

第31回NMR討論会

講演要旨集

日 時 1992年11月17日(火)～19日(木)

会 場 姫路商工会議所

共 催： 日本化学会・日本薬学会・日本生物物理学会・日本生化学会
日本農芸化学会・日本分析化学会・高分子学会・日本物理学会

会 場 案 内

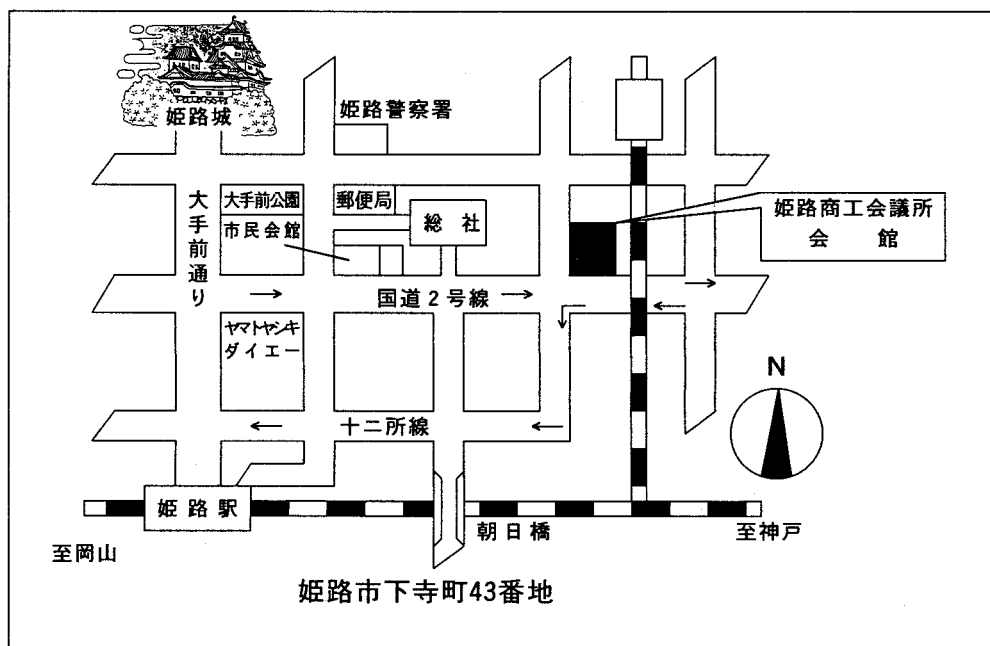
討 論 会 場 : 姫路市商工会議所
姫路市下寺町43番地, TEL (0792)22-6001

講 演 会 場 : 2階大ホール

ポスター会場 : 1階展示場

展 示 会 : 1階展示場
2階ギャラリー

会 場 案 内 図



交 通 案 内

J R 姫路駅北口より徒歩——15分

神姫バス—5分 市川台もしくは鹿島神社行坂田町下車

市バス——5分 日ノ出車庫行商工会議所前下車

一般講演 15分 討論 5分
 ミニシンポジウム 25分 討論 5分
 特別講演 50分 討論 10分

11月17日(火)

10:00-12:00

座長 高橋憲助

- L 1 ab initio MO法による γ -gauche効果の理論的研究 1
 (東工大工・サリー大) ○黒子弘道・安藤 勲・G.A. Webb
- L 2 HMBC法の新しい応用測定 HMBC-COSY, HMBC-OHAMAについて 5
 (東大農・応微研) ○降旗一夫・瀬戸治男
- L 3 構造情報H~H Couplingが無力な系のNMR構造解析: Thielocinsについて 9
 (シオノギ研) ○照井彬弘・松谷茂・吉田正

座長 西川弘恭

- L 4 トランジェント・ニューテーション信号を用いたイメージング 13
 (電子総研) ○亀井裕孟・片山義朗
- L 5 ^1H -検出によるラット脳内 ^{13}C -標識代謝産物の追跡 17
 (滋賀医大・横河メディカルシステム・京大医) ○犬伏俊郎・森川茂広・
 鬼頭幸一・荒井俊之
- L 6 B_1B_0 ハイブリッド磁場勾配を用いる ^1H NMR局在化測定法 19
 (国立環境研) ○三森文行

13:30-15:30

ポスターセッション(1) (主としてP 3 n-2)

15:30-16:45

ミニシンポジウム 高温超伝導体のNMR

座長 寺尾武彦

- M 1 Introductory talk 23
 (姫工大理) 小原孝夫
- M 2 酸化物高温超伝導体の磁気励起 27
 (東大物性研) 安岡弘志
- M 3 高温超伝導体のNMR 29
 (阪大基礎工) 朝山邦輔

—休憩—

17:00-18:20

座長 安藤 勲

- L 7 相互作用の競合する磁性体における磁気相転移とスピンの揺らぎ 33
(京大教養) ○前川寛・小山田明・後藤喬雄
- L 8 ^{13}C マジック・アングル・スピニングNMRのCHJ結合と磁気双極子 37
相互作用による微細構造
(京大理) ○久保厚・桑原大介・今城文雄・寺尾武彦

座長 早水紀久子

- L 9 ^{13}C ラベル試料のMAS条件下J-HOHAHAと双極子HOHAHA 41
(日本電子) ○藤原敏道・A. Ranamoorthy・永山国昭・杉沢寿志・
藤戸輝昭
- L 10 固体NMRによる包接化合物中ゲスト分子の静的動的構造の研究 43
(京大理) ○寺尾武彦・桑原大介・今城文雄

11月18日(水)

9:00-10:20

座長 引地邦男

- L 11 選択励起SASS ^{13}C NMR法によるガラス状高分子の化学シフトの異方性の測定とその解析 47
(京大化研・日本電子) ○堀井文敬・別府隆幸・杉沢寿志・藤戸輝昭
- L 12 固体高分解能 ^{13}C NMRによる紫膜中のバクテリオロドプシンの高次構造の変化の解析 51
(姫工大理) ○辻暁・内藤 晶・齊藤 肇

座長 堀井文敬

- L 13 芳香族ポリアミドの固体 ^{15}N NMR構造解析 55
(農工大工・東洋製罐綜研) 呂奏洪・○出村誠・朝倉哲郎・伊藤卓郎
- L 14 ^{15}N NMRによるポリペプチドの固体構造解析： ^{15}N 化学シフトに及ぼす側鎖構造の影響 59
(群馬大工・東工大工) ○荘司顯・芦川幹也・加藤寛・尾崎拓男・
黒木重樹・安藤勲

—休憩—

10:40-12:00

座長 内藤 晶

- L 15 固体高分解能 ^{17}O NMRによるポリグリシンの構造研究(4) 63
(東工大工・群馬大工) ○黒木重樹・安藤勲・荘司顯・尾崎拓男
- L 16 核四極子を持つ核のCP/MASスペクトルにおける線形- ^{23}Na 及び ^{11}B 核 ($I=3/2$) 67
(化技研) ○林繁信・上田貴洋・早水紀久子

座長 阿久津秀雄

- L 17 重水素NMR法による液晶分子のコンホメーション解析 71
(東大教養) ○鳥海弥和
- L 18 重水素NMRによるタンパク質の分子運動。固体および溶液中のSSIの
メチオニンの場合 75
(京大理・姫工大理・学習院大・東大工・神戸大理) 田村厚夫・
松下道雄・内藤晶・小島修一・熊谷泉・三浦謹一郎・○赤坂一之

13:30-14:30

座長 赤坂一之

- L 19 核酸構造解析のためのパルス列(HAL)の開発 79
(阪大蛋白研) ○児嶋長次郎・京極好正
- L 20 オキシトシンのDMSO中における構造 83
(日本電子・新技団ERATO・横浜国大工) ○加藤敏代・猿渡茂・
藤原敏道・藤原正子・永山国昭
- L 21 NOESY及び構造精密化プログラムMARDIGRASによるRibonuclease T_1 修飾体
の構造研究 87
(味の素中研・東大理・カリフォルニア大サンフランシスコ)
○宮野博・鈴木榮一郎・田之倉優・高橋健治・T. L. James

14:30-17:00

ポスターセッション(2) (主としてP 3 n - 1)

17:00-18:00

座長 斉藤 肇

- 特別講演 I High Field Magnetic Resonance and Surgical Practice 89
(National Research Council) Roxanne Deslauriers

18時から

懇親会 (商工会議所5階ホール)

11月19日(木)

9:00-10:20

座長 神藤平三郎

- L 22 ^{43}Ca -NMRによるリゾチームと α -ラクトアルブミンの研究 91
(北大工・北大理・内蒙古師範大・フィンランド技研セ・カルガリー大)
○平沖敏文・新田勝利・岳克・T. Drakenberg・J. M. Aramini・
H. J. Vogel
- L 23 チトクロム c_3 ヘム近傍の構造と酸化還元制御 93
(横浜国大工) ○阿久津秀雄・平澤政明・朴璋洙・加野勝宏

座長 甲斐荘正恒

- L 24 ^{13}C -, ^{15}N -標識FADで再構成した中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼの 97
 ^{13}C -, ^{15}N -NMR
(関西医大化・熊本大医) ○三浦洸・二科安三・佐藤恭介・藤井茂・
黒田記代・志賀潔
- L 25 安定同位体核利用多次元NMRによるシスタチンAのスペクトル解析 101
(都臨床研・青学大理工・日本電子) ○楯 真一・大山幸仁・
高橋誠一郎・梶裕之・大内宗城・鮫島達也・稲垣冬彦

10:20-13:30

ポスターセッション(3) (主としてP3n)

13:30-14:50

座長 稲垣冬彦

- L 26 2重共鳴、3重共鳴を利用した多次元NMRによる転写調節蛋白質の構造解析 105
(阪大蛋白研) ○白川昌宏・松尾浩・上垣浩一・芹川康治・
森田勇人・京極好正
- L 27 選択的安定同位体標識一多次元NMR法によるタンパク質NMRシグナルの帰属 109
(都立大理・日本ブルカー) ○甲斐荘正恒・三宅洋子・安倍未央・
鎌田創・滝沢由紀子・M. Waelchli

座長 京極好正

- L 28 免疫グロブリンのNMR構造解析 111
(東大薬・NKK中研) 嶋田一夫・加藤晃一・高橋栄夫・合田浩明・
金載一・金夏亨・中山智紀・松永千枝・尾高麻乃・鈴木恵理佳・
進藤一泰・田村洋・吉野温子・○荒田洋治
- L 29 安定同位体標識多次元NMR法によるc-Ha-Rasタンパク質のスペクトル解析 113

(東大理・日本ブッカー・萬有製薬・蛋工研) ○武藤裕・山崎和彦・
伊藤隆・M. Waelchli・西村暹・宮澤辰雄・横山茂之

—休憩—

15:10-16:10

座長 荒田洋治

特別講演Ⅱ ヘム蛋白質の分子工学とNMR—ヘム蛋白質における配位構造、
電子構造ならびに蛋白質構造と機能発現機構・・・・・・・・・・・・ 117
(京大工) 森島績

ポスターセッション演題 (括弧内の数字はセッション番号を示す)

錯形成

- P 1 (1) 完全メチル化シクロイヌロヘキサオースと金属カチオンとのコンプレク
セッション・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 121
(阪大産研・大教大生物) ○高井嘉雄・奥村泰男・高橋成年・
澤田正實・川村三志夫・内山喬夫
- P 1a(1) リン酸基・硫酸基間の金属イオン Mg^{2+} 、 Ca^{2+} のダイナミックスと結合
部位・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 123
(北大理・群馬大工) 和泉光則・○市川和彦・栄喜俊夫

有機構造

- P 2 (2) 免疫抑制タンパク、イムノフィリンが行うプロリルアミドcis/trans
異性化反応の遷移状態モデルの ^{13}C -NMRダイナミクス・・・・・・・・ 125
(九大薬・第一薬大) 小川晴・草場里奈・井本泰治・○加藤祐子・
富田盛子・野上靖純・古賀俊隆
- P 3 (3) 2-ピリジルメチルリチウム誘導体のメチレン内部回転に対するクラウン
エーテルおよびクリプタンドの効果・・・・・・・・・・・・・・・・ 129
(名工大工・新日本製鐵) ○吉野明広・榊原洋史・高橋憲助
- P 4 (1) 等価核のNMR的非等価性に着目した対称分子の構造解析法(第2報)
 ω_1 hetero half-filtered-HH相関法の応用・・・・・・・・ 133
(北大農) 川端潤・○福士江里・水谷純也
- P 5 (2) アルブミンに対する薬物の結合位置の緩和速度による研究・・・・・・・・ 137
(徳島文理大薬) ○田中正己・朝日豊
- P 6 (3) メチルピリジン類とそのN-オキシド類の 1H および ^{13}C NMRで観測される
重水素同位体効果・・・・・・・・・・・・・・・・ 141
(名工大応化・メニコンR&D) ○中島康喜・鈴木恵子・福永守高・
高橋憲助

測定技術

- P 7(1) 1軸勾配磁場を用いたGradient-enhanced NMR 145
(日本電子) ○内海博明・気田佳喜・池田博・長谷川憲一・
日元徹・樋口啓一郎・今成司
- P 8(2) TOSS/deTOSS法を利用した分子の微細構造の検討法 149
(大塚電子) ○仲村高志・山田浩美・中本弘幸・篁 進・三浦巖
- P 9(3) Shaped Pulsesの高分解NMRへの応用 153
(島津) ○大藪又茂・大野靖・寺下衛作
- P 10(1) 固体重水素NMRによる吸湿性有機固体中の水の運動 157
(アップジョン) ○檜山行雄・野呂優規美・M. D. Likar・P. E.
Fagerness
- P 11(2) リバース検出法の導入“旧型NMRの改造” 159
(アップジョン) ○野呂優規美・小形稔・檜山行雄・P. E. Fagerness
- P 12(3) 固体重水素NMR機能の導入“液体用NMRの改造” 161
(アップジョン) ○檜山行雄・野呂優規美・P. E. Fagerness
- P 56(2) LINEAR PREDICTIONの多次元NMRへの応用—展開時間の初期値, シグナル
位相に対する依存性— 309
(住友化学筑波研) ○岡田明彦

In vivo NMR、イメージング

- P 13(1) パルス磁場勾配を使ったパルス法NMRによる制限領域内の液体の自己拡散
係数の測定 163
(明治鍼灸大) ○福田耕治
- P 14(2) Relaxation of Intracellular ^{23}Na : Relaxation Mechanism of Na Ion in
Agar Gel Analyzed by Pulsed Field Gradient NMR 167
(生理研) ○瀬尾芳輝・村上政隆
- P 15(3) カエル灌流心臓におけるクレアチン・キナーゼ反応フラックスの心拍周期
 ^{31}P -飽和移動NMRによる測定 171
(京府医大) ○早野尚志・吉崎和男・尾内善四郎・森本武利
- P 16(1) ^1H -, ^{31}P -NMRより測定した抱卵状態のアメリカザリガニ卵の観察 175
(近畿大医) ○千葉惇・秩父志行
- P 17(2) 植物組織の拡散イメージング 179
(農水食品総研・農水生物研・日本電子データム) ○石田信昭・
狩野広美・小川秀次郎
- P 18(3) NMRマイクロイメージングによる大豆種子の水の拡散係数測定 183
(東京水産大・農業研セ) ○福岡美香・渡辺尚彦・島田信二

固体イメージング

- P 19(1) 固体NMRイメージングにおける選択励起法 185
(筑波大物理工) ○松井茂
- P 20(2) マジックサンドイッチエコー固体NMRイメージングによる弾性材のプロ
トン画像 187
(筑波大物理工) ○松井茂

水和

- P 21(3) ^{17}O , ^1H -NMRによる気体水和水の研究(1) 代替フロン141bを含有する系 189
(化技研) ○早水紀久子・柳沢勝
- P 22(1) タンパク質溶液→ゲル変換における水構造変化の研究 193
(藤田保衛大・岐阜大医・筑波大物工・生理研) ○曾我美勝・
恵良聖一・桑田一夫・加藤一夫・恵良田知樹・田崎明・中上寧・
松本元一・高崎昭彦・亘弘
- P 23(2) 糖質ゲル中の水の動的挙動: 拡散および回転拡散速度、緩和時間の解析 197
(東水産大・東電機大) ○渡部徳子・村勢則郎・大塚章宏
- P 24(3) ^{113}Cd 及び ^1H NMRによるゼオライト細孔内の水分子の運動 201
(北見工大) ○三浦宏一・小林祐介・松田弘喜・福井洋之
- P 25(1) ^1H -NMRによるソフトコンタクトレンズ内の水構造の研究 205
(岐阜大医・藤田保衛大・生理研) ○恵良聖一・桑田一夫・中村浩二・
今井一・曾我美勝・中上寧・亘弘

高分子

- P 26(2) ポリ(4-メチル-1-ペンテン)の立体規則性について—そのポリマー鎖
の特異なコンフォメーション 209
(三井石化分析研・農工大工) ○水野章・恩田光彦・木岡護・
朝倉哲郎

高温

- P 27(3) 高温 ^{27}Al NMRを用いたスピネル(MgAl_2O_4)の秩序・無秩序転移 213
(北大理・北大工) ○加藤智史・前川英己・河村雄行・横川敏雄・
下川繁三

生体膜

- P 28(1) ^2H -NMRによるジブカインとブタ赤血球膜、フォスファチジルコリン、および
フォスファチジルセリン二重膜との相互作用研究 217
(京大薬・京薬大) ○黒田義弘・脇田美砂子・小川雅弘・木山泰範・
藤原靖弘・中川照真
- P 29(2) NMRによる金属イオンの脂質人工膜透過性に関する研究—膜共存物質による
促進効果 219

固体および液晶

- P 30(3) 固体高分解能 ^{29}Si -NMRによるポリシランの構造研究 223
(神奈川大工・東工大工) ○高山俊夫・安藤勲
- P 31(1) 単結晶試料におけるオーバートーンNMRによる ^{14}N 四重極テンソルの決定 227
(北大理) ○竹腰清乃理・引地邦男
- P 32(2) 天然存在比 ^2H -NMRによる液晶構造の研究 231
(京大薬・東大教養・神戸大理) ○脇田美砂子・中川照眞・
鳥海弥和・赤坂一之
- P 33(3) 状態相関2次元NMR法による液晶構造の研究—混合液晶系— 233
(京大理・日本電子・姫工大工・神戸大理) ○木村雅晴・河原広典・
今成司・内藤晶・赤坂一之
- P 34(1) 固体高分解能NMRを用いたペプチドの水素結合の研究2 237
(東工大工・群馬大工) ○浅川直紀・黒木重樹・黒子弘道・安藤勲・
荘司顯・尾崎拓男
- P 35(2) 同種核間異種核間の原子間距離測定法の検討 241
(姫工大工・大塚電子) ○内藤晶・辻暁・仲村高志・斉藤肇
- P 36(3) cellobiose octa(decanoate)の液晶及び結晶状態に関する ^{13}C 及び ^2H NMR研究 245
(京大化研) ○高江洲昇・高田晃彦・堀井文敬・福田猛・宮本武明
- P 37(1) 2D-Nutation NMRによる結晶欠陥の評価法 249
(筑波大物工) ○中村弘輝・恵良田知樹・田崎明
- P 38(2) 多量子遷移フィルターによる超イオン導体中のイオンの運動 253
(筑波大物工) ○山田整・中村弘輝・恵良田知樹・田崎明
- P 39(3) 固体NMRの計算機実験プログラムの開発 255
(京大理・ブリティッシュ・コロンビア大) ○芦田淳・石井佳誉・
中井利仁・寺尾武彦
- P 40(1) 固体高分解能NMRによるゼラチンの特性評価 257
(阪大薬・日清製粉) ○藤原英明・高木達也・峯村剛
- P 41(2) 固体 ^2H -NMRによるpoly(γ -benzyl L-glutamate)側鎖末端の動的構造 261
(北大工) 北澤聡・平冲敏文・○堤 耀廣
- P 42(3) アミノ酸、ペプチドのCPMAS- ^{13}C -NMRの同位体効果 263
(味の素中研) ○海老沢計慶・鈴木榮一郎
- P 43(1) 固体金属カルボニルクラスター $[\text{DCo}_6(\text{CO})_{16}]^-$ の ^2H NMR 265
(阪大教養・阪大理・筑波大・リバプール大) ○江口太郎・中山尋量・
武田定・恵良田知樹・B. T. Heaton

P 44(2)	固体重水素NMRによる1,2-エポキシドリン酸ナトリウム結晶水の動的構造	269
	(阪大理) ○石丸臣一・中村亘男	
P 45(3)	ゾル・ゲル法におけるコーディエライトセラミックスの生成過程	271
	(化技研・東理大) ○菊地直人・清忠師・土谷敏雄・林繁信・早水紀久子	
P 46(1)	固体高分解能NMRによるポリピロールの構造研究	273
	(東工大工) ○菊池瑞代・黒子弘道・安藤勲	
P 47(2)	B ₄ Cの ¹¹ B及び ¹³ C-固体NMR	277
	(三菱化成総研・日本ブルカー・東京水産大) ○原園としえ・牛嶋裕次・横田悦造・廣山幸代・渡部徳子	
P 48(3)	固体高分解能 ¹⁰⁹ Ag NMRスペクトルを用いた銀(I)錯体の研究	281
	(東京都立大理・近畿大理工総研・近畿大理工) ○北川進・前川雅彦・杉野秀樹・川田知・宗像恵	
P 49(1)	絹の固体 ¹⁵ N NMR構造解析	285
	(農工大工・蚕糸科研・東洋製罐総研) ○朝倉哲郎・小中澤岳仁・出村誠・小松計一・伊藤卓郎	
P 50(2)	NQR法によるMASプローブの温度較正	287
	(日本電子) ○田中良二・杉沢寿志・出口健三・藤戸輝昭	
P 51(3)	La214系における銅の核四重極共鳴	291
	(京大理・東大物性研) ○吉村一良・小菅皓二・安岡弘志	
P 52(1)	ハルデンギャップ磁性体の核磁気緩和	293
	(京大理・京大教養) 藤原直樹・○後藤喬雄・前川覚	
P 52a(1)	ウラン化合物超伝導体のNMR, NQRによる研究	297
	(姫工大理) ○小堀洋・小原孝夫	

タンパク質、生体分子

P 53(2)	タンパク質の ¹ H NMR化学シフト計算	299
	(農工大工・シェフィールド大) ○朝倉哲郎・出村誠・萩原健一・田村 享・M. P. Williamson)	
P 54(3)	がん原遺伝子産物Myb DNA結合領域の異種核NMRによる構造解析	301
	(横市大総合理・阪大蛋白研・蛋工研・理研筑波ライフサイエンス) ○緒方一博・鈴木裕子・相本三郎・中村春木・皿井明倫・石井俊輔・西村善文	
P 55(1)	SDSミセル中でのPACAP27とVIPの立体構造	305
	(武田薬品筑波研) ○井ノ岡博・遠藤聡史・北田千恵子・水田栄治	
P 57(3)	ネオカルジノスタチン複合体の三次構造—分子認識とクロモフォア	

安定化機構	313
(東北大理・東北大分析セ・日本電子・サントリー生医研) ○田中俊之・平間正博・上野昌子・藤田憲一・今城精一・石黒正路	
P 58(1) 大腸菌由来ヒストン様蛋白質、H-NSおよびHUのNMRスペクトル帰属と構造解析	317
(東薬大・京薬大・名大農・中外製薬) 家田了一・胡桃坂仁志・ ○神藤平三郎・佐久間千勢子・今本文男・五島直樹・水野猛・久保庭 均	
P 59(2) 球状蛋白質BPTIの動的立体構造の計算機シミュレーションをもとにしたCa 原子のスピン格子緩和時間の計算	319
(日本電子・京大理) ○入佐正幸・郷信広	
P 60(3) 部位特異的アミノ酸置換P450 _{cam} のNMRによる構造解析	321
(京大工・島津) ○若杉桂輔・石森浩一郎・森島績・増田潤一・大野靖	
P 61(1) リン脂質ミセルに埋め込まれた糖脂質のコンホメーション緩和行列と ディスタンスジオメトリーによる解析	323
(都臨床研) ○稻垣冬彦・神田大輔	
P 62(2) リボヌクレアーゼHの ¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N核の完全帰属と化学シフトと構造の関係	325
(日本電子) ○山崎俊夫・永山国昭	
P 63(3) エンドセリンの立体構造形成におけるcore-tail相互作用の重要性	327
(武田薬品筑波研) ○遠藤聰史・井ノ岡博・菊池崇・今田岐・ 脇舩光廣・水田栄治	
P 64(1) 固体表面に吸着した蛋白質のH-D交換と溶液中高分解能NMRによる解析	331
(九大歯・九大薬) ○永留初実・河野敬一・寺田善博・植田正・ 井本泰治	
P 65(2) 回転系におけるプロトンスピン格子緩和時間を用いたタンパク質フラジェ リンの末端セグメントの運動性の評価	333
(日本電子・神戸大理・帝京大理工・ハンガリー科学アカデミー) ○伊島理枝子・赤坂一之・相沢真一・V. Ferenc	
P 66(3) NMRによるコリシンE3免疫タンパク質の高次構造解析	335
(東大農・東大理) ○矢嶋俊介・武藤裕・横山茂之・正木春彦・ 魚住武司	
P 67(1) 完全緩和行列を用いたペプチドの溶液構造の精密化-エルカトニンの 構造解析への適用	339
(阪府大農・阪大蛋白研・旭化成) ○西村重徳・小林祐次・京極好正・ 小川潔・林満男	
P 68(2) 常磁性 ¹ H-NMR飽和移動法によるフェリ型ミオグロビンの酸-塩基平衡のダイ ナミックスの研究	343
(東工大生命理工・西東京科大理工・高知大理) ○山本泰彦・ 中條利一郎・井上義夫・鈴木知彦	

- P 69(3) 新規環状depsipeptide, Leualacinの三次元構造決定 345
 (三共分析研) ○依田恵子・春山英幸・桑野晴光・浜野潔・
 丹沢和比古
- P 70(1) 同種核3次元NMRによるCINCの構造解析 349
 (三共分析研・サイトシグナル研) ○半沢宏之・春山英幸・
 渡辺一義・鶴藤丞
- P 71(2) 多次元NMRによる*A. niger*非ペプシン型酸性プロテアーゼの高次構造解析 353
 (東大理・味の素中研・明治製菓生科研) ○小島正樹・田之倉優・
 武藤裕・宮野博・鈴木榮一郎・浜谷徹・滝沢登志雄・高橋健治
- P 72(3) 安定同位体標識法によるヒトHla-Ras変異体タンパク質の機能構造の解析 355
 (東大理・東大工・国立がんセ研・蛋工研) ○山崎和彦・外山洋一・
 小塩尚代・武藤裕・吉垣純子・白水美香子・伊藤隆・河合剛太・
 渡辺公綱・西村暹・宮澤辰雄・横山茂之
- P 73(1) 大腸菌tRNAの同核3次元NMR 359
 (東大工・東大理・蛋工研) ○河合剛太・林宣宏・新美達也・
 宮澤辰雄・渡辺公綱・横山茂之

第 1 日

11月17日(火)

L 1 ~ L 10

(東工大・工) ○黒子弘道・安藤勲

(サリー大) Graham A. Webb

Theoretical Study of γ -Gauche Effect for n-Paraffin by using *ab initio* MOHiroimichi Kurosu and Isao Ando(Tokyo Institute of Technology)

Graham A. Webb(University of Surrey)

We report *ab initio* ^{13}C nuclear shielding calculations of γ -gauche effect for n-paraffin using the GIAO-CHF procedure. The used geometrical parameters are optimized on each dihedral angle. The dihedral angle dependence of shielding constant calculations are carried out and γ -gauche effect of n-octane are discussed.

1. はじめに

γ -gauche効果の考え方はパラフィンやポリマーのNMRスペクトルの帰属にしばしば用いられている。例えば飽和環状炭化水素における ^{13}C の γ -gauche効果はゴーシュ位にある炭素はトランス位にあるものより約5 ppmの高磁場シフトすることが知られている¹⁾。この効果の理論的な研究はMacielら²⁾によってFPT-INDO法によって行われているが、半経験的な方法では、この効果の評価はあまり成功していない。そこで本研究ではより信頼性の高い*ab initio* Gauge Invariant Atomic Orbitals(GIAO)-Coupled Hartree-Fock(CHF)法³⁾を用いて遮蔽定数を評価した。また、これまでの研究において用いられているモデルはn-ブタンであるため、末端基はメチル基であるが、環状炭化水素やポリマーは末端基の影響は無いため、本研究では末端基の影響が無視できる程度の大きさのモデル炭化水素を用いて二面角を変化させ、*ab initio* GIAO-CHF法を用いて γ -gauche効果を評価した。その際、用いたモデルの幾何パラメータは各二面角に対して構造最適化を行った。

 γ -gauche効果、遮蔽定数、GIAO-CHF、*ab initio* MO

くろす ひろみち あんどう いさお Graham A. Webb

2. 計算

モデル化合物の構造最適化は4-31G基底を用いて行った。遮蔽定数計算は4-31G基底を用いた*ab initio* MO・GIAO-CHF法により評価した。なお計算はロンドン大学計算機センターのConvexコンピュータ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. 結果および考察

環状炭化水素やポリマーにおける γ -gauche効果を考える場合、 γ 炭素に対する末端基の影響を排除する必要がある。末端基の効果が無視できれば、中央の2つの炭素の遮蔽定数とその両側の炭素の遮蔽定数は等しいと考えられる。そのため、末端基が γ 炭素の化学シフトに及ぼす影響を評価するため、n-ヘキサンとn-オクタンのall-transモデルについて遮蔽定数を計算した。中央の炭素とその隣の炭素の遮蔽定数の差はn-ヘキサンで9.0ppm, n-オクタンで1.1ppmであった。これより、末端基の影響の十分小さいn-オクタンをモデル化合物として用いれば良いことが分かる。

二面角の変化に対する γ 位の炭素の遮蔽定数の変化を評価するため、n-オクタンの中央の二面角(phi)を20度ずつ変化させて計算を行った。結合長, 結合角は二面角の変化とともに変化することが考えられるので、n-オクタンについて図1に示した結合長と結合角をそれぞれの二面角に対して4-31G基底を用いて構造最適化を行った。その結果を全エネルギーと

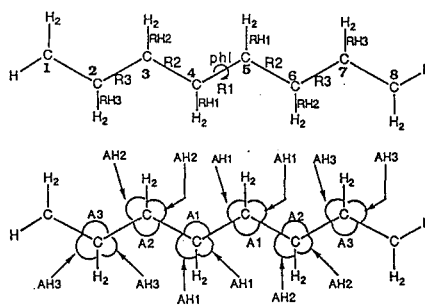


Fig.1 Schematic representation of optimized parameters of n-octane.

Table 1 Optimized Geometrical Parameters of Octane

Phi deg	R1 Å	R2 Å	R3 Å	A1 deg	A2 deg	A3 deg	RH1 Å	RH2 Å	RH3 Å	AH1 deg	AH2 deg	AH3 deg
0	1.5592	1.5352	1.5307	117.26	112.10	112.86	1.0854	1.0851	1.0861	108.31	109.48	109.32
20	1.5535	1.5346	1.5308	116.79	112.21	112.86	1.0858	1.0855	1.0861	108.41	109.46	109.32
40	1.5421	1.5336	1.5309	116.07	112.40	112.86	1.0867	1.0858	1.0861	108.56	109.41	109.32
60	1.5357	1.5336	1.5310	115.12	112.65	112.87	1.0871	1.0860	1.0861	108.78	109.36	109.32
80	1.5377	1.5330	1.5308	113.87	113.04	112.88	1.0866	1.0866	1.0862	109.10	109.28	109.31
100	1.5451	1.5319	1.5307	113.40	113.27	112.88	1.0859	1.0871	1.0862	109.26	109.23	109.32
120	1.5489	1.5313	1.5307	113.42	113.31	112.87	1.0857	1.0873	1.0862	109.28	109.22	109.32
140	1.5445	1.5312	1.5308	113.39	113.29	112.86	1.0861	1.0872	1.0862	109.27	109.23	109.32
160	1.5359	1.5316	1.5310	113.25	113.24	112.86	1.0866	1.0871	1.0861	109.26	109.24	109.32
180	1.5316	1.5318	1.5311	113.17	113.22	112.86	1.0869	1.0870	1.0861	109.25	109.24	109.32

共に表1に示した。二面角の変化に対してA1 ($C_3C_4C_5$)が最も大きく変化し、 $\text{phi}=0^\circ$ から $\text{phi}=100^\circ$ までA1は減少し、これ以降はほぼ変化はない。トランス($\text{phi}=180$)とシス($\text{phi}=0$)との差は約 4° である。ゴーシュ($\text{phi}=60$)付近の変化が大きいことがわかる。

構造最適化した幾何パラメータを用いて遮蔽定数を計算した結果を表2および図2に示す。これより、 σ_{C1} および σ_{C2} はほとんど二面角依存性を示さない。一方、 σ_{C3} と σ_{C4} は大きな二面角依存性を示している。図3に σ_{C3} とトランス($\text{phi}=180$)をとったときの遮蔽定数 $\sigma_{C3}(180)$ との差を示した。図3が γ 効果を表しており、 180° から約

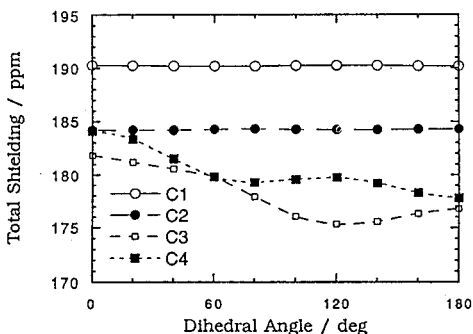


Fig.2 The calculated shielding constants on dihedral angle.

Table 2 Calculated Shielding Constants of Octane (in ppm)

Phi/deg	σ_1			σ_2			σ_3			σ_4		
	dia ¹⁾	para ²⁾	total	dia ¹⁾	para ²⁾	total	dia ¹⁾	para ²⁾	total	dia ¹⁾	para ²⁾	total
0	245.7	-55.4	190.3	240.3	-56.1	184.2	240.9	-59.1	181.8	240.0	-55.9	184.1
20	245.6	-55.4	190.2	240.2	-56.0	184.2	241.0	-59.8	181.2	239.8	-56.5	183.3
40	245.6	-55.4	190.2	240.2	-56.0	184.2	240.9	-60.3	180.6	239.6	-58.1	181.5
60	245.6	-55.4	190.2	240.2	-55.9	184.3	240.8	-61.0	179.8	239.6	-59.8	179.8
80	245.6	-55.4	190.2	240.2	-55.9	184.3	240.7	-62.8	177.9	240.0	-60.7	179.3
100	245.7	-55.5	190.2	240.5	-56.2	184.3	240.9	-64.8	176.1	240.3	-60.7	179.6
120	245.9	-55.6	190.3	240.6	-56.4	184.2	241.1	-65.8	175.3	240.6	-60.8	179.8
140	246.1	-55.8	190.3	240.8	-56.6	184.2	241.6	-66.0	175.6	240.7	-61.5	179.2
160	246.2	-56.0	190.2	241.0	-56.7	184.3	242.0	-65.7	176.3	241.0	-62.7	178.3
180	246.3	-56.1	190.2	241.0	-56.7	184.3	242.3	-65.5	176.8	241.1	-63.3	177.8

1) diamagnetic shielding, 2) paramagnetic shielding

90° までは低磁場シフトし、約 90° から 0° (シス) までは高磁場シフトしている。シスをとるとトランスに比べ約5 ppm高磁場にシフトすることがわかる。 $\text{phi}=60$ の 때가 γ -gauche効果であり、約3 ppmである。これは実測の約5 ppmに比べて小さいが、半経験的な方法に比べより良く再現されている。これにより、 γ -gauche効果の存在が理論的に支持された。

図4に σ_{C4} とトランス($\text{phi}=180$)をとったときの遮蔽定数 $\sigma_{C4}(180)$ との差を示した。 $\text{phi}=60$ ではトランスとの差は約2 ppmの高磁場シフトであることが分かる。この図から σ_{C3} (γ 炭素)のみならず、 σ_{C4} (α, β 炭素)もゴ

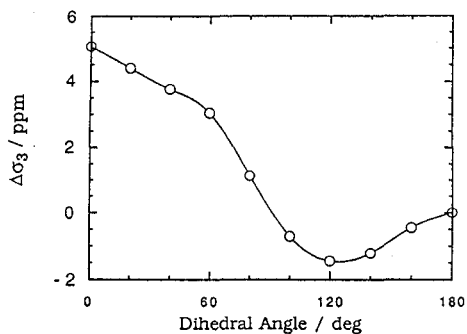


Fig.3 Plot of shielding constant difference of C3 carbon ($\sigma - \sigma (180)$).

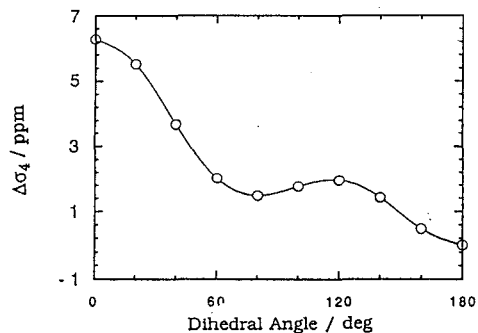


Fig.4 Plot of shielding constant difference of C4 carbon ($\sigma - \sigma (180)$).

ーシユ位をとることによって高磁場シフトし、その大きさは γ 位のシフトより小さいことが予想される。この効果はvicinal gauche効果⁴⁾として知られているもので、実測を再現している。

ab initio MOを用いた遮蔽定数等の理論計算は、信頼性の高さからその重要性がますます高まってきている。今後、計算機の能力の進歩に伴い、より大きな分子も扱えるようになり有力な方法となるものと思われる。

文献

1. K.Takaishi, I.Ando, M.Kondo, R.Chujo and A.Nishioka, Bull.Chem.Soc.Jpn., 47, 1559 (1974).
2. K.Seidman and G.E.Maciel, J.Am.Chem.Soc., 99, 659 (1977).
3. K.Wolinski, J.Hinton and P.Pulay, J.Am.Chem.Soc., 112, 8251 (1990).
4. F.A.L.Anet and A.K.Cheng, J.Am.Chem.Soc., 97, 2420 (1975).

L 2

HMBC法の新しい応用測定

HMBC-COSY、HMBC-HOHAHA について

東大農、東大応微研 ○降旗一夫、瀬戸治男

HMBC-COSY and HMBC-HOHAHA, new application of HMBC method

Kazuo Furihata and Haruo Seto

Faculty of Agriculture, University of Tokyo

Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo

Two new NMR techniques, HMBC-COSY and HMBC-HOHAHA, which are combinations of HMBC and COSY, or HMBC and HOHAHA pulse sequences, are proposed. These methods enable to reveal complicated and/or overlapped proton spin systems, which are often difficult to analyze by conventional techniques including HMBC. Their applications to structural studies of complicated natural products showed several advantages of these techniques over the HMBC method.

天然有機化合物の構造研究においてHMBC法は非常に重要な位置を占めている。本方法は2ないし3結合離れたプロトンと炭素の結合関係を明らかにすることができるが、両者の相関ピークを如何に効率良く観測するかが、構造決定の迅速さを左右する。HMBC法の問題点は、ある予想されるスピン結合定数を考慮して、それと対応したスピン展開時間を設定しなければならないことである。そのため、そのスピン展開時間に適合しないプロトンは観測されない。また、観測するプロトンが多数のプロトンとスピン結合してブロードなシグナルとなっている場合、あるいは炭素とのスピン結合定数が小さい場合は、観測がしばしば困難となる。このHMBC法と同じようなマルチボンド結合を明らかにする方法として、既にHMQC-COSY、HMQC-HOHAHA法が報告されている。しかしこのHMQC法を利用した方法の最大の弱点は、4級炭素との結合の関係を明らかにすることができないことである。

我々はこの問題を解決し、HMBC法で検出しにくいシグナルを効率良く検出するために、HMQC-COSY、HMQC-HOHAHA法をHMBC法に応用し、良好な結果を得たので報告する。

[方法]

HMBC-COSY、HMBC-HOHAHA法の原理はHMQC-COSY、HMQC-HOHAHA法と同一である。この方法のポイントは、HMBC法で観測されるlong-range CH結合を有するプロトンシグナルを、COSY展開、あるいはHOHAHA展開することにある(図1)。

HMBC-COSY、HMBC-HOHAHA

ふりはた かずお、せと はるお

HMBC-COSY、HMBC-HOHAHA法はHMBC法で検出する2ないし3結合離れたプロトンと炭素間の関係に加え、HMQC法で検出する炭素に直接結合したプロトンとの関係も利用する。

我々が使用したdecouplingタイプのHMBC(HMBC-D)法では、図1aに示すように C_A の炭素と H_A 、 H_B 、 H_C の三個のプロトン間の関係が観測される。HMBC-COSY法では、この三個のプロトンを同時にCOSY展開する。その結果、 H_A からは $H_A \rightarrow H_B$ 、 H_B からは $H_A \leftarrow H_B \rightarrow H_C$ 、 H_C からは $H_B \leftarrow H_C \rightarrow H_D$ の磁化移動が生じ、更に $H_D \rightarrow H_C$ の磁化移動も生じる。逆に H_A に注目してみると、 H_A は C_A 、 C_B 、 C_C とスピン結合している。このプロトン H_A の磁化を H_B に移動させると、 H_A で観測される三個の炭素との関係が H_B において検出される。またHMBC法において、 H_B について観測される炭素とのクロスピークも、 $H_A \leftarrow H_B \rightarrow H_C$ の磁化移動により H_A 及び H_C で観測される。

H_A と H_B との間のスピン結合が弱く磁化移動が生じにくい場合、HMQC-COSY、HMBC-HOHAHA法では $H_A \rightarrow H_B$ の結合を明らかにすることはできないが、HMBC-COSY法ではHMBC法による $C_A \rightarrow H_A$ 、 $C_A \rightarrow H_B$ 、 $C_A \rightarrow H_C$ の関係が保持されているため、 $H_A \rightarrow H_B \rightarrow H_C$ のクロスピークを検出することができる。また逆に、 C_A と H_B のlong-range CH結合が弱く、HMBC法からは $C_A \rightarrow H_B$ の関係を明らかにすることができない場合にも、 H_A と H_B の間のスピン結合を利用して $H_A \rightarrow H_B \rightarrow H_C$ の関係を明らかにすることができる。

また4級炭素で切断されたスピン系においても、4級炭素とスピン結合したプロトンがCOSY展開するため、4級炭素を含んだスピン系の抽出が可能となる。

HMBC-HOHAHA法はHMBC-COSY法と基本的な考え方は同じであるが、HMBC法で検出されたプロトン H_A 、 H_B 、 H_C の3個がHOHAHA展開を受け、in-phaseでHMBC-COSY法よりも遠隔磁化移動する。この場合もHMQC-HOHAHAでは検出が困難な弱いスピン結合をしたスピン系あるいは4級炭素を含んだスピン系に対しても良好な結果を与える。

[パルス系列]

HMBC-COSY、HMBC-HOHAHA法(図2)は、HMQC-COSY、HMQC-HOHAHAのパルス系列をそのまま使用するが、遠隔スピン結合の観測に応用する場合、最も基本的なHMQC-COSY、HMQC-HOHAHAのパルス系列がシグナル感度の点で優れている。 ^{13}C に直接結合したプロトンも観測に利用するため、HMBC法で使用されたlow-pass-J-filterは使用せず、HMQ

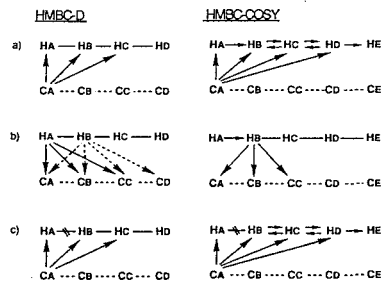


図1. HMBC-COSY法の磁化移動の原理。
a). b). HMBC-D (左)、HMBC-COSY (右)
c). H_A - H_B のスピン結合が弱い場合
d). C_A - H_B のスピン結合が弱い場合

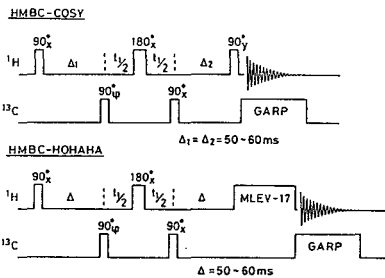


図2. パルス系列。
a). HMBC-COSY、b). HMBC-HOHAHA

C法と同様シグナル取得の段階で広帯域ヘテロデカップリングを行う。本方法では、炭素の全領域(0-220 ppm)をカバーするデカップリングの採用が望ましい。

[結果]

α -サントニン

図3に α -サントニンのHMBC-D及びHMBC-COSYのスペクトルを示す。 α -サントニンのHMBC-Dスペクトルにおいて、3位の4級炭素については1位と14位のプロトンから3結合離れたクロスピークが観測されるが、2結合離れた2位のプロトンからのクロスピークは検出されない。これは $^2J_{CH}$ が小さく、スピン展開時間 Δ_1 がスピン結合定数に適合していないためである。一方、HMBC-COSYスペクトルでは、3位の4級炭素については1位と14位のプロトンに加え、新たに2位及び6位のプロトンからのクロスピークも検出される。2位のプロトンとのクロスピークは、HMBC法による $C_3 \rightarrow H_1$ の磁化が $H_1 \rightarrow H_2$ の磁化移動により生じたものである。このクロスピークにより C_3 と H_1 、 H_2 の関係が明確になる。また6位のプロトンは3位の炭素と4結合離れた位置にあるにも拘らずクロスピークが観測される。これは H_{14} の磁化が H_6 とのホモアリアルカップリングによって H_6 に移動したためである。

ポートミシン

HMBC-COSY法では、long-range J_{CH} のスピン展開時間 Δ_1 とプロトン-プロトン J_{HH} のCOSY-展開時間 Δ_2 を設定するので、COSY展開時間の設定値によってデータの質が決定される。またシグナル取得の段階でデカップリングを行うため、 J_{CH} によって分裂したスピンの再結像するタイミングを考慮しなければならない($\Delta_2 = 2n + 1\Delta_1$, $n = 0, 1, 2, \dots$ に設定する)。HMBC法は、long-range J_{CH} の観測を目的とした測定法であり、スピン展開時間として50-60msecの値が比較的多用されている。プロトン-プロトンのrelayed-COSY実験でも、50-60msecのrelax time値は良好な結果を与えることが多い。この50-60msecの値をHMBC-COSY法のスピン展開時間及び、COSY展開時間として設定することにより、ポートミシンでは極めて良好な結果が得られた。

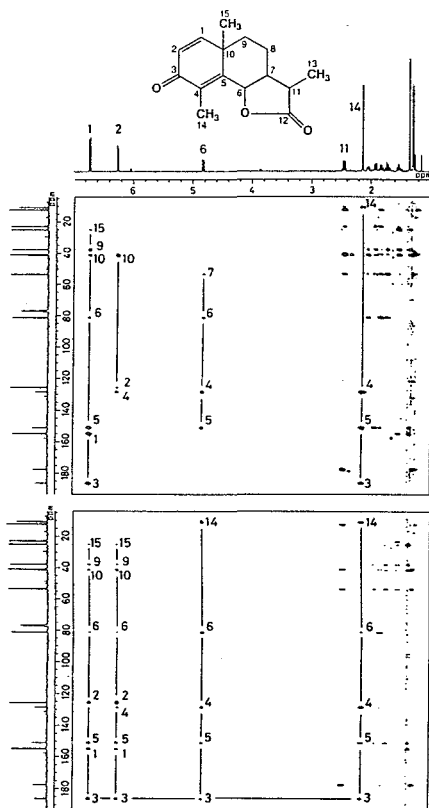


図3. α -サントニン
 a).HMBC-D スペクトル。
 $t_1 \times t_2 = 256 \times 512$ point
 $f_1 \times f_2 = 23800 \times 3000$ Hz
 times=128, PD=1.3ms $\Delta=60$ ms
 t_1 -noise 処理 absolute-mode
 b).HMBC-COSY スペクトル。
 times=2 x 64, PD=1.3ms $\Delta^1=60$ ms, $\Delta^2=60$ ms
 t_1 -noise 処理、half-absorption-mode

図4bに $\Delta_1 = \Delta_2 = 110\text{msec}$ に設定したHMBC-COSYスペクトルを示す。ポートミシンのようなメチル基の多い化合物においては、メチル基を有した $-\text{CHa}-\text{CHb}(\text{CH}_3)-\text{CHc}-$ というスピン系の迅速な解析が求められる。メチル基の領域が複雑に重なって、メチル基からのクロスピークの解析が困難となる場合、比較的分離の良いメチル基の付け根のプロトン(CHb)を積極的に利用することが望ましい。HMBC-COSY法において $\Delta_1 = \Delta_2 = 110\text{msec}$ に設定した時、メチル基の三個のプロトンの磁化が付け根のメチンプロトンに移動する。このメチンプロトンを利用して、メチル基を有したスピン系の解析を容易に行うことができる。例えば図4bに示すように6位、8位、22位等のメチル基の付け根のメチンプロトンのクロスピークが明確に観測される。

図4cはHMBC-HOHAHAスペクトルである。HMBC-HOHAHA法は炭素と1、2、3結合離れたプロトンを全てHOHAHA展開する。HMBC法では18-Meに対して17、18、19の炭素とのクロスピークが観測されるのに対して、本方法では更に20、21位の4及び5結合離れた炭素とのクロスピークが検出された。22-Meに対しても、同様に21、22、23に加え、24と24-Meの炭素によるクロスピークが観測された。これらのクロスピークは22-Meの結合した5員環を構成する全ての炭素に由来するものである。またHMBC法では検出しにくい18位のプロトンが、HMBC-HOHAHA法では検出されていることがわかる。HMBC法では、複雑に分裂したブロードなプロトンについてはクロスピークの観測が困難な場合が多いが、HMBC-COSY、HMBC-HOHAHA法ではこのような問題は生じにくく、感度の優れた測定方法であると考えられる。

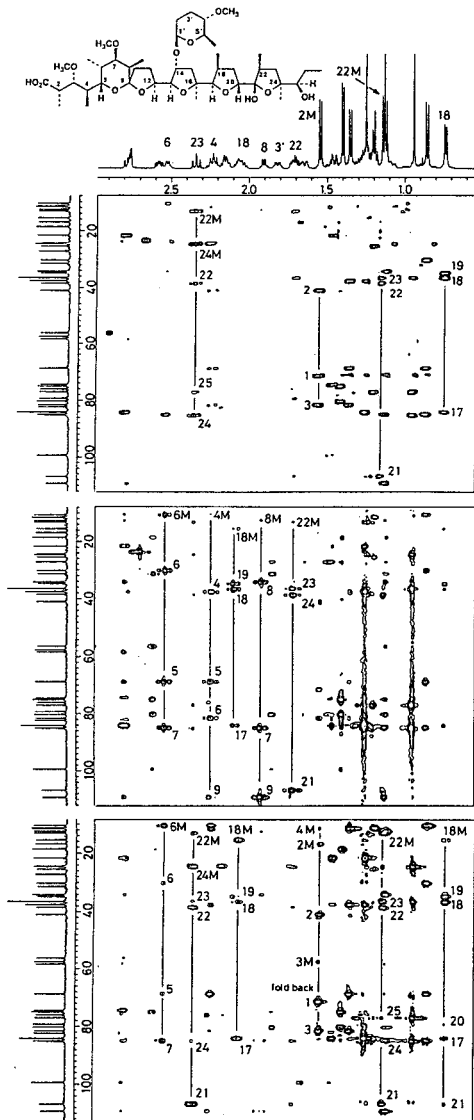


図4. ポートミシン
a). HMBCスペクトル。
 $t_1 \times t_2 = 140 \times 512$ point
 $f_1 \times f_2 = 13000 \times 2500\text{Hz}$
times=2 x 64 PD=1ms $\Delta=60\text{ms}$
sine-bell-window処理、
 t_1 -noise処理、absolute-mode.
b). HMBC-COSYスペクトル。
 $\Delta_1 = \Delta_2 = 110\text{ms}$
no- t_1 -noise処理、half-absorption-mode
c). HMBC-HOHAHAスペクトル。
 $\Delta_1 = 60\text{ms}$, mixing time=25ms
half-absorption-mode

L 3 構造情報 H~H Coupling が無力な系のNMR構造解析 : Thielocins について

(シオノギ研) ○ 照井 彬弘 , 松谷 茂 , 吉田 正

NMR STRUCTURE ANALYSIS WITHOUT H-H COUPLING : ON THE THIELOCINS

(Shionogi Research Laboratories) Y. Terui, S. Matsutani and T. Yoshida

There are special organic molecules exhibiting no useful H-H coupling for structure analysis. Thielocin analogues were the molecule of this kind in spite of the molecular weight near 1000. The method we used to reveal the structures is a combination of H-C and NOE correlation data. At first, partial structures (fragments) were determined using the method. Next, sequence of the parts was determined using the NOE data. The shown structures were clarified. Interesting isomerisms were found in the solution of these.

[序] 世の中には面白い物質が在るもので、カビの一種が生産し強力なPhospholipase A2 阻害活性を示すThielocin analogues¹は分子量1000 近辺のC,H,O より成る有機物にもかかわらず、構造解析上有用なH-H スピン結合情報が全く無い物質であった。また ¹H, ¹³C signals とともに一部が同一δで重なったり、異性現象の関与が状況をより複雑にしたりで、構造解析上何かと不都合の多い物質であったが、X線で構造解が得られなかったためNMRで攻めざるをえなかった。特殊制約下での構造解明プロセスや、そこで見られた異性現象について報告する。

[Thielocin A1 (α and β)] . A1 は MS, NMR より C₅₄H₆₀O₁₈ と判明したが、溶液中で相互変換する2種の構造(α and β)をとりうる酸性物質であった。両者は単離も可能で、溶媒と測定時間の選択のかねあいをうまくやればほぼ単一状態のデータが得られるが、¹H, ¹³C signals とともに一部重なるため構造組立て上曖昧性を生じ、本体の解析のみで完全解は得られない。メチル化により中性のジメチルエステル(DME)となるが、その他にもエステル結合らしき¹³C signalsを元来有するのでアルカリ分解を行ったところ、問題解決上有用な分解物類 (Fig.1) が得られた。

<Key word> Thielocins, structure, isomerism, H-C correlation, NOE

てるい よしひろ, まつたに しげる, よしだ ただし

分解物類もH-H couplingから攻め得る手がかりは全くないが、小サイズであることとsignalの重なりが解消される事によりH-C 相関とNOE 相関の組み合わせから比較的楽に構造と帰属を解明しえた。これらのNMRデータと親物質のそれとの比較から、fragmentの部分構造がそのまま採用可能の箇所と、未解決の箇所とのNMR signalsの振り分けが可能となり、後者をその構成 signalsで構築すればよい状況に追い込む事ができた。

そこで親物質の直結および遠隔のH-C相関(Fig.2)とNOE相関(Fig.3)を詳細に検討し、分解反応結果を考察に加味することより Fig.4 (a)に示す平面構造式に到達できた。 α, β 相互変換はketal性水酸基のエピ化であった。この構造には不整炭素が3個あるが、その相対配置はAl α の架橋誘導体分解物(OED)のNOE解析(Fig.4 (b))で明らかにされ、後にX線で確認が取れた。

Fig. 1 Products from alkaline hydrolysis or methanolysis (R = H or Me).

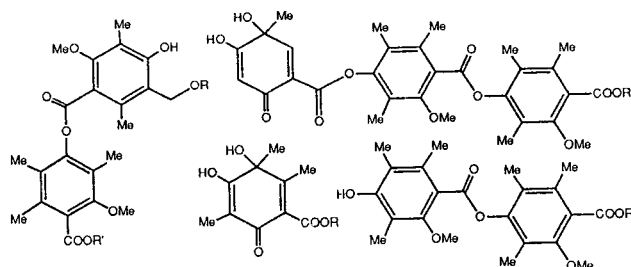


Fig. 2 HETCOR spectrum of Al α -DME (in CDCL₃).

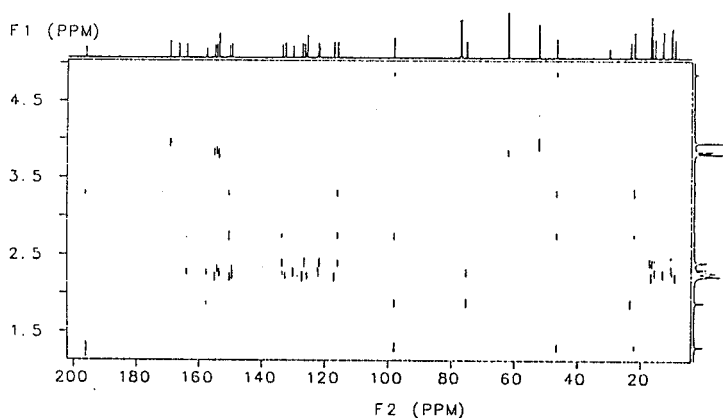
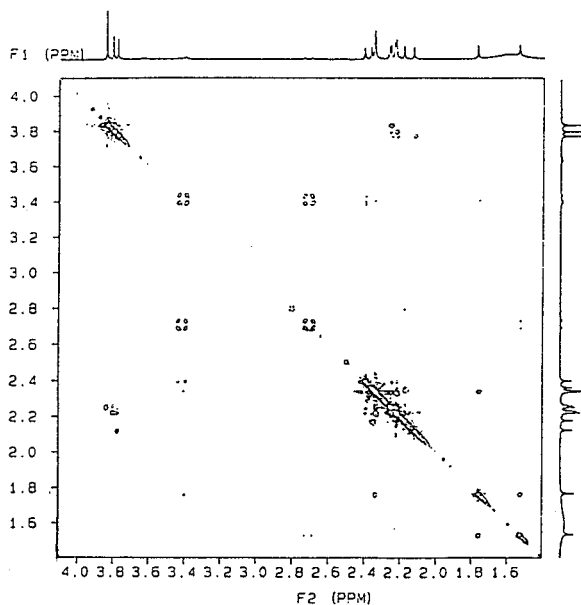


Fig. 3 ROESY spectrum of Al β (in CDCL₃).



[Thielocin B1] .

B1はNMR解析で全体の推定構造が出され、アルカリ分解産物からその確証が得られた。この物質も2種の構造に相当するNMR挙動を示したが、昇温すれば1種となり降温すれば元に戻り、それぞれの単離は不能である。

A1と共通の構造部に相当する signalsも認められるが、A1と異なりメチル基以外に飽和系の炭素は無く、中央部の構造が違っている事が示された。そこに焦点を絞り、H-C 相関とNOE相関で B1およびそのメチル化物 (TMD) の構造組立を行ったところ、Fig.5 に示す構造式に導かれた。

アルカリ分解で中央部に相当するエーテル結合の2環性分解物が得られ、確認が取れた。2種に別れるNMR上の非等価現象はB環とD環に集中して見られるので、回転異性における環境差の反映と考えれば納得がいく。

Fig. 4 Structure of A1 .

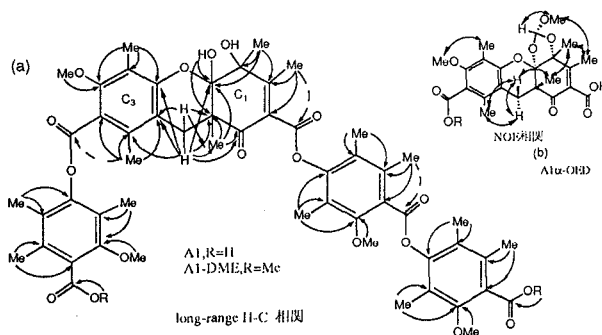


Fig. 5 Structure of B1

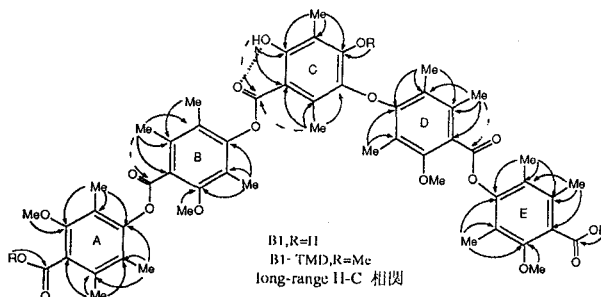


Fig. 6 H1 spectra of B1 (in CDCl3):

(a) at 23°C . (b) at 57°C .

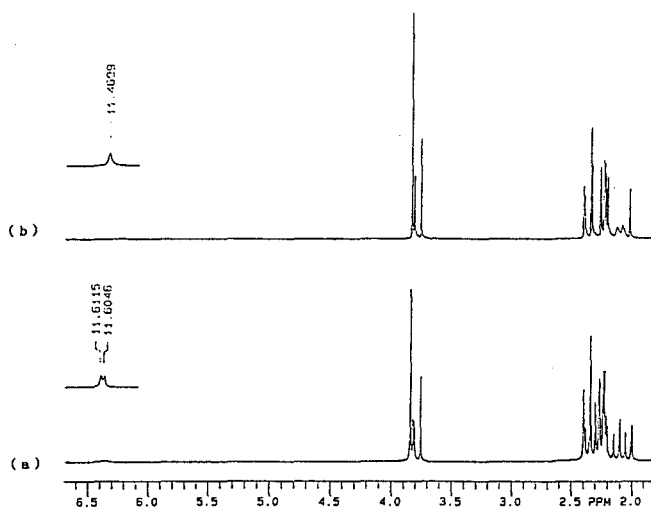


Fig.6 に B1の¹H 温度変化図を, Fig.7 にメチル化物のHETCOR図を示した。

[Thielocin B2] .

B2も同様に本体と分解物のNMR解析から, Fig.8 に示す構造と解明された。

その一部は B1 と同様の回転異性を示すが, 他に多置換 biphenyl 部と carbonate 連結部で連なる芳香核に別の回転異性があり, これがややこしいNMR挙動を誘発し, 常温下で一部の signalsが極端な broadening のため消えており, 構造解析の難度を増す要因となっていた。

¹H 温度変化状況の一部を Fig.9 に示した。なお, 上に記載のNMRデータは全てXL-400型NMR装置で測定された。

[謝辞] . MSとX線の情報提供者, 中川有造, 佐藤友宏 両博士に感謝する。

[REFERENCE] . 1. T. Yoshida et al, J. Antibiot., 36, 599, 1991

Fig. 7 HETCOR spectrum of B1-TMD (in CDCl₃).

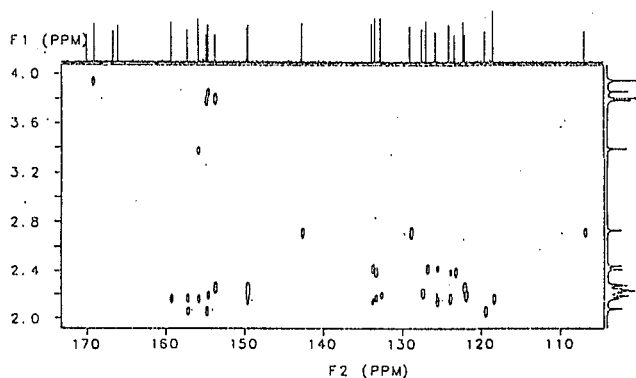


Fig. 8 Structure of B2 .

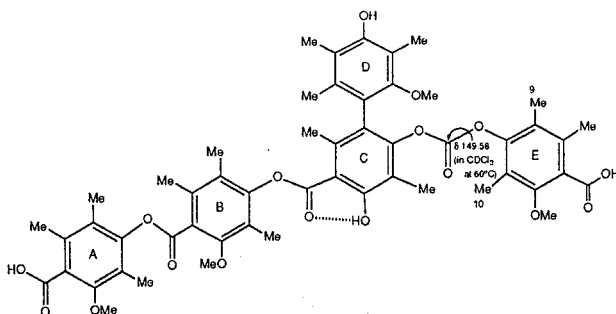
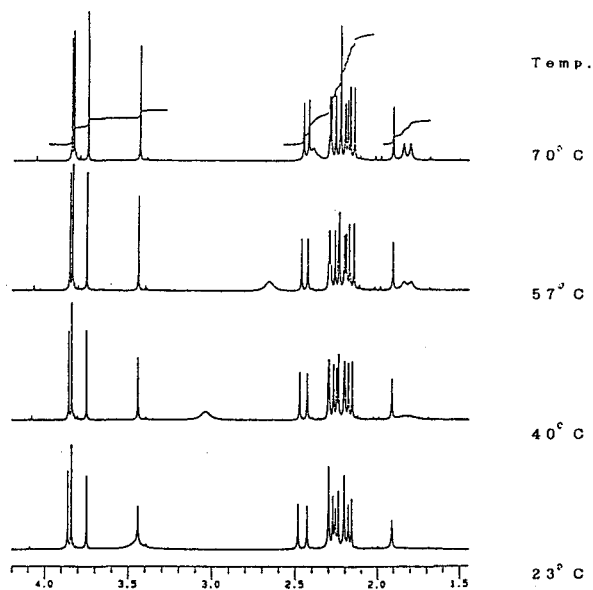


Fig. 9 ¹H spectra of B2 (in CDCl₃-CD₃OD (40:1)).



L 4 トランジェント・ニューテーション信号を用いたイメージング

(電子技術総合研究所) ○亀井 裕孟, 片山 義朗

NMR Imaging Using Transient Nutations

Hirotake Kamei and Yoshiro Katayama

Electrotechnical Laboratory

A pure rotating-frame imaging method is described which uses transient nutations as signals for imaging. The characteristics of a imaging system are demonstrated by proton density and chemical shift imaging experiments.

1.はじめに

スペクトロスコピック・イメージングや顕微イメージング (NMR 顕微鏡)では, 臨床医学で時実用化されている通常のMRI に比べ小さな強度の信号を取り扱う. このため, 高い空間分解能とS/N を得るためには, 磁場勾配の応答時間等による信号損失をできるだけ小さくする必要がある. そこで, 信号損失の少ないイメージング法として Transient Nutation Imaging法を開発した.

現在行われている通常のNMR イメージングはパルスの大きな高周波磁場 (回転磁場) を印加し, 高周波磁場のない状態で信号 (FID, エコー) を観測している. また, 回転系zeugmatographyも高周波磁場勾配を用いて位置情報をエンコードする以外は同様である. これに対し今回開発した純回転系イメージング法であるTransient Nutation Imagingでは, 高周波磁場の存在下で信号を観測する. このため通常のパルスNMR に比べ信号の観測や解析にやや面倒な点はあるが, つぎのような利点がある. 1)照射時間は通常のイメージング法に比べ長い, 小さな高周波磁場で信号を観測するので, 照射電力(積分値)は最大でも通常のイメージングと同程度, 一般に1/10程度である. 2)高周波磁場勾配を用いるので, 勾配の高速on/offが可能であるとともに生体に対する渦電流の影響も少ない. 3)信号減衰の時定数が $1/T_0 = (1/T_1 + 1/T_2)/2$ であるので, 生体系のように T_1 に比べ T_2 が比較的短い系ではFID に比べ信号の検出が若干有利である. 一方, 欠点としてはあまり大きな回転磁場を用いることが難しいので, 広い周波数範囲でのスペクトロスコピック・イメージングへの適用が難しい点がある.

transient nutations, rotating-frame NMR imaging, MRI, CSI

かめい ひろたけ, かたやま よしろう

2. 装置・測定

試作したシステムのブロック図を図1に示す。静磁場にはジャパンマグネトテクノロジー社のJMT-B2.0/310型超伝導磁石(横型)を用いた。磁束密度は2T、観測周波数は85.5MHzである。パルス列繰り返し制御はWavetek 75で行い、パルス列はMicro-11でプログラムして発生させている。周波数シンセサイザーはAnritsu MG3633Aを、平衡変調器にはHP-10514Aを使用している。画像再構成および画像処理にはSPARC-3300を使用している。信号の検出には試作したAnderson型非対称ブリッジ(図2)を用いた。Anderson型ブリッジは過渡応答特性が悪いため、パルスNMRには一般に不向きであるが、取り扱いが容易である点を考慮して、ここではこれを使用した。静磁場をz軸としたとき、x軸に励起・信号検出用コイルを、y軸にMaxwell型の位相エンコード用高

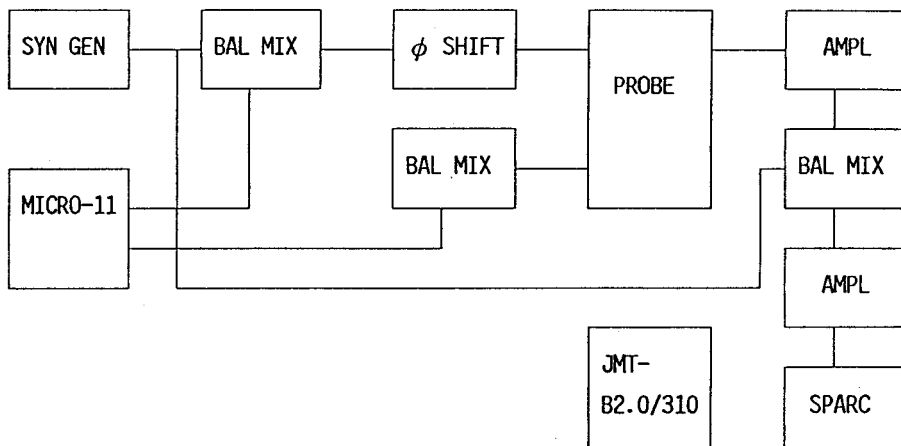


図1. Transient nutation imaging システムのブロック図.

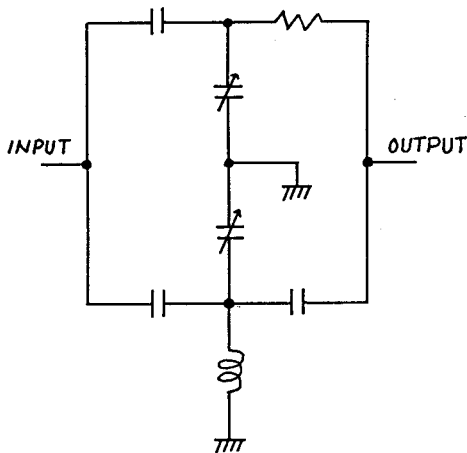


図2. Anderson型ブリッジ.

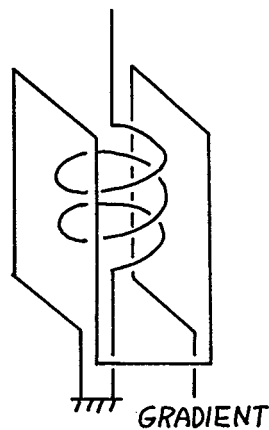


図3. コイル模式図.

周波磁場勾配コイルをセットした。コイルの模式図を図3に示す。

Maxwell 型高周波磁場勾配コイルの発生する高周波磁場は中心面で位相が反転しているの、従来の非対称Helmholtz型コイルあるいは表面コイル型高周波磁場勾配コイルに比べ、効率よく位置情報をエンコードすることが可能である。高周波磁場勾配コイルと検出コイルとの間の相互結合は位置情報や信号強度の曖昧さなどをもたらす。本システムの場合、相互結合は 3×10^{-3} 以下であり、両者間の相互結合が信号に与える影響は殆ど無視することができる。勾配高周波パルスの照射時間を系統的に変化させることによって、Transient Nutation信号にy 軸方向の位置情報をエンコードしている。使用したパルス列を図4に示す。観測用高周波磁場の大きさは $0.9 \sim 10 \mu\text{T}$ である。

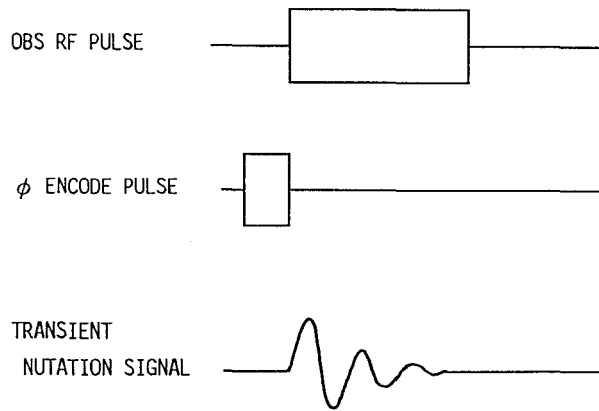


図4. パルス列と信号.

3. 結果

静磁場均一度、共鳴周波数のずれ等が同一のときの FID 信号と Transient nutation 信号の例をそれぞれ図5a および図5bに示す。観測高周波磁場の均一度が良好であることが判る。また、装置の性能評価の目安として回転系エコー信号を図6に示す。試料はいずれも常磁性イオンをドーブした水である。

外壁を接した外径5mm および10

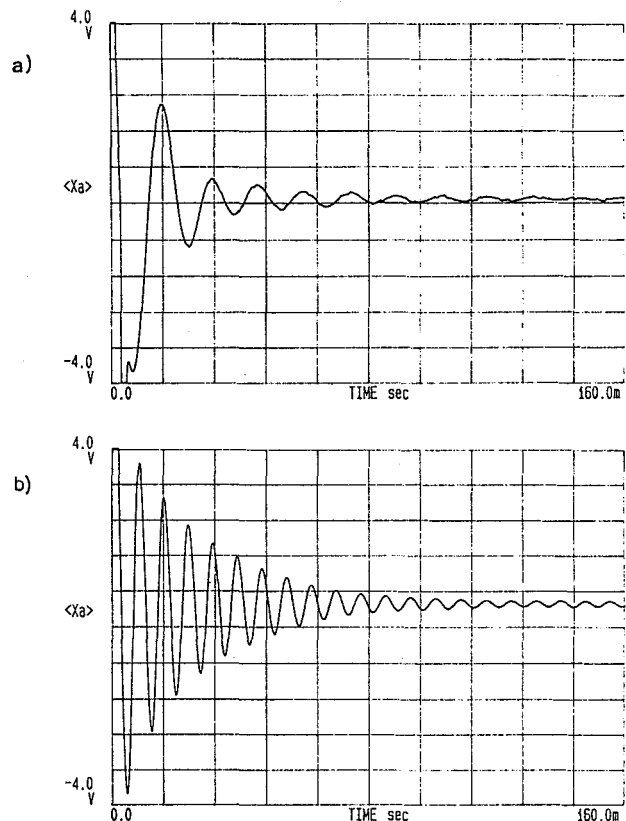


図5. FID と transient nutations.

mmの試料管中の水のプロトン密度像を図7に示す。位置情報エンコード回数は32回である。x軸勾配は非対称Helmholtz型コイルによって発生させている。

外壁間隔10mmで置かれた2本の外径5mmのNMR試料管中の水（左下方）とシクロヘキサン（右上方）のプロトンの化学シフト像を図8に示す。横軸は化学シフト，縦軸は位置を示している。位置情報エンコード回数は64回である。

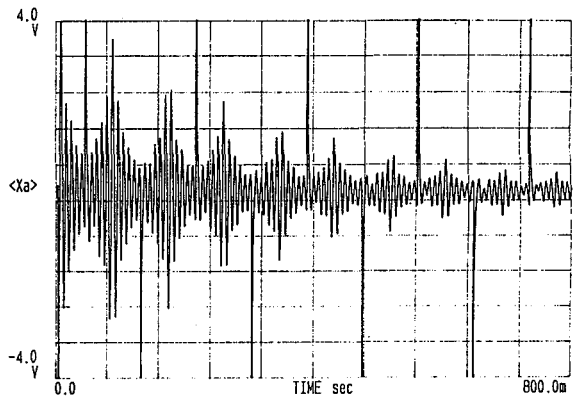


図6. 回転エコー信号.

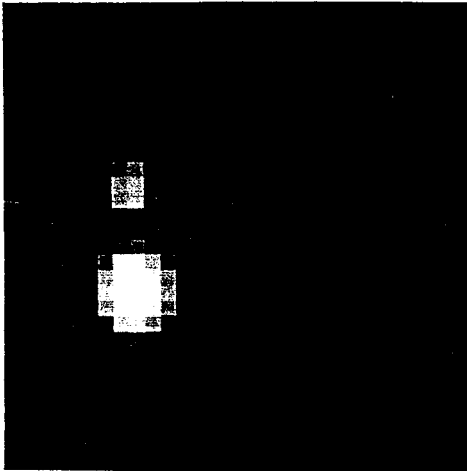


図7. 外壁を接した5mm および10mmの試料管中の水のプロトン密度像.

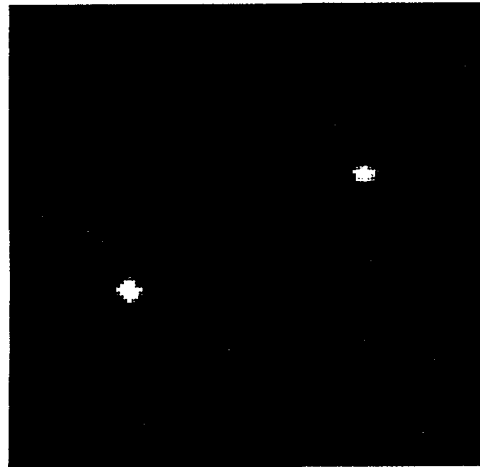


図8. 外壁間隔10mmで置かれた2本の5mm 試料管中の水とシクロヘキサンのプロトン化学シフト像。横軸：周波数，縦軸：位置。

今回は二次元イメージングについて報告する。現在、三次元および四次元イメージングへの展開を進めている。

L 5

^1H -検出によるラット脳内 ^{13}C -標識代謝産物の追跡

○ 犬伏俊郎^{1,2}、森川茂広¹、鬼頭幸一³、荒井俊之³

(¹滋賀医大 分子神経、²横河メディカルシステム、³京大医、麻酔)

Indirect detection of ^{13}C -enriched metabolites in rat brain utilizing the sensitivity of ^1H nucleus

Toshiro Inubushi^{1,2}, Sigehiro Morikawa¹, Kouichi Kito³ and Toshiyuki Arai³
(¹Molec. Neurobiol. Res. Centr., Shiga Univ. of Med. Sci., ²Yokogawa Medical System, ³Anesthesiology, Sch. of Med., Kyoto Univ.)

The metabolism of 1- ^{13}C -glucose and the distribution of the metabolic products in rat brain were investigated by ^1H -detected approach, a gradient enhanced version of hetero nuclear multiple quantum coherence (GE-HMQC). In order to simplify the ^1H NMR spectra bearing a narrow range of chemical shift, frequency selective DANTE ^{13}C pulses were employed in the sequence. The incorporation of ^{13}C -labeled glucose into rat brain reached the maximum in approximately 30 min and then decreased rapidly. However, the level of 3-/4- ^{13}C -glutamine/glutamate was high for 2 - 3 hr, even after the decay of the glucose. In this period chemical shift imagings were achieved to obtain the distribution of ^{13}C -labeled metabolites.

【緒言】 ^{13}C -核を利用したNMR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。そこで、昨年、本討論会で発表した磁場選択法による ^1H -検出-多量子(MQ)相関スペクトロスコピー法を発展させ、ラット脳内のグルコースの代謝産物の追跡とその脳内分布の画像化を試みた。

【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2TCSI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 -化学シフト画像

いぬぶしとしろう もりかわしげひろ、きとうこういち あらいとしゆき

犬伏俊郎、森川茂広、鬼頭幸一、荒井俊之

自作の ^{13}C - ^1H 二重同調の表面コイルを用いた。パルス系列には傾斜磁場パルスを利用した Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (GE-HMQC) 法を用い、 ^{13}C RFパルスには DANTE の周波数選択パルスを採用した。傾斜磁場パルスは 2 ms の幅で、最大 7 G/cm まで負荷した。ラットはハロセン麻酔下、1 g/kg BW の $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose を静脈より投与し、3 時間以内で測定を終了した。

【結果と考察】 一般に生体 ^1H NMR は画像用 NMR 装置が負う低磁場と、その不均一さの制限に加え、 ^1H NMR 特有の化学シフト幅の狭が相まって、スペクトルの分解能は極めて悪い。そこで、 ^{13}C NMR の広い化学シフト幅を利用し、励起する ^{13}C の信号を選択することから ^1H NMR で検出される信号を制限し、そのスペクトルの単純化を達成した。図 1 には、 ^{13}C NMR の 2 つの異なった信号領域から、ラット脳内に取り込まれる ^{13}C -標識グルコースとその代謝産物の ^1H NMR 信号を観測し、それぞれを時間の関数で示している。この図から脳内グルコースは投与後、約 30 分程で最大値に達し、その後漸減するものの、3-/4- ^{13}C -Glx は 1 時間程で最大値に至り、その後 2-3 時間、比較的高値を維持した。この安定な状態で ^{13}C 標識代謝産物の脳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。その結果を図 2 に示す。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、低磁場画像用 NMR によっても比較的大きな動物であれば短時間にその局所化、或いは、画像化も可能なものと考えられる。

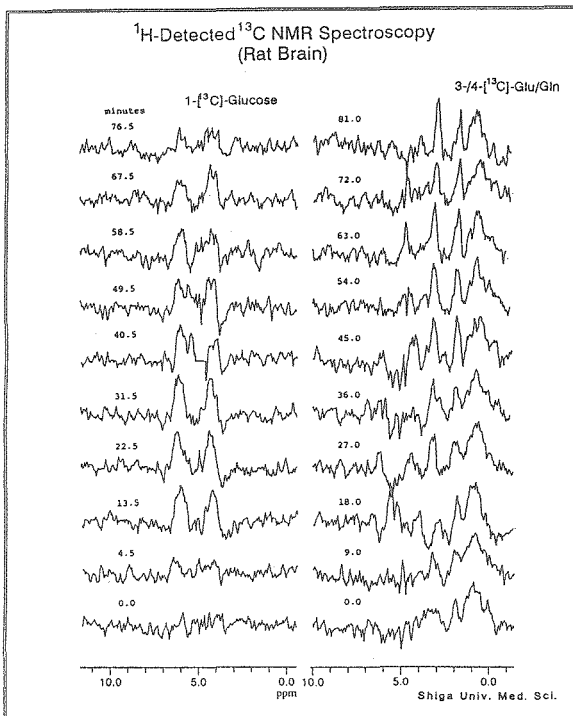


図 1. ^1H - 検出による ^{13}C 代謝産物

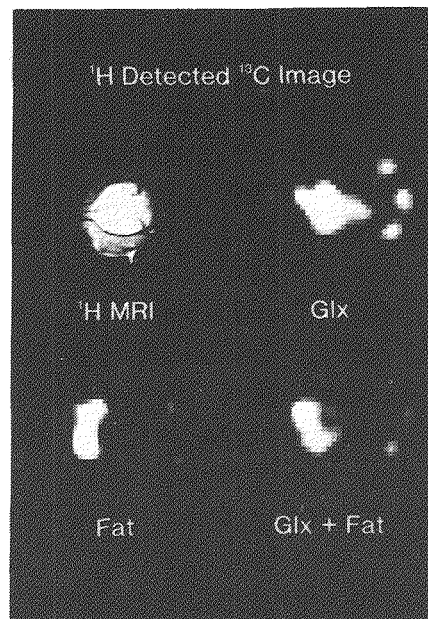


図 2. ^1H - 検出による ^{13}C 画像

L 6 B_1B_0 ハイブリッド磁場勾配を用いる ^1H NMR局在化測定法

(国立環境研究所) 三森文行

Localized ^1H NMR Spectroscopy Using B_1B_0 Hybrid Field Gradient.

Fumiyuki MITSUMORI (National Institute for Environmental Studies)

B_1 -gradient-based ^1H NMR localization spectroscopy (rotating frame imaging technique[1]) was improved by combining with a B_0 -gradient-based method (noise pulse pseudo-saturation). The RFI method with 2D- or 3D-noise pulse enabled us to observe N-acetylaspartate (NAA) and lactate in a rat brain with the spatial resolution up to 0.087ml. The developed method was applied to monitoring the metabolism in a hypoxic rat brain, revealing reversible changes in NAA and lactate in the brain. Noise pulse technique was also shown to be a useful means for localized shimming.

【はじめに】 In vivo NMR分光測定法において、対象の特定部位からの信号を選択的に測定する局在化測定法は極めて必要度が高い基盤技術である。筆者らは第28、29回討論会において、ラジオ波磁場勾配 (B_1 磁場勾配) を用いる ^1H 、さらに ^{13}C NMRスペクトルの1次元局在化法を発表してきた。この方法は静磁場を駆動しないので、渦電流によるスペクトルの乱れがないという利点がある。一方、 B_1 法のみで局在化を2、3次元に拡張するのは検出コイル設計上困難が大きい。本年度は B_1 法に、 B_0 磁場勾配と雑音変調ラジオ波パルスを用いて関心領域外の磁化を疑似飽和させる方法を組み合わせて、局在化の3次元への展開を図った。この結果、 ^1H NMR測定で0.087mlという微小領域での局在化測定が可能になった。この方法を用いて、ラット脳におけるN-アセチルアスパラギン酸(NAA)、乳酸等の消長を追跡できるようになった。

【方法】 1次元のrotating frame imaging局在化測定法 (RFI法) は既報[1]のincrement、位相エンコード、リフォーカスの3パルスよりなるスピネコー検出法を用いた。水信号の抑圧のために上記3パルスはすべて1331パルスで構成した。 B_1 軸と直交する2次元方向に B_0 勾配を設定し、これと雑音変調したラジオ波パルスを組み合わせて、2次元方向の領域選択を行った。雑音パルスは512点の乱数列の中央5または10%をゼロとした数列をフーリエ逆変換して作成した[2]。 B_0 勾配存在下でこの雑音パルスを付加すると、周波数軸の雑音部分に対応するスピンはランダムな励起を受け、その磁化が疑似的に飽和され、中央のゼロ部分の磁化のみが残る。この雑音パルスをRFIパルス列に先だてて加え、3次元の局在化を実現した。測定装置はBruker Biospec 24/30分光計を、検出器は既報の2重同心円コイル (受信コイ

局在化NMR測定法、ラジオ波磁場勾配、雑音パルス、脳、低酸素、乳酸

みつもり ふみゆき

ル径15mm)を用いた。B₀勾配パルスは、付属の非シールド型磁場勾配コイル(3mT/mで使用)、またはMagnex社の自己シールド型磁場勾配コイル(12mT/mで使用)を用いて発生させた。

【結果と考察】 (1) 2次元雑音パルス+RFI法 ラット脳をRFI法のみによる1次元局在化法で測定した場合、受信コイル径が頭蓋より小さいにもかかわらず、頭蓋をとりまく筋や表皮からの脂質信号の混入が問題となった。この状態を調べるためにまずファントム測定を行った。外筒および内筒の内径がそれぞれ46mm、16mmの2重円筒状容器に0.1M 乳酸、ピルビン酸、0.07M クレアチン(以上内筒)、0.1M 酢酸水溶液(外筒)を封入し、雑音パルスによる領域選択の有無両条件で11-22-スピンエコー測定を行った結果を図1に示す。通常測定では外筒に含まれる酢酸の大きな信号が観測されるが雑音パルスにより側方向を1×1cmに限定した場合には酢酸信号は十分に除去されている。同様の測定シーケンスをラット頭部に適用した結果を図2に示す(スピンエコーτ=200ms)。1.2~1.8ppmの脂質信号は減少し、2.0ppmにN-アセチルアスパラギン酸(NAA)、3.0ppmにクレアチン、3.2ppmにコリンの信号が観測される。選択領域を1×1cmから6.6×6.6mmにすると脂質信号の強度は一層低下する。この条件で11-22-スピンエコーのかわりに1331RFIシーケンスを適用し、深さ方向の位置分解を行うと、図3に示す結果が得られた。この場合の選択領域は、側方向の雑音パルスによる選択が6.6×6.6mm、深さ方向のRFI法の位置分解能が2mmであるため、0.087mlとなる。残存していた脂質信号とNAA信号は位置軸(f1軸)方向に分離されている。これにより深部では表面脂質の妨害なしにNAAを観測することが可能となった。

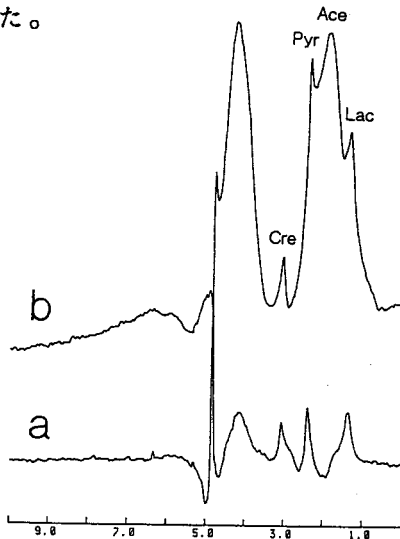


Fig.1 11-22-spin echo ¹H NMR spectra of double concentric cylindrical phantom (a)with, and (b)without 2D noise pulse spatial localization. Inner cylinder contained 0.1M lactate, pyruvate and 0.07M creatine, outer cylinder 0.1M acetate.

