

第29回NMR討論会

講演要旨集

日時 1990年11月19日(月)～21日(水)

会場 京 都 会 館

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

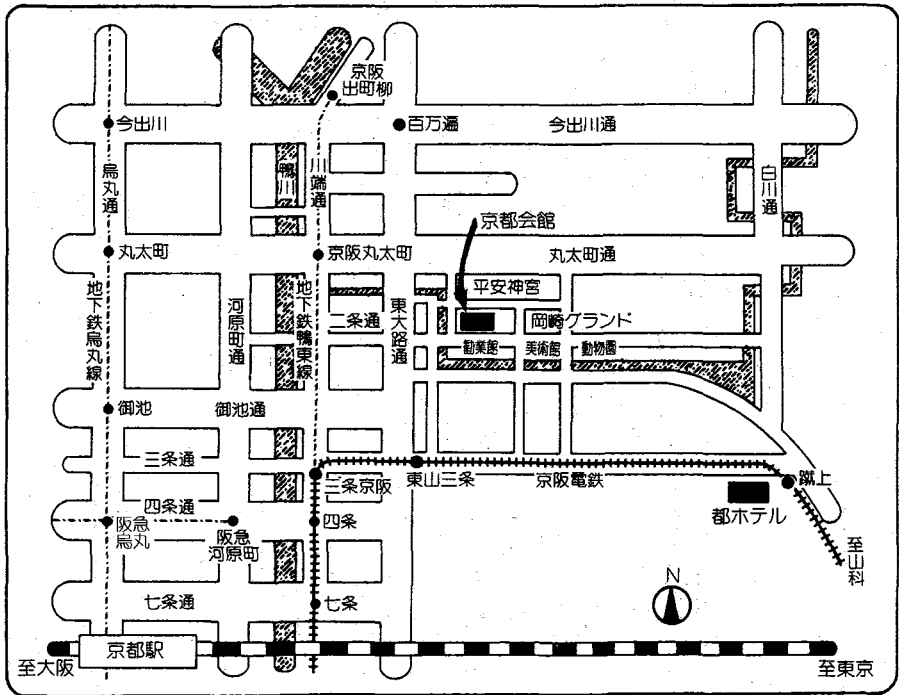
会場案内

討論会場： 京都会館 京都市左京区岡崎最勝寺町13
TEL (075) 771-6051

講演会場： 会議場

ポスター会場： 第1会議室・第2会議室

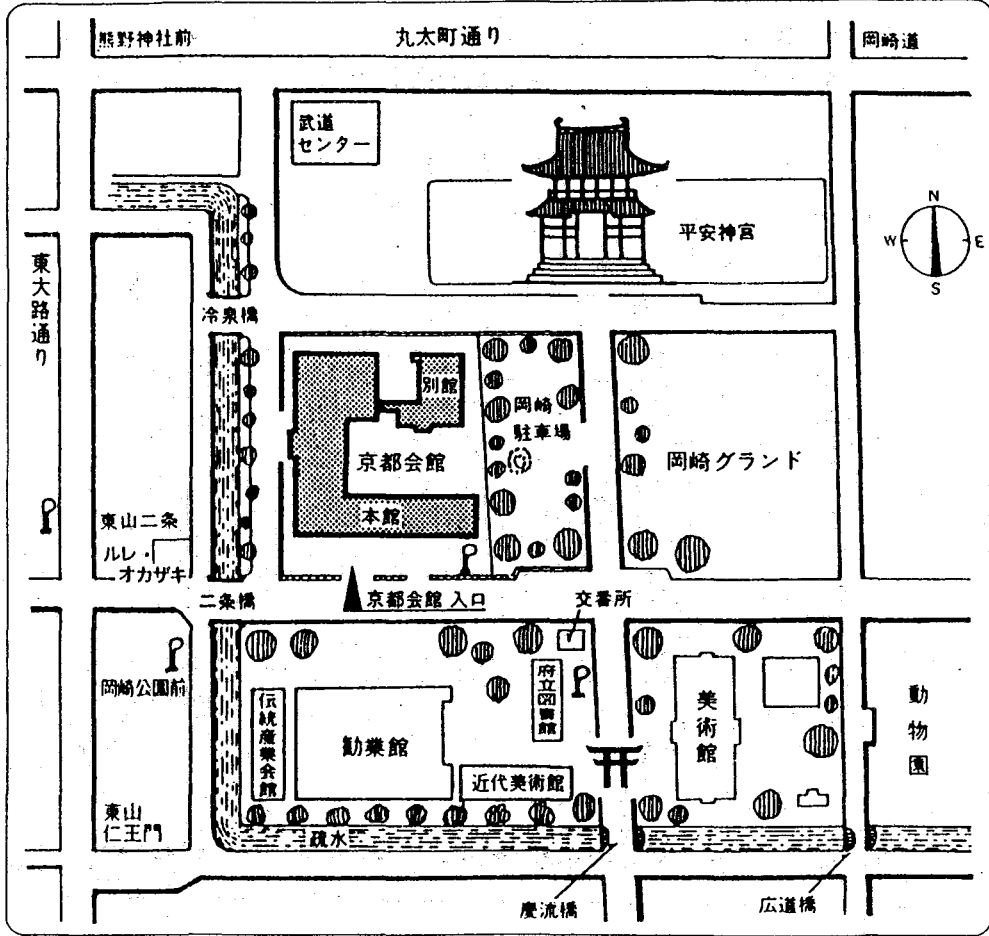
会場案内図



〈京都会館への交通案内〉

- | | | |
|---------|-----------|-------------|
| 京都駅より | タクシー-20分 | |
| | 市バス ⑤ | 京都会館・美術館前下車 |
| | ②06 | 東山二条下車 |
| 四条河原町より | タクシー-10分 | |
| | 市バス ②7 ③② | 京都会館・美術館前下車 |
| | ④6 | 京都会館・美術館前下車 |
| | ③① ②0① | 東山二条下車 |
| 三条京阪より | タクシー-5分 | |
| | 市バス ⑤ ②7 | 京都会館・美術館前下車 |

会場附近案内図



一般講演：講演15分
質疑応答5分
ポスター：紹介3分

11月19日(月)

10:00~11:00

座長 神藤 平三郎

- L1 ジブカインおよびテトラカインとリン脂質ベシクルとの相互作用研究ー 1
NOESYとROESYの比較
(京大・薬、京薬大) ○黒田義弘、脇田美砂子、藤原靖弘、中川照眞
- L2 核酸オリゴマーd (G_5T_5) が形成する四重らせん構造のNMRおよび 3
エネルギー計算による解析
(国際基督大、ニューヨーク州立大) ○梅本公子、M. H. Sarma、J. Luo、R.
H. Sarma
- L3 抗生物質トロスペクトマイシンの異性体生成ー溶液中、固体中のダイ 5
ナミクスー
(アップジョン) ○檜山行雄、Russel H. Robins

11:00~12:00

座長 高橋 憲助

- L4 発光細菌ルシフェラーゼ関連タンパク質補欠分子の構造について 9
(関西医大・化、大阪市大・工) ○藤井 茂、笠井佐夫、三浦 洸
- L5 バナジウム錯体の高分解能NMR. 3 複核バナジウム錯体の構造と化 . . . 13
学シフト
(近大・理工) ○北川 進、宗像 恵、木曾秀典
- L6 ホスト・ゲスト化学における金属イオンのダイナミクスと錯形成形態 . . . 17
(北大・理、北大・応電研) ○市川和彦、神 隆

— 昼 食 —

13:30~14:30

座長 荒田 洋治

特別講演 I

- NMR分光法の新しい展開 —温度ジャンプNMRと状態相関NMR . . . 19
(京大・理) 赤坂一之

14:30~17:00

座長 早水紀久子

ポスターセッション I

- P1 四重極子エコー ($I=1$) 用広帯域複合パルスの数値設計 . . . 25
(日本電子) ○藤原敏道、永山国昭
- P2 線形予測 z 変換によるNMRスペクトルの定量解析 . . . 27
(慶応大・理工) ○内山孝憲、南谷晴之
- P3 スピンシミュレータの開発とその応用 . . . 31
(島津製作所) ○藤田 真、寺下衛作、増田潤一
- P4 シムコイルの新しい設計法と試作 . . . 35
(島津製作所) 藤田 真、○小出淳一
- P5 先験情報を有効に利用したNMRパラメータの推定手法 . . . 39
(日立中研、東工大・像情報工研) ○関原謙介、大山永昭
- P6 t_1 -ノイズ消去法のHMBC法への応用 . . . 41
(東大・農、東大・応微研) ○降旗一夫、瀬戸治男
- P7 タングステン-炭素三重結合をもつカルピン錯体の ^{183}W NMR . . . 45
(埼玉大・分析セ、埼玉大・理) ○関野雅人、佐藤 勝、永澤 明
- P8 ^{15}N -NMRによるピリジルメチルリチウム誘導体の研究 . . . 49
(名工大・工) ○吉野明広、高橋憲助
- P9 ^{13}C NMR法による非対称性フルオラン染料の発色脱色変換に伴う構造解析 . . . 53
(三菱製紙) ○遠藤一央、藤田郁夫、小林直也
- P10 糖類とアンモニウム塩間の相互作用に関するNMR的アプローチ . . . 57
(阪大・産研) ○高井嘉雄、静間基博、欧陽荔、澤田正實、花房昭静

- P 1 1 ^1H -NMRによる β -カゼインホスホペプチドの構造解析 . . . 59
 (北大・理、明治乳中研、北大・農) ○津田 栄、桑田 有、仁木良哉、
 引地邦男
- P 1 2 NMR緩和時間法によるミセル/水、リポソーム/水系の分配係数
 の測定 . . . 63
 (阪大・薬) ○筧 永忠、伊藤勝彦、藤原英明
- P 1 3 ^{13}C -NMRと分子軌道計算による脂環式エポキシサイドの構造解析 . . . 67
 (東工大・生命理工) ○宇田川敦志、山本泰彦、井上義夫、中條利一郎
- P 1 4 固体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異性体の . . . 71
 立体構造の決定とアミノ基含有化合物との反応生成物の構造に関する研究
 (京大・薬、メレルダウ製薬、丸石製薬中研) ○黒田義弘、田嶋敏男、
 今井雅裕、八木茂政、中川照真
- P 1 5 ^{13}C -NMRによるポリノルボルナジエンの微細構造解析 . . . 73
 (三井石化) ○恩田光彦、水野 章、相根敏裕
- P 1 6 ポリアクリルアミドゲルに吸着された水の動的性質 . . . 75
 (北大・低温研) ○花房尚史
- P 1 7 消泡剤シリコンオイルのNMRによる解析 . . . 77
 (アップジョン) ○青木優規美、西村俊秀、檜山行雄
- P 1 8 ^{11}B NMRによるホウ酸とジオールとの間の錯形成に関する研究 . . . 81
 (上智大・理工) ○竹田卓也、大井隆夫、垣花秀武
- P 1 9 MBPT法による核スピン結合定数の計算 . . . 83
 (北見工大) ○福井洋之、三浦宏一、松田弘喜
- P 4 4 ヒト骨格筋におけるエネルギー代謝の ^{31}P -NMRによる研究 . . . 87
 (京府医大・生理、神戸大・体育、生理研) ○吉崎和男、平川和文、
 小田慶喜、森本武利、亘 弘

17:00~18:20

座 長 引地 邦男

- L 7 異核種間NOE相関NMR法 . . . 91
 (理研、メクト、日本電子データム) ○鶴沢 洵、柴田俊之、小川智也、浦
 本昌和、吉村昌治、坪野浩二

- L 8 二量子フィルタを用いた異種核間三次元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 . . . 95
- L 9 ^1H rotating frame法の拡張による ^{13}C 局在化NMR測定法の開発
 (国立環境研) 三森文行 . . . 99
- L 10 緩和誘起型多量子遷移によるメチル基の束縛回転運動の選択的検出
 (日女大・家政、日本電子) ○高橋征三、永山国昭 . . . 101

11月20日(火)

9:00~10:20

座 長 甲斐荘 正恒

- L 11 DNA修復酵素T4 Endonuclease VのNMRシグナル帰属とDNAとの複合体の研究
 (蛋工研、北大・薬) ○李 奉振、阪下日登志、大久保忠恭、土井知子、岩井成憲、大塚栄子 . . . 105
- L 12 安定同位体を用いたDNA結合蛋白質の研究
 (阪大・蛋白研、蛋工研) ○白川昌弘、松尾 浩、芹川康治、京極好正、吉川 渉、大久保忠恭 . . . 109
- L 13 安定同位体核を利用した2次元、3次元NMR法を用いたインターロイキン- 1β の構造解析
 (都臨床研) ○楯 真一、神田大輔、市川紗織、金子みどり、榊井美弘、菊本芳和、稲垣冬彦 . . . 113
- L 14 3次元NMRによる蛋白質の構造解析、RNase H(*E. coli*)
 (日本電子、協和発酵工業、蛋工研) ○山崎俊夫、好田真由美、猿渡 茂、永山国昭、金谷茂則、中村春木 . . . 117

— 休 憩 —

10:40~12:00

座長 稲垣 冬彦

- L15 ^{15}N ラベル法によるヒトc-Ha-rasタンパク質の構造解析 . . . 121
(東大・理、国立がんセンター、横浜国大・工、日本ブルカー) ○武藤 裕、
伊藤 隆、山崎和彦、藤田純子、西村 暹、河合剛太、宮澤辰雄、M. Waelchli、
横山茂之
- L16 安定同位体利用NMR技術によるタンパク性プロテアーゼイン . . . 125
ヒビター-SSIの構造研究
(都立大・理、東大・工、バリアン) ○甲斐荘正恒、三宅洋子、葦沢輝美、
安部未央、石原美和、小島修一、熊谷 泉、三浦謹一郎、串田克彦
- L17 チトクロム c_3 における分子間電子移動と分子間相互作用 . . . 129
(横浜国大・工、アリゾナ大) ○阿久津秀雄、古市 弘、平山浩一、
加野勝宏、朴 璋洙、仁木克己、M. A. Cusanovich
- L18 NMRによる抗体分子の高次構造解析 . . . 131
(東大・薬、花王生化研) 嶋田一夫、加藤晃一、高橋栄夫、金 載一、
松永千枝、中山智紀、金 夏享、尾高麻乃、水谷隆太、大和澄江、高羽わかな、
五十嵐貴子、河南俊郎、○荒田洋治

- 昼食 -

13:30~14:10

座長 永山 国昭

- L19 ^{13}C - ^1H NMR総合スペクトルデータベースシステム . . . 135
(神田外大、化技研) ○山本 修、早水紀久子、柳沢 勝
- L20 Parallel and Distributed Network Computing: New Tools for . . . 139
Multi-dimensional NMR Data Analysis and NMR Molecular Modeling
(Syracuse Univ., New Method Research) ○G. C. Levy, P. Kumar, S. Wang

14:10~16:40

座長 阿久津 秀雄

ポスターセッション I I

- P20 DNA結合タンパク質タイプIIの構造とDNAとの相互作用—HUとIHFとの比較
(東京薬大) 胡桃坂仁志、○神藤平三郎、佐久間千勢子、松本 潮 . . . 143
- P21 溶液中の立体化学における緩和時間 T_1 の利用 VI —抗HIVヌクレオシドAZTのDMSO-d₆中でのコンフォメーション—
(神女薬大) ○蔡 東玲、杉浦真喜子、高尾樽雄 . . . 145
- P22 RNase Msの連鎖帰属と基質アナログG_{pp}Cの結合様式
(都臨床研、阪大・薬、星薬大) ○稻垣冬彦、上杉晴一、入江昌親 . . . 149
- P23 XPLORによるディスタントジオメトリー計算の詳細
(都臨床研)○神田大輔、稻垣冬彦 . . . 151
- P24 リボヌクレアーゼ T_1 とそのカルボキシメチル化体との構造比較
(味の素・中研、東大・理) ○宮野 博、鈴木栄一郎、田之倉優、高橋健治 . . . 153
- P25 NMRによるヘム蛋白質の高次構造決定のための新しい解析法
(東工大・生命理工) ○山本泰彦、七井識成、中條利一郎 . . . 155
- P26 部位特異的アミノ酸置換ヘモグロビンの高次構造
(京大・工、阪大・医、阪大・基礎工) ○石森浩一郎、森島 績、今井清博、宮崎源太郎 . . . 157
- P27 二次元NMRとディスタンスジオメトリーによる生理活性ペプチドの立体構造と機能相関
(都臨床研、京大・薬、九大・理、新潟医大) ○Jean-Marc Lancelin、神田大輔、楯 真一、玉村啓和、生駒理恵、船越 奨、藤井信孝、岩永貞昭、柳川右千夫、阿部テルオ、佐武 明、稻垣冬彦 . . . 161
- P28 ラクトペルオキシダーゼ(LPO)と芳香族基質との相互作用—¹H NMR常磁性緩和および分子間NOEによる研究—
(千葉大・薬、日本女子大・家政、弘前大・農) ○佐藤康一、高橋征三、中村伸吾、細谷東一郎 . . . 165
- P29 部位特異的変異法によるヒトc-Ha-rasタンパク質の構造解析
(東大・理、国立がんセンター、横浜国大・工) ○山崎和彦、伊藤 隆、武藤 裕、白水美香子、新美達也、藤田純子、西村 暹、河合剛太、宮澤辰雄、横山茂之 . . . 169

- P 3 0 ^{31}P -NMRによる麻醉薬の淡水魚に対する高エネルギーリン酸代謝への影響
(近大・医) ○千葉 惇、浜口雅光、徳野達也、朝井俊治、秩父志行 . . . 171
- P 3 1 タンパク質プロトン T_1 の定量的解析
(京大・理、熊野高専) ○伊島理枝子、柴田 進、赤坂一之 . . . 175
- P 3 2 ラット糖白内障の ^1H -NMR緩和時間とMRIによる解析
(京都府立医大、明治鍼灸大) ○森 和彦、西川弘恭、赤木好男、照林宏文 . . . 177
- P 3 3 モモ花芽の休眠覚醒期における水の緩和時間変化
(農業環境技研、果樹試験場、農業生物資源研) ○吉田 充、杉浦俊彦、馬越 淳、小野祐幸 . . . 181
- P 3 4 固体高分解能NMRにおけるシフト基準の高精度測定 (I) ^{13}C 、 ^{29}Si 、 ^1H 核
(化技研) ○林 繁信、早水紀久子 . . . 185
- P 3 5 固体高分解能NMRを用いたオリゴペプチド及びポリペプチドの水素結合の研究 (II)
(東工大・工、群馬大・工) ○黒木重樹、浅川直紀、安藤慎治、黒子弘道、安藤 勲、荳司 顕、尾崎拓男 . . . 189
- P 3 6 ^{35}Cl -NQR法によるVTMASの温度校正
(日本電子) ○田中良二、出口健三、藤戸輝昭 . . . 193
- P 3 7 固体高分解能 ^{13}C -NMRによる微生物産生ポリエステル共重合体の構造解析
(東工大・生命理工、東工大・資源研) ○神谷尚子、櫻井実、井上義夫、中條利一郎、土肥義治 . . . 195
- P 3 8 ゴム状態におけるメチレン連鎖の分子運動に関する ^{13}C スピン緩和解析
(京大・化研) ○村田ツヨシ、堀井文敬、小谷 壽 . . . 199
- P 3 9 温度可変固体高分解能 ^{13}C -NMRによるn-アルカンの構造研究
(花王研、東工大・工) ○石川伸二、黒子弘道、安藤 勲 . . . 201
- P 4 0 固体高分解能NMRを用いたオリゴペプチド及びポリペプチドの水素結合の研究 (III) L-アラニン残基
(東工大・工、群馬大・工) ○浅川直紀、黒木重樹、安藤慎治、黒子弘道、安藤 勲、荳司 顕、尾崎拓男 . . . 205

P 4 1 ポリ (γ-ベンジルグルタメート) ラセミ混合物の¹³C-固体高分解
能NMRとその分子運動 . . . 2 0 7
(北大・工) ○堤 耀広、山口雅史、平沖敏文

P 4 2 固体金属カルボニルクラスターC₆₀(CO)₁₂における⁵⁹Co
Nutation NMR . . . 2 1 1
(阪大・理、阪大・教養、リバプール大) ○大木 寛、武田 定、中村亘男、
中山尋量、江口太郎、B. T. Heaton、S. Kernaghan

P 4 3 N-14 NMRを用いた細胞内アンモニウムの測定 . . . 2 1 3
(生理研) ○瀬尾芳輝、村上政隆、亘 弘

16:40~17:40

座 長 斉藤 肇

特別講演 I I

Multinuclear NMR Studies of Silica Surfaces . . . 2 1 7
(Colorado State Univ.) Gary E. Maciel

11月21日(水)

9:00~10:40

座 長 安藤 勲

L 2 1 ³¹Pの2次元anti-echo COSY, Double-quantum, およびZero-quantum
Cross-Polarization Magic-Angle-Spinning NMR . . . 2 1 9
(東京都立大学、The University of British Columbia) ○久保 厚、
A. Root、C. A. McDowell

L 2 2 状態相関二次元NMR分光法による液晶分子の局所双極子場の分離と
スピン拡散経路の決定 . . . 2 2 3
(京大・理、日本電子) ○内藤 晶、今成 司、赤坂一之

L 2 3 固体重水素NMRによるポリ(γ-ベンジル グルタメート) ラセミ
混合物の動的構造の研究 . . . 2 2 7
(北大・工) ○平沖敏文、小亀郎由、堤 耀広

L 2 4 ポリフェノキシホスファゼンの構造と分子運動 . . . 2 2 9
(北大・理、日本曹達) ○竹腰清乃理、引地邦男、東田史朗

L 2 5 多糖の多重鎖構造の¹³C NMRによる識別基準 . . . 2 3 1
(国立がんセンター研、生化学工業、筑波大、東京理大) ○斉藤 肇、
吉岡佑子、横井もと子、明田川純、田中重則、柴田有康、恵良田知樹、
行本 徹、竹山秀伸、矢島博文、遠藤隆一

— 休 憩 —

1 1 : 0 0 ~ 1 2 : 2 0

座 長 内藤 晶

L 2 6 羊毛ケラチン及びS-カルボキシメチル化ケラチンの固体構造研究 . . . 2 3 5
(東工大・工) ○吉水広明、三村博幸、安藤 勲

L 2 7 固体高分解能NMRによる置換ポリアセチレンの局所運動に関する研 . . . 2 3 9
究
(京大・化研、京大・工) ○植田 正、村田ツヨシ、堀井文敬、小谷 壽、
増田俊夫、東村敏延

L 2 8 固体NMR法による石炭構造の研究 (1) ¹H緩和曲線解析によるア . . . 2 4 1
ルゴンヌ標準石炭の研究
(化技研) 早水紀久子、林 繁信、河村光隆、神谷国男

L 2 9 各種異方性相互作用間の固体相関二次元NMR . . . 2 4 5
(京大・理) 芦田 淳、桑原大介、植垣隆弘、○寺尾武彦

— 昼 食 —

1 3 : 4 0 ~ 1 4 : 4 0

座 長 京極 好正

特別講演 I I I

in vivo NMR Spectroscopy From Animal Physiology to Human Diagnostics . . . 2 4 7
(滋賀医大、分子神経生物研) 犬伏俊郎

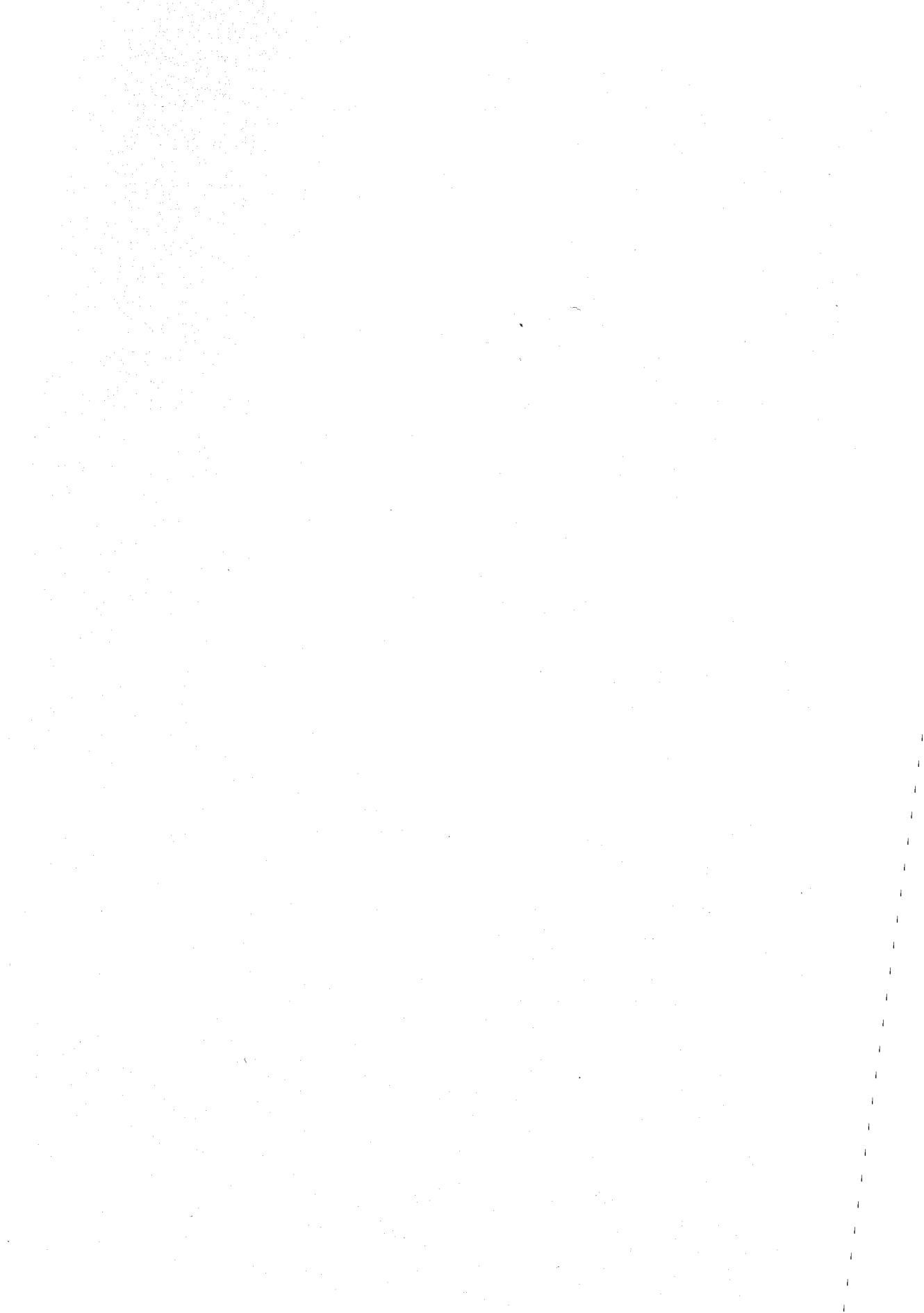
14:40~16:00

座長 西川 弘恭

- L30 フッ素糖の代謝追跡による脳機能評価 251
(九大・薬) ○金沢洋子、篠原俊次、小嶋正治
- L31 in-vivo 19F-MRSによる5-fluorotryptophanの肝臓における代謝
の観察 255
(徳島大・医、大塚製薬、和歌山県医大) ○原田雅史、西谷 弘、
古賀けい子、三浦 巖、城戸 亮
- L32 NMRによる感覚受容計測、味覚受容 259
(電総研) ○亀井裕孟、片山義朗
- L33 回転運動を行なっている物体の静止画像を得るイメージング法
(日立) 263
○小椋有希子、関原謙介

第 1 日

11 月 19 日 (月)



L1 ~ L6

L1

ジブカインおよびテトラカインとリン脂質ベシクルとの相互作用研究

—NOESYとROESYの比較

(京大・薬、*京都薬大)

○黒田義弘、脇田美砂子、*藤原靖弘、中川照真

Interactions between Local Anesthetics (Dibucaine, Tetracaine) and Phospholipid Vesicles as Studied by NOESY and ROESY Methods in ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Yoshihiro Kuroda, Misako Wakita, Yasuhiro Fujiwara*, and Terumichi Nakagawa
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, and *Kyoto Pharmaceutical University

Interactions between local anesthetics (dibucaine, tetracaine) and phospholipid vesicles have been studied by two-dimensional NOESY and ROESY methods in ¹H-NMR spectroscopy. In the NOESY spectra, NOEs between protons within the drug were overwhelmed by spin diffusion even at a short mixing time. This observation reduced the usefulness of the NOESY method, on the one hand; however, remarkably facilitated to reveal signals due to the drug hidden in broad resonances of the lipids, on the other. In the ROESY spectra, the spin diffusion phenomena were less effective as expected; accordingly the ROESY spectra could give the information on the proximity between protons more directly than do NOESY spectra. Moreover, the ROESY spectra were found to be able to clearly distinguish the drugs having protons which differ in the magnitude of T1ρ.

1. はじめに

局所麻酔剤の作用機序の一つとして、ナトリウムチャンネル蛋白を取り巻く脂質膜との相互作用が考えられる。本研究は超音波処理して得られるベシクルを脂質膜として用い、局所麻酔剤であるジブカインおよびテトラカイン(図1)の脂質膜中の存在状態(コンホメーション、会合状態、存在部位)をNOEにより検討する場合の二次元NMRにおけるNOESY法とROESY法の特徴を明らかにすることを目的とする。

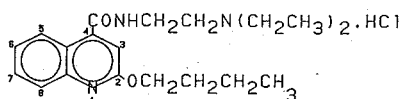
2. 実験方法

重水中にて超音波処理して得られたegg PCベシクル(燐酸緩衝液、0.1 M、pH 6.7、脂質濃度20-40 mM)に薬物(20-40 mM)を添加した溶液についてBruker AM-600 (600 MHz)または島津/GE Omega-500 (500 MHz)によりPhase-Sensitive NOESYおよびROESYスペクトルの測定を種々の混合時間(50-200 ms)およびスピロック時間(25-200 ms)について行なった。

3. 結果および考察

図2にジブカイン-egg PC溶液のROESY (A-C) およびNOESY (D-F) スペクトルの例をジブカインの芳香環プロトン(7-8.2 ppm)と側鎖のプロトン(0.5-4.5 ppm)とのクロスピークが期待される領域について示す。これらのクロスピークの位相はプラスの対角ピークに対してROESYにおけるクロスピークは全てマイナスであり、NOESYにおけるクロスピークは全てプラスであった。NOESYにおいては図2Dに見られるように50 msの混合時間においても芳香環プロトンから側鎖のプロトンへのスピン拡散は著しい。例えば7 ppm 付近の芳香環の3位のプロトンから、-OCH₂CH₂CH₂CH₃及び-CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂の全てのプロトンへのクロスピークが生じている。一方ROESYにおいても多くのNOE-HOHAHAタイプのリレーピー

DIBUCAINE



TETRACAINE

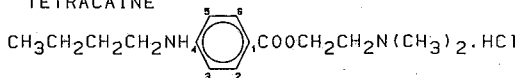


図1. ジブカインおよびテトラカインの構造

クが見られるが、NOESYスペクトルとの際だった違いはスピンロック時間が長くなるにつれて試料溶液中に少量の成分として存在するジブカインに由来するクロスピークが残って観測されてくる事である(図2C)。これらのクロスピークは図3に示すスピンロック時間を変えて測定した横緩和スペクトルからわかるようにT1ρの長いプロトン由来のものである。

4. 結論

薬物-リン脂質ベシクル相互作用系のようにτcの長い(〜1/ωSL程度)運動モードを反映してT1ρの異なったプロトンが存在するような試料については二次元NOESYよりもROESYにより距離に関する情報を得るのが良いと考える。一方NOESYは膜成分由来のブロードな信号中に埋もれた薬物のNMRピークの帰属に非常に有効である。

【謝辞】Omega-500の測定をして下さいました島津東京分析センターの大藪又茂博士に感謝致します。

図2. ジブカイン(40 mM) - egg PC (40 mM) 溶液の800MHz二次元ROESY (A-C) 及びNOESY (D-F) スペクトル。
スピンロック時間: A, 25 ms; B, 50 ms; C, 100 ms.
混合時間: D, 50 ms; E, 100 ms; F, 200 ms.

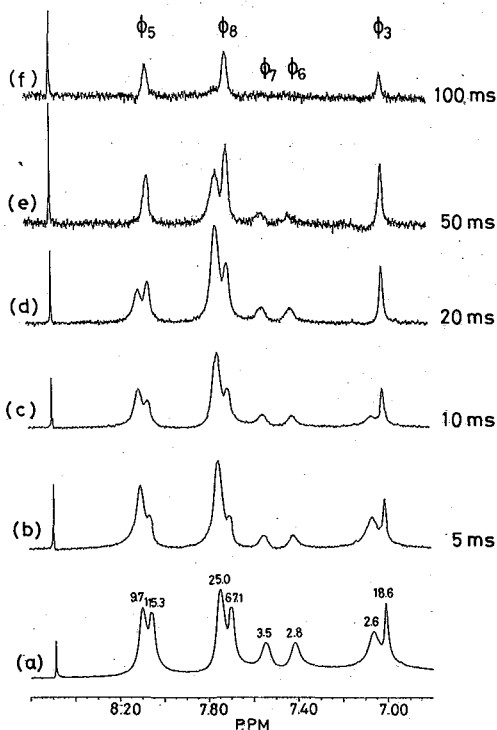
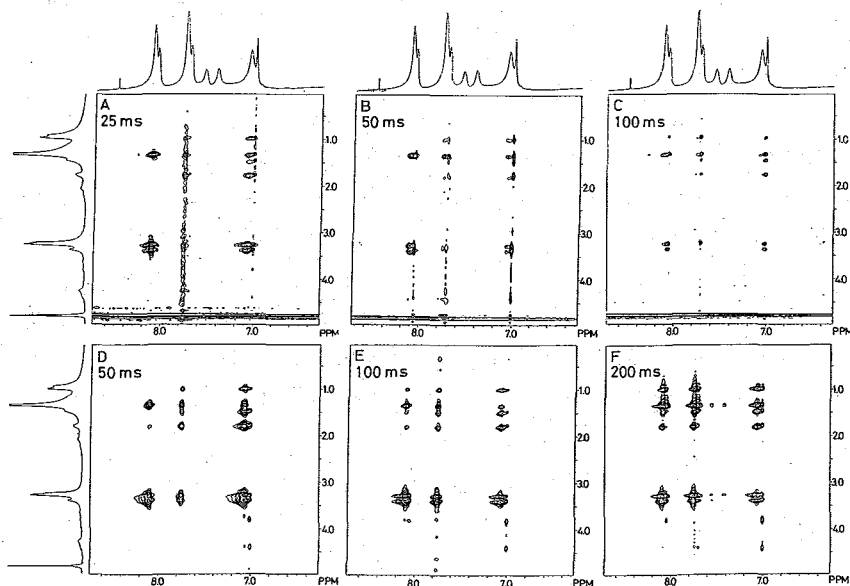


図3. ジブカイン(40 mM) - egg PC (40 mM) 溶液の600 MHz ¹H-NMR スペクトル。
(a) 通常の¹H-NMRスペクトル; (b) - (f) スピンロック時間を変えて測定した横緩和スペクトル。T1ρ (ms)の値をスペクトル(a)に示した。

L2

核酸オリゴマー d (G G G G G T T T T T) が形成する四重らせん構造の N M R およびエネルギー計算による解析

(国際基督教大、 ニューヨーク州立大*)

○梅本公子、 M.H. Sarma,* J. Luo,* R.H. Sarma*

Observation and Structural Analysis of Four-Stranded Helix Formed by d(G₅T₅).

Guanine-rich oligo- and polynucleotides are known to aggregate easily in solutions. It has also been observed that poly(G), when crystalized, forms a four-stranded parallel helix, and dGMP in solution associates in the form of a tetramer. G-rich sequences frequently occur in telomeric region, the ends of chromosomes and considered to play an important role in the replication process. On the bases of 1D/2D NMR and AMBER energy minimization studies, we demonstrate that inaqueous solution d(GGGGGTTTT) forms an exceptionally stable complex, d(G₅T₅)₄, in which imino protons are inaccessible to the solvent and the glycosidic torsion is in high-anti conformation.

グアニンを多く含むヌクレオシドは溶液中で会合しゲル状になりやすいことはよく知られている。また、X線解析では poly (G) は四重らせんを形成しており、 d (G M P) も溶液中および結晶中で安定なテトラマーとして存在することが確認されている。一方、染色体の尾部である t e l o m e r e はグアニンを多く含む T_nG_n の繰り返し配列からなり、この部分は染色体の複製を正しく完結させるために重要な役割を担っているとされている。

p o l y (G) の結晶構造では、グアニンは図1に示すような水素結合で結合し、各 DNA 鎖の極性は互いに平行になっている。この構造によれば、グアニンは一塩基当り2本の水素結合で結合しており、Watson-Crickの二重らせん(一塩基当り1または1.5本の水素結合)に較べても安定であることが予想される。チミンについて類似の構造を図2に示した。この場合でも塩基当りの水素結合数は1であって、通常のA・T結合と同じである。図1の構造のもう一つの特徴は、水素結合しているイミノプロトンは四重らせんの中心部にあって、糖および塩基で囲まれ、末端以外は溶媒から遮蔽されている。以上の特徴をイミノプロトンNMRの温度依存、および重水素交換によって確認し、更に、NOESY、MINSYおよびAMBERを用いたエネルギー最適化とから四重らせんの構造を求めた。

(実験方法)

d (G G G G G T T T T T) は DNA 合成機 (Applied Biosystems Model 380A) で合成し、カラムで精製した。NMR試料は20mMリン酸緩衝液 (pH7.0, 100 mM NaCl, 1mM EDTA

およびTSP含有)中、DNA濃度2 mMで作成した。NMR測定はMITのFrancis Bitter Magnet Lab.の500MHzの装置を使用した。温度可変の実験では測定前30分測定温度に保ち、各温度における測定時間は待ち時間を含めて1時間とした。

(結果と考察)

図3に軽水中のオリゴマーの1CにおけるNMRスペクトル(7-12ppm)を示す。7.5ppm付近に塩基のプロトン、9-9.5ppmにアミノプロトン、11ppm付近にイミノプロトンが見られる。このイミノプロトンは試料を凍結乾燥後重水に溶解して70Cで1時間加熱しても完全には重水素化しなかった。また、観測されたT₂は7.5Cで、G・GあるいはG・Tのwobble-paired duplexのT₂が25-40Cであることと比較すると非常に高く、これらの結果から図1に示した構造、すなわち、四重らせんを形成していることが強く示唆される。

イミノプロトンピークの温度依存を詳細に観察すると20-30Cで消失する部分があり、これはチミンのN3イミノプロトンである可能性が高い。

NOESYおよびMINSYからはグアニンのH8あるいはチミンのH6とH1'が非常に近い、すなわちグリコシル結合がsynに近い形が予想された。一方、poly(G)の結晶構造を基にプログラムJUMNAを用いて四重らせんのモデルを構築し、AMBERによりエネルギー最適化を行った。得られた構造はGの部分は結晶構造に非常に近く、右巻きらせんでhelical rise 3.3Å, twist angle 31°であった。Tに関してよく似た構造が得られた。またグリコシル結合はsynまたはhigh-antiの領域を示した。

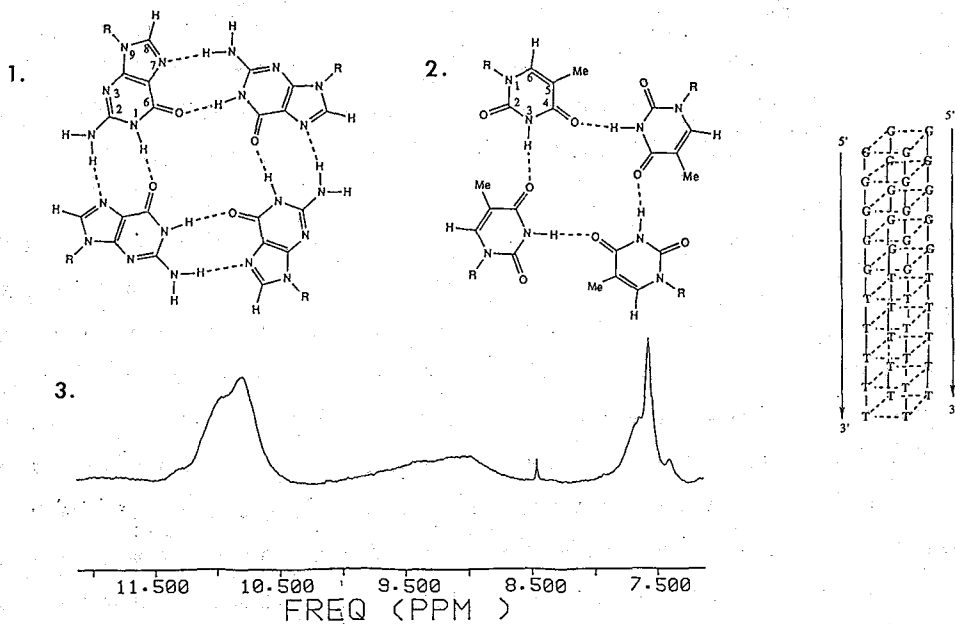


図1. Tetra-Gのモデル。 図2. Tetra-Tのモデル。

図3. d(GGGGGTTTTT)の軽水中NMRスペクトル(イミノ/アミノおよび塩基プロトン領域)。 Insetはd(G5T5)4のモデル。

アップジョン コントロール部門

○ 檜山行雄, Russel H. Robins

Formation of mutarotational isomers and conversion of keto-diol in Trospsectomycin.

Yukio Hiyama(*) and Russel H. Robins, Control Research and Development, Upjohn Pharmaceuticals LTD(*), Tsukuba 300-42 and The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan

Multinuclear magnetic resonance, LC-MS and UV studies have been carried out to investigate mutarotational isomers and keto-diol conversion of trospsectomycin. In aqueous environment at 20°C, populations of four mutarotational isomers are 90%, 6%, 1%, and 1% by C-13 NMR. Time constants (70% formation) of the mutarotational isomers' formation are 5 to 10 hours. The two most abundant isomers' three dimensional structures are determined by scalar connectivities, nuclear Overhauser effect and proton spin-lattice relaxation time measurements. The major isomer's configuration is the same as in spectinomycin. The last 2% is in keto form of the natural configuration of the drug molecule. Since the diol-keto conversion takes place in one second, that time scale of the conversion process is too short for any HPLC separation. Solid state C-13 NMR spectrum showed that the configuration in the solid phase is the same as the major configuration in solutions and that the two amine groups are both protonated.

Assay development for trospsectomycin has been a difficult problem because it has weak UV chromophore and because it appeared to be instable in solution. The assay uses UV detection at 214 nm because trospsectomycin has keto character at least partially. However bulk drug with more than 3% water content shows no C=O stretching band in IR and solution C-13 NMR shows essentially diol form. Formation of mutarotational isomers and keto-dial conversion may affect analytical methods. Therefore intensive study of molecular behavior of trospsectomycin has been carried out by various spectroscopic methods, multinuclear NMR, LC-MS and UV spectroscopy.

Three dimensional structure of trospsectomycin and NMR assignments

A single crystal X-ray diffractational study of spectinomycin dihydrobromide pentahydrate (1) has shown that the spectinomycin moiety takes R-cis configuration and the diol form rather than the keto at the 3' position (Figure 1). C-13 NMR spectrum of an equilibrated aqueous solution of trospsectomycin shows five different isomers including the mother configuration, R-cis (Figure 2a). C-13 NMR peaks of the mother isomer in spectinomycin occur essentially at the same positions of trospsectomycin except for the side chains. The similarity can also be recognized in carbon-proton shift correlation spectra. Therefore we can conclude that the

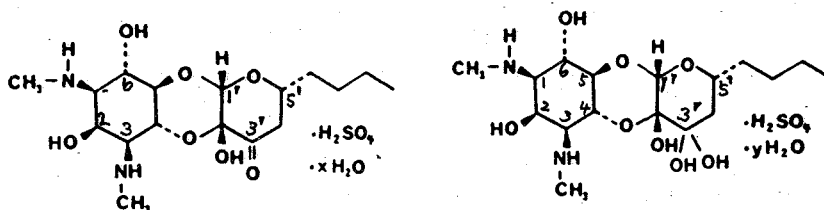


Figure 1. Molecular structure of Trospsectomycin.

major configuration of trospectomycin is R-cis as in spectinomycin. Also the mother isomers in aqueous environment are diols because there are no corresponding carbonyl resonances in C-13 NMR for the mother isomers of trospectomycin and spectinomycin.

For proton signal assignments, connectivities from N-methyl proton and the deuterium isotope effect on C6 have been utilized. Assignments of the two quaternal carbons, C2' and C3' were also based upon a deuterium isotope effect. C4' H2 sites are found to be exchangeable since the molecule undergoes keto-diol conversion at C3' position. By proton inversion recovery spectra (Table 1) one can note that the singlet proton 1' has the longest T₁, 1.45s, and that the buthyl side chain is flexible since 7' and 8' methylene protons have longer T₁ than that of 6' or 4' methylene protons which are included in the spectinomycin skeleton. Also T₁ of position 1, 3, 5 are shorter than those of the positions 2, 4 indicating spatial spin connectivity within the actinamine ring. These T₁ data not only support the natural R-cis configuration but excludes S-trans and R-trans configuration since the T₁ value at position 1' is 1.45s and that 20% steady state NOE was observed at the position 1' by saturating the 5' proton.

Table 1. 400 MHz H-1 NMR spectrum of trospectomycin assignment and spin-lattice relaxation time in D₂O at 22 C

| proton site | chemical shift (ppm) | T ₁ |
|-------------|----------------------|----------------|
| 9' CH3 | 1.00 | 1.2 |
| 8' CH2 | 1.45 | 0.6 |
| 7' CH2 | 1.70 | 0.6 |
| 6' CH2 | 1.70 | 0.2 |
| 4' CH2 | 1.96 | 0.2 |
| N() CH3 | 2.95 | 0.65 |
| N() CH3 | 2.97 | 0.65 |
| 1 CH | 3.37 | 0.58 (0.65) |
| 3 CH | 3.61 | 0.58 (0.65) |
| 5' CH | 3.97 | 0.58 (0.65) |
| 6 CH | 4.08 | 1.1 |
| 5 CH | 4.14 | 0.9 |
| 4 CH | 4.45 | 1.0 (1.1) |
| 2 CH | 4.90 | *(0.58) |
| H2O | 4.93 | long |
| 1' singlet | 4.97 | 1.45 (1.74) |

* not determined because of signal overlap

Identity of Isomers-in aqueous solution

C-13 NMR spectra with S/N > 1000 of trospectomycin can be obtained by extensive signal accumulation. There are essentially five isomers in aqueous environment in C-13 NMR. Populations of those isomers are 6%, 2%, 1% and 1% at 20°C which are named i, j, k and l, respectively. There is a carbonyl resonance at 206 ppm at 1% level in the C-13 NMR spectrum. A C-13 NMR spectrum at 60°C showed a larger population of 6% for the j isomer and the carbonyl resonance also grew accordingly. On the other hand the rest of the isomers (other than j) did not increase their population much at 60°C suggesting that the apparent energy surface for the mutarotational isomers is invariant over the temperature range. The set of the j resonances lacks 3' resonance in the diol carbon region (90-110 ppm). Therefore it is concluded that the j isomer is the keto form of the natural configuration. In freshly made aqueous solution, the isomers, i, k, l were not detected by the C-13 NMR while the keto form is seen at full population for the first data (less than 90 min.). Timescale of formation for i, k, l is 10 hrs, 5hrs and 10 hrs, respectively. The rate of formation of the i isomer was also monitored by proton NMR.

Table 3. 1 H spin-lattice relaxation times (s) of trospectomycin which are affected by the configurational changes in D2O

| isomer | 20 °C | | 60 °C | |
|------------------|-------|-----|-------|-----|
| | 1' | 5 | 1' | 5 |
| m (natural-diol) | 1.45 | 0.9 | 2.7 | 1.6 |
| i (S-trans-diol) | 0.66 | 0.7 | 1.2 | 1.2 |
| j (natural-keto) | * | * | 2.0 | ** |

Difficult to measure because of the low population(*) and because of signal overlap(**)

Structure of Mutarotational Isomers

Thermospray LC-MS showed that the isomers i, k, l gave Mass spectrum with parent ion at 374. Intensity of fragmentation that corresponds actinamine is less than 10% of the parent ion, which suggests that the dioxane ring (the two C-O-C

bonds) is intact for the isomers.

In order to determine three dimensional structure of the i isomer out of the possible four configurations, proton-proton shift correlation (COSY) of

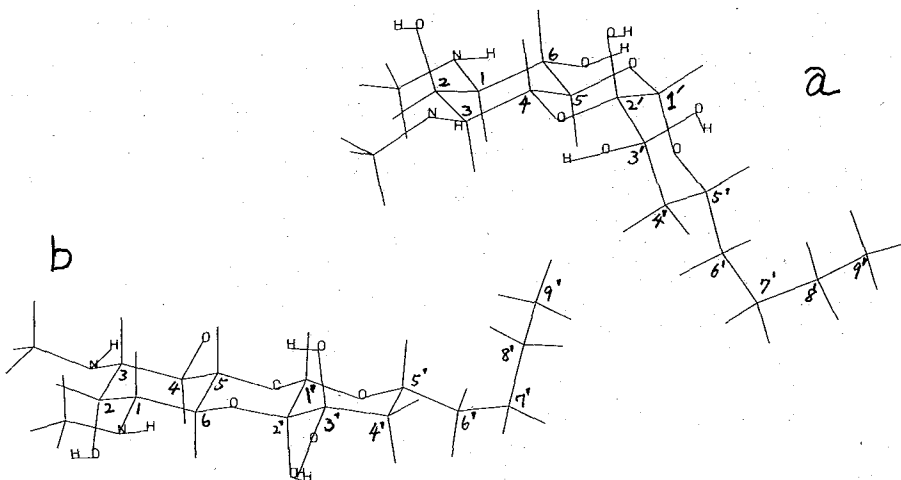


Figure 2. Three dimensional structures of the two most abundant mutarotational isomers of Trospsectomycin, (a) m:R-cis, natural (b) i:S-trans, the 6% isomer.

trospsectomycin in aqueous environment was recorded. The solvent system gives rather high population of the i isomer at 6% level. Since minor cross peaks corresponding to the i isomer in the downfield region provides a six spin circle, the actinamine ring is intact. Spin-lattice relaxation time of 1' proton, the singlet, of the i isomer is 0.6 s which is shorter by two than that of the mother configuration. So this strongly suggests that the i isomer is S-trans configuration (Figure 2b) where the 1' proton has another relaxing partner, 5 in addition to the 5' proton.

Molecular Mechanics Calculation for Mutarotational Isomers

Relative energetic calculation for the mutarotational isomers in diol forms of trospsectomycin have been carried out in "vacuum" with "Mosaic, MM2 mode". The natural configuration (R-cis) is most stable at -31.7 kcal/mol followed by the 6% isomer (S-trans) at -29.7 kcal/mol. The third one is S-cis having -28.1 kcal/mol and the least stable isomer is R-trans at -26.4 kcal/mol. This calculation predicts population of ca. 3% for the 6% isomer. Less than 1 kcal/mol shift can make this kind of population change (remember that RT is only 0.6 kcal/mol at T=300K). In fact S-trans's population varies from 6% in aqueous environment to 2.5 % in the potency assay mobile phase (28% pH=2.2 phosphate buffer + 72% acetonitrile).

During the course of the calculation, steep activation of more than 10 kcal/mol for the rotation defined by a dihedral angle of C-C-N-methylcarbon was recognized. And there are two minima for each methyl carbon. This may correspond to slow (a day), irreversible conformational changes near the methyl carbons. These observations were made in freshly dissolved samples observed by C-13 and proton NMR. Since the last step of synthesis includes knock off large functional groups from the amine groups at low temperature, we suspect that the methyl carbons may remain at the metastable position in bulk drug.

Table 3. Calculated Relative Energy (kcal/mol) of Mutarotational Isomers by Molecular Mechanics Mosaic.

| configuration | diol | keto |
|--------------------|-------|-------|
| R-cis (natural) | -31.7 | -40.5 |
| R-trans | -26.7 | -31.3 |
| S-trans | -30.0 | -35.5 |
| S-cis | -28.5 | -37.1 |

Solid State C-13 NMR Spectrum

The chemical shifts of the solid spectrum are essentially the same as in solution, which indicated the major configuration with the diol is also dominant in the solid phase.

In the cross polarization experiment carbon magnetization comes from the proton spin system, proton relaxation times T_1 and $T_{1\rho}$ were measured through C-13 NMR signal. Proton T_1 was 0.6 s at 25 C. T_1 of the proton is estimated to be 200 micro s, which indicated slow molecular motion on the time scale of 10^{-6} s. The proton spins are coupled with their homo nuclear dipolar interaction resulting in homogeneous relaxation behavior, so that local motion such as side chain fluctuation affects relaxation behavior of the entire molecule. C-13, on the other hand, is not coupled because natural abundance of the spin is 1% and its magnetic moment is small. Therefore ^{13}C spin can have distinct relaxation time than other carbon sites. C-13 NMR spectrum with delayed spin-locking for C-13 shows that $T_{1\rho}$ of sites 6, 7, 8 is about 200 micro s. This indicates that the slow molecular motion responsible for the short proton and C-13 $T_{1\rho}$ is the side chain fluctuation (sites 6, 7, 8). Although the sidechain is flexible, the spectinomycin part reveals rigid showing no drastic conversion demonstrated in solution.

In summary liquid chromatography can have adequate resolution in most cases, however it has long time scale (\geq 1 minute). On the other hand, NMR probably has the highest resolution among the molecular spectroscopic methods and yet has time resolving capability, up to \approx 10 ms for solution techniques. We have employed the technique to study dynamics of Trospectomycin and were able to improve its analytical methods.

References:

1. "Stereochemistry and Absolute Configuration of the Antibiotic spectinomycin: an X-Ray Diffraction Study", T.G. Cochran, D.J. Abraham, and L.L. Martin. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 494 (1972)
2. "Isotope Effects on Nuclear Shielding", P.E. Hanson, Annual Reports on NMR Spectroscopy, Vol. 15, G.A. Webb (ed.), Academic Press, (1983).

L4

○藤井 茂、笠井 佐夫*、三浦 洸

(関西医大・化学、*大阪市大・工)

On the structure of a prosthetic group in a protein relating to luciferase of luminous bacteria

Shigeru FUJII, Subu KASAI* and Retsu MIURA

(Laboratory of Chemistry, Kansai Medical University, and *Faculty of Engineering, Osaka City University)

A protein (FP390) in which a flavin derivative is bound was found to be induced under the conditions where luciferase was inductively produced. A flavin derivative was isolated from FP390, and it was confirmed to consist of FMN and myristic acid by elemental analysis and mass spectroscopy. NMR spectroscopy revealed that the flavin derivative was a mixture of two molecules: one in which the β -carbon of myristic acid is directly bound to the 6-carbon of FMN, and the other in which the γ -carbon of myristic acid is bound to the same position of FMN. The ratio of these flavin derivatives was determined to be 7:3 by NMR spectroscopy.

【序論】

発光細菌ルシフェラーゼは、還元型FMN (FMNH_2)とミリスチンアルデヒド(テトラデカナル)を基質として反応する。笠井らは、このルシフェラーゼを精製する過程において、修飾されたフラビン分子(Qフラビン、QF)を補欠分子として含むタンパク質(FP390)が多量に存在することを、見いだした(1)。また、最近このタンパク質の遺伝子が、ルシフェラーゼの遺伝子と同一のオペロン中に存在することが示唆され(2-4)、このタンパク質の生理的意義に対する興味が抱かれるようになった。

本研究では、FP390に結合したQFの構造を元素分析、マスペクトル、NMRなどをもちいて決定し、その構造に興味ある結果が得られたので報告する。

【方法】

精製したFP390を6M塩酸グアニジン存在下でゲル濾過することにより、補欠分子を集め、これを液滴向流分配クロマトグラフィーなどをもちいて精製した。

NMR測定には、バリアン社製UNITY400を用いて行った。構造決定に際しては、COSY, HOHAHA, NOESYなどの $^1\text{H-NMR}$ 測定ならびにCH-COSYなどの $^{13}\text{C-NMR}$ 測定により行った。

【結果および考察】

Qフラビンは、元素分析、マスペクトルの結果などから、FMNとミリスチン酸が直

接結合した化合物であることが明らかにされた(4)。この化合物を重メタノールに溶解し、NMR測定したところ、図1に示したH-1 NMRスペクトルを得た。

このスペクトルに示されるように、芳香族環に結合したと思われるメチル基のシグナルが、2.4 ppm から 2.6 ppm 付近に3本観測され、2.60 ppm のシグナルの面積強度が、他の2本のシグナルの面積強度の和に等しいことが明らかとなった。

また、3.55 および 3.98 ppm にミリスチン酸に由来すると考えられるシグナルが観測されたが、HOHAHA などの測定によりこれらのシグナルは、それぞれ別のスピン系にあることが確認された。さらに、これら両者のシグナルを与えるプロトンは、それぞれ 39.6 および 42.7 ppm に観測されるメチン炭素に結合していることが CH-COSY により明らかとなった。これらの結果から、この修飾されたフラビン分子は、2種類の混合物であることが予想された。

そこで、これらの化合物の分離を試みたところアセトニトリル-水系の逆相クロマトグラフィーにより互いに分離することができた。これらの分離されたフラビン化合物の COSY スペクトルをそれぞれ図2に示す。全体の約7割を占める主たる化合物(図2左)のミリスチン酸に由来し分離よく観測されるシグナルは、それぞれ 0.88, 1.02, 1.29, 2.02,

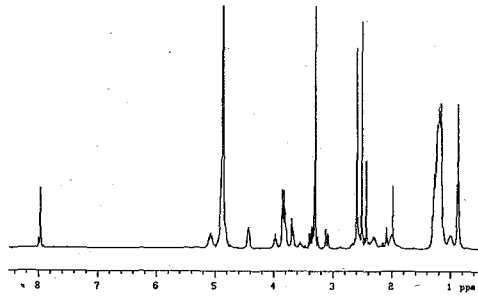


図1. QフラビンのH-1 NMRスペクトル

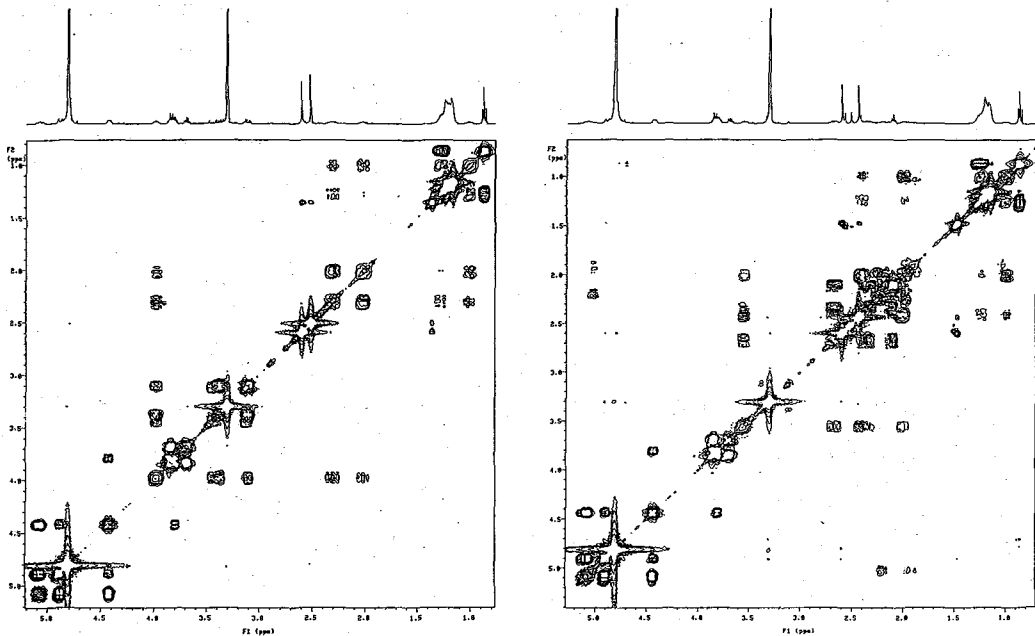


図2. 2種類に分離されたQフラビンのそれぞれのCOSYスペクトル

2.31, 3.11, 3.38, 3.98 ppm
 に表れ、それらのシグナルは、
 それぞれミリスチン酸部分の
 メチル-H、 δ -H、 δ -H、
 γ -H、 γ -H、 α -H、 α -H
 および β -Hに由来するものと
 帰属された。これらの結果と
 CH-COSY スペクトルの結果から
 ミリスチン酸の β 位の炭素には
 水素原子が1個のみしか結合し
 ておらず、この部位でフラビン
 分子と結合していることが明か
 となった。また、もう一方の
 分子も同様にしてミリスチン酸
 の γ 位の炭素とフラビン分子が
 結合していることが明かとなり、
 ミリスチン酸部分の α 、 β 、 γ 、
 δ 、 ϵ 位および末端のメチル基

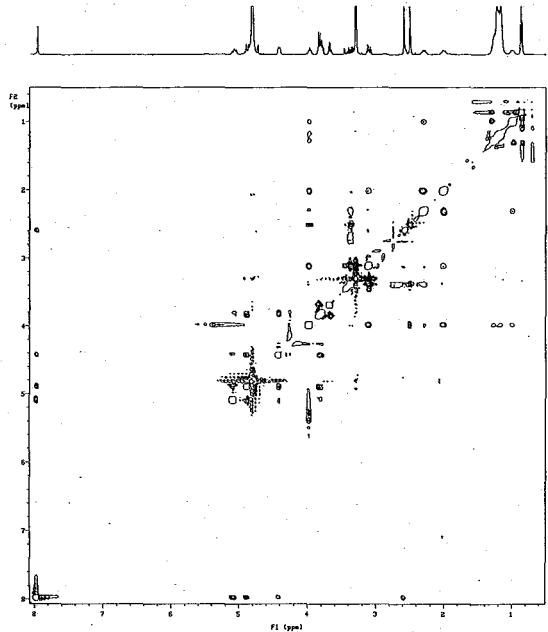


図3. Qフラビンの NOESY スペクトル

のプロトンシグナルは、それぞれ 2.11 ppm (2 個分)、2.36 と 2.67 ppm (それぞれ 1 個分)、3.55 ppm (1 個分)、2.00 と 2.40 ppm (それぞれ 1 個分)、1.00 と 1.27 ppm (それぞれ 1 個分) および 0.87 ppm (3 個分) に観測された。

ここに、2種類の修飾されたフラビン分子におけるミリスチン酸側の結合部位は決定されたが、次にフラビン分子のどの部位と結合しているかを明らかにする。フラビン分子には芳香族性水素がフラビン分子の6位と9位に2個存在するが、これら両者の化合物ではともに1個の芳香族性水素しか観測されないことから、ミリスチン酸がフラビン分子の6位あるいは9位に結合していることが予想された。この結合部位を明らかにするため図3に示した NOESY スペクトルを得た。このスペクトルから芳香族性のプロトンシグナルとリビチル基のプロトンシグナルと

の間に NOE が観測されることから、この芳香族性のプロトンシグナルは9位の水素に由来するものであることが明かとなり、ミリスチン酸はフラビン分子の6位の炭素と直接結合したものであると同定された。

また、低磁場側のメチル基は、

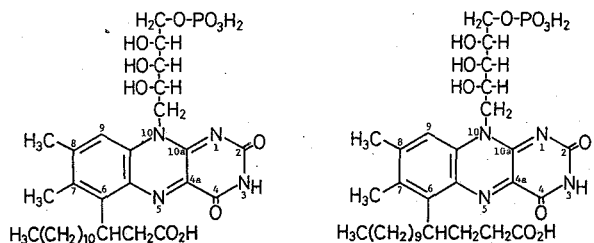


図4. 決定されたQフラビンの構造

芳香族性水素との間に、高磁場側のメチル基はミリスチン酸の水素との間にそれぞれ NOE が観測されることから、それぞれのメチル基のシグナルは、フラビン分子の 8 位および 7 位のメチル基に由来していることも明かとなった。他方の化合物に対しても同様の NOESY スペクトルが得られ、フラビン分子の 6 位とミリスチン酸の γ 位が結合したものであることが明かとなった。

以上の結果から、F P 3 9 0 から遊離されたフラビン化合物は、図 4 に示したようにミリスチン酸の β 位および γ 位とフラビン分子の 6 位との間で結合したものの混合物であり、その存在比率は、約 7 : 3 であった。

【文献】

1. S. Kasai, K. Matsui, T. Nakamura (1987) in *Flavins and Flavoproteins* (D.E. Edmondson, D.B. McCormic eds.) Walter de Gruyter, Berlin. pp 647-650.
2. J.A. Mancini, M. Boylan, R.R. Soly, A.F. Graham, E.A. Meighen (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14308-14314.
3. R.R. Soly, J.A. Macini, S.R. Ferri, M. Boylan, E.A. Meighen (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 351-358.
4. S. Kasai, S. Fujii, R. Miura, S. Odani, T. Nakaya, K. Matsui (1990) in *Flavins and Flavoproteins* (B. Curti, S. Ronchi, G. Zanetti eds.) Walter de Gruyter, Berlin in press.

High Resolution NMR Spectra of Antiferromagnetically coupled Vanadium Complexes.

Susumu KITAGAWA, Megumu MUNAKATA and Hidenori KISO (Kinki University)

^1H NMR spectra of divanadyl complexes, $[(\text{VO})_2\text{Cl}_2(\text{bil})_2(\text{OC}_2\text{H}_5)_2]$ ($\text{bil}=1,8\text{-naphthyridine}$ and $1,10\text{-phenanthroline}$), have been measured, and the signals are spread out over the 40 ppm range, characteristic of antiferromagnetically coupled systems. The chemical shifts are discussed in relation to the superexchange coupling constant, J ($\chi = -2JS_1S_2$), compared with those of dicopper(II) complexes.

[I] 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。その各酸化状態における価電子数をTable 1に示した。通常、NMRの観測可能な価数は-1, I, Vである。しかしd電子数が奇数の場合(d^2 は例外)には常磁性であるためNMR法の対象とはなり得ない。この時、Table 1に示したように複核構造を与える場合に限りNMR観測が可能である。複核の場合には2つの相互作用がある。第1は金属-金属結合が生成する場

Table. 1. バナジウムの酸化数, 価電子数およびNMR観測可能な錯体構造

| 酸化状態 | 電子数 | 複核 | | |
|------|-------|----|------|---------|
| | | 単核 | 反強磁性 | V-V結合 |
| V | d^0 | ○ | — | — |
| IV | d^1 | × | ○ | ○(1重結合) |
| III | d^2 | × | ○ | ○(2重結合) |
| II | d^3 | × | ○ | ○(3重結合) |
| I | d^4 | ○ | — | — |
| 0 | d^5 | × | ○ | 3重結合? |
| -I | d^6 | ○ | — | — |

○ 測定可, × 測定不可

* 通常 $S=1$ が基底状態である。

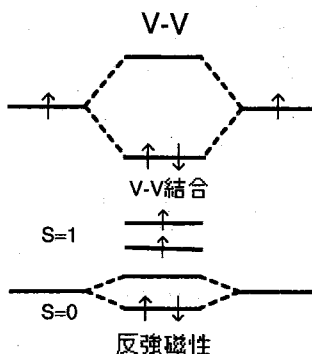
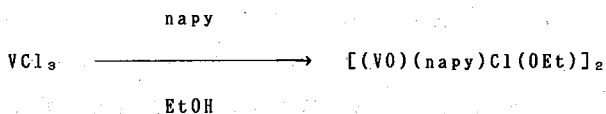


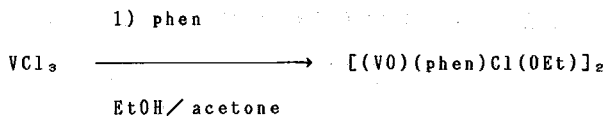
Fig. 1.

観測は可能であるが、NMRによる測定は出来ない。しかし、複核錯体になると先に述べた理由によりESRよりもNMR測定が有用と考えられる。本研究ではこのV(IV)の反強磁性系のNMRスペクトルの観測に成功し、これら錯体の溶液構造と化学シフトとの関連性について検討したので報告する。

【II】合成：VO-napy錯体は次のスキームに従い、アルゴン雰囲気下EtOH溶液中で、VCl₃に3倍量の1,8-naphthyridine(napy)を加えて、合成した。得られたものは、単結晶または微結晶として、単離した。



VO-phen錯体についても同様の方法で行った。単結晶はアセトン拡散により得た。



測定方法：¹H NMRの測定には、JEOL JNM-GSX 270 FT-NMRスペクトルメーターを用い、観測周波数 270.171 MHz、観測幅 18 KHz、パルス幅 4.0 μs、温度 23 °Cで測定した。サンプルチューブは5 mmφのものを使用し、バナジウム濃度を10~50 mMに調製し、15 Hz程度で回転させながら測定した。内部基準には、TMSを用いた。

【III】 (1) 複核バナジウム(IV)錯体の構造

[(VO)(napy)Cl(OEt)]₂²⁺のX線結晶構造解析からFig. 2のような分子構造であることが明らかとなった。2個のエトキシ基がバナジウムに橋かけ配位した4員環の複核構造であった。このようなtypeの複核VO-VO型錯体は珍しく、これまで3例しか合成されていない。このV...V間相互作用については[V₂O₂(μ-OH)₂([9]aneN₃)₂]²⁺³⁾について調べられておりJ値が-177 cm⁻¹であり(λ=-2JS₁S₂)強い反強磁性相互作用の存在が明らかにされている。本系も同様な反強磁性相互作用が期待される。

$[(VO)(napy)Cl(OEt)]_2$ の10 mM重水素化メタノール溶液の 1H NMRスペクトルの測定を行った。 $-2.8 \sim 12.0$ ppmに比較的半値幅の大きいシグナルを与えた。常磁性の単核 VO^{2+} 錯体では全く観測されないことから明らかに反強磁性系のスペクトルであると言える。しかし、この錯体はどの溶媒にも極めて難溶であるため、溶解している系はFig 2の構造とは異なっていることが考えられる。そこで溶解性の高い系での観測を試みた。

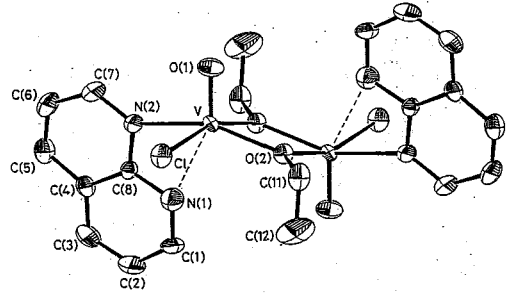


Fig. 2. $[(VO)(napy)Cl(OEt)]_2$ の分子構造

(2) 複核バナジウム(IV)錯体のNMR化学シフト

(i) $[(VO)(phen)Cl(OEt)]_2$ の50 mM重水素化メタノール溶液の 1H NMRスペクトルは、通常の反磁性系の観測範囲(0~10 ppm)に比べて、 $37.8 \sim -2.1$ ppm($\Delta \nu_{1/2} = 210 \sim 1600$ Hz)と非常に大きな観測幅をもち、しかも線幅の広いシグナルを与えた(Fig. 4)。バナジウム(IV)錯体は d^1 電子配置をもち、常磁性を示すことからバナジウム原子上の電子スピンの緩和時間が長いことそのNMRシグナルは広幅化して通常観測されない。

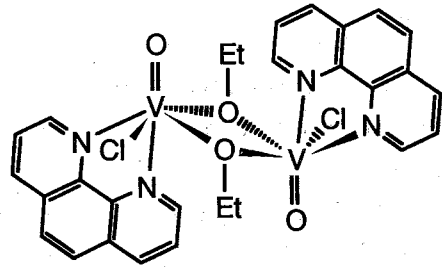


Fig. 3. $[(VO)(phen)Cl(OEt)]_2$ の推定構造

しかし $V \cdots V$ 距離 $3.101(1)$ Åの $[(VO)(napy)Cl(OEt)]_2$ のような橋かけ配位子を有する複核錯体では、2つのバナジウム(IV)がおたがひ反強磁性作用をしている場合は観測される。この場合の化学シフトは

$$\Delta \delta_{1,2} = \frac{g \beta A}{(\gamma / 2\pi) kT} \times [(\exp(-2J/kT)) + 3]^{-1}$$

A : S=1状態の時の超微細結合定数

γ : 磁気回転比

k : ボルツマン定数

と表される。

複核のCu(II)錯体(各銅については d^9 であるが $S=1/2$ でVOと同様の電子配置)の場合と同様のこのシフト式が適用できる。この場合、線幅も $[(\exp(-2J/kT)) + 3]^{-1}$ の項で示される状態密度項により小さくなることが指摘されている。本系でも、同様な相互作用により小さいシフトおよび線幅で観測されたものと解釈される。このスペクトルの帰属は $[Cu_2(phen$

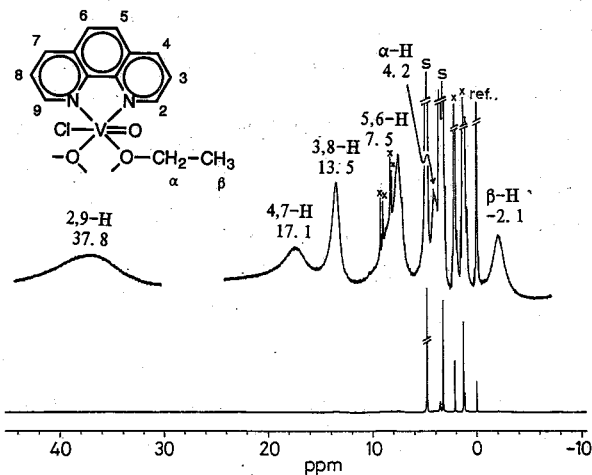


Fig. 4. $[(VO)(phen)Cl(OEt)]_2$ の 1H NMRスペクトル

50 mM MeOH- d_4 溶液 (640 scans, BF 1.0 Hz) の半値幅比べてみてもわかるように、 $[Cu_2(phen)_4(OH)]^{3+}$, $[Cu_2(phen)_4(Im)]^{3+}$ よりVO-phen錯体の方が、半値幅が小さく観測されている。これよりVO体では2,9-Hのシグナルが観測できたものと考えられる。 $[(VO)(phen)Cl(OEt)]_2$ のような複核バナジウム(IV)錯体のバナジウム…バナジウム間には 1H NMR観測可能な反強磁性相互作用があることがわかった。しかしながら、この複核バナジウム(IV)錯体の ^{51}V NMRスペクトルを測定したがシグナルを得ることができなかつた。これよりV-V間相互作用は ^{51}V NMRが観測可能な程強いとはいえない。

Table. 2. 1H NMR化学シフト値

| Complex | δ ppm ($\Delta\nu_{1/2}$ Hz) | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|-------------|------------|-------------|-------------------|-------------|
| | β -H | α -H | 5,6-H | 3,8-H | 4,7-H | 2,9-H |
| $[(VO)(phen)Cl(OEt)]_2$ | -2.1 (325) | 4.2 (225) | 7.5 (250) | 13.5 (210) | 17.1 (600) | 37.8 (1600) |
| $[Cu_2(phen)_4(OH)]^{3+}$ a) | | | 18.4 (126) | 29.8 (500) | ~52 ^{c)} | |
| $[Cu_2(phen)_4(Im)]^{3+}$ b) | | | 18.8 (633) | 30.5 (1225) | | |

a), b) Acetone- d_6 was used as a solvent c) Very broad

- 1) M. Maekawa, S. Kitagawa, M. Munakata, H. Masuda, *Inorg. Chem.*, **28**, 1904 (1989).
- 2) S. Kitagawa, M. Munakata, M. Ueda, T. Yonezawa, *Inorg. Chim. Acta*, **175**, 3L (1990).
- 3) K. Wieghardt, U. Bossek, K. Volckmar, W. Swirsdoff and J. Weiss, *Inorg. Chem.*, **23** (1984) 1387.

L6

ホスト・ゲスト化学における金属イオンのダイナミクスと 錯形成形態

(北大理) ○市川和彦

(北大応電) 神 隆

Dissociation Kinetics and Morphology of the Complex of Metal-Ion Guest with Molecular Host

Kazuhiko Ichikawa, Takashi Jin* (Faculty of Science, Hokkaido Univ., and Inst. Applied Electricity, Hokkaido Univ.)*

In host-guest chemistry the complexes of metal ions with molecular hosts were visualized as having three types of common shapes: 1) perching complexes, 2) nesting complexes and 3) capsular complexes. Since the complexing act must be accompanied by the fluctuation in the structure and conformation of molecular host, the dissociation kinetics of the complexes depends on the shapes of molecular hosts in their uncomplexed and complexed states. The present work reports the studies on the dissociation kinetics of calixarene ester- Na^+ complex (as an example of the capsular complex) from ^{23}Na longitudinal magnetization recovery curves and ^1H nmr spectra, and shows the comparison between the above complex and ATP-Mg^{2+} (as perching complex) or 18C6-Na^+ complex (as nesting complex).

〔序〕 ホスト分子をある溶媒に溶かすことにより、適当なイオン・分子をゲストとしてむかえることのできる“穴”を創りだすことができる。そのキャビティは、取り込み力を示す官能基群を内壁に保持し、その形・大きさによってゲストに対する選択性を示す。錯形成能力は、ホスト分子のコンホメーションと構造ゆらぎ、相手同志の取り込み部分の接触を大きくさせる相補性によって決められる。それ故、ホスト分子の金属イオン取り込み形態が金属イオン解離過程の動力学的性質を決定すると考えられる。クラムによる3種類の錯体 1) 腰掛け状錯体、2) 巣ごもり状錯体、3) カプセル状錯体に分類される。錯体3)としてカリックス〔4〕アレン・エステル(BCAD; 図1)-ナトリウムイオン錯体(BCAD $\cdot\text{Na}^+$)を取り挙げて、溶液内における錯解離過程の動力学的性質とホスト・ゲスト相互作用、錯形態と結合部位、錯解離機構について報告する。錯体1)としてアデノシン三リン酸-マグネシウムイオン錯体(ATP $\cdot\text{Mg}^{2+}$)及び錯体2)としてクラウンエーテル-ナトリウムイオン(18C6 $\cdot\text{Na}^+$)との比較検討についても報告する。

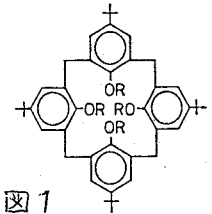


図1
BCAD: (R=CH₂COC₂H₅)

〔実験〕 試料: BCADとNaSCNを $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ (2:1, V/V)にとかし、濃度比($R = [\text{NaSCN}] / [\text{BCAD}]$)を1, 1.1, ∞ に調整した。測定は ^{23}Na NMR-XL 200を用いて、共鳴周波数59.2 MHzで測定した。縦磁化回復曲線は反転回復法($180^\circ - \tau - 90^\circ$)に依った。

〔結果と考察〕 錯形態と結合部位: 図2は、 $R=0, 0.5, 1$ の23℃における ^1H NMRスペクトルを示している。橋渡しメチレンプロトンのピーク(*印)など多くはBCADE構成する4コの部分が互に対称性の良い形態をとって錯形成に伴い低磁場側にシフトしていることから、コンホメーションは Na^+ を取り込んでいないにかかわらずコーン構造である。赤外吸収スペクトル測定、分子模型の組立てと ^1H NMRスペクトルから、

4コのエステル置換基の合計8コの酸素との結合部によって Na^+ は取り込まれている。

以上の事柄から推定した錯体 $\text{BCAD} \cdot \text{Na}^+$ の形態

(図3)は典型的なカプセル状になっている。

溶液内化学交換反応の動力学的性質とホスト

・ゲスト相互作用： $R=1.1, 1, \infty$ における ^{23}Na 核の縦磁化回復曲線の温度依存性で、 $R=1.1$ では単一の指数関数的挙動を示さなかった(図4)。

これは式

で示される Na^+ の化学交換反応を反映している。縦磁化回復曲線は、化学交換を含む Bloch 方程式の一般解

$$(M_z^0 - M_z(\tau))/M_z^0 = 2[C_1 \exp(-R_{1,A} \cdot \tau) + C_2 \exp(-R_{1,B} \cdot \tau)]$$

によって与えられる。みかけの縦緩和速度 $R_{1,\alpha}$ ($\alpha=A, B$) は次式

$$R_{1,\alpha} = (D \pm E^{1/2})/2 \quad (\alpha=A, B), \quad D = R_1^* \cdot A + R_1^* \cdot B + 1/\tau_A + 1/\tau_B,$$

および $E = (R_1^* \cdot A - R_1^* \cdot B + 1/\tau_A - 1/\tau_B)^2 + 4/(\tau_A \cdot \tau_B)$

によってスピノ-格子緩和速度 R_1^* , 化学種 α の化学交換寿命 τ_{α} の関数で与えられる。(2)式を用いて非指数関数的挙動を再現することにより(図4の曲線), $R_{1,\alpha}$ を決定することができた。

更に $R_{1,A}$, $R_{1,B}$ を測定から決定可能なので(3),(4)式より $\text{BCAD} \cdot \text{Na}^+$ 錯体の寿命 τ (Aが決まり, $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-1} \text{ s}$ ($23 \sim 63^\circ \text{C}$)). (1)式

の錯解離過程の活性化パラメータは $\Delta H_{AB}^\ddagger = 56 \pm 6 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S_{AB}^\ddagger = -39 \pm 21 \text{ JK/mol}$. ホスト分子と Na^+ との又は溶媒和分子と Na^+ との相互作用の大きさの比較は, $R_{1,A}^*$ と $R_{1,B}^*$ によって推定可能である。何故なら, ^{23}Na のスピノ-格子緩和速度の大きさは Na 核に生成する電場勾配子によって決まる。 $R_{1,A}^*/R_{1,B}^*$ は約40倍である故, Na^+ は溶媒分子と比較して, エステル置換基から強い相互作用を受けていると考えられる。

錯解離機構：溶液内において単分子, 二分子各錯解離速度定数は $k_1 = \tau_A^{-1}$, $k_2 = \tau_A^{-1} [\text{Na}^+]$ 。

$^1\text{H NMR}$ スペクトル解析から速度定数は $[\text{Na}^+]$ に依存しない事が判明したので錯解離反応は単分子反応である。

錯形態と錯安定性との相関：錯体の寿命の大きさで, 安定性の錯形態依存性を検討する。カプセル状の $\text{BCAD} \cdot \text{Na}^+$ 錯体の寿命は, 葉ごもり状 $18\text{C6} \cdot \text{Na}^+$ 錯体の60倍, 腰掛け状 $\text{ATP} \cdot \text{Mg}^{2+}$ 錯体のおおよそ20倍であった。この事からカリックスアレン[4]エステルは Na^+ を認識・選択し, そのキャリアとしての機能を持つ分子と結論できる。

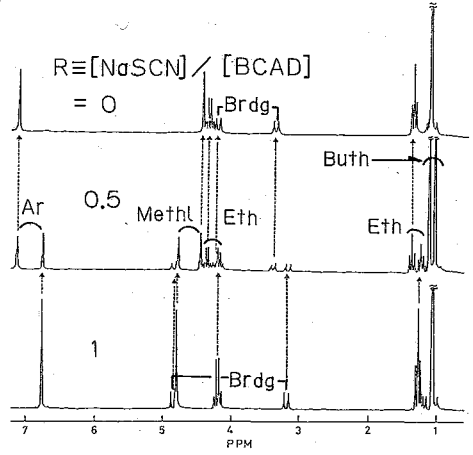


図2 CDCl_3 中の $^1\text{H NMR}$ スペクトル

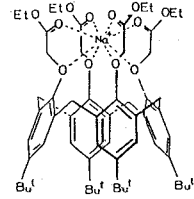


図3 $\text{BCAD} \cdot \text{Na}^+$ 錯体

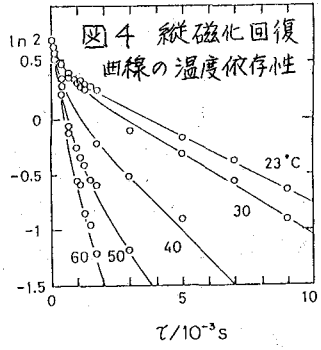


図4 縦磁化回復曲線の温度依存性

特別講演 I

NMR分光法の新しい展開—温度ジャンプNMRと状態相関NMR

(京大理学部) 赤坂一之

New Developments in NMR Spectroscopic Methods - Temperature-Jump NMR
and State-Correlated NMR Spectroscopy

Kazuyuki Akasaka

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University

Two new techniques were recently introduced to the NMR spectroscopy by the author's group. One is the temperature-jump NMR and the other is the state-correlated two-dimensional NMR spectroscopy. This paper describes the principles, constructions, performances, and applications of these new methodologies of NMR spectroscopy. Applications were largely chosen from those on a protein, ribonuclease A.

NMR分光法はこれまで、主として化学的平衡状態にある分子の構造、反応速度の研究手段として高度に発展してきた。しかし、化学的非平衡系ないしは異なる化学的状态間の転移を含む系に対して、NMR分光法は充分に対処できないで来た。たとえば、0.01-100 秒程度の時間域での過度的な分子種や化学緩和過程を観測することが困難であった。この時間域を対象としてストップフローNMR（濃度ジャンプNMR）が既に開発されているが、反応が不可逆的であるために信号積算に難がある。これに対し、温度ジャンプ法は温度に対して可逆的な過程を対象とする限り信号積算が可能である点で、NMRに適した条件を備えている。過去に温度ジャンプNMRの試みはなされたことはあるが、NMR検出器内で試料の温度を急速にジャンプさせることはできなかった(1)。これに代わる方法として、異なる温度の恒温槽中に試料溶液を連続的に流す Continuous Recycled Flow 法が開発されたが(2)、これは真の意味での温度ジャンプNMR法ではない。

私達は、以下の1、2に述べる二つの方式により、NMR分光法に初めて温度ジャンプ法を導入した。さらに、この過程で開発された高速の温度ジャンプ技術を利用して、3に述べる新しい二次元NMR分光法「状態相関NMR」を実現した。

1. ガス流温度ジャンプNMR装置の開発

温度の異なる加圧ガス流を高速で切り替えてNMR検出器に導入することにより、キャピラリー中の試料溶液の温度をジャンプさせる方法で、世界初の温度ジャンプNMR装置

を製作した(3,4)。三つのガス流は空気弁、電磁弁を通じてNMR分光器のコンピューターにより制御され、NMR観測用のラジオ波パルスと同期されるため、信号積算が可能である (Fig. 1)。この方式により $1-2^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 程度の速さのジャンプ (上昇および下降) を実現することができた(3,4)。この方式の特徴は温度上昇のみならず降下ジャンプが可能であることである。このためタンパク質の巻戻り過程でのNMRスペクトルの変化などを記録するのに適している。(昨年度のNMR討論会予稿集参照)。また、ガスを熱媒体としてを用いるこの方式は、通常のNMR検出器がそのまま使用できる利点がある。しかしながら、この方式では温度ジャンプ速度を数秒以下に短縮することは不可能であることがわかった。

2. マイクロ波加熱高速温度ジャンプNMR装置の開発

そこで温度ジャンプ (上昇) の手段として、新たにマイクロ波加熱を採用した。マグネトロン (1.KW, 2.45 GHz)からのマイクロ波を、同軸-導波管変換器を経て、NMR検出器中に効率よく導入することに成功した。CW型マグネトロンの出力をCPUで制御することにより、外径5 mmの通常のNMR試料管中のタンパク質水溶液試料に対して、ガス流方式より一桁速い、 $10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ の温度ジャンプ速度を実現した(5)。さらに最近、特別に設計したパルス型マイクロ波発生装置を用いることにより、ジャンプ速度をもう一桁速くし、最高で $10^{\circ}\text{C}/0.1\text{sec}$ 程度のジャンプ速度を達成することができた。ただし、温度の上昇効率は試料長、誘電率に大きく依存する。またこれらは試料全体の平均上昇温度であり、試料内の温度分布は大きく、また分解能も悪い。これらは今後解決しなければならない課題である。しかし、基本的に熱伝導に頼るガス流方式と比べ、マイクロ波は直接試料にエネルギーを与えるので、ジャンプ速度が速いこと以外にも、(1) 温度が直線的に上がる、(2) どの温度からでも温度ジャンプ幅がほぼ一定である、(3) 試料以外 (検出コイルなど) を加熱しない、などの優れた特徴をもっている。

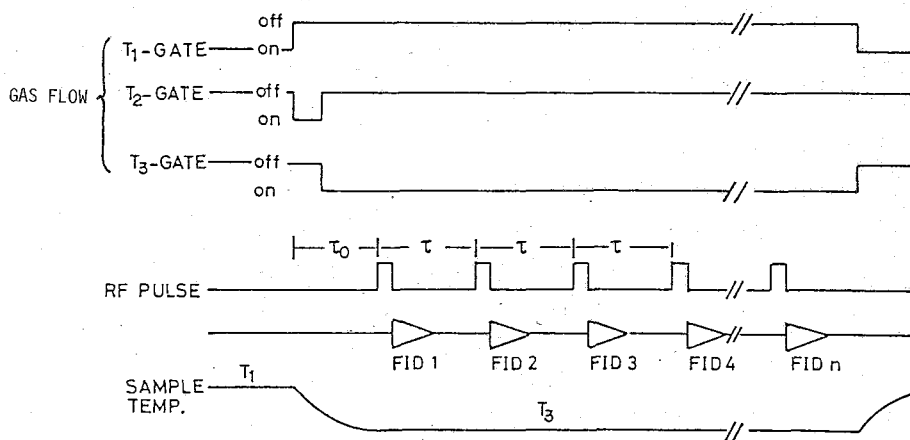


Fig. 1. The basic pulse sequence for a temperature-jump NMR experiment using gas flow.

3. 温度ジャンプを利用した状態相関二次元NMR分光法の開発

二次元NMRはNMR信号の分離、相関、あるいは交換の研究に極めて有用な方法である。二次元NMR、特に二次元分離NMRでは、発展期間と検出期間との間で、何らかの方法によって、スピンハミルトニアンを、スピン緩和時間 T_2 または少なくとも T_1 内に変化させる必要がある。これまで多くの場合、これはラジオ波パルスによって行われてきた。たが、最近では静磁場の大きさや試料回転角度を数十ミリ秒の時間内で変化させることによる新しい二次元NMRも Pines, Maciel, Terao らにより開発された。以上の方式では、いずれもスピンと磁場との相互作用に直接働きかける。われわれのもくろみは、分子の「化学状態」(相を含む)を変化させることによって、結果としてスピンハミルトニアンを変化させようというもので、これまでにない方式の二次元NMR分光法であり、これを「状態相関NMR」と名付けた(5)。いわば広い意味で、“化学”を“二次元NMR”に組み込む試みともいえる。

これが可能となったのは、第一に高い外部磁場(9.4 Tesla)の下ではNMRの縦緩和時間が比較的長いこと(1秒程度以上)、第二に、1秒をはるかに下回る短時間での温度ジャンプがマイクロ波を用いて再現性よく可能になったことによる。状態相関NMRのパルス系列(Fig. 2)は2D Exchange NMRまたは2D NOEのそれと酷似しているが、「混合期間」に代わって「転移期間」が置かれている。これは、2D Exchange NMRのように磁化が互いに交換するのではなく、通常一方向へのみ移動(転移)するからである。

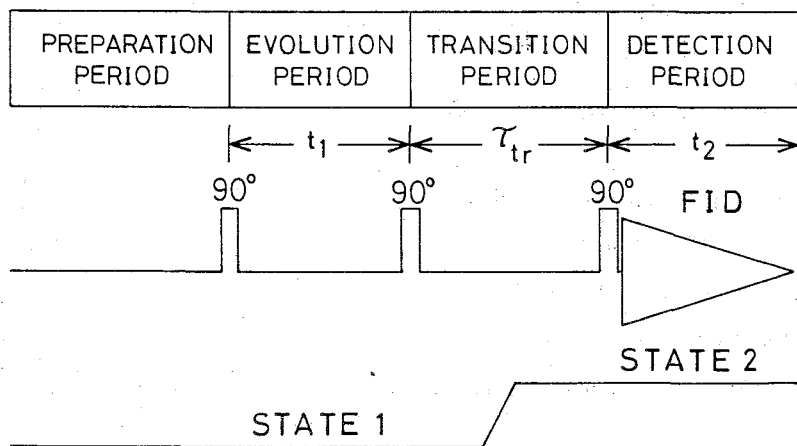


Fig. 2. The basic pulse sequence for State-Correlated 2D NMR Spectroscopy

4. 温度ジャンプNMRの応用例

(1) 反応過程の追跡 (Fig. 3)

秒程度の時間域で起こる反応過程の研究はこれまでNMRでは難しかった。例えば、ペプチドプロトンの重水素との交換反応はこれまで分程度の時間域での反応が測定の限度であったが、温度ジャンプNMRを用いれば、秒単位で測定できる (Fig.3)。

(2) 可逆的構造転移の研究 (Fig. 4)

タンパク質のfolding/unfoldingの過程は、ミリ秒から数十秒の範囲にわたることが知られている。Fig. 4 の例はタンパク質の協同的構造転移がNMRで観測されたもっとも速

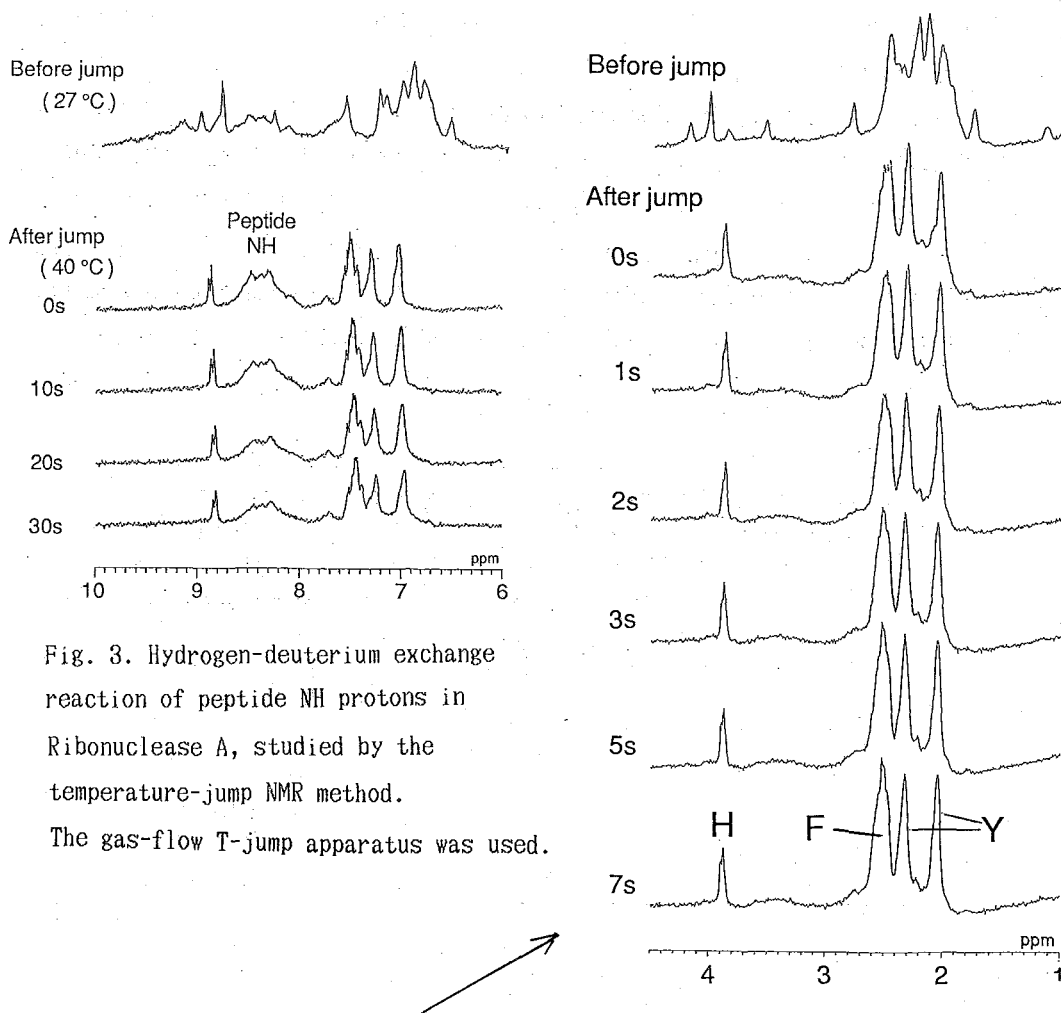


Fig. 3. Hydrogen-deuterium exchange reaction of peptide NH protons in Ribonuclease A, studied by the temperature-jump NMR method.

The gas-flow T-jump apparatus was used.

Fig. 4. Temperature-jump NMR spectra for Ribonuclease A (10% in D2O). The temperature was jumped from 30 °C to about 45 °C in 150 ms after which the spectra were recorded at every one second. The microwave T-jump NMR apparatus was used.

い例であろう。この条件の下では RNase A の unfolding が温度ジャンプ (150 ms) の 1 ミリ秒後にはすでに N 型構造は殆どなくなっていることを示している。また 1 秒以後は、もはやスペクトルには変化がなく、完全に D 型のものとなっている。しかし、1 ミリ秒と 1 秒との間には、スペクトルにわずかであるが変化がある。これは、1 ミリ秒後のスペクトルが N-D 構造転移の中間体のものである可能性を示す。

5. 状態相関 NMR の応用例

(1) 液晶-等方相間相関

最初の応用として、これを液晶-等方相間転移に適用し、液晶相では完全に重なっている複数のプロトンの信号 (プロトン間の双極子分裂パターン) を分離観測することに成功した (6)。通常の NMR 法を用いる限り、このような信号の分離は、水素核を重水素核で選択的に置換した試料を準備しなければ不可能である。状態相関 NMR は、そのような面倒な操作を一切必要とせず、重なった信号を簡単に分離できる画期的な方法である。これにより、液晶相での分子の配向や運動状態を克明に解析する手軽な方法が実現した。これについては L-22 の講演要旨を参照されたい。

(2) タンパク質の Native-Denatured Conformer 間の相関 (Fig.5)

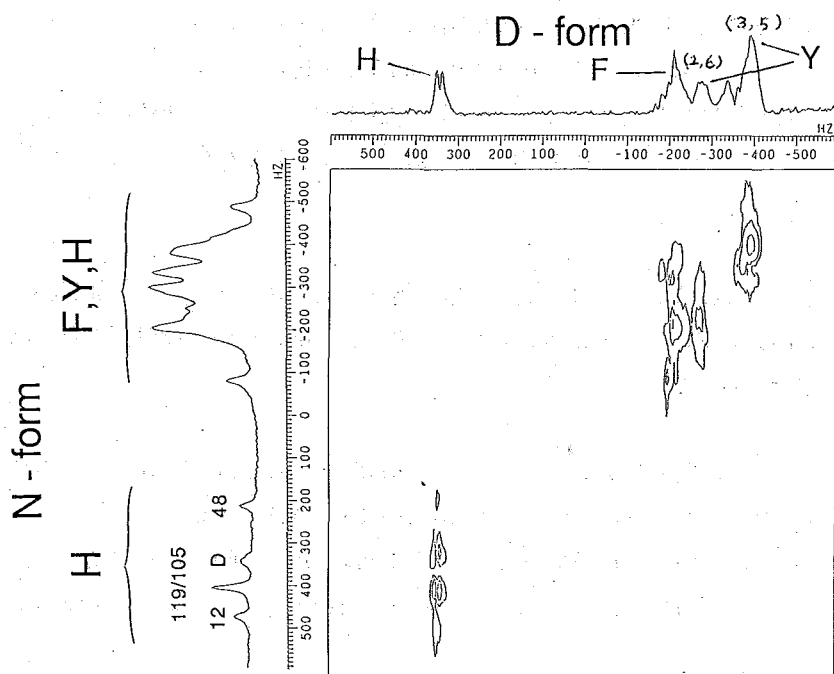


Fig. 5. Native state-denatured state correlated 2D NMR spectra of Ribonuclease A in the aromatic proton region.

Fig. 5 はタンパク質 RNase AのN型とD型間の間での相関NMRスペクトルである。二つの構造間での相関を示すNMRスペクトルは、これまで両者の共存系で適当な速度で交換が起こるとき、2D exchange NMRとして観測されてきた。この場合、両者のスペクトルが混在するため複雑であるばかりでなく、交換速度を平衡定数と独立に選ぶことはできない。温度ジャンプによる状態相関NMRの場合、ジャンプの温度幅を充分にとれば二つの構造が混在することはなく、スペクトルは簡単である。また、温度ジャンプの幅を選べば転移速度をある程度制御することもできる。

タンパク質の場合、D型でのアミノ酸の信号の位置は既知であるので、これを基にN型での信号のアミノ酸タイプへの帰属が可能である。さらにN型での信号が site-specific に帰属されている場合には、これを用いてD型信号の site-specific な帰属が可能となる（注意すれば、Fig.5でD状態で四つのHis-C2Hの信号が識別される。）。これは denatured state のタンパク質の構造の研究に役立つだろう。相関NMRはタンパク質の構造研究における有力な方法の一つとなる可能性をもっている。

6. 温度ジャンプおよび状態相関NMRの今後

温度ジャンプおよび状態相関NMRの応用はまだこれからであり、以上で示したものはほんの一部に過ぎない。今後その応用が見込まれる対象として、高分子（合成高分子、核酸、脂質など）の協同的構造転移、有機分子の構造異性体間転移、リガンドの結合解離反応があり、さらに将来、固相-液相間の相関NMRもその対象となろう。すなわち、温度ジャンプによって引き起こされるあらゆる可逆的構造転移における、キネティクスと信号の相関、分離、帰属に利用できる。さらに、状態相関NMRの概念は将来、温度以外の外的摂動（光、圧力ジャンプ、濃度ジャンプなど）による状態相関 NMRへと発展する可能性をもっている。

この研究は、協同研究者の内藤 晶、中谷 博、今成 司とともに、文部省科学研究費試験研究 の援助の下に行われたものである。また、一部、村田学術財団のお世話になった。記して感謝する。

1. A. D. Blum, S.H.Smallcomber, and R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.* 118, 305(1978).
2. M. Adler and H. A. Scheraga, *Biochemistry* 27, 2471 (1988).
3. K. Akasaka, A. Naito, H. Nakatani, and M. Imanari, *JEOL News* 25A, 2 (1989).
4. K. Akasaka, A. Naito, H. Nakatani, and M. Imanari, *Rev. Sci. Instrum.* 61, 66 (1990).
5. A. Naito, H. Nakatani, M. Imanari, and K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* 87, 429 (1990).
6. A. Naito, M. Imanari, and K. Akasaka, *J. Magn. Reson.*, in press.

P1 ~ P19, P44

P1

日本電子(株) 生体計測学研究室

○藤原敏道、永山国昭

Numerical Design of Composite Broadband Pulses for Quadrupole Echo in I=1 Systems.

Toshimichi Fujiwara and Kuniaki Nagayama

Biometrology Lab, JEOL Ltd. 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196, Japan

New broadband composite pulses for quadrupole echo in I=1 systems were designed systematically. First we generated 10^8 composite excitation pulses each of which was a combination of 45° pulses along the x, y, -x and -y axes. We selected broadband pulses for the echo from among the pulses generated, and further optimized the pulses numerically. Distortionless effective bandwidths of the pulses range from ± 1 to $\pm 4 \gamma B_1$ where B_1 is RF amplitude, and the largest bandwidth exceeds effective bandwidths of the pulses proposed so far. We also found pulses useful only for the first pulse of the echo sequence and pulses not phase-alternating which can not be derived by analogy with pulses for I=1/2 systems.

複合パルスを用いることによって、ラジオ波出力を増加させることなくより広い帯域を励起や反転、デカップリングすることができる。この方法を四極子分裂巾が最大約 250 kHzにもおよぶ重水素核つまり I = 1 のスピン系へ適用した。励起には四極子エコー法 ((CP₁) - Delay1 - (CP₂) - Delay2 - Acquisition) を用いて行うとして、その第 1 パルス (CP₁) と第 2 パルス (CP₂) を新たに設計した。通常の四極子エコー法では、(CP₁) = 90°x と (CP₂) = 90°y となっている。今までに四極子エコー用の広帯域パルスは、いくつか提案されているが、今回は新しい設計法に基づいて、より広い有効帯域を持った複合パルスを含め、多数のパルスを作ったので報告する。

パルス設計法

パルスの設計には、多次元パラメータ空間での最適値探索法を適用したが、少ない計算量で効率的に行えるよう、次の手順で系統的に行った。(1) 最初に、 $45^\circ x$ 、 $45^\circ y$ 、 $45^\circ -x$ 、 $45^\circ -y$ のパルスを組み合わせて 10^{10} 個の複合パルスを作り、その中から四極子結合定数がゼロの時、励起パルスとして

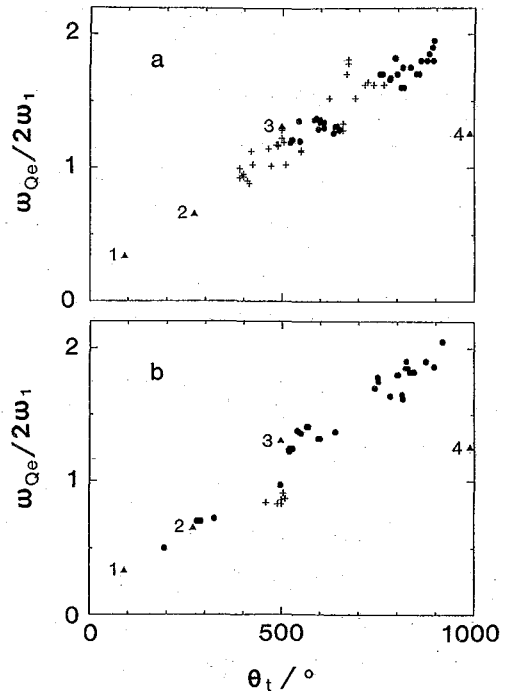


図 1. 複合パルスのパルス巾と規格化した有効励起帯域との関係。a と b は、それぞれ四極子エコーの第 1 パルスと第 2 パルスに対応する。●は 180° ラジオ波移相のみを用いた複合パルス、×はそれら以外の複合パルスに対応する。▲の中で 1 は 90° パルスに対応し、他の▲は既存の複合パルスに対応する。

使える 10^8 個のパルスを選んだ。(2)次に、そのパルスの中から、 xy 平面でのシグナル位相を無視した場合に、広帯域に磁化を励起できるパルスや再結像するパルスを 10^4 個選んだ。(3)この次にその中から四極子エコー用パルスとしてシグナル位相の乱れの小さいものを 10^3 個選び、それらの複合パルスについては、さらにパルス巾とラジオ波位相を変数として広帯域にわたってシグナル位相の乱れを少なく出来るようパルスを最適化した。(4)最後に、それらのうちのすぐれた 100 のパルスについては、励起されるべき帯域を変えて最適化を繰り返し、励起された同位相磁化 M_y の平均が $0.98 M_0$ (M_0 は平衡磁化) の大きさになる帯域を有効励起帯域とし、パルスのパラメータを最終的に決めた。

結果と考察

上記の方法で設計した複合パルスの効率を見るため有効励起帯域を複合パルスの全パルス巾に対して示したのが図1である。図のように有効励起帯域とパルス巾は比例していることがわかる。このことから、励起できる帯域の上限は複合パルスの中によってほぼ決まると考えられる。これは、励起などの不完全性が四極子結合定数に依存して大きければ大きいほど、その補正には長いパルスを用いたスピンの大きな回転を要するからだろう。

上で述べた設計では第1パルスと第2パルスはその機能が励起と再結像と言うように異なるので、それぞれ独立して設計した。第1パルスとしてすぐれたものの中には図1に示すように複合パルス中に 180° 以外のラジオ波位相シフトを持ったものもあるが、第2パルスは一般に 180° 以外の位相シフトを導入してもよくならないことがわかる。 180° 位相シフトのみ使う複合パルスの多くは正味のフリップ角が 90° であり、ラジオ波強度の不均一性に対しても強いことがわかる。新たに設計したパルスと既存のパルスを用いた四

極子エコーによる励起の数値シミュレーションを図2に示す。 90° パルスや既存の複合パルスによるエコー(図2 a, b)に比べ、新たに設計した複合パルスによるエコー(図2 c, d)では、広い帯域にわたってシグナル位相を乱すことなく励起できることがわかる。

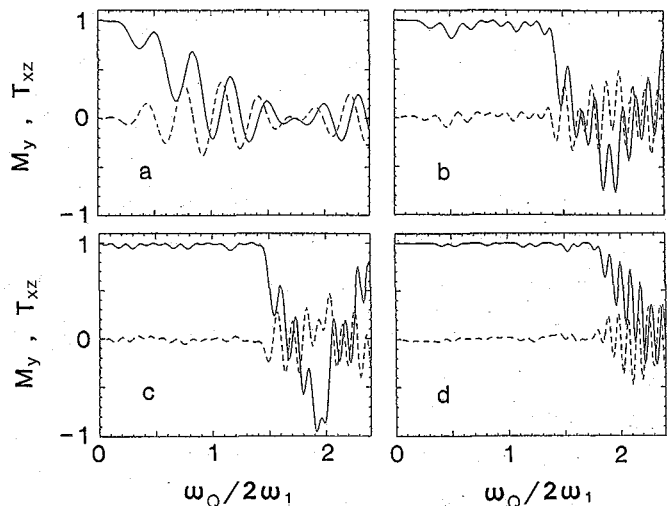


図2. 四極子エコーによって励起された同位相磁化 M_y と、反位相磁化 $T_{xz} = \langle I_x I_z + I_z I_x \rangle$ の帯域特性を規格化した結合定数に対して示した図。a は一般に使用される 90° パルスによるもの、b は Raleigh らによる複合パルス(文献1)、c と d は今回作った複合パルスで、それぞれ $31^\circ \overline{61^\circ} 74^\circ \overline{73^\circ} 155^\circ \overline{75^\circ} 65^\circ \overline{31^\circ}$ と $83^\circ \overline{75^\circ} 158^\circ \overline{66^\circ} 117^\circ \overline{42^\circ} 66^\circ \overline{158^\circ} 75^\circ \overline{66^\circ}$ である。ここで $\overline{\quad}$ は 180° 移相したラジオ波パルスを表す。

文献 1, D.P.Raleigh, E.T.Olejniczak, R.G.Griffin, J.Magn.Reson. 81,455(1989).

