ternatin D2 の溶液中のコンホメーションをさらに詳細に検討するために、ROESYスペクトルの測定を行った。

Hartmann-Hahn 効果による artifact を識別するため、スピロック位置及びスピロック強度を変えて測定した複数の ROESY スペクトルを解析に用いた。ROESY スペクトルの一例を図 3 に、観測された主な ROE を表 3 に示した。アグリコンの 4 位プロトンには、I と II の p-クマル酸の芳香環プロトンとの ROE が観測されており、環電流効果も -0.883 ppm と大きいことから、アグリコンを取り囲むように p-クマル酸が位置していると考えられる。又、3 つの p-クマル酸間の ROE も観測されており、一方の p-クマル酸の芳香環のプロトンと他方の 2 又は 3 位プロトン間に観測されていることから、芳香環がぴったり重なる位置ではなく少しずれた位置で重なっていることが示唆された。c と d の糖では、1 位、5 位プロトンと結合位置に近いプロトンとの ROE が認められ、全ての糖の 3, 4 位プロトンは、化学シフト値が同じ溶媒中で測定したグルコースの化学シフトと大差なく(表 1)、芳香環から遠い位置にあると考えられることから、側鎖は糖の位置で曲がり、糖とマロン酸が芳香環の外側に位置した構造を取っていると考えられる。

現在、これら ROE から得られる距離情報、芳香族性環電流効果及びカップリング定数を用いて、3 次元構造モデルの構築を行っている。

参考文献

- 1) T. Goto, et al. Annals New York Acad. Sci., 471, 155 (1986)
- 2) L. Mueller, J. Magn. Reson. 72, 191 (1987)
- 3) Ad. Bax and D. Marion, J. Magn. Reson. 78, 186 (1988)
- 4) 寺原、斉藤、本多、土岐、箆島、第 31 回天然有機化合物討論会 (1989) 名古屋
- 5) Ad. Bax, J. Magn. Reson. 77, 134 (1988)

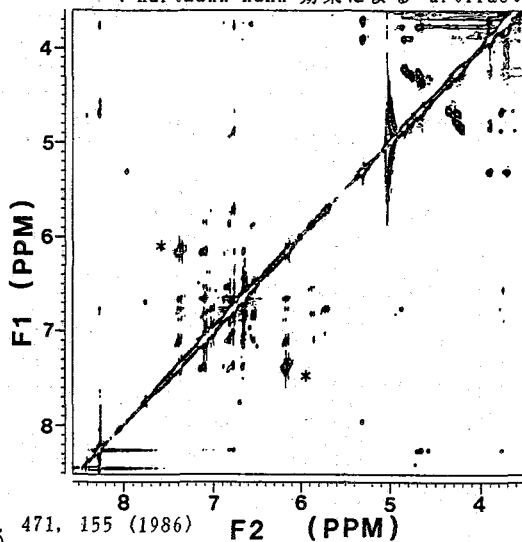
< 表 3 > ternatin D2 の ROE

assignment	intensity of ROE
4 / d-1	L
4 / d-5	M
4 / I-2", 6", 3", 5"	M
4 / II-2", 6"	S
6 or 8 / malonic acid	M
2", 6" / a-1 and b-1	S
I-2 / I-2", 6"	M
I-3 / I-2", 6"	L
I-2", 6", 3", 5" / III-2	S
I-2", 6", 3", 5" / III-3	S
I-2", 6", 3", 5" / c-5	S
I-3", 5" / c-1	M
II-2 / II-2", 6"	S
II-3 / II-2", 6"	M
II-2", 6" / III-3	S
III-2 / III-2", 6"	L
III-3 / III-2", 6"	L

*: L:Large, M:Medium, S:Small

(図 3) ternatin D2 の ROESY スペクトル

*: Hartmann-Hahn 効果による artifact



Structures of 9H-Xanthen-9-one and its Tricyclic Analogues Studied by NMR Spectroscopy using Liquid Crystal Solvents and ab initio Calculations

Kenji Murano, Tatsuya Takagi and Hideaki Fujiwara

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

We have studied the molecular structures of the titled tricyclic compounds by NMR spectroscopy using liquid crystal solvents and by ab initio MO calculations. The NMR spectrum of 9H-Xanthen-9-one has been measured in nematic phase ZLI1167 and analyzed to obtain the direct couplings. The direct couplings are interpreted by assuming a folded structure of the tricyclic framework. The dihedral angle between the two benzene rings is determined to be $167.9 \pm 1.3^\circ$. This value corresponds to the statistical average predicted by the ab initio MO calculations, but is smaller than a crystal value by about 10° .

序 論

液晶 NMR 法は、溶媒として液晶を用いる方法で、その NMR スペクトルから、その化合物の立体構造及び液晶に対する配向性を決定する方法である。液晶は、磁場をかけると生体膜のようにその長軸が同一方向に配向する傾向があり、液晶 NMR 法は、薬物の生体内での構造及びその配向性を知る一つの手がかりを与える方法として注目されている。その NMR スペクトルは、通常、等方溶液中では分子のブラウン運動により消去されていた直接結合定数 D の情報を与えるため、この D の値より、分子の立体構造及び液晶に対する配向性を知ることができる。その D の値は、核 a, b の配向パラメーターに比例し、核 a, b の距離の 3 乗に反比例する。直接結合定数 D_{ab}、配向パラメーター S_{pq} は、次式のように表される。

$$D_{ab} = -\frac{h}{4\pi^2} r_a r_b \frac{S_{ab}}{r_{ab}^3} \quad S_{pq} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos \theta_p^H \cos \theta_q^H - \delta_{pq} \rangle$$

$$S_{ab} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta_{ab} - 1 \rangle \quad S_{ab} = \sum_{p,q} \cos \theta_p^{ab} \cos \theta_q^{ab} S_{pq} \quad p, q = x, y, z$$

従来より当研究室では、半ば柔らかい化合物として、Phenothiazine 等の三環性化合物を取り上げ、液晶 NMR 法により分子構造の決定を行ってきた。今回、こうした研究の一環として、当薬の成分に含まれる swertianin, swertianorin 等の基本骨格である 9H-Xanthen-9-one (Fig. 1) を取り上げ、液晶溶媒中での ¹H-NMR スペクトルから 2 つのベンゼ

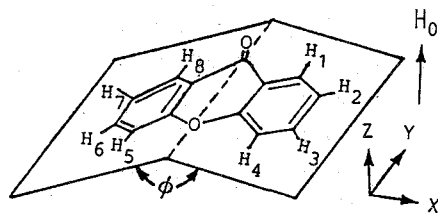


Fig. 1 9H-Xanthen-9-one

むらの けんじ、たかぎ たつや、ふじわら ひであき

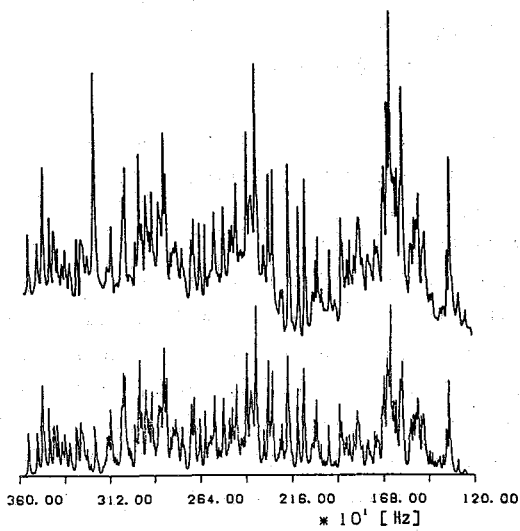


Fig.2 Experimental (upper) and Simulated (lower) ¹H-NMR Spectra

Table 1 NMR Spectral Parameters of 9H-Xanthen-9-one in Nematic Solution of ZLI1167

chemical shift/Hz at 90MHz	
$\nu_1 - \nu_2 = 121.5 \pm 0.3$	D(26) = 38.00 ± 0.15
$\nu_3 - \nu_2 = 35.5 \pm 0.3$	D(27) = 43.84 ± 0.25
$\nu_4 - \nu_2 = 39.1 \pm 0.3$	D(34) = 1603.44 ± 0.08
direct coupling/Hz	
D(12) = 1315.34 ± 0.09	D(35) = 105.14 ± 0.10
D(13) = -27.52 ± 0.23	D(36) = 49.80 ± 0.27
D(14) = -92.94 ± 0.14	D(45) = 375.61 ± 0.23
indirect coupling/Hz ¹⁾	
D(15) = 32.82 ± 0.15	J(12) = 8.0
D(16) = 47.49 ± 0.18	J(13) = 1.8
D(17) = 86.09 ± 0.09	J(14) = 0.5
D(18) = 269.38 ± 0.20	J(23) = 7.1
D(23) = -751.72 ± 0.12	J(24) = 1.1
D(24) = 28.57 ± 0.27	J(34) = 8.7
D(25) = 52.92 ± 0.17	RMS error = 0.65 Hz

ン環のなす二面角を決定した。さらに、ab initio MO計算により、二面角の最尤値及び統計平均値を求め実測値との比較を行った。

実験

9H-Xanthen-9-oneの液晶中の¹H-NMRスペクトルは、液晶溶媒としてZLI1167(ネマティック相、MERCK社製)を用い、日立90MHz NMR装置(R-900M型)にて、試料濃度約0.5重量%(飽和)、温度34.1℃で8192回積算し測定した。スペクトルの補正は、"base line correction"で行った。

¹H-NMRスペクトルの解析

¹H-NMRスペクトルの解析は、プログラムLAO3D9により繰り返し計算をすることにより行った。この分子はCs対称性分子であり、A,A',B,B',C,C',D,D'の8スピン系であるので、解析にあたり独立可変

なパラメータは化学シフトで4個、直接結合定数で16個の計20個である。最終的には、214本のピークを帰属して計算を行った。帰属したピークのずれは、最大で1.6Hz、RMS値では0.65Hzであった。計算スペクトルは、プログラムPIC7を用

Table 2 Structural Parameters and Order Parameters of 9H-Xanthen-9-one

い半値幅 7 Hz で作図した。計算スペクトルと実験スペクトル（低磁場側の半分のみ）を Fig. 2 に、解析結果を Table 1 に示す。得られた D の値よりプログラム SHAPE を用い構造パラメーターと配向

distance ratio	R(3,4)/R(2,3) = 1.006 ± 0.006
R(1,2)/R(2,3) = 1.012 ± 0.010	R(3,5)/R(2,3) = 2.760 ± 0.008
R(1,3)/R(2,3) = 1.738 ± 0.008	R(3,6)/R(2,3) = 3.610 ± 0.015
R(1,4)/R(2,3) = 2.790 ± 0.002	R(4,5)/R(2,3) = 1.830 ± 0.005
R(1,5)/R(2,3) = 2.010 ± 0.002	order parameter
R(1,6)/R(2,3) = 3.225 ± 0.012	S _{xx} = -0.2969 ± 0.0006
R(1,7)/R(2,3) = 2.942 ± 0.016	S _{zz} = 0.1984 ± 0.0010
R(1,8)/R(2,3) = 2.044 ± 0.005	S _{yz} = 0.0015 ± 0.0168
R(2,4)/R(2,3) = 1.742 ± 0.014	dihedral angle
R(2,5)/R(2,3) = 3.141 ± 0.009	φ = 167.9 ± 1.3°
R(2,6)/R(2,3) = 3.805 ± 0.005	RMS error 0.13 Hz
R(2,7)/R(2,3) = 3.733 ± 0.022	R(2,3) = 2.4925A assumed.

パラメーターを決定した。尚、この分子は C_s 対称性分子なので配向パラメーターは、S_{xx} S_{zz}、S_{yz}、の 3 種となる。仮定した H₂ と H₃ の間の距離の値は、半経験的分子軌道法 AM1 により構造最適化した値を用いた。得られたプロトンの座標よりプログラム DIANG を用い二面角の計算を行った。配向パラメーター、構造パラメーター、二面角の結果を Table 2 に示す。

結果と考察

解析結果 から、液晶 ZLI1167 中では 9H-Xanthen-9-one は二つのベンゼンのなす二面角が 167.9° であり X 線結晶解析による値 177.5°²⁾ よりも約 10° 小さい値となった。これは、

Table 3 Total Energy Difference on each Dihedral Angle of 9H-Xanthen-9-one

dihedral angle (degree)	energy difference (kJ/mol)
130.0	54.952
140.0	31.584
150.0	16.615
160.0	7.299
170.0	2.234
180.0	0.000

液晶中では結晶場と違い比較的自由に分子が運動できるためだと考えられる。プロトン間の距離の比から、この分子はカルボニル基側が酸素原子側よりも広がっていることが分かる。また、配向パラメーター S_{xx} が負でその絶対値が最大であることから 9H-Xanthen-9-one の X 軸が外部磁場に対し垂直であり、液晶 ZLI1167 は、外部磁場に対しその長軸が垂直に配向する傾向があるので液晶の長軸方向に平行に配向しやすいことが分かる。

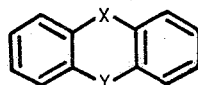
ab initio MO 計算による考察

ab initio MO 計算による 9H-Xanthen-9-one の二面角はまず半経験的分子軌道法 AM

1により構造最適化し、各二面角(10°おき)での最適構造を求め、その構造での全エネルギーをab initio MO法(基底関数STO-3G)で計算した。計算は、東大、阪大及び分子研の計算機センターを使用して行った。結果は、Table 3に示す。尚、ab initio MO計算は、プログラムGSCF3³⁾を用いた。エネルギー曲線の各二面角の間の値はSpline補間により求め、分子の存在確率は、Maxwell-Boltzmann分布に従うとしそのエネルギー曲線から二面角の最尤値及び統計平均値を求めた。この表から分かるように9H-Xanthen-9-oneの液晶中での二面角167.9°は、二面角の最尤値180.0°と一致しないが、二面角の統計平均値173.3°と近い二面角の値を示す。このことから、液晶中での測定値は、分子の二つのベンゼン環の"butterfly motion"の統計平均値を観測していると考えられる。

そこで、同様のab initio MO法によるエネルギー計算から二面角の最尤値が180°である三環性化合物Thioxanthen-9-one, Dibenzo[b,e][1,4]dioxinに関して比較を行った(Table 4)。尚、Thioxanthen-9-oneのab initio MO計算は、プログラムGAUSSIAN82⁴⁾を用いて行った。その結果、これらの化合物は、いずれも液晶NMR法による二面角の値が統計平均値を示すことが分かった。以上のことから、液晶NMR法は、"butterfly motion"を行っている

Table 4 Dihedral Angle of Three Tricyclic Compounds



	9H-Xanthen-9-one	Thioxanthen-9-one	Dibenzodioxin
	X	O	O
	Y	O	O
液晶NMR	167.9±1.3°	166.6±2.0° ⁵⁾	166.0±0.5° ⁶⁾
ab initio (統計平均)	173.3°	169.3°	167.4°
ab initio (最尤値)	180.0°	180.0°	180.0°
気体電子線回折		169.0±1.6°	
X線結晶解析	177.5° ²⁾		172.0°, 175.9°

References

- 1) N. E. Sharpless and R. B. Bradley, *Org. Mag. Res.* **6**, 115 (1974).
- 2) Biswas S C & Sen R K, *Indian J Pure & Appl. Phys.* **20**, 414 (1982).
- 3) N. Kosugi: Program GSCF3, Library Program, The Computer Centre, The University of Tokyo (1985).
- 4) 分子研分子科学プログラムパッケージgaussian82: J. S. Binkley, M. J. Frisch, D. J. Defrees, K. Raghavachari, R. A. Whiteside, H. B. Schlegel and J. A. Pople.
- 5) 村埜、高木、藤原、日本薬学会第109年会(名古屋)講演要旨集IV P171 (1989).
- 6) 広田、藤原、高木、平井、渡辺、佐々木、日本薬学会第107年会(京都)講演要旨集 P149 (1987).

(東工大・工) ○春日 紀子・中浜 精一、(東工大・理) 大橋 裕二
(神奈川大・理) 山口 和夫

Conformational Analysis of Synthetic Carboxylic Ionophore by NMR and X-ray Diffraction Method

Noriko Kasuga[†], Seiichi Nakahama[†], Yuji Ohashi[‡], (Dept. of Polym. Chem.[†], & Dept. of Chem.[‡], Tokyo Inst. of Tech.) Kazuo Yamaguchi (Dept. of Chem., Kanagawa Univ.)

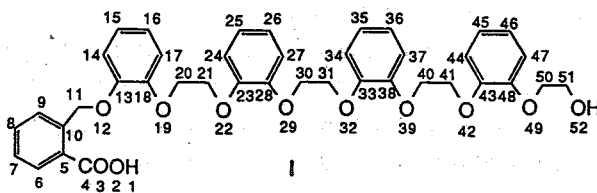
The synthetic ionophore (I) transports potassium ion selectively among alkali metal ions through liquid membrane ($K^+ > Rb^+ > Cs^+ \gg Na^+$). The conformation of the potassium, rubidium and cesium salts in solution are investigated based on ¹H-NMR; coupling constants of 1,2-dioxyethylene protons to predict the rotamer population about HC-CH fragments, chemical shifts which reflect the environments of protons, and NOE of adjacent protons through space. The estimated conformations of the ionophore salts in solution are found to resemble to those in crystals determined by X-ray analysis.

1. はじめに

イオノホアとは生体膜、有機液膜などを通して金属イオンを選択的に輸送する化合物である。その中で天然に見出されたモネシン、ニゲリシン等は末端にカルボキシル基、他末端に水酸基を持つ直鎖ポリエーテルでカルボン酸型イオノホアと呼ばれている。カルボン酸型イオノホアは輸送の際、まず界面でアルカリ金属イオンと塩を作る。次に、カルボキシルレートアニオンが他末端水酸基と head-to-tail 水素結合をし、分子内のエーテル酸素を内側に向けた擬環状構造をとってイオンを取り込み脂溶化する。そのため、イオノホアの空孔の大きさに適合したサイズのイオンが選択的に輸送されると考えられる。

我々は天然カルボン酸型イオノホアに類似した構造を持つモデル化合物を合成し、そのアルカリ金属イオン輸送能を検討してきた。その中で(1)がカリウムイオン選択性を示すことを見いだした($Na^+ : K^+ = 10 : 81$, $K^+ : Rb^+ : Cs^+ = 46 : 33 : 17$)。イオン選択性の発現は、イオノホア錯体のコンホメーションに大きく依存していると考えられる。そのためには溶液中での錯体のコンホメーションについての知見を得ることが望ましい。

そこで本研究では初めに(1)の K、Rb、Cs 塩の結晶中の構造を明らかにし、次いで¹H-NMRの測定を行い、X線の結果と照らし合わせることによって、結晶中での構造と有機溶媒中の構造の比較を行なった。



かすが のりこ、なかはま せいいち、おおはし ゆうじ、やまぐち かずお

2 実験

(1) X線結晶解析: クロロホルム溶液から得た(1)の K, Rb, Cs 塩の単結晶について MoK α 線によりX線強度を測定した。構造を直接法により解いた後、精密化を行なった。

(2) NMR: イオノホア金属塩の¹H-NMRの測定は日本電子 GSX-500 を用い、試料濃度 10-20mM (CDCl₃)、室温で行なった。結合定数は LAOCOON3 を用いて求めた。

3 結果と考察

結晶における(1)の K, Rb, Cs 塩の分子構造を Fig.1 に示す。どのアルカリ金属塩も10個のエーテル酸素が金属に配位し、天然イオノホアと同様に末端の水酸基とカルボキシレートアニオンで head-to-tail 水素結合をしていることがわかった。3つのアルカリ金属塩の O-C-C-O結合のまわりの2面体角はいずれもゴースユ配座をとり、12,39の酸素原子の所で折れ曲がり全体としてボールの縫目のような構造をしている¹⁾。また、いずれのアルカリ金属塩の結晶についても分子間に溶媒分子であるクロロホルムが入り込んでいることがわかった。そのことから、溶液中でも結晶中の分子構造と類似の構造をとっていることが予想される。

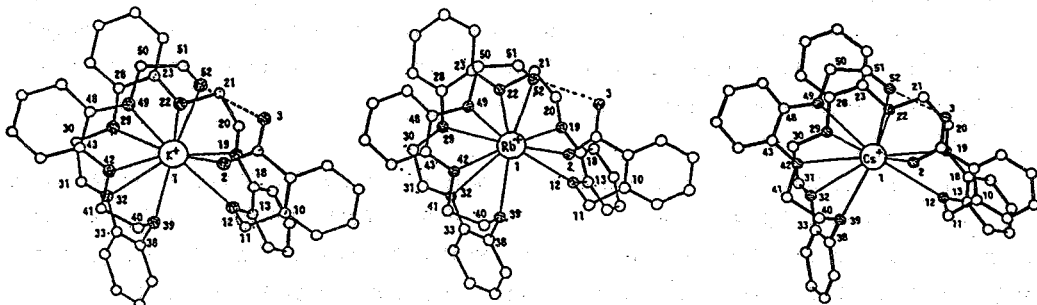


Fig. 1 Molecular structure of I-K, I-Rb, I-Cs

以下、CDCl₃中での¹H-NMRスペクトルを測定し溶液中のコンホメーションについて結晶中の分子構造と比較検討した。(1)及び(1)の K, Rb, Cs 塩の¹H-NMRスペクトルを Fig.2 に示す。イオンフリーのものに比べ金属錯体のスペクトルでは芳香族、脂肪族プロトンとともに複雑に分裂することが観察された。2次元NMRスペクトル COSY-NOESY の組合せにより水酸基末端から順に帰属を行なった。そして、化学シフト、結合定数、NOE を用いて溶液中のコンホメーション解析を行なった。

まず LAOCOON3 を用いて K, Rb 塩のオキシエチレンプロトン間の結合定数を求めた。その結合定数と Karplus 型の式²⁾から得られる J_0 , J_1 ($J_0=2.1$, $J_1=14.0$)を用いて下記の条件でのトランス及び

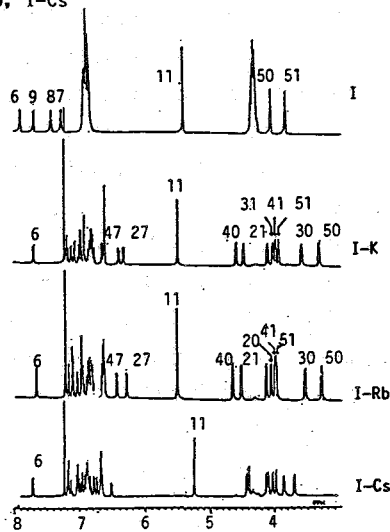


Fig.2 ¹H-NMR spectra of I, I-K, I-Rb, I-Cs

ゴーシュコンホマーの存在確率を求めた。(Table. 1)

$$J_{AB} = f_t \cdot J_t + f_g \cdot J_g + f_a \cdot J_a; \quad J_{A'B'} = f_t \cdot J_{t'} + f_g \cdot J_{g'} + f_a \cdot J_{a'}$$

$$f_t + f_g + f_a = 1, \quad f_g = f_{g'}$$

Table.1 Vicinal Proton Coupling Constants(Hz) and Fraction of the Corresponding Conformers for Potassium^{a)} and Rubidium salt

Proton	J(AB), J(A'B')		J(AB'), J(A'B')		Gaughe(%)		Trans(%)	
	K ⁺	Rb ⁺	K ⁺	Rb ⁺	K ⁺	Rb ⁺	K ⁺	Rb ⁺
20-21	2.5	2.3	6.3	6.2	97	98	3	2
30-31	2.2	2.1	6.3	6.2	99	100	1	0
40-41	2.2	2.2	5.5	5.4	99	99	1	1
50-51	2.9	3.0	5.3	5.3	93	92	7	8

a) For the data of potassium, see ref. 3)

50, 51 の末端の部分についてはトランス配座の割合が若干大きくなっているがいずれもゴーシュ配座が 90% 以上である。X線解析の結果も O-C-C-O 結合まわりの 2 面体角はいずれも 48~71 度とゴーシュ配座をとっており、溶液中の構造と結晶中の構造に類似点が見られた。

(1)に比べ金属塩錯体の ¹H-NMRスペクトルは複雑に分裂していることから、溶液中で特定のコンホメーションが安定であると考えられる。結晶解析により得られた分子構造を溶液中でもとっていると仮定して、プロトンの化学シフトに対する点電荷と環電流の効果を計算した。金属イオンの位置に正電荷を、カルボキシレートアニオンに負電荷をそれぞれ置いて、化学シフトに及ぼす効果を下式により求めた。

$$\delta_E = -12.5 \cdot Q \cdot \cos \theta / R^2 + 17.0 \cdot Q^2 / R^4$$

ここで Q は電荷を、R は電荷とプロトンとの距離を表しており θ はプロトンを中心にして電荷とプロトンの結合している炭素とのなす角度である。また、環電流の遮蔽効果は Bovey-Johnsonの式⁴⁾を用いて計算した。カリウム塩のプロトンのうち誘起効果が等しいオキシエチレンプロトン 20, 21, 30, 31, 40, 41について、この2つの効果による化学シフトのずれを計算した値と実測値の相対関係を Fig.3 に示した。

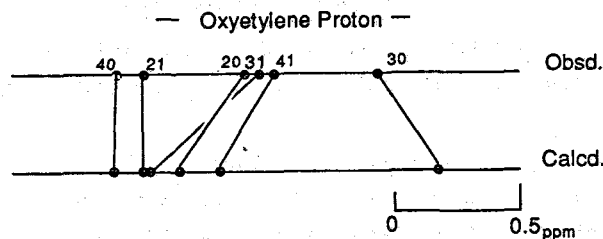


Fig. 3 Relationship between estimated effects on ring current and charge and observed chemical shifts

このように、X線結晶解析から見積られるケミカルシフトのずれと実測値との間に良い相関関係が見られた。芳香族のプロトンについては、ケミカルシフト値が近く計算誤差が大きいため議論することは難しいが、高磁場シフトしている 27 及び低磁場シフトしている 37 のプロトンについては結晶中の分子構造から見積られる環電流の効果と測定値との対応が見られた。このことにより更に結晶中での構造と溶液中の分子構造の類似性が示唆された。

核オーバーハウザー効果(NOE)が観測されるプロトン同士は空間的に近い距離にあり、その強度は距離の⁻⁶乗に比例することが知られている。NOEの強度を測定し、X線解析の結果得られた分子構造の各プロトン間の距離の⁻⁶乗に対してプロットした結果を Fig.4 に示す。

全体に比較的良い相関関係が見られた。特に、小さいながらも結合の離れた 11-40 のプロトンにもNOEが観測されたことから、溶液中でも結晶中の構造と似ていることを示している。

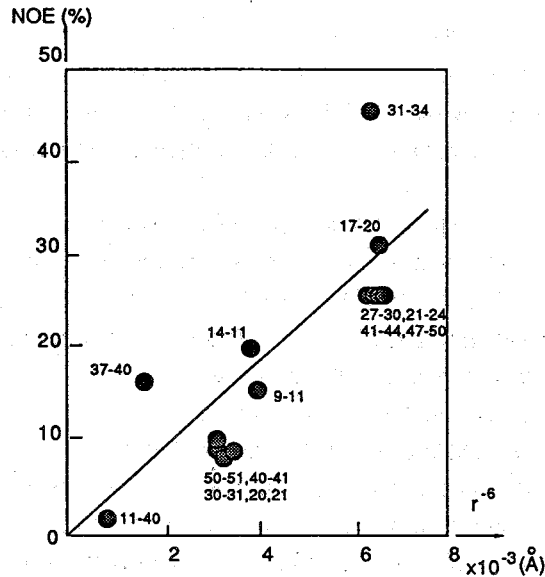


Fig. 4 Relationship between actual atomic distance in crystal and observed NOE(%) in solution

以上 ¹H-NMR 測定による化学シフト、結合定数、NOEの結果から、イオノホア(1)の塩は有機溶媒中でも結晶中の分子構造に類似のコンホメーションをとっている割合が多いと考えられる。

- 1) H. Kuboniwa et al., Chem. Lett., 923, (1988)
- 2) W. J. Colucci et al., Magn. Reson. Chem., 23, 335 (1985)
- 3) H. Kuboniwa et al., Magn. Reson. Chem., 24, 961 (1986)
- 4) F. A. Bovey et al., J. Chem. Phys., 29 1012 (1958)

(北見工大) ○三浦宏一、松田弘喜、福井洋之

 ^{25}Mg NMR Study of Ion Hydration and Solvation

Koichi Miura, Hiroki Matsuda, Hiroyuki Fukui

(Kitami Institute of Technology)

^{25}Mg NMR spectra of $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ were measured in the two kinds of mixed solvents of water-acetone and water-acetonitrile. The line width of the ^{25}Mg resonance in solution at rather low water concentration was broadened considerably. The concentration equilibrium constants for solvation reaction and the line widths of the complexes inherent in hydration number were obtained from analyzing the variation of ^{25}Mg line widths measured for various molar ratios of two solvents. It was found that the dihydrated Mg ion gives a large line width.

<序>

我々はこれまで ^1H 及び ^{17}O NMRを用いて、反磁性金属イオンの水和と溶媒和に関する研究を行ってきた。この中で、特に Mg^{2+} イオンは水と非常に強く結合し、例えば、アセトン溶媒中では、 Mg イオンの濃度に比較して非常に低い濃度の水しか存在しない場合でも、 Mg イオンに水分子が2個以上配位する可能性があることを指摘した。^{1), 2)}これまでの研究では、主として水和や溶媒和に関与する溶媒分子に着目してきたが、今回は金属イオンに着目し、水-アセトン及び水-アセトニトリル混合溶媒中で Mg イオンのNMRスペクトルを測定し、イオンの溶媒和に関する知見を得ることを目的として研究を行った。 ^{35}Cl ($I = 3/2$)や ^{25}Mg ($I = 5/2$)のように、核スピン量子数が1以上の四極子を持った核の緩和は四極子相互作用によって決まり、その緩和速度は核の位置での電場勾配 $e q$ に大きく依存することはよく知られている。その結果、NMRスペクトルの線幅 $\nu_{1/2}$ ($= 1/\pi T_2$)は、核の回りの電荷分布の対称性によって著しく変化することになる。従ってイオンが単独に存在したり、イオンに一種類の溶媒が対称的に配位して、核の回りの電子雲の対称性が良い場合には $e q$ は0に近くなり、そのスペクトルは非常に狭くなる。これに対してイオンペアを形成したり、溶媒和殻分子の一部が他の分子に置き換わったりして、核の回りの電子雲の対称性が崩れると、大きな電場勾配を生じ線幅は広がることになる。Brown等は水-メタノール混合溶媒中に溶かした MgCl_2 の ^{25}Mg NMRを測定し、メタノール中で少量の水が存在した場合、スペクトルの線幅が非常に大きくなることを定性的に示している。³⁾しかし、 ^{25}Mg 核の測定感度の低さから定量的な議論には至っていない。そこで本研究では、 Mg イオンの溶媒和殻形成によるスペクトルの線幅変化を詳細に測定し、溶媒和反応の平衡定数と水和数によって異なる溶媒和殻に固有な線幅を求め、考察してみた。

<実験>

(1) NMR測定用試料

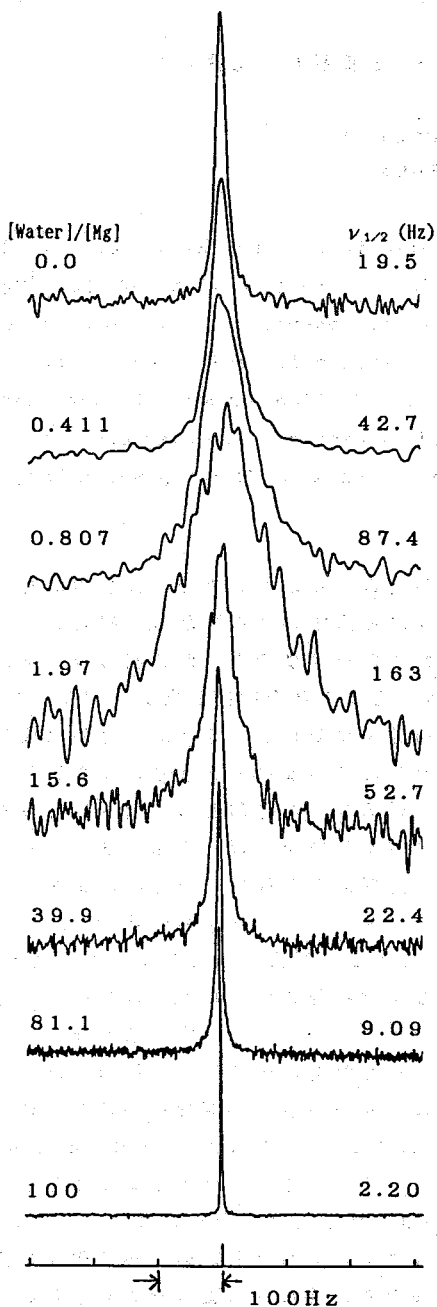


図1 Mg^{2+} -水-アセトン系の ^{25}Mg NMRスペクトル

NMR測定用試料は精製、脱水した過塩素酸マグネシウムを溶媒中に低濃度に溶かした溶液を用いた。溶媒は水-アセトン及び水-アセトンニトリルの混合溶媒を使用した。 Mg イオンとアニオンの相互作用をできるだけ小さくすることを考え、溶液中の Mg イオンと溶媒のモル比は1:100とした。試料はすべて化学天秤を用いて重量を測定することにより調整した。次に述べる考察のために、用いた試料溶液の粘度測定を $22.2^{\circ}C$ に保った恒温水槽中でOstwald粘度計を用いて行った。

(2) NMR測定

NMRスペクトルは、JEOL FX-200 FT-NMRに多核種測定用プローブを装着して室温($22.2 \pm 0.3^{\circ}C$)で測定した。 ^{25}Mg NMRの測定条件は、共鳴周波数 $12.21 MHz$ 、

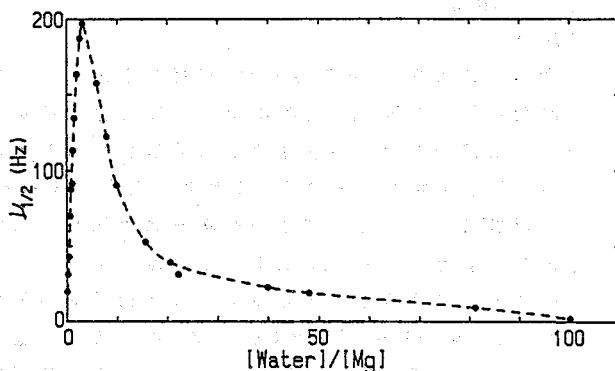


図2 Mg^{2+} -水-アセトン系の ^{25}Mg NMRスペクトルの線幅 $\nu_{1/2}$

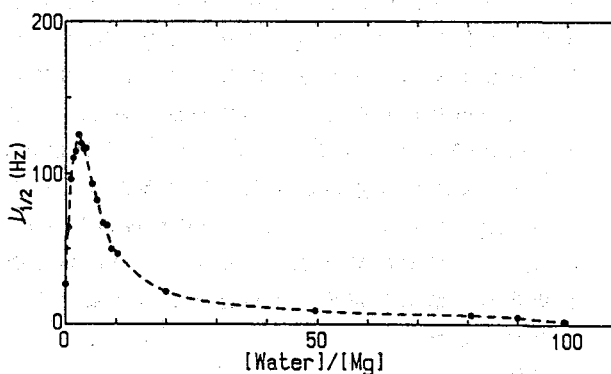


図3 Mg^{2+} -水-アセトンニトリル系の ^{25}Mg NMRスペクトルの線幅 $\nu_{1/2}$

観測幅 1 kHz 及び 2 kHz、
Single 90° Pulse 47.5 μsec、積
算回数 4,000~400,000 回である。
試料管は 10mmφ の標準管を用いた。
< 結果及び考察 >

図 1 は Mg-水-アセトン系の
²⁵Mg スペクトルを、図 2 はこの
系の水濃度に対する ²⁵Mg の線幅
の変化を示している。純アセトン
中で 20 Hz 程度の ²⁵Mg の線幅
は少量の水の存在により 200
Hz まで急激に大きくなる。さら
に水の濃度が増加すると線幅は少
しずつ小さくなってゆき、純水中
では約 2 Hz という非常に narrow
なスペクトルを与えた。この線幅
変化は、純アセトン中で Mg イオ
ンに対称的に配位していたアセト
ン分子が、少量の水の存在下でそ
の一部が水分子と置き換わった対
称性の低い溶媒和殻となり、さら
に水濃度が増すと、水分子のみが
対称的に配位した溶媒和殻構造と
なってゆくことに対応している。

図 3 は、水-アセトニトリル系の
結果であるが、アセトンの場合と
ほぼ同様の変化を示している。我々は水濃度による ²⁵Mg の線幅変化を次のように解析し

た。
スピン量子数 I が 1 以上の電气的四極子を持った核の NMR スペクトルの線幅 $\nu_{1/2}$ は、
次式で与えられる。

$$\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2} = \frac{3\pi}{10h^2} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left(1 + \frac{a^2}{3}\right) (eQ)^2 (eq)^2 \tau_c$$

[T_2 : スピン-スピン緩和時間、I: 核スピン量子数、a: 非対称性パラメータ
eQ: 核四極子モーメント、eq: 核の位置の電場勾配、 τ_c : 回転運動の相関時間]
ここで I と eQ は、核の種類によって固有の値である。今、a は一定と仮定すると上式
は次のようになる。

$$\nu_{1/2} = \text{Constant} \times (eq)^2 \tau_c$$

この式は、線幅が核の位置の電場勾配 eq の 2 乗と回転運動の相関時間 τ_c の積に比例す
ることを示している。本研究では、電場勾配 eq の線幅への寄与を見積もるために、 τ_c
が $\nu_{1/2}$ に与える影響を除くことを考えた。本実験における溶液系が、Stokes-Einstein の

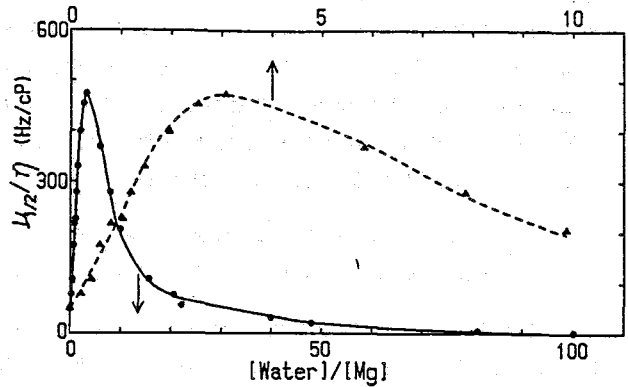


図4 Mg²⁺-水-アセトン系の $\nu_{1/2}/\eta$

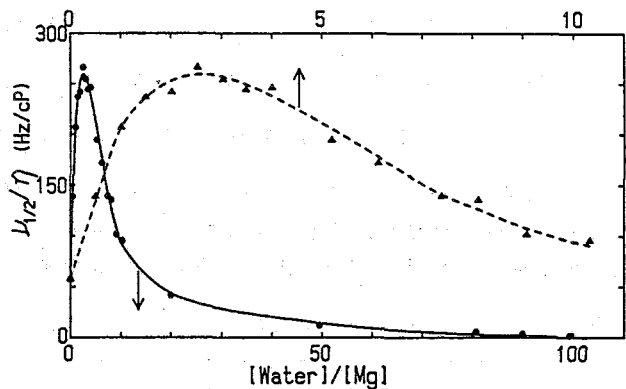
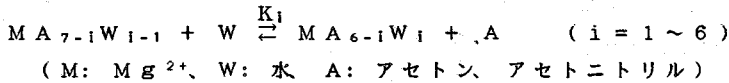
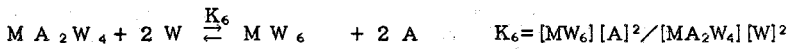
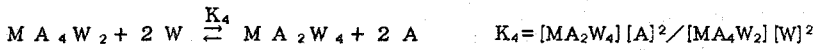
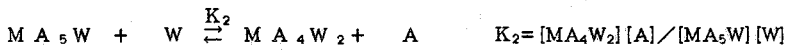
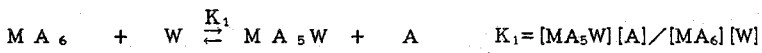


図5 Mg²⁺-水-アセトニトリル系の $\nu_{1/2}/\eta$

関係式に従うと仮定すると、 $\tau_c \propto \eta$ (η : 溶液の粘度) の関係が得られる。そこで線幅 $\nu_{1/2}$ を η で割り、この $\nu_{1/2}/\eta$ が $e q$ のみに依存する量であると仮定した。以下の議論はこの $\nu_{1/2}/\eta$ について行い、この値を便宜上線幅と呼ぶことにする。水濃度に対する $\nu_{1/2}/\eta$ を図4と5に示す。アセトン系、アセトニトリル系とも $[\text{Water}]/[\text{Mg}]$ が2から3の間で最大の線幅を与えていることがわかる。ここで、 Mg^{2+} イオンの溶媒和反応を考えると、一般式は次のようになる。ただし、 Mg^{2+} イオンに対する配位数は6と仮定した。



本研究では、できるだけ少ないパラメーター (K_i : 濃度平衡定数、 ν_i : 水分子が Mg イオンに i 個配位したときの $\nu_{1/2}/\eta$) を用いて実験結果を再現できるようにシミュレーションを試みた。その結果、次の4つの反応を仮定すると実験値 ($\nu_{1/2}/\eta$) をよく再現できることがわかった。



以上の4つの溶媒和反応を用いて解析した結果を表1と2に示す。なお図4と5の実線と点線は得られた ν_i と K_i を用いて描いた計算曲線である。

表1 Mg-水-アセトン系の ν_i と K_i ; 表2 Mg-水-アセトニトリル系の ν_i と K_i

i	ν_i (Hz/cP)	K_i	i	ν_i (Hz/cP)	K_i
0	48		0	57	
1	230	$> 10^5$	1	210	$> 10^5$
2	630	165	2	305	170
4	60	560	4	40	760
6	2.0	2.5	6	1.8	2.5

解析の結果、水分子2個とアセトン分子4個が Mg イオンに溶媒和したとき、 ^{25}Mg は大きな線幅を与えることがわかった。またアセトンのみが6個配位した場合と、水4個とアセトン2個が配位した場合は、その $e q$ への寄与が同程度であることがわかる。さらに6個の溶媒和アセトン分子のうち1個が水と置き換わる反応の平衡定数は非常に大きい。このことは水の ^1H 及び ^{17}O の化学シフトから得られた結果を支持している。水-アセトニトリル系の解析結果も、水-アセトン系の結果と類似の傾向を示している。

<References>

- 1) H. Fukui, K. Miura, T. Ugai, and M. Abe, J. Phys. Chem., **81**, 1205 (1977).
- 2) K. Miura, J. Magne. Reson., **81**, 552 (1989).
- 3) E. B. Brown and R. G. Bryant, J. Inorg. Nucl. Chem., **43**, 3213 (1981).

^{93}Nb NMR Chemical Shifts of Niobium Polynuclear Complexes
with Direct Metal-Metal Bonds

Toshihiro Kamada, Akira Nagasawa*, Tasuku Ito

(Faculty of Science, Tohoku University)

Abstract: The ^{93}Nb NMR chemical shifts of niobium polynuclear cluster complexes with direct metal-metal bonds have been examined. They show clear tendency that the ^{93}Nb shielding decreases (shifts to lower field) with increase in metal-metal bond multiplicity, $\text{Nb}-\text{Nb} > \text{Nb}=\text{Nb} > \text{Nb}\equiv\text{Nb}$. Bond multiplicity increases with decrease in the oxidation states. Similar results have been observed in the ^{93}Mo and ^{183}W shielding of molybdenum and tungsten polynuclear complexes. This tendency is in contrast to the general sequences of the transition metal shielding in mononuclear complexes.