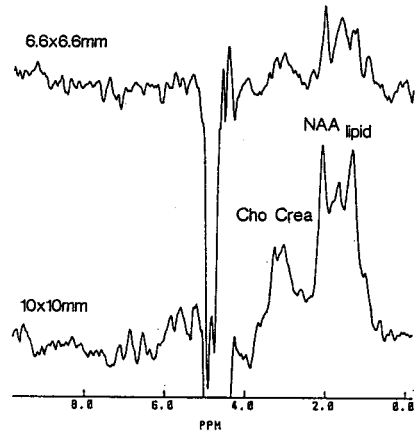


Fig.2 11-22-spin echo ¹H NMR spectra of rat brain with 2D noise pulse spatial localization. 64 scans

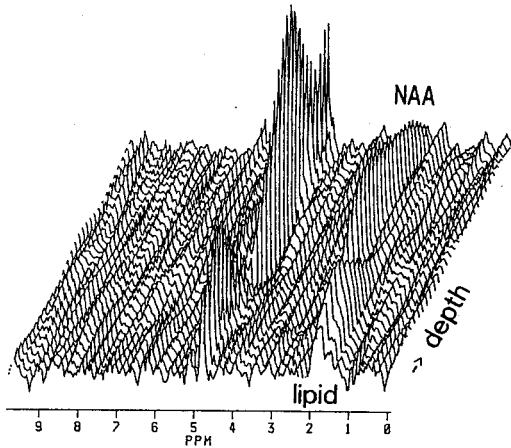


Fig.3 1331 rotating frame imaging(RFI) spectra of rat brain with 2D noise pulse localization(6.6 x 6.6mm). Surface lipid(1.2-1.8ppm) and NAA (2.0ppm) are spatially separated along f1 direction. pulse recycling, 2.7s; 128 scans; 16 phase encodings; spin echo τ , 200ms; noise pulse, 30ms; interpulse delay of 1331, 1.78ms; B_0 gradient, 3mT/m.

(2) 3次元雑音パルス+RFI法 図3で表層脂質と脳実質内のNAAを位置的に分離して観測することが可能になったが、同様の雑音パルスを3次元に用いて、表層脂質信号を消去することも原理的に可能である。この試みは非シールド型磁場勾配コイルを用いていたときにはうまく働かず、自己シールド型勾配コイルを用いてはじめて実現した。自己シールド型磁場勾配コイルでは渦電流の抑制が飛躍的に改善され、 B_0 勾配パルス付加後の待ち時間を1msに短縮することが可能になった。磁場勾配強度も約4倍となったので、雑音パルス付加時間も20ms→10msと短縮し、RFIシーケンスにはいる前に疑似飽和された磁化が回復してくるのを抑制することが可能になったためであろう。図4に第1層にオリーブ油、第2、3層に水をいれたファントム試料での表層抑圧の雑音パルスに対する応答プロファイルを示す。ラット頭部で本法を適用した結果は図5に示す。図3と比べて表在脂質信号が消去されているのが明らかである。

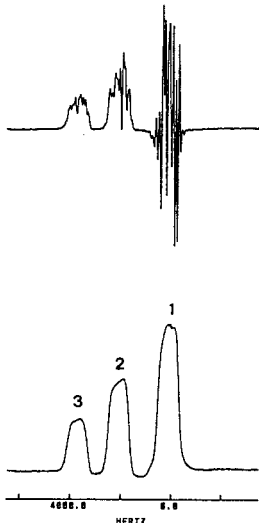


Fig.4 Depth profile of 3 compartments phantom with(upper), and without(lower) noise pulse randomization. Each layer was 1.5mm thick and 1.5mm apart.

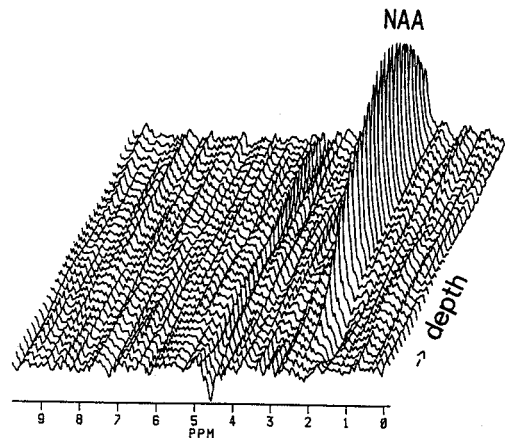


Fig.5 1331RFI spectra of rat brain with 3D noise pulse localization(1x1x1cm). Surface lipid is well eliminated. pulse recycling, 2.7s; 64 scans

(3)低酸素環境下におけるラット脳への適用 ハロセン麻酔下(halothane 1%, O₂ 50%, N₂O 50%)で、吸気中の酸素濃度を50%から8-9%へと減少させることにより低酸素環境下でのラット脳の¹H NMRの変化を観測した。(1)の方法でも表在の脂質信号と乳酸のメチル基信号とは f 1 軸上で位置的に分離されるため、hypoxiaに伴う脳内の乳酸増加は観測可能である。しかし、脂質信号が大きいと f 1 軸上での信号のテーリングや、トランケーションノイズのために微小な乳酸信号の観測にはやはり、脂質信号が妨害となった。一方、(3)の方法では表在脂質信号がほとんど抑圧されているため、微弱な乳酸信号の増加も観測可能となった。図6に酸素50%、8.4%両状態でのRFIスペクトルを示す。hypoxiaでの乳酸上昇が明らかである。さらに、hypoxiaではNAA信号が低下しており、この変化は可逆的である。NAAは神経細胞にのみ存在し、その減少は神経細胞の非可逆的損傷を示すと考えられてきたが、本実験でこのような比較的速い可逆的变化もする可能性が示された。

雑音パルス法は標的とする部分の磁化をintactに保つため、RFI法その他の局在化法と容易に組み合わせることが可能である。本研究ではRFI法の利点を生かしたままその局在化性能を高度化できることが示された。また、雑音パルス法は局所シムの手法としても有効であった[3]。

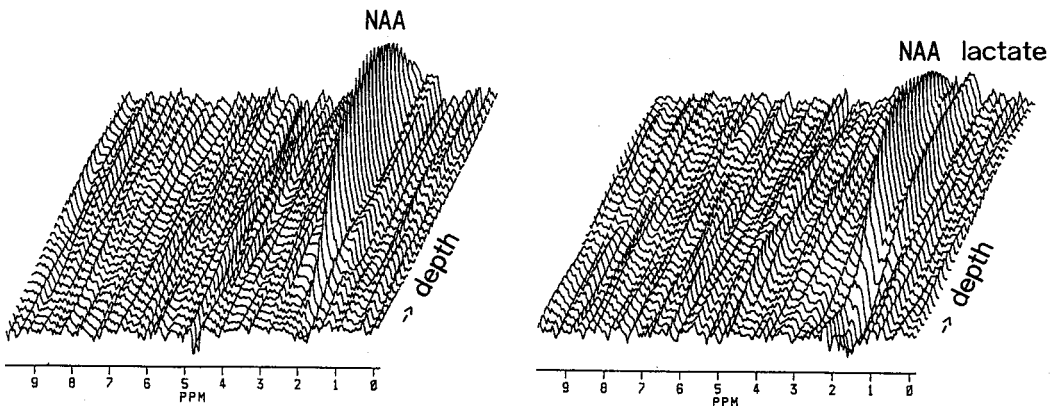


Fig.6 1331RFI spectra of rat brain with 3D noise pulse localization(1x1x1 cm). (Left spectra--normal) rat was administered with 1% halothane in 50% O₂ + 50% N₂O. (Right spectra--hypoxic) rat was administered with 1% halothane in 8.4% O₂ + 48.1% N₂ + 43.5% N₂O. pulse recycling, 2.7s; 64 scans; 16 phase encodings; spin echo τ , 200ms; noise pulse, 10ms; interpulse delay of 1331, 1.6ms; B₀ gradient, 12mT/m.

【文献】

- [1] F.Mitsumori, N.M.Bolas, J.Magn.Reson., 97, 282 (1992).
- [2] R.J.Ordidge, Magn.Reson.Med., 5, 93 (1987).
- [3] F.Mitsumori, J.Magn.Reson., in press.

ミニシンポジウム

M 1 ~ M 3



姫路工大、理学部 ○小原孝夫

Introductory talk

Dept. of Material Science, Himeji Inst. of Tech. Takao Kohara

In the CuO_2 -based superconductors, a crucial role is played by the magnetic correlations and the spin dynamics of the Cu^{2+} ions and by the effects of Sr and/or oxygen doping on these properties. We report the results of NMR and NQR on the O-loaded $\text{La}_2\text{CuO}_{4-x}$, which is composed of both a SC [O-rich($d > 0$)] phase and a non-SC [O-poor($d \leq 0$)] phase with a closely related orthorhombic structure. Our results have shown that the electronic states of O-rich and O-poor regions correspond to those in the SC $(\text{LaSr})_2\text{CuO}_4$ and the non-SC (anti-ferromagnetic) La_2CuO_4 , respectively. The T-dependence of $T_1\rho^{-1}$ of Cu below T_c is also similar to those in other oxide-superconductors, pointing to the same SC nature in these compounds.

酸化物高温超伝導体の発見以来、多くの特徴的な物性が明らかになったが、いまだに超伝導の発現機構については基本的な立場さえ明かにされていない。
酸化物超伝導体の最も大きな特徴の一つは、母物質と呼ばれる反強磁性体 (La_2CuO_4 , $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ 等) にキャリアを導入することにより超伝導が現れることである。また結晶構造上の共通の特徴として CuO_2 面を有しており、これが伝導面と考えられている。したがって2次元性の電子相関の取扱が超伝導発現機構を直接説明する鍵とされている。(CeCu_2Si_2 , UPt_3 , URu_2Si_2 等のいわゆる重い電子系超伝導体とは、いくつかの相違点があるが、強電子相関という観点では共通であり、本質的なところでの電子状態の比較は重要な課題である) すなわち、この CuO_2 面内に導入された電子あるいはホールと Cu サイトに局在していると思われる 3d の性質をもつホールのスピンの、このシナリオの主演となる。また直線的な Cu-O-Cu 結合が存在し、Cu の $3d(x^2-y^2)$ 軌道と O の $2p(\sigma)$ 軌道

NMR、NQR、核磁気緩和率の温度依存性、酸素添加型 La 系高温超伝導体

小原孝夫 (こはらたかお)

との間は強い混成状態にあり、Cuのdスピン間には強い反強磁性超交換相互作用($J_{dd} \sim 1000\text{K}$)が存在している。また超伝導に関係する低エネルギー励起を担うのも前記のCuの3dとOの2pによる状態であると考えられている。このような酸化物超伝導体での電子相関を記述するには、現在2つの立場がある。一つはRPA、SCR理論に代表される弱い電子相関係の場合と、t-Jモデル(Cuスピン間の相互作用までもとり入れたHubbardモデル)に代表される強い相関係の場合に分かれる。実際両極限からのアプローチが数多くあるが、現時点では常伝導、超伝導状態とも一致した描像が得られていない。

実験的には、NMRや中性子回折等の微視的立場での結果が、ますます重要になってきており、特にNMRのグループは現在まで、国内外とも数多くの結果を出している。我々も、いくつかの系でのNMR測定を行っているが、他のグループと異なった系としては、反強磁性体 La_2CuO_4 に通常BaやSrをドーピングして超伝導体とする代わりに、酸素ドーピングによりホールを供給した(すなわち $\text{La}_{2-x}\text{CuO}_{4-x}$ 、 $x: 0.01 \sim 0.03$ 、酸化物超伝導体の特徴的な性質がでていうえに、結晶中にCuサイトが一種しかない)超伝導体の、La、CuのNMR、NQR測定をおこなった。実験はすべて位相干渉型スピネコー法で共鳴周波数または外部磁場可変である。試料は通常の焼結体に高温高压酸素処理($\sim 1200 \text{ bar}$ 、 $\sim 600^\circ\text{C}$)をしたものである。

図1は、酸素を添加した $\text{La}_2\text{CuO}_{4-x}$ 、 $(\text{LaSr})_2\text{CuO}_{4-x}$ と酸素を添加しない $(\text{LaSr})_2\text{CuO}_4$ のCuのNQRスペクトラムを1.4 Kで測定したものである。図からわかるように、Srを添加して安定な酸化物超伝導体ができると、酸素原子の侵入にもかかわらず、CuサイトのNQR共鳴周波数(ν_{NQR})が大きく変わっていない。このことは、 ν_{NQR} がおもにCuのオンサイト-ホールによって決まっていることを暗示している。また酸素をドーピングすることで、NQR信号強度と超伝導領域の体積分率が増加するので、CuのNQR信号は超伝導を示す常磁性領域が微視的にも出現していることをあらわす。また外部磁場をかけずに同一試料でCuのNMR(AF-NMR)信号も観測できた。図2にしめす6本に分離したスペクトラムからCuサイトの内部磁場は約81.4 kOeと見積られ、この値は以前、津田(埼玉大)らによって測定された反強磁性体 La_2CuO_4 の値とほぼ一致する。これらの結果から、超伝導 $\text{La}_2\text{CuO}_{4-x}$ では超伝導 $(\text{LaSr})_2\text{CuO}_4$ に似たoxygen-rich領域と反強磁性 La_2CuO_4 に対応するoxygen-poor領域がorthorhombic structureを保ちながら、共存していることがわかった。図1のスペクトラムのピークで核スピン緩和率(T_1^{-1})の温度変化をSr添加系と共に、目盛ったものが図3である。超伝導領域での核磁気緩和は、Sr添加系とほとんど変わらない。またこの T_c 以下での核磁気緩和の温度変化の特徴的な振舞い(T_c 直下でのBCS特有の T_1^{-1} の増大がなく、低温で T^3 に近い温度変化)は、他の酸化物高温超伝導体(Y,Pb,Bi,Tl等)の場合に類似する。高温でおきる2相のorthorhombic structureへの相分離と反強磁性転移温度 T_m の関係等は、時間があれば報告する。

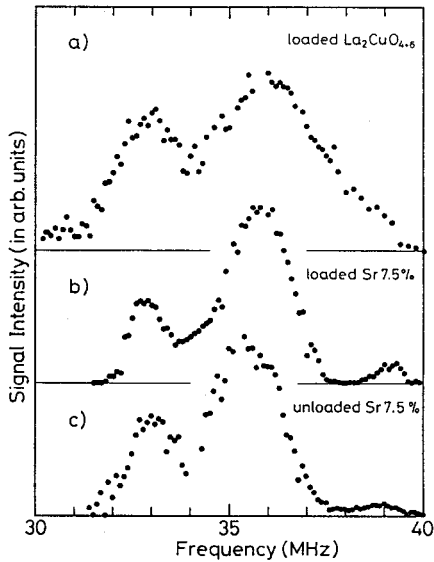


Fig 1 Spin echo spectra of Cu NQR at 1.4 K. (a) Oxygen loaded $\text{La}_2\text{CuO}_{4+\delta}$; (b) oxygen loaded $(\text{La}_{0.925}\text{Sr}_{0.075})_2\text{CuO}_{4+\delta}$ and (c) oxygen unloaded $(\text{La}_{0.925}\text{Sr}_{0.075})_2\text{CuO}_4$.

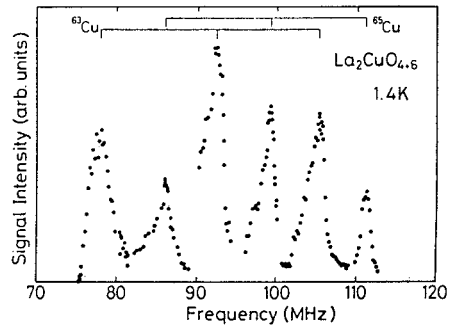


Fig 2 Zero field Cu NMR spectra. The internal magnetic field at Cu site is estimated as 81.4 kOe.

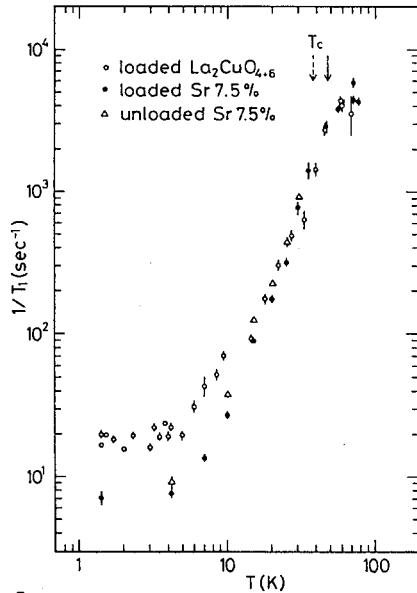


Fig 3 Temperature dependence of $1/T_1$ obtained for ^{63}Cu . The symbols of \circ , \bullet and \triangle show the values of $1/T_1$ in loaded $\text{La}_2\text{CuO}_{4+\delta}$, loaded $(\text{La}_{0.925}\text{Sr}_{0.075})_2\text{CuO}_{4+\delta}$ and unloaded $(\text{La}_{0.925}\text{Sr}_{0.075})_2\text{CuO}_4$. The solid and dotted arrows show the values of T_c in the loaded $\text{La}_2\text{CuO}_{4+\delta}$ and the Sr-doped samples, respectively.

M 2 酸化物高温超伝導体の磁気励起

東京大学物性研究所 安岡 弘志

Magnetic Excitation in High- T_c Oxide Superconductors

Hiroshi Yasuoka, Institute for Solid State Physics, University of Tokyo

The magnetic excitations in high- T_c oxide superconductors investigated by the nuclear spin-lattice relaxation are reviewed. In the normal state, the Cu relaxation is strongly enhanced and temperature dependent due to the antiferromagnetic spin fluctuations in the Cu-O planes, while the O relaxation has a strong correlation with the knight shift. Scaling between the Cu and O rates is quite important to understand the q -dependent magnetic excitations and is one of the promising test for the theoretical models for high- T_c 's.

銅を含む金属的な酸化物が高い温度で超伝導に転移することが発見されて以来、理論、実験をとわず、この高温超伝導の発現の機構をめぐって数多くの研究がなされており、且つ現在でも激しい論争が繰り広げられている。核磁気共鳴の分野においても、多くの銅酸化物系でNQRやNMRの技術を駆使した研究が世界中でなされ、この系における微視的な物性が明らかになりつつある。本講演ではそれらの研究の中から、特に常伝導状態における磁気励起に関連して、核磁気緩和の問題を取り上げることにする。銅を含む高温超伝導酸化物の場合、磁性や超伝導に深くかかわっていると思われる、ほぼ二次元正方格子を形成しているCu-O₂面が問題とされる。常伝導状態における磁性や伝導は、このCu-O₂面内に注入された電子あるいは正孔とほぼCu原子サイトに局在していると思われる、強い3dの性格を持つ正孔が主役を演ずる。又、構造上の特徴として、直線的なCu-O-Cuの結合が存在しCuの3d軌道(x^2-y^2)と酸素のp軌道(p_σ)との間は強い混成状態にあり、かつCuのdスピン間には、強い反強磁性的な超交換相互作用($J_{ex} \sim 1000K$)が存在していると考えられている。このような状態での電子系を記述するには、弱い相関の極限から出発する立場と、強い相関の立場より出発する立場があり得る。特に後者の場合は、従来のハバードモデルとは異なりCuスピン間の相互作用 J_{ex} を重視した、いわゆるt-Jモデルが議論されており、磁気励起に関しても注入された正孔と、Cu原子上のスピンが一重項結合した状態の準粒子(スピノン)が主役を演じるものとされる。実際この両極限からのアプローチが数多く展開されているが、現時点では現象を満足に説明する概念には至っていないように思われる。これらの問題は、構造上の特徴から生まれる付加的な事柄は別として、基本的には金属と絶縁体との中間領域の問題であり、常磁性状態を理解するだけでも一筋縄ではいかないと思われる。一方実験的な側面をみれば、磁性という観点からは当然NMRと中性子散乱の実験が重要な役割を果たしている。これ等の実験より、常伝導状態における反強磁性相関の存在や、磁気励起に関する多くのデータが蓄積されている。

さて、このCu-O₂面内における核磁気緩和の問題に話を進めることにする。まず最初に第1図を見ていただきたい。そこには、高温超伝導酸化物中最も典型物質であるYBa₂Cu₃O₇($T_c = 92K$)でのCu-O₂面内における⁶³Cuと¹⁷O核のスピン・格子緩和率 $1/T_1$ の温度依存性が示されている。この実験結果の特徴を、次のようになる。①銅サイトは130K以上の温度領域では $1/T_1$ が $a + bT$ なる関係にあり、金属状態でありながら従来我々が知らなかった温度依存性を示している。つまり金属の極限でみられるコリンハ則 $T_1 T = \text{一定}$ とも、又絶縁体の極限である $1/T_1 = \text{一定}$ という関係とも異なる振る舞いをしていて、この両者を同時に伴っているようにもみえる。②同じ温度領域における酸素サイトは非常によく $1/T_1 = cT$ という、いわゆるコリンハ則が成り立っている。③銅酸素どちらのサイトも130K以下 T_c までの温度領域でそれぞれ高温でみられた関係からずれ、緩和率は T_c に向かって大きく減少している。これらの特徴、特に銅と酸素サイトで全く異なった温度依存性を示すことから、磁気励起に関するスピンの自由度が独立に二つある、いわゆる二成分モデルも提出されたが、現在では強い反強磁性相関を伴った一つのスピン自由度で実験結果を説明するのが一般的となっている。

さて、核スピン格子緩和率 $1/T_1$ は動的帯磁率の虚数部 $\text{Im} \chi(q, \omega_0)$ を用いて一般的に、

$$\frac{1}{T_1 T} = \sum_q F(q) \times \frac{\text{Im} \chi(q, \omega_0)}{\omega_0}$$

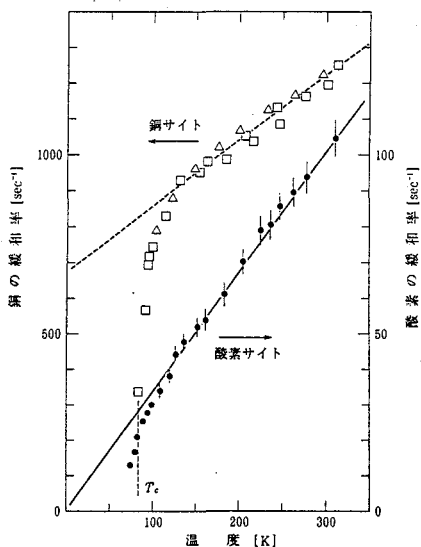
と書ける。ここで $F(q)$ は波数に依存した超微細結合定数のフーリエ成分と関係している形状因子(Form factor)と呼ばれるものである。ここでの特徴は酸素サイトにおける $F(q)$ が $q = Q$ (反強磁性波数ベクトル)で零になっていることである。これは酸素原子が反強磁性相関をしている両側の銅原子に対して対称の位置にあることから当然の結果であるが、いかなる反強磁性ゆらぎがあろうともそれが酸素サイトではフィルターされているこ

NMR, NQR, Nuclear Relaxation, High- T_c Oxide Superconductor, Magnetic excitations

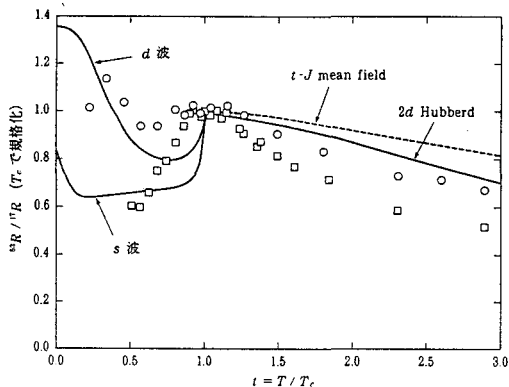
安岡 弘志(やすおか ひろし)

とを物語っている。又銅サイトに大きなCu-O-Cu結合に基づく超微細相互作用によるq依存性がある。これらの事情により、第1図に示された銅と酸素サイトにおける $1/T_1$ の異なる温度依存性は、例えば動的帯磁率がひとつのスピンの自由度で与えられていたとしても定性的に理解できる事柄となる。そこでいよいよ、問題は、いかに $\chi(q, \omega_0)$ を高温超伝導酸化物において記述できるかになってくる。これに対しては、前述の如く、弱い相関の極限および強い相関の極限からのアプローチがありいずれも実験結果のいくつかの側面を定性的に説明している。しかしながら、現時点では統一的に確立された理論には至っていないと言って良く、今後の研究に待たなければならない。以下には実験的な観点より理論のモデルに依存しない範囲で言えることを簡単に述べておく。

既に述べた如く、常伝導状態における銅サイトの $1/T_1$ は、通常のコリンハ則により一桁位大きく、かつ高温では漸近的に $1/T_1 T = a/T + b$ の式に従って温度変化する。従って、銅サイトの緩和をみる限り、比較的q依存性も小さくフェルミ液体的に振舞っている $\chi(q, \omega_0)$ と、反強磁性スピンゆらぎを反映した $q=Q$ 近似で増大した、しかもキュリー的な強い温度依存性を持つ、二つの寄与によってそれぞれb項およびa/T項が説明できると言うてよい。このように、銅サイトにおける局所磁場のゆらぎは、主として反強磁性スピンのゆらぎが支配しており、それが超伝導とどうかかわり合っているか興味ある問題である。これをみるために、銅と酸素サイトの緩和率の比をとり、その温度依存性について考えてみる。緩和率 $1/T_1$ をRと定義して、 ^{63}R と ^{17}R の比を T_c で規格化した温度にたいしてプロットしたのが第2図である。又同図に滝川等によって測定された結果(o印)を比較のために示してある。どちらにも共通する重要なことは、 T_c の上下数十度の範囲で $^{63}\text{R}/^{17}\text{R}$ の比が一定の温度領域が存在し、かつ T_c 直下で超伝導発現に伴った異状が認められないことである。 T_c 以下での $^{63}\text{R}/^{17}\text{R}$ は超伝導の秩序パラメータの対称性をみる上で極めて有力な手段となり得る。実際そのような計算が二次元ハバードモデルでRPA近似の範囲内でなされており、 T_c で規格化した結果を実線で示してある。実験との一致は、はなはだ不満足であるが T_c から数十度上までの温度依存性は再現しているように見える。つまり高温化ら成長してきた反強磁性的ゆらぎが T_c よりも高温(約130K)で飽和し、ほぼ $1/T_1 T$ が一定になっている。このことによりほぼコリンハ則に従っている酸素サイトの $1/T_1 T$ の比をとれば T_c 以上でそれが一定となる温度領域があるという訳である。同じような振舞いは最近のt-Jモデルによる計算でも示されており、その結果を点線で示しておく。尚、常伝導状態における計算と実験の不一致は、多分計算の方で $\chi(q, \omega)$ の反強磁性波数Qのまわりの拡がりが大きく出すぎており、酸素サイトもいくらか $\chi(Q)$ の温度依存性の影響をみているためではないかと考え等れている。第2図でみられる T_c 直下、および低温での $1/T_1$ の振舞いは、とても通常のs-波BCS超伝導としては説明できず、大きな問題として残されている。波数空間で異なった領域をプローブできる同一試料における銅、酸素サイトの核磁気緩和の研究は、その解決の糸口として、重要な情報を提供しており、今後他の銅酸化物系にも研究されるべき事柄のように思われる。



第1図



第2図

NMR of High T_C Superconductor

Kunisuke Asayama

Department of Material Physics, Faculty of Engineering Science,
Osaka University, Toyonaka, Osaka 560, Japan

A review on our systematic NMR measurements, T_1 , the Knight shift and NQR frequencies of ^{63}Cu and ^{17}O in the CuO_2 plane in the high T_C superconductor, mainly La, Y and Tl compounds in both the normal and superconducting states will be presented.

From the analysis of T_1 and the Knight shift of Cu in the external field parallel and perpendicular to the c axis it has been concluded that the antiferromagnetic spin fluctuations (AFSF) that enhance $1/T_1$ of Cu decrease in the order of $(\text{La}_{1.85}\text{Sr}_{0.15})\text{CuO}_4$, $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ and $\text{Tl}_2\text{Ba}_2\text{CuO}_{6+y}$.¹⁾ AFSF decrease with hole content in $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{CuO}_4$ and $\text{Tl}_2\text{Ba}_2\text{CuO}_{6+y}$. $1/T_1T$ follows a Curie-Weiss law at high temperature²⁾ and becomes constant below a characteristic temperature T^* , around which T_C appears. Although in some materials, $(\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{6.5}$,³⁾ $\text{YBa}_2\text{Cu}_4\text{O}_8$,⁴⁾) $1/T_1T$ decreases even above T_C , we suppose the behavior above is essential for high T_C materials. In the superconducting state, $1/T_1$ decreases rapidly without BCS peak just below T_C and decreases as T^3 at low temperature. This behavior of $1/T_1$ suggests the d-wave pairing.

$1/T_1$ of ^{63}Cu in $\text{YBa}_2(\text{Cu},\text{Zn})_3\text{O}_7$ (Zn 1~3%) shows a $T_1T=\text{const.}$ dependence at low temperature, while the Knight shift

キーワード：高温超伝導体、 T_1 、ナイトシフト、NQR周波数、d波、
反強磁性スピンゆらぎ

あさやま くにすけ

increases the residual part with Zn content.⁵⁾ These behaviors of $1/T_1$ and the Knight shift are consistently explained by an impurity induced gapless d-wave model⁵⁾ where the non-magnetic impurities act as a pair breaker and induce an extra density of states in the unitarity limit⁶⁾ in addition to the energy linear density of states associated with the gap zero on line.

In La system, when the Sr content is low, $1/T_1$ becomes T-independent at low temperature in the superconducting state, which is ascribed to a localized character of 3d holes.⁷⁾ For high Sr content $1/T_1$ shows a $T_1 T = \text{const.}$ relation at low temperature even in the superconducting state together with the increase in the residual Knight shift which are explained consistently with the impurity induced gaplessness in d-wave pairing.⁸⁾ The relation between the decrease of T_c and the extra density of states due to the pair breaking obtained from T_1 and K in $\text{YBa}_2(\text{Cu}, \text{Zn})_3\text{O}_7$ and $\text{La}_{2-x}\text{Sr}_x\text{CuO}_4$ is qualitatively in good agreement with the theoretical calculation.⁹⁾

AFSF increase with decreasing hole content, while T_c increases and then decreases with decreasing hole. As seen in T_1 in La system, the localized character becomes appreciable when the Sr content decreases which is considered to be unfavourable for the occurrence of the superconductivity even in the case where the AFSF are the origin of the attractive force and increase with decreasing hole content. Thus there may be an optimum value of the hole content where the increase of the attractive force and the decrease of the mobility compromise with each other to give a maximum in T_c .¹⁰⁾

Hanzawa et al. obtained the hole number at the Cu and O site in $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ assuming the NQR frequency of Cu and O to be mainly due to the Cu 3d and O 2p holes, respectively.¹¹⁾ Following this the hole number at the Cu and O site are obtained to decrease and increase in the order of La, Y and Tl compound, respectively.¹²⁾ This change of the holes is consistent with the change of AFSF. The AFSF increase with increasing and decreasing hole content at Cu and O site, respectively. Now, by applying pressure, T_c increases for La compound, while decreases for Tl compound with a small change for $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$. On the other hand, ν_Q of La, Y and Tl all decrease by pressure suggesting the transfer of the Cu 3d holes to O 2p state by pressure.¹²⁾ These facts suggest that there exists a peak in T_c at an optimum value of $n(\text{Cu})/n(\text{O})$

around $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$, if we plot T_c against $n(\text{Cu})/n(0)$.¹²⁾ When $n(\text{Cu})/n(0)$ increases, AFSF increases, which may be favourable for T_c if AFSF is responsible for high T_c . However, if $n(\text{Cu})/n(0)$ goes over an optimum value, the localized character appears which is unfavorable for high T_c , as mentioned previously. Thus we can expect an optimum value of $n(\text{Cu})/n(0)$ giving a maximum T_c .

Now the band calculation shows that the contribution from 4p electrons is also important as 3d holes.¹³⁾ Ohta et al.¹⁴⁾ analyzed by a cluster calculation the contribution from 4p electrons and explained ν_Q of several compounds. They showed that the contribution from 4p electrons was not so sensitive to the materials. If we assume that the contribution from 4p electrons does not change with material and pressure, the conclusion is qualitatively the same as those discussed above on the assumption of Hanzawa et al.¹⁵⁾

References

- 1) Y. Kitaoka, K. Fujiwara, K. Ishida, K. Asayama, Y. Shimakawa, T. Manako and Y. Kubo : *Physica C* **179** (1991) 107.
- 2) Y. Kitaoka, S. Ohsugi, K. Ishida and K. Asayama : *Physica C* **170** (1990) 189.
- 3) W.W. Warren and R.E. Walstedt: *Z. Naturforsch* **45a** (1990) 385.
- 4) H. Zimmerman, N. Mali, D. Brinkmann, J. Karpinski, E. Kaldis and Rusiechi : *Physica C* **159** (1989) 681.
- 5) K. Ishida, Y. Kitaoka, T. Yoshitomi, N. Ogata, T. Kamino and K. Asayama : *Physica C* **179** (1991) 29.
- 6) S. Schmitt-Rink, K. Miyake and C.M. Varma : *Phys. Rev. Lett.* **57** (1986) 2575.
P.J. Hirschfeld, D. Vollhardt and P. Wolfe : *Solid State Commun.* **50** (1986) 111.
- 7) S. Ohsugi, Y. Kitaoka, K. Ishida and K. Asayama : *J. Phys. Soc. Jpn.* **60** (1991) 2351.
- 8) S. Ohsugi et al. : submitted to *Proc. of Int. Conf. in Sendai* (1992).
- 9) K. Miyake, private commun. S. Schmitt-Rink, K. Miyake and C.M. Varma unpublished.
- 10) K. Asayama, G.-q. Zheng, Y. Kitaoka, K. Ishida and K. Fujiwara : *Physica C* **178** (1991) 281.
- 11) K. Hanzawa, F. Komatsu and K. Yoshida : *J. Phys. Soc. Jpn.* **59** (1990) 3345.

- 12) G.-q. Zheng, E. Yanase, K. Ishida, Y. Kitaoka, K. Asayama, Y. Kodama, R. Tanaka, S. Nakamichi and S. Endo : Solid State Commun. **79** (1991) 51.
- 13) K. Schwarz, C. Ambrosch-Draxl and P. Blaha : Phys. Rev. **B42** (1990) 2051.
- 14) Y. Ohta, W. Koshibae and S. Maekawa : J. Phys. Soc. Jpn. **61**(1992) 2198.
- 15) G.-q. Zheng et al. : in preparation.

京都大学 教養部 物理

○前川覚、 小山田明、 後藤喬雄

Magnetic Phase Transitions and Spin Dynamics in Frustrated Antiferromagnet
 Department of Physics, College of Liberal Arts and Sciences,
 Kyoto University ○ Satoru MAEGAWA, Akira OYAMADA, Takao GOTO

The magnetic ordering and spin fluctuation of the triangular-lattice Heisenberg antiferromagnets, CsNiBr_3 and CsNiCl_3 have been studied by ^{133}Cs -NMR. The successive magnetic phase transitions occur, such that the Ni^{2+} spin components parallel and perpendicular to the c -axis order at different temperatures due to the frustration effect. In the low temperature phase the spins form the triangular structure in the plane including the c -axis. Even in the ordered phases the spin structure has a freedom of rotation which depends on the value of D/J_1 . The characteristic spin fluctuation has been also revealed from the measurement of relaxation time.

1. はじめに

磁性体において、常磁性状態から強磁性や反強磁性などの秩序状態への相転移は、電子スピン間の相互作用とスピンの熱的揺動との競合により起こり、スピン間相互作用が熱的揺動に打ち勝つと秩序相が実現される。ところが、例えば正三角形の頂点に位置するスピンの互いに反強磁性相互作用を持っていると、3つのスピンが互いに反平行の関係になって安定化することはできない。この様に相互作用そのものが競合している場合にはフラストレーションの効果により特異な相転移や秩序相が現れてくる。このような系でのスピン構造や揺らぎなどの性質は、相互作用の対称性すなわちハイゼンベルグ型か、イジング型か、XY型かにも大きく依存している。

われわれは、スピン自由度のより大きいハイゼンベルグ型三角格子反強磁性体である、 CsNiBr_3 と CsNiCl_3 を取り上げ、コヒーレント・パルス法NMRによりスペクトル、スピン格子緩和時間 T_1 の測定を行い、スピン秩序化過程や秩序相にお

キーワード： 三角格子反強磁性体、逐次相転移、NMR、スピン格子緩和時間

まえがわ さとる、 おやまだ あきら、 ごとう たかお

けるスピン構造、スピン・ダイナミクスをマイクロな観点から研究している。

CsNiBr_3 、 CsNiCl_3 は、図1に示す様な六方晶形で、磁性イオン Ni^{2+} がc軸方向に反強磁性相互作用 J_0 を持って並んでおり、擬一次元磁性体を成している。この一次元鎖がc面内で三角格子を形成し、鎖間は鎖内の約 $1/100$ の反強磁性相互作用 J_1 を持っている。スピン系のハミルトニアンは、

$$H = 2J_0 \sum_{\langle i,j \rangle} \vec{S}_i \cdot \vec{S}_j + 2J_1 \sum_{\langle i,k \rangle} \vec{S}_i \cdot \vec{S}_k - D \sum_i (S_i^z)^2$$

で表され、弱い1イオン型の異方性Dは正で、c軸を容易軸とする異方性に当たる。 J_0 は両物質とも約17Kである。NMRで観測する ^{133}Cs 核は、6個の Ni^{2+} が作るプリズム形の中心に位置している。試料は単結晶で、 ^4He ないしは ^3He クライオスタットを使用し、測定温度域は0.4Kから77Kである。

2. NMRスペクトル

CsNiBr_3 の共鳴磁場スペクトルの温度変化を図2に示した。白丸は外部磁場 H_0 をc面内a軸に平行にかけた時に現れる3本の共鳴磁場ピーク、黒丸はc面内でa軸に垂直にかけた時に現れる4本のピークを表している。一方、×印は H_0 をc軸に平行にかけた時のピークを示している。このスペクトルの温度変化から、 $T_{N1} = 14.06\text{K}$ と $T_{N2} = 11.51\text{K}$ の2回、逐次的に磁気相転移が起こっていることがわかる。 $T_{N1} < T$ の常磁性相では、自由Cs核位置に1本のピークが現れるだけである。 $T_{N2} < T < T_{N1}$ の中間相では、c面内にも内部磁場が生じており、 $T < T_{N2}$ の低温相になると、さらにc軸に平行な方向にも内部磁場が発生してくる。Cs核位置での内部磁場は Ni^{2+} の双極子場より生じており、スペクトルの角度依存性の測定から、低温相においてはc面

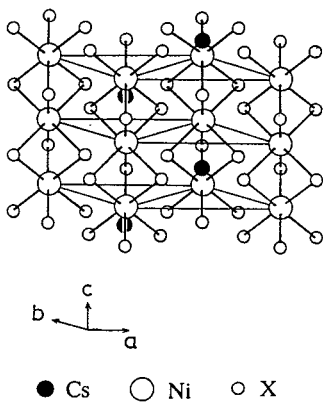


図1 CsNiX_3 型化合物の結晶構造

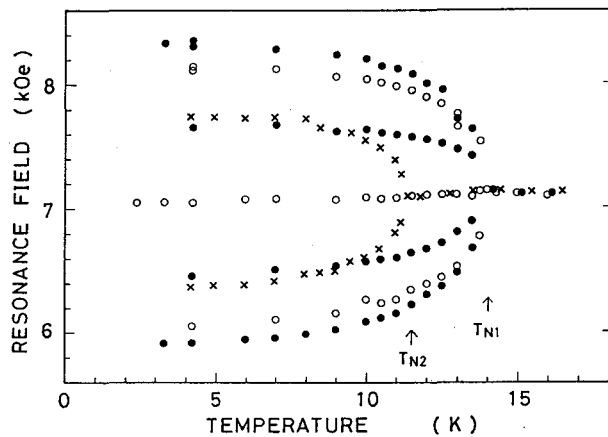


図2 CsNiBr_3 の $f = 4.0\text{MHz}$ における共鳴磁場スペクトルの温度変化

内の三角形の各格子点上の3つのスピンの、図3(a)に示す様に、c軸を含む面内で、1つのスピンのc軸に平行、他の2つのスピンのc軸から $\alpha = 39^\circ$ ずつ傾いた三角スピン構造をとっていることが明らかになった。一方、中間相では図3(b)に示す様にスピンのc軸方向成分のみが秩序化し、c軸に垂直な成分は無秩序のままであることが解った。すなわち、c軸に平行なスピン成分とc軸に垂直な成分とが異なる温度で相転移(成分逐次相転移)をし、基底状態では反強磁性相互作用が 39° 傾いた角度で互いに辛抱しあっているわけである。canting角 α は、 $\cos\alpha = 3/(6-D/J_1)$ の関係があり、これから $D/J_1 = 2.1$ と求まる。また低温相における $H_0 \parallel c$ 軸の時のスペクトルは粉末状パターンを示し、秩序相でありながらスピン面が時間的ないしは空間的にc軸周りに回転しており、c面内に磁場をかけると磁場に垂直にスピン面が固定されることが明らかになった。

CsNiCl_3 も $T_{N1} = 4.8\text{K}$ と $T_{N2} = 4.4\text{K}$ で成分逐次相転移を起こす。 CsNiCl_3 は異方性Dが小さく、 D/J_1 は0.35と、 CsNiBr_3 より約1桁小さい値で、 $\alpha = 58^\circ$ となり、3つのスピンのほとんど 120° の関係になる。 CsNiCl_3 では $H_0 \perp c$ 軸の時のスペクトルも T_{N2} より充分下の約1K($=T_D$)まで粉末状パターンを示し、 120° スピン配列がスピン面内で空間的、時間的にゆっくりと回転していることが明らかになった。これは D/J_1 が小さいため回転に伴うエネルギー損が小さく、擬縮退が起こっている事を示している。1K以下になると CsNiBr_3 と同様、1つのスピンのc軸方向に固定する様になるが、その変化は相転移を伴うものではなく、徐々に変化する。さらに0.6%程度の不純物が存在しても T_{N1}, T_{N2}, T_D は大きな変化を受け、フラストレーションが不純物によって解消され易いことが解る。この様に三角格子反強磁性体ではフラストレーション効果により、秩序相と言えども大きな揺動が残存していることが明らかになって

きた。この様なゆっくりした時間的、空間的变化は中性子回折実験では観測されず、NMRによって初めて明らかにされたものである。

3. スピン格子緩和時間

この様なフラストレーション効果を反映した三角スピン配列の揺動を調べるために、スピン格子緩和時間 T_1 の測定を行った。図4に、 CsNiBr_3 のスピン格子緩和率 T_1^{-1} の温度変化を示した。Cs核の緩和は、

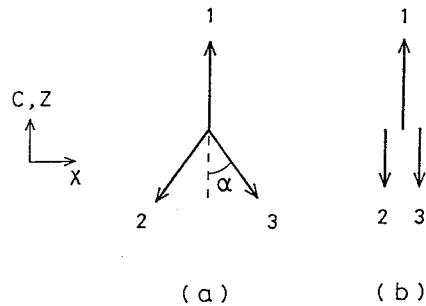


図3 (a) 低温相での三角スピン配列
(b) 中間相でのスピン配列
番号は三角格子点上の3つのスピンを指す。

Ni²⁺スピンと核スピンとの双極子相互作用が電子スピン系の交換相互作用により揺らぎを受けることにより起こっている。T > T_{N1}の常磁性相における緩和率は揺動散逸定理から帯磁率と温度の積で表され、温度変化は帯磁率の測定値を用いた計算値と良く一致する。

図4から解る様に、T₁⁻¹はT_{N1}で不連続に変化し、大きな温度変化を示す様になる。秩序相においてはT₁⁻¹は共鳴ピーク毎に異なるが、中心対称なピーク同士は等しい値を示す。図には、シフトのないピーク(a₂)と、シフトの最も大きいピーク(b₁)の値を示した。T_{N2}ではT₁⁻¹の温度変化は連続的でわずかな温度依存性の変化ないしは小さなカスプを示すに過ぎない。しかし、両ピークの緩和率の比は中間相では約8倍、低温相では約1.5倍と大きく変化している。これは両相における、スピンの横成分の揺らぎの相関の違いを反映している。低温相においてはT₁⁻¹はほぼT⁵に比例するが、磁場には依存しない。

低温相における緩和機構としては、マグノンが核スピンと相互作用をしエネルギー保存則を満たして散乱されるという2マグノン過程が考えられる。容易軸型異方性を持つ三角スピン配列のスピン波分散関係の低エネルギーモードとしては3つ存在する。最低エネルギーモードは三角スピン配列のc軸周りの回転に対応し、gμ_BH₀のギャップを持つ。2つ目のモードはスピン面内でのswinging運動に対応しギャップは異方性から5.4Kと見積られる。3つ目のモードは約10Kのギャップを持ち、スピン面がc軸を含む面から垂直に傾く運動に対応している。これらのモードについて長波長近似を用いた計算から、充分低温では3つのスピンが三角構造を保ったままスピン面内で揺動するというswinging運動が緩和に寄与していることが明らかになってきた。

参考文献

- 1) S.Maegawa, T.Kohmoto, T.Goto and N.Fujiwara: Phys.Rev. B44 (1991) 12617
- 2) S.Maegawa, T.Goto and Y.Ajiro: J.Phys.Soc.Jpn. 57 (1988) 1402

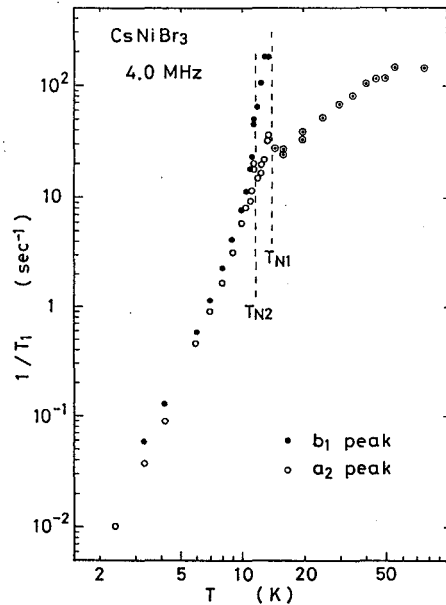


図4 CsNiBr₃のスピ
格子緩和率の温度変化

○久保 厚・桑原大介・今城文雄・寺尾武彦 (京大理・化学)

The fine structure of the ^1H coupled ^{13}C MAS NMR spectra
A.Kubo, D.Kuwahara, F.Imashiro and T.Terao
Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University

1.Introduction

High resolution magic-angle-spinning(MAS) NMR spectra of the strongly dipolar coupled systems such as the ^1H spins or the ^1H coupled ^{13}C spin, have been obtained for the inclusion compounds and the liquid crystallines.⁽¹⁾ In these systems, the intramolecular dipolar interaction tensors have the same orientations of their principal axes, because of the motional average. The intermolecular dipolar interactions are also relatively weak in these systems. If there are J -couplings or the isotropic chemical shift differences, we can expect the fine structure of the MAS NMR spectra, due to these interactions, which has not been interpreted, yet. In this paper, we studied the special sample, the α - ^{13}C labeled n-decane diluted by d_{22} -n-decane and d_4 -urea, and could observe such a fine structure of the ^1H coupled ^{13}C cross-polarization(CP) MAS NMR spectrum.

2.Experimental

α - ^{13}C n-decane was synthesized in the following steps. n-octylaldehyde was reacted with $\text{C}_2\text{H}_5\text{MgBr}$ prepared from α - ^{13}C (99.3 %) labeled $\text{C}_2\text{H}_5\text{Br}$, the obtained alcohol was brominated by PBr_3 , and was reduced to n-decane by LiAlH_4 . Urea was completely deuterated by dissolving it with D_2O , five times. 14mg α - ^{13}C labeled n-decane, 146mg d_{22} -(99.3 %) n-decane and 600mg d_4 -urea were recrystallized from 2.5ml d_1 -methanol. The NMR experiments were performed on the CXM300 spectrometer with the operating ^1H and ^{13}C frequencies, 300.46MHz and 75.56MHz, respectively. The magic angle was adjusted by looking at the ^{13}C CPMAS NMR spectrum of the methanol β -hydroquinone inclusion compound. The contact time, 3ms and the recycle delay, 10s were used. 16000 scans were collected.

キーワード (CPMAS NMR, ^{13}C NMR, J結合)

くほ あつし

3. Calculations of the MAS NMR spectra

We will show the effective algorithm for calculating the powder MAS NMR spectra of the multispin system. We found the algorithm to omit the average over the angle γ by using Floquet theory. γ is one of the Euler angles which relates the crystal fixed coordinate(C) to the rotar fixed coordinate(R). (See Fig.1) γ can be considered as a initial angle of the sample spinning, so that the spin Hamiltonian should satisfy,

$$H(\gamma; \omega_r t) = H(0; \omega_r t + \gamma) \quad (1)$$

The time evolution operator from 0 to t, $U(\gamma; 0, \omega_r t)$, also satisfy a similar relation.

$$U(\gamma; 0, \omega_r t) = U(0; 0, \omega_r t + \gamma)U(0; 0, \gamma)^{-1} \quad (2)$$

H is a periodic function of time. According to the Floquet theory, U can be written as a product of a periodic function, P , and a exponential operator.

$$U(\gamma; 0, \omega_r t) = P(\gamma; \omega_r t) \exp -iQ(\gamma)t \quad (3)$$

From Eqs. (2,3), we obtained,

$$P(\gamma; \omega_r t) = P(0; \omega_r t + \gamma)P(0; \gamma)^{-1} \quad (4)$$

$$Q(\gamma) = P(0; \gamma)Q(0)P(0; \gamma)^{-1} \quad (5)$$

The free induction decay $S_+(\gamma, \omega_r t)$, is given by,

$$S_+(\gamma; \omega_r t) = Tr\{I_+U(\gamma; 0, \omega_r t)I_-U(\gamma; 0, \omega_r t)^{-1}\} \quad (6)$$

This equation can be rewritten as follows, using Eqs. (3-5) and diagonalizing $Q(0) = T\Lambda T^{-1}$.

$$S_+(\gamma; \omega_r t) = \sum_{k,l} \exp -i(\Lambda_{k,k} - \Lambda_{l,l})t \langle k|G(\omega_r t + \gamma)|l \rangle \langle l|G(\gamma)^+|k \rangle \quad (7)$$

$$G(x) = T^{-1}P(0; x)^{-1}I_+P(0; x)T \quad (8)$$

If we introduce the Fourier component of $G(x)$ by,

$$G(x) = \sum_m F_m \exp imx \quad (9)$$

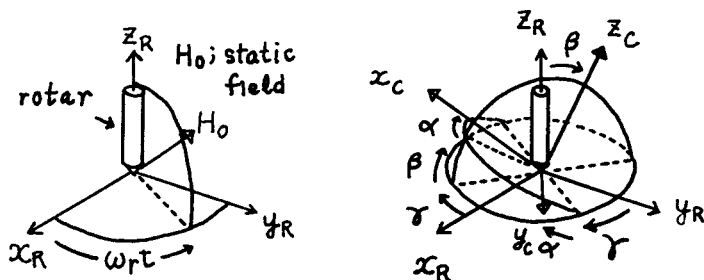
Eq. (7) can be reduced to a very simple form after the average over γ .

$$\langle S_+(\gamma; \omega_r t) \rangle_\gamma = \sum_{k,l} |\langle k|F_m|l \rangle|^2 \exp -i(\Lambda_{k,k} - \Lambda_{l,l} + m\omega_r)t \quad (10)$$

For the calculation of the powder spectra, only the time evolution operator for $\gamma = 0$, $U(0; 0, \omega_r t)$ has to be calculated. Then, $P(0; \omega_r t)$ and $Q(0)$ are obtained from $U(0; \omega_r t)$, and the spectra are calculated by using Eqs. (8-10).

Two methods were employed to calculate the time evolution operator. At first, we calculated it by multiplying the instantaneous time evolution operator. Secondly, we calculated it by treating the CH J -coupling and the ^1H isotropic chemical shift as the perturbation of the large CH and HH dipolar interactions. These two methods provide almost the same spectra.

Fig.1 Coordinate Transformations



4. Results and Discussions

4.1 Model calculations on the CH_1H_2 system.

Fig. 2 shows the calculated ^1H coupled ^{13}C MAS NMR spectra of the CH_1H_2 system, where only one of the protons have the CH J -coupling. ($J_{\text{CH}_1} = 0.12\text{kHz}$) The dipolar couplings were assumed to be $d_{\text{CH}_1} = -6\text{kHz}$, $d_{\text{CH}_2} = -2\text{kHz}$, and $d_{\text{H}_1\text{H}_2} = 4\text{kHz}$ for (a,b), 2kHz for (c). The ^1H isotropic chemical shifts were $\nu_2 = 0$, and $\nu_1 = 0$ for (a,c), and 0.2kHz for (b). From a perturbation calculation, we found there are six central lines at $\pm J/2$, $\pm rJ/2$, and $\pm r(\nu_1 - \nu_2)$. The latter four lines appear, when $d_{\text{H}_1\text{H}_2}$ is not zero. (r is a reduction factor, which depends on the dipolar coupling parameters.)

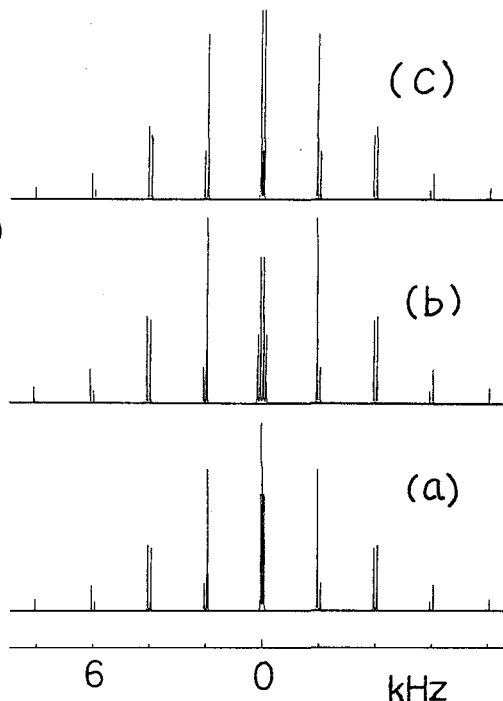


Fig.2 Calculated ^1H coupled ^{13}C MAS NMR spectra

4.2 The ^1H coupled ^{13}C MAS NMR spectra of urea-decane.

Fig. 3 shows the experimental (a), and the calculated (b,c) ^1H coupled ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the specially labeled urea decane. The left and the right sidebands were shown in the separate figures. The centerband intensities were normalized to the same level for a-c. The inner- CH_2 signal, arising from the natural abundance ^{13}C of the protonated and deuterated n-decane, (shown by $*$) has less than 9% intensity of the α - CH_2 peak. The α - CH_2 signal from the d_{22} -n-decane can be ignored in the analyses of the spinning sidebands. Because of very weak intermolecular dipolar interactions, we now can see a fine structure in the spectrum (c). (b) was calculated by taking account of only the two α - ^1H spins. (c) was calculated by taking account of the seven ^1H spins, including methyl-, α -

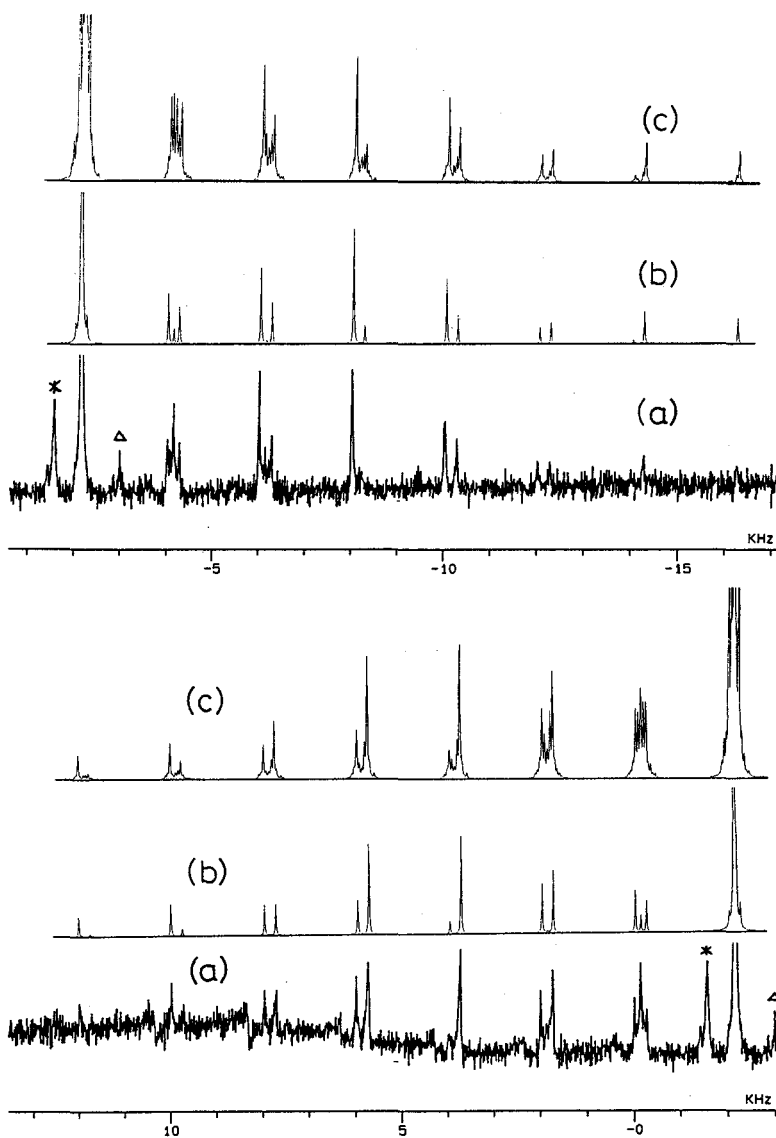


Fig.3 ^1H coupled ^{13}C MAS NMR spectra of urea-decane

methylene-, and γ -methylene-protons. The dipolar coupling parameters obtained in the previous study were employed.⁽³⁾ There are only three sidebands families in (b), while (a) and (d) include more lines.

References

- (1) S. Sekine, et al., *Chem. Phys. Lett.* **171**, 155 (1990); H. Ohe, et al., *Chem. Phys. Lett.* **172**, 284 (1990), and references there in.
- (2) M. Toda, *Theory of Oscillations* (Baifu-kan, Tokyo, 1968).
- (3) F. Imashiro et al., *J. Chem. Phys.* **90**, 3356 (1989).

L 9 ^{13}C ラベル試料のMAS条件下J-HOHAHAと双極子HOHAHA

日本電子(株) 生体研、NM応研¹、NMグループ²

○藤原敏道、A. Ramamoorthy、永山国昭、杉沢寿志¹、藤戸輝昭²

J- and Dipolar HOHAHA under MAS Conditions for ^{13}C -Enriched Solids

T. Fujiwara, A. Ramamoorthy, K. Nagayama, Y. Sugisawa and T. Fujito.
Biometrology Lab, NM Application Lab and NM Group, JEOL Ltd.

We have developed rf-pulse sequences for homonuclear Hartmann-Hahn (HOHAHA) cross polarization by J and dipolar interactions under magic-angle sample spinning. The dipolar mixing sequence suppresses isotropic and anisotropic chemical shifts and recovers the dipolar interactions by applying spin-echo and magic-echo sequences synchronously with the sample spinning. The J mixing sequence makes only the J interactions effective. The two sequences are applied to HOHAHA experiments which reveal the connectivities between isotropic shifts as NOE and HOHAHA experiments in liquids. Magnetization transfer for an amino acid in powdered solids consisting of four carbon-13 spins is shown.

〔序〕 複雑な生体分子などの構造解析を行う場合、スペクトルの分解能を高くし多くの情報を少数の実験で得ることが必要である。そのためには、溶液NMRと同様、等方シフト間のJと双極子結合による相関多次元NMRが有効である。今回この多次元NMRを ^{13}C ラベルした固体試料で実現するためにJ-HOHAHAと双極子HOHAHAの2つの混合パルス列を新たに開発した。この多次元分光法では展開期には異方的相互作用を消し等方シフトを働かす必要があるため全ての実験はMAS条件下で行っており、各期に働く相互作用はRFパルスのみにより瞬時に、切り換えられる。

〔同種核J-混合パルス列〕 このパルス列は、J結合のみによる磁化移動を行わせるもので、等方シフト、異方シフト、双極子相互作用はパルス列とMASで消去し、約40Hz程度の J_{c-c} のみを残す。用いたパルス列は溶液のHOHAHAで用いるMLEVを今回の目的に合わせ

固体高分解NMR、試料回転、 ^{13}C 同種核相関分光、安定同位体ラベル試料。

ふじわら としみち、エイ ラマムーティー、ながやま くにあき、すぎさわ
ひさし、ふじと てるあき。

て修正したものである。ただ、マジック角試料回転により平均化され働かなくなるべき異方シフトと双極子相互作用がラジオ波による変調で復活しないようにスーパー・サイクルを組んでパルス列を作った。このパルス列で共有結合を隔てたスピンを結び付けることができる。図 1 a, b に、このパルス照射下では双極子による混合が起こっていないことをアミノ酸についてのシミュレーションで示した。

〔同種核双極子混合パルス列〕 この双極子H0H0HAHAでは、化学シフトは消すが同種核双極子相互作用は消えないようする。パルス列は実効双極子結合定数の符号を変えないスピネコーとその符号を逆転するマジックエコーを組み合わせたもので、これをMAS に同期して照射し双極子相互作用を復活させている。同種核双極子混合を起こすためにはすでにDRAMA、SEDRA⁽¹⁾ というパルス列が提案されているが、これらによる混合はそれぞれオフセット、カップリングしているスピンの共鳴周波数差により大きな影響を受ける。しかし、今回設計したパルス系列は、オフセットの影響を消すように作ったMAS周期の1/6より短いサブサイクルより構成しているので、オフセットやオフセット差の影響を受けない。この双極子結合による混合は、溶液中でのNOEと同様に核間距離や二面角など分子の立体構造を表すパラメータに依存する。この例を図 1 c, d に示した。

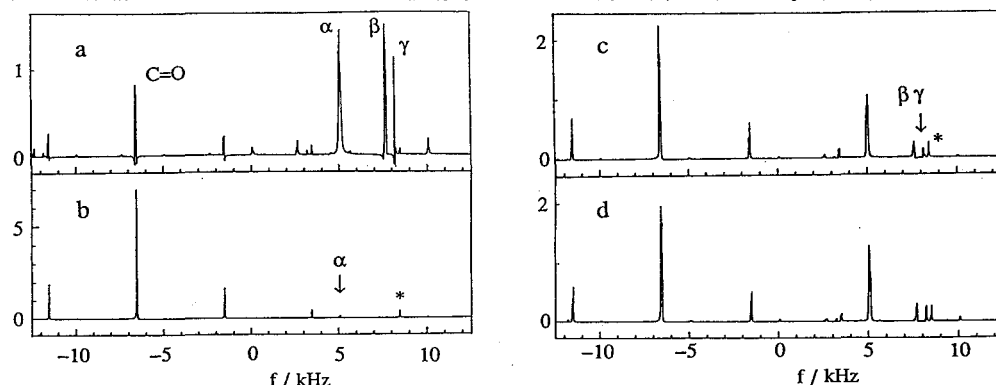


図 1. 固体H0H0HAHAのシミュレーション。試料はアミノ酸でカルボニルから γ 位までの ^{13}C の4スピン系の粉末。試料回転は5KHz、RF強度は100kHz。(a)カルボニル炭素のみ選択励起後、10.4msのJ-H0H0HAHAで得られるスペクトル。(b)全てのJ結合定数を0Hzとした以外(a)と同じ条件で求めたスペクトル。 α 炭素の小さい強度から判るようにJ-H0H0HAHA中には双極子による混合はほとんど起こっていない。(c)カルボニル炭素のみ選択励起後、1.6msの双極子H0H0HAHAで得られるスペクトル。ただし試料はアミノ酸はカルボニル炭素と γ 炭素はゴーシュの関係にある。(d)(c)と同じ方法で求めたスペクトル。ただしカルボニル炭素と γ 炭素はトランスの関係にある。カルボニル炭素と γ 炭素の距離はトランス形の方が長くなっているにもかかわらず、カルボニル炭素から γ 炭素への磁化移動はトランス形の方が1.5倍大きい。このことは磁化移動がカルボニル炭素と γ 炭素間の双極子結合によるのではなく、むしろスピンの拡散的に伝わっていることを示している。*はサイドバンド。
文献 (1) A. E. Bennett, et al., J. Chem. Phys. 96, 8624 (1992).

京大理 ○寺尾武彦, 桑原大介, 今城文雄

Solid-State NMR Studies of Dynamic and Static Structures of
Guest Molecules Trapped in Inclusion Compounds
Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University
Takehiko Terao, Daisuke Kuwahara, Fumio Imashiro

The behavior of guest molecules in β -cyclodextrin/ferrocene and cholic acid/ γ -valerolactone inclusion compounds has been studied mainly by variable-temperature measurements of ^{13}C chemical-shift powder patterns obtained selectively for the guest molecules using one-dimensional SASS NMR. Details of dynamics, conformations, populations, and selectivity of the guest molecules are discussed.

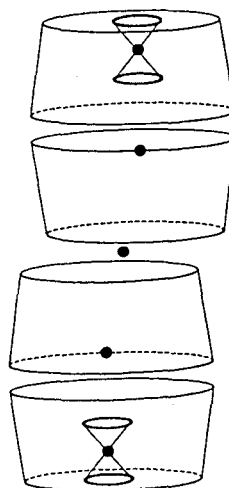
1. β -シクロデキストリン/フェロセン包接化合物

座 β -シクロデキストリン (CD) はフェロセンをモル比1:1で包接することが元素分析より分かっている [1]. 一方, X線回折 [2] により, 単位格子あたり4個のCD分子と5つのフェロセン分子の位置 (図1に鉄原子の位置が黒丸で示されている) が存在することが分かっている. フェロセン分子の炭素原子の位置は2つのフェロセン分子の位置に対してのみ決定されている.

この研究の目的は4個のフェロセン分子がどのように5つの位置に分布し, どのような運動を行っているかを明らかにすることにある.

結果 ^{13}C CPMASスペクトルではこの包接化合物中のフェロセン分子は単一の共鳴線を示す.

図1

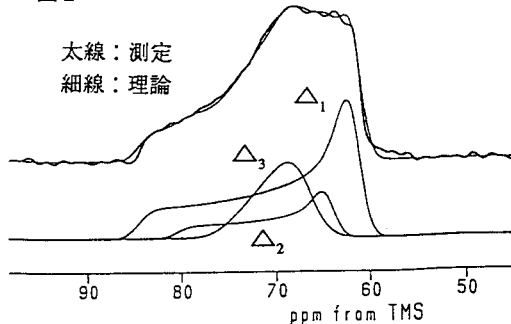


一方, 1次元SASS法 [3] で観測した ^{13}C 化学シフト異方性 powder pattern (68.7° のオフマジック角度回転により縮尺されている) は, 図2に示すように3つの軸対称テンソルに対する

固体NMR, SASS, 包接化合物, コール酸, β -シクロデキストリン

てらおたけひこ, くわはらだいすけ, いましろふみお

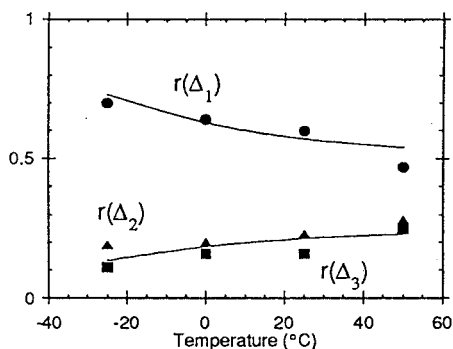
図2



powder patternの重ね合わせを仮定して良くシミュレートすることができる。全ての化学シフト異方性は固体フェロセン—その化学シフトテンソルは C_5 軸回りの回転により軸対称である—の異方性よりも小さい。これはゲスト分子の運動状態が3種あり、それぞれ才差角度 5° , 2° , 4° で才差運動していると仮定すれば説明される。

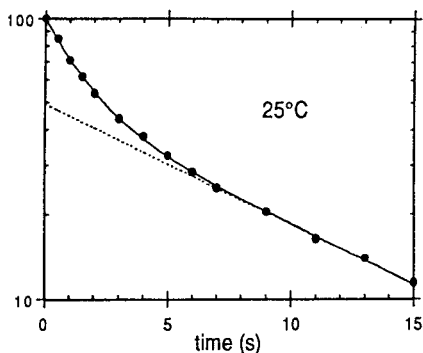
ゲストフェロセン分子の ^{13}C powder patternを -25 , 0 , $50^\circ C$ でも測定したが、いずれも図2とほとんど同じ異方性をもつ軸対称テンソルに対する3つのpowder patternの重なりとしてシミュレートすることができる。3つのpowder patternの相対強度は図3に示すような温度依存性を示す。

図3



ゲスト分子の $25^\circ C$ における ^{13}C の T_1 測定のプロットを図4に示す。実線は2種の T_1 を仮定した最小自乗適合緩和理論曲線であり、測定点と良い一致を示す。2種の成分比は1:1である。これは

図4

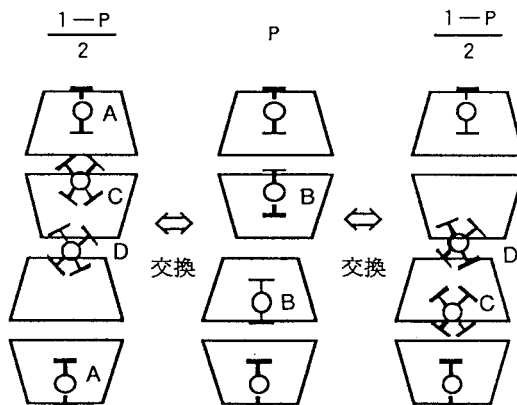


$-25^\circ C$ から $50^\circ C$ までの測定範囲で同じである。

議論 どのようなモデルがこれらの結果を説明し得るであろうか? ^{13}C powder patternの結果から見れば、ゲストフェロセン分子に3つの異なる運動状態があり、それらのpopulationは温度依存する。他方、ゲスト分子の $^{13}C T_1$ 測定の結果は、温度に依らず、等しいpopulationをもつ2つの異なる運動状態の存在を示唆している。この見かけ上の矛盾は次のように解くことができる。

我々のモデルでは図5に示すようなフェロセン分子に対して4つの異なる状態A, B, C, Dを仮定する。外側の2つのシクロデキストリン分子は状態Aのフェロセン分子を常に包接している。内側の3つの位置には2つのフェロセン分子が存在し、状態(C, D) \leftrightarrow (B, B) \leftrightarrow (D, C)の間でそれぞれ確率 $(1-p)/2$, p , $(1-p)/2$ をもって交換して

図5



いる。交換速度は化学シフト異方性より遅く、 $1/T_1$ より速い。したがって、状態B, C, Dは互いに異なる化学シフト異方性と、共通の T_1 をもつ。状態Aにあるフェロセン分子数とB, C, Dにある分子数との比は1:1であり、等しいpopulationをもつ2つの動的状態が存在するという T_1 の結果を説明する。状態Aにあるフェロセン分子は、X線の研究でほとんど動いていないことが分かっているから、最大の異方性 Δ_1 をもつと考えられる。 $r(\Delta_1) \geq 0.5$ であり、状態Cは不安定と考えられるから状態Bのフェロセンも Δ_1 に帰属される。このとき、3つのpowder patternの強度比は

$$r(\Delta_1) = \frac{1+p}{2}, r(\Delta_2) = r(\Delta_3) = \frac{1-p}{4}$$

で与えられる。ここで

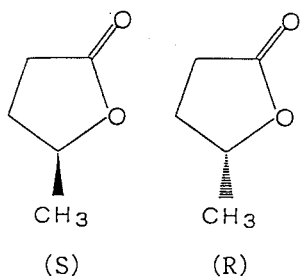
$$p = \frac{\exp(\Delta G/RT)}{1 + \exp(\Delta G/RT)}, \Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

これらの式を図3のデータにフィットさせることにより、交換過程における ΔH および ΔS はそれぞれ4.80 kcal/mol, 19.7 e.u.と求められる。

2. コール酸/ γ -バレロラクトン包接化合物

庄 コール酸(CA)は包接化合物形成の際、高い光学分割能を示すことが報告されている[5]。同報告によれば、 γ -バレロラクトン(V)のラセミ体を再結晶により包接させた場合、抽出された

γ -バレロラクトン



Vの光学純度は28%(S体過剰)である。しかしながら、X線構造解析による研究[6]ではS体のみが包接されると報告されている。

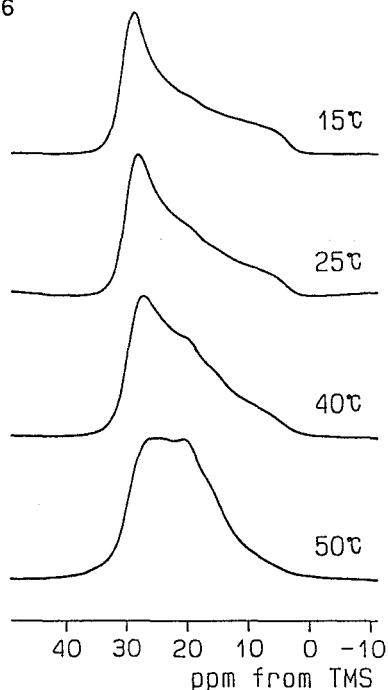
我々はこの矛盾点を解決し、さらにゲスト分子の動的状態を明らかにするために研究を行った。

結果と議論 CA/V包接化合物の ^{13}C CPMASスペクトルにおいてVのメチル基が強度の異なる2本の共鳴線を示した。再結晶とVの抽出を数回繰り返した試料では強い方の線の位置にしか信号は現われなかった。このことから強い線と弱い線はそれぞれS体とR体のメチル基に帰属される。Vのメチル基の ^{13}C をエンリッチしたCA/V包接化合物でMASスペクトルを観測し、そのシミュレーションからCA中のVは28% S体過剰であると結論した。これは従来の測定結果[5]と一致するが、方法はきわめて直接的である。

CA/V包接化合物中においてVのエーテル炭素の T_1 測定を行った。結果は28% S体過剰の通常の試料で4.1秒(S), 2.1秒(R), 20% R体過剰の試料(浸漬法で残留するR-リッチなVを用いて再度浸漬を行って作成)で0.55秒(S), 2.7秒(R)であった。2つの試料で T_1 が異なるということはR(S)体の存在がS(R)体の動的状態に影響を与えていることを示している。したがって、S体とR体はCAチャネル内で微視的に混在していると結論され、試料がS体の結晶とR体の結晶の混合物であるという可能性は除外される。すなわち、S体のみが結晶中に含まれるというX線の結果は完全に否定される。

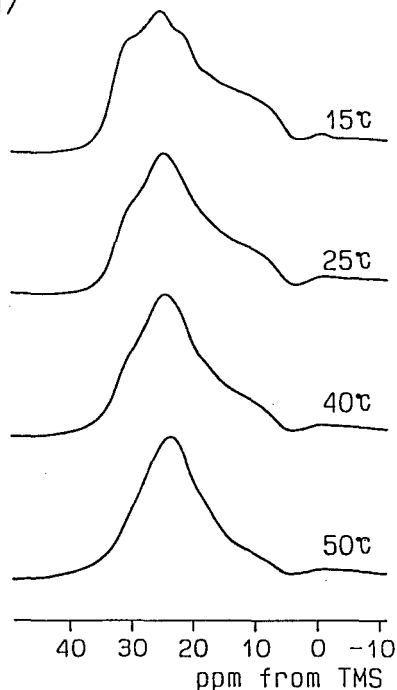
1次元SASS法を用いてS体とR体のメチル基の ^{13}C 化学シフト異方性 powder pattern(オフマジック角度回転による縮尺は元に戻されている)の温度変化測定を行った結果をそれぞれ図6と図7に示す。試料は28% S体過剰のものでVのメチル基の ^{13}C はエンリッチされている。どち

図6



らのスペクトルも測定温度範囲で大きく変化しており、ゲスト分子の全体的な運動が存在していることを示している。認識される方の分子はそうでない分子に比べてタイトに保持され、動き難いように思われがちであるが、この例は必ずしもそうではないことを示している。S体のスペクトルは数個の配向間のジャンプを仮定して良くシミュレートされる。R体の場合は今のところランダムジャンプモデルが良さそうである。また、S体とR体で化学シフトテンソルの主値および等方平均値が異なっているが、これは両者で配座が異なることを意味する。MM2分子力場計算を行った結果、孤立したVは2つの安定配座をもつことが分かった。両者に対して4-3 1G GIAO分子軌道計算を用いて化学シフトテンソルを求めると、第一配座は軸対称に近く、第二配座は全く非軸対称であった。このことから、S体、R体はそれぞれ第一、第二配座をもつものと思われる。MM2の計算では第二配座の方が球形に近く、R体がランダムジャンプを行なっているらしいことと辻褃があう。

図7



ンプを行なっているらしいことと辻褃があう。

3. 実験

測定はすべて日本電子GSX200 (^1H 共鳴周波数200 MHz) に高周波電力増幅器などを付加し、自作のSASSプローブを用いて行った。

文献

1. A. Harada, Y. Hu, S. Yamamoto and S. Takahashi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 729 (1988).
2. S. Takahashi et. al., to be published.
3. J. Ashida, T. Nakai and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.*, **168**, 523 (1990).
4. M. Miyata, M. Shibakami and K. Takemoto, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 655 (1988).
5. K. Miki, N. Kasai, M. Shinakami, K. Takemoto and M. Miyata, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1757 (1991).

第 2 日

11月18日(水)

L 11 ~ L 21

選択励起 SASS ^{13}C NMR法によるガラス状高分子の
化学シフトの異方性の測定とその解析

(京大化研)*堀井文敬、別府隆幸、(日本電子) 杉沢寿志、藤戸輝昭

Measurements of ^{13}C Chemical Shift Anisotropies of Glassy Polymers
by Selective Excitation SASS NMR Spectroscopy and Their Analyses

F. Horii, T. Beppu, H. Sugisawa*, and T. Fujito*

Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., Uji, Kyoto 611

*JEOL LTD., 3-1-2, Musashino, Akishima, Tokyo 196

In an attempt of measurements of spectra reflecting the chemical shift anisotropy, we have developed the selective excitation switching angle sample spinning (SASS) NMR method for solid polymers by combining the cross polarization, the selective excitation pulse (DANTE or SELDOM), and SASS by use of a Doty dynamic angle spinning probe. We have applied this method to the characterization of the phenylene motion of bisphenol A polycarbonate in the glassy state.

1. 緒言

固体高分解能 ^{13}C NMR法において静止状態で試料の測定を行うと、化学シフトの異方性 (chemical shift anisotropy, 以下、CSAと略す) を反映した共鳴線が得られ、これらの共鳴線は分子配向や分子運動の解析に極めて有力と考えられる。しかし、CSA共鳴線は一般には線幅が広く、化学的に非等価な ^{13}C 核が複数存在する試料では個々のCSA共鳴線が重なるため、解析が困難である。したがって、これまで特定の ^{13}C 核のCSA共鳴線を測定する方法がいくつか提案されてきた。

本研究では、Iwamiyaraが提案した方法¹⁾に基づいて、cross polarization (CP)と選択励起パルス (DANTE²⁾またはSELDOM³⁾並びに switching angle sample spinning (SASS)法⁴⁾を組合せた選択励起SASS NMR法によるCSA共鳴線の測定について検討を行う。また、この方法を用いて得たビスフェノールAポリカーボネート (BPAPC)固体の

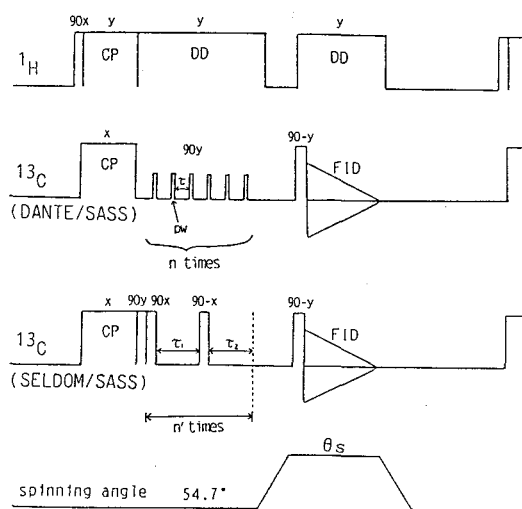


Fig.1 The basic pulse program for selective excitation SASS ^{13}C NMR

化学シフトの異方性、選択励起SASS NMR、Nサイト交換モデル、ガラス状高分子、分子運動
ほりい ふみたか、べっふ たかゆき、すぎさわ ひさし、ふじと てるあき

芳香族CH炭素のCSA共鳴線を、適当な分子運動モデルを用いてシミュレーションを行った共鳴線と比較することにより、BPAPCのフェニレンの分子運動について検討した結果を報告する。

2. 実験

JEOL JNM-GSX200分光計($B_0=4.7T$)にDoty社製 dynamic angle spinning プローブを組み込み、SASS用システムとした。選択励起SASS NMR測定に用いた2通りのパルス系列を図1に示す。DANTE/SASS¹⁾の選択励起 90° パルスのパルス幅(PW $\times n$)を $24\mu s$ とした。また、各パルスのサイクルタイム($\tau+PW$)は試料回転数($\nu_s=3.5kHz$)の逆数($286\mu s$)とした。一般に、パルス幅(PW)が小さいほど励起周波数域が狭くなり選択性は向上するが、感度は低下する。本研究ではPW= $2.4\mu s$, $n=10$ とした。選択励起 90° パルス後のFID観測の際の試料回転角 θ_s を 65.0° とした。magic angle(54.7°)から θ_s への切換えには数msを要した。

一方、SELDOM/SASSでは選択励起パルスとして $[90^\circ_x - \tau_1 - 90^\circ_x - \tau_2]_{n'}$ からなるパルストレインをかけた。 n' の値の増加により感度は低下するが選択性は向上する。本研究では $n'=13$ とした。また、 $\tau_1=1/\nu_s$, $\tau_2=1ms$ とした。

用いたBPAPCは、 $320^\circ C$ でホットプレスした後、氷水中に急冷することにより作製した非晶性フィルムである。

3. 結果および考察

図2(a)には、室温で測定したBPAPCのCP/MAS ^{13}C スペクトルおよびその帰属を示す。図2(b-1)はDANTE/SASS、(b-2)はSELDOM/SASSによりC5炭素を選択励起し、 $\theta_s=54.7^\circ$ として得たスペクトルである。これらの図により、いずれの方法によっても選択励起がうまく行われることが確認される。ただし、SELDOMでは横緩和の影響をより強く受けるため、DANTEに比べてS/N比が少し低い。図2(c)は、(b-1)と同一条件で $\theta_s=65.0^\circ$ (スケール因子: $f_s=3\cos^2\theta_s-1/2=-0.23$)として得たスペクトルである。C5のCSA共鳴線が選択的に精度良く得られることがわかる。また、図2(d)は(c)のスペクトルのC5の共鳴線をスケール補正したもので、静止状態の測定で得られるC5のCSA共鳴線に相当する。

同様な方法により、種々の温度で測定したBPAPCのC5のスケール補正後のCSA共鳴線を図3の実線で示す。これらの共鳴線の形状は剛直状態で認められる形状とは異なり、軸対称に近い形状である。したがって、フェニレンが 180° ジャンプのような回転運動を行っていると考えら

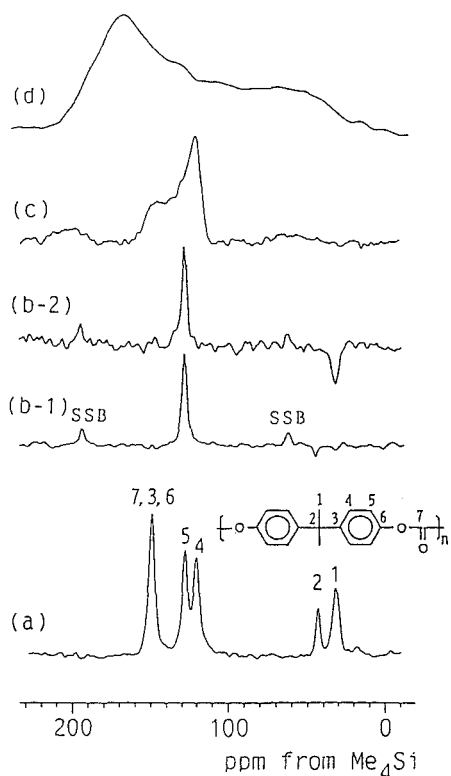


Fig.2 50MHz ^{13}C NMR spectra of BPAPC measured at $25^\circ C$. (a) CP/MAS, (b-1) DANTE/SASS for C5 with $\theta_s=54.7^\circ$, (b-2) SELDOM/SASS for C5 with $\theta_s=54.7^\circ$, (c) DANTE/SASS for C5 with $\theta_s=65.0^\circ$. (d) is reproduced from spectrum (c) by considering the scaling factor $f_s=-0.23$. SSB: spinning side band

れる。また、温度上昇により共鳴線の形状がわずかに変化することから、この回転運動の振幅や周波数が温度により変化することが推測される。

共鳴線のシミュレーション

これらの共鳴線の形状を説明するため、C5を含むベンゼン環の運動をNサイト交換モデルを用いて共鳴線のシミュレーションを行った。このモデルでは、フェニレンのポテンシャル極小の位置から軸まわりに角度 δ_j だけ回転した位置をサイトjとして合計N個のサイトをとり、それぞれのサイト間を単位時間あたりの遷移数 κ でランダムに交換すると仮定した。共鳴線 $I(\omega)$ は次式で与えられる。

$$I(\omega) = N^{-1} \text{Re} [L / (1 - \kappa L)] \quad (1)$$

$$L = \sum_{j=1}^N [i(\omega - \omega_j) + N\kappa]^{-1}$$

ここで ω_j はサイトjの共鳴周波数で、 δ_j および化学シフトテンソルの主値 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} の関数である⁵⁾。 σ_{11} , σ_{22} および σ_{33} はすべてのサイトに対して一定であると仮定し、文献⁶⁾に基づき $\sigma_{11} = 204$ ppm, $\sigma_{22} = 152$ ppm, $\sigma_{33} = 29$ ppmとした。まず、 $N = 2$ の2サイト交換モデルで種々の δ_1 , δ_2 および κ について共鳴線のシミュレーションを行ったが、測定で得た共鳴線の形状を説明することはできなかった。

そこで、図4に示すように、 $\delta_j = 0^\circ$ および 180° の平衡位置のまわりに幅 $\pm\delta_{max}$ の間を等間隔でいくつかのサイトが存在するとして、合計N個のサイト間をランダムに交換するモデル⁷⁾によりシミュレーションを行った。その結果、 $N \geq 10$ の場合にはサイト数によらず、同一の δ_{max} および κ の値に対し

て共鳴線の形状はほぼ一致した。したがって、 $N = 10$ としてシミュレーションを行った。

図3の破線は、上記10サイト交換モデルによるシミュレーションの結果である。実線で示した実測の共鳴線とほぼ良く一致する。したがって、BPAPCのフェニレンは振幅 $\pm 30^\circ$ 程度のポテンシャル極小内での揺動運動と $120^\circ \sim 240^\circ$ の2つのポテンシャル極小間のジャンプ運動を、周波数 10^3 Hz程度で行っていると考えられる。温度上昇により、50~70 ppmにおけるショルダーが滑らかになるが、これは δ_{max} および κ の値のわずかな増加に対応する。

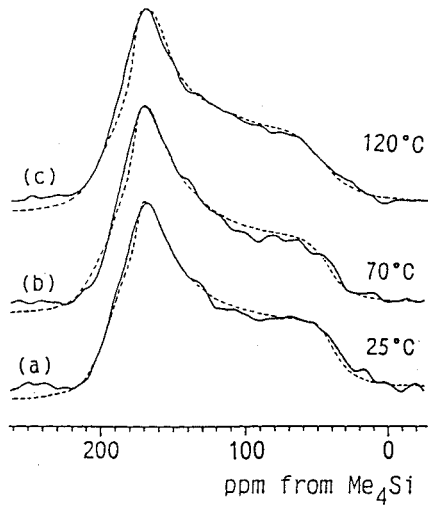


Fig.3 CSA powder spectra of the C5 carbon of BPAPC. Solid lines are experimental spectra measured at different temperatures by DANTE/SASS. Broken lines are simulated spectra by assuming that the phenylene group undergoes oscillations and flips among ten sites shown in Fig.4. (a) $\delta_{max} = 26^\circ$, $\kappa = 6.3 \times 10^2$ Hz, (b) $\delta_{max} = 30^\circ$, $\kappa = 7.9 \times 10^2$ Hz, (c) $\delta_{max} = 36^\circ$, $\kappa = 7.9 \times 10^2$ Hz.

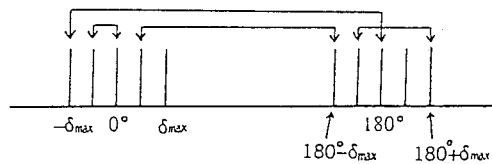


Fig.4 Schematic diagram of N-site exchange model for oscillations and flips ($N=10$).