Quantitative analysis of ^{31}P NMR spectra estimated by linear prediction z-transform

Takanori Uchiyama, Haruyuki Minamitani

(Inst. of Biomedical Engineering, Fac. of Science and Technology, Keio University)

Linear prediction z-transform (LPZAR) method was applied to quantitative analysis of ^{31}P NMR spectra. Low prediction order (twice higher than that given by Akaike's final prediction error criterion) estimation gives broad peak spectra. High prediction order (three times higher than that by Akaike's FPE) estimation gives narrow peak spectra which have correct peak splitting. However both low and high order estimation spectra have almost same peak area. In conclusion, LPZAR is not sensitive to estimation order and it is useful for quantitative analysis of ^{31}P NMR spectra.

1. はじめに

我々は昨年、特異値分解を伴う自己回帰モデル適合によるスペクトル推定法を ^{31}P NMRスペクトルに適用し、位相情報を失うことなく分解能の高いスペクトルが得られることを示した¹⁾。また、推定次数の値として許される範囲がMEM(Maximum entropy methods)に比べて広いことを示した。しかしながら、特異値分解は計算の上からは時間、記憶容量ともに多く必要とする欠点を持っている。また、推定次数は比較的広い範囲の値が許されるものの、FID信号のSN比が低い場合には、特異値分解した際のランクの決定に困難を伴うことがある。ランクの値はピークの数に直接影響するため、SN比が低い場合には本来存在するべきピークが失われてしまう可能性がある。そこで我々は、予測係数の推定にLevinsonの漸化式を用いることができるため、計算上やランク決定に対する問題を回避できるTangらによって提案された線型予測z変換(Linear prediction z-transform, LPZAR)法²⁾を ^{31}P NMRスペクトルの推定に適用し、その定量性について検討した。

2. 方法

試料にはリン化合物の水溶液(2mM KH_2PO_4 , 2mM Glucose 6-phosphate, 2mM adenosine triphosphate, 80mM KCl, 30mM NaCl, 10mM MgCl_2 , Tris-NaOH pH7.2)およびWistar系雄性ラット(20週齢)の摘出心臓をLangendorff式灌流したものを用いた。NMR分光計は多目的低磁場の装置(大塚電子 BEM250/80)を用いた。測定条件は、共鳴周波数34.53MHz, データ点数1024点とした。フリップ角はリン化合物溶液の測定では 90° , 灌流心臓ではパルス照射間隔が3秒のときは 45° , 1秒のときは 30° とした。積算は60回とした。

FFTでは、8192点まで零フィリングし、30Hzのラインブロードニングを行なった後にフーリエ変換した。

LPZARでは、観測されたFID信号を(1)式の前進予測式で近似する。

$$x_n = - \sum_{m=1}^M a_m x_{n-m} + w_n, \quad n = M, M+1, \dots, N-1 \quad (1)$$

ここで x_n はサンプリングされたFID信号の n 番目、 a_m は M 次の予測係数の m 番目、 w_n は n 番目の観測値に含まれるノイズである。予測係数 a_m をLevinsonの漸化式によって算出した後、(2)式によってスペクトル $S(z)$ を計算する。

$$\begin{aligned}
 S(z) &= H(z)/G(z), \\
 G(z) &= \sum_{m=0}^M a_m z^{-m}, \\
 H(z) &= \sum_{m=0}^{M-1} c_m z^{-m}, \\
 c_m &= \sum_{n=0}^m a_n x_{m-n}, \\
 a_0 &\equiv 1
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

FFTの場合と異なり、FID信号には前処理は行なわなかった。ラット灌流心の場合は、磁場の均一性を保ち難くノイズが多くなるので、信号成分の強度が大きいFID信号の初めの部分(2から256番目まで)255点からスペクトルを推定した。

推定次数の決定には、赤池の最終予測誤差(Final prediction error, FPE)最小を参考にしたが、FPE最小の条件が与える次数では分解能が不十分であるため、経験的にFPEが与える次数の2~3倍の値を用いた。

まず、推定次数の選び方によってピーク面積にどのような影響が現れるか調べるため、前述の溶液のFID信号から50, 75, 100, 125, 150, 175, 200次でスペクトルを推定した。推定したスペクトルからローレンツ曲線をフィッティングし波形分離によってピーク面積を求めた。

次にラット灌流心のFID信号に適用し、虚血および再灌流時のpH変化とPiおよびPCrの信号強度の変化を解析した。虚血時間は5分間とし、1分間の積算時間でスペクトルを連続測定した。

3. 結果および考察

リン化合物溶液のスペクトルをFig.1に示した。(a)はFFT、(b)および(c)はLPZARによるスペクトルである。(b)は推定次数75次、(c)は推定次数175次である。ピークはそれぞれ(1)G6P, (2)Pi, (3) γ -ATP, (4) α -ATP, (5) β -ATPを示す。LPZARによるスペクトルはノイズが著しく抑制されており、しかも推定次数が低い(b)のスペクトルでさえFFTによるスペクトルに比べてピークの線幅が狭く分解能が高いことが分かる。但し、FFTでは前処理でラインブロードニングを行なっているため、ピークの線幅だけでは議論できない。LPZARは予測係数の算出方法がBurg法と同じであるため、Burg法と同様に推定次数が高くなるとピークが分裂する。175次では、 α -ATPおよび β -ATPはそれぞれ2本に分裂し、 β -ATPは3本に分裂している。これは実際に観測されるべきピークの分裂であり、

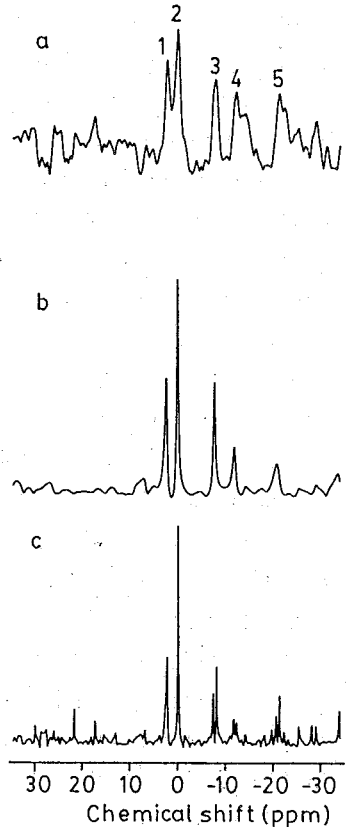


Fig. 1 リン化合物溶液の ^{31}P NMRスペクトル

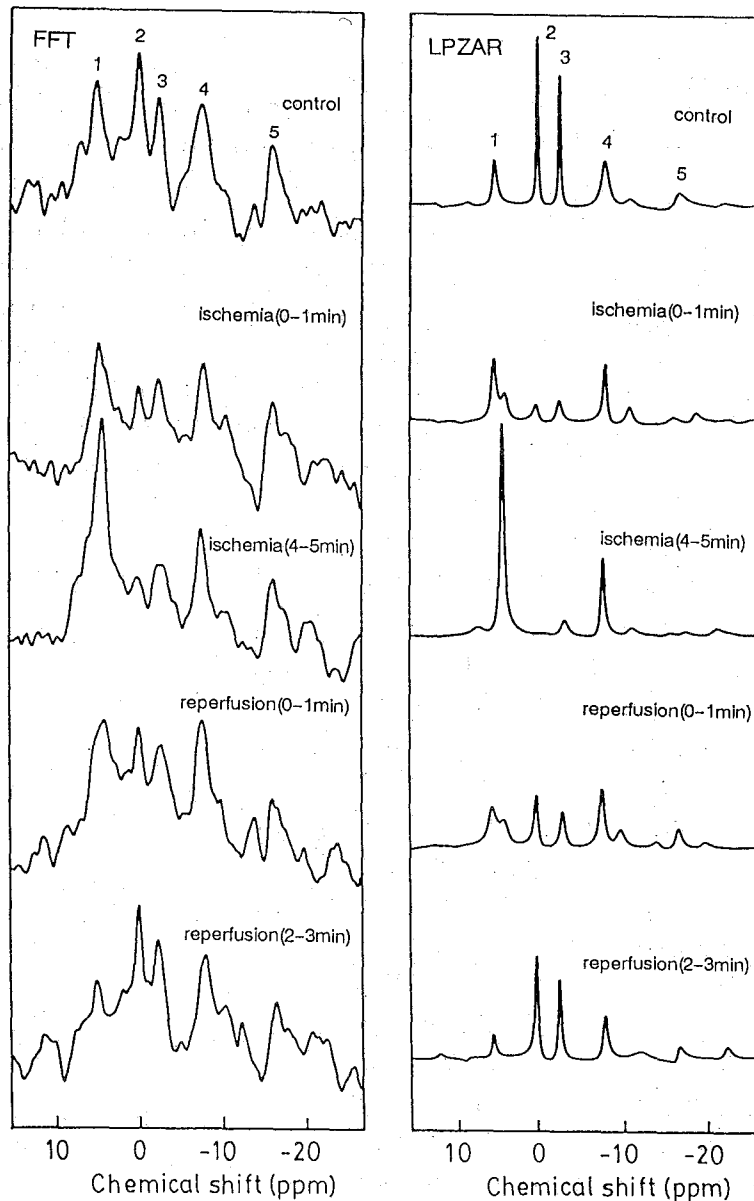


Fig. 2 虚血・再灌流時のラット灌流心の ^{31}P NMRスペクトル

矛盾しない。十分高い分解能でスペクトルを推定するためには次数は高い方が好ましいが、高すぎると本来存在しないピークを生じやすくなるため、我々はFEP最小の条件で与えられる次数の2~3倍を適当であるとした。

各推定次数におけるピークの化学シフトの値は、FFTにおける分解能の範囲内($\pm 0.14\text{ppm}$)で一致した。ピーク面積をTable 1に示した。Piのピーク面積の平均値を100%として示した。複数のピークに分裂したピークは、それらのピーク面積の和とした。50次から200次という広い推定次数の範囲でピーク面積はほぼ一定に保たれている。

Table 1 推定次数とピーク面積

| 物質 | 相対ピーク面積 |
|-------|-------------|
| G6P | 77.8 ± 6.1 |
| Pi | 100.0 ± 5.9 |
| γ-ATP | 70.0 ± 6.1 |
| α-ATP | 50.6 ± 6.2 |
| β-ATP | 50.2 ± 5.2 |

推定していることによると考えられる。

さらに、LPZARによるスペクトルでは、虚血直後および再灌流直後のスペクトルにおいてPiの化学シフトを示す領域にピークが2本観測されている。これらはいずれもPiに由来する考えられ、虚血直後および灌流直後には心筋内にpHが高い領域と低い領域が存在することを示している。これは、虚血直後の場合は血管から離れた内部の細胞から酸性化が進行すると考えられる。再灌流の場合は血管に近い部分からpHが回復し、内部の細胞のpHが回復するには時間がかかると考えられる。虚血直後のpHは、pH7.2およびpH6.2であった。再灌流直後のpHは、pH7.4およびpH6.4であった。Fig.3にLPZARによるスペクトルから得られたPiのピーク面積の経時変化を示した。FFTによるスペクトルでは分解能が低いため定量解析は困難であった。虚血時に観測されるPiの著しい増加と再灌流によってもとのレベルに回復する過程が観測されている。

以上のことから、LPAZRは³¹P NMRスペクトルの定量解析に有効であると考えられる。

文献

- 1) 内山, 南谷, 坂田: 第28回NMR討論会講演要旨集, pp.175-176, (1989)東京.
- 2) J. Tang and J. R. Norris, J. Magn. Reson., **78**, 23-30 (1988).

ラット灌流心のスペクトルをFig.2に示した。上段から虚血前, 虚血直後から1分, 虚血後4~5分, 再灌流直後から1分, 再灌流後2から3分に得られたスペクトルである。ピークはそれぞれ, (1)Pi, (2)PCr, (3)γ-ATP, (4)α-ATP, (5)β-ATPに由来する。速い代謝を追跡するため30°パルスで60回積算と測定条件が厳しく, FFTによるスペクトルの分解能は低い。

一方, LPZARによるスペクトルは, FIDのSN比が小さいにも関わらず, 分解能の高いスペクトルが得られている。これは, FID信号の初期部分の信号成分が多く含まれている部分だけを用いてスペクトルを

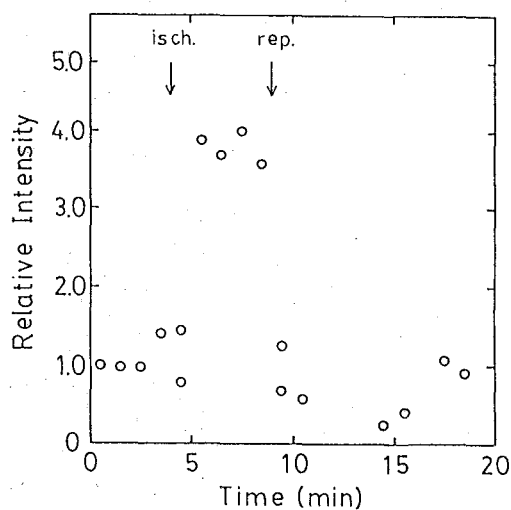


Fig. 3 細胞内Piの経時変化

P3

スピンシミュレータの開発とその応用

○藤田 真、寺下 衛作、増田 潤一

(株)島津製作所 第一科学計測事業部 技術部

Development of a Versatile Spin Simulation Program

Shin Fujita, Eisaku Terashita and Jun-ichi Masuda

SHIMADZU CORPORATION

A versatile spin simulation program was developed. This window based program can keep track of the change in density matrix elements at each step of pulse sequences, making it possible to analyze mechanisms of complex multiple pulse sequences. In principle, it can also be used for 2D NMR experiments. The program can take into account the strong spin coupling effects and can treat up to two kinds of nuclei.

The authors are using it for pedagogical purpose as well as for research.

1. 目的

近年では2次元NMRに代表されるようにマルチ・パルスNMR法がたいへんポピュラーになってきた。磁化移動などを行なうこれらのマルチ・パルス法理解のためには、どうしてもスピン空間での密度行列のようすを追っていく必要がある。これは原理的には有限次元の行列計算を行えば良いのであるから、例えば、プロダクト・オペレータ法(1)などにより、人間が行なっていくことも可能である。現在ある多くのパルス・シーケンスは実際、このようにして開発されたものである。ところが、計算に関与してくるスピンの数が多くなってきたり、あるいはスピン結合の強結合の効果なども厳密に取り扱いたいという状況になると、手計算では手に負えなくなるというのが実際のところである。

そこで我々はスピン密度行列を計算するプログラムを開発し、上記のような状況下でも各種のパルス・シーケンスのもとでこれがどのように変化するかを追いかけていくことができるようにした。このプログラムは各種のパルス・シーケンスの動作チェックに用いることができるとともに、密度行列をこれから勉強していこうという学生、研究者のための補助ツールになることを筆者らは期待している。

以下にプログラムの機能とアルゴリズムを紹介する。

2. 機能とアルゴリズム

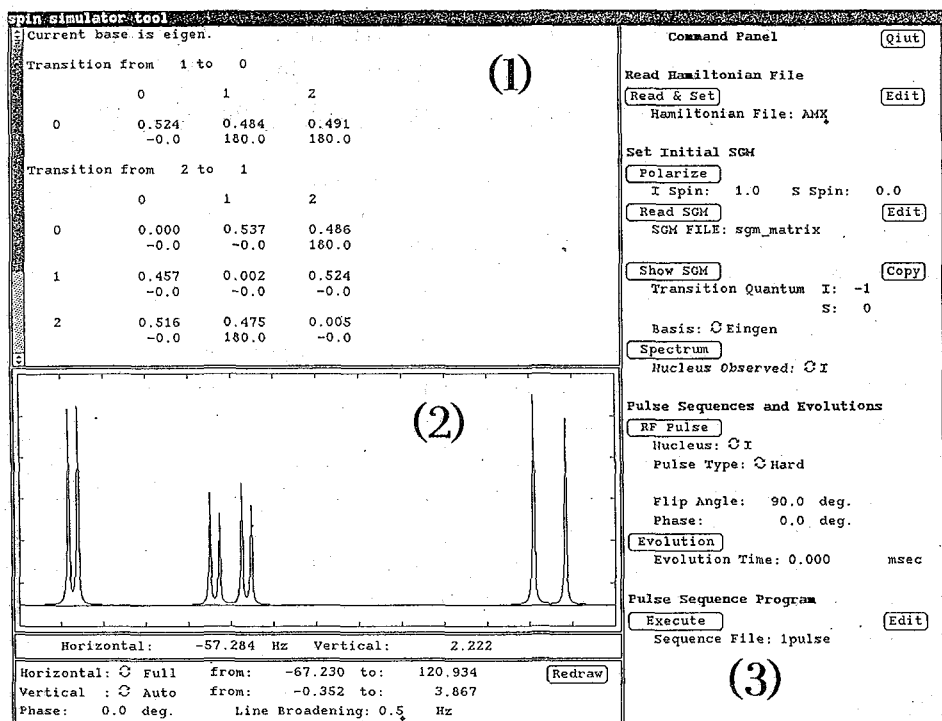


図1

プログラムの概観を図1に示す。当プログラムはサンマイクロシステム社製のワークステーション上で動作させることができる。ウィンドウ・ベースのプログラムであり、Sunviewウィンドウの動作環境が必要である。ウィンドウは大きく3つのサブウィンドウに分かれている。それは、1) 密度行列要素を表示するテキスト・ウィンドウ、2) 対応するNMRスペクトルを表示するキャンバス・ウィンドウ、それに3) 種々の操作をマウスを用いて指示することのできるパネル・ウィンドウである。

プログラムをスタートさせるには、まず、スピン・ハミルトニアンをセットする。ケミカルシフト値とスピン結合値はハミルトニアン・ファイルに保存してあるので、これを読み込む(図2)。必要に応じてテキスト・サブウィンドウを開いて編集し直すことができる。プログラムは現段階では2核種系まで取り扱えるようになっている。C-Hスピン系などもシミュレーションすることができる。強結合の効果を正確に取り扱えるようにするため、プログラムは入力されたハミルトニアンの対角化を行なうが、対角化のアルゴリズムとしてはハウスホルダー変換とQR法(2)を採用した。これは、この方法が大きな行列の対角化を高速で行えること、また、固有値のみでなく、このあとの計算にも必要な対角化ユニタリ行列をいっしょに求めてやることのできることに理由がある。固有値、固有状態の計算結果は、プリンターから出力され、同時にスピン系に対応する基本的な1パルスのNMRスペ

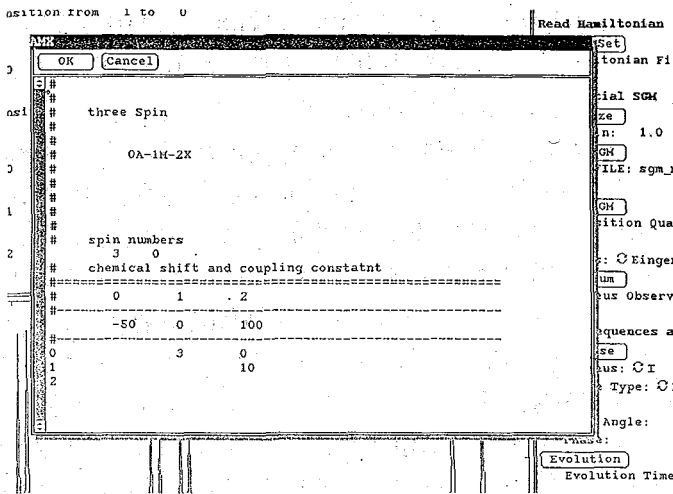


図2

っても良いし、あるいは密度行列ファイルから直接、各要素を読み込ませることもできる。後者は2次元NMRのミキシング・パルスの動作を確認するときなどに用いると便利である。次に、パルスを打ってみよう。パルスはI核あるいはS核のいずれへのものかを選択できる。また、ハード・パルスで全スピンを影響することもできるし、ソフト・パルスによってある指定した核に限ってフリップさせてやってもよい。もちろん、パルスのフリップ角度、位相も任意に指定してやることができる。ここで、現プログラムの限界になるが、パルスの強度は指定できない。パルス強度はケミカルシフトによる周波数オフセットに比べて十分に大きなものとして計算されており、現実にはオフセットのために生じるアーチファクトなどはこのプログラムで評価することはできない。このあと、スピンをハミルトニアンの影響下で発展させてやる。この発展時間も任意に指定することができる。

これらの操作中での密度行列のようすはいつでもテキスト・ウィンドウに表示させることができる。表示形式はプロダクト・オペレーターの方法ではなく、個々の遷移を

クトルがキャンバス・ウィンドウに表示される。

この段階でパネル・ウィンドウを用いて各種のコマンドでスピン系を操作できるようになっている。基本的な操作としては例えば次のようなものが挙げられる。まず、密度行列の初期値を定義する。これは、通常のNMR実験のときのようにz方向に磁化させてや

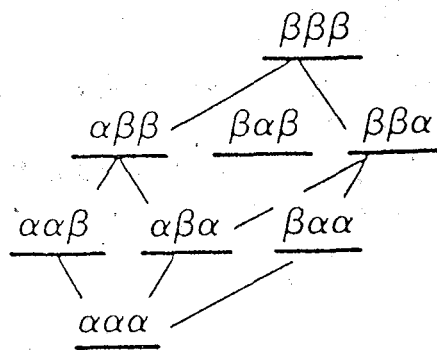


図3

直接表示する方法を採った。こうすれば、スピンの固有状態との対応が明白である(図3)。同時に、それぞれの密度行列状態に対応したNMRスペクトルもキャンバス・ウィンドウに表示することができる。

これらの操作を順番に何回か繰り返していけば、基本的にはどのようなパルスシーケンスにも1ステップずつ対応できることが判るであろう。現段階で2核種系まで対応しているので、DEPTなど異核種を含む実験もシミュレーションできる。また、2次元NMRもこれを、プレバレーション、エボリューション、ミキシング、ディテクションなどの各段階に分けて考えれば、十分に解析可能なはずである。この他、パルス・シーケンス・プログラム機能では、一連のコマンド操作の内容をシーケンス・ファイルに書き込んでおき、これを読み込み実行できる。頻繁に利用するシーケンスをマクロ化することが可能である。多量子遷移励起のシーケンスなどに用いれば便利であろう。

3. 応用例

現在、我々はこのプログラムを用いて、種々のパルスシーケンスを検討しているところである。討論会では、実験データも併せて当プログラムの応用例を示したいと考えている。また、要望があればプログラムを実際に動作してのデモンストレーションも当日会場で行ないたい。

4. まとめ

マルチ・パルス・シーケンスに対応できるスピン・シミュレーション・プログラムを作成した。従来からのものと比べると、その応用範囲は大きく広がったと考えられる。パルスシーケンスの解析に、また、NMR法の教育用に利用できると考えられる。

- (1) O. W. Sorensen et al., Progress in NMR Spectroscopy, vol. 16, 163, 1983
- (2) 戸川 隼人、マトリックスの数値計算(オーム社) p 159, p 184

P4

シムコイルの新しい設計法と試作

藤田 真、○小出 淳一

(株)島津製作所 第一科学計測事業部 技術部

A Novel Design Method of NMR Shimcoils

Shin Fujita and Jun-ichi Koide, SHIMADZU CORPORATION

A novel design method of NMR magnet shimcoil is developed. This method makes it possible to design shimcoil patterns which produce satisfactory shim field strength distribution over a large volume of space. This shimcoil is expected to be useful in combination with newly developed special type probes which have unique sample container shapes and locations and might not be shimmed well by conventional shimcoils.

Computational theory as well as some experimental results will be presented.

1. 目的

今回我々はなるべく広い空間域にわたって良好なシム磁場を発生させることのできるシムコイルの設計を試みた。設計方法は筆者のうち1名がMRIの傾斜磁場コイルを設計した際に考案した計算アルゴリズム(1)を発展させたものである(MRIの傾斜コイルは十分に広い範囲で直線性の良い傾斜磁場を発生できることが必須条件である。そうでないと画像が歪んで見えてしまう)。当発表では設計のための計算原理および、得られたシムコイルのパターン、シム磁場の空間分布のようすなどを、いくつかの例とともに示したい。

2. 設計原理

シムコイルなどの磁場発生装置の設計は通常、Biot-Savartの法則を用いて行なうことが多い。このとき、電流を流す複数の離散的なワイヤ線要素を適当に配置させ、発生磁場を計算する。ワイヤの配置位置に関するいくつかのパラメータを変化させて、例えば中心付近で適当な磁場強度分布ができるようにする。

このとき磁場の評価空間Vを適当に大きくとってやり(図1)広い範囲に渡って良いシム磁場を発生させてやろうとすると、ワイヤ線要素の数を増やし、パラメータ数を多くしなければなかなかうまくいかないことがわかる。パラメータ数を増すにしてもどの部分に自由度を持たせれば効果的であるの

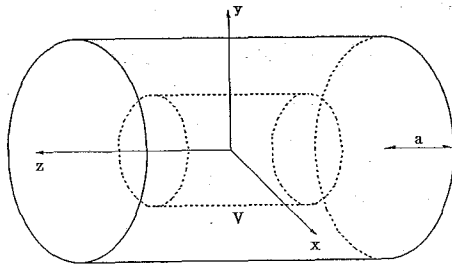


図 1

か明白でないし、また、いたずらに自由度を増やすと、あとで最小自乗法などによって最適パラメータを求めたときにひどく複雑で単位電流あたりの磁場発生効率の悪いシムコイル・パターンができてしまう。

そこで我々は、ワイヤ線要素の個数を増やしていく代わりに、最初から電流が連続分布しているものとして取り扱うことにした。満足できる設計値が得られたのち、この連続分布した電流

を離散的なワイヤ線要素で近似してやれば、シムコイルのパターンを得ることができる。

今、超伝導マグネット・システムでのシムコイルを考えることにすれば、コイルは円筒表面に巻かれることになる。この円筒表面上に電流がある分布しているとき内部に発生する磁場はどのように分布するであろうか。これは(1)による流れ関数法によって求めることができる。

円筒の内部、外部(円筒表面は含まない)には電流分布が無いことに注目すると、それぞれにおいて磁場スカラー・ポテンシャル(磁位)が存在することがわかる。

$$\vec{B}_i = -\text{grad}(\Phi_i) \quad (i=0 \text{ (内)}, 1 \text{ (外)})$$

計算によると、円筒表面境界における Φ_i の差が表面電流分布に対応する流れ関数になっている。

$$\Psi = (1/\mu) (\Phi_0 - \Phi_1) |_{r=a}$$

流れ関数とは湧き出し、吸い込み口のない2次元流を表わす方法で、実際の電流はその等高線方向に流れることになる(2)。また、電流密度は流れ関数の勾配に比例しているので、後にこの電流分布を離散ワイヤ線要素で近似するときには得られた流れ関数の等間隔等高線に沿ってワイヤを配置すれば良いことになる(図2)。

上の2つの式から、流れ関数と内部磁場の間に次の形の関係式を導くことができる。

$$\vec{B}_0(x) = \int dS \vec{T}(x, s) * \Psi(s)$$

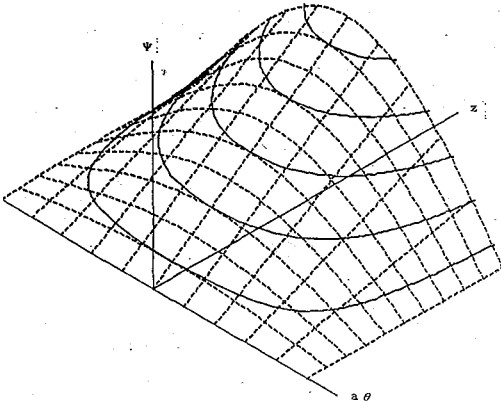


図 2

ここで dS は円筒表面上での面積分を表わしている。変換核関数 T をあらかじめ計算してテーブルとして持っておけば、上式を計算機によって評価するのは容易である。また、この式は Ψ に関して線型であるので、あらかじめ決めておいたターゲット磁場（得たいシム磁場強度分布）に最も近い \vec{B}_0 を発生させる Ψ を最小自乗法で計算することも可能である。ところが、前にも述べた理由により、最小自乗法では必ずしも満足なシムコイル・パターンを得ることがで

きない。そこで、我々は、変分法を用いることにした。

最初に適当な流れ関数の初期形 Ψ をとり、これを用いて内部磁場 \vec{B}_0 を計算する。次に Ψ を微小量だけ変化させ、 $\Psi + \delta\Psi$ として対応する \vec{B}_0 がよりターゲット磁場に近づくようにする。この操作を満足なシム磁場が得られるまで繰り返していく。この方法であると、流れ関数の形をモニターしながらシムコイル・パターンを設計できるので、パターンが必要以上に複雑化することを防ぐことができる。また、パターンに製作上の制約からくる条件を課することも容易にできる。

z 3 シムコイル・パターンの設計のようすを図 3 に示す。初期形ではターゲット磁場から大きくずれていた \vec{B}_0 強度分布が変分法によつてターゲット磁場に近づいていくことがわかる。

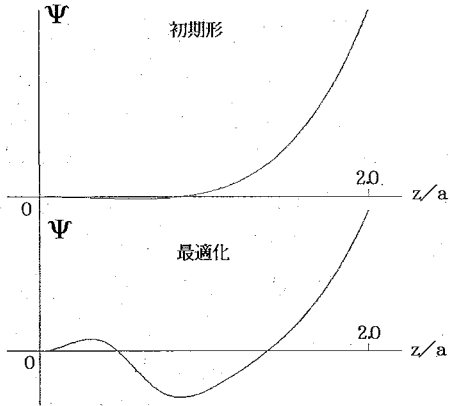
得られた代表的なシムコイル・パターンを図 4 に示す。

3. まとめ

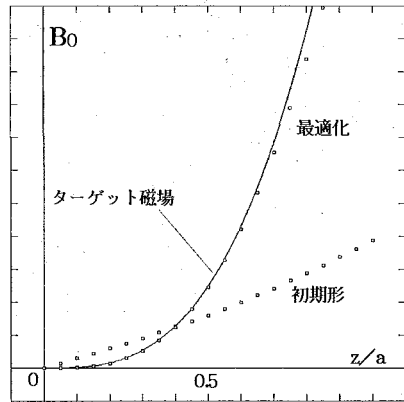
新しい設計法によって、広い空間域にわたって良好なシム磁場を発生させることのできるシムコイルが設計できることがわかった。今後はこのシムコイルの特徴をいろいろなプローブに試していきたい。

参考文献:

- (1) S. Fujita et al., SMRM Book of Abstracts vol. 1, p27, 1988
- (2) 今井 功, 流体力学 (岩波全書 1970) p63



z3シム流れ関数



発生磁場B0

図 3

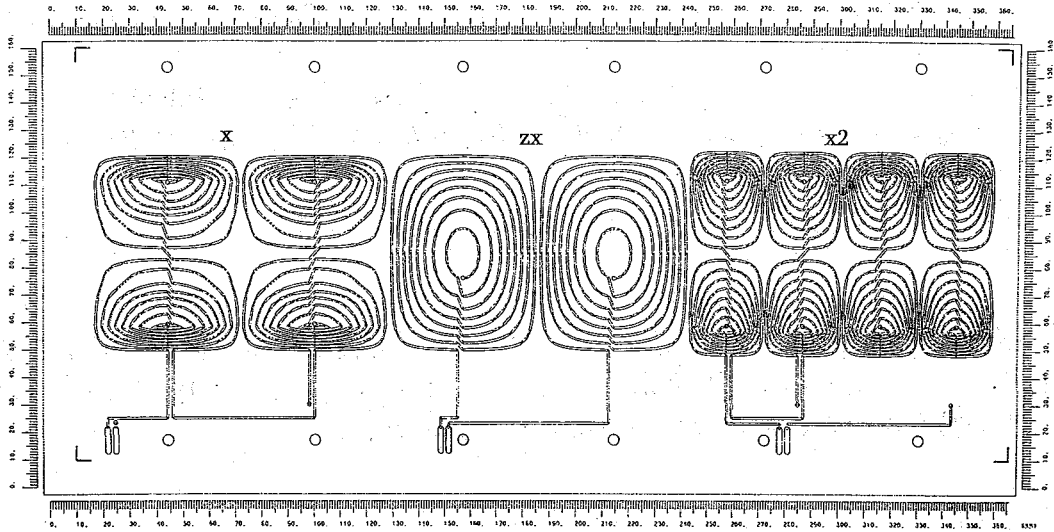


図 4

○関原 謙介、 大山* 永昭*

(株)日立製作所 中央研究所、 *東京工業大学 像情報工学研究施設

Parameter Estimation for Magnetic Resonance Spectroscopy.

Method When Exact Number of Components is Unknown.

Kensuke Sekihara, and Nagaaki Ohyama*

Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

*Imaging Science and Engineering Lab., Tokyo Institute of Technology

A Method has been proposed to estimate spectral parameters when the exact number of spectral components is unknown. This method incorporates a priori information regarding the maximum number of components that can be contained in a spectrum. With this method, the number of spectral components is, first, set larger than the above maximum number. Then, the optimum estimates are calculated by minimizing the sum of the amplitude estimates as well as minimizing the degree of mismatching between an estimated FID and a measured one. Computer simulation clearly demonstrates the effectiveness of the proposed method.

緒言

我々は、先に最適化演算にsimulated annealingと呼ばれる手法(1)を用い、スペクトルパラメータについての先験情報を有効に利用し、SN比の悪いFIDからでもこれらパラメータの正確な値を推定する手法を開発した(2)。この方法では、スペクトル成分の正確な個数が既知でなければならなかったが、今回、この手法をさらに発展させ、スペクトル成分の正確な個数が未知の場合でもその概略値を知ることができればスペクトルパラメータの正確な値を推定できる手法を開発した(3)ので報告する。

方法

スペクトルに含まれる成分の数をKとするとFIDは

$$F(t) = \sum_{k=1}^K A_k e^{-b_k t} \exp[i(\omega_k t + \phi_k)] \quad [1]$$

とモデル化できる。ここでパラメータ A_k , b_k , ω_k , ϕ_k はk番目のスペクトル成分の振幅、減衰定数、共鳴周波数、位相項を示す。本方法においてはまず、Kを予想される値よりも大きく設定し、次式で示されるコスト関数

$$E = \sum_{n=0}^{N-1} |F_M(t_n) - \hat{F}(t_n)|^2 + w \sum_{k=1}^K |\hat{A}_k|^\alpha \quad [2]$$

を最小にする上記スペクトルパラメータの値を求める。ここで、 $\hat{F}(t_n)$ はこれらパラメータの推定値を用いて計算した時刻 t_n におけるFIDであり、 $F_M(t_n)$ はFIDの実際の測定値、 w は定数、また右辺第2項の α は $0 < \alpha < 1$ なる実数である。先の提案と異なるのは[2]式右辺第2項の存在である。この項は振幅推定値の総和に関係した量であり、Kを実際の値よりも大きく設定することにより生じる過剰な自由度を抑える働きをする。

ここで[2]式の α の働きについては次のように説明できる。まず、スペクトルの ω_k の周波数位置に A_k の振幅を持つ成分が存在したとする。推定においては、スペクトルに実際に含まれるよりも多くの成分を仮定するため、 ω_k の周波数位置に2個以上の成分が推定されてしまうこと

が起こりうる。右辺第1項を最小にすることによりこれらスペクトル成分の振幅推定値の和は A_k に等しくなる。さらに、 $0 < \alpha < 1$ と設定しているので、第2項を最小にすることにより ω_k に推定される各成分の振幅のうち、1つの成分の振幅が正しい値 A_k に等しくなり、他の成分の振幅はほぼゼロとすることができる。

コンピュータシミュレーション

本提案の有効性を示すため、コンピュータシミュレーションを行った。まず、表1に示すスペクトルパラメータを仮定してデータ発生を行い、次に7本のスペクトル成分を仮定し推定を行なった。推定に際しては推定値に制約を設け、この範囲内で最適推定値を求めた。特に、実際には2本のスペクトル成分しか存在しない周波数領域600-760Hzに5本のスペクトル成分を仮定して推定を行った。推定結果を表2および表3に示す。

表2は[2]式第2項を用いない ($w=0$ とした) 場合の推定結果であり、表3は[2]式を用い、 $w=1$ 、 $\alpha=1/2$ とした場合の推定結果である。表2の結果では、上記周波数範囲に仮定された成分のうち第3成分を除きすべて間違った推定値に達しているのに対し、表3の結果では正しい推定値に達した2つの成分を除き振幅値がすべて非常に小さくなっており、本提案の有効性が示されている。

参考文献

- (1) S.Kirkpatrick et al., Science 13, 671 (1983).
- (2) K.Sekihara et al., Magn.Reson.Med.13,332 (1990).
- (3) K.Sekihara et al., J.Magn.Reson. in press.

表1 データ発生で仮定されたスペクトルパラメータ

| component | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------------|-------|-------|------|------|
| $\omega_k/2\pi$ (Hz) | -100 | 200 | 670 | 700 |
| A_k | 0.5 | 1.0 | 0.5 | 2.0 |
| b_k (sec ⁻¹) | 10.0 | 16.7 | 43.4 | 50.0 |
| ϕ_k (rad) | -0.63 | -0.04 | 0.88 | 0.94 |

表2 [2]式右辺第2項を用いない場合の推定結果

| component | 1 | 2 | assumed in 600-760Hz | | | | |
|----------------------------------|-------|------|----------------------|------|------|------|------|
| | | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| $\hat{\omega}_k/2\pi$ (Hz) | -99.8 | 200 | 671 | 702 | 693 | 695 | 694 |
| \hat{A}_k | 0.54 | 0.97 | 0.51 | 0.94 | 0.91 | 1.39 | 0.66 |
| \hat{b}_k (sec ⁻¹) | 13.3 | 16.7 | 33.3 | 33.4 | 52.5 | 43.8 | 44.6 |

表3 本提案による推定結果

| component | 1 | 2 | assumed in 600-760Hz | | | | |
|----------------------------------|-------|------|----------------------|--------------------|--------------------|------|------|
| | | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| $\hat{\omega}_k/2\pi$ (Hz) | -99.8 | 200 | 700 | 672 | 706 | 670 | 701 |
| \hat{A}_k | 0.54 | 0.96 | 2×10^{-4} | 5×10^{-5} | 8×10^{-5} | 0.49 | 1.93 |
| \hat{b}_k (sec ⁻¹) | 13.3 | 16.4 | 50.6 | 44.5 | 40.5 | 34.0 | 47.0 |

P6

東大農、東大応微研 ○降旗一夫、瀬戸治男

A New Improved HMBC Technique with t_1 Noise Suppression.

Kazuo Furihata and Haruo Seto*

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo

*Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo

Heteronuclear Multiple Bonds Correlation (HMBC) is one of the most useful NMR techniques for structural determination of complicated organic molecules. One problem with HMBC, however, is how to suppress proton main signals. If failed to do this, strong t_1 noise will appear in the NMR spectra making it very difficult to detect weak but important cross peaks.

We present here a new improved HMBC technique which has incorporated two high power long pulses to conventional HMBC in order to suppress proton main signals and to do spin locking for refocusing proton satellite signals to be observed. This improved HMBC technique gives NMR spectra with greatly decreased t_1 noise in shorter machine time and, therefore, its application is highly promising for structural analysis of complicated natural products.

天然有機化合物の構造研究において二次元NMRは非常に重要な手段となっている。特にプロトン観測 C-H 相関法 (HMQC)、long range C-H 相関法 (HMBC)は強力な方法である。これら inverse測定法ではプロトンのメインシグナルを如何に消去するかということが重要な問題であり、その成否がデータの質に大きく影響する。消去が不十分な場合は、 t_1 -ノイズが強く観測され、サテライトシグナルによるクロスピークの検出が困難となる。プロトンのメインシグナルの消去は位相回しによって行なうため、従来法では十分なサンプル量があっても多くの積算回数を必要とした。この問題を解決する一つの方法として、高出力の longパルスによるシグナル飽和法が検討され、HSQC法に¹⁾応用されている。我々はこのシグナル飽和法をHMBC法に応用し、 t_1 -ノイズの消去に有効な新手法である Spin Locked HMBC (SL-HMBC)を考案した。また新しい測定法である HSMBC法についても応用を検討した。

[HMBC法のパルス系列]

図1にHMBC法のパルス系列を示す。HMBC法では、HとCの long range couplingによる J-変調を多量子遷移に転化してHとCの相関を得る。J-変調の大きさはスピン展開時間 Δ に依存し、通常50-100msと非常に長く設定する。このスピン展開時間が長くなればなるほどプロトンメインシグナルの消去は困難となる。従来のHMBC法(a)において、Y軸方向に励起された磁化はスピン展開時間 Δ の間に、回転座標系におけるX成分、Y成分の両方を有するシグナルを形成する。この二つのシグナル成分を差スペクトル法により消去するためには、多くの積算回数を必要とする。

一方SL-HMBC法(b)では、スピン展開時間 Δ の間にHとCに新しく180パルスを加え、スピンエコーを生成させる。この時強度の強い一重線シグナルはY軸方向に再結集する。またH-H、H-Cによるスピン結合を有するシグナルは、J-変調を受けX軸方向に配向する。HとCの多量子遷移を形成する磁化はJ-変調を受けたシグナルのみである。そこで、X軸方向から longパルスをかけ、X軸方向にシグナルをスピンロックし、Y軸方向のシグナルのみを飽和させる。この longパルスの効果により、プロトンのメインシグナルは飽和され、シグナル

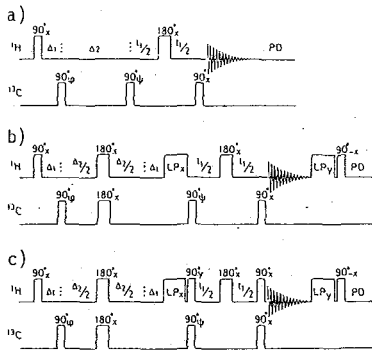


図1. HMBC法のパルス系列 (左)

- (a) conventional HMBC
(b) new HMBC. (c) new HSMBC

図2. longパルス(LP)による飽和に対するスピン展開時間(Δ)の影響 (LP=2.5ms) (中上)

- (a) $90^{\circ}_x-\Delta-LP_x-ACQ$.
(b) $90^{\circ}_x-\Delta/2-180^{\circ}_x-\Delta/2-LP_x-ACQ$

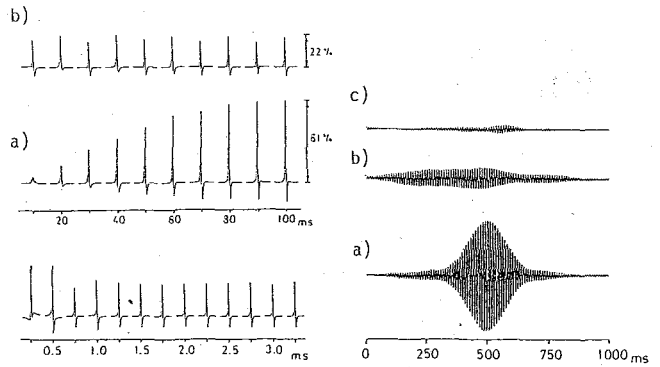


図3. longパルスの長さによるシグナル強度の変化 (中下)
 $90^{\circ}_x-\Delta/2-180^{\circ}_x-\Delta/2-LP_x-ACQ$. $\Delta=60ms$

図4. longパルス後の残存FID ($\Delta=500msec$) (右)

- (a) $90^{\circ}_x-\Delta-LP_x-ACQ$. $LP_x=2.5ms$
(b) $90^{\circ}_x-\Delta-1000^{\circ}_x5000^{\circ}_y-ACQ$.
(c) $90^{\circ}_x-\Delta-LP_x90^{\circ}_x-AQC$. $LP_x=2.5ms$

強度が大幅に減少する。その結果差スペクトル法の効果が著しく向上する。

[Long パルス]

図2はスピン展開時間を変化させた時のlongパルスによるシグナルの飽和効果を検討したものである。(a)は 90° パルスの後にスピン展開時間 Δ を入れ、acquisitionの直前でlongパルスをかける。(b)ではスピン展開時間の間に 180° パルスを入れてエコー形成段階でlongパルスをかける。(a)ではスピン展開時間が0-5msの場合シグナルは十分に飽和されるが、 Δ の時間が長くなるに従いシグナル強度が増大する。これは、シグナルのY成分は飽和されるが、X成分はlongパルスによりスピンロックされ、飽和されずに観測されてしまうからである。(b)では Δ が長くなっても、スピンロックされるシグナル強度は弱いまま殆ど変化がみられない。つまりY軸方向に再結集したシグナルは十分に飽和されていることになる。残るシグナルは磁場の不均一性に由来するX成分である。

図3は上記(b)の方法で、HMBC法に典型的なスピン展開時間60msを設定し、longパルスの長さを変えて、飽和の効果を調べたものである。パルスの長さ500-1000 μs で既にシグナルは飽和され、更にパルス巾を長くしてもシグナル強度に大きな変化が起きない事が分る。なお、longパルス(>3-5ms)を高出力で使用すると装置の破損を招く恐れがある為、パルス巾の設定には十分な注意が必要である。

図2、3よりHMBC法において、長いスピン展開時間の間に 180° パルスを入れ、スピン再結集した時、longパルスをかけるとY軸方向のシグナル成分を効率良く飽和できることが分る。しかし、H-Hスピン結合によりJ-変調を受けたメインシグナルはこの方法では消去できない。従ってこのシグナルは、差スペクトルで消去する事になる。

[パルス繰り返し時間]

メインシグナルの消去には差スペクトルを何回か積算する必要がある。積算回数を減少させれば、それだけメインシグナルの消去が不十分となり、 t_1 -ノイズを大きくする。我

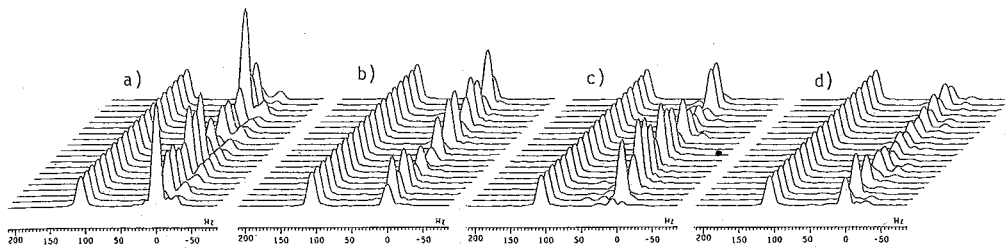


図5. SL-HMBC法による CHCl_3 のメインシグナルの消去

(a) HMBC, (b) HMBC+LP_y, (c) HMBC+10000°x5000°_y, (d) HMBC+LP_x90°_x, LP=2.5ms 繰り返し時間=0.5sec

々は、この問題をパルス繰り返し時間を最小にして、限られた時間内にできるだけ多数の積算をする方法により解決した。しかし、パルス繰り返し時間が短いと前のパルスで生じた横磁化が次の観測パルスに作用し、満足し得る差スペクトルが得られなくなる。従って、前のパルスで生じた残存横磁化を何らかの方法によって消去しなければならない。

既に高出力のlongパルスによる横磁化消去法が知られているが、SL-HMBC法では、効率の良い横磁化消去パルスとして、long(x)90°_yパルスを採用した。

図4で三つの方法による残存横磁化成分の消去の度合いをFIDのまま示した。90°パルスに続き、スピン展開時間を500msとし、その後longパルスを加えている。(a)はlong(x)パルスである。longパルスの後にシグナルエコーが生成し、横磁化が残存していることがわかる。この横磁化はlongパルスによりスピンロックされていたシグナルと考えられる。(b)は、10000°x5000°_yパルスである。この方法はX軸方向、Y軸方向にlongパルスを加える事により、(a)で生じたエコー成分を減少させている。(c)はlongパルスに90°パルスを付加した方法である。long(x)パルスによりX軸にスピンロックされた磁化をZ軸方向に配向させる事により、横磁化成分を消滅させている。

図5は新しいHMBCのパルス系列に図4で検討したlongパルスを付加して測定したSL-HMBCスペクトルである。0Hzのシグナルはクロロホルムのメインシグナルであり107Hzのシグナルは、¹³Cに結合したサテライトシグナルの一方である。サテライトシグナルを基準にして、それぞれのメインシグナルの消去の度合いを比較すると、(c)のlongパルスを付加したSL-HMBC法が最もメインシグナルの消去に効果的である事が分る。

SL-HMBC法のパルス系列においてlong(x)とlong(y)90°_xという二つのlongパルスの組合せがメインシグナルの消去にとって非常に重要な役割を果している事が判明した。

[SL-HSMBC法とSL-HSMBC法の複雑な化合物の構造解析への応用]

¹J_{C-H}を観測するHMQC法に対し、一量子遷移を利用したHSQC法の方が感度の点で優れていることが最近報告された。そこで、我々の考案した方法を一量子遷移を利用してlong range couplingを観測するHMQC法に応用し、SL-HSMBC法として実験を試みた。図1にSL-HSMBC法のパルス系列を示す。SL-HSMBC法ではSL-HMBC法と異なり一量子遷移を取り出す為に新たな二つの90°パルスを導入する。図6にポリエーテル抗生物質ポートミシンのSL-HMBCとSL-HSMBCのスペクトルを示す。メチル基領域において、従来法では強いt₁-ノイズがスペクトルの解析を困難しているが、SL-HMBC、SL-HSMBC法スペクトルではt₁-ノイズが大幅に減少し、クロスピークが明確に観測されている。

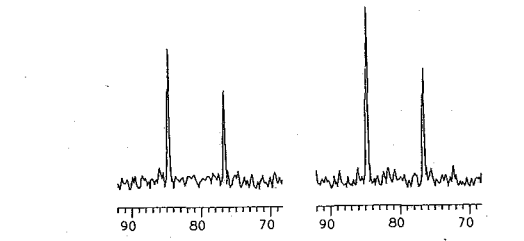
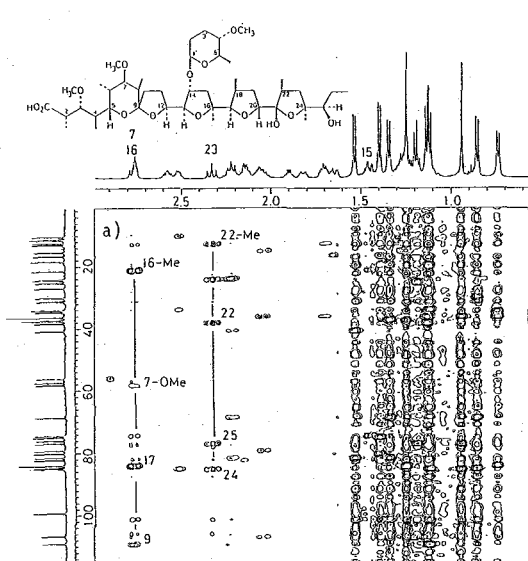


図6. ポートミシンのHMBC, new HMBCおよびnew HSMBCスペクトル (左)
 $t_1 \times t_2 = 256 \times 512$ points, $f_1 \times f_2 = 25000\text{Hz} \times 2500\text{Hz}$
 積算時間=128回, PD=0.4sec, LP=2.5ms
 測定時間=5時間, (a) 従来法, (b) SL-HMBC, (c) SL-HSMBC

図7. ポートミシンの H_{23} 位のクロスセクションスペクトル
 C_{24} と C_{25} のシグナル (上). (a) SL-HMBC, (b) SL-HSMBC
 $t_1 \times t_2 = 512 \times 512$ points, $f_1 \times f_2 = 13500\text{Hz} \times 2500\text{Hz}$
 積算回数=128回, PD=0.4sec

図7はSL-HMBC法とSL-HSMBC法の F_1 軸のクロスピークの強度を比較したものである。SL-HSMBC法では F_1 軸のクロスピーク上に現われるプロトン間のスピン結合をデカップルし一重線として観測するため、感度の増加を期待することができる。しかし、図7に示すようにデジタル分解能が10Hz以上の荒い場合は大幅な感度の増加は望めない。通常、 ^{13}C の観測領域(10KHz-20KHz)を256-512ポイントで測定する場合、デジタル分解能は10Hz以上となるため、HSMBC法の利点を十分に引出す事は困難と言える。

[まとめ]

HMBC法はHMQC法に比べプロトンメインシグナルの消去が困難ため、 t_1 -ノイズが深刻な問題であった。今回二つのlongパルスを採用したSL-HMBC法とSL-HSMBC法を考案し、従来の方法に比べ遙かに短時間で t_1 -ノイズを減少させたスペクトルの測定に成功した。

天然有機化合物の構造研究において、HMBC法は既に基本的な手段として使用されているが、今回の新しいSL-HMBC、SL-HSMBC法の採用により有機化合物の構造研究を格段と効率アップすることが可能となったと考えられる。

1) G. Otting and K. Wuthrich: J. Mag. Reson., **76**, 569 (1988)
 2) 鴨 修: 89 分析機器ユーザーズミーティング資料 (1989)
 3) D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin and A. Bax: J. Mag. Reson., **85**, 393 (1989)

P7

○関野雅人,^{a)} 佐藤 勝,^{a)} 永澤 明^{b)}

(埼玉大分析セ,^{a)} 埼玉大理^{b)})

¹⁸³W NMR of Tungsten Carbyne Complexes with 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene

Masato SEKINO,^{a)} Masaru SATO,^{a)} Akira NAGASAWA^{b)}

Chemical Analysis Center, Saitama University,^{a)} and Department of Chemistry, Faculty of Science, Saitama University^{b)}

The first ¹⁸³W NMR spectra were observed for the new Fischer-type tungsten carbyne complexes, [W(≡CR)Cl(CO)₂(dppf)] (R = Me, Ph, thienyl, and furyl; dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene). Of all the ¹³C, ³¹P, and ¹⁸³W signals, only the ¹⁸³W and carbyne ¹³C chemical shifts depends on the carbyne substituent. The carbyne ¹³C is deshielded, and ¹⁸³W shielded as the π-donating ability of the substituent on carbyne increases. The extent of the π-back bonding from the tungsten to the carbyne may be responsible for this relationship.

[緒言] 有機金属錯体のうちで、金属原子と配位子との間に不飽和結合をもつものが、近年有機合成化学において多くの点で注目されている。金属-炭素二重結合(M=C)をもつカルベン錯体(carbene complexes)はよく研究され、¹³C NMRはもとより、⁵³Crなどによる金属核NMRの測定も報告されている。¹⁾ 一方、金属と炭素との間に三重結合(M≡C)が考えられるカルピン錯体(carbyne complexes)は、化合物自体が不安定なものが多いことから、その三重結合の性質や電子状態についても解っていないことが多い。²⁾

さきに、われわれ³⁾は、前期遷移金属元素の多核錯体においては、金属原子間の直接結合形成にともないその金属核NMR化学シフトが大きく変わること、化学シフトが金属原子間結合の強さや金属原子の酸化数に相関していることを報告した。金属-炭素多重結合を含む化合物にもこの手法を適用し、さらに一般化したいと考えた。

最近、われわれは安定なカルピン錯体として、1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン(dppfと略)を配位子として含むタングステン化合物(Fig. 1)を合成した。⁴⁾ そこで、

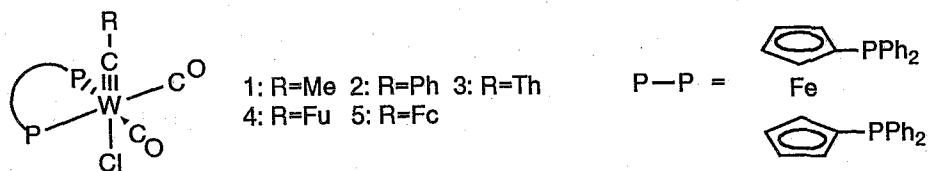


Fig. 1 [W(≡CR)Cl(CO)₂(dppf)]

この錯体について ^{13}C や ^{31}P と共に ^{183}W NMR も測定し、化学シフト相互の相関やカルビン炭素上の置換基効果をみることにより、多重結合まわりの電子状態を明らかにしようとした。

[実験] 試料の合成 化合物 1-5 を既知の方法⁴⁾に従って合成した。いずれも一般式は $[\text{W}(\equiv \text{CR})\text{Cl}(\text{CO})_2(\text{dppf})]$ で、W は形式的には +2 価、2 つのカルボニル基は *cis* 位、Cl とカルビンは *trans* 位に配位している。また、dppf は Fe を含む配位子として特異なもので、その特徴を明かにする目的で、 $[\text{W}(\text{CO})_4(\text{dppf})]$ (錯体 6) を合成した。これらの構造や試料の純度は、元素分析と ^1H NMR の測定によって確認した。

NMR 測定 Bruker AM-400 FT-NMR 装置を用いた。測定条件を以下に示す。

Table 1. Conditions of NMR Measurements

| | ^{13}C | ^{31}P | ^{183}W |
|-----------------------|-----------------|-------------------------------|---|
| Frequency (MHz) | 100.62 | 161.97 | 16.67 |
| Solvent | CDCl_3 | CDCl_3 | $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (20%) |
| Pulse width (us) | 3.0 | 3.0 | 50.0 |
| Repetition time (s) | 0.655 | 3.49 | 0.855 |
| Chem. Shift Reference | TMS | H_3PO_4 (85%) | $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{D}_2\text{O}$ (1M) |

[結果] ^{13}C NMR カルボニル炭素、および dppf の炭素の ^{13}C シグナルは、それぞれ 210.5-212.2 ppm に 1 本、72.1-76.2 ppm に 5 本現れ、化学シフトや結合定数はカルビン上の置換基 R を替えてもほとんど変化しない。それに対してカルビン炭素の化学シフトはかなり大きく変化した。カルビン上の置換基 R が、Me (275 ppm) > Fc (269) > Ph (267) > Th (251) > Fu (248) の順に遮蔽が増大した。

^{31}P NMR Table 2 に結果をまとめた。化学シフトは 16.27-16.52 ppm で、置換基の種類による変化はほとんどない。このシグナルには ^{183}W とのカップリングがみられたが、結合定数 J_{PW} はいずれも 238-240 Hz で、この値は他の *cis*-ビス(ホスフィン)型タングステン錯体のものとほぼ同じである。

Table 2. ^{31}P NMR of Tungsten-Carbyne and the Related Complexes

| Compds. | δ /ppm | J_{PW} /Hz | Compds. | δ /ppm | J_{PW} /Hz |
|---|---------------|---------------------|--|---------------|---------------------|
| $[\text{W}(\equiv \text{CR})\text{Cl}(\text{CO})_2(\text{dppf})]$ | | | <i>cis</i> - $[\text{W}(\text{CO})_4(\text{dppf})]$ (6) | 18.00 | 242 |
| R = Me (1) | 16.27 | 240 | $[\text{W}(\equiv \text{CMe})\text{Cl}(\text{CO})_2(\text{dppe})]$ ^{a)} | 39.45 | 230 |
| R = Ph (2) | 16.28 | 240 | <i>mer</i> - $[\text{W}(=\text{C}=\text{CHPh})(\text{CO})_3(\text{dppe})]$ ^{a)} | | |
| R = Th (3) | 16.27 | 241 | <i>trans</i> to C=W | 45.4 | 242 |
| R = Fu (4) | 16.52 | 238 | <i>cis</i> to C=W | 35.6 | 155 |

a) dppe: $\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{PPh}_2$

[考察] カルビン上の置換基の効果は、カルビン炭素と ^{183}W の化学シフトには及ぶが、その先のカルビンのcis位にある配位子には及んでいないことがわかる。さらに、カルビンの ^{13}C と ^{183}W の化学シフトの相関をみると、 $\text{R} = \text{Me}$ の場合を除きほぼ直線関係になっており、化学シフトの移動方向は両者が逆である。

$5p^65d^4$ の電子配置をもつ W^{II} とカルビン炭素間には σ 結合と2つの π 結合があり、 σ 結合を通じて炭素からの電子供与、 π 結合ではWからの逆供与が起きていると考えることができる。 $\text{R} = \text{Me}$ のように π 電子を持たない置換基では、その電子供与性が増大すれば、カルビン炭素上の電子密度は増して、 σ 結合を通じてW上の電子密度も増大して π 結合も強くなる (Fig. 3a)。しかし、 $\text{R} = \text{Ph}, \text{Th}, \text{Fu}$ など π 電子を持つ置換基をいれると、置換基炭素とカルビン炭素間の π 相互作用のために、Wからの逆供与が起きにくくなり、W-Cの結合次数が下がるとみられる (Fig. 3b)。 π 電子供与性の大きさは、 $\text{Ph} < \text{Fc} < \text{Th} < \text{Fu}$ であり、 ^{13}C の化学シフトはこの順に遮蔽方向に動いている。



Fig. 3a

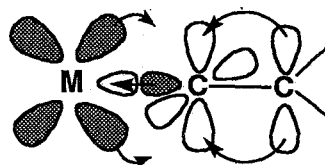


Fig.3b

W^0 の低原子価単核錯体では、 π 逆供与性が小さいほど、 ^{183}W 核の化学シフトは非遮蔽側に移ることが見いだされている。⁵⁾ 本研究でとりあげた W^{II} カルビン錯体でも、カルビン炭素の置換基により同様の影響を受けて化学シフトが変化するものと考えられる。これは、カルビン錯体の電子状態や反応性を推察するうえで金属核NMRが有効であることを示唆している。

[文献]

- 1) A.Hafner, L.S.Hegedus, G.de Weck, B.Hawkis, K.H.Dotz, *J.Am.Chem.Soc.*, **110**, 8413, (1988).
- 2) H.Fischer, P.Hoffmann, F.R.Kreissel, R.R.Schrock, U.Schubert, K.Weiss, "Carbyne Complexes," Verlag Chemie, New York, 1988.
- 3) 鎌田敏宏, 永澤明, 伊藤翼, 第28回NMR討論会, 東京, L34, 1989.
- 4) M.Sekino, M.Sato, A.Nagasawa, to be published.
- 5) D.Rehder, "Multinuclear NMR," J. Mason Ed., Plenum Press, New York, 1987.
- 6) R.L.Keiter, D.G.Van der Velde, *J.Organomet.Chem.*, **258**, C34, (1983).
- 7) G.T.Andrews, I.J.Colquhoun, W.McFarlane, S.O.Grim, *J.Chem.Soc.Dalton.*, **1982**, 2353.
- 8) G.T.Andrews, I.J.Colquhoun, W.McFarlane, *Polyhedron*, **2**, 783, (1983).

^{183}W NMR Fig. 2 にスペクトルの実例を示し, Table 3 に結果をまとめた. 錯体 $1 > 2 > 3 > 4$ の順に遮蔽が低下 (低磁場シフト) し, カルビン炭素と逆の傾向を示した. いずれもカルビンをもたない錯体 6 よりかなり低磁場にシグナルが現れており (^{31}P 核と逆), カルビンの配位またはそれに伴う W の価数の増大が, ^{183}W 核の化学シフトに及ぼす影響が大きいことを示している. なお dppf はフェロセン核をもつが, 配位子として W 核に及ぼす効果そのものは, 飽和の炭素鎖を持つ他のジホスフィン配位子と似ていることが, ^{183}W の化学シフトや結合定数から推定できる.

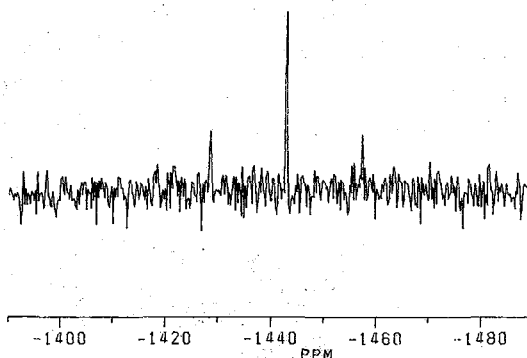


Fig. 2 ^{183}W NMR spectra of $[\text{W}(\equiv\text{CPh})\text{Cl}(\text{CO})_2(\text{dppf})]$ in $\text{CD}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_2\text{Cl}_2$ (20%).

Table 3 ^{183}W NMR Data of Tungsten-Carbyne Complexes and the Related Compounds

| Compound | ^{183}W | | Solvent | Refs. | |
|--|------------------|-----------------------|---------|---|-----------|
| | δ /ppm | $^1J_{\text{FW}}$ /Hz | | | |
| <u>W^{II} complexes:</u> | | | | | |
| $[\text{W}(\equiv\text{CR})\text{Cl}(\text{CO})_2(\text{dppf})]$ | | | | | |
| R = Me | (1) | -1583 | 244 | CD_2Cl_2 (20%) | This work |
| R = Ph | (2) | -1443 | 240 | CD_2Cl_2 (20%) | This work |
| R = Th | (3) | -1373 | 243 | CD_2Cl_2 (20%) | This work |
| R = Fu | (4) | -1365 | 243 | CD_2Cl_2 (20%) | This work |
| <u>W^{0} complexes:</u> | | | | | |
| $[\text{W}(\text{CO})_6]$ | | -3486 | | CH_2Cl_2 | 6 |
| <i>cis</i> - $[\text{W}(\text{CO})_4(\text{dppf})]$ | (6) | -3023 | | CD_2Cl_2 (20%) | This work |
| <i>cis</i> - $[\text{W}(\text{CO})_4(\text{dppm})]$ | | -2957 | | $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{D}_6$ | 7,8 |
| <i>cis</i> - $[\text{W}(\text{CO})_4(\text{dppe})]$ | | -3291 | | $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{D}_6$ | 7,8 |
| <i>cis</i> - $[\text{W}(\text{CO})_4(\text{dppp})]$ | | -3158 | | $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{D}_6$ | 7,8 |
| <i>cis</i> - $[\text{W}(\text{CO})_4(\text{dppb})]$ | | -3117 | | $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{D}_6$ | 7,8 |

Abbreviations

dppm : $\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{PPh}_2$; dppe : $\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{PPh}_2$; dppp : $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2$;
 dppb : $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_4\text{PPh}_2$

P8

○吉野 明広、高橋 憲助

(名工大・工)

Nitrogen-15 NMR Study of Pyridylmethyllithium derivatives

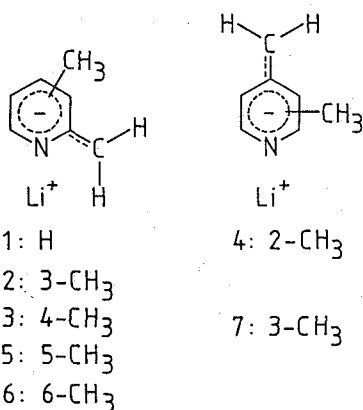
Akihiro Yoshino and Kensuke Takahashi

(Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology)

The ¹⁵N-NMR spectra have been observed for Pyridylmethyllithium derivatives in tetrahydrofuran(THF). The ¹⁵N resonances of these anions are found upfield about 100 - 130 ppm from those of precursors. Further, the ¹⁵N shift of 4-Pyridylmethyllithium is upfield 12.02 and 7.88 ppm from those of 2-Pyridylmethyllithium for 2,4- and 2,4,6-substituted ones, respectively. The charge density of nitrogen atoms also calculated using a MNDO MO method. In the anions, a good correlation has been obtained between the ¹⁵N chemical shifts and nitrogen charge densities, but in the precursors, correlation has not been obtained.

1. はじめに

α-ピコリンに極性溶媒中でn-BuLiを反応させると2-ピリジルメチルリチウム(1)を生成する。(1)を代表とするリチウム塩は反応中間体として、またその余剰電荷の分布状態や対イオンとの相互作用などについてたいへん興味を持たれる。ことに(1)のアニオンを特徴付けしている窒素原子からの情報として¹⁵N-NMRは有用であると考えられる。しかしながら、アニリンから生ずるリチウム塩のような置換基についた窒素の陰イオンについての報告はあるが、標題化合物のように芳香環に含まれるような窒素についての報告例は少ない。1), 2)



Scheme 1

本研究では、Scheme 1に示される7種のピリジンのメチル、ジメチルおよびトリメチル誘導体より生ずる9種のカルバニオンについてその¹⁵N-NMRスペクトルを自然存在比で観測したので報告する。さらに、求めた¹⁵N化学シフトについてMNDO法による分子軌道法の計算結果との比較検討を行なって考察する。

2. 実験

出発物質はすべて市販品を高真空下で脱水および蒸留したものを用いた。カルバニオンの合成はTHFまたはTHF-d₈を溶媒としてn-BuLiを高真空下において接触させて行なった。試料濃度はすべて1.0 mol dm⁻³とした。15N-NMR測定はペリアンXL-200分光計を20.28 MHzで操作した。測定には、INEPTとDEPTのパルス系列を適時使用した。操作条件はそれぞれ、AT=3.2 sec、SW=5000Hz、PW=20us、D1=5 secとし、測定試料の状況に応じて3000~6000回の積算を行なった。15N化学シフトはニトロメタンを外部標準として使い、それを380.23ppmとして無水液体アンモニアの値に換算した。3)

3. 結果と考察

1) 15N-NMRスペクトル

測定したカルバニオンのスペクトルの一部を図1に示す。図より明らかなように、アニオン3と4は吸収線の線巾が著しく広いのでS/N比が悪くなっている。これらのシフト値は、15Nがエンリッチされた8と9のエーテル溶液に対して報告されたシフト値とよく一致している。2) 表1に測定された化合物の15N化学シフトの値をまとめて示し、さらに、カルバニオンの出発物質のものも表わした。

Table 1 15N nmr chemical shifts for carbanions. a)

| compound | anion(ppm) | precursor(ppm) |
|-------------------------------|------------|------------------------------|
| 1 2-PyridylLi | 205.01 | 316.88(314.92) ^{b)} |
| 2 3-Me-2-PyLi | 204.66 | 315.54(308.80) |
| 3 4-Me-2-PyLi | 200.32 | 309.11(308.63) |
| 4 2-Me-4-PyLi | 188.30 | 309.11(308.63) |
| 5 5-Me-2-PyLi | 201.79 | 315.87(309.32) |
| 6 6-Me-2-PyLi | 213.50 | 316.23(315.09) |
| 7 3-Me-4-PyLi | 178.04 | 311.42(310.34) |
| 8 4,6-Me ₂ -2-PyLi | 202.41 | 308.29(306.98) |
| 9 2,6-Me ₂ -4-PyLi | 194.53 | 308.29(306.98) |

a) The 15N chemical shifts are referred to an external nitromethane (taking 380.23 ppm). The sample concentrations are 1.0 mol dm⁻³ and solvents are THF-d₈ or THF.

b) The values in parentheses are chemical shifts for neat liquids.

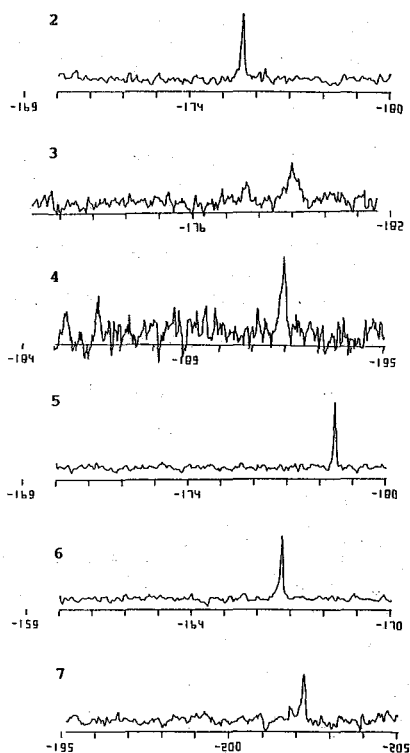


Fig. 1 15N nmr spectra for title anions.

The numeric under spectrum are chemical shifts referred to a nitromethane and take it 0.00 ppm.

表1の化学シフト値について化合物1を例にとって出発物質と比較するとアニオン化による化学シフト変化量は、111.87 ppmの高磁場シフトであるとわかる。ほかの化合物も同様に、102.73~133.38 ppmの高磁場シフトをしている。さらに、詳しくみて3と4、そして8と9を比較してみると、いずれも後者のほうが高磁場シフトをしており、その値はそれぞれ、12.02 および7.88 ppmである。この変化量について、置換基化学シフト (SCS) の考えかたを導入すると、1を基準物質として、2より-0.35 ppm (3-Me)、3より-4.69 ppm (4-Me)、5より-3.22 ppm (5-Me)、6より+8.49 ppm (6-Me) のようにSCSパラメータを決定できる。たとえば、この数値より化合物4と7の化学シフト差を計算すると $(-0.35-3.22)/2-8.49=-10.28$ のように実際の-10.26 ppmに近い数字がでてくる。一方、出発物質のほうは溶媒効果も考慮してTHF溶液の値を用いると、やはり、1を基準物質に、2より-1.34 ppm (3-Me)、3より-7.77 ppm (4-Me)、5より-1.01 ppm (5-Me)、6より-0.65 ppm (6-Me) のようにSCSパラメータを決定できる。両者のSCSの値を比較すると6-Meに対する数値が特に異なっているのがわかる。SCSで化学シフトの予想ができるということは1~9のカルバニオンの構造が基本的にはあまり変わらないことを意味している。この構造には、溶媒和の状態もふくめて考えてよいだろう。

2) 分子軌道計算 (MNDO) による考察

^{15}N 化学シフトと電子密度との関連を論じる時、変化が少ない場合には無理がある。³⁾ しかし、標題カルバニオンの場合には、余剰電荷による化学シフトの差も大きく、また負電荷の変化も大きいと考えられ、その点では好都合である。さらにSCSからもわかるようにアニオン間の大きな構造変化が見受けられないので、半経験的分子軌道計算法であるMNDO法を用いて構造の最適化を行なって実験値との比較を行なった。⁴⁾ 出発物質については、MNDO法の結果で説明されるようなものは全くみあたらなかった。一方、カルバニオンの結果が図2である。表1のデータに対し、MNDO計算によって最適な構造を求めてそれをもと

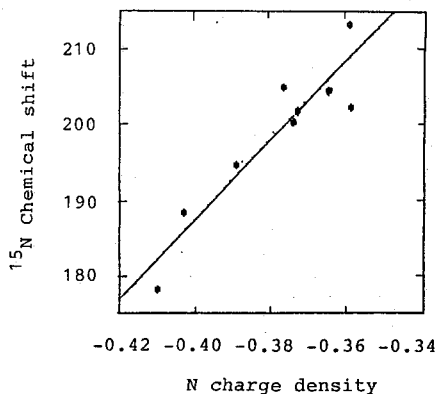


Fig. 2 ^{15}N nmr chemical shifts against N charge density(MNDO).

に計算した窒素の電荷密度をプロットしたところ、相関係数0.926となった。これより得られた関係式は、 $\delta(^{15}\text{N}) = 530.23 * (\text{N-charge density}) + 399.63$ となった。

すなわち、今回測定されたカルバニオンの ^{15}N 化学シフトはMND O法によって計算された窒素原子上の余剰電荷で説明されることがわかった。その電荷に対する傾きは、 ^{13}C 化学シフトに対する-160 ppm/electron に比べて大きいので、本研究で用いたようなイオン種には十分適用できるものである。

4. 参考文献

- 1) S. Ide, K. Iwasawa, A. Yoshino, T. Yoshida, and K. Takahashi, *Magnet. Reson. in Chemistry* 25, 675 (1987).
- 2) K. Konishi, A. Yoshino, M. Katoh, H. Matsumoto, K. Takahashi, and H. Iwamura, *Chem. Lett.*, 1982, 169.
- 3) G. C. Levy and R. L. Lichter, "Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy," John Wiley & Sons, INC., New York, (1979).
- 4) M. J. S. Dewar and W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 4907 (1977).

Kazunaka Endo, Ikuo Fujita and Naoya Kobayashi
Tsukuba Research Laboratory, Mitsubishi Paper Mills LTD.

The purpose of this study is to elucidate the structure of coloring and decoloring unsymmetrical fluoran dyes which are being used in heat-sensitive recording systems. We think it is well-known that coloring-to-decoloring reversible reaction of the fluoran dyes depends upon acidity. The reversible reaction corresponds to open-to-closed forms of the lactone ring. We observed some remarkable chemical shift differences between 23 species of ^{13}C signals in open-and closed-forms of lactone ring of 3-diethylamino-6-methyl-7-chlorofluoran(DEAMCF) in CDCl_3 . According to optimized molecular structure of DEAMCF by semi-empirical MO AM 1 method, in colorless neutral CDCl_3 solution, the Xanthene moiety was found to be folded as 166 around C(spiro)-O(xanthene) axis and the benzolactone moiety is almost perpendicular to the xanthene moiety. In colored solution for the molal DEAMCF/ H_2SO_4 ratio of 1/2.2, the xanthene moiety becomes almost planar and has canonical structures, while the lactone ring opens.

DEAMCF is one of simple model of unsymmetrical fluoran dyes which are used in heat-sensitive recording systems¹; in facsimile, word-processors, POS systems and automatic ticket examination. We selected DEAMCF as a typical compound to clarify the structure of the coloring of lactone dye-precursors experimentally. Despite the great deal of the use in heat-sensitive recording materials, we think there has been no paper which stated structure dependency of coloring and decoloring unsymmetrical fluoran dyes. It may be too difficult to identify the coloring species directly from the raw materials. By FTIR method, one can obtain vibrational spectra of the CO group in closed- or open-forms of the lactone ring. However, we think this is too difficult to discuss the change of the dye molecular structure from the spectra. On the other hand, by visible spectral method, we can observe the absorption spectra at the coloring state. This spectra is too simple to elucidate the coloring mechanism of the fluoran dye from the electronic spectra. We, here, demonstrate that the coloring mechanism can be clarified from ^{13}C NMR spectra of DEAMCF in closed- and open-form of the lactone ring.

Experimental

Materials

DEAMCF was recrystallized from CHCl_3 . The DEAMCF was commercially available. We observed a visible absorption spectrum of DEAMCF dye in coloring CDCl_3 solution and a reflection spectrum of coloring sample which consists of dispersed particles of DEAMCF and BPA in PVA layer on Al plate by Shimazu UV-3100 spectrophotometer at a room temperature (25°C).

NMR Measurements

The ^{13}C spectra were measured at 62.896MHz with Bruker AC 250 spectrometer. Between 100 and 1000 transients were accumulated using a 2 μs (40°) pulse; 32K data points were collected over a bandwidth of 4 KHz. These measurements were made at temperature of 30°C. One dimensional carbon and two dimensional COSY and HETCOR(C-H correlation) spectra were obtained using pulse sequences available in the Bruker library.

Results and Discussion

^{13}C Signal analysis of DEAMCF in CDCl_3

23 Species of ^{13}C signals which correspond to the number of the structural formula of DEAMCF dye in CDCl_3 in Fig. 1 and in Table 1 were assigned by the result of ^{13}C INKA Data Bank, ^1H COSY and C-H Correlation 2D pulse techniques. We found remarkable chemical shifts for some signals of xanthene-ring carbons (the numbers denote 2, 4, 9 and 11) in Table 1, in comparison with the observed values in the chemical shift ranges of about 110-150 ppm of normal benzene-ring carbons relative to TMS carbons. The result may indicate that the chemical shift in high field relative to the benzene-ring carbons depends upon molecular structure of DEAMCF.

By considering the molecular model of DEAMCF and according to X-ray diffraction analysis⁴ of the fluoran dye such as DEAMCF, the xanthene moiety is found to be folded as about 160 around C(spiro)-O(xanthene) axis and the benzolactone moiety is almost perpendicular to the xanthene ring. We observed ^{13}C CPMAS NMR spectra in DEAMCF crystal in comparison with the ^{13}C spectra of DEAMCF in CDCl_3 solution in the chemical shift range of 80 to 175 ppm. The good accordance of the spectra in solid with ones in CDCl_3 solution implies that the structure of DEAMCF in CDCl_3 solution corresponds considerably well to that in DEAMCF solid in closed-form of the lactone ring. Thus, we can consider that the coloring mechanism of DEAMCF is elucidated from analysis of the ^{13}C NMR spectra in CDCl_3 solution.

Coloring-to-Decoloring Reversible Reaction of DEAMCF in CDCl_3 Solution

In order to compare the coloring state of DEAMCF dye in CDCl_3 with the state of DEAMCF with BPA in heat-sensitive recording system, we used visible absorption spectral method. We observed absorption spectra in the two species of colored states for the DEAMCF dye. The double peaks (around 500 and 530 nm) in CDCl_3 correspond well to the reflection spectrum of coloring heat-sensitive sample which consists of dispersed particles of DEAMCF and BPA in PVA layer on the Al plate. Then, we confirmed that the coloring state in CDCl_3 is similar to one in PVA layer.

Let us examine how the ^{13}C NMR spectra of DEAMCF in CDCl_3 change as a small amount of concentrated H_2SO_4 is added; as the reddish orange color was deepened. In (a) -(c) in Fig. 2, we showed the ^{13}C spectra in the range of 80 to 175 ppm for molal DEAMCF/ H_2SO_4 ratios of 1/0.26, 1/0.54 and 1/2.2, respectively. Inspection of (a) to (c) in the figure indicates that some signals of xanthene ring shift considerably largely as the H_2SO_4 was added: the assigned signals of numbers 2, 4, 9 and 11 move to lower-field, while the signals of 12 and 15 shift to higher-field. The results were tabulated in Table 1. In the deepened reddish orange CDCl_3 solution, most of the ^{13}C signals of the xanthene ring exist in the shift range of normal benzene-ring carbons of about 110-150 ppm. This may mean that the xanthene ring becomes almost planar and has canonical structures in Fig. 3. On the other hand, after the amount of 4.5 molal NaOH versus 1 molal DEAMCF was added in the sample for molal DEAMCF/ H_2SO_4 ratio of 1/2.2, the coloring sample decolorated gradually. The decoloring sample showed the same spectra as the closed-form in Table 1. We have confirmed the reversible coloring-to-decoloring reaction three times. This indicates that the reversible reaction of DEAMCF depends on acidity and corresponds to open-to-closed form of lactone ring.

It is very interesting to discuss the correlation between the remarkable chemical shifts for some signals and canonical and steric structures in coloring form. In Table 1, large shift differences between open- and closed- form of lactone ring appear to exist in diethylaniline-ring of the xanthene moiety. The large shift differences in diethylaniline ring correspond well to a canonical structure in Fig. 3. We compared the ^{13}C shifts of the ring in DEAMCF with ones of diethylaniline(DEA)

and diethylaniline-ring in Rhodamine B. These comparisons gives us that xanthere moiety of DEAMCF in coloring form is almost planar and has canonical structures, since the shifts of diethylaniline-ring in the coloring form are in considerably good agreement with ones of DEA and the ring in Rhodamine B.

In (a) and (b) in Fig. 4, We showed the optimized molecular structures in both closed and open forms by semi-empirical MO AM 1 method. For the closed form in colorless neutral CDCl_3 solution, the xanthere moiety was found to be folded as 166 around C(spiro)-O(xanthere)(C(9)-O(10) in Fig. 1) axis and the benzolactone moiety is almost perpendicular to the xanthere. Especially the bond length of C(9)-O(8) of the lactone ring in Fig. 1 was calculated as 1.48 Å which is longer than normal C(sp³)-O bond-length 1.43 Å. This means that opening of the lactone ring occur here. In the case of open form in colored solution, the xanthere becomes almost planar and has a canonical structure in Fig.3. These results reflect well the informations from the NMR.

Acknowledgement

We express our appreciation to H. Higuchi, H. Ikeda and N. Koike who gave their helpful discussion. We thank S. Suzuki for his interest and support.

References

1. Z. Yoshida and T. Kitao, "Chemistry of Functional Dyes" (International Symposium in Osaka) 1989, Mita Press Tokyo, Japan.
2. N. Koike, F. Okumura and S. Tosa, "Chemistry of Functional Dyes" (International Symposium in Osaka) p. 401-407, 1989, Mita Press Tokyo, Japan.
3. Estimated ¹³C Chemical Shifts for DEAMCF were obtained from C13 NMR/IR(INKA,-DAT); ¹³CNMR Data Bank in Karlsruhe in West Germany.
4. K. Kubata, H. Yoshioka, K. Nakatsu, H. Matsumoto and Y. Sato, "Chemistry of Functional Dyes" (International Symposium in Osaka) p. 223-225, 1989, Mita Press Tokyo, Japan.

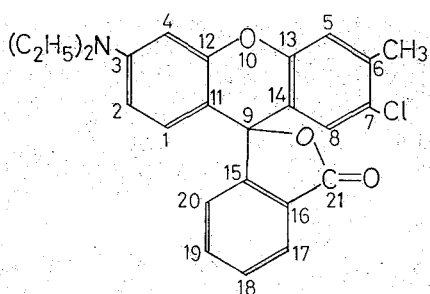


Fig. 1. The structural formula of DEAMCF dye in closed form.

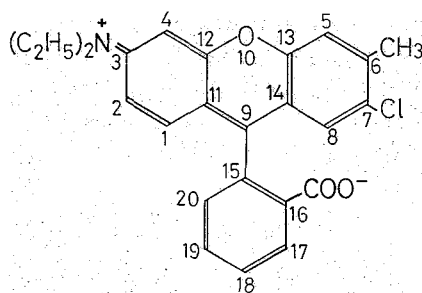


Fig. 3. The structural formula of DEAMCF dye in open form.

Table 1. ^{13}C Chemical Shifts of DEAMCF Dye
in CDCl_3 Solution.

| | closed-form shift(ppm) | open-form shift(ppm) | difference (ppm) |
|---|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| Xanthene-ring | | | |
| 1 | 128.8 | 130.5 | -1.7 |
| 2 | 108.5 | 116.8 | -8.3 |
| 3 | 152.7 | 153.0 | -0.3 |
| 4 | 97.5 | 108.2 | -10.7 |
| 5 | 119.0 | 119.4 | -0.4 |
| 6 | 138.7 | 140.8 | -2.1 |
| 7 | 128.5 | 126.5 | 2.0 |
| 8 | 127.8 | 130.1 | -2.3 |
| 9(spiro) | 83.5 | 94.0 | -10.5 |
| 11 | 104.6 | 118.0 | -13.4 |
| 12 | 152.8 | 149.0 | 3.8 |
| 13 | 149.7 | 149.7 | 0.0 |
| 14 | 118.5 | 118.3 | 0.2 |
| 15 | 150.2 | 144.0 | 6.2 |
| 16 | 127.0 | 124.8 | 2.2 |
| 17 | 125.0 | 127.5 | -1.5 |
| 18 | 129.7 | 130.5 | -0.8 |
| 19 | 135.0 | 135.3 | -0.3 |
| 20 | 124.0 | 126.6 | -2.6 |
| 21(=CO) | 169.4 | 168.5 | 0.9 |
| -N=(CH₂-)₂ | | | |
| | 44.5 | 51.8 | -7.3 |
| -CH₂-CH₃ | | | |
| | 12.5 | 11.1 | 1.4 |
| -CH₃ | | | |
| | 20.2 | 20.2 | 0.0 |

*The chemical shifts were referred from TMS carbon.

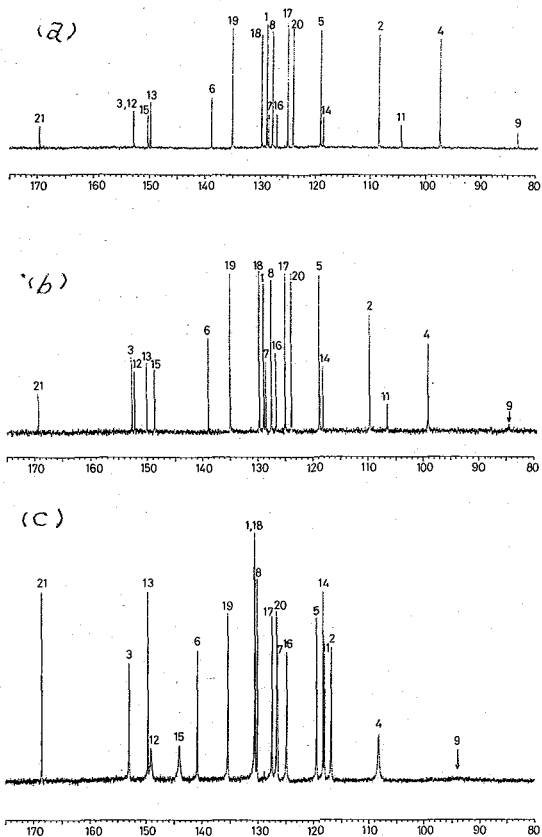
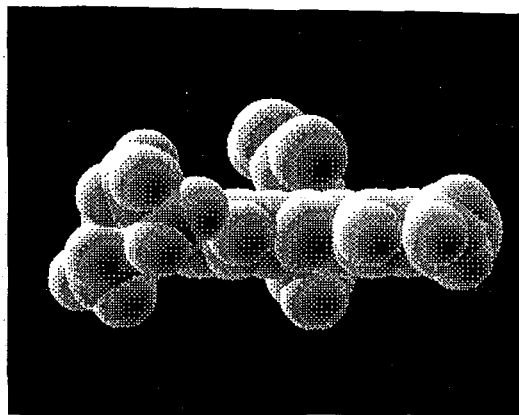
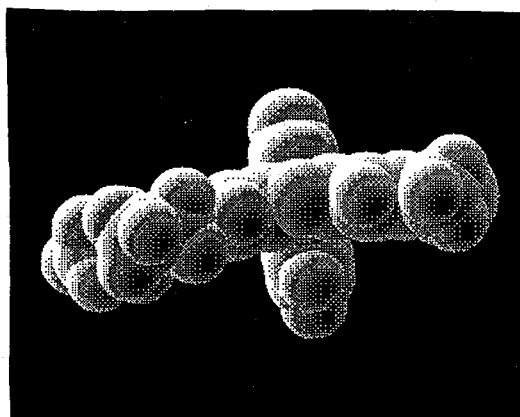


Fig. 2. ^{13}C spectra of DEAMCF in the range of 80 to 175 ppm for three molal DEAMCF/ H_2SO_4 ratios (a), (b) and (c) correspond to the ratios of 1/0.26, 1/0.54 and 1/2.2, respectively).



(a) closed form

(b) open form

Fig. 4. The optimized molecular structure of DEAMCF dye by a semi-empirical MO method(AM 1). (a) closed form (b) open form

P10

(阪大産研) ○高井嘉雄・静岡基博・欧陽荔・澤田正實・花房昭静

NMR Approach to Complexation between Saccharides and Ammonium Salts

Yoshio Takai, Motohiro Shizuma, Li Ouyang, Masami Sawada, Terukiyo Hanafusa

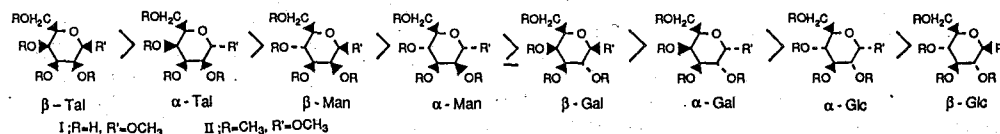
Material Analysis Center, The Institute of Scientific and Industrial Research,

Osaka University, 8-1, Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567

We have recently studied complexation between modified mono-saccharides (M) and alkylammonium salts(A)⁺ in gas phase by using FAB-mass spectrometry. Here, we report the complexation behavior in liquid phase by using ¹H-NMR spectrometry.

Stability constant(Ks) is determined as 9M⁻¹ for the association between penta-methylated β-D-talose and PhCH₂CH₂NH₃⁺ in CD₃CN. Diamagnetic induced shifts and competitive paramagnetic shifts are measured for various pairs of M and (A)⁺.

<序> 我々は、既に FABMS法を用いて、各種修飾単糖類とアルキルアンモニウムイオンとの気相ホスト-ゲストコンプレクセーションに関する研究を行ってきた。気相下、これらコンプレックスの安定度と単糖の立体構造との間には以下の相関が見い出されている¹⁾。



今回、我々は、液相下のコンプレクセーションの有無や構造などを知るため、¹H-NMR法を利用した。NMRタイトレーション、常磁性シフト試薬によるシフトなどから、コンプレックスの安定化定数、単糖間のコンプレクセーション強度の順序が得られ、塩添加による反磁性シフトの解析から、コンプレックスの正電荷の位置すなわち構造が推定される。

<実験> 修飾単糖類は箱守法などの常法により合成した。各種アンモニウム塩、K⁺ La³⁺ 塩などは市販品の再結晶、またはアニオン交換を行い、精製した。常磁性シフト試薬はEu(fod)₃を利用した。¹H-NMR測定溶媒には通常、重アセトニトリルを用い、常磁性シフト試薬添加実験には重クロロホルムを使用した。測定温度はそれぞれ30°Cで行った。

<結果と考察> 1. 安定化定数 図-1には完全メチル化タロース(M)と PhCH₂CH₂NH₃⁺(A⁺)との2:1混合溶液の¹H-NMRスペクトルを示した。中段の(A⁺)スペクトルに比べ(M+A)⁺スペクトルのNH₃⁺プロトンの低磁場シフトが見られ、(A⁺)濃度に対するこのプロトンのシフト変化からコンプレックス形成の安定化定数を求めた。完全メチル化β-タロース、β-マンノースの安定化定数は9M⁻¹、3M⁻¹と決定した。

2. 塩添加効果 NH₃⁺プロトンと同様なシフト変化が糖環プロトンにも図-1の点線で示すように生じている。各種添加塩による単糖類の環プロトンやメトキシメチルのシフト変化を表-1に示した。ここで中性アミンの添加効果は見られなかった。

α -Glcの場合に塩添加効果が見られないことは、FABMSでのコンプレクセーションの結果と同様に、溶液中でもコンプレクセーションが弱いものと考えられる。一方、効果の大きな β -talの場合には、カチオンの種類にかかわらず、それぞれの環プロトンのシフトが特徴的に表われた。このシフトが電荷によることから、単糖類に会合する電荷の位置をBuckinghamの式を用いて推定した。

表 - 1

Induced Downfield Shifts of Proton Signals of Saccharides on Addition of Salts (Hz)

| saccharides | salts | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | Me | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| β -Tal $1.4 \times 10^{-2} M$ | $PEA^+PF_6^-$ $8.0 \times 10^{-3} M$ | 8.2 | 16 | 2.1 | 14 | - | - | 5.6 | 5.6 | 4.9 | 2.5 | 0.7 |
| β -Tal $9.6 \times 10^{-3} M$ | K^+SCN^- $4.8 \times 10^{-3} M$ | 7.0 | 8.5 | 2.0 | 11 | - | - | 5.5 | 6.0 | 6.0 | 2.5 | 2.0 |
| β -Tal $9.6 \times 10^{-3} M$ | $NH_4^+SCN^-$ $2.6 \times 10^{-2} M$ | 12 | 18 | 4.7 | 18 | - | - | 10 | 8.8 | 8.9 | 4.5 | 6.8 |
| α -Tal $1.4 \times 10^{-2} M$ | $PEA^+PF_6^-$ $8.1 \times 10^{-3} M$ | 1.2 | 7.0 | 0 | 4.7 | 0.8 | 0 | 1.6 | 0.8 | 2.3 | 0 | 0 |
| β -Man $1.4 \times 10^{-2} M$ | $PEA^+PF_6^-$ $1.0 \times 10^{-2} M$ | 4.8 | 4.8 | - | 4.8 | 4.8 | 2.4 | 1.8 | 0.9 | 1.5 | 1.5 | 0.9 |
| α -Glc $1.5 \times 10^{-2} M$ | $PEA^+PF_6^-$ $1.2 \times 10^{-2} M$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |

$PEA^+PF_6^-$: $PhCH_2CH_2NH_3^+PF_6^-$ Solvent: CD_3CN

完全メチル化 β -talに対するカチオン中心は図-1のコンプレックス構造に点線で示した酸素原子回りに位置すると考慮される(多点相互作用)。この結果は、MND0-M0計算の結果とほぼ一致している。

3. 常磁性シフト試薬添加効果 塩添

加効果の実験でわかるように反磁性シフト変化が小さいために、弱いコンプレクセーションを示す α -Glcなどのコンプレクセーション程度を直接検出することが出来ない。常磁性金属 Bu^{++} とのコンプレクセーションによる大きな常磁性シフトから、弱いコンプレクセーション能を示す α -Glc, β -Glc, Galなどの溶液中での相対的なコンプレクセーション強度の順序を調べた。例を図-2に示した。

この結果から、 β -Manと β -Galとでは Bu^{++} に対するコンプレクセーション能力に差があることが判る。得られた順序は気相下での結果と同じであった。

以上、液相下でも完全メチル化単糖類の立体構造と電荷との多点相互作用が主としてコンプレクセーションに寄与していることが判った。また、液相のコンプレックスの構造は気相のそれと類似しているようであった。

1) a) M. Sawada, Li. Ouyang, Y. Takai, H. Yamada, and T. Hanafusa, Chem. Lett., 1989, 1743. b) ibid., Chem. Lett., 1990, 1361. c) ibid., 投稿中

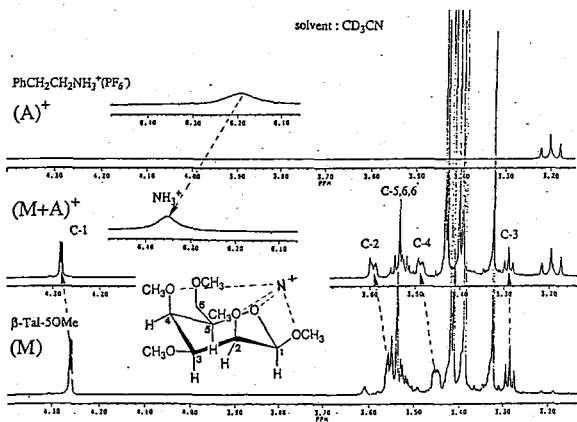


図 - 1

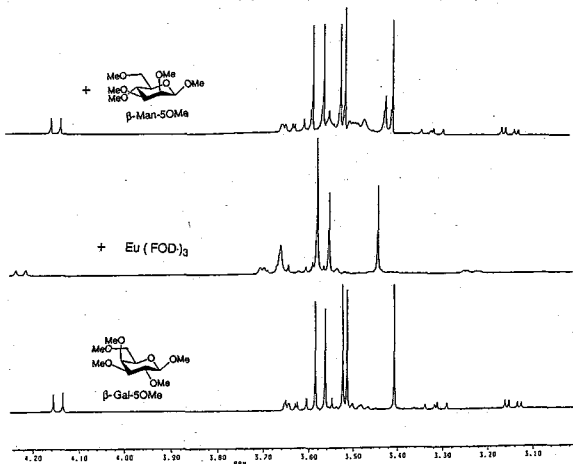


図 - 2

P11

○津田 栄、桑田 有、仁木 良哉、引^{*}地 邦男
 (北大・理、明治乳中研、北大・農)

¹H-NMR Conformational Analysis of Box β-Casein Phosphopeptide (1-25).

Sakae Tsuda, Tamotsu Kuwata[‡], Ryoya Niki, and Kunio Hikichi
 (Hokkaido University and [‡]Meiji Milk Products Co., Ltd.)

On the basis of several empirical ¹H-NMR rules, we examined the conformation of Box β-casein phosphopeptide (CPP). Two-dimensional NMR spectroscopy made us to assign proton resonances of 20 residues out of 25 of CPP molecule. The chemical shift values of the most of the side-chain protons were within 0.08ppm of those reported for random-coil conformation. By using interresidue NOE data, we identified the formation of the type II β-turn conformation of a segment Val8-Pro9-Gly10-Glu11. A few interresidue NOE's were observed between two residues, which are distant on the CPP sequence, suggesting that some of the parts are proximal to each other. Ca²⁺- and pH-titration experiments showed that the β-turn segment undergoes conformational change when side-chains of the acidic residues are charged.

【序論】 オリゴペプチドの立体構造を決める上でNMRが与える情報としては過渡的NOE、J結合定数、及び水素結合がある。水素結合の形成に関するNMR経験則は次のようなものである；(1) 2次構造(αヘリックスやβ構造)に基づく水素結合が形成されると、そのアミド水素の共鳴線は低磁場側へ大きくシフトする、(2) βターン構造に基づく水素結合を形成しているアミドプロトンの温度係数(-Δδ/ΔT×10³(ppm・K⁻¹))はそうでないものに比べて小さい(<4.0)[1]。今回我々はこれらのNMRの情報を利用して、カゼインという蛋白質の、N末端側から25番目までのオリゴペプチド断片であるカゼインホスホペプチド(CPP)の構造を調べた。

CPPのアミノ酸配列を図1に示す。このペプチドはカルシウムを結合することで知られており、その3次構造に興味を持たれている。CPPは磷酸化セリン残基(Ser(P))を4つ持つことを特徴とする。このペプチドに対してChou-Fasmanの2次

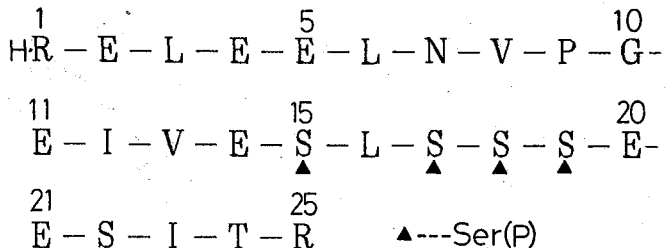


図1. CPPのアミノ酸配列

構造予測プログラムをかけると、一部を除いては α -ヘリックスと算出される。

【実験】CPPはHippの方法を用いて得た β -カゼインをトリブシン分解して粗精製物を単離した後、エタノール- Ca^{2+} 沈澱法により精製した。NMR測定には日本電子社製GX-500スペクトロメーターを用いた。帰属の為の測定試料の条件は次の通りである；[CPP]=10mM, [KCl]=0.2M, pH=6.34, 25°C。重水溶液中及び軽水溶液中での測定を行い、後者には20%のロック用重水を入れた。 Ca^{2+} 滴定実験を、pHと温度を変えた各々の場合について行った。これにはpHを調整した0.5Mの CaCl_2 溶液を母液として用いた。NOESYの水消去はパルス系列の最後にSR-1331パルスを付けることで行った[2]。混合時間はNOESYに対しては100msから800ms、HOHAHAに対しては30msから150msを選んだ。2次元スペクトルのアボゲイゼーションはNMR2(NMRI社製)データ処理システム上で行った。化学シフトは内部基準TSPからのppmで表した。

【結果】図2にCPPの純位相HOHAHAスペクトルの拡大図を示す(重水中)。帰属の結果を示す為、個々のクロスピークを相当するアミノ酸残基とその残基番号でラベルしてある。ほぼ同じ位置に共鳴している7つのGlu残基を含めて、かなり明瞭に個々のアミノ酸残基のスピン系が区別されることが分かる。我々は次にこれらのスピン系を軽水中のCOSYスペクトル上でアミドプロトンの共鳴線と結び、さらにNOESYスペクトル上でそれらの間の

$d\alpha_N$ 、 $d\beta_N$ 、 d_{NN} のNOE connectivityを見いだした。このスペクトル上での主鎖水素の連続した結び付きをCPPのアミノ酸配列と照らし合わせることで個々の共鳴線の帰属を完了した。CPPの25残基のうちN末端側から6番目まで(R¹-E-L-E-E⁵-L)の主鎖には上記のNOE connectivityが見いだされず、残基番号までの帰属はしていない。N末端のアルギニン残基の

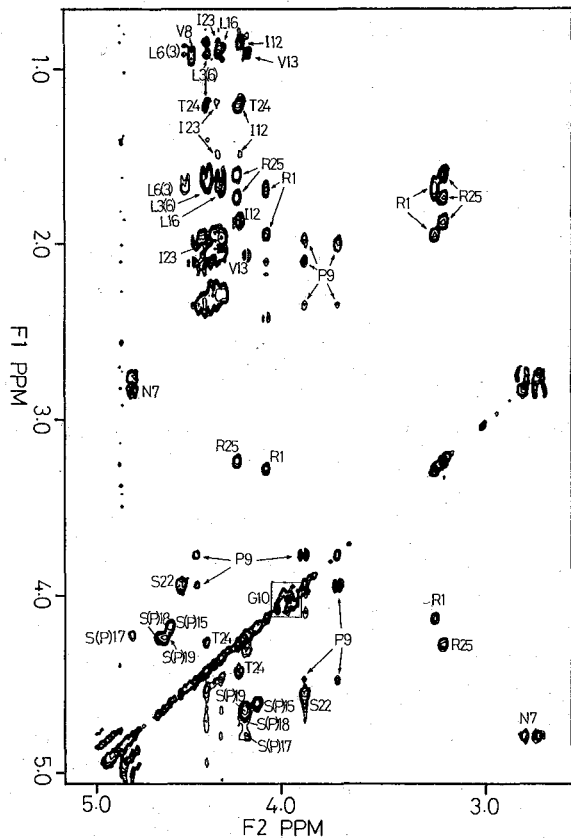


図2. CPPの純位相HOHAHAスペクトル
(混合時間65ms)

アミノ基の共鳴線は水との交換により現れていないことが分かった。 BundiとWüthrich (1979)により出されたランダム構造を仮定したときの側鎖水素の化学シフトの値と今回帰属されたそれらの値を比較すると最大0.08ppmの範囲内で一致することが分かった[3]。主鎖アミド水素の化学シフトに関しては、燐酸化セリン残基のものが他に比べて低磁場側に現れることが分かった。これに対する解釈は今後の課題である。

図3はNOEの実験から得られた残基間NOEをまとめたものである。一次構造上離れた残基の主鎖水素の間にNOEがあることから、CPPの全体構造は伸びきったものではないことが予想される。一方側鎖間には殆どNOEが観測されなかった。

UrryとLong(1976)の報告によるとVal-Pro-Gly-Glyのアミノ酸配列はβターン構造を形成する[4]。この配列とCPPの配列を比較することから、Val18-Pro9-Gly10-Glu11にβターン構造の形成が予想される。βターン構造には多くのヴァリエーションがあり、分類の仕方が今日なお検討されている。CPPの個々のアミノ酸がL体であることを踏まえ、またVal18とPro9のあいだのペプチド結合が一般的なトランス型であると仮定すると、タイプIかタイプIIのどちらかのターンを考えればよい。Wagnerら(1986)、Dysonら(1988)の報告によると、どちらのタイプのターンにしても $d_{NN}NOE$ がGly10とGlu11の間に、また弱い $d_{\alpha N}NOE$ がPro9とGlu11の間に期待される[5]。今回の実験では前者のみが観測された。また、タイプIなら $d_{NN}NOE$ がPro9とGly10の間に、タイプIIなら $d_{\alpha N}NOE$ がそれらの間に期待される。今回の実験では後者が観測された(図3)。これらのNOEの結果からこの4残基のセグメントはタイプIIのβターンを形成すると判断された。ここでGlu11のアミド基とVal18のカルボニル基の間

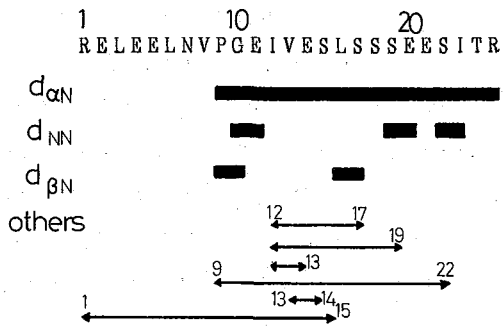


図3. CPPの残基間NOEconnectivity

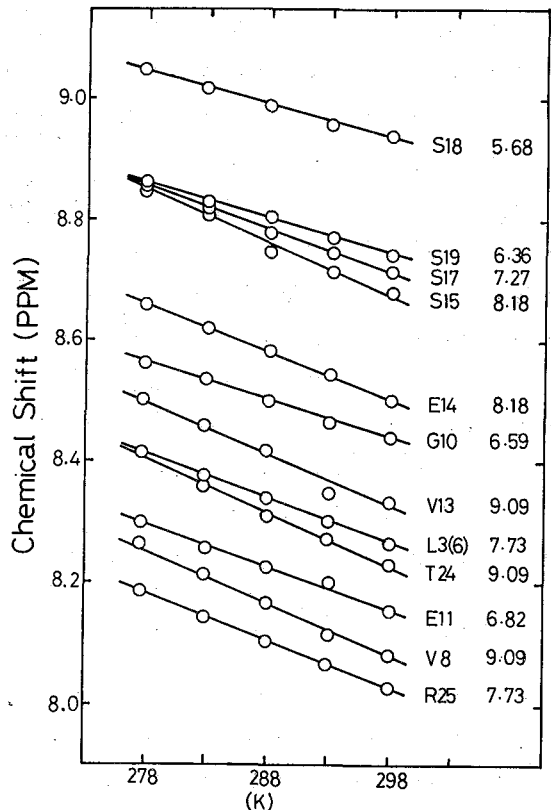


図4. アミド水素の化学シフト vs. 温度(K)
右側の数字は温度係数を表す。

の水素結合はβターン形成に必須ではないことを付記しておく。

図4はCPPのアミド水素の化学シフトを温度に対してプロットしたものである。直線の傾きから算出された温度係数($-\Delta\delta/\Delta T \times 10^3$ (ppm \cdot K $^{-1}$))の値は、いずれも2次構造に基づくアミド基の水素結合と判断するには大きすぎると言える[1]。

CPPに対する20倍までのCa²⁺滴定実験(実験の最初と最後のpHは7.2と7.4)では、Gly10と磷酸化セリン、グルタミン酸残基を除いた全ての共鳴線は化学シフト変化を示さずに線幅を増大した。室温、低温(4℃)の両方の実験でこの傾向は同じであった。これらの結果はCPPの酸性残基の側鎖にCa²⁺が結合し、これがGly10近傍の構造を変化させることを示す。Gly10の同様な化学シフト変化はアルカリ性から酸性へのpH変化実験においても観測された。この結果は水素イオンが磷酸化セリン、グルタミン酸に結合するとCa²⁺結合のときと同様の構造変化がもたらされることを示している。酸性条件(pH=5.6)でのCa²⁺滴定実験では全ての残基について化学シフトの変化、線幅の増大ともに観測されなかった。この結果は上記の酸性残基が水素イオンを結合していると、Ca²⁺はこれに置き変わって結合することができないことを示す。

図5にGly10を含むタイプIIβターン近傍の高次構造モデルを示す。矢印は観測されたNOEを表す。17と19番目の磷酸化セリン残基がIle12と近接し、22番目のセリン残基がPro9と近接していることを考えると、このターン部分はCPPのC末端側後半のペプチド鎖でくくられるような構造をしていることが予想される。

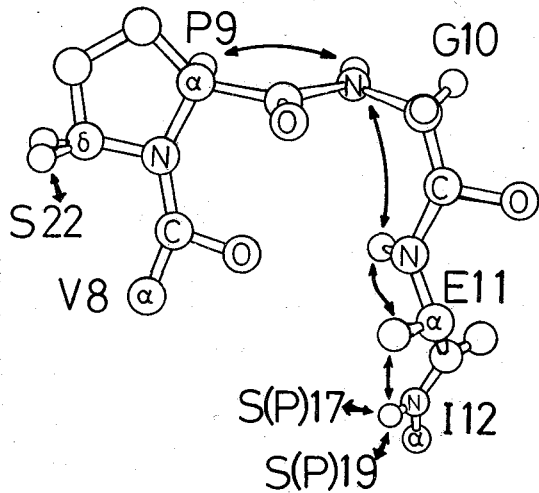


図5. タイプIIβターン近傍の構造モデル

参考文献

1. Dyson, H. J., Rance, M., Houghton, R. A., Lerner, R. A., & Wright, P. E. (1988) *J. Mol. Biol.* 201, 161.
2. Takegoshi, K., Tsuda, S., & Hikichi, K. (1990) *J. Magn. Reson.* 89, 399.
3. Bundi, A. & Wüthrich, K. (1979) *Biopolymers* 18, 299.
4. Urry, D. W. & Long, M. M. (1976) in *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 1-45.
5. Wagner, G., Neuhaus, D., Wörgötter, E., Vasák, M., Kägi, J. H. R., & Wüthrich, K. (1986) *J. Mol. Biol.* 187, 131.

