

第30回NMR討論会

講演要旨集

日時 1991年11月18日(月)~20日(水)

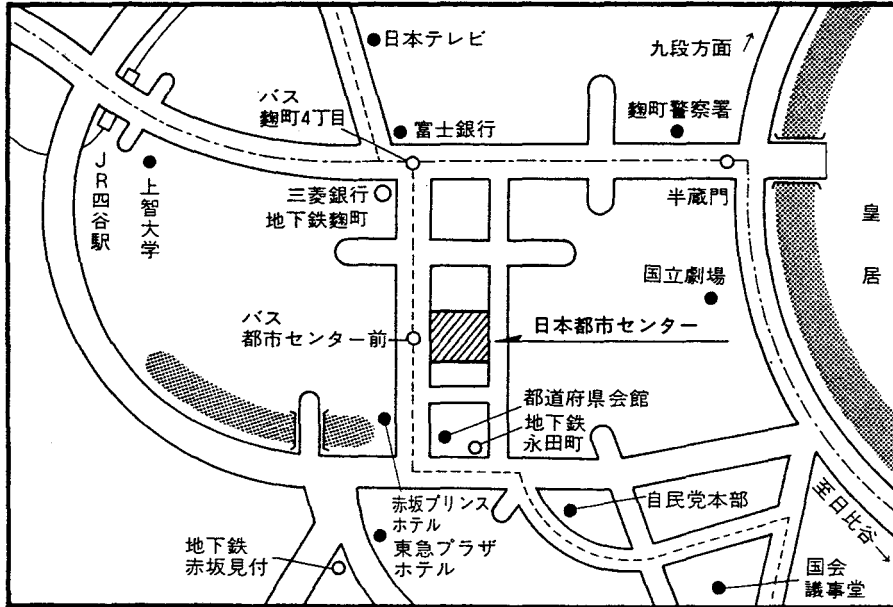
会場 日本都市センター

主催：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・日本蛋白工学会

第30回 NMR 討論会 会場案内

日本都市センター

(東京都千代田区平河町 2 - 4 - 1)
電話 03-3265-8211



交通の御案内

<地下鉄>

- ・有楽町線 永田町駅より徒歩約2分
- ・丸の内線 赤坂見付駅より徒歩約5分

<JR>

- ・中央線 四谷駅より徒歩約15分

連絡先

- ・〒113文京区本郷7-3-1
東京大学薬学部薬品物理化学教室
荒田 洋 治
電話 03-3812-2111 内線4810
FAX 03-3813-5099

一般講演 20分 討論10分
特別講演 50分 討論10分

11月18日 (月)

9:30-11:00

座長 安藤 勲

- L 1 固体における ^{13}C 化学シフト異方性および ^{13}C - ^{13}C 双極子相互作用の測定 1
(京大・理) 芦田 淳, 桑原大介, 今城文雄, ○寺尾武彦
- L 2 マジック・アングル・スピニング(MAS)下のクロスポーラリゼーションおよび ^{13}C 検出 ^1H MAS NMRスペクトルのシュミレーション 3
(都立大・理, コロンビア大) ○久保 厚, C.A. McDowell
- L 3 マジックサンドイッチエコーを用いた固体高分解能NMRイメージング 7
(筑波大・物理工学系) 松井 茂

— 休 憩 —

11:30-12:30

座長 寺尾武彦

- L 4 Measurement of Cross-Relaxation between Selected Pairs of Nuclei by Synchronous Stirring of Magnetization 11
(University of Lausanne, Switzerland)
G. Bodenhausen
- L 5 液晶におけるプロトンおよび炭素核の状態相関二次元NMR 13
(姫路工大・理, 日本電子, 京大・理)
○内藤 晶, 今成 司, 赤坂一之

12:30-15:00

ポスターセッション

15:00-17:00

座長 北川 進

- L 6 化学シフトにおける電子相関効果の計算 17
(北見工大) ○福井洋之, 松田弘喜, 三浦宏一
- L 7 高温NMR並びに高温高圧NMRの開発と其の応用 21
(北大・工) 下川繁三

座長 高橋憲助

- L 8 有機ゲルマニウム化合物の化学—NMRを中心として 25
(東大・教養) 竹内敬人
- L 9 バナジウム錯体の高分解能 ^1H , ^{13}C , ^{51}V NMR 29
(近畿大・理工) ○北川 進, 宗像 恵, 木曾秀典

17:00-18:00

座長 甲斐荘正恒

特別講演 1

- Recent Advances in Protein NMR 33
(National Institutes of Health, USA)
○A. Bax, F. Delaglio, M. Ikura
L.E. Kay, G. Vuister, M. Clore,
A. Gronenborn, & D. Torchia

11月19日 (火)

9:00-11:00

座長 引地邦男

- L10 固体状態における高分子鎖の高次構造と電子状態 35
(東工大・工) ○安藤 勲, 黒子弘道, 山延 健
- L11 ^{13}C 固体高分解能NMRによるV型アミロースの安定性および β 型への転移挙動の
検討 39
(姫路工大・理, 国立がんセンター, 東理大・理)
○斉藤 肇, 山田淳子, 行本 徹, 矢島博文,
遠藤隆一

座長 早水紀久子

- L12 ^{13}C -固体高分解能NMRによるL-ロイシン- γ -メチル, L-グルタメート共重合体
の分子運動の研究 43
(北大・工) ○堤 耀広, 唐沢 勝, 山口雅史
- L13 ポリビニルアルコールの固体状態における分子内および分子間水素結合 47
(京大・化研) 胡 紹華, ○堀井文敬, 小谷 壽

— 休 憩 —

11:30-12:30

座長 堤 耀広

- L14 固体高分解能 ^{13}C NMRによる6個の三重結合をもつ長鎖アルキンの固相重合過程
の追跡 49
(化技研, 織高研) ○早水紀久子, 柳沢 勝, 岡田修司, 松田宏雄
正木 篤, 中西八郎
- L15 傾斜磁場パルスの高分解能NMRへの応用 53
(島津製作所・応用技術部) ○大野 靖, 大藪又茂

12:30-15:00

ポスターセッション

15:00-17:00

座長 稲垣冬彦

- L16 NMRによるリボヌクレアーゼHの構造解析 57
(日本電子・生体計測研, 協和発酵工業・東京研, 蛋工研, 新技団・永山プロジェクト)
○山崎俊夫, 好田真由美, 小田康司, 金谷茂則
中村春木, 猿渡 茂, 永山国昭

- L17 安定同位体標識NMRを用いたDNA結合蛋白質の構造と相互作用の研究 59
(大阪・蛋白研, スクリップス研, 蛋工研)
白川昌宏, 松尾 浩, 芹川康治, 児嶋長次郎
P. Wright, 大久保忠恭, ○京極好正

座長 神藤平三郎

- L18 固体¹⁵N NMRによる絹フィブロインの構造解析 63
(農工大・工, フロリダ州大) ○朝倉哲郎, 出村 誠
L.K. Nicholson, T.A. Cross

- L19 タンパク質の状態相関二次元NMR 65
(京大・理, 姫路工大・理, 日本電子)
○赤坂一之, 木村雅晴, 内藤 晶, 今成 司

17:00-18:00

座長 小林祐次

特別講演 2

- Heteronuclear Half-filters for Studies of Complexes with Biological Macromolecules
..... 69
(ETH, Switzerland) K. Wüthrich

18:30 懇親会 (日本海運倶楽部, 4 F ホール)

11月20日 (水)

9:00-11:00

座長 阿久津秀雄

- L20 Decoupling of carbonyl carbons in multi-dimensional NMR and some new
multi-dimensional NMR experiments 71
(Bristol-Myers Squibb, Varian, USA)
○L. Mueller, M.G. Wittekind, W.J. Metzler,
M.S. Friedrichs, M.A. McCoy,
B.T. Farmer II

- L21 オーバーハウザー効果によるリン脂質ミセルの立体構造 73
 (理研, 茨城大, 日本電子データム)
 ○鶴沢 洵, 柴田俊之, 浦本昌和, 林 浩平
 坪野浩二, 清水章三

座長 齊藤 肇

- L22 脂質二重膜グリセロール骨格の重水素NMR 77
 (横浜国大・工) ○阿久津秀雄, 申 敬花, 長森敏明

- L23 Structure and Dynamics of a Membrane Protein Dimer; ^1H , ^{13}C and ^{15}N
 NMR Spectroscopy of M13 Coat Protein in SDS Micelles 81
 (University of Alberta, Canada)
 G.D. Henry & ○B.D. Sykes

— 休 憩 —

11:30-12:30

座長 赤坂一之

- L24 A Four-level Quantum Mechanical System in Living Tissue: ^{23}Na MRS
 and MRI 83
 (State University of New York, USA)
 C.S. Springer

- L25 超高速NMR映像法による乱流運動の可視化 85
 (筑波大・物理工学) 巨瀬勝美

12:30-15:00

ポスターセッション

15:00-17:00

座長 永山国昭

- L26 同種核3D-NMRによるグリコペプチド系抗生物質Galacardinの構造解析 89
 (三共・分析代謝研・発酵研) ○春山英幸, 桑野晴光, 竹内道子, 犬飼正俊

- L27 D-アミノ酸を含むペプチドのNMR研究—achatin-Iを中心として 93
 (サントリー・生有研, 大阪薬大, 広島大)
 ○岩下 孝, 釜谷好美, 南方宏之, 石田寿昌
 宗岡洋二郎, 野本享資

座長 竹内敬人

- L28 NMRで見る有機化合物の顔 97
 (筑波大・化) 楠見武徳

- L29 金属ポルフィリン関連ラジカルの常磁性NMR
 —その特異な電子構造と反応性との関連において— 101
 (京大・工) 森島 績

17:00-18:00

座長 京極好正

特別講演 3

- 一次元NMR — 伝統的手法の新しい応用 — 105
(都立大・理) 甲斐荘正恒

ポスターセッション演題

理論・方法および技術

- P 1 非等価メチレンプロトンの絶対的帰属法
— ポリ(3-ヒドロキシブチレート)への適用 — 107
(日本電子, 北大・理) ○小椋賢治, 引地邦男
- P 2 等価核のNMR的非等価性に着目した C_2 対称分子の構造解析 109
(北大・農) 川端 潤, ○福士江里, 水谷純也
- P 3 NMPによるブチルリチウム-ピリジン付加体におけるピリジン置換基および
フェニル置換基の効果に関する研究 113
(名工大・工) 吉野明広, ○中村典雅, 高橋憲助
- P 4 溶液内におけるスチルベンジアニオンのNMR研究 117
(筑波大・化) ○小泉輝武, 横山幸弘, 菊池 修
- P 5 溶液中の立体化学における緩和時間 T_1 の利用 VIII
— トロパンアルカロイドのコンフォメーション解析 — 121
(神女薬大) ○蔡 東玲, 杉浦真喜子, 高尾檜雄
- P 6 反磁性遷移金属錯体の 1H NMRスペクトルに見いだされる顕著な金属上の常磁性
電流の影響 125
(製品科学研) ○高橋利和, 平谷和久
- P 7 ^{13}C NMR化学シフトにおける重水素同位体効果のC-H結合距離への依存 129
(メニコンR&D, 名工大・応用化学科)
中島康喜, ○福永守高, 金田洋幸,
鈴木恵子, 高橋憲助
- P 8 タンパク質の構造と 1H NMR化学シフトの相関 133
(農工大・工, Sheffield大) ○朝倉哲郎, 出村 誠, M.P. Williamson
- P 9 スピンシュミレーションプログラムの開発 137
(協発発酵, 北大・理) ○垣田信吾, 竹腰清乃理, 引地邦男
- P 10 スピンシュミレーターの開発とその応用 2 139
(島津製作所・第1科学計測事業部)
○藤田 真

P11	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルデータベースによる検索同定システムの開発, 実用化の検討(3)	143
	(日立計測, 日立那珂) ○橋本正雄, 佐久間晃子, 田中保子, 笹淵 仁	
P12	LANを用いたNMRデータ管理及びオンライン処理システムの開発	147
	(三共・分析代謝研・活性物質研・研究企画部) ○皆川勝弘, 矢島美由紀, 春山英幸, 桑野晴光, 成戸俊二, 土田秋雄	
P13	分析研究室におけるNMRの包括的役割	151
	(アップジョン・筑波総研) ○青木優規美, 広瀬千恵子, 石川 茂, 小形 稔, 西村俊秀, 堀川力三, 檜山行雄	
P14	水溶液系の温度ジャンプNMRにおける温度指標とジャンプ効率	155
	(京大・理, 姫路工大・理, 日本電子) ○木村雅晴, 内藤 晶, 今成 司, 赤坂一之	
P14A	Multiple-Quantum NMR Experiments for Studying Spin-3/2 and Spin-5/2 Quadrupolar Relaxation	159
	(University of Manchester, England) C.W. Chung, B. Wood, S. Wimperis	

生体分子

P15	オキソトシンのDMSO中における構造	161
	(日本電子・生体計測研) ○加藤敏代, 藤原敏道, 永山国昭	
P16	^1H NMRによるエンドセリンの立体構造決定と core-tail 相互作用の解析	165
	(武田薬品・筑波研) ○遠藤聡史, 井ノ岡 博, 菊池 崇, 脇舛光廣, 水田栄治, 藤野政彦	
P17	エンドウ褐紋病菌の産出するサプレッサーのNMRによる構造研究	169
	(新日本製鐵, 岡大・農) ○齋藤公兒, 加藤敏朗, 金 洪範, 白石友紀, 山田哲治, 奥 八郎	
P18	安定同位体核利用NMRによる酸性繊維芽細胞成長因子(aFGF)の構造解析	173
	(都臨床研, Rhone-Poulenc Rorer Inc.) ○楯 真一, 楯(宇都宮)直子, 尾高雅文, M. Ravera, 稲垣冬彦	
P19	NMRによるヒトリゾチームと基質の相互作用研究	177
	(蛋工研) ○大久保忠恭, 伊中浩治, 松島正明, 谷山佳央 菊池正和	
P20	安定同位体利用NMRによる免疫グロブリン抗原結合部位の動的構造解析	179
	(東大・薬, NKK・中研) ○高橋栄夫, 鈴木恵理佳, 水谷隆太, 進藤一泰, 田村 洋, 嶋田一夫, 荒田洋治	

P 21	安定同位体利用NMRによる免疫グロブリンの動的構造解析 —分子量10万を越える巨大蛋白質へのアプローチ—	183
	(東大・薬) ○加藤晃一, 松永千枝, 金 夏亨, 伏見英樹, 吉野温子, 荒田洋治	
P 22	安定同位体標識を用いたc-Ha-Ras蛋白質の高次構造解析	187
	(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, 西村 暹, 宮沢辰雄, M. Wälchli, 横山茂之	
P 23	GDP→GTP交換にともなうRasタンパク質の動的な高次構造変化	191
	(東大・理, 横浜国大・工, 日本ブルカー, 国立がんセンター) ○伊藤 隆, 武藤 裕, 山崎和彦, 河合剛太 宮沢辰雄, M. Wälchli, 西村 暹, 横山茂之	
P 24	がん遺伝子産物MybのDNA結合ドメインの構造解析	195
	(横浜市大・総合理, 阪大・蛋白研, 蛋工研, 理研・筑波LS) 緒方一博, 平田善三, 北條裕信, 相本三郎, 中井孝尚, 中村春木, 皿井明倫, 石井俊輔, ○西村善文	
P 25	¹³ C-edited NOESYを用いたリボヌクレアーゼT ₁ とその Glu-58カルボキシメチル化体との構造比較	199
	(味の素・中研, 東大・理) ○宮野 博, 鈴木榮一郎, 田之倉 優, 高橋健治	
P 26	NMRによる常磁性ヘムタンパク質の磁化率テンソルの主軸の決定と活性部位の 構造解析	201
	(東工大・生命理工) ○山本泰彦, 小森研治, 七井誠成, 井上義夫 中條利一郎	
P 27	旧黄色酵素とシトクロムcの相互作用の研究	203
	(関西医大・化学) ○藤井 茂, 黒田記代, 三浦 洸	
P 28	¹ H-NMRによるタンパク質溶液→ゲル変換における水構造変化の研究	205
	(藤田保衛大・衛, 岐阜大・医, 生理研, 京大・理) ○曾我美 勝, 恵良聖一, 桑田一夫, 加藤一夫 中上 寧, 亘 弘, 赤坂一之	
P 29	ネオカルジノスタチンにおける分子認識	209
	(東北大・理, 東北大・分析セ, サントリー・生医研, 東北大・医, ポーラ化成) ○田中俊之, 高橋和信, 鈴木敏夫, 平間正博 上野昌子, 今城精一, 石黒正路, 水柿道直 江戸清人, 小松秀雄	
P 30	カプトガニ血球由来抗菌ペプチドTachyplesin I とリポ多糖(LPS)の相互作用	213
	(九大・歯・理) ○河野敬一, 寺田善博, 岩永貞昭	
P 31	LiDSミセル中でのrat-ANPの構造研究	215
	(塩野義研) ○林 文晶, 渡辺国夫, 井上 健, 新 優, 照井彬弘	

P32	^1H -NMRを用いたブタ赤血球膜とジブカインとの相互作用研究 —カチオン型と分子型の比較—	219
	(京大・薬) ○脇田美砂子, 黒田義弘, 中川照眞	
P33	NMR緩和時間法によるミセル/水系の分配特性の測定。安息香酸誘導体の分配 特性と構造活性相関	221
	(阪大・薬) ○神崎康治, 筧 永忠, 藤原英明	
P34	立体構造解析をめざしたtRNAの安定同位体標識	225
	(横浜国大・工, 東大・理) ○河合剛太, 高柳正明, 野口智明, 新美達也, 横山茂之, 宮沢辰雄	
P35	エチルピピリジノ化 β -シクロデキストリンのNMRによる構造解析	229
	(東工大・生命理工) ○池田 博, 杜 依群, 中村朝夫, 戸田不二緒	
P35A	Solution Distal Histidine Orientation in Monomeric Chironomus Thummi Thummi Cyano-Met Hemoglobins— A Proton NMR Study	233
	(University of Arkansas for Medical Sciences) ○S. Ramaprasad, D.H. Peyton, G.N. La Mar, S.W. Unger, S. Sankar, K. Gersonde	
多核種NMR		
P36	^{11}B NMRによるホウ酸とポリオールとの間の錯形成に関する研究	235
	(上智大・理工) ○竹田卓也, 大井隆夫, 向田政男	
P37	環状 14π オニウムイオンの ^{17}O -NMR化学シフト	237
	(九大・薬, 第一薬大) ○小川 晴, 井本泰治, 加藤祐子	
P38	^{17}O -NMRを用いた酸素架橋 [15] アヌレノンの物性研究: 酸素架橋基の分子内光 スクランプリングの機構解明	241
	(九大・薬, 第一薬大) ○小川 晴, 本島浩之, 井本泰治, 加藤祐子, 野上靖純, 古賀俊隆	
P39	The Observation of ^{23}Na Triple Quantum Dynamic Frequency Shifts in Solution	245
	(Tel Aviv University, Israel) ○H. Shinar, U. Eliav, G. Navon	
P40	2次元nutration NMRによる Na^+ 伝導体の研究	247
	(阪大・理) ○石丸臣一, 増井大二, 中村亘男	
P41	高温酸化物融体のNMR, ^{11}B , ^{23}Na 核の緩和時間の測定	249
	(北大・理・工) ○前川英己, 稲垣陽介, 下川繁三, 横川敏雄	
P42	白金ブルー系錯体の固体化学と溶液化学	253
	(東邦大・理, 早大・理工) ○森山広思, 松本和子	

固体NMR

- P 43 高分子ブレンドの固体NMRによる解析 257
(大塚電子・MR技術部) ○仲村高志, 河原美智代, 大川内 真
- P 44 ^1H CRAMPSによるカオリナイトの構造の研究 261
—天然物と合成物の比較
(化技研) ○林 繁信, 上田貴洋, 早水紀久子, 秋葉悦男
- P 45 固体金属カルボニルクラスター $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{HC}_6\text{O}_6(\text{CO})_{15}]$ における ^1H NMR 263
(阪大・教養・理, リバプール大)
○中山尋量, 江口太郎, 武田 定, 中村亘男
B.T. Heaton
- P 46 固体C-13, 重水素NMRによる抗生物質トロスペクトマイシンのケトージオール
交換と水のダイナミクス 265
(アップジョン・筑波総研) ○檜山行雄, M.D. Likar
P.E. Fagerness
- P 47 同位体利用とX線結晶構造解析によるアスパルテームのCPMAS- ^{13}C -NMR
スペクトルの解釈 269
(味の素・中研) ○海老沢計慶, 坂本公康, 永嶋伸也, 鈴木榮一郎
- P 48 固体NMRによる超微粒ダイヤモンドのキャラクタリゼーション 271
(豊田・中研) ○小岩井明彦, 樋口和夫, 野田正治
- P 49 固体高分解能 ^{13}C NMRを用いた強誘電性液晶の分子運動の研究 (5) 275
(日本鉱業・研究開発本部) 吉沢 篤, ○菊崎 浩
- P 50 置換ポリアセチレンのガラス状態における局所運動 279
(京大・化研) ○植田 正, 堀井文敬, 小谷 壽
- P 51 ^{71}Ga , ^{207}Pb NMRによる $\text{PbO-Ga}_2\text{O}_3$ 系ガラスの構造研究 281
(京大・化研) ○忠永清治, 宮路史明, 横尾俊信, 作花済夫
- P 52 固体重水素NMRによるpoly(γ -methyl L-glutamate)側鎖の動的構造 283
(北大・工) ○平沖敏文, 北澤 聡, 小亀朗由, 堤 耀廣
- P 53 固体重水素NMRによるpoly(L-phenylalanine)のフェニル環の運動 285
(北大・工) ○小亀朗由, 平沖敏文, 堤 耀廣
- P 54 固体高分解能NMRを用いたペプチドの水素結合の研究 287
(東工大・工) ○浅川直紀, 黒木重樹, 黒子弘道, 安藤 勲,
莊司 顯, 尾崎拓男
- P 55 固体高分解能NMRを用いた羊毛ケラチン及びカルボキシメチル化ケラチンの
構造研究 291
(東工大・工) ○三村博幸, 吉水広明, 安藤 勲

P 56	^{13}C 固体高分解能NMRによる膜蛋白質の構造解析とその問題点	295
	(姫路工大・理, 筑波大・物理工学)	
	○辻 暁, 新沢恭子, 恵良田知樹, 内藤 晶 吉川信也, 斉藤 肇	
P 57	^{15}N NMRによるポリペプチドの固体構造解析: L-ロイシン含有ポリペプチド	299
	(群馬大・工, 東工大・工)	
	○莊司 顯, 加藤 寛, 尾崎拓男, 黒木重樹, 安藤 勲	
P 58	固体高分解能 ^{17}O NMRによるポリグリシンの構造研究	303
	(東工大・工)	
	○黒木重樹, 安藤 勲, 莊司 顯, 尾崎拓男	
P 59	試料回転がオーバートーンNMRに及ぼす影響	307
	(北大・理)	
	○竹腰清乃理, 引地邦男	
P 60	試料回転下の固体多重パルスNMRのシミュレーション	311
	(日本電子・生体計測研)	
	○藤原敏道, 永山国昭	
P 61	静磁場をかけたNQR法によるVTMASの温度較正	313
	(日本電子)	
	○田中良二, 杉沢寿志, 出口健三, 藤戸輝昭	
P 62	新機構の温度可変MASプローブ及びその温度較正	315
	(大塚電子・MR技術部)	
	○大川内 真, 仲村高志, 三浦 巖	
P 63	固体NMR機能を溶液用NMRに付加するときの問題点	319
	(アップジョン・筑波総研)	
	○小形 稔, 青木優規美 P. E. Fagerness, 檜山行雄	
P 64	GX-270スペクトロメーターの改良	321
	(北大・理, 日本電子)	
	○竹腰清乃理, 引地邦男, 藤戸輝昭, 樋口啓一郎	
<i>in vivo</i> NMRとイメージング		
P 65	^1H 核による生体内 ^{13}C -標識化合物の間接的計測	323
	(滋賀医大, 横河メディカル)	
	○犬伏俊郎, 森川茂広, 木戸千絵	
P 66	選択的スピン励起法によるマスト細胞の ^1H -NMRスペクトル測定	325
	(京都府医大・生理)	
	○吉崎和男, 有蘭直樹	
P 67	細胞内Naの動的性質: ^{23}Na 二重子フィルターによる解析	329
	(生理研・分子生理)	
	○瀬尾芳輝, 村上政隆	
P 68	有機水銀が脳のエネルギー代謝機能に与える影響の ^{31}P NMRによる解析	331
	(国立環境研, 国立水俣病研究センター)	
	○三森文行, 中野篤浩	
P 69	飢餓時のザリガニの筋肉内のリン酸化代謝状態と水の緩和時間	333
	(近畿大・医)	
	○千葉 惇, 秩父志行	
P 70	特異値分解を伴う線形予測法による ^{31}P NMRスペクトル推定と定量解析の検討	337
	(慶大・理工)	
	○鶴池充宏, 内山孝憲, 南谷晴之	

P71	^1H -MRSによる肺癌由来培養細胞株A549への薬剤投与効果の検討	341
	(京大・理・医, 群馬大・医) ○伊島理枝子, 赤坂一之, 中井敏晴, 遠藤啓吾, 細野 真, 佐賀恒夫, 阪原晴海, 小西淳二	
P72	NMR Relaxation Characteristics of Interstitial Sodium	343
	(Beth Israel Hospital, USA) B.D. Foy, ○D. Burstein	
P73	<i>in vivo</i> Measurement of Cerebral Oxygen Consumption and Blood Flow Using Oxygen-17 Magnetic Resonance Imaging	345
	(NIH, USA) ○J. Pekar, L. Ligeti, Z. Ruttner, R.C. Lyon, T.M. Sinnwell, P. van Gelderen, D. Fiat C.T.W. Moonen, A.C. McLaughlin	
P74	^1H NMRイメージング法を用いた高分子ゲルの研究 I. 応力伝播の画像解析	347
	(東工大・工) ○安永秀計, 黒子弘道, 安藤 勲	

第 1 日 目
11月18日 (月)

L 1 ~ L 9

固体における ^{13}C 化学シフト異方性および $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ 双極子相互作用の測定

京大理 芦田 淳、桑原 大介、今城 文雄、○寺尾 武彦

Measurements of ^{13}C Chemical Shift Anisotropies and $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ Dipolar Interactions in Solids.

Jun Ashida, Daisuke Kuwahara, Fumio Imashiro, ○Takehiko Terao.

Faculty of Science, Kyoto University.

Two studies on measurements of anisotropies are reported. One is a study of dynamics of ferrocene molecules enchathrated in β -cyclodextrin by measurements of chemical shift powder patterns using one dimensional SASS NMR. The other is measurements of 2D powder patterns due to $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ dipolar interactions and ^{13}C chemical shift tensors for mandelic acid with 10% ^{13}C doubly enriched methine and carboxyl carbons using off-magic angle spinning 2D exchange NMR.

C P M A S 法では、異方性相互作用は高分解能を達成するために除去されている。しかしながら、各種異方性は等方平均シフトに比べて一層詳細な情報を与えることができる。今回、我々は異方性の測定に関し、二つの研究を報告する。一つは化学シフト粉末スペクトルの測定による、 β -シクロデキストリンに包接されたフェロセンの存在状態に関する研究であり、もう一つは $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ 双極子相互作用と化学シフト異方性による二次元(2D)粉末スペクトルの測定である。後者は昨年¹⁾の報告の続報である。

図1に β -シクロデキストリン/フェロセン包接化合物の ^{13}C スペクトルを示す。(a)はC P M A S スペクトルであり、(b)は一次元S A S S 法²⁾を用いて測定したゲスト分子フェロセンの ^{13}C 化学シフト粉末パターンである。測定周波数は ^1H に対して200MHzであり、一次元S A S S の観測時に磁場と試料回転軸のなす角 θ は 66.57° である。したがって、粉末パターンは $P_2(\cos\theta) = -0.263$ だけ縮尺されている。観測された粉末パターンは異なった異方性と異なった面積強度をもった軸対称化学シフトテンソルによる三つの粉末パターンの重ね合わせでよく再現される。

シクロデキストリン, S A S S, N M R, 化学シフト異方性, 双極子相互作用

あしだじゅん、くわばらだいすけ、いましてろふみお、てらおたけひこ

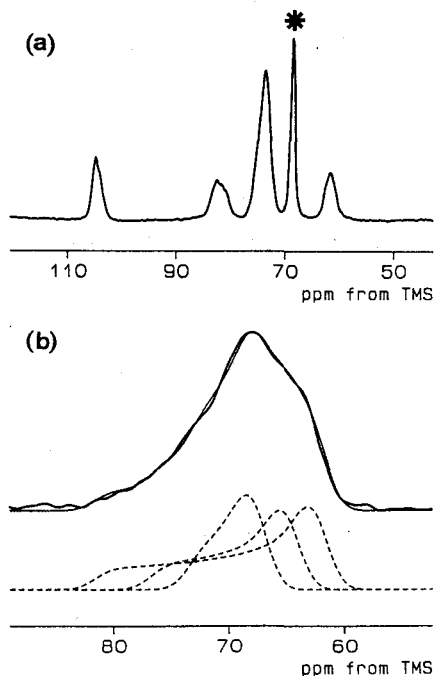
これらの結果から、フェロセン分子は単位格子中で三つの不平等な位置に存在し、かつ才差運動をしていることがわかる。三つのフェロセン分子の population は 0.42, 0.32, 0.26 であり、それぞれの才差角度は 6° , 30° , 42° である。 ^{13}C CPMAS スペクトルでは、フェロセンの信号はシャープな一本線であり、このような情報は得られない。

粉末パターンは二つの時間領域を設け、2D フーリエ変換を行うことにより、2D 化することができる。2D 粉末パターンは 1D に比べてスペクトル構造に富んでいるため、スペクトルの解析の信頼性ははるかに高くなるとともに、1D スペクトルから得られない情報をも提供する。昨年、我々はマンデル酸においてメチン炭素とカルボキシル炭素を 10% ダブルエンリッチして、両 ^{13}C 間の双極子相互作用と ^{13}C 化学シフト異方性による 2D 変換スペクトル

(共鳴周波数は ^1H に対して 200MHz) をオフマジック角度 (58.7°) で測定した結果について報告した¹⁾。今回、我々は ω_1 軸から化学シフトを取り除いたスペクトルの測定・解析を含め、シミュレーションを徹底して行い、各パラメータを決定した。その結果は次の通りである:カルボキシル炭素の化学シフトテンソルの主値は $(\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}) = (87.0, 75.9, 58.8 \text{ ppm})$ であり、主軸方向は 3 軸が COOH 面に垂直で 1 軸は $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ 軸方向である。メチン炭素に対しては主値は $(262.0, 162.7, 106.9 \text{ ppm})$ であり、主軸方向は、 $1.53 \pm 0.01 \text{ \AA}$ と求められたが、これは X 線の結果、 $1.530 \pm 0.008 \text{ \AA}$ とよく一致する。

文献

- 1) 芦田淳、桑原大介、植垣隆浩、寺尾武彦、第 29 回 NMR 討論会講演要旨集、245 (1990)。
- 2) J. Ashida, T. Nakai, and T. Terao, Chem. Phys. Lett., 168, 523 (1990)。



β -シクロデキストリン/フェロセン (1:1) 包接化合物の ^{13}C スペクトル。(a) CPMAS。*印はフェロセンの吸収線を示す。(b) 一次元 SASS 法で得られたゲスト分子フェロセンの ^{13}C 化学シフト粉末パターン。-0.263 倍に縮尺されている。太線は実験スペクトル、細線はシミュレーションを示す。シミュレーションは点線で示した三つの粉末パターンの重ね合わせである。

L2

マジック・アングル・スピニング下のクロスポーラリゼーション及び
 ^{13}C 検出 ^1H 双極子 MAS NMR スペクトルのシュミレーション
(都立大・理、ブリテイッシュコロンビア大) ○久保 厚・
C. A. M c D o w e l l

"Simulations of WIM-24 cross-polarization experiments under magic-angle-spinning and ^{13}C detected ^1H dipolar MAS NMR spectra."

We investigated (1) mixing time dependence of the WIM-24 cross-polarization curves and (2) ^{13}C detected ^1H dipolar MAS NMR experiments using a WIM-24 sequence during the mixing period. The experimental results were compared with the simulation using (a) average Hamiltonian theory and (b) multistep calculation of the time evolution operator during the mixing period. The simulations revealed that the ^{13}C detected ^1H dipolar MAS NMR spectrum using a WIM-24 mixing was not affected by pulse amplitude and phase errors, while the spectrum obtained by a cw-mixing depends on the Hartman-Hahn condition.

<序> 液晶、包接化合物などの系では、磁気双極子相互作用が残っているにもかかわらず、マジック・アングル・スピニング(MAS)法により非常に鋭い ^1H や ^{19}F のNMRスペクトルが得られる場合が報告されている。[1]我々は、包接化合物でこのような系を見だし、磁気双極子相互作用に由来する ^1H MAS NMR スペクトルのスピニング・サイドバンドの強度を解析する方法を示した。[2]しかしながら ^1H NMRでは、化学シフト相互作用が小さく、生体高分子のように多くの種類の ^1H が存在する場合には、十分な分解能を得ることは困難と思われる。そこで2次元のHeteronuclear COSY法を用いて ^1H から ^{13}C に磁化を移し ^1H NMRスペクトルの分離を計った。(以下この方法を ^{13}C 検出 ^1H 双極子MAS NMR法と呼ぶ。定量性を上げるためにmixing periodにはWIM-24パルス・シーケンス[3]を用いた。春期年会ではAverage Hamiltonian Theoryを使って実験データを解析し、報告した。今回は数値計算で直接、mixing periodの時間発展演算子を計算し実験データを解析すると共に、パルス幅や位相が完全に合っていない場合の影響について詳細に調べた。

<理論>

1. Average Hamiltonian Theory(AHT)による解析

WIM-24のAverage Hamiltonianは次の式で与えられる。

$$\mathcal{H}_{av}^M = \sum_i \frac{1}{3} \{2d_i(\beta_i, \gamma_i, t) + J_i\} \mathbf{S} \cdot \mathbf{I}_i \quad (1)$$

^{13}C スピン \mathbf{S} と i 番目の ^1H スピン \mathbf{I}_i との磁気双極子相互作用、 $d_i(\beta_i, \gamma_i, t)$ は、ロー

^{13}C magic-angle-spinning NMR, dipolar interaction

くぼ あつし、マクダウエル

ターに固定した座標系における磁気双極子相互作用テンソルの主軸の方向を表す極座標、 β_i と γ_i 、および時刻 t の関数となっている。すべての d_i 及び J_i が等しい時、 ^{13}C シグナルの強度のmixing time依存性（以下ではcross-polarization (CP) 曲線と呼ぶ。）にたいする厳密解が求まる。ここでは、回転運動を行っている孤立した CH_2 の ^{13}C に対して次式を得た。

$$g_2(\beta, \gamma, t_m) = \frac{4}{9} \left\{ 1 - \cos \frac{1}{2} (2d_c \Phi(\beta, \gamma, t_m) + J t_m) \right\} \quad (2)$$

ただし d_c 及び Φ は次式より求まる。

$$d_i(\beta, \gamma, t) = d_c f(\beta, \gamma, t) \quad (3)$$

$$\Phi(\beta, \gamma, t) = \int_0^t f(\beta, \gamma, \tau) d\tau \quad (4)$$

粉末試料にたいするCP曲線は(2)式の β と γ に関する平均を行うことにより計算できる。またメチレンの ^{13}C 信号により検出された ^1H 双極子MAS NMRシグナルの t_1 依存性は次式の β と γ に対する平均で与えられる。

$$S_+^C(t_1) = \text{Tr} \{ (I_{1+} + I_{2+}) U^H(0, t_1) \sum_i I_i U^H(0, t_1)^+ \} g_2(\beta, \gamma + \omega_r t_1, t_m) \quad (5)$$

この式が通常の ^1H NMRのPIDの式と異なる点は、 $\sum I_i$ が $I_{1+} + I_{2+}$ に変わった点及びCP効率の角度依存性を表す項、 g_2 が掛けられている点である。この式を t_1 に関してFourier変換すればメチレン ^{13}C に対する2次元スペクトルの断面が得られる。

2. Multistep method

1ではパルス幅や位相のずれ、多重パルスと試料回転の干渉の効果などは考慮していない。これらを明かにするために、数値計算によりmixing periodの時間発展演算子 U^n を計算し g_2 にあたる項を求めた。 U^n の計算は次式によった。

$$U^M(0, n\Delta t) = \exp\{-i\mathcal{H}^M((n-1)\Delta t)\Delta t\} \cdots \exp\{-i\mathcal{H}^M(0)\Delta t\} \quad (6)$$

ここで瞬間のハミルトニアン \mathcal{H}^n にはr.f. field及びC-H、H-Hの磁気双極子相互作用、C-HのJ相互作用を含めた。次式で ^{13}C のx及びy磁化に対するCP効率を求めた。

$$g_{2x,y}(\beta, \gamma, t_m) = \frac{\text{Tr} \{ S_{x,y} U^M(0, t_m) (I_{1x} + I_{2x}) U^M(0, t_m)^+ \}}{\text{Tr} \{ S_{x,y}^2 \}} \quad (7)$$

一方 ^{13}C 検出 ^1H 双極子MAS NMRの式は g_2 を $g_{2x} + i g_{2y}$ で置き換えた式を t_1 に関してFourier変換すれば求まる。また U^n のAHTからのずれを直接見積るために、ある単一の試料の配向に対して有効ハミルトニアンを計算した。[4]

<実験> 図1のパルス・シーケンスを用いた。最初のパルスの位相とレシーバーの位相を同時にx, y, -x, -yと巡回させ、シグナルを足し合わせた。90°パルスの

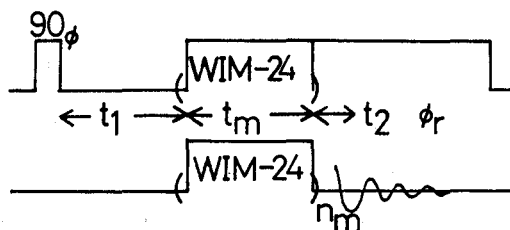


Fig.1 The pulse sequence used for the experiments.

幅は $4\mu\text{s}$ に設定した。 n -トリデカンの尿素包接化合物 (UTI) を試料として用い、特にバルク-メチレンのシグナルに注目した。2種類の実験を行った。第一の実験では $t_1=0$ に固定し mixing time, t_m の関数として、 ^{13}C シグナルの強度を測定した。第二の実験では t_1 を変化させ、2次元スペクトルを測定した。

< 結果及び考察 >

1. 実験結果のATHによる解析。

図2はUTIのバルク-メチレンの ^{13}C シグナルの t_m 依存性である。実線はATHを仮定した式(2)を使って計算した結果である。回転周期の整数倍でシグナルの強度が0に近づく点及び回転周波数を上げた時シグナルが減少する点では、実線は実験結果をよく再現している。しかしながら実験値は t_m が大きくなるにつれ、減少し、実線から離れていく。

図3は2次元スペクトルの ω_1 方向に対する切断面を示した。 ω_2 はバルク-メチレンの ^{13}C シフトに当たる。×は(5)式を使って計算した結果である。一番目と二番目のサイドバンドの強度は実験値よりかなり小さくなった。また、○はmultistep methodで計算した。こちらの方が良い一致を示した。

2. multistep methodによる計算

図4はmultistep methodで計算したCP曲線である。実線はATHを仮定した(2)式を使って計算した。aとcはパルスの周期の4倍及び3倍が回転周期に一致する場合でbの場合に比べてmultistep methodで計算した磁化が速く減衰していることがわかる。また種々のパルス幅や位相のずれに対してCP曲線を計算した。幅が1.1倍、位相が 2° 変化するとCP曲線の減衰がかなり速くなった。これらの場合について回転周期に対する有効ハミルトニアンを計算したとこ

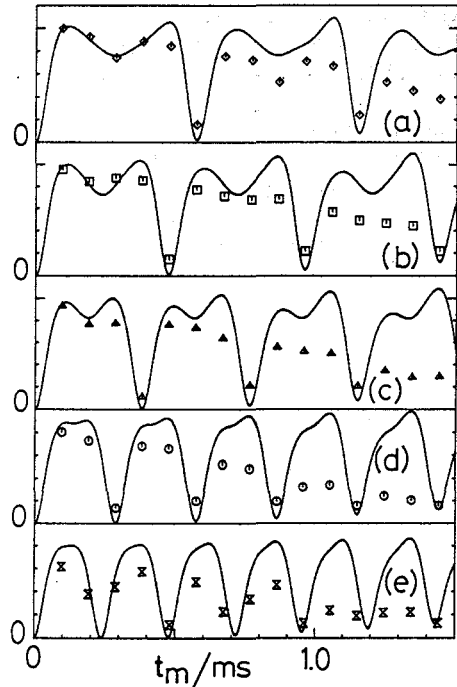


Fig.2 The t_m dependences of the bulky-methylene ^{13}C NMR signal of UTI obtained by the WIM-24. The spinning frequency was (a)1.74 kHz (b)2.08kHz (c)2.60 kHz (d)3.47 kHz and (e)4.19 kHz, respectively. The solid lines were calculated from ATH, using Eq.(2).

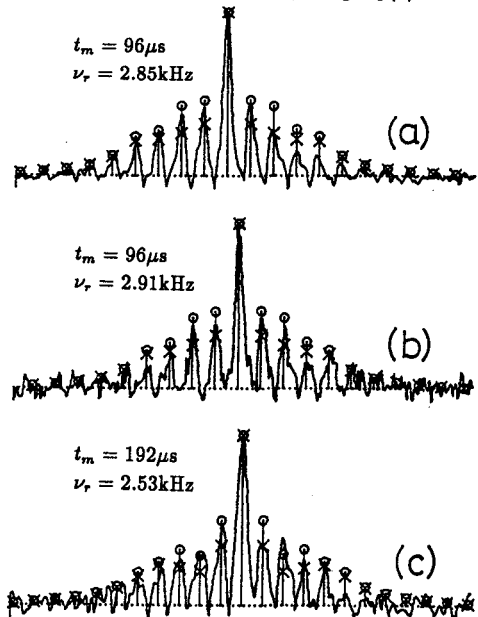


Fig.3 The slices of the ^{13}C detected ^1H dipolar MAS NMR spectra of UTI along the ω_1 direction, while ω_2 is at the resonance of the bulky-methylene carbons. The mixing time t_m and the spinning frequency ν_r are shown in the figure.

Fig.4 The comparisons of the calculated t_m dependences of the bulky-methylene carbon signal of UTI. — is S_x calculated from ATH. while \circ and \triangle are S_x calculated by the multistep method, for WIM-24-x($\bar{Y}XY\bar{Y}\dots$), and for WIM-24-y($XYX\dots$). \bullet and \blacktriangledown are S_y . The initial magnetization was fixed to $I_{1z}+I_{2z}$. The $4\mu\text{s}$ 90° pulse length was assumed. The spinning frequency was (a)2.604 kHz, (b)2.976 kHz, and (c)3.472 kHz.

ろ、図4のbについては0.07S ($I_{1z}+I_{2z}$)に近い形となった。ただしATHからは0.04S($I_{1z}+I_{2z}$)が予想される。一方パルスのずれがあったり、rotational resonance条件であったりすると、 S_x や S_{y1} の様な項が有効ハミルトニアンに含まれる様になり、後者の項は磁化の減少を引き起こす。図5には種々のパルスの設定のずれに対する ^{13}C 検出 ^1H 双極子MAS NMRスペクトルのサイドバンド・パターンをしめた。また比較のためにmixing periodにcw-CPを使った場合の ^{13}C 検出 ^1H 双極子MAS NMRスペクトルを、種々のHartmann-Hahn条件で計算した。cw-CPを使った場合にはH-H条件のずれに対し ^1H MAS NMRスペクトルのサイドバンド・パターンが変化したがWIM-24を使った場合にはほとんど変化しなかった。これは、WIM-24がWALTZなどと同様にH-H条件のずれを平均し、小さくする働きがあるためと考えられる。

[1] J. P. Yesinowski and M. J. Mobley, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 6191 (1983); I. Kustanovich et al., *J. Phys. Chem.* 92, 4134 (1988); J. Forbes et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110, 1059 (1988); J. P. Bayle,

et al., *J. Chim. Phys.* 83, 177 (1986). [2] S. Sekine et al., *Chem. Phys. Lett.* 171, 155 (1990). [3] P. Caravatti et al., *Chem. Phys. Lett.* 100, 305 (1983). [4] H. Liu et al., *J. Chem. Phys.* 93, 7543 (1990).

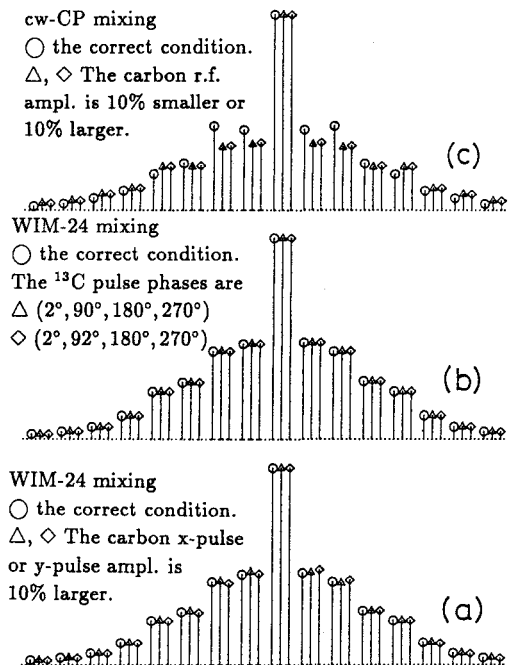
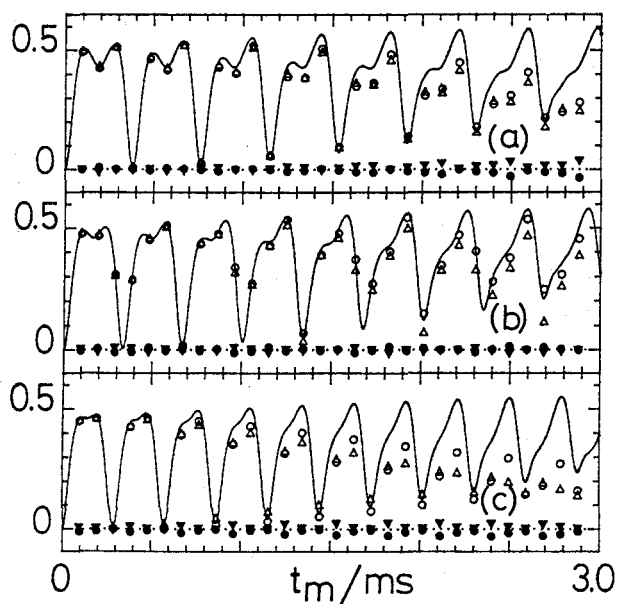


Fig.5 The calculated sideband intensities of the ^{13}C detected ^1H MAS NMR spectra of the bulky-methylene carbons of UTI under the various pulse errors of the WIM-24 pulse sequence. The spinning frequency 2.9kHz, the $4\mu\text{s}$ 90° pulse condition, and the mixing time $96\mu\text{s}$ were used in all the calculations. The sideband intensities were calculated by the multistep method and normalized by the centerband intensities.

L3

マジックサンドイッチエコーを用いた固体高分解能NMRイメージング*

筑波大物理工学 松井 茂

High-Resolution NMR Imaging of Solids by Magic Sandwich Echoes

S. Matsui

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305

We describe a new solid-state NMR imaging technique for abundant spins using magic sandwich echoes (MSE). Simple modification of the original MSE pulse sequence enables highly efficient narrowing of broad NMR lines in solids, allowing high-resolution imaging. Wider signal observation windows than those in multiple pulse approaches alleviate the problems of dead time and bandwidth in the signal detection, minimizing loss of sensitivity associated with the problems. Preliminary experiments performed on test samples with proton T_2 of 40-50 μ s suggest that high resolution of better than 50 μ can be achieved with the MSE technique. The MSE imaging is further combined with proton dipolar spectra, providing spatially resolved dipolar spectra as a measure of local molecular mobility.

<はじめに>

現在、主として医学の分野で用いられているNMRイメージング法は液体を対象としたものであり、*motional narrowing* の起こっていない固体には適用できない。高分子材料等への適用が期待されている固体のイメージングを行うには、測定原理にたち帰った工夫が必要である。このため、現在までに多種多彩なイメージング方式が試みられているが、実用に耐えうる最終的な方式は未定のままである。このうち、感度、空間分解能などの点から、マルチプルパルス法に代表される *line narrowing* 方式は有力ではあるが、*line narrowing* の効率が十分とは言えず、液体イメージングなみの高分解能を得るのは困難であった [1]。本研究では、マジックサンドイッチエコー (Magic Sandwich Echo: MSE) と呼ばれるNMR信号 [2] を用いた、新しいプロトン固体高分解能イメージング法を開発した。種々の実験的不完全性を除去できるようパルス系列に工夫を凝らすことにより、従来のマルチプルパルス法を用いたイメージング法に比べ約1桁 *line narrowing* の効率を向上させることに成功した。これにより、固体に於いても液体に近い高分解能イメージングが可能であることを実験的に確認したので報告する。(本研究とほぼ同時に、Garrawayのグループはマルチプルパルス法をさらに改良し、*line narrowing* の効率を本研究と同程度に向上させている [3]。)

* 本研究の一部は (S. Matsui, Chem. Phys. Lett. 179, 187 (1991)) に発表した。

KEY WORDS: NMRイメージング、固体、マジックサンドイッチエコー、*line narrowing*

まつい しげる

<方法>

マジックサンドイッチエコーはWaughのグループによって行われた時間反転の実験 [2] として有名であり、その pulse sequence は図 1 a に示すように 90°_x と 90°_{-y} pulse によってサンドイッチされた多数の $n180^\circ_x$ と $n180^\circ_{-x}$ pulse (n ; integer) から成っていた。サンドイッチされた on resonance rf irradiation の時間中、homonuclear dipolar Hamiltonian は tilted rotating frame において、その強度が $1/2$ になると同時にその符号も逆転する。この結果、spin 系の状態は $1/2$ の速さで過去に戻っていく。初めの正の evolution period τ に対して 4 倍の負の evolution period が与えられているので、時刻 $t=6\tau$ に echo が生じる。これがマジックサンドイッチエコーと呼ばれるものであり homonuclear dipolar coupling が refocussed されている。この pulse sequence を多数回繰り返して得られる多数の echo peak を sampling し、フーリエ変換すれば dipolar broadening のない sharp な line が得られる。

竹腰と McDowell [4] は、多数の $n180^\circ$ pulse を、図 1 b に示すように互いに逆位相の 2 つの continuous rf irradiation に置き換えても同等の結果が得られることを示し、改良した pulse sequence を high-resolution spectroscopy に応用した。イメージングに応用するには、さらに改良を行って line narrowing の効率を向上させることが可能である。すなわち、イメージングに於いては磁場勾配により誘起される local interaction 以外の全ての inhomogeneous interaction (chemical shift, magnetic susceptibility, etc.) は不必要であるので Carr-Purcell あるいは Meiboom-Gill pulse sequence を図 1 b の sequence に導入し不必要な inhomogeneous interaction を消去する。local interaction は磁場勾配を適切に反転させて印加することにより保存する。

Meiboom-Gill pulse sequence を導入するために、図 1 b に 180°_y pulse を挿入するには、rf irradiation の中央、sequence の最後など、いくつかの選択の余地がある。本研究では、

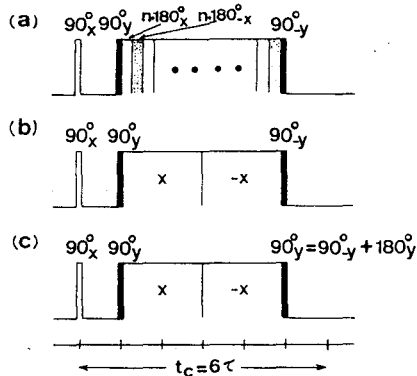


Fig. 1. Modification of magic sandwich echo pulse sequence. (a) The original sequence consisting of many $n180^\circ_x$ and $n180^\circ_{-x}$ pulses sandwiched by 90°_x and 90°_{-y} pulses. The sign of homonuclear dipolar Hamiltonian is reversed during the rf irradiation with the magnitude of the Hamiltonian scaled down by a factor of 2, leading to an echo formation at $t=6\tau$. (b) The sequence is modified for high resolution NMR spectroscopy of abundant spins in solids; the $n180^\circ$ pulses are replaced by two continuous rf irradiations with reversed phases. (c) Further modified sequence for imaging. Simply by inverting the phase of the 90°_{-y} pulse the sequence can incorporate the property of the Meiboom-Gill sequence

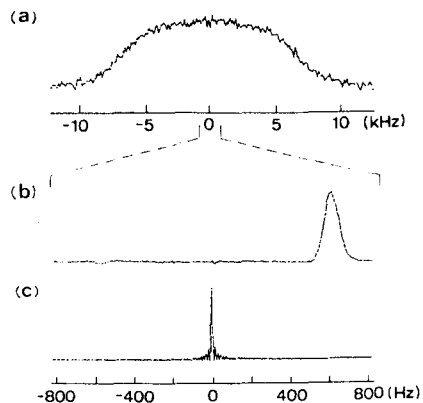


Fig. 2. Line narrowing of proton NMR of adamantane. (a) The dipolar spectrum with a broadening of about 13 kHz. (b) A narrowed spectrum obtained by using the sequence of fig. 1b. The linewidth is 88 Hz. (c) The 88 Hz line is further narrowed to about 8 Hz with the sequence modified for imaging (fig. 1c). Note that the resonance offset retained in (b) is removed in (c). In both narrowing experiments the time period τ (see fig. 1) was 50 μ s, which is equal to the proton spin-spin relaxation time of adamantane.

図 1 c に示すように 90° -y pulse の直後を選択した。この位置を選ぶことにより、line narrowing に悪影響を与える rf switching の増加を避けると共に、rotating frame における x, -x 方向への rf irradiation の不完全な cancelling などの効果を補償することが出来る。このようにして高分解能イメージングに必要な効率の高い line narrowing を実現することが出来る。

< 実験 >

実験は固体 NMR イメージング用に独自に開発した装置を用い、プロトンに対して共鳴周波数 59.75 MHz で行った。rf coil は 7.5 turn の solenoid (直径 9.5 mm, 長さ 15 mm) で、用いた rf 磁場強度は 25 G である。磁場勾配 Gz は、高速 switching のため probe box の中に巻いた 4 turn saddle coil (直径 20 mm, 長さ 23 mm) により発生させた。磁場勾配の switching 時間は、1.6 G/cm に対して約 3 μ s であった。test sample として、adamantane、hexamethylbenzene 粉末を用いた。これらの sample は分子運動によって、通常より多少小さい dipolar coupling (12-13 kHz, 図 2 a) を示し test sample として有用である。図 4 の結果 (2 回計算) をのぞいて信号の積算は行わなかった。

< 結果と議論 >

adamantane において得られた MSE sequence による line narrowing の様子を図 2 に示す。約 13 kHz の dipolar linewidth (a) が図 1 b の sequence を用いることにより 88 Hz まで減少している (b)。イメージング用に改良した図 1 c の sequence を用いることにより更に 8 Hz にまで narrowing している (c)。(b) では保存されている resonance offset が Meiboom-Gill sequence を導入した (c) では除去されている。これらの実験において、時間間隔 τ は 50 μ s であり、sample の spin-spin relaxation time と同じ長さである。hexamethylbenzene に於いても、同一条件下で同程度の narrowing が得られた。図 2 b, c に対応する linewidth はそれぞれ 110 Hz, 10 Hz であった。この様な narrowing は偶数番目の echo を sampling して得られたものであり、Meiboom-Gill sequence から期待されるように pulse sequence のわずかな misadjustment に対して非常に tolerable であった。

イメージングに用いた MSE pulse sequence を図 3 に示す。磁場勾配 Gz は rf irradiation のない区間のみ印加されている。rf field が十分強ければ rf irradiation 区間に磁場勾配を印加してもその効果は小さい。しかしながら、通常実験に用いられる程度の rf 強度では、磁場勾配の効果は無視できず narrowing の効率を著しく低下させてしまう。図 3 の pulse sequence の cycle time は $tc=12\tau$ であり、この cycle time 毎に偶数番目のエコーを 120 個 sampling した。

図 4 は 2 個の円筒からなる adamantane test sample の 1 次元イメージ (projection) を示している。cycle time, tc は 600 μ s、用いた磁場勾配 Gz は 1.6 G/cm である。2 つの半円がきれいに描出されており、空間分解能が非常に高いことを示している。viewwidth が 8.5 mm であり、signal sampling 数が 120 であることを考慮すると空間分解能は約 70 μ m となる。しかしながら、得られている projection の bandwidth は 1.67 kHz であり、最も narrowing された linewidth は adamantane で 8 Hz、hexamethylbenzene で 10 Hz であるから、さらに高い分解能 50 μ m が期待できる。S/N 比が十分高ければ、cycle time を短縮すると同時に磁場勾配強度を増加させることにより、更なる高分解能化が可能である。

イメージング実験においてしばしば、projection の中心 (zero frequency position) に鋭い peak が観測された。その強度は実験条件に依存し、この peak を完全に取り除くのは非常に

困難であった。例えば、図4のprojectionにおいてそのpeakは幅 13 Hz、高さは半円の約80%であり、in-phase FID からdecaying exponential を差し引くことにより取り除かれている。このpeakの原因は不明であったが、最近その原因を突き止め、そのようなpeakが生じないように改良したpulse sequenceを考案した [5] ので実験結果と共に講演で述べる。

従来のマルチパルスを利用したapproach [1,3] に比べ、マジックサンドイッチapproachはいくつかの利点を有している。すなわち、磁場勾配pulse印加に用いているwindow (rf irradiationのない区間)が約1桁広く、switching timeのあまり速くない磁場勾配を用いることが出来る。また、このwindowが広いことにより狭い信号受信帯域を使用でき、noiseを減らすことが出来る。更に、この広いwindowの中央でecho peakがsamplingされるので、受信系のdead timeはsampleの T_2 程度まで長くてもよい。この結果、probe tank circuitのQ-dumpingを最小限にとどめ、Q-dumpingによる受信感度の極端な低下を避けることが出来る。

以上の結果の他に、イメージングとprotonのdipolar interaction情報を2次元的に結合した実験結果 [6] も発表する。このような新しい実験により得られる空間的に分離されたproton dipolar spectraは、sampleの局所的なmolecular mobilityに関する情報を提供するものである。また、現在進行中の空間2次元イメージングの結果も報告する予定である。

<謝辞>

本研究を進めるにあたり、激励、ご鞭撻をいただいた井上多門教授、並びに巨瀬勝美博士に感謝致します。また、竹腰清乃理博士(北海道大学)にはMSE sequenceに関する貴重な議論をいただきました、この場を借りてお礼申し上げます。

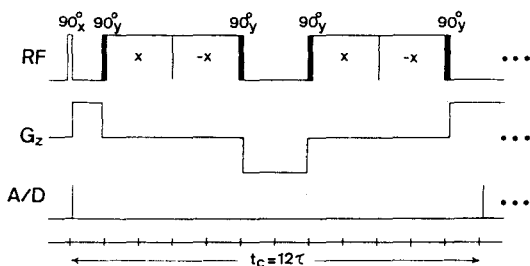


Fig. 3. Magic sandwich echo pulse sequence for one-dimensional imaging. A field gradient, G_z , is applied only during the periods with no rf irradiation, and inverted such that the echo envelope obtained by repeating the sequence is affected only by the applied gradient. Signal sampling (A/D) is made every cycle time, $t_c = 12\tau$.

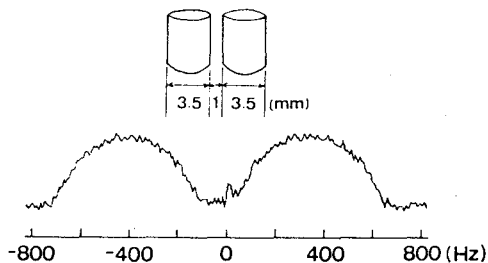


Fig. 4. One-dimensional proton image (projection) of the adamantane phantom shown in the inset. The half circles are clearly seen, demonstrating high spatial resolution.

<文献>

- [1] J.B. Miller and A.N. Garroway, *J.Magn.Reson.* **82**, 529 (1989); and references therein.
- [2] W.-K. Rhim, A. Pines, and J.S. Waugh, *Phys.Rev.* **B3**, 684 (1971).
- [3] D.G. Cory, J.B. Miller, and A.N. Garroway, *J.Magn.Reson.* **90**, 205 (1990).
- [4] K. Takegoshi and C.A. McDowell, *Chem.Phys.Lett.* **116**, 100 (1985).
- [5] S. Matsui, submitted for publication.
- [6] S. Matsui, *J.Magn.Reson.* October 15, 1991.

L4

Measurement of Cross-Relaxation between Selected Pairs of Nuclei by Synchronous Stirring of Magnetization

Geoffrey Bodenhausen

Section de Chimie, Université de Lausanne,

Rue de la Barre 2, CH-1005 Lausanne (Switzerland)

A novel technique is described that allows one to measure cross-relaxation rates (Overhauser effects) between selected pairs of nuclei in high-resolution NMR. The chosen sites are irradiated simultaneously with the sidebands of an amplitude-modulated radio-frequency (rf) field, so that their magnetization vectors are forced simultaneously to undergo a motion of nutation, referred to as "synchronous stirring". Suitably prepared initial conditions lead to simple exponential decays. From the differences in decay rates observed for different initial conditions, one may derive cross-relaxation rates, and hence determine internuclear distances. The method is applicable even in cases where normal Overhauser effects are perturbed by so-called spin-diffusion effects due to the presence of further spins. The technique is applied to various fragments of the protein bovine pancreatic trypsin inhibitor.

L5

液晶におけるプロトンおよび炭素核の状態相関二次元NMR

(姫路工大 理¹ 日本電子² 京大 理)

○内藤 晶 ・ 今成 司¹ ・ 赤坂一之²

¹H and ¹³C State Correlated Two Dimensional NMR in Liquid Crystals

(Himeji Institute of Technology, ¹JEOL Ltd., ²Kyoto University)

Akira Naito, ¹Mamoru Imanari, and ²Kazuyuki Akasaka

State correlated two dimensional NMR spectra between nematic and isotropic phases were obtained for ¹H and ¹³C nuclei using a microwave temperature jump NMR spectrometer. Phase transition from nematic to isotropic phase was performed within 10 msec for 4'-methoxybenzylidene-4-acetoxyaniline (APAPA). In the state correlated 2D NMR spectra, clear individual ¹H dipolar pattern in nematic phase was obtained in the cross section of the 2D NMR spectrum. ¹³C state correlated NMR spectrum was also obtained between nematic and isotropic phases of 4,4'-azoxydianisole (PAA). In the spectrum, ¹³C chemical shift correlation between the nematic and the isotropic phase was clearly obtained.

【はじめに】 昨年のNMR討論会において、マイクロ波加熱を用いることにより液晶相等方相状態相関二次元NMRスペクトルが観測されることを示した。状態相関二次元NMR分光法とは例えばAの状態での磁化を時間展開し、次にAからBの状態へ転移させた後、この状態でFIDを検出する二次元NMRの手法を用いている。したがって、この分光法からAとBの状態の間の二次元相関NMRスペクトルが得られる。この分光法を液晶試料に適用してよく分離した双極子パターンを得るためには、短時間で液晶相から等方相へ相転移を完了することが重要である。今回は、マイクロ波部分を含むプローブ部分をさらに改良することにより、より高速に相転移を起こすことに成功した。その結果、個々のプロトンの双極子パターンの分離が格段に向上し、その解析が非常に容易になったこ

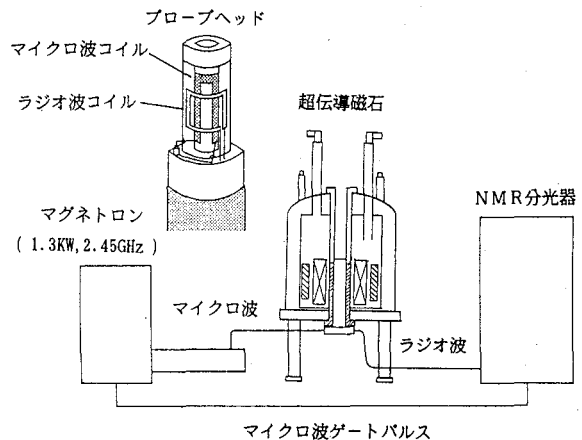


図1 マイクロ波温度ジャンプNMR装置

液晶、二次元NMR、相転移、マイクロ波加熱、温度ジャンプ、双極子パターン

ないとう あきら、 いまなり まもる、 あかさか かずゆき

とを報告する。

【装置】 図1にマイクロ波温度ジャンプNMR装置の概略図を示す。NMR分光器内のパルスプログラマーによって制御されたパルスマイクロ波 (1.3kW, 2.45GHz) は、導波管同軸変換器を通してプローブ内に伝送され試料に照射される。本研究で改良を加えた点は、マイクロ波照射部においてマイクロ波コイルをラジオ波コイルの内側に巻いた点である。このコイル形状を採用することにより、放電を防ぎ、かつ、高速温度ジャンプが可能になった。また、マイクロ波の電力線密度が試料部分で高くなるよう設計したコイルを用いることにより加熱効率が格段に向上した。

【実験】 液晶試料として4'-methoxybenzylidene-4-acetoxyaniline (APAPA), 4,4'-azoxydianisole (PAA) を用いた。APAPA および PAA の液晶相等方相転移温度はそれぞれ 110℃、133℃である。図2の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。¹Hの状態相関二次元NMRスペクトルの観測においては転移時間に10msecのパルスマイクロ波を挿入して液晶相から等方相へ転移を起こした。NMRスペクトルの観測には日本電子製GX400型FT-NMR分光器を使用した。

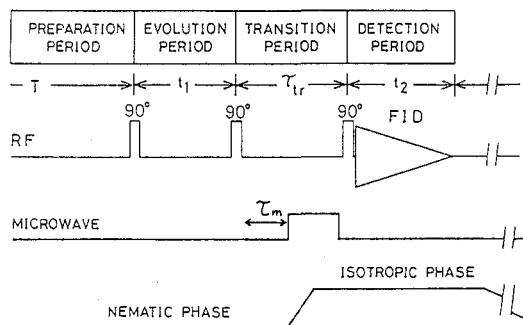


図2 状態相関2DNMRのパルス系列

【結果と考察】 図3にAPAPAの液晶相と等方相でのNMRスペクトルを示す。110℃で観測した等方相のスペクトルは分解能が高く、各共鳴線の帰属は図に示すように容易である。一方、108℃で観測した液晶相のスペクトルは20KHzにわたる広幅な共鳴線を示すので、このスペクトルから各プロトンの共鳴線の双極子パターンを決定することは困難である。

そこで、図4に示すAPAPAの状態相関二次元NMRスペクトルを観測した。図4においてF1軸には液晶相、F2軸には等方相のスペクトルが現れている。さらに、等方相の各共鳴線のF1軸に沿ったクロスセクションは各共鳴線の液晶相でのスペクトルを表している。このクロスセクションからα位のメチルプロトンは分裂幅が10.2kHzの三重項パターンになっていることが判明した。これは3個の等価なプロトンが他のプロトンと隔離して存在していることを示

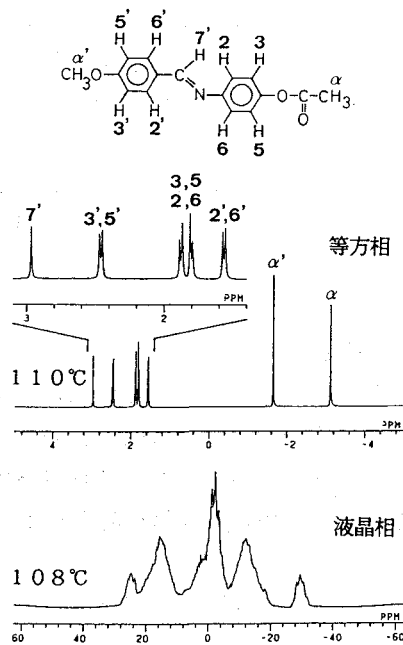
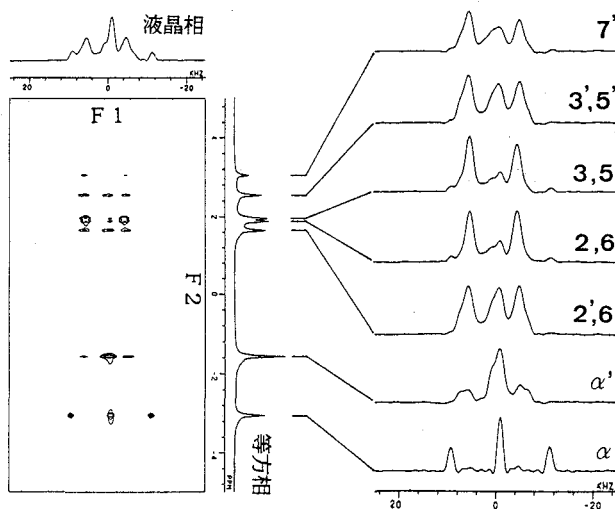


図3 APAPAの¹H-NMRスペクトル

している。一方、 α' 位のメチルプロトンは分裂が現れず広幅な一重項の線形を示した。このことは、 α' 位のメチルプロトンの双極子相互作用は α 位のプロトンに比べて非常に弱いことを示している。またベンゼン環に結合した2,3,5,6-プロトンは分裂幅9.7kHzの二重項パターンを示した。この分裂幅は2,3あるいは5,6間のプロトンの双極子相互作用を示しており、この値から液晶相のAPAPAの108℃での秩序因子を $S=0.41$ と決定した。



α' プロトンと2',3',5',6' プロトンの間ではスピン拡散のために互いに混じりあった双極子パターンが

図4 APAPA の状態相関2D-NMRスペクトル

観測された。この混じり合いはスピン間の拡散による交換から生じているので、この混合の程度からスピン拡散経路を考察することが可能である。APAPA の場合 α' と2',3',5',6'プロトン間の拡散は α と2,3,5,6間の拡散より速いことが判明した。

状態相関二次元NMRのクロスセクションを理論的に解析するために展開時間で観測される個々の核のFIDを求めることを考える。展開期間では液晶相の環境で時間展開し検出期間では特定の共鳴線が分離して観測されることを考慮すれば、観測される k 番目の共鳴線のFIDの y 成分は次のように表される。

$$\begin{aligned} \langle I_y^k(t_1) \rangle &= \text{Tr} \{ \rho(t_1) I_y^k \} \\ &= \text{Tr} \{ \exp(-iHt_1) \rho(0) \exp(iHt_1) I_y^k \} \end{aligned}$$

ここで、

$$\rho(0) = I_y = \sum_i I_y^i$$

$$H = - \sum_i \nu_L^i I_z^i - 2 \sum_{i,j} A_{i,j} [I_z^i I_z^j - \frac{1}{4} (I_+^i I_-^j + I_-^i I_+^j)]$$

$$A_{i,j} = (\gamma^2 \hbar / 4\pi r_{i,j}^3) \langle 3\cos^2\theta_{i,j} - 1 \rangle$$

$\rho(0)$ は展開期間が始まった直後の密度行列を表し、強い双極子相互作用ネットワークをもったハミルトニアンの下で時間発展し $\rho(t_1)$ となる。この時間発展に寄与するハミルトニアンにはゼーマン項と同種核双極子相互作用の永年項のみを考慮する。 $\theta_{i,j}$ は i,j の核間ベクトルと静磁場のなす角を表す。得られたFIDをフーリエ変換することによって、状態相関二次元NMRスペクトルのクロスセクション $S^k(\omega_1)$ が得られる。

APAPAについて3つの α プロトンと2,3,5,6プロトンの7スピン系として α プロトンと

2, 3, 5, 6 プロトンについてクロスセクションのシミュレーションを行った結果を図5に示す。 α プロトンおよび2, 3, 5, 6 プロトンについて実測スペクトルとよい一致が得られた。さらにシミュレーションの結果、スピンドラフが起らない条件においても、僅かながら双極子パターンの混合があることが判明した。

状態相関二次元NMRスペクトルを ^{13}C 核についても観測することに成功した。図6にPAAにおける液晶相等方相 ^{13}C 状態相関二次元NMRスペクトルを示す。このスペクトルにおいては液晶相と等方相における ^{13}C NMR共鳴線の化学シフト相関が現れている。メチル炭素の化学シフト値は液晶相と等方相であまり変化していないのに対して、環炭素の化学シフト値は液晶相においては等方相の値より大きく低磁場側にシフトしていることが容易に分かる。このことは環炭素の化学シフトテンソルの異方性が大きいことに起因しており、このシフト値は液晶の磁場中での配向角を反映していると考えられる。したがって、この値から液晶の配向因子を決定することも可能であろう。

【まとめ】 以上のように、パルスマイクロ波加熱を行うことにより液晶相等方相状態相関二次元NMRスペクトルの観測が可能になった。その結果、個々のプロトンの双極子パターンが分離して観測できるようになった。従来、液晶のプロトンNMRスペクトルの解析は非常に困難であったが、状態相関二次元NMRのクロスセクションではパターンが単純になるので、より少ないスピンドラフを考慮するだけで解析が行える。さらに従来の方法では得られなかったスピンドラフ経路の情報を得ることも可能であることが判明した。このように状態相関二次元NMR分光法は、新しいタイプの二次元NMRとして興味もたれるのみならず、液晶の構造解析に一般的でありかつ有効な手法であることが判明した。

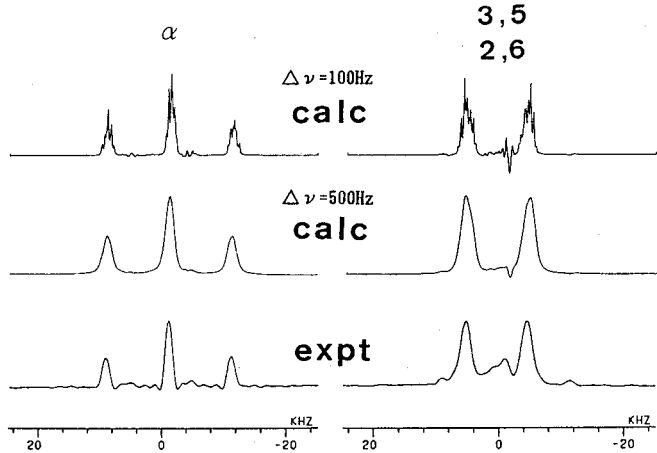


図5 クロスセクションのシミュレーション

$$A(\alpha\alpha) = -3410, \quad A(\alpha 3) = 400, \quad A(\alpha 2) = 50$$

$$A(32) = 3250, \quad A(35) = -400, \quad A(36) = -100 / \text{Hz}$$

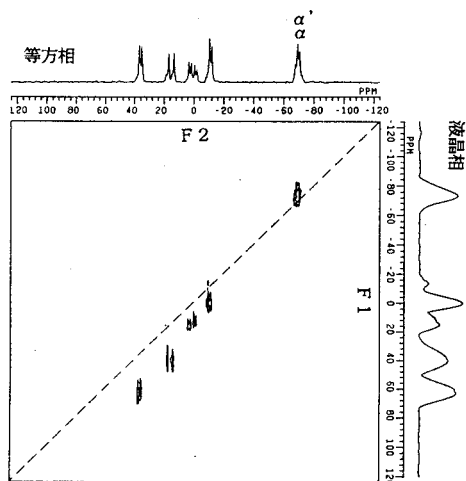
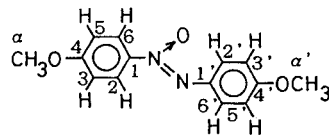


図6 PAAの ^{13}C 状態相関二次元NMRスペクトル

化学シフトにおける電子相関効果の計算

(北見工大) ○福井洋之、松田弘喜、三浦宏一

Calculation of NMR chemical shifts. Gauge invariant MBPT method
Kitami Institute of Technology, H. Fukui, K. Miura, and H. Matsuda

The calculation of nuclear magnetic shieldings σ was performed 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 the electron correlation correction with London's gauge invariant atomic orbitals (GIAO). The calculated isotropic shieldings $\bar{\sigma}$ for the heavy atoms were larger than the experimental values. The rotational and vibrational correction for the $\bar{\sigma}$ of the F atom in HF at 300K was estimated to be -4.0 ppm.

I. INTRODUCTION

Nearly all *ab initio* calculations of nuclear magnetic shieldings σ are performed using the coupled Hartree-Fock (CHF) approximation and its variants.¹⁻¹⁸ Very few studies go beyond CHF.¹⁹⁻²⁵ One of the main difficulties in the calculation of nuclear magnetic shielding arises due to the gauge origin dependence of σ in finite basis set calculations, a problem that is absent in nuclear spin-spin coupling calculations. The use of local gauge origins¹³⁻¹⁶ eliminates this dependence in CHF methods but the solutions obtained there do not seem to be applicable to the correlation methods. This gauge problem has been a major obstacle in going beyond CHF.

Inclusion of correlation contributions beyond CHF has been performed with various theoretical invention, namely, the equation-of-motion (EOM),²¹ second-order polarization propagator approximation (SOPPA),²⁵ variational perturbation,^{6,22} configuration interaction (CI),¹⁹ multiconfigurational time-dependent Hartree-Fock (MCTDHF)²⁴ methods, and many-body perturbation theory (MBPT).²⁰ Furthermore, correlated calculations using London's-field dependent atomic orbital,²⁶ so-called "gauge invariant atomic orbitals (GIAO)" would be one way to circumvent the gauge origin problem and to go beyond CHF.²³

In this paper, we report electron correlation effects on the nuclear magnetic shielding based on the finite perturbation (FP) MBPT method with GIAO's. We have introduced the second-order correlation correction, which is easily calculated as the first-order derivative of the correlation energy with respect to

化学シフト 電子相関効果 MBPT GIAO

ふくい ひろゆき、まつだ ひろき、みうら こういち

the FP parameter, *i.e.*, the external magnetic field strength. We have already applied the same method to the calculation of the electron correlation effects on the Fermi-contact coupling contributions.²⁷ In sec. II, we present and discuss the computational results.

II. RESULTS AND DISCUSSION

The spatial part of the spin orbital in our calculation was expressed as a linear combination of GIAO's, each consisting of a gauge factor and an real atomic orbital (RAO). We used contracted Gaussian type orbitals (CGTO) as RAO's. The CGTO sets used are 6-31G,²⁸ 6-31G*,²⁹ and 6-311G*.³⁰ The zeroth-order HF shielding tensor $\sigma^{(0)}$ and the second-order correlation correction $\sigma^{(2)}$ were calculated for four first-row hydrides, HF, H₂O, NH₃, and CH₄.

The nine components of the shielding tensor σ are calculated in a molecular-fixed coordinate system, and the symmetric and antisymmetric tensor elements defined by $\sigma_{ij}^s = (\sigma_{ij} + \sigma_{ji})/2$ ($i, j = x, y, z$) and $\sigma_{ij}^a = (\sigma_{ij} - \sigma_{ji})/2$, respectively, are obtained. The symmetric part σ^s is diagonalized to get the principal values of the shielding tensor. The calculation was performed at the experimental geometries.³¹ The computed principal values of σ tensor, *i.e.*, σ_{11} , σ_{22} , and σ_{33} , and the isotropic shielding values $\bar{\sigma} = (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3$ are presented in Table I.

In our calculation, the correlation effects $\sigma^{(2)}$ of the heavy atoms have the positive sign, but those for the hydrogen atoms show a small negative sign. It is rather disappointing that inclusion of the second-order correlation does not show the convergence of the results toward the experimental ones. However, in discussing the degree of agreement between calculated and observed chemical shifts, one must keep in mind the fact that we are comparing calculations carried out on rigid molecules fixed at equilibrium nuclear configuration with experimental chemical shifts for molecules at finite temperature (typically 300K) that are rotating and vibrating in the gas phase.

We estimated the vibrational and rotational correction for HF molecule at 300K by assuming non-rigid harmonic oscillation.³² The HF molecule showed the stretching of the bond length due to the non-rigid rotation by 1.10×10^{-3} Å and a lowering of the $\bar{\sigma}$ value for the F atom by 4.0 ppm,³³ which improves the result a little. The electron correlated $\bar{\sigma}$ of the F atom in HF is larger than the experimental value by 17 ppm, and this over-estimation is not relieved by including the vibrational and rotational correction. This result means that the over-estimation is due to inadequacy of the used basis set, 6-311G*.

Acknowledgments

All the calculations were performed on a HITAC M-682H at the Hokkaido University Computing Center. It is a pleasure to express our appreciation to Professor F. Sasaki for providing us with computer programs for molecular integrals. The calculation of the rotational and vibrational averaging of $\bar{\sigma}$ was assisted by our three students, Mr. T. Baba, Mr. H. Shiota, and Mr. H. Yamashita.

Table I. Principal values^a and isotropic values^b of the shielding tensors (in ppm).

		6-31G		6-31G*		6-311G*		Exptl. ^c
		$\sigma(0)$	$\sigma(0)+\sigma(2)$	$\sigma(0)$	$\sigma(0)+\sigma(2)$	$\sigma(0)$	$\sigma(0)+\sigma(2)$	
F	σ_{11}	375.2	392.5	385.5	403.3	381.3	399.0	
	σ_{22}	375.2	392.5	385.5	403.3	381.3	399.0	
	σ_{33}	483.0	482.1	482.4	481.2	482.8	483.0	
	$\bar{\sigma}$	411.2	422.4	417.8	429.3	415.2	427.0	410±6
HF ^d								
H	σ_{11}	24.18	24.52	22.11	22.66	22.82	23.03	
	σ_{22}	24.18	24.52	22.11	22.66	22.82	23.03	
	σ_{33}	43.41	43.83	43.84	44.31	43.40	43.53	
	$\bar{\sigma}$	30.60	30.96	29.36	29.88	29.68	29.86	28.72
O	σ_{11}	307.7	326.5	307.3	329.7	319.5	340.5	
	σ_{22}	318.5	339.2	321.7	345.5	361.7	363.6	
	σ_{33}	355.3	366.6	358.7	370.7	363.2	373.8	
	$\bar{\sigma}$	327.2	344.1	329.2	348.6	348.1	359.3	334
H ₂ O ^e								
H	σ_{11}	25.94	25.81	24.70	24.58	24.76	24.45	
	σ_{22}	27.66	27.55	26.12	25.97	26.36	26.02	
	σ_{33}	44.60	45.03	44.72	45.15	44.53	44.63	
	$\bar{\sigma}$	32.74	32.80	31.85	31.90	31.88	31.70	30.09
N	σ_{11}	241.5	253.2	238.8	255.0	237.1	249.3	
	σ_{22}	279.6	292.2	275.3	291.4	288.0	304.6	
	σ_{33}	279.6	292.2	275.3	291.4	288.0	304.6	
	$\bar{\sigma}$	266.9	279.2	263.1	279.3	271.0	286.2	264.5
NH ₃ ^f								
H	σ_{11}	27.72	27.34	27.12	26.60	26.74	26.27	
	σ_{22}	29.18	28.72	28.25	27.61	28.08	27.46	
	σ_{33}	43.78	44.13	43.16	43.50	43.22	43.47	
	$\bar{\sigma}$	33.56	33.40	32.84	32.57	32.68	32.40	30.68 ^g
C	σ_{11}	206.0	211.8	199.2	207.3	194.9	201.5	
	σ_{22}	206.0	211.8	199.2	207.3	194.9	201.5	
	σ_{33}	206.0	211.8	199.2	207.3	194.9	201.5	
	$\bar{\sigma}$	206.0	211.8	199.2	207.3	194.9	201.5	197.4
CH ₄ ^h								
H	σ_{11}	29.54	29.10	29.04	28.41	28.89	28.42	
	σ_{22}	29.54	29.10	29.04	28.41	28.89	28.42	
	σ_{33}	38.97	39.01	38.12	38.12	37.97	38.01	
	$\bar{\sigma}$	32.68	32.40	32.07	31.65	31.92	31.64	30.61

^a σ_{11} , σ_{22} , and σ_{33} are principal values of σ , and are ordered such that $\sigma_{11} \leq \sigma_{22} \leq \sigma_{33}$.

^b Isotropic value $\bar{\sigma}$ is defined as $\bar{\sigma} = (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3$.

^c Experimental values are taken from Ref. 10.

^d R(HF)=0.09170 nm used.

^e R(OH)=0.09572 nm and $\angle\text{HOH}=104.52^\circ$ used.

^f R(NH)=0.10124 nm and $\angle\text{HNH}=106.67^\circ$ used.

^g Liquid phase value.

^h R(CH)=0.1093 nm used.

References

1. R. M. Stevens, R. M. Pitzer, and W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.* **38**, 550 (1963).
2. R. Ditchfield, *Chem. Phys. Lett.* **15**, 203 (1972).
3. R. Ditchfield, *Mol Phys.* **27**, 789 (1974).
4. C. M. Rohlfing, L. C. Allen, and R. Ditchfield, *J. Chem. Phys.* **79**, 4958 (1983).
5. C. M. Rohlfing, L. C. Allen, and R. Ditchfield, *Chem. Phys.* **87**, 9 (1984).
6. H. Fukui, K. Miura, and F. Tada, *J. Chem. Phys.* **79**, 6112 (1983).
7. H. Fukui, K. Miura, H. Yamazaki, and T. Nosaka, *J. Chem. Phys.* **82**, 1410 (1985).
8. H. Fukui, K. Miura, and H. Shinbori, *J. Chem. Phys.* **83**, 907 (1985).
9. D. B. Chesnut and C. K. Foley, *Chem. Phys. Lett.* **118**, 316 (1985).
10. D. B. Chesnut and C. K. Foley, *J. Chem. Phys.* **84**, 852 (1986).
11. D. B. Chesnut and C. K. Foley, *J. Chem. Phys.* **85**, 2814 (1986).
12. D. B. Chesnut and C. G. Phung, *J. Chem. Phys.* **91**, 6238 (1989).
13. A. E. Hansen and T. D. Bouman, *J. Chem. Phys.* **82**, 5035 (1985).
14. A. E. Hansen and T. D. Bouman, *J. Chem. Phys.* **91**, 3552 (1989).
15. M. Schindler, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1020 (1987).
16. M. Schindler, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5950 (1987).
17. P. Lazzeretti and J. A. Tossell, *J. Phys. Chem.* **91**, 800 (1987).
18. K. Wolinski, J. F. Hinton, and P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 8251 (1990).
19. G. T. Daborn and N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.* **81**, 201 (1981).
20. M. Iwai and A. Saika, *J. Chem. Phys.* **77**, 1951 (1982).
21. V. Galasso and G. Fronzoni, *J. Chem. Phys.* **84**, 3215 (1986).
22. H. Fukui, *Int. J. Quantum Chem.* **23**, 633 (1983).
23. E. C. Vauthier, M. Comeau, S. Odier, and S. Fliszar, *Can. J. Chem.* **66**, 1781 (1988).
24. M. Jaszuński, A. Rizzo, and D. L. Yeager, *Chem. Phys.* **136**, 385 (1989).
25. J. Oddershede and J. Geertsen, *J. Chem. Phys.* **92**, 6036 (1990).
26. F. London, *J. Phys. Radium* **8**, 397 (1937).
27. H. Fukui, K. Miura, and H. Matsuda, *J. Chem. Phys.* **94**, 533 (1991).
28. W. J. Hehre, R. Ditchfield, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **56**, 2257 (1972).
29. P. C. Hariharan and J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta* **28**, 213 (1973).
30. R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **72**, 650 (1980).
We included the s component of the Cartesian d orbitals.
31. Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions, Supplement (The Chemical Society, London, 1965).
32. L. Pauling and E. B. Wilson Jr., *Introduction to Quantum Mechanics* (McGraw-Hill, New York, 1935).
33. We assumed the zero-point vibration. We obtained the following result for the F atom in HF at 300K with the 6-311G* basis set

$$\left(\frac{\partial \bar{\nu}}{\partial r}\right)_{r=r_0} = -445.4 \text{ ppm}\text{\AA}^{-1}$$
 and

$$\left(\frac{\partial^2 \bar{\nu}}{\partial r^2}\right)_{r=r_0} / 2 = -786.9 \text{ ppm}\text{\AA}^{-2},$$
 where r_0 is equal to the equilibrium bond length plus the bond elongation due to the rotational motion.

高温NMR及び高温高圧NMRの開発と其の応用

北大 工 下川繁三

Shigezo SHIMOKAWA, Hokkaido University

Development and Applications of High Temperature NMR and
High Temperature High Pressure NMR

A high temperature NMR probe equipped for 4.7T SCM was developed in which various oxides can be melted by a special electric furnace. This probe can be used for line shape and relaxation measurements from 22° C to 1200° C. A simple gas-pressurized high temperature NMR probe was also constructed. This probe was applied for high pressure measurements including critical region: ex. density measurement by 1D projection technique, separation of DD interactions, determination of critical exponent etc.

【はじめに】 熔融酸化物等を観測出来る4.7Tの超電導磁石用の高温NMRプローブを開発した。これを用いて室温から1450° Cの範囲で、固体状態から熔融状態の珪酸塩化合物の線形と緩和時間の測定をした。この装置は地球科学、材料科学、セラミックス、ガラス等の分野において、被測定物質の動的構造や性質の研究に極めて有用である。後半では先に開発した高温で且つ高圧NMR装置についてその応用も含めて言及する。

『1 高温NMR』

【高温プローブ】 1000°C以上の高温でNMRを観測する為のプローブの加熱には電気炉法とレーザー加熱法がある。更に電気炉加熱には直接加熱型と移動加熱型がある。電気炉で直接加熱する場合にはヒーター電流に起因する誘起磁束の影響、高温に曝されるRFコイルのQの低下の問題、保温と断熱の方法、温度の検出の方法を解決せねばならない。

【材料】 NMRは磁石の中で各種の作業を行う必要上、作業空間の制約と非磁性材料でなければ使用出来ないという決定的な制限がある。炉材として、高純度の酸化アルミ、酸化ケイ素等が比較的容易に使用できる。充填材ではシリコニア等も良く使用される。窒化ほう素の炉材はより高温に適しているが、水及び酸素と反応するので乾燥した不活性ガスを流すことが必要である。観測する核により使用する耐熱材料が決まるので、必要に応じて炉を(場合によりコイルを含むプローブを)幾つか用意する必要がある。電熱線の材料は白金線、白金-ロジウム合金線、モリブデン線、タングステン線、タンタル線(板)等がある。1400°C迄の高温の実験には多少高価

高温NMR、高温高圧NMR、珪酸塩融体、NMR装置、超臨界状態、

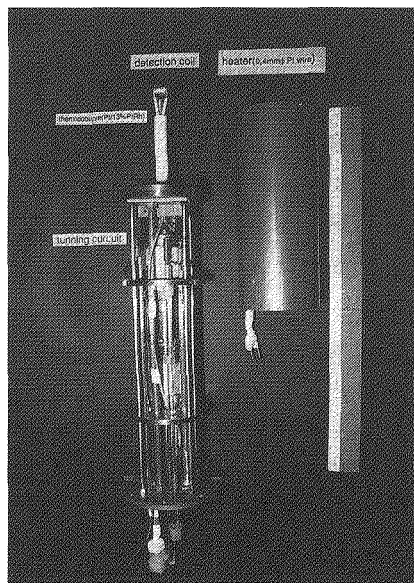
しもかわ しげぞう

ではあるが他と比べ白金線が最も酸化され難く、曲げ易く、折れ難く使い易い。プローブの材料にはチタン合金が良く450°Cまで用いられる。軽くて丈夫である。

【装置の詳細】我々は白金線のヒーターを用いてプローブの共振コイルを加熱する方法で1200°C以上の温度迄昇温出来る高温プローブを組上げた。此の方法は電磁石時代よりの伝統的な作り方で制作が容易である。此の方法には二種類がある。

二ヒーター方式ではその中央にRFコイルがある。この利点は共振コイルのリード線が直接高温に曝される割合が幾分減少し、温度によるコイルのQの低下が少し阻止出来る。しかしその試料部分に大きな温度勾配が出来る欠点がある。炉の中心温度が1450°Cの時コイル近傍の温度は1250°Cとなる。コイルの形はヘルムホルツ型で主に線形の観測用とした。0.4mmの白金線を用い、互いに逆向きに電流が流れるよう無誘導形に巻き2穴の保護管を通した。二組のヒーターの間隔は5cmである。コイルはアルミナ管に耐熱セメントで固定した。これらをチタンアルミ合金の支柱と支持板で固定しその外側は銅板で囲む。電気炉の外套は銅と真鍮で出来た二重管よりなり、温度を制御された蒸留水を循環して冷却した。加熱は安定化電源装置より電流を調整して制御した。ヒーター電流は炉芯の温度が1450度の時19Aで電力は800Wである。電流は測定中も常に流して置くが磁場への影響は全く観測されない。

次に、一ヒーター方式では緩和測定にソレノイド型コイルを採用し、取り外し可能なヒーター部分を作った。写真はコイルと共振回路を示すが使用時には耐熱セメントで覆われ固定される。RFコイルは任意の観測核に対応して取り替え出来る。共振回路は単一同調型である。コイルは直熱ヒーターの中心に位置するためにそのリード線は絶えず高温に曝される。この為コイルの抵抗値の増加が著しく、コイルのQ値は前述の場合より低下する。この例の場合はソレノイド型コイルで室温でのQ値が80であると、1000°C時にはQ値は10以下に低下する事もある。Qの低下を避けるには補償用のインダクタンス(L)を加え、リード線の一部を断熱する。又前述よりも太めの白金線を巻く等の策がある。170の90度パルス巾は周波数27MHzで3.6μsと得た。ヒーター電流によって生じる漏洩磁場を防ぐ為に並列逆向きのヒーター配線を行った。これは抵抗値も減少し効果的である。漏洩磁場の大きさは化学シフトの値で示すと最大34Hzで、此の値は通常の高スケーターでは検知出来ない。この



方式では1000°Cでの電力は16Aで320Wである。共振回路の耐圧15kvの可変容量コンデンサーはチタンアルミの水冷された冷却板に取付て熱的に絶縁しておく。試料容器は六方晶の窒化ほう素製よりなり酸化を防ぐ為に不活性ガスを実験中流しておく。

【移動法】StebbinsとPinesは試料移動式プローブを制作した。これはRFコイルを炉より離して下方に置き、試料を素早く上下に炉とコイルの間を移動させる方法であるが、緩和測定には適さず現在は主に直熱法で行っている。

【レーザー法】 Coutures等はCWのレーザー照射による加熱で酸化物を溶融しNMRスペクトルを観測した。1000°C以上では風圧法を用い試料容器なしで空中に浮揚させる方法を用いた。最近彼らは緩和測定のために空洞共振器を用いている。この方法は温度の測定が困難であり、磁場の外で同一条件で別にパイロメーターを用いて光学的に測定している。

【実験上の問題点】 線形測定では固体の場合は別として液体状態ではコイルの形状はヘルムホルツ型でもソレノイド型でもよい。温度に対するQの低下を防ぐ事が大切である。コンデンサーの耐電圧も通常の測定と同じと考えてよい。しかし分光器は固体用も併用出来なければ室温で固体から高温の液体を観測する事が困難である事は明白である。

緩和測定では高周波パルスによりコイルに生ずる高周波磁界(H_1)が均一であるためにコイルの形は円筒形(ソレノイド)になる。これは静磁場に直角に設置するから、試料の溶融物の保持が問題となる。溶融により試料の体積が増加し、容器から溢れ出ない工夫が必要になる。測定方法としては直熱法のみが可能となる。又長時間に亘る測定では容器と試料との反応が問題となる。BN容器の場合、又試料に僅かにのこるOH等の蒸発、雰囲気ガスの水素との反応、酸素の影響等が生ずる。 ^{17}O の観測では感度の点で同位体の測定が望ましい。緩和測定では自然存在量の常磁性不純物の影響を考慮せざるを得ない。緩和の主なルートがこれらの不純物に拠る場合が多くある。一方合成した純物質では緩和時間が長くなる場合が多く、測定が容易でない等の困難を伴う。

『2 高温高圧NMR』 高温高圧NMRの開発と応用について述べる。この場合にはコイル部分とヒーターが高压容器内に組込まれる。高温高圧で行う実験では現在までのところ超伝導磁石は使用していない。その理由は実験中の危険性を避ける方法の困難さによる。部分的な破壊事故が一旦生じた時に磁石迄損傷する可能性がある。ここでは電磁石を用いた例により説明する。液体を高温高圧の条件に置く場合にはその物質の臨界温度(T_c)、臨界密度(ρ_c)で示される状態を含む広い温度と圧力範囲で実験を行う事になる。液体-気体の転移が生じる変化は大凡圧力40bar~10kbarの範囲で温度は500°C迄に生じる。臨界域を越えた流体は溶解能の増加など種々の特異な性質を示すことが知られている。この領域では容易に液体の分子間相互作用を大きく変化させる事が出来る。現在迄の高温高圧のNMRでは、温度範囲80<T<800°C、圧力は10Kbar、超臨界ガスでは2Kbar迄の範囲で研究されている。

【材料】耐圧装置の材料には1960年代迄は銅ベリリウム合金(CuBe)が使用されたが、1970年に入りチタンアルミ合金(Ti-Al)が工業的に利用されるようになり、特に軽量で且つ高温での引張りに強いのでよく用いられるようになった。

【装置の構成】 高温高圧装置は、耐圧容器(観測用コイル、加熱ヒーター等が入る)、力発生装置とその伝達系、及び外側の冷却部分、安全カバーからなる。液体で圧縮する場合とガス圧縮の場合、及び加熱法により耐圧容器が幾分異なる。電磁石特有の外部磁場制御系(External Field Lock)も含む。

【ガス圧縮】 高温下での試料への圧力印加には、高圧不活性ガスの圧力を直接ま

たは間接に（加圧部分をペローズ等の体積可変装置で試料と分けて）加圧する。しかしガス圧縮法は最も危険を伴うので細心の注意が必要である。

【プローブ】 高分解能型の高圧装置はDeFeriesとJonasにより $30 < T < 700^{\circ}\text{C}$ 、 $1 < P < 2000\text{bar}$ の装置として1979年に組み上げたことは有名である。これは二つの耐圧容器からなる特徴を有している。我々の耐圧装置は上記と異なり構造が極めて簡単である。内熱式の耐圧装置を用いた例を載せる。 ^1H 核を観測用にして自己蒸気圧による有機超臨界流体の研究に用いた。この装置は温度範囲が $273\text{K} < T < 823\text{K}$ 、圧力は $0.1 < P < 100\text{MPa}$ 迄用いられる。耐圧容器(Ti6Al4V、KS130A)はネジ蓋式でシリンダー内部にヒーターやコイルを取り付けた。

【密度の直接測定】 液体や気体の圧力を変える事は、即ちその物質の密度を変えることになる。通常密度は体積法等を用いて測定する。ここではNMRのセルで密度を一次元投影法により測定する。液とガスの密度は

$$\rho^i(T) = (M_0/V_0) \times (S^i(T)/S(T)) / (L^i(T)/L(T))$$

M_0 は試料のモル数、 V_0 はセルの容量、 $i = l$ (液体)又は g (ガス)、面積 $S = S^l + S^g$ 、又長さ $L = L^l + L^g$ である。臨界温度よりも上では試料の密度は一定となり $M_0/V_0 = \text{const.}$ である。この方法は等温圧縮、自己蒸気圧の何れでも行う事が出来る。シクロペンタンによる実験結果を紹介する。化学シフトがある場合には化学基の一部を重水素化するか、又は計算機上で平滑化アルゴリズムにより波形修正して、投影図が一樣になる工夫を行う。

【緩和機構の分離】 プロトンの緩和機構には分子内と分子間の相互作用が同程度の大きさで存在するためにその分離は困難である。そこで同位体希釈法、四重極効果の利用、炭素核等の分子内緩和の抽出等が行われる。高圧NMRでもプロトンの緩和機構の研究が続けられたが、高い沸点の液体では高温高圧の装置により達成出来る。トルエンの例を紹介する。ここで臨界点ではプロトンの双極子相互作用における分子内と分子間の寄与が等しいと仮定した。これを用いて更に臨界温度を越えた広い温度範囲での核スピンの分子内の相関時間をそれぞれの寄与で分離した。

【臨界指数を決める】 密度と温度で表した気液共存曲線より求まる臨界指数 β は臨界点付近での流体の性質を表す重要な指標である、液体の種類によりどの様にその値が異なるかを知る事は興味もたれる。実験式は次のように与えられる。

$$(\rho_l - \rho_g) / \rho_c = A(1 - T/T_c)^\beta$$

これを用いてシクロペンタンの密度変化の図より横軸に換算温度の対数、縦軸に換算密度の対数を取りプロットした。縦軸への切片は $A = 2/7$ 、勾配より $\beta = 0.36 \pm 0.03 \sim 1/3$ と得た。

【オートクレーブ中の熱化学反応】 有機熱化学反応、Diels-Alder反応の実験は耐熱耐圧容器（オートクレーブ）の中で行われる。この反応は協奏反応と云われ、その分子機構は軌道対称性（フロンテア軌道）を考慮する事で解決された。しかし、オートクレーブの中はブラックボックスである。ここでは高温高圧プローブを用いてNMRにより観測した唯一の例を紹介する。ブタジエンとアクリル酸メチルの反応である。リアルタイムで観測してそのスペクトルを検出した。溶媒はベンゼン-d₆を用いた。温度変化より活性化エネルギーを求めた。

本研究は山田英二、前川英己両氏との共同研究によってなされたものである。

L8

有機ゲルマニウム化合物の化学 — — NMRを中心として

(東大・教養) 竹内 敬人

Chemistry of Organogermanium Compounds in view of NMR spectroscopy
(Coll. of Arts & Sciences, Univ. of Tokyo) YOSHITO TAKEUCHI

Abstract--The fact that ^{73}Ge are quadrupolar nuclei with $I = 9/2$ makes the measurement of ^{73}Ge NMR spectra difficult. The linewidth of unsymmetrically substituted species tends to be large. Molecular weight is another factor to determine the linewidth. ^{73}Ge chemical shifts reflect their stereochemical environment and can be a means to study the stereochemistry of organogermanium compounds. The spin-lattice relaxation of tetrahalogermanes generally proceeds via quadrupolar mechanism. The spin-spin relaxation of tetrachlorogermane proceeds, however, via a combination of quadrupolar and scalar coupling as revealed by the temperature dependency of relaxation times.

【1: 序論】

約8年前から、我々の研究室では有機ゲルマニウム化合物の化学に専念している。このやや珍しい化合物に関心を持つようになった第一の理由は、有機ゲルマニウム化合物は、同じ14族元素を鍵ヘテロ元素としながら、有機ケイ素化学はもとより、有機スズ化合物や有機鉛化合物の化学に比べても知られていることが遙かに少なかったことである。第二の理由は、鍵元素である ^{73}Ge NMRについてのまとまった研究は全く無かったことである。以後、このテーマは、我々のヘテロ原子化学への興味と、NMRへの尽きない関心を同時に満足させてくれている。

我々は構造ないし機能の面から重要と思われる環式有機ゲルマニウム化合物を取り上げた。一見簡単な化合物でも、有機ゲルマニウム化合物の合成は困難である。原料、条件の設定、分離精製のどれをとっても、炭素化学には無い問題を伴う。例えばgermacyclohexane(1a)の様なものの合成も、出発原料は GeCl_4 (2g)であり、数段階を要する過程である。構造化学的研究の面でも面倒は尽きない。例えば分子力学計算においても、ゲルマニウム化合物用のパラメータは標準プログラムには組み込まれていない等の問題点がある。同様な問題は半経験的分子軌道計算にもある。

 ^{73}Ge NMR スピン・格子緩和時間 スピン・スピン緩和時間 四極子核 四極子緩和
スカラー緩和 陰イオン捕捉

たけうち よしと

また、肝心の NMRでも、唯一の NMR核である ^{73}Ge 核は大きな四極子モーメントを持つだけでなく、共鳴周波数がとりわけ小さいという難点を持っている。

いま難点だけを列挙したが、このような難点があったからこそ、興味ある分野が未開拓の儘残されていたことを我々はよく承知している。

【2: ^{73}Ge NMRスペクトルの測定】

^{73}Ge NMR スペクトルの測定は、低い共鳴周波数（プロトンが90 MHzのとき3.10 MHz）が問題になる。我々が使用したJNM FX-90Qでは、多核用プローブと低周波数観測用インサート NM-IT10LFを用いる。この時 180° パルスは540 μs で比較的長い。

四極子核では、電場勾配の非対称性のため四極子緩和機構が働き、緩和時間が短くなる。この結果、線幅はかなりひろくなるのが特徴である。分子量も大きな影響を与える。対称性がよい分子では、広幅化はさほどではなく、 GeH_4 (2a)、 GeMe_4 (2b) 等では、1Hz あるいはそれ以下の線幅である。 $\text{Ge}(\text{OMe})_4$ (2f)、2gの様に電気陰性原子が結合していても、対称性がよければ線幅は狭い。

しかし、対称性がくずれると線幅はたちまち広がり、(1a)においても約16Hzとなる。 GeCl_2Me_2 (3a)の様に非対称でかつ電気陰性原子が結合すると、もはやシグナルは観測されない。非対称性による広幅化は四極子核一般の問題点であるが、残念ながら、 ^{73}Ge においては特に問題が深刻であり、 ^{73}Ge NMRの利用の一般化を妨げている。研究を進めている間に、世界のいくつかの研究室から ^{73}Ge NMR測定の依頼を受けたが、成功しなかったものが多かった。非対称性と分子量から、ほとんどの場合成否は測定前から分かってしまった。

測定上のもう一つの問題は、低周波核につきもののacoustic ringingである。観測パルスの終了からFIDの取り込み開始までの間に1 ms程度の遅延時間を入れる必要がある。しかし緩和時間が短い ^{73}Ge 核の場合、失われる情報は大きい。これを回避するために、適切なコンポジットパルスを利用する方法が提案されている。

INEPTなどの常法もGe-73 NMRに利用でき、かなりの感度向上が観測された。

緩和時間が短いにもかかわらず、スピン・格子緩和時間(T_1)の測定は通常の反転回復法が、スピン・スピン緩和時間(T_2)の測定には Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)法が用いられる。再現性は反転回復法で5%以内であり、信頼性がある。

【3: 化学シフト】

確かに ^{73}Ge NMRの測定は困難ではあるが、いったんデータが得られれば、それは貴重な情報源となる。

(a) 経験式: ^{73}Ge 化学シフトの起源は、他の多核と同じであると考えられるので、類似構造を持つゲルマニウム化合物の化学シフトとケイ素化合物あるいはスズ化合物の化学シフトとの間には相関が期待される。実際、 $\delta(^{73}\text{Ge})$ と $\delta(^{29}\text{Si})$ の間の相関はきわめてよい。ただし、勾配の異なる二種の相関が認められる。

$$\delta(^{73}\text{Ge}) = 3.4(+5.6) + 3.24(+0.05) \delta(^{29}\text{Si}) \quad (r = 0.994; n = 31)$$

$$\delta(^{73}\text{Ge}) = 55.9(+5.6) + 1.22(+0.03) \delta(^{29}\text{Si}) \quad (r = 0.996; n = 12)$$

類似の相関は多くの著者によって報告されており、きわめて一般的である。

(b) γ 効果: C-13化学シフトには、色々な利用の仕方があるが、おそらく、最も

頻繁に利用され、成果を上げてきたのは γ 効果であろう。この効果は、他の多核の化学シフトにも見られる一般的現象である。 ^{73}Ge 化学シフトでも γ 効果が観測される。すなわち、trans-及びcis-1,4-dimethylgermacyclohexane(1b)では、ゲルマニウム上のメチル基はそれぞれequatorial及びaxial配座をとるが、その ^{73}Ge 化学シフトはそれぞれ-61.5と-73.4ppmであり、その差が γ 効果を反映している。

^{73}Ge 化学シフトに対するより直接的な γ 効果は、1a(-130.3ppm)、3-germacyclohexane(1c)(-131.2)、3,3-dimethylgermacyclohexane(1d)(-142.1)の ^{73}Ge 化学シフトに現れている。これは ^{73}Ge NMRで観測された γ 効果の最初の例である。

【4: 緩和時間】

核スピン $I = 9/2$ をもつ ^{73}Ge 核は主に四極子緩和機構で緩和すると予想される。ゲルマニウム化合物の緩和機構をさらに詳しく研究し、分子構造との関連性を調べるため、対称性のよい四置換ゲルマン2a、2b、 GeEt_4 (2c)、 $\text{Ge}(\text{n-Pr})_4$ (2d)、 $\text{Ge}(\text{n-Bu})_4$ (2e)、2g、 GeBr_4 (2h)、 GeI_4 (2i)を合成し、 ^{73}Ge 核の T_1 を反転回復法で、 T_2 を線幅($\Delta\nu_{1,2}$)と、Carr-Purcell-Meiboom-Gill法(CPMG)で測定した

対称性のよいものでも緩和時間は一般に短く、また、緩和時間は分子半径に大きく依存している。さらに2b-2eでは、 T_1 と T_2 は実験誤差の範囲で一致した。即ち、2b-2eでは、 ^{73}Ge 核は T_1 、 T_2 共に四極子緩和で緩和しており、分子量が大きくなるほど、又、分子半径が大きくなるほど、緩和時間が短くなっている。

これに対して、ハロゲルマンの緩和では、問題はやや複雑であることが報告されていた。即ちTarasovらは2hは専ら四極子緩和機構で緩和するのに対して、2gは、330 K以上ではスピン-回転緩和機構、330 K以下では四極子緩和機構で緩和すると報告した。

そこで我々は2g-2iの緩和時間の温度依存性を詳細に検討した。図1には、2gについて $\ln(1/T_1)$ vs. $1/T$ および $\ln(1/T_2)$ vs. $1/T$ の両プロットを示す。第一のプロットは正の勾配を持つ直線で、2gではスピン・格子緩和はもっぱら四極子緩和で進むことを示す。これに対して、第二のプロットは、極小値を持つ凹型の線であり、

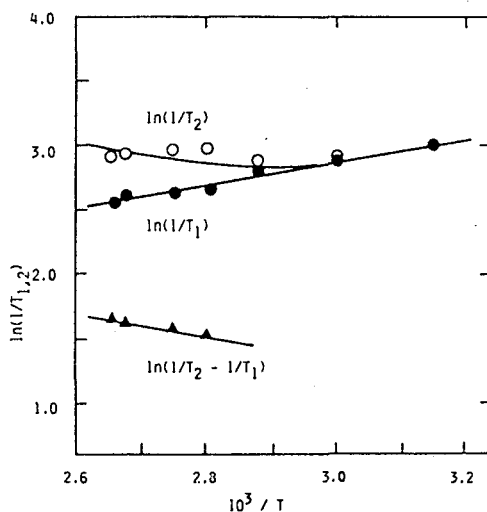


図1: GeI_4 (2i)の ^{73}Ge 核の
 $\ln(1/T_1)$ vs. $1/T$ および
 $\ln(1/T_2)$ vs. $1/T$ 両プロット

すくなくとも二種類の、温度依存性が異なる機構の関与を示す。プロット $\ln(1/T_2 - 1/T_1)$ vs. $1/T$ が負の勾配を持つ直線であることから、第二の機構は四極子緩和とは異なる温度依存性を持つ機構であると推定出来る。負の温度依存性を示す緩和機構で、 $2g$ の ^{73}Ge 緩和に寄与すると考えられるのはスカラー緩和である。ハロゲンは $l \neq 1/2$ であるから、これらと結合している ^{73}Ge 核には、スカラー緩和が関与する可能性がある。なお、 $2a$ 、 $2h$ 、 $2i$ についても、このような温度依存性の二重性が観測され、緩和が専ら四極子機構とスカラー機構の組合せで起こっていることが示唆された。

【5：四極子結合定数】

ゲルマニウム核の四極子結合定数についての報告は例が少ない。我々は $2b-2i$ のクロロホルム溶液の粘度測定から相関時間 τ_c を求め、これより四極子結合定数を得、分子半径 R との相関性を研究した。 τ_c は 30°C で $10^{-8} \sim 10^{-7}$ sec とかなり長い値が得られた。 τ_c は分子の大きさや、分子量が大きくなるにつれて、大きくなっている。四極子緩和定数は約 $0.9 \sim 1.9$ MHzとなり、半径が大きくなるにつれて小さくなるがその程度は小さい(図2)。

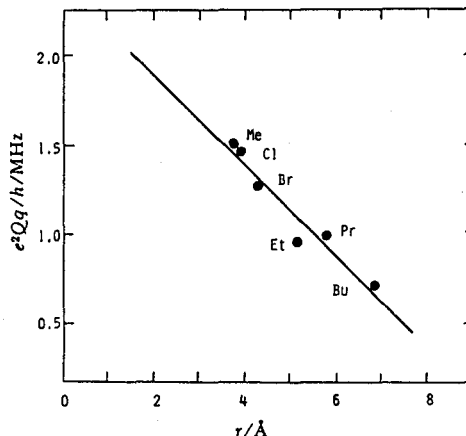


図2：四極子結合定数 $e^2 Qq/h$ と $2b-2i$ の分子半径 R とのプロット

これは ^{73}Ge 核の回りの対称性は、置換基の影響をあまり受けていない事を意味する。

【6：有機ゲルマニウム化合物のホスト・ゲスト化学】

クラウンエーテルのような系の陽イオン捕捉、クリプタンドのような系の陰イオン捕捉は、大環状化合物の新しい機能として、近年特に注目されている。ゲルマニウム原子は電気陽性であるから、これを環にうめこめば、中性分子をホスト、陰イオンをゲストとする新しいタイプのホスト・ゲスト化学が展開できる可能性がある。この相互作用と包接体の構造は、ホスト、ゲストを含めてNMRスペクトルで追跡可能である。

我々は10員環から44員環にいたる一連の大環状含ゲルマニウム化合物を合成して、その陰イオン捕捉能、移送能を検討している。この種の研究にNMRがきわめて有用であるが、 $\text{Ge-}73$ NMRはこの場合にもシグナル検出は困難である。

【謝辞】 緩和に関する研究の多くの部分を遂行された原園としえ博士に感謝する。

(近畿大・理工) ○北川 進・宗像 恵・木曾秀典

High Resolution ^1H , ^{13}C and ^{51}V NMR Spectra of Vanadium Complexes

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

^1H , ^{13}C and ^{51}V NMR spectra of Vanadium(III, IV and V) complexes were measured in relation to the oxidation state of vanadium atoms. In the solid state sharp ^{51}V signals are observed for some of V(V) complexes while divanadium complexes with metal-metal bond give no ^{51}V signals but sharp ^{13}C signals. In the case of antiferromagnetically coupled divanadium complexes only ^1H NMR signals of the species in solution were successfully detected. On the basis an application of NMR to vanadium complexes is discussed.

[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。従来バナジウムのキャラクタリゼーションは、Vanadyl (VO_2^{2+}) で代表される IV 価錯体の ESR が中心であった。しかし、ESR によるキャラクタリゼーションには、単核のバナジウム (IV) 錯体のような不対電子 (IV 価は d^1 電子配置) を持つ常磁性種の場合が可能であるが、I (d^4), V (d^0) 価の単核錯体、または II (d^3), III (d^2), IV (d^1) 価錯体でも多核構造を持ち V-V 間に相互作用がある場合は観測が困難である。一方、NMR の観測可能な価数は - I (d^0), I (d^4), V (d^0) であり、 d 電子数が奇数の場合 (d^2 は例外) は常磁性であるため NMR

法の対象とはなり得ない。しかし、 d 電子数が奇数でも反強磁性相互作用をする系の場合は NMR 観測が可能である。このように、NMR 法が ESR 法よりもバナジ

Relationship between V-V interaction and NMR parameters

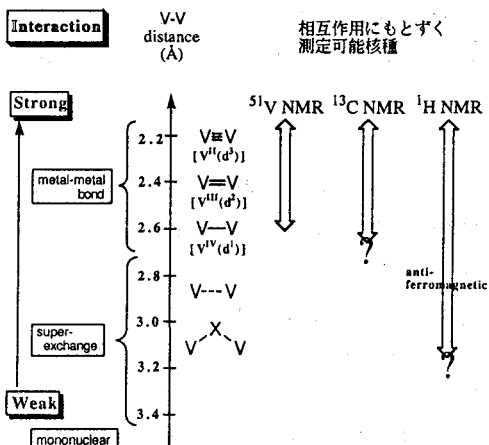


Fig. 1. V-V間相互作用と NMRパラメータの関係

キーワード: MAS ^{51}V NMR, CPMAS ^{13}C NMR, Divanadium Complexes,

Antiferromagnetic Interaction

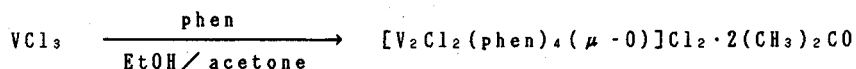
○きたがわ すすむ・むなかた めぐむ・きそ ひでのり

ウム錯体のキャラクタリゼーションに有用な場合があるが系統的に研究された例はない。

複核錯体のバナジウム間相互作用は2種に大別される。第1は金属-金属結合がある場合で、電子スピンの対をなしているため反磁性錯体となりNMRスペクトルが観測可能となる。一方、V-V結合を作る程金属間距離が接近しえない場合は橋かけ配位子を介した相互作用が期待される。この時、バナジウム同士が反強磁性相互作用をする場合 ($\rho = -2 J S_1 S_2$ の $-2 J$ 値の大きさと観測される) NMR測定が可能となる。本研究では、バナジウム核そのもの (^{51}V) および配位子核 (^1H , ^{13}C) に注目し、V-V相互作用とNMR観測量との関連を調べることを目的とする (Fig. 1)。

そこで①難溶性のため現在までNMR法の対象とならなかった、金属結合を持ち反磁性を示すII価およびIII価の複核バナジウム錯体の ^{13}C および ^{51}V 固体高分解能NMRを測定を行なった。また、②配位子を介した相互作用を持つ複核バナジウム(III)錯体を合成し、この錯体の反強磁性種の ^1H NMRの観測に成功した。そして、この錯体の固体、溶液構造と化学シフトとの関連性について検討した。さらに③単核の反磁性錯体である、バナジウム(I, V)錯体の固体高分解能 ^{51}V NMRスペクトルを測定し、溶液と固体状態との構造の比較検討を行なった。

[II] 合成: ① $[\text{V}_2(\text{dmp})_4] \cdot 2\text{THF}$ (1) (dmp=2,6-dimethoxyphenyl) および $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{V}_2(\text{edt})_4]$ (2) (edt=ethane-1,2-dithiolato) の合成は、文献に従って行なった。② $[\text{V}_2\text{Cl}_2(\text{phen})_4(\mu\text{-O})]\text{Cl}_2 \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (3) は、次のスキームに従い、アルゴン雰囲気下EtOH溶液中で、 VCl_3 に3倍量の1,10-phenanthroline(phen)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。



③バナジウム(I)錯体 $\text{Cs}_3[\text{V}(\text{CN})_4(\text{NO})(\text{H}_2\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4) およびバナジウム(V)錯体 $(\text{NH}_4)_3[\text{VS}_4]$ (5), $(\text{NH}_4)_3[\text{VO}_2(\text{C}_2\text{O}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6), $[\text{VO}_2(\text{pic})(\text{HMPT})]$ (7)などは文献に従って合成した。

測定方法: 溶液 ^1H , ^{51}V および固体 ^{13}C , ^{51}V NMRの測定には、JEOL JNM-GSX 270 FT-NMRスペクトルメーターおよびNM-G27MU固体ユニットを用いた。観測周波数 ($^1\text{H}/270.171$ MHz, $^{13}\text{C}/67.941$ MHz, $^{51}\text{V}/71.028$ MHz)、観測幅 ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}/27$ kHz, $^{51}\text{V}/160$ kHz)、パルス幅 ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}/4.0$ μs , $^{51}\text{V}(\text{soln.})/9.2$ μs , $^{51}\text{V}(\text{solid})/13.5$ μs)、温度 23 $^\circ\text{C}$ で測定した。サンプルチューブは ^1H は 5 mm ϕ , $^{51}\text{V}(\text{soln.})$ は 10 mm ϕ 、固体測定にはダイフロン製の弾丸型のものを使用した。また、固体状態ではマジック角回転を行ない(回転数は約 3.5 kHz)、 ^{51}V NMRの化学シフトの外部基準には $\text{VOCl}_3(\text{neat})$ を用いた。

[III] (i) $[\text{V}_2(\text{dmp})_4] \cdot 2\text{THF}$ (1) および $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{V}_2(\text{edt})_4]$ (2) の固体高分解能NMR Fig. 2に(1)と(2)の単結晶における固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルと分子構造を示した。V-V間距離は、錯体(1)が 2.200(2) Å、錯体(2)が 2.616(2) Åであり、それぞれ三重結合と一重結合の金属結合を持っている。どちらの錯体も磁化率測定

から完全な反磁性であることが示されている。それゆえに(1), (2)とも単核では常磁性をしめす酸化数であるにもかかわらず、比較的シャープなシグナルを与えた。また同時に、固体高分解能⁵¹V NMRスペクトルの測定も行なったが、シグナルを得ることが出来なかった。この原因は、バナジウムの配位環境の対称性が低いため四極子相互作用の効果が大きく、MAS (3.5

kHz)法では観測しえないことを示している。metal-metal結合を持つ⁵¹Vの化学シフトを観測した例はなく、挑戦に値する極めて興味深い課題である。

(ii) [V₂Cl₂(phen)₄(μ-O)]Cl₂·2(CH₃)₂CO(3)の構造 (3)の錯体は紫色柱状結晶として得た。(1)の単結晶X線構造解析による

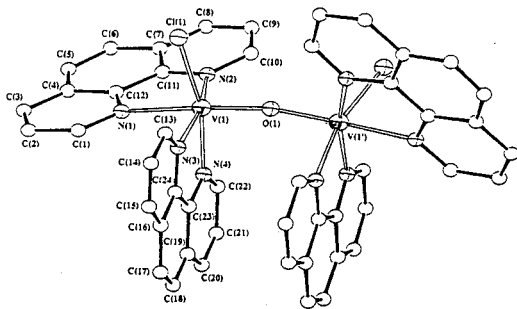


Fig. 3. (3)の分子構造

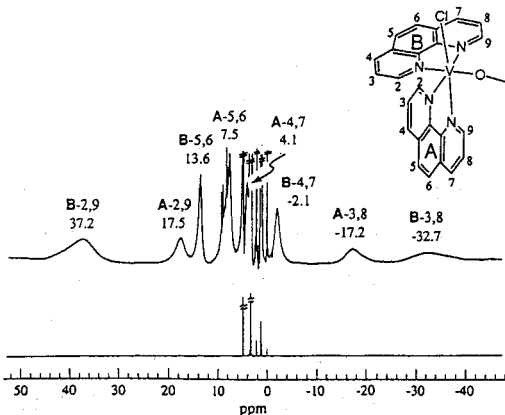
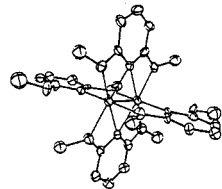
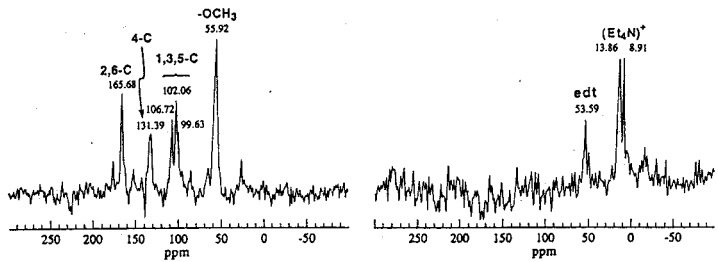
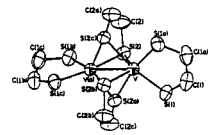


Fig. 4. (3)の¹H NMRスペクトル



[V₂(dmp)₄]·2THF



(Et₄N)₂[V₂(edt)₄]

Fig. 2. (1)および(2)の

CPMAS ¹³C NMRスペクトル

分子構造をFig. 3に示した。2つのバナジウム(III)イオンが、1つの酸素原子で直線的に橋かけされた構造であった。各バナジウム(III)イオンは橋かけした酸素原子と2つのキレート配位したphen、そして1つの塩素原子が配位した6配位の歪んだ八面体構造を有している。V-O距離は1.778(2) Åであり、向かい合ったphenのスタッキングによりV-O-Vの角度は187.9(6)°と折れ曲がっている。

複核バナジウム(III)錯体(3)の¹H

NMR (3)の重水素化メタノール溶液の¹H NMRスペクトルを測定した。Fig. 4に示したように、通常反磁性系の観測範囲に比べて、37~-32 ppm (Δν_{1,2}=200~2000 Hz)と非常に大きな観測幅を持ち、しかも線幅の広いシグナルを与えた。バナジウム(III)錯体はd²電子配置であるが、High spin状態をとりやすく常磁性を示すことから、そのNMRシグナルは広幅化して通常観測されない。しかし、Fig. 3にお}

るようにV-V間に橋かけした原子を有する複核錯体で、2つのバナジウム(III)が互いに反強磁性相互作用をしている場合は観測される。このスペクトルの帰属は現在のところ検討中であるが、温度を変化(23 ~ -90 °C)させて¹H NMRスペクトルを測定した結果、2種の温度依存性を示した。これは、Fig. 3の分子構造の、橋かけした酸素原子に対してトランス位の窒素原子を持つphenと、シス位の窒素原子だけを持つphenの2種類のシグナルであると思われる。この事より、(3)はメタノール中でもFig. 3と同様な構造を持っているものと考えられる。さらに、この(3)の¹³Cおよび⁵¹V 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った。これよりV-V間相互作用は¹³C, ⁵¹V NMRが観測可能な程強いとはいえない。

(iii) バナジウム(I, V)錯体の固体および溶液状態の⁵¹V NMR 固体状態において、¹³C核ではC P-M A S法により感度の良いNMRスペクトルが得られる。一方⁵¹V核では、通常バナジウムに最近接プロトンがないためC P(交差分極)の効果はない。そのためM A S法のみでの測定となる。しかしながら⁵¹V NMRは感度が良いため測定に困難はない。通常、固体状態では溶液のシグナルに比べて線幅の広いシグナルを与える。一般にM A S測定の場合、線幅の広がりには化学シフトの異方性、四極子相互作用などによる。本測定では(4~7)の錯体についてはシグナルの広幅化は溶液の場合の約10倍であった。この原因は四極子相互作用によるものと考えられる。Table 1およびFig. 5に溶液と固体状態における⁵¹V NMR化学

Table 1. バナジウム錯体の⁵¹V NMR化学シフト

complex	soln. δ ppm ($\Delta \nu_{1/2}$ Hz)		solid δ ppm ($\Delta \nu_{1/2}$ Hz)	
(NH ₄) ₃ [VS ₄]	+1391	(40)	+1372	(400)
(NH ₄) ₃ [VO ₂ (C ₂ O ₄) ₂]·2H ₂ O	-538	(210)	-533	(760)
[VO ₂ (pic)(HMPT)]	-525	(300)	-528	(1330)
Cs ₃ [V(CN) ₄ (NO)(H ₂ NO)]·2H ₂ O	-1100	(40)	-1107	(270)

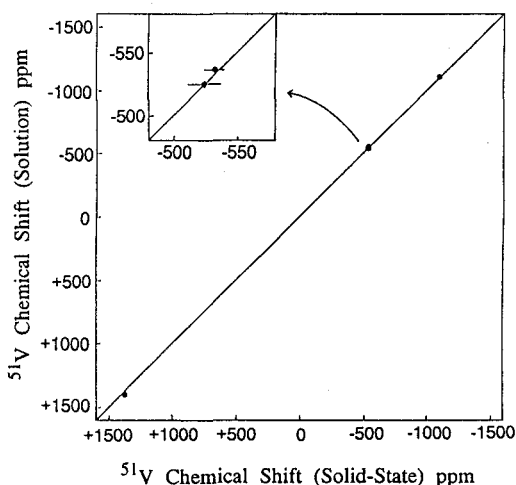


Fig. 4. 固体と溶液⁵¹V

NMR化学シフトの相関関係

シフトおよび線幅をまとめた。溶液と固体との化学シフトが同じときは、溶液状態でも固体での構造がそのまま保たれているものと考えられる。

以上より、V-V結合を持つ系では溶液状態では全ての核(¹H, ¹³C, ⁵¹V)が観測可能であること、固体では¹³Cが可能であることが理解される。また、V...V反強磁性系では、溶液状態に限り簡便に¹H核の測定が可能であることが明らかになった。V-V結合系の溶液⁵¹V NMRおよびV...V相互作用系固体¹³C NMRスペクトルの実際の測定例を得ることは今後の課題である。

特別講演 1

特 1

Recent Advances in Protein NMR

Ad Bax, Frank Delaglio, Mitsuhiro Ikura, Lewis E. Kay, Geerten Vuister, Marius Clore, Angela Gronenborn and Dennis Torchia*, Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, and *Bone Research Branch, NIDR, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA

In principle, protein structures can be determined from two-dimensional ^1H NMR spectra. In practice, spectral overlap limits the size of proteins that can be studied in this manner to less than ~10 kDa. Advances in molecular biology now make it possible to obtain most proteins of interest from bacterial growth media, which offer a straightforward avenue for incorporation of the stable isotopes ^{13}C and ^{15}N . With these isotopically enriched proteins it becomes feasible to record spectra of higher dimensionality (3D and 4D) which have greatly reduced spectral overlap compared to their conventional 2D counterparts. In addition, the presence of ^{15}N and ^{13}C in the protein provides new information on the structure and dynamics of the protein. New 3D experiments will be described that provide information regarding heteronuclear J couplings and their use for protein structure determination will be discussed.

第 2 日 目
11月19日 (火)

L10 ~ L19

固体状態における高分子鎖の高次構造と電子状態

(東工大) O安藤勲、黒子弘道
 (東工芸大工) 山延健
 (神奈川大工) 高山俊夫

Higher-order Structures and Electronic States of Polymer Chains in the Solid State

Isao Ando¹, Hiromichi Kurosu¹, Takeshi Yamanobe² and T. Takayama³

¹Dept. Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology;

²Dept. Industrial Chemistry, Tokyo Institute of Polytechnics;

³Dept. Applied Chemistry, Kanagawa University)

A methodology for understanding higher-order structures and electronic states of polymer chains in the solid state by means of solid-state NMR spectroscopy combined with quantum chemistry has been successfully developed. The higher-order structures and electronic state of some polymers in the solid state have been studied by means of the developed methodology, and the results will be presented and discussed.

1) 固体高分解能NMRスペクトルの観測から得られる固体状態における高分子鎖の化学シフトを解析することにより固体状態における立体構造、結晶構造および電子状態の有用な情報を得ることができる。これらの情報を、化学シフトを通してより深く、高い精度で解析するためにはどうしても量子化学的な面からの解析の手助けが必要となる。

高分子鎖の量子化学的アプローチとして2通りの方法がある。

a) 高分子のモデル低分子化合物（2量体、3量体、・・・）を用いた量子化学アプローチ

b) 無限高分子鎖を直接取り扱う量子化学的アプローチ

a) のアプローチにおいてはモデル低分子化合物のために電子数が比較的少ないので厳密な量子化学計算が容易である。この方法は高分子鎖の構造の安定性、電子状態が局所構造により決まっている場合は適切な方法となる。しかし、 α -ヘリックスをとったポリペプチドのように長距離相互作用により構造が安定化されている場合、また高分子鎖間相互作用が重要な役割を演じている場合はa) のアプローチでは不適當になる。

このような場合にはb) の方法を用いることが必要になる。このような観点から私どもの研究グループはb) のアプローチとして無限高分子鎖の電子状態を評価できる

固体NMR、高分子、電子状態、高次構造、バンド理論、化学シフト

あんどう いさお、くろす ひろみち、やまのべ たけし、たかやま としお

tight-binding MO (TB MO) 法とNMR化学シフト理論をcombineして高次構造、電子状態、NMR化学シフトを高い精度で解析できる方法を確立し、固体高分解能NMRにより得られる化学シフト値を通して固体状態における高分子鎖の高次構造、電子状態を研究してきた。研究対象の高分子としてポリエチレン、ポリアセチレン、ポリオキシメチレン、ポリオキシエチレン、ポリペプチドが挙げられる¹⁻¹¹⁾。本講演ではb)のアプローチについて簡単に述べ、いくつかの高分子について研究例を紹介するとともに、最近ポリシランについて研究して得られた成果を報告する。

2) 無限高分子鎖の電子状態を直接評価する方法として固体物理でよく知られているバンド理論を応用したTB MO法がある。これは高分子鎖の構造の周期性を利用することにより直接高分子鎖の電子状態を評価する方法である。無限高分子鎖のMOはBlochの定理により原子軌道 ϕ の線形結合で次のように表せる。

$$\Psi_n(k) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{j=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} \sum_v^s \exp(ikja) C_{vn}(k) \phi_v(r-ja) \quad (1)$$

ここで、 k は電子の波数、 s はモノマー単位内の原子軌道の数、 N はモノマー単位の数、 C_{vn} は n 番目のバンドの v 番目の原子軌道の係数である。(1)式を用いてNMR化学シフト理論をsum-over-states法の枠内で展開して得られた式が(2),(3)式である。

$$\begin{aligned} \sigma_A^d(k) &= \frac{-\mu_0 2e^2}{4\pi 3m_e^2} \sum_v^A \sum_v^A P_{vv}(k) \langle \phi_v(r) | r^{-1} | \phi_v(r) \rangle \quad (2) \\ \sigma_{A,\alpha\beta}^p(k) &= \frac{-\mu_0 h^2 e^2}{4\pi m_e^2} \sum_m^{occ} \sum_n^{unocc} \sum_j^A \langle r^{-3} \rangle_{2p} ({}^1E_m^n - {}^1E_0)^{-1} \\ &\quad \times \sum_j^B \sum_l^B [X(j,m,n,\beta,\gamma)X(l,m,n,\gamma,\alpha) - Y(j,m,n,\beta,\gamma)Y(l,n,m,\gamma,\alpha) \\ &\quad + X(j,m,n,\gamma,\alpha)X(l,n,m,\beta,\gamma) - Y(j,m,n,\gamma,\alpha)Y(l,n,m,\beta,\gamma)] \quad (3) \end{aligned}$$

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

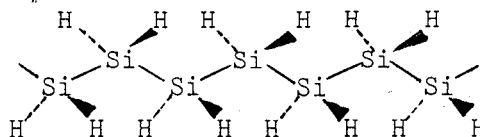
$$\begin{aligned} X(j,m,n,\beta,\gamma) &= C_{jm}^{R\beta} C_{jn}^{I\gamma} + C_{jn}^{R\beta} C_{jm}^{I\gamma} - C_{jn}^{R\gamma} C_{jm}^{I\beta} - C_{jm}^{R\gamma} C_{jn}^{I\beta} \\ Y(j,m,n,\beta,\gamma) &= C_{jm}^{R\beta} C_{jn}^{R\gamma} + C_{jn}^{R\gamma} C_{jm}^{R\beta} - C_{jn}^{I\beta} C_{jm}^{I\gamma}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

(2)式は反磁性項、(3)式は常磁性項を表している。(2)式において P_{vv} は電子密度を表し、 X 、 Y は結合次数に対応する因子である。 $(E_m - E_0)$ は一電子励起エネルギーでバンド・ギャップに対応する。本研究を通して用いられてきたMO法はCND0/2、INDO、INDO/S法である。計算は東大大型計算機センターおよび分子科学研究所のS-820/80スーパーコンピュータを用いて行った。

3) 本研究で取り扱うSi-Si結合を主鎖とするポリシランは導電性高分子、ホトレジ

ストなどの機能材料として注目されている。この高分子はamorphousとなり、X線回折法により構造解析ができない。このために固体高分解能NMRが有力な方法として期待されている。私どもはこのような観点から固体高分解能NMR量子化学的アプローチを併用して系統的に研究してきた。この一連の研究成果から最近の研究を報告する。Si-Si結合にあるSiのイオン化ポテンシャルは8.7 eVと小さいこととSi-Si結合長が2.4 Åで大変長い。このようなSiの特性がC-C結合を主鎖とした高分子と異なった物性を示し、またNMR化学シフトの挙動も異なる。このようなポリシランの構造と電子状態を私どもの方法論を用いてアプローチする。Fig.1に代表的なポリシランの構造と幾何学パラメータを示す。

ポリシランは固体状態で優位コンホメーションとして*trans-rich*コンホメーションと*gauche-rich*コンホメーションをとり、*trans-rich*の方が*gauche-rich*より少し安定であると推論されている。



Si-Si: 2.40 Å, Si-H: 1.48 Å
Si-Si-Si: 109.47°

Fig.1 The structure and geometrical parameters of polysilane 推論が妥当であるか、また電子状態、NMR化学シフトの挙動はどうかを私どもの方法論でアプローチした。-120°C~+120°Cの温度範囲の²⁹Si CP/MAS NMR実験から固体状態におけるポリメチルフェニルシランの²⁹Si NMRスペクトルは3本のピーク ($\delta = -43, -39, -36$ ppm from TMS)からなり、低温では高磁場ピーク (-43 ppm)の強度が強く、高温では低磁場ピークの強度が強くなる結果を得た。

低温において高磁場ピークに対応する構造、高温においては低磁場ピークに対応する構造が安定であることがわかる。これらについて深く解析するために、Fig.1に示したポリシランが*all-gauche*(G_n),*trans-gauche*(TG_n)コンホメーション取ったときのNMR遮蔽定数、電子状態についてTB CNDO/2-SOS法を用いて計算した。

計算で得られたNMR遮蔽定数、バンド・ギャップ,全エネルギーをTable 1および電子状態をFig. 2に示した。遮蔽定数 σ において負符号は低磁場シフトを意味しており、化学シフト δ において負符号は高磁場シフトを意味している。この表から(G_n)は(TG_n)より1.3 ppm低磁場に現れることを示唆している。

また、全エネルギーから

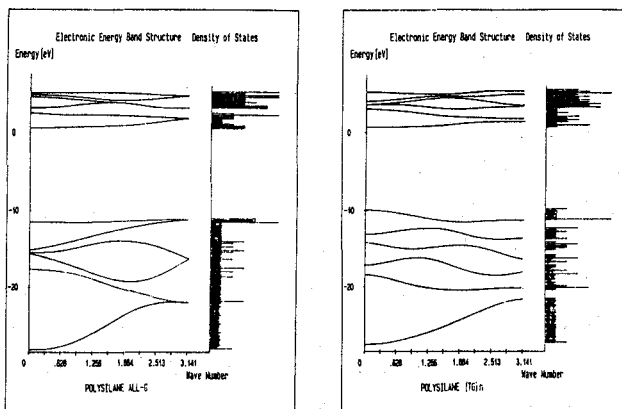


Fig.2 Electronic structure of an infinite polysilane

Table 1 NMR shielding constants, band gaps and total energy of an infinite polysilane

conformation	shielding constant/ppm			band gap/eV	total energy/a.u.
	σ^d	σ^p	σ^T		
$(G)_n$	70.8	-107.3	-36.6	11.80	-5.218
$(TG)_n$	70.8	-106.1	-35.3	10.69	-5.549

$(G)_n$ の方が $(TG)_n$ より不安定であることがわかる。このことより低磁場に現れるシグナルは *gauche-rich*の構造、高磁場に現れるシグナルは *trans-rich*構造から由来することが示唆される。また、 $(TG)_n$ の構造を取ったときのバンド・ギャップは $(G)_n$ の構造より小さいことがわかる。紫外領域における最大吸収ピークの λ_{max} は低温で350 nm、高温で310nmの実験値が得られている。計算から得られたバンド・ギャップから低温で *trans-rich*の構造、高温で *gauche-rich*の構造が存在していることを示唆している。以上のようなアプローチからポリシランの構造および電子状態の有用な情報が引き出せることを述べてきた。講演では、さらに詳細に述べるとともに、他の高分子についても私どもの研究成果を述べる。

References

1. T.Yamanobe, R.Chujo and I.Ando, Mol.Phys.,**50**,123(1983).
2. T.Yamanobe, I.Ando, H.Saito, R.Tabeta, A.Shoji and T.Ozaki, Chem Phys.,**99**,259(1985).
3. T.Yamanobe and I.Ando, J.Chem.Phys.,**83**,3154(1985).
4. T.Yamanobe, T.Sorita, T.Komoto, I.Ando and H.Sato, J.Mol.Struct.,**131**,267(1985).
5. T.Yamanobe, I.Ando, H.Saito, R.Tabeta, A.Shoji and T.Ozaki,Bull.Chem.Soc.Jpn,**58**,23(1985).
6. T.Yamanobe, I.Ando and G.A.Webb, J.Mol.Struct.,**151**,191(1987).
7. H.Kurosu, T.Yamanobe, T.Komoto and I.Ando, Chem.Phys.,**116**,391(1987).
8. H.Kurosu, T.Yamanobe and I.Ando, J.Chem.Phys.,**89**,5216(1988).
9. T.Ishii, H.Kurosu, T.Yamanobe and I.Ando, J.Chem.Phys.,**89**,7315(1988).
10. H.Kurosu, T.Yamanobe and I.Ando,J.Mol.Struct.(Theochem),**201**,239(1989).
11. I.Ando,T.Yamanobe, H.Kurosu and G.A.Webb,"NMR Nuclear Shielding and the Electronic Structures of Macromolecules.",Annual Reports on NMR Spectroscopy,Vol.22, p.205(1989).