図5の実線は、DANTE/SASSにより得たC4の室温におけるCSA共鳴線である。上述のC5に対するシミュレーションで得た δ_{max} および ν を用いて、 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} に適切な値を与えれば実測共鳴線に対応するシミュレーション共鳴線が得られるものと考えられる。しかし、実際には実測共鳴線と一致するシミュレーション結果は得られなかった。C4はC5に比べて分子内でメチル基やベンゼン環に近接しているため、ベンゼン環の回転により化学シフトテンソルの主値が変化すると考えられる。そこで、 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} の値が各サイトにより異なると仮定して解析を行った。

実測共鳴線に最も良く一致するシミュレーション共鳴線を図5の破線で示す。両共鳴線は互いに良く一致する。このシミュレーションでは、各サイトの化学シフトテンソルの主値は $\sigma_{11} = 189 + 5.5m$, $\sigma_{22} = 153 + 5.5m$, $\sigma_{33} = 22 - 11m$ ($m = -2, -1, 0, 1, 2$)であると仮定した。各サイトの m の値を図6に示す。

この結果、ベンゼン環のCH炭素でもフェニレンの回転運動により化学シフトテンソルの主値が変動することを考慮する必要があることが明らかになった。同様な方法によりベンゼン環を含むいくつかの高分子の分子運動についても現在解析を検討している。

References

- 1) J. H. Iwamiya et al., J. Magn. Reson., 88, 199(1990).
- 2) G. A. Morris and R. Freeman, J. Magn. Reson., 29, 433(1978).
- 3) P. Tekely et al., J. Magn. Reson., 80, 509(1988).
- 4) T. Terao et al., Chem. Phys. Lett., 107, 145(1984).
- 5) F. Horii et al., Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., 70(2), in press.
- 6) J. F. O'Gara et al., Macromolecules, 18, 1117(1985).
- 7) A. K. Roy and A. A. Jones, J. Magn. Reson., 64, 441(1985).

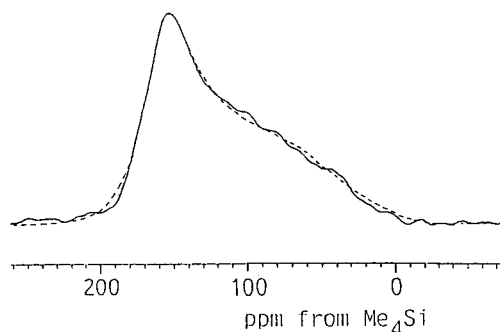


Fig.5 CSA powder spectrum of C4 of BPAPC; the solid line: measured by DANTE/SASS, broken line: simulated.

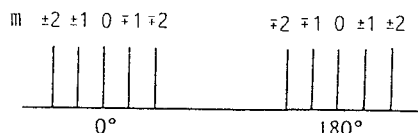


Fig.6 Representation for m values at the respective sites.

L 12 固体高分解能¹³C NMRによる紫膜中のバクテリオロドプシンの高次構造変化の解析

○辻 暁、内藤 晶、斎藤 肇
姫路工大 理 生命

Conformational Studies of Bacteriorhodopsin in Purple Membrane by High-Resolution Solid-State ¹³C NMR

○Satoru Tuzi, Akira Naito, Hajime Saitô
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We recorded high-resolution solid-state ¹³C NMR spectra of light-driven proton pump bacteriorhodopsin in purple membrane. Bacteriorhodopsin is a typical membrane intrinsic protein, consisting of seven α -helices traversing the lipid bilayer, and contains one chromophore, retinal. We prepared ¹³C labeled purple membranes using either [3-¹³C]L-alanine or [1-¹³C]L-valine, and observed remarked changes of higher order structure between dry and hydrated states of the samples. On the basis of the ¹³C chemical shift and relaxation parameters (TCH, T1 ρ and T1), this finding was ascribed to a change of the manner of mutual orientation between α -helices induced by hydration/dehydration.

バクテリオロドプシンをはじめとする膜内在性蛋白質の多くは脂質膜を横切る α -ヘリックスの集合からなる高次構造を持つ。このような脂質膜中の部位の高次構造は膜蛋白質の機能に影響すると考えられるが、溶液高分解能NMRを用いてその構造を解析することは、長い回転相関時間によるスペクトルの広幅化のために困難である。これに対し、固体¹³C NMRを用いて観測を行なうならば、膜中の蛋白質に関して高次構造を反映するスペクトルを得、個々の高次構造に関して緩和パラメーターの解析を行なうことができる。構造および運動性について得ら

れる情報を総合することで、生体膜中における膜蛋白質の構造と機能に関連した構造変化の挙動について総合的な描像を得ることができると考えられる。ここでは試料として、膜を横切る7本の α -ヘリックスからなり、ヘリックスに囲まれた反応部位にレチナルを有する膜内在性の光プロトンポンプ蛋白質、バクテリオロドプシンを用い、紫膜の水和状態の変化とそれに伴うレチナルの構造変化 (Fig. 1) に対応する高次構造の変化を解析する。

[実験]

バクテリオロドプシンは炭素源として18種類のアミノ酸を含む合成培地中で培養したHalobacterium Halobium S-9株の菌体より²、純水中で菌体を破碎したのち、緩衝液中での洗浄と遠心分離を繰り返すことにより紫膜の状態に精製した。合成培地中の特定のアミノ酸を¹³C標識アミノ酸

キーワード：固体高分解能¹³C NMR、バクテリオロドプシン、膜蛋白質、高次構造、水合

○つじ さとる、 ないとう あきら、 さいとう はじめ

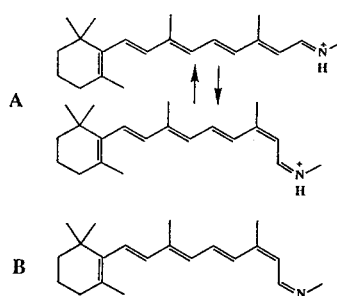


Fig. 1 Conformation of retinal in dark adapted bacteriorhodopsin at hydrated state (A), and dry state (B).

に置換することで、 $[3-^{13}\text{C}]$ L-アラニン ($[3-^{13}\text{C}]$ L-Ala) 標識および $[1-^{13}\text{C}]$ L-バリン ($[1-^{13}\text{C}]$ L-Val) 標識試料を調製した。紫膜はリン酸緩衝液から凍結乾燥し、測定試料として使用した。

^{13}C 固体高分解能 NMR スペクトルは Chemagnetics CMX400 FT NMR 分光器 (^{13}C : 100.7MHz) を用い、常温、遮光下で繰り返し時間 4s、接触時間 0.1-8ms、積算回数 1000-6000 回にて測定された。試料は凍結乾燥状態の紫膜をジルコニア製ローター中に充填し、乾燥状態の試料に関しては開放型キャップを用いて乾燥空气中で測定を行ない、また水と試料については相対湿度 100% のデシケーター中で一夜水和したのち密閉ローター中で測定を行なった。

[結果と考察]

二次構造の帰属 : Fig. 2A, B に乾燥状態の $[3-^{13}\text{C}]$ L-Ala 標識および $[1-^{13}\text{C}]$ L-Val 標識バクテリオロドプシンの ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを示す。Fig. 2A 中、37-39ppm および 22.7ppm の信号 (*) は代謝による ^{13}C 標識の他のアミノ酸残基の C_β 炭素および脂質の疎水部のメチル基への移動を示しているが⁵、主な信号は L-Ala C_β および L-Val $\text{C}=\text{O}$ への ^{13}C 標識を示している。

Fig. 3 に示すように L-Ala C_β および L-Val $\text{C}=\text{O}$ ピークは高次構造の違いに対応して複数のピークに分裂しており、ポリペプチドおよび繊維状蛋白質に関して与えられているコンホメーション依存 ^{13}C 化学シフトのデータ³ より、各試料中の二次構造を解析することができる。

Fig. 3B の L-Val $\text{C}=\text{O}$ の

173.9-174.5ppm の主ピークはバクテリオロドプシンの主な構造が α -ヘリックスであることを示しており、また、172ppm 付近の信号は一次構造を考慮すると α -ヘリックスをつなぐ部位に β -シート構造に対応する構造が存在することを示していると考えられる。同様に 177.1ppm の信号も折り返し部位に由来すると帰属される。L-Ala C_β についても主ピーク(乾燥時: 16-16.8ppm、水和時: 16.2ppm)は α -ヘリックス構造に帰属され、19.8ppm の小ピークと 17.5 および 14.7ppm 付近のシ

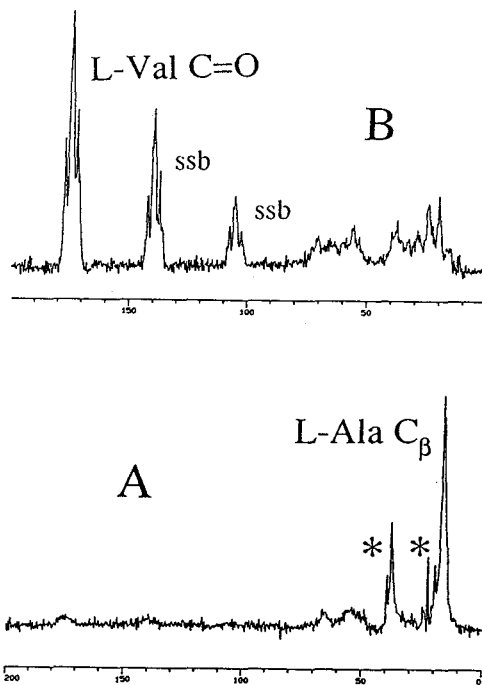


Fig. 2 ^{13}C CP-MAS NMR spectra of (A): $(3-^{13}\text{C})$ Ala, and (B): $(1-^{13}\text{C})$ Val labeled purple membranes at hydrated state. Ssb shows spinning side band.

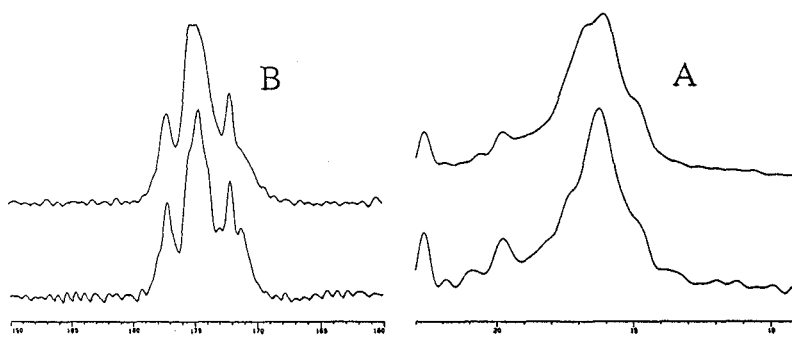


Fig. 3 Expanded ^{13}C CP-MAS NMR spectra of ^{13}C labeled purple membranes at dry (upper) and hydrated (lower) state.

(A) L-Ala C_β signals. (B) L-Val $\text{C}=\text{O}$ signals.

ルダ-はそれぞれ β -シートとその他の二次構造の存在を示している。

水和状態による高次構造変化： L-Ala C β の主ピークは乾燥時には16.0および16.8ppmに分裂したピークを与えるが、水和状態では16.2ppmに単一のピークを示し、試料の水和状態に応じて α -ヘリックス中のL-Ala C β の周囲の環境が変化していることを示している。L-Val C=Oの主ピークは3本以上のピークの重なりからなり、乾燥によって175.2ppmのピークの相対強度に増加が見られる。この変化は主鎖の二次構造の変化を示しているが、それはL-Ala残基に見られる変化と比較して小さく、水和状態によって生じる高次構造変化が主に α -ヘリックス間の相互作用の変化であることがわかる。

水和状態による運動性の変化： Table IにL-Ala C β 、L-Val C=Oおよび脂質のメチル炭素(22.7ppm)の交差緩和時間T_{CH}とプロトンのスピン格子緩和時間T_{1 ρ} の値を示す。乾燥時と水和時のT_{CH}を比較すると α -ヘリックス中のL-Ala C β では水和時T_{CH}(0.07ms)が乾燥時(0.17, 0.18ms)よりも有意に短くな

Table I
¹³C Chemical Shifts, Cross-Polarization Times (T_{CH}), ¹H Spin Lattice Relaxation Times in Rotating Frame (T_{1 ρ}) and ¹³C Spin-Lattice Relaxation Times (T₁) of L-Alanine C β , L-Val C=O and Methyl Group of Lipid in Purple Membrane at Dry and Hydrated State.

	Chemical shift (ppm)	T _{CH} (ms)	T _{1ρ} (ms)	T ₁ (s)
L-Ala Cβ				
Dry state	16.0 (α -helix) ^a	0.17	7 ^b	0.58
	16.8 (α -helix) ^a	0.18	7 ^b	0.58
Hydrated state	16.2 (α -helix) ^a	0.07	5 ^b	0.52
L-Val C=O				
Dry state	172.0 (β -sheet) ^a	0.40	7.0	
	173.9 (α -helix) ^a	0.45	5	
	174.6 (α -helix) ^a	0.36	6.1	
	175.2 (α -helix) ^a	0.36	6.7	
	177.1	0.27	8.8	
Hydrated state	172.1 (β -sheet) ^a	0.38	5.1	
	173.8 (α -helix) ^a	0.30	5.1	
	174.6 (α -helix) ^a	0.36	4.6	
	175.4 (α -helix) ^a	0.46	4.8	
	177.2	0.33	5.2	
Lipid (methyl group)				
Dry state	22.7	0.12		
Hydrated state	22.7	0.27		

^a Conformational assignment of peak is shown in parenthesis.

^b Accuracy of relaxation time value is not enough, because of dispersion of mobility of L-Ala residues.

っている。TCHは式

$$\frac{1}{T_{CH}} = \frac{C_{15}M_2^{15}}{\sqrt{M_2^{11}}} \quad (\text{Cis: 定数})$$

で示されるように¹³C、¹Hの二次モーメントM₂₁₅、M₂₁₁に依存し、遅い領域の運動速度または運動の異方性を反映するが、このTCH変化はバクテリオロドプシンのα-ヘリックスの膜中における配向の揺らぎが水和によって減少していることを示している。一方Val C=Oから得られた¹HT_{1ρ}はα-ヘリックス間の折り返し部位の水和による変化を示している。蛋白質中の¹HT_{1ρ}の値は一般にスピン拡散のために分子全体で平均化された値をとる。水和状態におけるT_{1ρ}はα-ヘリックス部位とその他の部位ではほぼ等しい値を与えるが、乾燥状態におけるT_{1ρ}は172.0および177.1ppmのピークと175.2ppmのピークで他のα-ヘリックス部位よりも長い値を与えている。前者はα-ヘリックス同士をつなぐ折り返し部位の運動性が乾燥時により高く、スピン拡散の程度が低くなっていることを示している。また、後者は175.2ppmのピークに対応するα-ヘリックスの一部が乾燥時に他のヘリックス部位より高い運動性を持つことを示すが、この点は水和により175.2ppmのピーク強度が減少する点を考慮すると、乾燥によってα-ヘリックスの一部により高い運動性を持つ構造への変化があることを示している。L-Ala C_βについてはL-Ala残基側鎖周囲の環境の分布のために単一の指数関数によるT_{1ρ}の評価が正確に行えないが、¹³C核のスピン格子緩和時間T₁(Table 1)を比較すると、乾燥時と水和時のα-ヘリックスのT₁に違いがなく、相関時間10⁻⁸秒付近の速いα-ヘリックスの運動は水和状態によって変化していないことがわかる。これらの運動性の挙動は、バクテリオロドプシンを水和状態から乾燥状態に移した際に、α-ヘリックス間を結ぶ折り返し領域の運動性が増加し、α-ヘリックスの配向の揺らぎが増していることを示している。また、脂質のメチル基ではTCHは水和状態でもより長く、脂質分子が蛋白質とは逆に乾燥時に良く配向していることがわかる。この点は紫膜の水和状態による蛋白質の構造変化が脂質ではなく、蛋白質自体の水和状態の違いに由来していることを示唆している。

以上のように、固体高分解能¹³C NMRによる観測から、紫膜の水和状態の変化によりレチナールの構造変化 (Fig. 1)と平行してバクテリオロドプシンの高次構造変化が生じ、膜内におけるα-ヘリックス構造の配向の変化とヘリックス間の相互作用の変化が起きていることが明らかになった。このことは、水和状態によるレチナールの構造およびシッフ塩基のプロトン化の違いに分子全体の高次構造の変化が影響している可能性を示している。このような固体高分解能¹³C NMRを用いた膜蛋白質の膜内部の高次構造変化の解析は、同様の構造を持つ他の膜蛋白質についても可能であり、高次構造の動的な挙動に関して情報を与えると考えられる。

本研究を進めるに当たり有益な助言をいただきました姫路工業大学津田基之博士、岩佐達郎博士、電気通信大学辻本和雄博士に深く感謝いたします。

[参考文献]

- 1)Korenstein, R. and Hess, B. (1982) Meth. Enzymol. 88, 180-193.
- 2)Onishi, H., McCance, M. E. and Gibbons, N. E. (1965) Can. J. Microbiol. 11, 365-373.
- 3)Saito, H. and Ando, I. (1989) Ann. Rep. NMR Spectrosc. 21, 209-290.

L 13 芳香族ポリアミドの固体¹⁵N NMR構造解析

農工大工 呂泰洪・○出村誠・朝倉哲郎
東洋製罐綜研 伊藤卓郎

Structural Analysis of Aromatic Polyamides by ¹⁵N Solid State NMR; Joo Hong Yeo¹, Makoto Demura¹, Tetsuo Asakura¹, and Takuro Itoh², 1 Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2 Co., R & D, Toyo Seikan Group

The structure in atomic level for aromatic polyamides, Kevlar and Nomex, were determined in the solid state by using ¹⁵N CP NMR method on the basis of the ¹⁵N chemical shift tensors. The ¹⁵N chemical shift tensors were determined by the simulation of the observed powder pattern spectra. ¹⁵N CP NMR spectra of the oriented samples were observed by setting up the block samples at parallel and perpendicular with respect to the magnetic field. By the simulation of both spectra, the Euler angles which characterize transformation of the principal axis system to fiber axis system were determined. The other Euler angles of transformation from PAS to molecular axis system were determined with ¹³C-¹⁵N double labeled model compound. The angles between the NH bon direction and the fiber axis of oriented samples were determined by using these Euler angles. The crystalline and non-crystalline structures of two aromatic polyamides were discussed.

緒言

通常の固体高分解能CP/MAS NMRでは消去されてしまう固体¹⁵N化学シフト異方性と¹⁵N-¹³C双極子相互作用に着目することにより、原子レベルでの詳細な高分子構造解析を行なうことのできる新しい方法を開発している。この方法を用いて絹タンパク質の特定残基主鎖の内部回転角(ϕ, ψ)を決定した結果については、本討論会で発表予定である(P49)。

本発表では、この新しい固体¹⁵N NMR解析法を芳香族ポリアミド、ケブラー、ノメックスの構造解析に適用した結果について述べる。

実験 NMR測定

芳香族ポリアミドは、poly-paraphenylene terephthalamide(Kevlar)およびpoly-metaphenylene terephthalamide(Nomex)を用いた。¹⁵N化学シフトテンソル値は、KevlarおよびNomexの粉末試料の¹⁵N CP NMR測定を行ない、そのスペクトルシミュレーションから決定した。また、KevlarおよびNomex繊維の一軸配向ブロック試料(4x4x12 mm)を作製後、静磁場と繊維軸とのなす角度を0度(平行)または、90

キーワード： 芳香族ポリアミド、ケブラー、ノメックス、固体¹⁵N CP NMR、配向、化学シフトテンソル

ようじゅほん、でむらまこと、あさくらてつお、いとうたくろう

度（垂直）に設定し、 ^{15}N CP NMRを測定した。配向試料のスペクトルのシミュレーションにより、主軸系と繊維軸系間の変換のオイラー角 α_F, β_F を決定した¹⁾。さらに、 ^{13}C - ^{15}N ダブルラベルベンズアニリドを合成し、 ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用によってモジュレートされたそのパウダーパターンのシミュレーションから、主軸系を分子軸系に変換するオイラー角 α_D, β_D を決定した²⁾。

^{15}N CP NMRの測定は、ブロック試料の角度を任意に変えられるプローブを備えたJEOL EX-270 NMRスペクトロメーターを用いた。CP時間は7 ms、繰り返し時間は7sとした。 ^{15}N 化学シフトは NH_4NO_3 を基準とした。

解析手順

解析手順をFig. 1にフローチャートとしてまとめた。

I. 化学シフトテンソルの決定

KevlarおよびNomexのパウダーパターンスペクトルのシミュレーションによって、各々の試料の化学シフトテンソル $\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$ を決定した。

II スペクトルの分離

Kevlarの一軸配向試料の繊維軸を磁場に平行に置いた時のスペクトルは1本のピークを与える。一方、Nomexの場合は、3本のピークが出現する。従って、Nomexの構造解析にあたって、まず、これらのピークの変換を行う必要がある。Gaussianを仮定したシミュレーションによって、各々の割合を決定した。

III 磁場に平行のスペクトルから α_F, β_F 値を予測

配向試料の繊維軸を磁場に平行に設定した場合、そのスペクトルのピーク位置は、パラメータ $\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}, \alpha_F, \beta_F$ の関数として表すことができる。このうち、 $\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$ は、手順Iで決定されるので、実際には、 α_F, β_F がパラメータとなる。特に、アミド ^{15}N 核の β_F 値は、 α_F に比較してそのピーク位置に敏感であることを加味して、最適な α_F, β_F 値の組み合わせを決定した。

IV. 磁場方向に対して平行のスペクトルのシミュレーション

手順IIIで決定した α_F, β_F の組み合わせは、すべて平行スペクトルのピーク位置を再

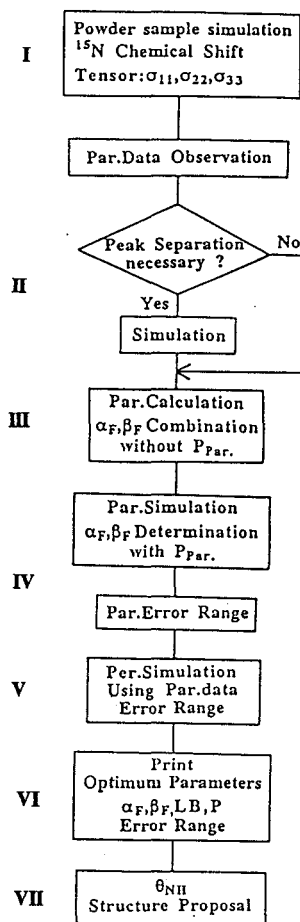


Fig.1 Flowchart of New Structure Analysis of Polyamides by ^{15}N Solid State NMR.

現できる。そこでさらに、繊維軸の分布 p (ガウス分布を仮定)を考慮に入れたスペクトルシミュレーションを行い、実測スペクトルと計算スペクトルの誤差の標準偏差SDの値が小さくなる α_F , β_F の範囲(error range)を決定した。計算範囲内の最大と最小のSDを求め、その差の10%をcut-offの範囲とした。

V. 磁場方向に対して垂直な場合のスペクトルシミュレーション

配向試料の繊維軸を磁場に平行に置いた場合と垂直に置いた場合のスペクトルシミュレーションの精度は、前者の方が格段に高い。そこで手順IVのerror range (< 10%)内の α_F , β_F の組み合わせを用いて、垂直スペクトルのシミュレーションを行い、同様にSD値を計算した。最終的に平行の場合に求めたerror rangeをさらに狭めた。

VI パラメータの決定

以上のようにして α_F , β_F の値と、さらに各々のピークのラインブロードニング(LB)、繊維軸回りの配向分布の角度 p が決定された。

VII 繊維軸とNH方向のなす角度 θ_{NH} の決定

決定した α_F , β_F の値と主軸系を分子軸系に変換するオイラー角 α_D , β_D (^{13}C - ^{15}N ダブルラベルベンズアニリドのパウダーパターンシミュレーションから決定した)のデータを組み合わせることによって、繊維軸と分子のNH方向のなす角度 θ_{NH} を計算した。

結果と考察

1. Kevlarの構造解析

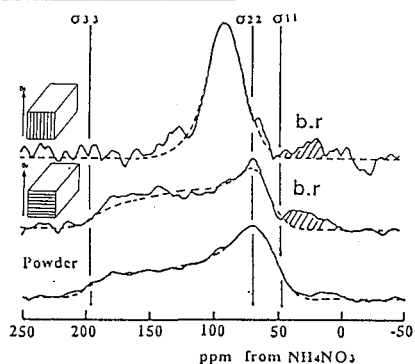


Fig.2 ^{15}N solid state NMR spectra of Kevlar. (—); observed, (- - -); calculated.

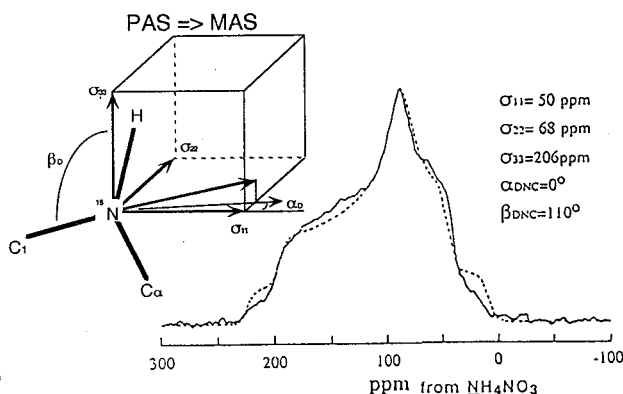


Fig.3 Comparison of the Observed and Calculated Powder Spectra of ^{13}C - ^{15}N Labeled Benzanilide. (—): Observed, (----): Calculated.

パウダーパターンのシミュレーションの結果、 ^{15}N 化学シフトテンソルの主値は $\sigma_{11} = 48$, $\sigma_{22} = 68$, $\sigma_{33} = 195$, $\text{LB} = 9$ (ppm)と決定された(Fig.2の最下段のスペクトル)。続いて、一軸配向試料の磁場に平行、および垂直のそれぞれのスペクトルパターンのシミュレーションから、 α_F , β_F の値をそれぞれ 40 ± 10 度、 60 ± 2 度と決定した(Fig.2)。なお、図中b.rは接着剤のピークである。

^{13}C - ^{15}N ダブルラベルベンズアニリドのパウダーパターンのシミュレーション結果をFig.3に示した。 $\alpha_D = 0$ 度、 $\beta_D = 110$ 度と決定した。これらの4つのオイラー角を用いて、Kevlar繊維の繊維軸とそのNH方向のなす角度 θ_{NH} を 56 ± 3 度、または 116 ± 3 度と決定した。

2. Nomexの構造解析

Nomexの ^{15}N 化学シフトテンソルの主値はパウダーパターンのシミュレーションから、 $\sigma_{11} = 51$, $\sigma_{22} = 66$, $\sigma_{33} = 196$, $\text{LB} = 20$ (ppm)と決定された。Nomex繊維の磁場に平行なスペクトルは、3本に分れるが(Fig.4)、スペクトル分離の結果、

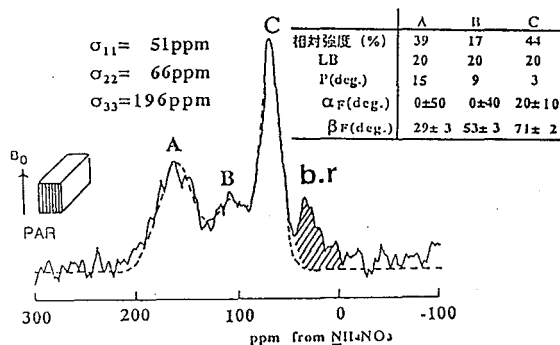


Fig.4 ^{15}N Solid State NMR Spectra of Nomex. (—): Observed, (----): Calculated.

その割合は、39%(A), 17%(B), 44%(C)であった。さらに各々のピークについて、最適な α_F , β_F の組み合わせとそのerror range、および繊維軸の配向分布 p を決定した(Fig.4)。その際、磁場に垂直なスペクトルのシミュレーション結果も参考にした。既に決定した α_D , β_D の値を組み合わせ、最終的に θ_{NH} は 24 ± 3 度(A), 49 ± 3 度(B), 76 ± 2 度(C)と決定した。

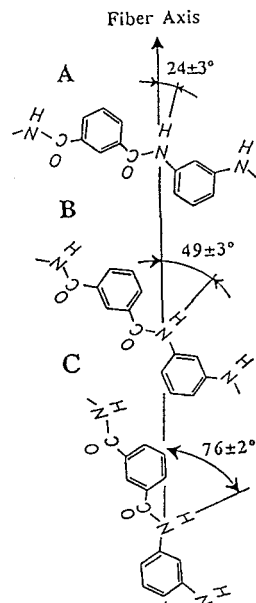


Fig.5 Structure of Nomex Obtained by ^{15}N CP NMR Analysis.

最終結果をFig.5にまとめた。Nomex繊維のX線回折によると、結晶部では分子間の水素結合に関するNH方向が繊維軸に対してほぼ垂直であることが報告されている³⁾。この方向はFig.4のピークC($\theta_{\text{NH}} = 76$ 度)に対応する。従って、残りのピークA, Bは、Nomexの非晶領域由来である。繊維軸とNH方向の平均の角度が24度(分布幅は15度)と49度(分布幅は9度)の異なる2成分が各々39%と17%ずつ存在する。

まとめ 本解析法は、X線回折法に匹敵する原子レベルの固体構造解析が可能であると同時に、結晶部のみならず非晶部の構造パラメータも同じように決定できることがわかった。

参考文献

1. L.K.Nicholson, T.Asakura, M.Demura and T.A.Cross, *Biopolymers*, submitted.
2. Q.Teng and T.A.Cross, *J.Magn.Reson.*, 85, 439(1989).
3. H.Kakida, Y.Chatani, H.Tadokoro, *J.Plym.Sci., Polym.Phys.Ed.*, 14, 427(1976).

¹⁵N NMRによるポリペプチドの固体構造解析：
¹⁵N化学シフトに及ぼす側鎖構造の影響

(群馬大工、東工大工*)

○ 荘司 顯、芦川幹也、加藤 寛、尾崎拓男、黒木重樹*、安藤 勲*

**STRUCTURAL ANALYSIS OF SOLID POLYPEPTIDES :
 Side-Chain Effects on ¹⁵N Chemical Shifts.**

Akira Shoji, Mikiya Ashikawa, 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 [AA*, X]_n (X denotes other amino acid residues: natural abundance) containing ¹⁵N-labeled L-Amino Acids (AA* = Gly*, Ala*, Leu* and Val*) residues was studied by means of ¹⁵N NMR. It was found that the σ_{iso} of Leu* and Val* residues are very useful for conformational analysis of copolypeptides. On the contrary, the σ_{iso} of Gly* and Ala* residues are difficult to determine their conformations of copolypeptides, which is quite different result from that of [Leu*, X]_n or [Val*, X]_n. Further, it was also found that the ¹⁵N chemical shift tensors (especially σ_{22}) are useful for the primary structural analysis such as the neighbouring amino acid sequence effects and the side chain effects of solid polypeptides.

1. 緒 論

タンパク質の主な構成元素である水素・炭素・窒素および酸素Oの各原子核の磁気的性質を通して分子構造を理解することは、タンパク質の機能と秩序構造との関係を解明する上で重要である。近年、核磁気共鳴(NMR)法の発展はめざましく、固体高分解能NMRの出現と共に従来の広幅NMRでは得られなかった固体の微細構造解析が可能となった。固体高分解能NMR法は、固体分子に固有の性質を原子レベルで調べたり動的構造の研究に有効であるので注目されている。¹⁵N核は孤立電子対(lone-pair electrons)を有するので¹³C核とは異なった情報が得られる点興味深い。本研究では、¹⁵N標識アミノ酸残基(AA*)を含むポリペプチド[AA*, X]_n(AA* = Gly*, L-Ala*, L-Leu*, L-Val*; Xは天然存在比¹⁵Nのアミノ酸残基)を用いて、¹⁵N化学シフトがポリペプチドのコンホメーションの他、アミノ酸の種類(側鎖の構造)、隣接アミノ酸の配列順序、水素結合様式などに関する情報を与えることを示し、¹⁵N化学シフトとこれらの構造との相関関係について述べる¹⁻⁷⁾。

固体高分解能 NMR・¹⁵N NMR・ポリペプチド・化学シフト・隣接アミノ酸配列順序・コンホメーション

しょうじ あきら・あしかわ みきや・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

2. 実 験

本研究で用いた¹⁵N標識アミノ酸(AA*)(MSDアイソトープ社; 99% ¹⁵N)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)。

CP-MAS (cross polarization - magic angle spinning) NMR スペクトルは JEOL GSX-270W 分光計を用い、27.4 MHz (¹⁵N 核) 及び 67.8 MHz (¹³C 核) で測定した。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 - 1128 回積算した。化学シフトは¹⁵NH₄NO₃を外部基準(δ=0 ppm)とし、グリシン-¹⁵N(δ=11.59)を二次基準とした。

固体コンホメーション解析は¹³C CP-MAS NMR と赤外(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 及び 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AA*残基の¹⁵N等方性化学シフト(σ_{iso})

ホモポリペプチド[Val*]_nとコポリペプチド[Val*, X]_n(Val*含量約20%)のσ_{iso}をFig.1に例示する。α-helixの[Val*]_nのσ_{iso}は得られていないが、β-sheetのσ_{iso}(105.4 ppm)は得られている。この場合も、[Ala*]_nや[Leu*]_nの場合と同様、σ_{iso}がコンホメーションに依存するといえる(Ala*: α-helix: 98.8、β-sheet: 102.2 ppm)(Leu*: α-helix: 97.0、β-sheet: 107.0 ppm)。いずれもα-helixのσ_{iso}がβ-sheetより高磁場に現われるが、シフト差は異なる。一方、[AA*, X]_nにおいては、σ_{iso}はAA*の種類およびXの種類によって大きく異なっている。即ち、Val*やLeu*ではα-helixとβ-sheetのピーク領域が分離するため、σ_{iso}よりコンホメーションが決定できる。これに対してAla*やGly*ではα-helixとβ-sheetのピーク領域が重なるため、一般にはσ_{iso}よりコンホメーションの決定を行うのは適当でない。このように[AA*, X]_nのσ_{iso}は、AA*残基の種類(側鎖構造の影響)により異なることから各アミノ酸残基の個性がσ_{iso}に反映されていると思われる。また、これらのσ_{iso}は隣接アミノ酸残基の種類によっても異なる。

3-2. [AA*, X]_nのAA*残基のσ_{iso}と[X]_nのσ_{iso}との関係

σ_{iso}が隣接アミノ酸残基の種類によりどのような影響を受けるかを調べた。[AA*, X]_nのσ_{iso}と[X]_nのσ_{iso}との関係をFig.2に示す。結果をまとめると次のようになる;

(1) AA*残基がAla*の場合、α-helixの[Ala*, X]_nのσ_{iso}は[X]_n(α-helix)のσ_{iso}より2~3 ppm 低磁場側(98-102 ppm)に、逆に、β-sheet [Ala*, X]_nのσ_{iso}は[X]_n(β-sheet)より5~6 ppm 高磁場側に観測される(99-102 ppm)。この結果、[Ala*, X]_nのα-helixピークとβ-sheetピーク領域は重なる。(2) Gly*の場合、α-helix [Gly*, X]_nのσ_{iso}は[X]_n(α-helix)より12~15 ppm 高磁場側(84-86 ppm)に、また、β-sheet [Gly*, X]_nのσ_{iso}も[X]_n(β-sheet)より14~22 ppm 高磁場側に観測される(83-88 ppm)。この結果、[Gly*, X]_nでもα-helixピークとβ-sheetピーク領域は重なる。一方、(3) Leu*の場合、α-helix [Leu*, X]_nのσ_{iso}は[X]_n(α-helix)のσ_{iso}より0~2.5 ppm 高磁場側(96-98 ppm)に、逆にβ-sheet [Leu*, X]_nのσ_{iso}は[X]_n(β-sheet)より0.6~1.1 ppm 低磁場側に観測され(106-107 ppm)、この結果、[Leu*, X]_nのα-helixピークとβ-sheetピーク領域は分れる。(4) Val*の場合、α-helix [Val*, X]_nのσ_{iso}は[X]_n(α-helix)より0~3 ppm 高磁場側(95-98 ppm)に、β-sheetでは1~3 ppm 高磁場側(あるいは4~5 ppm 低磁場側)に観測され(106-107 ppm)、この結果、[Val*, X]_nのα-helixピークとβ-sheetピーク領域は分れる。

以上の結果は、[AA*, X]_nのAA*残基のσ_{iso}はポリペプチドやタンパク質の隣接アミノ酸残基の影響やアミノ酸配列順序等を調べるうえで有用である事を示唆する。

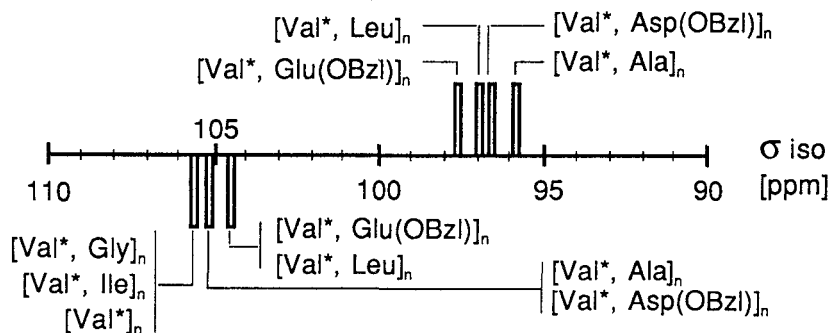
3-3. ポリペプチドのAA*残基の¹⁵N化学シフトテンソル(σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})

ホモポリペプチド[AA*]_nとコポリペプチド[AA*, X]_nの σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} に関する我々の今までの研究で、特にAA*残基の σ_{22} はコンホメーションと隣接アミノ酸残基の配列効果に関する情報を得る上で σ_{iso} より有用であることを明らかにした。しかし、その他の化学シフトテンソルについてはまだ実験データが少ないことと実験精度が低いため、今後これらデータの集積が必要である。 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が示唆される。そこで、今回のNMR討論会ではこの点に関する最も新しい研究手法と実験結果についても紹介する。

参考文献：

- 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.
- 5) 莊司、加藤、尾崎、黒木、安藤：第30回 NMR 討論会講演要旨集、(1991) 299-302.
- 6) A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, S. Ando, I. Ando, to be submitted.
- 7) A. Shoji, M. Ashikawa, T. Ozaki, S. Kuroki, I. Ando, in preparation.

α - helix



β - sheet

Fig.1. Diagram of the observed ¹⁵N isotropic chemical shift (σ_{iso}) of the Val* residue of some polypeptides [Val*, X]_n (Val* content is nearly 20%) in the solid state.

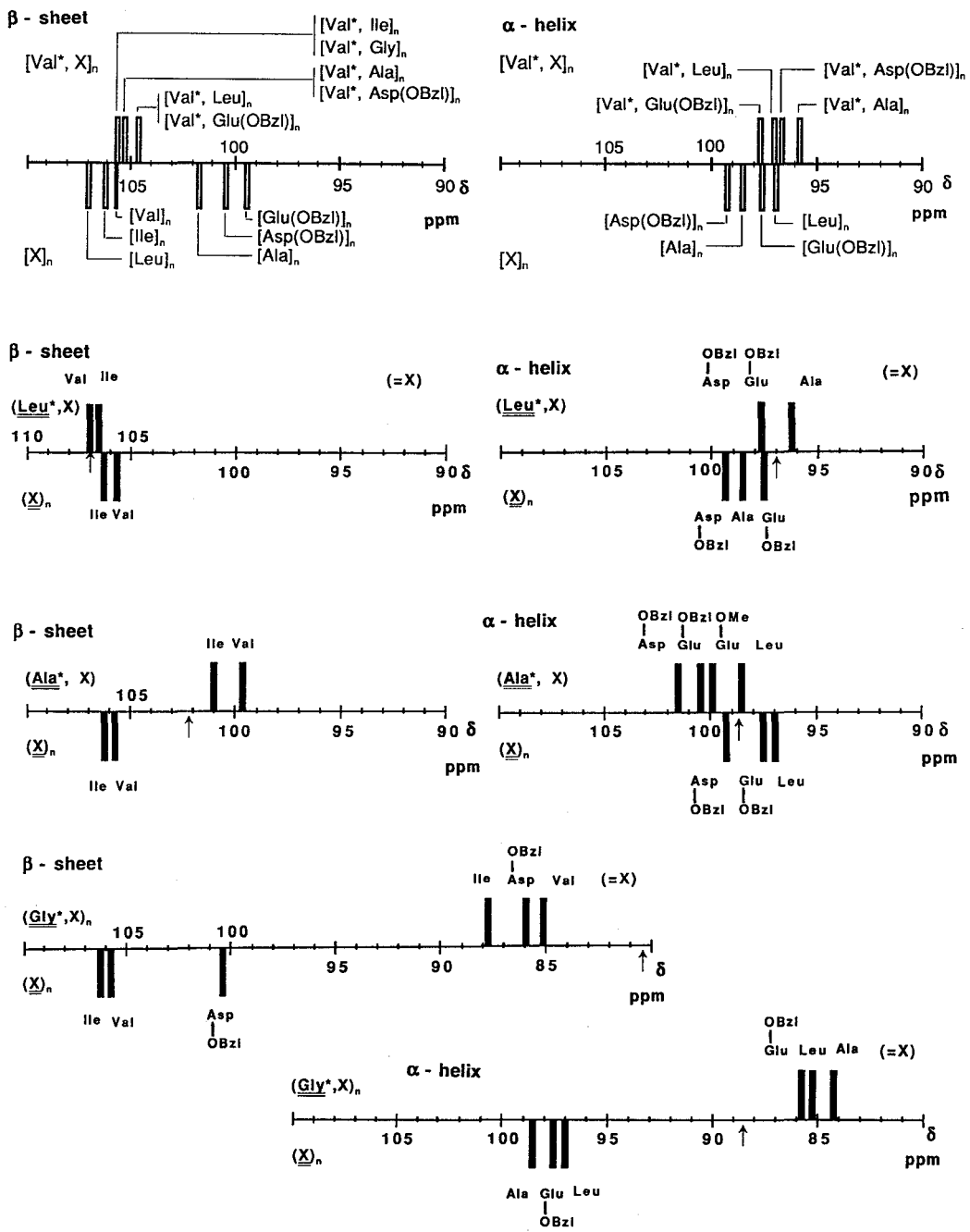


Fig.2. Correlation of the ^{15}N chemical shifts (σ_{ii}) of AA^* residue of some copolypeptides $[\text{AA}^*, \text{X}]_n$ with those of host homopolypeptides $[\text{X}]_n$ in the solid state. The arrow indicates the σ_{ii} of $[\text{AA}^*]_n$

L 15 固体高分解能¹⁷O NMRによるポリグリシンの 構造研究 (4)

(東工大) ○黒木重樹・安藤 勲
(群馬大工) 荘司 顯・尾崎拓男

A Structural Study of Polyglycine by Solid State ¹⁷O NMR Spectroscopy (4)

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

Recently, high resolution solid state NMR techniques have been developed for studying structure of peptides and proteins in the solid state. We have already reported that ¹³C chemical shift of the carbonyl carbon and ¹⁵N chemical shift of the amide nitrogen are closely related to the nature of hydrogen bond.

On the other hand, the universality of the oxygen atom in intra- and intermolecular interactions and in certain physiological processes, and in particular in hydrogen bonding in biological systems makes this nucleus especially suitable as a probe for investigating the structure and dynamics of solids and solutions. ¹⁷O NMR studies of amino acids, amides and peptides in the solid state are virtually non-existent. In this study, we attempt to observe the solid state ¹⁷O CP MAS and static NMR spectra of polyglycines I and II and oligopeptides containing glycine residue, to obtain the values of three NMR parameters (nuclear quadrupolar coupling constant, asymmetric parameter and chemical shift), and to reveal structural information through these parameters.

Figs. 2 a), b) and c) show 67.8MHz ¹⁷O CP static NMR spectra of polyglycines in the solid state. Figs. 3 a), b) and c) show 67.8 MHz ¹⁷O CP MAS NMR spectra of polyglycines in the solid state. Sample II contains form II only, but sample I contains form I and II and I/II ratio is 1/0.6. It is found from these spectra that there exist two magnetically-unequivalent sites in both the forms I and II and large isotropic chemical shift differences between the forms I and II. The details will be given in the presentation.

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なされている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

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

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 ^{17}O 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 ^{13}C 、 ^{15}N 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。

^{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、核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 ($-1/2 \leftrightarrow 1/2$) 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。理論式にしたがってスペクトルシミュレーション⁴⁾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 型およびグリシン残基を含むペプチドを合成し、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述べる。

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試料 I を合成し、これを試料 II に転化した。固体 ^{13}C -NMRの結果、試料 I には I 型と II 型が1:0.6の比で混在し、試料 II は II 型のみからなることが分かった。グリシン残基を含むオリゴペプチドは活性エステル法により合成した。

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 アクセサリーを付属した日本電子製 G S X - 2 7 0 NMR スペクトロメータ (観測周波数36.6MHz) および G S X - 5 0 0 NMR スペクトロメータ (観測周波数67.8MHz) 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 0 ppm とした。試料は静止状態およびマジック角で~7500Hzの速さの回転をさせた状態で測定された。パルスシーケンスは交差分極法を用いた。接触時間は 9 ms で、繰り返し時間は 3 または 5 s である。

3) スペクトルシミュレーション

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。

3. 結果と考察

Figs 1 a), b) にそれぞれグリシルグリシンの CP 法による 36.6MHz および 67.8MHz の固体 ^{17}O -NMR スペクトルを示す。36.6MHz と 67.8MHz でのスペクトルは大きく異なっている。この2つのスペクトルを見る限り、異なった磁場における測定が ^{17}O 核のような四極子核では有用であることがわかる。

ポリグリシンの67.8MHzにおける固体¹⁷O-CPNMRスペクトルを Figs. 2 a),b),c)に、固体¹⁷O-CPMASNMRスペクトルをFigs. 3 a),b),c)にそれぞれ示す。各々のスペクトルよりPG IにもPG I I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PG IとPG I Iで異なっていることがわかる。

次に結晶系の異なる3つのGly-Glyの固体¹⁷OCPNMRスペクトルをFigs. 4 a), b), c)に示す。結晶系の違いによりスペクトルの線形が敏感に変化していることがわかる。詳細な議論は講演で述べる。

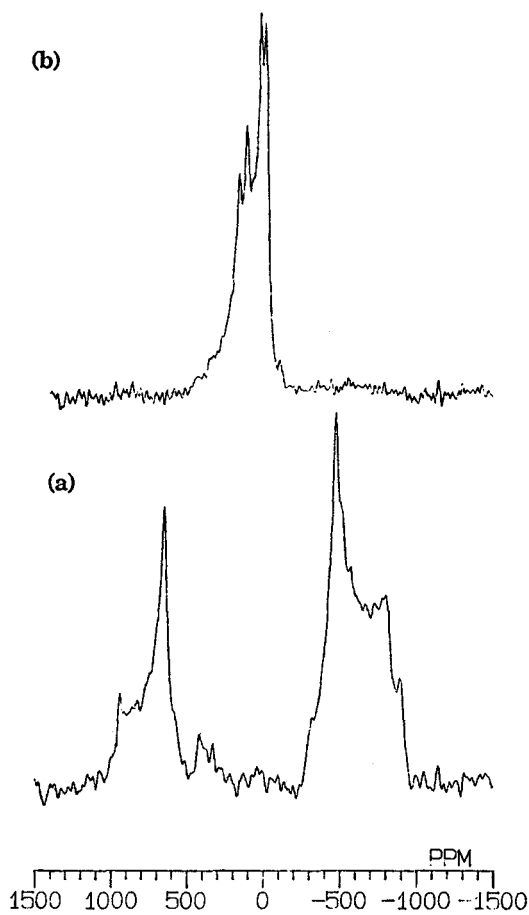


Fig.1 ¹⁷O CP static spectra of glycylglycine in the solid state, by 36.6 MHz (a) and 67.8 MHz (b), respectively.

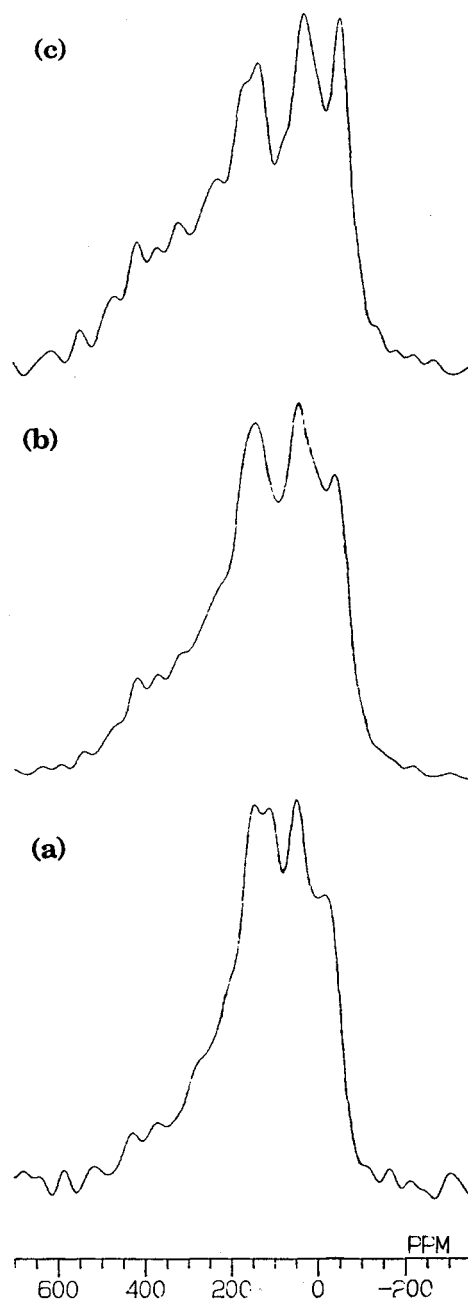


Fig.2 67.8 MHz ¹⁷O CP static spectra of polyglycines in the solid state, sample II (a), sample I (b), and sample I - sample II × 0.6 (c), respectively.

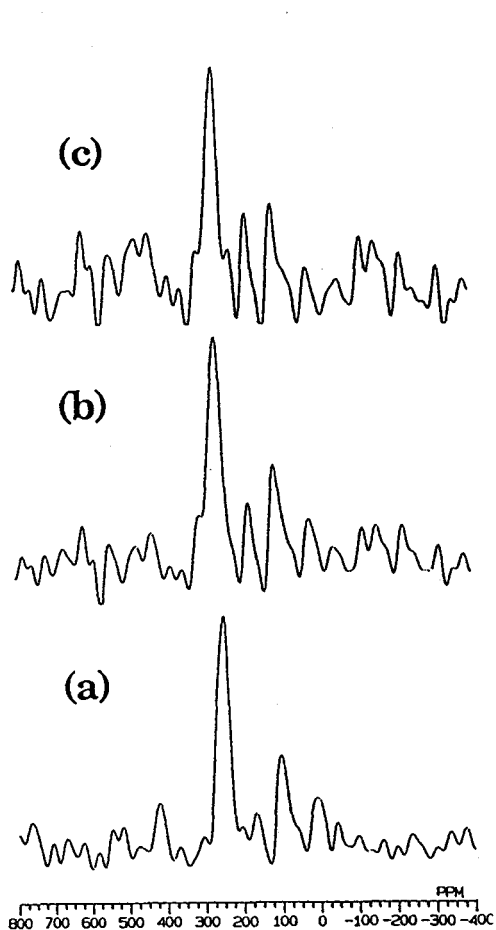


Fig.3 67.8 MHz ^{17}O CP/MAS spectra of polyglycines in the solid state, sample II (a), sample I (b), and sample I - sample II $\times 0.6$ (c), respectively.

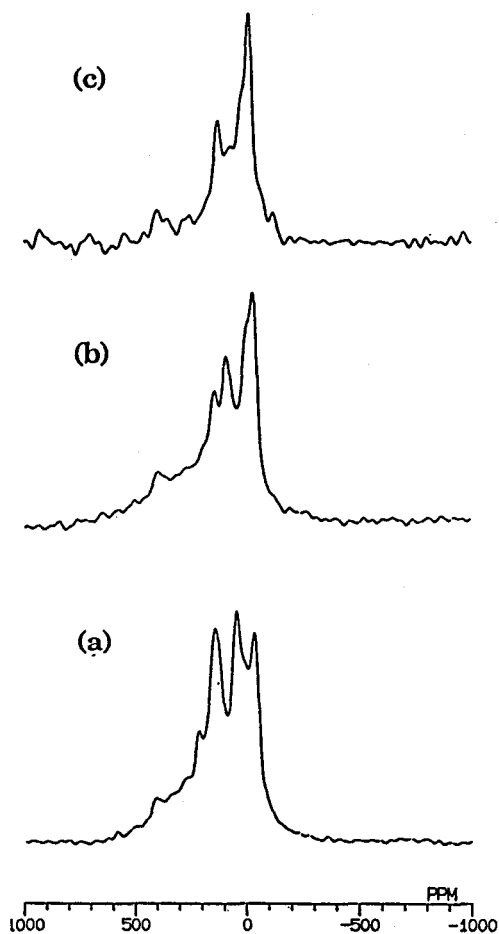


Fig.4 67.8 MHz ^{17}O CP static spectra of glycyglycine $\cdot \text{HNO}_3$ (a), glycyglycine (b), and glycyglycine $\cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (c), respectively.

謝辞

67.8MHzのスペクトルは科学技術庁金属材料技術研究所磁界ステーション超精密磁界システムの日本電子製GSX-500 NMR分光器を使用し測定しました。

文献

- 1) Saito, H. and Ando, I., *Ann. Repts. NMR Spectroscopy*, vol. 21, 209 (1989)
- 2) Ando, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 7648 (1985)
- Shoji, A. et al., *Macromolecules*, 20, 2441 (1987)
- 3) Kuroki, S. et al., *J. Mol. Struct.*, 245, 69 (1991)
- 4) Muller, V.D., *Annalen der Physik*, 39, S451 (1982)
- 5) Kuroki, S., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 5, 433 (1991)

L 16 核四極子を持つ核のCP/MASスペクトルにおける線形

- ^{23}Na 及び ^{11}B 核 ($I = 3/2$)

(化学技術研究所) ○林 繁信、 上田 貴洋、 早水 紀久子

Line shapes in CP/MAS NMR spectra of quadrupolar nuclei

(National Chemical Laboratory for Industry) Shigenobu Hayashi, Takahiro Ueda, and Kikuko Hayamizu

Cross polarization (CP) from ^1H to quadrupolar nuclei such as ^{23}Na and ^{11}B has been carried out under magic-angle-spinning conditions for powder samples of simple inorganic materials. Line shapes in the CP/MAS NMR spectra are different from those in the spectra measured with the single pulse sequence combined with the ^1H dipolar decoupling. Furthermore, the line shapes are found to be dependent on the measuring conditions such as the pulse amplitude for the quadrupolar nuclei. The mechanisms affecting the line shapes are discussed.

四極子を持つ核のNMRスペクトルは、核四極結合が強い場合、 $m = +1/2 \leftarrow \rightarrow -1/2$ の遷移のみが観測され、2次の核四極相互作用特有の線形を示す。マジック角回転(MAS)を行なってもこの相互作用を完全に消去できず、静止試料の約1/4の線幅が残り、静止試料のスペクトルとは異なる特有の線形を示すようになる。

^1H 核が四極核の近傍にある場合は、クロスポーラリゼーション(CP)によって四極核の信号を検出することが可能である。静止試料のCPスペクトルは直接四極核を励起した場合と同じ線形を示すが、MASを併用するとCPスペクトルは直接励起スペクトルとは異なった線形を示すようになる。また、CPスペクトルでは、パルス出力などの測定条件を変えることによっても線形が変化する。本研究では、測定条件による線形の変化を測定して、線形を変えている要因について検討を行なった。さらに、計算によってスペクトルのシミュレーションを行なった。

【実験】試料は市販の NaBH_4 及び $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ を用いた。NMR測定には、Bruker MSL400を用いた。測定周波数は、 ^{23}Na 105.84 MHz、 ^{11}B 128.38 MHzである。測定は

キーワード: CP/MAS NMR、 ^{11}B 、 ^{23}Na 、核四極子

はやし しげのぶ、うえだ たかひろ、はやみず きくこ

すべて室温で行なった。 ^1H の90度パルスは約 $5\ \mu\text{s}$ である。

【結果及び考察】 図1～図8に実測したスペクトルを示し、図9にシミュレーションしたスペクトルを示した。実測スペクトルは、強度を比較できるように規格化して表示した。また、すべてMASを行なって測定した結果を示している。

図1は、 NaBH_4 の ^{23}Na スペクトルである。シングルパルスと ^1H デカップリングを併用して測定した(HDと呼ぶことにする)スペクトルより、CPスペクトルの方が強度が強く、CPによる感度向上が起きている。 NaBH_4 の ^{23}Na の核四極結合定数はゼロであり、CP条件は $S=1/2$ の場合のように、 $\gamma_{\text{NH}}\text{H}_\text{H}=\gamma_{\text{S}}\text{H}$ 。(条件A)である。

図2は、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na スペクトルである。非等価な2つのサイトに相当する2本のピークが観測される。CPによる感度向上は困難である。また、同じCPスペクトルでも-2 ppmのピークの線形が条件によって異なっている。中段は、前述のCP条件Aを用いて測定したス

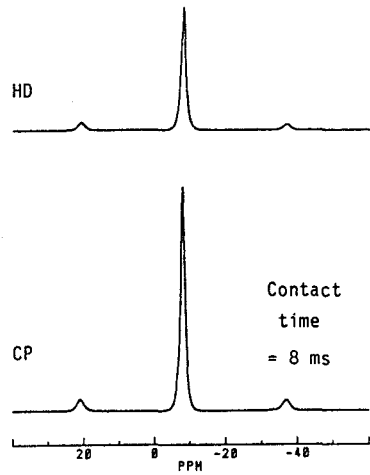


図1. NaBH_4 の ^{23}Na スペクトル
(回転数 3.05 kHz)

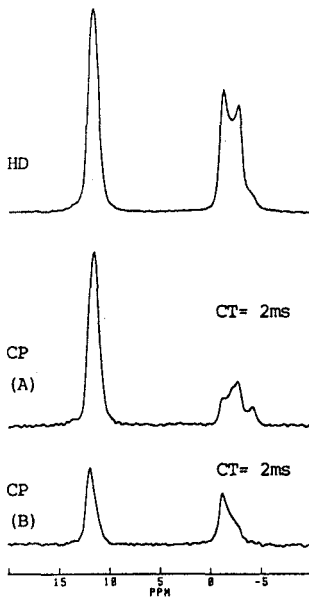


図2. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na スペクトル (回転数 4.00 kHz)

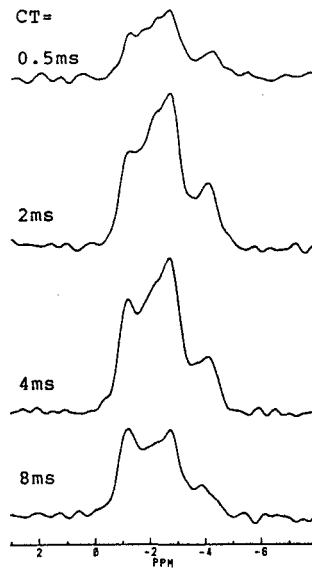


図3. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na CP
スペクトル
(条件A、回転数 3.99 kHz)

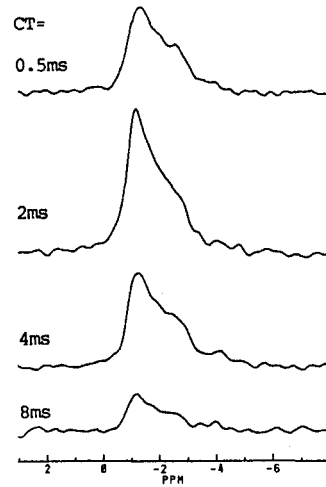


図4. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na CP
スペクトル
(条件B、回転数 3.99 kHz)

ベクトルであり、下段は CP 条件として、 $\gamma_H H_H = 2 \gamma_s H_s$ (条件 B) を用いて測定した。図 3 と図 4 に各 CP 条件における線形のコンタクト時間依存性を示した。多少の線形の変化が観測されたが、線形の大きな特長は変化していない。

図 5 に、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{11}B スペクトルを示した。4 配位と 3 配位の 2 つのホウ素が観測される。CP 条件 A では 4 配位のホウ素のみが観測され、条件 B では 3 配位のホウ素の強度の方が強くなる。また、3 配位のホウ素のピークの線形は HD と CP で異なっている。図 6 に条件 B でのコンタクト時間依存性を示したが、スペクトルの特徴はコンタクト時間にはほとんど依存していない。

CP を行なうと線形が変化する原因としては、CP ダイナミクスとスピンロックの 2 つの可能性が考えられるが、スピンロックの実験から後者の要因が大きいと考えられる。図 7 と図 8 に、

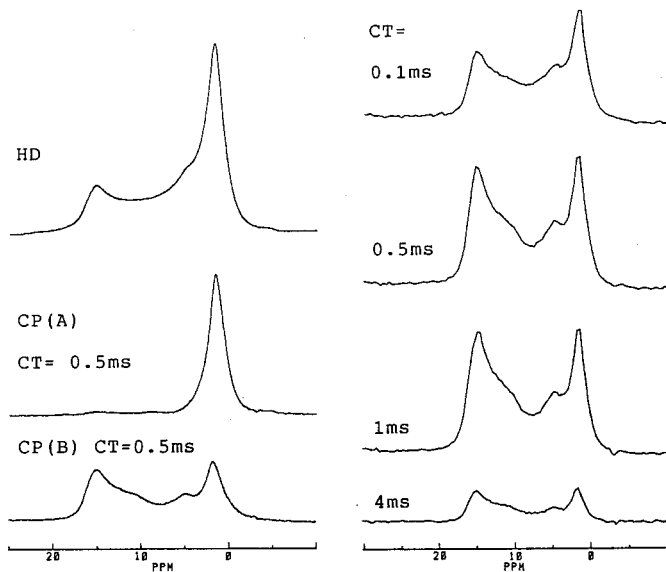


図 5. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{11}B スペクトル (回転数 4.05 kHz)

図 6. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{11}B CP スペクトル (条件 B、回転数 4.07 kHz)

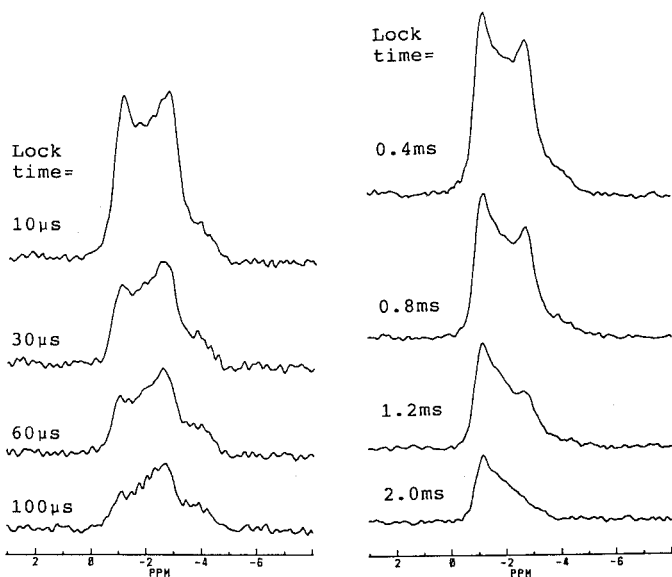


図 7. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na Spin-lock スペクトル (条件 A、回転数 2.50 kHz)

図 8. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na Spin-lock スペクトル (条件 B、回転数 5.00 kHz)

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na Spin-lock スペクトルを示した。図 7 が条件 A、図 8 が条件 B に相当する強度のパルスで ^{23}Na スピンをロックした後、FID 信号を観測した。CP スペクトルとほとんど同じ特徴を示すスペクトルが得られた。

四極核のスピンロックについては Vega が最近報告しており、スピンロックの効率がロックパルスの強度、試料の回転数、核四極結合定数の大きさに依存することを示している。スピンロックの効率を考慮して計算したスペクトルを図 9 に示した。実測のスペクトルの特徴をほぼ再現することができた。計算の詳細については当日報告したい。

【文献】 1) A. J. Vega, J. Magn. Reson., 96, 50
(1992).

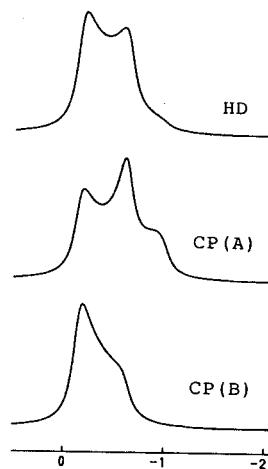


図 9. シミュレーション
スペクトル

Conformational Analysis of Liquid Crystalline Molecules by use of Deuterium LCNMR
 Department of Chemistry, College of Arts and Sciences, The University of Tokyo
 Hirokazu Toriumi

The general framework for the analysis of conformational and orientational properties of flexible molecules in liquid crystalline phases by use of ^1H - and ^2H -LCNMR technique is described. The deuterium NMR quadrupolar splitting patterns observed for flexible solute molecules such as n-alkanes and substituted alkanes are quantitatively reproduced using a newly developed formulation of the potential of mean torque including orientational correlations between neighboring bond segments (chord model). The theory is further extended to neat nematic molecules consisting of a rigid core segment and a flexible alkyl chain tail, yielding a consistent description of the essential features of the chain order profile and the even-odd variation of thermodynamic quantities associated with the nematic-isotropic transition. The chord theory can also reproduce the deuterium NMR segmental order parameter profiles of a variety of mesogenic and non-mesogenic molecules using the same parameterization of the potential of mean torque obtained above for alkane solutes in the nematic field and monomer mesogens in neat phases. These findings clearly indicate the predictive power of our chord model and the utility of the LCNMR technique for analyzing conformational and orientational properties of flexible molecules.

[序論] NMR スペクトルを決定するスピン・ハミルトニアンは

$$H = H_z + H_{\text{CSA}} + H_D + H_Q \quad (1)$$

と書き表わされる。ただし、等方性試料に対しては、ゼーマン項 H_z 以外の 3 項、すなわち化学シフト異方性項 H_{CSA} 、双極子-双極子相互作用項 H_D 、核四極子相互作用項 H_Q の寄与は平均化されて消滅する。このため、通常の液体（または溶液）について得られる NMR スペクトルは大幅に簡略化され、分子の一次構造に関する明瞭な知見が得られることはよく知っている通りである。一方、第 2 項以下はいずれも試料の配向状態と運動状態を反映した量であり、これらの相互作用が存在する系のスペクトルは前者に比べて複雑となる。もちろんスペクトルの複雑さは情報量の多さに由来するものであり、それを解析することができるようになれば、分子の高次集合状態に関する知見を直ちに入手することが可能となる。本報では、液晶 NMR (LCNMR) 法による双極子相互作用 (H_D) および四極子相互作用 (H_Q) の解析を通し、分子のコンホメーション特性と配向特性に関する詳細な情報が得られること、さらに LCNMR 法が従来の手法では達成不可能なほど高い精度と信頼性をもった解析法であることを、筆者らの最近の研究成果をもとに解説する。

[液晶 NMR データの解析] 図 1 は等方相および液晶溶媒中で測定したベンゼンの NMR スペクトルである。等方相ではただ一本の共鳴線が観察されるだけなのに対し、液晶溶媒中で一軸配向させて測定した ^2H -LCN

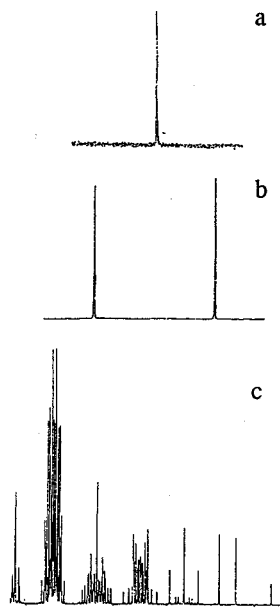


Fig. 1 NMR spectra of benzene: (a) in isotropic phase, (b) ^2H -LCNMR in liquid crystal solvent, (c) multi-quantum ^1H -LCNMR in liquid crystal solvent.

キーワード：重水素 NMR / 液晶 / コンホメーション / 配向ポテンシャル / セグメント配向相関 / コードモデル

とりうみひろかず

MRスペクトルには核四極子相互作用に由来するダブルレットが、さらにプロトンを核とする¹H-LCNMRスペクトルでは双極子相互作用に由来する多数の分裂線が観察されている。²H-LCNMRスペクトルで観察される核四極子ダブルレットの分裂幅 $\Delta\nu^i$ は次式で与えられるようにC-Dボンドベクトルの配向秩序度 S^i_{CD} に直接比例する。

$$\Delta\nu^i = \frac{3}{2} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) \frac{1}{2} (3\cos 2\theta_i - 1) = \frac{3}{2} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) S^i_{CD} \quad (2)$$

なお、ここで θ_i はC-Dベクトルが磁場に対してなす角である。我々が注目するフレキシブルな分子の場合には、例えば図2のn-decaneのスペクトルに示すように、配向に関して非等価なすべてのセグメントに夫々独立した $\Delta\nu^i$ 値、すなわち S^i 値を得ることができる。

一方、¹Hを核とするLCNMRで観察されるH-H双極子分裂の大きさ D^{ij} は次式のようになる。

$$D^{ij} = - \left(\frac{\gamma^2 h}{4\pi^2} \right) \frac{1}{2} \langle (3\cos 2\theta_{ij} - 1) / r_{ij}^3 \rangle \quad (3)$$

ここで θ_{ij} はプロトンペア(i, j)を結ぶベクトル r_{ij} が磁場に対してなす角であり、 $r_{ij} = |r_{ij}|$ である。式(3)から明らかのように、 D^{ij} はプロトン間距離の3乗に依存する量でありコンホメーションに非常に敏感である上、¹H-LCNMRスペクトルからは例えばn-hexaneのように簡単なアルキル鎖についてさえ16個もの互いに独立な D^{ij} を得ることができる(さらに²H-LCNMR解析から3個の $\Delta\nu^i$ が得られる)。従って、¹H-および²H-LCNMR法を併用すれば、情報量が多くかつ信頼性の高いコンホメーション解析を行なうことが可能となる。

しかし、液晶NMRデータ解析のためには、分子の非等方相における配向ポテンシャルに関する正確な知識が必要であり、conformation-orientation間の相関を任意に分離したりスケールリングしている限り正確な解析を行なうことはできない。次節ではセグメント間の配向相関を考慮した新しいモデルの概略を述べる。

[セグメント配向相関理論] フレキシブル鎖としてもっとも簡単なn-alkaneを例に取り、そのネマチック溶媒中における配向ポテンシャルについて考える。^{1,2)} このポテンシャルは、n-alkane分子を構成する各C-Cボンドセグメントの配向相互作用を平均場近似のもとで展開して、以下のように書き表される。

$$V(\omega, n) = - \frac{3}{2} S \sum \{ w_0 P(s^i, s^i) + w_1 P(s^i, s^{i+1}) + w_2 P(s^i, s^{i+2}) + \dots \} \quad (4)$$

$V(\omega, n)$ のアルキル鎖コンホメーション(n)および配向(ω)に対する異存性は、各C-Cセグメント・ペア(i, i+m)の配向相関関数 $P(s^i, s^{i+m})$ 中で表現されている。ただし、 s^i はi番目のC-Cセグメントに沿った単位ベクトルであり、 w_m はm次相互作用項からの寄与の大きさを表わす定数、またSはホスト液晶の配向秩序度である。

式4の第一項は各C-Cセグメントと配向場との直接相互作用の大きさを表現しているが、この項にはセグメント間の配向相関に関する情報は含まれていない。言い換えれば、各セグメントは独立に配向エネルギーに寄与するだけであり、この第一項のみでは図3に例を示すようなconformationおよびorientation間の差異を区別することができない(鎖中におけるセグメントの出現位置が変わっても第

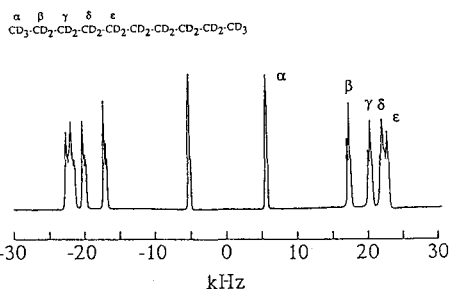


Fig. 2 Deuterium LCNMR spectrum of n-decane dissolved in a nematic Phase V solvent.

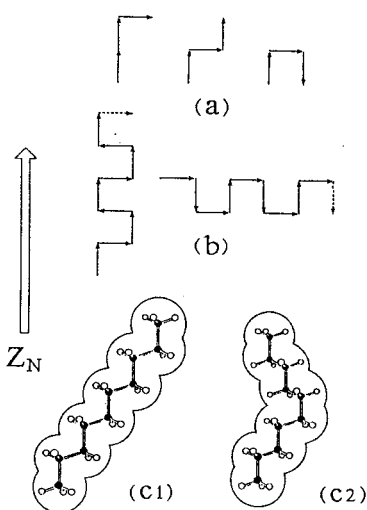


Fig. 3 Examples of conformation and orientation of n-alkyl chain with different shapes and identical orientational energy.

一項で与えられる配向エネルギーは変化しない)。セグメント間の結合(すなわち分子の一次構造)および配向に関する情報は第二項以下に含まれ、図3に示した例の区別がこれらの項の導入によりはじめて可能となる。ゲスト・アルカンに対する解析結果は、一次の相関項が直接相互作用項とはほぼ同程度の寄与を持つことを示している。この結果は、第一次相関項がセグメントの結合様式(すなわち鎖の configuration) を表現していることを考えれば当然の結果であり、式4で与えられる配向ポテンシャルの妥当性を示すものである。式4は $w_1 = w_0$ の条件下で次のように簡略化される。

$$V(\omega, n) = -\frac{3}{2} S \left\{ g_0 \sum_{i=1}^{N-2} P(c^i, c^i) + w_0 [P(t^1, t^1) + P(t^{N-1}, t^{N-1})] \right\} \quad (5)$$

ここで c^i は図4に示すように隣接するC-C結合の中点を結ぶベクトル(chord)であり、 $g_0 = [2\sin^2(\text{ccc}/2)]w_0$ 、 $w_0^1 = w_0/2$ である。式4による配向ポテンシャルの表現を bond representation と呼ぶのに対し、式5による表現を chord representation と呼ぶ。Chord には隣接ボンドの配向に関する情報がすでに含まれており、 g_0 および w_0^1 の定義から明らかなように、ポテンシャルの強さはただ一つのパラメーター w_0 のみで表現されている。式5による配向ポテンシャルの表現、すなわち chord representation の成立は、アルキル鎖の配向が分子の contour を反映するユニット(chord)と液晶場との相互作用に由来していることを意味する。すなわちこれは排除体積効果にほかならない。

[セグメント配向相関理論の応用] セグメント配向相関理論による液晶NMRデータの解析は、すでにアルカン、^{1,2)} ジプロモアルカン、³⁾ 単量体液晶、^{4,5)} 二量体液晶⁶⁾ などについて報告済みである。セグメント配向相関理論は、これらいずれの系においても、ad hoc なパラメーターを導入することなしに実験結果を定量的に再現することに成功している。以下では、その中から、ジプロモアルカンに対する解析結果を紹介して、²H-LCNMR解析によりダイポール・モーメントの存在に由来する分子間相互作用についても明瞭な知見が得られていることを示す。

図5にデカン(C10)およびジプロモデカン(DBr-C10)をネマチック液晶(Phase V)中に溶解させて測定した²H-LCNMRスペクトルを示す。

四極子分裂幅の比較から明らかなように、ジプロモデカンの配向秩序度はデカンの場合に比べ30%以上も向上しており、ダイポール相互作用に由来する配向秩序の顕著な向上があることがわかる。この点をより詳しく検討するため、化学構造のことなる複数の液晶溶媒を用いてさらに実験を重ねた結果を図6に整理する。ここに示すデータは、3種の代表的なネマチック

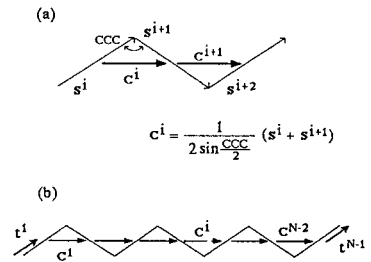


Fig. 4 (a) Chord segment geometry and (b) schematic representation of the elementary units in the chord representation of n-alkane used in eq. 5.

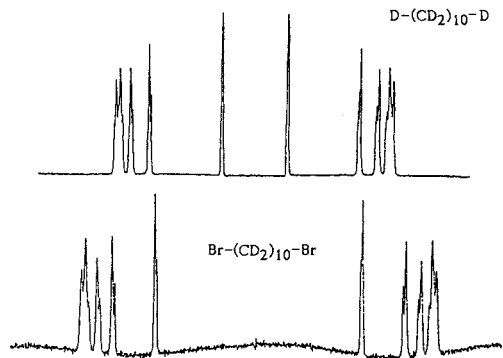


Fig. 5 Deuterium NMR spectra of C10 and DBr-C10 in a nematic Phase V solvent.

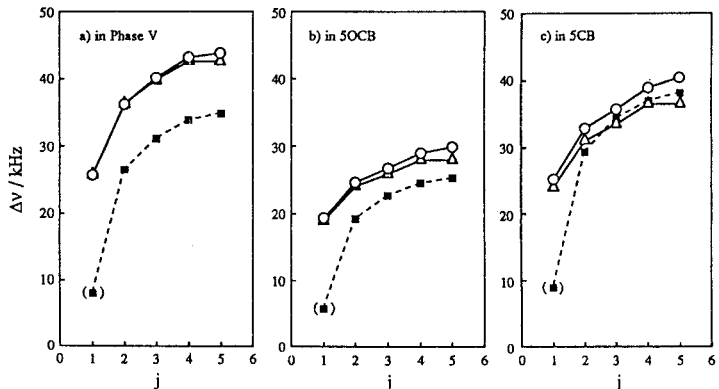


Fig. 6 Deuterium NMR quadrupole splittings of DBr-C10 (O), DBr-C9 (Δ) and C10 (■) in Phase V, 5OCB and 5CB solvents at the same reduced temperature.

ック液晶 (Phase V, 5OCB, 5CB) を溶媒として測定したジプロモデカン (DBr-C10:○)、ジプロモノナン (DBr-C9:△) およびデカン (C10:■) の四極子分裂幅 ($\Delta\nu$) である。すでに図5で見たように Phase V 中のジプロモアルカンには顕著な配向度の向上を示す。しかし、5CBを溶媒とした場合には配向の向上がほとんど観察されないばかりか、DBr-C9の値はむしろC10の値より小さくさえている。また、5OCB中에서도さほど顕著な配向度増加が見られず、変化の度合いは前二者のほぼ中間となっている。これらの結果は、ダイポール・モーメントをもつゲスト分子であるDBr-Cnの配向様式が、ホスト液晶分子の構造に依存して大きく変化することを示すものである。

実験に用いた液晶分子とゲスト分子の構造およびダイポール・モーメントの配置図を図7に示す。この分子構造データを参考に上述の実験結果を解釈すれば図8のような模式図を描くことができよう。すなわち、分子の中央付近にダイポール・モーメントをもつ Phase Vを溶媒とした場合には、ゲスト分子であるDBr-Cnがその双極子相互作用を最小化するように溶媒分子の間に入り込みかつ平行に配列しようとし(双極子相互作用エネルギーはダイポール間の距離と配向角の関数である!)、結果として図8左に示すように配向の向上が実現されることになる。改めて述べるまでもなく、この配向様式は分子間の排除体積効果を最小化する配向様式でもある。一方、5CBは分子の片末端にのみダイポール・モーメントをもつ分子である。従って、双極子相互作用のみを考えた場合に期待されるもっとも安定な配置図は図8右のようになり、Phase Vの場合とは異なり配向秩序度に大きな増加が現われないことがわかる。

ただし、図8は双極子相互作用の効果を説明するために極端に誇張して描いた図であることを指摘しておかねばならない。DBr-Cnがもつ実際の配向エネルギーは、分子を構成する各セグメントの配向ポテンシャルおよびダイポール・モーメントに由来する双極子相互作用ポテンシャルの総和を、分子の全 conformation そして全 orientation にわたって平均化することにより得られるものであることは言うまでもない。また、双極子相互作用も分子間距離が十分離れている場合には平均として消滅するものであり、これが液晶相において有限な寄与をもつのは分子間距離が小さくなり排除体積効果が無視できないためであることも指摘しておく必要がある。

「セグメント配向相関理論」による液晶NMRデータの解析は、ジプロモアルカンをはじめとするフレキシブル鎖、ベンゼンをはじめとする剛直なゲスト分子、そしてそれらをモジュールとして構成される単量体液晶や二両体液晶に至るまで、多くの分子を対象にそのコンホメーション特性と配向特性に関する定量的な情報を得ることに成功している。講演では、これら一連の解析結果を報告して、LCNMR解析法の有用性を明らかにする。

	Molecular Primary Structures	Idealized Shapes & Dipoles
Phase V		
5OCB		
5CB		
DBr-Cn		
C10		

Fig. 7 Molecular structure and dipole moment orientation in liquid crystal solvent molecules and guest molecules.

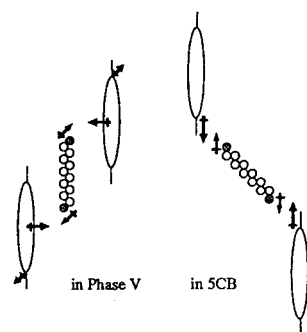


Fig. 8 Schematic representation of dipole interactions of dibromoalkanes in Phase V and 5CB liquid crystal solvents.

- [References] (1) J. Phys. Chem., 94, 4688 (1990); *ibid.* 94, 4659 (1990); (2) Mol. Phys., 72, 333 (1991); (3) J. Chem. Phys., in press (1992); (4) J. Chem. Phys., 94, 2758 (1991); (5) Mol. Cryst. Liq. Cryst., 204, 161 (1991); (6) J. Chem. Soc., Faraday Trans., 88, 1875 (1992).

L 18

重水素NMRによるタンパク質の分子運動。 固体および溶液中のSSIのメチオニンの場合

(京大理、姫工大理、学習院大、東大工、神戸大理) 田村厚夫、松下道雄、
内藤 晶、小島修一、熊谷 泉、三浦謹一郎、O赤坂一之、

Deuterium NMR study of Internal Motions in Proteins. The Case of Methionine Residues in *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor.

A. Tamura, M. Matsushita, A. Naito, S. Kojima, I. Kumagai, K. Miura, and K. Akasaka
Kyoto University, Himeji Institute of Technology, Gakushuin University, University of Tokyo, Kobe University

The motions of the side chains of three methionine residues were examined in a globular protein *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI) in solution as well as in solid, based on spin-lattice relaxation and line shape analyses in deuterium NMR spectroscopy at 61.4 MHz. Three kinds of artificial mutants of SSI with only one specific methionyl methyl group deuterated were used for this purpose in addition to the wild type SSI. In powders, the motions of the three methionines depend critically on the degree of hydration, approaching those in crystals as hydration increases. The types of motions of the three methionine side chains differ in crystals, but they all move rapidly in the range of correlation time of 10^{-8} to 10^{-10} sec, which is comparable to the correlation times in solution.

Table 1. Longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times of methyl deuterons of the methionines in *Streptomyces* subtilisin inhibitor in solution, measured at 61.4 MHz at 20°C, and the correlation times for the reorientation of methyl axes calculated therefrom,

Type of SSI	T_1	Linewidth	Correlation Time (s)	
	(ms)	(Hz)	from T_1	from linewidth
wild-type SSI				
([methyl- $^2\text{H}_3$]Met-70,73,103)				
narrow component	180	10	1.4×10^{-10}	$< 1.0 \times 10^{-9}$
broad component	98	50	1.0×10^{-8}	$< 1.1 \times 10^{-8}$
wild-type SSI				
([methyl- $^2\text{H}_3$]Mct-70,73,103)				
complexed with subtilisin	102	120	1.1×10^{-8}	$< 3.0 \times 10^{-8}$
73K103L (70Met C^2H_3)	250	8	9.8×10^{-11}	$< 6.2 \times 10^{-10}$
70I103L (73Met C^2H_3)	330	9	7.6×10^{-11}	$< 7.0 \times 10^{-10}$
70I73K (103Met C^2H_3)	120	42	1.3×10^{-8}	$< 1.0 \times 10^{-8}$

たむらあつお、まつしたみちお、ないとうあきら、こじましゅういち、くまがいしいずみ、みうらきんいちろう、あかさかかずゆき

Introduction

Despite prevailing evidences, we consider that some basic questions and details of molecular dynamics of proteins have been left still unclear. These may include questions such as (1) how different are the motions of a specific type of amino acid, e.g., methionine, differ according to the position within a protein molecule? (2) how much motion is allowed for an amino acid side chain in a packed core region? (3) how are internal motions in solid proteins related to the degree of hydration? (4) how different or similar are the motions in solution and in solid? In an effort to answer some of these questions, we have been engaged in studying dynamics of Met side chains in SSI for some time, and this report gives a summary of the results of such a study.

Results in solution

In solution, spin relaxation measurements disclosed that the side chains of Met 73 and 70 undergo extensive motions with effective correlation times of 0.8-1.0 $\times 10^{-10}$ s, which are largely quenched (correlation time 1.1×10^{-8} s) when SSI forms a complex with its target enzyme, subtilisin BPN'. In contrast, the correlation time for the buried side chain of Met 103 in free SSI is two orders-of-magnitude larger (1.3×10^{-8} s) (Table 1).

Results in solids

The nature of the internal motions of the three Met side chains of SSI was examined in more detail by deuterium NMR in powderline and crystalline solid, based on spectral simulation and spin relaxation measurements. Figure 1 shows the experimental result for crystalline SSI in which the methyl groups of all the three Met residues have been deuterated (a), and the simulation spectra with a combination of plausible motional models for the three Met side chains (b).

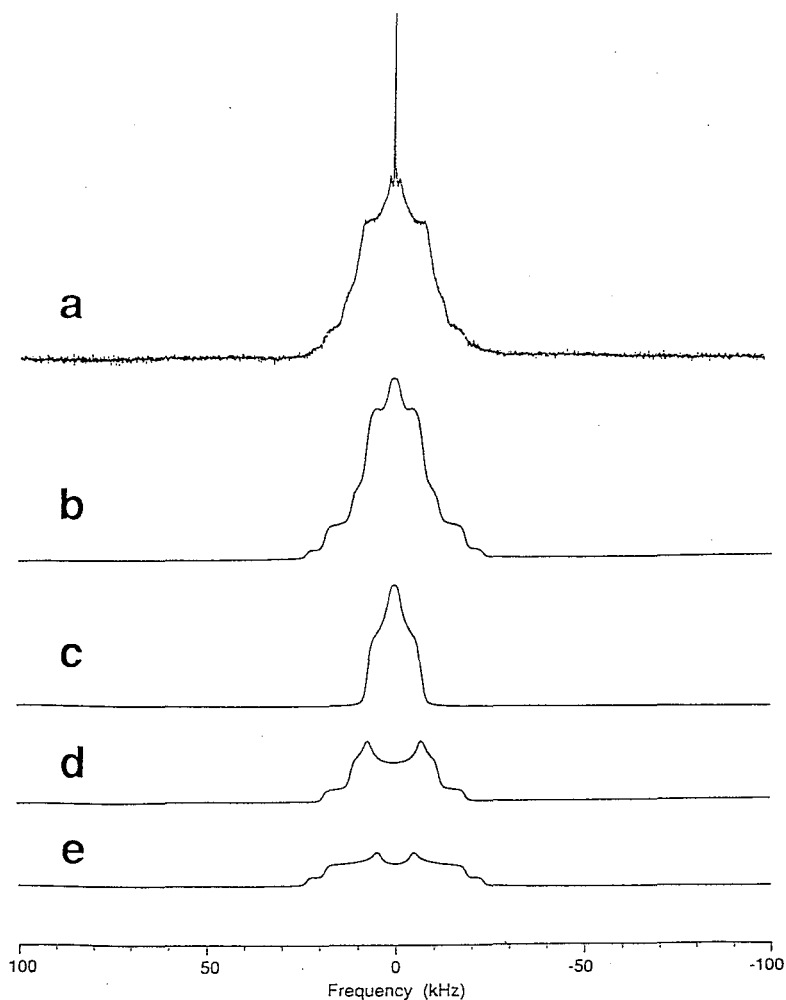


Figure 1. (a) Deuterium NMR spectra of polycrystalline SSI([methyl- $^2\text{H}_3$]Met-70, 73,103), obtained by accumulating 963,000 transients with a repetition time of 0.22 s and Fourier transformation with an exponential filter of 10 Hz. The sharp component in the middle is due to residual $^1\text{H}^2\text{HO}$ in ^2H -depleted water. (b) Computer simulation pattern of (a), obtained by combining (c), (d) and (e). (c) Computer simulation pattern for Met 70 under the assumption that the methyl axis jumps between neighbors of four different sites located on a large conic angle close to the magic angle (55.6 degrees) at a rate of 10 MHz or higher. (d) Computer simulation pattern for Met 73 under the assumption that the methyl axis undergoes random jumps between neighboring sites of four isoenergetic positions on a distorted cone at a rate of 10 MHz or higher, a Gaussian broadening of 5.0 kHz being applied. (e) Computer simulation pattern for Met 103 obtained under the assumption of a two-site jump of the methyl axis spanning an angle of 60 degrees.