P12

(阪大・薬) ○笠 永忠、伊藤勝彦、藤原英明。

Measurement of Partition Coefficients in Micelle/Water and Liposome/Water Systems by Paramagnetic ^1H NMR Relaxation Method

Yong-Zhong Da, Katsuhiko Ito and Hideaki Fujiwara.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

Partition coefficients were measured for Barbiturates in micelle/water system by paramagnetic relaxation method. The data obtained are somewhat larger than those reported in 1-octanol/water system. Also, they give better linear relationships against the reported biological activities.

The similar method is also applied to the liposome/water system with successful results

1. 序論

一般的に薬物の生理活性との相関を調べるには、オクタノール/水系での分配係数の対数 $\log P$ が用いられることが多い。油水分配平衡の測定には、Flask Shaking法やカロリメトリーなどが利用される。最近では、有機相をより生体膜の性質に近づけるため、ミセルや二分子膜リボソームなどが利用されるようになってきた。ミセル/水系の分配係数は、ガスクロマトグラフィーによる蒸気圧測定法、溶解度法、カロリメトリーによる溶解熱測定法、動電クロマト法、蛍光スペクトル法、ゲルろ過法、起電力法など、さまざまな方法で測定されているが、NMRによる緩和時間法も特徴ある方法の一つである。同様の方法がリボソーム/水系についても応用できるはずであるが、リボソームの場合は化学安定性や溶解度の低いことが問題となることがある。

NMRの緩和時間法(Paramagnetic Relaxation Method)によるミセル/水系の分配係数の測定は既に報告例がある。この方法では、ミセル/水系において緩和試薬(カチオン型あるいはアニオン型)が入っている時と入っていない時の溶質の ^1H NMRスピン-格子緩和時間の変化が利用される。

2. 方法

溶質のミセルに対する溶解度を ρ とすると、水相-ミセル相間での溶質の速い交換の状態において、溶質の実測のスピン-格子緩和速度 R ($R = \frac{1}{T_1}$ 、緩和時間 T_1 の逆数)は両相における緩和速度の加重平均となる。緩和試薬を入れていない時の溶質のスピン-格子緩和速

たつ えいちゅう、いどう かつひこ、ふじわら ひであき

度は次の式で表される

$$R_{1,obsd} = \rho R_{1(mic)} + (1 - \rho) R_{1(aq)} \quad (1)$$

ここで、 $R_{1(mic)}$ はミセル相中の溶質の固有緩和速度、 $R_{1(aq)}$ は水相中の溶質の固有緩和速度を表す。一方、緩和試薬を入れた後での溶質の観測緩和速度は(2)式のようなになる。

$$R_{1,obsd}^p = \rho R_{1(mic)}^p + (1 - \rho) R_{1(aq)}^p \quad (2)$$

$R_{1(aq)}^p$ は緩和試薬に影響された後の水相中の溶質の固有スピン-格子緩和速度である。緩和試薬をある濃度以下まで薄めると、水中の溶質の固有緩和速度は早くなるが、ミセル内の溶質の緩和速度には影響を与えない状況を作ることができる。この時、(1)式と(2)式より、 ρ が次のように求められる。

$$\rho = 1 - \frac{R_{1,obsd}^p - R_{1,obsd}}{R_{1(aq)}^p - R_{1(aq)}} \quad (3)$$

そして、ミセル/水系における溶質の分配係数 K_c は(4)式のようなになる。

$$K_c = \frac{C_{micellar\ phase}^s}{C_{aqueous\ phase}^s} \\ = \rho V_{aqueous\ phase} / (1 - \rho) V_{micellar\ phase} \quad (4)$$

C は各相に分配された溶質の濃度、 V は水相とミセル相の容積を示す。

3. 実験

ミセル/水(D₂O)系のミセル相にはSDS (Sodium Dodecyl Sulfate, キシダ化学)を用いた。緩和試薬にはMnCl₂を用いた。分配係数の測定の溶質には五つのバルビツール酸誘導体を選んだ。

各々のバルビツール酸誘導体について、四つのサンプルを調製し、¹H NMRにより、 $R_{1(aq)}$ 、 $R_{1,obsd}$ 、 $R_{1,obsd}^p$ 、 $R_{1(aq)}^p$ を測定する。ミセル相のSDSの濃度は33.6 mMである。MnCl₂の有効濃度を求めるため、予め、MnCl₂の濃度を変えて、SDSの(S-CH₂-)の¹H R₁を測定し、このR₁が変わらなくなるまでMn²⁺の濃度を下げた。Mn²⁺の濃度がこの濃度より低い場合、ミセル内の溶質の緩和速度はMn²⁺添加の影響を受けないこととなる。この限界濃度は[Mn²⁺] = 6.76 μMであった。実際に使われたMn²⁺の濃度は、Phenobarbitalの場合1.44 μM、それ以外は5.20 μMと調製した。スピン-格子緩和時間の測定は、日立R90H及びR250HT型FTNMR装置により、また一部の測定ではJEOL・GX500型FTNMR装置を利用した。

リボソーム/水(D₂O)系については、リボソームの作成にはLecithin from eggs (MERCK社)を用いた。まずLecithinをクロロホルムに溶かし、エバポレーターで溶媒留去(薄膜形成)、再び有機相(エーテルなど)に溶かし、水相(D₂O)を加える。そして、超音波処理、有機溶媒留去などの処理を行い、最後に水性の懸濁液を得る。分配係数の測定にはBenzylalcoholを選んだ。

4. 結果と考察

ミセル／水系におけるバルビツール酸誘導体の分配係数の測定結果をまとめた (Table 1、Table 2)。Table 1 には四種類の条件下における $^1\text{H T}_1$ の測定値及び ρ 値、また Table 2 には分配係数 Kc と 1-オクタノール／水系の分配係数 P の文献値を示した。なお、SDS のモル体積として、 0.8669ml/g (30.5°C) の文献値²⁾を引用した。

Table 1: $^1\text{H T}_1$ of Barbiturates in the Presence and Absence of Paramagnetic Ions and the Degree of Solubilizations in SDS

| solubilizate | $T_{1(\text{aq})}$ | $T_{1(\text{aq})}^{\text{P}}$ | $T_{1,\text{obsd}}$ | $T_{1,\text{obsd}}^{\text{P}}$ | ρ |
|--|--------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------|
| phenobarbital(2.2mM) $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$ | 4.43 ± 0.06 | 3.74 ± 0.09 | 1.64 ± 0.02 | 1.56 ± 0.02 | 0.21 |
| barbital(2.95mM) $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_2(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ | 1.12 ± 0.01 | 0.81 ± 0.01 | 0.77 ± 0.01 | 1.05 ± 0.01 | 0.11 |
| aprobarbital(0.73mM) $(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_2(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)$ | 2.25 ± 0.09 | 1.87 ± 0.07 | 1.69 ± 0.09 | 2.03 ± 0.09 | 0.34 |
| secobarbital(0.29mM) $(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_2(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$ | 0.24 ± 0.01 | 0.19 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 | 0.18 ± 0.01 | 0.45 |
| butalbital(0.97mM) $(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_2(\text{CH}_2\text{CHC}_2\text{H}_5)$ | 1.49 ± 0.01 | 1.02 ± 0.01 | 0.99 ± 0.01 | 1.41 ± 0.01 | 0.40 |

T_1 の単位は秒である。溶質の濃度はNMRスペクトル強度から求めた。下線の部分は T_1 が測定された核。

Table 2 より、測定された log Kc は

1-オクタノール／水系での log P と比べてみると、溶媒が1-オクタノールからミセルに変わり、溶媒の極性が大きくなると、分配係数が大きくなるのが分かる。また、ミセル／水系、1-オクタノール／

水系でのバルビツール酸誘導体の分配係数を用いてバルビツール酸誘導体の活性データを解析してみると、1-オクタノール／水系より、ミセル (SDS) / 水系の分配データの方が QSAR において良い相関関係を与えることが分かる (Fig 1、Fig 2)。

上の結果は、生物活性評価の上で、モデル系としてより生体系に近い分配系を用いることの意義を強調しており、NMR緩和時間法はそのための良い実験方法になると言える。

上述の方法を用いて、リポソーム／水系での分配係数の測定を試みた。Lecithinで調製されたリポソームを用いて、リポソーム／水 (D₂O) 系におけるBenzylalcoholの緩和時間を測定した。Fig 3 はリポソーム／水系 (D₂O) にBenzylalcoholを入れた後のサンプルの緩和時間のスペクトルである。Table 3 にそれらの緩和時間及び解析の結果を示す。

Table 2: Partial Coefficient of Barbiturate in SDS/Aqueous

| solubilizate | ρ | Kc | logKc | logP (Ref.3) | log(1/C) (Ref.4) |
|---------------|--------|------|-------|-----------------|---------------------|
| Phenobarbital | 0.21 | 31.1 | 1.49 | 1.42 | 3.32 |
| Barbital | 0.11 | 14.9 | 1.17 | 0.70 | 2.91 |
| Aprobarbital | 0.31 | 54.5 | 1.74 | 1.22 | 3.60 |
| Secobarbital | 0.45 | 97.4 | 1.99 | 1.97 | 3.45 |
| Butalbital | 0.40 | 81.0 | 1.91 | 1.65 | 3.63 |

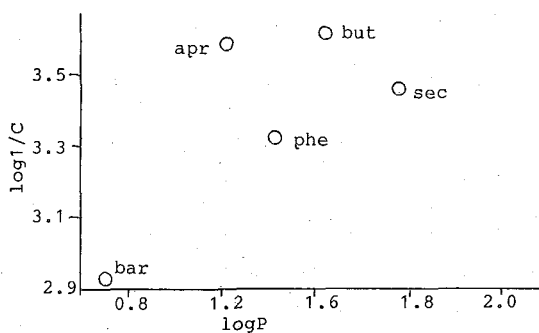


Fig1: 催眠活性log1/CとlogPの関係

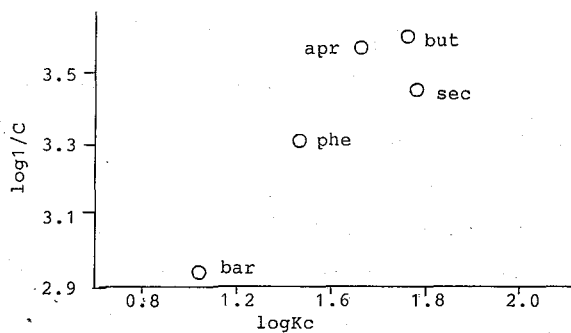


Fig2: 催眠活性log1/Cとミセル/水系のlogKcの関係

以上、バルビツール酸誘導体を用いて、ミセル(SDS)/水(D2O)系での分配係数の測定と解析が成功した。また、同じ方法でリポソーム/水系への応用も試みた。従来、生理活性と相関関係を調べるには、分配特性の測定データの多いオクタノール/水が利用されてきたが、その代わりに、ミセル/水系、あるいはリポソーム/水系など、より生体系に近い特性を有するモデル系の開発及びそこでの測定方法の開発がQSARの解析において重要となりつると結論されよう。

Table 3: ^1H T_1 of Benzylalcohol in the Presence and Absence of Paramagnetic Ions and Degree of Solubilizations in Liposome

| | $T_1(\text{aq})$ | $T_1^{\text{P}}(\text{aq})$ | T_1, obsd | $T_1^{\text{P}}, \text{obsd}$ | ρ |
|--|------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|--------|
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$ | 11.29 | 8.38 | 5.53 | 4.94 | 0.30 |

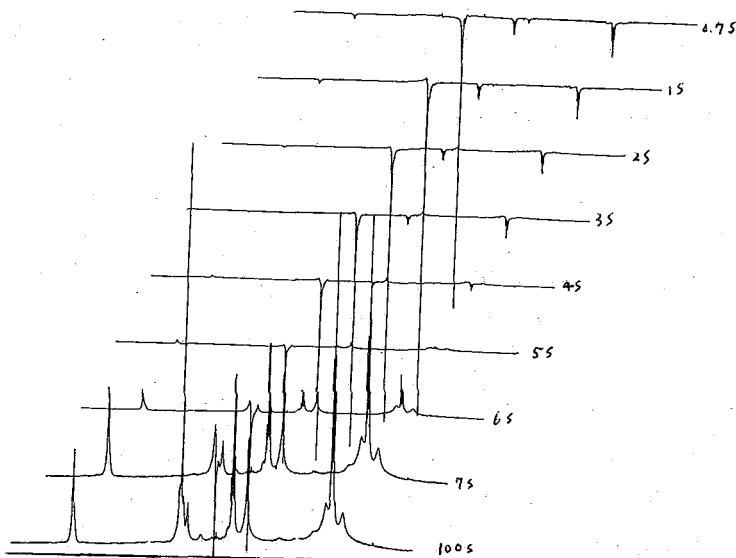


Fig3: リポソーム/水系におけるBenzylalcoholの T_1 測定(日立R25OHT型による)

参考文献

- 1). Z.Gao, R.E.Wasylishen and J.C.T.Kwak, J.Phys.Chem., 93, 2190 (1989).
- 2). K.Shinoda and T.Soda, J.Phys.Chem., 67, 2072 (1963).
- 3). C.Hansch and A.Leo, "Substituent Constants For Correlation Analysis", John Wiley & Sons, New York(1979).
- 4). C.Hansch, S.M.Anderson, J.Med.Chem., 11, 1 (1967).
- 5). G.C.Newman and C-H.Huang, Biochemistry, 14, 3363 (1975).

(東工大・生命理工) ○宇田川敦志、山本泰彦、井上義夫、
中條利一郎

Structural Determination of Cycloaliphatic Epoxide Using ^{13}C -NMR spectroscopy and MO Calculations

Atsushi Udagawa, Yasuhiko Yamamoto, Yoshio Inoue, and Riichiro Chujo

(Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology)

The stereochemical structure of the cycloaliphatic epoxy monomer, 4-vinylcyclohexene oxide (VCO), was determined using ^{13}C -NMR spectroscopy and quantum chemical calculations. The ^{13}C 2D INADEQUATE NMR spectrum of VCO clarified that this material is a mixture of 4 stereochemical isomers. Although NMR spectroscopy is unavailable to identify the structure of the isomers, the isomeric energy calculations using the MNDO method lead to the complete structural determination of them. Among 8 possible isomers in terms of the bond connecting cyclohexene oxide ring and ethylene oxide ring, the equatorial forms were more stable than the axial forms. Thus the formers are isomers found in the ^{13}C -NMR spectrum of VCO.

1. はじめに

エポキシ樹脂硬化物の物性はその出発物質の構造に大きく依存するので、モノマーのキャラクターゼーションは重要である。脂環式エポキシ樹脂は分子内にシクロヘキセンオキシサイドの環構造を有する化合物である。シクロヘキセンオキシサイドの分子構造は、イス形コンフォメーションで知られているシクロヘキサンの構造とは異なり、むしろシクロヘキセンに似ている。酸素原子に近い側の4つの炭素原子は平面を形成し、残りの2つの炭素原子はこの平面の上下に位置している¹⁾。

私どもは、代表的な脂環式エポキシ樹脂のひとつである4-ビニルシクロヘキセンオキシサイド(VCO)の構造を ^{13}C -NMRにより解析した。VCOの ^{13}C -NMR共鳴の帰属は2D-INADEQUATE法を用いて行い、得られた帰属よりこのエポキシ樹脂には4種の立体異性体が混在することが明らかになった。これらの異性体の立体構造を半経験的な分子軌道計算(MNDO; modified neglect of diatomic overlap)²⁾により決定した。

うだがわあつし、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

2. 実験

^{13}C -NMR測定はJEOL GSX-500を用い、観測周波数125 MHz、測定温度40°Cで行った。溶媒は CDCl_3 を用い、サンプル濃度は50 wt%に調製した。 ^1H -デカップリング ^{13}C スペクトルは繰り返し時間4秒、積算回数64回で得た。NOEを抑えた ^{13}C スペクトルは繰り返し時間20秒(最も長い T_1 の10倍以上)、積算2500回で得た。2D-INADEQUATEスペクトルは、 $90^\circ - T - 180^\circ - T - 90^\circ - t_1 - 135^\circ - t_2$ (acq.)のパルス系列($T=7.14\text{ms}$)を用いて得た。繰り返し時間2秒で各 t_1 につきFIDを256回積算した。2048×128のデータマトリクスを4096×256にゼロフィリングし、フーリエ変換を行った。

VCOの異性化エネルギーの計算はSUN-4マイクロコンピュータを用い、MNDO法で計算した。原子座標はシクロヘキセンオキサイド¹⁾とエチレンオキサイド³⁾の座標より得た。各モデルにおいて、 $\text{C}_1 - \text{C}_7$ 軸の回転により生じるいくつかのコンフォマーのエネルギーを計算し、最小の値をそのモデルの異性化エネルギーとした。

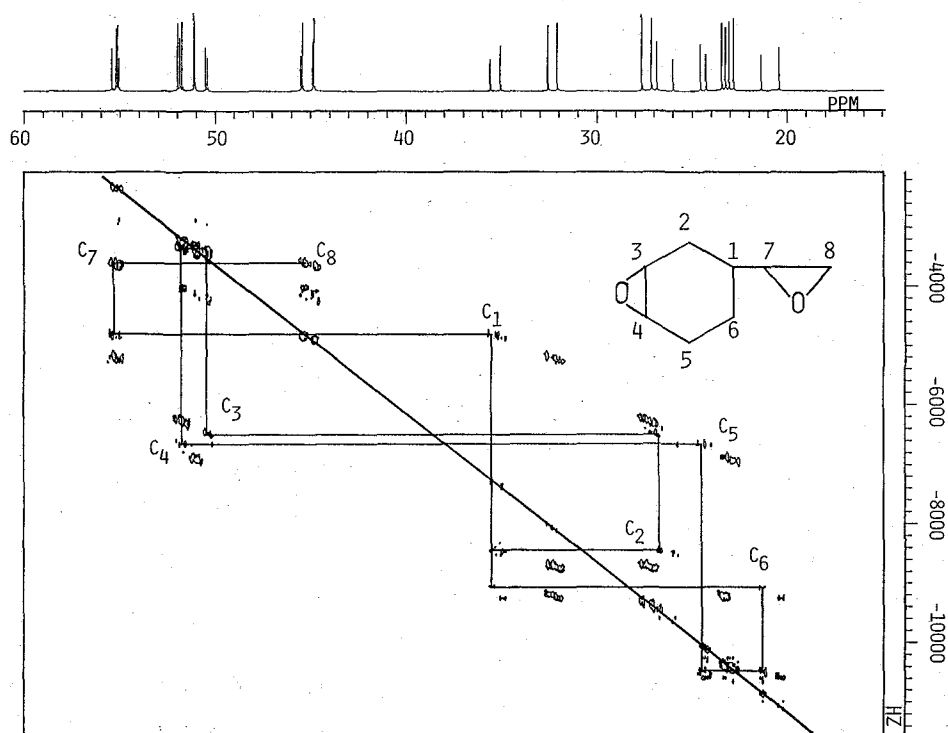


Figure 1. ^{13}C 2D INADEQUATE spectrum of 4-vinylcyclohexene oxide in 50wt% CDCl_3 solution. The $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ connectivities arising from Isomer A are indicated by the solid line.

3. 結果と考察

VCOの2D-INADEQUATEスペクトルを図1に示す。VCO分子には8個の化学的に非等価な炭素があるのに対し、 ^{13}C -NMRスペクトルには32本の共鳴が観測された。よって、VCOは4種の異性体の混合物であることが示唆される。2Dスペクトルにおいて、4つの独立な炭素骨格が観測されたことにより、4種の異性体の存在が確認された。帰属を表1にまとめた。さらに、VCO異性体の組成比を、定量性のある条件で測定したNOEを抑えた ^{13}C -NMRスペクトルのC₁共鳴の強度から計算し、表1に示した。

INADEQUATE法により、VCOの4種の異性体は同じ分子骨格をもつことが明らかになった。よって、これらの異性体は立体化学的な構造の違いにより生じていると考えられる。図2にVCOの分子モデルを示す。シクロヘキセンオキサイド環に対するエチレンオキサイド部分の結合の仕方は4種類あり、それに対応して4種の異性体(モデル1-4)が考えられる。モデル1と4ではエチレンオキサイド部分がアキシアルに位置しているのに対し、モデル2と3ではエクアトリアルである。C₁炭素原子とシクロヘキセンオキサイドの酸素原子の距離はモデル1と2で3.35Åに対し、モデル3と4では3.01Åである。さらに、C₁とC₇はキラルな炭素であるため、各々のモデルにおいて、C₇のコンフィギュレーションに対応して2つのジアステレオマーの構造が可能である。よって、VCOにはモデル1R, 1S, 2R, 2S, 3R, 3S, 4R, 4S(RとSはC₇のコンフィギュレーションを表す)の8種の異性体と考えられる。

8種の異性体の電子構造はそれぞれ異なるので、 ^{13}C -NMRスペクトルでは化学シフトが違うと考えられる。INADEQUATEスペクトルにおいて4種の炭素骨格が観測されたという事実は、VCOには4種の異性体が存在していることを示唆している。そこで、これらの立体構造的な安定性を評価するために、VCOの8種の異性体モデルの全エネルギーをMNDO法により計算し、表2に示した。エネルギーの低い順に、

$$2R < 2S < 3R < 3S < 1S < 1R < 4R < 4S$$

である。エネルギーの低い4つのモデルはすべてエクアトリアルであった。3Sと1Sのエネルギーの差は2.67kJであった。(つぎに大きいエネルギー差は1Rと4Rとの0.74kJである。)NMRでは4種の異性体しか検出されていないことから、その構造はみなエクアトリアルであることがわかった。これは他の脂環式エポキサイドの構造解析の結果⁴⁾と一致した。異性化エネルギーと表1の組成比を対照することにより、NMRで検出された異性体A, B, C, Dの立体構造はそれぞれモデル3S, 3R, 2S, 2Rに対応すると結論した。

参考文献

1) B. Ottar, Acta Chem. Scand., 1, 283 (1947). 2) M. J. S. Dewar and W. Thiel, J. Am. Chem. Soc., 99, 4899 (1977). 3) R. E. Parker and N. S. Isaacs, Chem. Rev., 59, 737 (1959). 4) A. Udagawa, et al, Polymer, in press.

Table 1. ^{13}C NMR chemical shift assignments and isomeric composition of 4-vinylcyclohexene oxide.

| Isomer | ^{13}C NMR chemical shift /ppm | | | | | | | | Isomeric composition |
|--------|---|------|------|------|------|------|------|------|----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| A | 35.3 | 26.5 | 50.4 | 51.8 | 24.1 | 21.0 | 55.3 | 45.5 | 0.178 |
| B | 34.7 | 25.5 | 50.2 | 51.8 | 23.8 | 19.9 | 54.9 | 44.9 | 0.212 |
| C | 32.2 | 27.1 | 51.9 | 51.0 | 22.6 | 23.1 | 55.1 | 45.4 | 0.293 |
| D | 31.6 | 28.8 | 51.6 | 51.0 | 22.3 | 22.8 | 55.0 | 44.8 | 0.317 |

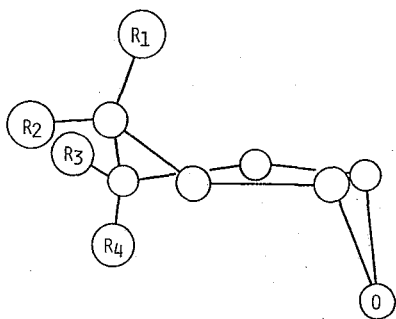


Figure 2. Molecular model of 4-vinylcyclohexene oxide. Model 1, $R_1 = \text{EO}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$; Model 2, $R_2 = \text{EO}$, $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$; Model 3, $R_3 = \text{EO}$, $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$; Model 4, $R_4 = \text{EO}$, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$, where EO is the ethylene oxide moiety.

Table 2. Isomeric energy of 4-vinylcyclohexene oxide.

| Model | Isomeric energy / $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ |
|-------|---|
| 1R | 4.61 |
| 1S | 4.13 |
| 2R | 0 |
| 2S | 0.30 |
| 3R | 0.88 |
| 3S | 1.46 |
| 4R | 5.35 |
| 4S | 5.64 |

P14

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-異性体の立体構造の決定とアミノ基含有化合物との反応生成物の構造に関する研究 (京大・薬、*メレル・ダウ製薬、**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

Structural investigations on the stereochemistry of glutaraldehyde oligomers and on the reaction products between the oligomer and an amino group containing compound by NMR spectroscopy

Yoshihiro Kuroda, Toshio Tashima*, Masahiro Imai**, Shigemasa Yagi, and Terumichi Nakagawa (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, *Merrell Dow Pharmaceuticals K.K., **Central Research of Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd.)

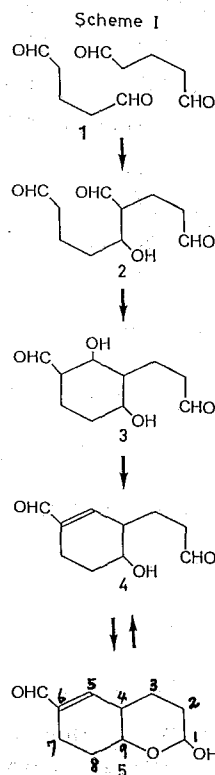
Structures of the stereoisomers (substances P1 and P2) of glutaraldehyde oligomers which are useful as a cross-linking agent of enzymes have been determined by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. As a model for the cross-linking reaction, structures of the products obtained from the reaction between substance P2 and O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (O-PFBHA) have also been investigated. The O-PFBHA was found to yield two Schiff's base linkages by reacting with the α, β -unsaturated formyl group and the hemiacetal in substance P2. The reaction product due to Michael addition was not detected.

1. はじめに

昨年のNMR討論会において、固定化酵素調製用新規架橋剤であるグルタルアルデヒドオリゴマー(化合物P2)の構造に関して報告した(講演番号P29)。この化合物はスキームIに示すように2分子のグルタルアルデヒド(1)から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ダイマー(5)であると結論した。このダイマーには不斉炭素原子が3ヶ所(1, 4及び9位)ある。これらのうち、1位に関しては2次元NOESYスペクトルにおける”交換”によるクロスピークの出現により、化合物P2は溶液中では水酸基の配向に関する異性体間の平衡状態で存在すると結論した。今回、化合物P2の4及び9位における立体異性体と思われる化合物(P1)を分離精製することができたので、その立体構造の検討を行った結果を報告する。また、生体物質と化合物P2との架橋化反応のモデルとしてO-(2,3,4,5,6-penta-fluorobenzyl)hydroxylamine(O-PFBHA)との反応生成物の構造決定の結果も併せて報告する。

2. 実験方法

化合物P1及びP2は、従来の方法(Chem. Pharm. Bull., 37, 2463, 1989)により得られた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分取した。分離条件は昨年のNMR討論会で報告したのと同じである。NMRスペクトルはBruker AM-600及びAC-300により測定した。



3. 結果及び考察

1) 化合物P2とP1の4及び9位の立体配座について

化合物P1は ^1H 及び ^{13}C -NMRスペクトル、及び ^{13}C -DEPTの結果から、その組成は化合物P2と全く同じであることがわかった。またCOSYスペクトルの解析の結果、そのプロトンのスピン系は(5)の構造で説明できた。従って、化合物P1は4及び9位の不斉炭素原子の配座の違ったものと結論した。その立体配座は化合物P2の1位に関する異性体の一方について(図1、 β -isomer)、(1)H1とH9の間にNOE相関がある、(2)H1とH4及びH4とH9相互にはNOE相関が無い、(3) $^3\text{J}(\text{H4-H9})=10\text{Hz}$ の理由から図1に示すようにH4とH9は共にaxial方向を向いていると結論した。一方、化合物P1に関するNOEデータは未だ得られていないが、 $^3\text{J}(\text{H4-H9})$ が2Hz以下であることよりH9とH4はピラン環においてそれぞれaxial及びequatorialに向いていると結論した。

2) 化合物P2とO-PFBHAとの反応生成物の構造決定

GC-MS及びTLC分析の結果、2種類の化合物(XG及びXC)が主な反応生成物として存在することがわかった。このそれぞれの重クロロホルム溶液におけるNMRスペクトルから、両者は数分以内に相互に異性化して平衡になることがわかった。しかしシクロヘキサン中においてはこの異性化の速度は遅いことより、シクロヘキサン- d_{12} 溶液として二次元COSY、NOESY、CH-COSY及びHMBCスペクトルの測定を行なった。HMBCスペクトルの例を図2に示す。これらの結果から、化合物XGの構造は図3に示すものと結論した。また、化合物XCはC1を含むオキシムがsynのものであると考えられる。

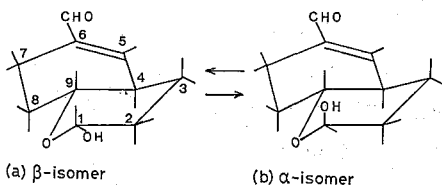


図1. 化合物P2の構造

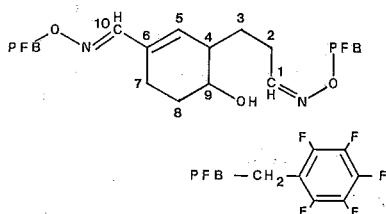


図3. 化合物P2とO-PFBHAとの反応生成物(化合物XG及びXC)の構造

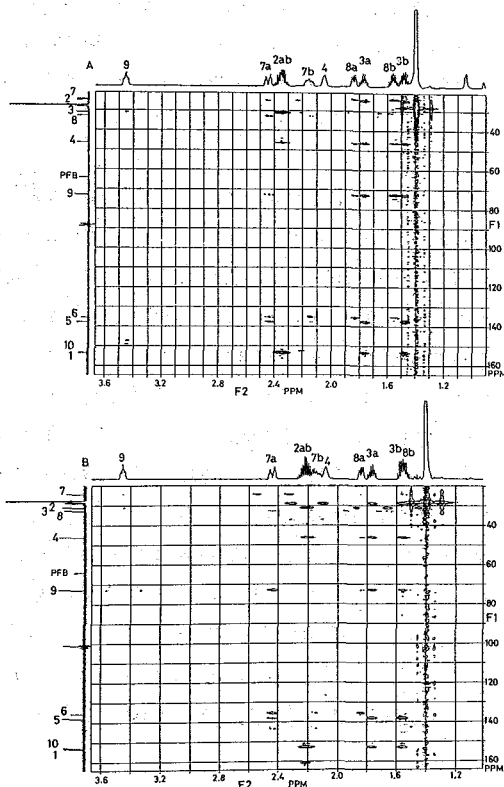


図2. 化合物XG(スペクトルA)及び化合物XC(スペクトルB)のシクロヘキサン d_{12} 溶液のHMBCスペクトル(^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz)。

多量子コヒーレンスの展開のための待ち時間:
A, 60 ms; B, 30 ms。

P15

(三井石化) ○恩田光彦、水野章、相根敏裕

^{13}C -NMR Study of Microstructure of Polynorbornadiene

(Mitsui Petrochemical Industries Ltd.) Mitsuhiko Onda, Akira Mizuno, and Toshihiro Sagane

Polynorbornadiene obtained with $\text{AlEtCl}_2/\text{t-BuCl}$ catalyst system at -50°C was successively fractionated by boiling toluene and *o*-dichlorobenzene. The microstructures of both toluene soluble and *o*-dichlorobenzene insoluble fractions were characterized by ^{13}C NMR in solution and/or in solid state and DSC. Both the polymer fractions were shown to contain repeating 3,5-disubstituted nortricyclene unit with *exo/exo* and *exo/endo* placements present in a 55:45 ratio. The polymerization mechanism concerning the stereoregular addition of a norbornadiene monomer to the carbonium ion at the growing polymer chain-end was also proposed.

1. 緒言

ノルボルナジエン (NBD) のカチオン重合は、Kennedy らにより検討され ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}$ または CH_2Cl_2 溶媒、 AlCl_3 触媒、 $-123^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$)、 -123°C という極低温に限りベンゼン可溶性ポリマーが得られると報告されている¹⁾。生成したポリマーの T_g は 320°C で、可溶性、linear な付加重合型ポリマーでは最高の T_g を示し興味深い。今回、 ^{13}C -NMR により、 $\text{AlEtCl}_2/\text{t-BuCl}$ 触媒系でカチオン重合したポリノルボルナジエン (PNBD) の立体構造および、重合機構を明らかにした²⁾。

2. 実験

2-1 試料

$\text{AlEtCl}_2/\text{t-BuCl}$ 触媒系で NBD のカチオン重合を -50°C で行なった。得られたポリマーを沸騰トルエンおよび *o*-ジクロロベンゼン溶媒で分別し、トルエン可溶部 (PNBD-S) および *o*-ジクロロベンゼン不溶部 (PNBD-I) を、構造解析に用いた。モデル化合物として用いた 3-Ethylnortricyclene を文献³⁾に従って合成した。

2-2 装置

溶液および固体高分解能 NMR 測定には、それぞれ、JEOL GX-500 および GSH-270 型核磁気共鳴装置を使用した。 T_g 測定には、PERKIN-ELMER DSC-7 型示差走査熱量計を使用した。

3. 結果と考察

Fig. 1 に PNBD-S の ^{13}C -NMR スペクトルを示す。DEPT 法により炭素種を判別した。高磁場 ($9 \sim 18\text{ppm}$) にメチンシグナルが観測されることから、3員環の構造部分の存在が示唆され

る。また、オレフィン炭素シグナルが観測されないこと、さらに、TOTALのメチレン/メチンシグナル強度比(1/6)を考え合わせると、重合により nortricycleneユニットが生じていることが判る。

2種類観測されたメチレンシグナルは、nortricycleneユニットのC3,C5位の立体配置の違いを反映していると考え、3-ethylnortricycleneの化学シフト値を基に、モデル化合物3,5-di-ethylnortricycleneの3種の立体異性体のリング炭素の化学シフトを計算し、実測値と比較した(Fig.1)。

その結果、PNBD-Sは、[A]:EXO/EXO型、および[B]:EXO/ENDO型の2種類の繰り返し構造からなり、[C]:ENDO/ENDO型構造は存在しないことが判った。また、シグナル強度から[A]/[B]=55/45であった。

PNBD-SおよびPNBD-Iは、ほぼ同じ¹³C-CP/MASスペクトルを示し、いずれも、290℃という高いT_gを与えた。従って、PNBD-IはPNBD-Sと基本的に同じ構造を持つと推定した。

PNBDが、[C]の繰り返し構造を持たない理由は、立体障害を含む前置換基効果のためと考え、scheme 1 に示すNBDの重合機構を提案した。

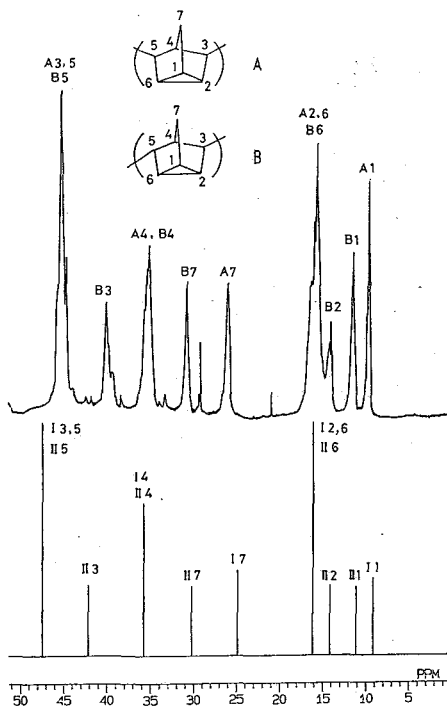
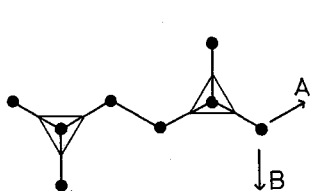
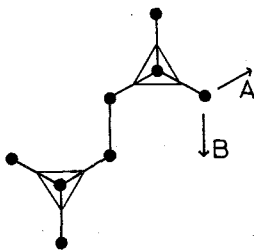


Fig.1
125MHz ¹³C-NMR spectrum of PNBD-S(top) and the sick spectrum calculated based on the chemical shifts of model compounds(botom)

Scheme 1



The polymerization proceeds either in the direction A or in B.



The polymerization proceeds only in the direction A.



III



steric representation of nortricyclene unit

4. 文 献

- 1) J.P.Kennedy and J.A.Hinlicky, *Polymer*, **6**, 133(1965)
- 2) A.Mizuno, M.Onda and T.Sagane, *Polymer*, submitted
- 3) U.M.Dzhemilev and O.S.Vastrikava, *J.Organomet.Chem.*, **285**, 43(1985)

花房尚史 北大 低温研

Dynamics of Water Absorbed to Polyacrylamide gel

Naofumi Hanafusa Inst. of Low Temp. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo, Japan

Polymers of acrylamide Na-salt are widely used for gel-electrophoresis, biogel and e.t.c. It was considered that the characteristic of water molecule trapped in narrow and small space was interested. Using $^1\text{H-NMR}$, the characteristics, the amount and the dynamics of unfrozen water in acrylamide gel, were estimated. As expected, the amount of unfrozen water was very large comparing with agarose or proteins. At room temperature and -35°C , about several times of water were contained in the network of polyacrylamide. Mono acrylamide salt itself had not so much hydration water. The extents of the interaction, the values of τ_0 and D , were rather small than proteins.

It might be thought that the water molecule contained polyacrylamide were separated and trapped mechanically only in the space of the network of polymer and not so restricted by the monomer molecule itself. The characteristic nature of the water in the gel were very similar with that of ordinary water.

「はじめに」アクリル酸塩の重合体としてのポリアクリルアミドは、ゲル電気泳動の担体、分子篩としてのハイゲル、などの他、吸水性高分子として紙おむつ、生理用品などに広く用いられている。この重合体のネットワークにトラップされている水分子の動的性質については甚だ興味のあるところである。一般に例えば蛋白の水和量が $0.3\sim 0.4$ であるのに対し、これは常温で数十倍、数百倍の水を吸収する。また、凍結や乾燥により可逆的に水を吸収、排出する。勿論これは重合体のネットワークの網目構造の中に吸収されると考えられるが、この細かい空間に分割された水分子の特性をその不凍水について量的変動と動的性質について $^1\text{H-NMR}$ を用いて調べた。

「材料と方法」材料はゲル電気泳動用のポリアクリルアミド、BIOGEL 60, 100, 300、ライソ油脂より提供された紙おむつ用のポリアクリルアミドを用いた。

$^1\text{H-NMR}$ はこれまで同様、JEOL FX100核磁気共鳴吸収装置(PVT,スピノロッキング・エント、ゲラー・イントロパルス発生装置付き)を用い、不凍水量は標準試料(23% LiCl, 0.01M MnCl₂, 48, 5M H₂O)のシグナルとの面積比から求めた。分子相関時間 τ_c は $-50\sim -2^\circ\text{C}$ の温度で反転回復法で T_1 を求め、最小点法から任意の温度の τ_c を近似的に計算した。自己拡散係数 D は、常温の場合は磁場勾配法で磁場勾配の大きさを換え、その関数として、不凍水(凍結下)ではロッキングパルスの大きさを換え T_1 を測定し、その関数として計算した。

「結果と論議」Fig. 1は種々の大きさのポリアクリルアミドゲルの不凍水量の凍結温度による変化を示す。図とTable 1に見られるように、蛋白の水和量を示すとされる -35°C と、 0°C に外挿した時の不凍水量はポリアクリルアミドでは通常の蛋白の十数倍も大きい。ポリマーの大きさによる違いはこの程度でははっきりしないが、Fig. 2の τ_c と温度の関係を示す図と、biogelの三種類、BIOGEL 60, 100, 300について比較した結果から、大体に於いてポリアクリルアミドの大きさの小さいほど、不凍水量が多く、動的性質はより水に近い性質を示す傾向が見られた。吸水性高分子として紙おむつなどに用いられるポリアクリルアミドは吸水すると数ミクロン以上の粒径の粒状になる。単体のアクリル酸塩の不凍水量は重合体に比較すると非常に少ない。また、対照として調べたブドウ糖とゼラチンでは、ブドウ糖の水和量はポリアクリルアミドとそれほど変わらないが、ゼラチンではこれらに比べ比較的少ないが、それでも通常の球状蛋白の二倍以上あるのは、ゼラチン分子に直接水和した水以外に分子間の網目構造に捕捉されている水分子のためと思はれる。Fig. 1に見られるように、ここではポリアクリルアミドを除き、不凍水量が -40°C 以下の温度で再び増加している。測定は昇温の過程で行なって居り、試料はブドウ糖の中で -70°C で急速に冷却してFIDを観察しながら過冷却でなく凍結したのを確認してから測定を開始している。したがって昇温の過程で不凍水量が減少するように見えるのは、比較的冷却速度が大きいのと、水分子が網目構造の小さな空間に閉じ込められているため、水分子の運動が束縛され、局所的に微小な部分で過冷却しているか、微小な氷核が生成しそれが再結晶しているのかもしれない。実際、このような -40°C 以下での不凍水量の増大という現象はモノマーのアクリル酸塩や蛋白溶液のような水溶液系ではみられない。なお、村瀬はDSCを用いて、その放熱曲線からBIOGELで再結晶と思われる結果を観測している。常温での相互作用の大きさは、 τ_c についてはブドウ糖を含めて、 $1.6\sim 3\times 10^{-11}\text{sec}$ のオーダーで、純水より10倍ほど大きい。Dについても同様で純水の半分ほどで、常温でも純水より束縛されていることを示している。 0°C 以下の不凍水では、ゼラチンが蛋白とほとんど同じような挙動を示し、 τ_c は比較的大きな値を示す。自己拡散係数 D は、ポリアクリルアミドでは小

さな値を示し、例えば、 -30°C で球状蛋白とほぼ同様の $3 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{sec}$ に対し、ホリマ-では $1.5 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{sec}$ と五倍ほど大きな値を示す。

これらの結果から、ホリマ-に捕捉された水は、ホリマ-の網目構造で形成される空間自体でいわば構造的にトラップされているのでそのこと自体でその運動が拘束されて居り、網目構造を形成するアクリル酸アミド分子自体との相互作用は、ホリマ-の場合に相互作用の大きさがかえって小さくなることから、それほど大きくないと考えられる。動的性質は純水と、高分子の分子周辺に水和している水と純水の間というよりむしろ純水に近い性質を示す結果が得られた。とくに、不凍水量が多いのは、この空間により非常に細かく分割されているので、局所的な過冷却か、アモルファスな状態、いわばglassfycationされ、その周辺にいわば氷表面の「偽液状層」のような液状層が形成されているためではないかと思われる。ただ、現在の所、過冷却状態の水、またはアモルファスな氷についての核磁気的特性はよく判っていない。日用品に用いられるホリマ-で低温側の τ_c 比較が大きいのは、これは粒径が大きいので、アモルファスな氷よりIce Iが生成しやすいのではないかと思われる。

文献

村瀬即郎 1987 第25回生物物理学会年会予稿集 s-56

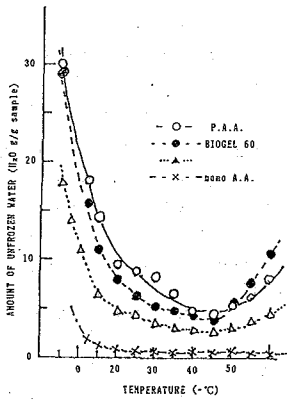


Fig. 1

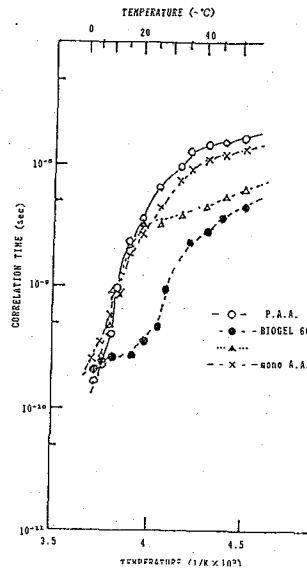


Fig. 2

Table 1 The characteristics of Polyacrylamide Gel

| | 24°C | | | -35°C | | |
|-----------|-------------|-----------------------|-------------------------------|-------|----------------------|-----------------------|
| | W.C. g/g | τ_c sec | D cm^2/sec | W.C. | τ_c | D |
| H.A.A. | ~ | 1.8×10^{-11} | 1.8×10^{-9} | 0.4 | 9.2×10^{-9} | 1.8×10^{-11} |
| BIOGEL 60 | 29 | 2.7×10^{-11} | 1.6×10^{-9} | 5 | 2.4×10^{-9} | 7.8×10^{-11} |
| P.A.A. | 30 | 2.1×10^{-11} | 2.1×10^{-9} | 4.5 | 1.1×10^{-9} | 4.8×10^{-11} |
| gelatin | 16 | 2.2×10^{-11} | 1.4×10^{-9} | 3.3 | 3.7×10^{-9} | |

1) W.C.; 凍結水(24°C)または不凍水(-35°C)の含量。(H₂O g/g Sample)

2) τ_c : 回転の分子相関時間; D: 自己拡散係数

3) H.A.A.: monomer of acrylamide, P.A.A.: acrylamide Na塩のpolymer.

P17

アップジョン ファーマシューティカルズ リミテッド

○青木優規美 西村俊秀 檜山行雄

NMR Spectroscopic Measurement of Silicon Antifoams

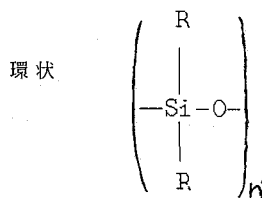
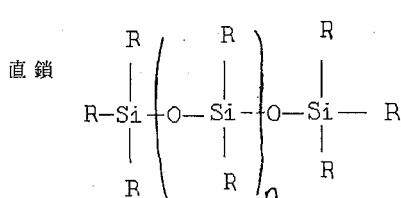
Upjohn Pharmaceuticals Limited

Y. Aoki, T. Nishimura, Y. Hiyama

Detection of small amount of silicone antifoam used in food and pharmaceutical products requires a methodology with high sensitivity and wide dynamic range. We could detect signals of fatty acid esters in antifoam emulsions as well as methyl groups from a methylpolysiloxane. Furthermore, thermospray mass spectrometric measurements showed that cyclic silicones were included in linear ones in antifoam emulsions. Proton NMR spectroscopy incorporated with TSP mass spectrometry is thus able to determine silicone antifoams of different types by 10-ppm order.

1. 序論

シリコンオイルは、下に示されるような直鎖又は環状のポリシロキサンを主成分とし、つや出し剤、離型剤、熱媒体、拡散ポンプ油、フッ素ゴムの可塑剤、繊維の撥水剤、潤滑剤等、各分野で広く用いられている物質である。



R: メチル基、フェニル基、水素など

本研究では、食品・医療品用消泡剤を中心として、シリコンオイルのNMR測定を行なった。この目的で用いられるシリコンオイルは主にオイル型とエマルジョン型が、製造されているが、検出には微量(10 ppm程度)で効くため高選択的かつ高ダイナミックレンジの方法が要求されるのである。

2. 実験方法

試料のNMR測定には、重クロロホルム溶解状態で、Bruker社 AM300を用いφ5 mmの試料管にて測定を行った。化学シフト値は、クロロホルムのピークをδ 7.3 ppmとし、これを基準とした。

シリコンの分子量分布は、Finnigan MAT-90 高分解能質量分析計において、フローインジェクションによるサーモスプレー (TSP) 質量分析法により測定した。

試料として用いたシリコンオイル及びシリコン消泡剤は以下の通りである。

シリコンオイル

S社の製品で、一般用のジメチルシリコンオイルとして市販されているKシリーズのなかで、粘度の違う二種、10CS及び500CSを使用した。また、T社の一般用のジメチルシリコンオイルとして市販されている製品T-1と化粧品添加用の環状ポリジメチルシロキサンであるT-2を使用した。

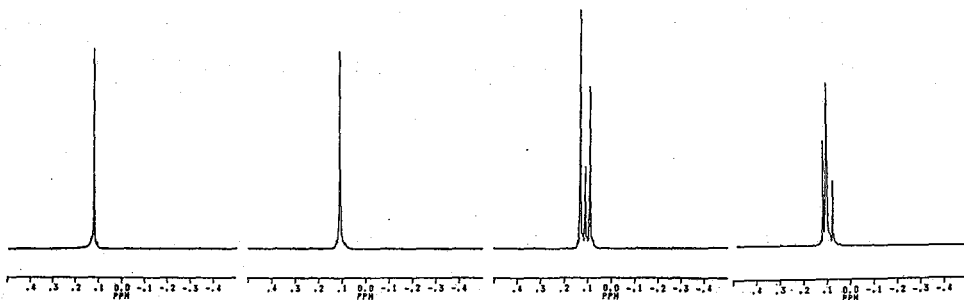
エマルジョン型シリコン消泡剤

S社の食品、医薬品用に使用可能な五種の製品、A, B, C, D, Fについて、またSI社の製品より、SA, SB, SCの三種、N社よりAFとDBの二種、TD社よりTD1の一種の製品を用いた。

3. 結果と考察

シリコンオイルのメチルピーク

シリコンオイルとしてはジメチルポリシロキサンが一般的であり、 $^1\text{H NMR}$ を測定すると、このメチルピークは $\delta 0.1$ ppm付近に出現する。直鎖ジメチルシリコンでは粘度が大きいもののメチルピークはほぼ重なって出現するのでシングレットとしてしか見られないが、粘度の小さなもの、すなわち分子量の小さなものでは多重線となって出現する。分子量を測定するためTSPマススペクトルも合わせて用いた。S社のKシリーズの10CS及びT社のT-1はトリプレットのピークである(図1)。Kシリーズの10CSは粘度より計算するとnの数は16個前後、質量スペクトルの結果では $n = 4 \sim 18$ 及び $n = 19 \sim 44$ の混合物であり、T-1は $n = 3$ の単一物であった。S社のKシリーズの500CSは、粘度より計算すると $n = 848$ 個前後であると考えられ、メチルシグナル分子の大きさを反映してシングレットであった。これに対して、環状ジメチルシリコンであるT-2は小さい分子であるが、メチル基はすべて等価であるためメチルシグナルは完全なシングレットを示した(図1)。TSP法の結果より、この分子は $n = 5$ と6であった。



T-2(T社)

K-500CS(S社)

図 1

T-1(T社)

K-10CS(S社)

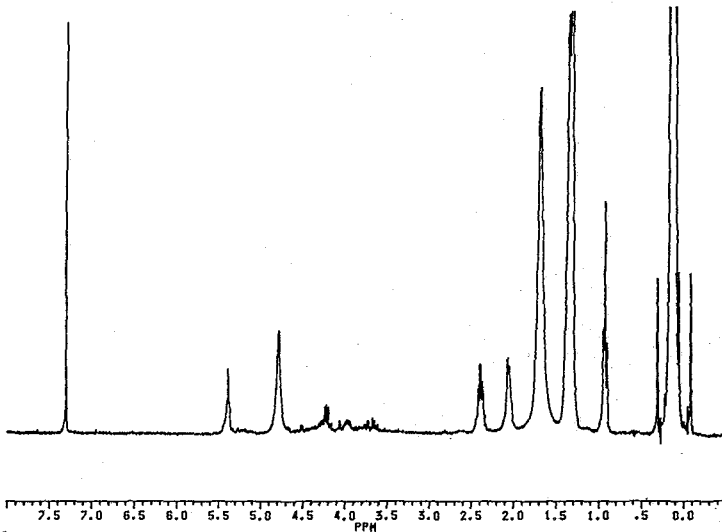
エマルジョン型消泡剤

エマルジョン型消泡剤の $^1\text{H NMR}$ を測定するとSiに結合したメチル基は全てシングレットのシグナルであった。しかし、エマルジョン型消泡剤では、シリコンの他に成分中に乳化剤が含まれており、成分が判明している消泡剤には共通して以下のものが含まれている。

シリコーン樹脂

| | |
|-----------------------------|------|
| ソルビタン脂肪酸エステル | 数% |
| グリセリン脂肪酸エステル | 数% |
| ショ糖脂肪酸エステルまたは繊維素グリコール酸ナトリウム | 0.数% |

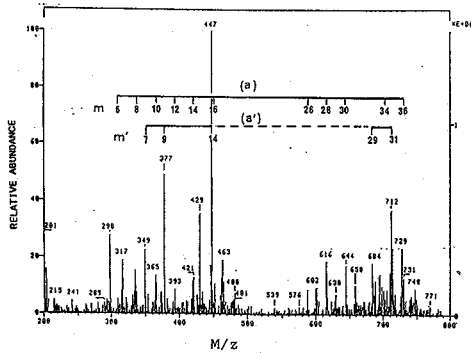
そこで、シリコーンシグナル以外にスペクトル上でこれらのシグナルが見られる代表としてS社のエマルジョン型消泡剤Aのスペクトルを次に示す。



エマルジョン型消泡剤Aの $^1\text{H NMR}$ スペクトル

全てのエマルジョン型消泡剤に共通して δ 0.9 ppmのトリプレット及び δ 1.2~1.3 ppmにブロードなシングレットまたはダブルットのシグナルが存在する。これは脂肪酸中のメチル基及びメチレン基と考えられる。また、 δ 2.3 ppmにトリプレット δ 4.1~4.2 ppmにマルチプレットのシグナルは多くのエマルジョン型消泡剤で見られる。 δ 4.1~4.2 ppmのシグナルはグリセリン脂肪酸エステル又はソルビタン脂肪酸エステルのグリセリン部もしくはソルビタン部のメチレン基と考えられる。

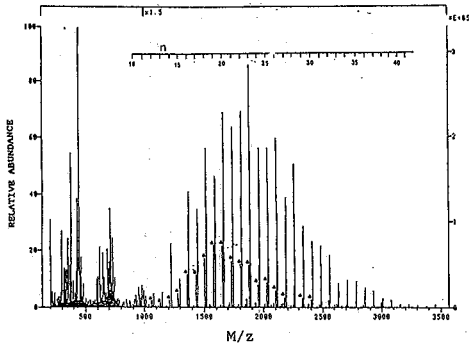
製品A(S社)では、 δ 5.35 ppmにブロードなシングレットのシグナルが、また、製品SA(SI社)でも δ 5.40 ppmにマルチプレットのシグナルが見られるが、これは不飽和脂肪酸のオレフィンプロトンと考えられる。実際、TSP質量スペクトルにおいても製品A(S社)においては、ソルビタン脂肪酸エステルに不飽和脂肪酸が存在していることが確認されている。この、S社の製品AのTSP質量スペクトルを次に示す。



S社 A の低質量領域の質量スペクトル

TSP質量分析法によって、エマルジョン型消泡剤はS社のA、F、D、またTD社のTD1を測定したが、これらに共通する特徴として、ポリシロキサン分子量は $n = 5 \sim 35$ が主であり、環状シリコンが共通して存在していることが分かった。

乳化剤の分子イオンピークは、低質量領域で観測される。



S社 A の質量スペクトル

環状シリコンは、左図のように直鎖シリコンのイオンピークより14 amu少ないところにイオンピークが現われているところから確認された。(図中△印)

水溶液中にシリコン消泡剤が存在している場合、クロロホルムにて抽出を行い、このサンプルを測定することによって定量を行なうことも可能である。S社のエマルジョン型消泡剤Cの10 ppm、50 ppm、100 ppmの水溶液を重クロロホルムにて抽出し、この試料にて $^1\text{H NMR}$ スペクトル上のシリコンシグナルのピーク高さとノイズレベルの比を求めると、この時の相関係数は0.998となり、この検量線を用い同様の測定条件にて未知の試料溶液を測定することで、水溶液中のシリコン量を定量することが可能であった。

4. 結論

以上のことから、微量のシリコン消泡剤は $^1\text{H NMR}$ を用いて定量を行なうことが可能であり、またTSP質量分析法を併せて用いることで、シリコン分子の大きさや環状ジメチルシリコンの存在、及びエマルジョン型消泡剤由来の乳化剤の存在を確認することで同定も可能である。

P18

○竹田卓也、大井隆夫、垣花秀武 (上智大・理工)

Complex formations between borate and diols in aqueous medium as studied by ¹¹B NMR

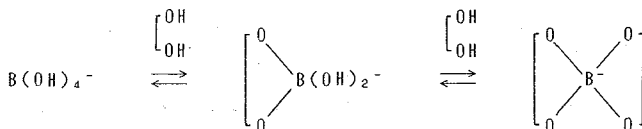
Takuya Takeda, Takao Oi and Hidetake Kakihana
(Dep. Chemistry, Sophia Univ.)

Borate is known to form complexes with polyols in aqueous medium. In this study, we examine by ¹¹B and ¹³C NMR spectroscopy complex formations between borate and three diols; 1,2-propanediol(1), 3-amino-1,2-propanediol(2) and 3-dimethylamino-1,2-propanediol(3).

At most three signals are observed in ¹¹B NMR spectra for each borate-diol solution. One of these signals is a peak corresponding to the exchange between boric acid and borate and the other two signals are assigned to 1:1 and 1:2 borate/diol complexes.

Stability constants between borate and the diols are calculated from the peak areas obtained. The decreasing order of the complex stability is, borate-(2) > borate-(3) > borate-(1).

【緒言】 水溶液中でホウ酸イオンはポリオールとの間で以下に示す錯形成反応をすることが知られている。本研究では、ポリオールとしてジオールである1,2-プロパンジオール CH₂(OH)CH(OH)CH₃ (1)、これにアミノ基を導入した3-アミノ-1,2-プロパンジオール CH₂(OH)CH(OH)CH₂NH₂ (2)、3-ジメチルアミノ-1,2-プロパンジオール CH₂(OH)CH(OH)-CH₂N(CH₃)₂ (3)を用い、それらとホウ酸との間の錯形成反応を¹¹B、¹³C NMRにより研究することを目的とした。



【実験】 約0.1M (1M = mol dm⁻³) ホウ酸と約0.5M ジオール (共に正確な濃度がわかっているもの) を含む3.0M NaCl水溶液をNaOHまたはHClを用いて様々なpHに調節し、各pHにおいて¹¹B、¹³C NMRを測定した。基準物質として¹¹B NMRでは三フッ化ホウ素・ジエチルエーテル、¹³C NMRでは3-(トリメチルシリル)プロパンスルホン酸ナトリウムを用いた。¹¹B NMRでは、得られたスペクトル中でピークが重なった場合にはスペクトル分解を行ない、ピーク面積により対応するホウ素種の濃度を決定した。

【結果と考察】 各試料の¹¹B NMRを測定した結果、いずれのホウ酸-ジオール水溶液についても最大三本のピークが観測された。Fig. 1, 2にホウ酸-1水溶液、ホウ酸-2水溶液

の¹¹B NMRスペクトルをそれぞれ示す。ホウ酸-2水溶液は2の場合と非常に類似したスペクトルを示した。各々のピークは文献値などを参考にB(OH)₃ + B(OH)₄⁻ (B⁰ + B⁻)、ホウ酸とジオールの1:1錯体(B⁻L)、1:2錯体(B⁻L₂)に帰属した。Table 1に各ピークの¹¹B NMR化学シフトを示す。ここでB⁰とB⁻は水溶液中での速い交換速度のため¹¹B NMRでは区別できず、pHで決まる両者の存在割合の加重平均によってピーク的位置が決まる一本のピークとして現われる。またアミノ基を含むジオールのホウ酸錯体のピークについてもわずかなpH依存性が観測された。これはアミノ基を含むジオールは次の平衡式による二つの状態が考えられ、それらが共にホウ酸イオンと錯形成するためと考えられる。

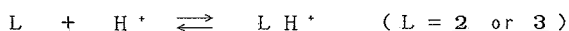


Table 1にピーク面積より計算された各ジオールのホウ酸錯体について以下で定義される平衡定数K₁、K₁'、K₂、K₂'を示す。

$$K_1 = [B-L] / [B^-] [L], \quad K_1' = [B-LH^+] / [B^-] [LH^+]$$

$$K_2 = [B-L_2] / [B-L] [L], \quad K_2' = [B-(LH^+)_2] / [B-LH^+] [LH^+]$$

この値よりジオールは2、3、1の順に錯形成がしやすいことが分かる。これは、アミノ基の電子吸引によりアルコールのOH基のO上の電子密度が変化した影響によるものと考えられる。

Table 1 Observed ¹¹B NMR chemical shifts and calculated stability constants between borate and the diols

| diols | chemical shifts (ppm) | | stability constants (mol ⁻¹ dm ³) | | | |
|---------------------------------|-----------------------|----------|--|------------------|----------------|------------------|
| | 1:1 錯体 | 1:2 錯体 | K ₁ | K ₁ ' | K ₂ | K ₂ ' |
| 1,2-propanediol | 5.5 | 9.2 | 4.4 | | 0.57 | |
| 3-amino-1,2-propanediol | 5.7-6.0 | 9.6-10.1 | 8.6 | 22 | 1.2 | 1.9 |
| 3-dimethylamino-1,2-propanediol | 5.5-6.1 | 9.5-10.0 | 7.5 | 18 | 1.0 | 1.9 |

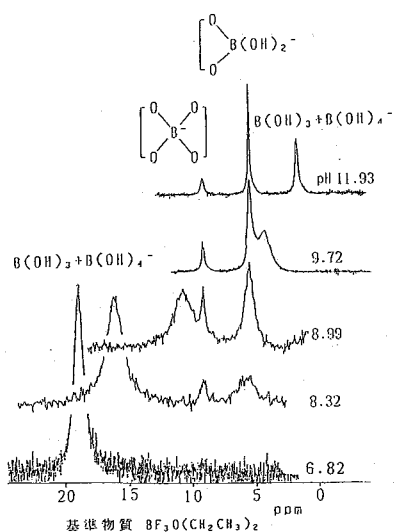


Fig. 1 ¹¹B NMR spectra of boric acid - 1,2-propanediol solutions

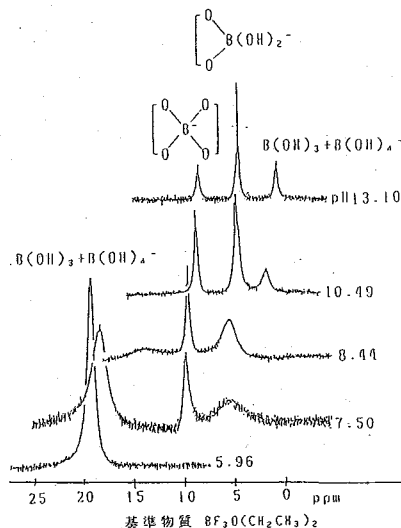


Fig. 2 ¹¹B NMR spectra of boric acid - 3-amino-1,2-propanediol solutions

(北見工大) ○福井洋之、三浦宏一、松田弘喜

Abstract

The Fermi-contact contributions to the nuclear spin-spin coupling constants are computed for four first-row hydrides, i.e., HF, H₂O, NH₃, and CH₄ using the finite perturbation many-body perturbation theory (FP-MBPT) through the second order in electron correlation correction. The calculated values of the J_{XH} (X=O,N,C) yield the reasonable results, but the calculation for J_{FH} and the geminal J_{HH} (in H₂O, NH₃, and CH₄) presents too large values.

I. Method of Calculation

If the Fermi-contact interaction between two particular nuclei A and B is investigated, the form of the total Hamiltonian H becomes

$$H = H^{(0)} + V_{AZ} + V_{BZ}, \quad (1)$$

where V_{AZ} and V_{BZ} can be written as

$$V_{NZ} = (8h\mu_B r_N/3)(\mu_0/4\pi) \sum_i \delta(\vec{r}_{Ni}) s_z(i) = \sum_i v_{NZ}(i), \quad N = A, B. \quad (2)$$

The phenomenological isotropic coupling constant J_{AB} is defined from the second order perturbation energy E_{AB} by

$$E_{AB} = hJ_{AB}. \quad (3)$$

We consider a molecular system containing even number of electrons interacting through the instantaneous mutual Coulomb potential v_{ij} and any number of nuclei. Within the fixed nucleus approximation, the unperturbed Hamiltonian H_0 for the system, excluding the inter-nuclear repulsions, is

$$H_0 = \sum_i^{\text{core}} h(i) + \sum_{i<j} v_{ij}, \quad (4)$$

where $h(i)$ is the sum of the kinetic energy and the nucleus-electron attractive potential of the i th electron. In order to solve the Schrodinger equation, we first introduce the one-body potential v giving an appropriate independent-particle model of the system. In this paper we shall choose v to be the Hartree-Fock (HF) potential V_{HF} .

Generally, in the calculation of correlation contributions to electromagnetic properties of atoms and molecules, the expansion in terms of one-electron states determined in the presence of the perturbation field is expected to be more rapidly convergent. Accordingly, if we obtain a set of one-electron states by solving the Hartree-Fock equation in the presence of the perturbation v_{AZ} , the one-electron equation to be solved is

$$[h^{\text{core}} + v_{\text{HF}} + \lambda v_{\text{AZ}}] \psi_k = \epsilon_k \psi_k, \quad (5)$$

where $\{\psi_k\}$ is a set of unrestricted one-electron spin-orbital wave functions, and λ is the perturbation parameter. In this case the total Hamiltonian H is partitioned as

$$H = H_A + v_{\text{corr}} + v_{\text{Bz}}, \quad (6)$$

where

$$H_A = \sum_i^{\text{core}} [h(i) + v_{\text{HF}}(i) + \lambda v_{\text{AZ}}(i)], \quad (7)$$

$$v_{\text{corr}} = \sum_{i < j} v_{ij} - \sum_i v_{\text{HF}}(i). \quad (8)$$

We expand here the second order perturbation energy E_{AB} in terms of the electron correlation potential v_{corr} . If we denote the energy of the j th order with respect to v_{corr} and the first order to both v_{AZ} and v_{Bz} as $\epsilon_{\text{AB}}^{(j)}$, we have

$$E_{\text{AB}} = \sum_{j=0}^{\infty} \epsilon_{\text{AB}}^{(j)}. \quad (9)$$

$\epsilon_{\text{AB}}^{(j)}$ is obtained from $\epsilon_{\text{B}}^{(j)}$, which is defined as the energy j th order in v_{corr} and first order in v_{Bz} , by using the equation

$$\epsilon_{\text{AB}}^{(j)} = \left[\frac{\partial}{\partial \lambda} \epsilon_{\text{B}}^{(j)} \right]_{\lambda=0} = \epsilon_{\text{B}}^{(j)} / \lambda \quad (10)$$

for the small finite perturbation of λv_{AZ} . If the j th correlation contribution to J_{AB} is defined by

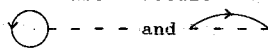
$$J_{\text{AB}}^{(j)} = \epsilon_{\text{B}}^{(j)} / h\lambda, \quad (11)$$

we get

$$J_{\text{AB}} = \sum_{j=0}^{\infty} J_{\text{AB}}^{(j)}. \quad (12)$$

We note that the zeroth order correlation contribution $J_{\text{AB}}^{(0)}$ is equal to the finite perturbation SCF coupling constant J_{AB} (FP). Furthermore, it is shown that the first order contribution $J_{\text{AB}}^{(1)}$ vanishes due to the Brillouin theorem as follows. If we denote the ground and excited eigen kets of H_A by $|0\rangle$ and $|n\rangle$, respectively, with the eigen energies $E_0^{(0)}$ and $E_n^{(0)}$, we have

$$\begin{aligned} \epsilon_{\text{B}}^{(1)} &= \sum_n (E_0^{(0)} - E_n^{(0)})^{-1} [\langle 0 | v_{\text{Bz}} | n \rangle \langle n | v_{\text{corr}} | 0 \rangle + \langle 0 | v_{\text{corr}} | n \rangle \langle n | v_{\text{Bz}} | 0 \rangle] \\ &= \sum_a^{\text{occ}} \sum_r^{\text{unocc}} (\epsilon_a - \epsilon_r)^{-1} [\langle 0 | v_{\text{Bz}} | \Psi_a^r \rangle \langle \Psi_a^r | v_{\text{corr}} | 0 \rangle + \langle 0 | v_{\text{corr}} | \Psi_a^r \rangle \langle \Psi_a^r | v_{\text{Bz}} | 0 \rangle] \\ &= 0, \end{aligned} \quad (13)$$

where Ψ_a^r is the singly excited triplet wave function made of the excitation from the occupied spin-orbital a to the unoccupied one r . The above result due to using HF orbitals demands to exclude the diagrams including  in the MBPT approach.

The lowest correlation contribution to J_{AB} is therefore $J_{\text{AB}}^{(2)}$. The second order correlation energy $\epsilon_{\text{B}}^{(2)}$ is the sum of the contributions of the 12 Feynman diagrams shown in Fig. 1. The algebraic representation for $\epsilon_{\text{B}}^{(2)}$ is easily obtained from the well known rule of the Feynman diagrams.

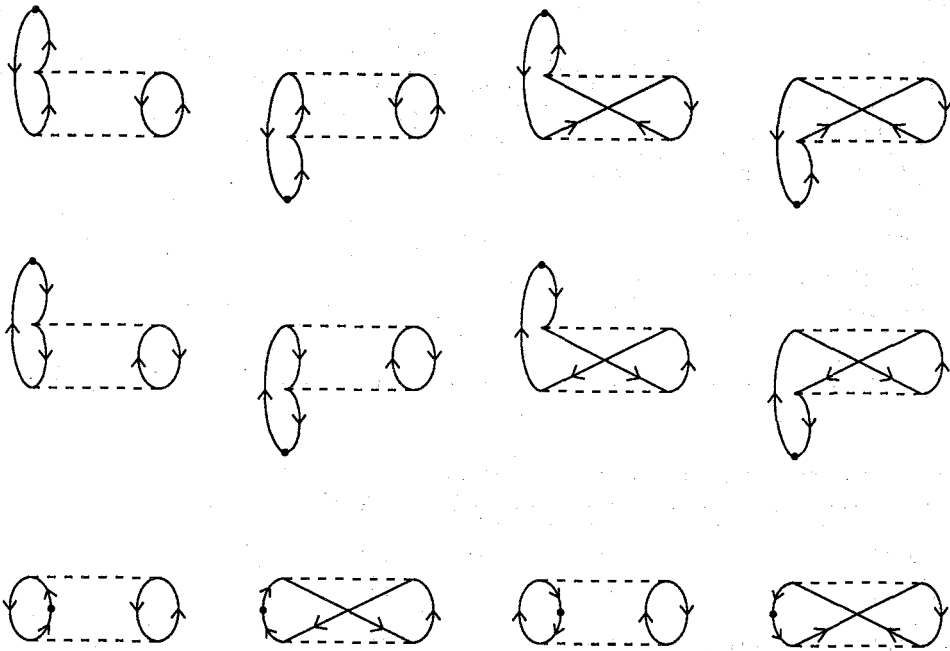


Fig. 1. Fermi-contact diagrams second order in correlation and first order in V_{Bz} .
 • means V_{Bz} interaction.

II. Results

Table I. Fermi-contact nuclear spin-spin coupling constants for the $H_2^{19}F$ molecule (in Hz).

| Basis set | 6-31G | 6-31G* | 6-31G** | 6-311G** | [7s4p2d/5s2p] | Exptl. |
|-------------------------------|-------|--------|---------|----------|---------------|--------|
| $J_{FH}^{(0)}$ | 259 | 211 | 274 | 341 | 453 | |
| $J_{FH}^{(0)} + J_{FH}^{(2)}$ | 248 | 198 | 253 | 307 | 391 | 343 |

Table II. Fermi-contact nuclear spin-spin coupling constants for the $H_2^{17}O$ molecule (in Hz).

| Basis set | 6-31G | 6-31G* | 6-31G** | 6-311G** | Exptl. |
|-------------------------------|-------|--------|---------|----------|--------|
| $J_{OH}^{(0)}$ | -74.2 | -67.0 | -66.2 | -72.8 | |
| $J_{OH}^{(0)} + J_{OH}^{(2)}$ | -69.8 | -61.1 | -59.4 | -64.6 | -62.2 |
| $J_{HH}^{(0)}$ | -24.0 | -22.7 | -22.8 | -23.9 | |
| $J_{HH}^{(0)} + J_{HH}^{(2)}$ | -20.5 | -18.9 | -18.7 | -19.7 | -8.9 |

Table III. Fermi-contact nuclear spin-spin coupling constants for the $^{14}\text{NH}_3$ molecule (in Hz).

| Basis set | 6-31G | 6-31G* | 6-31G** | 6-311G** | Exptl. |
|---|-------|--------|---------|----------|--------|
| $J_{\text{NH}}^{(0)}$ | 51.5 | 44.0 | 42.2 | 45.1 | |
| $J_{\text{NH}}^{(0)} + J_{\text{NH}}^{(2)}$ | 48.4 | 40.7 | 38.6 | 41.0 | 41.7 |
| $J_{\text{HH}}^{(0)}$ | -29.0 | -25.8 | -25.3 | -23.9 | |
| $J_{\text{HH}}^{(0)} + J_{\text{HH}}^{(2)}$ | -25.8 | -22.1 | -21.1 | -20.0 | -15.9 |

Table IV. Fermi-contact nuclear spin-spin coupling constants for the $^{13}\text{CH}_4$ molecule (in Hz).

| Basis set | 6-31G | 6-31G* | 6-31G** | 6-311G** | Exptl. |
|---|-------|--------|---------|----------|--------|
| $J_{\text{CH}}^{(0)}$ | 167 | 147 | 143 | 141 | |
| $J_{\text{CH}}^{(0)} + J_{\text{CH}}^{(2)}$ | 156 | 136 | 131 | 129 | 123.5 |
| $J_{\text{HH}}^{(0)}$ | -34.8 | -29.2 | -28.6 | -24.1 | |
| $J_{\text{HH}}^{(0)} + J_{\text{HH}}^{(2)}$ | -31.4 | -25.5 | -24.3 | -20.5 | -12.1 |

P44

(京都府立医大・生理、*神戸大・体育、**生理研・分子生理)

○吉崎和男、平川和文*、小田慶喜、森本武利、亘 弘**

^{31}P -NMR study on the energy metabolism in skeletal muscle of human arm.

Kazuo Yoshizaki, Kazufumi Hirakawa*, Yoshinobu Oda, Taketoshi Morimoto, and Hiroshi Watari** (Dept. Physiol., Kyoto Pref. Univ. Med., *Dept. Phys. Edu., Coll. G.A., Kobe Univ., and **Dept. Mol. Physiol., Natl. Inst. Physiol. Sci.)

^{31}P -NMR was shown to be useful for the analysis of energy metabolism in skeletal muscle of human arm. The surface coil tuned double to phosphorus and proton was useful to determine the location of sensitive volume using the NMR imaging of human arm. In the resting muscle the concentrations of phosphocreatine and inorganic phosphate were 34 and 5 mM, respectively, calculated with the assumption of 8.2 mM ATP. Intracellular pH was 7.1, calculated from the chemical shift (4.8 ppm) of the inorganic phosphate.

(はじめに)

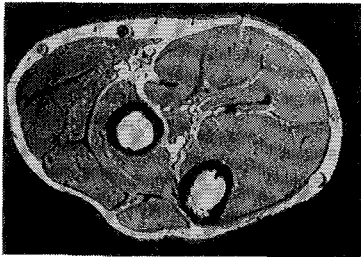
ヒト骨格筋におけるエネルギー代謝は従来、筋生検による微量の摘出した筋組織の生化学的分析により解析されてきた。本研究では非破壊的測定法であるNMR法をヒト骨格筋に応用し、表面コイルをもちいた ^{31}P -NMRスペクトル分析によるヒト前腕の骨格筋のエネルギー代謝について報告する。

さらに表面コイル法をヒト前腕の骨格筋に応用する場合、測定対象となる部位の把握が必要である。今回、 ^1H および ^{31}P の共鳴周波数に二重同調した表面コイルを用いることにより、 ^1H -MRI画像から測定部位の設定が可能となったことについても報告する。

[方法]

対象は健康成人男子で、左側・仰臥位のもとに左前腕内側の浅指屈筋付近の上に表面コ

A)



B)



図1 ヒト左前腕断面の ^1H -MRI画像(A)およびその表面コイルによる検出部位のMRI画像(B)。

よしざきかずお、ひらかわかかずふみ、おだよしのぶ、もりもとたけとし、わたりひろし

イルをおいた。表面コイルは半径40 mmの ^{31}P の共鳴周波数に同調したもの、ならびに ^1H および ^{31}P の共鳴周波数に同調した直径40 mmのものを用いた。また、前腕断面の ^1H -MRI画像の測定には直径10cmのコイル(スロット型)をもちい、前腕の同一部位をコイル内においた。

MRI画像ならびに ^{31}P -NMRスペクトルの測定には日立製MRI/MRS装置(2.1 T、 ^1H および ^{31}P の共鳴周波数:90および36 MHz)を用いた。スペクトル測定の際のシミングには水のシグナルを用いた。通常、定量分析には20秒の繰り返しで16回積算、運動負荷時には2秒の繰り返しで約0.5分あるいは1分間積算した。

安静状態を15分以上保った後、 ^{31}P -NMRスペクトルを測定した。運動負荷としてはゴム球を7秒間、最大握力でにぎる運動を0.5分あるいは1分ごとに繰り返した。阻血負荷には駆血帯を上腕にまき、最大血圧以上の圧を被検者が加え、血流再開時には同様に被検者が駆血帯を解放した。ゴム球を圧トランスジューサーにつなぎ、筋収縮時間を計測した。

[結果および考察]

1. 表面コイルによる検出部位の ^1H -MRI画像による同定。

ヒト左前腕の断面の ^1H -MRI画像を図1Aに示す。親指側を左に、前腕の内側を上を示す。中央部より左に伸筋群と橈骨、右に尺骨と屈筋群が認められる。表面コイルで前腕の ^1H -MRI画像を測定すると、図1Bに示すようにコイルの半径程度の深さまでが検出できている。この表面コイルの位置を前腕表層の屈筋群が検出できるように設置した。このように表面コイルを ^{31}P のみならず ^1H の共鳴周波数にも同調することにより同一のコイルでの測定部位の設定がMRI画像の測定によって容易に確認できるようになった。

2. ヒト前腕骨格筋の ^{31}P -NMRスペクトルによる安静時のエネルギー状態。

安静時の ^{31}P -NMRスペクトルを図2に示す。スペクトルの各共鳴線の面積をATPの β 位のリンの共鳴線の面積と比較し、ヒト前腕の安静時の筋細胞内のATP濃度を8.2 mMとすると、クレアチン磷酸(PCr) 34 ± 5 mM、無機磷酸(Pi) 5 ± 1 mMとなった。Piの化学シフトをPCrを基準として求めると 4.83 ± 0.05 ppmとなり、筋細胞内pHを計算すると 7.07 ± 0.04 となった(6名: mean \pm S.D.)。

3. ヒト前腕筋の運動負荷によるエネルギー代謝の解析。

運動負荷として、ゴム球を7秒間最大握力でにぎった直後にスペクトルを約1分間積算した。これを繰り返した結果を図3に示す。下から上に5個の安静時のスペクトル測定後、この運動を5回繰り返すとPCrは安静時の約90%に減少したが、細胞内pHはほとんど変化しなかった。

つぎに、阻血下に同じ運動負荷を加えた場合のスペクトルの変化を図4に示す。安静時のスペクトルを約0.5分ごとに6回測定した後、阻血負荷を加えても安静状態ではスペクトルに変化を認め

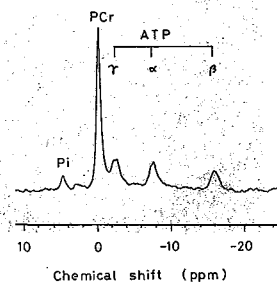


図2. ヒト前腕骨格筋の安静時の ^{31}P -NMRスペクトル。

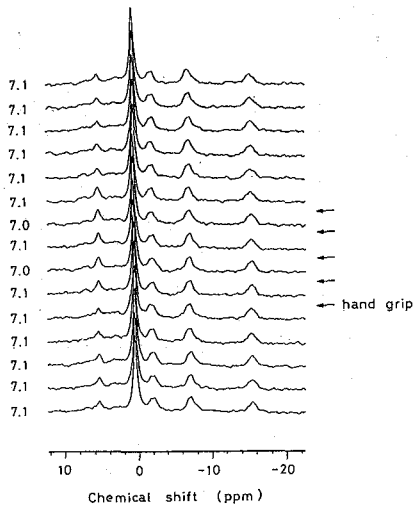


図 3. ヒト前腕骨格筋の運動負荷による ^{31}P -NMR スペクトルの経時変化(下から上へ; 左の数字は P_i の化学シフトから求めた細胞内 pH を示す)。

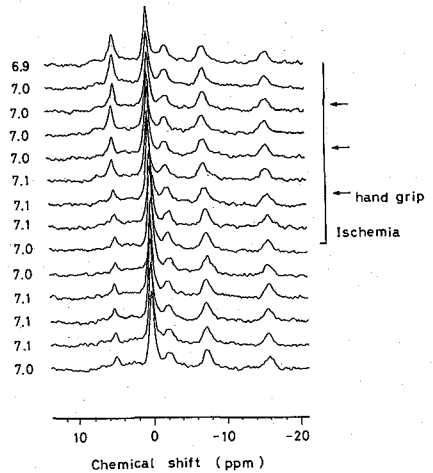


図 4. ヒト前腕骨格筋の阻血および運動負荷による ^{31}P -NMR スペクトルの経時変化(下から上へ)。

なかった。阻血下に運動負荷を加えると一回目の筋収縮でも有意な PCr の減少と P_i の増加を認めたが、細胞内 pH はあまり変化しなかった。さらにこの運動を繰り返すと PCr の減少にともない細胞内 pH の酸性化を認めた。

ところで、阻血下での筋収縮後に連続して得た 2 つのスペクトルはほぼ同一であった。しかも図 5 に示すように、筋収縮後のスペクトルの経時変化でも阻血状態を保っていると PCr の回復や細胞内 pH の回復は認められなかった。駆血帯の圧を緩め、血流を再開すると 1~2 分で PCr の急速な回復がみられ、さらに血流再開後に一過性に P_i が安静時よりも減少し、その後に P_i が増加して安静時のスペクトルとなる傾向が認められた。また、酸性化した細胞内 pH も血流再開によって回復した。

この結果は、筋収縮にともなうエネルギー消費ならびに嫌氣的解糖系の亢進が収縮の終了とともにただちに終わることを示唆している。さらに、酸性化した細胞内 pH は阻血状態

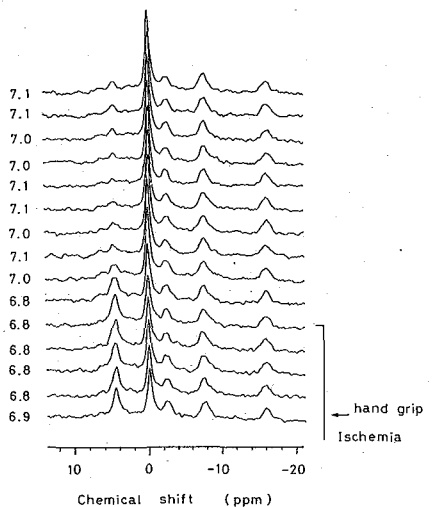


図 5. ヒト前腕骨格筋の阻血運動負荷後の ^{31}P -NMR スペクトルの経時変化。

ではATPがあるにもかかわらず回復せず、血流再開によって始めて回復したから、細胞内に蓄積したH⁺イオンの血流による洗い出しが重要であることを示唆している。

つぎに阻血下での筋収縮によるPCr濃度の減少と細胞内pHの酸性化を図6に示す。筋収縮によりPCrが減少しても最初は細胞内pHの酸性化はあまり認められず、PCrが約60%以下になると細胞内pHの酸性化が急に生じた。細胞内pHの酸性化が生じた時にはPCrはあまり減少せず、この時には筋収縮によって消費されたエネルギーが嫌氣的解糖系の亢進によって供給されていることを示している。すなわち、ヒト骨格筋における嫌氣的解糖系の著明な亢進によるエネルギー産生はPCrが約60%以下になったときに生じることが示唆された。

さらに阻血下での一回目の筋収縮時にはPCrの減少と相応するPiの増加が認められたが、細胞内pHの酸性化はあまり認められなかった。従って、嫌氣的ならびに好氣的なエネルギー産生を無視できると考えると、このPCrの減少量は筋収縮に使用されたATP量を反映していることになる。5名の被検者のPCrの減少量は $23 \pm 4\%$ であり、これは7.8 mMのATPが消費されたことになる。実測した収縮時間は 6.9 ± 0.4 秒であったので、最大握力での筋収縮時にはATPを1.1 mM/sの速度で使っていることになる。この値はヒト筋原線維のATPase活性が1.3 mM/sであるという報告¹⁾とほぼ一致している。

まとめると、ヒト骨格筋はその筋収縮によって1秒に約1 mMのATPを消費する。通常では、ただちに好氣的なエネルギー産生によってATPが補われる。しかし、このATPの補給が不足し、PCrの減少量が8 mM以上になると嫌氣的解糖系が著明に亢進され、細胞内pHの酸性化を生じる。しかもこの嫌氣的解糖系の亢進は筋収縮時にのみ生じ、筋収縮が終了するとただちに抑制される。従って、筋収縮後のエネルギー代謝の回復はおもにミトコンドリアによる好氣的エネルギー産生の能力を反映し、しかも細胞内pHの回復も血流の再開によって生じることが明らかとなった。

以上のように表面コイルを³¹Pのみならず、¹Hにも同調させておけば¹H-MRI画像から測定部位が明確になること、さらにヒト骨格筋のエネルギー代謝の研究に³¹P-NMR法が有用であることが明らかになった。

[謝辞]

本研究は生理研・生理機能研究施設の磁気共鳴装置を利用した。種々の御助言を頂きました生理研・村上助教授、瀬尾芳輝博士、市川修、大河原浩の諸氏に感謝します。

[文献]

1) Newsholme and Leech (1983) Biochemistry for Medical Sciences.

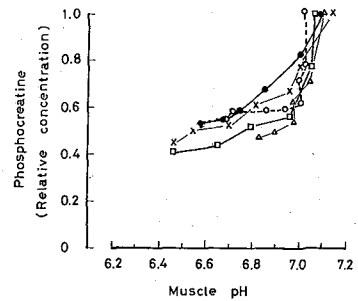


図6. ヒト骨格筋の阻血運動負荷によるクレアチンリン酸の減少と細胞内pHの酸性化。

L7 ~ L10



異核種間NOE相関NMR法

L7

○鶴沢 洵、柴田俊之、小川智也、浦本昌和（理研）
吉村昌治（メクト）、坪野浩二（日本電子データム）

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF HETERONUCLEAR NOE CORRELATED NMR SPECTROSCOPY

Jun Uzawa, Toshiyuki Shibata, Tomoya Ogawa, and Masakazu Uramoto (RIKEN, the Inst. Phys. and Chem. Res.)
Masaharu Yoshimura (MECT Corporation) and Koji Tsubono (JEOL Datum Ltd.)

A new method for measuring heteronuclear NOE correlated NMR spectrum and its application are presented in this report. The structure analysis of ^{13}C -enriched sialic acid which composes gangliosides, the important components of membrane, was carried out by 2D ^1H - ^{13}C NOE method. The results mostly supported the conformation proposed by S. Sabesan et al. For the improvement of 2D ^1H - ^{13}C NOE spectrum, the TANGO pulse sequence and the CYCLING method were proved to be useful. The results measured by the TANGO pulse sequence showed good disappearance of the meaningless cross-peaks between direct bonded protons and carbons. It is noted that S/N ratio was remarkably increased by the use of the CYCLING method.

1. 序言

演者らは1976年度の本討論会において、選択的に ^1H を照射したときに特定の ^{13}C シグナルの強度が増加する現象を報告し、これを「選択的 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOE法」として確立した。この測定法は有機化合物の構造解析¹⁾ やリン脂質ミセル ($^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$)²⁾、シクロヌクレオシド ($^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$)、第26回NMR討論会)の構造研究に利用された。異核種間の二次元NMR法については2つのグループ³⁾によって1983年に開発され、演者らもその検討結果を1984年の本討論会で報告した。二次元法は一次元では得られない貴重な情報も得られる反面、感度が極端に悪いためほとんど利用されなかった。1988年後半から異核種間二次元NMR法の感度を向上させる方法(Cycling法)が発表された⁴⁾。これを簡単に言えば、 ^1H を飽和させてヘテロ核に磁化を移動させる時にミキシングタイムをかなり長くする必要もあるにも関わらず、 ^1H の緩和時間が短いために磁化移動前に磁化が回復してしまう。これが感度が悪い一つの原因であったが、 ^1H の磁化が少し回復し、部分的に磁化移動したらミキシングタイムを打ち切ってこれをすぐに観測しないでループで繰り返し、NOE増加量を積み上げる方式である。

今回はあまり利用されていない異核種間NOE相関NMR法の応用例と検討中の新しい測定法を紹介し、それぞれの長所と短所を述べる。

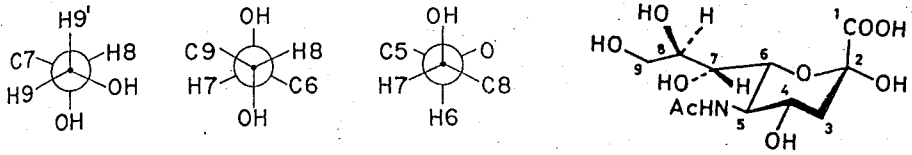
2. 一次元選択的 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOE法

一次元の選択的な $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOEを測定するにはLSPD法で面積強度を比較するか差スペクトルをとる方法が最も簡単である。しかし、S/Nが悪いスペクトルで面積強度を比較するのは誤差が大きく問題が残る。 ^1H を完全にデカップリングし、なおかつ $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOEを測定するパルス系列が日本電子の装置には用意されているのでこれも使える⁵⁾。このパルス系列(CNOEDIF)は簡単であるが、 ^1H 照射時間をかなり長くしないと肝心のところが見えない。演者の経験では10~15秒位が適当と思われる。一般に、 ^1H 照射時間を短くして積算時間を増やすと ^1H の直接結合した ^{13}C シグナルのみが強調される。

3. 二次元H-C間NOE法によるシアル酸の構造解析

シアル酸は生体機能と深い関係があるとされている9単糖の化合物で、特にガングリオシドの生理作用の発現にはシアル酸が不可欠であると言われている。シアル酸の重水素中の構造研究はE.B. BRAUNらが270MHzのNMRスペクトルを詳細に検討し、第1図の様な構造を提起した⁶⁾。

第1図

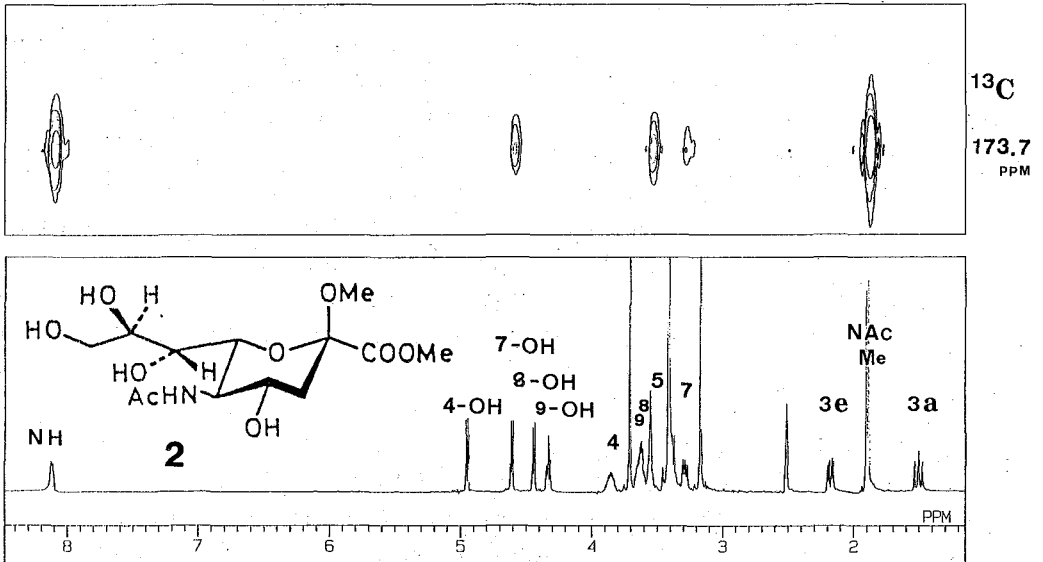
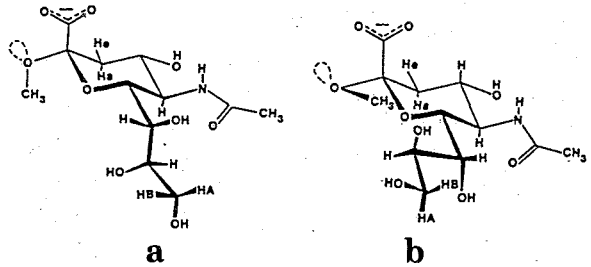


Conformation of glycerol side chain.

また、S. SABESANらはガングリッド GM2 と GM1の ^1H と ^{13}C のNMR研究からシアル酸部分の構造について右に示すような a と b の2種の可能性を提起した。彼らは a だとすると5-Hと8-Hが2.3Å位に近づくはずなのに両者間にNOEが見られないことからbの構造を示唆していた⁷⁾。

これらのシアル酸はいずれも天然にある α 型である。

演者らはシアル酸の一種である β -Nアセチルノイラミン酸メチルエステルメチルグリコシド(2)のNアセチル基のカルボニル基を90%以上 ^{13}C ラベルしたものを合成し、DMSO溶液中の構造解析を基本的な異核種間二次元NOE法により行った。その結果を第2図に示す。図中の ^1H の帰属は $^1\text{H}-^1\text{HCOSEY}$ 、 $^{13}\text{C}-^1\text{HCOSEY}$ 等による。



第2図 DMSO溶液中における化合物(2)の $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 2DNOEスペクトル

パルス系列は第3図(A)、PI3=0.4s、PD=7.36s、64scan、CLPNT=128

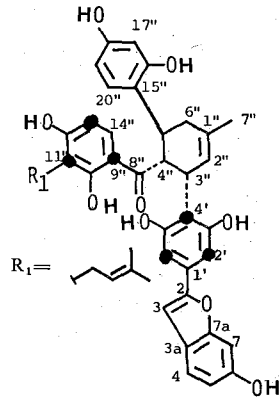
ラベルしたカルボニル基の両となりのメチル基とアミノ基から大きなクロスピークが見られると共に5-H、7-OH、7-Hからもクロスピークが見られた。この結果からNアセチルカルボニル基と7-OHが水素結合し、7-Hもカルボニル基に近い構造(bにちかい)をとっていることが強く示唆された。また、その他の構造はスピン結合定数がSABESANらの結果と誤差の範囲で一致するので 図の通りと考えられる。

なお、 ^1H のT₁をinversion recovery法によって測定した結果、4-OH;0.48、8-OH;0.46、9-OH;0.6秒であるのにくらべ、7-OHは0.29秒であった。

4. "TANGO" パルスによるスペクトルの単純化

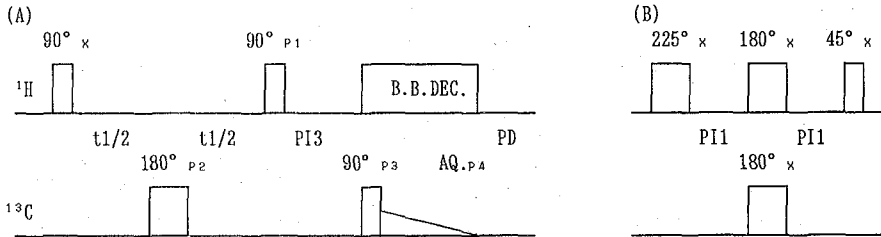
異核種間 NOE 相関 NMR 法はあくまで ^1H を照射して ^1H の直接結合していないカルボニル基など 4 級炭素等を観測する測定法である。したがって直接 ^1H の結合した ^{13}C との NOE は意味無いので観測パルスに TANGO を使い⁹⁾、これを消去する実験を行った。試料はクワカリスを用い、細胞に $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸を投与して生合成して得たシャルコモラシン (3)⁹⁾ を重アセトン溶媒で使用した。

その結果とパルス系列を第 3 図に示す。左図は従来の "HOESY" で測定し、右図は 1H の最初の 90° パルスを TANGO に変えて測定した結果である。 ^1H の直接結合した ^{13}C へのクロスピークが消えている。



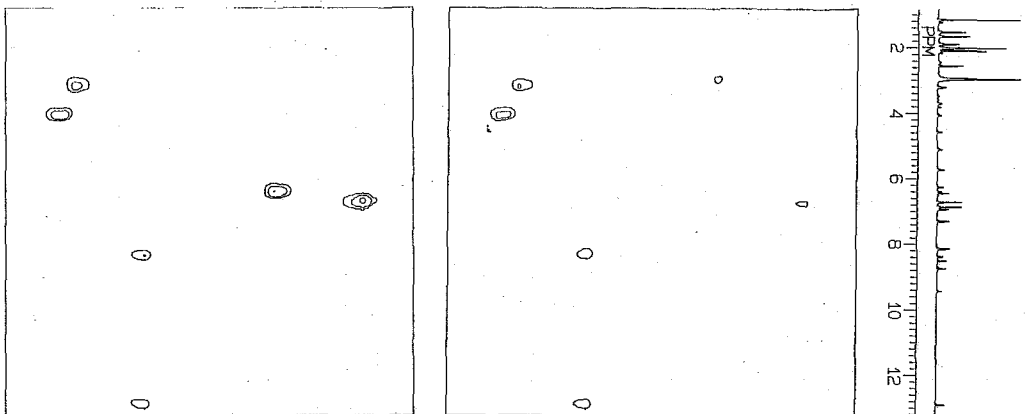
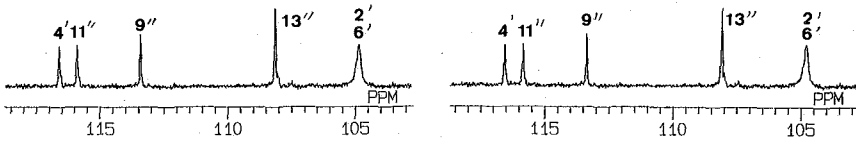
(3)

第 3 図



P1=X,Y,-X,-Y, Y,-X,-Y,X, -X,-Y,X,Y, -Y,X,Y,-X.
 P2=X,Y,-X,-Y. P3=X,Y,-X,-Y. P4=(X,Y,-X,-Y)4.
 PI3=0.8~2.4sec. PD=3.0sec.

The TANGO pulse sequence replaces the $90^\circ \times ^1\text{H}$ pulse.
 PI1=1/2J.



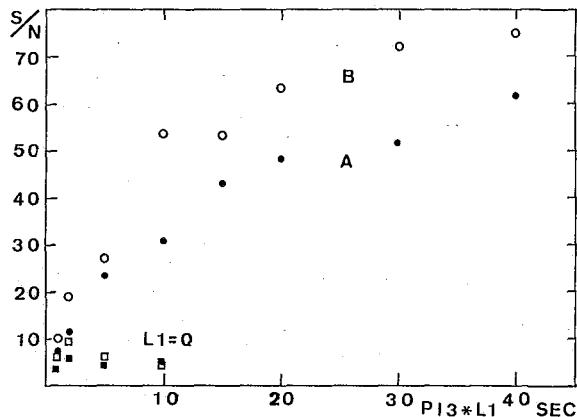
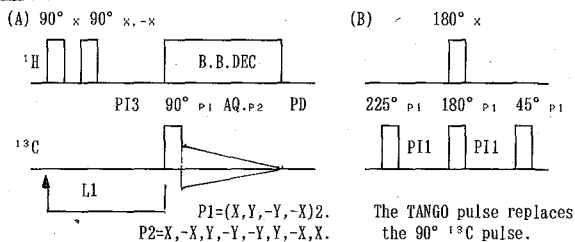
5. "CYCLING法"による感度向上効果

BIGLERらの文献にある一次元によるミキシングタイムおよびループ回数とNOE増加量をチェックするパルス系列を作成し、試料(2)を使って測定した結果を第4図に示す。ループ回数1回すなわち通常の方法で測定すると●印のようにミキシングタイムを増してもS/Nの向上は見られない。

一方、"CYCLING"法では●印のように■印にくらべ著しいS/Nの向上が見られる。ミキシングタイム×ループ回数の増加によって直線的にS/Nが増加している15秒程度が最適と思われる。ミキシングタイムは¹HのT₁より少な目に設定し、ループ回数を合計で15秒程度に合わせれば良い。分子量が大きくなれば、この時間は小さくする。

また、観測パルスにTANGOを使うと第4図の○印に示すように●印に比べむしろ感度向上が見られる。

第4図



6. まとめ

異核種間NOE相関NMR法は¹H-¹H同士のスピン結合がなく、ⁿJ_{X,H}がゼロまたは小さい場合やⁿJ_{X,H}があっても2ボンドか3ボンドかを判定したい場合に有益である。

もし¹Hシグナルが分離していれば一次元のLSPDやCNOEDIFを使う。¹Hが重なり合っている場合は注目する¹³C核などをラベルして二次元法を使う。S/Nを向上させるcycling法とスペクトルを単純化させるTANGOパルスを組み合わせることにより異核種間NOE法は有用性を増すものと思われる。さらに大きな化合物用にはスピンロック法が必要と考えられるが検討する予定である。

終わりに、貴重な試料(3)を使わせていただきました東邦大学薬学部野村太郎教授に深く感謝します。

文献

- S. Takeuchi et al, Tetrahedron Lett., 2943(1977). H. Seto et al, Tetrahedron Lett, 923(1978).
 J. Uzawa et al, Org. Magn. Reson., 11, 502(1978). Y. Tsuda et al, J. Natural Products, 43, 467(1980).
 T. Nomura et al, Tetrahedron Lett., 2195(1981). Y. Hano et al, Chem. Pharm. Bull., 32, 1260(1984).
 H. Ikuta et al, Heterocycles, 121(1985).
- T. Shibata, J. Uzawa and Y. Sugiura, Chem. Phys. Lipids, 33, 1(1983).
- P. L. Rinaldi, J. Am. Chem. Soc., 105, 5167(1983). C. Yu and G. C. Levy, ibid, 106, 712(1984)
- P. Bigler and C. Muller, J. Magn. Reson., 79, 45(1988). K. E. Kover and G. Batta, ibid, 79, 206(1988).
 C. Muller and P. Bigler, ibid, 84, 585(1989).
- 日本電子ユーザーズミーティング資料、「差スペクトルの利用法」
- E. B. Brown, W. S. Bray Jr and W. Weltner Jr, Biochim. Biophys. Acta, 399, 124(1975).
- S. Sabesan, K. Bock and R. U. Lemieux, Can. J. Chem., 62, 1034(1984).
- S. Wimperis and R. Freeman, J. Magn. Reson., 58, 348(1984).
- 羽野芳生、野村太郎、上田伸一、第30回天然有機化合物討論会要旨集(1988)、PP 150-157.

Investigation of Heteronuclear Three-dimensional NMR Spectroscopy by Double Quantum Filter. ^{13}C Chemical Shift Editing of DQF-COSY at Natural Abundance.

(JEOL) MUNEKI OHUCHI SIZUE KOHNO MAMORU IMANARI

Three-dimensional NMR spectroscopy has been shown to be an effective method for resolving spectral overlap encountered in two-dimensional NMR experiments.

Heteronuclear three-dimensional experiment is combination of a heteronuclear shift correlation experiment with homonuclear two-dimensional NMR experiments. Homonuclear two-dimensional spectra can be simplified with this technique by editing with respect to the heteronuclear chemical shift in a third-dimension. One of heteronuclear three-dimensional techniques, HMQC-COSY has the dispersion profile of the diagonal peak. To eliminate dispersion components from the diagonal peaks, we developed new heteronuclear three-dimensional HMQC-DQF(COSY) technique. Therefore, we obtained high resolution spectra.