^{13}C 固体高分解能 NMR による V 型アミロースの安定性および B 型への転移挙動の検討○齊藤 肇¹、山田淳子²、行本 徹³、矢島博文³、遠藤隆一³(¹姫路工大・理、²国立がんセ研、³東京理科大・理)Conformational Stability of V-Amyloses and Their Hydration-Induced Conversion to B-Type Form as Studied by High-resolution Solid-state ^{13}C NMR SpectroscopyH. Saito,¹ J. Yamada,² T. Yukumoto,³ H. Yajima³ and R. Endo³(¹Dept. of Life Science, Himeji Institute of Technology, ²Biophys. Div., National Cancer Center Research Institute, ³Dept. of Applied Chemistry, Science University of Tokyo)

We have recorded ^{13}C NMR spectra of several preparations of V-amyloses and their hydrates to gain insight into their relative stability and subsequent hydration-induced conformational change. It was found that these V-amyloses were not always stable when they are equilibrated in an atmosphere of 96% R. H. and converted to B-type form. It is unlikely that any drastic conformational change such as unfolding followed by refolding and plausible change of handedness is caused by such mild physical treatment as humidification. Therefore, it appears that the resulting B-type form should be ascribed to a left-handed single helix as a consequence of a slight modification of V-amylose, in contrast to the previous interpretation based on the data of X-ray diffraction and NMR studies.

1 はじめに

蛋白質や多糖類等の生体高分子固体において、結晶の多型あるいは異なったコンホメーションが存在するときには、問題とする残基が関与する二面体角に応じて、 ^{13}C 化学シフト変化が見られることを、これまでの一連の研究から明かにしてきた^{1,2}。それ故、それぞれの系において数多くの reference データを集積することにより、その対比による ^{13}C 固体高分解能 NMR から高次構造の情報が得られ、X 線回折に対する相補的なデータとして用いることが出来る。実際、結晶性の高い多糖類においては、X 線回折による多型構造の識別とスペクトルパターンの変化の間に、平行関係が認められている。しかし、セルロースのように NMR パターンの多様性に变化様性にも拘らず、X 線パターンがこれを反映して変化しないものや³、逆に無定形試料のために NMR スペクトルの変化にも拘らず、X 線回折からは何の情報も得られないこともある。一般に、溶液における糖鎖の高次構造の解明は、これに関与する物性あるいは生物学的意義からみて極めて重要であるにも拘らず、グリコシド結合回りの速い揺らぎのために、十分にキャラクタライズされないことが多い。それゆえ、このような回転が凍結された状態にある固体における、固体 NMR ないしは X 線回折による構造解析ならびにその対比は、糖質の高次構造を理解する上で極めて重要となる。

演者らは上の第三のケースに相当する (1→3)- β -D-グルカンの高次構造解析を ^{13}C 固体高分解能 NMR によって詳細に検討し、特に水和/脱水過程に伴うスペクトル変化の追跡により、その構造情報が得られることを示した⁴⁻⁸。本研究においては、これと同様の構造を取り得ると考えられている (1→4)- α -D-グルカンであるアミロースについての検討結果を報告する。

 ^{13}C 固体高分解能 NMR スペクトル、コンホメーション依存シフト、アミロース、糖鎖の高次構造

さいとう・はじめ、やまだ・じゅんこ、ゆくもと・とる、やじま・ひろふみ、えんどう・りゅういち

2 Vアミロースの水和による変換

Vアミロースは、n-ブタノール、DMSO、ヨウ素などの種々の低分子とのコンプレックスを形成し、左巻一重らせん構造を取ることが知られている。図1 (A), (B) に示すように、それぞれヨウ素、n-ブタノールとのコンプレックスを生成したVアミロースの ^{13}C NMRスペクトルは、ゲスト分子がDMSOの場合も含めて、ゲストの種類、ホストの分子量の差異に拘らず同一のパターンを示し、X線回折のデータと一致している。しかし、これらのコンプレックスの水和による安定性の差異は、アミロースの分子量ならびにゲスト分子の種類によって著しく異なる。実際、図

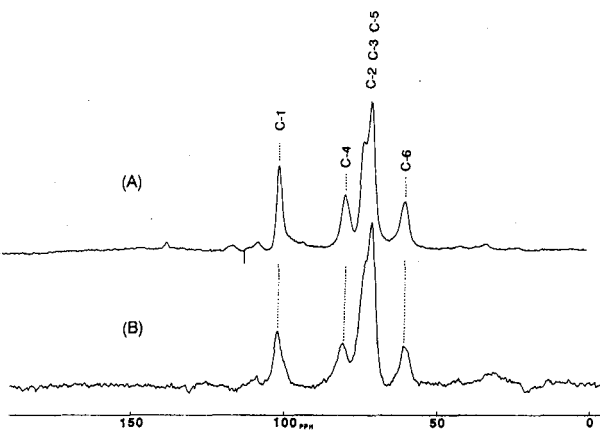


図1 Vアミロース ((A) ヨウ素および (B) n-ブタノールとのコンプレックス) の ^{13}C NMRスペクトル

2 (A)、(B) に示すように、高分子量 (Aldrich, DP 1000) アミロースとDMSOコンプレックスの場合は、水和によってB型のスペクトルパターンに完全に転換し、かつDMSO信号が消滅していることがわかる。これはアミロースと同様の一本鎖構造をとり、水和によって一重らせんに転換する(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン(カードランなど)の場合と同様の挙動を示す。さらに、低分子オリゴマー (EX-II, DP 17) の場合も、図3 (B) \rightarrow (C) の変化に見られるように、V \rightarrow Bへの転換が100%進行する。一方、中程度の分子量のアミロース (EX-III, DP 100) では、図4に示すように、この転換が50%程度にとどまるなど、必ずしもカードランの挙動と平行関係にあるとは限らない。上記の結果およびX線粉末図形による構造の同定結果を表1にまとめる。高次構造の同定結果は、V型の場合は両者とも同じ結果が得られているが、B型の場合X線回折ではアモルファスとの結果を得ている。

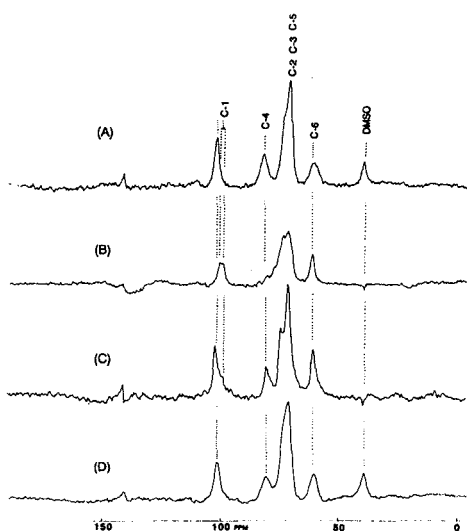


図2 Vアミロース (DP 1000, DMSO) の水和による変換: (A) 無水、(B) 水和、(C) ヨウ素コンプレックス、(D) 同上、無水

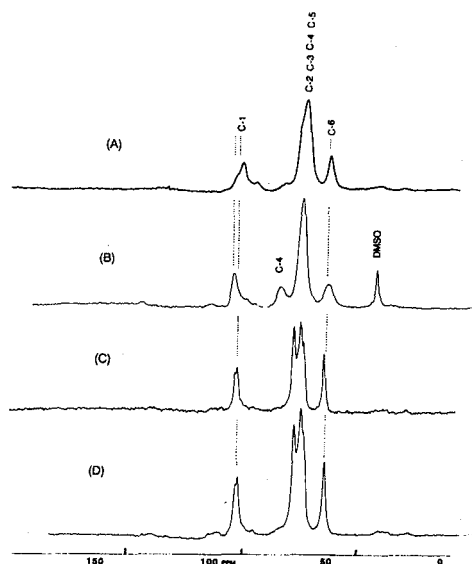


図3 低分子量アミロースオリゴマー (DP 17) の水和効果: (A) 無水粉末、(B) 凍結乾燥、(C) 同上、水和、(D) ヨウ素コンプレックス

このような水和による構造の転換が容易に起こるのは、DMSO分子等のアミロースへの結合が弱いからであると考えられる。この点の検証のために、ゲストとしてDMSO-d₆を用いて、²H NMRスペクトルに自由回転状態にあるメチル基の四極子相互作用による40 kHzの信号の分裂が観測されるか否かを知る必要がある。実際、観測された信号は、上記の四極子相互作用が10⁻⁶秒の時間尺度での、速い化学交換状態により平均化された一本線であった。²Hスピン格子緩和時間測定では、表2に示すように40 m秒のオーダーであり、T₁の極小値よりも高温側にある速い運動状態にあり、同時に示すカードランの場合と同様に、DMSO分子は高分子鎖への結合はルースであることが分かる。従って、水和

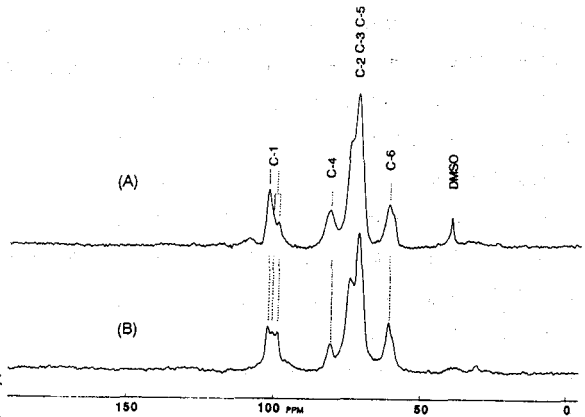


図4 中程度分子量 (DP 100) アミロースのDMSO
よりの凍結乾燥物の¹³C NMRスペクトル
(A) 無水、(B) 9.6% RHでの水和

Table 1 Summary of Conformation Characterized by ¹³C NMR and X-Ray Diffraction

	Anhydrous (lyophilized from DMSO solution)		Hydrate ^{a)}	
	NMR	X-ray	NMR	X-ray
DP 17 (EX-I)	V	V	B	amorphous B ^{b)}
DP 100 (EX-III)	V(70%) + B(30%)	amorphous	V(50%) + B(50%)	amorphous
DP 1000 (Aldrich)	V	V	B	amorphous
Iodine complex	V	V	V	V

a) Anhydrous lyophilized sample from DMSO solution was hydrated under the condition of 96% R. H. for over 12 h.

b) Anhydrous powder sample was hydrated.

によってこれらの分子は水分子に容易に置換されるわけである。

一方、ヨウ素分子がゲスト分子の場合は、図2(C), (D)に示すように、水和によってスペクトルパターンには変化が見られない。これは、コンプレックス中のヨウ素は、上記の場合とは異なり水分子との置換の代わりに、水和によってI₃⁻あるいはI₅⁻イオンへの変化することにより、Vアミロースの内部でより安定に存在するようになるためであると考えられる。実際、ヨウ素イオンは殆ど線形状にアミロース内に存在することが知られている。

3 水和構造のコンホメーション

上で述べたように、Vアミロースは水和によってB型に転換する。ただし、ここで使用した試料のX線回折図はアモルファスパターンを示しており、そのコンホメーションに関する知見をこれから得るのは困難である。

Table 2. ²H Spin-lattice Relaxation Times of DMSO-d₆ and Deuterium Oxide bound to Amylose and Curdlan (ms)

	Temp. (K)	DMSO-d ₆	D ₂ O	
Amylose, V form	295	42.9		
	303	52.6		
B form	295		14.3	
	295	44.2		
Curdlan, Anhydrous	303	44.8		
	314	48.5		
	323	68.3		
	Hydrate	295		10.1

しかし、これらのNMRパターンはBアミロースと同等であり、少なくとも短距離秩序に関する限り、ここで得られたB型は、Bアミロースと同一と考えてよい。実際、Vアミロースの水和によるBアミロースの変換はすでにBlackwell⁹により、1969年に報告されている。その結果、当初はBアミロースは一重ラセンであると考えられていた。しかしながら、その後Sarko¹⁰により右巻二重ラセンに変更され、さらには最近では左巻二重ラセン¹¹へとそのモデルが三転しているのが現状である。

われわれが今回報告したように、相対湿度96%での水和によって起こるVアミロースの一重ラセンから二重ラセンへの変換は、溶解過程を伴っていないことを考慮すると、モデルとしては受け入れ難い。ましてや、左巻から右巻のhandednessの変更はなおさらである。さらに、仮に二重ラセンモデルとしても、二重ラセン構造への転換の分子量依存性の説明も容易ではない。すなわち、上で述べたようにDP 100程度の中程度の分子量のアミロースは、B型への転換は50%すぎない。単分散アミロースを用いた実験によれば、DP 100以下の鎖長の場合aggregateを生じ、水溶液からの沈澱が起こることが報告されている。このようなaggregateはより疎水的となり、水和による構造変化が起こりにくいのが、この理由であろう。これらの結果を考慮すると、これまでX線回折により提唱されていたBアミロースの二重ラセン構造は、再考する必要があるように思われる。

なお、B型が一重ラセンであるならV→B変換が可逆的に起こり、逆過程のB→V変換の存在が確認される必要がある。X線回折に比べて、固体高分解能NMRによるアプローチでは、後者の過程の研究は容易である。これは(1→3)-β-D-グルカンについて詳細に報告したように、DMSOでの溶解、凍結乾燥によればよい。実際、この過程の追跡については上で詳細に述べた通りである。

4 結論

(1→3)-β-D-グルカンの場合と同様、DMSOによる脱水、水和過程による¹³C固体高分解能NMRスペクトル変化の追跡により、アミロースの多重鎖構造の有無に関する有用な知見を得ることが出来、B型構造の二重ラセン構造モデルは再考すべきであることがわかった。

- 1 H. Saito, Magn. Reson. Chem., 24, 835 (1986)
- 2 H. Saito and I. Ando, Ann. Rep. NMR Spectrosc., 21, 209 (1989)
- 3 R. H. Atalla (eds.), ACS Symp. Ser. No. 340 (1987)
- 4 H. Saito, R. Tabeta, M. Yokoi, and T. Erata, Bull. Chem. Soc. Jpn., 60, 4259 (1987)
- 5 H. Saito, M. Yokoi, Y. Yoshioka, Macromolecules, 22, 3892 (1989)
- 6 H. Saito and M. Yokoi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 392 (1989)
- 7 H. Saito, Y. Yoshioka, M. Yokoi, and J. Yamada, Biopolymers, 29, 1689 (1990)
- 8 H. Saito, ACS Symp. Ser., in press.
- 9 J. Blackwell, A. Sarko, and R. H. Marchessault, J. Mol. Biol., 42, 379 (1969)
- 10 H. C. H. Wu and A. Sarko, Carbohydr. Res., 61, 7 (1978)
- 11 A. Imberty, H. Chanzy, S. Perez, and A. Buleon, J. Mol. Biol., 201, 365 (1988)

^{13}C -固体高分解能NMRによるL-ロイシン - γ -メチル
L-グルタメート共重合体の分子運動の研究

北大工 堀 耀広・唐澤 勝・山口 雅史

Molecular Motion in Copolymers of L-Leucine and γ -Methyl L-Glutamate
Studied by Solid State High-Resolution ^{13}C -NMR

Akihiro Tsutsumi, Masaru Karasawa and Masashi Yamaguchi

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

It has been reported that in the copolymers of γ -methyl L-glutamate (MLG) and L-leucine (L-LEU), the side chain of MLG becomes considerably mobile with increase of L-LEU component in the solid state. However, molecular mechanisms of such a phenomenon have not been clarified. In this work, to obtain further information on the side chain motion, $T_{1\rho}(^{13}\text{C})$ was measured by means of the solid state high-resolution ^{13}C -NMR. It was found that with increase of L-LEU content the temperature where the $T_{1\rho}(^{13}\text{C}) \sim$ temperature curve shows a minimum shifts considerably and slightly to the lower temperature for MLG-CH₃ and MLG-C γ , respectively, and shifts to rather higher temperature for L-LEU - C β . These results indicate that the influence of L-LEU on the side chain motion is considerably different in the inner and outer parts of the side chain.

1. 序論 我々は、固体高分解能 ^{13}C NMR CP/MAS法を用いてポリペプチドの固体物性について研究を行っているが、今回は、L-leucine (L-LEU) と γ -methyl L-glutamate (MLG) のランダム共重合体について分子運動の組成依存性を調べた。L-LEU の側鎖は無極性であるが、MLG では、エステル結合の部分で極性基を持つため、誘電率測定により分子運動が調べられている。MLG のホモポリマーである PMLG では、誘電損失 ϵ'' (kHz) のピーク温度 T_{max} が室温付近に存在し¹⁾、これは、側鎖全体の活発な運動によるとされている。しかし、MLG は L-LEU と共重合体を形成したとき、L-LEU の含量が増加するにしたがって、 T_{max} は、低温側へ大きくシフトする傾向にあり、PMLG に比べて分子運動が更に活発になることを示している。また、MLG のメチル基の部分がフェニル基に置換されている γ -benzyl L-glutamate (BLG) との共重合体では、MLG の場合とは逆に、L-LEU の含量が増加すると、 T_{max} は高温側へ移動し、L-LEU の含量が 70%~80% では、MLG との共重合体より 100°C 程度も高くなる。しかし、これらの興味ある現象のメカニズムについては、まだよく解明されていない。

そこで今回は、まず、(L-LEU, MLG) 共重合体について、CP/MAS ^{13}C NMR により、 $T_{1\rho}(^{13}\text{C})$ を観測することから、側鎖の運動について、より詳細な情報を得ることを目的とした。

L-LEU-MLG Copolymer / Molecular Motion / ^{13}C -NMR/ CP/MAS / $T_{1\rho}(^{13}\text{C})$

つつみ あきひろ, からさわ まさる, やまぐち まさし

2. 試料と実験 用いたランダム共重合体は、味の素社より提供されたNCAより合成され、組成は、TFA-CDCl₃混合溶媒中でVarian社製XL-200を用い、¹H NMRスペクトルから求めた。(Table I-参照) また、CP/MAS ¹³C NMR法測定には、CHCl₃溶液から作成したキャストフィルムを液体窒素温度で粉末状に砕いたものを用いた。更に、測定に先立ち、130°Cで約12時間、真空中でアニールを行った。今回は、誘電緩和による実験に対応させるために、数10kHzのオーダーの分子運動を反映する T_{1ρ}(¹³C)を、共鳴周波数、50.3MHz、Bruker社製のMSL-200を用いて観測した。測定温度範囲は、20°C~120°C、接触時間は、1msであった。用いたパルスシーケンスは、Fig.1に示してある通りであり、スピロック周波数は、40~73.5kHz、MAS rateは、約3.5kHzで行った。

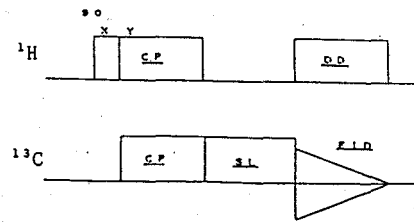


Fig.1 Pulse sequence for T_{1ρ}(¹³C) measurement.

Table. I Mole ratios of compositions in copolymers

MLG (mol %)	0	15	50	70	100
L-LEU (mol %)	100	85	50	30	0

3. 結果と考察 Fig.2は組成50:50の共重合体のスペクトルであるが、ほぼ、PLL, PMLGを重ね合わせた形状をしている。¹Hを有する側鎖の¹³Cの中で、MLGのCβ(3), L-LEUのCγ(8), CH₃(9)は互いに重なり合っているが、L-LEUのCβ(7), MLGのCγ(4)とCH₃(6)については、ピークが、よく分離している。そこで、これらの3つのピークについて解析を詳細に行った。まず、ケミカルシフト値は、L-LEUの含量、及び温度には大きくよらないことから、側鎖のconformationには、殆ど変化がないことがわかった。次に、各ピークに対するT_{1ρ}(¹³C)の温度依存性を測定した。Fig.3には、MLGのCH₃についての結果を示した。各試料でminimumが観測されている。PMLGに関してはこのminimumの温度域のかなり低温から既にCH₃のC₃軸まわりの回転運動が生じていることが知られている。従って、前述の誘電緩和による観測結果を考慮するとこのminimumは、カルボニルを含む側鎖先端部分の更に大きなスケールの運動に起因すると考えられる。また、minimumの温度域は、L-LEUの比率が大きくなるにしたがって、大きく低温側へシ

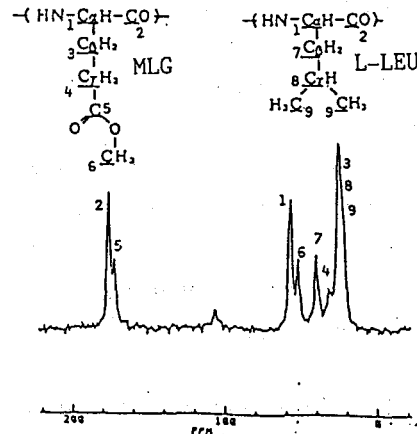


Fig.2 ¹³C CP/MAS NMR spectra of copolymer(50:50).

フトしている。Fig.4にminimumの温度 T_{min} を L-L E U 含量に対して示した。周波数が異なるため温度域が違うが、誘電緩和の結果とよく対応していることがわかる。よって、今回の NMR の測定からも、MLG の側鎖先端部分は、L-L E U と共重合することにより、かなり動きやすくなることが確認された。Fig.5は、MLG の C γ についての結果である。これも各試料で minimum が観測され、PMLG については、CH₃ とほぼ同じ温度域にみられる。このことは、室温付近では、側鎖全体の運動が協同的に起こっているという考えを支持していると考えられる。また、L-L E U の含量が増加しても、その温度域は、若干低温側へシフトしているが、ほとんど変化せず、上記の CH₃ とは、異なる振舞いをしている。

Fig.6は L-L E U の C β についての結果である。浅い minimum が観測され、L-L E U の比率が高くなると、今度は高温側へシフトしていく傾向が観測された。また、 $T_{1\rho}$ (¹³C) の値は、L-L E U の含量が高くなるにしたがい、大きくなり、PLL に近づいている。PLL については、ブロードライン NMR、およびプロトンの T_1 の測定から、側鎖全体の運動は、非常に広い温度範囲で徐々に解放されることが知られており、minimum の温度域が広いのは、このためと考えられる。

以上を要約すると、MLG の CH₃ の結果より、L-L E U の content の増加にともない、MLG の側鎖は、CO より先端部分 (outer part) で動きやすくなる。また、L-L E U の C β と MLG の C γ の結果より、側鎖の、主鎖に近い部分 (inner part) では、運動性は、殆ど変化しないか、むしろ、束縛される傾向にある (Fig. 7-参照)。従って、MLG と L-L E U の共重合体では、側鎖の先端部分と内側部分で、運動性が大きく異なることがわかった。特に、側鎖先端部分の運動性が、誘電測定などの、他の物性測定には敏感に反映するものと考えられる。

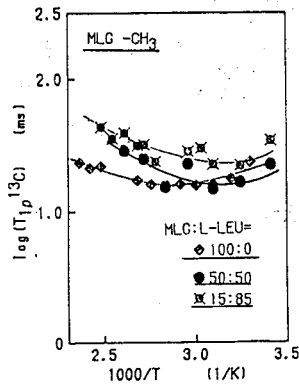


Fig.3 $\text{Log}(T_1(^{13}\text{C}))$ vs. $1000/T$ for MLG-CH₃.

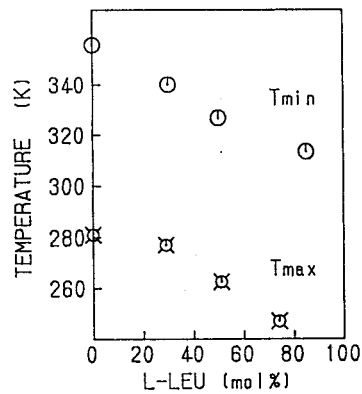


Fig.4 $T_{min}(T_{1\rho}-73.5\text{kHz})$ and $T_{max}(\epsilon''-1\text{kHz})$ vs. temperature.

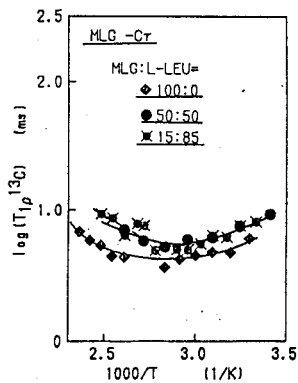


Fig.5 $\text{Log}(T_{1\rho}(^{13}\text{C}))$ vs. $1000/T$ for MLG-Cr.

最後に、実際に観測される $T_{1\rho} (^{13}\text{C})$ は、spin同士のflip-flopの項と分子運動を反映する項からなると考えられる⁽¹⁾⁽²⁾。そこで、Fig. 8に示されているように、20°Cでのスピンロック周波数変化の測定を行った。その結果、 $T_{1\rho} (^{13}\text{C})$ は、周波数 ω_{1e} の二乗に従い変化することから、分子運動過程を反映していることを反映していると結論できる。

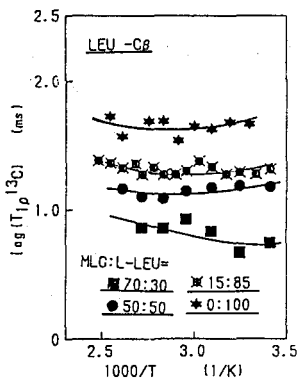


Fig.6 $\text{Log}(T_1(^{13}\text{C}))$ vs. $1000/T$ for L-LEU-C β .

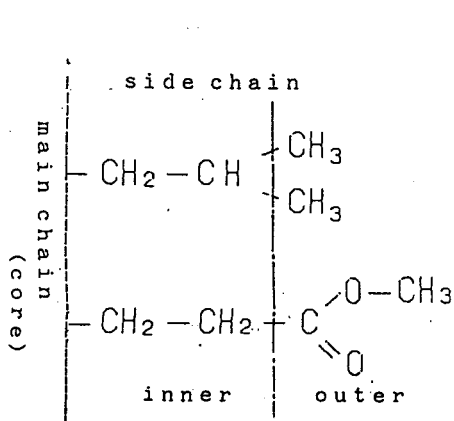


Fig.7 Schematic presentation of side chain region for L-LEU and MLG copolymers.

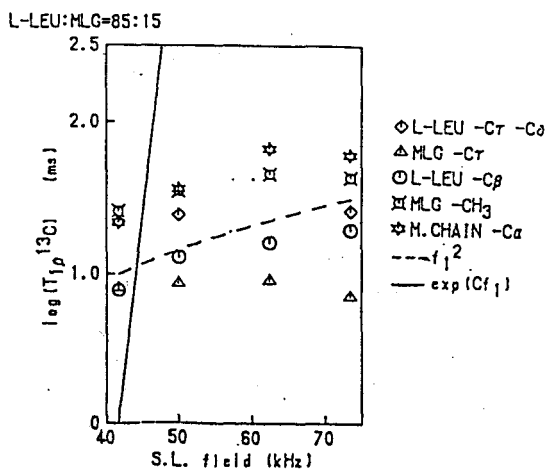


Fig.8 $\text{Log}(T_1(^{13}\text{C}))$ vs. f_1 .

References

- (1) K. Hikichi, S. Yamahata, and A. Tsutsumi, *Polym. J.*, **17**, 1241 (1985).
- (2) M. Yamaguchi and A. Tsutsumi, *Rept. Progr. Polym. Phys. Jpn.*, **33**, 547 (1990).
- (3) D. E. Demco, J. Tegenfeld, and J. S. Waugh, *Phys. Rev.*, **11**, 4113 (1975).

ポリビニルアルコールの固体状態における
分子内および分子間水素結合

京大化研 胡 紹華、堀井 文教、小谷 壽

Intramolecular and Intermolecular Hydrogen Bondings
of Poly(vinyl alcohol) in the Solid State

Shaohua Hu, Fumitaka Horii, and Hisashi Odani
(Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611)

The intramolecular and intermolecular hydrogen bondings have been examined for poly(vinyl alcohol)(PVA) films with different tacticities by CP/MAS ^{13}C NMR spectroscopy and a statistical calculation. The CH resonance line splits into a triplet, lines I, II, and III, due to the formation of two, one, and no intramolecular hydrogen bond(s) in the triad sequences. The integrated fractions of lines I, II, and III have been statistically calculated using a model based on the crystal structure of PVA, where the intramolecular and intermolecular hydrogen bonds are formed at certain probabilities for all possible triad-tetrad or triad-triad pairs in the neighboring two chains. The observed fractions, which are determined by the lineshape analysis of the CH triplet, are in good accord with the calculated fractions for different PVA samples. On the basis of these results, the characteristic hydrogen bondings are discussed for the crystalline and noncrystalline components in the dried or hydrated state.

1. 緒言

ポリビニルアルコール(PVA)固体試料のCP/MAS ^{13}C NMRスペクトルのCH共鳴線はtriplet(低磁場側からline I、II、IIIと呼ぶ)に分裂するが、その原因はmm、mrおよびrrシークエンスに分子内水素結合が2、1および0個形成されることにあると考えられている¹⁾。しかし、これらの共鳴線の相対強度比は室温付近ではmm、mr、rrの含率の比と一致しない。我々は、この原因はmシークエンスにおいても分子間水素結合が形成されることにあると推定し、PVAの結晶構造モデルを基にして、分子内および分子間水素結合がそれぞれ確率p、および1-pで生成する場合について統計的取り扱いによりCH共鳴線の相対強度を計算した。また、種々のPVA試料についてCP/MAS ^{13}C NMRスペクトルを結晶および非晶成分の寄与に分離したのち、lineshape解析により各成分のCH共鳴線の相対強度を決定した。本報告では、これらの結果をまとめて述べるとともに、分子内と分子間水素結合に及ぼす立体規則性、水、温度などの影響について考察する。また、これらの水素結合状態の時間変化の可能性について検討した結果も述べる予定である。

2. 分子内および分子間水素結合に関する統計的計算

桜田ら²⁾の結晶構造モデルに従えば、分子間水素結合に関与する隣接PVA分子は同一単位格子内または隣接単位格子内にそれぞれ一分子存在し、これらは鎖軸方向に互いに1/2周期だけずれている。したがって、ある分子鎖に沿ったmmまたはmrシークエンスに注目し、これらと隣接する分子鎖上のtetradまたはtriadシークエンスとのすべての可能なペアに対して分子内および分子間水素結合の検討を行った。すなわち、ペアi-jにおいてシークエンスiに分子内水素結合が2個生成する場合(ケースI)、分子内水素結合が1個生成する場合(ケースII)および分子内水素結合が生成しない場合(ケースIII)が存在するとし、ケースI、II、IIIの取り得る確率をそれぞれ求め、あらゆる可能なペアについてのケースI、II、IIIの数分率の和すなわち共鳴線I、II、IIIの積分分率に対する式を誘導した³⁾。

キーワード: CP/MAS ^{13}C NMR, Poly(vinyl alcohol), Hydrogen bonding, Crystal structure
胡 紹華 (Hu Shaohua)、堀井 文教 (ほりい ふみたか)、小谷 壽 (おだに ひさし)

Table 1 Observed and Calculated Fractions of the CH Carbons I, II, and III for Different PVA Samples.

Sample	Observed fraction			Calculated fraction			p_a^a	F_a^b
	I	II	III	I	II	III		
Crystalline								
S-PVA	0.064	0.350	0.586	0.048	0.364	0.588	0.08	0.239
A-PVA	0.109	0.457	0.434	0.090	0.473	0.437	0.32	0.343
A-PVA,hydrated ^C	0.154	0.513	0.333	0.143	0.522	0.335	0.74	0.455
I-PVA	0.386	0.351	0.263	0.368	0.519	0.113	0.89	0.744
Noncrystalline								
A-PVA	0.170	0.493	0.337	0.147	0.524	0.329	0.77	0.467

^a Probability of the intramolecular hydrogen bonding. ^b Fraction of OH groups associated with the intramolecular hydrogen bonding. ^c The water content is 18% as described by (g H₂O/g PVA)x100%.

3. 結果および考察

表1には、本研究で用いた試料、S-PVA、A-PVA、I-PVAのmシークエンスの数分率 f_i およびこれらの結晶成分およびA-PVAの非晶成分に対するCH tripletのline I、II、IIIの積分分率 f_i^* をまとめて示す。同表には上述のモデルにより求めたline I、II、IIIの積分分率に対する計算値も示す。また、この計算に使用した p_a の値および同様な方法で計算した分子内水素結合に関与するOH基の分率 F_a も示す。I-PVAの場合を除いて計算値は観測値と良く一致する。S-PVAとA-PVAとの f_i の差はわずかに0.05に過ぎないが、結晶成分の p_a はS-PVAの方がA-PVAのそれに比べてはるかに小さい。このことは、あるしきい値より低い f_i をもつ試料の場合、分子間水素結合が優先的に形成されることを示すものと考えられる。これに対して、ほとんどアタクチックなPVA(A-PVA)では分子内および分子間水素結合の生成確率に大差はないと結論される。一方、I-PVAの場合計算値と観測値の一致はそれ程良くない。このことは、アイソタクティシティの高い試料では p_a がi-jペアの種類に依存する影響が強く現われるためと推定される。

含水させたA-PVAの結晶成分の場合、そのCH炭素IおよびIIの分率は乾燥試料の値より約0.05だけ増大する。上に述べた統計的計算に従えば、水の吸収によるこれらの値の変化は、 p_a の値を0.32から0.74に増大させることに相当する。したがって、少量の水が結晶領域に拡散することは確実であり、このことにより分子間水素結合がかなり切断され、その結果として新しい分子内水素結合が生成すると推定される。なお、乾燥状態では温度の上昇によっても p_a の値は増大した。

乾燥したA-PVAの非晶成分については、line I、IIおよびIIIの観測値は含水した場合のPVAの結晶成分のそれらとかなり近い。このことは非晶領域におけるPVA分子鎖の局所構造は水素結合を通じてみる限り、含水状態の結晶領域の局所構造とかなり類似していることを示す。すなわち、水が存在しなくても非晶領域ではその分子運動性がかなり高く、分子間水素結合が切断されて分子内水素結合が形成される確率がかなり高いと考えられる。

1) T. Terao et al., *Macromol.* **16**, 1535 ('86). 2) 桜田ら, 化研報告, **23**, 78 ('50). 3) S. Hu et al., *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, in press. 4) F. Horii et al., *Polym.*, in press.

固体高分解能¹³C NMRによる6個の共役三重結合をもつ長鎖
アルキンの固相重合過程の追跡

(化技研・織高研) ○早水紀久子・柳沢 勝・岡田修司・松田宏雄・
正木 篤・中西八郎

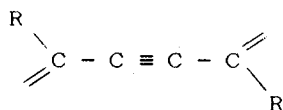
¹³CNMR Study on the Solid-State Polymerization Procedure for a Hexayne
with Long Alkyl Substituents

K. Hayamizu and M. Yanagisawa, National Chemical Laboratory for Industry
and

S. Okada, H. Matsuda, A. Masaki, and H. Nakanishi, Research Institute for
Polymers and Textiles

Polydiacetylenes (PDA) are usually synthesized from conjugated acetylenes, diacetylenes, triynes, tetraynes by the γ -ray irradiation. A hexayne with C₁₄ alkyl chains (15,17,19,21,23,25-tetracontanehexayne, 14-6A-14) is very reactive at room temperature and polymerized. The polymerization procedures have been detected by the solid-state high-resolution ¹³CNMR under the magic angle sample spinning. The polymerization proceeds with 1,4-addition scheme and three-step polymerization reactions were thoroughly monitored by the ¹³C spectra. The final product is a ladder-polymer where the main chain is allene or cumulene structures, which is a new class of polymer.

ポリジアセチレン(PDA)は骨格となる主鎖の構造は



であり、オレフィン炭素に種々の側鎖が結合したポリマーである。PDAは主鎖の π 電子構造について興味をもたれていると同時に、大きな3次の非線形光学特性を示すことから応用面においても着目されている。一般にPDAはジアセチレンの固相における γ 線照射等により合成され、単結晶のポリマーになる点でも特異な性質をもっている。我々は長鎖アルキルをもつトリイン、テトラインが1,4-位で固相重合しPDAを形成することを明らかにすると同時に、テトラインの重合物において

ポリジアセチレン・重合過程の追跡・固相常温反応・¹³C NMR・共役側鎖

○はやみず きくこ・やなぎさわ まさる・おかだ しゅうじ・まつだ ひろお・
まさき あつし・なかにし はちろう

は熱処理により側鎖のジイン部分がさらに付加重合を起こしてラダーポリマーを形

成することを明かにした^{1,2}。本報告ではC₁₄アルキル基が共役した6個のアセチレンに結合したヘキサイン(15,17,19,21,23,25-tetracontanehexayne, 14-6A-14)が2段階の重合によりラダーポリマーになった後で主鎖がアレン,クムレン結合に変化する過程をすべて固体高分解能¹³C NMRで追跡した。言い替えるとモノマーから最終生成物に至るまでMAS用のローターの中で起こった変化を逐次¹³C NMRスペクトルでモニターし、各段階での構造を確定した。またESRシグナルの強度の増大もモニターした。

【実験】

合成したモノマーの純度は溶液状態の¹³C NMRで確かめた。再結晶の直後は白色の結晶であるが、短時間のうちに緑色の部分が生じる。本研究においては、再結晶乾燥後、直ちに固体測定用のローターの中に充填し測定を開始した。固体高分解能¹³C NMRの測定はJEOL-GSX-200スペクトロメータをもちい、MASの回転速度はほぼ4.2kHzであった。測定は2週間連続して行い、その間サンプルはブロープで高速回転したままであった。初期は約30分毎にスペクトルを取得したが、パターンの変化が小さくなった時には、1時間毎、2時間毎、5時間毎といった割合で積算回数を増加していった。不飽和炭素のシグナルの線幅が徐々に広がったために積算回数を増やす必要もあった。スピニング・サイト・ハットの確認のためにTOSS法を組み込んだ。最後の段階ではローターの中で室温に放置したサンプルを約6カ月間繰り返し測定した。ESRにおいて不対電子密度の増大をモニターしたが、5mm中のNMR試料管を用い、測定しない時は室温放置であった。

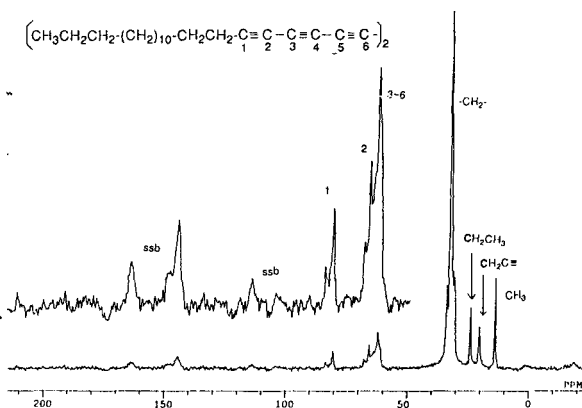


Fig. 1 モノマーの¹³C NMRスペクトル

【結果】

14-6A-14モノマーの固体状態の¹³C NMRスペクトルをFig.1に示す。溶液状態のスペクトルと比べるとピーク位置は低磁場側に移動している。固体状態のスペクトルは線幅が狭く帰属は容易である。アセチレン炭素のシグナルはシングレットにならず、結晶状態に多形があることを示唆している。

測定開始後22時間後に取得したスペクトルをFig.2に示す。トリイン及びテトラインの固相重合物であるPDA

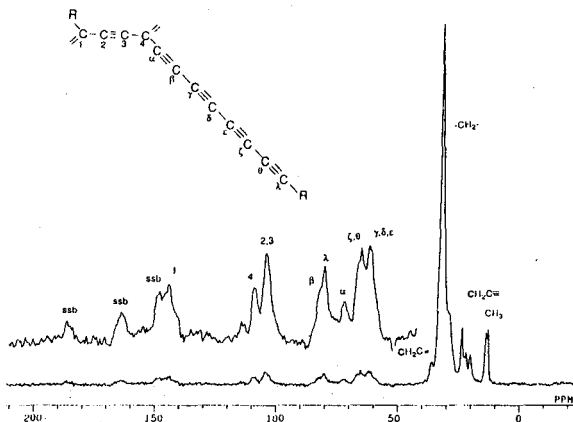


Fig. 2 polymer Iの¹³C NMRスペクトル

では主鎖の2個のオレフィン炭素の一方にはアルキル側鎖、他方はアセチレン炭素が直接に結合するために非等価になる。また主鎖の2個のアセチレン炭素は非等価ではあるが ^{13}C NMRのシフト差は小さいために、主鎖の炭素シグナルは3本測定されることは既に報告してある。Fig. 2においては図中に帰属が示してあるように、主鎖の炭素シグナル及び側鎖の8個のアセチレン炭素シグナルがみえる。アルキル側鎖の炭素シグナルを詳細に解析するとアセチレン炭素に結合したメチレン炭素とオレフィン炭素に結合したメチレン炭素に対応するシグナルの相対強度は等しく、またメチル炭素シグナルも等強度の2本に分裂し、異なったアルキル基が存在することがわかる。これは主鎖のオレフィン炭素に直接結合したアルキル基と、側鎖のアセチレン炭素に結合したアルキル基として帰属できる。モノマーに対応するシグナルはなく、第1段階の重合が終了していることがわかる。Fig. 2に至るまでに18枚のスペクトルを測定してあるが、測定開始後2時間半後にポリマーのシグナルがみえ始めてから、徐々にポリマーが増大する様子がスペクトル上に明らかに映し出されている。

重合反応は漸次継続するが、その時の構造の変化をFig. 3に示す。

56時間後の ^{13}C NMRスペクトルをFig. 4に示す。このスペクトルではFig. 2と比べると、主鎖のシグナル強度が増大し、

側鎖のアセチレン炭素シグナルが減少していることがわかる。また側鎖シグナルにおいてはアセチレン炭素に結合したメチレンシグナルは消滅し、高磁場側にメチレン鎖の新たなシグナルが出現していることが解る。Fig. 2でみられたようなメチルシグナルの分離はなくなり、シグナル位置からアセチレン炭素の結合したアルキル側鎖はなくなっている。このスペクトルから、側鎖のアセチレンの末端で1,4-位において重合がおきて、Fig. 3に示したポリマーIIが形成されていると考えられる。

このポリマーは対称性がよいので、Fig. 4に示されているような帰属で十分に説明できる。これらの固相反応が全て均一におこるとは仮定できず、詳細にみるとスペクトルには未反応物と次の反応生成物が混在している。Fig. 4においても、188, 165, 150, 132ppmを中心にブロードなシグナルが見えている。時間の経過とともにこれらのシグナル強度は増大し、同時にすべての不飽和炭素のシグナルはブロードにな

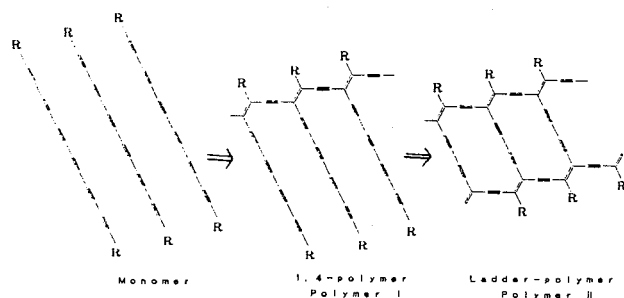


Fig. 3 14-6A-14 の重合の構造変化

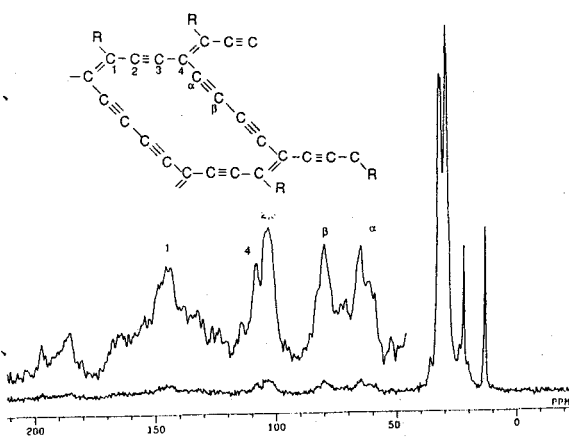


Fig. 4 polymer II の ^{13}C NMRスペクトル

っていく。一方側鎖のアルキル炭素シグナルにおいてピーク値と相対強度において各ポリマーに対応して顕著な変化がみられるが、線幅については一般にシャープで最終段階のポリマーであってもモノマーの高々2倍程度で変化は僅かである。

約6ヵ月室温ローター中で放置した試料のスペクトルをFig.5に示す。主鎖のアセチレン炭素4個、オレフィン炭素2個のシグナル領域(115-100ppm)ではシグナル強度は著しく減少し、低磁場側のシグナル強度が増加している。またラダーポリマーの橋部分の炭素シグナル(95-55ppm)は積分強度から約25%となり、ポリマーIIの33%と比べると幾分減少しているが、骨格構造は大きく変化していないことを示唆

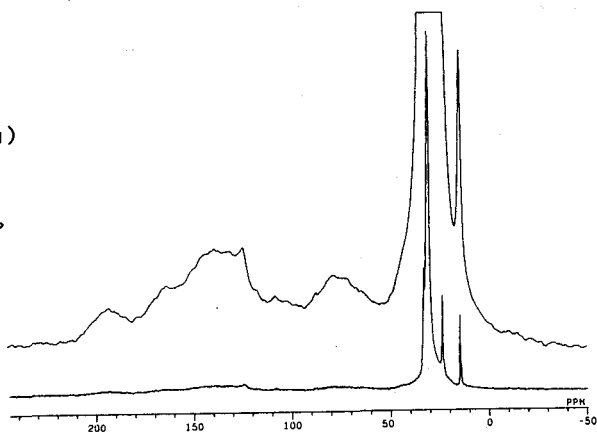


Fig.5 6ヵ月後のスペクトル

している。ESRシグナルの強度はFig.6で示すように1ヵ月間は明らかに増大を続けたが、その後の変化は小さく、他のPDAとの比較から、不対電子が¹³C化学シフト値に影響しないことがわかっている。このポリマーは明らかにC, Hのみから構成されるポリマーであり、¹³C NMRで190,160ppmのような低磁場にシグナルをしめす構造はアレン、クムレン構造だけである。

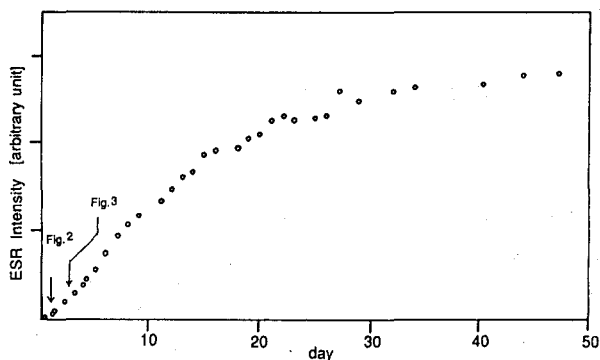


Fig.6 ESR強度の変化

長期にわたるスペクトル測定および定量性を考慮すると主鎖の部分は=C-C-C-C=Cから-C=C=C=C-に変化しているとして説明できる。なおモノマーのγ線照射をした試料でも常温において反応が進行して、途中の経過は必ずしも同じであるとはいえないが、最終反応物は¹³C NMRで全過程を追跡した試料とほぼ同じスペクトルを示している。本報告で示した最終ポリマーの構造が安定かどうかまた橋部分の構造がさらに変化するか否かについては、反応を加速するか(熱処理など)時間をかけるかいずれかの方法で確かめることを予定している。本研究では構造の変化を追跡することにより、最終生成物の構造決定を可能になったといえよう。

本研究で示したポリマーは非常に特異な構造をもつので、種々の機能をもつ可能性があり、それらの点に関しては現在検討中である。

1. Okada, S., Hayamizu, K., Matsuda, H., Masaki, A. and Nakanishi, H.

Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991, 64, 857.

2. Okada, S., Matsuda, H., Masaki, A., Nakanishi, H. and Hayamizu, K.

Chem. Lett. 1990, 2213.

傾斜磁場パルスの高分解能NMRへの応用

(島津製作所 応用技術部) ○大野 靖、大藪 又茂

Application of Magnetic Field Gradient Pulse to High Resolution NMR Spectroscopy

Yasushi Ohno, Matashige Oyabu

Analytical Applications Department, SHIMADZU CORPORATION

Recently magnetic field gradient pulses have been applied to high resolution NMR spectroscopy. (Gradient Enhanced Spectroscopy ; GES)

Magnetic field gradient methods, supported by hard ware technology such as actively shielding, have advantages of the elimination of the need for phase cycling, the reduction of t1 artifact in 2D-NMR and selective observation based on diffusional property.

Several applications, such as water suppression by the selection of coherence transfer pathway or stimulated echo, will be shown.

【序論】

高分解能NMRスペクトルの測定に使われているパルスシーケンスは高周波パルスを組み合わせてることによって構成されている。最近、これらの高周波パルスの列に傾斜磁場(グラジエント)パルスを加えた測定技術が注目されている。高分解能NMRへの傾斜磁場の応用は以前から提唱されていたが、傾斜磁場コイルの性能に帰因する渦電流(Eddy Current)などの問題から実用化されなかった。近年、医療用のMRI装置の急速な発展とともに、このような問題を解決する技術が開発された。すなわちアクティブシールド技術、プローブ内での非電導材料の使用により、渦電流の発生を極力抑えることが可能になり、傾斜磁場を高分解能NMRへ応用することが試みられつつある。

このような状況の中で我々はグラジエントシステムを使用する機会を得たので、その測定例を紹介し、その有用性について検討したい。

【測定】

測定には GE社製FT-NMR装置 Omega 400WBを使用した。グラジエントパルスは高分解能測定用に設計された Microstar S-35グラジエントシステムにより発生させた。また測定試料として軽水に溶解した

gradient, water-suppression, coherence, diffusion, stimulated echo

大野 靖(おおの やすし)、大藪 又茂(おおやぶ またしげ)

5 mMの卵白リゾチームなどを用いた。

【測定例と考察】

1. DRYCLEAN-STE

生体分子を試料とする測定はしばしば軽水中で行われる。巨大な水のシグナルを消去するために数多くのパルスシーケンスが考案されているが、P. Zijl¹⁾らはグラジエントパルスを使い、溶媒と溶質の拡散係数の差を利用した水消去法を提案した (diffusion-reduced water signals in spectroscopy of molecules moving slower than water; DRYCLEAN)。一般には最初のグラジエントによって、すべての横磁化の位相を分散させる (dephase)。次に大きさの等しい2番目のグラジエントによって、位相を再結像させる (rephase)が、この時2つのグラジエントの間にスピンの“位置”が変わっていると位相は元に戻らない。すなわ溶媒と溶質との拡散係数の違いによって試料の信号だけを検出することが可能になる。また水の信号が抑制される割合は、Fig. 1 でグラジエントを使った場合のエコーの強度をS、使わない場合の強度をS₀。とすると次式で表される。²⁾

$$S / S_0 = \exp \{ -\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta / 3) D \}$$

ここで、 γ は磁気回転比、Gはグラジエントの強度、 δ はグラジエントパルスの時間幅、 Δ は最初のグラジエントをかけてから次のグラジエントをかけるまでの時間Dは拡散係数である。

P. Zijlらはいくつかのパルスシーケンスを提案しているが、そのうち我々は stimulated echo (STE) を用いたパルスシーケンス (Fig. 1) を使って測定を行い Fig. 2 のスペクトルを得た。(データポイント数1 K, 積算回数32回)

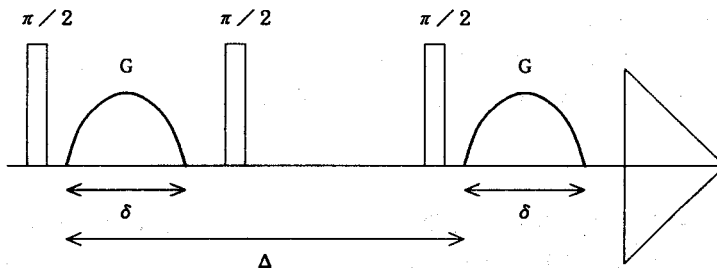


Fig. 1 DRYCLEAN-STE Pulse Sequence

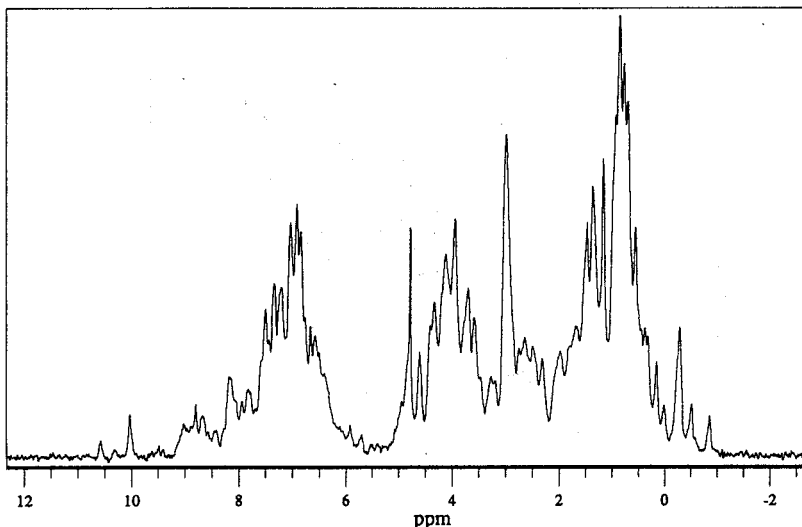


Fig. 2 Water-suppressed proton NMR spectra of 5mM lysozyme in H₂O

2. DQFCOSY

グラジエントパルスを組み込んだDQFCOSYのパルスシーケンス³⁾をFig. 3に、2次元スペクトルをFig. 4に示す。(測定データマトリックス2K×128, 積算回数256回、 ω_1 方向に2回ゼロフィリング)

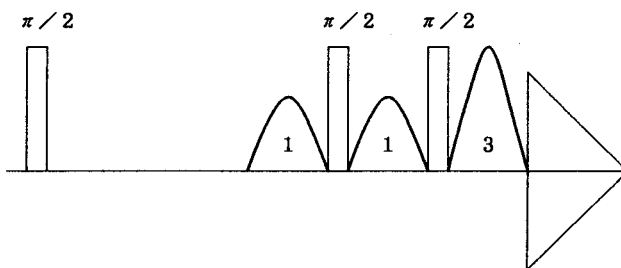


Fig. 3 2D-Gradient-Enhanced-DQFCOSY Pulse Sequence

Fig. 3 ではいわゆる位相回し (phase cycling)によるのと同じ効果をグラジエントパルスによって得ている。すなわち1つの2量子コヒーレンスの経路のシグナルのみが再結像されて検出され、2量子コヒーレンスを生成しない水のシグナルは検出されない。これを通常の位相回しで行うと、アンプの安定性、位相シフトの精度などハードウェア上の問題から水のシグナルが消え残ったり、t₁ノイズが生じることが多い。

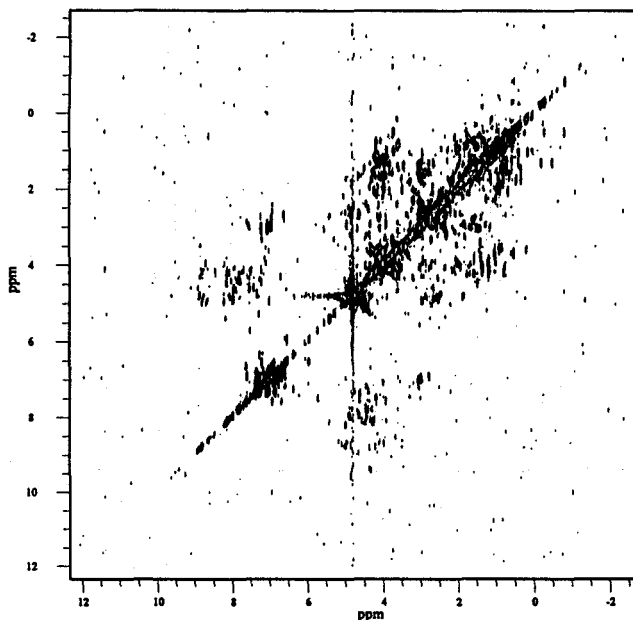


Fig. 4 DQFCOSY spectrum of lysozyme in H₂O

Fig. 4 では軽水のシグナルはほぼ消去されており、軽水シグナルの真近のピークの観測にはグラジエントパルスの利用が有効であることが示されている。

現時点ではグラジエントパルスの応用性は傾斜磁場コイルなどハードウェアの性能に依存する点が多いと言わざるを得ない。今後、グラジエントシステムが普及しその性能が向上すれば、応用範囲がさらに広がるものと期待している。

最後にグラジエントシステムでのロックやシム調整、測定パラメーターの設定などは従来の装置と同じように容易に行い得たことを付記しておく。

【文献】

- 1) P. C. M. van Zijl and C. T. W. Moonen J. Magn. Reson. 87, 18(1990)
- 2) E. O. Stejskal and J. E. Tanner J. Chem. Phys. 42, 288(1965)
- 3) R. E. Hurd J. Magn. Reson. 87, 422(1990)

【謝辞】

本発表について、討論や示唆をしていただき、測定に協力していただいたG E社のBoban K. John 博士に感謝します。

NMRによるリボヌクレアーゼHの構造解析

○山崎俊夫¹、好田真由美²、小田康司³、金谷茂則³、中村春木³、
猿渡茂⁴、永山国昭^{1,4} (1. 日本電子・生体研、2. 協和発酵工業・東京研、
3. 蛋白工学研、4. 新技術事業団)

Structure determination of ribonuclease H by NMR

Toshio Yamazaki¹, Mayumi Yoshida², Yasushi Oda³, Shigenori Kanaya³, Haruki Nakamura³,
Shigeru Endo⁴, Kuniaki Nagayama^{1,4} (1. Biometrology Lab, JEOL LTD., 2. Tokyo
Laboratories, Kyowahakko Kogyo, 3. Protein Engineering Reserch Institute, 4. ERATO)

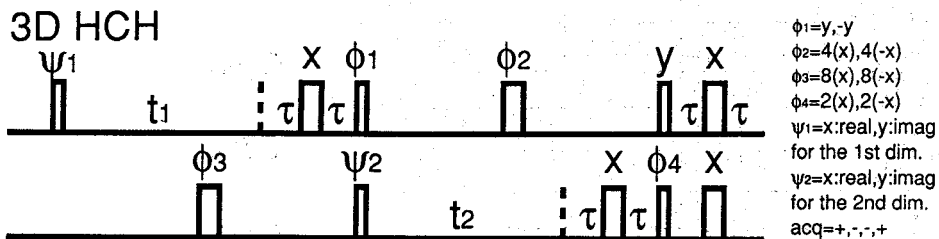
Ribonuclease H (from *E. coli*) is an enzyme to cleave RNA moiety of RNA-DNA hybrid duplex, and it consists of 155 amino acid residues. In order to determine the solution structure, we applied heteronuclear multiple dimension NMR techniques to stable isotope enriched protein samples. We have already reported the assignments of backbone nuclei (N, NH, C α , C β), assignments of methyl and aromatic sidechain nuclei. After that we have obtained secondary structure elements and global fold of the protein. Complete assignments of sidechain nuclei are required for higher resolution structures. The new techniques 3D HCH, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY gives powerfull and reliable information for assignments of sidechain of this size of protein.

リボヌクレアーゼH (*E. coli*) は 155 残基からなるタンパク質で、DNA-RNAハイブリッド2重螺旋のRNAを切る機能を持っている。

我々はこの酵素の立体構造を得るために、安定同位体でラベルして、多次元NMR (主に3次元NMR) を用いて研究を進めている¹⁾

前回までに、主鎖原子核(N, NH, CA, CAH)のNMRシグナルの帰属²⁾ 一部の側鎖(aromatic, methyl)原子核の帰属ができた。これらの間のNOEのシグナルからこの酵素の全体構造を得ている³⁾。しかし、 α ヘリックスの相対位置のトポロジーは定まったものの、まだかなりの自由度が残されている。NOEから得た距離の制約を満足する構造群は6Aものばらつきを持っている。

より精度の高い構造を得るためには、より多くの側鎖の帰属が必要である。我々は¹³Cで均一にラベルした酵素に対して、3D HCH、HCCH-COSY、HCCH-TOCSYの3次元NMRを適用した。これらの測定法は共有結合した¹³C間の約35HzのJカップリングを利用するため、¹Hだけの測定法に比べて高分子量のタンパク質に対して感度が良く、¹³Cの化学シフトで展開して多次元NMRにすることができて、シグナルの重なりを避けることができる。ほぼ全ての側鎖の帰属を得ようとしている。



安定同位体、リボヌクレアーゼH、多次元NMR、構造決定、タンパク質

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

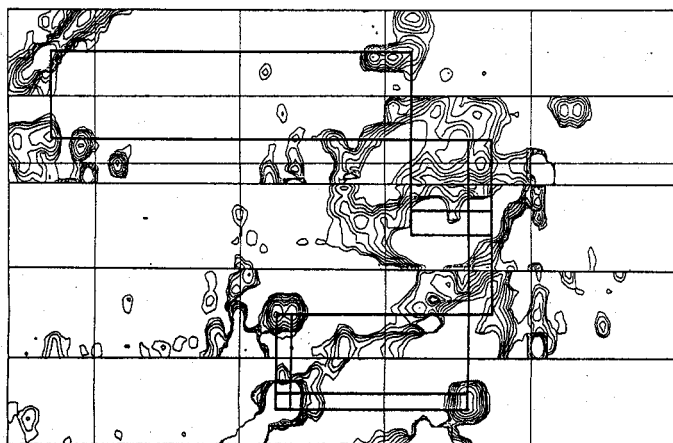
3D HCHはメチレン基の ^{13}C と2つの ^1H の共鳴周波数からなる3次元NMRである。2次元の $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ HMQCでも激しく重なってしまうメチレン基を分離するためのものである。

HCCH-COSYは隣合う ^{13}C についている ^1H を観測するものである。第3軸は2つの ^{13}C の1つの共鳴周波数になる。帰属のついていない $\text{C}\alpha\text{H}$ から $\text{C}\beta\text{H}$ へと帰属することができる。この先の帰属はシグナルの重なりのため一般的には難しい。

HCCH-TOCSYは ^{13}C のTOCSYを用いて隣合う ^{13}C へ順に磁化を移していく。 $\text{C}\alpha$ から側鎖の端までつながる。側鎖内の2つの ^1H とそれに共有結合している ^{13}C の1つの共鳴周波数からなる。側鎖内の位置(β , γ , δ)はHCCH-COSYの情報をもとに決める。

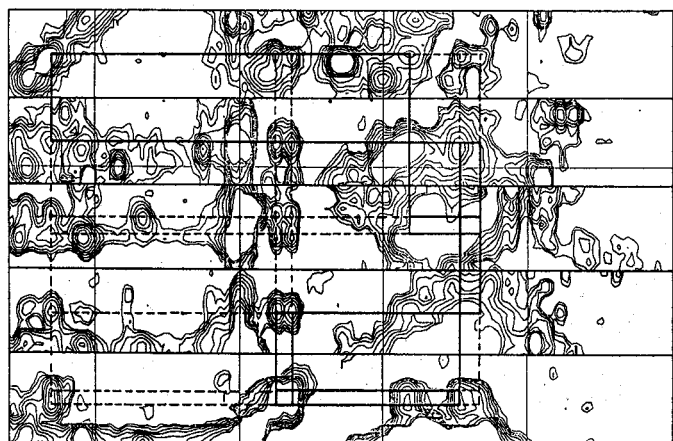
例として、今まで帰属がかなり難しかったリジン残基(Lys3)側鎖の帰属を上げる。

HCCH-COSY



HCCH-COSY, HCCH-TOCSYの3次元スペクトルからそれぞれのCHの化学シフトで切り出し、並べた。横軸は ^1H の化学シフト(4.6-0.0 ppm)。なお、NMRの測定はGSX400(JEOL)、構造の計算はMolskop, JML-S1000(JEOL)を用いている。

HCCH-TOCSY



$\text{C}\alpha\text{H}$
 $\text{C}\beta\text{H}_2$
 $\text{C}\gamma\text{H}_2$
 $\text{C}\delta\text{H}_2$
 $\text{C}\epsilon\text{H}_2$

- 1) K. Nagayama, T. Yamazaki, M. Yoshida, S. Kanaya, & H. Nakamura, *J. Biochem.* **108**, 149-152. (1990)
- 2) T. Yamazaki, M. Yoshida, S. Kanaya, H. Nakamura, & K. Nagayama, *Biochemistry* **30**, in press. (1991)
- 3) S. Endo, H. Wako, K. Nagayama, & N. Go. NATO ASI series "Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by NMR" (Ed. J. Hoch), in press, Plenum (1991).

安定同位体 NMR を用いた DNA 結合蛋白質の構造と相互作用の研究

(阪大・蛋白研) 白川昌宏、松尾浩、芹川康浩、児島長次郎、

○京極好正

(米国・スクリップス研) P. E. Wright

(蛋白工学研) 大久保忠恭

Stable Isotope Aided NMR Studies on the Structures of DNA Binding Proteins and Their Interaction with DNA

M. Shirakawa, H. Matsuo, Y. Serikawa, C. Kojima, Y. Kyogoku (Institute for Protein Research, Osaka University), P. E. Wright (Research Institute of Scripps Clinic, USA), T. Ohkubo (Protein Engineering Research Institute)

Solution structures of Cro protein from bacteriophage λ and the DNA binding domain of yeast GAL4, and their interaction with DNA fragments were studied by stable isotope aided NMR. Both Cro protein and the DNA binding domain of GAL4 were labeled with ^{15}N -enriched amino acids, or uniformly labeled with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. For the ^{13}C - ^{15}N double-labeling experiments, ^{13}C -amino acids were incorporated into the uniformly ^{15}N -labeled proteins. Efficient combination of series of $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ two-dimensional, and three-dimensional spectra enabled us to make almost total $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ assignments of the two proteins. Based on the assignments, secondary structure elements of the two proteins were identified, and the three-dimensional solution structures were calculated. Intersubunits interaction and interaction with DNA fragments were also studied.

【序論】DNAの塩基配列を認識し、結合して遺伝子の転写を調節する転写調節蛋白質のDNA結合ドメインにはそれらの一次構造の類似などからいくつかの構造モチーフが提唱されている。それらはヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフ、Znフィンガー・モチーフ、塩基性領域-ロイシンジッパー・モチーフ等である。今回我々は、異なる構造モチーフを持つと思われる2種の転写調節蛋白質、ヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフを持つλファージCro蛋白質と、いわゆるZnフィンガーモチーフの一種のCys-clusterモチーフを持つ酵母*Saccharomyces cerevisiae*のGAL4蛋白質のDNA結合ドメインの溶液中での立体構造とDNAとの相互作用を主に安定同位体を用いたNMRの手法を用いて研究した。 ^{15}N 核、 ^{13}C 核を利用した ^1H 2次元、3次元NMRにより、Cro蛋白質及び62残基から成るGAL4蛋白質のDNA結合ドメインのほぼすべての ^1H 核、 ^{15}N 核の帰属を終

安定同位体標識、DNA結合蛋白質、HMQC、SQC、3次元NMR

きょうごくよしまさ、しらかわまさひろ、まつおひろし、せりかわやすはる、こじまちょうじろう、ピーター・ライト、おおくぼただやす

了し、2次構造を同定した。Cro に関しては立体構造を計算した。

ラベルした部位の情報を選択的に抽出できるという点において特に安定同位体を用いたNMRの手法は、蛋白質-DNA複合体のような高分子同士の相互作用の研究には極めて強力である。 ^{15}N で標識した蛋白質と非標識のDNAとの複合体の $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ SQCスペクトルを詳細に検討することによって蛋白質のDNAと相互作用する部位や、DNAとの相互作用によって蛋白質に誘起される構造変化が観察できた。

【実験】 λ ファージCro蛋白質、GAL4蛋白質DNA結合ドメイン1-62アミノ酸残基、1-110アミノ酸残基は、それぞれ大腸菌を利用した大量産生系を構築して得た。結合するDNA断片は化学合成により調整した。NMR測定は、日本電子GX-500、GSX-500、Bruker AM500、AM600スペクトルメーターを使用した。 ^{15}N 標識は大腸菌を $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を含むM9最小培地で育成する事で得た。 ^{13}C 標識は同様に ^{13}C 標識グルコースをM9最小培地に加えた。ダブルラベルは大腸菌を $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ と ^{13}C を含むM9最小培地で育成する事で得た。

通常の ^1H 2次元NMRに加えて $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 2次元HMQC, HMQC-COSY, HMQC-NOESY, SQC, SQC-TOCSY, SQC-NOESY, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 3次元NOESY-HMQC, TOCSY-SQC, NOESY-SQC, に加えてL. Kayらによって考案された $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HMQC-Jスペクトルから主鎖 $^3J(\text{NH}-\alpha\text{H})$ を得た。

【結果と考察】

(1) Cro蛋白質の $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ シグナルの帰属¹⁾

Cro蛋白質の ^1H 核、 ^{15}N 核の帰属は昨年の本討論会で発表したようにアミノ酸特異的 ^{15}N 標識、 ^{15}N 均一、アミノ酸特異的 ^{13}C 標識した試料の2次元 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ SQCスペクトル測定、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 2次元NMR及び $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 3次元NMRスペクトル測定を行い連鎖帰属法を用いて行った。この過程でCro蛋白質は溶液中で3本のヘリックスと、3本の伸長鎖からなる β シートを持つ事が明らかになった(図1)。またC末端の6残基には明確な2次構造がなくかつpHに非常に敏感であることから溶媒に突出し、きちんとした構造をとっていない事が示唆された。SQCスペクトルを用いたH-D交換実験の結果は、NMR的に同定された2次構造にはほぼ対応したが、3番目のヘリックス($\alpha 3$ ヘリックス)に関しては交換の遅いアミド水素が少なく、溶媒に露出していると思われる。同定された2次構造は、2番目のヘリックスの始まりを除いて他はX線結晶構造解析の結果とよく一致した。

(2) Cro蛋白質の溶液中での立体構造

得られた帰属をもとに2次元NOESY、 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 3次元NOESY-HMQCスペクトルから得た距離情報と $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HMQC-Jスペクトルから得た主鎖 $^3J(\text{NH}-\alpha\text{H})$ による角度情報などをもとにDADAS90プログラムにより3次元構造を計算した。計算はCro 2量体のうち2量体形成に関与しない53残基に関して340の近・中距離NOE、40の遠距離NOE、26の角度情報を計

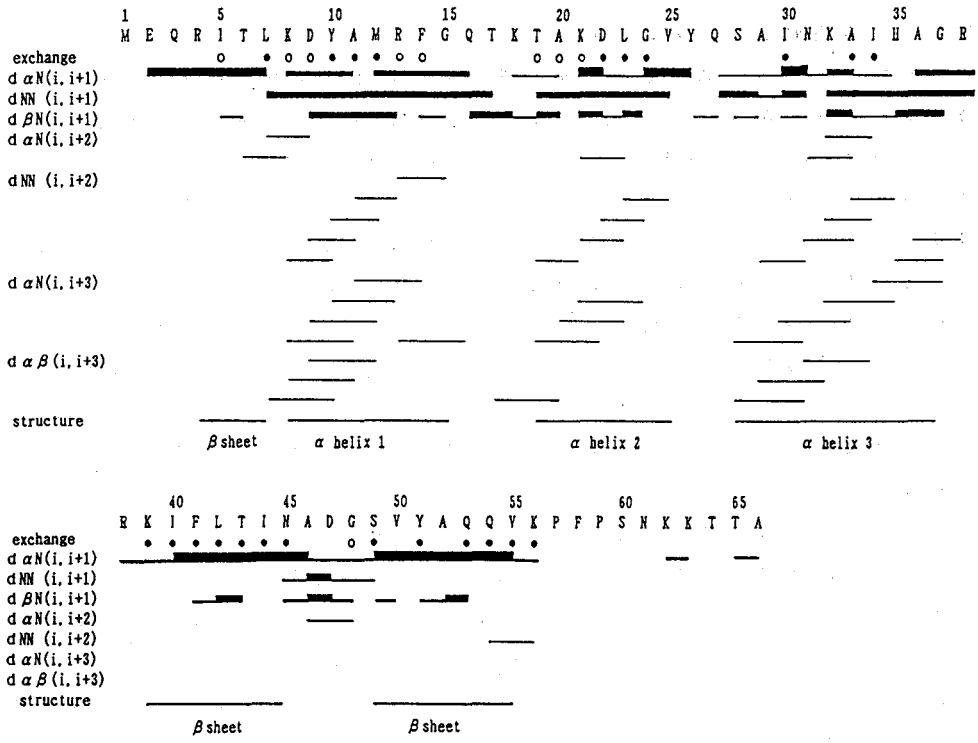


図 1. λ -Cro 蛋白質の連鎖帰属と 2 次構造要素
 ● 印 : H-D 交換速度が 1 時間以上のもの

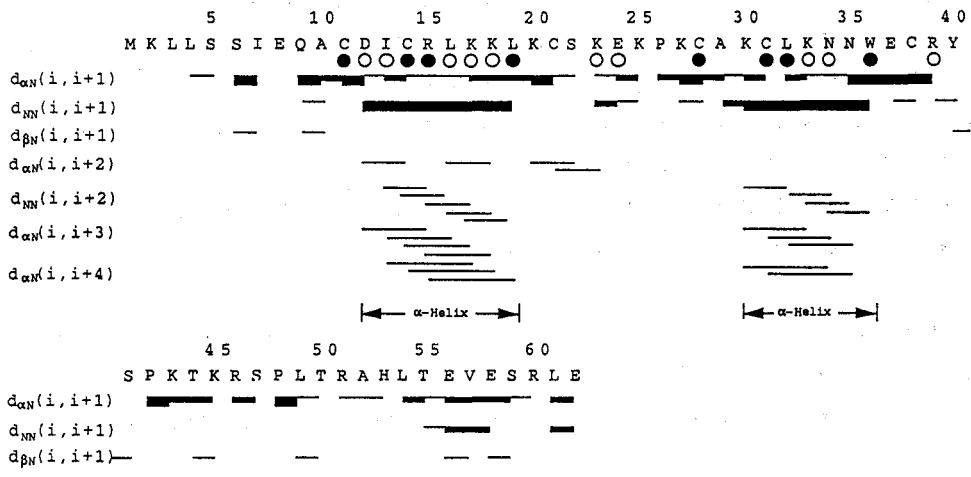


図 2. 酵母 GAL4 の DNA 結合ドメイン 62 残基の連鎖帰属と 2 次構造要素
 ● 印 : H-D 交換速度が 1.5 時間以上のもの

算に用いた。

(3) C r o 蛋白質と D N A の相互作用

^{15}N 核でラベルされた C r o 蛋白質に加える D N A の量を変化させ $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ H M Q C スペクトル測定を行った。C r o 蛋白質が特異的に結合する塩基配列をもつ λ ファージ O_R3 (17塩基対)を加えた場合、認識ヘリックスといわれる $\alpha 3$ ヘリックスはもとより D N A と直接接しない β シート部分の残基にも化学シフトに大きな変化がみられた。2量体の接触部位を含む広範囲に変化が観察されることから C r o 蛋白質2量体に構造変化が誘起される事が示唆された。

(4) G A L 4 蛋白質 D N A 結合ドメインの $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ シグナルの帰属²⁾

G A L 4 蛋白質 D N A 結合ドメインの ^1H 核、 ^{15}N 核の帰属は基本的には C r o 蛋白質について用いた方法に従った。すなわち、アミノ酸特異的 ^{15}N 標識、 ^{15}N 均一、アミノ酸特異的 ^{13}C 標識した試料の2次元 $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ S Q C スペクトル測定、 $^1\text{H} - ^1\text{H}$ 2次元 N M R 及び $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ 3次元 N M R スペクトル測定を行い連鎖帰属法を用いて行った。側鎖の帰属は主に $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ 3次元 T O C S Y - S Q C により得た。これらによりほぼすべての ^1H 核、 ^{15}N 核の帰属を得た。

近、遠距離 N O E の結果を図2に示す。S Q C スペクトルを用いた H - D 交換実験の結果と共に、C y s クラスタ領域に2つの α ヘリックス(12-20、30-36)がある事が判った。アミノ末端の8残基、及びカルボキシル末端側の10数残基は比較的柔らかい構造をしているように思われる。現在、得られた帰属を基にこの G A L 4 (62) の溶液中での立体構造を計算中である。

(5) G A L 4 蛋白質 D N A 結合ドメインと D N A との相互作用

特異的 D N A 結合能をもつ 110残基からなる G A L 4 (110) と D N A との相互作用を p h o t o - C I D N P 法を用いて研究した。G A L 4 (110) 単独では、T y r 40 と H i s 53 の側鎖芳香環は溶媒に露出していないが、T r p 36 の側鎖は溶媒に露出している。特異的結合部位である U A S。17塩基対 D N A と複合体を形成すると、この T r p 36 はもはや溶媒に露出しない。これらの結果は T r p 36 の側鎖が D N A によって覆われていることを示す。T r p 36 は2番目のヘリックスの末端に位置し、また Corton と Johnston³⁾によって変異体を用いた解析で D N A 特異性を決定するとされている領域の近傍である。このヘリックスと D N A との相互作用が強く示唆される。

1) H. Matsuo et al., J. Biomolecular NMR, 1, 191-204 (1991)

2) M. Shirakawa et al., Biochemistry, submitted.

3) C. J. Corton and S. A. Johnston, Nature, 340, 724-727 (1989)

固体¹⁵N NMRによる絹フィブロインの構造解析

(農工大・工、フロリダ州立大)⁰朝倉哲郎、出村誠、L.K.Nicholson, T.A.Cross

Structural Analysis of Silk Fibroin by Solid State ¹⁵N NMR; Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, T.Asakura and M.Demura, and Department of Chemistry, Florida State University, L.K.Nicholson and T.A.Cross

Abstract; Solid state ¹⁵N NMR techniques are applied to elucidate atomic resolution details of the Silk II conformation of silk fibroin from *Bombyx mori*. Biosynthetic labeling is employed to separately incorporate ¹⁵N-Gly and ¹⁵N-Tyr into natural silk fibroin. An analytical approach is developed in which distinct features of the ¹⁵N chemical shift spectra obtained from oriented fibers placed parallel and perpendicular the applied magnetic field are used to restrict the number of possible orientations of an individual peptide plane, and ¹⁵N-¹H dipolar splittings are used to further narrow the number of possible orientations. Full spectral simulations are performed to refine the allowed regions, yielding high resolution structural information.

緒言

配向試料の固体NMR化学シフト異方性や双極子相互作用は、原子レベルでの構造ならびに、ダイナミックスの解析に用いることができる。我々は、これを、絹の構造解析に用いた。

1955年, MarshとPauling¹によって、X線回折にもとづく、家蚕絹 (Silk II型) の構造が提案された。しかしながら、このモデルは6個の回折斑点の強度にもとづいており、数が少ない上に、R因子は、37%で、計算と実測値との一致は不十分であった。それにもかかわらず、今日まで、このモデルは、絹の構造として広く受け入れられてきた。絹構造 (Silk II型) が、逆平行β構造であるという結論は、我々の一連の¹³C CP/MAS NMRの研究からも支持されるが^{2, 3}、原子レベルでの構造の詳細は、さらに検討する必要がある^{4, 5}。

本研究では、固体¹⁵N NMRと絹繊維の¹⁵Nラベリングによって、Silk II型構造を検討したので、報告する。この手法は、絹に限らず、高分子や繊維の構造解析の手法として有用である。

実験

試料: 5齢期家蚕 (*Bombyx mori*) に、¹⁵N-Glyまたは、¹⁵N-Tyrを投与し、2種類の¹⁵Nラベル繭を得た⁶。注意深く精練後、自作の装置を用いて、絹繊維の配向試料を作製した。また、Boc-[1-¹³C]Ala-¹⁵N-Gly-OMeは、[1-¹³C]Alaと¹⁵N-Glyから液相法により合成した。

NMR測定: ¹⁵N CP NMRの測定は、Chemagnetics CMX 400MHz NMRスペクトロメーターを用い、室温にて、約 10000 (配向試料の繊維軸が静磁場に平行の場合) から、約20000 (同軸が垂直の場合) 回の積算を行なった。

結果と議論

1. ¹⁵N 化学シフト異方性

図1に¹⁵N Glyラベル絹フィブロイン配向試料の¹⁵Nスペクトル、磁場に平行、磁場に垂直、ならびにパウダーパターン、を示した。磁場に平行、垂直スペクトルともに、30%含まれるパウダーパターンを引いてある。パウダーパターンから、シミュレーションによって、¹⁵N Glyサイトの化学シフトテンソル、($\sigma_{11} = 22$,

キーワード/家蚕絹フィブロインのSilk II型構造/¹⁵N化学シフト異方性/¹⁵N-¹H双極子相互作用

あさくらてつお、でむらまこと、L, K, ニコルソン、T, A, クロス

$\sigma_{22} = 48$, $\sigma_{33} = 183$ ppm 基準は、 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$) を決定し、次に、磁場に平行と垂直のスペクトルをシミュレーションすることによって、化学シフト主軸系を繊維軸系に変換する際のオイラー角、 α_F , β_F の値を決定した^{7,8}。特に、図1の垂直スペクトルが、非対称であり、高磁場方向に山をもつ理由は、繊維軸の分布によって説明できた。図2に示したように、8個のオイラー角の組み合わせと、繊維軸の分布 (10°) が、決定された。

2. ^{15}N - ^1H 双極子相互作用

図3に ^{15}N Gly 絹フィブロイン配向試料を磁場に平行に置いた場合の ^{15}N - ^1H 双極子分裂を示した。NH結合と磁場方向 (繊維軸方向) の角度 θ_{NH} は、 ^{15}N - ^1H 双極子分裂の観測値、 10.2 ± 0.5 kHz を用いて、 $\theta_{\text{NH}} = 37.3, 142.7, 79.5, 100.5^\circ$ と決定された⁸。

その他、化学シフト主軸系を分子座標系へ変換する際のオイラー角 α_D , β_D 値は、ダブルラベル試料 Boc-[1- ^{13}C]Ala- ^{15}N -Gly-OMe の ^{15}N パウダーパターンスペクトルから、各々、 $0^\circ, 97^\circ$ と決定された⁹。 ^{15}N Tyr ラベル絹フィブロインの場合も、同様の一連の解析を行なった。

これらの構造情報を組み合わせて、総合的に、絹 (Silk II 型) の構造を検討した。

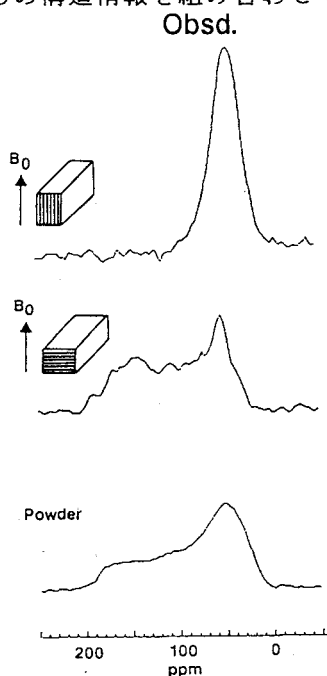


Fig.1 ^{15}N CP NMR spectra of ^{15}N Gly-silk fibroin.

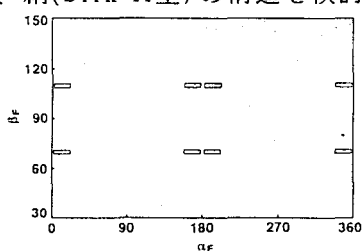


Fig.2 Best fit Euler angles, α_F , β_F plots determined from error analysis for the observed and calculated NMR spectra of the oriented ^{15}N Gly-silk fibroin. Distribution of the fiber axis was assumed as 10%.

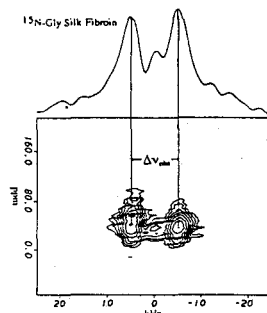


Fig.3 ^{15}N - ^1H dipolar spectra obtained from samples placed with the fiber axis parallel to the applied magnetic field.

参考文献

- 1 R. E. Marsh, R. B. Corey and L. Pauling, *Biochem. Biophys. Acta.*, **16**, 1 (1955)
- 2 H. Saito, R. Tabeta, T. Asakura, T. Iwanaga, A. Shoji, T. Ozaki and I. Ando, *Macromolecules*, **17**, 1405 (1984)
- 3 T. Asakura, A. Kuzuhara, R. Tabeta and H. Saito, *Macromolecules*, **18**, 1841 (1985)
- 4 Y. Takahashi, N. Shimokata and K. Kurenai, *Polymer Preprints, Jpn.*, **38**, 3278 (1989)
- 5 T. Fujiwara, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku and K. Kataoka, *J. Mol. Biol.*, **187**, 137 (1986)
- 6 T. Asakura, H. Yoshimizu and F. Yoshizawa, *Macromolecules*, **21**, 2038 (1988)
- 7 L. K. Nicholson, Q. Teng and T. A. Cross, *J. Mol. Biol.*, **218**, 621 (1991)
- 8 Q. Teng, L. K. Nicholson and T. A. Cross, *J. Mol. Biol.*, **218**, 607 (1991)
- 9 Q. Teng and T. A. Cross, *J. Magn. Reson.*, **85**, 439 (1989)

タンパク質の状態相関二次元NMR

(京大理、姫路工大理、日本電子) ○ 赤坂一之、木村雅晴、内藤 晶、今成 司

STATE-CORRELATED 2D NMR SPECTROSCOPY IN PROTEINS

K. Akasaka, M. Kimura, A. Naito, and M. Imanari
Faculty of Science, Kyoto University; Faculty of Science, Himeji
Institute of Technology; Application Laboratory, JEOL, Ltd.

Introduction: So far, a correlation NMR spectrum between two conformers of a molecule has been measured in a system in which two conformers coexist in equilibrium, as in 2D exchange spectroscopy. Such a method can be applied, i.e., only to a slow exchange case satisfying the condition $T_2 < t \leq T_1$. The State-Correlated 2D NMR spectroscopy associated with a temperature-jump introduced by us (J. Magn. Reson. 87, 429-432(1990)) is not hampered by the same limitation and can also be applied to fast-exchanging systems. Moreover, the resulting correlation spectrum can be intrinsically simpler, as the direction of magnetization transfer is only one way.

Method: The temperature-jump technique currently utilizes a pulsed magnetron of 2.45 GHz at a power of 1.3 kilo watts (See L5). By this technique, under favorable cases, we could attain a T-jump up of a protein aqueous solution of 10 C within 100 -300 ms, enabling conformational transition from a folded form to an unfolded form within spin-lattice relaxation times (Fig. 1). Utilizing this rapid temperature-jump technique along with the 2D exchange rf pulse sequence, we performed a first successful experiment of spectral correlation between the folded and unfolded conformations of a protein in an aqueous environment using the pulse sequence shown in Fig. 2 (J. Am. Chem. Soc. 113, 4688-9, 1991). In the present paper, a more detailed study is reported on ribonuclease A.

キーワード (タンパク質、リボヌクレアーゼA、温度ジャンプ、状態相関二次元NMR)

あかさかかずゆき、きむらまさはる、ないとうあきら、いまなりまもる

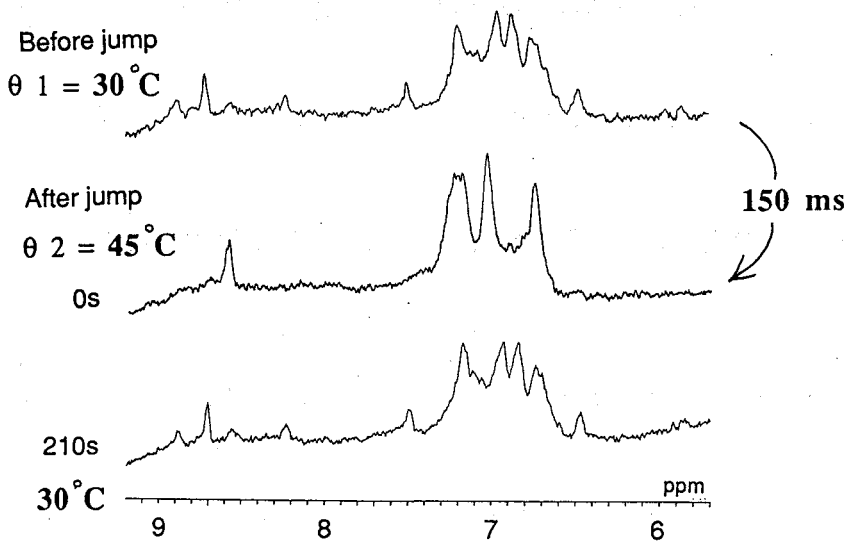


Fig. 1. A microwave-induced NMR spectral change of ribonuclease A (the aromatic region) (from 30°C to about 45°C), followed by slow cooling of the sample temperature by a gas flow.

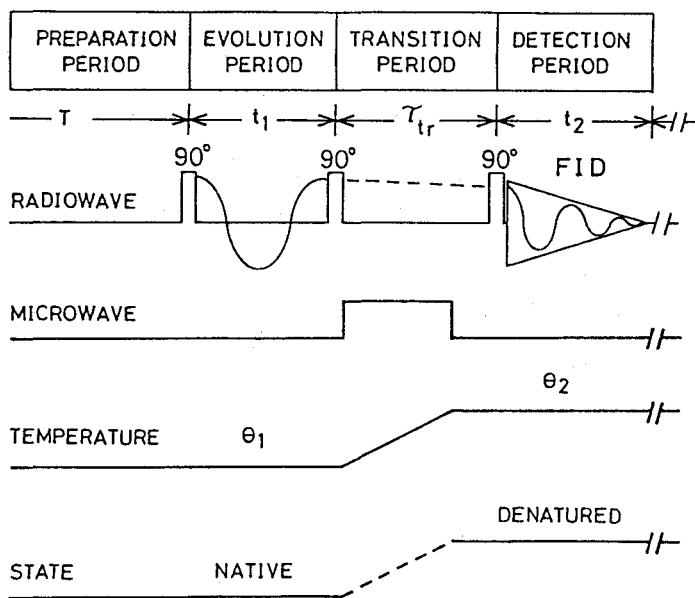


Fig. 2. A combined radiofrequency wave and microwave pulse sequence for measuring state-correlated 2D NMR spectrum of proteins in solution.

Results: Figure 3 shows a high resolution proton correlation spectrum in the aromatic region of ribonuclease A between the folded conformer (30°C) and unfolded conformer (immediately after the jump to about 45°C), the jump taking place within 150 ms. Since many peaks in the folded (N) form of ribonuclease A have already been assigned specifically by various techniques (Lenstra et al., Eur. J. Biochem. 98, 385-397, 1979), peaks in the unfolded (D) form can also be assigned specifically using cross peaks of Fig. 3, as shown by connected lines.

Discussion: First of all, it is surprising to find that in the unfolded form of ribonuclease A there are considerable dispersions of chemical shifts among the same kinds of protons of the same kinds of amino acids. This suggests strongly that the structure of the unfolded form (the heat-denatured form) of ribonuclease A is not totally random. Furthermore, specific assignments in the unfolded conformer made possible by use of the present technique will be useful for further studies of the structure of the denatured conformer using NMR spectroscopy.

Although the technique presented here has a great potential for use in structural studies of unfolded forms of proteins in solution, the current status of the technique still suffers from a certain number of difficulties in applying to a wide variety of protein systems. Among them, signal-to-noise ratio has to be improved. One limitation to S/N comes from the loss of transferred magnetization during a finite length of the transition period (the T-jump period) due to spin-lattice relaxation. To shorten the transition time, we are working along two lines; First, we have investigated solution conditions giving good efficiency of microwave heating, which will be reported separately (See P14). Secondly, the probe must be optimized for an efficient T-jump of aqueous systems and a good sensitivity. We will discuss the current status of the probe improvement.

Folded

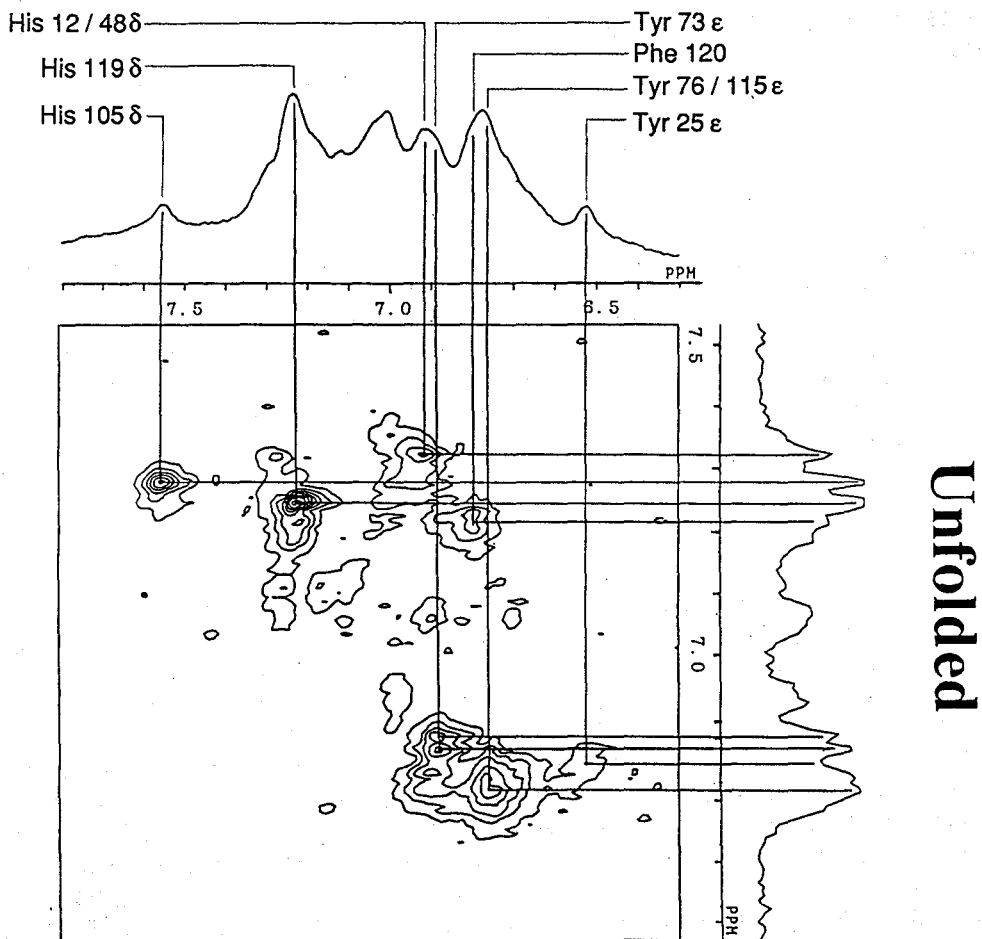


Fig. 3. A correlation spectrum between the folded (N) and unfolded (D) conformations of ribonuclease A obtained by using the pulse sequence of Fig. 2.

特別講演 2

特 2

Heteronuclear half-filters for studies of complexes with biological macromolecules

Kurt Wüthrich
Institut für Molekularbiologie und Biophysik
ETH Hönggerberg, CH-8093 Zürich, Switzerland

In complexes with proteins and peptides, different components can be combined that have previously been independently labelled with ^{13}C or ^{15}N . In the complexes formed, the labelled components can be investigated with minimal interference from the unlabelled components through the use of heteronuclear half-filters in homonuclear ^1H NMR experiments (1,2). In particular, in [^1H , ^1H]-NOESY experiments recorded with $X(\omega_1, \omega_2)$ -double-half-filters (3), separate subspectra contain, respectively, exclusively intramolecular NOEs between different protons of the labelled component, intramolecular NOEs of the unlabelled component, or intermolecular NOEs from the labelled to the unlabelled molecule. Practical applications will be illustrated with an *Antennapedia* homeodomain-DNA complex, and with the complex formed between cyclosporin A and its cellular receptor cyclophilin.

References:

1. G. Otting, H. Senn, G. Wagner and K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **70**, 500- 505 (1986). Editing of 2D ^1H NMR Spectra Using X Half-Filters. Combined Use with Residue-Selective ^{15}N Labeling of Proteins.
2. G. Otting and K. Wüthrich, *Quart. Rev. Biophys.* **23**, 39-96 (1990). Heteronuclear Filters in Two-Dimensional [^1H , ^1H]-NMR Spectroscopy: Combined Use with Isotope Labelling for Studies of Macromolecular Conformation and Intermolecular Interactions.
3. G. Otting and K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **85**, 586-594 (1989). Extended Heteronuclear Editing of 2D ^1H NMR Spectra of Isotope-Labeled Proteins, Using the $X(\omega_1, \omega_2)$ Double Half Filter.

第 3 日 目

11月20日 (水)

L 20 ~ L 29

L20

Decoupling of carbonyl carbons in multi-dimensional NMR and some new multi-dimensional NMR experiments.

Luciano Mueller

Michael G. Wittekind, William J. Metzler, Mark S. Friedrichs,
Mark A. McCoy

Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute,
P.O. Box 4000

Princeton, New Jersey 08543-4000

and

B.T. Farmer II

NMR Instruments, Varian Associates, 3120 Hansen Way,
Palo Alto, California 94304

We explored the use of various shaped pulses to achieve selective carbonyl decoupling. Furthermore, we developed a compensation scheme which minimizes possible artifacts caused by some complex crafted pulses such as the hyperbolic secant pulse. Our search for coherent decoupling schemes resulted in novel decoupling patterns which permit homo-nuclear selective broadband decoupling, e.g. complete decoupling of carbonyl carbons from the rest of a spin system without affecting coherences of nearby resonances i.e. of aromatic carbons.

Novel sequences for measuring $J_{\text{nh},\text{C}\alpha\text{H}}$ -coupling constants will be discussed some of which utilize shaped pulses. Applications of ^{15}N -correlated three dimensional TOCSY-NOESY experiments will be discussed and an improved version of the HNCA-sequence (Ad Bax & co-workers) will be presented.

オーバーハウザー効果によるリン脂質ミセルの立体構造

理化学研究所 鶴澤 洵、柴田俊之、浦本昌和
茨城大学 林 浩平
日本電子データム 坪野浩二、清水章三

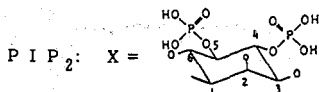
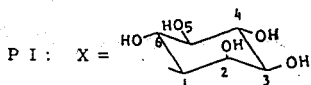
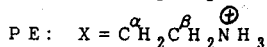
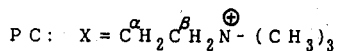
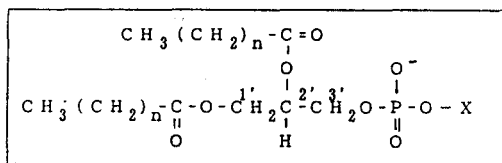
Analysis of the structure of phospholipid micelle by nuclear Overhauser effect.

(Inst.Phys.Chem.Res.) J.Uzawa, T.Shibata, M.Uramoto
(Ibaragi Univ.) K.Hayashi
(JEOL Datum LTD.) K.Tsubono, S.Shimizu

NMR analyses of micelle structure of phospholipids, phosphatidylinositol(PI) etc., were carried out in the mixed solvent of deuterated chloroform and deuterated methanol with phosphatidylcholine(PC). It was possible that the size of a micelle was controlled by adding a small amount of water to the solvent system. Overhauser effects in the mixed micelle were observed between the methyl groups of PC and not only alpha- and beta-H of PC but 2-H of PI by ROE and NOE experiments. In the heteronuclear NOESY experiments of mixed micelle of DLPC and DLPE, the cross peaks were observed between phosphorus of phosphate and not only adjacent methylene protons but methyl protons of choline. In heteronuclear difference NOE experiments, NOE was observed between amine protons and phosphorus in the mixed micelle of PC and PE.

1. 序論

リン脂質で構成される生体膜の構造研究をNMRを使って行う場合、軽水または重水中でのラメラを固体高分解能装置を使う方法やベシクルを作って高分解能装置を使う方法がある。一方、有機溶媒中でミセルを作らせて高分解能装置を使う方法はベシクルで行う方法に比べ、生体モデルから遠ざかる欠点はあるものの、分解能の良いスペクトルが得られ極性基近傍の構造を細かく解析できる長所を持っている。すでに演者らは卵黄より抽出したegg phosphatidylcholine (egg PC)、dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)、dipalmitoyl phosphatidylethanolamine



イノシトールリン脂質、混合ミセル、NOE、ROE、ヘテロNOE、スピン拡散

うざわじゅん、しばたとしゆき、うらもとまさかず、はやしこうへい、つぼのこうじ、しみずしょうぞう

2. 試料と実験装置

DPPC、DLPC、DLPE、PIはシグマ社より購入し、そのまま使用した。PIP2は牛脳よりHendrickson-Ballouの方法³⁾により抽出し、カルシウム(Ca)塩とアンモニウム(NH₄)塩として使用した。NMR装置は日本電子製GX-400とEX-270を使用し、5mmφチューナブルプローブを³¹P中心に改造して使用した。

3. 結果と考察

(1) 各種リン脂質の有機溶媒への溶存状態

egg PCやDPPC、DLPCなどはクロロフォルムやベンゼン中で比較的小さなミセルを作っていることが知られている。しかしPIP2などイノシトールリン脂質は有機溶媒に少し溶けるものもあるが溶解度が悪かったり、大きなミセルを作るため、きれいなスペクトルを得ることが難しい。ここでは演者らが試みたPCなどと混合させて混合溶媒に溶解させる方法について述べる。

① PIの場合

単独では重メタノールに少し溶ける。PCと混合させると重クロロフォルムによく溶け、混合ミセルを作る。高分解能NMRのスペクトル解析に十分使える。

② PIP2 アンモニウム塩の場合

単独では重メタノールに少し溶ける。単独ではクロロフォルムに溶けないが、PCと混ぜるこ混合ミセルを作ってからかなり溶ける。egg PCの方がDPPCやDLPCよりよく溶かす。クロロフォルムと重メタノールの混合溶媒には単独ではやはり溶けない。混合溶媒中ではPCと小さい混合ミセルを形成する。¹H-NMRではイノシトール部分やグリセロール部分のシグナルがPC部分のシグナルと重なるため、解析が難しい。

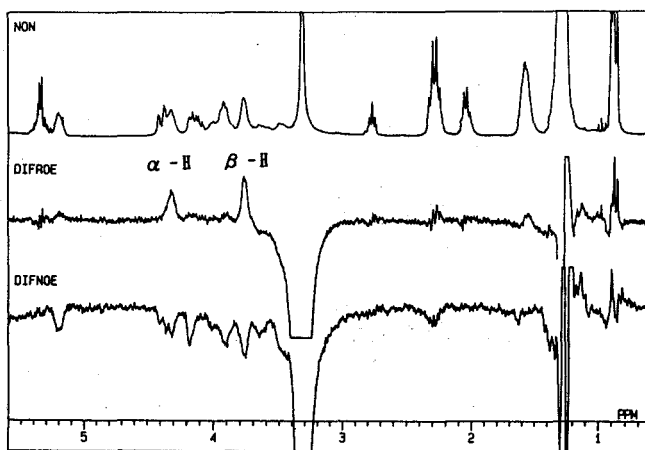
③ PIP2 カルシウム塩の場合

単独で有機溶媒に溶けるが、³¹Pのシグナルは表れず、¹Hでもアルキル基部分ははっきりと出てくるもののグリセロール部分からイノシトール部分は広幅化してしまうのでNMRによる研究は困難である。

有機溶媒中のミセルに水を少量入れるとミセルの中心部分に入り、親水基部分の運動を早める効果がある。しかし、ものによってはミセルが大きくなりうまくいかないこともある。これをメタノールとの混合溶媒にするとミセルの大きさを調節することも可能である。

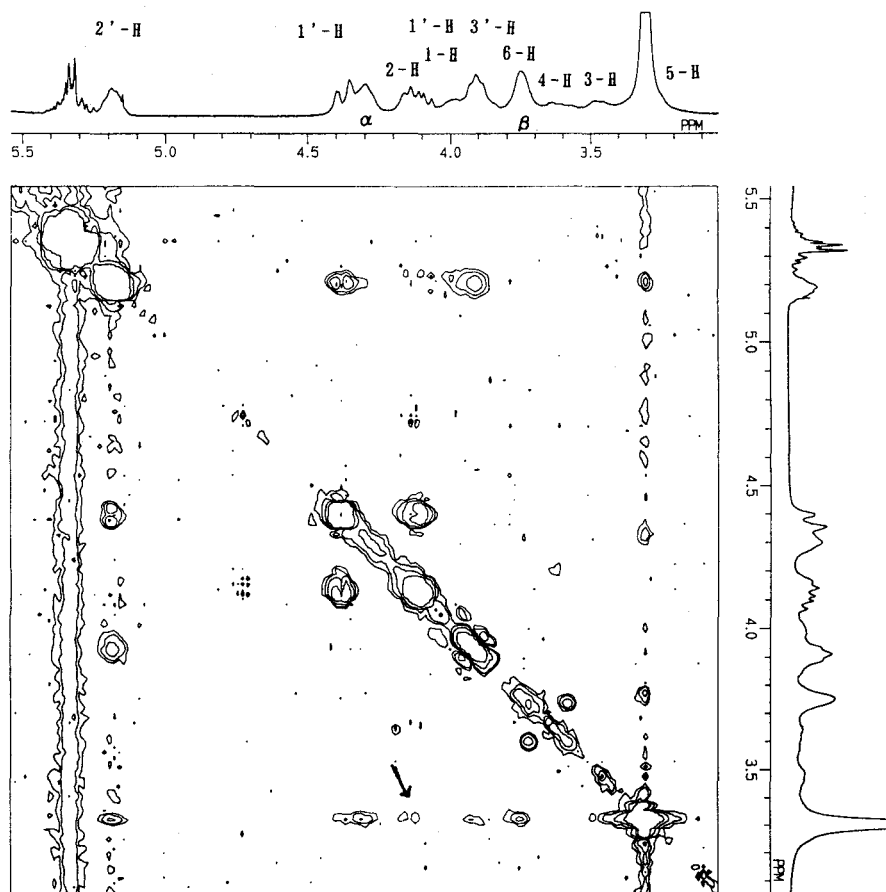
(2) NOEとスピン拡散

イノシトールリン脂質とPCの混合ミセル状態における構造研究を行うため一次元差NOEとROE、二次元のNOESYおよびROESY実験を行った。PIP2の場合はPCのグリセロール部分のシグナルとイノシトール部分のシグナルの重なりが多く溶解度も良くない。PIとPCを混合してクロロフォルムに溶解し、差NOEと差ROEによりPCのコリンメチルを照射した結果を第1図に示す。アルキル基部分を除きPC部ばかりでなくPI部分のシグナルが照射シグナルと同方向に出る。



第1図 PIとDLPCの重クロロフォルム中における差NOEと差ROEスペクトル。ミキシングタイムは50ms。EX270。

ROEでは α Hと β Hに大きなピークが見られる。この試料に水を少し加えてNOEをとるとROEと同様のスペクトルが得られる。グリセロールの1'Hを照射してもほぼ同様である。これらの結果を検討して見るとマイナスのNOEというよりもスピン拡散と考えられかなり硬いミセルを作っているものと考えられる。この試料でROESYを行った結果を第2図に示す。コリンメチルとPIのリン酸基の隣にある2-Hへのクロスピークが見られた。

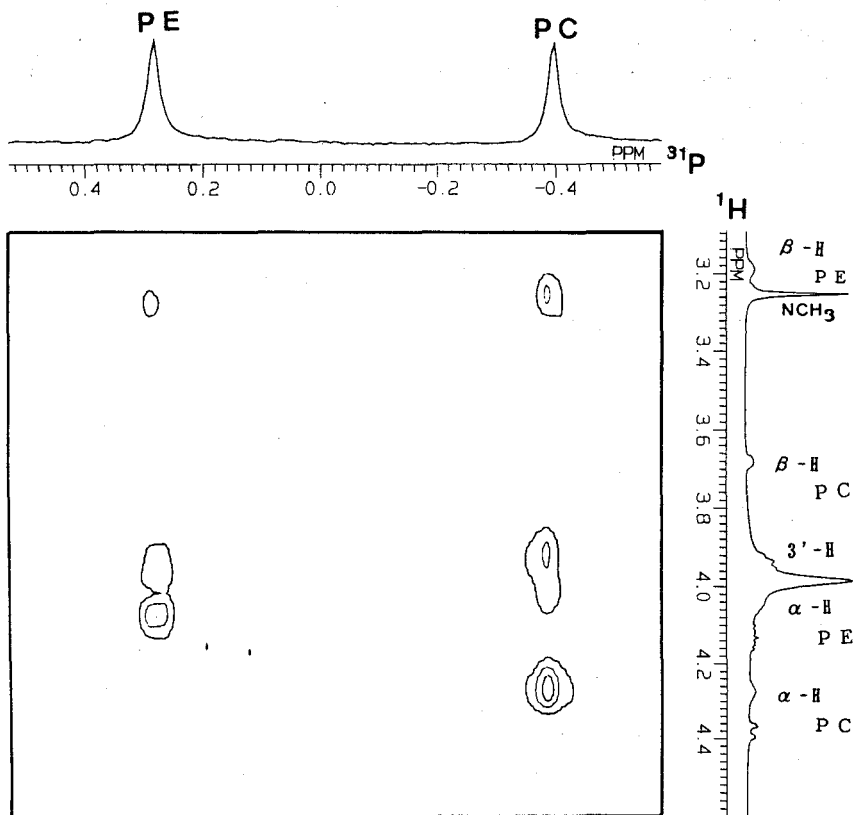


第2図 PIとDLPCの重クロロホルム中におけるROESYスペクトル。位相検出モード。ミキシングタイムは250ms。1024x512データ、16SCAN、PD:2.287s、EX270。

(3) ヘテロNOE⁴⁾

DLPCとDLPEを混合して重クロロホルムに軽水を4ml加えて溶解し二次元のヘテロNOESYを測定すと第3図に示すようになる。リン酸基の両隣のメチレンばかりでなく、コリンメチルからDLPEのリン酸基へもクロスピークが認められる。PEのアミンからのクロスピークは見られなかったが、一次元のヘテロ差NOEでアミンを照射すると、PCとPEのリンへのNOEがむしろコリンメチルを照射した場合よりはっきりと観測された。

現在、PIP2とPCやPIとPCの混合ミセルについてヘテロNOEの測定を試みている。



第3図 DLPCとDLPEの重クロロホルム中におけるヘテロNOESYスペクトル。
軽水を4 μ l含む。ミキシングタイム;400ms、800SCAN、512x171 τ 、GX400。

4. まとめと今後の計画

PIP₂は生理的に重要なリン脂質でありながら適当な溶媒が無く、NMRによる解析が困難であった。今回のように適当な混合溶媒でPCと共に溶解させ、ミセルの大きさを調節してやれば種々の手法により研究が可能と思われる。また、ヘテロROEについては今年のENCにおいてDM₂SO中のグラミジジンの α -¹HやNHからカルボニル基炭素へのROEが報告されているが⁵⁾、様々な化合物や溶存状態での実験条件など検討の余地を残している。これらの測定手法を検討し、立体構造の解明を行っているところである。

文献

- 1) T. Shibata, J. Uzawa, Y. Sugiura, Chem. Phys. Lipids, 33, 1 (1983).
- 2) T. Shibata, J. Uzawa, Y. Sugiura, K. Hayashi and T. Takizawa, Chem. Phys. Lipids, 34, 107 (1984).
- 3) H. S. Hendrickson and C. E. Ballou, J. Biol. Chem., 239, 1369 (1964).
- 4) 鶴澤 洵、柴田俊之、小川智也、浦本昌和、吉村昌治、坪野浩二、第29回NMR討論会、京都、1990.
- 5) M. Tokles, P. L. Rinaldi and H. J. Hawood, 32nd ENC, St. Louis, 1991.

脂質二重膜グリセロール骨格の重水素NMR

(横浜国大・工) ○阿久津秀雄、申敬花、長森敏明

Deuterium NMR on the Glycerol Backbone of the Lipid Bilayers.

Hideo Akutsu, Gyonghwa Shin, Toshiaki Nagamori

(Faculty of Engineering, Yokohama National University)

Phospholipid bilayers are composed of mainly three parts. The hydrocarbon chains form the hydrophobic region and usually do not show the identity of each phospholipid molecules. The polar groups form the hydrophilic region and show explicit difference depending on the molecular species. They are now relatively well characterized. In contrast, the intermediate region, the glycerol backbones, has not been investigated physicochemically very well. In this paper, we have characterized this part by the use of selective deuteration and deuterium NMR. The results showed that the quadrupole splitting at the glycerol backbone is sensitive to the molecular interactions among the different phospholipids.

【はじめに】

生体膜は生命体と外界との境界であり、生体反応に秩序を与える重要な場である。生体膜は脂質二重膜と膜タンパク質より構成され、脂質の主要な構成成分はグリセロリン脂質である。グリセロリン脂質二重膜は化学的にみて三つの部分に分けることができる(図1参照)。まず、脂肪酸よりなる疎水性領域で、液晶状態では液体に近く、個々の分子の個性はほとんど現れない。末端の極性基は親水性領域を形成しているが、この場合は分子が異なれば化学構造も違っており、分子の個性が最も明確に現れるところである。これらの二つの領域については多くの研究がされており、その性質は比較的良好に分かっている。それに対して、グリセロール骨格部分は化学構造的には分子種によらず均一であるが、二つの全く異なる性質を示す領域の間にあり、どのような物理化学的性質を示すのか興味深

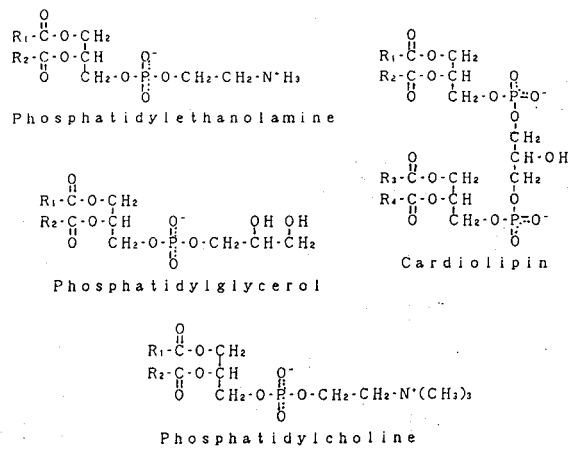


Fig.1 Structure of Phospholipids.

重水素NMR、選択的重水素化、リン脂質間相互作用、グリセロール骨格、

○あくつひでお、 シンギョンファ、 ながもりとしあき

い。この部分は他の二つの領域に較べると固い構造をとることは知られているが、その性質はあまりよく分かっていない。そこで、本研究では図1に示すようなさまざまなリン脂質について、そのグリセロール骨格を選択的に重水素化し、重水素NMRを使って、液晶状態に置くグリセロール骨格の動的構造を調べた。

【実験】

フォスファチジルエタノールアミン、カルジオリピンのグリセロール部分の選択的重水素化はグリセロール要求性の大腸菌を用いて生合成的に行った。フォスファチジルグリセロールはフォスホリパーゼDの酵素反応により、フォスファチジルエタノールアミンより合成した。フォスファチジルコリンはフォスファチジルエタノールアミンのメチル化によって得た。また、ジパルミトイルーおよび、ジミリスティルフォスファチジルエタノールアミンは重水素化フォスファチジルエタノールアミンより、ポリマー固定化トリフェニルクロライド法で脂肪酸の置き換えを行うことにより合成した。NMR測定用試料としては各単一成系、2成分混合系の脂質膜を作り、100 mM PIPES, 2 mM EDTA (pH 7.2)の緩衝液に分散させて多重層リポソームを調整した。重水素NMRスペクトルの測定は日本電子 F X 200(30.6 MHz)固体NMRシステム、およびブルカー A M 400(61.4 MHz)に自家製の重水素固体NMRシステムを組み込んだものを用いた。

【結果と考察】

1. フォスファチジルエタノールアミンにおけるマイクロドメインの形成。

われわれは飽和脂肪酸が蓄積する条件下で培養した大腸菌のフォスファチジルエ

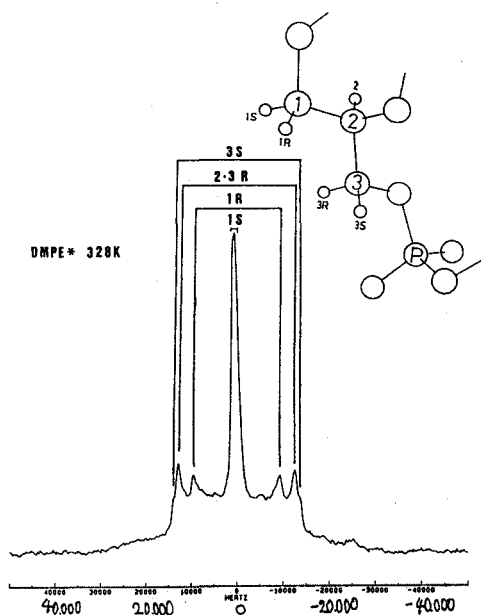


Fig. 2 Deuterium NMR spectrum of DMPE*

タノールアミンのグリセロール骨格C1部位の一つの重水素由来のシグナルが二つに分裂することを見いだした。これはリン脂質のこの部位が二重膜中で二つの構造をとっており、かつこの二つの構造は遅い交換をしていることを示す。この二つの構造の原因としてはフォスファチジルエタノールアミンが2分子複合体をつくるためか、あるいは脂肪酸組成の違いによるドメインをつくるためと考えられる。もし、前者であるとするならば脂肪酸の揃った二重膜中でもシグナルが分裂するはずである。そこで、グリセロール骨格を選択的に重水素化したL型のジパルミトイルー、およびジミリスティルフォスファチジルエタノールアミン(DPPE, DMPE)を合成し、その二重膜の重水素NMRスペクトルを測定した。DMPEのスペクトルとその帰属を図2

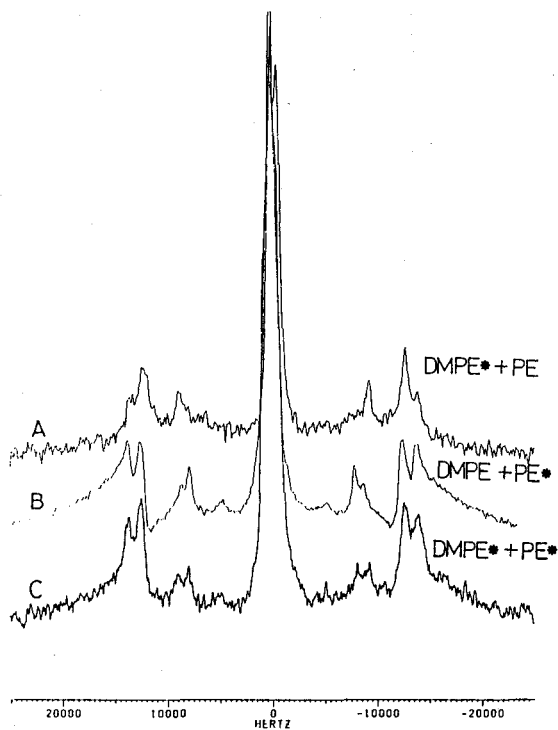


Fig. 3 Deuterium NMR spectra of DMPE and PE from *E. coli*.
 (A) DMPE**+PE, (B) DMPE+PE*
 (C) DMPE**+PE*

ドメインをつくっており、両者ではグリセロール骨格の C 1 位の構造が少し異なっているものと考えられる。

2. さまざまなリン脂質間相互作用でのグリセロール骨格構造の適応。

飽和脂肪酸が蓄積される条件下での大腸菌細胞膜のリン脂質組成は主にフォスファチジルエタノールアミン (PE) とカルジオリピン (CL) からなる。また、通常の成育条件下では、フォスファチジルグリセロール (PG) が酸性リン脂質の主成分であることが知られている。まず、PE*、CL*、PE*+CL、PE+CL* について調べてみると、グリセロ

に示す。この図から分かるように C 1 位のシグナルは 1 本しか観測されない。この結果より、2 分子複合体の形成が 2 つの異なる構造が現れる原因であるとの考えは否定される。そこで、C 1 位の 2 本のシグナルの帰属を試みた。DMPE と大腸菌のフォスファチジルエタノールアミン (PE) を混合して、3 種類の二重膜をつくった。即ち、DMPE*+PE (*は重水素化物。以下同じ)、DMPE+PE*、DMPE*+PE* であり、その重水素 NMR スペクトルを図 3 に示す。ここから明らかのように、四重極分裂の大きいものは飽和脂肪酸のみを持つものに由来し、小さいものは不飽和脂肪酸をも含むフォスファチジルエタノールアミンに由来すると結論できる。これらは二重膜中で、それぞれ独立な

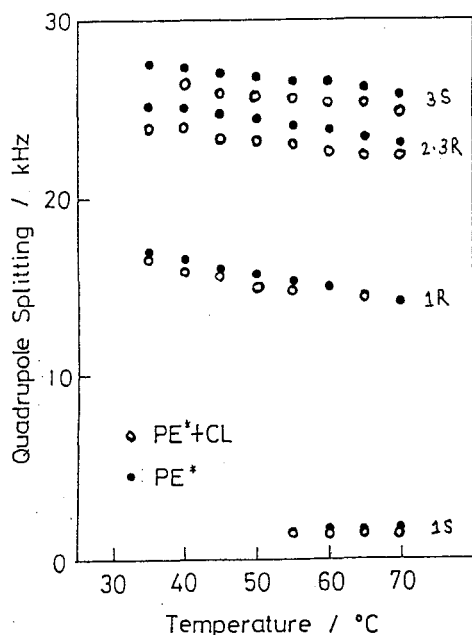


Fig. 4 Temperature dependence of quadrupole splitting measured for deuterated PE in the presence and absence of non-deuterated CL.

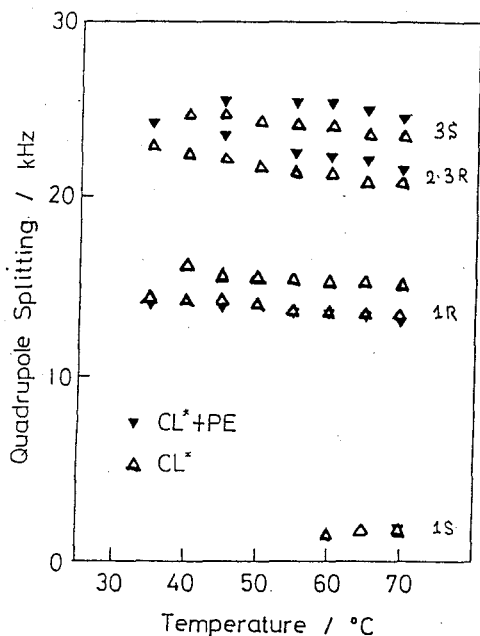


Fig. 5: Temperature dependence of quadrupole splitting measured for deuterated CL in the presence and absence of non-deuterated PE.

重極分裂はその単一成分の値から2 kHzも変化して、ほぼPE単一成分の場合と同じ値になった。したがって、この部分の構造については、PGはPEに引きずられる形となっている。いずれにしても、C1位にフォスファチジルグリセロールとカルジオリピンの違いが出てくることは興味深い。現在、フォスファチジルエタノールアミンとフォスファチジルコリンの系についても実験を進めている。

【結論】

リン脂質のグリセロール骨格の3つの部位の重水素四重極分裂は異なるリン脂質間の相互作用においてちがった挙動をとる。したがって、この方法は液晶状態におけるリン脂質二重膜中での脂質分子間相互作用を原子の分解能で解析することを可能にするものである。

【謝辞】 NMR測定の一部で便宜をはかっていただいた東京薬科大学の神藤平三郎先生、ポリマー固定化トリフェニルクロライド法のご指導をいただいた横浜国立大学工学部の友井正男先生に感謝いたします。また、重水素固体NMRシステムを作るにあたって、いろいろご助言、およびご援助をいただいた姫路工業大学理学部内藤晶先生、日本ブルカー黒田幸夫氏に感謝いたします。

ール骨格のC2、C3位の四重極分裂は単一成分の場合と混合成分系の場合では一致しなかった。これらの重水素四重極分裂値の温度依存性を図4、5に示す。一方、混合物どうして較べるとPE、CLのC2、C3位の四重極分裂は全ての温度領域においてほぼ同じ値であった。即ち、混合系ではPEもCLもC2-C3軸に結合する重水素は単一成分の状態から互いに同じ動的構造をとるように変化していることが分かる。PE+PG系についても同様なことが観測された。

一方、C1位については変化の傾向が異なっていた。即ち、PE+CL系では大きな変化がなかったが、PE+PG系ではPGの四

L23

STRUCTURE AND DYNAMICS OF A MEMBRANE PROTEIN DIMER; ^1H , ^{13}C AND ^{15}N NMR SPECTROSCOPY OF M13 COAT PROTEIN IN SDS MICELLES. Gillian D. Henry and Brian D. Sykes, Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 2H7, Canada.

The coat protein of the filamentous coliphage M13 is a 50-residue polypeptide chain which is inserted in the inner membrane of the *E. coli* host upon infection. Isolated coat protein is insoluble in water, but may be studied conveniently in detergent micelles, where it is believed to be a dimer. The coat protein may be labelled biosynthetically with ^{13}C or ^{15}N by inclusion of the labelled amino acid precursor in the culture medium¹. Many ^{13}C labelled carbonyl sites in the protein give rise to two distinct resonances of equal intensity, suggesting the monomers to be inequivalent^{2,3}. Slightly different amide exchange rates (approximately 2-fold) are observed for the individual monomers under conditions of fast amide exchange; however, various experiments show the monomers themselves to exchange between sites at a slower rate. Amide nitrogen and proton resonances were assigned to residue types using site-specific ^{15}N labels and ^{15}N - ^1H heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) spectroscopy; sequential assignments were made using ^{15}N - ^1H HMQC-NOESY and conventional ^1H - ^1H NOESY. Micelle-bound coat protein dimers have a long rotational correlation time (τ_c) and poor chemical shift dispersion in the ^1H spectrum. However, many sequential dNN NOESY crosspeaks are observed, suggesting the protein to be largely α -helical. The position of the helical sections in the protein can also be deduced from the pattern of chemical shifts of the αCH protons in the protein⁴.

1. Henry, G.D. & Sykes, B.D. (1990). *Biochem. Cell Biol.* **68**:318-329.
2. Henry, G.D. & Sykes, B.D. (1990). *J. Mol. Biol.* **212**:11-14.
3. Henry, G.D., Weiner, J.H. & Sykes, B.D. (1987). *Biochemistry* **26**:3626-3634.
4. Wishart, D.S., Sykes, B.D. & Richards, F.M. *J. Mol. Biol.* (in press).

A Four-Level Quantum Mechanical System in Living Tissue:

 ^{23}Na MRS and MRI

Charles S. Springer, Jr.

Departments of Chemistry and Radiology, State University of New York, Stony Brook, NY 11794

Sodium is the tenth most abundant element in living tissue.¹ Its biological distribution is such that it is mostly confined to extracellular spaces. Isotopically, sodium is 100% ^{23}Na , which has a nuclear spin quantum number of $3/2$. In the presence of a strong magnetic field, this provides for a four-level quantum mechanical system which is subject to electrical quadrupole effects. When outside the extreme narrowing regime (*type d*), the quadrupolar-effected spin dynamics become complicated, yielding three other regimes (*types c, b, and a*) characterized by the motion and order of the spin's environment.² In living systems, the chemistry of Na^+ dictates that it is present mostly as the aquo cation. However, the nature of tissue is such that, apparently, almost all Na^+_{aq} exists in one or another of several different *type c* spin dynamics regimes.^{2,3} Apparently, this is because, although there are very few true Na^+ binding sites (and most of these are not "strong"), the macromolecule concentration is generally sufficient such that the quadrupolar properties of the Na^+ hydration shell are modulated by frequent diffusional encounters with macromolecules.^{2,3} Each population of spins in a *type c* regime is characterized by six relaxation rate constants, all of which are quite large in the tissue situation: two of them can be extremely so.^{2,3} The consequences of this for *in vivo* MRS and MRI are quite profound and confer both advantages and disadvantages. The fact that the two longitudinal relaxation rate constants (R_1 's) are large, coupled with the intrinsic NMR receptivity of ^{23}Na , provide that the strength of the tissue ^{23}Na signal is second only to that of the $^1\text{H}_2\text{O}$ signal.¹ However, the fact that one of the single-quantum transverse relaxation rate constants (R_2 's) can be extremely large means that a significant fraction of the signal can escape detection in a typical *in vivo* spectroscopic or imaging experiment.^{2,3} Even if it is completely detected, the broad spectroscopic peaks which result can lead to severe overlap of signals whose frequencies are discriminated by the action of a hyperfine shift reagent.²

1. C.S. Springer, "Measurement of Metal Cation Compartmentalization in Tissue by High-Resolution Metal Cation NMR," *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 375 - 399 (1987).
2. W.D. Rooney, and C.S. Springer, "A Comprehensive Approach to the Analysis and Interpretation of the Resonances of Spins $3/2$ from Living Systems," *NMR Biomed.* **4**, 000 - 000 (1991).
3. W.D. Rooney, and C.S. Springer, "The Molecular Environment of Intracellular Sodium: ^{23}Na NMR Relaxation," *NMR Biomed.* **4**, 000 - 000 (1991).

超高速NMR映像法による乱流運動の可視化

筑波大学物理工学系 巨瀬勝美

Visualization of Turbulent Motion using Ultrafast NMR Imaging

K.Kose, Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

Two visualization techniques for turbulent flow have been developed using ultrafast NMR imaging (echo-planar imaging : EPI). The first method employs a flow-sensitive magnetic field-gradient, achieving visualization of a velocity component of any direction. The second method utilizes a spatial tagging sequence using a combination of DANTE pulses and magnetic field-gradients. Experimental results for turbulent flow in a circular pipe have demonstrated that EPI is very promising in studying fluid turbulence.

1. はじめに

NMRは古くから流れの計測に用いられてきたが(1-3)、NMR映像法が開発されてからは、流れの空間分布を求めるといふ、いわゆるFlow Imagingが医学診断の分野を中心に行われるようになってきた。ところで、この手法を、流体现象そのものの研究に応用することも期待されていたが、通常の映像法では、計測に数秒以上を要するため、物理的に非常に興味深い乱流に対してはほとんど試みられていなかった(4,5)。そこで筆者は、Mansfieldらによって提案された超高速NMR映像法(echo-planar imaging : EPI)(6,7)を用いることにより撮像時間を20ms程度に短縮し、円管内を流れる乱流を可視化することに成功した(8-10)。さらにその後の研究により、任意の速度成分の分布を求めることができ、渦運動の可視化に極めて有効であること(11)、瞬間的速度ベクトルの分布も求められること(12)、速度勾配の分布も可視化できること(13)などを見いだした。また、核磁化の位相シフトを用いた方法のみでなく、振幅を用いた、より直感的な乱流運動の可視化手法も開発したので(14)、合わせて報告する。

2. 方法

NMRを用いた流れの計測法は、位相法と振幅法に大別される。すなわち、核磁化の位相もしくは振幅を用いる方法である。EPIを用いて瞬間的な流れを映像化する場合も、この2つの手法を用いることができる。以下に、その代表的手法を概説する。

<位相法> 図1に典型的なEPIのパルス系列を示す。このようなパルス系列で流体を映像化する場合、面内方向の流速が、(画素サイズ/撮像時間)に比べあまり速くなければ、観測される核磁化の位相シフト ϕ は、 $\phi = \alpha u + \beta v + \gamma w$ と表される(9,12)。ここで、 α, β, γ はパルス系列で定まる定数、 u, v, w は流速の x, y, z 成分である。このように、位相シフトは、流速ベクトル (u, v, w) の (α, β, γ) 方向の速度成分に対応したものである。スライス面を yz 面とし、 k を定数、 $\rho(y, z)$ を面内のスピンドensityとすると、NMR信号から直接再構成される実数部と虚数部の画像はそれぞれ、 $R(y, z) = k\rho(y, z)\cos\phi$ 、 $I(y, z) = k\rho(y, z)\sin\phi$ と表すことができるので、これらの画像から位相分布 $\phi(y, z)$ を計算することにより、その速度成分の分布を求めることができる。なお、 α, β, γ は、勾配磁場パルスを付加することにより、任意に設定できるため、任意の速度成分の分布を求めることが可能である(11)。また瞬間的な速度ベクトルを求める方法として、連続した複数のスピنعコー信号を用い、EPIで独立した速度成分を与える画像を短期間に複数枚取得する手法が提案され、乱流速度場の画像化も行われている(12)。

以上の議論では、画素内の速度分布を無視していたが、これが無視できない場合には、実部と虚部の画像の二乗和の平方根である絶対値画像は、スピンドensity分布と一致せず、信号の欠損を示すことが実験的にも知られている。いま、 α と γ が0で速度成分 v のみを測定する場合を考え、画素内の速度分布として、空間座標に関し一次のもの(線型

Key Words: NMR imaging, ultrafast, EPI, turbulent flow

こせかつみ

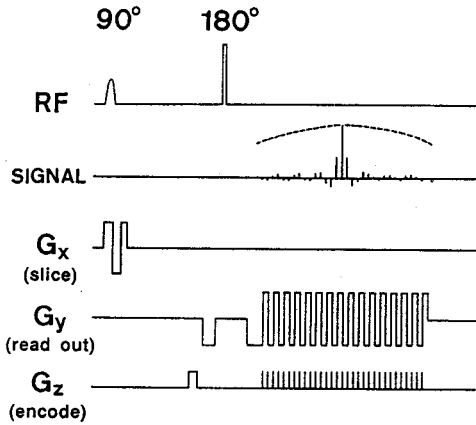


図1. 位相法のパルス系列

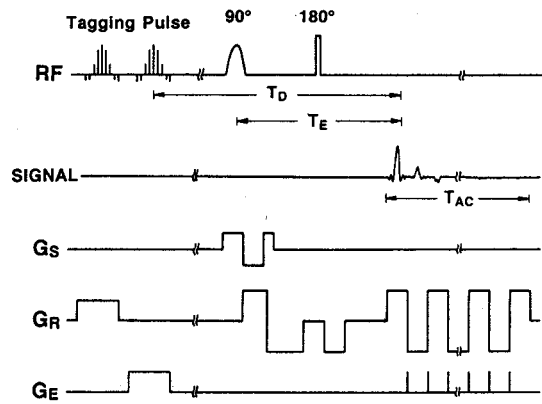


図2. 振幅法のパルス系列

の速度勾配)のみを仮定すると、絶対値および位相画像は、

$$M(y_0, z_0) = k\rho(y_0, z_0) \left| \text{sinc}(\beta v_x^0 \Delta x) \right| \left| \text{sinc}(\beta v_y^0 \Delta y) \right| \left| \text{sinc}(\beta v_z^0 \Delta z) \right|, \quad \Phi(y_0, z_0) = \beta v^0$$

と表すことができる。ここに、 (x_0, y_0, z_0) は画素の中心の座標、 $2\Delta x, 2\Delta y, 2\Delta z$ は画素の x, y, z 方向の長さ、 v^0, v_x^0, v_y^0, v_z^0 は (x_0, y_0, z_0) における流速成分、およびその一階の偏微分係数である。すなわち、この近似の範囲でも、位相画像は画素の中心の流速(平均流速)の分布を示し、また絶対値画像は、画素内の速度勾配の分布を示すことができる。また、通常の断層映像法では、 $\Delta x \gg \Delta y, \Delta z$ であるので、絶対値画像は、

$$M(y_0, z_0) \approx k\rho(y_0, z_0) \left| \text{sinc}(\beta v_x^0 \Delta x) \right|$$

と書くこともできる。すなわち、絶対値画像は、画素内のずり流れの分布を表すことができ、乱流中の渦度分布に関する情報を与える(13)。

<振幅法>図2に、空間標識パルスを用いた方式のパルス系列を示す(14)。この方式では、まず、勾配磁場を印加した状態でDANTEパルス照射して空間的に縞状の磁化分布を生成する操作を、断層面内の直交する2方向で行うことにより格子状のパターンを生成する(15,16)。そしてそのしばらく後にEPIで映像化して、そのパターンの変形によって流れを可視化する。なお、映像化においては、位相情報は不用であるので、最初の勾配エコーにおいて流れによる位相シフトが0になるようにして、フーリエ空間の半分の領域の信号から画像再構成を行う手法を用い、撮像時間を約半分に短縮している。この方式は、位相法に比較して、定量性にはやや劣るものの、一枚の画像のみから、面内の二つの速度成分の分布を同時に求めることができ、流体の複雑な運動を可視化する非常に優れた方法である。

<実験方法>用いた装置は、磁極口径30cm、ギャップ6.6cm、磁場強度1Tの鉄心電磁石(JEOL)をもちいた自作のシステムである。水平においた、内径18mm(=D)、全長2700mmのpolycarbonate製のパイプに定常水流を流し、管の入口から120D下流において、管軸に垂直な断層面を映像化した。水には硫酸銅を溶かし、 T_1 を60ないし70msに調製した。また、管の入口には口径9mmのオリフィスを設け、流れに攪乱を導入した。実験の対象は、円管の層流-乱流遷移領域($2000 < Re < 2700$, Re : Reynolds数)において層流の中に間欠的に発生するパフと呼ばれる安定な乱流塊である(9,11,17)。パフにおいては、乱れは上流の層流-乱流境界において発生し、その乱れは下流に向かってしだいに減衰することが知られている。

3. 実験結果

図3に、 Re が2250のとき、パフにおける主流方向の速度分布を、位相法を用いて

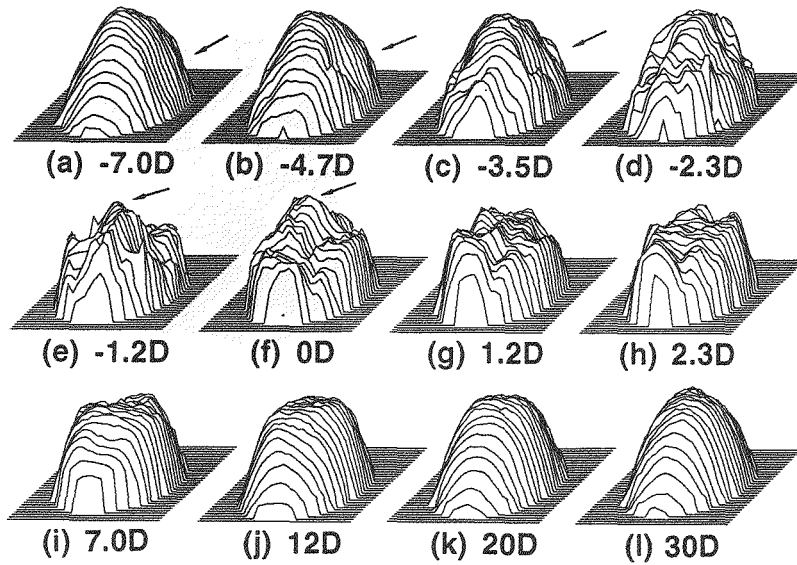


図 3 . バブの主流方向の瞬間的流速分布

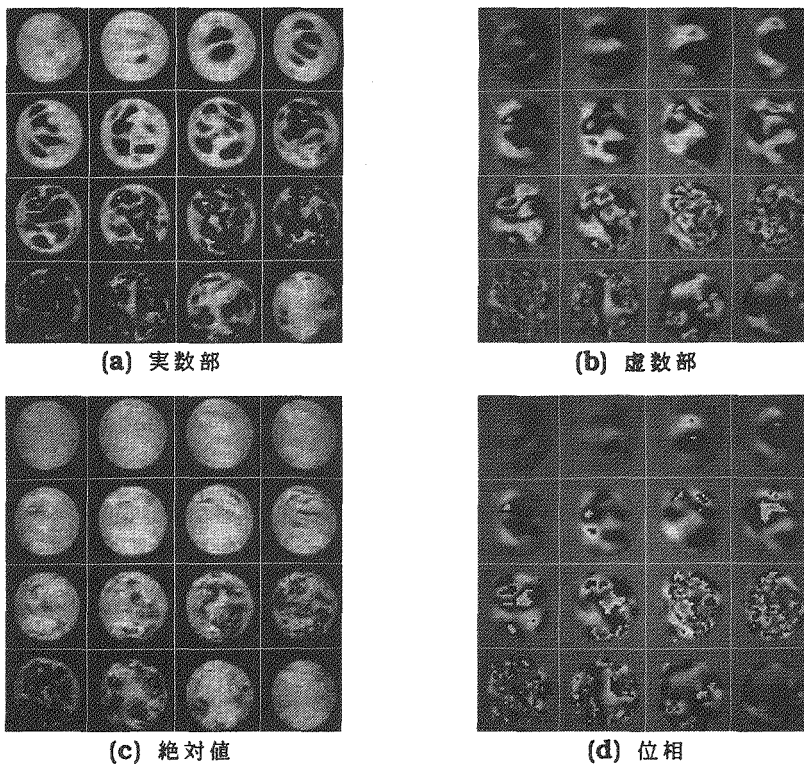


図 4 . バブの主流に垂直な方向の流速で可視化された画像

200msの時間間隔で連続的に計測した結果を示す(11)。計測は、図2に示すようなパルス系列(エコー時間28ms)を用いて行った。スライス厚は4mm、撮像領域は24mm x 24mm、画素数は32 x 32である。速度分布は、上流から下流へと表示してあり、各分布の下には、層流-乱流境界から測った軸方向への距離が示してある。すなわち、その境界

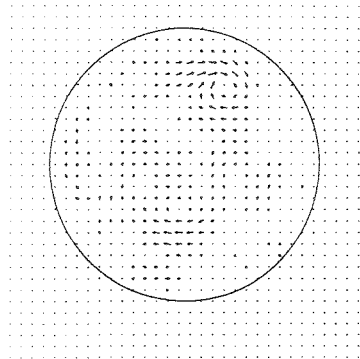


図5. パフにおける流速ベクトルの分布

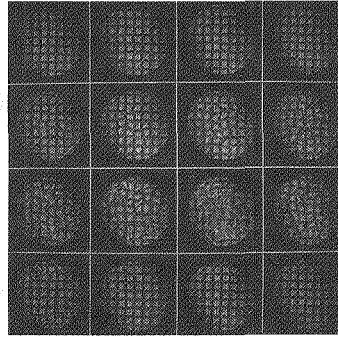


図6. 振幅法によるパフの画像

のすぐ上流 (a)-(c) ではポアズイユ流に近い流れが実現されているのに対し、その境界の下流域では、非常に乱れた流れ (g)-(i) が出現しており、下流域にポアズイユ流が達成されるには、非常に長い距離が必要であることがわかる (j)-(l)。

図4に、パフにおける主流に垂直な速度成分を、上と同様の手法で計測した結果を示す (13)。(a)-(d)はそれぞれ実部、虚部、絶対値、位相画像であり、画像を取得した順に、パフの下流部分から上流部分へと並べて表示してある。スライス厚、撮像領域、画素数は図3と同様である。位相画像は画面の左右方向の速度分布を示し、下流域においては、巨大な縦渦の存在を示している (3番目の画像) もの、上流域では、乱流強度の増大に伴い、位相の aliasing が顕著である。また、絶対値画像は、上流域の層流-乱流境界 (13番目の画像) 付近において、著しい信号欠損を示しており、画素内の速度勾配の分布を表している。図5は、2つのスピンエコーを用いて連続的に取得した2枚の位相画像から作成した、パフの下流域における速度ベクトルの分布である (12)。

図6は、振幅法で計測したパフの画像である。200msの時間間隔で連続的に撮像したものを表示しており、スライス厚は2.5mm、撮像領域は24mm x 24mm、画素数は64 x 64である。Tagging Pulseから1番目の勾配エコーまでの時間は70msであり、データ収集期間は21.12msであるので、映像化された格子パターンの動きはこの約70ms間の流体運動によるものである。11番目の画像は層流-乱流境界に対応しており、乱れが最大になっていることが明瞭である。

4. むすび

EPIを用いた乱流の可視化法に関し、位相法と振幅法による手法とその適用例を示した。EPIは、流速のみならず、速度勾配ないし渦度分布の情報も直接可視化できる手法であるので、今後流体計測の分野で、本格的に応用されていくことが期待される。

【参考文献】

- 1) J.R.Suryan, Proc. Indian Acad. Sci. Sect. A33, 107(1951).
- 2) D.W.Jones and T.F.Child, Advance in Magnetic Resonance, ed. J.S.Waugh (Academic Press, New York, 1976), Vol.8, p.123-148.
- 3) A.Caprihan and E.Fukushima, Physics Report 198, 195(1990).
- 4) J.Frahm, A.Haase, and D.Matthaei, Magn.Reson.Med.3, 321(1986).
- 5) D.O.Kuethe, Phys.Rev.A40, 4542(1989).
- 6) P.Mansfield, J.Phys.C10, L55(1977).
- 7) P.Mansfield and I.L.Pykett, J.Magn.Reson.29, 355(1978).
- 8) 巨瀬勝美,第28回NMR討論会講演要旨集p.177(1989).
- 9) K.Kose, J.Phys.D23, 981(1990).
- 10) 巨瀬勝美,日本物理学会誌46巻1号29(1991).
- 11) K.Kose, Phys.Rev.A44, August(1991).
- 12) K.Kose, J.Magn.Reson.92, 631(1991).
- 13) K.Kose, J.Magn.Reson. to be published in March 1992.
- 14) K.Kose, J.Magn.Reson. submitted.
- 15) G.A.Morris and R.Freeman, J.Magn.Reson.29, 433(1978).
- 16) T.J.Mosher and M.B.Smith, Magn.Reson.Med. 15, 334(1990).
- 17) I.J.Wygnanski, M.Sokolov, and D.Friedman, J.Fluid Mech.69, 283(1975).