[緒言] 金属核 NMR は近年、測定装置が進歩し研究が一般的に行われるようになり、錯体化学の分野における応用に益々興味もたれている。一般に遷移金属核は NMR 的にみて感度の良いものが多い。さらに化学シフト範囲が広く小さな構造の変化にも敏感であり、緩和時間やカップリング定数も含めて金属中心の電子状態や中心金属-配位子間の結合に関する情報が直接的に得られるという点で NMR は有力な手段となる。これまで遷移金属錯体に関しては、 ^{51}V , ^{59}Co , ^{95}Mo , ^{183}W , ^{195}Pt などの核種の NMR が広汎に研究されてきた。¹⁾ 今回対象としてとりあげた ^{93}Nb 核

は、 ^3H , ^1H , ^{19}F に次ぐ感度のよい核種であり NMR 法を用いる有意性は大きい (表 1)。しかしこれまでの研究例はニオブ 5 価 (d^0 電子配置) および有機ニオブ錯体のごく一部 (1 価, -1 価) のみに限られていた。ニオブを含む前期遷移金属の錯体はさまざまな酸化数を取り、各酸化数に特徴的な多核クラスター構造をもつものが多く、錯体化学的に大変興味深い。特に低酸化状態では d 軌道の重なり合いに基づく金属-金属間直接結合の生成に伴い反磁性化など特異な性質が発現する。一般に酸化状態が低くなるほど金属-金属間結合が強くなり、結果としてその結合距離が次第に短くなることが X 線結晶構造解析から確かめられている。錯体化学における金属核 NMR を用いた研究は従来は主に単核錯体に限られていた。本研究では金属-金属間直接結合をもつニオブ多核錯体を対象として ^{93}Nb NMR を測定し、化学シフトと電子状態、酸化数、金属間結合の強さとの相関関係

表 1. ^{93}Nb 核の性質¹⁾

核スピン	9/2
天然存在比	100%
感度 (^{13}C)	2770
核四極子モーメント	$-0.32 \times 10^{-28} \text{m}^2$
磁気回転比	$6.57 \times 10^7 \text{rad s}^{-1}\text{T}^{-1}$
共鳴周波数 ^{a)}	24.55 MHz
^{a)} ^1H TMS resonance at 100 MHz	

かまだとしひろ・ながさわあきら・いとうたすく

* (埼玉大理: Faculty of Science, Saitama University)

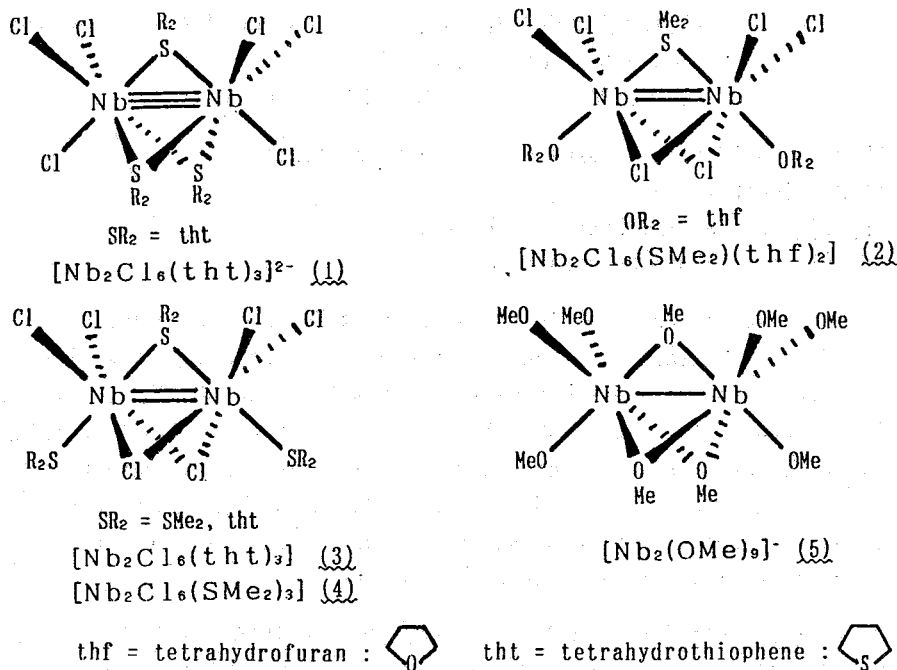


図 1. ニオブ多核錯体の構造

を明らかにすることを目的とした。対象とした錯体の構造を図 1 に示す。今回得られたデータはニオブ 2 価 (d^3)、3 価 (d^2)、4 価 (d^1) の化合物では最初の例である。

[実験] 試料とした錯体は既知の方法に従って合成した。元素分析、紫外可視吸収、IR、 ^1H および ^{13}C NMR から錯体を同定し、溶液中でも固体と同じ構造を保持していることを確かめた。サンプルはアルゴン雰囲気下で調製した。機器は日本電子 JNM-GSX-270 型 FT-NMR 装置を用いた。測定条件は 10mm ϕ 管中、室温 (20-27°C)、観測周波数 66.13MHz、フリップアングル 90° (15.9 μs)、パルス繰り返し時間 0.058s で 10 万 ~ 100 万回積算した。化学シフトは外部標準物質として飽和 $[\text{NbCl}_6]^-/\text{CH}_3\text{CN}$ を用い、非遮蔽方向 (低磁場側) を正として表わした。ロック用に 10-20% 程度の重水素化物を含む溶媒を用いた。

[結果] 得られたスペクトルを図 2 に示した。化学シフト (δ) と半値幅 ($W_{1/2}$) を錯体の中心金属の酸化数、金属原子間結合距離 (Nb-Nb)、および結合次数と共に表 2 にまとめた。

表 2. ^{93}Nb の化学シフト

錯体	酸化数	δ/ppm	$W_{1/2}/\text{Hz}$	溶媒	Nb-Nb/ \AA^a	結合次数
$[\text{Nb}_2\text{Cl}_6(\text{tht})_3]^{2-}$ (1)	II	2117	4450	CH_3CN	2.63	3
$[\text{Nb}_2\text{Cl}_6(\text{SMe}_2)(\text{thf})_2]$ (2)	III	1041	840	CHCl_3	2.68	2
$[\text{Nb}_2\text{Cl}_6(\text{tht})_3]$ (3)	III	-430	710	CHCl_3	(2.70)	2
$[\text{Nb}_2\text{Cl}_6(\text{SMe}_2)_3]$ (4)	III	-443	450	CHCl_3	(2.71)	2
$[\text{Nb}_2(\text{OMe})_9]^-$ (5)	IV	-1010	1880	CH_3OH	2.64	1

^{a)} () 内は同構造の Ta 錯体から推定した。Nb-Nb = Ta-Ta + 0.015 \AA

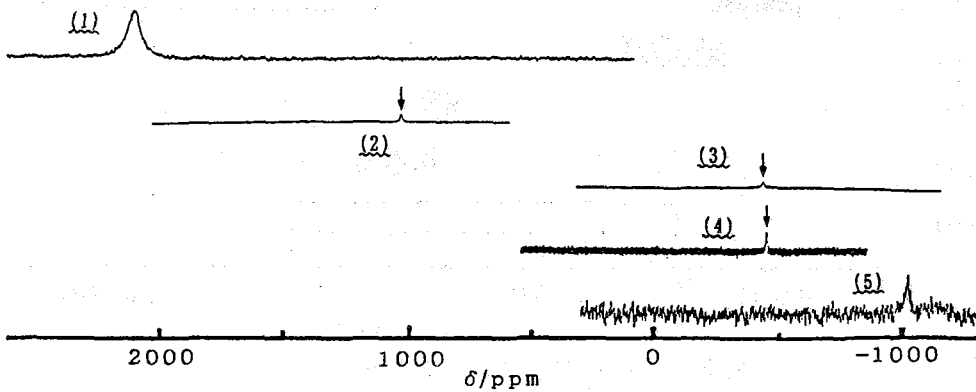


図2. ニオブ多核錯体の ^{93}Nb NMR スペクトル

[考察] (1) ^{93}Nb 核の化学シフトについての従来の知見 既報の ^{93}Nb 核の化学シフトのデータはニオブ5価のものが大部分で-1500~+1000ppm, また1価,-1価の有機ニオブ錯体が-2250~-1300ppmである.¹⁾ 酸化数が低くなると遷移金属の単核錯体に一般的であるように遮蔽方向に移行する傾向がみられる (図3の□).

(2) Nb多核錯体の化学シフト 4価の $[\text{Nb}_2(\text{OMe})_9]^-$ が-1010ppmと最も遮蔽され, 2価の $[\text{Nb}_2\text{Cl}_6(\text{tht})_3]^{2-}$ が2117ppmと最も非遮蔽されている. 化学シフトは3130ppmの広範囲に現われた. ^{93}Nb 核は核四極子モーメントが大きいため, どの錯体も速い四極子緩和により幅の広いシグナルを示した. 化学シフトを比較すると, 中心金属の酸化数が低くなるほど非遮蔽方向 (低磁場側) に移行する (図3の■). これは遷移金属の単核錯体で一般にみられる傾向とは逆である.

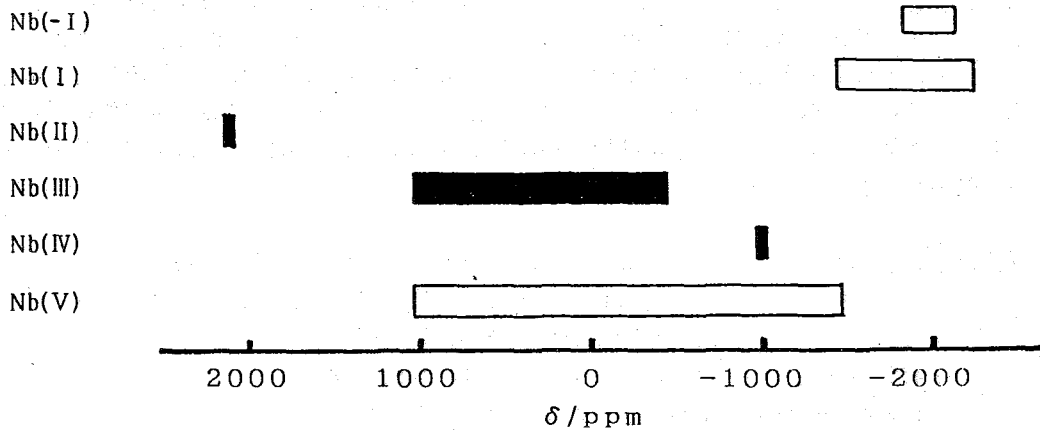


図3. ^{93}Nb NMR の化学シフト

■ M-M 結合あり, □ M-M 結合なし

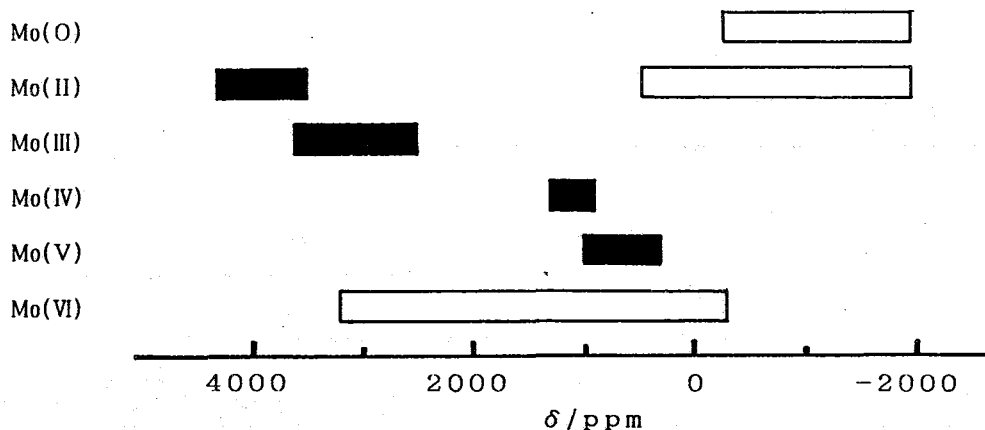


図4. ^{95}Mo NMR の化学シフト

■ M-M 結合あり, □ M-M 結合なし

(3) モリブデンおよびタングステン多核錯体の ^{95}Mo , ^{183}W NMRの化学シフトについての知見 MoおよびWの多核錯体でも $^{95}\text{Mo}^{2-4.6}$, $^{183}\text{W}^{5.6}$ NMRシグナルは今回Nbでみられたように中心金属の酸化数が低くなるほど非遮蔽側に移行することが観測されている。また多核錯体と同じ酸化数の単核錯体のデータも知られているが、多核錯体の方が単核錯体よりもかなり非遮蔽側にシグナルが観測されている(図4)。Masonによれば、金属核化学シフト(δ)に大きい寄与をする常磁性局所磁場の項は、励起エネルギー(ΔE)、原子近傍の電子の偏り(P)、および軌道の広がりを示す項($\langle r^{-3} \rangle$)などの関数であるから、シフトは

$$\delta \propto \langle r^{-3} \rangle \cdot P / \Delta E$$

で表わされる。⁷⁾ 低酸化状態になると、多核錯体では金属間結合の多重性が増すので一般にPがおおきく ΔE が小さくなり、化学シフトは非遮蔽側に移行すると考えられる。

(4) まとめ 今回Nb(5族)で見られたように多核錯体において中心金属の酸化数が低くなるほど金属核は非遮蔽されるという傾向は、MoやWの6族錯体に限られるものではなく、前期遷移金属多核錯体に特徴的なものと思われる。前期遷移金属多核錯体では低酸化数になるほど金属間結合が強くなるため(多重結合性が増す)、中心金属間距離が短くなることが知られている。低酸化数ほど金属核が非遮蔽されるのは、この金属間結合の形成と関連すると考えられる。

[文献] 1) J. Mason (Ed.), "Multinuclear NMR," Plenum Press, New York (1987).

2) S. F. Gheller, et al., J. Am. Chem. Soc., **105**, 1527, (1983).

3) R. A. Grieses, J. Mason, Polyhedron, **5**, 415 (1986).

4) M. Minelli, et al., Coord. Chem. Rev. **68**, 169, (1985).

5) D. J. Santure, et al., Inorg. Chem. **22**, 1877, (1983).

6) A. Nagasawa, Y. Sasaki, B. Wang, S. Ikari, T. Ito, Chem. Lett., **1987**, 1271.

7) J. Mason, Chem. Rev. **87**, 1299, (1987).

High Resolution ⁵¹V NMR Spectra in the Solid State and in Solution.

The Relationship between Structures and Chemical Shifts of Vanadium (I,V) Complexes.

Susumu KITAGAWA, Megumu MUNAKATA and Masanobu UEDA (Kinki University)

⁵¹V NMR studies were carried out for the Vanadium (I,V) complexes both in the solid state and in solution. Various Vanadium (I,V) complexes have been synthesized and isolated as microcrystallines or single crystals. ⁵¹V NMR spectra have been measured for Vanadium (I) complexes [V(NO)L]⁻ (L = triethanolamine and its derivatives) in aqueous solution. The obtained chemical shift (δ) ranges from -67 to +501 ppm. The correlation of the chemical shift with the reciprocal of the d-d transition energy has been found. The great difference in chemical shifts between solution and solid state NMR has been found, which can be ascribed to the difference in the structure between the two states. ⁵¹V solid state NMR spectra of Vanadium (V) complexes were also measured and examined.

【序論】 バナジウムは -III 価から V 価まで幅広い価数をとる金属元素である。⁵¹V NMR 観測可能な価数は -I, I, V である。⁵¹V 核は Table 1 に示すよう相対感度 (¹³C 基準)

Table 1 NMR パラメーター

Nucleus	⁵¹ V	¹³ C
Resonance Freq.(MHz)	71.00	67.94
Natural Aband.(%)	99.76	1.108
Spin(I)	7/2	1
Receptivity*	2150	1
Quadrupole Moment(e $\times 10^{-24}$ cm ²)	-4 $\times 10^{-2}$	-

* relative sensitivity including natural abundance

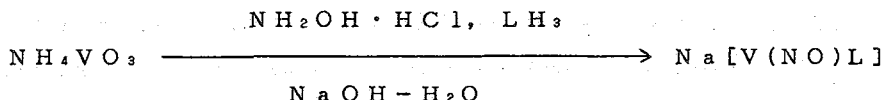
)]⁻ (theaH₃ = trisethanolamine) の、溶液中での平衡、構造変化を ⁵¹V NMR で調べて

きたがわ すすむ・むなかた めぐむ・うえだ まさのぶ

が 2150 で、金属核の中では最も感度の良い核種に属している。ところがこれまでよく研究されているものはほとんど V 価のバナジウム錯体であり¹⁾、化学シフトも 1500 ppm(+500 ~ -800 ppm from VOCl₃) におよぶことがわかっている。一方、低酸化数の I, -I 価についてのデータはきわめて少ない。さらに固体の ⁵¹V NMR については V 価のものでも数例である。演者らは

きた²⁾。本研究では低原子価バナジウム錯体の⁵¹V NMRスペクトルを測定し構造とシフトとの関連を明らかにすること、ならびにバナジウム(V, I価)錯体の固体⁵¹V NMRスペクトルを測定し溶液と固体状態との構造の比較検討を行った。

【実験】 (1)錯体の合成 バナジウム(I)錯体[V(NO)L]⁻(1~5)は次のスキームに従い、アルゴン雰囲気下NaOH水溶液中でNH₄VO₃に等モル量のLH₃(トリエタノールアミン(theaH₃), トリス(2-プロパノール)アミン(thpaH₃), ニトリロ三酢酸(ntaH₃), N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(bhegH₃), N-(2-ヒドロキシエチル)イミノ酢酸(heiaH₃))とNH₂OH·HClを2倍量過剰に加えて合成した。



バナジウム(V)錯体(NH₄)₃[VS₄](6), (NH₄)₃[VO₂(C₂O₄)₂]·2H₂O(7), [VO₂(pic)(HMPT)](8)などは文献にしたがって合成し、IRスペクトルおよび溶液⁵¹V NMRスペクトルなどを用いて同定した。

(2)⁵¹V NMRの測定 溶液および固体の⁵¹V NMRの測定には JEOL JNM-GSX 270 FT-NMRスペクトロメーターおよびNM-G27MU固体ユニットを用いた。観測周波数71.00 MHz, 観測幅160 KHz, 90°パルス幅を溶液で9.2 μs, 固体で13.5 μsとし、23 °Cで測定した。溶液状態ではサンプルチューブはすべて10 mmφのものを使用しバナジウム濃度を20 mMに調製して測定した。また固体状態ではマジック角回転を行ない(回転数は約3.5 KHz)、サンプル管は弾丸型のもので約400 mgの試料量を用いた。⁵¹V NMRの化学シフトの外部基準にはVOCl₃ (neat)を用いた。

【結果および考察】

(a)バナジウム(I)錯体(1~5)の構造

[V(NO)(thea)]⁻(1)については、合成した溶液に過剰のNaIを加えることにより赤色単結晶

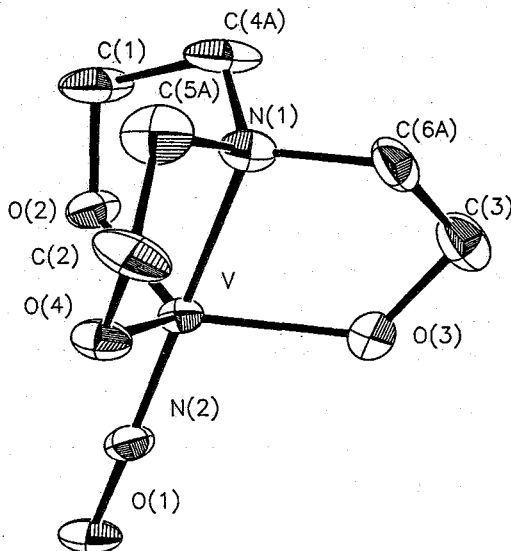


図1 [V(thea)(NO)]⁻の分子構造

Table 2 [V(NO)L]⁻の分光学的データ

complex	δ (⁵¹ V) ($\Delta \nu_{1-2}$)	δ (¹⁴ N)	$\tilde{\lambda}_{\text{max}} \times 10^{-4}$ (cm ⁻¹)
Na[V(NO)(bheg)]	+501 (2200)	+4.26	1.40
Na[V(NO)(thpa)]	+341 (3600)	-	1.96
Na[V(NO)(thea)]	+340 (1800)	+11.96	1.96
Na[V(NO)(nta)]	-67 (1300)	+1.08	2.45
Na[V(NO)(heia)]	-127 (2100)	+2.03	2.44

Na[V(NO)(thea)]·NaI·5H₂Oを得た(収率71.0%)。X線結晶構造解析の結果、錯体の結晶の分子構造は図1に示すようにtrigonal-bipyramidal型構造であった。これはI価系では珍しい構造である。その他の錯体(2~5)についても同様の構造であると考えられる。

(b)バナジウム(I)錯体の⁵¹V NMR化学シフト [V(NO)(thea)]⁻の20 mM水溶液の⁵¹V NMRスペクトルは+340 ppmに半値幅1.8 KHzの単一のシグナルを与えた。その他の錯体(2~5)の⁵¹V NMRシグナルは+501~-127 ppmにあらわれ、半値幅は1.3~3.6 KHzを与えた。錯体(2~5)の構造はNa[V(NO)(thea)](1)と同様、trigonal-bipyramidal型構造でN₂O₂ドナーセットを有していると考えられる。バナジウム(I)イオンはd⁴電子配置をもち、d-d遷移吸収帯を与える。例えば[V(NO)(thea)]⁻の電子スペクトルはλ_{max} = 19600 cm⁻¹(ε = 240 M⁻¹cm⁻¹)であった。

これらの⁵¹V NMRの化学シフト(δ)は配位子場にもとづく電子遷移エネルギー(ΔE)との相関関係があることが考えられる。

Table 2に[V(NO)L]⁻の⁵¹V NMRのδ値、ΔE_{1/2}と¹⁴N NMRのδ値および水溶液の

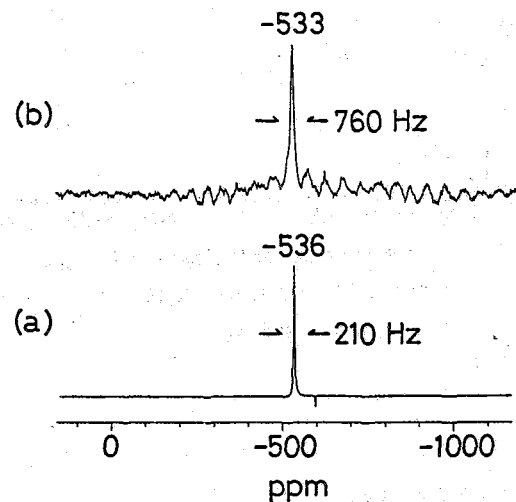


図3 [VO₂(C₂O₄)₂]³⁻の⁵¹V NMRスペクトル (a)固体 (b)20 mM H₂O溶液

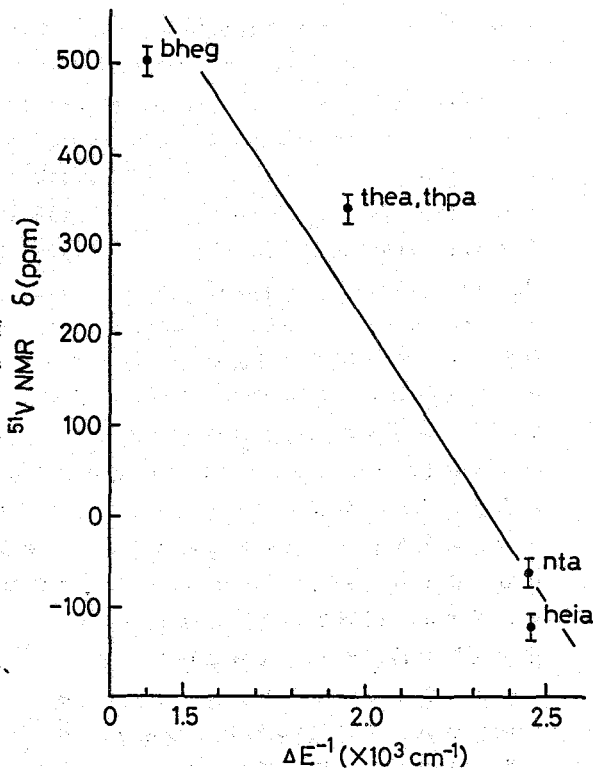


図2 [V(NO)L]⁻の⁵¹V NMR化学シフト(δ)と遷移エネルギー(ΔE⁻¹)との関係

と遷移エネルギー(ΔE)との相関関係があることが考えられる。Table 2に[V(NO)L]⁻の⁵¹V NMRのδ値、ΔE_{1/2}と¹⁴N NMRのδ値および水溶液のλ_{max}をまとめた。ΔE⁻¹(≅ λ_{max})と⁵¹V NMRのδ値とをプロットしたところよい直線関係が得られた(図2)。この結果からこの系列の化学シフトは

σ_{para} = C · ΔE⁻¹ < 1 / r⁻³ >_{3d} C_{V(3d)}²

≅ C' · ΔE⁻¹ (只しC, C'は定数)

により説明することができると考えられる。(c)固体NMR ¹³C核ではCP-MAS法により感度の良いNMRスペクトルが得られる。一方⁵¹V核では、通常バナジウムに最近接プロトン(例えばH₂Oの配位)がないためCP(交差分極)の効果はない。そのためMAS法のみでの測定となる。しかしながら⁵¹V NMRは感度が良いため測定に困難はない。図3に

(NH₄)₃[VO₂(C₂O₄)₂]·2H₂Oの固体と溶液⁵¹V NMRスペクトルを上げた。固体状態では溶

Table 3 パナジウム錯体の⁵¹V NMR化学シフト

complex	soln. δ ppm ($\Delta \nu_{1/2}$ Hz)	solid δ ppm ($\Delta \nu_{1/2}$ Hz)
$(\text{NH}_4)_3[\text{VS}_4]$	+1403 (40)	+1372 (400)
$(\text{NH}_4)_3[\text{VO}_2(\text{C}_2\text{O}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-536 (210)	-533 (760)
$[\text{VO}_2(\text{pic})(\text{HMPT})]$	-525 (300)	-526 (1330)
$\text{Na}[\text{V}(\text{NO})(\text{thea})] \cdot \text{NaI} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	+340 (1800)	-1240 (11000)

液のシグナルに比べて線幅の広いシグナルを与えた。一般にMAS測定の場合、線幅の広がりには化学シフトの異方性、四極子相互作用などによる。本測定では(1, 6~8)の錯体についてはシグナルの広幅化は約10倍であった。この原因は四極子相互作用によるものだと考えられる。Table 3および図4に溶液と固体状態における⁵¹V NMR化学シフト及び線幅をまとめた。溶液と固体との化学シフトが同じときには、溶液状態でも固体での構造がそのまま保たれているものと考えられる。興味深いことに $\text{Na}[\text{V}(\text{NO})(\text{thea})] \cdot \text{NaI} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1)は溶液状態では+340 ppm(1800 Hz)にシグナルが観測され固体状態では-1240 ppm(12000 Hz)にシグナルが観測された。錯体(1)は溶液状態ではバナジウムの価数または構造変化をしているものと考えられる。しかしながら錯体(1)は固体と溶液との電子スペクトルに顕著な変化がないため価数の変化によるものとは考えられない。また錯体(1)はH₂Oの他のどの溶媒にも溶解しない。このことは水溶液中ではH₂Oが配位し、そのためtrigonal-bipyramidからoctahedronの $[\text{V}(\text{NO})(\text{thea})(\text{H}_2\text{O})]^-$ へ構造変化している(下図)ことが示唆される。

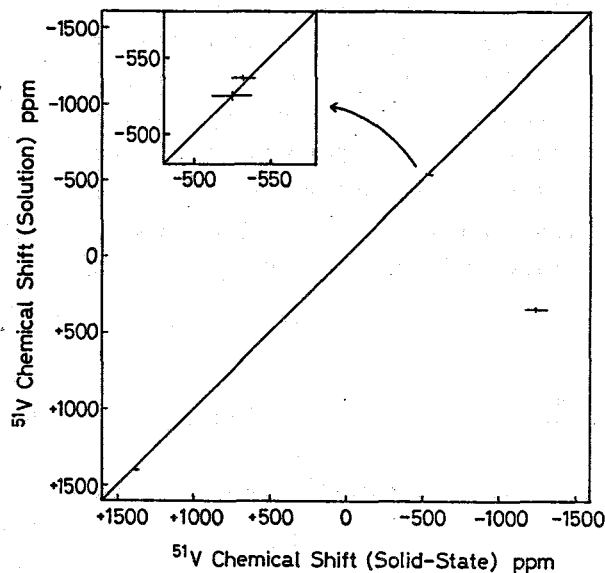
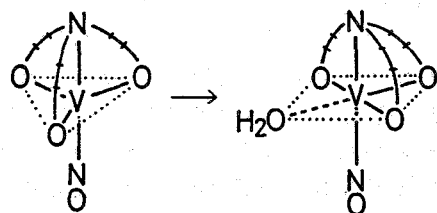


図4 パナジウム錯体の固体と溶液⁵¹V NMR化学シフトの相関関係

参考文献

- 1) D. Rehder, Magn. Res. Rev., 9, 125 (1984).
- 2) S. Kitagawa, M. Munakata, M. Ueda, Inorg. Chim. Acta, 164, 49 (1989).

P26 — P45

(東邦大・薬) ○森井俊夫, 野村太郎

 ^{13}C NMR Spectra of Prenylated Phenols

Toshio Fukai and Taro Nomura

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University)

In the course of our studies on the structure of prenylated phenols, we noticed that the chemical shift of the carbon atom at the C-1 position of the prenyl (3-methyl-2-butenyl) group depended on the substituents located at the adjacent positions. We found out that the prenyl groups could be classified into the six types according to the substituents located at the adjacent positions, and that the chemical shifts of the C1 signals of the prenyl groups were observed in the restricted range specific to each type (Fig. 1).

1. はじめに

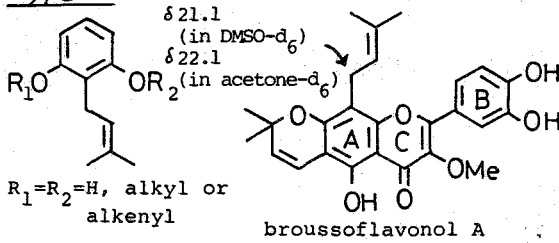
天然からはプレニル(3-methyl-2-butenyl)基を有するフェノール性化合物が多数分離されている。我々らはクワ科植物を中心として薬用に用いられている植物のプレニルフェノール類の研究を行なっており、現在までに100以上の α -プレニルフェノール類を分離し、構造研究を行なってきた。¹⁾ いろいろ α -プレニル基を有するフェノール性化合物の構造決定においてプレニル基の結合位置を決定する為に多くの時間が費やされてきた。 ^{13}C NMRスペクトルはこの問題を解決するには非常に有効な手段であるが、多数の置換基を有する芳香環の場合には、芳香環炭素に置換基化学シフトの加減則を適用するには問題が多い。今回我々らはプレニル基の化学シフトに注目し分類を試みたところ、プレニル基のメチレン炭素の化学シフトがプレニル基の両オルト位の置換基の種類により異なることを見出しFig. 1の様に分類した。²⁾ Fig. 1に示した分類を用いることにより、プレニル基の両オルト位に置換している置換基の種類を推定することが可能となり、これは複雑なプレニルフェノール類の構造決定を行なう際、非常に有用な情報となり得る。この分類を試みている際、broussofflavonol C(1), D(2)の構造に誤りのあることを見出し、構造を訂正した。³⁾ 以下結果について合せ報告する。

2. α -プレニルフェノール類におけるプレニル基のメチレン炭素の化学シフト

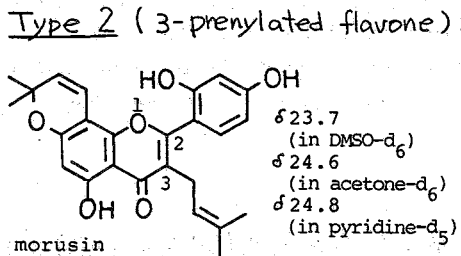
我々らのグループ及び他の研究者により報告されている約200のプレニルフェノール類の ^{13}C NMRスペクトルに加え、若干の化合物の ^{13}C NMRスペクトルを測定し、整理したところ、プレニル基のメチレン炭素の化学シフトはプレニル基のオルト位の置換基の種類(水素原子, 酸素官能基, 炭素官能基など)により、異なる値を示すことが明らかとなった。そこで両オルト位の置換基の種類により次の6 type に分類した(Fig. 1参照)。

ふかいとしお, のむらたろう

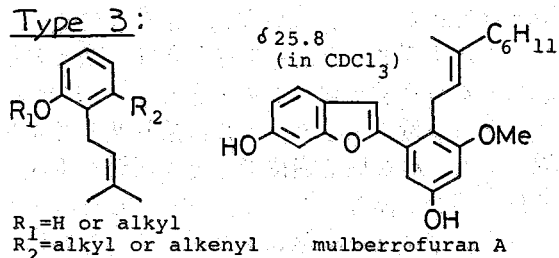
Type 1: プレニル基の両オルト位に酸素官能基が存在する場合、プレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 20.7-24.0に観測される。天然からはこのtypeに属する化合物が一番多く分離されている。プレニル基が置換している芳香環にカルボニル基が置換している場合(フラボンのA環など)、プレニル基のメチレン炭素のシグナルは $CDCl_3$ 中又はDMSO- d_6 中 δ 20.7-22.8に観測される。芳香環にカルボニル基が置換していない場合(フラボンのB環など)、これらメチレン炭素のシグナルは $CDCl_3$ 中又はDMSO- d_6 中 δ 21.6-23.4に観測される。



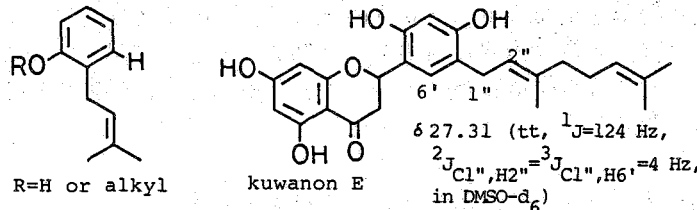
Type 2 (3-prenylated flavone): 3位にプレニル基の存在するフラボン誘導体は現在までクワ科植物からのみ得られており種々の生理活性を有することが知られている。この化合物の3位のプレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 23.5-24.9に観測される。Type 2は一部type 1とtype 3に重なるが、3位にプレニル基を有するフラボン誘導体は特徴的なUV及び 1H NMRスペクトルを示す為、このスペクトルにより同定は容易である。プレニル基のオルト位に酸素官能基、他のオルト位にアルキル基かアルケニル基が置換している場合、プレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 24.8-27.0に観測される。



Type 3: プレニル基のオルト位に酸素官能基、他のオルト位にアルキル基かアルケニル基が置換している場合、プレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 24.8-27.0に観測される。

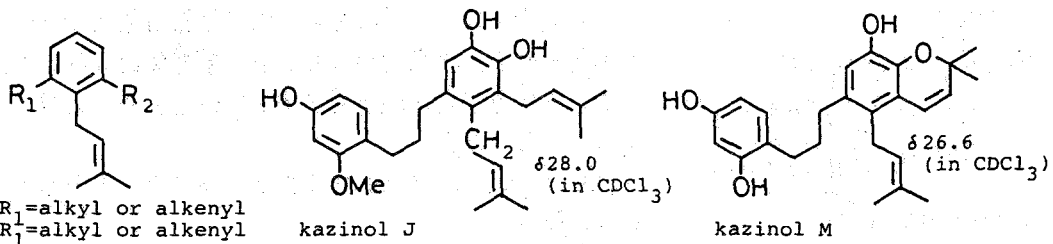


Type 4: プレニル基のオルト位が水素原子で他のオルト位に酸素官能基が置換している場合、プレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 27.2-30.1に観測される。この場合メチレン炭素のシグナルはアレニル基のオレフィンプロトン及びアレニル基のオルト位の



のプロトンとの間の long-range coupling の為、triplets of triplet のシグナルとして観測される。

Type 5: プレニル基の両オルト位が共にアルキル基かアルケニル基、又はオルト位がアルキル基とアルケニル基の場合、通常プレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 27.2-28.8に観測される。一斉、1,3-ジフェニルプロパン及びフラバン誘導体において、プレ



ニル基のオルト位がアルキル基で他のオルト位がピラン環を形成している場合 (Kazinol M など) プレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 26.5-26.8 に観測される。Type 5 に属する化合物のメチレン炭素の化学シフトは type 4 と重なるが、type 5 に属する化合物のメチレン炭素のシグナルは doublets of triplet ($^1J = ca. 126$ Hz, $^2J = ca. 4$ Hz) のシグナルとして観測されることから type 4 との区別は可能である。

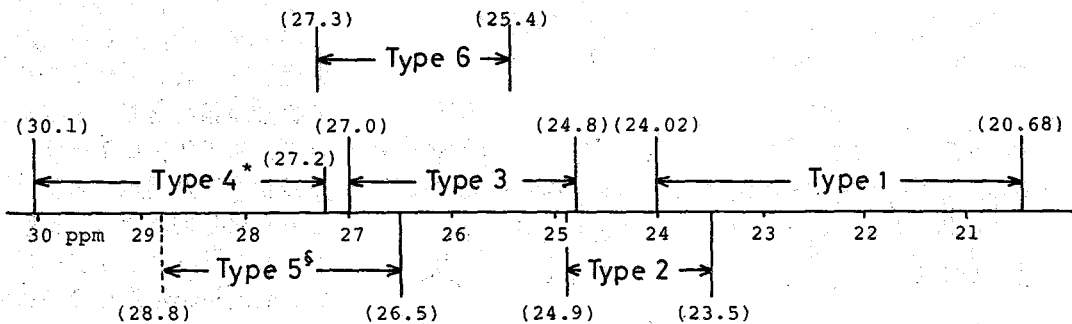


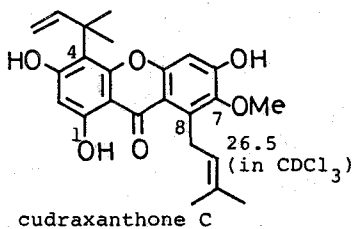
Fig. 1 Chemical Shifts of Methylene Carbons of Prenyl Groups (data from 117 references)

The chemical shifts were measured in $CDCl_3$, $DMSO-d_6$, $acetone-d_6$, $pyridine-d_5$, $CDCl_3$, $dioxane-d_6$, $acetonitrile-d_3$, or $benzene-d_6$. The following chemical shifts (δ) were observed in each solvent: in $CDCl_3$, type 1: 20.8-23.37 (31 compounds), type 2: 24.41-24.61 (3), type 3: 24.8-26.72 (16), type 4: 27.4-30.1 (17), type 5: 26.5-28.6 (16), type 6: 25.6-26.5 (7), in $DMSO-d_6$; type 1: 20.68-23.2 (62), type 2: 23.5-24.1 (13), type 3: 25.0 (1), type 4: 27.2-29.07 (10), type 6: 27.2 (1), in $acetone-d_6$; type 1: 21.4-24.02 (39), type 2: 24.4-24.61 (6), type 3: 25.1-27.0 (6), type 4: 28.1-29.1 (8), type 5: 28.1 (1), type 6: 25.4-27.3 (5), in $pyridine-d_5$; type 1: 22.2-22.5 (5), type 2: 24.3-24.9 (4), type 4: 29.0 (1), in CD_3OD ; type 1: 21.60-23.57 (4), type 2: 24.71 (1), type 3: 26.8 (2), type 4: 28.27-29.12 (3), in $dioxane-d_6$; type 3: 26.3-26.4 (3), type 5: 28.8 (1), type 6: 26.3 (1), $acetonitrile-d_3$; type 1: 21.32-22.00 (3), type 2: 24.51-24.55 (2), in $benzene-d_6$; type 1: 23.3 (1).

*: The group could be distinguished from the type 5 by nondecoupling spectrum because the long-range coupling between the methylene carbon and an aromatic proton was observed only in type 4 (observed as triplets of triplet or double doublets of triplet).

§: Generally, the group shows δ 27.2-28.8, but in the case of the prenyl group adjacent to pyrene ring in 1,3-diphenylpropane and flavane, the chemical shifts were observed in the range of δ 26.5-26.8. The data of brousoflavonols C (1) and D (2) ($R_1=R_2=alkenyl$) are not included.

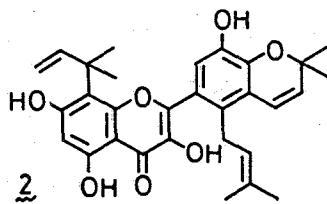
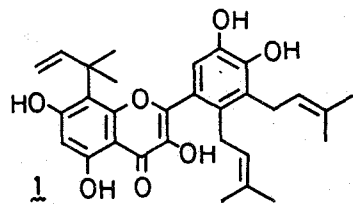
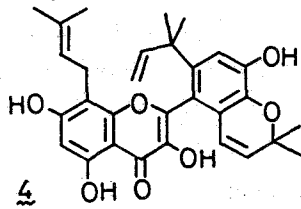
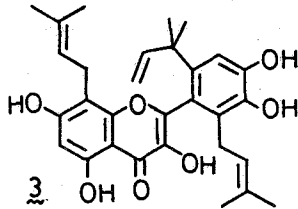
Type 6 [2-oxygenated 1-prenylated xanthone (7-oxygenated 8-prenylated xanthone)]: プレニル基のオルト位に酸素官能基, 他のオルト位にカルボニル基が存在する場合, プレニル基のメチレン炭素のシグナルは δ 25.4-27.3 に観測される。この type 6 は type 3 と同様, オルト位に酸素官能基と炭素官能基を有するが, 天然から得



られているアレン基のオルト位に酸素官能基とカルボニル基を有する化合物はキサントン誘導体のみなので、ここでは構造決定の際の便を考えtype 3からは分け、type 6とした。

以上のtype 1~6の化学シフトを図示するとFig. 1のようになる。

3. Brousoflavonol C (1) 及び D (2) の構造



Brousoflavonol C 及び D はカジノキ (*Broussonetia papyrifera*) より分離されたフラボノール誘導体である。この化合物は不安定な為、構造決定において化学的方法、X線結晶構造解析の手段がとれず、スペクトルデータより3及び4式が提出された。⁴⁾ この化合物のアレン基のメチレン炭素のシグナルはbrousoflavonol Cでは $\delta 26.2$

及び 29.2 (in $CDCl_3$) に観測され、⁴⁾ Fig. 1 に当てはめるとそれぞれtype 3かtype 6及びtype 4かtype 5のアレン基であることが示され、brousoflavonol Dでは $\delta 28.0$ (in $CDCl_3$) に観測され⁴⁾ type 4かtype 5のアレン基であることが示されることから、それぞれ3式及び4式ではないことが明らかとなった。これまで得られている種々のデータ⁴⁾ を合せ考えることによりbrousoflavonol CとDはそれぞれ1式と2式であることが示された。この構造はLSPDの実験を行ない確認した。³⁾ 以上述べたアレン基のメチレン炭素のシグナルの化学シフトによる分類 (Fig. 1) は複雑なアレンフェニール類の構造決定に有用な知見を与えるものとする。

References and Note

1. T. Nomura, "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products," Vol. 53, eds. W. Herz et al., Springer, Wien, 1988, pp. 87-201 and references cited therein.
2. Furukawaらはactidone alkaloidにおいて、アレン基の両オルト位が酸素官能基である場合、アレン基のメチレン炭素のシグナルは $\delta 21.1-22.5$ に、オルト位がN-CH₃基と酸素官能基である場合 $\delta 26.0-27.1$ に観測されることを報告している (H. Furukawa, M. Yogo, and T.-S. Wu, Chem. Pharm. Bull., 31, 3084 (1983)).
3. T. Fukai and T. Nomura, Heterocycles, submitted.
4. T. Fukai, J. Ikuta, and T. Nomura, Chem. Pharm. Bull., 34, 1987 (1986).

(三菱油化・筑波総合研究所) ○村田美恵、森輝雄、酒井総夫

Conformation analysis of aliphatic polycyclic isomers with the combination of two-dimensional NMR and Europium shift reagents.

(Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd. Tsukuba Research Center)

Mie Murata, Teruo Mori, Toshio Sakai

It is difficult to analyze ^1H - or ^{13}C -NMR spectra of aliphatic polycyclic compounds, because multiplet signals of proton overlap each other complicatedly. It is known that tricyclo-decenealdehyde(2) is synthesized as the approximate 1:1 mixture of two isomers, which is identified as the mixture of tricyclo-[5,2,1,0^{2,6}]-3-decene-8-carboaldehyde(3a) and its 9-carbo-aldehyde isomer(4a). In this work we assigned ^1H -NMR signals of two isomers completely, and confirmed the configurations of the two components with combination of 2-D NMR and Europium shift reagents. As far as we know, this is the first report of the combined use of 2-D NMR and shift reagents for aliphatic polycyclic compounds.