1986年第27回ENCにてPlantらのグループが溶液試料の三次元NMR法を公表して以来、溶液試料の三次元NMR法は飛躍的な発展をとげた。三次元NMR法は二次元NMRスペクトルの信号に重なりがありスペクトルの解析が困難な場合、信号の重なりを効率良く分離し解析を容易かつ明確にするため考案されたものである。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。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法を組み合わせたものであり、第三軸にケミカルシフトの広い ^{13}C 核などの異種核を使用し、信号の重なりを効率良く分離することが可能である。異種核三次元NMRの実験では測定時間を短縮する目的で、 ^{15}N 核や ^{13}C 核などで同位体ラベルした試料が使用されている。しかし、同位体ラベルが困難な天然物等を試料として使用する場合は、天然存在比下で三次元NMRの実験を行なう必要がある。 ^{12}C 核による ^1H 核信号を消さなければならないので天然存在比下での三次元NMRの実験は昨年本討論会で発表したような困難さを伴う。また昨年本討論会で発表したHMQC-COSY法では対角ピークが分散波形となりこの分散波形が相関ピークと重なってスペクトル解析を困難にしていた。そこで我々は新しく対角ピークが純吸収波形になる二量子フィルタを用いたHMQC-DQF(COSY)法を開発した。測定に要する時間がHMQC-COSY法の二倍必要となる欠点を持ちながらもこのHMQC-D

○おおうち むねき こうの しずえ いまなり まもる

QF (COSY) 法は対角ピークが純吸収波形になるためジグナルの分離が良く飛躍的にスペクトルの解析が容易になった。

< 実験 >

三次元NMRの測定はHMQC法の測定可能なGSX400を使用し行なった。サンプルは市販トマチン20mgをC₅D₅N0.5mlに溶解した。図1にHMQC-COSY、HMQC-DQF (COSY) 法のパルス系列を示した。図1bのHMQC-DQF (COSY) 法のパルス系列は図1aのパルス系列の最後の90°パルスを二つの90°パルスに置き換えたものである。また、二量子遷移のみを取り出すため、最後の90°パルスの位相をx, y, -x, -yと変え、またレーザーの位相もx, -y, -x, yと変えている。二次元NMRにおいてもDQF-COSY法ではすべてのピークが純吸収波形で表示できるようにこのHMQC-DQF (COSY) 法でもすべてのピークが純吸収波形となる。また、¹²C核による¹H信号を消すため図1のパルス系列にバードパルス

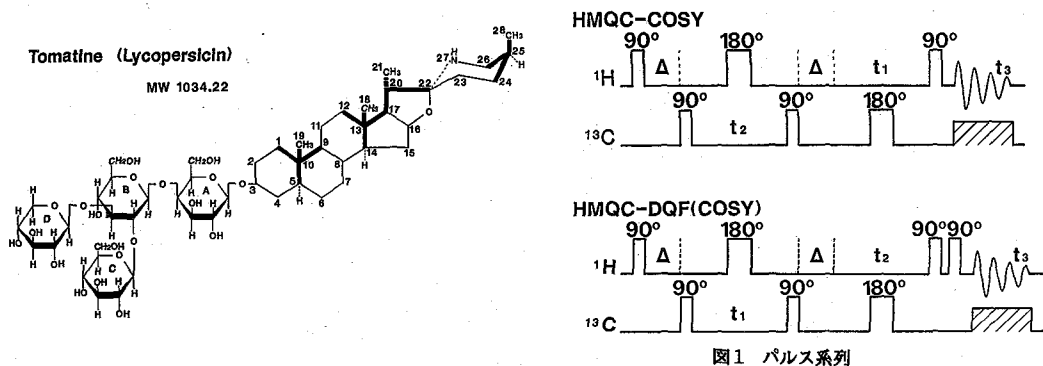


図1 パルス系列

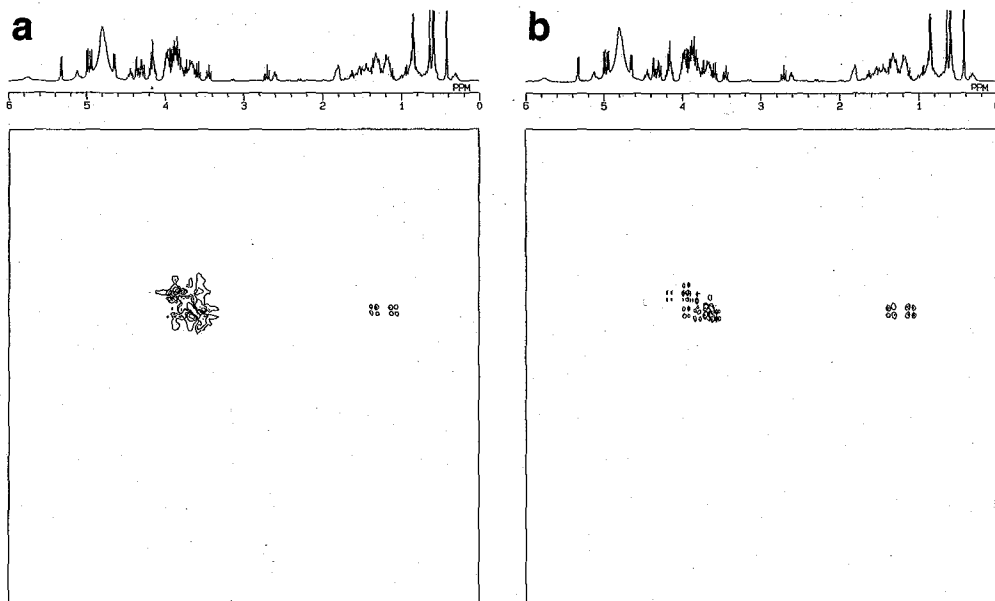


図2 三次元 NMRのスライスデータ: a.HMQC-COSY b.HMQC-DQF(COSY)

を付加して異種核三次元NMRスペクトルを測定した。HMQC-DQF(COSY)法は、基本となる位相回しがHMQC-COSY法と比較して二倍になるために測定に要する時間が二倍必要となる。HMQC-DQF(COSY)法の実験条件は次の通りである。F1, F2, F3軸の実測の点数は55, 75, 256点で、処理時、64, 128, 256のreal点までゼロフィリングを行なった。一つのパルス系列を0.7秒で繰り返してそれぞれの点に対して16回の積算を行ない、約4.5日を費やして三次元HMQC-DQF(COSY)NMRデータを採集した。三次元NMRのデータ処理は昨年本討論会で報告した方法とほぼ同様であるが最初の二次元データセットは信号が検出できずF3軸の位相情報が正確に得られないため、F3軸の位相補正は、すべての軸の複素フーリエ変換を行なった後目的のケミカルシフトでのクロスセクション(スライススペクトル)として取り出した二次元データに対して行なった。その他F2, F1軸の位相補正は計算値を使用した。

<結果および考察>

図2および3図にHMQC-COSY法と二量子フィルタを用いたHMQC-DQF(COSY)法で測定したトマチンのスライススペクトルを示した。図2aに示したようにHMQC-COSY法は対角ピークが分散波形で表示されるため対角ピーク近くの相関ピークは対角ピークに重なりスペクトルの解析は困難である。これに対し、HMQC-DQF(COSY)法は図2bに示したように対角ピークと相関ピークとも純吸収波形で表示されるので対角ピーク近くの相関ピークの分離が飛躍的に向上しスペクトルの解析が容易となる。図3にトマチンの糖のアノメリック・水素のスライススペクトルを示した。図3の下段のHMQC-COSYのスライススペクトルでは対角ピークが分散波形であるため重なりが多く完全には相関ピークの分離ができなかった。しかし、図3の上段のHMQC-DQF(COSY)のスライススペクトルでは純吸収ピークのため相関ピークの分

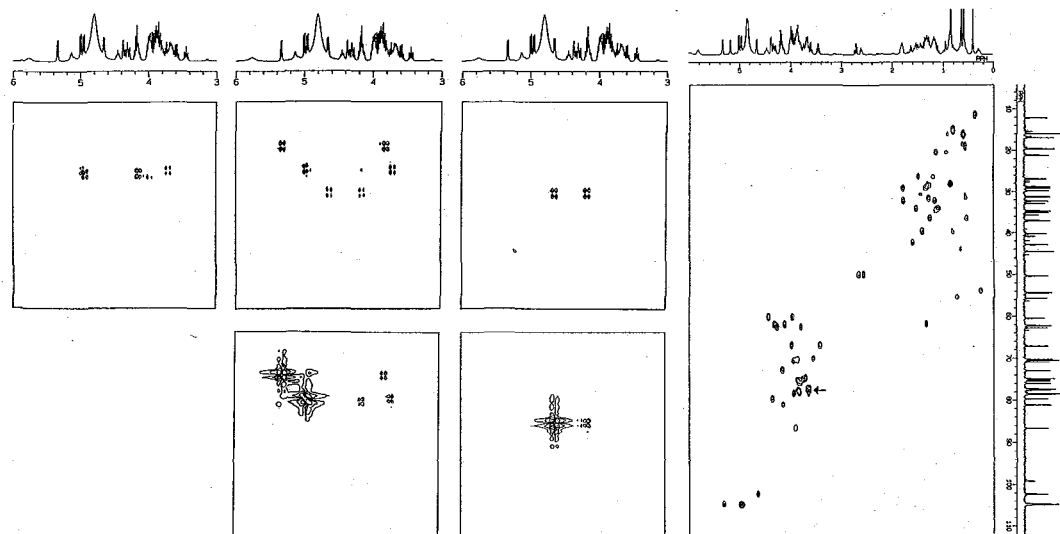


図3 アノメリック水素のスライスデータ：上段HMQC-DQF(COSY)、下段HMQC-COSY

図4 HMQCスペクトル

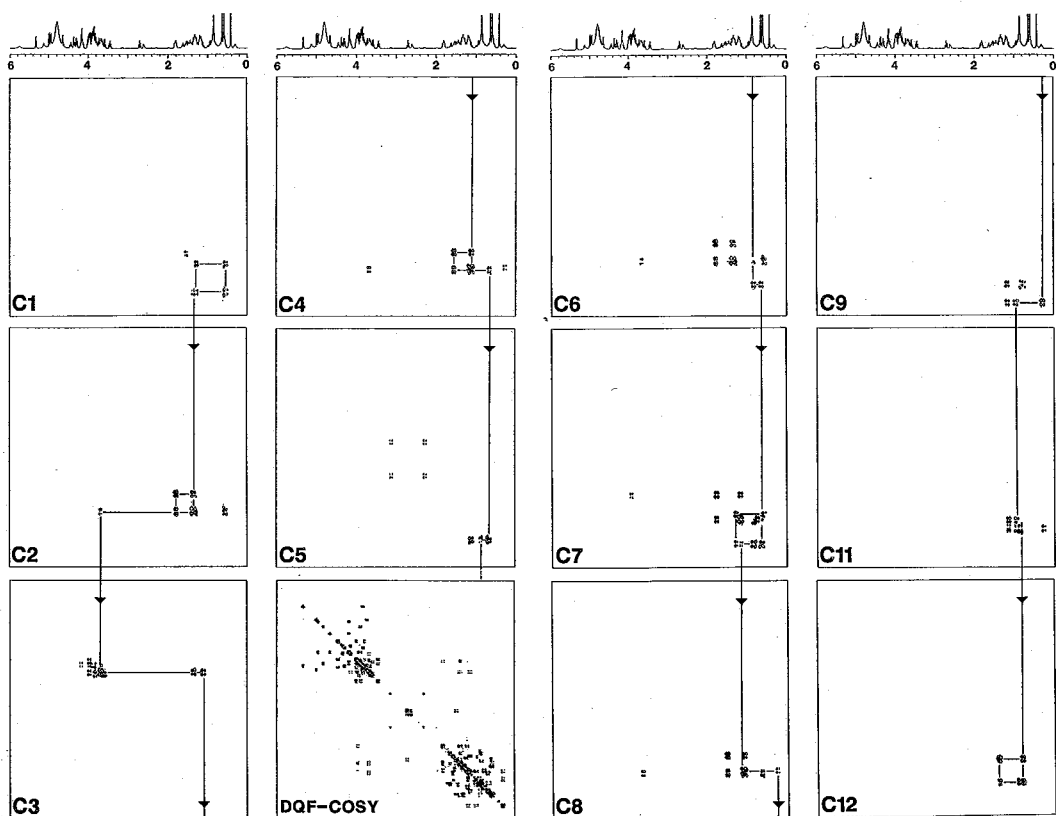


図5 アグリコン部の三次元NMRのスライスデータ

離が可能になった。また、水素のスペクトルの0.5～1.8 ppmの範囲ではアグリコン部分の水素の信号が重なりスペクトルの帰属は二次元NMR法を使用しても非常に困難である(たとえば図4のHMQCスペクトルなど)が、三次元HMQC-DQF(COSY)法を使用することによりスペクトルの解析が非常に容易となる。図5にトマチンの三次元HMQC-DQF(COSY)の炭素軸に垂直なクロスセクションを取り出し炭素の順に並べ替えた。ただこの三次元NMR法のみでは四級炭素やヘテロ原子によりスピンスが切断されている水素の解析はできないのでさらにHMBCなどの二次元法を併用して複雑な化合物トマチンの構造解析が可能となった。

以上、この三次元HMQC-DQF(COSY)法はすべてのピークが純吸収波形で表示されるため信号の重なりが多い複雑な化合物のスペクトル解析に適している。ただ、測定時間が長い等の欠点も合せて持っている。

参考文献

- 1) H.D.Plant, T.H.Mareci, M.D.Cockman, W.S.Brey "27th Experimental NMR conference" 1986 USA
- 2) S.W.Pesik, E.R.P.Zuiderweg, J. Magn. Reson. , 78, 588 (1988)
- 3) 大内宗城、河野静江、今成司、第28回NMR討論会要旨(1989)
- 4) 大内宗城、河野静江、有機合成化学協会誌 第48巻 577 (1990)

(国立環境研究所) 三森文行

^1H detected ^{13}C localized NMR spectroscopy by rotating frame imaging method
FumiYuki MITSUMORI (National Institute for Environmental Studies)

A new ^{13}C localization method is proposed based on ^1H rotating frame imaging technique. ^{13}C localization was realized by editing ^1H localized spectra using ^{13}C - ^1H J modulation with 3 coils and 3 pulses system. Spatial resolution of 1.5 mm was attained with a phantom sample.

【序】 測定対象の特定部位からの NMR スペクトルを選択的に測定する局在化測定法は、丸ごとの実験動物や人間を対象とした in vivo NMR の分野において極めて重要な測定技術である。現在、主として静磁場勾配 (B_0 磁場勾配) と周波数選択パルスを組み合わせた手法の開発が進められているが、局在化の位置分解能、精度の点で十分とは言えない。特に、 ^{13}C などの化学シフト域の広い核種に対しては、 B_0 磁場勾配法の直接適用は困難である。我々は昨年、ラジオ波磁場勾配 (B_1 磁場勾配) を用いる rotating frame imaging 法によって、プロトン NMR スペクトルを高い位置分解能で局在化測定できることを示した。今回は、この方法をさらに発展させ、 ^{13}C 核の局在化測定法を開発したので報告する。

【方法と結果】 本法の趣向は、局在化測定したプロトン NMR スペクトルを、 ^{13}C - ^1H 間のスピン結合定数 J を利用して変調させ、差スペクトル法により、 ^{13}C に直接結合したプロトンのみを選択的に局在化測定しようとするものである。上記の目的を達成するため、 ^1H rotating frame 法を基盤として、以下の改造を行った。

- (1) Biospec 24/30 分光計 (Bruker) のデカップリングチャンネルを広帯域化して、 ^{13}C 周波数の出力を可能とした。
- (2) ^1H rotating frame imaging 用の 2 重表面コイルに、 ^{13}C 照射用の Helmholtz コイルを付加し、3 コイルプローブを作製した。
- (3) J 変調スペクトルを測定するために、従来の increment パルスと位相エンコードパルスの 2 パルスよりなる測定パルス列にリフォーカスのための 180° パルスを付加し測定パルス系をスピネコー法に変換した。

この結果、測定系は 3 コイル、3 パルスを用いる方法となった。作製した測定プローブの全容を図 1 に、ラジオ波パルス系を図 2 に示す。

この方法を用いて、increment パルスを 1 パルスで測定した ^{13}C $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{H}$ (99 atom%) の J 変調スペクトルを図 3 に示す ($\tau = 3.858$ ms)。差スペクトルにおいては ^{13}C に直接結合したメチル基プロトン信号のみが観測され、OH 基の信号は消去されている。さらに、この方法で図 2 のパルス系を用いて rotating frame 局在化測定を行い、 ^{13}C H_3 信号の選択的局在化スペクトルを得ることができた (図 3)。

【結論】 Rotating frame imaging 法により、 ^1H 検出による ^{13}C 局在化測定が可能となった。本法の主な特長は以下の通りである。

- (1) ^1H の感度で ^{13}C の局在化測定が可能である。
- (2) ^1H 検出であるので、化学シフト域の広い ^{13}C でもオフレゾナンス効果がほとんどみられない。
- (3) 磁場を駆動しないので、数 ms という短いエコータイムでの測定が可能である。したがって、 T_2 による信号の減衰を抑えられる。

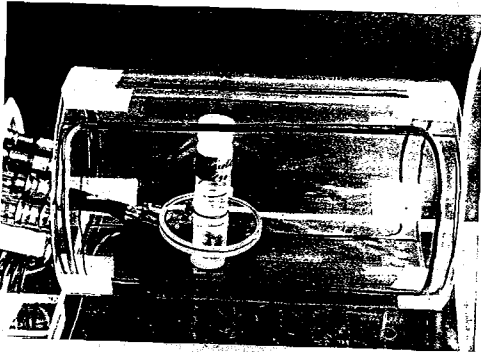


Fig 1.

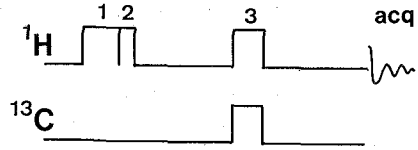


Fig 2.

Fig 1. A 3 coils probe for ^{13}C localization.
inner: double concentric ^1H surface coils
outer: ^{13}C Helmholtz coil

Fig 2. A 3 rf pulses sequence. 1: increment pulse,
2: phase encode pulse, 3: 180 degree pulse

Fig 3. ^1H spin echo spectra of $^{13}\text{CH}_3\text{COOH}$.
upper: without J modulation,
middle: with J modulation ($\tau=3.858\text{ms}$),
lower: difference spectrum

Fig 4. ^1H rotating frame spectra of $^{13}\text{CH}_3\text{COOH}$
with (right), and without J modulation
(left).

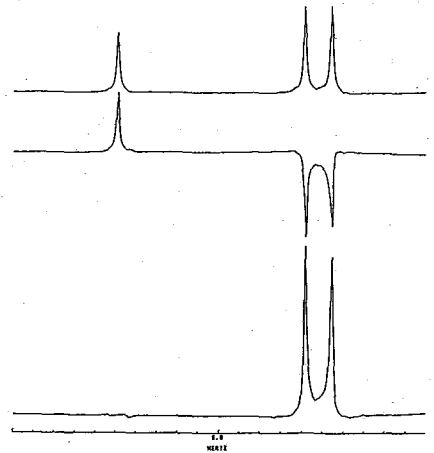


Fig 3.

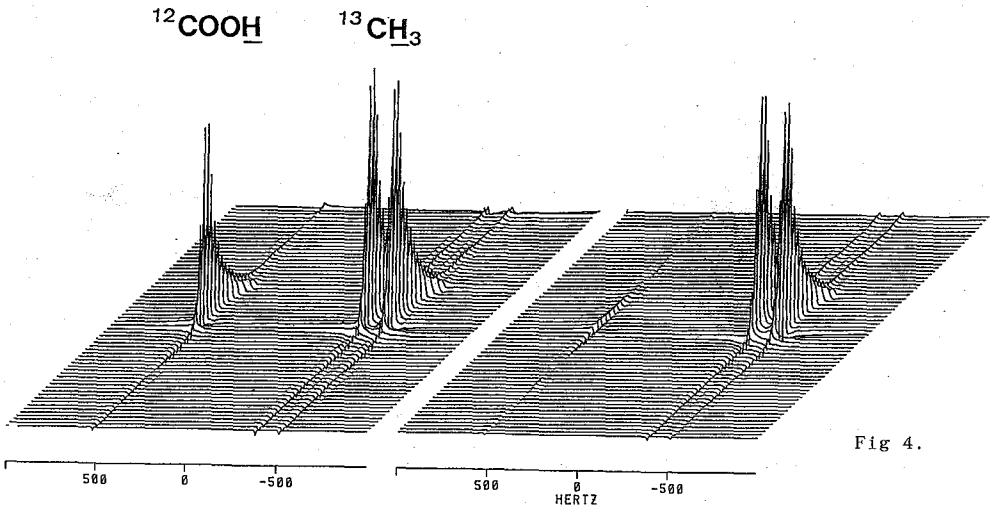


Fig 4.

L10

(日本女大家政・日本電子生体研) ○高橋征三・永山国昭

Selective Detection of Slowly Tumbling Methyl Protons
by Relaxation Allowed Multiple Quantum Coherence

Seizo Takahashi and Kuninaki Nagayama (Japan Women's Univ. & JEOL Ltd.)

Coherence-transfer pathways involving multiple-quantum coherences are accessible through multi-exponential relaxation in systems of degenerate 3/2 spins. This behavior was utilized to monitor the methyl protons of lysozyme. Three-quantum-filtered T_1 pulse sequence was able to emerge several methyl protons, free from J coupled multiple quantum transitions, from the overlapped methyl resonances. This method may become a valuable probe for the selective detection of the interior methyl residues of macromolecules.

1. はじめに

分子表面に存在する残基, つまり溶媒と接触できる残基が分かれば, 蛋白質の構造決定過程での補助的情報としてかなり有用であろう. さらに運動に関する定量的な情報が得られれば, 多型構造を示す蛋白質の動的構造について推論できる. このような期待のもとに, 我々は蛋白質の分子表面と内部をNMR法で類別・抽出する方法を探索している. 昨年本討論会において, 我々は溶媒との分子間NOEの情報から, 分子表面残基を抽出する試みについて報告した. その後さらに検討を進めた結果, 緩和時間の違うメチル基は別に扱った方がいいことが分かった. 分子内部のメチル基はその大部分が束縛回転をしていると考えられる. そこでこの分子内部のメチル基を選択的に検出できないかどうか検討した.

多量子遷移にはJ結合由来のものと緩和由来のものがある. extreme narrowing の条件が成立しない遅い運動のときは, エネルギーの縮退がとけるために, スピン 3/2 以上のものでは各エネルギーレベル間の緩和が異なる. 束縛回転をしている多くのメチル基がちょうどこの条件を満たすと考えられる¹⁻⁴⁾ これを1量子遷移の信号に邪魔されずに3量子フィルターを用いて選択的に検出することを試みた.

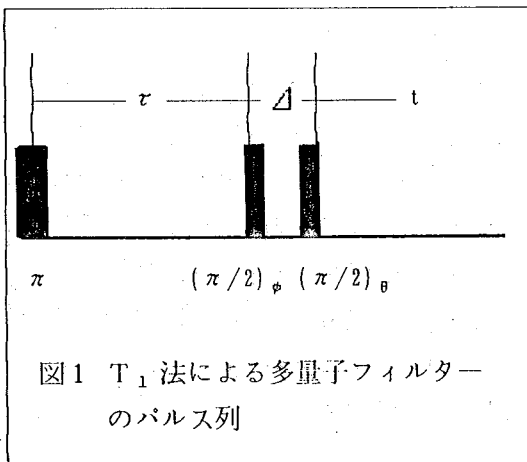


図1 T_1 法による多量子フィルターのパルス列

たかはし せいぞう・ながやま くにあき

2. 方法

① 3量子フィルターの時間応答

緩和過程は図1のパルス列に基づく密度行列の時間発展で与えられる。3スピン整列が進行するときメチル・プロトンの密度行列 ρ の時間変化は Redfield の理論より

$$d\rho/dt = R\rho$$

に従う。ここで R は Redfield の緩和行列であり、種々のモデルを用いて、縦緩和の値が計算されている。結論としては、いずれにしても3量子フィルターの時間応答波形は

$$S(\tau, t) = \varepsilon (\exp\{-R^0_1 \tau\} - \exp\{-R^0_2 \tau\}) \exp\{-R_{3q} \Delta\} (\exp\{-R^1_1 t\} - \exp\{-R^1_2 t\}) \quad (1)$$

$$R^0_1 = 2J(\omega), \quad R^0_2 = 2J(2\omega), \quad R^1_1 = J(\omega) + J(2\omega), \quad R^1_2 = J(0) + J(\omega)$$

$$J(\omega) = 2\tau_c(1 + (\omega\tau_c)^2)^{-1}, \quad \varepsilon = \text{const} * (\gamma^4 h^2 \tau_{ij}^{-6})$$

の形になる¹⁻²⁾。ここで S は信号強度、減衰速度定数 R^0 と R^1 はそれぞれ0次と1次コヒーレンスについての Redfield 緩和行列の固有値を意味する。

図2は R 対 $\omega\tau_c$ の関係を示す。通常の T_1 測定においては上式のマイナス符号がプラスになるので信号強度は

$$R^0_1 + R^0_2 \quad \text{および} \quad R^1_1 + R^1_2$$

に比例するのに対して、 T_1 パルス列による3量子フィルターを通過する信号の強度は上式から

$$R^0_1 - R^0_2 (= \Delta R^0) \quad \text{および} \quad R^1_1 - R^1_2 (= \Delta R^1)$$

に比例する。

図に見られるように ΔR^1 は $\omega\tau_c$ が增大するにつれて急速に大きくなるが、 ΔR^0 はほと

んど変化しない⁴⁾。さらに1QF/3QFを計算すると(3/20)という強度因子が入ってくるので、3量子フィルターのスペクトル強度はかなり弱いことが予想される¹⁾。

T_1 パルス列のかわりに T_2 パルス列を使えば ΔR^0 の項のかわりに ΔR^1 の項が入る。従って相対的に S/N 比は良い。しかし T_2 パルス列の場合は発展時間中はスピン結合による変調を受けるので、その寄与を取り除かなければならない。スピンロック等の手段を講じても微小の不完全性が3量子フィルターのスペクトルを凌駕する可能性があり、非常に困難が予想される。従って今回は T_2 パルス列は考えなかった。

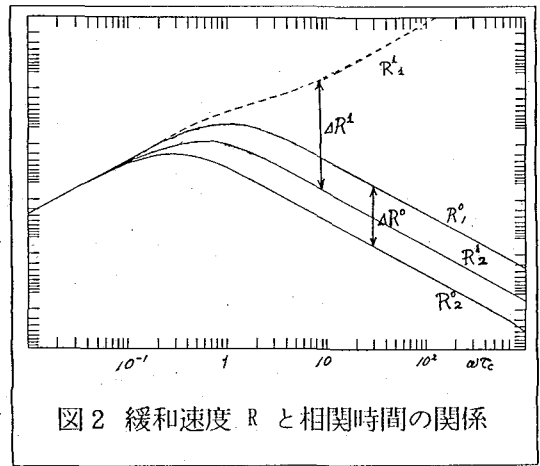


図2 緩和速度 R と相関時間の関係

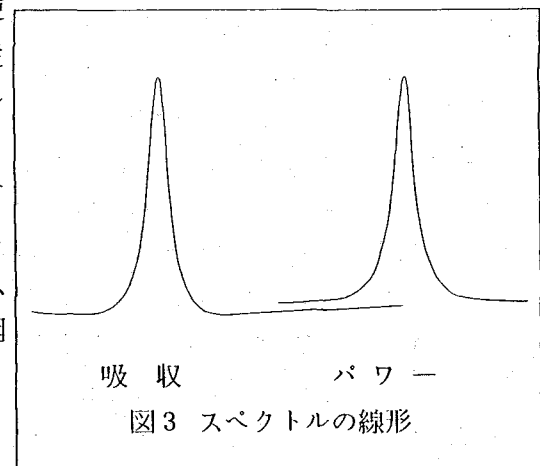


図3 スペクトルの線形

② スペクトルの線形

(1)式よりFIDは

$$S(t) \propto (\exp[-R^1_1 t] - \exp[-R^1_2 t]) \quad (2)$$

である。これをフーリエ変換すると

$$S(\omega) = \frac{1}{i\omega + R^1_1} - \frac{1}{i\omega + R^1_2} = \frac{R^1_2 - R^1_1}{(i\omega + R^1_1)(i\omega + R^1_2)} \quad (3)$$

である。式(3)から、吸収スペクトルは広幅の負の吸収の上に比較的シャープな吸収が乗っかっていて、全体としての積分強度はゼロになることを示す。従って広幅の吸収が互いに重なり合う場合は、そのほとんどが打ち消し合わされると考えられる。つまり蛋白質のような重なり合った信号がある場合、もともとシャープな信号だけを選択的に拾う可能性は否定できない。

S/N比が小さいときは位相合わせが非常に難しく、定量的な信号強度の評価が困難である。そこでパワー・スペクトル表示をすることにした。そのときスペクトルの線形は

$$|S(\omega)|^2 = \frac{(R^1_2 - R^1_1)^2}{(\omega^2 + (R^1_1)^2)(\omega^2 + (R^1_2)^2)}$$

となり、ピークが孤立しているときは強度が $(R^1_2 - R^1_1)^2$ に比例し、線形は2つのパワー・スペクトル

$$\frac{1}{\omega^2 + (R^1_1)^2} \quad \text{と} \quad \frac{1}{\omega^2 + (R^1_2)^2}$$

の積になる。従って1量子フィルターのパワー・スペクトルよりシャープな線形が期待される。

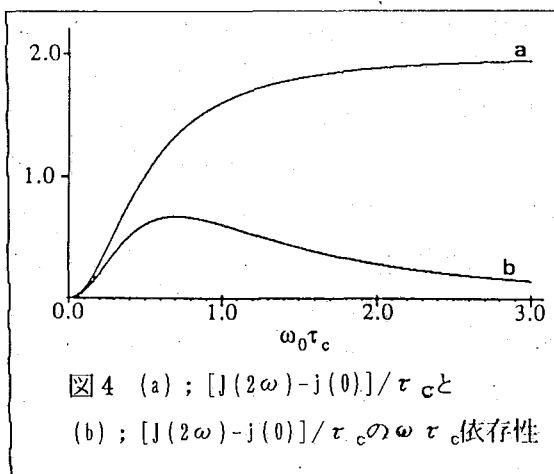


図4 (a); $[J(2\omega) - j(0)]/\tau_c$
(b); $[J(2\omega) - j(0)]/\tau_c$ の $\omega\tau_c$ 依存性

③ 3量子フィルター信号強度の解析

(1)式を Taylor 展開すると

$$\partial F^0(\tau)/\partial \tau \propto R^0_2 - R^0_1 \propto J(2\omega) - J(\omega) \quad 0\tau$$

$$\partial F^1(t)/\partial t \propto R^1_2 - R^1_1 \propto J(\omega) - J(2\omega)$$

になる。従って初期勾配をとると τ 依存性は $R^0_2 - R^0_1$ を与え、 t 依存性は $R^1_2 - R^1_1$ を与えるので、根源的な量である $J(0)$ 、 $J(\omega)$ 、 $J(2\omega)$ の全部を求めることができる。

3. 結果および考察

試料は約2 mM濃度のリゾチーム重水溶液0.3 mLを対称型マイクロ試料管に入れて、日本電子のGSX-400を用い10°Cで測定した。図1の θ が0°のとき $\phi = 60^\circ$ 、 180° 、 300° の3つの組み合わせを使い、 θ に4種類の位相を用いることで3QF以外の信号を十分に抑えることができた。上に説明したように T_1 パルス列は T_2 パルス列に比べS/N比の点で不利だが、J結合による多量子遷移を考慮しなくてよいという利点

がある。

パルスの繰り返し時間はメチル基の緩和時間の約2.5倍にセットしたが、十分待った場合と比べてメチル基部分のスペクトルに有意の差は認められなかった。ただし溶媒はdecoupleして信号を抑制した。

図5は通常のスเปクトルと τ が200 msのときの3量子フィルターを通過したパワー・スペクトルを示す。積算時間は約40分である。図から明らかなようにメチル・プロトンの中の限ら

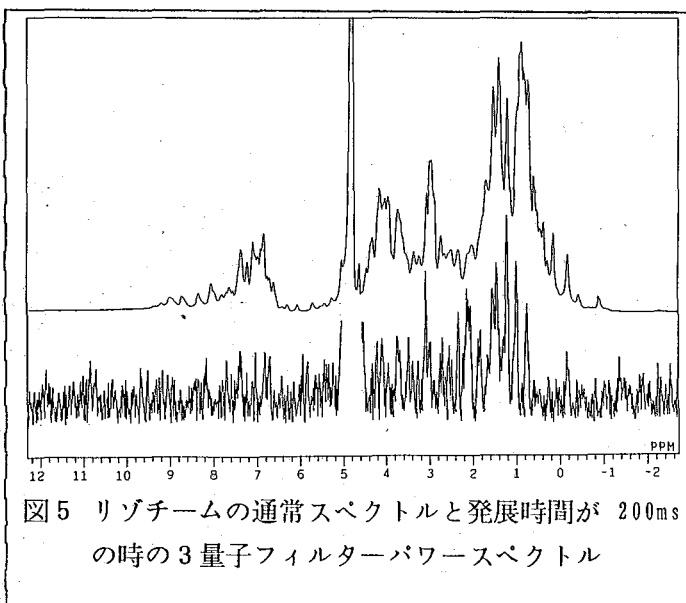


図5 リゾチームの通常スぺクトルと発展時間が 200msの時の3量子フィルターパワー・スぺクトル

れたものだけが選択的に観測されている。またメチル基以外のプロトンで3量子フィルターを通過するものがある。その理由はよく分かっていない。

0 ppm 付近のメチル基由来のピークはMet-105およびIle-98と帰属されていて、結晶構造から判断すると分子内部に存在する。その一方で分子内部に存在する多くのメチル・プロトンが観測されない。これらの詳細な検討は今後の課題である。

3量子フィルターのスぺクトルが正しく測定されていることは発展時間を変えて1.2 ppmのAla-110, Ala-122などに帰属されると思われるピーク強度をプロットすることで確認した(図6)。この緩和曲線を解析すればメチル基の内部回転緩和速度を評価できる。

分子表面に存在し、かつ束縛回転を受けているメチル基は常磁性物質を共存させることにより消去できる可能性があるため、今後検討していきたい。

<参考文献>

(1) G. Juccard et. al. (1986)

J. Chem. Phys. 85, 6282;

(2) N. Muller et. al. (1987)

J. Mag. Res. 75, 297

(3) W. D. Rooney et. al. (1988)

J. Am. Chem. Soc. 110, 674

(4) Y. Seno et. al. (1990) Biochem. 29, 599; 第28回NMR討論会要旨(1989) 298

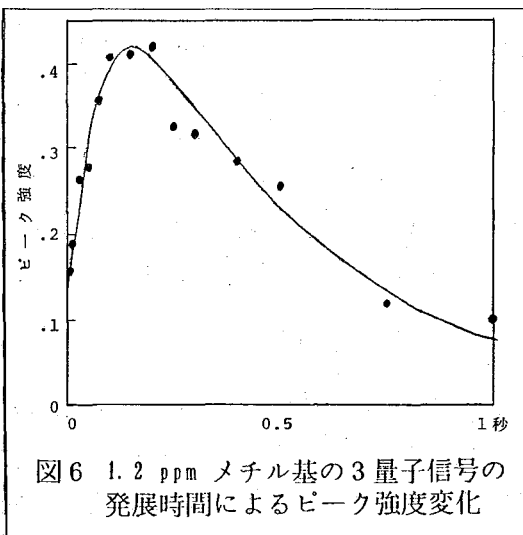


図6 1.2 ppm メチル基の3量子信号の発展時間によるピーク強度変化

第 2 日

11 月 20 日 (火)

L11 ~ L20

DNA 修復酵素 T4 Endonuclease V の NMR シグナル 帰属と DNA との
複合体の研究

○李 奉振, 阪下 日登志, 大久保 忠恭, 土井 知子 (蛋工研)

岩井 成憲, 大塚 栄子 (北大 薬)

NMR peak assignment of DNA repair enzyme, T4 endonuclease V and study of DNA-protein complex.

Lee Bong Jin, H.Sakashita, T.Ohkubo, T.Doi (Protein Engineering Reseach Institute), S.Iwai, E.Ohtsuka (Hokkaido University)

In order to elucidate the structure-function relationship of the T4 endonuclease V, we have taken NMR study of this protein and its complex with oligonucleotides. We succeeded in assigning of nearly all of the resonances in DNA and some resonances in protein. To assign the resonances of protein, we used stable isotopic labelling. On the basis of the assigned resonances, we could detect the evidence that T4 endonuclease V exhibited conformational change on complex formation with DNA

序論

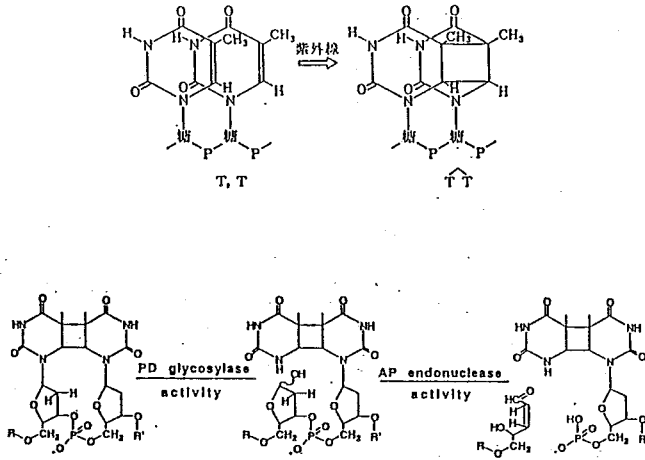
生体遺伝物質である DNA は放射線, 紫外線, 化学物質等 様々な変異原にさらされており, これらによって生じた DNA 損傷の多くは生体内に存在する酵素によって修復され DNA は安定に保たれる. このように DNA の修復は生命の維持, 種の保存に重要な役割を果たしている. T4 イントヌクレアーゼ V は 紫外線により DNA 上にポリリシソクイマーが生じた時, これを特異的に切除修復する酵素である. 分子量は 16,000 で アミノ酸 138 個 からなっている. 小さな酵素でありながら ポリリシソクイマー-DNA グリコシラーゼ と アポリリシソク DNA イントヌクレアーゼ と 言う 2 つの酵素活性を有しており, その構造活性相関には興味を持たれている. (図 1)

この蛋白質の分子量では 通常の ^1H -2 次元 NMR だけでは, シグナルの帰属が困難であるので 安定同位体 ラベル を用いた. 一方 T4 イントヌクレアーゼ V の DNA 結合部位 10mer を合成し, 全プロトシグナルを帰属した. これら帰属から 蛋白質-核酸相互作用を蛋白質側及び核酸側から調べた. また 他 2 種類の オリゴヌクレオチド についても同様に調べたので 以下に詳述する.

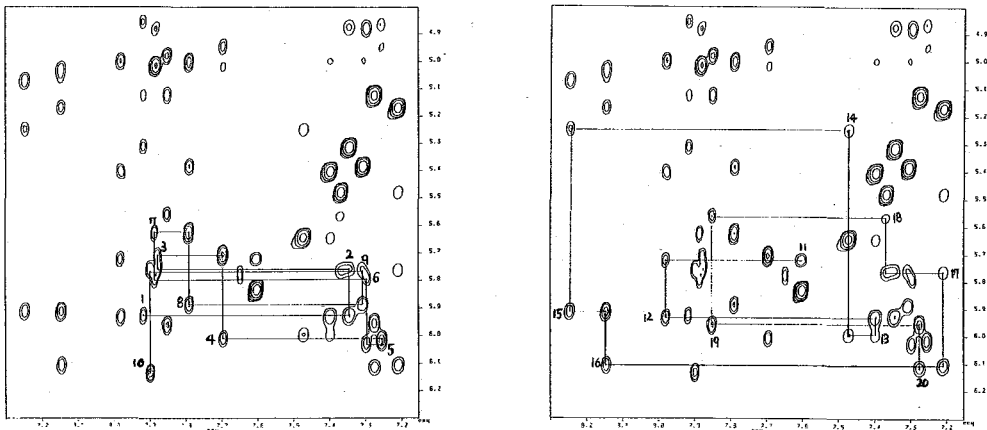
試料と方法

均一な ^{15}N ラベル は λ クク-を保持する大腸菌株を $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む M9 最小培地で生育させて行った. DNA は 化学合成した DNA 10mer, poly(dA)₂₀, TT を用いた. NMR 測定法は DQF-COSY, noesy, tocsy, 1-1 Echo pulse, SQC 等を用いた. 測定には Bruker

製 AM-500 及び AM-600 装置を使用し, 23°C, pH 6.5 で行った.



1. 紫外線によるヒロミシオン 2 量体生成と T4 endonuclease V の活性



2. D₂O 中の DNA 10 mer の NOESY spectrum

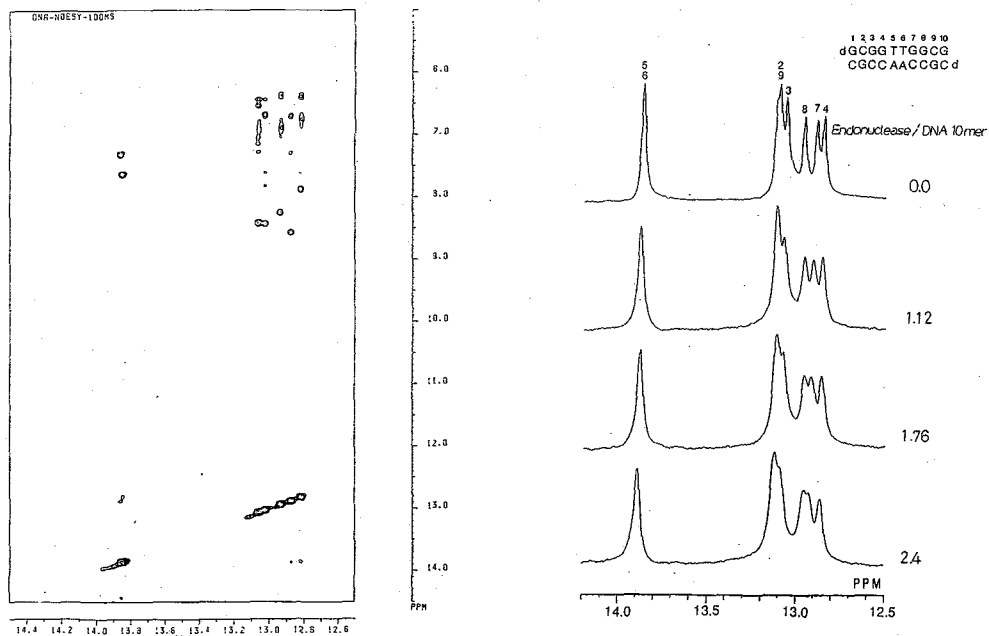
結果と考察

DNA の D_2O 中の NOESY spectra で 塩基 proton (pyrimidine H6, purine H8) と糖 H1' proton 間の NOE を通じて 1H resonance の連続帰属を行った. right handed DNA で 塩基 proton (pyrimidine H6, purine H8) と同一 residue の H1' proton そして 5' end 側のとなりの塩基の H1' proton 間の距離は NOE 観測可能距離に存在する. 図 2 のように両鎖に対して連続帰属を行った. DQF-COSY, TOCSY, 等も測定して ほぼ全非交換性 proton を帰属した. また交換性 proton は Ad.Bax によって開発された 1-1 echo NOESY を使用して帰属を行った. 図 3 に H_2O 中の DNA の NOESY spectrum を表した. DNA の imino proton peak, amino proton peak 等を帰属した. DNA の imino proton は DNA の helix 内部に存在するので DNA helix 構造に起きた変化の probe として imino proton resonance が使用できる. 蛋白質 peak と重ならないので peak 変化を追跡しやすい.

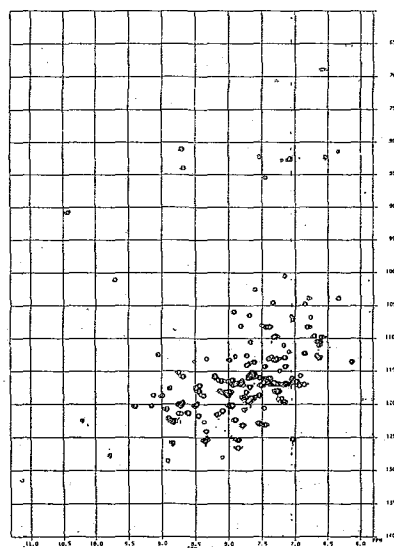
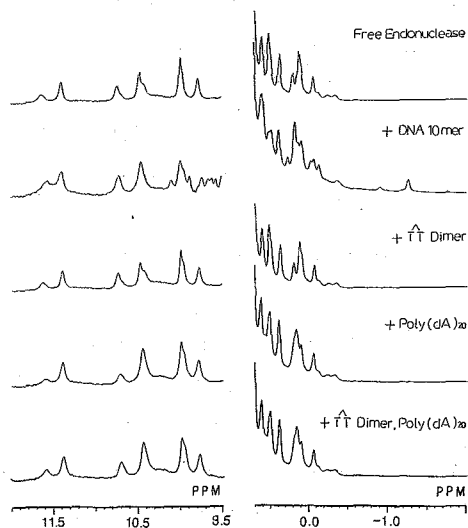
DNA に T4 endonucleaseV を入れた時, 全体的な peak の broadening が起きたのと同時に 7 番 imino proton が低磁場 shift した. (図 4) この 7 番 imino proton は TT のとなりの塩基の imino proton である. 従って蛋白質の結合によって DNA の全体的な構造変化よりは局所的構造変化が起こったものと思われる. 蛋白質に DNA を滴定して蛋白質側の構造変化も観測した. (図 5) 高磁場で顕著な peak 変化と同時に -0.9 ppm, -1.3 ppm あたりに新しい peak が現れた. 低磁場でも 10 ppm あたりで peak 変化が起きたのと同時に 9.8 ppm あたりに新しい peak が現れた. したがって T4 endonucleaseV は DNA と結合時 蛋白質に構造変化が起きると思われる. peak 変化から蛋白質と DNA は NMR time scale より slow exchange をしているのがわかった. TT dimer だけは, 蛋白質に結合しないこともわかった. そして poly(dA)₂₀ を滴定した時には peak 変化が少し起こったが大きな変化ではなかった. TT dimer と poly(dA)₂₀ を同時に滴定した時は poly(dA)₂₀ だけを滴定した時とほぼ同じ蛋白質側の変化が現れた. 従って T4 endonuclease V と DNA が結合する時 起きる蛋白質の構造変化は DNA の二重らせん構造が必要であり TT dimer だけでは結合しないことから T4 endonucleaseV は DNA に結合して構造変化が起きてから TT dimer と結合できるようになる可能性がある. 現在 この可能性を調べるために他の oligonucleotide を合成して実験中である.

また arginine と lysine は 正電荷をもつ amino acid で, これらの側鎖は DNA との結合に関与することが知られている. 最近 HMQC, SQC という方法を通じて N についている proton を感度よく観測する方法が開発された. これらの手法を用いて arginine と lysine の NH proton が観測できるようになったが lysine の側鎖の NH₃ peak は線幅が広く観測に低い pH 条件を必要とするので indicator として不適当である. しかし, arginine の側鎖の ϵ NH peak は比較的 sharp であり ^{15}N chemical shift が 80 ppm あたりに現れるので他の backbone の NH peak と重ならなくよく分離されているのでこれらの peak は DNA との結合実験の indicator として使用できる. 均一に ^{15}N ラベルされた T4 endonucleaseV の SQC spectrum を図 6 に示した. 80 ppm (^{15}N) あたりに

arginine の ϵ NH peak があらわれた。これら arginine の側鎖と DNA との結合の可能性を SQC における滴定実験から検討中である。



3. H₂O 中 DNA 10 mer の NOESY spectrum 4. DNA 10 mer に T4 endonuclease V を滴定



5. T4 endonuclease V に DNA 10 mer を滴定 6. T4 endonuclease V の SQC spectrum

謝辞

NMR 測定において助言を下された吉川 渉 博士に感謝いたします。またデータ解析に際し貴重な助言と激励をくださった森川 取右 先生に深く感謝の意を表します。

L12

(阪大蛋白研) °白川昌宏、松尾浩、芹川康治、京極好正

(蛋白工学研) 吉川渉、大久保忠恭

Stable isotope aided NMR studies of DNA binding proteins

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

Cro protein from bacteriophage λ , the DNA binding domain of yeast GAL4 and the DNA binding domain of yeast *Saccharomyces pombe* PAP1 and their interactions with DNA fragments have been studied by stable isotope aided NMR spectroscopy.

1. Strategy for assignments of the ^{15}N and ^1H resonances due to the main chain of the proteins were obtained by conventional 2-dimensional ^1H -NMR spectra and various ^{15}N and ^{13}C aided NMR spectroscopy.
2. Interactions of the proteins with DNAs were monitored by adding DNA fragments to series of ^{15}N -labeled proteins. About the interactions of the cro protein with DNAs, the result indicates that in the specific interaction, compared to the non-specific interaction, a much wider region of Cro makes a tight contact with DNA, allowing conformational changes on both Cro and the operator DNA as we showed previously.
3. ^{13}C -double filtered ^1H -NOESY experiment was performed on the mixture of ^{13}C -labeled Cro protein and ^{12}C Cro protein, which enabled to selectively detect inter-subunit NOE cross peaks.

序

^{15}N 、或いは ^{13}C などの安定同位体で蛋白質をラベルする事により、蛋白質 核酸複合体の複雑なスペクトルから、特定の情報を選択的に取り出す事が可能となった。今回、この手法をそれぞれ異なる構造モチーフを持つと思われる3種のDNA結合蛋白質、 λ ファージ cro protein、yeast GAL4 protein 及び yeast *Saccharomyces cerevisiae* PAP1 proteinに適用した。

帰属法としては、通常の 2D ^1H -NMRに加えて、2Dや3DのHMQC-NOESY、HMQC-COSY法、mutantを用いる方法などに加えて、carbonyl- ^{13}C 、amide- ^{15}N のdouble labeling法なども駆使して行った。 ^{15}N 又は ^{13}C でラベルした蛋白質と種々のDNAとの複合体についても解析を行い、相互作用についての多くの知見も得ている。

一般に塩基配列特異的にDNAに結合する蛋白質は2量体を形成する。今回取り上げた3種とも溶液中では2量体である。 ^{13}C 又は ^{15}N でuniformにラベルした蛋白質とラベルしていない蛋白質を混ぜisotropicにヘテロな2量体を形成させ、 ω_1/ω_2 -double- ^{13}C

／ ^{13}C -filter を利用し 2 量体間の NOE シグナルのみを選択的に 2 次元で観測する方法を開発中である。それにより ^{13}C でラベルした cro protein について inter-molecular の NOE クロスピークと思われるシグナルを検出した。このテクニックは蛋白質-DNA 間にも利用できる。

[実験]

(1) 試料の調整: λ ファージ cro protein は、cro 遺伝子を tac プロモーター、或いは 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り大腸菌で大量に発現したものをを用いた。Lys 32 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。GAL4 蛋白質の DNA 結合ドメインは、GAL4 の N 末 110 残基及び 62 残基をコードする DNA 断片を用いて大量生産系を構築した。PAP1 protein についても、特異的 DNA 結合能をもつ 71 残基の DNA 結合ドメインが大腸菌で効率よく発現されている。uniform な ^{15}N 及び ^{13}C 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 または BL21 (DE3) を $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 及び ^{13}C -glucose を含む M9 最小培地で生育させることでおこなった。

アミノ酸特異的 ^{13}C carbonyl-ラベル / uniform- ^{15}N -ラベルは、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を含む M9 最小培地に ^{13}C -ラベルした種々のアミノ酸を加える事により行った。測定はすべて 20 mM リン酸カリウム / 300 mM KCl 溶液中で行った。

(2) パルスシーケンス

HMQC 法、HMQC-COSY 法、HMQC-NOESY 法、SQC 法等のパルスシーケンスを用いた。図 1 には ^{13}C -double filtered-2D- ^1H -NOESY のパルスシーケンスを示す。double-filter NOESY に関しては、 t_1 期は、 ^{13}C decoupling しているが、 t_2 期はしていない。 $\phi_1 = (X, -X)$ 、 $\phi_2 = [2X, 2(-X)]$ 、receiver = $(X, -X)$ 、とすると、 t_1 期に ^{13}C に結合した ^1H 核が、 t_2 期に ^{12}C に結合した ^1H 核が観測される。これを基本として、256 回の phase 廻しによって測定を行った。

$X(\omega_1, \omega_2)$ Double Half Filter

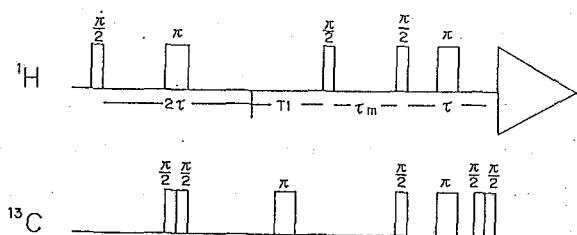


図 1
 $(\omega_1; ^{13}\text{C} - \text{selected}) -$
 $(\omega_2 - ^{13}\text{C} - \text{filtered}) -$
 $^1\text{H} - \text{NOESY}$ のパルス系列

[結果と考察]

(1) ダブルラベル法

Cro protein について行った carbonyl- ^{13}C -、 ^{15}N ダブルラベル法の例を図 3 に示

す。 ^{15}N については uniform に、 carbonyl ^{13}C については、種々のアミノ酸特異的にラベルしたものの single-quantum-coherence (SQC) スペクトルである。 HMQC 法では F1 方向の分解能が充分でなく、同定が困難であったものが、SQC法では $^1\text{J} (^{15}\text{N} - ^{13}\text{C})$ で doublet に分裂したシグナルを容易に読み取れる。又、F2 方向の分裂から $^2\text{J} (^1\text{H} - ^{13}\text{C})$ も測定できる。又、加えた ^{13}C 体アミノ酸については ^{15}N のシグナルが消去する事によりある程度の帰属も可能である。

以上の結果や、mutant や、アミノ酸特異的 ^{15}N ラベルを基にして、あいまいさの少ない帰属を進めていき、Cro protein について殆どの ^{15}N 核、 ^1H 核の帰属をしたが、すでに発表されている帰属 (Weber, et al., 1985, Biochemistry 24) と異なっている箇所が多かった。

(2) protein-DNA 相互作用

^{15}N で uniform ラベルした Cro protein と化学合成した λ cro protein の特異的結合部位 O_R3 の 17 塩基対 DNA や、非特異的な塩基配列を持つ DNA 断片との複合体の $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HMQC スペクトルを Cro protein 単独のそれと比較すると、いくつかのシフトや broadening を個別に Cro protein の X 線構造の上にプロットしたのが図 3 である。特異的相互作用においては、 α_2 helix (残基 16 - 23) を含む広範囲が DNA と結合する面を形成しているようであるのに対して、非特異的相互作用では、C 末の arm 構造 (残基 60 - 66) と、2 量体の結合部位辺 (残基 56 など) の狭い領域で DNA と接触しているようである。これは、変位体などを用いたこれまでの解析結果と一致する。

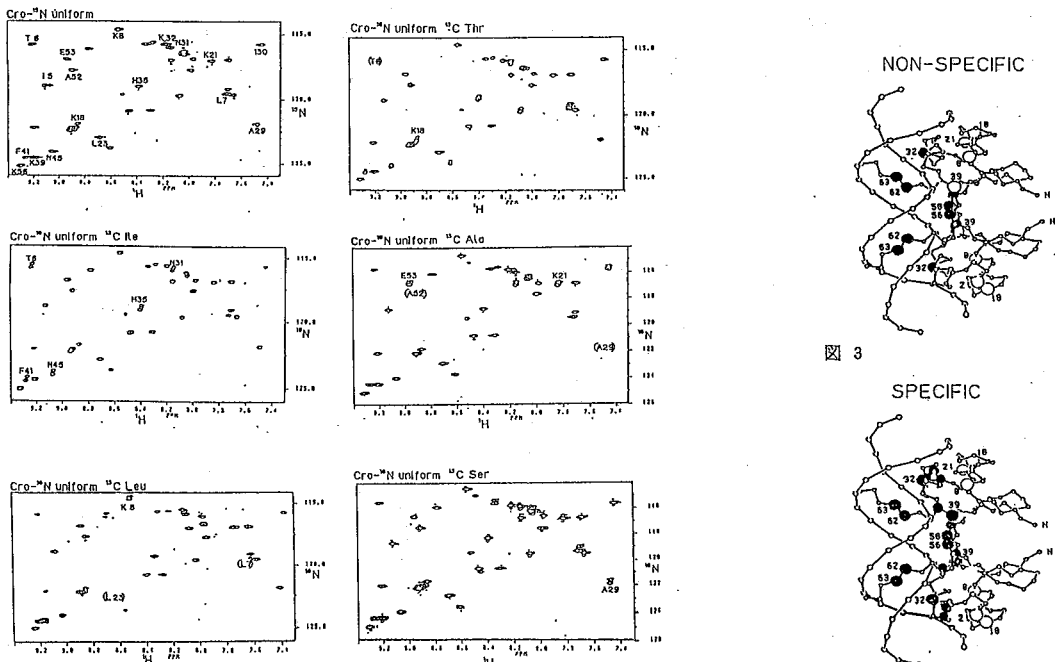


図 2 ダブル・ラベル法の例

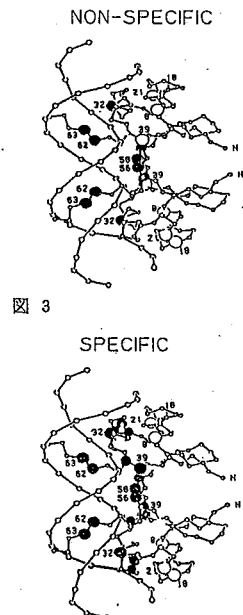


図 3

(3) X-double-filter を用いた inter-subunit NOE の選択的検出

^{13}C - 或いは ^{15}N - で uniform にラベルした Cro protein を、ラベルしていない Cro protein と 1 : 1 に混ぜ、55°C 10分 或いは、界面活性剤を加える事により、isotropic にヘテロな 2 量体を形成させた。この試料に対して、図 1 のパルスを用いた ^1H - NMR 測定を行った。図 4 は、 ^{13}C ラベルの Cro protein について測定した (ω_1 ; ^{13}C - selected) - (ω_2 - ^{13}C - filtered) - ^1H - NOESY である。重水中では ^{13}C に結合した ^1H 核から、 ^{12}C に結合した ^1H 核への NOE シグナルが選択的に観測される。Phe 58 の ring 2,6H と Val 55 の γCH_3 間の subunit 間の NOE クロスピークと思われるシグナルが観測されている。

以上の手法は、GAL4 protein PAPI protein についても適用している。得られた、蛋白質 - DNA、蛋白質 - 蛋白質相互作用についての知見を議論したい。

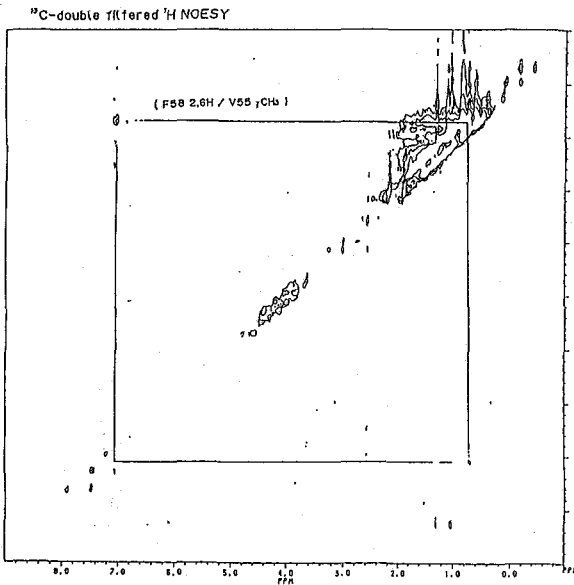


図 4
 $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ cro protein dimer の
 (ω_1 ; ^{13}C) - selected - (ω_2 -
 ^{13}C - filtered) - ^1H - NOESY
 スペクトル
 Phe58 2,6H、Val55 methyl-H 間の
 NOE クロスピークが観測された。

○橋 真一、神田大輔、市川紗織、金子みどり、梶井美弘*、菊本芳和*、
稲垣冬彦 (東京都臨床医学総合研究所、*大塚製薬)

Structural analysis of Interleukin-1 β with stable isotope-aided 2D and 3D NMR

Shinichi Tate, Daisuke Kohda, Saori Ichikawa, Midori Kaneko, Yoshihiro Masui*,
Yoshikazu Kikumoto* and Fuyuhiko Inagaki

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome 3-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113,
Japan

* Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., Kawautimachi, Tokushima 771-01, Japan

ABSTRACT: Almost complete assignment of backbone signals of Interleukin-1 β (IL-1 β) was made. Because of the large molecular weight of this protein (17.4kDa, 153residues), we used isotope-aided NMR techniques such as ^{15}N -SQC hetero correlation spectroscopy applied to ^{15}N -selective or 1- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -double labeled samples and 3D-NMR. On the basis of our assignments, we analyzed the ^{15}N -SQC spectra of three types mutant IL-1 β s whose biological activities are dramatically reduced. As a result, we observed distinctive spectral changes in the region consisting of amino acid 90 through 95, suggesting that this region is important to the biological activity of IL-1 β .

1. 序 インターロイキン-1 β (IL-1 β)は、アミノ酸残基153個よりなるサイトカイン分子であり、IL-2産生の誘導、プロスタグランジンE₂産生の誘導などの広範な生物活性を持っている。IL-1 β 程度の分子量のタンパク質になると ^1H -NMRのみではスペクトルの解析が困難であるが、我々は、安定同位体核(^{13}C , ^{15}N)を利用した2次元、3次元NMRを用いることで、その主鎖のシグナルの帰属を終えることができた。今回は、我々がIL-1 β のスペクトルを解析するにあたって用いてきた手法および解析法の詳細について述べる。また、この帰属をもとにしてIL-1 β 変異体のヘテロ相関スペクトルを解析した結果得られたIL-1 β の構造と機能に関する知見についても報告する。

2. 実験 IL-1 β は、大塚製薬で作成されたプラスミドにより形質転換した大腸菌を用い、常法に従い調製した[1]。NMRの測定に用いたサンプルの濃度は0.5mM-2mMであった。測定は温度は28 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプルのpHは7.2で行なった。ヘテロ相関スペクトルおよび3Dスペクトルの測定は、日本電子GX-400分光器で行なった。

3. アミノ酸タイプ別帰属 IL-1 β の分子量は17.4kDaであるが、このような分子量のタン

パク質ではシグナルの T_2 緩和時間が短くなるため、HOHAHAの混合時間の間にシグナルが消失してしまい、従来のようなHOHAHAによるスピン系の解析ができなくなる。そこで我々は、 ^{15}N で選択的にラベルしたIL-1 β を数多く調製しそのヘテロ相関スペクトルを測定することで、まずアミドプロトンのタイプ別帰属を進めた。Table Iには我々が選択ラベルに用いたアミノ酸の種類を示してある。Gly, Asp, Glnの場合を除くと1次配列から期待できる全てのシグナルを観測することができた。我々の用いた系では、 ^{15}N -Gluで選択的にラベルした場合には、Gluの生体内における代謝によってラベルが希釈され、ヘテロ相関スペクトル上でシグナルを観測することができなかった。Gly, Aspの場合にもやはり代謝によるラベルの希釈が生じたが、これらの場合にはシグナルを観測することができた。ただし、観測されたシグナルの数は1次配列から期待されるよりも多かった。この余分に観測されたシグナルは、代謝の結果ラベルが流れクロスラベルされたことによるものである。シグナルの帰属を進める

段階で、Glyは、Serに、Aspは、Asn, Glu, Glnにクロスラベルされたことが分かった。このようなクロスラベルは、観測が難しいという点を除くと効率のよくタイプ別帰属を進める上で有効であった。

ヘテロ相関スペクトルの測定は、1種類のアミノ酸でラベルした場合でもシグナルどうしが近いものがあって F_1 軸方向に分解能の高い ^{15}N -SQC法が有効であった[2]。 ^{15}N -SQC法は多くのパルスが必要とするため、水シグナルの消去が難しいが、我々はDANTEパルスとスピナーロックパルスを用いることで良好な水シグナルの消去を実現することができ、非常に弱いシグナルを観測する際にも ^{15}N -SQC法を有効に使うことができた[3]。

さらに我々は、選択ラベルによってタイプ別帰属のできにくいつかのヘテロ相関シグナルに対して $^{1-13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ダブルラベルを用いた部位特異的な帰属を行なった。Table IIには、我々の行なったダブルラベルの組み合わせを示す。期待できる全てのダブルット・シグナルを観測することができた。 $^{1-13}\text{C}/^{15}\text{N}$ によるダブルット・シグナルは、HMQC法では F_1 軸方向の分解能が低いため観測できず、 ^{15}N -SQCでのみ観測可能であった。図1には $[^{1-13}\text{C}]\text{Lys}/^{15}\text{N}$ -Ala, Met, Leu, IleラベルされたIL-1 β の ^{15}N -SQCスペクトルを示す。 ^{15}N -Ala由来のシグナルは代謝による希釈のためシグナル強度が弱くなっているが、DANTEパルス

Table I: Listing of Residues Labeled at the Peptide Nitrogen in the different labeled IL-1 β with Numbers of Expected and Observed NH signals in the ^1H - ^{15}N Correlation Spectrum

| residue | expected | observed |
|---------|----------|----------|
| Phe | 9 | 9 |
| Tyr | 4 | 4 |
| Ile | 5 | 5 |
| Leu | 15 | 15 |
| Met | 6 | 6 |
| Lys | 15 | 15 |
| Ala | 5 | 4 |
| Val | 11 | 11 |
| His | 1 | 1 |
| Asp | 8 | 27 |
| Gly | 8 | 20 |
| Glu | 11 | 0 |

Table II: Listing of Residues Labeled at the Peptide Nitrogen and Peptide Carbonyl Carbon in the different labeled IL-1 β with Expected and Observed Number of Doublet Signals in the ^1H - ^{15}N Correlation Spectrum

| ^{1-13}C | ^{15}N | expected | observed |
|-------------------|-----------------|----------|----------|
| Pro | Val | 3 | 3 |
| | Lys | 2 | 2 |
| | Tyr | 1 | 1 |
| Val | Met | 1 | 1 |
| | Phe | 3 | 3 |
| | Leu | 1 | 1 |
| | Ala | 1 | 1 |
| Lys | Ala | 1 | 1 |
| | Ile | 2 | 2 |
| | Met | 1 | 1 |
| | Leu | 1 | 1 |
| Leu | Val | 1 | 1 |
| | Lys | 3 | 3 |
| | Tyr | 1 | 1 |
| Phe | Val | 3 | 3 |
| Phe | Luc | 1 | 1 |

とスピナーロックパルスを用いた ^{15}N -SQC法を用いることで、このようなAlaのシグナルに関しても明瞭なダブルット・シグナルを観測することができた。

4. 3D-NMR 上に述べたようにして我々は多くのアミドプロトンのタイプ別帰属を行なったが、アミドプロトンの化学

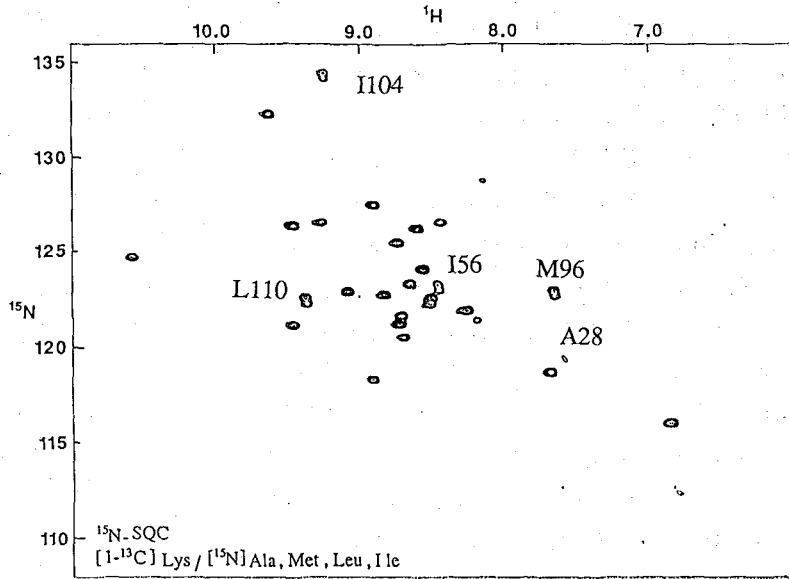


図1 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ダブルラベル (^{15}N -SQCスペクトル)

シフトの重なりのため、かなりのアミドプロトンに対しては、それにJ結合している $\text{C}\alpha$ プロトンの位置を知ることができなかった。従って、このようなアミドプロトンのタイプ別帰属のみでは、連鎖帰属をほとんど進めることはできなかった。さらに、2D-NOESYスペクトル上のシグナルの重なりが大きいという理由からも、2Dスペクトルのみでは連鎖帰属を進めることは非常に困難であった。そこで、我々はヘテロ相関スペクトル上で帰属できたシグナルの $\text{C}\alpha$ プロトンの帰属と、NOESYスペクトルにおけるシグナルの重なりを解消する目的のため、3D HOHAHA-HMQCと3D NOESY-HMQCの2種類の ^{15}N -3D-NMRスペクトル[4]を用いた。3D HOHAHA-HMQCスペクトルを用い、シグナルの ^{15}N 化学シフトに対応する面を調べることでヘテロ相関スペクトル上のシグナルに対応する $\text{C}\alpha$ プロトンを帰属することができる。さらに、それに対応する面の3D NOESY-HMQCスペクトルよりそのアミドプロトンに由来する隣接残基とのNOEシグナルの位置を知ることができる。このように、 ^{15}N -3D-NMRを利用することで連鎖帰属における"縦方向"の曖昧さを解消することが可能である。しかし、"横方向"の曖昧さは依然として残っていることに注意すべきである。この"横方向"の曖昧さは、永山らのように ^{13}C -3D-NMRを用いることで解消することができる[5]。我々の場合、サンプル溶液のpHが7.2であり、連鎖帰属の連鎖が断続的になることが予想されたのでこの"横方向"の曖昧さを、多くのタイプ別帰属と部位特異的な帰属を行なうことで解消することにした。連鎖帰属の課程で、このようなタイプ別帰属は $\text{C}\alpha$ プロトンの重なった場合には非常に有効あり、特に部位特異的な帰属は1次配列上の位置を明らかにするので解析を速めるのに役立った。なお、測定条件は異なるが、我々の帰属は他のグループによって出された帰属と矛盾しなかった[6]。

4. IL-1 β 変異体の解析 IL-1 β のN末端側の変異は、その生物活性を著しく低下させる。

例えば、N末端側3残基のないIL-1 β (4-153)では、intact IL-1 β の約20%のレセプター結合能しかなく、N末端側6残基を失ったIL-1 β (7-153)はほとんどレセプター結合能を持たないことが示されている[7]。さらに、N末端側にMetが余分に付加したMet-IL-1 β は、intact IL-1 β の10%未満の生物活性しか持たないことも分かっている[1]。我々は、上に述べた3種類のIL-1 β 変異体の¹⁵N-SQCスペクトルを測定し、このような変異に伴う構造変化を調べてみた。図2には、IL-1 β (4-153)の場合の、intact IL-1 β との化学シフトの差をプロットしたものを示す。この結果から、N末端側の変異により、意外にも、変異点から離れたアミノ酸残基90-95の領域に大きな変化があることが分かった。同様の傾向は他の2種類の変異体についても見られた。このことは、このアミノ酸残基90-95の領域がIL-1 β の生物活性に重要な役割を果たしていることを示唆する。この結果は、K93,K94を化学修飾したIL-1 β では、その生物活性が著しく低下するという実験結果と対応する[8]。

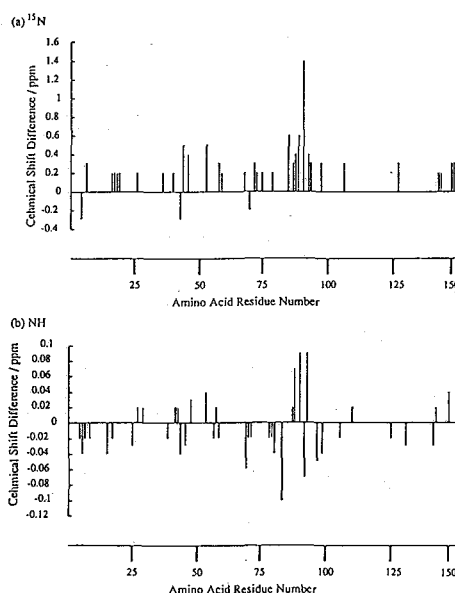


図2 IL-1 β (4-153)とIL-1 β (wild)の化学シフトの差

謝辞 3D-NMRの測定は、日本電子(株)大内宗城博士と共同で行なったものであり、御協力に感謝致します。

<文献>

- 1) Kikumoto, Y. et al. (1987) BBRC, **147**, 315-321
- 2) Bodenhausen, G. and Ruben, D.J. (1980) Chem Phys. Lett., **69**, 185-189
- 3) 楯真一、榊井美弘、稲垣冬彦 第17回生体分子の構造と機能に関する討論会(大阪)
- 4) Marion, D. et al. (1989) Biochemistry, **28**, 6150-6156
- 5) Nagayama, K. et al. (1990) J. Biochem., **108**, 149-152
- 6) Driscoll, P.C. et al. (1990) Biochemistry, **29**, 3542-3556
- 7) Mosley, B. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 4572-4576
- 8) Yem, A.W. et al. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 17691-17697

3次元NMRによるタンパク質の構造解析 RNase H (*E. coli*)○山崎俊夫¹、好田真由美²、猿渡茂¹、金谷茂則³、中村春木³、永山国昭¹

1. 日本電子(株)、生体計測学研究室、2. 協和発酵工業(株)、東京研究所、
3. 蛋白質工学研究所

Structure determination of a protein, RNase H (*E. coli*), by 3D NMR experimentsToshio Yamazaki¹, Mayumi Yoshida², Shigeru Endo¹, Shigenori Kanaya³, Haruki Nakamura³, Kuniaki Nagayama¹

1. Biometrology Lab, JEOL, 2. Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo, 3. Protein Engineering Research Institute

The global fold of a protein, RNase H (*E. coli*), was determined by the combination of 3D NMR experiments and distance geometry calculation. To overcome the problem of overlapping of ¹H resonances in larger proteins, several kinds of heteronuclear 3D NMR experiments were applied to the protein. Subsequent to the assignment of backbone atoms, we assigned aromatic protons and methyl carbons and protons. These atoms were important to understand the inner structure because they form hydrophobic cores. From the spectrum of 3D HMQC-NOESY for the sample of which aromatic residues were labeled with ¹³C and others were labeled with ¹⁵N, 32 NOE cross peaks between the secondary structures were picked up (those within the β -sheet were not counted). Through the calculation by DADAS90, the global fold was determined.

”安定同位体と多次元NMRの新しい展開により、分子量1万以上、3万以下のタンパク質の構造決定が現実のものとなった。”

¹H NMRのみを用いる従来法の限界：K. Wuthrich等によって確立された方法は、2D ¹H-¹H COSY, NOESYを用いて共鳴を帰属して、NOESYのcross peakを距離の制約条件として構造を組み立てるものである¹⁾。タンパク質の分子量が大きくなると、化学シフトのオーバーラップのためこの方法の適用は困難になる。特にCOSYを用いたアミノ酸の種別への分類はAla以外の場合適用できない。そこでTOCSY(HOHAHA)やアミノ酸選択的ラベルなどが併せ用いられる。この方法により帰属に関しては分子量1万を超えるタンパク質の成功例がある。しかし、NOEのcross peakの帰属の問題は簡単に解決しない。両方向の周波数軸上での化学シフトにオーバーラップが無い時のみ帰属でき、それを特定の原子間の距離情報に入れることができる。分子量が増えるに従い、NOE cross peakの数は増えるが、帰属可能なものは減少していく。全ての局面で最大の困難は化学シフトのオーバーラップであり、次の困難は横緩和の増大に伴う、¹H間のスカラ結合由来のcross peakの消失である。この両者が特に側鎖の帰属には致命的である。

新しい次元：オーバーラップした¹Hの共鳴を別の次元で展開する。具体的には、その¹Hが共有結合している原子核(炭素核、窒素核)の化学シフトで再度分解する。但し、試料を安定同位体(¹³C, ¹⁵N)でラベルする必要がある。¹Hが直接ついている原子核とのスカラ結合(¹J)は十分大きく、磁化を移す時の損失は小さい。それらの化学シフトで展開するには、HMQC, HSQCなどを利用する。任意の¹H-¹Hの2次元のNMRを3次元に拡張することができるが、digital resolutionが充分無いのでpeakの形がin-phaseになるものが望ましい。我々の実験ではNOESY, TOCSYを3次元に拡張した。パルスシーケンスは特に難しくはなく単に2次元パルスシーケンスを連ねるだけでよい。但し¹Hの化学シフトで展開する時は異種核間の¹Jをデカップルする必要がある。例えば、NOESYの前または後ろにHMQCを連ね、3D(¹H-¹⁵N-¹H)NOESY-HMQCあるいは3D(¹⁵N-¹H-¹H)HMQC-NOESYを作ることができる²⁾。括弧の中に順に展開する化学シフトの核種をならべた。3次元以上の実験で気をつけなければならないのは測定時間である。もし粗い分解能でピーク

が充分に分離するなら、感度は2次元と比べてそれほど悪くならない。従って、実験を2日程度に抑えるように、分解能、観測帯域、位相回転を調整し選ばなければならない。我々の実験では位相回転を実験にあわせて最小限にしているが、位相回転無しで実験をする事もできる³⁾。

タンパク質への応用：タンパク質中の水素は主鎖のアミドが窒素に、そのほかは脂肪鎖、芳香環共にほとんど炭素に付いている。まず、それらをスピン 1/2 の安定同位体でラベルする。E. coli 等での overproduction の系では最小培地に $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ と per- ^{13}C glucose を用いることによって容易に均一ラベルする事ができる。NMR 装置が両方の核を同時に照射できない時は実験に合わせて、片方ずつラベルしたものをつくってもよい²⁾。 ^{14}N が ^{15}N に変わることによって線幅は減少する。 ^{12}C が ^{13}C に変わることによって線幅は増加する。我々は一昨年より RNase H (E. coli) 分子量 17.6kDa (155 a. a.) を対象として構造解析を目的に新しい測定方法を開発してきた。このタンパク質は RNA-DNA ハイブリッド2重螺旋を RNA 鎖を切る酵素である。等電点はおよそ pH 9 で酸性水溶液中でよく溶ける。E. coli での overproduction の系が確立していて安定同位体によるラベルが可能である。従来の ^1H NMR (NOESY, COSY) スペクトルだけでは共鳴ピークの重なりが激しく、曖昧さなく共鳴ピークを対応する核に帰属することも NOE の cross peak を核の組に帰属する事もほとんどの場合不可能であった。

主鎖の帰属：主鎖の帰属に重要な実験は隣合った残基の NH-NH と NH-C α H 間の NOE である。アミド水素の化学シフトをさらにアミド窒素の化学シフトで展開する 3D NOESY-HMQC (C α H-N-NH) がまずなされるべき実験である。軽水中で測定する必要がある、検出は水から遠い化学シフトを持つアミドを観測するほうが有利であり、NOESY-HMQC の順に連ねる実験がよい。溶媒信号消去の為に、我々は 1-1 echo を用いたが、スピンロックを用いて ^1H の single quantum を消す方法もある⁴⁾。また逆に C α ^1H の化学シフトを $^{13}\text{C}\alpha$ の化学シフトで再分解する実験をすることで C α ^1H のオーバーラップを解くことができる。ここでは逆の順に連ね、3D HMQC-NOESY (C α -C α H-NH) を用いる。この場合も検出核 NH である。水信号の消去では presaturation を用いればよく、 $^{13}\text{C}\alpha$ とのスカラ結合で分裂した C α H の信号はたとえ水の下にあっても完全には消えない。そのかわり C α の展開期にとカルボニル炭素とのスカラ結合をデカップルしたほうがよく、我々の実験では 1-1 echo を用いた。さらに残基内と残基間の NH-C α H の cross peak を区別するために 3D TOCSY-HMQC と 3D HMQC-TOCSY の実験も行った。これら4つの3次元の実験と14種類のアミノ酸選択的にラベルした試料を用いて主鎖の帰属を行った²⁾。各原子の直接結合を辿る実験の成功も報告されている⁵⁾。

2次構造：主鎖間の近距離 NOE 及び J 結合情報を整理することにより α -helix、 β -strand を決めることができる。 α -helix は隣接残基間の NH-NH 間の NOE、残基内の NH-C α H 間の J が小さいことを条件とし、さらに C α H と3つまたは4つ先の残基の NH の間に NOE が観測されるが、この間に含まれていることを条件に加え、決めた。 β -strand は C α H と隣接残基の NH の強い NOE と残基内の NH-C α H が大きいことを条件に決めた。5本の α -helix と5本の β -strand が存在する。5本の β -strand は1枚の β -sheet を形成していることが主鎖間の NOE からわかった。

側鎖の帰属：前記の ^{13}C 3D HMQC-TOCSY のスペクトル中には C α ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ -C β

^1H に対応するピークがある。これによって $\text{C}\beta^1\text{H}$ の化学シフトを帰属することができる。この方法はしかし運動性の低いメチレン水素核のシグナルが弱いため、必ずしもさらに大きなタンパク質に一般化できない。現在、芳香環の ^1H とメチル基の ^{13}C と ^1H の帰属を先に行い、全体構造のトポロジーを求めているところである。軽水中の 2D NOESY と重水中の 2D TOCSY で Trp の芳香環水素核をつないだ。さらにそれぞれの主鎖の水素核との間の NOE を用いて、帰属した。Ala のメチル基は 3D HMQC-TOCSY ($\text{C}\alpha$ 中心) スペクトル中のピーク ($\text{C}\alpha\text{H}-\text{C}\alpha-\text{C}\beta\text{H}$) と 3D TOCSY-HMQC (メチル炭素中心) スペクトル中のピーク ($\text{C}\alpha\text{H}-\text{C}\beta-\text{C}\beta\text{H}$) から帰属した。Ile の ($^{13}\text{C}\gamma, \text{C}\gamma^1\text{H}$) Val の 2つの ($^{13}\text{C}\gamma, \text{C}\gamma^1\text{H}$) は 2D relayed COSY および 3D TOCSY-HMQC を用いた。Ile の ($^{13}\text{C}\delta, \text{C}\delta^1\text{H}$) は主に 3D NOESY-HMQC を用いた。Leu についてはいろいろな 3D NOESY から一部帰属した。この問題に対して炭素原子核間の直接結合を辿る実験が報告されていて、完全な帰属に成功している⁶⁾。

2次構造間の NOE: 芳香環の水素とメチル基の炭素と水素の帰属を先行させたのは、これらのアミノ酸残基の側鎖は通常 hydrophobic core を形成していて構造中心に位置し、これらの間の NOE だけからでも2次構造間の配置、つまり global fold が決定できるだろうと考えたためである。 ^{12}C の付いた水素核のほうが ^{13}C の付いた水素核のほうが sharp であることと、aliphatic

carbon と aromatic carbon を同時にデカップルすることが容易でないので 芳香環アミノ酸を ^{12}C 残りを ^{13}C にラベルした試料を用い、3D HMQC-NOESY を測定した。この場合、検出期に対応する周波数軸の分解能は測定時間に関係なく高くできるので、芳香環水素の化学シフトの展開を最後に持ってきた。得られたスペクトルの一部を図1に示す。同じ化学シフトを持つメチル水素核がそれぞれの炭素核の化学シフトで分解され、cross peak の帰属に必須であることが分かる。結果、25個の2次構造間の NOE (β -strand 間のものも含まない) を得ることができた。メチル基間の NOE も同じスペクトルから5つ得た。そのほか含め、32個の NOE を得た。まだオーバーラップがかなりあるため、この数は当初の期待よりかなり少ない。

構造の計算: DADAS90 を用いた。このプログラムは2面角のみを自由変数に分子の構造を作る。与えられた距離の制約条件と van der Waals 接触を満足すべく、

$^{13}\text{C}-^1\text{H}-^1\text{H}$ HMQC-NOESY methyl-aromatic region

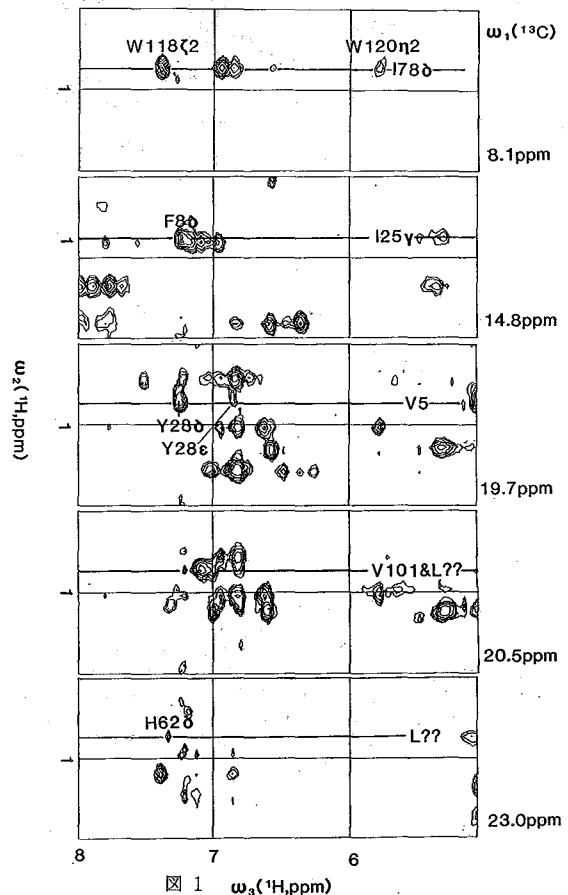


図1 $\omega_2(^1\text{H}, \text{ppm})$

ユーザの指定した command list に従い、計算を進める。command list 内には距離の制約条件、van der Waals 接触の重みと範囲、minimizer の種類などが指定できる。距離の制約条件として NOE からの情報、角度の制約条件として、2次構造の情報を主鎖の標準構造に余裕をもたせていた。この計算では、自由度をさらに減らし計算効率をあげるため、メチル基などを1つの原子として扱う united atom model を用いた。200個のランダムに選んだ初期構造から始め、化学結合に沿って近距離の条件を極小化し、満足するものを約30個選び、さらに全ての条件を満足するように極小化した。現在得られている最も条件を充たす構造を図2に示す。

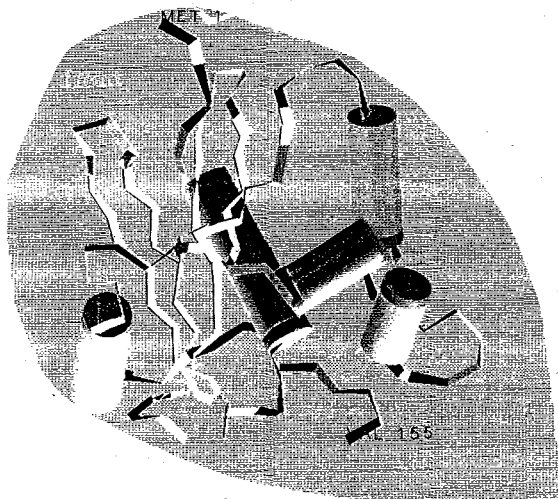


図 2

"Forget enlightenment. I want you to concentrate on the structure of the protein molecule."



参考文献

- 1) K. Wüthrich, "NMR of Proteins and Nucleic Acids", John Wiley & Sons, New York
- 2) K. Nagayama, T. Yamazaki, M. Yoshida, S. Kanaya, & H. Nakamura (1990) J. Biochem. 108, 149-152
- 3) D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin, & A. Bax (1989) J. Magn. Reson. 85, 393-399
- 4) B. A. Messerle, G. Wider, G. Otting, C. Weber, & K. Wüthrich (1989) J. Magn. Reson. 85, 608-613
- 5) M. Ikura, L. E. Kay, & A. Bax (1990) Biochemistry 29, 4659-4667
- 6) G. M. Clore, A. Bax, P. C. Driscoll, P. T. Wingfield, & A. M. Gronenborn (1990) Biochemistry 29, 8172-8114

L15

¹⁵Nラベル法によるヒトc-Ha-rasタンパク質の構造解析

○武藤裕¹, 伊藤隆¹, 山崎和彦¹, 藤田純子¹, 西村暹², 河合剛太³, 宮澤辰雄³, M.Waelchli⁴, 横山茂之¹ (¹東大・理・生化, ²国立がんセンター研・生物, ³横浜国大・工, ⁴日本ブルカー)

¹⁵N-Labeling NMR Study on the Structure of Human c-Ha-Ras Protein

Yutaka Muto¹, Yutaka Ito¹, Kazuhiko Yamasaki¹, Junko Fujita¹, Susumu Nishimura², Gota Kawai³, Tatsuo Miyazawa³, Markus Waelchli⁴, and Shigeyuki Yokoyama¹, ¹Faculty of Science, University of Tokyo, ²Biology Division, National Cancer Center Research Institute, ³Faculty of Engineering, Yokohama National University, and ⁴Bruker Japan

By uniform and leucine-specific ¹⁵N-labeling and HMQC measurements, conformation of human c-Ha-ras protein was analyzed and compared between GDP-bound form and GTP-bound form. There is a three-stranded antiparallel/parallel β -sheet structure in the amino-terminal domain. One end of this sheet is regularly ordered in the GDP-bound form and largely distorted in the GTP-bound form, while the other part is regularly ordered in both forms. Such a conformational difference between the two forms is probably important for the regulation of biological function of the ras protein.

ヒトc-Ha-ras遺伝子の産物である 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, 多くのがん細胞からこの遺伝子の点突然変異が見いだされている. rasタンパク質は, 189アミノ酸残基よりなる分子量約21000のタンパク質である. rasタンパク質は, GDPあるいはGTPを1分子結合しているが, これにより, 細胞における活性が制御されている. すなわち, GTPを結合したrasタンパク質が活性型である(ターゲットとなる分子と相互作用する)のに対し, GDPを結合したrasタンパク質は不活性型である(ターゲット分子とは相互作用できない)(図

1). rasタンパク質は, それ自身でGTPase活性をもっており, 結合しているGTPを加水分解することにより, 活性型から不活性型にもどることができる. 多くの発がん性点突然変異体では, GTPase活性が低下しており, 活性型のGTP結合型rasタンパク質が細胞内に蓄積することによってがん化すると考えられている. rasタンパク質の正常細胞における機能を明らかにし, また ras遺伝子の突然変異による発がん機構を理解するために, rasタンパク質の機能構造の解明は, 重要な課題である.

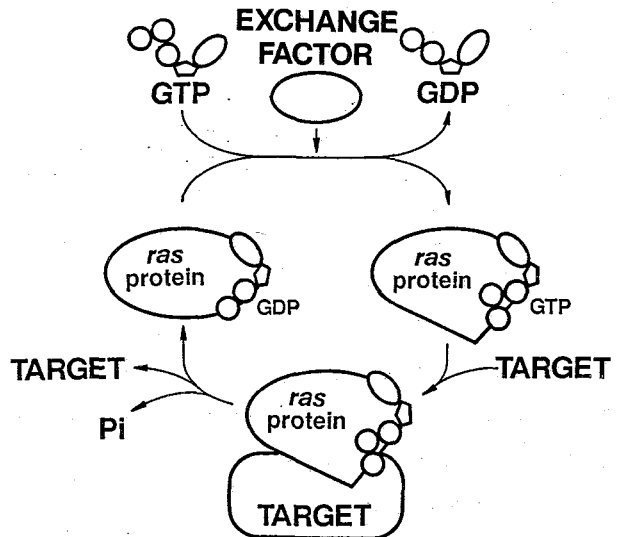


図1. rasタンパク質の機能制御モデル

我々は、NMRの各種の方法を用い、GDP結合型およびGTP結合型のrasタンパク質について高次構造の比較を行ってきた。既に、rasタンパク質に結合したグアニンヌクレオチドのコンフォメーションを解析し、結合したGTPとGDPとではコンフォメーションが異なり、GTPの場合には動的なコンホメーション平衡にあることを示した（第28回NMR討論会）。さらに、C α プロトンを重水素化したアミノ酸を用いて、GDP結合型のrasタンパク質には、Asp38-Val44のストランドとCys51-Asp57のストランドよりなる逆平行 β シート構造が存在し、この構造がGDPからGTPへの交換により変化することを見いだしている（文献1）。

rasタンパク質のGDP結合型とGTP結合型については、X線結晶解析が既になされているが、報告された構造は、我々がNMRによって得た構造とは一致しない部分がある。したがって、水溶液におけるrasタンパク質の構造について、NMRによる解析をさらに進める必要がある。上記の逆平行 β シート構造の領域には、3個のLeu残基（Leu52, Leu53, Leu56）が含まれている。そこで、今回は、rasタンパク質をユニフォームに ^{15}N でラベルし、また、Leu残基のみを選択的に ^{15}N でラベルして、GDP結合型およびGTP結合型の高次構造を比較した結果について報告する。

c-Ha-rasタンパク質のC末端18残基を除いた短鎖rasタンパク質（171残基）の合成遺伝子を導入した大腸菌を最少培地で培養し、タンパク質の大量調製を行なった。ユニフォーム ^{15}N ラベリングの場合は、唯一の窒素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を用いた。選択的な ^{15}N のラベリングの場合は、最少培地を用い、アミノ基を ^{15}N でラベルしたロイシンとラベルされていないその他の19種のアミノ酸を加えた。また、 ^{15}N の希釈を防ぐため、大腸菌としてはトランスアミナーゼ欠損株を用いた。

大腸菌菌体から精製された短鎖rasタンパク質は、すべてGDPを結合している。これを測定用緩衝液（20mM リン酸, 10mM MgCl_2 , 150mM NaCl , pH5.4, 10% D_2O ）に置換し、GDP結合型rasタンパク質のNMR測定に用いた。また、GDP結合型rasタンパク質を、EDTA存在下でGTPの非水解アナログ（GMPPNP）とともに37°Cでインキュベートすることを繰り返し、GTP結合型rasタンパク質に変換したのち、測定用緩衝液に置換した。

ユニフォームに ^{15}N ラベリングしたrasタンパク質のGDP結合型およびGTP結合型について、HMQC法、HMQC-NOESY法およびHMQC-HOHAHA法によりスペクトルを測定した。GDP結合型とGTP結合型のrasタンパク質のHMQCスペクトル（図2-A,B）を比較すると、GDP結合型rasタンパク質でプロトン化学シフト10.6ppm付近にあるクロスピークが、GTP結合型では大きくシフトし、この領域に観測されないなどの差異がある。全体的に、GTP結合型では、GDP結合型に比べて、シグナル同士で化学シフトの差が小さく、クロスピークの重なりが顕著である。さらに解析を進めるため、選択的な ^{15}N ラベリングを行なった。

Leu残基を選択的に ^{15}N でラベルしたrasタンパク質を作成してGDP結合型とGTP結合型の試料を調製し、HMQCスペクトルの比較を行なった（図2-C,D）。この短鎖rasタンパク質分子には、13個のLeu残基が存在するが、そのすべてについてクロスピークを観測することができた。観測されるクロスピークのうち、プロトン化学シフトが8.0-6.0ppmにあるク

ロスピークは、GDP結合型とGTP結合型の両者において完全に一致しているのに対し、プロトン化学シフトが8.0ppmより低磁場にあるクロスピークでは、変化しているものがある。

さらに Leu残基のシグナルを帰属するため、 ω_2 -filtered NOESYを測定した(図3)。8.0-6.0ppmのアミドプロトンシグナルについては、アミドプロトン同士の強いNOEを観測された(rasタンパク質のカルボキシル末端にあるLeu171に由来すると思われるシグナルを除く)。したがって、これらのシグナルが α ヘリックスにあるLeu残基に由来することが示唆される。これらのアミドプロトンシグナルから側鎖プロトンへのNOEをみると、GDP結合型とGTP結合型とで全く一致しており、これらのLeu残基が存在している α ヘリックス部分には、GDP/GTP交換により大きな構造変化が生じていないことがわかる。GDP型のrasタンパク質については、軽水溶液のNOESYスペクトル、HOHAHAスペクトルを ω_2 -filtered NOESYスペクトル、HMQC-HOHAHAスペクトルと合わせて解析することによって、逆平行 β シート構造部分の帰属を完了した(図4)。この帰属に基づいて逆平行 β シート構造に存在するLeu残基のHMQCクロスピークを見ると、GDP結合型とGTP結合型の間で、Leu52、Leu53に由来するシグナルでは化学シフト差が極めて小さいが、Leu56に由来するシグナルでは大きな化学シフト差がある。これは、GTP結合型では逆平行 β シート構造の一部が開裂していること(文献1)と対応しており、さらに、この構造上の差異が β シート構造の片方の端に限られていることを示している。

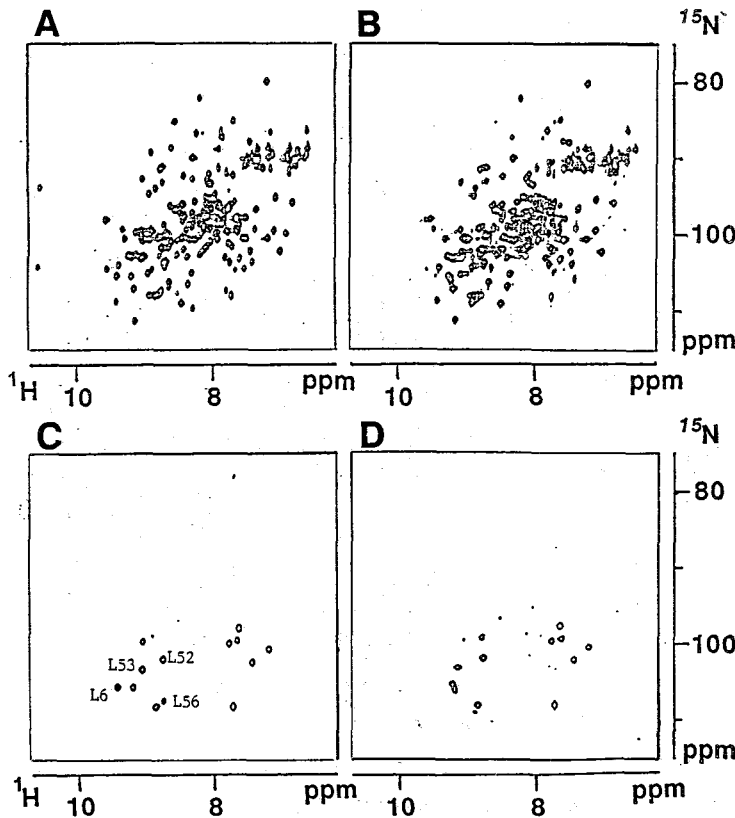


図2. ユニフォームに ^{15}N でラベルしたrasタンパク質(A,B)ならびにLeu残基を選択的に ^{15}N でラベルしたrasタンパク質(C,D)のHMQCスペクトル(軽水溶液)

A, C: GDP結合型

B, D: GMPPNP結合型

Leu52-Leu56のストランドは、さらに第3のストランド（ひとつのLeu残基を含む）と平行 β シート構造を形成していることが示された。この第3のストランドは、X線結晶解析の結果（図5）を参照して、Met1-Val9と推定された。さらに、残基間NOEによりLeu6に由来するシグナルが帰属され、GDP結合型とGTP結合型とで大きくシフトしていることがわかった（図2-C,D）。すなわち、GDP型からGTP型への変換により、rasタンパク質のN末端ドメインの構造（ β シート構造を中核とする）の片方の端において、逆平行 β シート構造部分に加えて、平行 β シート構造部分にまで変化が生じていることがわかった。これに対し、rasタンパク質の α ヘリックスの大半は、構造変化を起こしていない（上述）。

現在、Leu以外に、Phe, Tyr, Ile, Val, Arg, Ser, Glyなどについても、選択的 ^{15}N ラベリングを行ない、シグナル帰属を進めつつある。今後は、rasタンパク質全体についてさらに詳しい構造解析を行なっていく予定である。

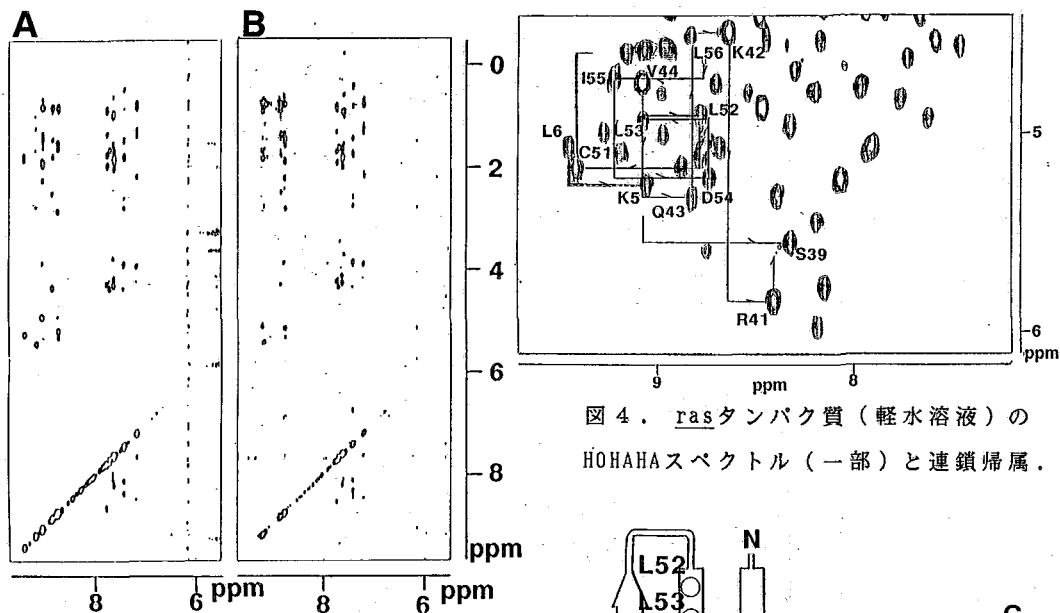


図4. rasタンパク質（軽水溶液）のHOHAHAスペクトル（一部）と連鎖帰属。

図3. Leu残基を選択的に ^{15}N でラベルしたrasタンパク質（軽水溶液）の ω_2 -filtered NOESY スペクトル。

A: GDP結合型

B: GMPPNP結合型

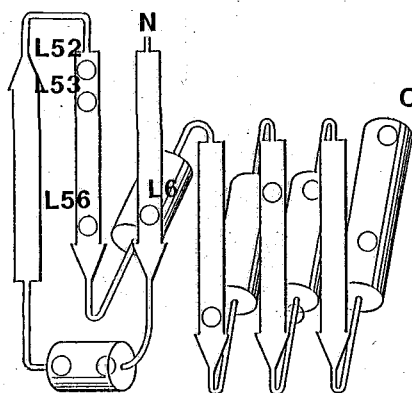


図5. rasタンパク質の2次構造の模式図。○はLeu残基の位置。

文献

1. K. Yamasaki, G. Kawai, Y. Ito, Y. Muto, J. Fujita, T. Miyazawa, S. Nishimura and S. Yokoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 1054-1062 (1989)

L16

安定同位体利用 NMR 技術によるタンパク性プロテアーゼインヒビター S S I の構造研究

○甲斐莊正恒、三宅洋子、葦沢輝美、安倍未央、石原美和（都立大）
小島修一、熊谷泉、三浦謹一郎（東大工）、串田克彦（パリアン）

Structural studies on a protein proteinase inhibitor SSI by means of stable isotope assisted NMR spectroscopy

M. Kainosho, Y. Miyake, T. Nirasawa, M. Abe, M. Ishihara (Tokyo Metro. Univ.)
S. Kojima, I. Kumagai, K. Miura (Tokyo Univ.), K. Kushida (Varian Instrument)

A protein proteinase inhibitor SSI, whose molecular weight is 23,000, has been extensively used as a model protein system in order to develop stable isotope assisted NMR techniques which are useful for larger proteins. The site-directed mutagenesis of SSI and ^{14}N -reverse double labeling were found to be useful to assign the backbone carbonyl resonances in the degenerated dipeptide units, where normal double labeling could not give unique assignments. Uniform, selective, and "block" ^{13}C -labeled amino acids have been used in various new NMR methods.

放線菌の生産するタンパク質 S S I は、特異なダイマー構造とともにセリンプロテアーゼに対する幅広い阻害スペクトルにより特徴づけられる。遊離状態では分子量 23,000 のダイマーとして存在するが、プロテアーゼ類（例えばサブチリシン）と 2 : 2 の複合体を形成すると分子量 78,000 の高分子タンパク質複合体となる。我々は NMR スペクトルによる S S I の構造と機能の相関に興味を持ち、高分子量タンパク質複合体の構造変化を鋭敏に検出する方法を開発してきた。S S I の活性を最も直接に担う部位はプロテアーゼの活性セリンと相互作用する Met-73 のカルボニル炭素である。従って我々の最初の興味は遊離および複合体形成時において、Met-73 のカルボニル炭素を如何にして観測・帰属するかという問題にあった。" ^{15}N , ^{13}C -ダブルラベル法 " はこのような背景から考案された。ここで、我々の研究室において最近開発した安定同位体利用 NMR 技術のうち幾つかをとりあげ、カルボニル炭素シグナルを巡る多彩な手法について紹介する。

(I) 主鎖カルボニル炭素 ^{13}C -シグナルの補助的帰属手法 : ダブルラベル法は問題とするカルボニル炭素に隣接する C-末端側残基が同一である場合、及び隣接する C-末端側残基の α -窒素の高濃度 ^{15}N ラベルができない場合に一義的な帰属が困難となる。このようなケースは分子量が増加するとともに頻繁に生じる。その上さらに、分子量が大きくなるに従いカルボニル炭素の線幅が広くなり $^1\text{J}_{\text{CN}}$ を観測するには相当な高濃度の ^{15}N ラベルが前提となる。したがってダブルラベル法が不成功に終わった場合、代用となる（或いは補助する）手法の開発が望ましい。次の 2 つの手法は有効である。

(a) 位置特異的アミノ酸変異体の利用 : S S I の遺伝子はクローン化され高発現系も確立しており、いかなる部位でも原理的にはアミノ酸置換・削除・挿入が可能である。同列のアミノ酸配列をもつジペプチド単位（重複配列）の存在により一義的帰属が困難な場

合にはカルボニル炭素を持つ残基（或いはアミド窒素を持つ残基）を置換し重複を解消することができる。変異の前後でのスペクトルの比較により帰属を確定するにはタンパク質の全体構造が変化しないように”保守的”な変異が望ましい。但し、アミノ酸はどの2種の変換であってもかなり大きな（少なくとも局所的には）擾乱を引き起こすことは避けられない。図-1にSSIに4ヶ所含まれるLeu-Thr配列にあるLeu(14,33,63,80)のカルボニル炭素シグナルの帰属例を示す。この場合4ヶ所のLeuを野性型SSIには存在しないIleに置換した4種の変異体をそれぞれ[1-¹³C]Leu

でラベルしたものと野性型のLeuラベル体とのカルボニル炭素シグナルを比較した。

殆どの場合、野性型のスペクトル中★を付けた4ヶ所のLeu-Thr部位のうちで何れのシグナルが変異体で消失しているかは明瞭である。ただ、L⁸⁰I SSIの場合にはLeu-79のシグナルが大きく低磁場シフトしている（帰属は独立なダブルラベルにより決定）。これは主として側鎖のアルキル基の構造による化学シフト変化に起因する。

カルボニル炭素の帰属にスピン結合の相手側（アミド窒素側）を置換するのも有効な場合がある。アミノ基転移酵素などの作用で¹⁵Nの選択的な高濃度ラベルが困難なケースにも役にたつ。Cys残基はCys-Ala 2ヶ所(35,50), Cys-Glu 1ヶ所(101)がありダブルラベルによる決定には不向きであるが[C, G] A³⁶G SSIのスペクトル(図-2c)、及び次項の¹⁴N復帰ダブルラベル法の併用により帰属された(内田・細谷・三宅)。

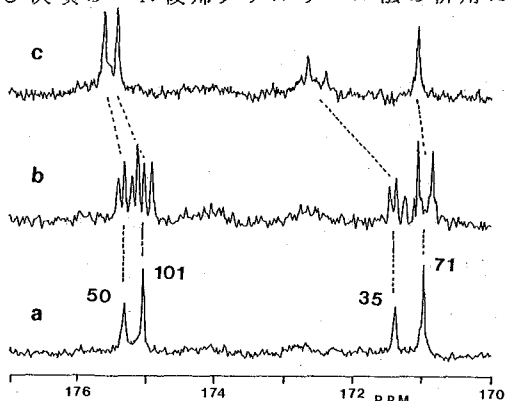


図-2. Cysカルボニルの帰属。b) ¹⁴N-Ala復帰ダブルラベル(50,35の線型に注意); c) アミノ酸変異体のダブルラベル[C, G] A³⁶G SSI。75MHz; (a), (b) 80℃; (c) 40℃。

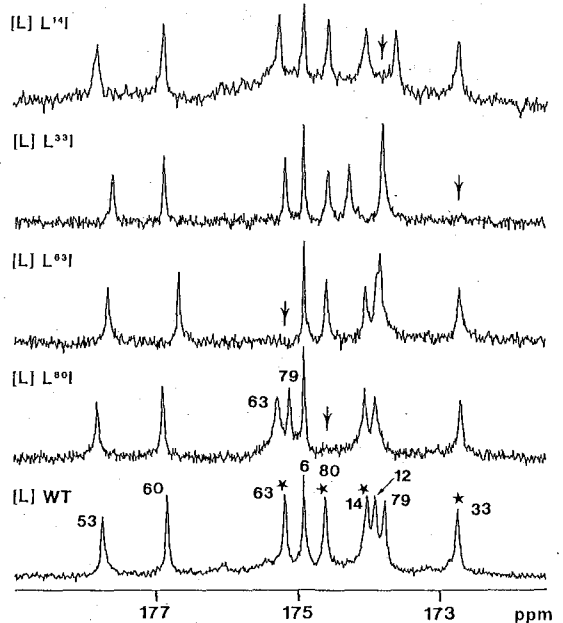


図-1. 位置特異的アミノ酸変異によるLT配列を持つ4ヶ所のLeuシグナル(★)の帰属。↓はIle置換により消失。75MHz, 50℃。

殆どの場合、野性型のスペクトル中★を付けた4ヶ所のLeu-Thr部位のうちで何れのシグナルが変異体で消失しているかは明瞭である。ただ、L⁸⁰I SSIの場合にはLeu-79のシグナルが大きく低磁場シフトしている（帰属は独立なダブルラベルにより決定）。これは主として側鎖のアルキル基の構造による化学シフト変化に起因する。

(b) ¹⁴N-復帰ダブルラベル法：通常の方法とは全く逆に、特定アミノ酸のカルボニル炭素を¹³Cラベルし、さらに¹³Cラベル部位に隣接する残基を以外を全て均一¹⁵Nラベルする方法である。¹⁴Nアミノ酸に隣接するカルボニル炭素シグナルにはセンターが強く観測される。スピン分裂しないセンターの相対強度を用いる本アプローチは、低ラベル率の場合には特に優れている。実験は¹⁵Nラベル菌体から得られる¹⁵Nアミノ酸混合物にカルボキシル基を¹³Cラベル

の ^{14}N アミノ酸を加えた培地でタンパク質を生産する方法で十分目的が達成できる。この場合 ^{15}N -アミノ酸混合物に含まれる量に比べて十分過剰な量の ^{14}N アミノ酸を加えることにより、このアミノ酸残基のアミド窒素がある程度選択的に ^{14}N に“復帰”する。このことから ^{14}N -復帰ダブルラベル法 (^{14}N -Reverse Double Labeling)と命名した(甲斐荘・細谷)。前項に述べた、Cys-Ala (35,50) とCys-Glu (101) は図-2に示したようにセンターピークの強度が等しい2ヶ所(35,50)と、より弱い1ヶ所(101)が容易に見出される。Ala と Glu はお互いにアミノ基を交換するためにラベルの選択性は低く、通常のダブルラベル法では Cys-50 とCys-101 の帰属は不確実である。Cys-Pro 配列の 71 は何れの方法でも帰属できる。

(II) 主鎖カルボニル炭素シグナルを起点とする帰属拡張手法：我々は本討論会において既に、カルボニル炭素とスピン結合を介して関連づける方法で、主鎖・側鎖原子団のNMRシグナルの帰属を確定できることを繰り返し示してきた。²⁾この数年間、この種の帰属拡張手法の可能性について徹底的に可能性を追求した。

(a) 均一 ^{13}C -ラベルアミノ酸の利用：異なった同位体濃度の均一 ^{13}C ラベルアミノ酸はそれぞれ特徴を活かした利用がある。我々は15, 36, 98%と3種類アミノ酸をタンパク質NMRへ応用している。15%標識体では隣接する炭素が同時にラベルされる確率が低いために、各炭素の ^{13}C シグナルを1次元NMRにより直接に観測する場合には好都合である。36%体では隣接炭素が同時にラベルされる確率が高く、2D-INADEQUATEによる炭素連鎖の決定に有用である。98%体では全炭素が同時に ^{13}C ラベルされているので、COSY, HOHAHA等を利用して炭素連鎖を一挙に決定できる。^{2d)}

(b) 位置特異的2重 ^{13}C ラベルアミノ酸の利用：特定の炭素対が選択的に高濃度に ^{13}C ラベルしたアミノ酸は炭素連鎖の個別の決定に有効である。既に我々は $(1,2-^{13}\text{C}_2)$ アミノ酸が、カルボニル炭素と α 炭素の連鎖決定に有用なことを報告している。^{2e)}カルボニル炭素は低磁場に離れて存在するため、この部分の炭素連鎖の決定を独立に行うことの利点は大きい。分子量が大きくなるにつれ最終的にはこのような、炭素対を個別に決定する手法が有利になると思われ詳しい検討を行っている。

(c) “ブロック”ラベルアミノ酸の利用：アミノ酸の微生物発酵原料グルコースは、くつかの構成単位“ブロック”に分解された後アミノ酸に取り込まれる。例えば、ロイシンは図-3の構造式に示されているように3ブロックから構成されており、各ブロックは異なったグルコース分子に由来する。従って、98%に均

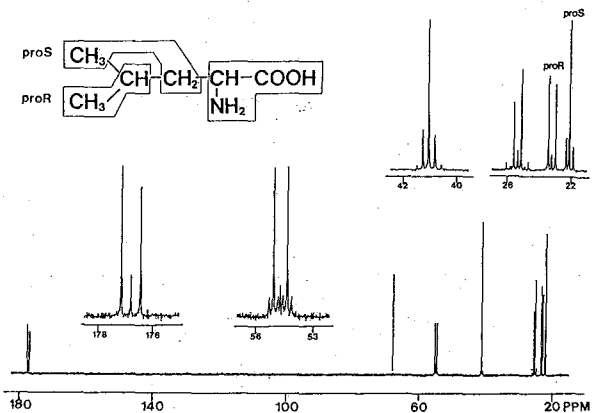


図-3. 36% “ブロック” ^{13}C -ラベル Leuの ^{13}C -NMR スペクトル。98% $^{13}\text{C}_6$ -グルコース：グルコース(1:2)混合物から発酵法により合成。ボックスで囲んだ3つのブロックから構成される。

— ^{13}C ラベルしたグルコースを2倍量のグルコースと混合したものを原料としてロイシンを調製すると、ブロック内は高い確率(85%)、ブロック間は低い確率(30%)でラベルされる。このような生合成過程を反映した不均一な ^{13}C 分布を持つアミノ酸を"ブロック"ラベルアミノ酸と命名した(甲斐荘・武)。ブロックラベル体の重要な利用法としてプロキラルなメチル(Val, Leu)の立体特異的帰属があげられる。図-3のスペクトルが示すように、pro-R炭素は隣接炭素も同一ブロックに属していることから doublet、pro-S炭素は singletとなる。これらのブロックラベル Leuや Valがタンパク質に取り込まれている場合は 2D-INADEQUATE により pro-Rメチル炭素のみが観測できることから、立体特異的帰属が確定する。

微生物発酵で製造可能な全アミノ酸について"ブロック"ラベル体の調製が可能であることが見出された。³⁾我々とは全く独立にNeriら⁴⁾はグルコースを炭素源とするタンパク質の調製時に少量の高濃度に ^{13}C ラベルしたグルコースを混在させることにより、不均一なラベルを行った。この方法によりシグナルの全帰属が既に確定しているメチル基の立体特異的帰属が達成された。しかしながら、彼等の方法では全てのアミノ酸残基が同時にラベルされてしまうために、個々のアミノ酸のブロックラベル体を用いる我々のアプローチが少なくとも高分子量タンパク質への応用という点では遙かに優れている。

[謝辞]

アミノ酸発酵に協力して頂いた味の素(株)中央研究所に心より感謝する。共同研究者の全てを列記することはできなかったので、各項目のところで名前を引用した。本研究はこれらの方々の熱心な研究の成果である。ここで述べた安定同位体利用技術の多くは科学技術庁振興調整費により始めて経済的に可能となった。また NEDO Bioscience Grant による高感度NMR検出プローブの製作なども本研究の遂行上大変有益であった。関係官庁の助成に感謝する。

[文献]

- (1) 「主鎖カルボニル炭素 ^{13}C -NMRによるタンパク質高次構造の研究」、新生化学実験講座(第1巻 蛋白質 III, 高次構造)、印刷中、東京化学同人(1990);及び引用文献。
- (2) a 第24回本討論会要旨, 255(1985); b 第25回本討論会要旨, E7(1986); c 27回本討論会要旨, 63(1988); d 第28回本討論会要旨, 163(1989)。
- (3) 甲斐荘、栗原、中松、「新規な ^{13}C 標識アミノ酸及びその発酵的または酵素的製造法」平成1年度特許出願第35527号。
- (4) D. Neri, T. Szyperski, G. Otting, H. Senn, and K. Wuethrich, *Biochemistry*, **28**, 7510-7516(1989).