(三共・分析代謝研、醗酵研) ○春山英幸 桑野晴光 竹内道子 犬飼正俊

The Application of Homonuclear 3D NMR Spectroscopy to the Structural Analysis of Galacardin, a novel member of the glycopeptide family of antibiotics

(Sankyo Co., Analytical & Metabolic Research, and Fermentation Research Laboratories)

Hideyuki Haruyama, Harumitsu Kuwano, Michiko Takeuchi and Masayoshi Inukai

Galacardin is a new member of the glycopeptide family of antibiotics isolated from *Saccharothrix* sp. SANK 64289. The chemical study of this compound suggested the presence of an additional galactose moiety comparing to D-Galactosyl- β -avoparcin. The analysis of the NOESY spectrum to identify the site at which the galactose moiety would be attached was hampered due to the serious overlap of the sugar protons in the region from 3 to 4 ppm. To overcome this difficulty, the application of 3D NOESY-HOHAHA spectrum was examined. Based upon a fact that the NOE observed between protons belonging to the same sugar moiety can be associated with the cross peak on a backtransfer line, intra- and inter-sugar NOEs could be unambiguously differentiated. Consequently, it was determined that the newly introduced galactose moiety is bound at 4' position of L-rhamnose.

1. 序

ガラカルディン (Galacardin, **1**) は *Saccharothrix* sp. SANK 64289株より単離された新規なグリコペプチド系抗生物質で、¹⁾ 化学的手段により D-Galactosyl- β -Apoparcin にさらにガラクトース 1 分子が付加したものであると推定された。当初 2D-NMR によって、新たに付加したガラクトースの結合位置の決定を試み、NOESY スペクトルの解析の結果から、1 分子のガラクトースについては、D-Galactosyl- β -Apoparcin と同様、F 環に結合している事が明らかとなったが、残るもう 1 分子のガラクトースからは、主鎖及び、A~G のベンゼン環に NOE が観測されず、いずれかの構成糖に結合している事が示唆された。一方、図 1 に示す様に、**1** の ¹H-NMR の 3~4 PPM の領域には構成糖由来のシグナルの重複が著しく、同一構成糖に属するプロトン間の NOE と、糖の結合位置の決定に重要な構成糖間での NOE を明瞭に識別する事が困難であった。この問題を解決するため 3D-NOESY-HOHAHA スペクトル²⁾の適用を試み、その有効性を検討したので、以下に報告する。

2. 実験法、及び解析法

あらかじめ凍結乾燥を二回繰り返して、交換性プロトンを D 置換した Galacardin 10 mg を 0.5 ml の DMSO-d₆ に溶解し (8.7 mM)、1~2 μ l の 0.1 N DCI を添加し測定試料とした。測定は JEOL GSX-500 分光器を用い、40°C で行った。

測定に用いたパルス・シーケンスを図 2 (a) に示す。吸収波形を得るためには States の方法³⁾を三次元に拡張する必要があるため、一つの t₁ に対して RR, RI, IR, II 成分に対応する 4 つのデータを図 2 (a) に示すそれぞれの位相回して測定した。ここで、先行する R/I は t₁ 軸の実部/虚部、続く R/I は t₂ 軸に対する実部/虚部を示す。実際の測定は、スペクトル幅 5000 Hz、t₁、t₂、t₃ 軸方向にそれぞれ、3.2、1.28、5.12 ポイント、各 t₁、t₂ について、積算 8 回、繰り返し時間 1.051 s で行った。NOESY 部分の混合時間として 600 ms、スピン・ロック時間 90 ms を用いた。データ処理はワーク・ステーション D5000 上の NMRZ プログラム (NMRi 社) を用い、t₁、t₂ 方向について、それぞれ、2 回、1 回のゼロ・フィリング

グリコペプチド抗生物質、3D-NMR、NOESY-HOHAHA

はるやまひでゆき くわのはるみつ たけうちみちこ いぬかいまさとし

¹H-NMR Spectrum of Galacardin
(8.7 mM in DMSO-d₆)

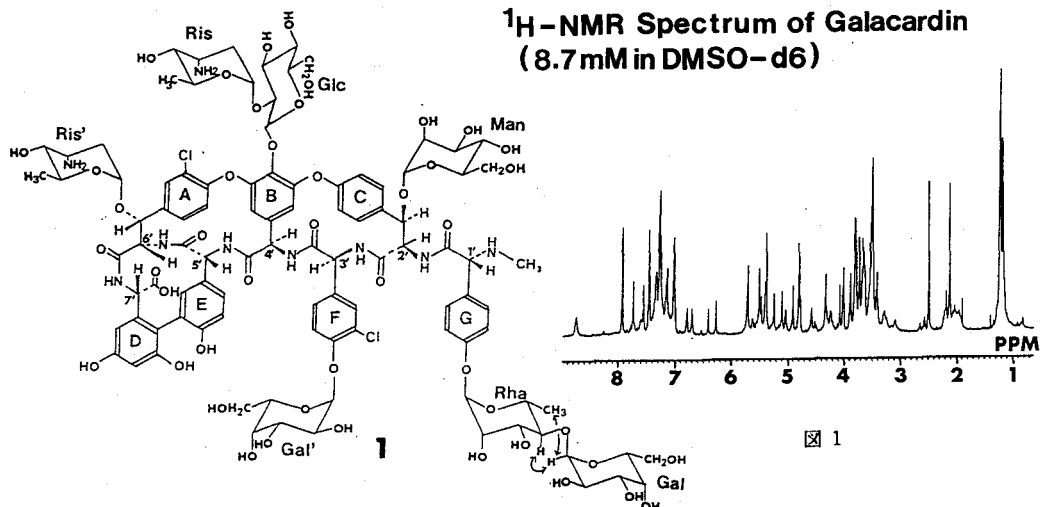


図 1

3D-NOESY-HOHAHA

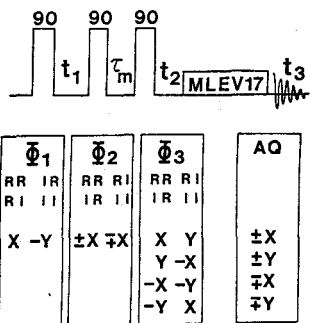


図 2 (a)

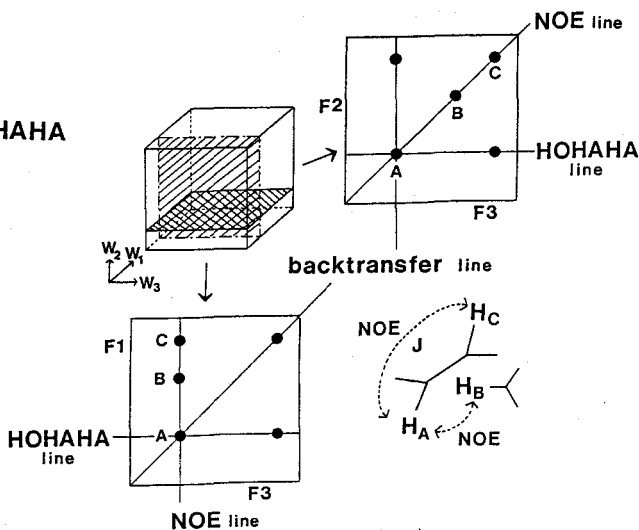


図 2 (b)

を行い、 t_3 方向については、ベースライン補正を行った。したがって最終的にデータ・サイズは $128 \times 256 \times 256$ ポイント ($= t_1 \times t_2 \times t_3$) となった。

図 2 (b) は、図に示す、 H_A 、 H_B 、 H_C からなる系について、NOESY-HOHAHAスペクトル上のピークの出現様式を示している。 $\omega_1 = \omega_2 = \omega_3 = \delta A$ である点の座標を $(\delta A, \delta A, \delta A)$ と表現する事にすれば、この点を含む $F_2 F_3$ 断面において、 $H_A \rightarrow (\text{NOE}) \rightarrow H_B \rightarrow (\text{HOHAHA}) \rightarrow H_B$ の様な過程により生じた交叉ピークは座標 $(\delta A, \delta B, \delta B)$ の位置、すなわち対角線 (= NOE line)上に現れ、 $H_A \rightarrow (\text{NOE}) \rightarrow H_A \rightarrow (\text{HOHAHA}) \rightarrow H_C$ の過程によって生じた交叉ピーク $(\delta A, \delta A, \delta C)$ は、 F_3 軸に平行な直線 (= HOHAHA line)上に現れる事が分かる。これらの交叉ピークは、それぞれ NOESY、HOHAHA スペクトル上に観測されるピークと同じ情報を含んでいるだけであるが、 F_2 軸に平行な軸 (= backtransfer line)上に現れる交叉ピーク、図 2 (b)の例で $(\delta A, \delta C, \delta A)$ に出現するピークは $H_A \rightarrow (\text{NOE}) \rightarrow H_C \rightarrow (\text{HOHAHA}) \rightarrow H_A$ の過程によって生じたピークであって、ガラカルディンの例に即して言えば、この様なピークは同一糖に属するプロトン間に NOE が観測さ

れる場合、それに付随して出現するはずで、同一構成糖に属するプロトン間のNOEと、異なる糖に属するプロトン間に観測されるNOEを区別する有力な情報を与えると期待される。

図2(b)には、F1F3面上での、NOE line、HOHAHA line、及び backtransfer line の現れ方も示してあるが、何故、その様なパターンを与えるかは、上の議論から明らかであろう(但し、図2(b)で、F1F3面上のbacktransfer line上のピークは、HC→(NOE)→HA→(HOHAHA)→HCの過程で出現する点に注意)。

3. 結果、考察

3. 1 新しく付加したガラクトースの結合位置

図3は、2D NMRスペクトルの解析によって結合位置を確定できなかったガラクトース(Gal)のアノメリック・プロトンからのNOE、HOHAHA移動を示す、NOESY、及びHOHAHAの部分スペクトルである。NOESYスペクトル上には、NOESY-HOHAHAスペクトルの解析からGal-H1とラムノース(Rha)-H4に帰属される事になった交叉ピークが確かに観測されているが、この領域には、他の糖由来のシグナルも重複して存在する事を考慮すると、NOESY、及びHOHAHAスペクトルの比較から帰属を確定するのは困難である。一方、図4に示す、この領域のNOESY-HOHAHAスペクトルのF2F3面を見てみると、NOESY、及びHOHAHAスペクトルに対応する交叉ピークが、NOE line、HOHAHA line上に現れている他、backtransfer line上、Gal-H2に対応する位置に交叉ピークが観測される。したがってGal-H1との間に観測される二つのNOE上の交叉ピークのうち、低磁場のピークはH1-Gal、H2-Gal間のNOEに帰属でき、そして、backtransfer line上にピークを与えない高磁場のピークは、NOEによる磁化移動の後、更にRhaのH2プロトンまでのコヒーレンス移動を示す事から、Gal-H1と、Rha-H4間のNOEに帰属できた。同様にRhaの5位メチル・プロトンとGal-H1間のNOEも帰属できた事から、ガラクトースの結合位置をG環に結合しているラムノースの4位に結合している事が明らかとなった。

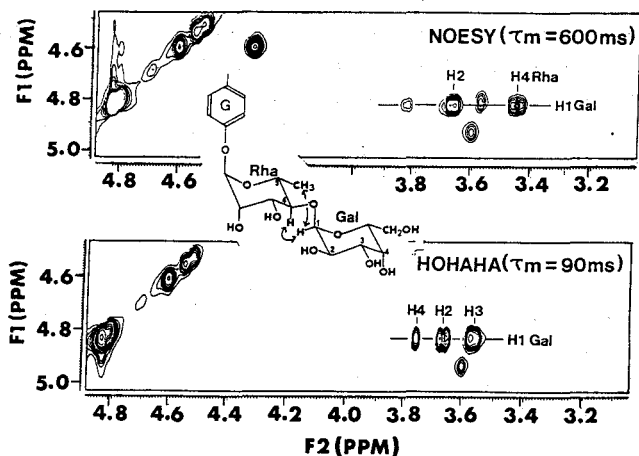
3. 2 O-2-(リストサミニル)-O-β-グルコースの存在の確認

ガラカルディンには、もう一つの2糖成分として標記の糖が存在する。そこで、次にNOESY-HOHAHAスペクトルによるリストサミン(Ris)とグルコース(Glc)の結合関係の確認を行った。Glcのアノメリック・プロトンの化学シフトの近傍には、他にRis、Gal'のアノメリック・プロトンが存在するため、F2F3面では一義的帰属が困難であった。しかし、図5に示す様に、F2=H1-RisにおけるF1F3面(B)には、Risと他の糖に属するプロトン間のNOEによる交叉ピークがNOE line上に観測された(図中点線)。そして、このF1方向の化学シフト値がH2-Glcである事が、F2=H1-GlcにおけるF1F3面との対応から帰属される事によって、O-2-(リストサミニル)-O-β-グルコースの存在が確認できた。

以上、NOESY-HOHAHAスペクトルが重複の著しい糖領域のNOEの解析に有効である事が分かった。本討論会においてはガラカルディンの溶液中の三次元構造を考える上で重要な他のNOEの帰属についても報告する。

参考文献

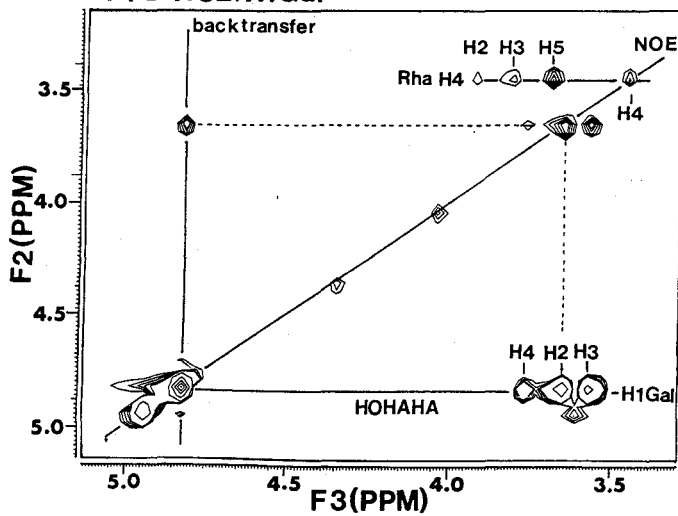
- 1) 竹内、榎田、高橋、加賀崎、春山、木下、犬飼、第35回日本農芸化学会要旨集、1991。
- 2) G. W. Vuister, R. Boelens, and R. Kaptein, *J. Magn. Reson.*, 1988, **80**, 176; G. W. Vuister, P. de Vwaard, R. Boelens, J. F. G. Villegenthart and R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 772。
- 3) D. J. States, R. A. Haberkorn and D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.* 1982, **48**, 286。



☒ 3

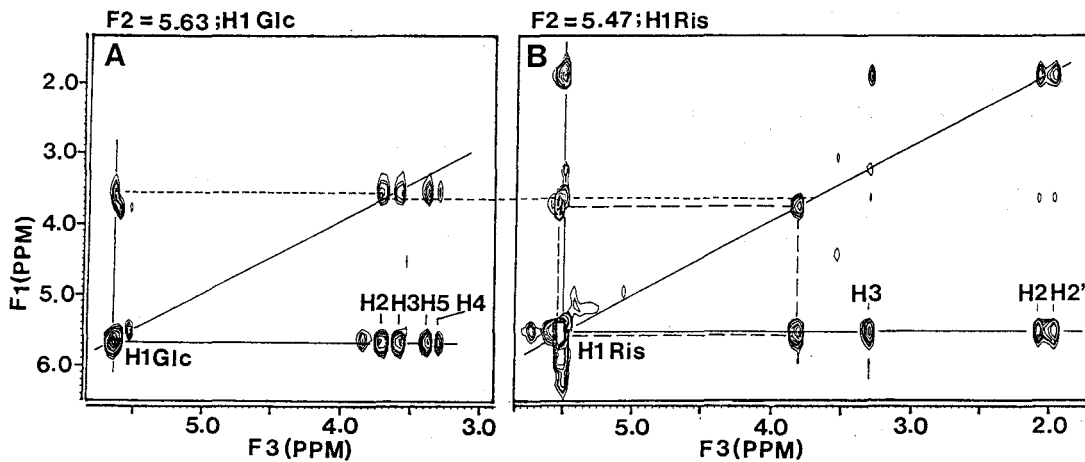
NOESY-HOHAHA Spectrum of Galacardin (8.7 mM in DMSO-d₆)

F1 = 4.82; H1Gal



Data Size = 128 X 256 X 256
Spectral Width = 5000 Hz

☒ 4



☒ 5

L27

D-アミノ酸を含むペプチドのNMR研究 - achatin-Iを中心として

((財) サントリー生有研、大阪薬大、広島大) ○ 岩下 孝、安田
(釜谷) 好美、南方宏之、石田寿昌、宗岡洋二郎、野本享資

AN NMR STUDY ON SMALL PEPTIDES CONTAINING D-AMINO ACID RESIDUE
- AN ENDOGENOUS NEUROPEPTIDE ACHATIN-I -

Takashi Iwashita¹, Yoshimi Yasuda-Kamatani¹, Hiroyuki Minakata¹,
Toshimasa Ishida², Youjiro Muneoka³, and Kyosuke Nomoto¹

¹Suntory Institute for Bioorganic Research, ²Department of Physical
Chemistry, Osaka University of Pharmaceutical Science, ³Faculty of Inte-
grated Arts and Sciences, Hiroshima University

A tetrapeptide achatin-I was isolated from the suboesophageal and cere-
bral ganglia of the African giant snail, and evoked a potent neuroexcita-
tory effect. The amino acid sequence of achatin-I is H-Gly-D-Phe-Ala-Asp-
OH, and it is the first example of an endogenous neuropeptide having
D-amino acid residue. All possible D,L isomers of achatin-I were synthe-
sized using the solid-phase method. The sensitivity of the neuron to
achatin-I and its isomers was strictly stereospecific.

The conformational character of this peptide was studied by NMR and X-
ray crystal analysis and it is found that achatin-I adopted a turn confor-
mation in both liquid and solid states.

1. はじめに

Achatin-Iは軟体動物アフリカマイマイ (*Achatina fulica*) の食道下神経節および
脳神経節より単離された神経興奮性テトラペプチドである¹⁾。achatin-Iのアミノ酸
配列は、H-Gly-D-Phe-Ala-Asp-OHであり、これは、D-アミノ酸を含む内在性の神経
ペプチドとしては最初の例である。このペプチドはアフリカマイマイの巨大ニュー
ロン (PON: periodically oscillating neuron) に対してナトリウムイオンによる電圧
依存性電流を誘起する。同時に、L-Pheを含むachatin-IIも単離されたが、こちら
には全く活性が無いことが分かった²⁾。われわれは、構造と活性との関係に興味を

神経興奮性ペプチド、Achatin-I、アフリカマイマイ、神経節、HOESY

いわした たかし、やすだ (かまたに) よしみ、みなかた ひろゆき、
いしだ としまさ、むねおか ようじろう、のもと きょうすけ

持ち実験を行った。まず、achatin-IのX線結晶解析ではターン構造が明きらかとなった³⁾。NMRによる溶液中のコンフォメーションに関しても同様の結果を得た。また、より感度の良い生理活性試験法としてアカニシ(*Rapana thomasi*)の歯舌牽引筋を用い、H-Ala-Gly-D-Phe-Ala-Asp-OHなどachatin-Iの誘導体に関して活性とNMRによる構造解析を行った。その誘導体の中にはachatin-Iと類似のコンフォメーションを取ると考えられるものもあり、活性も10分の1程度持つことが分かった。ここでは、NMRによるコンフォメーション解析の結果を中心に述べる。

2. 実験

Achatin-Iおよびその関連化合物は、固相法により合成しセファデックスG-10および逆相HPLCで精製した。Achatin-IのX線解析用試料はメタノール/ジオキサン溶液より針状結晶として得た。X線回折データは理学AFC-5により収拾し、MULTAN87プログラムによって解析した。NMR用試料は10mM程度の濃度になるように25mMリン酸バッファー(ロック用のD₂Oを10%含む)に溶かし、pHが3.5前後になるように調製した。NMR測定にはGE社GN-500(¹H:500MHz)およびGN-300(¹H:300MHz)を用いた。NOESYおよびROESYは混合時間200-300msとし、通常のpresat法により水ピークを消去しながら測定した。HOESYはachatin-IのGly,D-Phe,Alaのカルボニル基およびAspのγC=Oを¹³Cラベルした化合物について測定した。生理活性試験は、achatin-Iの可能な8種類の立体化学異性体についてはアフリカマイマイの巨大ニューロン(PONなど)を用い、achatin-I類似ペプチドについてはアカニシの歯舌牽引筋を用いて行った。

3. 結果と考察

Achatin-IのX線結晶解析より得られた構造をFig.1に示す。この結果によれば、achatin-Iは2つの分子内水素結合NH(Gly)⋯γC=O(Asp),NH(Asp)⋯γC=O(Asp)によって安定化され、D-Phe-Alaのところでtype II'β-turn構造を取り、さらにGly-D-Phe-Alaの部分について見ればγ-turn構造を取っている。はじめ、このペプチドは4アミノ酸残基と非常に小さいため溶液中では安定なコンフォメーションを取り得ないのではないかと考えられたが、Fig.2に示すようにpH7でも強い水素結合をしていることやNH(Phe)⋯NH(Ala)⋯NH(Asp)間のNOEが観測されたことなどより、かな

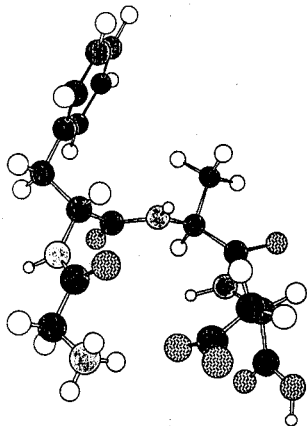


Fig.1 Crystal Structure of Achatin-I

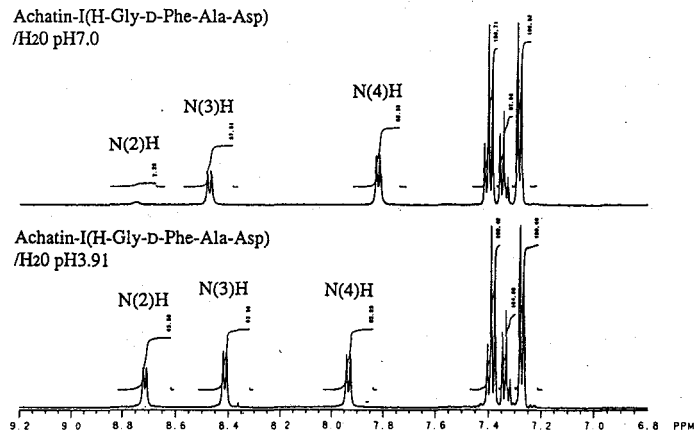


Fig.2 ¹H-NMR(500MHz) Spectra of Achatin-I

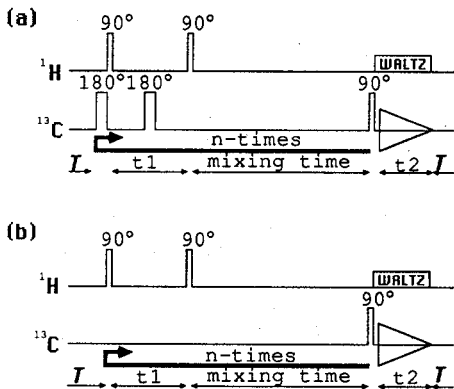


Fig.3 HOESY pulse sequence

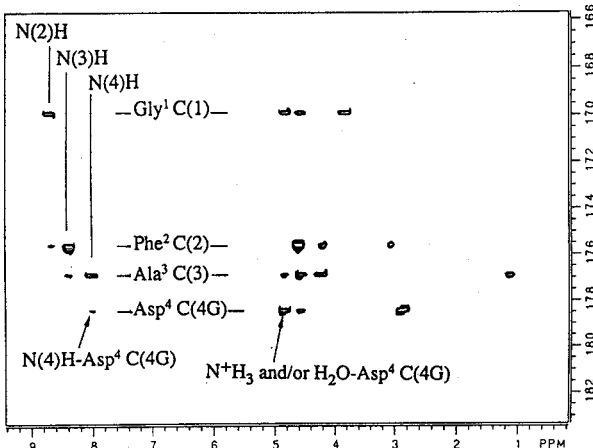


Fig.4 HOESY Spectrum of Achatin-I (¹³C-NMR:75MHz)

り高い確率で一定のコンフォメーションを取っているものと考えられた。しかしながら、小さいペプチドであるが為に有効な距離情報は多く得られなかったので、NH...O=¹³C間の異種核間NOEの観測を試みた。測定は、1次元についてはsteady-state NOEを観測し、2次元についてはFig.3(b)に示すcyclized HOESYの180°パルスを除いたパルス列を用いた⁴⁾。これは、ラベルしてある炭素がカルボニル基であるためF₁側でデカップルする必要がないためと、180°パルスを使うと小さいサテライトピークが出る可能性があるため非常に弱いクロスピークを観測するには不向きなためである。Fig.4にachatin-IのHOESYスペクトルを示す。このスペクトルでγC=O(Asp)と水ピークとの間で強いNOEが観測される。NH₃+(Gly)のプロトンは溶媒の水と交換しているため、このピークはNH₃+(Gly)または水和水との水素結合によるものと考えられる。さらに、Fig.2に示すような強い分子内水素結合の存在を考え合わせると、X線結晶解析で示されたNH(Gly)...γC=O(Asp)水素結合のものが水溶液中でも存在するものと考えられる。上記の結果と距離に関する束縛条件を考慮し、分子力場計算(MM2)を行うと、水溶液中ではFig.5(a)に示すような構造を取る確率が高いものと推定される。この構造はFig.1のX線結晶解析より得られた構造によく似ており、ペプチド

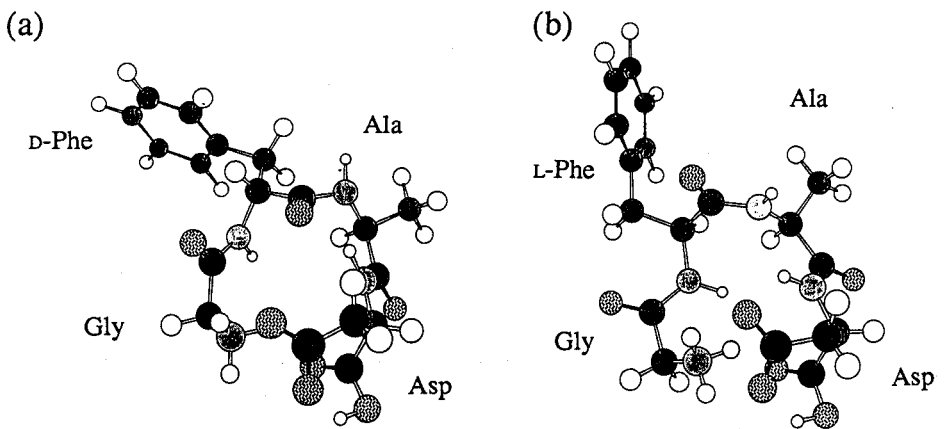


Fig.5 Solution Structure of Achatin-I(a) and Achatin-II(b)

No.	Peptides	Twitch contraction(M)				Conformation	NOE
		10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴		
1.	GdFAD(Achatin-I)	+	++	NT	NT	Turn	+
2.	AGdFAD	NT	+	++	+++*	Extended chain?	+
3.	GAGdFAD	NT	+	++	+++*	Turn	+
4.	AdFAD	NT	NT	-	+	Extended chain?	+
5.	VdFAD	NT	NT	-	-	Turn?	+
6.	GVdFAD	NT	NT	-	+	Extended chain?, gel	-
7.	GdFADG	NT	+	++	+++	Turn	+
8.	GdFADD	NT	NT	+	+++	Turn	+
9.	GGdFADD	NT	NT	-	+	Extended chain?	+
10.	GdFPD	NT	NT	-	+	Turn	+

+++,,+,+,: potentiation. -: no effect. NT: not tested *,: weak contraction.

Table.1 NOE is measured on GN-500(500MHz) by using of NOESY and ROESY method.

の主鎖が作る15員環構造が特徴的である。achatin-IIについては、Fig.5(b)に示すような構造を取るものと考えられる。両者の構造では、主鎖の作る大員環のコンフォメーションがフェニル基の配置によって少し異なるのと第二残基Pheのフェニル基と第三残基Alaのメチル基の突き出す方向がかなり違うので、これがPONに対する極めて高い立体選択性の主因であると考えられる。そこで、D-Phe-Alaの部分はなるべく保存し、その前後を少し変化させ、構造と活性との関係を調べた。生理活性試験にはより感度の高いアカニシの歯舌牽引筋を用いた。これら関連ペプチドの構造はNOESYおよびROESYのデータより推定した。その結果、Table 1に示すようにachatin-Iと同程度の高い活性を示すペプチドはなかったが、かなりの程度の活性を示すものはいくつかあった。構造の面ではH-Gly-D-Phe-Ala-Asp-Gly-OHやH-Gly-D-Phe-Ala-Asp-Asp-OHのように部分的にachatin-Iと同様のコンフォメーションを取っていると考えられるものについては活性を示すようである。また、H-Ala-Gly-D-Phe-Ala-Asp-OHやH-Gly-Ala-Gly-D-Phe-Ala-Asp-OHのようにN端側にアミノ酸残基を伸ばしたものには、電気刺激による単一収縮のみならず筋収縮も起こることが観察され、やや性質の異なった受容体と反応している可能性がある。

4. 文献

1. Kamatani, Y., Minakata, H., Kenny, P.T.M., Iwashita, T., Watanabe, K., Funase, K., Sun, X.P., Yongsiri, A., Kim, K.H., Novales-Li, P., Novales, E.T., Kanapi, C.G., Takeuchi, H. and Nomoto, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160 (1989) 1015-1020
2. Kim, K.H., Takeuchi, H., Kamatani, Y., Minakata, H. and Nomoto, K., *Eur. J. Pharmacol.*, 194 (1991) 99-106
3. Kamatani, Y., Minakata, H., Iwashita, T., Nomoto, K., In, Y., Doi, M. and Ishida, T., *FEBS*, 276 (1990) 95-97
4. Bigler, P. and Müller, C., *J. Magn. Reson.*, 79 (1988) 45-53

筑波大学化学系 楠見武徳

NMR Study on the Absolute Configuration of Organic Compounds

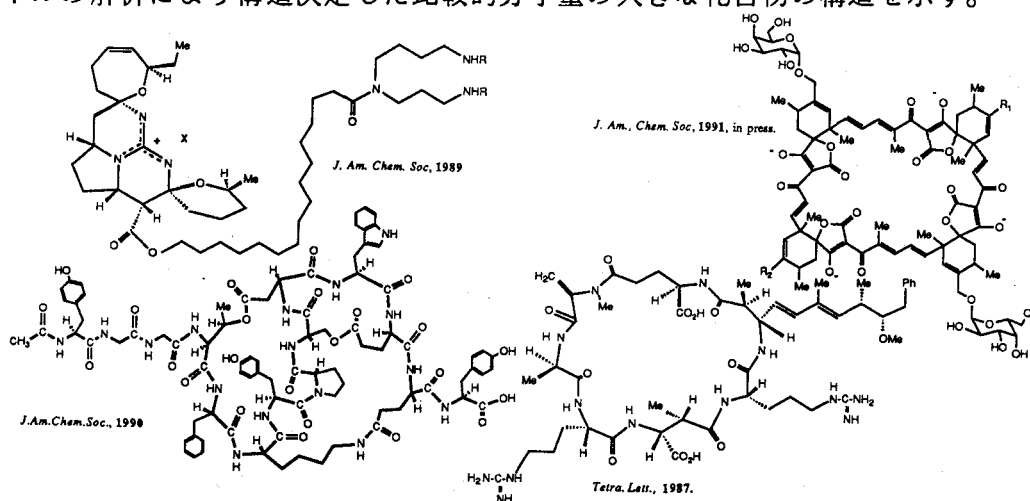
Takenoi Kusumi

Department of Chemistry, University of Tsukuba

New method, modified Mosher's method, has been designed to elucidate the absolute configuration of organic compounds. The method utilizes MTPA esters or amides of secondary alcohols or primary amines, respectively, and depends on the recent new NMR techniques that have enabled us to assign the NMR signals of the protons of even a big molecule such having molecular weight more than a thousand dalton. This method is quite reliable because it collects the chemical shift changes of many protons, that is, it includes much data points. Several exceptions to which the present method is inapplicable are also mentioned.

我々が他人を認識するとき最も注目するのは相手の顔である。顔を見ることにより、相手が知人であるか未知の人であるかを即座に判断できる。また、相手が初めて会った人でも、その人の顔の様子から年令、人種などのその人の属性を認識できる場合が多い。一方、NMRスペクトルは問題とする有機化合物の構造を最も端的に反映する優れた分析法であり、スペクトルをながめることにより化合物がどのような種類のものか、時にはどのような構造をしているかをほぼ直感的に知ることができる。このことから、NMRスペクトルは「有機化合物の顔」とみなすことができる。

最近のFT-NMRスペクトルの進歩により、分子量が1000を越えるような複雑な化合物の構造決定も可能になってきた。下に、我々が最近NMRスペクトルの解析により構造決定した比較的分子量の大きな化合物の構造を示す。

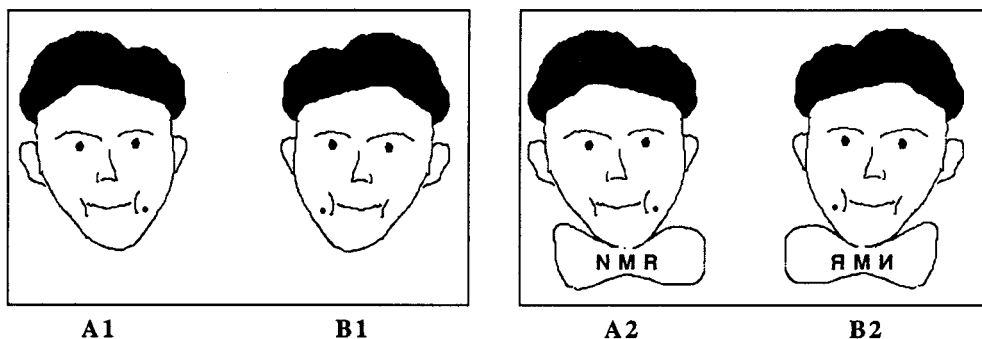


NMR、Mosher法、絶対配置、天然物、MTPA

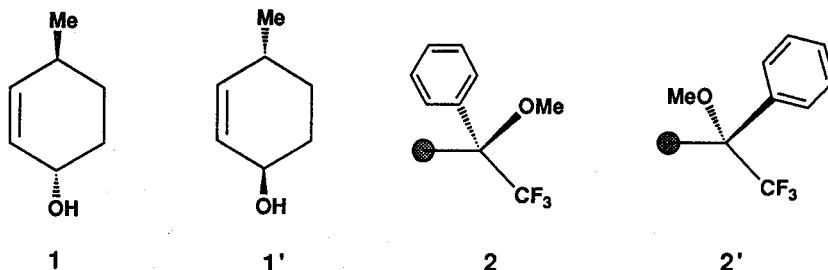
楠見武徳、くすみたけのり

一方、NMRスペクトルはあらゆる構造解析に万能ということでは勿論なく、いくつかの解決すべき問題点を残している。本発表では、その問題の一つであるNMRスペクトルによる有機化合物の絶対構造決定へのアプローチについて述べる。

下の図で A1 と B1 とは互いに鏡像体の関係にある顔である。例えばこの人の顔を写真で見たとすると、この人がどちらの顔を持っているのかを決めることができない。A1と B1 とでは印象も異なるし、人相書きを書こうとしてもホクロが左頬にあるのか右頬にあるのかを記述できない。一方、A2 は左右が完全に分かるチョウネクタイをしており、これを参考にすると B2 が鏡に映った顔であることがすぐに分かる。



不斉中心を有する化合物について、NMRスペクトルではその絶対構造までを決定することができない。すなわち A1 なのか B1 なのかを知ることができない。例えば、1のような物質の構造は、置換基の相対的な配置も含め、容易に決定することが出来るであろうが、1なのか1'なのかをNMRスペクトルで知ることが不可能である。ところが、問題とする分子に左右が完全にわかる構造部分（チョウネクタイ）を付け足せば絶対構造を決められる可能性がある。付け足す構造部分としてMTPA基（2および2'）を用いる方法はMosher法として知られている。またMTPA基の左右（*R*または*S*）はすでに決定されている。



MTPA基を2級アルコールに結合させると、生じたMTPAエステルはAのようなコンフォメーションをとることがいくつかの実験で知られている。Aに於て(-)-MTPAエステルについては、MTPA平面と名付けた面の左側に位置するプロトンはベンゼン環の異方性効果により対応するジアステレオマー{(-)-MTPAエス

テル)のものと比較して高磁場に現われる。この MTPA 平面の左右での化学シフトの差を利用するのが Mosher 法であるが、旧来の方法ではアルコールの隣の置換基の化学シフトのみに注目したため、十分な信頼性があるとはいえなかった。

現在では、2次元スペクトルを含めた各種のテクニックにより分子中のほとんどのプロトンの帰属を行なうことも可能になった。そこで、我々は帰属を行なった全てのプロトンについて、それらの MTPA 平面に対する位置(左右)と化学シフトの動きを観測する「新 Mosher 法」と名付けた新しい方法を考案した。

〈 新 Mosher 法とは 〉

まず、光学活性な 2 級アルコールを (+) 及び (-) の α -メトキシ- α -トリフロロメチルフェニル酢酸 (MTPA) エステルに誘導する。先に述べた通り (+) MTPA エステルと (-) MTPA エステルとでは、ベンゼン環の向きが異なる為、各 ^1H の異方性効果の受け方に差が出る。本法では、このことによって生じる複数の ^1H のケミカルシフトの差を用いて絶対配置を決定する。すなわち、

(1) 2 級アルコールの (+) 及び (-) MTPA エステルについて、それぞれ 2D NMR 等によりできるだけ多数の ^1H の帰属を行ない、各 ^1H について $\Delta\delta$ 値 ($\Delta\delta = \delta_{(-)} - \delta_{(+)}$) を求める。

(2) MTPA を上側、カルビニルプロトンを下側とし、 $\Delta\delta > 0$ の ^1H グループを右側、 $\Delta\delta < 0$ の ^1H グループを左側に書く (Figure [B])。

(3) 分子のコンフォメーションを考え、 $\Delta\delta > 0$ の ^1H グループが実際に MTPA の右側、 $\Delta\delta < 0$ の ^1H グループが左側に来ており、 $\Delta\delta$ の絶対値が MTPA に近い程大きく、遠い程小さいことを確認する。

MTPA エステル部分が Figure [A] のコンフォメーションから大きくずれた場合には、 $\Delta\delta$ 値が全て正(負)、または、正、負入り乱れるというようなことが起こり、この方法が適用できないことがわかる。すなわち、従来の方法と比較しこの方法では複数の ^1H を観測する為、より客観的に、問題とする化合物に対しての適、不適が判断できる。

次ページに、我々の方法により絶対配置を決定した化合物を、データと共に示す。いずれの場合も $\Delta\delta > 0$ のプロトンと $\Delta\delta < 0$ のプロトンとがそれぞれ MTPA 基の右及び左に位置しており、 $\Delta\delta$ 値の絶対値も MTPA 基との距離に応じて小さくなっていることが分かる。

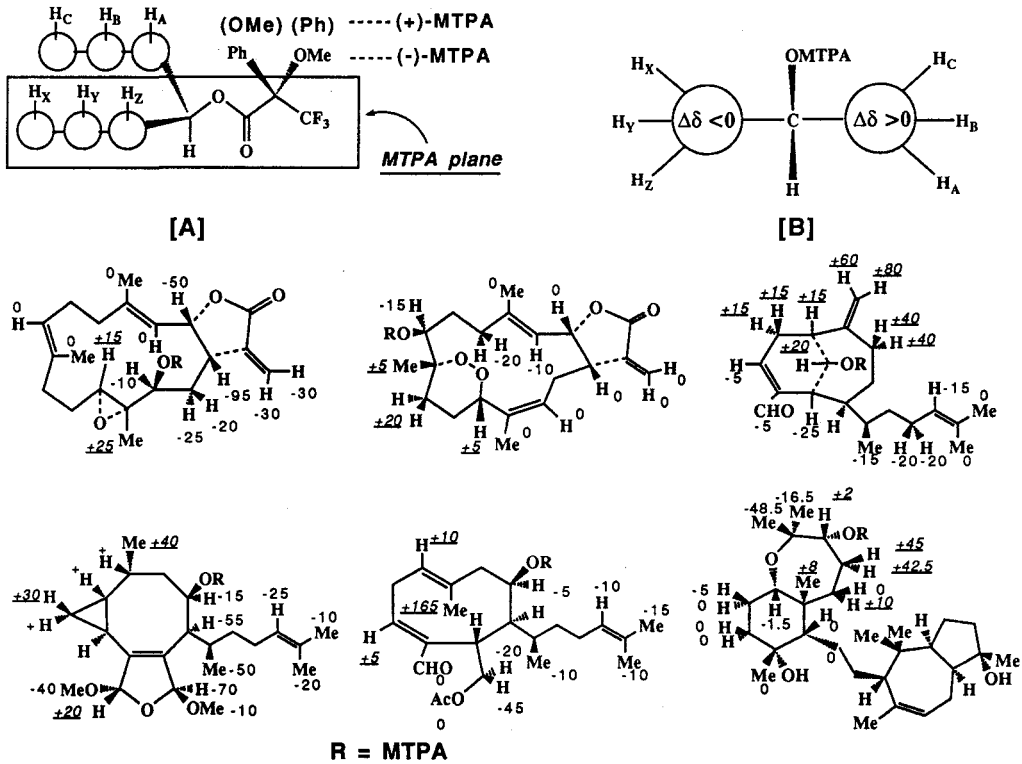
この方法のもうひとつの利点は超伝導 NMR スペクトルの高感度により 1 mg のサンプルがあればそれを 2 等分し、500 μg のサンプルについて、それぞれ R および S の MTPA エステルを調整することにより絶対配置の決定が可能であることである。コレステロール位の分子であれば、2次元スペクトルによりこの位の少量であっても相当な部分のプロトンの帰属が可能である。

また、新 Mosher 法は 2 級アルコールを有する化合物にのみ適用できるのではなく、アミノ酸の D, L の決定にも使用できることが分かっている。

一方、2 級アルコールを有する化合物であっても、水酸基が立体的に込み合っているときは新 Mosher 法が使用できないことがあることも見いだした。立体障害が増加すると MTPA 基も影響を受け [A] の様な理想的なコンフォメーションを取れなくなるためと思われる。

有機化合物の絶対配置を決定する他の有力な方法としては、X 線解析、CD 法が知られているが、いずれも使用上の制約がある。我々の今回開発した方法は、これらの方法に対して相補的な役割をすることが期待される。また、この方法

は既に国内だけでなく世界各国で各種の天然物の絶対配置決定に使用されて始めている。



Reference

I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4092.

L29

金属ポルフィリン関連ラジカルの常磁性NMR—その特異な電子構造と反応性との関連において—

京大・工 森島 績

Paramagnetic NMR of Metalloporphyrin Radicals--In Relation to Their Unusual Electronic Structures and Reactivities--

Division of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Isao Morishima

Abstract: We have studied the metallo-porphyrin and -chlorin π radicals which afford very broadened or no distinct ESR signals due to an enhanced electron spin relaxation and have therefore remained open to the detailed characterization of their electronic structures. The paramagnetic NMR is best suited for such systems. There are two cases for such metalloporphyrin π radicals with enhanced electron spin relaxation in which (a) the unpaired electrons of the metal or metal-bound ligand and the porphyrin or chlorin radical are more or less magnetically interacted and (b) the metal center is in a diamagnetic state, but the π radical orbitals (HOMO and next HOMO) are nearly degenerate, or combination of (a) and (b). Several examples of such systems will be shown with implications for the reaction mechanism of some heme enzymes.

はじめに

種々の金属ポルフィリン錯体の π カチオンおよび π アニオンラジカルはペルオキシダーゼやカタラーゼなどのヘム酵素やチトクローム類などの電子伝達ヘム蛋白質さらには光合成中心などの酸化、還元挙動に伴う反応中間体のモデルとして興味をもたれ、ポルフィリン化学の一つの中心研究課題となっている。演者らも、例えば、酸化、還元がポルフィリン環で起こるのか或は金属で起こるのか、またこれら酸化、還元がどのような構造因子で制御されるのか、さらにはそれらの電子構造について多くの研究を行ってきた。特に、金属ポルフィリン π ラジカルにおいて電子構造が特異である場合（例えば a_{1u} 状態と a_{2u} 状態とが殆ど縮重している）、あるいは中心金属が常磁性である場合には、電子スピンの緩和時間が短くなりそのESRがサイレントになるが、演者らはこのような金属ポルフィリンラジカルが常磁性NMRを与え、これによってはじめてその電子構造についての知見を

キーワード；常磁性NMR, 金属ポルフィリンラジカル、ヘム酵素反応中間体

もりしま いさお

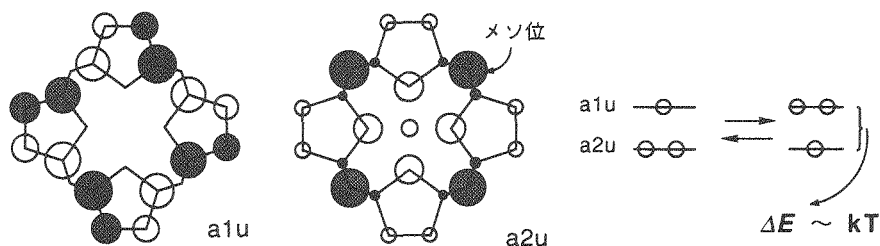
得ることができることに着目してきた。

本講演では、いくつかの特異な電子構造を有する鉄ポルフィリンラジカル、すなわち
(1) a_{1u} 、 a_{2u} 状態が殆ど縮重している鉄3価ポルフィリン π カチオンラジカル、
(2) ヘム代謝反応中間体モデルとしての鉄2価メソ-オキシポルフィリン中性ラジカル、
(3) 亜硝酸還元酵素の反応中間体モデルとしてのニトロシル鉄2価クロリン π カチオンラジカル、ならびに(4) 鉄1価と鉄2価 π アニオンラジカルの間状態にある還元型鉄ポルフィリン錯体、などの常磁性NMRとそれにもとづく電子構造について述べる。

1. 金属ポルフィリン π カチオンラジカルの a_{1u} 、 a_{2u} 電子状態とメソ位置換基効果

(1)

ポルフィリンのメソ位に置換基を持たないOEP (オクタエチルポルフィリン) の π カチオンラジカルは a_{1u} 状態を、メソ位にフェニル基を有するTPP (テトラフェニルポルフィリン) は a_{2u} 状態をとる。



我々は、Ru(II)CO(OEP)、Co(III)OEPの π カチオンラジカルがシャープな常磁性プロトンNMRスペクトルを与えることを見いだした。この場合、中心金属は反磁性であり典型的な π ラジカルであるにもかかわらず、シャープなコンタクトシフトしたプロトンNMRが観測されたのは、上図に示すように π ラジカル軌道がたまたまnextHOMO軌道と縮重に近い状態にあり、従って a_{1u} 、 a_{2u} の二つのラジカル状態が熱的に混じり、電子スピンの超微細結合定数がモジュレートされて電子スピン緩和時間が短くなったためと解釈した。ポルフィリン π 軌道のこのような偶然縮重は中心金属だけでなく、対イオン、リガンド、置換基適当に選ぶことによってももたらすことができる。置換基効果の例を見てみよう。

OEPのメソ位に置換基を一つずつ増やしていくと鉄3価ポルフィリン π カチオンラジカルのラジカル軌道がどの様に変化するかを常磁性NMRを用いて調べた。図上に示すように a_{1u} と a_{2u} ラジカル軌道の違いは、前者ではメソ位、ピロール窒素に電子スピン密度がなく、後者では大きなスピン密度があることである。この違いは常磁性NMRスペクトルにおいて常磁性シフトの大きさの違いとして観測される。図1にメソ位を重水素化したOEPおよびそのメソ位にフェニル基を一つあるいは二つ導入したものの3価 π カチオンラジカルのDNMRを示した。メソ位置換の数が増えるにしたがって、メソ-Dの常磁性シフトが著しく大きくなる。この傾向は置換基をClにかえても同様であった。この結果はOEPのメソ位に置換基を導入していくとラジカル軌道が a_{1u} から a_{2u} に変化していくことを示している。また、モノ置換、ジ置換体の常磁性NMRシフトの温度変化はキュリ

一則に従わず、 a_{1u} 、 a_{2u} 両状態が熱的に混ざりあった状態にあることを示唆している。このNMRシフトの温度変化をシミュレートすることから両状態のエネルギー差を見積ってみたところ図2のようになり a_{1u} 、 a_{2u} ラジカル軌道のクロスオーバーが起こっている。すなわち、OEPのメソ位をモノ置換すると a_2 (a_{1u})、 b_2 (a_{2u}) 軌道が殆ど縮重し、両ラジカル状態が混じるのである。

一方、ポルフィリンの一つのピロール環が還元されたクロリンの鉄3価 π カチオンラジカルでは a_2 (a_{1u}) と b_2 (a_{2u}) ラジカル軌道は充分離れており、メソ位置換によってそのクロスオーバーは起こらず常に a_2 状態にあることもわかった。

2. 鉄3価メソ-ヒドロキシポルフィリンの特異な電子構造と酸素との反応性 (2)

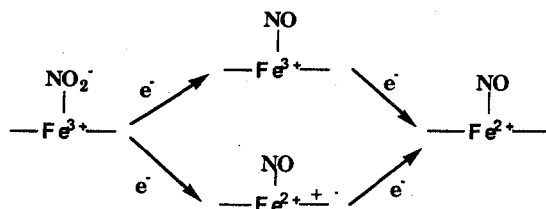
上述のメソ位にモノ置換されたポルフィリン錯体は天然にはあまり存在しないが、そのうちの一つであるメソ-ヒドロキシポルフィリン (ポルフィリンのメソ位が水酸化された) は生体内のヘムオキシゲナーゼによるヘムから胆汁酸へのヘム代謝反応の中間体として知られている。この化合物がなぜ酸素にたいして高い反応性を示すのか、またなぜ酸素がポルフィリンの特定の部位 (ピロール環の α 位) と反応するのかを明らかにするために、鉄3価メソ-ヒドロキシOEPの電子構造を調べた。

嫌気条件下で合成したこの化合物のピリジン溶媒中での電子スペクトルは鉄2価、鉄3価ポルフィリンのものとは異なり、ESRも特異で、メスバウアースペクトルは鉄2価を示していた。そこでNMRスペクトルを測定すると高磁場側111と154 ppmに大きく常磁性シフトしたメソ位のプロトンシグナルが観測された。これはポルフィリンに π ラジカルが生成していることを示している。このラジカルは種々の溶媒の効果を調べた結果、ピリジン溶媒中でメソ位の水酸基がプロトン解離したエノレートアニオンから鉄に一電子分子内移動した鉄2価オキシポルフィリン中性 π ラジカルであると同定された。

またNMRシフトはキュリー則に従わず (1) で述べたメソモノ置換ポルフィリン π カチオンラジカルと同様、 a_2 、 b_2 ラジカル状態が殆ど縮重して熱的に混じっていることがわかった。いまこの二つのラジカルの電子スピンの平均値をとるとメソオキシ基の隣のピロール α 炭素上の π スピン密度が最も大きくなり、従来実験的に示されてきた酸素分子の攻撃部位を合理的に説明できる。

3. ニトロシル鉄2価クロリン π カチオンラジカルの常磁性NMR (3)

鉄ポルフィリン環の一部が飽和された鉄クロリン、鉄イソバクテリオクロリン錯体を補欠分子族として含む亜硝酸還元酵素は、亜硝酸イオンを NO 、 N_2O 、 N_2 に還元する反応を触媒する。この酵素反応中に中間体として鉄2価ニトロシル錯体が存在することが見いだされているが、還元過程において下図のいずれの経路を経るのかを調べるため、安定な鉄2価錯体の一電子酸化生成物の同定とその電子構造を常磁性NMRを用いて検討した。



鉄3価ニトロシル錯体は不安定であるため、安定な鉄2価錯体を一電子酸化したところESRスペクトルは消失した。一方NMRスペクトルは大きく常磁性シフト(40-200ppm)したシグナルを与え、クロリン環が酸化されてニトロシル鉄2価クロリン π カチオンラジカルが生成したことを示した。NOの電子スピンとクロリン環上の電子スピンの相互作用で電子スピンの緩和時間が短くなりNMRスペクトルが観測されるのである。コンタクトシフトの値からこのラジカル電子は a_2 を占めていることがわかった。また、この常磁性シフトしたシグナルのキュリー則に従わない温度依存性は、両スピン間に弱い反磁性てき相互作用を考慮することによってシミュレートすることができた。

また、軸配位子としてイミダゾールを用いると、ニトロシル鉄3価クロリン錯体ができることがわかり、これより酵素反応サイクルではヒスチジンが配位した活性中心において π カチオンラジカルよりはむしろ鉄3価クロリンを経由することが示唆される。他方、イソバクテリオクロリン錯体では軸配位子があるなしにかかわらず π カチオンラジカルのみが生成した。

4. 低原子価鉄ポルフィリン錯体の常磁性NMR—鉄1価ポルフィリンか鉄2価ポルフィリン π アニオンラジカルか?—(4)

鉄2価ポルフィリンを一電子還元すると一般には鉄1価ポルフィリンが生成する。これと同じ酸化状態である鉄2価ポルフィリンアニオンラジカルはどのような場合に生成するか、またそのような場合電子構造はどうなっているのか、などを調べるために1と同様メソ位モノ置換鉄(II)OEPの一電子還元体の常磁性NMRを調べた。種々の置換基の中で電子吸引性のニトロ基をメソ位に導入すると一電子還元体は大きくコンタクトシフトしたポルフィリンラジカル特有のNMRシグナルを与えた。このNMRスペクトルと特異なESRスペクトルとよりこの一電子還元体は鉄1価ポルフィリンと鉄2価ポルフィリンアニオンラジカルの共鳴構造状態にあることがわかった。

文献

- (1) 森島、高向、城、J. Am. Chem. Soc., 106, 7666(1984); 森島、城、中島、Biochemistry, 25, 3576(1986); 藤井、森島、ibid., 投稿中。
- (2) 森島、藤井、城、佐野、J. Am. Chem. Soc., 108, 3858(1986); 藤井、森島、ibid., 投稿中
- (3) 小澤、藤井、森島、投稿中
- (4) 山口、森島、投稿中

特別講演 3

特 3

一次元 NMR - 伝統的手法の新しい応用 -

(都立大・理) 甲斐 荘正 恒

ONE-DIMENSIONAL NMR-TAKING A LEAF OUT OF A WISE MAN'S BOOK

MASATSUNE KAINOSHO, TOKYO METROPOLITAN UNIVERSITY

"Unfortunately, many of the hard-won lessons of the past on how to squeeze the most from a sample in a particular spectrometer are sometimes ignored or forgotten" (Sanders & Hunter, Modern NMR Spectroscopy, Oxford, 1987). We should realize that many chemical problems can be solved equally well or even better by careful application of one-dimensional NMR spectroscopy. A few such examples from my lab will be given here in order to show a breadth of NMR information, irrespective of their dimensionality, has not yet been fully explored.

我々は、本討論会における Bax、Wuethrich 両氏らの講演などを通じて、改めて多次元 NMR の進歩がいかに急速であり、素晴らしいものであるのかを再確認することができた。しかし「温故知新」の言葉もある。先人が旧世代の装置を縦横に駆使して多くの構造情報を得ようと格闘した歴史に学ぶことも無駄ではなからう。次元の如何にかかわらず、そのような創意と工夫がなければ決して独創的な研究が生まれえないと思うからである。本討論会の世話人でもある畏友荒田洋治氏からこのような趣旨で講演を依頼され、誠に正しい指摘であるとおひきうけしたものの、その責を果たすに十分な、創意溢れた一次元 NMR を用いた研究例をお示しできるかどうかは疑問である。但し、ここで示す例は全て最新の多次元 NMR 手法を用いたとしても容易には得られない構造情報が、如何にして NMR スペクトルから絞り出すことができたかについて私自身が語ることのできるものばかりである。

[1] 高い対称性を持つ分子の構造情報を得ることは容易ではない :

単純に見える NMR スペクトルが実は極めて複雑な構造に由来する場合がある。最近の例としては、いわゆるサッカーボール状の C_{60} 。(フラレンとも呼ばれる)、及びそれらの類縁体があげられよう。及ぶ炭素のクラスター化合物である C_{60} は全ての炭素が等価であり、只一本の ^{13}C -NMR シグナルを与える。このような場合、正しい構造を導くことは容易ではない。多次元 NMR は複雑なスペクトルから構造情報を得るには様々な工夫を凝らすことのできるものの、このようにすでに単純なスペクトルに対しては力が入らない。ましてや、 1H -検出法に活躍の余地はない。この分子にはプロトンが一つとして存在しないからである。

ヌクレオチド-ウラニル錯体、SSI、プロテアーゼ、DEALS 法、 χ -角の決定

かいのしょう まさつね

今から20年以上も前になるが、Feldmanらは5'-アデニル酸と硝酸ウラニルとのアルカリ性水溶液の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルが遊離のヌクレオチドとは全く異なったシグナルを与えることを見出した。 11 5'-ヌクレオチドが安定なウラニル(UO_2^{2+})錯体を形成するのである。NMRシグナルの帰属方法に疑問をもった私は、Feldmanの帰属が全く誤っていることを明らかにした。問題点は誤った帰属に基づいて"決定"されていた錯体の構造の訂正にある。我々は最終的にこの錯体が単純なスペクトルからは想像することの困難な、アデニル酸を4分子持つ2種類のテトラマーとアデニル酸8分子から構成されるオクタマー1種類の動的平衡状態にあることを明らかにした。 21 このためには360MHzや500MHzなどの高磁場NMR装置の利用が必須ではあったものの、最も重要な鍵となったのは1D $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの注意深い観察と、その観察から得られた仮説を検証する実験にあった、と私は考えている。

[11] 巨大なタンパク質にはそれなりの攻め方がある

我々がタンパク性プロテアーゼインヒビターSSIの構造と機能に関するNMR研究を開始したのは10年以上前のことになるが、。ダイマーとして23kDaの遊離状態のSSIですら「大」タンパク質であるが、プロテアーゼとの複合体では78kDaの「巨大」タンパク質となる。SSIのインヒビター機能を構造面から説明することが我々の最終的な目的であったが、用いるNMRプローブとして種々の理由から主鎖カルボニル炭素の $^{13}\text{C-NMR}$ シグナルが選ばれた。幸か、不幸か当時タンパク質の主鎖カルボニル炭素NMRシグナルは殆ど研究に利用されていなかったために、自由な発想で白紙に絵を書くことができた。 21

(a) アミド水素の重水素交換速度の新しい測定法 (DEALS法):アミド結合のカルボニル炭素シグナルが隣接する窒素上の水素が重水素に置換することにより同位体シフトすることはペプチドでは知られていた。タンパク質においては高次構造を有するために分子の表面と内部の区別が存在する。重水-軽水(1:1)溶液におけるカルボニル炭素シグナルの定常状態の線型を利用してこれらの区別が可能である。

(b) 側鎖の回転構造 (χ -angle) の決定:タンパク質の溶液中における構造決定技術は急速に進歩しているが、今後に残された重要な課題として側鎖原子団の立体配座の決定がある。特に、タンパク質表面残基の立体配座の定量的解析手法の開発は、それらの立体配座と機能の関連から多くの興味を集められている。 $^1\text{H-NMR}$ シグナルと比較してはるかに鋭い ^{13}C -シグナルを利用して二面角依存性スピン結合定数を求め、このような目的に利用することができる。

(c) 立体構造変化の検出プローブとしてのカルボニル $^{13}\text{C-NMR}$ シグナル:カルボニル炭素シグナルの化学シフトを様々な条件で測定することによりタンパク質の主鎖構造の変化を最も鋭敏に反映する構造プローブとしての価値が明らかとなった。プロテアーゼとの複合体形成に伴う構造変化、アミノ酸置換・化学修飾・側鎖のイオン化状態など様々な変化に対応するSSIの立体構造変化部位を決定できる。

文献:1) Feldman, I. et al., J. Amer. Chem. Soc., 89, 49(1967); 2) Kainosho, M. & Takahashi, M., Nucl. Acids Res., Symp. Ser., 12, 181(1983); 3) 甲斐荘、三宅、新生化学実験講座、第1巻(タンパク質Ⅲ)、151(1990)。

ポスターセッション

P 1 ~ P74

P1

非等価メチレンプロトンの絶対的帰属法 —ポリ(3-ヒドロキシブチレート)への適用—

(日本電子, 北大理) ° 小椋賢治, 引地邦男

Complete Assignment Technique of Unequivalent Methylene Protons

-Application to Poly(3-Hydroxy Butyrate)-

Kenji OGURA and Kunio HIKICHI

(NMR Application Laboratory, JEOL Ltd. and Faculty of Science, Hokkaido University)

In order to assign unequivalent methylene protons, we use the long range ^{13}C - ^1H coupling constant instead of ^1H - ^1H NOE. This method is applied to poly(3-hydroxy butyrate).

不斉炭素に隣接するメチレンプロトンは磁気的非等価になることが多い。非等価メチレンプロトン、 ^1H 間のピシナルスピン結合定数 ($^3J_{\text{HH}}$) によるKarplus式とNOEを利用して帰属する試みがポリ(3-ヒドロキシブチレート) (PHB) について最近なされた¹⁾。しかし、NOEは試料物質の運動相関時間に依存することが大であり、あらゆる試料について、この手法が適用できるとはいえない。そこで我々は ^{13}C と ^1H 間のピシナルスピン結合定数 ($^3J_{\text{CH}}$) を実測し、これについてもKarplus式を適用することにより非等価メチレンプロトンを絶対的に帰属する手法を考案した。

我々はこの手法をPHBに適用し、NOEによった場合と同等の結果を得ることができたのでここに報告する。

PHB (Aldrich製, 平均分子量800,000) 19mgを0.5mlの CDCl_3 に溶かした。すべての実験において、試料温度を26℃に保った。1次元スペクトルをJEOL ALPHA600 (^1H 共鳴周波数600MHz) を用いて測定した。2次元 ^{13}C ロングレンジJ分解²⁾スペクトルをJEOL EX400 (^1H 共鳴周波数400MHz) を用いて測定した。

Fig.1にPHBの分子式と ^1H 1次元スペクトルおよびその帰属を記す。メチンとのあいだの $^3J_{\text{HH}}$ 値は、高磁場側メチレンが7.4Hz, 低磁場側メチレンが5.7Hzであった。PHBの3種のコンフォーマー (trans (t), gauche (g), gauche* (g*)) をNewmann投影図法によりFig.2のように定義する。これらの存在確率をそれぞれPt, Pg, Pg*とする。trans位の $^3J_{\text{HH}}$ をJtH, gauche位の $^3J_{\text{HH}}$ をJgHとすると、実測スピン結合定数であるJ α H, J β Hについて以下の式が成立する。

$$PtJtH + PgJgH + Pg*JgH = J\alpha H$$

$$PtJgH + PgJtH + Pg*JgH = J\beta H$$

$$Pt + Pg + Pg* = 1$$

Boveyによる³⁾ JgH=2Hz, JtH=11Hzを利用してこの式を解くと、Fig.2のH α が高磁場側信号とすると (Pt, Pg, Pg*) = (0.42, 0.58, 0) となり、H β が高磁場側信号とすると (Pt, Pg, Pg*) = (0.58, 0.42, 0) となる。

次に、2次元 ^{13}C ロングレンジJ分解スペクトル (Fig.3) からメチレンプロトンとメチル ^{13}C 間のおおよその $^3J_{\text{CH}}$ 値を読み取った。Fig.3から高磁場側は3.5Hz, 低磁場側は4.7Hzと読むことができる。これらの値は ^1H 選択的照射のために実際よりも小さい値となっているが、この一連の実験で ^1H 照射磁場強度は一定に設定したため、 $^3J_{\text{CH}}$ 値の大小関係には信頼性がある。ここで、 $^3J_{\text{HH}}$ と同様の式が $^3J_{\text{CH}}$ についても成立する。

$$PtJgC + PgJgC + Pg*JtC = J\alpha C$$

$$PtJtC + PgJgC + Pg*JgC = J\beta C$$

ポリ(3-ヒドロキシブチレート) / 非等価メチレンプロトン / スペクトル帰属

おぐら・けんじ ひきち・くにお

$$P_t + P_g + P_{g^*} = 1$$

$P_{g^*} = 0$ を用いてこの式を変形すると

$$J_{tC} - J_{gC} = (J_{\beta C} - J_{\alpha C}) / P_t$$

となる。Marshall⁴⁾によると、 $J_{tC} > J_{gC}$ であるから、この式が成立するためには $J_{\beta C} > J_{\alpha C}$ でなければならない。よってメチレンプロトンのうち高磁場側信号がFig.2の H_α であり、低磁場側信号が H_β であると絶対的に帰属できる。したがって、コンフォマーの存在確率は $(P_t, P_g, P_{g^*}) = (0.42, 0.58, 0)$ である。

この結果はさきに触れたNOEによる解析結果と一致している。 $^3J_{CH}$ 値を実測することはポリマーよりも低分子有機化合物において容易であり、ここで報告した手法は、NOEによる手法よりも汎用性の点で優れている。

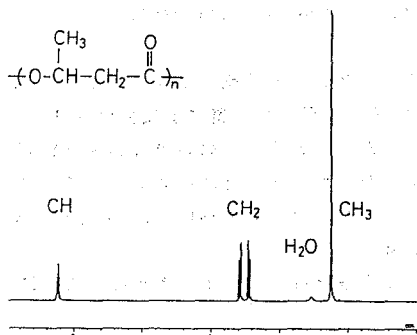


Fig.1. 1H NMR spectrum of PHB.

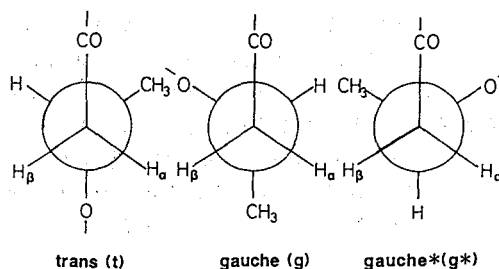


Fig.2. Newmann projections of PHB.

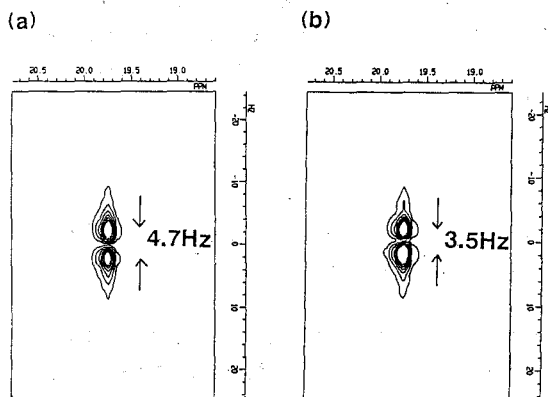


Fig.3. The methyl region of ^{13}C long range J resolved spectra. High field methylene proton(a), and low field methylene proton(b) are selectively irradiated.

文献

- 1) N.Kamiya, et al., *Macromolecules* 23,1313(1990).
- 2) 瀬戸治男, 降旗一夫, *日本電子ニュース* 24, 37(1984).
- 3) F.A.Bovey, "High Resolution NMR of Macromolecules"; Academic Press, 1972.
- 4) J.L.Marshall, "Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR Couplings"; Verlag Chemie.Int., 1983.

等価核のNMR的非等価性に着目した C_2 対称分子の構造解析
(北大・農)川端 潤、○福士江里、水谷純也

Structure Elucidation of C_2 Molecules
from a Viewpoint of the Non-equivalency of Equivalent Nuclei in NMR

Jun Kawabata, Eri Fukushi and Junya Mizutani
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Structure elucidation of C_2 symmetric molecules by NMR methods sometimes falls into difficulties in distinguishing two equivalent nuclei. As to a pair of equivalent carbons, however, an asymmetric $^{12}C/^{13}C$ isotopomer of 2.18% natural abundance is only detectable in ^{13}C NMR, since a $^{13}C/^{13}C$ isotopomer is rare. In the same way, equivalent protons are also distinguishable as $^{12}C-H$ and $^{13}C-H$ in the $^{12}C/^{13}C$ species. In this paper, we propose 2D ^{13}C -coupled HMQC-NOESY and HMQC-ROESY sequences as well as the time-saving 1D version of the latter for detecting NOEs between equivalent protons which have never been observed by previous methods. The stereochemical assignments of naturally occurring C_2 molecules, cycloshizukaol A and hopeaphenol, were achieved by these methods. Detection of connectivity between equivalent carbons in a C_2 molecule by distinguishing $^1J_{CH}$ and $^2J_{CH}$ is also discussed.

はじめに

C_2 対称分子には2つの等価なユニットが存在するため、構造決定において等価な核の区別が必要となることがある。本報ではNMR活性な ^{13}C の同位体存在比が1.09%と低いことを利用して等価核を区別した測定法を紹介する。 C_2 分子では、等価な2つの炭素の両方が ^{12}C の分子(a)が全体の97.8%を占めるが、これは ^{13}C NMRに検出されないの除外すると、一方が ^{12}C 、他方が ^{13}C の分子(b)が残りの99.4%を占め、両方が ^{13}C の分子(c)は0.6%と存在比が低く無視しうる。すなわち、 ^{13}C NMRで観測しているのは非対称な分子(b)であり、それぞれのユニットの区別が可能である。水素についても ^{13}C に直結した 1H がダブルレットとなることから $^{12}C-H(A)$ と $^{13}C-H(B)$ を区別できる。この C_2 対称分子のNMR的非対称性を利用し、天然 C_2 分子cycloshizukaol A(1)やhopeaphenol(2)の構造解析に応用した。特に、従来法では検出不可能であった等価なプロトン間のNOE観測を、2D/1D ^{13}C -coupled HMQC-NOESY(ROESY)により達成した。また等価な炭素間の結合を LSPD、 ^{13}C -coupled COLOCなどを用いて証明した。

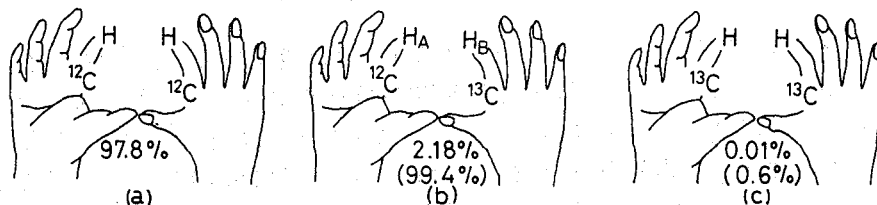
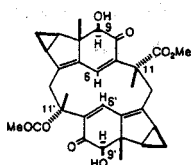


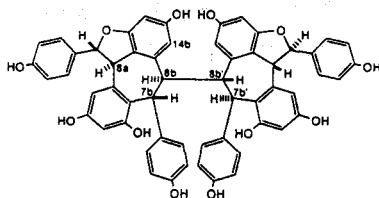
Fig.1. Three isotopomers as regards a C-H site of a C_2 molecule.

keywords: C_2 molecule, isotopomeric asymmetry, equivalent nuclei, HMQC-NOESY, HMQC-ROESY, INEPT-LSPD, COLOC, HMBC.

かわばたじゅん、ふくしえり、みずたにじゅんや



1



2

1) 等価なプロトン間のNOE観測

通常のNOE差スペクトルや、2D NOESY では等価なプロトン間のNOE観測はできないが、等価なプロトンを $^{12}\text{C-H(A)}$ と $^{13}\text{C-H(B)}$ として区別し、これらの間のNOEを化学シフトが近いプロトンのNOE観測法として発表された2D $^{13}\text{C-coupled HMQC-NOESY}^{1)}$ を応用して観測した。この方法ではHMQCシグナルを与えるプロトンは $^{13}\text{C-H(B)}$ 、そこから磁化移動を受けてNOEシグナルを与えるプロトンは $^{12}\text{C-H(A)}$ であり、(B)はサテライト位置に、(A)はセンター位置に逆位相で検出される。実際この方法で化合物1を測定したところH-6/H-6'およびH-9/H-9'にNOE相関が認められ(Fig.2)、12員環のコンホメーションを決定することができた。

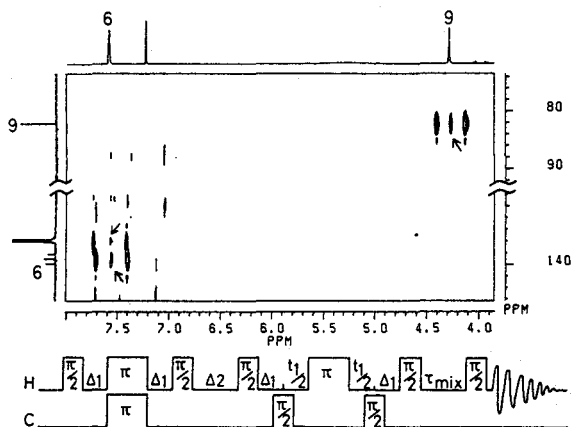


Fig.2. Part of the 2D $^{13}\text{C-coupled HMQC-NOESY}$ spectrum of 1.
Negative cross-peaks are marked by arrows. The mixing time was set to 0.4 s.

化合物2は分子量906であるため500MHzの装置ではNOE強度が弱く、上述のHMQC-NOESYでは、HMQCシグナル以外にはほとんど相関が得られなかった(Fig.3A)。そこでHMQC-NOESYのパルス系列の後半の混合時間をスピロックにおきかえたHMQC-ROESY法を作成し、化合物2を測定した(Fig.3B)。7b位のH- ^{13}C のHMQCダブレットの中心に明瞭な負のROEシグナル($^{13}\text{C-H} \rightarrow \text{H-}^{12}\text{C}$)が得られたことからユニット間の相対配置を決定することができた。1D HMQC-ROESY法は、1D HMQC-TOCSY $^{2)}$ と同様HMQC部分をSELINCOR $^{3)}$ におきかえて作成した。 ^{13}C 選択 $\pi/2$ パルスは2.2 msの矩形とし励起周波数をC-7bにおいたところ、2Dスペクトル同様にHMQCシグナルとその逆位相のROEシグナルが得られた(Fig.3C)。1D HMQC-NOESY については現在検討中である。

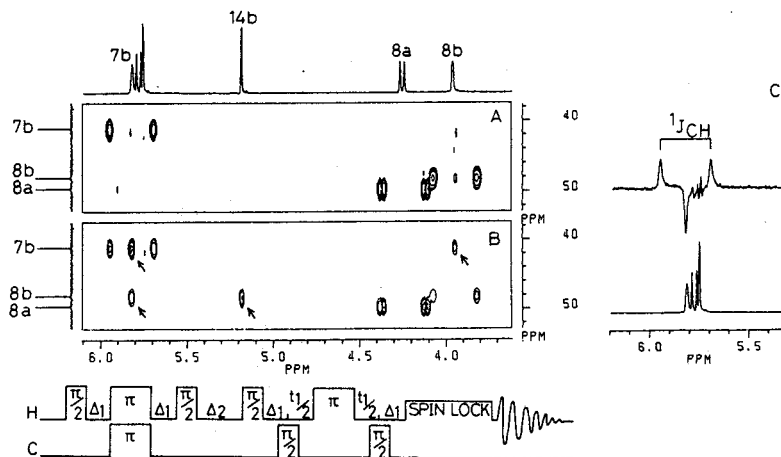


Fig.3. Part of the 2D ^{13}C -coupled HMQC-NOESY (A) and -ROESY (B), and 1D HMQC-ROESY (C) spectra of 2.

Negative cross-peaks are marked by arrows. The pulse sequences used are shown in Fig.2 for (A), and under the spectral panels for (B) and (C). The mixing time for each experiment was 0.4 s. A 2.5 kHz spin-lock field centered at δ 6.7 (B) and 7.5 (C) ppm was used. The 1D HMQC-ROESY spectrum with the selective excitation of C-7b (C) was obtained using a selective ^{13}C pulse as the last $\pi/2$ pulse of the 2D sequence. The evolution time $t_{1/2}$ was fixed to 1.8 ms.

2) 等価な炭素間の結合の証明⁴⁾

化合物2は等価なユニット同士がただ一つの結合8b-8b'で結ばれたタイプの C_2 分子であり、その対称性は、中心結合の回りのユニット同士のなす角によらず常に保持される。C-8b、C-8b'は等価でありこの間の結合は通常の方法では証明が困難であるが、 ^{13}C NMRにおいては8bが ^{12}C 、8b'が ^{13}C である非対称な分子を観測していることを利用し、この間の結合を証明した。

まず、INEPT-LSPDによりH-8b(H(A))/C-8b'間の ^2J を観測した。 ^1H NMRにおいて、H-8bは中心に(^{12}C - ^{12}C 分子のピークと重なって)、H-8b'はサテライト位置にあらわれる。中心位置のみを弱い出力で照射するとC-8b'シグナルはH-8b'との $^1\text{J}_{\text{CH}}$ による分裂を残したまま、形がシャープに変化する(Fig.4)。次にCOLOCにより $^1\text{J}_{\text{CH}}$ と $^2\text{J}_{\text{CH}}$ を区別することを試みた。COLOCにおいて展開時間の中間の ^{13}C π パルスを除くと相関ピークは J_{CH} に従って分裂する⁵⁾が F_1 方向の分解能の低さから $^1\text{J}_{\text{CH}}$ のみが分裂して観測される。遅延時間 $\Delta_1=55$ msで測定するとH-8b'/C-8b'の直結のダブルレットのみが観測される(Fig.5A)が、 $\Delta_1=90$ msで測定するとこれが消失し、H-8b/C-8b'のロングレンジ相関ピークのみが現れてくる(Fig.5B)。一方HMBCでは、パルス系列に元々 ^{13}C デカップリングを含んでいないのでH-8b(8b')/C-8b'の相関はロングレンジのシングレットと直結のダブルレットが重なったトリプレットとして観測される。

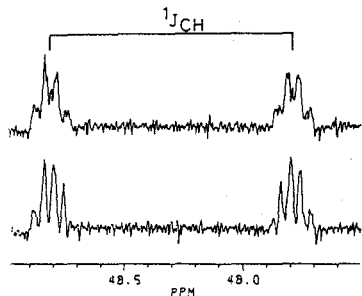


Fig.4. The INEPT-LSPD spectra of C-8b of **2** obtained by irradiation at the central peak of H-8b (lower) and at the spectral end for reference (upper).

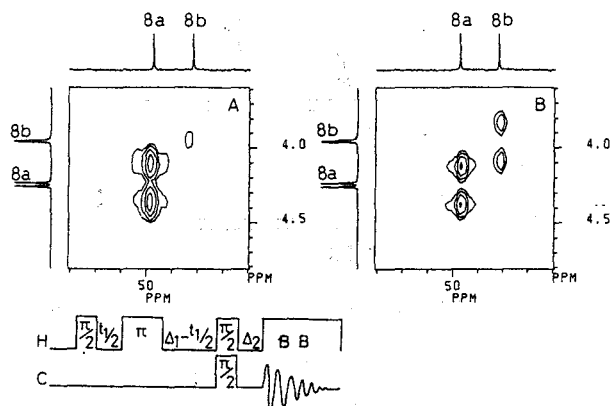
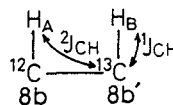


Fig.5. Part of the modified COLOC spectra of **2**.

(A) $\Delta_1=90$ ms and $\Delta_2=45$ ms
 (B) $\Delta_1=55$ ms and $\Delta_2=27.5$ ms.



おわりに

近年、生理活性をもつ天然 C_2 対称分子の数が増加しつつあるが、その立体化学の決定にあたって等価なプロトン同士のNOEはユニット同士の位置関係を示す有用な情報を与える。化合物**1**は12員環のコンホメーションが不明のため11位の立体化学が決定されていなかったが、今回H-9/H-9'間にNOEが存在することが証明されたため、立体化学がFig.6のように決定できた。また化合物**2**の中心結合8b-8b'の回りの2つのユニットの位置関係は、分子模型から推定するのみであったが、H-7b/H-7b'間にROE相関が得られたことからこの配置(Fig.6)の正しさが証明された。また平面構造の決定においても、**2**の8b-8b'のような等価な炭素同士の結合が証明された。いずれもNMR活性な ^{13}C の天然存在比が低いことを逆用して、 C_2 対称分子がNMR的には非対称であることに着目した手法であり、今後種々の応用が期待される。

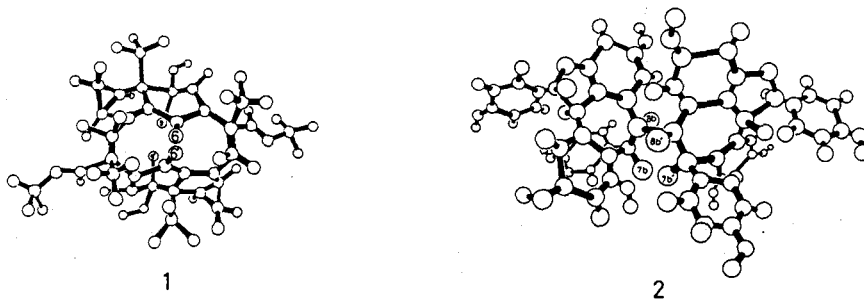


Fig.6. Perspective view of **1** and **2**.

References

- 1) R.C.Crouch, R.B.McFadyen, S.M.Daluge and G.E.Martin, *Magn.Reson.Chem.*, **28**,792(1990); G.E. Martin and R.C.Crouch, *J.Nat.Prod.*, **54**,1(1991).
- 2) R.C.Crouch, J.P.Shockcor and G.E.Martin, *Tetrahedron Lett.*, **31**,5273(1990).
- 3) S.Berger, *J.Magn.Reson.*, **81**,561(1988).
- 4) J.Kawabata, E.Fukushi and J.Mizutani, *Magn.Reson.Chem.*, in press(1991).
- 5) S.Prytulla, J.Lauterwein, M.Klessinger and J.Thiem, *Magn.Reson.Chem.*, **28**,888(1990).

NMRによるブチルリチウム-ピリジン付加体における
ピリジル置換基およびフェニル置換基の効果に関する研究

名古屋大・工 吉野明広、○中村典雅、高橋憲助

NMR Study of Pyridyl- and Phenyl-substituted Effects
for n-Butyllithium-pyridine adducts.

Akihiro Yoshino, Norimasa Nakamura and Kensuke Takahashi

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

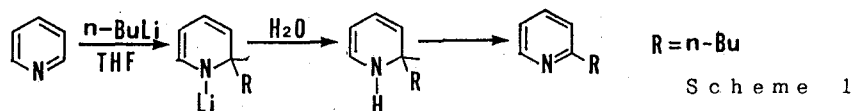
NMR spectra have been observed for seven n-butyllithium-pyridine adducts substituted by 2-pyridyl and phenyl groups. The structure and the substituent effects for delocalization of excess negative charge of adducts have been investigated. For 2-pyridyl substituent, the excess charge were delocalized, while for phenyl one, the delocalized excess charge were unexpectedly small. ^1H and ^{13}C NMR spectra of n-butyllithium-bipyridine adducts(1:1 and 2:1) show hindered rotation about the bond between the two rings since partial double-bond character is increased. On the contrary, phenyl substituent behaves like a free rotator.

1. はじめに

近年、n-BuLiのようにアルカリ金属を対イオンとして持つ有機金属化合物は、有機合成の分野において重要な位置を占めており、これを用いた反応の機構や中間体の構造を研究することは、有機金属化合物を用いた反応をより深く理解する上で重要と思われる。

そこで、演者らはn-BuLiの反応相手としてピリジン⁽¹⁾とその誘導体を選び、これらを真空中で反応させることにより生ずる中間体アニオンの構造を研究した。

本研究における一連の反応はScheme 1 に示す通りである。



まずピリジンにn-BuLiを作用させると、ピリジンの α 位と窒素にそれぞれn-Bu基とリチウムが付加した中間体アニオン 1.a が生じ、これを H_2O で失活させるとリチウムが水素で置換されたジヒドロ体 1.b が生じる。さらにこの 1.b は放置しておくと水素が脱離してより安定な2-n-ブチルピリジンを生じる。

^1H NMR・ ^{13}C NMR・束縛回転・置換基効果・ブチルリチウム-ピリジン付加体

よしの あきひろ、 なかむら のりまさ、 たかはし けんすけ

演者らは Fig. 1 に示されるような 7 種のアニオン (以下 Li 体と呼ぶ) と、ジヒドロ体を合成し、中間体においてピリジル基とフェニル基が余剰負電荷の共鳴安定化に及ぼす効果について検討した。

2. 実験

出発物質は、すべて市販のものをそのまま用いた。中間体アニオンの

合成はすべて高真空下 (2.0×10^{-5} mm Hg 以下) において、*n*-ヘキサンまたは *n*-ヘキサン-THF 混合溶媒中、ピリジンおよびその誘導体を *n*-BuLi と接触させ、次いで溶媒を THF または THF-*d*₆ に交換し、これを試料管に移し溶封した。

試料濃度は 0.4 ~ 1 M であり測定には Varian XL-200 分光器および Varian UNITY-400 分光器をそれぞれ ¹H は 200MHz、400MHz で、¹³C は 50.3MHz、100.6MHz で操作した。

測定は室温で行い、シグナルの帰属は proton decouple、¹H-¹³C selective decouple および ¹H-¹³C COSY スペクトルより行なった。

なお化学シフトは溶媒のピーク (THF: ¹H 1.79ppm, ¹³C 26.40ppm; THF-*d*₆: ¹H 1.75ppm, ¹³C 25.40ppm) を基準として用いた。

3. 結果と考察

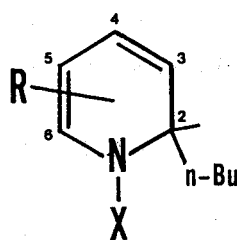
Table 1 に得られた Li 体と H 体の ¹³C 化学シフトとその差を示した。

Table 1 ¹³CNMR chemical shifts of the adducts and the differences between Li form and H form. (in ppm)

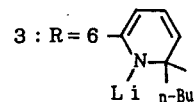
	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	ΔC ₂	ΔC ₃	ΔC ₄	ΔC ₅	ΔC ₆
1a	57.16	98.11	126.29	91.05	150.03	4.68	-16.94	1.39	-3.05	15.76
1b	52.48	115.05	124.90	94.10	134.27					
2aE	58.31	97.04	127.68	86.78	168.26	5.32	-21.86	2.64	-7.90	26.55
2aZ	59.15	97.20	127.68	87.37	168.26	6.16	-21.00	2.64	-7.31	26.54
2b	52.99	118.90	125.04	94.68	141.72					
3a1	59.25	97.10	129.13	88.59	159.19	6.36	-23.94	4.40	-9.21	17.21
3a2	58.86	97.10	128.53	88.06	159.01	5.97	-23.94	3.80	-9.74	17.03
3b	52.89	121.04	124.73	97.80	141.98					
4a	57.81	97.16	126.69	88.31	156.80	4.59	-18.43	4.73	-6.36	12.83
4b	53.22	115.59	121.96	94.67	143.97					
5a	58.58	101.24	124.27	99.97	150.59	5.97	-15.10	-0.39	-7.07	17.79
5b	52.61	116.34	124.66	107.04	132.80					
6a	58.10	94.87	144.86	89.79	150.93	4.94	-17.09	7.80	-4.63	15.60
6b	53.16	111.96	137.06	94.42	135.33					
7a	57.78	97.37	124.00	91.21	151.19	4.46	-29.31	2.66	-4.90	17.99
7b	53.32	126.68	121.34	96.11	133.20					

以前の報告で Fraenkel らは、¹H NMR の化学シフトから 1a の N-Li 結合は共有結合性を帯びていると報告している⁽¹⁾。したがって Li 体の構造を研究するには互いに構造が類似している Li 体と H 体とのシフトを比較することが妥当と考えられる。

Table 1 の 1a と 1b のシフト差を見ると、Li 体になることにより C(3) と C(6) がそれぞれ大きく高磁場および低磁場シフトしているのに対し、C(4) と



1: R=H
2: R=6-(2-Py)



4: R=6-Ph
5: R=5-Ph
6: R=4-Ph
7: R=3-Ph

a: X=Li
b: X=H

Fig. 1

C (5) のシフト差の変化は少ないことがわかる。ところで、これら四つの炭素は共役しており四つの炭素のシフト差を加え合わせると -2.84ppm と比較的小さな値になった。以上の結果は H 体が Li 体になっても環炭素の全負電荷はあまり増加せず、むしろ C (6) から C (3) へ負電荷の移動が起こったことを示している。また Li 体になったことによる同様な負電荷の移動は、他の Li 体でも観測された。

次に、置換基がアニオンの構造および電荷分布に及ぼす影響を検討した。

ビリジル基の場合、化学シフトが H 体と比較して C (3') ~ C (5') が約 12 から 30ppm 高磁場シフトしているのが観測された。このことは 2_a のビリジル基に負電荷が流入していることを示している。このような負電荷の移動が起きるには両方の環の π 電子間の相互作用が不可欠であることから、2_a の二つの環は互いにほぼ同一平面上にあり、両環を結ぶ結合の二重結合性は増加していると考えられる。

一方、フェニル基の場合では化学シフトは H 体と比較して 0.1 から 7.6ppm しか高磁場シフトしておらずビリジル基ほど負電荷を収容していないと判断される。特に 2_a と同じ位置に置換基が結合している 4_a のフェニル基がほとんど負電荷を収容していないことから判断しても、2_a における 2-ビリジル基は余剰負電荷の安定化に大きく役立っていると言える。

さらにフェニル基の結合位置が余剰負電荷の安定化に及ぼす影響を検討した。フェニル基のパラ位の化学シフトは他の位置と比べて電荷密度をよく反映すると報告されているので⁽²⁾、パラ位のシフトを用いてフェニル基の電荷密度を評価した。Table 2 に各フェニル置換基における Li 体と H 体のパラ位のシフト差を示した。

Table 2 The differences of the chemical shifts at para position

	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
$\Delta\delta$	-2.75	-7.63	-1.80	-6.58

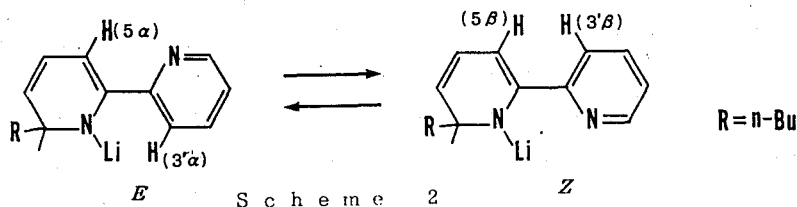
Table 2 を見ると β 位が置換された 5 と 7 が 4 および 6 より高磁場シフトしていることから、より多くの負電荷を収容していることがわかる。これは β 位がもともと負電荷を蓄積している位置であるためと考えられる。

ところで、5_a と 7_a はともに 3-フェニルビリジンから同時に生じたアニオンであり、その存在比は $^1\text{H NMR}$ の積分比から 5_a : 7_a = 73.1% : 26.9% となった。このように存在比に偏りが生じた原因としては、反応時のフェニル基の立体障害が主に考えられる。

2_a の両環を結ぶ結合の二重結合性の増加の証拠として、2_a と 3_a では $^{13}\text{C NMR}$ において四級炭素を除く環炭素に対し二つのサイトが観測された。また $^1\text{H NMR}$ においても 2_a の 5 位と 3' 位、3_a の 5 位の吸収に対して二つのサイトが観測された (Fig.2 参照)。すなわち 2_a と 3_a では両環を結ぶ結合の二重結合性が増加したために環の回転が束縛を受け、NMR のタイムスケールで Scheme 2 に示したような E-Z 異性体が区別されたと考えられる。

二つのサイトの出現の原因が束縛回転によるのは、-60℃で 3_a の $^{13}\text{C NMR}$

を測定したところ、常温測定時より二つのシグナルのシフト差が広がったことから確認された。



続いて 2_a の 5 位と 3' 位プロトン間の NOE を測定することにより *E* 体と *Z* 体の帰属を試みた。その結果、5 α (3' α) ではシグナル強度に変化が見られなかったのに対し、5 β (3' β) では 7.3% のシグナル強度の増加が認められた。そして 5 α 位と 5 β 位の積分比から、*E* 体 : *Z* 体 = 66.3% : 33.7% となった。この結果は 2-ピリジル基の窒素とリチウムとの相互作用よりも窒素の孤立電子対とリチウム原子との反発が大きいためと考えられる。

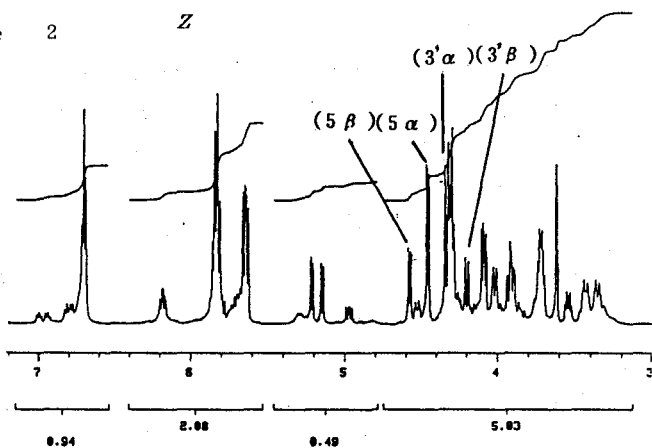


Fig. 2

一方 3_a の場合、問題としている 5 位の化学シフトが同じであるため、NOE による帰属を行なうことができなかった。しかしその存在比は $^1\text{H NMR}$ の積分比から 55.9% と 44.1% であった。3_a の *E* 体と *Z* 体の存在比は 2_a と比較して偏りが少なくほぼ 1 : 1 で存在していることから、3_a の *E* 体と *Z* 体の安定性の差は 2_a における *E* 体と *Z* 体の安定性の差より小さい。

これに対し、フェニルピリジンから生ずる付加体 4_a - 7_a では、2_a および 3_a に対し観測されたような両環を結ぶ結合の二重結合性の増加は認められず、NMR のタイムスケールでフェニル基は自由回転をしていることがわかった。これは、フェニル基が余剰負電荷をほとんど収容していないことから明らかである。

4. 結論

本研究系において 2-ピリジル基は余剰負電荷の共鳴安定化に寄与しているのに対しフェニル基はほとんど寄与していない。

2_a と 3_a は NMR のタイムスケールで環の回転が束縛されている。このことは両環を結ぶ結合の二重結合性の増加を示唆している。

それに対しフェニル基は NMR のタイムスケールで自由回転をしている。

謝辞

UNITY-400 の測定をして頂きました Varian 社の串田克彦氏に感謝致します。

References

- (1) G. Fraenkel *et al*, *Tetrahedron Letters*, 15, 1825, (1968)
- (2) E. Buncel *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 303, (1985)

P4

溶液内におけるスチルベンジアニオンのNMR研究

(筑波大化) ○小泉 輝武・横山 幸弘・菊池 修

An NMR Study of Stilbene Dianions in Solution.

Terutake Koizumi, Yukihiro Yokoyama and Osamu Kikuchi

(Department of Chemistry, University of Tsukuba)

The dianions of *cis*-, *trans*-stilbene, and *trans*-4-methylstilbene were prepared in THF- d_6 and their 1H and ^{13}C NMR spectra were measured. The NMR data demonstrate that the two isomeric stilbene dianions form indistinguishable species even at $-70^\circ C$. From the coupling constants obtained, it is concluded that the configuration around the central bond of the dianions is not fixed at the *trans*-form but the intramolecular rotation occurs about the bond in the NMR time scale. While, the chemical shifts of two ortho and meta positions of phenyl ring of the dianions are nonequivalent, indicating that the rotation about the α - and ipso-carbon bond is restricted even at room temperature. The charge transmission into the phenyl rings is almost governed by exact $p\pi$ - $p\pi$ resonance interaction between the α - and ipso-carbon.

(序)

スチルベンは、典型的アリアルエチレンであり、そのジアニオンは電子状態及び構造の観点から興味ある分子種である。溶液中のスチルベンジアニオンについては、電子スペクトル¹⁾、X線研究²⁾等が既に報告されている。電子スペクトルから、スチルベンジアニオンは溶液内においてトランス体で平面またはほぼ平面であると考えられている。またTMED及びPMDTAが配位しているスチルベンのジリチウム塩について、スチルベン炭素が平面でトランス体を形成していることがX線研究により明らかにされている。更に、スチルベンジアニオンは溶液内でのシス-トランス異性化反応における中間体であり、スチルベンジアニオンの二つの異性体は区別し得る分子種であると報告されている³⁾。一方溶液中のスチルベンジアニオンの構造、電荷分布に関する情報が直接的に得られるNMR研究は未だなされていない。これはスチルベンジアニオンの調製が困難なためであろう。

最近、溶液内でシス-、トランス-スチルベン及びトランス-4-メチルスチルベンから、対応するジアニオンをリチウム金属還元によって生成させ、これらのNMRスペクトルを初めて観測した。得られたデータより、ジアニオンの構造及び電子状態等についての検討を行なった。

スチルベンジアニオン・分子内回転・電荷分布

こいずみ てるたけ・よこやま ゆきひろ・きくち おさむ

(実験)

出発物質であるシス-及びトランス-スチルベン(CS, TS)は市販品を、またトランス-4-メチルスチルベン(4MS)はWittig反応により合成したものをを用いた。これらの出発物質を乾燥脱気したTHF-d₈に溶解させ、その溶液を真空下でリチウム金属に接触させた。得られた暗赤色の溶液をろ過し、NMR試料管に密封した。

NMR測定は日本電子社製 JNM-GXS400を用いて行なった。またスペクトルの帰属は、COSY、H-C COSYスペクトルによって確認した。

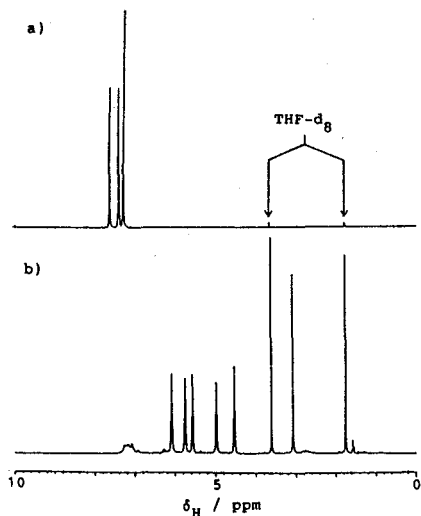


Fig.1 ¹H NMR spectra of TS and TS²⁻ in THF-d₈ at 400MHz. (a) TS at 27°C, (b) TS²⁻ at -50°C.

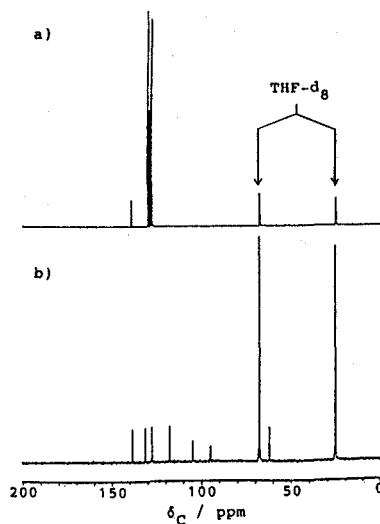


Fig.2 ¹³C NMR spectra of TS and TS²⁻ in THF-d₈ at 100MHz. (a) TS at 27°C, (b) TS²⁻ at -70°C.

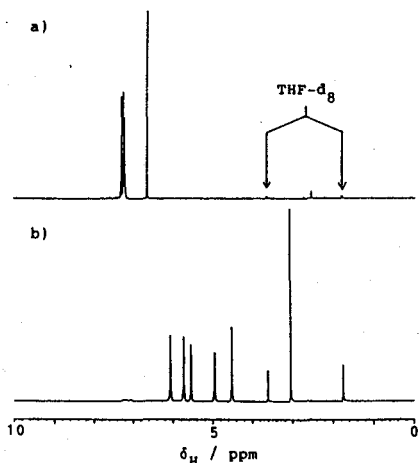


Fig.3 ¹H NMR spectra of CS and CS²⁻ in THF-d₈ at 400MHz. (a) CS at 27°C, (b) CS²⁻ at -50°C.

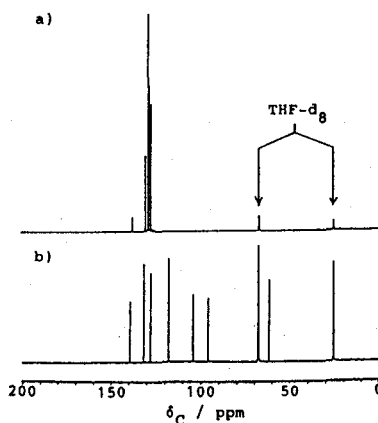


Fig.4 ¹³C NMR spectra of CS and CS²⁻ in THF-d₈ at 100MHz. (a) CS at 27°C, (b) CS²⁻ at -50°C.

Table 1. Proton NMR Data of The Carbanions and Their Precursors at 400 MHz

Compd.	Temp/°C	Chemical shifts/ppm						coupling/Hz ^{a)}		
		ortho	meta	para	α	ortho	meta	α	Me	$^3J_{aa}$
TS ²⁻	27	5.02	5.88	4.71	2.96					b)
		5.73	6.21							
	-30	4.98	5.78	4.59	3.01					10.8
		5.60	6.11							
	-50	4.96	5.73	4.52	3.06					11.0
CS ²⁻	-70	5.55	6.06							11.3
		4.93	5.68	4.45	3.10					
		5.49	6.01							
	27	5.02	5.88	4.72	2.96					10.2
		5.73	6.21							
4MS ²⁻	-30	4.98	5.78	4.58	3.01					10.4
		5.60	6.11							
	-50	4.95	5.73	4.52	3.05					10.9
		5.55	6.06							
	-70	4.93	5.67	4.45	3.09					10.9
	5.48	6.01								
4MS ²⁻	27	4.89	5.79	4.64	2.79	5.02	5.79	2.95	1.75	9.5
		5.70	6.18			5.79	6.08			
	-30	4.87	5.75	4.55	2.83	5.01	5.75	3.01	1.75	10.3
		5.60	6.11			5.70	6.03			
	-50	4.87	5.72	4.50	2.88	5.00	5.72	3.06	1.77	10.3
	5.57	6.07			5.66	6.00				
TS	27	7.57	7.35	7.24	7.21					16.4
CS	27	(7.18	-	7.29)	6.63					12.4
4MS	27	7.55	7.34	7.23	7.14	7.46	7.17	7.19	2.35	16.3

a) Measured from the ¹³C satellite spectra with accuracy of ±0.3Hz, except for 4MS²⁻ and 4MS. b) Not available because of broad signals.

Table 2. Carbon NMR Data of The Carbanions and Their Precursors at 100 MHz

Compd.	Temp/°C	Assignments										
		ipso	ortho	meta	para	α	ipso	ortho	meta	para	α	Me
TS ²⁻	27	140.7	103.0	127.7	97.7	59.7						
			117.9	131.6								
	-50	138.8	104.1	127.4	95.5	61.4						
			117.6	131.1								
CS ²⁻	-70	138.2	104.5	127.3	94.8	61.8						
			117.5	131.0								
	27	140.7	103.0	127.7	97.6	59.8						
			117.8	131.6								
4MS ²⁻	-30	139.4	103.6	127.5	96.2	60.9						
			117.5	131.3								
	-50	138.8	104.0	127.4	95.5	61.4						
			117.5	131.1								
4MS ²⁻	27	140.5	102.6	128.9	97.0	56.8	139.7	104.6	127.7	102.1	60.8	21.0
			117.9	131.8				117.2	131.7			
	-30	139.6	102.8	128.7	95.7	57.9	138.5	103.2	127.4	102.4	61.9	21.2
			117.6	131.6				117.5	131.6			
4MS ²⁻	-50	139.1	102.8	128.6	95.1	58.2	138.0	103.2	127.3	102.6	62.2	21.2
			117.5	131.5				117.5	131.5			
	TS	27	138.6	127.4	129.4	128.3	129.5					
CS	27	138.3	129.7	129.0	127.9	131.1						
4MS	27	138.8	127.3	129.4	128.1	128.5	138.1	127.3	130.1	135.8	129.5	21.4

生成したジアニオンを確認するために、TS²⁻をH₂OまたはD₂Oでクエンチした。クエンチ物のNMRデータより、クエンチによる1,2-ジフェニルエタンの生成が確認された (NMRデータ; $\delta_c(\text{CH}_2)=37.8$, $\delta_H(\text{CH}_2)=2.87$; $\delta_c(\text{CHD})=37.6$, $^1J_{cD}=20.3$, $\delta_H(\text{CHD})=2.88$)。

(結果及び考察)

得られたジアニオン及びその出発物質のNMRスペクトルを図1~4に、またそのデータを表1及び2に示す。溶液内の三種のジアニオンは、いずれも低温においても一種類のみで存在していることがわかった。TS²⁻とCS²⁻の化学シフトは、室温から-70℃の間で一致していることから、TS²⁻とCS²⁻はNMR時間スケールで区別できない、単一のステルベンジアニオン(S²⁻)として存在していることが明らかとなった。

ステルベンジアニオンにおいて、二つの分子内回転が存在し得る。表1からわかるようにジアニオンのビシナル結合定数($^3J_{aa}$)は、S²⁻で10.2~11.3Hz、4MS²⁻で9.5~10.3Hzである。この値は、アリルアニオンのシス及びトランスのビシナル結合定数(シス: 8.6Hz、トランス: 15.2Hz)の平均値に近い値を示している⁴⁾。従っ

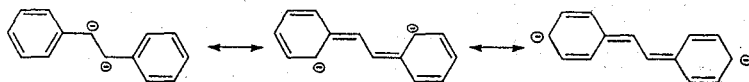


Fig.5 Resonance structures of stilbene dianion.

て S^{2-} 及び $4MS^{2-}$ は、いずれもトランス体で束縛されているのではなく、 $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 結合周りの分子内回転が存在すると考えられる。このことは、X線や電子スペクトルによる研究で得られた結果とは対照的である。

フェニル基についてみると、オルト位とメタ位の各々の 1H 及び ^{13}C の化学シフトは、中性分子では等価であるのに対し、ジアニオンではそれぞれ非等価である(表1、2)。これはジアニオンになることにより、 $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 結合間の回転が束縛されることを示している。

以上のことは、図5のような極限構造で説明できる。すなわち、スチルベンが二電子還元されることによって α 炭素がアニオン中心となり、 $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 間の二重結合が弱まる。そして $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 間の回転が容易に起こるようになる。この回転障壁は、一電子還元で得られるアニオンラジカルの回転障壁よりも小さいと考えられている³⁾。一方、共鳴の効果によって $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 間の結合の二重結合性が増し、回転が束縛される。

電荷分布について、表2より中性分子からジアニオンへの ^{13}C のシフト変化をみると、高磁場シフトの大きさは α 位 (約 -70ppm) > パラ位 (約 -30ppm) > オルト位 (約 -25~-10ppm) > メタ位 (約 -2~2ppm) \approx イブソ位 (約 1ppm) の様になり、これは図5の極限構造を反映させている結果となった。イブソ位以外のシフト変化は、ベンジルアニオン等の従来知られているカルバニオンと同様の傾向を示している。一方、イブソ位のシフト変化は、著しく異なっている。すなわち、イブソ位炭素は、ベンジルアニオンで約 12~20ppm⁵⁾、1,4-ジフェニルプタジエンジアニオンで約 6~8ppm⁶⁾ 低磁場シフトするが、スチルベンジアニオンでは殆ど変化しない。これはスチルベンジアニオンにおける芳香環への電子伝達が、ほぼ完全に共鳴により支配されることを示している。

(謝辞)

本研究にあたり、NMR装置の使用を許可していただいた、(株)ハリマ化成筑波研究所の近藤 寿博士と畑 憲明博士に深謝致します。

(参考文献)

- 1) H. Suzuki et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 45, 979(1972).
- 2) M. Walczak et al., J. Am. Chem. Soc., 98, 5531(1976).
- 3) T. A. Ward et al., J. Am. Chem. Soc., 97, 258(1975).
- 4) D. H. O'Brien, "Comprehensive Carbanion Chemistry," ed. by E. Buncl and T. Durst, Elsevier, New York(1980), Vol.5A, p.273.
- 5) K. Takahashi et al., Org. Magn. Reson., 6, 580(1974).
- 6) Y. Yokoyama et al., Chem. Lett., 1988, 589; Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 682(1989).

P5

溶液中の立体化学における緩和時間 T_1 の利用VIII —トロパンアルカロイドのコンフォメーション解析— (神女薬大) ○蔡 東玲 杉浦眞喜子 高尾植雄

APPLICATION OF RELAXATION TIMES T_1 TO STEREOCHEMISTRY IN SOLUTION VIII

—CONFORMATIONAL ANALYSES OF TROPANE ALKALOIDS—

T. Sai, M. Sugiura, N. Takao

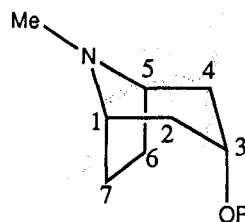
(Kobe Women's College of Pharmacy)

The relaxation method using selective (T_1^S) and bi-selective relaxation times (T_1^{BS}) have been applied to Tropine and Atropine. Their conformation have been discussed on r_{ij} derived from cross-relaxation σ_{ij} and τ_c . The σ_{ij} are obtained from T_1^S and T_1^{BS} and the τ_c are from $^{13}C T_1$. In the $CDCl_3$ solution, the piperidine rings of Tropine and Atropine have the flattened conformation.

[はじめに]

Atropine, Scopolamine 等で代表されるトロパンアルカロイドは、アセチルコリン拮抗作用など特異な薬理作用を有するものが多く、その溶液中でのコンフォメーションについては、作用機序との関係で、これまでに多くの議論がなされている。

今回演者らは、その基本骨格であるTropineおよび大きな置換基のついた Atropine について、我々の開発した T_1^S, T_1^{BS} を用いる方法によって、 $CDCl_3$ 中でのそれぞれのコンフォメーション解析を試みた。



Tropine R=H

Atropine R=COCH(C₆H₅)CH₂OH

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

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

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

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

$$\tau_c = \frac{r_{CH}^6}{NT_1^C \hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2} \quad (5)$$

selective T_1 bi-selective T_1 cross relaxation Tropane Alkaloid

○さい とうれい すぎうら まきこ たかお ならお

この方法は、 T_1^S, T_1^{BS} より交差緩和 σ_{ij} を(3)式によって求め、その σ_{ij} と(5)式の $^{13}\text{C}T_1$ より得られる τ_c とから(4)式によって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]

NMRの測定は Varian VXR-500 (^1H ;499.84MHz, ^{13}C ;125.70MHz) を用い、 $^{13}\text{C}T_1$ は通常のIR法を、 T_1^S, T_1^{BS} は先に報告したパルスシーケンスを用い測定を行った。Tropine, Atropineは濃度 0.05 mol dm^{-3} で CDCl_3 に溶解し、脱ガス、溶封してサンプルとした。

[結果と考察]

Tropine 及び Atropine の溶液中でのコンフォメーションについて、主に議論の対象となるのは、ピペリジン環部分のコンフォメーションである。図1に示すように主にchair型、boat型及びその中間のflat型の3つのコンフォメーションの可能性が考えられるが、X線結晶解析の結果は、Tropine, Atropine共にややflatなchair型をとっていると報告されている。

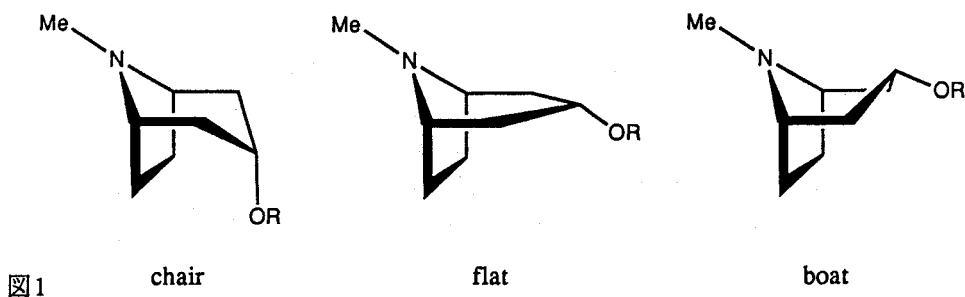


表1にトロパン骨格部分の $^{13}\text{C}T_1$ の観測値、(5)式によって得られた τ_c の値を示した。表2,表3には、ピペリジン環部分の ^1H について測定した T_1^S, T_1^{BS} の観測値、表4には(3)式より得られた交差緩和 σ_{ij} を示した。さらに表1の τ_c の平均値 (Tropine $8.65 \times 10^{-12}/\text{S}$, Atropine $2.29 \times 10^{-11}/\text{S}$) と表4の σ_{ij} を用いて、(4)式から算出される

表1 Tropine, Atropine の測定された $^{13}\text{C}T_1$ 及びそれから得られる τ_c

	Tropine			Atropine		
	T_1^C/S	NT_1^C	$\tau_c \times 10^{-12}/\text{S}$	T_1^C/S	NT_1^C	$\tau_c \times 10^{-11}/\text{S}$
C-1	6.71	6.71	8.18	2.24	2.24	2.08
C-2	3.03	6.06	9.05	1.02	2.04	2.30
C-3	6.42	6.42	8.55	2.17	2.17	2.15
C-4	3.03	6.06	9.05	1.01	2.02	2.32
C-5	6.71	6.71	8.18	2.19	2.19	2.14
C-6	3.11	6.22	8.81	0.96	1.92	2.43
C-7	3.11	6.22	8.81	0.89	1.78	2.62

r_{ij} の値を r_{ij}^{obs} として表5に示した。又表5には図1の3つの可能なコンフォメーションについて分子模型から計算される r_{ij}^{calc} を示した。ここで得られた r_{ij}^{obs} のすべてを満足するものが、 $CDCl_3$ 中での優位コンフォメーションである。得られた r_{ij}^{obs} と3つの型での r_{ij}^{calc} を比較し、その相関を調べたところ、次のような結論が得られる。

表2 Tropine の測定された T_1^S, T_1^{BS}

	T_1^S/S	T_1^{BS}/S			
		H-1,5	H-2,4 α	H-2,4 β	H-3
H-1,5	7.28		6.84	6.54	7.28
H-2,4 α	3.47	3.37		2.56	3.41
H-2,4 β	3.36	3.19	2.51		3.10
H-3	7.12	7.17	6.79	5.94	

表3 Atropine の測定された T_1^S, T_1^{BS}

	T_1^S/S	T_1^{BS}/S						
		H-1	H-2 α	H-2 β	H-3	H-4 α	H-4 β	H-5
H-1	2.62		2.49	2.50				
H-2 α	1.14	1.11		0.87	1.14			
H-2 β	1.21	1.17	0.87		1.15			
H-3	3.20		3.12	2.91		3.15	2.89	
H-4 β	1.20				1.14	0.88		1.16
H-5	2.63					2.41	2.46	

表4 Tropine, Atropineの交差緩和 σ_{ij} (sec⁻¹)

i	j	Tropine		Atropine	
		$\sigma_{ij} \times 10$	$\sigma_{ji} \times 10$	$\sigma_{ij} \times 10$	$\sigma_{ji} \times 10$
H-1	H-2 α	0.087	0.086	0.204	0.205
	H-2 β	0.156	0.161	0.192	0.291
	H-3	—	—		
H-2 α	H-2 β	1.030	1.011	2.749	3.269
H-3	H-2 α	0.068	0.058	0.074	—
	H-2 β	0.279	0.249	0.308	0.455
	H-4 α	0.068	0.058	0.047	
	H-4 β	0.279	0.249	0.331	0.434
H-4 α	H-4 β	1.030	1.011		2.990
H-5	H-4 α	0.087	0.086	0.333	
	H-4 β	0.156	0.161	0.249	0.297
	H-3	—	—		

表5 σ_{ij} と τ_c より得られた r_{ij}^{obs} 及びいくつかのコンフォメーションについて分子モデルより計算される r_{ij}^{calc}

i	j	Tropine	Atropine	chair	boat	flat
		$r_{ij}^{obs}/\text{\AA}$	$r_{ij}^{obs}/\text{\AA}$	$r_{ij}^{calc}/\text{\AA}$		
H-1	H-2 α	2.56-2.56	2.60-2.61	2.53	2.81	2.81
	H-2 β	2.31-2.32	2.46-2.63	2.50	2.31	2.40
	H-3	—	—	>4	3.50	>4
H-2 α	H-2 β	1.70-1.70	1.64-1.69	1.80	1.73	1.73
H-3	H-2 α	2.67-2.74	3.08- ∞	2.53	3.13	2.95
	H-2 β	2.11-2.15	2.28-2.43	2.50	2.36	2.27
	H-4 α	2.67-2.74	3.33	2.52	3.15	2.92
	H-4 β	2.11-2.15	2.30-2.40	2.50	2.51	2.28
H-4 α	H-4 β	1.70-1.70	1.67	1.80	1.85	1.87
H-5	H-4 α	2.56-2.56	2.40	2.52	2.82	2.63
	H-4 β	2.31-2.32	2.45-2.52	2.50	2.22	2.33
	H-3	—	—	>4	3.67	>4

表6 r_{ij}^{obs} と r_{ij}^{calc} の相関係数 R^2

	boat	flat	chair
Tropine	0.889	0.962	0.717
Atropine	0.819	0.901	0.556

Tropine, Atropine 共 flat 型が表6に示すように boat 型 chair 型に比べ、良好な相関が見られ、flat 型が優位コンフォメーションであると考えられる。又 boat 型と chair 型では boat 型の方が相関係数 R^2 が大きいことから、flat 型と boat 型の間で揺れているのではないかと考えられる。Tropine と Atropine とでは置換基 R の大きさにかなりの差があるにもかかわらず、そのコンフォメーションにはあまり差はみられなかった。

[まとめ]

CDCl_3 中での Tropine 及び Atropine の ^{13}C T₁ ρ , ^1H の T₁ ρ^S , T₁ ρ^{BS} を測定し、H-H 間距離 r_{ij} を算出し、ピペリジン環部分の優位コンフォメーションについて検討を行った。その結果、ピペリジン環部分の優位コンフォメーションはむしろ boat 型に片寄った flat 型であることが解った。この結果は、X線結晶解析で得られている結晶状態でのコンフォメーション、やや flat な chair 型とは、少し違うものである。

反磁性遷移金属錯体の¹H NMRスペクトルにおける
 顕著な金属上の常磁性電流の影響

製品科学研究所 ○高橋利和、平谷和久

Significant Paramagnetic Current Effect Observed on ¹H NMR Spectra of
 Some Diamagnetic Transition Metal Complexes.

Toshikazu Takahashi, Kazuhisa Hiratani,
 Industrial Products Research Institute.

Anomalous large shifts on ¹H NMR signals assignable to the protons located at a close proximity to the central metal ion in several diamagnetic Ni(II) complexes, are rationally explained by dominative influence of paramagnetic current induced on a metal ion by magnetic field. The differential shifts for some proton signals of a Ni(II) complex (4a) compared to the Zn(II) complex with the same ligand (4b) has been estimated semi-quantitatively, on the account of unisotropic magnetic field formed by the single average induced magnetic moment on the metal ion. Further, the induced magnetic moment has been calculated for Ni(II) complexes by means of Pople's treatment based on perturbation theory applied on a simple coordination field model, yielding a good agreement to the experimental results. Finally, a classification of transition metal complexes discriminated by its *d*-electron configuration and co-ordination geometry which will arouse large paramagnetic current is presented as a general rule.

1. はじめに

常磁性金属錯体上の磁気モーメントが近接核に及ぼす偽コンタクトシフト、ならびにその影響の位置依存性（異方性）についてはこれまでに多くの研究がなされ、詳しい解析も行われてきた。一方、反磁性金属錯体のNMRスペクトルはより頻繁に測定されているにも関わらず、金属イオン上の誘起磁気モーメントが近接核のケミカルシフトに及ぼす影響、とくにその位置依存性についてはこれまではっきりとした解析がなされていなかった。

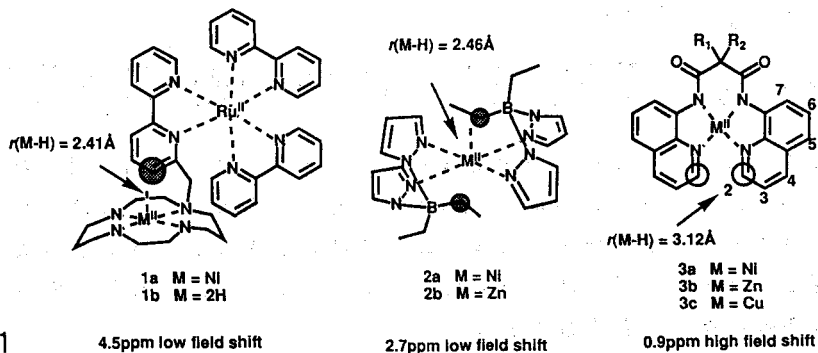


図 1

我々は最近、いくつかの平面4配位型反磁性Ni(II)錯体のNMRスペクトルにおいて、Ni(II)に近接(約3Å以内)している¹H核によるシグナルが、対応するZn²⁺またはH⁺錯体と比較して異常に大きなシフト(+4.2~-0.9ppm)を示し、しかも錯体の軸方向と軸に垂直な方向とで逆にシフトする例を見いだした。これらの異常な化学シフトが主として金属核上の常磁性電流による誘起磁気モーメントを考えるとよく説明できることを見いだしたので、報告する。

2. シグナルが顕著なシフトを示す例とその誘起磁気モーメントによる解釈

例えば図1の1aのNMRスペクトルにおいて、金属に近接したプロトンに対応するシグナルは12.5ppmに見いだされた。¹⁾ 1bの対応するプロトンのシグナルから約4.2ppm低磁場シフトしている。また2aの金属に近接したメチレンプロトンのシグナルは2bよりも2.7ppm低磁場シフトしていると報告されている。²⁾

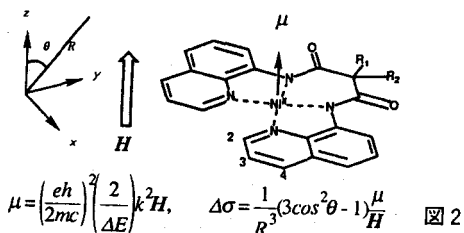
一方、錯体3aのH₂のシグナルは対応するZn(II)錯体3bと比較して0.86ppm高磁場シフトしている。³⁾ この他にも配位平面内でNi²⁺イオンに近接したプロトンに対応する核が高磁場シフトする例は数多く見いだされた。

錯体3aのプロトンの内、コンホメーションの微妙な差による化学シフトの変化が少ないと考えられる3個(H₂, H₃, H₄)については、下図のように錯体の対称軸に平行に $\mu = 1.19 \times 10^{-28} H_0 (\text{cm}^{-3})$ の磁気モーメントが金属上に誘起されると考えると差シフトの70%以上が解釈されたことになる。なお、本稿においては配位結合をもつ核については取り扱わないが、ヒドリド配位子に見いだされるより大きなシフトにおいて、やはり常磁性項が支配的であることが指摘されている。⁴⁾

表1. 差シフトの実測値と計算値の比較

$\Delta\sigma(\sigma_{\text{Ni}} - \sigma_{\text{Zn}})$	H ₂	H ₃	H ₄
found (ppm)	-0.86	-0.29	-0.27
calcd. (ppm)	-0.85	-0.24	-0.19

(4cのX線結晶構造を座標として用いた。)



3. 錯体中の金属原子に誘起される電流による磁気モーメント

Popleの摂動論によると、磁場中におかれたある原子上に電子の運動によって誘起される磁気モーメントは次の式で表される。⁵⁾

$$\mu' = \mu'_{\text{dia}} + \mu'_{\text{para}} \quad (1)$$

$$\mu'_{\text{dia}} = -\frac{e^2}{4mc} \langle 0 | r \times (H \times r) | 0 \rangle \quad (2)$$

$$\mu'_{\text{para}} = \frac{1}{2} \left(\frac{eh}{2mc} \right)^2 H \sum_n \left\{ \frac{\langle 0 | 2L \hbar | n \rangle \langle n | L | 0 \rangle}{E_n - E_0} + \frac{\langle 0 | L \hbar \times n | 2L | 0 \rangle}{E_n - E_0} \right\} = 2 \left(\frac{eh}{2mc} \right)^2 H \sum_n \left\{ \frac{\langle 0 | L \hbar \times n | L | 0 \rangle}{E_n - E_0} \right\} \quad (3)$$

なおここでのLは通常角運動量演算子/hである。また慣例に従い静電単位系を用いている。(2)は反磁性項、(3)は常磁性項である。実際にはこれら2項の寄与は同程度である。また分子や錯体においては分子中の他の原子上の磁気モーメントの影響をうけるため問題は極めて複雑となる。ここではこれら2項の内の後者、すなわち常磁性項のみを問題にする。

(3) は磁場におかれた金属上に生じる常磁性電流に基づいており、基底状態にある電子が磁場の影響のもとに励起状態の軌道を借りて金属上を回転することによって生じる。(3) の値を正確に知るためには、基底状態と全励起状態の波動関数とそのエネルギーが必要となるが、実際には、低い励起状態—遷移金属錯体においては可視光領域の $d-d$ 遷移に基づく励起状態—がもっとも重要な寄与をもつ。従って常磁性項は Zn^{2+} のように完全殻をなすイオンでは充分小さく、 $Ni(II)$ イオン (d^8) のように不完全殻をもつイオンにおいてのみ有意な値を持つと考えられる。 $Zn(II)$ 錯体にも高エネルギーの励起状態の影響による小さな常磁性項の影響はあるが、そのかなりの部分是对応する $Ni(II)$ 錯体と近い値をもつと考えられる。また中心金属以外の原子を中心とする磁気モーメントについても $Zn(II)$ と $Ni(II)$ との差は小さいと期待される。結果として $Zn(II)$ 錯体と $Ni(II)$ 錯体との化学シフトの差はほぼ純粋に (4) 式、すなわち (3) 式のうち、 $d-d$ 遷移に関する部分に帰することができるであろう。(d_0 : 満ちた d 軌道、 d_u : 空の d 軌道)。

$$\mu'_{para} = 2 \left(\frac{e\hbar}{2mc} \right)^2 H \sum_{d_0} \left\{ \frac{\langle d_0 | L | d_u \rangle \langle d_u | L | d_0 \rangle}{E_u - E_0} \right\} \quad (4)$$

4. $Ni(II)$ 平面 4 配位型反磁性錯体における誘起磁気モーメントの常磁性項

(4) の $\{ \}$ 内の値を見積もるために、ここでは最も簡単な配位子場理論に基づいたモデルを採用する。配位子場理論による平面 4 配位型 (D_{4h}) d^8 錯体の電子構造はおよそ図 3 のようになる。このうち B_u ($d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$)、 E_u ($d_{xz} \rightarrow d_{x^2-y^2}$, $d_{yz} \rightarrow d_{x^2-y^2}$) の 2 種の遷移が磁気双極子的に許容な遷移にあたる。それぞれの遷移に対応する項の $\{ \}$ 内は B_u の遷移について

$$\frac{\langle d_{xy} | L_z | d_{x^2-y^2} \rangle^2}{\Delta E_1} = \frac{4k_1^2}{\Delta E_1} \quad (5)$$

E_u の遷移については

$$\frac{\langle d_{xz} | L_y | d_{x^2-y^2} \rangle^2}{\Delta E_2} = \frac{\langle d_{yz} | L_x | d_{x^2-y^2} \rangle^2}{\Delta E_2} = \frac{k_2^2}{\Delta E_2} \quad (6)$$

となる。分子の k_1 , k_2 は d 電子が金属上に極在している場合 1、配位子上へと広がっている場合は 1 より小さくなる係数で、軌道縮小係数と呼ばれる。 k の値は通常の $Ni(II)$ 錯体においては 0.8 から 0.9 前後の値をとるとされている。ここでは簡単のため $k_1 = k_2 = k$ と仮定する。またアミンなどを配位子とする低スピン $Ni(II)$ 錯体の吸収スペクトルは可視部にはただひとつの吸収帯をもち、多くの場合にこれらの 2 種の遷移エネルギー間の差は小さい。そこでここではこれら 2 種の遷移に対応するエネルギー

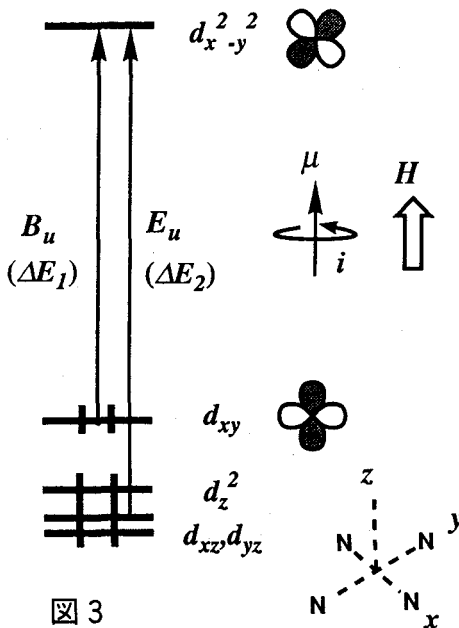


図 3

ギーが等しいことも仮定した場合 ($\Delta E_1 = \Delta E_2 = \Delta E$) の計算結果を示す。

$$\mu_{||} = \mu_{zz} = 2 \left(\frac{e\hbar}{2mc} \right)^2 H_0 \frac{4k^2}{\Delta E} \quad (7)$$

$$\mu_{\perp} = \mu_{xx} = (\mu_{yy} =) 2 \left(\frac{e\hbar}{2mc} \right)^2 H_0 \frac{k^2}{\Delta E} \quad (8)$$

この誘起磁気モーメントにより、近接する核がうける化学シフトは、

$$\begin{aligned} \sigma_{long} &= -\frac{1}{3R^3 H_0} \left\{ (3\cos^2\theta_x - 1)\mu_{xx} + (3\cos^2\theta_y - 1)\mu_{yy} + (3\cos^2\theta_z - 1)\mu_{zz} \right\} \\ &= -\frac{1}{R^3} \left(\frac{e\hbar}{2mc} \right)^2 \left(\frac{2k^2}{\Delta E} \right) (3\cos^2\theta_z - 1) \end{aligned} \quad (9)$$

この式で吸収スペクトルから求めた $\Delta E = 3.761 \times 10^{-12}$ erg, $k = 0.93$ として求めた値が、 1.19×10^{-30} cm³ であり、この値で錯体 3 a のシフトがよく説明できることは 2 の表にも示したとおりである。なお、ここでは結果がよく一致するように k の値を定めたが、 k の MO による推算についても現在検討中である。

5. 他の遷移金属錯体における常磁性電流の影響の予測

最後に他の遷移金属の反磁性錯体における常磁性電流の効果について考察する。大きな誘起磁気モーメントが生じる条件としては、(i)互いに磁気双極子遷移が許容な関係にある電子の満ちた軌道と空の軌道との組が少なくとも 1 組存在し、(ii)複数組ある場合にはそれらの総和が空間的に打ち消しあわないことが必要となる。(i)の条件を満たす錯体は数多くあるが、頻繁に見いだされる O_h 対象性を持つ d^6 錯体や、 T_d 対象性をもつ d^4 錯体では(ii)の条件が満たされないため、大きな誘起磁気モーメントは観測されないだろう。

最も大きな常磁性電流の影響が期待されるのは、 O_h またはそれに近い対象性をもつ d^4 錯体、 T_d またはそれに近い対象性をもつ d^6 錯体である。この 2 つのケースにおいては、同じ方向への磁気モーメントを生ずる電子対が 2 対となる。実際には T_d 対象性を持つ d^6 錯体などは極めて希である。最後に予想される常磁性電流の大きさをそれぞれの錯体の対称性並びに d 電子の数について分類し、表にまとめた。

表 2. 遷移金属錯体の常磁性電流の度合

d^n	T_d	O_h	D_{4h}
d^2	○	○	○
d^4	×	◎	○
d^6	◎	×	○
d^8	○	○	○

謝辞：この仕事のきっかけを与えていただいた広島大学医学部、木村栄一先生ならびに木村研究室の職員、学生の皆様に感謝します。

- 1) E. Kimura, M. Shionoya, S. Wada, T. Takahashi, Y. Iitaka, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1990, 397.
- 2) S. Trofimenko, J. Am. Chem. Soc., 1967, 89, 6288.
- 3) J.-C. Chambron, K. Hiratani, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1991, 1483.
- 4) A. D. Buckingham, P. J. Stephens, J. Chem. Soc., 1964, 2747.
- 5) 例えば米沢、永田、加藤、今村、諸熊、三訂量子化学入門(下)、化学同人、1983年。

^{13}C NMRにおける重水素同位体シフトのC-H結合距離への依存

中島 康喜、○福永 守高、金田 洋幸、鈴木 恵子、高橋 憲助
 (メニコンR&D、名工大・応用化学科)

Deuterium isotope shifts in dependence upon C-H bond lengths
 on ^{13}C NMR spectra

Yasuki Nakashima, Moritaka Fukunaga, Hiroyuki Kanada, Keiko Suzuki and
 Kensuke Takahashi (Menicon R&D and Department of Applied Chemistry, Nagoya
 Institute of Technology)

We have studied in deuterium isotope shifts of aromatic compounds on
 ^{13}C NMR spectra. In this study, we propose a new application of deuterium
 isotope shifts.