(1) Firstly, the spectra of the powder samples were highly dependent on the degree of hydration. Upon lyophilization, a 37 kHz doublet splitting typical for methyl deuterons was observed with slight broadening, indicating rapid three-site random jumps of the methyl deuterons about the methyl axes added with slow (10 kHz) orientational fluctuation of the methyl axes themselves. At a stage of hydration of 0.20 g/g protein-water, the doublet pattern disappeared into a bell-shaped singlet, indicating fluctuation of the methyl axes of Met 70 and 73 at intermediate rates of 1.0 MHz. At almost a saturating stage of hydration (0.60 g/g protein-water), extensive motions set in for the side chains of Met 70 and 73 at a rate higher than 10 MHz. Even the side chain motion of Met 103 buried in the core part becomes activated by the hydration at a rate higher than 1 MHz., although its amplitude is much smaller than the above two.

(2) Secondly, polycrystalline samples of SSI([methyl- $^2\text{H}_3$]Met-70,73,103) were studied, whose spectrum with clear fine structures could be reproduced reasonably well with exactly the same motional models and parameters as were used for the spectral simulation of the fully hydrated powder. This result indicates that the internal motions in the fully hydrated powder and those in crystals are alike. (3) Spin-lattice relaxation measurements in crystals gave evidence that the side chains of all the three Met residues undergo rapid motions with correlation times between 10^{-8} and 10^{-10} s. Comparison of these values with those obtained for solution suggests that the rates of the side chain motions of the three Met residues in crystals are close to those in solution.

(4) Finally, small amplitude motions were found to be present in the side chain(s) of Met 70 and/or 73, even when SSI forms a complex with its target enzyme subtilisin BPN', suggesting loose contact of SSI with subtilisin BPN' at the P1 and/or P4 sites.

Key Words:

Deuterium NMR, Internal motions in proteins, Motions in protein crystals and powders, Molecular dynamics of methionine, Protein hydration, Site-directed mutagenesis, *Streptomyces* subtilitin inhibitor

L 19 核酸構造解析のためのパルス列 (HAL) の開発

(阪大・蛋白研) ○児嶋長次郎 京極好正

HAL Experiment, A Novel Filtering Technique For DNA Assignments

Chojiro KOJIMA & Yoshimasa KYOGOKU

Institute for Protein Research, Osaka University

ABSTRACT: The solution structures of small DNA oligomers have been studied by using conventional ^1H NMR. A little larger DNA molecules (M.W. >10000) were hardly studied due to difficulties such as signal overlapping. Here we propose a novel filtering technique to resolve the overlapping and simplify the DNA spectrum. This technique consists of the Hahn-echo and spin-locking, and there was named HAL. HAL experiment selects singlet peaks (A2H, A8H, G8H, T5H) from mixed doublet ones (C6H), and is applicable to NOESY detection pulse. This experiment, HAL-NOESY, gives the spectrum which has clearly separated cross-peaks between all proton peaks (F1) and the filtered peaks (F2). These proposed techniques, HAL & HAL-NOESY, were applied to the signal assignment of a DNA oligomer d(CGCGAATTCGCG)₂.

I. 序論

核酸 (DNA や RNA) の構造は、大きく分類すると A・B・Z の 3 つの基本構造に分類できるが、実際には塩基配列に依存した基本構造からのばらつきがある。この構造のばらつきが、蛋白質による分子認識などの生物学的な機能に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで核酸を研究する過程で、特異的に認識される特定配列や機能構造単位を形成する配列の詳細な構造解析が大変重要になってくる。

キーワード：核酸、NMR、Hahn エコー、スピンロック

こじま ちょうじろう、 きょうごく よしまさ

NMRは溶液状態で詳細な構造解析が出来る素晴らしい手法であるが、核酸の構造解析に用いる時には幾つかの問題点がある。以下列挙すると、①核酸塩基の種類が5つしかなく、骨格を形成している糖・リン酸部位に帰属の容易な¹Hが無い、という化学構造上の問題。②分子形状が棒状であることが多く、構造解析に有効なNOE情報の数が少ない、という3次元構造上の問題。③核酸の安定同位体標識法が現段階では困難であり、それによって解析できる分子量が制限される、というサンプル調製上の問題などである。

今回、我々はこれらの問題を解決する1つの方法として、簡単で便利な、新しいシグナル選択法(HAL)を開発した。本発表ではこの新しい測定法の原理から応用までを報告する。

HAhn echo & spin Locking (HAL)

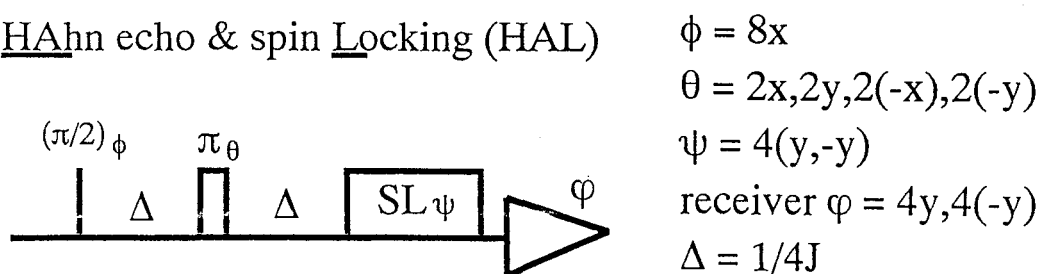


図1. HALのパルス列とその位相回し

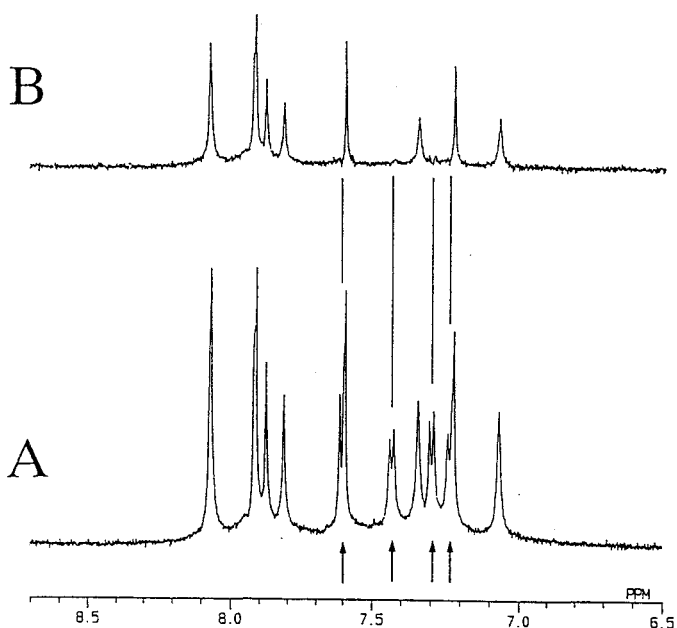


図2 標準的な12mer DNA d(CGCGAATTCGCG)₂の¹Hスペクトル。
A. 通常の1Dスペクトル。
B. HAL-1Dスペクトル。
測定条件、強度目盛は同一。また、矢印は消去されたシグナルの位置を示している。

II. 新しいシグナル選択法 (HAL) の原理

HALとはHahn-echo&Spin-lockingの略であり、2つの部位、Hahnエコーとスピ
ンロックから成る(図1)。HALは、核酸の塩基プロトン領域のようなシングレ
ット・ピークとダブルット・ピークの混じり合った領域から、シングレット・ピークを
選び出す技法であり、そのスペクトルはシングレット・ピークのみを示す(図2)。
核酸塩基ではA 2H、A 8H、G 8H、T 6Hが観測可能で、C 5/6H、U 5/6H
は観測されない。

以下、HALの原理をPRODUCT-OPERATOR(斜字体で表示)を用いて説明する。初期
状態として平衡磁化 I_{Sx} 、 I_{1x} 、 I_{2x} が存在する場合について考える。ここでスピ
ン I_S はJ結合を持たないが、スピン I_1 と I_2 はJ結合しておりその結合定数が J_{12}
 であるとする。そして簡単のためにパルスの位相を $(\pi/2)_x - \Delta - (\pi)_x - \Delta - S L_y - REC_y$ に
 固定する。まず最初のHahnエコー部位によって、 I_{Sx} は $\{-I_{Sy}\}$ へ、 I_{1x} は $\{-I_{1y} \cos(\pi J \cdot 2\Delta) + 2 I_{1x} I_{2z} \sin(\pi J \cdot 2\Delta)\}$ へ、 I_{2x} は $\{-I_{2y} \cos(\pi J \cdot 2\Delta) + 2 I_{1x} I_{2z} \sin(\pi J \cdot 2\Delta)\}$ に展開される。ここで Δ を $1/4 J_{12}$ に一致させることで $\cos(\pi J \cdot 2\Delta) = 0$ となり、 \sin 項だけが残る。次に続くスピ
ンロック部位では以下の交換係

$$[\{ H^{(SL)}_y \}, \{ \frac{1}{2} (I_{1y} + I_{2y}) \}] = 0,$$

$$[\{ H^{(SL)}_y \}, \{ I_{1x} I_{2z} + I_{1z} I_{2x} \}] = i (I_{1z} I_{2z} - I_{1x} I_{2x}),$$

に従って展開する。ただし

$$H^{(SL)}_y = \beta I_{1y} + \beta I_{2y} = 2\beta * \{ \frac{1}{2} (I_{1y} + I_{2y}) \},$$

ここで β はスピ
ンロックパルスのフリップ角を示し、 $H^{(SL)}_y$ はスピ
ンロック・ハミ
ルトニアンをあらわす。 $H^{(SL)}_y$ の形式からも解るように、スピン I_1 と I_2 が結合し
た成分 $\{ I_{1x} I_{2z} + I_{1z} I_{2x} \}$ は、フリップ角の2倍、すなわちパルス磁場 B_1 回
りに 2β 回転する。ゆえに $\beta = (\pi/4) + (n\pi/2)$ の時、スピン I_1 と I_2 が結合した成
分 $\{ I_{1x} I_{2z} + I_{1z} I_{2x} \}$ は、観測不可能な成分 $\{ I_{1z} I_{2z} - I_{1x} I_{2x} \}$ に展開する
。ところがスピン I_S は $H^{(SL)}_y$ によって展開されない。これはシングレットを与え
るスピン I_S のみが観測されることを意味する。

III. HALの2次元展開とその応用

以下ではHALの実用性に関して記述する。フリップ角 β が $\{ (\pi/4) + (n\pi/2) \}$ の時
にシングレットが選択できる事は既に示した。しかし実際上は B_1 不均一性のために
 $n=0$ 以外ではシングレットは選択できないうえに、正確な $(\pi/4)$ パルスの決定が困

難であるため実用的でない。そこで B_1 不均一性を有効に用いる事が考えられる。つまり 5000° パルス ($\approx 500\mu s$) を用いてもシングレットを与える成分は展開されないがダブルットを与える成分は B_1 不均一性によって観測不可能になる。この様な B_1 不均一性を用いて得たスペクトルが、図 2 に示されている。測定条件は、 $\Delta = 33ms$ 、 $\beta = 5000^\circ$ であり、 90° パルス幅以外のパラメータは最適化する必要がない。図 3 には NOESY の観測パルスに HAL を用いた例を示す。明らかに C_6H (ダブルット) 由来のクロスピークが消失している。この方法は、先に提出されているダブルットを残す HOENOE という手法¹⁾ と合い補う技法であるが、感度的には HAL-NOESY の方が上回り、両者を組み合わせて用いることで帰属の確実性が増すものと考えられる。

今回は DNA オリゴマーに適用したが、有用性では RNA への応用の方が期待できる。また、薬物-核酸および蛋白質-核酸の系での titration 実験でも、観測パルスに用いる事が出来る。討論会ではこれらの応用例に関しても報告する。

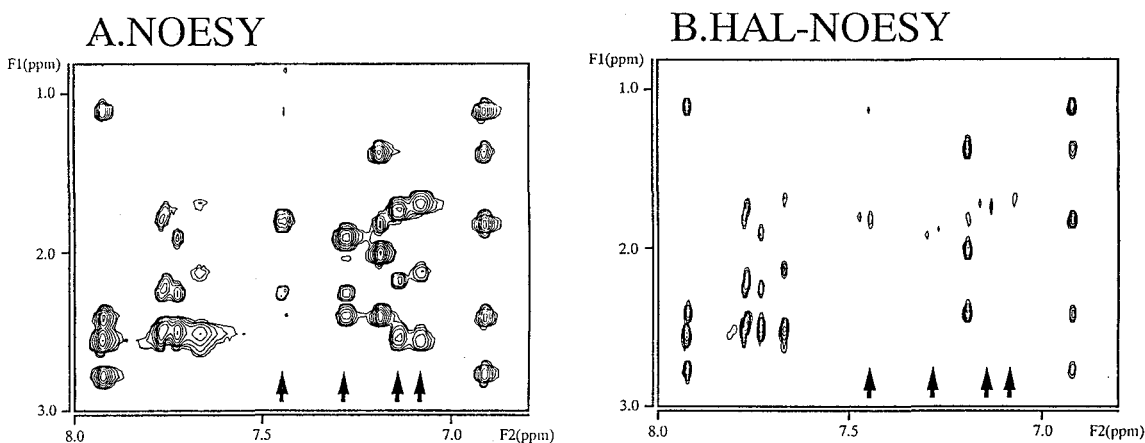


図 3. 両スペクトル中に示した矢印は、 C_6H (ダブルット) 由来のシグナルの位置を示す。測定条件は一致していない。

A. 通常の NOESY スペクトル

B. HAL-NOESY スペクトル：観測パルスに HAL を用いた。 C_6H 由来のクロスピークは、ノイズレベル付近まで強度が低下している。

参考文献

1. V. SKLENAR & J. FEIGON, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 5644 (1990)

L 20 オキシトシンのDMSO中における構造

○加藤敏代、猿渡茂^{*}、藤原敏道^{*}、藤原正子、永山国昭

(日本電子・生体研、^{*}新技術事業団・ERATO)

(^{*}現 横浜国大・工)

Solution Structures of Oxytocin in Dimethylsulfoxide

Toshiyo Kato, ^{*}Shigeru Endo, Toshimichi Fujiwara, Masako Fujiwara and Kuniaki Nagayama
Biometrology Lab. JEOL Ltd., ^{*}ERATO JRDC

Using 2D NMR techniques, NMR parameters relevant to conformations of oxytocin, $\overline{\text{Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH}_2}$, for protonated and unprotonated forms at the N-terminal group were determined in DMSO solution. Comparing these NMR parameters, a small but effective change in backbone conformation of the cyclic moiety associated with the protonation at the N-terminus was first suggested. This conclusion was next tested by elucidating the solution conformations of the two forms of oxytocin with computer calculations based on a relaxation matrix analysis. Totals of 100 and 114 distances were obtained for the protonated and unprotonated forms, respectively. Interresidue distances for the cyclic moiety were 26 in the protonated and 44 in the unprotonated form. Overall structures with the lowest target function were similar between two forms for β -turn structure elements with the backbone conformation of the endocyclic residues of Tyr2-Asn5. However, the protonated form is slightly swollen with the deleted hydrogen bond between Tyr2 NH and Asn5 backbone carbonyl. These β -turn structures could not be characterized by any kind of classic β -turns.

1. はじめに

オキシトシン ($\overline{\text{Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH}_2}$) の N 末の解離状態の異なる 2 つの型 (unprotonated form および protonated form) の DMSO 中における NMR パラメータの比較を行い (^1H , ^{13}C ケミカルシフト、NH の温度依存性および $^3\text{J}_{\text{HH}}$, $^3\text{J}_{\text{CH}}$ 等)、両者の cyclic 部分の骨格構造に違いが示唆されることを昨年の本年会で報告した¹⁾。オキシトシンの DMSO 中での構造は主に cyclic 部の Tyr2 - Asn5 から成る β ターンで特徴付けられる。この β ターンのタイプや水素結合の有無については種々のモデルが報告されているがまだよく分かっていない。オキシトシンよりも高い活性をもつ deamino-oxytocin (1-mercaptopropionateoxytocin) の結晶構造は既に分かっており、それによると S-S のキラリティーの異なる 2 つのコンホマーが存在し、いずれもタイプ II β ターン構造をとっている²⁾。unprotonated form と protonated form の NMR パラメータにみられる違いは決して大きくないが、2D NOE スペクトル強度を正確に求めた緩和行列に基いた構造計算を行い、cyclic 部分の小さな構造の差異を見出すことができるかを試みたので報告する。

2. 方法

[1] 緩和行列の計算 : 2D NOE として mixing time の異なる全部で 6 種 ($\tau_m = 50 \sim 800$ ms) のデータを使用した。NOE ピーク強度は NMR2/Distance ソフトウェア (NMRi) を用いて体積積分から定量的に求めた。

^1H NMR、 ^{13}C NMR、オキシトシン、帰属、溶液構造

かとうとしよ、えんどしげる、ふじわらしみち、ふじわらまさこ、ながやまくにあき

緩和行列は、Madridらの方法³⁾と同様に次式より計算した。即ち、mixing time τ_m におけるNOEピーク強度は次のように表される。

$$M(\tau_m) = \exp(-R\tau_m)M(0), \quad (1)$$

ここで R は緩和行列、 $M(0)$ は $\tau_m = 0$ における2D NOEスペクトル強度である。最初にある τ_m について R を求める。次にこの R を初期値として上式で求まる計算スペクトルと実験スペクトルで約1000個の強度の差が最小になるように R を計算した(非線形最小自乗法)。

[2] プロトン間距離の計算 : 緩和行列 R をプロトン間距離に変換するために、分子構造の揺らぎを考慮したBraunらのuniform averaging model⁴⁾を用いた(このモデルではスピン i, j 間の距離は、ある最小値 r_m と最大値 R_m の間を均一に変化していると考え)。即ち、みかけの交差緩和速度は次式で表され、

$$\sigma_{ij}^* = \left\langle \frac{f(\tau_{ij})}{r_0^6} \right\rangle = \frac{f(\tau_{ij})}{5(R_m - r_m)} \left(\frac{1}{r_m^6} - \frac{1}{R_m^6} \right), \quad (2)$$

さらに基準の距離 r_0 に対するNOE強度との比を $Q(R_m)$ で定義すると次式が得られる。

$$\begin{aligned} Q(R_m) &\equiv \frac{r_0^6}{5(R_m - r_m)} \left(\frac{1}{r_m^6} - \frac{1}{R_m^6} \right) \\ &\equiv \frac{f(\tau_{ij})}{f(\tau_R)} \frac{r_0^6}{5(R_m - r_m)} \left(\frac{1}{r_m^6} - \frac{1}{R_m^6} \right) = \frac{\sigma_{ij}}{\sigma_0} \end{aligned} \quad (3)$$

ここで τ_R は分子全体の回転相関時間、 $f(\tau_{ij})$ はスピン i, j 間の双極子相互作用の相関時間 τ_{ij} の関数である。我々はBraunらと異なり、(3)式において距離の最小値 r_m をvan der Waalsの接触距離(2.0 Å)に固定するのではなく可変とした。即ち、最大値 R_m に対する r_m の割合を変えることにより最小値を可変とする方法をとった((3)式で、 $r_m/R_m = x$ を定義する。以下 x をrigidityパラメータと呼ぶ)。

[1]で得られた σ_{ij} のうち、計算値と実験値のエラーの大きいものおよび強度が小さいために信頼性の低いものを除き、最終的に unprotonated formで114個、protonated formで100個の σ_{ij} を、6個の x ($x = 0.9 \sim 0.5$)についてそれぞれプロトン間距離に変換した。

[3] Distance Geometry計算 : 構造計算は二面角を独立変数にとり、プロトン間距離の制約条件を基にした疑似エネルギーを目的関数としてこれを極小化するDADAS法(DADAS90プログラム⁵⁾)を用いた。
[2]で求めたプロトン間距離をupper constraintsをして使用した。これらの距離制約条件の総数(前述)のうち、cyclic部分に関する残基間の距離制約条件の数は、unprotonated formでは44個、protonated formでは26個であった。計算はすべてJML-S1000 MolSkop システム(JEOL)で行い、200個のランダムな構造から出発し、全部で6種のrigidityパラメータにおいて各200個の最終構造を得た。

3. 結果と考察

Fig. 1に目的関数値がrigidityパラメータの減少とともに変化する様子を示す。目的関数値はxを小さくすると、即ちフレキシブルにすると小さくなる。従ってxをどの値にするかは任意性があるが、次の3つの条件を満たすxにおける構造を目的の構造とした：(i) 距離のviolationの総和が1.0 Å以下である、(ii) S-S結合に関する距離（即ちS-S間およびふたつのC'-S間の距離）が標準値を満たす、(iii) すべての残基内 $d(\alpha_1, \beta_1)$ および $d(\alpha_1, NH_1)$ が幾何学的に可能な距離の最大値を大きく上まわらない、である。その結果 unprotonated formでは $x = 0.65$, protonated formでは $x = 0.70$ を採用した。これらのxにおける最も目的関数値の小さい構造に関する計算結果をTable 1にまとめた。またそれらの平均構造の重ね合わせをFig. 2に示した。一般にβターン構造であるための定義は、 C_i^* と C_{i+3}^* 間の距離 $< 7 \text{ \AA}$ で、かつターンを構成する残基がヘリックス構造をとらないことである⁶⁾。さらにターンのタイプは、ターンのコーナーを占める残基(Ile3とGln4)の ϕ, ψ angleによって特徴付けられる。unprotonated formでは $(\phi_3, \psi_3) = (-93 \pm 6^\circ, 17 \pm 3^\circ)$; $(\phi_4, \psi_4) = (-166 \pm 8^\circ, 30 \pm 5^\circ)$ 、protonated formでは、 $(\phi_3, \psi_3) = (-95 \pm 5^\circ, 32 \pm 5^\circ)$; $(\phi_4, \psi_4) = (170 \pm 8^\circ, 39 \pm 5^\circ)$ であり、両formのIle3、Gln4の ϕ, ψ angleには大きな差異は認められない。Wilmotらが、典型的なものを含む上記の定義を満たす様々なβターン構造を報告しているが⁷⁾、両オキシトシンの示すβターン構造はそれらのどれにも当てはまらなかった。一方、Tyr2の ϕ angleとAsn5の ψ angleが両オキシトシンで約50°ずれており、unprotonated formでは骨格のTyr2 NHとAsn5 CO間に水素結合を形成し得るが protonated formでは形成しない。これらのことはTyr2 NHの温度依存性の結果（unprotonated formでは $-\Delta \delta / \Delta T = 0$ ）およびTyr2とAsn5間のロングレンジNOEの出方（unprotonated formではこれらの残基間NOEが観測されるのに対し、protonated formではそれらが観測されないあるいは著しく弱い）の結果と一致する。即ち、両オキシトシンの構造の違いを定性的に述べるならば、unprotonated formの方がTyr2とAsn5間がより近いβターン構造をとっているといえる。

Table 1: Summary of the mean values of target function and the sum of distance violations with the two forms of oxytocin derived from distance geometry calculations

form	rigidity parameter x	target function ^a	no. of violations (0.1 Å >) ^b	sum of violations (Å)	rmsd ^c (Å)
protonated	0.70	0.12	0	0.16	0.24
unprotonated	0.65	0.29	0	0.12	0.46

^a The values are the averages for 10 conformations with the lowest target function of protonated form and 20 conformations of unprotonated form, respectively. ^b The constraint violations which exceed the upper bounds by above 0.1 Å are included; the total number of distance constraints are 100 for protonated form, and 114 for unprotonated form, respectively. ^c Average root-mean-square deviation of backbone atoms N, C^α, C' in the cyclic part.

最後にunprotonated formの目的関数値の低い構造の中にタイプII β ターン構造が得られ、この構造も考慮すると骨格のNOE強度の実験値と計算値の比がより良い一致を示すことが分かった。我々はNOEが単一のコンホメーションから由来するという仮定のもとに解析しておりコンホマーについて言及することはできないが、今後 time-averaged molecular dynamicsをとり入れたコンホマー解析が必要であることが示唆された。

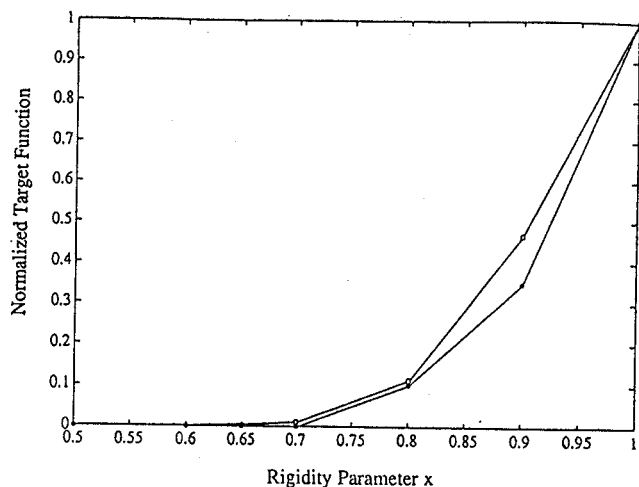


Fig. 1 : Dependence of normalized target function averaged over 10 structures with the lowest target function on the rigidity parameter, x ($x = r_m/R_m$), for protonated form (●) and unprotonated forms (○) of oxytocin.

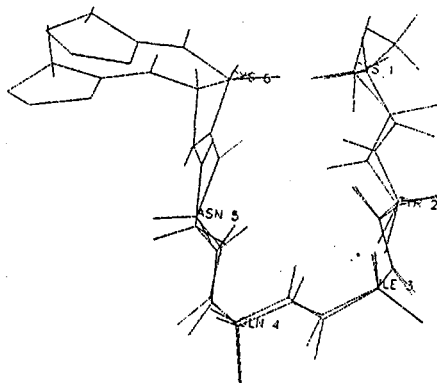


Fig. 2 : Superposition of the C', C α , N backbone for cyclic part of the protonated and unprotonated forms of oxytocin at the N-terminal.

< 参考文献 >

- 1) 加藤、藤原、猿渡、永山 (1991)第30回NMR討論会講演要旨集、pp.161-164.
- 2) Wood, S. P., Tickle, I. J., Treharne, A. M., Pitts, J. E., Mascarenhas, Y., Li, J. Y., Husain, J., Cooper, S., Blundell, T. L., Hruby, V. J., Buku, A., Fishman, A. J. and Wyssbrod, H. R. (1986) *Science*, **232**, 633-636.
- 3) Madrid, M., Llinas, E. and Llinas, M. (1991) *J. Magn. Reson.*, **93**, 329-346.
- 4) Braun, W., Bosch, C., Brown, L. R., Go, N. and Wuthrich, K. (1981) *Biochimica et Biophysica Acta*, **667**, 377-396.
- 5) Endo, S., Wako, H., Nagayama, K. and Go, N. (1991) *Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (Eds, Hoch, J. C. et al.) Plenum Press, New York, pp.233-251.
- 6) Lewis, P. N., Momany, F. A. and Scheraga, H. A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **303**, 211-229.
- 7) Wilmot, C. M. and Thornton, J. M. (1990) *Protein Engineering*, **3**, 479-493.

L 21

NOESY及び構造精密化プログラムMARDIGRASによるRibonuclease T₁修飾体の構造研究

○宮野博¹, 鈴木榮一郎¹, 田之倉優², 高橋健治², Thomas L. James³

(¹味の素(株)・中研, ²東大・理, ³University of California, San Francisco)

Structure Analysis of Carboxymethylated Ribonuclease T₁ by Using NOESY and MARDIGRAS

Hiroshi Miyano¹, Ei-ichiro Suzuki¹, Masaru Tanokura², Kenji Takahashi² and Thomas L. James³

¹Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., ²Faculty of Science, University of Tokyo, ³University of California, San Francisco

Ribonuclease T₁ (RNase T₁) loses the enzymatic activity thoroughly by carboxymethylation at the residue Glu-58, but the carboxymethylated (CM) RNase T₁ still retains nucleotide-binding ability. In order to determine the solution structure of the RNase T₁, the sequence specific assignments were performed to obtain the secondary structure. Then we calculated distances between protons by using the program MARDIGRAS (Matrix Analysis for Discerning the Geometry of an Aqueous Structure) based on NOE intensities. We also applied the distance geometry method to obtain the structure determination of CM-RNase T₁.

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¹⁾。活性発現には、His-40, Glu-58, Arg-77, His-92が必要であるが、その反応機構の詳細は明らかになっていない。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してカルボキシメチル(CM)化され、酵素活性は消失する²⁾。Glu-58の側鎖が、僅か4 Å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、NMRによる構造研究を進めてきた³⁾。

今回、NOESYの結果をもとに、プログラムMARDIGRAS (Matrix Analysis for Discerning the Geometry of an Aqueous Structure) ⁴⁾を用い核間距離を求め、さらに、水溶液中でのCM-RNase T₁の構造を求める試みを行なったので報告する。

【実験】

CM-RNase T₁は、ICH₂COOHを用い、文献²⁾に従い合成した。試料濃度は、約2mMでpH 4.4とした。

NMRはAMX600 (Bruker) を用い、NOESYなど各種二次元NMRを測定した。

NOESYのピーク強度はNMRZにより求めた。その結果をもとに、それぞれのクロスピークに対応する核間距離をMARDIGRASにより算出した。また、座標計算は、EMBEDなどを用いた⁵⁾。

【結果と考察】

CM-RNase T₁の¹H-NMR帰属は、常法の連鎖帰属法によって行なった。近接残基間のNOEをRNase T₁の

Ribonuclease T₁, NOESY, MARDIGRAS

みやのひろし, すずきえいいちろう, たのくらまさる, たかはしけんじ, Thomas L. James

場合と比較したところ、CM化によってもその二次構造やトポロジカルな構造に変化は起こらないことが確認された³⁾。

NOESYで検出された非交換性プロトン間のクロスピークを解析し、混合時間50msで216、100msで308、150msで453のNOEが帰属出来た。NOE強度を核間距離に変換するに際し用いたMARDIGRASは、relaxation matrixの完全解を求めるプログラム(図1)であり、それゆえNOE強度から正確に核間距離に導くことが出来る。本プログラムは、対象としている化合物のモデル構造が必要で、それから推定されるNOE強度と実測NOE強度とを比較しながら計算を行なう。CM-RNase T₁では、protein data bankに記載があるRNase T₁ - 2'-GMP complexを利用し、まず2'-GMPを除去した後、Glu-58のγカルボキシル基にCM基を導入したものを作成しこれをモデル構造とした。計算の結果、全部で381の距離が得られた。さらに、これと二次構造を束縛条件として、EMBEDによる座標計算を行なった。得られた主鎖構造を図2に示した。現在、得られた構造(図1のIMPROVED MODEL)をもとに、MARDIGRASの2サイクル目に移行しており、そうすることでより収束性のよい構造が求まるものと考えられる。

一方、これとは別に、CM-RNase T₁の構造³⁾及び2'-GMPとの複合体の構造をエネルギー計算より求め、RNase T₁の場合との比較検討を行なっている。CM-RNase T₁では、2'-GMPが約2ÅRNase T₁に比べ蛋白質の酵素の外側の方向に平行移動し、その結果、活性に必要なとされる残基との距離も大きくなる。また、CM基とArg-77のグアニジル基は2'-GMPの存在の有無にかかわらず近接しており、これらの残基間の何らかの相互作用が示唆された。NMRの結果とこのエネルギー計算の結果の比較も本討論会で触れる予定である。

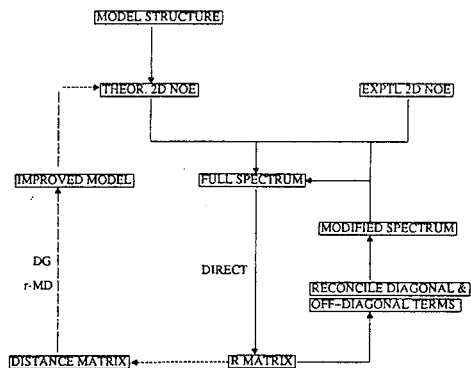


図1 MARDIGRASのフローチャート

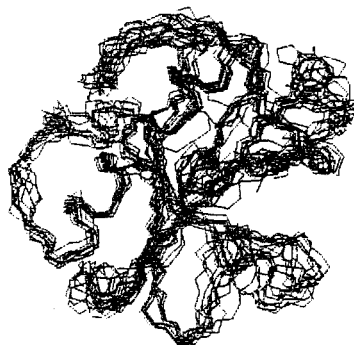


図2 NOESYより得られたCM-RNase T₁の構造(主鎖のみ表示)

【参考文献】

- 1) K. Takahashi, and S. Moore, *The Enzymes* 15, 435 (1982).
- 2) K. Takahashi, W. H. Stein and S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 242, 4682 (1967).
- 3) 宮野, 鈴木, 田之倉, 高橋, 第29回NMR討論会要旨集 p153 (1990), 第30回NMR討論会要旨集 p199 (1991).
- 4) B. A. Borgias and T. L. James, *J. Magn. Reson.*, 87, 475 (1990)
- 5) I. D. Kuntz, J. F. Thomason and C. M. Oshiro, *Methods in Enzymol.*, vol 177, 159 (1989).

特別講演 I

HIGH FIELD MAGNETIC RESONANCE AND SURGICAL PRACTICE

Roxanne Deslauriers, Keith W. Butler, John K. Saunders, Sylvain Lareau⁺, Rosalind Labow⁺, Wilbert J. Keon⁺, Gang-Hong Tian[#], Valery Kupryianov[&], Anthony L. Panos^{*}, Carlos A.M. Barrozo^{*}, Owayed Al-Nowaiser^{*}, Imtiaz S. Ali^{*}, and Tomas A. Salerno^{*}.

Institute for Biological Sciences, National Research Council of Canada, Ottawa

⁺ University of Ottawa Heart Institute, [#] Department of Physiology, University of Ottawa
& Cardiology Research Center, Moscow, Russia

^{*} Division of Cardiovascular Surgery, University of Toronto, Toronto, Canada.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy (MRS) of living systems has been used mainly as a tool for basic research. It is now used to improve medical diagnosis and therapy. We are applying MR techniques to improve the condition of the heart before transplantation and to improve the techniques used for open heart surgery.

Preservation of the Heart Before to Transplantation

A) Studies of Human Heart Tissue

These studies focus on extending the safe storage time of the heart before transplantation in order to increase availability and allow better cross-matching of donor hearts. Human heart tissue (right atrial appendage) removed and normally discarded during heart surgery requiring cardiopulmonary bypass is used with the consent of the patient. The advantage of this approach is that it avoids the use of animal tissue that may be very dissimilar metabolically when compared to human tissue.

A MR microprobe has been developed to study heart tissue subjected to different preservation conditions. Trabeculae isolated from human right atrial appendages and weighing 8 - 25 mg can easily be studied. The MR microprobe is equipped with a perfusion system and a MR compatible strain gauge that allows simultaneous measurement of MR data and mechanical performance of the trabeculae. Using ³¹P and ¹H MR spectroscopy in the presence of inhibitors of glycolysis and oxidative phosphorylation the contributions of various metabolic pathways to energy production during preservation at different temperatures can be measured.

B) Studies using a Porcine Model of the Human Heart

Most published MR studies on heart preservation have used rodent hearts (rats, guinea pigs...). A porcine heart model has been developed because it is more metabolically and architecturally similar to the human heart. ³¹P MR spectroscopy is used to investigate the effects of preservation protocols (eg. temperature) and cardioplegia (solutions used to stop the mechanical activity of the heart) on energetics

during arrest and function following reperfusion. This work has demonstrated a steep temperature dependence in the efficacy of certain types of preservation solutions that renders them unsuitable for use during procedures where the temperature cannot be rigorously controlled. These studies have also shown that, independently of energetics, the reperfusion modality can have a major influence on the incidence of ventricular fibrillation.

In addition, ^{23}Na MR spectroscopy in the presence of shift reagent is providing information on the ionic gradients and fluxes in the heart during preservation and reperfusion. This work forms the basis for developing new preservation strategies.

Heart Preservation during Surgery

Cardiac surgery is changing: surgery is being offered to higher and higher risk patients. This has placed a demand on the development of better means of protecting the heart during surgery. In conjunction with ^{31}P MR, the isolated blood-perfused porcine heart is being used to assess and optimize myocardial protection under conditions similar to those occurring during surgery, including normothermic blood cardioplegia and secondary re-arrest cardioplegia.

These studies translate into practical applicability for the surgeon by providing insight, under controlled conditions, into the effects on myocardial energetics of conditions applied during surgery, and the consequences these may have on cardiac function. For instance, by using fiber optic oxygen monitors in conjunction with MR experiments, it is possible to correlate tissue oxygen levels with the critical phosphocreatine and ATP values compatible with complete functional recovery of the heart. These data can then serve as benchmarks for the use of such probes in the surgical theatre.

Preservation of the Brain During Cardiac Surgery

Surgery for complex cardiac diseases or for diseases of the major vessels require that the body be cooled to 15-20°C, and the circulation stopped. Periods of ischemia greater than 45 to 60 minutes are associated with serious, at times irreversible, brain damage. Using MR spectroscopy and imaging it is possible to explore newer and innovative means of cerebral protection. Namely, after the circulation is interrupted, the brain can be perfused in a "backwards" fashion via the venous system. MR technology in the intact pig is useful as a non-invasive tool to assess the metabolic status of the brain during circulatory arrest. This work will have significant implications in terms of the manner in which circulatory arrest is conducted, and promises to be a major advance in cerebral protection.

In conclusion, spectroscopic techniques have achieved a level of detection sensitivity and ease of use that make MR a valuable tool in the practice of modern surgery.

This work was supported in part by the Heart and Stroke Foundation of Ontario and the Medical Research Council of Canada.

第 3 日

11月19日(木)

L 22 ~ L 29

北大工、北大理*、内蒙古師範大[#]、フィンランド技術研究センター[†]、
カルガリ-大[§]

平沖敏文、新田勝利*、岳 克[#]、T. Drakenberg[†]、J. M. Aramini[§]、
H. J. Vogel[§]

^{43}Ca -NMR Studies of Lysozymes and α -Lactoalbumins

Toshifumi Hiraoki, Katsutoshi Nitta*, Yuc Ke[#], Torbjörn Drakenberg[†], James M. Aramini[§], and Hans J. Vogel[§]

Department of Applied Physics and *Polymer Science, Hokkaido University, [#]Inner Mongolia Normal University,

[†]Technical Research Center of Finland, [§]University of Calgary.

The calcium-binding properties of equine and pigeon lysozyme as well as those bovine and human α -lactalbumin were investigated by ^{43}Ca NMR spectroscopy. All proteins were found to contain one high-affinity calcium-binding site. The chemical shifts, line widths, relaxation times, and quadrupole coupling constants for the respective ^{43}Ca NMR signals were quite similar. These are indicative of a high degree of homology between the strong calcium-binding sites of these four proteins. The correlation times for bound calcium ions indicate the restricted motion of these binding sites. The ^{43}Ca NMR findings provide direct evidence in support of an evolutionary link between the functionally distinct lysozymes and α -lactalbumins.

α -lactalbumin(α -LA)とニワトリ型lysozyme(LZ)は機能は全く異なるが、アミノ酸組成、立体構造、遺伝子構造が良く似ており、両者は共通の祖先蛋白質から進化したものと考えられている。 α -LAには立体構造の維持に必須の1ケのCa結合部位が存在する。ウマとハトのLZはCaを結合し(Table-1)¹⁾、そのCa結合部位は α -LAと類似であることが明かにされている。²⁾ これらLZの二次・高次構造はCaイオンの存否により変化がなく、酵素活性は高温まで保持され、Caイオンは構造を安定化していると考えられている。本研究では ^{43}Ca -NMRによりウシとヒトの α -LAと、ウマとハトのLZのCa結合部位の構造と性質を比較検討した。³⁾

ウマとハトのLZはそれぞれ馬乳と卵白より精製した。ウシとヒトの α -LAは市販品を用いた。約80%に安定同位体濃縮された $^{43}\text{CaCl}_2$ を用いた。 ^{43}Ca -NMRの測定は水平ソレノイド型コイルのプロープを用い、Bruker-AM400WB(26.9MHz)で行った。1M CaCl_2 を化学シフトの外部基準に用いた。20K-60Kの積算を行った。

Table I. Partial amino acid sequences of α -lactalbumins and lysozymes.

		*	80	*	*	*	*	*	90					
bovine α -LA	C	D	K	F	L	D	D	D	L	T	D	D	I	M
human α -LA	C	D	K	F	L	D	D	D	I	T	D	D	I	M
equine LZ	C	S	K	L	L	D	E	N	I	D	D	D	I	S
pigeon LZ	C	S	K	L	R	D	D	N	I	A	D	D	I	Q

* indicates Ca-binding residues.

アポウマリゾチームに対する ^{43}Ca

NMRスペクトルの濃度依存性を

Fig. 1に示す。-5.3ppmに250Hzの線

^{43}Ca -NMR、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン、カルシウム結合

ひらおき としふみ、にった かつとし、ヨ-コ、T. ドラケンベルグ、J.M. アラミニ、H.J. ボーゲル

巾をもつシグナルが観測され、その強度はモル比に比例して増加するが、線巾は変化しない。これは蛋白質に結合したCaと帰属できる。モル比が1以上になると、1ppmに鋭いシグナル($\Delta\nu=10\text{Hz}$)が現れ、このシグナルの強度のみ増加する。同様の結果が他の蛋白質で得られた(Table 2)。これらの結果は一ケのCaイオンが蛋白質に強く結合し、しかも蛋白質に結合したCaとフリーのCaとの化学交換が非常に遅いことを示している。

$I=7/2$ である ^{43}Ca は四重極相互作用で緩和する。 T_1 と線巾より求めた T_2 を用いて、蛋白質に結合したCaの運動の相関時間 τ と四重極結合定数 χ を求めた(table II)。いずれの τ の値もnsのオーダーで、約14kDの蛋白質の分子全体の回転運動の値に近く、Ca結合部位にはローカルな速い運動がないことを示している。 χ は互いに似た小さな値で、Caイオンの配位構造の対称性が高いことを示している。

以上の結果は α -LAとLZのCa結合部位が互いに極めて類似していることを示している。 ^{43}Ca -NMRパラメーターはカルモジュリン等のCa結合蛋白質($\delta=+10\text{ppm}$, $\chi\geq 1\text{MHz}$)とは異なり⁴⁾、両蛋白質群でCaイオンの配位構造に異なることを示している。

Table IIに pK_a' と K_d を示す。 ^{43}Ca -NMRスペクトルのpH依存性より求めた pK_a' の値はCaの配位子にカルボキシル基が存在することを示唆している。EDTAとの競合反応より求めた K_d はいずれも他の方法から求めた結果と一致する。

bovine α -LAの鋭い ^{43}Ca シグナルの線巾と化学シフトはpHとCa濃度に依存する。これは第二の弱いCa結合部位が存在し、速い化学交換をしていることを示している。Fig. 2にこのシグナルの線巾のpH依存性を示す。pH依存性から求めた pK_a は6.3であり、このCa結合部位にHisが関与していることを示唆している。他の三つの蛋白質には第二のCa結合部位はないことがわかった。

Table II. ^{43}Ca -NMR data at 294K.

	δ/ppm	$\Delta\nu/\text{Hz}$	T_1/ms	τ/ns	χ/MHz	pK_a'	K_d/M
bovine α -LA	-5.8	260	4.0	8.6	0.7	3.8	5×10^{-8}
human α -LA	-6.7	330	2.8	8.0	0.8	4.7	5×10^{-8}
equine LZ	-5.3	250	2.9	6.0	0.7	3.8	1×10^{-6}
pigeon LZ	-3.2	190	3.1	4.4	0.7	3.4	1×10^{-7}

References

1. K. Nitta, et al., *FEBS Lett.* 223, 405(1987); S. Sugai et al., *Colloq.INSERM* 197, 591(1989).
2. K. Inaka, et al., *J.Biol.Chem.* 266, 20666(1991).
3. J. Aramini, et al., *Biochemistry* 31, 6761(1992).
4. H. Vogel and S. Forsén, *Biol. Magn. Reson.* 7, 249(1987).

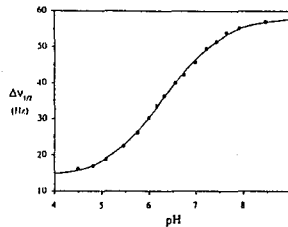


Fig. 2 pH dependence of $\Delta\nu$ of the ^{43}Ca signal bound to the second site of bovine α -LA.

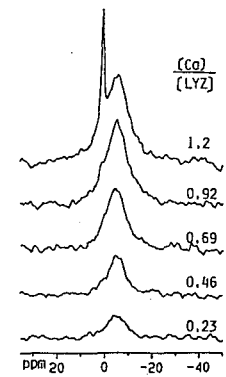


Fig. 1 ^{43}Ca NMR spectra of equine LZ at pH 6.0.

(横浜国大工) ○阿久津秀雄、平澤政明、朴璋洙、加野勝宏

Cytochrome c_3 is a tetraheme protein of sulfate-reducing bacteria. Cytochrome c_3 of *D. vulgaris* Miyazaki F was studied by $^1\text{H-NMR}$ in this work. The signals of four heme groups were assigned to the specific hemes in the crystal structure. Now, the redox behavior observed by NMR can be analyzed on the basis of the crystal structure. The microscopic redox potentials were determined at three different pHs and were discussed in connection with the structural information. The chemical properties of the ligated imidazole rings were shown to be nonequivalent. The structure of the heme environment was suggested to change through the alteration of the oxidation state on the basis of the NOE measurements.

【はじめに】チトクロム c_3 は絶対嫌気性菌である硫酸還元菌のマーカータンパク質で、4つのヘムを持ち、非常に低い酸化還元電位を示すことを特徴とする。このタンパク質の分子量は約14000で、その高いヘム密度のためにさまざまな特異な物理化学的性質を示すことが知られている。本研究で取り上げるタンパク質については樋口らにより結晶構造が報告されている(図1)。われわれはこのタンパク質における電子移動のメカニズムをここ数年に亘って調べてきた。特に、NMRの高い分解能を使うことにより、ここのヘムの酸化還元挙動を詳細に追うことができた。それによって、個々のヘムの微視的酸化還元電位を見積もることが可能となった。しかし、電子移動機構を解明するためにはこれらの情報が分子の3次構造と結びつかなければならない。そこでわれわれは硫酸還元菌の化学培地による培養法を確立し、このタンパク質のアミノ酸残基の選択的標識を可能にした。そこで、選択的標識と2次元NMRを合わせ用いることにより、このタンパク質のNMRスペクトルの帰属を進めている。本講演ではヘム自身とそのまわりのアミノ酸残基についてのシグナルの帰属をもとに、酸化還元挙動とヘム近傍の構造について検討した結果を報告する。

ヘムタンパク質、電子伝達タンパク質、チトクロム c_3 、NMR、酸化還元制御

○あくつひでお、ひらさわまさあき、パクジャンスウ、かのかつひろ

【実験】チトクロム c_3 は大量培養した硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F の菌体より、八木らの方法の変法により精製した。アミノ酸残基の選択的重水素化においては当研究室で開発した化学培地を用いた。完全還元型の試料は微量のヒドロゲナーゼ存在下で気相を水素ガスで置き換えることによって得た。NMR の測定には Bruker AM400 NMR 装置を用いた。2次元NMR の H O H A H A の混合時間には完全酸化型では 26.6 ms を完全還元型では 200 ms を用いた。また、1次元の NOE 測定では 0.5 s の前照射を行い、on-resonance と off-resonance の差を取った。

【結果と考察】結晶構造上のヘムとNMRシグナルの間の対応関係は核間の距離情報をもとに組み立てた。まず、完全酸化型および完全還元型のチトクロム c_3 について、2次元NMRと1次元NOEにより、ヘム由来のシグナルの帰属を行った。次に、これらのシグナルとの間でNOEが観測されるアミノ酸残基のシグナルを2次元NMRとアミノ酸の選択的重水素化によって帰属した。芳香環のシグナルについてはフェニルアラニン、チロシン、ヒスチジンを次々に選択的に重水素化する事により、アミノ酸種別を同定した。2次元のスペクトルに全くクロスピークの現れなかったものはメチオニンの重水素化より、メチオニンの ϵ メチルであることが分かった。これらを基に、0.5 nm よりも近距離にある核のネットワークをつくった。これには3つの異なるヘムの核が含まれている。結晶構造を調べてみるとそれに対応する距離のネットワークがあることが分かった。このようなネットワークはただ1種類しか存在しないので、これを基に、完全酸化状態、および完全還元状態においてNMRシグナルの部位特異的な帰属を行うことができた。

図1にここから明らかになった結晶構造上のヘムと微視的酸化還元電位の関係を示

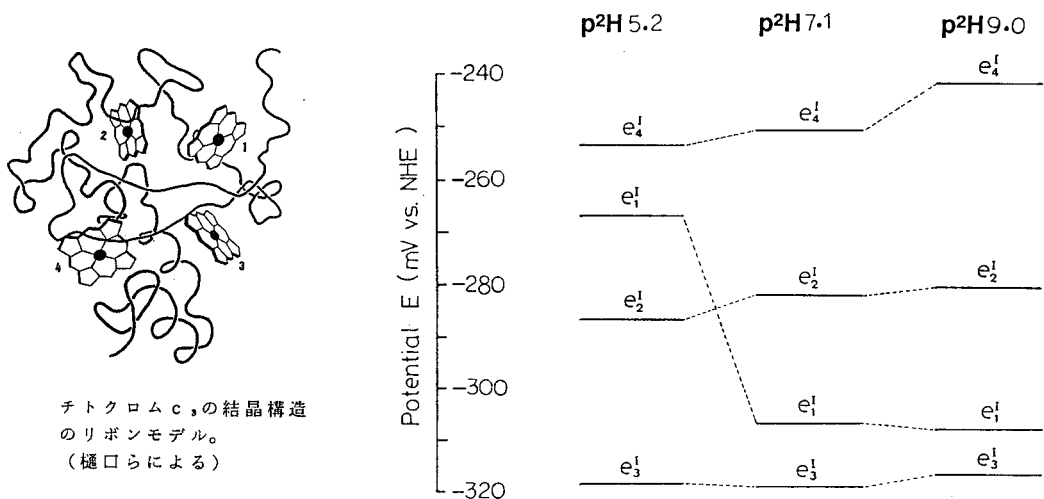


図1 硫酸還元菌宮崎株チトクロム c_3 の結晶構造と4つのヘムの微視的酸化還元電位 (e)。e の添え字は結晶構造中のヘムの番号を、肩字は還元第1ステップであることを示す。

す。次に、微視的酸化還元電位の pH 依存性を調べた。pH 5.2、7.1、9.0 における第 1 還元ステップの微視的酸化還元電位をやはり図 1 に示してある。図から明らかのように、ヘム 1 の酸化還元電位は酸性側で顕著な変化をしている。その原因を調べるために、帰属されているシグナルの pH 変化を調べてみた。その結果、ヘム 1 の酸化還元電位の pH 依存性はヘム 1 の 6 位のプロピオン酸の滴定曲線と非常によく一致を示した。その pKa は約 6 で、通常のプロピオン酸のそれよりもかなり高い。結晶構造で見ると、このプロピオン酸は半分タンパク質の中に埋まっており、この疎水的環境が異常な pKa の原因であると考えられる。このプロピオン酸の解離が何らかの構造変化を引き起こし、それが酸化還元電位の変化の原因になっているものと考えられる。

ヒスチジンのイミダゾール基の C 2 位を選択的に重水素化すると、通常芳香族領域でシグナルが 1 本消えるが、同時に、図 2 に示すように 0 ppm よりも高磁場側で非常に幅の広いシグナルが 8 本消えるのが観測された。これは 4 つのヘムに配位している 8 個のイミダゾールに由来するシグナルであると帰属できる。このようなところに広く分散して観測される原因についてはまだ明かではない。しかし、イミダゾールがイミダゾレート型になると高磁場側に現れるという報告もあり、8 個の配位子の化学的性質が通常イミダゾールとはかなり異なっている可能性を示すものである。もし、配位子が部分的にでもイミダゾレート型を取っていれば、ヘムの酸化型が安定化され、このタンパク質の酸化還元電位が異常に低いことを説明できる。

次に、ヘムの酸化還元がヘムのまわりの構造にどのように反映するかを NOE を用いて調べた。

この際、完全酸化型ではヘムが常磁性であるため、ヘムのシグナルの緩和時間が非常に短くなっており、NOE が観測されにくい。そこで、完全酸化型では 2 次元 NOESY

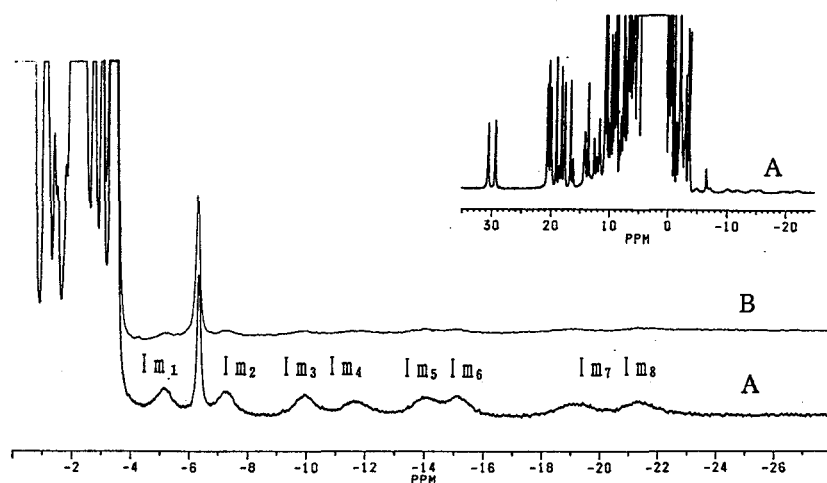


図 2 完全酸化型チトクロム c の通常の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (A) とヒスチジンのイミダゾール C 2 位を選択的に重水素化したもののスペクトル (B)。

と1次元NOEを組み合わせて検討した。このタンパク質はヘム密度が非常に高いので、分子内でのヘム間NOEが多数観測される。ヘム1（2番目に還元されるヘム）とヘム2（4番目に還元されるヘム）は部分的に近づき、ヘム1とヘム3の間でも相対的な構造変化が起こっていることが認められた。ヘム1とヘム3の間には酸化還元にとまなう協同的相互作用があることをわれわれは既に報告している。この二つのヘムの間の構造変化が、このような協同的相互作用とどのように関係するのかは興味深い。

このタンパク質の芳香族アミノ酸の側鎖の多くはヘム近傍に存在する。したがって、ヘムと芳香環の間のNOEも構造変化を知る良いプローブとなる。中でも、ヘム1とTyr43の関係は興味深い。完全還元型では図3に示すように、ヘム1の1-メチル、8-メチル、 δ -メソプロトンとTyr-43の芳香環との間にNOEが観測されるが、完全酸化型ではヘム1の δ -メソプロトンとの間にしかNOEは観測されない。したがって、両者の相対的距離は酸化還元によって変化するものと考えられる。さらに興味深いのは、結晶構造を見ると、完全還元型で観測されたNOEに対応する核間距離は完全酸化型でも全てNOEを与える距離にあることである。したがって、この構造は結晶中と溶液中では若干異なっているものと考えられる。ヘム1はアミノ末端の近傍にあり、NMR的にもさまざまな外部要因に対して最も変化しやすいことが分かっている。本講演でも、pH影響を最も強く受けることを前に指摘している。

したがって、このヘムのまわりはさまざまな状態変化に対して鋭敏な領域であると結論できる。

謝 辞

本研究に当たりましては、横浜国立大学工学部仁木克己教授、大阪大学蛋白質研究所京極好正教授、並びに日本ブルーカー社にたいへんお世話になりました。ここに、深く感謝します。

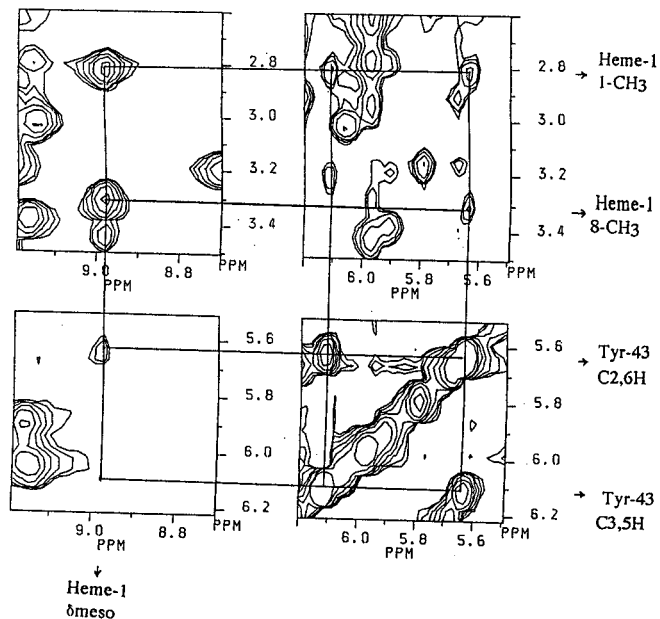


図3 完全還元型チトクロムc, の2次元NOESYスペクトルのヘム1とTyr-43に関する領域。関係するクロスピークは実線で結んである。

L 24 ^{13}C -, ^{15}N -標識FADで再構成した中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼの ^{13}C -, ^{15}N -NMR

(関西医大・*熊本大医) ○三浦湧・二科安三*・佐藤恭介*・藤井茂・黒田記代・志賀潔*

^{13}C - and ^{15}N -NMR of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Reconstituted with ^{13}C - and ^{15}N -Labeled FAD. Laboratory of Chemistry, Kansai Medical University and *Department of Physiology, Kumamoto University Medical School. Restu Miura, *Yasuzo Nishina, *Kyosuke Sato, Shigeru Fujii, Kiyo Kuroda and *Kiyoshi Shiga

Medium-chain acyl CoA dehydrogenase (MCAD) from porcine kidney was reconstituted with FAD which was selectively labeled with ^{13}C and ^{15}N . The positions labeled were 1-, 3-, and 5-N and 2-, 4-, 4a-, and 10a-C of the flavin moiety of FAD. The ^{13}C - and ^{15}N -NMR spectra of MCAD reconstituted with ^{13}C - and ^{15}N -labeled FAD were measured under various conditions. The resonance positions of 4a- and 10a- ^{13}C are the most down-field shifted among the flavoproteins with ^{13}C -NMR data available thus far, indicating low electron density at these positions. The chemical shift value for 4a- ^{13}C of reduced MCAD is the greatest (the lowest field) among the flavoproteins observed to date. This offers the chemical basis for the low reactivity of reduced MCAD toward molecular oxygen. The 5- ^{15}N resonance undergoes specific down-field shift upon complex formation with a substrate analog, acetoacetyl-CoA, implying specific change in the electronic state at N(5) upon substrate (analog) binding.

^{13}C , ^{15}N -標識フラビンで再構成したフラビン酵素の ^{13}C , ^{15}N -NMRは、活性中心の情報を直接的かつ選択的に得ることのできる優れた方法である。演者らは、この方法によっていくつかのフラビン酵素について、その静止状態や酵素-基質複合体、反応中間状態におけるフラビン部分(活性中心)の電子状態の変化、水素結合ネットワークの変動などを知ることができ、反応機構を理解するための貴重な知見を得てきた。フラビン酵素反応の特異性は、個々のフラビン酵素のフラビン部分の反応性がそれぞれの環境の中でコントロールされることによって発現される。演者らはこのコントロールのメカニズムを知ることによって、フラビン酵素反応の統一的な理解をめざしている。このような観点から、FAD酵素であるブタ腎臓中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ(medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCADと略)のFADを ^{13}C , ^{15}N -標識FADにおきかえて再構成し、種々の条件下に ^{13}C , ^{15}N -NMRを測定した。得られた結果をもとに、MCADのフラビン周囲の環境、MCAD-基質複合体、還元型MCADの再酸化過程について考察した。

[実験]

[2- ^{13}C], [4a- ^{13}C], [4,10a- $^{13}\text{C}_2$], [1,3- $^{15}\text{N}_2$], [5- ^{15}N]-リボフラビンを文献記載の方法で化学合成し、*Brevibacterium ammoniagenes* より精製したFAD合成酵素によってそれぞれFADに導いた。図1はフラビン部分の位置番号を示す。文献記載の方法で調製したアポMCADに ^{13}C , ^{15}N -標識FADを再構成させて、 ^{13}C , ^{15}N -標識MCADを調製した。

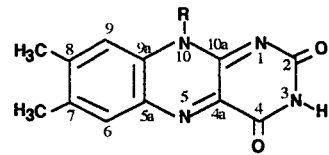


図 1

アシルCoAデヒドロゲナーゼ, C-13 NMR, N-15 NMR, フラビン酵素

みうられつ、にしなやすぞう、さとうきょうすけ、ふじいしげる、くろだきよ、しがきよし

^{13}C -, ^{15}N -NMR測定は、Varian UNITY 400 を用い、それぞれ、100.6 MHz, 40.5 MHzにて行なった。NMR試料はすべて、50 mM リン酸カリウム/ D_2O , pH 7.60 に溶解し、5mmセル中で測定した。化学シフトは、 ^{13}C -NMR では、TSPのメチル- ^{13}C 信号を外部基準(0 ppm)にし、 ^{15}N -NMR では、2 N 硝酸中硝酸[^{15}N]-アンモニウムを外部基準(21.60 ppm)にし、液体アンモニアを0 ppmとして表す。

【結果と考察】

図 2, 3 に、それぞれ[^{13}C]FAD, [^{15}N]FADで再構成したMCADの ^{13}C -NMR, ^{15}N -NMRスペクトルを示す。それぞれの ^{13}C -, ^{15}N -信号は図に示すように明瞭なピークとして観測された。これらのスペクトルは酸化型MCADのスペクトルである。

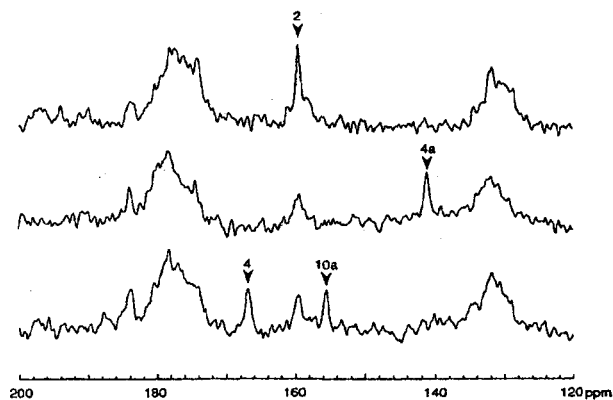


図 2 [^{13}C]FADで再構成したMCADの ^{13}C -NMRスペクトル

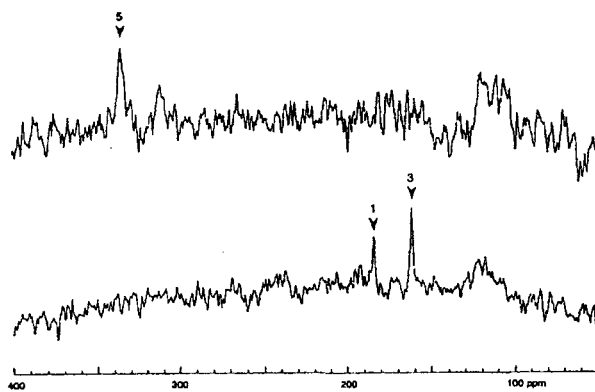


図 3 [^{15}N]FADで再構成したMCADの ^{15}N -NMRスペクトル

次に、還元型MCADの ^{13}C -, ^{15}N -NMRスペクトルを測定した。さらに、MCADと基質アナログのアセトアセチルCoAとの複合体の ^{13}C -, ^{15}N -NMRスペクトルを測定した。アセトアセチルCoAはMCADと結合し、電荷移動複合体を形成することが知られている。これらの結果を表Iにまとめて示す。表Iには比較のために、遊離FMN、中性型還元FMN、アニオン型還元FMNの化学シフト値も含まれている。

表 I

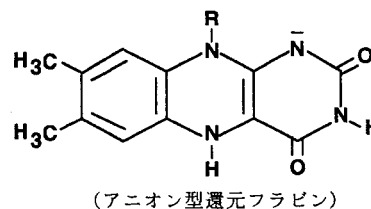
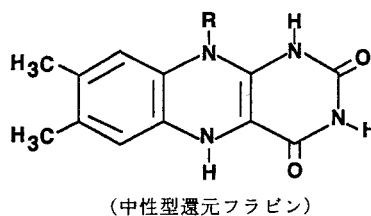
	Positions						
	C(2)	C(4)	C(4a)	C(10a)	N(1)	N(3)	N(5)
MCAD(oxidized)	159.5	166.8	141.1	155.5	183.6	161.1	334.7
MCAD(reduced)	160.3	160.6	106.1	155.7	175.1	151.4	63.9
MCAD-AAC ^{a)}	160.1	167.0	140.3	156.0	184.0	159.4	325.2
FMN	161.4	165.3	137.8	153.7	190.8	160.5	334.7
FMNH ₂ ^{b)}	152.7	158.8	104.7	145.9	128.0	149.7	58.0
FMNH ^{c)}	159.8	159.3	103.0	157.1	182.6	149.3	57.7

a) MCAD-アセトアセチルCoA複合体

b) 中性型還元FMN

c) アニオン型還元FMN

これらの結果から、酸化型MCADでは、C(4)=O, N(5)と蛋白質または水との間に強い水素結合が存在することが推定された。フラビン環をめぐる水素結合のネットワークは、フラビンの反応性をコントロールするもっとも重要な因子の一つであることが分子軌道の計算結果からあきらかにされており、C(4)=O, N(5)における強い水素結合はMCADの反応の特異性に寄与しているものと思われる。また、酸化型MCADに際だった特徴として、4a, 10aの π -電子密度がこれまでに調べられたフラビン蛋白質のなかでもっとも低いことがわかり、MCADのフラビン部分の電子状態の特異性を知ることができた。還元型MCADの化学シフト値と、中性型還元FMN, アニオン型還元FMNのそれらとの比較から、還元型MCADのフラビンはアニオン型還元フラビンであることが結論できた。還元型MCADのC(4a)の化学シフトはこれまでに調べられたフラビン蛋白質のなかでもっとも低磁場にみられ、この位置の電子密度が他のフラビン蛋白質に比べて低いことがわかった。MCADはフラビン酵素の中で脱水素酵素に分類され、還元型酵素が再酸化される際、電子は分子状酸素に伝達されるのではなく、別の蛋白質、electron transferring flavoproteinに伝達される。すなわち、還元型MCADでは、分子状酸素との反応が抑制されている。一般に、還元型フラビンと分子状酸素との反応は、C(4a)の分子状酸素への求核攻撃によって進む。還元型MCADのC(4a)の電子密度が低いという今回得られた結論は、還元型MCADと分子状酸素との反応が抑制されていることの化学的な根拠となっている。



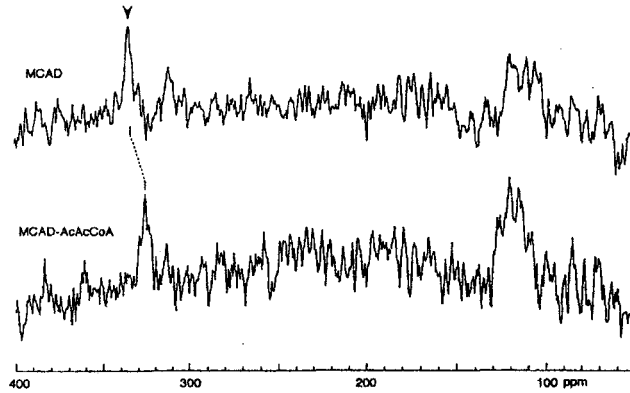


図4 [5-¹⁵N]FAD-MCADの酸化型および、アセトアセチルCoAとの複合体の¹⁵N-NMRスペクトル

MCADと基質アナログのアセトアセチルCoAとの複合体では、N(5)の化学シフトが他に比べてとくに変化が大きかった(表I, 図4)。すなわち、アセトアセチルCoAと結合することによってN(5)の¹⁵N-信号は酸化型MCADのそれに比べて9.5 ppm 高磁場に観測された。アセトアセチルCoAは基質結合部位に結合すると予想されることから、この結果は、基質(アナログ)が結合することによってフラビンのN(5)の電子状態が変化することを示し、このことによってフラビン部分の反応性が基質との反応に適応するのではないかと考えている。

【参考文献】

- (1) R.Miura, H.Tojō, S.Fujii, T.Yamano, Y.Miyake (1984) *J. Biochem.* **96**, 197-206
- (2) R.Miura, T.Yamano, Y.Miyake (1986) *J. Biochem.* **99**, 907-914
- (3) R.Miura, Y.Miyake (1987) *J. Biochem.* **101**, 581-589
- (4) R.Miura, Y.Miyake (1987) *J. Biochem.* **102**, 1345-1354
- (5) Y.Nishina, K.Sato, K.Shiga, S.Fujii, K.Kuroda, R.Miura (1992) *J. Biochem.* **111**, 699-706
- (6) K.Nishimoto, Y.Watanabe, K.Yagi (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **526**, 34-41
- (7) K.Nishimoto, E.Kai, K.Yagi (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 321-325
- (8) K.Nishimoto, H.Fukunaga, K.Yagi (1986) *J. Biochem.* **100**, 1647-1653
- (9) C.T.W.Moonen, J.Vervoort, F.Muller (1984) *Biochemistry* **23**, 4859-4867
- (10) J.Vervoort, F.Muller, S.G.Mayhew, W.A.M.van den Berg, C.T.W.Moonen, A.Bacher (1986) *Biochemistry* **25**, 6789-6799

L 25

安定同位体核利用多次元NMRによるシスタチンAのスペクトル解析

○楯 真一、大山幸二*、高橋誠一郎*、梶 祐之*、大内宗城#、鮫島達也*、
稲垣冬彦
(都臨床研、* 青山学院大・理工、# 日本電子)

Spectral Analysis of human Cystatin A with Stable Isotope Aided Multidimensional NMR Spectroscopy

Shin-ichi Tate, Kohji Ohyama*, Sei-ichiro Takahashi*, Hiroyuki Kaji*, Muneki Ohuchi#,
Tatsuya Samejima*, and Fuyuhiko Inagaki
The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
Honkomagome 3-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113,
*Aoyama Gakuin University, #Jeol Ltd., Akishima, Tokyo
Japan

We have started the spectral analysis of human cystatin A with stable isotope aided NMR techniques. Human cystatin A is a cysteine protease inhibitor consisting of 98 amino acid residues (11kDa). After the spectral analysis of 2D and 3D NMR spectra, we could assign all main chain and some side chain signals. On the basis of the NOESY analysis, we could clarify the secondary structure of cystatin A, which resembled that of cystatin B obtained by X-ray crystallography. In this paper, we will show some details in the spectral measurement and 3D assignment process.

序 システインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンAは、モノマー状態で可逆的にシステインプロテアーゼと結合するタンパク質である。シスタチンAは、アミノ酸98残基(11kDa)よりなる中程度の大きさを持っている。我々は、シスタチンAの立体構造決定とそのバインドとの相互作用部位の同定を目的として、NMRスペクトルの解析を始めた。シスタチンAは、ヒトの皮膚に大量に存在し、天然のシスタチンAは、角質化したヒトの皮膚より精製される。今回の実験では、ヒトシスタチンAの発現系を用いて大腸菌より調製したタンパク質を用いた。大腸菌より得られたシスタチンAは精製の効率化のため、M65はLeuに変えられているが、その生物活性は天然のものとは変わらない。また、2次元NMRスペクトルを比較した結果、アミノ酸置換のある65残基目近傍の数残基のシグナルの位置が変化している他は、NOESYスペクトルのパターンも両者では、ほとんど同じであった。

シスタチンAは、11kDaという分子量を持つため、 ^1H -NMRのみで解析を進めるのは必ずしも容易でない。そこで、我々は ^{15}N 3D-NMRを併用してその主鎖のシグナルの帰属を進め、現在までにシスタチンAの2次構造を明らかにした。本要旨では、主にこのシスタチンAのスペクトル解析を行う上で行った測定上の検討事項、および解析の効率化について触れることとする。

3D-NMR, 安定同位体核, シスタチンA, プロテアーゼインヒビター

たて しんいち、おおやま こうじ、たかはし せいいちろう、かじ ひろゆき、さめじま たつや、
いながき ふゆひこ

Tocsy の Mixing Pulse の検討

Tocsy の測定は、タンパク質の分子量が大きくなるにつれてT2緩和時間が短くなるために、その測定は一般的に困難となってくる。しかしながら、Tocsyにおけるコヒーレンス・トランスファーの効率は、mixingパルスの選択とmixingパルスに用いるRF powerの選択によってかなり改善され得る。一般には、Tocsyのmixingパルスには、MLEVやWALTZといったデカップルパルスがそのまま用いられるが、良く知られているように、良いデカップルパルスが必ずしも良いTocsy mixingパルスとはならない。一方、spin-lockの帯域はRF powerを強くすれば広がるが、サンプルの発熱にもつながるためあまり強いRF powerを入れることはできない、殊に600MHzでの測定の場合にはRF powerがあまり高い場合には、顕著に観測されるシグナルのS/Nが悪くなった。そこでより効率的なTocsyの実験を行うには、より広くかつフラットな帯域をもったmixingパルスを選択する必要がある。このようなmixingパルスの候補としては、WALTZ-16, DIPSI-2, MLEV-16(R = 100x-200y-100x)が知られている。よく用いられるMLEV-17(17th pulse = 60°)は帯域の幅においても、またその分布においても良好とは言えない。このいずれを選択するかについては次の点を考慮する必要がある。

Tocsyの測定の際には、preparationパルスとmixingパルスの照射位相をそろえておく必要があるため、一般的には、preparationパルスとmixingパルスは同じレベルのattenuationをかけておこなわれるが、このことにより、preparationパルスのもつ空間および周波数帯域におけるinhomogeneityが大きくなるため、ベースラインのうねりや、溶媒シグナルの消去が困難となるという問題を持つ。このことは、600MHzでの測定時においては厳しい制約となる。すなわちスペクトル域が広いためpreparationには強いRFを用いる法が望ましいが、mixingには出来るだけ弱いRFが必要となるからである。この両者の要望を同時に満たすには、ハードパルスによるpreparationが可能であるZ軸でのTocsy mixingが最適である。Z軸のTocsyのこのような性質により、積算回数が限られる3Dの測定の際にはpulse imperfectionの影響を少なくできる。我々は、3D Tocsy-HMQCでの適用を考えて、ハードパルスでのpreparationが可能でZ軸上でのmixingの場合に最も帯域の広いDIPSI-2を用いることとした。図1に2D、3DのTocsyの実験に用いたパルスシーケンスを示す。図2には、(a) MLEV-17(17th pulse = 60°)と(b)DIPSI-2を用いたZ軸上でのTocsyの結果を示す。明らかに(b)の結果が優れている。DIPSI-2のmixingパルスは、パルスimperfectionに対する耐性があり、またZ軸上でのmixingを行うことによってpreparationがハードパルスで可能となるため、3Dのように積算回数の少ない測定の場合にはパルスimperfectionの影響を受けにくくなりより良い結果を得ることが可能である。

3D-NMRスペクトルの効率的な解析

3次元NMRは、その高い分解能を与える代償として解析者が扱うスペクトルの数が多くなり、解析する際には煩雑さが増すという実際上の問題も生じる。我々は、今回シスタチンAのスペクトル解析を進める上では、このような解析上の煩雑さを軽減するために簡単な解析支援のプログラムを作成し利用した。このプログラムでは、市販のNMRスペクトル処理プログラムであるNMRZ（日本電子輸入販売）のピークピッカーを用いて作成されたピークテーブルをもとに、ピーク番号、化学シフト、3D面番号のみを抽出した簡単なピークテーブルを作りノートパソコン上でDQF-COSY, TOCSY-HMQC, NOESY-HMQCの3つのピークテーブルを同時に扱い、各

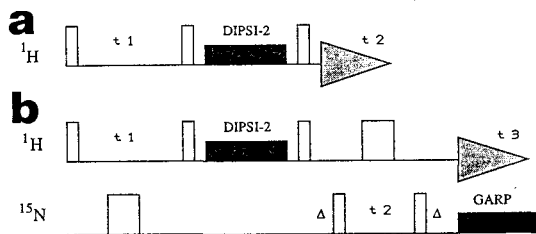


図1 DIPSI-2を用いたZ軸 Tocsy
パルスシーケンス
(a) 2D, (b) 3D
白い部分 RF power = 35kHz
Mixing RF power = 8.3kHz

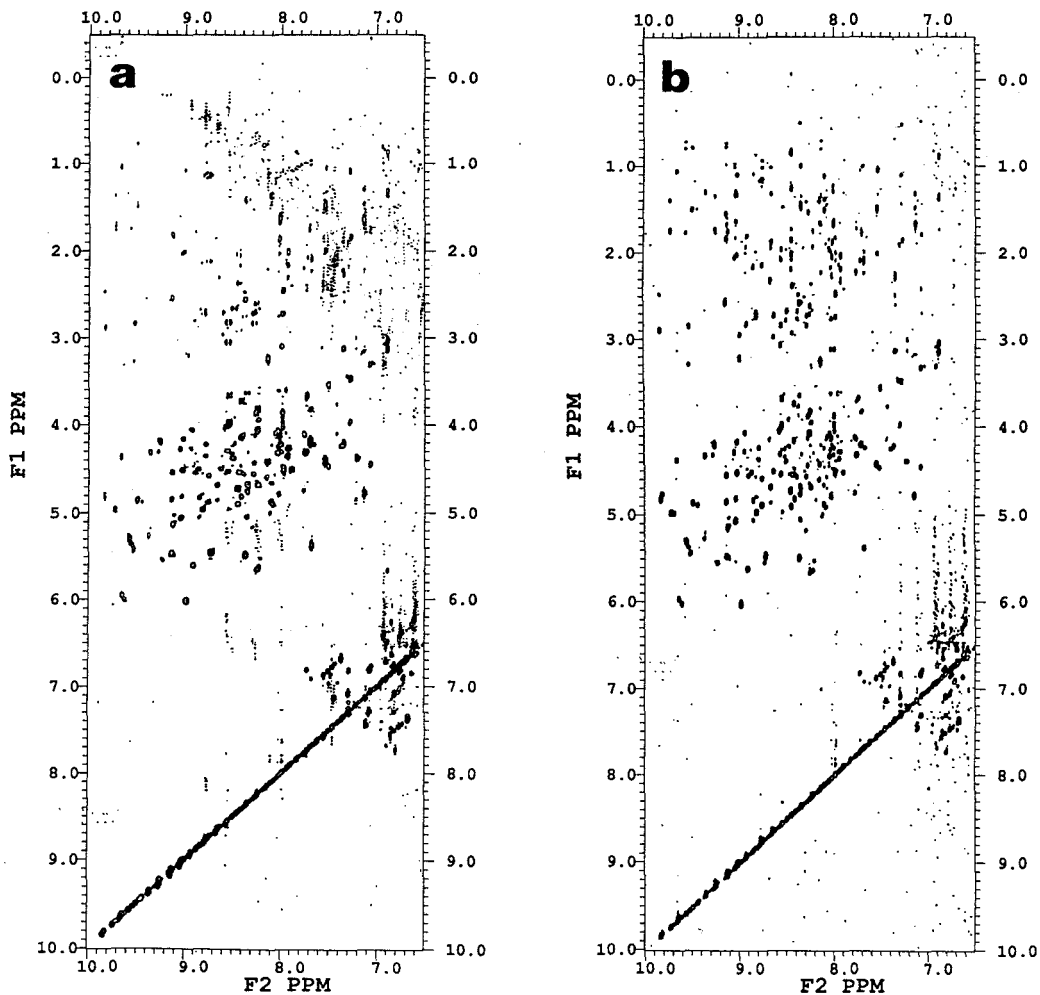


図2 Mixing Pulseの違いによるTocsyスペクトルの比較

(a)MLEV-17(17th pulse width = 60° pulse),(b)Z-axis mixing DIPSI-2,1.5mM cystatin A, H₂O, 37°C; mixing time = 45msec; 測定はJeol α-600で行った。

シグナルにクロスするシグナルを検索するものである。このようなシグナル検索システムを解析台の上のノートパソコン上で併用することで3Dスペクトルの解析を効率的に行えた。図3には、このような解析で行った3DNOESY-HMQCの解析例を示す。

シスタチンAの2次構造決定

¹H-2Dスペクトル、および¹⁵N-3Dスペクトルを用いたスペクトル解析の結果、シスタチンAは5つの鎖よりなる逆平行β-シート構造、α-ヘリックス、およびそれらをつなぐターン構造よりなっていることがわかった。この構造は、シスタチンBの結晶構造と良く似ている。また、23-33、44-47、85-89のシグナルは2つの異なるシグナルを与えており、この部分には2つのコンフォメーションが存在することが示唆された。

現在側鎖の帰属、およびこのコンフォメーション平衡の問題に関して検討を進めている。

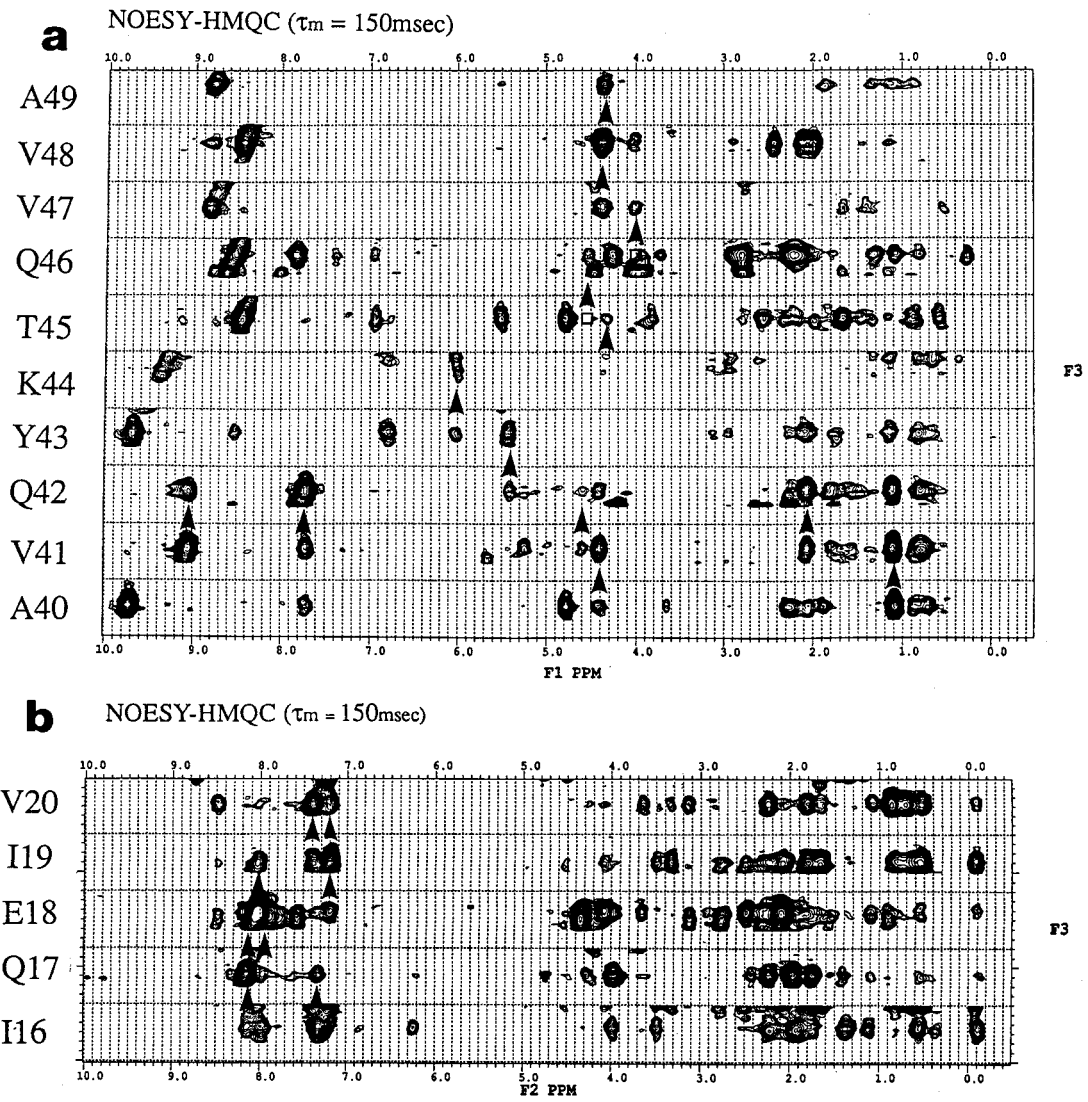


図3 NOESY-HMQCを用いた連鎖帰属; 1.5mM cystatin A, H₂O, 37°C

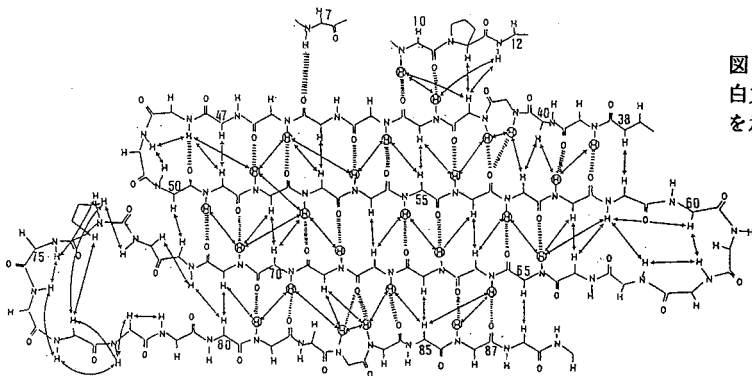


図4 シスタチンAの2次構造
白丸はH-D交換の遅いシグナルを示す。

L 26

2重共鳴、3重共鳴を利用した多次元NMRによる転写調節蛋白質の構造解析

大阪大学・蛋白質研究所 ○白川昌宏、松尾浩、上垣浩一、芹川康治、森田勇人、京極好正

Structural studies of transcription regulatory proteins by means of double- and triple-resonance multi-dimensional NMR

M. Shirakawa, H. Matsuo, K. Uegaki, Y. Serikawa, U. Morita and Y. Kyogoku
(Institute for Protein Research, Osaka University)

Triple-resonance multi-dimensional NMR approach was applied to four transcription regulatory proteins, λ -Cro protein, the DNA binding domain of yeast GAL4, the homeo domain of mouse Oct-3 and the DNA binding domain of mouse IRF2. By means of the application of 10 different types of heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy to the proteins, the most of the main chain resonances were assigned in remarkable efficiency.