L17

○阿久津秀雄、古市弘、平山浩一、加野勝宏、朴璋洙、仁木克己、

M. A. Cusanovich (横浜国大工、アリゾナ大)

Intermolecular electron transfer and Intermolecular interactions in Cytochrome c₃
Hideo Akutsu, Hiroshi Puruichi, Koichi Hirayama, Katsuhiko Kano, Jang Su Park
 and Katsumi Niki (Yokohama National University), and Michael A. Cusanovich
 (The University of Arizona)

The electron self exchange rate of cytochrome c₃ from *D. vulgaris* MF was determined from the line broadening of ¹H NMR signals. The second order rate constant was found to be concentration dependent at a higher concentration. The rate constant was about 2x10⁵ M⁻¹s⁻¹, which was much faster than that of cytochrome c. The electron transfer from small reductants were also investigated by the use of laser flash photolysis. The mechanism of the electron transfer will be discussed on the basis of their structures and intermolecular interactions.

[はじめに] チトクロム c₃ 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、14000の分子量で4つのヘムを持つ特異なチトクロムである。このタンパク質はバクテリア内では主にペリプラズムに存在し、ヒドロゲナーゼが水素を分解して得た電子を直接受け取り、細胞内の硫酸イオン還元系に渡す役割をはたしている。この電子伝達系に存在するフェレドキシンはin vitroでもチトクロム c₃ と直接電子授受を行うことが知られている。このような電子授受において4つのヘムがどのような役割をはたしているのかはチトクロム c₃ の特異性を理解する重要な鍵となる。われわれは既にチトクロム c₃ の4つのヘムの微視的酸化還元電位をNMRを用いて解析し、個々のヘムがそれぞれ固有の性質を持っていることを示した。本講演ではチトクロム c₃ の電子移動速度と分子間相互作用からこの問題を考えてみたい。

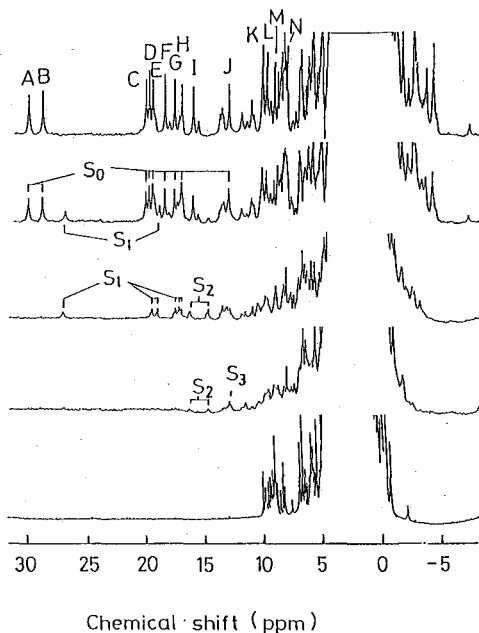


図1 種々の酸化還元状態におけるチトクロム c₃ の¹H NMRスペクトル。1番上が完全酸化、1番下が完全還元。S_nはn電子還元状態を示す。

[実験] ¹H-NMRの測定はBruker

AM400で行った。レーザーフラッシュフォト

リシスでは5デアザリボフラビンを386nmの色素レーザーで励起してチトクロムc_hへの電子移動を観測した。

[結果と考察] 図1に様々な酸化還元状態にあるチトクロムc_hの¹H-NMRスペクトルを示す。既に報告したように、これは5つの巨視的酸化還元状態に対応するスペクトルの重ね合わせとなっている。このことは分子間の電子移動がNMRの時間尺度より遅いことを示している。ところで、各シグナルの線幅は酸化還元状態とともに変化している。そこで、この線幅の変化を使って分子間の電子移動の定量的解析を行った。チトクロムc_hは4つのヘムを持つため分子間と分子内の電子移動が存在するが、完全酸化型のシグナルの線幅には分子間の電子移動のみが影響を与える。そこで、完全酸化型のヘムメチル基のシグナルを木村の方法(1)で解析した。その

結果を表1および表2に示す。高濃度では見かけの電子移動速度が遅くなっている。ヘム間では大きな違いは認められないが、これは分子内の電子移動が速いためであると考えられる。ここで求めた電子交換速度はチトクロムc_hについて報告されているものよりも2桁近く大きい。一方、レーザーフラッシュフォトリシスで小さな分子からの電子移動を見てみると、これはさらに2桁以上速い。しかも、ヘム1への電子移動が他のものに比べて速いことがわかった。このことは、分子間電子移動ではヘムと電子供与体の間の種々の相互作用がその速度を決める重要なファクターとなることを示している。そこで、チトクロムc_hが実際に電子授受を行う相手であるフェレドキシンが4つのヘムのいずれかと特異的に相互作用するかどうかをNMRを用いて調べた。その結果、フェレドキシンはヘム1と最も強く相互作用することが分かった。以上の知見を基に分子間電子移動と分子間相互作用について考察する。

[文献] 1. K. Kimura, J. Magn. Reson., **52**, 13-22 (1983)

[謝辞] 本研究におけるNMR測定でお世話になった東大理学部の横山茂之助教授と日本ブルーカー株式会社に感謝いたします。

表1

| ヘム | 濃度 シグナル | 電子移動速度定数/10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹ | | | |
|----------------------------------|----------------|--|----------|----------|----------|
| | | 1.03/mM | 0.383/mM | 0.238/mM | 0.137/mM |
| I ^a I ^b | A ^c | 0.36±0.07 | 1.3±0.2 | 1.8±0.3 | 1.4±0.3 |
| | H | — | — | — | — |
| | I | 0.35±0.06 | 1.2±0.2 | 1.5±0.2 | 2.1±0.4 |
| | K | 0.37±0.06 | 1.4±0.2 | 2.1±0.3 | 2.7±0.5 |
| | 平均 | 0.36±0.06 | 1.3±0.2 | 1.8±0.3 | 2.1±0.4 |
| 2 III | B | 0.36±0.07 | 1.2±0.2 | 2.2±0.4 | 1.2±0.3 |
| | F | 0.47±0.09 | 1.6±0.2 | 1.2±0.2 | 1.4±0.3 |
| | G | 0.23±0.04 | 1.2±0.2 | 2.1±0.3 | 1.0±0.2 |
| | M | — | — | — | — |
| | 平均 | 0.35±0.07 | 1.3±0.2 | 1.8±0.3 | 1.2±0.3 |

a: NMRにより帰属されたヘム b: X線結晶解析により帰属されたヘム
c: NMRスペクトルのシグナル

表2

| ヘム | 濃度 シグナル | 電子移動速度定数/10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹ | | | |
|-----------------------------------|----------------|--|----------|----------|----------|
| | | 1.03/mM | 0.383/mM | 0.238/mM | 0.137/mM |
| 3 ^a IV ^b | C ^c | 0.25±0.06 | 1.2±0.2 | 2.3±0.3 | 3.0±0.5 |
| | D | 0.37±0.06 | 1.1±0.2 | 1.8±0.3 | 1.9±0.4 |
| | J | 0.20±0.03 | 1.5±0.2 | 2.2±0.4 | 1.7±0.4 |
| | — | — | — | — | — |
| | 平均 | 0.27±0.06 | 1.3±0.2 | 2.1±0.3 | 2.2±0.4 |
| 4 II | E | 0.48±0.09 | — | 2.2±0.3 | 3.5±0.6 |
| | L | — | — | — | — |
| | N | — | — | — | — |
| | — | — | — | — | — |
| | 平均 | 0.48±0.09 | — | 2.2±0.3 | 3.5±0.6 |

a: NMRにより帰属されたヘム b: X線結晶解析により帰属されたヘム
c: NMRスペクトルのシグナル

NMRによる抗体分子の高次構造解析

L18

嶋田一夫, 加藤晃一, 高橋栄夫, 金載一, 松永千枝, 中山智紀, 金夏亨, 尾高麻乃, 水谷隆太, 大和澄江, 高羽わかな, 五十嵐貴子, 河南俊郎*, 荒田洋治
(東京大学薬学部, 花王(株)生物化学研究所*)

免疫グロブリンは、高等動物の生体防御システムにおいて中心的役割を演ずる多機能巨大タンパク質である。我々は、NMRによって、免疫グロブリンの高次構造と機能の関係を研究するために必要なさまざまな方法論の開拓を行ってきた。本講演では、安定同位体 (^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N) 標識法とタンパク質化学的手法によって、我々のグループが現時点までに達成した成果を総合的に報告する。

I. 抗ダンシル・スイッチバリエント抗体

解析の対象とした一連の抗ダンシル・スイッチバリエント抗体は次のような特徴を持っている。

- (1) V_H , V_L , C_L ドメインの一次構造が同一で、サブクラスのみが異なっている。
- (2) C_H1 ドメインが欠落した変異体 IgG2a(s)¹⁾をそのメンバーに含む。
- (3) IgG2a(s)を限定分解することによって、 F_v フラグメント(分子量25K)を得ることができる。

II. ^{13}C -NMRシグナルの帰属と応用

多機能タンパク質としての免疫グロブリンの分子構築原理を理解するためには、機能発現に伴う、複数ドメイン間の相互作用機構を総合的に捉える視点が必須である。そのためには、巨大な免疫グロブリン分子(分子量150K)中の、任意の部位からの情報抽出を可能とする方法の確立が不可欠である。前回報告したように、アミノ酸タイプ別に標識した主鎖カルボニル炭素の ^{13}C -NMRシグナルは、intactな免疫グロブリンを対象とした場合でも、全て観測可能であり、この目的に適った極めて有用な情報を提供する²⁾。得られたシグナルの帰属は、次のようにして確立した³⁾。

- (1) 限定分解によって F_v , F_{ab} , F_c フラグメントにシグナルを割り振る。
- (2) 標識抗体と非標識抗体のサブユニットの組み換えによってH鎖, L鎖にシグナルを割り振る。
- (3) F_v のスペクトルと比較することによって、 F_{ab} のシグナルをV領域とC領域に割り振る。
- (4) ダブルラベル法によって位置特異的に帰属を行う。

とくに、(1)-(3)において、ドメイン間の相互作用により、スペクトル間の加減則が成立しない場合、ダブルラベル法の適用が重要である。さらに、 ^{15}N -NMRや化学修飾(鎖間ジスルフィド結合を形成するCys残基のカルボキシメチル化)を組み合わせることにより、帰属の可能性は大きく拡張される。こうして、一連のスイッチバリエント抗体に存在する全てのMet残基の帰属を完了した(図1)。Trp, Tyr, Cysについても、帰属を進行中である。これらの残基は、1)抗原結合部位、2)immunoglobulin foldのコア、3)ドメイン間の接触部位、4)ヒンジ領域、5)糖鎖伸長部位近傍、6)プロテインA結合部位など、抗体の高次構造と機能の関係を考察する上で重要なポイントに

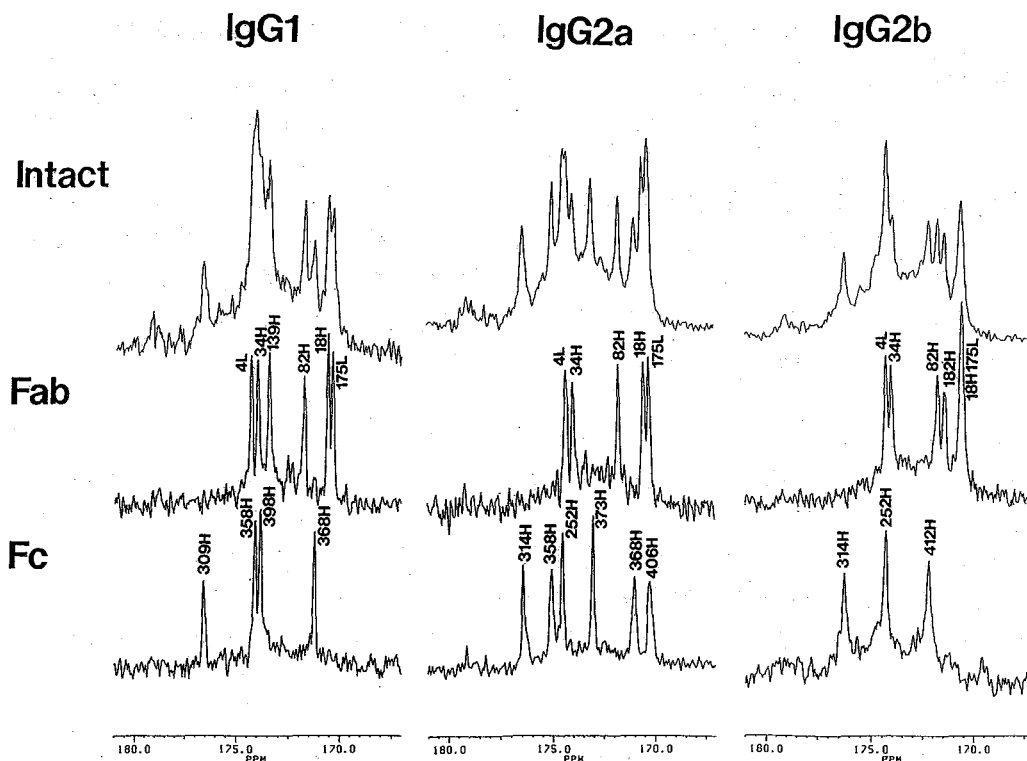


図1. [1-¹³C]Metで標識した抗ダニシル・スイッチバリエーション抗体IgG1, IgG2a, IgG2bのintact, Fab, Fcの¹³C-NMRスペクトル³⁾

図中, HはH鎖, LはL鎖に由来することを示す。

位置しており, その¹³C-NMRシグナルは, これらの領域の高次構造(変化)を鋭敏に反映する有用なプローブとなる。

III. Fvの抗原認識機構の精密解析

V_H, V_LのヘテロダイマーからなるFvフラグメントは, 抗原認識能を有する最小の構造単位である。我々は, IgG2a(s)をプロテアーゼ消化することによって得た抗ダニシルFvを用いて, 特異的抗原(ε-ダニシル-L-リジン)との相互作用様式をさまざまな角度から詳細に解析して, 現在までに次のような知見を得ることができた。

(1) ¹³C-NMRによる抗原結合部位のmapping

抗原結合によって誘起される主鎖カルボニル炭素の化学シフト変化を用いて, Fvにおける抗原結合部位のmappingを行った(図2に, 例としてTrpとHisのシグナルの抗原結合に伴う変化を示す)。顕著な化学シフト変化を示すシグナルを与える残基はH鎖CDR3に局在しており, この領域が抗原との直接の結合を担っていると考えられる。

(2) ¹H-¹⁵N S Q Cによる抗原結合部位の動的構造解析

この領域に多数存在しているTyr残基に着目して, [¹⁵N]Tyrで標識したFvを調製し, S Q Cを用いてアミド水素由来のシグナルの観測を行った(図3)。ダブルラベル法によりH鎖CDR3に位置するTyrに帰属されたシグナルは, いずれも抗原結合に伴って化学シフト変化を示した。また, Fv単独の場合, これらのシグナルは, いずれも

[Trp, Met]Fv

[His, Tyr]Fv

| Heavy chain | Light chain |
|-------------|-------------|
| 55 CDR2 | 27 CDR1 |
| 98 CDR3 | 34 CDR1 |
| | 93 CDR3 |

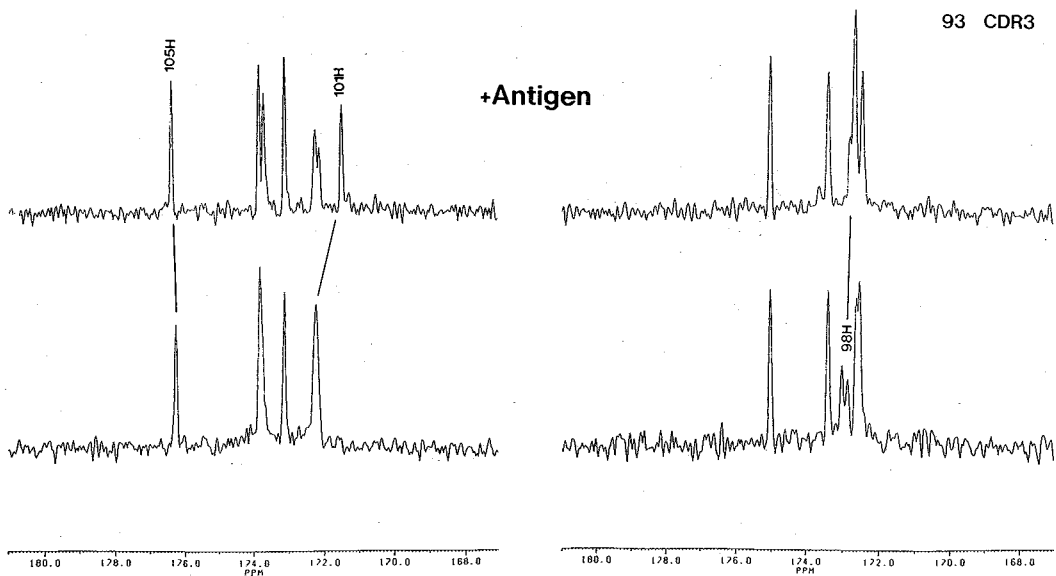


図2. [1- ^{13}C]Trpと[^{15}N]Met (左)および[1- ^{13}C]Hisと[^{15}N]Tyr (右)でダブルラベルを行ったFvの ^{13}C -NMRスペクトル
 ϵ -ダンシル-L-リジンを加えることによって(上段)His-98H, Trp-101H, Trp-105Hに0.1ppm以上の化学シフト変化が誘起されている。

重水中で速やかに消失したが、抗原が結合した状態では、このうちの一部のシグナルの重水素交換速度が著しく減少していることが明らかとなった。

(3) NOESYによる抗原-Fv相互作用様式の解析⁴⁾

選択的 ^2H 標識を施したFvを用いて、NOESYの測定を行い、抗原結合によって化学シフト変化を示すTyrの3,5- ^1H のシグナルについて、次の結果を得た。1) Fvに対して50%および120%のモル比で抗原を加えた試料のNOESYスペクトル上に現れる化学交換由来のクロスピークを解析することによって、抗原、抗体双方について、結合状態と解離状態のシグナルを対応させることができた。図4のEx4のピークから、Tyr-Dのシグナルは、抗原結合によって1.4ppmもの高磁場シフトを示していることがわかる。2) 抗原-抗体間に検出されるNOEより、少なくとも、Tyr-DおよびTyr-Jがダンシル環と直接コンタクトしていることが判明した。これらのTyrは、上述したH鎖CDR3に由来している可能性が極めて高い。現在、1)ヨウ素化による化学修飾、2)アミド水素を起点として残基内 ^1H を経由した連結、3)カルボニル炭素を起点とした ^{13}C - ^{13}C および ^1H - ^{13}C スピン結合による連結などのさまざまなアプローチによって、これらの残基の位置特異的な帰属を行っている。

なお、今回報告する多核種NMRの成果は、我々のグループが解析を進めている他の抗原-抗体系においても成功裡に適用されつつある。

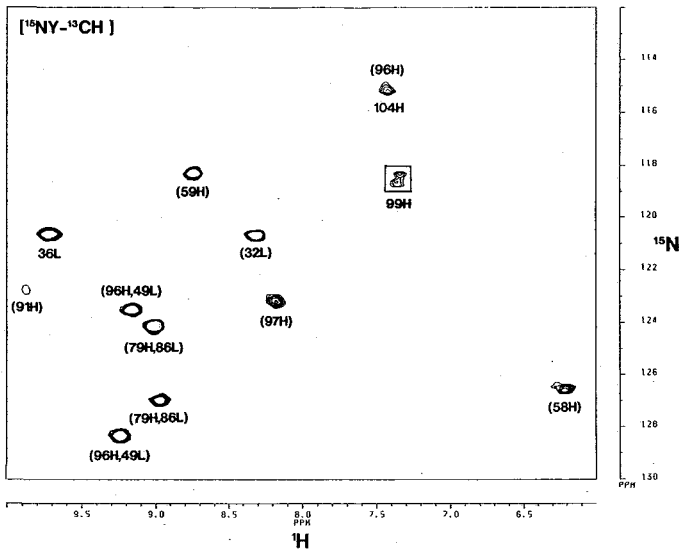


図3. $[^{15}\text{N}]\text{Tyr}$ と $[1-^{13}\text{C}]\text{His}$ でダブルラベルを行ったFvの ^1H - ^{15}N -SQCスペクトル
四角で囲んだピークが、ダブルラベルによって分裂している。

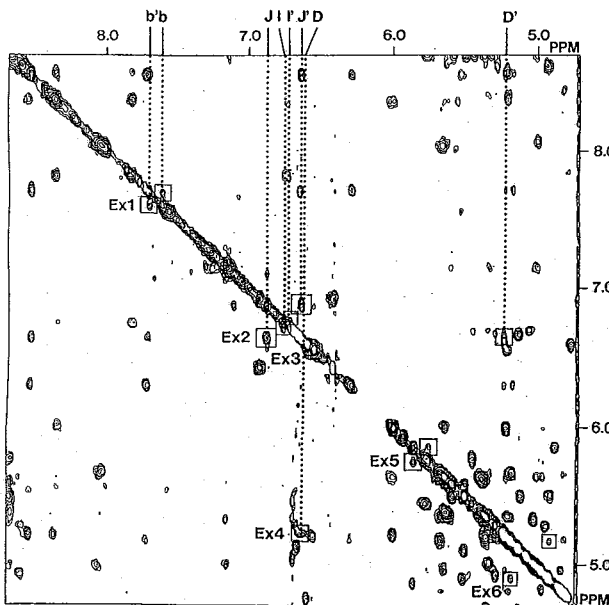


図4.

Tyr 2,6- d_2 によって選択的 ^2H 標識したFvに、50%のモル比で ϵ -タンシル-L-リジンを加えた試料のNOESYスペクトル⁴⁾

Exで示したクロスピークは、解離型のFvのTyrシグナル(D, I, J)と抗原結合型のFvのTyrシグナル(D', I', J')の間の化学交換によって生じている。

【文献】

1. T. Igarashi, M. Sato, Y. Katsube, K. Takio, T. Tanaka, M. Nakanishi, and Y. Arata (1990) *Biochemistry* 29, 5727-5733.
2. K. Kato, C. Matsunaga, Y. Nishimura, M. Waelchli, M. Kainosho, and Y. Arata (1989) *J. Biochem.* 105, 867-869.
3. K. Kato, C. Matsunaga, T. Igarashi, H. Kim, A. Odaka, I. Shimada, and Y. Arata (1990) *Biochemistry* 29 in press.
4. H. Takahashi, T. Igarashi, I. Shimada, and Y. Arata (submitted).

L19

(神田外語大、化技研) ○山本 修、早水紀久子、柳沢 勝

An Integrated $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ NMR Spectral Database System

Osamu YAMAMOTO, Kikuko HAYAMIZU and Masaru YANAGISAWA (Kanda University of International Studies and National Chemical Laboratory for Industry)

Nowadays we can easily obtain ^1H and ^{13}C NMR spectra for the same sample, and $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ shift-correlated two-dimensional spectroscopy can be routinely used in many laboratories. To meet the new phase of the situation, we have constructed an integrated $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ NMR spectral database system, in which (a) given a ^{13}C shift, the corresponding ^1H shifts are obtained, and vice versa; (b) given ^1H and ^{13}C shifts, the substructure satisfying both of the shift values are obtained; and (c) given a substructure, ^1H and ^{13}C shifts are estimated for the substructure at the same time.

化学データのデータベース活動において、スペクトルデータは長い歴史をもつものの一つである。赤外スペクトルにおけるASTMやIRDCカードの時代から始まって、今日では多くのスペクトルデータがいわゆるcomputer-readableな形で集積され、巧妙なソフトウェアの下で多数実用に供せられるようになった。特にNMRスペクトルは各シグナルが化合物の部分構造と直接結びつくために、単にスペクトル・パターンの一致から同定検索を行う目的だけでなく、スペクトルから部分構造を組み立てて行き、未知化合物の推定が可能な点において、データベースの果たす役割は大きいと考えられる。わが国におけるNMRデータベースは昭和47年藤原敏男教授(現神奈川大)の提唱により日本化学会にNMRデータ小委員会が設けられた時から実質的な活動が開始されたというべきであろう。同時にNMRスペクトル及びデータベースを用いる同定、構造推定のソフトの研究も盛んになり今日に至っている。

われわれはこのような時代の趨勢の中でNMRを含む総合データベースシステムSDBSを構築してきた¹⁾。SDBSは赤外、 ^1H および ^{13}C NMR、質量、ESR及びラマンの6種のスペクトルが一つの辞書システムの下に統合された総合データベースであり、次のような基本機能をもっている。(1)分子式、化合物名などを検索キーとして出来るだけ真のスペクトルに近いスペクトルを出力する。(2)未知物質のスペクトルデータを入力して、類似のスペクトルを出力する。またNMRスペクトルについては構造情報を入力し部分構造を推定する機能、逆にスペクトルデータから部分構造を推定する機能が備えられている。

SDBSは異種のスペクトルを統合した総合スペクトルデータベースとして他に例を見ないものであり、現在化合物の同定がただ1種のスペクトルだけを用いて行われることは希であ

る点を考えればその利用価値は高いと思われる。しかし残念ながらSDBSが総合データベースとして価値を十分に発揮できるのは(1)の機能においてだけである。(2)の機能では各スペクトルの特質がかなり異なっているために、それぞれの特徴を活かしたシステムを考へざるを得ないからである。 ^1H 及び ^{13}C スペクトル・サブシステムは同じNMRシステムなので同一環境の下に構築されてはいるが、両システム間のaccessibilityに多少難があったことは否めない。例えば同一の化合物の ^1H 及び ^{13}C シフト値を同時に取り出したり、片方のシフト値から他方のシフト値を推定するにはかなりの時間と手間がかかる。

近年二次元NMRがルーチン化され、 ^1H と ^{13}C とのデータが同時に必要になるケースが非常に多くなってきた。それに伴ってデータベースも独立に構築された ^1H および ^{13}C のデータベースの間に関連を取るのではなく、少なくとも検索、推定機能に関するところは始めから一つのデータベースとして統合しておいた方が望ましいと思われる。このような点に着目して従来のSDBSのサブシステムとしての ^1H 及び ^{13}C システムの再構築を行い、同時にNMRサブシステムを独立に起動できるようにした。これは将来このシステムをパソコンまたはワーク・ステーション用に移行する際の便宜を考えたものである。以下これらの点について報告する。

I. 目的とする機能

本NMR総合データベース・システムは以下のような機能をもつものとする。

- (1)分子式、化合物名などを検索キーとするスペクトルの表示。
- (2)構造情報の入力による推定シフト値の表示。
- (3)シフト値の入力による構造情報の表示。

以上は元のシステムとほぼ同じ機能であるが、(2)については必要に応じ ^1H または ^{13}C のいずれか、或いは両方のデータが迅速に得られるようにし、(3)についてはデータベースを切り替えることなく ^1H または ^{13}C のシフト値が利用できるようにする。

さらに総合データベースの利点を活かすために次のような機能を追加する。

(4)片方のシフト値、例えば ^1H のシフト値を入力してその部分構造に見合う ^{13}C のシフト値を表示する。逆も同様。

(5)あるシフト値を入力し、そのシフト値に見合う部分構造において、隣接した位置にある ^{13}C または ^1H (この場合はビシナル・プロトン)のシフト値を表示する。(4),(5)の機能をCOSYオペレーションと呼ぶことにする。

以上を基本機能としてデータベースを構築することにしたが、さらにユーザーの便を考へて種々のアプリケーション機能を付加することが考えられる。例えば構造情報の入力にグラフィック画面からの入力機能を付加したり、さらにこれを拡張して一つの化合物の化学式をグラフィック画面に描き、そのシフト値を一度に推定してしまう機能である。この部分は使用機種、利用端末に依存することが多く、汎用コンピュータをホストとして用いる場合には、システムに乗せるのが困難なことが多いが一応は付加することにした。(パソコンまたはワークステーションなどの場合には、面倒ではあるがかえってシステムを組

み易い部分であろう)。

II. データファイルの構成

以上の機能を実現するためには、最低次の3種のデータファイルが必要である。

- a. 原スペクトルファイル
- b. 辞書用のファイル
- c. 構造情報ファイル

原スペクトルファイルは上記(1)のスペクトル表示機能を実現するために必要であり、この部分は従来のSDBSファイルがそのまま利用できる。しかしSDBSの原スペクトルファイルはできるだけスペクトルを忠実に再現するように配慮されているため、特に¹Hスペクトルでは膨大なデータ量が必要である。従ってパソコン等に移行させるときには適当なデータ圧縮の方法が必要であろう。この点に関しては昨年の情報化学討論会における著者らの報告を参照されたい。²⁾

辞書用のファイルはFACOM社のデータベース・マネージメント・システム(DBMS)であるFAIRSの上に構築する。SDBSもFAIRSを利用しているが、その理由は大型計算機を使用する限り、このようなDBMSを利用するのが一番便利だからである。但し他のシステム、特に大型以外のシステムに移行する場合には、この点はかなり問題がある。

辞書用のファイルの中には種々の目的の検索に用いるデータが適当な項目名の下に格納されている。ユーザーは先ず辞書ファイルを開き、必要な検索を行った後、所望の情報を得ることができる。検索し得る項目を表1に掲げる。

表1 辞書ファイルの検索項目

| | | | |
|--------------------------|--|----|--------------------|
| NAME | 化合物名 | MF | 分子式 |
| MW | 分子量 | SV | 溶媒 |
| ST | 構造因子: AROMATIC, SATURATED, C=C, COOH, NO ₂ 等約50種を定義 | | |
| C,H,N,O,SI,P,S,F,CL,BR,I | 当該原子の数 | | |
| X | ハロゲン原子の総数 | Y | C,H,ハロゲン以外の上記原子の総数 |
| M | 上記以外の原子の種類 | Z | M原子の総数 |
| PK,PK1,PK2,PK4 | ピーク値: PKは ¹³ C、その他はそれぞれ90, 200, 400MHzにおける ¹ Hのピーク値。 ¹ Hの場合、約0.5Hzの区間に最大ピークがあれば、それをピーク値とする。いずれも強度が組になって格納されている。 | | |
| SH | シフト値、 ¹³ Cの場合はピーク値と同じ。 ¹ Hの場合は各スピンの真のシフト値。これらの値がそのシフト値を与える構造情報番号と組になって格納されている。 | | |

構造情報はそのシフト値を与える原子のタイプ(例えばCH₃, CH₂など、以後これをSPと略記する)から8位までの原子または原子団を採用した。これはほぼBrenser等の方法と同じである³⁾。ただこれだけでは不十分なので次の点を考慮した。

a. SPがベンゼン環に置換しているとき、para位は ϵ 位になるが、これが往々にしてシフト値にかなり影響を与えることがあるので、この効果を考慮する。

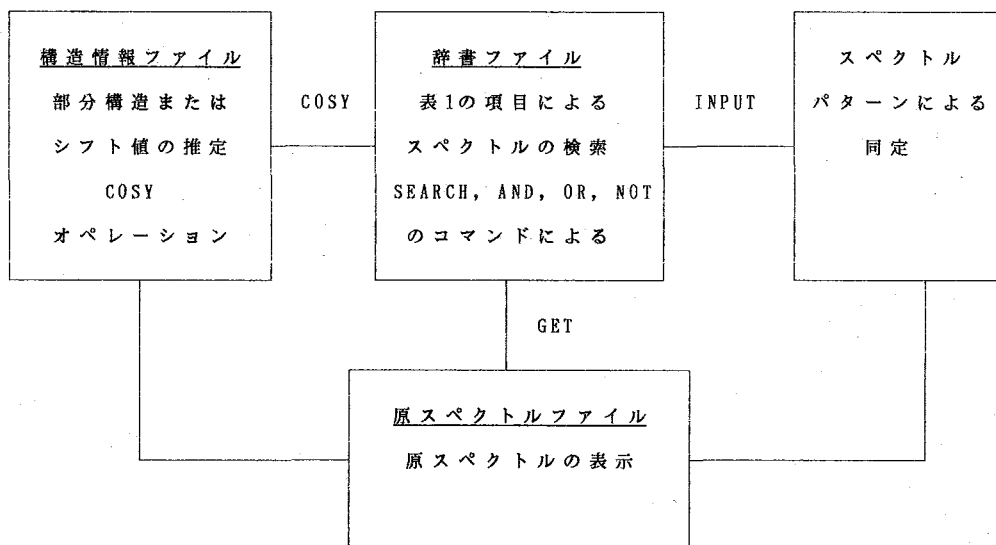
b. 幾何異性体に対してはcis及びtransを区別した。この区別はSPが二重結合炭素の場合(^1H の時はその炭素に結合したプロトンである場合)及びSPが二重結合炭素に対し α 位にある場合の両方について行われる。

c. 完全ではないが、脂環式6員環に対してはaxial及びequatorialの区別、糖に対しては α 及び β の区別を行った。

このような構造情報のそれぞれに対し、データベースから切り出したシフト値の平均値と、標準偏差が組になって格納されている。この構造情報ファイルを効果的に使用することにより、 ^1H 及び ^{13}C の両方に対しシフト値及び部分構造の推定が迅速に行われる。

III. アクセス方法

ユーザーは先ず辞書ファイルにアクセスする。ここで表1の検索項目によりスペクトルを絞ることができる。スペクトルの簡単な内容はすぐ端末に表示される。詳細に知りたければGETコマンドを用いて原スペクトルを表示できる。スペクトルを絞った後、または直接INPUTコマンドを用いてパターン・マッチング方式の同定検索を行うことができる。同様にCOSYコマンドを用いてシフト値、部分構造の推定または他のCOSYオペレーションを行うことができる。この関係を下図に示す。



1) O. Yamamoto, K. Hayamizu, M. Yanagisawa, Anal. Sci., 5,141(1989) 及びその中に記載された文献参照。

2) 山本、早水、中川、宮林、第12回情報化学討論会予稿集 p88(1989)。

3) W. Bremser et al, M. Klier, E. Meyer, Org. Magn. Resn., 7,97(1975)。

Parallel and Distributed Network Computing: New Tools for Multi-dimensional NMR Data Analysis and NMR Molecular Modeling

L20

George C. Levy, Pankaj Kumar and Sophia Wang, NMR and Data Processing Laboratory, Syracuse University, Syracuse, New York 13422-4100 and Alexander Macur, New Methods Research, Inc., 6035 Corporate Drive, E. Syracuse, New York 13057

An important area of investigation at Syracuse University involves utilization of parallel and distributed computing methods for NMR and related data processing. These are initially being applied to two applications: 1) 2D and 3D NMR data reduction, including optimization methods and 2) using a genetic algorithm for NMR molecular modeling.

The basic idea is to optimally utilize, in parallel, workstations and other computers coexistent on local and wide-area computer networks. In cases where specialized parallel computing hardware such as MIMD (examples: Alliant, Stardent, Hypercubes, etc.) or SIMD architectures (example: the Connection Machine) are available, an additional opportunity is present to dissect computational applications and allocate appropriate portions to the specialized hardware. This type of distribution of processing tasks is included in the work underway in our laboratory. Thus, on a computational network such as the one existing at Syracuse University (which incorporates a large number of Sun workstations, IBM RISC System 6000's, and a large configuration Connection Machine 2, as well as an Alliant FX/80), 1 to 3 orders of magnitude speed-up may be realized in compute and I/O intensive applications, such as 3D NMR data processing and the matrix manipulation found in aspects of NMR molecular modeling.

Two-dimensional Maximum Likelihood Method (MLM) spectral optimization is one example of computation and I/O intensive NMR data reduction. However, for NMR spectra of 3- or higher dimensions, even standard Fast Fourier transform (FFT) data reduction can tax computational resources, and certainly limit the amount of interaction between the scientist and the data. Tomorrow's 3-dimensional NMR spectra will consist of 10^8 to 10^9 data elements (*or more*), and computation of 3-dimensional FFT's for such large arrays requires a balance of cpu-intensive *and* disk I/O-intensive operations for *sustained calculation efficiency*. A maximum likelihood calculation on a data array of this size would be impractical on today's machines.

This situation will undoubtedly change over the next few years. Computing technology is advancing at such a rapid and accelerating rate, that it is anticipated that by 1992-93 a high-end desktop workstation (cost *ca.* \$30,000) will have compute power for these types of applications equivalent to a Cray XMP; by 1996-98, a single user workstation may approach true gigaflop speeds. Those machines will undoubtedly be *parallel* architectures.

An exciting aspect of that fact, is that those parallel architectures will probably be fully *scalable*. That is, a desktop workstation in the year 2000 might contain approximately 1% of the computational elements present in a year-2000 Teraflop supercomputer, and thereby offer 10 gigaflops of compute power, in a compact, low cost package.

All of this science fiction is a few years away. Nevertheless, utilization of massive parallelism and distributed network computing will not be easily achieved, and it is for this reason that our laboratory is spending considerable effort today to develop *new computing paradigms* to take advantage of the expected computing environments.

We are currently developing computing methods to exploit use of distributed *and cooperative network computing*, with additional fine-grain parallel optimization for problems requiring and supporting those capabilities (including large array Fourier transform and MLM processing, as well as aspects of NMR molecular modeling). Much of the success of using distributed computing depends on the existence of *efficient* distributed parallel algorithms. These algorithms must be scalable, i.e., with an increase in the size of the problem they must be able to use more machines to keep the overall processing time low. *This means that they must exhibit linear or near-linear speed-ups.*

The above NMR related applications offer a high degree of parallelism, ranging from coarse-grained to fine-grained. The Syracuse University distributed system comprises several kinds of architectures including SIMD (Connection Machine) and MIMD parallel machines (8 processor Alliant FX/80; 4 "pipeline" Stardent), and a network of high performance Sun, DEC and IBM workstations. Our goal is to develop the applications in a manner so that *parallelism is exploited at all levels*. This approach would allow the different sections of the applications to be mapped onto the most suitable architecture.

Developing distributed programs with linear speedups has until now been considered a difficult task. This is because it requires a proper task decomposition strategy and elimination of as much synchronization and communication overhead as possible. To reduce the effect of synchronization, the computation must be restricted to only a small number of processors. However, to reduce the execution time, more processors must be used. To achieve both of these **conflicting** goals, we use a hierarchical scheme, where initially the problem is divided into very coarse-grained subproblems. Thus synchronization is limited only to a small number of processors. However, each of the subproblems is then recursively subdivided into finer-grained subproblems to utilize any remaining idle processors. *The size and the number of these finer-grained subproblems is decided dynamically at run time and is a function of the size of the problem, number of processors available, and communication latency.* We use a dynamic load balancing scheme to achieve the optimal decomposition strategy and size.

Initial Performance Results

As shown in the table below, near linear speed-ups have already been obtained for implementation of 3D FFT. Much of this success can be attributed to a simple but effective load balancing scheme. Due to load balancing, communication was done only when a request was made, which was initiated *before* the requesting processor became idle. Thus, communication was able to keep up with the data requirements of the cpus acting as workers. Also, since each packet of work contained the sender's address, each worker was able to anticipate the needs of other workers; thus communication was initiated even before the other worker made a request for data. We were thus able to avoid sending data to machines where the data was never going to be used. As a result of this load balancing and the paradigm used for the algorithm, most communication took place *in parallel to the computation*, without affecting overall processing time.

Preliminary Results for Distributed 3D FFT

| Data | Configuration | Time ^a , secs | Speedup |
|-------------|-------------------------------------|--------------------------|---------|
| 128x128x128 | SPARC 1+ | 2400 | 1 |
| 128x128x128 | 12 SPARCstations (heterogeneous) | 236 | 10.16 |
| 256x256x256 | SPARC 1+ | 18816 | 1 |
| 256x256x256 | 12 SPARCstations (heterogeneous) | 1873 | 10.04 |

^a3D FFT algorithm uses small RAM configuration and is not yet optimized.

Multi-dimensional Fourier transform processing is certainly not the only application for distributed network processing, or for fine-grained parallel processing. This paper will also describe initial work utilizing a genetic algorithm approach for parallel implementation of NMR molecular modeling.

A New Project: Parallel Molecular Modeling Using a Genetic Algorithm

Genetic algorithms simulate natural evolution, with each species evolving according to its "fitness" to an environment. As in natural evolution, each species searches for beneficial adaptation during its evolution. The genetic algorithm is a "weak" method that makes no assumptions about the system at hand. It is a search method based on the localization of solutions in hyperplanes within the search space. Genetic algorithms can exploit the inherent advantage of parallel evolution. The Syracuse laboratory is using the genetic algorithmic approach in an attempt to develop a robust NMR molecular modeling system which will be able to generate *and evaluate* complex molecular structures. It is hoped that this approach may also produce an adaptive modeling scheme which extends itself, providing confidence in later studies.

P20 ~ P43

P20

DNA結合タンパク質タイプIIの構造とDNAとの相互作用 —HUとIHFとの比較—

東葉大 胡桃坂仁志、○神藤平三郎、佐久間千勢子、松本 潮

The Structure of DNA binding Proteins Type II and Their Interaction with DNA. Parallel NMR Study of IHF and HU.

H. Kurumizaka, H. Shindo, A. Chiseko Sakuma, U. Matsumoto (Tokyo College of Pharmacy)

HU and IHF proteins have high sequence homology but their biological functions are quite distinctive. It is therefore interesting to investigate the structural features of the proteins and their interaction with DNA. ^1H NMR study of HU and IHF proteins and their complexes with oligonucleotide will be presented. There were several lines of evidence that HU protein has high order structure in solution and that the flexible arm region is indeed binding site to DNA. As for HU-DNA complex, histidine residue was involved in HU binding and HU protein was highly stabilized. These results were compared with the case of IHF.

高いホモロジーを有する一群のDNA結合タンパク質が原核細胞中に存在する。これらはDNA結合タンパク質タイプIIまたはヒストン様タンパク質として知られており、それぞれ多様な機能を担っている。HUタンパク質は大腸菌の核様体に最も豊富に存在し、DNAの塩基配列に対して非特異的に結合する。一方、IHFは λ ファージの部位特異的な組換えに必須の因子であり、DNAに特異的に結合する。両者はそのアミノ酸配列においてホモロジーが高いにもかかわらず、DNAへの結合性およびその機能が異なる点はきわめて興味ある問題である。前回の討論会において演者らは ^1H NMRによってHU α の構造およびDNAとの複合体について報告した。今回はHUの研究のその後の進展と共に、IHFについても検討したので報告する。

【試料と方法】 HUは前回と同様¹⁾にして得た。IHFの大腸菌産生株、K-5746 (H. A. Nashの好意による) からNashらの方法²⁾により精製IHFタンパク質を得た。このタンパク質は凍結乾燥により変性を起こすので、限外濾過法によって H_2O 溶液を D_2O (0.1M NaCl, 10mM phosphate pH=7.0) 溶液に変換し、NMRの測定に供した。 ^1H NMRの測定には Bruker社製 AM-500 および Aspect-3000 コンピュータを使用した。

【結果と考察】 HU α は90個のアミノ酸残基からなっており、芳香族アミノ酸として1個のHisと3個のPhe残基を含む。 β -sheet構造に参与するHis54, Phe50, Phe79, Ser81およびThr49の $\text{C}\alpha$ プロトンピークが帰属できた。これらの結果はHUとホモロジーの高いHBsについて得られたX線構造解析の結果と矛盾しなかった。IHFの基本単位はIHF α とIHF β のヘテロダイマーであるが、高次の会合体として存在することを示した。IHFダイマーは芳香族アミノ

酸として4個のHis, 9個のPhe および4個のTyrを含む。図1にIHFの¹H NMRスペクトルを示した。低磁場領域Aは芳香環プロトンに帰属され、B領域はβ-sheet構造領域内のCαプロトンに、またピークCおよびDはそれぞれArg CδおよびLys Cεに帰属される。領域Eは高磁場シフトしたメチルプロトンに帰属される。図1からいくつかの点が指摘される。a) A群の中で異常に高磁場シフトしたピーク(6.0-6.5 ppm)が見られる、またb) 異常に高磁場シフトしたメチルプロトン(-0.4-0.4 ppm)が観測される。c) いくつかのCαプロトンが低磁場に現れている。a)とb)の結果はHUの場合と同様にPheやTry残基による環電流効果により説明できる。c)の結果はβ-sheet構造の存在を示唆している。現在、IHFのスペクトルのより詳細な解析を試みている。

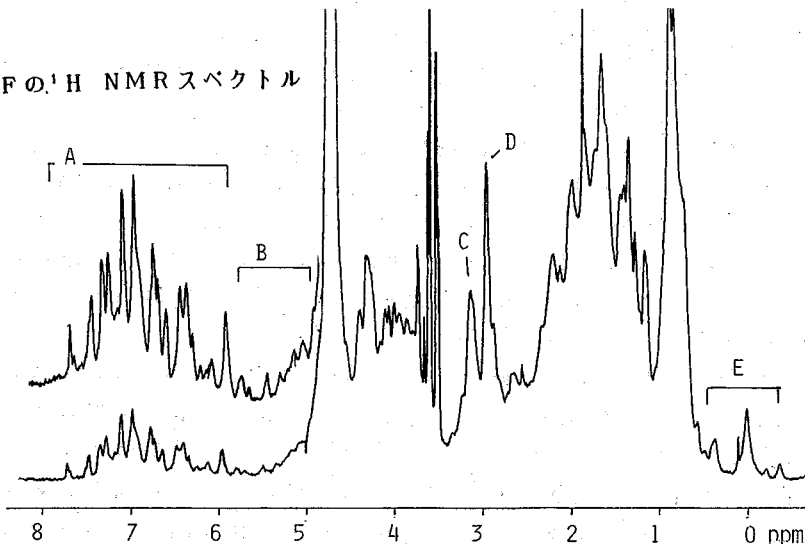
HUの熱安定性については高次構造の転移転T_mが37°Cであることは前回既に報告した。IHFについても、同様に高磁場シフトしたPhe環プロトン(5.98 ppm)を指標にしてその転移転を測定した。このピーク強度は、温度の上昇と共に45-55度で急に減少し、同時に沈澱の生成が見られ、またこの熱過程は非可逆的であった。それ故、IHFの場合は構造転移と言うよりは変性であると考えられる。これら熱的な挙動は2つのタンパク質で著しく異なっている。なお、IHFのDNAへの結合性について現在検討中である。HUとIHFとの比較を表1に示した。

Table 1. HUとIHFの基本的性質の比較

| Subunit | State in solution at 200ug/ml | Solubility | T _m (C) | Ring current effect |
|------------------|-------------------------------|---------------|--------------------|---------------------|
| HU HUα | 4-mer | >20 mg/ml | 37 | strong |
| IHF IHFα IHFβ | 6-mer | c.a. 10 mg/ml | 50 | strong |

図1

IHFの¹H NMRスペクトル



文献 1) 神藤平三郎他、第28回NMR討論会、東京、1989

2) H. A. Nash et al.: *J. Bacterio.* **169**, 4124(1987)

P21

— 抗 HIVヌクレオシド AZT の DMSO- d_6 中での

コンフォメーション —

(神女薬大) ○ 蔡 東玲、杉浦眞喜子、高尾楯雄

APPLICATION OF RELAXATION TIMES T_1 TO STEREOCHEMISTRY IN SOLUTION VI

-CONFORMATION OF ANTI HIV NUCLEOSIDE AZT IN DMSO- d_6 -

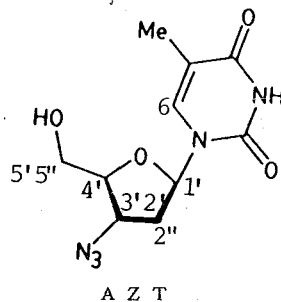
T. Sai, M. Sugiura, N. Takao

(Kobe Women's College of Pharmacy)

The relaxation method using selective (T_1^s) and bi-selective relaxation times (T_1^{bs}) have been applied to anti HIV nucleoside AZT. Its conformation have been discussed based on r_{ij} derived from cross-relaxation σ_{ij} and τ_c which are obtained from T_1^s and T_1^{bs} and the frequency dependence of T_1^{ns} . In the DMSO- d_6 solution, AZT has an anti glycosyl angle α similar to AZT A in the solid state, a sugar pucker with equilibrium between C2'-endo and C3'-endo geometries.

[はじめに]

AZT(3'-azido-3'-deoxythymidine)は、図のようにアジド基を持ったヌクレオシドであるが、1985年には抗 HIV(human immunodeficiency virus)活性を持つことが明らかにされ、現在では代表的なエイズ治療薬として実用化されている。その立体化学、特に糖のバックリング及びグリコシル結合まわりのコンフォメーションについては多くの議論があり、その作用機序からも興味を持たれている。X線結晶構造解析の結果から、¹⁾ その結晶構造には表1に示すような A, B 2つのコンフォーマーの存在が知られている。



| 表1 | コンフォーマー | 配向 | α (O4'-C1'-N1-C2) | 糖のバックリング |
|----|---------|------|--------------------------|------------------|
| | A | anti | -127.1° | C2'-endo/C3'-exo |
| | B | anti | -176.5° | C3'-exo/C4'-endo |

一方 J_{H-H} 及び $J_{C-N-C-H}$ を用いた DMSO- d_6 中でのコンフォメーション解析がなされており、²⁾ その結果、グリコシル結合に関しては anti、 $\alpha = -165^\circ$ で B の値に近く、糖については C2'-endo と C3'-endo の平衡にあり、C2'-endo が約 60% の割合で存在すると結論している。今回演者らは、先に我々の開発した T_1^s 、 T_1^{bs} を用いる方法³⁾ によって DMSO- d_6 中での AZT のコンフォメーション解析を試み、J 値から得られている結論との比較を行なった。

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

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

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

ここで

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

$$\rho_{ij} = 1/10 \gamma^4 \hbar^2 r_{ij}^{-6} [\tau_c + 3\tau_c / (1+\omega^2 \tau_c^2) + 6\tau_c / (1+4\omega^2 \tau_c^2)] \quad (5)$$

いま $\rho^* \ll (\sigma_{ij} + \rho_{ij})$ とすると

$$T_1^{NS}(\omega_1) / T_1^{NS}(\omega_2) = (5 + 8\omega_2^2 \tau_c^2)(1 + 5\omega_1^2 \tau_c^2 + 4\omega_1^4 \tau_c^4) / (5 + 8\omega_1^2 \tau_c^2)(1 + 5\omega_2^2 \tau_c^2 + 4\omega_2^4 \tau_c^4) \quad (6)$$

また (1)、(2) 式より $R^i(ij) - R^i(i) = N_i \sigma_{ij} \quad (7)$

この方法は、 T_1^s 、 T_1^{ps} より交差緩和 σ_{ij} を(7)式によって求め、その σ_{ij} と T_1^{NS} の周波数依存性(6)式より得られる τ_c とからH-H間距離 r_{ij} を算出し、コンフォメーション解析に利用するものである。

[実験]

^1H NMRの測定は Varian XL-200 (200.06 MHz) 及び VXR-500 (499.84 MHz) を用い、 T_1^{NS} は200 MHz、500 MHzで通常のIR法を、 T_1^s 、 T_1^{ps} は500MHzで、以前に報告したパルス・シーケンス³⁾を一部改良して測定を行なった。AZTは濃度0.06 mol dm⁻³で DMSO-d₆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2に200 MHzと500 MHzにおける T_1^{NS} の観測値を示した。(6)式によって得られる $T_1^{NS}(500)/T_1^{NS}(200)$ と τ_c との関係より、これらの実測値を用いて τ_c を求めた(表1)。

表3には、すべての ^1H について500MHzで測定した T_1^s および T_1^{ps} の観測値を示してある。これらの値を用いて(7)式より得られた σ_{ij} の値を表4に示し、さらにこの値と、表2に得られている τ_c 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5に示した。 σ_{ij} から得られたものと r_{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。

表2 200MHz 及び 500MHz における T_1^{NS} と得られた τ_c

| position | $T_1^{NS}(500)/\text{sec}$ | $T_1^{NS}(200)/\text{sec}$ | τ_c/sec |
|----------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| Me | 1.021 | 0.695 | 1.41×10^{-10} |
| H-6 | 1.333 | 0.838 | 1.62×10^{-10} |
| H-1' | 1.857 | 1.233 | 1.47×10^{-10} |
| H-2' | 0.491 | 0.339 | 1.38×10^{-10} |
| H-2'' | 0.556 | 0.400 | 1.27×10^{-10} |
| H-3' | 1.369 | 0.928 | 1.42×10^{-10} |
| H-4' | 1.570 | 1.012 | 1.55×10^{-10} |
| H-5'5'' | 0.463 | 0.330 | 1.29×10^{-10} |

表3 500MHzにおける主な¹HのT₁^S及びT₁^{BS}

| position | T ₁ ^S /sec | T ₁ ^{BS} /sec | | | | | | |
|----------|----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | | H-6 | H-1' | H-2' | H-2" | H-3' | H-4' | H-5'5" |
| H-6 | 1.579 | | 1.622 | 1.454 | 1.600 | 1.487 | 1.570 | 1.542 |
| H-1' | 2.169 | 2.146 | | 2.103 | 1.979 | 2.170 | 2.147 | 2.189 |
| H-2' | 0.658 | 0.617 | 0.633 | | — | 0.623 | 0.694 | — |
| H-2" | 0.742 | 0.743 | 0.697 | — | | 0.725 | 0.764 | — |
| H-3' | 1.642 | 1.541 | 1.638 | 1.508 | 1.595 | | 1.560 | 1.579 |
| H-4' | 1.799 | 1.784 | 1.807 | 1.828 | 1.787 | 1.760 | | 1.666 |

表4 T₁^S, T₁^{BS}の観測値より得られるσ_{ij}(sec⁻¹)

| H-i | H-j | σ _{ij} | σ _{ji} |
|------|--------|-----------------------|------------------------|
| H-6 | H-1' | — | 0.49x10 ⁻² |
| | H-2' | 5.44x10 ⁻² | 10.10x10 ⁻² |
| | H-2" | — | — |
| | H-3' | 3.92x10 ⁻² | 3.99x10 ⁻² |
| | H-4' | 0.36x10 ⁻² | 0.47x10 ⁻² |
| | H-5'5" | 1.52x10 ⁻² | |
| H-1' | H-2' | 1.45x10 ⁻² | 6.00x10 ⁻² |
| | H-2" | 4.43x10 ⁻² | 8.70x10 ⁻² |
| | H-3' | — | 0.15x10 ⁻² |
| | H-4' | 0.47x10 ⁻² | — |
| | H-5'5" | — | |
| H-2' | H-3' | 8.54x10 ⁻² | 5.41x10 ⁻² |
| | H-4' | — | — |
| H-2" | H-3' | 3.16x10 ⁻² | 1.79x10 ⁻² |
| | H-4' | — | 0.37x10 ⁻² |
| H-3' | H-4' | 3.20x10 ⁻² | 1.23x10 ⁻² |
| | H-5'5" | 2.43x10 ⁻² | |
| H-4' | H-5'5" | 4.44x10 ⁻² | |

表5 σ_{ij}とσ_oより得られたr_{ij}^{obs}

| i | j | r _{ij} ^{obs} |
|------|--------|--------------------------------|
| H-6 | H-1' | ~ 4.00 |
| H-6 | H-2' | 2.40 ~ 2.63 |
| H-6 | H-2" | ∞ |
| H-6 | H-3' | 2.78 ~ 2.79 |
| H-6 | H-4' | ~ 4.00 |
| H-6 | H-5'5" | 3.25 |
| H-1' | H-2' | 2.61 ~ 3.30 |
| H-1' | H-2" | 2.46 ~ 2.74 |
| H-1' | H-3' | ∞ |
| H-1' | H-4' | ~ 4.00 |
| H-1' | H-5'5" | ∞ |
| H-2' | H-3' | 2.46 ~ 2.65 |
| H-2' | H-4' | ∞ |
| H-2" | H-3' | 2.91 ~ 3.19 |
| H-2" | H-4' | ~ 4.00 |
| H-3' | H-4' | 2.90 ~ 3.38 |
| H-3' | H-5'5" | 3.03 |
| H-4' | H-5'5" | 2.73 |

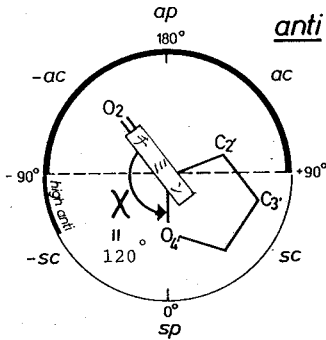


図1 AZTに予想されるグリコシル結合
まわりのコンフォメーション

このようにして得られたすべての r_{ij} を満足するものが、この化合物の DMSO- d_6 中での優位コンフォメーションであるが、分子模型を実際に組んで検討すると以下のような結論が得られる。まずグリコシル結合まわりのコンフォメーションを決定する、H-6とH-2'、H-6とH-3'の距離が比較的近いことから anti 配向と結論され、 $\alpha \approx -120^\circ$ が得られる。これは表1の A コンフォーマーに近い値である。一方、デオキシリボースのパッカリングについては、糖部分の r_{ij} の値からは、決定的な結論を得ることが出来ないが、 r_{ij} に中に見られることから、コンフォメーションにゆらぎのあること、即ち平衡にあることが示唆される。ただし H-2'' と H-4' の距離が比較的大きいことから、わずかに C2'-endo 側に平衡が片寄っていることも予想される。

[まとめ]

DMSO- d_6 中での AZT の $T_1^{N^S}$, T_1^S , $T_1^{B^S}$ を測定し、H-H 間距離 r_{ij} を算出し、コンフォメーションについて検討を行なった。その結果のグリコシル結合まわりの配向は anti で $\alpha \approx 120^\circ$ (コンフォーマー A)。糖部分は C2'-endo 側に片寄った平衡にあることが解った。これを J 値を用いて検討された結果と比較すると、糖のパッカリングについてはほぼ一致するが、グリコシル結合まわりの配向については矛盾するものである。

[文献]

1. A. Camerman, D. Mastropaolo, and N. Camerman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 8239-8242 (1987).
2. G. V. T. Swapna, B. Jagannadh, M. K. Gurjar and A. C. Kunwar, Biochem. Biophys. Res. Commun., 164, 1086-1092 (1989), 他.
3. a) 杉浦、高尾、石田、大石、井上、加藤、浜田、塩入、第 28 回 NMR 討論会講演要旨集 P235 (1989).
b) M. Sugiura, N. Takao, and H. Fujiwara, Magn. Reson. Chem. 26, 1051 (1988).

P22

(都臨床研・阪大薬*・星薬大*) ○稲垣冬彦・上杉晴一*

入江昌親*

Two-dimensional NMR investigation of RNaseMs and its novel substrate analog,
2'-deoxy-2'-fluoroguanyl-(3'-5')cytosine(GfpC) complexFuyuhiko Inagaki¹, Seiichi Uesugi², Masachika Irie³

(1Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 3Department of Microbiology, Hoshi College of Pharmacy)

Two-dimensional ¹H-NMR studies have been performed on a guanine and adenine specific ribonuclease Ms, RNaseMs, and its GfpC complex. The sequence specific resonance assignments of free RNaseMs were obtained for the back-bone protons of 81 amino acid residues and most of its side-chain protons. RNaseMs contains an α -helix and two anti-parallel β -sheet as secondary structure elements, which was similar to that of a homologous protein RNaseT₁. On the basis of the present assignments, the binding modes of the substrate analog, GfpC, were discussed.

タンパク質による分子認識、すなわち基質特異性の発現機構を解明することは、タンパク質工学の基本的な問題のひとつである。この問題を解くためには遊離型タンパク質及びタンパク質-複合体の立体構造を明らかにすることが重要であろう。我々はこの問題の解明をめざして、リボヌクレアーゼMs (RNaseMs)を用いてNMRによる構造解析を行った。

RNaseMsはAspergillus saitoiが産生する、分子量12,000アミノ酸残基数106よりなる酵素であり、3'-環状リン酸中間体を経由してリボヌクレオチドを加水分解する。その際リボヌクレオチド鎖の3'側の塩基としてグアニン、アデニンに対して特異性を示すことが知られている。本研究では、二次元NMRを用いて遊離型RNaseMsのプロトンシグナルの帰属を行い、高次構造上の特徴を明らかにするとともに、基質アナログである2'-deoxy-2'-fluoroguanyl-(3'-5')cytosine (GfpC)とRNaseMsの複合体についてもプロトンシグナルの帰属を行い、両者を比較することで基質アナログの結合様式を調べることを目的とした。

実 験

RNaseMs5mM溶液(重水; 100%D₂O、軽水; 90%H₂O-10%D₂O)をNMR試料として用いた。RNaseMs-GfpC複合体は、あらかじめRNaseMs5mM溶液をGfpC溶液で適定し、His91C2プロトンおよび11e89 δ メチルプロトンシグナルのケミカルシフト変化が飽和することを確認してNMR試料とした。最終的なRNaseMs、GfpC比は1:1.98とした。測定温度は37°C、pHは5.7に調整した。測定にはJEOLGX-500を用いた。DQF-COSY、HOHAHA(混合時間45ms、85ms)およびNOESY(混合時間150ms)の測定を純吸収モードで行った。水のsuppressionにはプレサチュレーションを用いた。

結 果

帰属 連鎖帰属法に従い、RNaseMsのプロトンシグナルの帰属を行った。まず重水中のD

Q F - C O S Y スペクトル、軽水および重水中の H O H A H A スペクトルを比較することでスピン系の同定を行った。次に各タイプに帰属されたアミノ酸をNOEより得られる距離情報 ($d\alpha N$, $d\beta N$, dNN) に従って接続した。この時一次構造を参照しながらアミノ酸タイプの確認を行った。以上の解析によりこれまでに81残基の帰属を完了した。図1に連鎖帰属で確認したNOE connectivityをまとめて示す。

二次構造 連鎖帰属により確定した帰属に基づいてNOESY交差ピークを帰属し、二次構造の同定を行った。RNaseMsの二次構造は一本の長い α -ヘリックス (Ser14-Ser30) と二組の β -シート (図2) から成っている。これは類縁微生物起源RNaseであるRNaseT₁ (一次構造の相同性57%) の二次構造と全体的には良く類似したものである。

基質アノログ (GfpC) との結合 RNaseMs-GfpC複合体と遊離型RNaseMsについてDQF-COSY、NOESYスペクトルの比較を行った。DQF-COSYスペクトルの指紋領域ではTyr37、His39、Glu40、Tyr41、Glu57、Arg76、Ile78、Gly81、Ile89、His91等のピークに明瞭なケミカルシフト変化が認められた。また芳香族側鎖については、Phe79、Tyr12、Tyr25、Tyr28、Tyr37、Tyr56等のシグナルはほとんど変化しなかったが、それ以外のTyr5、37、41、44、55、58、64、67、Phe47、49、100、Trp13のシグナルにケミカルシフト変化あるいは消失が認められた。GfpCの結合によりシグナル変化を生じたアミノ酸残基をX線構造解析で得られたRNaseT₁の構造上で確認すると、図3に示すように分子表面の触媒部位、リン酸基結合部位および塩基認識部位周辺に集まっていることが明らかになった。詳細については現在解析をすすめている。

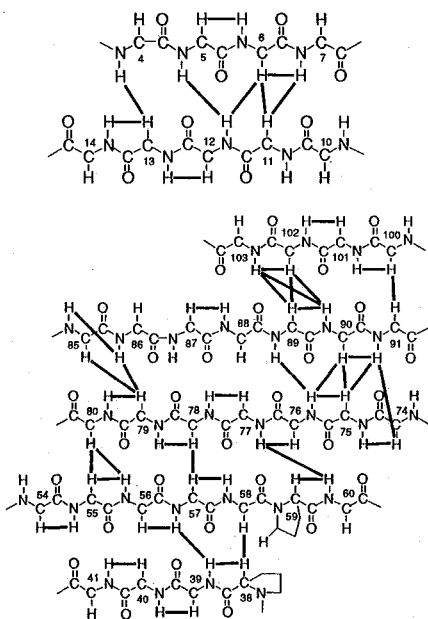


図2 RNaseMsの β -シート構造

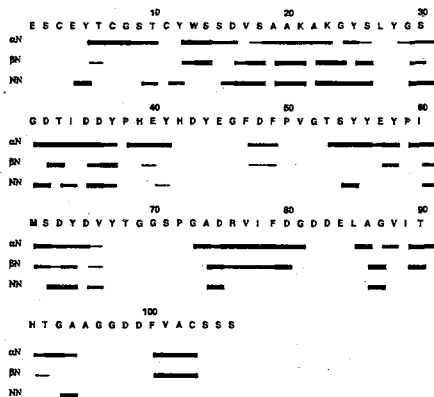


図1 RNaseMsのNOESY connectivity

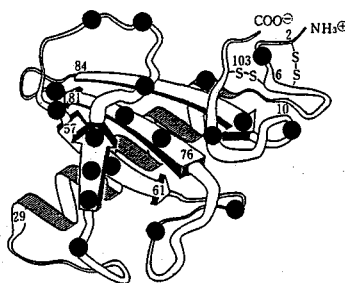


図3 GfpCとの結合によりシグナルに変化を生じたアミノ酸残基

P23

○神田大輔、稲垣冬彦

東京都臨床医学総合研究所 生理活性物質研究部門

How to Calculate Protein Tertiary Structures using XPLOR

Daisuke Kohda, Fuyuhiko Inagaki The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
Department of Molecular Physiology

One of the purposes of NMR analyses of proteins is to determine three-dimensional structures. This process consists of sequential assignment and distance geometry calculation. Sequential assignment has become routine work in regard to proteins with the molecular weight up to 10 kDa, while distance geometry calculation still remains to be laborious work. Here we present details of our calculation procedure using XPLOR.

1) はじめに タンパク質のNMR解析の目的の一つはその立体構造の決定である。2次元NMRスペクトルを利用した連鎖帰属法 (sequential resonance assignment) を適用することにより、分子量が一万以下のタンパク質のスペクトルの帰属は、ほとんどルーチンワークになっている。ところが、NOESYスペクトルを解析して距離情報を得るステップとその距離情報を基に立体構造を計算するステップについては、未だ困難な点が多い。後者について、今回の発表ではXPLORによる立体構造計算の方法を具体的に述べる。

2) 入力データの作成 NOESYからNOE情報のデータのファイル、およびDQF-COSY、P.E. COSYの解析から、二面角 ϕ と χ^1 に関する情報をまとめたファイルをつくる。これらを適当なプログラムでフォーマット変換すると便利である。現在はPC98上でBASICを用いて変換を行なっている。この変換ではNOE強度とカップリングデータの距離および二面角制限情報への自動変換、シュールド原子の使用とそれに伴う距離の補正、メチル基のNOE強度補正、S-S結合と水素結合情報の付加などが行なわれる。

3) XPLOR計算 XPLORはX線およびNMRの立体構造計算のための特別なバージョンのCHARMmである。現在のXPLORは種々の改良が行なわれた結果、ポテンシャル関数(ターゲット関数)の形は実質的にDADAS(DISMAN)と同じになっていて、関数の最小値を見つけるのにニュートン運動方程式を解く点のみが異なっている。XPLORの大きな利点は、XPLORが一種のプログラム言語でありプログラムを組む感覚で計算の流れを自由に書き変えることができる点にある。ラフな中間構造を作るのに、Clare & Gronenborn らはDISGEOを用いているが、我々は替わりにVariable Target Function (VTF) 法に基づくXPLORプログラムを用いている*1。DADASでもVTFを採用しているが*2、DADASでは

一次構造に沿って関数を変化させるのに対し、XPLORでは空間的に変化させる点が異なっている。具体的には、violation が一定値（例えば1.0 Å）より小さなNOEのみをポテンシャル関数に組み込む。このVTF法と、NOEポテンシャル関数として途中でなだらかな曲線にスイッチする関数を採用して、計算の初期においてviolationの大きなNOEが計算に悪影響を与えないようにしている。後半のSimulated Annealing (SA)^{*3}では、原子同士の反発を表す係数 (k_{repel}) をNOEの係数 (k_{NOE}) よりもゆっくり増やすことにより、原子同士のすり抜けを許して立体構造の精密化を行なっている。

(4) 計算の能率を高める方法 オリジナルの方法ではXPLOR計算を制御するパラメータは、プログラム自身に埋め込んで使う。これでは計算の度にプログラムを書き直さなくてはならないので不便である。そこで、パラメータだけ抜き出して一つのファイルにまとめ、さらにUNIXシェルプログラムで起動するようにした。こうすると、例えば100個の計算を初期条件を少しずつ変えて自動的に行なうことができる。

(5) 計算結果の解析 計算の結果得られた座標の解析ツールを整備しておくことも重要である。UNIXシェルプログラムから解析用のXPLORプログラムを起動するようにした。現在、RMSD（複数の座標間のRMSDを計算し、平均や標準偏差をとる）、AVERAGE（複数の座標の空間平均をとる）、REFINE（平均座標を精密化する）、FIT（座標同士をフィットする）、ANALYSIS（特定の座標のエネルギー値やviolated NOEなどのリストを作る）などのプログラムを使っている。

(6) 結果 現在までに以下のタンパク質について計算を行なった。括弧内は残基数である。1) マウスEGF(53) 2) ヒトEGF(53) 3) ヒトTGF- α (50) 4) Erabutoxin b(62) 5) ミセルに埋め込んだmelittin(26) 6) ミセルに埋め込んだLHRH(10) 7) Sapecin(40) 8) Tachyplesin(17) 9) Conotoxin GIHA (22) どの場合でも、よい解が得られるのは全計算の5~10%であった。計算時間はIris4D/70Gを用いて一つの座標あたり30分（10残基）から3時間（50残基）程度であった。また、ある座標に対するNOEの満足度と原子同士の反発の程度は片方が大きければもう一方は小さいと一般には考えられるけれども、実際はほとんどの場合で、NOEからみてよい構造は原子同士の反発も小さかった。最終的に5から10個程度の座標を集めて比較すると、1.5 Å（主鎖3原子）程度の収束が得られた。Tachyplesin と Conotoxin については立体特異的な帰属と ϕ および χ^1 の制限情報を入れると1 Å程度のRMSDが得られ、かなりよい収束であった。

1) Nilges, M., Gronenborn, A.M., Brunger, A.T., & Clore, G.M. (1988) *Protein Engineering*. 2, 27-38.

2) Braun, W., & Go, N. (1985) *J. Mol. Biol.* 186, 611-626.

3) Nilges, M., Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (1988) *FEBS Lett.* 229, 317-324.

(味の素(株)・中研) ○宮野 博 鈴木榮一郎
(東大・理) 田之倉優 高橋健治

Structure Comparison between Ribonuclease T₁ and Its Glu-58 Carboxymethylated Derivative By Proton Nuclear Magnetic Resonance

Hiroshi Miyano, Ei-ichiro Suzuki, Masaru Tanokura* and Kenji Takahashi*
Central Research Laboratories, Ajinomoto Co. *Faculty of Science, University of Tokyo

600 MHz ¹H-NMR spectra of ribonuclease T₁ and its Glu-58 carboxymethylated derivative (inactivated) were measured. Resonance assignments of both proteins were obtained for the backbone protons of almost all amino acid residues using sequence-specific assignment procedures. For topological secondary structure, no difference was observed between ribonuclease T₁ and carboxymethylated one. Chemical shifts of backbone protons were also compared. Large chemical shift variation (more than 0.1 ppm) was observed on the around twenty residues near the active site which suggests that carboxymethylation of Glu-58 induced the conformational distortion on the active site.

【緒言】

Ribonuclease T₁ (RNase T₁) は、コウジ菌 *Aspergillus oryzae* が産生するタカジアスターゼより単離された RNA 分解酵素で、RNA 中のグアノシン 3'-リン酸部分のホスホジエステル結合を極めて選択的に切断する。RNase T₁ の構造と活性については、NMR により様々な検討がなされている。特に稲垣らは、His 残基の局所的な存在環境を明らかにし、阻害剤共存下でのスペクトル変化を解析し、活性部位に関する詳細な研究を行なっている(1,2)。全体構造に関しては、RNase T₁ と阻害剤 (2'-GMP, 3'-GMP) とが結合した状態の X 線結晶構造解析の結果があり(3,4)、また、近年 Ruterjans らは、Gln25 が Lys に置換されたタイプの RNase T₁ の ¹H-NMR の帰属と二次構造解析を行なっている(5)。

我々は、RNase T₁ の構造、特に活性部位の詳細な構造を NMR により明らかにすることを最終目標として、その構造解析に着手した。まず、Gln25 タイプの RNase T₁ 及び、活性発現に重要な役割をはたす残基のひとつ Glu58 をカルボキシメチル (CM) 化した RNase T₁ (CM-RNase T₁) の二次元 NMR を測定し、殆ど全ての残基の主鎖のプロトンシグナルの帰属を行なった。さらに、両者の化学シフトを比較し、活性に大きな影響を与える CM 化が構造的に RNase T₁ のどの部分を変化させているかを明らかにすることを試みた。

【実験】

RNase T₁, CM-RNase T₁ の合成、精製は文献に従った(6)。

RNase T₁, CM-RNase T₁ を濃度が約 2 mM となるように、それぞれ 90% H₂O/10% D₂O に溶解し、pH 4.4 に調整した。測定は、すべて Bruker AMX600 NMR スペクトロメーターを用いた。それぞれの試料について、DQF-COSY, HOHAHA, NOESY の各二次元 NMR スペクトルを測定した。HOHAHA の mixing time は 40 ms、NOESY の mixing time は 150 ms とした。測定温度は 32 °C で行なった。

【結果と考察】

(1) RNase T₁ の ¹H-NMR 帰属と二次構造

常法に従って、RNase T₁ の連鎖帰属を行ない、C2, N44, P55, Y57, D66, G70~P73 を除くすべての主鎖のプロトンを帰属した。Ruterjans らの Lys25 タイプ RNase T₁ の ¹H-NMR では未帰属であった残基のうち、新たに S35, N36, N98 のシグナルを帰属できた。

主鎖プロトンの NOE から RNase T₁ の二次構造の推定が可能で、その結果、S13~D29 が α ヘリックスを形成していること、7つの逆平行 β シート(3~4, 11~13, 39~40, 56~59, 76~81, 86~92, 100~103)が存在していることが明かとなった。これは Ruterjans らの報告とよく一致していた。

(2) RNase T₁ と CM-RNase T₁ の構造比較

CM-RNase T₁ についても同様に帰属を行い、主鎖間の NOE シグナルを解析した。その結果、CM-RNase T₁ も1つの α ヘリックスと7つの逆平行 β シートを有しており、それらを形成する残基は、RNase T₁ と完全に一致していた。即ち、CM化によっても RNase T₁ の二次構造はトポロジカルな意味では保持されることが明かとなった。

RNase T₁ と CM-RNase T₁ の主鎖のアミドプロトン、 α プロトンの化学シフトの比較を行った(図)。アミドプロトンの変化の割合が大きかったが、その中で、0.1 ppm 以上化学シフトが異なる残基は、T5, S12, S13, N36, Y38, H40, Y42, N43, E46, Y57, E58, W59, V79, F80, E82, V89 であった。 α プロトンで 0.1 ppm 以上シフトした残基には、G23, D49, E58, V79, S96 があつた。修飾残基の近くにある残基だけでなく、RNase T₁ 分子全体の残基の化学シフトをも変化させていることは、CM化が一次構造上離れた位置にあるアミノ酸残基の存在環境に影響を与えていることを示している。その中で、E58 と同様、活性発現に重要な残基である H40, H92, R77 の化学シフト変化は、少なくとも主鎖に関するかぎり、特に大きくはなく、一方、G23~Y24, N36~D46, D76~E82, G94~S96 で変化の割合が顕著であった。これらはいずれも、これまでの NMR、X線結晶構造解析より、活性部位と空間的に近くに位置していることが明かとなっている残基である。

以上の結果は、Glu58 の CM化による RNase T₁ の活性の消失は、その二次構造ないしはトポロジカルな構造の変化によるのではなく、活性部位近傍の部分的なコンフォメーション変化に密接に関連していることを示すものである。

今後、側鎖を含めた NOE データを収集し、RNase T₁ 及び CM-RNase T₁ の三次構造を詳細に比較考察していきたいと考えている。

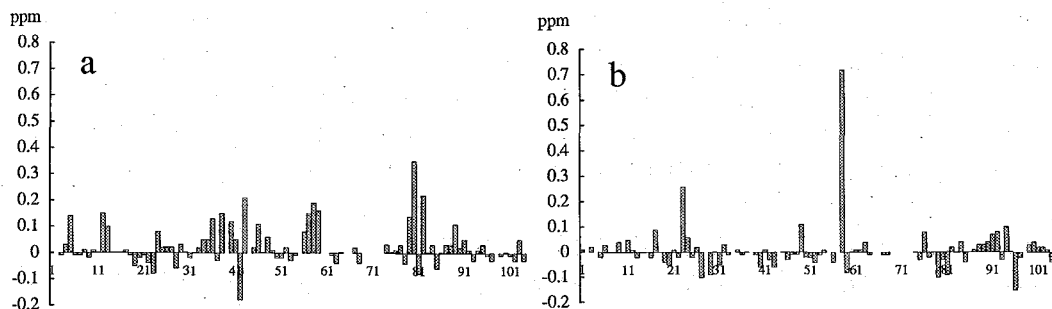


図 RNase T₁ と CM-RNase T₁ 主鎖化学シフト比較 a;アミドプロトン, b; α プロトン

【参考文献】

1. Inagaki, F., Shimada, I., and Miyazawa, T., *Biochemistry* **24** 1013 (1985)
2. Shimada, I., and Inagaki, F., *Biochemistry* **29** 757 (1990)
3. Arni, R., Heinemann, U., Maslowska, M., Tokuoka, R., and Saenger, W., *J. Biol. Chem.* **263** 15358 (1988)
4. Sugio, S., Amisaki, T., Ohishi, H., and Tomita, K., *J. Biochem.* **103** 354 (1988)
5. Hoffmann, E., and Ruterjans, H., *Eur. J. Biochem.* **177** 539 (1988)
6. Takahashi, K., Stein W., and Moore, S., *J. Biol. Chem.* **242** 4682 (1967)

(東工大・生命理工) ○山本泰彦、七井謙成、中條利一郎

NMR DETERMINATION OF THE MAGNETIC SUSCEPTIBILITY TENSOR ORIENTATION IN FERRIC LOW-SPIN FORM OF HEMOPROTEIN

Yasuhiko YAMAMOTO, Norishige NANAI, and Riichirō CHŪJŌ

(Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology)

A novel approach called MATDUHM (Magnetic Anisotropy Tensor Determination Utilizing Heme Methyls) for determining the orientation of the principal magnetic axes in ferric low-spin form of hemoprotein has been established. This method is based on the hyperfine shifts of the heme methyl carbon and attached proton resonances and requires neither the magnetic property nor the crystal structure of the protein. Therefore this method can be applicable to any hemoproteins to locate experimentally the orientation of the principal magnetic axes at a given temperature, while the applicability of the conventional least-square search method is limited to the proteins of which X-ray crystal coordinates are known. The paramagnetic metal-centered dipolar field in met-cyano sperm whale myoglobin was quantitatively mapped using the results obtained from MATDUHM. The observed shifts for some non-coordinated amino acid proton resonances were reasonably predicted by the present method.

<はじめに>

ヘムを補欠分子とする蛋白質(ヘモグロビン、ミオグロビン、チトクローム類等)は、生物が酸素を利用した効率の良いエネルギー代謝により生命活動を続けるための中心的役割を担っている。これらのヘム蛋白質の生理活性中心は例外なくヘム鉄であり、その多様な生理活性機能はヘムと近傍のアミノ酸残基との相互作用によって発現すると考えられている。そこで、ヘム鉄の反応性がヘムと近傍のアミノ酸残基との相互作用にどのように関連しているかを解明するために、ヘム蛋白質の生理活性部位の分子構造を決定し、得られた構造をそれぞれの蛋白質の機能に関して比較検討することは有用である。常磁性ヘム蛋白質のNMRで観測されるアミノ酸残基のプロトンに由来するシグナルの擬コンタクトシフト値は、プロトンスピンと不対電子スピンの空間的位置関係にきわめて敏感であるので、NMRによるヘム蛋白質の活性部位の高次構造決定に重要である。ところで、擬コンタクトシフトはヘム鉄の不対電子の磁化率の異方性により生じ、擬コンタクトシフト値は磁化率のテンソルの主軸によって実際の分子座標と結び付けられているため、観測されるシフト値をプロトンとヘム鉄との相対的位置関係に関して解析するためには、磁化率の主軸のヘムに対する配向の決定が不可欠である。我々は、磁化率の主軸をNMRから決定する方法(MATDUHM: Magnetic Anisotropy Tensor Determination Utilizing Heme Methyls)を構築した。

<方法>

解析方法の概要を図1に示した。天然に存在するヘム蛋白質のヘムは側鎖として四つのメチル基を有している。それらのメチル基のプロトンとカーボン核に由来するシグナルの超微細シフトは、(1) コンタクトシフト、(2) 配位子中心の擬コンタクトシフト、(3) 金属中心の擬コンタクトシフトの和となっている。(1)と(2)は共に、メチル基が直接共有結合するピロールカーボンの E_2 軌道にある不対電子密度に比例する(H. M. McConnell, J. Chem. Soc., 24, 764 (1956)) ので、McConnell の式により同一ヘムメチル基のプロトンとカーボンの超微細シフトを同時に評価することによって、プロトンとカーボンシグナルそれぞれの(3)を決定することができる。MATDUHMでは磁化率の主軸の決定は、試料の磁化率の異方性の大きさによって計算過程は異なるが、ヘムメチル基のプロトン核(三つの核の位置の重心)とカーボン核の幾何因子をヘム鉄を原点とすあらゆる配向の直交座標系に関して計算し、それぞれのシグナルの(3)を満足する最良の座標系を決定することと等価である。計算プログラムをFORTRANで書き、計算はSUN 4で行った。

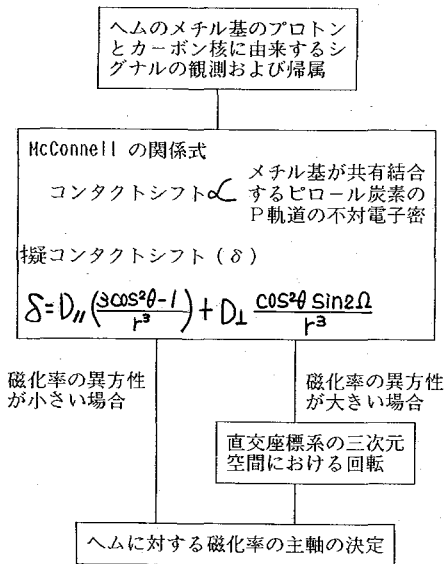


図1: MATDUHM

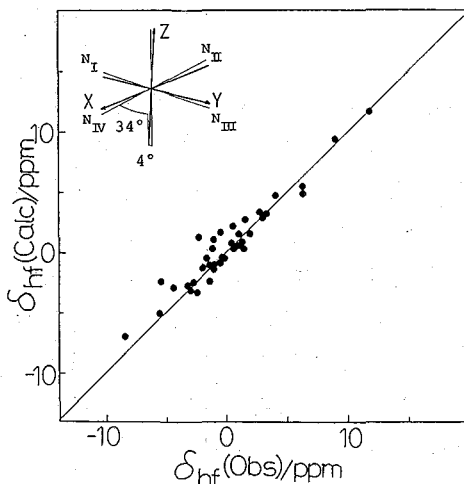


図2: 実測値と計算値の比較

異なるが、ヘムメチル基のプロトン核(三つの核の位置の重心)とカーボン核の幾何因子をヘム鉄を原点とすあらゆる配向の直交座標系に関して計算し、それぞれのシグナルの(3)を満足する最良の座標系を決定することと等価である。計算プログラムをFORTRANで書き、計算はSUN 4で行った。

<結果と考察>

マッコウクジラのみオグロビンのメトシアノ体に対してMATDUHMを適用して得られた磁化率テンソルの主軸のヘムに対する配向と、アミノ酸残基のプロトンシグナルの擬コンタクトシフトの実測値(S. D. Emerson & G. N. La Mar, Biochemistry 29, 1545(1990))と計算値との相関を図2に示した。磁化率テンソルの主軸のZ軸は、ヘム鉄を通るヘム平面の垂線に対して4°傾いている結果となった。また、Z軸のヘム平面への投影と $N_{II}-F-N_{IV}$ 軸との成す角は34°となった。計算値はCO体のX線結晶解析の結果(J. C. Hanson & B. P. Schoenborn, J. Mol. Biol., 153, 117 (1981))をもとにして得られたものである。実測値と計算値との相関は比較的良いことから、この方法論の妥当性がわかる。MATDUHMは、鉄三価低スピン状態のあらゆるヘム蛋白質の磁化率テンソルの主軸の配向の決定に適用することができるので、それぞれの蛋白質での不対電子による常磁性双極子磁場の定式化、そして活性部位の高次構造解析に用いることができると期待される。

P26

○石森 浩一郎^{a, b}・森島 績^a・今井 清博^b・宮崎 源太郎^c
(京都大学・工学部^a、大阪大学・医学部^b、大阪大学・基礎工学部^c)

NMR Study of Recombinant Human Hemoglobin Mutants

Koichiro Ishimori^{a, b}, Isao Morishima^a, Kiyohiro Imai^b and Gentaro Miyazaki^c

(^aGraduate School of Engineering, Kyoto University, ^bMedical School, Osaka University, ^cFaculty of Engineering Science, Osaka University)

Using site-directed mutagenesis, we have generated some mutant proteins of human hemoglobin (Hb) with altered inter- and intrasubunit hydrogen bonds, in order to examine the influence of these hydrogen bonds on the structure and function. The mutants examined here were $\alpha 42\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$, His, $\beta 37\text{Trp}\rightarrow\text{Phe}$, $\beta 145\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$. Their NMR spectra clearly showed that the intersubunit hydrogen bond between $\alpha 42\text{Tyr}$ and $\beta 99\text{Asp}$ plays an important role in the stabilization of the low oxygen affinity form of Hb. However, the cleavages of the hydrogen bonds between $\alpha 94\text{Asp}$ and $\beta 37\text{Trp}$ (intersubunit) or $\beta 98\text{Val}$ and $\beta 145\text{Tyr}$ (intrasubunit) induce a little structural and functional changes in Hb.

【序論】ヘモグロビン(Hb)の酸素結合機能を理解する上で、協同効果発現の分子レベルでのメカニズムを解明することは最も本質的な課題である。X線構造解析の結果から、Hbの酸素結合に伴う高次構造変化と協同的酸素結合との関係が議論され、水素結合の生成、解離、ファンデルワールス接触の変化などの重要性が指摘されてきた。特に水素結合はHbの高次構造や機能を維持するのに大きな役割を果たしていることが知られており、酸素分子の結合によりHb中の多くの水素結合が解離、生成しHbの構造を変化させることにより酸素親和性が影響を受け、協同効果が発現するものと考えられる。しかし、個々の水素結合がどのような働きをしているかについての実験的、直接的な証明は困難であり、現在まで十分検討されてきたとはいえない。そこで本研究では特に協同効果発現の上で重要な役割を果たしていると考えられているいくつかのサブユニット間あるいはサブユニット内の水素結合に注目し、蛋白質工学の技術を応用して特定のアミノ酸を置換したHbを合成し、その高次構造をNMR測定を中心に検討することによって協同効果発現のメカニズムにおける水素結合の役割について検討を行なった。

【実験及び方法】アミノ酸置換Hbの調製はNagai¹らの方法を用いた。アミノ酸置換Hbの置換部位の確認はグロビン部分を限定分解し、マススペクトルを用いて確認した。酸素平衡曲線、NMR測定等は既報に従った。²⁻⁵

【結果と考察】 1. $\alpha 42\text{Tyr}$ 置換体⁶ $\alpha 42\text{Tyr}$ は $\alpha 1\beta 2$ サブユニット界面に位置し、天然Hbではデオキシ状態、つまり「T」状態で β サブユニットの99Aspと水素結合を形成していることが知られている。

水素結合と考えられてきた。そこでTyrを比較的立体障害のよく似たPheに置換する(HbY α 42F)ことにより、 β 99Aspとの水素結合をできないようにしてみた。図1にその酸素結合体のNMRスペクトルを示した。低磁場側にはサブユニット界面の水素結合、高次場側にはポルフィリンの環電流によって高磁場シフトしたヘム近傍残基のシグナルが観測される。HbY α 42Fのスペクトルパターンは多少は異なる点があるものの、 α 1 β 2界面に存在する α 94Aspと β 98Asnとの間の水素結合や α 1 β 1界面に存在する2個の水素結合に由来するシグナル、及び、 α 62Val、 β 67Valのシグナルは天然型Hbとほぼ同じ位置に観測され、酸素結合体においては大きな構造変化は検出されなかった。しかし、酸素が解離したデオキシ状態では大きなスペクトル変化が観測された。近位HisのN₁Hの常磁性NMRシグナルは α 、 β サブユニットとも天然Hbに比べ、より大きな低磁場シフトを示し、また、ヘムメチル基が観測される領域でもスペクトルパターンに変化がみられることから、ヘム近傍及びヘムの電子状態に大きな変化が誘起されたことが明らかとなった(図2)。このようなスペクトル変化はデオキシ状態でも高い酸素親和性を示す天然突然変異Hbや化学修飾Hbの特徴と一致しており、天然Hbではデオキシ状態で安定化される低い酸素親和性の構造がこのHbY α 42Fでは安定にとれないことを示している。実際、酸素平衡曲線の結果(表1)から、このHbは高い酸素親和性と協同効果のない酸素結合能を示すことが明らかになった。

一方、Phe残基の代わりにHisを置換したHbY α 42Hでは、比較的低い酸素親和性と協同的な酸素結合を示し(表1)、常磁性シグナルのパターンも天然Hbの場合に似ており、構造的、機能的にその異常は小さいことが示された。このような構造、機能異常の小さい理由としてはHbY α 42Hの場合 α 42Hisの=NH⁺基と β 99AspのCOO⁻基の間の水素結合に由来すると思われるNMRシグナルが観測される(図2)ことから、低酸素親和性の構造と機能がある程度安定化されるものと考えられる。

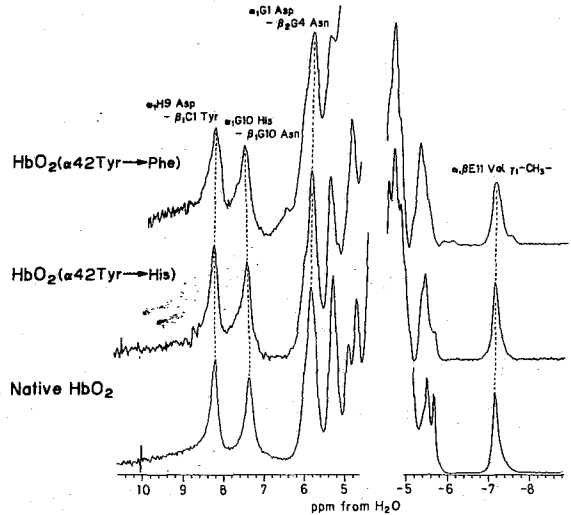


図1 オキシHb A, HbY α 42F, HbY α 42HのNMRスペクトル

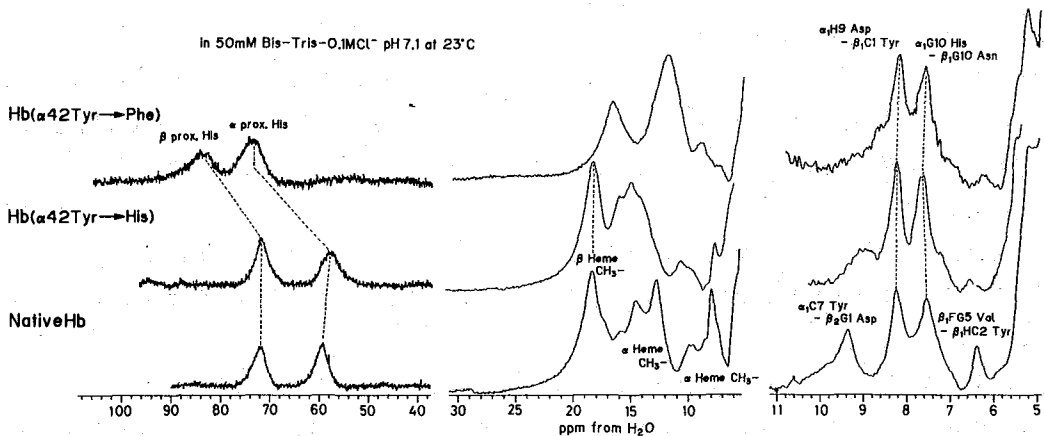


図2 デオキシHb A, HbY α 42F, HbY α 42HのNMRスペクトル

2. β 145Tyr置換体 β 145TyrはFおよびHヘリックスとFGコーナーによって囲まれた「チロシンポケット」に位置しており、デオキシ状態ではTyr残基先端の水酸基がFGコーナーの β 98Valの主鎖カルボニル基と水素結合している。この水素結合はヘムがオキシ化することにより切れ、そのフェノール環がチロシンポケットの外へ排出されるように動くことがX線構造解析の結果から知られている。この β 145Tyrが置換された天然の異常Hbは著しい機能異常を示し、この β 145Tyrと β 98Valとの水素結合は低酸素親和性状態の維持に役立っているものと考えられてきた。しかし、天然の異常Hbはいずれも立体障害の差の大きなアミノ酸に置換されており、その機能及び構造異常が水素結合だけに由来するのかどうかについては明らかではなかった。そこでTyrを立体障害のよく似たPheに置換したHbY β 145Fの合成を試みた。その酸素結合体のスペクトルは図3に示すように α 42置換体と同様に大きな変化はみられず、酸素が結合した場合にはアミノ酸置換による構造変化は小さいものと考えられた。また酸素が解離してもNMRスペクトルのパターン(図4)は天然Hbに近く、デオキシ状態でも構造的には変化が小さいことを示している。酸素平衡曲線の結果からも、酸素親和性は上昇するものの、HbY α 42Fのような大きな機能異常はみられなかった。従って、この β 145Tyrと β 98Valとの水素結合は低酸素親和性状態の維持や協同効果発現にある程度の寄与はしているものの、 α 42Tyrと β 99Aspとの間の水素結合のように決定的な役割を持つのではなく、むしろ天然異常Hbの結果と比較よりベンゼン環程度の立体障害を持ったアミノ酸側鎖がいわゆる「チロシンポケット」に収まることの方が重要であることを示唆している。また、NMRスペクトルにおいて水から6.4 ppmに観測されるシグナルは β 145Tyrと β 98Valとの水素結合に帰属されてきたが、そのTyrをPheに置換しても同じ位置にシグナルが観測されることからその帰属に対して再考の余地があることを示している。

3. β 37Trp置換体 β 37Trpは α 1 β 2サブユ

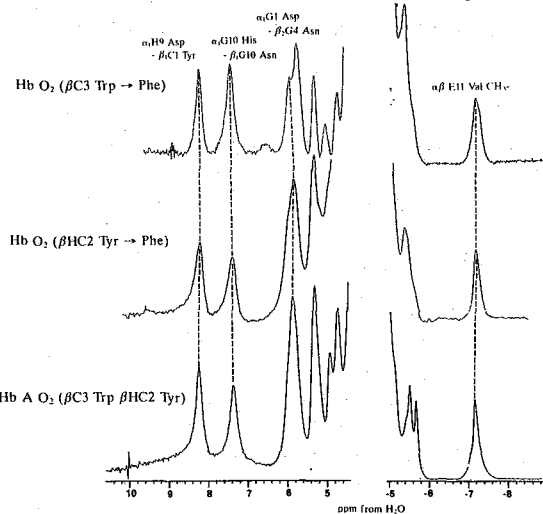
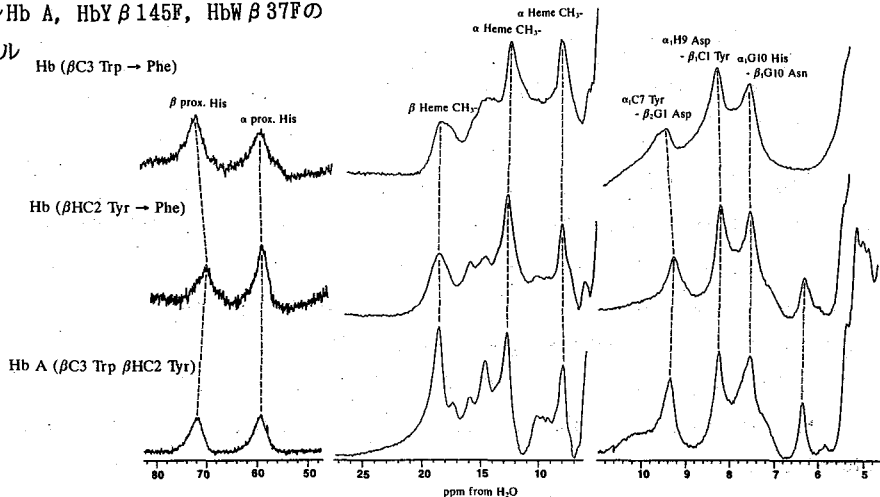


図3 オキシHb A, HbY β 145F, HbW β 37FのNMRスペクトル

図4 デオキシHb A, HbY β 145F, HbW β 37FのNMRスペクトル



ニット界面に存在する2個のinvariantなアミノ酸残基の一つで、「T」状態で同じくinvariantな α 94Aspと水素結合を形成している。従ってこの水素結合も協同効果発現において重要な役割を果たしていると考えられるが、このTrp残基の位置にはその立体障害が大きく異なったSerやArgに置換した天然異常Hbしか報告されていない。そこでこのinvariantな水素結合の役割を検討するため、この残基を比較的立体障害のよく似たPhe残基に置換してみた。そのNMRスペクトル(オキシ型図3およびデオキシ型図4)はデオキシ状態で6.4ppmのシグナルが完全に消失している外は著しい変化はなく、9.4ppmのシグナルもやや強度が弱まっているものの観測され、常磁性シグナルの観測位置に大きな変化はなかった。しかし、酸素親和性は非常に高くなり(表1)、協同性的酸素結合も観測されなかった。このような高次構造と機能の矛盾は、主にアミノ酸置換による二量体-四量体平衡の移動によると考えられる。つまり、TrpをPheに置換することによりHbが二量体に解離しやすくなり、NMR測定濃度(約3mM)では四量体であるが酸素平衡曲線測定時(約60 μ M)では二量体に解離し高酸素親和性状態になっているものと考えられる。実際このHbW β 37Fは酸素親和性の濃度依存性が大きく、会合状態の変化が示唆されている。もしこのHbの高次構造がNMRスペクトルで示唆されたように天然Hbとよく似た構造であるならば、この水素結合も β 145Tyrと β 98Valとの水素結合同様低酸素親和性状態実現のためには α 42Tyrと β 99Aspとの間の水素結合ほど大きな役割を持っていないことが推定される。更に、デオキシ状態のNMRスペクトルで、6.4ppmのシグナルだけが選択的に消失したことから、2.で触れたこのシグナルの帰属についてこの α 1G1Aspと β 237Trpとの水素結合がその候補の一つとなり得ることを示している。

表1 天然及び人工異常Hbの酸素親和性の比($P^{X_{50}}/P^{A_{50}}$)と協同性定数(n_{max})

| Hemoglobin | $P^{X_{50}}/P^{A_{50}}$ | n_{max} |
|--|-------------------------|------------|
| Hb A | --- | 3.1 |
| <u>Hb Yα42F (α42(C7)Tyr \rightarrow Phe)</u> | <u>7.5</u> | <u>1.2</u> |
| <u>Hb Yα42H (α42(C7)Tyr \rightarrow His)</u> | <u>3.1</u> | <u>2.0</u> |
| <u>Hb Yβ145F (β145(HC2)Tyr \rightarrow Phe)</u> | <u>3.1</u> | <u>2.2</u> |
| Hb Nancy (β 145(HC2)Tyr \rightarrow Asp) | 14 | 1.1 |
| Hb Bethesda (β 145(HC2)Tyr \rightarrow His) | 30 | 1.2 |
| Hb Rainier (β 145(HC2)Tyr \rightarrow Cys) | 26 | 1.0 |
| <u>Hb Wβ37F (β37(C3)Trp \rightarrow Phe)</u> | <u>8.3</u> | <u>1.2</u> |
| Hb Hirose (β 37(C3)Trp \rightarrow Ser) | 3.4 | 1.5 |
| Hb Rothschild (β 37(C3)Trp \rightarrow Arg) | 0.57 | 1.8 |

- 【参考文献】 1. Nagai, K., Luisi, B., Shih, D., Miyazaki, G., Imai, K., Poyart, C., De Young, A., Kwiatkowski, L., Noble, R. W., Lin, S.-H., & Yu, N.-T. (1988) Nature 329, 858-860. 2. Imai, K., Morimoto, H., Kotani, M., Watari, H., Hirata, W., & Kuroda, M. (1970) Biochem. Biophys. Acta. 200, 189-196. 3. Imai, K. (1973) Biochemistry 12, 128-134. 4. Ishimori, K., & Morishima, I. (1988) Biochemistry 27, 4060-4066. 5. Nagai, K., & Kitagawa, T. (1980) Proc. Natl. Sci. U.S.A. 77, 2033-2037. 6. Ishimori, K., Morishima, I., Imai, K., Fushitani, K., Miyazaki, G., Shih, D., Tame, J., Pegnier, J., & Nagai, K. (1989) J. Biol. Chem. 14624-14626

Solution Structure of Bioactive Peptides by
Two-Dimensional NMR and Distance Geometry Calculations

Jean-Marc Lancelin, Daisuke Kodha, Shinichi Tate, Yoshikazu Tamarura*, Rie Ikoma*, Susumu Funakoshi*, Nobutaka Fujii*, Sadaaki Iwanaga†, Yuchio Yanagawa#, Teruo Abe#, Mei Satake# and Fuyuhiko Inagaki.

The Tokyo Metropolitan Institute for Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, †Faculty of Science, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka and #School of Medicine, Niigata University, Asahimachi, Niigata 951, Japan.

NMR derived distance constraints and distance geometry calculations are now of routine use for stereostructure studies of medium sized peptides and small proteins with defined structure in water solution [1]. We recently applied these methods to solve two highly biologically active peptides from marine invertebrates. The first is coming from the Japanese horse-shoe crab Tachyplesus tridentatus from which was isolated tachyplesin I, a 17-residue peptide, by acidic extracts of hemocytes debris after lysis [2]. This peptide was shown to have a high affinity to bacterial endotoxins of the lipopolysaccharide (LPS) series and consequently is most probably involved in prime antibacterial self defense mechanisms of this arthropod. The second example was taken from the wide family of conotoxins [3]. Conotoxin GIIIA (geographutoxin) with 22 amino-acids residues, was isolated from the venom of Conus geographus (hunting cone snail) and was demonstrated to be a selective tetrodotoxin competitor for the skeletal muscle Na^+ channel. The location of the three disulfide bridges was very recently demonstrated using chemical labelling and mass-spectrometry [4].