We measured deuterium isotope shifts ($^n\Delta$, $n=1,2$) of various aromatic
 compounds on ^{13}C NMR spectra. $^1\Delta$ show a linear correlation with C-H
 bond lengths. On the other hand $^2\Delta$ on the compounds with heteroatom don't
 show any linear correlation with C-C bond lengths. Interest is drawn in an
 influence of heteroatom on $^2\Delta$.

Generally it is difficult to evaluate C-H bond lengths by any method,
 for example, X-ray diffraction or electron diffraction. We concluded
 $^1\Delta$ measurement is one of the ways to estimate C-H bond lengths.

【序】

^{13}C NMR化学シフトにおける重水素同位体効果は、スペクトルの帰属や、反応
 機構の解明に有用なパラメーターであることが知られている。一方、これまでも
 NMR同位体シフトは幾つかの、物理化学的パラメーターとの相関が示されている
 が、その起源については完全には解明されていない。そのため、その新しい応用方
 法と同位体シフトの機構の解明のために、更に研究が必要とされている。

我々は、これまでに芳香族化合物の重水素同位体シフトに関する一連の研究をす
 すめてきている。本研究においては、 ^{13}C NMRにおける重水素同位体シフトの新
 しい応用方法を提案する。

我々は様々な芳香族化合物の、 ^{13}C NMRにおける重水素同位体シフト ($^n\Delta$ 、
 $n=1,2$) を測定した。

key word: ^{13}C NMR, Deuterium isotope effect, Bond length

なかしま やすき・ふくなが もりたか・かなだ ひろゆき・すずき けいこ・
 たかはし けんすけ

この結果、芳香族炭素での $^1\Delta$ と、対応する C-H 結合距離 (r_{C-H}) との間には直線関係が得られた。two-bond 重水素同位体シフト ($^2\Delta$) に関しては、C-C 結合距離 (r_{C-C}) との関係について以前に報告されているが¹⁾、我々の研究では複素環芳香族化合物については直線関係が得られなかった。

C-H 結合距離は、既存の核間距離測定法 (X線回折、電子線回折法等) によって、値を見積もることは一般に難しいとされている。

よって、 $^1\Delta$ を測定することは、C-H 結合距離を見積もる手段の一つとなり得る。

【実験】

実験系としては、重水素ラベル体の比較的得られやすい、芳香族化合物を選び、その内の9種から測定値が得られた。重水素ラベル体は主として、酸性またはアルカリ性の条件下で D₂O による H/D 交換反応によって得た。

^{13}C NMR 測定は、Varian XL-200 FT-NMR 分光計 (50.3 MHz) を用いて行った。この際、デジタル分解能を向上させるために、測定は芳香族領域に限定して行なった。データポイント数は 32 K、測定範囲は 2500 Hz なので、デジタル分解能は 0.15 Hz/point (3 ppb) である。スペクトルとその帰属の例を、Fig. 1 に示した。

【結果と考察】

$^1\Delta$ は 194 ~ 373 ppb (データ数 20)、 $^2\Delta$ は 51 ~ 213 ppb (データ数 23) の範囲で得られた。この結果を、Table 1、2 に示す。この変化の大きさは、デジタル分解能から考えて、十分議論に耐え得るものである。

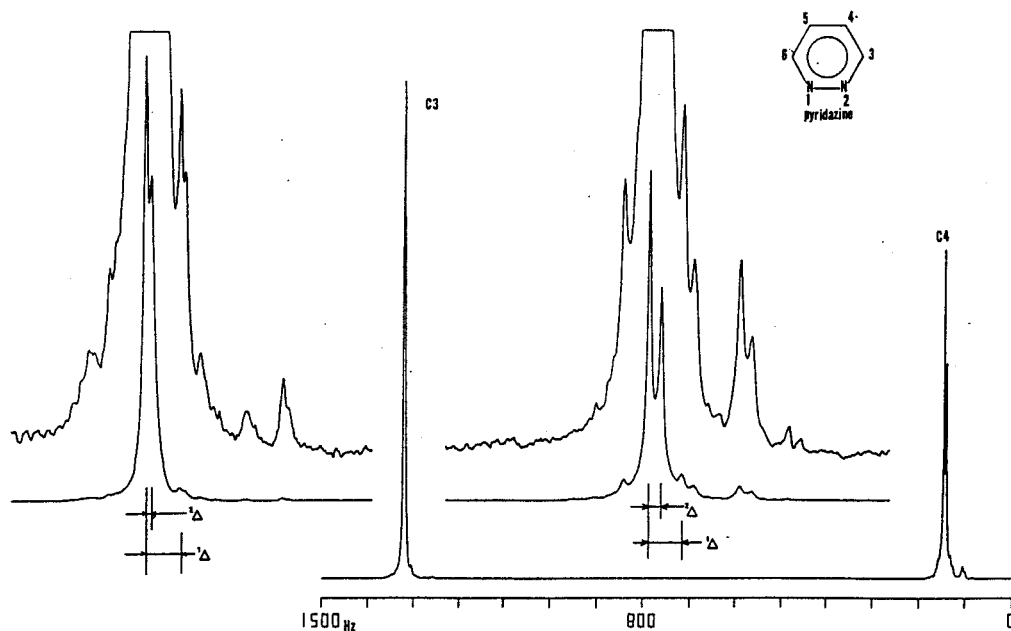


Fig. 1 ^{13}C NMR spectrum of pyridazine in a 5wt% NaOH-D₂O solution. Two upper traces show deuterium isotope shifts.

Table 1. One-bond deuterium isotope shifts ($^1\Delta$) of aromatic compounds in ppb^{a)} and C-H bond lengths (r_{C-H}) in Å optimized by the MNDO MO calculation.

compound	observed carbon	solvent	$^1\Delta$	r_{C-H}
pyridine	C-2	neat	351	1.095
	C-4	neat	296	1.090
pyridine-N-oxide	C-2	0.1wt%NaOH-D ₂ O	268	1.092
	C-4	10 wt%NaOH-D ₂ O	252	1.089
quinoline	C-2	methanol-d	336	1.096
quinoline-N-oxide	C-2	1wt%NaOH-D ₂ O	269	1.093
isoquinoline	C-1	methanol-d	361	1.097
pyridazine	C-3	5wt%NaOH-D ₂ O	314	1.093
	C-4	5wt%NaOH-D ₂ O	296	1.089
furan	C-2	neat	225	1.084
thiophene	C-2	neat	194	1.079
purine	C-8	D ₂ O	237	1.087
benzene ^{b)}		acetone -d ₆	283	1.090
naphthalene ^{b)}	C-1	CHCl ₃	310	1.091
	C-2	CHCl ₃	280	1.091
phenanthrene ^{b)}	C-9	CHCl ₃	310	1.092
benzo[c]phenanthrene ^{b)}	C-2	CHCl ₃	270	1.091
azulene ^{b)}	C-2	acetone -d ₆	246	1.082
	C-6	acetone -d ₆	332	1.098
tropylium ion ^{b)}		CD ₃ CN	373	1.100

a) Error are estimated to be within 5ppb.

b) Cited values.

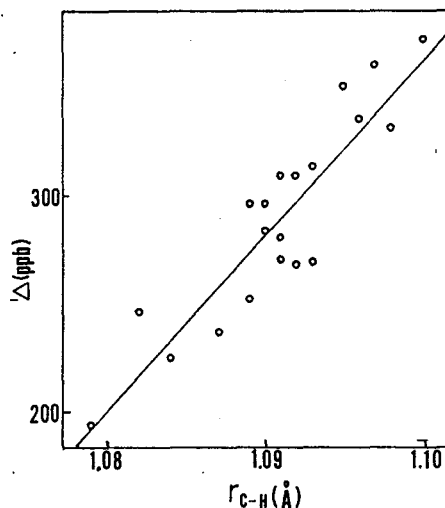


Fig.2 Plots of $^1\Delta$ vs r_{C-H} . A correlated straight line is expressed as $^1\Delta = 814 \times 10 r_{C-H} - 859 \times 10$ with $r = 0.906$.

Table 2. Two-bond deuterium isotope shifts ($^2\Delta$) of aromatic compounds in ppb^{a)}.

compound	observed carbon	solvent	$^2\Delta$	r_{C-C}
pyridine	C-3 from 2-D	neat	129	1.411
	C-3 from 4-D	neat	106	1.404
pyridine-N-oxide	C-3 from 2-D	0.1wt%NaOH-D ₂ O	129	1.400
	C-3 from 4-D	10 wt%NaOH-D ₂ O	106	1.404
quinoline	C-3 from 2-D	methanol-d	124	1.436
quinoline-N-oxide	C-3 from 2-D	1wt%NaOH-D ₂ O	117	1.420
isoquinoline	C-8 from 1-D	methanol-d	109	1.445
pyridazine	C-3 from 4-D	5wt%NaOH-D ₂ O	51	1.411
	C-4 from 5-D	5wt%NaOH-D ₂ O	105	1.401
furan	C-3 from 2-D	neat	213	1.390
thiophene	C-3 from 2-D	neat	148	1.368
benzene ^{b)}		acetone -d ₆	111	1.407
naphthalene ^{b)}	C-2 from 1-D	CHCl ₃	120	1.383
	C-8, from 1-D	CHCl ₃	120	1.400
	C-1 from 2-D	CHCl ₃	120	1.383
phenanthrene ^{b)}	C-3 from 2-D	CHCl ₃	80	1.427
	C-10 from 9-D	CHCl ₃	120	1.365
	C-8, from 9-D	CHCl ₃	70	1.451
benzo[c]phenanthrene ^{b)}	C-1 from 2-D	CHCl ₃	110	1.389
	C-3 from 2-D	CHCl ₃	100	1.416
azulene ^{b)}	C-1 from 2-D	acetone -d ₆	108	1.412
	C-5 from 6-D	acetone -d ₆	96	1.400
tropylium ion ^{b)}		CD ₃ CN	98	1.406

a) Error are estimated to be within 5ppb.

b) Cited values.

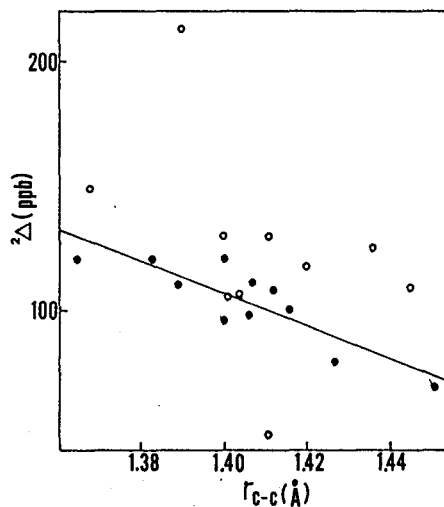


Fig.3 Plots of $^2\Delta$ vs r_{C-C} . White and black circles show aromatic compounds with or without heteroatom respectively. A correlated straight line for latter circles is expressed as $^2\Delta = -635 \times r_{C-C} + 996$ with $r = -0.875$.

r_{C-H} vs $^1\Delta$ プロットを、Fig. 2 に示す。 r_{C-H} は MNDO MO 法により最適化した値である。

Table 1 のデータから最小二乗法により、式 (1) を得る。

$$^1\Delta = 8.14 \times 10^3 R_{C-H} - 8.59 \quad (1)$$

(1) の直線の傾きは正であることから、 r_{C-H} が小さくなるほど、 $^1\Delta$ が小さくなる。これと類似の関係が、モノ置換メタンに関して報告されている²⁾。即ち、 sp^3 炭素、 sp^2 炭素共に、 $^1\Delta$ は r_{C-H} に強く依存していて、その傾きも同符号である。しかし、その値については大きな開きがある。

以上の事実は、Jameson 等が提案している同位体シフトモデル³⁾を、強く支持している。即ち、 $^1\Delta$ の生ずる原因は、C-H と C-D 結合の非調和性の大きさの違いにより NMR タイムスケール上での時間平均結合長が異なる結果、炭素との時間平均の位置が C-D 結合の場合ではより炭素に近くなり、炭素核の遮蔽を増加させ高磁場の同位体シフトを引き起こすものである。又、より強く短い C-H 結合では、非調和性はより少ないと仮定するならば、対応する C-D 結合の場合においてもその変化の度合いはより少ないものとなる。その結果として、 $^1\Delta$ が減少すると解釈できる。

R_{C-H} vs $^2\Delta$ と r_{C-H} の関係

r_{C-H} vs $^2\Delta$ プロットを Fig. 3 に示す。このプロットでは、 $^1\Delta$ の場合と違って、直線関係が得られない。しかし、ヘテロ原子を含まない系のみを取り出せばすでに Sardella ら¹⁾によって報告されているように、比較的よい直線関係が得られる (図中、●で示す)。この時、最小二乗法を用いて $^2\Delta$ から ± 0.01 Å の精度で r_{C-H} を見積もることができる。

複素芳香族の「ずれ」を説明できる仮説は二つ考えられる。まず一つ目は、ヘテロ原子の電気陰性度の大きさのため π 結合だけでなく σ 結合の電子分布にも影響を及ぼす結果、同位体シフトに影響をもたらしたとするもの。もう一つは、ヘテロ原子の孤立電子対の軌道が、環内の軌道と相互作用して、同位体シフトを変化させるとするものである。

reference

- 1) D. J. Sardella and Alyaa Emad El-Din, Magn. Reson. Chem., 27, 253 (1989)
- 2) Y. Nakashima and K. Takahashi, Bull. Chem. Soc. Jpn., in press (1991)
- 3) C. J. Jameson and H. J. Osten, Am. Rep. NMR Spectrosc., 17, 1, (1985)

タンパク質の構造と¹H NMR化学シフトの相関(農工大・工、シェフィールド大)⁰朝倉哲郎、出村誠、M. P. WilliamsonRelationship between Protein Structure and ¹H NMR Chemical Shift; Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, T.Asakura and M.Demura, and University of Sheffield, M. P. Williamson.

Abstract; The chemical shifts of α -CH protons (677 protons) have been calculated for nine proteins, based on coordinates taken from high-resolution crystal structures. Chemical shifts were calculated using ring-current shifts, shifts arising from magnetic anisotropies of bonds, and shifts arising from the polarizing effect of electric field on the C^α-H bond. The parameters used were refined iteratively to give the best fit to (experimental - random coil) shifts over the set of 9 proteins. A further small correction was made to the averaged Gly C^αH shift. The calculated shifts match observed shifts with correlation coefficients varying between 0.45 and 0.86, with a standard deviation of about 0.3 ppm.

緒言

タンパク質の¹H NMR化学シフトをその原子座標から十分な精度で直接評価することができれば、¹H化学シフト計算は、帰属の確認はもとより、現在の核オーバーハウザー効果NOE、スピン結合定数、NHプロトンの交換速度などのNMRパラメーターと相補的にタンパク質の構造解析に用いることができる。

これまで、タンパク質中の芳香環からの環電流効果を計算することによって、特にメチルの¹H化学シフトが高い精度で評価できることが示されてきた¹。しかしながら、主鎖の構造解析を行なうためには、 α -CHまたは、NHプロトン进行评估することが必要である。その場合、環電流効果以外に、明らかに他のしゃへい効果が存在するであろう。たとえば、BPTI (Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor)の α -CHまたは、NHプロトンの化学シフトは、最近接のカルボニル酸素との間の距離の3乗の逆数に比例することが、実験データから報告されてきたが、これは、磁気異方性効果の存在を予想させる²。

我々は、以前の論文で、BPTIとTendamistatのすべての α -CHプロトン化学シフトが、X線回折から得られた原子座標を用いると、環電流効果と、カルボニル結合の磁気異方性効果の和として精度よく再現されることを報告してきた³。実測との間の良い一致を考えると、¹H化学シフト計算は、構造解析の手段として、使えるようになってきたといえよう。しかしながら、計算結果と実測結果の間のより良い一致を得るとともに、より多くのタンパク質へこの計算を拡張していくためには、用いた化学シフト評価のパラメーターを改良するとともに、他の結合からの磁気異方性効果や、電場効果の可能性を、さらに検討する必要がある。

現在、多くのタンパク質について、X線回折やNMR法によって、精度よく原子座標が求まると同時に、¹H NMRの詳細な帰属がなされ、多くのデータが集積されてきている。我々は、これらのデータを用いて、タンパク質の¹H NMR化学シフト評価のためのパラメーターを詳細に検討することを試みたので報告する。

キーワード/ タンパク質の¹H NMR/¹H NMR化学シフト計算/環電流効果/
磁気異方性効果/電場効果

あさくらてつお、でむらまこと、M.P.ウイリアムソン

計算

本研究で用いた9個のタンパク質をTable 1 に示した。合わせて、677個の α -CHプロトンのNMR化学シフトデータをパラメーター決定のために用いた。

α -CH ^1H NMR化学シフトは、環電流効果、C=Oならびに C-N結合の磁気異方性効果、電場効果の和として評価した^{3,4}。環電流効果は、Johnson-Boveyの式⁵に基づき、Giessen-Prettre-Pullmanの強度因子による補正⁶を加えて評価した。磁気異方性効果の評価式ならびに、磁気異方性の定義は、Ref.3と同じである。C=O結合 ($\Delta\chi_1^{\text{C=O}}$, $\Delta\chi_2^{\text{C=O}}$)、(O=)C-N結合 ($\Delta\chi_1^{\text{C-N}}$, $\Delta\chi_2^{\text{C-N}}$)ならびに、C $^{\alpha}$ -N結合 ($\Delta\chi^{\text{C}^{\alpha}\text{-N}}$)の磁気異方性を考慮し、ダイボールの位置も適宜変化させた。電場効果の評価式は、Ref.4に従い、電場は、各原子上に置かれたモノポール (Momanyらの値⁷を使用) からの寄与の和として評価した。

計算は、Sheffield大の μ VAX IIコンピュータを用いた。 $\Delta\chi_1^{\text{C=O}}$, $\Delta\chi_2^{\text{C=O}}$, $\Delta\chi_1^{\text{C-N}}$, $\Delta\chi_2^{\text{C-N}}$, $\Delta\chi^{\text{C}^{\alpha}\text{-N}}$ の各値ならびに、C=O、(O=)C-NおよびC $^{\alpha}$ -N結合のダイボールの位置、電場効果の式の係数 ϵ_1 , ϵ_2 の値の計10個を変数とし、実測値 (アミノ酸残基ごとにランダムコイルシフト値を引いた) を用いて最適化した⁸。最適化の判定は、実測値と計算値の相関係数Rと、標準偏差sd値 (ppm単位) から行なった。用いたタンパク質の原子座標は、Brookhaven Protein Data Bankより得られた。

結果と考察

1. ^1H 化学シフト評価のためのパラメーターの決定

9個のタンパク質の合わせて677個の α -CHプロトンについて、最適化を行なった結果をTable 1 に示した (なお、グリシンの α -CHプロトンは、メチレンプロトンであり、他の α -CHプロトンと異なるので、補正值0.28 ppmを計算値に加えた。また、グリシンのメチレンプロトンの化学シフトの実測値は、2個のプロトンの平均値とした)。相関係数Rは、0.45-0.86の範囲、標準偏差sdは、約0.3 ppmであった。

Table 1 Proteins Used in Chemical Shift Calculation and Parameter Optimisation

Proteins	Source	Short Brookhaven	No of protons used for fit ^a	Final values	
				R	sd
Ubiquitin	Man	1UBQ	75	0.857	0.25
RNAseT1	<i>Aspergillus oryzae</i>	1RNT	89	0.859	0.27
Eglin c	<i>Hirudo medicinalis</i>	1CSE	62	0.807	0.28
BPTI	Ox	6PTI	54	0.791	0.25
Lysozyme	Man	1LZ1	125	0.795	0.27
Tendamistat	<i>Streptomyces tendae</i>	^b	70	0.733	0.30
Lysozyme	Hen	2LZT	119	0.708	0.34
Ovomucoid 3rd domain	Turkey	3SGB	48	0.696	0.26
CPase inhibitor	Potato	4CPA	35	0.446	0.39

a) Three members are less than the total number of α -CH in the protein, because values are not used where the assignments were not made, or where the calculated ring current shift exceeded 0.5 ppm. In addition, the C-terminal residues of BPTI are disordered in the crystal structure used, and therefore no calculated shifts are available.

b) Coordinates kindly provided by Prof.R.Huber.

最終的に得られたパラメーターは、以下のごとくであった。

a. 磁気異方性の値($\times 10^{30} \text{ cm}^3$)

$$\Delta\chi_1^{\text{C=O}} = -18.0, \Delta\chi_2^{\text{C=O}} = -8.0, \Delta\chi_1^{\text{C-N}} = -12.0, \Delta\chi_2^{\text{C-N}} = 1.3, \Delta\chi^{\text{Ca-N}} = 0.$$

b. ダイボールの位置

C=O結合の場合、C原子から1.1 Åの位置

(O=C-N結合の場合、C原子からN原子方向に85%の位置。

c. 電場効果の係数

$$\epsilon_1 = -1.1 \times 10^{12}, \epsilon_2 = 0$$

2. 異なった構造間の比較

実測結果と計算結果の不一致の原因を明らかにするために、同一のタンパク質の構造が、若干異なった場合について、¹H化学シフト計算を行ない、比較した。(Table 2)。期待されたように、Brookhaven Protein Data Bankの初期座標から、ランダム方向に一定量ずつ原子座標を変化させると、その変化量の増加につれて、実測と計算値との間の相関は悪くなる。さらに、Brookhaven Protein Data Bankには、構造の異なるhen lysozymeのデータが蓄積されているので、各々の構造ごとに α -CH化学シフトを計算した(Table 3)。特に、1LYM(1)ならびに1LYM(2)の座標データの分解能は、2.5Åと、他に比較して悪いが、この場合には、R, sdから判断して、計算値と実測値の α -CH化学シフトの一致が悪いことがわかった。Table 1において、最も分解能が悪い(2.5Å以上) CPase inhibitorの場合も、化学シフトの計算値と実測値の一致は悪い。このように、X線回折の分解能と¹H化学シフトの計算値と実測値の一致との間には相関があり、実測との良い一致を得るには、X線回折の高い分解能が要求されることがわかった。今後さらに、溶液と固体間でのタンパク質の局所構造の違いについて¹H化学シフトの計算結果に基づいて考察を進める予定である。

Table 2 Dependence of results on random variation of coordinates

Protein	Magnitude of random change (Å)	Comparison with experimental data		Correlation with unchanged coordinate	
		R	sd	R	sd
UBQ	0	0.857	0.25	1.000	0.00
UBQ	0.1	0.870	0.24	0.931	0.16
UBQ	0.15	0.828	0.28	0.845	0.24
UBQ	0.2	0.758	0.34	0.735	0.33
PTI	0	0.791	0.25	1.000	0.00
PTI	0.1	0.758	0.27	0.942	0.13
PTI	0.15	0.713	0.30	0.873	0.19
PTI	0.2	0.648	0.34	0.783	0.27

Table 3 Results of calculation on alternative crystal structure of hen lysozyme

Structure	Comparison with exptl. values		Pairwise comparison with							
			2LZT		2LYM		1LYM(1)		1LYM(2)	
	R	sd	R	sd	R	sd	R	sd	R	sd
1LZT	0.80	0.27	0.77	0.28	0.79	0.27	0.61	0.39	0.60	0.39
2LZT	0.79	0.28	-	-	0.91	0.15	0.70	0.32	0.69	0.33
2LYM	0.78	0.29	-	-	-	-	0.74	0.30	0.65	0.34
1LYN(1) ^a	0.64	0.39	-	-	-	-	-	-	0.51	0.44
1LYM(2)	0.67	0.36	-	-	-	-	-	-	-	-

a) Structure 1LYM has two non-equivalent molecules in the unit cell.

3. グリシンの α -CHプロトン化学シフトの計算

グリシンの2個の α -CHプロトンを各々のプロトンに帰属することは、一般に容易ではなく、これまでに、実験的に帰属が報告されたプロトンの数は限られている。我々は、 ^1H 化学シフトの計算から、その帰属が可能と考え、シフト差が0.3 ppm以上の場合について、計算結果にもとづいて帰属を試みた (Table 4, なお、HA1とHA2プロトンの原子座標は既に決定されている。たとえば、 $\Delta\delta$ ($\Delta\text{HA1-HA2}$) が+の値の時、2個のプロトンのうちで、HA1プロトンは、より低磁場に出現することを意味する)。

Table 4 Predicted Gly α -CH assignments

Protein	Residue	Experimental $ \Delta\delta(\Delta\text{HA1-HA2}) $ (ppm)	Calculated $\Delta\delta(\Delta\text{HA1-HA2})$ (ppm)
Human lysozyme	19	0.94	+0.41
RNAse	7	0.39	+0.50
Eglin c	40	0.68	+0.34
Eglin c	70	0.92	+0.71
BPTI	12	0.64	+0.86
Human lysozyme	19	0.94	+0.41
Hen lysozyme	4	0.33	-0.33
Ovomucoid	54	1.04	+0.30
CPase inhibitor	20	0.30	-0.35
CPase inhibitor	35	1.45	-0.81

さらに、今後、 α -CHプロトンの帰属を行なうにあたり、原子座標が精度良く得られていれば、 ^1H 化学シフトの計算結果に基づいて、アミノ酸レベルの帰属結果を、シーケンスレベルの帰属にまで進めることが可能となろう。

謝辞；有益な助言をいただいたProf. T.A. Cross (Florida State University, USA)、ならびに、Dr. P.J. Artymiuk (Krebs Institute, UK) に感謝する。

参考文献

1. J.C. Hoch, C.M. Dobson and M. Karplus, *Biochemistry*, **21**, 1118(1982).
2. G. Wagner, A. Pardi and K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5948(1983).
3. T. Asakura, E. Nakamura, H. Asakawa and M. Demura, *J. Magn. Reson.*, **93**, 355(1991).
4. T. Asakura, I. Ando and A. Nishioka, *Makromol. Chem.*, **178**, 1111(1977).
5. C.E. Johnson and F.A. Bovey, *J. Chem. Phys.*, **29**, 1012(1958).
6. A. Pullman, H. Berthod, C. Giessner-Prettre, J.F. Hinton and D. Harpool, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3991(1978).
7. F.A. Momany, R.F. McGuire, J.F. Yan and H.A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **75**, 2286(1971).
8. M.P. Williamson and T. Asakura, *J. Magn. Reson.*, in press.

スピンスミュレーションプログラムの開発

○垣田信吾、竹腰清乃理*、引地邦男* (協和発酵 東京研、北大・理*)

Development of Spin Simulation Programs

Shingo Kakita, Kiyonori Takegoshi*, and Kunio Hikichi*

Tokyo Research Laboratories, Kyouwa Hakko Kogyo Co., Ltd.

and *Hokkaido University

We have developed two spin simulation programs. One program is designed to calculate free induction decay(FID) according to given information(chemical shift, coupling constant, a pulse sequence), the other program is to animate the results from pulse sequence simulation on the graphics device in real time. These programs are useful to check a new pulse sequence and effects of the pulse imperfection.

序

NMRは多次元NMRやマルチパルスNMR法などの発展が著しい分野である。これらのパルスシーケンスを理解するため、あるいは新たにパルスシーケンスを考案するに当たっては密度行列を計算する必要がある。そこで我々は、スピン系の情報(化学シフト δ とカップリング定数 J)とパルス系列とを入力すると対応するFIDを密度行列法に基づいて計算するプログラムを開発した。また、その際の磁化ベクトルの動きをリアルタイムでグラフィックス表示するプログラムも同時に開発した。これにより、新しく考案されたパルス系列を簡単に試すことが可能となり、またパルスの位相誤差や長さの誤りがスペクトルにどのような影響を与えるか確認することが可能となった。

プログラムの機能

我々は、日本電気製パーソナルコンピュータPC-9801上でシミュレーション計算を行うプログラムの開発を行った。シミュレーションプログラムは実行にあたって、図1,2に示すようなデータファイル、パルスシーケンスファイルを読み込む。データファイルにはスピンの数(最高5スピン系まで)、化学シフト、カップリン

NMR, simulation program

かきたしんご、たけごしきよのり、ひきちくにお

グ定数等を指定する。またパルスシーケンスファイルにはrf磁場の強度、パルスの位相、長さ、delay time等を指定する。Rf磁場の強度、パルスの位相、長さを自由に設定できるためオフレゾナンスの効果を見積ったり、あるいはパルスのimperfectionの効果などを見積ることが容易に出来る。計算されたFIDは日本電子製NMR装置GXシリーズと同じフォーマットで出力される。そのため、FIDデータをethernetを介してGXに転送し、GX上でデータ処理を行うことが出来る。図3に2,3-ジヒドロキシ安息香酸のDQF COSYの実測およびシミュレーションスペクトルを示す。

また、同時にあるパルスシーケンスを与えた際の磁化の運動をグラフィックス表示するプログラムも作成した。与えるデータは先のプログラムと共通であるが、現在は2スピン系までしか対応していない。2スピン系の場合、I核のXY平面の磁化はIx, Iy, 2IxSz, 2IySz, Z軸方向はIz, 2IzSzのベクトル和で表される。このプログラムを用いると磁化移動の様子等がリアルタイムで見られるため、NMRの学習にも有効であると考えられる。

```

point=512  {ポイント数
frequ=2000 {観測範囲(Hz)

ns=3       {スピンの数

I1= 300    {I核1の化学シフト(Hz)
I2=-200    {I核2の化学シフト(Hz)
I3= 500    {I核3の化学シフト(Hz)
J12= 10    {I核1,2の結合定数(Hz)
J13= 5     {I核1,3の結合定数(Hz)
J23= 10    {I核2,3の結合定数(Hz)

```

図1 データファイル

```

{ DQF COSY(Real)
{
$times = 4           {積算回数
$stodat = 128       {F1側ポイント数
$rf = 100k          {rf磁場の強度
$t1 = 2.5u          {90°パルス幅
$p1 = x;             {位相回し
$p2 = x;
$p3 = x y -y -x;
$p4 = x -y y -x;
$v0 = 0u, 1/frequ

init
pulse(t1; p1, og)
delay(v0)
pulse(t1; p2, og)
pulse(t1; p3, og)
accum(p4, ob)
relax

```

図2 パルスシーケンスファイル

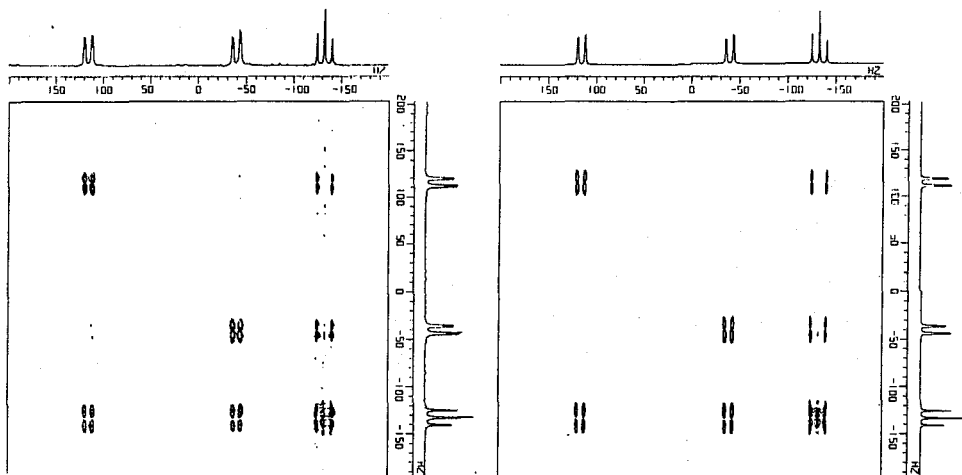


図3 2,3-ジヒドロキシ安息香酸のDQF COSYスペクトル
(左:実測、右:シミュレーション)

P10

スピンシミュレータの開発とその応用 — その 2 —

(株)島津製作所 第一科学計測事業部 技術部

○藤田 真

Development of a Versatile Spin Simulation Program 2

Shin Fujita SHIMADZU CORPORATION

Some modifications to a Spin Simulation Program originally developed by the same author was accomplished so that various kinds of 2D,3D spectrum simulations can be done with ease.

This program literally simulate the real situation of pulse NMR experiments. It traces changes in spin density matrix step by step in sequences. It also reproduces NMR results in each scan and block of experiments. Strong coupling effects are taken into account and genuine spectra can be obtained.

1. はじめに

第29回NMR討論会において、我々は、スピン系の密度行列の変化のようすを直接に計算し、その内容を表示するプログラムを発表した[1]。密度行列の中身を直接に調べることができるため、これを用いてマルチ・パルスNMR法の動作を理解する手助けとすることができた。

反面、密度行列そのものを出力とするため、2次元以上の多次元NMRのスペクトルそのもののシミュレーションを行なうには不向きな点があった。プログラムは密度行列そのものを計算しているのであるから、原理的には任意のパルスシーケンスをシミュレーションできるはずである(スピン系の情報として化学シフトとスピン結合定数のみを与えているので、勿論、NOE等の緩和機構に基づいたシーケンスはシミュレーションできない)。そこで、今回我々は、前回発表したプログラムをベースとして、これを多次元NMRスペクトルのシミュレーションができるように変更を施した。

討論会会場では、このプログラムで得られたシミュレーション・スペクトルと実験で得られたスペクトルの比較、スペクトル・シミュレーションを行なうことによって得られる知見などについて議論していきたい。

NMRスペクトル、シミュレーション、パルスシーケンス、多次元NMR

ふじた しん

2. 計算原理

対象スピン系の情報として、各スピンの化学シフト値およびスピン間の結合定数を入力する。これらの情報は入力ファイルに一定の書式で記述されている。スピン系の情報が入力されるとプログラムはまず、スピンハミルトニアン行列を計算し、固有値、固有状態の計算を行なう。この計算にはQR法 [2] が用いられており、スピン結合の強結合の効果（フリップフロップ項による効果）も正確に取り扱われている。

図1に例としてアリルグリシジルエーテルの ^1H 、 1 パルススペクトルを示した。アリルグリシジルエーテルは図1. (a)の構造を持っており、各々のプロトンの化学シフト値およびスピン結合定数は表1のようになっている。これらの値は、GE社製QE-Plus NMRスペクトメータ (^1H 共鳴周波数300MHz)で実測したスペクトルから得られたものである。これらの値を用いて得られたシミュレーション・スペクトルを図1. (b)に示す。ここで4番、5番プロトンのスペクトルに注目すると、ここでは2つのプロトンの化学シフトの差、10.6Hz、に比べてこれらの間のスピン結合値、13.0Hz、が大きく、強結合の効果が現れることが期待される。実際この部分を拡大してみると図1. (c)左側に示すスペクトルが得られている。このスペクトルは実験で得られたスペクトルパターンを忠実に再現できていることが確認された。

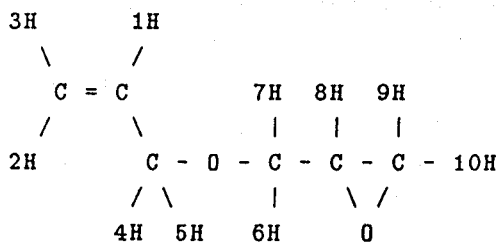
ここで、プログラムにパルスシーケンス（独立したパルスシーケンス・ファイルにシーケンスデータがある）ならびにスペクトル幅、データサイズ、積算回数等の必要データを入力する。シーケンスデータには位相サイクリングのデータも入れておくことができる。プログラムはこれらの入力データに基づいて、実際のNMR実験を忠実に再現していく。つまり、パルスシーケンスの各ステップ毎にスピン系の密度行列の変化を計算していき、最後にNMR信号を計算してデータの積算を行なうのである。フェーズサイクリングがある場合も1スキャン毎に計算し、これを積算していく。このため、フェーズサイクリングを指定回数行わずに、途中で積算を打ち切った場合にはどのようなアーチファクトが出るのかなどをシミュレーションすることも可能である（それが何の役に立つのかは知らないが）。2次元以上の多次元NMRをシミュレーションするときには、実際の実験のときと同じように、 t_1 等を変えて別々のデータブロックに計算データを出力し、実際の場合と同様にデータ処理をしてスペクトルを得るという手続きをとる。（但し、データ採取方向-2次元のときには t_2 、 ω_2 方向-に関しては、フーリエ変換されたデータが出力される。つまり、1次元の場合にはFIDではなく、スペクトルがプログラム出力となる）

このように実験を行なうときのステップを忠実に再現しているため、計算量が多くなるという難点があるが、その反面、様々な実験内容をシミュレーションできるという柔軟性に優れている。

3. 2次元スペクトルの例

多次元スペクトルのシミュレーション例を示すために、想像上のAMXスピン系に対してDQF-COSYの実験をしたときのスペクトル・シミュレーションを計算した。

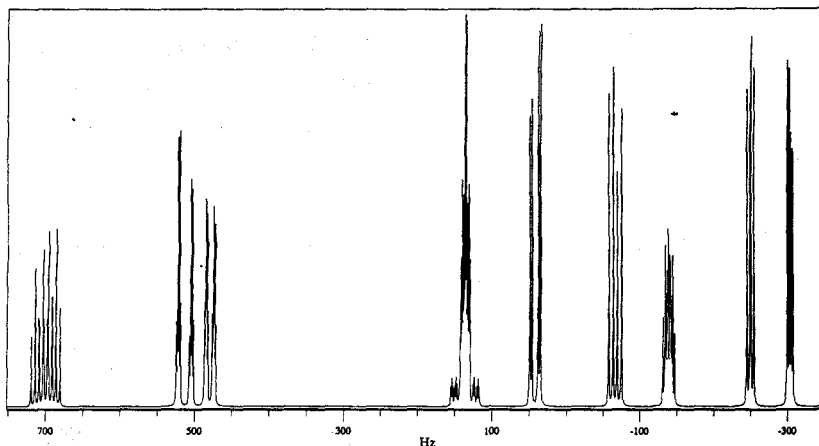
Allyl Glycidil Ether



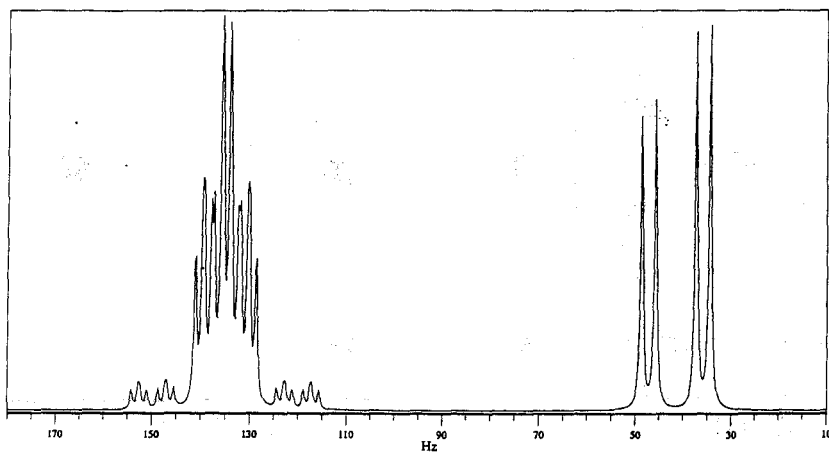
☒ L (a)

表 I

chemical shifts and coupling constants					
#	1	2	3	4	5
#	697.7	512.0	478.0	140.3	129.7
#		17.3	10.4	6.5	5.5
#			1.9	1.8	1.8
#				1.4	1.4
#					13.0
#					
#	6	7	8	9	10
#	41.3	-66.6	-139.6	-249.7	-303.4
#		11.4	2.9	0.0	0.0
#			6.0	0.0	0.2
#				4.2	2.7
#					6.2
#					



☒ L (b)



☒ L (c)

このAMXスピン系の1パルス・スペクトルは図2.(a)に示す通りである。スペクトルまん中のスピンの左右両側のスピンと結合しており、左右両側のスピンは直接には結合がない。

DQF-COSYのシミュレーション・スペクトルを図2.(b)に示す。このスペクトルはフェーズセンシティブ、hypercomplexモードで計算したものであり、スペクトル幅は図に示すように ± 250 Hz、データサイズは 512×512 で、 t_1 方向に1回ゼロフィリングしてある。最終スペクトルを得るために必要なデータ処理はGE社、Omega・データステーションを用いて行なった。

NMR討論会会場では、いろいろなスペクトルについてのシミュレーション結果を発表し、その有効性について探っていきたい。

4. 今後の展開

多次元NMRにおけるスペクトル・シミュレーションは今までのところあまり熱心に行なわれていないようである。このため、シミュレーションがどのような応用に対して有効であるのか、はっきりした知見は得られていないというのが現状のようである。しかし、多次元スペクトルパターンに現われる強結合効果の影響を調べたり、スペクトロメータの不具合(RFパルスの大きさやフェーズがずれている)によって生じるアーチファクトを同定するなど、シミュレーションを役立てることができる分野はいろいろと出てきそうである。

[1] 藤田、寺下、増田：第29回NMR討論回講演要旨集、p31-34(1990)京都

[2] 戸川 隼人：マトリクスの数値計算(オーム社)、p159,p184

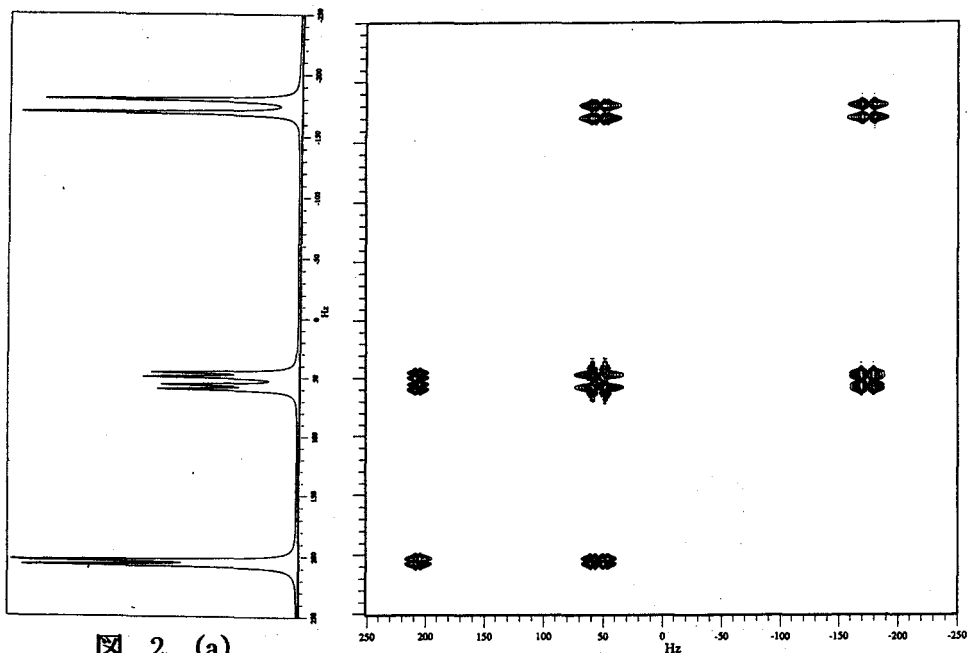


図 2 (a)

図 2 (b)

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルデータベースによる検索同定システムの
開発・実用化の検討(3)

(日立計測・日立那珂*) 橋本正雄, ○佐久間晃子, 田中保子,
笹渕 仁*

A Computer-Assisted Structure Elucidation System by $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR Spectral Data Base (III)
- Problems and Countermeasures in Practical Applications

Masao S. Hashimoto, Akiko Sakuma, Yasuko Tanaka (Hitachi Instrument Engineering Co. Ltd.)
Hitoshi Sasabuchi (Hitachi Ltd.)

A computer-assisted structure elucidation system, which has been developed and revised several times since 1986, is now on the stage of practical usage. The latest edition was introduced briefly and after that, problems and countermeasures in practical applications were discussed, especially in regard to the difference of data acquisition system and to the existence of giant peaks in the spectra.

§ 1 はじめに

有機化合物の同定を目的としたスペクトルのコンピュータによる検索システムの開発研究は新しいテーマとはいえないが、パーソナルコンピュータの発展とラボラトリオートメーション化の機運とあいまって研究が続行されている。このようなシステムは入力された未知化合物のスペクトルとデータベース中の参照化合物のスペクトルを比較し、両者の類似の度合い(合致度と定義)を数値化することを基本としていて、質量分析・赤外吸収・ICP発光分析の分野では実用化されている。

NMRの分野では(特に高分解能の測定装置の場合)、データベースに頼ることなく同定が可能な場合が多いことからこのような検索同定システムで実用化されているものは少ない。しかし、NMRを専門としない分析者が未知化合物のNMRスペクトルを測定して同定解析をする場合には、スペクトルデータ集から類似あるいは合致したものを目視で選択せざるを得ず、それに必要な時間は莫大なものになる。また、NMRの専門家にとってもデータベースを検索して類似した化合物を選択することができる機能をもった測定装置の方が良いことは言うまでもない。

筆者らは数年来、有機化合物の ^1H -および ^{13}C -NMRスペクトルのパーソナルコンピュータによる検索同定システムの開発研究に取り組んでおり、システムプログラムとNMR測定装置との結合の標準化の問題を一部残すのみでほぼ実用化しようとしている。本報では実用化の過程で遭遇した幾つかの問題点とその対策について述べる。

§ 2 本システムの概要

本システムでは、図1に示すようにNMR測定装置より取り込んだスペクトルをパソコンに送信し、ピーク検知する。 ^{13}C の場合、値(各ピークのシフト値-強度)

キーワード: データベース, NMRスペクトル, パターン認識

はしもと まさお, さくま あきこ, たなか やすこ, ささぶち ひとし

がそのままデータベースとなるが、 ^1H の場合は各ピークの $\pm \sigma$ ppm 以内に何本のピークが存在するかということにより、多重度をもった一つのグループ（パターン化されたピークの群）に属すると考え、さらにそのグループ内で最大最強のピークの相対強度を四段階評価してパターン化したものをデータベースとする（図2）。データベースは文献やデータ集のスペクトルチャートからデジタイザにより取り込んだデータからも構築される。

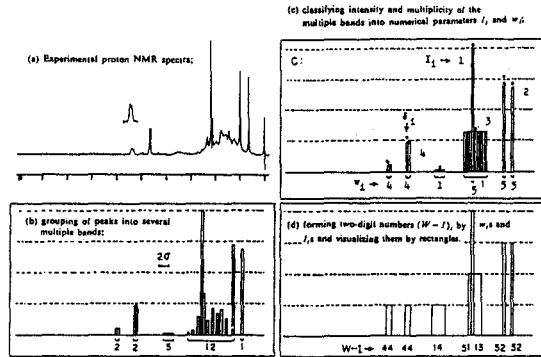
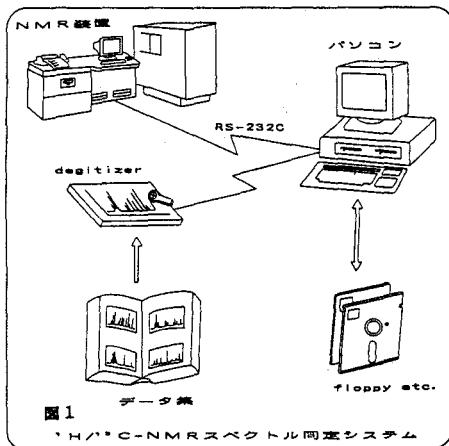
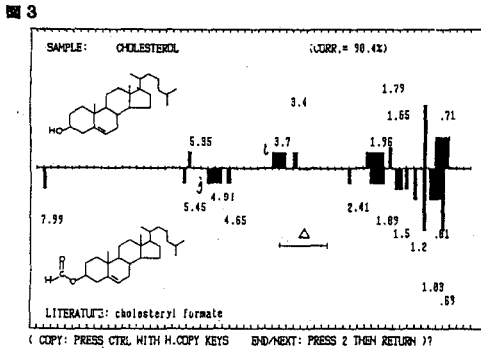


図2 Patterning procedure for proton NMR spectra.



未知化合物と参照化合物のスペクトルの比較はパターン化されたピーク群の比較を通じて行う（図3）が、 $\pm \Delta$ ppm 以内で

一致している二つのピーク（またはピーク群）の化学シフトの差 $|\gamma|$ の大きさに応じた因子を合致度算出の計算式（図4）に取り入れてある。これにより類似の度合いが『完全に一致している』から『何%位で類似している』までが連続的になり、『類似している、いない』という人間の曖昧な感覚に近づいたものとなる。 ^1H の場合はさらに多重度-強度パターンの差に応じた因子も合致度算出の計算式に取り入れられており、溶媒の差や測定機種間の差がある場合でも類似したスペクトルの検索が可能である。

本検索同定システムは部分構造および全体構造に着目した二通りの検索同定を行うことができる。まず部分構造の類似したもので検索し、候補が多数の場合は全体

図4 合致度の計算式

$$R(\beta, \gamma) = \sum_{i=1}^M R_{ij}^2 \times (H/B) \times r \times 100 \text{ (in \%)}$$

$$R_{ij}^2 = R_{ij}^I \times R_{ij}^A$$

$$R_{ij}^I = [1 / (|W_i - W_j| \times f + 1)] \times [1 / (|I_i - I_j| \times f + 1)]$$

$$R_{ij}^A = 1 / (|\delta_i - \delta_j| \times f + 1)$$

i, j : 距離 $\gamma = |\delta_i - \delta_j|$ が Δ ppm 以内のピーク対
 M : (i, j) の対の数
 r : 強度の組 (I_i, I_j) に関する相関係数
 f : 実験結果定まるパラメータ

構造の類似した絞るようにしてある。これにより、ノイズ化合物を排除することができる。部分構造での検索同定ができることにより、 ^{13}C の場合は混合物の成分同定が容易にできる。

本検索同定システムは分析者個人により編集されたスペクトルデータベースの検索同定を目的としているので、2ドライブ方式のフロッピディスクを使用するとして最大 5000 件程度のスペクトルを収容することを考えている。BASIC インタプリタを用いて本システムの検索同定プログラムを RUN させたときの検索速度はスペクトルのピーク本数による差があるが、16 ビットの機種を用いた場合、参照化合物 100 件あたり ^1H で 2 分、 ^{13}C で 4 分程度である。プログラムの改良により若干向上させることはできるが、オーダ的にこれが改善されることはないと考えられる。インタプリタの代わりにコンパイラを使用すると、約 1/3 に時間短縮がなされるので十分実用に耐える。ハードディスクを使用すれば、さらに短縮できることはいうまでもない。

プログラムは BASIC で作成しているのでファイル操作やグラフィック関係の命令の若干の書き換えにより異機種間でも互換性が十分ある。筆者らは例として日立 B16 系統から NEC PC-98 系統パソコンに変換し問題がないことを確認している。しかし、測定装置はメーカーにより大きく異なるので、RS-232C 通信によるデータ取り込みを採用したが、測定装置からどのようなデータフォーマットで送られるかによって個別対応のデータ変換サブルーチンを余分に添付する必要がある。

§ 3 実用化の検討

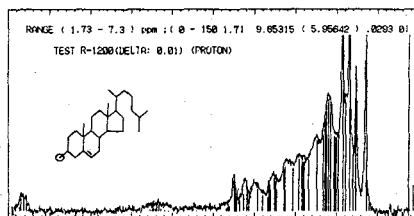
① デジタイザと NMR 測定装置間のスペクトルデータ点数の差による不整合

本システムは文献やデータ集のチャートから目視あるいはデジタイザを用いて得たスペクトルからもデータベースを構築できるように設計してある。しかし、デジタイザと NMR 測定装置のデータ点数は大きく異なるので、検出されたピーク群の集合パターンの整合性は一般には良くない (図 5)。

この問題は、NMR 測定装置からのスペクトルが S/N の悪い条件で測定された時には特に重大で実用化に向けて克服すべき条件の一つである。ピーク検知方式や合致度計算式中の諸パラメータに関する種々の実験の結果、測定装置からのデータに対して (I), (II) のデータ処理が有効であることがわかった。

(I) ピーク検知の際のピーク位置と共にその両側の谷位置を検出して裾幅を求め、これが appm 以下のものはノイズと見なして捨てる。こうして例えば 4k 点のデータより検出されるピーク数は、約 100 本となる。

(II) (I) で得られたピーク群に対し、隣り



実際のスペクトル

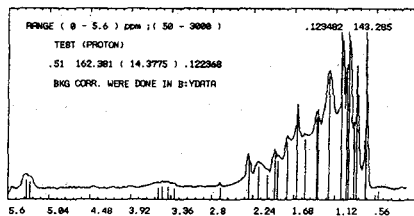
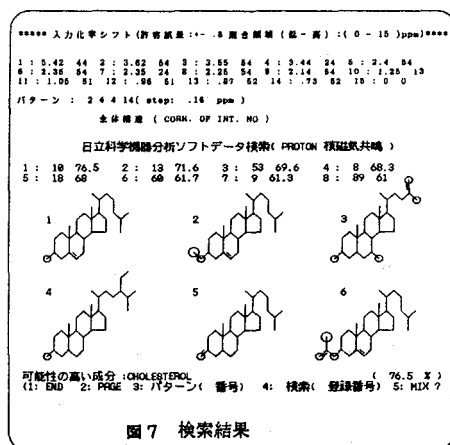
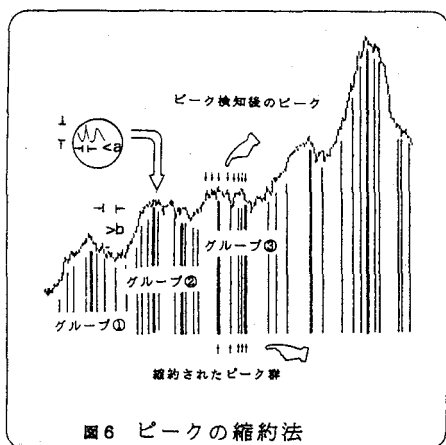


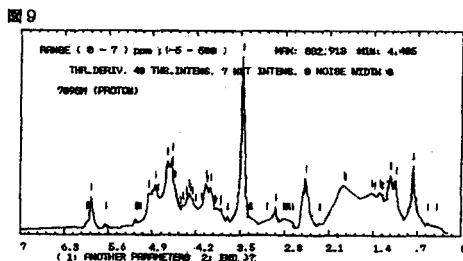
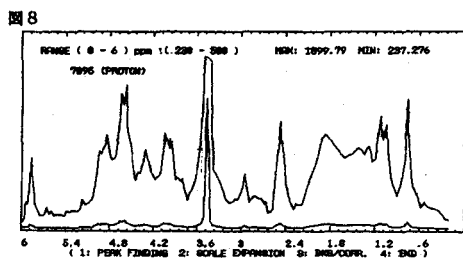
図 5 デジタイザによる文献スペクトル

合ったピーク間の距離が b ppm 以内に存在する幾つかのピーク群に分け、その中で最大強度のピークのみを選択する。こうして上記の 100 本のピークは約 40 本に縮約され、デジタイザで得られたピーク数に匹敵するものになる (図 6)。a, b は測定装置の分解能 (データ点数) により決定されるが、80MHz の装置では大体 0.01 および 0.03ppm であった。デジタイザにより作成した約 100 種のステロイド化合物のデータベースに対して測定装置からの実例スペクトルのパターンを検索同定した結果を図 7 に示す。



② 巨大ピークの存在による合致度低下の問題

図 8 に G-strophathin の ^1H -スペクトル概念図を示す。OH のピーク強度が他と比べて抜群に大きいため、これを 1 とした場合の他のピークの相対強度はいずれも $1/4$ 以下になり、図 3 のアルゴリズムを用いると類似した骨格を持つ他の cardiac Glycosides のスペクトルに対比しうる類似性を有する (拡大図よりわかる) のに検出されてこないことになる。これを改善するために着目するスペクトル領域の平均強度よりも c 倍大きなピークが存在する場合、この強度を d 倍縮小してパターン化する手法を検討した。巨大ピークを挟む 2 点を指定すると、その 2 点間の強度をすべて d 倍にするようなサブルーチンプログラムを追加した。図 7 の OH 領域を 0.5 倍した図 9 になると他領域の相対強度分布が有意義になりはじめ、類似性をもつものとして検索されるようになる。パラメータ c の選択に応じてパラメータ d が自動的に選択できるアルゴリズムにしてあるが、 c の値が幾つから本手法を機能させるべきかはさらに実験をした上で決定したい。



LANを用いたNMRデータ管理およびオンライン処理システムの開発

(三共分析代謝研) ○皆川勝弘・矢島美由紀・春山英幸・桑野晴光
(同活性物質研) 成戸俊二
(同研究企画部) 土田秋雄

The development of NMR data book-keeping and desktop data processing system

(SANKYO Co., Ltd. Analytical & Metabolic Research, New lead Research Laboratories* and Research Planning Department**)

Katsuhiko Minagawa, Miyuki Yajima, Hideyuki Haruyama, Harumitsu Kuwano, Syunji Naruto*, Akio Tsuchida**

With the increasing capabilities of NMR spectroscopy as an analytical method in a wide range of pharmaceutical chemistry, the number of samples which had to be examined by NMR began to rise dramatically in recent years. The requirement to cope with this situation forces us to innovate our routine NMR service system. Among issues undertaken, this report describes the development for the system which enables user friendly desktop NMR data processing and NMR data book-keeping using local area network.

緒言

NMRは化学における有力な分析手段の一つである。特に有機合成化学者や天然物化学者にとって反応生成物の確認法としての重要性は極めて高い。当社研究所においても、本システム施行前から測定依頼業務を主体として、月に最高700件程の1D-NMRの測定が行われ、現在も全体として増加傾向にある。しかし一般的にNMRの測定は積算時間に対してデータ処理に要する時間の方が長く、NMR装置のコンピュータを用いて大量のサンプルの処理を行うには限界があった。

このような問題の解決と多量のデータを有効に活用するには、効率的なデータ処理環境と特許対策を考慮したデータ管理体制が必要と考えた。またこれらの内容は定型的であり、多くの部分において自動化及び省力化が可能である。そこで研究所構内LANを利用して管理用のコンピュータを設定しそこにデータを集積し、化学系の研究者が自分の研究室でデータ処理が行える環境を構築した。これにより今まで各装置に分散していたデータを系統的に整理し保存でき、かつ装置付属のコンピュータより大型の記憶装置に保存できるため長期にわたる保存が可能となった。

また測定依頼のデータについては従来オペレータがデータ処理をし、スペクトルチャートとして返却していたが、本システム稼働後は原則として依頼者にデータ処理を委ねることにした。

NMR・コンピュータ・ネットワーク

○みながわかつひろ・やじまみゆき・はるやまひでゆき・くわのはるみつ
・なるとしゅんじ・つちだあきお

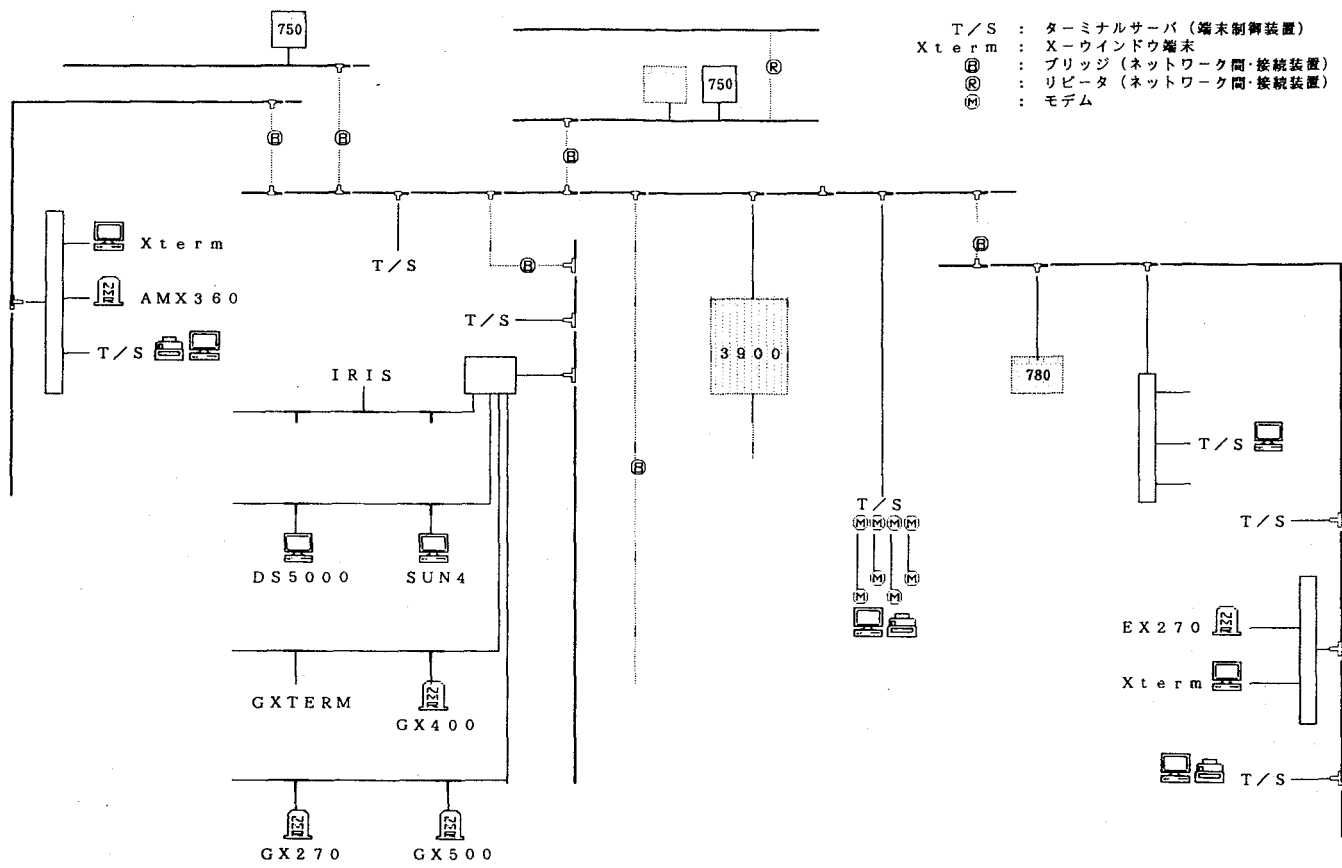


図1 ネットワーク構成図

ネットワーク全体から主に本システムに関する部分を抜粋した。(本文参照)

実験

本システムは、図1に示すようにオートサンプルチェンジャを装備したJEOL GX270（測定依頼業務用）とJEOL EX270、BRUKER AMX360（共に一般開放）の3台のスペクトロメータと、データ集積、管理用のミニコンピュータDEC MicroVAX 3900をEthernetで接続し構成されている。また解析用のNMR装置や2D-NMRの処理サイトとしてsun,DEC Station等のUNIXワークステーションも接続されている。各CPU間の通信プロトコルは、GX270、EX270、MicroVAX間にはDECnetをAMX360、MicroVAX、EWS間にはTCP/IPを用いている。

システムを利用するための端末は主に一般のパーソナルコンピュータで、グラフィック端末エミュレータソフトを使用している。さらに高解像度のX-ターミナルやワークステーションからリモートログインすることによっても利用可能である。処理結果の出力先は、XYプロッタ、ページプリンタ等がネットワーク上にあり任意の場所に出力する事ができる。

本システムのソフトウェアは、図2に示すようにデータ管理プログラムNMRADM、データ処理プログラムMUPS その他ユーティリティプログラムから構成され、FORTRAN, C, DCLで記述されている。

NMRADMは、装置で発生したデータをホストコンピュータに転送し、管理ファイルにより一定期間保存するものである。まず転送プログラムによってNMR装置から転送されてきたデータを測定内容別に分別し、管理ファイルを更新する。磁気ディスク容量に限りがあることから、定期的に古いデータから光磁気ディスクに退避する機能を備えている。また必要に応じて隨意取り出す事も可能としている。さらに測定依頼業務用のものは、依頼サンプルの受付、依頼情報の表示・検索、受付内容を基にした測定用のメニューファイル（測定条件を書き込んだパラメータファイル）の生成、集計機能などを備えている。

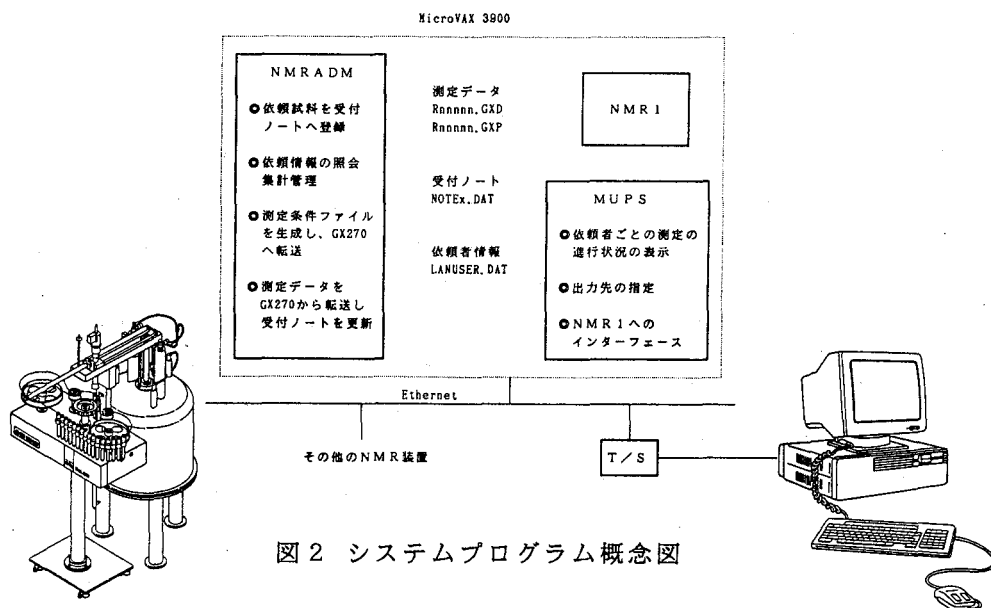


図2 システムプログラム概念図

一方MUPSは、実際のスペクトル処理パッケージである米国NMRiの一次元NMR処理ソフトウェア「NMR1」へのインターフェイスプログラムで、依頼サンプルの間合せ、ユーザのデータ検索、異機種データを共通フォーマットにするコンバーター、プリンタ・プロッタのアサイン等LAN環境で効率よく使うためのユーザインターフェイス機能を持っている。ユーザである有機化学者は自分で依頼もしくは測定したデータが、どこのディスクにどのようなフォーマットで存在するかを意識することなく、希望のデータにアクセスできる。NMR1によるデータ処理はプロセスコントロール機能を用いて半自動化されており、また異機種データも共通に扱えるためユーザの負担は大幅に軽減されている。

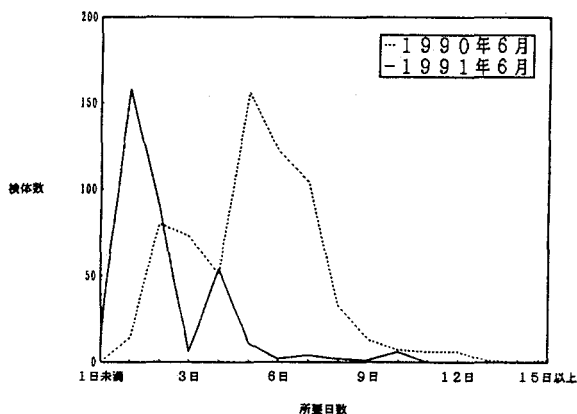


図3-1 スペクトル入手可能までの日数

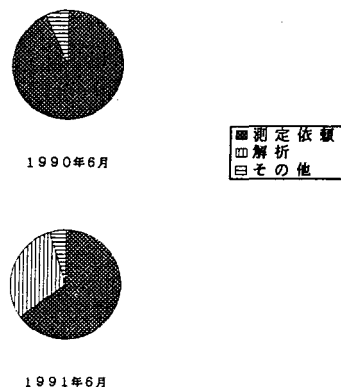


図3-2 オペレータの作業内容の変化

結果及び考察

このシステムを使用することによって、今までほとんど1回しか利用されていなかったデータを何度も参照したり、ウィンドウ処理によって必要な情報を強調するなど通常の処理では不明だった点が解明されたりして、測定済みのデータがより有効に活用されるようになった。

図3-1に示すように測定依頼業務については本システムを利用することによって、測定を依頼してからチャートが入手できるまでに3日程度かかっていたものが、依頼日当日か翌朝にはスペクトルを見ることができるようになった。また図3-2に示すようにオペレータの負担も軽減され、サービス向上や別の業務に携われるようになった。

研究者自身が測定するデータも処理を本システムで行うことによって、開放利用装置の占有時間を最小とし、1日に50件以上の測定を行え利用効率を向上させる事ができた。

P13

分析研究室におけるNMRの包括的役割

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, 広瀬千恵子, 石川茂, 小形稔, 西村俊秀,
堀川力三, 檜山行雄

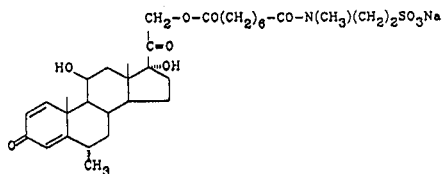
The comprehensive role of NMR in the analytical laboratory
Upjohn Pharmaceuticals Limited

Y. Aoki, C. Hirose, S. Ishikawa, M. Ogata, T. Nishimura, R. Horikawa, Y. Hiyama

NMR spectroscopy has been indispensable for an analytical laboratory. The practical utility of NMR in our laboratory is presented in a series of analyses and identification studies. First, NMR spectroscopy is used as a screening method of bulk drugs and formulations. The main utility is identification of minor components in the products. This time a photodegradation product of Promedrol is reported as an interesting example. And next, the UV response factors of HPLC minor components can be determined by help of integral values of ^1H NMR. Varied valuable information from simple measurements of NMR is obtained in combination with other analytical methods on consideration of the character of NMR.

1. はじめに

NMR測定は、検出感度も飛躍的に向上し、多次元NMR、多核種NMR等の開発により、新たな領域を広げつつある。ここでは实际的に薬の開発に向けて行なわれる一連の開発研究；薬物としての有機化合物のキャラクタリゼーションや他の化合物との相互作用、また分離された不純物や分解物の同定・分析などにおいて、向上した装置の特性を生かした簡単な方法で、NMRを効率的かつ有効に使用している例を示す。具体的には、当社開発中のステロイド化合物であるプロメドロールの分析を例として説明を行なう。



Promedrol

キーワード：スクリーニング、物質の同定、相対ピーク強度比

○おおきゆきみ, ひろせちえこ, いしかわしげる, おがたみのる,
にしむらとしひで, ほりかわりきぞう, ひやまゆきお

2. 実験及び結果

装置: ここに示す一連の実験は全て Bruker AM300 にて $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ dual probe を用いて行なった。

2-1. スクリーニングのための NMR 測定

薬物原体及び製剤中の不純物のスクリーニングの手段として ^1H NMR を用いることができる。スペクトル上の微小信号により、不純物・分解物及び残留溶媒の有無と大まかな量の情報が得られる。NMR を用いる利点として、試料に手を加えないため環境からの混入物が少ないこと、HPLC による分析の際、UV 検出器で見過しやすいものも検出できること、またシグナルの帰属が決定しているものについてであれば、迅速に測定及び解析をすることが可能であることがあげられる。現在の高ダイナミックレンジをもつ装置では、約 0.1 mol% までは十分検出できる。

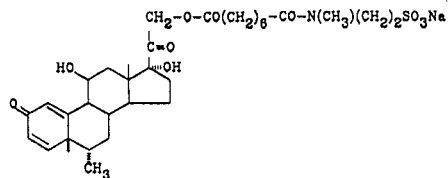
2-2. 分離された分解物の同定

主な不純物・分解物を同定することは、薬物の開発には非常に重要である。当研究室でも、オーソドックスに HPLC により分離した不純物・分解物をマススペクトルと共に NMR を用いて同定を行なっている。ここでは、分取により得られたプロメドロールの光分解物について同定を行なった結果について述べる。

まず、 ^1H 及び ^{13}C NMR のスペクトルを測定し、プロメドロールのスペクトルと比較を行なったところ (fig. 1), 側鎖部分には全く変化がなく、ステロイド環のシグナルに大きな違いがあることが分かった。違いは環全体に及んでいるが、特に A 環と B 環が大きく変化していた。また、この光分解物はプロトン及びカーボンの数は、プロメドロールと同一であった。次に、COSY スペクトルを測定したところ、光分解物では 4-C H と思われた $\delta 6.67 \text{ ppm}$ のシグナルと 6-C H のシグナルの間には相関ピークが見られなかった。さらに詳しくこのスペクトルを解析していくと、A 環と B 環の上下、例えば B 環では 9-C H はプロメドロールと比べて低磁場へ、6-C H は高磁場へと言うように変化が逆である。また、この光分解物のマススペクトル (FAB) の結果は、M/Z = 674 でプロメドロールと同一であったが、フラグメントには相違があった。

そこで、予想される構造式を右図に示す。

この構造を確認するために NOESY スペクトルを測定した。この NOESY スペクトルにより 4-C H のシグナル ($\delta 7.33 \text{ ppm}$) と 19-C H₃ のシグナル ($\delta 1.19 \text{ ppm}$) の間に相関ピークが、また 1-C H のシグナル

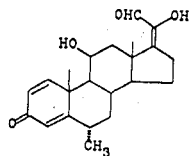


The structure of the photo-degradation product

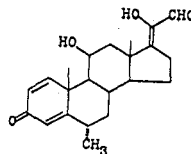
(δ 6.67 ppm) と 11-CH のシグナル (δ 4.48 ppm) の間に相関ピークが見られることにより、この構造が強く示唆された。この興味深い構造は、反応経路は明確でないものの 30 年以上前に既に提案されている。(1)

2-3. NMR と HPLC を用いた相対ピーク強度比の決定

薬物の不純物・分解物を HPLC により分析する際、これらの不純物・分解物の相対ピーク強度比を求めて分析を行なう方法がある。この方法によれば、個々の標品を用いることなく簡便かつ再現的に不純物・分解物の混在量を評価することができる。通常、相対ピーク強度比は主薬を 1 とし、各不純物の濃度とクロマトグラムのピーク面積との一次関数の傾きを用いて算出される。ここでは、主薬あるいは、すでに相対ピーク強度比の判明している物質を内部標準として用い、 $^1\text{H NMR}$ の積分値によりモル比を計算した後、HPLC により分析し、このピーク面積とモル比より相対ピーク強度比を算出することを考えた。試料として、熱分解物である二つのエノールアルデヒド(シス体とトランス体)について、プロメドロールに対する相対ピーク強度比を求めた。



Trans-form



Cis-form

The structure of two enol-aldehydes

内部標準としてはメチルプレドニゾロンを用いた。この物質の、主薬であるプロメドロールに対する相対ピーク強度比は 1.8 であることが分かっている。 $^1\text{H NMR}$ を測定する際、積分値を正確に出すため、測定範囲をできるだけ小さくし、積算回数を増やす、ゼロフィルにより FID データを有効に使う、待ち時間 (relaxation delay) を長く取るなどの点に気を配った。積分値を比較するシグナルについては、できるだけ近接したピーク同士を用い、測定する試料のシグナルと内標物質のシグナルには他のシグナルが重ならないことを事前に確認した。ここで得られたメチルプレドニゾロンと二つのエノールアルデヒドのモル比と、HPLC により得られたピーク面積比により、エノールアルデヒドの相対ピーク強度比を算出したところ、どちらも 2.0 であった。

また、同様に NMR によりモル比を測定する方法を用いて純度を求めることも可能である。しかし、どちらの場合においても、位相補正や積分の読み取りにより、ある程度の誤差が生じることは理解しておかなければならない。

3. まとめ

NMRの特性を考え、他の分析機器と組み合わせることにより物質の同定のみならず、簡単な測定で多くの分析に役立てることができる。

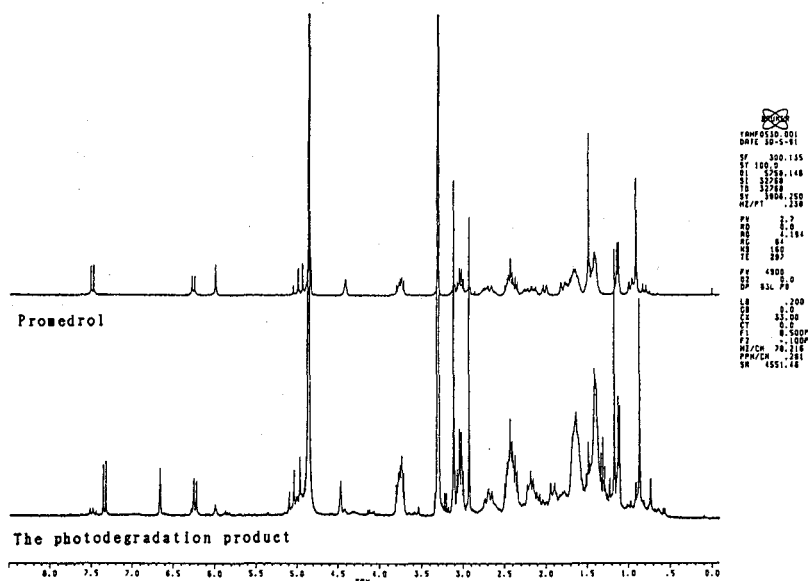


Fig. 1 The ^1H NMR spectra of Promedrol and the photodegradation product

(文献)

1. D.H.R.Barton and W.C.Taylor, "Photochemical Transformations Part IV. The Photochemistry of Prednisone Acetate.", *J. Chem. Soc.*, 1958, 2500-2510.

水溶液系の温度ジャンプNMRにおける
温度指標とジャンプ効率

○木村雅晴、内藤 晶¹、今成 司²、赤坂一之
(京大・理、¹姫路工大・理、²日本電子)

INTERNAL TEMPERATURE INDICATOR AND T-JUMP
EFFICIENCY IN T-JUMP NMR STUDIES OF AQUEOUS
SYSTEMS

M. Kimura, A. Naito¹, M. Imanari², and K. Akasaka
Faculty of Science, Kyoto University ; ¹ Faculty of Science, Himeji
Institute of Technology ; ² Application Laboratory, JEOL, Ltd.

As an internal temperature indicator that can be used both in conventional and temperature-jump NMR measurements of aqueous systems, we have investigated the possibility of using chemical shift of the water (HDO) resonance. Empirical equations relating the chemical shift of water to the temperature of the sample solution were obtained for pure water and for water containing ions KCl, NaCl, and inorganic phosphate. A protein ribonuclease A was found to give measurable effects on water chemical shift only when it is dissolved in more than millimolar concentrations. The efficiency of temperature jump of water upon irradiation of 1.3 kW microwave at 2.45 GHz showed a dramatic increase when KCl or NaCl was dissolved in a concentration range of 0.1-0.5 M.

1. はじめに

最近、マイクロ波を使った高速温度ジャンプNMR法が開発された。(L5, L19参照)この新しい方法を水溶液系に適用する場合、まず試料の温度をいかに迅速に測定できるかが問題になる。温度ジャンプの効率は試料ごとに異なると考えられるので、測定試料に内在する温度指標を用いることが望まれる。我々はこの温度指標として水の化学シフトを利用することを考えた。また、温度ジャンプのみならず通常の平衡系でのNMR測定においても、水溶液系での測定が増えており、水の化学シフトを試料の温度指標として確立することは有用であると考えられる。そのために平衡系での純水の化学シフトの温度変化を測定すると共に、それが塩濃度やpH、タンパク質濃度によってどのような影響を受けるかを調べ、様々な条件下での温度指標を作成した。

次に、温度ジャンプNMR固有の問題として、いかに短い時間で必要な温度ジャンプを実現するかということがある。充分短い時間でマイクロ波(2.45GHz)照射により15

Temperature-jumpNMR, 温度指標,

きむらまさはる、ないとうあきら、いまなりまもる、あかさかかずゆき

℃程度の温度上昇を実現できる最適の条件を捜すために、様々な条件下で温度ジャンプの実験を行い、その温度上昇効率を先の温度指標を利用して評価した。

2. 温度指標としての水の化学シフト

2-1 純粋な水 (99.9% D_2O , 0.03mM TSP, pH7.75) の温度 (℃) に対する化学シフト値 (ppm) の変化を図1に示す。 ^1H-NMR の測定は以下の実験すべてにおいて、日本電子製GX-400パルスFT-NMR分光器を用いて行った。また、設定温度については、予め熱電対を用いて温度可変装置の校正を行った。30℃以下あるいは70℃以上では顕著に直線性が失われ、温度に関する2次式でよくフィットすることができた。

$$\text{(Chemical Shift (ppm))} = K_0 + K_1 * T(^\circ\text{C}) + K_2 * T(^\circ\text{C})^2, \\ K_0=5.074, K_1=0.012, K_2=1.92*10^{-5} \quad (1)$$

この直線性の喪失は同じ化学シフト値の変化に対して、温度の変化量に違いがあることを示している。水の化学シフトに最も大きな影響を及ぼすのは水素結合の効果であると考えられ、その温度依存性は水素結合の歪みや切断が主な原因であろうと考えられている。

2-2 図2, 図3はそれぞれ濃度の異なるKCl溶液、リン酸緩衝液中での水の化学シフト値を示したものである。KCl溶液の方は濃度を上げるにつれて水の化学シフト値が高磁場側へ移動しているが、リン酸緩衝液の場合は、これとは対照的に低磁場側へ移動している。また、いずれも濃度を上げるほど、温度に対する傾きは緩やかになる傾向にある。

各データを式(1)でフィットしたときの各係数を調べてみると、少なくともそれらは0~3.0Mの範囲で溶質濃度にほぼ比例して変化することがわかった。例えばpH6.50のKCl溶液に対しては、式(1)における各係数の濃度依存性は、

$$K_0 = 5.070 - 0.108 * (\text{Conc.}) \\ K_1 = -0.012 + 0.001 * (\text{Conc.}) \\ K_2 = \{2.07 - 0.30 * (\text{Conc.})\} * 10^{-5} \quad (2)$$

で近似することができる。(濃度はmol/l, 試料濃度や温度の誤差から±0.005ppm程度の誤差を含む)NaClやリン酸緩衝液についても同様の実験式が得られた。

以上の結果を用いれば、純水及びKCl溶液やNaCl溶液、リン酸緩衝液の水の化学シフトを温度指標として利用することができる。

2-3 DCI添加による水の化学シフト値はDCI濃度0.1M以上(pH1以下)ではKClやNaClと同様の高磁場側へのシフトを示すが、濃度0.1M以下(pH1以上)においてはほとんどpHに依存しない。

2-4 タンパク質の1つとして、RNaseAの、水の化学シフト値への影響を調べた。

濃度1 MのRNase Aによる化学シフトの変化は、KCl濃度1 Mの場合の変化と比べて約50倍である。しかし、通常のNMRの測定におけるタンパク質の濃度（1 mM程度）では、純水に対する式（1）を用いても、温度にして0.5°C程度の差にしかならない。ただし、化学シフト値の変化の方向はKClの場合とは逆の向きである。すなわちタンパク質の濃度を上げるに連れて、水の化学シフトは低磁場側へシフトする。

少なくとも、RNase Aの場合、またその濃度が1 mM以下の場合には、純水またはイオン水に対する（1）、（2）式を温度指標に用いてもその誤差は0.5°C以下である。

結論として、水溶液系のNMR測定の際、水の信号は内部温度指標として極めて有効であると思われる。予めイオン組成に対して検定曲線を作成しておくことにより、充分精度の良い温度指標とすることができる。

3. マイクロ波照射による温度ジャンプの効率

実験には、マグネトロン（1.3 kW, 2.45 GHz）をもつパルス型マイクロ波発生装置（東京電子製IDX-2502P）を用い、溶質を様々に変えてジャンプ効率を測定した。マイクロ波照射の時間はすべて0.3秒である。

マイクロ波照射による温度上昇（高周波加熱）は、誘電損失という現象を利用したものである。被熱物体内で発生する単位体積あたりの熱量は、

$$P = 5/9 * f * \epsilon'' * E^2 * 10^{-12} \quad (\text{W/cm}^3) \quad (3)$$

で与えられる。ここでfは周波数、Eは高周波電界である。 ϵ'' は誘電損失率であるが、これは希薄溶液におけるデバイ型の緩和を仮定した場合、誘電緩和時間 τ と次の関係にある。

$$\epsilon'' = (\epsilon_s - \epsilon_i) \omega \tau / (1 + \omega^2 \tau^2) \quad (4)$$

ここで ω は高周波電界の角周波数、 ϵ_s 、 ϵ_i はそれぞれ静電的誘電率と、無限に速い応答をする誘電率の部分である。純水の場合、 ϵ'' の最大値は20 GHz近辺にあるため、2.45 GHzのマイクロ波を用いた場合の吸収効率は余りよくないと予想される。イオンを含む水溶液の場合には、これ以外に高周波磁界によるイオン電流が発熱の原因として加わると考えられ、加熱効率の上昇が期待される。

そこで、温度上昇効率に対するKCl及びNaClの濃度の効果を調べた。図4にKCl濃度に対する温度ジャンプ幅 ΔT を示す。データは0.1 M KCl（pH 6.80）の試料を25°Cからジャンプさせた時の ΔT によって規格化されている。温度ジャンプ幅は特に0~0.5 Mの範囲でイオン濃度に顕著に依存することがわかった。また、ジャンプする前の温度によって効率が多少異なることもわかっ

た。これらのことは、他のNaCl溶液やリン酸バッファーでも見られた。

DC1添加によるpHの変化に対する温度上昇幅 ΔT の変化は、実用的なpH範囲（pH1以上）ではほとんど見られず、pH1以下ではKCl溶液などと同様の挙動を示した。

図5は、0.1MKCl溶液中のタンパク質の濃度に対する ΔT の依存性を示したものである。実用的な濃度範囲（1~5mM）では ΔT のタンパク質濃度依存性は塩の効果程には大きくないが、多少効率を良くする方向へ働くことがわかった。

結論として、現行の装置において水溶液系の温度ジャンプを効率よく行うためには、KClまたはNaClの濃度を0.1M以上出来るだけ濃く保つことが必要である。

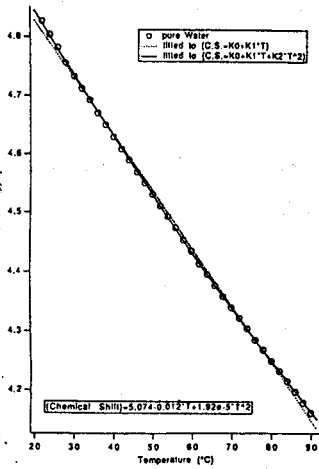


図 1

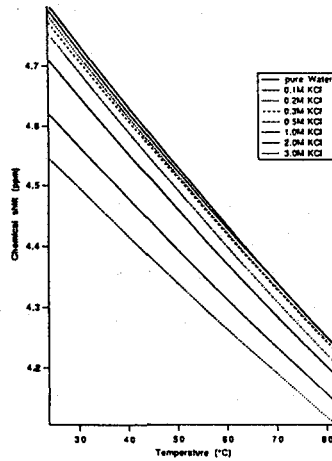


図 2

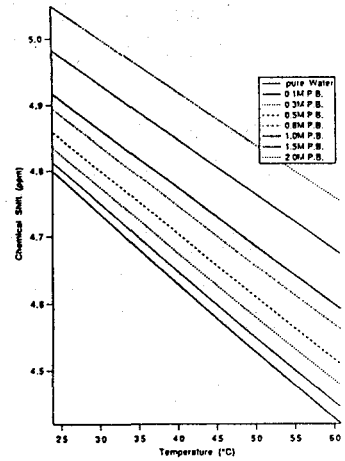


図 3

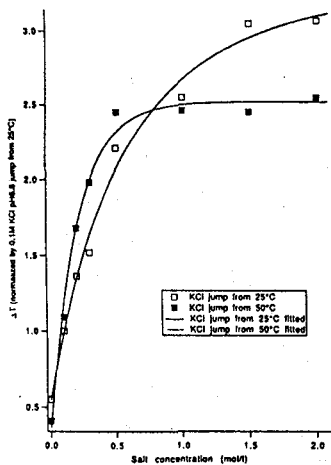


図 4

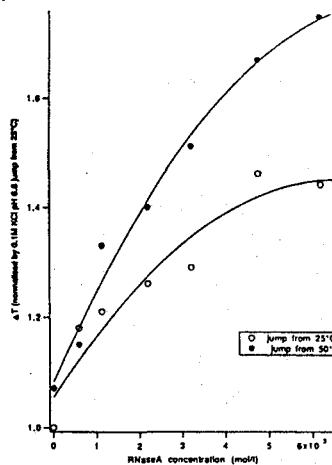


図 5

P14A

Multiple-Quantum NMR Experiments for Studying Spin-3/2 and Spin-5/2 Quadrupolar Relaxation

Chun-wa Chung^a, Brian Wood^b and Stephen Wimperis^{a,c}

^a*Department of Chemistry, University of Cambridge, United Kingdom*
and

^b*Biomedical NMR Unit and* ^c*Department of Chemistry,*
University of Manchester, United Kingdom

Novel sodium NMR imaging experiments that utilize triple-quantum coherence are demonstrated. Multiple-quantum coherences can only be excited for ²³Na nuclei which are in the slow-motion relaxation limit ($\omega_0\tau_c \geq 1$) and, as a result, the new experiments image only these nuclei and not those which are in the fast-motion limit ($\omega_0\tau_c \ll 1$). Unlike previously reported imaging techniques that achieve this discrimination, the present experiments are *not* simply multiple-quantum filtration experiments: the phase-encoding gradients are applied directly to a state of triple-quantum coherence. The main advantage of true triple-quantum imaging over multiple-quantum filtration imaging of sodium is that the effective strength of the phase-encoding gradients is tripled and that, combined with the favourable relaxation properties of triple-quantum coherence, this can lead to enhanced experimental performance.

Multiple-quantum coherences of spin-5/2 nuclei in solution can be excited if the transverse or longitudinal relaxation is triexponential. Filtration of the NMR signal through a state of three- or five-quantum coherence greatly facilitates the study of spin-5/2 quadrupolar relaxation in biological and macromolecular systems. The results of these multiple-quantum filtration experiments are analysed by directly fitting correlation times and quadrupolar coupling constants to the experimentally observed spin-5/2 Lorentzian lineshapes or triexponential decays. More complicated experimental techniques measure the simple exponential relaxation of four- and five-quantum coherences and provide an alternative and straightforward method of obtaining spin-5/2 motional parameters outside the extreme-narrowing limit. Irreducible spherical tensor operators are used to describe both the spin-5/2 quadrupolar relaxation and the multiple-quantum NMR techniques. Results are drawn from ²⁵Mg NMR of magnesium ions binding to a large protein (bovine albumin) in aqueous solution, although the experimental techniques and fitting procedures are applicable to other spin-5/2 nuclei, such as ¹⁷O and ²⁷Al.

P15

オキシトシンのDMSO中における構造

○加藤敏代、藤原敏道、猿渡茂*、永山国昭

(日本電子・生体研、*新技術事業団・ERATO)

Solution Structure of Oxytocin in Dimethylsulfoxide

Toshiyo Kato, Toshimichi Fujiwara,*Shigeru Endo and Kuniaki Nagayama

Biometrology Lab., JEOL Ltd., * ERATO JRDC

Two different ionized states of oxytocin were found by acid-base titration in dimethylsulfoxide (DMSO). There was a difference in spectral behaviors between the two states. A change in the state of protonation of the N terminal amino group was responsible for large lowfield shifts in the N terminal amino proton, Cys-1 H^{α} and Tyr-2 NH resonances from a basic to an acid extreme. Full assignments of proton and carbon-13 resonances for the two extreme states were reported. The disagreement of assignment and the controversial spectral variation observed in many previous reports for oxytocin in DMSO were settled. Comparing NMR parameters such as the chemical shifts, temperature dependence of amide protons and J couplings, a change in backbone conformation of the cyclic moiety associated with the protonation is suggested. To confirm this tentative conclusion, conformations of the two states are investigated with the distance geometry calculation on the basis of the relaxation matrix analysis.

1. 概観

オキシトシン (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂) はこれまでNMRにより最も多く研究されてきたホルモンペプチドのひとつである。オキシトシンは水中ではフレキシブルであるが、DMSO中では制限された構造をもつと考えられている。DMSO中でのプロトンおよびカーボンの帰属に関する過去の報文を比較すると、無視できないケミカルシフトの不一致が認められる。これは試料中の不純物によることが示唆されていたが(1)、その原因については明らかにされていなかった。我々はオキシトシンのDMSO溶液中に酸あるいは塩基を添加して、プロトンケミカルシフトの変化を追い、N末解離に伴う2つの極限状態を得た(Figure 1)。この結果から前述のケミカルシフトの不一致は不純物として含まれる塩基(おそらく酢酸塩)によるものと考えている。2つの極限状態をそれぞれ oxytocin I(N末が脱プロトン型)および oxytocin II(N末が塩酸塩型)とし、IとIIについてプロトンとカーボンの全帰属を行った。両者のNMRパラメータ(ケミカルシフト、アミドプロトンの温度依存性およびJ結合)を比較したところ、N末解離による誘起効果のみでは説明しにくい差が得られた。すなわち、(i)N末から8ボンド以上離れたIle-3とGln-4の骨格のカーボンのケミカルシフトに有意な差(0.5-1.2 ppm)があること、(ii)IではTyr-2とAsn-5のアミドプロトンの温度依存性がともにゼロであるのに対しIIでは両者に温度依存性が現れること、(iii)IではTyr-2のカルボニルカーボンが大きく(1.4 ppm)低磁場シフトすることである。これらの結果から Iはcyclic partの

¹H NMR、¹³C NMR、オキシトシン、溶液構造、帰属

かとう としよ、ふじわら としみち、えんど しげる、ながやま くにあき

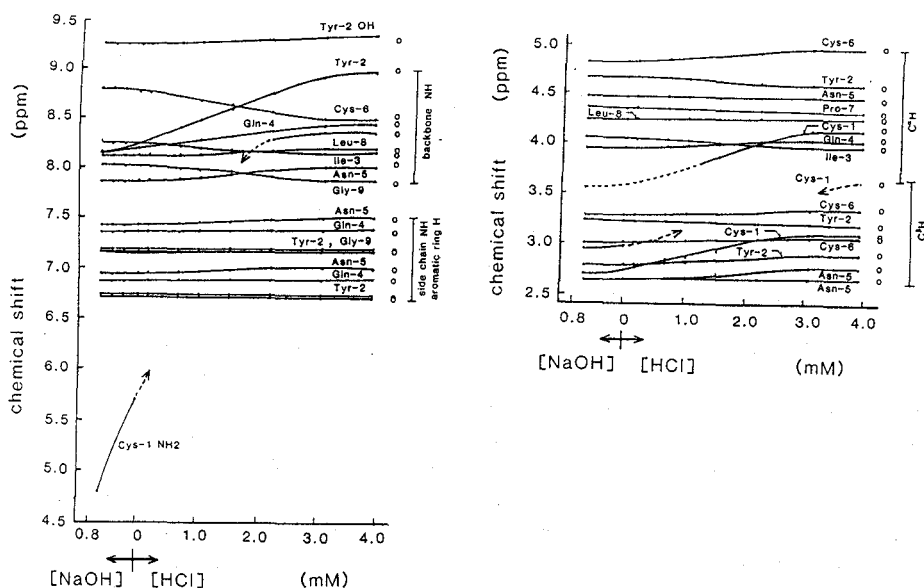


Fig. 1 Acid-base titration of oxytocin in DMSO at 23°C. Chemical shift changes of lower field region (A) and higher field region (B) were plotted as a function of hydroxide or hydronium ion concentration. Sample concentration was 3.7mM. The mark o, shows the values of oxytocin hydrochloride.

Tyr-2とAsn-5間に比較的安定な水素結合を形成しているが、IIではそれが不安定化すると想像される。以上の差が果たして構造変化の寄与を反映したものであるかについては、定量的な2DNOEスペクトル強度より求めた緩和行列に基いた構造計算を行い検討している。

2. 方法

1) NMRパラメータの抽出

測定はすべてJEOL製GSX400スペクトロメータを用いた。それぞれの試料についてDQF-COSY, NOESYを測定し(3.7mM, 23°C)、連鎖帰属法に従ってプロトンを帰属した。カーボンの帰属はHMQCとHMBCスペクトルよりおこなった(20mM, 36°C)。

$J_{NH\alpha H}$ は1次元スペクトルより直接測定し、 $J_{\alpha H\beta H}$ はP.E.COSYスペクトルから得た。 $J_{CO\beta H}$ はプロトン検出2DJ法(2)により求めた。 $J_{\alpha H\beta H}$ と $J_{CO\beta H}$ の組み合わせから側鎖βプロトンの立体特異性帰属を行い(3)この情報はdistance geometry計算の際に入力した。NMRパラメータの一部をTable 1とTable 2に示す。

2) 緩和行列の計算

2DNOEとしてmixing timeの異なる($\tau_m = 50-800ms$)全部で6種のデータを使用した。NOEピーク強度は、ピークの積分を求め定量化した。緩和行列の計算は次式に基いて行う。

		NH(ppm)	$J_{NH-C_{\alpha H}}$ (Hz) ^a	$-\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/°C)
Tyr-2	I	8.15	* ^d	~0
	II	9.03	8.2	1.7
Ile-3	I	8.25	6.4	8.9
	II	8.14	5.9	4.5
Gln-4	I	8.15	6.4	4.3
	II	8.46	4.4	4.2
Asn-5	I	7.83	6.5	0.0
	II	8.07	7.0	4.0
Cys-6	I	8.81	7.9	10.4
	II	8.54	7.7	6.1
Leu-8	I	8.11	7.6	6.3
	II	8.19	7.9	4.7
Gly-9	I	8.03	5.9	5.5
	II	7.86	5.9	3.2

Table 1 Properties of amide protons for the two states of oxytocin. I and II denote oxytocin I and oxytocin II, respectively.

(a) oxytocin I

		$J_{C_{\alpha H}C_{\beta H}}$	$J_{C_{\alpha H}C_{\beta H}}$		assignment
		(Hz)	HMBC	2DJ	
	P.E.C				
Cys1	β^a	6.6	w ^b	<9	pro-S
	β'	7.3	m	10	pro-R
Tyr2	β	4.7	vw	~6	pro-S
	β'	10.7	vw	~6	pro-R
Gln4	β	4.4	vw	* ^c	pro-S
	β'	9.1	vw	*	pro-R
Cys6	β	6.9	w	6	pro-S
	β'	7.3	s	9	pro-R

(b) oxytocin II

		$J_{C_{\alpha H}C_{\beta H}}$	$J_{C_{\alpha H}C_{\beta H}}$		assignment
		(Hz)	HMBC	2DJ	
	P.E.C				
Cys1	β	4.7	vw	- ^d	pro-S
	β'	8.0	m	~10	pro-R
Tyr2	β	3.7	vw	-	pro-S
	β'	10.4	vw	-	pro-R
Asn5	β	7.3	m	9	pro-S
	β'	6.3	s	10	pro-R
Cys6	β	6.0	w	-	pro-S
	β'	7.3	s	~8	pro-R
Leu8	β	10.5	-	-	pro-R
	β'	4.9	-	-	pro-S

Table 2 Homo- and heteronuclear coupling constants and assignment of β protons for the two states of oxytocin

$$M_z(\tau_m) = e^{-R\tau_m} M_{z0}$$

ただし、 R は緩和行列、 $M_z(\tau_m)$ と M_{z0} はそれぞれmixing timeが τ_m およびゼロの時の2DNOEスペクトルの強度である。最初にある τ_m について R を求める。次にこの R を初期値として、複数の τ_m について上式で求まる計算スペクトルと実験スペクトルで、約2000個のピーク強度の差が最小になように R を計算した(非線形最小自乗法: Levenberg-Marquart法)。

3) distance geometry計算

計算はすべてJEOL製 MolSkop(JML-S1000)を用いて行った。2)で求めた緩和行列 R を核間距離に変換する方法にuniform averaging model(4)があるが、現在これを変形したモデルを検討している。核間距離から三次構造を計算するプログラムとしてDADAS90を使用した。

<文献>

- (1)Walter et al.(1977)J. Am. Chem. Soc.,99,7326-7332.
- (2)Pratum et al.(1988)J. Magn. Reson.,78,376-381.
- (3)Kessler et al.(1987)J. Am. Chem. Soc.,109,6927-6933.
- (4)Braun et al.(1981)Biochim. Biophys. Acta,667,377-396.

P16

¹H NMRによるエンドセリンの立体構造決定と

core-tail相互作用の解析

○遠藤聡史、井ノ岡博、菊池 崇、脇舛光廣、水田栄治、藤野政彦
(武田薬品工業(株)筑波研究所)

Solution conformation of endothelin-1 studied by ¹H NMR spectroscopy :

evidence for the interaction between the core and the tail regions

Satoshi Endo, Hiroshi Inooka, Takashi Kikuchi, Mitsuhiro Wakimasu, Eiji Mizuta
and Masahiko Fujino

Tsukuba Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.

ABSTRACT : The solution conformation of human endothelin-1 has been determined
in aqueous ethylene glycol by ¹H NMR spectroscopy and distance geometry.

Conformation of residues 1-17 is well-defined but the following residues 18-21 do not
adopt a defined conformation. Although NOE interactions between the core (residues
1-15) region and the C-terminal 4 residues (18-21) were not observed, limited digestion
by carboxypeptidase and the subsequent spectral analyses clearly demonstrated the
existence of the interaction between the core and the tail regions.

[序]

エンドセリンは強力な血管平滑筋収縮活性を有する、アミノ酸21残基からなる
生理活性ペプチドである(図1、文献1)。我々は既にジメチルスルホキシド溶液
中での立体構造を決定しているが²⁾、活性に重要な役割を果たしているC末端部分
のコンホメーションは揺らいでおり、特定の立体構造をとっていなかった。しかし
ながら、C末端部分の疎水性を考えると、より水溶液に近い系では何らかの構造を
とることが期待される。そこで今回、溶媒として33%エチレングリコールを含む
水溶液を用いて、¹H NMRとディスタンスジオメトリー法によるエンドセリンの
立体構造決定を行なった。C末端の4残基(Asp18-Trp21)のtail
部分とN末端側のcore領域(Cys1-Cys15)の間の相互作用は、NOE
としては観測できなかったが、カルボキシペプチダーゼによるC末端からの逐次
限定分解反応に伴うスペクトル変化を解析することにより、coreとtailの
間の相互作用について興味ある知見が得られた。

Keywords: endothelin, ¹H NMR, conformation, CPase digestion

えんどうさとし、いのおかひろし、きくちたかし、わきますみつひろ、みずたえい
じ、ふじのまさひこ

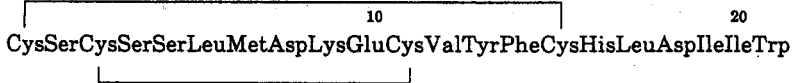


図1 ヒトエンドセリン-1のアミノ酸配列

[実験]

(1) 試料の調製

ヒトエンドセリン-1 (ET-1) は固相法により合成し、ランダムにS-S架橋をかけた後、HPLCにより分離精製した。S-S結合の架橋様式については、酵素および化学分解とFAB-MS解析により、天然型と同一であることを確認した³⁾。NMR測定には、33%エチレングリコール-d₄を含むH₂O溶液または33%エチレングリコール-d₆を含むD₂O溶液にET-1を溶解して試料とした。

(2) NMR測定

測定にはBruker社AM-500を用いた。各種2次元NMRスペクトル(DQF-COSY、HOHAHA、NOESY)を測定し、連鎖帰属法によりプロトンシグナルの帰属を行なった。βメチレンプロトンの立体特異的帰属はdNβ、dNβ'の大きさからE、COSYスペクトルにより求めたJαβ、Jαβ'の値に基づいて行なった。

(3) ディスタンスジオメトリー計算

NMR解析から得られた距離情報を入力としてプログラムDADASにより立体構造計算を行なった。

(4) CPase差スペクトル⁴⁾

エンドセリンのcore領域(Cys1-Cys15)とtail領域(His16-Trp21)の間の相互作用についての情報を得ることを目的として、カルボキシペプチダーゼY(CPaseY)によるC末端からの逐次限定分解反応に伴うスペクトル変化を解析した。手順は以下の通り。

- ① ET-1溶液(0.5mM、pH6.3)にCPaseYを加え、NMR試料管内で限定分解反応を行なう(E:S=1:6000、30℃)。
- ② 一定時間ごとにNMRスペクトル(1D、2D)を測定して、反応経過を追跡する。2Dスペクトルとしては、感度とシグナル解析の容易さからHOHAHAスペクトル(mixing time=40ns)を用いた。各スペクトルの測定時間は1Dが15分、2Dが1時間40分であった。
- ③ 1Dスペクトルにより、各残基の遊離を特徴づけるスペクトル変化(化学シフト変化)を同定し、各残基の遊離ステップを示すのに最も適した2D差スペクトルを計算する。
- ④ 2D差スペクトルによりシフト変化したシグナルをすべて拾い出し、もとの2次元スペクトルにより帰属を行なう。

[結果と考察]

(1) ディスタンスジオメトリーによる立体構造決定

図2にET-1のNOESYスペクトルのNH-αH領域を帰属とともに示す。

NOESYスペクトルの解析およびDQF-COSYスペクトルと β プロトンの立体特異的帰属により得られた2面角 ϕ 、 χ^1 の値から合計230個の距離情報を抽出した。内訳は残基内121個、隣接残基間59個、非隣接残基間50個であった。これらを入力として、ランダムに発生させた50個の初期構造に対してDADAS計算を行ない、最終的にNMR情報をよく満足する9つの立体構造が得られた。距離情報に対する violation の総和は平均1.3 Åであった。得られた9つの構造を重ね合わせると、Cys1-Leu17の部分では収束がよい(ペプチド主鎖原子間のRMSD=1.1 Å)のに対して、Asp18-Trp21の部分の配向は乱れていた。立体構造上の特徴的な点として(図3参照)、①Ser5-Asp8の部分がタイプI β ターン様の構造をとっていること、②Lys9-Cys15の部分が規則的な α ヘリックス構造をとっていること、③Asp8、Glu10、Phe14の3残基がヘリックスの一方の側にほぼ直線上に配置していること、④Leu6、Val12、Leu17の疎水性残基がクラスターを形成していること、⑤core領域の中ではCys1-Ser5部分の収束がよくないこと、があげられる。Asp18-Trp21部分とcore領域の間にはNOEは観測されず、C末端4残基のcore領域に対する配向は決定できなかった。

(2) CPase差スペクトル

C末端4残基(18-21)とcore領域の間の相互作用はNOEとしては観測されなかったが、この相互作用についてさらに情報を得るためにCPase差スペクトルによる解析を行なった。図4にTrp21が遊離する前後の2次元差スペクトル、図5にTrp21とLeu17の各遊離ステップにおける化学シフト変化を示す。この結果から明らかなように、Trp21が遊離することによるシフト変化は、C末端数残基のみならず分子全体に及んでいる。とくにLys9の ϵ メチレンシグナルに0.08 ppmの低磁場シフトが観測された。Ile20の遊離によるシフト変化

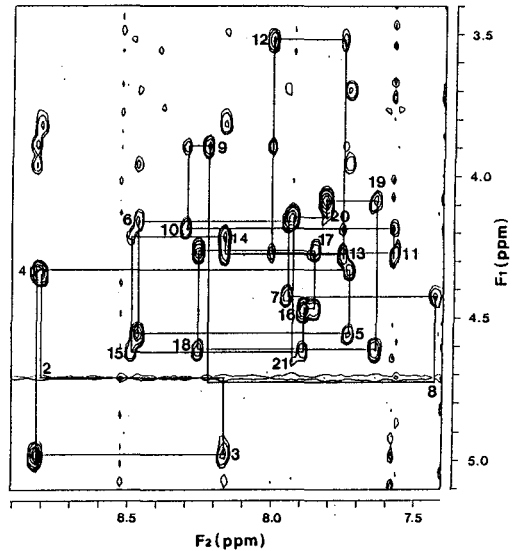


図2 ET-1のNOESYスペクトル(NH- α H領域) 数字は各残基のNH- α Hクロスピーク的位置、実線は sequential connectivitiesを示す。測定条件はET-1濃度3.6 mM、pH 3.2、40℃、mixing time = 200ms

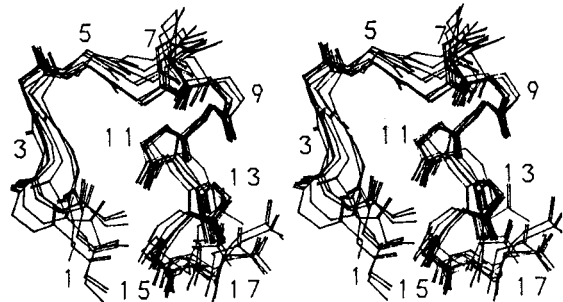


図3 ET-1の溶液中の立体構造(主鎖構造のみを表示) デイスタンスジオメトリーにより得られた9つの構造をCys1-Leu17の部分について重ね合わせた。

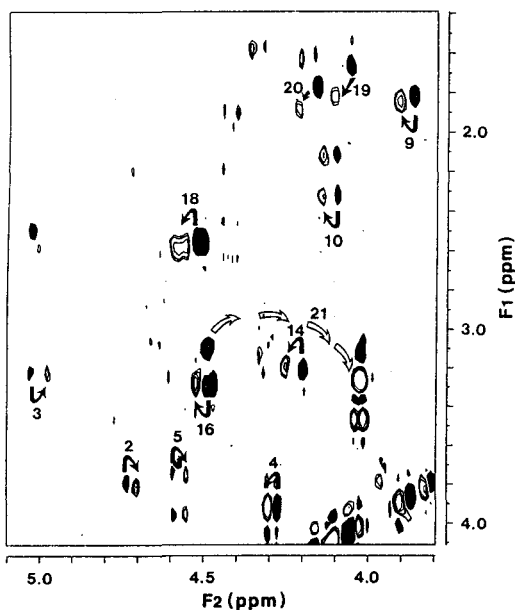


図4 Trp 21 が遊離する前後のHOHAHA差スペクトル影をつけたピーク (negative) は intact なエンドセリン (1-21) のシグナル、白抜きピーク (positive) は Trp 21 遊離後のペプチド (1-20) のシグナルに対応し、Trp 21 の遊離により化学シフトの変化したシグナル (残基番号で表示) のみが差スペクトル上に現われている。

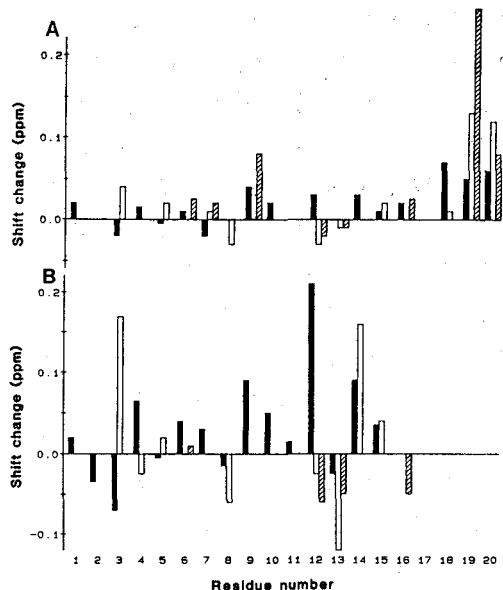


図5 Trp 21 (A)、Leu 17 (B) が遊離する前後での各残基のシグナルの化学シフト変化。プラスは低磁場シフト、マイナスは高磁場シフトを示す。■ はアミドプロトン、□ はαプロトン、▨ はその他のプロトンのシフト変化を表す。

は小さいのに対して、Ile 19 の遊離によるシフト変化は大きく、やはり分子全体に及んでいる。Leu 17 の遊離によるシフト変化はさらに大きく、Cys 3、Val 12、Tyr 13、Phe 14 に 0.1ppm 以上のシフト変化が観測され、Leu 17 まで切断が進むと core 領域の立体構造にかなりの変化が生ずることがわかる。このことは NOE で観測された Leu 17 と Val 12 の間の相互作用が、実際に core 領域全体の立体構造の形成に寄与していることを示唆している。このように、CPase 差スペクトルの解析から、core 領域との NOE が観測されない C 末端の 4 残基も含めて、tail 領域との相互作用が core 領域の立体構造に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

本研究で明らかにした ET-1 の立体構造と core-tail 相互作用は、エンドセリンの構造活性相関を理解する上で有用な情報となるものと期待している。

[文献]

- 1) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988) Nature 332, 411-415
- 2) Endo, S., Inooka, H., Ishibashi, Y., Kitada, C., Mizuta, E., Fujino, M. (1989) FEBS Lett. 257, 149-154
- 3) Ishibashi, Y., Kikuchi, T., Wakimasu, M., Mizuta, E., Fujino, M. (1991) Biol. Mass Spectrom., in press
- 4) Endo, S. and Arata, Y. (1985) Biochemistry 24, 1561-1568

P17

エンドウ褐紋病菌の産出するサブレッサーのNMRによる構造研究

(新日本製鐵㈱・先端研*、岡山大・農) ○齋藤公児*、加藤敏朗*、
金洪模、白石友紀、山田哲治、奥八郎

Structural analysis on suppressors secreted from Pea Pathogen,
Mycosphaerella pinodes, by NMR experiments

Koji Saito*, Toshiaki Kato*, Honma Kimu, Tomonori Shiraishi, Tetsuji Yamada
, Hachirou Oku

(Advanced Materials & Technology Research Lab. Nippon Steel Corporation*
Faculty of Agriculture Okayama University)

Pynospores of *Mycosphaerella pinodes*, a pea pathogen, secrete compounds appear to suppress defense reactions of pea plant when they germinate on the pea leaves. Purification of the compounds by gel filtration and HPLC yielded two active substances. The chemical structures of these substrates were studied by NMR and were determined as a small glycopeptide. Spin coupling values of $^3J(\theta)$ showed that their peptide chains hold α -helix structure. These conformations were consistent with those estimated by molecular dynamics programs.

1. 序論

植物は、有害な生物の侵入やその繁殖を防止するため、様々な防御機構を備えている。対して、ある種の糸状菌は、生きた植物の防御反応を乗り越えて、特定の植物に寄生できるようになっている。

エンドウの褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes*) の胞子は、ファイトアレキシンの生産を遅らせる (サブレスする) 物質などを産出し、エンドウに感染することが知られている¹⁾。本研究において我々は、このサブレッサーを胞子の懸濁液から単離・精製し、2種類のサブレッサー化合物を得た。一つは、植物のファイトアレキシンの生産だけをサブレスする化合物、もう一方は、ファイトアレキシンの生産をサブレスするとともに、植物のプラズマメンブレンのATPaseの活性を阻害する物質であった。そこで両化合物について、構造決定を実施し、NMRによる立体配座の検討を行なった。また分子動力学計算による立体配座の検討も行なったので報告する。

*

サブレッサー・エンドウ褐紋病菌・糖ペプチド・分子動力学計算

*

さいとうこうじ、かとうとしあき、きむほんも、しらいしとものり、やまだてつじ、
おくはちろう

2. 実験

*Mycosphaerella pinodes*を6日間培養し、得られた胞子を20時間水中で振盪・懸濁した後、濾過し、ミリポアPTGC142にて分子量10000以上の分子をカットした。この低分子量画分を12000rpm*5minで遠心後、上澄み部分をトヨパールHW40F(2.5*450mm)で分画した。ファイトアレキシンをサプレスする画分のうち、水移動相でsep pak C-18に素通りの分画について、更にHPLCでODSカラム(4*250mm)を用いて水とメタノールのグラジエント法にて分画し、ファイトアレキシンの生産をサプレスする活性画分を得た。ATPaseの活性抑制画分は、同様にして分画した後、更にHPLCにて、Biorad社製HPX-42Aカラム(7.8*300mm)を使用し、移動相を水として、80℃で分離・分取した。凍結乾燥後、pH=6.8に調整して、重水中と軽水中でのNMRスペクトルの試料とした。

NMRの測定は、温度制御装置を付設した日本電子製EX-400スペクトロメーターで行なった。測定温度は24.0℃とした。¹Hの測定には、H5プローブを、¹³Cの測定には、TH5プローブを使用した。

分子動力学的計算は、プログラムCHARM²⁾を使用し、IRIS4Dで計算を行なった。周辺の水分子を考慮し、非結合相互作用の距離のカットオフは9Å程度とした。積算ステップは1fsとし、20psの平衡化後サンプリングを実施した。誘電率は、水を連続体で近似した場合は距離依存とし、個別評価の時には1とした。

3. 結果と考察

Fig.1にファイトアレキシンの生産抑制物質(以後PA)の重水中のDQF-COSYのNMRスペクトルを示す。

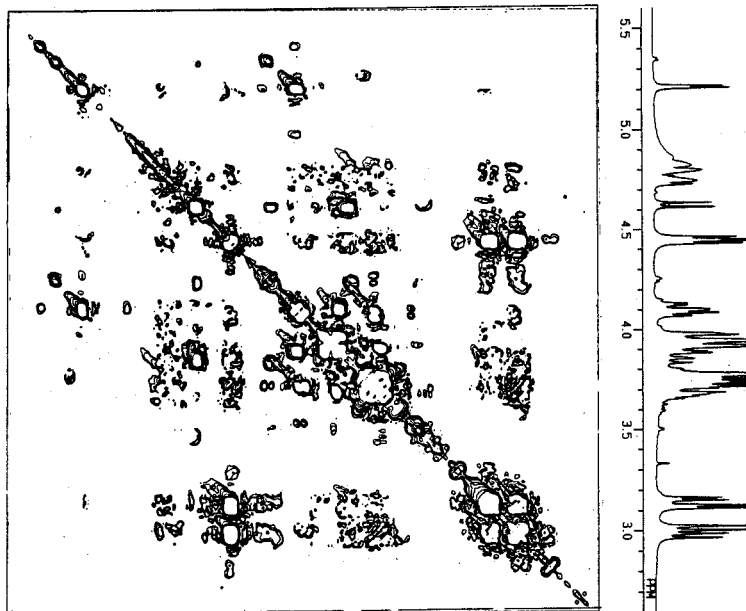


Fig.1 DQF-COSY molecule spectra of PA molecule in D2O

PA化合物の糖部分とペプチド鎖部分に分けて、NMRスペクトル解析を実施した結果、Fig.2に示すようなムチン型糖ペプチドであることがわかった。

α -N Acetyl-Gluc-Ser-Ser-Gly :

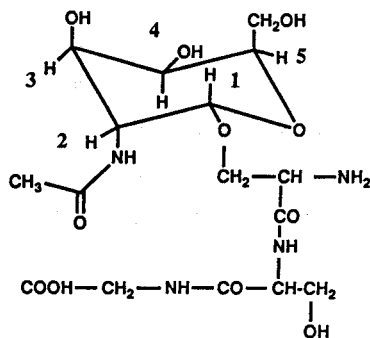


Fig.2 the structure formula of PA molecule

PA化合物についての ^1H と ^{13}C NMRの解析結果をTable 1に示す。解析の結果から特徴的な事は、ペプチド鎖のカルボニル炭素の化学シフトが α ヘリックス型に多く見られる値を示していることと $^3\text{J}(\theta)$ ($\text{NH}-\text{C}\alpha\text{H}$)の値が6 Hz以下という2点である。つまりPA化合物は、小さな糖ペプチドにも関わらず、ペプチド鎖は α ヘリックス型であることを示唆している。更にペプチド鎖に隣接するNH-NH間のNOEについての実験をした所、弱いNOEしか観測されなかったことから、ペプチド鎖が α ヘリックス型であることが裏付けられる。また糖残基部分でも、 $\text{J}(2,3)/(\text{2位と3位の化学シフト差}) > 1$ の場合に生ずる ^3J の多い、1位-3位と1位-4位のlong-rangeカップリングが観測された。これらについては、それぞれ3位と4位でのデカップリング実験により1位のピーク形状の変化から確認した。また糖の1位とペプチド鎖のSerのメチレンとの $^3\text{J}(\text{C}-\text{H})$ の値が5.7 Hzであることから、Tvaroskaらの経験式 $^4)$ により糖とペプチド鎖の2面角の大きさは約153度と推定された。

Table 1 NMR spectral parameters of PA molecule

	α -NAGla		Ser	Ser	Gly
^{13}C	C1=92.1 C2=55.1 (ppm)	カルボニル炭素(ppm)	175.1	175.7	174.8
	C3=72.0 C4=71.5	$\text{C}\alpha$ (ppm)	57.3	58.1	49.1
	C5=72.5 C5=62.2	$^3\text{J}(\text{COCH})=5.7$ (Hz)			
^1H	$\text{J}(1,2)=3.7$ $\text{J}(1,3)=0.8$		$^3\text{J}(\theta)=3.1$	$^3\text{J}(\theta)=2.9$	
	$\text{J}(1,4)=-1.2$ $\text{J}(2,3)=9.7$	$w\alpha$ (ppm)	3.91	3.94	3.75
	$\text{J}(3,4)=3.6$ $\text{J}(4,5)=0.6$	$w\beta$ (ppm)	3.95, 3.99	3.97, 3.99	
	$\text{J}(5,5)=6.4$	NH (ppm)	8.35	8.24	8.49
		$\text{J}(\alpha\beta)$ (Hz)	4.6, 8.5	4.7, 8.4	
	$w2-w3=22$ (Hz)	$\text{J}(\beta\beta)$ (Hz)	8.3	8.1	

PA化合物を分子動力学プログラムCHARMmを活用し、周辺の水分子を考慮した立体配座解析を実施した。計算での初期構造では、NMRから得られたカップリング定数から推定できるペプチド鎖の各2面角値 θ と糖とペプチド鎖の2面角値 ϕ を使用し、rigidとした。その結果短いペプチド鎖は、水の誘電率の値により変化することがわかった。水を連続体近似した場合、電荷同志が引き合う α ヘリックスに近い屈曲構造を取ったのに対して、誘電率を50と高くした場合は進展構造を取った。また糖残基とペプチド鎖の結合角度 ϕ はあまり大きくは揺らがなかった。Fig.3に分子動力学計算でのPA化合物のコンホーメーションを示す。

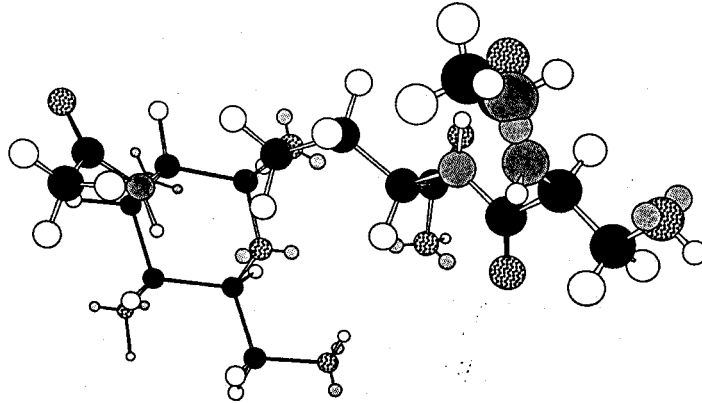


Fig.3 conformation of PA molecule calculated by molecular dynamics

4. 結論

エンドウ褐紋病菌の産出するサブレッサーを単離・精製し、その構造をNMRにより解析した結果、PA化合物はムチン型の小さな糖ペプチドであり、そのペプチド鎖は α ヘリックス型のコンホーメーションを取っていることがわかった。また周辺の水分子を考慮した分子動力学計算からも同様なコンホーメーションであることが示唆された。

植物のプラズマメンブレンのATPaseの活性を阻害する化合物（以後AA化合物）についても、同様の実験を実施中である。AA化合物はPA化合物と同じムチン型の糖ペプチドであるが、ペプチド鎖がPA化合物と比較して6残基と少し長くなっているのが特徴である。討論会ではAA化合物についての結果とともに、両者の構造的な差異や植物への機能や役割についても併せて報告したい。

参考文献

- 1) H.Oku et al Naturwissenschaften 64 S 643 (1977)
T.Shiraishi et al. Ann.Phytopath.Soc.Japan 44 659(1978)
- 2) Karplus et al 「QUANTA CHARMm ver3.2」 Polygen Corp. (1991)
- 3) Brisson,J.R et al. J.Biol.Chem. 257 11207 (1982)
- 4) Igor Tvaroska et al 「Computer Modeling Carbohydrate Molecules」
ACS Symposium Series 430 163 (1991)

安定同位体核利用NMRによる酸性繊維芽細胞成長因子(aFGF)の構造解析

(都臨床研, Rhone-Poulenc Rorer Inc. *)

○楯 真一, 楯 (宇都宮) 直子, 尾高雅文, M.Ravera *, 稲垣冬彦

Structural Analysis of acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF)
with Stable Isotope Aided NMR Spectroscopy

Shin-ichi Tate, Naoko U. Tate, Masafumi Odaka, Mark Ravera*,
and Fuyuhiko Inagaki

Department of Molecular Physiology,
The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
18-22, Honkomagome 3-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113, Japan.

*Rhone-Poulenc Rorer Central Research, 660 Allendale Road, King of Prussia, PA 19406, USA.

We have started the structural analysis of acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) with stable isotope aided NMR spectroscopy. aFGF is a member of a family of the heparin binding proteins, of which biological activity is enhanced by heparin binding. Here, we report some new pulse techniques and the labeling method developed in the course of this study. The hxy-5 composite pulse sequence was used to suppress efficiently the "water hump" which is caused by the B_1 -field inhomogeneity. And to discriminate the NH_2 and NH resonances in the 1H - ^{15}N inverse correlation spectrum of the uniformly ^{15}N labeled aFGF, the DEPT-SQC was useful. Furthermore, ^{15}N selective labeling of NH_2 groups in Asn and Gln was devised which will be helpful for studying the interaction between the side chain NH_2 groups in aFGF and heparin.

1.序 酸性繊維芽細胞成長因子(aFGF)は、ヘパリン結合性蛋白質の一つであり、ヘパリンの結合によりその生物活性に変化のあることが報告されている15kDaの蛋白質である。我々は、aFGFのヘパリン結合による構造変化を明らかにすることを目的として安定同位体核を利用したNMRによる構造解析を行なっている。今回は、aFGFのNMR測定を行なう上で開発したパルス法、および安定同位体核標識法を中心として報告する。

2. B_1 -field inhomogeneity 観測パルスの B_1 -fieldはサンプルの全領域において均一ではなく、照射コイルから離れるとその均一度は急激に悪くなる。高橋らによって開発されたマイクロセル(シゲミスタンダード工業)は、 B_1 の均一な部分のみのシグナルの観測を可能とするので、軽水中でのNMR測定には有効なセルである。しかし、aFGFの場合には十分なサンプル濃度を維持するためには1.5MのNaClを必要とするためマイクロセルは有効に使えない。なぜなら、このような高イオン強度溶液のサンプルは、マイクロセルのガラスとの磁化率の違いが大きくなるためシムの調整が困難となるからである。そこで、通常の5mm管を使用し、さらに静磁場の均一度を上げるために最低4cm程度のサンプル長にしたものを測定試料とする必要がある。このような条件では、上記の B_1 -field inhomogeneityの問題が無視できなくなる。 B_1 -fieldが不均一な領域に由来する水のシグナルは図1aに示すような幅の広いシグナル(water hump)を与える。このような幅の広いシグナルは、単一周波数を用いるpresaturation法では抑えることはできない。しかし、このwater humpは、 B_1 -fieldが均一な部分から来るシグナルのみを選択的に観測することで効率的に抑制することが可能である。我々は、hxy-5と呼ぶ5つの π -pulseからなるcomposite pulseを作製し、 B_1 -field強度選択的な観測を行なうことで効率的にwater humpを消去することができた[1]。その結果を図1bに示す。

NMR, ^{15}N -labeling, acidic Fibroblast Growth Factor

たて しんいち, たて (うつのみや) なおこ, おだか まさふみ, マーク ラベラ,
いながき ふゆひこ

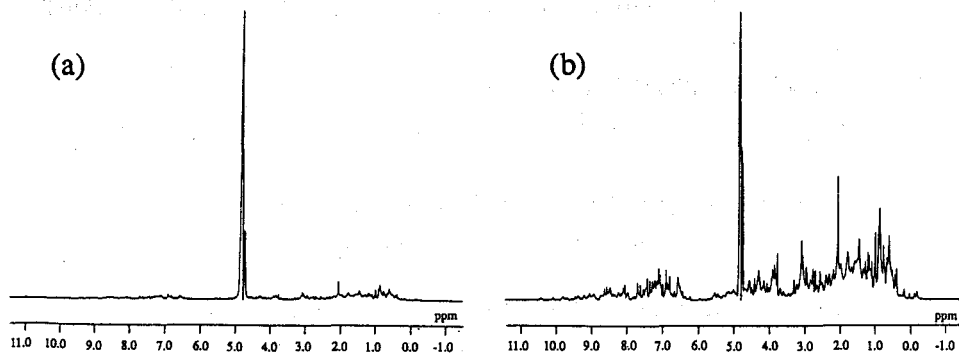


図1 hxy-5によるwater hump抑制効果。(a)通常の1Dスペクトルの測定結果。大きなwater humpがシグナル観測の妨げになっている。(b)hxy-5によってwater humpを抑制して測定した1Dスペクトル。water humpは効率的に抑制されている。

3. 側鎖NH₂シグナルの選択的観測 ¹⁵Nで均一にラベルした蛋白質の¹H-¹⁵N相関スペクトル上には、主鎖のNHシグナルの他に側鎖のNH₂のシグナルも観測される。両者のスペクトル上での区別は解析を進める上で重要である。我々は、このようなシグナルの区別を行なうためにDEPT-SQCを開発した[2]。パルス内容を図2に示す。DEPT-SQCでは、磁化は、NH、NH₂のスピンの違いによりDEPTシーケンスによってエディットされた後、それに続くt₁時間では¹⁵N核のsingle quantum coherence (SQC)として展開し、最後に¹⁵N核から¹H核へ移動して観測される。観測されるシグナルの選択は¹Hの3番目のパルスβのパルス幅によって行なわれる。図3に、β=180°に設定した場合のDEPT-SQCスペクトルの最初のインクリメントのデータを示す(サンプルはIL-1β)。この条件ではNHとNH₂のシグナルが反対の符号を持つシグナルとして観測される。DEPT-SQCの特徴は、¹⁵N軸側の分解能が高い点にある。このことは主鎖NHの選択的観測の場合に重要となる。

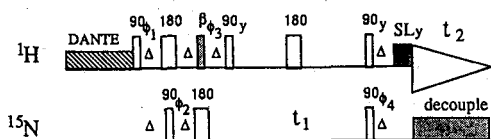


図2 DEPT-SQC; $D=1/2J_{NH}$ であるが、測定時には緩和の効果を避けるため4.5msecを用いた。位相回しは以下の通りである。: $\phi 1=8(x), 8(-x)$; $\phi 2=x, y, -x, -y$; $\phi 3=8(y), 8(-y)$; $\phi 4=4(x), 4(-x)$; receiver = $2(x), 4(-x), 2(x), 2(-x), 4(x), 2(-x)$. 偶数回, 奇数回の積算結果は別々の領域に保存する。F1側の処理はStatesの方法に従う。

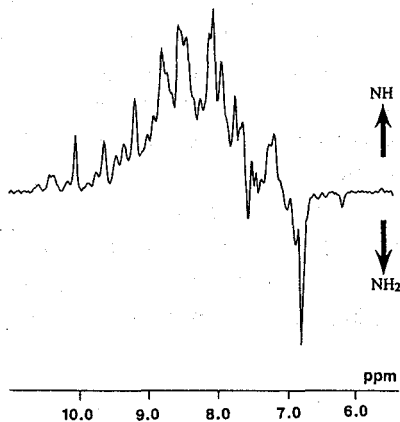


図3 DEPT-SQCの最初のインクリメントデータ。β=180°に設定してある。

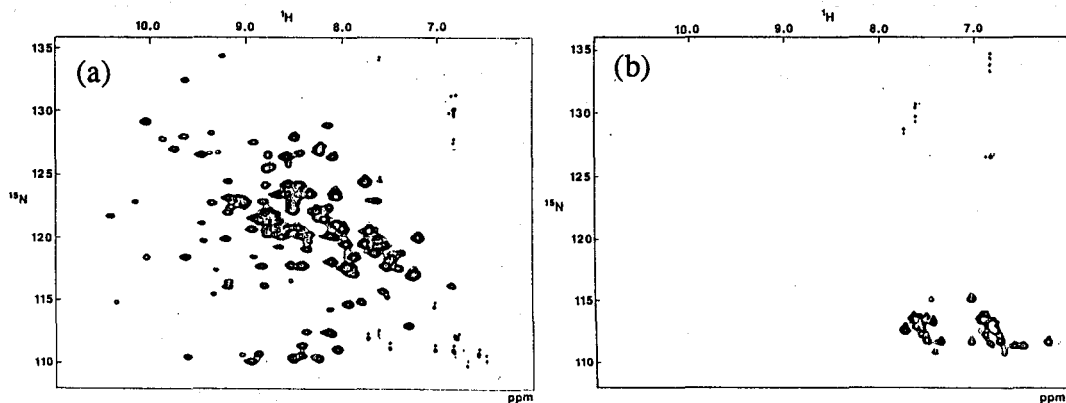


図4 2D DEPT-SQCの測定結果。(a)NHシグナル, (b)NH₂シグナルが選択的に観測されている。

図4には $\beta=180^\circ$ で測定した2DのDEPT-SQCスペクトルを示す。(a)ではNH由来のシグナルのみが、(b)ではNH₂由来のシグナルのみが観測されている。両スペクトルは同一スペクトルの正の面と負の面の関係にある。

4. 側鎖NH₂の選択的¹⁵Nラベル DEPT-SQCの場合にはHSQCの場合に比べて2倍の待ち時間が必要となる。このため、高分子量の蛋白質を対象とする場合、磁化のT₂緩和時間が短いために、DEPT-SQCで観測されるシグナルの強度はHSQCの場合に比べてかなり低くなる。従って、側鎖NH₂とリガンドの間のNOEの選択的観測(このような観測は、NHとNH₂の¹⁵Nの化学シフトが重なる場合には必要である)を行なうために、DEPT-SQC-NOESYといったパルスを用いることは感度的にかなり困難になる。しかし、側鎖NH₂(主にGln, Asn)に選択的に¹⁵Nラベルを入れることができれば、HSQC-NOESY,あるいはHMQC-NOESYを用いて同じ情報を得ることができると、測定感度としては非常に有利になる。この利点は、蛋白質の分子量が大きくなるほど顕著になる。このような側鎖NH₂の選択的なラベルは大腸菌の氨基酸代謝をうまく利用することで容易に行なえる。図5には、Gln, AsnとGlu, Aspとの代謝的な関係を示している。注目すべき点はGln, Asnの側鎖NH₂が培地中のアンモニアを取り込むことで行なわれている点である。従って、培地にGln, Asn以外の氨基酸(ラベルなし)を入れた¹⁵NH₄Cl含有のM9最少培地で大腸菌を培養して得た蛋白質ではGln, Asnの側鎖NH₂に選択的に¹⁵Nラベルを入れることが可能になる(主鎖NHは培地に入れたラベルなしの氨基酸に由来するためラベルされない)。図6には、このようにして得られた側鎖NH₂が選択にラベルされたaFGFの¹⁵N-SQCスペクトル(a)と¹⁵Nで均一

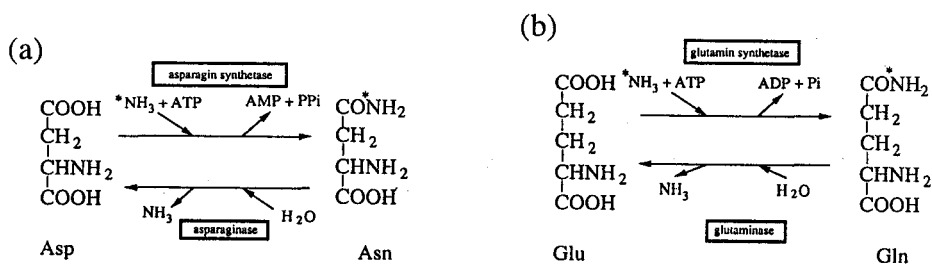


図5 Asn, Glnの生合成過程。Asn, Glnは培地のアンモニアを取り込んでAsp, Gluより生合成される。*は、¹⁵Nラベル表す。

ラベルされたaFGFの ^{15}N -SQCスペクトル(b)を示す。 ^{15}N -SQCの感度で NH_2 のシグナルが選択的に観測されている。

現在、以上のような測定を基にaFGFの主鎖のシグナルの解析を行ないつつある。

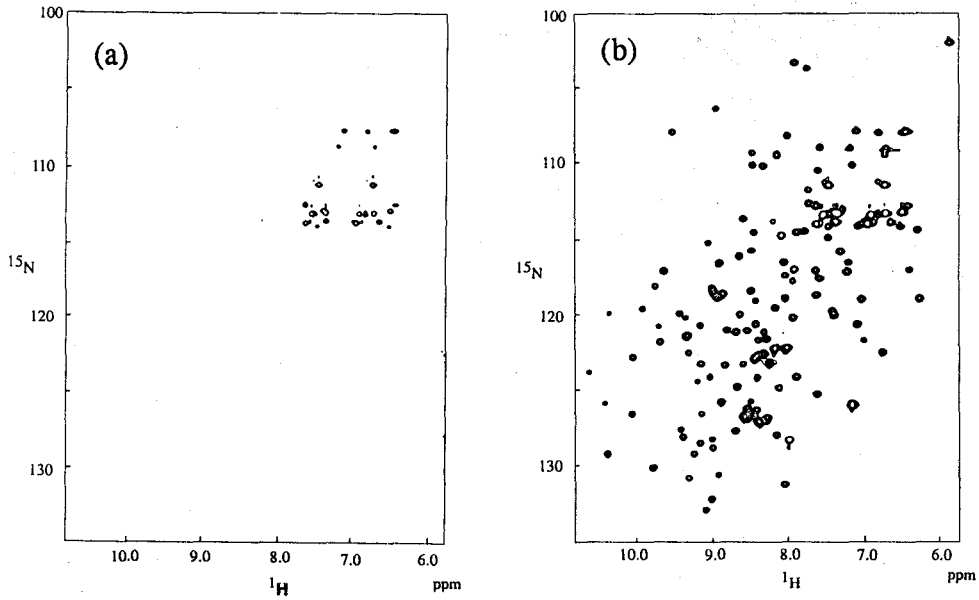


図6 NH_2 選択ラベルの効果。(a) NH_2 選択ラベルされたaFGFと、(b) ^{15}N で均一ラベルされたaFGFの ^{15}N -SQCスペクトル。 NH_2 選択ラベルにより、aFGFの13個の NH_2 シグナル(Asn 7個, Gln 6個)が全て観測できた。

参考文献

- [1] S.Tate and F.Inagaki, J.Magn.Reson.(1991) in press.
- [2] S.Tate, Y.Masui, and F.Inagaki, J.Magn.Reson.(1991) in press.
- [3] S.Tate, N.U.Tate, and F.Inagaki, submitted to FEBS Lett.

P19

NMRによるヒトリゾチームと基質の相互作用研究

○大久保忠恭 伊中浩治 松島正明 谷山佳央 菊池正和
蛋白工学研究所 (現武田薬品生研)

NMR study of interaction of human lysozyme with its inhibitor
Tadayasu Ohkubo, Koji Inaka, Masaaki Matushima, Yoshio Taniyama and
Masakazu Kikuchi (Protein Engineering Research Institute)

[Abstract] The interaction between human lysozyme and its inhibitor N-acetyl-chitotriose was investigated by ^{15}N - ^1H HMQC spectra. Most of the ^{15}N -NH cross-peaks in the spectra were separated well enough to be followed during the titration experiment. Residues whose NH proton signals decrease in intensity upon complex formation, are located mainly around subsites B, C and D. Local conformational changes were observed around the fourth helix adjacent to the cleft of human lysozyme.