【序論】 2次元NMRから、3次元、4次元などの多次元NMRへの展開時間軸の次元の拡張と、 ^{15}N 核と ^{13}C 核を介した1-bond結合(^1J)、ジェミナル結合(^2J)を利用するいわゆる3重共鳴法の導入により、NMRで構造解析できる蛋白質の分子量の上限は飛躍的に拡大された。加えて、 ^{15}N 核や ^{13}C 核などの安定同位体を利用する事により、蛋白質-核酸複合体といった生体高分子間の複合体の解析が可能になってきた。

今回我々は、異なる構造モチーフを持つ4種のDNA結合蛋白質である、 λ ファージCro蛋白質と、出芽酵母GAL4蛋白質、マウスIRF2蛋白質のDNA結合ドメイン、及びマウスOct-3のPOU-homeoドメイン中のhomeoサブドメインに、それらの手法を適用しほとんどの帰属を終了したので報告する。

Cro蛋白質とGAL4のDNA結合ドメインについては、立体構造をdistance

【キーワード】 3重共鳴 3次元NMR DNA結合蛋白質

しらかわ まさひろ、まつお ひろし、うえがき こういち、せりかわ やすはる、もりた はやと、きょうごく よしまさ

geometry法により決定した。その際用いた、 ^{13}C 核ダブルハーフフィルターによる2量体中のサブユニット間NOEの選択的検出についても併せて報告する。

【実験】 λ ファージCro蛋白質と、62残基および110残基から成る出芽酵母GAL4蛋白質のDNA結合ドメイン、112残基からなるマウスIRF2蛋白質のDNA結合ドメイン、及び62残基からなるマウスOct-3のhomeoサブドメインは大腸菌tacプロモーターあるいはT7ファージ ϕ 10プロモーターを保持する発現プラスミドに、対応する遺伝子をクローンする事により大腸菌に発現させた。 ^{15}N 標識及び ^{13}C 標識は大腸菌を培養するM9合成培地にそれぞれ $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、または ^{13}C -グルコースを加えることにより行った。結合するDNA断片は化学合成により調整した。

NMR測定には主にBruker AMX-500スペクトルメーターを用いB.B. inverseプローブまたはtriple-resonanceプローブを使用した。測定したスペクトルは以下の通り。

2重共鳴2次元NMR

$^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC、 $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC、 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC、 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQC、 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HMQC-J

2重共鳴3次元NMR

$^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC、 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQC、 $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ NOESY-HSQC、HCCH-TOCSY¹⁾、constant-time HCCH-COSY²⁾

3重共鳴3次元NMR

constant-time HNCAC³⁾、constant-time HN(CO)CA³⁾、constant-time HNCOC³⁾、constant-time HCACO⁴⁾、constant-time HCA(CO)N⁵⁾

3次元 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC、 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQCの軽水中での測定は、スピナーロックのみで水シグナルの消去を行なった。

【結果と考察】

(1) 主鎖の帰属

(i) 3D $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQC、3D $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC、3D triple-resonance HCA(CO)Nの組み合わせによる帰属

まず、 ^{15}N 核の化学シフトで分離したTOCSY、NOESYである3D $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ TOCSY-HSQC、3D $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ NOESY-HSQCにより、主に $d_{\text{HN}(i, i+1)}$ と $d_{\alpha\text{N}(i, i+1)}$ の相関を使って、連鎖帰属法(sequential assignment)により、主鎖アミド・プロトン、 α プロトン、アミド窒素の帰属を得た。この際、水シ

グナルの消去にスピン・ロック・パルスと F I D の低周波成分除去のデジタル・フィルターを使うと、水シグナルの飽和消去法と比較して、溶媒との交換の早いアミド・プロトンの感度良い検出が達成できた。また、水シグナルのごく近傍までの α プロトンも観測する事が出来た。

続いて、3 D triple-resonance H C A (C O) N により主鎖 α プロトン、 α 炭素と、次の残基のアミド窒素の相関を得た。 α プロトン [α H (i)] と次の残基のアミド窒素 [N (i + 1)] の相関により、先に得た連鎖帰属の確認を行うと同時に、独立に主鎖 α 炭素の帰属が可能となった。この H C A (C O) N の代わりに H N C A を用いても同様の情報を得る事ができる。

(i i) 主に 3 D triple-resonance H N C A、H N (C O) C A、H N C O、H C A C O を使う方法

H N C A と H N (C O) C A は α 炭素の化学シフト値として残基間の相関を与える。特に H N C A は残基内のアミド・プロトン、アミド窒素、 α 炭素の化学シフトに加えて、かなりの確率で、1つ前の残基の α 炭素の化学シフトを与える。残基内の α 炭素に対するシグナルの方が一般に強いので、両者の区別が可能で、H N C A のみでもかなりの連続帰属が可能であった。しかし、より確実な帰属のため、残基間のシグナルのみを与える H N (C O) C A も測定した。

同様に、H N C O と H C A C O はカルボニル炭素の化学シフトを残基間の相関として得るのに使った。

この方法は (i) の方法と共に I R F - 2 の D N A 結合ドメインの帰属に使った。残基間の連続帰属に、独立にプロトン間の $d_{\text{NN}(i, i+1)}$ と $d_{\alpha\text{N}(i, i+1)}$ の相関、アミド窒素の化学シフト、 α 炭素の化学シフト、カルボニル炭素の化学シフトを使ったため、より確実な主鎖の帰属が可能になった。特に有効であったのは、H N C A、H N (C O) C A の組み合わせであった。

(2) 側鎖の帰属

側鎖の帰属には、3 D $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ T O C S Y - H S Q C、3 D H C C H - T O C S Y、3 D H C C H - C O S Y を使ったが、とりわけ有効であったのは主鎖 α プロトン、 α 炭素の帰属を基に帰属を伸長する事が出来る、H C C H - T O C S Y と H C C H - C O S Y の組み合わせであった。これにより、リジン残基のような長い側鎖も完全帰属が可能となった。C r o 蛋白質と G A L 4 の D N A 結合ドメインに適用したところほぼ全ての側鎖の ^1H 及び ^{13}C 核の帰属が出来た (図 1) 。

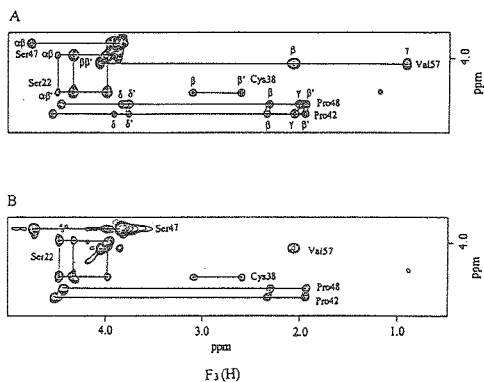


図1 GAL4 DNA結合ドメインのHCCH-TOCSYスペクトル(A)、HCCH-OSCYSスペクトル(B)の($\omega 1, \omega 2$)プレーンの一部

(3) 構造計算

Cro 蛋白質とGAL4 蛋白質について、得られた帰属を基に主として3D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC、3D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ NOESY-HSQCを解析し、プロトン間の距離情報を収集した。それらとHMQC-Jスペクトルから得られた角度情報から、Guntertらの開発したdistance geometryプログラムDIANAにより構造計算を行った(図2)。この際、Cro 蛋白質は2量体なのでサブユニット内とサブユニット間のNOEを区別する必要がある。そのため、Cro 蛋白質を ^{13}C 標識し、標識していない試料と1:1で混合し、同位体的なhetero dimerを形成させ、 ^{13}C ダブル・ハーフフィルター法⁶⁾を適用して分子間NOEの選択的検出を行った。

特にCro 蛋白質の構造計算において、3D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ NOESY-HSQCスペクトルから多くの長距離NOEを得る事が出来、構造決定に威力を発揮した。

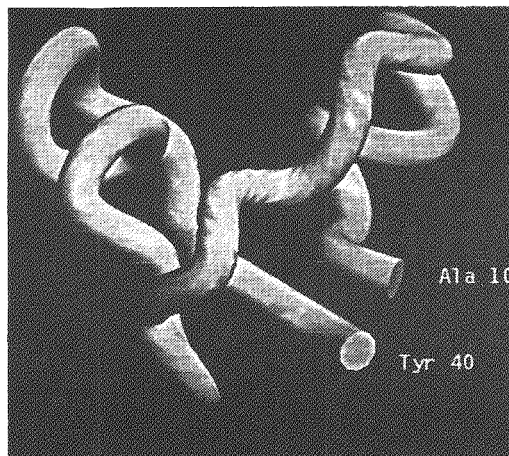
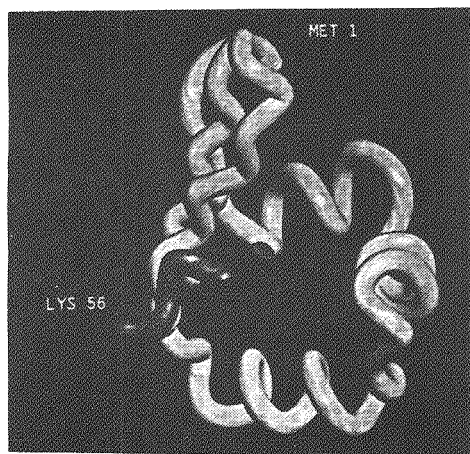


図2 計算したCro 蛋白質の構造の一つ 図3 計算したGAL4の構造の一つ

- 文献 1) A.Bax, M.Clore and A.M.Gronenborn, J.M.R., 88, 425-431 (1990).
 2) Mikura, L.E.Kay and A.Bax, J.bio.NMR, 1, 299-304 (1991).
 3) S.Grzesiek and A.Bax, J.M.R., 96, 432-440 (1992).
 4) R.Powers, A.M.Gronenborn, G.M.Clore and A.Bax, J.M.R., 94, 209-213 (1991).
 5) A.G.Palmer III et al., J.bio.NMR, 2, 103-108 (1992).
 6) G.Otting and K.Wuthrich, J.M.R., 85, 586-594 (1989).

L 27 選択的安定同位体標識—多次元NMR法によるタンパク質NMRシグナルの帰属

(都立大・理) ○甲斐荘正恒、三宅洋子、安倍未央、鎌田創、滝沢山紀子
(日本ブルカー) Markus Waelchli

Assignment of Larger Proteins by Means of the Combined Use of Multi-dimensional NMR and Selective Isotope Labeling Methods

Masatsune Kainosho, Yoko Miyake, Mio Abe, Hajime Kamada, Yukiko Takizawa and Markus Waelchli *

(Tokyo Metropolitan University and Bruker Japan *)

Recently developing multinuclear multidimensional NMR methods have been successfully applied for a protein proteinase inhibitor SSI which has been selectively labeled with various types of labeled amino acids. For example, a series of pairwise ^{13}C -double labeled amino acids were incorporated into SSI in order to extend the carbonyl carbon assignments to those of the side-chain moieties. The 2D/3D spectra obtained for selectively labeled SSI's can be compared favorably with the 3D/4D spectra using non-selectively $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled proteins, as far as spectral simplicity concerns.

過去数年間、タンパク質NMRの方法論は重大な転機を迎えたように思われている。タンパク質工学により均一に ^{15}N , ^{13}C 標識した試料が容易に入手できるようになり、これらの均一標識体の利用を前提とした様々な多核種多次元NMR法が発展した結果、20 kDa程度の分子量であればその全NMRシグナル(^1H , ^{13}C , ^{15}N)の帰属を数カ月で完了することも可能である。このような進歩の結果、少なくとも帰属手法に関しては概ね完成の域に近づいたとの考えが広まっただけでなく、タンパク質のNMRによる構造研究自体がルーティンとなりつつあるような印象すらうかがえる。当然のことだがタンパク質の機能は無限の多様性により特徴付けられており、タンパク質の機能に注目する限りNMR研究の手法もまた多様にならざるを得ない。タンパク質NMR分野にお

安定同位体標識法, 多次元NMR, プロテアーゼ・インヒター, SSI

かいのしょう まさつね、みやけ ようこ、あべ みお、かまだ はじめ、たきざわ ゆきこ、マーカス ベルヒリ

ける今後の一つの重要な発展方向は、多彩な研究手段を生み出す安定同位体標識技術の高度化、および多次元NMRとの併用による構造情報の選択性と精度の向上に向けられるべきであろう。このようなNMR解析技術の高度化と複合化は、より高分子量のタンパク質の構造化学的研究にとって特に有効な手法を提供するであろう。

直接に結合した特定の炭素-炭素結合を"pairwise"に標識したアミノ酸類は高分子タンパク質の主鎖カルボニル炭素シグナルの帰属を側鎖へと拡張するための、様々な手法を提供すると思われる。我々は既に高分子量タンパク質のAla・Valなどのメチル基シグナルの帰属に一連の"pairwise"標識体を利用する手法を提案しているが、これらの手法の有効性・一般性はそのようなアミノ酸の化学的合成の難易度により大きく影響される。高分子量タンパク質の主鎖カルボニル炭素NMRシグナルの帰属は、線幅の広がりや重複ジペプチド配列の存在等により、ダブルラベルを基本とする手法が確実な帰属をもたらさない場合が多く、著しく困難になる。このような場合は、アミノ酸変異体とのスペクトル比較による帰属が重要な補助手段となる。現在においては遺伝子操作によるアミノ酸変異は容易となっており、本法の確実性を高めることは有益である。[1- ^{13}C]アミノ酸を用いて野生型、変異体タンパク質を標識し、それらのスペクトルの比較から置換前後のシグナルが対応づけられる場合は問題ないが、カルボニル炭素シグナルのシフトは鋭敏に変化しすぎる場合が多い。一方、[1,2- $^{13}\text{C}_2$]アミノ酸類を取り込ませ2D-INADEQUATEスペクトルを比較すれば、相関ピークは二次元平面上に分散するためにはるかに正確に置換前後の相関を見出すことができる。

[1,2- $^{13}\text{C}_2$]アミノ酸で標識したタンパク質は3D-NMR実験にも有用である。例えば、3D-HCACOスペクトルなどは通常の均一標識体の場合と比較すれば著しく単純であり、SSIのようにカルボニル炭素シグナルの帰属が確立してさえいれば、 α 炭素・水素シグナルの帰属は全く自動的に決定する。均一に ^{13}C -、或いは($^{13}\text{C}+^{15}\text{N}$)-標識したアミノ酸類を種類別に取り込ませたSSIを利用した多次元NMRスペクトルも、主鎖・側鎖原子団のNMRシグナルの帰属に有用である。3D-HCCH TOCSY, 3D-HNCAなどの利用により、高分子量タンパク質における望みの部位の残基に関してのみ選択的な帰属を行うことも可能である。一方、主鎖カルボニル炭素シグナルを起点にし、多次元NMR法を利用することにより当該残基の残りの全NMRシグナルの帰属を確定できる。しかも、これらの標識タンパク質の標識部位は1D/2D NMRなどにおいても十分なシグナルの単純さと感度を示すことから、高い分解能・感度での構造研究が可能となる。

SSIについては均一に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した試料に関する3D/4D NMRの測定と解析もProf. Markley (Univ. Wisconsin)との共同研究により進行中であるが、データの解析が間に合えば、これら二つのアプローチを比較して述べたい。

L 28 免疫グロブリンのNMR構造解析

(東大・薬, NKK中研⁺) 嶋田 一夫, 加藤 晃一, 高橋 栄夫,
合田 浩明, 金 載一, 金 夏亨, 中山智紀, 松永 千枝, 尾高 麻乃,
鈴木 恵理佳⁺, 進藤 一泰, 田村 洋, 吉野 温子, ○荒田 洋治

NMR structural analyses of immunoglobulins

Ichio Shimada, Koichi Kato, Hideo Takahashi, Hiroaki Gouda, Jae Il Kim, HaHyung Kim, Tomonori Nakayama, Chigusa Matsunaga, Asano Odaka, Erika Suzuki,⁺ Kazuyasu Shindo, Hiroshi Tamura, Atsuko Yoshino, and Yoji Arata
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo and Advanced
Technology Research Center, NKK Corp.⁺

Abstract: Immunoglobulin G (IgG), which is a multidomain glycoprotein with a molecular weight of 150,000, plays a crucial role in immune response. We have been developing a multinuclear NMR strategy for the molecular structural analyses of the intact IgG and a variety of proteolytic fragments thereof. In the present talk, we will discuss the static and dynamic structure of the antibody combining site on the basis of the NMR data obtained. The dynamical structure of the hinge region of the intact IgG will also be discussed.

水溶液中における低分子量タンパク質の高次構造解析の手段として, NMRはその地位を確立した. しかし, 分子量の増大とともに, 線幅の広がり, シグナルの重なりのために, 解析は急速に困難となる. われわれは, 分子量の壁を越えて, 他法では得ることが不可能な情報をNMRにより抽出し, タンパク質の構造に関する種々の

NMR/免疫グロブリン/抗原抗体反応

しまだ いちお, かとう こういち, たかはし ひでお, ごうだ ひろあき, きむ
じえいいる, きむ はひょん, なかやま ともりの, まつなが ちぐさ, おだか
あさの, すずき えりか, しんどう かずやす, たむら ひろし, よしの あつこ,
あらた ようじ

知見を得るための試金石として免疫グロブリンを設定し、方法論の開発を続けている。

代表的な抗体分子である免疫グロブリンG (I g G) は、1300個のアミノ酸残基からなる巨大タンパク質(分子量150,000)である。I g Gは、約110残基からなる相同な12個のドメインより構成されている。われわれは、intactなI g Gを対象とする解析法の確立を目指すとともに、I g G分子中における機能単位フラグメントを酵素消化によって切りだし、より詳細な構造解析を行いつつある。

【I】緩和の経路を絶つ：intactなI g Gの構造解析

分子の巨大化にともなう相関時間の増大を克服してスペクトル情報を得るには、磁気的相互作用を可能なかぎり小さくする以外に方法がない。分子量150,000のintactなI g Gを対象とする時、可能な唯一の方法は、甲斐荘正恒博士によって確立されたカルボニル炭素の選択的 ^{13}C ラベル法であろう。抗体のカルボニル基の ^{13}C の線幅は、化学シフトの異方性によって支配される。従って、最適の実験条件は測定磁場の強度とS/N比のかねあいによって決まる。S/N比とのバランスを考慮し、I g Gの場合には100MHzの測定周波数が適当であると結論した。

抗体のカルボニル炭素の線幅はまた、相関時間によって大きく変化する。この事実をもとに、抗体分子におけるinternal flexibilityのマッピングを行うことができる。一例として、I g Gヒンジ領域の動的構造について述べる。

【II】I g Gのドメイン構造にもとづくフラグメント化による情報の抽出

ドメイン4個から成るFab(分子量50,000)は、最も広く用いられている抗原結合フラグメントである。われわれは、C_H1ドメインを欠損した抗dansylマウスモノクローナル抗体IgG2a(s)の酵素消化によって、Fabのほか、V_H,V_L,C_Lの3ドメインからなるFab*(分子量37,000)、V_H,V_LだけからなるFv(分子量25,000)を大量に調製する道を開いた。ここで得られるFvは、抗原結合活性を有する最小のフラグメントである。われわれは、抗原結合部位がどのように構築されているかを明らかにするために、安定同位体ラベル多核種NMR法により解析を進めている。本講演においては、主としてFvによる抗原認識の静的・動的背景について議論する。さらに、分子量50,000のFabへの安定同位体多核種NMRの適用の可能性についても触れる予定である。

【文献】 Odaka et al. Biochemistry (in press); Takahashi et al. Biochemistry 31, 2464 (1992); Matsunaga et al. J. Biomol. NMR 1, 379 (1991); Takahashi et al. Biochemistry 30, 6611 (1991); Kato et al. Biochemistry 30, 6604 (1991); Takahashi et al. Biochemistry 31, 2840 (1991); Kato et al. Biochemistry 30, 270 (1991).

○ 武藤 裕¹, 山崎和彦¹, 伊藤 隆¹, M. Wälchli², 西村 暹³,
宮澤辰雄⁴, 横山茂之¹ (¹東大・理, ²日本ブルカー, ³萬有製薬
つくば研, ⁴蛋白工学研)

An NMR study on the c-Ha-Ras protein by stable isotope-labeling technique

Yutaka Muto¹, Kazuhiko Yamasaki¹, Yutaka Ito¹, Markus Wälchli², Susumu Nishimura³, Tatsuo Miyazawa⁴, and Shigeyuki Yokoyama¹

¹Faculty of Science, University of Tokyo, ²Bruker Japan, ³Banyu Tsukuba Research Institute, and ⁴Protein Engineering Research Institute

In order to elucidate the structural change between the GDP-bound and GTP-bound forms of the Ras protein, isotope-aided 2D and 3D NMR experiments were performed for uniformly ¹⁵N - ¹³C labeled sample. First, most of the backbone resonances (N, NH, C α , CO) were assigned for the GDP-bound form by HNC0, HNCA and HCACO experiments. Next, HCCH-TOCSY and CT-HCCH-COSY experiments were performed for observation of side chain resonances of the Ras protein. For the GTP-bound form, the resonances due to G10-G13, I21, Y32-S39, and D57-Y64 were not identified clearly due to line broadening. Strength of the magnetic field strongly influenced the line shape of the resonances of residues near these regions of the GTP-bound form in ¹H-¹⁵N HSQC spectrum, otherwise such an effect was not observed for the GDP-bound form. These results suggested that chemical exchange between multiple conformations occurred in the GTP-bound form.

発癌ウイルスから発見された ras 遺伝子産物 (Ras) 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 の重要性が指摘されている. 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, 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. 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相互作用を行うことができない. 活性型である GTP 結合型 Ras は, その GTPase 活性により GDP 結合型に変換するため細胞内で常に GTP 結合型が蓄積していることはない. このように Ras は結合したグアニンヌクレオチドによってその機能の制御を受けている. 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 の高次構造変化を解析することは, Ras 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 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. われわれは, 現在までにアミノ酸選択的な ¹⁵N 標識を用いたアイソトープフィルターの実験およびユニフォームに ¹⁵N

安定同位体標識 二次元, 三次元 NMR 分光法

むとうゆたか やまさきかずひこ いとうゆたか まるくすべりへり にしむらすむ みやざわたつお よこやましげゆき

標識を行なったRasの三次元NMRスペクトルの解析から、主鎖アミドプロトンおよびCH α プロトンの帰属を完了している。今回さらに ^{15}N 、 ^{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、GTP結合型Rasについて解析を行なった。

【材料および方法】

試料の調製 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を大量調製した。ユニフォーム ^{15}N 、 ^{13}C 二重標識を行う場合、唯一の窒素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を、炭素源として ^{13}C 標識グルコースを用いた。 ^{13}C 標識を行なう場合には炭素源として ^{13}C 標識グルコースを用いた。非常に微量のプロテアーゼの混入を除くため、FPLCシステムのmonoQカラムによる精製の段階を付け加えた。これにより試料の長時間の測定が可能になった。

精製したRas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。また、GTP結合型Rasとして結合したGDPをGTPの非水解アナログであるGMPPNPに交換したものを用いた。

測定 二重標識を行なった試料を用いてHNC O 、HNC A スペクトルの測定を行なった。これらの測定には、ブルカー社製AMX-600分光計を用いた。また、 ^{13}C 標識を行なった試料を用いてCT-HCAC O 、CT-HCCH-COSY、およびHCCH-TOCSYスペクトルの測定を行なった。これらの測定には、ブルカー社製AMX-600あるいはAM-400分光計を使用した。

【結果および考察】

1) 主鎖部分のシグナルの帰属 ^{15}N 安定同位体標識をもとにした実験結果から得られている主鎖アミド基のプロトンおよび ^{15}N 核のシグナル帰属をもとに、HNC O (図1)、HNC A 、およびHCAC O スペクトルの解析を行ない、GDP結合型Rasについて、ほとんどの主鎖部分のシグナルについて帰属を進めることができた(表1)。HNC A スペクトルではひとつのアミドプロトンと ^{15}N 核のシグナルの組に対して2つのクロスピークが現れる。これは、残基内の α 位の ^{13}C 核の他に一残基先のアミノ酸に由来する α 位の ^{13}C 核との間にもクロスピークが現れるためであるが、これにより ^{15}N 安定同位体標識を用いて行なった帰属を確認することもできた(図2)。GTP結合型では、アミドプロトンのシグナルの広幅化が起こっている領域(G10-G13, I21, Y32-S39, D57-Y64)についてこの三重共鳴の実験からはカルボニルおよび α 位の ^{13}C 核のシグナルの帰属を行なうことはできなかった。

2) 側鎖部分のシグナルの帰属 GDP結合型Rasについて、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すため、CT-HCCH-COSY、HCCH-TOCSYの測定を行なった。この測定から、 ^1H - ^1H のTOCSYの実験では明

図 1

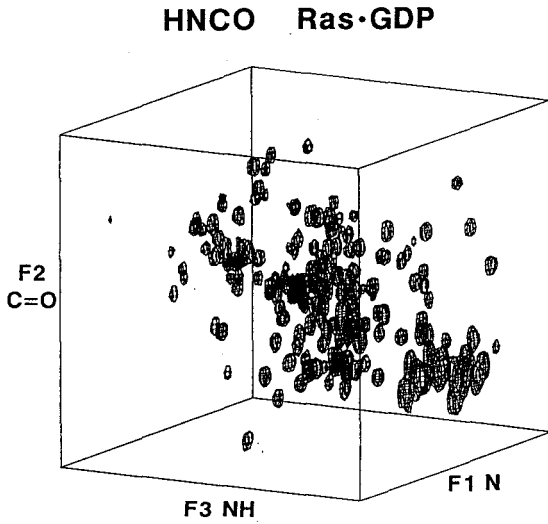


図 2

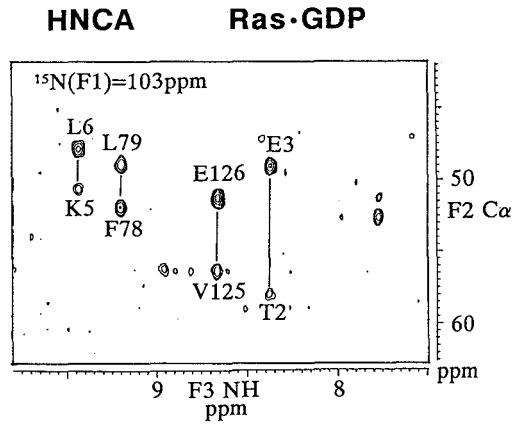
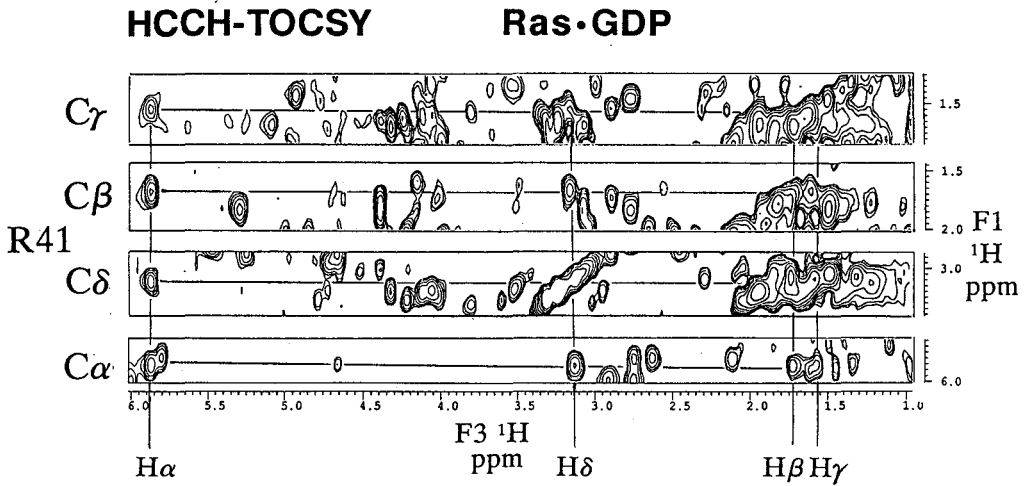


表 1 GDP 結合型 Ras の主鎖シグナルの帰属 (ppm で表示)

	N	NH	Ca	Ha	CO		N	NH	Ca	Ha	CO		N	NH	Ca	Ha	CO		N	NH	Ca	Ha	CO
M1			48.8	4.21	165.75	I46	102.5	8.31	54.3	3.99	170.20	E91	97.9	8.48	53.1	3.81	173.36	S136	94.0	7.96	55.5	4.28	169.83
E3	100.2	8.80	57.1	4.18	165.56	D47	106.3	9.42	49.2	4.28	169.91	D92	93.5	8.45	50.0	4.55	171.59	Y137	96.2	7.62	48.8	4.92	169.98
F3	103.9	8.39	48.0	5.32	168.69	G48	79.6	8.19	39.2	3.17	166.85	R93	97.2	7.65	56.5	3.99	171.48	G138	87.5	8.31	40.3	2.22	168.89
Y4	99.4	8.78	50.6	5.13	168.27	E49	99.4	7.72	48.6	4.63	169.36	H94	92.5	7.97	53.3	4.33	170.68	I139	89.6	8.06	52.4	5.24	166.8
K5	100.5	9.04	49.5	5.28	168.99	T50	102.1	8.89	57.9	4.61	167.31	Q95	94.2	7.38	52.3	3.98	172.57	P140			56.5	4.67	168.40
L6	102.9	9.45	46.7	5.09	169.30	C51	101.5	9.39	50.4	5.20	165.21	R96	95.3	7.52	56.7	4.11	171.51	Y141	96.3	8.18	49.0	5.99	168.25
V7	97.3	7.95	55.1	4.76	167.92	L52	99.1	8.76	47.4	4.92	168.79	R97	94.6	8.31	54.0	3.85	171.42	I142	106.4	8.47	53.5	3.97	168.76
V8	105.4	8.94	56.1	4.72	169.19	L53	100.6	9.05	47.6	4.94	168.13	E98	93.6	7.75	53.0	3.86	172.58	E143	101.1	7.74	49.8	4.84	169.91
V9	97.2	9.14	53.2	4.81	166.56	D54	101.1	8.73	46.7	5.23	168.53	Q99	96.0	7.69	53.0	3.98	171.69	T144	88.6	8.74	53.6	5.06	169.96
G10	84.3	7.15	37.6	3.89	168.41	I55	100.6	9.20	54.2	4.77	168.50	I100	96.1	7.85	59.4	3.21	170.92	S145	89.1	8.77	51.3	4.92	169.54
A11	100.1	9.13	46.4	4.49	171.16	L56	104.7	8.76	47.9	4.64	167.54	K101	94.2	7.78	53.8	3.97	173.07	A146	109.0	9.15	48.5	3.91	169.62
G12	82.6	8.56	40.9	3.88	169.64	D57	105.2	8.53	47.7	4.79	169.44	R102	94.0	7.77	52.9	4.11	173.02	K147	92.6	7.08	52.3	2.60	170.76
G13	91.3	10.55	40.1	4.12	168.20	T58	87.1	6.90	55.6	4.51	167.43	V103	94.0	8.03	59.0	3.92	171.44	T148	82.6	7.69	55.5	4.18	169.61
V14	89.8	7.70	56.7	4.12	168.20	A59	98.2	8.97	45.6	4.81	171.86	K104	92.9	8.05	48.9	4.26	169.88	R149	94.3	7.80	53.6	3.49	169.34
G15	86.4	8.62	40.0	3.88	167.61	G60	94.2	8.25	39.9	4.14	168.58	D105	96.9	8.05	48.6	4.37	168.38	Q150	100.5	7.81	51.4	4.11	170.78
K16	101.7	10.59	55.1	3.56	173.46	Q61	95.7	8.47	50.2	4.42	170.14	S106	85.4	7.47	51.1	4.56	166.74	G151	91.4	8.85	40.8	2.88	167.39
S17	96.8	9.34	55.2	4.23	169.53	E62	97.1	8.71	51.6	4.24	170.50	D107	98.3	8.29	48.1	4.68	169.74	V152	96.9	7.10	62.2	3.25	170.86
A18	102.0	9.57	48.4	3.88	175.78	E63	96.5	8.31	50.8	4.27	169.73	D108	98.0	8.44	46.9	4.88	168.17	E153	95.1	8.28	54.3	3.31	170.06
L19	97.0	9.05	52.8	3.87	171.44	Y64	96.4	8.15	52.1	4.53	169.47	V109	98.2	7.52	52.9	4.29	167.91	D154	92.8	8.04	51.3	4.21	173.11
T20	93.1	7.68	62.3	3.42	169.65	S65	95.4	7.83	51.6	4.41	168.38	P110			57.6	4.40	169.48	A155	100.4	8.55	50.1	3.79	171.50
T21	97.1	8.90	58.6	3.17	172.77	A66	104.6	8.66	48.6	4.21	173.60	M111	99.4	8.13	48.9	5.79	167.93	F156	88.9	7.26	56.8	3.94	171.86
Q22	97.3	7.96	52.9	4.31	172.96	M67	93.6	8.11	51.4	4.28	171.13	V112	95.1	8.08	55.1	4.37	166.95	Y157	95.6	9.59	52.3	4.40	172.94
L23	96.8	7.67	52.0	3.78	171.96	R68	96.9	8.02	52.8	3.80	171.57	L113	105.4	8.86	47.9	5.18	167.21	T158	93.6	8.48	61.6	3.95	169.54
L24	90.4	8.09	56.3	3.69	171.24	D69	95.1	7.89	51.5	4.33	171.78	V114	104.6	9.17	54.1	5.12	167.48	L159	98.0	7.20	51.9	3.92	169.94
Q25	92.2	8.94	49.1	4.58	170.21	Y70	94.3	7.87	53.1	4.11	172.96	G115	90.9	8.02	39.2	2.88	165.40	V160	95.3	7.66	61.6	3.11	171.08
N26	93.0	7.97	48.5	4.79	168.03	Q71	95.8	8.19	54.4	4.29	172.33	R116	97.5	8.74	45.5	5.62	168.48	R161	95.4	8.14	55.0	3.81	173.17
I27	86.6	6.74	48.2	4.88	166.18	M72	95.1	8.42	52.5	4.49	170.86	K117	88.6	7.36	51.3	4.33	171.06	E162	95.6	8.28	53.0	4.28	172.87
F28	99.3	8.67	49.3	5.08	168.47	R73	92.6	7.96	53.6	4.01	172.55	C118	90.7	8.75	54.6	4.33	167.08	I163	99.4	8.44	60.3	3.64	172.15
V29	101.9	7.55	54.0	4.04	167.13	T74	84.8	7.61	56.5	4.36	169.38	D119	93.7	8.64	48.0	4.48	169.30	R164	96.2	8.73	54.1	4.06	172.99
D30	98.7	7.78	48.4	4.02	170.0	E75	85.3	7.91	40.1	3.84	166.46	L120	97.1	7.79	48.7	4.26	170.19	Q165	92.6	8.10	52.4	4.13	172.13
E31	95.3	7.65	49.5	4.92	168.13	G76	97.9	8.81	50.6	4.51	170.22	A121	99.3	8.10	47.0	4.24	172.34	H166	94.6	8.15	52.9	4.36	170.50
Y32	101.7	8.71	52.5	4.34	168.87	F77	77.6	7.19	39.5	3.87	164.44	A122	98.2	7.57	45.2	4.54	168.98	K167	95.3	7.65	49.8	4.19	
D33	104.8	7.81	46.4	4.62	170.0	G78	97.4	8.18	50.8	5.45	167.51	R123	96.3	7.93	49.5	4.15	169.88	L168	85.3	7.65	49.8	4.30	
P34		58.0	4.43	172.26	L79	103.0	9.19	48.0	4.72	168.55	T124	90.3	9.05	55.6	4.58	167.88	R169	95.3	7.65	50.8	4.31	169.78	
T35	86.7	8.93	56.1	4.40	168.42	C80	100.8	8.70	51.7	4.77	166.46	V125	100.6	7.61	55.5	4.02	169.48	K170	98.1	7.94	50.1	4.39	169.10
L36	97.5	6.92	56.1	4.04	168.72	V81	102.6	8.96	55.3	5.02	168.75	E126	103.6	8.67	50.2	4.30	171.78	L171	105.4	7.73	50.6	4.23	176.3
E37	106.9	8.31	48.4	4.98	168.08	F82	100.3	9.22	49.3	5.01	164.90	S127	98.0	9.31	56.8	4.06	170.44						
D38	100.2	8.19	46.5	4.79	167.16	A83	97.7	8.06	43.6	5.09	173.08	R128	94.3	8.58	52.8	4.05	171.56						
S39	90.8	8.29	49.8	5.59	167.18	I84	90.1	8.44	57.3	4.08	167.99	Q129	93.3	6.33	52.3	4.12	172.69						
Y40	98.3	9.04	50.9	5.84	168.21	N85	93.4	7.89	46.0	5.08	168.36	A130	99.7	7.01	48.7	3.95	171.99						
R41	96.9	8.39	48.2	5.87	169.98	N86	95.4	7.92	46.1	5.09	168.89	Q131	94.3	8.54	52.8	3.75	172.98						
K42	98.6	8.62	49.5	4.52	167.52	T87	100.5	9.21	60.8	3.80	169.89	D132	96.3	8.14	51.3	4.41	172.64						
Q43	105.3	8.80	49.4	4.35	169.01	K88	100.5	8.39	53.4	4.20	171.89	L133	99.6	7.46	51.6	3.90	172.66						
V44	97.9	9.05	53.5	4.76	166.94	S89	90.8	8.07	55.8	4.23	169.59	A134	98.4	8.37	49.8	3.82	173.72						
V45	98.6	8.04	55.6	4.68	169.55	F90	101.0	7.41	53.7	4.07	171.06	R135	94.6	8.50	53.3	4.20	173.85						

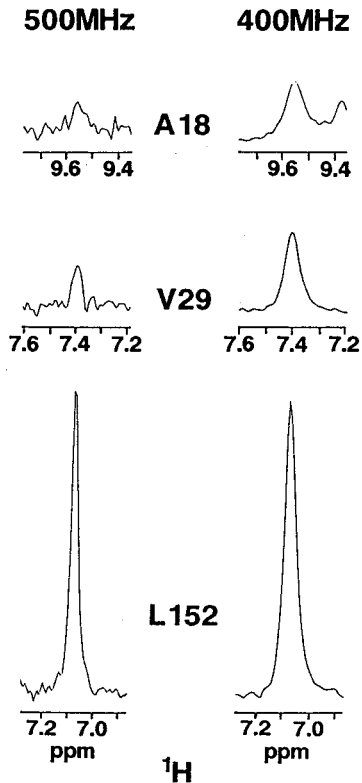
図 3



確に化学シフトがわからなかったものについても帰属を進めることができています (図 3)。

3) $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルにおける GDP 結合型 Ras と GTP 結合型 Ras の比較 GTP 結合型におけるシグナルの広幅化について考察するため、異なる磁場の強さ (400MHz および 500MHz) における $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルでのシグナル強度を比較した (図 4)。磁場強度が強い 500MHz の場合、GTP 結合型 Ras において、シグナルの広幅化がおこる領域の近傍にある A18, V29 のシグナル強度は、400MHz での測定の場合に比べると非常に小さくなっている。GTP 結合型で見られるシグナルのこのような磁場依存性は、GTP 結合型 Ras では、局所的に複数の構造の平衡状態にあることを示唆している。この平衡は、Ras の活性の制御という点でも興味深い。現在、活性との関連について考察するため、いくつかの変異体を作成し、解析を進めている。

図 4 $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルにおける磁場に依存したシグナル強度の変化



【文献】(1) K. Yamasaki, Y. Muto, Y. Ito, M. Walchli, T. Miyazawa, S. Nishimura & S. Yokoyama: *Journal of Biomolecular NMR* (1991) 2 71-82.

特別講演 II

ヘム蛋白質の分子工学とNMR—ヘム蛋白質における配位構造、電子構造ならびに蛋白質構造と機能発現機構

(京大・工) 森島 績

Molecular Engineering of Hemoproteins and NMR--Iron Coordination, Electronic and Protein Structures and Functional Regulation Mechanisms

Division of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 606-01

Isao Morishima

The talk will present how we have used NMR in the last few years to complement our studies on the structure-function relations of hemoproteins by protein engineering, chemical modification and model studies. The heme iron-bound histidine in myoglobin was altered by site-directed mutagenesis to cysteine or tyrosine to mimic cytochrome-P-450 or catalase. The coordination of altered amino acid to the heme iron was confirmed by paramagnetic NMR. Site-specific mutants of myoglobin were studied, in which Leu 29 is replaced by Ala or Ile. The very unique heme environmental structures and ligand binding properties were delineated by NMR and laser flash photolysis measurements. We have discovered a novel modification of the distal histidyl imidazole in myoglobin to N-tetrazole-substituted imidazole by using ^{15}N NMR and studied its effects on the heme environmental structures and ligand binding properties. Mutational studies of hemoglobin were also studied with much emphasis on the role of amino acids located at intersubunit interface in the allosteric effects. Some chimera hemoglobin was synthesized by mutagenesis to study intersubunit interaction. Paramagnetic NMR was also used to study electronic structures of heme π radicals which are reaction intermediates of heme enzymes and are ESR silent.

1 はじめに

ある機能・特性をもつ蛋白質をいかに構築（分子設計）し創製するかを探求することが蛋白質工学といえるが、そのためには蛋白質の構造と機能の相関関係を解明することが必須となる。蛋白質の構造—機能相関の解析的研究が従来の生化学的、生物物理化学的方法に加えて機器測定技術の発展、遺伝子工学手法の導入、さらには蛋白質分子の分子動力学的計算法の発展などによって、新しい展開を見せ、今やこれらを総合し、あらゆる知見を総動員して望む機能・特性を持つ蛋白質をいかに構築するかという総合的研究、すなわち蛋白質分子工学へと発展している。われわれもこのような視点に立って金属酵素の一種である一連のヘム蛋白質の分子工学的研究を行なっている。我々はこれまでにヘム蛋白質、ヘム酵素の機能制御機構などの分子論的メカニズムに関する研究をNMRをはじめ種々の物理化学的手法や蛋白質工学的手法さらにはモデルポルフィリン錯体による研究などを用いて多角的に進めてきた。すなわち、ヘム蛋白質に種々の分子操作を施し（アミノ酸残基の特異的の化学修飾、遺伝子操作によるアミノ酸置換、天然ヘムの人工ヘムへの置換など）、これらの修飾または変異ヘム蛋白質の構造と機能を詳細に検討してきた。¹⁾ 本講演ではこれらの研究の中から最近の成果いくつかを紹介する。

Keyword:蛋白質工学、アミノ酸置換ミオグロビン・ヘモグロビン、特異な化学修飾、構造—機能相関、常磁性NMR、

もりしま いさお

2 蛋白工学によるアミノ酸置換ミオグロビンの構造と機能

(2-1) ヘム鉄軸配位子アミノ酸を置換したヒトミオグロビンの構造、物性と酵素活性²⁾

ミオグロビン (Mb)、チトクロームP-450、カタラーゼはいずれもヘム蛋白質であるが異なった分子分光学的性質、機能を有している。ヘム鉄の軸配位子は、それぞれ、ヒスチジン (His)、システイン (Cys)、チロシン (Tyr) で酸素結合、酸素活性化、過酸化水素分解の機能をもつ。これらヘム蛋白質の機能発現における軸配位子の役割を明らかにするために、ヒトミオグロビンの軸配位子His93をP-450型のCys、カタラーゼ型のTyrにそれぞれ置換し (H93C、H93Y) これら変異型ミオグロビンの分光学的特性、構造、酸化還元電位、P-450活性、カタラーゼ活性、さらにはこれらの酵素の反応サイクルにみられる配位した過酸化物のO-O結合開裂様式 (ホモリシスあるいはヘテロリシス) を検討した。変異型ヒトミオグロビン (H93C、H93Y) の酸化型 (鉄3価) の電子スペクトル、ESRはいずれも天然型 (WT) のそれとは大きく異なり、H93Cではチオレート基がヘム鉄に配位しているP-450の基質結合型に、H93Yではチロシンが軸配位子であるカタラーゼのそれらとほぼ一致していた。チオレート、チロシン基のヘム鉄への配位のより直接的証拠としては共鳴ラマンスペクトルにおけるFe-S伸縮振動シグナル (350cm^{-1} 付近) ならびに常磁性NMRスペクトルにおけるチロシン基のフェニルプロトンシグナル (低磁場側120ppm近傍) が挙げられる。WT、H93C、H93Yの酸化還元電位 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) はそれぞれ+50、-230、-190mVと、アニオン性リガンドの配位によって大きく負のほうへシフトし、P-450の-270mV、カタラーゼの-500mV以下と良い対応を示す。一方、H93C、H93Yの還元型 (鉄2価) はチオレート、チロシン基いずれもヘム鉄には配位しておらず、そのかわり遠位側のヒスチジンが軸配位子として配位しWT型のスペクトルの特徴を示した。従って一酸化炭素などは近位側でヘム鉄に配位する。これら変異型ミオグロビンの還元型の構造特異性のため、酸化型での酵素活性を調べた。すなわちP-450の反応サイクルで酸化型酵素と過酸化水素による基質の酸化反応、過酸化水素の酸素と水への分解、ならびに過酸化物のO-O開裂反応を検討した。H93Cを用いた系ではスチレンのエポキシ化およびN,N'-ジメチルアニリンのN-脱メチル化反応においてそれぞれ約5倍および2倍程度の活性の増加がみられたが、H93Yではどちらの酸素添加反応についても活性は増加しなかった。過酸化水素の分解反応では変異型の活性は増加しなかった。一方、クメンヒドロペルオキシドとの反応では、WT、H93Yではヘテロリシス/ホモリシス=3.2、2.8であるのに対し、H93Cでは7.2となった。この結果は、酸化型ミオグロビンと過酸化水素とのホモリシス反応でフェリル鉄オキソヘムが生成するのに対しアニオン性リガンドの配位しているペルオキシダーゼ、カタラーゼ、P-450ではヘテロリシス反応してフェリル鉄オキソヘムカチオンラジカルという反応性の高い中間体が生成することと対応する。これらの結果より、ヒトミオグロビンのヘム鉄軸配位子は酸素添加酵素活性に対して著しい効果はみられなかったものの、O-O結合開裂反応過程を制御する一つの構造因子であることが示された。

(2-2) 遠位アミノ酸を置換したミオグロビンの構造とリガンド結合反応の動的特性³⁾

ミオグロビンの配位子 (酸素、一酸化炭素) 結合反応は、ヘム近傍のアミノ酸特に遠位ヒスチジンにより制御されていると考えられそのアミノ酸置換効果が活発に研究されているが詳細は未だ明らかではない。我々はヒトミオグロビンにおいて遠位His以外の二つのアミノ酸を置換 (Lys45(CD3)-Arg (K45R), Leu29-Ala(L29A)) したミオグロビンを合成し、それらのヘム近傍構造、配位子結合構造をNMR, IR などによって検討するとともに、高圧下フラッシュフォトリシス法による配位子結合速度の圧力依存性とそれから得られる活性化体積を調べた。このLys45(CD3)は配位子がミオグロビン蛋白質内部へ入る際に

大きく揺らぐ必要があるとされているアミノ酸であり、Leu29は配位子結合反応の中間状態で配位子が一時捕捉されると考えられている位置にある。L29Aでは一酸化炭素結合反応の活性化体積がWTと比べて符号が逆になり、またIRスペクトルにおけるCO伸縮振動やメトシアン体のプロトン常磁性スペクトルもWTのそれらとは著しく異なっておりこの位置のアミノ酸の配位子結合反応に対する重要性が示された。酸素結合反応について、配位子が溶媒中からミオグロビン内部へ入る拡散過程 (S-B) と、配位子がヘム鉄と結合を作る結合形成過程 (B-A) のそれぞれの素過程の速度定数を求めた。L29Aではミオグロビン内部からの結合が観測されず、 $k_{BA} < k_{BS}$ であることがわかった。WTとK45Rの素反応定数を比較すると、拡散過程の速度定数は一致しており結合形成過程の速度定数のみ変化がみられた。このことから45 (CD3) のアミノ酸は拡散過程には関与しておらず、結合形成過程にのみ影響を及ぼしていることが示唆された。

(2-3) ミオグロビンの遠位ヒスチジンの特異な化学修飾と構造および機能変化⁴⁾

我々はある偶然の機会に酸化型ミオグロビンの遠位ヒスチジンのNHが臭化シアンと特異的に反応してN-CNとなり、さらにこれが外部配位子として加えたアジドイオン (N_3^-) と反応してN-テトラゾールを生成することを見いだした。これは¹⁵Nでラベルした臭化シアンおよびアジドイオンを用いた反応生成物を¹⁵N-NMRで解析した結果わかったことである。このテトラゾール化反応はヘム蛋白質内でのみ起こりヘムポケットが環化反応に都合の良い空隙を提供しているためと考えられる。これらの遠位ヒスチジン修飾ミオグロビンのヘム近傍構造を2次元NMRで調べ、さらに一酸化炭素の結合反応を検討した。遠位ヒスチジンがN-シアノ化されたミオグロビンでは、遠位ヒスチジンは一酸化炭素の結合反応に対して立体障害となり、一方、N-テトラゾール体ではヘムポケット空隙が大きくなり結合速度は速くなった。

3 蛋白質工学によるアミノ酸置換ヘモグロビンの構造と機能の研究—協同効果発現における水素結合の役割—

ヘモグロビン (Hb) のサブユニット内やサブユニット界面には多くの水素結合が介在しており酸素の結合に伴う構造、機能変化を制御し、Hbの酸素結合における協同効果発現に対して重要な役割を果たしていると考えられてきた。そこで我々は従来天然の変異体の利用だけでは困難であった特定の水素結合の協同効果発現に対する役割を蛋白質工学の手法を用いて明らかにした。

(3-1) $\alpha 42$ 置換体^{5, 6)}

$\alpha 42$ (C7)Tyrは $\alpha 1\beta 2$ 界面に位置し、 β サブユニットの $\beta 99$ (G1)Aspと水素結合しており、低酸素親和性状態 (T状態) の安定化に大きな寄与をしているものと考えられてきた。そこで、Tyrと立体障害はよく似ているが水素結合のできないPheに置換したところ (Hb Phe-42 α)、機能的には酸素親和性の上昇、協同効果の消失が観測され、構造的にはヘム鉄に配位した近位ヒスチジンのNHのNMR常磁性シフトの増加、ヘム鉄-ヒスチジン間結合の共鳴ラマン線の高波数シフトなどが観測され、これらはいずれも高酸素親和性 (R状態) Hbの特徴を示していた。この結果は、HbのT状態の安定化のためには $\alpha 42$ 位に β サブユニットのAspと水素結合のできるアミノ酸が必要であることを示している。

(3-2) $\beta 145$ 置換体⁷⁾

$\beta 145$ (HC2)Tyrは $\beta 98$ (FG5)Valの主鎖カルボニル基とサブユニット内水素結合を形成しており、酸素脱着に伴うTyr残基の変位を制御する水素結合として重要視されてきた。しかし、われわれの作成したHb

Phe-145 β は水素結合を形成できないPheを有するにもかかわらず、構造、機能異常は小さく、この水素結合はHbのT状態の安定化には大きな寄与を果たしていないことが明らかになった。一方、Hb Phe-145 β の一酸化炭素再結合反応の解析（レーザーフォトリシス）から、R-T転移速度が天然Hbより遅いことが示唆され、静的構造への寄与は小さくとも動的な状態ではT状態の安定化に寄与しているものと考えられる。

(3-3) キメラ型ヘモグロビン

ヘモグロビンのサブユニット間会合形成におけるモジュール構造の役割を検討するために、 β サブユニットのF4部分を α 鎖のそれで置換したキメラヘモグロビンを遺伝子工学的に作成し、NMRなどの測定よりこのモジュールがサブユニット間会合に重要であることが示された。

4 ヘム酵素反応中間体モデルとしての鉄ポルフィリンおよびクロリンラジカルの特異な電子構造と常磁性NMR⁸⁾

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、これによつてはじめてその電子構造についての知見を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）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中間状態にある還元型鉄ポルフィリン錯体、（5）鉄4価オキソポルフィリン π カチオンラジカル、（6）鉄5価オキソポルフィリン、などの常磁性NMRについて述べる。

文献

- (1) 森島、蛋白質核酸酵素、32、144 (1987)
- (2) S. Adachi, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 180, 138(1991); Biochemistry, in press.
- (3) S. Adachi, et al., J. Biol. Chem., 267, 12614(1992)
- (4) I. Morishima, et al., Biochemistry, 28, 7582(1989); S. Adachi and I. Morishima, Biochemistry, in press.
- (5) K. Ishimori, et al., J. Biol. Chem., 264, 14624(1989)
- (6) K. Imai et al., J. Mol. Biol., 218, 769(1991)
- (7) K. Ishimori, et al., Biochemistry, 31, 3256(1992)
- (8) S. Ozawa et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 1548(1992); Inorg. Chem., in press; and references cited therein.

ポスターセッション

P 1 ~ P 73

P 1

完全メチル化シクロイヌロヘキサオースと金属カチオンとの
コンプレクセーション

(阪大産研・大教大生物) ○高井嘉雄・奥村泰男・高橋成年・澤田正貴
川村三志夫・内山番夫

Complexation of Permethylated Cyclonulohexaose with Metallic Cations

Yoshio Takai, Yasuo Okumura, Shigetoshi Takahashi, Masami Sawada

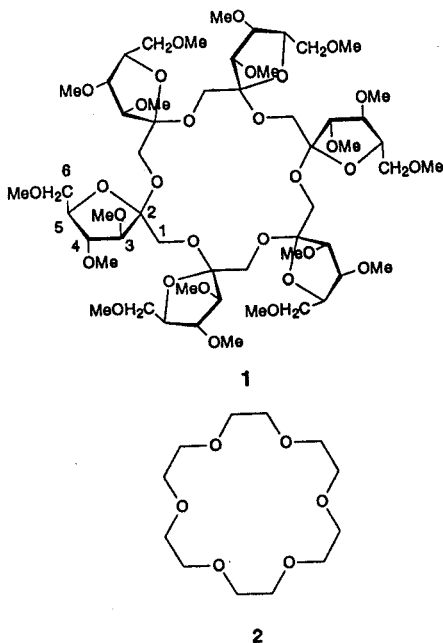
Material Analysis Center, the Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

Mishio Kawamura, Takao Uchiyama

Department of Biology, Osaka Kyoiku University

A new type of host molecule, permethylated cyclonulohexaose(1), can form the host-guest complexes with some metallic cations in solution. Association constants were determined in several organic solvents at 298K by using $^1\text{H-NMR}$ titration(non-linear least squares method). Those of 1 are about two orders of magnitude smaller than those of 18-crown-6(2). Metallic cation selectivity of 1 is $\text{Ba}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+$, and is similar to that of 2. The binding site of 1 with a cation in the solution(acetone- d_6) is deduced to be at the near OMe-3 groups, and not at the center of 18-crown-6 skeleton on the basis of the differences(Ba^{2+} , K^+) of the charge induced proton shifts.

われわれは、新しいタイプの糖ホスト化合物である完全メチル化シクロイヌロヘキサオース1(完全メチル化シクロフラクタン, Me-CP)によって示される溶液中のカチオン種とのコンプレクセーションについて、 $^1\text{H-NMR}$ 法を用い検討した結果を報告する。シクロイヌロヘキサオースは6個のフルクトフラノースが $\beta-(2\rightarrow1)$ 結合した環状糖であり、その中心部には特徴的な18-クラウン-6構造を有している(MS, NMR, X-ray)¹⁾。さらに、水性溶液中アルカリ金属カチオン類やアルカリ土類金属カチオン類とは、2の場合と同様のカチオン選択性を有していることは、すでに報告された²⁾。



シクロイヌロヘキサオース・糖ホスト化合物・18-クラウン-6・カチオン選択性

たかいよしお・おくむらやすお・たかはししげとし・さわだまさみ・かわむらみしお・うちやまたかお

われわれは、この新しい環状糖のホスト-ゲスト相互作用の理解を深めるために、今回完全メチル化誘導体1を選び、¹H-NMR滴定法を用いて代表的なカチオン種との溶液中の会合平衡定数などの熱力学的性質を決定し、さらにホスト-ゲスト錯イオンの溶液中の構造を¹H-NMR差誘起シフト法を用いて推定した。

塩添加法を用いて、非直線最小自乗法により25°Cにおける会合平衡定数(Ks)を求めた(表1)。金属カチオンがK⁺のとき、1のKs(6.1×10³M⁻¹, アセトン-d₆中)は対応する18-クラウン-6(2)のKs(1.0×10⁶M⁻¹, アセトン-d₆中)に比べて、ほぼ10²程度小さい。Ksで評価される1のカチオン選択性はNa⁺<Cs⁺<K⁺<Ba²⁺であり、TLEXC(薄層リガンド交換クロマトグラフィー)²⁾で観測されたシクロイヌロヘキサオースのカチオン選択性(Li⁺<Na⁺<Cs⁺<K⁺, Rb⁺<Ba²⁺, 53% MeOH)や、2のKsによる選択性(Li⁺<Na⁺<K⁺<Ba²⁺, MeOH)とよい一致を示す。

ホスト-ゲスト錯イオンの構造はアセトン中25°CにおけるKSCNおよびBa(SCN)₂の添加に基づく誘起シフトの差から推定した。この差誘起シフト法によれば、同一サイズの金属カチオンを利用するので、コンホメーション変化が及ぼす誘起シフト成分を消去でき、正味の電荷がおよぼす誘起シフト、したがって電荷の位置を推定することができる。OMe-3およびH-3, H-4が最大の差誘起シフトを示し[OMe-3(66.6Hz), OMe-4(21.8Hz), OMe-6(16.1Hz), H-1, -1'(21.7, 24.4Hz), H-3(57.2Hz), H-4(59.3Hz), H-5(ca. 30Hz), H-6, 6'(ca. 20Hz)]、K⁺やBa²⁺イオンはOMe-3, H-3の近傍にあることが証明された。H-1およびH-1'の差誘起シフト量は相対的に小さく、カチオン中心はH-1, -1'より遠いことが示された。従って、溶液中カチオンは18-クラウン-6骨格内では会合されておらず、その上層のOMe-3グループで強く会合されていると推定した。

謝辞: Me-CPをご提供いただいた三菱化成(株)今木直博士に厚く感謝致します。

Table 1. Association Constant (M⁻¹) of 1 at 298K

Guest		Solvent			
A ⁺	X ⁻	acetone	MeOH	70%MeOH	acetonitrile
Na ⁺	SCN ⁻	(1.5±0.3)×10 ²	(2.6±0.2)×10	0.6±0.2	
K ⁺	SCN ⁻	(6.1±0.1)×10 ³		(2.47±0.03)×10 ²	
Cs ⁺	SCN ⁻	(7.5±0.4)×10 ²	(3.6±0.3)×10 ³		
Ba ²⁺	SCN ⁻	1.9×10 ⁴			
NH ₄ ⁺	SCN ⁻			7.1±0.3	
EtNH ₃ ⁺ PF ₆ ⁻					(1.9±0.6)×10

1) Sawada, M.; Tanaka, T.; Takai, Y.; Hanafusa, T.; Taniguchi, T.; Kawamura, M.; Uchiyama, T. Carbohydr. Res., 217(1991)7-17.

2) Uchiyama, T.; Kawamura, M.; Uragami, T.; Okuno, H. Carbohydr. Res. in press.

P 1 a リン酸基・硫酸基間の金属イオン Mg^{2+} , Ca^{2+} のダイナミックスと結合部位

(北大・理、*群馬大・工) 和泉光則 ○市川和彦 栄喜俊夫*

The Dynamics and Location of Mg^{2+} or Ca^{2+} Bound at the Two Sites, Phosphate and Sulfate Moieties

Mitsunori Izumi, Kazuhiko Ichikawa and Toshio Eiki*

(Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo 060, and *Gunma University, Kiryu, Gunma 376)

^{31}P NMR measurements have been made on Mg^{2+} or Ca^{2+} -bound phosphate and sulfate moieties in non-aqueous and aqueous solutions in order to investigate three questions about (i) the identification of the location of metal ions bound at the two sites, phosphate and sulfate moieties, on PPS^{2-} , (ii) the kinetic properties of chemical exchange of Mg^{2+} between the above sites in non-aqueous solutions, and (iii) the pronounced difference of the stability between the Mg^{2+} and Ca^{2+} -phenylphosphosulfate divalent anion (PPS^{2-}). The computer simulation of the collapse among the three ^{31}P NMR bands with increasing temperatures at $[Mg^{2+}]/[PPS^{2-}] > 1$ has shown that the frequencies of Mg^{2+} transported from phosphate moiety to sulfate moiety and vice versa, $\nu_{PS}(=k_{BA})$ and $\nu_{SP}(=k_{AB})$, range from $2 \times 10^{-1} s^{-1}$ to $2 \times 10^2 s^{-1}$ and from $10^2 s^{-1}$ to $10^3 s^{-1}$. The ^{31}P NMR line width $\nu_{1/2}$ of Mg^{2+} complex is more than that of Ca^{2+} complex by a factor of more than 10.

[緒言] 生体内における ATP のリン酸基開裂反応には、加水分解酵素およびマグネシウムイオンを必要とする。溶媒である水はこの加水分解に求核試薬として寄与しているが、一方でイオンに対する強い水和はリン酸基とマグネシウムイオンとの直接の結合を妨げている。酵素の活性中心は疎水場のポケットであって、ここで当反応が進行すると考えられる。故にリン酸基開裂・転移反応は非水溶媒中で研究する必要がある。水、DMF溶媒中において、ATPモデル化合物フェニルホスホ硫酸エステル(PPS)と Mg^{2+} 、 Ca^{2+} との相互作用の溶媒および金属イオン効果が ^{31}P NMR化学シフト・線形の顕著な変化として現れ、 Mg^{2+} のダイナミックスと結合部位に関する情報が得られたのでここに報告する。

リン酸基開裂反応、 ^{31}P NMR化学シフト・線形、 Mg^{2+} のダイナミックス、疎水場と結合部位

いずみ みつ のり・いちかわ かずひこ・えいき としお

【実験】 PPS濃度を10mM一定とし、MgCl₂を0~100mM ($R=[Mg^{2+}]/[PPS^{2-}]=0\sim 10$)と変化させた DMF溶液に対し -30℃における ³¹P NMR (北海道大学理学部 NMR研究室 JEOL FX-500、共鳴周波数202.35MHz) を測定し、現れた5本のピークの強度変化を観測した。また3種類の錯体のみがスペクトルに現れる R=3の溶液に対し ³¹P NMRを-20℃~+30℃、10℃間隔の7点について測定した(図1(a)参照)。

【結果および考察】 PPSの ³¹P NMR スペクトルのピークは R=0ではひとつ、Mg²⁺との錯形成に伴って R=0.8では5本になり、さらに、R=1で4本、そして R>1では3本となった。各ピーク強度のR(即ち、Mg²⁺濃度)依存性から各化学種は低磁場側から順に PPS²⁻、[PPS₂·Mg]²⁻、2種の PPS·Mgおよび [PPS·Mg₂]²⁺ と各々同定された。R=3のDMF溶液では、温度上

昇と共にひとつのピークに合体しているスペクトル群を化学交換モデルを用いてシミュレートした(図1参照)。3錯体間(Scheme参照)の化学交換の動力学的パラメータを求めた。Mg²⁺の結合部位がリン酸基の酸素O_rである錯体(B)が他の金属錯体AとC(硫酸基の酸素O_sに結合部位がある)と比較して安定であると考えられる。それは、Bの濃度分率が一番大きく、Mg²⁺のO_rからO_sへの移行頻度数は逆のO_sからO_rへのそれと比較して小さいことから明らかである。

³¹P NMR スペクトルの半値幅 $\nu_{1/2}$ はCa²⁺とMg²⁺と比較して、前者が1ケタ余り小さく、低温においてもローレンツ型のひとつのピークが観測される。結合状態そしてリン酸基・硫酸基間のそれ等金属イオンのダイナミックスの時間尺度が非常に相異なることを示している。更には、フェニルホスホ硫酸マグネシウム塩単結晶の構造決定を踏まえて溶液内のMg²⁺の配位形態と比較して議論する。

Scheme

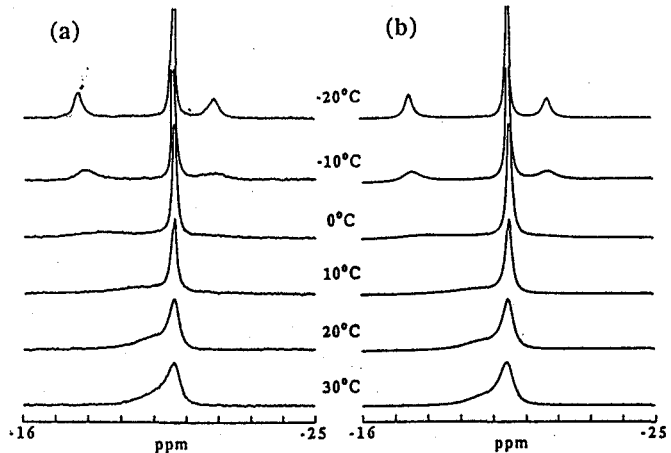
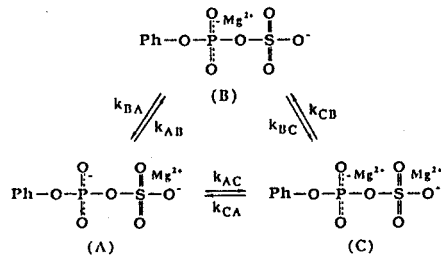


Figure 1. Temperature dependence of ³¹P NMR line shapes at R=3.0. The right side (b) shows the simulated ³¹P line shapes between -20℃ and -30℃.

P 2

免疫抑制タンパク、イムノフィリンが行うプロリルアミド cis/trans 異性化反応の遷移状態モデルの ^{13}C -NMRダイナミクス

¹ 九大 薬・² 第一薬大 小川 晴¹・草場里奈¹・井本泰治¹
○加藤祐子²・富田盛子²・野上靖純²・古賀俊隆²

^{13}C -NMR Dynamics of a Transition State model of the cis/trans Isomerization of Peptide Bond catalyzed by FKBP, a Prolyl cis/trans Isomerase

Haru Ogawa¹, Rina Kusaba¹, Taiji Imoto¹

Yuko Kato², Mitsuko Tomita², Yasuyoshi Nogami², Toshitaka Koga²

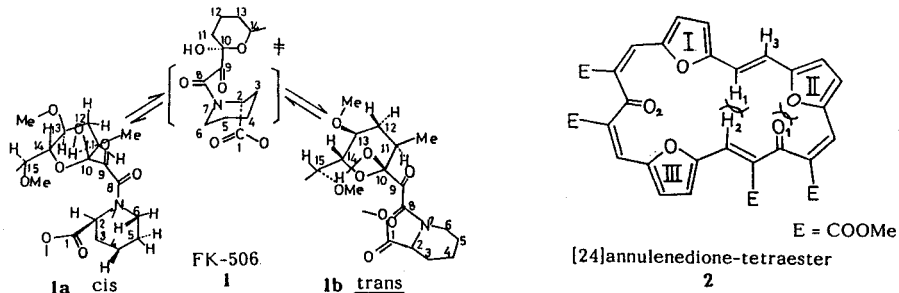
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, 812, Fukuoka

2) Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 815, Fukuoka

Recently, Schreiber and coworkers¹⁾ have reported that the α -ketoamide of FK-506 serves as a transition state "surrogate" of a twisted amide bond, and hence, it inhibits prolyl cis/trans isomerase (rotamase) activity via a twisted amide mechanism. We have now found that **2** undergoes a similar isomerization by which the trans olefinic double bond attached to the furan ring III of **2** could be isomerized via twisted mechanism in NMR time scale. In our model, **2** holds furan ring III almost orthogonal to the best plane of the molecule, much as the carbonyl of the twisted peptidyl prolyl amide bond of **1** is orthogonal to the plane of its prolyl amide bond.

1. 緒論 酵素が基質にひずみをかけて結合すると、そのひずみが基質のアミド結合の cis/trans 異性化を加速する例として prolyl cis/trans 異性化酵素 (ロータマーゼ) がある。FKBPはこの機能をもつタンパクである。一方、免疫抑制剤 FK-506 **1** はプロリルアミドが cis/trans 異性化する際の遷移状態の "surrogate" の構造をもつ故に、FKBPと強力に結合して、上記のロータマーゼ活性を阻害して免疫抑制の初期段階を発現させている [Fig. 1]。¹⁾ 我々はFK-506よりも少し大きい環サイズの24員環共役系 **2** がその cis/trans 配座を strain 機構によって NMR 時間尺度で変換することを見出した [Scheme 1]。NMR は strain relief によって起こる運動様式の characterization に有力な手段であった。

Fig. 1



2. Strainが誘起する環状共役系のコンホメーション変化

2 のフラン環 I と II の間にあるトランス二重結合由来の 6.30ppm に出現したシングレット [500MHz. in CD₂Cl₂. at 25 °C] は -80°C に冷却しても AB 型シグナルを与えなかったので、トランス二重結合の内部回転は ^1H -NMR で調べる限り凍結しない。しかし -80 °C

cis/trans 異性化、低温 ^1H - ^{13}C COSY、面性キラル化合物

○かとうゆうこ おがわ はる くさばりな いもとたいじ とみたみつこ のがみやすよし こがとしか

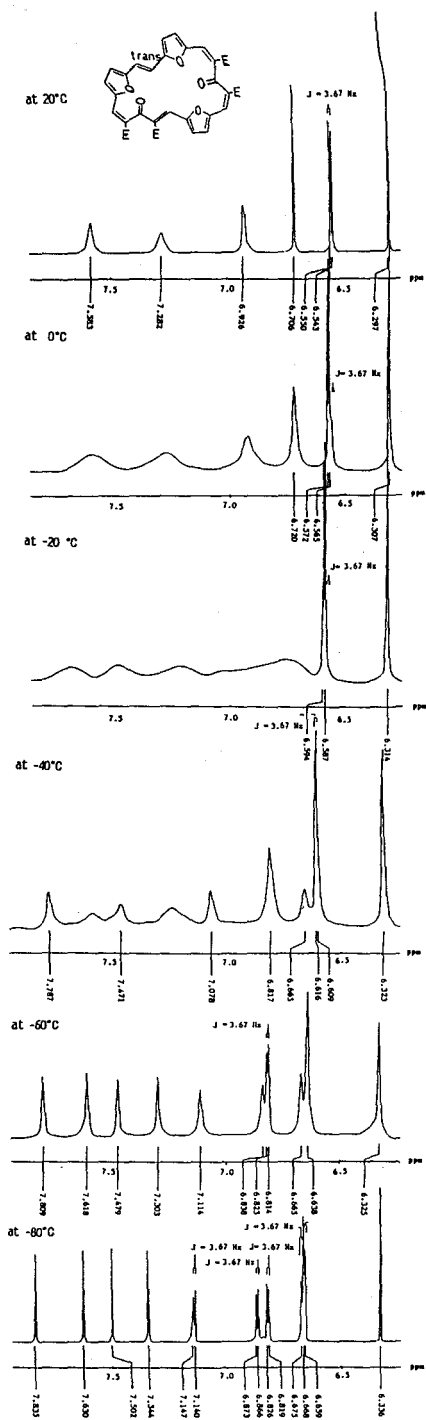


Fig. 2 Variable temperature ^1H -NMR spectra of triepoxy[24]annulene dione tetraester (2) (500MHz)

では δ 7.34, 7.50, 7.63 および 7.84 ppm に 4 本のシングレットが出現した。これらのシングレットは、 -70°C で測定した $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ COSY スペクトルの結果、いずれも非フラン環性の 3 級 $\text{CH} =$ 結合由来であった。 -80°C での $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ スペクトルから、2 の冷却は分子を 2 個の異なる分子に熱分割することが判った。低温の $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ は 3 級炭素シグナルとして計 16 本のシグナル (2 本のトランス二重結合、フラン環上の炭素シグナル 6 本、非フラン環性 3 級炭素 8 本) を与えた。注目すべきことに、このうち非フラン環性 3 級炭素シグナル 4 本は ^1H シグナルと相関シグナルを示さない。この結果は 2 を冷却すると 2 つの面性キラルなコンホマーが生成し、そのうち 1 つは他の 1 つより運動性が大きく、その運動性は分子内回転ではなく、“ねじれ運動” によるものであることがわかった。この結果は一見奇異にみえるが、高度なひずみのために平面配座をとり得ない trans octene がその二重結合の回転により 2



つの面性キラル化合物を与えるのと共通している。上記の結果は以下のように説明できる。

$^{13}\text{C} - \text{NMR}$ が示すように、トランス二重結合の内部回転が凍結されると、Fig. 1 の 2 で示したように、フラン環 II とカルボニル基 $\text{C}=\text{O}$ 間、および内部水素 H_1 と H_2 間でおこる分子内相互作用がある。この結果フラン環 III の配向は分子平面に対して直交に近い二面角配置に換わり、このフラン環の両側に twist double bond を作りだす。Twist double bond からのひずみ解放のための運動は“協奏的ねじれ”である。この際、トランス二重結合の内部水素 H_1 と外部水素 H_2 が環の内と外に反転する運動により、2 つの面性キラル化合物が低温で生成す

る。低温 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ COSY NMR スペクトルの結果、次の2点が重要である。(1) 2では、フラン環 I と II の間にあるトランス二重結合の分子内回転は協奏的ねじれ運動が凍結するより前にストップしている。(2) $2a \rightleftharpoons 2b$ の相互変換は twist 機構でのみおこる。

2 の相互変換の速度パラメータを eq. 1 の two site exchange program を用いて分子の各 site で算出し、その結果の一部を Fig. 3 の c, e に示した。

$$q(\nu) = [(1 + \tau \pi \Delta) P + QR] / (4 \pi^2 P^2 + R^2) \dots \dots \dots [\text{eq. 1}]$$

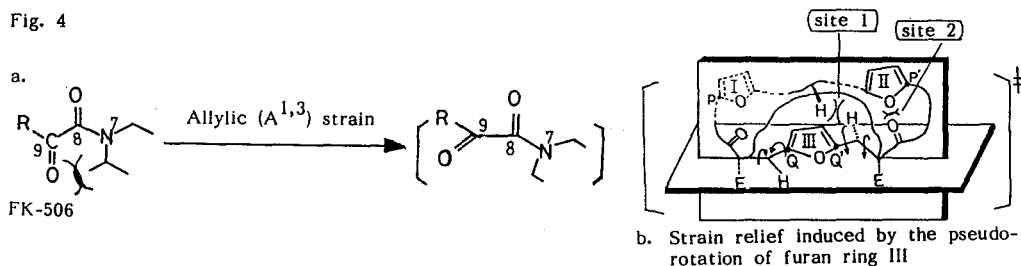
$$\text{ただし、} P = (\frac{1}{4} \Delta^2 - \nu^2 + \frac{1}{4} \delta \nu^2) \tau + \Delta / 4\pi, \quad Q = [-\nu - 0.5(P_A - P_B) \delta \nu] \tau$$

$$R = 0.5(P_A - P_B) \delta \nu - \nu (1 + 2\pi \tau \Delta), \quad \tau = \tau_A \tau_B / (\tau_A + \tau_B)$$

3. Discussion

FK-506 は prolyl amide cis/trans 異性化酵素に結合する基質の遷移状態 "surrogate" であることが Schreiber らにより報告された。¹⁾ FK-506 では 9 位のカルボニル基は Allylic ($A^{1,3}$) strain によってピペコリニルアミド平面に垂直に配向している [Fig. 4a]。2 は FK-506 のピペコリニル環の代りに 5 員環のフラン環をもち、このフラン環 III が分子平面からほぼ垂直に近い配向をとることにより、分子内の site 1, 2 の相互作用を解消させる代りに、その両側に twisted double bond をつくりだす。cis/trans 異性化反応の遷移状態をつくっている点で両者は似かよった構造性をもつ。FK-506 の C_7-C_8 のアミド結合は cis と trans の双方の配向をとることができるが、その比率は溶媒の

Fig. 4



種類や FKBP の存在下で連続的あるいは劇的に変る。²⁾ Scheme 1 に示した $2c$ は $1a$ に対応する異性体であるが、この異性体を得られなかったのは、フラン環 III の回転障害によるものと考えられた。Fig. 4b ではフラン環 I と III を結ぶ P 点と Q 点、フラン環 II と III を結ぶ P' 点と Q' 点の両端距離はほぼ一定に保たれて、³⁾ 協奏的ねじれが Q と Q' 点でおこり、フラン環 III はコンホメーション変化によってその配向をほとんど変えないで (つまり、フラン環 III はほとんど回転できないというひずみ機構の条件を満足して) 2 はそのコンホメーション変化の 1 サイクルを完了する。

4. 謝辞 本研究にあたり、FK-506 のサンプルをご恵与賜り、比較実験をする便宜を計っていただきました藤沢薬品株式会社 研究開発課、大保 同、馬杉 峻両博士のご好情に深く感謝申し上げます。

5. 文献

- 1) M. K. Rosen, R. F. Staudart, A. Galat, M. Nakatsuka, and S. L. Schreiber, *Science*, **248**, 862 (1990)
- 2) 第 62 回有機合成シンポジウム、1992 年 11 月 6 日 (東京・日仏会館) 講演要旨集
小川 晴、草場里奈、井本泰治、加藤祐子、富田盛子、野上靖純、古賀俊隆
- 3) H. Ogawa, H. Syouji, T. Imoto, Y. Kato, Y. Nogami, and T. Koga, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1991**, 498

P 3

2-ピリジルメチルリチウム誘導体のメチレン内部回転に対するクラウンエーテルおよびクリプタンドの効果

(名工大工・新日本製鐵¹) ○吉野明広、 榑原洋史¹、 高橋憲助

Effect of Crown ether and Cryptand on Restricted Methylene Rotation in 2-Pyridylmethyllithium Derivatives.

Akihiro Yoshino, Hiroshi Sakakihara¹, and Kensuke Takahashi

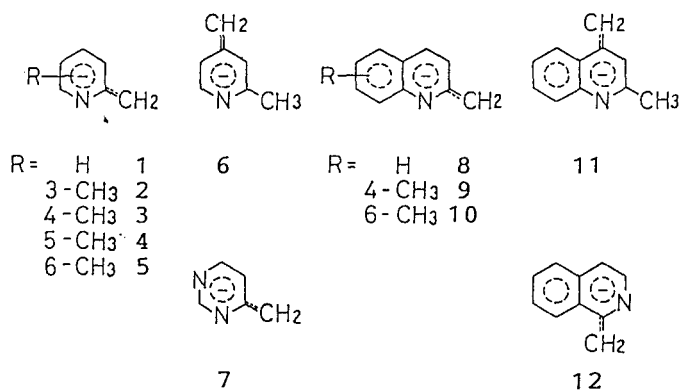
(Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology and

¹Nagoya Technology Reserch Div., Nippon Steel Corporation)

Thermodynamical parameters for the restricted rotation of the title carbanions have been obtained by means of the DNMR techniques. The results have been discussed in terms of the steric and electronic effects of the substituents. Effect of crown ether and cryptand on restricted rotation have been also discussed. The activation enthalpy and entropy decrease of 19.0 kJmol^{-1} and $65.6 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ in the presence of 15-crown-5, respectively.

1. はじめに

これまでDNMR技術の手法は、部分的に二重結合性をもつ結合についての回転障



Scheme 1

壁における多くの問題に応用されてきた。われわれは以前の報告でスキーム1に示されるカルバニオンのNMRパラメータを¹H、¹³C、⁷Li NMRについて報告した。¹⁾ また、メチレン基の束縛回転についてはそれらの中の1と2に対して報告されており、3位のメチル基は結果的に回転障壁に影響しな

DNMR・¹H NMR・カルバニオン・クラウンエーテル・クリプタンド・束縛回転

○よしのあきひろ、 さかきはらひろし、 たかはしけんすけ

い点と活性化エントロピーとエンタルピーが大きい点が指摘されている。²⁾ そこで本研究ではこれらのカルバニオンの束縛されたメチレン基の回転に対するメチル基の置換基効果、ヘテロ原子の効果、共役経路の効果を見いだすためにスキーム1に与えられている10個のカルバニオンを対象とした。また、窒素原子やリチウム原子の束縛回転に対する寄与についてクラウンエーテルを共存させて検討した。

2. 実験

出発物質(メチル置換ピリジンとピリミジンとキノリン)はすべて市販のものである。カルバニオンの調整の方法は以前に述べた方法と同様である。¹⁾ 試料の濃度はTHFまたはTHF-d₆中にて約1.2 mol dm⁻³であった。¹H NMRスペクトルは、R-202VTC温度制御装置を備えた60MHzの日立R-20B分光計によって記録された。

6の場合にはスペクトルはVarian XL-200分光計で測定された。プローブの温度はメタノール(低温領域)またはエチレングリコール(高温領域)の温度依存性の化学シフトにより標準方程式を使って

較正した。理論的なDNMRスペクトルは修正されたQuabexプログラムによりシャープMZ-80Bパーソナルコンピュータで計算され、オンラインドットプリンタによってプロットされた。

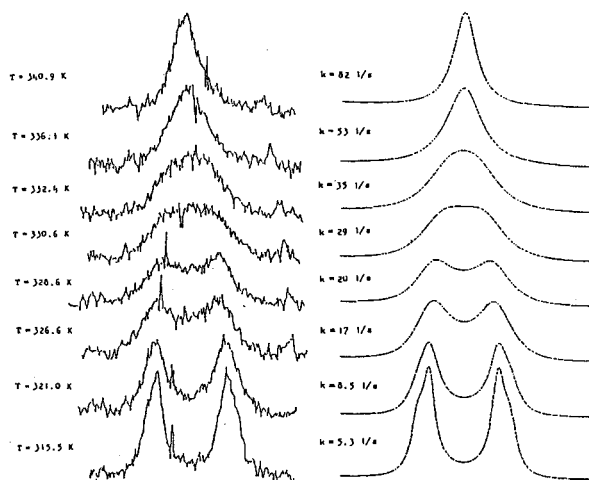


Fig. 1. Observed (left) and calculated (right) ¹H NMR spectra of the methylene protons of 4-Methyl-2-quinolylmethyl lithium in THF-d₆ at different temperatures and 60 MHz.

Table 1. Parameters Used for the DNMR Analyses of Carbanions.

Compound	$\Delta\delta(ab)/\text{Hz}$	$J(ab)/\text{Hz}$	T_2^*/s
1 ^{a)}	9.50+0.040t ^{b)}	2.2	0.25
2 ^{a)}	33.2	1.4	0.202+0.00012t ^{b)}
3	10.0	2.2	0.22
4	7.5	1.5	0.175+0.00150t ^{b)}
5	11.7	1.9	0.217+0.00164t ^{b)}
8	13.2	1.7	0.22
9	13.1	1.8	0.38
10	14.3	1.9	0.19
12	22.5	1.0	0.26

a) Data from Ref. 3.

b) The values are dependent upon the temperatures studied, which are expressed as t given in °C.

3. 結果と考察

DNMR解析はおのおのの試料のメチレンプロトンの信号のスペクトルに対しておこなわれた。解析は、メチレンプロトンと環プロトンの間のわずかな結合はあるがAB系として

おこなわれた。解析に使用されたパラメータはslow- とfast- の両方の交換限界において得られた。このパラメータは表1に与えられている。

それらの中のいくつかは温度依存性を持つ。いくつかの典型的な¹H NMRスペクトルが図1に与えられている。測定されたカルバニオンの融合温度は3、4、5、8、9、10、12に対して

それぞれ約 281、257、249、333、330、323、357 Kであった。熱力学的パラメータは速度定数の対数値と温度の逆数とのアイリングとアレニウスのプロットによって得られ、図2にアイリングプロットが示されている。図によれば、カルバニオンはふたつのグループに分けられる。一方は1から5のグループであり、もう一方は8から12のグループである。前者のカルバニオンは後者のものよりも小さな傾きを持っている。このようにして決定された活性化エネルギーとほかのパラメータは表3に与えられている。測定した10種のカルバニオンのうち、6、7、11のメチレンの信号は-70から100℃の温度範囲においていかなる線形変化も示さなかった。このうち、7と11の信号は100℃においてもA B-スピン系の四重線として現われている。ところが、6の信号は60 MHzにおいては-70℃でさえも一重線である。しかしながら、その信号は200 MHzにおいて-90℃で2本に分裂している。よって、こ

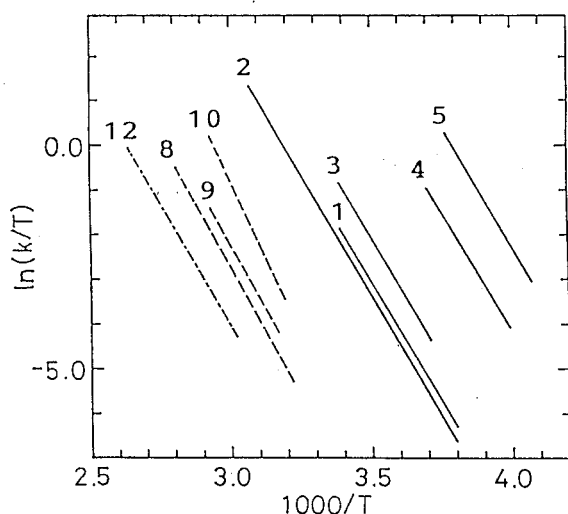


Fig. 2. An Eyring plot for the methylene rotation of carbanions.

Table 3. Thermodynamic Parameters for the Hindered Rotation of the Methylene Groups of Carbanions.

Compound	E_a	$\ln A$	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger
	kJmol^{-1}		kJmol^{-1}	$\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
1 ^{a)}	93.4±2.3	41.9±1.0	91.0±2.3	95.8±8.4
2 ^{a)}	93.5±3.7	41.6±1.5	91.1±3.6	93.1±12.4
3	93.6±4.0	43.1±1.6	91.3±4.0	106.0±14.5
4	89.8±5.1	44.7±2.3	87.7±5.1	118.8±19.7
5	93.0±1.7	47.9±0.7	90.8±1.7	146.6±6.8
8	99.5±3.0	38.9±1.2	96.7±3.1	69.6±9.2
9	100.2±3.2	39.8±1.2	97.5±3.2	76.6±9.7
10	121.7±1.9	49.0±0.7	119.0±1.9	153.3±5.7
12	97.0±2.6	36.6±0.9	94.1±2.6	50.4±7.3

a) Data from Ref. 3.

の二重線はA B-スピン系の四重線のふたつの内側の吸収線であると思われる。

メチル置換基効果

われわれの以前の報告では、3位のメチル置換基は活性化エネルギーに影響を与えないことを指摘した。²⁾ 表3で与えられるように、4は1に比べて 3.6kJmol^{-1} だけ低い活性化エネルギーを持っている。このことはメチル置換基の電子的な効果に起因する。第一

のグループの中で1から5の活性化エネルギーの比較より、有効な効果は4に対してのみ現われ、他はほとんど1のそれと同じである。メチル基のパラの位置に該当する置換基の有効な位置は芳香環においては典型的なオルト-パラ配向である。それゆえメチル置換基の電子的な効果は2と4の両者においても現われていることが予想される。しかしながら2では置換基の電子的な効果が立体効果で抑制されている。

窒素原子の効果

表 3 に示される活性化エネルギーは分子内に窒素原子を含まない同様なベンジルカルバニオンに対して報告された値よりも大きい。それゆえ窒素原子の効果は約 30 kJ mol^{-1} と見積もられる。さらに、7 は分子内にふたつの窒素原子を持っている。それゆえそのメチレン基の回転は 100°C においてさえも制限されている。メチレン炭素の電子的な環境は一つの結合を隔てた炭素-水素結合定数 ($^1J_{\text{CH}}$) によって得ることができる。すなわち、7 は 155 Hz と 1 の 150 Hz に対して大きな値であり、一方、5 は最も小さい 148 Hz である。

共役経路の効果

8 と 9 は 1 と 3 に対してより大きな活性化エネルギーを持っている。このことは共役系の拡張に起因する。このこともまた $^1J_{\text{CH}}$ の 8 と 9 に対するその値 (153 Hz) が 1 と 3 よりも約 3 Hz 大きいことから説明される。

活性化エントロピー

表 3 に示されている値は大きく正の値である。この特徴については以前に指摘した。²⁾ 第一のグループの化合物に対してその値は 2、1、3、4、5 の順序で増加する。われわれの以前の報告では¹⁾、ピリジルメチルリチウムはタイトなイオン対を形成する。もしこのことが本当ならば、リチウム原子はベンジルアニオンに対する X-線の測定によって決定されたのと同様に、N1、C2、C α 原子によって作られる三角形の重心の近くに位置するであろう。第二のグループでは 10 は最も大きなエントロピーを持ち 8 はかなり小さな値を持つ。それでも、8 と 12 に対する 69.6 と $50.4 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ の値は 2-および 1-ナフチルメタニドイオンの小さな値 (1.3 と $6.3 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) と比較して大きい。

クラウンエーテルの効果

1 におけるリチウムイオンの窒素原子と α -炭素原子との相互作用をより詳しく調べるため、クラウンエーテルまたはクリプタンドを共存させた。これらの化合物はリチウムイオンと安定な錯体を形成し、アニオンとの相互作用を減少させることが期待される。その結果、18-クラウン-6 では活性化パラメータに変化がなかったが、15-クラウン-5 では活性化エネルギーが 19 kJ mol^{-1} の減少を示し、活性化エントロピー・活性化エンタルピー・融合温度はともに減少した。すなわち、クラウン化合物との錯形成によりアニオンの平衡がフリーイオンの方に傾いて環内への負電荷の流れ込みが抑えられ、炭素-炭素の二重結合性が弱まって活性化パラメータの減少を引き起こしたものと説明される。

本研究で示されるように D N M R 法により求められた活性化パラメータとクラウンエーテルを利用する方法はアニオン-カチオン相互作用に対して非常に鋭敏である。

REF. 1) K. Konishi, A. Yoshino, M. Katoh, K. Takahashi, Y. Kawada, T. Sugawara, and H. Iwamura, Bull. Chem. Soc. Jpn., 54, 3117 (1981).

2) H. Matsui, A. Yoshino, T. Yoshida, and K. Takahashi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 57, 1052 (1984).

P 4 等価核のNMR的非等価性に着目した対称分子の構造解析法 (第2報)
 ω_1 hetero half-filtered-HH 相関法の応用
 (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 (Part II).
 Application of ω_1 Hetero Half-Filtered HH Correlation.

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

In the NMR analysis of C_2 symmetric molecules, an asymmetric $^{12}C/^{13}C$ isotopomer regarding a pair of equivalent carbons can be selectively observed. The J coupling between equivalent protons such as H-8b/H-8b' in **1** is detectable in this isotopomer because of their non-equivalency. The 2D ω_1 hetero half-filtered DQF-COSY made it possible the precise measurements of $^3J_{HH}$ between equivalent protons by avoiding the influence of $^2J_{CH}$ in the COSY cross-peaks. Furthermore, in the 7b-8b-8b'-7b' system in **1**, selective determination of $^2J_{CH}$, C-8b'/H-7b' and C-7b'/H-8b', was achieved by this ω_1 hetero half-filtered method.