1. 序論

近年のNMR装置の分解能向上と2次元法の発達にもかかわらず、多脂環系化合物はピークが複雑に重なり合うため解析が困難なものが多い。トリシクロデカジエン1のCO/H₂加圧反応で得られるトリシクロデセンアルデヒド2もそのひとつである。2には8種の異性体が考えられるが、花王(株)の稲本らは2が8-及び9-エキソ-ホルミ体(3a及び4a)の44:56の混合物であると推定した¹⁾。しかし、どちらが3aか明示されていない。本研究ではシフト試薬でピークを完全分離し、2次元法により完全な帰属と解析を行ない、2が3a:4a=53:47の混合物であることを確定した。

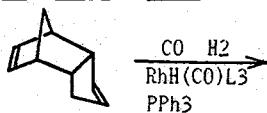


図1. トリシクロデセンアルデヒド2の合成反応

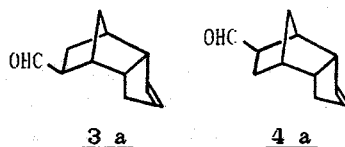


図2. 2を構成する異性体

2. 実験

トリシクロデセンアルデヒド2は文献¹⁾に従い、トリシクロデカジエン1をCO/H₂加圧反応により合成したものをを用いた。2の10⁻⁴ mol溶液にシフト試薬としてEu(fod)₃を0~1当量添加し、シフト試薬が完全に配位するまで放置したものをNMR測定試料とした。シフト値はTMS基準である。NMR測定には日本電子製JNM-GSX400を用いた。

3. 結果

3-1. シフト試薬によるピーク分割

トリシクロデセンアルデヒド 2 は 2 主要成分 (X, Y) から成っていた。シフト試薬の添加量を 0~1 当量まで数段階に変化させた試料を用いて H-HCOSY 測定を行なった。その結果から表 1 に示した 26 種プロトンの (X), (Y) への区別およびシフト試薬の添加量増加に伴う化学シフトの変化量を求めた (図 3)。さらに図 3 からピーク分割に良い添加量の値を数ヶ所選び、H-HCOSY, C-H COSY, NOESY スペクトルを測定した。

3-2. ホルミル基の置換決定

ホルミル基の結合がノルボルニル骨格かシクロペンチル骨格かにより、その二重結合隣接炭素はそれぞれメチレン・メチン炭素とメチン炭素 2 個になる。

表 1 に示した sp^2 炭素に結合するプロトン L, M (L', M') と H-HCOSY スペクトルで強い相関が認められたプロトン C, G, H (C', G', H') が結合する炭素を C-HCOSY 測定より求めた。その結果、プロトン G, H (G', H') がメチレンプロトンであり、化合物 (X), (Y) 共にホルミル基はノルボルニル骨格に結合していることが判明した (図 4)。

3-3. ホルミル基の置換位置決定

ホルミル基と同じ炭素に結合するプロトンを H-HCOSY スペクトルから求めた。(X) においてはプロトン A がそれに対応することがわかり、これはシフト試薬添加量の増加に伴う化学シフト変化量が最大であることに矛盾がない。(Y) においては COSY スペクトルからそのプロトンは認められなかったが図 3 に示した化学シフトの変化量からプロトン A' がそ



化合物	スペクトル	sp ³ 炭素に結合するプロトン											
		sp ² 炭素に結合するプロトン											
X		L M	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Y		L' M'	A'	B'	C'	D'	E'	F'	G'	H'	I'	J'	K'

表 1. 各プロトンの命名

(注) sp^2 炭素に結合するプロトンがより高磁場中存在する化合物を (X) とした。

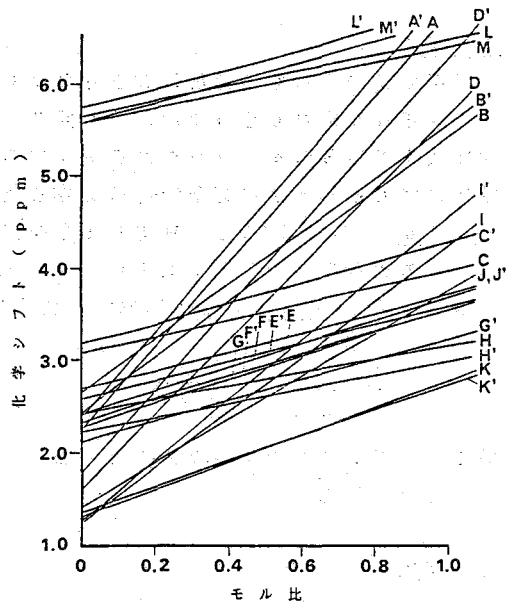


図 3. 各プロトンの化学シフトの $Eu(fod)_3$ 試料比増加に伴う変化

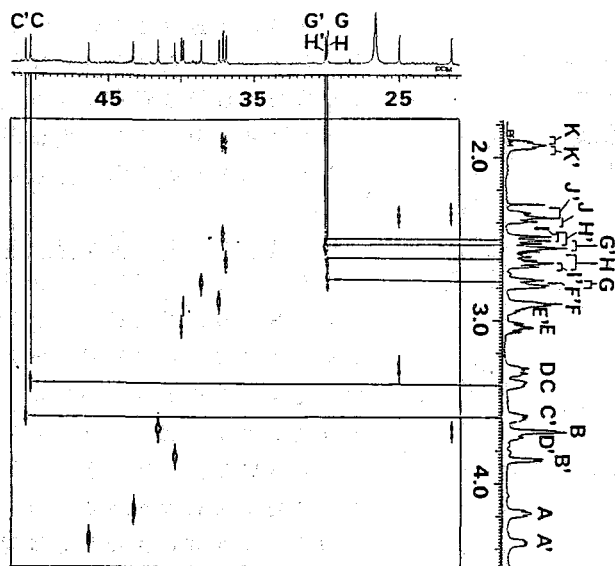


図4. 2のC-H COSYスペクトル

プロトン	相関のあるプロトン
A	D J K
B	E I K M
C	E F L M H
D	J A F
E	B C G H
F	C D I K
G	H E M L
H	G E M L C
I	K B F L
J	D A K
K	I B F A J
L	M C G H I
M	L G H C B

表2. 化合物(X)の各プロトン間の相関

プロトン	相関のあるプロトン
A'	D' J' K'
B'	C' I' K' M'
C'	B' E' L' M' H'
D'	J' A' F'
E'	C' F' G' H'
F'	D' E' I' K'
G'	H' E' M' L'
H'	G' E' M' L' C'
I'	K' B' F' L'
J'	D' A' K'
K'	I' B' F' A' J'
L'	M' C' G' H' I'
M'	L' G' H' C' B'

表3. 化合物(Y)の各プロトン間の相関

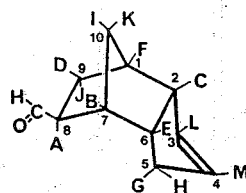


図5. 化合物(X)の構造

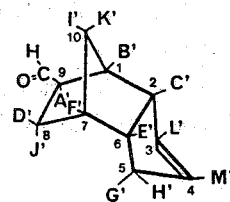


図6. 化合物(Y)の構造

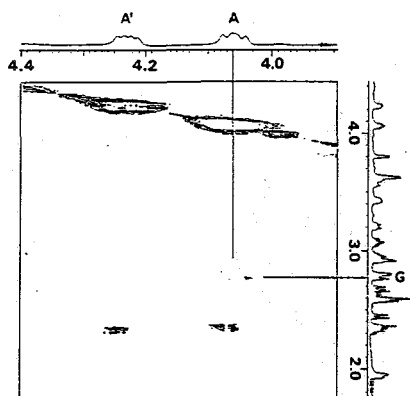


図7. 2のNOESYスペクトル

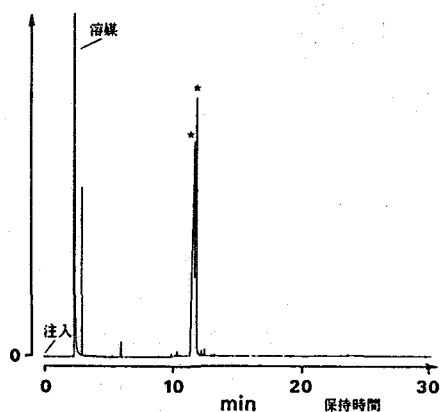


図8. 2のガスクロマトグラム

うであると予想できる。 sp^2 炭素に結合するプロトンとプロトンA (A')は骨格構造からおのずとその結合位置は固定される。以上から表2, 3に示した各々のプロトンの相関関係から化合物(X), (Y)の構造を3 a, 4 aと決定した。

3-4. エンド, エキソ配置の決定

化合物(X), (Y)のプロトンA, A'がプロトンB, B'とスピン結合していないことからホルミル基はエキソ配置と考えられる。NOESY測定の結果、プロトンAがプロトンGとNOEが認められたことから確かに(X)は3 aの構造を持っていた(図7)。プロトンA'はNOEを示すプロトンが認められなかった。しかし(X)と(Y)ではホルミル基の付加反応は同じくエキソ配置で起こり易いと考えられるので(Y)も構造4 aを持っていると思われる。

3-5. 生成比の決定

トリシクロデセンアルデヒド2は3 aと4 aの混合物であることが明らかになり、NMRスペクトル上で3 aのピーク強度は4 aよりわずかに強かった。このことと2のガスクロマトグラフィ分析の結果から2は3 aと4 aの53:47の混合物であることを確定した(図8)。

4. まとめ

シフト試薬はNMRピーク分離の有力な手段でありこれまで多数の報告があるが、2次元法を組み合わせる多脂環系化合物の解析をした例は見られない。

本報告では、2次元法とシフト試薬の併用により、ピーク重なり複雑なほほ等含量の混合物の完全解析を可能にした。

文献

- 1) 日本公開特許公報: 特開昭52-68168

Galactosylceramideの糖 anomeric protonにおける virtual long-range couplingの性質

石塚 稲夫, 田中(飯田)直子, 永井 謙一 · 帝京大学医学部第二生化学

The line shape of the anomeric proton signal from galactosylceramide (Gal β →Cer) containing 2-hydroxy fatty acids varied depending on the temperature and the concentration of [^2H] $_2\text{O}$ in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$. The significant values of the long-range coupling constant, $^4J_{1,3}$ and $^5J_{1,4}$, were obtained from 2D-COSY spectra and decoupling analyses of the H-4 proton. We concluded that $^4J_{1,3}$ and $^5J_{1,4}$ are important for the calculation of the H-1 signals.

糖残基の ring protonの $^1\text{H-NMR}$ において, H-2 protonとH-3 protonの化学シフトが近いことによって(結合定数($^3J_{2,3}$)/化学シフト(Hz)の差($\nu_2 - \nu_3$, $\delta \nu_{2,3}$)が1程度以上のとき), H-1 protonのシグナルの形が複雑化することはよく知られた現象であり¹⁾, コンピュータを用いたスペクトルのシミュレーションなどによっても, 化学シフトと結合定数の様々な値に対するH-1シグナルの形の変化が研究されている²⁾.

本研究室ではこれまで複雑な糖鎖構造をもつ糖脂質の構造解析を目的として, 糖脂質の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの解析をおこなってきた. 今回, 中性糖脂質 galactosylceramide (Gal Cer)のうち2-hydroxy脂肪酸を含むもの(図1)について, galactosyl残基のH-1シグナルが, この影響を受けていることに気づき, その性質についていくつかの知見を得たので報告する.

[$^1\text{H-NMR}$ 測定] 試料 約2 μmol を五酸化リン上, 真空ポンプで乾燥し, 0.5mlの $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ / $[\text{H}_2\text{O}]_2$ ($[\text{H}_2\text{O}]_2$ 濃度を2.6%と段階的に変化させた)に溶解して測定した. 測定は日本電子GX-400に, チューナブルプローブTH5を用いて行なった. 1次元スペクトルは観測周波数範囲4000Hz, データポイント数65K. 二次元COSYは500Hz, 2048x1024ポイントで測定した.

[結果と考察] $\delta \nu_{2,3}$ は温度および溶媒中の $[\text{H}_2\text{O}]_2$ 濃度に依存して変化し, それにともなってH-1シグナルの形も変化した. 2D-COSYスペクトルにおいて(図2), H-1/H-3およびH-1/H-4のcross peakが観察された. また, H-4 protonをデカップリングすることにより, H-1シグナルの形が変化することが確認された(図3). これらの結果は, H-1とH-3およびH-1とH-4が無視しがたい大きさの結合定数をもってスピン結合していることを示しており, H-1シグナルのシミュレーションをおこなうさいにlong-range coupling constant ($J_{1,3}$, $J_{1,4}$)を考慮にいれる必要性を示唆している.

いしづかいねお, たなか(いいだ)なおこ, ながいけんいち

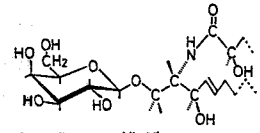
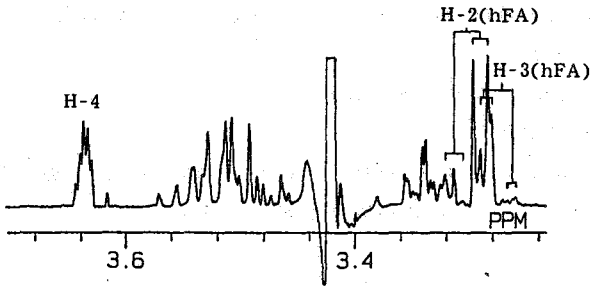


図1 GalCerの構造

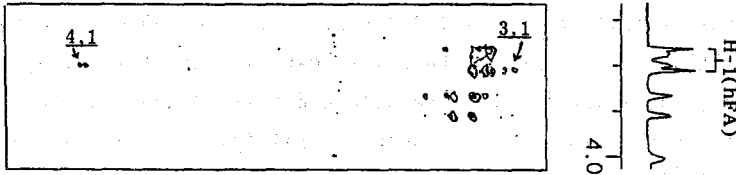


図2 2D-COSY spectrum

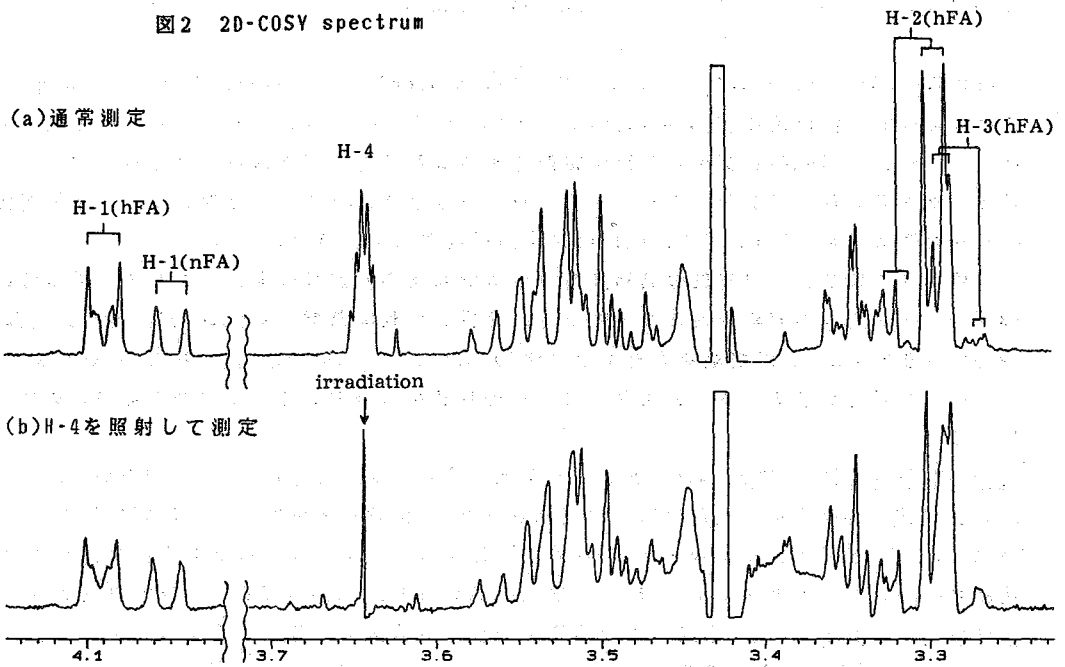


図3 ヒト脳より精製したGalCerの¹H-NMRスペクトル (6% [D₂O], 45°C)

hFA:GalCer containing 2-hydroxy fatty acids, nFA:GalCer containing non hydroxy fatty acids

[文献] 1)Brisson, J.-R. and Carver, J. P. (1982) J. Biol. Chem., 257, 11207-11209
 2)Dahmén, J., Frejd, T., Grönberg, G., Magnusson, G. and Noori, G. (1984) Carbohydr. Res., 125, 161-164

いしづかいねお, たなか(いいだ)なおこ, ながいけんいち

(京大薬、丸石製薬中研^a) ○黒田義弘、田嶋敏男^a、今井雅裕^a、八木茂政、中川照眞

Structural Studies of Glutaraldehyde Oligomers Used as New Cross-Linking Agent of Enzymes by NMR

Yoshihiro Kuroda, Toshio Tashima^a, Masahiro Imai^a, Shigemasa Yagi and Terumichi Nakagawa (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University and ^aCentral Research of Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd.)

The structure of glutaraldehyde(GA) oligomer which is useful as a cross-linking agent of enzymes has been studied by ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopies. Detailed examination of two-dimensional COSY, HOHAHA, HMBC, and NOESY spectra has revealed that the GA oligomer is a dimer formed by aldol condensation reaction of GA monomer and that the structure is (1). The dimer of GA was found to exist as a 1:1 equilibrium mixture of two isomers in CDCl₃ solution undergoing the isomerization at such a speed that can produce exchange cross-peaks in the NOESY spectra.

1. はじめに

グルタルアルデヒド(GA)は、蛋白質との反応がおだやかな架橋剤として、生体物質の固定化に利用されているが、その架橋化反応機構等における化学については、いまだに不明な点が多く、固定化の再現性に問題が残されている。通常、担体に酵素を固定化する際のGAの架橋剤としての機能は、担体及び酵素の各アミノ基とGAのアルデヒド基との間での Schiff 塩基形成によるものであると考えられている。ところが近年、塩基性条件下でGAのアルドール縮合により生成した α, β -不飽和アルデヒド基を有するGAオリゴマーを架橋剤とした場合、GAを用いた場合と比べて高い活性を持つ固定化酵素の調製が可能であることがわかってきた。^{1, 2)}今回は、このようなGAオリゴマー中の主成分と思われる化合物の構造について、二次元NMR法(COSY, NOESY, C-H COSY, HOHAHA, HMBC等)を中心として検討を行った。

2. 実験方法

従来の方法^{1, 2)}により得たGAオリゴマーを水系のサイズ排除クロマトグラフィーによりさらに精製処理して、目的とするGAオリゴマー(以下化合物Pと略す)を分取した。分離条件は以下の通りである。カラム、Ultrasphere 500(300mm X 7.8mm ϕ , 排除限界 MW 4 X 10⁶) ; 流速、1.0ml/min ; 移動相、1W/V% NaCl水溶液 ; カラム温度、60 $^{\circ}$ C。得られた化合物の純度は、逆相系HPLC²⁾等により確認した。分取した試料における炭素、水素及び酸素の含有率を求めると共に電子衝撃イオン化法あるいはイソブタンを反応ガスとした化学イオン化法による質量分析を行い、化合物Pの元素組成及び質量数を求めた。IRスペクトルは、化合物PをCCl₄に溶解して測定した。また、NMRスペクトルは試料をCDCl₃溶液とし(約2mM)、Bruker AM-600及びAC-300により測定した。

3. 結果及び考察

1) 元素分析、質量分析及び赤外吸収分析

元素分析、質量分析及び赤外吸収分析の結果から、化合物Pは
$$\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{CHO}}{\underset{\text{CHO}}{\text{C}}}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHO}$$
 (1) GAがアルドール縮合して生成する α, β -不飽和アルデヒド基を有するGAダイマーではないかと推測された。通常、GAのアルドール縮合により生成するダイマーは、(1)のような構造を有すると推察されている。³⁾ところが、化合物PのIRスペクトルには、飽和型のアルデヒド基による吸収が観測されなかった。そこで、分取した試料中に存在するアルデヒド基の個数を求めるために、0-ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン(PFBOA)を用いてアルデヒドのオキシム化反応を行い、⁴⁾生成したPFBOA誘導体をGC-MSにより分析した。その結果、PFBOA誘導体の質量数が572であったことから、2個のアルデヒド基が存在する可能性が示唆

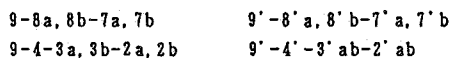
された。さらに、IRスペクトル上に水酸基に帰属し得る吸収があったことから、その個数を求めるために、PFOA誘導体を*N*,*O*-bis-(Trimethylsilyl)Trifluoroacetamide(BSTFA)を用いてトリメチルシリル(TMS)化反応にかけた後、⁴¹生成したTMS誘導体をGC-MSを用いて分析した。その結果、親イオンが*m/z*644に観測されたことから、1個の水酸基が存在していることがわかった。しかしながら、これらの情報からでは、化合物Pの構造を推測することは容易ではない。そこで、¹H-, ¹³C-NMR及び種々の二次元NMR法を用いて、より詳細な検討を行った。

2) ¹H-, ¹³C-NMR 及び DEPT

¹H-, ¹³C-NMRの測定結果は、質量分析の結果と異なり、化合物Pは炭素20個及び水素28個からなることを示した。またDEPTの測定結果から、その炭素原子の種類は、CH₂基(8個)、CH基(10個)及び4級炭素(2個)であることがわかった。さらに¹H-NMRスペクトルから、交換性プロトン(OH, 2個)の存在が示唆された。従って、化合物Pの組成はGAのテトラマーに相当するC₂₀H₂₈O₆と考えられる。また¹H-, ¹³C-NMRの化学シフト及びスピン結合の様子から、i)β位に水素を持つα,β-不飽和アルデヒド基(2個)、ii)オレフィンのプロトン(2個)、iii)4級炭素はオレフィン炭素であること、iv)アルデヒド以外のCH基としてHC-O-及びHC(OH)O-タイプがそれぞれ2個ずつ存在することが、示唆された。これらの結果及びGAの重合や脱水反応経路を考慮することにより、(II)に示すようなGAのテトラマーが可能な構造の一つとして推定された。1から10までの番号を付けた炭素のうち(1~5)及び(6~9, 10)がそれぞれGAのモノマーに相当し、1~10でダイマーとなり、これが残りのダッシュを付けて区別した(1'~10')のダイマーと反応して、(II)のヘミアセタール構造を有するテトラマーが形成されているのではないかと考えることができる。

3) COSY及びHOHAHA

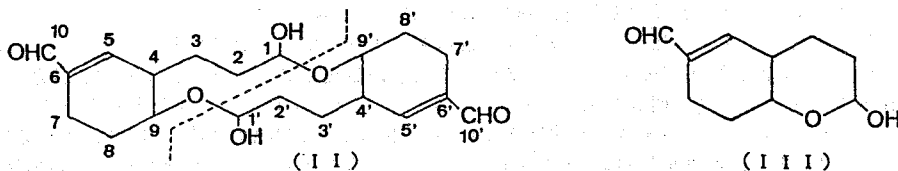
¹H-¹H COSY及びHOHAHAスペクトルにより、化合物Pの¹H-スペクトルの帰属を決定した。図1にHOHAHAスペクトルを示す。磁化移動のためのmixing timeは206msである。COSYスペクトルだけの情報では、1~10及び1'~10'の各ダイマー単位に含まれるメチレンプロトンのピークが重なるために(1.5-2.5 ppm)、600MHzの観測周波数においても解析が容易ではない。しかし、HOHAHAスペクトルを測定することにより、1.5-2.5ppmの領域から外れたピークからの磁化移動経路を追跡できるので、非常に有用な情報を得ることができた。図1に示すように、9と9'あるいは1と1'(II参照)のCHプロトンからのスピン結合を介した磁化移動の結果、例えば、



のように、1.5-2.5ppmの領域における相互に重なったCH₂(及びCH)プロトンの帰属が可能となった(CH₂の2個のプロトンはa及びbを付けて区別した)。しかしながら、これらCOSY及びHOHAHAのスペクトルからは、(1~10)のダイマー単位と(1'~10')のダイマー単位が相互に"連結"している証拠が得られなかった。この時点において、これは、1と9'あるいは1'と9のプロトン間のスピン結合がロングレンジ⁽⁴⁾であるため、J値が非常に小さくなるからと解釈した。

4) CH-COSY及びHMBC

1と9'あるいは1'と9の水素-炭素間のスピン結合がthree-bond coupling ³JCHであることに注目して、(1~10)と(1'~10')の各ダイマー単位の連結関係についての情報を得るために、HMBCスペクトルを測定した。図2に1', 1, 9'及び9のプロトン領域に関するHMBCスペクトルを示す。³JCHの大きさに依存したanti-phaseの磁化の成長のための待ち時間は60msである。また¹³C-スペクトルの帰属は、CH-COSYにより決定した。HMBCの測定の結果、図2に示すように、期待に反して1-9'及び1'-9の各水素-炭素間にはクロスピークが観測されず、注目すべきことに、1'の水素と9'の炭素及び9の水素と1の炭素間にHMBCクロスピークが観測された。(II)の構造に基づいて考えれば、これらのクロスピークは⁵JCHカップリングに起因しなければならないので、明らかに不都合である。これらのクロスピークの出現を無理なく解釈するためには、(1~10)及び(1'~10')の各ダイマー単位が(III)のように



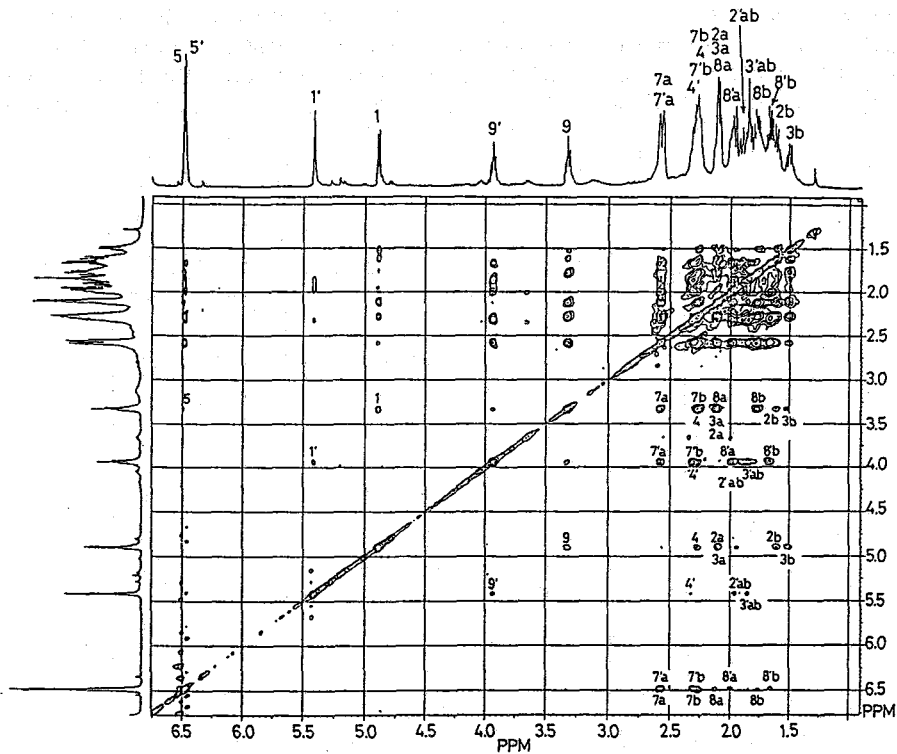


図1 化合物PのHOHAHAスペクトル
混合時間206ms

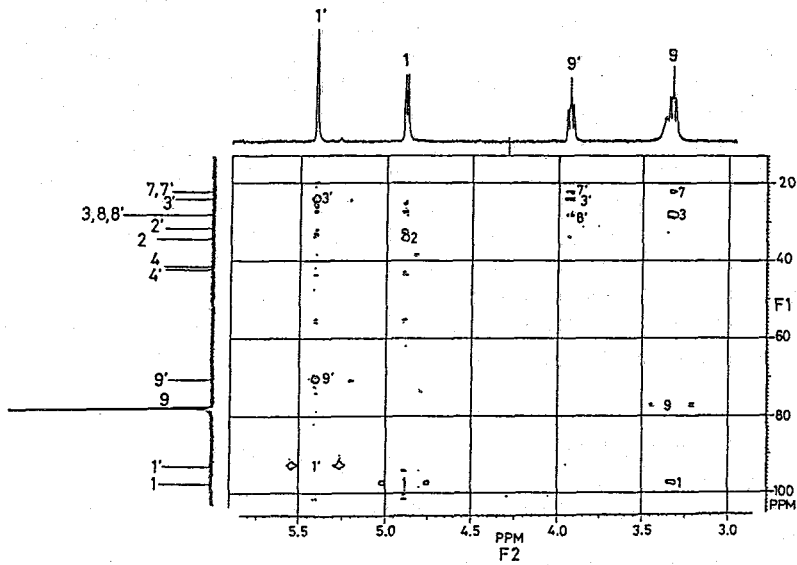


図2 化合物PのHMBCスペクトル

分子間で付加するのではなく、各ダイマー単位において分子内付加反応が起こり、その結果(III)に示した環状ヘミアセタールが生成しているのではないかと考える必要がある。(III)の構造であれば、上記HMBCスペクトルのクロスピークは $^3\text{JC}_{9'-\text{H}1'}$ 及び $^3\text{JC}_{1-\text{H}9}$ のスピンの結合に起因すると考えることができ、無理なく説明することが可能となる。また化合物Pがダイマーであれば、1)の結果とも一致する。

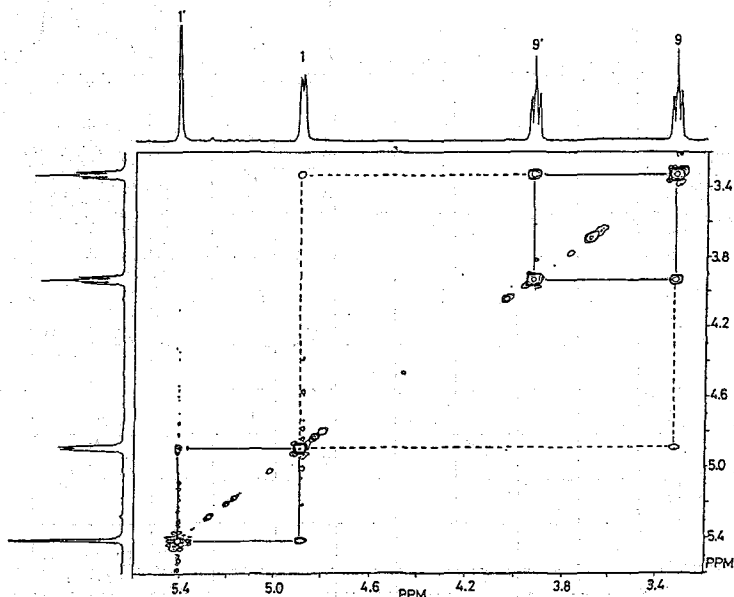


図3 化合物PのNOESY (Phase-Sensitive Mode) スペクトル
対角ピークと同位相の相関を実線で、逆位相の相関を破線で示した。

5) NOESY (Phase-Sensitive Mode)

(II)の(1~10)及び(1'~10')が、それぞれ独立したダイマー分子であるとするならば、それらのダイマー相互はいかなる関係にあるのか?この答えはNOESYを測定することにより得られた。図3に縦磁化の混合時間を0.8sとして観測したNOESYスペクトルを示す。その結果、注目すべきことに1'と1及び9'と9のプロトン間に対角ピークと同位相のクロスピークが観測された(実線で示した相関)。600MHzの観測周波数においても、(III)や(II)程度の大きさの分子については $\omega^2\tau c^2 \ll 1$ と考えることができるので、1'と1及び9'と9のプロトン相互のクロスピークは、dipolar相互作用によるものではなく、交換によると解釈できる。このような"交換"によるNOEクロスピークを生じ得るようなダイマー間の関係としては、(III)に示した構造のピラン環部分のOH基の配向の違いを考えることができる。図3において、1と9のプロトン間に対角ピークと逆位相のクロスピークが観測されているので、(1~10)のダイマーにおいてはOH基がequatorialに、また(1'~10')のダイマーにおいてはOH基がaxialに配向した化合物であると考えられる。

結論として、化合物Pは(III)の構造で示されるダイマーであり、また重クロロホルム溶液中においては、ピラン環部分のOH基がaxial型とequatorial型の平衡状態をとっているものとする。

[参考文献]

- 1) 伊沢健治, 八木茂政, 中川照眞, 田中久, 田嶋敏男, 今井雅裕; 第32回液体クロマトグラフ研究会講演要旨(1989), pp.46-49.
- 2) T. Nakagawa, K. Izawa, S. Yagi, H. Tanaka, T. Tashima & M. Imai; Chem. Pharm. Bull., **37**, 2463-2466 (1989).
- 3) P. Monsan, G. Puzo & H. Mazarguil; Biochimie, **57**, 1281-1292 (1975).
- 4) F. J. G. M. van Kuijk, D. W. Thomas, R. J. Stephen & E. A. Dratz; Biochem. Biophys. Res. Commun., **139**, 144-149 (1986).

○林 文晶、長島一男、板崎 弘、照井彬弘 (塩野義製薬・研)

NMR studies of PA-48009 (Duramycin)

Fumiaki HAYASHI, Kazuo NAGASHIMA, Hiroshi ITAZAKI, and Yoshihiro TERUI

(Shionogi Research Laboratories, Shionogi & CO., LTD. Fukushima-ku, Osaka 553, Japan.)

Primary structure of antibiotic nonadecapeptide PA-48009 was determined by the combined use of two-dimensional NMR spectroscopy (COSY, RELAY, and NOESY) and Edman degradation method. The peptide contains three sulfide bridges and a bridge from the side chain of a lysin residue. Re-investigation of Duramycin with almost the same amino acid components showed that Duramycin was quite identical to PA-48009 and hence the primary structure of Duramycin was revised. Application of the other 2D pulse techniques on this issue are also discussed.

<序> 抗菌作用を持つ生理活性物質として得られたPA-48009は、19残基より成るオリゴペプチドである。このペプチドは、lanthionine, methyl-lanthionine, lysinoalanine等通常のものではないアミノ酸側鎖による架橋構造を持つため、化学的に一次構造決定するためには多くの労力を要する。これらS-およびNH-bridgeを持つペプチドのNMR法による一次構造解析は、すでにKesslerらによって報告されており、relayed-NOESY法等を駆使することによってNMR法のみによりRo 09-0198 (lanthiopeptin)の推定一次構造が提出された。しかしながら、この一次構造は化学的手段を用いた解析の結果からlysinoalanineの架橋様式が適切でないことが宮らによって示された。我々もこれらの研究とはほぼ平行して、上記ペプチドとホモロジーがあると考えられたPA-48009の一次構造解析をNMR法と化学的手法(Edman法)の両面から行い、両者の結果を組み合わせることによって一次構造を得た。さらにアミノ酸構成がほとんど一致するが一次構造が異なると報告されていたDuramycinを、発見者のgroupの一人Dr. Chenよりいただき比較してみたところ、両者は全く一致し、Duramycinの一次構造が訂正された。上の解析では、COSY, RELAY, NOESY法による解析で直面した困難はEdman法より得られた部分構造により解決したが、これが他の二次元NMR法の応用によりどの程度解消することができるかについても調べてみた。

<実験> 試料は水溶液で目的のpHに調整後凍結乾燥したもの15~20mgを0.4mlのDMSO-d₆に溶解した。Duramycinは、Dr. Chenよりいただいたものを特に精製せずにそのまま用いた。すべてのNMRスペクトルは、Varian社製XL-400を用いて測定した。二次元NMRスペクトルは、室温(23℃)、40℃

はやし ふみあき、ながしま かずお、いたざき ひろし、てるい よしひろ

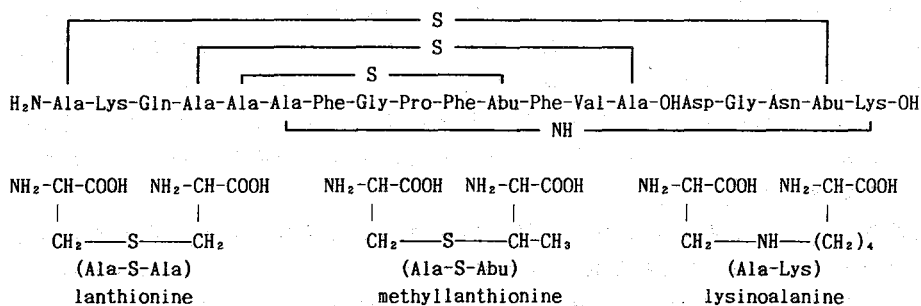
、60℃で測定した。

<結果と考察>

1. 一次構造解析 二次元NMRスペクトルの解析は、Wüthrich等の連鎖帰属法に準じて、COSY, RELAY, スペクトルによってスピン系を分類し、NOESYスペクトルによって主鎖にそって残基をつないでいった。PA-48009は、構造的な遅いゆらぎのある部分を含むためか、分子量の割りには線幅が広く、特に、後の帰属で1~2, 5~10, 12~14番目の残基のシグナル、とりわけアミドNHシグナルがブロードで、条件によっては数十Hz以上となり検出が困難であった。そこで、できるだけ多くのアミドNHシグナルを観測できる条件を捜すため、pHを3~7、温度を23℃~60℃の範囲で変えてみた。ここでは、主鎖アミドプロトン18個(19-1(Pro))中16個が観測できたpH3.0, 60℃の条件で主に解析を行った。各種2DNMRスペクトルの解析の結果、主にシグナルの重なりや主鎖アミドプロトンのブロードニングの問題で、主鎖のつながりは5個のセグメントとして得られた。次に、これら5個のセグメントの配列は、同時に進められていたEdman分解による、通常のアミノ酸部分の部分構造と比較することにより決めることができた。なお、スピン系の解析の段階でS-AlaとPheの区別が困難だった2, 3の残基についても、この比較により決定することができた。S-およびNH-bridgeの決定は、pH3.0, 23℃で測定したNOESYスペクトルを用いて行った。ヘテロ原子を挟むメチレン、メチル、メチン間のNOEは、架橋しているペア間のみで観測され、他の架橋間等のNOEはなかったので、一意に決定できた。得られた一次構造を図に示す。次に図の一次構造とはかなり異なるが、構成アミノ酸がほぼ一致するDuramycinを同様にして調べてみたところ、PA-48009と完全に一致し、これにより、これまで報告されていたDuramycinの一次構造が訂正された。

2. 他の2D測定法の応用 この系でDQC-COSY, relayed-NOESY等の測定を行った。これらの結果の詳細は会場で示すつもりである。

Figure Primary structure of PA-48009(Duramycin)



P31

ホモ多糖類カードランの化学修飾：NMR解析でみる残基種の多様化
 (味の素・中研、東大・生技研) ○鈴木榮一郎、宮野 博、澄川弘美、
 中川隆祐、永嶋伸也、瓜生敏之*

Chemical Modification of a Homopolysaccharide, Curdlan - Multiformality Analysis of Residue Types by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Ei-ichiro SUZUKI, Hiroshi MIYANO, Hiromi SUMIKAWA, Ryusuke NAKAGAWA, Nobuya NAGASHIMA, and Toshiyuki URYU* (Cntrl. Res. Labs., Ajinomoto Co., Inc., *Institute of Industrial Science, Univ. of Tokyo)

The structure of synthesized curdlan sulfate, which has antiviral activity *in vitro*, has been determined with proton and carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy. Nine residue types were apparently recognized in the proton two dimensional NMR, i.e., DQF-COSY and HOHAHA spectra, and chemical shifts of all protons were unambiguously assigned. All C6 and about one third of C2 hydroxyl groups were substituted to sulfate, while the smaller amount of C4 hydroxyl groups were also substituted in a typical curdlan sulfate. ^{13}C -NMR data could be coincided with ^1H -NMR. The comparatively predominant regularity of sulfation pattern was identified with NOESY spectrum.

【緒言】ホモ多糖類カードランは、化学修飾などにより硫酸エステルに変換されると抗エイズウイルス活性を示す。¹⁾ そこで、本研究では、グルコース残基上の修飾位置の決定を基礎として、より高次の分子構造を明らかにすること、並びに、位相検出型 2D-NMR の多糖類の構造解析への応用の可能性と限界を探ることを目的とした。

既に、我々は、市販のカードランを DMSO 中ピペリジン-N-硫酸を用いて硫酸化したカードラン硫酸ナトリウム (Curdlan Sulfate Sodium; CSS) を試料として、1) 重水溶液中での ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DQF-COSY, 2D-HOHAHA, 位相検出型 ^{13}C - ^1H シフト相関二次元 NMR の測定、2) ^{13}C -NMR の軽水重水両溶液中のスペクトルの測定による同位体シフト解析 (帰属の確認)、3) PSNOE (位相検出型の二次元 NOE) の測定 (残基種の隣接関係の検討)、などを行っている。これらの測定を通じて、分子量 2 万以上の硫酸化多糖類についても、試料条件 (食塩 0.1 M 添加など) やデータ処理を工夫することにより、解析可能な ^1H -NMR スペクトルが得られることがわかるとともに、NMR 方法論上重要と思われる以下のような知見を得た。²⁾

1) ^1H -NMR, ^{13}C -NMR の各シグナルの完全帰属が出来た。特にプロトンの帰属には、2D-HOHAHA が有用であった。MLEV17 によるよりも、単純なスピニングの方が、クロスピークの形に何位同志の相互作用であるかによる特徴が現れる。

2) 分離の良い 1 位を中心に、エステル化による化学シフト変化の規則性を考察することができた。

3) ^{13}C -NMR 化学シフトの同位体効果を見る手法は、このような多糖類でも有効であった。

4) 主な構成残基種のタイプとして C6 の水酸基が硫酸化された残基 (一硫酸化糖) と、C2, C6 2 つの水酸基が硫酸化された残基 (二硫酸化糖) の二種類あるが、C4 の水酸基が硫

すずきえい ちろう みやのひろし すみかわひろみ なかがわりゆうすけ
 ながしまのぶや うりゅうとしゆき

酸化されたものと目されるシグナルも検出された。

5)これらの構成残基種の配列は複雑であるが、PSNOE データの解析から、代表的な規則性の存在が明らかになった。

以上の解析で対象としたロットを CSS-A とすると、今回は、上記 4) で述べた C4 の水酸基がより多く硫酸化された CSS-B の解析を行ったので、比較を含めて報告する。

【実験】

試料 CSS-B 100 mg を 0.05 M NaCl を含む 99.95 % D₂O 1 ml に溶解、凍結乾燥後、窒素気流下 0.5 ml 99.95 % D₂O に溶解し試料とした。尚、予備実験で、種々の食塩濃度で ¹H-NMR を測定した。その結果、0.1 M 程度の溶液中でシグナルの分離がよいことが判明した。そのため、今回の測定はこの条件で行った。

測定 装置は全て JNM GX-400 NMR を用いた。通常の一次元 ¹H-NMR、¹³C-NMR の他に、以下の二次元 NMR の測定を行った。

(i) 2D-HOHAHA: 遠隔の ¹H 核のスピンのネットワークを追跡できるスペクトル手法

(ii) ¹H-¹³C シフト相関二次元 NMR: 測定には、位相検出型シーケンスを用いた。

尚、測定温度は全て 32 °C で行い、DSS を基準として化学シフトを求めた。

【結果と考察】

¹H-NMR

CSS-B の 2D-HOHAHA を測定して、CSS-A のそれ²⁾と比較して以下のことがわかった。

1) CSS-B には CSS-A より C1H シグナルと相関をもつシグナル (相関ピーク、クロスピーク) の数が多い。このことは残基の構造の多様性、または、残基の配列様式等の影響で、多くの環境の異なる残基が存在していることを示している。

2) CSS-A で帰属したシグナルは、全て CSS-B にも含まれている。しかも、そのシグナル強度は、未帰属のシグナルに比べずっと大きい。

3) 2) は、CSS-B の構造が NMR 的にみて CSS-A と極めて近い構造をとっていること、また、帰属出来ないシグナルの残基は、CSS-B の中でも他の残基に比べて量が少ないことを示している。

HOHAHA は、遠隔のスピンのネットワークの追跡が可能な二次元 ¹H-NMR であるが、ある設定条件 (混合時間、mixing time) を変化させることでリレー式の磁化移動の範囲を調節することができる。即ち、mixing time, 35 ms では 4 bonds まで、例えば C1H に着目すると C2H, C3H のシグナルとの間にクロスピークが得られ (C1H → C2, 3H)、55ms では、5 ~ 6 bonds (C1H → C2, 3, 4, (5)H)、75 ms では、6 bonds (C1H → 2, 3, 4, 5H) まで磁化が移動 (リレー) することがわかった。

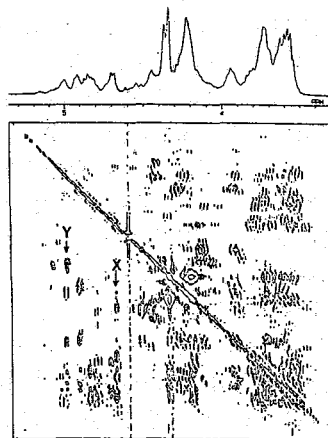


図 1. CSS-B の HOHAHA スペクトル (mixing time: 55 ms)

X, Y については、本文参照。

このような詳細な検討の結果、CSS-B に比較的多く含まれていた未知のシグナルの帰属が可能となり、新たにいくつかの残基種を抽出、区別することが出来た。中でも、特に二つのシグナル群 (X, Y) が、比較的強度が大きくしかも特徴的な化学シフトを示した (図 1)。その化学シフト値をまとめたのが図 2 であり、これより以下のことが新たに分かった。

1) CSS-B には、C4, C6 水酸基が硫酸エステル化されたジエステル残基種が存在している。

その残基種のシグナル群は図中の X である。根拠は、i) C6 モノエステル体の残基の化学シフトと比較して C3H, 4H, 5H のシグナルが低磁場にあること。特に、C4 のプロトンは大きく低磁場シフト (約 0.7 ppm シフト、C3H は 0.35 ~ 0.4 ppm、C5H は約 0.2 ppm シフト) しているが、これは、まさに C4 の水酸基がエステル化され、geminal なプロトンが置換基効果を受けたためと考えられる。ii) C2 プロトンのシグナルの化学シフトは、C4H 程の変化がみられず、この位置の水酸基はエステル化されていないと考えられること、さらに、iii) C6, 6'H の化学シフトは、C6 位の水酸基が反応していることを示したものであること²⁾、の三点である。

2) CSS-B には、C2, C4, C6 全ての水酸基が硫酸エステル化されたトリエステル残基種も存在している。

その残基種のシグナル群は図中の Y である。C2H, C3H, C4H のシグナルが、いずれも、これまで観測された残基のなかで最も低磁場シフト (C6 モノエステル体に比べ、C2H シグナルが約 0.9 ppm、C3H シグナルが 0.65 ~ 0.7 ppm、C4H シグナルが約 0.85 ppm それぞれ低磁場シフト) していることがその理由である。C2H, C4H が低磁場にシフトしたのは、その位置の水酸基が硫酸エステル基になり、その置換基効果を受けたためであり、また C3H シグナルのシフトは、その隣接 (C2, C4) 硫酸エステル基二つの影響を受けたもので、C2 或は C4 水酸基のどちらかが硫酸化された C2, C6 ジエステル体や C4, C6 ジエステル体の C3H に比べ、大きな低磁場シフトになったものと説明出来る。

¹³C-NMR

¹³C-¹H シフト相関二次元 NMR から帰属された ¹³C シグナルの化学シフトの様子も、

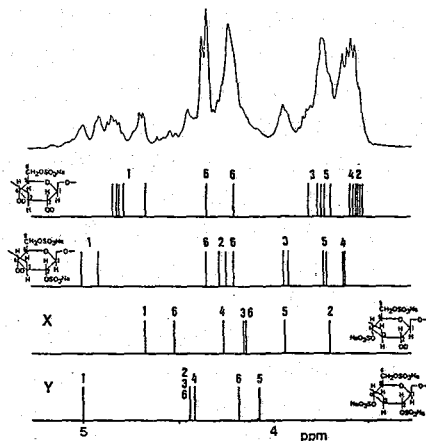


図 2. CSS-B の ¹H-NMR の帰属

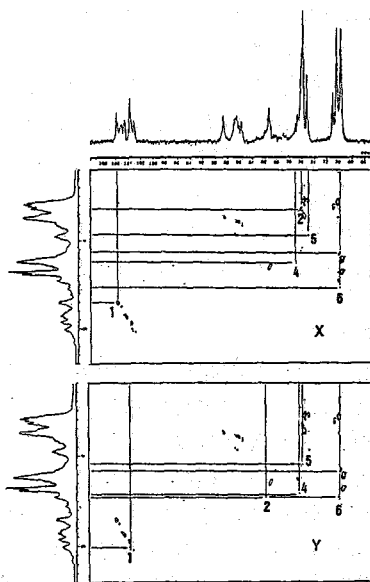


図 3. CSS-B の ¹³C-¹H シフト相関 NMR スペクトル、残基種 X, Y の帰属

上述残基種 (C4, C6 ジエステル体 X、トリエステル体 Y) の存在を支持するものであった。

図 3 に $^1\text{H-NMR}$ のシグナル群 X, Y に対応するクロスピークを示した。また、その化学シフトの比較結果を図 4 に示した。

X については、C4 が他の残基のそれと比べ大きく低磁場シフト (6.6 ppm) していること、C5 は β 効果と考えられる若干の高磁場シフトがみられていることから、この残基は、C4, C6 ジエステル体と推測できる。

また、Y の ^{13}C のシグナルでは、C2, C4 が共に大きく低磁場シフトしており、それぞれ C2, C6 ジエステル体の C2 の化学シフト、C4, C6 ジエステル体 X の C4 の化学シフトと殆ど同じ値をとっていることがわかり、これらが、残基の全ての水酸基が硫酸化されたトリエステル体のシグナルであると考えるのが妥当である。

尚、同位体効果を用いることにより、 ^{13}C シグナルに結合している水酸基が、硫酸エステルになっているか否かを明確に区別することが出来た。

NOESY

PSNOE 法により、代表的な規則性として、図 5 のような配列の存在を見いだすことができた。

【結論】

カードラン硫酸ナトリウムは、CSS-A も CSS-B も、概略としては、大部分が、C6 水酸基のエステル化された残基種 (モノエステル体) と、C2, C6 水酸基がエステル化された残基種 (ジエステル体) で構成されている。

しかし、ある種の合成反応条件によって生成する CSS-B には、C4, C6 水酸基が硫酸エステル化された残基種や、全ての水酸基 (C2, C4, C6) が硫酸エステル化されているトリエステル体も、比較的微量ながら存在することが分かり、本研究では、これらの残基の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ シグナルを帰属することができた訳である。

総じて、CSS-A CSS-B ともに、基本的には類似しており、C4 硫酸化の量の程度だけが、若干異なっている、と言える。

【文献】

- 1) Kaneko, Y. et al., Biochem. Pharm., in contribution.
- 2) 鈴木、宮野、澄川、中川、伊達、永嶋、松崎、瓜生、日本分光学会春季講演会要旨集 P 26 (1989)

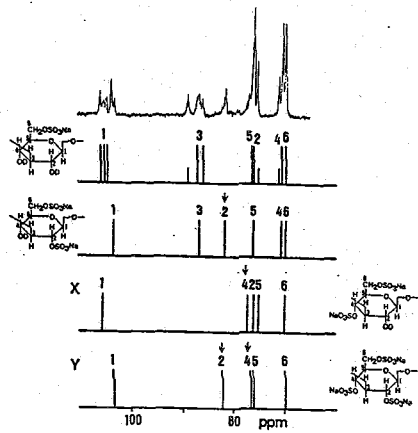


図 4. CSS-B の $^{13}\text{C-NMR}$ の帰属

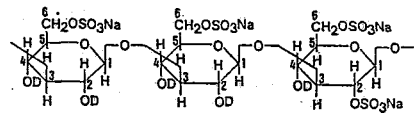


図 5. CSS の残基配列の代表的な規則性

APPLICATION OF ^1H SELECTIVE AND BISELECTIVE T_1 TO STEREOCHEMISTRY IN SOLUTION VI - CONFORMATIONAL EQUILIBRIUM OF THE CYCLIC PEPTIDE.