<序> ヒトリゾチーム (hLZM) は4組のS-S結合を持つアミノ酸130残基よりなる溶菌酵素で、細菌細胞壁を構成する糖鎖の β -1,4結合を加水分解する。類縁蛋白質である卵白リゾチームは、アミノ酸残基の40%が置換されているにもかかわらず、X線結晶解析によれば両者の立体構造は活性部位も含めて一致している。卵白リゾチームと基質アナログ(NAG)₃との複合体のX線結晶構造解析の結果より、6個の基質結合部位が分子の中央部のクレフトに存在する事が示唆され、各々1個の糖残基が結合するサブサイトはA, B, C, D, E, Fと名付けられている。触媒作用に必須の残基はサブサイトDとEに位置しているGlu35, Asp53と考えられている。hLZMと基質の相互作用及び反応機構を解明するために、hLZMと(NAG)₃の溶液中に於ける結合の様子を ^{15}N - ^1H HMQC法により調べた。
<実験> hLZMの均一 ^{15}N ラベル化は $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$ と $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を唯一の窒素源とした最少培地中で酵母を培養することにより行った。NMR測定試料として蛋白質濃度2~4mM、pH4.0の軽水試料溶液を調製した。 ^1H 検知 ^{15}N - ^1H 2次元HMQC, HTQC, HTQC-NOESYスペクトルを温度40°Cで測定した。
<結果と考察> 一昨年の本討論会で ^{15}N ラベル化したhLZMを用いた主鎖の ^{15}N , NH及びC α Hシグナルの連続帰属を報告したが、今回基質との相互作用の解

ヒトリゾチーム (NAG)₃ ^{15}N - ^1H HMQC法 基質結合部位

おおくぼ ただやす、 いなか こうじ、 まつしま まさあき、
たにやま よしお、 きくち まさかず

明のため、更に A sn, G ln 側鎖 NH₂シグナルの帰属を行った。NOESY及びHMQCスペクトル中ではNH₂とNHのシグナルは同じ領域に観測されるため両者由来のNOEを区別できなかった。HTQC及びHTQC-NOESY法ではNHに由来するシグナル

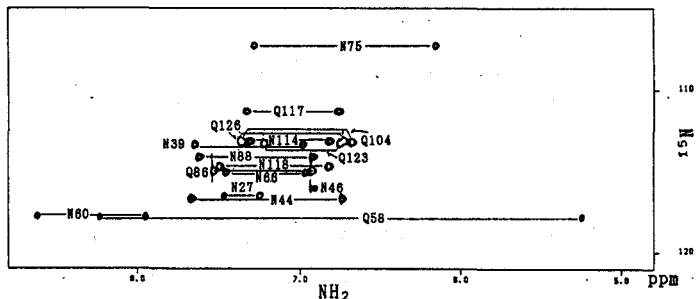


図1 ¹⁵N-¹H HTQCスペクトル

は観測されずNH₂に由来するシグナルのみが観測されスペクトルが簡素化される(図1)。これによりCβHとの残基内NOEを用いて側鎖NH₂シグナルの帰属を確実に行う事が出来た。

溶液中に於けるhLZMと(NAG)₃との結合の様子を¹⁵N-¹H HMQC法により調べた。スペクトル中のほとんどの¹⁵N-NH相関ピークはよく分離し(NAG)₃の添加によるシグナルの変化を容易に調べることが出来た。hLZMと(NAG)₃を1:1の比で混合したとき多くのシグナルがシフトした。とくに(NAG)₃との結合により結合の影響を受けた17個のNH, 2個の側鎖NH₂, 3個のTrp残基側鎖NHは、NMRの時間スケールに対して遅い交換過程によりシグナルの強度が減少して消失した。図2にX線結晶解析により決定されたhLZMの立体構造とシグナル強度の減少したアミドプロトンの位置を示した。NHシグナルが消失した残基のほとんどは図中の蛋白質クレフトの左の部分、特にBとCのサブサイトを囲むように分布している。シグナルの化学シフトが変化したアミドプロトンはこれらの残基の周囲に位置している。E, Fサブサイトの近傍ではシグナルの消失は観測されていない。また、Dサブサイト近傍に位置するA sn46, A sn60のNH₂シグナルが消失した事からこれらの残基が結合に関与していると考えられる。これらのデータから(NAG)₃がB~Dのサブサイトに結合することが示唆された。この結果はX線結晶解析等の結果と一致している。糖鎖と直接結合しないTrp112, Arg113, A sn114, G ln117のアミドプロトンのシグナル強度が減少した。これらの残基はクレフトに隣接する疎水性コアに位置する4番目のヘリックスを構成している。温度変化に対するクレフト近傍の残基との挙動の違いから、これは(NAG)₃との結合によりこの部位に構造変化が生じていることを意味している。

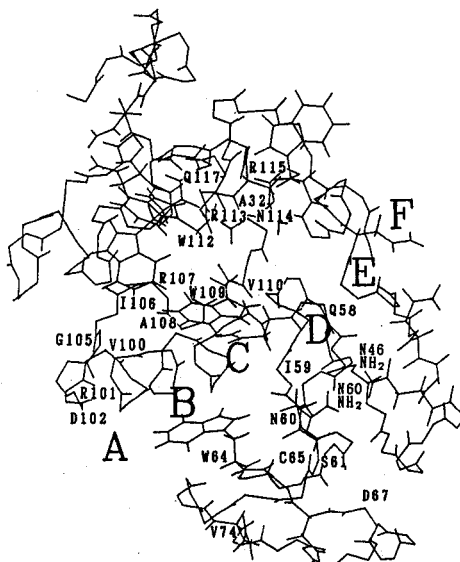


図2 hLZMのX線構造

P20

安定同位体利用 NMR による免疫グロブリン抗原結合部位の動的構造解析

○高橋栄夫、鈴木恵理佳*、水谷隆太、進藤一泰、田村 洋、嶋田一夫、
荒田洋治 (東大・薬、*NKK・中研)

Dynamical structure of the combining site of Fv as studied by stable isotope aided NMR spectroscopy

Hideo Takahashi, Erika Suzuki*, Ryuta Mizutani, Kazuyasu Shindo,

Hiroshi Tamura, Ichio Shimada, Yoji Arata

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo,

*Advanced technology Reserch Center, NKK Corporation)

The structure of the antibody combining site has been studied on the basis of the X-ray crystallographic data. However very little is known about the dynamical structure of the antibody combining site in solution. Here we discuss on the basis of ^1H - ^{15}N shift correlation data the dynamical structure of the Fv fragment (Mw 25K) in solution in the absence and presence of the antigen. It has been shown that 1) H1 and H3 loops are primarily responsible for the antigen binding, 2) in the absence of the antigen H3 loop displays an internal motion on a time scale of $10\mu\text{sec} - 2\text{msec}$, and 3) antigen binding induces a significant change in the dynamical structure of the H3 loop, rendering it less flexible.

免疫グロブリン分子のもつ柔軟かつ特異的な抗原認識機構を解明するために、数多くの研究が行われている。X線結晶構造解析では、十数種の抗原結合部位フラグメント (Fab) の立体構造が決定されている。しかしながら、①結晶中であるという制限、②抗原の存在・非存在下両方の構造が解析された例が少ない、という点を考慮し、我々は NMR により水溶液中での「真の」抗原認識機構の解析を行っている。

我々は $\text{C}_\text{H}1$ ドメインが欠落している変異体・抗ゲンシル (DNS) IgG2a(s) を酵素消化することにより、抗原結合能を有する最小の構造単位である可変領域フラグメント (Fv) を安定に調製することが可能であることを示した¹⁾。単離された Fv は、立体構造上ホモロジーの高い V_H , V_L ドメインから成る分子量 25K のヘ

免疫グロブリン、抗原結合部位、Fv、安定同位体、NMR、動的構造

たかはし ひでお、すずき えりか、みずたに りゅうた、しんどう かずやす、
たむら ひろし、しまだ いちお、あらた ようじ

テロダイマーであり、安定同位体を利用したNMRにより水溶液中における抗原結合部位の構造について詳細な解析が行える^{1),2)}。

本研究では主鎖アミド窒素を選択的に¹⁵Nで標識したFvを用い、抗原抗体認識機構の解析を行った。その結果、1) 抗原であるDNSの結合は6つの相補性決定領域(CDR)ループのうち、H1及びH3を中心として行っており、2) H3ループは抗原の結合に伴い、動的構造変化が誘起される、ことが判明した。

[方法]

抗体産生細胞を¹⁵N標識したアミノ酸を添加した無血清培地中で培養することにより、主鎖アミド窒素を選択的に標識した抗体(IgG2a(s))を得る。これを酵素(クロストリパイン)消化することにより¹⁵N標識Fvが得られる。

測定にはプロトン検出¹H-¹⁵Nシフト相関法(SQCなど)を用いた。

シグナル帰属は、主鎖カルボニル炭素を¹³C標識したアミノ酸を培地に加え、ダブルラベル法により行った。さらに、ダブルラベル法で帰属が困難な場合には、 ω_2 -filtered HOHAHA/NOESYによる連鎖帰属法を用いた。

[結果と考察]

抗原結合部位には芳香族アミノ酸残基が多く存在することから、 [¹⁵N-Ala, His, Ile, Phe, Trp, Tyr] Fvを用いた構造解析を行った。

◎抗原結合部位の決定

スピンラベルハブテン(DNS-AmTEMPO)の結合実験により、H1及びH3ループ由来のシグナルに顕著な線幅の増大がみられた。従って抗原結合が主としてH1及びH3ループにおいて行われていることが明らかとなった。

◎主鎖アミドプロトンのH-D交換

抗原非存在下でH-D交換実験を行った(pH5.0 303K)。10時間後には53個のシグナルのうち31個のシグナルが消失した。これらの大部分がCDRループに由来するものである。抗原存在下では、H1, H3ループの根元部分(A32(H1), W33(H1) / I95(H), Y96(H3), W101(H3), F102(H3))のアミノ酸残基のH-D交換速度が著しく減少することがわかった。この様なH-D交換速度の変化($k_m > 10^{-1} \sim 10^{-3} \text{min}^{-1} \rightarrow k_m < 10^{-5} \text{min}^{-1}$)から、抗原結合により抗原結合部位に新たな水素結合のネットワークが形成されたことが示された。

◎H3ループのゆらぎ

主鎖アミド窒素の横緩和時間(T_2)を測定したところ、抗原非存在下では、H3ループ及びその近隣由来のシグナル(I95, Y96, Y97, H98, Y99, W101, F102, Y104)は、他のCDR及びフレーム領域由来のシグナルの T_2 (50~70msec)に比べ非常に短い値(10~40msec)を示した。一方、縦緩和時間(T_1)には顕著な相違はみられなかった。また磁場依存性の実験により、磁場が高くなるとこれらのシグナルの線幅がさらに増大することが明らかになった。従ってH3ループの短い T_2 の値は化学交換に由来するものであり、H3ループには2コンフォマー以上の交換、即ち『揺らぎ』

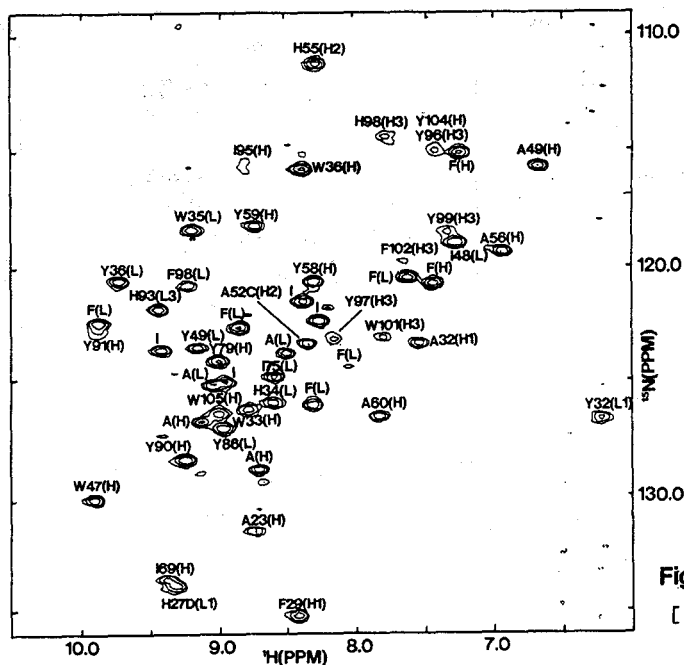


Fig1
 [¹⁵N-Ala, His, Ile, Phe, Trp, Tyr]
 標識Fvの¹⁵N-¹Hシフト相関
 スペクトル(SQC).

が存在していると考えられる。H3ループの揺らぎの時間域はCPMGにおけるパルス間隔及び線幅の増大を考慮すると、10 μ sec~2msec程度であることがわかる。

抗原存在下ではH3ループのT₂の値は抗原非存在下と比べ大きく変化し、ループの根元部分ではそのT₂の値が長くなる。各コンフォマー間の化学シフト差が未知であるため、その揺らぎの速度の変化を単純には議論できないが、H-D交換の結果と考え合わせると、H3ループは抗原結合により、強固な水素結合ネットワークを形成し、揺らぎが抑えられる方向に動的構造変化がおこったと推察できる。

以上のように、安定同位体標識したFvを用いることにより、水溶液中での抗原結合部位の動的構造、及びその変化をNMRにより追うことが可能となった。今後、さらに、抗原結合がFvのフレーム領域に及ぼす影響や、Fabフラグメント(Mw 50K)を用いて他のドメインの存在が抗原結合部位に及ぼす影響などを解析していく予定である。

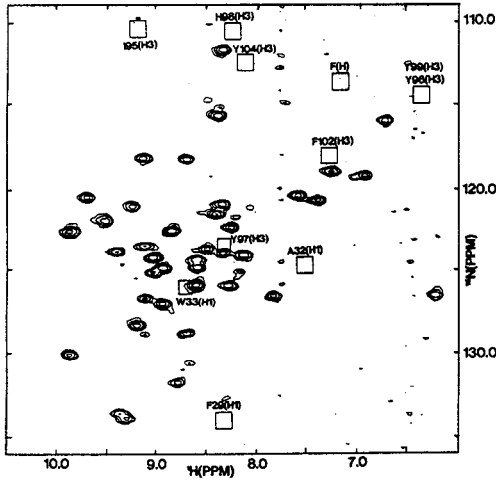


Fig2

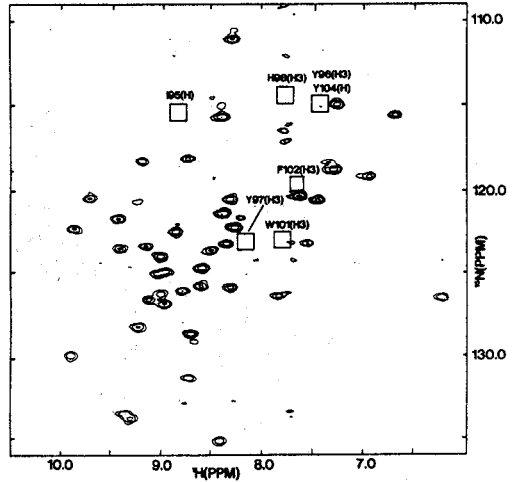


Fig3.

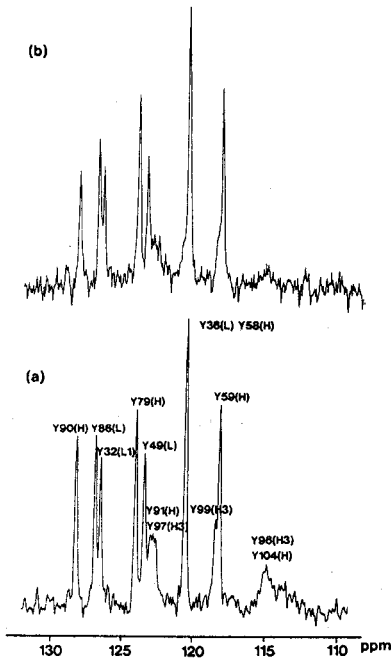


Fig4.

Fig2.

DNS-AmTEMPO存在下のSQCスペクトル。
線幅が著しく増大したシグナルを□で
囲っている。

Fig3.

[¹⁵N] T₂ filtered スペクトル。
CPMG delay time = 25 msec。
T₂緩和により消失したシグナルを
□で囲っている。

Fig4.

[¹⁵N-Y] Fv DEPT スペクトル
の磁場依存性. a) 40 MHz b) 60MHz

参考文献

- 1) H. Takahashi, T. Igarashi, I. Shimada, and Y. Arata (1991) Biochemistry 30, 2840-2847
- 2) H. Takahashi, A. Odaka, S. Kawaminami, C. Matsunaga, K. Kato, I. Shimada, and Y. Arata (1991) Biochemistry 30, 6611-6619

P21

安定同位体利用NMRによる免疫グロブリンの動的構造解析 -分子量10万を越える巨大蛋白質へのアプローチ-

(東大・薬) ○加藤晃一、松永千枝、金 夏亨、伏見英樹、
吉野温子、荒田洋治

Dynamical structure of immunoglobulin molecules as studied by stable isotope aided NMR spectroscopy - An approach toward large proteins with molecular weight more than 100 K

Koichi Kato, Chigusa Matsunaga, Hallyung Kim, Hideki Fushimi, Atsuko Yoshino, and Yoji Arata (Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo)

Many of biologically interesting proteins and their complexes have their molecular weight more than 100 K, which precludes an elegant multi-dimensional NMR analysis. We have been using stable isotope labeling to develop general methods in order to cope with such difficulties and extract information as much as possible concerning large proteins such as immunoglobulins. Here we report a C-13 NMR study of mouse monoclonal antibodies. On the basis of the spectral data obtained, the dynamical structure of the hinge region of an intact immunoglobulin G (Mw 150 K) will be discussed. Dynamical structure of immunoglobulin molecules forming immune complexes (Mw 300 K - 1,100 K) will also be discussed.

I. 序

多次元NMRの急速な発展によって、分子量20K前後の蛋白質の立体構造決定が可能となった。しかしながら、生物化学的に興味深い蛋白質は、多次元NMRの適用限界を遙かに越える高分子量のものであったり、あるいは巨大な超分子複合体を形成して機能を発現している場合が多い。このような巨大蛋白質あるいはその集合系を対象とした際に、NMRは果たして何をなし得るであろうか？本研究は、その可能性を探るべく、免疫グロブリン(分子量150K以上)を題材に、安定同位体を利用したNMRによる解析を行ったものである。

¹³C NMR、安定同位体、免疫グロブリン、ヒンジ領域、動的構造

かとう こういち、まつなが ちぐさ、きむ はひょん、ふしみ ひでき、
よしの あつこ、あらた ようじ

II. 実験

既に報告した通り^{1,2)}、マウス抗体産生細胞を適切な代謝阻害物質と同位体標識アミノ酸を含む無血清培地中で培養することによって、主鎖カルボニル炭素・アミド窒素をアミノ酸タイプ別に¹³C、¹⁵Nで標識したモノクローナル抗体を調製した。¹³C-¹⁵N二重標識法と蛋白化学的手法（限定分解、サブユニット組替え、化学修飾など）を組み合わせれば、免疫グロブリンのカルボニル¹³Cシグナルをほぼ自由自在に帰属することができる。また、化学シフトの異方性に由来するカルボニル¹³Cシグナルの広幅化と感度とのかねあいから、100MHzの静磁場中で¹³C NMRシグナルを測定した。

III. ヒンジ領域の動的構造³⁾

免疫グロブリンのような巨大蛋白質を対象とした場合、対象の中の着目する部位に由来する構造情報を選択的に抽出することが重要である。ここでは、免疫グロブリンG (IgG) のヒンジ領域に着目して、その動的構造の解析を行った。ヒンジ領域はF a bとF cを連結する約20残基のセグメントで、免疫グロブリンの抗原認識とエフェクター機能の連動に必要な領域である。図1にマウスIgG2aのヒンジ領域の一次構造を示す。図2にLysのカルボニル炭素を選択的に¹³C標識したIgG2a ([K]IgG2aと略記する)の¹³C NMR (CPMG) スペクトルを示す。40個あまり存在するLysに由来するシグナルのうち、CPMGスペクトル(遅延時間 40msec)中で観測されるのは、upper hingeに存在するLys-222のシグナルのみであった。Ile、Thrをプローブとした場合でも同様にCPMGスペクトル中において観測されるシグナルは、upper hingeとC末端付近に由来するシグナルのみであった。また、core hingeに存在するジスルフィド結合を還元アルキル化すると、core hingeに存在するLys-228が新たにシャープなシグナルを与えた(図2)。[C]IgG2aを用いて同様の実験を行うと、やはりcore hingeに由来する3つのCysシグナルが顕著に先鋭化することが示された(図3)。以上より、ヒンジ領域は、柔軟なupper hingeと堅固なcore hingeが連なった動的に不均一な柔構造(ヒンジ領域の“モザイク構造”)を形成していることが明らかとなった。

ジスルフィド結合の切断はこうしたモザイク構造を解消し、ヒンジ領域は全体として高度な運動性を獲得する。そして、それに伴ってF cに由来するシグナルの

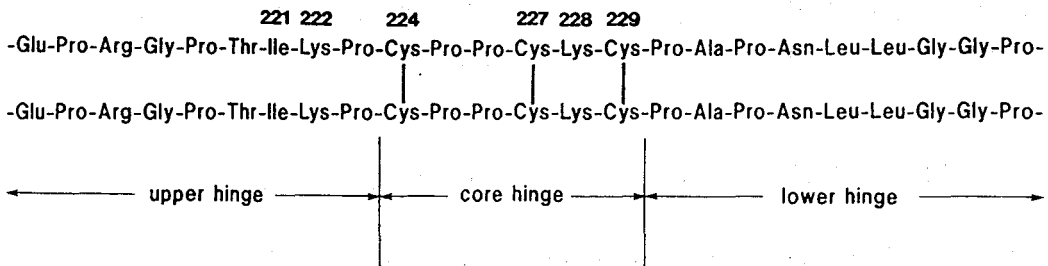


Fig.1 Amino acid sequences of the hinge region of a mouse IgG2a antibody.

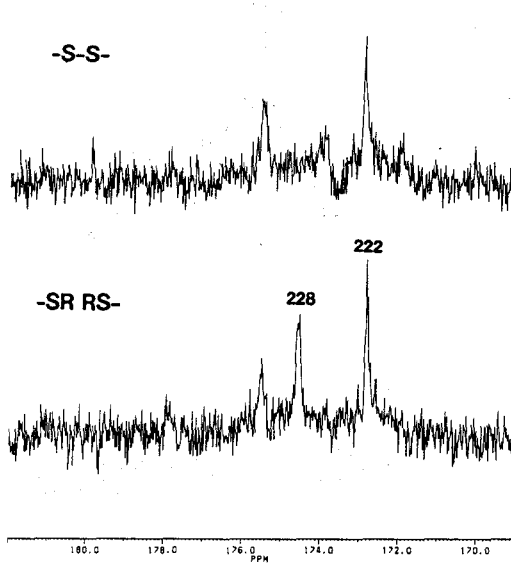


Fig.2 100-MHz ^{13}C NMR spectra of [K]IgG2a before (upper) and after (lower) reduction and alkylation. The spectra were obtained by using a CPMG pulse sequence $\pi/2 - (\tau - \pi - \tau)_n$, with $\tau = 2$ msec and $n = 10$.

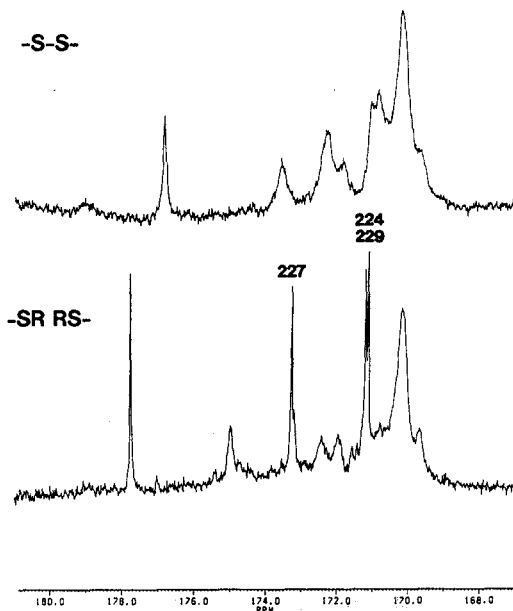


Fig.3 100-MHz ^{13}C NMR spectra of [C]IgG2a before (upper) and after (lower) reduction and alkylation.

一部に有意な化学シフト変化が誘起される。ジスルフィド結合の切断によって免疫グロブリンのエフェクター機能が喪失することから、ヒンジ領域のモザイク構造は、免疫グロブリンの生物活性の発現において、重要な役割を果たしていると考えられる。

IV. 免疫複合体中における I g G の動的構造³⁾

免疫グロブリンが、そのエフェクター機能を発現するためには、多価抗原によって F a b 部分が架橋されることが必要である。従って、その分子機構を理解するためには、巨大な超分子複合体を NMR の解析の対象とする必要がある。図 4 に [I] I g G 2 a のスペクトルを示した。二価ハプテン (bis-(dansyl)cadaverine) で架橋した I g G 2 a 二量体 (分子量 300 K) では、F a b 由来のシグナルは顕著な広幅化を起こしてスペクトル中から消失しているにもかかわらず、upper hinge 以下の F c のシグナルは観測されている。また、多価抗原 (一分子当たり平均 10 個のダンシル基を結合したウシ血清アルブミン) で架橋した [C] I g G 2 a の免疫複合体 (分子量 1, 100 K) においても、ヒンジ領域および F c に由来するシグナルは、選択的に観測された。以上の結果より、免疫複合体中においても、F c 部分は、upper hinge の柔軟性のために高度な運動性を保持していると結論した。これは、免疫複合体中で F c とエフェクター分子との適合に有利に働いていると考えられる。

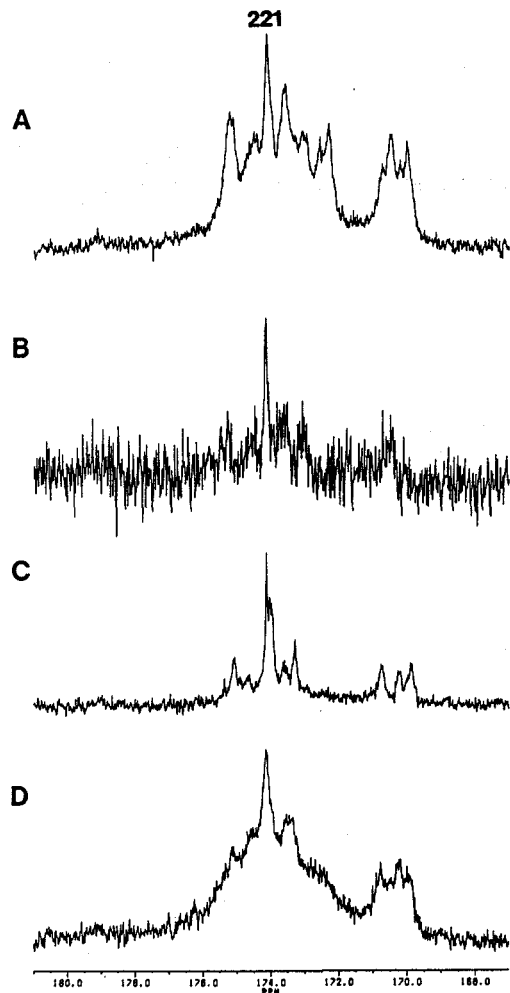


Fig.4 100-MHz ^{13}C NMR spectra of (A) and (B) [I]IgG2a, (C) [I]Fc, and (D) hapten-linked dimeric [I]IgG2a. The spectrum (B) was obtained by using a CPMG pulse sequence as in Fig.2.

V. おわりに

主鎖カルボニル炭素の選択的 ^{13}C 標識によって、免疫グロブリン分子のみならず、それが多数集合した超分子複合体も原子レベルで解析することが可能となった。その結果、IgGのヒンジ領域が動的に不均一な柔構造を形成していることを明らかにした。こうしたヒンジ領域のモザイク構造は、Fc上のエフェクター分子との相互作用面の高次構造の保持および免疫複合体中でのFcの運動性の保持を保証していると考えられる。現在、免疫グロブリンの動的構造と生物活性の関係を、より明確に理解するために、IgM(分子量900K)を題材に解析を進めている。

【文献】

- 1) Kato, K., Matsunaga, C., Igarashi, T., Kim, H., Odaka, A., Shimada, I., and Arata, Y. (1991) *Biochemistry*, **30**, 270-278.
- 2) Kato, K., Matsunaga, C., Odaka, A., Yamato, S., Takaha, W., Shimada, I., and Arata, Y. (1991) *Biochemistry*, **30**, 6604-6610.
- 3) Matsunaga, C., Kato, K., and Arata, Y., (1991) *J. Biomol. NMR*, **1**, in press.

安定同位体標識を用いたc-Ha-Ras蛋白質の高次構造解析

○武藤 裕¹, 山崎和彦¹, 伊藤 隆¹, 西村 運², 宮澤辰雄^{3,4},
M. Wälchli⁵, 横山茂之¹ (¹東大・理, ²国立がんセンター研究
所・生物, ³横浜国立大学・工, ⁴現 蛋白質工学研究所, ⁵日本
ブルカー)

Structural analysis of c-Ha-Ras protein by stable isotope-labeling NMR method
Yutaka Muto¹, Kazuhiko Yamasaki¹, Yutaka Ito¹, Susumu Nishimura², Tatsuo
Miyazawa^{3,4}, Markus Wälchli⁵, & Shigeyuki Yokoyama¹, ¹Faculty of Science,
University of Tokyo, ²Biology Division, National Cancer Center Research
Institute, ³Faculty of Engineering, Yokohama National University, ⁴Present
address; Protein Engineering Research Institute, and ⁵Bruker Japan

Ras protein consists of 189 amino acids and binds with either GDP or GTP. In order to elucidate the secondary structure of GDP-bound truncated Ras protein [Ras(1-171) protein], isotope-aided 2D and 3D NMR experiments were performed with uniform and amino acid selective ¹⁵N-labeling. First, all of the backbone amide ¹H-¹⁵N resonances were assigned. Next, by hydrogen-exchange experiments and measurement of coupling constants for pairs of NH and CαH, the secondary structure of Ras protein was elucidated. From these results, six β strands and five helices were identified in Ras protein. Further, for observation of side chain signals in ¹H-¹³C HMQC spectrum, ¹³C-labeling was performed with [U-¹³C] glucose and also with [1-¹³C]glucose.

発癌ウイルスから発見されたras遺伝子の産物 (Rasタンパク質) はヒト正常細胞にも存在し, 増殖や分化に関わる重要な機能を果たしている. 多くの癌細胞でras遺伝子の点突然変異体が発見されており, 発癌におけるRasタンパク質の重要性が指摘されている. Rasタンパク質は, アミノ酸189残基からなる分子量約21Kのタンパク質で, 1分子のGDPあるいはGTPを結合しており, 弱いGTPase活性をもっている. 細胞におけるRasタンパク質の働きはこの結合したグアニンヌクレオチドによって制御されている. すなわちGTP結合型は, ターゲットとなるタンパク質分子と相互作用を行う活性型であるのに対して, GDP結合型は, このターゲットとなるタンパク質とは相互作用を行うことができない不活性型である. グアニンヌクレオチドの交換によって引き起こされるRasタンパク質の高次構造変化を解析することは, Rasタンパク質の機能の理解および発癌のメカニズムを探る上で重要な意義を持つと考えられる. Rasタンパク質については, GDP結合型およびGTP結合型ともにX線結晶解析がなされているが, GTP結合型では結晶における分子間の相互作用により水溶液とは異なる高次構造を取っている可能性があり, 水溶液におけるNMR分光法による解析が必要である. Rasタンパク質のように分子量が2万を超えるタンパク質の¹H

Rasタンパク質 安定同位体標識 二次元, 三次元NMR分光法

むとうゆたか やまざきかずひこ いとうゆたか にしむらすすむ みやざわたつお まるくすべりへり よこやましがゆき

-NMRスペクトルは多くのシグナルが重なりあい、容易に解析することができない。しかし、近年、安定同位体標識を用いた種々のNMR分光法が開発され、このような高分子のタンパク質分子の構造についても多くの研究成果が得られるようになってきた。われわれの研究室では、現在までに選択的な ^{15}N 安定同位体標識法を用いた解析からRasタンパク質の構造解析を行ってきたが、さらに ^{15}N あるいは ^{13}C のユニフォームな安定同位体標識を利用したNMR分光法により、GDP結合型Rasタンパク質について高次構造解析を進めた。

【材料および方法】NMR分光法による解析には、Rasタンパク質のC末端18残基を除いた短鎖Rasタンパク質を用いた。化学合成したc-Ha-ras遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸菌に導入し、これを最少培地で培養することによってRasタンパク質を大量調製した。ユニフォーム ^{15}N 標識を行う場合は唯一の窒素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を用いた。また、シグナルを帰属するために、Val, Leu, Ile, Ala, Thr, Arg, Lys, Glx, Asx, Tyr, His, Phe, Ser, Gly, Metについてアミノ酸選択的な15種類の ^{15}N 標識を行った⁽¹⁾。この場合、 ^{15}N 標識アミノ酸とその他の19種類のアミノ酸を最少培地に加えることによってアミノ酸選択的 ^{15}N 標識を行った。さらに代謝による ^{15}N の希釈を防ぐために標識アミノ酸に対応して各種トランスアミナーゼを欠損した大腸菌変異株を選択した (Table 1)。ユニフォームな ^{13}C 標識を行なう場合には最少培地における炭素源として[U- ^{13}C]グルコースを用いた。また、同様に[1- ^{13}C]グルコースを用いたRasタンパク質の標識も行った。

精製したRasタンパク質はすべてGDP結合型であり、測定のため限外濾過を繰り返すことによって測定用緩衝液 (20mM リン酸ナトリウム緩衝液, 10mM MgCl_2 , 150mM NaCl , pH5.4, 10% D_2O) への溶媒置換を行った。

主鎖部分のシグナルの帰属のため、アミノ酸選択的な ^{15}N 標識した試料について isotope filtered NOESY, TOCSYの測定を行った。また、ユニフォーム ^{15}N 標識した試料を用いてNOESY-HMQC, TOCSY-HMQC三次元NMRスペクトルを測定し解析した。このように選択的およびユニフォームな ^{15}N 標識の結果からsequential assignmentを行い、Rasタンパク質の主鎖部分のシグナルを帰属した。さらに ^{13}C 標識した試料

Table 1 アミノ酸選択的 ^{15}N 標識を行うための培養条件

^{15}N -labeled residues	[^{15}N]amino acid(s)	concentration	host strain	genotype
uniform	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	2000mg/l	TG1	prototrophic
Ala+Val	L-alanine	100	DL39	<i>aspC, ilvE, tyrB</i>
	and L-valine	50		
Arg	L-arginine	55	AB1255	<i>argH, hisG, ilvA, metB</i>
Asx	L-aspartate	90	DL39	
Gly	glycine	100	AT2457	<i>glyA</i>
Glx	L-glutamate	100	PA340	<i>gdh, gltB</i>
His	D,L-histidine	100	AB1255	
Ile	L-isoleucine	55	DL39	
Leu	L-leucine	55	DL39	
Lys	L-lysine	55	JE5811	<i>lys</i>
Met	L-methionine	75	AB1255	
Phe	L-phenylalanine	50	DL39	
Ser+Gly	L-serine	50	PC0950	<i>argF, argI, serB, thr</i>
	and glycine	50		
Thr	L-threonine	50	PC0950	
Tyr	L-tyrosine	50	DL39	
Val	L-valine	55	DL39	

についても、HMQCスペクトルの測定を行った。

【結果および考察】選択的な ^{15}N 標識を行うことにより、スペクトルの簡略化が可能である。われわれは、Val, Leu, Ile, Ala, Thr, Arg, Lys, Glx, Asx, Tyr, His, Phe, Ser, Gly, Metの17種類のアミノ酸について15種類の選択的に ^{15}N 標識した試料を調製し、NMR測定を行った(その結果の一部については昨年の本討論会において発表した)。しかし、このなかには代謝による ^{15}N の希釈を完全に抑えることができない場合がある。例えばGlx, Asxの選択的 ^{15}N 標識では、 ^{15}N の希釈のためisotope-filtered NOESY, TOCSYの測定ではシグナルを十分に得ることができない。このためユニフォーム ^{15}N 標識した試料についてNOESY-HMQCおよびTOCSY-HMQC三次元NMRスペクトルを測定し、 ^{15}N の化学シフトによるシグナルの選別を行った(Fig.1)。ユニフォームに ^{15}N 標識した試料では、HMQCスペクトル上でペプチド主鎖のアミドプロトンとGln, Asnの側鎖にあるアミドプロトンのシグナルが重なりやすい。Gln, Asnの側鎖アミドプロトンはHeteronuclear Triple Quantum Coherence Spectroscopy (HTQC)によって選別を行った。この選別を踏まえて三次元スペクトルでペプチド主鎖部分にあるアミドプロトン由来のシグナルを選び出すことができる。このように ^{15}N を用いた三次元NMRの手法と選択的な ^{15}N 標識による二次元NMRによる手法を組み合わせることによりはじめてsequential assignmentのために十分な情報を得ることができる。Fig.2に帰属に利用した隣接残基間のNOEのデータを示す。この情報の他に、アミドプロトンの交換速度および

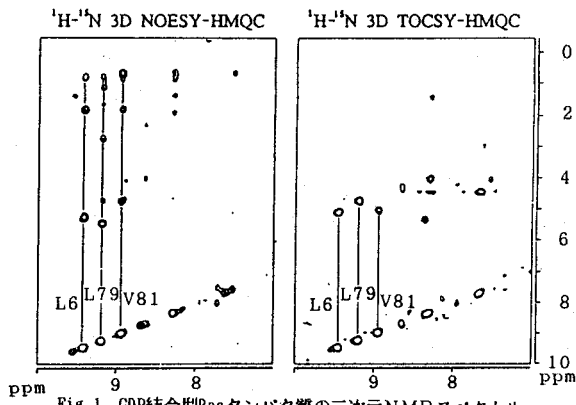


Fig.1 GDP結合型Rasタンパク質の三次元NMRスペクトル ($\delta^{15}\text{N}=102.5\text{ppm}$)

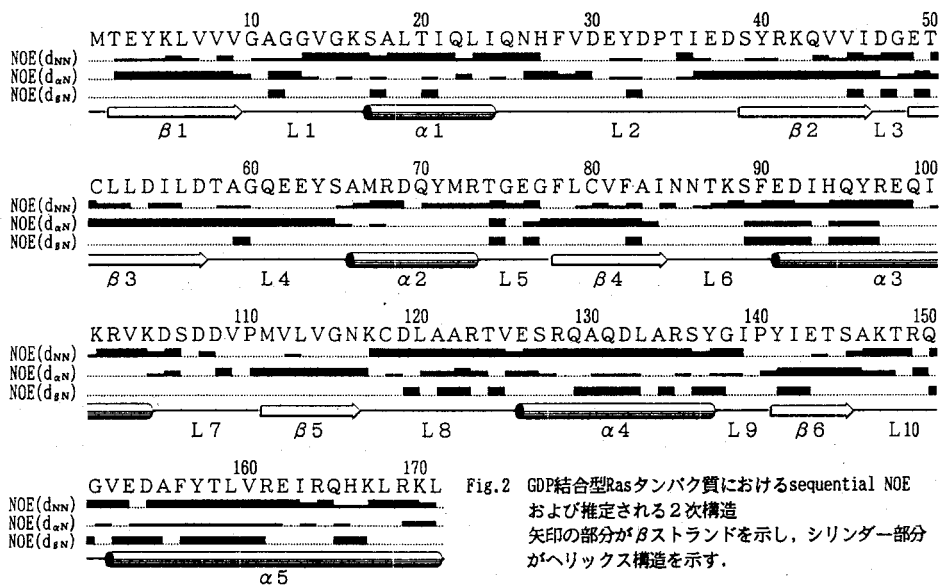


Fig.2 GDP結合型Rasタンパク質におけるsequential NOE および推定される2次構造 矢印の部分がβストランドを示し、シリンダー部分がヘリックス構造を示す。

主鎖二面角の情報をもとにGDP結合型Rasタンパク質について二次構造を決定した (Fig.2) .

この主鎖部分の帰属をもとにアミノ酸の側鎖へと帰属を伸ばし、高次構造を組み立てるためのNOE情報を得るためには、 ^{13}C 標識を行なったRasタンパク質を調製しHCCH-COSY, TOCSYあるいはNOESY-HMQCなどの三次元NMRの測定が必要である。このために $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルコースでユニフォーム ^{13}C 標識した試料を作成し、まずHMQCスペクトルを測定した。このスペクトルの中で $\text{C}\alpha$ カーボン由来のシグナルがある程度帰属できると解析を進める上で都合がよい。しかし、この場合 $\text{C}\alpha\text{H}$ プロトンの化学シフトのひろがりアミドプロトンの場合よりも小さく、多くのシグナルが重なっていることが問題となる。この問題を解決するため、 $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ グルコースによる ^{13}C 標識の利用も試みた。Fig.3に両者のスペクトルの $\text{C}\alpha\text{H}$ プロトンと $\text{C}\alpha$ カーボンとのクロスピークが現れる領域を比較した。 $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ グルコースで ^{13}C 標識を行うと、 $\text{C}\alpha$ カーボンが標識されるアミノ酸はLeu, Ile, Pro, Met, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Argの11種類である。両者のスペクトルの比較から $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ グルコースを用いた場合にスペクトルがかなり簡略化されているのがわかる (ほぼ同じプロトンの化学シフトをもつS39, N116についても $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ グルコースを用いるとS39に由来するシグナルが消失しているため容易に判別できる)。また一般に、ユニフォームに ^{13}C 標識した試料では、隣あった ^{13}C 同士のカップリングの影響あるいは緩和の影響により線幅が増大する。特にLeu, Ile, Val残基側鎖にあるメチル基からのNOEは構造情報として重要な意味をもつが、 $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ グルコース

で標識した試料では、Val残基の β メチレン、Leu残基の γ メチレンが ^{13}C によって標識されないため、これらのアミノ酸のメチル基由来のシグナルは比較的シャープな線幅をもっていた。このように $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ グルコースを用いた安定同位体標識

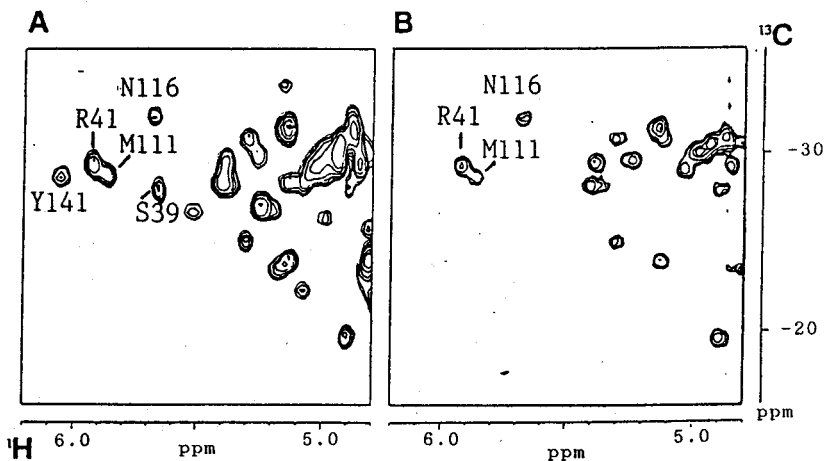


Fig.3 ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル ($\text{C}\alpha\text{H}$ プロトンと $\text{C}\alpha$ カーボンのクロスピークの一部を示す.)

A: $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルコースによる標識 B: $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ グルコースによる標識

を併用することでユニフォームに ^{13}C 標識を行った試料についてのNOE情報をよりよく解釈できるものと考えられる。現在、 ^{13}C 標識を行った試料についても三次元NMRの手法を利用することにより解析を進めている。

【文献】(1)K.Yamasaki, Y.Muto, Y.Ito, M.Walchli, T.Miyazawa, S.Nishimura & S.Yokoyama : Journal of Biomolecular NMR, in press

P23

GDP→GTP交換にともなうヒトc-Ha-ras遺伝子産物の動的な高次構造変化

○伊藤 隆¹, 武藤 裕¹, 山崎和彦¹, 河合剛太², 宮澤辰雄^{2,3}, M.Wälchli⁴, 西村 暹⁵, 横山茂之¹ (¹東大・理・生化, ²横浜国大・工, ³現在 蛋白工学研, ⁴日本ブルカー, ⁵国立がんセンター研)

Dynamic Structure Change of Ras Protein on GDP→GTP Exchange

Yutaka Ito¹, Yutaka Muto¹, Kazuhiko Yamasaki¹, Gota Kawai², Tatsuo Miyazawa^{2,3}, Markus Wälchli⁴, Susumu Nishimura⁵, and Shigeyuki Yokoyama¹ (¹Faculty of Science, University of Tokyo, ²Faculty of Engineering, Yokohama National University, ³Present Address: Protein Engineering Research Institute, ⁴Bruker Japan, ⁵Biology Division, National Cancer Center Research Institute)

Ras protein is bound with GDP or GTP, and the GTP-bound form is active while the GDP-bound form is inactive. Sequence specific assignment and secondary structure determination of Ras protein bound with GMPPNP (nonhydrolyzable analogue of GTP) were performed by heteronuclear multidimensional NMR with uniform and amino acid-selective ¹⁵N labeling. Upon GDP→GMPPNP exchange, nearly half of the cross-peaks shifted and 20 cross-peaks due to residues in biologically important regions disappeared in the HSQC spectrum observed in 37°C, which was found to be due to line-broadening caused by chemical exchange between multiple conformations.

序

ras遺伝子産物(Ras)は、アミノ酸189残基からなる分子量約21Kのタンパク質であり、細胞の増殖や分化に関与している。またRasは、GDPあるいはGTPを1分子結合しており、GDP結合型からGTP結合型への転換はヌクレオチドの交換によって、GTP結合型からGDP結合型への転換はRas自身のGTPase活性によって進行する。RasはGDP結合型が不活性型であり、GTP結合型が活性型であるが、GTP結合型はGDP結合型とは高次構造が異なり、シグナル伝達経路でRasの下流に存在する未知のターゲットとの相互作用が可能であると考えられている。

当研究室では、c-Ha-ras遺伝子産物のC末端18残基を除いた171残基からなるRasを用い、GDP→GTP交換にともなう高次構造変化の解析を行ってきた。GDP結合型とGTP結合型の高次構造の差異については、X線結晶解析結果の比較により論じられている。しかし、これまでNMRによって得られた結果によると、X線結晶解析により報告されている高次構造変化に比べて、水溶液においては、より動的な高次構造変化が生じている可能性がある。したがって、NMRを用いて水溶液における高次構造を詳細に解析することは、Rasの活性制御のメカニズムを解明するために必須であると考えられる。私たちは、現在までに、¹⁵Nユニフォーム標識とアミノ酸選択的¹⁵N標識を用いたNMRの手法により、GDP結合型Rasについて、主鎖アミドプロトン、Caプロトンの帰属、および2次構造の決定を行った。今回、GTP結合型Rasについて同様の手法で解析を行い、GDP結合型からGTP結合型への転換にともなうRasの動的な高次構造変化について考察した。

方法

1) Rasの調製 ¹⁵Nユニフォーム標識の際は、完全人工合成したc-Ha-ras遺伝子を組み込んだ発現ベクターで大腸菌野生株TG1をトランスフォーメーションし、¹⁵NH₄Clを含むM9最少培地で培養して、Rasを大量発現させた。アミノ酸選択的¹⁵N標識の際は、この発現ベクターで、種々の大腸菌アミノ酸要求性株をトランスフォーメーションし、[¹⁵N]アミノ酸を含む最少培地で培養してRasを大量発現させた。アミノ酸選択的¹⁵N標識は合計15種行った。精製されたRasはGDP結合型であるため、GTP結合型Rasとしては、結合GDPをGMPPNP(GTPの非水解アナログ)に交換したものを用いた。

Ras, Dynamic Structure, ¹H-¹⁵N 3D NMR

いとう ゆたか, むとう ゆたか, やまさき かずひこ, かわい じょうた, みやざわ たつお, まるくす へるひり, にしむら すずむ, よこやま しげゆき

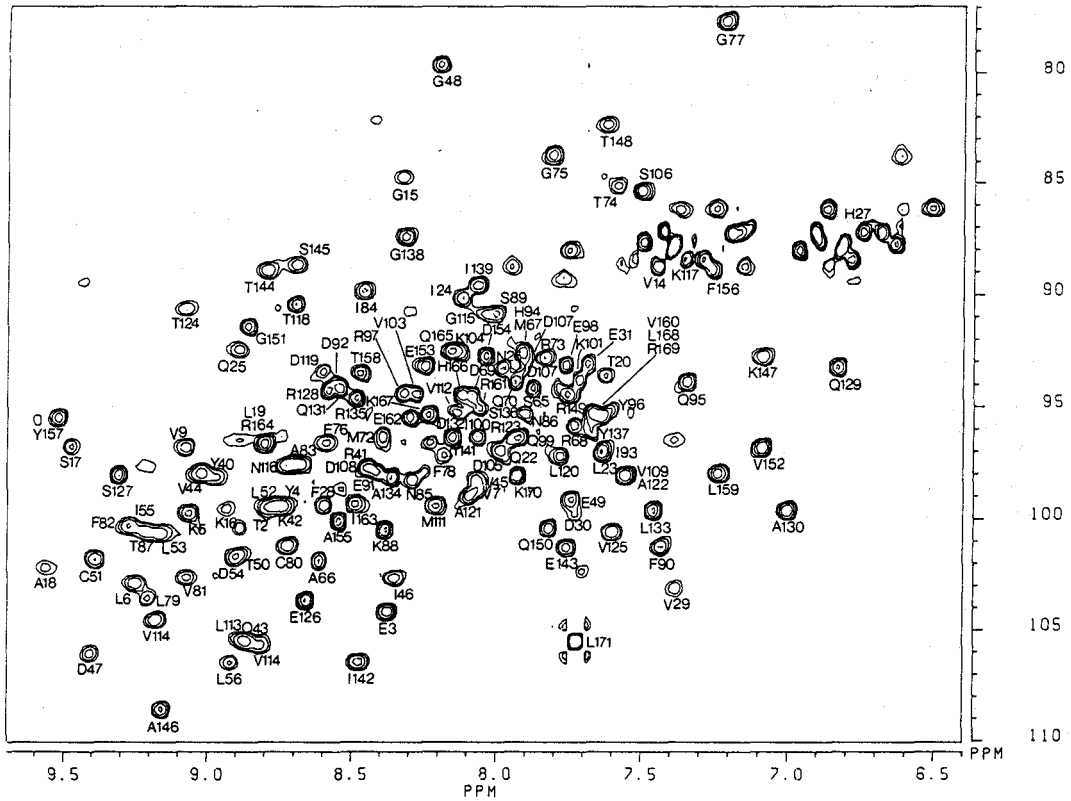


図1. ^{15}N ユニフォーム標識Ras (GMPPNP結合型) のHSQCスペクトル. 主鎖アミド基由来のピークには帰属を付した.

5) NMR試料の調製, NMR測定 精製したRasは,限外ろ過により,2~3mMの溶液[20mM Na_2HPO_4 (pH5.5), 10mM MgCl_2 , 150mM NaCl]として測定を行った. 測定は全てブルカー社AM-400分光計を用い, 温度変化の実験以外は37°Cで行った.

結果

- 1) GMPPNP結合型Rasの主鎖アミドプロトン, Caプロトンの帰属 ^{15}N ユニフォーム標識Ras (GMPPNP結合型) のHSQCスペクトルにおいて観測される主鎖アミド基由来のピークについて, アミノ酸選択的 ^{15}N 標識RasのHMQC, HSQCスペクトルを測定することにより, アミノ酸タイプの識別を行った. HSQCスペクトル(GMPPNP結合型)では, GDP結合型に比べて, 20個程度のピークが観測されず, いくつかのピークの相対強度が減少していた. ついで, ^{15}N ユニフォーム標識Rasについて, HSQC-NOESY, 3D NOESY-HMQC, 3D TOCSY-HMQCスペクトルを測定し, 他方, アミノ酸選択的 ^{15}N 標識Rasについて ^{15}N -edited 2次元NMRスペクトルを測定することで, 主鎖アミドプロトン, Caプロトンの位置特異的帰属を行った. 図1に, HSQCスペクトル上での帰属を示した. 位置特異的帰属により, GMPPNP結合型のHSQCスペクトルでは, G10~G13, I21, Y32~S39, D57~Y64の残基についてアミド基由来のピークが観測されないことが明らかになった. G10~G13, D57~Y64はグアニンヌクレオチドのリン酸基結合部位に位置し, Y32~S39はターゲットとの相互作用に重要な"エフェクター領域"に位置している.
- 2) GMPPNP結合型Rasの2次構造 GMPPNP結合型Rasの2次構造は, NOE(d_{NN}), NOE($d_{\alpha N}$)の情報, $^3J_{\text{HN}\alpha}$ の情報, H-D交換速度の情報をもとに決定した. $^3J_{\text{HN}\alpha}$ は ^{15}N ユニフォーム標識RasのHMQCスペクトルから読み取った. H-D交換速度の情報は, ^{15}N ユニフォーム標識Rasについて, 重水置換後のHSQCスペクトルの経時変化を解析することで得た. 図2にNOE(d_{NN}), NOE($d_{\alpha N}$), $^3J_{\text{HN}\alpha}$, H-D交換速度の情報から推定した水素結合の強弱, および2次構造を示した.
- 3) GDP \rightarrow GMPPNP交換による主鎖アミドプロトン, アミド窒素の化学シフトの変化 GMPPNP

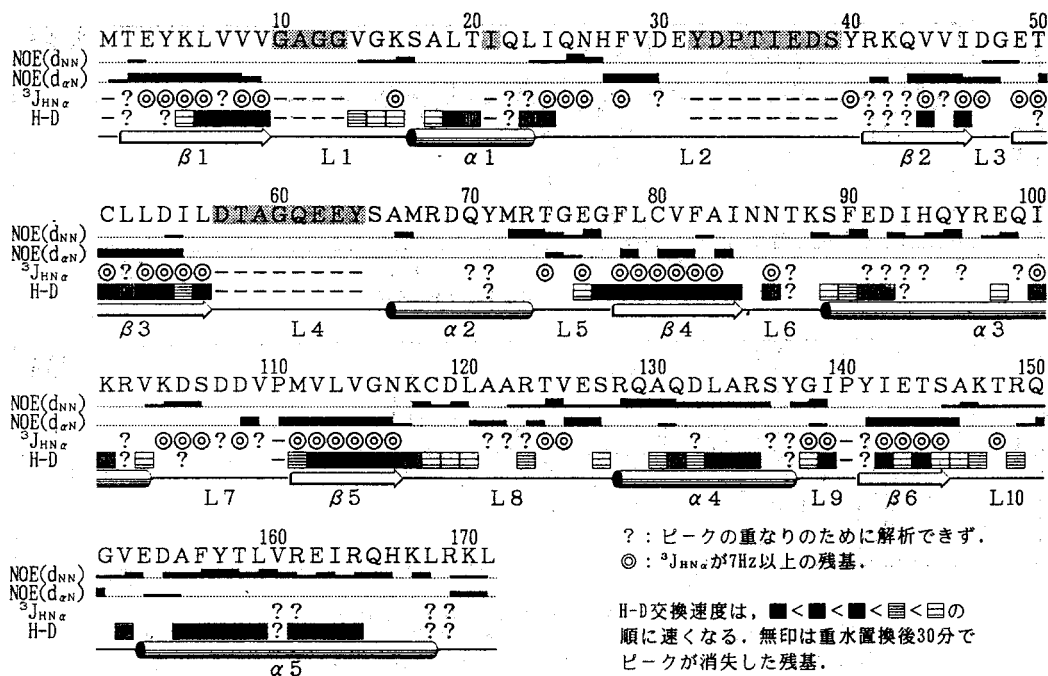


図2. GMPPNP結合型Rasで観測された、NOE(d_{NN}), NOE(d_{αN}), ³J_{HNNα}, H-D交換速度の情報と、それに基づく2次構造。HSQCスペクトルにおいて、アミド基由来のピークが観測されない残基は■で示した。

結合型RasのHSQCスペクトルでは、GDP結合型に比べ約半数のピークの化学シフトが¹H軸、¹⁵N軸について異なっていた(図3)。これらの化学シフトの差異は、GDP→GMPPNP交換にともなう主鎖の高次構造変化を反映していると考えられる。アミドプロトン、アミド窒素の化学シフト差が大きい残基は、Rasのアミノ端側の半分に集まっており、HSQCスペクトル(GMPPNP結合型)においてピークが消失した残基の前後では、化学シフト差が特に大きい。

4) HSQCスペクトルの温度変化 GMPPNP結合型のHSQCスペクトル(37℃)で、21個の主鎖アミド基由来のピークが観測されない理由として、化学交換によるシグナルの線幅の増大の結果、相対強度が著しく減少している可能性が考えられた。このためGDP結合型、GMPPNP結合型Rasについて温度を変えてHSQCスペクトルの測定を行った。図4にはGDP結合型、GMPPNP結合型の25℃、37℃、47℃でのHSQCスペクトルの一部を示した。GDP結合型では、個々のピークの相対強度に温度依存性をほとんど見られなかったが、GMPPNP結合型では、温度の上昇にともない、いくつかのピークが明瞭に観測されるようになった。アミノ酸選択的¹⁵N標識Rasについて同様の温度変化の実験を行った結果、37℃から47℃へ測定温度を上昇させることにより、37℃ではほとんど観測できなかった4つのグリシン残基のうち、3つが明瞭に観測されることが明らかになった。以上の結果より、GMPPNP結合型Rasでは、局所的に複数のコンフォメーションの平衡が存在していることが強く示唆された。

考察

以上の結果を総合し、GDP→GTP交換にともなう高次構造が変化する領域を2次構造上で示した(図5)。X線結晶解析の結果ではL2、L4、α2に大きな高次構造変化が報告されているが、今回のNMRによる解析により、水溶液においては、β1、L1、α1、α3も含めた広い範囲で高次構造変化が起こっていることが明らかになった。しかもL1、L2、L4ではフレキシビリティが増大し、複数のコンフォメーションの平衡状態にあることが強く示唆された。L1やL4はGTPaseの活性中心であり、L2を構成する残基のうちいくつかはリン酸基の結合に関与している。またL2はターゲットとの相互作用に関わる重要な領域である。

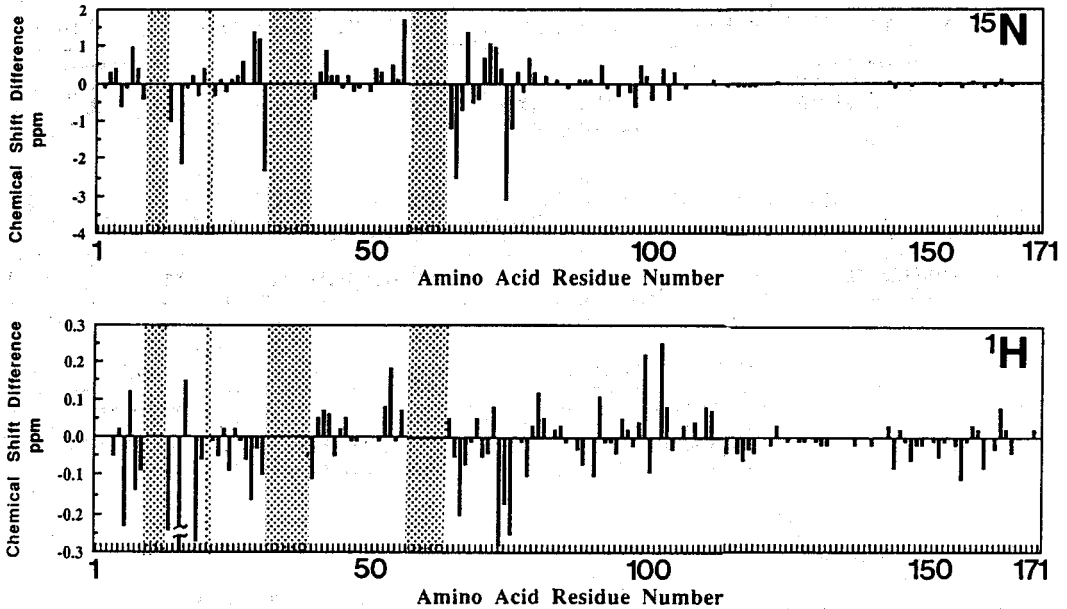


図3. GDP結合型とGMPPNP結合型の間の、アミド窒素およびアミドプロトンの化学シフト差。
HSQCスペクトルにおいて、アミド基由来のピークが観測されない残基は■で示した。

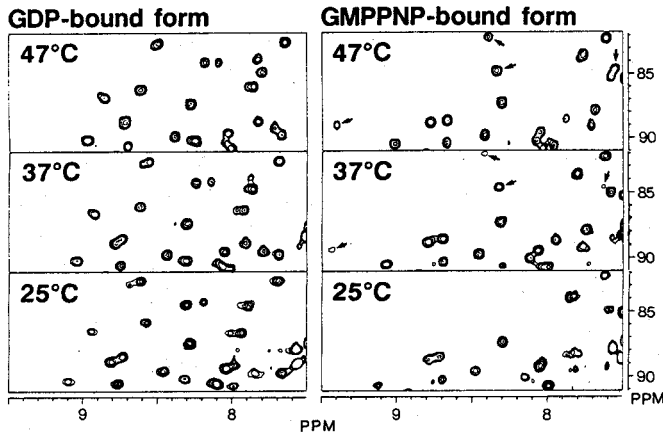


図4. GDP結合型、GMPPNP結合型の25°C, 37°C, 47°CでのHSQCスペクトル(部分図)。
GMPPNP結合型では、温度の上昇にしたがって、矢印で示したグリシンのピークの強度が増大する。

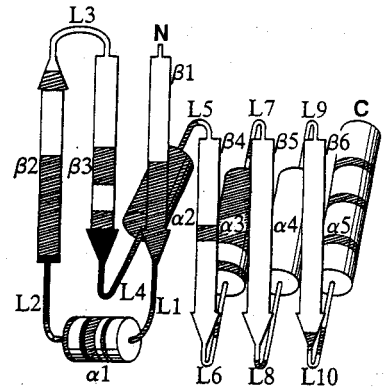


図5. GDP→GTP交換にともなう動的構造変化。
■: アミド基由来のピークが観測されない残基。
▽: アミド窒素、アミドプロトンの化学シフトが大きく変化した残基。

したがって、GTP結合型における局所的なフレキシビリティーの増大は、本質的な意味を持っていると考えられる。私たちは以上の結果から、GDP→GTP交換によるRasの活性化のメカニズムについて以下のような仮説を提唱する。GTP結合型に転換しリン酸基が一つ増えることにより、L1, L2, L4がフレキシブルになる。L2は、GDP結合型においては不活性型のコンフォメーションに固定されていたが、GTP結合型においては、ターゲットとの相互作用が可能なコンフォメーションを取り得るようになる。

現在、この仮説を検証するために、L2に存在する残基について変異を導入し、このうちGTP結合型における動的構造に影響を及ぼすいくつかの変異体について、高次構造解析を行っている。また今回は主に、主鎖アミドプロトン、アミド窒素についての解析結果を述べてきたが、現在、 ^{13}C ユニフォーム標識Rasを用いて側鎖プロトンシグナルの帰属を行っており、GDP結合型およびGMPPNP結合型Rasの水溶液における3次構造を決定し、Rasにおける活性制御のメカニズムをより詳細に解明することを目指している。

P24

がん遺伝子産物 Myb の DNA 結合ドメインの構造解析

緒方一博¹、平田善三¹、北條裕信²、相本三郎²、中井孝尚³、中村春木³、皿井明倫⁴、石井俊輔⁴、○西村善文¹

(¹横浜市大・総合理、²阪大・蛋白研、³蛋工研、⁴理研・筑波LS)

A Helix-Turn-Helix Related Motif with a Hydrophobic Core Formed by Tryptophans and Histidines in a DNA-binding Unit of a Proto-oncogene Product, Myb.

Kazuhiro Ogata¹, Zenzou Hirata¹, Hironobu Hojo², Saburo Aimoto², Takahisa Nakai³, Haruki Nakamura³, Akinori Sarai⁴, Syunsuke Ishii⁴, Yoshifumi Nishimura¹

(¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, ²Institute for Protein Research, Osaka University, ³Protein Engineering Research Institute, ⁴Tsukuba Life Science Center, Institute of Physical and Chemical Research)

The DNA-binding domain of the c-myb proto-oncogene product (c-Myb) consists of three imperfect tandem repeats of 52 amino acids, each of which has three conserved tryptophans. The three-dimensional structure of the third repeat which is essential for sequence-specific DNA-binding has been determined by NMR. It includes three well-defined helices maintained by a hydrophobic core formed by three tryptophans, together with two histidines. Helices 2 and 3 form a structure related to but distinct from a canonical helix-turn-helix motif. In particular, the turn between these helices is one amino acid longer than the corresponding turn in bacterial repressors and homeodomains and contains a proline residue. The architecture of three helices is different from those of homeodomains and DNA-binding domains of bacterial repressors.

はじめに

がん原遺伝子 c-myb は、トリ骨髄芽球症ウィルスの持つがん遺伝子 v-myb の細胞性遺伝子である。c-myb 遺伝子の発現は、造血系細胞の増殖・分化と密接に関連し、未分化細胞で高く、分化にともなって抑制される。c-myb 遺伝子産物である Myb タンパク質は DNA の塩基配列に特異的に結合する転写制御因子であり、N 末端から順に DNA 結合ドメイン、転写活性化ドメイン、負の調節ドメインを持っている。DNA 結合ドメインは、52 個のアミノ酸を単位とした 3 個の繰り返し構造からなっている。ここでは 3 個の構造単位を N 末から順にリピート 1、2、3 と名づける。各リピートの中には規則的に繰り返した 3 個のトリプトファンがある。私たちは、DNA 結合ドメインの中でこれらのトリプトファンが疎水的な環境にあること更に 2 次構造としてヘリックス含量が高い事を報告し、DNA 結合ドメインのモデル構造を提唱した¹。今回我々は、DNA 結合ドメインの構造を NMR により調べ、リピート 3 に関しては立体構造を得たのでここに報告する。

がん遺伝子産物、Myb、DNA 結合タンパク質、立体構造解析、NMR、転写制御因子

おがたかずひろ、ひらたぜんぞう、ほうじょうひろのぶ、あいもとさぶろう、なかいたかひさ、なかむらはるき、さいらいあきのり、いしいしゅんすけ、にしむらよしふみ

実験

MybのDNA結合ドメインのうち、N末を含む全体（PR123）、3個のリピートを含むもの（R123）、2番目と3番目のリピートを含むもの（R23）の大腸菌大量発現系を作成し、NMR用に大量調製を行った。更に3番目のリピートのみ（R3）は、ペプチド合成により大量調製を行った²。これらの試料に関して1次元および2次元¹H-NMRの測定を、Bruker AMX-500で行った。

結果

図1にアミド・芳香族領域の1次元¹H-NMRの測定結果を示す。これを見て判るように、R3の高磁場側、低磁場側の特徴的なシグナルは、R23、R123、PR123、中に保存されていて、R3は特異的な立体構造をとりしかもその立体構造がDNA結合ドメイン全体中で保持されていることを示唆している。R3はDNAの塩基配列認識において必須であることが既に判っているので、先ずR3の立体構造を解析した。

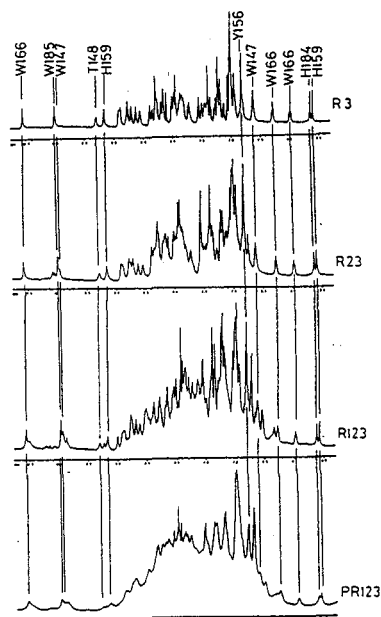


図1. MybのDNA結合ドメインの1次元NMRスペクトル (10.5 ppm - 5.5 ppmの領域を示してある。)

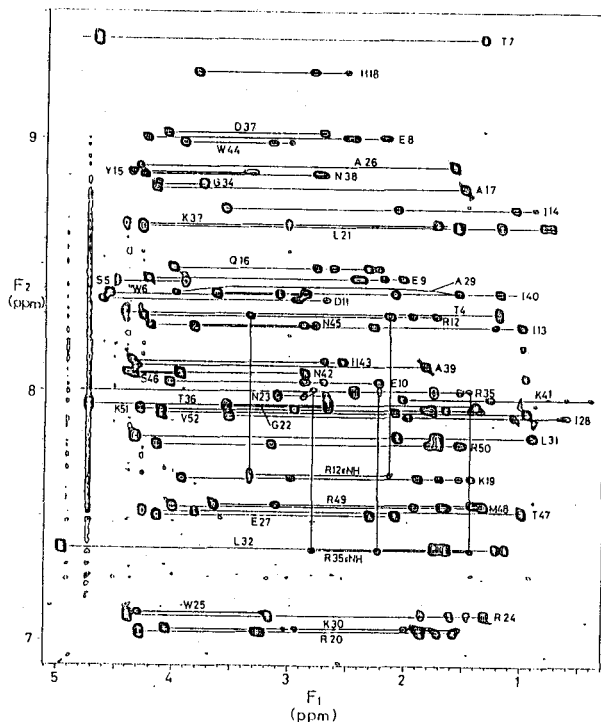


図2. Myb R3のHOHAHAスペクトル (混合時間101ms)

常法にしたがって、H₂O、D₂O中のDQF-COSY, TOCSY, NOESYを測定し、アミノ酸タイプ別の帰属と配列特異的な帰属を行った。図2にTOCSY (混合時間101ms)の結果を示す。更に³J_{NHα}の結合定数の測定、βプロトンの立体特異的な帰属を行った。図3にR3の配列とともに、近距離NOE結果等をまとめた。図4に各アミノ酸残基と近距離NOE、遠距離NOEの数を示してある。

全体で496個の距離制限、35個のφ角度と17個のχ¹角度制限を基に、distance geometryの計算を行った。エンベディングの計算にはプログラムEMBOSSを用いて150個の構造を

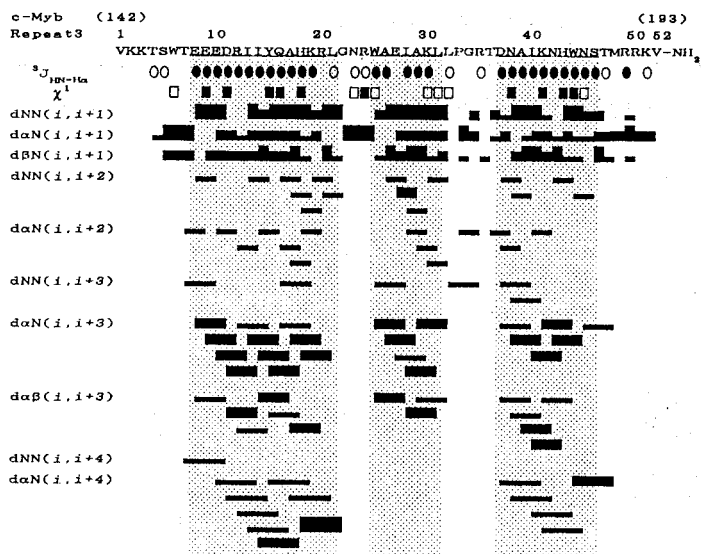


図3. Myb R3のアミノ酸配列と近距離NOE ($^3J_{NH\alpha}$ 結合定数が7 Hz以下は黒丸で8.5 Hz以上は白丸で示してある。 χ^1 角が $180^\circ \pm 60^\circ$ は黒い四角で $-60^\circ \pm 60^\circ$ は白い四角で示してある。)

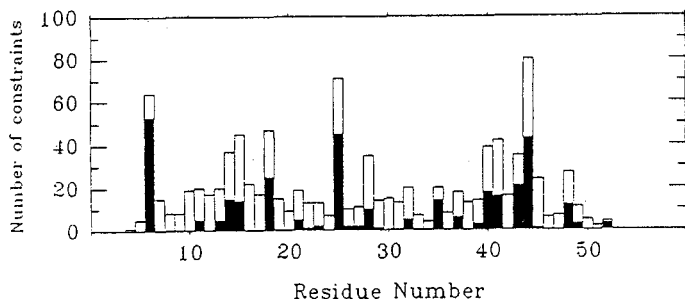


図4. 残基毎のNOE距離制限の数(近距離NOEの数は白で遠距離NOEの数は黒で示した。)

得た。これらの構造の中で、violationの大きな構造や鏡像構造を除き、45個の構造を出発点として、SA (simulated annealing)の計算を行った。プログラムはPRESTOを用い、計算の結果最終的にviolationの小さな29個の構造を得た。図5に、特に疎水的なコアを形成しているアミノ酸残基と骨格と一緒に表示した。今回の計算結果、6番目から48番目の重原子に関して、RMSD (root-mean-square deviation)の値は骨格で0.45 Å、全残基で0.93 Åだった。各残基毎の骨格のRMSDの値を図6に示す。

図5に示すようにMyb R3の中には、3個の α -ヘリックスと2個のターンがある。2番目と3番目の α -ヘリックスはHTH (helix-turn-helix)構造と類似していた。しかしホメオドメインや細菌のリプレッサータンパク質のDNA結合ドメインと比較すると、ターン部のアミノ酸残基の長さが1残基長かった。Myb R3のターン部の1残基を除いて、ホメオドメインやリプレッサーのHTH構造と重ね合わせてRMSDの計算を行ったところ、1.4-1.7 Åだった。ホメオドメインやリプレッサー間のRMSDは全て1 Å以内なのでMyb R3はHTHに類縁した構造でしかも区別可能な構造をとっていると結論できる。図6を見ても判るように、1番目と2番目の α -ヘリックス間のターンの構造がよく決定されているのに比較して、2番目と3番目の α -ヘリックス間のターンのRMSDの値が大きい。この事はHTH構造中のターン部が硬い構造をとっているのと比べて興味深い。その原因としてMyb R3のターン部に存在するプロリン残基の影響が考えられる。現在までに知られているリプレッサーやホメオドメインのHTH部にはプロリン残基は見

つかって、MybR3は新しいタイプのDNA結合モチーフである。

MybR3のもう一つの特徴は3個の α -ヘリックスの立体構造を安定化させている疎水的なコアである。非常によく保存されている3個のトリプトファンの他に2個のヒスチジン、4個のイン



図5. MybR3の立体構造のステレオ表示 (疎水的なコアを構成するアミノ酸残基も一緒に示してある。)

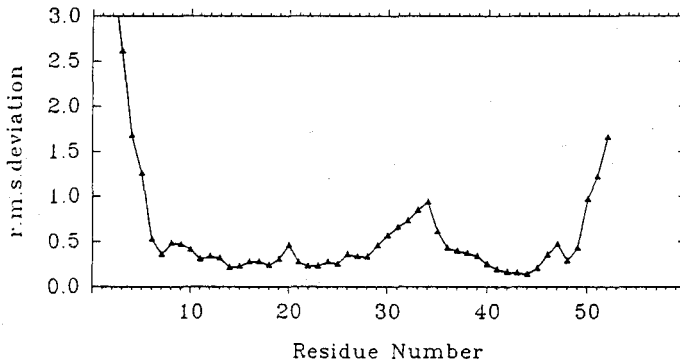


図6. 各残基毎の骨格のRMSDの値 (単位 Å)

ロイシン、1個のロイシン、1個のメチオニンがコアの形成に関与している。特に2個のヒスチジンの役割に関してはこれまで注目されていなかった。このヒスチジンはリピート1や2では保存されていず、そのことが、1次元NMRでリピート3のみが非常に際だった構造特異的なシグナルを与えている原因だろう。R23やR123についても現在帰属を進めているが、これらのタンパク質中のリピート3に関してはかなり帰属ができています。しかしリピート2中にはヘリックスが存在している様子はなく、むしろ塩基性アミノ酸が多いことから、DNAのリン酸骨格と非特異的に結合し、リピート3の特異的結合能を高めている可能性がある。

今回のMybR3の構造を基に特異的な配列(AAC)をもつDNA二重らせんととの相互作用モデルを構築することができた。そのモデルはDNA認識に関する過去のアミノ酸置換の実験をよく説明できる。

REFERENCES

1. C.K.-Ishii, A.Sarai, T.Sawazaki, H.Nakagoshi, D.-N.He, K.Ogata, Y.Nishimura, S.Ishii
J. Biol. Chem. 265, 19990-19995 (1990)
2. H.Hojo, S.Aimoto, Bull. Chem. Soc. Jpn. 64, 111 (1991)

P25

¹³C-edited NOESYを用いたリボヌクレアーゼT₁とそのGlu-58カルボキシメチル化体との構造比較

(味の素・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 ¹³C-edited NOESY

Hiroshi Miyano, Ei-ichiro Suzuki, Masaru Tanokura* and Kenji Takahashi*

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc. *Faculty of Science, University of Tokyo

Detailed comparison of the active site structure between ribonuclease T₁ (RNase T₁) and [γ -carboxymethyl-Glu-58]-RNase T₁ (CM-RNase T₁, inactivated) has been done by NMR and mechanics / dynamics studies. Distance restraints were derived from the ¹³C-edited NOESY spectrum which was measured for the ¹³C-enriched preparation of CM-RNase T₁. The carboxymethyl group is oriented toward the guanidino group of Arg-77, which is thought to be responsible for the inactivation of RNase T₁.

【緒言】

Ribonuclease T₁ (RNase T₁) は、RNA分子中のグアノシン-3'-リン酸部分のホスホジエステル結合のみを極めて選択的に切断する酵素である。活性発現には、His-40, Glu-58, Arg-77, His-92が必要であるが、反応機構の詳細は明らかにされていない。¹⁾ そのため、RNase T₁の構造研究の焦点は、この厳密な基質特異性と反応機構を構造化学的に明らかにすることにある。上記4残基のうち、Glu-58はヨード酢酸と極めて選択的に反応(カルボキシメチル(CM)化)し、酵素活性は消失する。Glu-58の側鎖が、僅か4Å程度のびるだけで極性の変化もないCM化が、酵素を失活させるこの現象は興味深く、反応機構の解明に有用な情報を含むものと考えられる。そこで我々は、この修飾蛋白質(CM-RNase T₁)に着目し、これまで、全ての主鎖プロトンの化学シフトをRNase T₁と比較することで、主にCM化が全体構造に与える影響を議論してきた。²⁾ 今回、さらに、CM化によるGlu-58近傍の局所構造変化を明らかにすることを考えた。そのため、CM基のC2のみを¹³Cでラベル化したCM-RNase T₁ ([2-¹³C]-CM-RNase T₁)を合成し、¹³C-edited NOESYを測定することで、CM-Glu-58に選択的なNOE情報の抽出を行なった。実測されたCMメチレンプロトンとRNase T₁残基プロトンとのNOE強度をもとに動力学計算を行ない、RNase T₁の反応機構を構造化学的に明らかにすることを試みた。

【実験】

NMR測定はAMX600及びAMX500 NMRスペクトロメーター (Bruker) を用いた。試料の[2-¹³C]-CM-RNase T₁は、I¹³CH₂COOH (¹³C率, 99%)を用い、文献に従い³⁾合成した。濃度は約2mMで、pH 4.4とした。

動力学計算は、PDBのRNase T₁ - 2'-GMP complexの立体構造から2'-GMPを削除したのち、Glu-58の γ カルボキシル基にCM基を加え、これを初期構造とした。計算はNMRgraf (MSI) により行なった。

【結果と考察】

まず、CM-RNase T₁のCM基の帰属をSQCにより行なった。その結果、66.8ppmの¹³Cシグナルに対

Ribonuclease T₁ ¹³C-edited NOESY

みやのひろし すずきえい ちろう たのくらまさる たかはしけんじ

し、4.64ppmと5.01ppmの2つのプロトンシグナルとの間にクロスピークが検出され、これがC2に直接結合しているメチレンプロトンであると帰属された。以下、4.64 ppmのシグナルをH3C1、5.01 ppmのシグナルをH2C1と記述することにする。γ CMグルタミン酸標品のCM基のメチレンプロトンは等価で、4.49ppmに化学シフトを有する。CM-RNase T₁中のCM基のメチレンがこのように区別されて観測されるのは、CM基がRNase T₁分子中で何らかの安定なコンフォメーションをとっていることを示している。

¹³C-edited NOESY法を用い、CM基のH2C1、H3C1に近接する残基のみが選択的に抽出出来た。その結果、Phe-100、Tyr-42、His-40の3つの芳香族残基のプロトンとの間にのみNOEが観測され、CM基はRNase T₁分子中でこれらの芳香族残基の側鎖方向に配向していることが明らかとなった。

このNOESYより、CM-RNase T₁の距離束縛付きの動力学計算を行なった。H2C1、H3C1シグナルのNOESYクロスセクションより、対角ピーク及びクロスピークの強度をピーク高さとして計測した。この際、CM基の二つのメチレンプロトンの距離 (r_{CM}) が1.77Åでほぼ不変であることより、この値を基準とした。プロトン間に観測されたクロスピークの強さを I_{CM} とし、他のプロトン対のクロスピーク強度及び距離をそれぞれ I_{HH} 、 r_{HH} とすると、孤立スピン対近似 (isotropic spin pair approximation) により、 $I_{HH}/I_{CM} = (r_{CM}/r_{HH})^6$ の関係を仮定して、実測の I_{HH} から r_{HH} を求めた。このようにして得られた値は近似であり正確でないため、0.5Åの幅で距離の上限、下限を設定して、NMRgrafの束縛条件 (restraints) とした。この条件でエネルギー極小化-ダイナミクス計算を行なったところ、全体的には、Tyr-42~Glu-46の塩基結合部位と推定される残基の存在位置が、CM化により特に大きく変化していた。これは、RNase T₁とCM-RNase T₁の主鎖プロトンの化学シフトを比較したときの結果³⁾とよく対応していた。また、活性部位周辺の構造では、CM基の-COO⁻が、Arg-77のグアニジル基水素と水素結合、或いはイオン結合するに十分な位置にまで近接 (最短で1.97Å) する距離に近づくことがわかった。

稲垣らは、Glu-58とCM-Glu-58のpKaの劇的な変化 (4.3→0.8) に着目し、CM基が他の塩基性側鎖 (おそらくArg-77) との強力な塩結合を形成していると推定した。⁴⁾ 本研究の結果は、この仮説を強く支持するものとなった。即ち、CM-RNase T₁が基質結合能を保存しながらも失活している現象は、CM基が、Arg-77と強く相互作用し、RNase T₁のGlu-58と異なり一般塩基触媒として働くことが出来ないためと考えられ、Glu-58は、RNase T₁の酵素反応に直接関与する残基であると推定される。

【謝辞】

NMR測定に関しては、日本Bruker社の方にお世話になった。記して感謝致します。

【参考文献】

- 1) K. Takahashi and S. Moore, *The Enzymes* (P. D. Boyer, ed.), 15 435 (1982).
- 2) 宮野, 鈴木, 田之倉, 高橋, 第29回NMR討論会要旨集 p.153 (1990).
- 3) K. Takahashi, W. H. Stein and S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 242 4682 (1967).
- 4) F. Inagaki, Y. Kawano, I. Shimada, K. Takahashi, and T. Miyazawa, *J. Biochem.*, 89 1185 (1981).

NMRによる常磁性ヘムタンパク質の磁化率テンソルの主軸の決定と活性部位の構造解析

(東工大・生命理工) ○山本泰彦、小森研治、七井謙成、井上義夫、

中條利一郎

NMR Determination of the Principal Magnetic Axes in Horse Heart Ferrocycytochrome-c
Yasuhiko Yamamoto, Kenji Komori, Norishige Nanai, Yoshio Inoue, and Riichirô Chûjô
Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology

The principal magnetic axes in horse heart ferrocycytochrome-c have been determined using MATDUHM (Magnetic Anisotropy Tensor Determination Utilizing the Heme Methyls) (Y. Yamamoto et al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1556-1557(1990); *Eur. J. Biochem.*, 198, 199-306(1991)). The pseudo-contact shifts of NMR resonances in this protein have been calculated from the obtained magnetic axes and the reported X-ray structure (G.W. Bushnell et al. *J. Mol. Biol.*, 214, 585-595 (1990)) and the calculated values were compared with the observed shifts, i.e. the chemical shift difference between the corresponding resonances in ferri- and ferro-forms (Y. Feng, Ph. D. dissertation, Univ. of Penn. (1989)). For the main-chain proton resonances, the two values agreed within 0.3 ppm.

はじめに

常磁性ヘムタンパク質のヘム近傍のアミノ酸残基に由来するNMRシグナルは、
不対電子との双極子相互作用により擬コンタクトシフト (δ_{pc} , (1)式)する。

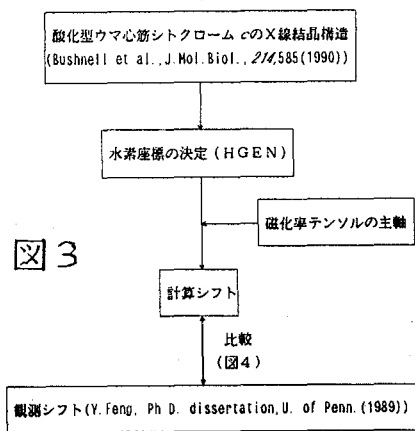
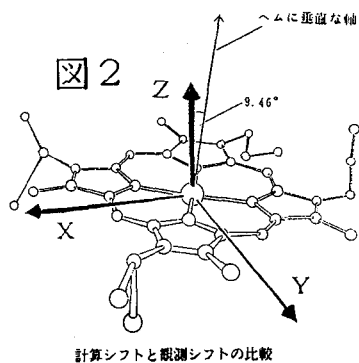
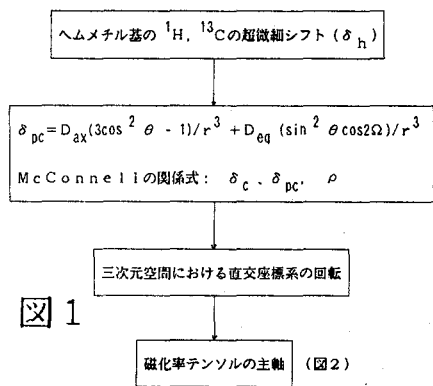
$$\delta_{pc} = D_{ax} (3\cos^2 \theta - 1)/r^3 + D_{eq} (\sin^2 \theta \cos 2\Omega)/r^3 \quad (1)$$

(r , θ , Ω)は、磁化率テンソルの主軸に関する核の極座標、 D_{ax} 、 D_{eq} は、
テンソルの軸成分により決まる量である。したがって、磁化率テンソルが決定でき
れば、NMRにより不対電子と核の空間的な位置関係が求まることになる。

多数のNMRシグナルについて δ_{pc} を測定し、X線結晶構造をもとにしてそれぞ
れの δ_{pc} を(1)式で満足させる直交座標(つまりテンソルの主軸)を最小二乗法
により決定することは、原理的には可能であり、NMRによるヘムタンパク質の磁
化率テンソルの唯一の決定法であると考えられていた。そして、近年になっていく
つかのヘムタンパク質に対して、この方法によるテンソルの主軸の決定が報告され
ている(Emerson & La Mar, *Biochemistry*, 29, 1556(1990); Feng et al., *Bio-
chemistry*, 29, 3494(1990); Veitch et al., *FEBS Lett.*, 269, 297(1990))。ただ
し、この方法には、試料のX線結晶構造が不可欠であるという制約がある。

MATDUHM (Magnetic Anisotropy Tensor Determination Using the Heme
Methyls)は、ヘムタンパク質のヘム近傍の構造解析を目的とし、NMRだけから
磁化率テンソルの主軸の配向を決定するための方法である(Yamamoto et al., *J.
Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1556(1990), *Eur. J. Biochem.*, 198, 299(1991))。今回は、
キーワード:ヘムタンパク質、超微細シフト、磁化率テンソル

やまもとやすひこ、こもりけんじ、なないのりしげ、いのうえよしお、
ちゅうじょうりいちろう

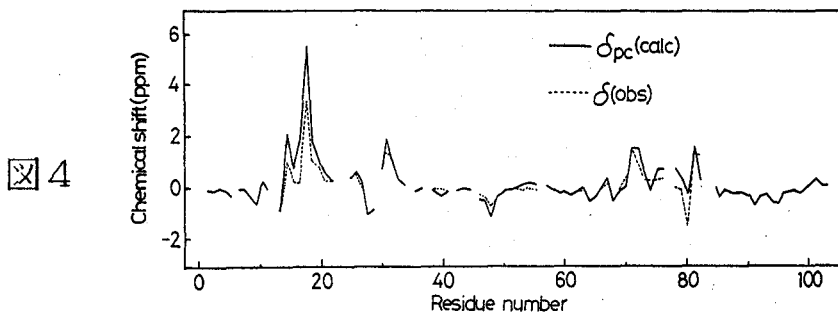


酸化型ウマ心筋シトクローム c の磁化率テンソルの主軸を MATDUHM により求めた結果について報告する。

結果と考察

MATDUHM の手順を図 1 に示した。鉄三価低スピン状態の常磁性ヘムタンパク質のヘムメチル炭素の NMR シグナルの帰属には、 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ シフト相関二次元 NMR 法が有効である。次に、(1) 式と McConnell の関係式を考慮し、ヘム鉄 (あるいは、4 つのピロール N の重心) の位置を原点とする直交座標を空間のあらゆる方向に回転させ最良の配向を決定する。酸化型ウマ心筋シトクローム c に対して得られたヘムに対する磁化率テンソルの主軸の配向を図 2 に示した。

δ_{PC} の計算値は、図 3 に示したようにして求めた。HGEN とは、重原子の座標をもとにして水素座標を計算するプログラムである (C-H 結合長 = 0.1 nm と仮定する)。図 4 に Gly 残基を除いたすべての残基の C_αH の計算値と実験値をアミノ酸配列に対してプロットした。コンタクトシフトの寄与が無視できないアミノ酸残基 (Cys 14, Cys 17, His 18, Met 80) 以外については両者の値の一致は良く、このタンパク質については主鎖の Folding に関しては溶液中、単結晶中の両状態ではほぼ同じであることがわかった。



(関西医大・化学) ○藤井 茂、黒田 記代、三浦 洸

Interaction of Old Yellow Enzyme with Cytochrome c

Shigeru FUJII, Kiyo KURODA and Retsu MIURA

(Laboratory of Chemistry, Kansai Medical University)

Old yellow enzyme (OYE) from Brewer's yeast was reconstituted with ^{13}C -enriched FMNs and 8-demethyl-8-fluoro-FMN. Interaction of the reconstituted OYEs with cytochrome c was investigated by F-19 and C-13 NMR spectroscopy. By the complex formation between these proteins, 8- ^{19}F and 2- ^{13}C NMR signals shifted to higher fields by 2.0 and 0.2 ppm, respectively, whereas 4-, 4a-, 10a- ^{13}C NMR signals shifted to lower fields by 0.1, 0.5 and 0.3 ppm, respectively. On the basis of the titration curve of OYE with cytochrome c, the dissociation constant was estimated to be 0.3 mM.

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

今回用いた旧黄色酵素(OYE)は、ビール酵母より精製されたもので、分子量49000のサブユニットあたり1分子のフラビンモノヌクレオチド(FMN)を補酵素に持つ。われわれは、フラビン環の8位のメチル基をフッ素で置換した8F-FMNを活性域プローブとして用いた実験などから、OYEの活性域近傍の構造およびアミノ酸残基に関して、同じFMNを補酵素として持つフラボドキシンとの間に、多くの類似性が存在することを示してきた。フラボドキシンと電子受容体であるシトクロムcとの相互作用は、反応動力学的によく調べられている。われわれは、フラボドキシンとOYEの相同性に注目し、OYEからシトクロムcへの電子伝達機構を知るために、両タンパク質間の相互作用について調べた。

【実験】 図1に示した8位のメチル基をフッ素で置換した8F-FMNおよび2-, 4-, 4a-, 10a-の炭素をそれぞれC-13で標識したFMNを文献記載の方法で化学合成した。これらのFMNで再構成したOYEとシトクロムcとの相互作用を、UNITY-400 NMR装置を用いて、F-19, C-13 NMR測定することにより調べた。測定に用いたOYEは、25 mM

C-13, F-19, NMR, Flavin, electron transfer

ふじい しげる、くろだ きよ、みうら れつ

リン酸緩衝液（重水溶液、pH 7.9）に溶解され、その濃度は、0.7 mM程度であった。化学シフトは、C-13およびF-19の外部標準としてそれぞれ TSPのメチルシグナルと NaFの F-19シグナルを用いた。測定温度は、22~23 °Cであった。

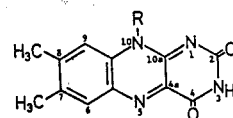


図1. FMNのフラビン環の構造

【結果と考察】 8F-FMNで再構成したOYEにシトクロムc溶液を加え滴定したところ、図2に示すように8F-FMNのF-19 NMRシグナルは、シトクロムcの添加に伴い高磁場側にシフトした。この結果は、OYEもフラボドキシン同様シトクロムcと複合体を形成することを示しており、このF-19 NMRシグナルの変化から、OYEとシトクロムcとの複合体の解離定数は0.3 mMと求められた。また、この滴定曲線からOYEの8F-FMNのF-19 NMRシグナルは、シトクロムcとの複合体形成に伴い、2.0 ppm高磁場側にシフトすることも明らかとなった。

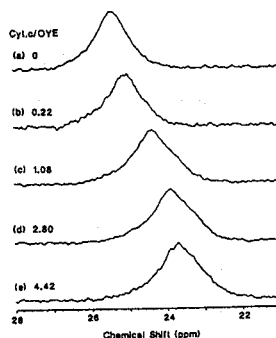


図2. シトクロムcによる8F-FMN-OYEのF-19 NMRのスペクトル変化

一方、C-13標識FMNで再構成したOYEのC-13 NMRシグナルもF-19 NMRシグナルと同様にシトクロムcの添加に伴いそれぞれシフトした。2-, 4-, 4a-, 10a-位のC-13 NMRシグナルは、遊離のOYEにおいてそれぞれ 161.93, 165.65, 138.19, 154.38 に観測され、シトクロムcの滴定から、シトクロムcとの複合体での化学シフトは、それぞれ 161.75, 165.73, 138.67, 154.63 と求められた（表1）。これらの結果は、2位のC-13 NMRシグナルを除き、シトクロムcとの複合体形成に伴い8位のフッ素シグナルとは逆にそれぞれ低磁場側にシフトしていることを示している。この低磁場側へのシフトは、あまり大きくはないが、OYEとフェノール化合物との電荷移動複合体では、これらのNMRシグナルのほとんどすべてが高磁場側にシフトする結果と関連して興味深い（表1）。

シトクロムcとの複合体形成に伴うこれらのNMRシグナルの変化は、シトクロムcの常磁性効果では説明できず、複合体形成によるフラビン分子の電子状態の変化をより強く反映しているものと考えられる。これらの考察から、得られた結果は、OYEがシトクロムcとの結合により、フラビン環のウラシル部分の相対的な電

表1 C-13 and F-19 Chemical Shifts of FMN bound to OYE

	2- ¹³ C	4- ¹³ C	4a- ¹³ C	10a- ¹³ C	8- ¹⁹ F
OYE	161.93	165.65	138.19	154.38	25.4
OYE+Cyto.c	161.75	165.73	138.67	154.63	23.4
OYE-Cyto.c -OYE	-0.18	0.08	0.48	0.25	-2.0
OYE-PBP -OYE	-0.51	-0.95	-3.69	0.00	-4.1

PBP, p-bromophenol

子密度の低下と8位のフッ素シグナルの高磁場シフトにみられるようなキシレン部分の電子密度の上昇によると解釈される。フラボドキシンからシトクロムcへの電子伝達がフラビン環のキシレン部分のメチル基を介して行われることを示唆する Tollin らの結果や OYEに結合したFMNのキシレン部分がタンパク質表面近くに位置しているという我々の以前の実験結果を総合して、今回得られた結果から次のような電子伝達促進の仮説が考えられる。すなわち、OYEに電子受容体であるシトクロムcが結合することにより、フラビン環の電子密度分布がウラシル部分からキシレン部分に移動し、この複合体形成がキシレン部分から電子受容体への電子伝達を容易にしている。

¹H-NMRによるタンパク質溶液→ゲル変換における水構造変化の研究

¹藤田保衛大・衛・生理, ²岐阜大・医・生理, ³稲沢市民病院・臨床病理,

⁴生理研, ⁵京大・理・化

○曾我美 勝¹, 恵良聖一², 桑田一夫², 加藤一夫³, 岩間 亨², 今井 一²,
中上 寧¹, 巨 弘⁴, 赤坂一之⁵

Cross-relaxation studies on water structure in bovine plasma albumin gel (BPA^a-gel) and solution

¹Dept. of Physiol., Sch. of Health Sci., Fujita Health Univ., ²Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., ³Dept. of Clin. Med., Inazawa City Hosp., ⁴Dept. of Mol. Physiol., Natl. Inst. for Physiol. Sci., ⁵Dept. of Chem., Fac. of Sci., Kyoto Univ.

M. Sogami¹, S. Era², K. Kuwata², K. Kato³, T. Iwama², H. Imai², Y. Nakagami¹, H. Watari⁴, K. Akasaka⁵

Cross-relaxation phenomena in bovine plasma albumin gel (BPA^a-gel) and solution were studied using the saturation transfer (SAT) and inversion recovery (INV) methods of Akasaka (1981, 1983). (1) There were fast and slow intramolecular cross-relaxation times ($T_{1s,r}$, $T_{1s,s}$) between irradiated and observed protein protons in BPA^a-gel. $T_{1s,r}$ components (1/10 ~ 1/20 of $T_{1s,s}$) were detected only by SAT in BPA^a-gel. Intramolecular cross-relaxation processes in solution, obtained by SAT and/or INV were a single kind of T_{1s} , corresponding to $T_{1s,s}$ in BPA^a-gel. (2) $T_{1s,r}$ components in BPA^a-gel might contribute intermolecular cross-relaxation process from protein to water (T_{1s} (HDO)), resulting in T_{1s} (HDO) in BPA^a-gel being far less than that in solution above 10.5 %.

はじめに 市販ウシ血漿アルブミン(BPA)は微量のプロテアーゼを含み、この酵素はpD 4.0 (F型構造)においてGln-392とCys-435間のペプチド鎖を1~2個所切り、BPA(66K)→BPA^a(66K)→BPA^{a*}(63K)を生成する。BPA^a, BPA^{a*}の混合物は4.5%以上でD₂O(pD 4.0)中において透明なゲル(BPA^aゲル)になる。非常に精製したウシ・メルカプトアルブミン(BMA)は上述の酵素を含まず12.5%でもゲル化しない。溶液→ゲル変換において水分子の T_1 , T_2 は短縮し、特にタンパク質より水への交差緩和時間(T_{1s} (HDO))は著しく短縮した。また $1/T_{1s}$ (HDO) vs 濃度(W%)プロットにおいて、ゲルの $1/T_{1s}$ (HDO)は、10.5%以上で急峻に増加し、Akasaka(1981, 1983)(1)のインバージョン・リカバリー法で求めた分子内交差緩和時間(T_{1s})よりも短縮した。この機序について検討を加えた。

タンパク質溶液・ゲル変換, 水構造, 分子内交差緩和現象, 分子間交差緩和現象

曾我美 勝, 恵良聖一, 桑田一夫, 加藤一夫, 岩間 亨, 今井 一, 中上 寧, 巨 弘,
赤坂一之

実験材料及び方法 BPA^{*}ゲルおよびBMA溶液はSogamiら, Eraらの方法により作製した(2)。Bruker社WM 360wbまたはAMX 360wb型を用い T_1 , T_2 , T_{1s} , $T_{1s}(HDO)$ を測定した。 T_{1s} , $T_{1s}(HDO)$ はAkasaka(1)の飽和移動法(SAT法), インバージョン・リカバリー法(INV法)を用い, -2.45, 7.13, 8.65 p.p.m.などに $\gamma H_2/2\pi$ 単位で64~107 Hzの f_2 照射を与えた。

実験結果と考察 (I)BMA溶液, BPA^{*}ゲル中の水分子の T_1 , T_2 値を比較すると, 何れもゲル化により短縮した(図 1)。 $1/T_1(HDO)$ vs $W(\%)$ を用い推定したBPA^{*}ゲルの結合水量はBMA溶液の数倍であった。7.13 p.p.m., $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz (図 2)または8.65 p.p.m., $\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hzの f_2 照射により求めた $1/T_{1s}(HDO)$ vs $W(\%)$ (図 2)は, 溶液, ゲル状態で特に著しい差を示した。BPA^{*}ゲルの $T_{1s}(HDO)$ はSAT法, INV法の何れでも, ほぼ同一の値であった。また, 10.5 %以上では $T_{1s}(HDO)$ はINV法より求めたタンパク質分子内交差緩和時間(表1参照)よりも短縮した。一般にタンパク質より水への $T_{1s}(HDO)$ は T_{1s} より長いはずである(3)。この結果は, BPA^{*}ゲル中の速い分子内交差緩和現象がINV法で測定出来ないことを示唆しているのだろう。このためI項の測定をした。

(II)BPA^{*}ゲル中の T_{1s} をSAT法とINV法を用いて測定すると, 図 3A(BPA^{*}ゲル, 11.87 %, pD 4.01, 0.10 M Cl⁻; f_2 照射, 7.13 p.p.m., $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz)に示すように, SAT法では速い成分($T_{1s,r}$)と遅い成分($T_{1s,s}$)の2成分よりなり, $T_{1s,r}$ は $T_{1s,s}$ の1/10~1/20, 速い成分の比率は ~ 0.2 であった(表 1参照)。Akasakaら(4)は T_{1s} は分子全体の回転相関時間にはほぼ逆比例すると報告している。BPA^{*}ゲル中における $T_{1s,r}$ はBPA^{*}分子の2次結合による安定な大きい分子集合体の生成によるのだろう。INV法ではBPA^{*}ゲルは, SAT法の $T_{1s,s}$ に対応したほぼ1成分の T_{1s} 値のみを示した(図 3B, 表1参照)。BMA溶液(pD 4.0, 0.10 M Cl⁻)ではSAT法, INV法の何れでも, T_{1s} はBPA^{*}ゲルの $T_{1s,s}$ に対応した1成分のみであった。

(III)BPA^{*}ゲルにおけるSAT法, INV法による T_{1s} 測定の差異は, 図 4に示す機序によるのだろう。図中の T_1^* は一般に $1/T_1^* = 1/T_1 + 1/T_{1s}$ の関係がある。仮にS, Iスピン系があり, Sスピン系を f_2 照射すると, 図 4上段に示すように, 直ちに飽和し, ついで観測するIスピン系に, 図 4に示す式のように飽和移動する。この際仮に, Iスピン系に交差緩和の速い系($I_{s,r}, T_{1s,r}^*$)と遅い系($I_{s,s}, T_{1s,s}^*$)があるとすると, SAT法では $T_{1s,r}^*$, $T_{1s,s}^*$, 即ち $T_{1s,r}$, $T_{1s,s}$ の観測は可能であろう。しかしながら, INV法では, 観測されるIスピン系の時間変化の大部分は遅い成分($T_{1s,s}^*$, 即ち $T_{1s,s}$)よりなり, 分子内交差緩和時間は $T_{1s,s}$ に対応したほぼ1成分となるのであろう。BMA溶液ではBPA^{*}ゲルのように分子集合体がなく, SAT法, INV法の何れでも T_{1s} は1成分となるのだろう。

(IV)BPA^{*}ゲルの $T_{1s}(HDO)$ は5~12 %にわたり, SAT法, INV法の何れでも1成分で, ほぼ同一の値を示した。タンパク質の特定の側鎖を f_2 照射すると, その部位が飽和し→分子内スピン拡散→結合水へスピン拡散→化学交換により自由水へ飽和移動する(3)。図 5はBPA^{*}ゲルを用い $\gamma H_2/2\pi \sim 64$ Hz, 15秒各部位を f_2 照射したときのHDOへの飽和移動のアクション・スペクトルを示す。図 5の結果も前述の説明に一致するのだろう。BPA^{*}ゲルの T_{1s} に $T_{1s,r}$, $T_{1s,s}$ の2成分があるが, $T_{1s}(HDO)$ が1成分であることは興味深い点である。図 4に示した $T_{1s,r}$ 成分が水への交差緩和において主役であることを示唆している。このため, 10 %以上のBPA^{*}ゲルにおいて, $T_{1s,s} > T_{1s}(HDO) > T_{1s,r}$ となるのであろう。言うまでもなく, BPA^{*}ゲルにおける結合水量の増加も, タンパク質より水への交差緩和速度の増加に役立っているのだろう。

文献 (1) Akasaka, K., J. Magn. Resonance 45, 337 (1981) ; Akasaka, K., *ibid.*, 51, 14 (1983) (2) Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S. et al., Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130 (1986) ; Era, S., Sogami, M., Kuwata, K. et al., *ibid.*, 33, 214 (1989) ; Era, S., Kato, K., Sogami, M. et al., Biomed. Res. 7, Suppl. 2, 41 (1986) (3) Akasaka, K., J. Magn. Resonance 36, 135 (1979) (4) Akasaka, K., Ishima, R., Shibata, S., Physica B 164, 163 (1990)

TABLE 1 Cross-relaxation times (T_{IS}) of side chains ($-\text{CH}_3$, $\xi\text{-CH}_2$ of Lys, and aromatic protons (7.13 p.p.m.)) of BPA* in the gel state (0.10 M Cl^- , pD 4.0 before gelation), obtained by the saturation transfer and inversion recovery (T_{IS} values given in brackets) methods

Conc. (%)	f_2 (p.p.m.)	$\gamma\text{H}_2/2\pi$ (Hz)	SLOW CROSS-RELAX.				I_{∞}/I_0	FAST CROSS-RELAX.				$f(\text{FAST})^b$
			$-\text{CH}_3$	Lys	Arom	$T_{IS,s}$ (SEC)		$-\text{CH}_3$	Lys	Arom	$T_{IS,f}$ (SEC)	
11.87	7.13	69	1.39	1.35		0.67	0.12	0.12		0.15	0.21	
			(1.06	1.35) ^c								
10.42	7.13	69	0.90	0.96		0.57	0.12	0.12		0.16	0.26	
			(0.94	1.15) ^c								
8.85	7.13	69	1.33	1.43		0.66	0.13	0.12		0.07	0.24	
			(1.21	1.54) ^c								
8.85	-2.45	107	1.11	1.27	1.21	0.62	0.19	0.11	0.10	0.27	0.28	
			(1.16	1.47	1.56) ^c							
11.87	-2.45	107	1.52	1.43	1.11	0.69	0.10	0.07	0.08	0.06	0.21	
11.87	-2.45	135	0.87	0.92	0.68	0.56	0.07	0.07	0.04	0.10	0.28	

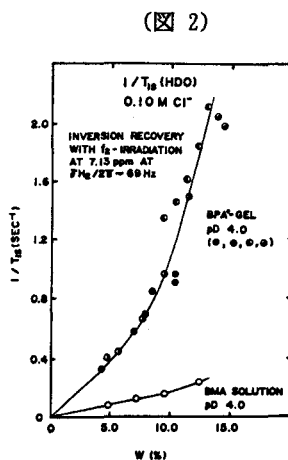
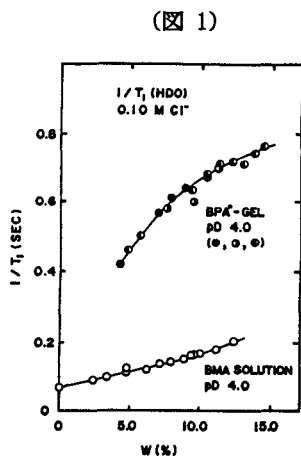
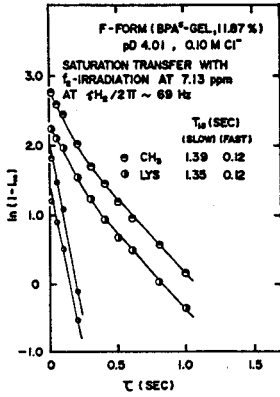


図 1 ウシ血漿アルブミン(BMA)溶液, BPA*ゲル中のHDOの $1/T_1$ vs W(%)。

図 2 ウシ血漿アルブミン(BMA)溶液, BPA*中の $1/T_{IS}$ (HDO) vs W(%) (f_2 照射 : 7.13 p.p.m., $\gamma\text{H}_2/2\pi \sim 69 \text{ Hz}$, 25°)。

(図 3A)



(図 3B)

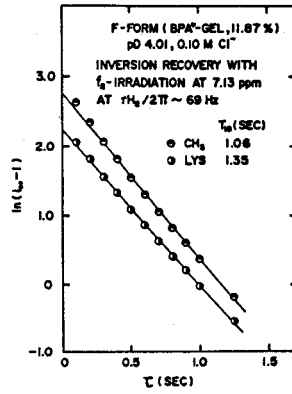
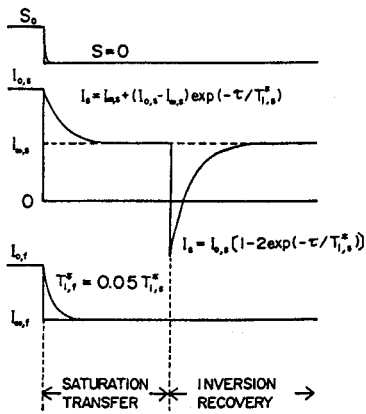


図 3 BPA⁺ゲル(11.87%, pD 4.0, 0.10 M Cl⁻)の飽和移動法(A), インバージョン・リカバリー法(B)による測定(f₂照射 : 7.13 p.p.m., γH₂/2π ~ 69 Hz, 25°)。

(図 4)



(図 5)

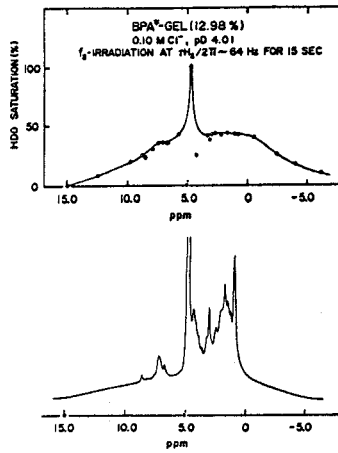


図 4 交差緩和時間(T_{1s})測定法の模式図。

図 5 BPA⁺ゲルの¹H-NMRスペクトル(下段)とBPA⁺よりHDOへの飽和移動のアクション・スペクトル(下段, f₂照射 : γH₂/2π ~ 64 Hz, 15秒, 25°)。

(東北大・理¹, サントリー生医研², 東北大・医³, ポーラ化成新薬研⁴)
 ○ 田中 俊之¹, 高橋 和信¹, 鈴木 敏夫¹, 平間 正博¹, 上野 昌子¹,
 今城 精一², 石黒 正路², 水柿 道直³, 江戸 清人³, 小松 秀雄⁴

Molecular Recognition in the Neocarzinostatin Complex

Toshiyuki Tanaka¹, Kazunobu Takahashi¹, Toshio Suzuki¹, Masahiro Hiram¹, Masako Ueno¹, Seiichi Imajo², Masaji Ishiguro², Michinao Mizugaki³, Kiyoto Edo³, and Hideo Komatsu⁴

¹Faculty of Science, Tohoku University, ²Suntory Institute for Biomedical Research, ³Tohoku University Hospital, ⁴POLA Pharmaceutical R & D Laboratory

2D-NMR Studies on neocarzinostatin complex, which is composed of a nonprotein chromophore and an apoprotein, have revealed that the hydrophobic pocket formed by the internal four-strand β-sheet of apoprotein binds NCS-chr with the conformation in which its naphthoate moiety sits on the bottom of the pocket and the aminosugar and the carbonate group face outwards. It indicates that the interaction between the pocket and the naphthoate is essential for the chromophore binding, and that the chromophore would be stabilized by the steric hindrance to the active center C12 of the core, which is caused by the protonated methylamino group of the aminosugar as well as the apoprotein.

【序】ネオカルジノスタチン (NCS) は、*Streptomyces carzinostaticus* var. F-41が産生する強力な抗癌剤であり、ラジカルを発生しDNA切断活性を有するクロモフォア (1) と、アミノ酸113残基からなるアポタンパク (アポNCS) から構成されている (図1)。このアポNCSは、単独では非常に不安定なクロモフォアを特異的にしかも強く結合して安定化する役割と、キャリアーとしての機能を果たしていると考えられている。その結合構造と安定化機構の解明は、分子認識の観点から非常に興味深い。今日まで、NCS複合体の低分解能X線結晶解析¹⁾、アポ

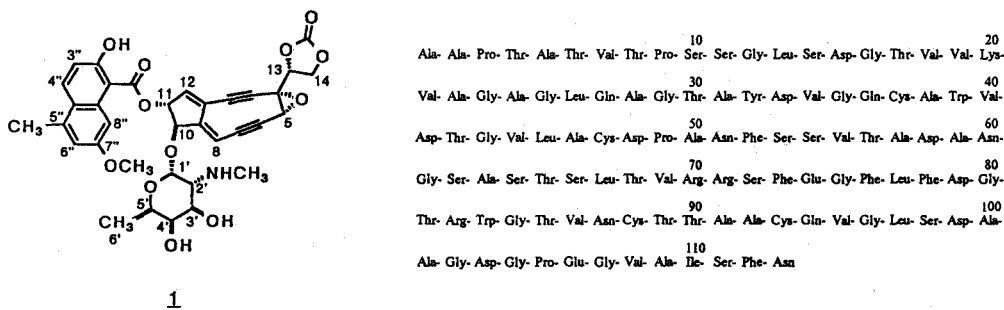


図1. ネオカルジノスタチン・クロモフォアの構造 (左) とアポタンパクのアミノ酸配列 (右)

ネオカルジノスタチン, クロモフォア, 二次元NMR, 分子認識

たなか としゆき, たかはし かずのぶ, すずき としお, ひらま まさひろ,
 うえの まさこ, いまじょう せいいち, いしぐろ まさじ, みずがき みちなお,
 えど きよと, こまつ ひでお

NCSのCDおよび二次元NMRによる二次構造の解明^{2,3)}が行われてきたが、クロモフォアの結合部位を含めたNCS複合体の詳細な高次構造は明らかにされていない。我々は既にコンピューター・モデリングによる予測を報告した⁴⁾。二次元NMRを用いたNCS複合体の構造解析⁵⁾によって得られた知見について報告する。

【方法】NCS複合体の1 mM (重水) および5 mM (軽水) の溶液 (pH 4.0) をNMR試料として用いた。測定はBruker AM600装置を使用して30℃および35℃で行い、DQF-COSY, HOHAHA (混合時間40~80 ms), NOESY (混合時間200 ms) スペクトルを純位相モードで測定した。また、軽水ピークの除去は通常のpre-saturation法を用いた。

【結果と考察】タンパク由来のシグナルのスピンの同定、連鎖帰属は常法⁶⁾に従い、全ての主鎖のプロトンと、94%以上の側鎖プロトンの帰属を行った。クロモフォア由来のシグナルに関してもすべての帰属が終了している。主鎖プロトン間のロングレンジNOE、交換の遅いアミドプロトンから、二次構造 (図2) およびその折りたたみを予測した。アポNCS単独の解析結果^{3,7)}と比較すると、クロモフォアとの結合による大きな構造変化はタンパク主鎖部分に引き起こされていない。同一条件で測定したアポNCS単独のシグナル帰属⁷⁾と比較すると、Asp33~Ser53, Phe76~Gly84, Cys93~Val108の主鎖あるいは

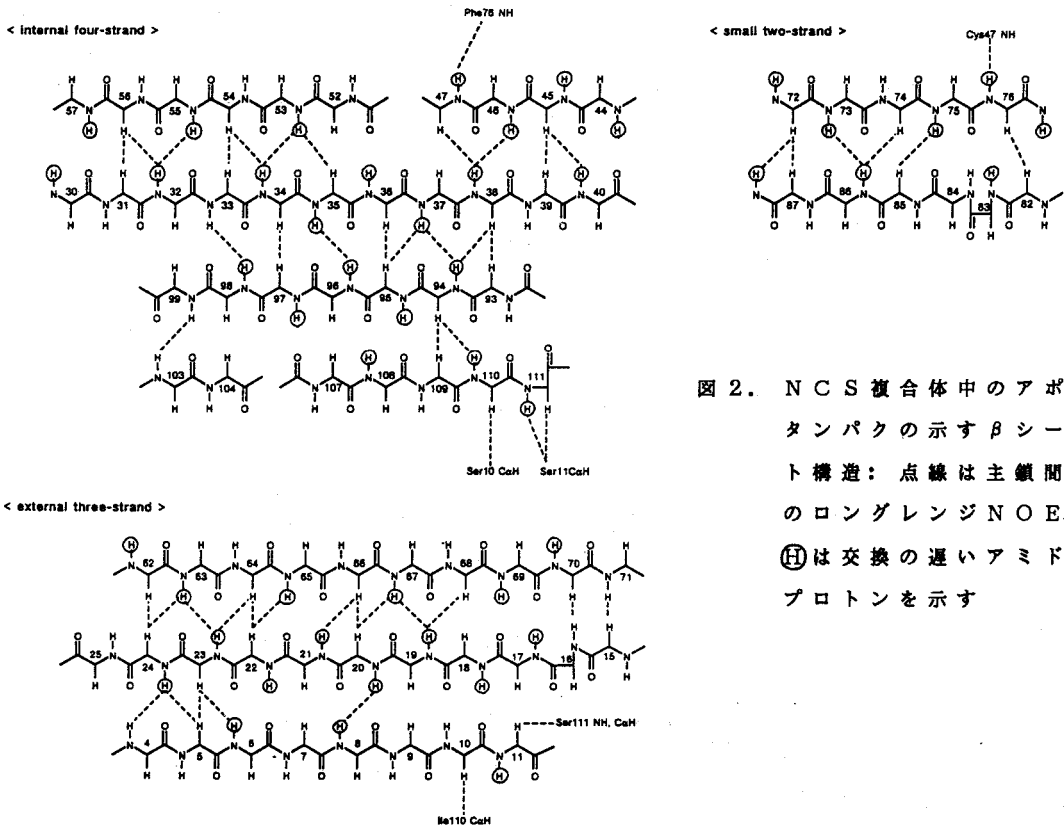


図2. NCS複合体中のアポタンパクの示すβシート構造: 点線は主鎖間のロングレンジNOE、Ⓜは交換の遅いアミドプロトンを示す

側鎖の一部のプロトンが0.1 ppm以上の大きな高磁場あるいは低磁場シフトを示している。これらのアミノ酸に囲まれた部位にクロモフォアが結合していると考えられる。この部位は、コンピューター・モデリングより予測したクロモフォア結合部位⁴⁾に対応している。

クロモフォアの疎水部分であるナフトエート部位とコア（ジエンジン骨格）にアポタンパクとの間の分子間NOEが多く観察されているが、親水部分であるアミノ糖とカルボネート部位には余り見られない。コンピューター・モデリングによって得られたアポタンパクの構造を基に、これらの分子間NOEからディスタンス・ジオメトリー法でクロモフォアの結合部位および結合構造を求めた（図3）。ナフトエートがゆりかご状のアポNCSの内側βシートからなる疎水性ポケットの底に位置し、アミノ糖とカルボネートがポケットの入口を塞ぐように結合していることが明らかとなった。このことから、ナフトエートがクロモフォアとアポタンパクの強い結合に重要な役割を果たしていることが予想される。これは、クロモフォアモデル化合物（2～5）が、アミノ糖の有無にかかわらず、アポNCSと強い結合定数を有することからも支持された（図4）。ナフトエートとTrp39の側鎖芳香環との間に分子間NOEが見られ、両者が近接していることがわかった。しかし、ディスタンス・ジオメトリーから得られた構造では、両者の相対配置はπスタッキングに適していない（図3）。アポNCS単独においてTrp39の側鎖芳香環により遮蔽され高磁場シフトを示していたLeu45のメチル基が、クロモフォアの結合によりさらに1.0 ppm近く高磁場にシフトする（図5）。これが単にナフトエートによる遮蔽の上乗せの結果か、あるいはTrp39の側鎖芳香環を含むアポタンパク側鎖の構造変化によるものなのかはまだ明らかでない。ナフトエートとアポタンパク間の詳細な結合構造と相互作用について更に検討中である。

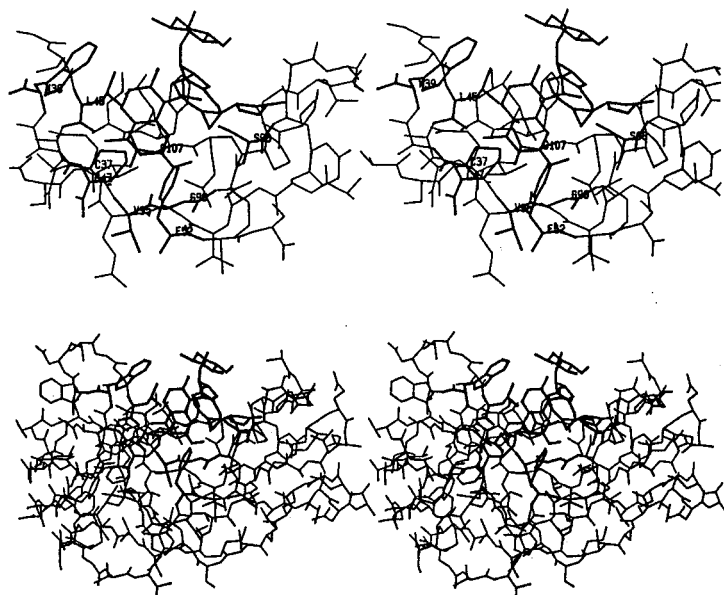


図3. NCS複合体の構造（上：クロモフォア結合部位拡大図，下：全体図）

アミノ糖のメチルアミノ基は、Ala101およびGly102と分子間NOEを示し、Asp99~Asn103からなる親水性のループ構造と近接している。また、コアのC5位のプロトンは、Phe76との間に分子間NOEを有し、Phe76~Arg82からなる疎水性の高いループ構造と近い。それぞれイオン性相互作用と疎水性相互作用がクロモフォアをおさえる役割を果たしている。

ディスタンス・ジオメトリーから、アミノ糖のメチルアミノ基（アンモニウム塩）が、クロモフォアの活性化部位のC12位をおおう空間配座をとっていることも明らかとなった。求核剤やラジカルの攻撃から保護していると思われる。これが会合によるクロモフォア安定化要因の一つと考えられる。また、活性なエポキシドは、アポタンパクポケットの底に面しており、酸触媒の攻撃から保護されている。一方、コンピューター・モデリングほどではないが⁴⁾、Cys37とCys47のジスルフィド結合がクロモフォアのコアの三重結合に近い。単なる疎水性相互作用ばかりでなく、軌道相互作用による安定化機能も果たしている可能性がある。

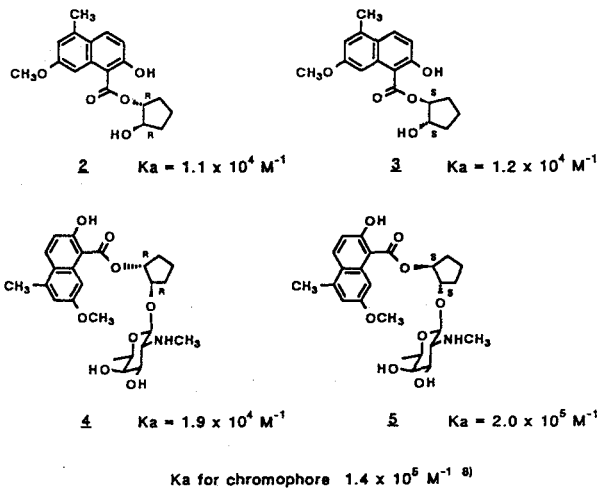


図4. クロモフォアモデル化合物とそれらの示すアポNCSとの結合定数

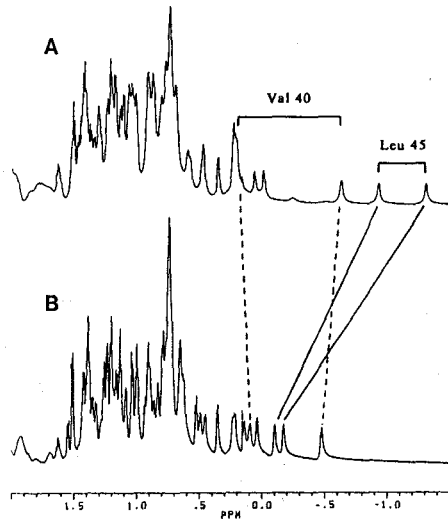


図5. A: NCS複合体, B: アポNCSの一次元NMRスペクトル

【参考文献】

- 1) L.C.Sieker, L.H.Jensen, T.S.A.Samy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 358 (1976).
- 2) K.Saito, Y.Sato, K.Edo, Y.A.-Murai, Y.Koide, N.Ishida, M.Mizugaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3078 (1989).
- 3) M.L.Remerowski, S.J.Glaser, L.C.Sieker, T.S.A.Samy, G.P.Drobny, *Biochemistry*, **29**, 8401 (1990); E.Adadj, J.Mispelster, E.Quiniou, J.-L.Dimicoli, V.Favaudon, J.-M.Lhoste, *Eur. J. Biochem.*, **190**, 263 (1990).
- 4) M.Ishiguro, S.Imajo, M.Hirama, *J. Med. Chem.*, in press.
- 5) T.Tanaka, M.Hirama, M.Ueno, S.Imajo, M.Ishiguro, M.Mizugaki, K.Edo, H.Komatsu, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 3175 (1991).
- 6) K.Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York. 1986.
- 7) T.Tanaka, M.Hirama, unpublished results.
- 8) K.Edo, K.Saito, Y.A.-Murai, M.Mizugaki, Y.Koide, N.Ishida, *J. Antibiot.*, **41**, 554 (1988).

カプトガニ血球由来抗菌ペプチド Tachyplesin I とリポ多糖 (LPS) の相互作用

(九大菌・理*) ○河野敬一、牟田達史*、関典昭*、寺田善博、岩永貞昭*

Interaction of lipopolysaccharide with antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab

Keiichi Kawano, Tatsushi Muta, Noriaki Seki,

Yoshihiro Terada, and Sadaaki Iwanaga

(Faculty of Dentistry and Faculty of Science, Kyushu University Fukuoka, Japan)

Tachyplesin I is an antimicrobial cationic peptide of 17 residues found in the hemocyte debris of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). It takes on a fairly rigid conformation constrained by two disulfide bridges and adopts a conformation consisting of an anti-parallel β -sheet connected by a β -turn. Tachyplesin I forms a complex with bacterial lipopolysaccharide (LPS). The interaction of tachyplesin I with LPS in DMSO solution was studied by ^{31}P -NMR.

LPS (リポ多糖、エンドトキシン) は、グラム陰性菌外膜表層に存在する菌体成分であり、多くの細胞や生体成分に結合して、発熱性のほかエンドトキシンショック、致死、炎症、Schwartzman 反応、免疫増強作用や凝固-補体系の活性化など生体にとって有害な作用と有益な作用の両面にわたる多彩な活性を持っている。LPS の作用機作を理解する上でLPS と生体成分の結合様式の研究は重要であると思われるが、LPS はミセルを形成しその分散状態により活性が変化するなど困難な点が多い。tachyplesin I はカプトガニ血球から得られるアルギニンを多く含む抗菌性ペプチドであり、LPS によるカプトガニ血球凝固反応 (リムルス反応) を阻害することからアガロースゲルを用いた二重拡散の実験が行われ、tachyplesin I とLPS は複合体をつくることが確認されている。また β シート型の骨格構造をとり、側鎖は両親媒性の配向をしている¹⁾。17残基からなるこのペプチドは低分子でありながらリジッドな構造をしており、更に (1)強塩基性である、(2)両親媒性である、(3)NH₂末端またはCOOH末端残基がブロックされている等のLPS結

タキプレシン、カプトガニ、リポ多糖、ペプチド、LPS、リポドA、NMR

かわのけいいち、むたたつし、せきのりあき、てらだよしひろ、いわながさだあき

合性蛋白質・ペプチドに共通の性質²⁾を全て備えており、LPSとの相互作用を研究する上で優れたモデルであると思われる。一方、菌体成分としてのLPSは不均一な混合物であるので、多糖部を除いた活性部位(リピドA)を用い、なおかつ完全に均一な合成標品を使用した。

tachyplexin I はリン脂質とは結合するが、糖とは結合しないことがわかっており³⁾、LPS全体を用いずリピドAを相互作用の実験に用いることは妥当と考えられる。

(実験) リピドAは第一化学薬品KKのLA-14-PPを用いた。tachyplexin I はカプトガニ *Tachypleus tridentatus* 血球の酸抽出物より精製した。

(結果) リピドAのDMSO溶液の³¹P NMRスペクトルはリピドA分子中の2個のリン原子に対応して2本のピークを与えた。これにtachyplexin Iを加えていくとFig. 2に示すように、0.6 ppmの³¹Pシグナルがまず高磁場にシフトする。一方、2.6 ppmの³¹Pシグナルは最初ブロードニングするがシフトせず、さらにtachyplexin Iを加えていくと高磁場シフトすると共にシャープになる。以上の結果からリピドAの2個のリン酸基はtachyplexin Iとの相互作用において非等価であること、一方のリン酸基が優先的に相互作用することが示された。

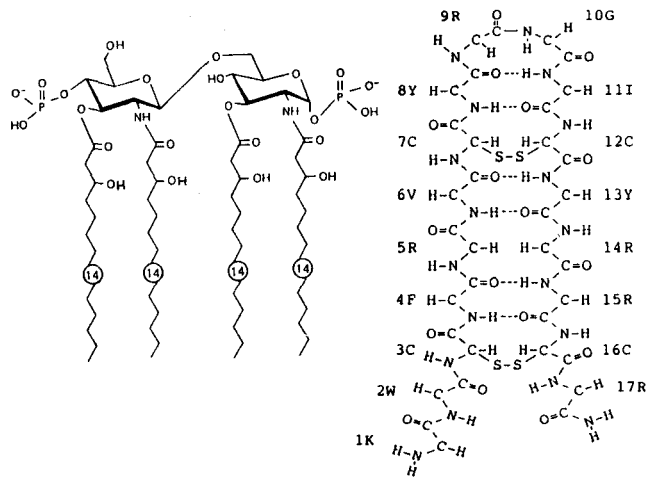


Fig. 1. The structure of lipid A (A-14-PP) (right) and the structure of tachyplexin I (left).

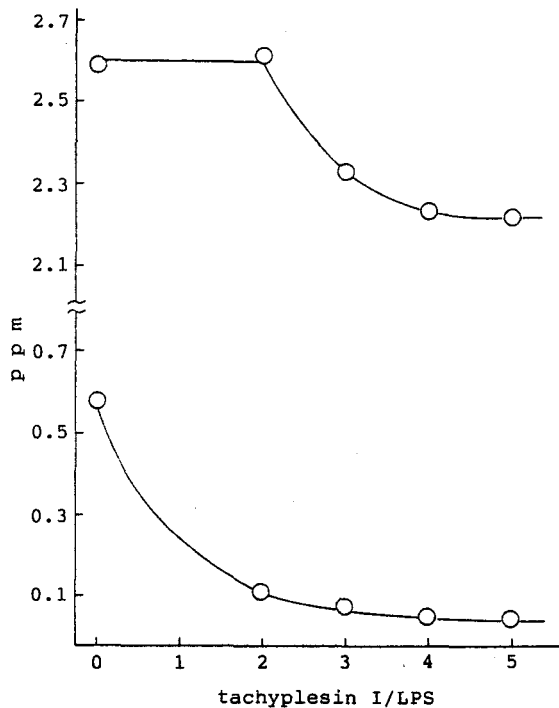


Fig. 2. Titration of lipid A with tachyplexin I in DMSO-d₆ at 30 °C.

1. K. Kawano, T. Yoneya, T. Miyata, K. Yoshikawa, F. Tokunaga, Y. Terada and S. Iwanaga, *J. Biol. Chem.* 265, 15365-15367 (1990)
2. 徳永文穆, 岩永貞昭, *代謝* 26, 429-439 (1989)
3. T. -C. Shieh, T. Kohzuma, N. G. Park, M. Ohno, T. Nakamura, S. Iwanaga and T. Yamamoto, *FEBS Lett.* 252, 121-124 (1989)

P31

LiDSミセル中でのrat-ANPの構造研究

○ 林 文晶, 渡辺国夫, 井上 健, 新 優, 照井彬弘 (塩野義研)

NMR study of rat-ANP(7-28) and its analogs in LiDS micelles.

F. Hayashi, K. Watanabe, K. Inouye, M. Shin, Y. Terui

(Shionogi Research Laboratories)

The interaction with LiDS micelles and conformational properties of rat-ANP(7-28) and its analogs(G9D-Ala, G9P, G9Sar) have been investigated using 2D NMR techniques. The micelle bound region of rat-ANP(7-28) were determined by the analysis of the chemical shift changes between aqueous and micelle condition and by the study of local environment of amide NH protons. The regions were Arg11 - Ile15 and Phe26 - Tyr28, which belong to the biologically essential region. The conformational effects of a point substitution, here at Gly9, were examined for the study of local environment around biologically essential residues. In this experiment we found two types of chemical shift change; one is large local changes and the other is wide-range minor changes. The former is intimately related with the change of biological activity and the latter is caused by the change of interaction with micelles. In the case of the substitution of Gly9 the change of the biological activity were originated from the conformational changes at Phe8 and Ile12.

〈序〉

心房性ナトリウム利尿ペプチドはNa利尿作用、平滑筋弛緩作用等を持つペプチドホルモンとして注目され、これまで、生物活性に必要な残基レセプターの同定及び作用機構等の生化学的諸性質から溶液中での立体構造に至るまで世界中で広く研究されている。これによると、Cys7 - Ile15部分に活性に不可欠な残基が集中し、C末付近も活性に大きく寄与しているらしい。また、distance geometry計算からは、いくつかの、turn様の折れ曲がりや伸びた構造、C末部分の折り返し構造の存在が示唆されているが、全体的には2次構造を持たずflexibleであると報告されている^{1,2)}。ANPとミセル、lipidとの相互作用に関しては、CD及びIRによる研究よりrandomからβ構造へ変化することが報告されており^{3,4)}、膜との相互作用のreceptor結合への寄与の可能性が示唆された。NMRでもrat-ANP(7-23)部分についてSDSミセル中での立体構造決定が行われており、DMSO中よりも少し折れ曲がりの多い構造が報告されている⁵⁾。

本研究では、rat-ANP(7-28)といくつかの9位置換アナログについてSDSのNa⁺をLi⁺に変えたLiDSミセル中での物性、構造解析を行い、ANPとミセルの相互作用部位及びそれと活性に不可欠な残基の位置関係等を明らかにしようと考えた。また、活性に大きく寄与しているGly9についても調べた。

key word: NMR, rat-ANP, LiDS micelles, interaction, conformation

はやし ふみあき, わたなべ くにお, いのうえ けん, しん まさる, てるい よしひろ

〈方法〉

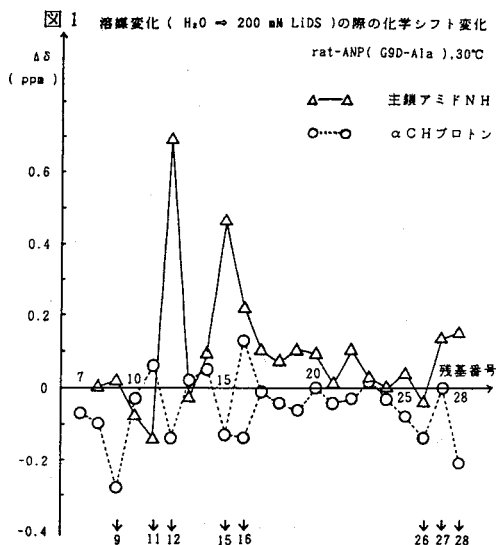
rat-ANP(7-28)及び9位置換アナログ(D-Ala,Pro,Sar体)は、固相合成法により化学合成し、逆相HPLCで精製した。LiDSは市販の全重水素化SDS(MSD Isotopes)をLi塩にイオン交換して得た。試料条件は：micelle free系：5mM試料/0.1M重酢酸、D₂OまたはH₂O/D₂O(9:1)、micelle系：10mM試料/0.6M LiDS、D₂O又はH₂O/D₂O(9:1)、pH 5で行った。

NMR測定はVarian XL-400分光計、データ処理はSparkstation330上でVarian VNMR ver. 3.2Aを用いて行った。COSY,HOHAHA(DIPS1-2,z-filter),NOESY測定は、TPPI-States法により行った。f1方向の位相補正はMarion & Baxらの方法により evolution timeのdelayの補正を行い、FT後の位相合わせによって生じるartifactを防いだ。軽水消去としてはCOSYはDANTEとSCUBA法、HOHAHA,NOESYはDANTEとJump & Return pulseを組み合わせて行った。HOHAHAのmix. timeは通常40msを用いたが、HD交換の際は1scan,mix.time=30ms,全積算時間約10分で行った。NOESYはmix. time=40,80,120,200,300msの5点で測定し、そのvolume integral値をfittingして距離の定量に用いた。

〈結果と考察〉

化学シフト変化 水系とミセル系でのANPの特徴を明らかにするためにそれぞれの系でのANPの帰属を行った。帰属はWüthrichらの連鎖帰属に従ってCOSY,HOHAHA,NOESYを用いて行った。それぞれの帰属に基づき、水系⇒ミセル系での化学シフト変化の結果をrat-ANP(G9D-Ala)についてまとめたのが図1である。一見して明らかかなように、大きく変化が起きている領域とほとんど変化のない領域に明瞭に分かれている。大きく変化が起きている領域はIle12とIle15を中心としたD-Ala9 - Gly16部分とC末の2残基であり、ここを中心にミセルと相互作用していることが明らかになった。この領域は活性発現に重要な領域と重なっておりその点でも興味深い。

アミドNHの挙動 Ile12,15のNHのシフトは0.5 - 0.7ppmにも達しておりとりわけ大きな変化を示しているがこの原因を検討するためにNHの温度依存性及びHD交換実験を行った。図2にrat-ANP(7-28)のアミドNH化学シフトの温度依存性を示す。予想どおりIle12,15,加えてC末のTyr28のアミドNHも温度依存性が小さく、溶媒からの遮蔽または水素結合の存在が示唆された。これらのアミドプロトンはHD交換実験でも遅い交換を示し、Ile12,15で重水溶解後約2時間、Tyr28で約40分間HOHAHAの交差ピークとして観測された。さらに、3つのArg11,14,27及びPhe26のアミドNHも10-20分程度観測でき、他よりも遮蔽された環境にあることが分かった。これらの



アミドNHプロトンは、いずれも上で得られたミセルとの相互作用領域に位置し、化学シフト変化の結果と一致している。また、Arg11,14の ϵ NHも溶解後10分間程度観測され、側鎖の正電荷とミセルの負電荷の相互作用が示唆された。このことはArg14をD-Argに変えたアナログのミセルとの相互作用能の著しい減少からも支持された。

9位置換アナログの比較 ANPは分子内に5個ものGly残基を含む点で特徴的だが、とりわけ9位のGlyは活性に対する寄与が大きいことが知られている。我々は、3種の9位置換アナログについて同様の実験を行い、その原因について検討した。図3に9位置換アナログのrat-ANP(7-28)に対する化学シフト変化を主鎖についてまとめた図を示す。いずれのアナログもfull agonist活性を示すがそのpotencyはD-Ala9体ではほぼ1、Pro、やSar9体で1/100程度である。変化のパターンは極めて特徴的で活性の高いD-Ala9体は際だった大きな変化を示さなかったが、活性の落ちるProやSar置換体では8位の α CHと12位のNHに0.2-0.6ppmの大きな化学シフトを示した。また、Pro,Sar置換体では8-9のペプチド結合のcis-trans isomerに由来すると考えられるいくつかの残基のピークの分裂が観測された。これよりPro,Sar置換体では8-9位、12位を中心にconformation変化が起こり、これが活性低下につながったことが分かった。化学シフト変化のもう一つの特徴として、分子がflexibleな割には変化が広範囲におよんでいることである。これは、シフト変化の分布がミセルとの相互作用領域とよく相関していることからミセルとの相互作用様式の変化によるものと思われる。このことは、それぞれのアナログのHD交換速度変化の結果からも支持された。以上の結果を模式的に示したのが図4である。斜線で囲まれた部分はミセルとの相互作用領域、矢印がconformation変化の様子、波線がPro,Sar置換体でピークの分裂が観測された領域である。

図2 主鎖アミドNH化学シフトの温度依存性
rat-ANP(7-28) 0.6M LiDS/H₂O

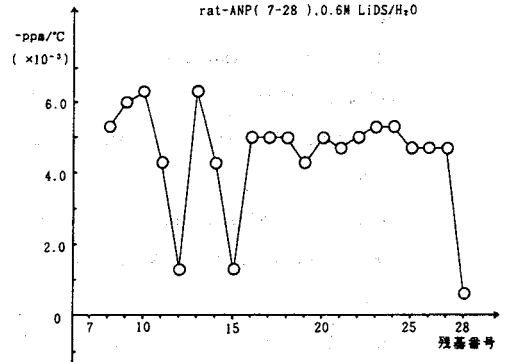


図3 9位置換アナログの化学シフト変化(主鎖)

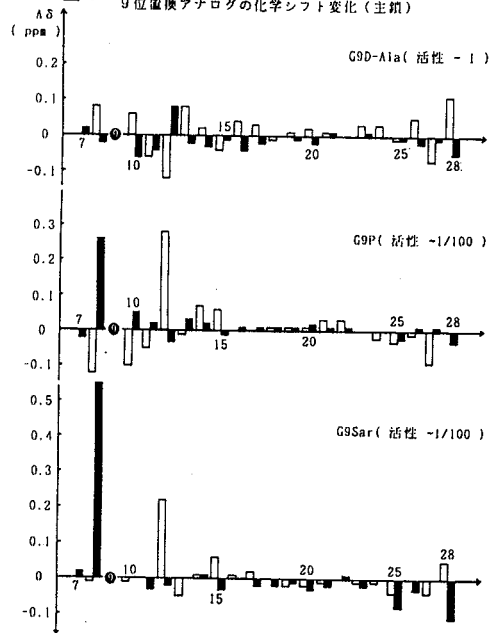
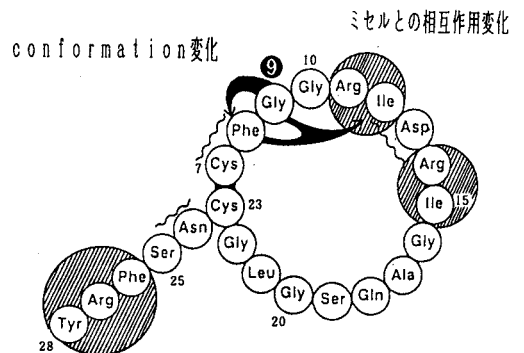


図4 rat-ANP(7-28) 9位置換の影響



現在, distance geometry法によるANPの構造計算を行っており討論会では立体構造の立場に立って討論したいと考えている。

〈文献〉

- 1) S. Koyama, Y. Kobayashi, T. Ohkubo, Y. Kyogoku, A. Sato, M. Kobayashi, and N. Go, Protein Engineering 3 393-402 (1990)
- 2) H. Inooka, T. Kikuchi, S. Endo, Y. Ishibashi, M. Wakimatsu, and E. Mizuta, Eur. J. Biochem 193 127-134 (1990)
- 3) R. M. Epand and G. L. Stahl, Int. J. Peptide Protein Res. 28 238-243 (1987)
- 4) W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, G. L. Stahl, and R. M. Epand, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 7028-7030 (1987)
- 5) E. T. Olejczak, R. T. Gampe, Jr., T. W. Rockway, and S. W. Fesik, Biochemistry 27 7174-7181 (1988)

¹H-NMRを用いたブタ赤血球膜とジブカインとの相互作用研究
—カチオン型と分子型との比較—

(京大・薬) ○脇田美砂子、黒田義弘、中川照眞

Interaction between Dibucaine and Pig Erythrocyte Membranes as Studied by NOESY Experiments in ¹H-NMR Spectroscopy — Which Form of Dibucaine Interacts More Strongly, Cationic or Uncharged?