はじめに

近年、生理活性天然有機化合物によくみられる対称化合物の構造解析には、等価なユニット内に存在する等価なプロトンやカーボンの区別が必要となることが多い。 C_2 対称化合物は、その中の一組の等価なカーボンに着目したとき、その両方が ^{12}C である(a)、一方が ^{12}C 、他方が ^{13}C である(b)、両方が ^{13}C である(c)の3つのアイソトポマーからなっている(Fig.1)。私達は、NMR活性な ^{13}C の同位体存在比が1.09%と低いことを逆用する

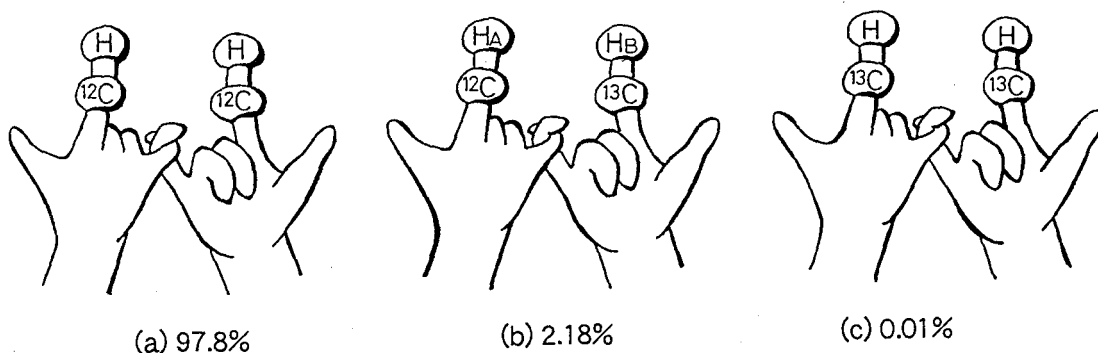


Fig.1. Three isotopomers of a C_2 symmetric molecule.

keywords: C_2 symmetric molecule, isotopomeric asymmetry, equivalent nuclei,
 J coupling between equivalent protons, ω_1 hetero half-filtered DQF-COSY.

かわばたじゅん、ふくしえり、みずたにじゅんや

と、 C_2 対称分子の中で、等価な2つのカーボンの一方が ^{12}C 、他方が ^{13}C の非対称な(b)の分子のみを観測できることに着目し、 ^{13}C -coupled HMQC-NOESY (-ROESY)法により、等価なプロトン間のNOE検出に初めて成功し、天然有機化合物の立体構造解析に応用した^{1, 2)}。今回は、同じ考え方をさらに拡張し、 ω_1 hetero half-filtered 法を応用した C_2 対称分子の構造解析を、コウボウシバに含まれる抗菌性テトラスチルベン hopeaphenol(1)をモデル化合物として行なった。

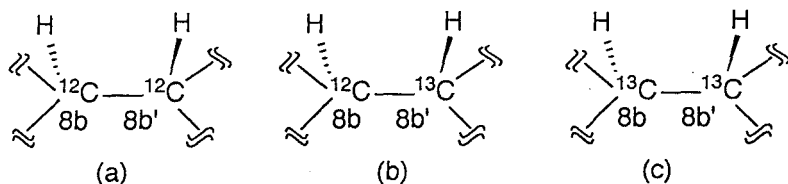
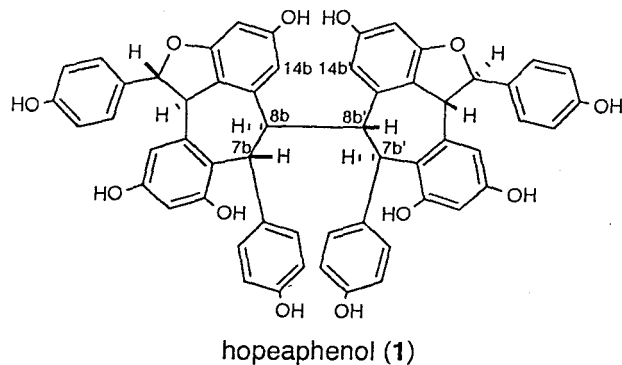


Fig.2. Three isotopomers of 1 regarding the C-8b/C-8b' bond

1) 等価なプロトン間のJカップリング

等価なカーボン同士の直接結合を持つ C_2 対称化合物1の中心結合C-8b/C-8b'について考えるとき(Fig.2)、通常のプロトンスペクトルで観測しているのは(a)のアイソトプマーである。(a)においてC-8b(8b')上の等価なプロトンH-8b(8b')の化学シフトは一致しており、これらの間のJカップリングは観測できない。ところが(b)では、H-8bが ^{13}C とのカップリングによって分裂してH-8bとは異なるシグナルを与え、両者は非等価となるためこれらの間のJカップリング($^3J(H-8b'/H-8b)$)が観測できる。このような等価な(厳密には非等価であるが、以後便宜上等価とあらわす)プロトン間のJカップリングは、既存のHMQC-COSY法によっても検出可能であるが、その場合相関ピークは $^2J(^{13}C-8b'/H-8b)$ によっても分裂しているため、正確な $^3J_{HH}$ を求めることはできない。最近、遠隔 J_{CH} を精密に読む方法として、HMQC-HOHAHA(-NOESY)の展開期 t_1 をHOHAHA(NOESY)側に移した ω_1 hetero half-filtered HOHAHA(NOESY)が報告された³⁾。この手法では、各相関ピークは F_1 軸方向に $^1J_{CH}$ によって大きなダブルットとなり、それぞれが F_2 軸方向に遠隔 J_{CH} だけずれてあらわれる。このように遠隔 J_{CH} の寄与を $^1J_{CH}$ により分裂した相関ピークのずれとして分離することができれば、相関ピークの F_2 軸上には正確な $^3J_{HH}$ が検出できるはずである。

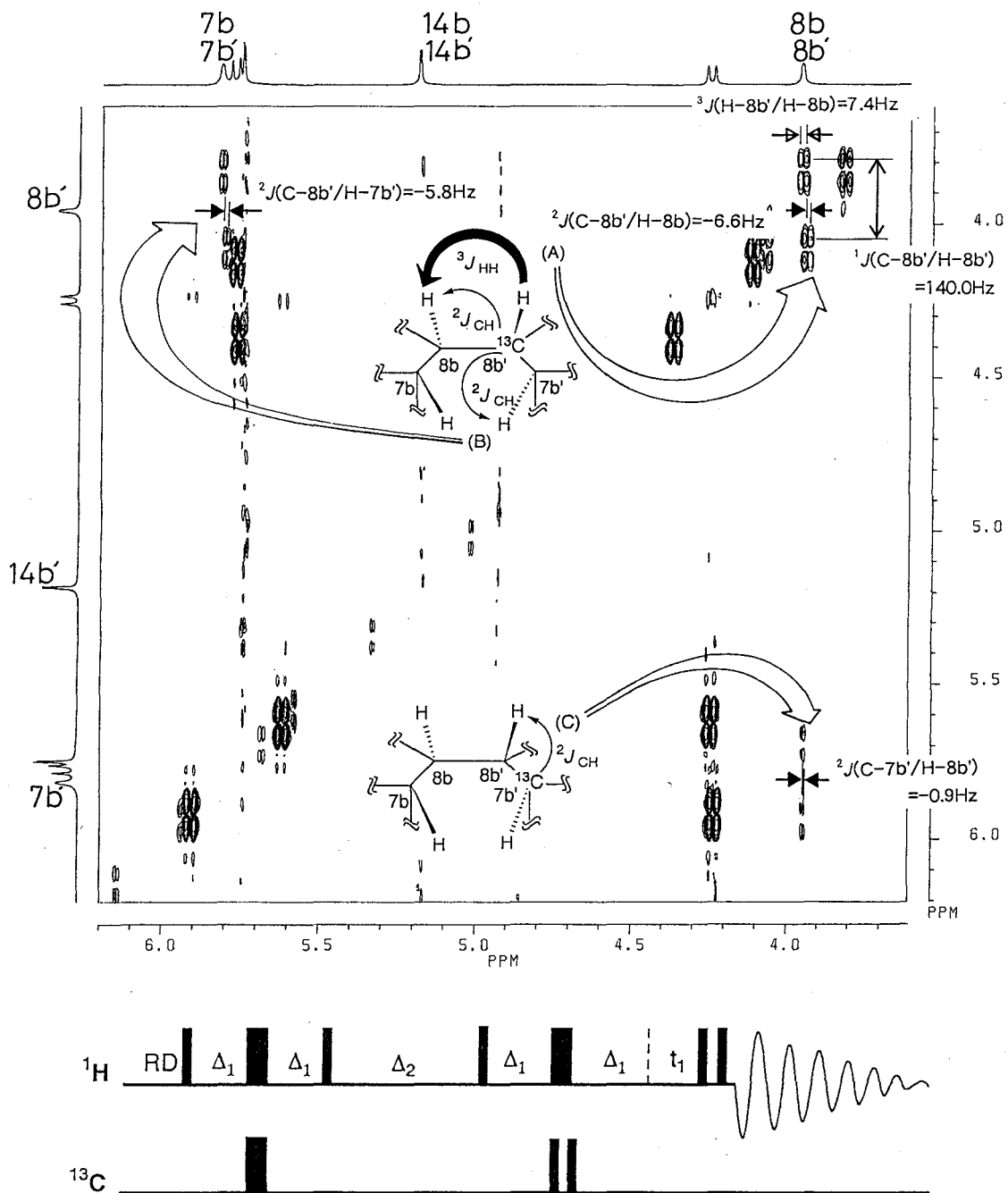


Fig.3. Part of the 2D ω_1 hetero half-filtered DQF-COSY spectrum of 1. Both positive and negative peaks are plotted without distinction.

そこで、正確な ${}^3J_{\text{HH}}$ を得る目的で、 ω_1 hetero half-filtered DQF-COSY法を作成し、1を測定した。この場合、すべてのピークの位相を吸収形にするため、DQ-filterを用いている。このスペクトルでは F_1 もプロトン軸となりここには ${}^{13}\text{C}$ に結合したプロトンのみが変わる。たとえば、 F_1 軸のH-8b'の化学シフト位置にあらわれる相関ピークはC-8b'が ${}^{13}\text{C}$ であるアイソトポマー由来で、 F_1 軸側がH-7b'の位置のピークはC-7b'が ${}^{13}\text{C}$ である別のアイソトポマー由来である。そのためスペクトルは対角線に対して非対称となる。本文中では、相関ピーク的位置を表す際に、各軸方向のプロトンを $\{F_1, F_2\}$ の順に表記することにする。 $\{H-8b', H-8b\}$ の相関ピーク(Fig.3(A))は予想通り、 F_1 軸方向に ${}^1J(C-8b'/H-8b')$ (140.0Hz)で分裂し、それぞれが ${}^3J(H-8b'/H-8b)$ (7.4Hz)による反位相吸収形ピークとなり、これが F_2 方向に ${}^2J(C-8b'/H-8b)$ (-6.6Hz)ずれて観測された。

2) 二組の等価核の区別による遠隔 J_{CH} カップリング

これまで、一組の等価核(H-8b'/H-8bまたはH-7b'/H-7b)についての関係(COSY, NOESY)を検討してきたが、次にこれら二組の等価核を含む系について考える。化合物1の7b-8b-8b'-7b'の系における遠隔 J_{CH} について、通常の方法では、H-7b'とH-7bが等価なため ${}^2J(C-8b'/H-7b')$ と ${}^3J(C-8b'/H-7b)$ は区別できない。しかし、 ω_1 hetero half-filtered DQF-COSYスペクトル中の $\{H-8b', H-7b'\}$ のCOSYピーク(Fig.3(B))では ${}^4J(H-8b'/H-7b)$ の寄与が無視できると考えられるため、この相関ピークから得られる遠隔 J_{CH} は ${}^2J(C-8b'/H-7b')$ (-5.8Hz)である。同様に、C-7b'が ${}^{13}\text{C}$ であるアイソトポマーでは、 $\{H-7b', H-8b'\}$ のピーク(Fig.3(C))から ${}^2J(C-7b'/H-8b')$ と ${}^3J(C-7b'/H-8b)$ のうち前者の値(-0.9Hz)のみを選択的に得ることができた。

おわりに

以上のように ω_1 hetero half-filtered法を用いることによって、2Dスペクトルの相関ピークにおいて遠隔 J_{CH} カップリングを分離観測することが可能であり、対称化合物の等価なプロトンの区別に有効であることがわかった。さらにこの考え方によってNOESY (ROESY) スペクトルでNOE相関ピークを与えるプロトンとその結合カーボン間に遠隔 J_{CH} カップリングが存在するかどうかを検出し、対称化合物のユニット内NOEとユニット間NOEを区別する方法を現在検討中である。

引用文献

- 1) 川端 潤、福士江里、水谷純也、第30回NMR討論会講演要旨集、p.109 (1991).
- 2) J. Kawabata, E. Fukushi and J. Mizutani, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1115 (1992).
- 3) M. Kurz, P. Schmieder and H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 1329 (1991).

(徳島文理大・薬) ○田中正己, 朝日 豊

Studies of Binding Position of Drugs with Albumin by means of Relaxation Rate

Masami Tanaka and Yutaka Asahi

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University)

The interactions of drugs [phenylbutazone(PB), ibuprofen(IB), azathioprine(AZ) and berberine chloride(BC)] with bovine serum albumin (BSA) were studied by means of proton relaxation rate. The binding positions of drugs to BSA were investigated by using the ratio of the $1/T_2$ values of bound drug to free drug $[(1/T_2)_b/(1/T_2)_f]$, which were shown by contour plots. The binding of PB and IB to BSA were considered to involve mainly the phenyl groups of drugs. The binding of AZ to BSA was considered to be primarily at the methyl group on the imidazole ring of AZ. The binding of BC to BSA was estimated to be widespread in the drug molecule because of its rigid structure.

1. 目的 薬物-タンパク結合の研究において種々の実験方法が確立され、結合パラメータ、結合部位の種類や特異性について多くの報告がある。しかし、薬物分子の結合位置に関する報告は数少ない。本研究では、薬物-タンパク結合における薬物分子の結合位置を微視的に鳥瞰するため、緩和速度を用いて検討した。

本研究では、Sudlowら¹⁾によって、人血清アルブミン(HSA)上で異なる特異的部位に結合することが報告されている薬物：フェニルブタゾン(PB)とイブuproフェン(IB)を用いた。さらに、2つの異なる複素環を有する薬物：アザチオプリン(AZ)とイオン結合を示す薬物：塩化ベルベリン(BC)を用いた。タンパクはHSAと相同タンパク質である牛血清アルブミン(BSA)を用いた。

2. 実験 結合パラメータ(結合定数, 結合部位数, 熱力学的パラメータ)は平衡透析法で求めた。NMR測定は、JEOL-GX400を用い、0.1Mリン酸緩衝重水溶液中、40°C, pD=7, TMS外部基準で行った。 T_1 はInversion Recovery法, T_2 はCarr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)法で測定した。すべての測定において、H₂O抑制のためホモゲート照射を併用した。

3. 結果と考察

3-1. 平衡透析法による結合パラメータと結合機構

マクロ的な結合機構は、平衡透析法から得られた熱力学的パラメータおよびイオン強度依存性の傾向から判断した。Table Iに本研究で扱った薬物の結合定数(K), 結合部位数(n), 熱力学的パラメータおよび結合機構を示した。

Table I. Binding Parameters of Drugs to BSA by Equilibrium Dialysis method

Drug	K (M ⁻¹)	n	ΔG° (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (Jmol ⁻¹ K ⁻¹)	pK _a	Binding Mechanism
PB	1.38X10 ⁴	3	-24.02	-20.80	10.63	4.2	hydrophobic
IB	1.28X10 ⁴	3	-23.80	-9.20	48.18	4.35	hydrophobic
AZ	3.92X10 ³	2	-20.84	-23.43	-8.28	<3.2 ^{a)} 8.0 ^{b)}	hydrophobic
BC	1.15X10	32 ^{c)}	-6.15	-4.85	4.29	2.47	hydrophilic

[BSA]=7.25X10⁻⁵, pH=7, 30°C, [phos.buf.]=0.1M, a)pK_{a1} of the imidazolium, b)pK_{a2} of the purine at 25°C, c)R.N.Nahar et al., J.Bangladesh Acad.Sci., 13,197(1989).

薬物-タンパク結合, 緩和速度, 結合位置

たなかまさみ, あさひゆたか

3-2. 化学シフト, T_1 , T_2 の変化
 4つの薬物とも薬物濃度を变化させた場合, 化学シフト, T_1 および T_2 の変化はあまりなかった(最も变化したのはBC). BSAを添加した場合, 化学シフトはあまり变化しなかったが, T_1 と T_2 は減少した. 一例として, IBについて示す(Table II). また T_2 は T_1 よりも変化が大きいのので, 薬物-タンパク結合実験に T_2 が適することがわかる. アルブミンの添加により T_2 が減少するのは, 運動の遅いアルブミン分子に結合した薬物の運動が, 遊離薬物に比べ遅くなったためである.

Table II. Chemical Shifts(δ^a), Spin-Lattice Relaxation Time(T_1) and Spin-Spin Relaxation Time(T_2) of IB.

1 3 4 6 7 5 2

Cc1ccc(cc1)C(C)C(=O)O

Concentration	1-CH ₃	2-CH ₃	3-CH	4-CH ₂	5-CH	6-CH	7-CH
δ (ppm)	d	d	m	d	q	d	d
10mM IB	0.809	1.321	1.776	2.413	3.542	7.143	7.206
1mM IB	0.808	1.320	1.776	2.413	3.541	7.143	7.206
10mM IB/ 7.25x10 ⁻⁵ M BSA	0.791	1.314	1.757	2.387	3.530	7.124	7.191
T_1 (s)							
10mM IB	1.28	0.89	2.50	1.15	3.15	2.54	2.74
1mM IB	1.41	1.02	2.75	1.22	3.43	2.73	2.88
10mM IB/ 7.25x10 ⁻⁵ M BSA	0.90	0.86	0.96	0.93	1.15	1.13	1.15
T_2 (s)							
10mM IB	1.09	0.82	1.38	1.27	1.92	2.43	2.36
1mM IB	1.06	0.67	0.98	1.15	1.36	1.98	2.16
10mM IB/ 7.25x10 ⁻⁵ M BSA	0.081	0.065	0.074	0.059	0.080	0.067	0.063

a) From TMS(external references), pH=7, [phos.buf.]=0.1M, 40°C.

3-3. 緩和速度とBSA濃度の関係

IB濃度を10mM一定とし, BSA濃度を变化させた場合, Fig.1に示すように良好な直線関係が得られた. 各プロトンの傾きは4-CH₂, 7-CH, 6-CH, 2-CH₃, 3-CH, 5-CH, 1-CH₃の順になるが, すべてのプロトンにおいて遊離型薬物の緩和速度($(1/T_2)_f$)の値が異なっているため, 傾きの大きさから結合位置を決定することはできない.

3-4. 結合型薬物の緩和速度

遊離型薬物の緩和速度($(1/T_2)_f$)と結合型薬物の緩和速度($(1/T_2)_b$)と交換速度($(1/T)_{ex}$)の間にはJardetzky²⁾によって考えられた次の関係(1)が成立している.

$$(1/T_2)_f < (1/T_2)_b < (1/T)_{ex} \quad (1)$$

この条件下において, 実際に観測される緩和速度

($1/T_2$)は式(2)で表される.

$$1/T_2 = (1/T_2)_f + B[(1/T_2)_b - (1/T_2)_f] \quad (2)$$

また結合定数Kは簡単な質量作用式(3)で与えられる.

$$K = \frac{D(1-B)(nP-DB)}{DB} \quad (3)$$

ここでDは遊離薬物濃度, Bはタンパクに結合している薬物の割合, Pはタンパク濃度を表す. 実際のNMR測定条件では $B \ll 1$ であるので, 式(3)は式(4)に変形される.

$$D = -\frac{1}{K} + \frac{nP}{B} \quad (4)$$

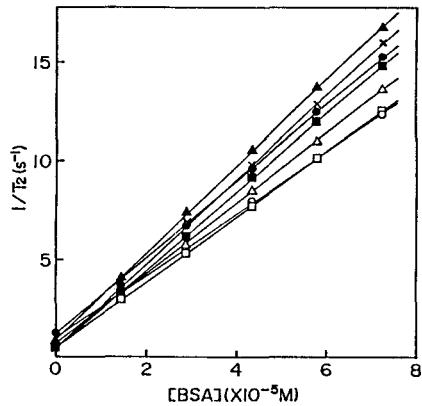


Fig.1. Effect of BSA on the Proton Relaxation Rate ($1/T_2$) of IB. [IB]=10mM, pH=7, at 40°C. ○, 1-CH₃; ●, 2-CH₃; △, 3-CH; ▲, 4-CH₂; □, 5-CH; ■, 6-CH; ×, 7-CH.

すなわち、タンパク濃度と薬物濃度を变化させた一連の実験から、一定の $1/T_2$ 値を満足するタンパク濃度と薬物濃度との間に直線関係が成立するとき、切片から K 、傾きから B を求めることができる。

まずIBの6-CHについてFig.2に示すように、IB=10mMにおいて良好な直線関係が得られたので、他の濃度においても直線関係が成立すると仮定した。次に任意の値 $1/T_2 = 10s^{-1}$ を満足する $[IB]$ と $[BSA]$ との間には、各プロトンについて直線関係が得られた (Fig.3)。その傾き (n/B) は、 $2.47 \pm 0.28 \times 10^2$ であった。平衡透析法から得られた結合部位数 $n=3$ の値を用い、 n/B から各プロトンの B を算出し、式(2)から $(1/T_2)_b$ を求めた (Table III)。ここで $(1/T_2)_b$ は4-CH₂が最も大きい、 $(1/T_2)_r$ がすべてのプロトンで異なるため $(1/T_2)_b$ の絶対値から結合位置について議論することはできない。そこで $(1/T_2)_b / (1/T_2)_r$ で検討した結果、6-CH、7-CHが最も大きく、IBとBSAとの結合位置はフェニル環部分(疎水性部分)であると考えられる。さらに結合位置を明瞭に表現するために、等高線表示を用いた (Chart I)。ところで、NMRで扱った実験条件は[薬物]/[タンパク]がかなり大きな値である。それゆえ非特異的結合の寄与が予想される。そこで結合部位を

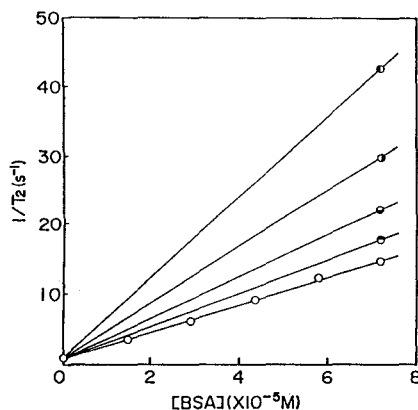


Fig.2. Effect of BSA on the Proton Relaxation Rate ($1/T_2$) of IB at 6-CH. ●, $[IB]=2mM$; ○, $[IB]=4mM$; ◐, $[IB]=6mM$; ◑, $[IB]=8mM$; ○, $[IB]=10mM$.

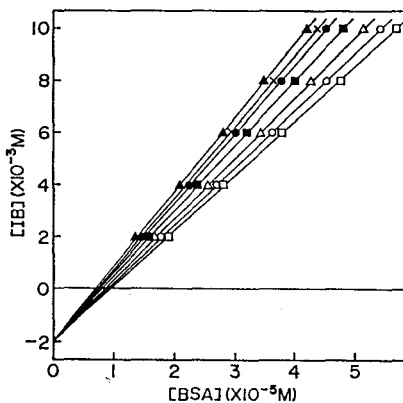


Fig.3. Linear Relationships between Concentrations of Free IB and BSA Estimated from the Proton Relaxation Rate ($1/T_2$) of IB. ○, 1-CH₃; ●, 2-CH₃; △, 3-CH; ▲, 4-CH₂; □, 5-CH; ■, 6-CH; X, 7-CH.

Table III. Spin-Spin Relaxation Rates($1/T_2$) of IB

Peak	$1/T_2$ (s^{-1})	$(1/T_2)_r$ (s^{-1})	n/B ($\times 10^2$)	$n=3(\text{dialysis})$		$n=100(\text{assumed})$	
				$(1/T_2)_b$ ($\times 10^2 s^{-1}$)	$(1/T_2)_b / (1/T_2)_r$ ($\times 10^2$)	$(1/T_2)_b$ ($\times 10 s^{-1}$)	$(1/T_2)_b / (1/T_2)_r$ ($\times 10$)
1-CH ₃	12.3	0.917	2.20	8.39	9.14	2.61	2.84
2-CH ₃	15.4	1.220	2.65	12.52	10.27	3.88	3.18
3-CH	13.5	0.725	2.31	9.85	13.60	3.03	4.18
4-CH ₂	16.9	0.787	2.84	15.31	19.44	4.67	5.93
5-CH	12.5	0.521	2.10	8.39	16.11	2.57	4.93
6-CH	14.9	0.412	2.48	12.00	29.17	3.64	8.85
7-CH	15.9	0.424	2.72	14.01	33.07	4.24	10.02

$1/T_2$, overall observed(10mM IB/7.25 $\times 10^{-5}$ M BSA); $(1/T_2)_r$, free IB(10mM) observed; $(1/T_2)_b$, IB bound to BSA calculated; n, number of binding sites on BSA; B, ratio of IB bound to BSA.

$n=100$ と仮定した場合について検討した (Table III)。その結果、 $(1/T_2)_b$ の絶対値は減少したが、相対値は変化しなかった。当然 $(1/T_2)_b / (1/T_2)_f$ も相対値は変化せず、結合位置に関しても同様の結論を得た。

つぎに、他の薬物についても I B と同様に検討した。まず P B は I B と同様フェニル基部分が結合位置であった (Chart I)。P B と I B は Sudlow らにより、Site I、Site II 薬物に分類されているが、両者とも結合位置が疎水能の大きいフェニル基部分であった。これは本研究において [薬物] / [タンパク] の比がかなり大きいため、非特異的結合の寄与があるためと考えられる。A Z は 2 つの異なる芳香環を有するため、結合の主体がどちらの環に在るのか興味深い薬物であるが、結合位置はイミダゾール環メチル基部分であった (Chart I)。これは平衡透析法で得られた結合機構と一致する。A Z は滴定法で、イミダゾニウムの pK_a が 3.2 以下、プリン環が 8.0 であるため、 $pH=7$ では、プリン環は 1/10 がイオン型であり親水性を持つ。ゆえに、相対的に疎水能を有するイミダゾール環メチル基が疎水結合を示したと考えられる。B C は平衡透析法からイオンの結合機構を示したが、これは B C が分子中に 4 級窒素を有し、薬物そのものがイオン性を持つためである。しかし、等高線表示では疎水性を持つ芳香環の寄与も認められ、結合が分子全体に広がっていることを示した (Chart I)。これは B C 分子が連続した硬い環構造をもつためと考えられる。

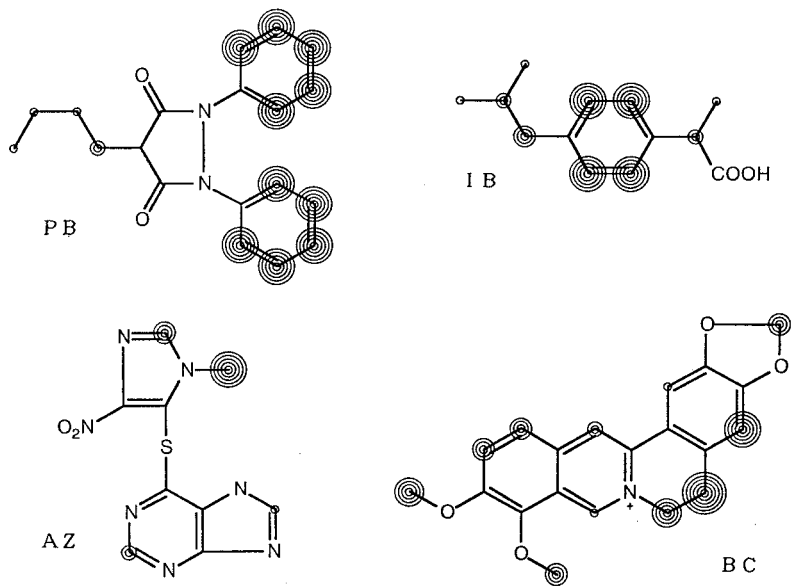


Chart I. Contour Plots of the Ratio of Spin-Spin Relaxation Rate of Bound Drugs to Free Drugs

References

- 1) G. Sudlow, D. J. Birkett and D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.*, 11, 824(1975).
- 2) O. Jardetzky, *Advan. Chem. Phys.*, 7, 499(1964).

P 6 メチルピリジン類とそのN-オキシド類の

^1H および ^{13}C NMRで観測される重水素同位体効果

名工大応化・* メニコンR&D

○中島康喜* ・ 鈴木恵子 ・ 福永守高 ・ 高橋憲助

Duterium Isotope Effects on ^1H and ^{13}C NMR

for Methylpyridines and Their N-oxides

* Yasuki Nakashima, Keiko Suzuki, Moritaka Fukunaga, and Kensuke Takahashi

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, and

* Menicon Co. Ltd. R&D Division

Duterium isotope effects on ^1H and ^{13}C NMR for methylpyridines and their N-oxides were investigated. One-bond shifts; $^1\Delta$ (^{13}C) in ring carbons of lutidines agreed with the simple additive rule of methyl substituent effects. On the other hand, their N-oxides did not. $^1\Delta$ (^{13}C) and $^2\Delta$ (^1H) in methyl groups reflect the steric interactions between methyl and N-oxide group

〔序〕

NMR化学シフトにおける重水素同位体効果（同位体シフト）は、スペクトルの帰属などに古くから応用されている。また、同位体シフトは、結合次数や結合定数など、幾つかの物理化学的パラメーターと相関を示すことが知られている。しかし、同位体シフトの起源は完全には解明されておらず、現在、集中的な研究と議論が行われている。我々はこれまでに、芳香族化合物の ^{13}C NMRの重水素同位体シフトを中心に、種々の同位体シフトを調べ、置換基効果の加成性や電子密度依存性^{1, 2, 3, 4)}、C-H結合距離依存性^{5, 6, 7)}などを解明してきた。本研究では、メチルピリジン類とそのN-オキシド類を取り上げた。これらの ^1H および ^{13}C NMRでの重水素同位体シフトを報告する。重水素標識は、環とメチル基に施した。よって、環の ^{13}C NMRのワンボンドシフト ($^1\Delta$)とメチル基の ^{13}C NMRの $^1\Delta$ 、 ^1H NMRの $^2\Delta$ が観測された。

環の ^{13}C NMRの $^1\Delta$ は、次のような変化を示した。ルチジン（ジメチルピリジン）では、メチル置換基効果に単純加成則が成立した。一方、ルチジンN-オキシドでは成立しなかった。メチル基の ^{13}C NMRの $^1\Delta$ は、N-オキシド類の2-メチルのみ、他と異なる挙動を示した。これは、2-メチルとN-Oの立体相互作用で説明できた。

キーワード：重水素、同位体効果、置換基効果、ピリジン、 ^{13}C NMR、 ^1H NMR

なかしま やすき すずき けいこ ふくなが もりたか たかはし けんすけ

メチル基の ^1H NMRの $^2\Delta$ も、立体相互作用を反映すると思われる挙動を示した。しかしこの挙動は、 ^{13}C NMRの $^1\Delta$ とは異なる。

〔実験〕

扱った化合物は、ピコリン、ルチジンとそれらのN-オキシドである。市販されていないルチジンN-オキシドは、対応するルチジンを酸化して得た。重水素標識化合物は、塩基存在下の重水によるH/D交換反応で用意した。NMR測定は、バリアンXL-200, Gemini-300, またはUNITY-400 FT-NMR分光計で行った。測定温度は室温(約22℃)である。測定試料は、H体とD体の混合物である。メチル基の ^{13}C スペクトル例をFig.1に示す。

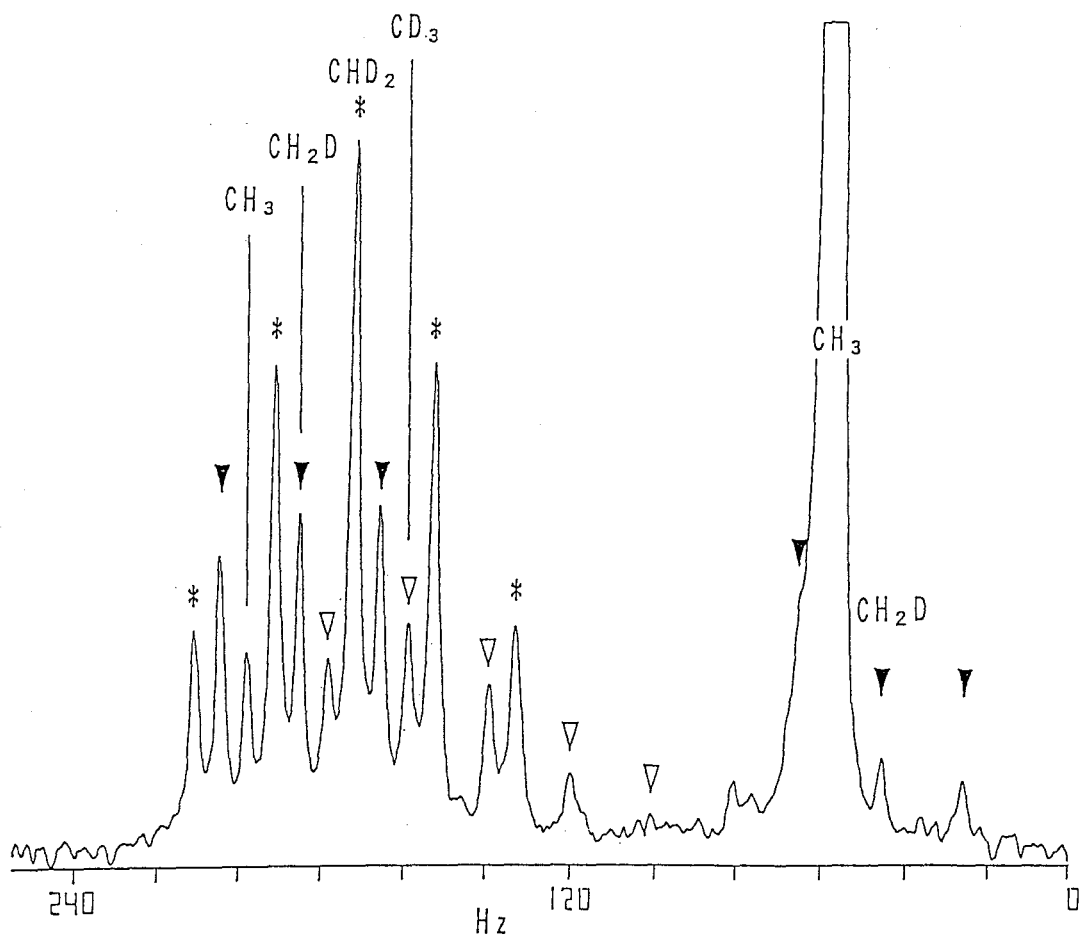


Fig.1 ^{13}C NMR Spectrum of 3,4-lutidine (methyl region).
Upper field : 3-Me, Lower field : 4-Me

〔結果と考察〕

同位体シフトは全部高磁場シフトであった。

① 環の¹³C NMRでの¹Δ

ピコリンとピリジンとの差を取ることで、¹Δに対するメチル置換基効果 (¹SIS; Substituent Isotope Shift) を見積もった。

¹SIS (ppb) は右のようであった。

¹SISと次式を使って、ルチジン (ジメチル体) の¹Δを計算した。

$${}^1\Delta_{\text{calc}} = {}^1\Delta(\text{無置換体}) + \sum {}^1\text{SIS}$$

ルチジン類では実測値と計算値は良く一致した。ルチジンN-オキシドでは一致は悪い。また、前者では、¹Δと¹J_{CH}との直線関係も得られた。

② メチル基の¹³C NMRの¹Δ

Table 1 に示すように、¹Δの大きさは重水素数に比例した。N-オキシドの2-Meの¹Δだけが他より小さい。CD₃で約100ppb小さいシフトである。メチル炭素の¹J_{CH}を測定すると、やはり、N-オキシドの2-Meだけが他と異なる挙動を示す。N-オキシド化で、ピリジン類の2-Meの¹J_{CH}は3~4Hz増大した。他のMeでは変化はない。重水素同位体シフトはC-HとC-D結合の伸縮振動の違いが原因といわれている。また、2-ピコリンN-オキシドでは、2-MeとN-Oとの間に立体的相互作用が存在するといわれている。よって、2-Meの小さい同位体シフトは、次のように説明できる。

	ピリジン	ピリジンN-オキシド
2-Me	± 0	+ 30
3-Me	- 2	- 13
4-Me	+ 1	- 2
5-Me	+ 24	+ 14

Table 1.

One-bond Deuterium Isotope Shifts in ¹³C NMR of Methyl Groups of Pyridines and Their N-Oxides in ppb.

	X = CH ₂ D	CHD ₂	CD ₃
(Methylpyridines)			
2-X	258	518	780
2-X, 3-Me	258	518	773
2-X, 4-Me	255	516	776
2-X, 5-Me	258	522	783
2-X, 6-Me	260	521	786
2-X, 4,6-Me ₂	261	522	786
4-X	266	528	790
4-X, 2-Me	255	522	781
4-X, 3-Me	262	524	786
4-X, 2,6-Me ₂	261	528	789
(Methylpyridine N-oxides)			
2-X	230	461	690
2-X, 3-Me	227	451	670
2-X, 4-Me	236	464	688
2-X, 5-Me	227	457	686
2-X, 6-Me	233	463	703
2-X, 4,6-Me ₂	237	468	694
4-X	257	514	774
4-X, 2-Me	260	518	779
4-X, 3-Me	251	496	748
4-X, 2,6-Me ₂	261	519	788

立体的相互作用がC-H結合の伸縮振動に影響した。
 立体効果によってC-H伸縮振動の幅が小さくなり、
 D置換された時の伸縮振動の変化が
 他の場合よりも小さくなり、その
 結果として¹Δが小さくなった。

Table 2.

Two-bond Deuterium Isotope Shifts
 in ¹H NMR of Methyl Groups of
 Pyridines and Their N-Oxides in ppb.

③ メチル基の¹H NMRの²Δ

Table 2 に示すように、メチル基の¹Hで観測される²Δは重水素数に比例する。²Δは小さく、大きな変化はない。しかし、2, 3-ルチジンN-オキシドの2-Meでは他と異なる値が得られた。この2-Meは、N-Oと3-Meにはさまれる位置にある。なんらかの立体的な寄与が、他よりも大きな²Δを与えたと考えられる。立体的効果で²Δが増大したことは、¹³Cでの¹Δの場合と逆である。

	X = CH ₂ D	CHD ₂
(Methylpyridines)		
2-X	16	32
4-X	15.5	31
2-X, 3-Me	17	34
2-X, 5-Me	16	32
(Methylpyridine N-oxides)		
2-X	15	30
3-X	15	30
4-X	15.5	31
2-X, 3-Me	18	37
2-X, 5-Me	15	30
3-X, 2-Me	16	30
3-X, 4-Me	15	30
3-X, 6-Me	15	--
4-X, 3-Me	15	31

[謝辞]

300および400MHz¹H NMR測定をして頂きました バリアン インストルメンツ リミテッド の串田克彦氏、小野明氏に感謝いたします。

[References]

- 1) 中島ら、第28回NMR討論会講演要旨集 p. 249 (1989)
- 2) Nakashima et al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 1401 (1989)
- 3) Nakashima et al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 63, 2025 (1990)
- 4) Nakashima et al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 64, 3694 (1991)
- 5) 中島ら、第30回NMR討論会講演要旨集 p. 129 (1991)
- 6) Nakashima et al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 64, 3166 (1991)
- 7) Nakashima et al. Bull. Chem. Soc. Jpn., 65, in press (1992)

P 7 1 軸勾配磁場を用いた Gradient-enhanced NMR

日本電子(株)、○内海 博明、気田 佳喜、池田 博、長谷川 憲一
日 元 徹、樋口 啓一郎、今成 司

Gradient-enhanced NMR at Z-axis

Hiroaki Utumi, Yoshiki Kida, Hiroshi Kida, Keniti Hasegawa,
Tetsu Hinomoto, Keiiti Tsuru, Mamoru Imanari
(JEOL Ltd. Akisima, Tokyo 196, Japan)

A specific coherence pathway can be selected by combination of field gradient pulse in 1 scan experiment. Therefore, the experiment using field gradient pulse is one of the important methodology in NMR spectroscopy. However, conventional phase sensitive techniques, TPPI and State method, can not be applied for some 2D NMR experiments with field gradient pulse. We tried to apply time reversal method proposed by Nagayama for phase sensitive HMQC experiment with field gradient pulse, and got good result.

In pulsed field gradient experiment, elimination of unwanted signal is another important purpose. We, therefore, propose a pulsed field gradient 2D NMR experiment in combination with phase cycle of RF pulse in order to eliminate unwanted signal from 2D NMR spectrum.

1 ; 序論

近年、コヒーレンス移動の径路の選択に傾斜磁場パルス (field gradient pulse) を用いることが試みられている。この、傾斜磁場パルスを用いた径路選択は、従来のラジオ波パルスの位相回しを用いて行う径路選択に比較して、次の点で優れている。

(1) 理論的には1回積算で、希望する径路を選択できる為、十分なサンプル濃度さえあれば、1回積算で多量子遷移を選択することができる。これは、多次元nmrの測定時間の大幅な短縮を意味する。

(2) 径路選択が、ラジオ波の位相回しに比較してより完全に近いので、DQF-COSY, HMQC等の測定における不要信号の消去が容易である。

勾配磁場パルス、純吸収波形二次元、HMQC,

うつみ ひろあき、きだ よしき、いけだ ひろし、はせがわ けいいち、
ひのもと てつ、ひぐち けいいちろう、いまなり まもる

しかしながら、まだ、いくつか問題が残っている。特に問題なのは ^1H 観測異種核相関スペクトル (HMQC etc) において、従来方法 (TPPI, State-method) で純吸収波形 (pure-absorption) の2次元スペクトルを得るには、難しいことである。

今回、我々は500MHz narrow bore 超伝導磁石 対応の field gradient system を作成し、多次元nmrの中で重要な測定法の一つであることを考え、できるだけ短い時間で、pure-absorptionのfield gradient HMQC (FG-HMQC) の測定することを試みた。

2 ; 実験方法

nmr装置は、日本電子製A-500を用いた。サンプルは、180mm Cholesterol in CDCl_3 を用いた。field gradient は、z軸に+- 144G/cmかけることができる。また、スペクトルの処理に関しては、一部、日本電子製MolSkopシステムを用いた。

3 ; 実験結果及び考察

a ; 必要な勾配磁場の強度

通常、勾配磁場をかけた場合の信号は式 (1) で表される。

γ ; 磁気回転比

G ; gradientの大きさ

Z ; Z方向の位置

τ ; gradient をかけている時間

$$A = \int_{-a}^a \exp(-i\gamma G Z \tau) dZ = \frac{2}{\gamma G \tau} \sin(\gamma G a \tau) \cong \frac{2}{\gamma G \tau} \times 0.637$$

この式より勾配磁場をかけない場合の信号強度の比をとると、勾配磁場による信号消去率が求められる。

$$A/A_0 = 0.637 / a\gamma G \tau$$

この式に次の値を代入すると

$$a = 3.5 \times 10^{-3} \text{ m}$$

$$\gamma = 26.751 \times 10^{-7} \text{ rad/Tsec}$$

$$\tau = 1 \text{ msec}$$

信号消去率と勾配磁場の強度は次の関係にある。

$$A/A_0 = 6.803 \times 10^{-4} / G$$

さて、 ^1H 観測の ^1H - ^{13}C 相関nmrにおいては、信号消去率は次の要因を考える必要がある。

(1) ^{13}C の天然存在比1.1%

当然のことながら、 ^{12}C の信号は十分に消去しなければならない。

(2) 観測信号の信号の最大最小比 8 ;

1

通常の ^1H 信号は、今回使用した Cholesterolのように信号強度にかなりの差がある(たとえば、一重線 CH_3 と多重線の CH の比率など)。

これらの、関係を計算すると、信号消去率は、最低でも 1.4×10^{-3} 程度必要であり、勾配磁場としては、約 48G/cm は必要となる。

一方、絶対値表示のFG-HMQCでは、fig.1

の脉冲系列を用いる。この脉冲列においては、 $G_1; G_2=2;1$ の関係にある場合、 ^1H - ^{13}C HMQCの信号を生じる。2個の G_1 のgradientは、 ^1H に関してgradient echoを生じるにすぎないので、 G_2 のgradientのみが、不要信号の消去に関係する。fig.2に $G_2=28.8\text{G/cm}$ を、fig.3に $G_2=43.2\text{G/cm}$ の1scan、位相回し無しの絶対値表示のFG-HMQCスペクトルを示す(1024X128測定時間128sec)。

fig.2をみて判るように、勾配磁場が不十分であると、f1軸に零信号が生じる。この、零信号は基本的に不要信号の1つであるため、1scanでFG-HMQCを測定するために基本的な問題となる。その解決手段として、fig.1の脉冲系列の最初の ^{13}C の脉冲の位相と、積算位相を t_1 を増やすごとに、 180° ずつ増やすと、零信号はf1軸の両端に移動する(fig.4 $G_2=28.8\text{G/cm}$)。このようにすれば、消え残り信号も、解析の障害にならない。

b ; pure-absorptionのFG-HMQC

pure-absorptionのFG-HMQCは、fig.5の脉冲系列を用いた。この脉冲系列に

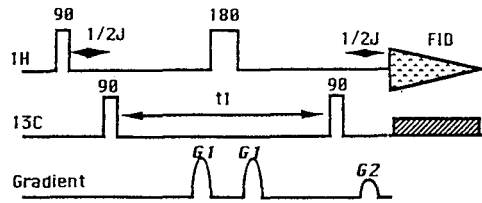


fig1 絶対値表示 FG-HMQC脉冲系列

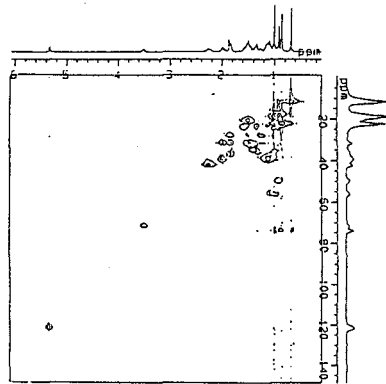


fig.2 $G_1=57.6\text{G/cm}$, $G_2=28.8\text{G/cm}$ の絶対値表示FG-HMQCスペクトル。f1軸に零信号が生じている。

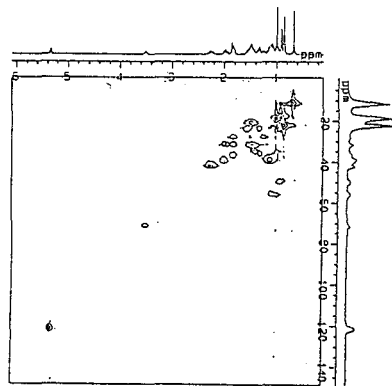


fig.3 $G_1=86.4\text{G/cm}$, $G_2=43.2\text{G/cm}$ の絶対値表示FG-HMQCスペクトル。f1軸の零信号が消えている。

において、 $G1-G2;G3=2;1\text{ or }2;-1$ でHMQCが測定できる。また、 $2;1$ でp-type, $2;-1$ でn-typeの2次元となる。ここで、用いた $G2$ の勾配磁場パルスは ^{13}C の 180° パルスの不完全性を打ち消すために用いる。ちなみに、 $G2=0$ とすると、再び $f1$ 軸に零信号が生じる。pure-absorptionの方法としては、p-type,n-typeの信号を別々に測定し、n-typeの信号を $f1$ 軸で時間反転させてp-typeの信号と足し合わせるNagayama methodを用いた。また、 $f1$ 軸の位相補正に関してはHilbert変換を用いて行った。pure-absorption FG-HMQCスペクトルをfig.6に示す

($G1=63.3\text{G/cm}, G2=5.76\text{G/cm}, G3=28.8\text{G/cm}, 1024\times 256$ 1scan 測定時間512sec)。

まとめ

このように、我々は、1scanでpure-absorption FG-HMQCを測定することができた。今後、多次元nmrに拡張し、より短時間で測定できるように試みつもりである。

参考文献

- (1) R.E.Hurd, J.Magn.Reson 91,648(1991)
- (2) A.L.Davis, J.Magn.Reson 98,207(1992)
- (3) J.R.Tolman, J.Magn.Reson 98,462(1992)
- (4) K.Nagayama, J.Magn.Reson 66,240(1986)
- (5) J.Boyd, J.Magn.Reson 98,660(1992)

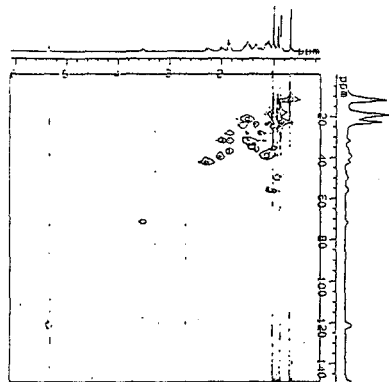


fig.4 $G1=57.6\text{G/cm}, G2=28.8\text{G/cm}$ の絶対値表示FG-HMQCスペクトル。位相回しを併用し、 $f1$ 軸の零信号を移動させた。

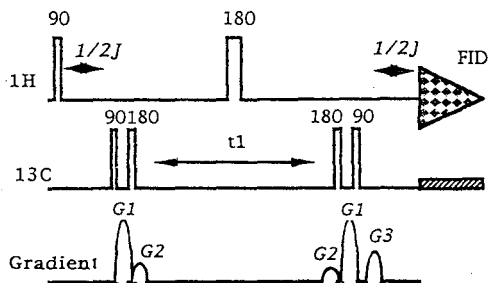


fig.5 純吸収波形測定のためのFG-HMQCパルス系列

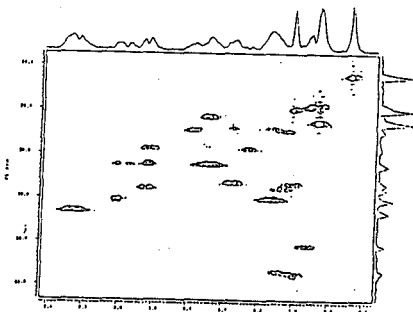


fig.6 純吸収波形のFG-HMQCスペクトル

P 8 TOSS/deTOSS法を利用した分子の微細構造の検討法

大塚電子株式会社 MR技術部

◇ 仲村高志、山田浩美、中本弘幸、篁 進、三浦巖

Molecular fine structure determination using 2D MAS NMR
TOSS/deTOSS

Takashi Nakamura, Hiromi Yamada, Hiroyuki Nakamoto,
Susumu Takamura, and Iwao Miura

(Otsuka Electronics Co., Ltd. MR Technical Division)

Several years ago, Kolbert and Griffin described a two-dimensional (2D) magic angle spinning nuclear magnetic resonance experiment which yields a complete separation of isotropic and anisotropic chemical shifts. This experiment is based on TOSS sequence and needs a pulse sequence has no external equipments about 2D experiments. We improve their sequence and describe method about a determination of chemical shift tensor value. Practical application of this method are demonstrated with ^{13}C spectra of the Hexamethylbenzene and the p-Methoxybenzoic Acid.

1. はじめに

固体高分解能NMRが発表されてからすでに十数年が経過し、その代表的な手法であるCP/MAS (Cross-Polarization/Magic-Angle Spinning)法[1]は、もはや一般のNMR装置で測定できる手法である。しかし、この高分解能にする手法は固体が本来持っている豊富な情報を失ってしまう。化学シフトの異方性もその大きな情報の一つである。化学シフトの異方性を測定することは、対称となる物質のそれぞれの原子のミクロな情報を得る大きな手掛かりとなる。そこでこれら固体状態で特有の情報を失うことなく測定したいという研究者の努力によってSASS (Switching Angle Sample Spinning)法[2,3]をはじめとするいくつかの方法[4-11]が提案され、そのうちのいく

キーワード：固体NMR、2次元NMR、化学シフト異方性、TOSS、MAS

なかむら たかし、やまだ ひろみ、なかもと ひろゆき、たかむら すすむ、みうら いわお

つかは化学シフトの等方性と異方性を分離して観測することの出来る2次元NMR [2,4-12]として発表された。しかし、それらの手法のほとんどは特殊な装置が必要となり、スピニングの角度をパルスシーケンスの中で変更したり[2,3,5-7]、回転スピードをパルスシーケンスの中で変更しなければならない[8,9]。そこで標準の装置で実行の可能な実験方法として考えられるものは回転に同期したパルスを使用する方法 [4,10]と、TOSS[12,13]を基本としたパルスシーケンスを用いたもの[11]で、化学シフトの異方性が t_2 軸に、等方性が t_1 軸に観測される。この方法は、現在、TOSSを実施できる装置であれば実験可能なもので、非常に実用性の高いものと言える。このTOSS/deTOSS法によって、固体の持つ本来の情報がどこまで解析できるかについて検討する。

2. 実験

試料は ^{13}C -CP/MASを観測するための標準試料であるHexamethylbenzene(Aldrich Chem. Co.)およびアニス酸(p-Methoxybenzoic Acid; Wako Pure Chem. Indust. Ltd.)を用いた。装置はChemagnetics社製CMX-400で測定した。

3. 結果および考察

TOSSを実施する場合には、特に $\pi/2$ パルスと π パルスを正確に設定する必要がある、標準となるサンプルで十分なシグナルが得られるまで設定する(Fig.1)。Fig.2はHexamethylbenzeneの測定結果でCH₃とベンゼン環の化学シフトの等方性と異方性がそれぞれ観測されていることが確認できた。Fig.2-bが示すようにベンゼン環のスピニングサイドバンドはほぼ化学シフトの異方性を示す形になってきている。Fig.3はアニス酸を測定したものだが、等方性と異方性はそれぞれ観測されているもののスピニングのスピードが早くあまりよい結果とならなかった。しかし、それぞれのピークがどの原子にあたるかの帰属は行なえそうである。また、スピニングのスピードが遅い場合には、感度が低くサイドバンドの観測されないピークがあった。スピニングスピードを低速にし、かつ分離のよいスペクトルを得ることについての議論と、サイドバンドパターンからのより詳細な議論については会場で行ないたい。

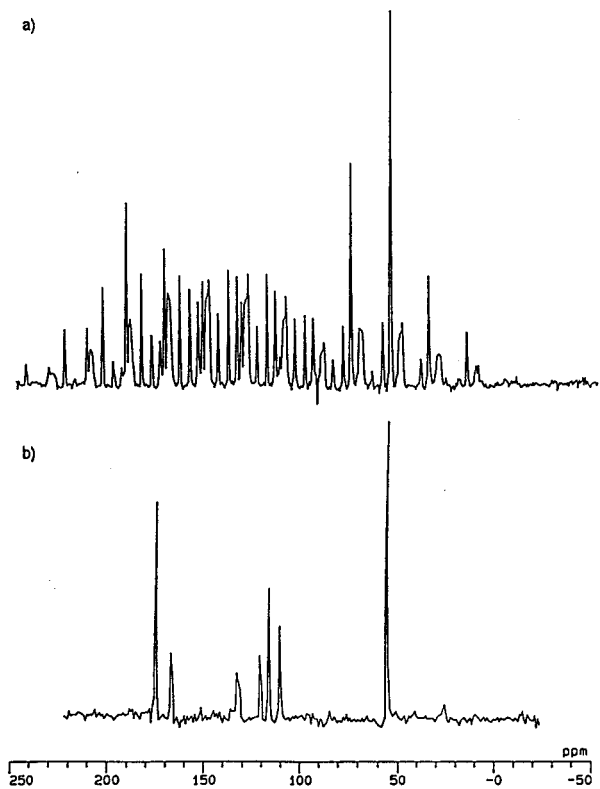


Figure. 1 ^{13}C NMR spectra of p-Methoxybenzoic Acid
 The magic angle spinning rates 2000Hz
 a) CP/MAS b) CP/MAS with TOSS

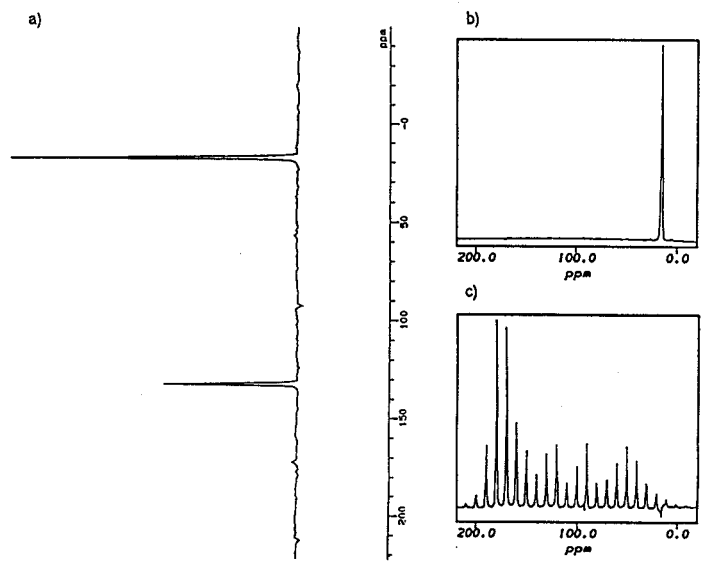


Figure. 2 ^{13}C CP/MAS Spectra of Hexamethylbenzene
 The magic angle spinning rates 4000Hz

5. 文献

- [1] J.Schaefer and E.O.stejeskal, *J.Am.Chem.Soc.* **98**, 1031 (1976).
- [2] T.Terao, T.Fujii, T.Onodera, and A. Saika, *Chem.Phys. Lett.* **107**, 7311 (1984).
- [3] J.Ashida, T.Nakai, and T.Terao, *Chem. Phys. Lett.* **168**, 523 (1990).
- [4] A.Bax, N.M.Szeverenyi, and G.E.Maciel, *J.Magn.Reson.* **51**, 400 (1983).
- [5] A.Bax, N.M.Szeverenyi, and G.E.Maciel, *J.Magn.Reson.* **52**, 147 (1983).
- [6] A.Bax, N.M.Szeverenyi, and G.E.Maciel, *J.Magn.Reson.* **55**, 494 (1983).
- [7] G.E.Maciel, N.M.Szeverenyi, and M.Sardashti, *J.Magn.Reson.* **64**, 365 (1985).
- [8] R.C.Zeigler, R.A.Wind, and G.E.Maciel, *J.Magn.Reson.* **79**, 299 (1988).
- [9] A.C.Kolbert, H.J.M.de Groot, and R.G.Griffin, *J.Magn.Reson.* **85**, 60 (1989).
- [10] R.Tycko, G.Dabbagh, and P.A.Mirau, *J.Magn.Reson.* **85**, 265 (1989).
- [11] A.C.Kolbert and R.G.Griffin, *Chem.Phys. Lett.* **166**, 87 (1990).
- [12] W.T.Dixon, *J.Magn.Reson.* **44**, 220 (1981).
- [13] W.T.Dixon, J.Schaefer, M.D.Sefcik, E.O.Stejeskal, and R.A.McKay, *J.Magn.Reson.* **49**, 341 (1982).

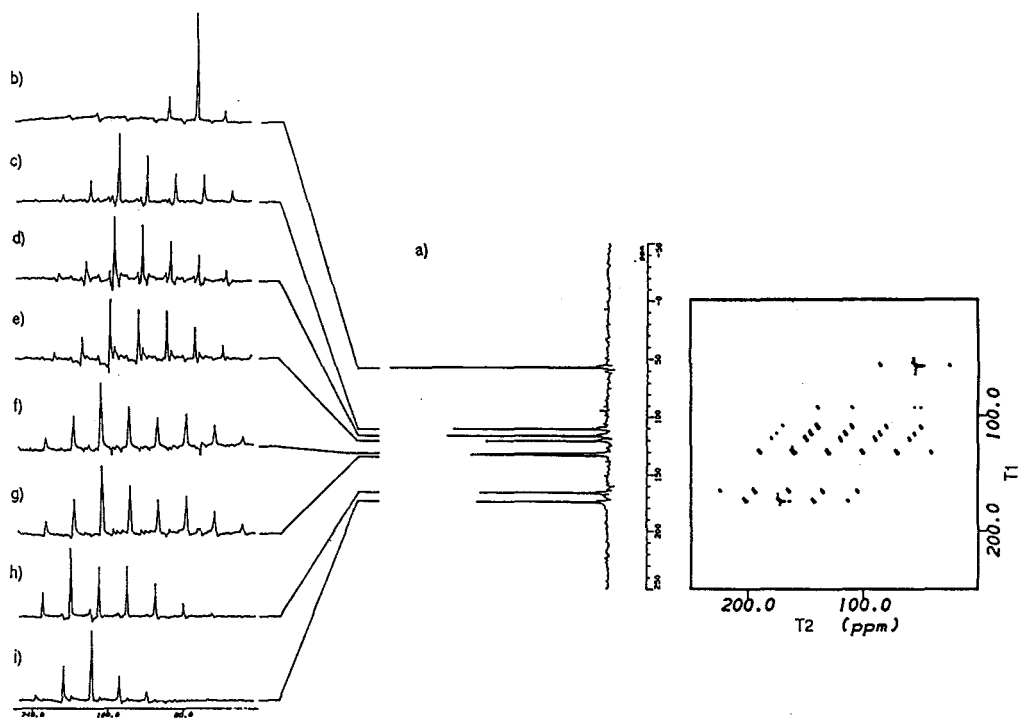


Figure. 3 2D spectra of p-Methoxybenzoic Acid
 The magic angle spinning rates 5000Hz
 a) TOSS b) -j) Side band pattern

(島津製作所) ○大藪又茂 大野靖 寺下衛作

Applications of Shaped Pulses to High Resolution NMR Spectroscopy

(SHIMADZU CORPORATION) Matashige Oyabu, Yasushi Ohno, Eisaku Terashita

2D NMR experiments are usually carried out using high power short pulses to excite entire spectral range. However they have drawbacks of the need of large data memory and long experimental time to increase f1 digital resolution. Recently the use of shaped pulses has become more popular on commercial spectrometers and it can reduce the spectral range and consequently improve the digital resolution. Applications of purged half Gaussian pulse to phase-sensitive DQF-COSY are shown here. The fine structures of cross peaks, where no phase distortion is, can be observed for short experimental time with purged half Gaussian pulse.

《序論》

2次元NMRの測定は一般に高出力のいわゆるハードパルス(～数十usec)により、試料の周波数全域を励起して行われる。そのため、分子内の相関の情報を一回の測定で得ることができるが、反面、f1側の分解能を向上させるためには測定に時間がかかる、大容量のコンピュータメモリーを必要とする、などの欠点を持っている。また、測定目的によっては必ずしも全周波数領域の2次元測定の必要がない場合がある。このような問題に対応するために、特定のスピンのみを選択的に励起して、限定された周波数領域のみの2次元スペクトルを測定する手法が多く提案されてきている。選択励起の方法としては、選択性や位相特性に優れたshaped pulsesの使用が望ましいが、これらのパルスの発生は最近の市販の装置で容易に可能になりつつある。本講演では、shaped pulsesのなかでも位相特性に優れたpurged half Gaussian pulseの利用によりf1側の分解能向上をめざしたphase-sensitive 2次元測定例を紹介し、shaped pulsesの有用性を検討したい。

Key words; selective excitation, shaped pulse, purged half Gaussian, DQF-COSY

おおやぶまたしげ、おおのやすし、てらしたえいさく

《実験》

1. 装置

測定には島津／GE製FT-NMR装置 Omega 400WBを使用した。half Gaussianパルスの発生は、プログラムで計算した数値テーブルをパルスシーケンスソースファイルに組み込むことにより行った。このテーブルでは、波形の立上がりは0.1%レベルから、時間分解能は400ポイントと設定した。これらのデータはコンパイラにより波形メモリーにロードされ、シーケンス実行の際に、モジュレータが制御されてhalf Gaussian pulseが発生される。

2. 試料

ストリキニーネ45mgを0.5ml 重クロロホルムに溶解し、5mm サンプルチューブで測定した。ストリキニーネの構造式を図1に示す。ストリキニーネの分子式は、 $C_{21}H_{22}N_2O_2$ 、分子量は334.42である。

《測定結果と考察》

1. purged half Gaussian pulseの励起特性

様々な波形の選択励起パルスの特性については、すでに詳細に検討されているが、⁽¹⁾ここでは我々が作成したプログラムに基づき、half Gaussian pulse についてその特性を再掲したい。図2の(a)にhalf Gaussian (b)にはpurged half Gaussian の波形を示した。(b)においては不要磁化をキャンセルするためにパージパルスの位相を $\pm X$ として2回積算する必要がある。(a)、(b)それぞれについて励起特性を磁場強度1.5Hzとしてシミュレーションした結果を M_x 、 M_y および $\sqrt{M_x^2 + M_y^2}$ 成分について図3に示した。

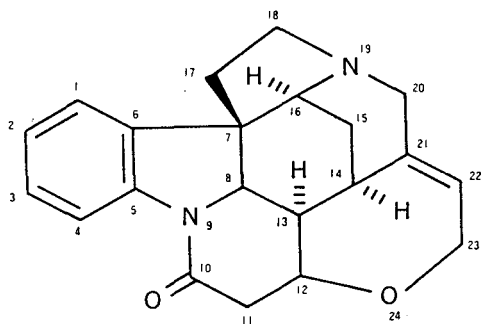


Fig.1 Strychnine

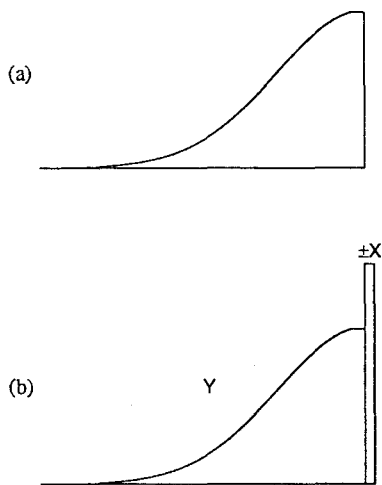


Fig.2 Half Gaussian(a) and purged half Gaussian(b) pulses

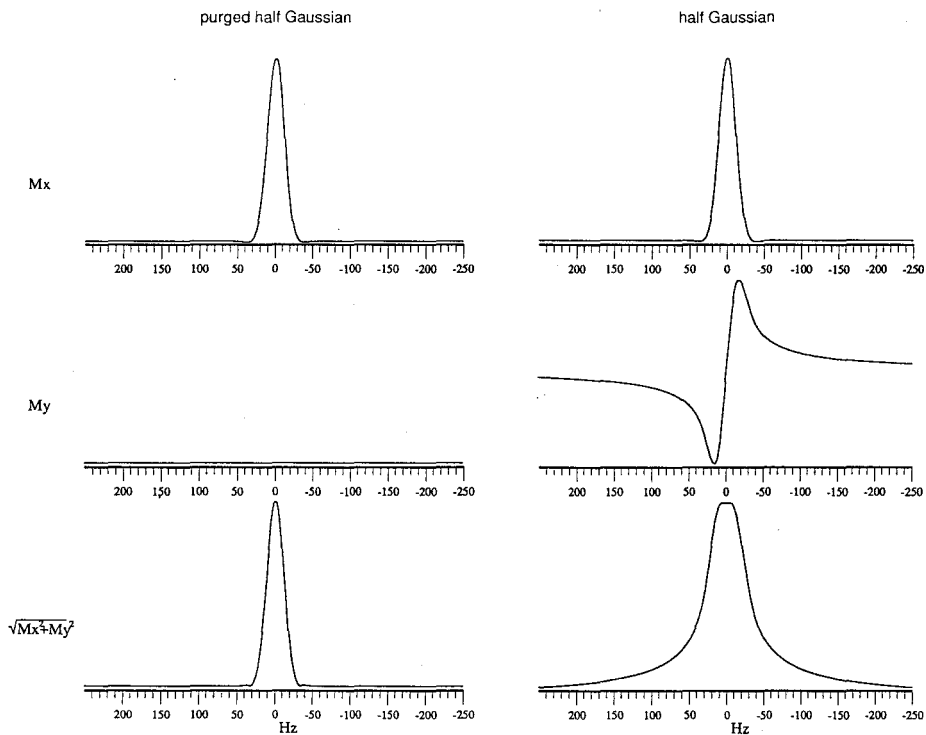


Fig. 3 Simulated excitation profiles of purged half Gaussian and half Gaussian pulses

purged half Gaussian pulseでは 90° パージパルスにより M_y 成分が消去され、同時に良好な選択性を示している。(Gaussian pulseに比べても、選択性は2倍向上することが知られている。) M_y 成分の消滅は、purged half Gaussian pulseを2次元測定 of 励起パルスとして使用した場合には、 t_1 の第一インクリメントにおいて展開時間をゼロと仮定でき、その結果 f_1 方向に位相歪みの少ないスペクトルを得ることが期待される。

2. phase-sensitive DQF-COSYへの応用

パルスシーケンスは第一励起パルスのみが50msecのpurged half Gaussian pulseに置き換えられている。位相回しは基本的には通常のDQF-COSYと同じであるが、パージパルスの付加の分だけ、積算回数は2倍になる。ストリキニーネ(図1)の15の ^1H (2.34ppm)を選択的に励起してDQF-COSYのスペクトルを得た。 t_1 のインクリメントは2msec \times 256回行った。 f_1 側の分解能はゼロフィリングなしで1.95Hz/ポイントとなる。このデータに処理を施し、 t_1 インクリメント64回、128回、256回のデータを作成し、それぞれを比較した様子を図4に示す。通常の2次元測定 of f_1 側の分解能は図4の(a)(分解能7.8Hz)に相当するが、微細構造を十分再現しているとは言えない。一方(b), (c)では、交差、対角ピークともに微細構造の観測がさらに可能になっており、選択励起の有効性が示されている。

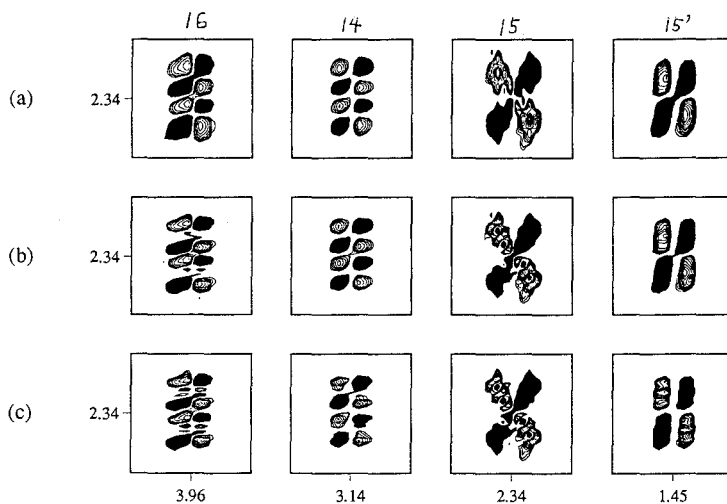


Fig.4 f1 resolution dependence of DQF-COSY spectrum
 f2 resolution; 3.9Hz. f1 resolution before zerofilling; (a)7.8Hz,
 (b)3.9Hz and (c)1.95Hz. Window function; sinsquare 45deg. shifted
 for both dimintions. Each final data size is same by zerofilling
 to 2k x 512.

J. CavanaghらはすでにGaussian pulseを使用したphase sensitive DQF-COSYの測定例を報告しているが、⁽²⁾ 我々のデータはこれらのデータに比べても、位相歪みの少ないもので、パージパルスの効果が良く現れているものと考えている。

《結語》

purged half Gaussian pulseを2次元シーケンスの励起パルスに組み込むことにより、位相歪みの少ない選択励起2次元スペクトルを得ることができる。その結果、スペクトルの微細構造を観測することが可能になる。

《参考文献》

- 1) H. Kessler, S. Mronka and G. Gemmecker, Magn. Reson. Chem., 29, 527(1991)
- 2) J. Cavanagh, J. P. Waltho and J. Keeler, J. Magn. Reson., 74, 386(1987)

《謝辞》

本研究を進めるにあたり測定に協力して頂いた大日本印刷株式会社中央研究所後藤貴和氏に感謝いたします。

P 10 固体重水素 NMR による吸湿性有機 固体中の水の運動

アップジョン ファーマシューティカルズ リミテッド

○ 梶山行雄, 野呂優規美, Michael D. Likar, Paul E. Fagerness

Water dynamics by solid state deuterium NMR of hygroscopic organic solids.

Control Research and Development, Tsukuba Research Laboratories

Upjohn Pharmaceuticals Limited, Tsukuba, 300-42

Yukio Hiyama, Yukimi Noro, M.D.Likar and P.E.Fagerness

Solid deuterium NMR spectra of hygroscopic organic solids (U-63,366F, U-67,590A and U-74,006F) have been recorded at various water contents at room temperature. The organic materials absorb and lose water in minutes according to the relative humidity of the environment, The samples were prepared under humidity chambers of D₂O atmosphere. Lineshapes of the deuterium NMR are vastly different from sample to sample. One showed a near static powder pattern with 140 kHz quadrupole splitting. Another gave a sharp Lorentzian of less than 3kHz. Spin-lattice relaxation times other than the broad component were less than 20 ms, which indicates that a fast motion (likely C₂ flips) occurs close to T₁ minimum. At the same time a significant echo loss was observed for the component with short T₁. The solid state deuterium spectra were obtained on a modified Bruker AM-300 with BC-140 fast digitizer and with a Doty Scientific single tuned probe.

薬品を開発する上で原薬といわれる薬分子の固体が吸湿性であると以下の問題に突き当たることが多い。

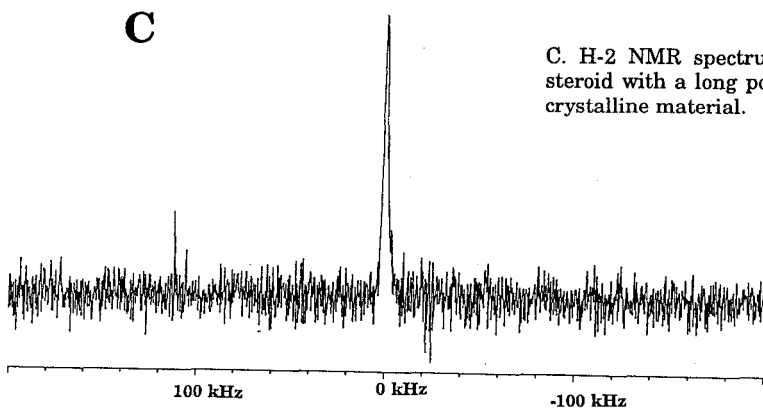
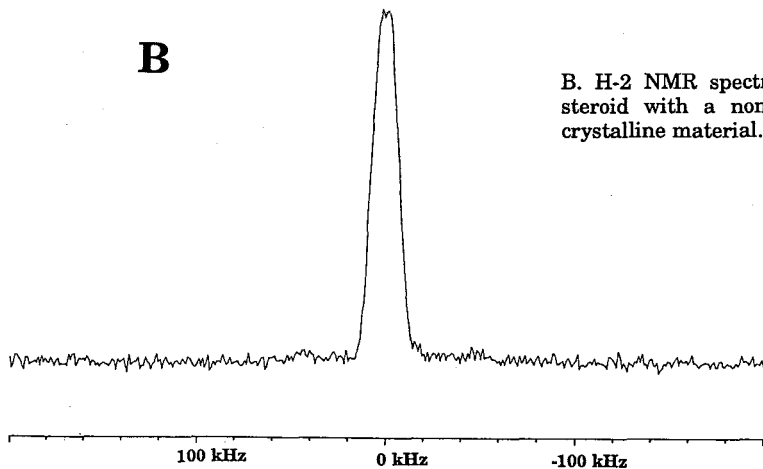
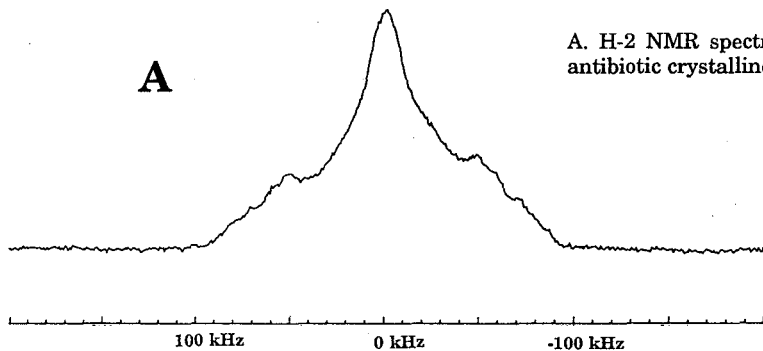
- (1) 環境湿度変化により分単位で吸排水が生じ大きな重量変化を引き起こす。これにより、分析値、製品中の薬の含量にずれが起こる。
- (2) 固体中で加水分解が生じ、製品としての有効期間が短くなる。
- (3) 吸湿により物理的形狀が変化し、取り扱いが困難になる。

キーワード: 固体重水素 NMR, 吸湿性薬物, 分子運動

○ ひやまゆきお, のろゆきみ, マイケル・ディ・ライカー,
ボール・イー・ファガーネス

吸湿性と水分子の運動性の相関を検討するため、我々が現在抱えている吸湿性薬物を選び水分子の固体重水素 NMR を測定した。

同程度の含水量であってもパウダースペクトルは、static な Pake Doublet から液体のスペクトルに近いもの（3kHz 以下の線幅）のものまであった。



アップジョン ファーマシューティカルズ リミテッド

○野呂優規美, 小形稔, 楡山行雄, Paul E. Fagerness

Introduction of the reverse mode function into an old NMR Equipment.

Upjohn Pharmaceuticals Limited, Tsukuba 300-42

Yukimi Noro, Minoru Ogata, Yukio Hiyama, Paul E. Fagerness

Recently the reverse NMR method has been remarkably developed because the correlation between proton and heteronuclei (^{13}C , ^{15}N , etc.) can be detected with higher sensitivity. The Bruker AM 300 model NMR, which was purchased six years ago, was not equipped with the apparatus for reverse mode detection. We reconstructed this model to add reverse mode functions. This hardware had the following difficulties for the reverse mode; 1. The proton-detection is impossible. 2. The decoupling of heteronuclei is not performed effectively. We conquered them, and introduction of the reverse mode function was completed successfully without any influence to the normal mode.

プロトン検出のいわゆるリバース検出法は、 ^{13}C や ^{15}N などの多核と ^1H との相関を、古典的な測定に比べ、 ^{13}C では約8倍、 ^{15}N では約30倍と高感度に測定できるので、ここ数年大きく発展した。新しい市販の装置では、ボタン一つで通常モードとリバースモードが切り替わり大変便利になっている。ところが6年前に購入した市販の装置ではリバースモードのことがほとんど考慮されておらず、ハードウェアにおいても

- (1) プロトン検出ができないこと
- (2) ヘテロ核を有効にデカップルできないこと

以上の二つの問題があった。

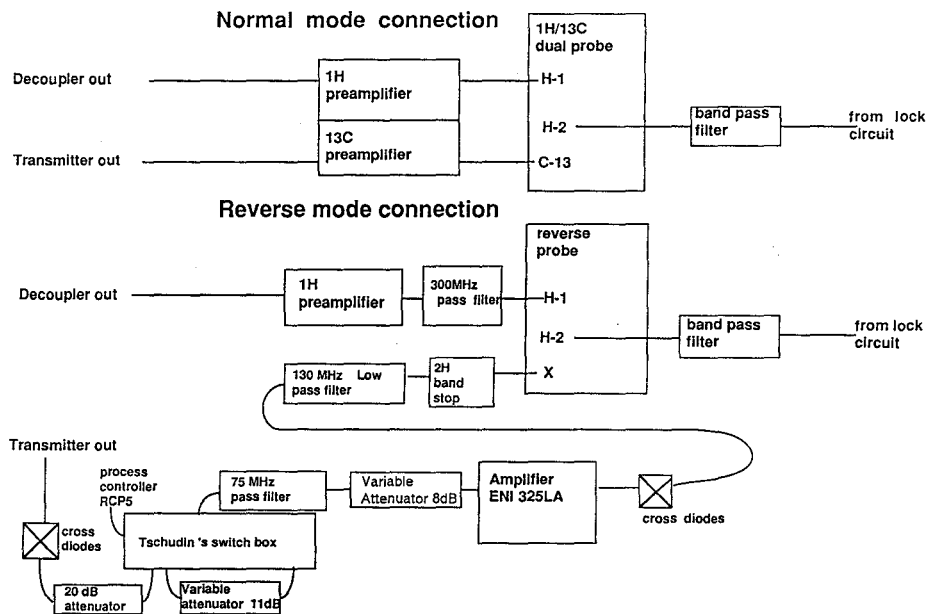
キーワード: リバース検出法, 改造

○のろゆきみ, おがたみのる, ひやまゆきお, ボール・イー・ファガーネス

我々は1985年製ブルカーAM300にリバース機能を付加すべく下記のことを行った。

1. メーカー供給の回路図と実際のハードウェアとの比較
プロトン検出用の局部発信器、リレー等回路図にはないものを「発見」し改造が容易であることを確認
2. リバースプローブ、外付用アンプ、アナログスイッチ等を調達
リバースプローブ; IR-50 probehead (Cryomagnetic System)
外付用アンプ ; 325LA power amplifier (ENI)
アナログスイッチ; the switch box (Tschudin Associates)
その他 ; 減衰器 (多摩川電子) 他
3. コンソール内の配線をリバース対応に変更
4. 標準サンプルを用いてのキャリブレーション。
標準サンプルとして、硝酸ナトリウム- ^{13}C 標識化合物の重水溶液を用いた。

元々の通常モードにも影響を与えることもなく改造は成功した。



固体重水素 NMR 機能の導入
” 液体用 NMR の改造 ”

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, 野呂優規美, Paul E. Fagerness

Introduction of Solid Deuterium NMR Functions into Liquid NMR Spectrometer

Control Research and Development, Tsukuba Research Laboratories

Upjohn Pharmaceuticals Limited, Tsukuba, 300-42

Yukio Hiyama, Yukimi Noro, Paul E. Fagerness

Solid deuterium NMR is a very powerful method to investigate molecular dynamics of specific site by deuterium-labeling. In order to introduce the solid deuterium NMR functions into the liquid NMR machine, there are some issues to be resolved, such as 1) high speed data acquisition, 2) high power pulse, and 3) wide band width in a receiver. We introduced a high speed A/D converter for high speed data acquisition and a high power amplifier to obtain enough power for pulse. Duplexer for liquid NMR was skipped to improve power loss. We observed that solid deuterium NMR could be measured even with the narrow band width of the receiver for liquid NMR.

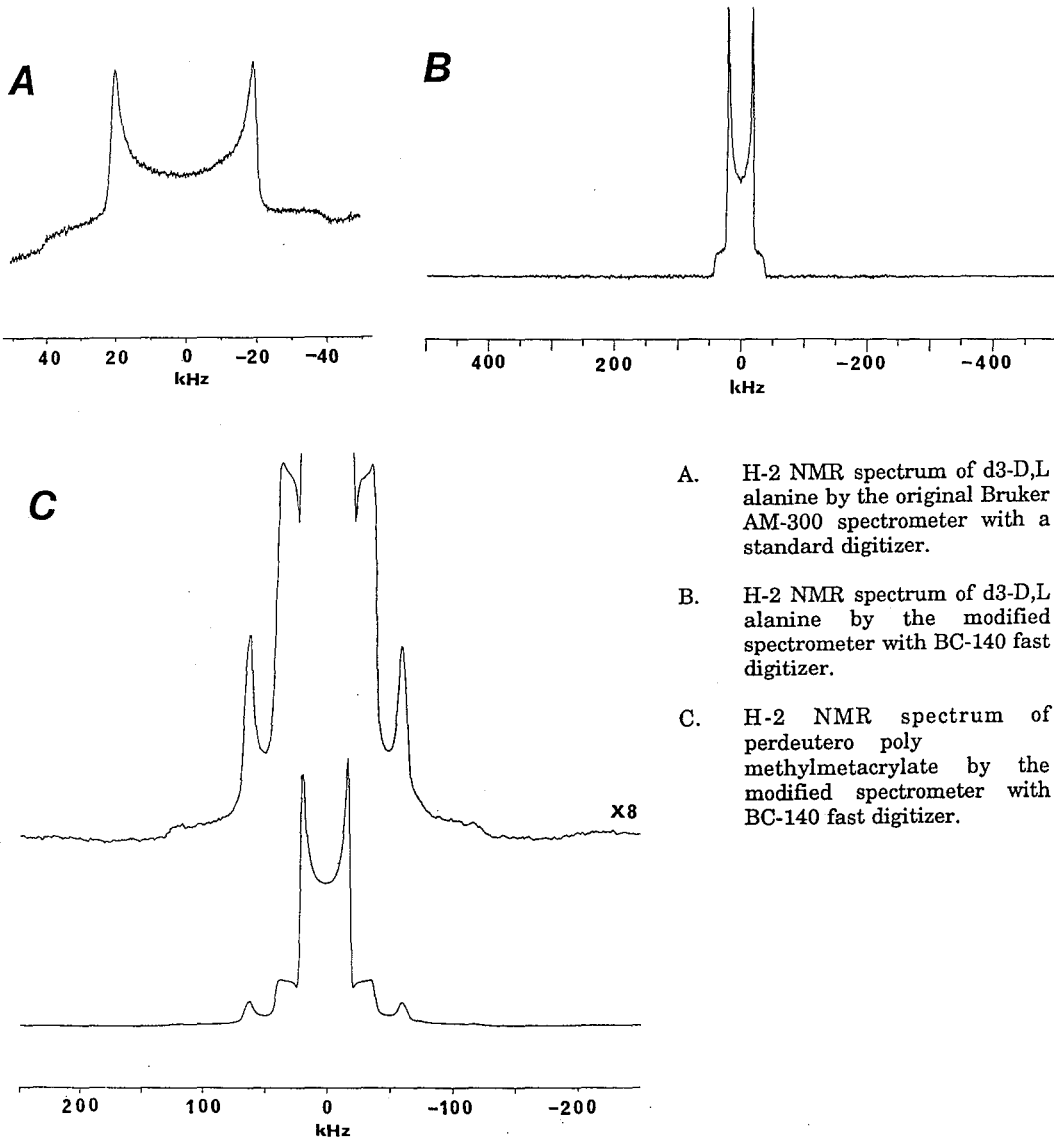
固体重水素 NMR は、分子運動を同位体ラベル導入で特定部位を詳細に研究できる非常に有用な方法である。ところが、液体用 NMR では、(1) データの高速取り入れができない、(2) 送信器から十分なパワーがでない、あるいはパルス形状がきたない、(3) 受信側のバンド幅が狭い / 高耐圧でない、といった問題がある。プローブそのものは、簡単なシングルチェーンであるので問題は少ない。

キーワード: 固体重水素 NMR, 改造

○ ひやまゆきお, のろゆきみ, ポール・イー・ファガーネス

我々は、1985年製、ブルカーAM300に固体重水素機能を付加するため以下のことを行った。

- (1) 高速ADコンバータ(BC-140)を、ASPECT3000上に載せる。
- (2) 既存の液体NMR用duplexをスキップさせ、損失を減少させ送受信共能率を改善した。さらに送信側には高出力増幅器を付加させた。
(90°パルスが、3.5 μ sから2.0 μ s未満になる)
- (3) 受信側のバンド幅は確かに狭いが、そのまま使えることが判明した。



- A. H-2 NMR spectrum of d3-D,L alanine by the original Bruker AM-300 spectrometer with a standard digitizer.
- B. H-2 NMR spectrum of d3-D,L alanine by the modified spectrometer with BC-140 fast digitizer.
- C. H-2 NMR spectrum of perdeutero poly methylmetacrylate by the modified spectrometer with BC-140 fast digitizer.

明治鍼灸大学・生理学教室、○福田耕治

Measurement of restricted self-diffusion of water
molecules by pulsed NMR with pulsed NMR

Kohji FUKUDA

Dept. of Physiol., Meiji College of Oriental Medicine,

Kyoto Hiyoshi, 629-03, Japan

A system of devices for precise measurements of diffusion constants and relaxation times of fluid has been set up. Pulsed NMR experiments of CPMG method and stimulated echo method can be done using this system. This system consists of a synthesizer, tow kinds of timing devices, a power transmitter, a receiver and a signal averager. One of the timing devices is used for making an rf pulse train. The other is used for an external clock signal of the signal averager. The clock signal is not continuous but a pulse type. The clock signal is put on during time intervals each echo appears. Therefore the signal averager works on a high efficiency. All devices also a power supply for gradient coil are synchronized with the synthesizer.