Basically we used four types of NMR experiments, double-quantum filtered COSY, HOHAHA (MLEV-17), NOESY and P.E.COSY in the phase sensitive mode (States method) to achieve first sequence specific assignment of resonance lines [1] and then stereospecific assignments of resolved diastereotopic methylene protons. Two sets of experiments at 28°C and 10°C were used. A 250 mixing time was selected for NOESY experiments at 400 or 500 MHz ^1H frequency. Slow exchangeable amide protons were observed in D_2O at 10°C. Fig. 1 illustrates the quality of spectrum

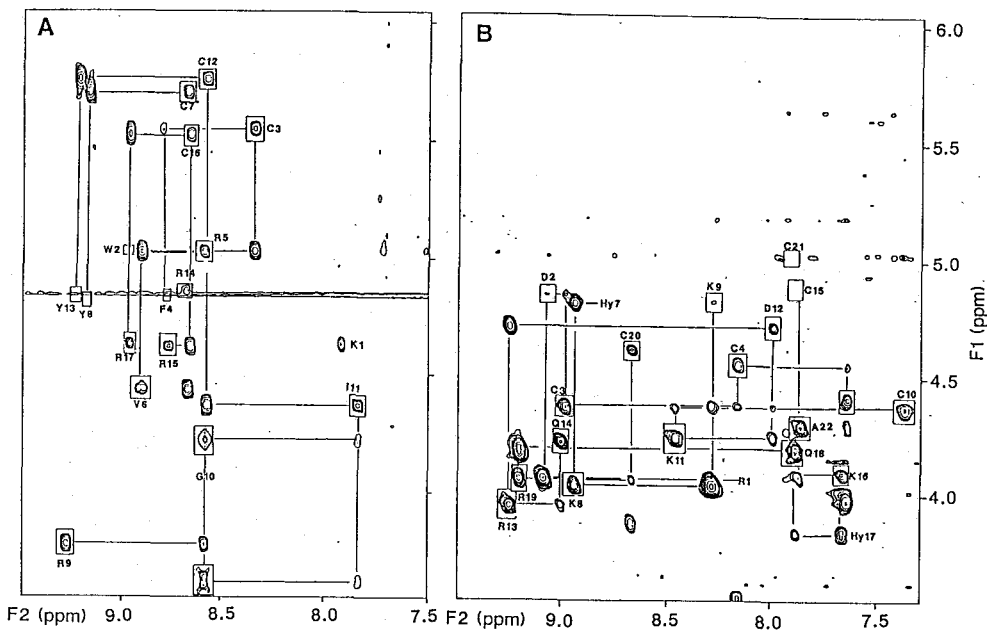


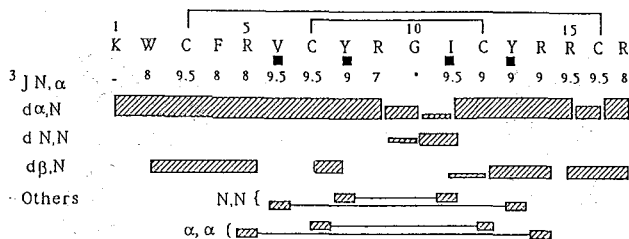
Fig.1. ^2H - ^1H NOESY regions of A- tachyplesin I in H_2O - D_2O 90:10 at 500 MHz, 28 $^\circ\text{C}$ and pH 2.9 and B- conotoxin GIIIA at 400 MHz, 10 $^\circ\text{C}$ and pH 2.5. Inboxed cross-peaks indicates corresponding COSY connectivities. A DANTE and spin lock type water suppression was used during relaxation period with typical DANTE pulse of 3-4.5 $^\circ$ with intervals of 0.250-0.500 ms until c.a. 1 s duration.

^3J NH, α coupling constants were deduced from 1D-spectrum and occasionally from a 4Kx512W data points DQF-COSY in H_2O .

From preliminary analysis (fig.2) it was possible to assign a secondary structure for tachyplesin I as an anti-parallel β -sheet from residue 3 to 15 with a β -turn formed by residues of Tyr 8, Arg 9, Gly 10 and Ile 11. Variation of NOESY cross-peaks intensity associated with terminal residues 1-3 and 16-17 with the temperature indicated some flexibility for these parts of the molecule. For conotoxin GIIIA, no secondary structural element was recognized but significant ^3J NH, α indicated a defined structure in solution.

A total of 142 and 194 NMR constraints were finally derived for tachyplesin I and conotoxin GIIIA respectively. NOE cross-peak intensities were classified to three categories (weak-medium-strong). Stereospecific assignments were explicitly introduced in distance geometry calculation when possible. For tachyplesin I each of the four cysteine side chains take a t_g^3 conformation. Two other stereospecific assignments were determined for Arg 9 and Tyr 13 but were not introduced in these calculations.

A



B

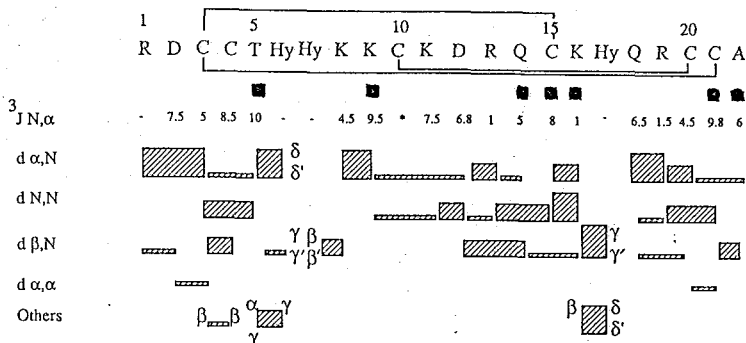


Fig.2. Main experimental data used for stereostructure calculations for A. tachyplesin I and B. conotoxin GIIIA. For Conotoxin GIIIA only sequential nOes are shown. A shaded bar indicates that a nOe is observed. The thickness is related to the relative intensity of the cross-peak. A filled square indicates a slow exchangeable NH at 10°C. J couplings are indicated in Hz. $d\alpha, N$ are compiled over the two temperature used 10 and 28°C.

For conotoxin GIIIA all cysteins were assigned in t^2g^3 conformers excepted for Cys 20 found in a g^2g^3 disposition. For Cys 15, the stereospecific assignments was not possible due to the chemical shift degeneracy. Lys 8 (t^2g^3) and Gln 18 (t^2g^3) were also used. Slow exchangeable amido proton information was not included as distance constraint but was used as an posteriori checking. Fig.3 displays RMS superposition of the best structures obtained from 150 runs of XPLOR.

Carefull examination of one of these structures with side chains on display reveals the remarkable location of guanidinium and ammonium groups around each molecules. For tachyplesin I two pairs formed by the couples of Arg 5-Arg 14 and Arg 15-Arg 17 are in opposite directions almost perpendicular from the β -sheet plane. If we consider that tachyplesin I interacts with a Glc1^B6Glc-1,4' diphosphate glycolipid which is shown to be the major active part of LPS [5], the distance between guanidinium groups within each pair seems suitable to fit with phosphates. Additional interactions could also be provided by the pair Tyr 8-Arg 9 and the two first amino-acids Lys 1 and His 2. We think that this feature is at the origin of the precipitation of LPS by tachyplesin I this latter acting as a cross linking agent. For conotoxin GIIIA the particular folding with the three disulfide bridges concentrated at the center of the structure forms a real crown of basic residues almost regularly spaced (Arg 13-Lys 16-Arg 19 and Lys 8- Lys 9-Lys 11) which could interact strongly with an anionic "mouth" of the receptor.

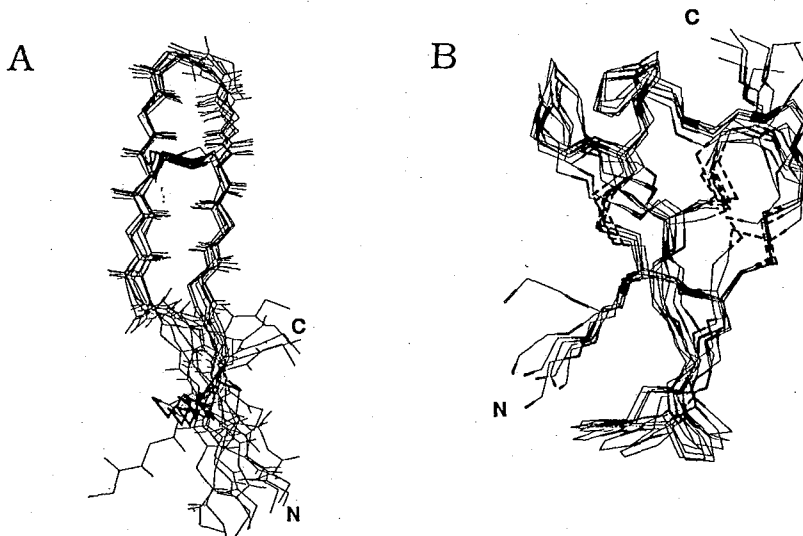


Fig.3. RMS (N,CO,C) superposition of A- the 10 best XPLOR solutions of tachyplesin I and B- the 7 best solutions of conotoxin GIIIA. The respective combined RMSD are $1.03 \pm 0.33 \text{ \AA}$ (66 3:16) and $0.80 \pm 0.26 \text{ \AA}$ (66 2:21).

High level of molecular organization in the structure of tachyplesin I and conotoxin GIIIA allowed the 3D-structures determination in water solution using NMR data and distance geometry calculations. From this study it is highlighted that disulfide bridges when properly located can constrain a medium sized peptide, otherwise subjected to conformational averaging over several conformers. The relationship possible between biological activities and observed structures is then deduced.

References

- [1] K.Wüthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, J.Wiley and Sons, N.-Y., 1986.
- [2] T.Nakamura, H.Furunaka, T.Miyata, F.Tokunaga, T.Muta, S.Iwanaga, M.Niwa, T.Takao, and Y.Shimonishi, J.Biol.Chem., 263(1988)16709-16713.
- [3] B.M.Olivera, J.Rivier, C.Clark, C.A.Ramillo, G.P.Corpuz, F.C.Abogadie, E.E.Mena, S.R.Woodward, D.R.Hillyard, and L.J.Cruz, Sciences, 249(1990)257-263.
- [4] Y.Hidaka, K.Kato, H.Nakamura, J.Kobayashi, Y.Ohizumi, and Y.Shimanishi, FEBS Lett., 264(1990)29-32.
- [5] C.Galanos, O.Luderitz, E.T.Rietshel, O.Westphal, H.Brade, L.Brade, M.Freudenberg, U.Schade, M.Imoto, H.Yoshimura, S.Kusumoto, and T.Shiba, Eur.J.Bioch., 148(1985)1-5.

P28

ラクトペルオキシダーゼと芳香族基質との相互作用

—¹H NMR常磁性緩和および分子間NOEによる研究—

○佐藤 康一、高橋 征三*、中村 信吾**、細谷 東一郎

(千葉大・薬、*日本女子大・家政、**弘前大・農)

Interaction of Aromatic Donor Molecules with Lactoperoxidase

Probed by ¹H NMR Relaxation and Intermolecular NOE

Koichi Sato, Seizo Takahashi*, Shingo Nakamura** and Toichiro Hosoya

(Fac. Pharmaceutical Sciences, Chiba Univ.; *Dept. Chemistry, Japan Woman's Univ.; **Fac. Agriculture, Hirosaki Univ.)

¹H NMR was used for investigating the interaction of aromatic donor molecules with lactoperoxidase (LPO). Aromatic donor molecules displayed rapid- and slow-exchange interaction with LPO. Relaxation data of LPO-CN⁻ suggested the presence of multiple binding sites in LPO. The calculated distance as a binding site of aromatic molecules was 6.5 - 7.5 Å from ferric iron, which was substantially closer to the heme plane than that of horseradish peroxidase (HRP) (8.4 - 11.0 Å). Intermolecular NOE suggested that the binding site was in the distal side close to dis His and Arg. Thus the present results suggest that an analogy in terms of structure does not hold between HRP and LPO.

【序】

ラクトペルオキシダーゼ(LPO)は、分子量約 77500のヘム蛋白質で主として牛乳中に存在する。補欠分子族は、8-メチル基がメチレンチオールとなったプロトヘムIXである。それがアポ蛋白質中のシステイン残基と、ジスルフィド結合していると考えられている。ペルオキシダーゼは一般に、H₂O₂を第1基質とし、第2基質(種々の有機・無機化合物)の酸化反応を触媒する。この酵素と第2基質との相互作用を明らかにすることは、反応機構の詳細を知る上できわめて重要である。我々は以前西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)において、芳香族基質がヘム鉄からの距離 8.4-11.0Åで、ヘムの 8-メチル基近傍に、ヘム面にほぼ垂直に結合していることを、¹H NMRによる研究から報告した[1]。LPOの場合¹H NMR常磁性シフトは broadで重なり合っており、ヘムの開裂および再構成も困難なことから、シグナルの帰属はなされていない。しかし CN⁻の配位したLPO (LPO-CN⁻)では sharpで分離したピークが現れることが知られ、最近その帰属が報告された[2]。そこで HRPの場合と同様に酵素-基質分子間NOE および常磁性緩和の手法を用いて、LPOと芳香族基質との相互作用を調べ、HRPとの比較検討を行った。

【実験方法】

サンプル調製 LPOは新鮮なスキムミルクから精製し、R_Z値(A₄₁₂/A₂₈₀比)が、pH7.0で0.90以上のものを使用した。LPOの濃度は、モル吸光係数 ε₄₁₂ = 1.12 × 10⁵ により計算した。LPO-CN⁻はモル比で 1000倍量の pH調整 KCN溶液を LPOに加えて調製した。最終的

にサンプルは重水素化 0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)に溶かした。

NMR測定 ^1H NMRは Bruker WH-270を用い、20°Cで測定した。化学シフトは、サンプル中の HD0を 4.8ppmとして計算した。縦緩和時間(T_1)の測定は通常の inversion-recovery法を用い、得られたデータは一般に用いられている(1)式で最適化した。酵素結合および非結合の基質間の交換速度が、NMRのタイムスケールにおいて十分に速いならば、基質の見かけの縦緩和速度は、酵素結合(T_{1b})および非結合(T_{1f})それぞれの要素の1次結合で表される。 K_d を酵素-基質複合体の解離定数、 S_0 と E_0 をそれぞれ基質および酵素の初濃度とすると、 $S_0 \gg E_0$ のとき (2)式が誘導され、 T_{1b} および K_d が計算できる。分子間NOE は、直接 on-resonanceと off-resonanceをそれぞれ 0.1秒照射し、直接 FIDの差を積算して得た。

$$(I_{\infty} - I_{\tau}) / (2 I_{\infty}) = \rho \exp(-\tau / T_{1obs}) \quad (1)$$

$$E_0 \left(\frac{1}{T_{1obs}} - \frac{1}{T_{1f}} \right)^{-1} = K_d \left(\frac{1}{T_{1b}} - \frac{1}{T_{1f}} \right)^{-1} + S_0 \left(\frac{1}{T_{1b}} - \frac{1}{T_{1f}} \right)^{-1} \quad (2)$$

常磁性緩和の理論 今回の系での核スピンの緩和は、電子スピンとの相互作用によるものが支配的となる。その寄与は Solomon-Bloembergen式 of 双極子項で表されるが、プロトンが $S=5/2$ または $S=1/2$ の金属と相互作用するとき、 r を常磁性金属とプロトン間の距離、 τ_c を常磁性分子の相関時間として、最終的にそれぞれ次の形に導くことができる。

$$r \text{ (cm)} = (2.88 \times 10^{-31} \cdot T_{1M} \cdot f(\tau_c))^{1/6} \quad (3a)$$

$$r \text{ (cm)} = (2.47 \times 10^{-32} \cdot T_{1M} \cdot f(\tau_c))^{1/6} \quad (3b)$$

τ_c の値がわかれば、 T_{1M} を求めることにより(3)式から基質プロトン-ヘム間の距離が計算できる。上述のようにして T_{1obs} から導いた T_{1b} は、常磁性項(T_{1M})および反磁性項(T_{1d})から成るが、一般に後者の寄与は小さく通例 $T_{1M} = T_{1b}$ とみなせる。

【結果】

Fig. 1Aは LPO/レゾルシノールの系で基質プロトンの inversion-recovery測定結果から T_{1obs} を求めた1例、Fig. 1Bは一定の酵素濃度下、基質濃度による T_{1obs} の滴定結果の(2)式に基づくプロットである。この直線から計算された T_{1b} と K_d の値を Table Iに示す。

LPO-CN⁻存在下においても同様の実験が可能であり、その結果をFig. 2およびTable Iに示した。LPO-CN⁻存在下の基質の緩和は S_0/E_0 比に依存した点で LPO存在下のそれと異なっている。この値が大きい時 LPO存在下と同様に 1相であるが(Fig. 2A)、小さくなると遅い相が出現し、緩和は見かけ上 2相となった(Fig. 2B)。

いくつかの芳香族基質を試した中で、p-クロロフェノールにおいてもレゾルシノールと同様の結果が現れ、 T_{1b} と K_d が得られた(Table I)。ところが 2-メトキシ-4-メチルフェノールや p-クレゾールを用いた時、 T_{1obs} は基質濃度に対して有意に変化せず(Fig. 3)、得られた結果は(2)式に全くあてはまらなかった。ここで得られた T_{1obs} の値は、酵素非存在下の T_1 とは異なり、縦緩和速度は酵素濃度に対してほぼ直線的に変化した(Fig. 3 inset)。このことは、この種の基質では酵素結合および非結合の基質間の交換速度が、NMRのタイムスケールにおいて十分遅いことを示す。したがってこの T_{1obs} には、酵素溶

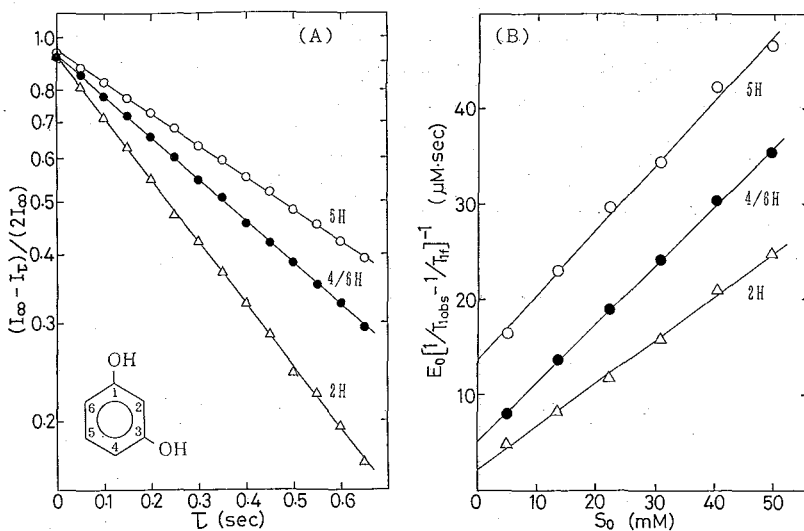


FIG. 1. (A) Semilogarithmic plots (eq 1) for 22.3 mM resorcinol relaxation in the presence of 30 μM LPO. (B) Plots (eq 2) for resorcinol/LPO system.

液のバルクの効果が現れていると考えられ、 T_{1d} はこの T_{1obs} の程度であるとみなした。この値は前出の T_{1b} に比べ、無視できるほど小さく $T_{1b} = T_{1M}$ と考えられる。LPOの $\tau_c = 5.5 \times 10^{-10}$ s[3]を用いて(3)式にしたがって計算した r の値を Table Iに示す。

Fig. 4には LPO-CN⁻の常磁性シフトプロトンシグナルを照射した時、基質のシグナルに現れた分子間NOE 差スペクトルを、負の NOEを上方に描いて示した。(A)は p-クロロフェノール、(B)は 2-メトキシ-4-メチルフェノールの場合である。照射位置およびその帰属は図中に示した。ヘム側鎖の 8-メチレンや 3-メチルに比べ、distal His C ϵ Hや distal Arg(?)を照射したときの方がはるかに大きい NOEが得られた。

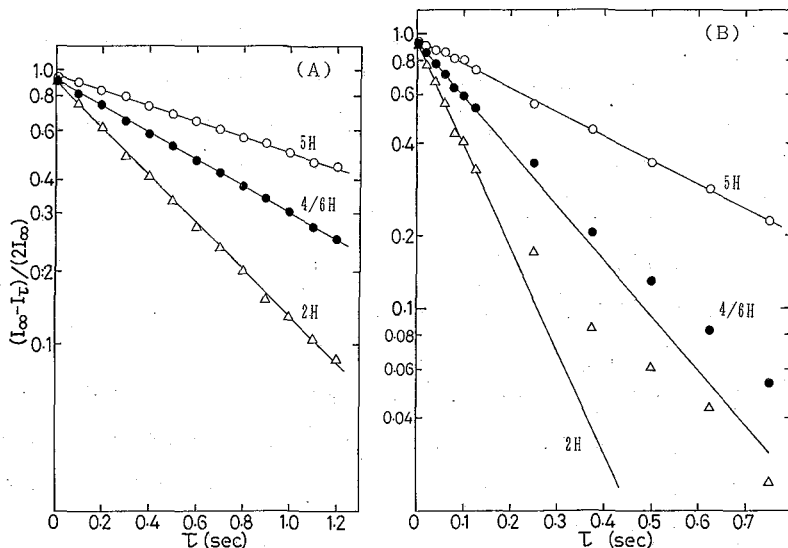


FIG. 2. Semilogarithmic plots (eq 1) for 7.6 mM resorcinol relaxation in the presence of 20 μM LPO-CN⁻ ($S_0/E_0 \doteq 380$) (A) and those for 6.0 mM resorcinol in the presence of 90 μM LPO-CN⁻ ($S_0/E_0 \doteq 67$) (B).

TABLE I. Binding of aromatic substrates to LPO and LPO-CN⁻

| substrate | resorcinol | | | p-chlorophenol | |
|----------------------------------|------------|------|------|----------------|------|
| | 5H | 4/6H | 2H | 3/5H | 2/6H |
| LPO (S=5/2) | | | | | |
| T_{1b}^{-1} (s ⁻¹) | 1401 | 1588 | 2375 | 3018 | 3410 |
| K_d (mM) | 18.3 | 7.8 | 6.5 | 13.3 | 6.8 |
| r (Å) | 7.5 | 7.4 | 6.9 | 6.6 | 6.5 |
| LPO-CN ⁻ (S=1/2) | | | | | |
| T_{1b}^{-1} (s ⁻¹) | 212 | 462 | 963 | 696 | 996 |
| K_d (mM) | 4.9 | 2.5 | 1.8 | 6.4 | 2.2 |

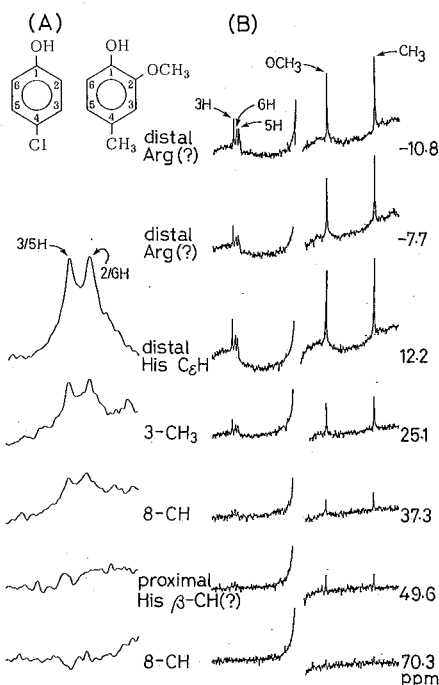
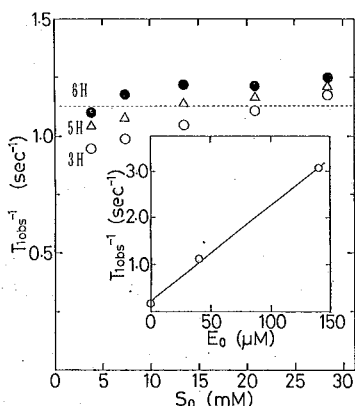


FIG. 3 (left). Longitudinal relaxation rates of 2-methoxy-4-methylphenol in the presence of 40 μ M LPO versus S_0 . (inset) Linear relationship for E_0 .

FIG. 4 (right). Difference intermolecular NOE spectra of 29.6 mM p-chlorophenol plus 270 μ M LPO-CN⁻ (A) and 14.8 mM 2-methoxy-4-methylphenol plus 100 μ M LPO-CN⁻ (B).

【考察】

¹H NMR常磁性緩和を基に芳香族基質と LPOとの結合を調べたところ、LPO-基質相互作用に rapid-exchangeと slow-exchangeの2種あることが確認された。レゾルシノールと p-クロロフェノールは前者、2-メトキシ-4-メチルフェノールと p-クレゾールは後者に属した。後者が酵素と結合していない、あるいは交換なしの結合をしている可能性は、NOE実験により否定された。rapid-exchangeの基質は、理論的取り扱いによりヘム鉄-基質プロトン間の距離が計算できる。その値は 6.5-7.5Åであり、HRPにおける値 8.4-11.0Åに比べて顕著に小さかった。slow-exchangeの基質の緩和速度は、基質濃度に依存せず酵素濃度にも依存した。これは酵素溶液のバルクの効果をみたと考えられる。LPO-CN⁻からも同様にして rの計算が可能であるが、妥当な τ_c の値が今のところなく、今回は計算していない。ただし HRP-CN⁻が基質の緩和に反磁性様の寄与しか示さなかったのとは対照的に LPO-CN⁻はあきらかな常磁性の寄与を与えたことは注目に値する。さらに LPO-CN⁻存在下基質の緩和は、条件により明らかな複相を呈し、複数の結合部位の存在が示唆された。分子間NOEの実験からは、LPOに対する基質の結合部位を知る手がかりがはじめて与えられた。基質は HRPのようにヘムの peripheral位ではなく、distal側のアミノ酸残基付近に結合していることが推定された。

【文献】

- [1] Sakurada, J., Takahashi, S. & Hosoya, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9957-9662
- [2] Thanabal, V. & La Mar, G. N. (1989) *Biochemistry* 28, 7038-7044
- [3] Shiro, Y. & Morishima, I. (1986) *Biochemistry* 25, 5844-5849

P29

部位特異的変異法によるヒトc-Ha-ras タンパク質の構造解析

○山崎和彦, 伊藤 隆, 武藤 裕, 白水美香子, 新美達也, 藤田純子,
西村 暹*, 河合剛太**, 宮澤辰雄**, 横山茂之

(東大・理・生化, *国立がんセンター研・生物, **横浜国大・工)

An NMR and Site-Directed Mutagenesis Study of Human c-Ha-Ras Protein Structure

Kazuhiko Yamasaki, Yutaka Ito, Yutaka Muto, Mikako Shirouzu, Tatsuya Niimi, Junko Fujita, Susumu Nishimura*, Gota Kawai**, Tatsuo Miyazawa**, and Shigeyuki Yokoyama, *Faculty of Science, University of Tokyo*, **Biology Division, National Cancer Center Research Institute*, and ***Faculty of Engineering, Yokohama National University*

By site-directed mutagenesis, a tryptophan residue was introduced in place of Tyr-32 or Tyr-40 of human c-Ha-ras protein which originally has no tryptophan residue. By selective deuteration of phenylalanine and tyrosine residues, NOESY and HOHAHA cross peaks due to the single tryptophan residue were clearly observed. It was found that the aromatic ring of Trp-32 is buried in the GDP-bound state and exposed in the GTP-bound state while that of Trp-40 is buried both in the GDP-bound and GTP-bound states.

ヒトのras遺伝子は、特定の点突然変異によってがん遺伝子となり、種々のがんを引き起こすが、正常細胞においても増殖や分化に関わるシグナル伝達において重要な役割を果たしている。rasタンパク質(分子量約2万1千)は、GDPを結合した状態では「不活性型」コンホメーションをとるが、GDPが解離して代わりにGTPが結合すると「活性型」コンホメーションとなり、シグナル伝達に関与すると考えられている。正常のrasタンパク質は、結合したGTPを自ら加水分解して不活性なGDP結合型にもどるが、GTP加水分解能が低下している突然変異体rasタンパク質は、活性型に長くとどまるので、がん化を引き起こす。

rasタンパク質の中で、シグナル伝達のターゲットとの相互作用に直接に関与する領域は、「エフェクター領域」と呼ばれ、変異導入の手法により、Tyr32からTyr40までとされている。GTP結合型のみがターゲットを認識するのは、このエフェクター領域のコンホメーションがGTP結合型とGDP結合型とで異なるためであると考えられる。我々は、既に、エフェクター領域に含まれる38位~40位のアミノ酸残基が、GDP結合型ではβシート構造に組み込まれているが、GTP結合型ではループ構造をとることを見いだしている(1)。本研究では、rasタンパク質がTrp残基をもたないことに注目し、エフェクター領域に存在して活性に必須なTyr32およびTyr40を、それぞれTrpに置換することにより、NMRによるコンホメーション解析のプローブを導入することを計画した。

ヒトc-Ha-rasタンパク質について、Tyr32→Trp, Tyr40→Trpの変異体遺伝子を部位特異変異法により作製し、大腸菌で発現させることにより、これらの変異体タンパク質を調製した。培養細胞を用いて調べたところ、いずれの変異体も、シグナル伝達活性を保持していた。したがって、32位あるいは40位に導入されたTrp残基は、本来のTyr残基と同じように機能していると結論された。そこで、これらの変異を導入した短鎖型rasタンパク質(C末端18残基を除いた171残基よりなり、高濃度溶液の調製が容易)を調製した。GDP結

合型およびGMPPNP (GTPの非水解アナログ) 結合型について, Bruker AM400の装置を用い 37°Cでの400MHzプロトンNMRスペクトルを測定した。2D-HOHAHAの混合時間は50ミリ秒, NOESYの混合時間は, 重水中では100ミリ秒, 軽水中では150ミリ秒である。

2D-HOHAHAスペクトルにおいて, 新たに導入したTrp残基のリングプロトンに由来するクロスピークは, Phe残基由来のクロスピークと重なっていた。そこで, Phe残基およびTyr残基を選択的に重水素化した試料を作成し, 2D-HOHAHAスペクトルを測定したところ, ひとつのTrp残基に由来するクロスピークのみを観測することができた(図1)。GDP結合型とGMPPNP結合型の間でTrp残基のリングプロトンシグナルの化学シフトを比較すると, Trp32の場合は大きく異なるのに対して, Trp40の場合は差異はわずかであった(図1)。さらに, 軽水溶液のNOESYスペクトルを測定することにより, Trp残基のH1およびH2のシグナルを観測し, H4~H7のシグナルを帰属した(Trp32変異体のGMPPNP結合型を除く)。Trp残基のプロトンのNOESYクロスピークは, Trp32変異体の場合には, GDP結合型では多いのに対して, GMPPNP結合型では著しく少なかった。他方, Trp40変異体の場合には, GDP結合型でもGMPPNP結合型でもクロスピークは多く, 差異はほとんどなかった。

これらの結果により, 40位では, GDP結合型とGTP結合型の両方で, 芳香環側鎖がタンパク質表面には露出していないのに対し, 32位では, GDP結合型からGTP結合型への変換によって, 芳香環側鎖がタンパク質内部に埋もれた状態から表面に露出した状態に移行すると考えられる。これは, Trp残基の蛍光の解析によっても確認された。したがって, 不活性型から活性型への変換にともなって表面に露出してくるTyr32の芳香環側鎖が, ターゲットと直接に相互作用することが推定された。現在, エフェクター領域およびその周辺領域について種々の変異体を作製し, シグナル伝達活性と高次構造の対応を検討している。

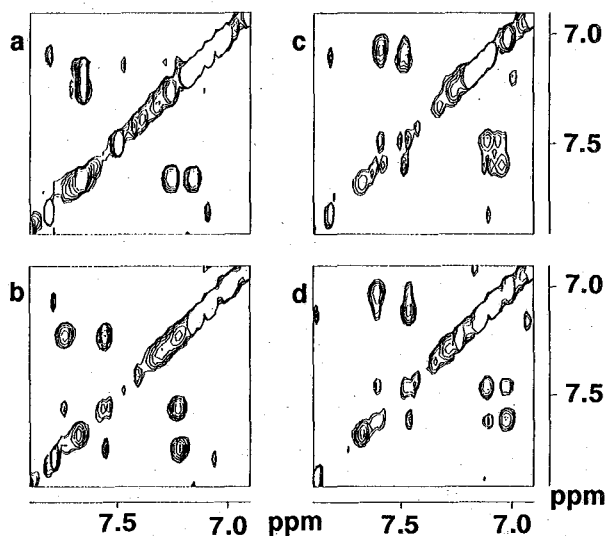


図1.
[2,3,4,5,6-²H]Phe,
[3,5-²H]Tyrで標識した
変異体rasタンパク質
(重水溶液)のHOHAHA
スペクトルのTrp領域;
Trp32変異体(a,b),
Trp40変異体(c,d),
GDP結合型(a,c),
GMPPNP結合型(b,d).

1. K. Yamasaki, G. Kawai, Y. Ito, Y. Muto, J. Fujita, T. Miyazawa, S. Nishimura and S. Yokoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 1054 (1989)

P30

^{31}P -NMR による麻酔薬の淡水魚に対する高エネルギーリン酸代謝への影響

(近畿大・医・第一生理) ○千葉 惇、浜口雅光、徳野達也、朝井俊治、秩父志行

Anesthetics effects on high energy metabolism in the loach studied with ^{31}P -NMR

Atsushi CHIBA, Masamitsu HAMAGUCHI, Tatsuya TOKUNO, Toshiharu ASAI and Shiko CHICHIBU
(Dept. Physiol., Kinki Univ. Sch. Med.)

We evaluated changes in high energy phosphate metabolism on muscles of the loach induced by 8 anesthetics with ^{31}P -NMR. The phosphate metabolism in the loach muscle during anesthesia could be classified into three types, aerobic (Pentobarbital, Quinaldine, 2-Phenoxyethanol), anaerobic (MS 222, Diethylether, Chloral hydrate) and unchanged (Ethyl-p-aminobenzoate) types. Combination of ^{31}P -NMR with characteristic properties is useful for estimating phosphate metabolism in the muscle during anesthesia.

動物実験や手術時に麻酔をほどこした場合、その麻酔状態の善し悪しが手術の結果にしばしば大きな影響を与える。麻酔レベルの判断は、感覚の消失、瞳孔反射、呼吸状態により行なわれるが、生体のエネルギー状態の変化による判断には適切な検査方法がなかった。近年、医学生物学領域で無侵襲的に生体の高エネルギーリン酸代謝物を測定できる ^{31}P -NMR が汎用されており、生体のエネルギー状態を調べるのが可能となった。外径 5-20mm の NMR 試料管で測定するものは各種細菌から単離細胞、血液、摘出臓器などで、大きな動物組織やヒトの特定部位については局所スペクトロスコーピーが用いられる。しかしながら、NMR の測定は狭い磁場内で行なうので、測定対象となる標本や動物は目的に応じて選択する必要がある。

著者らは、麻酔中の生体エネルギー状態を調べるためにドジョウを対象として ^{31}P -NMR を用いて各種麻酔薬の影響を高エネルギーリン酸代謝の面から検討した。対象動物にはシマドジョウを選んだ。この理由は、シマドジョウの体形が細長く、卵形の断面をもつため NMR 試料管にうまくフィットし、リン酸化合物のシグナルがたやすく得られるからである。また、ドジョウは、泥や砂の中に潜り込む性質があるため細長い NMR 試料管に入れても拘束性ストレスがかかりにくいために用いた。

方法

体長 45mm のシマドジョウ (*Cobitis biwae* JORDAN et SNYDER (Cobitidae)) を用いた。ドジョウを外径 10mm の NMR 試料管に頭部を下に向けて入れ、管底より 50mm の深さになるように流速 3ml/分、水温 20°C の淡水を灌流した。灌流液は、95% O_2 と 5% CO_2 でバブルした好氣的条件下の淡水を用いた。NMR 測定には、高分解能核磁気共鳴装置 JEOL-GX 400

(日本電子)を用い、 ^{31}P を161, 70MHzで測定した。フリップ角は、 45° で、パルス繰返し時間は2秒で60回の積算を行なった。図1にNMR試料管内に入れたドジョウのようすを図2と3に得られたシグナルを示した。低磁場側より糖リン酸(SP)、無機リン酸(Pi)、クレアチンリン酸(PCr)、ATP(γ , α , β)が得られた。化学シフトの基準は、クレアチンリン酸(PCr)を0ppmとして求めた。筋細胞内のpHは、PiとPCrとの化学シフトより求めた。得られた各シグナルの面積より各シグナルの濃度を算出した。用いた麻酔薬は10種類で、その濃度と麻酔にかかった時間は表1に示した。ドジョウをNMR試料管に入れ、安定シグナルを得てから灌流液中に20~45分間麻酔液を含んだ灌流液を循環させた。回復には、麻酔液を含まない淡水を用いた。NMR試料管内のドジョウの麻酔状態についての判断は、あらかじめNMRの磁場外で同様のシステムにより、NMR試料管内でドジョウの機械刺激に対する応答より麻酔状態を判断した。また、ドジョウの動きは、尾部のまわりのフィルムリングに触れることからストレインゲージ(Str.)よりモニターした。その結果から無麻酔期(淡水灌流)、麻酔期(麻酔液灌流)、そして麻酔回復期(再淡水灌流)を区別した。測定は、水温 20°C で行なった。

結果

in vivo ^{31}P -NMRで種々の麻酔時のドジョウの高エネルギーリン酸代謝の変化をみると3群に分けられた。麻酔中にPCrの濃度上昇とPiやSPの低下が観察されるドジョウの筋肉内の高エネルギーリン酸代謝が好気状態に移行するタイプ、Piの上昇とPCrの低下が観察される嫌気状態に移行するタイプ、そして麻酔液で灌流したにもかかわらず高エネルギーリン酸代謝化合物濃度に全く変化のないタイプに分類できた。結果は、表1に示した。好気状態に移行した例としてネンブタールの場合を示したのが図2である。ネンブタールで灌流するとPCrのシグナルの上昇とPiやSPのシグナルの低下もしくは消失が認められた。麻酔液から淡水液に切換えると麻酔前状態の状態となった。ネンブタールと同じ傾向をもつものは、キナルدين、フェノキシエタノールであった。嫌気状態に移行するタイプの例としてMS 222を示したのが図3である。麻酔液を灌流し始めるとPCrの低下とPiやSPのシグナルの上昇が観察された。淡水に切換えると、PCrの上昇とPiの低下が認められるがSPは出現したままの状態であった。MS 222と同じ現象が観察されたのはエーテルや抱水クロラールである。顕著にドジョウの筋のpHが酸性に傾いたのは、ウレタンやMS 222であったが他の麻酔薬ではあまり変化はなかった。また、ウレタンは、Piが低下したにもかかわらずPCrにはほとんど影響を与えなかった。麻酔中に全く高エネルギーリン酸代謝に影響を与えなかったのはp-アミノ安息香酸ナトリウムであった。

考察

現在、魚に対する麻酔薬は20数種類使われている。そのほとんどは、主に薬浴によるもので、麻酔中の魚は酸素消費量は約1/4に減少する。個体においては、麻酔状態は、エネルギー消費が少なく、そのエネルギー状態は主に体温や呼吸状態の観察、血液中の代謝産物の変化より判断される。著者らは、in vivoにおける麻酔中の高エネルギーリン酸代謝の

^{31}P -NMR測定を行なった。ドジョウを用いる利点は、束縛性ストレスがかかりにくいことと、筋肉が体の大部分を占め、筋のエネルギー状態が生命のインジケーターとして重要であると考えたからである。今回用いた麻酔薬は、in vivo ^{31}P -NMRで麻酔時のドジョウの高エネルギーリン酸代謝の変化を調べてみると3群に分けられた。一般に、麻酔薬は麻酔時の解糖系に対するよりは好気代謝に及ぼす作用があり、その作用部位は主にミトコンドリアである。また、麻酔時に生体内の酸素消費が低下するが、これは臓器機能の低下による代謝量の減少で、ミトコンドリアの呼吸に対する直接効果による抑制作用ではない。したがって、麻酔薬が直接臓器の代謝に作用するのか、あるいは神経に作用した結果による間接作用で臓器代謝に影響するかを考慮する必要がある。薬浴による麻酔作用は、その麻酔薬のほとんどがエラから呼吸され、その薬物の魚体内での分布は主に脳に集積し、筋肉に少ないことから麻酔効果は中枢性と考えられる。ネブタール群は、呼吸循環抑制を引き起こすにもかかわらず、呼吸系の酵素に対して阻害作用はなく、むしろATP産生酵素の活性化を引き起こすためと思われる。魚の麻酔に頻用されているMS 222は他の生化学のデータより魚に対して代謝阻害作用があり、 ^{31}P -NMRの結果からもそれを示唆している。一方、p-アミノ安息香酸エチルは、神経系のみに対して麻酔効果をもち代謝系にはほとんど影響を与えなかった。

麻酔時の生体エネルギー観察のスクリーニングの対象動物として著者らはドジョウを選んだ。麻酔機構については主に神経レベルあるいは代謝酵素の活性レベルで論じられてきた。in vivoにおける ^{31}P -NMR測定法とドジョウの特性を生かして麻酔時の個体全体のエネルギーを測定したことにより麻酔薬の有効な選択に役立つと思われる。

表 1

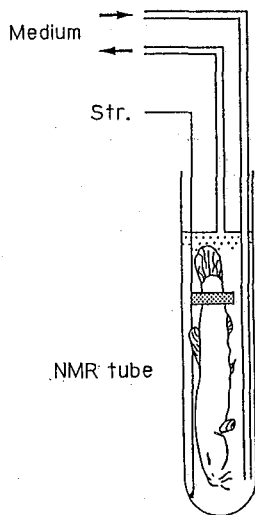
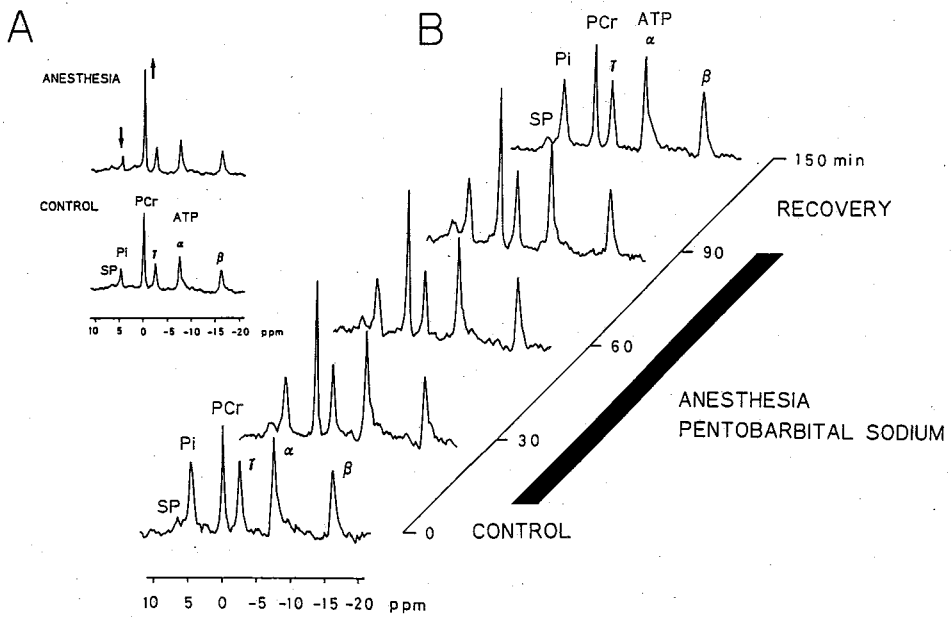


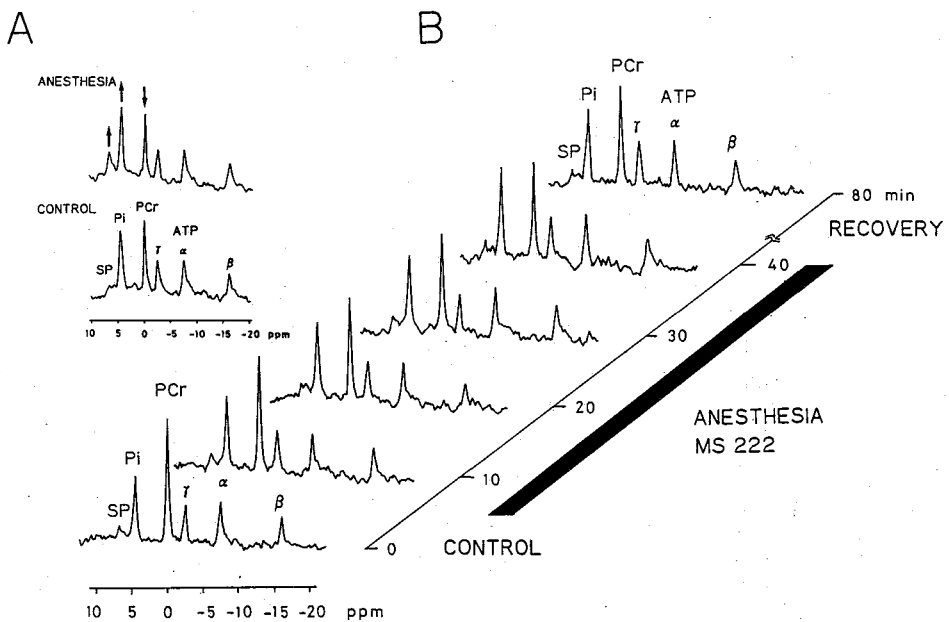
図 1

| Anesthetic | Concentration | Induction Time | SP | Pi | PCr | pH |
|-----------------------|---------------|----------------|----|----|-----|----|
| MS 222 | 25-100 mg | 1-3 min | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ |
| Diethyl ether | 10-50 ml | 2-3 | ↑ | ↑ | ↓ | ↔ |
| Chloral hydrate | 0.8-0.9 g | 8-10 | ↑ | ↑ | ↓ | ↔ |
| ----- | | | | | | |
| Pentobarbital Na | 50 mg | 5-10 | ↔ | ↓ | ↑ | ↔ |
| Quinaldine | 0.01-0.03 ml | 1-3 | ↑ | ↓ | ↑ | ↔ |
| 2-Phenoxyethanol | 0.1-0.5 ml | 5-10 | ↓ | ↓ | ↑ | ↔ |
| ----- | | | | | | |
| Urethan | 5-40 mg | 2-3 | ↔ | ↓ | ↔ | ↓ |
| Ethyl-p-Aminobenzoate | 0.2-0.3 g | 3-10 | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ |

* Expressed in milligram, gram or milliliter per 1 liter water.



☒ 2



☒ 3

○伊島理枝子、*柴田進、赤坂一之（京大理、*熊野高専）

Quantitative Analysis of Proton Longitudinal Relaxation of Proteins in Solution

Rieko Ishima, Susumu Shibata* and Kazuyuki Akasaka[†]

† Faculty of Science, Kyoto University and *Kumano Technical College)

Time courses of the recovery upon non-selective inversion of all individual proton magnetizations in several globular proteins in aqueous ($^2\text{H}_2\text{O}$) solution were calculated for varying degrees of rotational correlation time of the molecule ($10^{-9}\text{sec} \rightarrow \infty$) and compared with the experimental data of various proteins at 400 MHz. In the calculation, the spin relaxation mechanism was assumed to be solely the dipolar interaction between protons, and the three-site random jumps of the methyl groups, besides the rotation of the whole molecule, were taken into account. The following conclusions were drawn. (1) For proteins whose molecular weights are below $\sim 10,000$, the whole molecular rotation is a dominant source of relaxation, and the longitudinal relaxation times (T_1 's) may vary considerably from protons to protons. (2) For proteins whose molecular weights are above $\sim 20,000$, the methyl group rotations assisted by spin diffusion are common and major sources of relaxation, rendering T_1 values close to 1 sec. In the intermediate region (molecular weight; $10000 \sim 20000$), both the whole molecular rotation and the methyl group rotations contribute significantly to the relaxation. (3) In some proteins, segmental motions are equally important as the methyl group rotations in determining relaxation rate.

プロトンNMRにおいて、タンパク質中のプロトン縦緩和は、主にプロトンの感じる双極子磁場が分子全体の回転運動や内部運動で揺らぐことによって促進される。分子の回転相関時間は溶媒の種類、タンパク質の分子量や試料濃度から、おおよそ見積もることが出来る。一方、内部運動としては、その1つとして、メチル基の内部回転をあげることができる。現在我々が用いている高分解能NMRでタンパク質を対象にしたときには、メチル基のプロトンの縦緩和時間 (T_1) は短くなり、さらに、メチル基以外のプロトンでもプロトン間交緩和によって縦緩和を促進されるであろうことは知られている。¹しかし、分子全体の回転、メチル基の内部回転、又、その他の内部運動など要因がどの程度の寄与があるのかは限られたケースでしか明示されていない。²

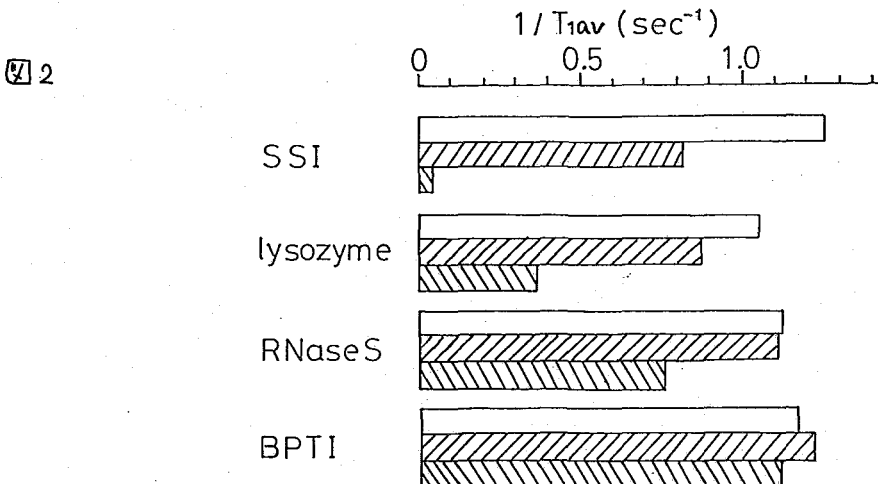
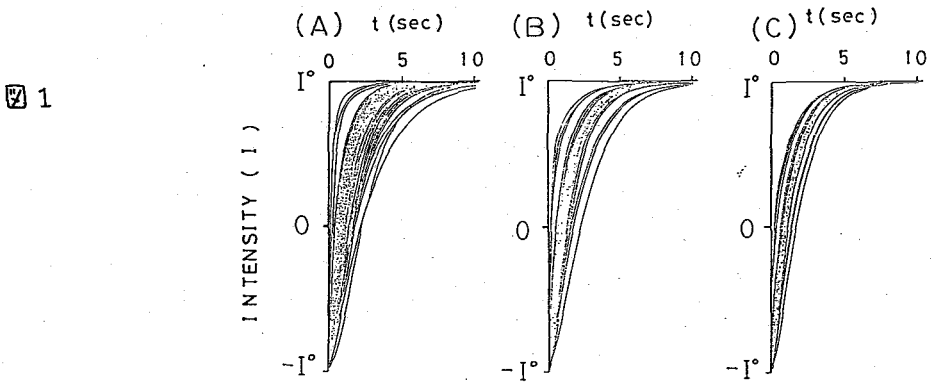
そこで我々はタンパク質のプロトン縦緩和時間 (T_1) が何によって決まっているかを出来るだけ一般的に明らかにする為、種々の回転相関時間を持つ系で非選択的 180° 反転による縦緩和を測定し、得られたタンパク質のプロトン T_1 を、①内部運動のない場合、②内部運動としてメチル基の内部回転を考慮した場合についての計算値と比較し、出来る限り定量的な解析を行なった。³

【計算方法】タンパク質分子を対象とし、プロトンの位置はX線回折により与えられるC、O、N、Sの座標から求めたものを用いた。分子全体の回転相関時間、メチル基の回転相関時間、ラーモア周波数を設定し、緩和行列を解いた。得られた縦緩和の時間変化を単一の指数関数で近似し、その特性時間を T_1 とした。メチル基の内部回転は three-site-jumpを仮定したが、内部回転による双極子ベクトルの変化は、メチル基のプロトン間のみで起こるとした。^{3,4}

【結果と結論】図1は SSI (Streptomyces subtilisin inhibitor)のうちコア領域にある 258個のプロトンについて、異なる分子全体の回転相関時間 ($\tau_R=1 \times 10^{-8}\text{sec}$, $3 \times 10^{-8}\text{sec}$, $7 \times 10^{-8}\text{sec}$)を設定して非選択的 180° 反転後の縦緩和の時間変化をプロットしたものである。縦緩和の回復は $\tau_R=1 \times 10^{-8}\text{sec}$ の場合より $\tau_R=7 \times 10^{-8}\text{sec}$ の場合のほうがばらつきが少ないことが分かる。これは、交緩和によって磁化の平均化が起こる為と考えられる。これら磁化の時間変化から T_1 が得られ、メチル基のプロトンと非メチルプロトンの T_1 の比較を行なった結果、特にメチル基の内部回転が緩和のシンクとして働く為、平均化された T_1 は分子の回転相関時間が長くなっても余り変わらない(1秒程度)ことが理解された。

図2は比較的相関時間の異なる4つの球状タンパク質、SSI(MW=23000), lysozyme(MW=14300), RNase S(MW=13680), BPTI(MW=6500)について解析した結果である。□ は実験的に求めた平均の T_1 (磁化強度の平均的時間変化)、▨ は分子全体の回転のみを考慮し計算により求めた T_1 、▩ は分子全体の回転の他にメチル基の内部回転も考慮し計算により求めた T_1 である。いずれも T_1 は 1 sec 程度であったが、BPTI程度のタンパク質では分子全体の回転の方が、一方 SSI程度のタンパク質ではメチル基の内部回転の方が主に T_1 を決める要因であった。また、特に lysozyme と SSI では、メチル基の内部回転以外の内部運動の寄与が顕著であるが、これは少なくとも SSI については固体試料についての測定結果と定性的に一致している。⁵

- 1 A.Kalk and H.J.C.Berenderson, J.Magn.Reson., 24, 343(1976)
- 2 E.T.Olejniczak and M.A.Weiss, J.Magn.Reson., 86, 148(1990)
- 3 R.Ishima, S.Shibata and K.Akasaka, J.Magn.Reson., in press(1991)
- 4 S.Shibata and K.Akasaka, Mag.Res. in Chemistry, 28, 129(1990)
- 5 K.Akasaka, K.Takegoshi, T.Terao and S.Ganapathy, Can.J.Chem., 66,2014(1988)



P32

○ 森 和彦*¹, 西川弘恭*², 赤木好男*¹, 照林宏文*¹

京都府立医科大学眼科学教室*¹, 明治鍼灸大学生理学教室*²

¹H-NMR AND IN VIVO MRI ANALYSIS OF THE RAT SUGAR CATARACT

Kazuhiko MORI*¹, Hiroyasu NISHIKAWA*², Yoshio AKAGI*¹ and Hirofumi TERUBAYASHI*¹

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine*¹

Dept. of Physiology, Meiji College of Oriental Medicine*²

¹H-NMR relaxation times and *in vivo* MRI studies were performed, as a non-invasive evaluation method of rat sugar cataracts. We used the cataracts, including rat galactosemic cataract and streptozotocin-induced diabetic cataract. From *in vitro* ¹H-NMR studies, T₁ and T₂ were prolonged before the histological changes appeared. The high intensity area of the MRI showed the elongation of the relaxation times and the histological liquefaction of the lens cortex. These results showed that MRI would be useful in the early detection of human diabetic cataract and the evaluation of the effectiveness of anti-cataract agents in near future.

[はじめに]

磁気共鳴画像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)は生体内水の状態や含有量などの情報が非侵襲的に得られ, 眼科領域でもMRIによる種々の研究¹⁻²⁾がなされている. 水晶体へのMRIの応用に関しては摘出眼球での報告はあるが^{3, 4)}, *in situ* で生きた状態での報告はない. 一方, ラット糖白内障はヒト糖尿病性白内障のモデルであり, アルドース還元酵素(AR)を起因酵素とし, 糖アルコール蓄積による水晶体線維の膨化・液化がその本態である(Polyol浸透圧説⁵⁾). またAR阻害剤(ARI)は糖アルコールの産生を抑制し, この白内障を予防・治癒させる. 本研究では白内障水晶体内の水構造変化を, 水の¹H-NMR緩和時間と*in vivo* MRIによって解析し, 組織変化との対応を検討した.

[試料と方法]

試料としてSprague-Dawley系Rat(3週齢, 体重50g, 雄)のStreptozotocin(STZ)誘発糖尿病性白内障(DM)とGalactose白内障(Gal)を用いた. DM群はSTZ(100mg/kg)静注後正常食にて7週間, Gal群は15, 25, 50%Galactose含有食にて5週間飼育した. これらラットに対し経時的に緩和時間測定, MRI測定, 組織検索を行った.

NMR装置は、緩和時間測定用にspin echo NMR装置(JNM-FSE-60E,60MHz,JEOL), イメージング用に超伝導型MRI装置(CSI-II 4.7T, GE)を用いた。

緩和時間測定は、摘出後すぐに水晶体をNMR試料管(10mm径, moist chamber)にいれ、IR法にて T_1 , CPMG法にて T_2 を求めた。MRI測定はラットを麻酔後、自家製テフロン樹脂台に固定し、Imaging CoilにBird Cage型(内径160mm, GE)を用い、パルス系列spin echo(SE)法($TR=300-2000$ msec, $TE=20-90$ msec), slice幅1.2mm, FOV 56.02mm/256dotsの条件で、Proton密度, T_1 , T_2 強調画像を得た。また組織学的検索は既報^{6,7)}に従った。

Fig. 1a

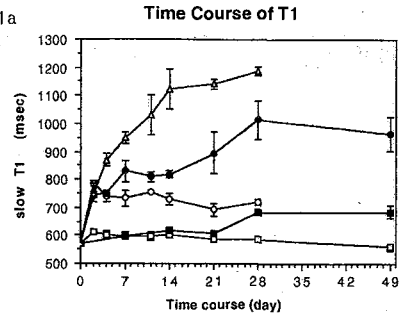
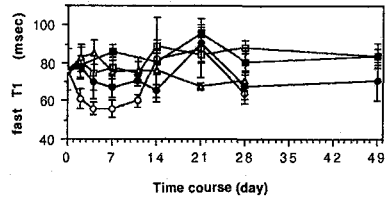


Fig. 1b



Time Course of T2

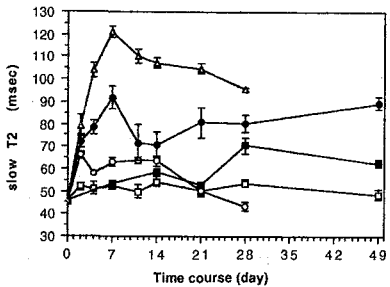


Fig. 1c

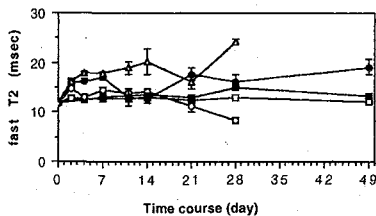


Fig. 1d

Time Course of Water%

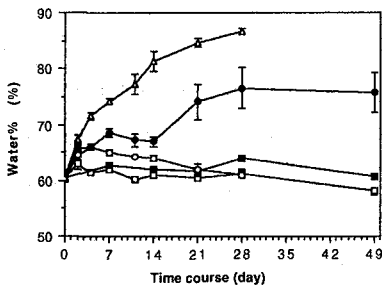


Fig. 1e

—□— CR
—■— DM
—○— 15 G
—●— 25 G
—△— 50 G

[結 果]

(1) 緩和時間による検討

T_1 (Fig.1a,1b), T_2 (Fig.1c,1d), 水分含有率(Fig.1e)の経時的変化を示す。 T_1, T_2 とも2つの成分が認められ、組織学的に液化変性の認められない初期、すなわち25%Gal群では2日目、DM群では1週目から緩和時間の長い成分(longT)に延長を認めた。またGal群ではこれらの緩和時間の延長はGalactose濃度に依存していた。さらにlong T_1 は白内障進展に平行して延長を示したが、long T_2 は早期に延長した後平衡状態もしくはやや低下傾向を示した。さらにこれらの変化はガラクトース濃度に依存していた。一方短い成分(shortT)に関しては各群で有意な経時的変化はなかった。

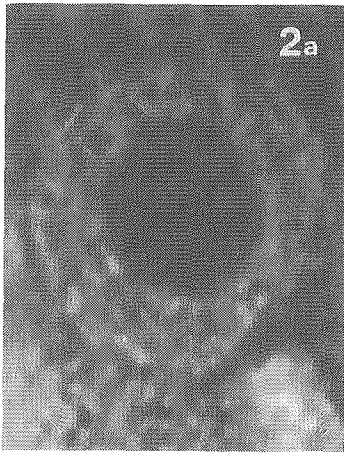


Fig. 2a

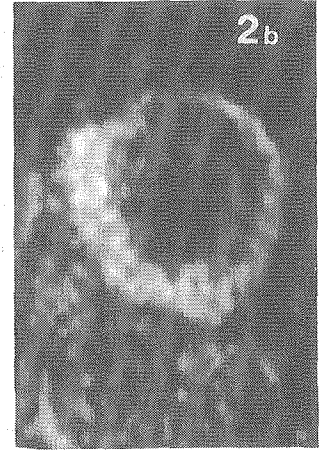
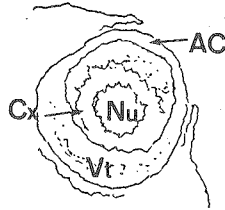
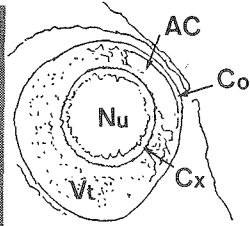


Fig. 2b

(2)MRIによる解析

正常群とDM群のProton密度強調画像をそれぞれFig.2a,2bに示す。正常群では水晶体は周囲の硝子体(Vt)から明らかに区別され、水晶体の皮質(Cx)と核(Nu)の境界は段階的に移行していた。一方DM群7週目では水晶体皮質領域の緩和時間の延長に基くHigh-intensity area(Cx)が出現しており、硝子体(Vt)との境界が不鮮明となっていた。また皮質の液化変性により浮遊状態になった水晶体核(Nu)が、液化部分と区別されて水晶体内でやや下方に偏位した像を示した。(Cx:水晶体皮質, Nu:水晶体核, Vt:硝子体, AC:前房, Co:角膜)

(3)組織学的観察

Gal群の1週後(Fig.3a)では赤道部から前赤道部皮質に膨化液化が認められ、2週頃(3b)膨化部位は前・後皮質に向かって拡大し、3~4週(3c)では全周の皮質が液化し、核が浮遊した状態を示した。一方DM群は1週後では明らかな異常は認めなかったが、4週後には25%Gal群の1週後に、7週後になると25%Gal群の2~3週後に対応する所見を示した。

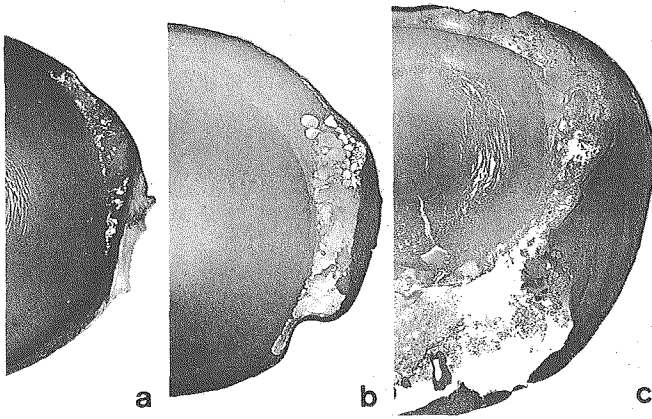


Fig. 3

[考 察]

ラット糖白内障の発症理論であるPolyol-Osmotic説^{9, 7)}では(Fig.4), ARの働きで徐々に水晶体線維中に蓄積した糖アルコールは、浸透圧差により水を吸引して水晶体線維の膨化・液化を引き起こす。これらは二次的にタンパク変性をきたし、水晶体が混濁する。糖アルコール蓄積に続く水変化をとらえ、その進行程度の定量化やAR阻害剤(ARI)のような抗白内障薬の効果をみるには、生体内の水情報が得られる⁸⁾MRIが適している。

これまでの水の緩和時間による解析では、水晶体皮質に自由水成分(longT₂), 核に結合水成分(shortT₂)が多く含まれることがわかっている。今回のデータでは、組織学的な混濁の出現前である初期の水晶体皮質における自由水増加に対応して、自由水成分(longT₂)が著明に延長した。つまり白内障の進行に伴い水晶体内の自由水が増加し、それによりタンパクの高次構造が破壊されるため混濁が出現すると考えられる。またMRIでは、Fig.2b, 2cに示すDM, Gal群のProton密度強調画像, さらにT₂強調画像においても水晶体皮質にHigh intensity areaが出現していた。すなわちこれは、組織学的所見としての皮質における水晶体線維の膨化・液化に対応し、*in vitro*でのlongT₂の延長と一致している。これらの事実は、MRIが水晶体の代謝の局在性、膜機能を反映する水の動き、白内障発症時の代謝動態などを生きたままの状態 で把握し、さらにARIなどの抗白内障薬の効果判定に使用しうることを示したといえる。

[ま と め]

ラット糖白内障の水構造変化が、Proton密度や緩和時間の変化、さらには*in vivo* MRIのContrast変化に反映された。

[文 献]

- 1) Racz, P. et al.: Exp. Eye Res. 36:663-669, 1983.
- 2) Lerman, S. et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 23:218-226, 1982.
- 3) Williams, T.R. et al.: Ophthalmic Res. 22:89-94, 1990.
- 4) Ahn, C.B. et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30:1612-1617, 1989.
- 5) Kinoshita, J.H.: Invest. Ophthalmol. 4:786-799, 1965.
- 6) 森 和彦・他: 眼紀 40: 2890-2895, 1989.
- 7) 赤木好男・他: 眼紀 40: 1698-1703, 1989.
- 8) Stankeiwicz, P.J. et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30:2361-2369, 1989.

〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465

京都府立医科大学眼科学教室 (TEL 075-251-5578)

森 和彦

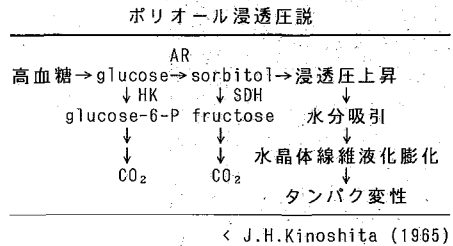


Fig. 4

P33

○吉田 充、杉浦俊彦*、馬越 淳**、小野祐幸*

(農業環境技術研究所、*果樹試験場、**農業生物資源研究所)

Change in water relaxation time in flower buds of peach at breaking of dormancy

M. Yoshida, T. Sugiura*, J. Magoshi** and S. Ono*

National Institute of Agro-Environmental Sciences, *Fruit Tree Research Station,

**National Institute of Agrobiological Resources

T_1 of water protons in flower buds of peach was measured from December to March. Two water components with different T_1 were detected in the buds. When the rest of the buds was broken in early February, the T_1 of the major water component increased a little. At breaking of the imposed dormancy in late February, the T_1 increased markedly as well as water content of the buds. This T_1 change is considered to become an indicator for the breaking of imposed dormancy. Moreover, physiological change of the buds for flowering can be monitored by the T_1 change.

1. 目的

落葉果樹の花芽は秋から冬にかけて休眠状態にあり、この時期には気温が上昇しても開花できない。しかし一定の期間の低温期を過ぎると気温が上昇すれば開花できる状態になる。気温が上昇しても開花できない休眠状態を自発休眠と呼び、気温が上昇すればいつでも開花できる状態の休眠を他発休眠と呼ぶ。冬から早春にかけては花芽の形態変化はみられないが、細胞中では自発休眠覚醒 - 他発休眠覚醒 - 開花準備という重要な生理変化が起こっているのである。休眠からの覚醒の時期は、植物生理学上興味深い時期であるばかりでなく、農業の現場においても大きな意味を持つ。すなわち休眠覚醒の時期を知ること、樹液の流動状態を知り、その後の芽の成長過程に適した施肥などの栽培管理を行うために必要なことであり、また開花予測にも重要である。そこで休眠覚醒期における花芽の水分状態の変化を知り、休眠覚醒の時期を容易に推定するための指標を得ることを目的としてこの研究を行った。

2. 試料及び方法

茨城県つくば市の果樹試験場内の圃場で栽培されているモモ(品種「白鳳」)の新梢を1989年12月5日から1990年3月26日(満開の9日前)まで毎月2回10本ずつ先端より30~40cm採取した。採取した枝は3組に分け3反復とし、各組から25個ずつ(ただし2月26日は20個、3月8日は15個、3月26日は3個ずつ)花芽をもぎとり、10mmφのNMR試料管に入れ、JEOL FX

-90Q装置を用いて inversion recovery法で水のプロトンの T_1 の測定を行った。測定周波数幅を4500Hzとし、繰り返し時間を3~5秒、各スペクトルの積算回数は4回とした。各試料について20点のデータをサンプリングし、一つの試料の測定に要した時間は約10分であった。得られた緩和曲線からシンプレックスを用いた非線形最小自乗法により、緩和時間の異なる水の各成分の存在割合とその T_1 の値とを求めた¹⁾。

花芽の一部を採取した枝は、水に挿し、20℃の恒温室に60日間置いて花芽の開花を調べた。開花率は、枝の総数10本に対する花芽が開花した枝の数の%として表した。

花芽の水分含量は、花芽の新鮮重と80℃で2週間乾燥させた後の乾物重との差から求めた。不凍水量は示差走査熱量(DSC)測定によって求めた。

3. 結果及び考察

2月5日以降に採取した枝が開花率100%となったため、1月24日から2月5日の間でモモの花芽は完全に自発休眠から覚醒したと判断できる(図1)。

花芽の含水率は、12月5日以降自発休眠が明けるまで緩やかに上昇し、自発休眠が完全に明けた頃にその上昇の度合いがやや増加し、その後急激な上昇がみられた(図2)。この含水率の変化から、2月5日と2月26日の間で他発休眠が明け、花芽に大きな生理変化が生じ、開花準備の一段階として枝からの吸水が盛んになったと推測される。

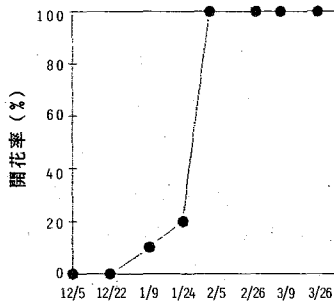


図-1 開花率からみたモモ花芽の自発休眠覚醒度

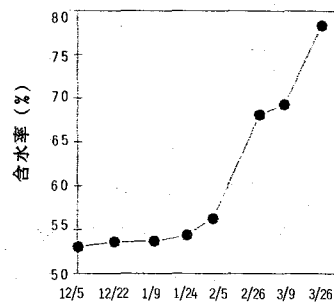


図-2 モモ花芽の含水率の変化

花芽中には T_1 の長さの異なる二種類の水が検出された。自発休眠からの覚醒が始まる頃に水の主成分(長い T_1 を持つ水)の T_1 の緩やかな上昇がみられ、他発休眠から覚醒したとみられる頃にその T_1 は急激に長くなった(図3)。一方、水の副成分(短い T_1 を持つ水)の T_1 は自発休眠の明けきる少し前から上昇し始め、他発休眠明け後もほぼ同じ速度で上昇を続けた(図3)。水の主成分の T_1 の変化パターンは花芽の含水率の変化とかなり一致し、 T_1 の増加の原因は水分含量の増加に伴う細胞質中の水の粘度の低下である可能性が高い。

T_1 の長い水と短い水の割合については、自発休眠の明ける前から徐々に T_1 の長い水の割合の減少が見られ、開花直前の3月26日にその割合が急激に低下した(図4)。一般的に植

物細胞においては、 T_1 の長い水は細胞質中の水、 T_1 の短い水は細胞壁結合水であると考えられているが、冬から春にかけてのこの二種類の水の割合の変化から考えると、モモの花芽においてはこの帰属は妥当なものとは言い難い。 T_1 の長い水を液胞中の水、 T_1 の短い水を細胞質の水とする説もあるが、やはり開花直前の各々の割合の急激な変化からみると説得力に欠ける。モモの花芽において、 T_1 の長い水、短い水が具体的に細胞のどこに存在する水であるかは未だ明らかではない。

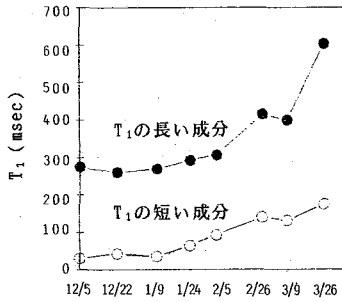


図-3 モモ花芽の水のプロトンの T_1 変化

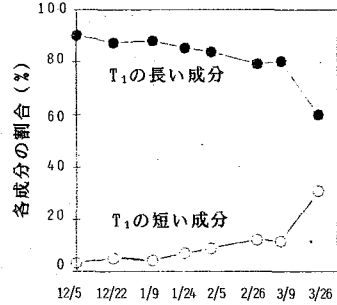


図-4 モモ花芽中の水の各成分の割合の変化

花芽の乾物重当たりの不凍水量は他発休眠明けとともに上昇し、含水率や水の主成分の T_1 と同じような変化パターンが見られた(図5)。このことから、他発休眠明け後の吸水期には細胞中の自由水のみでなく結合水も増加している、すなわち生体成分の水和が起こっていることがわかる。しかし一方、花芽の全水量に対する不凍水の割合は、春になるに従って徐々に減少し(図6)、 T_1 の変化との間には、はっきりした相関はみられなかった。また T_1 の短い水の割合の変化との間にも相関は見られず、 T_1 の短い水が不凍水=結合水であるという説はこの結果からも否定される。DSC測定で検出された不凍水とNMRで検出された水とは細胞内の異なった compartment に存在するものと考えられる。

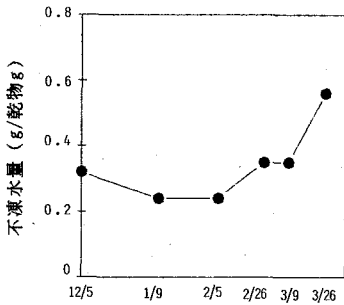


図-5 モモ花芽の乾物重当たりの不凍水の量変化

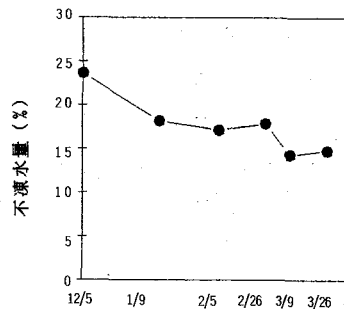


図-6 モモ花芽の全水量に占める不凍水の割合の変化

測定前5日間の平均気温は波うちながらも1月29日まで下降を続け、それ以後上昇した(図7)。花芽が自発休眠から完全に覚醒したのは平均気温が最低を示す1月24日と2月5日の間である。その後2月10日から2月28日までの季節はずれの異常な気温の上昇のおかげで他発休眠もここで明けたと推測され、花芽は吸水を開始し、含水率が高まり、水の主成分の T_1 の急激な上昇が観測されるようになったと考えられる。しかし3月1日から3月12日の間で一時気温の下がった時期があり、このため花芽の生理変化がここで一時止まったと思われる、それが含水率や不凍水量や T_1 の変化のグラフ上に「肩」となって現れている(図2,3,4,5)。これ以降3月26日まで気温はほぼ順調に上昇し、それに伴い花芽の開花へ向けての生理変化も再開したことが含水率や T_1 の上昇から推測できる。

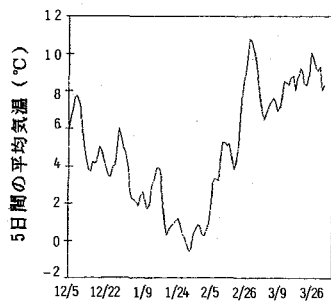


図-7 12月から3月にかけての5日間の平均気温の変化

4. 結論

- ① 自発休眠からの覚醒時期は、花芽の含水率の変化からおおよそ予測可能であるが、この時期において水の T_1 の大きな変化はみられず、水の T_1 の変化から自発休眠明けを予測することは難しい。
- ② 他発休眠が明けた結果生ずる開花へ向けての劇的な花芽の生理変化は、含水率のみならず水の主成分の T_1 に反映され、他発休眠明けを T_1 の上昇より予測することは可能である。
- ③ 他発休眠から覚醒した後の開花に向けた花芽の生理変化の進行の度合いも、含水率や水の主成分の T_1 の変化から推測できる。
- ④ NMRにより検出された花芽中の T_1 の長い水、及び T_1 の短い水が具体的に花芽のどこに存在する水であるかは明らかではない。ただし T_1 の短い水を結合水とみなすことはできない。

5. 参考文献

- 1) M. Yoshida and K. Nose, Agric. Biol. Chem. 51, 3399-3401 (1987).

P34

固体高分解能 NMR におけるシフト基準の高精度測定

(I) ^{13}C 、 ^{29}Si 、 ^1H 核

(化技研) 〇林 繁 信・早水 紀久子

Chemical Shift Standards in High-Resolution Solid-State NMR

(1) ^{13}C , ^{29}Si , and ^1H Nuclei

Shigenobu HAYASHI and Kikuko HAYAMIZU

(National Chemical Laboratory for Industry)

The ^{13}C , ^{29}Si , and ^1H NMR spectra of the first shift-standard material, pure tetramethylsilane, have been measured with very high resolution by spinning the liquid sample at the magic angle. The effect of the bulk magnetic susceptibility on the chemical shift in the magic-angle-spinning (MAS) experiment has been checked for pure benzene by use of various types of sample containers, and no effect is observed when the liquid sample is spun at the magic angle. The chemical shifts of several second shift-standard materials in ^{13}C , ^{29}Si , and ^1H NMR have been determined precisely.

化学シフトは基準物質からの共鳴周波数のずれとして表現される。例えば、 ^{13}C 、 ^{29}Si 、 ^1H 核の溶液の NMR では少量のテトラメチルシラン (TMS) を溶解してそのシグナルを 0 ppm としている。一方、固体の NMR では通常外部基準方式を用いており、体積磁化率の効果に注意する必要がある。我々は以前に¹⁾固体高分解能 NMR で用いることのできる 2 次基準物質の化学シフト値を測定し報告した。このときは、TMS のスペクトルが高分解能で測定できず共鳴周波数を TMS と直接比較することができなかつた。このため、異なる 2 次基準を用いて測定した文献間での比較ができるという段階にとどまっていた。また、体積磁化率の影響についてはあえて検討しなかつた。

固体高分解能 NMR においていくら試料の線幅が狭くできても、基準物質が高分解能で測定できなければ化学シフト値を正確に測ることができない。そこで、本研究では、TMS の ^{13}C 、 ^{29}Si 、 ^1H 核のスペクトルを高分解能で測定することを第 1 目的とした。シム調整によって磁場の均一性をあげるとともに、液体試料をマジック角回転することにより、半値幅 0.010 ppm 以下の高い分解能を得ることができた。TMS を高分解能で測定できたことにより、2 次基準物質の化学シフトを高精度で決めることができた。さらに、球形及び円筒状の試料管を用いて MAS NMR 測定時における体積磁化率の影響を調べた。

【実験】 試料は市販のものをそのまま用いた。

NMR 測定はブルカー-MSL 400 を用いた。測定周波数は、 ^{13}C 100.614 MHz、 ^{29}Si 79.496 MHz、 ^1H 400.136 MHz である。ローターの内側にすっぽり入り密閉することのでき

る円筒型の容器を試作し、液体試料の回転に用いた。液体試料の場合は、0.5~1.0 kHzで回転させた。固体試料の場合は、3~4 kHzで回転させた。また、球形部分が先端についた市販のNMR試料管の球形部分を球形の試料容器として用いた。磁場のドリフトは一日当たり0.006 ppm以下であり、基準物質のシフト位置は常時チェックした。シムは液体試料を回転させながら半値幅0.010 ppm以下に調整した。化学シフト値は、回転させて測定したTMS（純粋）を0 ppmとして外部基準法により決め、高周波数側を正として表わした。試料交換にともなうプローブヘッドの出し入れは不要であるため、試料交換にともなう誤差は無視し得る。また、分解能が高いため、デジタル分解能にも注意した。

【結果及び考察】

1. 体積磁化率の影響 球形の試料及び円筒型の試料について体積磁化率の影響を実験的に調べた。試料として、ベンゼン（純粋）を用い、 ^{13}C 、 ^1H 核の測定を行なった。Table 1に結果をまとめた。球形の試料の場合は体積磁化率の影響はない。ただし、試料を静止状態においているため、磁場の不均一性による線幅が ^{13}C では0.2 ppmほどあった。円筒型試料をマジック角回転した場合、非常に高い分解能が得られ、しかも、シグナル位置は実験誤差範囲内で球形試料と一致している。また、円筒型試料を静止した場合もシグナル位置は変化しない。以上のことから、MAS NMRのプローブヘッドにおいては体積磁化率の影響を無視し得ると結論づけることができる。

2. ^{13}C Figure 1にTMS（純粋）のスペクトルを示した。試料を回転させることにより、固体のプローブで液体NMRに匹敵する分解能が得られた。デカップルしたスペクトル（Fig.1A）の線幅は0.008 ppmである。一方、カップルススペクトル（Fig.1B）には長距離スピン結合も観測される。このTMSのシグナル位置を基準として、2次基準物質としてよく用いられている化合物の化学シフトを測定した。得られた結果をTable 2にまとめた。

3. ^{29}Si ^{13}C の場合と同じようにマジック角回転させることにより、TMSの高分解能スペクトルを得ることができた（Fig.2）。また、TMSを基準とした2次基準物質の化学シフト値をTable 3にまとめた。表中、TSPA-d₄、TSPA、DSSは3-(trimethylsilyl) propionic-d₄ acid sodium salt、3-(trimethylsilyl)propionic acid sodium salt、3-(trimethylsilyl)propanesulfonic acid sodium saltの略号である。この3種の化合物は高分解能でスペクトルを測定するとFig.3に示すように微細構造を持っている。Table 3には主なピークの化学シフト値と人為的に広幅化して得た平均値とを示した。

4. ^1H 固体中の ^1H の場合はMASのみで高分解能が得られるケースが限られており、CRAMPSの使用が望まれる。しかし、CRAMPSの場合スケールリングファクターの

Table 1. Chemical shifts of pure benzene of various shapes^{a)}

| Nucleus | Shape | Mode | $\delta^b)$ /ppm | FWHM ^{c)} /ppm |
|-----------------|----------|--------|---------------------|----------------------------|
| ¹³ C | Cylinder | MAS | 128.475 (0.005) | 0.006 |
| | Sphere | Static | 128.45 (0.05) | 0.19 |
| | Cylinder | Static | 128.51 (0.05) | 0.22 |
| ¹ H | Cylinder | MAS | 6.771 (0.005) | 0.011 |
| | Sphere | Static | 6.76 (0.02) | 0.050 |
| | Cylinder | Static | 6.78 (0.03) | 0.22 |

a) Chemical shifts are expressed with respect to TMS spinning at the magic angle.

b) Numbers in the parentheses are experimental errors.

c) Full width at half maximum.

Table 2. ¹³C chemical shifts a)

| Compounds | $\delta^b)$ / ppm | FWHM ^{c)} / ppm |
|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| [Liquid, pure] Tetramethylsilane | 0 | 0.008 |
| Benzene | 128.475 (0.005) | 0.006 |
| Chloroform | 77.966 (0.005) | 0.020 |
| [Solid] Adamantane | 38.520 (0.005) 29.472 (0.004) | 0.050 0.049 |
| Glycine | 176.46 (0.02) 43.67 (0.01) | 0.40 0.90 |
| Hexamethylbenzene | 132.07 (0.04) 17.17 (0.02) | 0.83 0.80 |
| Tetrakis(trimethylsilyl)silane | 3.517 (0.005) | 0.077 |
| Silicone rubber | d) 1.422 (0.004) e) 1.412 (0.004) | 0.030 0.030 |

a) Samples are spinning at the magic angle.

b) Numbers in the parentheses are experimental errors.

c) Full width at half maximum.

d) $\nu_r \approx 1.0$ kHz. e) $\nu_r \approx 2.5$ kHz.

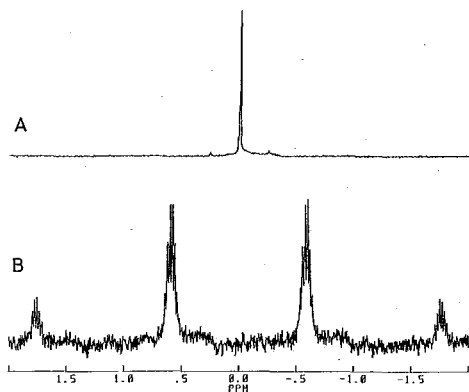


Fig. 1. ¹³C MAS NMR spectra of pure tetramethylsilane (A) with ¹H decoupling and (B) without decoupling. The resonance frequency is 100.614 MHz.

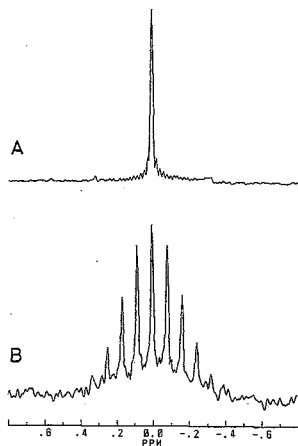


Fig. 2. ²⁹Si MAS NMR spectra of pure tetramethylsilane (A) with ¹H decoupling and (B) without decoupling. The resonance frequency is 79.496 MHz.

Table 3. ²⁹Si chemical shifts a)

| Compounds | $\delta^b)$ / ppm | FWHM ^{c)} / ppm |
|----------------------------------|--|-----------------------------|
| [Liquid, pure] Tetramethylsilane | 0 | 0.008 |
| Hexamethyldisiloxane | 6.879 (0.004) | 0.011 |
| [Solid] TSPA-d ₄ d) | 1.669 (0.022) 1.445 (0.012) av. 1.50 (0.03) | 0.17 0.16 |
| TSPA d) | 1.682 (0.022) 1.459 (0.012) 1.158 (0.022) av. 1.50 (0.03) | 0.24 0.17 0.28 |
| DSS d) | 1.534 (0.012) av. 1.46 (0.03) | 0.22 |
| Hexamethylcyclotrisiloxane | -9.66 (0.05) | 1.0 |
| Tetrakis(trimethylsilyl)silane | -9.843 (0.006) -135.402 (0.007) | 0.040 0.059 |
| Silicone rubber | e) -22.319 (0.005) f) -22.333 (0.008) | 0.030 0.031 |

a) Samples are spinning at the magic angle.

b) Numbers in the parentheses are experimental errors.

c) Full width at half maximum.

d) Shift values of main peaks are listed. Average values indicated by av. are determined by artificial broadening.

e) $\nu_r \approx 1.0$ kHz. f) $\nu_r \approx 2.0$ kHz.

問題があり、化学シフトを一つのスペクトルから直接求めるのは困難である。ここでは、その前段階として、MASのみで線幅の尖鋭化が起きるものを選んで、TMSを基準とした化学シフト値を求めた。結果をTable 4に示した。

【文献】 1) S. Hayashi and K. Hayamizu, Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 2429 (1989).

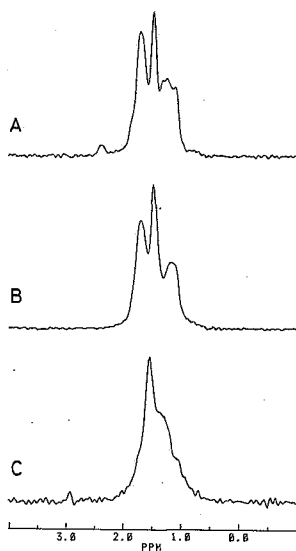


Fig. 3. ^{29}Si CP/MAS NMR spectra of (A) TSPA- d_4 , (B) TSPA, and (C) DSS, measured at $\nu_0 = 79.496$ MHz.

Table 4. ^1H chemical shifts a)

| Compounds | δ b) / ppm | FWHM(c) / ppm |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| [Liquid, pure] Tetramethylsilane | 0 | 0.012 |
| Benzene | 6.771 (0.005) | 0.011 |
| Chloroform | 7.392 (0.005) | 0.006 |
| Cyclohexane | 1.482 (0.005) | 0.014 |
| Water | 4.877 (0.005) | 0.024 |
| [Solid] Adamantane | 1.85 (0.15) | 2.5 ^d |
| d-Camphor | 1.1 (0.1) | 2.7 ^d |
| Tetrakis(trimethylsilyl)silane | 0.249 (0.010) | 0.80 ^d |
| Silicone rubber | e) 0.123 (0.003) f) 0.119 (0.003) | 0.048 0.047 |

a) Samples are spinning at the magic angle.

b) Numbers in the parentheses are experimental errors.

c) Full width at half maximum.

d) The linewidth depends on the spinning rate. The listed values were obtained at $\nu_r = 4.04, 3.59,$ and 4.01 kHz for adamantane, d-camphor, and tetrakis(trimethylsilyl)silane, respectively.

e) $\nu_r \approx 1.0$ kHz. f) $\nu_r \approx 2.5$ kHz.

Hydrogen Bond Length and ^{15}N NMR Chemical Shift of the Glycine Residue of Some Oligopeptides in the Solid State
Shigeki Kuroki, Naoki Asakawa, Shinji Ando, Hiromichi Kurosu, Isao Ando, (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152), Akira Shoji, Takuo Ozaki, (Department of Biological Sciences, Gunma University, Kiryushi, Gunma 376)
 ^{15}N CP-MAS and CP-static NMR spectra of a variety of solid oligopeptides containing glycine residue were measured. It was found that the isotropic ^{15}N chemical shifts move downfield with a decrease of the hydrogen bond length ($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$), and that the principal value of σ_{33} moves linearly downfield with a decrease of $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$. Further, the ^{15}N chemical shift calculation was carried out using a peptide model compound by the FPT-INDO method, in order to understand 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 が用いられてきた¹⁾。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 0.37% 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。すでに昨年の本討論会において、 ^{15}N 化学シフトが水素結合に関する情報を含んでいることは明らかにした³⁾。本研究ではさらに深く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するために、 ^{15}N エンリッチサンプルを調製し等方平均化学シフトのみならず、化学シフトテンソルのそれぞれの主値に対しても考察を行った。

2. 実験

1) 試料

試料として、tert-ブトキシカルボニル (Boc) グリシンシーケンスをもつオリゴペプチドを活性エステル法で合成した。その際にグリシン残基を ^{15}N で 10% エンリッチした。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。

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(27.25MHz)を用い、室温で測定を行った。コンタクトタイムは5ms、繰り返し時間は10sである。積算回数は100~2000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11.59ppmとして、 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ 水溶液基準に換算した。CP-MASスペクトルはシリンダー型ロータに試料を詰め、マジックアングルで4~5kHz回転させ測定した。パウダーパターンスペクトルは回転させずに測定した。

3. 結果と考察

BocGlyAlaの ^{15}N CP-MAS NMRスペクトルおよび ^{15}N パウダーパターンスペクトルをFigure 1に示した。Figure 2において等方平均化学シフト

σ_{110} 、および化学シフトテンソルの3つの主値(低磁場側から σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33})を水素結合距離 $\text{N}\cdots\text{O}$ ($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$)に対してプロットした。 $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ の減少に伴い、 ^{15}N 等方平均化学シフト σ_{110} が低磁場シフトしていることがわかる。また、それぞれの化学シフトテンソルの主値は σ_{11} および σ_{22} は水素結合距離との間に明確な相関は得られていないが、 σ_{33} が水素結合距離の減少にともない直線的に低磁場シフトしていることがわかる。したがって、 σ_{110} の水素結合距離依存はおもに σ_{33} の変化によって起こっていることがわかる。

FPT-INDO法をもちいて、N-アセチル-N'メチル

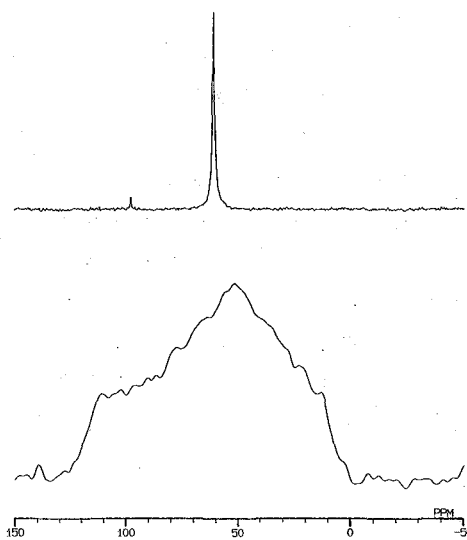


Figure 1 27.25MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectrum(a) and ^{15}N powder pattern spectrum(b) of BocGlyAla in the solid state.

グリシンアミドをモデルとして、水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ を変化させて化学シフトを計算した。その結果をそれぞれ Figure 3 に示す。計算結果は遮蔽定数なので、絶対値が大きい方が低磁場側である。 $R_{N\cdots O}$ の減少に伴い σ_{iso} 、 σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} すべてが低磁場シフトしていることがわかる。この結果は σ_{iso} および σ_{33} に関する実験結果を再現しているが、 σ_{11} および σ_{22} の結果をうまく説明していない。つまり、水素結合距離を変化させたモデルだけでは、実際の系をうまく再現していないことがわかる。したがって、次に水素結合距離を固定し、水素結合の角度 $\angle N-H\cdots O$ を変化させて、化学シフトを計算した。その結果を Figure 4 に示す。水素結合角度の変化の影響を σ_{11} と σ_{22} が大きく受け、 σ_{33} はあまり影響を受けていないことがわかる。これにより、 σ_{33} が水素結合距離のみの影響を受け、水素結合角の影響を受けないことが理論計算から証明された。したがって、最大遮蔽軸方向のテンソルの主値である σ_{33} を測定することにより、水素結合距離に対する情報をダイレクトに得ることができることがわかった。

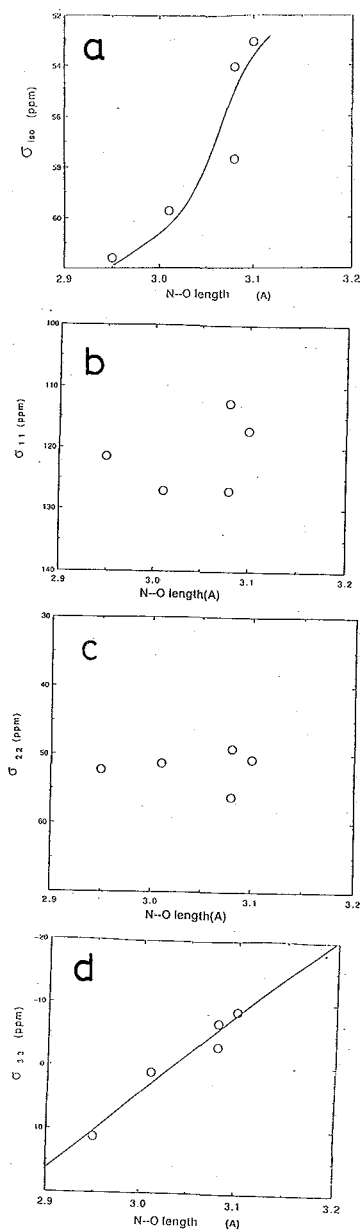


Figure 2 Plots of the observed chemical shift (a) σ_{iso} , (b) σ_{11} , (c) σ_{22} and (d) σ_{33} against the $R_{N\cdots O}$.

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) Kuroki, S, et al., J. Mol. Struct. in press.

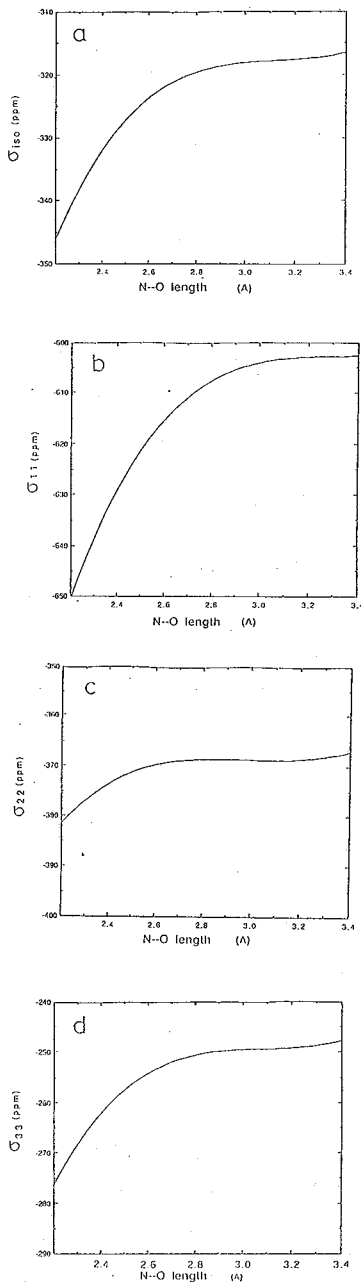


Figure 3 Variation of the calculated ^{15}N shielding constant and its tensor components with the $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$. (a) σ_{iso} . (b) σ_{11} . (c) σ_{22} and (d) σ_{33} .

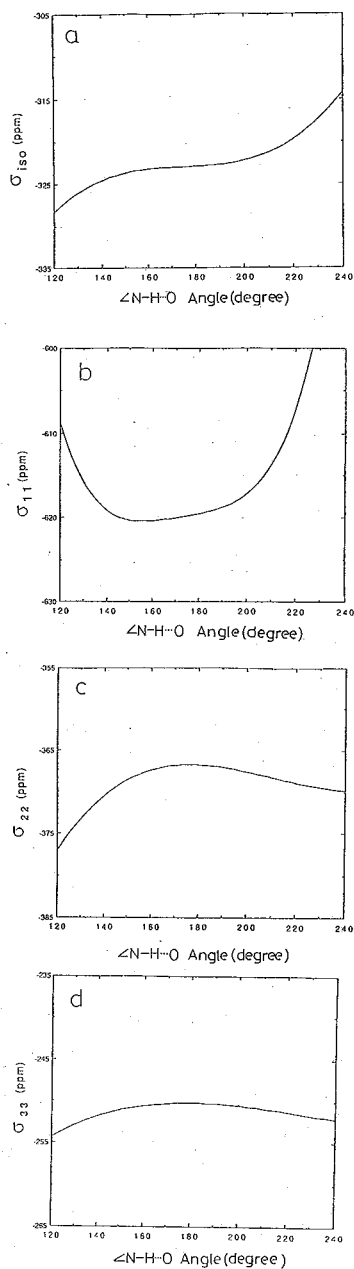


Figure 4 Variation of the calculated ^{15}N shielding constant and its tensor components with the hydrogen bond angle $\angle\text{N-H}\cdots\text{O}$. (a) σ_{iso} . (b) σ_{11} . (c) σ_{22} and (d) σ_{33} .

P36

(日本電子) ○田中良二, 出口健三, 藤戸輝昭

Temperature calibration using ^{35}Cl NQR in KClO_3 for VTMAS NMR

(JEOL Ltd) Ryoji Tanaka, Kenzo Deguchi, Teruaki Fujito

We propose a new technique of temperature calibration for variable temperature magic-angle spinning (VTMAS) NMR. This technique using ^{35}Cl NQR in KClO_3 under zero field, shows high accuracy temperature calibration over wide range. We obtained temperature calibration curve (spinning gas temperature vs sample temperature) and temperature distribution in a sample tube by this technique.

1. はじめに

MASを使った温度可変測定では、多くの場合、試料管に吹きつける気体の温度を測定し温度コントローラーの表示温度としている。この表示温度は、試料管付近での気体の膨張、熱リークなどにより実際の試料温度とは異なる¹⁾ので、あらかじめ表示温度から試料温度を求める校正曲線を測定しておく必要がある。校正曲線を測定するために試料温度をはかる方法としては、(1) 酢酸サマリウム²⁾の常磁性シフトの温度依存性を利用した方法²⁾、(2) エチレングリコールの2本のピークの化学シフト差の温度依存性を利用した方法³⁾などが使われてきた。我々は今まで(1)の方法を使って温度校正してきたが、化学シフトの温度変化量が小さい、信号強度が弱いなどの理由から高精度で試料温度を決定するのは困難だった。一方、 KClO_3 の ^{35}Cl -NQRにおいて温度と共鳴周波数の詳細な関係が知られており、その温度依存性は精密温度計として研究されてきた⁴⁾。

我々はNQRの測定がNMR装置でできることに着目し、 KClO_3 の ^{35}Cl -NQR共鳴周波数の温度依存性を使って温度校正をおこなった。(以下NQR法と略す) NQR法は、化学シフトの温度依存性を使った方法に比べ共鳴周波数の温度変化量が大きく比較的鋭い信号が得られるので高い精度で温度を決定することができる。広い温度範囲を同一の方法で連続的に測定できるという利点がある。また従来、測定が難しかった試料管内部の温度分布についてもNQR法を使うことによって情報を得ることができた。

2. 実験と結果

実験には JEOL JNM-ESH270固体高分解能NMR装置を使用した。測定に用いたプローブは270NB-VTMASで、試料管は外径6φのジルコニア製である。NQRの測定手順は無磁場で測定す

たなかりょうじ, でぐちけんぞう, ふじとてるあき

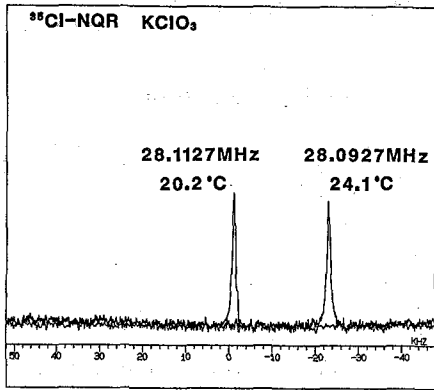


図1. KClO_3 の ^{35}Cl -NQRスペクトル

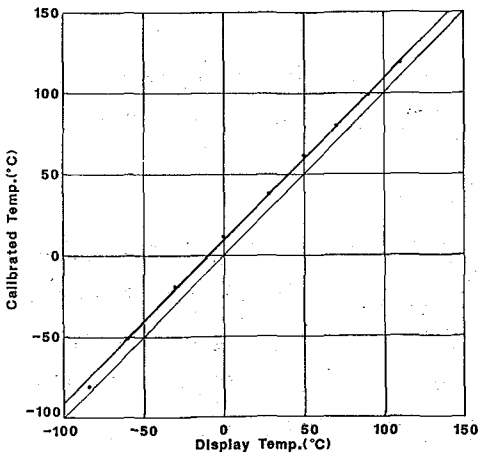


図2. 表示温度の較正 (回転数5.8kHz)

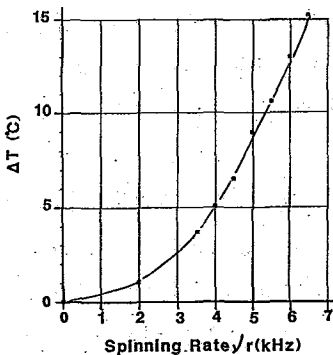


図3. 回転による試料温度の上昇

参考文献

- 1) J.F.Haw, G.C.Campbell and R.C.Crosby, *Anal. Chem.*, 58, 3172 (1986).
- 2) G.C.Campbell, R.C.Crosby and J.F.Haw, *J. Magn. Reson.*, 69, 191 (1986).
- 3) A.D.English, *J. Magn. Reson.*, 57, 491 (1984).
- 4) G.B.Benedek and T. Kushida, *Rev. Sci. Inst.*, 28, 92 (1957).

ること以外は通常のNMRの場合と同じである。ただし磁場によるブロードニングを防ぐために試料空間を1 gauss以下にする必要がある。測定にはシングルパルスを用いた。

図1は KClO_3 の室温のNQRスペクトルである。温度が低いほど共鳴周波数は高くなり、その変化率は室温付近で約5.2kHz/°Cである。共鳴周波数と温度の換算は多項式で与えられていて、ピークの周波数から試料温度を計算した。 KClO_3 に温度分布がなければ、容易に0.1°C以下の精度で温度を決定できる。

上記の方法でコントローラーの表示温度と試料温度の関係を示したのが図2である。表示温度が室温に近い時、試料温度は表示温度より、ほぼ一定の値だけ高いことがわかる。この温度差は主として回転による摩擦熱だと考えられる。

図3は室温測定での試料管の回転数と試料温度の関係である。横軸は回転数、縦軸は試料温度の室温からの上昇分 ΔT である。回転数が増えると温度上昇も大きくなるので、特に高速回転時には試料温度に注意を要する。

また、試料管内の温度分布を調べるために試料管の一部に KClO_3 を詰めて測定をおこなった。その結果、室温の測定では試料管内部のラジアル方向に1~2°Cの温度分布があることがわかった。

NQR法での較正值と他の方法での値との比較もおこなう。

P37

固体高分解能 ^{13}C -NMRによる

微生物産生ポリエステル共重合体の構造解析

(東工大生命理工)° 神谷尚子、櫻井実、井上義夫、中條利一郎

(東工大資源研) 土肥義治

A Study of Cocrystallization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Solid-State High-Resolution ^{13}C NMR Spectroscopy

Naoko Kamiya, Minoru Sakurai, Yoshio Inoue, Riichirō Chūjō and Yoshiharu Doi*
Dep. of Biomolecular Engineering and *Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Inst. of Tech.

In the system of 3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate copolymers (P(3HB-3HV)) two kinds of comonomer units should crystallize together in the crystalline lattices which are analogous to those of the parent polymers. The partitioning of comonomer units in P(3HB-3HV) is determined by high-resolution solid-state NMR spectroscopy. A theory of isomorphism of A-B random copolymers is formulated and a phase diagram is proposed. The experimental data on P(3HB-3HV) are analyzed using the equations formulated here. The melting points vs. composition curve of P(3HB-3HV) copolymers is consistent with the proposed diagram.