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

Interaction between amine local anesthetic dibucaine and pig erythrocyte membranes has been studied by ¹H-NMR spectroscopy. NOESY spectra were observed so as to investigate which form of dibucaine, cationic or uncharged, interacts with membranes more strongly. The spectra were measured by raising temperature (45-60°C) to detect simultaneously both forms of dibucaine at pH 7.4. In the buffer solution, only uncharged dibucaine showed NOE cross-peaks. In the buffer solution containing erythrocyte membranes, however, only cationic dibucaine showed clear cross-peaks. It was concluded that the cationic molecule interacts with erythrocyte membranes more strongly than the uncharged one, and that it associates in membranes.

1. はじめに

局所麻酔剤は分子型で神経細胞膜を通過し、カチオン型で膜の内側からNaチャンネルタンパク質に作用して刺激の伝導を阻害すると考えられている。従って、分子型あるいはカチオン型のどちらがより強く膜と相互作用するのか見極めることは、麻酔作用機序の分子レベルでの解明のための重要な手がかりとなるであろう。本研究では神経細胞膜のモデルとしてブタ赤血球膜を取り上げ、カチオン型と分子型のどちらも取り得る3級アミン型局所麻酔剤であるジブカインとの相互作用を¹H-NMRにおけるNOEにより検討した。しかし、生理的pHでは分子型のジブカインはほとんど溶解せず、解析し得るシグナルを得るのは困難である。そこで、pKaの温度依存性に着目して試料の温度を上昇させ、カチオン型と分子型が共存する状態での¹H-NMRスペクトルの測定を試みた。

2. 実験方法

ジブカイン塩酸塩 (Fig.1) 3mMを10mOsmリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、60°Cにおいて¹H-NMRスペクトルを測定した。ブタ赤血球膜は常法に従って調製し、10mOsmリン酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁させた。これにジブカイン塩酸塩を3mM添加し、27°C、及び45°CにてNOESYスペクトルを測定した。測定は、Bruker AM-600 (600MHz) を用いて行なった。

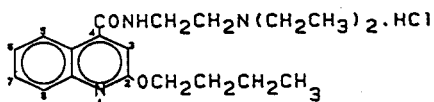


Fig.1 Structure of Dibucaine HCl

3. 結果及び考察

60°Cにおける3mMジブカイン溶液のNOESYスペクトルをFig.2に示した。シグナルの帰属のために、3mMジブカイン溶液の¹H-NMRスペクトルの温度変化を検討した結果、

局所麻酔剤、ブタ赤血球膜、¹H-NMR、核オーバーハウザー効果、pKa

わきたみさこ、くろだよしひろ、なかがわてるみち

▽を付けたシグナルはカチオン型由来であり、▼を付けたややブロードなシグナルは、溶液の温度を上昇させたことによりジブカインのpKa (8.1) が低下して新たに生じた分子型由来であることを確認した。分子型には対角ピークと同位相のNOEクロスピークが観測されたが、カチオン型には観測されなかった。従って、カチオン型は溶液中では特定の構造をとらず、分子型は特定の構造 (例えば会合) をとって存在していることがわかった。次に、ブタ赤血球膜にジブカイン塩酸塩3mMを添加し、40℃においてNOESYスペクトルを測定した。Fig. 3に60msの混合時間のNOESYスペクトルを示した。カチオン型には芳香環の5, 6, 7, 及び3位のプロトンとジメチルアミノ基のプロトンとの間に、対角ピークと同位相の明瞭なNOEクロスピークが観測された。また、芳香環の5位のプロトンとプトキシ基のメチル基のプロトンとのクロスピークが観測された。このクロスピークは膜中におけるジブカインの分子間NOEであると考えた。一方、分子型には明確なクロスピークは観測されなかった。唯一、芳香環の5位のプロトンとジメチルアミノ基のメチル基のプロトンとの間にクロスピークが観測されたが、これは溶媒中の分子型のジブカインに由来すると考えられる。

以上の結果よりジブカインは分子型よりもカチオン型の方がより強く膜と相互作用し、膜に結合したカチオン型のジブカインはcmc (約50mM) よりも充分低い濃度でも会合していることが示唆された。本知見はカチオン型がより強い麻酔活性を持つとするRichie¹⁾や檜橋²⁾の報告を分子レベルで支持するものである。更に、薬物の会合が局所麻酔剤の非特異性を説明し得るのではないかと考えている。なお、現在コンピューターグラフィックス(CG)を用いたジブカインの溶液中、及び膜中でのコンホメーションを検討中である。

【謝辞】CGを行って下さいましたSimulation Technology Inc.のJ.W.Hare博士、及び日本電子輸入販売(株)の石田さゆりさんに感謝致します。

- 【参考文献】 1) J. M. Richie et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 152-159, 1965.
2) T. Narahashi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 171, 32-44, 1970.

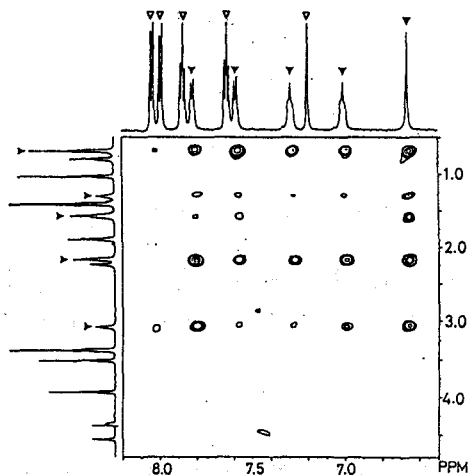


Fig.2 600MHz NOESY Spectrum of Dibucaine (3mM) in Phosphate Buffer (10mOsm, pH7.4) at 333K; Mixing Time, 0.6s

▽, cationic form; ▼, molecular form.

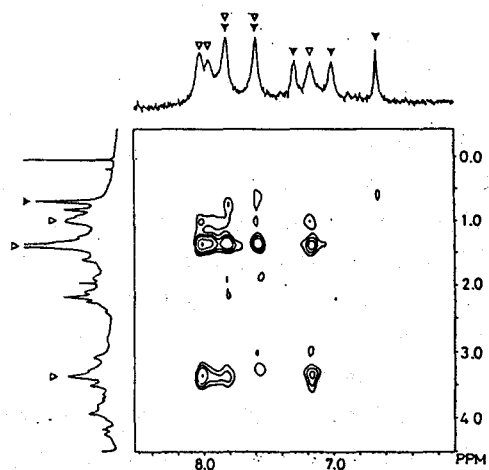


Fig.3 600MHz NOESY Spectrum of Dibucaine (3mM) in Pig Erythrocyte Ghosts Suspended in Phosphate Buffer (310mOsm, pH7.4) at 318K; Mixing Time, 0.06s

▽, cationic form; ▼, molecular form.

NMR緩和時間法によるミセル／水系の分配特性の測定

— フェノール誘導体及び安息香酸誘導体の分配特性 —

(阪大・薬) ○神崎康治・ 笄 永忠・ 藤原英明

Partition Properties in Micelle/Water Systems Mesured
by the ^1H NMR Paramagnetic Relaxation Method

— Partition Properties for Phenols and Benzoic acids —

Koji Kanzaki, Yong-Zhong Da and Hideaki Fujiwara.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

Partition coefficients were measured for phenols and benzoic acids in micelle/water systems by means of the paramagnetic relaxation method. These values were somewhat larger than those reported in 1-octanol/water system. Partition properties were also determined from the van't Hoff plots. These experiments showed that Partition of phenols as well as Benzoic acids are mainly dominated by the enthalpy term and that the data of p-amino benzoic acid are affected by the hydration around the NH_2^+ group.

1. 序論

医薬品の疎水性を表すパラメーターとして、油水分配係数が最も重要であり、例えば輸送特性が分配係数の関数となることが簡単なモデルにより示されている。実際に生理活性を定量的に考察するには、1-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、「フラスコ振とう法」のように分配後の平衡濃度を分光法により定量することが基本的な方法であるが、最近では、種々の機器分析法が利用されるようになり、更に有機相をより生体膜の性質に近づけるために、ミセルや二分子膜リポソームなどが利用されるようになってきた。1-オクタノール／水系以外の分配特性のデータは、余り詳しく測定されていないが、分配系の有機相の極性を反映して分配係数値が系統的に変わることが認められている。その他分配係数だけではなく、分配のエントロピーやエントロピーに分けた測定が構造活性相関を定量的に進める上で重要であることも報告されている¹⁾。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、電動クロマト法、蛍光スペクトル法、ゲルろ過法、起電力法など、様々な方法で測定されており、NMRによる緩和時間法も特徴ある方法の一つである。これらの方法は各々適用上の制約や問題点があり、

NMR緩和時間法, ミセル, 緩和試薬, 分配係数, エントロピー, エントロピー, 構造活性相関

かんざき こうじ, たつ えいちゆう, ふじわら ひであき

適切に応用することが肝要である。

NMR 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が、^{2),3)}その実際の適用は必ずしも簡単ではない。前回の本討論会ではバルビツール酸誘導体の分配係数を測定し報告した。今回、フェノール誘導体及び安息香酸誘導体を特に中性型のままで分配特性を測定するために、NMR 緩和時間法の適用の最適条件を検討した。さらにミセル/水系での分配のエネルギー側面 (エンタルピー、エントロピー項) を測定した。

2. 実験

フェノール誘導体及び安息香酸誘導体の解離型の影響を排除し、中性型のままで測定するには、溶液のPHが十分酸性でなければならない。フェノール誘導体のpkaは9-10であるのでPH=7(D2O)、安息香酸誘導体のpkaは4-5であるのでPH=2(DCl-D2O)に調製して測定を行った。前回の報告ではミセル相にはSodium Dodecyl Sulfate (SDS)、緩和試薬にはMn²⁺を用いた。この方法では、Mn²⁺が静電結合し易いためMn²⁺の濃度を低く抑えなければならず、今回の溶質については緩和速度の十分な変化を観察できないことが分かった。次にミセル相はSDS、緩和試薬に3-Carboxypropylを用いたが、ミセルの緩和速度に影響を与えない緩和試薬濃度を求められなかった。これは溶液のPHを2-1に調製したので3-Carboxypropylのカルボキシル基が中性型となり、ミセル表面との間にアニオン-アニオン型の静電的反発力が働かず、緩和試薬がミセルに取り込まれてしまうことが原因と考えられた。そこで、ミセル/水(D₂O)系のミセル相に Dodecyltrimethylammonium Bromide(DTAB、東京化成)を、緩和試薬には MnCl₂(半井化学)を用いた。MnCl₂の有効濃度を求めるためにpH=7とpH=2でMn²⁺の濃度を変化させて、DTABの(-CH₂-N(CH₃)₃)の¹H_{R1}を測定した。R₁の変化しない Mn²⁺濃度が限界濃度である。更に25℃から46℃まで温度変化させて、van't Hoffのプロットからエネルギー側面の測定を行うことから、25℃と46℃の二つの温度でこの限界濃度を求めた。この限界濃度は、[Mn²⁺]=1.3mMであった。実際に使われた Mn²⁺ の濃度はP-Cl Phenolで1.18mM、それ以外では0.59mMとした。溶媒にはD₂O(Merck)を、pH調整用にDCl(Merck)を用いた。分配係数の測定は三つのフェノール誘導体及び三つの安息香酸誘導体について行った。

NMR 緩和時間法では、溶質のミセルに対する溶解度ρは次式で求められる。

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

ここでR_{1,obsd}は緩和試薬をいれていない時の溶質のスピン-格子緩和速度、R_{1,(aq)}は水相中の溶質の固有緩和速度を表す。R_{1,(aq)}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。この時、ミセル/水系における溶質の分配係数K_cは(2)式のようになる。

$$\begin{aligned} K_c &= C_{micellar\ phase}^s / C_{aqueous\ phase}^s \\ &= \rho V_{aqueous\ phase} / (1 - \rho) V_{micellar\ phase} \end{aligned} \quad (2)$$

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。

各々の誘導体について四つのサンプルを調整し、 ^1H NMRにより $R_1^{\text{p, obsd}}$ R_1^{obsd} $R_1^{\text{p, (aq)}}$ $R_1^{\text{(aq)}}$ を測定する。ミセル相のDTABは62.0mMである。DTABの限界ミセル濃度は、DTABのDodecyl鎖の CH_3 基の ^1H NMRにおける緩和速度 R_1 をDTABの濃度を変えて測定し求めた(Fig.1)。得られたcmcは温度やpHによる変化はほとんど見られず、19mMであった。Partial molar volumeも25°Cから46°Cの範囲ではほとんど変化がなく、 $295 \text{ (dm}^3\text{)/mol}$ (25°C)の値⁵⁾で近似できることを確かめた。分配のエンタルピーとエントロピーを求めるため、上述の測定を25°C, 27°C, 32°C, 37°C, 41°C, 46°C, の五つの温度で繰り返し、van't Hoffのプロットを行った。スピン-格子緩和時間の測定は日立R250HT型FTNMR装置により250MHzにて行った。相対粘性率の測定は毛細管式粘度計(草野科学器械)を用いて行った。

3. 結果と考察

理想的にはミセル形成後は R_1 が一定になると考えられる。しかし、実際にはDTABの高濃度領域においてDTABのドデシル鎖の CH_3 基の ^1H の緩和速度 R_1 がDTABの濃度に比例して変化した(Fig.1)。この原因について検討した。アラガムは水における陽子の緩和が分子間の双極子結合により起こると述べている⁷⁾。彼によれば、 $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ の混合物において水の陽子緩和時間 T_1 と相対粘性率 η の積の逆数が相対体積濃度に比例する。この粘性の変化を考慮するためDTABの濃度を変化させ相対粘性率を測定した。相対粘性率の補正を行った後もDTAB高濃度領域における R_1 のDTAB濃度依存性は変わらなかった。これらのことより、この比例関係はDTAB分子間の双極子結合に基づく分子間緩和の効果と考えられる。DTABのcmcを求める際にもドデシル鎖の CH_3 基の R_1 にこの分子間双極子緩和の補正を行いDTAB濃度に対するプロットを行った。

ミセル/水系におけるフェノール誘導体及び安息香酸誘導体の25°Cにおける分配係数の対数($\log K_c$)とエンタルピー、エントロピー項の測定結果を示す(Table 1)。併せて各誘導体のオクタノール/水系における $\text{p}K_a$ 及び $\log P$ の文献値を示す。Table 1より、測定された

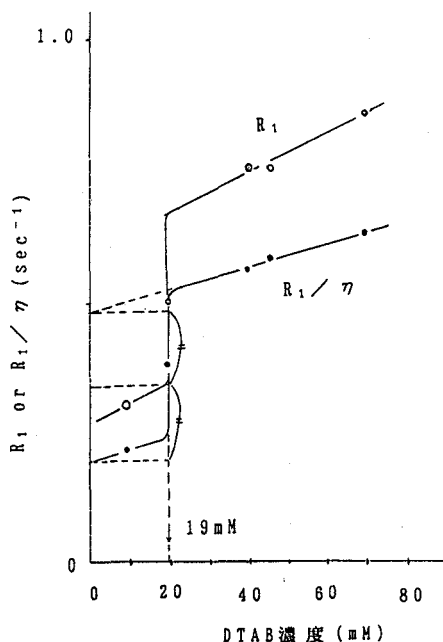


Fig.1 DTAB濃度とDTABの緩和速度との関係

logKcは 1-オクタノール/水系でのlogP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、分配特性に関してフェノール及び安息香酸誘導体ともエンタルピーの寄与が大きく、かつ分配係数の置換基依存性もエンタルピーで支配されていることが分かる。ただ、P-アミノ安息香酸だけは、 ΔH , ΔS の符号が正であり、かつエントロピー項の寄与はエンタルピー項の寄与より大きい。これは、酸性溶液中でアミノ基がプロトン化され水の溶媒和が強く影響しているためだと思われる。

以上より、NMR緩和時間法はミセルと緩和試薬の組み合わせを適切に選べば分配特性を測定する有効な方法といえる。しかし分配のエンタルピー、エントロピーを求めて医薬品の構造活性相関に応用するには測定時間の短縮などを計るか、これに変わる有効な方法の開発が待たれる。

Table 1 logKc, Enthalpy and Entropy of Phenols and Benzoic Acids

compound	pka (Ref.4)	logKc (25°C)	logP (Ref.6)	ΔH_p (kJ/mol)	ΔS_p (J/Kmol)
benzoic acid (35.1mM)	4.17	2.48	1.87	-41.1	-90.3
P-amino benzoic acid (31.3mM)	4.85	1.45	0.46	21.9	101.4
P-hydroxy benzoic acid (51.7mM)	4.65	1.89	1.57	-20.3	-31.8
phenol (365.8mM)	9.98	1.70	1.51	-19.1	-24.2
P-F phenol (127mM)	9.95	2.05	1.87	-22.9	-37.4
P-Cl phenol (33.3mM)	9.38	3.31	2.44	-48.9	-100.6

参考文献

- 1). H.Fujiwara, H.Yosikawa, S.Maruta, and Y.Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1095, (1991)
- 2). Z.Gao, R.E.Wasylishen and J.C.T.Kwak, *J. Phys. Chem.*, **93**, 2190 (1989).
- 3). 苜 永忠、伊藤勝彦、藤原英明、第29回NMR討論会要旨集p63(1990).
- 4). A.Albert, E.P.Serjeant著、松浦貞郎訳、「イオン定数-測定法と応用-」丸善(1963)
- 5). R.De Lisi, V.Turuco Liveri, M.Castagnolo, and A.Inglese, *J. Solution Chem.* **15**, 23, (1986).
- 6). C.Hansch and A.Leo, "Substituent Constants For Correlation Analysis", John Wile & Sons, New York(1979).
- 7). A.Abragam著、富田和久、田中基之訳、「核の磁性 (下)」、吉岡書店(1966).

P34

立体構造解析をめざした tRNA の安定同位体標識

○河合剛太, 高柳正明, 野口智明, 新美達也¹, 横山茂之¹, 宮澤辰雄²
(横浜国大・工, ¹東大・理, ²現 蛋白工学研)

Isotope labeling of tRNA for 3D-structure determination

Gota Kawai, Masaaki Takayanagi, Tomoaki Noguchi,
Tatsuya Niimi¹, Shigeyuki Yokoyama¹ and Tatsuo Miyazawa²

Faculty of Engineering, Yokohama National University,

¹Faculty of Science, University of Tokyo,

²Present address: Protein Engineering Research Institute.

The isotope labeling is now indispensable for assignment of NMR signals of proteins. In the present study, *E. coli* tRNAs, whose molecular weights are above 25,000, were labeled *in vivo*. Uniform ¹⁵N labeling was performed with ¹⁵NH₄Cl and 500 mg of crude tRNA fraction was extracted. By using HPLC, 4 mg of [U-¹⁵N]tRNA^{Glu} was purified. Further, specific ¹³C labeling of C1' of ribose moiety was also performed with glucose-2-¹³C. The NMR analyses of these isotope labeled tRNAs will provide useful informations for elucidating the dynamic structure and function.

リボザイムが発見されて以来, RNAにはさまざまな‘活性’があることが明らかになってきており, その立体構造と機能との関係が注目されている。また, 従来よりさまざまな研究対象となっている tRNA についても, その水溶液におけるコンホメーションは, いまだ詳細には解っていない。そこで, 本研究では tRNA を材料として, RNA の水溶液における立体構造あるいは動的な構造を解析するための手法を探ることを目標とした。現在のところ RNA の NMR スペクトルを解析することは必ずしも容易ではない。これは, RNA を構成する要素がおもに 4 種の塩基とリボースおよびリン酸基に限られておりシグナルの重なりがはげしいことによる。さらに, tRNA の場合には, 分子量が 2 万 5 千の巨大分子であることが, その解析をさらに困難にしている。したがって, tRNA の安定同位体標識を行なって, NMR スペクトルを単純化することが必要であると考えられた。tRNA は, 約 80 残基のヌクレオチドからなる生体高分子であり, ステム構造, ループ構造および 3 次構造的な会合などの特徴的な構造モチーフを持つ分子である。このような分子のコンホメーションを解析することにより, ほかのさまざまな RNA 分子の構造と機能の関係を解析するための手法を提供できるだけでなく, RNA のコンホメーションの構築原理の解明に寄与できると考えられる。

tRNA・RNA・安定同位体標識

かわい ごうた・たかやなぎ まさあき・のぐち ともあき・にいみ たつや・よこやま しげゆき・みやざわ たつお

【安定同位体標識】

(1) ^{15}N 標識によるイミノプロトンのシグナルの分離

核酸のNMRにおいて、通常1塩基対あたり1つ観測されるイミノプロトンのシグナルは、二重らせん構造からの情報を得るために重要である。本研究では、 ^{15}N によって均一に標識したtRNAを調製し、そのイミノプロトンのシグナルの帰属にHSQC法を利用することめざした。大腸菌のtRNA^{G1u}のイミノプロトンのスペクトルはシグナルの重なりがはげしく、 ^1H -NMRのみでは帰属ができなかった。そこで、大腸菌より ^{15}N 標識したtRNA^{G1u}を精製し、そのイミノプロトンのスペクトルを解析することを試みた。 ^{15}N 標識は、塩化アンモニウム- ^{15}N を含む最少培地で大腸菌(A19株)を培養することによって行なった。

(2) ^{13}C 標識によるリボースプロトンのシグナルの分離

はじめに述べたように、RNAのNMRシグナルの帰属が困難である理由の1つは、その基本構造がリボースと塩基およびリン酸基だけで構成されていることである。とくにリボースについては、H1'以外のプロトンシグナルはほとんどが4~5 ppmに集中している。これに対し、H1'のシグナルはそのほかのシグナルとは異なった比較的広い範囲に観測される。しかし、通常はこれもピリミジン塩基のH5のシグナルと重なってしまう。そこで本研究では、リボースのC1'を標識し、H1'のシグナルをH5のシグナルと分離して、さらに ^{13}C の化学シフトで展開することをめざした。また、このようにして良く分離した ^{13}C -H1'シグナルを出発磁化としてHOHAHAなどを行ない、リボースの他のプロトンシグナルを帰属することも可能であると考えられる。このようなリボースの1'位に特異的な ^{13}C 標識を行なうために、リボース-1- ^{13}C による標識、およびグルコース-2- ^{13}C による標識を検討した。リボース-1- ^{13}C によるtRNAの標識は、すでにAgrisら¹⁾によって行なわれている。これは、最少培地にプリンヌクレオチド生合成の阻害物質である6-メルカプトプリン(6MP)およびリボース-1- ^{13}C 、塩基を加えて大腸菌を培養することによって行なうものである。一方、グルコース-2- ^{13}C による標識は、ペントースリン酸サイクルにおいて、グルコースの1位の炭素が抜けることによってリボースが供給されることを利用している。実際に、グルコース-2- ^{13}C を含む最少培地で大腸菌(A19株)および解糖系の変異株を培養し、 ^{13}C 標識を行なった。このグルコース-2- ^{13}C による標識は、東大理学部生物化学教室の溝淵 潔 助教授および三瓶 巖一 助手との共同研究として行なっている。

【結果および考察】

(1) ^{15}N 標識

塩化アンモニウム- ^{15}N による標識については、すでに50Lの培養を行ない、およそ500mgのtRNA粗分画を得た。これを、HPLCによる2段階のイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、およそ4mgのtRNA^{G1u}を得た。現在、このtRNA^{G1u}について測定を行なっている。また、そのほかのtRNA分子種についても精製を行なっている。このような、塩化アンモニウム- ^{15}N による均一な標

識は比較的容易であり、また、 ^{13}C 標識と組み合わせることも可能である。

さらに、プリンおよびピリミジンに選択的な ^{15}N 標識を行なうために、すでに国立遺伝学研究所よりプリン要求株およびピリミジン要求株をとりよせて、培養条件などを検討している。

(2) ^{13}C 標識

Agrisらは、リボース-1- ^{13}C による標識のために、プリンヌクレオチドのサルベージ経路による生合成の効率のよい大腸菌株を用いている。これを6MP存在下で培養することによってプリンヌクレオチドの新規合成を阻害し、培地から供給される塩基およびリボースから（サルベージ経路によって）核酸を合成させている。今回は、代謝に関しては野生型であるA19株を用いて実験を行なったところ、6MP存在下において培地中のリボース濃度は増殖にほとんど影響しなかった。したがって、野生型の大腸菌では、この方法による ^{13}C 標識は困難であると考えられた。また、この方法において、プリンヌクレオチドの生合成を阻害しても、リボースはグルコースを原料としてペントースリン酸サイクルからも供給されるので、標識率は高くないと考えられる。実際に、Agrisらの例では、プリンヌクレオチドで50%程度、ピリミジンヌクレオチドでは20%程度しか標識されていない（ただし、原料のリボースの標識率も86%程度である）。したがって、さらに別の方法を検討する必要があると考えられた。

通常の生合成経路において、グルコースはその1位の炭素がはずされて5炭糖となりリボースが合成されることが知られている。したがって、2位が ^{13}C で標識されたグルコースをもちいて大腸菌を培養すれば、RNAのリボースの1'位が特異的

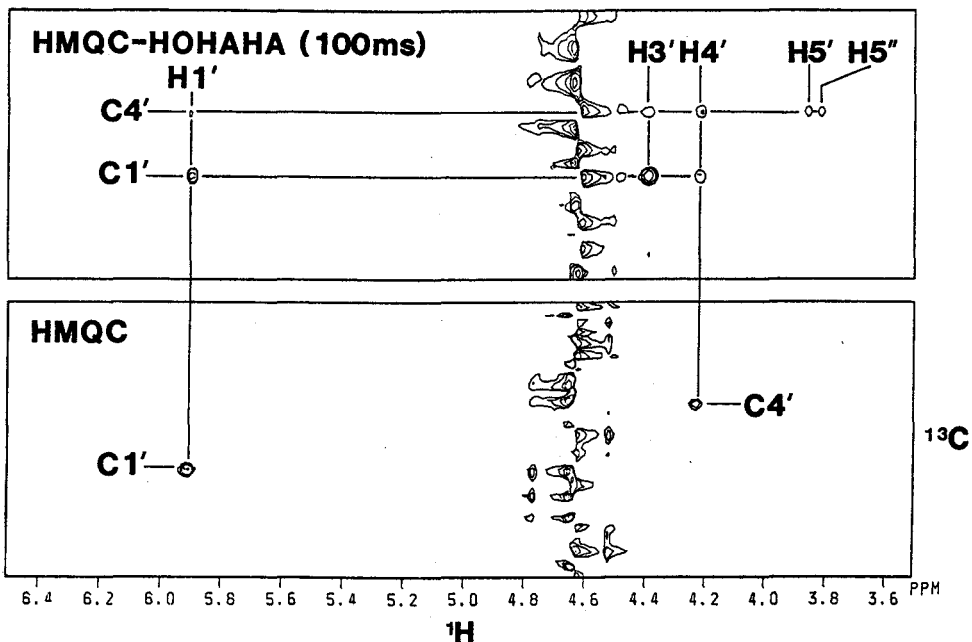


図1 [1'- ^{13}C] グアノシン (および [4'- ^{13}C] グアノシン) のHMQCスペクトルおよび2次元HMQC-HOHAHAスペクトル。

に標識されることが期待された。そこで、グルコース-2- ^{13}C を含む最少培地で大腸菌 (A19株) を1L培養し、得られた菌体よりRNAを抽出した。これを酵素によってヌクレオシドにまで分解し、さらに逆相のHPLCによって4種のヌクレオシドを単離精製した。得られた各ヌクレオシドの ^1H -NMRスペクトルを測定したところ、 ^{13}C 核とのスピン結合による分裂パターンから、リボースの1'位が80%の効率で標識されたことが確認できた。したがってグルコース-2- ^{13}C による標識は有効であることがわかった。また、リボースの4'位もわずかながら標識されたことも確認された。

図1に、グルコース-2- ^{13}C による標識によって得られた [$1'$ - ^{13}C] グアノシン (および [$4'$ - ^{13}C] グアノシン) のHMQCスペクトルおよび2次元HMQC-HOHAHAスペクトルを示した。このように、 $1'$ - ^{13}C 標識が、tRNAのリボースの各プロトンのシグナルを分離して観測するために有用であることが示唆された。しかしながら、HMQC-HOHAHAにおいて [$4'$ - ^{13}C] グアノシン由来のシグナルもはっきりと観測されており、この ^{13}C の‘もれ’がスペクトルを複雑にする可能性があることも考えられた。この ^{13}C の‘もれ’には、ペントースリン酸サイクルからフルクトース-6-リン酸を介して再びグルコース-6-リン酸へ戻る経路の寄与が考えられた。そこで現在、フルクトース-6-リン酸とグルコース-6-リン酸の変換ができない変異株を用いて、さらに特異性が高くまた効率の良いリボースの $1'$ - ^{13}C 標識を行なうための条件検討を行なっている。

【今後の展望】

tRNAは、タンパク質合成系において、mRNA, ARS, EF-Tuあるいはリボソームなどさまざまな分子と相互作用してその機能を発現している。したがって、tRNAを安定同位体標識することは、その動的構造を解析するだけにとどまらず、さまざまな相互作用の解析にも極めて有効であると考えられる。例えば、 ^{15}N 標識をもちれば、相互作用によって塩基対が形成あるいは開裂するのが観測できるかもしれない。tRNAの修飾ヌクレオチドに関しては、メチル基の ^{13}C 標識が行なわれているが²⁾、この手法との組み合わせも有効であると考えられる。

安定同位体標識法がタンパク質で成功した背景には、クローニングされた遺伝子によるタンパク質の大量発現法によるところが大きい。したがって、RNAを大量にかつ純粋に合成する方法の開発が必要である。すなわち、tRNAの大量発現系の開発や、あるいは安定同位体標識したNTPからのT7RNAポリメラーゼによるRNAの合成などが有効であると考えられる。これらの手法と組み合わせることにより、RNAにおける安定同位体標識法はさらに威力を発揮するであろう。

【文献】

- 1) Schmidt, P.G., Playl, T., and Agris, P.F. (1983), *Biochem.* **22**, 1408-1415.
- 2) Yokoyama, S., Usuki, K.M.J., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Miyazawa, T. (1980), *FEBS lett.* **119**, 77-80.

P35

エチルピピリジニオ化 β -シクロデキストリンのNMRによる構造解析

(東工大・生命理工) ○池田 博、杜 依郡、中村朝夫、戸田不二緒

NMR Study of Conformation of Ethylbipyridinio-appended β -Cyclodextrin

Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology

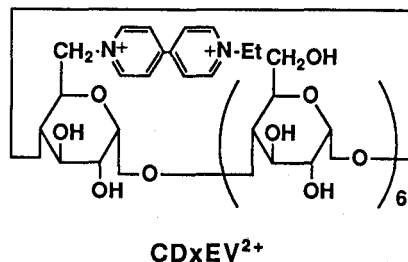
○Hiroshi IKEDA, Yi-qun DU, Asao NAKAMURA, and Fujio TODA

The conformation of ethylbipyridinio-appended β -cyclodextrin ($CDxEV^{2+}$) was studied by the combination of some kinds of NMR spectroscopic techniques. The assignment of resonances was made by the combination of HOHAHA, COSY, and ROESY. H6 resonances of un-modified glucose unit which was adjacent to ethylbipyridinio-appended glucose unit was abnormally shifted to up-field, because of anisotropic ring current effect of ethylbipyridinio group. The conformation around C5-C6 bond was also analyzed. From these consideration and examination of CPK molecular models, the three dimensional structure of $CDxEV^{2+}$ was estimated. The long axis of ethylbipyridinio moiety directs approximately perpendicular to the z-axis of β -cyclodextrin but deviates from the center of cavity. Ethylbipyridinio moiety faces the glucose unit B.

1. はじめに

シクロデキストリンは、グルコースが環状に α -1、4結合により結合した環状オリゴ糖であり、その中心に疎水の空洞を有し、その空洞に様々なゲスト分子を包接する。そして、ゲスト分子の包接のされ易さは、ゲスト分子の立体的、静電的性質などの違いにより大きく異なる。また、この疎水的空洞を、反応場として利用すると、立体的、静電的効果などにより、反応を特異的に、あるいは、選択的に進行させることができる。そして、このようなシクロデキストリンの性質を改善する目的や、新たな機能を付け加える目的で、シクロデキストリンの修飾体が数多く合成されている。修飾シクロデキストリンの特性を理解するためには、修飾残基のシクロデキストリン骨格に対する三次元的配向を知る必要がある。しかしながら、これまでに報告されている修飾シクロデキストリンのうち修飾残基の三次元的配向に関して考察がなされた例は僅かしかない。^{1, 3)}

我々は、選択的包接能を有する光増感還元システムとして、 β -シクロデキストリンの一級水酸基側にエチルピピリジニオ基を一個有する修飾シクロデキストリン ($CDxEV^{2+}$) を合成し、その化合物の包接特性や、エチルピピリジニオ基の還元特性について検討を行ってきたが、²⁾ その結果を解釈するためには、修飾残基の三次元的配向を知る必要がある。そこで、今回各種



シクロデキストリン、NMR、HOHAHA、COSY、ROESY、構造解析、人工光合成、ピピリジニオ

いけだひろし、といぐん、なかむらあさお、とだふじお

の NMR の測定法を組み合わせることにより、修飾残基のシクロデキストリン骨格に対する三次元的配向について検討を行なったので報告する。⁴⁾

2. 実験方法

NMR は、Varian社のVXR-500S (500 MHz) を用い、重水中 (5 mM)、30 °C で測定した。

HOHAHA の mixing time は、100 ms、ROESY の mixing time は300 ms で測定した。

3. 結果および考察

¹H NMR のピークの帰属を次のように行なった。まず、シクロデキストリンの各グルコース残基が別々のスピン系であることに注目して、HOHAHA を用いて、ピークを各グルコース残基ごとにグループ分けを行なった。5 ppm 付近にアノマーのピークが H2 ~ H6 のピークとは独立して存在する。β-シクロデキストリンには、7つのアノマープロトンが存在するが、そのうちの4つのピークが分離して観測できたので、4つのスピン系に属するピークだけをグループ分けすることができた。次に、COSY を用いて、グループ分けしたピークをそれぞれのグルコース残基のプロトンへ帰属した。最後に、あるグルコース残基の H1 とそれに隣接するグルコース残基の H4 とは距離的に近く、NOE が観測できることを利用して、グルコース残基の配列を決定した。すなわち、このNOE を ROESY を用いて観測し、グルコース残基の配列を決定した。

HOHAHA、COSY、ROESY の各スペクトルを図1-図3に示した。また、帰属の結果を図4に示した。

エチルピリジニオ基が付いているグルコース残基をグルコース A (G-A) とし、他のグルコース残基を図4のように命名したとき、G-A、G-B、G-C 及び G-G に属するプロトンのピークをすべて帰属することができた。エチルピリジニオ基が G-A の C6 に結合したことによる H6 の低磁場へのシフトピークのほか、次のような特徴的なシフトピークが見られる。修飾されていない G-B の H6 のピークが大きく高磁場シフトしている。これは、ピリジン環の環電流効果に基づくものと思われる。すなわち、ピリジン環の面が、

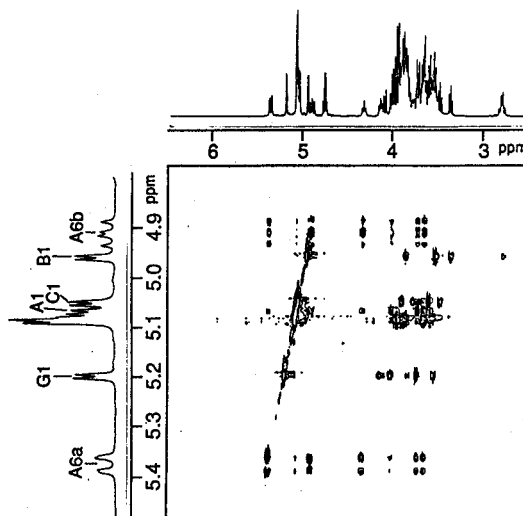


Fig. 1 HOHAHA Spectrum of CDxEV²⁺ in D₂O at 30 °C with Mixing Time of 100 ms.

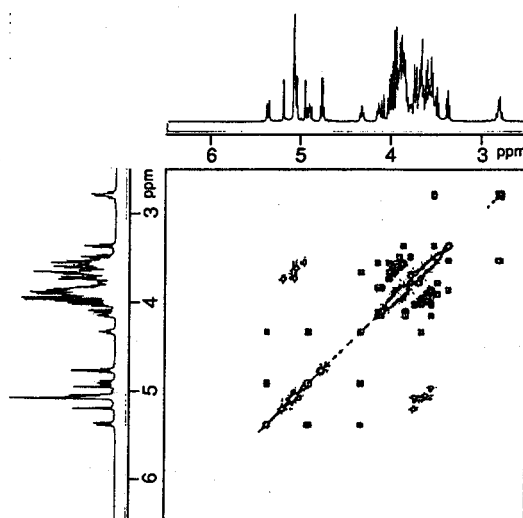


Fig. 2 COSY Spectrum of CDxEV²⁺ in D₂O at 30 °C.

G-Bに向いていることを示している。

次に、H5 と H6 との間のカップリングコンスタントから、C5-C6 結合に関するコンフォメーションの解析を行なった。実際に観測されるカップリングコンスタント $J_{5,6a}$ 、および、 $J_{5,6b}$ は、3つのコンフォーマにおけるカップリングコンスタントの加重平均と見なすことができる。したがって、カップリングコンスタントから、3つのコンフォーマの存在比を求めることができる。G-A および G-B の H6 のピークが他ピークと分離しているのでカップリングコンスタントを解析できる。そこで、 $J_{5,6a}$ 、および、 $J_{5,6b}$ を VXR-500S 付属のスピシミュレーションプログラムを用いて求め、得られたカップリングコンスタントを用いて、コンフォーマの存在比を求めた(表1)。G-A では、gt が主成分である。したがって、ピリジニオ基が G-B の方向に向いていることになる。

以上の結果および、CPK モデルによる検討の結果から、CDxEV²⁺ の三次元的構造は、図5のようであると推定した。

エチルピリジニオ基は、G-B 側にピリジン環の面を向けた形で、シクロデキストリンに蓋をかぶせたような配置に存在するが、シクロデキストリンの空洞の中心からずれた位置に存在する。また、ピリジン環の長軸とシクロデキストリンの空洞の縁とのなす角は、上向きに約30度ほどだと思われる。

次に、CDxEV²⁺ の構造と比較するために、β-シクロデキストリンの一级水酸基側にピリジニオ基を一個

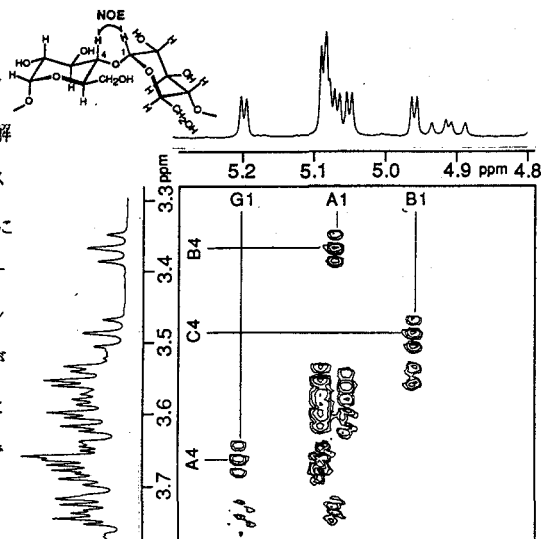


Fig. 3 ROESY Spectrum of CDxEV²⁺ in D₂O at 30 °C with Mixing Time of 300 ms.

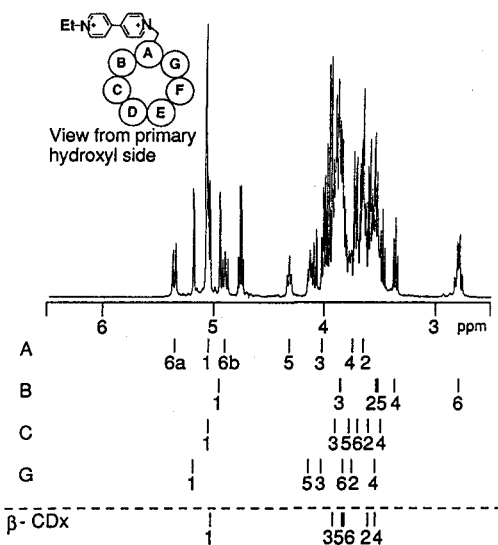


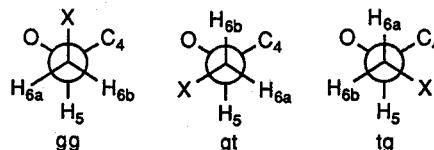
Fig. 4 ¹H NMR Spectrum of CDxEV²⁺ Only in the Region of Resonances of Cyclodextrin.

Table 1. Calculated Fractional Population of Rotamers of C5-C6 Bond, and Observed Coupling Constants ($J_{5,6a}$, $J_{5,6b}$) of G-A and G-B of CDxEV²⁺ and CDxP⁺.

		P_{gg}	P_{gt}	P_{tg}	$J_{5,6a}$	$J_{5,6b}$
CDxEV ²⁺	G-A	0.14	0.86	≈ 0	1.8	9.8
	G-B	0.58	0.42	≈ 0	1.8	5.5
CDxP ⁺	G-A	0.16	0.84	≈ 0	1.8	9.6
	G-B	0.76	0.23	≈ 1	1.6	3.7

$$J_{5,6a} = 1.7P_{gg} + 1.9P_{gt} + 11.1P_{tg}$$

$$J_{5,6b} = 1.5P_{gg} + 11.1P_{gt} + 2.1P_{tg}$$



有する修飾シクロデキストリン (CDXP⁺) についても同様に解析を行なった。CDXP⁺ のスペクトルは全体的には CDxEV²⁺ のスペクトルとよく似ているが、G-B の H6 のピークの形がかなり異なっている (図 6)。CDXP⁺ の G-B における C5-C6 結合に関するコンフォーマの存在比は CDxEV²⁺ とは異なり、gg が主成分である。(表 1)。この違いにより H6a と H6b とで受ける環電流の大きさに差が生じスペクトルの形に違いが生じたのであろう。すなわち、G-A の修飾残基が、隣接する G-B の C5-C6 結合における回転の自由度に影響を及ぼしていることになる。

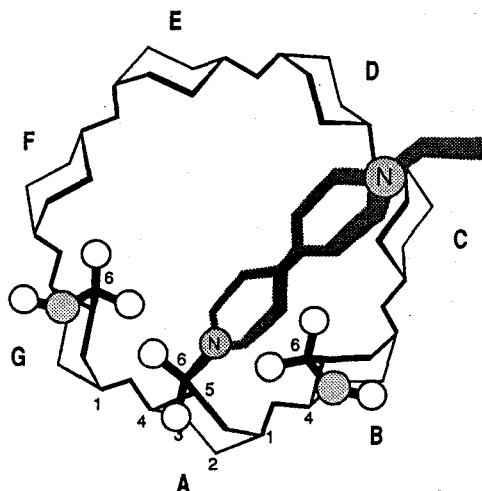


Fig. 5 Structure of CDxEV²⁺ as Determined by NMR

以上のように二次元 NMR を組み合わせることによりピークの帰属を行なうことができ、得られた帰属結果を基に一次元 NMR のスペクトルを検討することにより修飾シクロデキストリンの三次元構造を推定することができた。¹³C-¹H のカップリングコンスタントなどを解析することにより、より詳細な構造の解析および、ゲスト化合物を包接したときの構造変化について現在検討中である。

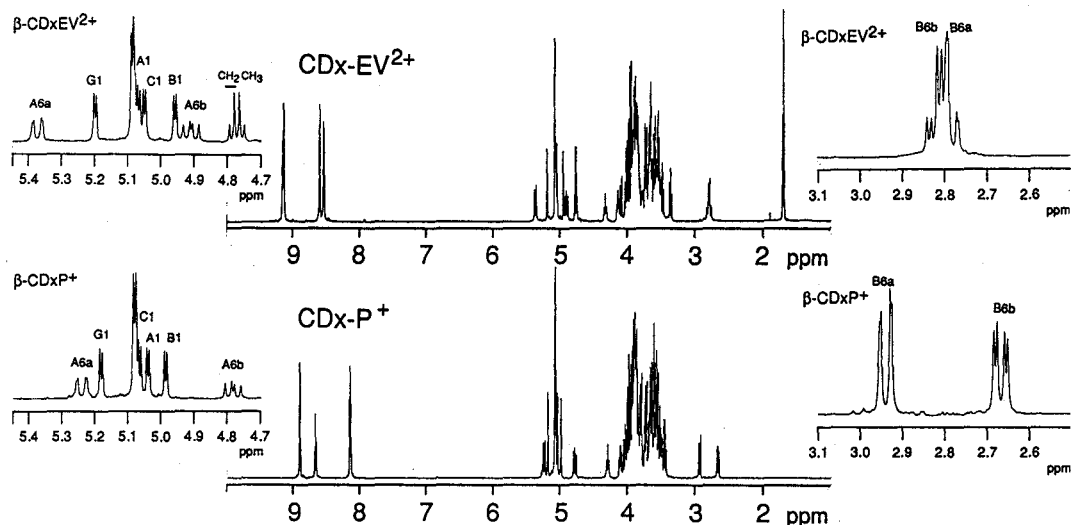


Fig. 6 ¹H NMR Spectra of CDxEV²⁺ and CDXP⁺

References

- 1) W. Saka, Y. Yamamoto, Y. Inoue, R. Chūjō, K. Takahashi, and K. Hattori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 3175 (1990).
- 2) a) Y. Du, A. Nakamura, and F. Toda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 3351 (1990).
b) Y. Du, T. Harada, A. Nakamura, and F. Toda, *Chem. Lett.*, **1990**, 2235.
c) Y. Du, A. Nakamura, and F. Toda, *J. Incl. Phenom.*, in press.
- 3) H. Ikeda, Y. Nagano, Y. Du, T. Ikeda, and F. Toda, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5045 (1990).
- 4) H. Ikeda, Y. Du, A. Nakamura, and F. Toda, *Chem. Lett.* **1991**, 1495.

P35A

Solution Distal Histidine Orientation in Monomeric *Chironomus Thummi Thummi* Cyano-Met Hemoglobins -- A Proton NMR Study

S. Ramaprasad^{1,2}, D. H. Peyton^{2,3}, G. N. La Mar²,
S. W. Unger², S. Sankar², and S. Gersonde⁴

- ¹ Departments of Radiology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, 72205, U.S.A.
- ² Department of Chemistry, University of California, Davis, California 95616, U.S.A.
- ³ Department of Chemistry, Portland State University, Portland, Oregon 97207, U.S.A.
- ⁴ Hauptabteilung Medizintechnik, Fraunhofer-Institut für Zerstorungsfreie Prüfverfahren, and Fachrichtung Medizintechnik, Universität des Saarlandes, D-6650 Homburg/Saar, Germany

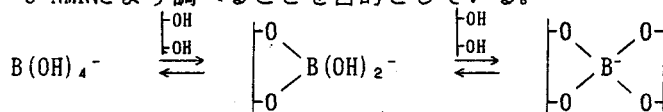
Proton NMR spectral characteristics of the cyano-met form of *Chironomus thummi thummi* (CTT) and monomeric hemoglobins I, III, and IV in ¹H₂O are reported. A set of four exchangeable hyperfine-shifted resonances (downfield of 10 ppm) is found for each of the two heme-insertion isomers. An analysis of relaxation times, exchange rates, and nuclear Overhauser effects leads to assignments for these resonances to histidine F89 and the side chains of histidines E7 and arginine FG3. In aqueous solution, the side chain from histidine E7 does not occupy two orientations, as found in the solid state; rather the histidine E7 side chain adopts a conformation similar to that of sperm whale myoglobin or hemoglobin. Evidence is presented for the allosteric transition in these hemoglobins as arising from the "trans effect." An analysis of the exchange of the histidine E7 labile proton with bulk solvent confirms that the group is completely buried within the heme pocket similar to that in sperm whale cyano-met myoglobin. A comparative study of solvent access to the heme pocket of the three monomeric hemoglobins, as measured from proton exchange rates of heme pocket protons, is made and correlated to binding studies with the diffusible small molecules such as O₂.

○竹田卓也、大井隆夫、向田政男（上智大・理工）

Complex formations between borate and polyols in aqueous medium as studied by ^{11}B NMRTakuya TAKEDA, Takao OI and Masao MUKAIDA
(Department of Chemistry, Sophia University)

Borate is known to form readily complexes with polyols in aqueous medium. In this study, we examine by ^{11}B and ^{13}C NMR spectroscopy complex formations between borate and three polyols: Glycerol, meso-Erythritol and N-Methylglucamine. The signals of 1:1 (borate:polyol) and 1:2 complexes are observed and coordinations through α, β OH groups and α, γ groups are distinguished in ^{11}B NMR spectra for every borate-polyol solution. Stability constants between borate and the polyols are calculated from the peak areas of respective boron species. The stability of complexes formed increases with increasing the number of OH groups in polyols.

【緒言】 前回の本討論会において、 ^{11}B NMRを用いたホウ酸とジオールとの系における錯形成に関する報告を行った。得られた ^{11}B NMRスペクトルからホウ酸とジオールとの間で Scheme 1 に示す 1:1 (ホウ酸:ジオール) 錯体と 1:2 錯体が観測された。本研究では、ジオールの系に引続き、トリオール、テトリール、ペンチールとしてそれぞれグリセリン $\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 、メソ-エリトリット $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、N-メチルグルカミン $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ を用い、水溶液中でのこれらポリオールとホウ酸との間の錯形成反応を ^{11}B 、 ^{13}C NMRにより調べることを目的としている。



Scheme 1 Equilibria between borate, diols and their complexes in aqueous medium

【実験方法】 0.1M (1M=1mol dm^{-3}) ホウ酸と0.5Mグリセリンを含む3.0M NaCl水溶液をNaOHあるいはHClを用いて様々なpHに調整し、各pHにおいて ^{11}B 、 ^{13}C NMRを測定した。同様にメソ-エリトリットについては0.3M:0.3M、N-メチルグルカミンに関しては0.3M:0.3M、0.4M:0.4M、0.5M:0.5Mなど様々な濃度比においてpH調節した後、NMR測定を行った。これらの系の全てに、基準物質として ^{11}B NMRでは三フッ化ホウ素・ジエチルエーテル、 ^{13}C 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使用した。

^{11}B 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 ^{11}B NMRを測定した結果、ある程度高いpH領域においてScheme 1 に示されたホウ素種に対応するピークの他に新たに2~3本のピークが観測された。Figure 1にpH12付近における各ホウ酸-ポリオールについての ^{11}B NMRスペクトルを示す。各々のピークは文献値などを参考に $\text{B}(\text{OH})_3 + \text{B}(\text{OH})_4^-$ ($\text{B}^0 + \text{B}^-$)、ホウ酸とポリオール

keyword : ^{11}B NMR, ホウ酸錯体, ポリオール

ただたくや おおいたかお むかいだまさお

との1:1錯体 (B^-L)、1:2錯体 (B^-L_2)に帰属した。各錯体について、ポリオールがホウ酸に対して α, β 位のOH基で配位する場合と α, γ 位のOH基で配位する場合の二種類の配位形式が存在することが明らかとなった。

Table 1に ^{11}B NMR化学シフトを示す。 B^0 と B^- に関しては水溶液中での速い交換速度のため、 ^{11}B 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。アミノ基を含むN-メチルグルカミンのホウ酸錯体のピークについてはアミノ基を含むジオールの系と同様にわずかなpH依存性が観測された。

Table 2にピーク面積より計算された各ポリオールのホウ酸錯体について以下で定義される各平衡定数を示す。

$$K_1 = [B^-L] / [B^-][L]$$

$$K_2 = [B^-L_2] / [B^-L][L]$$

ホウ酸-N-メチルグルカミン系については平衡定数を求めるに至っていない。現在2:1錯体の存在を仮定して、再計算を行っている。アミノ基を含まないポリオールに関しては、OH基の数が増えるに従い、平衡定数が大きくなる傾向が明らかである。

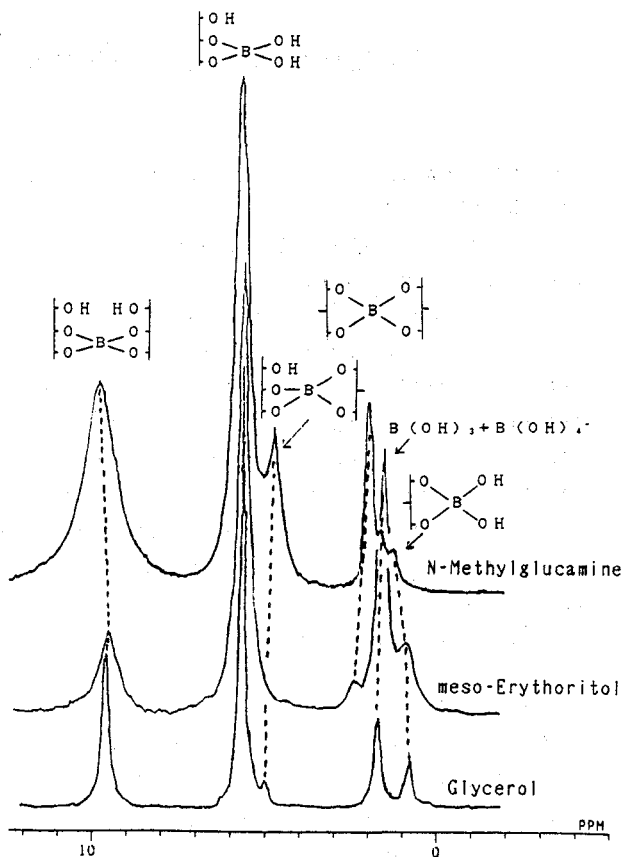


Figure 1 ^{11}B NMR spectra of boric acid-polyol solutions at about pH 12

Table 1 Observed ^{11}B NMR chemical shifts

polyols	1:1 complexes (ppm)		1:2 complexes (ppm)			
	α, β	α, γ	(α, β)	(α, β)	(α, γ)	(α, γ)
Glycerol	5.5	0.7	9.5	—	—	5.0
meso-Erythoritol	5.5	1.2	9.4	1.6	—	—
N-Methylglucamine	5.5-5.7	0.6-0.7	9.5-10.1	1.1	—	4.5-4.8

Table 2 Calculated stability constants between borate and the polyols

polyols	K_1 ($\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$)		K_2 ($\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$)			
	α, β	α, γ	(α, β)	(α, β)	(α, γ)	(α, γ)
1,2-Propanediol	4.4	—	0.57	—	—	—
Glycerol	11	1.1	1.1	—	—	0.16
meso-Erythoritol	47	4.7	4.8	0.90	—	—

The ¹⁷O-NMR Chemical Shifts of 14 pi Annulenylium Ions

Haru Ogawa, Takashi Nakamura and Taiji Imoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, Fukuoka 812

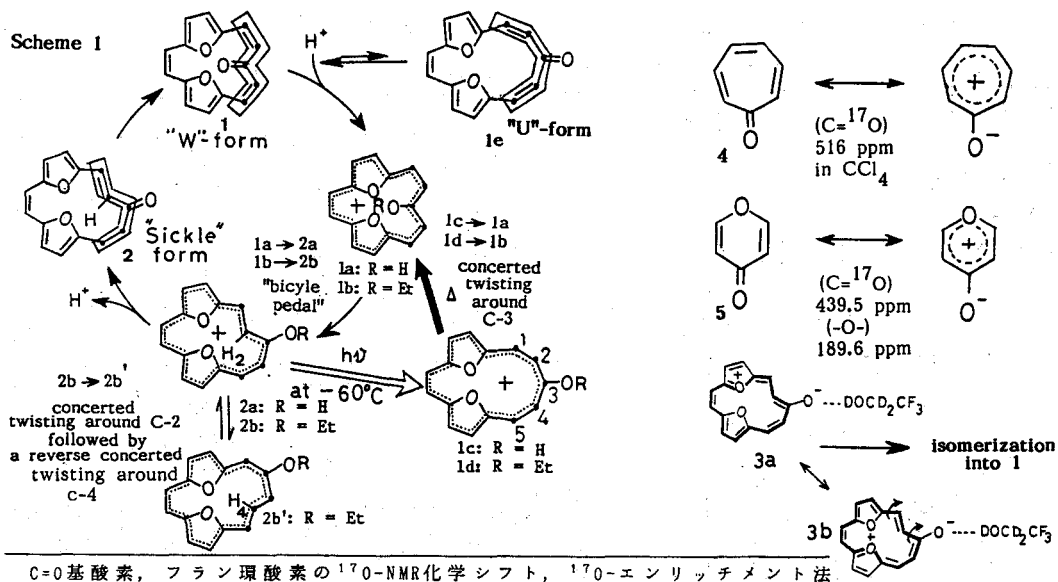
Yuko Kato

Daichi College of Pharmaceutical Sciences Fukuoka 815

[15]annulenone 1, a 14 pi homolog of tropone, is conformationally flexible, and readily undergoes a sequential geometrical change to equilibrate with environmental factors, such as light, heat and proton.

The ¹⁷O-chemical shifts of annulenylium ions 2a and 2b have been measured for evaluating aromatic character. A novel ¹⁷O-enrichment technique was applied for the measurements. Upon protonation or on O-alkylation, 330 - 340 ppm shieldings were observed for their C=¹⁷O chemical shifts, showing large decreases in C=O pi bond order (ca. 87 % decrease in 2a, if the chemical shift of EtO group of ethoxybenzene was taken as standard). The bond order decrease was prominent as compared with the decrease that was obtained from the O-ethylation of 4-pyrone, another model compound of 1.

結論 2個の酸素原子で架橋した15員環ケトン, [15]アヌレノン1の物性と運動性を¹H-, ¹³C-および¹⁷O-NMRを用いて研究した。1は6π系トロポン4の高級同族体としての電子配置をもつ。しかし一方、Oを介する環状共役を考えると、1はγ-ピロン5の高級同族体としての電子配置をもつ。1から発生させた14π芳香族カチオンには、1a(R=H), 1b(R=Et), 2a(R=H), 2b(R=Et)のような幾何異性体や topomer 2b'が発生するのが特徴である。この事実から判るように、1の分子の右半分のコホメーションはflexibleで、溶媒分子, 光, 熱, プロトンと相互作用すると、(Scheme 1)に示す状態から状態への変化が高速で起こり、その状態変化が1つの“閉じた平衡系”をつくり、その平衡系では、個々の平衡の前後で状態間の電子的安定性が著しく変化する。

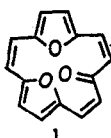

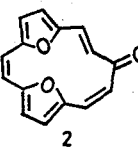
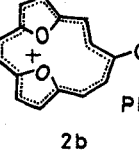


C=O基酸素, フラン環酸素の¹⁷O-NMR化学シフト, ¹⁷O-エンリッチメント法

本報は1の異性化、プロトン化、分極化、0-アルキル化による構造変化や0-アルキル化体の光異性化などによって生じるNMRスペクトル変化をまとめた。1の酸素架橋基の転位反応(Scheme 2)を応用して、1の2つの酸素原子に ^{17}O を導入することに成功したので、1の状態変化に伴う ^{17}O 化学シフトの変化を詳細に調べ、その結果を関連した電子系の ^{17}O -化学シフトの値と比較した。

1. ^1H -および ^{13}C -NMRからの情報

はじめに1のmobilityに関する ^1H -NMRからの知見、すなわち1の動的セグメントのコンホメーション変化、光異性化、topomerizationなどについて述べる。X線解析の結果、1のカルボニル基は平均自乗平面から 57° 上に立ち上がっている¹。この結果、1の ^1H -NMRスペクトルは通常のオレフィン性化合物としてのシグナルを与えた。1をプロトン化後、脱プロトン化して発生させた2(Scheme 1)は、1よりも平面性が高いことは、 14π 電子系にもとづく反磁性環電流効果により、そのtrans二重結合の内側向きのプロトンが、外側向きプロトンよりも δ 3.40ppm高磁場にシフトして、diatropic characterを増すことから支持された。1を CF_3COOH でプロトン化すると、trans構造を優勢種とするアヌレニウムイオン2aと1aの平衡混合物を生じた。これは H^+ のよりよいbindingをおこすため1aの動的セグメントが、“自転車ペダル運動”を行って、cis \rightarrow trans異性化し、より平面性の高い2aに誘導適合することを示している。2aを -60° に冷却して照射すると、高量子収率で1aに100%変化した。照射の1次生成物は1cであり、1cが1aに異性化する際、1cのc-3を中心にした協奏的ねじれによって1aへの異性化が低温で起こるものと考えられる。1aは、 -60° 以下の低温でのみ純粋状態で存在でき、加温すると2aに変化した。1aの OCH_2CH_3 基のメチレンおよびメチルプロトンは、すべて 14π 反磁性環電流効果の支配領域に位置することを示し、それが1cの構造でなく、1aの構造であることを示した。アヌレニウムイオン1a、2aに強い反磁性環電流の存在が認められた(1a: $H_{\text{outer}}=9.12\sim 9.68\text{ppm}$ 2a: $H_{\text{inner}}=-3.69\text{ppm}$, $H_{\text{outer}}=9.14\sim 10.63\text{ppm}$)。プロトン化の代わりに、カルボニル基を0-Et化すると、2b(R=Et)が、純粋状態で単離できた。2bに照射すると、1bが同様に生成する。2aをnitrobenzen- d_5 中で加熱すると、そのtrans二重結合の位置が交換したtopomer 2b'を生じ、 $2b \rightleftharpoons 2b'$ の高速交換によって160'では、flexible segmentの4H分のシグナルは消失した(Scheme 1)。アヌレノン1のジオメトリーがW型、

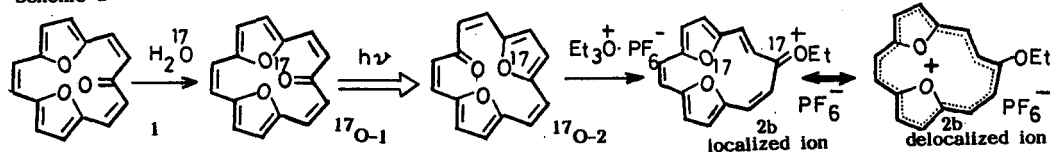
 <p>1</p> <p>^1H-NMR (in CD_2Cl_2, 500 MHz)</p> <p>H_{r} 7.27 (2H, J= 3.67 Hz) H_{f} 7.24 (2H, J= 3.67 Hz)</p> <p>H_{cis} 7.03 (2H, singlet) H_{cis} 7.19 (2H, J= 11.73 Hz) H_{cis} 7.01 (2H, J= 11.73 Hz)</p>	 <p>1b</p> <p>^1H-NMR (in acetone-d_6, at -90°C, 270 MHz)</p> <p>H_{r} 9.68 (2H, J= 4.40 Hz) H_{f} 9.64 (2H, J= 4.40 Hz)</p> <p>H_{cis} 9.60 (2H, singlet) H_{cis} 9.53 (2H, J= 9.53 Hz) H_{cis} 9.12 (2H, J= 9.53 Hz)</p> <p>$H_{\text{CH}_2\text{Me}}$ 0.52 (2H, q, J= 6.60 Hz) H_{Me} -0.66 (3H, t, J= 6.60 Hz)</p>
 <p>2</p> <p>^1H-NMR (in CD_2Cl_2, 500 MHz)</p> <p>H_{r} 7.56 (1H, J= 3.67 Hz) H_{r} 7.36 (1H, J= 3.67 Hz) H_{r} 7.33 (1H, J= 3.67 Hz) H_{r} 7.25 (1H, J= 3.67 Hz)</p> <p>H_{cis} 7.49 (1H, J= 13.94 Hz) H_{cis} 6.70 (1H, J= 13.94 Hz) H_{cis} 6.17 (1H, J= 12.47 Hz) H_{cis} 7.06 (1H, J= 12.47 Hz)</p> <p>H_{trans} 8.05 (1H, J= 15.41 Hz) H_{trans} 4.65 (1H, J= 15.41 Hz)</p>	 <p>2b</p> <p>^1H-NMR (in acetone-d_6, at -30°C, 270 MHz)</p> <p>H_{r} 10.04 (1H, J= 4.40 Hz) H_{r} 9.83 (1H, J= 4.40 Hz) H_{r} 9.72 (1H, J= 4.40 Hz) H_{r} 9.70 (1H, J= 4.40 Hz)</p> <p>H_{cis} 9.78 (1H, J= 11.73 Hz) H_{cis} 9.90 (1H, J= 11.73 Hz) H_{cis} 10.08 (1H, J= 12.47 Hz) H_{cis} 9.14 (1H, J= 12.47 Hz)</p> <p>H_{trans} 10.63 (1H, J= 14.67 Hz) H_{trans} -3.69 (1H, J= 14.67 Hz)</p> <p>$H_{\text{CH}_2\text{Me}}$ 5.31 (2H, q, J= 6.60 Hz) H_{Me} 1.88 (3H, t, J= 6.60 Hz)</p>

Sickle型以外に、U型をとることが $CD_2Cl_2 : CF_3CD_2OD(TFE) = 1 : 1$ (by volume) 中で測定した ^{13}C -NMRから支持された。1は CD_2Cl_2 中で ^{13}C -NMRを測定すると、5本の炭素シグナルを与えるにすぎない。しかし、前記の混合溶液では、これらに加えてさらに4本の強度の低い炭素シグナルを与えた。このことから、1は溶媒分子と非共有結合で相互作用すると、U型コンホメーションを保持できることを示した。1のフレキシブルセグメントのコンホメーション変化に必要な運動は、上述の“自転車ペダル運動”、“協奏的ねじれ運動”であると考えられる。この運動型式は、バクテリオロドプシンのタンパク場に幽閉状態になっている レチニリデンシッフ塩基のN原子から数えて5個の sp^2 炭素のsequenceが行うコンホメーション変化と同じであることをすでに発表した²。

2. 1のカルボニル酸素とフラン環エーテル性酸素の双方を ^{17}O でエンリッチする方法

1の酸素原子の ^{17}O -NMR化学シフトを測定して、カルボニル酸素の π -bond orderやフラン環の酸素の π 共役の寄与をしらべることは、興味深い。以下の方法を用いるとC=O基とフラン環酸素の双方にエンリッチメントが可能になった。すなわち、1をジオキササン中 $H_2^{17}O$ と触媒量の H_2SO_4 とともに $60^\circ, 48hr$ 加温して ^{17}O をカルボニル酸素に導入したのち、得られた ^{17}O -1 (Scheme 2)を CH_2Cl_2 中、酸素遮断下、可視光を4日間照射すると、酸素架橋基の光組替えが起こり、フラン環に ^{17}O をもつ ^{17}O -2が得られた (Scheme 2)³。このサンプルでは ^{17}O -1と ^{17}O -2の ^{17}O 比はほぼ1:1であった。この混合物およびこの混合物に $Et_3O^+PF_6^-$ を反応させて合成した2bを用いて以下の ^{17}O -NMRを測定をした。

Scheme 2



3. ^{17}O -NMRから得られた情報

化合物1, 2, 2b (in CD_2Cl_2)の ^{17}O -NMR化学シフトをFig. 2に示した。異性化1→2により1の δ ($C=^{17}O$)は528.8ppmから484.8ppmへ41.5ppm高磁場シフトした。これに対して、2のフラン環のエーテル性酸素の化学シフトは1のそれよりも、0.9ppm高磁場シフトしたにすぎない。2→2bの変化でもフラン環の δ (^{17}O)は、8.5ppm高磁場にシフトしたにとどまった。この結果は、Karplus-Pople式にもとづいて ^{17}O -NMRでは化学シフトにおよぼす反磁性項の寄与は重要でなく、 1H -NMRで見られる内部プロトンの劇的な高磁場シフトの様な効果はおこらないことを示した。2の δ ($C=^{17}O$)の化学シフトは γ -ピロン5の δ ($C=^{17}O$) 460ppmよりも低磁場シフトし、2は5よりも π -bond orderが高い。しかし、 $CD_2Cl_2+CF_3CD_2OD(TFE)$ 中で2の δ ($C=^{17}O$)を測定するとTFEのモル分率の増加と共に高磁場シフトし、カルボニル基のbond orderはTFEのモル分率の増加と共に減少する(see, Table II)。その減少の程度はTFEのモル分率が0.472のとき、2で100ppm以上に達するのには、1をTFE中のみ溶かして測定した δ ($C=^{17}O$)は CD_2Cl_2 中の値とくらべて38.3ppm高磁場シフトするにとどまった。この結果はTFEのモル分率が0.472のとき分子間水素結合によって生じる2のC=O結合のbond orderの減少は、2をOEt化したときに生じるbond orderの減少の30%(484.3-382.6)/(484.3-141.7) = 0.297に達することを示した。

他方、2の共役系を γ -ピロン5がその酸素原子を介して行う 6π 環状共役のビニログとして見なす際の寄与を検討した。この効果の存在は ^{13}C -NMR化学シフトを用いるつぎの比較から

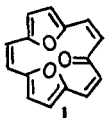
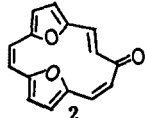
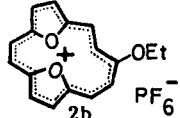

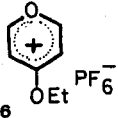
Table II Effects of intermolecular H-bonding on 1 and 2 using trifluoroethanol (TFE) as proton donor in CD_2Cl_2

mole fraction of $^2\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}$ in CD_2Cl_2 , x_F		^{17}O chemical shift, in ppm	mole fraction 1 of $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OD}$ in CD_2Cl_2 , x_F		^{17}O chemical shift, in ppm
0		484.3	0.130		488.3
0.056		440.8	0.230		479.5
0.099		420.0	0.310		474.9
0.152		407.5	0.374		472.0
0.193		399.0	0.427		470.5
0.472		382.6	0.472		468.5
			0.614		467.0
			0.729		463.4
			1.000		450.0

支持された。フラン環の β 位炭素の化学シフト(in CD_2Cl_2)は、アヌレノン炭素の化学シフトと比較すると低磁場に共鳴している。しかし、フラン環 β 位炭素の ^{13}C -NMR化学シフトの平均値(in CD_2Cl_2)と4級炭素を除いたその他のアヌレノン炭素の ^{13}C -NMR化学シフト平均値の差は、1, 2, 2bの順に4.6, 10.6, 11.8 ppmの順に増すことが判った(関連した ^{13}C -NMRデータは示していない)。この差は、2の環状共役が $3a \leftrightarrow 3b$ の様な共鳴構造をもち、 γ -ピロン5のビニログ型構造をとる。その結果フラン環の β 位炭素の化学シフトを反磁性環電流効果の支配下におくことを示している(Scheme 1)。

2をプロトン化あるいはOEt化すると δ (OH)あるいは δ (-O-Et)のシグナルは、 δ 150と141.7ppm付近に出現し、これらは正電荷が環状共役系に非局在化したアヌレニウムイオンであることを示した(Fig. 2)。この結果は、アセトンのカルボニル基をOEt化して発生させたオニウムイオンの ^{17}O シグナルが、250ppmに出現し、通常のケトン構造の寄与を60%をのこす結果と対照的である。⁴ 2bの ^{17}O 化学シフトはethoxybenzeneの酸素が示す化学シフト($\delta^{17}\text{O} = 78\text{ppm}$)⁵に近づいている。2bの δ (OEt)の化学シフトは γ -ピロンのOEt化体6の δ (-OEt) 171.2ppm(in CD_3CN)よりさらに約30ppm高磁場シフトしており、両者間のオニウム塩の“非局在化”構造の ^{17}O シフトの差を明示するものとして興味深い。

Fig. 2 The ^{17}O -NMR Data of 1, 2 and 2b as compared with those of 5 and 5a

					
δ (C=O) (ppm)	525.8 ^a	484.3 ^a		439.5 ^b	
δ (-O-)	236.9 ^a	237.8 ^a	229.3 ^a	189.6 ^b	257.1 ^c
δ (C-O-Et)			141.7 ^a		171.2 ^c

^a in CD_2Cl_2 , ^b in liquid state, and ^c in acetonitrile

References

- 1) H. Ogawa, M. Inoue, T. Imoto, I. Miyamoto, H. Kato, Y. Taniguchi, Y. Nogami and T. Koga, *J. Chem. Commun.* **1989**, 118.
- 2) H. Ogawa, H. Syouji, T. Imoto, Y. Kato, Y. Nogami, and T. Koga, *ibid.* **1991**, 498.
- 3) H. Ogawa et al., *J. Chem. Soc. Commun.*, **1991** in press.
- 4) A. Olah, A. L. Berrier, and G. K. S. Prakash, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1982**, **104**, 2373.
- 5) G. A. Kalabin, D. F. Kushnarev, R. B. Valeyev, B. A. Trofimov, and M. A. Fedoatov, *Org. Mag. Res.* (1982) **18**, 11.

^{17}O -NMR Study on the Mechanism of the Carbonyl-transposition Reaction of an Oxygen-bridged [15]-annulenone

Haru Ogawa, Hiroyuki Motoshima, Taiji Imoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, Fukuoka 812

Yuko Kato, Yasuyoshi Nogami, and Toshitaka Koga

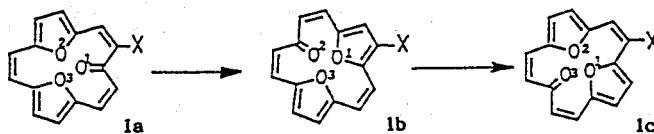
Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815

We have now found that mono-substituted [15]annulenone **A₁** (Scheme 1c) exchanges oxygen bridges by visible light giving a mixture of five position isomers (X= Br) [encorded by A,B,C,D and E isomer (Scheme 1c)]. The photo-rearrangement of the oxygen bridges forms a cycle consisted of 15 kinds of species in all, (i.e., 5 position isomers multiply by three different arrays of oxygens). It has been found that ^{17}O NMR spectroscopy is a powerful tool for analyzing the rearrangement mechanism, when coupled with multi-channel photodiode array spectrophotometry.

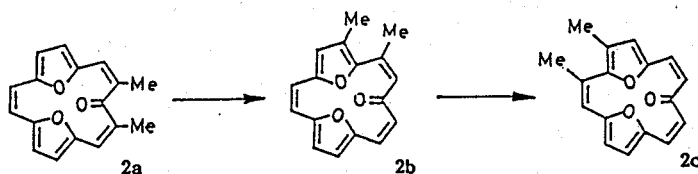
1. はじめに

^1H , ^{13}C -NMRの場合と比較すると、 ^{17}O -NMRを用いて反応機構を解明した事例は桁違いに少ない。この理由は ^{17}O 核の4極子モーメントの存在により、シグナルの広幅化に加えて、天然同位体比が0.037%なので、NMRの絶対感度がプロトンの場合と比べて $1/10^5$ となり、強度の増大が期待できないことによる。しかし、試料を適当な方法で ^{17}O -エンリッチすると、 ^{17}O -NMRは酸素に関する直接的な情報を与える点で、強力な研究手段になる。最近、酸素架橋[15]アヌレノン **1a**に光照射すると、カルボニル酸素 ($\delta_{\text{C=O}} = 538\text{ppm}$)は、フラン環のエーテル性酸素 ($\delta_{\text{-O-}} = 245\text{ppm}$)に組換る一種の縮退転位を行うことを見いだした (Scheme 1a and Fig. 1)。この架橋基の光組換えを、ジ置換[15]アヌレノン **2a**について行くと2種類の位置異性体 **2b**, **2c**が得られた (Scheme 1b)。今回、この光転位反応をモノ置換体 (X=Br)について行い、その反応機構を ^{17}O -NMRを用いて調べた。この結果、光転位反応は、期待した5種類の位置異性体を与えるのみならず、環内で3個の酸素原子が互いにその位置を交換し合った3種の同族の位置異性体が存在可能であること、つまり光転位は合計15個の分子種からなる“閉じた平衡系”として記述できることが判った (Scheme 4)。

Scheme 1a



Scheme 1b



^{17}O -NMR, 酸素架橋基の組替え, 縮退転位の反応機構

2. モノブrom [15]アヌレノンの酸素架橋基の光組替え転位

モノブrom [15]アヌレノンの塩化メチレン溶液を、1 kW プロジェクターランプで150時間光照射すると、5種類の位置異性体 (Brの位置がカルボニル基の隣にあるものから順に、A, B, C, D, E-異性体とcode化, (Scheme 1c)) を与えた。反応機構に関して以下の問題設定を行った。

- (1) 特定の位置異性体がどの順序にどの位置異性体から生成するのか?
- (2) Scheme 1d に示すように、環状系内部にある3個の酸素原子を反時計回りで、順に O_1, O_2, O_3 と規定した場合、同一の位置異性体 (たとえばB) で O_1, O_2, O_3 の占有位置の異なる3個の同族構造 [たとえば B_1, B_2, B_3 , (Scheme 1d)] が存在可能か? (位置異性体を表す記号の下付数字はカルボニル酸素として存在する酸素原子の番号である。)

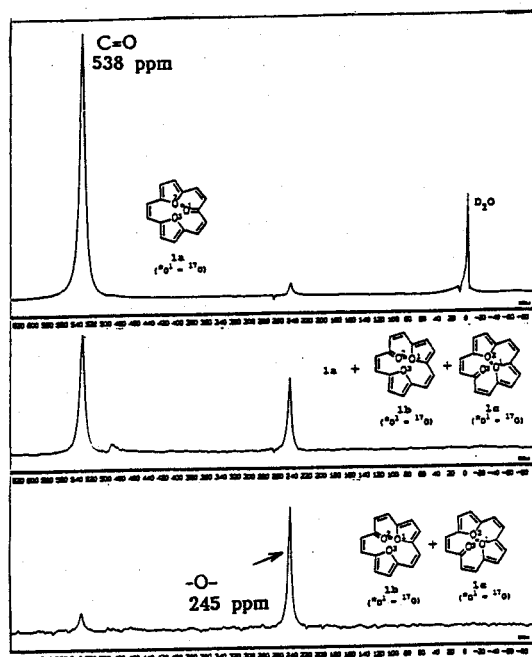
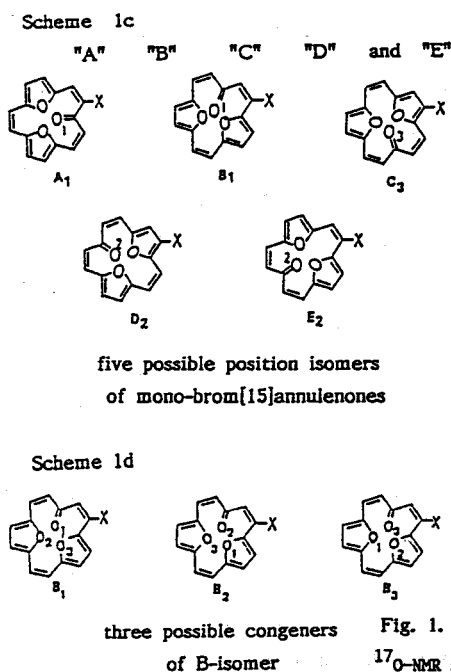
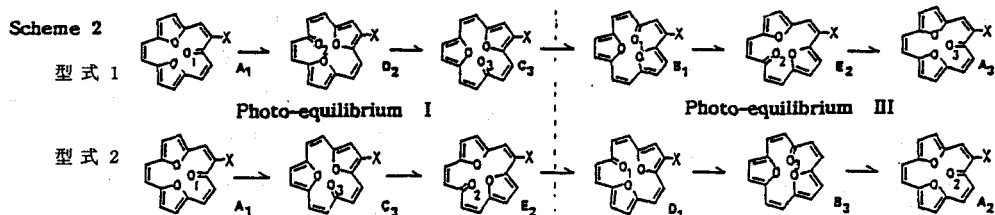


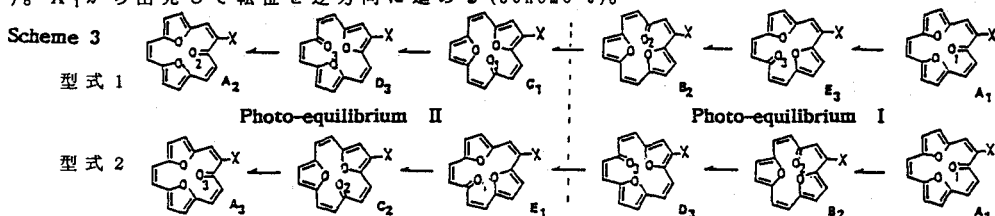
Fig. 1. ^{17}O -NMR spectra of ^{17}O -enriched oxygen bridged-[15]annulenone in CD_2Cl_2 at 67.7 MHz: (a) C^{17}O enriched sample; (b) after 150 hr irradiation of sample (a) in CD_2Cl_2 , and (c) de-enrichment of sample (b) at the carbonyl site by refluxing 24 hrs in dioxane / H_2O .

3. 光平衡系の2つの転位様式

A異性体をジオキサン中、少量の H_2SO_4 存在下 60° で H_2^{17}O と加温し、カルボニル酸素を ^{17}O でエンリッチしたサンプル A_1 を調製した。 A_1 に光を照射してA~E異性体を生成させたのち、各位置異性体をHPLCで分離し、 ^{17}O がカルボニル酸素上にあるかまたはフラン環のエーテル性酸素上にあるかを ^{17}O -NMRを用いて判別した。その結果、出発物質A以外は全ての位置異性体で ^{17}O はフラン環上にあることが判った。架橋基の転位には型式1と2、あるいは型式1と2の混合系が考えられる (Scheme 2 and 3)。Scheme 2について、 A_1 から出発して矢印の方向に転位を進める。カルボニル基がフラン環に組換わった後、もとあったフラン環の酸素がカルボニル基に組換わる型式1では、 $A_1 \rightarrow D_2 \rightarrow C_3 \rightarrow B_1 \rightarrow E_2 \rightarrow A_3$ のように、またフラン環が連続して2回順に生成した後に、2番目のフラン環の酸素がカルボニル基に組換わる型式2では、 $A_1 \rightarrow C_3 \rightarrow E_2 \rightarrow D_1 \rightarrow B_3 \rightarrow A_2$ のような配列を得る。



いずれの型式でも、架橋基の転位が進んで位置異性体の下付数字が1に達するとカルボニル基上に ^{17}O が来るので上記の実験結果から光平衡系はその手前の位置異性体までである (Scheme 2)。 A_1 から出発して転位を逆方向に進める (Scheme 3)。



型式 1 と 2 では、それぞれ C_1 と E_1 に達すると、カルボニル基上に ^{17}O が来るので、光平衡系はその手前の位置異性体どまりとなる。結局、光平衡系は型式 1 では、 $B_2 \rightleftharpoons E_3 \rightleftharpoons A_1 \rightleftharpoons D_2 \rightleftharpoons C_3$ 、型式 2 では、 $D_3 \rightleftharpoons B_2 \rightleftharpoons A_1 \rightleftharpoons C_3 \rightleftharpoons E_2$ となり、これを光平衡系 I とする。光平衡系 I が型式 1 をとると、 C_3 と B_1 とのリンクを介して平衡系 I は平衡系 III と、また B_2 と C_1 のリンクを介して光平衡系 II と連結する。実験結果を上記の考察でまとめると、 A_1 を 150 時間光照射した光平衡系 I の両端の位置異性体 (型式 1 では C_3 と B_2 、型式 2 では E_2 と D_3) は決して互いにリンクしないことを示唆している (Scheme 4 参照)。

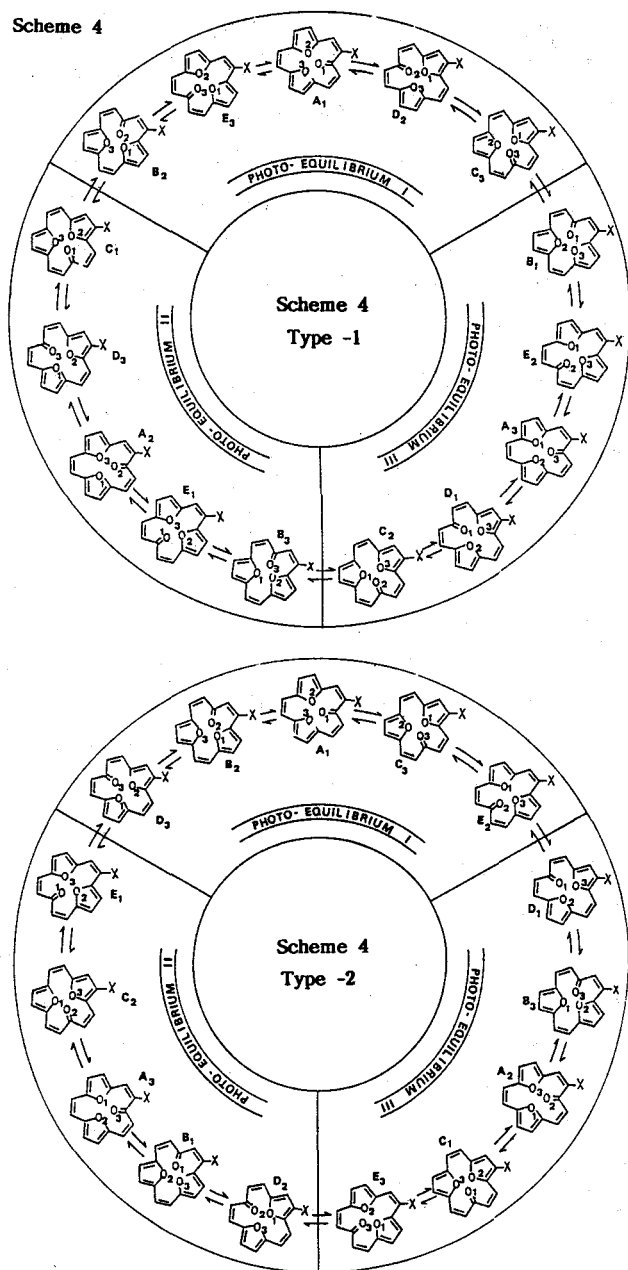
4. 光転位様式と光平衡系 I, II, III の相互連結の決定

転位型式 1, 2 のいずれによって酸素架橋基の組換えが起こるかを決定するためには、次の 2 つの方法が有効であると考えられた。(1) A_1 の光照射によって、生成する位置異性体の時間的分布を速度論的に調べる。(2) 光平衡系 I を発生させておき、これから特定の位置異性体 (あるいは複数の位置異性体) を除去した混合物を調製した後、再度光照射して新たに光平衡を達成させて、さきに除去した特定の位置異性体を取りだし、 ^{17}O ラベルがカルボニル酸素とフラン環エーテル性酸素上に出現する比率を調べる。ただし、実験結果から光転位の量子収率は低いので、異なる光平衡系間の連結性をしらべるには 100 時間以上の光照射が必要であった。

以下の 2 つの実験結果は、光転位が型式 2 で起こり、かつ光平衡系 I と III は E_2 と D_1 で連結していることを支持した。

① A_1 に 77 時間光照射すると異性体 B と C の生成が起こった。異性体 C を単離したのち H_2^{17}O でそのカルボニル基をエンリッチし、再度 30 時間光照射すると未反応の異性体のほかに、A と B 異性体が生成した ($B/A \approx 2$)。 ^{17}O はいずれの異性体においてもフラン環上 (δ 242 ppm) にあった。D の生成は A よりも少なかった。この結果は転位が、型式 1 よりも 2 で起こっていることを支持している。型式 1 に従えば Scheme 2, 型式 1 より D は C から 1 段階目の転位体なのでその生成は A より多くなければならない。しかし、これは観察されていない。型式 2 に従うと、C から A の生成と B の生成が各々 1 段階目と 2 段階目の転位として起こり、D の生成量は A の生成量より少ないことが説明できる。 $B/A \approx 2$ が起こる理由として、生成した B が光で cis \rightarrow trans 幾何異性化を起こし、一度光転位の系外にでた後、dark で B trans \rightarrow B cis への異性化が起こること

Scheme 4



5. 結論

^{17}O -NMRは酸素架橋[15]アツレノンの架橋基転位の反応機構の究明に強力な手段であることが判った。酸素架橋[15]アツレノンの架橋基転位反応を種々の置換体に応用して、官能基の導入位置の異なる種々のアツレノンを光化学的に系統的に合成できる展望が拓けた。

Reference

- (1) H. Ogawa, M. Maruoka, T. Imoto, Y. Kato, Y. Nogami, and T. Koga, *J. Chem. Soc. Commun.* **1991**, soon to be published.

で説明できる。

②カルボニル基を ^{17}O でエンリッチした A_1 に光照射して光平衡系Iを得たのち、その光平衡系IからBをとりのぞき、DおよびCの混合比が平衡系IのDおよびCの組成より高くしたA, E, C, Dからなる混合物に70時間光照射して、Bを再生させた。再生Bをクロマトグラフィーにより他の位置異性体から分離し、再生Bの ^{17}O -NMRを測定すると、 ^{17}O はカルボニル基上になくフラン環エーテル性酸素に存在することが判った。Bを取り除いた後、平衡系I中のDとCからBが生成する際、型式Iを探ると平衡系Iの C_3 から光平衡系IIIにシフトして、 C_3 から1段目で B_1 を、また D_2 からは2段目の光転位で B_1 が生じるはずである。生じる B_1 にはカルボニル酸素上に ^{17}O があるべきであるが、これは実験から支持されなかった。この結果は型式Iで光転位が起こっていないことを指示する。型式2では、Bの再生は光平衡系I内部での転位として位置づけできる。すなわち D_3 および A_1 からそれぞれ1段目の光転位として B_2 が再生する。この際、Bの ^{17}O はフラン環上に存在しており、実験結果と一致する。

P39

An Observation of ^{23}Na NMR Triple-Quantum Dynamic Shifts in Solution

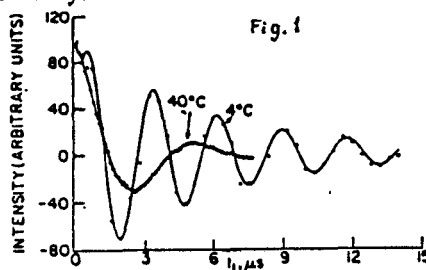
Hadassah Shinar, Uzi Eliav and Gil Navon

School of Chemistry, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Tel Aviv 69978, Israel

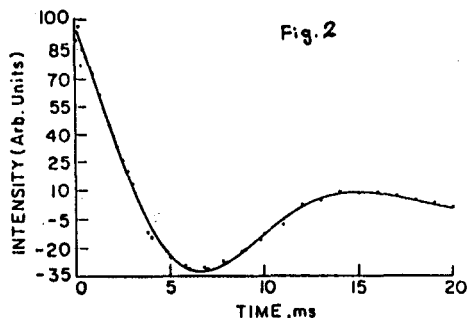
Multiple quantum coherence spectroscopy of spin $3/2$ nuclei in solution has recently become a subject of intensive research. It was found, both theoretically and experimentally, that in all cases where the single quantum transitions differ in their widths and peak positions, higher order coherences may be observed^{1,2}. The shift of the resonance frequency, relative to the Larmor frequency resulting from relaxation processes is referred to as dynamic frequency shift (DFS). Theory predicts that this shift is smaller than the line width for double quantum (DQ) coherences³ but significantly larger for triple quantum (TQ) coherences^{3,4}.

We chose to demonstrate the phenomenon of TQ DFS in solutions of ^{23}Na on two types of systems. First, a simple one site system with no exchange, and then a system where Na^+ is bound at a slowly rotating site and exchanges with free Na^+ in the bulk. The TQ evolution was measured by varying t_1 in the sequence $\pi/2-\tau/2-\pi-\tau/2-\pi/2-t_1-\pi/2-t_2(\text{Acq})$ ^{1,2}. The carrier frequency was centered on the peak of the narrow SQ transition. In the absence of dynamic shifts, the TQ evolution is a simple monoexponential decay.

The TQ evolution plots for the single site system are given in Figure 1. The TQ DFS is larger at the lower temperature, while the TQ decay rate is smaller. Analysis of the curves in terms of the microscopic parameters yielded 7.6 ns and 1.9 ns for τ_R , the rotational correlation time, at 4°C and 40°C respectively. χ , the quadrupolar coupling constant was found to be 1.55 MHz, and is independent of the temperature.



^{23}Na NMR TQ coherence time evolution for Na-Kryptofix 221 in glycerol, 105.8 MHz.



^{23}Na NMR TQ coherence time evolution for a solution containing 4.0 mM HSA coupled to DTPA, 130 mM NaCl, pH 9.6, 105.8 MHz.

In figure 2, the TQ evolution plot is given for a system of human serum albumin coupled to the metal chelator diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). In this way we achieve a macromolecular system with well defined binding sites for the sodium ions. The results may be rationalized in terms of a small fraction (p) of bound Na^+ in fast exchange with free sodium. $\chi\sqrt{p}=0.21$ MHz and $\tau_R=26$ ns were obtained from T_{2f} and TQ DFS the two parameters which are not affected significantly from the relaxation of the free ^{23}Na .

A discrimination between intra and extracellular NMR signals, of alkali metal ions has been made possible with development of shift reagents. However, the introduction of these shift reagents to living systems may have some undesirable effects. It has been shown that intracellular ^{23}Na shows a more pronounced biexponential behaviour than extracellular ^{23}Na ^{5,6} and thus the TQ DFS at the two compartments is expected to be different. The results presented here raise the possibility that the signals from intra and extracellular spin $3/2$ ions, may be separated, non invasively on the basis of their different TQ dynamic shift.

1. J. Pekar and J.S. Leigh, Jr., J. Magn. Reson. 69, 582 (1986).
2. G. Jaccard, S. Wimperis and G. Bodenhausen, J. Chem. Phys. 85, 6282 (1986).
- 3a. U. Eliav, H. Shinar and G. Navon, J. Magn. Reson., in press.
- b. U. Eliav, and G. Navon, J. Chem. Phys., in press.
4. L. Werbelow and G. Pouzard, J. Phys. Chem. 85, 3887 (1981).
5. H. Shinar and G. Navon, a) Biophys. Chem. 20, 275 (1984), b) Magn. Reson. Med. 9, 927 (1986), c) Biophys. J. 59, 203 (1991).
6. C.S. Springer, Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 16, 975 (1987).

(阪大理) ○石丸 臣一・増井 大二・中村 亘男

2D nutation NMR study of sodium ion conductors

S. Ishimaru, H. Masui, N. Nakamura

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka university

^{23}Na 1D and 2D nutation NMR experiments were conducted in order to study the dynamic property of sodium ions in some NASICON type superionic conductors. The 1D spectrum indicates that the crystal of $\text{Na}_3\text{In}_2(\text{PO}_4)_3$ undergoes phase transitions around 230K and 330K. There are three inequivalent Na sites below 330K and two above the phase transition. From the 2D nutation spectrum obtained at 330K the value of e^2Qq/h was estimated to be about 0.5MHz for one site and the another site has a slightly lower e^2Qq/h than 0.5MHz.

序) NASICON型の超イオン伝導体は、結晶中にいくつかの結晶学的に非等価な site を持っており、イオンがこれらの site を跳び移ることによって電気伝導性を生じる。通常の1次元 NMR では、これらの site の信号が重なり合うため、異なる site を特定することが極めて困難である。我々は先に 2D nutation NMR

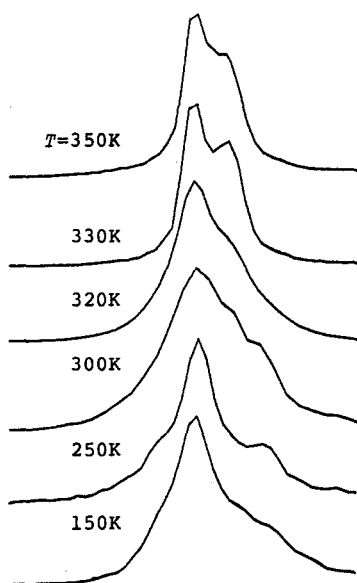


Fig. 1

Temperature dependence of ^{23}Na 1D NMR spectrum of $\text{Na}_3\text{In}_2(\text{PO}_4)_3$

によって site を分離する手段を提出し、¹⁾ これをいくつかの NASICON 型超イオン伝導体に応用してきた。²⁾ 今回は、主として $\text{Na}_3\text{In}_2(\text{PO}_4)_3$ について ^{23}Na の 1D 及び 2D nutation NMR の測定を行い、イオン伝導に関連する動的挙動について考察を行った。

実験) $\text{Na}_3\text{In}_2(\text{PO}_4)_3$ の試料は Na_2CO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, In_2O_3 を原料として焼結法により作成した。 ^{23}Na の NMR は、150K から 350K の間で共鳴周波数 52.938MHz 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、これを 2次元フーリエ変換することによって得た。

結果及び考察) $\text{Na}_3\text{In}_2(\text{PO}_4)_3$ の 1次元 NMR スペクトルの温度変化の様子を図 1 に示す。DTA の結果によると、230K と 330K の付近で相転移が起こることが確認されたが、これに対応して、NMR スペクトルにも明かな変化がみられた。それぞれの温度でのスペクトルは何れも 2 ないし 3 本のピークの重ね合わせになっており、各相で少

しずつ線形が違うが、どの相でも温度の上昇とともに各ピークの chemical shift の差が小さくなってゆくのが分かる。これは、結晶学的に異なる site 間での Na^+ イオンの交換が温度の上昇と共に次第に激しくなってゆくことを示している。しかし、1D のスペクトルでは、何れの場合も 1 次の核四極相互作用による satellite は観測されず、各 site での e^2Qq/h 及び η の値を決定することはできない。2 つのピークが最もはっきり分離している 330K での 2 次元 nutation NMR の測定結果を図 2 に示す。図の横軸が通常の 1 次元スペクトルの軸、縦軸が nutation 軸である。図中に a, b で各ピークの中心位置を示す。simulation の結果、peak a から $e^2Qq/h \approx 0.5\text{MHz}$ が得られた。peak b ではそれより若干小さい値になると思われる。 η はどちらもかなり小さいものと思われる。

発表では、その他の温度での解析結果と $\text{Na}_{3.2}\text{Hf}_2\text{Si}_{2.2}\text{P}_{0.8}\text{O}_{12}$ の測定結果も合わせて報告する予定である。

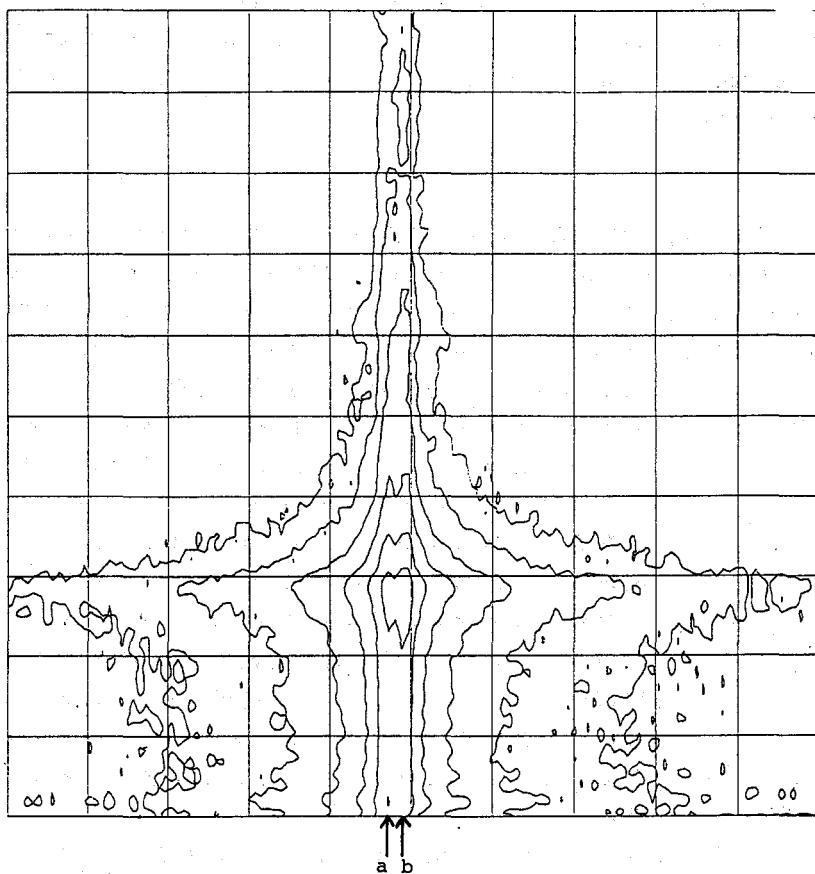


Fig. 2 Contour plot of ^{23}Na 2D nutation spectrum of $\text{Na}_3\text{In}_2(\text{PO}_4)_3$ at 330K.

References

- 1)大木 寛, 中村 亘男, 千原 秀昭, 日本化学会第60秋季年会予稿集, 1990, p308.
- 2)H. Ohki, N. Nakamura, H. Chihara, 11th International Symposium on Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy, London, 1991.

高温酸化物融体の NMR

 ^{11}B , ^{23}Na 核の緩和時間の測定

(北大理、*北大工) 稲垣陽介、前川英己、*下川繁三、横川敏雄

High temperature NMR studies of oxide melts,
relaxation time measurements of ^{11}B and ^{23}Na nucleus.Yosuke Inagaki, Hideki Maekawa, *Shigezo Shimokawa,
Toshio Yokokawa

(Fac. of Sci. and *Fac. of Eng. Hokkaido Univ.)

High temperature NMR relaxation time measurements were made on ^{11}B and ^{23}Na nucleus in sodium borate glasses and melts.For sodium diborate glass ($\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{B}_2\text{O}_3$), the relaxation time (T_1 and T_2) was obtained in the temperature range from room temperature to 1000°C . The spin-lattice relaxation time (T_1) have minima at 730°C and 550°C for B and Na, respectively.

[序] ほう酸塩、けい酸塩などのガラス形成酸化物は、イオン性と共有結合性の混在した結合を持ち、イオン性と分子性の中間に位置する物質系と考えられる。また、基本単位 (SiO_4 , BO_4 四面体, BO_3 三角形等) が、3次元的につながった網目構造をとることが特徴である。一方、それらは、ガラスやセラミックスの基本材料であり、またその融体はマグマ溜りやスラグのモデル化合物として重要である。その熔融状態下での構成イオンの拡散挙動や微視的な構造についての知見を得ることにより、理解の立ち後れているガラス転移、液体-固体、固体-固体の種々の相転移を含む構造変化、融液の動的性質の解明が進むものと考えられる。一方、高温下での NMR 線形、緩和時間の測定から、観測核の周りの環境の運動に関する情報が、化学結合状態(化学シフト)に関する情報と共に得られている(1-4)。今回、ガラス形成酸化物に対して、ガラス転移のメカニズムや、熔融状態の構造化学に関する情報が高温下での NMR 測定によって得られると考え、典型的なガラス形成酸化物である $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 系ガラス及び融体について緩和時間、 T_1 , T_2 の測定を行った。

[装置] NMR 装置は Bruker MSL-200、磁石は super wide bore (bore径 150mm)、磁場の強さ 4.7T である。緩和測定用に新たに開発した高温 NMR プローブは、これまで用いていた低出力型のプローブ(1)の改良型となっている。同調回路部分に 15kV耐電コンデンサーを用い、検出コイルをソレノイド型とし、観測核種に合わせて取り替えられるようにした。

キーワード: 高温 NMR, ^{11}B , ^{23}Na , 緩和時間 (T_1 , T_2), $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$

融体、ガラス

いながきようすけ、まえかわひでき、しもかわしげぞう、よこかわとしを

また、ヒーターは0.4mmφの白金線で、従来の2ヒーター方式から、コイル部分を直に加熱する方式に変更したため、より均熱性が高くなっている。

ヒーターは2本並列に互いに反対方向に電流を流す様に無誘導型で巻き、加熱には直流安定化電源を用いた。実験中は常時電流を供給したが電流により誘起されるシフトは34Hz以下である。

このプローブを用いてこれまでに、 ^{17}O 、 ^{29}Si 、 ^{23}Na 、 ^{27}Al 、 ^{11}B 、 ^{31}P の測定を行った。このうち ^{17}O 、 ^{11}B 、 ^{23}Na 、 ^{31}P については、緩和測定にも成功した。

〔実験〕 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ ガラス試料は、炭酸ナトリウムと無水ほう酸からなる混合物を、白金るつぼ中で熔融させ、急冷したものを、特製のアルミナ試料ケースにいれ、再び熔融、冷却した物を用いている。今回測定を行った $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ は、放冷により容易にガラス化する典型的なガラス形成酸化物である。試料はすべて室温でガラス状態から出発し、昇温、降温の過程での結晶化は観測されなかった。室温から高温にゆく過程において、ガラス→過冷却液体→液体状態での測定を行っていることになる。

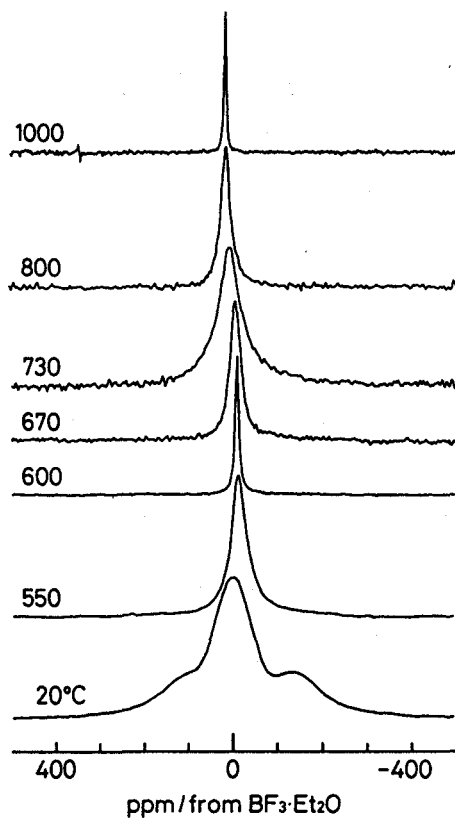


Fig.1 Temperature dependence of the ^{11}B NMR lineshapes of the $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{B}_2\text{O}_3$ glass and melt.

〔結果〕 Fig.1 には、 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{B}_2\text{O}_3$ の ^{11}B NMR スペクトルの温度変化を示した。ここで、低温での広幅スペクトルの測定には四極子エコー法を用いている。このガラス中には、ほう素を中心とした2種類の構造グループがあることがよく知られている。(5) 室温でのスペクトルの中央の盛り上がりは酸素4配位ほう素（ほぼガウス型：四極子結合定数が小さい）その両わきに見えるのが酸素3配位ほう素（大きな四極子結合定数を持つために2次の四極子相互作用に起因する特徴的な線形を示している。）に対応する。

$\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{B}_2\text{O}_3$ 組成で観測された ^{11}B NMR 線形は、Fig.1 で見られるように室温から

550℃までの温度領域では、3配位ほう素からと4配位ほう素からの信号の重なった線形を示すが、550℃以上では、単一のローレンツ型のピークとなった。600℃まで線幅は温度と共に減少するが、600℃～730℃で線幅の増加が観測され、730℃を過ぎるとふたたび線幅は減少した。

Fig. 2には、 B_2O_3 と $Na_2O \cdot 2B_2O_3$ の T_1 と化学シフトの温度変化を示した。 T_1 と線幅の逆数との間には、600℃以上で $T_1 = 1/\pi f$ (f : 半値半幅(Hz))の関係がみられることから、 $T_1 = T_2$ が成立している。また、観測されたピーク位置は温度上昇にともない、高磁場側へシフトし、730℃以上で一定値(16ppm)となった。また、ピーク位置が一定となるのは、 T_1 の最小値が観測される温度とほぼ一致している。

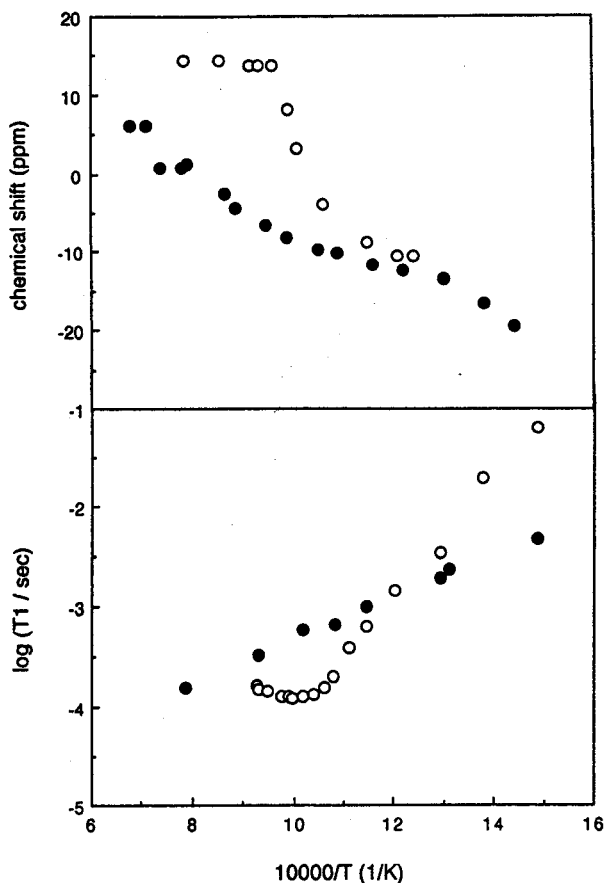


Fig. 2 (above) Temperature dependence of the ^{11}B chemical shifts(ppm from $BF_3 \cdot Et_2O$) of (●) B_2O_3 and (○) $Na_2O \cdot 2B_2O_3$ melts.

(below) Temperature dependence of the ^{11}B spin-lattice relaxation times(T_1) of (●) B_2O_3 and (○) $Na_2O \cdot 2B_2O_3$ melts.

鉱物などのほう酸塩結晶、ガラスの MAS-NMR 測定によって得られている等方的化学シフト値は、3配位が 12~18 ppm、4配位が ~0 ppmと与えられている。(6) 730℃以上の温度で観測された化学シフト値(16ppm)は、3配位ほう素の範囲に入っている。

Fig. 3には、 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{B}_2\text{O}_3$ ガラスの ^{11}B 及び ^{23}Na の T_1 の温度依存性を示した。 ^{11}B では730℃付近、 ^{23}Na では550℃付近に T_1 の最小値がそれぞれ観測された。

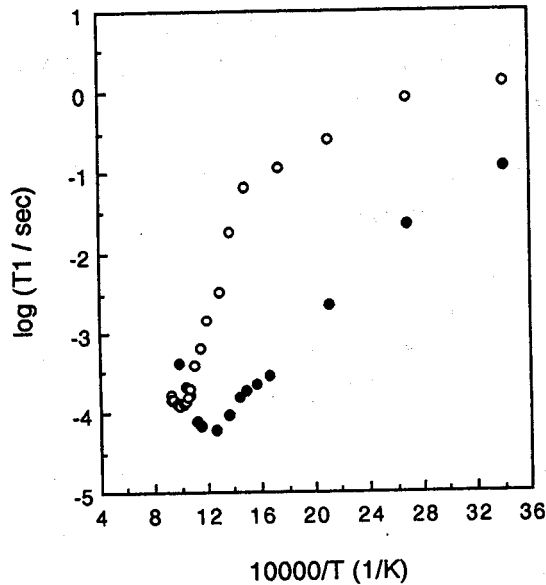


Fig. 3 Temperature dependence of T_1 of $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{B}_2\text{O}_3$. (●) ^{11}B and (○) ^{23}Na results, respectively.

参考文献

- (1) S. Shimokawa, H. Maekawa, E. Yamada, T. Maekawa, Y. Nakamura, and T. Yokokawa Chem. Lett., 617(1990/4)
- (2) H. Maekawa, Y. Inagaki, S. Shimokawa, Y. Nakamura, T. Maekawa, and T. Yokokawa Mater. Sci. Forum, 73, 123(1991)
- (3) S.-B. Liu, A. Pines, M. Brandriss, and J. F. Stebbins, Phys. Chem. Minerals, 15, 155(1987)
- (4) D. Massiot, F. Taulelle, and J. P. Coutures Colloque de Physique C5-425(1990)
- (5) J. Zhong and P. J. Bray, J. Non-cryst. Solids, 111, 67(1989)
- (6) G. L. Turner, K. A. Smith, R. J. Kirkpatrick, and E. Oldfield, J. Magn. Reson., 67, 544(1986)

本研究の一部は三菱財団研究助成金により行ったものであることを付記する。

Solid State Chemistry and Solution Chemistry of Platinum Blues

H. Moriyama ^{a)} and K. Matsumoto ^{b)}(Departments of Chemistry, ^{a)}Toho University, Funabashi, Chiba 274 and ^{b)}Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo 169)

Abstract: Some amidate-bridged binuclear or tetranuclear platinum complexes related to so-called "platinum blues" were synthesized, and crystal structures were determined by X-ray diffraction analysis. These complexes in solutions were characterized by ¹H, ¹³C, ¹H-¹³C COSY, ¹⁹⁵Pt NMR spectroscopy, and compared to the crystal structures and ¹³C CP/MAS spectra. They were demonstrated to designate complicated behavior in solutions, e.g., head-to-head to head-to-tail transformation, conversion to tetranuclear from binuclear complex, solvolysis to mononuclear complex, etc. These intriguing solution structures are also to be compared to the electrochemical nature of these platinum complexes.

Amidate-bridged binuclear or tetranuclear platinum complexes related to the so called "platinum blues" are quite interesting in the viewpoint of not only structural chemistry but also antitumor platinum metallotherapy. However, the crystal structure and solution chemistry of these platinum complexes have not been fully clarified until recently. In the present study, we would like to report solid and solution structures of some "platinum blue" complexes by X-ray structural analyses and NMR spectroscopy.

[I] [Pt^{II}₂(NH₃)₄(C₄H₆NO₂)₂]₂(PF₆)(NO₃)·H₂O ¹⁾

The crystal structure and ¹³C and ¹⁹⁵Pt NMR spectra of the α-pyrrolidonate-bridged Pt(II) binuclear complex, [Pt^{II}₂(NH₃)₄(C₄H₆NO₂)₂]₂(PF₆)(NO₃)·H₂O show that it is tetranuclear in the solid state, although the complex cation is binuclear in solution. The crystal structure is basically identical with that of previously reported cis-diammineplatinum α-pyrrolidonate tan cation [Pt₄(NH₃)₈(C₄H₆NO)₄]⁶⁺. ²⁾ The amidate-bridged Pt-Pt distance in the complex is 3.033(2) Å, and the central Pt-Pt distance, without the amidate bridge, is 3.186(2) Å (Fig. 1).

Both ¹³C and ¹⁹⁵Pt NMR spectra of the present complex in D₂O revealed the co-existence of head-to-head (H-H) and head-to-tail (H-T) isomers, indicating that the H-H isomer very rapidly isomerizes to H-T isomer on dissolution in water and both isomers exist in equilibrium in solution (Fig. 2,3,4). This rapid isomerization contrasts to the case of the corresponding α-pyridonate complex [Pt₂(en)₂(C₅H₄NO)₂]⁴⁺. ³⁾ whose isomerization equilibrium requires about 2 days to be established.

白金ブルー系錯体、白金二核錯体、白金四核錯体、パラジウム二核錯体、異性化、¹H NMR、¹³C NMR、¹⁹⁵Pt NMR

もりやまひろし、まつもとかずこ

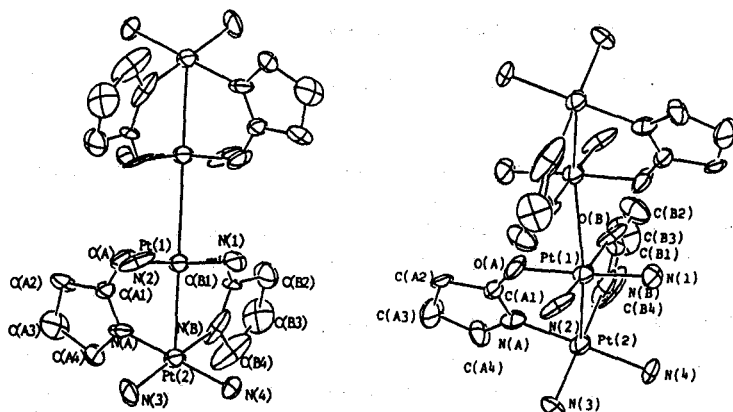


Figure 1. Molecular structure of $[\text{Pt}_2(\text{NH}_3)_4(\text{C}_4\text{H}_6\text{NO})_2]^{4+}$ observed from two different angles. The molecule has an inversion center at the midpoint of the Pt(1)–Pt(1') vector. Thermal ellipsoids are drawn at 50% probability.

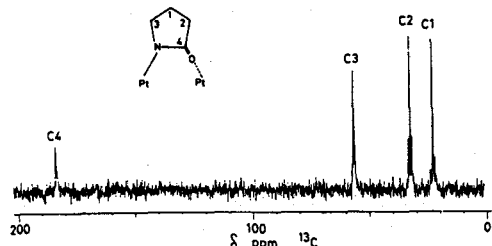


Figure 2. ^{13}C NMR spectrum of $[\text{Pt}_2(\text{NH}_3)_4(\text{C}_4\text{H}_6\text{NO})_2]^{2+}$ in D_2O , measured on a JEOL FX90A spectrometer.

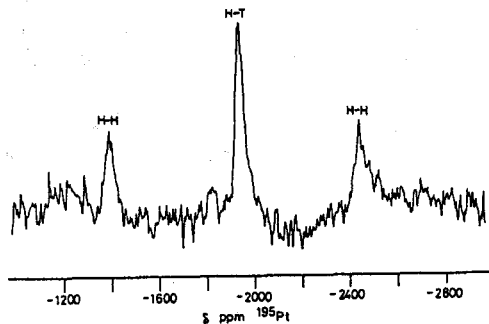


Figure 3. ^{195}Pt NMR spectrum of $[\text{Pt}_2(\text{NH}_3)_4(\text{C}_4\text{H}_6\text{NO})_2]^{2+}$ in D_2O , showing the existence of H-H and H-T isomers.

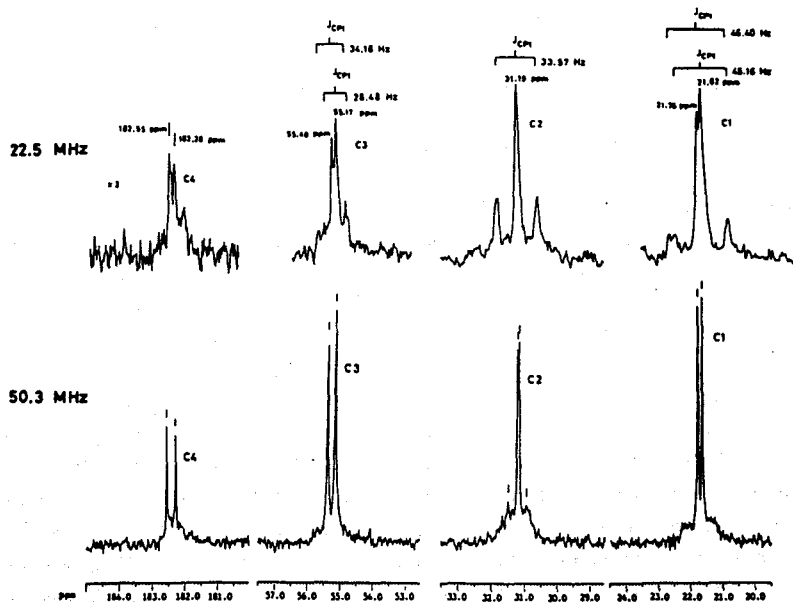
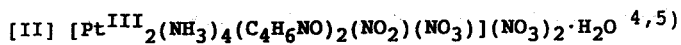


Figure 4. Enlargement of the four ^{13}C NMR peaks in Figure 2 (JEOL FX90A, at 22.5 MHz, upper four peaks) and the same peaks measured on a Bruker AC200P spectrometer, at 50.3 MHz (lower four peaks). The two closely lying peaks for each carbon show the existence of H-H and H-T isomers.



The α -pyrrolidionate-bridged binuclear Pt(III) complex $[\text{Pt}^{\text{III}}_2(\text{NH}_3)_4(\text{C}_4\text{H}_6\text{NO})_2(\text{NO}_2)(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ was also prepared by oxidation of

[Pt^{II}₂Pt^{III}₂(NH₃)₈(C₄H₆NO)₄](NO₃)₂·2H₂O with HNO₃. The crystal structure was solved by X-ray diffraction analysis, and ¹³C and ¹⁹⁵Pt NMR, and UV-vis spectra, and the electrochemical properties are investigated. The two Pt(III) atoms are bridged by two α-pyrrolidionate ligands in a head-to-head manner. Each Pt(III) atom is also coordinated by two NH₃ groups in cis position. One of the Pt atoms is axially coordinated by NO₂⁻ and the other is by NO₃⁻ (Fig. 5).

[III] [Pt^{II}₂(NH₃)₄(C₇H₁₀NO₂)₂](NO₃)₂·H₂O 6)

3,3-dimethylglutarimide-bridged Pt(II) complex has a binuclear structure with two bridging 3,3-dimethylglutarimide ligands in a head-to-tail (H-T) manner. Each platinum atom is coordinated with two amine ligands in cis position, a deprotonated nitrogen atom and an oxygen atom of 3,3-dimethylglutarimide ligands. The Pt-Pt separation within the complex cation is 2.939(1) Å (Fig. 6). It was demonstrated that the ¹³C NMR spectrum in solutions, although the ¹³C spectrum of this complex in D₂O measured immediately after dissolution corresponds to the solid structure, gradually changes to the solvolysis product of mononuclear platinum complex from the results of ¹³C and ¹⁹⁵Pt NMR in D₂O and DMSO-d₆.

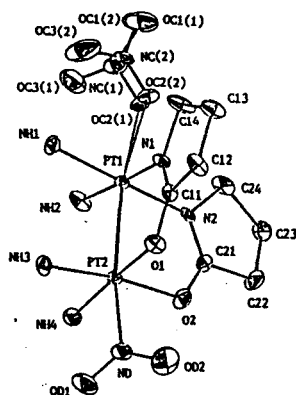


Figure 5. Molecular structure of H-H [Pt^{III}₂(NH₃)₄(C₄H₆NO)₂(NO₂)(NO)]²⁺. The thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level.

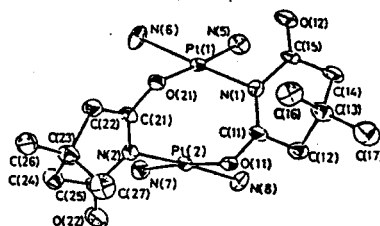


Figure 6. ORTEP drawing of H-T [Pt₂(NH₃)₄(C₇H₁₀NO₂)₂]²⁺. Thermal ellipsoids are drawn at 50% probability.

[IV] [Pd₂(en)₂(C₅H₄NO₂)₂](NO₃)₂ 7)

In comparison with the "platinum blues", binuclear palladium analogue [Pd₂(en)₂(C₅H₄NO₂)₂](NO₃)₂ has been synthesized and the crystal structure has been solved with a single-crystal X-ray diffraction technique. The binuclear complex cation has head-to-head geometry with Pd-Pd distance of 2.981(1) Å. Two binuclear cations are arranged in the crystal as if to form a zigzag chain of four palladium atoms with an inversion center at the midpoint of the central Pd-Pd vector between the two dimers. However, the central Pd-Pd distance is 3.220(1) Å and is not Pd-Pd bond (Fig. 7). The ¹³C NMR spectrum of the compound shows two very close signals for every carbon resonance in D₂O and DMF-d₇, which indicates the co-existence of head-to-head (H-H) and head-to-tail (H-T) isomers (Scheme I, Fig. 8,9). Although the isolated complex is pure H-H complex, which was confirmed with powder X-ray diffraction, the isomerization to the H-T isomer after dissolution is very rapid and the equilibrium is established almost instantaneously after dissolution. The present complex is the first example of H-H to H-T isomerization of a binuclear palladium(II) complex in solution.

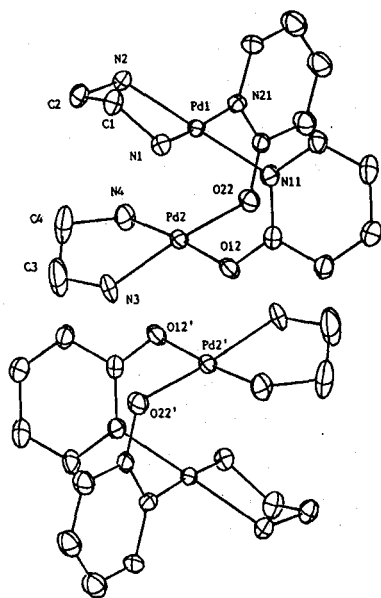
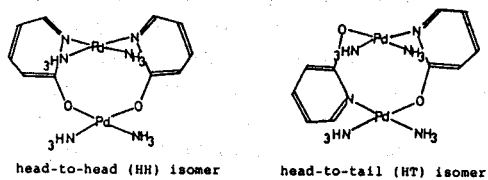


Figure 7. Molecular structure of HH $[\text{Pd}_2(\text{en})_2(\alpha\text{-pyridonato})_2]^{2+}$. The thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level.

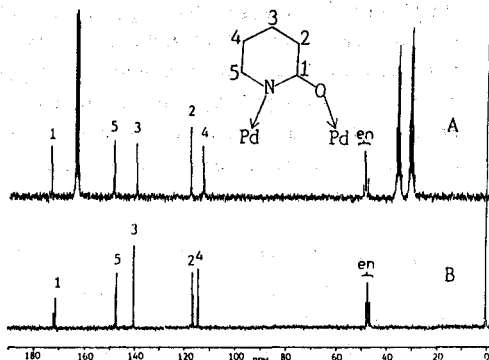


Figure 8. ^{13}C NMR spectra of $[\text{Pd}_2(\text{en})_2(\alpha\text{-pyridonato})_2](\text{NO}_3)_2$: (A) $\text{DMF-}d_7$ solution; (B) D_2O solution.

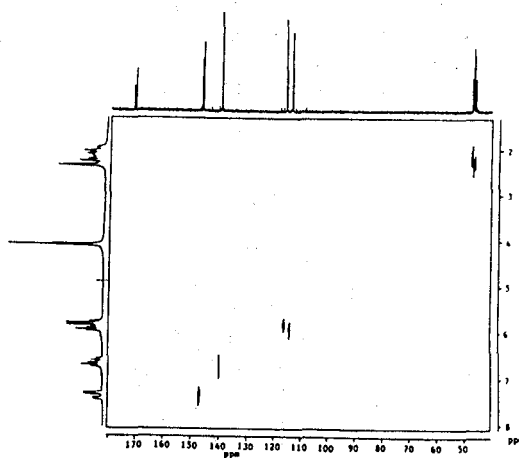


Figure 9. ^1H - ^{13}C COSY spectrum of $[\text{Pd}_2(\text{en})_2(\alpha\text{-pyridonato})_2](\text{NO}_3)_2$ in D_2O .

Acknowledgment:

We thank Dr. S. Hayashi of the National Chemical Laboratory for Industry, and Mr. J. Masuda and Mr. S. Fujita of Shimadzu Corporation for their help and effort in the measurement of ^{13}C and ^{195}Pt CP/MAS NMR spectra.

References:

- 1) K. Matsumoto, H. Miyamae, H. Moriyama, *Inorg. Chem.*, **28**, 2959 (1989).
- 2a) K. Matsumoto, K. Fuwa, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 897 (1982).
- 2b) K. Matsumoto, H. Takahashi, K. Fuwa, *Inorg. Chem.*, **22**, 4086 (1983).
- 3) L. S. Hollis, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3494 (1983).
- 4) T. Abe, H. Moriyama, K. Matsumoto, *Chem. Lett.*, 1857 (1989).
- 5) T. Abe, H. Moriyama, K. Matsumoto, *Inorg. Chem.*, in press.
- 6) H. Urata, H. Moriyama, K. Matsumoto, *Inorg. Chem.*, in press.
- 7) K. Matsumoto, H. Moriyama, K. Suzuki, *Inorg. Chem.*, **29**, 2096 (1990).

高分子ブレンドの固体NMRによる解析

大塚電子(株) MR技術部

○仲村 高志、河原 美智代、大川内 真、三浦 巖

Analysis of Polymer blends using the solid state NMR

Takashi Nakamura, Michiyo Kawahara, Makoto Okawauchi, and Iwao Miura

(Otsuka Electronics Co.,Ltd. MR Technical Division)

Solid State NMR is an useful and powerful technique for characterization of polymers. It can provide new information on the mechanism of microscopic phenomena in polymer blends.

The compatibility between polymers is of particular importance in the study of polymer blends. Caravatti and coworkers¹⁾ have reported on the two-dimensional proton exchange in a heterogeneous polymer blends. The technique used was spin diffusion and proved to be a very powerful method of polymer compatibility characterization. We have improved on this method by changing the pulse sequence.

【序論】

今日、高分子のキャラクタリゼーションには、固体NMRが果たす役割は大きく、多くの情報が得られることが分かっている。あらゆる種類の高分子について研究が行われ、その幾つかは成書²⁾³⁾にあげられている。

固体NMRによる研究は、他の分析機器や手法に拠っては得られない種々の知見を得ることに成功している。特に、高分子ブレンドの研究では、多成分系の相溶性についてのミクロな見地からの解析が¹⁾Hのスピン拡散によって詳細に解析することが可能であることがCaravatti¹⁾らによって、示唆されている。今回、我々はCaravattiらの用いた多重パルス系を変更し、分解能の良く、有用な¹⁾Hの固体高分解能の2次元スペクトルを得ることに成功したのでこれを報告する。

Keyword: Solid State NMR, 2D NMR, CRAMPS, Spin diffusion

なかむら たかし、かわはら みちよ、おおかわうち まこと、みうら いわお

【¹H 固体高分解能 NMR】

通常、¹H や ¹⁹F のように天然存在比が大きく、磁気モーメントの大きい核の場合の固体高分解能の NMR スペクトルは、多重パルス法⁴⁾と MAS (Magic Angle Spinning)⁵⁾ を組み合わせることによって達成される。これは、古くから知られている手法で CRAMPS (Combined Rotation And Multiple-Pulse Spectroscopy) と呼ばれている⁶⁾。しかし、これらの多重パルスを達成するためにはパルスのパラメータの設定が困難⁷⁾であるため、長い間 ¹H の固体高分解能 NMR による研究は盛んではなかった。近年、多重パルスが改良されたこと等の技術進歩により、分解能の良いスペクトルが報告⁸⁾⁹⁾されるようになり、感度も高いことからゼオライトやシリカーアルミナ¹⁰⁾の吸着状態の研究等の表面の解析に利用される等、その応用性が再び注目されている。

【実験】

実験は Chemagnetis 社製の固体高分解能スペクトロメータ CMX-300 を用いた。実験に使用したパルスシーケンスは図 1 にしめたもので Caravatti⁹⁾ らが ¹H - ¹H 双極子相互作用のデカップルに用いた多重パルス (MREV-8¹¹⁾¹²⁾) を変更して BR24¹³⁾ ($\pi/2$ パルスのシーケンス: x, y, -y, -x, -x, y, -y, x, y, x, -x, -y, -y, x, y, x, -x, -y, -y, x, -x, y, -x, y) とした。¹H の $\pi/2$ パルスには 1.3 μ sec、サイクルタイムは 108 μ sec を使用した。また、スピニングスピードは 1.4 kHz に設定した。試料は分解能調整のために和光純薬工業社製のアジピン酸に緩和試薬として Cracac を混合したものを用い、スピン拡散を確認するために用いた混合試料は和光純薬工業社製のアダマンタンおよびマロン酸を使用した。高分子ブレンドには SCIENTIFIC POLYMER PRODUCTS, INC. の Poly(vinyl methyl ether) (PVME) および東ソー社製の Polystyrene (PS) を用いて Caravatti⁹⁾ らと同様の溶液キャストブレンド (solution-cast blends) でトルエンおよびクロロホルムのそれぞれの溶媒についての 2 種類の試料を用意した。

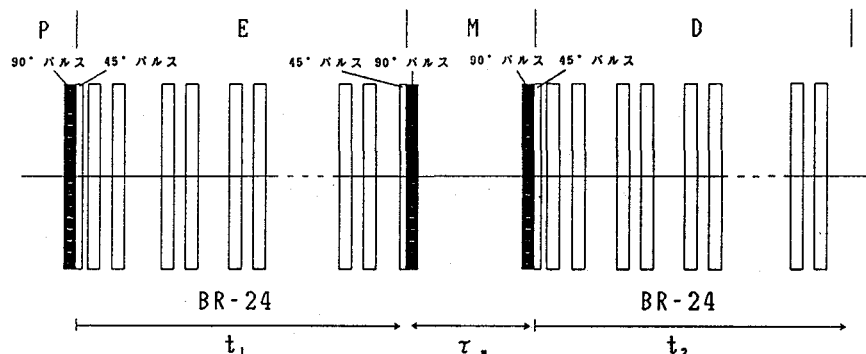


図 1. 2D プロトン スピン ディフュージョン法の
パルスシーケンス

- P: preparation by a $\pi/2$ pulse
- E: evolution for time t_1 under BR-24 decoupling
- M: spin diffusion during mixing time
- D: detection in the presence of BR-24 decoupling

【結果と考察】

図2に示すように、 ^1H の固体高分解能スペクトルを得た。Maciel¹⁾らの報告している分解能とはほぼ同等の結果である。分解能の調整はアジピン酸の $-\text{CH}_2-$ のスペクトルで行い、外部標準としてTMS Pを用い、スケールリングファクタは0.385とした。

図3はアジピン酸の分子内のスピン拡散を測定したもので、ミキシング時間は100msecである。次に、等量のマロン酸とアダマンタンの混合した試料の測定をしたものが図4である。マロン酸とアダマンタンのスペクトルの間にはクロスピークはなく、2つの試料間にはスピン拡散が観測されないことから改良したパルスシーケンスが高分解能を保持しながら2次元に展開出来たことを確認した。最後に、高分子ブレンドであるPS/PVMEの混合試料について図5に示す。Caravattiらの得た結果と同様のスペクトルを得た。

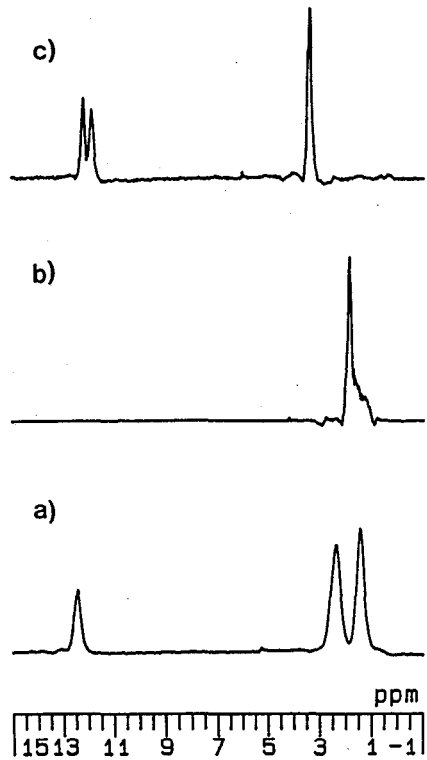


図2 ^1H 固体高分解能スペクトル
a) アジピン酸 b) アダマンタン
c) マロン酸

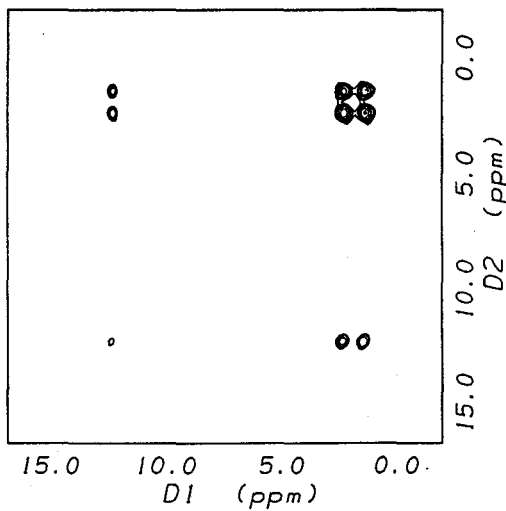


図3 アジピン酸の2次元スピン拡散スペクトル

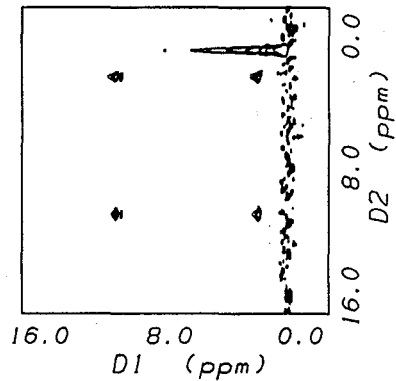


図4 マロン酸とアダマンタンの混合した試料の2次元スピン拡散スペクトル

【まとめ】

^1H の固体高分解2次元スピン拡散スペクトルを得ることが出来た。固体のミクロな状態についての強力な解析手段となるであろう。しかし、高分子のサンプルの場合にはCaravattiらの得ているスペクトルと分解能に差は見られない、これは高分子のミクロな運動性に関連したものであり、これ以上の分解能の向上は期待出来ないと思われる。更にこれからの課題として ^1H の観測を多重パルスを用いることで ^{13}C 等の他の核種で間接的に観測することが有用となるであろう¹⁴⁾。

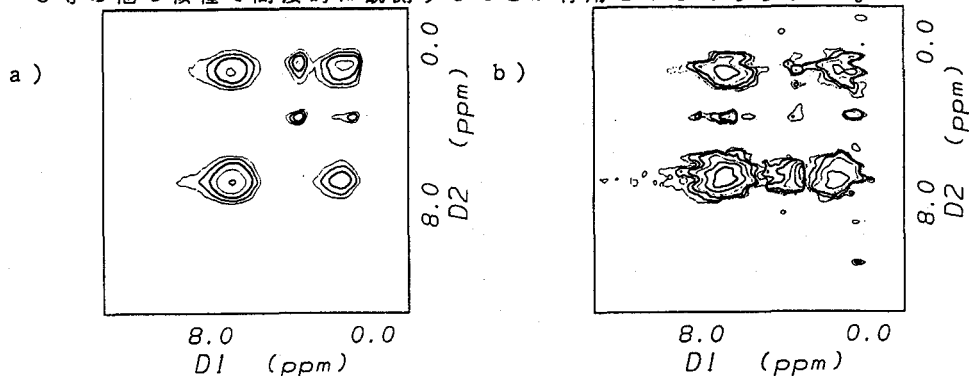


図5 高分子ブレンドPS/PVMEの2次元スピン拡散スペクトル

- a) 溶媒クロロホルムからキャストした試料の等高線図
 b) 溶媒トルエンからキャストした試料の等高線図

【参考文献】

- 1) P.Caravatti, P.Neuenschwander, R.R.Ernst, *Macromolecules*, **18**, 119-122 (1985).
- 2) R.A.Komoroski, "High Resolution NMR Spectroscopy of Synthetic Polymers in Bulk," VCH Publishers, Inc. Deerfield Beach, Florida (1986).
- 3) C.A.Fyfe, "Solid State NMR for Chemists," C.F.C. Press, Guelph (1984).
- 4) U.Haeberlen, "High Resolution NMR in solids. Selective Averaging," Academic Press, New York (1976).
- 5) a) E.R.Andrew, A. Bradbury, R.G.Eades, *Nature (London)*, **182**, 1659 (1958).
 b) I.J.Lowe, *Phys.Rev.Lett.*, **2**, 285 (1959).
- 6) B.C.Gerstein, C.Chou, R.G.Pembleton, and R.C.Wilson, *J.Phys.Chem.*, **81**, 565 (1977)
- 7) 寺尾 武彦、化学総説 No. 49, "新しい磁気共鳴と化学への応用" 日本化学会編、学会出版センター
- 8) C.E.Bronnimann, B.L.Hawkins, Ming Zhang, and G.E.Maciel, *Ann.Chem.* **60**, 1743 (1988)
- 9) S.F.Dec, C.E.Bronnimann, R.A.Wind, and G.E.Maciel, *J.Magn.Reson.* **82**, 454 (1989)
- 10) C.E.Bronnimann, I.Chuang, B.L.Hawkins, and G.E.Maciel, *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 1562 (1987)
- 11) W.K.Rhim, D.D.Elleman, and R.W.Vaughan, *J.Chem.Phys.*, **58**, 1772 (1973).
- 12) P.Mansfield, *J.Phys.C*, **4**, 1444 (1971).
- 13) D.P.Burum and W.K.Rhim, *J.Chem.Phys.*, **71**, 944 (1979).
- 14) J.Schaefer, private communication.