1. はじめに

パルス法NMRは液体中の分子の自己拡散係数を測定する最も優れた手段として認められている。種々の均一な液体中の自己拡散係数の測定に続き、生体組織、細胞内外、ゼオライト、多孔質ガラス等の中の液体の自己拡散に関心もたれた。¹⁾測定では大きな静磁場に加え磁場勾配が必要である。スピンエコー信号強度は自己拡散係数、磁場勾配の大きさ、測定時間の関数として得られる。CPMG法は液体の自己拡散係数の測定法として最も優れている。制限の無い領域の液体では一般に縦緩和時間 T_1 、横緩和時間 T_2 が共に長く(純水の ^1H の場合では2s程度)、この方法が有効である。しかし制限領域内の水のスピンの系では T_1 は純水のそれに比べ1桁程度小さく、 T_2 は3桁程度小さ

キーワード：パルス法NMR、パルス磁場勾配、自己拡散係数、緩和時間、制限領域、水溶液

福田耕治 (ふくだこうじ)

い。このような核スピン系を持つ試料の自己拡散係数の測定では、Stimulated Echo法が有利である。また小さな自己拡散係数を持つ試料に対しては磁場勾配をパルス的に印加するPMFG(Pulsed Magnetic Field Gradient)法が有利である。

CPMG法とStimulated Echo法による自己拡散係数の測定に必要な機器の構成を紹介する。エコー信号強度が自己拡散係数がどのような関数になるかを見る。多孔質ガラス中と牛アルブミン溶液中の水の自己拡散係数の測定の例を紹介する。

2. 機器構成

PMFGを用いたパルス法NMRのシステムの機器構成を図1に示す。この構成はCPMG実験を基本としたものである。

【磁場】主磁場(最高0.6T)の電磁石で0.21Tで測定する。手作りの磁場勾配用コイル。

【RFパルス送信装置】: SYNTHESIZER(TOA FS-1321)からのrf信号(20MHz)はPULSE SEQUENCE PROGRAMMER(MATEC 410)、R.F. GATED AMPLIFIER(MATEC 515A)、GATING MODULATOR(MATEC 5100)に送られゲート増幅され、RFパルス(10MHz)列となりNMR送信コイルに与えられる。

【NMR信号受信装置】: エコー信号列はNMR受信コイルで受けられ、DOUBLE TUNED PRE-AMPLIFIER(MATEC 252)を経てBROADBAND RECEIVER(MATEC 605)で増幅される。位相敏感検波(PSD)の場合の参照用信号はMATEC 410から供給される。

【加算平均装置】: SIGNAL AVERAGER(エレクトロニカ ELK-5150AVE)は外部クロックで動作可能である。エコー信号の形は非常に鋭く短い時間である(特に勾配磁場が時間的に一定の場合)。エコー信号列が現れる全ての時間について加算平均する事は無駄であ

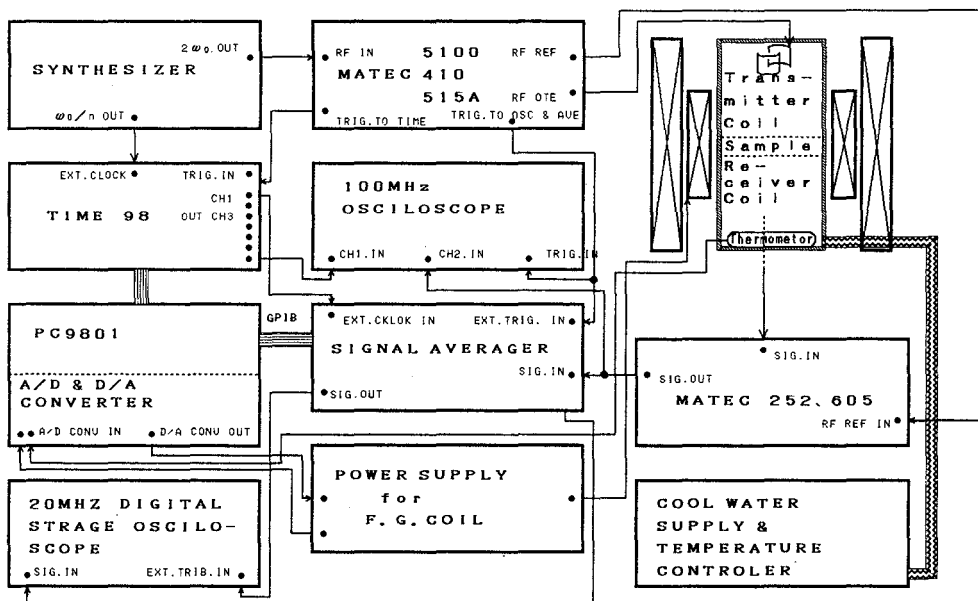


図 1

るばかりでなく、各アドレスが受け持つ時間が長くなると、個々のエコー信号に割り当てられるアドレス数は減少し、エコー信号の形を正しく収録できない。

この困難は外部クロックをエコー信号出現時の前後の信号の幅の数倍の時間間隔だけONにし、それ以外の時間ではOFFにすることで解決する。外部クロックは後述するTIME98から供給される。SIGNAL AVERAGERのパラメタの設定および加算平均データ収録はGPIBを介してパソコンから行われる。

【TIME98】：TIME98(アスコム タイム98)はパソコン(EPSON PC286-V)の拡張スロットに装着して使う。CRT画面上で出力したい波形(ロジックレベル)を編集し、波形を出力する。基本ボードの出力は8チャンネルである。波形を作るためのクロックとして外部クロックを使う事もできる。

本構成ではSYNTHESIZERの出力20MHzを分周した800KHzを外部クロックとした。TIME98へのトリガー入力としてMATEC 410のSIGNAL AVERAGER用のトリガーを用いた。このトリガーは各MATEC 515Aから180° RFパルス時に出力される。TIME98での編集でエコー信号出現時に時間間隔がエコー信号幅の数倍の間だけ800KHzのクロックをONにする。これをSIGNAL AVERAGERのクロック信号とする。こうしてRFパルス送信装置、NMR信号受信装置、加算平均装置、TIME98をSYNTHESIZERと同期させ、加算平均を行うときに問題になるRFパルスやサンプリングパルスのジッターを避ける。またTIME98の大きい利点は波形を出力したままでパソコンは別のアプリケーションを実行できることにある。

【磁場勾配用電源】：D/Aコンバータを介してパソコンで定電流直流電源(高砂 GP035-10)を制御し、磁場勾配用のコイルへ電流を供給する。コイルと直列に接続されている標準抵抗の両端の電位差はA/Dコンバータを介しパソコンでモニターされている。

【冷却水循環装置と温度制御】：冷却水循環装置(ORION-MACHINERY RKC-400-SCY-1)から供給される冷水は温度制御装置(BROOKFIELD EX100)で制御され試料室の温度を一定にする。試料室の温度計の出力はA/Dコンバータを介しパソコンでモニターされる。

3. 自己拡散係数とスピネコー信号

液体中の分子の自己拡散による広がりを見る。ある分子が時刻0に位置 r_0 にある確率を $p(r_0)dr_0$ 、その分子が時刻 t に位置 r と $r+dr$ の間にある条件付確率密度を

$$P(r, r_0, t) = \iint (4\pi D t)^{-3/2} \exp\left\{-\frac{(r-r_0)^2}{4Dt}\right\}$$

とすれば、時間間隔 t での拡散半径は D を自己拡散係数として、次式で与えられる。

$$\begin{aligned} \langle (r-r_0)^2 \rangle &= \iint (r-r_0)^2 p(r_0) \\ &\quad \times P(r, r_0, t) dr dr_0 \\ &= 6Dt \end{aligned} \tag{1}$$

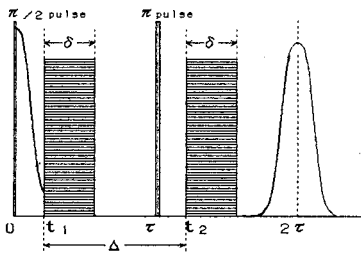


図 2

図2にrfパルス、PMFG、FIDとエコー信号の時間系列

を示す。磁場は大きな静磁場 $B_0(0, 0, B_0)$ と PMFG による小さな磁場 $g(t) \cdot r$ の和である。時刻 0 と τ の rf パルス、時刻 t_1 と t_2 の PMFG により磁気モーメントは $x'-y'$ (回転座標系) 面内で運動する。核スピンの番号を付け、 i 番目の核スピンの時刻 t での y' 軸からの位相 (角度) を $\phi_i(t)$ とする。時刻 t_2 の PMFG によりエコー信号出現の時刻の位相は次式で与えられる。

$$\phi_i(2\tau) = \gamma \delta g \cdot [r_i(t_2) - r_i(t_1)] \quad (2)$$

エコー信号強度はすべての核スピンの位相 (4) 式の余弦の和に比例するので試料全体からのエコー信号強度として次式を得る。和を積分に変えた。

$$F = M_i / M_0 = \iint \cos[\gamma \delta g \cdot (r_2 - r_1)] P(r_1) P(r_2, r_1, t_2 - t_1) dr_1 dr_2 \quad (3)$$

液体の中では $P(r_1) = \text{一定}$ とできる。磁場勾配ベクトルを z 方向とし ($g = (0, 0, g)$)、 $\Delta = t_2 - t_1$ とすると次の結果を得る。

$$F(\gamma g \delta, \Delta) = \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 D \Delta) \quad (4)$$

時間 δ の間の拡散が無視できない場合には $\exp\{-\gamma^2 g^2 \delta^2 D (\Delta - \delta/3)\}$ で与えられ、定常な磁場勾配である場合には $\exp\{2\gamma^2 g^2 \tau^3 D/3\}$ で与えられる。

第 2 第 3 の信号強度も同様に計算できる。

4. 実験例

牛アルブミン溶液中の水のエコー信号列と自己拡散係数の結果を図 3、4 に示す。

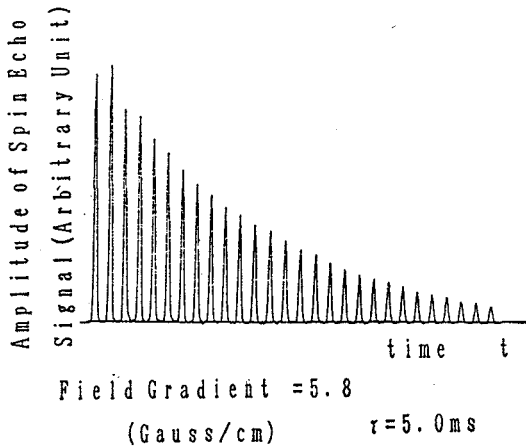


図 3

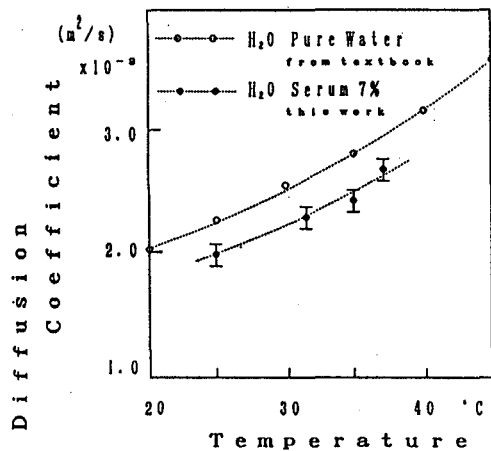


図 4

Stimulated Echo法を用いて多孔質中の水の自己拡散係数を測定した。自己拡散係数はポロシティ (多孔質全体の体積に対する孔の容積の割合) と純水の自己拡散係数の積で表される事を得た。²⁾

1) 福田耕治: 日本バイオレオロジー学会誌、第 6 巻・第 2 号、20~29 頁 (1992)

2) K. Fukuda, T. Kasuga, T. Mizusaki, A. Hirai and K. Eguchi: J. Phys. Soc. Jpn.

Vol. 58, No. 5, 1662-1666 (1989)

P 14 Relaxation of Intracellular ^{23}Na : Relaxation Mechanism of Na Ion in Agar Gel Analyzed by Pulsed Field Gradient NMR

Yoshiteru SEO and Masataka MURAKAMI

Lab. for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, Dept. of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444, Japan

We have applied ^{23}Na double-quantum filter NMR and ^{23}Na pulsed field gradient NMR to analyse the relaxation of Na ion in agar gel, which is a model for the intracellular Na to test the discrete exchange model. From diffusion coefficient of Na in agar gel, we estimated transverse relaxation rate constant of Na in extreme narrowing region. The transverse relaxation rate constants obtained by the double-quantum filter NMR (2.34 T and 8.45 T) fit well the exchange model, and we estimated a correlation time (16 nsec) and a quadrupole coupling constant (1 MHz) for Na in the slow motion condition.

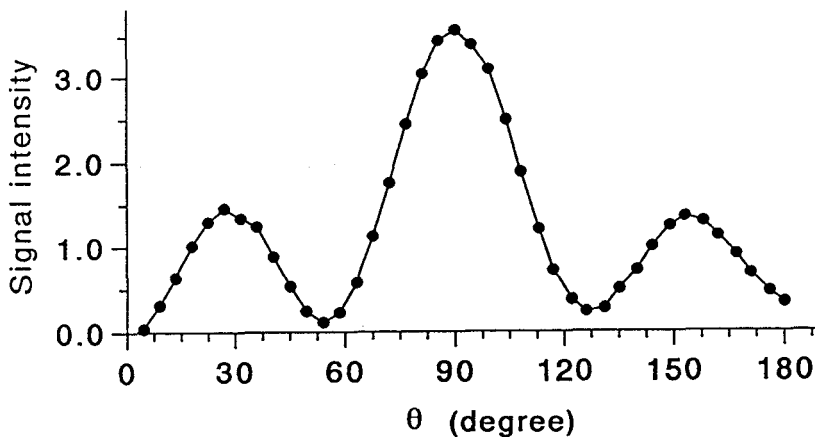
Introduction We have measured the ^{23}Na relaxation of the intracellular Na ion by the double-quantum filter NMR technique, and found that the intracellular ^{23}Na is in the slow motion condition ($\omega\tau_c \gg 1$, ω is the Larmor frequency, τ_c is the correlation time) (1). The next question is the relaxation mechanism of the ^{23}Na nuclei in the intracellular fluid. In this paper, we have measured B_0 dependencies of the transverse relaxation rate constants and the diffusion coefficient of ^{23}Na in an agar gel model. We have estimated a binding site correlation time (τ_b) and a quadrupole coupling constant (e^2qQ/h) on assumption of the discrete exchange model.

Double-Quantum Filter NMR The relaxation rate constants of ^{23}Na in agar gel (1, 2, 3, 4% agar and 1 M NaCl in water) were measured at 8.45 T and 2.34 T at 25°C. ^{23}Na NMR spectra were collected using an AMX-360wb (8.45 T) and an MSL-100 (2.34 T) spectrometer with broadband probes (10 mm in diameter). The T_2 double-quantum filter ($D-90^\circ-\tau/2-180^\circ-\tau/2-90^\circ-\delta-90^\circ$ -acquire) was used. The peak heights of Fourier transformed spectra with various creation time (τ) values were used for determining the transverse relaxation rate constants.

Figure 1 shows flip angle dependency (θ) of the signal passed by the T_2 double-quantum filter ($D-90^\circ-\tau/2-180^\circ-\tau/2-\theta-\delta-\theta$ -acquire). Since the signal virtually disappeared at the flip angle of 54.7° , the observed signal from the agar gel rise from the T_{32} component and the contribution from the T_{22} component is negligibly small. When the quadrupolar coupling do not averaged completely, the T_{22} component are not suppressed by the double-quantum filter (2, 3). Thus, we can use Na in agar gel as a model system for the discrete exchange model.

Key words: sodium, quadrupole relaxation, double-quantum filter NMR, pulsed field gradient NMR

Figure 1. Flip angle dependency of double-quantum filtered signal from Na in agar gel at 8.45 T and 24°C. θ is the flip angle of the 3rd and 4th pulses.



Pulsed Field Gradient NMR The self-diffusion coefficient of ^{23}Na in the agar gel was measured at 2.34 T using a micro-imaging unit with a home-built ^{23}Na coil (15 mm in diameter). The conventional pulsed field gradient spin-echo sequence (d - 90° - t_1 - δ - t_2 - 180° - t_1 - δ - t_2 -acquire) was used. Typical values used are a pulsed gradient field strengths of 5.4 mT/cm, 90° pulse of 18 μsec , 180° pulse of 36 μsec , Δ (pulse distance = $t_1 + \delta + t_2$) of 40 msec and δ (width of pulsed gradient) was varied from 0.3 msec to 4 msec (4).

Discrete exchange model We have applied the discrete exchange model to these data. An exchange between Na in a particular slow motion condition and in the extreme narrowing limit is assumed. Transverse relaxation time and diffusion coefficient are written as follows:

$$1/T_{2i} = s_{\text{free}} \cdot (1 - P_b) + s_1 \cdot P_b \quad (1)$$

$$D = D_{\text{free}} \cdot (1 - P_b) + D_b \cdot P_b \quad (2)$$

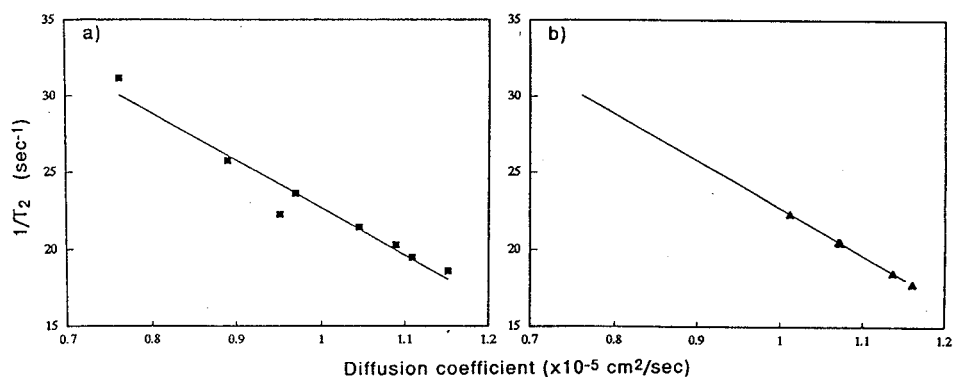
Where, $1/T_{2i}$ and D are the observed values of $1/T_{2f}$ or $1/T_{2s}$ and diffusion coefficient, respectively. s_1 and D_b are the transverse relaxation rate constants (s_1 or s_2) and the diffusion coefficient of Na in the slow motion condition, respectively. s_2 and s_1 correspond to the $|1/2\rangle\langle -1/2|$ coherence and the $|-1/2\rangle\langle -3/2|$, $|3/2\rangle\langle 1/2|$ coherences, respectively. P_b is the fraction of the Na in the slow motion condition ($1 \geq P_b \geq 0$), which is proportional to the fraction of agar. s_{free} and D_{free} are the relaxation rate constant and the diffusion coefficient of ^{23}Na in the extreme narrowing condition.

The observed relaxation time is time-averaged value of s_{free} and s_1 . The fraction of Na in the slow motion condition is expected small, but the transverse relaxation rate constants (s_i) are expected larger than s_{free} by 10 to 100 times. Therefore, we applied using this equations to the observed relaxation rate constants to estimate the 2 compartments. One problem is accurate knowledge of the value of s_{free} for ^{23}Na in the agar gel.

Estimation of s_{free} As shown in Eq. 2, the observed diffusion coefficient should be time-averaged value of D_{free} and D_b . However, the observed value is virtually equal to D_{free} since values of D_b and P_b are so small compared with values of D_{free} and $(1 - P_b)$. Therefore, observed diffusion coefficient of Na in the agar gel mainly represents the motion of Na in the extreme narrowing region.

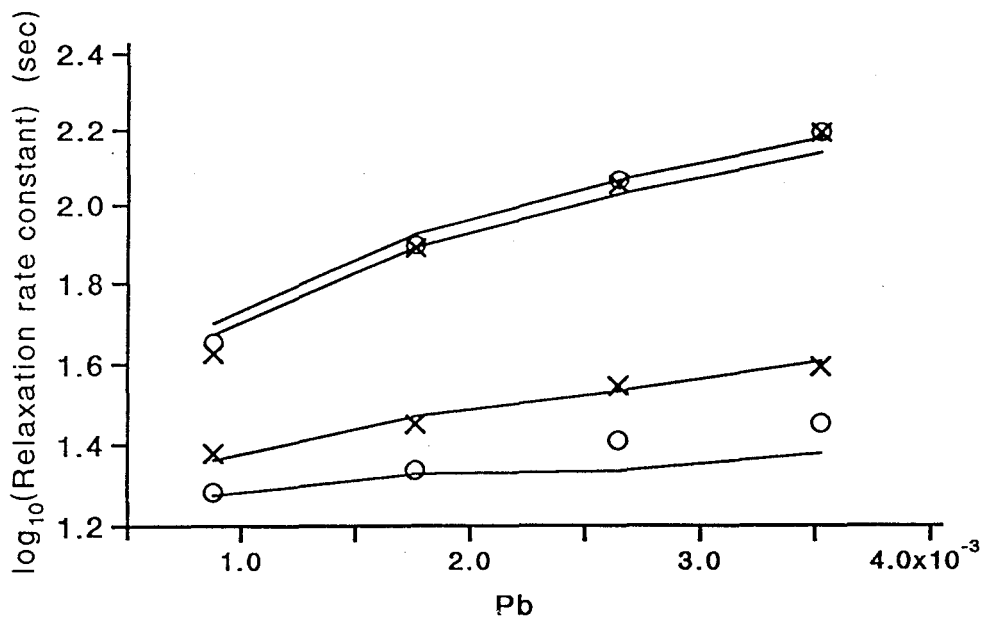
Since the relaxation rate constant of ^{23}Na depends strongly on the viscosity of the solution, we measured the self-diffusion coefficient of ^{23}Na in glycerol/water solution, and found a relationship between the self-diffusion coefficient and the transverse relaxation rate constant on viscosity [Fig. 2-a]. Then, We have estimated the s_{free} value of ^{23}Na in the agar gel from the self-diffusion coefficient of ^{23}Na in the agar gel using the observed relationship [Fig. 2-b].

Figure 2. Relationships of transverse relaxation rate constants ($1/T_2$) and diffusion coefficient of Na in glycerol/water solution (a), and estimated $1/T_2$ value for Na in the agar gel from the diffusion coefficient of Na (b).



Results of minimization The result of the minimization is shown in Fig. 3. Relaxation rate constants (s_1 and s_2) of ^{23}Na in agar gel at 25°C . Solid lines represent result of fitting the data obtained at 2.34 T (x) and at 8.45 T (o). The fraction of the ^{23}Na in the slow motion condition (P_b for 1% agar/ 1 M NaCl/ water gel) was calculated as $9 \cdot 10^{-4}$. The values of e^2qQ/h and the correlation time were 1.0 MHz and 16 nsec, respectively. The observed data fit this model well ($r^2 = 0.98$), and the calculated value of e^2qQ/h (1.0 MHz) lies in the reasonable range (0.2 MHz - 2 MHz). These results support the exchange model. Thus, we will proceed to analyze the relaxation of the intracellular ^{23}Na using the discrete exchange model.

Figure 3. The transverse relaxation rate constants of Na in agar gel at 2.34 T (x) and at 845 T (o). Solid lines are results of fitting data to the discrete exchange model.



References

- 1) Seo, Y., Murakami, M. & Watari, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1034**, 142-147 (1990)
- 2) Jaccard G., Wimperis S. & Bodenhouse, G., *J. Chem. Phys.*, **85**, 6282-6293 (1986)
- 3) Eliav, U., Shinar, H. & Navon, G., *J. Magn. Reson.*, **98**, 223-229 (1992)
- 4) Kärgler, J., Pfeifer, H. & Heink, W., In: *Adv. in Magn. Reson.*, **12**, 1-89 (1988)
- 5) Bull, T.E., *J. Magn. Reson.*, **8**, 334-353 (1972)

Acknowledgements We thank Professor C. S. Springer Jr., Dr. J.-H. Lee, Dr. S. Wimperis and Dr. H. Shinar for stimulating discussions, and this study was supported by the Monbusho International Science Research Program (No.03044153).

P 15 カエル灌流心臓におけるクレアチンキナーゼ反応フラックスの 心拍同期³¹P-飽和移動NMR法による測定

(京府医大・第一生理・*小児疾患研究施設内科) ○早野尚志, 吉崎和男,
尾内善四郎*, 森本武利

Flux of Creatine Kinase Reaction in Perfused Frog Heart
Studied by gated ³¹P Saturation Transfer NMR

Department of Physiology,*Division of Pediatrics, Children's Research Hospital,
Kyoto Prefectural University of Medicine
Takashi Hayano, Kazuo Yoshizaki, Zenshiro Onouchi*, Taketoshi Morimoto

The concentration of high-energy phosphorus metabolite and the flux of creatine kinase reaction was measured in perfused frog heart by gated ³¹P saturation transfer NMR. No difference in signal intensities of PCr and ATP was found between systole and diastole in frog heart. The concentration of phosphocreatine and ATP was 4.5 and 2.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight, respectively. The flux of the forward reaction of creatine kinase (PCr \rightarrow ATP) was 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight $\cdot\text{s}^{-1}$. The turnover rate of ATP, calculated from oxygen consumption rate, was 0.014 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight $\cdot\text{s}^{-1}$. The flux of creatine kinase reaction was about 80 times larger than the net turnover rate of ATP in frog heart. Thus, the flux of the creatine kinase reaction in frog heart is large enough to maintain the equilibrium state of the reaction.

心臓の拍動にともない、心筋内の高エネルギーリン酸化合物であるクレアチンリン酸 (PCr) ならびにATP濃度が収縮期に減少し、拡張期に増加するという報告と、変化しないという相反する報告がある^{1),2),3)}。今回、カエル灌流心臓における高エネルギーリン酸化合物の濃度ならびにクレアチンキナーゼ反応のフラックスについて心拍同期³¹P-飽和移動NMR法を用いて測定したので報告する。

[方法] ウシガエルから摘出した心臓を空気飽和させたリンゲル液 (NaCl:118, KCl:2.5, CaCl₂:2.0, Tris-Cl:5.0 mM, pH 7.4) で灌流した。灌流液は5 ml/minでカニューレを挿入した心房から心室を経て動脈幹から流出する。流出した灌流液は、sample chamberをへてNMRプローブの外へ出る。他方の動脈幹からカテーテルを挿入し心室圧をモニターした。

心拍同期、³¹P-NMR、クレアチンキナーゼ反応、灌流心

はやの たかし、 よしざき かずお、 おのうち ぜんしろう、 もりもと たけとし

この灌流心臓を入れた chamber の外側に鞍型コイル ($\phi=20$ mm) を巻いた。

^{31}P -NMR スペクトルの測定には日本電子製 GX200-SMR (^{31}P :80 MHz) および 4.7T ワイドボア超伝導磁石を用い、通常 128 回積算した。磁場の均一度は水のプロトン信号を用いて最適化した。

クレアチンキナーゼ反応のフラックスの測定には飽和移動法を用いた⁴⁾。クレアチンキナーゼ反応の正方向 ($\text{PCr} \rightarrow \text{ATP}$) のみかけの速度定数 k は次式から計算した： $M^+/M^0 = T_{1m}/T_1$ 、 $1/T_{1m} = 1/T_1 + k$ 。ここで M^+ および M^0 は ATP の γ 位のリンを磁気飽和させた時およびさせない時の PCr の共鳴線の強度、 T_1 は内因性の縦緩和時間、 k はみかけの速度定数を表す⁵⁾。

[結果および考察] ウシガエル灌流心臓の ^{31}P -NMR のスペクトルには 2 つのピークからなるホスフォジエステル⁶⁾、クレアチンリン酸 (PCr)、および ATP の γ 、 α 、 β 位のリン酸の共鳴線が検出でき、ホスフォジエステルの共鳴線の左にホスフォモノエステルおよび無機燐酸の小さなピークも認められた。

心室内圧をトリガーとし収縮期および拡張期に同期して RF パルスをかけて心筋 ^{31}P -NMR スペクトルを測定した (図 1)。その結果、ウシガエル灌流心臓においては収縮期と拡張期の PCr および ATP の信号強度に差は認めなかった (図 2)。

共鳴線の面積から外部標準を用いて定量したカエル心臓のクレアチンリン酸 (PCr) の濃度は $4.5 \mu\text{mol/g}$ 湿重量 ($n=6$) であり、ATP の濃度は $2.3 \mu\text{mol/g}$ 湿重量となった。

^{31}P -飽和移動 NMR 法には照射幅 20 Hz の Homonuclear gated irradiation を用い、照射強度は ATP の γ 位のリン酸を飽和するのに十分な最低の強度とした。ATP の γ 位のリン (γ -ATP) を磁気飽和させると、PCr の共鳴線の強度は 60% に減少した ($M^+/M^0 = 0.60 \pm 0.02; n=4$) (図 3)。クレアチンリン酸の縦緩和時間 (T_{1m}) は γ -ATP の選択的照射下に Progressive

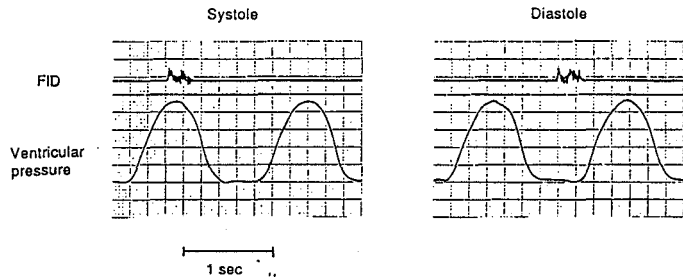


図 1 心拍同期 ^{31}P -NMR の FID と心室内圧

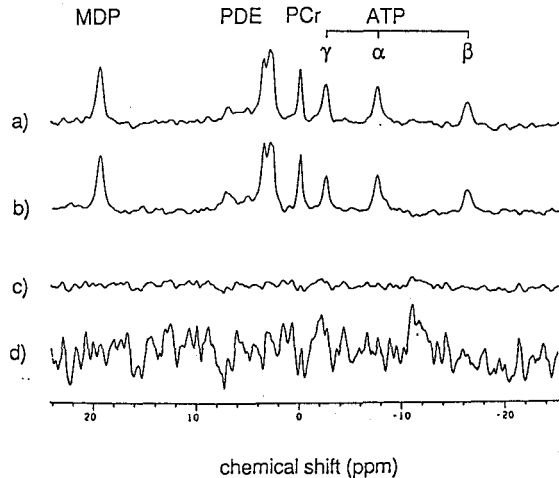


図 2 カエル灌流心臓の心拍同期 ^{31}P -NMR スペクトル
a) 拡張期 b) 収縮期 c) 差スペクトル (a-b)
d) 差スペクトル (a-b) $\times 5$

saturation 法を用いて測定した。90°パルスの繰り返し時間を10秒~0.75秒と変えてスペクトルを得た(図4)。クレアチンリン酸の共鳴線の高さから non-linear curve fitting 法にて T_{1m} を計算し 1.9 ± 0.3 s となった。これから計算した PCr の intrinsic T_1 は 3.1 ± 0.6 s となり、クレアチンキナーゼ反応(PCr \rightarrow ATP)のみかけの速度定数(k)は 0.22 ± 0.04 s⁻¹ となった。この速度定数と PCr 濃度の積から求めたクレアチンキナーゼ反応のフラックスは 1.0 ± 0.3 μ mol.g⁻¹湿重量.s⁻¹ となった。

このクレアチンキナーゼ反応のフラックスと比較するために心臓の酸素消費を同一の灌流条件において測定した。心臓への流入および流出する灌流液の酸素分圧をポーラログラフィー法を用いた酸素電極で測定しそれらの差からの求めたカエル心臓の酸素消費量は 0.14 ± 0.03 μ mol.g⁻¹湿重量.min⁻¹ (n = 4) となった。P/O 比を3とすると、ATPの産生および消費速度、すなわちATPの正味の回転速度は 0.014 ± 0.003 μ mol.g⁻¹湿重量.s⁻¹ となる。

従って、クレアチンキナーゼ反応のフラックスはATPの回転速度より約80倍大きく、カエル心筋においても細胞内のクレアチンキナーゼ反応は平衡状態にあると考えられる。

今回の測定ではPCrおよびATP濃度の周期的変化が認められなかった。これはATPの濃度が減少してもクレアチンキナーゼ反応のフラックスが大きいため、クレアチンリン酸の分解によ

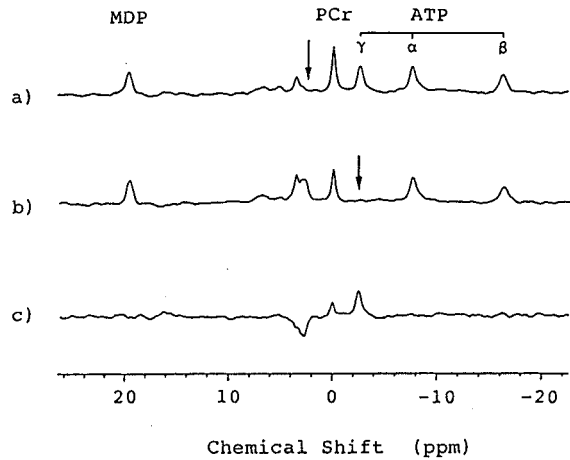


図3 カエル灌流心臓の³¹P-NMR スペクトル
a) 矢印の部分を選択的に照射したコントロールスペクトル
b) ATPの γ リン酸を選択的に飽和したスペクトル
c) 差スペクトル(a-b)

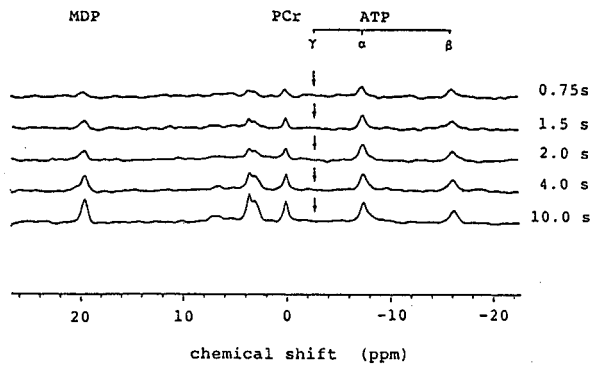


図4 Progressive saturation 法によって求めたクレアチンリン酸の縦緩和時間(T_{1m})。 γ -ATP の選択飽和下に繰り返し時間を段階的に短くした時のクレアチンリン酸のピークの減少から non-linear curve fitting 法にて T_{1m} を求めた。

てただちにATPの減少が補われるためATP濃度の変化を認めなかったのか、あるいは、我々の灌流心では負荷が小さいためATPの回転速度が小さく、そのためPCrおよびATP濃度の変化がともに検出感度より小さかったためと思われる。

[文献]

- 1) Kantor, H. L., Briggs, R. W., Metz, K. R., and Balaban, R. S. Am. J. Physiol. 251, H171-H175 (1986)
- 2) Koretsky, A. P., Wang, S., Murphy-Boesch, J., Klein, M. P., Lames, T. L., and Weiner, M. W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7491-7495 (1983)
- 3) Fossel, E. T., Morgan, H. E., and Ingwall, J. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3654-3658 (1980)
- 4) Yoshizaki, K., Watari, H., and Radda, G.K. Biochim. Biophys. Acta 1051, 144-150 (1990)
- 5) Shoubridge, E.A., Briggs, R.W., and Radda, G.K. FEBS Lett. 140, 288-292 (1982)
- 6) Yoshizaki, K., Maruyama, Y., Yamada, S., Nishikawa, H. J. Kyoto Pref. Univ. Med. 89, 895-903 (1980)

P 16 ^1H -、 ^{31}P -NMR より測定した抱卵状態のアメリカザリガニ卵の観察

(近畿大・医・第一生理) ○千葉 倅, 秩父志行

Observation of crayfish embryos and eggs during hatching by ^1H - and ^{31}P -NMR

Atsushi Chiba and Shiko Chichibu

(Dept. Physiol., Kinki Univ. Sch. Med.)

Using ^1H - and ^{31}P -nuclear magnetic resonance (NMR), we studied the state of water protons (the spin-lattice (T_1) and spin-spin relaxation time (T_2)) and changes in high energy phosphate metabolism of crayfish embryos (*P. clarkii*) during hatching. The proton T_1 , T_2 and phosphoarginine (Arg-P) increased with the maturation of hatching stages. In fresh black eggs which adhered onto the abdominal legs, a lack of dissolved oxygen (DO) decreased β -ATP and increased inorganic phosphate (Pi). In the bright red eggs, which were destined to die, signals of sugar phosphate (SP) and only β -ATP were observed. In the nauplius stage, when DO was insufficient, an increase in Pi and decreases in both Arg-P and β -ATP were observed.

【はじめに】

アメリカザリガニは、直径 2mm の赤褐色の卵を年に 1 回、数十から数百個産卵する。産卵した卵は、腹部の腹肢で抱卵される (図 1)。孵化すると体長 4mm の第 1 期若エビとなり、さらに脱皮した体長 6mm の第 2 期の若エビとなる。ここまでの若エビもまだ腹肢に付着する長い帯状の糸に数珠つなぎとなっていて、母体の腹肢から離れないで成長する。抱卵は、卵や若エビの成長と保護に必要ではあるが、卵内の代謝や生理状態は、硬い卵殻の外からはわかりにくい。また、抱卵しているにもかかわらず、孵化せず、抱卵群の卵から脱落してゆくものもある。

著者らは、アメリカザリガニが産卵後に抱卵という生態行動をとることに注目し、その時の卵の高エネルギーリン酸化代謝産物とプロトンの緩和時間を測定した。抱卵時の卵内のリン酸化代謝や水の状態にどのような変化があるかを調べた。

抱卵 アメリカザリガニ 高エネルギーリン酸化代謝 水の緩和時間

○ちば あつし, ちちぶ しこう

【材料・方法】

用いたアメリカザリガニ (*Procambarus clarkii*) の抱卵状態のものは、以下の5タイプを用いた。①産卵直後の暗赤褐色(黒色)卵, ②産卵後2~3週間経過し、孵化しなかった橙色もしくは赤色の卵, ③孵化直前の卵, ④ゾエア, ⑤孵化後の第2期の若エビである。それぞれは、付着している母体の腹肢からていねいに離し、10℃の淡水を浸けた。³¹P-NMRの測定では、直径10mmのNMR試料管に深さ50mm内に収るように入れた。¹H-NMRでは、直径10mmの試料管内に直径5mmの試料管を入れて測定した。また、NMR測定後に卵と若エビの重量を測定した。また、卵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℃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。

³¹P-NMR測定には、高分解能核磁気共鳴装置JEOL-GX400を用いた。³¹Pを161.7MHzで、観測パルス角を45°、2秒間のパルス繰返し時間で60回の積算を行った。インターナルロックとしてキャピラリーに重水をいれてNMR試料管の底に置いた。化学シフトの基準は、Methylenediphosphonic acid (MDP)で水温10℃で測定した。細胞内pHは、MDPとPiとの化学シフトの差より推定した。¹H-NMRの測定では、¹H-T₁値(縦緩和時間)は、inversion recovery法を用いた。¹H-T₂値(横緩和時間)は、Carr-Purcell-Meiboom-Gill法(CPMG法)を用いた。

【結果】

図2にアメリカザリガニの2種類の卵、ノーブリス、ゾエア、そして若エビの³¹P-NMRのシグナルを示した。産卵直後の暗赤褐色をしたアメリカザリガニの卵のシグナルは、低磁場側より無機リン酸(Pi)、 γ -ATP、 α -ATP、 β -ATPが観察された。産卵後3週間以上抱卵したままで赤色もしくは橙色になった卵では、³¹Pのシグナルは、Pi、SP、 β -ATPのシグナルしか見出されなかった。 β -ATPの濃度は、暗赤褐色をした卵に比べると約1/10に減少した。細胞内pHは、7.21から7.98とアルカリ側にシフトした。孵化直前のノーブリスではアルギニンリン酸の出現が認められた。ゾエアや若エビでは、成体から得られるシグナルと一致した。図3にNMR試料管内を好氣的灌流から嫌氣的灌流に切替えた際の2種類の卵とノーブリスのPi/ β -ATPの変化を示した。孵化しない赤色の卵は灌流液を好氣的状態から嫌氣状態に切替えてもPi/ β -ATP比は変化しなかったが、孵化する暗赤褐色(黒色)はPi/ β -ATP比は上昇し卵内が嫌氣状態になった。ノーブリスではこれが顕著に嫌氣状態に移行し、卵外の淡水の溶存酸素状態より著しく影響を受けた。図4に抱卵中のザリガニ卵の水分含有率、T₁値、T₂値を示した。暗赤褐色(黒色)の卵は、64%の水分含有率で、T₁は1.63 sec、T₂は24 msecでした。赤色の卵は、87%の水分含有率を示し、T₁は1.89 sec、T₂は280 msecと増加していた。ノーブリスでは73%の水分含有率で、T₁は1.71、T₂

は 68 msec あった。孵化しない卵は水分含有量, T_1 , T_2 とともに高い値を示した。

【考察】

アメリカザリガニなどの甲殻類は、抱卵という形で産卵後もしばらく卵を母体に付着させる。孵化後もしばらくの間は母体から離れずに生活する。卵の付着している腹肢は、周期的に前後方向に繰返し運動し、絶えず新鮮な水を卵表面に送り続けている。著者らは、こうしたアメリカザリガニの生態面に注目し、リン酸化代謝の面から検討した。ザリガニの卵の ^{31}P -NMR 測定の結果では、卵黄タンパクのシグナルは見出されず、ATP (γ , α , β) と Pi しか観察されなかった。卵黄タンパクは、受精卵が発生分化する際のエネルギー貯蔵物質ではあるが、ザリガニ卵は直接 ATP からエネルギー供給を受けていた。また、産卵された途中で発育が停止し、孵化するまでに至らなかった橙色の卵では、 β -ATP と Pi のシグナルだけが認められた。しかも、これらの卵では細胞内 pH がアルカリ側にシフトしていた。暗褐色卵の場合にはかなりの量の ATP の存在が観察されたが、孵化しなかった橙色の卵では、すでに ATP が消費されつくされていて検出されなかった。このことは、卵分割において、孵化しない卵細胞では細胞融解もしくは細胞崩壊が生じていることを示していると考えられる。一方、孵化した卵は若エビとなり、アルギニン酸の出現をきたし、相対的に ATP の割合は小さくなった。これは卵割における酵素発現を起きたことを示す。ザリガニ卵は、硬い殻をもつが、抱卵している際には親は絶えず腹肢を動かし、卵に溶存酸素を送っている。この卵殻を通じてガス交換が行なわれていると思われる。卵黄タンパクというエネルギー源をもたず、ATP の形でのみ卵内にエネルギー源を蓄積していた。これは、殻につまっていた卵内の ATP を好氣的に分解・利用するために外界からの酸素供給を必要とし、抱卵行動を行なっていることと関係があると思われる。

生体内の水のプロトン T_1 および T_2 測定の意義は、組織内の水の存在状態や自由水量に関係している。著者らは、抱卵状態の卵分化の水プロトン緩和時間を測定した。孵化の進む卵では、 T_1 , T_2 とともに増加し、ノープリウスやゾエアの状態でも増加傾向を示した。これは、分化の際の組織の含水量の増加や蛋白質の構造変化を伴う細胞成長速度の増加と関係が深いと思われる。分化は卵組織内での水と相互作用する高分子物質の変化を示す。このことは、卵内の水の緩和時間を測定することにより分化の進行状態を知ることができる。

著者らは、産卵後のアメリカザリガニの卵の ^1H -、 ^{31}P -NMR を測定した。抱卵は、卵内の ATP を利用し、分化の際のエネルギーを得るのに必要なガス交換を促進するための生態行動のひとつである。また、抱卵中の卵分化は、水の緩和時間測定から孵化に至る状態を予測できる指標に成り得ると考えられる。

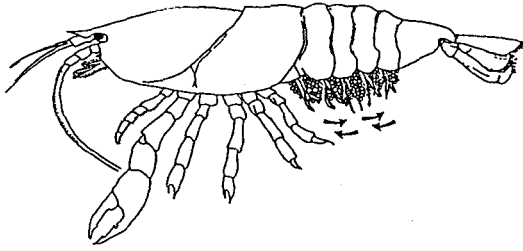


図1 アメリカザリガニの抱卵状態

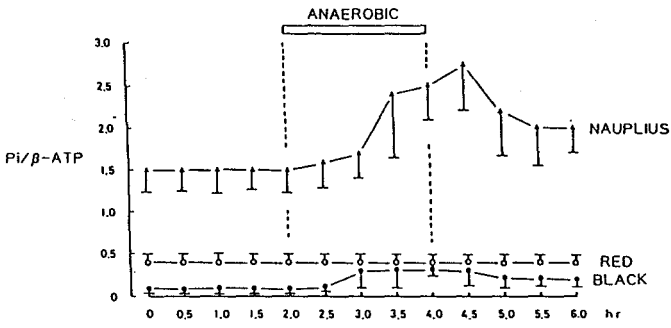


図3 嫌気状態中の Pi/β -ATP の変化

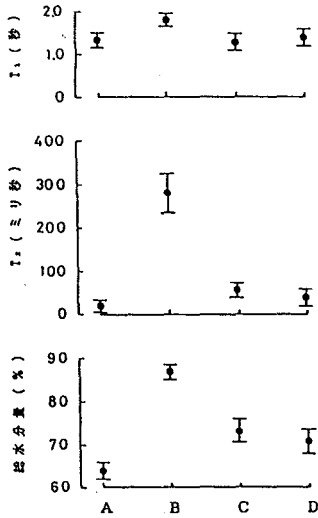


図4 抱卵中の総水分量、 T_1 、 T_2

A : BLACK B : RED C : NAUPLIUS D : ZOEAE

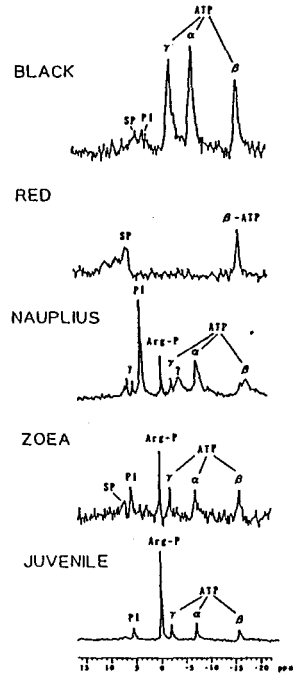


図2 抱卵中の ^{31}P -NMR シグナル

P 17 植物組織の拡散イメージング

(¹農水省・食総研、²農水省・生物研、³日本電子データム)
○石田信昭¹、狩野広美²、小川秀次郎³

Diffusion Weighted Imaging of Plant Tissues.

(¹National Food Research Institute, ²National Institute of Agricultural Resources, ³JEOL Datum)

Nobuaki ISHIDA¹, Hiromi KANO², Hidejiro OGAWA³

Diffusion coefficients and images weighted by diffusion of water in plant tissues were measured by an NMR microscope by devising a generator of pulse gradient magnetic fields. Diffusion coefficient calculated from image data by the equation of Stejskal-Tanner ranged from $0.4 - 1.5 \times 10^{-5}$ cm²/sec according to materials, the maximum value of which reached almost the same level as that of pure water. Images weighted by diffusion are considered to be a useful means to indicate fluctuations of cell activity in plant tissues with complex structures through mobility of cell-associated water.

植物組織の物質代謝、エネルギー代謝、及びイオン輸送等の生体反応は水層または水に囲まれた構造体において行われているので、水の物理的な性質は細胞の活性を反映していると考えられる¹⁻³⁾。本研究では細胞の活性部位への基質やO₂の供給、またはそこからの熱やCO₂の排出に直接的に関与していると思われる細胞の水の運動性の植物組織内及び組織間の変動をマイクロNMRイメージングを用いて、パルス磁場勾配法による自己拡散係数の測定によって検討した。

【材料及び方法】

水、グリセリン、ペンタンを含むキャピラリーを径10mmのNMR試料管に挿入してファントムとした。ワケギは市販のものを用いた。トウモロコシは湿った口紙で発芽させた後、水耕装置に移植して6日目のものを用いた。

イメージングは超伝導NMR JEOL GSX-270WBのマイクロイメージングプローブを用い、スピンエコー2D-FT法により測定した。励起パルスは2 msecの sinc-function-modulatedパルスを用い、エコータイムは21~41 msecに設定した。イメージン

キーワード: ¹H-NMRマイクロイメージング、自己拡散係数、パルス磁場勾配、ワケギ、トウモロコシ

いしだのぶあき、 かのひろみ、 おがわひでじろう

グ用磁場勾配はX、Y、Z軸に対し58mT/mで、平面分解能0.05mm x 0.05mm及びスライス厚1.6mmであった。

自己拡散係数は最大278mT/mのパルス磁場勾配を発生させる装置を作製して、パルス磁場勾配を10~12msec間隔で1~3msec与え、シグナルの減衰をもとに算出した⁴⁾。測定に用いたパルス系列を図1に示す。T₁はパルスの繰り返し時間を0.5、1.5、5.0msecに設定してProgressive Saturation法により、T₂はエコータイムを21、31、41msecに設定し、Hahnの方法により測定した。測定は室温(25°C±1°C)で行った。

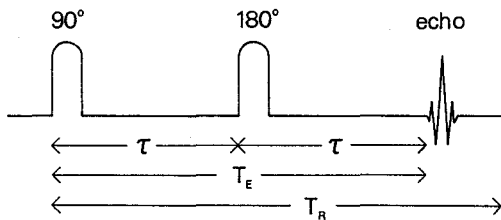
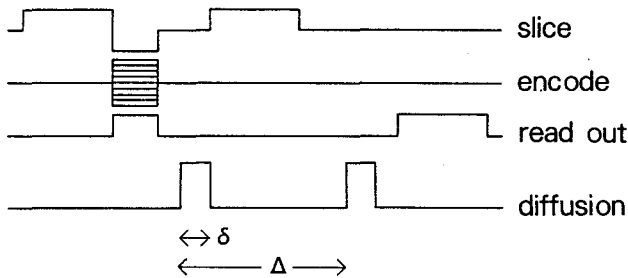


図1 拡散イメージング測定用パルスシーケンス



【結果及び考察】

ファントムを用いて測定した拡散測定用パルス磁場勾配の強度と時間が水のシグナルに与える影響を図2に示す。ln(I/I₀)は磁場勾配の2乗に比例した。Stejskal-Tannerの式によって算出した自己拡散係数は、パルスの印加時間1msecで2.00 x 10⁻⁵ cm²/sec、2msecで1.94 x 10⁻⁵ cm²/sec、3msecで2.16 x 10⁻⁵ cm²/secとなり、文献値(2.14 x 10⁻⁵ cm²/sec)⁵⁾とよく一致していた。

ワケギのイメージ(A)と拡散測定用パルス磁場勾配を与えたイメージ(B)を図3に示す。右にこの2つのイメージの割り算(A/B)によって作ったイメージ(C)(拡散イメージ)を示す。2つの画像をもとに拡散係数のイメージを作る場合、-ln(B/A)とするべきところであるが、画像解析装置が対数計算をサポートしていなかった。そこで-ln(B/A)は0.6<B/A<1.0でA/Bと近似的に比例すると考えて、A/Bイメージにより検討を行った。

発芽後6日目のトウモロコシの茎の拡散イメージ、T₁およびT₂イメージを図4に示す。右は種子より約3cm、左は1cmの高さでスライスしたイメージである。茎の基部における水は鞘葉と第1葉の中肋が多く、第1葉の縁及び第2葉より小さな葉では少なかった。茎の上部では鞘葉及び第1葉と第2葉の中肋に水が多かった。拡散イメージとT₁及びT₂イメージはほぼ同一の傾向を示し、水の多い部位では水の運動性が高いことがわかった。葉の水の自己拡散係数は0.4~1.7 x 10⁻⁵ cm²/sec

であり、運動性の高い部位ではほぼ純水と同程度の値を示した。

水の自己拡散係数は細胞内の水の移動速度を表しており、水の移動速度は細胞内への、または細胞内における反応物質及び生産物の輸送を制御しているものと考えられるので、拡散イメージによって複雑な構造を持つ植物組織において水の運動性の変化を通して細胞の活性の変化を捉えることができる。本研究で用いた試料、ワケギ、トウモロコシの茎では水の多い部分で水の運動性が高く、細胞中の水の自己拡散係数は純水に近い値にまで達した。このような植物組織の水の運動性の変動は、 T_1 及び T_2 イメージでも把握することができるが、異なる組織間の水の運動性を比較するためには、自己拡散係数の測定とそれをもとにしたイメージング画像は有効な解析方法であると思われる⁶⁾。

【文献】

- 1) C.F. Hazlewood: "Cell-associated Water", Ed) W. Drost-Hansen and J. S. Clegg p.165 (1979), Academic Press, New York
- 2) J.S. Clegg: "Cell-associated Water", p.363
- 3) P.K. Seitz et al., Arch. Biochem. Biophys., 210, 517 (1981)
- 4) E.O. Stejskal and J.E. Tanner, J. Chem. Phys., 42, 288 (1965)
- 5) J.H. Wang, J. Amer. Chem. Soc., 73, 510 (1951)
- 6) 石田等、分析化学 (印刷中)

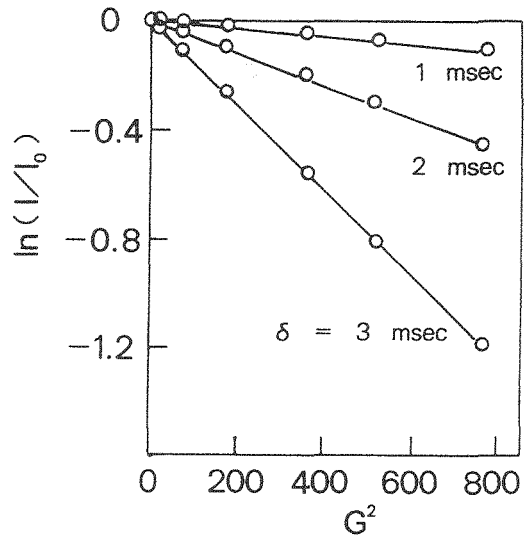


図2 拡散測定用パルス磁場勾配の強度 (G) と水のシグナル (I) の関係

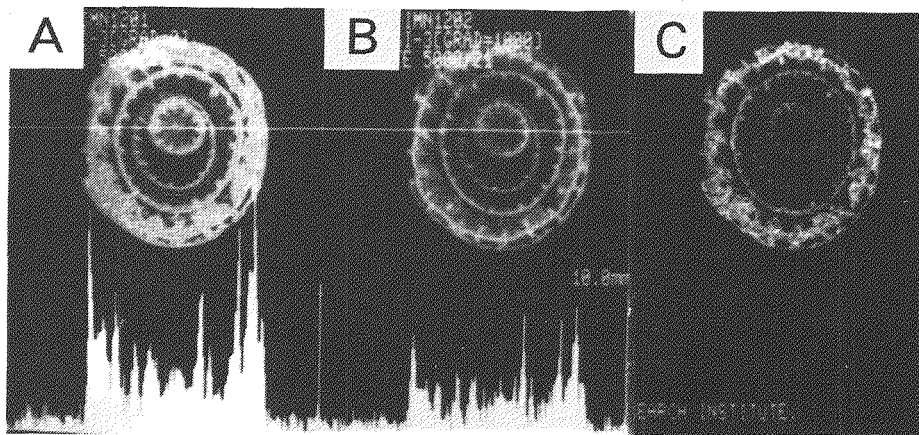
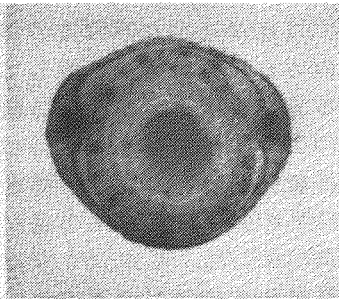
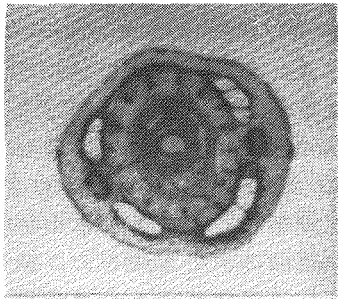


図3 ワケギの拡散イメージ

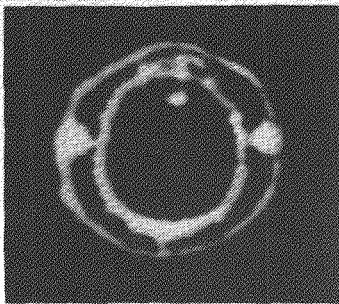
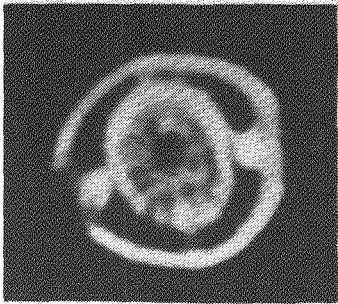
A: 磁場勾配 G=0

B: G=278mT/m、 δ = 3msec

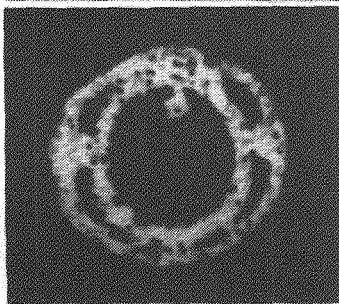
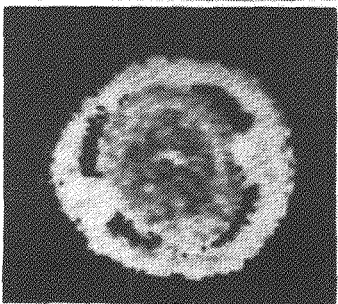
C: A/Bイメージ



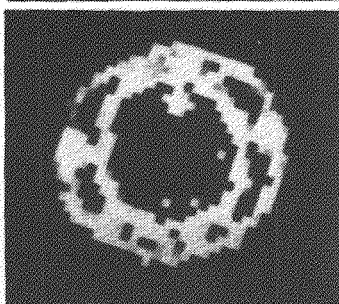
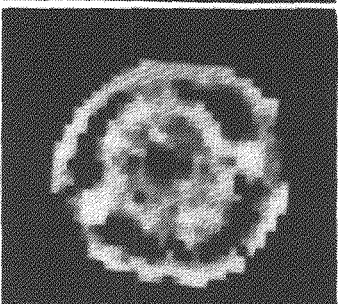
Micrograph
(x20)



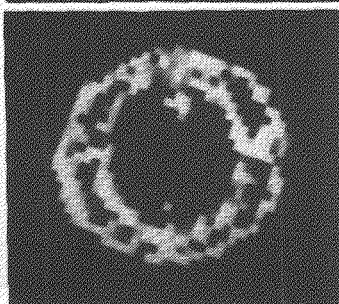
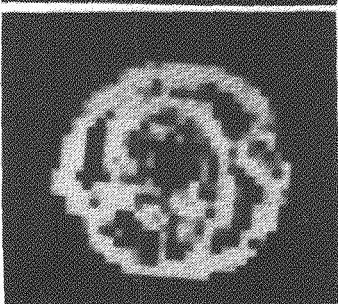
Image



Diff. image



T₁ image



T₂ image

図4 トウモロコシの茎の各種イメージ

左: 茎の基部より1cm

右: 基部より3cm

Measurement of moisture diffusion in soybean seed using PFG-NMR

Mika Fukuoka, Hisahiko Watanabe, Shinji Shimada

Self-diffusion coefficient of moisture in soybean seeds during maturation was measured by an NMR pulsed-gradient method using stimulated echo. Moisture in partially matured seed consists of two components having equal population: $D=1.6 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$, $T_1=40\text{ms}$ for one component, and $D=6.6 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$, $T_1=531\text{ms}$ for the other. In fully matured seed, moisture component with $D=6.6 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$, $T_1=531\text{ms}$ is remained. However, moisture diffusion is deeply restricted at a diffusion time as short as 50ms. The size of barrier space is estimated as $18\mu\text{m}$.

はじめに 食品の貯蔵、加工といったプロセスにおいて、食品素材中に含まれる水の拡散現象が果たす役割は大きい。しかしながら、食品素材が複雑な多成分系であるため、重量法やトレーサー法では純粋な拡散係数を得ることは難しい。磁場勾配NMR法はこれら従来法に代わる強力な手法である。数msの観測時間における、100ミクロン程度の距離の拡散現象を観測することができるので、分子レベルでの解析が可能である。また、非破壊的に検出できることから対象物の変化を経時的に追跡できる。一方、食品素材、例えば植物種子を顕微鏡的に見れば、数10ミクロン単位で細胞を構成している。よって、種子内の水の拡散係数をNMR法で測定すれば、制限拡散による効果が無視できなくなる。制限拡散速度が観測されることにより、細胞内の詳細な構造に関する情報を得ることになる。本研究では、食品素材に大豆種子を用い、保存状態、すなわち完全に発熟した状態に移行するまでの構造変化を水の拡散係数を測定することにより検討することを目的とした。

方法 試料として発熟過程にある大豆種子 (Partially Matured Soybean Seed) ($0.966\text{gH}_2\text{O}/\text{gDM}$) と、完全に発熟した大豆種子 (Fully Matured Soybean Seed) ($0.0947\text{gH}_2\text{O}/\text{gDM}$) を用いた。

測定は、Bruker AM200WB (4.7Tesla) マイクロイメージング付きを用い、RFコイル直径15mm、測定温度25°Cで行なった。Stimulated echo法により、拡散時間を20msから450msまで変化させ測定した。パルスシーケンスをFig. 1に示す。

結果及び考察

1. Water Diffusion in Partially Matured Soybean Seed

拡散時間に対するエコーシグナル強度の変化をFig. 2. に示した。磁場勾配パルスを与えない場合 ($G=0$) のエコーシグナルの拡散時間の変化に対する減衰は、スピナー格子緩和 (T_1) によるものである。このグラフが曲線を示していることからサンプル中には少なくとも2種以上の異なる T_1 を持つ水が存在すると考えられる。この曲線を解析すると $T_{1A}=40\text{ms}$ 及び $T_{1B}=531\text{ms}$ の2成分が得られた。測定においては、TE (エコータイム) =8msに保ってあるので、スピンスピン緩和による減衰は拡散時間の変化に対しては常に一定である。一方、これに磁場勾配パルスを与えると、スピナー格子緩和 (T_1) による減衰に加えて、磁場勾配パルスの強度及び時間に比例した、分子拡散による減衰が起こる。2成分ある T_1 がそれぞれ異なる拡散係数 D_A と D_B をもつとすれば、エコーシグナル強度の拡散時間に対する減衰は次のような式で表せる。

$$A = a \text{Exp}(-t/T_{1A}) \text{Exp}(-\gamma^2 \delta^2 G^2 (\Delta - \delta/3) D_A) \\ + b \text{Exp}(-t/T_{1B}) \text{Exp}(-\gamma^2 \delta^2 G^2 (\Delta - \delta/3) D_B)$$

この式を用いて、シュミレーションを行なった。Fig. 2. において点線で示されたプロットは $D_A=1.6 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ 、 $D_B=6.6 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ を用いた場合のシュミレーションの結果である。磁場勾配パルスの強度が小さい場合はシュミレーションの結果は実測値と良く一致している。しかし磁場勾配パルスの強度が大きい場合は、シュミレーションの結果では Δ が大きくなるとともにほぼ直線的に減衰していくのに対し、実測値では曲線性を残している。このことから、 $\Delta=200\text{ms}$ 以降においては制限拡散の効果が生じていると考えられる。

磁場勾配NMR法、制限拡散

ふくおか みか、 わたなべ ひさひこ、 しまだ しんじ

2. Water Diffusion in Fully Matured Soybean Seed

Δ に対するエコーシグナル強度のプロットは、磁場勾配パルスを与えなかった場合、直線を示した。この直線から得られた T_1 は383msであった。Fig. 3. に $\ln A(G)/A(0)$ vs. $\gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3)$ のプロットを示す。 Δ が50msまでは直線性を示すことから、この範囲では磁場勾配の大ききによらず一定の拡散係数値が得られることがわかる。この直線の傾きから得られた拡散係数は、 $5.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ であった。この値は、登熟過程にある大豆で得られた2種の拡散係数のうち一方の値に近いと言える。 $\Delta=50\text{ms}$ 以降は、 Δ が大きくなるとともにみかけの拡散係数 (apparent diffusion coefficient) は減少していく。制限をうける空間の一次元方向のサイズを a 、制限をうけていない拡散係数を D_0 ($5.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$)、ある Δ におけるみかけの拡散係数を D とし、相対的拡散時間 $\Delta D_0/a^2$ に対して D/D_0 をプロットした (Fig. 4)。このプロットより、制限をうけている空間のサイズは $18 \mu\text{m}$ と推算された。また、Tannerによる解析 (J. E. Tanner, 1979) と比較して、本実験では、Permiability=0を示しており、登熟した大豆種子の水は、透過性のない壁に囲まれて、非常に安定な状態で保存されていることがわかった。

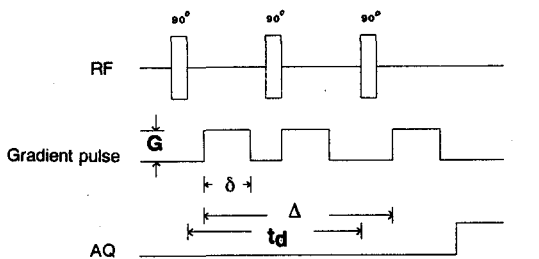


Fig. 1. Stimulated echo pulse sequence for diffusion measurement

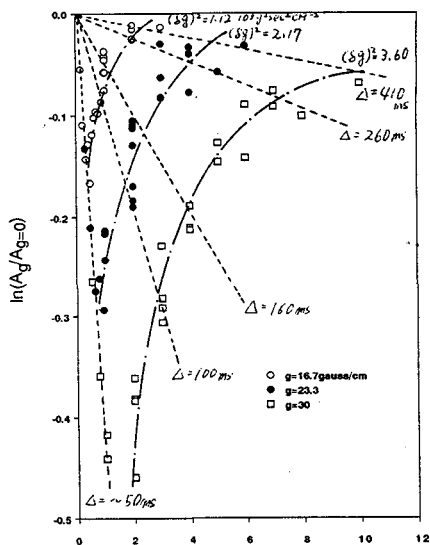


Fig. 3 A semi-log plot of echo attenuation ($A_g/A_{g=0}$) vs. $\gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3)$ for water in a fully matured soybean seed. The family of dashed lines shows the variation with $(\delta g)^2$ by connecting points of equal Δ , as indicated. The family of chain lines shows the variation with Δ at constant $(\delta g)^2$, as indicated.

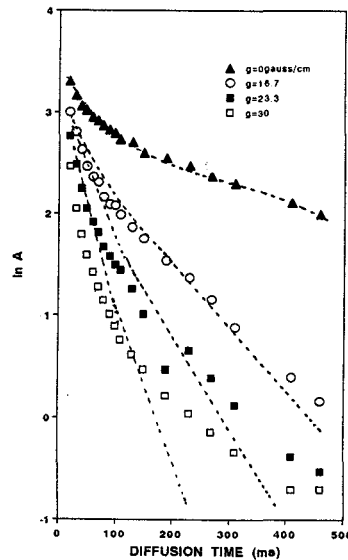


Fig. 2 A semi-log plot of intensity against diffusion time Δ . The family of dashed lines indicates that the decay of echo intensity is simulated using an equation; $A = a \text{Exp}(-td/T_{1A}) \text{Exp}(-\gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3) D_A) + b \text{Exp}(-td/T_{1B}) \text{Exp}(-\gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3) D_B)$
 $a=13.5$, $b=18.2$, $T_{1A}=40$, $T_{1B}=531$,
 $D_A=1.6 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, $D_B=6.6 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$

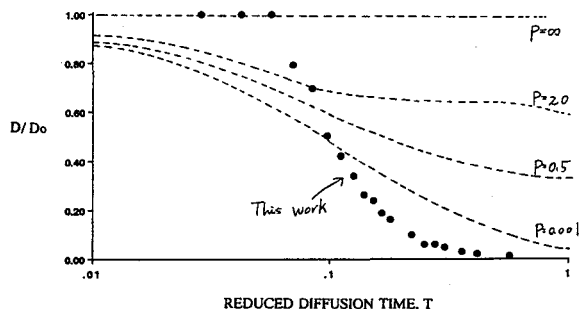


Fig. 4. Reduced apparent diffusion coefficient, D/D_0 , vs. reduced diffusion time, $T = \Delta D_0/a^2$.
 $D_0 = 4.5 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, $a = 18 \text{mm}$.
 The family of dashed lines was shown by Tanner. In the limit of zero time, D/D_0 approaches unity, as expected. At very long times, it is verified numerically that D/D_0 approaches values which may be calculated from $1/D = 1/D_0 + 1/ap$, a is the barrier spacing, and p is the barrier permeability.

筑波大物理工学 松井 茂

Selective Excitation in Solid-State NMR Imaging

S. MATSUI

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

So far, only a few methods seem to have been proposed for spatially selective excitation in solids (1-4), despite the need in solid NMR imaging. Because of the strong dipolar coupling in solids, the selective excitation technique developed for liquid imaging (5) can not be applied to solids directly. Certain artificial quenching of the dipolar coupling would be required in solids for achieving highly selective excitation without significant loss of sensitivity. We present here a simple and efficient selective excitation technique which can be utilized for direct slicing in solid-state proton imaging. The new technique relies on selective saturation resulting from repeated off-resonance spin tipping under the presence of a static field gradient.

As is well known, longitudinal magnetization, M_z , tipped by an off-resonance rf pulse, ω_1 , precesses about the effective field in the rotating frame, ω_e , by a tip angle, $\omega_e t_w$, where t_w indicates the rf pulse width. The amplitude and direction of the effective field depend on the resonance offset frequency, $\Delta\omega$. Therefore, under an applied field gradient, some portion of the magnetization precesses back to the initial longitudinal position while the other portion fails to return. The magnetization of the latter portion dephases rapidly in a time T_2 after the tipping and the former portion remains. (This discrimination can be effected by an rf field gradient as well; however, the rf field is assumed to be spatially uniform in this paper.) After the tipping is repeated N times with a suitable dipolar dephasing interval inserted between the tippings, the surviving portion of the magnetization can be represented by

$$M_z(\delta, t_w) = \{\cos(\sqrt{1+\delta^2} \omega_1 t_w) \sin^2 \theta + \cos^2 \theta\}^N M_0, \quad [1]$$

where $\theta = \tan^{-1}(1/\delta)$, $\delta = \Delta\omega/\omega_1$, and M_0 is the thermal equilibrium magnetization.

For dipolar-coupled protons in solids, such a description of separate magnetization behavior is generally inappropriate because of the mutual couplings.

* 本研究の一部は S. Matsui, J. Magn. Reson. 27, 335 (1992) に発表した。

KEY WORDS: NMR イメージング、固体、マジック角度、選択励起

まつい しげる

Nevertheless, if certain protons satisfying the magic angle condition in the rotating frame (6) are dipolar decoupled sufficiently, the corresponding portion of the magnetization can actually be tipped separately. The magic angle dipolar decoupling effect minimizes the loss of magnetization during the rf irradiation as long as the rf field is strong enough. With the condition, $\omega_e t_w = 2n\pi$, imposed at the magic angle $\theta = 54.7^\circ$, Eq. [1] reduces to

$$M_z(\delta) = \{\cos(2n\pi\sqrt{1+\delta^2}/1.225)\sin^2\theta + \cos^2\theta\}^N M_0. \quad [2]$$

The selectivity has been simulated on the basis of Eq. [2] for studying the applicability and limitation of the technique. Figure 1 shows a simulation result obtained with the tip angle fixed at 2π . The selectivity has also been examined by experiments using an adamantane sample. Further, with the high-resolution imaging technique by magic sandwich echoes (7-9) the selectively prepared longitudinal magnetization has been directly monitored, giving an experimental example of the excitation profile as shown in Fig. 2.

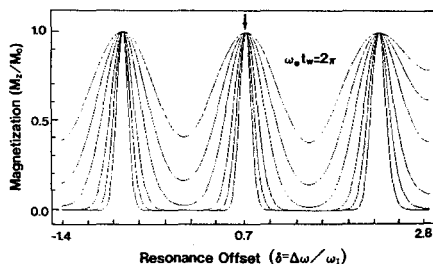


FIG. 1. Simulated profiles of the selective excitation by the off-resonance tipping (see Eqs. [1] and [2]). Spins are assumed to be tipped by $\omega_e t_w = 2\pi$ pulses N times with a suitable dipolar dephasing interval inserted between the pulses. The tip angle is adjusted at the magic angle in the rotating frame ($\delta = 0.707$, indicated by the arrow) (6). The repetition number N is increased as 1, 2, 4, 10, 20, and 40; narrower profiles correspond to larger repetition numbers. The central peaks are used for selective excitation of a single frequency component or a slice and the side peaks are discarded.

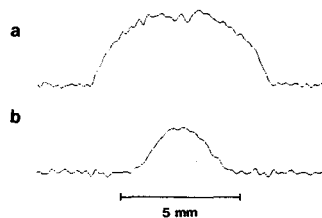


FIG. 2. Experimental example of an excitation (or slicing) profile directly monitored by the solid-state imaging sequence using magic-sandwich echoes (7-9). (a) Projection of the unsliced cylindrical adamantane phantom (diameter, 7.0 mm). (b) Projection of the phantom sliced under the following conditions: tip angle, 4π ; repetition number, 30; and applied field gradient, 15 G/cm. These conditions give a slice thickness of 2 mm, which is in good agreement with the thickness of 2.1 mm observed in (b).

REFERENCES

- 1) M. Corti, F. Borsa, & A. Rigamonti, *J. Magn. Reson.* **79**, 21 (1988).
- 2) E. Rommel & R. Kimmich, *J. Magn. Reson.* **83**, 299 (1989).
- 3) J.B. Miller & A.N. Garroway, *J. Magn. Reson.* **85**, 432 (1989).
- 4) D.G. Cory, J.B. Miller, & A.N. Garroway, *J. Magn. Reson.* **90**, 544 (1990).
- 5) A.N. Garroway, P.K. Grannell, & P. Mansfield, *J. Phys. C* **7**, L457 (1974).
- 6) M. Lee & W.I. Goldberg, *Phys. Rev. A* **140**, 1261 (1965).
- 7) S. Matsui, *Chem. Phys. Lett.* **179**, 187 (1991).
- 8) S. Matsui, *J. Magn. Reson.* **95**, 149 (1991).
- 9) S. Matsui, *J. Magn. Reson.* **98**, 618 (1992).

筑波大物理工学 松井 茂

Proton Images of Elastomers Obtained by the Application
of Magic-Sandwich-Echo Solid-State NMR Imaging

S. MATSUI

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

The well-established liquid-state techniques of NMR imaging can be applied to even solid-like materials if the transverse relaxation times T_2 of the signals are longer than several milliseconds (1,2). However, the resultant images necessarily suffer from lowered sensitivity and are heavily T_2 -weighted, due to the technical limitations (2). Care must be taken to interpret quantitatively these images. To alleviate these problems, we have applied the solid-state NMR imaging technique by magic sandwich echoes (MSE) (3-5) to such troublesome materials. Two-dimensional proton high-resolution images of two types of elastomers will be reported.

Experiments were performed on a home-built spectrometer operating at 59.75 MHz for protons at room temperature. The RF field strength was 2.5 mT which is strong enough for the measured elastomers. A field gradient of 26 mT/m was generated along the z axis with a 4 turn saddle coil (diameter 20 mm and length 23 mm) located inside the probe box for faster switching; the switching time was about 5 μ s. Slice selection (6) was not made. Multiple MSEs of 160-256 were produced with the time interval τ fixed at 30 μ s⁽⁵⁾ and the even-numbered echo peaks were sampled. Each two-dimensional (256 x 256) image with a high resolution of 50 - 125 μ m was reconstructed from 100 projections recorded within 1 - 1.2 h.

The elastomers chosen here are a natural rubber and a composite rubber comprising two polymer blends. The T_2 s of the two types of rubbers were 1.0 and 0.4 ms, respectively, at room temperature (Table I). Samples were cut from the rubber hoses. The composite rubber (gas hose) consists of two layers (Dunlop Home Products, Ltd.): The outer layer is a blend (50/50) of ethylene-propylene-diene rubber (EPDM) and chlorosulfonated polyethylene (CSM). Styrene-butadiene rubber (SBR) is blended with EPDM at 60/40 to form the inner layer. On the outer surface, there is a fine structure of notches.

Prior to the imaging experiments, we have first measured bulk relaxation times. The results are summarized in Table I. Based on the T_2 results, rough estimation can be made with respect to relative contributions of homogeneous and inhomogeneous interactions to the free T_2 decay: In the natural rubber, the homogeneous interaction has an approximately 60 % contribution while it is about 50 % in the composite rubber. The rest of the free T_2 decay is dominated by

KEY WORDS: NMRイメージング、マジックサンドイッチエコー、弾性材

まつい しげる

inhomogeneous interactions; the compensation effect of the experimental imperfections contributes only a few percents or less.

An efficiency of line narrowing, 1/20, obtained for the elastomers with the MSE technique is very low compared to the high efficiency, 1/1000, attained on adamantane (3). This is presumably due to molecular motions with a correlation time of the order of milisecond in the elastomers. However, the 1/20 narrowing has greatly improved the quality of the resultant images, because the sensitivity increases as a consequence of the line narrowing. Due to the relatively long T_2 s, the measurements could be made almost routinely without the critical tuning of the spectrometer. The proton-density image of the composite rubber has shown a very clear differentiation between the two layers (Fig. 1). This is consistent with the difference in their proton densities; CSM contains many chlorosulfonate groups and chlorines, giving a lower proton density than those of the others. A small void and the fine structure on the outer surface are also clearly visualized.

Table I Bulk proton NMR relaxation times of the natural rubber and the composite rubber, indicated in units of ms.

	natural rubber	composite rubber
T_1	100	120
$T_1 \rho^a$	5	4
T_2	1.0	0.4
T_2 (CPMG) ^b	1.6	0.8
T_2 (MREV) ^c	4.5	1.5
T_2 (TREV) ^d	6.0	2.5
T_2 (REF) ^e	20	5.5
T_2 (MSE) ^f	20	8

^a Spin-lattice relaxation time in the rotating frame (RF field strength 100 kHz). ^b A Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence (7) $90^\circ x - \{ \tau - 180^\circ y - 2\tau - 180^\circ y - 2\tau - 180^\circ y - 2\tau - 180^\circ y - \tau \}$. ^c A multiple pulse sequence MREV-8 for high-resolution spectroscopy in solids (8,9). ^d A magic sandwich echo sequence TREV-8 for high-resolution spectroscopy in solids (10). ^e A multiple pulse sequence REF-24 for solid imaging, in which the effective field is reversed, leading to removal of inhomogeneous interactions (11). ^f A magic sandwich echo sequence for solid imaging, where 180° pulses are virtually inserted, eliminating inhomogeneous interactions (3-5).

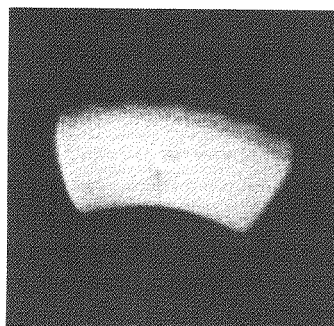


Fig. 1 Two-dimensional proton-density NMR image of the composite rubber. The sample is a piece cut from the gas hose with inner and outer diameters of 9.5 mm and 15.5 mm (3 mm long). (A circle in the center of the image matrix is an artifact.) The two layers are clearly differentiated and the fine structure on the outer surface is also clearly visualized. A small void is detected at the center of the sample. The viewwidth is 9 mm and the theoretical resolution is 125 μm .

We thank Mr. T. Yoshida of Dunlop Home Products, Ltd. for informing the chemical composition of the polymer-blend gas hose. Thanks are also due to Prof. T. Inouye and Mr. Y. Ogasawara for encouragement and data processing.

REFERENCES

- 1) P. Blümler and B. Blümich, *Macromolecules* 24, 2183 (1991).
- 2) S.N. Sarkar and R.A. Komoroski, *Macromolecules* 25, 1420 (1992).
- 3) S. Matsui, *Chem. Phys. Lett.* 179, 187 (1991).
- 4) S. Matsui, *J. Magn. Reson.* 95, 149 (1991).
- 5) S. Matsui, *J. Magn. Reson.* 98, 618 (1992).
- 6) S. Matsui, *J. Magn. Reson.* 97, 335 (1992).
- 7) S. Meiboom and D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.* 29, 688 (1958).
- 8) P. Mansfield, *J. Phys. C* 4, 1444 (1971).
- 9) W.-K. Rhim, D.D. Elleman, and R.W. Vaughan, *J. Chem. Phys.* 58, 1772 (1973).
- 10) K. Takegoshi and C.A. McDowell, *Chem. Phys. Lett.* 116, 100 (1985).
- 11) J.B. Miller and A.N. Garroway, *J. Magn. Reson.* 82, 529 (1989).

P 21

^{17}O , ^1H -NMRによる気体水和水の研究

(1) 代替フロン141bを含有する系

(化技研) ○早水紀久子、柳沢 勝

^{17}O and ^1H -NMR Studies on Gas Hydrates (1) H_2O -141b system

Kikuko Hayamizu and Masaru Yanagisawa, National Chemical Laboratory for Industry, Tsukuba, Ibaraki 305

The relaxation times of T_1 , T_2 and line widths of ^{17}O NMR were observed for ion-exchanged water and 141b- H_2O system with and without ^1H decoupling, where 141b means $\text{CH}_3\text{CFC1}_2$. The line broadening of 141b- H_2O system was observed for the spectra without ^1H decoupling. ^1H NMR spectra of the 141b in H_2O system consist of three component of CH_3 peaks, which indicates that the three different environments around 141b molecules are formed.

気体水和水の研究は主として氷点以下の状態で ^1H NMRが測定され、水分子の形成するクラスター構造について研究されている。最近では低温の固体高分解能NMRスペクトルによって抱接されている気体分子のシグナルから水をつくるクラスターを詳細に検討している。ここでは気体分子、具体的には代替えフロンの一種である141b (1,1-dichloro-1-fluoroethane, $\text{CH}_3\text{CFC1}_2$)を気体分子として、液体状態で抱接現象を観測することを目的にしている。工業的には水-141b系は蓄熱のために使われており、 7.5°C で三重状態をとることが状態解析から知られている。ここでは ^1H NMRと ^{17}O NMRによって主に線幅、 T_1 、 T_2 を測定した。気体水和水との対比のために水(イオン交換水)に関するデータも取得した。

実験

本研究ではイオン交換水(蓄熱のプロセス実験に使っているものと共通)およびイオン交換水に小過剰の141bを添加してNMRを測定した。 ^{17}O は天然存在比のままである。141bを含む系では相分離した状態であり、141bは下の相を形成する。NMRの測定はJBOL-GSH-200により10mmのサンプル管を用い、ロックなし、サンプル・スピニ

気体水和水、 ^{17}O NMR、水、OH交換

はやみず きくこ、やなぎさわ まさる

ング速度は15~20で ^{17}O NMRでは ^1H NMRの照射をした場合と照射しない場合で線幅、 T_1 、 T_2 を測定した。線幅はウィンドウ関数を乗じない値である。 T_1 は $180^\circ-\tau-90^\circ$ 法、 T_2 は $90^\circ-\tau-180^\circ-\tau$ -echo法で測定した。温度範囲はほぼ -10°C から 60°C である。熱履歴があるので、繰り返し測定した。

結果

^1H NMR

種々の塩類を含んだ水の ^1H NMRについては詳細な研究が既に報告されている。141bを添加した系の ^1H NMRにおいて水のシグナルのシフト値の温度依存性、線幅、緩和時間等についてはイオン交換水と比較して実験誤差を大きく上回るような特別の変化はみられなかった。NMRプローブ内のサンプル管の中で温度冷却時にはほぼ -12°C まで過冷却する。水結すれば ^1H シグナルは観測されなくなる。フロン水において徐々に温度を上げてシグナルを観測したのが図1である。純粋なイオン交換水では 0°C になってはじめてシグナルが観測され、急速にシグナルが増加する。フロン水では -8°C で融解が始まり、シグナルが観測される。 141b の CH_3 の ^1H シグナルは ^{19}F とのスピニング結合で 13.7Hz で分裂するが、分裂した3種類のシグナルが観測できるので 141b の分子には3つの異なった状態があることがわかる。シャープなシグナルはフリーな状態に対応し、2種類のブロードなシグナルは 141b を中心にして形成されたクラスターと考えられる。特に 141b を含む重水の系では CH_3 シグナルが観測しやすいので、温度履歴や時間経過による系の変化を研究した。再現性などについて種々の知見を得ている。

^{17}O NMR

^1H をデカップルしない ^{17}O NMRの線幅は2つの異なった要因によって決まることが報告されている。1-3) H_2O において直接結合した ^{17}O と ^1H とのスカラー・スピニング結合定数は約 90Hz と報告され、 $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ 分子を仮定すれば、 ^{17}O シグナルはトリプレットになると考えられる。 H_2O の解離速度、言い替えると ^{17}O が結合しているプロトンと交換する速度が十分に速い場合には平均化されて線幅は狭くなる。交換速度が小さい場合には線幅の大きな原因になる。水の解離速度はアルカリ性あるいは酸性

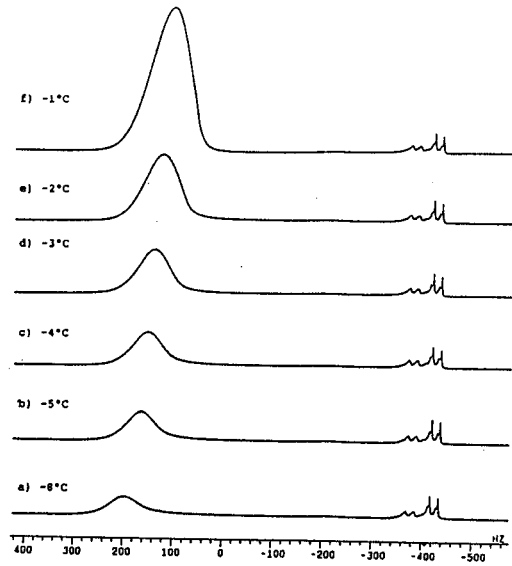


図1. $\text{H}_2\text{O}-141\text{b}$ 系の ^1H NMR、凍結状態から温度上昇時の変化、高磁場側が CH_3 低磁場側は水のシグナル

で大きくなり、 ^{17}O NMRの線幅のpH依存性が報告されている。この時の解離は次のように考えられる。



この現象は水の形成する水素結合の交換現象としてとらえることもできる。スカラー・スピン結合に起因する線幅の広がり $\Delta\nu$ は ^1H のデカップリングにより除去できる。

もう1つの原因は核四極子結合による緩和である。この時には水分子が一部クラスターを形成していると仮定して、その割合をp、クラスター内での相関時間を τ_{c1} 、自由水での相関時間を τ_0 とすると

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{40} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left(\frac{eQq}{h} \right)^2 \times \{ (1-p)\tau_0 + p\tau_{c1} \} \quad (1)$$

核四極子緩和だけが主な寄与の時に線幅 $\Delta\nu$ とすると

$$T_1 = T_2 = 1 / \pi \Delta\nu \quad (2)$$

が成立する。

実験的にイオン交換水の線幅、 T_1 、 T_2 を ^1H デカップリングのある時とない時について室温で測定し、表1に示す。

^1H NMRの照射によりサンプル温度は約2°C上昇する。 T_1 の値は ^1H の照射の有無に関係なく実験誤差内で一致している。 ^1H 照射すれば T_1 と T_2 は等しくなる。測定した線幅は磁場の不均一性によって広がることを考慮すれば緩和

	^1H デカップリングあり	なし
	26°C	24°C
線幅(Hz)	50	80
T_1 (ms)	7.1 ± 0.5	6.6 ± 0.5
T_2 (ms)	7.6 ± 0.4 (42Hz)	5.0 ± 0.3 (64Hz)

射した時にはほぼ等しいといえよう。一方 ^1H を照射しない場合には、 T_2 の値は短くなる上に線幅も広がり、 ^{17}O と ^1H のスカラー・スピン結合の効果が寄与していることがわかる。イオン交換水は温度変化後、時間経過後、また新たに採水後と繰り返し測定すると ^1H を照射すればよい再現性が得られるが、 ^1H 照射しない場合には線幅は50~100Hzの間で変化する。これ

は核四極子緩和の項、即ちクラスターを形成した水分子と自由水との割合及び相関時間で記述できる線幅はよく再現するが、水の解離・交換による効果は水の履歴などによって大きく変化することを示唆している。

	^1H デカップリングあり	なし
	26°C	24°C
線幅(Hz)	55Hz	100Hz
T_1 (ms)	8.3 ± 0.4	6.4 ± 0.5
T_2 (ms)	7.8 ± 0.6 (41Hz)	4.6 ± 0.2 (69Hz)

141bを添加したフロン水の常温における ^{17}O NMRのデータを表2に示す。 ^1H を照射すれば線幅、 T_1 、 T_2 のいずれをとってもイオン交換水と実験誤差を越えるような大きな相違はないが、 ^1H を照射しない時の線幅の大きな広がりや T_2 値の減少がみられる。これは141bが含まれることによって水の解離・交換速度が遅くなっていると説明できる。

141bを含む系においては低温領域が重要であるので、室温から -5°C までの ^1H を照射した場合と照射しない場合の線幅の温度変化を図2に示す。明らかに線幅は温度を下げると広がる。式(1)からわかるように ^1H を照射した場合には温度が下がれば水分子の相関時間が長くなるとして説明できる。イオン交換水の線幅の値と大きな相違はなく、温度上昇時(図中■印)の値は再現している。ところが ^1H を照射しない場合には温度を下げる過程で線幅は徐々に広がるが、温度上昇時(図中●印)には再現せず

に熱履歴があることを示している。141bを含むことによって141bを中心にしてクラスターが形成されることは ^1H NMRから明かであるが、141bの溶解度は小さいので、クラスターの割合も小さい。それは ^1H 照射の線幅にイオン交換水とフロン水の差が小さいことによってもいえる。ところが水の交換速度には大きく影響するので、水全体の水素結合に及ぼす効果として、再現性を含めて検討中である。

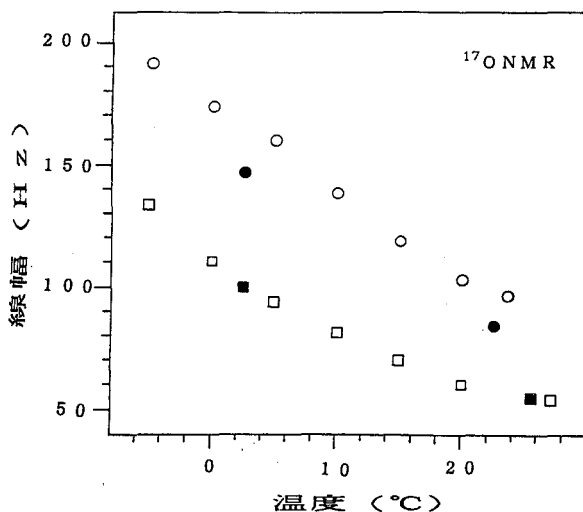


図2. 141b-H₂O系の ^{17}O NMRの線幅の温度変化

^1H 照射なし○:温度下降時●温度上昇時

^1H 照射□:温度下降時■温度上昇

文献

1. S. Meiboom, J. Chem. Phys., 34, 375(1961)
2. F. Fister and H. G. Hertz, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 71, 1032(1967).
3. B. B. Garrett, A. B. Denison, and S. W. Rabideau, J. Phys. Chem., 71, 2606(1967).