M. Sugiura, N. Takao, T. Ishida, H. Ohishi, M. Inoue, S. Kato, Y. Hamada, and T. Shioiri

(Kobe Women's College of Pharmacy, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University)

^1H Nonselective (T_1^{NS}), Selective (T_1^{S}), and Biselective T_1 (T_1^{BS}) of the Cyclic Peptide I have been measured at two frequencies (200 MHz and 500 MHz). The correlation times (τ_c) can be obtained by the ratio of $T_1^{\text{NS}}(500)/T_1^{\text{NS}}(200)$ and the cross-relaxations (σ_{ij}) are derived from the observed T_1^{BS} and T_1^{S} values. The conformation of I in CDCl_3 solution are discussed based on the r_{ij} determined from eq.(4) with the τ_c and σ_{ij} .

[はじめに]

これまで ^1H Selective T_1 と Biselective T_1 を測定することによって交差緩和 σ_{ij} が得られること、またその σ_{ij} を用いて H-H 間の距離の関係から化合物の立体化学を議論出来ることなどを明らかにし、いくつかの化合物への応用を試みてきた。今回は、周波数の異なる装置での測定を行ない、従来は直接得られなかった回転相関時間 τ_c を T_1 の周波数依存性より求め、それと σ_{ij} とから H-H 間の距離 r_{ij} を算出し、溶液中でのコンフォメーションを議論する試みを行なった。

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

$$1/T_1^{\text{BS}}(j) = R^{\text{BS}}(ij) = N_j \sigma_{ij} + R^{\text{S}}(i) = N_j \sigma_{ij} + \sum_l N_l \rho_{il} + \rho^* \quad (2)$$

$$1/T_1^{\text{NS}} = R^{\text{NS}}(\text{all}) = \sum_j R^{\text{BS}}(ij) = \sum_j N_j \sigma_{ij} + R^{\text{S}}(i) = \sum_j N_j \sigma_{ij} + \sum_l N_l \rho_{il} + \rho^* \quad (3)$$

ここで

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

$$\rho_{il} = 1/10 \gamma^4 \hbar^2 r_{il}^{-6} [\tau_c + 3\tau_c / (1+\omega^2\tau_c^2) + 6\tau_c / (1+4\omega^2\tau_c^2)] \quad (5)$$

(3) 式に (4)、(5) 式を代入すると

$$1/T_1^{\text{NS}} = 3/10 \sum_j N_j \gamma^4 \hbar^2 r_{ij}^{-6} [\tau_c / (1+\omega^2\tau_c^2) + 4\tau_c / (1+4\omega^2\tau_c^2)] + \rho^* \quad (6)$$

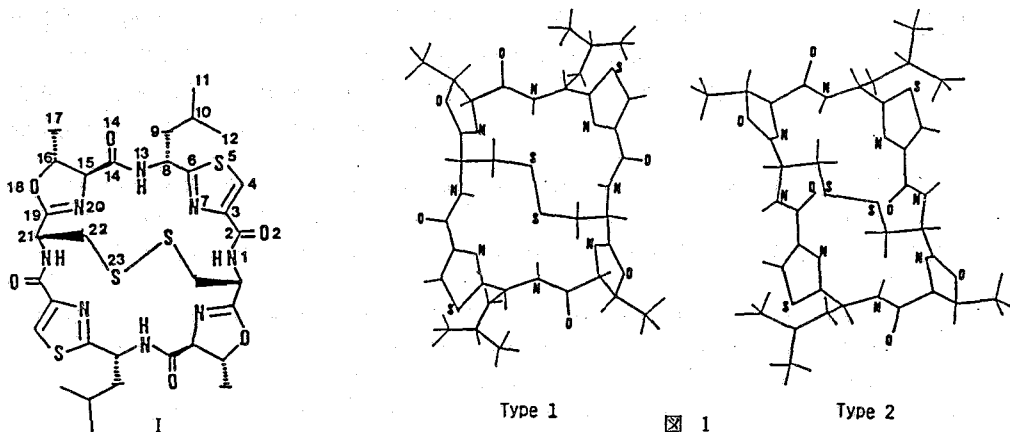
いま $\rho^* \ll (\sigma_{ij} + \rho_{ij})$ とすると

$$T_1^{\text{NS}}(\omega_1) / T_1^{\text{NS}}(\omega_2) = (5 + 8\omega_2^2\tau_c^2)(1 + 5\omega_1^2\tau_c^2 + 4\omega_1^4\tau_c^4) / (5 + 8\omega_1^2\tau_c^2)(1 + 5\omega_2^2\tau_c^2 + 4\omega_2^4\tau_c^4) \quad (7)$$

$$\text{また (1)、(2) 式より } R^{\text{BS}}(ij) - R^{\text{S}}(i) = N_j \sigma_{ij} \quad (8)$$

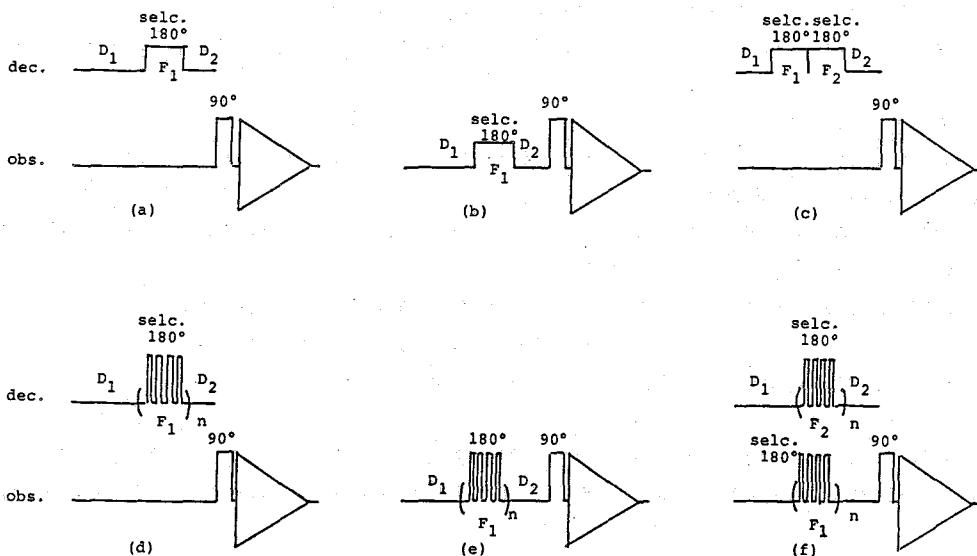
^1H Selective (T_1^{S})、Biselective (T_1^{BS}) 及び Nonselective T_1 (T_1^{NS}) は、それぞれ (1)~(3) 式で表わされる。従って異なる周波数で得られる T_1 の比は、 T_1^{NS} の場合 (7) 式の

すぎうら まきこ たかお ならお いしだ としまさ おおいし ひろふみ いのうえ まさとし
かとう しんじ はまだ やすまさ しおいり たかゆき



よくなる。この式を使って $T_1^{NS}(\omega_1) / T_1^{NS}(\omega_2)$ と τ の関係が得られ、 $T_1^{NS}(\omega_1) / T_1^{NS}(\omega_2)$ の実測値より τ を求めることが出来る。²⁾ 一方 σ_{ij} は (8) 式のように T_1^{BS} と T_1^S の逆数の差を取れば得ることが出来、それぞれの σ_{ij} と τ を使って (4) 式より r_{ij} を算出することが出来る。

今回この取扱いの対象としたのは、強い細胞毒性を有する環状ペプチド、ユリチアサイクラマイド (I) である。このものは、NOE を含めた ^1H NMR の詳細な検討及びエネルギー計算により、 CDCl_3 中では図 1 の Type 1、DMSO 中では Type 2 のコンフォメーションをとることがすでに明らかになっている。³⁾ ここでは CDCl_3 中での T_1 の測定により、上記と同じ結果を得ることが出来るかを検討し、この方法の妥当性を確かめることを目的とした。



[実験]

¹H NMR の測定は Varian XL-200 (200.06 MHz) 及び VXR-500 (499.84 MHz) を用い、T₁^{NS} は通常の IR 法を、200 MHz における T₁^S、T₁^{NS} の測定は以前に報告した通り、図 2(a)、(c) のパルス・シーケンスを用いた。500 MHz における T₁^S は (a)、(b)、(d)、(e) いずれでも誤差の範囲内で等しい値が得られることを確かめた上で、(d) または (e) を用い、T₁^{NS} には (f) を用いた。I は約 20 mM 濃度で CDCl₃ に溶解し、脱ガス、溶封して測定サンプルとした。

[結果と考察]

表 1 に 200 MHz と 500 MHz における T₁^{NS} の観測値を示した。(7) 式によって得られる T₁^{NS}(500)/T₁^{NS}(200) と τ との関係より、これらの実測値を用いて τ を求めた(表 1)。得られた τ を見ると、S-S 結合で固定されている Cys 部分の運動が比較的束縛されていることが解る。

表 2 には、いくつかの ¹H についての二つの周波数での T₁^S および T₁^{NS} の観測値を示してある。これらの値を用いて (8) 式より得られた σ_{ij} の値を表 3 に示した。さらにこの値と、表 1 に得られている τ を用いて、(4) 式から算出される r_{ij} の値を r_{ij}^{obs} として表 4 に示した。 σ_{ij} から得られたものと σ_{ij} から得られたものに多少差のあるものもあるが、溶液中でのコンフォメーションの揺らぎなどを考慮すれば、これらの差は容認出来る範囲と思われる。また 200 MHz からの値と 500 MHz からの値も、お互いにほぼ似かよったものになっている。

表 4 には、図 1 の二つのコンフォメーション (Type 1 と Type 2) についての理論計算より得られた r_{ij} の値を r_{ij}^{calc} として示したある。これらの値と、今回得られた r_{ij}^{obs} の値を見比べると、いずれも Type 1 の値に近い値となっており、この溶液 (CDCl₃) 中での優位コンフォメーションが Type 1 であると結論することが出来る。これは、すでに得られている結論²⁾と矛盾しない。

表 1 200 MHz 及び 500 MHz における T₁^{NS}

position	T ₁ ^{NS} (200)/sec	T ₁ ^{NS} (500)/sec	τ /sec
1NH	0.673	0.893	1.16 x 10 ⁻¹⁰
H-4	19.855	25.867	(1.10 x 10 ⁻¹⁰)
H-8	0.979	1.334	1.20 x 10 ⁻¹⁰
H-9		0.491	
H-9'		0.468	
H-10		0.897	
11,12Me	0.503	0.586	0.80 x 10 ⁻¹⁰
13NH	0.571	0.752	1.14 x 10 ⁻¹⁰
H-15	1.452	1.963	1.18 x 10 ⁻¹⁰
H-16	1.401	1.926	1.22 x 10 ⁻¹⁰
17Me	0.363	0.444	0.94 x 10 ⁻¹⁰
H-21	1.117	1.638	1.42 x 10 ⁻¹⁰
H-22	0.272	0.408	1.46 x 10 ⁻¹⁰
H-22'	0.276	0.417	1.48 x 10 ⁻¹⁰

表 2 200 MHz (上段)、500 MHz (下段) におけるいくつかの T₁^S 及び T₁^{NS}

position	T ₁ ^S /sec	T ₁ ^{NS} /sec			
		H-4	H-21	H-22	H-22'
1NH	0.772 0.969	0.769 —	0.751 0.933	0.946	0.955
		11,12Me	13NH		
H-8	1.274 1.634		1.215 1.578		
		H-8	H-15		
13NH	0.675 0.842	0.659 0.820	0.654 0.828		
		13NH	H-16		
H-15	1.791 2.329	1.704 2.234	1.704 2.290		
		H-15	17Me		
H-16	1.876 2.312	1.764 2.208	1.462 2.104		
		1NH			
H-21	1.404 1.907	1.309 1.842			

表 3 T_1^S , T_1^{BS} の観測値より得られる σ_{ij} (sec^{-1})

H-i	H-j	σ_{ij} (200)	σ_{ji} (200)	σ_{ij} (500)	σ_{ji} (500)
1NH	H-4	0.42×10^{-2}	—	—	—
1NH	H-21	3.54×10^{-2}	5.19×10^{-2}	3.98×10^{-2}	1.84×10^{-2}
1NH	H-22	—	—	2.56×10^{-2}	—
1NH	H-22'	—	—	1.51×10^{-2}	—
H-8	11.12Me	—	—	1.56×10^{-2}	—
H-8	13NH	3.78×10^{-2}	3.60×10^{-2}	2.15×10^{-2}	3.27×10^{-2}
13NH	H-15	4.76×10^{-2}	2.84×10^{-2}	2.09×10^{-2}	1.84×10^{-2}
H-15	H-16	2.84×10^{-2}	3.41×10^{-2}	1.76×10^{-2}	2.04×10^{-2}
H-15	17Me	5.03×10^{-2}	—	1.12×10^{-2}	—

表 4 σ_{ij} と τ_c より得られた r_{ij}^{obs} と、二つのコンフォメーションにたいして理論計算により得られる r_{ij}^{calc}

H-i	H-j	$r_{ij}^{\text{obs}}/\text{\AA}$		$r_{ij}^{\text{calc}}/\text{\AA}$	
		(200 MHz)	(500 MHz)	Type 1	Type 2
1NH	H-4	4.39	—	4.57	1.99
1NH	H-21	2.96~3.07	2.80~3.18	2.95	2.15
1NH	H-22	—	3.02	3.43	4.07
1NH	H-22'	—	3.29	—	—
H-8	11.12Me	—	3.28	3.47*	3.56*
H-8	13NH	3.05~3.06	2.89~3.11	2.95	2.96
13NH	H-15	2.92~3.20	3.12~3.19	3.42	2.55
H-15	H-16	3.11~3.20	3.13~3.21	3.07	2.89
H-15	17Me	3.33	3.46	2.53*	2.55*

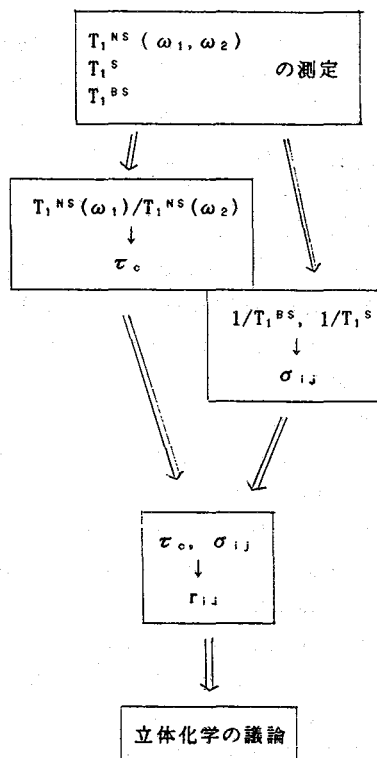


図 3

[まとめ]

今回の方法をまとめると図 3 のようになる。

以上のように、この方法を環状ペプチド I に適用し、妥当な結論を得ることが出来た。このことはこの方法の妥当性、有用性を確かめると共に、この程度の化合物に十分適用出来ることを示すものである。

[謝辞]

VXR-500 装置でのパルス・シーケンスを作るに当たって、ご助言を賜りました Varian 大阪営業所、稲葉好美氏に深謝致します。

[文献]

1. a) 杉浦、高尾、市丸、加藤、藤原、第 26 回 NMR 討論会講演要旨集 P1 (1988).
b) M. Sugiura, N. Takao, and H. Fujiwara, Magn. Reson. Chem. 26, 1051 (1988).
2. C. H. Fung, R. J. Feldmann, and A. S. Mildvan, Biochemistry 15, 75 (1976).
3. T. Ishida, H. Ohishi, M. Inoue, M. Kamiguchi, M. Sugiura, N. Takao, S. Kato, Y. Hamada, and T. Shioiri, J. Org. Chem. in press.

テストステロン及びメチルテストステロンの600-MHz ^1H NMR
及び固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトル
(化技研) ○早水紀久子・石井哲子・柳沢 勝
(日本電子) 鴨 修・今成 司

600-MHz ^1H NMR and Solid-State High-Resolution ^{13}C NMR Spectra of
Testosterone and Methyltestosterone

Kikuko Hayamizu, Tetsuko Ishii and Masaru Yanagisawa, National Chemical
Laboratory for Industry, and Osamu Kano and Tsukasa Imanari, JEOL Ltd.

600 MHz ^1H NMR spectra of testosterone and 17-methyltestosterone were observed and complete assignment has been accomplished by using two-dimensional ^1H - ^1H COSY, NOESY and ^1H - ^{13}C shift correlation methods. The corrected assignment for H-16 α and H-16 β is given. The methylation effects on ^1H and ^{13}C chemical shifts are discussed. The solid-state high-resolution ^{13}C spectra were observed for these compounds and the ring conformation is discussed relating to the ^1H spin coupling constants.

演者らが化技研で構築しているNMRスペクトルデータベース(NMR-SDBS)ではスペクトルの帰属をつけている。ステロイド類の ^{13}C NMRは文献データが多くかなり多数のデータが既に収録されているが、 ^1H NMRは全く手をつけていなかった。我々は90MHzと400MHzの ^1H スペクトルを対象にしてデータの収録を行っている。ステロイド類の400MHzのスペクトルでは個々のプロトンシグナルの分離は良好であり、かなり詳細な帰属がつけられるが、その限界を見定める目的があつて600MHzのスペクトルを測定して詳細な解析を行った。その結果を従来の報告と比較するとH-16 α とH-16 β の帰属を入れ換えねばならないことがわかつた。今までの報告はNOE差スペクトル、X線回折による結晶構造およびKarplusの平面角とスピン結合定数の関係を主たる根拠にして議論がすすめられていたので、固体状態の ^{13}C NMRスペクトルを測定して環構造の安定性について考察した。

実験 試薬は市販品をそのまま用いた。400MHzの ^1H と ^{13}C NMRの測定にはGSX-400をもちいた。600MHzの ^1H NMRはGSX-600で得た。二次元NMRのうちでCOSYは400MHzと600MHzで測定した。NOESY、CHシフト相関は400MHzの装置で測定した。固体高分解能 ^{13}C NMRはFX-200で測定した。

結果と考察

1) ^1H NMR

テストステロン(1)とメチルテストステロン(2)

はやみずきくこ・いしいてつこ・やなぎさわまさる・かも おさむ・いまなりつかさ

の600MHzの ^1H NMRスペクトルを図1に示す。テストステロンには20個の非等価なプロトンと2個のメチル基、1個のOH基がある。帰属決定の戦略は ^{13}C NMRの帰属が既に報告されているので¹⁾、C-H相関二次元NMRから同一の炭素に結合しているプロトンを見つけだして、帰属を決めることであつた。ところがメチルテストステロンでは ^{13}C NMRの帰属が報告されてなかつたので、C-H二次元NMRからは疑問が残つた。 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSYを測定することによって帰属が完成するともくろんだが、A、B、C環のプロトンは疑問なしに決定できたのにD環のプロトンについては α 位と β 位との帰属が困難であつた。ここでとりあげた化合物については ^1H NMRは報告されていない

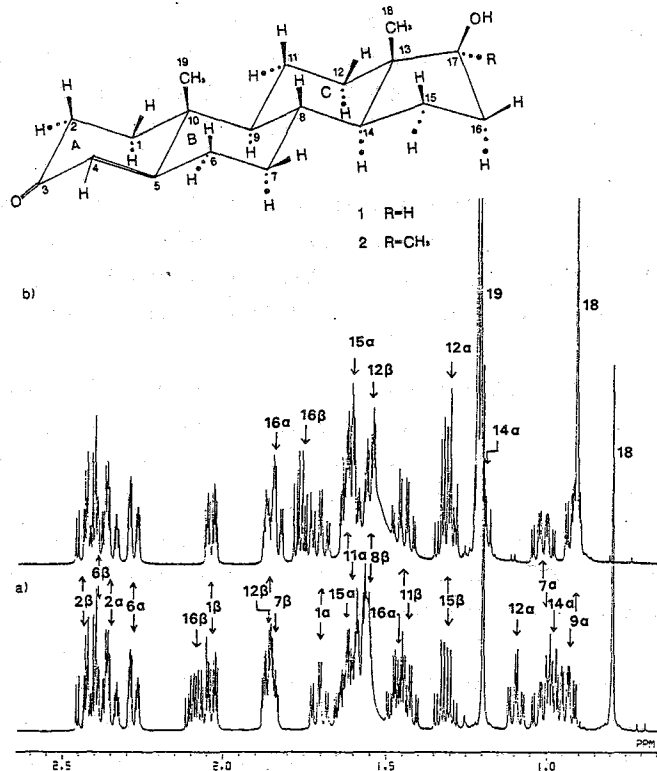


図1. テストステロン (a) とメチルテストステロン (b) の600MHzの ^1H スペクトル

が、類似のステロイド類については報告されており、その帰属はスピン結合定数を重視し、各種の二次元NMRの結果を参考にして決められている。特にH-16 α とH-16 β の帰属は、ステロイドの ^1H NMRの最初の論文²⁾に準じて多くの報告ではH-15 α とH-15 β のスピン結合定数の大小関係で決定している。D環は5員環であり、スピン結合の関係は必ずしもKarplusの平面角の法則が成立しない。従つて仮定なしに実験的に帰属をつけるためには立体的な位置関係を利用することとしてNOESYを測定した。その結果として従来の文献とは異なつて図1に示したようにテストステロンではH-16 β がH-16 α より低磁場側にメチルテストステロンではその逆になることがわかつた。この帰属の正当性についてはメチル基の置換によるシフトによつても証明された。20個のプロトン・シグナルはかなりよく分離してそのパターンは一次近似となりスピン結合定数を分裂幅から読むことができたが、シグナルが重なり合っている場合にはLAOCNの解析計算を補助的に用いて、スピン結合定数とシフト値を決定した。ここではD環に結合したプロトンのシフト値とスピン結合定数だけを示す。精度のよいスピン結合定数を得るためには600MHzの ^1H スペクトルは非常に有効であり、パターンも一次近似に近いので解析は容易である。しかしながらシフト値が近く重なり合いが激しい場合にはスペクトルを拡大してLAOCNの計算を併用しながら個々のピークを分離・帰属する必要があつた。

表1 D環のプロトンのNMRパラメータ

	化学シフト値		スピン結合定数		
	1	2	1	2	
1 4	0.978	1.201	7.2	7.4	1 5 α
			12.3	12.3	1 5 β
			10.9	10.9	8
1 5 α	1.628	1.612	-12.6	-12.4	1 5 β
			3.5	3.5	1 6 α
			9.5	9.8	1 6 β
			7.2	7.4	1 4
1 5 β	1.313	1.314	-12.6	-12.4	1 5 α
			11.9	12.2	1 6 α
			5.9	6.5	1 6 β
			12.3	12.3	1 4
1 6 α	1.466	1.842	-13.7	-14.0	1 6 β
			3.5	3.5	1 5 α
			11.9	12.2	1 5 β
			8.3	-	1 7 α
			-	0.6	1 7 α - CH ₃
1 6 β	2.084	1.758	-13.7	-14.0	1 6 α
			9.5	9.8	1 5 α
			5.9	6.5	1 5 β
			9.1	-	1 7 α
			8.3	-	1 6 α
1 7 α	3.655	-	8.3	-	1 6 α
			9.1	-	1 6 β

2) ¹Hと¹³Cシフトに対するメチル化の効果

1 7 α 位にメチル基が置換することによって生じる¹Hと¹³Cのシフト値を表2に示す。ここでは大きな値を示した位置についてだけを表わし、低磁場シフトを正としてある。1 7 α 位へのメチル化によって、¹H NMRでは立体的に近い位置にあるプロトンがおおきなシフトを経験するが、1 2位と1 6位で α -Hは低磁場側へ β -Hは高磁場側へのシフトする。同様にH-1 4 α は低磁場側へシフトしている。1 5位のプロトンには大きなシフトは見られず立体的に離れているためとして説明できる。さきに述べた帰属において、従来の文献どおりにH-16 α とH-16 β を逆にするとメ

表2. メチル化によるシフト

	¹ H NMR	¹³ C NMR
1 1 β	0.011	
1 2 α	0.210	-5.03
1 2 β	-0.311	
1 3	-	2.53
1 4	0.223	
1 5 α	-0.016	
1 6 α	0.376	8.39
1 6 β	-0.326	
1 8 (CH ₃)	0.114	2.85

チル化シフトの点では整合性がなくなるので、我々の帰属のもう1つの論拠である。 ^{13}C におけるメチル化シフトは6位のメチル化シフト³⁾と類似の挙動を示している。

3) 固体高分解能 ^{13}C NMR

テストステロンのX線回折の結果、2つの分子が異なったコンフォメーションで結晶では存在することがわかっている。またA環の構造は溶液状態では half-chair になっていることが ^1H NMRで確かめられているが、X線回折の結果と必ずしも一致していない。ここでは図2と図3にテストステロンとメチルテストステロンの温度変化スペクトルを示し、帰属も図中に示した。AからD環の炭素シグナルに分裂がみられ、結晶解析の結果と一致する。温度上昇とともにA環炭素のシグナルにブロードニングがみられ、環の運動が考えられるが、D環では際だった変化がないところから、環は安定であるといえよう。

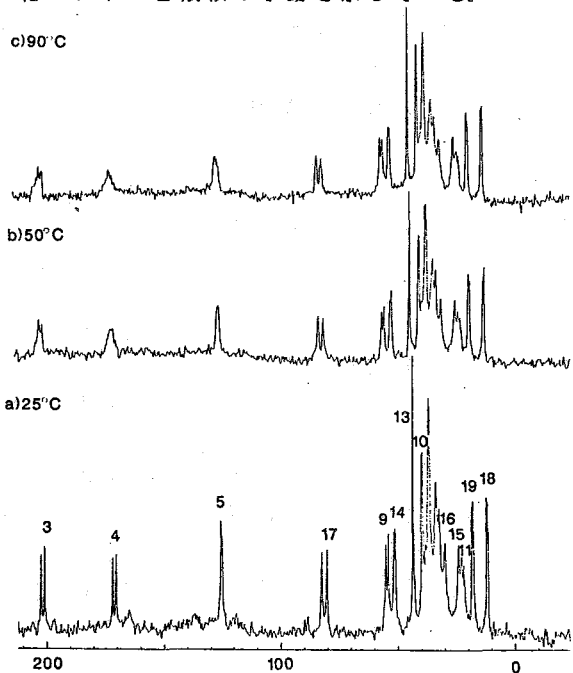


図2. テストステロン固体の ^{13}C スペクトル

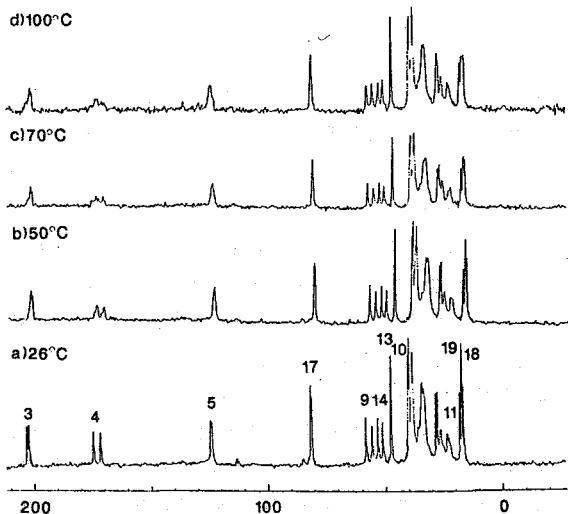


図3. メチルテストステロン固体の ^{13}C スペクトル

文献

1. E. Breitmaier and W. Voelter, "Carbon-13 NMR Spectroscopy", Third Ed., VCH (1987).
2. L. A. Hall and J. K. M. Sanders, J. Am. Chem. Soc., 102, 5703 (1980).
3. T. Iida, T. Tamura, and T. Matsumoto, Mag. Reson. Chem., 25, 558 (1987).

(芝浦工大. 工) ○三重野聡・近森正博・永田親清

¹H, ¹³C and ¹¹⁹Sn DNMR Spectra of Indenyltin Derivatives

Satoshi MIENO, Masahiro CHIKAMORI and Chikakiyo NAGATA (Department of Industrial Chemistry, Shibaura Institute of Technology)

The intramolecular rearrangement behaviour of triphenyl(indenyl)stannane, (1), diphenyldi(indenyl)stannane, (2), triphenyl(2-bromoindenyl)stannane, (3) and dimethyldi(indenyl)stannane, (4) has been investigated using variable-temperature ¹H, ¹³C and ¹¹⁹Sn NMR spectroscopy. The activation energies of (1) and (2) were obtained 14.4 and 13.7 kcalmol⁻¹, respectively, by the total line shape analysis of ¹³C NMR spectra. In the ¹¹⁹Sn NMR spectra of (2) and (4) were observed to the signals of doublet due to the stereoisomerism.

・序論: 1-インデニルスズ(IV)化合物のメタロトロピック転位は、多くの種類の化合物が合成されDNMRが測定されてきた。そしてその多くが1,2-シフトの可能性を支持する結果であった。しかし一方で1,3-シフト機構も提案されており、その転位機構についてはいまだはっきりしていない。

本研究では、(1)および(2)について活性化エネルギーを線形解析により求め、新たに(3)および(4)のDNMRを測定することにより、インデニルスズ系の動的挙動について考察した。

・実験方法: 合成は以前示された方法によって行なった²。NMR測定には、日本電子FX-90Qを使用した。積算回数は¹³C-NMRで200-500回、¹¹⁹Sn-NMRで2000-10000回である。温度制御はNM-PVTで行なった。線形解析には、修正Blöchの方程式に基づいたプログラムを使用し、NEC PC-9801型パソコンによって行なった。活性化パラメータはArrheniusプロットによる方法で求めた。

・結果および考察: (4)の¹H-NMRスペクトル変化は、-37°CでC¹のキラリティーに基づく立体異性(+:++,-=1:1)がH²シグナルで観察された(図-1)。昇温に伴ってH²の共鳴線は合体し、H¹とH³も同時に広幅化していく。さらに60°CにおいてH²シグナルは三重線化し、オレフィン性を有すると考えられるシグナルになる。このことは他の多くの文献においても示

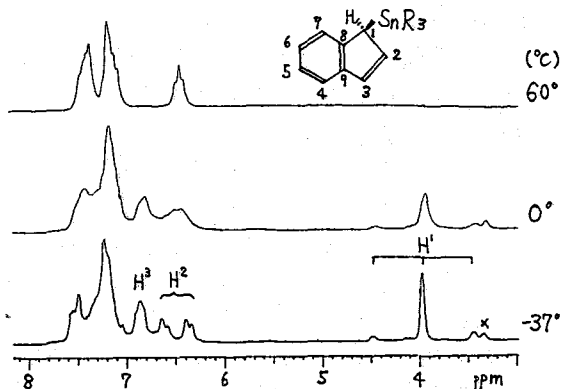


図-1. Me₂Sn(C₉H₇)₂の¹H-NMRスペクトル
x印は未反応インデン

されている。

(1)の ^{13}C -NMRスペクトルは、 -30°C でrigidな構造のスペクトルを示すが、昇温に伴って広幅化し、 $45\sim 50^\circ\text{C}$ で C^1/C^2 , C^5/C^6 , C^7/C^8 の対は合体した。そして 60°C では、平均化されたシャープなシグナルとなっていく様子が観察された。 C^1/C^3 の対は、化学シフト差が大きすぎるためにブロードになるだけで、平均化されたシグナルはみられない。また、 C^2 の δ 値、線幅および $J(\text{Sn}-\text{C}^2)$ の値には変化がなかった。このような挙動は、化合物(2)および(4)においても観察された。

線形解析によるスペクトルの照合(図-2)と、Arrheniusプロットから、 $E_a = 14.4 \pm 0.5$ (kcal mol^{-1}), $\log A = 11.9 \pm 0.5$ という値を得た(表-1)。なおスペクトルの照合には、化学シフト差および線幅を変化させる必要があった。

(3)の CDCl_3 を溶媒とした室温から 60°C までの ^1H -NMRスペクトルでは、線幅の変化は認められず、その転位速度はきわめて遅いものと考えられる。トリメチル(2-ブロモインデンリ)スタンナンでは、トリメチルインデンリスタンナンとくらべて約 55°C 高い温度からフラクショナルな挙動を起こすことが示された²。(3)では(1)とくらべても 80°C 以上高い温度でもフラクショナルな挙動を示さない。このことは Me_3Sn 基よりも Ph_3Sn 基の方が高いことにもよるが、 R_3Sn 基が C^2 炭素に近い経路で転位する可能性が高いことを示していると考えられる。

(4)の ^{119}Sn -NMRでは、立体異性による二重線が生じた(図-3)。このスペクトルにも温度依存性があり、 0°C で合体した。同様のことは(2)においても観察された。

以上の実験結果とこれまでの研究から、インデンリスズ系化合物について次のようなことがわかった。①. C^2 の δ 値、 J 値、線幅に変化はない。②. ^{13}C -NMRでは η^5 -アリル錯体として表わされるような変化である。③. インデンリスズの E_a はおおよそ $13\sim 15$ (kcal mol^{-1})であり、これは1,2-シフトを支持する値となる。④. ^1H , ^{13}C -NMRにおいてもイソインデンリ構造に相当するシグナルは観察されない。⑤. ^{119}Sn -NMRは立体異性に対して敏感であり、はっきりと分裂したシグナルを与える。

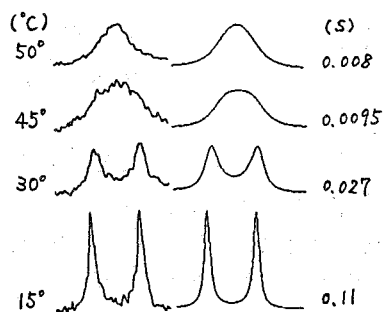


図-2. (1)の ^{13}C -NMRにおける実測と計算のスペクトル(C^1/C^7 部分)

表-1. (1)および(2)の活性化パラメータ

	E_a (kcal mol^{-1})	$\log A$
$\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{C}_9\text{H}_7)$	14.4 ± 0.5	11.9 ± 0.5
$\text{Ph}_2\text{Sn}(\text{C}_9\text{H}_7)_2$	13.7 ± 0.6	11.9 ± 0.5

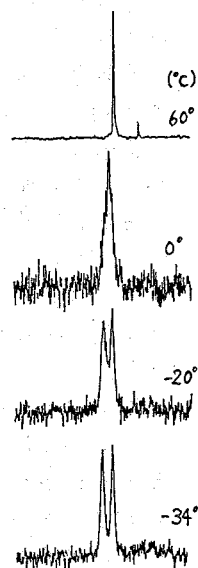


図-3. $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{C}_9\text{H}_7)_2$ の ^{119}Sn -NMRスペクトル

- 1) K.G.Orrell, V.Sik, M.O.Dunster, E.W.Abel, J.Chem.Soc., Dalton trans., 1974, 631.
- 2) A.Davison and P.E.Rakita, J.Organomet.Chem., 1970, 23, 407.
- 3) A.D.McMaster and S.R.Stobart, J.Chem.Soc., Dalton Trans., 1982, 2275.

(阪大教養, 阪大理, リバプール大)

○江口太郎, 武田 定, 中村亘男, 千原秀昭,

B. T. Heaton, and S. Kernaghan

^{13}C and ^{59}Co NMR in solid $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$

T. Eguchi, S. Takeda^{a)}, N. Nakamura^{a)}, H. Chihara^{a)},
 B. T. Heaton^{b)}, and S. Kernaghan^{b)}

College of General Education and ^aFaculty of Science, Osaka Univ.

^bDepartment of Chemistry, The University of Liverpool

Temperature variation of ^{13}C and ^{59}Co NMR has been measured in the crystalline $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$. Both the temperature dependence of the spin-lattice relaxation time and that of the chemical shift of ^{59}Co suggest that the motion of Co_4 -tetrahedron becomes rapid in the regime of $\omega_0\tau_c \gg 1$ in the solid state. Seven peaks of ^{13}C MAS NMR became broad as increasing the temperature. It is, however, rather difficult to assign those peaks to particular carbonyls in the unit cell, and to determine the chemical-exchange process of carbonyl groups.

1. はじめに

溶液中や結晶中での $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$ の構造については, 過去30年以上にわたって, 多方面から活発に研究されてきた。もっとも興味をもたれてきた問題の一つは, 固体中の金属クラスターの動的構造である。

X線結晶構造解析によると, Co_4 クラスターの配向に関しては, 室温で Fig. 1 (右) に示した2回軸まわりの乱れの存在が示唆されている¹⁾。

^{13}C MAS NMR は, このような固体中のダイナミクスを解明するための強力な手段になりつつある。Hansonらは, $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$ の ^{13}C MAS NMR スペクトルの温度変化

を測定し, 結晶中でもカルボニル基の化学交換が起こっており, それは, カルボニルで形

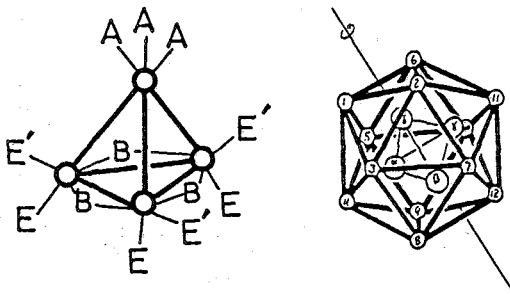


Fig. 1. Schematic representation of the structure of $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$. left: in solution (A=apical, B=bridge, E and E'=edge CO). right: in crystals.

成されたクラスター中の Co_4 クラスターの運動によるものと推論した^{2,3/}。しかし、そのスペクトルは、分解能が十分でなかったり、spinning side bands と重なったりしているため、化学交換による線形の変化はそれほど明瞭ではない。

Co_4 クラスターの結晶中の動的挙動を定量的に明らかにするために、われわれは、 ^{13}C MAS NMR と ^{59}Co NMR の吸収線形とスピン-格子緩和時間 (T_1) の温度変化を測定した。

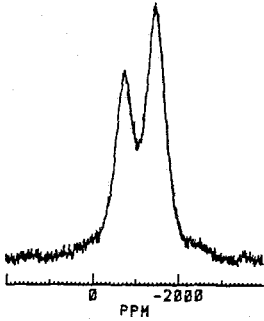


Fig. 2. ^{59}Co line-shape at $T=106\text{ K}$

2. 実験と結果

^{13}C 含有率 20.2 % の試料を合成した。Bruker MSL-200 を使用し、 ^{59}Co NMR スペクトルと T_1 を 106 K から 330 K まで測定した。結果を Fig. 2-4 に示す。 ^{13}C MAS NMR スペクトルの温度変化の測定結果を Fig. 5 に示す。

3. 考察

Fig. 1 (左) に溶液中の $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$ クラスターの構造を示す^{4/}。CO (apical) が配位した Co と CO (edge), CO (bridge) が配位した Co の 2 種類が存在する。Fig. 2 から

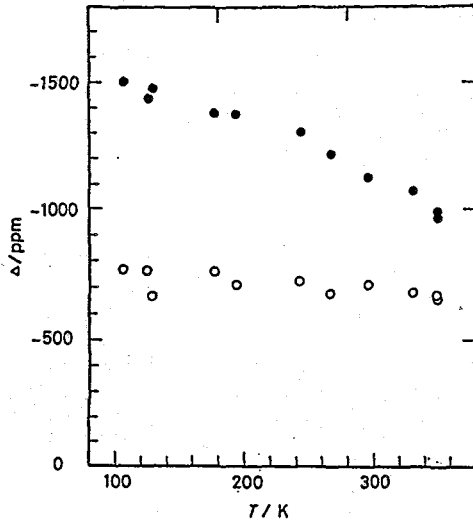


Fig. 3. Temperature dependence of ^{59}Co chemical shift
● up-field (basal Co); ○ down-field (apical Co)

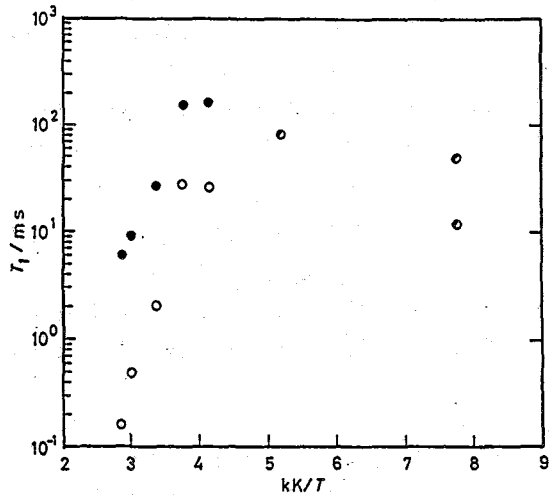


Fig. 4. ^{59}Co T_1 vs $1/T$
○ short component, ● long component

わかるように、結晶中でも 2 種類の Co が存在しており、それぞれのピークの強度比から考えて、低磁場側が CO (apical) の配位した Co に、高磁場側ピークが basal の Co に、

帰属することができる。

^{59}Co は $I = 7/2$ で、核四極相互作用の効果を考慮しなければならない。Fig. 2 の線形はパルス幅に依存する。みかけの $\pi/2$ パルス幅が basalの Co では $2.75 \mu\text{s}$, apicalの Co では半分の $1.35 \mu\text{s}$ になった。このことから、Co(apical)の $e^2q q$ のほうが Co(basal)のそれより大きくなるものと考えられる¹⁵⁾。しかしながら、 $K_3[\text{Co}(\text{CN})_6]$ 結晶(標準物質: $e^2q q/h = 5.88 \text{ MHz}$, $\eta = 0.9/6$)の場合、 ^{59}Co スペクトルには典型的な2次の quadrupolar shiftの粉末パターンが観測されたので、 $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$ 結晶中の $e^2q q$ は $K_3[\text{Co}(\text{CN})_6]$ の値より小さいことがわかる。

T_1 測定の場合、 π パルス = $5.5 \mu\text{s}$ を使い、Co(basal)の磁化回復を観測したけれども、Co(apical)と厳密に区別するのは非常に困難だった。 $I = 7/2$ の多重レベルのため磁化回復曲線は2成分からなり、それぞれの温度依存性を Fig. 4 に示す。250 K 以上で T_1 が急激に短くなり(活性化エネルギー = $40 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$)、 $\omega_0 \tau \gg 1$ の範囲で Co(basal)の電場勾配のゆらぎが速くなる。

Fig. 3 に示した ^{59}Co のケミカルシフトの温度依存性も、 δ (apical)はほぼ一定なのに対して、 δ (basal)のほうは温度上昇とともに低磁場側にシフトする。これも、おそらく、クラスタの運動により Co(basal)のケミカルシフトの異方性が変化するためであろう。奇妙なことは、 δ (apical)は室温の溶液中の値 (-715 ppm)と一致するけれども、106 Kの δ (basal)は -1500 ppm で、溶液中の値 (-2065 ppm)よりもかなり低磁場側にシフトしていることである。結晶中の値は、低温極限で、あたかも溶液中の値に近づいてゆくように見える。

^{13}C NMRの場合、溶液中では、191.7 と 195.6 ppm に CO (edge) による鋭いピーク、200~205 ppm に CO (apical) による幅広く弱いピーク、243.1 ppm に CO (bridge) による鋭いピークの計4本が観測されている¹⁴⁾。

Fig. 5 に示した結晶中のスペクトルには、少なくとも7本のピークがある。spinning rate を変えた測定と TOSS法を使った測定とで、これらのピークはside bands ではないことを確かめた。また、試料の分解などが無いことも、6週間後の再測定で確認した。なお、Hansonらは、68 MHz で ^{13}C MAS NMRスペクトルを測定しているが、spinning side band の影響で、われわれが得たデータより分解能がずっと悪い¹³⁾。

単純に溶液のスペクトルと比較すれば、230 ppm のピークが CO (bridge)に、それ以外

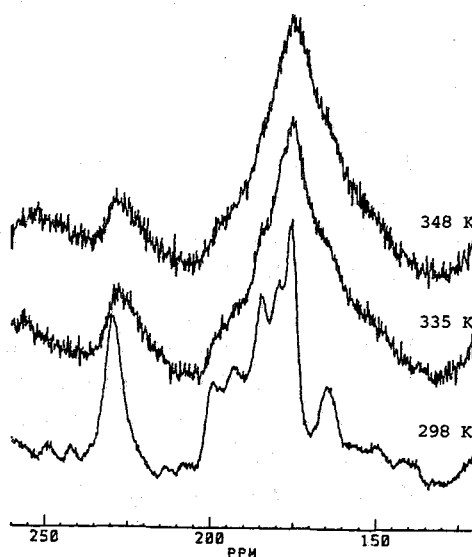


Fig. 5. Temperature variation of ^{13}C MAS NMR spectra

のピークがCO(edge), CO(apical)に帰属できそうである。しかし、結晶構造解析によれば、単位格子中には6種類の非等価なCOが存在しており、また、2回軸まわりの乱れがあることを考えると、ピークの帰属はそれほど簡単ではない。温度変化の結果も230 ppmのピークに対応したCOは、最高温度でも化学交換していないことを示している。これは、Co(basal)が運動していることと矛盾するように思える。結晶の場合は、bridge, apical, edge, それぞれのCOピークが、溶液の場合とは違うケミカルシフトの領域に現れる可能性も考えられる。さらに、共鳴線の位置ばかりでなく、それぞれのピーク強度も未解決の問題である。

しかしながら、今回、比較的シャープな ^{13}C 信号が得られたこと、また、二つのサイトの ^{59}Co の信号がはっきり観測され、その e^2qQ が小さいこと、が確認されたので、今後、クラスターの動的構造のモデルを立てるうえで有効である。

References

- /1/ F. H. Carre, F. A. Cotton, and B. E. Hanson, *Inorg. Chem.* 15 (1976) 380.
- /2/ B. E. Hanson and E. C. Lisic, *Inorg. Chem.* 25 (1986) 715.
- /3/ S. Aime, M. Botta, R. Gobetto, and B. E. Hanson, *Inorg. Chem.* 28 (1989) 1196.
- /4/ S. Aime, R. Gobetto, D. Osella, L. Milone, G. E. Hawkes, and E. W. Randall, *J. Magn. Reson.* 65 (1985) 308.
- /5/ P. P. Man, J. Klinowski, A. Trokiner, H. Zanni, and P. Papon, *Chem. Phys. Lett.* 151 (1988) 143.
- /6/ J. A. J. Lourense and R.C. Reynhardt, *J. Phys. Soc. Jpn.* 30 (1971) 898.