P44

^1H CRAMPSによるカオリナイトの構造の研究

— 天然物と合成物の比較

(化学技術研究所) ○林 繁信、 上田 貴洋、 早水 紀久子、
秋葉 悦男

Microstructure of kaolinites studied by ^1H CRAMPS

(National Chemical Laboratory for Industry) Shigenobu Hayashi, Takahiro Ueda, Kikuko Hayamizu, and Etsuo Akiba

Microstructures of various kaolinites have been studied by means of nuclear magnetic resonance to elucidate correlation between the intercalation phenomena and the microstructure. ^1H broad line spectra, CRAMPS spectra, and T_1 have been measured at room temperature, which demonstrates a variety of distribution and bonding states of hydrogens. In addition to the ^1H results, ^{29}Si and ^{27}Al results have also been reported.

カオリナイトは、 $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ の化学式を持つフィロケイ酸塩であり、Si層とAl層とが1対1で一つの層を形成している。Si原子は4配位、Al原子は6配位をとっている。層間にはイオン種はなくイオン交換機能はない。しかし、フォルムアミドのような分子を層間にインターカレーションさせることができる。このインターカレーションをするものは天然のカオリナイトにかぎられ、人工的に合成したものはインターカレーションをさせることができない。X線回折などの手段では天然物と合成物の違いを明らかにすることができていない。

NMRはマイクロ構造を調べる有力な手段である。カオリナイトの構成元素のうち酸素以外は比較的容易にNMR測定ができ、NMRに適した測定対象である。そこで、我々は、天然物と合成物とでマイクロ構造に違いがあるのかどうかを調べるために種々のNMR測定を試みた。

【実験】測定に用いたカオリナイトは10種類である。天然物は、関白(A)、API No.9標準試料(B)、アメリカジョージア産(C)、箱根大湧谷産(D)、木節(E)、蛙目(F)の6種類である。合成物は、水熱合成したものであり、290℃で反応させたもの(G)、220℃で反応させたもの(H)、0.1M LiCl溶液を用い220℃で合成したもの(I)、 D_2O を用い220℃で合成したもの(J)の4種類である。

NMR測定には、Bruker MSL400を用いた。測定はすべて室温で行なった。

【結果及び考察】カオリナイトの層間にはAlと結合した水酸基が出ている。インターカレーションにはこの水酸基がなんらかの影響を与えらる。そこで、

キーワード: NMR, ^1H , ^{29}Si , ^{27}Al , CRAMPS, カオリナイト, 構造

はやし しげのぶ、うえだ たかひろ、はやみず きくこ、あきば えつお

^1H NMRの測定を行なった。図1に10種類のカオリナイトの ^1H 広幅スペクトルとCRAMPSスペクトルを示した。種々のパターンを示し、天然物もしくは合成物内でもかなり水素のおかれている環境が違っていることがわかる。

広幅スペクトルではいずれの試料も少なくとも2成分以上の水素を含んでいる。線幅の広い成分はガウス型もしくはガウス型より四角張った線形をしており、約30 kHzの線幅を示す。この成分は、Alと結合した水酸基に帰属される。一方、線幅の狭い成分はローレンツ型の線形を示し、線幅は1.2~4.1 kHzである。層間に水分子は入り得ないため、この成分はカオリナイトの外表面に弱く吸着した水と考えられる。試料E、Fでは、8~10kHzの線幅を持つガウス型線形の成分が含まれており、前述の線幅の狭い成分は観測されない。線幅の広い成分も他の試料に比べて線幅が広い。

図のCRAMPSスペクトルはBR24パルス系列を用いQuadrature detectionを行なって測定した。図には現われていないが、Alとの双極子相互作用に起因するサイドバンドが両側に強く現われた。試料I、J以外はAl-OHに帰属されるピークが3 ppm付近に観測された。試料によってシフト値が微妙に変化している。試料I、Jは複数のピークを与え、Al-OH以外の化学種(例えばSi-OH)の混在も考えられる。

当日は、 ^{29}Si 、 ^{27}Al の測定結果についてもあわせて報告し、インターカレーションとの関連について議論したい。

謝辞: カオリナイトの試料を提供していただいた名工試の宮脇律朗氏に感謝いたします。

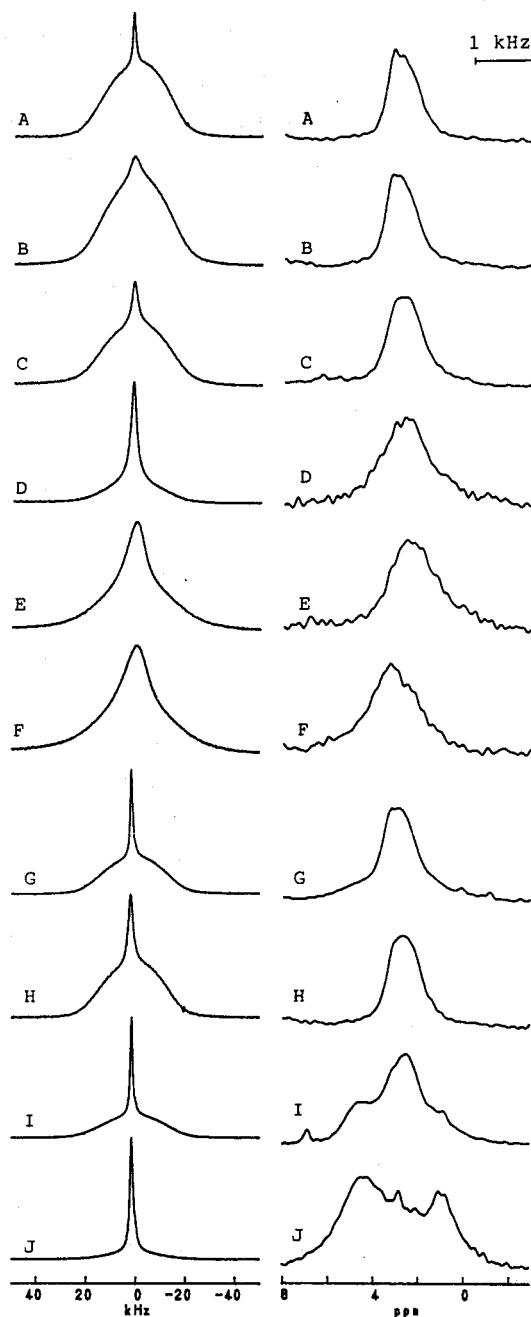


図1. ^1H 広幅スペクトル(左)と

CRAMPSスペクトル(右)。測定周波数400.14 MHz。室温。CRAMPS conditons: BR24(Quadrature detection), 90deg. pulse 1.6 μs , cycle time 144 μs , 256 cycles for 1 scan, 8~32 scans, and spinning rate 1.5~2.0 kHz。

固体金属カルボニルクラスター $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{HCo}_6(\text{CO})_{15}]$
 における ^1H NMR

○中山尋量・江口太郎・武田定*・中村亘男*・B.T. Heaton**
 (大阪大学教養部・大阪大学理学部*・リバプール大学**)

^1H NMR in Solid $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{HCo}_6(\text{CO})_{15}]$

H. Nakayama, T. Eguchi, Institute of Chemistry, College of General Education, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560,

S. Takeda, N. Nakamura, Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560,

B.T. Heaton, Department of Chemistry, University of Liverpool, Liverpool, L69 3BX, United Kingdom

We first obtained ^1H NMR chemical shift of a metal carbonyl cluster in the solid state. Proton chemical shift in solid $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{HCo}_6(\text{CO})_{15}]$ is -28 ppm contrary to 23.2 ppm in solution. This fact strongly suggests that proton does not locate at the centre of the Co_6 octahedron in solution. Some motional process would induce the low field shift. On the other hand, hydrogen probably stays in the centre of the Co_6 octahedron in the solid state.

はじめに 標題の化合物は、固体中では Figure 1 に示すように Co が八面体のクラスターを形成し、その中央に水素原子が存在した特異な化合物である/1/. 溶液にして ^1H NMR を測定すると、室温では信号が見えない。しかし、冷却してゆくと -100°C で 23.2 ppm に幅広いピークが存在する/2/. クラスターの水素化物ではふつう高磁場側 (-10 から -40 ppm) に信号がある。これらの事実は、水素原子が八面体の中央に存在せず何等かの運動をしている可能性を示唆するが、異常な電子状態による可能性も完全には否定できない。本研究では ^1H 固体高分解能 NMR を測定し、この点を明らかにする。

実験 試料は文献 2 の方法で合成した。溶液の赤外吸収スペクトルで不純物、分解成分がないことを確認した。Bruker MSL-200 を使用し、 ^1H 固体高分解能 NMR スペクトル (CRAMPS) を 200.13 MHz で測定した。

$[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{HCo}_6(\text{CO})_{15}]$, ^1H 固体高分解能 NMR, 金属カルボニルクラスター

なかやま ひろかず・えぐち たろう・たけだ さだむ・なかむら のぶお・
 ブライアントマス ヒートン

結果と考察 Figure 1 に結果を示す。6.7 ppm の信号はフェニル基のプロトンによる。-28 ppm の幅広い信号がクラスター中のプロトンによる。6.7 ppm と -28 ppm の信号の強度比は約 22:1 で水素数の比 30:1 とほぼ一致する。中性子回折によると^{1/}, 80 K では水素原子は Co₆ 八面体の中央に存在する。Table 1 のように他の金属多面体の間隙にある水素原子では高磁場（マイナス）側にケミカルシフトする

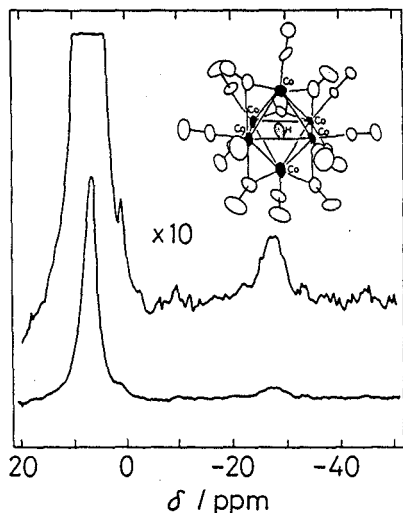


Figure 1. ¹H high resolution NMR spectrum of crystalline [(Ph₃P)₂N][HCo₆(CO)₁₅]

えな。H が Co₆ 八面体中に存在すれば -28 ppm にあるはずである。したがって、Co₆ 八面体中には存在しない。また八面体の面（Co の三角形）にある場合は [Rh₁₃(CO)₂₁H₃]²⁻ などのように -30 ppm 付近に観測されるし^{5/}、Co に配位している場合でも -10 から -20 ppm になる。結局、H 原子は [HCo₆(CO)₁₅]⁻ 溶液中では CO を含めた陰イオンクラスターの表面に存在するか溶媒と交換していると考えられる。

/3/。また、金属多面体の表面に水素原子がある化合物や水素原子を配位子にもつ錯体でも -10 から -30 ppm にあらわれる。つまり低磁場側に信号がある化合物は、溶液中の [HCo₆(CO)₁₅]⁻, [HRu₆(CO)₁₅]⁻ 以外には存在しない。したがって、-28 ppm の信号は室温でも水素が Co₆ 八面体のなかに存在することをしめしている。この結果、金属多面体の間隙に水素をもつクラスターの中で [HRu₆(CO)₁₅]⁻ のケミカルシフトのみがプラスの値を示すことになる。上の議論からすると溶液中では、固体中と違い^{4/}、水素が Ru₆ 八面体の中央にはない可能性が高い。

[HCo₆(CO)₁₅]⁻ の溶液中では、-100 °C では 23.2 ppm に幅広い信号があるが、室温では見

Table 1. Chemical shifts of interstitial hydrogens

Compound	δ / ppm
[HCo ₆ (CO) ₁₅] ⁻	-28 ^a
	23.2
[HRu ₆ (CO) ₁₅] ⁻	16.4
[H ₂ Ni ₁₂ (CO) ₂₁] ²⁻	-18.0
[HNi ₁₂ (CO) ₂₁] ³⁻	-24.0

^a in solid.

References

- 1/ D.W. Hart, R.G. Teller, C. Wei, R. Bau, G. Longoni, S. Campanella, P. Chini and T. F. Koetzle, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1458 (1981).
- 2/ D.W. Hart, R.G. Teller, C. Wei, R. Bau, G. Longoni, S. Campanella, P. Chini and T. F. Koetzle, *Angew. Chem.*, **91**, 86 (1979).
- 3/ R.W. Broach, L.F. Dahl, G. Longoni, P. Chini, A.J. Schultz and J.M. Williams, *Adv. Chem. Ser.*, **167**, 93 (1978).
- 4/ P.F. Jackson, B.F.G. Johnson, J. Lewis, P.R. Raithby, M. McPartlin, W.J.H. Nelson, K.D. Rouse, J. Allibon and S.X. Mason, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 295 (1980).
- 5/ V.G. Albano, A. Ceriotti, P. Chini, G. Ciani, S. Martinengo and W.M. Aufer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 859 (1975).

P46

固体 C-13, 重水素 NMR による抗生物質トロスペクトマイシンの
 ケト-ジオール交換と水のダイナミクス

アップジョン ファーマシューティカルズ リミテッド

○ 檜山行雄, Michael D. Likar, Paul E. Fagerness

Keto-Diol Conversion and Water Dynamics in Solid Trospectomycin by C-13 and H-2 NMR Spectroscopy

Yukio Hiyama+, Michael D. Likar and Paul E. Fagerness

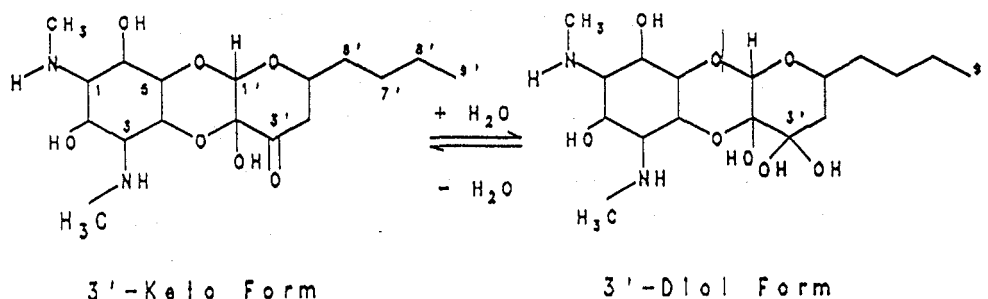
Control Research and Development, Upjohn Pharmaceuticals Limited, +Tsukuba 300-42 JAPAN and The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan 49001 USA.

We have applied C-13 CP/MASS and H-2 NMR techniques to quantitate keto form and to correlate water dynamics to the ket-diol conversion in crystalline bulk drug and freeze dried Trospectomycin sulfate. Water molecules in the crystalline phase are found to be more mobile than those in the freeze dried formulation by the solid deuterium NMR.

Trospectomycin sulfate (U-63,366F) can exist in either the 3'keto or 3'-diol form, as shown below. Freeze drying U-63,366F increases the concentration of the keto form in sterile powders, since removal of water shifts the equilibrium towards the keto form. The keto form of the drug is less chemically stable than the diol form. So it is vital to keep the molecule in the diol form in the product. This poster reports how C-13 CP/MAS solid-state NMR spectroscopy estimated how much of the drug is present as the keto form in the bulk drug, and in sterile powders containing 3-12% water. Solid H-2 NMR spectra of water in the solids were also recorded to correlate dynamics of water to the keto-diol conversion.

C-13 NMR

Figure 1 shows the 50 MHz C-13 CP/MAS spectrum of the crystalline bulk drug. The resonances are sharp (the methyl resonance at 16.3 ppm is 40 Hz wide). There are two methyl carbon resonances at 16.3 and 14.0 ppm. This indicates that the drug molecules in the sample experience two different environments; Because the 1' and 3'-diol carbons overlap at 94 ppm, one cannot measure directly the amount of diol drug present in the sample. Instead, one has to try to detect the 3' carbonyl resonance of the keto drug. The spectrum shows no evidence of the 3'-keto form of the drug. The resonance of the 3' ketonic carbon occurs at about 206 ppm. The sample was determined to contain about 16% water. This is enough water to keep



キーワード: 固体 NMR、C-13、H-2、水、ダイナミクス

○ ひやまゆきお、マイケル・ディ・ライカー、ポール・イー・ファーガネス

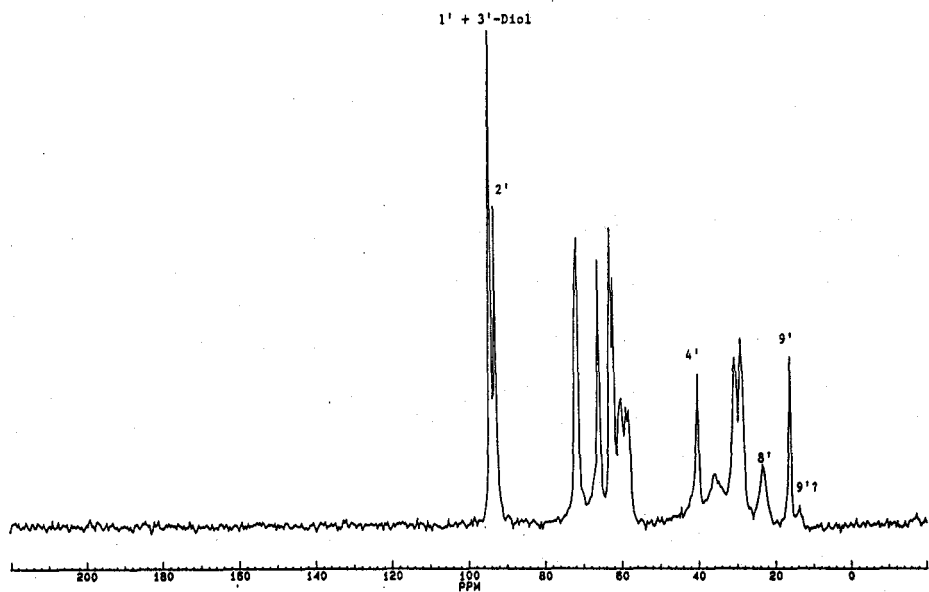


Figure 1. C-13 CP/MASS Spectrum of the crystalline drug.

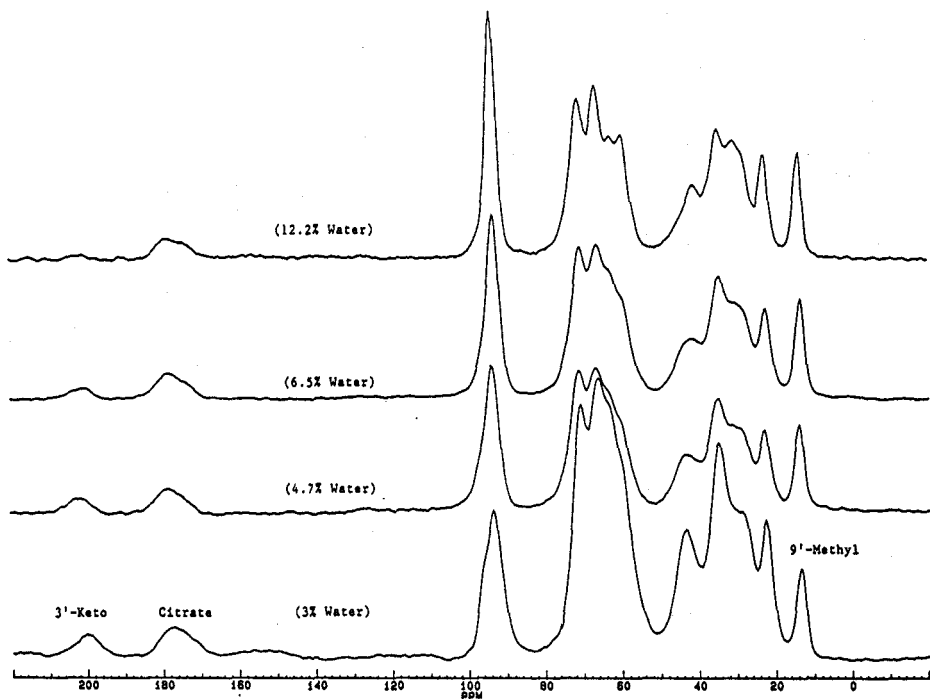


Figure 2. C-13 CP/MASS Spectra of Freeze Dried Powders Containing Different Amounts of Water.

the drug in the diol form. Figure 2 gives the C-13 CP/MAS spectra of a freeze-dried powder containing various amount of water. The resonances are much broader (e.g., the methyl resonance at 13.7 ppm has a natural linewidth of about 110 Hz). These freeze-dried materials and crystalline bulk drug showed about same long echo life time. Therefore the broadening in the freeze-dried samples is due to chemical shift dispersion caused by the fact that the sample is amorphous. It is interesting to note that the chemical shift (13.7 ppm) of the broad methyl resonance of the sterile powder is nearly the same as that of the weak, upfield resonance seen for the bulk drug (14.0 ppm), and not the intense resonance at 16.3 ppm (see Fig.1). This observation may suggest that the small resonance at 14.0 ppm arises from drug molecules in the amorphous domain of the bulk drug sample. Except for the 9' methyl resonance, many of the resonances of the bulk drug and sterile powder have very similar chemical shifts. These samples contain significant quantities of the keto form of the drug. The 3' keto carbon is clearly present as a broad resonance at about 202 ppm. These spectra show that the intensity of the 3'-keto resonance decreases for cakes with increasing water content. Since all of the drug molecules have the 9' methyl group, a ratio of intensities of the methyl and carbonyl will indicate what fraction of the molecules are in the keto form. By simply taking the ratio of the intensity at 202 ppm to that at 13.7 ppm, we find that $66 \pm 10\%$ of the drug is present as the keto form for the powder with 3.0% water, and that this amount falls to about 35% for the sample with 6.5% water. The sterile powder with about 12% water, and the bulk drug did not show any evidence of the 3'-keto drug.

H-2 NMR

The C-13 NMR data have shown that the freeze-dried powder has a substantial keto population despite of abundant water content. It seems that availability of water molecule to the drug molecule in solids is a key to the keto-diol equilibrium. Dynamics of water in the crystalline bulk drug and in the freeze-dried formulation has been studied by solid state deuterium NMR spectroscopy. The technique enables us to distinguish water hydrogen sites from those in the drug molecule by observing deuterium NMR signal of the solid materials stored in a humidity chamber with heavy water.

²H NMR spectrum of the bulk with RH 55% showed multiple superimposed powder patterns (Figure 3a); one is narrow, the other is broad. Spin lattice relaxation times were measured by a series of inversion recovery experiments resulting in two distinct time constants. At 10 ms, the narrow component relaxed back to show a positive signal while the broad component has approximately 700 ms for spin-lattice relaxation time. This drastically different T₁ values enabled us to obtain only the narrow component by the rapid recycling signal accumulation. The narrow component is presented in Figure 3b while a difference spectrum (Figure 3a-Figure 3b) is shown in Figure 3c, which represents the broad component. The relative intensities of the broad component to the narrow component are about 3 to 2.

The short spin-lattice relaxation time for the narrow component is obviously caused by motion with large amplitude and with the correlation time which is close to T₁ minimum, where there should be no T₂ distortion. However, the narrow component also showed short T₂, which was evidenced by increasing the echo delay time. This suggests that the narrow component has two types of motion. One determines the short spin lattice relaxation time while the other leads to the short T₂. The motion that determines T₁ is likely a 180° flipping motion about the C₂ axis. In order to reproduce the narrow component, one has to also introduce a large amplitude motion on the microsecond time scale that occurs along an axis other than the C₂ axis. Figure 4 shows simulation spectra with such conditions. A sterile powder which contains about same amount of water as the bulk drug showed mostly static-like powder spectrum (Figure 5). However, a series of inversion recovery experiments showed that there are two components distinguishable by the spin lattice relaxation time, just as in the bulk drug sample. Therefore we concluded that the water in the freeze-dried formulation is less mobile than in the bulk drug.

The spin-lattice relaxation time for the broad component is less than one second. There are two possibilities to account for the T₁ value. (1) Molecules undergo small amplitude motion

near T1 minimum. (2) Inherent T1 for the component is very long because of no motion. However, apparent T1 is determined by spin lattice relaxation of the narrow component which exchanges with the broad component in a time scale of the apparent T1 of the broad component. The second possibility can be eliminated because lineshape of the broad component is close to static one and because the relative intensities of the two components are about on the same order in the bulk drug. Therefore it is reasonable to consider that the two components; broad and narrow in the bulk drug are from two classes of water sites. Water in the broad component is rather stationary one, which would not contribute to rapid transfer of water in the solid material.

The crystalline bulk drug has a substantial mobile water population, which may be moving through the solid material, while water in the freeze dried formulation is mostly stationary. This may lead to small availability of water resulting in the large keto population in the formulation.

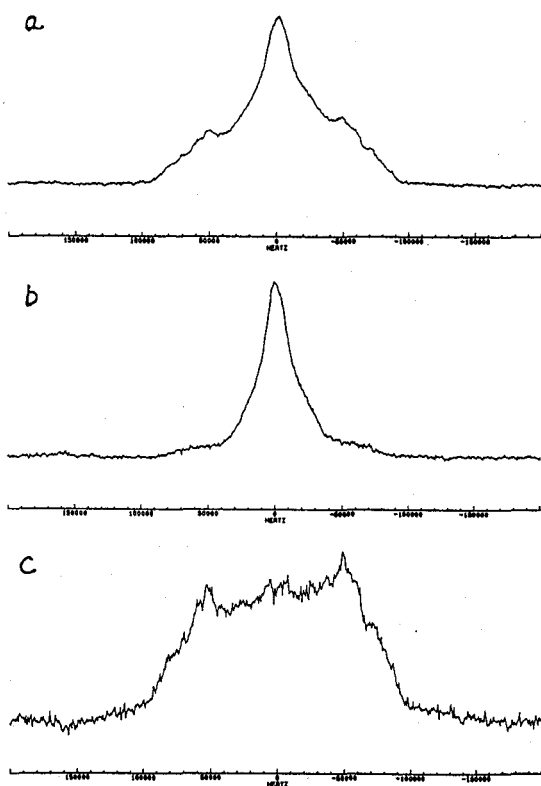


Figure 3. 76 MHz deuterium NMR spectra of the crystalline drug. (a) All signal. (b) Only narrow component. (c) Only broad component= a-b.

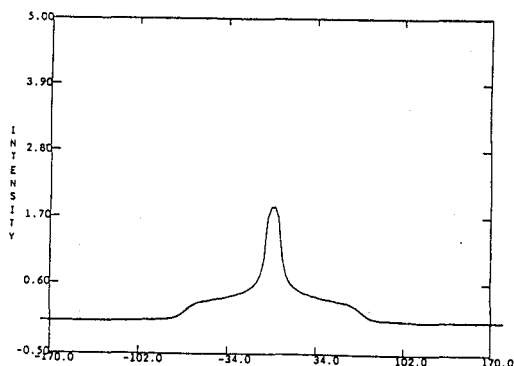


Figure 4. Simulation spectrum for the narrow component.

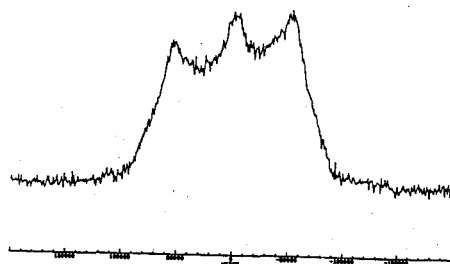


Figure 5. 76 MHz deuterium NMR spectrum of freeze dried material.

P47

同位体利用とX線結晶構造解析による

アスパルテームのCPMAS- ^{13}C -NMRスペクトルの解釈

(味の素(株)・中研) ○海老沢計慶、坂本公康、永嶋伸也、鈴木榮一郎

CPMAS- ^{13}C -NMR Spectral Study of Aspartame based on Crystal Structure and Isotope Effect

Kazuyoshi Ebisawa, Kimiyasu Sakamoto, Nobuya Nagashima, Ei-ichiro Suzuki
Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

Aspartame(AP) exists in some crystal forms (polytypism) such as I A, I B, II A. X-ray crystallographic studies have revealed that I A form AP consists of three types of conformers in an asymmetric unit, and that there is only one type in the II A's case. These characteristic features reflect the differences between the two types in signal shapes and chemical shifts by CPMAS- ^{13}C -NMR. We tried to assign each signal to each conformer in I A form and to use CPMAS-NMR for the determination of II A content in I B media.

【はじめに】

アスパルテーム(以下、APと略す)には、IA晶¹⁾、IB晶²⁾、IIA晶³⁾など、いくつかの結晶型があり、このうちIA晶とIIA晶については、それぞれX線結晶構造解析がなされている。解析の結果、IA晶では、単位格子中に6分子のAPが3種類のコンフォメーションをとって存在し、Asp側鎖のカルボキシル基がCOO⁻に、また、アミノ基がNH₃⁺にチャージして、親水性のコアを形成していることがわかった。また、IIA晶では同様のコアは形成するが、単位格子中には4分子のAPが同一のコンフォメーションをとって存在している。固体NMRで結晶構造を解析する場合、このような相違は、シグナルの数と化学シフトに影響する。即ち、IA晶では、3種のコンフォメーションの各々に対応して、同じ炭素に由来するシグナルが基本的には3本観測されるが、IIA晶ではコンフォメーションが等しいため、1本である。本研究では、以下の方法に従って、このIA晶の固体NMRシグナルの帰属を行い、いくつかの炭素については、シグナルと各コンフォメーションとの対応についても推定することができた。また、IB晶とIIA晶の混合試料について、各結晶型を定量する方法についても検討した。

固体NMR、アスパルテーム、シグナル帰属、同位体効果、 ^{15}N ラベル、

えびさわかずよし、さかもときみやす、ながしまのぶや、すずきえいいちろう

【方法】

装置は JEOL EX-400を使用し、シグナル帰属に関しては、以下の1)~4)を検討した。また、測定の前後で、粉末X線回折による結晶型の確認も併せて行った。

- 1) 溶液状態のシグナルの完全帰属との比較
- 2) HD交換による同位体効果の影響
- 3) 交差分極の接触時間(Contact Time)の変化による影響
- 4) ^{15}N ラベルによる影響

【結果と考察】

1) APの固体NMRシグナルの帰属に関して(下表参照)

- ① 基本的には、溶液状態の帰属が固体(結晶)状態でも成り立つことが確認された。
- ② Asp側鎖のカルボキシル基の炭素については、結晶内の水素結合の状態から、3種類のコンフォメーションと3本のシグナルの対応を推定することができた。
- ③ ペプチド結合部のカルボニル炭素については、同位体効果などを調べることで、ほぼそのシグナル帰属を確定することができ、さらに、ペプチド結合付近の内部回転角やAPの ^{15}N ラベルによる影響などを考察することで、結晶中の3種のコンフォメーションとシグナルとの対応についても推定することができた。

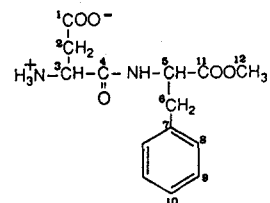
2) IB晶とIIA晶の混合試料中の各結晶型の定量に関して

APのPhe側鎖の γ 炭素に帰属されるシグナルは、IIA晶では1本であるのに対し、IB晶では3本である。この違いを利用し、各結晶型の混合試料について、その混合比率をスペクトルのピーク分離により求めたところ、2~3%の定量精度で、各結晶型を定量することができることが確認された。なお、今回の定量性は、S/N比の向上と多数のサンプリング測定により、さらに改善されることが期待される。

表1. APのIA晶のシグナル帰属(ppm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
固 体	174.8	39.8	51.1*	169.9**	51.7	32.2	136.4	132.4	127.2***	125.3	169.9**	51.1*
	173.3		50.0	168.6	51.1*		135.4	130.0				
	172.6		49.5					127.2***				
液 体	177.0	38.2	51.5	170.8	55.4	37.3	137.3	130.1	129.8	128.2	174.0	53.9

*, **, *** : 互いに重なり合っている



【謝辞】

種々の御助言を頂きました東大薬学部の
佐藤能雅教授、目黒俊幸氏に感謝いたします。

【文献】

- (1) 目黒、佐藤、永嶋、日本結晶学会年会、講演要旨集、p81 (1990.11.仙台)
- (2) N. Nagashima, C. Sano, S. Kishimoto, Y. Iitaka, 14th Int'l. Congress of Crystallography, Abstracts, C-54, 03.2-12 (1987)
- (3) Hatada, M., Jancarik, J., Graves, B., Kim, S. H.: Crystal Structure of Aspartame, a Peptide Sweetener. J. Am. Chem. Soc., 107:4279-4282, 1985.

P48

固体 N M R による超微粒ダイヤモンドのキャラクタリゼーション

備 豊田中央研究所 * 小岩井明彦、樋口 和夫、野田 正治

Solid State NMR Study of Ultra Fine Diamond Particle

Toyota Central Res. and Devel. Labs., Inc.,

Akihiko Koiwai, Kazuo Higuchi, and Shoji Noda

Ultra fine diamond particle, whose average diameter was 5nm, was characterized by solid state NMR spectroscopy. It was suggested by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy that the surface of the diamond particle was hydrogen-terminated.

It was found that solid state NMR spectroscopy was a powerful method to study the surface structure of ultra fine particles.

1. はじめに

固体 N M R は、バルクの局所構造解析の手法として材料開発において重要な位置を占めつつあるが、表面・界面構造解析に対しては、表面・界面核の選択的測定が一般的には困難であり、さらに、測定感度が低いことより応用例が少ない。ところで、表面に ^1H が存在する系に対しては、交差磁化 (C P) 法により表面核の選択的測定が可能となる。また、粒径の小さな微粒子をモデル系として測定することによって、測定感度の問題点はある程度克服できると考えられる。

本研究では、固体 N M R の表面・界面構造解析への応用性を検討することを目的として、C P 法を用いたダイヤモンド粒子の表面構造解析を試みた。ダイヤモンドは、機械的、熱的に優れた性質を有しており、工業材料としての研究開発が盛んに行なわれている。バルクのダイヤモンドの ^{13}C N M R の測定報告¹⁾はあるが、表面構造に関する測定報告は無い。ダイヤモンド粒子の表面構造解析手法が確立されれば、人工合成における結晶成長機構等に対する有意義な知見が得られるものと期待される。

本研究では、平均粒径 5nm の超微粒ダイヤモンド (1 粒子当りの炭素原子数は約 10^4 個) をモデル系として選択した。尚、超微粒ダイヤモンドのキャラクタリゼーションは、 ^{13}C 、 ^1H N M R の他に、X R D、T E M およびラマン分光により実施した。

キーワード ダイヤモンド、超微粒子、固体 N M R、 ^{13}C 、 ^1H

こいわい あきひこ、ひぐち かずお、のだ しょうじ

2. 実験

試料： 衝撃法により合成された超微粒ダイヤモンド（平均粒径5nm、市販品）を有機溶媒で洗浄後、NMR測定に供した。試料の粒径および結晶性は、XRDおよびTEM観察により確認した。

また、リファレンスとして、粒径0-0.5 μm の天然微粒ダイヤモンド（以後、バルク状ダイヤモンドと称する）のNMR測定を行なった。

装置： ブルカー社製 MSL-300

測定： DD/MAS、CP/MAS、インタラプテッドデカップリングCP/MAS（図1） ^{13}C -NMR、および、 ^1H -NMR

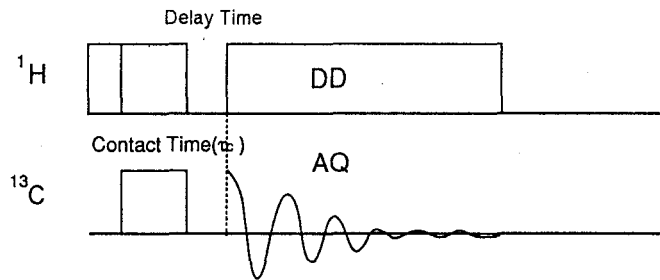


図1 インタラプテッドデカップリング CP/MAS法

3. 結果および考察

3.1 ^{13}C NMRスペクトル

バルク状ダイヤモンドと超微粒ダイヤモンドの ^1H 双極子デカップリング ^{13}C MAS NMRスペクトルを図2に示す。バルク状ダイヤモンドの炭素原子の化学シフト(TMS基準)は35ppmであり、超微粒ダイヤモンドは、35ppmを中心とした幅広いスペクトルを示した。

図3は、超微粒ダイヤモンドの ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルの、 ^1H 核スピン系と ^{13}C 核スピン系との接触時間 τ_c による変化を示す。CP法によりMASスペクトルが変化したことより、超微粒粒子表面の炭素原子の多くが水素原子により終端されていることが示唆され

た。また、CP法では、 ^1H との相互作用が強い、すなわち、 ^1H と近距離にある ^{13}C ほど ^1H からの磁化移動が容易になり、短い τ_c でスペクトルが強調される。

図3において、図2(b)のスペクトルと比較して、 τ_c が短いほど低磁場側にスペクトルが広がっていることより、主として低磁場側のスペクトルが表面の炭素原子か

(a)バルク状ダイヤモンド

(b)超微粒ダイヤモンド

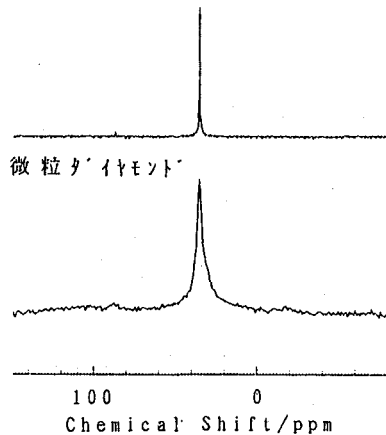


図2 ダイヤモンドの ^1H 双極子デカップリング ^{13}C MAS NMRスペクトル

らの寄与によると考えられる。このことは、インタラプテッドデカップリング法による測定(図4)からも示唆された。

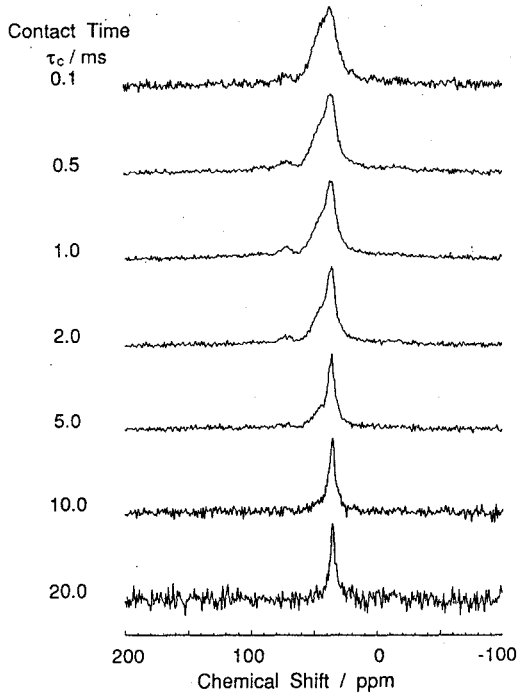


図3 **) 超微粒ダイヤモンドの¹³C CP/MAS NMRスペクトルの接触時間依存性

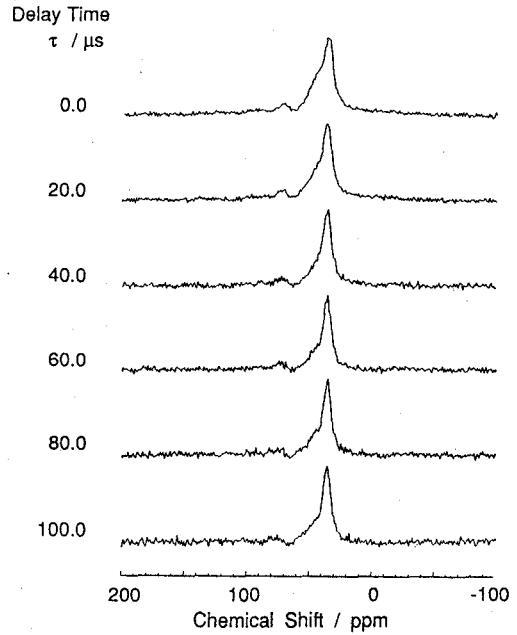


図4 **) 超微粒ダイヤモンドの¹³C インタラプテッドデカップリングCP/MAS NMRスペクトルの遅延時間依存性

*) スペクトルの線形変化を示すために、各スペクトルのピーク高を一定に表示した

3. 2 ¹H NMR スペクトル

超微粒ダイヤモンドの¹H NMR スペクトルを図5に示す。スペクトルの2次モーメント $M_2^{(2)}$ は、

$$M_2 = \frac{3}{5} \gamma_H^4 \hbar^2 I(I+1) \sum r_{ij}^{-6} \quad (r_{ij}^{-6} \text{は、水素原子間距離})$$

と表わされ、ガウス曲線を仮定すると、

スペクトルの半値幅 W は、

$$W = 2.36 \sqrt{M_2}$$

と書ける。水素原子で終端されたダイヤモンド結晶の(111)面では、

$$W_{111} = 30 \text{ kHz}$$

と見積ることができる。 $W_m = W_{111}$ であるが、他の結晶面を考慮する必要があり、

詳細な解析は、現在進行中である。

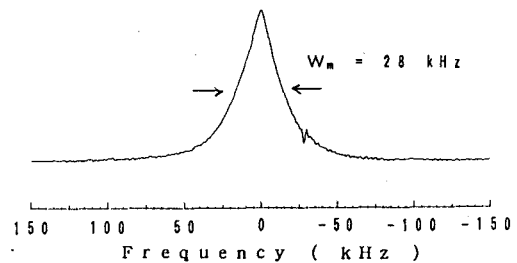


図5 超微粒ダイヤモンドの¹H NMR スペクトル

3. 3 ^{13}C 、 ^1H の縦緩和時間

インバージョンリカバリー法 ($\pi - \tau - \pi / 2$ パルス列) により得られた、超微粒ダイヤモンドとバルク状ダイヤモンドの ^{13}C 、 ^1H 縦緩和時間 ($T_{1\text{C}}$ 、 $T_{1\text{H}}$) を表1に示す。 $T_{1\text{H}}$ に関しては両者に大差はみられないが、超微粒ダイヤモンドの $T_{1\text{C}}$ は、バルク状ダイヤモンドのそれと比較して極端に短い値を示した。これは、表面に存在する ^1H との双極子緩和の効果が顕著に現れた結果と考えられる。

表1 ダイヤモンドの ^{13}C 、 ^1H 縦緩和時間 ($T_{1\text{C}}$ 、 $T_{1\text{H}}$)

	$T_{1\text{C}}$	$T_{1\text{H}}$
超微粒ダイヤモンド	8.4 ms	6.8 ms
バルク状ダイヤモンド	2.6 s	8.2 ms

4. まとめ

平均粒径5nmの超微粒ダイヤモンドのキャラクタリゼーションを固体NMRを中心に行なった結果、超微粒粒子表面の炭素原子の多くが水素原子により終端されていることが示唆された。

固体NMRはバルクの構造解析手法であるが、粒径が5nm程度の超微粒粒子の表面構造解析へ応用可能なことが示された。

謝辞 当所の石黒友乙、入谷澄子氏には、それぞれ、TEM、ラマン測定において御尽力頂きました。

Reference

- 1) P. M. Henrichs et al., J. Magn. Reson., 58, 85 (1984)
- 2) J. H. van Vleck, Phys. Rev., 74, 1168 (1948)

P49

固体高分解能¹³C NMRを用いた強誘電性液晶の分子運動の研究(5)

吉沢 篤^a, ○菊崎 浩^b(日本鉱業(株) 新材料研究所^a, 分析研究センター^b)

¹³C NMR Analysis of Molecular Motions of a Ferroelectric Liquid Crystal(5)

Atsushi Yosizawa^a and Hiroshi Kikuzaki^b

(^aMaterials Development Research Laboratory, Nippon Mining Co., Ltd.,

^bAnalysis Research Center, Nippon Mining Co., Ltd.)

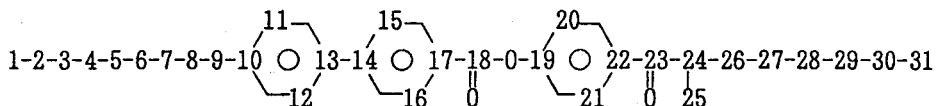
The molecular dynamics of a chiral(racemic) smectic liquid crystal has been studied by means of ¹³C spin relaxation. The T_1 , $T_1 \rho$ and NOE measurements were obtained in the S_A and S_C (or S_C) phases. The T_1 's for unprotonated carbons of a chiral compound show a remarkable increase in the S_A phase in the vicinity of the S_A - S_C phase transition. The deviation in the T_1 may be attributed to the molecular reorientation which is related to the formation of the helicoidal layer structure in the S_C phase.

1. 緒言

我々は、強誘電性液晶の自発分極の発現機構と分子構造の関係についての知見を得るために相転移に伴う分子挙動について調べている。^{1)~3)} 本報では、光学活性体(O.A.)及びラセミ体(RAC.)についてNMR磁場に配向させた場合の相転移に伴うスペクトルの変化及び相転移に伴う液晶分子各部の運動性の変化を測定した結果、光学活性体の S_C 相において螺旋構造の形成に関連すると推定される分子挙動が観測されたので報告する。

2. 実験

試料はS(-)-2-Methyloctanol(89%ee)より誘導した強誘電性液晶：4-(2-Methyloctanoyl)phenyl-4'-nonylbiphenyl-4-carboxylate：1 及び同ラセミ体：2を用いた。試料の構造式及びDSCから求めた相転移温度を以下に示す。



1 O.A. Cry. (78.5°C) S_C (100.6°C) S_A (117.6°C) Iso. 自発分極値=114nC/cm²(88°C)

2 RAC. Cry. (70.5°C) S_C (101.5°C) S_A (118.9°C) Iso.

測定は固体高分解能ユニットを付設した JEOL GSX-270を用いた。高分解能測定はパルスサチュレーション法を用い、試料回転速度は4.5KHzとした。縦緩和時間(T_1)の測定は反転回復法によって行い、回転座標系の縦緩和時間($T_1 \rho$)の測定はスピンロッキング法によって行った。この時のスピンロッキング磁場の大きさは56KHz、試料回転速度は4.5KHzとした。NOEの測定はパルスサチュレーション法と高出力デカップリング法の各ピーク強度の比から求めた。液晶分子の磁場への配向は試料を回転させずにNMR磁場内で一旦、130°Cで等方相とした後、1°C/10minで除冷することでNMR磁場に配向させた。MASを併用する際の装置の制御温度と実際の試料温度との補正は上記の実試料における Iso.- S_A 相転移温度から求めた。

KEYWORDS : 固体高分解能¹³C NMR, 強誘電性液晶, 分子運動, 緩和時間, 相転移, メソゲン液晶

よしざわ あつし, ○きくざき ひろし

3. 結果 及び 考察

① 試料をNMR磁場に配向させた場合の側鎖アルキル基のC24及びコア部のC23の化学シフト値の温度依存性をFig.1に示し、Fig.2に同測定のS_c相(88°C)におけるO.A.及びRAC.のスペクトルを示す。

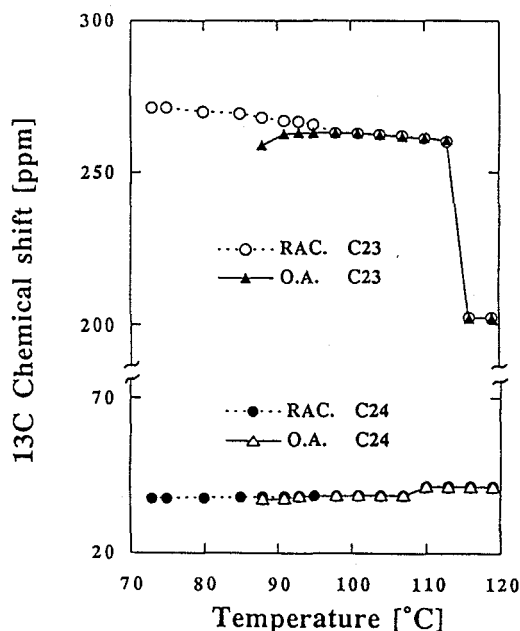


Fig.1 配向時の化学シフト値温度依存性

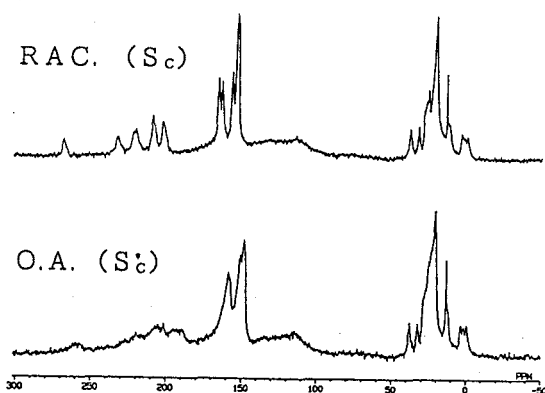


Fig.2 磁場配向時(88°C)のスペクトル

Fig.1からC24はO.A.及びRAC.とも徐冷するに従って、等方相からS_c相まで徐々に高磁場シフトしている。これに対しC23は等方相からS_a相では急激に低磁場シフトしており、S_a相からS_c相ではRAC.はそのまま徐々に低磁場シフトしているが、O.A.では逆に高磁場シフトしている。ここでM. Luzer他の解釈に従うと、⁴⁾RAC.においては等方相<S_a相<S_c相の順に分子軸が外部磁場方向に配向している事が推定される。O.A.では等方相からS_a相においてRAC.と同様に、分子軸が外部磁場方向に配向しているが、S_c相へ移ると再び分子軸は外部磁場方向からずれている。このずれは層が螺旋構造を形成する際の傾斜角に相当していると考えられる。

Fig.2から両者のスペクトルを比較すると、側鎖アルキル基のピーク線幅はO.A.とRAC.の間でほとんど差はないのに対し、O.A.のコア部炭素のピーク線幅はRAC.よりも著しく広がっていることが確認される。この事はS_c相においてコア部が外部磁場に対して異方性を持っている事が推定される。即ち、側鎖アルキル基の分子軸は外部磁場方向に揃っているため異方性は小さく、線幅も狭いが、コア部は層の法線に対して傾斜角を持ち、層の法線は外部磁場方向と一致し、更に、層が螺旋構造を形成している事が推定される。O.A.に対しRAC.は分子全体が外部磁場方向に揃っているため異方性は小さく、ピーク線幅が狭いと考えられる。

② O. A. を NMR 磁場に配向させた時の T_1 値の測定結果を側鎖末端のメチル基及びカルボニル基について Fig. 3 に示した。Fig. 3 から相転移点近傍で T_1 値の著しい変化が見られ、特に 4 級炭素において変化が観測された。

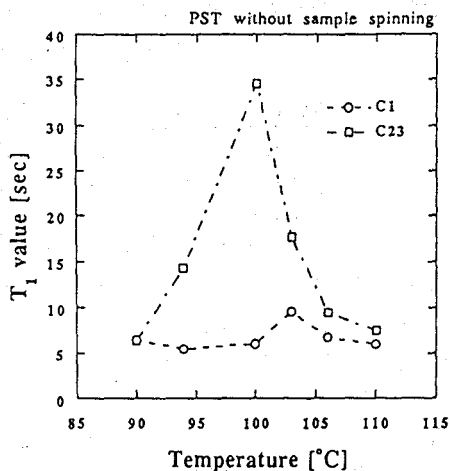


Fig. 3 磁場配向時の T_1 測定結果

③ ②の結果は分解能が低く、かつ帰属が困難である。そこで次に MAS を用いて O. A. 及び RAC. についての T_1 値の測定し、その結果をそれぞれ Fig. 4 及び 5 に示した。

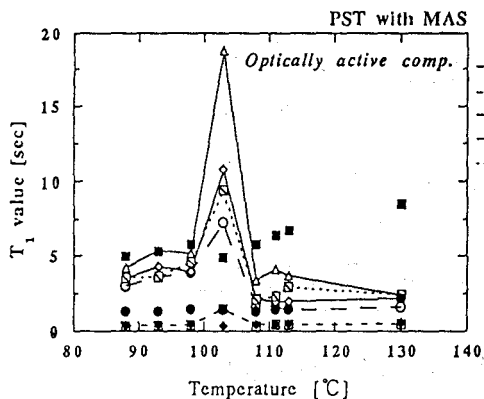


Fig. 4 O. A. の T_1 値測定結果

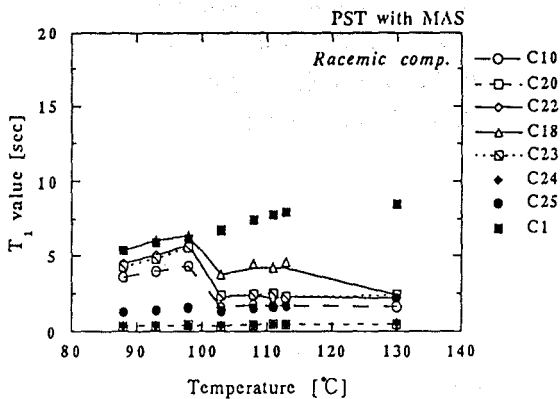


Fig. 5 RAC. の T_1 値測定結果

これらの結果から O. A. 及び RAC. のいずれの場合も C1, C24 及び C25 の炭素原子は温度変化に伴う相転移によってほとんど変化を示さないが C10, C18, C20, C22 及び C23 の炭素原子は相転移時に O. A. のみに T_1 値の著しい増大が認められる。この O. A. の相転移に伴う T_1 値の変化は ② の磁場配向時のものと同様の傾向を示している。

既報²⁾で述べたように O. A. のコア部は S₆ 相において傾斜角を形成し、螺旋構造をとると考えられており、このように相転移時に O. A. のコア部炭素のみが著しい運動性の変化を示す原因はこの螺旋構造の形成に関連があるものと推定される。

次に T_1 の緩和における双極子-双極子相互作用の寄与を調べるために各相におけるNOE値を測定した。得られた結果をTable 1に示す。炭素番号は構造式の番号に対応する。

Table 1 O. A. の各温度におけるNOE値

Temp.	C1	C10	C18	C20	C22	C23	C24	C25
93°C	2.67	1.67	1.58	2.52	1.70	1.59	2.75	2.63
103°C	2.31	1.25	1.28	2.34	1.28	1.30	2.23	2.41
113°C	2.10	1.16	1.27	2.19	1.24	1.32	2.31	2.49

Table 1からプロトンのついた炭素原子はいずれも 2.2~2.7のNOE値を持つのに対し、プロトンのついていない炭素原子のNOE値は 2以下である。プロトンのついた炭素原子の緩和機構は分子内の C-H双極子相互作用によるものと考えられる。そこで、O. A. のC20について双極子-双極子相互作用による縦緩和時間(T_{1D})を求め、異方的分子運動に対し Huntressの取り扱いに従い、⁵⁾分子長軸回りの回転拡散係数($D_{||}$)及び分子短軸回りの再配向に関する回転拡散係数(D_{\perp})を推定した。その結果、相転移点近傍の T_1 値が著しく大きくなっている事は分子短軸回りの再配向に関する運動が増大していると解釈でき、この分子運動がSc相における螺旋構造の形成に関与していると考えられる。

④ O. A. についてMAS法を用いた時の $T_1 \rho$ の測定結果をFig. 6に示した。

Fig. 6から相転移点近傍において $T_1 \rho$ 値の不連続的な変化が観測された。この変化は RAC. も同様であった。この $T_1 \rho$ 値の変化は層内における協同的な運動の変化に相当するものと推定される。

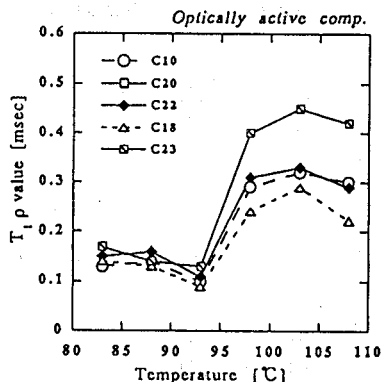


Fig. 6 O. A. の $T_1 \rho$ 測定結果

4. 謝辞

当研究の測定に際し、御助言・御協力を頂いた日本電子(株) 応用研究室 藤戸 輝昭 博士に感謝致します。

5. 参考文献

- 1) A. Yosizawa, H. Kikuzaki, T. Hirai and M. Yamane: Jpn. J. Appl. Phys., L1988, 28(11), (1989).
- 2) A. Yosizawa, H. Kikuzaki, T. Hirai and M. Yamane: Jpn. J. Appl. Phys., L1153, 29(7), (1990).
- 3) 吉沢 篤, 菊崎 浩: 日本化学会第59春季年会 講演予稿集, (1990).
- 4) M. Luzer, V. Ruter, J. Seliger, R. Blinc: Ferroelectrics, 58, 115, (1984).
- 5) Wesley T. Huntress, Jr.: J. Chem. Phys., 48(8), 3524, (1968).

置換ポリアセチレンのガラス状態における局所運動

京大・化研 〇植田 正、堀井文敬、小谷 壽

Local Motions of Substituted Polyacetylenes in the Glassy State

Tadashi Uyeda, Fumitaka Horii, and Hisashi Odani.

(Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, JAPAN)

Local motions of substituted polyacetylenes, poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne][PTMSP] and poly[o-(trimethylsilyl)phenylacetylene][PTPA], have been studied by high-resolution solid-state NMR spectroscopy for ^{13}C and ^{29}Si nuclei. Lineshape analysis for the ^{29}Si spectra reflecting the chemical shift anisotropy reveals that the backbone carbon-Si bond of PTMSP fluctuates at a frequency greater than 80Hz with an amplitude more than 45 degrees, while the corresponding bond for PTPA is hindered in motion. The temperature dependence of the ^{13}C spin-lattice relaxation time of methyl carbons is analyzed well in terms of the molecular motional model which describes the molecular motion of methyl group as a superposition of the three-fold rotation and the rapid torsional motion about the rotation axis.

1. 緒言 含ケイ素置換ポリアセチレンである poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne][PTMSP]、及び poly[o-(trimethylsilyl)phenylacetylene][PTPA]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し注目されている。これには、かさ高い置換基であるトリメチルシリル基の活発な運動が大きく関係しているものと思われる。本研究では、 ^{29}Si 核の化学シフトの異方性、及び ^{13}C スピン-格子緩和時間 $T_{1\rho}$ を解析することにより、これらの高分子の局所運動、特にトリメチルシリル基の分子運動について検討した結果を述べる。

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。 ^{29}Si 及び ^{13}C NMR測定は、JEOL JNM-GX400、JNM-FX200分光計により行った。

3. 結果 Fig.1に、magic-angle spinningを行わずに測定した場合のPTMSP及びPTPAのCP/DD ^{29}Si NMRスペクトルを示す。PTMSPの場合かなり左右対称なスペクトルが得られるのに対して、PTPAでは軸対称なスペクトルである。したがって、C-Si(CH₃)₃結合軸(以下C-Si結合軸と略記する)は、PTMSPの方がPTPAに比べて高速で運動をしているものと推定される。

10^{-2} s オーダーのC-Si結合軸の揺動運動は、Si核の化学シフトの異方性を反映した共鳴線の形状より解析できる。まず、C-Si結合軸方向をz軸とする分子座標系 A_M を考え、剛直状態における A_M を参照座標系 A_R とする。いま、 ^{29}Si の化学シフトテンソルに対する主軸座標系は A_M と一致すると考えられるので、 A_R に対してEuler角 $(\delta_j, \epsilon_j, \eta_j)$ [$j=1, 2, \dots, N$]で定義されるN個のサイト間をC-Si結合軸がジャンプすると仮定して、共鳴線の形状を計算する。 A_M の実験室座標系 A への座標変換は、 A の A_R に対するEuler角 (ϕ, θ, ψ) を用いて、 $R(\phi, \theta, \psi) \cdot R(-\eta_j, -\epsilon_j, -\delta_j)$ と表すことができる。このようにすると、j番目のサイトの共鳴周波数は式(1)、式(2)で与えられる。ここで、 $\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$ は化学シフトテンソルの主値、 ω_{si} は ^{29}Si の共鳴周波数である。また、C-Si結合軸周りの回転運動は揺動運動に比べて十分速いため、 $\eta_j = 0, \sigma_{11} = \sigma_{22}$ とした。

キーワード：置換ポリアセチレン/lineshape 解析/化学シフトの異方性/N-site jump モデル
植田 正(うえだ ただし)、堀井文敬(ほりい ふみたか)、小谷 壽(おだに ひさし)

$$\omega_j = \omega_I + \frac{3}{4} \left\{ \sin^2 \epsilon_j \sin^2 \theta \cos(2\phi - 2\delta_j) + \sin 2\theta \sin 2\epsilon_j \cos(\phi - \delta_j) \right. \\ \left. + \frac{1}{3} (3 \cos^2 \epsilon_j - 1) (3 \cos^2 \theta - 1) \right\} \times (\omega_{Si} \sigma_{33} - \omega_I) \quad (1)$$

$$\omega_I = \frac{1}{3} \omega_{Si} (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) \quad (2)$$

N個のサイト間の単位時間当りのジャンプ数を κ とすると、共鳴線 $I(\omega)$ は次のようになる。

$$I(\omega) = \frac{1}{N} \text{Re} \left(\frac{L}{1 - \kappa L} \right), \quad L = \sum_{j=1}^N \left[i(\omega - \omega_j) + N\kappa \right]^{-1} \quad (3)$$

さらに、粉末試料の共鳴線は $I(\omega)$ を (ϕ, θ) の分布に応じた平均を取ることにより得られる。

Fig.2(a)~(c)には、 $\sigma_{11} = \sigma_{22} = 0, \sigma_{33} = 30$ ppmでの種々の κ' 、 ϵ に対する計算結果を示す。計算には、 δ に $0, 90, 180, 270^\circ$ の4点、 ϵ に 5° きざみで m 点を取り、頂点 $(0, 0)$ を加えて全体で $(4m+1)$ 個のサイトが存在する場合について行った。Fig.2では、 $m = 3, 6, 9, 12$ の場合を $\epsilon = 15/3, 30/6, 45/9, 60/12$ と略記した。また、 $\kappa' = 10^4 \kappa / \omega_{Si}$ である。 $\kappa' = 0.01$ における結果はほぼ剛直な場合のスペクトルとなり、サイトの選び方によらない。図より、 κ' の増大に伴い軸対称なスペクトルが狭幅化していることがわかる。この傾向は ϵ が小さい $15/3$ 及び $30/6$ の時には明確には現れない。すなわち、 ϵ, κ' が共に大きい場合のみ、左右対称なスペクトルが得られる。したがって、PTMSPのC-Si結合軸は少なくとも 45° の大きな振幅で周波数80 Hz以上で揺動しているが、PTPAのそれはPTMSPの場合ほど活発な運動をしていないと考えられる。一方、 β 基の $T_{1\rho}$ の温度依存性は、 β 基の運動をSi-CH₃結合軸及びC-Si結合軸の回りの3回回転運動とねじれ運動の重ね合わせで記述するモデルによりうまく解析できた。詳細については当日述べる。

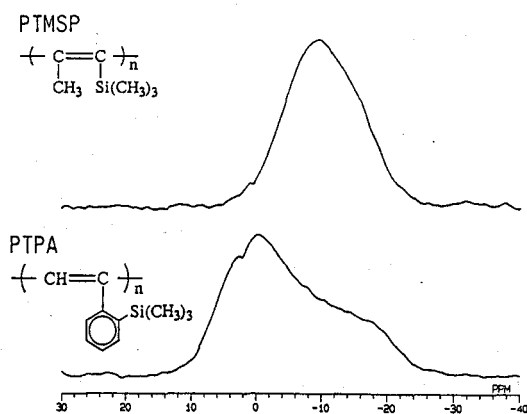


Fig.1 CP/DD ^{29}Si NMR spectra without magic-angle spinning for PTMSP and PTPA at room temperature.

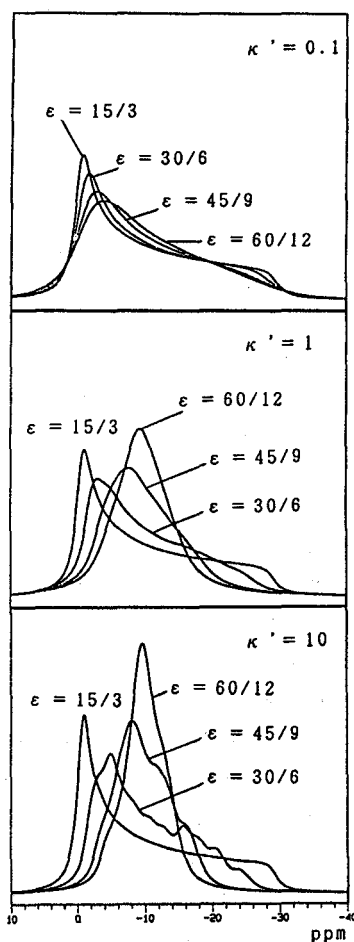


Fig.2 Calculated powder spectra with different ϵ and κ' values. $\delta = 0, 90, 180, 270$ degrees.

P51

^{207}Pb , ^{71}Ga NMRによるPbO-Ga₂O₃系ガラスの構造研究

(京大化研) ○ 忠永清治・宮路史明・横尾俊信・作花済夫

^{207}Pb , ^{71}Ga NMR Study on PbO-Ga₂O₃ Glasses

Kiyoharu Tadanaga, Fumiaki Miyaji, Toshinobu Yoko and Sumio Sakka
(Institute for Chemical Research, Kyoto University)

^{207}Pb and ^{71}Ga NMR spectra of several Pb- or Ga-containing crystals with different lead-oxygen or gallium-oxygen configurations and PbO-Ga₂O₃ glasses were measured and compared. It was found that in PbO-Ga₂O₃ glasses, Pb²⁺ ions are surrounded by six or seven oxygen ions at different distances ranging from about 2.2 to 3.2 Å, among which three or four oxygen ions are located at much closer distances than others as found in H-Pb₂SiO₄ and PbSiO₃ crystals. Most of Ga³⁺ ions were found to be tetrahedrally coordinated by four oxygen ions.

1 緒言

固体高分解能NMRによる酸化物ガラスの構造の研究は、これまでガラス形成酸化物と呼ばれ、単独でガラス化するSiO₂ (^{29}Si), B₂O₃ (^{11}B) ガラスを中心に行われてきた。本研究では、いわゆるガラス形成酸化物を含まないにもかかわらず安定なガラスが得られ、高屈折ガラス、赤外透過材料及び非線形光学材料としての応用が期待されているPbO-Ga₂O₃系ガラスと、種々の結晶の ^{71}Ga (I=3/2), ^{207}Pb (I=1/2) NMRスペクトルを測定し、ガラス中のGa³⁺及びPb²⁺イオンの配位数、結合状態を検討した。

2 実験方法

ガラスは、Pt-Rh坩堝を用いて通常の熔融急冷法で作製した。結晶は熱分解反応、フラックス法、固相反応、ガラスからの結晶化などによって作製した。NMR測定には日本電子社製固体高分解能NMR GSX400を用いた。試料管の回転速度を約6kHzとしてMASによる測定を行なった。標準物質としては ^{71}Ga ではGaAs、 ^{207}Pb ではPb(NO₃)₂を用いた。パルスは、 $\pi/2$ - $\pi/4$ パルスを用い、繰り返し時間は1-10秒、繰り返し回数は結晶については500-10,000回、ガラスについては約30,000回として測定を行った。

3 結果と考察

(1) ^{207}Pb NMR

70PbO-30GaO_{1.5}ガラスの ^{207}Pb NMRスペクトルは、67PbO-33SiO₂ガラス及び80PbO

固体高分解能 NMR, ^{207}Pb NMR, ^{71}Ga NMR, PbO-Ga₂O₃系ガラス

ただなが きよはる・みやじ ふみあき・よこお としのぶ・さっか すみお

-20B₂O₃ガラスと同様、きわめて幅広いバンドを形成している。このバンドはケミカルシフトの値で、3000ppmから6000ppmにわたっている。一方、H-Pb₂SiO₄およびPbSiO₃結晶のNMRスペクトルは、3~4個の等方性シフトからなっているが、これらのケミカルシフトの値は3000~6000ppmの範囲にある。従って、本ガラス中のPb²⁺イオンは、PbO-SiO₂及びPbO-B₂O₃系ガラスと同様、H-Pb₂SiO₄またはPbSiO₃結晶中のPb²⁺イオンに類似した配位状態をとっている、すなわち、Pb²⁺イオンは約2.2-3.2 Åの距離のところにある6~7個の酸素によって配位され、そのうち3または4個の酸素は他の酸素よりはるかに近い距離にあるといえることができる。

(2) ⁷¹Ga NMR

図1に種々の結晶及びガラスの⁷¹Ga MAS NMRスペクトルを示す。(a)から、GaAsのスペクトルは鋭く強い一本のピークであるが、これはこの結晶中でGa³⁺イオンが正四面体配位されて、Ga核の周囲の電場の対称性がよいためと考えられる。

β-LiGaO₂結晶は、歪んだGaO₄四面体の三次元骨格で構成されているが、そのスペクトル(b)では、-5ppm付近にメインピークが現れており、その他のピークはSSBである。

GaNbO₄結晶は歪んだGaO₆八面体とNbO₆八面体から構成されているが、GaNbO₄結晶のスペクトル(c)では、-245ppmにピークがみられる。これより、Ga³⁺イオンが4配位であるか6配位であるかによって約240ppmの差が生じると考えられる。(d)に示したようにα-Ga₂O₃結晶のスペクトルは、非常にブロードで多くのSSBと思われるピークを含む複雑なプロファイルを示している。

α-Ga₂O₃結晶は、コランダム型の結晶で対称性の悪いGaO₆八面体型をとるため、Ga核に大きな電場勾配が生じ、2次の4極子モーメントの寄与、及びケミカルシフトの異方性が大きく、そのためスペクトルは500ppm以上の幅を持つブロードなピークを示すと考えられる。MASによる測定によっても十分に尖鋭化することができず、中心ピークの位置を決定できなかった。しかし、そのスペクトルの中心位置はGaNbO₄結晶のピークの位置とほぼ同様であり、Ga³⁺イオンが6配位で存在することを示していると考えられる。

(e)に示すように60PbO-40GaO_{1.5}ガラスのスペクトルでは、Ga³⁺イオンが4配位の結晶であるβ-LiGaO₂とほぼ同様の位置にピークが観測された。Ga³⁺イオンが6配位のときに現れると考えられる-150~-250ppm付近には目だたないことから、このガラス中では大部分のGa³⁺イオンが4配位で存在すると考えられる。

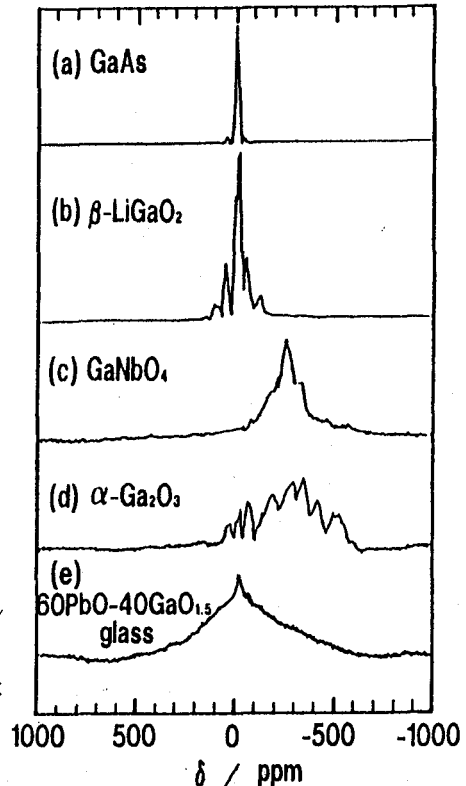


図1 結晶とガラスの⁷¹Ga NMRスペクトル

(北大 工)・平沖敏文, 北澤 聡, 小亀朗由, 堤 耀広

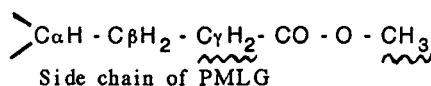
Side Chain Dynamics of Poly(γ -methyl L-glutamate) by Solid State ^2H -NMR

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060.

*T. Hiraoki, S. Kitazawa, A. Kogame, and A. Tsutsumi

Deuterium quadrupole echo spectroscopy is used to study the dynamics of the side chain in poly(γ - $[\text{}^2\text{H}_3]$ methyl L-glutamate) and poly(γ -methyl L- $[\gamma\text{-}^2\text{H}_2]$ glutamate). Temperature-dependent line-shapes, their intensities, and T_1 were employed to determine the rate and mechanisms of the side chain motions. The line shapes could be simulated quantitatively with the jump model. The molecular motions of methyl and γ -methylene groups are shown to be characteristic of three-site jump and two-site jump, respectively, in addition of libration at below -40°C . The additional large amplitude motions about the multiple bonds appears in the side chain at the higher temperatures.

重水素 NMR スペクトルの線形と T_1 は主に核四重極相互作用によってきまる。このため線形と T_1 は重水素でラベルされた部位の分子運動の速さや運動モードによって著しく変化し、局所的な分子運動についての詳細な情報を得ることができる。本研究では固体状態において、右巻き α -helix の Poly(γ -methyl L-glutamate) 側鎖の運動を調べるために、側鎖の γ 位メチレン基と末端メチル基をそれぞれ重水素化し、重水素 NMR スペクトルの線形と T_1 を測定した。



実験

側鎖末端のメチル基の重水素化は Poly(γ -benzyl L-glutamate) と重水素化メタノールとを反応させて得た (PMLG-d3)。 γ 位を重水素化した試料はグルタミン酸を重塩酸で処理して γ 位メチレン基の重水素化を行い、メチル化し、NCA法により重合して得た (PMLG- γ d2)。NMR の測定は Bruker MSL-200(30.7MHz) で行い、スペクトルは四重極エコー法により得た。 T_1 は Inversion-recovery 四重極エコー法により得た。

結果と考察

(1) PMLG-d3 スペクトルの温度依存性を Fig.1(a) に示す。 -40°C 以下では 38KHz の四重極分裂巾を持つ軸対称な粉末平均スペクトルが観測され、メチル基が C_3 軸のまわりを高速に回転していることを示している。この分裂巾は C_3 回転の理論値 42KHz よりわずかに小さく、小振幅の libration が存在することを示している。温度上昇に伴い、分裂巾は減少する。線形のシミュレーションより、温度上昇に伴い libration の振幅と速さが増加することがわかった。さらに室温以上から、線形が、大きく変化し始め、分裂巾を変調する速さの、 C_3 回転以外の運動がスペクトルに寄与してくることを示している。

キーワード: Solid State ^2H -NMR, Poly(γ -methyl L-glutamate), Jump motion

ひらおき としふみ、きたざわ そう、こがめ あきよし、つつみ あきひろ

Fig.2に T_1 の温度依存性を示す。-40°C以下では、スペクトルの σ_{\perp} 成分の T_1 は σ_{\parallel} 成分の T_1 のほぼ2倍であり、メチル基の回転が回転拡散ではなく、3-site jumpであることを示している。jump rateの温度依存性より求めた運動の活性化エネルギーは 7.7 KJ/mol で小さい。これは側鎖末端のメチル基が酸素原子に結合し、運動し易いことを示している。 T_1 は-10°Cで最大になり、昇温に伴い減少し、130°C付近で最小の60msになる。これは C_3 回転に加えて、 C_3 軸自体の運動が T_1 に寄与するためである。

(2)PMLG- γ d2 スペクトルの温度依存性をFig.1(b)に示す。-40°C以下では分裂巾120KHzを持つ軸対称な粉末平均スペクトルが観測され、 C_{γ} -D軸の運動が非常に遅く、制限されていることがわかる。分裂巾は理論値の128KHzよりも小さく、librationの存在を示している。温度上昇に伴い、スペクトル強度が減少し始める。室温から50°Cにかけて、強度が著しく減少し、線形も大きく変化する。これは、これらの温度領域で四重極相互作用の大きさ(170KHz)と同程度の速さの運動が生じていることを示している。更に高温では、スペクトルの中央部の強度が増し、singlet-likeになる。線形のシミュレーションより、この運動は C_{γ} -D軸が C_{β} - C_{γ} 軸のまわりにトランスゴーシュ間で2-site jumpし、昇温に伴いこのjump rateが増加し、さらに高温では C_{α} - C_{β} 軸のまわりの運動も寄与することが分かった。

Fig.2に T_1 の温度依存性を示す。 T_1 は低温から室温にかけて徐々に減少し、slow-regionにあることを示している。室温より、 T_1 は急に減少し始め、約120°Cで最小の6msになる。これは C_{γ} -D軸の運動に $\omega_0\tau \sim 1$ の条件を満たす相関時間 τ が大きく寄与していることを示している。

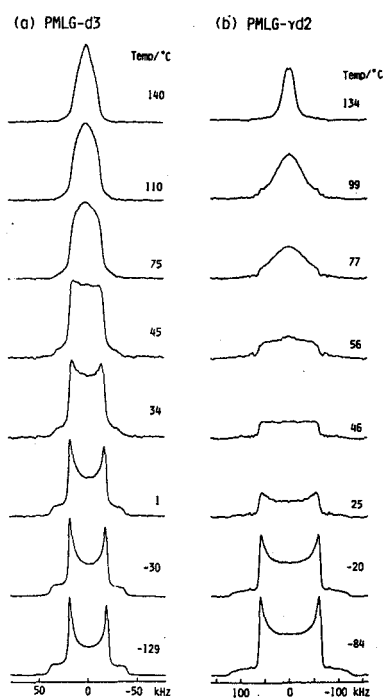


Fig. 1 Temperature dependence of ^2H -NMR spectra of PMLG-d3(a) and PMLG- γ d2(b).

(3) Fig.2に示すように、PMLG-d3とPMLG- γ d2の T_1 はほぼ同じ温度で最小値を示す。PMLG-d3のメチル基ではeffectiveな四重極相互作用の大きさは C_3 回転のため1/3になっている。従って、両者の高温でのプロファイルはほぼ一致し、メチル基と γ 位メチレン基には同じ運動が反映しており、側鎖全体の運動が生じていることを示している。又、相関時間にかなり広い分布があることがわかった。一方、低温では、一軸まわりのジャンプ運動が支配的である。

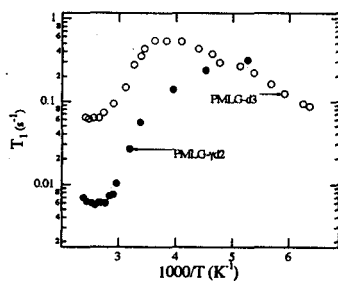


Fig. 2 Temperature dependence of T_1 of PMLG-d3 and PMLG- γ d2.

固体重水素NMRによるpoly(L-phenylalanine)のフェニル環の運動

(北大 工) 小亀朗由、平沖敏文、堤 耀廣

Phenyl Ring Dynamics of Poly(L-phenylalanine) by Solid State ^2H -NMR

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060

A. Kogame, T. Hiraoki, and A. Tsutsumi

We measured ^2H NMR line shapes of poly(L-[d₅]-phenylalanine) from at -81°C to 65°C and analyzed them by line shape simulation to study the dynamics of the side-chain phenyl-rings. A wide range distribution of the flipping rate for the phenyl-ring is found to contribute to the observed line shapes from the line shape simulation. The mean rates are 2.5kHz at -81°C and 400kHz at 22°C. With increasing temperature the quadrupole splitting decrease, suggesting the existance of the other rapid small amplitude motions.

固体状態における ^2H , ^{13}C NMR測定により、フェニルアラニンや蛋白質中のフェニルアラニンのフェニル環の運動が調べられている¹⁾⁻³⁾。室温ではフェニル環の運動はrigid状態であったり、 C_β - C_γ 軸まわりを高速でフリップ・フロップ運動していたりと状態により様々である。本研究ではフェニル環の運動を詳細に調べるため、フェニル環を重水素化したポリ-L-フェニルアラニンの固体重水素NMR測定と、スペクトル形のシミュレーションを行ない、ポリマー側鎖のフェニル環の運動を検討した。

実験

フェニル環の水素を重硫酸で重水素化し、これをDPPA法で重合して重水素化試料を得た。固体重水素NMRスペクトルはBruker MSL-200を用い、共鳴周波数30.7MHzで、四重極エコー法により得た。90度パルス幅は約1.5 μs である。スペクトルのシミュレーションは、四重極結合定数を180kHz、非対称パラメータを0.05³⁾とし、MXQET⁴⁾を使用した。

結果と考察

室温におけるスペクトルをFig. 1aに示す。126kHzと29kHzの二つの四重極分裂幅をもつスペクトルが観測される。126kHzの分裂幅を与えるシグナルのスピングリッド緩和時間 T_1 と29kHzを与えるシグナルの T_1 はそれぞれ約1s, 20msと大きく異なる。これはこのスペクトルが運動性の大きく異なる2つの成分の寄与からなり、スペクトルが重なっていることを示している。 T_1 の違いから、 T_1 の短い成分の29kHzの分裂幅をもつスペクトルのみを得ることができた(Fig. 1b)。このスペクトルは、フェニル環のオルト・メタ位からの寄与と考えられ、 C_β - C_γ 軸のまわりをMHz以上の速さでフリップ・フロップ運動するフェニル環の存在を示している。一方、126kHzの分裂幅を持つスペクトルはおもにパラ位からの寄与によるものと考えられる。このスペクトルの T_1 (約1s)はstaticな場合の T_1 (60s)¹⁾よりもはるかに短い。また、四重極分裂幅も理論値の128kHzよりもわずかに小さい。これらは C_β - C_γ 軸自身の小振幅のlibrationのためと考えられる。

スペクトルの温度依存性をFig. 2aに示す。-81°Cにおいてスペクトルは127kHzと29kHzに四重極分裂幅をもつ。温度上昇にともない29kHzの分裂幅を持つシグナルの強度が大きくなり、線形も変化する。49°C以上になると線形は変化しなくなる。フェニル環の運動は温度上昇とともに速くなり、49°Cまではその速さはintermediateの領域にあり、49°C以上ではfast-exchange limitの領域にあると考えられる。しかし、22°Cで観測される T_1 の短い成分のスペクトル(Fig. 1b)はフェニル環のフリップ運動の速さがfast-exchange limitの領域にあるときに得られるスペクトルである。これはフリップ運動の速さに分布があることを示唆している。四重極分裂幅は温度上昇と

poly(L-phenylalanine), phenyl-ring motion, solid state ^2H NMR, line shape,

こがめ あきよし ひらおき としふみ つつみ あきひろ

ともに減少し、65°Cにおいては122kHzと28kHzとなる。これはC_β-C_γ軸間自身のlibrationの振幅が温度上昇とともに大きくなることを示唆している。

フェニル環がC_β-C_γ軸のまわりをフリップ・フロップ運動すると仮定し、スペクトルのシミュレーションを行なった。パラ位はC-D軸が静止し、オルトとメタ位はC-D軸が回転軸と60度の角をなし、180度2サイトジャンプ運動をすると仮定した。ただし、librationの効果は無視した。これら2つの成分を加えてシミュレーションスペクトルを得た。速さの分布を考えないシミュレーションスペクトルをFig.2bに示す。-81°C、49°C、65°Cの測定スペクトルに対しては、シミュレーションスペクトルはほぼ一致するが、それ以外の温度に対しては中央部の強度が一致しない。フリップ運動の速さが正規分布すると仮定し、正規分布を速さの常用対数にたいしてとり、スペクトルのシミュレーションを行なった。分布の分散が3のシミュレーションスペクトルをFig.2cに示す。速さの分布を考えたシミュレーションスペクトルは、各温度の測定スペクトルに対して良く一致する。このことはフリップ運動の速さが6桁にも及ぶ非常に広い範囲に分布していることを示している。フリップ運動の速さの中心値は温度上昇にともない速くなる。

以上より、ポリ-L-フェニルアラニンのフェニル環はフリップ・フロップ運動しており、その速さはかなり広く分布していることがわかった。フェニル環は-81°Cの低温においてフリップ運動しており、温度上昇にともない運動は速くなる。また、C_β-C_γ軸自身のlibrationも-81°Cにおいて存在し、温度上昇にともない振幅がわずかに大きくなる。これまでに報告されているフェニル環の運動が速さの分布を考慮せずに説明できたのは結晶の場合は分布が非常に狭いため、蛋白質の場合は速さの中心が非常に狭い領域にあるためと考えられる。

- 1) Y. Hiyama, et al., J. Am. Chem. Soc., 108, 2718 (1986)
- 2) M. H. Frey, et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 7311 (1985)
- 3) C. M. Gall, et al., J. Am. Chem. Soc., 103, 5039 (1981)
- 4) M. S. Greenfield, et al., J. Magn. Reson., 72, 89 (1987)

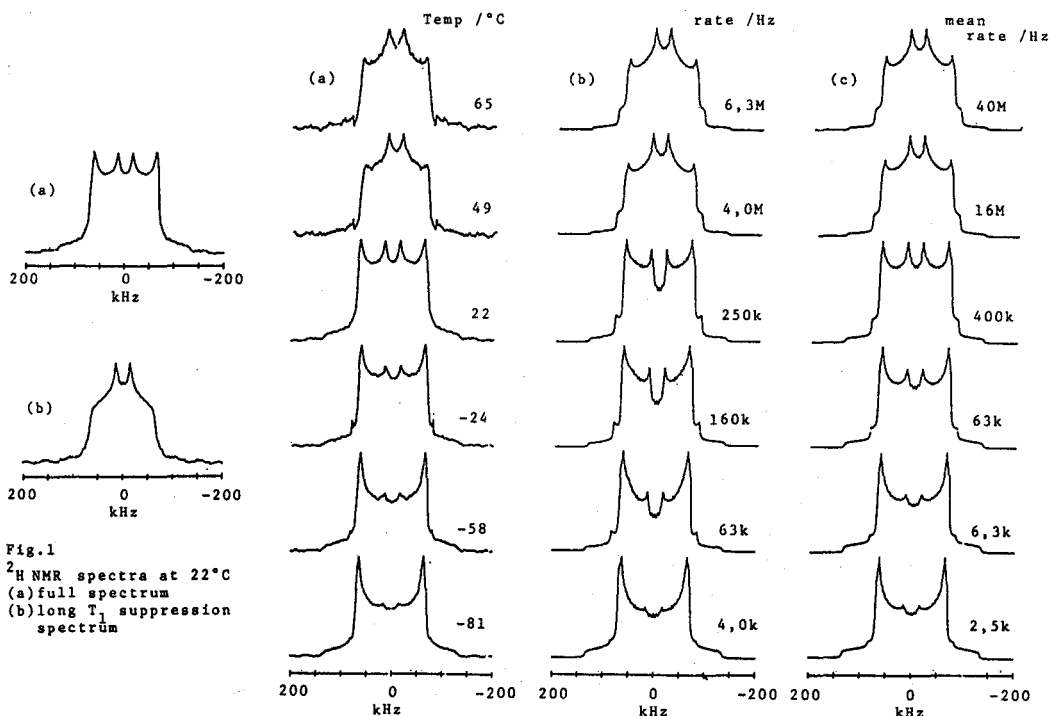


Fig.2 (a) temperature dependence of spectra, (b) simulated spectra with one flipping rate, (c) simulated spectra with a distribution of flipping rate

(東工大) ○浅川直紀・黒木重樹・黒子弘道・安藤 勲
(群大工) 莊司 顯・尾崎拓男

Hydrogen-Bonding Effect on ^{13}C NMR Chemical Shift of the L-Alanine Residue in Peptides as Studied by High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR Spectroscopy

Naoki Asakawa, Shigeki Kuroki, Hiromichi Kurosu, Isao Ando (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo152)

Akira Shoji, Takuo Ozaki, (Department of Biological Sciences , Gunma University, Kiryu-shi, Gunma376)

The ^{13}C NMR chemical shifts of the L-alanine-residue carbonyl-carbons(L-Ala CO) of peptides in the crystalline were measured. The observed isotropic ^{13}C chemical shifts of L-Ala CO in the amide-type hydrogen bond moves linearly downfield with a decrease of hydrogen bond length. Such downfield shift is predominantly governed by the chemical shift tensor component δ_{22} . The δ_{11} moves somewhat upfield, and the δ_{33} is not sensitive to change of $R_{N\cdots O}$. The above results were used in analysing the structure of polypeptides and proteins in the crystalline state through the observation of the ^{13}C chemical shift.

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L-アラニン残基に注目し、モデル化合物としていくつかのL-アラニン残基を含むペプチドを合成し固体高分解能 ^{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、L-アラニン残基中のカルボニル基がアミド結合しているペプチドを合成した。化学シフトを正確に観測するためにL-アラニンはカルボニル炭素を ^{13}C でラベルしたものをを用いて通常のL-アラニンに5%混ぜて合成を行った。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、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。試料を1500-1700Hzで回

固体高分解能 ^{13}C CP-MAS NMR、水素結合、L-アラニン、ペプチド、タンパク質

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

転させ、スピニングサイドバンドの強度からHertzfeld-Berger³⁾およびFenzkeら⁴⁾の方法によって化学シフトテンソル主値を得た。 δ_{22} の測定誤差は ± 0.7 ppmで、 δ_{11} 及び δ_{33} が ± 1.5 ppmであった。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

Fig.1にa)4400Hz及びb)1550Hzで回転させたときの[1-¹³C]Ala-Serの¹³C CP-MAS NMRスペクトルをそれぞれ示した(他のペプチドについても同様なスペクトルが得られた)。得られたペプチド中のL-アラニン残基のカルボニル炭素の等方平均¹³C化学シフト(δ_{iso})及び化学シフトテンソル主値(低磁場側から δ_{11} , δ_{22} 及び δ_{33})をX線回折で決定されているN \cdots O水素結合距離とL-アラニン残基の二面角(ϕ , ψ , 及び ω)とともにTable 1に示した。また δ_{iso} , δ_{11} , δ_{22} 及び δ_{33} を $R_{N\cdots O}$ に対してプロットしたものをFig.2に示した。

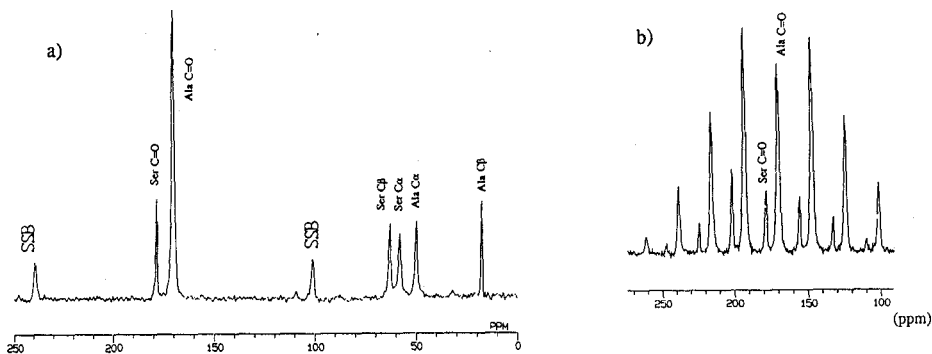


Figure 1. 67.80MHz ¹³C CP-MAS NMR spectrum of L-[1-¹³C]Ala-L-Ser in the solid state. The magic angle spinning rates are a) 4400Hz and b) 1550Hz.

Table 1 Observed ¹³C chemical shifts of L-Alanine-residue carbonyl-carbons for oligopeptides containing L-Alanine residue in the solid state as determined by ¹³C CP-MAS NMR and their geometrical parameters.

sample	geometrical parameters								
	¹³ C chemical shift(ppm)			Hydrogen bond length (Å)	Hydrogen bond angle (deg.)	dihedral angle (deg.)			
	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	N \cdots O	C=O \cdots N	ϕ	ψ	
Ac-Ala-NHMe	175.9	245	186	96	2.92	138.3	-84.3	159.0	173.3
	177.0	241	196	94	2.72	132.4	-87.6	154.8	171.9
Ac-Ala-Aib-OMe	174.7	-	-	-	2.93	154.5	-134.0	122.2	-174.1
	171.7	-	-	-	2.97	152.2	-129.8	121.5	-179.5
Ala-Gly-Gly-H ₂ O	172.6	245	179	93	3.00	150.2	-	160.0	172.4
Ala-Ser	170.1	249	172	89	3.04	156.3	-	124.8	-178.0
Ala-Pro-Gly-H ₂ O	169.3	235	178	95	3.157	155.2	-	153.2	177.0
Poly(Ala) α -helix	176.8	243	194	94	2.87	-	-57.4	-47.5	-179.8

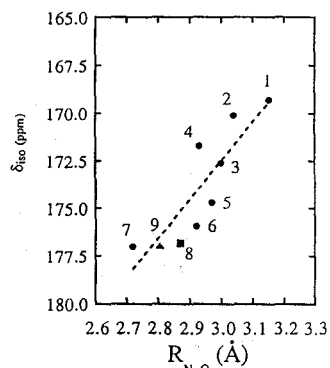


Figure 2. Plots of the observed isotropic ¹³C chemical shifts(δ_{iso}) in the solid state against the $R_{N\cdots O}$. 1:Ala-Pro-Gly-H₂O, 2:Ala-Ser, 3:Ala-Gly-Gly-H₂O, 4-5:Ac-Ala-Aib-OMe, 6-7:Ac-Ala-NHMe, 8:(Ala)_n and 9:BPTI.

Fig.2に示されるように、 $R_{N...O}$ が減少するに伴い δ_{iso} が直線的に低磁場側へシフトしている。この相関関係は $\delta_{iso}=237.5-21.7R_{N...O}$ (ppm)となった。この関係式を用いることにより δ_{iso} の観測値から水素結合距離を求めることができる。Fig.3をみるとわかるように、この傾向はおもに δ_{22} によって支配されていて、 $R_{N...O}$ が減少するにつれて δ_{22} が大きく直線的に低磁場側へシフトしていることがわかる。また δ_{33} は $R_{N...O}$ の変化に敏感ではないが、 δ_{11} は $R_{N...O}$ の減少に伴い多少高磁場側へシフトしていることもわかる。これらの結果から、固体状態のペプチドに含まれるL-アラニン残基中のカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトに対する影響は「水素結合の距離の効果」が大きく、明かな「水素結合の角度の効果」や「L-アラニン残基のコンホメーションの効果」はみられなかった。さらにポリL-アラニンに対するプロットから、高分子と低分子の違いもみられなかった。なおAla-Pro-Gly \cdot H $_2$ Oに対するプロットは得られた相関からはずれているが、これはL-アラニン残基とL-プロリン残基とでつくられる結合がイミド結合であるためアミド結合と電子構造が異なることが原因であると考えられる。

ウシ脳臓塩基性トリプシンインヒビター(BPTI)はX線回折法によって既にその単結晶中での分子構造が決定されている⁵⁾。また水溶液中でのBPTIに含まれるカルボニル炭素のNMRスペクトルの完全な帰属も既になされている⁹⁾。ペプチド鎖の末端や長い側鎖を除いて、結晶中での分子は水溶液中での分子構造を保持していると考えられる。従ってBPTIはNMRパラメータとタンパク質の分子構造との相関を調べるための優れたモデル化合物となる。BPTIは6個のL-アラニン残基を含み、その中で48番目のL-アラニン残基中のカルボニル炭素(Ala-48 CO)のみが他のアミノ酸残基と水素結合を形成していることがX線回折法によりわかっている。この $R_{N...O}$ は2.8Åと決定されている⁵⁾。また水溶液中でのAla-48 COの ^{13}C 化学シフトは177.70ppmであると報告されている⁹⁾。このデータはFig.2の相関関係を支持している。このように、ここで得られた等方平均 ^{13}C 化学シフトと水素結合距離($R_{N...O}$)との相関は水素結合を形成しているタンパク質の構造解析に有用である⁷⁾。

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) Hertzfeld, J. et al. J. Chem. Phys., 73, 15 (1980)
- 4) Fenzke, D. et al. J. Mag. Res., 88, 172 (1990)
- 5) Deisenhofer, J. et al. Acta crystallogr., B31, 238 (1975)

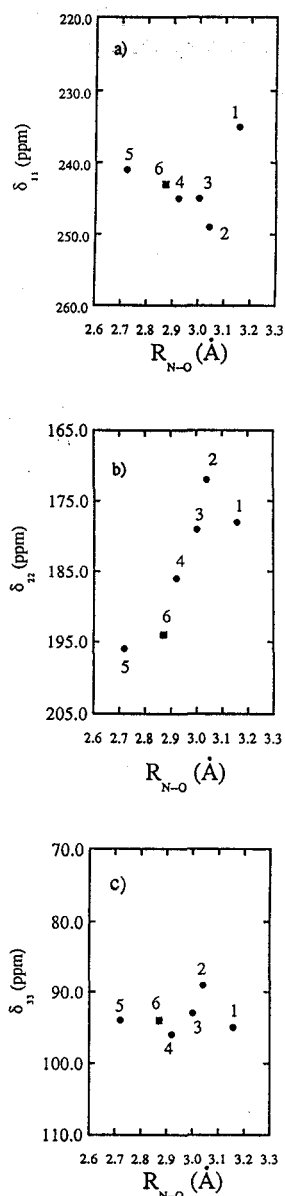


Figure 3. Plots of the observed principal values of ^{13}C chemical shift tensors (a) δ_{11} , (b) δ_{22} and (c) δ_{33} against the $R_{N...O}$. 1:Ala-Pro-Gly \cdot H $_2$ O, 2:Ala-Ser, 3:Ala-Gly-Gly \cdot H $_2$ O, 4-5:Ac-Ala-NHMe and 6:(Ala) $_n$.

6) Tuchsén, E. et al. *Biochemistry*, 27, 8568 (1988)

7) Asakawa, N. et al., to be submitted.

固体高分解能NMRを用いた羊毛ケラチン及び S-カルボキシメチル化ケラチンの構造研究

(東工大工) ○三村博幸・吉水広明・安藤 勲

Structure of Wool Keratin and S-Carboxymethyl Keratines in the
Solid-State As studied by High-Resolution Solid-State NMR

Hiroyuki Mimura, Hiroaki Yoshimizu, and Isao Ando

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152)

S-Carboxymethyl keratines were extracted from wool. ^{13}C CP/MAS spectra of SCMKA [low-sulfur fraction] films with steam- and unsteam-treatments, cast aqueous solution and formic acid solution were measured. From the observed ^{13}C chemical shifts and relaxation times, it was found that the major conformation of SCMKA in the film cast from aqueous solution and formic acid solution is the right-handed α -helix form, but that of SCMKA in the steam-treated film is the β -sheet form. and the mobility of SCMKA molecules in the steam-treated film is higher compared with that in the unsteam-treated film.

1. 緒言

繊維状タンパク質は、一次構造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きわめて重要である。古くから衣料材料として用いられてきた羊毛繊維は、代表的な繊維状タンパク質の一つであり、その主成分であ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較すると、アミノ酸組成が変化に富み、また複数のタンパク質からな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タンパク質は、繊維状のマイクロフィブリル構成成分と考えられる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残基の多い成分の三つに大別される¹⁾。我々は ^{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きわめて有用な方法であることを示してきた²⁾。本報告では、ジスルフィド結合の還元開裂で得られる羊毛ケラチンの一つであり、マイクロフィブリル由来のS-カルボキシメチル化ケラチンA画分(SCMKA)を調製し、その水溶液キャスト膜及びギ酸溶液からキャスト膜を調製し、その固体構造、更にギ酸キャスト膜の湿熱処理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。

固体高分解能 ^{13}C -NMR、コンホメーション、S-カルボキシメチル化ケラチン、分子運動

みむら ひろゆき ・ よしみず ひろあき ・ あんどう いさお

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脱水して風乾した。その羊毛を、O'Donnellらの方法³⁾に従い、2-メルカプトメタノール-8M尿素水溶液中で還元可溶化し、モノ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⁴⁾により三つの成分に分離した。Cys残基の少ない成分であるSCMKAは、0.05M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ を溶媒に用い、溶解-等電点沈澱を繰り返すことにより精製し、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凍結乾燥物を、イオン交換水及びギ酸に溶解させて、テフロン板上に流延し、風乾により得ものを試料とした。SCMKAギ酸キャスト膜の湿熱処理は、坂部らの報告⁵⁾を参考に、水蒸気雰囲気下で80°C、3時間行った。

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(67.8MHz)を用いてTOSS法を併用して行った。 ^{13}C -MNR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。スピナー格子緩和時間(T_1^C)はTorchiaの方法⁶⁾で求めた。

3. 結果と考察

1) Figure 1に各SCMKA試料の ^{13}C CP/MAS TOSS NMRスペクトルを、Figure 2にカルボニル炭素領域の拡大スペクトルを、Figure 3に $\text{C}\alpha$ メチン炭素及び側鎖アルキル鎖領域の拡大スペクトルを示す。帰属は固体状態のホモポリペプチドの ^{13}C -NMR化学シフト値を参考に行った。175ppm付近にカルボニル炭素のピーク、115~158ppm付近にPhe、Tyr残基の側鎖芳香族炭素のピーク、45~65ppm付近に $\text{C}\alpha$ メチン炭素のピーク、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⁷⁾、 α -ヘリックスをとる主鎖カルボニル炭素は $175.8 \pm 0.8\text{ppm}$ に、 β -シートをとる主鎖カルボニル炭素は $170.9 \pm 1.2\text{ppm}$ にピークを、アミノ酸残基の種類にかかわらず与える。Figure 2を見るとSCMKA水溶液キャスト膜及びSCMKAギ酸キャスト膜では176ppm付近に高磁場側に肩をもつピークが観測されている。これとは対称的に、湿熱処理をしたSCMKAギ酸キャスト膜では172ppm付近に観測されているピークは、低磁場側に肩をもっている。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。Table 1にカルボニル炭素の線形解析結果を示す。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。水溶液キャスト膜、ギ酸キャスト膜、及び湿熱処理をしたギ酸キャスト膜の低磁場側成分の相対強度は、そ

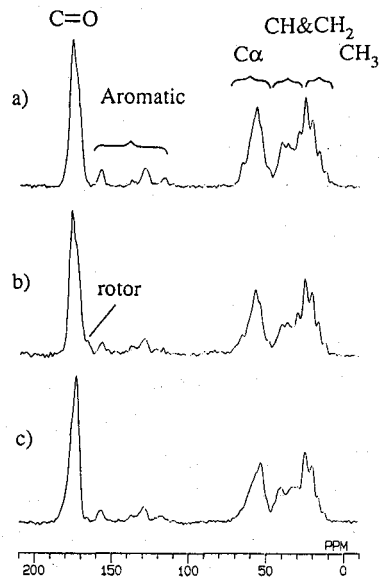


Figure 1 ^{13}C CP/MAS TOSS NMR spectra of SCMKA films, a) cast from aqueous solution, b) cast from formic acid solution, and c) steam-treated for b).

れぞれ56%、51%、31%となった。水溶液キャスト膜とギ酸キャスト膜の α -ヘリックス含量にあまり変化が認められなかった。しかし、ギ酸キャスト膜に湿熱処理を施すと、SCMKA膜中の α -ヘリックス含量が半減し、 β -シート含量が増加した。また、Figure 3のC α メチン炭素領域を見ると、水溶液キャスト膜及びギ酸キャスト膜では65ppm付近の小さなピークと53ppm付近に肩をもつ56ppm付近の大きなピークが現れている。これに対して、湿熱処理をしたギ酸キャスト膜では、65ppm付近と56ppm付近に肩をもつ53ppm付近の大きなピークが現れている。65ppm付近のピークは α -ヘリックスをとるVal、Ile残基のC α メチン炭素と β -シートをとるSer残基のC α メチレン炭素由来のものである。また、56ppm及び53ppmの化学シフト値は、それぞれ、既知のポリペプチドC α メチン炭素の化学シフト値に、SCMKAの氨基酸組成及びカルボニル炭素の線形解析より求められたコンホメーション組成を考慮して得られた平均値56.4ppm、53.0ppmによく一致している。更に、メチル炭素領域の α -ヘリックスをとるAla残基のC β メチル炭素に由来する16ppm付近のピークに注目すると、水溶液キャスト膜及びギ酸キャスト膜と比べて湿熱処理をしたギ酸キャスト膜はピークが小さくなっている。即ち、SCMKAギ酸キャスト膜は、湿熱処理により α -ヘリックスが β -シートに転移すると考えられる。

Table 1 The observed ^{13}C NMR chemical shifts, half-widths, and relative peak intensities of the main-chain carbonyl carbons of SCMKA in the film cast from aqueous solution and formic acid solution, and in the steam-treated film

	^{13}C NMR chemical shift/ppm	half-width /ppm	relative peak intensities %
film cast from aqueous solution	176.2	4.0	56
film cast from formic acid solution	172.5	4.8	44
steam-treated	176.3	3.7	51
	172.4	4.7	49
	176.4	3.8	31
	172.7	4.2	69

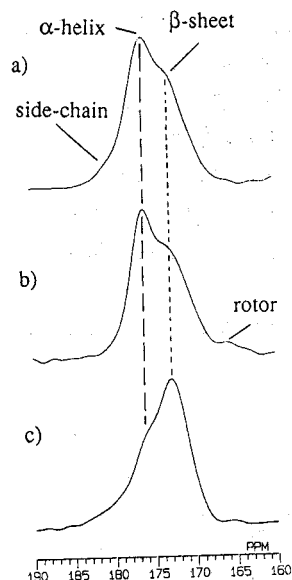


Figure 2 Expanded ^{13}C CP/MAS TOSS NMR spectra of the carbonyl carbons in SCMKA films, a) cast from aqueous solution, b) cast from formic acid solution, and c) steam-treated for b).

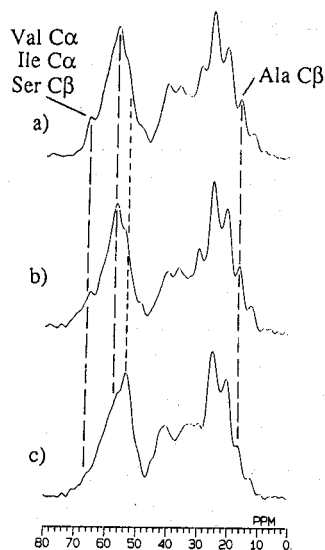


Figure 3 Expanded ^{13}C CP/MAS TOSS NMR spectra of the C α methine carbons and side-chain alkyl carbons in SCMKA films, a) cast from aqueous solution, b) cast from formic acid solution, and c) steam-treated for b).

2) Table 2にSCMKA膜試料の各炭素の T_1 を示す。水溶液キャスト膜とギ酸キャスト膜を比べてみると、ギ酸キャスト膜の主鎖カルボニル炭素の T_1 値のみが小さく、主鎖カルボニル炭素のみの運動性が高くなっていることが分かる。これは、溶媒をギ酸に変えたことにより起因し、局所的構造の変化と関連していると考えられる。一方、湿熱処理をしたギ酸キャスト膜では、全ての炭素の T_1 値が小さく、分子全体の運動性が高くなっていることが分かる。前述のコンホメーション変化と重ね合わせると、湿熱処理により、SCMKA分子内を水分子が通り抜けるときに、コイルドコイルもつ α -ヘリックスを形成する分子内水素結合が切れて、 β -シートを形成する分子間水素結合に変化し、その際、分子間のパッキングが緩むものと考えられる。

Table 2 The determined ^{13}C spin-lattice relaxation times T_1 for SCMKA films

	^{13}C spin-lattice relaxation time T_1		
	carbonyl carbon/s	Camethine carbon/s	methine and methylene carbons/s
film cast from aqueous solution	25 (sc) 42 (α h) 38 (β s)	21	14
film cast from formic acid solution	25 (sc) 33 (α h) 33 (β s)	23	13
steam-treated	14 (sc) 25 (α h) 26 (β s)	14	6

sc, α h, and β s in parentheses indicate the side-chain, α -helix, and β -sheet, respectively.

4. 参考文献

- 1) for example; J.H.Brabury, *Adv.Protein Chem.*, **27**, 111(1973)
- 2)a) H.Yoshimizu and I.Ando, *Macromolecules*, **23**, 2809(1990)
 - b) H.Yoshimizu, H.Mimura and I.Ando, *Macromolecules*, **24**, 862(1991)
 - c) H.Yoshimizu, H.Mimura and I.Ando, *J.Mol.Struct.*, **246**, 367(1991)
- 3) I.J.O'Donnel and E.O.P.Thompson, *Austl.Biochem.Sci.*, **17**, 973(1964)
- 4) L.M.Dowling and W.G.Crewther. *Pre.Biochem.*, **4**, 203(1974)
- 5) H.Sakabe, T.Miyamoto and H.Inagaki, *Sen-i Gakkaishi*, **38**, T-517(1982)
- 6) D.A.Torchia, *J.Magn.Reson.*, **30**, 613(1978)
- 7) for example; H.Saito and I.Ando, *Ann.Repts.NMR Spectroscopy*, **21**,209(1989)

P56

¹³C 固体高分解能 NMR による膜蛋白質の構造解析とその問題点

○辻 暁¹、新沢 恭子¹、恵良田 知樹²、内藤 晶¹、
吉川 信也¹、齋藤 肇¹
¹姫路工大 理 生命、²筑波大 物理工学系

Conformation analysis of Membrane Proteins by High-Resolution Solid State ¹³C
NMR

○Satoru Tuzi¹, Kyoko Shinzawa¹, Tomoki Erata², Akira Naito¹, Shinya
Yoshikawa¹, Hazime Saitô¹

¹Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, ²Department of
Applied Physics, University of Tsukuba

We recorded high-resolution solid state ¹³C NMR spectra of crystals of bovine heart cytochrome c oxidase, which is a membrane protein of the electron transport system of the mitochondrial inner membrane. We were able to observe ¹³C NMR spectra of the protein with minimum overlap from detergent signals. This is because the cross polarization times of the proteins, TCH's, are one order of magnitude shorter than those of detergent. Further, it was found that the detergent molecules are dynamically disordered state as manifested from the, cross polarization times, ¹³C spin-lattice relaxation times, and chemical shift anisotropies.

[はじめに]

膜内在性の膜蛋白質はしばしば高分子量の複合体を形成すると同時に、周囲の脂質分子と会合した状態をとっている。また、nativeな状態で可溶化、精製された膜蛋白質試料は、安定化のために加えられる界面活性剤と会合している。そのために、膜蛋白質試料の溶液NMRによる研究は、高分子量による回転相関時間の長大化に起因する線幅の広がりまたは信号の消失、界面活性剤の大きな信号と蛋白質の信号の重なりという二点の困難な問題に遭遇する。一方、¹³C固体高分解能NMRで結晶状態の膜蛋白質の観測を試みれば、少なくとも前者の問題は解決し、蛋白質複合体に関して鋭い信号を得ることが期待できる。また、蛋白質と界面活性剤の運動状態に違いがあるならば、CP-MAS法の接触時間を適切に設定することにより、後者の信号強度が低い条件下で膜蛋白質のスペクトルを得ることが可能であると期待できる。その場合には、コンホメーションが既知のポリペプチドや蛋白質の¹³C化学シフトデータをもとに、膜蛋白質複合体の高次構造の知見を得ることも可能になってくる。ここでは、吉川らによって精製、結晶化法が確立されたウシ心筋チトクロム酸化酵素複合体の結晶¹⁾

¹³C 固体高分解能 NMR、チトクロム酸化酵素、膜蛋白質

つじ さとる、しんざわ きょうこ、えらた ともき、ないとう あきら、
よしかわ しんや、さいとう はじめ

の ^{13}C 固体高分解能NMRによる解析を行ない、蛋白質の高次構造および蛋白質結晶中の界面活性剤の存在状態について議論した。

[実験]

ウシ心筋チトクロム酸化酵素は、ウシ心筋よりコール酸を用いて可溶化し、硫酸による塩析を繰り返すことによって精製した。精製の段階において、界面活性剤をコール酸からBL8SY ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_8\text{-OH}$)に置き換えた。酸化型酵素は精製試料を限外口過膜を用いて濃縮することにより結晶化し、還元型酵素は N_2 雰囲気下において還元剤であるL-アスコルビン酸存在下、BL8SY濃度を調整することにより結晶化した。

^{13}C 固体高分解能 NMRスペクトルは、Bruker MSL400 FT NMR分光器(^{13}C :100.6MHz)を用い、常温下で繰り返し時間4s、接触時間0.1~10ms、積算回数1000~24000回にて測定された。試料はジルコニア製ローターに充填し、密閉型キャップを用いて密閉し、測定した。

[結果と考察]

蛋白質信号の選択的観測： Fig.1A、Bにそれぞれ接触時間を1msとしたときのチトクロム酸化酵素結晶のCP-MAS NMRスペクトルおよびBL8SY溶液のMAS NMRスペクトルを示す。Fig.1Aに見られる30.0および70.1ppmの鋭いピークは結晶中のBL8SYに由来しており、その他の信号は主に蛋白質に由来していることがわかる。Fig.2に接触時間を0.1~8msの間で変化させたときのチトクロム酸化酵素結晶のCP-MASスペクトルを示す。CP-MASスペクトル中の信号の強度は、接触時間を変化させた場合、核の交差分極時間 T_{CH} および回転系の ^1H スピン格子緩和時間 $T_{1\rho}$ を反映して変化するが、チトクロム酸化酵素の信号強度が接触時間1ms付近で最大となっているのに対して、BL8SYの信号は接触時間4ms以上で最大値をとっている。このことは接触時間を1msとした場合、主に蛋白質の信号を、界面活性剤に由来する信号との重なりが少ない条件下で観測できることを示している。チトクロム酸化酵素結晶中には蛋白質1分子あたり40分子程度の界面活性剤が存在すると考えられるが、Fig.1Aで観測される界面活性剤の信号強度は分子数から予測される値の10%程度となっている。

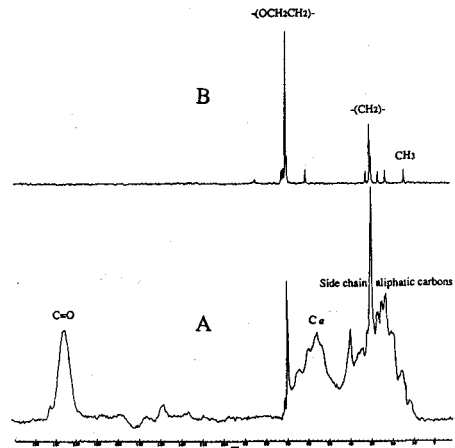


Fig. 1 ^{13}C CP-MAS NMR spectrum of cytochrome c oxidase crystal (A), and ^{13}C MAS NMR spectrum of BL8SY solution (B).

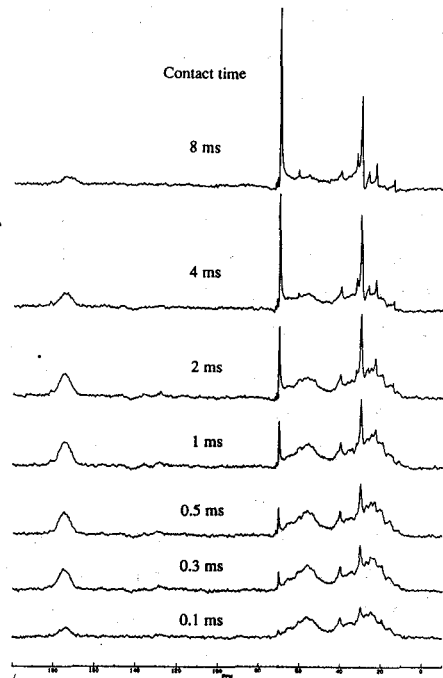


Fig. 2 Contact time dependence of ^{13}C CP-MAS NMR spectra of cytochrome c oxidase.

チトクロム酸化酵素の高次構造：一般に ^{13}C 化学シフトはコンホメーション依存シフト²⁾により、固体、溶液を問わず高次構造に関する情報を含んでいる。C α および側鎖炭素では、残基の種類による化学シフトの差が大きいが、C=Oピークは影響を受けにくく、主に二次構造に関する情報を与える。モデルポリペプチドおよび繊維状蛋白質から得られた化学シフト値のデータより、 α -ヘリックス構造中のC=O炭素のピークは174~177ppmの領域に現われることが知られている。この領域の信号強度から得られる α -ヘリックス含量の推定値は52%であった。ただし、 α -ヘリックス含量が少なく不規則構造を含む蛋白質について α -ヘリックス含量推定に用いる境界値を174ppmとすることの妥当性については現在検討中である。

Fig. 3A, B, Cに、酸化型、還元型のチトクロム酸化酵素のスペクトルおよびその差スペクトルを示す。スペクトルには、若干の界面活性剤ピークの変化を除き酸化型および還元型の間で全く差が見られず、高次構造に大きな違いが存在しないことがわかる。

蛋白質結晶中における界面活

性剤の存在状態： Table Iに、蛋白質結晶中における蛋白質および界面活性剤のスピン格子緩和時間 T_1 および交差緩和時間TCHの値を示す。蛋白質の主鎖領域(C=O, C α)の T_1 は側鎖および界面活性剤と比較して長く、主鎖構造が結晶中では動いていないことを示している。これに

対し、界面活性剤の T_1 はより短く溶液中においてミセル状態をとった場合の T_1 と有意な差が見られない。このような蛋白質と界面活性剤の運動性の違いは、BL8SYが蛋白質とは異なり、結晶中においても溶液状態に近い状態をとっていることを示している。このことは、Fig. 1Aにおいて、BL8SYの主ピークの化学シフト値(30.0, 70.1ppm)が固体状態のBL8SYの値(33.2, 72.1ppm)よりも溶液状態の値(30.2, 70.1ppm)に近い点とも一致している。Fig. 4は接触時間に対する蛋白質のC α 、C=O、界面活性剤の-(CH₂)-、-(OCH₂CH₂)-炭素の磁化の大きさの変化を示しているが、磁化の極大を与える接触時間は界面活性剤では蛋白質よりもはるかに長くなっている(~4ms)。このことは、Table Iに示すように、分子のランダムな運動による配向の乱れにより、界面活性剤のTCHが蛋白質のTCHよりも非常に長く、回転座

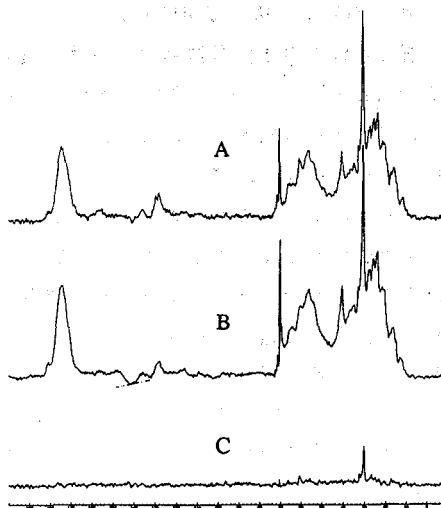


Fig. 3 ^{13}C CP-MAS NMR spectra of oxidized cytochrome c oxidase (A), reduced cytochrome c oxidase (B), and difference spectrum of A and B.

Table I
 ^{13}C chemical shifts, ^{13}C Spin-Lattice Relaxation Times(T_1), Cross-Polarization Times(TCH), and ^{13}C Spin-Lattice Relaxation Times in Rotating Frame($T_{1\rho}$) of Cytochrome c Oxidase and BL8SY in Cytochrome c Oxidase Crystal.

chemical shift / ppm	T_1 / s			TCH / ms	$T_{1\rho}$ / ms	
	C.T. ^a =1ms	C.T. ^a =4ms	C.T. ^a =8ms			
Cytochrome c Oxidase: C=O	175.5	13.0	15.4	22	0.27	5.1
C α	56.2	6.46	8.4	_b	0.073	13
	40.2	0.72	0.62	0.68	0.100	25.7
Side chain aliphatic carbons	19.9	0.59	0.70	0.81	0.16	4.5
	16.0	0.96	_b	_b	0.18	4.9
	12.0	0.99	_b	_b	0.4	2
BL8SY: CH ₃	14.1	_b	_b	1.75	_b	_b
-(CH ₂)-	30.0	0.712	0.563	0.527	1.01	57.5
-(OCH ₂ CH ₂)-	70.1	0.462	0.474	0.496	3.83	542

T_1 of BL8SY in solution / s : CH₃: 2.1, -(CH₂)-: 0.87, -(OCH₂CH₂)-: 0.606.

^aContact time.

^bSignal intensity is not enough to determine the accurate value.

標系の¹Hスピン格子緩和時間T_{1ρ}もまた、蛋白質に比較して長いことによっている。

界面活性剤の蛋白質結晶中における運動に関しては、T₁およびT_{CH}からより詳細な情報を得ることができる。Table Iからみて、蛋白質結晶における界面活性剤のT₁値は、溶液におけるミセルの値に比べて若干の短縮が見られるものの、それを有意に識別することは難しい。T₁値は、10⁻⁸秒に近い速い分子運動に対して敏感であるが、界面活性剤と蛋白質の相互作用の影響を受けるような遅い時間尺度の運動を問題にする際には必ずしも適切なパラメーターと言うことができない。チトクロム酸化酵素結晶に関してstaticな測定を行なうと、化学シフトの異方性による信号の広がりが見いだされることから、界面活性剤の分子運動に運動速度または運動方向の制限があることがわかる。このような運動の制限は、T_{CH}を通して観測することができる。T_{CH}は、式

$$\frac{1}{T_{CH}} = \frac{CIS M_2^{1S}}{\sqrt{M_2^{1I}}} \quad (CIS: \text{定数})$$

で示されるように¹³C、¹Hの二次モーメントM₂^{1S}、M₂^{1I}の関数である³⁾。この二次モーメントは数10kHz程度の運動に敏感であるので、T_{CH}は遅い運動、または等方的に平均化されない運動によって値が決まっていることがわかる。Table Iにおいて界面活性剤の疎水性部位 (-CH₂-) に比べ親水性部位

(-OCH₂CH₂-) のT_{CH}が有意に長くなっている点は、親水性部位の揺らぎがより大きいことを示している。反対に、疎水性部位では蛋白質表面との相互作用によって運動が制限を受けており、その結果として短いT_{CH}が観測されていると考えられる。これらの観測結果は、T_{CH}を蛋白質と界面活性剤の相互作用を検討する際の良い指標として利用できることを示している。

以上のように、固体高分解能NMRを用いて膜蛋白質結晶を観測することにより、蛋白質、界面活性剤に関して選択的に構造および運動性の情報を得、分子の機能と関連づけた解析を行なうことができる。このような方法は、チトクロム酸化酵素に限らず、界面活性剤と共存して結晶化する膜蛋白質一般に適用可能であると考えられる。

[参考文献]

- 1) Yoshikawa, S., Tera, T., Takahashi, Y., Tsukihara, T. and Caughey, W. S. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 1354-1358.
- 2) Saito, H. and Ando, I. (1989) Ann. Rep. NMR Spectrosc. **21**, 209-290.
- 3) Shaefer, J. and Stejskal, E. O. (1979) in Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy, ed. Levy, G. C. (John Wiley & Sons, New York), Vol. 3, pp. 283-324.

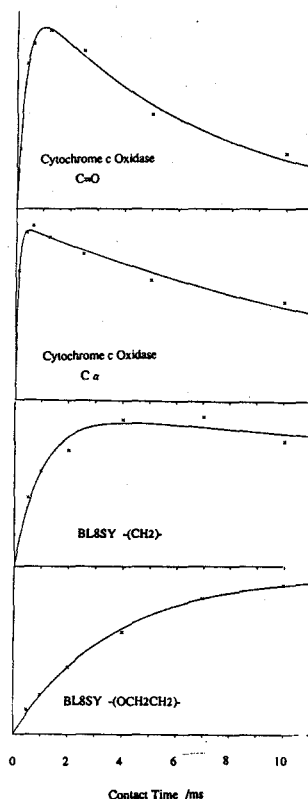


Fig. 4 Contact time dependence of magnetization of the carbons of cytochrome c oxidase and BL8SY in cytochrome c oxidase crystal.

¹⁵N NMR によるポリペプチドの固体構造解析：
L-ロイシン含有ポリペプチド

(群馬大工、東工大工*)

○ 莊司 顯、加藤 寛、尾崎拓男、黒木重樹*、安藤 勲*

STRUCTURAL ANALYSIS OF SOLID POLYPEPTIDES
CONTAINING L-LEUCINE RESIDUES BY ¹⁵N NMR.

Akira Shoji, Hiroshi Katoh, Takuo Ozaki, Shigeki Kuroki* and Isao Ando*

(Department of Biological Sciences, Faculty of Engineering, Gunma University,

*Department of Polymer Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology.)

Abstract: The relation between the chemical structures (primary structure and conformation) and the ¹⁵N chemical shift tensors (σ_{11} , σ_{22} and σ_{33}) as well as the isotropic chemical shift (σ_{iso}) of some solid polypeptides $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$ (X denotes other amino acid residues: natural abundance) containing ¹⁵N-labeled L-Leucine (Leu*) residues was studied by means of ¹⁵N NMR. It was found that the σ_{iso} of Leu* residues is conformation-dependent, but is independent of the nature of X, L-Leucine content. This result is quite different from that of $[\text{Ala}^*, \text{X}]_n$ or $[\text{Gly}^*, \text{X}]_n$. It was also found that the σ_{22} of Leu* residues in $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$ depends not only on conformation but also on L-Leucine content. Thus, the ¹⁵N chemical shift tensors (especially σ_{22}) are useful for fine structural analysis of solid polypeptides.

1. 緒 論

¹⁵N 核は ¹³C 核と異なり孤立電子対 (lone-pair electron) を有するため、¹⁵N 化学シフトはコンホメーションの他、隣接アミノ酸残基の種類、水素結合様式や長距離相互作用などに関する情報が得られる可能性がある。我々は最近、種々のホモポリペプチド、¹⁵N 標識 L-アラニン残基 (Ala*) を含むポリペプチド $[\text{Ala}^*, \text{X}]_n$ (X は天然存在比 ¹⁵N のアミノ酸残基) 及び ¹⁵N 標識グリシン残基 (Gly*) を含むポリペプチド $[\text{Gly}^*, \text{X}]_n$ の ¹⁵N 化学シフトと構造 (アミノ酸残基の種類、アミノ酸組成及びコンホメーション) との関係を明らかにし^{1,3}、また、固体高分解能 ¹⁵N-NMR 法がコラーゲン線維や絹フィブロインなど天然繊維状タンパク質の構造解析に有効な手段であることを報告した⁴。

本研究では、重要なアミノ酸の一つである L-ロイシンに着目し、ポリペプチドのコンホメーション・L-ロイシン含量・隣接アミノ酸残基の種類などが L-ロイシン残基の ¹⁵N 化学シフトにどのように反映されるか? を明らかにするため、¹⁵N 標識 L-ロイシン残基 (Leu*) を含む種々のポリペプチドを合成し、その ¹⁵N 化学シフトと構造との相関を調べ、Ala* や Gly* の結果と比較検討した。

固体高分解能 NMR・¹⁵N NMR・ポリペプチド・化学シフト・コンホメーション・ロイシン

しょうじ あきら・かとう ひろし・おざき たくお・くろき しげき・あんどう いさお

表 1. ^{15}N Isotropic Chemical Shift (σ_{iso}) and ^{15}N Chemical Shift Tensors (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) of Solid Polypeptides $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$ Containing ^{15}N -labeled L-Leucine Residue in the α -Helix and β -Sheet Forms

sample	composition, %			major conformn	^{15}N chemical shift, ppm		
	Leu*	Leu	X		σ_{iso}	σ_{22}	
L01	$[\text{Leu}^*]_n$	20	80	0	α - helix	97,0	55,7
L02	$[\text{Leu}^*]_n$ -5	20	80	0	β - sheet	107,0	66,9
L03	$[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$	20	0	80	β - sheet	107,0	65,1
L04	$[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$	20	10	70	β - sheet (*1)	106,4 (97,0)	65,3
L05	$[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$	20	30	50	α - helix	97,0	55,3
L06	$[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$	20	50	30	α - helix	96,9	54,0
L07	$[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$	20	60	20	α - helix	96,8	54,0
L08	$[\text{Leu}^*, \text{Ala}]_n$	20	0	80	α - helix	96,2	55,5
L09	$[\text{Leu}^*, \text{Ala}]_n$	20	30	50	α - helix	96,5	55,5
L10	$[\text{Leu}^*, \text{Ala}]_n$	20	60	20	α - helix	96,8	51,0
L11	$[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$	20	0	80	β - sheet	96,9	61,2
L12	$[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$	20	30	50	α - helix	97,2	55,5
L13	$[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$	20	60	20	α - helix	96,8	53,2
L14	$[\text{Leu}^*, \text{Lys}(\text{Z})]_n$	20	0	80	β - sheet (*2)	105,1 (97,2)	63,0
L15	$[\text{Leu}^*, \text{Lys}(\text{Z})]_n$	20	30	50	α - helix	97,6	50,1
L16	$[\text{Leu}^*, \text{Lys}(\text{Z})]_n$	20	60	20	α - helix	97,0	54,8
L17	$[\text{Leu}^*, \text{Ile}]_n$	20	0	80	β - sheet	106,7	58,0
L18	$[\text{Leu}^*, \text{Ile}]_n$	20	30	50	α - helix	97,1	56,0
L19	$[\text{Leu}^*, \text{Asp}(\text{OBzl})]_n$	20	30	50	α - helix	97,7	56,7
L20	$[\text{Leu}^*, \text{Glu}(\text{OBzl})]_n$	20	30	50	α - helix	97,6	50,1

(*1) Major conformation of $[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$ (L04) is the β -sheet form containing small amounts (assumed below 30-40%) of the α -Helix form. (*2) Major conformation of $[\text{Leu}^*, \text{Lys}(\text{Z})]_n$ (L14) is the β -sheet form containing small amounts (assumed below 25-35%) of the α -Helix form.

2. 実 験

本研究で用いた Leu^* (MSDアイソトープ社; 98.9% ^{15}N) と天然存在比アミノ酸 (X) からなるポリペプチド試料は、N-カルボキシアミノ酸無水物 (NCA) 法により合成した (表 1)。

^{15}N 及び ^{13}C CP-MAS (cross polarization - magic angle spinning) NMR スペクトルは CP-MAS 装置付属の JEOL GSX-270W 分光計を用い、それぞれ 27.4 MHz (^{15}N 核) 及び 67.8 MHz (^{13}C 核) で測定した。 ^{15}N CP-MAS NMR の測定条件は、コンタクト時間: 2 ms、繰り返し時間: 5 s、 90° パルス幅: 5.7-5.8 μs 、スペクトル幅: 20 kHz、及びデータポイント: 8 K であり、64 - 520 回積算を行った。 ^{15}N 粉末 (CP-static) スペクトルの測定は、試料管をマジック角に固定し静止状態で行い、200 - 1128 回積算した。 ^{15}N 等方性化学シフト (σ_{iso}) 及び ^{15}N 化学シフトテンソル主値 (低磁場側より σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} とする) は $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (飽和水溶液) を外部基準 ($\sigma=0$ ppm) とし、グリシン- ^{15}N の σ 値 (11.59 ppm) を二次基準とした (表 1)。 ^{15}N 化学シフトの実験誤差は σ_{iso} と σ_{22} については ± 0.5 ppm 以内、 σ_{11} と σ_{33} については、 ± 2 ppm 程度であった。

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

3. 結果及び考察

3-1. ポリペプチドの Leu* 残基の ^{15}N 等方性化学シフト (σ_{iso})

ホモポリペプチド $[\text{Leu}^*]_n$ 及び $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$ (Leu* と天然存在比アミノ酸 (X) からなる一連の合成コポリペプチド $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$ 試料 (Leu* の含量がおおよそ 20%) における L-ロイシン残基の σ_{iso} 値を表 1 に示す。表 1 から明らかなように、Leu* の σ_{iso} 値はコンホメーションに依存し、 α -ヘリックスでは 96.2 ~ 97.7 ppm、 β -シートでは 105.1 ~ 107.0 ppm の範囲に現われる (ただし、 $[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$ (β -シート形) は例外と考える)。これらの σ_{iso} 値は、ホモポリペプチド $[\text{Leu}^*]_n$ の σ_{iso} 値 (α -ヘリックス: 97.0 ppm、 β -シート: 107.0 ppm) とほぼ等しい。また、 α -ヘリックスと β -シート間の Leu* の σ_{iso} 値の差はおおよそ 7~11 ppm と大きい、隣接アミノ酸残基 X の違いによるシフト差は 1.5 ppm (α -ヘリックス) と 1.9 ppm (β -シート形) といずれも 2 ppm 以内と非常に小さい。また、隣接アミノ酸残基が Gly の場合、 β -シート形の σ_{iso} 値 (96.9 ppm) が α -ヘリックス形の σ_{iso} 値 (96.8-97.2 ppm) と同じであるが、これはグリシンがアミノ酸の中で不斉炭素原子を持たない特異的なアミノ酸であることを考慮すれば、Gly の系は他のアミノ酸の場合と区別して考えるのが妥当かも知れない。

以上の結果は、我々がすでに報告した Ala* や Gly* の結果 (α -ヘリックスと β -シートのピークの領域が重なる) と大きく異なっており、Leu* の σ_{iso} 値がポリペプチドやタンパク質のコンホメーション解析に極めて有用なアミノ酸であるといえる。

3-2. ポリペプチドの Leu* 残基の ^{15}N 化学シフトテンソル (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})

ホモポリペプチド $[\text{Leu}^*]_n$ 及び $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$ (Leu* の含量がおおよそ 20%) における L-ロイシン残基の σ_{22} 値を表 1 に示す。表 1 から明らかなように、Leu* の σ_{22} 値も σ_{iso} の場合と同様、コンホメーションに依存し、50.1~56.7 ppm (α -ヘリックス) 及び 58.0~66.9 ppm (β -シート) の領域に現われる ($[\text{Leu}^*]_n$: 55.7 ppm (α -ヘリックス)、66.9 ppm (β -シート))。しかし、 σ_{22} 値の場合には σ_{iso} 値の時と比べて隣接アミノ酸残基 X の違いによるシフト差は 5.6 ppm (α -ヘリックス) と 11.9 ppm (β -シート形) と非常に大きい。例えば、 β -シート形をとる $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$ の中でも X が Val と Ile との間で約 8 ppm のシフト差がある。これは明らかに有意差である。このことは、 σ_{22} 値がポリペプチドやタンパク質の主鎖のコンホメーションだけでなく、一次構造や高次の構造にも依存している可能性を示唆している。

3-3. ポリペプチドの Leu* 残基の ^{15}N 化学シフト (σ_{iso} , σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) とアミノ酸組成との関係

$[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$, $[\text{Leu}^*, \text{Ala}]_n$, $[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$ 及び $[\text{Leu}^*, \text{Lys}(\text{Z})]_n$ について、Leu* 残基の ^{15}N 化学シフト (σ_{iso} 及び σ_{22}) とアミノ酸組成との関係を図 1 に示す。Leu* 残基の σ_{iso} 値は Val, Ala, Gly, Lys(Z) など隣接するアミノ酸の種類や L-ロイシン含量によってほとんど影響を受けず、主にコンホメーションの影響を受けるという結果が得られた。次に σ_{22} 値に着目すると、いずれの系でも L-ロイシンの含量によって σ_{22} 値に変化が見られ、例えば、 $[\text{Leu}^*, \text{Ala}]_n$ と $[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$ では L-ロイシン含量が 80% の付近で比較的大きく (2~5 ppm) 高磁場へシフトし、 $[\text{Leu}^*, \text{Lys}(\text{Z})]_n$ では含量 50% 付近で高磁場へ (約 5 ppm) シフトした。この理由は今のところ明らかではないが注目したい結果である。また、 α -ヘリックスと β -シートの間で σ_{iso} にシフト差が見られなかった $[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$ の系でも σ_{22} は大きな (約 5~8 ppm) シフト差を示した。今後、単分散の ^{15}N 標識モデルペプチドを用いてこの点を明らかにしたい。

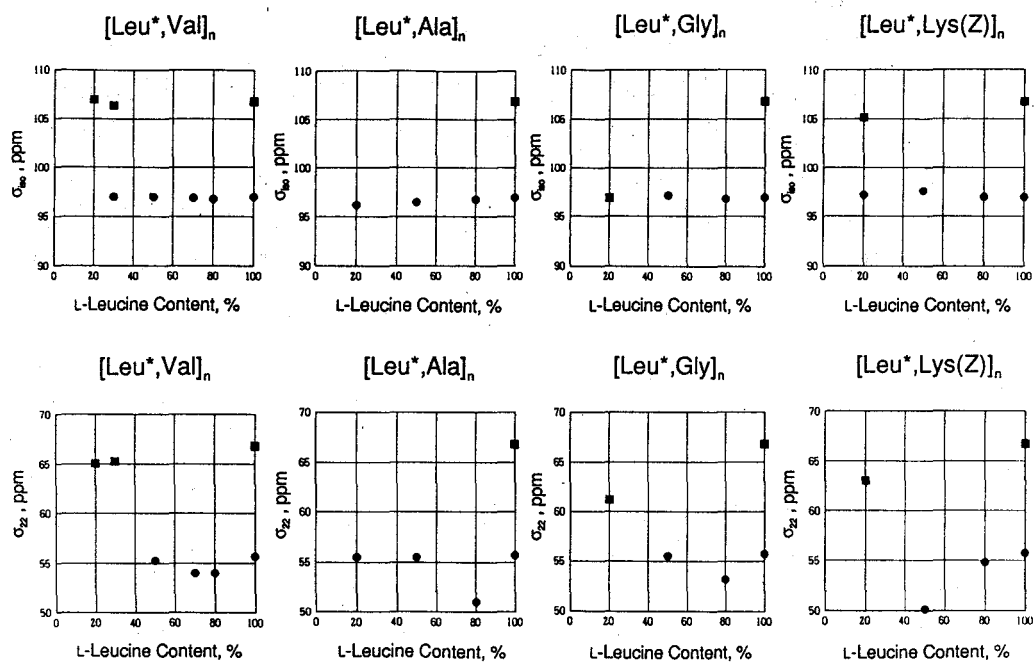


図 1. Plots of σ_{100} and σ_{22} of the Leu* residue in $[\text{Leu}^*, \text{Val}]_n$, $[\text{Leu}^*, \text{Ala}]_n$, $[\text{Leu}^*, \text{Gly}]_n$ and $[\text{Leu}^*, \text{Lys(Z)}]_n$ against the L-leucine content (%): (●) α -helix form; (■) β -sheet form;

文献：

- 1) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; I. Ando, *Macromolecules*, 1987, 20, 2441-2445.
- 2) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; S. Ando; I. Ando, *Macromolecules*, 1989, 22, 2860-2863.
- 3) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; S. Ando; I. Ando, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 4693-4697.
- 4) 莊司、尾崎、藤戸、出口、安藤：第28回 NMR 討論会講演要旨集、(1989) 5-8.