1. はじめに

ランダム共重合体の結晶相は、その共重合成分をすべて含む可能性がある。これは共重合体の共結晶化、すなわち、isomorphismである。共重合体の固体物性は、当然、その結晶成分に大きく依存するので、結晶中の組成比の決定は重要である。しかし、共結晶化や isomorphism現象に関しては、これまで定量的な観測はほとんど報告されていない¹⁻⁴。また、その報告例は、共重合組成比が数%以内場合にのみ注目しており、共重合組成比が0から1まで広範囲にわたる挙動を考察しているものは見られない。本研究では isomorphism現象を示す⁵といわれている3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシバリレートの共重合体(P(3HB-3HV))において、HVモル分率0.00から0.93までの結晶中の組成比を求める。このような、結晶相のみ、あるいは、非晶相のみというような物理的に異なる領域の組成比を別々に観測するには固体高分解能NMRが有力である。さらに、求めた組成比を共結晶化の自由エネルギーを考慮した理論により解析する。これにより共重合体の共結晶化を定量的に評価するための一方法を示す。

2. 共重合体結晶の組成に関する熱力学

Aホモポリマーと同じ結晶格子を持つAB共重合体について考えることにする。共重合体の融解の自由エネルギーは、ホモポリマーのそれと、隣接した2モノマー間の相互作用による自由エネルギー変化、配列のエントロピーを考慮して求める。2モノマー間の相互作用は、AAの融解の自由エネルギー(ΔG_a°)(Aホモポリマーの値を用いる。)に対する、AB、BBの相互作用によるモルあたりの融解の自由エネルギー変化をそれぞれ α 、 β とする。融液のBのモル分率を x_B 、その融液から形成される結晶中のそれを x_c とし、A、

B 両成分の 1 モノマーあたりのセグメント数と体積は等しいとすると、このときの融解の自由エネルギーは、

$$\Delta G^A = \Delta G_A^0 - 2 \alpha x_0 (1 - x_0) - \beta x_0^2 - RT \left[(1 - x_0) \ln \frac{1 - x_0}{1 - x_m} + x_0 \ln \frac{x_0}{x_m} \right] \quad (1)$$

で表せる。 ΔG_j^i は j の格子における成分 i の融解の自由エネルギーを表す。また、B 成分は格子の不純物であるので $\alpha, \beta \geq 0$ である。

相平衡を仮定した場合の $x_{0,q} (= x_0)$ と ΔG^A は

$$x_{0,q} = \frac{a x_m}{1 - x_m + a x_m} \quad a = \exp \frac{-2}{RT} [(1 - 2 x_{0,q}) \alpha + x_{0,q} \beta] \quad (2)$$

となる。 $\alpha = \beta = 0$ でない限り $0 < x_{0,q}$ となり、共重合体のいずれの結晶も二成分を含む、すなわち、isomorphism は必ず起こることがわかる。このとき融点は

$$\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_{m,A}} = \frac{R}{\Delta H_A} \left[\frac{(2 \alpha - \beta) x_{0,q}^2}{RT_m} - \ln(1 - x_m + a x_m) \right] \quad (3)$$

となる。ここで $T_m, T_{m,A}$ は、それぞれ、共重合体、A ホモポリマーの融点、 ΔH_A はホモポリマー A の融解熱とする。

相平衡時の共重合体の最安定結晶を考えるには少なくとも A の格子の他に B の格子も考慮しなくてはならない。この B 格子についても A 格子と同様な式が適用できる。A、B、両格子を考慮して (2)、(3) 式から A B 共重合体の相図を求めた。これを Fig. 1 に示す。

3. 実験

P(3HB) および H V モル分率 0.18 の P(3HB-3HV) (P(3HB-18%-HV)) は Aldrich 社より購入した。それ以外の試料は *A. eutrophus* H16 (ATCC17699 と NCIB11599) を用いて生合成した。NMR 測定に用いたサンプルは、熱履歴をなくするために高真空中、融点以上の温度で溶解後、急冷し、5 日以上放置した。270MHz¹H NMR 及び 67.9MHz¹³C 固体高分解能 NMR 測定は日本電子 (株) 製 GSX-270 を用いた。カープリゾリユーションは、NEW METHODS RESEARCH, INC のプログラム NMR 1 を用いた。

4. 固体高分解能 NMR による組成解析

P(3HB-3HV) の 67.9MHz¹³C CPMAS NMR スペクトルを測定した。このスペクトルの化学シフトが H V モル分率 0.00-0.32 のサンプルと 0.55-0.93 のサンプルで明らかに異なっていた。また、P(3HB-41%-3HV) では、これら二種類の化学シフト値の両方にそれぞれピークがみられた。P(3HB-3HV) の結晶格子は H V モル分率約 0.4 を境に変化することが X 線回折により知られている^{5,6}。化学シフト変化はこの結晶格子の変化^{5,6}であると考えられる。H V モル分率 0.00-0.41 のサンプルにみられる結晶格子を B 格子、H V モル分率 0.41-0.93 のサンプルにみられる結晶格子を V 格子と呼ぶことにする。

化学シフト差の大きい主鎖メチン部分の B 格子と V 格子のピークを B 格子結晶成分、V

格子結晶成分と、非晶部分にピークを波形分離した。HBユニットとHVユニットの結晶成分のCP効率が同じであると仮定して、ピーク面積比より結晶中の組成比を決定した。求めた x_0 をTable1に示す。その結果、どのサンプルにおいても、また、どの結晶においても二成分を含む共結晶化が観測され、B格子の結晶では $x_0 < x$ 、V格子の結晶では $x_0 > x$ となり、B格子にはHBユニット、V格子にはHVユニットが入りやすいことが示された。

5. 共結晶化理論の適用

P(3HB-3HV)で、その共重合体全体の組成を x とし、 $x_0 = x_{0q}$ 、 $x = x_m$ を仮定して融点の再現を試みた。このとき、P(3HV)の融点を108°Cとし、P(3HB)、P(3HV)の融解熱を、それぞれ、11kJ·mol⁻¹、10kJ·mol⁻¹とした。DSC測定で求めた融点の実測値はTable1に示す。

V格子については、 $x = 0.407$ と 0.554 のサンプルの T_m と x_0 、 x より、(2)式を用いて α 、 β を決定したところ、 $\alpha = 1.2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $\beta = 2.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ であった。これを(3)式に代入して T_m を求め、Fig.2に実線で示した。これによりV格子の T_m を再現することができた。このときの x_0 、 T_m の計算値もTable1に示す。一方、B格子では(2)式で求めた α と β では実測の融点にみられるような急激な降下を再現することができなかつた。これは $x_0 > x_{0q}$ であることが原因となって起こると考えられる。 $x_0 = x_{0q}$ と $x = x_m$ の仮定に無理がある場合、kineticな条件下で結晶化³、あるいは、 α 、 β に組成依存性がある場合にこのような現象が起こる。この結晶の融点を再現するために(2)式を書き換えて、実験式として

$$x_0 = \frac{a' x_m}{1 - x_m + a' x_m} \quad a' = \exp \frac{-2}{R T \kappa} [(1 - 2 x_0) \alpha + x_0 \beta] \quad (4)$$

とする。 κ は相平衡からのずれの程度を表すために導入されたパラメータである。 κ が大きくなるほど最近接相互作用の効果が小さくなる。HVモル分率0.316と0.407のサンプルの T_m と x_0 、 x を(4)式に代入したところ $\alpha/\kappa = 2.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $\beta/\kappa = 3.2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ が得られた。(4)式を満たす結晶の融点は次式で表される。

$$\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_{m0}} = \frac{R}{\Delta H_0} \left[\frac{2 \alpha (\kappa - 1) x_0 - (2 \alpha - \beta) (\kappa - 2) x_0^2}{R T_m \kappa} - \ln(1 - x + x a') \right] \quad (5)$$

これを用いて融点を再現すると $\alpha = 5.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $\beta = 7.7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $\kappa = 2.4$ となった。従って、B格子ではkinetic条件下で結晶化が進むことが示唆される。このときの x_0 、 T_m の計算値もFig.2とTable1に示す。ここで得られた α と β は、B格子における共結晶化のエネルギーの損失がV格子におけるそれよりも非常に大きいことを表し、大きいモノマーよりも小さいモノマーの方が共結晶化しやすいことを示唆する。

このように、ここで定式化した共結晶化理論でP(3HB-3HV)の実験値を再現し、共結晶化を熱力学的に解釈するためのパラメータを得ることができた。他の共重合体についても、固体高分解能NMRで各相の組成比を求めて、この理論で解析することで、共重合体の固体状態に関する理解が深まることが期待される。

参考文献

1. E. Perez et al., *Macromolecules*, **20**, 78 (1987).
2. E. Perez et al., *Polymer*, **30**, 1508 (1989).
3. E. Helfand et al., *Macromolecules*, **6**, 631 (1973).
4. I. C. Sanchez et al., *Macromolecules*, **8**, 638 (1975).
5. T. L. Bluhm et al., *Macromolecules* **19**, 2871 (1986).
6. M. Kunioka et al., *Macromolecules*, **22**, 694 (1989).

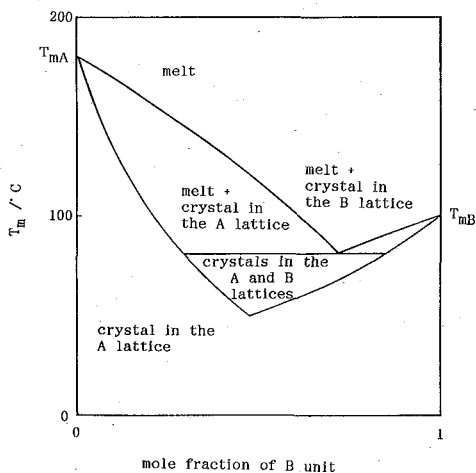


Figure 1 Phase diagram for A-B random copolymer in isidomorphic system:

$T_{mA}=180^{\circ}\text{C}$, $\Delta H_A=12\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,
 $\alpha=2.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\beta=6.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the
 A lattice; $T_{mB}=100^{\circ}\text{C}$, $\Delta H_B=10\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,
 $\alpha=1.2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\beta=2.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the
 B lattice.

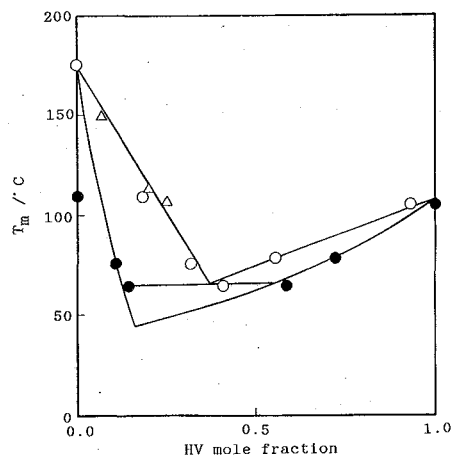


Figure 2 Phase diagram for P(3HB-3HV) random copolymer: Calculated data (—): $T_{mA}=180^{\circ}\text{C}$, $\Delta H_A=11\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\alpha=5.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\beta=7.7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\kappa=2.4$ for the P(3HB) lattice; $T_{mB}=108^{\circ}\text{C}$, $\Delta H_B=10\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\alpha=1.2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\beta=2.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\kappa=1$ for the P(3HV) lattice. Experimental data: \circ , Δ X vs. T_m ; \bullet X_c vs. T_m : data of Kamiya et al. *Macromolecules* 1989, 22, 1676.

Table 1 Composition in the Crystalline Phases and Melting Points

| X | experimental | | calculated | | parameters |
|-------|--------------|--------------------------|------------|--------------------------|---|
| | X_c | $T_m / ^{\circ}\text{C}$ | X_c | $T_m / ^{\circ}\text{C}$ | |
| 0.000 | 0.000 | 175.0 | 0.000 | 175.0 | |
| 0.183 | 0.000 | 109.0 | 0.059 | 121.8 | $\alpha=5.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
| 0.316 | 0.102 | 75.5 | 0.105 | 81.4 | $\beta=7.7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
| 0.407 | 0.142 | 64.2 | 0.138 | 53.7 | $\kappa=2.4$ |
| 0.407 | 0.586 | 64.2 | 0.585 | 66.4 | $\alpha=1.2\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
| 0.554 | 0.721 | 78.3 | 0.721 | 77.5 | $\beta=2.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
| 0.931 | 1.000 | 104.5 | 0.966 | 103.6 | $\kappa=1$ |

^{13}C Spin-Relaxation Analysis of the Molecular Motion of Methylen Sequences
in the Rubbery State

Tsuyoshi Murata, Fumitaka Horii, and Hisashi Odani

(Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan)

Carbon-13 spin relaxation analysis has been carried out to characterize the molecular motion of methylene sequences of polyethylene (PE) and terephthalic-acid polyesters (TPPE), $[-\text{COC}_6\text{H}_4\text{COO}(\text{CH}_2)_m\text{O}-]_n$ ($m=2-20$), above the glass transition temperature using the 3τ model where the random motion of the C-H internuclear vector is described as a superposition of the rotational diffusion, the libration, and the isotropic motion with different correlation times. The analytical results suggest that the rotational diffusion may be the cooperative torsional motion for the sequences with about 10 methylenes, while the libration may be assignable to the motion involving the *trans-gauche* transitions for the sequences composed of more than 20 methylenes.

1. 緒言

気体透過性、耐衝撃性など高分子材料の巨視的性能はその材料に内包される種々のオーダーの分子鎖運動と密接に関係すると考えられ、高分子の多様な分子運動を明らかにすること重要である。我々は、既にポリエチレン (PE) 及びテレフタル酸系ポリエステル (TPPE) $[-\text{COC}_6\text{H}_4\text{COO}(\text{CH}_2)_m\text{O}-]_n$ ($m=2\sim 10$) 固体試料のゴム状成分の ^{13}C スピン-格子緩和定数 T_1 などのスピン緩和パラメーターの温度依存性を 3τ モデル¹⁾により解析できることを明らかにした。固体試料のゴム状成分の T_1 の場合、測定可能な温度領域で極小値が得られるので、通常 T_1 の極小値を観測できない溶液の場合と比較して、解析の精度が高い。しかし、 3τ モデルで仮定した3種の運動モードの実体は明らかではない。これらの運動モードの詳細な内容を明らかにするため、本研究では $m=12, 20$ について、VT/MAS ^{13}C NMR法により、これらのメチレン連鎖のゴム状態における分子運動を検討した。

2. 実験

TPPE試料は、ジフェニルテレフタレートと $\text{HO}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ を重縮合させ、精製後、融体から融点近傍で等温結晶化させて得た。また、PE試料は三井石油化学(株)製Hizex Million M240のゲル乾燥フィルムを 145°C で10分間熱処理したものである。VT/MAS ^{13}C NMR測定はJEOL JNM-FX200分光計により、4.7Tの静磁場下で -55°C から 80°C の温度領域で行なった。温度の較正はエチレングリコール法²⁾により行った。

3. 結果

図1(a)には、各試料のゴム状成分の NT_1 を絶対温度の逆数 $1/T$ に対してプロットした。ここで、 N は問題とする炭素に化学結合している ^1H の数で、本研究では $N=2$ となる。いずれの試料においても明瞭に T_1 の極小が観測できる。各曲線は 3τ モデルによる解析結果で、実験値と良く一致する。ここで、 3τ モデルはC-Hベクトルの運動を3種の運動モードの重ね合わせで記述するモデルである。3種の運動モードとは、図2に示したように、第一は、C-Hベクトルが A_1 軸のまわりの頂角 $2\theta_R$ のコーンの外周を回転拡散する運動、第二は、 A_1 軸が A_2 軸のまわりの頂

角 $2\theta_L$ のコーンの内部をランダムに揺動する libration 運動、第 3 は、 A_2 軸の実験室座標系に対する等方ランダム運動である。図 1 (b) には解析の結果得られた回転拡散、libration 及び等方運動の相関時間 τ_R , τ_L , τ_I を示した。この解析では、 τ_R は温度に依存しないが、 τ_L 及び τ_I はアレニウスの式に従って温度変化すると仮定した。また、 $\tau_R < \tau_L < \tau_I$ と仮定した。

この解析によれば、 T_1 の極小はいずれの試料においても libration 運動の相関時間 τ_L が $1/\omega_C$ に達したときに現われるといえる。また、TPPE ($m=6$) では、PE と比べて、ピコ秒オーダーの回転拡散の振幅 (θ_R) に大きな差があったのに対し、TPPE ($m=12, 20$) では、この運動の振幅もほぼ PE のそれと一致した。従って、12 個以上のメチレンを含むポリエステル回転拡散は PE のそれとほぼ一致することが明らかになった。しかし、図 1 (b) に見られるようにこれらの TPPE の T_1 の極小値はなお PE のそれと一致しない。この主な原因は、libration 運動に差があるためであることが判明した。

以上の結果、回転拡散運動は、活性化エネルギーが 0 であり、10~12 メチレン連鎖に対する C-C 結合のまわりの協同的なねじれ運動であると考えられる。一方、libration 運動の活性化エネルギーは、各炭素原子について *trans-gauche* 遷移が 2 個程度起こることを示している。従って、libration 運動は、20 メチレン以上の連鎖に対して、ある C-C 結合が *trans-gauche* 遷移をすると、そのために起こる歪を相殺するような形で他の C-C 結合が *trans-gauche* 遷移を起こす運動で、このような運動がナノ秒オーダーの時間内に分子鎖内のいずれの C-C 結合についても一様に起こっていると推定される。

文献

- 1) K. Murayama, F. Horii, and R. Kitamaru, *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **61**, 229 (1983).
- 2) 村田ツヨシ, 堀井文敬, 藤戸輝昭, 第 7 回高分子・固体 NMR 研究会報告集, No. 7, 29, (1990).

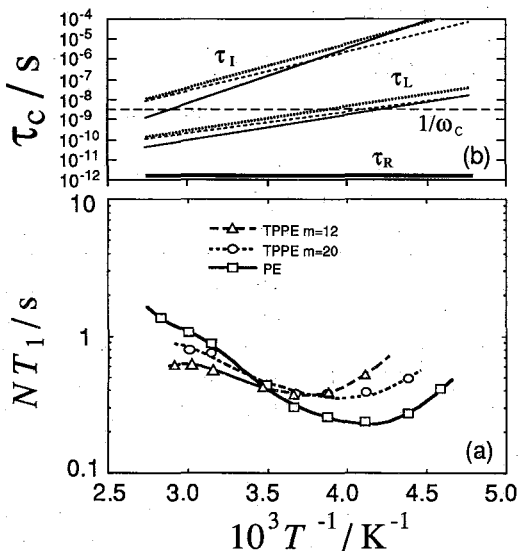


Fig. 1 $\ln(NT_1)$ vs. $1/T$ (a) and logarithmic correlation times vs. $1/T$ (b) for different polymers.

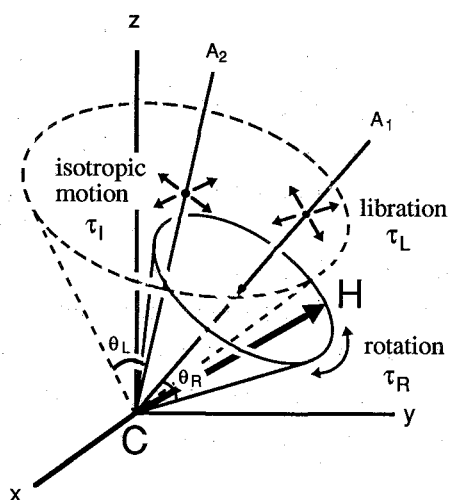


Fig. 2 Schematic diagram of 3τ model for the motion of a C-H internuclear vector.

(花王研、東工大・工)○石川伸二・松本 清・黒子弘道・安藤 勲

Structural Studies of n-Alkanes by Variable-Temperature Solid-State High-Resolution ^{13}C NMRShinji Ishikawa¹, Kiyoshi Matsumoto¹, Hiromichi Kurosu² and Isao Ando² (¹Kao Research Laboratories, Ichikaimachi, Haga, Tochigi, ²Department of Polymer Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo)

Crystal structure and conformation of some n-alkanes (n-C₁₉H₄₀~n-C₄₄H₉₀) with the orthorhombic or the triclinic form in the solid state have been studied through the observation of ^{13}C NMR chemical shift values in a wide range of temperatures. In n-C₃₂H₆₆, n-C₃₈H₇₈ and n-C₄₄H₉₀ the terminal methyl carbons or their neighboring methylene carbons give two peaks at temperatures below the melting points. This indicates that the three n-alkanes take two types of structures.

1、はじめに

n-アルカン (C₄₄H₉₀, C₃₈H₇₈, C₃₂H₆₆, C₂₀H₄₂, C₁₉H₄₀) は固体状態においてトランスジグザグ構造をとり炭素数によって斜方晶系、三斜晶系などの結晶構造をとる。n-アルカンは結晶のパッキングの効果を調べるための良い研究対象となるためにいくつかの研究がなされてきた¹⁻⁴⁾。しかしながら、これまでにn-アルカンについて固体高分解能NMRによる広い温度範囲における詳細な構造についての研究はあまりなされていない。そこで、我々は温度を変化させて斜方晶系及び三斜晶系の結晶構造をとるいくつかのn-アルカンについて ^{13}C NMRシフトの測定を通して結晶構造とコンホメーションを系統的に研究した。

2、実験

^{13}C CP/MAS及び ^{13}C PST(pulse saturation transfer)⁵⁾ /MASスペクトルの測定は温度可変(VT) /MAS装置付属のJNM-GX270 NMR分光器(67.5 MHz)で測定した。n-アルカン(東京化成製)をジルコニア製ローターに詰め融点以上の温度で融解させた後、室温で一晩放置した。測定時にはそれを3.0-4.0kHzで回転させた。CP時のコンタクトタイムは3ms、また、パルス遅延時間は5s、スペクトル幅は2.7kHzデータポイント数は8K、積算回数は100-1000回とした。 ^{13}C 化学シフトの外部基準にアダマンタンの高磁場ピーク(TMSに対して29.5ppm)を用いた。

3、結果と考察

図1に $n-C_{44}H_{90}$ の ^{13}C VT/MAS NMR スペクトルを示した。70℃以下の温度ではCP/MAS法、80℃以上の温度ではPST/MAS法により測定した。またその ^{13}C 化学シフト値を表1に示した。 α -メチレン炭素のピークは60℃以下の温度で24.8ppmに現れるが70℃以上の温度でそのピークは高磁場シフトしている。この高磁場シフトはゴーシュ・コンホメーションをとることによる γ 効果の寄与に因るもので、 $n-C_{44}H_{90}$ の融点は86℃であるので融点よりも10℃以上低い温度で構造に変化が生じていることになる。また、70℃の温度で α -メチレン炭素のピークは23.3ppmと24.0ppmの2つある。前者は非晶状態にあるが、後者は斜方晶系と異なった結晶構造をとっていると考えられる。したがって、 α -メチレン炭素には3種類の状態があると結論される。次にメチル炭素に注目すると60℃以下の温度でそのピークは15.2ppmに現れるが70℃以上の温度でそれはより高磁場の14.4ppmに現れる。メチル炭素も α -メチレン炭素と同様、融点以下の温度で再配向が起

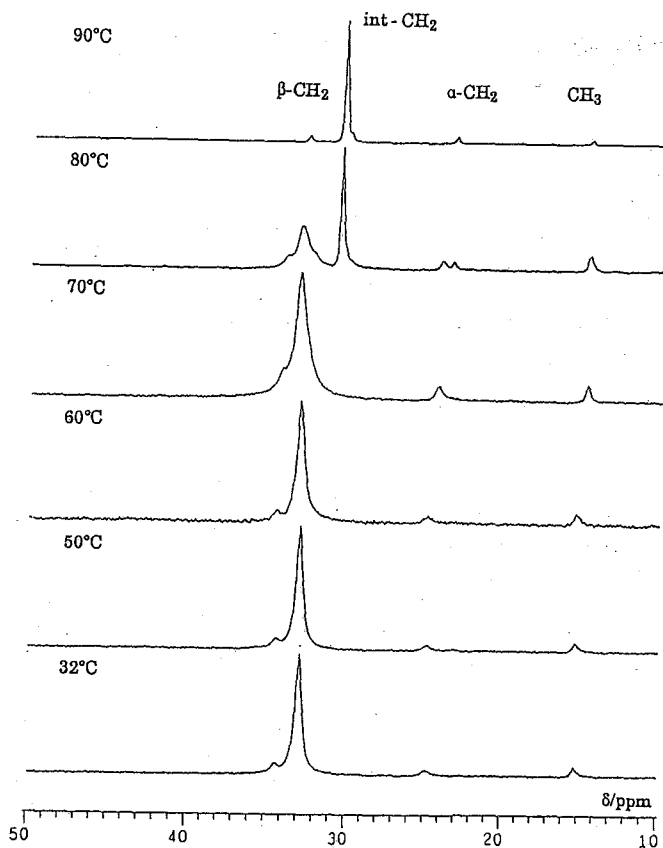


Fig. 1 ^{13}C VT/MAS NMR spectra of $n-C_{44}H_{90}$ as a function of temperatures.

Table 1 ^{13}C chemical shift values of $n-C_{44}H_{90}$ in the solid state at various temperatures

| Temp. (°C) | ^{13}C chemical shift (ppm) | | | |
|------------|-------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------|
| | β -CH ₂ | int-CH ₂ | α -CH ₂ | CH ₃ |
| 32 | 34.3 | 32.8 | 24.8 | 15.2 |
| 50 | 34.3 | 32.8 | 24.8 | 15.2 |
| 60 | 34.3 | 32.9 | 24.8 | 15.2 |
| 70 | — ^{a)} | 33.0 | 24.2 | 14.5 |
| 80 | — ^{a)} | 32.9, 30.5 | 24.0, 23.3 | 14.4 |
| 90 | 32.6 | 30.3 | 23.2 | 14.4 |

a) overlapped with other carbon peak

こっている。

図2に $n-C_{32}H_{66}$ の ^{13}C VT/MAS NMR スペクトルを示した。また、その化学シフト値を表2に示した。 α -メチレン炭素は70℃の温度では $n-C_{44}H_{90}$ の場合と同様、2種類の状態が存在している。メチル炭素については60℃以下の温度では14.9ppmと15.1ppmの2つのピークが重なっている。これらはどちらも結晶状態にあるメチル炭素であると考えられる。つまり、 $n-C_{32}H_{66}$ のメチル炭素は結晶状態において2種類の構造を含んでいる。これらの状態を検討するため Torchia のパルスシーケンス⁶⁾を用いて $n-C_{32}H_{66}$ の緩和時間 (T_{1c}) の測定を行った。観測される緩和時間より14.9ppmのメチル炭素 ($T_{1c}=1.7\text{sec}$) は15.1ppmのメチル炭素 ($T_{1c}=1.4\text{sec}$) よりも柔軟である (メチル炭素の運動はBPP理論において extreme narrow region にある。)。

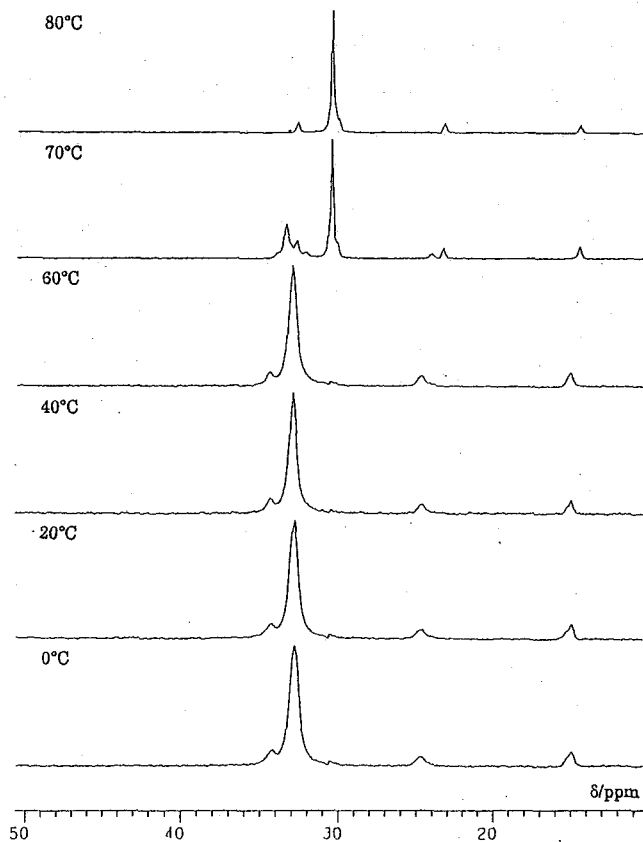


Fig.2 ^{13}C VT/MAS NMR spectra of $n-C_{32}H_{66}$ as a function of temperatures.

Table 2 ^{13}C chemical shift values of $n-C_{32}H_{66}$ in the solid state at various temperatures

| Temp.(°C) | ^{13}C chemical shift (ppm) | | | |
|-----------|-------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------|
| | β -CH ₂ | int-CH ₂ | α -CH ₂ | CH ₃ |
| 0 | 34.1 | 32.7 | 24.7 | 15.1, 14.9 |
| 20 | 34.2 | 32.7 | 24.6 | 15.1, 14.9 |
| 40 | 34.3 | 32.8 | 24.7 | 15.1, 14.9 |
| 60 | 34.3 | 32.8 | 24.6 | 15.1, 14.9 |
| 70 | a) | 30.4 | 24.0, 23.2 | 14.4 |
| 80 | 32.5 | 30.3 | 23.2 | 14.4 |

a) overlapped with other carbon peak

参考文献

- 1) D. L. VanderHart, J. Magn. Reson. 44, 117, (1981)
- 2) T. Yamanobe, T. Sorita, T. Komoto and I. Ando, J. Mol. Struct. 131, 267, (1985)
- 3) M. Möller, H. J. Cantow, H. Drotloff, D. Emeis, K. S. Lee and G. Wegner, Makromol. Chem. 187, 1237, (1986)
- 4) H. Kurosu and I. Ando, J. Mol. Struct. 201, 239, (1989)
- 5) 藤戸、出口、大内、今成、J. M. Albright, 第20回NMR討論会要旨集、68, (1981)
- 6) D. A. Torchia, J. Magn. Reson. 30, 613, (1978)

固体高分解能NMRを用いたオリゴペプチド及びポリペプチド
の水素結合の研究(Ⅲ). L-アラニン残基

(東工大) ○浅川直紀・黒木重樹・黒子弘道・安藤 勲

(群大工) 荘司 顕・尾崎拓男

Hydrogen-Bonding Effect on ^{13}C NMR Chemical Shift of the Alanine Residue in peptides as Studied by High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR/Spectroscopy

Naoki Asakawa, Sigeaki Kuroki, Hiromichi Kurosaki, Isao Ando, (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152)

Akira Shoji, Takuo Ozaki, (Department of Biological Sciences, Gunma University, Kiryu-shi, Gunma 376)

The ^{13}C NMR chemical shifts of the alanine-residue carbonyl-carbons of peptides in the solid state were measured. The obtained ^{13}C chemical shifts were plotted against the N-H hydrogen bond length ($R_{\text{N-H}}$). It was found that the decrease of $R_{\text{N-H}}$ leads to a downfield shift. Further, the calculation of the ^{13}C shielding constant for peptide model compounds were carried out by means of the FPT-INDO method, taking into account the hydrogen bond and conformation. It reproduces reasonably the experimental results.

1. 緒言

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¹⁾、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⁾。

タンパク質の中でグリシン残基を含むものは非常に多く、またグリシン残基はアミノ酸残基の中で最も簡単な構造をもつため、グリシン残基を含むペプチド化合物はタンパク質の優れたモデル化合物と考えられる。しかし、タンパク質の中には不斉炭素原子をもつアミノ酸残基を含むものが大部分であるため、それらの効果をペプチド化合物中のグリシン残基のみで議論することは難しいと考えられる。本報告では、不斉炭素原子をもつアミノ酸残基のうち最も簡単な構造をもつアラニン残基に注目し、モデル化合物としていくつかのアラニン残基を含むペプチド化合物を用いて固体高分解能 ^{13}C CP/MAS NMRの測定を行い、 ^{13}C 化学シフトと水素結合、コンホメーション効果との関係を明らかにすることを研究の目的とする。

2. 実験

試料として、アラニン残基中のカルボニル基がペプチド結合しているペプチド化合物を合成した。今回試料として用いたものはすでにX線回折により構造が明らかになっているもので (Table 1)、すでに報告されている方法で再結晶した。

また固体高分解能 ^{13}C 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-270NMR分光器(67.80 MHz)を用い、室温で測定を行った。積算回数は200~800回である。化学シフトの基準としては外部基準としてアダマンタンを用い、その化学シフトを29.50ppmとして、TMS基準に換算した。

3. 結果と考察

観測して得られたペプチド化合物中のアラニン残基のカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトをX線回折で決定されているN-H水素結合距離に対してプロットしたものをFig. 1に示す。プロットは大きく2つのグループに分けられる。グループ(a)は β シートのコンホメーションをもつものである。一方グループ(b)は、 α -ヘリックスのコンホメーションをもつものである(しかし、現在のところデータが少ないので今後このグループのデータの補充が必要である)。グループ(a)はN-H水素結合距離の減少にともない、化学シフトが低磁場シフトしている。した

あさかわなおき、くろきしげき、くろすひろみち、あんどういさお、しょうじあきら、おざきたくお

が、2つのグループの間の ^{13}C 化学シフト差はコンホメーション効果に由来するものと考えられる。これらの結果は、「水素結合がグリシン残基中のカルボニル炭素の化学シフトに及ぼす効果は水素結合の「距離の効果」が大きく「コンホメーションの効果」は相対的に小さい」と報告している前の結果²⁾とは対照的である。「コンホメーションの効果」は水素結合の「距離の効果」とともにアラニン残基中のカルボニル炭素の化学シフトに大きな影響を及ぼす。またFPT-INDO法により、N-アセチル-N'-メチルアラニンアミドにホルムアミド2分子を水素結合させたモデルを用いてN...O水素結合距離とコンホメーション(β シートと α ヘリックス)を変化させ、カルボニル炭素の化学シフトを計算した。その結果をFig. 2に示した。計算で得られる化学シフトは遮蔽定数なので、負の符号は「de-shielding」を意味している。Fig. 2から、N...O距離の減少にともない低磁場側へシフトしていることがわかる。したがって、計算は、Fig. 1の実験結果を合理的に再現している。なおINDO法では2中心電子積分の一部を無視しているため安定な水素結合距離が短めに評価されている³⁾。

4. 参考文献

- 1) Saito, H and Ando, I, Ann. Repts. NMR Spectroscopy, 21, 209 (1989)
- 2) Ando, S, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 3380 (1988)
- 3) Morokuma, K, et al., Chem. Phys. Lett., 19, 129 (1971)

Table 1 Geometrical parameters for peptides containing alanine residues.

| sample | H bond length/ \AA | dihedral angle/deg. | | |
|-------------|-----------------------------|---------------------|--------|-------|
| | N...O | ϕ | ψ | |
| Ac-Ala-NHMe | 2.92 | -87.6 | 154.8 | |
| Ala-Gly-Gly | 3.00 | - | 160.0 | |
| Ala-Ser | 3.04 | - | 124.8 | |
| Poly(L-Ala) | α helix | 2.87 | -66.9 | -43.7 |
| | β sheet | 2.83 | -138.6 | 134.7 |
| BPTI Ala-48 | 2.80 | -67 | -34 | |

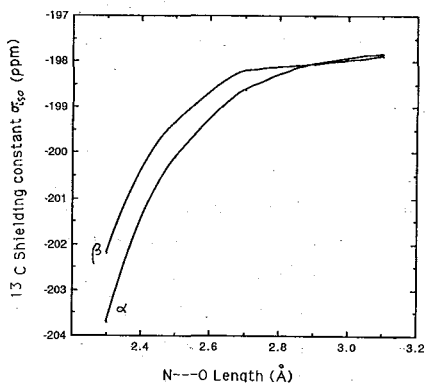


Fig. 2 Variation of the calculated ^{13}C shielding constant with the N...O hydrogen bond length.

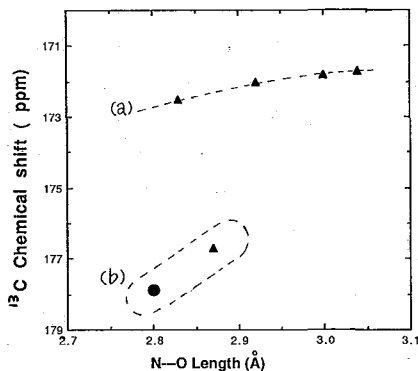


Fig. 1 Plots of the observed ^{13}C chemical shifts in the solid state against the N...O hydrogen bond length. ● denotes Ala-48 C=O of BPTI in aqueous solution.

北大工 山口雅史・平沖敏文・堤耀広

Molecular Motion of Racemic Poly(γ-benzyl glutamate) Studied by
Solid State High-Resolution ^{13}C -NMR

Masashi Yamaguchi, Toshifumi Hiraoki, and Akihiro Tsutsumi (Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

^{13}C CP/MAS NMR measurements were made on racemic poly(γ-benzyl glutamate)(PBDLG) and poly(γ-benzyl L-glutamate)(PBLG) in the solid state to investigate the effects of the regular side chain stacking on the molecular motion. For PBDLG in the stacked state, C_β and C_γ showed complicated signals which are different from PBLG. However, above the break down temperature of the stacking, they are well resolved similarly to PBLG. Racemic sample deuterated at C_γ showed two C_γ peaks in the stacked state corresponding to stacked and unstacked side chains. $T_{1\rho}$ of PBDLG in the stacked state is longer than that of PBLG for all carbons containing C_α in the main chain, while at the break down temperature of the stacking $T_{1\rho}$ of PBDLG suddenly changes to the values in PBLG. It is noticeable that the $T_{1\rho}$ change is the smallest for C_{phen} , indicating that phenyl rings undergo considerable motion even in the stacked state.

1) 固体中で主鎖が安定なα-ヘリックス構造であるポリ(γ-ベンジルグルタメート)のラセミ化物中では、側鎖のフェニルリング同士が重なり合うスタッキング構造を取る事が従来から知られている。スタッキング状態での構造や分子運動状態について、X-線回折¹⁾、誘電²⁾、力学緩和³⁾などを用いた研究がなされ、X-線回折では、PBLGには見られない反射が現れることや、スタッキング崩壊に伴いDSCに吸熱ピークが現れる事などが報告されている。一方、固体高分解能NMR、 ^{13}C CP/MAS NMR、及び、重水素NMRは固体中での分子の詳細な構造や分子運動を調べる上で非常に有用な手段であるので、我々はこれらの方法をPBLG及びそのラセミ体に適用し、スタッキング状態における側鎖の構造、分子運動についてより詳細な情報を得ることを試みた。本報告では ^{13}C CP/MAS NMRより得られた結果を述べる。

2) 測定に用いた試料はNCA法により合成されたpoly(γ-benzyl L-glutamate)(PBLG)及び、poly(γ-benzyl D-glutamate)(PBDG)との1:1の混合物であるPBDLGの2種類である。測定にはこれらのクロロホルム溶液から室温でキャストしたfilmを130°Cで約12時間アニールした

やまぐちまさし、ひらおきとしふみ、つつみあきひろ

ものを使用した。PBDLGについてはDSCでスタッキング崩壊に伴うとされる吸熱ピークが90°C付近で観測された。又γ-位重水素化PBDG、PBLGは、D-及び、L-グルタミン酸を6NのDCI中で105~108°Cに熱する事により、γ-位重水素化グルタミン酸を得た後⁴⁾、ベンジルエステル化し、NCA法により合成した。

¹³C CP/MAS NMR測定はBruker MSL-200 スペクトロメータ(50.3MHz)を用い、MAS (Magic Angle Spinning) rate 3.85KHzで行った。¹³C T_{1ρ}測定に於けるspin-lock周波数は40.0-73.4KHzである。

3) Fig.1にスタッキング状態及びスタッキング崩壊温度以上におけるPBLG及びPBDLGの¹³C CP/MASスペクトルを示した。大きな変化がでると予想されたフェニルピークのケミカルシフトにはスタッキング状態、及び、スタッキング崩壊後共にPBLGと殆ど違いが見られていない。一方、主鎖に近い位置にあるC_β、C_γのピークはPBDLGのスタッキング状態において重なり合いが生じており、PBLGの場合と大きく異なっている。しかしながら、スタッキング崩壊温度以上においては、ピークは2本に分離しPBLGと同様のケミカルシフト値を取っている。このことは、スタッキングに関与しているC_βあるいはC_γがスタッキングに関与していないものとなったケミカルシフトをもつことを示唆する。

我々は、γ-位重水素化試料を用い、これらのピークの分離を試みた。この様な重水素化試料においては、最近接プロトンが重水素で置き変わっているために、C_γはC_βに比べ長いT_{1ρ}をもっていると考えられる。又、局所場の大きさも弱くなっているためT₂も長くなる。この為、Fig.2に示したpulse sequenceを用いることにより、C_β及びC_γピークを強調したスペクトルを得ることができる。Fig.3にC_β及びC_γピークを強調したスタッキング状態におけるPBDLGのスペクトルを示した。これより、C_βピークは対称性のよい線形であり、単一のlorentz曲線でfittingできることがわかる。これに対し、C_γピークは対称性の悪い複雑な線形をもち、単一のlorentz曲線では説明不可能であること

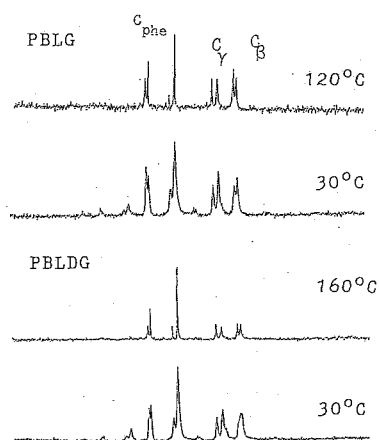


Fig.1. ¹³C CP/MAS NMR spectra of PBLG and PBDLG (50MHz)

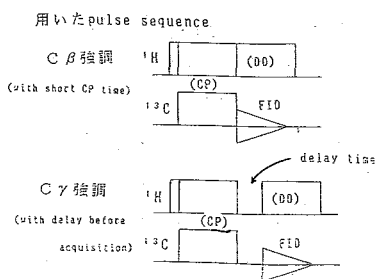


Fig.2. Pulse sequence used for γ-deuterated samples

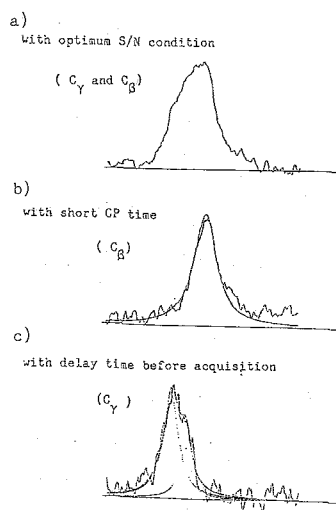


Fig.3. ¹³C CP/MAS NMR spectra of γ-deuterated PBDLG(C_β and C_γ region)

がわかる。即ち、スタッキングにより生じた新たなピークはCY由来のものであることを示している。側鎖コンフォメーションとの関係については現在検討中である。

4)次に、 ^{13}C CP/MAS NMRから分子運動に関する情報を得るために ^{13}C の回転系における緩和時間 $T_{1\rho}$ の測定を行った。 $T_{1\rho}$ は固体中でのボンド回転を調べる上で重要な数十kHz程度の運動に敏感であり、 ^{13}C の高分解能NMRを用いる事により、側鎖の各部分の運動を調べることができる。

しかしながら、実際の系においては ^{13}C の磁化は回転系においてプロトン系との相互作用のためにFig.4に示した様な経路で緩和する。このうち、プロトンdipole系の緩和時間 T_{1D} はMAS rate、 ω_r に依存して、 $1/T_{1D} = \pi/2 * 3\omega_r^2 \tau_D^5$ と表される。ここで、 $\tau_D = (3/M_{HH}^{(2)})^{1/2}$ ($M_{HH}^{(2)}$ はproton-proton dipole相互作用の2次モーメント)である。 $M_{HH}^{(2)}$ の値を過去に行われたbroad-line NMRの結果より見積った結果⁶⁾、室温付近では、 $T_{1D} = 17.7\text{usec}$ 程度であった。この値は後に示すように、 ^{13}C の回転系における緩和時間の測定値 $T_{1\rho}$ に比べ非常に短く、従って $T_{CH} \gg T_{1D}$ の条件が成立しているとみなせる。この場合、proton系はlattice系と常に熱平衡にあると考えられ、 ^{13}C の磁化は $T_{1\rho}$ と、 T_{CH} の2つの過程によって緩和する。従って、 $1/T_{1\rho} = 1/T_{1\rho} + 1/T_{CH}$ で表される⁷⁾。ここで、第一項は分子

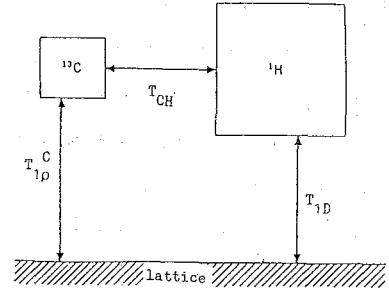


Fig.4. A thermodynamic model for the ^{13}C rotating frame experiment

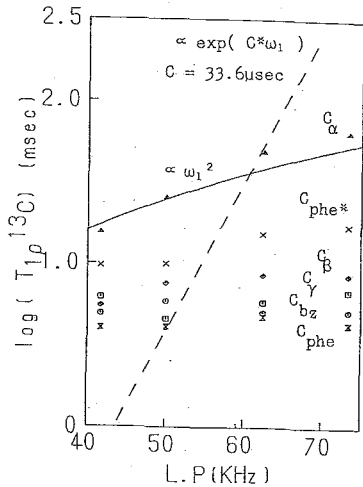


Fig.5. Spin-Lock frequency dependence of ^{13}C $T_{1\rho}$ for PBLG

運動の効果を反映するのに対し、第2項は反映しない。従って、測定値がどちらの過程を主に反映しているかを知ることが重要である。ここで、それらのspin-lock周波数、 ω_{1c} 依存性は、 $T_{1\rho} \sim \omega_{1c}^2$ 以下であるのに対し、 $T_{CH} \sim \exp(C * \omega_{1c})$ の依存性をもっている。

Fig.5にPBLGの室温における各カーボンの $T_{1\rho}$ のspin-lock周波数依存性を示した。これより、全てのカーボンにおいて $T_{1\rho} \sim \omega_{1c}^2$ 程度であることから、 $T_{1\rho}$ は主に分子運動過程を反映していることがわかった。特に、 $C\alpha$ は他に比べやや大きな $T_{1\rho}$ 及び ω_{1c} 依存性をもっている事がわかる。これは主鎖の運動が側鎖に比べて遅いため T_{CH} からの寄与が若干増えたためであると考えられる。同様の傾向はPBDLGにおいても観測された。

5) C_{β} 、 C_{γ} 及び $C\alpha$ の $T_{1\rho}$ の温度依存性をFig.6に示した。PBLGではminimumが観測されている。一方、PBDLGでは室温付近ではPBLGに比べ大きな値を取っているが、図に示した温度付近で急激に変化し、それ以上の温度域ではPBLGとほぼ同様な値を取っている。この

変化域はDSCで観測されたスタッキング崩壊に対応した吸熱ピークの温度に近い。同様の 'とび' は他の側鎖のカーボン、主鎖のカーボンに対しても観測されている。このことは、スタッキング状態においては、側鎖のみならず、主鎖の運動も束縛されており、スタッキングの崩壊により、運動性が急激に高まる事を示している。また、 C_{α} の $T_{1\rho}$ の 'とび' が C_{γ} に比べて小さいのは特徴的である。これより、スタッキング状態においてもフェニルリングは既にかかなりの程度の運動状態にあることがわかる。即ち、いわゆるスタッキング状態では、フェニルリングはstaticに重なり合っているのではなく、フェニルリングがある程度の運動を行いつつ全体の秩序構造を保った状態にあることを示唆している。

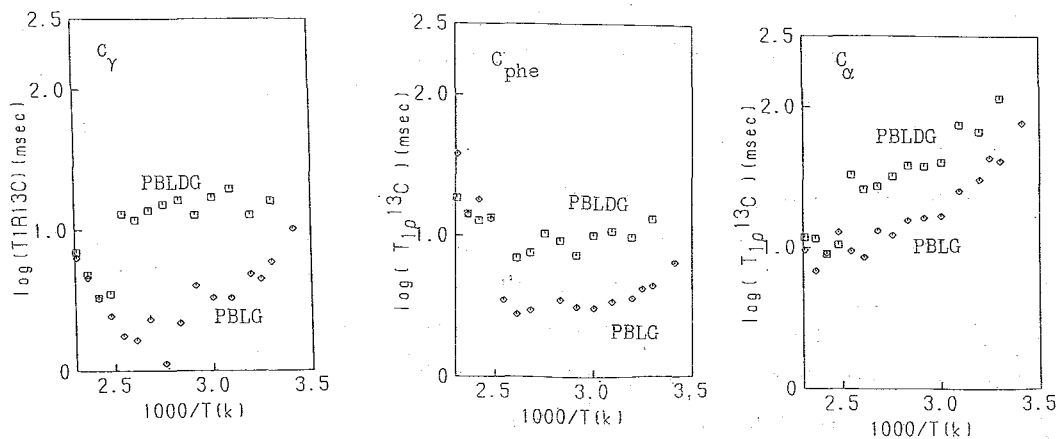


Fig.6. Temperature dependence of ^{13}C $T_{1\rho}$ for C_{γ} (a), C_{phe} (b), and C_{α} (c)

References

- 1) J.M.Squire and A.Elliot, *J.Mol.Biol.*, **65**, 291, (1972)
- 2) T.Takahashi, A.Tsutsumi, K.Hikichi and M.Kabeko, *Macromolecules.*, **7**, 806, (1974)
- 3) M.Tokita, Y.Yamashita, and K.Hikichi, *Polym.J.*, **13**, 569, (1981)
- 4) A.C.Murray and D.L.Williams, 'Organic syntheses with Isotopes', Vol.IV, Interscience, New York, N.Y., 1302, (1972)
- 5) A.N.Garroway, *J.Magn.Reson.*, **34**, 283, (1979)
- 6) A.Tsutsumi, S.Anzai and K.Hikichi, *Polym.J.*, **15**, 355, (1983)
- 7) D.L.VanderHart and A.N.Garroway, *J.Chem.Phys.*, **71**, 2773, (1979)

O大木 寛, 武田 定, 中村 亘男, 中山 尋量, 江口 太郎,
 B. T. Heaton, S. Kernaghan
 (阪大理・阪大教養・リバプール大)

^{59}Co 2D Nutation NMR in Solid $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$

H. Ohki, S. Takeda, N. Nakamura, H. Nakayama,^{a)} T. Eguchi,^{a)}
 B. T. Heaton,^{b)} and S. Kernaghan^{b)}

Faculty of Science and ^aCollege of General Education, Osaka University

^bDepartment of Chemistry, The University of Liverpool

^{59}Co 2D nutation NMR experiments were conducted at 47.485MHz in order to determine the quadrupole coupling constants (e^2Qq/h) of ^{59}Co nuclei in solid $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$. The 2D spectrum obtained indicates the presence of two inequivalent ^{59}Co nuclei, Co(apical) and Co(basal). The e^2Qq/h and the asymmetry parameter of the EFG, η , were estimated to be 9MHz and 0, and 15MHz and 0.8 for Co(basal) and Co(apical), respectively. These data support our previous proposal that the symmetry conserved reorientation of Co_4 clusters occurs in the solid state.

《序》 溶液中や結晶中の $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$ の構造は過去30年以上にわたって活発に研究されており、特に固体中の金属クラスターの動的構造に興味を寄せられてきた。我々は、先に ^{13}C MAS 及び ^{59}Co NMR を測定し、固体中でも2種類の Co が存在し (apical,

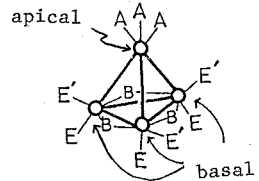


Fig. 1 Schematic representation of the structure of $\text{Co}_4(\text{CO})_{12}$.

basal; Fig.1), Co_4 クラスターが再配向運動をしていることなどを明らかにした。

しかし ^{59}Co の粉末スペクトルの線形からは、

2次の核四極相互作用による可能性も残されていた。そこで、Coの e^2Qq/h の決定を目的とし、クラスターの運動モードをより詳細に調べるために ^{59}Co 2次元 Nutation NMRを行なった。

《実験》 ^{59}Co の NMR は共鳴周波数 47.485MHz で Bruker MSL200を使って測定した。2次元 nutation スペクトルはパルス幅を $1\mu\text{s}$ から $128\mu\text{s}$ まで $1\mu\text{s}$ ずつ変えて FID を検出し、それを2次元 Fourier 変換して得た。

《結果と考察》 パルス幅による信号の強度変化を Fig. 2 に示す。みかけの $\pi/2$ パルス幅は apical の Co では $1.35\mu\text{s}$ 、basal の Co では $2.75\mu\text{s}$ になるので、apical の方が e^2Qq/h が大きいと考えられる。そこでスペクトル幅を広げて1次の satellite の検出を試みた (fig.3)。室温では中心のピークから約 700kHz 離れた

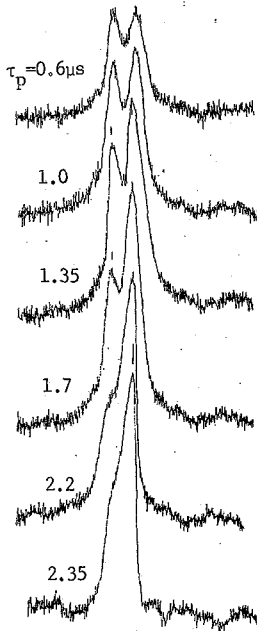


Fig. 2 Pulse width dependence of the central peaks.

位置に1本、176Kでは中心から650kHzと200kHzの位置に2本の satellite peak が観測された。satelliteの位置は e^2Qq/h だけでなく η にも依存するので、この低温スペクトルからこれらのパラメーターを決めるのは無理である。

2次元 nutation NMR の測定結果を Fig.4 に示す。矢印の位置がそれぞれ apical と basal の peak に対応する。

simulation の結果、 e^2Qq/h は basal で 9MHz、apical で 12MHz 以上になった。apical の peak に2次の四極子効果がないので e^2Qq/h は 15MHz 程度と推測できる。basalのCo について $e^2Qq/h=9\text{MHz}$ 、 $\eta\sim 0$ 、apical について $e^2Qq/h\sim 15\text{MHz}$ 、 $\eta\sim 0.8$ を使って ^{59}Co の1次元 NMR スペクトルの simulation を行うと、実測スペクトルとよく一致する結果が得られた。

溶液中では apical の Co が高い対称性 (C_2) を有することがわかっており固体の場合とは逆になっている。また、basal の e^2Qq/h は温度上昇とともに apical の値に近づくことも判明した。これらの結果を前に報告した化学シフトの温度変化との関連のもとに議論する。

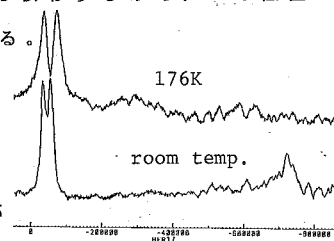


Fig. 3 Temperature dependence of first order satellites.

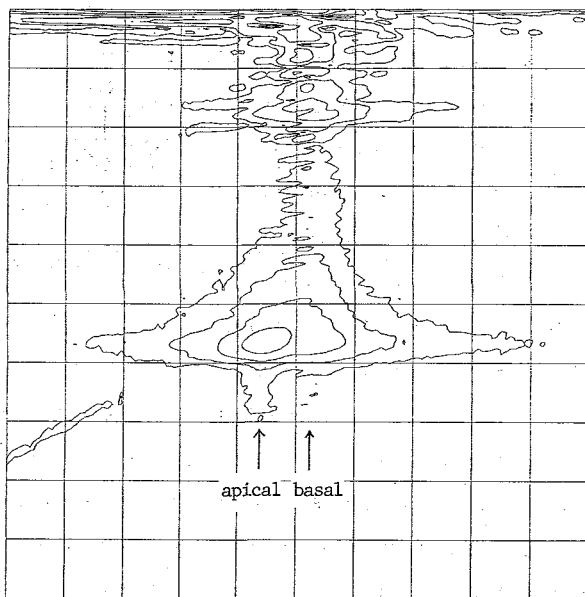
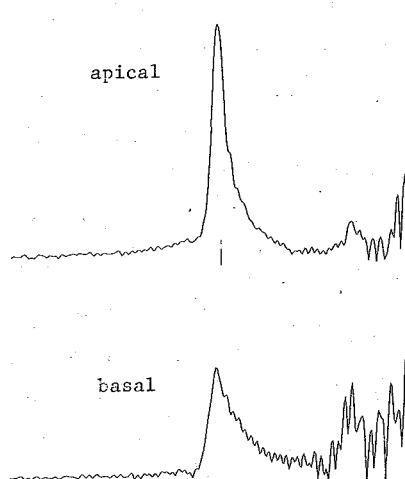


Fig. 4 Contour plot of 2D nutation spectrum.



Reference

江口 太郎, 武田 定, 中村 巨男, 千原 秀昭, B. T. Heaton, and S. Kernaghan,

第28回NMR討論会予稿集, 1989, 東京, p245.

B. T. Heaton, J. Sabounchei, S. Kernaghan, H. Nakayama, T. Eguchi,

S. Takeda, N. Nakamura, and H. Chihara,

Bull. Chem. Soc. Jpn., in press.

P43

瀬尾芳輝、村上政隆、亘 弘 (生理学研究所、分子生理)

Monitoring of intracellular ammonium by using N-14 NMR spectroscopy.

Yoshiteru SEO, Masataka MURAKAMI and Hiroshi WATARI (National Institute for Physiological Sciences, Dept. of Molecular Physiology)

We have applied nitrogen-14 nuclear magnetic resonance spectroscopy (N-14 NMR) to the isolated perfused rat mandibular salivary gland. Two high-resolution resonances: choline (-328 ppm) and betamine (-329 ppm), were observed, and the resonance from endogenous ammonium (-355.6 ppm) could not be detected. Intracellular and extracellular ammonium resonances are discriminated by using 10 mM of dysprosium triethylenetetraaminehexaacetic acid (DyTTHA). We have tried to analyze the transport of ammonium and cellular buffering processes in the acinar cells during 20 mM ammonium pulse application.

[はじめに] アンモニウムパルス法は細胞のpH緩衝能力やその機構を解析する手段として古くから用いられてきた。しかしながら、細胞内のアンモニウム濃度を経時的にはかる手段はなくnon-ionic diffusionによりすみやかに細胞内外のアンモニウムが平衡に達すると仮定されてきた。今回、我々は細胞内外のアンモニウムをN-14 NMR法 [1]を用いて測定し、アンモニウムパルス負荷実験中の細胞内アンモニウムの経時変化を明らかにすることができた。さらに、細胞内アンモニウムの定量を行なうために基礎実験を行なったので報告する。

[方法] ベントバルビタール麻酔下のラットより顎下腺(0.2g)を摘出し、37度C、100%酸素で飽和したクレブスーリンゲル液を定流量灌流し、外径10mmの試料管内に固定した。ブルカ-WM/AMX-360wb 分光器(8.45 T)を用い、N-14 (26 MHz), P-31 (145MHz), Na-23 (95 MHz) の測定には10mm径の広帯域プローブを同調させ、K-39 (16.8 MHz) は10mm径の専用プローブをもちいた。縦緩和時間はInversion-Recovery法で測定した。N-14 の化学シフトは 3M LiNO₃/H₂O 溶液中のNO₃の共鳴周波数を外部基準として表わした。

[結果及び考察] 唾液腺のN-14 NMRスペクトル(60度パルス、パルス繰り返し時間1.2秒、40960回積算、13.6時間にて測定)を図1-aに示す。2本の高分解能スペクトル:-328 ppmにコリン、-329 ppmにベータアミン、そして-345 ppmあたりに幅の広い蛋白質等のアミンが検出された[2]。心臓や腎臓では、かなり多量に測定される細胞内のアンモニウム(-355.6ppm)[2,3]は唾液腺では検出限界以下であった。

細胞内外でのアンモニウムの化学シフトはほとんど同じなので、化学シフト試薬(dysprosium triethyleneteraminehexaacetic acid (DyTTHA))を10 mM用いて、細胞内のアンモニウム(-355ppm)と細胞外のアンモニウム(-352ppm)とを分離して測定した[4]。図1-bに20 mMアンモニウム-パルス負荷実験中のスペクトルの経時変化を示す。各スペクトルは、90度パルス、パルス繰り返し時間

0.1224秒、4096回積算、8.3分間で測定した。細胞外にアンモニウムを負荷すると、細胞内のアンモニウム信号強度は急速に上昇し、7.5分以降は一定定常値を保つ、細胞外のアンモニウムを洗い流すと細胞内のアンモニウムはすみやかに細胞外に流出し、10分以降は細胞内のアンモニウムは検出されない。一方、細胞内無機燐酸のP-31 NMR化学シフトから求めた細胞内pHは、細胞外にアンモニウムを負荷すると、一旦、極めて急速に0.5pH unit アルカリ化するが、その後、細胞内のアンモニウムが一定定常値を保っているにもかかわらず、ゆるやかに酸性化がすすむ。すなわち、細胞性pH緩衝機構が働いていることが明らかとなった。その機構については、細胞内Na, K量, 細胞内pHの時間変化測定と、想定される細胞性pH緩衝機構への阻害剤等を用いた実験から解析をすすめている。

細胞性pH緩衝機構をさらによく検討するためにも、N-14 NMRスペクトルの定量化が必要なので、アンモニウムの縦緩和時間を測定した。pH 7.4のクレブス-リンゲル液および10 mM DyTTHA添加リンゲル液中のアンモニウムの縦緩和時間は、各々0.27秒、0.26秒であった。常磁性イオンが共存しても、アンモニウムのN-14縦緩和時間はほとんど変化しない。しかしながら、縦緩和時間のpH依存性を調べて見ると、アンモニウムの縦緩和時間は、図2に示すように生理的pH領域で大きなpH依存性を示した。測定試料には、20 mMまたは40 mM NH₄Clを添加したクレブス-リンゲル液、0.1 N HCl または 0.1 N NaOH 溶液を用いた。

アンモニウムの解離平衡はNH₃ + H⁺ ⇌ NH₄⁺ (pK = 9.25)であり、速い交換をおこなっている。よって、測定されている見かけのアンモニウムの縦緩和時間(T_{1obs})は加重平均: $1/T_{1obs} = k 1/T_{1NH_3} + (1-k) 1/T_{1NH_4}$, $k = [NH_3]/([NH_3] + [NH_4])$

$= 1/(1+10^{-(pK-pH)})$ 、となっているはずである。このモデルのもとに実測値に非線形の最適化をおこなった結果が図2の実線であり、 NH_3 および NH_4^+ の縦緩和時間 ($T_{1\text{NH}_3}$ 、 $T_{1\text{NH}_4}$) は各々 5 msec、1.57 sec、pK値は 9.2であった ($r^2 = 0.996$)。

N-14 はスピニングが1であるため、対称系の NH_4^+ の緩和は長い、非対称系の NH_3 では、四重極緩和が効率よく働いて短い縦緩和時間となる。 NH_3 の縦緩和時間が NH_4^+ に比べほぼ3ケタ短いために、pK値よりも2 pH unitあまり低い生理的pH領域で、縦緩和時間が大きなpH依存性を示すこととなっている。

20 mMアンモニウム-パルス負荷中に細胞内外のアンモニウムの縦緩和時間測定をおこなった。細胞外pHが7.4 (細胞内pHは7.0 - 6.6)のとき、細胞内外のアンモニウムの縦緩和時間は、各々 0.19 sec, 0.22 secであった。図2から予測されるクレスーリングル液中での縦緩和時間はpH 7.4, 7.0, 6.6の時、各々0.26, 0.52, 0.86秒なので、細胞内のアンモニウムの縦緩和時間はかなり短くなっている。アンモニウムのN-14縦緩和時間は、金属イオンによってはほとんど変化しないので[5]、細胞内の緩和時間が短いのは、細胞内液の粘性が細胞外液の粘性に比べて2-5倍高いことによるものと考えられる。現在、粘性の寄与について検討しており、生体系でのアンモニウムの定量測定の可否について報告したい。

References

- [1] R.E. Richards & N.A. Thomas, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 368-374 (1974)
- [2] O. Lutz, T. Erata, H. Forster & D. Muller, *Naturwissenschaften* 73, S97-S98 (1986)
- [3] R.S. Balaban & M.A. Knepper, *Amer. J. Physiol.* 245, C439-C444, (1983)
- [4] S.C. Chu, M.M. Pike, E.T. Fossli, T.W. Smith, J.A. Balschi & C.S. Springer Jr., *J. Magn. Reson.* 56, 33-47 (1987)
- [5] T. Raj & R.G. Bryant, *J. Magn. Reson.* 34, 537-542 (1979)

Fig. 1-b

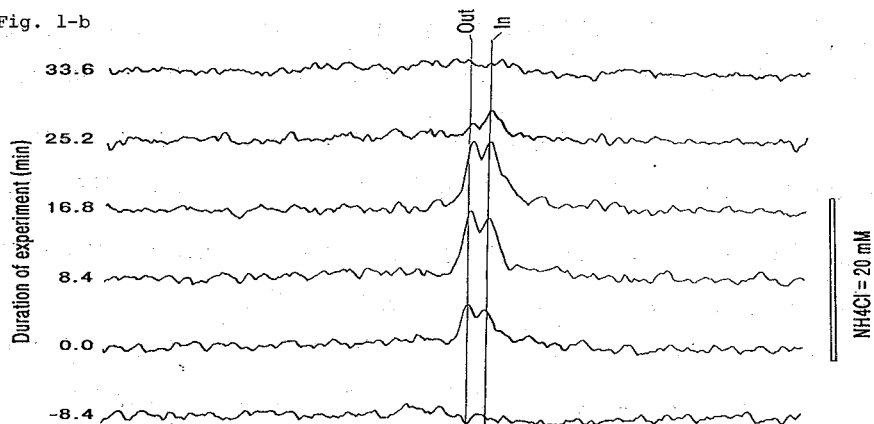


Fig. 1-a

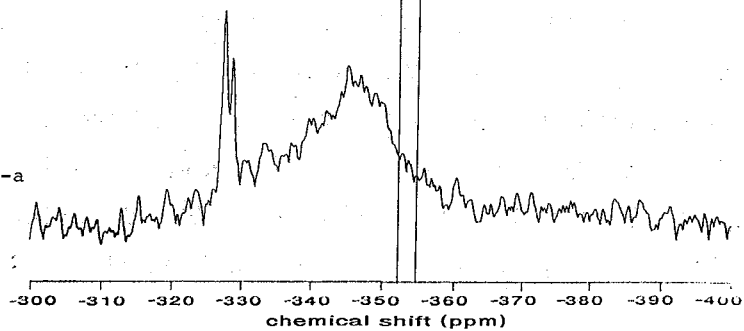
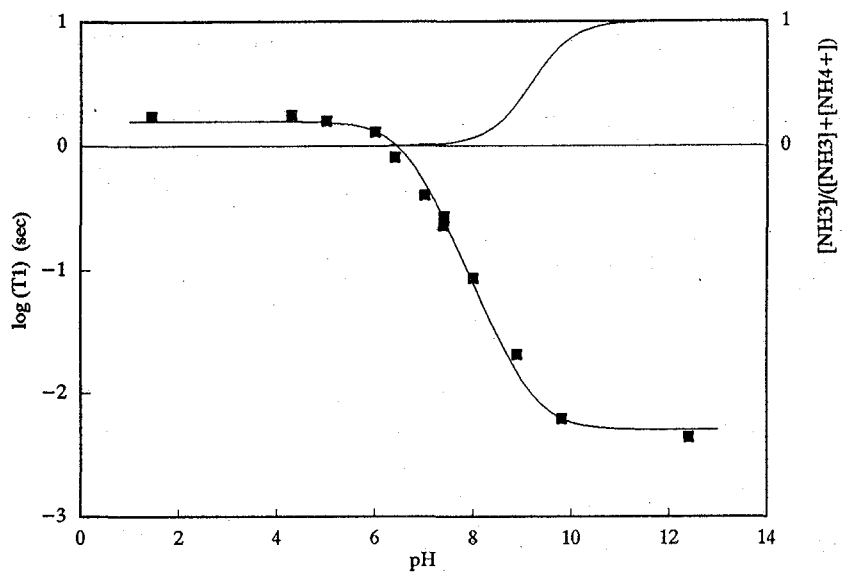


Fig. 2



特別講演Ⅱ

Multinuclear NMR Studies of Silica Surfaces

Gary E. Maciel, Charles E. Bronnimann, Robert C. Zeigler and I-Ssuer Chuang
Department of Chemistry, Colorado State University,
Fort Collins, CO 80523

$^1\text{H} \rightarrow ^{29}\text{Si}$ cross polarization, with magic-angle spinning, provides a highly valuable surface-selective approach for observing local silicon environments on the silica surface. The ^1H CRAMPS approach distinguishes clustered and isolated surface silanols. Correlations of the variations in ^{29}Si and ^1H peak intensities with silane loading level in $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ -derivatized silica gels suggests a specific model of the silica surface. Other nuclides, e.g., ^2H , ^{13}C and ^{15}N , along with ^{29}Si , provide valuable approaches for the characterization of local structure and motion in derivatized (silylated) silicas.

第 3 日

11 月 21 日 (水)

L21 ~ L29

L21

^{31}P の 2次元 anti-echo COSY, Double-quantum, および Zero-quantum
Cross-Polarization Magic-Angle-Spinning NMR

○久保厚・A. Root・C.A. McDowell (東京都立大学・The Univ. of
British Columbia)

Two dimensional ^{31}P NMR coherence transfer experiments under magic-angle sample
spinning

Atsushi Kubo, Andrew Root, and Charles A. McDowell

(Tokyo Metropolitan Univ., The Univ. of British Columbia)

In this paper, we report on two dimensional (2D) ^{31}P Cross-polarization (CP) magic-angle-spinning (MAS) NMR experiments on the coupled two-spin systems, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (SP) and $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{PP}(\text{O})(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ (TPPO), including anti-echo COSY, double-quantum NMR and zero-quantum NMR experiments. There are two mechanisms of coherence transfer; the homonuclear J-coupling and the dipolar coupling. In the case of TPPO, where the two ^{31}P nuclei have different isotropic chemical shift values, the flip-flop terms in the hamiltonian can be ignored to interpret the experimental 2d spectra.

1. 研究目的 ^{31}P を含む固体粉末試料を分析する方法として、 ^{31}P の cross-polarization (CP) magic-angle-spinning (MAS) NMR法は有力である。 ^{31}P 核の天然存在比が100%であるため、 ^{31}P 核スピンの間には磁気双極子相互作用やJ結合が働いており、CP-MAS NMRスペクトルは複雑な線形を示す。(2,3) これらのスピン結合を利用すれば溶液の高分解能NMRでよくもちいられている anti-echo COSY, double-quantum, zero-quantum 2次元NMR法で二つ以上の核スピンの相関を見ることが可能である。本研究ではこれらの実験をMAS条件下で行い、2次元の spinning side-band intensityから、化学シフトテンソルの相対的な方向の決定を試みた。これらの実験は Kentgenらの2次元 exchange CP-MAS NMR法を一般化したものである。(4) またこの方法で得られる化学シフトテンソルの相対的な方向からは粉末固体やアモルファス固体の化学結合の方向などの物質のミクロな構造についての情報が得られるはずである。固体試料の場合、coherence transferの機構としては磁気双極子相互作用とJ結合がある。磁気双極子相互作用はMASにより時間変化するので、spinning周波数の整数倍が化学シフトの等方値の差に等しい条件、rotational resonance conditionでのみ重要になると予想される。(1, 2, 3)

2. 実験 本研究では $\text{Zn}[(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{PS}_2]_2$, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{PP}(\text{O})(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ の三つの試料(以下ZNP, SP, TPPOと略す。)を用いた。ZNPの結晶中には橋かけとキレートの種類2種の配位子が存在し、最近接の ^{31}P 核間距離は4.77Åとかなり離れている。SPとTPPOはほぼ2スピン系と見なせる。SPの結晶中では P_2O_7 イオン中のふたつの ^{31}P 核は互いに2回転軸で関係づけられる位置にある。これらの ^{31}P 核の化学シフトの等方値は等しいがテンソルの方向は異なる。 ^{31}P 核間距離はこれらのペアに対し2.9Å、次の近接 ^{31}P 核のペアに対し6.0Åで、

ほぼ2スピン系とみなすことができる。TPPOでは分子内のふたつの³¹Pは異なる化学シフトの等方値を持つ。P-P一重結合の結合距離は2.2Åと短いことから、この系もSP同様2スピン系と考えられる。以上の三種類の試料について³¹Pのanti-echo COSY NMRスペクトルの測定を行った。次式でパルス・シーケンスを示す。

$$\begin{array}{l}
 1H \quad (\pi/2)v(CW)w\text{-----decoupling-----} \\
 31P \quad \quad (CP)-y--t_1--(\pi/2)\psi_1\text{--acquisition}(\psi_r) \quad (1)
 \end{array}$$

ここで ψ_r (receiver phase)= $x \psi_1=x, y, -x, -y$ とした。

またTPPOとSPについてdouble-quantum及びzero-quantum NMRスペクトルの測定を行った。

(2)式でパルス・シーケンスを示した。

$$\begin{array}{l}
 1H \quad (\pi/2)v(CW)w\text{-----decoupling-----} \\
 31P \quad \quad (CP)\psi_1\text{--}\tau\text{--}(\pi)x\text{--}\tau\text{--}(\pi/2)x\text{--}t_1\text{--}(\pi/2)\psi_2\text{--acquisition}(\psi_r) \\
 \quad \quad \text{double-quantum NMR; } \psi_1=-y, (\psi_2, \psi_r)=(x, x), (y, -y), (-x, -x), (-y, y) \quad (2a) \\
 \quad \quad \text{zero-quantum NMR; } \psi_1=x, (\psi_2, \psi_r)=(x, x), (y, y), (-x, -x), (-y, -y) \quad (2b)
 \end{array}$$

NMRの測定はBruker社製のCXP200スペクトロメターを用い、³¹Pの共鳴周波数80.98MHzで行った。TPPOのanti-echo COSY NMRスペクトルの測定だけはBruker社製のMSL400スペクトロメターを用いて³¹Pの共鳴周波数161.98MHzで行った。absolute mode Fourier変換により2次元スペクトルを得た。

3. 結果及び解析 図1はZNPのanti-echo COSYスペクトルである。2次元のspinning sidebandはdiagonalにのみ現れている。anti-echo COSY experimentのsignalは次式のように書ける。

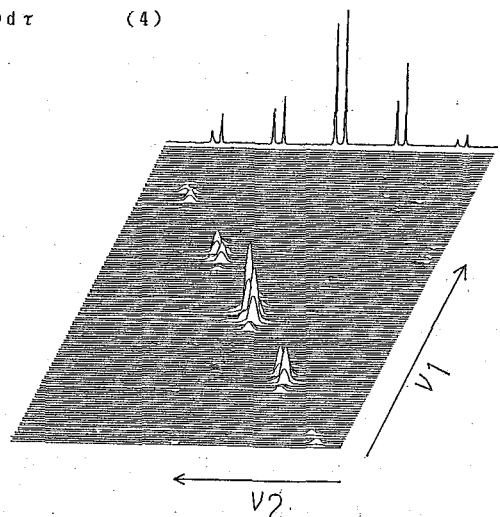
$$\exp\{i\phi_1(t_1)-i\phi_1(0)+i\phi_2(t_1+t_2)-i\phi_2(t_1)\} \quad (3)$$

ただし

$$\phi_k(t) - \phi_k(0) = \int_0^t \omega_k(\tau) d\tau \quad (4)$$

$\omega_k(t)$ はk番目の遷移の角振動数である。

ZNPのように磁気双極子相互作用もJ結合も弱い場合にはcoherence transferは起こらず、横磁化は t_1 periodと t_2 periodで同じ周波数で歳差運動を行う。この場合(3)式は t_1+t_2 のみの関数となり、off-diagonalのsideband intensityはゼロになる。(4) 図2 aはTPPOの実測のanti-echo COSYスペクトルである。TPPOでは大きな強度のoff-diagonal sideband peakが多数観測できた。



以前我々はTPPO及びSPの2スピン系について 図1 ZNPのanti-echo COSYスペクトル
磁気双極子相互作用の1次元CP-MAS NMRスペクトルと 2次元のspinning周波数は2006Hzであった。

クトルに与える影響について調べた。TPPOのように2種類の核スピンの化学シフトの等方向値が異なる場合には、荒い近似ではハミルトニアンはflip-flop項を無視して次のように書ける。

$$H(t) = \omega_1(t)I_{1z} + \omega_2(t)I_{2z} + \{J + 2d(t)\}I_{1z}I_{2z} \quad (5)$$

ここで $\omega_1(t), \omega_2(t)$ は I_1 及び I_2 スピンの共鳴周波数、 $d(t)$ 及び J は磁気双極子相互作用およびJ結合の結合定数である。(5)式のハミルトニアンをもとにproduct operator formalismを使って2次元anti-echo COSY NMRスペクトルを計算した。まず1次元CP-MAS NMRスペクトルのsideband intensityのシュミレーションにより化学シフトテンソルの主値をふたつの ^{31}P 核について求めた。次に化学シフトテンソルの相対的な方向を変化させながら2次元spinning sidebandパターンを計算し、実測のスペクトルと良い一致を与える配向を求めた。得られた計算のスペクトルを図2bに示した。図2aと2bの良好一致は(5)式の近似がほぼ正しいことを示している。さらにこうして得た化学シフトテンソルの値を使いdouble-quantum NMRスペクトルの計算を行った。計算のスペクトルは実測のスペクトルと良く再現した。(5)式の近似がTPPOについて妥当であることは、zero-quantum NMRの実験からも示すことができた。(5)式のハミルトニアンで表される2スピン系では、(2b)式のパルス・シーケンスを使った時、zero-quantum coherenceは励起されない。TPPOのzero-quantum NMRスペクトルは図3に示すように、同じpreparation periodを用いて測定したdouble-quantum NMRスペクトルに

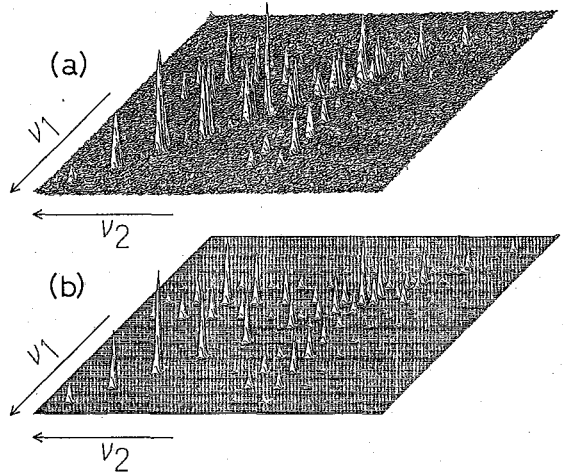


図2 TPP0のanti-echo COSYスペクトル spinning周波数4120Hz。(a)実測(b)計算

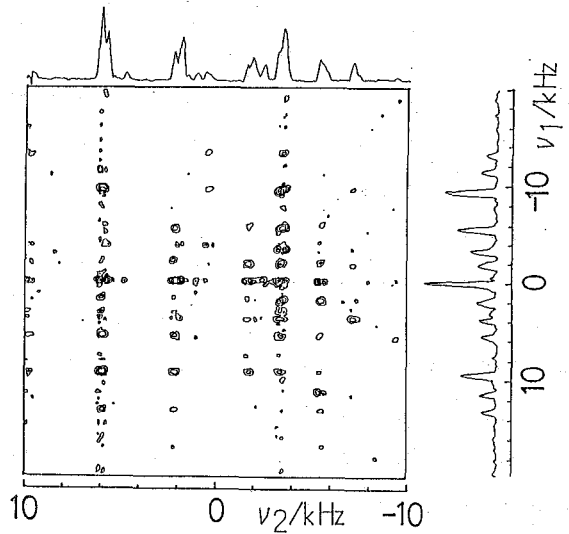


図3 TPP0のzero-quantum NMRスペクトル spinning周波数3800Hzで測定。

比べてSNが非常に悪い。この結果も(5)式の近似の妥当性を示している。

SPの場合ふたつのスピンは化学シフトテンソルの等方位が等しく、配向のみが異なる。この場合はもはやflip-flop項を無視できない。図5にSPのanti-echo COSYスペクトルを示した。spinning周波数が低い時、diagonalに近い部分にのみspinning sidebandが現れている。SPについては以前に単結晶³¹P NMRを行いふたつの化学シフトテンソルと磁気双極子相互作用テンソルの大きさと方向を決定した。この値を用いて(5)式より2次元スペクトルを計算した場合、実測のスペクトルを再現することはできなかった。また(2b)の脉冲・シーケンスを用いてzero-quantum NMRを観測したところdouble-quantum NMRとほぼ同じ強度でシグナルが観測できた。われわれは以前、SPの1次元CP-MAS NMRの線形の解析で次式のような摂動ハミルトニアンをもちいた。(3)

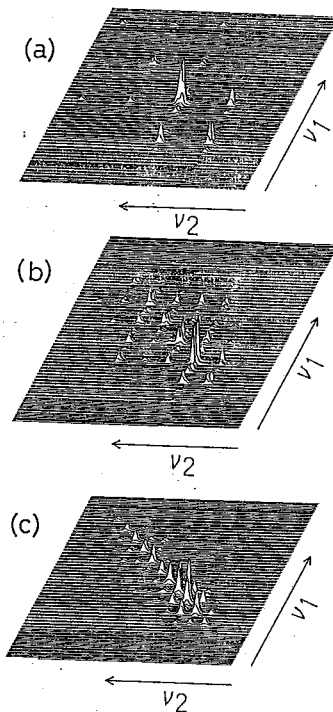
$$H_1'(t) = \sum \{ B_m^+ |1_+ 1_+ \rangle \exp(i m \omega_r t) + B_m^- |1_- 1_- \rangle \exp(-i m \omega_r t) \} \quad (6)$$

$$B_m = \text{Tr}^{-1} \int_0^{T_r} \{ J-d(t) \} / 2 \exp\{ i \int_0^t \omega_1(\tau) \omega_2(\tau) d\tau - i m \omega_r t \} dt \quad (7)$$

ここで ω_r はspinning周波数、 T_r はその逆数である。1次元CP-MAS NMRスペクトルの分裂はほぼ $2 B_0$ で与えられる。この項により引き起こされるcoherence transferは $d(t)$ 、 $\omega_1(t)$ 、 $\omega_2(t)$ の関数であるため、これらのテンソルの方向、あるいは結晶の配向に依存する。また各々のsidebandは、inhomogeneousな相互作用で広がり構造をもっている。2次元スペクトルの計算はJ couplingのみがcoherence transferの機構である場合に比べて非常に複雑となる。したがって化学シフトテンソルの相対的な方向を決定するという目的では、磁気双極子相互作用を取り除くことが望まれる。

(1a) E.R. Andrew, A. Bradbury, R.G. Eades, and V.T. Wynn, Phys. Letters, 4, 99 (1963). (1b) E.R. Andrew, S. Clough, L.F. Farnell, T.D. Glendhill, and I. Roberts, Phys. Letters, 21, 505 (1966). (2) M.H. Levitt, D.P. Raleigh, F. Creuzet, and R.G. Griffin, J. Chem. Phys., 92, 6347 (1990). (3) A. Kubo and C.A. McDowell, J. Chem. Phys., 92, 7156 (1990). (4) A.P.M. Kentgens, E.de Boer, and W.S. Veeman, J. Chem. Phys., 87, 6859 (1987).

図4 SPのanti-echo COSYスペクトル
spinning周波数は(a)3980Hz(b)2005Hz
(c)1060Hz



状態相関二次元NMR分光法による液晶分子の局所双極子場の分離と
スピン拡散経路の決定

(京大 理・*日本電子) ○内藤 晶・今成 司*・赤坂一之

Separation of local dipolar fields and determination of spin diffusion pathways in liquid crystals by state correlated 2D NMR spectroscopy.

Akira Naito, Makoto Imanari* and Kazuyuki Akasaka

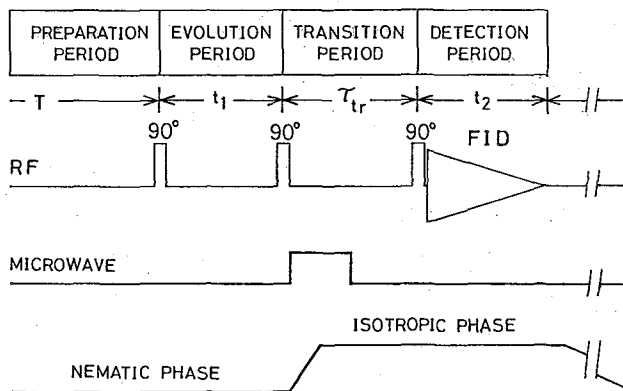
Faculty of Science, Kyoto University and *JEOL Ltd.

Nematic-isotropic phase correlated 2D NMR spectrum was successfully obtained in 4'-ethoxybenzyliden-4-n-butylaniline (EBBA). Transition from nematic to isotropic phase was realized within 0.2 sec using microwave pulse of 2.45 GHz in the transition period in a state correlated 2D NMR pulse sequence. Local dipolar fields of eleven magnetically different protons in EBBA in the nematic phase were separately observed in F1 dimension by means of well resolved signals in the isotropic phase. Spin diffusion caused mixing of the spin states and gave mixed patterns in the 2D NMR spectrum in the F1 dimension, which gave information on spin diffusion pathways in EBBA in the nematic phase.

【序】 液晶の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに現れる双極子パターンには、液晶の秩序因子、分子構造、運動性に関する有用な情報を含んでいる。しかし、液晶の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、双極子相互作用による広幅化のため共鳴線は互いに重なり合い、特定の核の双極子相互作用を分離観測するのは難しいのが通常である。本研究では、演者等によって開発された状態相関二次元NMR分光法を用い、液晶相と等方相との間のNMRスペクトルの相関をとることにより、等方相の分解能で液晶相における各共鳴線の局所双極子パターンを観測することを試みた。この分光法は液晶の物性研究に対して新しい方法論を提供するものである。本講演では、この状態相関二次元NMR分光法を液晶試料に適用する場合の基本的な問題である、マイクロ波を用いた高速温度ジャンプによる液晶相等方相転移、局所双極子場の分離、スピン拡散経路の決定について報告する。

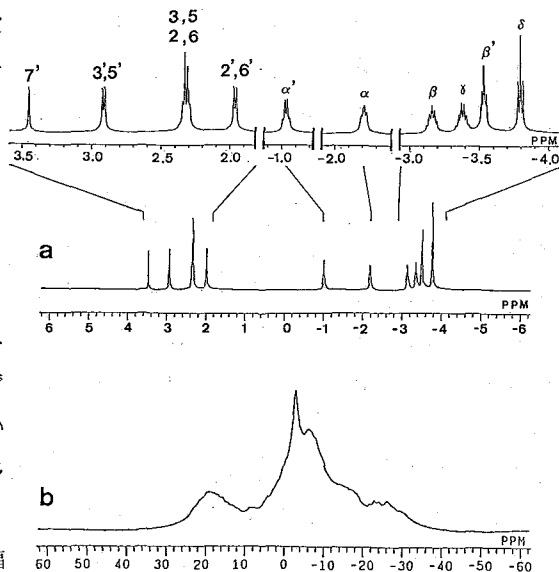
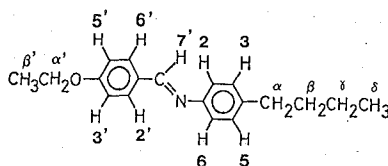
【測定原理】 図1に状態相関二次元NMRスペクトル測定のためのパルス系列を示す。まず準備期間では、試料を液晶相に保つ温度に設定する。準備期間の最後に 90° パルスを照射して磁化を磁場に垂直な方向に倒し、発展時間 (t_1) 磁化を液晶状態で時間推進させる。次に2番目の 90° パルスを照射し、磁化を静磁場の方向に向ける。引き続き転移期間内にマイクロ波を照射し、液晶相から等方相に素早く相転移を起こさせる。3番目

の 90° パルス後の検出期間 (t_2) に等方相状態で自由誘導減衰 (FID) を検出する。こうして得られる二次元 FID、 $f(t_1, t_2)$ を二次元フーリエ変換することにより、二次元 NMR スペクトル、 $F(\nu_1, \nu_2)$ が得られる。この二次元 NMR スペクトルの F2 軸への投影は等方相のスペクトルを与え、



その各々の吸収線の F1 軸には 図 1 状態相関二次元 NMR 分光法のパルス系列 液晶相での吸収線形が現れる。このパルス系列の特徴は転移時間の存在であり、 t_1 時間の状態を記憶しているためには、スピン-格子緩和時間より短く設定する必要がある。

【実験】 液晶試料として、4'-エトキシベンジリデン-4-n-ブチルアニリン (EBBA) を使用した。この試料の等方相液晶相転移温度は 80°C である。 $^1\text{H-NMR}$ の測定は日本電子製 GX-400 パルス FT-NMR 分光器を使用して行った。温度ジャンプの実験は分光器付属の温度可変装置で 78°C に設定し、マイクロ波パルスを照射して行った。マイクロ波 (2.45 GHz) は東京電子製パルスマイクロ波発生装置 (最大 1.3 kW) を用いて発生し、NMR 分光器のパルスプログラマーでタイミングを制御した。NMR プローブには、マイクロ波が照射できるようにマイクロ波用コイルを導入した。



【結果と考察】

液晶の高速温度ジャンプ NMR 図 2 に EBBA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。図 2 a は 82°C で測定した等方相状態のスペクトルを示しており、図 2 b は 78°C で測定した液晶状態のスペクトルを示している。等方相における各スペクトル線は、多重項パターンを解析することにより、図 2 に示すように帰属された。等方相では線幅の狭い共鳴線がすべて 10 ppm の範囲内に分布しているが、液晶相のスペクトル

図 2 EBBA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
a. 等方相、b. 液晶相

は 70 ppm にもわたって分布する線幅の広いスペクトルを示していることが分かる。したがって、一次元 NMR スペクトル単独で共鳴線の帰属を行い、双極子パターンを解析することは不可能である。状態相関二次元 NMR スペクトルを得るには、スピン格子緩和時間以内に相転移を完了させなければならない。そこで、マイクロ波を用いた温度ジャンプの実験を行い、相転移に要する時間を測定した。この結果、図 3 の時間分解スペクトルに示すように 0.3 秒のマイクロ波照射によって液晶は完全に相転移を完了し、等方相に転移することが確認された。しかし、マイクロ波照射直後は残留マイクロ波のために、信号にノイズが混入するので、マイクロ波照射完了後、0.3 秒のデッドタイムを開ける必要があった。図 3 では 0.3 秒のマイクロ波照射後、0.4 秒のデッドタイムを開け、図 3 b のスペクトルが観測された。次に、78℃ (液晶相) と 82℃ (等方相) で ^1H の縦緩和時間を測定した結果、液晶相の緩和時間はすべての ^1H について等しく 1.4 秒であり、等方相の緩和時間は 0.9 秒から 1.9 秒の範囲であることが分かった。この液晶試料において液晶相から等方相に転移するとき、縦緩和時間に大きな変化がないことが判明した。

状態相関二次元 NMR スペクトル

温度ジャンプの実験から、図 1 のパルス系列における転移時間を 0.7 秒に設定することが可能になった。この時間はスピン格子緩和時間以内であるので、状態相関二次元 NMR スペクトルの測定が可能であると期待できる。実際、準備期間を 78℃ に設定して、0.3 秒のマイクロ波を照射し、0.4 秒のデッドタイムを開けたパルス系列を用いて状態相関二次元 NMR スペクトルを観測した

結果、図 4 に示す二次元 NMR スペクトルが得られた。F2 軸の投影図は等方相のスペク

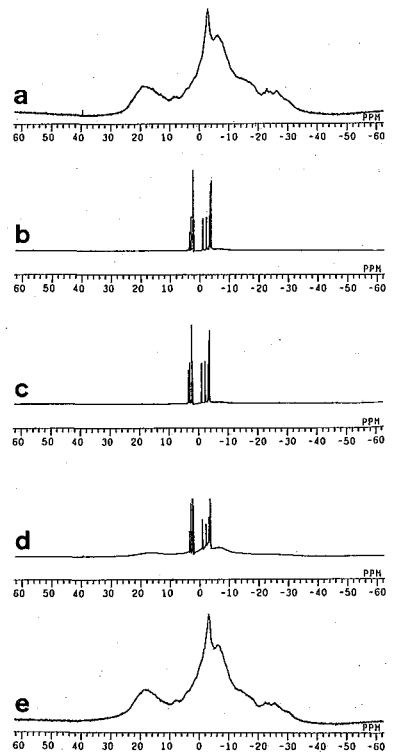


図 3 高速温度ジャンプ NMR スペクトル。

- a. マイクロ波照射前
- b. 照射後 0.7 秒
- c. 20.7 秒後
- d. 60.7 秒後
- e. 80.7 秒後

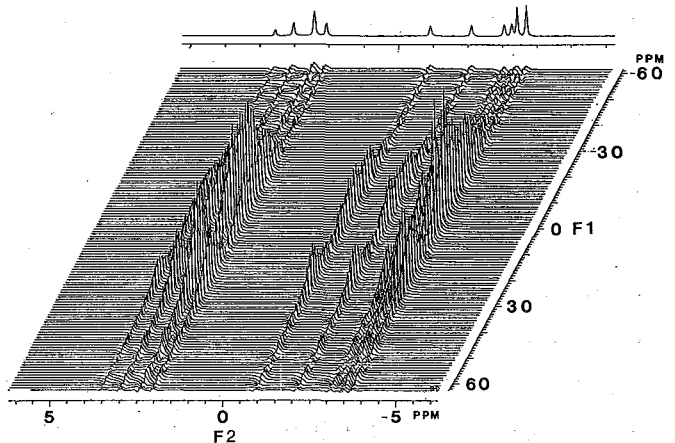


図 4 EBA の状態相関二次元 NMR スペクトル

トルを示しており、その各々の ^1H スペクトルの F1 軸はプロトンの局所双極子場を反映した双極子スペクトルが現れている。各々のスペクトルの F1 軸への断面図を図 5 に示す。この断面図を解析することにより、このスペクトルには次のような特徴が認められた。

①メチルプロトン (δ 、 β') のスペクトルに三重項パターンを示すスペクトルが現れている。さらにこの三重項の分裂幅は β' の方が δ より大きい。これは双極子結合をもつ等価な 3 スピン系のパターンを示している。

②芳香族プロトンとメチレンプロトンのスペクトルには基本的に大きな分裂幅をもつ二重項線が認められる。これは強い双極子結合をもつ 2 スピン系のパターンを示している。

③各スペクトルは純粋な 3 スピン系、2 スピン系の単独パターンではなく、それらが混ざりあっている。この原因は転移時間にスピン拡散が起こり、それぞれのプロトンの中でスピン交換が起こるからである。これは 2D-NOE や 2D 交換スペクトルにおける交差ピークの出現に対応する。したがって、 β' のスペクトルにおいて比較的分離の良い三重項パターンが現れているのは、

このメチルプロトンが他のプロトンから比較的分離されていることを示している。この情報は液晶の分子内スピン拡散経路が決定できることを意味している。すなわち、芳香族プロトンやメチレンプロトンのスペクトルは、完全に混ざり合っよく似た線形を示しているが、メチルプロトンは他のプロトンと比較的分離されているのでメチルプロトン由来の三重項のパターンが現れている。このことは、芳香族プロトンやメチレンプロトンの間のスピン交換は速く、これらのプロトンとメチルプロトンの間のスピン交換は比較的遅いことを意味している。

【まとめ】 本研究において、状態相関二次元 NMR 分光法を液晶試料に適用することにより、 ^1H の SLF-2D スペクトルが容易に得られることが判明した。従来、このようなスペクトルを得るには多重パルス等調整の困難な実験方法を行うか、または同位体標識を行う必要があった。状態相関二次元 NMR 分光法は困難な装置の調整も必要なく、一般の液晶試料に適用できると期待できるので、液晶の物性研究にとって非常に優れた方法である。さらに、スピン拡散経路の決定が可能であることが判明した。装置面ではマイクロ波パルスの立ち上がり時間が短くなれば、相転移に要する時間はさらに短縮され、より明確に局所双極子場の分離やスピン拡散経路の決定が行えるものと期待できる。

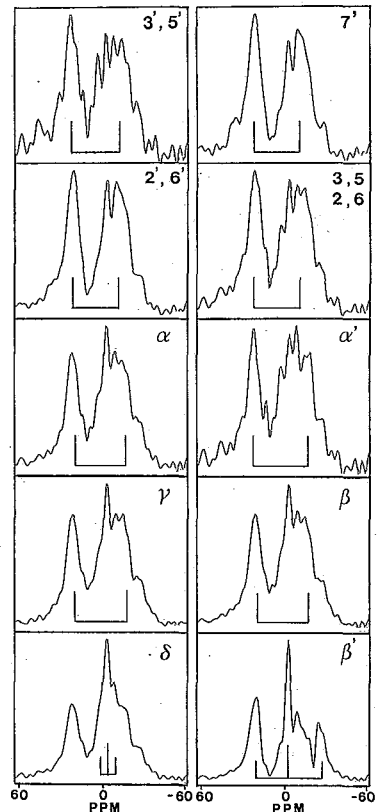


図 5 状態相関二次元 NMR スペクトルの断面図。

(北大工) 平沖 敏文、小亀 朗由、堤 耀広

Side Chain Dynamics of Racemic Poly(γ-benzyl-L-glutamate) by Solid State ²H-NMR

T. Hiraoki, A. Kogame, and A. Tsutsumi

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

It is well known that the phenyl rings of racemic poly(γ-benzyl-L-glutamate) form the regular stacking in the solid state, and that the stacking breaks down at above 90°C. Deuterium quadrupole echo spectroscopy is used to study the effect of the side chain dynamics for the stacking. Temperature-dependent lineshapes, T₁ were employed to determine the dynamics. The phenyl rings locally undergoes rapid two-fold flip even in the racemic form. The onset temperatures for additional large amplitude motions are higher at 10-20K in the racemic form than in the L form, suggesting that the side chain motions in the racemic form are restricted.

poly(γ-benzyl-L-glutamate)(PBLG)は右巻きのα-helixでそのD体のPBDGは左巻きのα-helixである。L体とD体のラセミ混合物では、固体中で隣接するL体とD体の側鎖末端のフェニル環同志が交互に重なり合うstacking構造をとると考えられている。この規則構造は90°C以上で壊れることがX線回折²⁾、誘電緩和³⁾、DSC、比容などから明らかにされている。本研究では側鎖を重水素化したPBLGとPBDGのラセミ混合物のstackingの影響がどのように固体重水素NMRスペクトルに現れるか検討した。

実験

フェニル基とα位を重水素化したPBLG(PBLG-d₅, PBLG-ε-d₂)はpoly(γ-methyl-L-glutamate)と対応する重水素化ベンジルアルコールよりエステル交換により調整した。ラセミ体はこれらの重水素化PBLGとPBDGを1対1に混合したクロロホルム溶液からキャストして得た。いずれの試料もDSC測定により90°C付近に吸熱ピークが存在することを確認した。固体重水素NMRスペクトルはBruker MSL-200(30.7 MHz)を用い、四重極エコー法により得た。90度パルス幅は約1.4μsである。T₁はInversion-recovery四重極エコー法で測定した。

結果と考察

(a) PBLG-d₅ / PBDG

低温におけるスペクトルをFig.1に示す。ラセミ体、L体ともに四重極分裂幅129kHzのほぼ軸対称な線形で、スペクトルの中央部に分裂幅28kHzのシグナルが重なっている。これはフェニル環が約10kHzでflip-flopしていることを示している。温度上昇に伴いこのシグナルの強度が増し、flip-flopの速度が速くなる。両者のスペクトルに差異は認められなかった。

室温以上におけるスペクトルの温度依存性をFig.2に示す。L体では約30°Cから、スペクトルの線形や強度が大きく変化し始める。

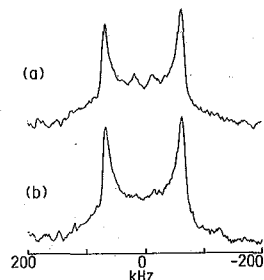


Fig.1 ²H-NMR spectra of PBLG-d₅:
(a)racemic-form at -100°C,
(b)L-form at -95°C.

これはフェニル環の flip-flop 運動に加えて、他の大振幅の運動が寄与するようになるためである。一方、ラセミ体ではこの温度は約 5°C で、L 体よりも 2°C 高い。さらに、L 体では 75°C 以上で、ラセミ体では 85°C 以上でスペクトルは singlet になり、複雑な速い運動が生じていることを示している。

$20 - 70^{\circ}\text{C}$ の温度領域でラセミ体の T_1 は L 体の T_1 より約 20% 長く、この温度領域は $T_{1 \text{ min}}$ より低温側にある。これはラセミ体のフェニル環の運動が L 体よりもわずかに抑えられていることを示している。この領域以外では両者の T_1 はほぼ一致した。

(2) PBLG- ζ d2 / PBDG

20°C ではラセミ体、L 体ともに四重極分裂幅が約 110 kHz の軸対称なスペクトルが得られた。この分裂幅は理論値の 128 kHz よりも小さく、速い libration の存在を示している。温度上昇に伴い exchange broadening し始める。L 体では 80°C 以上で singlet になり、 $\text{O}=\text{C}$ と軸のまわりのジャンプ運動に加えて他の大振幅の速い運動が寄与している。一方ラセミ体では L 体と同様な傾向を示すが、同じ線形を示す温度が L 体よりもほぼ $10 - 15^{\circ}\text{C}$ 高い。

以上より、ラセミ体のスペクトルの線形が変化する温度は、L 体より $10 - 20^{\circ}\text{C}$ 高く、側鎖フェニル基の stacking により側鎖全体が関与する運動が抑えられると考えられる。フェニル環も ζ 位のメチレン基もローカルにはかなり速く運動しているから、stacking は束縛の緩い状態にあるものと考えられる。講演では、 γ 位を重水素化したラセミ体についての結果もあわせて検討する予定である。

謝辞 測定に際し、お世話になった下川繁三博士に深謝します。

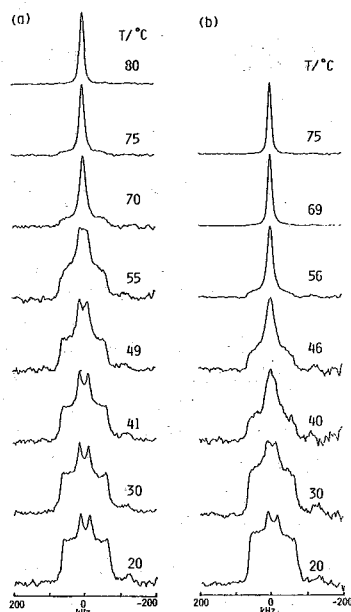


Fig.2 Temperature dependence of ^2H -NMR spectra of PBLG-d5; (a) racemic-form, (b) L-form.

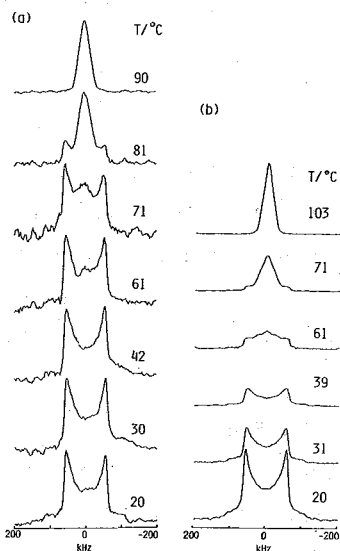


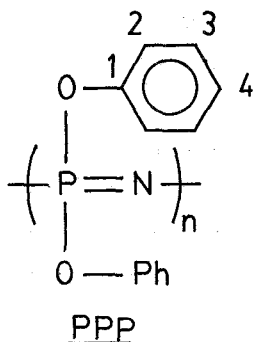
Fig.3 Temperature dependence of ^2H -NMR spectra of PBLG-d2; (a) racemic-form, (b) L-form.

1) Y. Mitui, et al., J. Mol. Biol., 24, 15 (1967), J. M. Squire and A. Elliott, J. Mol. Biol., 65, 291 (1972). 2) M. Yoshikawa, et al., Polym. J., 7, 96 (1975). 3) T. Takahashi, et al. Macromolecules, 7, 806 (1974). 4) T. Hiraoki, et al., 第28回 NMR 討論会 (東京) 1989.

L24

(北大・理) ○竹腰 清乃理、引地 邦男

(日本曹達) 東田 史朗



ポリフェノキシホスファゼン (PPP: 左図) の主鎖の ^{31}P の NMR 信号は THF 溶液中では 1 本で、調べた PPP には枝別れなどは存在しないことが示されたが、固体では約 10 ppm 離れた 2 本の共鳴線が観測された (Fig. 1)。このような固体における NMR 信号の分裂はしばしば観測されて主に以下のような原因が上げられている: (1) 結晶中で非等価な分子が存在する、(2) 溶液中では平均化されている双極子相互作用や分子間水素結合などの相互作用が発現する、などである。PPP における分裂の原因を検討するために種々の実験を行った。

結果を以下に示す。(i) ^1H との回転系交差緩和による信号の増大は高磁場側の信号 (信号 a) のほうが顕著である、(ii) 311 K での縦緩和時間は信号 a が約 1.4 秒、信号 b が約 5 秒であった、(iii) 温度を上げると信号 a の強度が減少し信号 b の強度は増大した (Fig. 2)。以上のことより信号 a を与える ^{31}P は運動性が信号 b の ^{31}P より乏しいことが明らかになった。よって PPP において観測された主鎖の 2 本の ^{31}P 信号は PPP の結晶性領域 (信号 a) と非晶相領域 (信号 b) を反映しているのではないかと考えられた。このような結晶-非晶相における共鳴位置の変化は例えばポリエチレンの ^{13}C にも観測されているがその分裂は小さく (約 2 ppm、文献 1)、PPP に

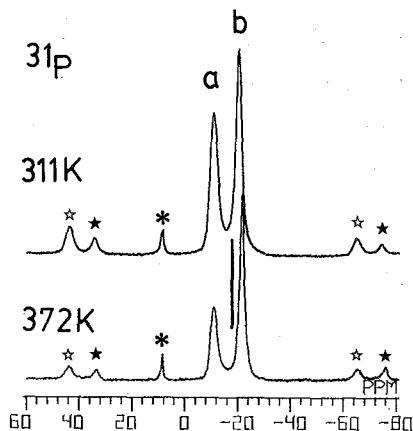


Fig.1 ^{31}P MAS spectra of PPP taken at 311 and 372K. The peaks marked with ☆ and ★ are spinning sidebands of peak-a and peak-b, respectively. The peak with * is unknown impurity. The bar denotes the resonance position in THF. The chemical shift is given in ppm by taking 85% H_3PO_4 as an external reference.

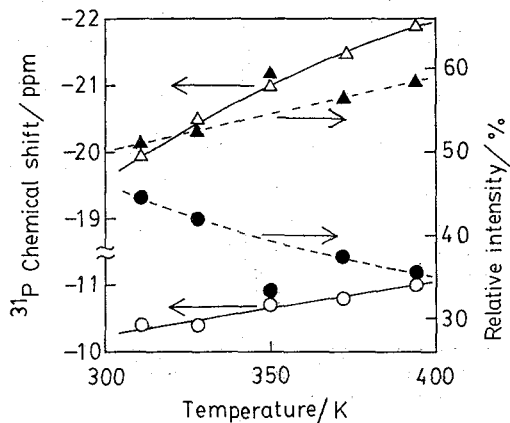
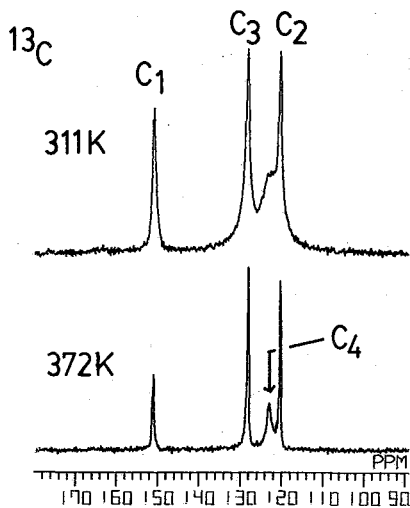


Fig.2 Temperature dependence of relative intensity of peak-a (●) and -b (▲). Also temperature dependence of ^{31}P chemical shift is plotted for peak-a (○) and -b (△). The lines are drawn to guide reader's eyes.

における大きな分裂(約10ppm)は ^{31}P の化学シフトが ^{13}C に比べて電子構造の違いを大きく反映するということが、PPPが結晶/非晶で異なった電子構造をとりうることなどによるものであろう。例えば、結晶ではトランス構造をとり、二重結合間の共鳴が起こっているのに対し、非晶ではトランスとシス間を転移運動して二重結合間の共鳴が起こりにくくなっているというような違いが ^{31}P の10ppmもの違いとして現れたのではないかと我々は考えている。信号強度と共に共鳴位置の温度依存性も観測された(Fig. 2)。温度依存性は非晶相のものと考えられた信号bのほうが著しく、主鎖の運動が化学シフトに影響を与えていることが分かる。

^{31}P の信号は2本に分裂しているが側鎖の ^{13}C の信号にはそのような分裂はみられない(Fig. 3)。311Kと372Kでのスペクトルを比較すると、特に311KでC4の線幅に増大がみられている。また372KにおいてもC4の線幅は他のものよりも大きい。このことよりC2やC3においては直接結合したHとの双極子相互作用はフェニル環のO-C結合の廻りの運動より平均化され既に小さくなっていることが分かる。C4における直接結合したHとの双極子相互作用はP-O結合の廻りの運動に影響されるが、311Kにおける線幅の増大はこの運動が311K付近で ^1H スピンの照射による強制回転と干渉しあっている(文献2)ためと考えられる。即ち、P-O結合の廻りの運動は311Kにおいて約50kHz程度と示唆される。このように側鎖はそれ自身で局所的運動を行っており結晶/非晶という巨視的構造の違いは運動により平均化され、側鎖の ^{13}C においては主鎖の ^{31}P でのような信号の分裂は観測されていない。



試料は日本曹達社製PLP210(分子量約20万)をそのまま用いた。NMR測定は日本電子社製JEOL GX270を用いた。 ^{13}C 、 ^{31}P 、 ^1H の共鳴周波数はそれぞれ約67、109、270MHzでマジック角回転(回転周波数6kHz)と ^1H 核照射(照射強度56kHz)を併用して固体高分解能スペクトルを得た。

Fig.3 ^{13}C MAS spectra taken at 311 and 372K.

(文献)

- (1) W.L. Earl and D.L. VanderHart, *Macromolecules*, 12, 762 (1979).
- (2) W.P. Rothwell and J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.* 74, 2721 (1981).

L25

○齊藤 肇¹, 吉岡 佑子¹, 横井もと子¹, 明田川 純², 田中重則²,
柴田有康², 恵良田知樹³, 行本 徹⁴, 竹山秀伸⁴, 矢島博文⁴,
遠藤隆一⁴

(¹国立がんセンター, ²生化学工業, ³筑波大, ⁴東京理大)

Identification of Multiple-stranded Helices of Polysaccharides by ¹³C NMR

H. Saitô, Y. Yoshioka, M. Yokoi, J. Aketagawa, S. Tanaka, Y. Shibata, T. Erata,
T. Yukimoto, H. Takeyama, H. Yajima and R. Endo

(Natl. Cancer Ctr. Res. Inst., Seikagaku Corp., U. of Tsukuba and Sci. U. of
Tokyo)

We examined hydration/dehydration-induced spectral change of ¹³C NMR spectra of some polysaccharides, including (1→3)-β-D-glucan, (1→3)-β-D-Xylan, (1→4)-α-D-glucan, agarose and carrageenans. It was found that this method provides a convenient means to distinguish the single helical chain from the multiple-stranded helices. Conformational features thus obtained were related to a variety of physical and biological properties of these polysaccharides.