(名工大) ○中島 康喜・中根 英樹・坂 貞徳・高橋 憲助

Linear Correlations between NMR Deuterium Isotope Shifts and Electron Density Changes in Substituted Benzenes.

Yasuki Nakashima, Hideki Nakane, Sadanori Ban, and Kensuke Takahashi

(Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology)

The $^1\Delta$ and $^2\Delta$ deuterium isotope effects on ^{13}C NMR chemical shifts were investigated for substituted benzenes. Additive substituent parameters which were calculated by $^n\Delta$ ($n=1$ or 2); SIS ($^n\Delta$) were correlated with electron density changes of observed carbons. SIS ($^1\Delta$) and SIS ($^2\Delta$) were correlated with π - and σ -electron density changes, respectively.

[序]

^{13}C NMR 化学シフトにおける重水素同位体効果は、スペクトルの帰属や反応機構や生合成経路の研究に有用なパラメーターであることが知られている。また、最近では炭素-炭素結合距離の測定¹⁾や、分子の立体配座の研究や、蛋白質のゆらぎに関する研究²⁾に至るまで幅広く応用されており、その有用性は益々増大していると言える。

しかし、NMR 同位体シフトの起源はまだ完全には解明されておらず、幾つかの化学的パラメーターとの相関は示されているが、同位体シフトの生じる機構の解明のために更なる研究が望まれている。我々はこれまでに、ベンゼン環炭素に直接結合する重水素原子が引起こす two-bond 同位体シフト ($^2\Delta$) に対する置換基効果 (SIS) と ^{13}C SCS との相関を示した³⁾。本報告では、新しく得られた one-bond シフト ($^1\Delta$) のデータと併せて、同位体シフトの生じる機構を考察し、興味深い知見を得たので報告する。

[実験]

実験系としては、重水素ラベル体の合成が比較的容易な置換フェノール、置換アニソール、アニリンを選んだ。ラベル体の合成は主に酸あるいはアルカリ触媒の H/D 交換反応により行なった。 ^{13}C NMR 測定は、Varian XL-200 FT NMR 分光計 (50.3 MHz) を用いて行なった。詳細は既報³⁾の通りである。 $^1\Delta$ 測定の際には、重水素原子の四極子相互作用によって α -炭素の吸収がブロード化して測定精度が低下する。

なかしま やすき ・ なかね ひでき ・ ばん さだのり ・ たかはし けんすけ

そこで高温測定(80℃)を行なうことでこの問題を解決したスペクトル例をFig. 1に示す。

[結果と考察]

$^1\Delta$ は217~318 ppb(データ数39)、 $^2\Delta$ は29~138 ppb(同76)まで変化した。変化の大きさはどちらもおよそ100 ppbである。それらの値をTable 1、2に示す。無置換のベンゼンで観測される値($^1\Delta=283$ 、 $^2\Delta=111$ ppb)を基準にこれらのデータを見ると、 $^2\Delta$ の場合には、3-ヨードフェノールのC₃で観測されるものだけがベンゼンよりも大きく、他はすべて小さい。一方 $^1\Delta$ の場合はベンゼンより大きい場合、小さい場合の両方が見られる。 $^1\Delta$ はC-H結合定数($^1J_{CH}$)と相関を示すという報告があるが、本研究の系では、何等相関は得られなかった。観測核はすべて

sp²炭素なので、 $^1J_{CH}$ はさほど大きな変化を示さない。一方 $^1\Delta$ は100 ppbもの変化を示す。この変化は、混成変化による $^1\Delta$ の減少—例えばシクロヘキサン(sp³)→ベンゼン(sp²):418-283=135 ppb—to匹敵するものである。よって、置換ベンゼンにおける $^1\Delta$ は、炭素の混成以外の重要な因子に支配されると考えられる。

SIS($^1\Delta$)の統計的決定

既報³⁾で行なった、同位体シフトに対する置換基効果(SIS)の決定を $^1\Delta$ についても試みた。リニアリグレーションの手法により、得られた39個のデータと4個の文献値^{4,5)}を次式に代入し、NEC PC 9801を用いて、各パラメータb~dを最適化した。

$$^1\Delta = B_0 + n_o b + n_m c + n_p d \quad (1)$$

ここで、B₀は無置換ベンゼンの $^1\Delta$ をあらわす。b、c、dは置換基が観測核に対して、それぞれ、オルト、メタ、パラ位にある時の効果を表すパラメーター(SIS)である。n_o、n_m、n_pは、その位置にある置換基の数をあらわす整数である。解析法の詳しい説明は既報³⁾で述べてある。B₀は常温の値なので変数として取り扱い、統計的に決定した。B₀の決定値と実測値はよく一致したので、測定温度による $^1\Delta$

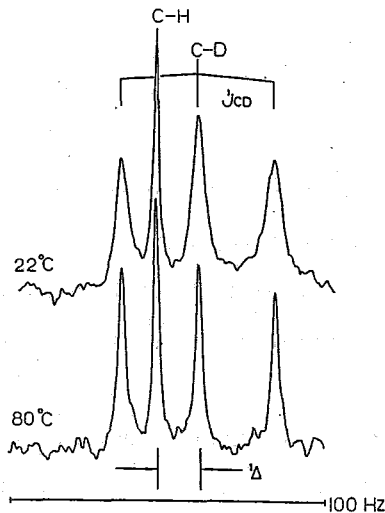


Fig. 1 C-13 NMR spectra of C_{2,3} of 4-methylphenol.

Table 1 α -Deuterium isotope effects on ^{13}C chemical shifts of phenols and substituted benzenes in ppb ($^1\Delta$)*,b)

Substituent	Observe carbon				Solvent
	C ₂	C ₃	C ₄	C ₆	
H	282		269	262	neat
H-3-d ₁		272			CDCl ₃
3-NH ₂	257		260	239	0.10vtXNaOH-D ₂ O
3-OH	251		247	247	0.10vtXNaOH-D ₂ O
3-OMe	275		283	254	neat
4-OMe	263	285	263		neat
3-tert-Bu	...		280	...	neat
4-tert-Bu	274			274	1,4-Dioxane
3,5-tert-Bu ₂	269		295	269	1,4-Dioxane
3-Me	287		285	258	neat
4-Me	262		264	262	neat
3-Cl	264		264	250	neat
4-Cl	255			255	neat
3,5-Cl ₂	257		267	257	neat
3-I	314		305	260	neat
3-F	217 ^{f)}		218 ^{f)} 251 ^{f)}		1.0vtXNaOH-D ₂ O
Aniline	278		259	278	neat
3-Me-Anisole	318		293	296	neat
Toluene		280 ^{c)}	276 ^{c)}		CDCl ₃
tert-Bu-benzene			278 ^{c)}		acetone-d ₆

a. Errors are estimated to be within 4 ppb.
b. Digital resolution = 0.156 Hz/point(3.1 ppb/point).
c. Signal is not available because line overlapped.
d. Cited value from ref. 4.
e. Cited value from ref. 5.
f. With large uncertainty.

の違いは無視できると言える。計算における最小二乗誤差は3.0 ppb、決定されたSISから計算される

$^1\Delta$ の計算値と実測値との間の直線相関係数は0.995であった。よって各置換基に3種類のSISで、 $^1\Delta$ をよく表現できると言える。メチル基のSIS ($^1\Delta$)はBergerら⁴⁾が発表しているが、その値と、本研究のメチル基の値は、実験誤差以内で一致した。決定されたSIS ($^1\Delta$)をSIS ($^2\Delta$)³⁾とともにTable 3に示す。明らかに、両者の間には相関は見られない。

SIS ($^0\Delta$)と電子密度との相関

NMR同位体シフトの原因は、少なくとも一部はC-H結合とC-D結合の振動の違いであると言われている。C-H結合とC-D結合の平均結合距離の違いを仮定したMO計算の結果は、 α -炭素 ($^1\Delta$ 観測炭素)では遮蔽が増大し、 β -炭素 ($^2\Delta$ 観測炭素)では減少することを示している。即ち、 $^1\Delta$ は高磁場シフト、 $^2\Delta$ は低磁場シフトであることを予言している。しかし、実際には、一部の例外を除いて $^1\Delta$ 、 $^2\Delta$ はともに高磁場シフトである。従って、C-H結合がC-D結合に置換された直接の影響による β -炭素の遮蔽変化は、 $^2\Delta$ には重要でないと考えられる。 $^1\Delta$ はC-HとC-Dの違いを直接反映するパラメーターであるといえるが、 $^2\Delta$ については、 α -炭素の遮蔽変化が伝達されて β 炭素の遮蔽を変化させるという機構が示唆される。SIS ($^2\Delta$)は、 ^{13}C SICSと強い相関を示すが、オルト・パラのデータは、イプソ・メタのデータから得られる最小二乗線の下側(即ち ^{13}C SICSの高磁場側)にデビエーションを示すことがわかっ

Table.2 β -Deuterium Isotope effects on ^{13}C chemical shifts of phenols in ppb ($^2\Delta$)^{a)}

Substituent	Observe carbon			Solvent	Digital resolution
	C ₁	C ₂	C ₃		
H	44	107	107	neat	a
2-Me	39	105	112	neat	a
3-Me	47	84	107	neat	a
4-Me	43	96	96	neat	a
2,3-Me ₂	42	84	111	1,4-Dioxane	a
2,4-Me ₂	43	-	105	neat	a
2,5-Me ₂	38	111	80	1,4-Dioxane	a
2,6-Me ₂	-	111	111	1,4-Dioxane	a
3,4-Me ₂	46	76	101	1,4-Dioxane	a
3,5-Me ₂	45	86	86	1,4-Dioxane	a
2-OHc	39	105	109	neat	a
3-OHc	48	46	107	neat	c
4-OHc	48	92	92	neat	a
2,3-OHc ₂	47	42	110	neat	b
2-Cl	38	99	108	neat	a
3-Cl	46	88	106	neat	a
4-Cl	45	91	91	neat	a
2,3-Cl ₂	40	83	106	1,4-Dioxane	a
3,4-Cl ₂	48	76	-	1,4-Dioxane	a
3,5-Cl ₂	50	86	86	neat	a
2-tert-Bu	32	108	108	CDCl ₃	a
3-tert-Bu	40	66	100	neat	a
4-tert-Bu	44	101	101	neat	a
3-OH	47	47	107	0.14v1X NaOH-D ₂ O	b
2-NO ₂	-	110	102	D ₂ O	c
3-NO ₂	54	61	97	CH ₃ OH	a
4-NO ₂	-	98	98	CH ₃ OH	a
3-NH ₂	43	83	104	0.10v1X HCl-D ₂ O	b
3-I	48	138	111	neat	c
4-I	-	82	82	CDCl ₃	c
3-F	46	29	102	neat	c

- a. 0.16 Hz/point (3.2 ppb/point)
 b. 0.19 " (3.7 ")
 c. 0.22 " (4.3 ")
 d. Errors are estimated to be within 5 ppb.

Table.3 Statistical parameters for Eqn.(1)---SIS($^2\Delta$)

Substituent	SIS($^1\Delta$) ^{a)}			SIS($^2\Delta$) ^{a)}			
	b	c	d	a	b	c	d
H	0	0	0	0	0	0	0
F	-47.8	-	-14.0	-78.5	-	-2.9	-
OH	-18.5	-12.3	-17.8	-64.7	-3.0	-3.5	0
OMe	14.7	-2.0	-10.9	-60.2	-6.5	2.7	0
NO ₂	-	-	-	-46.5	-3.5	-1.4	0
NH ₂	-6.4	-	-25.2	-44.5	-	-3.4	-
tert-Bu	14.1	9.0	-7.8	-41.5	-6.8	-6.9	0
Me	20.4	-3.2	-5.5	-22.7	-4.1	0.2	0
(Me) ^{b)}	23.7	-0.9	-7.4	-26.4	-5.5	0	0
Cl	0.5	-10.0	-11.7	-19.7	-9.5	0.7	0
I	44.2	-	-5.0	30.5	-25.5	2.6	0
	B ₀ = 283.4			B ₀ = 111(const.)			

- a. RMS error = 3.0ppb.
 Linear correlation coefficient between experimental and calculated data = 0.995.
 Standard deviation = 2.1 ppb.
 b. Cited value from ref.4.
 c. RMS error = 4.3ppb.
 Linear correlation coefficient between experimental and calculated data = 0.992.

ている³⁾。このことより、 $^2\Delta$ には置換基の共鳴効果は寄与しないことが考えられる。そこで、 $SIS(^2\Delta)$ と Δq_σ (σ -電子密度に対する置換基効果)をプロットするとFig. 2に示すような直線相関が得られる。一方、 $SIS(^1\Delta)$ と ^{13}C SCSとの間には相関は得られない。しかし、パラ位の SIS つまりdだけに注目すれば、直線相関を得ることができる。しかし、この時の直線の傾きの符号は $^2\Delta$ の場合とは逆である。パラ位炭素は置換基から最も遠く、置換基の誘起効果の寄与は小さい。そこで、 $SIS(^1\Delta)$ のdと、 Δq_π (π -電子密度に対する置換基効果)をプロットすると、

Fig. 3のように直線関係が得られる。このことより $^1\Delta$ には π -電子密度が重要であることがわかり、 π -電子密度が大きい程、 $^1\Delta$ は小さくなると言える。ただしオルト位の SIS のbとの間には、このような相関は見られないので、全く異なる因子が存在すると考えなければならない。

[まとめ]

以上のことより、 $^2\Delta$ は α -炭素で生じた遮蔽変化が σ -結合を通して伝達される「誘起的な」機構で生まれると考えられる。 $^1\Delta$ には、 π -電子密度が重要であるが、他の因子も重要な寄与をしており、更なる研究が必要と考えられる。

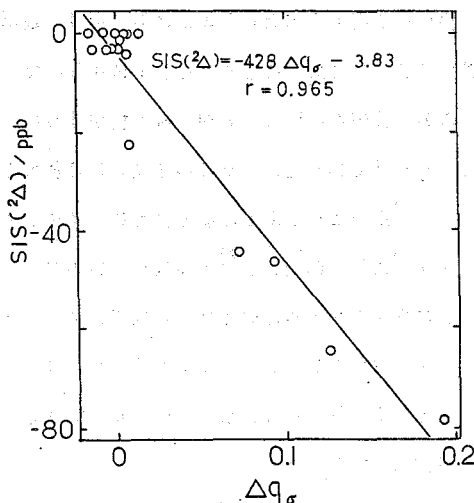


Fig. 2 Correlation between Δq_σ and $SIS(^2\Delta)$

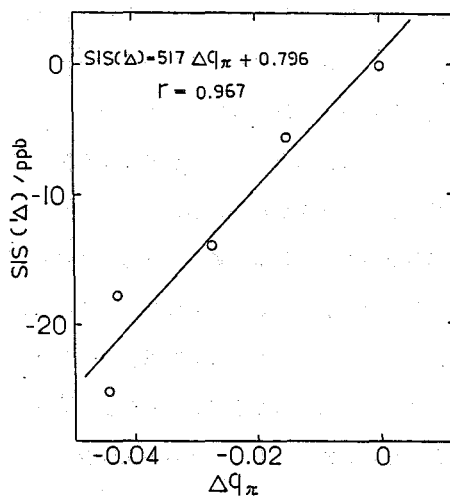


Fig. 3 Correlation between Δq_π and $SIS(^1\Delta)$

References)

- 1) D.J. Sardella et.al. Magn. Reson. Chem., 27, 253 (1989)
- 2) K. Uchida et.al. 第27回NMR 討論会講演要旨集 67, (1988)
- 3) Y. Nakashima et.al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 1401 (1989)
- 4) S. Berger et.al. Magn. Reson. Chem., 24, 1073 (1986)
- 5) S. Berger et.al. Tetrahedron Lett., 28, 1243 (1987)

東北大・理 ○山口 正・永澤 明・佐々木陽一・伊藤 翠

The Rate of Site-selective Acetate Exchange in $[\text{Pt}_4(\text{CH}_3\text{COO})_8]$
by means of Saturation Transfer Method

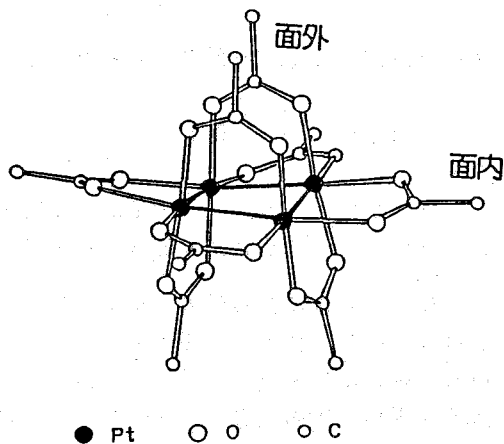
Tadashi Yamaguchi, Akira Nagasawa, Yoich Sasaki, Tasuku Ito

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

Kinetics of the acetate exchange reaction for in-plane acetate of $[\text{Pt}_4(\text{CH}_3\text{COO})_8]$ in CDCl_3 has been studied by ^1H -NMR saturation transfer method. The rate law was found to be, $\text{Rate} = 4(k_0 + k_1[\text{CH}_3\text{COOH}])([\text{Pt}_4(\text{CH}_3\text{COO})_8])$. At 25°C , k_0 and k_1 are 0.36s^{-1} and $4.4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. The rate constant k_1 is considerably larger than normal second order rate constant for platinum(II).

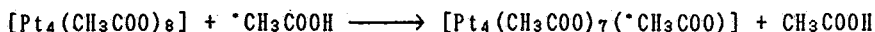
<緒言> 金属錯体の配位子置換反応を調べる上で、置換する配位子と置換される配位子が同じである配位子交換反応は基本的な反応であり、金属錯体の反応性について重要な知見を与える。原系と生成系が同じで反応を通じて濃度変化がないので、通常は同位体標識法またはNMR法が用いられている。同位体標識法に比べてNMR法は、取扱いの容易さ、サイトが特定できることなどたいへん有用な方法である。NMR法は従来、速い反応については線形解析法が、遅い反応については重水素化した配位子と錯体を混合しそのシグナル強度の変化を追跡する方法が用いられてきた。強度変化を追う方法ではストップフロー-NMRなどの装置を用いないかぎり1分以内に完結する反応や低温での測定は困難であった。また、この領域の速度をもつ反応では、溶媒の沸点近くまで温度を上げてピークがcoalesceせず線形解析法が用いられないことが多い。このような中間的な領域には飽和移動法が適用できる。この測定法は1963年にForsenら¹⁾によって考案された方法で、交換速度が縦緩和時間 T_1 の $(1/10)$ - 10 倍程度の時に測定可能な方法であるが、その適用できる速度範囲が狭いためか、速度論的な研究にはあまり用いられていなかった。今回、白金(II)四核錯体 $[\text{Pt}_4(\text{CH}_3\text{COO})_8]$ (図1)の配位酢酸イオンの交換について ^1H -NMR飽和移動法を用いて反応速度論的研究を行ったので報告する。

この錯体には白金平面内と面外の二種類の酢酸イオンがある。2.44 ppmのピークが面内の、2.01 ppmのピークが面外

図1 $\text{Pt}_4(\text{CH}_3\text{COO})_8$ の構造

やまぐち ただし・ながさわ あきら・ささき よういち・いとう たすく

のメチルにそれぞれ対応する。⁴⁾ 錯体の溶液に酢酸-d₄を加えると、面外の酢酸のメチルピークは室温で1ヶ月たっても減少しないのに対して面内の酢酸は-30℃でさえも速やかに交換が起こり強度の時間変化を追うのは難しい。そこでこの交換反応に飽和移動法を適用した。



<測定法> 二つのサイトが適当な速度で交換している場合、そのNMRスペクトルの一方のサイトに対応するピークを照射して飽和させると、もう一方のピークも交換による影響を受けて強度が減少する。また緩和時間も交換により短くなる。交換の速度定数が縦緩和時間と同程度であるとき、これらを解析することによって交換速度を求めることができる。¹⁾

遊離の酢酸イオンをサイトA、錯体の面内の酢酸イオンをサイトBと考えると、交換反応は次式のようになり、交換速度Rは、AからBへ、BからAへの速度定数k_A、k_Bを用いて次のように表わされる



このような系においてBのメチルプロトン照射するとAのメチルプロトンのシグナル強度M_Aは照射しないときの強度M_{A0}より減少する。定常状態においてその強度比は、交換がないとしたときのAのピークの縦緩和時間T_{1A}とk_Aを用いて次のように表わされる。

$$\frac{M_A}{M_{A0}} = \frac{1}{1 + k_A T_{1A}}$$

また、Bを照射したときのピークAの縦緩和時間T_{1Aobs}は

$$\frac{1}{T_{1Aobs}} = \frac{1}{T_{1A}} + k_A$$

M_A/M_{A0}とT_{1Aobs}の測定から上の式を用いてk_A、T_{1A}が求まる。

$$k_A = \frac{1}{T_{1Aobs}} \left(1 - \frac{M_A}{M_{A0}} \right) \quad ; \quad T_{1A} = T_{1Aobs} \cdot \frac{M_{A0}}{M_A}$$

同様にしてAを照射した測定からk_B、T_{1B}が求まる。両方の測定から得られるk_A、k_Bと濃度から、それぞれ交換速度Rが求まるが原理的には両者は等しくなるはずである。

<実験> 錯体は既報²⁾の方法で合成し、CH₂Cl₂より再結晶した。CDCl₃、酢酸、TMSは市販の特級試薬をそのまま用いた。測定には日本電子JNM-GSX-270FT-NMR装置を用いた。試料には一定量の錯体、酢酸および標準物質としてのTMSをCDCl₃に溶かした溶液を用い、恒温装置で25℃にして次の方法で測定した。

①照射-非照射時の強度比 (M_A/M_{A0}) 照射はホモゲートデカップリングで行ない、パルス間隔は定常状態になるように15秒にして16回積算した。強度比はTMSを基準とした時の積分値の比をとった。照射による観測ピークの強度への直接的な影響を除くため

表1 各濃度における交換速度

No. a)	$[Pt_4]$ $10^{-2} mol \cdot kg^{-1}$	$[CH_3COOH]$ $10^{-2} mol \cdot kg^{-1}$	T_{1obs} sce	M_A/M_{A0}	R $M \cdot sec^{-1}$
1 A	0.65	5.67	2.035	0.592	1.14
1 B			0.590	0.697	1.34
2 A	0.99	5.98	1.548	0.530	1.82
2 B			0.573	0.743	1.78
3 A	1.49	5.68	1.206	0.397	2.84
3 B			0.595	0.714	2.85
4 A	0.99	1.20	1.098	0.279	0.79
4 B			0.794	0.846	0.76
5 A	1.00	2.74	1.349	0.451	1.12
5 B			0.663	0.756	1.47
6 A	1.00	3.56	1.319	0.439	1.51
6 B			0.677	0.711	1.71
7 A	1.00	7.46	1.726	0.532	2.02
7 B			0.553	0.677	2.33
8 A	0.99	9.97	1.799	0.546	2.52
8 B			0.541	0.642	2.62
9 A	0.99	18.93	2.108	0.558	3.97
9 B			0.459	0.502	4.30
10 A	1.00	21.32	2.049	0.593	4.24
10 B			0.449	0.533	4.15
11 A	1.00	29.50	2.117	0.596	5.63
11 B			0.388	0.508	5.10
12 A	1.00	44.18	2.307	0.554	8.54
12 B			0.361	0.343	7.28

a) A, Bはそれぞれ遊離, 面内の酢酸のメチルピークを照射したときの値

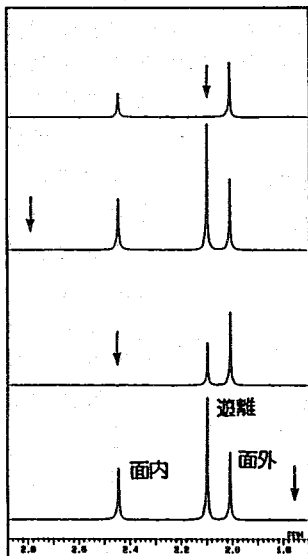


図2 照射時のスペクトル
(↓は照射位置を示す)

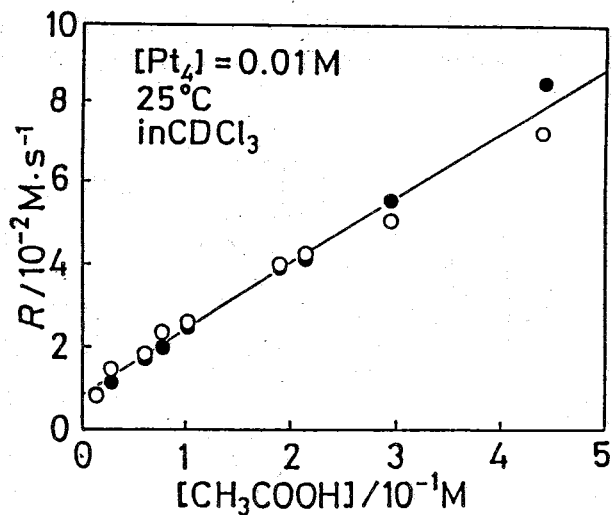


図3 交換速度の酢酸濃度依存性
(○, ●はそれぞれ遊離, 面内の酢酸の
メチルピークを照射したときの測定)

に観測ピークについて照射ピークと対称的な位置を照射したスペクトルを非照射の対照スペクトルとして用いた(図2)。

②照射時の縦緩和時間 ($T_{1\rho}$) $180^\circ-\tau-90^\circ$ 法を用いた。ホモゲートデカップリングで照射して、パルス間隔を5-15秒にして8回積算した。 τ を変えて7点測定し非線形最小自乗法によって縦緩和時間を測定した。

以上の二つの測定を配位の酢酸イオン、遊離の酢酸イオンのそれぞれのメチルプロトンピークについて行なった。二つの交換速度 k_A [A], k_B [B] がほぼ等しいことよりこの測定法の妥当性を確認した。

<結果と考察> 測定結果を表1に示す。

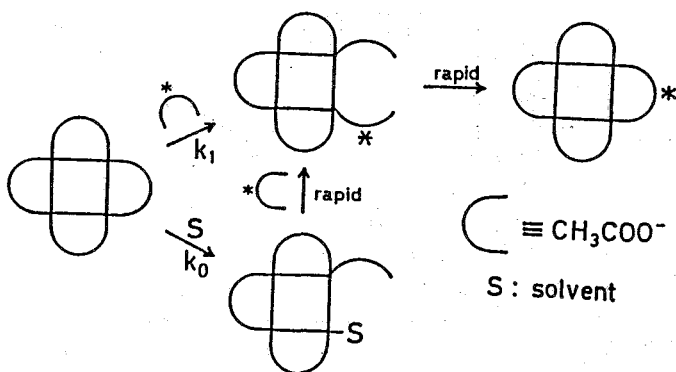
①錯体濃度依存性 酢酸濃度を一定にし(0.057M, $M = \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$), 錯体濃度 [Pt^4] を変化(0.06-0.15M)させて交換速度を求めると原点を通る直線になった。

②酢酸濃度依存性 錯体濃度を一定(0.01M)にし酢酸濃度を変えて(0.01-0.44M)交換速度をプロットすると切片をもつ直線になった(図3)。従って速度式は次のようになる

$$R = 4 \times (k_0 + k_1 [\text{CH}_3\text{COOH}]) [\text{Pt}^4]$$

③速度定数 図3のデータより速度定数はそれぞれ $k_0 = 3.6 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_1 = 4.4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ となった。このことから反応には、酢酸が直接置換していく経路と酢酸と直接関係しない経路の二つがあると思われる。 k_1 の値は通常のPt(II)錯体の二次速度定数($10^{-3} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 程度)に比べ非常に大きい(図4)。

④考察 一般に白金(II)単核錯体の置換反応は会合機構で進み、その速度定数も通常分光光度法で測定できる程度である。今回の反応は白金(II)のキレート配位子の置換反応にしては異常に速い。また、この反応は立体的に考えて解離機構で進むと考えられる。この



ような白金(II)錯体としては特殊な反応性は白金-白金結合のトランス効果によるものと思われる。酢酸イオンのO原子とPt原子との距離が面内(2.16Å)のほうが面外(2.00Å)よりも長いこと³⁾もこの考え方を支持する。

図4 配位子交換のスキーム

<文献> 1) Forsenら, J.Chem.Phys. 39, 2892(1963). 2) 山口ら, 第55回日本化学会春季年会(3VA31). 3) Skapskiら, Acta Cryst. B34, 1857(1978); B34, 3576(1978).

4) Yamaguchiら submitted for publication.

RELAXATION TIME STUDY OF QUATERNARY CARBONS.

RELAXATION MECHANISMS AND THE STATE OF DISSOCIATION IN AMINO ACIDS

Katsuhiko Ito, Y-Zh. Da, and Hideaki Fujiwara

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

^{13}C spin-lattice relaxation times ($^{13}\text{C } T_1$) and NOE factors (η) of glycine were measured for its zwitter ionic and cationic forms in D_2O solution at different magnetic fields.

From these data, observed T_1 values of the quaternary carbons were divided into the components of T_1^{D} , T_1^{C} and T_1^{SR} . The quaternary $^{13}\text{C } T_1$ was shorter by about 40% in the cationic form than that in the zwitter ionic form. Also, the spin-rotation relaxation time was decreased much in the cationic form.

1. 序 論

著者らはこれまで、ストリキニーネ、テストステロン等の生体関連物質に関して、 ^{13}C スピン-格子緩和時間 ($^{13}\text{C } T_1$) を測定することにより、溶液状態での分子の動的性質を調べ、解析モデルの妥当性の評価と合わせて報告してきた。また、分子内の四級炭素に関しては、異なる2種類の磁場の下で測定した $^{13}\text{C } T_1$ 値を双極子-双極子緩和 (T_1^{D}) とその他の緩和 (T_1^{others}) とに分け、更に T_1^{others} を個々の成分 (四級炭素では化学シフト異方性緩和 (T_1^{C}) とスピン-回転緩和 (T_1^{SR}) が重要とされる。) に分割することができ、 T_1^{C} より、化学シフト異方性パラメーターである $\Delta\sigma$ を求めた。この値は結晶その他で測定されている類似化合物の値と矛盾しなかった。また、これらの研究ではコンピューター法を活用し、 ^{13}C の NOE 因子 (η) を計算により求めたが、それは実測値と一致することも確認された。

今回は、 T_1^{others} の分割から得られる T_1^{C} を用いて $\Delta\sigma$ が計算できることを考え、 $\Delta\sigma$ が溶液中の分子構造をどの程度反映し得るかに注目して、溶液の $^{13}\text{C } T_1$ 測定により、 $\Delta\sigma$ の構造パラメーターとしての有用性を調べることにした。

試料には、四級炭素を有する比較的小さな分子として、最も簡単なアミノ酸であるグリシンを取り上げ、まずその両性イオン型とカチオン型に関して $^{13}\text{C } T_1$ 及び η をそれぞれ高低2種類の磁場で測定した。そして、 T_1^{D} から相関時間 (τ_c) を求め、 τ_c と T_1^{C} を用いて両者の $\Delta\sigma$ を計算した。それらの結果について、カルボキシル基の解離と緩和機構の関係を中心に報告する。

いとう かつひこ たつ えいちゆう ふじわら ひであき

2. 実験

グリシン (pK₁=2.34, pK₂=9.60, pI=5.97) を水から再結晶し、乾燥後、重水に溶かして 1M 溶液とした。この時、カルボキシル基の解離状態を考慮して予め定沸点塩酸(約 5.5N) を適量加え、pD が 0.02 及び 5.80 付近の 2 種類の溶液を調製した。この溶液をそれぞれ 5φ 管と 8φ 管に入れ、真空ラインを用いて脱ガスし、測定試料とした。

高磁場での測定には、JEOL JNM GX-500 型 FTNMR 装置を用い、観測周波数は 125.7MHz であり、取り込み幅は 160ppm とした。¹³C T₁ 測定には、Fast Inversion Recovery (FIR) FT法を用い (T - 180° - t - 90°) のパルス系列で、プロトン完全デカップリングにより測定した。90° パルスの照射時間は 12μ sec、16K 点で 16 回積算後フーリエ変換した。また、NOE 値は、プロトン完全デカップリングとゲート付きデカップリングを行い、両者のピーク強度の比較として求めた。ただし、各スペクトルは、パルス照射時間 9μ sec、64K 点で 32 回積算後フーリエ変換して得た。測定温度は 34.1°C である。

低磁場での測定には、HITACHI R-900 型 FTNMR 装置を用い、観測周波数 22.6MHz で行った。90° パルスの照射時間は 27μ sec、16K 点で 64 回積算後フーリエ変換した。また、NOE の測定では、この 90° パルスを用い、積算回数を 128 回とした。その他の測定条件は、高磁場のそれに準ずる。

3. 結果と考察

前回までの研究では、 η の測定値 (η^{obsd}) を用いないでプロトンの付いた二級、三級炭素の T₁ データを回転拡散運動モデルにより解析し、動力学パラメーター (回転拡散定数 D など) を求めてその値から T₁^{DD} を評価したが、今回は得られる ¹³C T₁ のデータ数が少ないため、 η^{obsd} を用いて T₁^{DD} を得た。

Table 1 に 2 種類の pD におけるグリシンの四級炭素の ¹³C T₁ 及び η^{obsd} 、また、それらを用いて次の ① 式より求めた T₁^{DD} の値、更に、② 式より求めた T₁^{others} の値を示した。

$$T_{1}^{DD} = \frac{1.988}{\eta^{obsd}} \times T_{1}^{obsd} \dots \dots \textcircled{1} \qquad \frac{1}{T_{1}^{others}} = \frac{1}{T_{1}^{obsd}} - \frac{1}{T_{1}^{DD}} \dots \dots \textcircled{2}$$

ここで、各 pD におけるグリシンの存在形態は、計算上、以下の通りである。

pD 0.02 のとき	カチオン型99.5 %
pD 5.80 のとき	両性イオン型99.9 %

Table 1 を見ると、四級炭素に関しては、両性イオン型からカチオン型になると T₁^{obsd} が約 40% 減少していることが分かる。個々の緩和機構について検討すると、この四級炭素には α 位に 2 個のプロトンが存在するため、T₁^{DD} の寄与も認められ、その値は、pD の低下とともに約 40% 減少している。しかし、明らかに T₁^{DD} よりも T₁^{others} の寄与の方が大きい。

T₁^{others} の内容を更に調べるために、これを T₁^{CA} と T₁^{SR} の二項に分けることを考える。スカラー緩和 (T₁^{SC}) は、一般にハロゲン原子と結合した場合には有効となることが知られているが、今回の試料では特に寄与しないとして除外した。T₁^{others} の T₁^{CA} と

T_{1}^{SR} の二項への分割は、以下の「反復法」により行った。すなわち、③式において、異なる磁場に関して比をとると、④式が得られる。

$$\frac{1}{T_{1}^{CA}} = \frac{2}{15} \gamma^2 B_0^2 (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \tau_c$$

$$= \frac{2}{15} (2\pi\nu)^2 (\Delta\sigma)^2 \tau_c \quad \dots\dots\dots ③$$

$$\frac{1}{T_{1}^{CA(L)}} = \left(\frac{22.6}{125.7}\right)^2 \cdot \frac{\tau_c^{(L)}}{\tau_c^{(H)}} \cdot \frac{1}{T_{1}^{CA(H)}} \quad \dots\dots\dots ④$$

ここで、 γ は観測核の磁気回転比、 B_0 は外部磁場、 σ_{\parallel} 、 σ_{\perp} はそれぞれ化学シフトテンソルの、対称軸に平行及び垂直方向の成分、 ν は共鳴周波数である。また、右肩の()内のHは高磁場、Lは低磁場を示す。

同様に、⑤式についても異なる磁場で比をとると、⑥式が得られる。

$$\frac{1}{T_{1}^{SR}} = \frac{\pi I^2}{3h^2} \cdot \frac{C_{\parallel}^2 + 2C_{\perp}^2}{3} \cdot \frac{1}{\tau_c} \quad \dots\dots\dots ⑤$$

$$\frac{1}{T_{1}^{SR(L)}} = \frac{\tau_c^{(H)}}{\tau_c^{(L)}} \cdot \frac{1}{T_{1}^{SR(H)}} \quad \dots\dots\dots ⑥$$

ここで、 I は分子の慣性モーメント、 h はボルツマン定数、 C_{\parallel} 、 C_{\perp} はそれぞれスピン-回転結合定数の、対称軸に平行及び垂直方向の成分である。また、今回の場合は、次の⑦式が成り立つと考えられるので、④、⑥、⑦式から、更に③式が得られる。

Table 1. Parameters for carboxyl carbon in glycine.
(Calculated values except for T_{1}^{obsd} and η^{obsd} .)

	pD 5.80 (zwitter ion)		pD 0.02 (cation)	
	125.7MHz	22.6MHz	125.7MHz	22.6MHz
T_{1}^{obsd} (sec)	46.05 ± 0.94	66.44 ± 2.30	29.80 ± 0.85	37.76 ± 1.75
η^{obsd}	0.63	0.87	0.75	0.77
T_{1}^{DD} (sec)	145.46	151.97	79.07	97.59
T_{1}^{others} (sec)	67.38	118.05	47.82	61.59
τ_c (sec)	9.45×10^{-12}	9.05×10^{-12}	1.74×10^{-11}	1.41×10^{-11}
T_{1}^{CA} (sec)	144.21	4657.71	126.22	4817.84
T_{1}^{SR} (sec)	126.47	121.12	76.99	62.39
$\Delta\sigma$ (ppm)	93.9	93.9	74.0	74.0

$$\frac{1}{T_{1, \text{others}}} = \frac{1}{T_{1, \text{CA}}} + \frac{1}{T_{1, \text{SR}}} \quad \dots\dots\dots ⑦$$

$$\frac{1}{T_{1, \text{CA}(\text{H})}} = \left\{ \frac{1}{T_{1, \text{others}(\text{H})}} - \frac{1}{T_{1, \text{others}(\text{L})}} - \frac{1}{T_{1, \text{SR}(\text{H})}} \left\{ 1 - \frac{\tau_c(\text{H})}{\tau_c(\text{L})} \right\} \right\} / P$$

$$\text{ただし、 } P = 1 - \left(\frac{22.6}{125.7} \right)^2 \cdot \frac{\tau_c(\text{L})}{\tau_c(\text{H})} \quad \text{である。} \quad \dots\dots\dots ⑧$$

そこで、 $\tau_c(\text{H}) \doteq \tau_c(\text{L})$ とみなすと、⑧式は⑨式に簡略化され、これより $T_{1, \text{CA}(\text{H})}$ が計算される。

$$\frac{1}{T_{1, \text{CA}(\text{H})}} = \left\{ \frac{1}{T_{1, \text{others}(\text{H})}} - \frac{1}{T_{1, \text{others}(\text{L})}} \right\} / P \quad \dots\dots\dots ⑨$$

得られた $T_{1, \text{CA}(\text{H})}$ から、⑦式を用いて $T_{1, \text{SR}(\text{H})}$ を求め、その値を⑧式に代入して、2回目の $T_{1, \text{CA}(\text{H})}$ を計算する。そして最初の値と一致すれば、計算を終了する。一致しなければ、2回目の値を再び⑦式に代入して $T_{1, \text{SR}(\text{H})}$ を求め、⑧式から3回目の $T_{1, \text{CA}(\text{H})}$ を計算する。以下同様に計算を進め、 $T_{1, \text{CA}(\text{H})}$ の値が一段階前の値と一致したら、その値を真の $T_{1, \text{CA}(\text{H})}$ とする。そして、⑦式から $T_{1, \text{SR}(\text{H})}$ 、④、⑥式からそれぞれ $T_{1, \text{CA}(\text{L})}$ 、 $T_{1, \text{SR}(\text{L})}$ を計算する。今回の場合には、4、5回の繰り返し計算で実質的に一定な $T_{1, \text{CA}}$ が得られた。

このようにして求めた各パラメーターも Table 1 に示してある。それによると、 $T_{1, \text{CA}}$ は⑨式に示す通り、 B_0 の2乗に反比例するので、低磁場の下ではその寄与は極めて小さく、専ら $T_{1, \text{SR}}$ が支配的であるが、高磁場になり $T_{1, \text{CA}}$ の効果が大きくなっても、 pD が低下すると $T_{1, \text{SR}}$ が優勢になることが分かる。この傾向は、 τ_c は pD の低下にともなって増大しているので、 τ_c の影響として説明することはできない。従って、残るパラメーターであるスピン-回転結合定数の変化によるものと考えられる。しかし、この結合定数に関するデータはあまり多くは得られておらず、詳しい考察のためには、今後データを集積する必要がある。

また、③式を用いて両性イオン型とカチオン型の $\Delta\sigma$ 値を計算したところ、両者の間には約 20ppm の差があることが分かった。 $T_{1, \text{SR}}$ の誤差による $\Delta\sigma$ の誤差は、 pD 5.80 では約 1.7%、 pD 0.02 では約 4.5% であったので、この 20ppm の差は有意であると考えられる。

REFERENCES

- 1) H. Fujiwara, Y-Zh. Da, T. Takagi, and Y. Sasaki, Chem. Pharm. Bull., in press (1989).
- 2) H. Fujiwara, Y-Zh. Da, D. Zheng, Y. Sasaki, Y. Takai, and M. Sawada, J. Chem. Soc., Perkin 2, in press.

(日本女大家政・日本電子生体研) ○高橋征三・永山国昭

Solvent-Solute Intermolecular NOE Mediated by Paramagnetic Species.

Seizo Takahashi and Kuniaki Nagayama (Japan Women's Univ. & JEOL Ltd.)

Intermolecular NOE was observed on the methyl resonance of DMSO(1%) irradiating with H₂O resonance. The NOE was found to become negative with the addition of paramagnetic ions as well as nitroxide spin label reagents, 4-Hydroxy-TEMPO. This phenomenon can be rationalized if a large amount of nuclear spins are able to perturb the population of rare electron spins. In other words, the overwhelming concentration of proton spins override the energy gap of electron spins which exist in a minute amount as a paramagnetic species. Then, the saturation of aqueous nuclear spins perturbs the population of paramagnetic electron spins, which then perturbs the methyl proton spins of DMSO. This phenomenon could be applied to exploring the surface geometry of macromolecules.