固体高分解能¹⁷O NMRによるポリグリシンの構造研究

(東工大) ○黒木重樹・安藤 勲
(群馬大工) 莊司 顯・尾崎拓男

A Structural Study of Polyglycine by Solid State ¹⁷O NMR Spectroscopy

Shigeki Kuroki¹, Isao Ando¹, Akira Shoji² and Takuo Ozaki²

1 Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, Japan 152

2 Department of Biological Science, Gunma University, Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma, Japan 376

The fact that the oxygen atom in polypeptides takes a very important role in intra- and inter-molecular interaction makes this nucleus especially suitable as a probe for investigating the structure and dynamics. There is little ¹⁷O NMR study of peptides and polypeptides in the solid state. In this study, we attempt to observe the solid state ¹⁷O-MAS NMR spectra of glycine and polyglycines with form I and II, in order to obtain the values of three NMR parameters (nuclear quadrupolar coupling constant, asymmetric parameter and chemical shift), and to discuss structural information through these parameters.

Figures 3 a) and b) show observed 67.7MHz ¹⁷O-MAS NMR spectra of polyglycines with forms I and II in the solid state, respectively. It is found from these spectra that there exist two magnetically nonequivalent sites for the oxygen atom in the forms I and II and large difference between them.

1. 緒言

近年、固体状態でのペプチドおよびタンパク質の構造研究に固体高分解能NMRが用いられるようになってきた¹⁾。この手法により、¹³C化学シフトおよび¹⁵N化学シフトのコンホメーション依存性が見い出され、¹³C化学シフトと¹⁵N化学シフトを用いたコンホメーションの決定が為されている²⁾。私どもは既にペプチド中のカルボニル炭素の¹³C化学シフトおよびアミド窒素の¹⁵N化学シフトから固体結晶中の水素結合に関する情報が得られることを明らかにした³⁾。

一方、¹³Cおよび¹⁵Nのようなスピン量子数 $I = 1/2$ 以外の核の固体NMRがここ数年注目されつつある。特に生体分子中に酸素原子は多く含まれる上に、生体分子の機能および構造の発現に大いに寄与しているため、その同位体でNMR観測可能な核¹⁷O核 ($I = 5/2$) はペプチドおよびタンパク質の構造解析に今までの¹³C、¹⁵Nとは違った面からアプローチできる可能性を秘めている。

固体¹⁷O-NMR、ポリグリシン、構造解析、コンホメーション

くろきしげき、 あんどういさお、 しょうじあきら、 おざきたくお

^{17}O 核は天然存在比0.037%であるが溶液では T_1 が短いために繰り返し時間を短くして単位時間内の積算回数を稼ぐことが可能であるが、固体では T_1 はそれほど短くないために繰り返し時間を短くすることは不可能であり、天然存在比でのスペクトル測定は今のところ困難であるので、 ^{17}O エンリッチラベルをする必要がある。また、 ^{17}O 核は四極子核であるため、核正電荷分布に偏りが生じ、電気四極子モーメントが生じる。これが核周辺にある電場勾配と核四極子相互作用をもつ。この相互作用は固体における他の化学シフト異方性、双極子-双極子相互作用よりもはるかに大きい。この核四極子相互作用をゼーマン相互作用の摂動として扱くと、中央遷移 ($-1/2 \rightarrow 1/2$) は1次摂動ではシフトされないが、2次摂動によってシフトされる。これはMAS (マジック角回転) によっても回避することは不可能である。したがって、この2次の摂動により高磁場側にピークの位置 ω がシフトする。その位置は以下に示す式で与えられる⁴⁾。

$$\omega_{\frac{1}{2}, \frac{1}{2}} - \omega_0 = -\frac{F}{\omega_0} [A^r(\phi) \cos^4 \theta + B^r(\phi) \cos^2 \theta + C^r(\phi)] \quad (1)$$

$$A^r(\phi) = \frac{21}{16} - \frac{7}{8} \eta \cos 2\phi + \frac{7}{48} \eta^2 \cos^2 2\phi \quad (2)$$

$$B^r(\phi) = -\frac{9}{8} + \frac{\eta^2}{12} - \eta \cos 2\phi - \frac{7}{24} \eta^2 \cos^2 2\phi \quad (3)$$

$$C^r(\phi) = \frac{5}{16} - \frac{1}{8} \eta \cos 2\phi + \frac{7}{48} \eta^2 \cos^2 2\phi \quad (4)$$

$$F = \frac{\omega_Q}{6} \left[I(I+1) - \frac{3}{4} \right] \quad (5)$$

$$\omega_Q = \frac{3e^2qQ}{2I(2I-1)h} \quad (6)$$

ここで、 I はスピン量子数 (^{17}O の場合は $5/2$)、 η は非対称パラメータ、 e^2qQ/h は核四極子結合定数である。

従って、以上の式からスペクトルシミュレーションを行うことにより、核四極子結合定数 e^2qQ/h 、非対称パラメータ η 、および化学シフト δ を決定することができる。

本研究では ^{17}O ラベルしたグリシンおよびポリグリシンI型、II型を合成し、その固体高分解能 ^{17}O NMRスペクトルを観測した。得られたスペクトルから核四極子結合定数 e^2qQ/h 、非対称パラメータ η 、化学シフト δ を得て、その各々のパラメータが固体中での構造に関するどのような情報を持っているかを明らかにした。そして、今後ペプチドだけでなく他の合成高分子にも固体 ^{17}O NMRによる解析が有用であることを示唆する。

2. 実験

1) 試料の合成

まず、グリシンメチルエステルを Na^{17}OH /メタノール溶液によって加水分解することにより ^{17}O エンリッチグリシンを得た。溶液 ^{17}O -NMRによりエンリッチ率は5.7%であることがわかった。この試料を用い、N-カルボキシアミノ酸無水物 (NCA) 法によ

りポリグリシンI型(以下、PGI) (β -シート構造)を合成し、これをポリグリシンII型(以下、PGII) (3_1 ヘリックス構造)に転化した。PGIとPGIIのコンホメーションは固体 ^{13}C -NMRで確認した。

2) 固体 ^{17}O NMR測定

固体高分解能 ^{17}O 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スペクトロメータ(観測周波数36.5MHz)およびGSX-500NMRスペクトロメータ(観測周波数67.7MHz)を用い、室温で測定を行った。積算回数は500~9000回である。化学シフトの基準としては外部基準として H_2O を用い、その化学シフトを0ppmとした。試料は窒化ケイ素製のロータに入れ、マジック角で~7500Hzの速さの回転をさせた。パルスシーケンスはシングルパルスモードでFID取り込み時間中にプロトンデカップリングを行う方法を用いた。また、交差分極法による測定も試みた。

3) スペクトルシミュレーション

上述した理論式に基づきスペクトルシミュレーションプログラムを作成した。パーソナルコンピュータのCRT上で理論曲線と観測されたスペクトルを重ね合わせることにより、核四極子結合定数 e^2qQ/h 、非対称パラメータ η および化学シフト δ を決定した。その1例をFigure 1に示す。

3. 結果と考察

Figure 2 a)、b)にそれぞれグリシンのシングルパルスモードによる36.5MHzおよび67.7MHzの固体 ^{17}O -MAS NMRスペクトルを示す。36.5MHzで観測されたNMRシグナルの線幅が67.7MHzでのそれよりも大きく広がっている。この2つのスペクトルを見る限り、高磁場での測定が ^{17}O 核のような四極子核では有用であることがわかる。また、Figure 1のように67.7MHzにおいて観測されたグリシンの ^{17}O -MASスペクトルと理論曲線とを重ね合わせることにより $e^2qQ/h = 7.5\text{MHz}$ 、 $\eta = 0.55$ 、 $\delta = 290\text{ppm}$ と決定した。水溶液におけるグリシンの化学シフト δ は270ppmであるから、固体での化学シフトはずいぶん

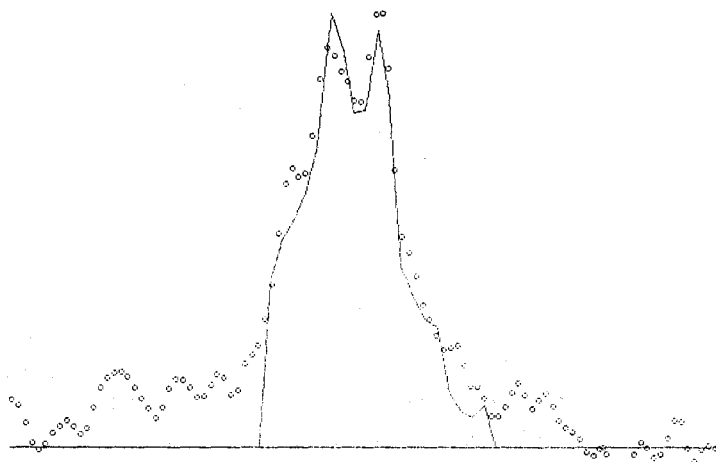


Figure 1 Schematic representations of experimental ^{17}O -MAS spectra and theoretical ^{17}O -MAS spectra. The circles indicate the experimental data for glycine. $e^2qQ/h = 7.5\text{MHz}$, $\eta = 0.55$, $\delta = 290\text{ppm}$.

磁場側にある。

PGI、PGIIの67.7MHzにおける固体 ^{17}O -MAS NMRスペクトルをFigure 3 a),b)にそれぞれ示す。各々のスペクトルよりPGIにもPGIIにも少なくとも2つの異なった環境の酸素原子が存在することがわかる。これらが、どのような酸素原子に対応しているかは現在検討中である。また、スペクトルの線形はPGIとPGIIで異なっていることがわかる。詳細な議論は講演で述べる。

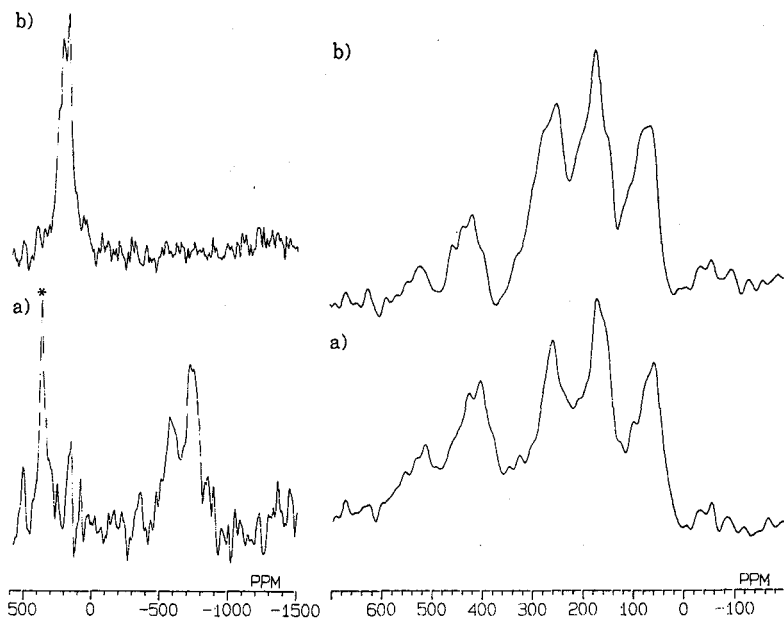


Figure 2 ^{17}O -MAS NMR spectra of glycine in the solid state at a) 36.5 MHz. * comes from an NMR rotor which is made of ZnO_2 . and b) 67.7 MHz. An NMR rotor is made of silicon nitride.

Figure 3 67.7 MHz ^{17}O -MAS NMR spectra of polyglycine in the solid state with a) form I and b) form II. An NMR rotor is made of silicon nitride.

Acknowledgement

67.7MHzのスペクトルは科学技術庁金属材料研究所の日本電子製GSX-500 NMR分光器を使用し測定しました。

References

- 1) Saito, H and Ando, I., *Ann. Repts. NMR Spectroscopy*, vol. 21, 209 (1989)
- 2) Ando, S et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 7648 (1985)
Shoji, A et al., *Macromolecules*, 20, 2441 (1987)
- 3) Kuroki, S et al., *J. Mol. Struct.*, 245, 69 (1991)
Asakawa, N et al., to be submitted.
- 4) Muller, V. D., *Annalen der Physik*, 39, S451 (1982)

試料回転がオーバートーン NMR に及ぼす影響

(北大・理) ○竹腰 清乃理、引地 邦男

Effects of sample spinning on Overtone NMR

K. Takegoshi and Kunio Hikichi (Hokkaido Univ)

Recently, techniques called double rotation (DOR)(1) and dynamic angle spinning (DAS)(2,3) have been proposed to remove orientational dependence associated with second-order quadrupole interactions in the central NMR transition ($1/2 \leftrightarrow -1/2$) of half-odd-integer quadrupole nuclei. In this work, we exploit a possibility of removing another second-order quadrupole broadening from a NMR "overtone" transition ($1 \leftrightarrow -1$) of nuclei with spin=1(4). To appreciate effects of sample spinning on "overtone" spectra, we examine "overtone" lineshapes under spinning.

We consider that the total spin Hamiltonian \underline{H} consists of the Zeeman \underline{H}_Z and the quadrupole \underline{H}_Q as

$$\underline{H} = \underline{H}_Z + \underline{H}_Q, \quad [1]$$

$$\underline{H}_Z = -\nu_L \underline{I}_Z, \quad [2]$$

$$\underline{H}_Q = \sum_{k>0} \sum_{q=-k}^k (-1)^q \nu_Q A_{kq} T_{k-q}. \quad [3]$$

where ν_L is the Larmor frequency and ν_Q is the quadrupole coupling constant $\nu_Q = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)\hbar}$. A_{kq} and T_{kq} are the q -th components of irreducible spherical tensor operators with rank- k representing the geometrical and the spin parts, respectively. For simplicity, we neglect the chemical shielding anisotropy. When the Zeeman term is much large $|\underline{H}_Z| \gg |\underline{H}_Q|$, the second-order quadrupole interaction is given as the secular part of the first-order average Hamiltonian at the Larmor frequency ν_L as (5)

$$\begin{aligned} \underline{H}_Q^{(2)} &= -\nu_Q^2 / \nu_L^{-1} \{ [T_{21}, T_{2-1}] A_{21} A_{2-1} + (1/2) [T_{22}, T_{2-2}] A_{22} A_{2-2} \} \quad [4] \\ &= -\nu_Q^2 \nu_L^{-1} \{ (-\sqrt{2}/10)(2T_{30} - 4T_{10}) \underline{V}_{00} \\ &\quad + (\sqrt{35}/35)(3T_{30} + T_{10}) \underline{V}_{20} + (\sqrt{7}/70)(17T_{30} - 6T_{10}) \underline{V}_{40} \}. \quad [5] \end{aligned}$$

Here, we describe product of $A_{2j} A_{2-j}$ by a linear combination of the tensor \underline{V}_{10} with $0 < j < 4$, using Clebsch-Gordon coefficients. It is these spatial parts (\underline{V}_{20} and \underline{V}_{40}) which are averaged to be zero by either DOS or DAS.

In the DOR experiments, a inner rotor with the sample is rotated in an outer rotor spinning at 54.74° with respect to the static magnetic field, and the angle between the inner and the outer spinning axes is 30.56° . The first rotation at angle 54.74° is to make $\underline{V}_{20}=0$ and the second at angle 30.56° is to make $\underline{V}_{40}=0$. In the DAS experiment, the spinner axis is switched between two axes called DAS complementary angles, such as, $\theta_1=37.38^\circ$ and $\theta_2=79.29^\circ$, and the transverse magnetizations are allowed to evolve for a certain period of time. At these two angles, the signs of \underline{V}_{20} and \underline{V}_{40} are altered, and for any crystallines in a sample, the anisotropic term depending on both the crystallite orientation Ω and the spinning angle θ_i has the following relation

$$\nu(\Omega, \theta_1) = -\nu(\Omega, \theta_2). \quad [6]$$

KEY WORDS : overtone NMR , second-order quadrupole interaction.

たけこし きよのり、ひきち くにお

Therefore, an echo would be formed for a spin isochromat after staying same periods in the two spinning angles, at that point, time-evolution due to the second-order anisotropy is cancelled. These complicated motions of the sample are necessary to remove the second-order quadrupole interaction because it has complicated angular dependence.

The second-order quadrupole interaction also determines line-shape of the NMR "overtone" transition ($1 \leftrightarrow -1$) of nuclei with spin=1, such as ^{14}N . The eigen energies in Hz are calculated upto second-order are given by using Eqs. [1-5] as: (4)

$$\begin{aligned} \nu_{+1} &= -\nu_L + (\nu_Q/\sqrt{6})A_{20} - \nu_Q^2/(2\nu_L)[A_{2-2}A_{22}-A_{2-1}A_{21}], \\ \nu_0 &= -(2\nu_Q/\sqrt{6})A_{20}, \\ \nu_{-1} &= \nu_L + (\nu_Q/\sqrt{6})A_{20} + \nu_Q^2/(2\nu_L)[A_{2-2}A_{22}-A_{2-1}A_{21}]. \end{aligned} \quad [7]$$

The overtone resonance, thus, appears at

$$\begin{aligned} \nu_{1-1} &= \nu_{-1} - \nu_1 \\ &= 2\nu_L + (\nu_Q^2/\nu_L)[A_{2-2}A_{22}-A_{2-1}A_{21}] \\ &= 2\nu_L + (\nu_Q^2/\nu_L)[2V_{00}/\sqrt{5}+V_{20}/\sqrt{14}+3V_{40}/\sqrt{70}]. \end{aligned} \quad [8]$$

At first sight, it appears possible for both DAS and DOR to reduce ν_{1-1} to be $2\nu_L + (\nu_Q^2/\nu_L)2V_{00}/\sqrt{5}$ by averaging V_{20} and V_{40} to be zero. The remaining resonance frequency has no spatial dependence thus realizing high resolution. This is true for DOR, because the averaging of V_{20} and V_{40} is done at the Hamiltonian level. While for DAS, since the spins experience two different spinning orientations in the process of averaging, one should taken into account orientational dependence of transition probability. In the following, we show that transition probabilities for a crystalline rotating at different spinning angles are different, thus, the DAS complementary angles are not complementary any more for overtone NMR.

For a general coil orientation that the coil is oriented by angle θ from the Z axis in the XZ plane, the transition moment M is given as

$$M_{1-1} = \langle \phi_1 | I_X \sin \theta + I_Z \cos \theta | \phi_{-1} \rangle. \quad [9]$$

Here ϕ_i is the i -th eigen function of the total Hamiltonian, and is calculated by the first-order perturbation theory by taking H_Q as a perturbation (4,8):

$$\begin{aligned} |\phi_1\rangle &= |1\rangle + (\nu_Q/\sqrt{2}\nu_L)A_{21}|0\rangle - (\nu_Q/2\nu_L)A_{22}|-1\rangle, \\ |\phi_0\rangle &= |0\rangle + (\nu_Q/\sqrt{2}\nu_L)A_{2-1}|1\rangle + (\nu_Q/\sqrt{2}\nu_L)A_{21}|-1\rangle, \\ |\phi_{-1}\rangle &= |-1\rangle - (\nu_Q/\sqrt{2}\nu_L)A_{2-1}|0\rangle + (\nu_Q/2\nu_L)A_{2-2}|1\rangle, \end{aligned} \quad [10]$$

where $|i\rangle$ is an eigenstate of I_Z . The transition moment is written as (4)

$$M_{1-1} = (\nu_Q/\nu_L)(\cos \theta A_{21}^* + \sin \theta A_{22}), \quad [11]$$

where the asterik * denotes a complex conjugate. The A_{2m} 's can be derived from the tensor components in the principal axis system of the quadrupole moment A_{2k}^P using two Wigner rotation matrixes D as

$$A_{2m} = \sum_l D_{lm}^2(\psi_0 + \omega_{rt}, \theta, 0) \sum_{\mathcal{K}} D_{kl}^2(\alpha, \beta, \gamma) A_{2k}^P, \quad [12]$$

where the first \underline{D} describes a spinning at angle θ with angular velocity ω_r with an initial phase of ψ_0 , and the latter \underline{D} describes the general rotation from the principal axis system to the rotating sample system. Here, we assume that the spinning axis and the coil is parallel. The tensor components in the principal axis system are $A_{20}^P = \sqrt{6}$, $A_{2+1}^P = 0$, and $A_{2+2}^P = \eta$, where η is the asymmetry parameter. In the above calculations, the contributions from the angle γ can be included in $\omega_r \underline{t}$ terms, thus, we define an Euler angle as $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma = 0)$ and $\psi_0 = 0$ without losing generality. To show the angular and the time dependences of M_{1-1} (Eqs.[11,12]) and ν_{1-1} (Eqs.[7,12]) explicitly, we shall express them as $M(\Omega; \underline{t})$ and $\nu(\Omega; \underline{t})$, respectively, with $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$, and tentatively neglect $2\nu_L$.

To include effects of the time-dependent transition probability, we assume that at a certain time \underline{t} during a detection period an overtone transition occurs at a frequency $\nu(\Omega; \underline{t})$ with a probability $M(\Omega; \underline{t})$. When a maximum breadth of the overtone frequency $\nu(\Omega; \underline{t})$ for one rotation is smaller than the spinning frequency, the overtone frequency can be averaged over one cycle for a given crystalline with Ω , and it may be written as:

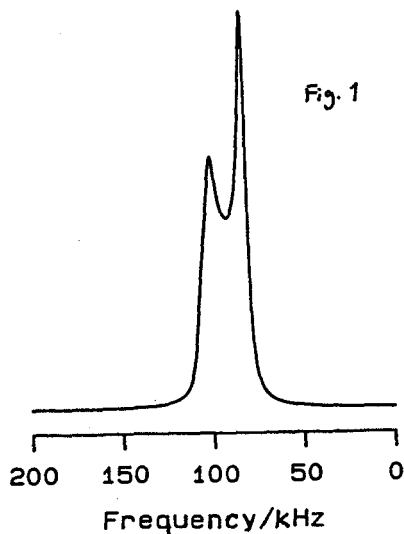
$$\nu(\Omega; \underline{t}) = \int_0^{2\pi/\omega_r} |M(\Omega; t)| \nu(\Omega; \underline{t}) dt / \int_0^{2\pi/\omega_r} |M(\Omega; t)| dt. \quad [13]$$

It is clear that for the DAS complementary angles, Eq.[6] does not hold. The total powder lineshape function $\underline{S}(\nu)$ is calculated as

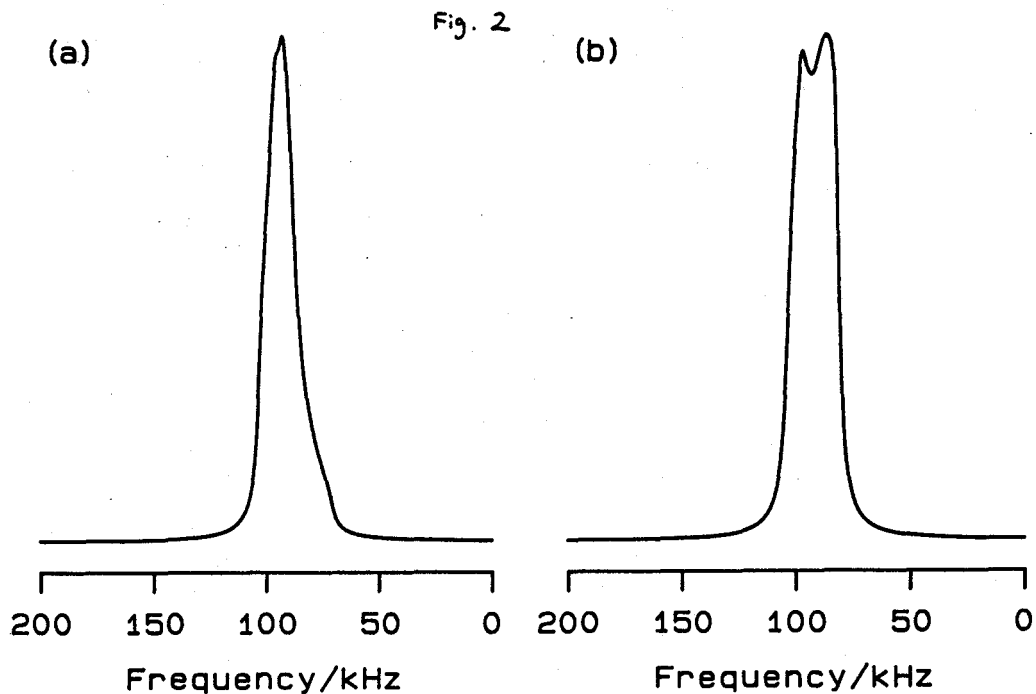
$$\underline{S}(\nu) = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \sin \beta |M(\Omega_0; \underline{t}=0)| f(\nu - \nu(\Omega; \underline{t})) d\alpha d\beta d\gamma. [14]$$

Here, the $|M(\Omega_0; \underline{t}=0)|$ is included to evaluate an initial transverse magnetization excited by a certain method at $\underline{t}=0$ for a crystalline with $\Omega_0 = (\alpha, \beta, \gamma)$ and an initial rotational phase of ψ_0 . The integral over γ is only applicable to this term. $f(\nu - x)$ is the Lorentian lineshape. In actual calculations, the integrals are replaced with discrete sums, and the angles were calculated for each 2° of α , γ , and $\omega_r \underline{t}$ from 0 to 360° , and each 2° of β from 0 to 180° . The half-width of the Lorentian lineshape was 2kHz.

Figure 1 shows a calculated spectrum using Eqs.[13,14] with $\nu_L = 18.061\text{MHz}$, $\nu_Q = 0.79475\text{MHz}$, $\eta = 0.31$, and spinning at 90° . Chemical shift anisotropy is not included. These values were chosen to represent the experimental spectra in Ref.(4) of *N*-acetyl-DL-valine. A characteristic splitting found for the experimental spectrum(4) is realized. Chemical shift effects are not included. Nevertheless, calculations based on Eqs.[13,14] should be useful for investigating effects on rotation on overtone NMR spectra, especially, the DAS experiment in mind.



Figures 2a and 2b show that calculated overtone spectra spinning at the two DAS complementary angles, namely, 37.38° (Fig. 2a) and of 79.29° (Fig. 2b) using Eq.[13] directly. Clearly, the DAS complementary angles are complementary only approximately, and it is concluded that the DAS method can not perfectly remove effects of the anisotropic second-order quadrupole interaction from overtone spectra. Thus, the DOR approach should be the one to choose in such a purpose.



References

- (1) A. Samoson, E. Lippmaa, and A. Pines, *Mol. Phys.* 65, 1013 (1988).
- (2) A. Llor and J. Virlet, *Chem. Phys. Lett.* 152, 248 (1988).
- (3) K.T. Mueller, B.Q. Sun, G.C. Chingas, J.W. Zwanziger, T. Terao, and A. Pines, *J. Magn. Reson.* 86, 470 (1990).
- (4) R. Tycho and S.J. Opella, *J. Chem. Phys.* 86, 1761 (1987).
- (5) A. Samoson and E. Lippmaa, *J. Magn. Reson.* 84, 410 (1989).

Numerical Simulation of Multipulse Solid NMR under Sample Spinning Conditions

*Toshimichi Fujiwara and Kuniaki Nagayama

Biometrology Lab, JEOL Ltd. Akishima, Tokyo 196, Japan

A computer program for simulating one-, two- and three-dimensional NMR in heteronuclear multi-spin systems is presented. Time-domain NMR signals are simulated by density matrix calculation based on numerical integration of time dependent hamiltonians representing RF field, chemical shielding, dipole and quadrupole interactions. Simulation of a powder sample necessitates summing spectra for a number of samples different in orientation, and continuously changing interactions by sample rotation require dividing a rotation period into a number of divisions expressed by different propagators, which make the calculation time-consuming. We reduced the computational time by using periodicity of the sample rotation, parallel processing and a sparse matrix technique. Some illustrative examples for CPMAS are shown.

固体NMRにおいては、試料回転と同期させて特別な多重パルスを照射する事によって、マイクロ秒の時間スケールで化学シフトや双極子相互作用を制御することが可能である。しかし固体NMRでは、試料は静磁場に対し異方的な相互作用を持った多数のスピンからなる粉末を回転させて相互作用に時間依存性を持たせたものであり、また、実験では強いRFパワーの速い制御を要しアーティファクトを生じやすいなどのことから、パルスに対する試料のNMR応答は複雑になる。固体用多重パルスを設計する際には、そのため、低次の近似で作ったパルスがより複雑で装置上の不完全性も含まれるような系で働くかどうかを調べることは解析的方法ではむずかしく、数値シミュレーションが有効な手段である。また、スペクトル解析、つまりスペクトルから双極子結合や化学シフト異方性を決定する際にもシミュレーションは不可欠な道具である。このシミュレーションを行う上で問題なのは、粉末試料の再現のためには静磁場に対する配向の異なる数万の試料についてのシミュレーション・スペクトルを計算して加え合わせる必要があり、さらに試料回転の数値的再現のためには1回転を100以上の区間に分割してスピンの時間展開を表すプロパゲータを求める必要があるために、計算に要する時間が長くなることである。

計算時間の短縮のための工夫をして今回新しく作成したシミュレーション・プログラムは、3つのオイラー角による粉末試料や配向試料の生成と3次元までのNMRシミュレーションが可能であり、通常のNMRと同様FIDを通じてスペクトルシミュレーションを行うものである。このプログラムと、それによる固体用パルス

NMRシミュレーション、多重パルス、試料回転、プロパゲータ、密度行列。

ふじわら としみち、 ながやま くにあき。

系列のシミュレーションについて報告を行う。

アルゴリズムと機能

アルゴリズムは、ハミルトニアンからプロパゲータへの変換、プロパゲータ間の乗算、プロパゲータから各時刻における磁化の算出を中心にして、これらを時間変化のためのループ、位相サイクルのループ、粉末に相当する試料分布を作るループで繰り返すように成っている。

機能としては次のようなものがある。

- (1) スピン系：取り扱えるのは $I = 1/2$ 、1 のスピンの ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{14}N 、 ^{29}Si などである。扱える相互作用は、化学シフト異方性と等方性、ラジオ波との相互作用、同種あるいは異種核の J と双極子相互作用、四重極相互作用である。熱運動による緩和は考慮していない。溶液 NMR でいえば H O H A H A は扱えるが N O E は扱えない。
- (2) 時間変数：独立な変数は 3 つで 3 次元 NMR までシミュレートできる。
- (3) パルス系列：RF はパルス巾、振幅、位相、周波数で決める矩形波の系列として表す。ループを使うこともできる。各核種に 1 チャンネル割り当てられる。
- (4) 位相サイクル：RF 位相を変えたスペクトルを積算できる。
- (5) 試料回転：回転を計算で近似する精度や回転軸の傾き角を指定できる。

効率的な計算のための工夫

先に述べたようにこのシミュレーションには膨大な計算量を要する。このことに対し以下に述べるような方法で計算量と計算時間の短縮を計った。

- (1) 試料回転によるハミルトニアンの時間変化の周期性の利用。時間変数を (回転周期) / (整数) だけ変化させる場合には、同じプロパゲータを何回も使えるので、時間変数を更新するごとにプロパゲータをハミルトニアンから計算し直す必要はない。
- (2) 複数のコンピュータあるいはプロセッサの利用。異なる配向のスピンの系についての計算はほとんど相関なく行える。このことを使って、それら計算を全く独立に並行して行うことができる。現在使っているコンピュータ、タイタン 3000 では 3 つの CPU で並列した計算を行っている。
- (3) 疎行列の利用。多スピン系の核スピン演算子を表す行列の要素はほとんどがゼロなので行列間の乗算を行う時にはゼロの行列要素との演算は除くことができ、その分メモリーも節約できる。
- (4) 零次の平均ハミルトニアンの利用。時間について相加平均を行ったハミルトニアンからプロパゲータを求めることで、試料の 1 回転の分割数を減らすことができる。
- (5) RF 位相のみ変えたプロパゲータを求める時には、以前に求めたプロパゲータから新しいプロパゲータを効率的に求める。
- (6) 粉末パターンを作る際、配向の異なる試料にかける立体角の重みを各配向に対する試料数に直し、スペクトルに寄与の少ない配向の試料の数を減らす。
- (7) 粉末を作るための試料数や 1 回転の分割数の適切な選択。これらの数は系やスピニングの条件によって大きく異なるので結果に影響を与えずに計算時間を短くできるように選ぶ。

静磁場をかけたNQR法によるVTMASの温度校正

(日本電子) ○田中良二, 杉沢寿志, 出口健三, 藤戸輝昭

Temperature calibration using ^{35}Cl NQR under magnetic field for VT MAS NMR(JEOL Ltd) Ryoji Tanaka, Hisashi Sugisawa, Kenzo Deguchi,
Teruaki Fujito

We proposed the technique of temperature calibration using ^{35}Cl NQR in KClO_3 for variable temperature NMR. However the sample spinning induces broadening of the NQR spectra for powder sample due to Berry's phase effect which gives fictitious field. In the case of Variable Temperature Magic-Angle-Spinning (VT MAS) NMR, the technique loses its high sensitivity and accuracy by this line broadening.

We apply magnetic field along spinning axis and cancel a fictitious magnetic field arising from the sample spinning. We obtain NQR spectra with spinning under magnetic field as narrow as that without spinning under zero field.

1. はじめに

NMRの温度可変測定では、試料管に吹きつける気体の温度を測定し、温度コントローラの表示温度としている。この表示温度は、種々の原因により実際の試料温度とは異なるので、表示温度から試料温度を求める校正曲線が必要になる。校正曲線を得るために試料温度をはかる方法として、従来は化学シフトの温度依存性などが利用されてきた。

前回、我々は KClO_3 の ^{35}Cl -NQR共鳴周波数の温度依存性を利用する方法を提案した(1)。この方法は、化学シフトの温度依存性を利用した方法に比べて、共鳴周波数の温度変化量が大きいので、高い精度で温度を決定することができる。また、同一の方法で連続的に広い温度範囲を測定できる、感度が高いなどの特徴を持っている。今回は零磁場下で KClO_3 の ^{35}Cl -NQRスペクトルを測定し、そのピーク周波数から温度を計算するという手順で測定をおこなっていた。しかし、零磁場下の測定では試料を回転したとき Berry's phaseの効果により共鳴線の幅が広がるという欠点があり、試料を高速回転させるVTMASの温度校正に応用する上で大きな制約になっていた。図1に回転数を変えて測定した KClO_3 の ^{35}Cl -NQRスペクトルを示す。回転が高速になるほど線幅が広がり、ピーク強度が低下する。この Berry's phaseの効果は回転軸に沿って、回転数に比例した静磁場をかけることで打ち消せることが単結晶の NaClO_3 について報告されている(2)。

今回、我々は温度校正に利用している KClO_3 の粉末試料についても同様に静磁場をかけることで線幅の広がりを打ち消せることを実験的に確認した。この方法を使うことによって高速回転時でも静止状態と同程度の精度と感度を得ることができた。

温度測定, NQR, ^{35}Cl , Berry's Phase

たなか りょうじ, すぎさわ ひさし, でぐち けんぞう, ふじと てるあき

2. 実験と結果

測定には JEOL JNM-ESH270 固体高分解能 NMR 装置を使用した。KC103 は市販の試薬をそのまま用いた。測定の方法を図 2 に示す。測定手順は以下の通りである。

- (a) プローブはマグネットから離れた、外部磁場の十分小さいところに置く。
- (b) 回転軸方向に磁場をかけるためのコイルをかぶせ、回転数に合わせた静磁場をかける。
- (c) 通常の NMR 測定と同じように NQR スペクトルを測定する。

共鳴周波数は室温で約 28.1 MHz で、測定には、シングルパルスを用いた。

図 3 に回転数 5 kHz の時のスペクトルを示す。上は零磁場のスペクトルで、下は回転軸の方向に 12 gauss の静磁場をかけた時のスペクトルである。静磁場をかけたスペクトルの線幅は、零磁場下の静止状態のスペクトルの線幅と誤差の範囲で一致した。スペクトルの線幅が最も狭くなる磁場は計算値と一致した。

NQR 法での温度較正值と融点や化学シフトを利用した他の方法での較正值との比較もおこなう。

参考文献

- (1) 第 29 回 NMR 討論会予稿集, 1990, 京都 p. 193
- (2) R. Tycko, Phys. Rev. Lett. 58, 2281 (1987)

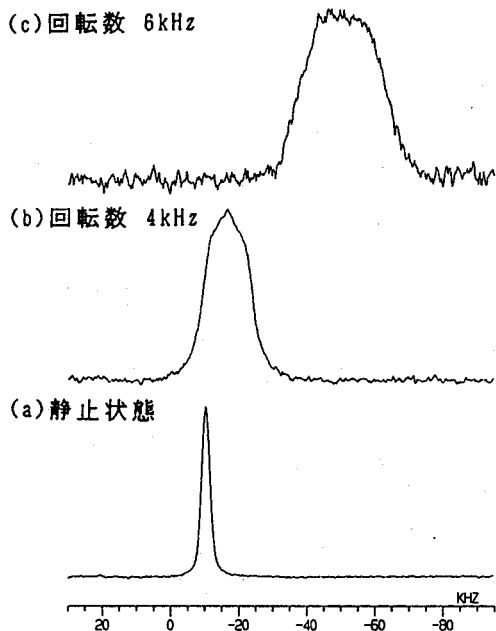


図 1 零磁場下の KC103 の ^{35}Cl -NQR スペクトル

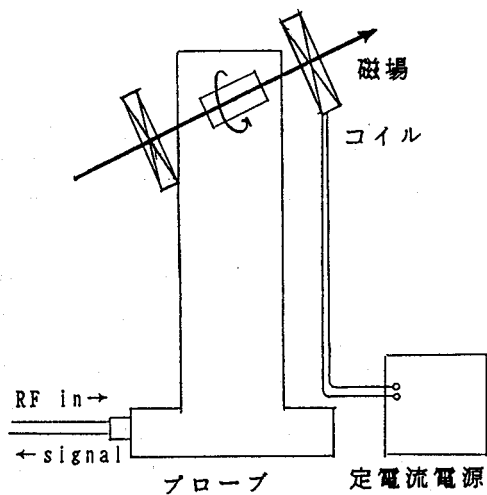
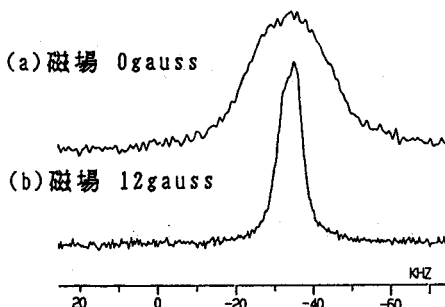


図 2 測定のブロック図

図 3 回転している KC103 の ^{35}Cl -NQR スペクトル (回転数 5 kHz)



P62

新機構の温度可変MASプローブ及びその温度校正

大塚電子(株)MR技術部 ○大川内 真 仲村高志 三浦 巖

A Novel VTMAS Probe for Solid State NMR and Its Temperature Calibration

Otsuka Electronics Co., Ltd. MR Technical Group

Makoto Okawauchi Takashi Nakamura and Iwao Miura

Temperature-variation measurements are important in solid state NMR applications. Stable spinning for a wide temperature range is crucial in such experiments. In conventional MAS probes the sample temperature was varied by varying the MAS drive and bearing atmosphere. Unstable spinning resulted in the conventional method due to the expansion of the bearing parts, etc., especially at high temperature. We have developed a novel VTMAS probe with separate gas systems for the bearing/driving system and the VT chamber. By the use of this VTMAS probe measurements of solid state NMR spectra from -150°C to 250°C were accomplished with very stable MAS speeds. The temperature change due to the change in the rotor speed was monitored by means of a phosphor optical fiber thermometer and NQR spectrum. The use of the phosphor optical fiber thermometer as an ideal means of measuring the actual sample temperature is proposed.

【序論】

固体高分解能NMRにとって温度可変実験は重要な手法である。できるだけ広い範囲にわたり温度を可変でき、しかも各温度において安定なスピニングが要求される。従来のMASプローブは、MASのドライブ及びベアリング用の気体の温度自体を可変する事により、試料に対する温度可変をおこなってきた。しかしながら、この方法では、特に高温において、ベアリング部等が熱膨張し、スピニングの不良をおこす可能性があった。

今回、我々は、MASを行うためのドライブおよびベアリング用の気体とは異なる別系統の温度可変専用の気体を用いて温度可変を行うVTMASプローブを固体高分解能NMRの実験に使用した。このような機構により、ドライブ及びベアリング用の気体は、室温のまま、試料部の温度のみの可変が可能になり、温度の変化がスピニングの安定性を阻害することが激減した。さらに、広い温度範囲にわたる($-150\sim 250^{\circ}\text{C}$)MASによる固体高分解能の実験が可能になった。

温度可変専用の気体を高速回転しているサンプル管に吹き付けて温度可変実験を行う場合、吹き付ける気体の温度を白金抵抗体を用いて測定し、試料の温度を制御しているが、この温度は、実際の試料や試料管の近傍の温度とは異なることが知られている。特に、サンプル管が高速回転している場合には、回転に伴う摩擦熱による温度の上昇が考えられ、サンプル管のごく近傍あるいは理想的には、直接サンプル管中のサンプルの温度を直接測定しその温度で、可変温度を制御することが望ましい。しかしながら、金属製温度センサーは、プローブのコイル近傍に設置する事は不可能であり、その他のNMRによる温度感応物質を用いた温度測定は、試料と同時に測定するのが困難である場合や、その測定温度範囲が狭い等の問題がある。

Solid State NMR, VT, CP/MAS, CRAMPS, NQR, BR-24

おおかわうち まこと なかむら たかし みうら いわお

そこで、我々は、蛍光寿命を測定することにより温度を算出する、蛍光光ファイバー式温度計を用いて、サンプル管のごく近傍の温度を測定した。この温度計のセンサー部は、非金属であり、RFコイル中にも設置することが可能であり、また、蛍光物質と光ファイバーを空間的に離れた非接触温度測定も可能となす、測定可能温度は $-190\sim 300^{\circ}\text{C}$ と広く、温度較正点における温度精度は $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ である。この温度計を用いたサンプル管中のサンプルから直接温度を測定する方法についても考察する。

【実験】

固体高分解能NMR測定は、Chemagnetics社製CMX-300を用いた。測定に使用したプローブは、Chemagnetics社製COAXプローブ、ローター部はChemagnetics社製PENCIL ROTOR (図1)を使用した。このローターは、3箇所のエアベアリング部、1ヶ所のドライブ部を有し、これらに供給された気体は、VTチャンバー外に排気される。試料管は、外径7.5mm、長さ40mmのジルコニア製である。試料管の回転スピードは、試料管上部のマーカースによりモニターし、設定回転数を保つようにドライブ側の気体の流量を電磁弁により自動的に調整する。これにより試料管の回転数を設定回転数の $\pm 1\text{Hz}$ 以内に保つことができる。温度可変用の気体は、図2に示すようにマグネット上部から電熱線と温度測定用白金抵抗体を有したVTスタック中を通してVTチャンバー内の試料管に吹き付けられる。

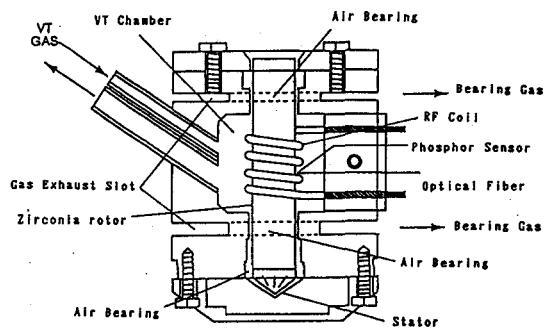


Fig. 1

蛍光光ファイバー式温度計は、LUXTRON社製 (アステック株式会社) モデル755フロロブチック光ファイバー式温度計を用いた。蛍光物質封入型光ファイバー温度プローブは、MIW Fluoptic プローブ (直径約1mm) を用いた。測定温度範囲は $-150^{\circ}\text{C}\sim 300^{\circ}\text{C}$ 、精度は、較正点において $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ である。

^{13}C -CP/MAS測定を行ったcaffeine、 ^1H -CRAMPS測定を行ったp-Methoxybenzoic Acid、 ^{99}Tc -NQR測定に用いた KClO_3 はそれぞれ和光純薬工業 (株) から購入した。 KClO_3 は、蒸留水中から4回再結晶させたものを用いた。

【結果と考察】

図3に、 25°C および 260°C において測定した、無水カフェインの ^{13}C のスペクトルを示す。室温において試料管にカフェインを充填した後、まず 25°C でCP/MASで測定し、そのまま 260°C まで昇温し、DD/MASで測定した。カフェインの融点は 238°C であるので、 260°C では完全に融解し、DD/MASで測定可能となる。このときの試料管の回転スピードは、 25°C および 260°C の両温度において、 $5000\text{Hz} \pm 1\text{Hz}$ に保たれた。この様に、今回用いたローター部の構造は、高温 260°C でも測定が可能で、かつ高温においても安定したスピニングが可能であることが判る。

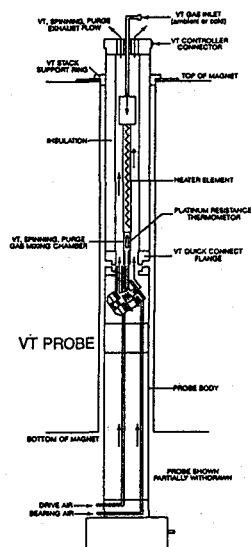


Fig. 2

図4は、室温において試料管に充填した p-Methoxybenzoic Acidをそのまま、 -156°C から 195°C まで温度変化させながら測定した ^1H -CRAMPSの結果である。CRAMPS測定のパルスシーケンスは、BR-24を使用し、 90° 度パルス幅は $1.3\mu\text{s}$ 、サイクル時間は $3\mu\text{s}$ 、積算回数4回である。CRAMPS測定のため、試料管の回転スピードは $2000 \pm 1\text{Hz}$ と比較的低速であるが、低温から比較的高温まで安定した回転スピードとデータが得られた。

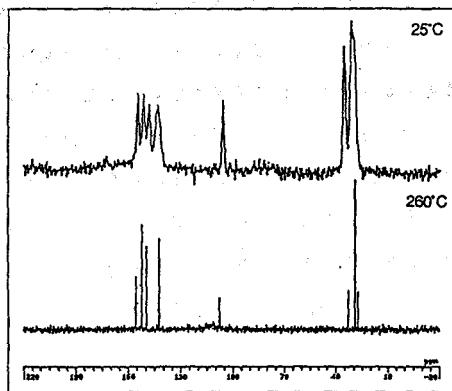


Fig. 3

以上のように、今回用いたローターの機構により、広い温度範囲にわたって、安定した測定とスピニングが可能であることが判ったが、高速回転している試料管中の温度、または、試料管のごく近傍の温度は、当然ながらローター内のVTチャンバーに供給されたVT用の気体の温度と異なる可能性がある。そこで、試料管内の実際の温度を ^{85}C 1-NQRを用いて、試料管の近傍の温度を蛍光ファイバー式温度計を用いて測定した。MASプローブを 0.5G 、 25°C の環境下に置き、試料管内部に KClO_3 を充填し回転スピードを変化させながら

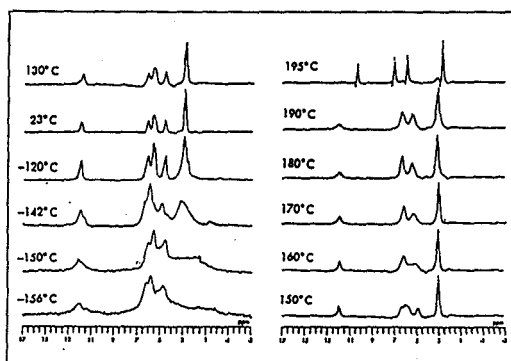


Fig. 4

^{85}C 1-NQRスペクトルを測定すると同時に、図1に示したように回転している試料管のごく近傍であるRFコイル上に、蛍光物質を先端に封入した石英光ファイバーを固定し、回転に伴う温度変化を測定した。 ^{85}C 1-NQRスペクトルから得られた回転にともなう温度変化と蛍光ファイバー温度計より得られた温度変化は、 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以内で一致した。図5にその結果を示す。VT用の気体を供給しない状態

(0 l/h)、すなわちVTチャンバー内の気体が入れ替わらない状態では、 7kHz での回転スピードで、回転していないときに比べ、約 17°C 温度が上昇していることがわかる。 25°C のVT用の気体を 2832 l/h (100SCFH)で供給すると回転に伴う温度上昇は、 7kHz で、 4°C におさえられた。

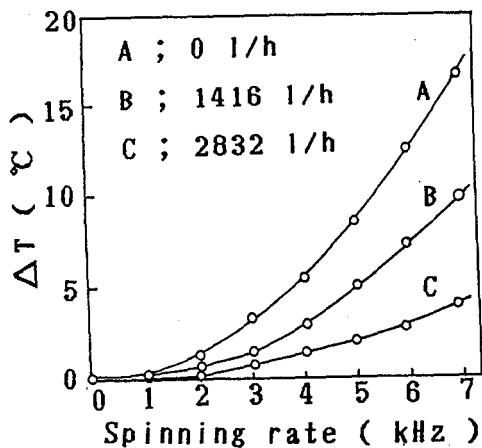


Fig. 5

理想的には、試料管中の試料の温度を直接測定することができれば、その温度を用いてVT用気体の温度を制御し、試料の温度を設定温度に、より近づけるこ

とができる。特に我々が今回使用したローターシステムは、蛍光光ファイバー温度センサーを用いた試料の温度を直接測定することが充分可能な設計になっている。我々は、蛍光光ファイバー式温度計及びその温度センサーを用いて、図6に示すような方法により、高速回転し、高静磁場中でありしかもRF磁場にさらされている試料管中の試料から直接温度を測定する方法も考慮中であるので、この方法についても議論する。

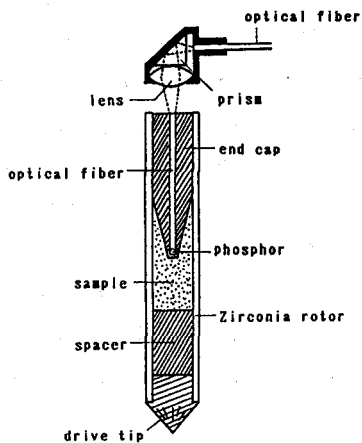


Fig. 6

P63

固体 N M R 機能を溶液用 N M R に付加するときの問題点

アップジョンファーマシューティカals リミテッド 筑波総合研究所 開発化学部

○ 小形 稔, 青木 優規美, Paul E. Fagerness, 檜山 行雄

Construction of Solid NMR Functions on Liquid NMR Spectrometer - Issues and Solutions

Control Research and Development, Tsukuba Research Laboratories,

Upjohn Pharmaceuticals Limited

Minoru Ogata, Yukimi Aoki, Paul E. Fagerness, Yukio Hiyama

Solid NMR functions were constructed on liquid NMR machine using solid NMR attachments purchased from third vendors. There were some issues in order to construct solid NMR functions. Those were 1) how to change solid NMR and liquid NMR easily, 2) how to distinguish input and output pulses in a line, and 3) how to reduce noise in output pulse. Those issues were resolved by introducing a new connector between RF amplifier and receiver mixer, a $\lambda/4$ cable and tuned diodes, and a band pass filter before mixing unit, respectively. These results showed that solid NMR functions could be achieved economically.

固体 N M R から得られる情報は、時として非常に有益であるが、大部分の溶液用 N M R の場合とは異なり、実験をすれば必ず成果が得られるというものでもない。このような状況が固体専用装置への投資をためらわせている。そこで、サードベンダーの供給する固体 N M R 用アタッチメントを用い、固体機能を比較的少額で導入することを試みた。

用いた機器は以下のものである。

溶液用 N M R: Bruker AM-300

固体用アタッチメント: 固体用 Probe (Doty Scientific Inc.)

ENI Model 3100LA RF Power Amplifier

MITEQ Preamplifier

Band Pass Filter (多摩川電子, コスモ電子)

130MHz Low Pass Filter (CIR-Q-TEL Microwave Inc.)

Attenuator (KAY)

キーワード: 固体 N M R, 改造

おがたみのる, あおきゆきみ, ポール・イー・ファガーネス, ひやまゆきお

固体NMR機能を溶液用NMRに付加する場合、固体用パルスを出力するのに十分な能力を持つアンプが必要となる。日本国内では、そのような条件を満たすアンプを入手することが困難だったので、米国ENI社製のアンプを用いることにした。また、固体用プローブは米国Doty Scientific社のものを借用した。

これらの装置を使用して、固体機能を構築しようとした場合、次にあげるような問題があった。

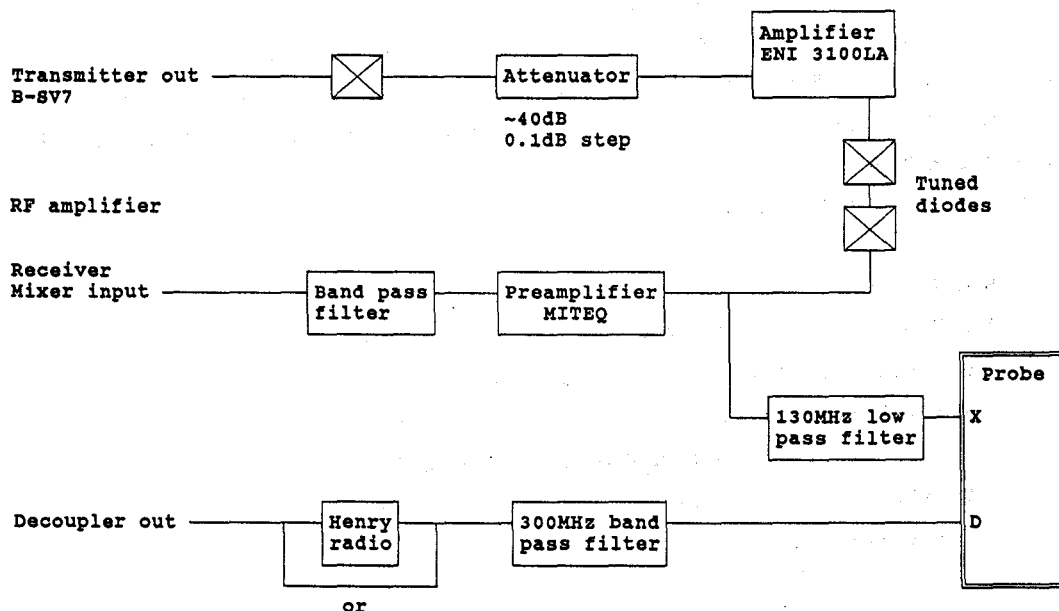
1. 固体測定と溶液測定とを簡単に切り換える方法
2. 入力パルスと出力パルスを分岐させる方法
3. 出力パルス中に含まれるノイズを低減させる方法

固体測定と溶液測定とを簡単に切り換える方法は、固体測定用アンプの装脱着をどのように簡便にするかにつきる。そこで、RFアンプからミキシングユニットへの回路の一部を切断し、固体測定用アンプからの出力を接続できるように改造した。

入力パルスと出力パルスを分岐させるために、入力アンプの後にtuned diodesを入れ、ミキシングユニットへの分岐点に入/4のケーブルを用いた。

また、ノイズを低減させるために、ミキシングユニットへ出力する前にバンドパスフィルターを挿入した。

これらの自作したシステムで固体機能を付加したときのみにおこる溶液測定上の問題は特に認められず、このようにして、サードベンダーの供給する固体NMR用アタッチメントを用いて、固体機能を構築することができた。



P64

G X - 2 7 0 スペクトロメーターの改良

(北大・理) ○竹藤 清乃理、引地 邦男

(日本電子) 藤戸 輝昭、樋口 啓一郎

Modification of GX-270 spectrometer

K. Takegoshi, K. Hikichi, T. Fujito*, and K. Higuchi*

(Hokkaido Univ, JEOL Ltd. *)

To achieve more flexible operation and wider band-width, a pulse programmer and a fast degitizer were introduced to a commercial NMR spectrometer. This allows us to further introduce other peripheral instruments e.g. a four-phase adjuster easily. A few illustrative spectra realized by these modifications are given.

我々のスペクトロメーターは、元来溶液仕様のものに高出力アンプとdeplexerを付け加えたものであり、例えば重水素の固体NMRのように広い観測幅が必要なものは出来なかった。また、通常の溶液NMRを観測するさいには問題にならないような点も、例えば多重パルス法のようにパルスの位相や強度が正確に調整されなければならない手法においては大きな問題となる。そこで、まずの図1に示すような改良を行った。点線でかこんだ部分が、今回、追加または作製されたところである。また*は、多少の改良をおこなった部分である。追加した装置を以下にまとめる。

P P G : パルス発生機 : Univ. of British Columbia, Prof. M. Bloom
よりライセンスと回路図を購入して作製。
(64ゲート、50ns分解能)

A / D : A / D変換機 : オートニクス社製 APC-510
(20MHz、10bit)

P C 1 : パソコン : NEC PC-9801

P C 2 : パソコン : エプソン PC-286VF

4φ : 位相微調整器 : JEOL社製

P. A M P : パワーアンプ : サムウェイ社製 PA40-2801
(10W、100k-350MHz)

これら以外のものは自作した。PPGはPC1により、A/DはPC2により制御される。また、human readableなパルスプログラムをPPG readableなコードに変換するcompileプログラムを作った。積算位相(acq. phase)はPC1よりPC2に自作のインターフェース(8255A)を通じて送られる。フーリエ変換等の処理はPC2で行っている。このような改良により、重水素の固体NMR(図2)や、多重パルス法に必要なパルスの位相や強度の調整(図3)が可能になった

KEY WORDS : Modification, NMR.

たけこし きよのり、ひまちくにお、ふし"とてろあま、ひく"さ 17(1)1
ち3う

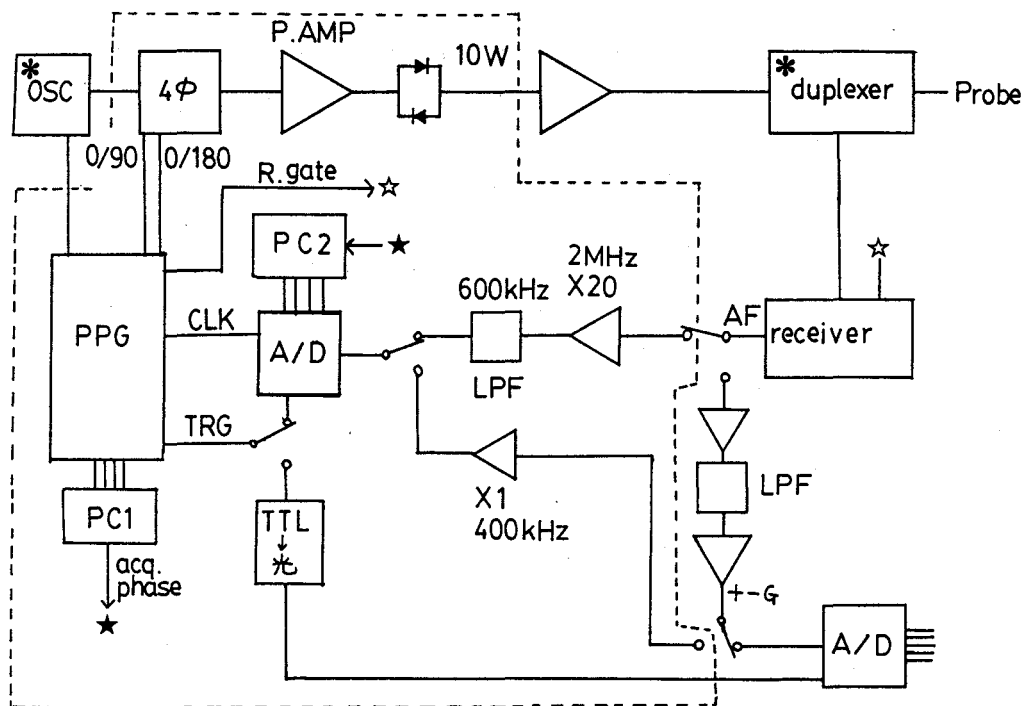


Fig. 1 Block diagram of our modified GX-270

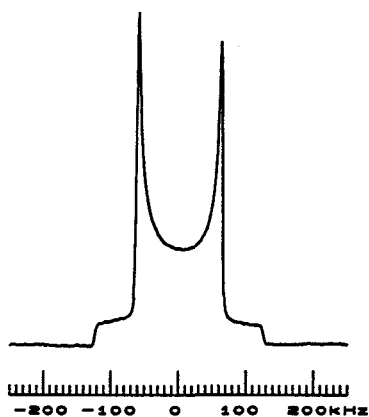


Fig. 2 Deuterium NMR spectrum of polystyrene-d₃ at room temperature. Main-chain protons are deuterated.

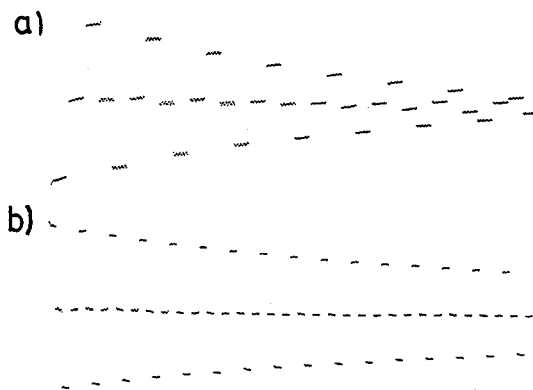


Fig. 3 Fine adjustments of (a) the 90° pulse intensity by the -x-x-x-x- sequence and (b) the relative phase between x and -x by the x-(-x)-x-(-x)- sequence.

Acknowledgment: This work was supported by Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan (02554014), and partly from Iketani Foundation of Promotion of Science and Technology.

P65

^1H 核による生体内 ^{13}C -標識化合物の間接的計測

○ 犬伏俊郎^{1, 2}、森川茂広¹、木戸千絵²

(¹滋賀医大 分子神経、²横河メディカルシステム)

Indirect detection of ^{13}C -enriched biological materials in living tissues utilizing the attached ^1H nucleus

Toshiro Inubushi^{1, 2}, Sigehiro Morikawa¹ and Chie Kido²

(¹Molec. Neurobiol. Res. Centr., Shiga Univ. of Med. Sci., ²Yokogawa Medical System)

Proton-detected measurement of ^{13}C -enriched compound in living tissues was developed by heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) technique. Taking advantage of imaging NMR system, gradient selection pulses rather than rf phase cycling were employed to achieve multiple quantum coherence. Unwanted water signal as well as the protons attached to non-enriched carbon were dephased with the selection gradients and the ^1H signals coupled with ^{13}C were selectively detected by this method. Extension to ^1H - ^{13}C chemical shift correlation 2D NMR was easily obtained for signal assignment. Chemical shift imaging was also incorporated into this method. Imaging of ^{13}C in particular metabolite may be feasible by this approach.

【緒言】 NMRにおける ^{13}C トレーサー法は広範な有機代謝産物を網羅し、またその同位体の天然存在比が低いために、選択的に標識物質の時間的、並びに化学的消長を追跡できることから、生理、病理学の分野でも様々な応用が展開されている。その反面、 ^{13}C 核のNMR感度が極めて低いことから、標識化合物の大量投与や、長時間の測定を余儀なくされ、動物を利用した生理学的実験や、医療、臨床方面への普及の妨げになっている。ここでは、生体内での ^{13}C 標識化合物を効率良く検出するために磁場選択を用いた ^1H 検出-多量子(MQ)相関スペクトロスコピー法を低磁場NMR機に導入し、生体NMRへの応用の検討を行った。

【方法】 測定にはS-150自己遮蔽傾斜磁場コイルを附備したGE社製2T CSI装置を用い、 ^{13}C 核のrfは広域デカップラーを利用した。信号検出には

^{13}C -標識化合物、磁場選択-HMQC、 ^1H -検出、 ^{13}C -CSI

いぬぶしとしろ もりかわしげひろ きどちえ

犬伏俊郎、森川茂広、木戸千絵

^{13}C - ^1H 二重同調の表面コイルあるいは体積コイルを用いた。パルス系列には Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) 法に MQ を得るための傾斜磁場パルスを組み込んだものを用いた。 $^{1-3}$ 傾斜磁場パルスには 1 - 2 ms の幅で最大 1.4 G/cm まで負荷し、パルスの比率は 2:2:-1 とした。

【結果と考察】 図 1 には表面コイルにて軽水中 ca. 50mM の 1- ^{13}C -glucose を通常の single pulse と上記 MQ により測定した ^1H NMR スペクトル (85 MHz) を示した。通常の方法では、大きな水の溶媒信号に隠れて検出できないものの、本図では 1 - ^{13}C に直結する ^1H 信号が選択的に測定でき水の信号も効率よく抑制されている。また、動物実験機の低磁場、かつ、不均一磁場によるために、スペクトルの分解能が悪いが、二種類の ^1H 信号の分離も確認できる。さらに、 ^{13}C - ^1H 化学シフト相関 NMR で展開すると、それぞれの ^1H 化学シフトに対応した位置に相関信号が現れその ^{13}C 核の帰属が容易にできる。さらに ^{13}C 標識化合物の生体内分布を画像化するために、本 HMQC 法に空間位置情報をもたらす位相エンコード磁場パルスを組み込み、いわゆる化学シフト画像 (CSI) を試みた。本稿では一例として、軽水中の sodium 2- ^{13}C -acetate の一次元 CSI の各スライスのスペクトルを図 2 に示した。ファントムの位置からのみ標識化合物の信号が検出され、水信号の抑制、 ^{13}C 核に直結した ^1H 核の選択的検出、及び位置情報の抽出が達成されている。従って、この方法により生体中の ^{13}C 標識化合物の検出が ^1H 核の感度で行え、その生体中での局所化、或いは、画像化も可能なものと考えられる。

- 【文献】 1. A. Knuettel, et al., J. Magn. Reson., 86, 526(1990).
 2. S. Swanson, et al., ENC Abstract, p. 197(1990). 3. R. Hurd and B. John, J. Magn. Reson., 91, 648(1991).

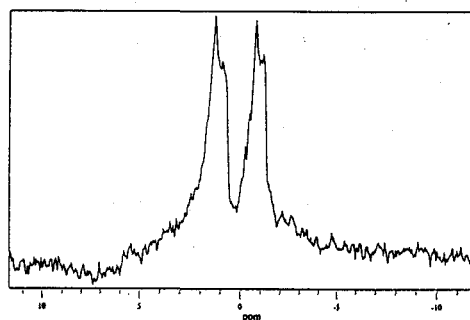


Fig. 1 ^1H - ^1H NMR spectrum of 1- ^{13}C -Glucose in H_2O by HMQC.

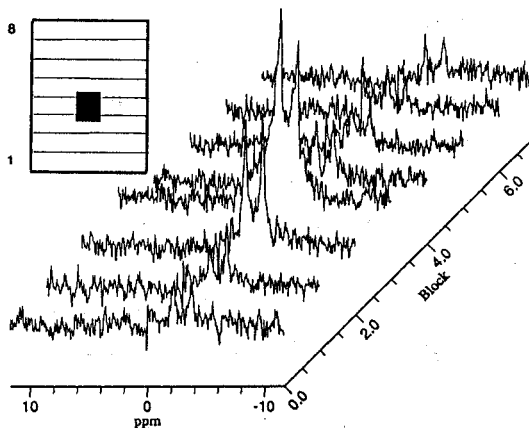


Fig. 2 1D-Chemical shift imaging of the phantom containing 2- ^{13}C -acetate in H_2O by ^1H -1 detected-HMQC.

選択的スピンの励起法によるマスト細胞の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定

(京都府立医大・生理、医動物) ○吉崎和男、有園直樹

$^1\text{H-NMR}$ Spectra of Rat Mast Cells Obtained by Selective Spin-Excitation Technique.

Kazuo Yoshizaki, and Naoki Arizono* (Dept. Physiol. and Dept. Med. Zool., Kyoto Pref. Univ. Med., Kyoto 602, Japan)

$^1\text{H-NMR}$ spectroscopy was applied on intact mast cells isolated from rats. The resonance lines of the aromatic histamine protons in mast cells, detected by the selective spin-excitation technique, were broader and located in lower magnetic field than those in free histamine solution. When exocytosis of mast-cell granules was induced by compound 48/80, free histamine appeared, with a corresponding decrease in amount of histamine in the mast cells; the lactate signal was also detected in the spectrum. On the addition of compound 48/80, there was a further release of histamine from mast cells, accompanied by further production of lactate. This result indicates that the mechanisms which induce the exocytosis of granules, and/or the events following exocytosis, activate glycolysis.

〔はじめに〕

気管支喘息やアレルギー反応ならびにアナフィラキシー・ショックなどはマスト細胞(肥満細胞)の脱顆粒に伴うヒスタミンなどの分泌によって引き起こされる。このヒスタミンはマスト細胞の細胞質に多数ある顆粒に高濃度に含まれる(図1)。

本研究ではマスト細胞のヒスタミンが選択的スピンの励起法で測定した $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに検出できること、さらに種々の脱顆粒薬の投与による顆粒分泌時に、ヒスタミンの細胞外への放出が検出され、同時に乳酸の出現することを報告する¹。

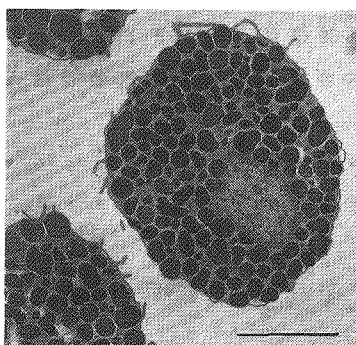


図1 マスト細胞の電子顕微鏡像。

高電子密度の分泌顆粒が細胞質に多数みられる。ヒスタミンはこの顆粒の中に高濃度(約0.4 M)に含まれる。顆粒分泌(脱顆粒)に伴い、ヒスタミンは細胞外に放出される(棒線: 5 μm)。

肥満細胞、分泌顆粒、ヒスタミン、乳酸、解糖系、 $^1\text{H-NMR}$ 、スピンの拡散

よしざき かずお、ありぞの なおき

【方法】

マスト細胞はラット腹腔内の浮遊細胞からPercollで分離・収集し、0.1%ウシ血清アルブミンならびに5.6 mMブドウ糖を含むHanks溶液に浮遊させた。Hanks溶液の組成は137 mM NaCl、5.4 mM KCl、1.3 mM CaCl₂、0.8 mM MgSO₄、0.34 mM Na₂HPO₄、0.44 mM KH₂PO₄、4 mM NaHCO₃(pH 7.3~7.4)である。脱顆粒薬はマスト細胞の浮遊液に追加した。

¹H-NMRスペクトルの測定にはJEOL GX-200SMR(¹Hの共鳴周波数:200 MHz)をおもに用いた。NMR試料管(直径5 mm)にマスト細胞(2~10 x 10⁶ cells)の浮遊液を入れ、室温(24 °C)で測定した。

測定には選択的スピン励起法である¹³³Iパルス系列をおもに用いた(図2)。

なお、このパルス系列によるスペクトル測定では、通常の数値関数のウィンドウ処理では基線のうねりを生じるが、特定部位のスペクトル領域の基線のうねりを引算してスペクトルを表示した。また、ゲートド・デカップリング法による選択的水飽和法でのスペクトル測定もこころみた。外部基準には0.1 M TSP((3-trimethylsilyl)tetraduteropropionate sodium)を重水に溶かしたものを同軸の挿入管にいった。

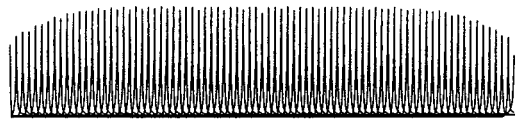
【結果および考察】

1. マスト細胞の¹H-NMRスペクトル。

ヒスタミンは水の共鳴線(4.8 ppm)の低磁場側にイミダゾール環のC2-H(7.8 ppm)およびC4-H(7.1 ppm)の共鳴線、ならびに高磁場側にメチレン基の二つの共鳴線を与える(図3)。

マスト細胞浮遊液の¹H-NMRスペクトルでは水の共鳴線(4.8 ppm)の低磁場側に二つの線幅の広い共鳴線(8.6 ppmおよび7.3 ppm)が検出できた。これらの共鳴線はマスト細胞を遠沈して取り除いた上清液では検出できず、さらにこの細胞浮遊液を凍結・融解させ細胞を破壊すると、これらの共鳴線は右の高磁場側にシフトし、ヒス

a) Single pulse



b) ¹³³I pulse

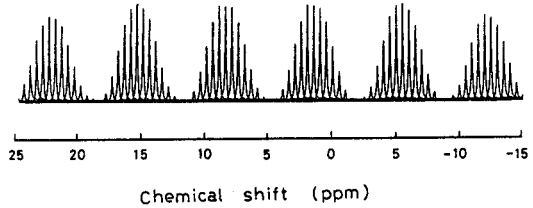


図2 ¹³³Iパルス系列によるスピン励起強度分布。水の共鳴線の位置(4.8 ppm)の励起は抑制されている。

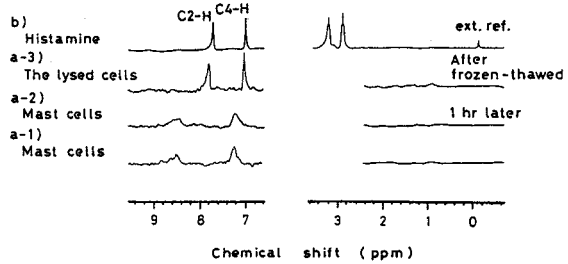


図3 ¹³³Iパルス系列によるマスト細胞の¹H-NMRスペクトル。マスト細胞(a)、その凍結・融解により破壊された細胞(a-3)およびヒスタミン溶液(4 mM、pH 7.4)のスペクトル(b)。

タミン溶液のイミダゾール環のC4-HおよびC2-Hの共鳴線と一致した。従って、マスト細胞に検出できたこれらの共鳴線はマスト細胞の顆粒に含まれるヒスタミンに由来すると考えられる。なお、高磁場側のヒスタミンのメチレン基の共鳴線はマスト細胞浮遊液ではその溶液中のブドウ糖などの共鳴線と重なるので解析の対象としなかった。

つぎに、選択的水飽和法であるゲートド・デカップリング法を用いて、マスト細胞の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定したところ、ヒスタミンは検出できなかった(図4)。しかし、ヒスタミン溶液では検出できた。

このことは選択的水飽和法では水分子のみならず、分泌顆粒の基質のプロトンが磁気飽和され、この磁気飽和された基質プロトンからヒスタミンのプロトンへのスピン拡散が生じたと考えられる。すなわち、ヒスタミン分子はマスト細胞内では顆粒基質と結合していることを示唆している。

なお、マスト細胞のヒスタミンは水溶液の共鳴線よりも低磁場側に位置していた。この化学シフトの差は細胞内での顆粒への結合を反映しているか、あるいは顆粒内のpHが酸性であることを示している。

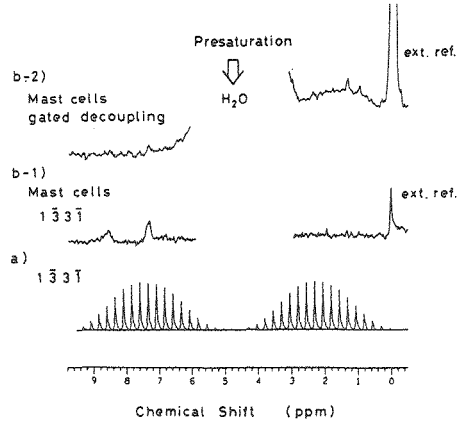


図4 ^{133}I パルス系列およびゲートド・デカップリング法によるマスト細胞の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。 ^{133}I パルス系列による励起強度分布(a)も示した。

2. マスト細胞の顆粒分泌にともなう $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの変化。

脱顆粒薬である compound 48/80 をマスト細胞浮遊液に投与すると、顕微鏡下でマスト細胞に脱顆粒現象が認められた(図5)。この時、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルではマスト細胞のヒスタミンに由来する共鳴線の強度が減少し、遊離ヒスタミンの共鳴線が出現した(図6)。さらに compound 48/80 を追加投与すると、マスト細胞のヒスタミンは減少し、遊離ヒスタミンが増加した。従って、マスト細胞が細胞質の顆粒を分泌し、顆粒内のヒスタミンが細胞外に放出されたことを示している(図6)。

同時に乳酸のメチル基に由来すると推定される1.3 ppmの共鳴線が出現した。しかも、ヒスタミンの細胞外への分泌の増加に

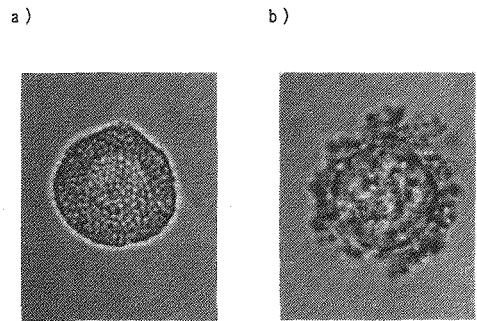


図5 マスト細胞における顆粒分泌の光学顕微鏡像。顆粒分泌前(a)、および compound 48/80 の投与による顆粒分泌(b)を示す。細胞周囲に分泌された顆粒基質がみられる。

ともない、その共鳴線の強度も増加した。その同定を確認するため、マスト細胞浮遊液を遠心分離し、上清液の¹H-NMRスペクトルを測定すると、遊離ヒスタミンとともに1.3 ppmの共鳴線が検出できた(図7)。さらにこの溶液に lactate oxidase(5 U)を加えるとこの共鳴線は消失した。従って、この共鳴線は乳酸に由来し、しかも細胞外に出たことを示している。

Compound 48/80と同様に、マスト細胞に脱顆粒を誘導する polymyxin B(25 μg/ml)あるいは melittin(100 μg/ml)をマスト細胞浮遊液に投与すると、いずれの場合にも、遊離ヒスタミンの出現とともに乳酸の増加を認められた(図7)。すなわち、マスト細胞の脱顆粒によるヒスタミン分泌時に解糖系によるエネルギー産生が著明に亢進することが明らかになった。

以上、マスト細胞の¹H-NMRスペクトルの測定に選択的スピン励起法を用いると、マスト細胞の分泌顆粒に含まれるヒスタミンが非破壊的に測定できること、しかもこのヒスタミンはスピン拡散により磁気飽和を生じることから分泌顆粒に結合していることが示唆された。このスピン拡散を利用すれば結合型ヒスタミンと遊離ヒスタミンとが区別でき、また遊離ヒスタミンと結合型ヒスタミンが同時に測定できることも明らかになった。

さらにマスト細胞の顆粒分泌に伴うヒスタミンの放出時には解糖系が著明に亢進し、乳酸が産生される。しかもこの乳酸は細胞外に放出されることが明らかになった。また、乳酸の同定には lactate oxidase の投与が簡便で、有用であることも明らかになった。

[文献]

1) Yoshizaki K. and Arizono, N.: Exp. Cell Res. 193: 279, (1991).

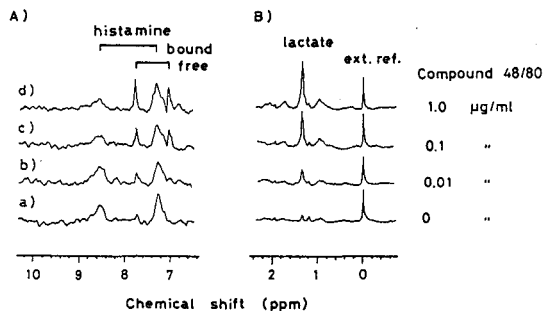


図6 Compound 48/80の投与によるマスト細胞の¹H-NMRスペクトルの変化。試薬は直接、試料管に追加増量した。

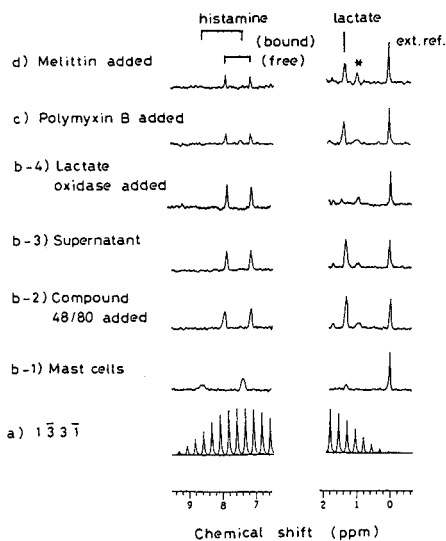


図7 脱顆粒薬によるマスト細胞の¹H-NMRスペクトルの変化と、乳酸の共鳴線の lactate oxidase による同定。(※ melittinの寄与を含む)。

P67

細胞内Naの動的性質： ^{23}Na 二量子フィルターによる解析

○瀬尾芳輝、村上政隆
(生理学研究所、分子生理)

Relaxation of the intracellular Na studied by using ^{23}Na double-quantum filter NMR spectroscopy.

Yoshiteru SEO and Masataka MURAKAMI
(National Institute for Physiological Sciences, Department of Molecular Physiology)

We have applied the double-quantum filter NMR to analyse the relaxation of the intracellular Na-23 of the perfused salivary gland. Using the relaxation rate constants of $| -1/2 \rangle \langle -3/2 |$, $| 3/2 \rangle \langle 1/2 |$ coherence and $| 1/2 \rangle \langle -1/2 |$ coherence, we have analysed two possible models: 1) static model, 2) exchange model. To test these analysis, we also measured relaxation of Na in the agarose/glycerol/water/NaCl solution.

Naイオンは細胞内に約10mM、細胞外液に145mM存在する陽イオンであり、細胞の興奮、運動、吸収、分泌等の基本機能にとり重要な役目を果たす。我々はNa-23 NMR法により、唾液腺細胞内Naイオンの生理的変動を計測してきた(SEO et al., 1987)。二量子フィルター-NMR法により、細胞内Naイオンの緩和時間は短く、分子相関時間(τ_c)は長く、いわゆるslow motion condition ($\omega\tau_c > 1$)にあることを明らかにした(SEO et al., 1990)。今回、細胞内Naイオンの存在状態モデルについて検討をおこなったので、報告する。

ウィスター系ラット(180-350 g)をペントバルビタール麻酔下に手術し、顎下腺(約0.2-0.3 g)を摘出し、2 ml/minで動脈より定流灌流した。Na-23 NMRはブルカー-AMX-360wb分光器(8.45T)またはMSL-100分光器(2.34T)と広帯域プローブ(10 mm径)を用いた。T₂緩和速度はスピンエコー二量子フィルターおよびスピンエコーにて測定した。測定の詳細はK-39核について、報告しているので、参照していただきたい(瀬尾他、1989)。

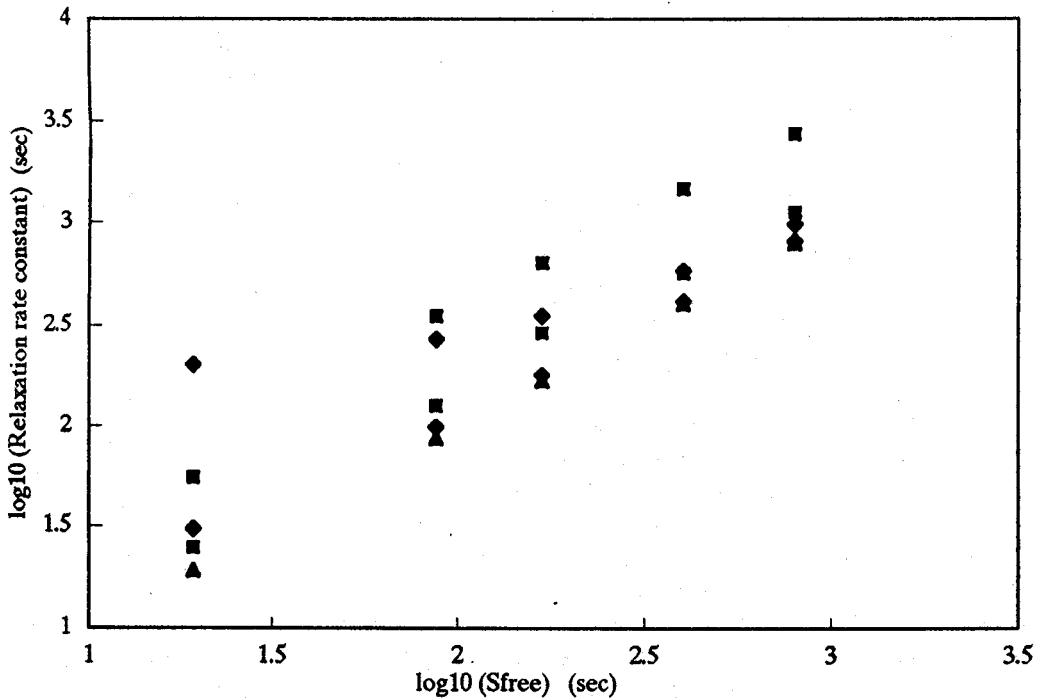
Na-23 NMRにより測定される細胞内Naイオンの存在状態として、1) 均一な分子相関時間をもつひとつのポピュレーションと考えるモデル(static model)と、2) いわゆるslow motion condition とextreme narrowing condition のふたつのポピュレーションが速い交換をおこなっていると考えるモデル(exchange model)がある。8.45Tで測定した細胞内Naイオンの二つのT₂緩和速度($| -1/2 \rangle \langle -3/2 |$, $| 3/2 \rangle \langle 1/2 |$ coherence と $| 1/2 \rangle \langle -1/2 |$ coherenceに対応する)と上記2モデルから細胞内Naイオンの分子相関時間(τ_c)と四極子モーメント(ω_Q)を求めると、 τ_c は各々4 nsecと60 nsec、 ω_Q は各々0.3 MHzと1.8 MHzとなった。四極子モーメントの値は両モデルともに、イオン結晶や、イオノフォアに結合したNaイオンなどで求められている値の範囲であり、どちらのモデルともに、否定できなかった。

キーワード：ナトリウム、二量子フィルター、四極子緩和、唾液腺

せお よしてゐる、むらかみ まさたか

exchange modelの代表的な例とみなされているアガロース／水系について検討してみた。exchange modelの場合、測定されるT₂緩和速度 (S_{obs}) はふたつのポピュレーションのT₂緩和速度 (S_{free}, S_{bound}) が交換により平均化されたものとなる (S_{obs} = (1-Pb)·S_{free} + Pb·S_{bound}, Pbはslow motion condition のNaのフラクション)。グリセリン／水／NaCl溶液では、グリセリン量0から76%の範囲で、粘度では約1から50 cP、S_{free}では19から800 /secまで、変化させることができる (図▲)。そこで、2%V/Vアガロース/1M NaClゲルのグリセリン量を0から76%の範囲にとり、このときのみかけのT₂緩和速度を2.34Tで測定した (図■)。測定値にexchange modelによりフィッティングをおこなった (図◆) ところ、アガロースに”結合”しているNaイオンの分子相関時間と四極子モーメントは各々 25 nsec、2 MHzであった。S_{free}の影響を大きくうける|1/2><-1/2| coherenceに対応する遅い緩和速度については実測値とよくあったが、|-1/2><-3/2|, |3/2><1/2| coherence に対応する速い緩和速度については全く実測値とあわなかった。これは、1) 水中とグリセリン中でのNaイオンの四極子モーメントとが同一でない、2) アガロース／水系が理想的なexchange modelではないためと考えられる。

文献 : Y. Seo et al., Pfluegers Arch, 409, 343-348 (1987)
 Y. Seo et al., Biochim Biophys Acta, 1034, 142-147 (1990)
 瀬尾他、第28回NMR討論会講演要旨集、298-301 (1989)



有機水銀が脳のエネルギー代謝機能に与える影響の³¹P NMRによる解析

(国立環境研究所、国立水俣病研究センター) ○三森文行、中野篤浩*

³¹P NMR study on the energy metabolism of the rat brain intoxicated by methylmercury

Fumiyuki Mitsumori, Atsuhiro Nakano* (Natl. Inst. for Environmental Studies and Natl. Inst. for Minamata Disease*)

The Pi→ATP flux was measured by a ³¹P NMR saturation transfer technique in the rat brain intoxicated by methylmercury. In the steady state the PCr concentration declined from 5.45→4.55 μmol/g in the poisoned brain. However, the Pi→ATP flux of 0.22 μmol g⁻¹ s⁻¹ obtained with the poisoned brain showed no difference from that in the normal brain. These results suggest that methylmercury affected the ATP synthesizing system and reduced the V_{max} of ATP production reaction.

【序】 本発表では、これまでに蓄積されたin vivo NMRの手法を用いて、環境が健康に及ぼす影響の解明という問題に実際にどこまで迫れるのか、例をあげ議論することをめざす。メチル水銀による健康被害は水俣病として知られ、脳が標的となることが明らかにされている。有機水銀の毒性については、タンパク質合成系の阻害、マイクロチューブルの生成阻害などさまざまな研究が行われているが、その毒性発現機構は必ずしも明らかになっていない。そのひとつの原因は脳に直接アクセスする研究手段がこれまで極めて少なかったことによる。培養細胞を用いた研究では、有機水銀は前記のさまざまな毒性とならんで、脳のミトコンドリアの構造異常やATP濃度の低下を引き起こすとの報告もある。本研究では、³¹P NMRの通常測定法、飽和移動測定法を用いて、メチル水銀中毒モデルラットの脳のエネルギー代謝系の解析を行った。

【方法】 成熟ラットに5mg Hg/kg 体重のメチル水銀を12日間連続投与して作成したモデル動物の脳を対象としてBruker Biospec 24/30 NMR分光計を用いて³¹P NMRの測定を行った。表皮や頭蓋両側および頸部の筋肉からNMR信号が混入するのを防ぐため、外科処置により、これらの表皮および筋肉を切除し、脳からの信号のみを直径2cmの表面コイルを用いて測定した。γATPから無機リン(Pi)の共鳴線への飽和移動は、データ取得時間以外の期間に測定用送信器の出力を弱めてγATPの共鳴位置を選択照射して飽和させて測定した。飽和移動によるPiの減分 $\Delta Pi/Pi$ は、コントロール照射スペクトルとの差スペクトルより求めた。同様にγATPを照射しながら、saturation recovery法によりPiの緩和時間 T_1^* を測定した。これより $\Delta Pi/Pi = k_1 / (1/T_1 + k_1)$ 、 $1/T_1^* = 1/T_1 + k_1$ によりPi→ATPの反応速度定数 k_1 を求めた。

【結果と考察】 水銀中毒ラットと正常ラット脳の完全緩和条件下での³¹P NMRスペクトル(図1)でATP、クレアチンリン酸(PCr)、Pi等の共鳴線強度を比較すると、中毒脳でPCr/PCr+Pi比が 0.692 ± 0.044 (n=5, mean±SD)と正常脳の値 0.759 ± 0.009 に比べて有意に低下している。培養細胞での結果とは異なり、ATPには変化がみられなかった。脳内のATP濃度を $3 \mu \text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet wt}$ とすると、PCr濃度は中毒脳で 4.55 ± 0.31 、

in vivo NMR、飽和移動法、エネルギー代謝、脳、有機水銀、ATP

みつもり ふみゆき、なかの あつひろ

正常脳で $5.45 \pm 0.30 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ と算出される。この結果は水銀中毒脳でのエネルギー代謝系の変化を示唆するが、これだけでは、有機水銀が脳におけるATP消費をひきあげたことによりPCrが低下したのか、ATP供給系が障害されたのか区別できない。すなわち、この結果からはATP代謝回転速度が増大した、変わらない、減少した、いずれの場合も考えられる。そこで次の段階として飽和移動法によりATPの生成速度を直接測定することとした。図2に正常脳において測定した飽和移動スペクトルの例をあげる。Piでの飽和移動の大きさ $\Delta\text{Pi}/\text{Pi}$ は、中毒ラット脳では 0.217 ± 0.035 (n=4)、正常脳では 0.262 ± 0.057 (n=5)であった。この値と、測定した T_1^* 値 $1.99 \pm 0.39\text{s}$ (中毒脳, n=5)、 $2.11 \pm 0.17\text{s}$ (正常脳, n=6)より前掲の関係式を用いて、Pi \rightarrow ATPの反応速度定数 k_1 を中毒脳では0.109、正常脳では0.124と算出した。さらにそれぞれのPi濃度 2.03 ± 0.42 (中毒脳, n=5)、 $1.73 \pm 0.11 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (正常脳, n=6)を用いて、中毒脳におけるATPの生成速度を $0.221 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、正常脳における値を $0.215 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と得た。飽和移動法によって求められる生成速度は可逆反応の単方向速度であり、このPi \rightarrow ATPの反応速度にはATP合成酵素のみでなく解糖系酵素の寄与があることを我々は*大腸菌*の例で示した(1)。しかし、脳の場合には、これまでに測定された酸素消費速度との比較から、P/O比は2~3と小さく、解糖酵素の寄与は小さいと考えられる。さらに、ATP合成酵素での反応はATP分解方向の反応は無視できると考えられるので、ここで得られたATP生成速度はATP純生成速度と考えるとよい。したがって定常状態における結果と考えあわせて、水銀中毒脳ではPCrの低下、Piの増大が起きているが、ATPの生成速度は正常に保たれていると結論される。この結果はメチル水銀はATP消費系ではなく、ATP生成系に作用していることを示す。しかも、その障害の程度は、正常のATP消費とつりあうATP生成を十分達成できるがATP生成反応の V_{max} を低下させているものと考えられる。

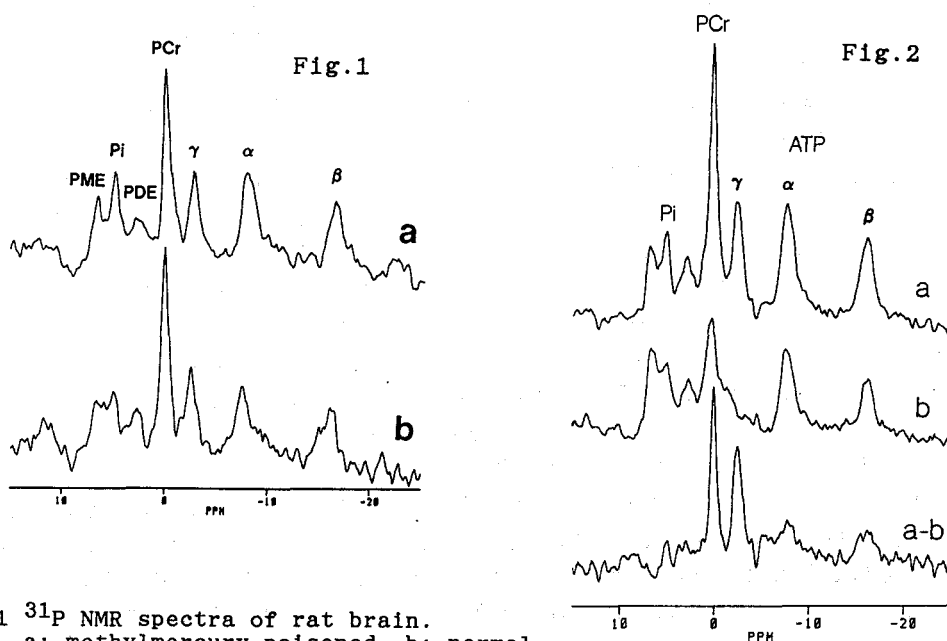


Fig.1 ^{31}P NMR spectra of rat brain. a: methylmercury poisoned, b: normal

Fig.2 ^{31}P NMR saturation transfer spectra of rat brain. a: irradiation at control position, b: irradiation at ATP γ

(1) F.Mitsumori et al: *Biochim.Biophys.Acta*, 969, 185 (1988).

P69

飢餓時のザリガニの筋肉内のリン酸化代謝状態と水の緩和時間

(近畿大・医・第一生理) ○千葉 博、秩父志行

Phosphate metabolism and water proton relaxation of the crayfish muscle during starvation

Atsushi Chiba and Shiko Chichibu

(Dept. Physiol., Kinki Univ. Sch. Med.)

Using ^1H - and ^{31}P -NMR, we studied the state of the in vivo water to establish the correlation between the degree of starvation and the spin-lattice or spin-spin relaxation times (T_1 and T_2) of water protons in the leg muscles of crayfish (Procambarus clarkii), and evaluated changes in high energy phosphate metabolism during concentration of muscle under starvation. As the period of starvation increased, the water content as a component of the body weight increased, and both T_1 and T_2 were also proportional to the increase in water content of the leg muscles. When the chela nerve was stimulated, the rate of phosphoarginine concentration decrease was dependent on the progress of starvation.

[はじめに]

飢餓はエネルギー摂取が中断させられ、生体にとっては好ましくない状態であり種々の病的な変化を引き起こす。長期間にわたり飢餓状態にさらされた動物は、栄養状態が悪化し、体が瘦せ衰え顕著な体重減少を示し、また生体組織構造に変化が認められる。これは、生体の構造蛋白質や脂肪が生命維持のため消費された結果である。実験上の強制飢餓状態と異なり、自然行動のひとつである冬眠においても同様のことが観察される。しかしながら、無セキツイ動物の場合には、外見からその栄養状態を判断することは困難である。その理由は、例えばザリガニの場合には体表は堅い甲殻でおおわれているため、体内の筋肉、臓器の消耗状態を判断することができないからである。

著者らは、アメリカザリガニの飢餓状態における高エネルギーリン酸化代謝状態と水プロトン緩和時間(T_1 :縦緩和時間, T_2 :横緩和時間)を測定した。外観からでは、生体内部の状態を判断できぬ無セキツイ動物のリン酸化代謝と水の状態を観察し得た。

飢餓 アメリカザリガニ 高エネルギーリン酸化代謝 水 緩和時間

○ちば あつし ちちぶ しこう

[材料、方法]

体長8~10cmのアメリカザリガニ(*Procambarus clarkii*)の第一歩脚(ハサミ)と第二歩脚を用いた。収縮時の高エネルギーリン酸代謝の測定には長さ6.0~8.0cmの第一歩脚を、水の緩和時間の測定には長さ3.5~4.0cmの第二歩脚を用いた。それぞれは、ザリガニを水で冷却麻酔した後に基部より切断した。

In vivo ^{31}P -NMRの測定標本は、第一歩脚を直径25mmのNMR試料管内に入れ、van Harrevelde液を深さ50mmになるように満たした。刺激には、第一歩脚の基節(近位側)より興奮性神経線維を露出し、双極刺激電極を接触させた。電気刺激には、2.5V、0.1mパルスで50Hzを1分間与えた(図1)。 ^{31}P の測定には、高分解能核磁気共鳴装置JEOL-GX400(日本電子)を用い、 ^{31}P を161.7 MHzで測定した。観測パルス角は、 45° 、パルス繰返し時間は、2秒で、60回の積算で行なった。化学シフトの基準には、アルギニンリン酸を0 ppmとした。細胞内pHは、Piの化学シフトより求めた。

In vivo ^1H -NMRの測定では、直径10mmのNMR試料管の中へ直径5mmのNMR試料管を中央に置き2連管とし、長さ3.5~4.5mmの第二歩脚を1本置いて測定した。 ^1H - T_1 値(縦緩和時間)測定には、inversion recovery法を用いた。 180° パルス幅は、試料ごとにシグナル強度をみながら決定した。 τ 時間は、0.1msecより10000msecまで変化させ12個のシグナルを検出し、これより縦磁化回復曲線より T_1 値を求めた。 ^1H - T_2 値(横緩和時間)測定にはCarr-Purcell-Meiboom-Gill法(CPMG法)を用いた。 τ 時間は、1msecから500 msecの間で、10個のシグナルより算出し、 T_2 を求めた。NMR試料管内の温度は、 ^{31}P 、 ^1H ともに $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で行なった。

ザリガニ第二歩脚の組織水分含有率の測定は、NMR測定後、湿重量測定した後に、 120°C で3日間乾燥させ、その乾燥重量をもとめて水分含有率(%)を算出した。すなわち、歩脚の湿重量から乾燥重量を引き、その値を湿重量で割って100を掛けて得た。

ザリガニは、購入時または、2日に1回の割合でエサを与えていたものをコントロール(飢餓期0ヵ月)とした。その後、1,2,3,4,5ヵ月間エサを与えなかった。ザリガニの飼育は、水槽に深さ2cmの水を入れて一週間に2~3回水を交換した。

[結果]

アメリカザリガニの歩脚の筋の ^{31}P -NMRスペクトルは、低磁場側より糖リン酸(SP)、無機リン酸(Pi)、アルギニンリン酸(Arg-P)、そしてATP(γ , α , β)のシグナルが得られる。このうち、筋収縮や筋疲労などの筋代謝に顕著な変化が認められるのはPiとArg-Pシグナル変化である。図2に収縮時のArg-P/Pi比の変化を示した。コントロールに比べて同じ刺激による筋収縮時のザリガニの筋肉内のArg-P/Pi比は、飢餓が進むにつれて減少した。コントロール群もしくは飢餓前では約10.0の値であったが、3月間頃より減少傾向を示し、5月間の飢餓では約1/3に減少した。静止時の細胞内pHは、飢餓期間中はほとんど変化なかったが、電気刺激を与えて収縮を引き起こした後の変化は飢餓期間が長いものほど酸性側にシフトした。

図3に飢餓中のザリガニの筋組織の水分含有率、 T_1 、 T_2 の変化を示した。飢餓前

では、平均して58%の水分含有率であるが、飢餓が進むにつれて、組織水分含有率は増加し、5カ月後には約70%近くまで増加した。 T_1 では、飢餓前は、1.6であったが飢餓が進むにつれて増加し、5カ月後には約2.6の値まで増加した。 T_2 も増加したがその増加率は T_1 の増加率よりもはなはだしく、飢餓前は、16~50 msecであったが、2カ月後では100 msecとなり3カ月後には約200 msecに延長したが、5カ月後には約480 msecまで急増した。

[考察]

飢餓状態は、大きく3種類に分けられる。食物はもとより水も与えない絶対飢餓、水のみ与える食物飢餓、そして食物の一部の栄養分のみ制限して与える比較飢餓に分類できる。本実験で用いたザリガニは通常の淡水の水槽で飼育しており、食物飢餓状態の実験である。

無侵襲的な測定法である ^{31}P -NMRは筋の代謝の研究に力を発揮した。筋収縮や筋代謝の実験において得られるリン酸のシグナル変化の解析では、単にシグナルの濃度変化にのみならず、ローマン反応により、 P_i と各高エネルギーリン酸化合物の割合を求めることが重要されている。それらの比は、NMRインデックスとして代謝の状態をみる指標となっている。本実験における筋収縮時の $\text{Arg-P}/\text{P}_i$ を観察した結果、筋のリン酸化代謝状態は、飢餓が進むにつれて筋の嫌気代謝状態となってくると考えられる。正常な筋肉内の $\text{Arg-P}/\text{P}_i$ は、電気刺激による筋収縮により減少するのであるが、飢餓状態では筋肉内は急速に嫌気代謝状態なり、筋肉内の代謝環境によい状態であるとはいえない。病態時の筋の状態では、他のリン酸代謝化合物の出現が認められるが、飢餓状態下での刺激後の筋の $\text{Arg-P}/\text{P}_i$ の低い比も筋の代謝環境の変化を示すものと考えられる。

生体試料を用いたNMR緩和時間の変化の要因はいろいろ調べられている。これは、1971年のDamadianらのガン組織での水プロトン緩和時間に関する報告以来、医学領域ではNMR画像として広く用いられるようになったMagnetic Resonance Imaging (MRI)として汎用されている。著者らは、飢餓という生体内の著しい内部環境の変化を生体内水分量と T_1 、 T_2 値の関係を明らかにする目的でその相関を検討してみた。生体内の水のプロトン T_1 および T_2 測定の意義には、組織内の水の存在状態や自由水量に関係している。Hazlewoodらは、ラットの筋を用いたNMR実験において2つの水の状態(結合水と自由水)を観察した。NMR法では、組織内の自由水が測定対象となる。飢餓状態は、生体内に栄養源が不足し、蛋白質や脂肪が消費される。これには、筋の蛋白構造の変化を伴うことが予想される。本実験において組織の含水量の増加から T_1 値の増加は、筋肉内の自由水の増加に関連していると考えられる。Mathur-Deらは、 T_1 の延長の原因として細胞内のpHの上昇、細胞成長速度の増加、総水分量の増加、export proteinの合成能低下などを示唆している。飢餓においては、組織含水量の増加が T_1 値の延長の要因と考えられる。しかしながら、飢餓期間と T_1 および T_2 値の関係をみると T_1 に比べて T_2 の方が増加率が高い。これは、含水量の増加に伴うだけの変化では説明できない。 T_2 の延長の原因には、細胞質内の脂肪球の増加、粗面小胞体での細胞質内小器官の減少、水分子と相互作用する高分子物

質の表面積の減少である。水の緩和時間の延長の増加度が T_1 より T_2 の方が大きいことは、飢餓により筋組織内での水と相互作用する高分子物質の関連に大きな変化があると考えられる。 ^{31}P -NMR のリン酸化代謝産物の割合の変化のデータからも、飢餓時には生じていると推測される。

著者らは、 ^1H - および ^{31}P -NMR を用いて飢餓時のザリガニの筋肉内の水およびリン酸化代謝状態を観察した。NMR 法は、飢餓状態を観察するのに適切な手段の一つであることがわかった。

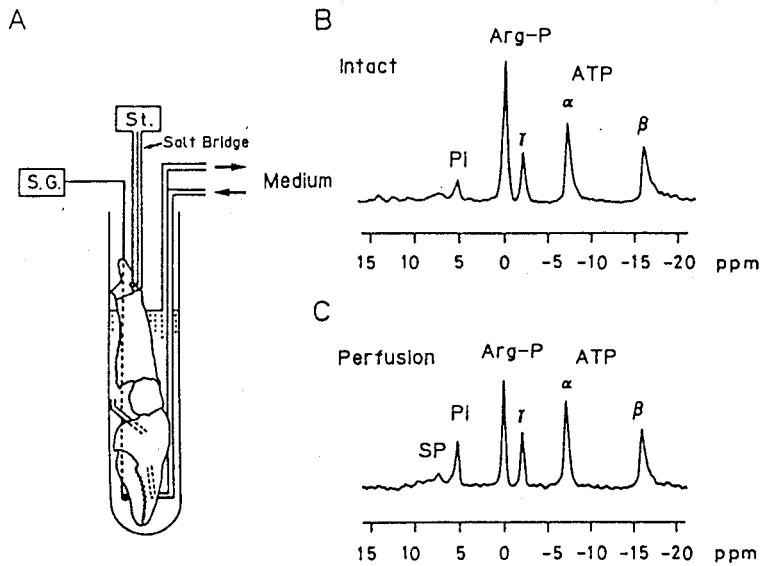


図 1

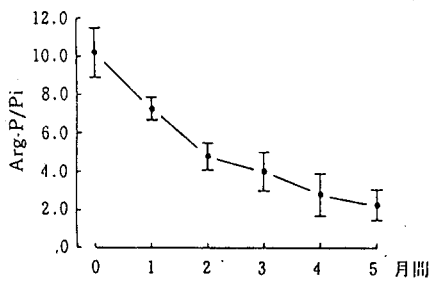


図 2

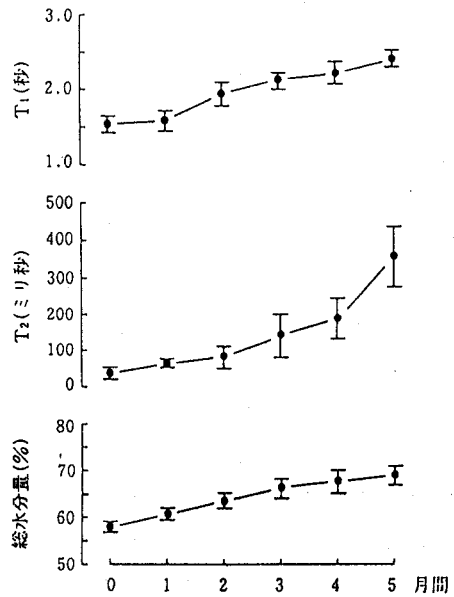


図 3

特異値分解を伴う線形予測による
 ^{31}P NMR スペクトル推定と定量解析の検討

(慶大・理工) ○ 鶴池 充宏、内山 孝憲、南谷 晴之

Spectral estimation and quantitative analysis of ^{31}P NMR signals by linear prediction methods
 with singular value decomposition

Mitsuhiro Uike, Takanori Uchiyama and Haruyuki Minamitani

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

Several linear prediction (LP) methods based on singular value decomposition and pole-zero modeling were applied to quantitative analysis of ^{31}P NMR signals. By using these methods, the frequency, the damping factor, the amplitude and the phase of each component in the FID can be directly estimated. First, we compared characteristics of these methods by using simulated signals. At a low signal-to-noise ratio (SNR), modified TLS provided the best results.

1. はじめに

生体における ^{31}P NMR スペクトルは、生体内の代謝情報を多く与えるので重要である。一般にスペクトルは FFT 法により計算されるが、得られたスペクトルからさらに定量解析を行う場合には、スペクトルにカーブフィティングを行い、ピークの位置や面積を求める必要がある。このカーブフィティングには幾つかの前処理が必要であり、スペクトルの SN 比が低い場合にはピークの情報が求められない場合もある。

そこで我々は、特異値分解を伴った線形予測法を FID 信号の解析に適用した。この方法では FID 信号の数学的モデルにおける各パラメータの値が推定されるため、その推定値を直接用いて定量解析を行うことができる。まず、Barkhuijsen らの方法 (LPSVD) を基本とする幾つかの変形した方法 (LPSVD⁽¹⁾, modified LPSVD⁽²⁾, TLS⁽³⁾, modified TLS⁽⁴⁾) についてシミュレーション信号を解析することにより比較し、最適な方法を選択した。次に、選択した方法を ^{31}P NMR 信号の定量解析に適用した。

2. 方法

K 個の成分を持つ FID 信号は次式のようにモデル化される。

$$x(n) = \sum_{k=1}^K C_k e^{s_k n} + W(n) \quad (1)$$

$$s_k = -b_k n \Delta t + j(2\pi f_k n \Delta t + \varphi_k) \quad (2)$$

key words : linear prediction, singular value decomposition, total least squares

ういけ みつひろ, うちやまたかのり, みなみたにはるゆき

ここで $-b_k, f_k, C_k, \varphi_k$ はそれぞれ k 番目の信号成分における減衰率, 周波数, 振幅, 位相である.

LPSVD は, FID 信号を (3) 式の後退予測式で近似し, 得られる右辺のデータ行列を特異値分解することにより, 予測係数を計算する方法である.

$$x(n) = - \sum_{m=1}^M a_m x(n+m) \quad 0 \leq n \leq T \quad (3)$$

modified LPSVD は, データ行列を特異値分解後し, 特異値の補正を行って予測係数を計算する方法である. TLS は, 右辺のデータ行列, 左辺の観測ベクトル共にノイズの影響を受けているという仮定に基づいて, データ行列の代わりに両辺を組み合わせた $T \times (M+1)$ 行列を用いる方法である. (4) 式から予測係数を計算する.

$$\mathbf{a} = - \sum_{k=p+1}^{M+1} \left[\frac{(v_k)_1^*}{\sum_{i=p+1}^{M+1} |(v_i)_1|^2} \right] \mathbf{v}'_k \quad (4)$$

ここで \mathbf{v}_k は特異ベクトル, p は行列の有効ランクである. modified TLS は, TLS の各行列要素に自己相関関数を与える方法である. いずれの方法においても予測係数計算後, (5) 式に示す M 次多項式を解くことによって, 各パラメータの値を推定する.

$$Z^M + a_1 Z^{M-1} + a_2 Z^{M-2} + \dots + a_M = 0 \quad (5)$$

まず, 前述した線形予測法によって ^{31}P NMR スペクトルを仮定したシミュレーション信号を解析し, 最も NMR 信号の解析に適した方法を選択した. シミュレーション信号は成分数 7, データ点数 2048 点, サンプリング間隔 $50\mu\text{s}$ とし, 各推定法に対し 50 回試行した.

次に選択した方法の定量性を推定した各振幅の比から調べ, FFT 法の結果と比較した. FFT では 90Hz のラインブロードニングを行った後フーリエ変換し, 得られたスペクトルからローレンツ曲線近似のカーブフィッティングにより面積を求めた.

次にラット灌流心臓における FID 信号の定量解析に適用した. 試料は Wistar 系雄性ラット (3 週齢) の Langendorff 式灌流心臓を用いた.

3. 結果と考察

シミュレーション信号の各パラメータの真値と線形予測法による推定結果を Table 1 と Table 2 にそれぞれ示した. Table 2 から明らかなように, modified TLS の結果が推定値に対し最小の標準

Table 1 シミュレーション信号の真値

k	b_k (Hz)	f_k (Hz)	C_k $\times 10^5$	φ_k (deg)
1	120	-3200	1.0	80
2	70	-1200	1.5	90
3	65	-1000	1.8	90
4	60	-100	1.6	95
5	80	300	4.3	100
6	85	1100	4.3	100
7	100	2500	4.2	105

Table 2 線形予測による推定結果 (SN 比 : 10dB)

	k	b_k (Hz)	f_k (Hz)	C_k $\times 10^5$	φ_k (deg)
LPSVD	1	78.69±40.42	-3200±8.178	0.8785±0.2371	82.10±13.26
	2	60.87±23.52	-1200±5.092	1.435±0.2134	89.86±8.981
	3	60.77±31.11	-999.8±4.599	1.781±0.2927	89.45±9.207
	4	57.75±23.11	-99.87±3.872	1.574±0.1770	94.97±6.598
	5	77.48±9.895	300.1±1.640	4.256±0.2369	99.89±3.562
	6	85.35±10.73	1100±1.699	4.295±0.2427	99.90±2.909
	7	99.19±10.69	2500±2.101	4.187±0.2727	104.5±3.460
modified LPSVD	1	231.5±76.12	-3198±9.736	1.325±0.2659	78.33±13.36
	2	122.8±34.90	-1199±5.312	1.787±0.2375	86.66±9.053
	3	113.1±37.08	-999.5±4.784	2.167±0.3105	89.73±9.138
	4	104.0±36.40	-100.0±3.980	1.895±0.2526	94.95±6.607
	5	97.33±10.88	299.5±1.673	4.617±0.2488	101.3±3.614
	6	106.1±11.71	1100±1.711	4.648±0.2548	101.1±2.870
	7	124.5±11.82	2500±2.146	4.566±0.2789	105.6±3.494
TLS	1	116.5±51.66	-3199±8.357	1.017±0.2435	81.68±12.99
	2	67.68±26.06	-1199±5.007	1.479±0.2238	89.78±8.757
	3	66.21±30.83	-999.6±4.870	1.823±0.2867	89.45±9.578
	4	62.30±25.35	-100.0±3.990	1.604±0.1941	95.27±6.757
	5	78.17±9.894	300.0±1.657	4.268±0.2354	100.1±3.630
	6	86.16±10.68	1100±1.642	4.308±0.2453	100.0±2.907
	7	100.4±11.29	2500±2.075	4.205±0.2799	104.5±3.398
modified TLS	1	232.5±86.41	-3202±6.306	1.314±0.2471	82.67±11.80
	2	88.78±21.17	-1199±2.600	1.619±0.2131	88.42±5.731
	3	79.94±15.52	-1000±1.997	1.935±0.1827	90.97±5.108
	4	73.66±10.73	-100.1±2.626	1.689±0.1463	95.58±5.987
	5	81.33±6.486	299.9±1.117	4.320±0.1983	100.4±2.741
	6	90.03±7.253	1100±1.058	4.374±0.1916	100.6±2.421
	7	105.0±8.811	2500±1.280	4.274±0.2555	105.2±2.448

偏差を与えた。また、50回のシミュレーション実験のうち modified TLS のみが全試行において7成分全てを推定した。これらの理由から我々は、modified TLS がパラメータ推定に際し最も安定しており、FID 信号の定量解析に最適であると判断した。

Table 3 定量性の比較

k	true value	FFT	modified TLS
1	0.5556	0.7738	0.6844
2	0.8333	1.003	0.8436
3	1.000	1.000	1.000
4	0.8889	1.192	0.8801
5	2.389	2.218	2.252
6	2.389	2.275	2.285
7	2.333	2.586	2.225

次に、同じシミュレーション信号に対する FFT と modified TLS の定量解析結果を Table 3 に示した。k=3 の成分を基準にとり、その解析値に対する面積比と振幅比で表した。この Table から明らかなように、modified TLS による解析結果は FFT による解析結果よりも（特に振幅の小さい成分に対して）理論値に近い値を与えている。さらに計算時間について比べてみると、スペクトル推定のみにかかる時間は FFT による計算がはるかに速いが、得られたスペクトルからの定量解析の時間も含める

と、FFT では非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを伴うため、modified TLS と同程度かむしろ多くの計算時間を必要とする。従って modified TLS は FFT よりも有効であると考えられる。

生体への応用例としてラット灌流心臓の FID 信号を modified TLS によって定量解析し、心筋内の ATP と PCr の濃度を見積った。その結果を Table 4 に示した。ここで得られた値は過去の研究例と比較して妥当な値であった。

Table 4 ラット灌流心臓の定量解析

物質	濃度
PCr	8.076mM
ATP	1.419mM

以上のことから modified TLS が ^{31}P NMR 信号の定量解析に有効であると考えられる。

参考文献

- (1) H. Barkhuijsen, R. de Beer, W. M. M. J. Bovée, and D. van Ormondt, *J. Magn. Reson.* **61**, 465 (1985).
- (2) R. Kumaresan and D. W. Tufts, *IEEE Trans. ASSP-30*, 833 (1982).
- (3) C. F. Tirendi and J. F. Martin, *J. Magn. Reson.* **85**, 162 (1989).
- (4) J. A. Cadzow and M. -M. Wu, *IEE Proc.* **134-F**, 69 (1987).

¹H-MRSによる肺癌由来培養細胞株A549への
薬剤投与効果の検討

○伊島理枝子、赤坂一之、中井敏晴¹、遠藤啓吾²、
細野真¹、佐賀恒夫¹、阪原晴海¹、小西淳二¹
(京大・理、¹京大・医・核、²群馬大・医・核)

Effect of drugs on malignant cells studied by ¹H MRS
Ishima, R., Akasaka, K., Nakai, T.¹, Endo, K.², Hosono, M.¹,
Saga, T.¹, Sakahara, H.¹, Konishi, J.¹

Faculty of Science, Kyoto University,

¹Nucl. Med. Kyoto Univ. Hospital,

²Nucl. Med. Gunma Univ. Hospital

In order to evaluate the role of MRS in detecting biological characteristics of malignant cells, we investigated ¹H MRS spectral changes caused by drugs regulating cell metabolism and differentiation. Although no significant spectral changes of original 1D spectra were not observed between drug-treated and non-treated cells of A549 which is a human lung adenocarcinoma cell line, 1D differential spectra presented relative changes of the signal intensities of Cr/PCr, lactate, choline and other lipid. However, these changes were not quantitatively correlated with each concentration of culture supernatant.

MRSは非侵襲的な方法として in vivoで癌の診断への応用が期待されている。今回我々は腫瘍細胞への薬剤添加による生化学的、生物学的変化を ¹H NMR測定により検出することを培養細胞を用いて検討した。

[実験] 肺腺癌由来培養細胞株A549 (2X10⁶ cells)をフラスコ(150 cm²)で培養開始し、24時間毎に培養液(50ml)を交換した。細胞培養

----- ☆☆☆ -----

¹H NMR, ¹H MRS, 腫瘍細胞

いしまりえこ、あかさかかずゆき、なかいとしはる、えんどうけいこ、ほそのまこと、さがつねお、さかはらはるみ、こにしじゅんじ

開始後2日間は薬剤を添加しない通常の培地(RPM11640+10%FCS)で培養し、その後 Interferon- γ (10^3 U/ml), Sodium butyrate (5×10^{-5} M), Dexamethasone (10^{-6} M)の各薬剤 [1] を培地に添加した。5日目、7日目に細胞懸濁液 (5×10^7 cells/ $0.5 \text{ ml}^2 \text{ H}_2\text{O}$) について、1次元 ^1H スペクトルを観測周波数400MHz、35°Cで測定した。薬剤非投与群(コントロール)については、2次元DQFCOSY, HOHAHAスペクトルを測定した。またコントロールの細胞抽出液について同様に2次元スペクトルを測定した。

[結果] コントロールの1次元スペクトルで5時間を経過してもケミカルシフトが変化しなかった信号のみを対象に、文献値 [2,3,4] と抽出液のスペクトルから同定を行った。乳酸、脂質、数種のアミノ酸が暫定的に同定された。

薬剤投与群とコントロールとの1次元スペクトルでは顕著な違いは見られなかったが、1次元差スペクトルには Cr/PCr、乳酸、脂質分画由来の信号が観測され、これらの量的変化が示唆された。しかしながら、これらの変化量と生化学的分析により調べられた各物質の変化量との間に完全な一致は見られなかった。

[検討] ^1H NMRを用いた培養細胞の薬剤投与効果の研究は、各物質からの信号をそれぞれ分離、検出できるという点に加えて、医療用の近年のMRSの進歩から *in vivo*での測定結果と直接比較できるであろう点で非常に重要である。我々の研究結果は薬剤投与効果が ^1H NMRで検出できる可能性を示したが、シグナルの同定の不十分さや生化学的分析による結果との違いなどの問題を残している。討論会では、今後どのような手法の実験や解析をおこなったら良いか、我々の研究の問題点を掲げて議論したい。

1 Nakai, N., Endo, K., Hosono, M., et al. *Int. J. Cancer*, **48**, 463 (1991)

2 Alonso, J., Arus, C., Markley, J. et al., *Magn. Reson. Med.*, **15**, 142 (1990)

3 Mountford, C. E., Holmes, K. T. and Smith, I. C. P., *Prog. Clin. Biochem. Med.*, **3**, 72 (1986)

4 Evanochko, W. T., Sakai, T. T., Ng, T. C., et al., *BBA*, **805**, 104 (1984)

P72

NMR Relaxation Characteristics of Interstitial Sodium

B.D.Foy, D.Burstein

Beth Israel Hospital, USA

P73

In Vivo Measurement of Cerebral Oxygen Consumption and Blood Flow Using Oxygen-17 Magnetic Resonance Imaging

J. Pekar¹, L. Ligeti^{1,2}, Z. Ruttner^{1,2}, R.C. Lyon¹, T.M. Sinnwell¹,
P. van Gelderen^{3,4}, D. Fiat^{2,5}, C.T.W. Moonen³, and A.C. McLaughlin¹

¹National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism,
12501 Washington Ave., Rockville, Maryland 20852;

²Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary;

³In Vivo NMR Research Center, National Institutes of Health,
Building 10, Room B1D-125, Bethesda, Maryland 20892;

⁴Department of Applied Physics,
University of Technology, Delft, the Netherlands;

⁵Department of Physiology and Biophysics,
University of Illinois, Chicago, Illinois.

We used ^{17}O NMR imaging techniques to measure the H_2^{17}O concentration in a 0.8 ml voxel in the cat brain following injection of an arterial bolus of enriched H_2^{17}O , and during inhalation of enriched $^{17}\text{O}_2$. We also measured the H_2^{17}O concentration in arterial blood during $^{17}\text{O}_2$ inhalation. The data from the first measurement were used to calculate the blood flow in the voxel. The data from all three measurements were combined to calculate the oxygen consumption in the voxel. The values of cerebral blood flow and oxygen consumption calculated with ^{17}O NMR techniques agree reasonably well with values calculated for a similar region of the cat brain using autoradiographic techniques.

^1H NMR イメージング法を用いた高分子ゲルの研究 I. 応力伝播の画像解析

(東工大) ○安永秀計・黒子弘道・安藤 勲

Polymer Gel as Studied by ^1H NMR Imaging I. Image Analysis of Stress-Strain Propagation

Hidekazu Yasunaga, Hiromichi Kurosu, and Isao Ando
(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology)

Application of ^1H NMR imaging spectroscopy to polymer gel was studied. Imaging for strain developed in polymethacrylic acid (PMAA) gel was carried out. An intensity gradient pattern is generated in ^1H spin density and T_2 enhanced images of PMAA gel under stress. And the intensity of gradient pattern decreases with an increase in the strength of stress. It indicates that the thermodynamic behavior of water in PMAA gel changes with strain developed in the gel. The result suggests that the observed pattern quantitatively relates to strain. Thus, the magnitude and position of stress applied to gel is detected and stress-strain propagation in gel is analyzed by NMR imaging. And the other variety of information on gel can be obtained by ^1H NMR imaging spectroscopy.

1) 緒言

NMR イメージング法は現在、主として医学の分野で用いられ、医療診断法としての有用性はますます高まっている。また、この手法は生体内の形態学的情報と共に生化学的情報を得ることができ、in vivoの系で生体を生きたままの状態を観察する手法として広く用いられて来ている。これはNMR イメージング法が試料中の核の空間分布に関する情報を得るのに有力な手法であることに起因する。一方、化学の分野では一部のマクロな材料評価に用いられてはいるが、NMR イメージング法の特徴を十分に生かした研究はまだ端緒についたばかりである¹⁾。近年、基礎的物性と応用という見地から高分子ゲルの研究が盛んになっている。しかるに特にゲルの物性とその発現機構については未解明の部分が多く、さらに基礎的研究を進めていく必要がある。

^1H NMR イメージング・高分子ゲル・画像解析・応力伝播・勾配パターン

やすなが ひでかず・くろす ひろみち・あんどう いさお

当研究室では、高分子ゲルの研究にNMRイメージング法が有力な手段になるのではないかと考え研究を進めてきた。その結果、 ^1H NMRイメージング法によって高分子電解質ゲルに外部より応力を加えることで発生した歪を画像化し、応力伝播の空間的情報が得られることを見出した。そこで本研究で明らかとなった応力とイメージングパターンの発現について報告する。

2) 実験

現在のNMRイメージング法は、一般的には3次元の立体的な試料を1本の軸にそって切った切り口の2次元平面の情報の集合として捉える方式になっている。試料の空間的に分布した情報を得るためには空間の各位置を標識する必要があり、NMRイメージング法では静磁場強度に空間的勾配をつけてこれを行っている。

NMR信号からの画像化は、本研究で用いた2次元フーリエ変換法では、 $\pi/2$ パルスと π パルスの間に磁場勾配 G_y を印加するとともに生じたスピンエコー信号を G_x を印加しながら取り込み、2次元フーリエ変換して行われる (Fig.1)²⁾。なおFig.1では G_x 、 G_y 、 G_z がそれぞれ周波数標識、位相標識、切片選択の磁場勾配である。

^1H NMRイメージング測定はNM-GIM270イメージングシステム (日本電子製) を接続したGSX270 NMR分光器 (270 MHz, 日本電子製) を用い、 $2 \times 10^{-2} \text{ Tm}^{-1}$ の磁場勾配を印加してスピンエコー法によって行った。そしてシリンダー型のセルにおかれた円盤状のゲルにピストンで応力を加え、応力の印加方向および垂直方向の切断面の状態を画像化した。画像化したのはゲル中の水のプロトンのスピン密度および T_2 強調像である。試料として用いたポリメタクリル酸 (PMAA) ゲルは、N, N'-メチレンビスアクリルアミド (MBAA) を橋かけ剤、過硫酸カリウムを開始剤として

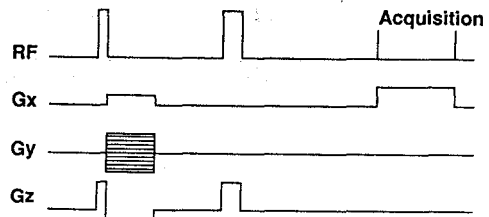


Fig. 1 Timing diagram for the spin-echo imaging pulse sequence.

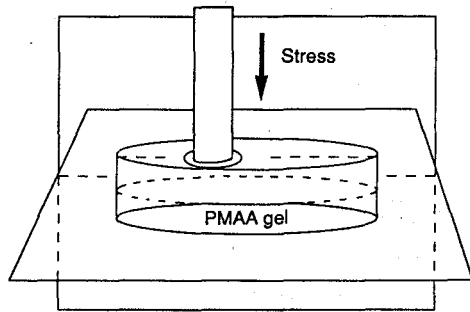


Fig. 2 Schematic view of stress applied on PMAA gel.

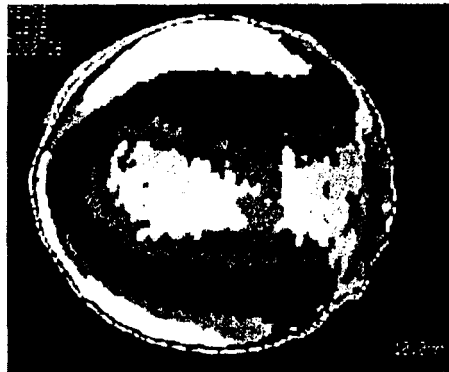


Fig. 3 Transverse image of PMAA gel under 4.8 kPa stress.

メタクリル酸 (MAA) をラジカル重合させ、洗淨の後純水で平衡膨潤させて合成した。膨潤度 q はゲルの膨潤時の質量 $M_{swollen}$ と乾燥時の質量 M_{dry} を用いて次式で定義される。

$$q = \frac{M_{swollen}}{M_{dry}}$$

3) 結果と考察

膨潤度 q が22のPMAAゲルの一部にFig.2に図示したように4.8 kPaの応力を加えたときの、この応力の印加方向に垂直な面での断層像をFig.3に示す。圧力を加えることによりプロトンのスピンドensityに勾配パターンが生じることがこの図よりわかる。スピンドensityの高さをZ軸にとり、断層像を3次元ヒストグラムとして描写するとFig.4のようになる。またこの立体像をXZおよびYZ平面で切った切り口のヒストグラムも合せて示してある。応力のかかった部分の信号強度が最も低く、ここを中心にして周囲にいくにしたがって強度が増加し、勾配があることがわかる。すなわち応力によってゲル中の水のスピンドensityが低くなるとともに、このような外的刺激がゲル内の空間を伝播していくことがわかった。溶媒である水や直鎖状PMAAの水溶液ではこのような応答は見られず、NMRイメージング法によって見いだされた応力伝播がゲルに特異な現象であることが明らかとなった。信号強度の変化のパターンより、 T_2 強調像にも同様な傾向が見いだされるのではないかと考え、応力の印加方向と平行な平面で切った断層について T_2 強調の画像化を行ったところFig.5のような画像が得られた。これをヒストグラム化した図をFig.6に示した。この図より、応力印加によって T_2 が短くなるとともに印加部分を中心とした勾配パターンが生じることともわかった。以上の結果より、加えられた応力によってゲル内に生じた歪の3次元的な伝播

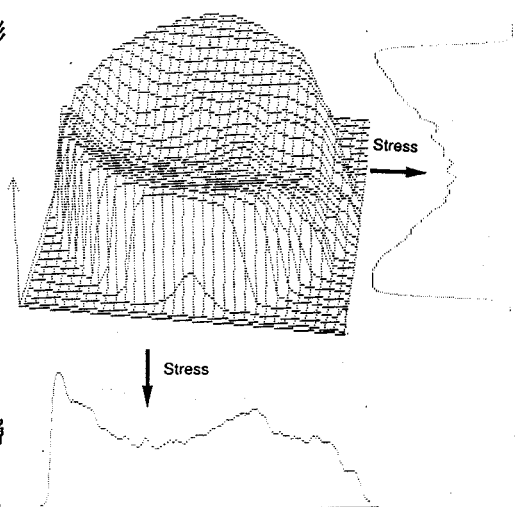


Fig. 4 Intensity profile of the same data as shown in Fig. 3.

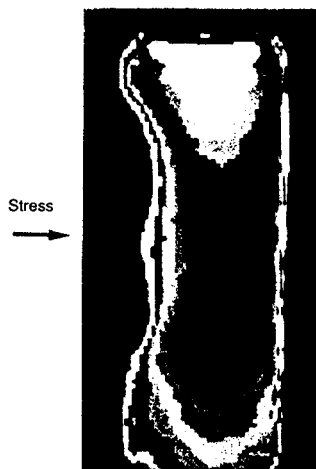


Fig. 5 Coronal T_2 image of PMAA gel under 4.8 kPa stress.

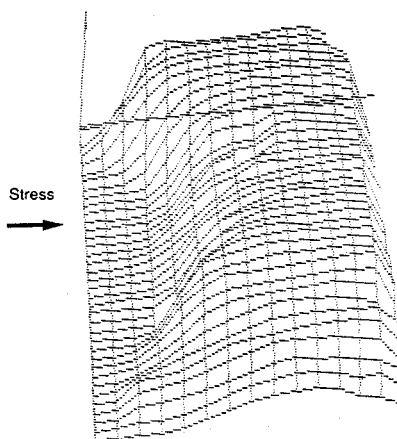


Fig. 6 T_2 profile of the same data as shown in Fig. 5.

をNMRイメージング法によって画像化できることが明らかとなった。

次に応力印加方向と平行な平面で切った断層像において、印加する応力を増加させたときの T_2 勾配パターンの変化をFig.7に示した。応力印加方向の断層面の T_2 強度の変化が、応力の増加にともなって急勾配となった。すなわち加える応力が増加するほど空間における水の T_2 の変化が大きくなっていくことがわかる。したがって、応力の大きさと勾配パターンには相関があるといえる。この結果より、画像に現れたパターンを解析することによって、逆にゲルに加えられた応力の方向、範囲、大きさなどの情報を得られるのではないかと考えられる。

さきに我々は、ゲルの橋かけ度の増加とともに水の T_2 と自己拡散係数が減少するという結果を得た³⁾。橋かけ度の増加

でゲル中の3次元高分子網目の大きさが小さくなり、水の運動が抑制されて T_2 が減少すると考えられる。このことから、応力によってゲルに現れるイメージングパターンの発現機構を次のように考察した。すなわちゲルの一部に応力を加えることによって3次元高分子網目が変形し、応力が大きいほど変形も大きくなる。本研究のように圧力を加えた場合には3次元高分子網目の大きさが小さくなり、その結果水の分子運動が束縛されて T_2 が減少する。局所的な応力による3次元高分子網目の変形の度合いは力を受けた部分で最も大きく、その部分を中心にしてゲル内を3次元空間的に広がっていく。この分布が画像におけるパターンとして現れるのである。

以上のように ^1H NMRイメージング法は、ゲルに外部より加えられた応力によって引き起こされた内部の変化の空間的分布を観測する有力な手法であることが明らかとなった。 ^1H NMRイメージング法によってゲルに関する新たな知見がさらに得られるものと期待される。

文献

- 1) 斎藤 肇, 森島 績, “高分解能 NMR”, 東京化学同人 (1987).
L. A. Weisenberger and J. L. Koenig, *Macromolecules*, **23**, 2445 (1990).
L. A. Weisenberger and J. L. Koenig, *ibid.*, **23**, 2454 (1990).
- 2) A. Kumer, D. Welti, and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **18**, 69 (1975).
- 3) 安永秀計, 黒子弘道, 安藤 勲, 第40回高分子学会予稿集, **40**, 725 (1991).

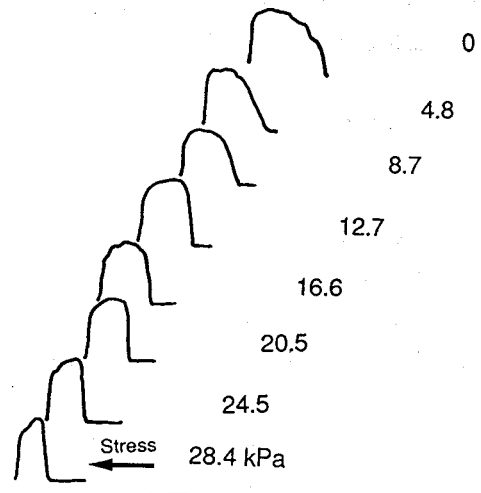


Fig. 7 T_2 profiles from the T_2 image of PMAA gels under stress (4.8 - 28.4 kPa).

第30回NMR討論会要旨集

発行日 平成 3 年 10 月 15 日

発行者 第30回 NMR 討論会

世話人 荒 田 洋 治

〒113 東京都文京区本郷7-3-1
東京大学薬学部薬品物理化学教室
TEL 03-3812-2111 内線4810

印刷所 (株) 林 工 房

〒113 東京都文京区本郷7-3-1
東京大学医学図書館内
TEL 03-3816-6110