1. はじめに

多糖の高次構造を明確にする有力な手段はX線回折であることは間違いない。しかし、この方法は結晶性の良好な試料に限定されること、線維図形であるために回折点の数が限定され、分子力学等のモデルに強く依存する傾向のあること等、多くの問題をふくむ。一方、分子力学パラメーターは、炭水化物のように水和性の高い系に対しては、蛋白質、核酸のように疏水的相互作用の大きい系ほどには、信頼性のあるデータが得られないのが現状である。このような現状をふまえると、多糖の高次構造の解明の相補的手段としての¹³C 固体高分解能NMRの重要性が浮かび上がってくる。¹³C NMR法は、結晶、非晶を問わずコンホメーションに関する知見が得られるため、多糖の種々の物性、あるいは生物活性との関連を理解する上で有用である。

多糖は二重あるいは三重らせんの多重鎖構造をとるものが多い。問題としている糖鎖が一重あるいは多重鎖のいずれかの決定は、X線回折を用いても容易ではない。しかし、これは種々の物性や生物活性を決定する要因になり得るため、そのコンホメーションを簡便に決定する方法が望まれる。今回、水あるいはDMSO溶媒系からの脱水、あるいはその逆過程である水和にともなう¹³C NMRのスペクトル変化からこの問題を容易に取り扱えることがわかり、多くの系への応用が可能であることがわかったので報告する。

2. (1→3)-β-D-グルカン (I) における脱水/水和にともなう変化の特長

多糖の固体におけるコンホメーションは、必ずしも最もエネルギー的に安定な一つの状態にあるとは限らない。(1→3)-β-D-グルカンの場合に詳細に検討した結果を図1に示すが、前処理の条件によって三種類のコンホメーション間で転換が起こる^{1,2)}。このときの¹³Cスペクトル変化のうちで、一般的な変化を表1にまとめた。

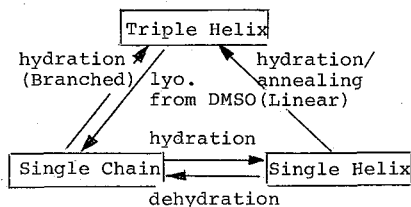


図1. (1→3)-β-D-グルカンの三種類のコンホメーション間の転換経路

表1に示す変化の特長は(1)脱水/水和によるスペクトル変化を起こすのは一本鎖/一重ラセン

のみであり、(2)DMSO処理によって三重ラセンがバラバラになればもとの構造の特長を失う、という点にある。このような変化は、(1→3)-β-D-グルカンだけでなく多糖一般の構造変化に

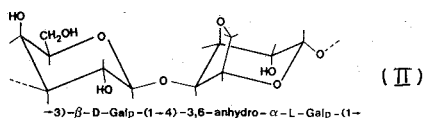
表1. (1→3)-β-D-グルカンの種々の処理にともなうスペクトル変化

| | 一本鎖/一重ラセン | 三重ラセン |
|-----------------|-----------|-------|
| 脱水/水和にともなうシフト変化 | + | - |
| DMSO処理によるシフト変化 | - | + |

特長であると考えられ、以下に述べる種々の多糖への応用を試みた。なお、(1→3)-β-D-グルカンの一重ラセンの存在は、ゲルの物性のみならず³⁾、リムルテスト、抗腫瘍性などの種々の生物活性に影響を及ぼす⁴⁾。

3. アガロース (II) カラゲナン⁵⁾

アガロースはIIに示す一次構造を持ち、直鎖



アガロースゲルのネットワーク構造はReesらによる二重ラセンの集合体と考えるモデルは有名である。これはアガロースのX線回折にもとづくモデルではあるが、高度に水和したゲルネットワークにそのままあてはまるかどうかは疑問である。実際、アガロースゲルは通常の高分解能NMRによって観測し得るピークが多数出現し、rigidなネットワークからはこのようなピークの存在が説明できない。図2に示すようにアガロースの水和、ゲル化、その凍結乾燥物のスペクトルパターンは、その間に線巾の差異がみられるものの、ほぼ一定である。さらに図3に示すように、DMAC溶液からキャストし、100℃で乾燥したフィルムを水和したもののスペクトルパターンは、ゲルの場合に著しく類似している。これはゲル化によってランダムコイル⇄二重ヘリックス間の転換を考える従来のゲル化機構に対し、一重鎖構造がドミナントであり、部分的な架橋のゲル化に導くと考える立場を支持する。カラゲナンの場合も同様の結果を得た。

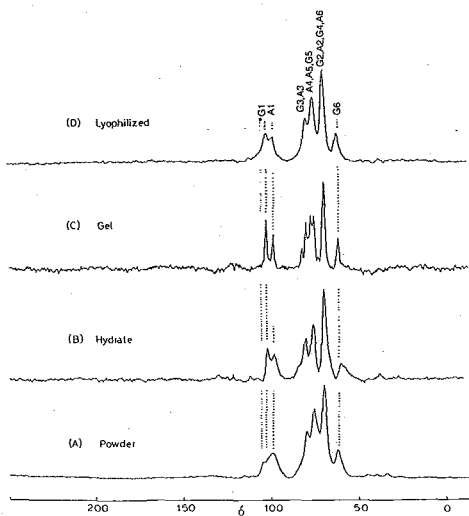


図2 アガロース (Type VII) の ^{13}C NMR スペクトル

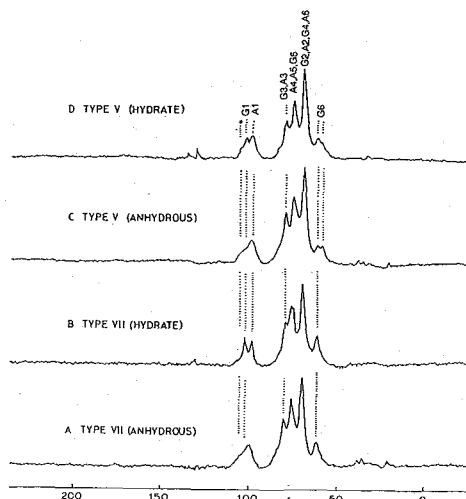


図3 アガロース (Type VII および V) フィルムの水和による効果

3. (1→3)-β-D-キシラン⁶⁾

(1→3)-β-D-キシラン (III) は、グルカンにくらべて C5 に結合したヒドロキシメチル基が存在しない構造である。したがって、高次構造をふくめ (1→3)-β-D-グルカンに類似した構造をとることが予測できる。緑藻から種々の条件で単離した (1→3)-β-

D-キシランの ^{13}C NMR スペクトルを図4に示す。このスペクトルパターンは、(A)-(D), (E), (F) の三種類に分類することができる。R = CH₂OH のおおよす ^{13}C 化学シフトにおおよす置換基効果は、β-キシロースとβ-グルコースのスペクトル差から容易に見積もることが出来る。その結果、(1→3)-β-D-グルカンで見出された三種類のコンホメーション(三重ラセン、一本鎖、一重ヘリックス)の ^{13}C 化学シフトを (1→3)-β-D-キシランに上記の置換基効果を考慮して換算すると、図4にみられる三つのグループの ^{13}C シフトはグルカンと同様三重ラセン、一本鎖一重ヘリックスの存在に帰着できることがわかった。これは、グルカン、キシランとも R がラセンの外側に位置することから同等のコンホメーションをとっておかしくない。ここに用いたコンホメーションは、いうまでもなく表1の条件を満足する。なお、キシランの三重ラセンは強固で DMSO 処理によっても、その構造を維持することがわかった。

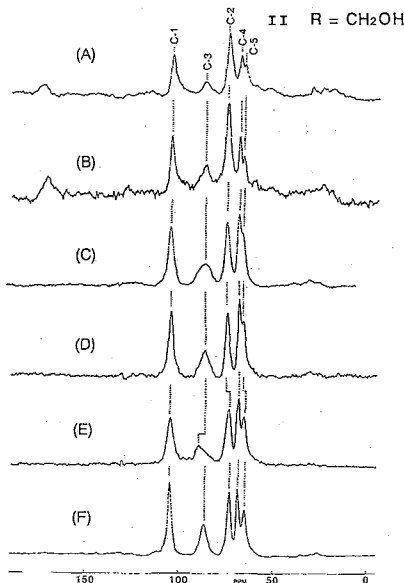
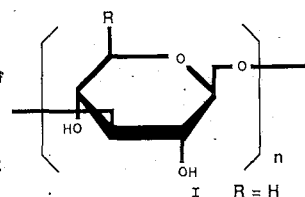


図4 種々の条件で単離した (1→3)-β-D-キシランの ^{13}C NMR (A) 乾燥葉状体, (B) 同水和物, (C) 沸水抽出, (D) 同水和物, (E) ZnCl₂ 抽出, (F) 同水和

4. (1→4)- α -D-グルカン⁷⁾

アミロースは一重ヘリックスであるVアミロースの他に、二重ヘリックスであるA及びB型の多形の存在が知られている。図5に示すように、DP100のDMSOからの凍結乾燥物はV形のスペクトルパターンを与えるが、その水和物は一部のV形の他にB型のパターンを与える。高重合度及びオリゴマーのアミロースも同様のパターンを与えるが、水和による構造の転換はほぼ100%であった。水和によってVからBに転換する過程はすでにBlackwellらによってX線回折からも認められてい

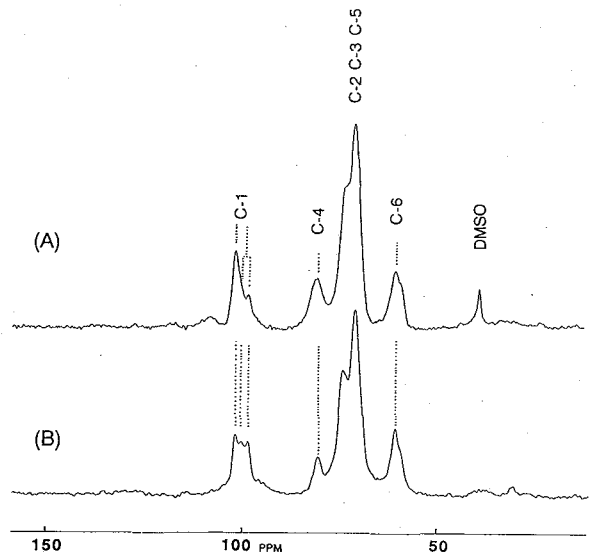


図5. Vアミロース及びその水和物の¹³C NMRスペクトル

るが、B形を二重らせんとする考え方に立てば水和のみの条件で一重鎖から二重鎖への組み換えがおこるとは考えにくい。このことは、B形を二重鎖とする考え方に問題があるのか、またはX線回折、NMRともにそのスペクトルパターンだけでは識別がつかないのか、どちらかであろう。しかし、本研究で用いたような試料の処理のヒストリーを考慮すれば、このような問題の解決には有用であることがわかる。

5. 結論

多糖のとり得る個々のコンホメーションの識別、とくに一本鎖と多重鎖の識別の判定には、脱水/水和、およびDMSO処理にもとづくスペクトルに変化の検討が有用であることがわかった。脱水/水和によるスペクトル変化は、多糖のみならず種々の線維状蛋白においても認められている^{8,9)}

文献

- 1) H. Saitô and M. Yokoi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 392-398 (1989)
- 2) H. Saitô, M. Yokoi and Y. Yoshioka, Macromolecules, 22, 3892-3898 (1989)
- 3) H. Saitô, Y. Yoshioka, M. Yokoi and J. Yamada, Biopolymers, 29, 1689-1698 (1990)
- 4) H. Saitô, Y. Yoshioka, N. Uehara, J. Aketagawa, S. Tanaka and Y. shibata, Carbohydr. Res., in press
- 5) H. Saitô, M. Yokoi and J. Ymada, Carbohydr. Res., 199, 1-10 (1990)
- 6) H. Saitô, J. Yamada, Y. Yoshoka, Y. Shibata and T. Erata, Biopoymers, submitted
- 7) H. Saitô, T. Yukimoto, H. Takeyama, H. Yajima and R. Endo, Manusript in Preparation
- 8) M. Ishida, T. Asakura, M. Yokoi and H. Saitô, Macromolecules, 23, 88-94 (1990)
- 9) H. Saitô and M. Yokoi, Manusript in Preparation

Structural Analysis of Wool Keratin and S-Carboxymethyl Keratines
in the Solid State

Hiroaki Yoshimizu, Hiroyuki Mimura, and Isao Ando

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152)

^{13}C CP/MAS NMR spectra of native wool fiber and four kinds of S-carboxymethyl keratines extracted from wool [low-sulfur fractions (SCMKA), helix-rich fragments (SCMKA-hf), high-sulfur fractions (SCMKB), and high-glycine-tyrosine fractions (HGT)] were measured in the solid state. Furthermore, ^{13}C CP/MAS NMR spectra of SCMKA films were measured under the unstretched, stretched, and heated conditions, where the film was prepared by casting from aqueous solution. From the observed ^{13}C chemical shifts, half-widths and relaxation parameters, it was found as follows. 1) the major conformations of SCMKA and SCMKA-hf were determined to be the right-handed α -helix form, but those of SCMKB and HGT to be the β -sheet form. 2) it was suggested that the coiled-coil structure exists in wool, SCMKA, and SCMKA-hf. 3) in SCMKA film, it was confirmed that β -sheet and random-coil forms appear upon stretching and heating, respectively. 4) it was found that the mobility of the main-chains of SCMKA does not change upon stretching or heating.

1. 緒言

繊維状タンパク質は、アミノ酸配列及び高次構造に周期性を持っており、その構造を明らかにすることは、物性との相関を議論するためにはばかりでなく、ポリペプチドの分子設計に関する情報を得る上でも極めて重要である。羊毛中に多量に含まれるケラチンタンパク質は、コラーゲンや絹フィブロインと比べると、アミノ酸組成が変化に富み、また複数のタンパク質から成っているのが特徴の一つである。羊毛ケラチンを構成する成分タンパク質は、繊維のマイクロフィブリル構成成分と考えられているCys残基が少ない成分(α -ヘリックス含量が多い)、及び主として非晶マトリックスに由来するCys残基の多い成分とGly、Tyr残基の多い成分に大別される¹⁾。私どもは ^{13}C CP/MAS NMRが羊毛及びケラチンタンパク質の固体構造研究に極めて有用な方法であることを示してきた^{2,3)}。本報告では、羊毛及び還元羊毛ケラチンであるS-カルボキシメチル化ケラチン(SCMK)を調製することにより、各成分タンパク質に分離し、その固体構造、及び延伸に伴う構造変化を固体高分解能 ^{13}C -NMR法を用いて検討した。

2. 実験

1) 試料: メリノ羊毛(64'S)を0.3% SDS水溶液で繰り返し洗浄し、水で十分にゆすいだ後アセトンで脱水して風乾し、試料として用いた。SCMKはO'Donnellらの方法⁴⁾に従って、2-メルカプトエタノール-8M尿素水溶液中で羊毛を可溶化した後、ヨード酢酸を用いてS-カルボキシメチル化反応を行い、更にDowlingらの方法⁵⁾により三つの成分に分離、調製した。Cys残基が少ない成分であるSCMKAは、溶媒として0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ を用い、溶解-等電点沈澱を繰り返すことによって精製し、最終的にはSCMKA水溶液をイオン交換水を用いて透析法により精製した後、凍結乾燥した。SCMKA膜は水溶液(2wt%)をテフロン板上に流延し、風乾により得た(膜厚は約100 μm)。SCMKA膜の延伸は、坂部らの報告⁶⁾を参考に、70%エタノール-水混合液中で行い、延伸倍率は延伸前後の延伸方向の寸法比で評価した。SCMKA膜の熱処理は窒素雰囲気下で200 $^{\circ}\text{C}$ 、3時間行った。SCMKAのヘリックスリッチフラグメント(SCMKA-hf)は、Crewtherらの方法⁷⁾に従い、 α -キモトリプシンで部分加水分解(pH=8.6、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5.5時間)することによりSCMKAから得た。

2) NMR測定: 固体高分解能 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルの測定は、CP/MAS装置付属のJEOL GSX-270 NMR分光器(67.8 MHz)を用いてTOSS法を併用して行った。 ^{13}C -NMR化学シフトは、アダマンタンを外部基準(29.5ppm)として測定し、これをTMS基準に換算した。スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)はTorchia⁹⁾の方法で、横緩和時間に対応する時定数(T_{DD})はDipolar Dephasing実験⁹⁾(DDph)により決定した。

3. 結果と考察

1) 図1に羊毛と各SCMKA試料の ^{13}C CP/MAS TOSS 及び DDph NMRスペクトルを、図2にカルボニル炭素領域の拡大スペクトルをそれぞれ示す。175ppm付近にカルボニル炭素のピーク、115-158ppm付近にPhe、Tyr残基の芳香族炭素のピーク、45-65ppm付近に α 炭素のピーク、10-40ppm付近に側鎖アルキル炭素のピークがそれぞれ観測されている。既にポリペプチドにおいて、 ^{13}C -NMR化学シフトが主鎖コンホメーションの情報を与えることが明らかにされており¹⁰⁾、 α -ヘリックスをとるカルボニル炭素は $175.8 \pm 0.8\text{ppm}$ に、 β -シートをとるカルボニル炭素は $170.9 \pm 1.2\text{ppm}$ にピークを、アミノ酸残基の種類にかかわらず与える。図2を見ると羊毛では175.3と173.2ppmにピークの頭があり、この二つ

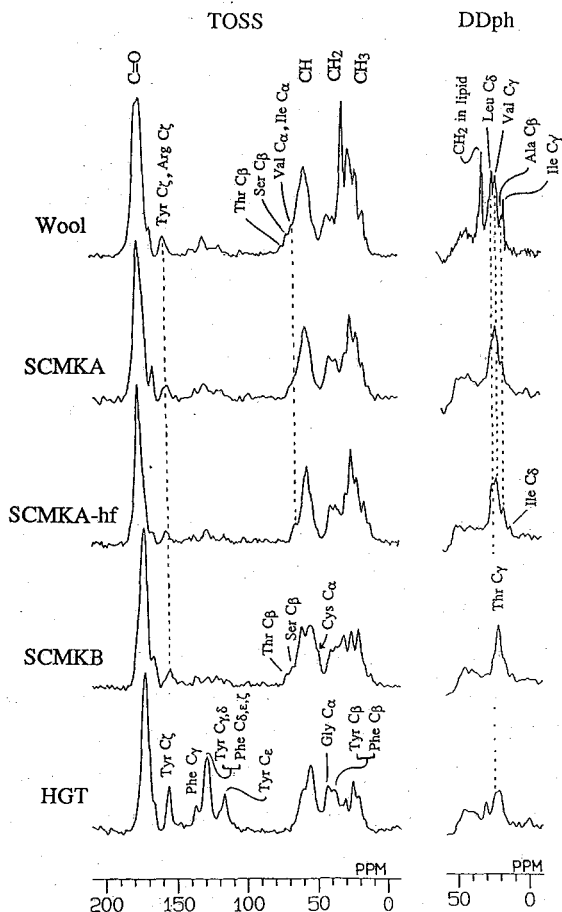


Figure 1

^{13}C CP/MAS TOSS NMR spectra of wool, SCMKA, SCMKA-hf, SCMKB and HGT in the solid state and ^{13}C CP/MAS DDph NMR spectra in the aliphatic carbons region.

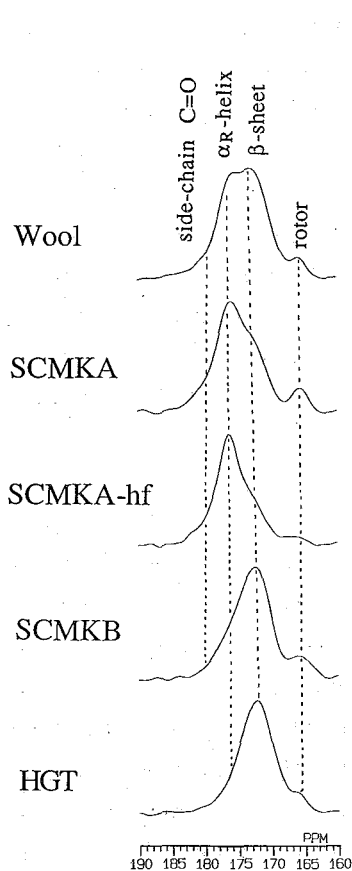


Figure 2

Expanded ^{13}C CP/MAS TOSS NMR spectra for the carbonyl carbons region in wool, SCMKA, SCMKA-hf, SCMKB and HGT.

のコンホメーションが共存していることがわかる。SCMKA-hfでは176ppm付近に対称性の良いピークが観測され、SCMKAでは176ppm付近に、高磁場側に肩を持つピークが観測されている。これとは対称的にSCMKBとHGTでは172ppm付近に観測されているピークが低磁場側に肩を持っている。この観測事実は各試料の二次構造の組成が異なることを示している。表1にカルボニル炭素ピークのカーブフィッティング結果を示す。低磁場側成分の相対強度は各試料の α -ヘリックス含量に対応する。一方、 α 炭素及び側鎖アルキル炭素領域では、アミノ酸残基の種類とコンホメーションにより化学シフトは大きく変化するの、各々のピークの帰属は困難である。その中において、 α -ヘリックスをとるAla残基の β 炭素のピークは、他の残基のピークの少ない15.7ppm(ポリ(L-アラニン)の値)に観測されるので帰属が可能である。ここで注目されるのは、図1に示された羊毛及びSCMKA、SCMKA-hfのAla β 炭素ピークの化学シフトは、何れもポリ(L-アラニン)に比べ若干低磁場側にシフト(16.3-16.8ppm)していることである。既に、2本の α -ヘリックス鎖が互いに巻き付いたコイルドコイル構造をとっていることが明らかにされているトロポミオシンにおいても、同様の結果が得られており¹¹⁾、この低磁場シフトは羊毛ケラチンタンパク質がコイルドコイル構造をとっていることを示唆している。

Table I The observed ^{13}C NMR chemical shifts, half-widths, and relative peak intensities of the main-chain carbonyl carbons in wool, SCMKA, SCMKA-hf, SCMKB, and HGT determined by computer fitting

| | ^{13}C chemical shift | half-width | relative peak intensity |
|----------|--------------------------------|------------|-------------------------|
| wool | 176.3 ppm | 4.3 ppm | 42 % |
| | 172.2 ppm | 4.8 ppm | 58 % |
| SCMKA | 176.2 ppm | 4.0 ppm | 56 % |
| | 172.5 ppm | 4.8 ppm | 44 % |
| SCMKA-hf | 176.4 ppm | 3.6 ppm | 65 % |
| | 173.0 ppm | 4.5 ppm | 35 % |
| SCMKB | 176.0 ppm | 3.7 ppm | 25 % |
| | 172.5 ppm | 4.6 ppm | 75 % |
| HGT | 176.6 ppm | 4.0 ppm | 8 % |
| | 172.2 ppm | 5.6 ppm | 92 % |

2) 次に、SCMKA膜を70% エタノール-水混合液中で延伸し、 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルから解析した。カルボニル炭素ピークのカーブフィッティングを行うと、未延伸、2倍延伸、3倍延伸膜の低磁場側成分の相対強度はそれぞれ42、46、53%となった。これは、SCMKA膜中には延伸により β -シート構造が発現してきたことを示している。また、SCMKA膜の ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルにおける α 炭素の領域(45-65ppm)は種々のアミノ酸のピークが重なり、ちょうど非常に線幅の広い一本のピークのようにになっている。この広幅なピークは延伸すると高磁場側シヨルダーピークの強度が増加してきている。これをスペクトルシミュレーションで説明する(図3)。既に報告されているホモポリペプチド等の化学シフト値に、面積強度がSCMKAのアミノ酸組成に比例したガウス曲線を置いてスペクトルを再現すると、実測の傾向を良く再現した。これらより、SCMKA膜は羊毛繊維と同様に延伸によって $\alpha \rightarrow \beta$ 型の転移をされると考えられる。

3) 表2にSCMKA膜試料のメチル炭素の T_1 と T_{DD} 及びカルボニル炭素の T_{DD} 値を示す。ここでメチル炭素の各緩和時間は試料中の全てのメチル炭素の平均の値である。主鎖カルボニル炭素の T_{DD} 値は延伸、加熱(未延伸試料を100℃で測定)及び熱処理によって顕著な変化がみられないのでその運動性に大きな変化はない。一方、延伸試料と熱処理試料のメチル及び側鎖カルボニル炭素の緩和時間は未処理試料のそれに比べて長くなっており、側鎖の運動性が高くなったことを示している。SCMKAは、延伸及び熱処理によって分子間のパッキングが緩むものと考えられる。

Figure 3
Observed and simulated ^{13}C NMR spectra for the C_α methine carbons region in SCMKA films.
The details are described in the text.

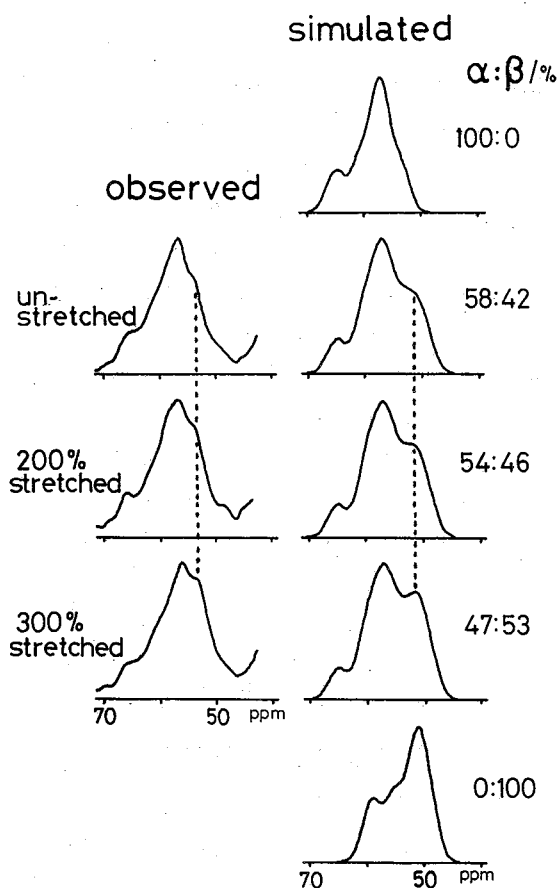


Table II The observed ^{13}C spin-lattice relaxation time, T_1 , and dipolar dephasing time, T_{DD} of SCMKA films

| | methyl carbons | | carbonyl carbons, T_{DD} (μs) | |
|----------------------|----------------|----------------------------|--|---------------|
| | T_1 (s) | T_{DD} (μs) | side-chain | main-chain |
| unstretched (r.t.) | 0.70 | 70 | 76 | 73(downfield) |
| | | | | 77(upfield) |
| (100℃) | 1.55 | 109 | 130 | 76(downfield) |
| | | | | 79(upfield) |
| 200%stretched (r.t.) | 0.90 | 89 | 166 | 73(downfield) |
| | | | | 70(upfield) |
| 300%stretched (r.t.) | 0.84 | 87 | 161 | 86(downfield) |
| | | | | 72(upfield) |
| heated (r.t.) | 0.93 | 83 | 143 | 80(downfield) |
| | | | | 65(upfield) |

参考文献

- 1) for example; J.H.Brabury, Adv.Protein Chem., 27, 111(1973).
- 2) H.Yoshimizu and I.Ando, Macromolecules, 23, 2908(1990).
- 3) H.Yoshimizu, H.Mimura and I.Ando, Macromolecules, in press.
- 4) I.J.O'Donnel and E.O.P.Thompson, Aust.J.Biol.Sci., 17, 973(1964).
- 5) L.M.Dowling and W.G.Crewther, Pre.Biochem., 4, 203(1974).
- 6) H.Sakabe, T.Miyamoto and H.Inagaki, Sen-i Gakkaishi, 37, 273(1981).
- 7) W.G.Crewther and B.S.Harrap, J.Biol.Chem., 242, 4310(1967).
- 8) D.A.Torchia, J.Magn.Reson., 30, 613(1978).
- 9) S.J.Opella and M.H.Frey, J.Am.Chem.Soc., 101, 5856(1979).
- 10) for example; Saito.H and Ando.I, Ann.Repts.NMR Spectroscopy, 21, 209(1989).
- 11) S.Tuzi, S.Sakamaki and I.Ando, J.Mol.Struct., 221, 289(1990).

京大・化研 °植田 正、村田ツヨシ、堀井文敬、小谷 壽

京大・工 増田俊夫、東村敏延

NMR Studies on the Local Motions of Substituted Polyacetylenes

Tadashi Uyeda,* Tsuyoshi Murata,* Fumitaka Horii,* Hisashi Odani,*

Toshio Masuda,** and Toshinobu Higashimura**

(* Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, JAPAN)

(** Department of Polymer Chemistry, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, JAPAN)

Local motions of substituted polyacetylenes, mainly poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne] [P(TMSP)], were studied by high-resolution solid-state NMR spectroscopy for ^{13}C and ^{29}Si with and without magic-angle spinning(MAS). The ^{13}C and ^{29}Si NMR spectra for P(TMSP) reveal that the mobility of trimethylsilyl group is extremely high, and that, consequently, the mobility of main chain carbons is affected by the trimethylsilyl group, i.e. the mobility of the carbon atom bonded to the trimethylsilyl group is somewhat higher than that bonded to the methyl group.

1. 緒言

ポリ[1-(トリメチルシリル)-1-プロピン][P(TMSP)]は、測定条件下でガラス状態にあるにもかかわらず極めて高い気体透過性を示すが、その透過性は真空中に保持する時間と共に著しく低下する。これは側鎖のトリメチルシリル基の活発な運動が剛直な主鎖に影響を及ぼし、膜の微細構造が変化するためと考えられている¹⁾。また、P(TMSP)と同様にトリメチルシリル基を有するポリ[o-(トリメチルシリル)フェニルアセチレン][P(TPA)]もガラス状高分子でありながら、一般のゴム状高分子と同程度の高い気体透過性を示す。しかし透過性の経時変化による低下はP(TMSP)と比べてはるかに小さい。本研究では、 ^{13}C 及び ^{29}Si の固体高分解能NMR測定を行うことにより、P(TMSP)及びP(TPA)の主鎖及び側鎖の局所運動について検討した。

2. 実験

試料膜は、1%ベンゼン溶液から溶媒を蒸発させ(室温、10日間)作製した。膜中の残留溶媒は、膜を室温でメタノールに浸漬した後真空乾燥して除去した。 ^{13}C 及び ^{29}Si 固体高分解能NMR測定は、JEOL JNM-FX200、JNM-GX400分光計により行った。

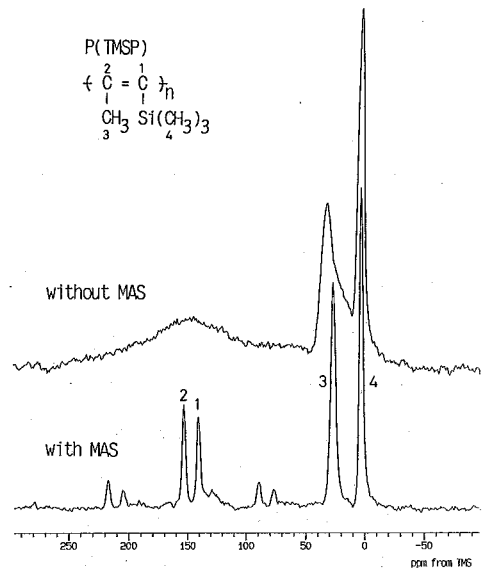
3. 結果

Fig.1にmagic-angle spinning(MAS)を行った場合と行っていない場合の、P(TMSP)室温における ^{13}C NMRスペクトルを示す。主鎖のC1、C2のピークは、MASを行わない時にはその低い運動性を反映して非常にブロードである。主鎖に直結しているC3のMASを行わない時のスペクトルは、C2-C3軸に関する軸対称スペクトルになっている。このことは、C2-C3結合の周りの回転運動はかなり活発であるが、等方運動は拘束されていることを示す。一方、Siに結合しているC4については、MASを行わなくてもシャープなスペクトルが得られることより、Si-C4結

合はほぼ等方的な運動をしていると考えられる。 ^{29}Si i に関する同様な測定結果をFig.2に示す。ここには比較のためP(TPA)の結果も示してある。P(TMSP)の場合、MASを行わなくても対称的なスペクトルが得られることより、C1-Si結合はかなり振幅の大きな運動をしていることがわかる。また、この運動は少なくとも -170°C までは凍結されないことが確認された。この高い運動性のため先に述べたSi-C4結合の等方運動が促進されるものと思われる。一方、P(TPA)では、 150°C における測定でもスペクトルの形状はFig.2のものほとんど変わらず軸対称スペクトルが得られた。したがって、ベンゼン環のCとSiの結合の等方運動はかなり制約されていることがわかる。このようなP(TMSP)とP(TPA)の間のトリメチルシリル基の運動性の差、及びP(TPA)ではトリメチルシリル基と主鎖との間にベンゼン環が介在しトリメチルシリル基の運動性による影響が主鎖にまで及ばないということが、両者における透過性の経時変化の違いの原因と考えられる。Fig.3に、MASの回転数を2kHzにして、サイドバンドの包絡線として測定したC1、C2の粉末スペクトルを示す。いずれも剛直状態のスペクトルではないものの、C1の方がC2よりも線幅が若干狭いことより、わずかではあるがC1の方が運動性が高いことがわかる。二重結合をしている炭素原子間で運動性に差があるということは注目される結果であり、これはかなり活発に運動するトリメチルシリル基がC1の運動を促進するためと考えられる。現在、コンピューターシミュレーションにより ^{29}Si i 共鳴線の形状に及ぼす分子運動について検討を行っている。

1) 下村秀樹、中西和樹、小谷壽、倉田道夫、増田

俊夫、東村敏延、高分子論文集、43、747、(1986)。 Fig.1 CP/DD ^{13}C NMR spectra with MAS(6kHz)



and without MAS for P(TMSP) at r.t.

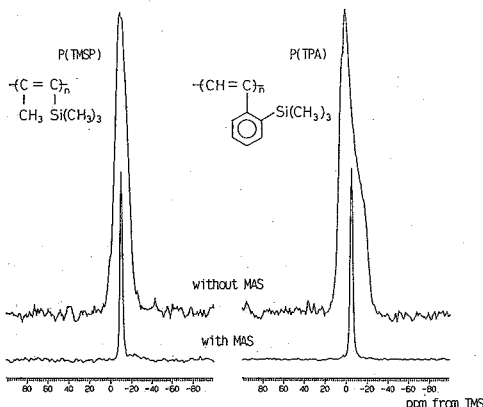


Fig.2 CP/DD ^{29}Si NMR spectra with MAS(6kHz) and without MAS for P(TMSP) and P(TPA) at r.t.

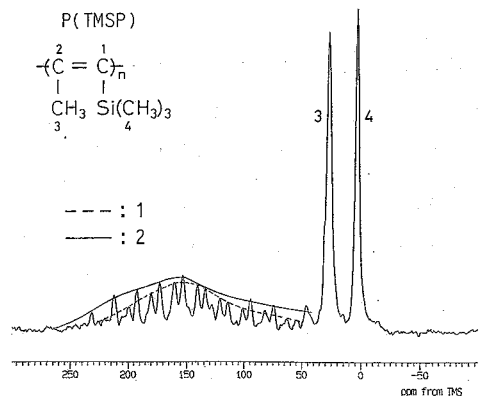


Fig.3 CP/DD ^{13}C NMR spectrum with MAS (2kHz) for P(TMSP) at r.t.

The Study on Coal Structure by Solid-State NMR (1) The Analysis of ^1H Relaxation Curves for Argonne Premium Coals

Kikuko Hayamizu, Shigenobu Hayashi, Mitutaka Kawamura, and Kunio Kamiya

National Chemical Laboratory for Chemistry, Tsukuba, Ibaraki 305

The ^1H relaxation curves were observed for 8 Argonne premium coals for the fresh, degassed, dried and demineralized samples. Most of the coals show non-linear relaxation curves, which were analysed by two components. Generally, T_1 values of the low-rank coals are shorter than those of high-rank coals without acid-treatment. After the demineralization, the T_1 values of the former become longer, while those of the latter become shorter. Then the ^1H relaxation of the low-rank coals is induced by paramagnetic metals, while that of the higher-rank coals is mainly induced by organic free radicals.

石炭は炭素資源として将来長期にわたって利用しなければならない重要な天然物であり、既にかかなりの期間にわたる研究がなされているにも関わらず、構造は不明な点が多い。従来の研究は石炭を燃料として利用することに主眼が置かれていたことも原因ではあるが、石炭は“生き物”で、採炭後の時間経過によって性質が変化するために、異なった研究グループあるいは過去の実験の結果を直接に比較できないという大きな問題点があった。1973年の第一次オイルショック後の一時的な華々しい石炭研究の時期をすぎて、現在は長い将来をみた基礎研究の必要性が認識され始めている。その中であって米国の国立アルゴンヌ研究所で標準石炭配布のプロジェクトを開始した。多種類の米国炭の中から相当量の埋蔵量があり、炭種としても低ランクの褐炭(炭素含量の低い石炭)から亜歴青炭、高ランクの歴青炭までにわたって8種が選択され、採炭の現場から粉碎・混合・アンブル封入までアルゴン雰囲気下で行い、性質の変化に対して細心の注意を払って製造されている。この標準炭が配布されてからはデータの比較ができること、種々の方法で測定したデータをそのまま信頼性の高いものとして参照できること等により、構造に関する研究は著しく進歩し、磁気共鳴法による研究の寄与も大きい。

本研究では ^1H NMRの主に緩和曲線の解析という手法により、石炭の中に含まれている水分を除去した乾燥炭、無機鉱物を除去した脱灰炭を研究した。また ^1H NMRの緩和機構を明かにするためにESRの測定を行い、炭種によって機構が異なることを明らかにした。

1. 実験

サンプルは A. アンブル開封直後にサンプリングした“Fresh”, B. Freshを液体窒素で冷却しながら真空ポンプで脱気した“Degassed”, C. 110°Cで8時間以上脱気した“Dried”,

D.蓋のついた容器のなかで1年間保管後乾燥した"Aged", E.50℃、10% HCl 水溶液中で攪拌し、水洗、乾燥した" HCl treated", F.さらに HF で処理した" HCl/HF treated"の6種である。 $^1\text{H NMR}$ の緩和時間の測定は Bruker/CXP-100で90MHzで通常の $180^\circ - \tau - 90^\circ$ 法で行い、緩和曲線は一成分あるいは二成分として解析した。

2. アルゴンヌ標準石炭の性質

石炭のキャラクタリゼーションのために必要な種々の定数が発表されているが、本報告に必要な基本的な性質を記載する。

| 略号 | 産地/炭種 | | C | H | H_2O | Ash |
|---------|----------------------|-----------|-------|------|----------------------|-------|
| 1. ND | ND/Beulah-Zap | 褐炭 | 72.94 | 4.83 | 32.24 | 9.72 |
| 2. WY | WY/Wyodak-Anderson | 亜歴青炭 | 75.01 | 5.35 | 28.09 | 8.77 |
| 3. IL | IL/Illinois #6 | 歴青炭(高揮発性) | 77.67 | 5.00 | 7.97 | 15.48 |
| 4. UT | UT/Blind Canyon | 歴青炭(高揮発性) | 80.69 | 5.76 | 4.63 | 4.71 |
| 5. WV | WV/Lewiston-Stockton | 歴青炭(高揮発性) | 82.58 | 5.25 | 2.42 | 19.84 |
| 6. PITT | PA/Pittsburgh #8 | 歴青炭(高揮発性) | 83.20 | 5.32 | 1.65 | 9.25 |
| 7. UF | PA/Upper Freeport | 歴青炭(中揮発性) | 85.50 | 4.70 | 1.13 | 13.18 |
| 8. POC | VA/Pocahontas #3 | 歴青炭(低揮発性) | 91.05 | 4.44 | 0.65 | 4.77 |

3. 緩和曲線の解析

緩和曲線は直線にならない場合が多く、(1)式でシュミレートした。

$$(M_0 - M(\tau)) / M_0 = N \sum C_j \exp(-\tau / T_{1j}) \quad (1)$$

また逆に平均値を(2)式で求めた。 $1 / T_{1a} = \sum C_j / T_{1j}$ (2)

4. 結果

4.1 $^1\text{H NMR}$ スペクトル・パターンの変化

図1に3種の石炭 ND, UT, POCの Fresh, Degassed, Driedの状態のスペクトル変化を示す。NDでは表からも明かなように、水分含量が多く脱水していないサンプルのシグナルは水のシグナルである。脱ガスすることにより水シグナルの線幅は狭くなり、溶存する酸素の効果があるものと考えられる。UTでは水分含量が少ないために、 NMR

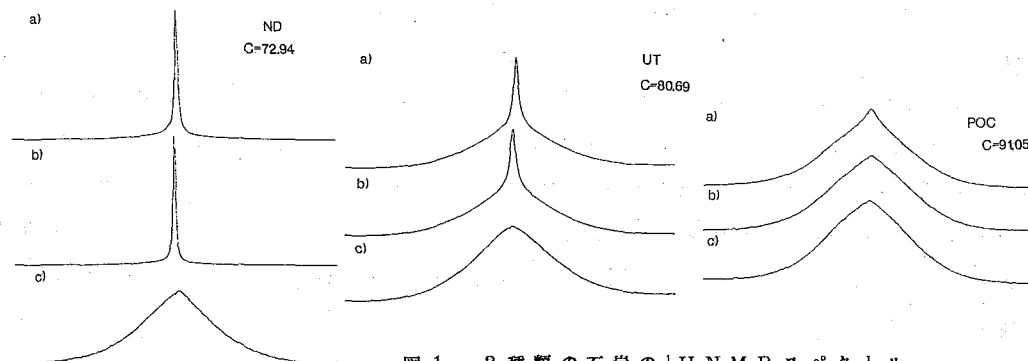


図1. 3種類の石炭の $^1\text{H NMR}$ スペクトル
(a) Fresh, (b) Degassed, (c) Dried

スペクトルでは水シグナルは分離できる。POCでは僅かではあるが水の影響がみられる。他の石炭でも同様なスペクトルが測定された。乾燥炭の線幅は炭種によって変化をし、低ランク炭のNDとWYでは線幅が狭い。

4.2 石炭の処理による T_1 の変化

緩和曲線を(1)式によって解析し、成分比と T_1 値とを求めた結果を図2に示す。成分比は円の面積に比例するように表わした。図ではND、UT、POCについて処理の方法の相違による T_1 の変化が示されている。水分含量の多いNDの非脱水のサンプルでは水のシグナルを観測していることになり、全体的に T_1 が短くなる。緩和曲線は二成分として解析され成分比や T_1 の相互関係が乾燥したサンプルと類似している。UTの乾燥炭は一成分になるが水分や空気酸化によって均一でなくなることがわかる。POCのFreshではスペクトルからは僅かではあるが水分の存在がわかるが、緩和曲線は直線になり T_1 の値は小さい。脱ガスをする事により T_1 が大きくなることから、溶存する酸素ガスの効果があるものと考えられる。酸処理によってNDでは T_1 は長くなるが、UTでは変化は小さく、POCでは短くなっている。種々の処理を行なってもまた水のシグナルにおいてもほぼ二成分になり、 T_1 の長い成分の方が量が多いことなどの特徴は変わらない。このことは石炭には大きくわけて2つの異なったサイトが存在することを示唆している。

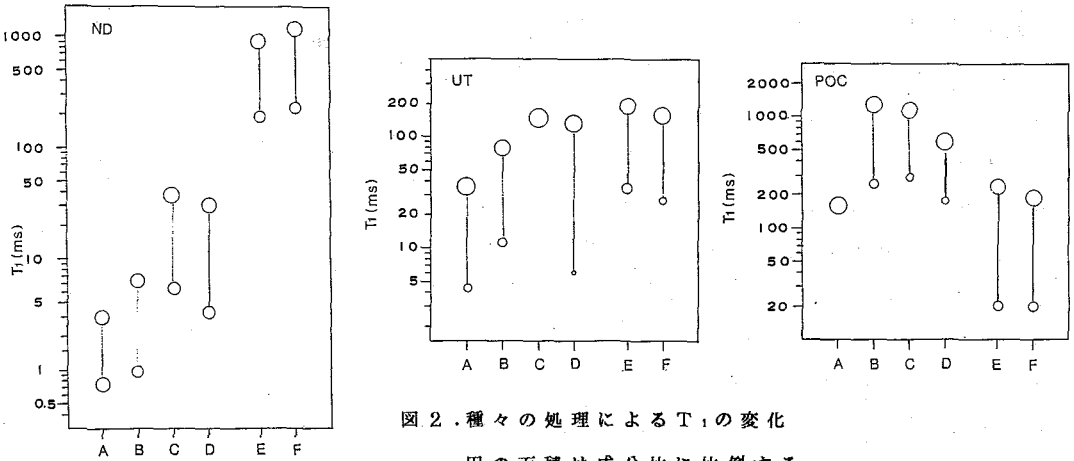


図2.種々の処理による T_1 の変化

円の面積は成分比に比例する。

4.3 炭種間における比較

乾燥炭に対して炭種による T_1 の変化を図3に示す。コロラド大学のWindらによってアルゴンヌ標準炭の緩和が60と187MHzで測定されている。乾燥法が異なるので厳密な比較はできないが、本報告の90MHzの結果との一致は良好で標準炭のデータが相互比較ができることを証明できた。 T_1 の周波数依存性は非常にわずかである。図から明かなように石炭のランクが高くなるにつれて T_1 は長くなっている。また二成分のうちの T_1 が長い成分の割合が多くなっている。これはランクの高い石炭の方が堆積歳月が長く分子量が大きくなり構造の均一性が増すとされていることと一致している。また図4に乾燥炭の T_1 の平均値がプロットされているが、ここで T_1 は表1で示した石炭の分類に対応した値になって

いる。 T_1 の値を決める要因は緩和機構と分子の運動性であるが、 T_1 の値を石炭構造と関連して論じるためには緩和機構を明かにする必要がある。

石炭の $^1\text{H NMR}$ の緩和機構については、溶存酸素、常磁性金属、有機のフリーラジカルなどが考えられている。酸素の効果については脱ガスの有無の比較から石炭中の酸素は明らかに緩和に寄与するが、脱ガスを行なうことにより酸素は残存しないと見えよう。ここでは酸処理を行なうことにより常磁性金属の効果をはっきりさせることを試みた。議論を明確にするために(2)式を用いて平均の T_1 値を求め、乾燥炭と HCl/HF 処理炭に対して炭素の含有量でプロットして図4に示す。NDとWYに対しては酸処理の効果は大きく T_1 は長くなっている。従って低ランク炭では明らかに緩和機構は常磁性金属であるといえる。高ランク炭では酸処理によって T_1 は逆に短くなり、常磁性金属の効果は小さい。有機のフリーラジカルによる緩和が考えられるのでESRによるスピン濃度の測定を行い図5に示す。ESRではシャープな吸収だけを対象にして面積を測定したので、図5は有機のフリースピン濃度変化と考えられる。褐炭や亜歴青炭では酸処理によってスピン濃度の変化は見られず、歴青炭ではスピン濃度は上昇し $^1\text{H NMR}$ の T_1 は短くなる。従って歴青炭の主たる緩和機構は有機のフリーラジカルであるといえよう。高ランク炭の乾燥炭における T_1 の大きな上昇は石炭の高分子量化と均質化による運動性の低下で説明できる。

文献

- 1) R.A.Wind, et al, Fuel, 68, 1189(1989)

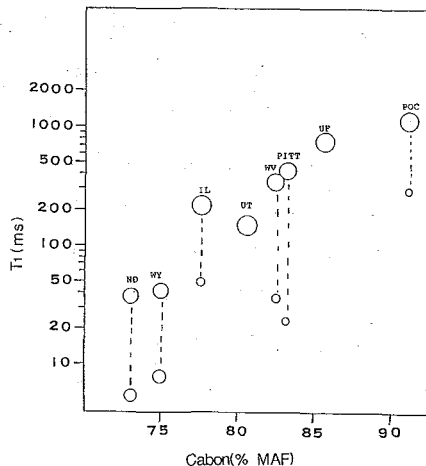


図3. T_1 のランク依存性

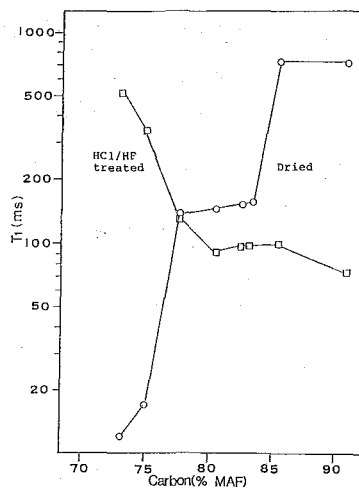


図4. 乾燥炭と酸処理炭の T_1

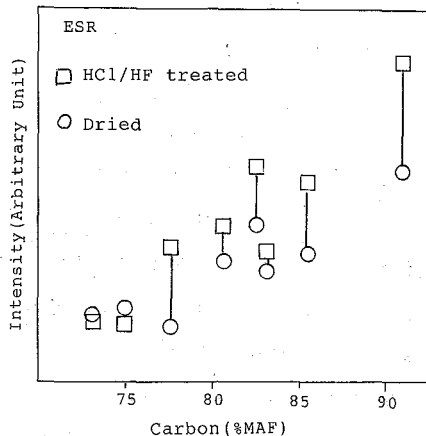


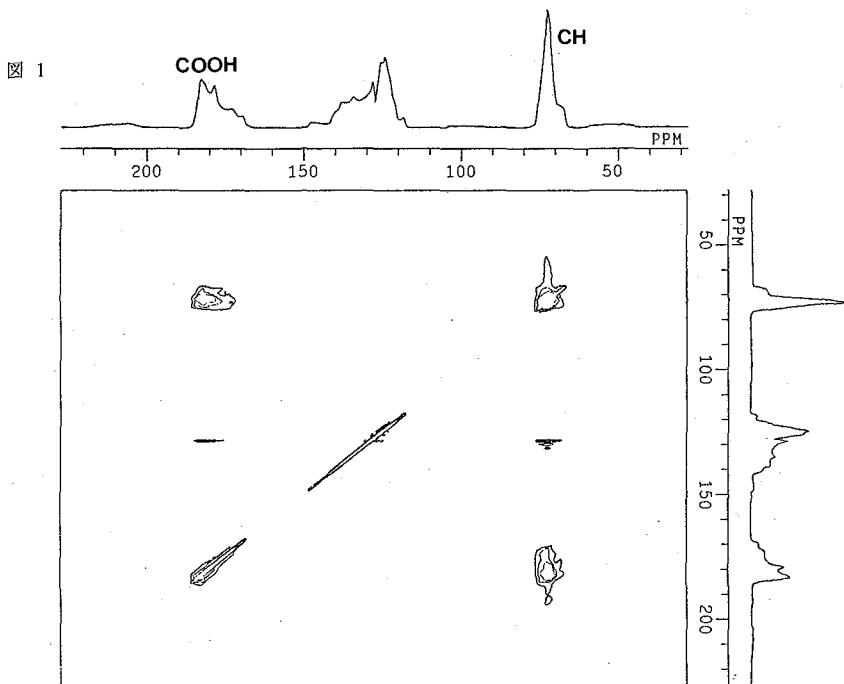
図5. ESRによるスピン密度の変化

Tensorial Interaction Correlation 2D Powder Patterns

Jun ASHIDA, Daisuke KUWABARA, Takahiro UEGAKI, Takehiko TERAQ (Kyoto University)

A 2D powder pattern to which two ^{13}C chemical shielding anisotropies and the ^{13}C - ^{13}C dipolar interaction contribute has been observed for DL-mandelic acid with 10% ^{13}C doubly enriched methine and carboxyl carbons under off-magic angle spinning using a 2D exchange NMR sequence. Some other 2D powder patterns will also be discussed.

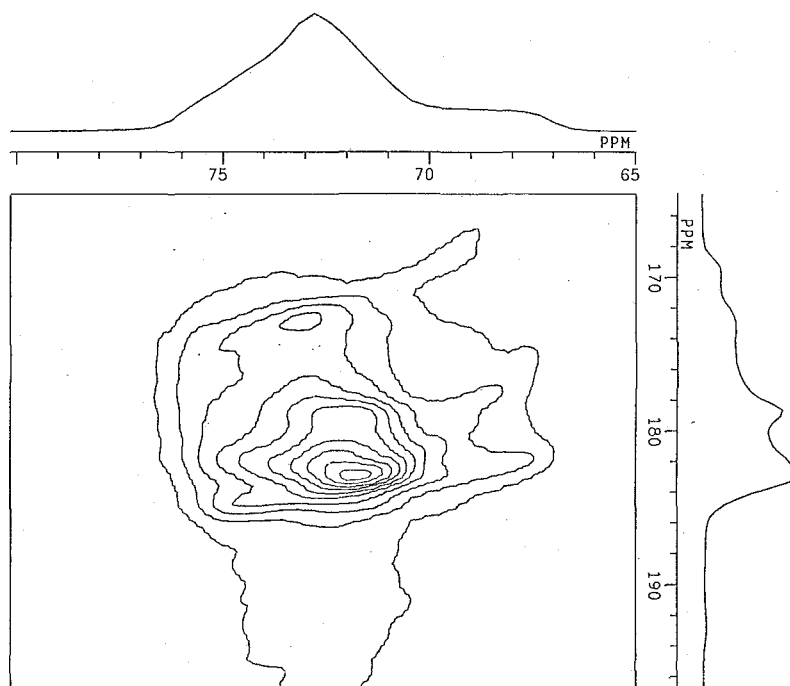
粉末試料において固体高分解能NMRを行なうためには化学シフト異方性、同種および異種核間双極子相互作用、四極子相互作用による広い線幅を適当な方法を用いて消去しなければならないが、これらの異方性はいずれもミクロな静的動的構造に対する情報を与えるきわめて重要な量である。このため、異方性による powder pattern を化学的に異なる核に対し分離測定する SASS 法などの手法が開発されているが、一次元スペクトルではテンソルの軸方向に関する情報が得難いほか、複数のテンソルがスペクトルに寄与してい



る場合、各テンソル成分を決定するのは困難である。これらの問題点は2つの軸上に異なる異方性をもつハミルトニアンを反映させ、それらの間の相関を表わす二次元 powder pattern を測定することにより緩和される。2つのハミルトニアンは必ずしも共通のスピンを含む必要はなく、それぞれのハミルトニアンに含まれるスピンの双極子相互作用によるネットワークで結ばれていればよい。ただし、後者の場合、mixing period を設けて2つのスピンの間でコヒーレンスをネットワークを通じて動かせる必要がある。

種々のハミルトニアンに対する様々な2D powder pattern が考えられるが、ここでは特に分子内の2つの ^{13}C 核の化学シフト異方性と ^{13}C - ^{13}C 双極子相互作用による2D powder pattern について述べる。図1はDL-マンデル酸において off-magic angle spinning を行ない、 ^{13}C スピンに対して2D exchange NMR のパルス系列を適用して観測したスペクトルである。メチン炭素とカルボキシル炭素をダブルエンリッチした試料を通常の試料で10倍に希釈して測定に供した。両者の炭素の間にクロスピークが見られるが図2にそれを拡大したスペクトルを示す。 ^{13}C の共鳴周波数は50MHz、mixing time は10ms、回転軸方向は $\theta = (\text{マジック角度}) + 4^\circ$ 、回転速度は3.9kHz、である。シミュレーションを行なうことにより、メチン炭素とカルボキシル炭素の化学シフト相互作用テンソルの主値、両炭素間の距離、2つのテンソルの主軸方向と核間ベクトルの相対方向の決定が可能となる。

図 2



特別講演 III

i n v i v o N M R S P E C T R O S C O P Y

From Animal Physiology to Human Diagnostics

犬伏俊郎

滋賀医大、分子神経生物学研究センター

i n v i v o N M R Spectroscopy

From Animal Physiology to Human Diagnostics

Toshiro Inubushi

Mol. Neurobiol. Res. Centr., Shiga U. Med. Sci.

ABSTRACT: Nuclear magnetic resonance imaging has been well developed and has been widely used in clinical field as an important non-invasive morphological technique for patients. However, conventional NMR techniques employed in chemical and biochemical studies have not been commonly available in medical application. We intend to integrate various multi-nuclear MR techniques for investigating animal pathophysiology, and to incorporate them into clinical NMR. Here we report some of our early experience in this direction.

緒言:

MR画像法が近年医療診断に於いてきわめて重要な非侵襲的手法になってきているにもかかわらず、化学や生化学の分野で使用されているNMR装置に較べると本来の磁気共鳴現象のごく限られた一面の性質しか利用されていない。磁気共鳴法は広範囲の核種から信号を検出でき多様な有機、無機化合物の存在やそれが置かれた環境を知ることが出来る特異な方法である。

NMRから生体内の水の ^1H 画像のみでなく他核種NMR画像を組み合わせて、NMR固有の化学分析能を引き出し、形態学的な画像情報に化学的な知見を加味することによりNMRが的確な診断と治療のモニターのための非侵襲的な手法となり得よう。このために我々は基礎的実験を動物専用のNMR装置にて行い、パルス系列の開発やデータ解析法の展開を行い、これによって蓄積された手法を人体画像用NMRに応用することをめざしている。そしてNMRが生体の生理学研究の一手段にとどまるのみならず、臨床現場での化学分析の機能を発揮する多角的な利用が開かれることを期待している。

実験:

NMRの測定にはGE社製2T 31cm口径動物用並びにGE社製1.5T人体画像用装置を用いた。この動物用装置には対象動物の生理的状态をコントロール、モニターするために、血圧計、心電図、脳波計、呼気ガスアナライザー、など種々の計測器を付設している。プローブは通常二つ以上の核種のnmr信号、例えば ^{31}P と ^1H 、を平行して測定するためにsingle portのinductively coupled double tuned coilを自作したものを用いた。

^1H 画像用にはヘルムホルツ型コイルを改良して使用した。得られたデータは off-line の personal computer における自作のソフトウェアにて解析し定量化を試みた。

結果と考察:

まず始めにラット後肢の虚血モデル作成し骨格筋の急性虚血及び再灌流後の生理的变化を ^{31}P , ^1H NMR スペクトルを装置のセティングを変更する事なく平行して追跡した。 ^{31}P NMR スペクトルは虚血開始直後より PCr (クレアチンリン酸) の減少と Pi (無機リン酸) の増加が認められ (図 1)、6 時間後の虚血の最終段階では ATP (アデノシン三リン酸) が完全に消失しほぼ Pi のみのスペクトルを呈し、この状態での虚血がかなり進行している事がわかる。その後再灌流を始めると、それぞれの ^{31}P NMR 信号は虚血前のレベルの 80% 程度まで回復した。一方、これらの変化を ^1H 画像で追跡すると図 2 の様に、虚血中では全般的な信号強度の漸増が認められた。しかし、再灌流後は一部の信号強度は減少して虚血前のレベルに復帰して行くものの、anterior tibial muscle 及び gastrocnemius muscle に於いて強信号が持続し、特に T_2 強調画像ではさらに上昇を続けた。この強信号は H_2O の T_2 の変化に由来するものと解釈され、その分布から white / red muscle の成分比率に関連して再灌流障害を受け安いことを物語っている。

健康人のふくらはぎからの ^{31}P 3次元化学シフト画像と対応する部位の ^1H 画像を図 3 に示した。このデータは一方向のスライス選択と二方向のヘースエンコーディングにより非侵襲的に 2.5cm 立方の部位からスペクトルを取得したもので、測定には 10 数分を要した。それぞれのウォクセルから筋肉特有の ^{31}P NMR スペクトルが得られていることが分かる。この様に、筋肉は NMR の測定が最も容易であり、また疲労、代謝障害、種々の内部疾患 (糖尿病) などがその生理的メカニズムに鋭敏に反

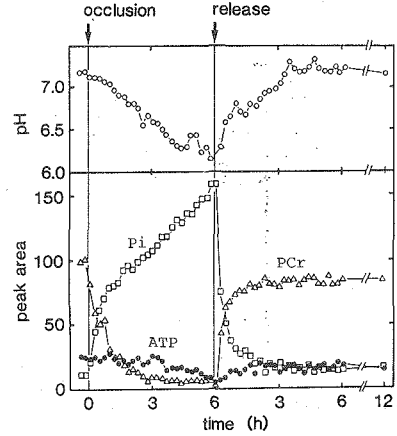


図 1. 虚血前後に於けるラット後肢の ^{31}P NMR によるリン酸化合物の消長と細胞内 pH の変化。

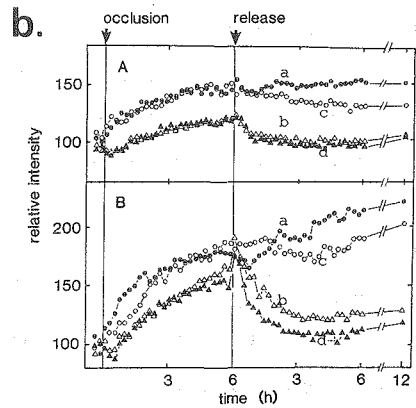
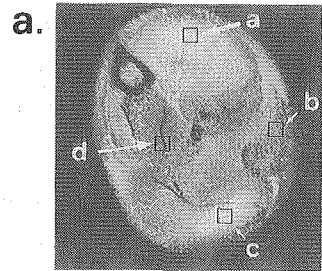
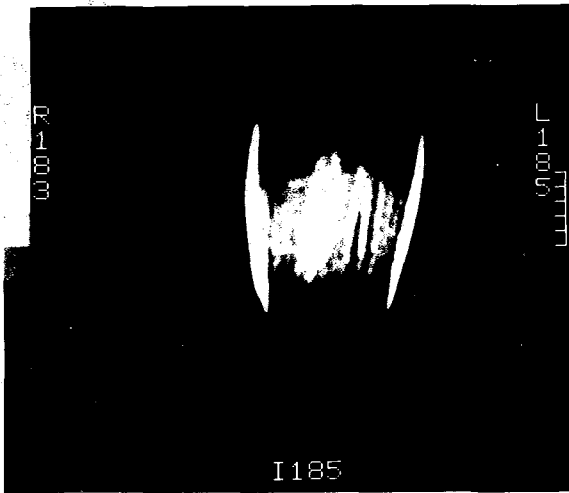


図 2. a) 再灌流後のラット後肢の ^1H 画像、と b) その異なる部位に於ける画像信号強度の変化。A: T_1 強調画像; B: T_2 強調画像。



3D-³¹P CSI DATA OF CALF MUSCLE

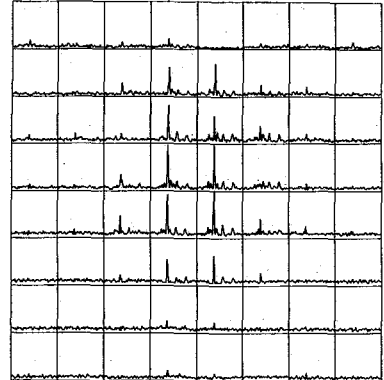


図3. a) 人ふくらはぎの1H画像と、 b) 同部位からの³¹P 化学シフト画像(CSI)。 一辺2. 5 cm立方の体積からの筋内の³¹P NMRデータを示す。

映されデータの解析、ならびに解釈法が確立されれば臨床での利用が期待される方法の一つである。

次に人脳の³¹P NMRについての臨床例を報告する。ここでは表面コイルを用いたDRSS法と呼ばれる最も単純な局所化の方法を採用した。これは、表面コイルの持つ限られた感度領域特性と磁場勾配、選択的90°パルスの組み合わせによって、対象の指定された面(スライス)領域から信号を得る方法である。

この様な手法によってえられた脳梗塞患者からのスペクトルとその薬物による反応の例を図4にしめした。薬物投与前のコントロールのスペクトルではPCrの信号が小さく、Piが相対的に大きく、また全体的に全ての信号が小さく観測される。しかし、この症例で血管拡張剤の投与後の時間変化を追跡すると、15分後、30分後と次第に信号強度が増大し、ことにPCrの信号強度は著しく増加し、最終的には典型的な正常人の脳と区別がつかない³¹Pのスペクトルを呈した。この結果は、適当な血液の供給、換言すれば、必要量の酸素の供給があれば、リン酸代謝物の濃度が回復し得る事を示唆しており、治療のための参考データになると考えられる。

この薬物の一般的な傾向として、一例を図式化したものが図5である。図5-d-1Iの例に較べ、d-Iの様に全シグナルの増加が顕著でない場合も見られるが、PCr/Pi値は30分後ぐらいに最大値を示し(図5

EFFECT OF DIAMOX ON BRAIN P-31 NMR SPECTRA
RIGHT IC OCCLUSION, LEFT STENOSIS
(MEASURED RIGHT SIDE, 45 MM DEEP)

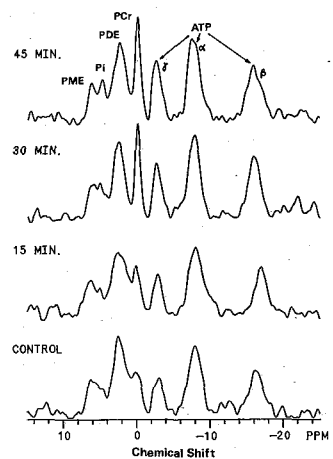


図4. 脳梗塞患者からの脳の³¹P NMRスペクトル、血管拡張剤投与前後のスペクトルの変化を示す。

- b - I, I I)、それに呼応して pH が低下する傾向がみられる。前者は虚血的な状況が改善されることによる P i 濃度の減少によるものと考えられ (図 5 c - I, I I)、後者は本薬物の効果である血中 CO₂ 濃度が増加し、血液の pH が低下し、ひいては細胞内 pH も酸性化傾向を示したものと推察される。

これらの例から、人脳の ³¹P NMR データから梗塞部位の病状や血量の増加によって病変部組織の代謝活動が改善されるかどうか、等の情報を治療に先だってもたらずものと考えられる。この様な方法論が MR 画像のもたらず情報に有意な付加的価値を与えるかはどうかは、まだ多数の症例によって検討されねばならないが、この様なデータがその可能性の一端を示しているものと期待される。今後はルーチン化された MR 画像取得法に比して (1) 測定時間の短縮化、(2) 測定法の簡便化、そして (3) 測定精度と再現性等の問題が克服されれば医療現場にてより広範囲な NMR 法が活躍することになる。

謝辞:

本研究は横河メディカルシステム(株)によって設置された寄付講座、分子神経生物学研究センター、生命動態学部門にて行われた。また全ての共同実験者を列挙できないもの本講演でのデータは、滋賀医大、京大医学部、並びに九大医、放射線、北大脳外等の多くの方々との共同の成果であることを付記します。

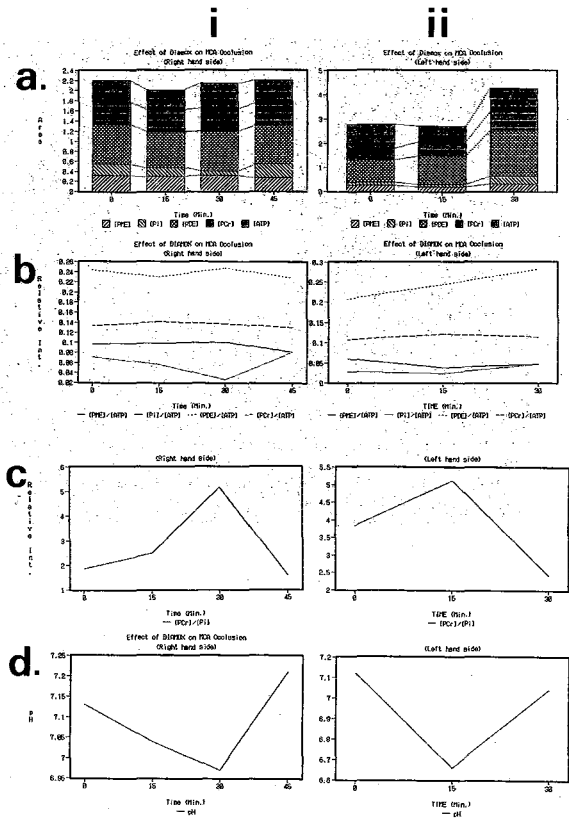


図5. 血管拡張剤投与前後の人脳の³¹P NMRスペクトル。脳梗塞患者の左右両側を測定した。I. 右側、II. 左側。a) リン酸化合物によるNMR信号の増長、b) リン酸化合物のATPに対する相対的濃度の変化、c) PCr/Piの変化、とd) pHの変化を投与後の時間の関数に対して表示した。

L30 ~ L33

L30

金沢洋子、篠原俊次、小嶋正治・九大薬

In vivo Dynamics of Fluorinated Hexoses Studied by ^{19}F NMR

Yoko Kanazawa, Shunji Shinohara, Masaharu Kojima

Kyushu University, Faculty of Pharmaceutical Sciences

Summary

In vivo dynamics of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (FDG) in mice was studied by ^{19}F NMR. An epimerization of FDG-6-phosphate to FDM-6-phosphate, which has been found in mice, was proved to be catalyzed by phosphoglucose isomerase. It may be suggested from the present experimental results that the efficiency of FDG-FDM conversion depends on the glycolysis activity. The conversion will be used as a parameter of energy metabolism in specific organs including brain.

NMRによる生体計測の一つに標識化合物の動態追跡があるが我々はフッ素ラベル糖の体内動態を追跡し新規な生化学反応を見出し既に報告した。^{1,2)}ここではこの反応を臓器の状態モニタに活用する可能性について検討する。

グルコースは脳の主たるエネルギー源であり、その消費量が脳機能状態を示すものとして放射性同位元素でラベルしたグルコースの取り込み量から代謝マップが作成される。即ち6-リン酸化の後で代謝トラップを受ける修飾糖として2-デオキシ-D-グルコース(DG)あるいは2-デオキシ-2-フルオロ-D-グルコース(FDG)が使われる。特にポジロン放射核 ^{18}F でラベルしたFDGを用いる画像法(PET)が臨床利用されてきた。²⁾さて、このような標識糖の代謝物質は主としてクロマトグラフィで分析されてきたが、通常の方法では識別困難な化合物が多いためにFDG-6-P以後の情報は殆ど得られていなかった。そこで ^{19}F NMRを用いてマウス体内での動態を追跡したところ、FDGは体内でFDG-6-Pとしてのみトラップされているのではなく、さらにそのエピマーである2-デオキシ-2-フルオロ-D-マンノース 6-リン酸(FDM-6-P)に変換されることが見いだされた。¹⁾また、FDG-6-PとFDM-6-Pとの間の変換(FDG-FDM変換)は体内で可逆的に進行することを実証し、in vitroの実験によりその反応がホスホグルコースイソメラーゼ(PGI)によって触媒されるものであることを示唆した²⁾。

ここでは通常の酵素反応としては予測されなかったFDGとFDMの間のエピマー化がPGIによって触媒されることの証明を示すとともに、体内のFDG-FDM変換を糖代謝活性測定の原理として利用する可能性について検討する。

[実験]

試薬: FDG と FDM は合成した。それぞれはエピマーに関して純粋である。

動物：ddY 系雄性マウス。6-7 週令。16 時間絶食後使用。正常マウス (CON) には生理食塩水 (腹腔内投与)、麻酔マウス (ANE) にはペントバルビタール (65 mg/kg, 32.5 mg/kg を 2 h 後に追加、腹腔)、カフェインマウス (CAF) には 30 mg/kg を投与 (静注) した。FDG 静注後決められた時間に全脳あるいは他の臓器を摘出し、100 °C で 3 分で酵素を失活させた。

In vitro 実験：脳の水抽出物で FDG とその代謝産物である FDG-6-P や FDG-1-P 等を識別定量した。脳の水抽出物に含まれる FDG-6-P あるいは FDM-6-P にホホジロニン (PGI) あるいはホホジロニンイソマーゼ (PMI) を作用させ、¹⁹F NMR で反応を追跡した。

In vivo 実験：摘出脳の ¹⁹F NMR スペクトルの面積強度からフッ素糖の集積と FDG-FDM 変換率を得た。覚醒 (CON)、麻酔 (ANE)、カフェイン投与 (CAF) を比べた。

投与量：50, 100, 200 mg/kg。 時間：5分-180分。

定量用装置：JEOL FX-100、10 mm 試料管。パルス幅 8 or 16 μs、パルス繰り返し時間 80 or 160 ms、室温 23 - 26°C。100 - 1,200 千回積算、検出限界 ca. 20 μmol/kg 脳。スペクトルデータ、反応モニタ用装置：JEOL GSX-270WB、10 mm 試料管。

[結果]

In vitro 反応 (図. 1) FDG あるいは FDM 投与後 5 分 (殆ど 6-P 化を受けているがまだエピマー化が進んでない時点) で摘出した脳の抽出物中の FDG-6-P あるいは FDM-6-P を使って酵素反応を試みたところ FDG-FDM 可逆反応を PGI が触媒した。また、2つの反応の早さは同じ程度であり、これは体内での FDG-FDM 定常値 (約 50 %) と相容れる。

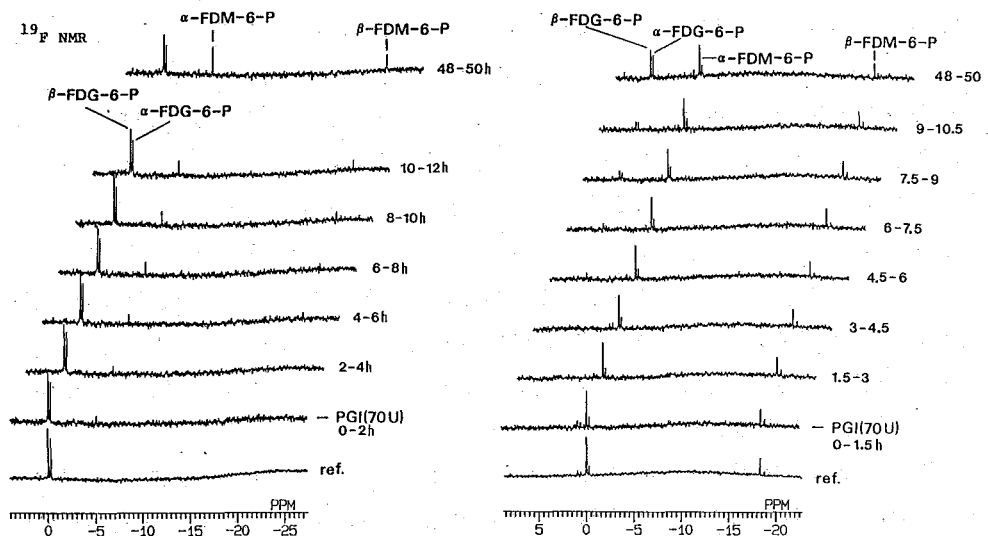


図. 1. マウス脳抽出物を用いた FDG-FDM 変換の実証。

左：FDG 投与マウスの脳抽出物。右：FDM 投与マウスの脳抽出物。

In vivo 反応

1. 集積量 (図. 2) 集積量はデータのバラツキ (個体差) の範囲で動物の状態を殆ど反映していない。投与量依存からFDGに関して飽和過程であることがわかる。(Fig. 2a,b) これらは脳血管中の血液を含めたデータであるが、FDG投与後5分においてすら6-P体が80%以上を占めることより圧倒的に脳集積を観測しているといえる。

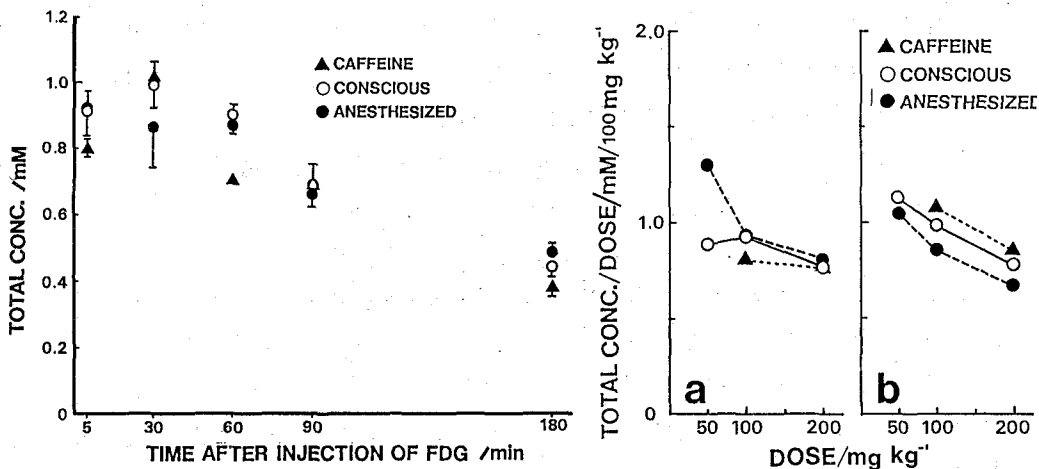


図2. マウス脳におけるFDGの集積 (左図の投与量 100 mg/kg)

2. FDM変換率 (図. 3) FDG-FDM変換率は Fig.3 に見られるようにデータのバラツキは集積より小さい。CON: dose 200 mg/kg 内で飽和傾向がある。(PGIのプロセスが酵素の飽和を示す。) ANE: 変換率は低い。投与量に関して二相性を示す。CAF: 投与量 100 mg/kg, 60.90 分で有意に高かった。即ち臓器状態によって変化することが示された。

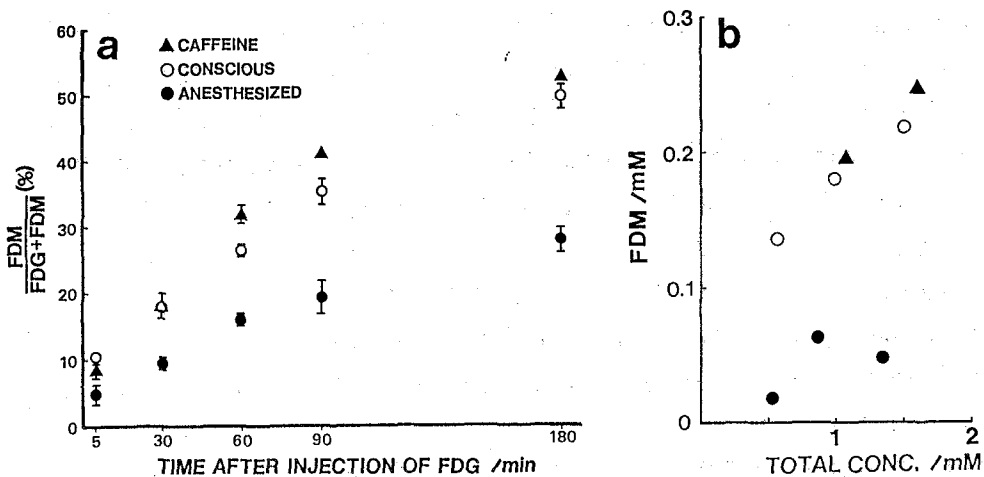


図3. マウス脳におけるFDG-FDM変換率

[考察]

本実験の集積データとマウスの状態との間に相関はみられなかった。PET-FDG法ではラベル糖の集積が糖代謝活性を通じて機能を表すのに対し、本実験条件においては機能を反映しないが、これらが互いに矛盾しないことが必要である。一方、FDM生成のデータは集積より高い精度で得られており、これが動物の状態に依存する。従って変換率は代謝活性の指標となりうるようにみられる。はじめに示したFDG-FDM変換が可逆的にPGIに触媒されることを前提とし、FDGがFDMに変換されるまでには次のステップを経ることをふまえてこれらの実験結果を考察する。

1. グルコーストランスポータによる血液-脳関門(BBB)の通過。
2. ヘキソキナーゼによる6-リン酸化。
3. PGIによるFDG-6-PからFDM-6-Pへの変換

集積量：NMRで実測したFDGの集積には強い投与量依存がみられた。一方、3つの状態(CON, ANE, CAF)で有意差がなかったがこれはPET-FDGの結果と合わない。ここでNMR実験におけるFDG投与量が多く、血糖値に匹敵することを考慮すると集積量は血液中のグルコースとFDG濃度の両方に影響されることになり、活動状態変化による糖摂取量の変化はその範囲に含まれてしまうとして説明できる。

FDG-FDM変換：FDMへの変換率はhrの時間スケールで定常値(約54%)に近付く。さて、過程3によるFDM-6-Pの生成量はFDG-6-Pの濃度できまるはずである。ところが動物の状態差を無視してすべてのデータをまとめて扱った場合には集積量とFDM生成量との間に相関はみられない(図3b, 30分データ)が、CON, ANE, CAFそれぞれを別に扱えば2つの量に相関がある。また、心臓、骨格筋ではCONとANEの間の差は脳に比べはるかに小さかった。⁴⁾ 即ちFDG-FDM変換率は臓器の状態により変化するといえる。

[まとめ]

FDG-FDM変換は化学シフト幅の大きい¹⁹F NMRを用いることで他の方法と比較し格段に容易に測定できる。FDGとFDMの間には5 ppmの化学シフト差があるのでこれを使うことによって化学シフトを用いた機能画像化の原理としての可能性を持っている。現段階ではまだ動物実験およびNMR測定技術面で解決すべき問題点が多々残されているが、このような標識化合物の反応は機能測定の新しい原理としてさらに開発されるべきものといえる。

1. Y.Kanazawa et al., Life Sciences, 39, 737 (1986).
2. Y.Kanazawa et al., Chem. Pharm. Bull. 35, 895 (1987).
3. L.M.Sokoloff et al., J.Neurochem. 28, 897(1977), B.M.Gallagher et al. J.Nucl. Med. 19, 1154(1978).
4. 一部は日本磁気共鳴医学会大会および Society of Magnetic Resonance in Medicine, 8 and 9th Annual Meeting で報告した。篠原俊次他、1989-1990。

in-vivo 19F-MRSによる5-fluorotryptophanの肝臓における代謝の観察

○原田雅史, 西谷 弘 (徳島大. 医)

古賀けい子, 三浦 徹 (大塚製薬. 徳島研)

城戸 亮 (和歌山医大. 生化学)

Observation of the metabolism of 5-fluorotryptophan
in the liver by in-vivo 19F-MRS

Masafumi Harada, Hiromu Nishitani (School of Medicine, Tokushima University)

Keiko Koga, Iwao Miura (Tokushima Res. Inst., Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

Ryou Kido, (Dept. of Biochemistry, Wakayama medical college)

The metabolism of 5-fluorotryptophan in rat liver was examined by in-vivo 19F-MRS. A high peak due to 5-fluorotryptophan was noted immediately after 200mg/kg 5-fluorotryptophan injection, and decreased gradually. Another peak appeared about 40 min after 5-fluorotryptophan injection. This peak, which was considered due to 5-fluorokynurenine, was shifted about 3 ppm from the peak of 5-fluorotryptophan. In the liver injury group, this metabolite peak was low and slow to appear compared to the normal liver, which was considered to reflect dysfunction of the liver.

19F-MRS observation of 5-fluorotryptophan was thus considered to be useful for the direct evaluation of amino acid metabolism.

1. はじめに

19Fは、ほとんど生体内に存在しないことから、19F標識薬剤の生体内動態を、19F-MRSで観察し、評価することが可能である。既に我々は、in-vivo 19F-MRSを用い、5-fluorouracilの代謝を観察し、その有用性を発表してきた¹⁾。これまでの経験から、19F標識物質の代謝を観察することにより、代謝の主たる場所である肝臓の機能評価が可能であることを見だし、5-fluorouracil以外の19F標識物質についても、肝機能評価に使用できる可能性があると考えた。今回我々は、肝臓のamino acidの代謝を評価するため、19F標識物質として5-fluorotryptophanの代謝を、in-vivo 19F-MRSを用いて観察し、amino acidの肝機能評価に使用できるかを検討した。

2. 対象と方法

Wistar 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2群に分類した。

1)Control群(n=6):大腿静脈より5-fluorotryptophan 200mg/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5-fluorotryptophan 200mg/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(GOT1000IU/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。

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120分間とした。

3.結果及び考察

Fig.1,2にcontrol群とCCl₄肝障害群におけるスペクトルを示す。5-fluorotryptophanのpeakを0ppmとした場合代謝物のpeakは約-3ppm離れた位置に出現した。代謝物のpeakは、合成した5-fluorokynurenineのpeakとshift値がほぼ一致したことより、5-fluorokynurenineによるものと考えた(5-fluorokynurenineの合成については参考文献2)を参照のこと)。Fig.3,4に最初の5-fluorotryptophanのintensityを1としてnormalizeした場合の5-fluorotryptophanと代謝物のintensityの経時的变化をしめす。Fig.3より、正常群と肝障害群とで、5-fluorotryptophanの減少についてはほとんど差がないことが分かる。しかし、Fig.4より代謝物のintensityの変化には両群で大きな差があり、肝障害群ではほとんど5-fluorotryptophanが代謝されないことが分かる。

以上より、肝障害群では、5-fluorotryptophanはほとんど代謝されず、それにもかかわらず、5-fluorotryptophanの減少は両群で差が少ないことから、腎臓よりの排泄が関与しているものと推察される。

4.結語

in-vivo ¹⁹F-MRSを用い、肝臓における5-fluorotryptophanの代謝を観察でき、しかも肝障害群での代謝の低下も検出できることから、肝臓のamino acidの代謝能について、¹⁹F-MRSで評価できる可能性が示唆された。

5.参考文献

- 1)Harada,M., Nishitani,H., Shirahama,T., Koga,K. and Miura,I., Ninth annuals of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, abstract, NewYork,USA pp950,1990
- 2)Warnell,J.L., and Berg,C.P., J.Am.Chem.Soc. 76.1708-1709,1954

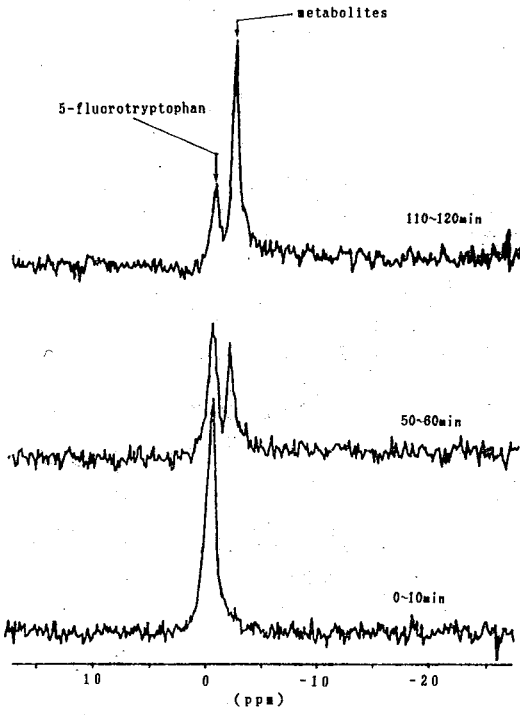


Fig. 1

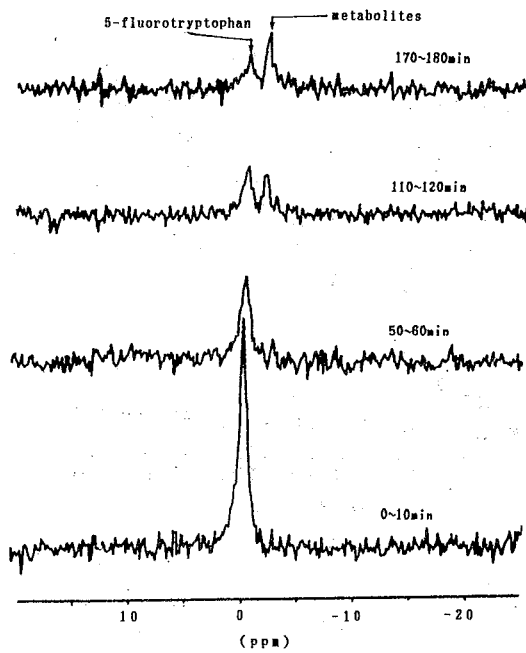


Fig. 2

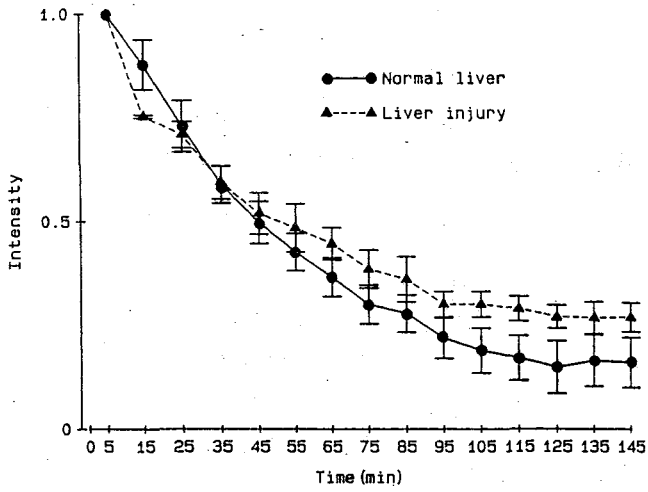


Fig.3

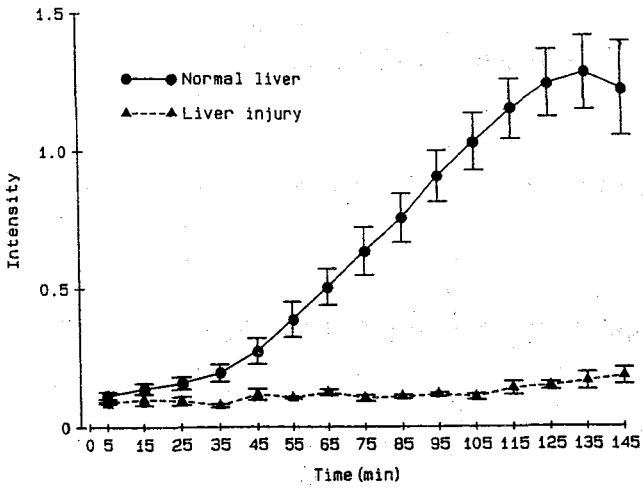


Fig.4

○亀井裕孟, 片山義朗 (電子技術総合研究所)

Measurements of Human Brain Functions by Differential NMR. Perception of Taste.

Hirotake Kamei and Yoshiro Katayama (Electrotechnical Laboratory)

Cerebral metabolism and blood flow are enhanced during the activation of regions of the cerebral cortex involved in the performance of specific tasks. We developed a differential NMR technique to detect the enhancement of blood flow in activated regions. Signals evoked by perception of taste were observed. The power law has been found to hold between reduced concentration of saline solution and evoked signal intensity. It has been found that there is considerable variation in the taste threshold from individual to individual and threshold is lowered by taking salt free diet for 6 days. The differential NMR technique appears to have promise for the analysis of brain functions.

精神作業を行ったり外的刺激を受容することによって、大脳は活動し、そこで消費される酸素及びグルコースを補うため、活動部位の局所血流量が増大する。大脳のプロトンNMR信号を観測すれば、この血流増大に伴う信号強度変化が観測される筈である。しかし、このときのプロトンNMR信号強度の変化は大脳全体から得られるプロトンNMR信号強度の僅か0.1~10ppm程度と見積られ、通常のA/D変換器を使用しているMRI (magnetic resonance imaging) 装置では、この微弱な変化は1ビット内に隠れてしまうため観測することができない。さらに、脳内の血流は心拍に同期して時間的に変動している。この変化量も大きく、活動に伴う血流の変化を捉えるためには心拍同期測定をしなければならないが、これは脳機能測定にとっては不便であり、また、意味ある測定を行なうことは不可能に近い。しかし、もし、脳活動に伴う血流変化が観測されれば、プロトンNMR信号の観測から大脳の活動部位および活動度を知ることができ、NMRの新しい応用分野が拓かれるものと期待される。

われわれは微弱なNMR信号の変化を観測することのできる新手法として「差分NMR法」を開発し¹⁾、精神作業および感覚受容に関わる脳活動の計測に適用している。今回は味覚受容の計測に適用した結果について報告する。

[差分NMR法の原理]

大脳は機能的にも構造的にも左右対称ではないが、プロトンNMR信号を観測すると、ごく大雑把には左右対称の信号が得られる。そこで、2個の表面コイルを正中面に対して対称的な頭表面上の位置に設置し、それらに誘導される信号のアナログ差信号を平衡検出回路を通して観測する。いま、理想的な被験者を想定し、正中面に対して完全に対象的な脳を持っているとする。もし、理想的な状態で安静時には、左右のコイルに同一の信号が誘起されたとすると、差信号としては何も現われない。次いで、外的刺激等によって左脳が活動すると、そこからの信号強度は増大し、ある振幅を持った差信号が現われる。一方、右脳が優位に活動した場合にも差信号が観測されるが、その位相は左脳が優位に活動したときに観測される差信号のそれとは逆位相になっている。このように、何れの大脳半球が優位に活動したかは差信号の位相から知ることができる。

正中面に対して垂直な線形磁場勾配、あるいは、正中面に対して対象的な磁場勾配（例えば、屋根型磁場勾配）を印加することによって、活動部位に関する位置情報を得ることができる。理想的な場合、安静状態では差信号は現われないが、活動によって大脳の一部の血流量が増大したとすると、その部位の信号が増大し、その部位の共鳴周波数の信号のみが差信号として観測され、他の部位の信号は観測されない。このように必要な信号のみを観測できるのも本手法の持つ大きな特長の一つである。

平衡検出回路で強制的に平衡をとるが、実際には理想的状態とは異なり、人間の脳は構造的に対象ではないから、完全に平衡をとり安静時の信号をゼロにするということは不可能であり、非平衡分の信号が出力に現れる。この信号では、脳活動による信号強度の変化分が全信号強度に占める割合が十分大きいので、A/D変換器を通して問題ない。そこで、まず、安静時の差信号を観測し、それをコンピュータの記憶装置に蓄えておく。次いで、脳を活動させた時の信号を記憶させ、両者の差をとることによって、脳活動に伴うNMR信号のみを観測することができる。正中面に対して対称的な磁場勾配を加えることによって、得られる信号の周波数から大脳の活動部位の正中面から垂直方向の位置に関する情報を得ることができる。これと頭部表面上に設置した表面コイルの位置から、大脳活動部位の位置を三次元的に求めることができる。

[測定]

測定には当所で開発した全身用差分NMR装置を使用した。測定条件は磁束密度：0.019 T、観測周波数：800 kHz、パルス繰り返し時間：0.1 s、積算回数：128回、FI D信号を観測した。

鹹味の測定には種々の濃度の食塩水を刺激物として用いた。旨味の測定には旨味物質としてL-グルタミン酸ナトリウム(MSG)および5'-イノシン酸ナトリウム(5'-IMP)を取り上げ、種々の濃度の水溶液を刺激物として用いた。用いた。舌の先端近くの右あるいは左側に味物質水溶液50 μ lを滴下したときの味覚野からのNMR応答を観測した。また、安静状態の信号を記録し、両者の差信号を活動信号とした。安静状態の信号測定を味

覚受容測定の前々それぞれに2回以上行った。各測定終了後は蒸留水で口腔内を十分に洗浄し、前の測定における刺激の影響がつぎの測定に現れないよう配慮した。被験者は右利き男性健常人である。

[結果と考察]

(1) 鹹味受容における刺激量と応答信号強度

既に視覚受容においては、照度と応答NMR信号強度との間にWeber-Fechner則が成立することを見いだしているが、味覚受容においては刺激量と応答信号強度との間にどのような関係が成立するかを調べた。舌上に滴下する食塩水の濃度の違いを刺激量の変化とした。測定結果を図1に示す。食塩水濃度 C と側頭葉からのNMR応答信号強度 I との間には、

$$I = K(C - C_0)^{0.38}$$

が成立する。ここで C_0 は鹹味受容の閾値濃度である。

(2) 減塩食摂取による受容閾値濃度の変化

鹹味受容閾値濃度は一般に0.02Mといわれている。ここでは、先ず閾値の個人差を調べてみた。応答信号の例を図2に示す。横軸は周波数で、活動部位の正中線からの距離を表している。被験者Aは日常的に東京地区でごく一般的な食塩濃度の食事を摂っており、Bは食塩濃度の低い食事を摂取している。日常的に塩分の少ない食事を摂っているものは、そうでないものに比べ閾値が低いようである。

つぎに、被験者Aについて、減塩食摂取の効果を調べた。一日の食塩摂取量7gの減

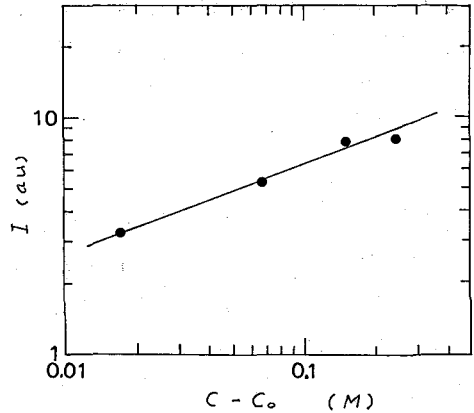


図1. 刺激量と応答信号強度。

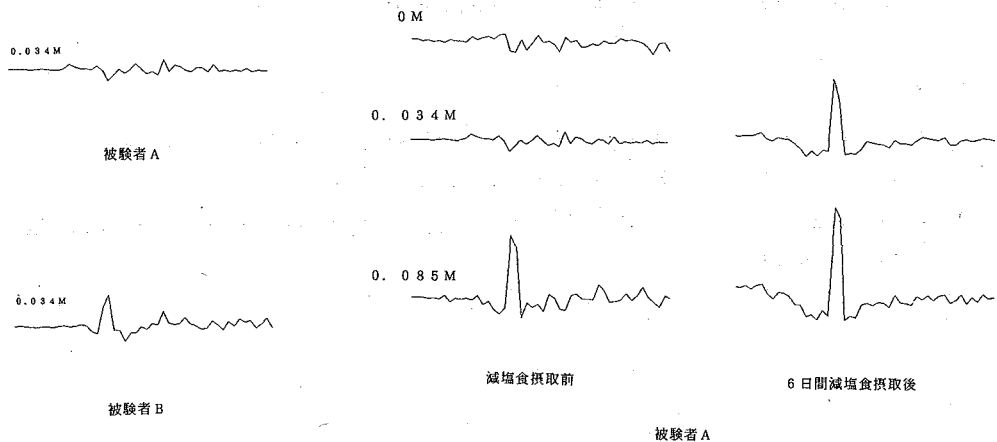


図2. 応答信号の個人差。

図3. 減塩食摂取前後の応答信号の変化。

塩食を6日間続けた場合の、応答信号を摂取前のそれとともに図3に示す。閾値は減塩食摂取前後で0.085Mから0.017Mに減少した。被験者Aの訴えによれば、一般的体調について両測定時に特段の変化はない。この結果は味覚受容閾値が生活条件によって大幅に変化することを示している。

(3) 旨味受容

味覚には甘味、酸味、鹹味、苦味の四原味があるとされているが、光の三原色とは異なり、四原味によって全ての味覚を表現することはできない。日本では古くから「鰹だし」や「昆布だし」が使われ、旨味が味覚の一つとなっているが、欧米では旨味を単独の味覚として捉える概念はないとされている。旨味に対する大脳の応答が、他の四原味に対する応答と同様なものであるか、あるいは異なるものかを知るため、旨味受容に対する応答信号を観測した。また、旨味物質の相乗効果はとくに顕著であるので、相乗効果についても測定した。

MSG, 5'-IMP, 何れの旨味物質に対しても、鹹味、甘味などに対するのと同じの領域からのNMR信号が観測され、四原味と同様の脳活動が認められた。MSGに対する受容閾値濃度は0.05%, 5'-IMPに対するそれは0.025%であった。これに対し、MSG-5'-IMP等量混合液に対する閾値は0.0125%と低下した。0.1%混合液(MSG:0.05%+5'-IMP:0.05%)では、それぞれの信号強度の加算値に対し2.8倍の強度の信号が観測された。また、MSGに1.5%の5'-IMPを加えた系では、閾値の低下を明確に検出することはできなかったが、高濃度領域における活動信号強度が、MSG単体のときに比べ約1.5倍に増大することが認められた。これらの結果は旨味受容における相乗効果を示すものである。

以上、差分NMR法によって、味覚受容における刺激量と応答信号強度との間に「べき則」が成立すること、受容閾値の生活状態による変化、旨味受容における相乗効果を明らかにした。今後、活動度の絶対値測定への展開を図りたい。

[文 献]

- 1) H. Kamei, Y. Katayama and H. Yokoyama: in "Microcirculation, An Update," Ed. M. Tsuchiya et al. (Excerpta Medica, Amsterdam, 1987) Vol.1, pp 417.
- 2) W. F. Ganong: Review of Medical Physiology, Lange Medical Publications, Los Altos, 1977, pp118.

L33

回転運動を行なっている物体の静止画像を得るイメージング法

○小椋 有希子、 関原 謙介

(株)日立製作所 中央研究所

Static Imaging of a Rotating Object.

Yukiko Ogura, Kensuke Sekihara

Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

A new method for obtaining a static image of a rotating object has been studied. This method requires only one static field gradient in a fixed direction. The n th sideband in the discrete spectrum obtained represents the magnetization with a point spread function which is equal to Bessel function J_n^2 . We demonstrate the effectiveness of the J^2 synthesis on the improvement of a point spread function. Based on the results, we also clarified the influence of imaging parameters on the image quality in this method.

1. 緒言

我々は先に回転運動を行なっている物体の静止画像を得るイメージング法を提案してきた¹⁾。本法は傾斜磁場を時間的に変調する必要がないので、高空間分解能に必要な大振幅の傾斜磁場を印加することができ、顕微鏡的NMRイメージングの実現が可能となる。また、対象物体に回転運動をさせるので、マジック角度試料回転法を併用して、固体NMRイメージングへの応用の可能性がある。本報告では、本イメージング法における画質向上に関して J^2 synthesis²⁾の有効性を実証し、イメージングパラメータの最適化について検討を行ったので、報告する。

2. 像再構成法

Fig. 1 に本イメージング法において用いるパルスシーケンスを示す。以下、像再構成は回転周波数 ω_r で回転する物体に固定した座標系 (x_r, y_r) において考える。座標系 (x_r, y_r) において、印加される傾斜磁場は

$$G_x(t) = G \cos \omega_r(t + t_k) \quad [1]$$

$$G_y(t) = G \sin \omega_r(t + t_k)$$

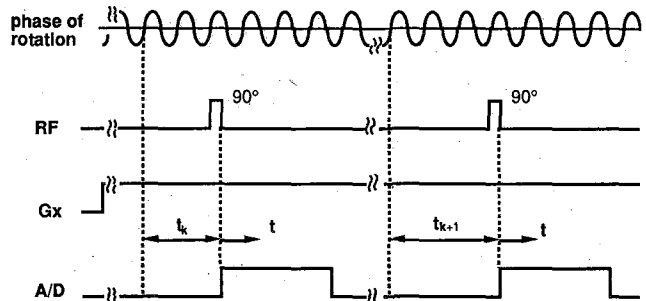


Fig. 1 The pulse sequence for obtaining a static image from a rotating object. The uppermost sequence shows the phase of rotation of a specific point.

と表される。Fig. 1 のパルスシーケンスにより得られる信号と $\exp(i\gamma D(x_r, y_r, t, t_k))$ の積の平均値をフーリエ変換すると、間隔 ω_r の離散スペクトルを得る。ここで、点 (x_r, y_r) は再構成する点であり、 $D(x_r, y_r, t, t_k) = x_r \int_k^t G_x(t) dt + y_r \int_k^t G_y(t) dt$ である。この離散スペクトルの n 番目のサイドバンドの振幅値あるいは面積値は

$$h_n = \int M_0(x_r - x_r, y_r - y_r) J_n^2\left(\frac{\gamma G \rho}{\omega_r}\right) dx_r dy_r \quad [2]$$

となる。 $M_0(x_r, y_r)$ は磁化分布、 γ は磁気回転比、 G は傾斜磁場強度を示す。 h_n は、点像分布関数 (PSF) J_n^2 を持つ、点 (x_{r0}, y_{r0}) における磁化分布に等しい。 J_n は n 次の第1種ベッセル関数である。 J_n^2 は大きなサイドローブを持つので、PSFを適当な形に改良する必要がある³⁾。 J^2 synthesisを用いてPSFを J_n^2 の線形結合で表わし、 $\sum_{n=0}^N a_n J_n^2$ とすると、点 (x_{r0}, y_{r0}) における磁化分布は

$$M_0(x_r, y_r) = \sum_{n=0}^N a_n h_n \quad [3]$$

と表すことができる。ここで、 a_n は係数である。

3. コンピュータシミュレーションおよび実験結果

まず、コンピュータシミュレーションにより画質向上に関する J^2 synthesisの有効性を確認し、1.5Tの超伝導磁石を用いてイメージング実験を行なった。対象にはCuSO水溶液のファントムを用いた。

1) J^2 synthesisによる画質向上

Fig. 2に J^2 synthesisを用い、PSFを改良した結果を示す。 N を増加させると、PSFのサイドローブが減少することがわかる。なお、PSFの半値幅(FWHM)は $N \geq 2$ で一定で、その値は $\omega/\gamma GL$ に比例する⁴⁾。 L は視野幅である。Fig. 3にFWHMをパラメータとし、

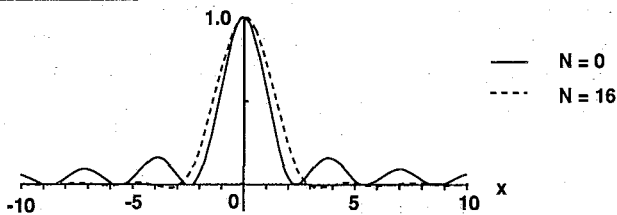


Fig. 2 Point spread function using J^2 synthesis with $N = 0$ and 16.

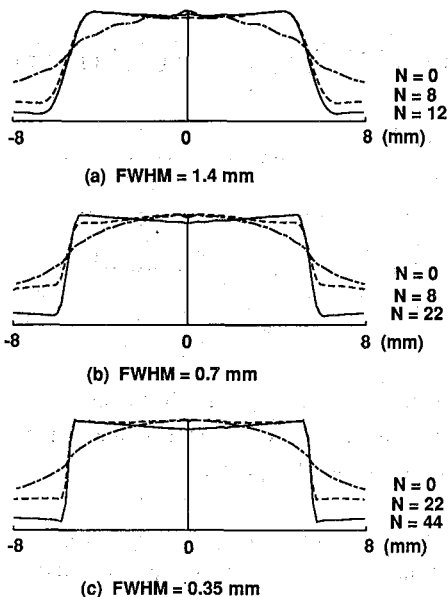


Fig. 3 Profiles along the horizontal axis at the center of images with three different FWHMs of PSFs.

N を変えたときの画像プロファイルのシミュレーション結果を示す。また、Fig. 4にその再構成画像濃度の誤差を示す。その結果、十分な画質を得るためには、FWHM=1.4mm, 0.7mm, 0.35mmのとき、それぞれ $N=11, 22, 44$ とする必要があることがわかる。この N は観測できるサイドバンドの数 $\gamma GL/\omega$ に等しく、FWHMすなわち空間分解能に反比例する。

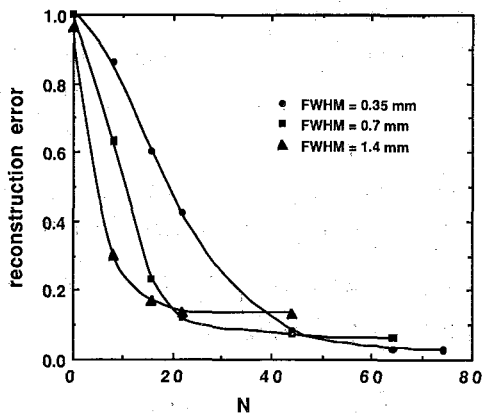


Fig. 4 Relationship between reconstruction error and N .

2) 静磁場不均一および傾斜磁場非線形が画質に与える影響

本法では、静磁場不均一および傾斜磁場非線形が存在する場合、離散スペクトルのサイドバンドの振幅値 h_n' は

$$h_n' = \int M_0(x_{r0} - x_r, y_{r0} - y_r) J_n^2\left(\frac{\gamma G \rho}{\omega_r}\right) \text{Re} \left\{ E(\omega - \omega_r, x_r, y_r) d\omega \right\} dx_r dy_r \quad [4]$$

となり、画像濃度に歪みが生じる。しかし、そのサイドバンドの面積を計算すると、上述の磁場不均一の影響を相殺した値を得る。Fig. 5 に均一な濃度分布を持ったファントムを用いた、像再構成結果を示す。サイドバンドの振幅値を用いて像再構成を行なった場合、リング状のアーチファクトが生じているが、面積値を用いた場合では均一な濃度分布の画像を得ている。



Fig.5 (a) image reconstructed with peak values of sidebands and (b) one with the area values of sidebands.

3) 回転周波数と画質の関係

本法において、空間分解能を向上させる点では ω_r を小さくする方が有利である。しかし、サイドバンドは T_2^* に依存した線幅を持つので、 ω_r を小さくすると、隣接するサイドバンドの分離が劣化し、サイドバンドの面積値が正確な磁化分布を示さなくなる。Fig. 6 に ω_r と画質の関係を示す。Fig. 7 は使用したファントムの断面図である。Fig. 6 から、 ω_r はサイドバンドの包絡線が重ならない程度に大きくする必要があることがわかる。

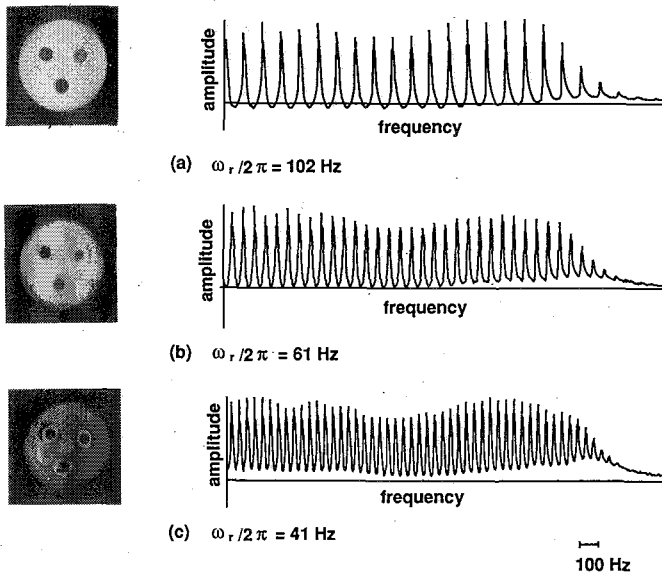


Fig.6 Phantom images with different rotation frequencies of 102 Hz, 61 Hz, and 41 Hz.

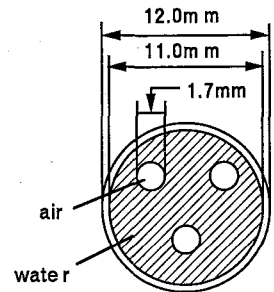


Fig.7 Configuration of a phantom in a plane perpendicular to the axis of rotation.

4.結言

本イメージング法の画質向上において、 J^2 synthesisの有効性を確認し、各イメージングパラメーターの画質に与える影響を明らかにすることができた。

参考文献

- 1) Y.Ogura and K.Sekihara, J.Magn.Reson.,83,177(1989).
- 2) J.P.Wild, in Proc.Roy.Soc.,286,499 (1965).
- 3) A.Macovski, Magn.Reson.Med.,2,29 (1985).
- 4) Y.Ogura and K.Sekihara, J.Magn.Reson.,88,359(1990).