1 はじめに

2次元NMRの出現によって、低分子量の蛋白質の構造をNMRで決定出来るようになった。つまりNOESY情報に基づいて距離マップを作り、立体構造モデルを構築すればよい。しかし現実には、NOESYやCOSYスペクトルは必ずしもモデル構築に十分な情報を与えるとは限らない。その上、分子量がさらに大きくなると、現在の方法の延長では、早晚限界に行き着くであろう。我々は選択励起法による軽水溶液のNMR測定法について検討を行ってきたが¹⁾、その応用として分子間NOEの測定法について検討をはじめた。分子表面の残基だけをスペクトル的に抽出できれば、相補的な情報が得られることを期待してである。その過程で興味深い現象を発見したので報告する。

2 実験方法

試料はとくに断らない限り、重水10%を含む軽水中にDMSOを1%濃度になるよう溶かし、対称型マイクロ試料管を用いて測定した²⁾。溶液の脱気は行っていない。装置は日本電子のGSX-400を用い、温度は30°Cにコントロールした。測定は11パルスの改良法を使用し¹⁾、水を照射するラジオ波の位相を固定した³⁾。照射時間は5秒にセットし、積算は8回行った。分子間NOEの測定で、再現性ある結果を得るために若干の検討を行ったが、詳細は当日報告する。

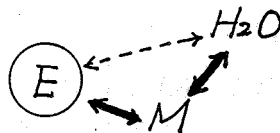
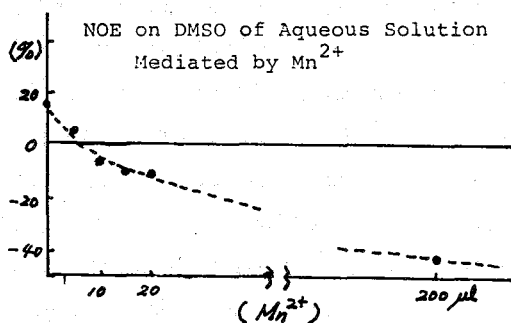
たかはし せいぞう, ながやま くにあき

3 結果と考察

分子表面残基のスペクトルは、原理的には溶媒との分子間NOEを測定すればよい。つまり軽水中に溶質分子を溶かし、プロトンの核スピンを飽和すれば、水と接触する部位は分子間NOEが現れるはずである。ところがリゾチームで測定した結果 100 ms 程度照射しなければ、分子間NOEが観測されなかった。従ってこのまゝでは、スピン拡散が支配的な高分子の場合、選択的な表面残基だけのスペクトル抽出が、極めて困難なことが明らかになった。次に、緩和試薬を少量混ぜ、溶媒の緩和速度を促進したところ、期待どおり 10 ms 以下の照射時間でも分子間NOEが観測された。そこで緩和試薬共存下での分子間NOEの機構について検討した。

分子間NOEの大きさは溶質濃度に顕著に依存する。従ってDMSO濃度を1%に固定した。常磁性イオンとして Mn^{2+} または Gd^{3+} を添加した結果、いずれもある濃度から分子間NOEは負になった。中性の常磁性試薬である 4-Hydroxy-TEMPOも同じ結果を得た。しかし $Fe(CN_6)^{3-}$ を1Mまで添加した限りでは負にならなかった。これは緩和効果が比較的小さいので、NOEが負になるほど濃度が充分でないか、または相対濃度が高いために、以下で説明する条件を満たさないためであろうと思われる。

従って我々は、常磁性物質が溶液中に存在すれば、溶媒-溶質間のNOEは常に飽和移動の方向に働くと結論した。機構としては、溶媒-溶質間のスピン相互作用よりは、溶媒-常磁性物質-溶質間のスピン相互作用が支配的になるためであると考えざるをえない。我々は、約100Mの溶媒プロトン濃度に対して、mM程度しかない常磁性物質との間の、濃度比に注目した。そして圧倒的な数の核スピスが飽和されると、微量存在する孤立電子スピンの分布が影響を受けると解釈した。この解釈によると、分子間NOEが負になってもおかしくない。これは我々が全く予期していなかった、新しい現象であり、今後さらに検討して行きたい。



- 1) S. Takahashi and K. Nagayama, J. Magn. Reson., 81, 555 ('89)
- 2) S. Takahashi and K. Nagayama, J. Magn. Reson., 76, 347 ('88)
- 3) 高橋征三, 永山国昭; 1989年度日本化学会春季年会(東京)

(北見工大) ○福井洋之、三浦宏一、松田弘喜

The Effect of Zero-Field Splitting on the Nuclear Relaxation Times.

Quenching of the Electron Spin Angular Momentum

H. Fukui, K. Miura, and H. Matsuda

(Kitami Institute of Technology)

Abstract: The effect of zero-field splitting (ZFS) on the nuclear relaxation rates, T_{1M}^{-1} and T_{2M}^{-1} , are investigated in the condition that the static ZFS is larger than the energy uncertainty of the ZFS levels. It is shown that the rhombic term E of ZFS drastically reduces the nuclear relaxation rates of a paramagnetic molecule with an integer electron spin quantum number. In this case the nuclear relaxation time is independent of the external magnetic field. This means a quenching of an electron spin angular momentum, which was predicted by Bloembergen and Morgan. It is suggested that the true value for correlation time of lanthanide ion complexes could be much longer than the accepted value, 10^{-13} s.

I. INTRODUCTION

The effect of the electron-nucleus dipolar interaction on the nuclear relaxation rates can be described by the well known Solomon equation^{1,2}. In the Solomon equation, it is assumed that the S manifold is split by the electron Zeeman energy alone, with an isotropic g factor. When $S > 1/2$, the effect of spin-orbit coupling results in zero-field splitting (ZFS) which alters the spacing of the spin levels^{3,4}. If the ZFS energy is smaller than the electron Zeeman energy, it will only introduce a small perturbation. However, when the ZFS is large compared to both the electron Zeeman energy $\hbar\omega_S$ and the EPR linewidth, its presence may severely alter the nuclear relaxation equations^{5,6}. The present study investigates the effect of the ZFS energy on the nuclear relaxation rates, T_{1M}^{-1} and T_{2M}^{-1} , in which it is assumed that the static ZFS is larger than the energy uncertainty of the ZFS levels. Furthermore, we assumed that the electron spin is coupled to the lattice through a mechanism in which the electron spin system can be described by a single relaxation time τ_S .

II. THEORY

(i) Nuclear Longitudinal Relaxation Time

In the general formalism of Kubo and Tomita⁷ the nuclear longitudinal relaxation rate T_{1M}^{-1} is given in the laboratory fixed axis system x,y,z by

$$T_{1M}^{-1} = \int_0^{\infty} \langle [I_z, \mathcal{K}'(\tau)] [\mathcal{K}'(0), I_z] \rangle d\tau / \hbar^2 \langle I_z^2 \rangle, \quad (1)$$

where

$$\mathcal{K}'(\tau) = e^{(i/\hbar)\mathcal{K}_0\tau}\mathcal{K}'e^{-(i/\hbar)\mathcal{K}_0\tau} \quad (2)$$

and

$$\mathcal{K}_0 = \mathcal{K}_{ZFS} + \hbar\omega_S S_z + \hbar\omega_I I_z \quad (3)$$

The ZFS interaction Hamiltonian \mathcal{K}_{ZFS} is given as a static energy in the molecular axis system x', y', z' by

$$\mathcal{K}_{ZFS} = D[S_z'^2 - \frac{1}{3}S(S+1)] + E(S_x'^2 - S_y'^2) \quad (4)$$

\mathcal{K}' represents the perturbation Hamiltonian for the nuclear spin system due to the dipolar interaction between electronic and nuclear spins and can be expressed as the scalar product of nuclear and electronic spin operators in the molecular frame. That is,

$$\mathcal{K}' = \sum_{i=-1}^{+1} (-1)^i I_i' \cdot F_{-i}' \quad (5)$$

where

$$I_{\pm 1}' = \mp \frac{1}{\sqrt{2}} I_{\pm}' \quad , \quad I_0' = I_z' \quad (6)$$

and

$$F_{\pm 1}' = \mp \sqrt{2} \left(-\frac{1}{4} S_{\pm}' \cdot \phi(0) + S_z' \cdot \phi(\pm 1) + S_{\mp}' \cdot \phi(\pm 2) \right) , \\ F_0' = S_{+}' \cdot \phi(-1) + S_z' \cdot \phi(0) + S_{-}' \cdot \phi(1) \quad (7)$$

Here $I_{\pm}' = I_x' \pm i I_y'$, $S_{\pm}' = S_x' \pm i S_y'$ and the ϕ'_S have the form of spherical harmonics which are given by

$$\phi(\pm 2) = \frac{3}{4} \hbar a \sin^2 \theta e^{\pm 2i\varphi} , \\ \phi(\pm 1) = \frac{3}{2} \hbar a \sin \theta \cos \theta e^{\pm i\varphi} , \\ \phi(0) = \hbar a (3 \cos^2 \theta - 1) , \quad (8)$$

where $a = (\mu_0/4\pi) r_{IG} \mu_B r^{-3}$ and r , θ , and φ are the polar coordinates of the nucleus, with respect to the molecular axis system, from the electronic spin at the origin.

In order to evaluate T_{1M}^{-1} we need to transform I_z in Eq. (1), written in the laboratory system, into the nuclear spin operators in the molecular axis system at $t=0$ with the Wigner rotation matrix. We proceed calculation with the following approximations.

(a) The molecular axes at time τ differ from those at $t=0$ on account of molecular reorientation. We simply introduce the factor $e^{-\tau/\tau_r}$ into the ensemble average of the product $\mathcal{K}'(\tau)\mathcal{K}'(0)$ and in return we replace the molecular axes at τ by those at $t=0$.

(b) The rate of molecular rotational motion τ_r^{-1} is assumed to be much larger than ω_I . The last term of χ_0 given by Eq. (3), $\hbar\omega_I I_z$, is ignored. This is the extreme narrowing condition for the nuclear spin system.

(c) It is assumed that the electron spin system can be described by a single electronic relaxation time τ_S without argument about the particular electron spin relaxation mechanism.

The second term of χ_0 in Eq. (3), $\hbar\omega_S S_z$, is transformed into the molecular axis system at $t=0$, and we choose the molecular z' axis at $t=0$ as the quantization axis for the electron spin. χ_0 is written in the molecular axis system at $t=0$ as

$$\chi_0 = \chi_{ZFS} + \hbar\omega_S S_z \cdot \cos\beta + \hbar\omega_S S_x \cdot \sin\beta \cos\alpha + \hbar\omega_S S_y \cdot \sin\beta \sin\alpha, \quad (9)$$

where α , β , and r are the Euler angles between the molecular coordinate at $t=0$ and the laboratory coordinate defined by the external magnetic field. Let the eigenket for χ_0 be $|n\rangle$ and its eigenvalue be $\hbar\omega_n$. Taking ensemble average for both the molecular orientation and the electron spin orientation at τ with respect to those at $t=0$, we obtain

$$\begin{aligned} T_{1M}^{-1} = & \frac{1}{32\pi^2} a^2 (2S+1)^{-1} \int_0^{2\pi} d\alpha \int_0^\pi \sin\beta d\beta \sum_{mn} J(\omega_{mn}) \{ |\langle m | S_z' | n \rangle|^2 \\ & \times [8C_1(3\cos^2\theta - 1)^2 + 36(C_0 + C_1)\sin^2\theta \cos^2\theta] \\ & + |\langle m | S_+ | n \rangle|^2 [(C_0 + C_1)(3\cos^2\theta - 1)^2 \\ & + 36C_1 \sin^2\theta \cos^2\theta + 9(C_0 + C_1)\sin^4\theta] \}, \end{aligned} \quad (10)$$

where

$$C_1 = \frac{1}{2} \sin^2\beta, \quad C_0 = \cos^2\beta, \quad (11)$$

$$J(\omega) = 2\tau_C / (1 + \omega^2 \tau_C^2), \quad (12)$$

$$\tau_C^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_S^{-1}, \quad (13)$$

and

$$\omega_{mn} = \omega_m - \omega_n. \quad (14)$$

In the limiting condition of weak field, $\omega_S \tau_C \ll 1$, χ_0 is approximated to be equal to χ_{ZFS} and ω_{mn} 's become independent of α and β . T_{1M}^{-1} is given by

$$\begin{aligned} T_{1M}^{-1} = & \frac{1}{3} a^2 (2S+1)^{-1} \sum_{nm} \{ \tau_C / (1 + \omega_{nm}^2 \tau_C^2) \} [|\langle n | S_z' | m \rangle|^2 \\ & \times (2 + 6\cos^2\theta) + |\langle n | S_+ | m \rangle|^2 (5 - 3\cos^2\theta)]. \end{aligned} \quad (15)$$

(ii) Nuclear Transverse Relaxation Time

In the formalism of Kubo and Tomita the nuclear transverse relaxation rate T_{2M}^{-1} is given in the laboratory axis system by

$$\begin{aligned} T_{2M}^{-1} = & \int_0^\infty \langle [I_{1x} \chi'(\tau)] [\chi'(0), I_{-1}] + [I_{-1} \chi'(\tau)] [\chi'(0), I_{1x}] \rangle d\tau \\ & / \hbar^2 \langle I_{1x} I_{-1} + I_{-1} I_{1x} \rangle, \end{aligned} \quad (16)$$

where $I_{\pm 1} = \mp(I_x \pm iI_y) / \sqrt{2}$. Transforming Eq. (16) into the molecular coordinate

system at $t=0$ and taking ensemble average, T_{2M}^{-1} becomes

$$\begin{aligned}
 T_{2M}^{-1} = & \frac{1}{32\pi} a^2 (2S+1)^{-1} \int_0^{2\pi} d\alpha \int_0^\pi \sin\beta d\beta \sum_{m,n} J(\omega_{mn}) \{ |\langle m|S_z|n\rangle|^2 \\
 & \times [2(1+C_0)(3\cos^2\theta-1)^2 + 18(1+C_1)\sin^2\theta\cos^2\theta] \\
 & + |\langle m|S_+|n\rangle|^2 [\frac{1}{2}(1+C_1)(3\cos^2\theta-1)^2 \\
 & + 9(1+C_0)\sin^2\theta\cos^2\theta + \frac{9}{2}(1+C_1)\sin^4\theta] \}. \quad (17)
 \end{aligned}$$

In the limit of $\omega_S\tau_C \gg 1$, we get $T_{1M}=T_{2M}$.

We find the following results. If S is a half integer, the nuclear relaxation time is rather insensitive to ZFS. However, if S is an integer, ZFS drastically reduces the nuclear relaxation rate and the nuclear relaxation time is independent of the external magnetic field. This means a quenching of the electron spin angular momentum, which was first suggested by Bloembergen and Morgan⁸. However, our work is the first paper which exactly derived the electron spin angular momentum quenching. The quenching of the electron spin may be effective in some lanthanide shift reagents. Using the Solomon equation, a very short τ_S , 10^{-13} s, is necessary to account for well resolved NMR spectra of lanthanide shift reagent complexes⁹. Such a short τ_S is strange and difficult to explain. In a lanthanide ion complex with an integer J value and large ligand field coefficients, ZFS will necessarily reduce T_{1M}^{-1} and T_{2M}^{-1} , and the true value for τ_S could be much larger than the accepted value, 10^{-13} s. If we tentatively assume τ_C of 10^{-11} s and ligand field coefficients of 5 cm^{-1} , our theory presents the T_{1M}^{-1} and T_{2M}^{-1} values of the same order of magnitude as that estimated from the Solomon equation assuming 10^{-13} s for τ_C .

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to Professor J. Sohma for valuable discussions. Calculations were performed on a HITAC M-682H at the Hokkaido University Computing Center.

REFERENCES

1. I. Solomon, Phys. Rev. 99, 559 (1955).
2. A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1961).
3. A. Abragam and M. H. L. Pryce, Proc. Roy. Soc. (London), A205, 135 (1951).
4. G. E. Pake, *Paramagnetic Resonance* (Benjamin, Inc., New York, 1962).
5. I. Bertini and C. Luchinat, *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems* (Benjamin/Cummings, Inc., Menlo Park, 1986).
6. U. Lindner, Ann. Phys. 16, 319 (1965).
7. R. Kubo and K. Tomita, J. Phys. Soc. Jpn. 9, 888 (1954).
8. N. Bloembergen and L. O. Morgan, J. Chem. Phys. 34, 842 (1961).
9. F. Inagaki and T. Miyazawa, Prog. NMR Spectro. 14, 67 (1981).

北大 低温研 花房尚史

Phospholipid Hydration using ^1H NMR Naofumi Hanafusa

Inst. of Low Temp. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo, Japan.

The characteristics of unfrozen water of phospholipid, especially lamellar phase and H_{II} phase of PC and PE, was investigated using ^1H NMR. The amount of unfrozen water was reduced monotonously depending on lowering of the temperature. The extent of hydration was greater in lamellar phase than in H_{II} phase. The extents of the restriction of hydration water, such as molecular correlation time and self diffusion coefficient, were greater in H_{II} phase than in lamellar phase. It seems not only the chemical structure of the head group in the lipid but also the phase of liposome affect the extent of the interaction of the hydration water and lipid.

「始めに」 生体高分子の構造と機能に対する水の寄与に関して、蛋白の水和は色々な方法により汎く調べられているが、生体膜の構成成分である燐脂質に関しての水和特性の報告は比較的少ない。燐脂質は温度を始め環境条件により種々な形態変化を示す。このときの物理的条件はDSCや ^{31}P NMRなどで詳しく調べられているが、水和については主としてDSCや等温吸着法などで調べられて居り、 ^1H NMRで不凍水について調べた報告は比較的少ない。このときの水和水の量や動的性質の変化は膜機能と関連して興味がある。ここでは、蛋白のときと同様、その不凍水について、その量や動的性質の温度による変化を調べて報告する。

「材料と方法」 lamellar phaseの代表として、卵のphosphatidylcholine(PC), hexagonal II phase(H_{II})の代表として卵のphosphatidylethanolamine(PE)を用いた。リポソームの製法は常法による。今回は他の溶質の寄与を除くため、すべて緩衝液無しの水のナノソリューションとした。 ^{31}P 及び ^1H NMRはJEOL FX100(PVT及びスピノ ロッキング装置付き)を用い、リポソームの濃度は、 ^{31}P NMRにより既知濃度の Na_2HPO_4 水溶液とのスプレッドの面積比から求め、同時にその形状からラメラ相か H_{II} 相かを判定した。不凍水の量的、動的性質の変化については、これまで蛋白不凍水について報告したのと同様で、不凍水量は24% LiCl溶液(0.01M MnCl_2 を含む)との面積比から、分子相関時間 τ は反転回復法で T_1 を求め、これまでと同様、双極子間相互作用が支配的であると仮定して最小点法から近似計算で求め、自己拡散係数はBurrnett等²⁾の方法により、スピノ ロッキング法で T_1 を求め、それから計算した。

「結果と論議」PCとPEについて、それぞれ不凍水量の温度依存性を求めると図1のようになる。なお、ここで用いたPCはラメラ相、PEは、25°Cでラメラ相、35°C以上で H_{II} 相、25°Cに冷却すると再びラメラ相に戻ることを ^{31}P NMRで確認した。 H_{II} の場合は、PEを45°Cに30分放置した後、liq. N_2 中に投入し急速凍結後、-50°Cにあらかじめ冷却したNMRの7 $^{\circ}$ U-7 $^{\circ}$ にセットし測定する。いずれの場合も温度の降下と共に不凍水量は単調に減少して行く。球状蛋白では、Kuntz以来、-35~-45°Cの領域で不凍水量が一定になり、それが蛋白の単層水和の量に一致することが示されているが、リポソームでは単調に減少するため、このような方法では水和水量を求めることが出来ない。しかし、図1に見るように、ここで測定したすべての温度領域にわたり、PC(ラメラ相)と比べ、PE(45°Cで H_{II} 相)の不凍水量が少ないこと、しかしPEがラメラ相をとった時は、不凍水量はPCと同じような値まで増加していることが判る。PCとPEの水和水量についての報告は、測定法により大きな違いが有り、DSCの結果²⁾からはそれぞれ約10 μL と7~8 μL 、 ^3H をふくむ H_2O を用いた結果³⁾からは31 μL と7~8 μL と報告されている。

は な ふ さ な お ふ み

ここでの結果からいえば、それぞれ-20°Cおよび-15°Cでの不凍水量にほぼ相当する。

図2は、上記の試料について緩和時間 T_1 を測定し、それから分子相関時間 τ_c を近似的に計算した結果である。別図に示すように、リポソームの不凍水の緩和曲線は、PC、PEのラムラ相で-20°C、PEの H_{II} 相で-15°Cで最小値を示し、蛋白のそれと異なり、最小値付近で急激に T_1 の値が減少し、これから求められる平均の τ_c の間距離は1Å前後と、蛋白の場合の1.6~2Åと比較して小さな値を示す。とくに H_{II} 相では1Åより小さい値を示す。これは水分子のH-H間の距離と比較しても小さな値なので、不凍水の他に、リポソーム自体の共有結合のH-の、特に疎水部のC-Hの寄与と共に、磷酸基の強い荷電のため水分子の配向が通常より圧縮された状態にあるという考え方を支持する。この結果から計算される τ_c の値を見ると、低温領域、特に最小点より低温側でPCとPEのラムラ相に比べ、同じ温度では、例えば-20°CでPCの $\sim 9 \times 10^{-10}$ secに対しPEの H_{II} 相で $\sim 1 \times 10^{-9}$ secと著しく大きな値を示し、 H_{II} 相の水分子がラムラ相よりより束縛された状態にあることを示している。更にこの最小点での不凍水量がこれまで報告されたリポソームの水和量とほぼ一致すること、これを境にラムラ相と H_{II} 相との τ_c の値が大きく異なって来ることから、 T_1 の最小点付近での不凍水量が単層水和水の和量にほぼ相当すると考えて良いのではないかと考えられる。ここでの結果からPCで約15%、PEの H_{II} で7%となり、これまで報告された値と良い一致を示す。更に、別図に示すように、並進の自己拡散係数Dを上記試料について測定すると、低温領域では例えば-20°CでPCの $\sim 1.4 \times 10^{-10}$ cm²/secに対し $\sim 4 \times 10^{-10}$ cm²/secとわずかではあるが明らかにラムラ相より H_{II} 相のDが小さな値を示し、と同様水分子の束縛の度合いが大きいことを示している。更に、同じPEでも不凍水量、分子相関時間、自己拡散係数いずれも、ラムラ相ではPCとほとんど同じ値であり、一度 H_{II} 相になっても凍結融解して室温に放置すると始めのラムラ相に近い値に戻っている。³¹Pと²Hの測定からPCよりPEの頭部の熱運動がより束縛されていることは報告されていたが、今回の²Hによる不凍水の測定からも不凍水の運動について同様の結果がえられた。更にPCとPEの正の荷電が局在している-N(CH₃)₃⁺と-NH₃⁺との比較で後者の電荷密度が大きいことからこの結果が説明されていたが、今回のラムラ相と H_{II} 相の比較から、リポソームとその水和水との相互作用は、 α ヘリックスの化学構造自体もさることながら、リポソーム全体の構造が大きな要因となることが示唆された。水和水がリポソームの親水性の α ヘリックスとしか相互作用しないこと、ラムラ相では α ヘリックスが外側へ向いているのに対し、 H_{II} 相では内側へ向いているので総和としての電荷密度は H_{II} でより強くなり、水和水の束縛の程度はより強いものと考えられる。

文献

- 1) Burnett, L. J., and J. Harmon: J. Chem. Phys., 57, 1293 (1972)
- 2) Ladbrooke, B. D., and D. Chapman: Chem. Phys. Lipids, 3, 304 (1969)
- 3) Sen, A., and S. Hui: Chem. Phys. Lipids, 49, 179 (1988)

図 1

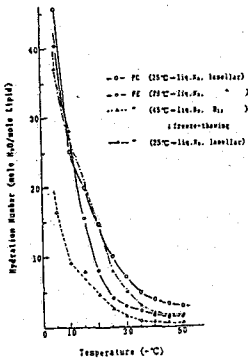
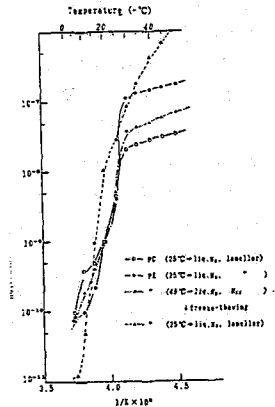


図 2



P42

交差緩和時間(T_{IS})測定による蛋白質ゲル、合成高分子ゲル内水構造の研究

(岐阜大・医・生理、*脳外、**病理、***眼科) ○桑田一夫、恵良聖一、

曾我美 勝、岩間 亨*、山田 弘*、加藤一夫**、藤井裕子、天野 肇***、

河合憲司***、北沢克明***、(生理研) 巨 弘⁺、(京大・理・化) 赤坂一之⁺⁺

¹H-NMR studies on water structure in modified bovine plasma albumin (BPA*) gel and soft contact lens (SCL)

K. Kuwata, S. Era, M. Sogami, T. Iwama*, H. Yamada*, K. Kato**, H. Fujii,

H. Amano[#], K. Kawai[#], Y. Kitazawa[#], H. Watari⁺ and K. Akasaka⁺⁺

Dept. of Physiol., *Neurosurg., **Pathol. and [#]Ophthalmol., Sch. of Med., Gifu Univ., Gifu, ⁺Natl. Inst. for Physiol. Sci., Okazaki and ⁺⁺Dept. of Chem., Fac. of Sci., Kyoto Univ., Kyoto

Water structure in modified bovine plasma albumin gel (BPA*-gel), bovine mercaptalbumin (BMA) solution, copolymers (SCLs) of N-vinylpyrrolidone (m), methyl methacrylate (0.92-m), benzyl methacrylate (0.08) etc, where numbers in brackets indicate weight fractions of monomers, and mouse lens (2, 4 and/or 8 weeks) were studied, using spin-lattice (T_1), spin-spin (T_2) relaxation times and cross-relaxation times (T_{IS}) between irradiated protein or polymer protons and observed water protons (360 MHz ¹H-NMR). Plots of $1/T_1$, $1/T_2$ or $1/T_{IS}$ of BPA*-gel vs protein concentration (W(%)) were far steeper than those of BMA solution. Plot of $1/T_{IS}$ vs W(%) showed the significant difference between BPA*-gel and BMA solution. So, water structure in SCLs and mouse lenses were studied mainly, by measuring T_1 and T_{IS} . $1/T_{IS}$ values of water in SCLs were ~ 0 below 26.8% (dry weight) and increased steeply above 26.8%, indicating the significant change in water structure above 26.8%. Plot of T_{IS} vs dry weight (%) of mouse lenses also indicated the significant change in water structure above $\sim 20\%$ (dry weight).

Danadian(1971), Hazlewood(1972)らは、腫瘍組織の水の縦緩和時間(T_1)、横緩和時間(T_2)が正常組織の T_1 、 T_2 よりも長いことを見いだした。彼らは単に含水量の差のみによるものでなく、水構造に差のあることを示唆した。生体組織のモデル系として、蛋白質溶液 \rightarrow ゲル変換、鎖状高分子ゲル(ソフトコンタクト・レンズ(SCLs))内水構造、マウス水晶体内水構造を T_1 、 T_2 及び蛋白質または鎖状高分子プロトンより水への交差緩和時間(T_{IS})を測定し、水構造を比較研究した。

くわた かずお、えら せいいち、そがみ まさる、いわま とおる、やまだ ひろむ、
かとう かずお、ふじい ひろこ、あまの はじめ、かわい けんじ、きたざわ よしあき、
わたり ひろし、あかさか かずゆき

【材料、実験方法】 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pD 4.0 ~ 4.1(BPAはF型構造)でGln-392とCys-435の間で1~2箇所加水分解し、BPA(66K)⇒BPA*(66K)⇒BPA**(63K)と変化し、D₂O中で5%以上ではゲル化する。このゲルをBPA*ゲルと名付けた。一方、非常に精製したプロテアーゼを含まないウシ・メルカプトアルブミン(BMA)はpD 4.0 ~ 4.1でゲル化しない。これらを蛋白質溶液⇒ゲル変換による水構造変化の研究に用いた。SCLsは表2に示すモノマー組成で、含水量18.4~79.2%である。

SCLsは棒状に加工し、内径1.1 mmのガラス細管に入れ、ロック用溶媒を入れた5 mmφのNMR試験管に挿入した。また、2, 4, 8週齢のマウス水晶体(20~8個)を内径2.3 mmのガラス細管に入れ、SCLsの場合と同様にして測定した。

360 MHz ¹H-NMRを用い、T₁、T₂及びT_{IS}を測定した。T_{IS}は8.65, 7.13, -4.00 ppmをγH₂/2π、69~107 Hzでf₂照射し、Inversion Recovery法(Akasaka, 1981, 1983)を用いて測定した。

【結果と考察】 BMA溶液、BPA*ゲル中の水構造：水分子のT₁(図1)、T₂、T_{IS}(蛋白質より水への交差緩和時間、図 2A, 2B)は、溶液⇒ゲル変換により大幅に減少した。特に蛋白質より水へのT_{IS}値(T_{IS}(HDO))の減少が著しかった。表1に、8.63, 7.13, 0.40, -2.45 ppmをγH₂/2π、39~107 Hzでf₂照射した際の、BPA*ゲル中におけるBPA*分子内のT_{IS}値及びBPA*分子より水へのT_{IS}(HDO)が示してある。図 2A, 2Bに、7.13, 8.65 ppmを、それぞれ69及び107 Hzでf₂照射した際のBMA, BPA*ゲルの1/T_{IS}(HDO)を示した。興味ある現象は、蛋白質濃度10%以上ではBPA*ゲル中のT_{IS}(HDO)が著しく減少し、BPA*分子内のT_{IS}値よりも短いことである。この現象は、BPA*ゲル中では結合水量(構造化した水)が増加し、蛋白質より水へと速やかに交差緩和することを示唆している。

ソフトコンタクト・レンズ(SCLs)内水構造：表2に示すように、SCLsの水のT₁値は含水量の減少とともに連続的に減少した。1/T₁ vs dry weight(%)は、図1の蛋白質ゲルと異なり、上方に凹であった。SCLsを7.13または、-4.00 ppmをγH₂/2π~69 Hzでf₂照射して求めた1/T_{IS}(H₂O)値は図 3A, 3B(○)に示すように、乾燥重量26.8%以下では~0(T_{IS}(H₂O)が非常に長い)、26.8%以上では図に示すように大幅に増加する。この現象は、SCLs中の水構造が乾燥重量27%近傍で変化することを示唆している。

マウス水晶体内水構造：マウス水晶体の水のT₁は、2, 4, 8週齢の何れでも1成分であった。7.13, -4.00 ppmを69 Hzでf₂照射して求めた1/T_{IS}(H₂O)を図 3A, 3B(●)に示してある。水晶体の場合も、含水率80%近傍で、水構造変化を示唆している。

(表 1)

INTRAMOLECULAR CROSS-RELAXATION TIMES(T_{IS})
AND INTERMOLECULAR CROSS-RELAXATION
TIMES($T_{IS}(HDO)$) OF BPA^{*}-GEL AT pD 4.0 AT 25°

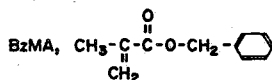
CONC(%)	f_2 (p.p.m)	$\nu_{CH_2}/2\pi$ (Hz)	T_{IS} (SEC)			$T_{IS}(HDO)$ (SEC)
			-CH ₃	LYS	AROM	HDO
10.42	8.65	107	0.96	1.11	1.10	1.12
12.98	7.13	69	0.83	0.91		0.48
12.23	7.13	69				0.54
11.29	7.13	69				0.62
10.35	7.13	69				0.69
9.41	7.13	69	0.88	0.89		0.75
11.35*	7.13	69				0.67
9.50*	7.13	69				1.04
7.61*	7.13	69				1.51
5.71*	7.13	69				2.27
4.75*	7.13	69				2.48
10.42**	7.13	69	0.94	1.15		1.04
8.85**	7.13	69	1.21	1.54		1.20
7.87**	7.13	69				1.46
7.02**	7.13	69	1.01	1.01		1.75
10.42**	0.40	39	1.13	1.24	1.39	1.81
8.85**	0.40	39	0.95	1.09	1.61	1.80
10.42**	-2.45	107	1.05	1.30	1.56	0.97
8.85**	-2.45	107	1.16	1.47	1.56	1.15
14.39***	7.13	69				0.50
13.81***	7.13	69				0.49

(表 2)

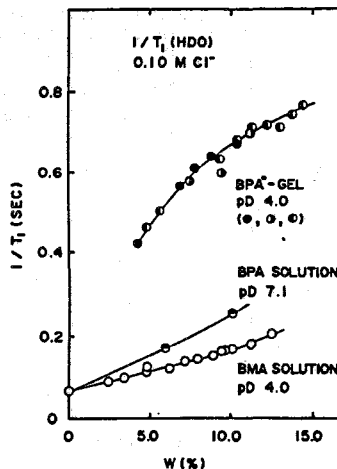
Weight percents of monomers and water
content in SGM soft contact lenses

(SGM)	NVP	MMA	BzMA	AMA	V-65	WATER(%)
#15	33.9	58.1	8	0.3	0.07	18.4
#16	42.9	49.1	8	0.3	0.07	28.5
#17	51.9	40.1	8	0.3	0.07	40.0
#18	60.9	31.1	8	0.3	0.07	53.3
#19	69.9	22.1	8	0.3	0.07	64.7
#20	78.9	13.1	8	0.3	0.07	73.2
#21	87.9	4.1	8	0.3	0.07	79.2

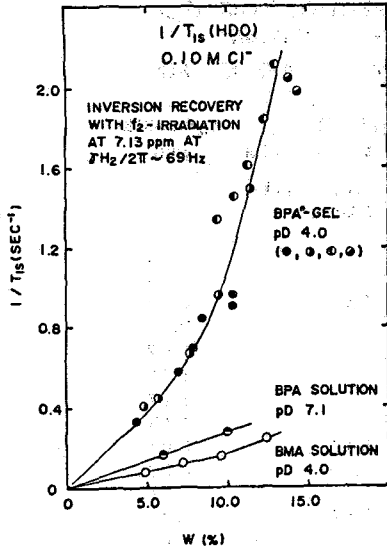
NVP, N-vinylpyrrolidone; MMA, methy methacrylate;
BzMA, benzyl methacrylate; AMA, allyl methacrylate;
V-65, 2,2'-azobis(2,4-dimethyl valeronitrile)



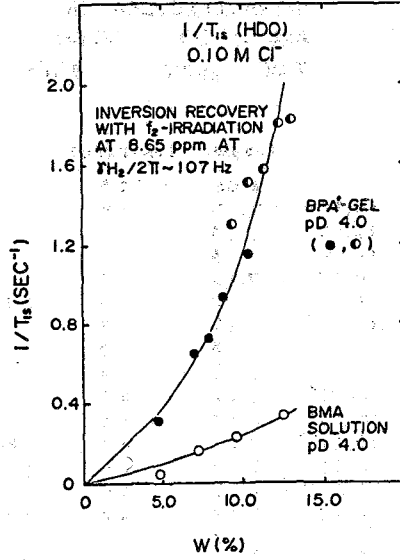
(图 1)



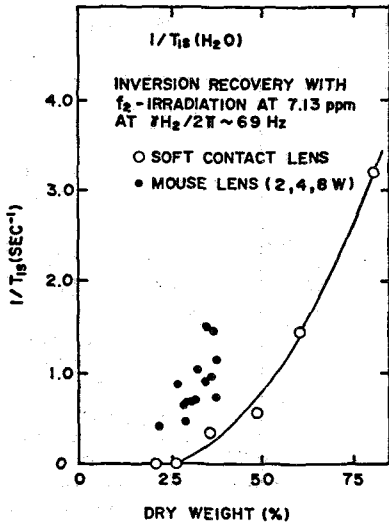
(2A)



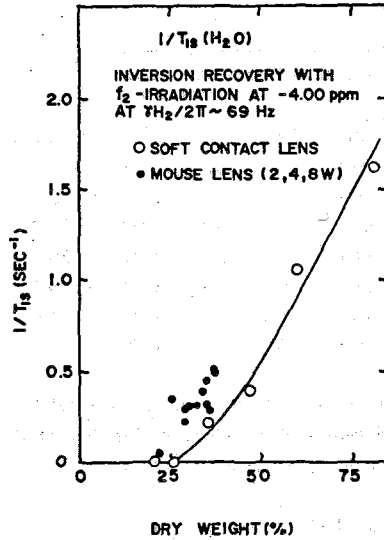
(2B)



(3A)



(3B)



京大 理 学 部 内 藤 晶 井本聡一郎

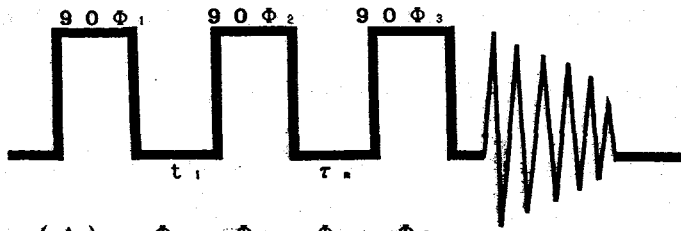
Measurements of ion transfer rate across prototype biomembranes by using lanthanide shift reagent

Akira Naito and Soichiro Imoto (Faculty of Science, Kyoto University)

^{23}Na NMR signals of internal and external Na^+ in a suspension of unilamellar vesicles have been separated by using $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$ as a shift reagent. 1D magnetization transfer and 1D exchange pulse sequences were applied to determine the ion transfer rate across prototype biomembranes. Transfer rate was successfully determined for the case where the transfer rate was sufficiently faster than the spin lattice relaxation rate. This condition was established by adding monensin in the solution to enhance the ion transfer rate.

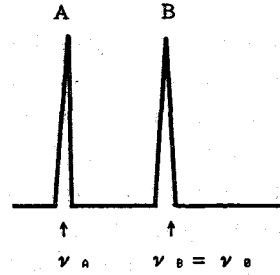
(序) 細胞膜における小分子の膜透過の機構や選択性についてはまだ不明な点が多く、この問題を解明するためには小分子の膜透過速度を広い温度範囲にわたって正確に測定する必要がある。従来、膜透過速度は放射性同位元素の放射線カウンティング、pH測定、イオン選択性電極を用いた方法によって測定されてきた。今回、NMR分光法を用いた膜透過速度の測定法について報告する。この方法の要点は、まずランタニドシフト試薬によって膜の内側と外側の小分子のNMR信号を区別しておき、次に選択的に一方の信号を励起する。次に、それらの信号が熱平衡に回復する過程を時間の関数で観測し解析することにより、磁化の交換速度、即ち膜の透過速度を決定しようとするものである¹。この方法の特徴は原理的には種類の違う各々の分子について透過速度の測定が可能であること、温度可変が容易にできること、繰り返し測定が可能であること、さらに透過速度を測定した同じ試料について膜の運動状態に関する情報が得られるなどがあげられる。今回はこの方法を用いて Na^+ イオンの透過速度を測定したので、その基礎検討について報告する。

(実験) 卵黄レシチンのリポソームは大きな内部容積をもたすため逆相蒸発法を用いて調製した。リポソームの分散した水溶液に0.01Mのジスプロシウムのピストリポリリン酸錯体、 $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$ を加え、リポソーム外側の ^{23}Na 信号を選択的にシフトさせた。 ^{23}Na イオン透過速度の測定において透過速度を促進するためモネンシンを溶液に0.1mM混入した。図1に示すパルス系列と位相サイクルを用いて ^{23}Na NMRスペクトルの測定を行った。図1(A)は一次元磁化移動パルス系列を示す。この系列では分光器周波数を ν_b 、 $t_1 = 1/2(\nu_a - \nu_b)$ に設定することにより ν_b の磁化を選択的に反転させ、この磁化が熱平衡に回復していく様子を観測する。図1(B)は一次元交換パルス系列を示す。この系列では分光器周波数を $2\nu_b - \nu_a$ 、 $t_1 = 1/4(\nu_a - \nu_b)$ に設定し、 ν_b の磁化を選択的に飽和させ、熱平衡磁化への回復を観測するものである。



(A)

Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_R
X	X	X	X
Y	Y	Y	Y
-Y	-Y	-Y	-Y
-X	-X	-X	-X
-X	-X	-X	-X
-Y	-Y	-Y	-Y
Y	Y	Y	Y
X	X	X	X
X	-X	-X	-X
Y	-Y	-Y	-Y
-Y	Y	Y	Y
-X	X	X	X
-X	X	X	X
-Y	Y	Y	Y
Y	-Y	-Y	-Y
X	-X	-X	-X

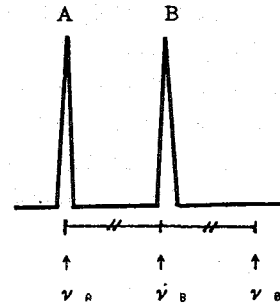


$$t_1 = 1 / 2 (\nu_A - \nu_B)$$

$$\nu_B = \nu_0$$

(B)

Φ_1	Φ_2	Φ_3	Φ_R
X	X	X	X
Y	Y	Y	Y
-Y	-Y	-Y	-Y
-X	-X	-X	-X
-X	-X	-X	-X
-Y	-Y	-Y	-Y
Y	Y	Y	Y
X	X	X	X
X	-X	-X	X
Y	-Y	-Y	Y
-Y	Y	Y	-Y
-X	X	X	-X
-X	X	X	-X
-Y	Y	Y	-Y
Y	-Y	-Y	Y
X	-X	-X	X



$$t_1 = 1 / 4 (\nu_A - \nu_B)$$

$$\nu_0 = 2\nu_B - \nu_A$$

図1 膜透過速度測定のためのパルス系列及び位相サイクル。(A)一次元磁化移動パルス系列。(B)一次元交換パルス系列。 Φ_1 、 Φ_2 、 Φ_3 、 Φ_R はそれぞれ1番目、2番目、3番目のパルス及び受信機の位相を表す。 τ_n は混合時間、 ν_A 、 ν_B はピークA、Bの共鳴周波数、 ν_0 は分光器の設定周波数を表す。

^{23}Na -NMR測定は日本電子製GX-400FT-NMR分光器を用いて行なった。

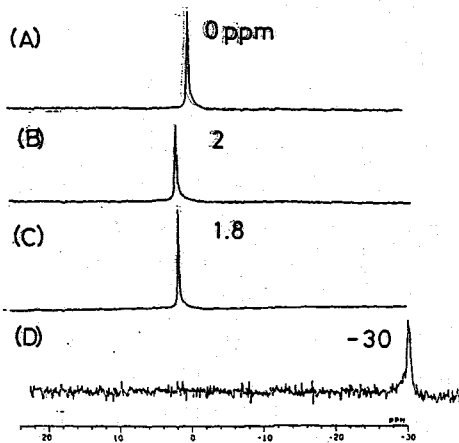


図2 ^{23}Na NMRスペクトル。(A)シフト試薬無添加。(B)含10mMDy (PPP) $_2^{7-}$ 。(C)含10mMDy (tiron) $_2^{2-}$ 。(D)含10mMDy (PPP) $_2^{7-}$ 。

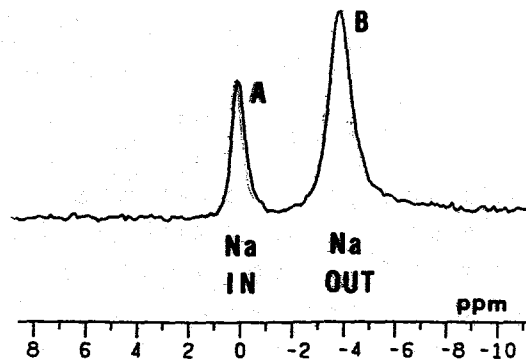


図3 Na^+ を含んだリボソームが分散した水溶液に0.01MのDy (PPP) $_2^{7-}$ を加えた試料の ^{23}Na NMRスペクトル。

(結果と考察) 図2にシフト試薬を加えたときの ^{23}Na -NMR信号のシフトの様子を示す。Dy $^{3+}$ (B)、Dy (tiron) $_2^{2-}$ (C)、Dy (PPP) $_2^{7-}$ (D)を加えたとき、BとCでは信号はシフト試薬を含んでいない場合(A)に比べて低磁場側にシフトし、Dの試薬では信号は高磁場側に大きなシフトを示した。図3はNaを含んだ水溶液に分散させたリボソームにDy (PPP) $_2^{7-}$ を加えたときの ^{23}Na -NMRスペクトルを示す。リボソーム外側の ^{23}Na 信号は高磁場側にシフトし、かつ多少ブロードになっているのに対し、リボソーム内側の信号はシフトを示さず線幅もシャープであることが分かる。したがって、このシフト試薬は膜を透過する事なくリボソーム外側の ^{23}Na -NMR信号のみをシフトすることが確認された。

次に図1(A)のパルス系列を用いて観測した τ_c に対する信号強度の変化を図4に示す。高磁場側の共鳴線Bは反転した状態から熱平衡磁化へと回復していき、低磁場側の共鳴線Aは励起を受けていないが、 ν_a と ν_b の信号の間で交換(Naの膜透過)が起これば ν_a の強度の減少が観測できるはずである。実際、図においては ν_a が一旦減少してからその後、再び増加し熱平衡状態へ回復していく様子が観測された。この現象を解析するため



のような一次の交換が起こっている系を考える。この場合の磁化の変化の様子は交換を考慮したブロッホ方程式を解くことにより、次式のように表される

$$M_z^A(t) = M_0^A [M_e^A/M_0^A - \phi_1 \exp(-\lambda_1 t) - \phi_2 \exp(-\lambda_2 t)] \quad (2)$$

$$M_z^B(t) = M_0^B [M_e^B/M_0^B - \phi_3 \exp(-\lambda_1 t) - \phi_4 \exp(-\lambda_2 t)] \quad (3)$$

ここで M_a , M_b は熱平衡磁化、 M_a^0 , M_b^0 は初期磁化を表す。(2)式あるいは(3)式の最少自乗解析から、 λ_1 , λ_2 を決定することができ、さらに

$$k_{-1} = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 - 1/T_1^A - 1/T_1^B}{1 + K_e} \quad (4)$$

$$K_e = \frac{[B]_e}{[A]_e} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (5)$$

の関係を利用して k_{-1} , k_1 を決定することができる。これらの式から分かるように速度定数を求めるためには緩和時間を求めておく必要がある。この緩和速度は交換のない状態、即ちモノシオンを混入する前に測定した。実際、 ν_a ピークの強度の時間変化を(1)式に最少自乗フィットさせた様子を図4(B)に示す。この図の解析から、 $k(\text{in} \rightarrow \text{out}) = 155.7 (\text{S}^{-1})$, $k(\text{out} \rightarrow \text{in}) = 60.4 (\text{S}^{-1})$ が得られた。

次にパルス系列図1(B)を用いた場合の信号強度の τ_a に対する変化の様子を図5に示す。 ν_a は τ_a の増加と共に増加していき、最終的に熱平衡磁化に到達する。このパルス系列の特徴は緩和時間の考慮を行う必要がないことであり、 $r = [1 - \exp(-k\tau_a)] / [1 + \exp(-k\tau_a)]$ として $\ln[(1+r)/(1-r)]$ 対 τ_a のプロットは直線になり、その傾きから k を算出することができる²。図5のデータより透過速度を求めたところ、図1(A)のパルス系列によって決定した値と大きく異なる値が得られた。この原因については現在検討中である。

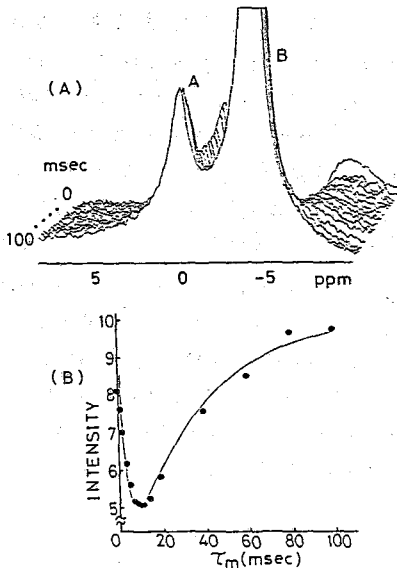


図4 図1(A)のパルス系列で測定したピーク強度の τ_a 依存性。測定温度 50°C 、 $\tau_a = 100, 80, 60, 40, 20, 15, 12, 11, 10, 9, 8, 6, 4, 2, 1, 0 \text{ msec}$ 。(A) スタックプロット。(B) ν_a のピーク強度の τ_a に対するプロット。

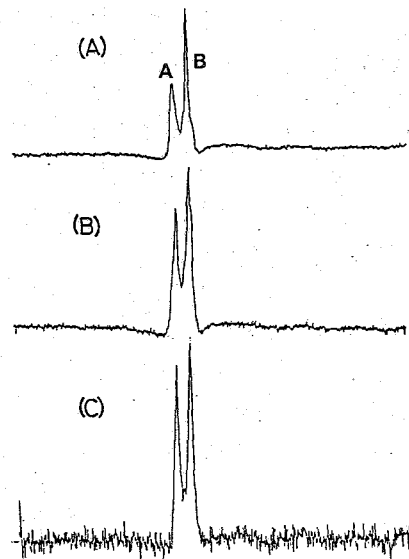


図5 図1(B)のパルス系列で測定したピーク強度の τ_a 依存性。(A) $\tau_a = 8 \text{ msec}$ 。(B) $\tau_a = 20 \text{ msec}$ 。(C) $\tau_a = 40 \text{ msec}$ 。

(文献)

- (1) D.C. Shungu and R.W. Briggs, J. Magn. Reson., 77, 491 (1988).
- (2) c. Connor, A. Naito, K. Takegoshi and C.A. McDowell, Chem. Phys. Lett., 113, 123 (1985).

(九大歯) ○河野敬一, 下川 修, 中山宏明

¹³C NMR Study of Glucose Metabolism in the Mutant of Pathogenic Fungus *Candida albicans*

Keiichi Kawano, Osamu Shimokawa and Hiroaki Nakayama

(Faculty of Dentistry, Kyushu University)

Aerobic and anaerobic glycolysis in *Candida albicans* has been studied by ¹³C NMR at 100.6 MHz. [1-¹³C] and [2-¹³C] glucose were fed to suspensions of two strains of *C. albicans*, KD-14 and its sterol mutant KD-4900. Under anaerobic conditions alcoholic fermentation took place in both strains, whereas under aerobic conditions two strains revealed different way of metabolism. The rate of glucose consumption in KD-4900 is slower than that in KD-14 and accumulations of trehalose, mannitol and arabitolare increased in KD-4900. However, addition of KCN as an inhibitor of electron transport system induces recovery of the rate of glucose consumption in KD-4900.

1. はじめに

二形性を示す病原性真菌カンジダ・アルビカンスのKD14から紫外線照射によりポリエーテル抗生物質の一つであるビマリシンに耐性を示す変異株KD4900を分離し、脂質を分析した結果、4,4,14α-トリメチルエルゴスタ-8,24(28)-ジエン-3β-オールなどの14位にメチル基を有するステロール(図1)を蓄積するステロール変異株であることがわかった^{1,2)}また蓄積ステロールが全て14α-メチルステロールであることからエルゴステロール合成経路の14位脱メチル化反応欠損株であると考えられる。本変異株の特徴として、グルコースを基質とするときの酸素消費速度が親株に比べて顕著に減少していることが明らかとなった。これは本変異株の呼吸活性が低下していることを示唆する。最終発酵産物であるグリセロールや乳酸塩あるいはコハク酸塩などを炭素源/エネルギー源として利用できないこともこのことを支持する。今回我々は呼吸活性低下の条件下での変異株と親株のグルコース代謝を¹³C NMRを用いて *in vivo* で比較し、

呼吸活性とグルコース代謝について検討した。

2. 実験

カンジダ・アルビカンスをYEPG(酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%)液体培地で25℃2日間振とう培養し酵母型細胞を得た。遠心により集菌後、MgSO₄・7H₂O(0.5g/l)とNaCl(0.1g/l)を含有する50mMリン酸緩衝液(pH7.2)

4,4,14α-trimethylergosta-8,24(28)-dien-3β-ol

ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (ergosterol)

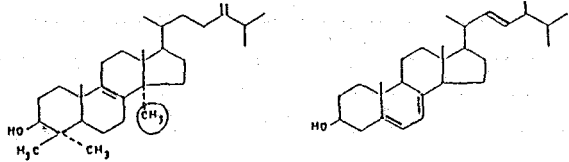


図1 KD14の産生するエルゴステロールと変異株KD4900に蓄積するステロールの構造

図 2-1 KD14 による $1-^{13}\text{C}$ グルコースの代謝

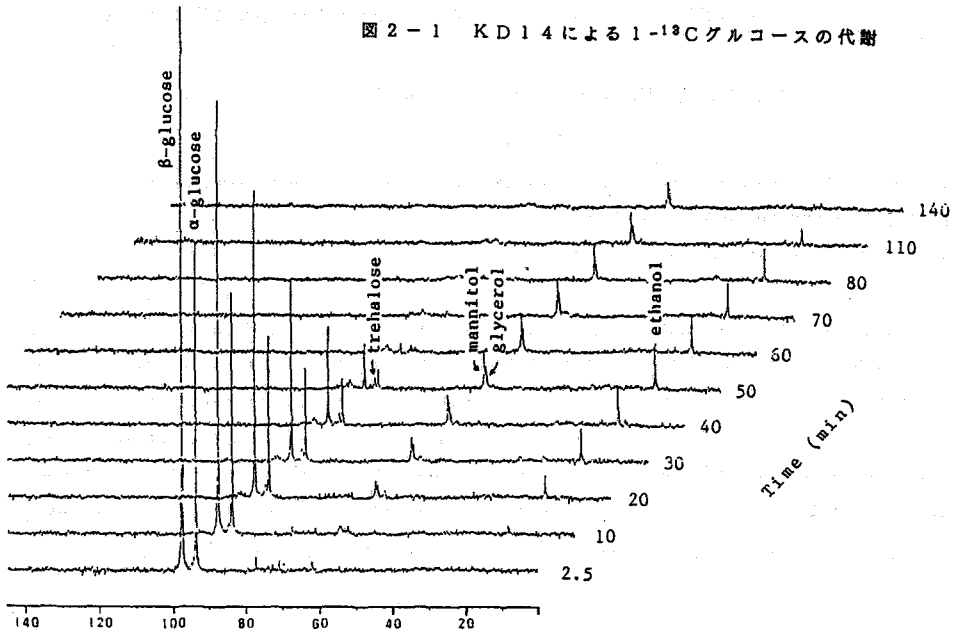
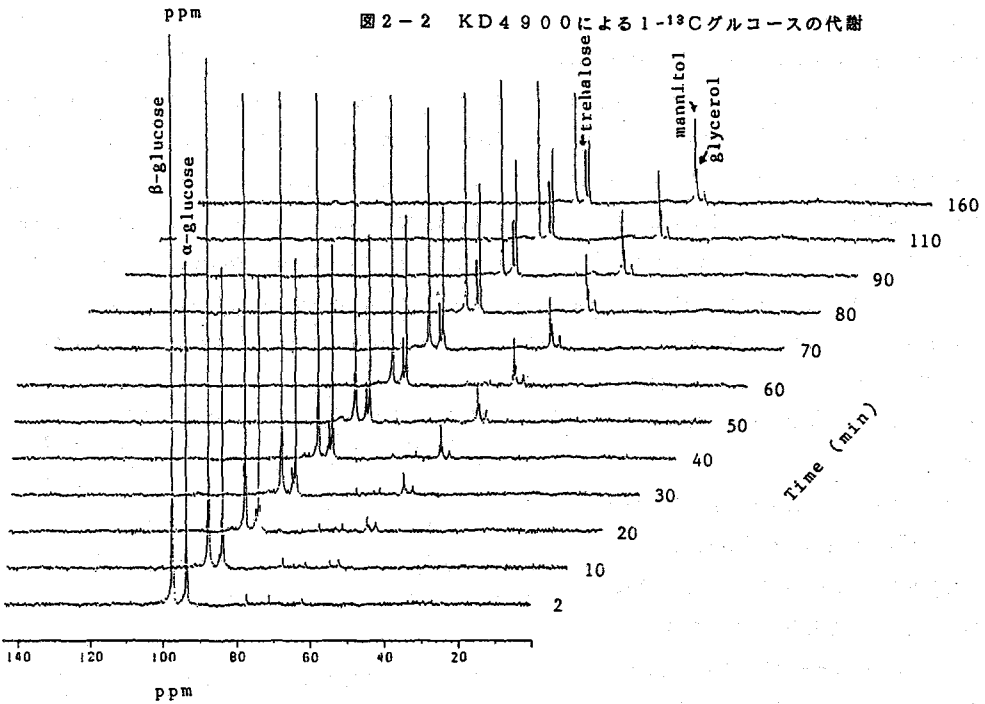


図 2-2 KD4900 による $1-^{13}\text{C}$ グルコースの代謝



で洗浄し、同緩衝液に 1×10^9 細胞/ml の濃度になるようにケン濁した。

この菌液 2 ml を NMR 試験管 (直径 10 mm) に取り、管底部より約 10 ml/min の流速で通気しながら、 ^{13}C でラベルしたグルコース ($1\text{-}^{13}\text{C}$ グルコースは MSD, $2\text{-}^{13}\text{C}$ グルコースは CEA より購入した。) を最終濃度

37.5 mM となるように添加し、直ちに ^{13}C NMR スペクトルを一定時間毎に測定した。

電子伝達系阻害剤は KCN (1 mM)、 NaN_3 (5 mM) とサリシルヒドロキサメート (SHAM) (3 mM) を通気時に添加した。

^{13}C NMR スペクトルは Bruker AM400 (100.6 MHz) を用い 45° パルス、繰り返し時間 448 ミリ秒、800 回積算の条件で測定した。ピークの帰属は文献値による推定と、推定される化合物のスペクトルを実際に測定し比較することで行った。

3. 結果と考察

(1) 嫌気条件では二株ともエタノール発酵をするのに対し好気条件 (通気) では KD4900 のグルコース代謝速度は親株 KD14 の 30-40% に減少していた。(図 2, 3)

(2) カンジダ・アルビカンスのグルコース代謝産物は解糖系産物としてグリセロール、エタノール、貯蔵炭水化物としてトレハロース、マンニトールが、またペントースリン酸経路の産物としてアラビトールが検出された。

変異株 KD4900 は通気条件下で親株と異なりエタノールの蓄積は殆どなく、かわりに親株では少量見られるにすぎないトレハロースやマンニトール、それにアラビトールが顕著に産生された。(図 2)

(3) これらの代謝異常は通気条件下、電子伝達系阻害剤の存在下では見られなかった。すなわち、グルコースの代謝

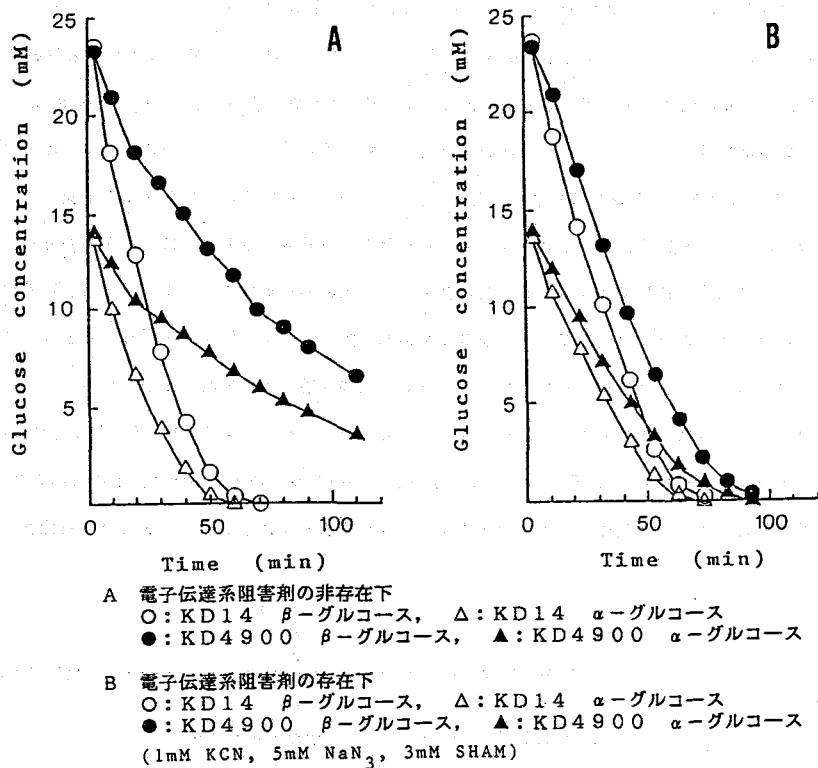


図3 グルコース消費の時間変化

速度は親株同様になり、代謝産物もエタノールの顕著な蓄積が見られた。

(4) またKD4900から分離した復帰株KD4907のグルコース代謝は全く親株と同様であった。ステロール合成経路の14位脱メチル化反応阻害剤であるクロトリマゾール(CTZ)を0.01 μg/ml含有するYEPG培地で培養したKD14はKD4900と同様の代謝異常を示した。CTZ処理のKD14はKD4900と同様の14 α-メチルステロールのみを蓄積する。しかし、14 α-メチルステロールを蓄積する変異株であるが同時にエルゴステロールも蓄積するKD4700はKD4900程の代謝異常を示さず、ほぼ親株同様であった。

(5) 以上の結果はKD4900で見られたグルコース代謝異常がステロールの変化と関連性のあることを示唆している。我々はステロールの変化がミトコンドリアの細胞膜に何らかの機能障害を与えると考えてきたが、今回得た結果はそれに伴った現象と考えられる。KD4900に顕著に蓄積する産物、すなわちトレハロース、アラビトールおよびマンニトールは、それぞれグルコース6-リン酸およびフルクトース6-リン酸から産生されること、それに解糖系においてフルクトース6-リン酸 → フルクトース1,6-ニリン酸の反応が律速反応であることなどを考えると、KD4900のグルコース代謝異常はこの段階が何らかの阻害を受けることによるという可能性も考えられる。

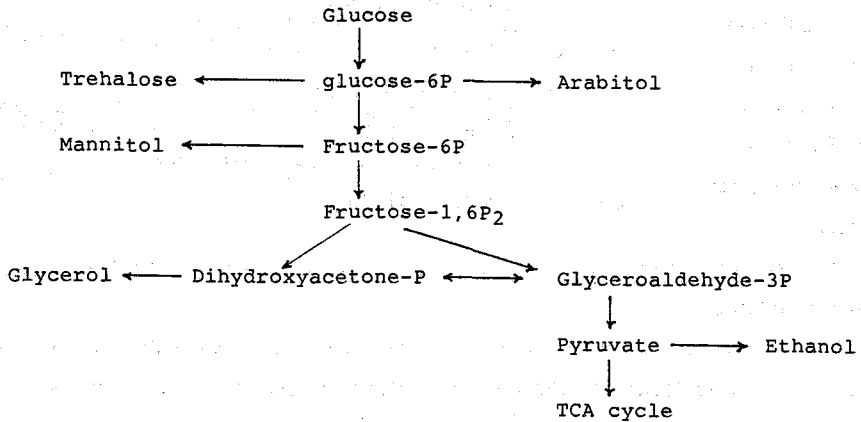


図4 グルコース代謝の推定される経路

文献

- 1) Shimokawa, O., Kato, Y. and Nakayama, H.
J. Med. Vet. Mycol., 24, 327-336 (1986)
- 2) Shimokawa, O., Kato, Y., Kawano, K. and Nakayama, H.
Biochim. Biophys. Acta, 1003, 15-19 (1989)

Masafumi Harada, Hironu Nishitani (School of Medicine, Tokushima University)

Keiko Koga, Iwao Miura (Tokushima Res. Inst., Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

We investigated metabolism of 5-fluorouracil in the rat liver with acute liver failure by in-vivo ^{19}F -MRS. In the liver failure group, fluoronucleotide was found to increase markedly and the production of α -fluoro- β -alanine delayed compared to the normal group. These results show that nucleotide synthesis can be assessed by ^{19}F -MRS and would be a new method for the evaluation of the liver viability.

1. はじめに

従来、chromatographyやradioisotopeによって認められた5-fluorouracil(以後5FUと略す)の代謝産物の一部がin vivo ^{19}F -MRSによっても確認できることが示され、既にいくつかの報告がある^{1)~3)}。

purineやpyrimidineの分解は、おもに肝臓によって行われ、また核酸合成経路として重要なsalvage回路の主たる場所も肝臓である。従って肝障害の場合には、5FUの分解が正常と比べ減少することが予想され、また、肝細胞再生時には核酸合成の亢進を反映してfluoronucleotide(Fnctと略す)の合成増加が観察できる可能性がある。我々は5FUの ^{19}F -MRSによる観察が、核酸代謝に関する肝機能評価に使用できると考えた。さらに、5FUは臨床肝障害患者に用いられることも稀ではなく、肝障害ratにおける5FUの代謝の観察は、MRSの臨床応用の際にも参考になると考えた。そこで、病態モデルとして CCl_4 投与による急性肝炎ratを作成し、5FUを静注してその代謝を観察した。

また、5FUのchemical modulatorとしてuracilがあり、uracilと5FUの併用による抗腫瘍効果の増強は既に報告されている。今回我々は、uracilの併用による5FUの分解抑制が、Fnctの合成にどの程度影響を与えるかを検討し、 CCl_4 による急性肝障害モデルにおけるFnctの亢進と比較した。

2. 対象と方法

Wister Kyoto rat(WKY)雄性20週齢を用いた。麻酔はsodium pentobarbital50mg/kgを腹腔内投与して行った。麻酔後、大腿静脈にcatheterを挿入し、外科的に開腹して肝臓の表面にサーフェスコイル(直径20mm)が密着するようにプローブを固定した。肝臓とサーフェスコイルとの間には、プラスチックフィルムを置いた。Ratは次のように3群に分類した。

ほ了だ まさふみ

1) Control群(n=6): 大腿静脈より5FU(5FU協和, 協和発酵工業) 100mg/kgを注入し、直後よりスペクトルを測定した。

2) CCl₄投与群(n=6): CCl₄1ml/kgを腹腔内投与後24時間のratを用いた。スペクトルは5FU 100mg/kgを注入後より測定した。終了後、採血してGOT, GPTを測定し、有意な上昇(GOT 1000IU/L以上, かつGPT500IU/L以上)をきたしたもののみを検討の対象とした。

3) Uracil併用群(n=6): 5FU投与20分前から大腿静脈よりuracil200mg/kgをゆっくり注入し、スペクトルは5FU100mg/kg静注直後より測定した。

測定装置は、大塚電子(U.S.A)INC社製BEM140/200(磁場強度4.7Tesla)を用いた。測定条件は、¹⁹F共鳴周波数187.4MHz, pulse幅100μs, 繰り返し時間2.5s, 積算回数240回とし、1スペクトルの測定時間は10分間とし、全測定時間は100分間とした。

二群間の差の検定には、t検定及びWilcoxon検定を用いた。

3. 結果

Fig. 1にcontrol群とCCl₄肝障害群におけるスペクトルを示す。既に報告されている結果を基にし5FUのpeakを0として-18.8ppm及び4.9ppmの位置にあるpeakはそれぞれα-fluoro-β-alanine(FBALと略す), Fnctと判断した。Control群に比べ肝障害群においてFnctのpeakの増高とFBALの生成の遅延が認められた。

5FUの代謝の変化を比較するために次のような半定量化を行った。

1) 5FUの減少率: $5FU(t)/5FU(0\sim 10)$ (Fig. 2)

2) FBALへの分解率: $FBAL(t)/5FU(t)$ (Fig. 3)

3) Fnctへの合成率: $Fnct(t)/(5FU(t)+FBAL(t))$ (Fig. 4)

5FU(0~10): 0 10分間の5FUのpeak intensityを意味する。

5FU(t), FBAL(t), Fnct(t): 各(t)時間における5FU, FBAL, Fnctのpeak intensityを意味する。

Fig. 2に3群間における5FUの減少率を示す。uracil併用群における5FUの減少は著明に遅く、一方肝障害群における5FUの減少はuracil併用群ほどではないが、正常群と比べ僅かに遅い傾向にあった。

Fig. 3には、3群間のFBALの生成の違いを示す。uracil併用群においてFBALの生成が最も遅く、障害肝においても正常群と比べ明らかに分解が遅かった。

Fig. 4は、3群におけるFnctの生成率を比較したグラフである。肝障害群において、著明にFnctの生成が多いことがわかる。特に、5FU静注後0~40分間の早期に著しく、以降はプラトーになる傾向にあった。Uracil併用群もcontrol群と比べると少しFnctの生成が多いが、肝障害群におけるような、静注後早期からの著しい上昇は認めない。

4. 考察

in vivo ¹⁹F-MRSによる5FUの肝臓における代謝の報告は、これまでに数編がある。これらの報告では、in vivoか灌流系かというモデルの違いや、磁場強度等に由来する感度の違いなどのため、若干検出できる代謝産物の数が異なっている。しかし、各報告で共通している5FUの分解産物としてはFBALがあり、代謝産物の中で最も高いpeakとして認められてい

る。Cabanacらによる報告では、FUPAのpeakが低く認められるが²⁾、我々の観察やWolfらの報告では認められなかった³⁾。一方、5FUの合成経路としては、Fnc_tのpeakが認められる。

今回我々の実験の結果、肝障害群においてFnc_tが著明に増加していることが示された。また、FBALの生成は明らかに遅い傾向にあるが、5FUのpeakの減少は、正常群と僅かな違いしかない。これは5FUがFnc_tの生成に使用されたためと考えられる。一方、uracil併用群においては、肝障害群よりもFBALへの分解が強く抑制されているにもかかわらず、Fnc_tの生成は肝障害群よりも少なかった。uracilは、5FUの分解酵素ほど強くFnc_tの合成酵素を抑制しないことが知られている。このことから、障害肝におけるFnc_tの合成増加が、5FUの分解抑制によるものではないことが示唆される。

CCl₄投与による肝障害については、古くから研究が行われており、肝障害の原因としてradical($\cdot\text{CCl}_3$)を生成して脂質過酸化を発生させやすくし、細胞構造を変えるためといわれている。CCl₄における肝障害の発生は急速であり、組織学的には投与直後より発生し48時間以内に最高になるといわれている。また、肝細胞の再生についても詳細な検討が行われており、それによると薬物や肝切除による肝細胞壊死の後、16時間目頃より核酸合成を開始し、20時間目に最高になることが知られている。従って、我々の測定したCCl₄投与24時間後という時期は、核酸合成が最も盛んな時期に一致すると考えられ、5FUによる観察でFnc_t合成が亢進してみえる結果とよく合致する。

以上の考察より、CCl₄投与による急性肝障害においてFnc_tの生成の亢進が認められるのは、肝細胞壊死にともなう再生の初期過程として、核酸合成の著明な亢進を反映するものと推察され、5FUを用いた¹⁹F-MRSが肝障害における細胞のviabilityの評価に使用できる可能性が示唆される。

5. 参考文献

- 1) A. N. Stevens, P. G. Moris, R. A. Iles, et al.: Br. J. Cancer, 50: p113 (1984)
- 2) S. Cabanac, M. C. Malet-Martino, M. Bon, et al: NMR in Biomedicine, 1: p113 (1988)
- 3) W. Wolf, M. J. Albright, M. S. Silver, et al.: Magn. Reson. Imaging, 5: p165 (1987)

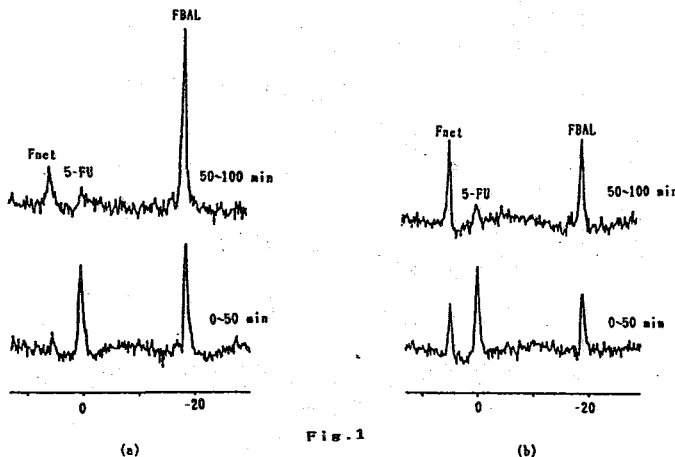


Fig. 2

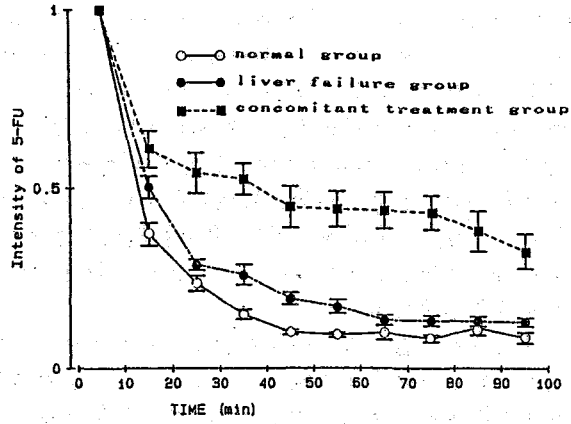


Fig. 3

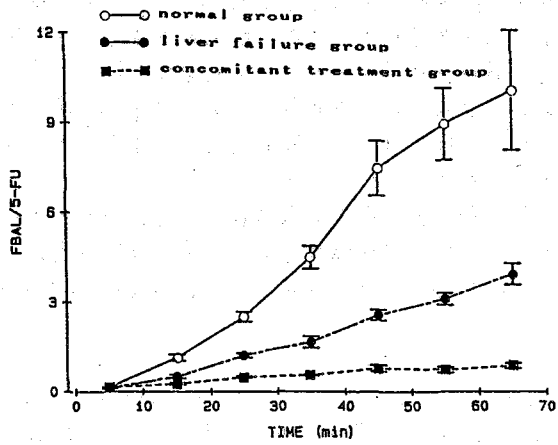
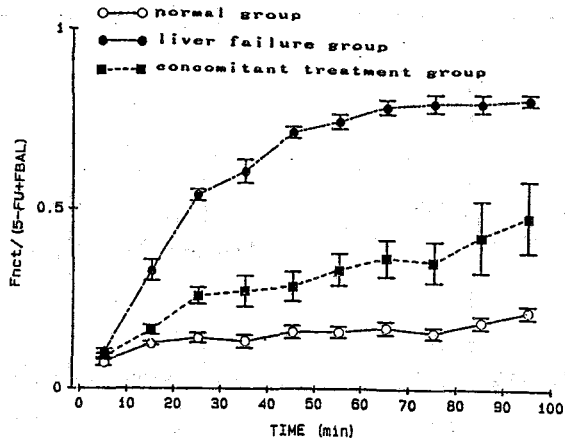


Fig. 4



L36 — L40

(明治鍼灸大学生理、京都府立医大眼科、化学) ○西川弘恭、森和彦、貝塚由利子、照林宏文、赤木好男、糸井素一、森山祥彦

¹H-NMR Studies on Whole Lens of Rat of Various Ages

H. NISHIKAWA, K. MORI, Y. KAIZUKA, H. TERUBAYASHI, Y. AKAGI, M. ITOI AND Y. MORIYAMA, Meiji College of Oriental Med. and Kyoto Prefectural Univ. Med.

We studied on a whole lens of rat of various ages by ¹H-NMR spectrum and relaxation time measurements. There were no changes of the relaxation times (T_1 and T_2) of water in normal lens of various ages, but their increases in galactose cataract lens. We obtained ¹H-NMR spectra of whole rat lens by using water suppression ¹H-NMR at 300MHz. The spectra showed resonance lines of aliphatic amino acids of lens proteins and lactate in lens. We could not found specific changes of the spectra with age.

眼球の水晶体はFig.1に示すように眼球前部にある両凸レンズ形の透明体である。水晶体は水晶体質とそれを包む弾性を有する水晶体包 (lens capsule) よりなる。水晶体質は中心部の脱核した水晶体線維細胞よりなる水晶体核と表層部の細胞核を有する水晶体線維細胞よりなる水晶体皮質で構成されている。水晶体線維細胞は65-70%の水と30-35%の水晶体タンパク質 (α 、 β 、 γ -クリスタリン) および微量の低分子物質を含んでいる。水晶体タンパク質は光が良く透過する構築をもつ。このタンパク質が会合すると光散乱を生じ、水晶体混濁をもたらす。近年水晶体タンパク質構造の *in vivo* 研究にレーザーラマン分光法が応用され、報告されている。¹⁾ 本研究では水晶体タンパク質構造の加齢による変化を水晶体タンパク質の構造と密接に関連する水晶体質水の¹H-NMR緩和時間とwater suppression ¹H-NMRスペクトルで検討した。

試料と方法

試料

ラット (緩和時間測定にSprague-Dawley系、スペクトル測定にWister系、雄) の水晶体

NMR装置

緩和時間測定: スピノエコ-NMR装置

(JNM-FSE-60E、JEOL)、

60MHz

T_1 IR法、 T_2 CPMG法

試料管 moist chamber (10mm径、自家製)

スペクトル測定: 高分解能超伝導磁石NMR装置 (NT-300、NICOLET)、300MHz

試料管 5mm径

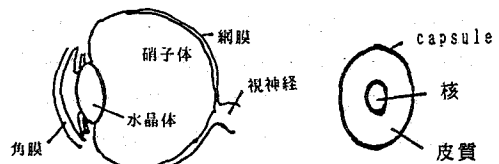


Fig.1 眼球と水晶体

にしかわひろやす、もりかつひこ、かいづかゆりこ、てるばやしひろふみ、あかぎよしお、いといもとかづ、もりやまよしひこ

結果と考察

1. 水晶体水の $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間

正常ラット水晶体水の $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間の加齢に関する検討と水晶体タンパク質が徐々に変化する例としてのラット糖白内障での水晶体水の $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間とタンパク質構造の関係を検討した。

糖白内障による混濁した水晶体は50%ガラクトース含有飼料での飼育で得た。飼料投与開始後2、4、7、11、14、21日目に両眼を摘出し、capsuleを保った状態の水晶体を試料として $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間を測定した。

糖白内障ラット水晶体の組織像はガラクトース投与開始後次のような変化を示す。

- 2日目 赤道部から前赤道部の皮質に軽度の膨化が見られる。
- 4日目 膨化の亢進が見られる。
- 7日目 前皮質の液化が見られる。
- 14日目 全周性に液化変性が見られ、核にも混濁が見られる。

ラット水晶体の水分含有量の経時的变化をFig. 2に示す。正常ラット水晶体ではほぼ一定の値を示している。一方水晶体タンパク質の結晶構造の破壊による混濁を示す糖白内障ラットでは水分含有量の増加を示している。したがって糖白内障ラット水晶体は加齢によるのではなく、その病態の進行に伴い水分含有量の増加を示す。

ラット水晶体の T_1 緩和時間の経時的变化をFig. 3に示す。正常ラットと糖白内障ラットの両者とも2成分(fastとslow)の T_1 緩和時間を示す。正常ラットではほぼ一定の T_1 値を示し、加齢による変化は見られない。糖白内障ラットでは長い方の T_1 の延長が見られる。糖白内障ラットのslow T_1 は水分含有量と高い相関を示した。

ラット水晶体の T_2 緩和時間の経時的变化をFig. 4に示す。正常ラットでは1成分、糖白内障ラットでは1日目は1成分であるが、4日目では2成分(fastとslow)の T_2 緩和時間を示す。正常ラットでは T_2 値は延長傾向を示す。糖白内障ラットではslow T_2 は4日目から7日目では単調な増加を示し、それ以後では減少傾向を示す。この事実は組織像でみられる広範な水晶体質の液化

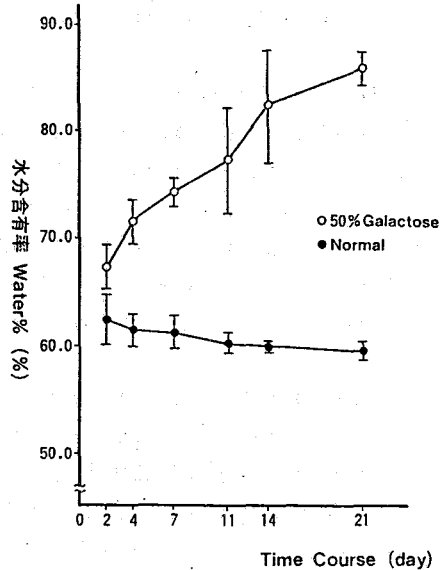


Fig. 2 ラット水晶体の水分含有量の経時的变化

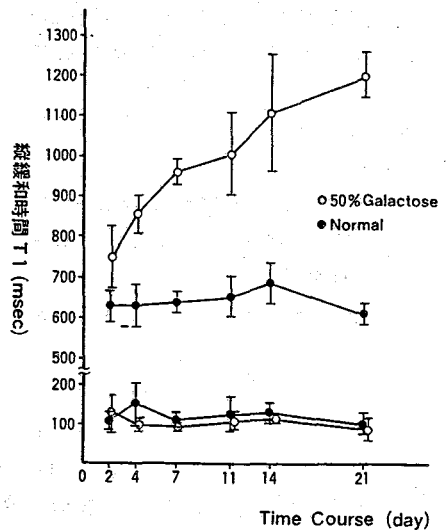


Fig. 3 T_1 値の経時的变化

変性に対応している。すなわち水晶体タンパク質の結晶構造の崩壊のため水晶体質の水がより粘張になったと考えられる。 T_2 値では水分含有量との相関性は見られなかった。すなわち水分含有量の増加時に液化変性が生じ、粘性が増加し T_2 値の減少傾向をもたらしたと言える。正常ラット水晶体ではNMR緩和時間を有意に変化させる水晶体タンパク質構造の変化は見られなかった。

2. ラット水晶体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

正常ラット(4週齢から10週齢)の水晶体にwater suppression $^1\text{H-NMR}$ を適用し、水晶体タンパク質と低分子物質のスペクトルを得、加齢による変化を検討した。

capsuleを保った状態の水晶体を試料とした。

水晶体は重水を添加したmedium (pH 7.4、浸透圧 286 mOsm/L) と共に5mm径NMR試験管に入れた。ハルス系列は1331 water suppression法を用いた。化学シフトの基準はDSSとした。resolution enhancementのためparameter MSを用いた。

Fig. 5に4週齢ラット水晶体のスペクトルを示した。Lは乳酸、Pは水晶体タンパク質の脂肪族アミノ酸側鎖による共鳴線である。同じ週齢のラットを同じ処理をして試料調製したにもかかわらず水晶体タンパク質の脂肪族アミノ酸側鎖による共鳴線群のピークに顕著な差異が認められる。この原因として、(a) 4週齢では水晶体が未成熟であり、わずかの時間的な差異が水晶体タンパク質構造の差異をもたらすこと、(b) 水晶体タンパク質を構成する α 、 β 、 γ -クリスタリンの分画に個体差があり、これを反映していること、が挙げられる。Fig. 6に4週齢、7週齢と10週齢のラット水晶体のスペクトルを示した。これらの間に週齢と関係する一定の、かつ特異的な差異は認められない。この原因として、本実験に用いた週齢は水晶体が未成熟の時期であるため、前述のように水晶体タンパク質構成クリスタリン分画の個体間のバラツキが大きいためと考えられる。

文献 1) 尾崎幸洋、入山啓治、蛋白質 核酸 酵素, 33, 1098-1110, 1988

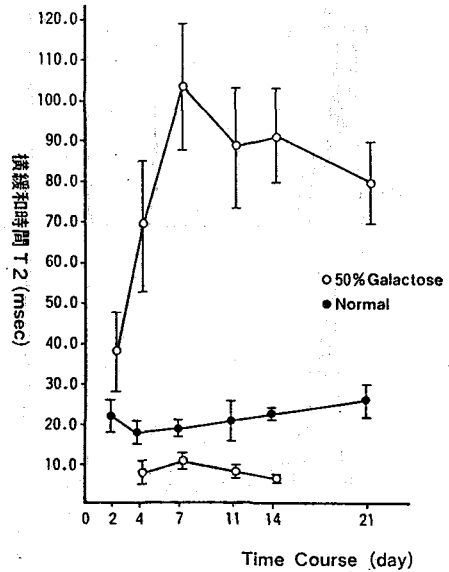


Fig. 4 T_2 値の経時的変化

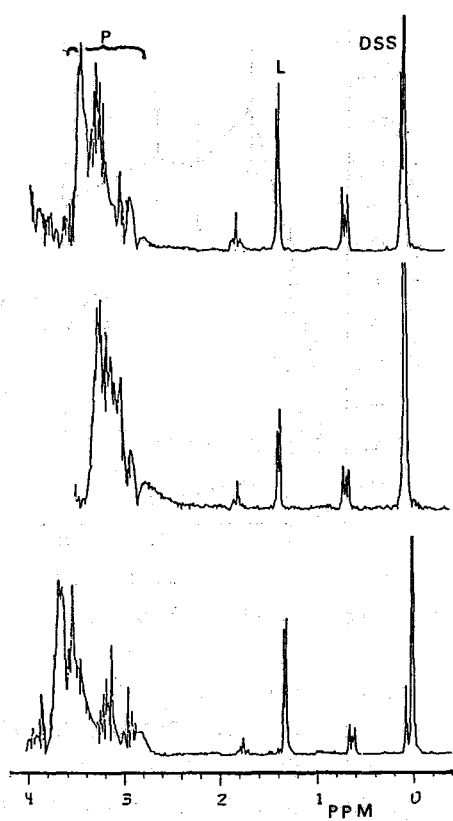


Fig. 5 4週齢ラット水晶体の¹H-NMRスペクトル

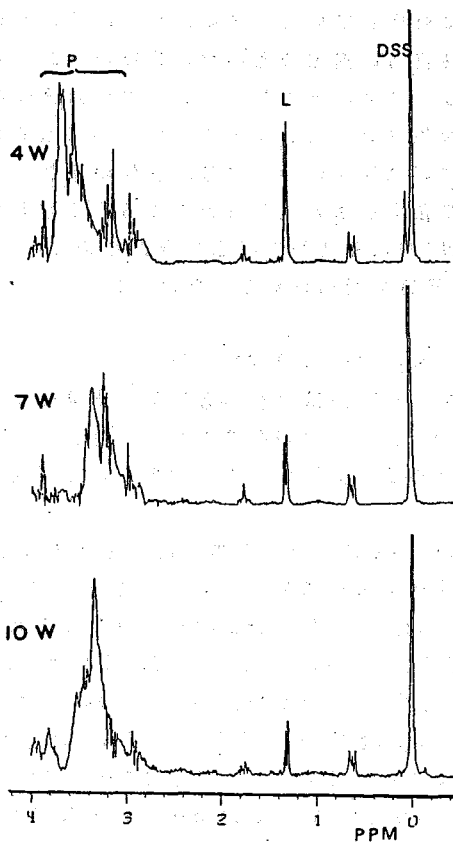


Fig. 6 4、7、10週齢ラット水晶体の¹H-NMR
スペクトル

^{31}P -NMR STUDY ON THE FLUX OF CREATINE KINASE REACTION AND OXYGEN
 CONSUMPTION RATE IN SKELETAL MUSCLE OF BULLFROG.

Kazuo YOSHIZAKI, Norihiko YOKOI, and Taketoshi MORIMOTO
 (Dept. Physiol., Kyoto Pref. Univ. Med.)

The flux of the creatine kinase reaction in sartorius muscle of bullfrog was $3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ wet weight} \cdot \text{sec}^{-1}$ determined by ^{31}P -saturation transfer NMR. The flux was large enough to maintain the equilibrium state of the reaction in muscle. The oxygen consumption rate increased when the concentration of phosphocreatine was decreased in the resting muscle. The rate was apparently proportional to the concentrations of inorganic phosphate and creatine, and was increased hyperbolically to the ADP concentration.

[はじめに]

単離した骨格筋を嫌気的な条件に保つと酸素欠乏のためにクレアチン磷酸(PCr)が徐々に減少し、細胞内pHの酸性化が生じる。しかしその場合でも筋細胞内のクレアチン・キナーゼ反応のフラックスは一定であることを昨年報告した。今回、カエル縫工筋のクレアチン・キナーゼ反応のフラックスを ^{31}P -飽和移動NMR法で測定し、酸素消費速度と比較検討した。さらに嫌気的条件下に保った筋肉を好気的条件下にすると再びPCrが増加するが、その際の化合物の濃度の変化と酸素消費速度についても検討したので報告する。

[方法]

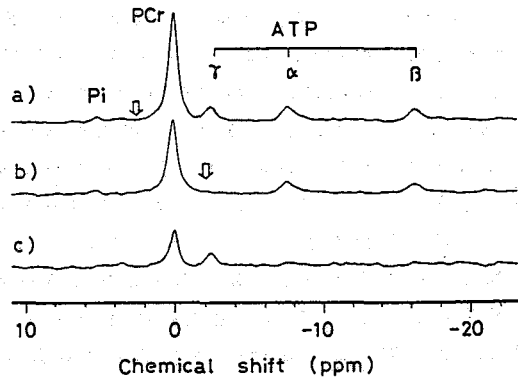
^{31}P -NMRの測定にはリンの共鳴周波数 80 MHz、ワイド・ボアの超伝導磁石を用い、市販の10 mmのプロブ、および試料の灌流の際には9ターンの内径10 mmのソレノイド・コイルで室温で測定した。 ^{31}P -飽和移動NMR法にはゲーテッド・デカップリング法を用い、10-20 Hzの雑音変調によりATPの γ 位のリン(γ -ATP)の共鳴線を照射した。試料にはウシガエルの大腿の縫工筋を用いた。

図1 ^{31}P -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) 対照スペクトル(照射位置: 矢印)。

b) γ -ATPの共鳴線を照射・飽和したスペクトル。

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(a-b))。



よしざき かずお、よこい のりひこ、もりもと たけとし

〔結果および考察〕

1. カエル縫工筋におけるクレアチン・キナーゼ(CPK)反応のフラックス。

³¹P-飽和移動NMR法によるカエル縫工筋のCPK反応のフラックス測定における³¹P-NMRスペクトルを図1に示す。縫工筋は一晚、冷蔵庫で空気飽和したトリス・リンゲル溶液中に保った後、室温で灌流しながら測定した。スペクトルからPCr 27.0 mmol/kg 湿重量(以下mMと略す)、無機リン酸(Pi, 1.5mM)を定量した。これらは表1に示すごとく、昨年報告した大腿二頭筋に比べPCrの濃度は大きく、Piは少ない。これは筋線維間の差異、あるいは縫工筋に比べて筋層の厚い大腿二頭筋では酸素の供給が不十分であったためかもしれない。しかし細胞内pH(pHi)は7.3で、大腿二頭筋との差は認められなかった。

次にATPのγ位のリンの共鳴線を照射・飽和させると、PCrの共鳴線の面積は67%に減少した(図1、表1: M*/M°)。また、PCrのスピン・格子緩和時間(T_{1m})を飽和回復法で求めると3.2 sとなった。これらの値は大腿二頭筋に比べ大きい。しかしこれらから計算したPCrのintrinsic T₁は4.7 sとなり、大腿二頭筋との有意差は認められなかった。また、CPK反応の正反応方向(PCr → ATP)のみかけの速度係数kは0.11 s⁻¹となり、大腿二頭筋のそれよりも小さい。PCrの濃度を乗算して、CPK反応のフラックスを求めると2.9 mM/sとなり、大腿二頭筋よりもわずかに小さい値が得られたが有意差はない(p < 2%)。

これらの結果はPCrが減少しても筋細胞内のCPK反応のフラックスならびにPCrのintrinsic T₁は変化しないとの昨年の本会での報告とほぼ一致した。

表1. カエル縫工筋および大腿二頭筋におけるCPK反応のフラックスの³¹P-飽和移動NMR法による測定結果(mean ± S.D.)。

	PCr(mM)	Pi(mM)	pHi	M*/M°	T _{1m} (s)	T ₁ (s)	k(s ⁻¹)	flux(mM/s)
縫工筋	27.0	1.5	7.3	0.67	3.2	4.7	0.11	2.9
(n = 9)	± 0.6	± 0.6	± 0.1	± 0.03	± 0.3	± 0.4	± 0.02	± 0.4
大腿二頭筋	21	7	7.3	0.58	2.6	4.4	0.17	3.6
(n = 5)	± 3	± 2	± 0.0	± 0.03	± 0.3	± 0.5	± 0.03	± 0.8

2. カエル縫工筋における酸素消費速度の測定。

³¹P-飽和移動NMR法によりカエル縫工筋のCPK反応のフラックスは3 mM/sの値が得られた。すなわち、1秒間に3 mMのATPがPCrになり、同時にPCrからATPになる。このATPのturnover rateと比較するために酸素消費速度を測定した。

カエル縫工筋を同様に一晚、冷蔵庫で空気飽和したトリス・リンゲル溶液中に保った後、一定温度(24.0 ± 0.1 °C)のリンゲル溶液を満たしたガラス容器内につるし、密閉してクラーク型の酸素電極(ポーラログラフィー法)で溶存酸素量を測定した(図2)。その溶存酸素量の減少速度から縫工筋の酸素消費速度を求めると15 ± 3 μM/minとなった(n = 6)。

酸素消費によるATPの産生速度はP/O = 3と仮定すると0.0015 mM/sとなる。この値は同時に、静止筋におけるATPの消費速度でもある。この酸素消費から求めたATPのturnover rateと比較すると、CPK反応によるATPのturnover rateは2,000倍も大きい(図3)。さらに次節の図5に示すように、カエル縫工筋の酸素消費は最大で6倍に増加するにすぎない。したがって、ATPの正味のturnover rateと比較して、CPK反応のフラックスははるかに大

きく、すなわちCPK反応は細胞内で平衡状態にあることを示している。

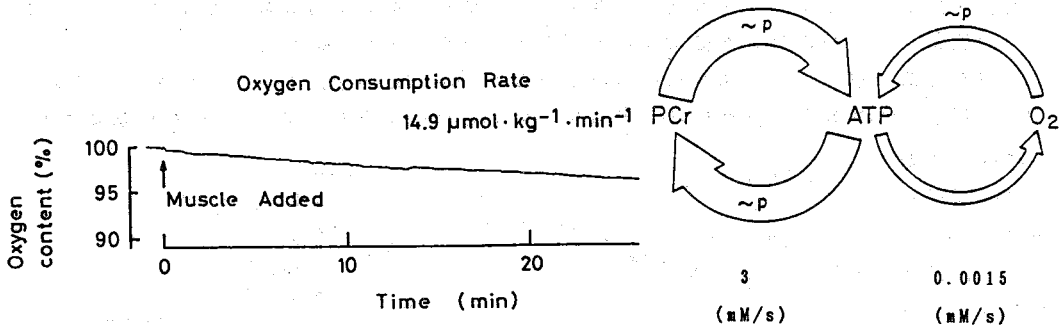


図 2 カエル縫工筋の酸素消費速度の測定。
密閉したガラス容器内の溶存酸素量を酸素電極
で測定した。

図 3 カエル縫工筋における CPK反
応のフラックスと酸素消費による
ATPの代謝回転速度。

3. 静止筋における酸素消費速度と³¹P-NMRスペクトル。

細胞内でCPK反応が平衡状態にあればその平衡定数を用いてADPの濃度が計算できる。と
ころでミトコンドリアの研究によると酸素消費のミカエリス定数、すなわち最大酸素消費
速度の50%を与える濃度は20~56 μM ADP および1 mM Piであると報告されている。これ
らでカエル骨格筋の呼吸調節が説明できるかどうかについて検討した。

嫌気的狀態に保った筋肉を好氣的条件におくと再びPCrが増加する。その際の酸素消費
速度を測定した。PCrの減少、Piの増加、細胞内pHの酸性化した筋肉では酸素消費速度が増
加した。以後、酸素消費速度と³¹P-NMRスペクトルとを交互に測定すると、経時的にPCrの
増加・Piの減少が認められ、酸素消費速度はPCrの増加と共に遅くなった(図4)。4例の筋
肉のリン化合物ならびに酸素消費速度の経時的な変化を図5に示す。

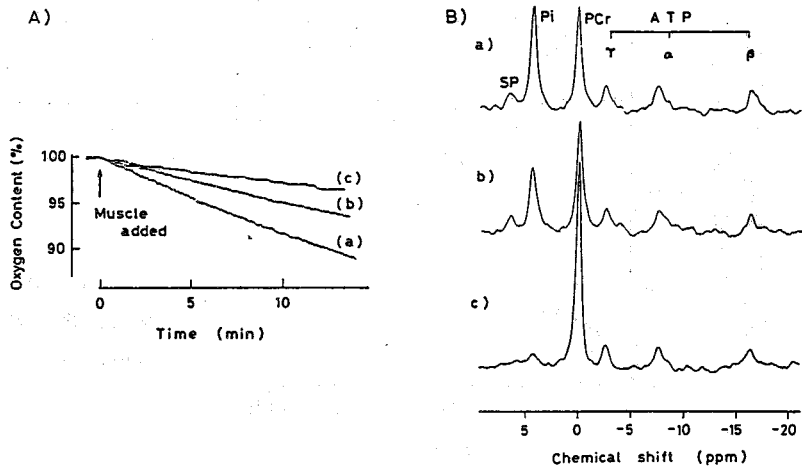


図 4 カエル縫工筋
の酸素消費速度(A)
と³¹P-NMRスペクト
ル(B)。

NMR試料管内に筋
肉を一晩おき、翌日
この筋肉のスペクト
ルと酸素消費速度を
交互にa, b, cの順に
測定した。

酸素消費によるエネルギー産生によりPCrの増加ならびにPiの減少が生じ、もとの濃度への回復が認められたが酸素消費速度の減少にともない、その回復速度は遅くなった。しかし、酸性化した細胞内pHの回復はほとんど認められなかった(図5)。

この酸素消費速度とリン化合物の濃度との関係を図6に示す。Piならびにクレアチン(Cr)の増加により酸素消費速度は直線的に増大する傾向があり、また、ADPの増加に対して

も同様に酸素消費速度が増加したが、プラトーが認められた。その最大酸素消費速度の50%を与えるADPの濃度はおおよそ20~30 μ Mとなった。

図5 カエル骨格筋のリン化合物、細胞内pHならびに酸素消費速度の経時変化。

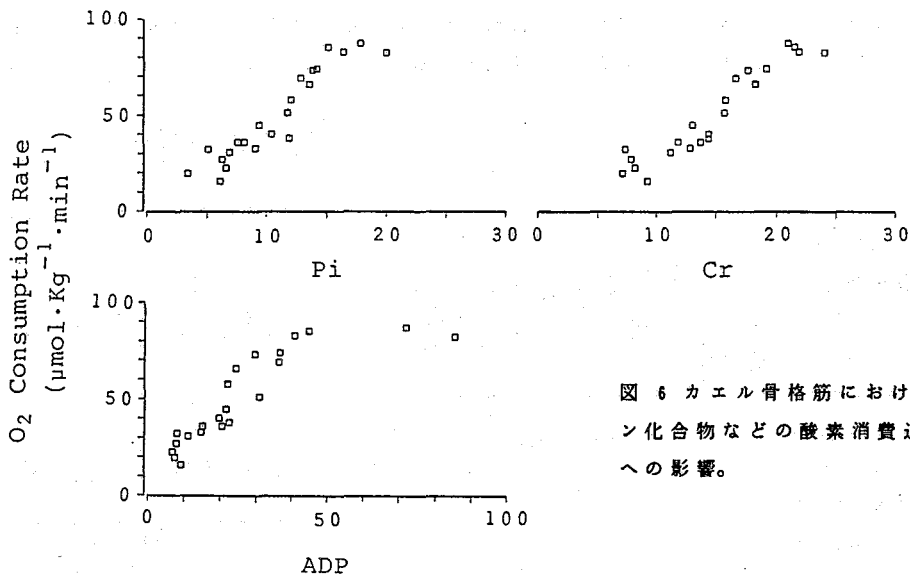
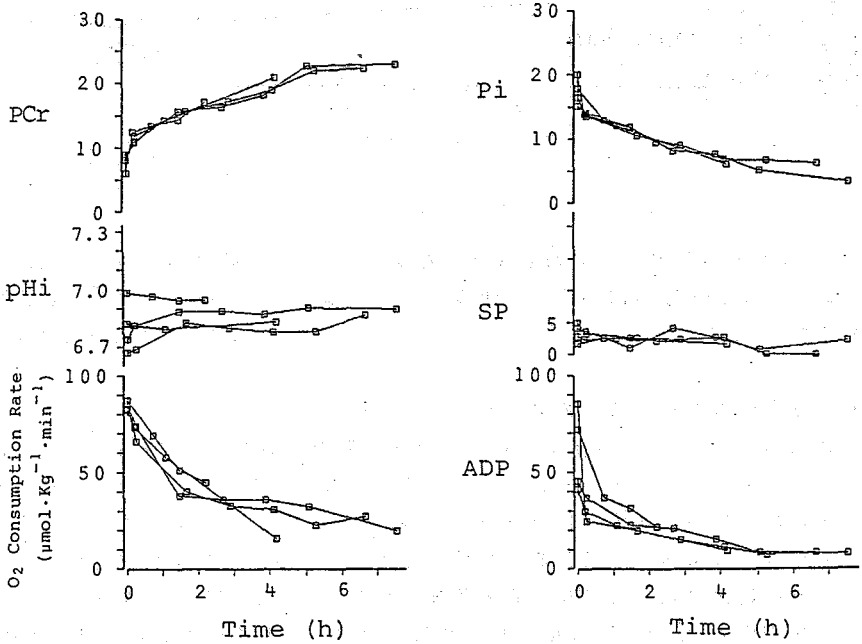


図6 カエル骨格筋におけるリン化合物などの酸素消費速度への影響。

(University of Minnesota) Kamil Ugurbil

Recent NMR spectroscopy studies on excised perfused hearts have significantly increased our understanding of myocardial bioenergetics. Spatially localized NMR spectroscopy techniques permit for the first time to extend such investigations to the cardiac muscle in vivo; furthermore, these techniques provide the unique opportunity to examine the metabolic and functional heterogeneity present in the left ventricular wall of the cardiac muscle. An overview of these applications and the spatially localization techniques employed to accomplish them will be presented.

Kamil Ugurbil

University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455

Rotating frame法による ^1H NMRスペクトルの
局在化測定

(国立公害研、M R C*) ○三森文行、N. M. Bolas*

Rotating Frame Localization of ^1H NMR Spectra

Fumiyuki MITSUMORI and Nicholas M. Bolas*

(National Institute for Environmental Studies, Medical Research Council*)

Although various localization methods of NMR spectra utilizing the B_0 or B_1 gradient were proposed, none of them has yet been a reliable method, especially for small volumes. We constructed a small double concentric rotating frame probe for ^1H NMR, aiming at practical localization at experimental animals. By using that probe we investigated the fundamental aspects of the method including the water suppression.

〈はじめに〉

in vivo NMRにおいて、完全に無侵襲的な測定、あるいは、対象となる臓器内の不均一な代謝を検出するためには、なんらかの方法でスペクトルに位置情報を付け加えることが必要である。このためには、 B_0 磁場、または B_1 磁場に傾斜を与えて、測定部位による B_0 または B_1 の違いを位置情報に変換する方法がある。 B_0 磁場勾配を用いる方法では、静磁場を駆動することによる磁場の均一度の低下や、周波数選択パルスのきれの問題などにより、現状では空間分解能を数cm以下にすることは困難である。一方、 B_1 磁場勾配を用いる方法にはrotating frame法がある。この方法では静磁場を動かすことはないので、上述の問題はなく、手法としてもシンプルである。現在までにrotating frame法を用いた局在化法は ^{31}P NMRで開発が進められているが、 ^1H NMRでの試みは行われていない。本研究では、高感度の ^1H NMRでこの方法を実現することをめざして、動物実験用のNMR信号検出器を作製し、空間分解能、水信号の抑圧法などについて基礎的な検討を行った。

〈検出器の作製〉

直線性の高い B_1 磁場勾配を得るために、大口径のトランスミッター用表面コイルと小口径の検出用表面コイルとを同心円状に配置した検出器を作製した。深さ1cm程度までの信号を高空間分解能で検出することを想定し、トランスミッターコイルの直径を4.2cm、検出コイルの直径を1.5cmとした。実際の検出器の外観を図1に示す。このような配置では両コイルはたがいにカップリングを起し、共振周波数が分裂する。これを防ぐために、Stylesらが提唱したクロストダイオードと同軸ケーブルを用いる受動的分離回路¹⁾を

みつもり ふみゆき、にこらす ぼらす

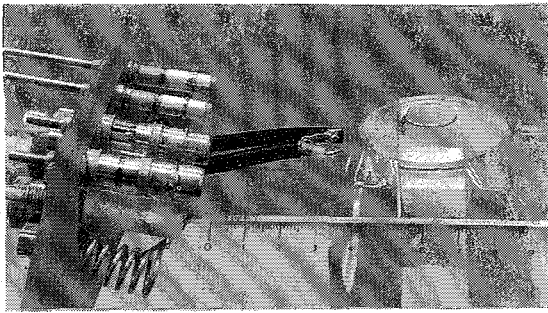


Fig.1 A double concentric ^1H rotating frame probe.

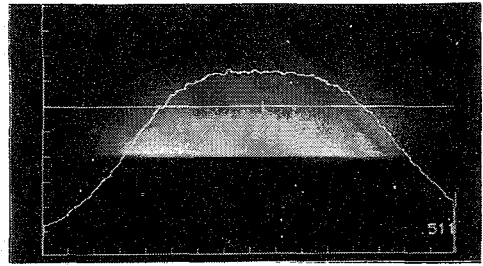


Fig.2 An image of 0.1M KCl solution obtained by the rotating frame probe and the signal intensity profile along the horizontal line which is 4 mm apart from the receiver coil.

設置した。作製したコイルの信号検出能を試験するために検出コイルの上に0.1 M KCl水溶液を置き、NMRイメージの測定を行った。コイル中央でコイル面及び B_0 磁場に直交する面内でのイメージを図2に示す。コイル面より4 mmでの信号プロファイルでは、コイルに平行な面内で均一な信号分布が得られていることがわかる。

《方法》

上記の検出器を30 cm径の水平ボア磁石を有するBruker Biospec 24/30分光計(^1H の共鳴周波数100 MHz)に装着して測定を行った。観測パルスは、磁化をyz面内で回転させるための、段階的にパルス幅を増加させた第1パルス(16~32段)と、磁化をxy平面に倒してphase encodeする第2パルスを用いた。測定結果を、通常の時間軸方向に第一のフーリエ変換、パルス幅方向に第二のフーリエ変換を行うと、第二軸方向がコイルからの距離に変換される。厚さ3 mmの水層の上にオリーブ油を重層した試料で第一パ

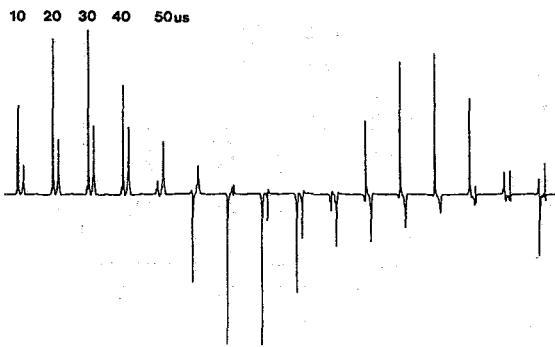


Fig.3 The amplitude modulated signals of H_2O and CH_2 of olive oil obtained with incremented pulses.

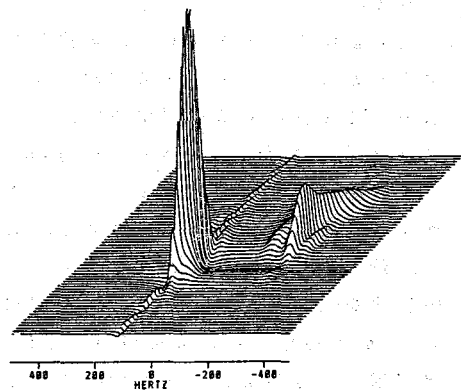


Fig.4 A stacked plot of rotating frame spectra of H_2O /olive oil layered sample.

ルスのみを用いて測定し、フーリエ変換を一回だけ行った結果を図3にあげる。空間位置の異なるH₂Oとオリーブ油のCH₂の磁化が異なる回転速度でyz面内を回転する様子が明らかである。

〈結果と考察〉

上記の水／オリーブ油試料でphase encodingした測定を行い、得られた結果を図4に示す。両者の空間位置が明らかに識別されている。さらにこの方法で得られる位置分解能を検討するために、一辺2 cmの立方体の内部を層厚1.5 mmに、厚さ1.5 mmの亚克力板で仕切ったファントムを製作し、コイル近傍よりエタノール、ベンゼン、水を封入して測定を行った。結果のstacked plotを図5、等高線プロットを図6に示す。存在位置に対応して、エタノールのCH₃、CH₂、OH、C₆H₆、H₂Oの各共鳴線が区別される。化学シフト軸の分解能は、同一試料を位置分解を行わないで測定した場合よりもあがっている。深さ方向の位置分解能は、1.5 mm離れた各層の信号が等高線プロット(ピーク高の9.5%まで表示)でほとんど重ならないことより、この程度の分解能が達成されていると考えられる。

次の段階として本法を実際の生体に適用するためには、なんらかの方法で支配的な水の信号を抑圧する必要がある。このためには水信号の選択飽和パルスの付加、測定パルス系列をすべて1331パルスで置き換えるなどの方法が考えられるが、ここでは、最も簡単なロングパルスを用いた選択飽和法を試みた。水／オリーブ油試料で400 msの矩形波パルスを用いて水信号を選択照射した結果を図7に示す。大口径のトランスミッターコイルを用いているため、単一表面コイルでは得られない効率の良い水信号の抑圧が達成されている。照射領域

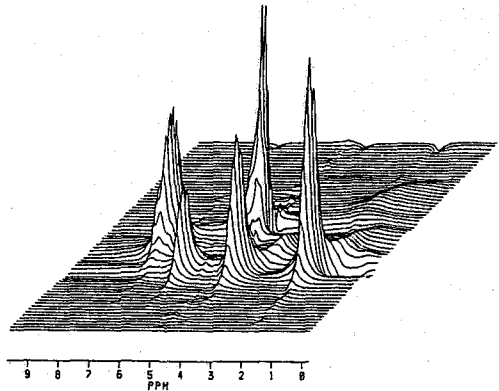


Fig. 5 A stacked plot of rotating frame spectra of C₂H₅OH/C₆H₆/H₂O phantom. The thickness of each layer is 1.5 mm.

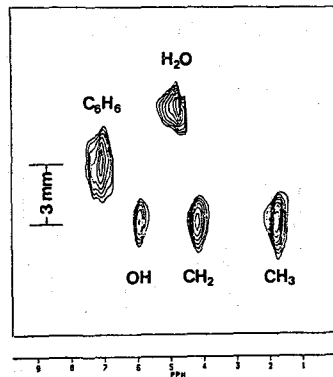


Fig. 6 A contour plot of the rotating frame spectra of the same phantom as Fig. 5.

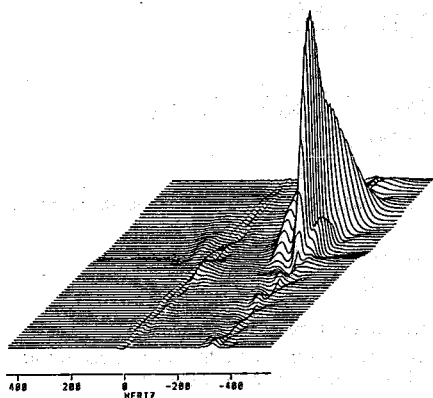


Fig. 7 A stacked plot of rotating frame spectra of H₂O/olive oil with the presaturation at H₂O.

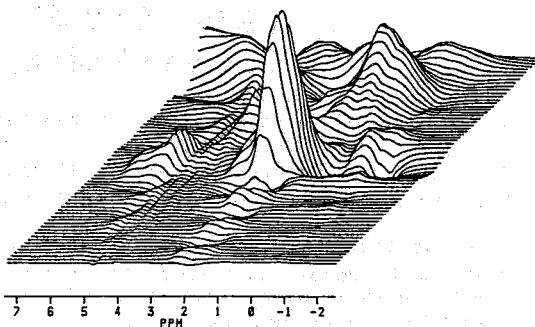


Fig. 8 A stacked plot of rotating frame spectra of living rat head with the presaturation at H₂O.

の選択性をあげるために、照射パルスの波形をガウス波形に替えた方法も試みたが、効果は認められなかった。実際の生体系で同様の水信号の抑圧が得られるかどうかを確認するために、ラットの頭部にrotating frame 検出器を装着して測定を行った(図8)。一応、水信号の抑圧は有効に働いているが、最深部で抑圧しきれない信号によると思われるベースラインのうねりが認められる。

rotating frame 法による¹H NMRの局在化測定は高い位置分解能で実験動物に適用できる可能性がある。今後、低濃度の代謝物の測定や、¹³C標識の間接検出に応用していくために、さらに水信号の抑圧の効率をあげる方法、測定パルスへのスペクトル編集シーケンスの組み込みなどの検討を行っている。

《 文 献 》

- 1) P. Styles, NMR in Biomedicine, 1, 61-66 (1988).

(生理研・分子生理) 瀬尾芳輝、村上政隆、亘 弘
 (日本電子・生体計測) 永山国昭

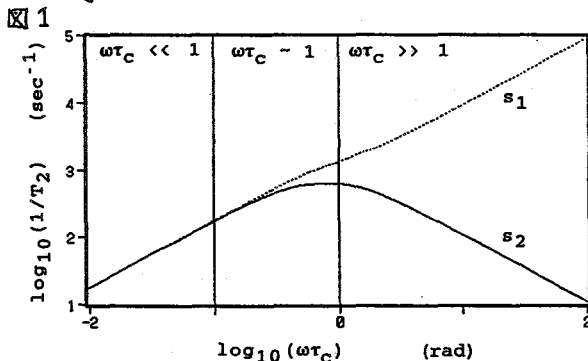
Measurement of Intracellular K in the Rat Salivary Gland by Double Quantum Filter ^{39}K NMR
 Yoshiteru SEO, Masataka MURAKAMI, Hiroshi WATARI (National Institute for Physiological Sciences) Kuniaki NAGAYAMA (JEOL Ltd.)

Intracellular K of the perfused rat mandibular salivary gland (25°C) was measured by double quantum filter ^{39}K NMR spectroscopy at 8.45 T. The resonance due to intracellular K consisted of two Lorentzian signals stemming from the $|1/2\rangle\langle-1/2|$ coherence and the $|1/2\rangle\langle-3/2|$, $|3/2\rangle\langle1/2|$ coherences. The transverse relaxation time (T_2) corresponding to the $|1/2\rangle\langle-1/2|$ coherence was 2.5 msec and that corresponding to the $|1/2\rangle\langle-3/2|$, $|3/2\rangle\langle1/2|$ coherences was 0.4 msec. The relaxation time of the double quantum coherence of rank 3 (originating from product operators like $I_x^2 I_z$) was determined to be 0.2 msec. These results suggest the possibility of the presence of a single homogeneous population of intracellular K with a correlation time of ca. $2.5 \cdot 10^{-8}$ sec and a quadrupolar coupling constant of ca. 1.4 MHz.

Kイオンは細胞内液中に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重要な役割を果す。我々は、 ^{39}K NMR法により唾腺細胞内Kの動態を計測してきた(Seo et al., 1987; Murakami et al., 1989)。細胞内Kイオンの緩和時間は短く、四重極緩和機構が効率よく働いているものと考えられる(図1の $\omega T_c \geq 1$ の領域)。今回、二量子フィルターを用い細胞内 ^{39}K の緩和定数を求めたので報告する。

<材料および方法>

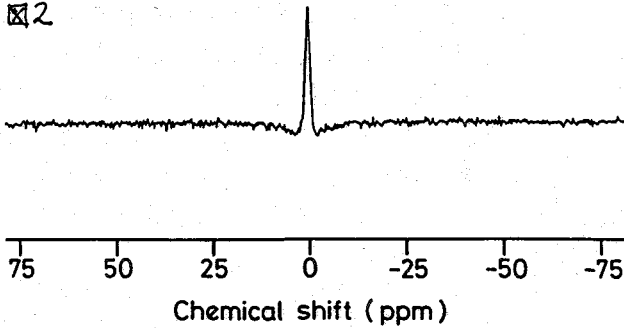
ウィスター系ラット(180~350g)をペンタバルビタール麻酔下に手術し、顎下腺(約0.2g)を摘出し、2ml/minで動脈より定流灌流した。 ^{39}K NMRはブルカー-WM-360



wb 分光器(8.45T)と ^{39}K 専用プローブ(16.8MHz)を用い、スピノ・エコー二量子フィルター(D-90°- $\tau/2$ -180°- $\tau/2$ -90°-8-90°-acquire)にて測定した(Piantini et al., 1982)。図1にスピノ ^{39}K の核の横緩和と分子相関時間 T_c との関係を示す。 S_1 , S_2 は、各々、 $|3/2\rangle\langle1/2|$, $|1/2\rangle\langle-3/2|$ コヒーレンス、 $|1/2\rangle\langle-1/2|$ コヒーレンスの T_2 緩和速度である。 $\omega T_c \geq 1$ の領域の核のみ

せば よして、あらかみ ましたか、あたり ひろし、ながやま くにあき

図2



二量子フィルターを通過することができる。

<結果および考察>

アルブミン溶液(0.5gアルブミン、1ml 2MKCl)中のKイオンの二量子⁹⁹Kスペクトルを図2に示す。スペクトルは、 $1\frac{1}{2} > -\frac{1}{2} |$ コヒーレンス由来の $\nu\frac{1}{2} = 30\text{Hz}$ の共鳴線と、逆位相の $\nu\frac{1}{2} = 90\text{Hz}$ の

$1\frac{3}{2} > < \frac{1}{2} |, | -\frac{1}{2} > < -\frac{3}{2} |$ コヒーレンス由来の信号が重畳している。

On-resonance 条件で得られる時間領域の信号強度 $M(\tau, \delta, t)$ は、

$$M(\tau, \delta, t) = 0.75 \cdot (e^{-S_1\tau} - e^{-S_2\tau}) \cdot e^{-S_4\tau\delta} \cdot (e^{-S_1t} - e^{-S_2t})$$

で表わされる (t は最後の 90° パルス後の時間)。 S_1, S_2 の緩和速度を求めるときは、① FID の信号強度の t 依存性、または、② スペクトル強度の τ 依存性をもたせればよい。図3a, 3b に示すように結果は、よく一致した。FTスペクトルの S/N の方が FID の S/N よりも1ケタ良いが、多点数の τ を測定することになるので、全測定時間はあまりかわらない。 $S_1/S_2 \sim 3$ なので、二量子フィルターの効果は、あまりよくなく、 δ も、とも信号強度の大きくなる τ を用いても、単パルス測定 ($0-90^\circ$ acquire) で得られる信号強度の 10~15% 程度の信号しか得られない。

図3

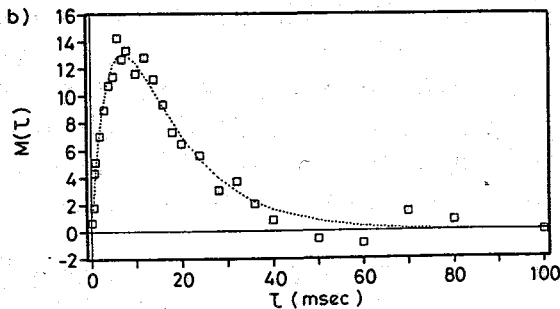
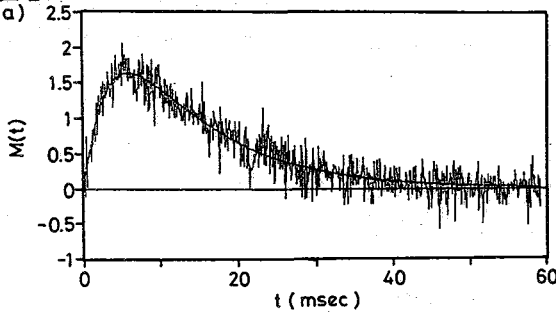
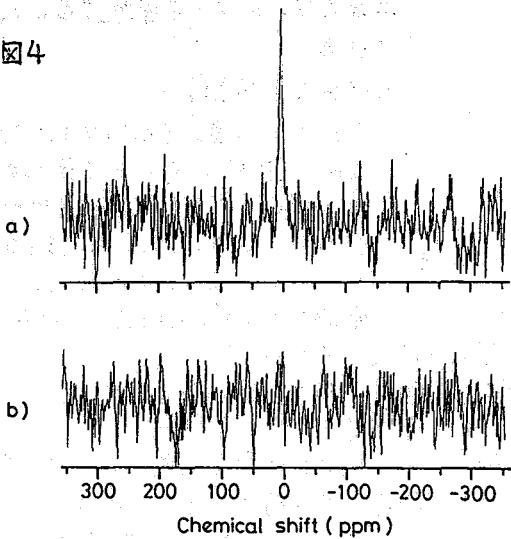


図3. アルブミン溶液中のKイオンの緩和速度の測定。

a) 二量子フィルターで得た FID 信号。実線は $(e^{-S_1t} - e^{-S_2t})$ にデータを非線形フィッティングした結果を示す。 $S_1 = 290, S_2 = 89 \text{ sec}^{-1}$ ($R^2 = 0.93, N = 500$) の値を得た。

b) 二量子フィルターで得たスペクトル強度の τ 依存性。 $\delta = 10 \mu\text{s}, \tau = 0.25 - 100 \text{ msec}$ で測定した。破線は $(e^{-S_1\tau} - e^{-S_2\tau})$ にデータをフィッティングした結果を示す。 $S_1 = 220 \text{ sec}^{-1}, S_2 = 78 \text{ sec}^{-1}$ ($R^2 = 0.98, N = 27$) の値を得た。

図4



膵流唾液腺の二量子 ^{39}K NMRスペクトルを図4aに示す($\tau = 0.5 \text{ msec}$, $\delta = 10 \mu\text{sec}$)。S/Nが低いために $|\frac{1}{2}\rangle\langle\frac{1}{2}|$ コヒーレンスの信号のみが明らかである。この腺を脂肪酸灌流(20% O_2 / 80% N_2)し細胞内K濃度を低下させると信号はほとんど検出できなくなる(図4b)。

化学シフト剤、 $\text{D}_2(\text{TTHA})$ を用い細胞内外のKイオンを分離して測定した。図5aは単パルスで測定した膵流唾液腺の ^{39}K スペクトルである。10mM $\text{D}_2(\text{TTHA})$ により細胞外Kの共鳴線は5.5 ppmシフトしている。二量子フィルターで測定すると、細胞内Kに相当する共鳴線(0.0 ppm)のみが測定された。以上の結果より、二量子フィルターで測定される

信号は細胞内Kに由来し、輸送可能なKであることが確かめられた。また、細胞外Kイオンの参与は無視できる。

図5

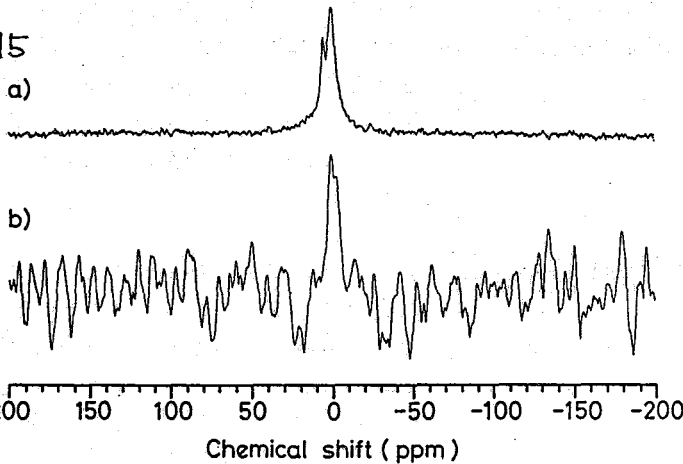


図6aに、二量子フィルターで得た膵流唾液腺の ^{39}K FID信号を示す。 $\tau = 0.5 \text{ msec}$, $\delta = 10 \mu\text{sec}$ で測定した。 $(e^{-S_1 t} - e^{-S_2 t})$ に $t = 0.1 \sim 12 \text{ msec}$ のデータをフィッティングした結果を実線を示す。三回実験を行い、 $S_1 = 1860, 2360, 4060 \text{ sec}^{-1}$, $S_2 = 540, 350, 300 \text{ sec}^{-1}$ の緩和速度を得た。図6a上の●は、 τ を変化させて得たデータを重ねて表示したものであり、両者の結果はよく一致した。図6bは $\tau = 0.5 \text{ msec}$ で $\delta = 0.01 \sim 0.32 \text{ msec}$ まで変化させて得た $|\frac{1}{2}\rangle\langle\frac{3}{2}|, |\frac{3}{2}\rangle\langle\frac{1}{2}|$ コヒーレンスの緩和で、 $S_{\text{dg}} = 570 \text{ sec}^{-1}$ であった。

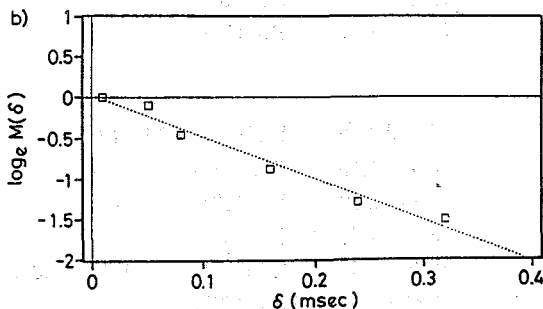
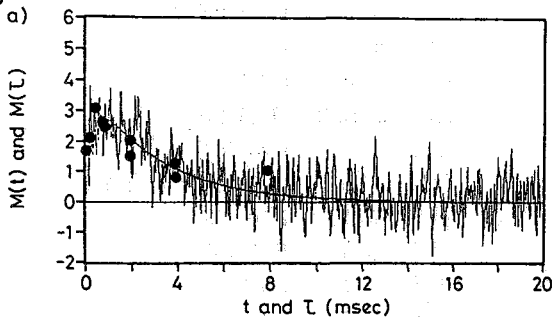
細胞内K, NaイオンのNMRスペクトルとして、パウダーパターンスペクトルが示唆されてきたが、本実験の結果、細胞内Kのスペクトルは2つのローレット曲線の重畳したも

の (homogeneous biexponential spectra) であることが明らかになった。このスペクトルは、 $\bar{\omega}_a \gg \tau_c \gg \omega^{-1}$ の条件下で得られることが知られている (Rooney et al., 1988; $\bar{\omega}_a$: 時間平均四極子結合定数, ω : ラーマー周波数)。細胞内の K が均一な状態にあるとして、 τ_c, ω_a を S_1, S_2 より求めると各々、 $2.5 \cdot 10^{-8}$ sec, 1.4 MHz となった (非対称パラメータ $\eta = 0$ と仮定した)。 ω_a の値は、 $KClO_3$ の 1.06 MHz (Das & Hahn, 1958) バリ/マイエーン等のイオノフォアと結合した K の 1.1 ~ 2.6 MHz (Drankenberg, 1986) と同程度の大きさである。また、 ω_a, τ_c より T_1 値を計算してみると、2 および 6 msec となり、細胞内 K の T_1 緩和時間の実測値 2.3 msec, 10 msec とよく一致する。 $\omega \tau_c \gg 1$ の数と $\omega \tau_c \ll 1$ の数との速い交換が仮定されているモデル (rapid-exchange model) の場合には、真の ω_a は 1 つだけ大きい値を持つことになる。今回の実験結果からは積極的に rapid-exchange model を否定することはできません。さらに、細胞内 K の緩和定数の温度依存性、割定周波数依存性の解析が必要である。

<文献>

1. Seo et al., (1987) J. Magn. Reson. 75, 529-533
2. Murakami et al., (1989) Pflügers Archiv 414, 385-392
3. Piantini et al., (1982) J. Amer. Chem. Soc. 104, 6800-6801
4. Rooney et al. (1988) J. Amer. Chem. Soc. 110, 674-681

図 6



5. Das & Hahn (1958) Solid State Physics, Suppl. 1, pp. 180-183
6. Drankenberg (1986) Annual Reports on NMR Spectroscopy 18, pp 231-283.

索

引

() はページ

A

- 足立 伸一 L10(37)
 赤木 好男 L36(285)
 赤坂 一之 L25(93), P42(269)
 阿久津秀雄 L11(41)
 天野 肇 P42(269)
 安藤 勲 L2(5), P1(103), P3(111)
 安藤 慎治 P1(103)
 青木 明良 P2(107)
 浅川 晴美 P17(157)
 朝倉 哲郎 L1(1), P2(107), P17(157)
 芦田 淳 P11(137)
 荒田 洋治 L20(75), P13(145), P14(149)

B

- 坂 貞徳 P36(249)
 Bolas, Nicholas M. L39(295)
 Borer, Philip L23(87)

C

- 千原 秀昭 L7(25), P35(245)
 近森 正博 P34(243)
 Cho, Shin-II L27(101)
 丁 世栄(Choung Se-Young) L28(183)
 Clingan, Michael N. L27(101)

D

- 出口 健三 L2(5)
 Delaglio, Frank L23(87)
 Doty, F. David L27(101)

E

- 海老沢計慶 L20(75)
 江口 太郎 P35(245)
 恵良 聖一 P42(269)

F

- 范 可君(Fan Ke-jun) L11(41)
 深井 俊夫 P26(215)
 福井 洋之 L33(203), P40(263)
 藤井 敏 P12(141)
 藤井 茂 L12(45)
 藤井 裕子 P42(269)

- 藤田 純子 L16(61)
 藤戸 輝昭 L2(5), P10(133)
 藤原 英明 L31(195), P38(257)
 藤原 敏道 P22(169)
 隆旗 一夫 L22(83)
 古市 弘 L11(41)

G

- Grahn, Hans L23(87)

H

- 浜田 康正 P32(235)
 花房 尚史 P41(267)
 半沢 宏之 L20(75)
 原田 雅史 P45(281)
 春山 英幸 L30(191)
 早水紀久子 L6(21), P33(239)
 林 文晶 P30(229)
 林 繁信 L6(21)
 林 哲男 P2(107)
 Heaton, B. T. P35(245)
 東島 勉 L28(183)
 引地 邦男 L21(79), P21(167)
 樋岡 克哉 P10(133)
 平井 嘉勝 P16(155)
 平沖 敏文 L3(9)
 檜山 行雄 L4(13)
 Hoffman, Roy L23(87)
 細谷 仁子 P19(163)
 堀井 文敬 P5(117)

I

- 五十嵐貴子 L20(75), P14(149)
 今井 雅裕 P29(225)
 今泉醇二郎 P10(133)
 今本 文男 L14(53)
 今成 司 L25(93), P23(171), P33(239)
 井本聡一郎 P43(273)
 稲垣 冬彦 L17(65), P16(155), P17(157), P19(163)
 井上 圭三 L28(183)
 井上 正敏 P32(235)
 井上 多門 P25(177)
 井上 義夫 L9(33)

- 石井 哲子 P 33(239)
石田 みか L1(1)
石田 寿昌 P 32(235)
石塚 稻夫 P 28(223)
板崎 弘 P 30(229)
伊藤 隆 L 16(61)
伊藤 勝彦 P 38(293)
伊藤 翼 L 34(207), P 37(253)
糸井 素一 L 36(285)
岩間 享 P 42(269)
岩田 辰夫 L 29(187)
- K**
加賀 一有 P 19(163)
甲斐荘正恒 L 20(75), P 18(161), P 19(163), P 20(165)
貝塚由利子 L 36(285)
筧 永忠 P 38(257)
鎌田 敏宏 L 34(207)
鴨 修 P 33(239)
金谷 茂則 L 15(57)
金子みどり P 16(155)
加納 康正 L 14(53)
加瀬 良一 P 16(155)
春日 紀子 L 32(199)
片田 元己 P 8(125)
片平 正人 P 12(141)
加藤 一夫 P 42(269)
加藤 晃一 L 20(75), P 13(145), P 14(149)
加藤 伸治 P 32(235)
河合 剛太 P 16(61)
河合 憲司 P 42(269)
河野 敬一 P 44(277)
Kernaghan, S P 35(245)
菊池 正和 L 18(69)
菊本 芳和 P 16(155)
金 夏享 L 20(75), P 14(149)
木村 恒久 P 5(117)
北川 進 L 35(211)
北沢 克明 P 42(269)
小林 哲幸 L 28(183)
神田 大輔 L 17(65), P 16(155)
古賀けい子 P 45(281)
河野 静江 P 23(171)
小島 修一 P 18(161)
巨瀬 勝美 P 25(177)
久保 厚 L 5(17), P 8(125), P 9(129)
- 黒田 義弘 P 29(225)
黒木 重樹 P 1(103)
黒子 弘道 P 3(111)
胡桃坂仁志 L 14(53)
桑田 一夫 P 42(269)
京極 好正 L 11(41), L 13(49), P 12(141)
- L**
Lévy, Daniel L 19(73)
Levy, George C. L 23(87)
- M**
前川 英己 L 26(97)
前川 尚 L 26(97)
Markley, J. L. 特別講演 (181)
梶井 美弘 P 16(155)
松田 弘喜 L 33(203), P 40(263)
松田 裕生 P 13(145)
松井 茂 L 24(89)
松本 潮 L 14(53)
松永 千枝 L 20(75), P 14(149)
松尾 浩 L 13(49)
松尾 研吾 L 3(9)
McDowell, C. A. L 5(17)
三重野 聡 P 34(243)
南谷 晴之 P 24(175)
三森 文行 L 39(295)
三浦 巖 P 45(281)
三浦 謹一郎 P 18(161)
三浦 宏一 L 33(203), P 40(263)
三浦 洌 L 12(45)
三宅 洋子 P 19(163)
宮野 博 P 31(231)
宮澤 辰雄 L 16(61), L 28(183)
水谷 隆太 L 20(75), P 14(149)
森 和彦 L 36(285)
森 輝雄 P 27(219)
森本 武利 L 37(289)
森島 續 L 10(37)
森山 祥彦 L 36(285)
宗像 惠 L 35(211)
村上 政隆 L 40(299)
村埜 賢司 L 31(195)
村田 美恵 P 27(219)
武藤 裕 L 16(61)

N

永澤 明 L34(207), P37(253)
 永井 謙一 P28(223)
 長島 一男 P30(229)
 永嶋 伸也 P31(231)
 永田 親清 P34(243)
 永山 国昭 L15(57), L40(299), P22(169), P39(261)
 内藤 晶 L25(93), P43(273)
 中川 將 P5(117)
 中川 照眞 P29(225)
 中川 隆祐 P31(231)
 中浜 精一 L32(199)
 中井 孝尚 P15(151)
 中井 利仁 P11(137)
 中島 康喜 P36(249)
 中條利一郎 L9(33)
 中村 英二 P17(157)
 中村 春木 L15(57), P15(151)
 中村 聡 P13(145)
 中村 亘男 L7(25), P35(245)
 中村 義男 L26(97)
 中根 英樹 P36(249)
 中谷 博 L25(93)
 中山 宏明 P44(277)
 中山 智 L20(75)
 根本 一弥 P5(117)
 Neumann, Joan-Michel L19(73)
 野村 太郎 P26(215)
 野中 泰樹 L12(45)
 布目 華一 P7(123)
 仁木 克己 L11(41)
 西川 弘恭 L36(285)
 西村 暹 L16(61)
 西村 善文 P13(145)
 西谷 弘 P45(281)
 菲沢 輝美 P18(161)

O

尾高 麻乃 L20(75), P14(149)
 小谷 壽 P5(117)
 小椋 賢治 L21(79)
 大橋 裕二 L32(199)
 大江 浩 P8(125)
 大木 寛 L7(25)
 大久保忠恭 L18(69)
 大谷 光昭 L29(187)

大内 宗城 P23(171)
 大石 宏文 P32(235)
 岡本 光弘 L12(45)
 岡崎 正治 P7(123)
 尾崎 拓男 L2(5), P1(103)

P

朴 璋洙(Park Jang-Su) L11(41)
 Pines, A. L24(89)

R

Rigaud, Jean-Louis L19(73)
 Roggenbuck, Mark L23(87)
 Roy, Siddhartha L4(13)

S

斎藤 肇 L1(1), P6(119)
 斎藤 隆 L29(187)
 斎藤 規夫 L30(191)
 酒井 稔夫 P27(219)
 坂田 亮 P24(175)
 佐野 博敏 P8(125), P9(129)
 佐々木陽一 P37(253)
 佐藤 晴哉 P18(161)
 Scholtyssek, G. P4(115)
 Seigneuret, Michel L19(73)
 関根 素馨 P9(129)
 瀬尾 芳輝 L40(299)
 芹川 康治 L13(49)
 瀬戸 治男 L22(83)
 嶋田 一夫 L17(65), P14(149)
 下川 修 P44(277)
 下川 繁三 L3(9), L26(97)
 神藤平三郎 L14(53)
 塩入 孝之 P32(235)
 白川 昌宏 L13(49)
 荘司 顯 L2(5), P1(103)
 曾我美 勝 P42(269)
 相馬 純吉 P4(115)
 Spitzmesser, J. B. L27(101)
 須田亜紀子 L17(65)
 菅田 宏 P12(141)
 杉浦眞喜子 P32(235)
 澄川 弘美 P31(231)
 Sun, B. Q. L24(89)
 鈴木榮一郎 P31(231)

鈴木 知彦 L9(33)

T

田嶋 敏男 P29(225)
高木 達也 L31(195)
高橋 栄夫 L20(75), P14(149)
高橋 憲助 P36(249)
高橋 征三 P39(261)
高尾 楯雄 P32(235)
高山 陽子 L29(187)
武田 定 P35(245)
竹腰清乃理 L21(79), P10(133), P21(167)
田宮 信雄 L17(65)
田村 亘弘 P5(117)
田中(飯田)直子 P28(223)
田中 俊之 L20(75)
谷山 佳央 L18(69)
楯 真一 P16(155)
寺尾 武彦 L8(29), P10(133), P11(137)
照林 宏文 L36(249)
照井 彬弘 L29(225), P30(229)
Torchia, Dennis A. L4(13)
鳥山 和美 P7(123)
津田 栄 P21(167)
堤 耀広 L3(9)

U

内山 孝憲 P24(175)
植田 昌伸 L35(211)
上田 貴洋 L7(25)
Ugurbil, Kamil L38(289)
瓜生 敏之 P31(231)

W

Waelchli, Markus L20(75), P14(149)
若松 馨 L28(183)
Wang, Sophia L23(87)
亘 弘 L40(299), P42(269)

Y

八木 茂政 P29(225)
山田 英二 L26(97)
山田 弘 P42(269)
山口 和夫 L32(199)
山口 正 P37(253)
山川 真透 L29(187)

大和 澄江 L20(75), P14(149)
山本 泰彦 L9(33)
山崎 和彦 L16(61)
山崎 俊夫 L15(57)
柳田 顕郎 L14(53)
柳沢 勝 P33(239)
矢田 信久 L20(75)
依田 恵子 L30(191)
吉田 浩 P15(151)
好田真由美 L15(57)
吉田 美香 P20(165)
吉岡 佑子 P6(119)
吉川 涉 L13(49), P15(151)
吉崎 和男 L37(293)
横井もと子 L1(1), P6(119)
横井 則彦 L37(293)
横川 敏雄 L26(97)
横山 茂之 L16(61)

Z

Zachmann, G. H. P4(115)