曾我美勝¹, 恵良聖一², 桑田一夫², 加藤一夫², 恵良田知樹³, 田崎明³, 中上寧¹,
松本元一¹, 高崎昭彦¹, 巨弘⁴

¹藤田保衛大・総医研・分子生理, ²岐阜大・医・生理, ³筑波大・物工, ⁴生理研・分子生理

はじめに

ウシ血漿アルブミン(BPA Fr. V)は微量のプロテアーゼを含み, BPAがF型(pH 3.8)構造のとき, Gln-392とCys-435の間でペプチド鎖を1~2箇所加水分解し, BPA*(MW, 66K), BPA**(63K)をつくる。BPA*, BPA**はpD 4.0, 6%以上で透明なゲルになる(BPA*-gel)。非常に精製した, プロテアーゼを含まぬウシ・メルカプトアルブミン(BMA; MW, 66K)は12.4%においてもゲル化しない(1)。

BPA*-gelの T_1 (HDO), T_2 (HDO), 特にタンパク質を f_2 照射して求めた分子間交差緩和時間(T_{1s} (HDO))は, BMA溶液の対応する値に比し著明に短縮していることを著者らは見出した。著者らは, 交差緩和イメージングの基礎的研究として, BPA*-gel, BMA溶液内の水構造について, T_{1s} (HDO), タンパク質より水への飽和移動の作用スペクトル, 動的光散乱測定(粒径分布)などを用いて研究した。

材料及び方法

BPA*-gel, プロテアーゼを含まぬ BMAは著者らの方法により作製した(1)。

動的光散乱による BPA*-gel(pD 4.03, 0.10 M Cl⁻), BPA(pD 7.20, 0.10 M Cl⁻)の粒径分布測定は Photal LPA-3000/3100型(大塚電子, $\lambda = 632.7$ nm)を用いて測定した。 T_{1s} (HDO)測定は Bruker AM 500型を用い Akasaka(2)のインバージョンリカバリー法により, 39~107 Hz(γ Hz/ 2π 単位)の f_2 照射を用いて測定した。作用スペクトルは, 15~-10 p.p.m.にわたり, 10~69 Hzの f_2 照射をし, タンパク質より水への飽和移動を測定して求めた。また, Bruker MSL 400型を用い, BPA*-gel, BMA溶液の¹H-NMRスペクトルを Lorentz型吸収線に分離し, 幅広い成分の有無を調べた。

結果と考察

BPA*-gel(pD 4.0, 0.10 M Cl⁻), BMA溶液(pD 4.0, 0.10 M Cl⁻)の $1/T_1$ (HDO) vs 乾燥重量(W(%))を図1に示してある。BPA*-gelと BMA溶液の $1/T_1$ (HDO)の差は, BPA*-gelの結合水量がより多いことを示唆している(1)。7.13 p.p.m., 69 Hzまたは8.65 p.p.m., 107 Hzで f_2 照射して求めた T_{1s} (HDO)も図2に示すように, BPA*-gelがBMA溶液よりも, より短縮している。この結果も, BPA*-gelがより多くの結合水を持ち, しかも BPA*-gel中に高分子量の分子集合体が存在し, Akasakaら(3)の報告のよ

うに、分子内交差緩和時間が短縮するためであろう(4)。

図3に示すように、動的光散乱を用い粒径分布を測定すると、BPA^{*}-gel(13.8%, pD 4.0, 0.10 M Cl⁻)中には高分子量の集合体が存在するが、BPA溶液(13.8%, pD 7.2, 0.10 M Cl⁻)には分子集合体は検出されなかった。

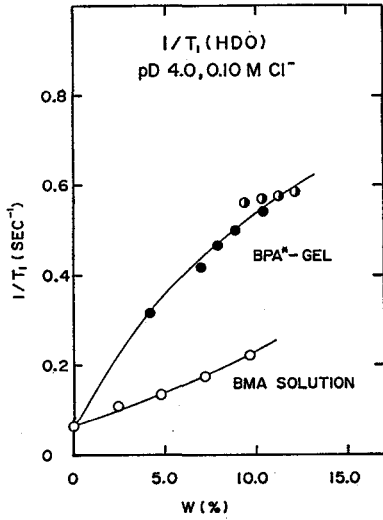
BPA^{*}-gel(13.8%, pD 4.0, 0.10 M Cl⁻)の¹H-NMRスペクトルを成分わけするとBPA^{*}-gelの場合、~1.70 p.p.m.に極大をもつ半値幅~1900 Hzの Lorentz型成分が存在した。この成分を差し引くと、図4に示すような BMA溶液(pD 4.0, 0.10 M Cl⁻)に似たスペクトルが得られた。図4(b)のスペクトルは高分子量分子集合体によるのだろう。ついで、f₂照射位置の関数として HDOシグナルの飽和度を示す作用スペクトルを、f₂照射時間10秒、 $\gamma \text{ Hz}/2\pi = 10 \sim 69 \text{ Hz}$ を用いて測定した。BMA溶液(9.6%, pD 4.0)では作用スペクトルは、ほぼ¹H-NMRスペクトルに対応した結果が得られた(図5)。BPA^{*}-gel(8.9%, pD 4.0)の作用スペクトルはf₂照射強度の弱いときは($\gamma \text{ Hz}/2\pi$, 10~20 Hz)、ほぼ¹H-NMRスペクトル(溶液スペクトル)に一致し(図6)、39~69 Hzのf₂照射では、図4(b)の線幅の大きい成分の寄与が強調された作用スペクトルであった(図6)。即ち、BPA^{*}-gelタンパク質分子より HDOへの飽和移動において高分子量集合体の寄与を示唆する結果であろう。さらに、図4(b)の線幅の大きい Lorentz型成分の寄与を見るため、-8.79 p.p.m., $\gamma \text{ Hz}/2\pi \sim 69 \text{ Hz}$ でf₂照射し、T_{1s}(HDO)を測定した。図7に示すように、数%前後の BMA溶液では1/T_{1s}(HDO)は、ほぼゼロであるが、BPA^{*}-gelでは、1/T_{1s}(HDO) vs W(%)は急峻に増加した。

タンパク質より水への交差緩和現象(飽和移動)におけるBPA^{*}-gelと BMA溶液の差は BPA^{*}-gel中の高分子量集合体の存在と結合水量の増加によるのだろう。

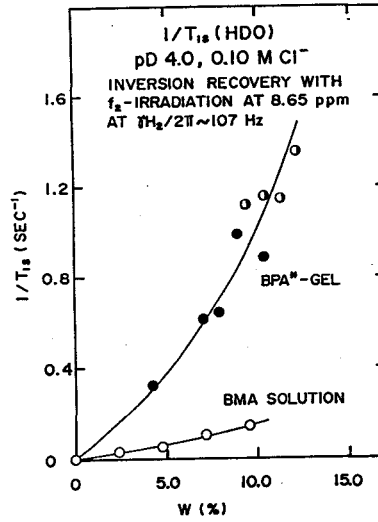
文 献

1. 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)
2. Akasaka, K., J. Magn. Reson. 45, 337 (1981); Akasaka, K. ibid. 51, 14 (1983)
3. Akasaka, K., Ishima, R., Shibata, S., Physica B 164, 163 (1990)
4. Sogami, M., Era, S., Kuwata, K. et al, SMRM Abstract p. 686 (1991)

(図 1)



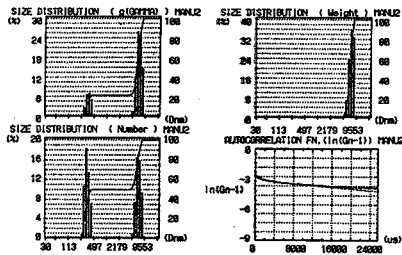
(図 2)



(図 1) BPA*-gel (●, ○; pD 4.0, 0.10 M Cl⁻), BMA 溶液 (○; pD 4.0, 0.10 M Cl⁻) の $1/T_1(\text{HDO})$ vs 乾燥重量 (W (%)) (25°)。

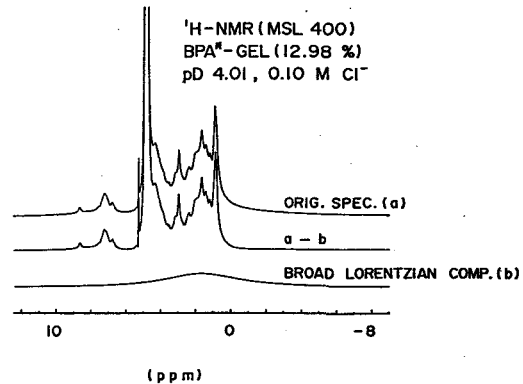
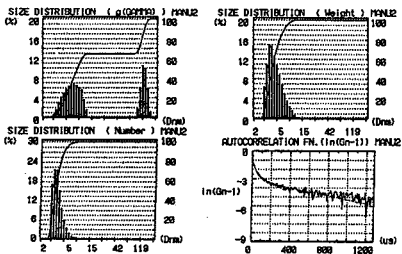
(図 2) 8.65 p.p.m., $\gamma H_2/2\pi \sim 107 \text{ Hz}$ の f_2 照射より求めた BPA*-gel, BMA 溶液の $1/T_{1s}(\text{HDO})$ vs W (%) (符号図1参照, 25°)。

BPA*-GEL (13.8%), pD 4.03, 0.10 M Cl⁻



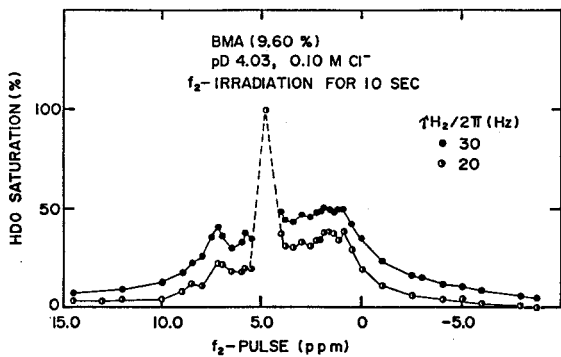
(図 3) BPA*-gel (13.8%, pD 4.0, 0.10 M Cl⁻, 25°), BPA 溶液 (13.8%, pD 7.2, 0.10 M Cl⁻, 25°) の動的光散乱より求めた粒径分布 (D (nm))。

BPA SOL. (13.8%), pD 7.20, 0.10 M Cl⁻

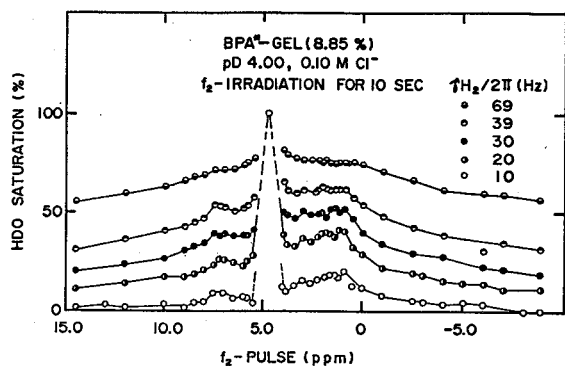


(図 4) BPA*-gel (13.0%, pD 4.0, 0.10 M Cl⁻, 25°), の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

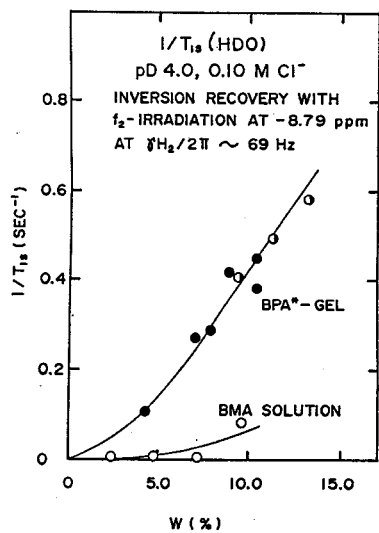
(a), 幅の広い Lorentz 型成分 (b) 及び (a - b)



(図 5) BMA 溶液 (9.6%, pD 4.0, 0.10 M Cl⁻) における f₂ 照射位置の関数として HDO シグナルの飽和度を示す作用スペクトル (25°)。f₂ 照射時間, 10 秒。



(図 6) BPA*-gel (8.9%, pD 4.0, 0.10 M Cl⁻) における f₂ 照射位置の関数として HDO シグナルの飽和度を示す作用スペクトル (25°)。f₂ 照射時間, 10 秒。



(図 7) - 8.79 p.p.m., $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz の f₂ 照射より求めた BPA*-gel, BMA 溶液の 1/T_{1s}(HDO) vs W (%) (符号図 1 参照)。

○渡部 徳子、 村勢 則朗*、 大塚 章宏

東京水産大学、 *東京電気大学

A gel, a crosslinked polymer soaked with fluid, is an important state which is found in foods and in a variety of biological and chemical materials. Interaction between water and polysaccharide, especially in gel phases, is important in food science and technology. In this paper we targeted to make clear the dependence of water compartment size and shape in gels on the proton exchange rate between water and polymer chain and on the translational diffusion rate. Proton relaxation times (T1 and T2) by multiexponential analysis and self-diffusion coefficient by pulsed field gradient (PFG) NMR method were investigated for water in polysaccharide gels, Sephadex and Dextran, which form various sizes of compartment with various amount of water. Slow proton exchange was observed in a specific combination of water content and compartment size at a specific temperature range.

[はじめに]

ゲルは3次元網目構造をもった高分子であるが、特に水溶性のヒドロゲルは生体組織のモデルや医療材料など生体系に近い材料として注目されている。また、食品科学の分野においてもゼラチンや寒天などの天然物質（多糖類）からのゲルや卵白アルブミンやリゾチームなどのタンパク質のゲルは食品の物性発現に密接な関係をもっている。ゲルの示す様々な物性や機能を解明する方法として、本研究においては、ゲルが構築する微小空間内での溶媒分子の動的挙動を手がかりとし、その環境（3次元網目構造の大きさと形、高分子鎖の架橋間距離、疎水性・親水性、溶媒分子・高分子比、電荷分布、弾性・粘性など）との相関性を明かにし、さらにはゲル化の機構と関連つけることを目的としている。

[実験]

水溶性鎖状高分子デキストラン（T10～T500）とその架橋高分子であるセファデックスゲルG（G10～G100）を素材とし、水分含量 30～90 w/w % に調製した。パルス磁場勾配NMR（stimulated spin echo）法により拡散係数を求めた。エコー信

わたなべとくこ、むらせのりお、おおつかあきひろ

号をFT後、水プロトンの信号(0 ppm)と高分子鎖プロトンの信号(-1.2 ppm)の信号強度の減衰をそれぞれ計測した。装置はMSL100および400分光計(ともにBruker社)を用い、磁場勾配0.25~4 mT/cm、磁場勾配の作用時間4 ms、拡散時間2~400 msで測定した。回転拡散速度はJES-FE1Xによりスピンプローブ法で温度範囲0~50℃の測定結果から求められた。緩和時間はPC-120(Bruker)を用い温度範囲5~50℃でCPMG法(T2)およびIR法(T1)によりデータを取得し、multiexponential解析により求められた。

[結果と考察]

① 拡散運動について

デキストラン中の水(図1)セファデックスゲル中の水(図2)の拡散による信号強度の減衰の過程を示す。前者においては減衰が拡散時間によらず一定であるのに対し、後者においては拡散時間が長くなると減衰の度合いが小さくなる。これは高分子水溶液においては水の拡散は阻害されないが、架橋のあるゲル中においては水は制限拡散の状態にあることを意味している。また、系中には拡散速度の異なる二種類の水が存在することが明らかである。

図3aに拡散による影響をうけた後のNMRスペクトルを示す。0 ppmの信号は系内の水プロトンに、また、-1.2 ppmの信号は高分子鎖中のCH₂プロトンによる。拡散時間を十分に長くすれば、自由に動ける水の信号が速く減衰するために、動きにくい水(trapped water 又は bound water)と高分子鎖の信号が観測される。これらの信号の減衰からみかけの拡散速度を求めることができる。図3bおよびcにその解析例を示す。得られたみかけの拡散速度D_{app}はポア内の水および高分子水溶液中の水: 10⁻⁵~10⁻⁶ cm²/s、trapped water 又は bound water; Ca. 10⁻⁷~10⁻⁸ cm²/s、高分子鎖のゆらぎ; Ca. 10⁻⁸ cm²/sであった。D_{app}から拡散時間(Δ)の間の平均2乗変位<[r(Δ) - r(0)]²>、として、ゲル又はゾル中の水で2~15 μm、高分子鎖で0.1 μm程度と求められた。これらの位はセファデックスゲルの平均ポアサイズと比べるとかなり大きく、高分子鎖の作る拡散運動へのバリアーはpermeableであることを反映しているといえる。

② 回転拡散運動について

ESRスピンプローブの線形解析より、異方性回転していること、回転運動の活性化エネルギーがポリサイズに依存することが明らかとなった。

③ T2緩和機構について

図4に示すようにセファデックスゲル中の水の緩和時間はポアサイズ依存性、水分含量依存性を示した。系内には2種類の水が存在する。それらは、長い緩和時間を示すポア内の水(80%)と鎖のからみあったところに閉じこめられた緩和時間の短

い水（20%）に帰属される。これら2種類の水は①で得られた二つの異なる拡散速度をもった水に相当する。温度依存性から、緩和機構は主に双極子-双極子相互作用に支配されるが、特定の温度、特定の試料において、水プロトンと高分子鎖プロトンとの間の遅いプロトン交換相互作用の影響を受け、急激にT2が短くなることが明らかとなった。

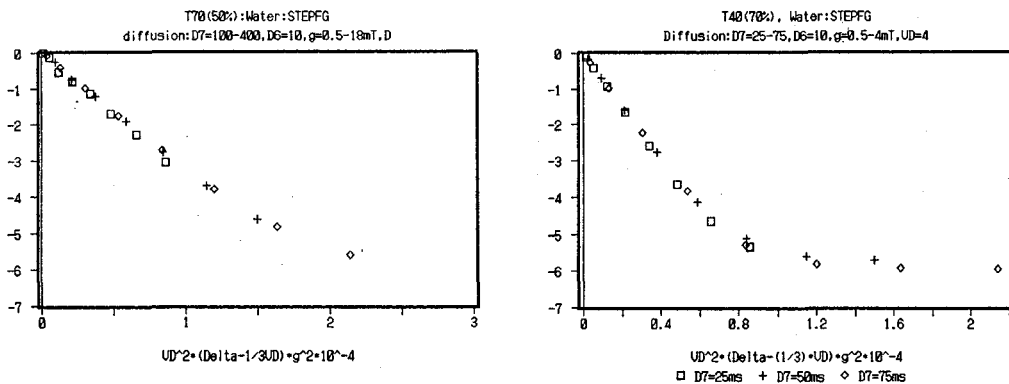


図1. デキストラン中の水信号の減衰. a ; T70 (50%), b ; T40 (70%)

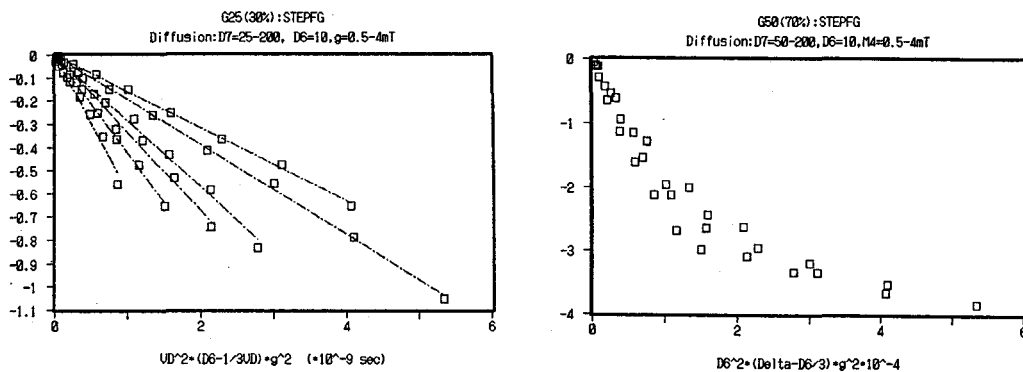


図2. セファデックスゲル中の水信号の減衰.
a ; G25 (30%), b ; G50 (70%)

図3. (次ページ)

- a ; 拡散の影響を受けたNMRスペクトル ; G50 (90%)
- b ; 0 ppmの信号の減衰とその成分解析
- c ; -1.2 ppmの信号の減衰曲線. (初めの数ポイントは水信号のすその影響を受けているため、解析から除いた。)

図 3

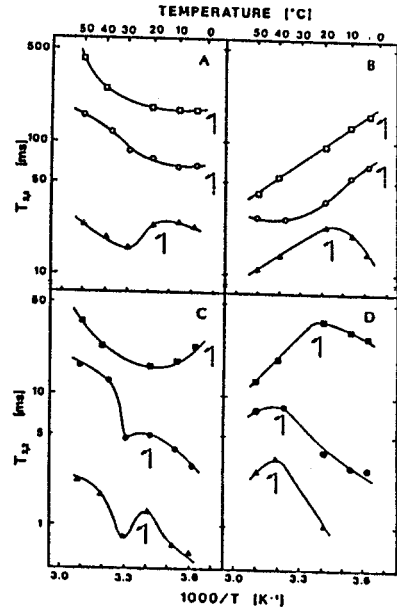
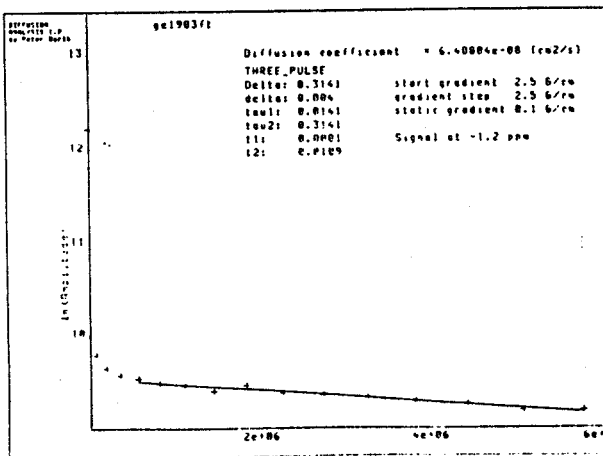
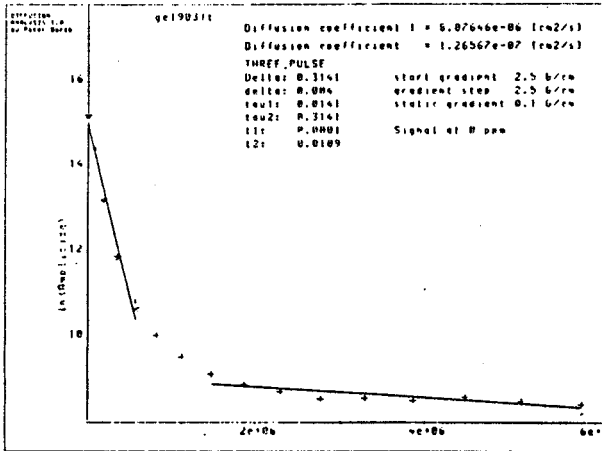
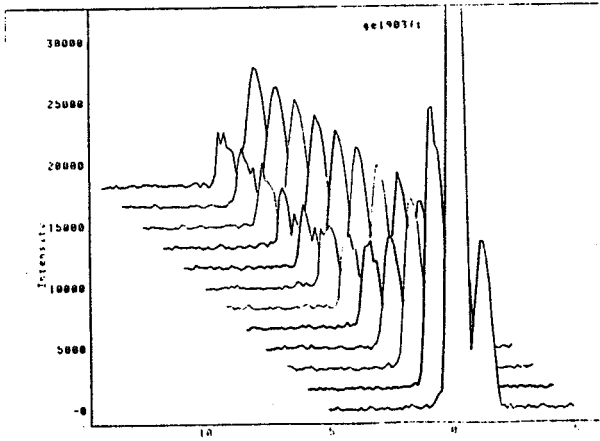


図 4 セファデックスゲル-水系における T₂ 緩和時間の温度依存性。

ゲル ; G 50 (A , C)

G 25 (B , C)

水分含量 ; 70 % (■ □)

50 % (● ○)

30 % (▲ △)

[謝 辞]

PPGNMR(MSL100)による拡散速度の測定に際し、生理学研究所、瀬尾博士のご協力を得ましたこと、感謝申し上げます。

^{113}Cd 及び ^1H NMR による
ゼオライト細孔内の水分子の運動

(北見工大)○三浦宏一、小林祐介、松田弘喜、福井洋之

 ^{113}Cd and ^1H NMR Studies of Motion of Water Molecules in Zeolite Pores

Koichi Miura, Yusuke Kobayashi, Hiroki Matsuda and Hiroyuki Fukui

Department of Industrial Chemistry, Kitami Institute of Technology.

^1H and ^{113}Cd NMR spectra of cadmium-exchanged Y-zeolite were studied at ordinary temperature. The ^1H relaxation time of water absorbed in Y-zeolite was 10ms. This shows that the motion of water molecules in zeolite is obviously restricted compared with that of free liquid water. The measurements of solid NMR by single pulse, single pulse MAS, and CP-MAS of ^{113}Cd in Y-zeolite containing absorbed water showed that two distinct states of water molecule exist in zeolite pores.

《はじめに》

ゼオライトはアルカリまたはアルカリ土類金属イオンを含む含水テクトアルミノケイ酸塩の総称であり、構造内のアルカリ、アルカリ土類金属イオンは容易に他の金属イオンと交換する。ゼオライトの構造的特徴は、その構造内にさまざまな形や大きさをもったかご状の空洞や、それらを相互に結んでいるトンネル状の孔路と呼ばれる大きな空間があることである。また、ゼオライトは古くから結晶構造を破壊することなく加熱によって結晶水を放出し、結晶水を失ったゼオライトは選択的に気体分子を吸着し、吸湿能をもつことが知られている。

前述したようにゼオライト細孔内にある水分子は重要な役割をはたしているが、その状態は、吸着したり会合したりして非常に複雑であり、その状態を解明することは重要である。NMRを用いたゼオライト内の水分子についての研究として、30年近く前に、桐山等¹⁾が天然と合成ゼオライト内の水を広幅NMRを用いて液体窒素温度から常温まで測定し、ゼオライトの構造と温度による線幅の変化について考察した研究があるが、高分解能NMRを用いた研究はほとんど見当たらない。本研究ではCdイオン交換したY型ゼオライトを調整し、飽和吸湿したゼオライト内の水のプロトン緩和時間と、ゼオライトを加熱処理して含水量を変化させたときの固体Cd NMRを室温で測定し、ゼオライト細孔内での水分子とCdイオンの状態について調べた。

キーワード : ^{113}Cd NMR, ^1H NMR, ゼオライト, 水分子, 水和, 分子運動

みうら こういち、こばやし ゆうすけ、まつだ ひろき、ふくい ひろゆき

《実験》

Cd イオン交換 Y 型ゼオライトは、Na/Y ゼオライト (東洋曹達) と塩化カドミウム水溶液を用いて常法で得た。得られた Cd-Y 型ゼオライトは 100°C で 24 時間乾燥させた後、水の入ったデシケーター中に約 1 週間放置し飽和吸水させ、これを飽和吸湿試料として用いた。加熱処理は試料を真空中で所定の温度で 3 時間行い、これを真空中で冷却後、直ちに NMR 測定を行った。

^1H NMR 測定は、JEOL FX-200(^1H 200MHz) に溶液用プローブを付け、10mm ϕ 試料管を用いて室温 (22°C) で行った。 T_1 の測定は Inversion Recovery 法により行った。 ^{113}Cd NMR 測定は、FX-200(^{113}Cd 44.26MHz) に固体多核種用ユニットを付け、ダイフロン試料管を用いて室温で行った。Cd 観測周波数幅は 30,000Hz、積算回数は 20,000~40,000 回である。化学シフトの外部基準としては固体 $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$ を用い、その CP-MAS スペクトルの高磁場側ピークを -56ppm とした。

《結果と考察》

飽和吸湿した Cd-Y ゼオライトと比較のための純水の ^1H NMR スペクトルを Fig.1 に示す。ゼオライト中の水の線幅は純水に比べ約 100 倍も広がっており、明らかにその運動状態が異なっていることがわかる。パウダー試料の場合、線幅は試料の局所的な透磁率の違いなどを反映している場合もあるので、プロトンの緩和時間 (T_1) を測定した。測定した Y ゼオライト内の水の緩和時間は 10msec であり、液体状態の水に比べ数百倍短くなっている。これから、線幅の変化は T_1 の変化に比例していることがわかった。極度尖鋭の条件下では、緩和速度は相関時間に比例すると考えてよいから、室温におけるゼオライト中の水の運動は液体の水よりも 100 倍程度遅いことがわかった。また ^1H スペクトルの線幅は、水分子の運動状態を定性的に反映することが確かめられた。

ゼオライト中の Cd イオンと水との相互作用について調べるために、固体 ^{113}Cd NMR を測定した。飽和吸湿した Cd-Y ゼオライトについて、MAS を行わずに single pulse で測定したスペクトル、MAS を行い single pulse で測定したスペクトル、さらに CP-MAS で測定した 3 種類のスペクトルを Fig.2-A に示す。以下、3 種類の測定を SP、SP-MAS、CP-MAS と記すことにする。ここで注目したいのは、SP と SP-MAS のピークは、ほとんど同程度の narrow な線幅を与えていることである。このことは両法で観測された Cd イオンが固体状態よりもむしろ液体に近い状態にあることを示唆するものである。Fig.3 に Y ゼオライトの骨格構造とカチオンサイトを示したが、吸湿した Y ゼオライトでは、Cd イオンの一部は super cage (13Å) 中で水とイオン構造を形成し、溶液状態に近い速い運動を行っていると考えられる。また、この試料では CP-MAS によるピークも観測されているが、このピークは SP や SP-MAS のピークとは化学シフトが異なっている。このことから、CP-MAS によるピークは、前述した Cd 種



Figure 1. ^1H NMR spectra of water in Cd exchanged Y-zeolite (a) and liquid water (b) at room temperature.

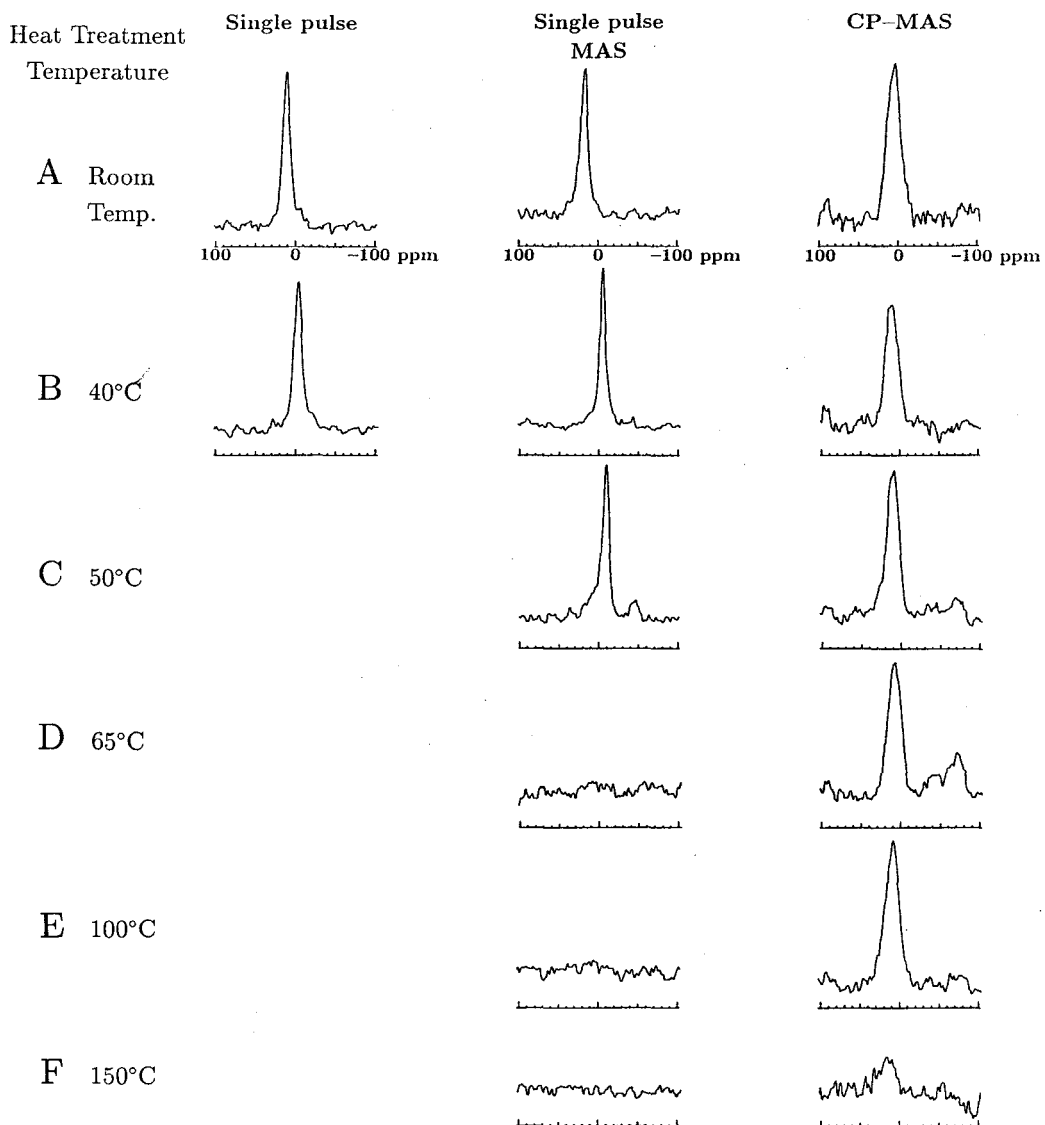


Figure 2. ^{113}Cd NMR spectra of Cd exchanged Y-zeolite. Rotor speed, 3kHz; line broadening applied 100Hz. Each temperature on the left side indicates the heat treatment temperature in vacuo.

とは異なり、I、II、III等のサイトで水分子と強く結合しているCdイオンによるピークと考えられる。CPの測定原理を考慮すると、このCdイオンに結合している水分子の運動は非常に強く束縛されていて固体状態に近いことを示唆している。このような固体状態に近い水分子の ^1H NMRの線幅は非常に大きく、通常の高分解能 ^1H NMRでは観測されない。従って我々が ^1H NMRで観測した水のピークは、前者のsuper cage中での水和水に相当していることになる。

次に、飽和吸湿したゼオライトを真空中で種々の温度で加熱処理した後測定したCdスペクトルをFig.2のB~Fに示す。SP-MASのシグナルは 50°C 付近まで高磁場シフトしつつ観測されたが、 65°C 以上で加熱処理した試料ではピークは観測されなかった。このことは、加熱による水分量の減少によりsuper cage中での水和水の構造が変化し、 65°C 以上では水和水が蒸発して水和水構造が消失するためと思われる。一方CP-MASで測定したCdシグナルは 100°C 程度の加熱ではその強度と化学シフトは変化せず、 150°C で高温処理したとき強度の減少が見られた。これは、I、II、III等のゼオライト骨格に近いサイトにあるCdイオンに結合した水分子は、super cage内における水和水よりもCdとの結合力が強く容易に蒸発しないことを示すものである。

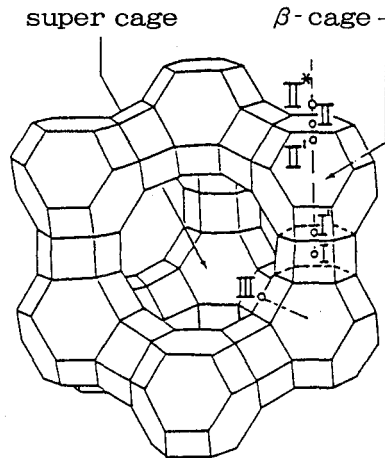


Figure 3. Framework structure of Y-zeolite with cation sites indicated by Roman numerals.

<<結論>>

吸湿したCd-Yゼオライトの常温における ^1H 及び ^{113}Cd NMRの測定から、Y型ゼオライト中には、状態の異なる2種類の水分子があることが確かめられた。一つはsuper cage中でCdイオンと溶液状の水和水構造をとり、その運動は通常の水に比べ数百倍程度遅い。もう一方はゼオライト骨格上のカチオンサイトにあるCdイオンと強く結合した水分子である。後者の水分子は運動が非常に遅いため、高分解能 ^1H NMRでは測定ができないが、 ^{113}Cd のCP-MASによってその存在を知ることができた。

<<文献>>

- 1) 桐山良一ほか, 工化, **68**, 1485 (1965).

P 25

$^1\text{H-NMR}$ によるソフトコンタクトレンズ内の水構造の研究

岐阜大・医・生理, *藤田保衛大・総医研・分子生理, **生理研・分子生理

○恵良聖一, 桑田一夫, 中村浩二, 今井一, 曾我美勝, 中上寧, 巨弘**

$^1\text{H-NMR}$ studies on water structure in soft contact lens

Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., *Div. of Mol. Physiol., Inst. for Compreh. Med. Sci., Fujita Health Univ., **Dept. of Mol. Physiol., Natl. Inst. for Physiol. Sci. S. Era, K. Kuwata, K. Nakamura, H. Imai, M. Sogami*, Y. Nakagami*, H. Watari**

Water structure in soft contact lenses (SCLs, water content from 18.4 to 80.0 %) and mouse lenses (2-, 4- or 8-week-old) were studied by measuring spin-lattice relaxation times (T_1) and intermolecular cross-relaxation times (T_{1s}) from irradiated protein or polymer protons to water protons, using 360 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrometer at 25 °C.

(1) $1/T_1$ values of SCLs increased gradually with increasing dry weight (W(%)). $1/T_{1s}$ values of SCLs were approximately zero at W of 20.8 and 26.8 %, and increased gradually from 26.8 % and then steeply above ~ 50 %. (2) A plot of $1/T_1$ vs W(%) of mouse lenses was almost equal to that of SCLs. However, a plot of $1/T_{1s}$ vs W(%) of mouse lenses was an approximately straight line with the intercept at W of 23 % and with the slope which is almost equal to that of SCLs above W of ~ 50 %. The plot of $1/T_{1s}$ vs W(%) of mouse lenses might indicate that significant change in water structure and/or protein-water interaction above W of 23 %.

1. はじめに

Damadian(1), Hazlewoodら(2)は種々の腫瘍組織内の水の T_1 , T_2 が正常組織内の水の T_1 , T_2 よりも長いことを見だし, このことは単に含水量の差のみによるものではなく, 水構造に差のあることを示唆した。このような生体組織内の水構造の系統的研究として, 我々は今までにタンパク質のゾル・ゲル変換(3), ラット正常・腫瘍肝組織(4), ラット正常・浮腫脳組織(5), ラビット正常・炎症関節軟骨組織(6)などの水構造変化を, 360 MHz $^1\text{H-NMR}$ により主として縦緩和時間(T_1), タンパク質より水分子への分子間交差緩和時間(T_{1s})を測定し, 特に T_{1s} が生体組織内における水構造変化を鋭敏に反映し得ることを見だした。今回は, 合成高分子ゲルとしてソフトコンタクトレンズ(SCLs)を用い, その組成を種々に変化させることによって含水量の異なったSCLs内の水構造について検討し, マウス水晶体内水構造と比較研究した。

合成高分子ゲル, 水晶体, 水構造

えらせいいち, くわたかずお, なかむらこうじ, いまいはじめ, そがみまさる, なかがみやすし, わたりひろし

2. 材料と方法

SCLsのモノマー重量分率組成を表1に示す。モノマーの組み合わせによりNVP-MMA系, NVP-GMA系, HEMA-AHEMA系コポリマーで, 含水量は表1に示すように, 18.4 ~ 80.0 %である。これらのSCLsを円柱状に加工し, 内径1.1 mmのNMRガラス細管に入れ, ロック用溶媒としてDMSO-d₆を入れた5 mmφのNMR試料管に挿入した。また, 2, 4または8週齢のddyマウス水晶体を内径2.3 mmのNMRガラス細管に入れ(2週齢~20個, 4週齢~15個, 8週齢~10個), SCLsの場合と同様にロック用溶媒を入れた5 mmφNMR試料管に挿入して2時間以内に測定した。360 MHz ¹H-NMRを用いて, T₁, T_{1s}を測定した。T_{1s}は7.13または-4.00 ppmを $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hzで照射し, inversion recovery法(Akasaka, 7)により測定した。

表 1 Weight Ratio of Monomers and Water Content (%)
in Soft Contact Lenses (SCL)

SCL	N-VP	MMA	GMA	DMA	HEMA	AHEMA	WATER(%)
copolymers of N-VP and MMA							
	33.9	58.1	-	-	-	-	18.4
	42.9	49.1	-	-	-	-	28.5
	51.9	40.1	-	-	-	-	40.0
	60.9	31.1	-	-	-	-	53.3
	69.9	22.1	-	-	-	-	64.7
	78.9	13.1	-	-	-	-	73.2
	87.9	4.1	-	-	-	-	79.2
	57.1	28.6	-	14.3	-	-	80.0
copolymers of N-VP and GMA							
	28.6	-	71.4	-	-	-	61.0
	50.0	-	50.0	-	-	-	64.0
	66.7	-	33.3	-	-	-	68.0
copolymers of HEMA and AHEMA							
	-	-	-	-	94.3	5.7	29.0
	-	-	-	-	99.0	1.0	39.0

N-VP, N-vinyl-2-pyrrolidone ; MMA, methyl methacrylate ; GMA, glyceryl methacrylate ; DMA, N-N'-dimethylacrylamide ; HEMA, 2-hydroxyethyl methacrylate ; AHEMA, 2-alkyl-2'-hydroxyethyl methacrylate

3. 結果と考察

水晶体は水66%, タンパク質33%, その他の物質1%から構成される親水性の液晶的なゲル構築体であり, その透明性と屈折性は水-タンパク質-その他の微量物質群の3者間の巧妙な相互作用のバランスにより保持されている。Ozakiら(8)は水晶体の老化と水晶体タンパク質の構造変化について, ラマン分光法によりSD系ラット水晶体を測定し, 含水量及び水晶体タンパク質の構造変化は生後より生じ, 6月齢まで大きく変化することを見いだした。我々が得たddyマウス水晶体の¹H-NMR測定結果をまとめたものを表2に示す。表からもわかるように, ddyマウスにおいては含水量, T₁値, T_{1s}(7.13 ppm, 69 Hz)値, T_{1s}(-4.00 ppm, 69 Hz)値のいずれも2週齢と4週齢の間には大きな違いがみられるが, 4週齢と8週齢間には有意な差はみられなかった。1/T₁, 1/T_{1s}(7.13 ppm, 69 Hz), 1/T_{1s}(-4.00 ppm, 69 Hz)を乾燥重量(W(%))に対してプロットしたものがそれぞれ図1A, 1B, 1Cである。また, SCLsにおける測定結果をマウス水晶体の結果と重ね合わせたものを図2(図2A, 1/T₁ vs W(%); 図2B, 1/T_{1s}(-4.00 ppm, 69Hz) vs W(%))に示す。SCLsにおいて, NVP-MMA系コポリマー(○), NVP-GMA系コポリマー(●), HEMA-AHEMA系コポリマー(◎)のいずれも1/T₁ vs W(%)プロットでは, マウス水晶体で得られた結果(●)と良く一致して分布しているが, 1/T_{1s} vs W(%)プロットではいずれのコポリマーでも乾燥重量が26.8%以下では~0(T_{1s}(H₂O)が非常に長い), 26.8%以上では図2Bに示すように大幅に増加する。また, マウス水晶体の結果と良く一致しているSCLsはNVP-GMA系コポリマーであり, このことより, NVP-GMA系コポリマー内の水の存在状態はNMR的にみて, 生体組織のそれに類似していることが示唆された。

表2 ¹H-NMR data for water protons in mouse lenses ⁸

	(2-week-old)	(4-week-old)	(8-week-old)
chemical shift (p.p.m.)	4.76 ± 0.01 (n = 4)	4.83 ± 0.09 (n = 10)	4.89 ± 0.10 (n = 6)
\bar{W} (%)	25.3 ± 2.41 (n = 4)	31.1 ± 3.62 (n = 10)	34.3 ± 2.70 (n = 6)
\bar{T}_1 (SEC)	2.38 ± 0.26 (n = 4)	1.57 ± 0.21 (n = 10)	1.44 ± 0.23 (n = 6)
\bar{T}_{1S} (SEC)	3.42 ± 1.71 (n = 4)	1.24 ± 0.46 (n = 10)	1.21 ± 0.23 (n = 6)
f ₂ = 7.13 p.p.m.			
↑H ₂ /2π ~ 69 Hz			
\bar{T}_{1S} (SEC)	22.8 ± 9.50 (n = 3)	3.17 ± 1.12 (n = 10)	3.09 ± 0.74 (n = 4)
f ₂ = -4.00 p.p.m.			
↑H ₂ /2π ~ 69 Hz			

⁸, 10(8-week-old) ~ 20(2-week-old) mouse lenses were carefully inserted into a glass capillary of 2.30 mm inside diameter. An open end of the glass capillary was filled with inert plastic paste. ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.02; *, P < 0.05; NS, not significant.

図 1 A

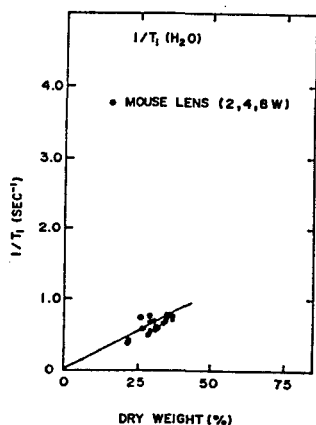


図 1 B

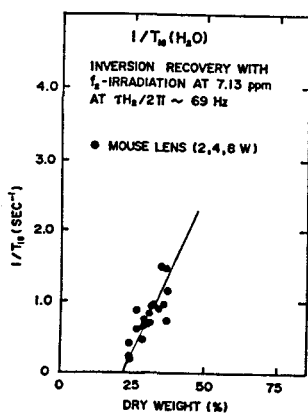


図 1 C

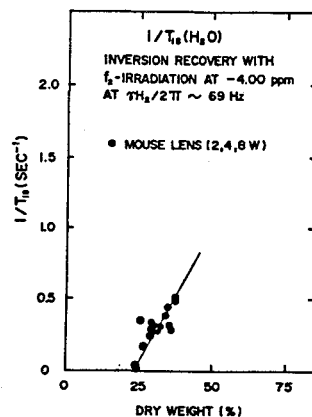


図 2 B

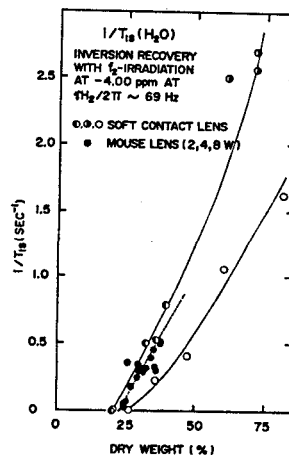
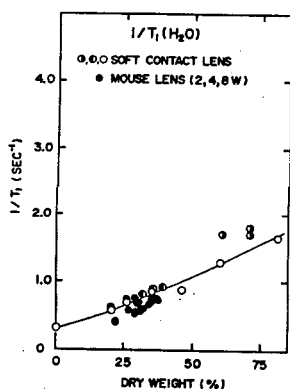


図 2 A



文献

- (1) Damadian, R., Science 171, 1151 (1971)
- (2) Hazlewood, C. F., Chang, D. C., Medina, D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1478 (1972)
- (3) Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S. et al. Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130 (1986); Era, S., Kuwata, K., Sogami, M. et al. ibid. 33, 214 (1989)
- (4) Era, S., Kato, K., Sogami, M. et al. Biomed. Res. 7, Suppl. 2, 41 (1986)
- (5) Iwama, T., Yamada, H., Era, S. et al. Magn. Reson. Med. 24, 53 (1992); Iwama, T., Yamada, H., Andoh, T. et al. Magn. Reson. Med. 25, 78 (1992)
- (6) Sato, S., Kida, K., Takeuchi, S. et al. Acta Sch. Med. Univ. Gifu 38, 674 (1990)
- (7) Akasaka, K., J. Magn. Reson. 45, 337 (1981); Akasaka, K., ibid. 51, 14 (1983)
- (8) Ozaki, Y., Mizuno, A., Itoh, K. et al. Biochemistry 22, 6254 (1983)

P 26 ポリ(4-メチル-1-ペンテン)の立体規則性について

— そのポリマー鎖の特異なコンフォメーション —

(三井石化・分析研) ○水野 章, 恩田光彦, 木岡 護

(農工大・工) 朝倉哲郎

^{13}C NMR study of tacticity of poly(4-methyl-1-pentene)

- The unique conformation of the polymer chain -

Akira Mizuno, Mitsuhiko Onda, Mamoru Kioka and Tetsuo Asakura*

(Mitsui Petrochemical Industries, Ltd., *Tokyo University of Agriculture and Technology)

The tacticity assignment of ^{13}C NMR spectrum of poly(4-methyl-1-pentene) was performed by using 2D-INADEQUATE technique. The backbone methine carbon (C2) shows a relatively large chemical shift difference (1ppm) between the mm and rr peaks, and the methylene of the side chain (C3) resonates in the order of the rr, mm and mr peaks from low to higher field. These results considerably differ from those of a series of polyolefins. An application of the rotational isomeric state (RIS) model combined with the γ effect was unsuccessful to reproduce these characteristic tacticity splittings of C2 and C3 carbons of poly(4-methyl-1-pentene). The interaction between the bulky side chain and the main chain might give a specific influence on the backbone chain conformation.

1. はじめに

チーグラ触媒で得られるポリ(α -オレフィン)の立体規則性はその物性を支配する重要な構造因子の一つである。これまでポリプロピレンからポリ(1-ノネン)までの一連のポリオレフィン、3-メチル-1-ブテン、エチレン-オレフィンコポリマーについて、その立体規則性が ^{13}C -NMRによって解析されてきた^{1, 2, 3}。しかしながら、工業的に重要なポリ(α -オレフィン)の一つであるポリ(4-メチル-1-ペンテン)(P4MP)については、未だ立体規則性評価の検討はなされていない。そこで、我々はP4MPの ^{13}C -NMRスペクトルを測定し、その立体規則

Poly(4-methyl-1-pentene), Tacticity, Conformation, ^{13}C -NMR, 2D-INADEQUATE

ミズノ アキラ オンダ ミツヒコ キ オカ マモル アサクラテツオ
水野 章、恩田光彦、木岡 護、朝倉哲郎

性を解析することを試みた。帰属は 2D-INADEQUATEを用いて行なった。ピークの出現順序を他のポリ(α-オレフィン)の場合と比較し、その構造的特徴についても調べることにした。

2. 実験

i) 重合

MgCl₂/TiCl₄/EtAl₃触媒系を用いてn-デカン溶媒中で、50℃、2時間4-メチル-1-ペンテンを重合した。ポリマーはメタノールを添加して析出させた。

ii) 分別

得られたパウダー状のポリマー5gに混合溶媒1(200cc n-ヘキサン/200cc アセトン)を添加し、還流下で5時間加熱後、室温まで放冷し、溶媒に可溶性成分(フラクション1)と不溶性成分に分離した。不溶性成分は、さらに混合溶媒2(300cc n-ヘキサン/100cc アセトン)で同様に還流下で5時間加熱後、室温まで放冷し、可溶性成分(フラクション2)と不溶性成分(フラクション3)に分離した。

iii) NMR測定

日本電子GX400型核磁気共鳴装置を用い、温度120℃で未分別試料およびフラクション1-3の¹³C-NMRスペクトルを測定した。ヘキサクロロブタジエン/重ベンゼン=9/1(vol)を溶媒とし、約10wt%濃度に調製した。さらに、2D-INADEQUATE測定用にフラクション1(アタクト成分)の40wt%溶液も調製した。

iv) X線回折による結晶化度の測定

未分別試料およびフラクション1-3の分別試料からそれぞれ厚さ約1mmのシートを250℃でプレスして作成し、その結晶化度を理学電機RU-300型X線回折装置を利用して求めた。

3. 結果と考察

図1にP4MPのフラクション1-3の¹³C-NMRスペクトルを示した。結晶化度がフラクション1, 2, 3の順に向上することから、破線のピークはアイソタクチックに起因することが分かる。フラクション2, 1の順にラセミの割合が増加することが定性的にスペクトルから認められる。そこで、さらにラセミを含む立体規則性ピークの帰属を詳細に行なうために、2D-INADEQUATEを測定した。P4MPのフラクション1(アタクト成分)の2D-INADEQUATEスペクトルを図2に示した。主ピークはアイソタクチック連鎖に起因するピークであるので、各ピークのつながりを2次元チャート上で追跡することによって図中に示したようにダイアッド, トリアッドレベルで帰属を行なうことができた。

C 1 炭素の立体規則性ピークの出現順序は基本的にはポリ(1-ブテン)より長いアルキル基をもつ直鎖状ポリオレフィンのスペクトルと同じである。一方、C 2 炭素における *mm* と *rr* ピークの 1 ppm 程度の大きなシフト差、ならびに C 3 ピークの出現順序、高磁場側へ *rr*, *mm*, *mr*, は一連のポリオレフィンのスペクトルと一致しない。さらに C 5 (CH₃ 基) ピークは立体規則性が低下すると著しくブロードニングする。

従来、ポリオレフィンの¹³C-NMRピークの立体規則性分裂はランダムコイル鎖の回転異性状態モデルと¹³C-NMRのγ効果に基づく計算によって説明されてきたが、P 4 MPの場合は従来の方法では必ずしも説明できない。この理由の一つとして、回転異性状態モデルでは側鎖のコンフォメーションの厳密な構造モデルを考察していないことが挙げられる。アタクト構造をもつP 4 MPでは、側鎖のC 3とC 4の結合が主鎖との相互作用により種々の回転異性状態をとるため、C 5ピークがブロードニングし、またC 2炭素の規則性によるピークのシフト差が大きくなると推定できる。さらに、側鎖と主鎖間の相互作用の結果、ポリマー鎖が一連のポリオレフィンとは異なるコンフォメーションをとっている可能性も示唆される。なお、希薄溶液(0.8wt%)でのP 4 MPの¹³C-NMRパターンが通常濃度で得られるスペクトルと同一であることから立体規則性によるピークの分裂は一本の分子鎖に起因し、分子間の相互作用に依らない。

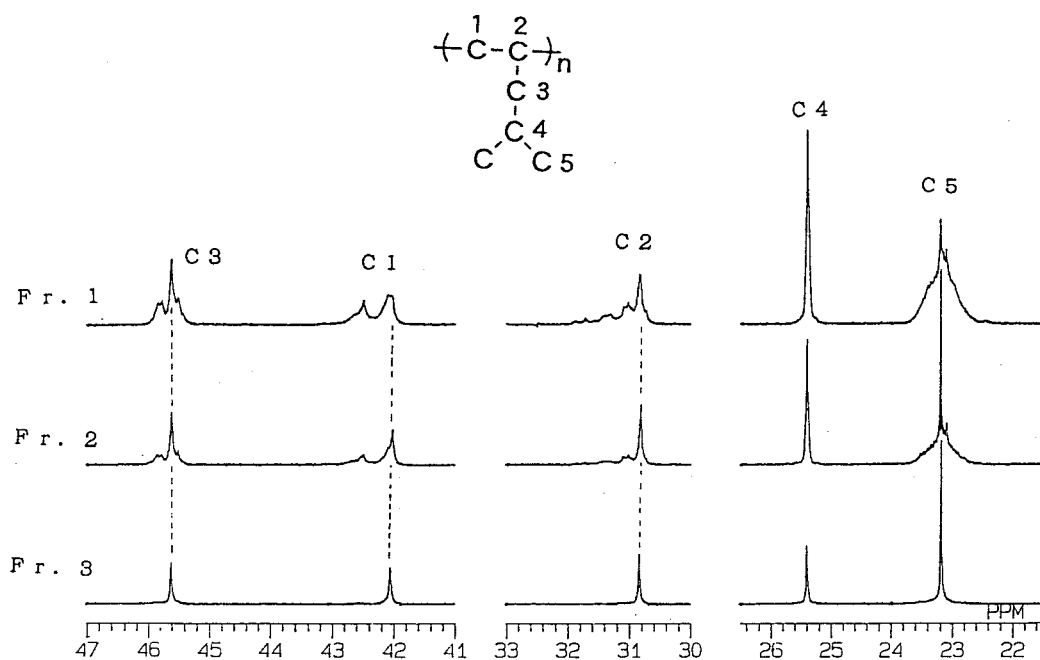


Figure 1 ¹³C-NMR spectra of fractionated P4MP samples

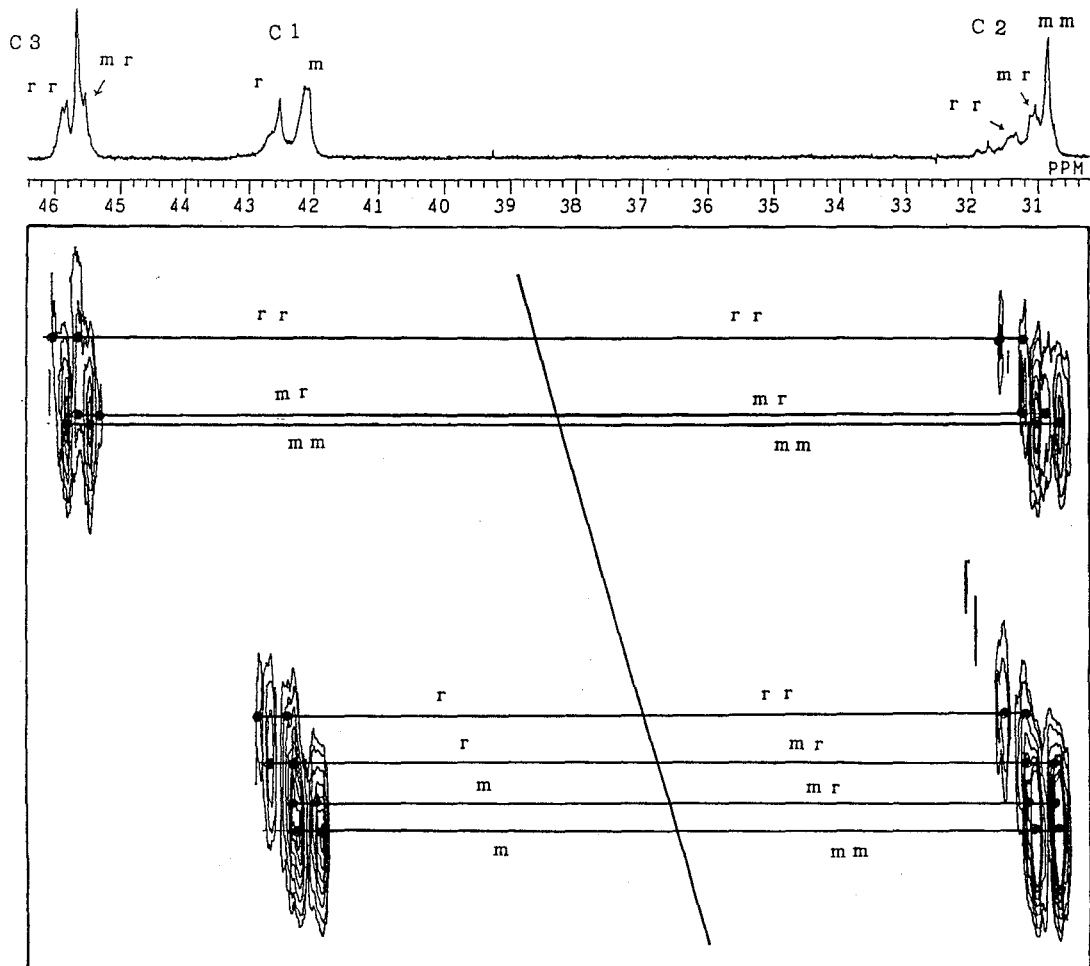


Figure 2 ^{13}C 2D-INADEQUATE spectrum of atactic P4MP (fraction 1) in 40wt% hexachlorobutadiene/ C_6D_6 (=9/1) solution. The ^{13}C - ^{13}C connectivities in the different tacticities of C1, C2 and C3 carbons are traced out.

4. 文献

- 1) T.Asakura, M.Demura and Yuko Nishiyama, *Macromolecules*, 24, 2334 (1991)
- 2) T.Asakura and N.Nakayama, *Polymer Commun.*, 32, 213 (1991)
- 3) T.Asakura, K.Hirano and M.Demura, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 12, 215, (1991)

P 27

高温 ^{27}Al NMR を用いた
スピネル (MgAl_2O_4) の秩序-無秩序転移

(北大理) ○加藤智史 前川英己 河村雄行 横川敏雄
(北大工) 下川繁三

High temperature ^{27}Al NMR study of the order-disorder transition
of spinel (MgAl_2O_4)

Satoshi Kato, Hideki Maekawa, Katsuyuki Kawamura, Toshio Yokokawa,
Faculty of Science, Hokkaido University

Shigezo Shimokawa
Faculty of Engineering, Hokkaido University

^{27}Al NMR spectra of MgAl_2O_4 (spinel) were obtained in situ at temperature up to 1373 K. The distribution of Mg^{2+} and Al^{3+} cations between the tetrahedral and octahedral sites in spinel has been determined. The inversion parameter x (atomic fraction of Al in tetrahedral sites), increased from 0.18 at 873 K to 0.36 at 1173 K. The inversion parameter was compared with that determined by ^{27}Al MAS-NMR of quenched sample and in situ neutron scattering.

【緒言】

スピネル構造では酸素イオンが立方最密パッキングをしており、カチオンが酸素4配位及び6配位のサイトを1:2の割合で占めている。スピネル型化合物はそれぞれのサイト中に様々なカチオンを収容でき得ること、以下に述べるようなサイト交換があることから結晶学的に重要である。このような物質は材料、および地球構成物質として地球科学的にも重要である。

常温常圧下においてスピネル (MgAl_2O_4) は正スピネル型構造をとり、Alは6配位、Mgは4配位の位置にある。温度上昇に伴い $\text{Mg} \leftrightarrow \text{Al}$ 間のサイト交換が生じ、600~800°C

キーワード： 高温 ^{27}Al NMR、スピネル (MgAl_2O_4)、秩序-無秩序転移、
nutaton法。

かとう さとし、まえかわ ひでき、かわむら かつゆき、よこかわ としを
しもかわ しげぞう

で2次の秩序-無秩序転移を起す。このような温度に伴う相変化は熱力学的にも重要で、高温中性子線回折⁽¹⁾、高温X線回折、ESR測定、²⁷Al MAS NMR^{(2)・(3)}及び熱量測定などで調べられている。この変化を追うには高温その場観察が必要である。本研究では²⁷Al NMR測定を高温下で行ない、Alイオンの配位環境の温度変化を調べ、各サイトにおけるAlイオンの定量を行なった。

【実験】

試料には天然鉱物スピネルの粉末及び単結晶を用いた。自作の高温NMRプローブ⁽⁴⁾中の検出コイル内部に試料を固定し室温から1100℃までの²⁷Alの広幅スペクトルを測定した。又、2次元NMR測定(nutation NMR法)及び²⁷Al MAS-NMR測定も行なった。

装置は Bruker MSL-200 (²⁷Alの共鳴周波数52.148MHz)を用いた。

【結果と考察】

Fig.1に粉末サンプルを用いて得られた高温²⁷Al NMR スペクトルを示した。室温から温度を上げてゆくにつれ、高周波数側が増加して、700-800℃で急激な変化が見られる。これは秩序-無秩序転移が、この温度領域で生じたことを示す。

²⁷Alは核スピン量子数 $I=5/2$ を持つ四極子核なので、四極子相互作用が線形に最も影響を及ぼす。これは四極子結合定数(e^2qQ/h)、非対称性因子(η)及びケミカルシフトで決まる。故に4、6配位Alのそれぞれに対しこれらのパラメータ値が分かれば定量できることになる。²⁷Al MAS NMRより室温での6配位のパラメータ値は $e^2qQ/h=4.2\text{MHz}$ 、 $\eta=0.35$ と求められる。これまでの報告より、4配位Alはかなり小さい e^2qQ/h 、 η を持つと考えられているので、今回は $e^2qQ/h=1.5\text{MHz}$ 、 $\eta=0.3$ という値を用いた。また2次元NMR測定(nutation法)を室温、600、700、

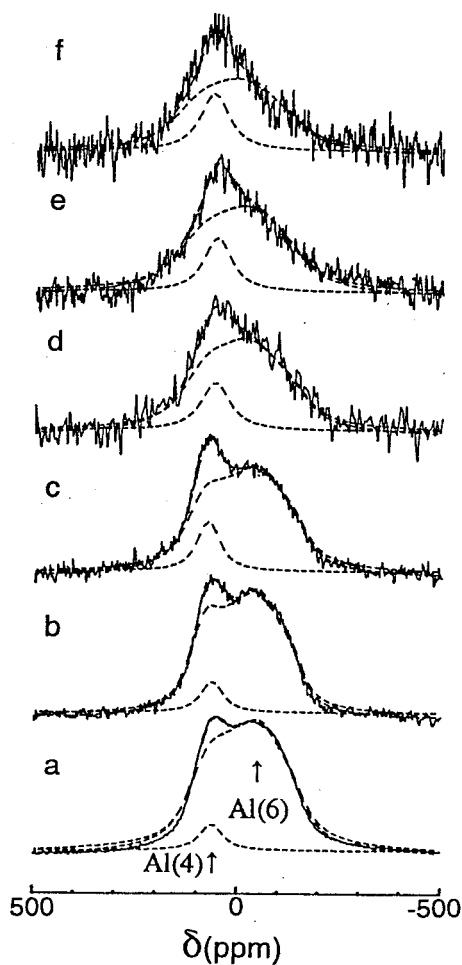


Fig.1 ²⁷Al NMR spectra of MgAl₂O₄. a) 20°C, b) 600°C, c) 700°C, d) 800°C, e) 900°C, f) 1100°C. The dashed lines are the computer simulations discussed in the text.

900°Cおよび900°Cからの急冷サンプルを用いて行なった。Fig.2においてF2軸はケミカルシフト軸、F1軸は四極子結合定数や非対称パラメーターの値に依存した軸である。この結果、900°CのスペクトルはS/N比が悪いため他のスペクトルと比べにくい、F1軸から見たスペクトルを見たとき、室温と急冷サンプルとではピーク位置に変化は見られず、四極子結合定数や非対称パラメーターは変化していないものと考えられる。これらのことを用いて、線形のシミュレーションを行なうと4、6配位Alは Fig.1の破線のようになる。昇温に伴って4配位のAlが増加していることが分かる。また、Fig.1において900°C以上では室温に比べてスペクトルのすそが少し広がっている。サイト交換がかなり進行して、同じサイトのAlでも環境の異なるものが生じたためと考えられる。6配位Alの隣接6配位は6個ある。均一に交換が起これば、 $X=0.35$ の時、その6個の内訳は(A16 Mg0)が31.5%、(A15 Mg1)が40.1%、(A14 Mg2)が21.3%、(A13 Mg3)が6%という確率でそれぞれ占有することになる。このように同じ6配位Alでも幾つかの異なる環境下にあるため、それぞれのAlの感じる電場勾配の大きさが変わり、スペクトルに影響を与えたと考えられる。

スペクトルより inversion parameter x (4配位席におけるAlの割合) を求めると、Fig.3のようになる。これらの値は、Wood(1986)らによる MAS NMR の結果と最近報告されている高温中性子線回折や MAS-NMR の結果との中間の値になる。このパラメーター X の温度依存性を無秩序についてのエンタルピー変化が X に依存しないNavrotsky-Kleppa⁽⁵⁾のモデルと、 X の1次関数であるとするO'Neill-Navrotsky⁽⁶⁾のモデルを使って比較するとFig.3のようになり、前者のモデルでは今回の結果をうまく表わせないことが分かった。

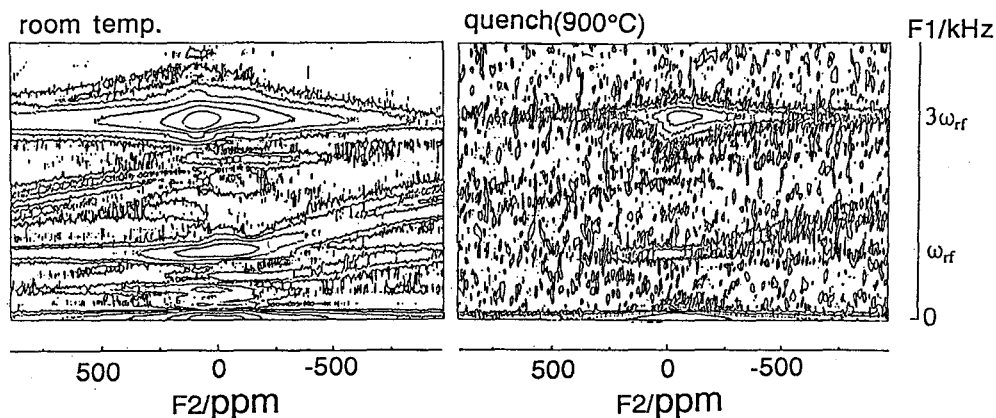


Fig.2 ^{27}Al nutation NMR spectra.

128 data points were acquired by steps of $1.25\mu\text{s}$.

また、Fig.1における4,6配位Alについてのシミュレーションスペクトルの線幅を温度に対してプロットするとFig.4のようになる。図から分かるように900℃で、急冷サンプルとその場観察のスペクトルとで線幅は異なり、特に6配位Alの線幅が大きく変っている。これは 1)高温下での交換速度が線型に影響を及ぼすぐらいに大きくなったため、2)急冷により、4,6配位Alの中距離構造が変化したためである。急冷条件やカチオンの動的挙動を知るためにも、交換速度を見積もることが必要である。

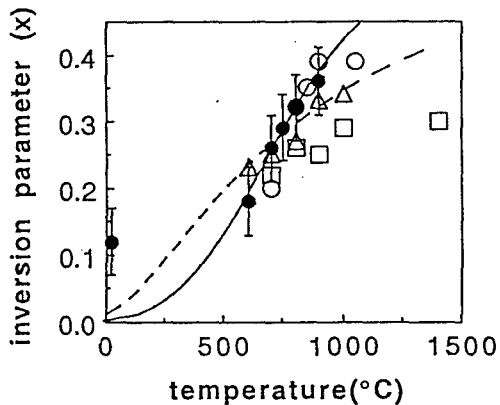


Fig.3 The temperature dependence of inversion parameter X. Symbols denote (○) ^{27}Al MAS NMR ⁽²⁾, (△) neutron scattering ⁽¹⁾, (□) ^{27}Al MAS NMR ⁽³⁾, (●) this experiment. The dashed and the solid line represent simulations based on the Navrotsky-Kleppa model and O'Neill-Navrotsky model respectively.

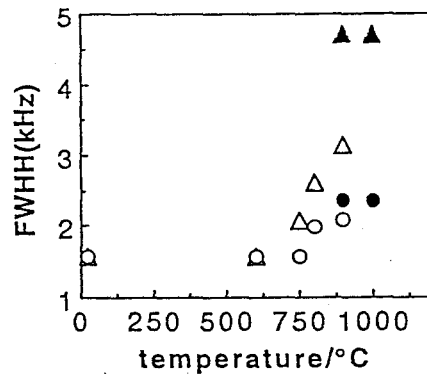


Fig.4 Temperature dependence of full width at half height for simulated spectra. Symbols denote (△) Al(6), (○) Al(4) in situ, (▲) Al(6), (●) Al(4) quenched sample.

- 1) R.C.Peterson et al.: Am. Mineral. 76(1991)
- 2) B.J.Wood et al.: Am. Mineral. 999(1986)
- 3) Millard et al.: Am. Mineral. 44(1992)
- 4) S.Shimokawa et al.: Chem. lett. 617(1990)
- 5) A.Navrotsky et al.: J. Inorg. Nucl. Chem. 2701(1967)
- 6) H.St.C.O'Neill et al.: Am. Mineral. 181(1983)

(京大薬・京都薬大*) ○黒田義弘、脇田美砂子、小川雅弘、
 木山泰範#、藤原靖弘*、中川照眞

Interaction between Dibucaine and Pig Erythrocyte Membranes, Phosphatidylcholine, and Phosphatidylserine Bilayers as Studied by Deuterium NMR Spectroscopy

Yoshihiro Kuroda, Misako Wakita, Masahiro Ogawa, Yasunori Kiyama, Yasuhiro Fujiwara,* and Terumichi Nakagawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, 606-01 and
 Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, 607

In succession to our previous paper,¹ interactions between local anesthetic dibucaine and pig erythrocyte membranes (ghost), multilamellar dispersions of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylserine (PS), have been studied by deuterium NMR spectroscopy of the deuterated dibucaine at the 3-position in its quinoline ring. At pH 7.4 and at a room temperature, in which condition although ¹H-NMR spectra showed the presence of only a cationic form of dibucaine, the present deuterium NMR spectra clearly showed the presence of a molecular form of dibucaine partitioned into the PC, PS, and ghost membranes. These findings can explain why the molecular form of dibucaine which was "apparently" detected in the ¹H NMR spectra observed at an elevated temperature did not show any NOE cross-peak in the NOESY spectrum of a dibucaine-ghost solution at pH 7.4.

The reaction scheme to synthesize the dibucaine deuterated at the 3-position in its quinoline ring is summarized in Fig. 1. PC (egg yolk) and PS (bovine brain) were obtained from Sigma. Ghost (pig blood) was prepared as described previously.² The deuterium NMR data were acquired at 92 MHz on a Bruker AM-600 spectrometer. The quadrupolar echo sequence was employed; $\pi/2 = 10 \mu\text{s}$ and its pulse spacing was 15–50 μs . The recycle time was 0.26 s. Acquired number of transients were typically 300,000. Observed deuterium NMR spectra for PC-, PS-, and ghost-membrane systems at both pH 7.4 and pH 5.8 are shown in Figs. 2–4, respectively.

The dibucaine-PC solution at pH 7.4 and at 300 K showed an axially symmetric quadrupole splitting (5.0 kHz) together with a narrow center peak (Fig. 2). On raising temperature to 333 K, this splitting reduced to 3.4 kHz, retaining the ratio of the peak area between the broad and narrow resonances at a constant value. In contrast, no quadrupole splitting was observed for the solution at pH 5.8 (Fig. 2d). Likewise, the dibucaine-PS solution showed the quadrupole splitting of 9.2 kHz at 300 K; this splitting reduced to 8.0 kHz at 333 K. Interestingly, the corresponding solution at pH 5.8 showed a quadrupole splitting of 4.8 kHz (Fig. 3d). For dibucaine-ghost solution, the spectrum at 300 K was broad, rather featureless, with a width of approximately 4 kHz (Fig. 4a); at 333 K, this broad resonance became fairly sharp, but showed no well-defined quadrupole splitting as in the cases of PC and PS membranes; at pH 5.8, the spectral pattern was essentially the same as in the solution at pH 7.4 (Fig. 4c).

Combining the present data with those our previous paper allows us to draw the scheme of possible equilibria of dibucaine between water and membranes as shown in Fig. 5. It can be concluded that at pH 7.4, a saturated amount of the molecular form of dibucaine already exists within membranes (Bbb), although the corresponding ¹H NMR spectra showed no evidence for the presence of the molecular form. On raising temperature, an excess amount of the molecular form of dibucaine, Bf, which can no longer partition into the membranes, was created. This dibucaine forms semi-stable micelles, (Bf)_n, in a buffer solution and does not interact with the membrane; consequently, it shows no NOE cross-peak as discussed previously.¹

Key Words: Dibucaine; Erythrocyte membranes; Phosphatidylcholine; Phosphatidylserine; ²H-NMR

くろだよしひろ わきたみさこ おがわまさひろ きやまやすのり ふじわらやすひろ なかがわてるみち
 #現在、日本新薬株式会社 薬剤研究所

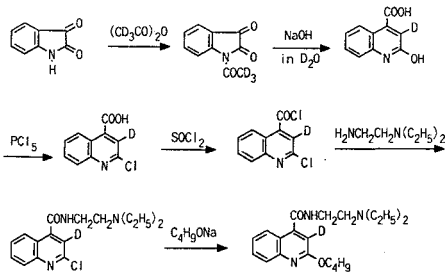


Fig. 1 Reaction scheme to synthesize the dibucaine deuterated at the 3-position

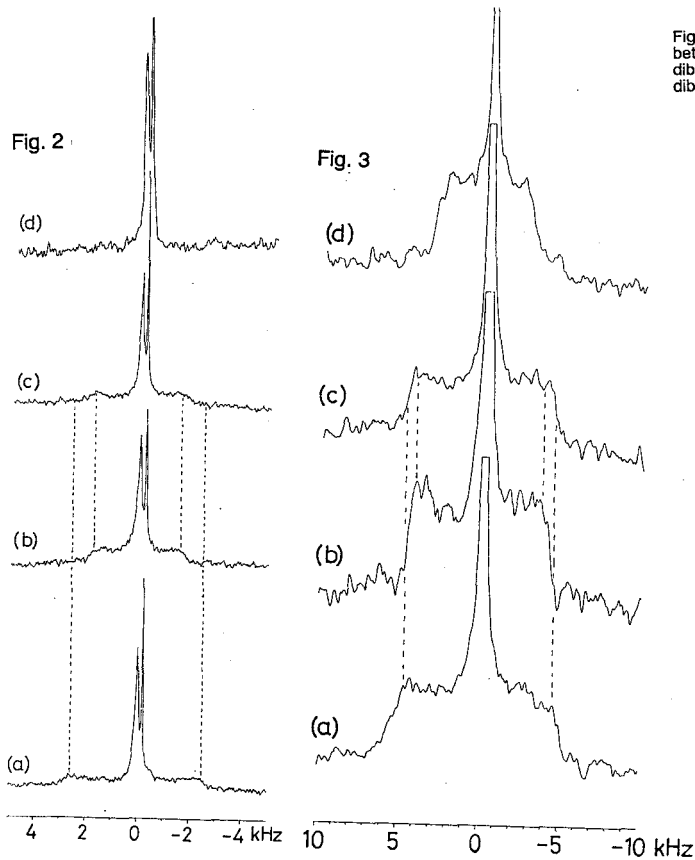


Fig. 2 (a) ^2H -NMR spectrum of dibucaine- d_1 (3 mM)-PC (12 mM) solution at pH 7.4 and at 300 K; (b) as in (a), but at 333 K; (c) as in (b), but cooled again to 300 K; (d) ^2H -NMR spectrum of dibucaine- d_1 (3 mM)-PC (12 mM) solution at pH 5.8 and at 300 K.

Fig. 3 (a) ^2H -NMR spectrum of dibucaine- d_1 (3 mM)-PS (17 mM) solution at pH 7.4 and at 300 K; (b) as in (a), but at 333 K; (c) as in (b), but cooled again to 300 K; (d) ^2H -NMR spectrum of dibucaine- d_1 (3 mM)-PS (23 mM) solution at pH 5.8 and at 300 K.

Fig. 4 (a) ^2H -NMR spectrum of dibucaine- d_1 (3 mM)-ghost suspension at pH 7.4 and at 300 K; (b) as in (a), but at 333 K; (c) ^2H -NMR spectrum of dibucaine- d_1 (3 mM)-ghost suspension at pH 5.8 and at 300 K. Estimated concentrations of phospholipids in the ghost suspensions were 4.7 mM in (a) and (b), and 6.2 mM in (c).

References

1. M. Wakita, Y. Kuroda, and T. Nakagawa, The 30th NMR Symposium (Japan), Tokyo, 1991, Poster Presentation No. 32.
2. M. Wakita, Y. Kuroda, and T. Nakagawa, Chem. Pharm. Bull., 40, 1361 (1992).

Scheme of Possible Equilibria of Dibucaine between Water and Lipid Phases

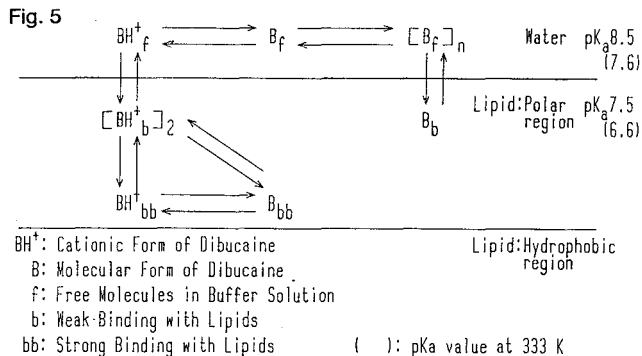
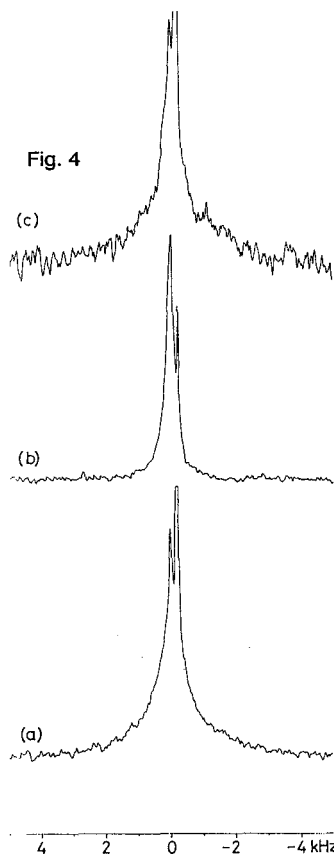


Fig. 5 Scheme of possible equilibria of dibucaine between water and lipid phases. The pK_a value of dibucaine reported is 8.5; estimated pK_a value of dibucaine located at a lipid polar region was 7.5.



P 29

NMRによる金属イオンの脂質人工膜透過性に関する研究—膜共存物質による促進効果

(阪大薬) ○ 木村 敦臣・鹿野 哲司・高木 達也・藤原 英明

NMR studies on the transmembrane permeability of alkali metal ions

- The enhancement effect of materials coexisting in membrane

Atsuomi Kimura, Tetsushi Kano, Tatsuya Takagi and Hideaki Fujiwara.

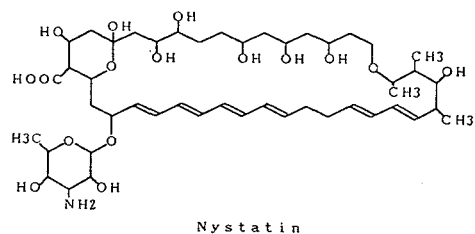
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

The effect of nystatin, a polyene antibiotic, upon the transmembrane permeability of alkali ions in egg lecithin liposomes containing cholesterol was investigated using ^7Li , ^{23}Na , ^{39}K NMR. Two types of experiments were employed to determine the rate constants: total line shape analysis on ^{39}K NMR and 2D-EXSY (two-dimensional exchange NMR spectroscopy) on ^7Li and ^{23}Na NMR. The permeability coefficients calculated from the resultant rate constants are 0.474 , 12.0 , and $59.3 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ for Li^+ , Na^+ , and K^+ ions, respectively. From these values, it can be drawn that the permeability of alkali ions through the nystatin-cholesterol channel is dependent on the size of the hydrated ions.

1、序論

天然に存在するある種の抗生物質、毒素等は生体膜に作用し、イオンの膜透過性を著しく高めることが知られている。この担体輸送の機構を解明することは、それら薬物の作用機序にとどまらず、膜タンパク質に担われる物質輸送機構に対し有用な示唆を与えるものと思われる。

このようなイオン担体物質の中で、ポリエン系抗生物質であるナイスタチンは、膜成分であるコレステロールと集合体を作り、チャンネルを形成することによりイオンの膜透過性変化を引き起こす。¹⁾そこで細胞



^7Li , ^{23}Na , ^{39}K -NMR、2D-EXSY、リポソーム、透過係数、ナイスタチン

きむら あつおみ、かの てつし、たかぎ たつや、ふじわら ひであき

膜モデルとしてリポソームを用い、2D-EXSY 及び線型解析により Li^+ , Na^+ , K^+ イオンのナスタチンによる促進輸送速度を測定し、その選択性を調べた。

2、実験

60mM の脂質 (卵黄レシチン: コレステロール=5:1) を pH 7.9 Tris-HCl buffer (200mM Li, Na, K Cl) 中に分散させ、リポソーム (REV) を逆相蒸発法により調整した。リポソームの中と外のイオンの信号を区別するため、この溶液にランタニドシフト試薬 $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$ (10mM) を等量、D2O を 10% 加えたものをサンプルとした。²⁾ 透過速度測定の際にはこのサンプルにナスタチンを 5mM 加えた。NMR 測定は Varian VXR-200 により、³⁹K 測定は 16mm ϕ を用いて 35 $^\circ$ C で行った。測定周波数は ⁷Li, 77.749; ²³Na, 52.921; ³⁹K, 9.337 (MHz) を用いた。線型解析は大阪大学大型計算機センターライブラリプログラム SALS を用いた自作のプログラムにより行った。³⁾ 計算はすべて、大阪大学大型計算機センター、ACOS2000システム及び、富士通 S-4/IP により行った。

3、結果と考察

35 $^\circ$ C においてシフト試薬を加えたときの ⁷Li および ²³Na-NMR 信号のシフトの様子をそれぞれ図 1、図 2 に示す。

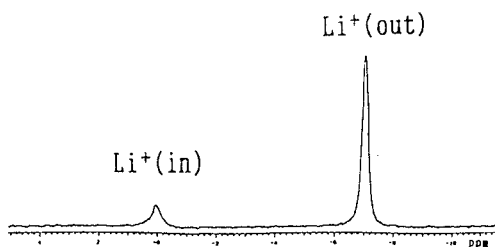


Fig.1 ⁷Li NMR spectrum of liposome suspension.

The sample contains approximately 200mM LiCl and 5mM $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$.

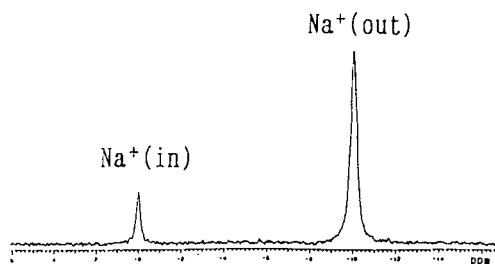


Fig.2 ²³Na NMR spectrum of liposome suspension.

The sample contains approximately 200mM NaCl and 5mM $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$.

$\text{Na}^+(\text{in})$ および $\text{Na}^+(\text{out})$ の信号強度比 (0.17:0.83) からリポソームの粒子径は 190nm と算出され、光散乱光度測定から得られた値 200nm とほぼ一致した。したがって、シフト試薬によるリポソーム膜の破壊はないものと思われる。これにナスタチンを加えた系に、NOESY pulse sequence (di-90 $^\circ$ -t1-90 $^\circ$ -tm-90 $^\circ$ -t2) を用いて 2D-EXSY を適用した。35 $^\circ$ C における ²³Na 2D-EXSY スペクトルを図 3 に示す。ピーク強度から(2)式により一次の交換系 $\text{in} \rightleftharpoons \text{out}$ の速度定数 k を求めた。⁴⁾

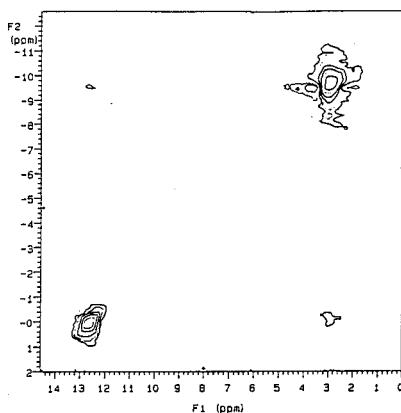


Fig.3 ^{23}Na 2D-EXSY spectrum

nystatin 5mM

$t_m=30\text{msec}$

number of increment=128

256×256 data matrix

phase sensitive mode

$$I_{ij} = (e^{-Rtm})_{ij} M_j^0 \quad (1)$$

I_{ij} ; ピーク強度 M_j^0 ; j site にある熱平衡磁化

R ; 速度行列 $R_{ij} = -k_{ji}$

$$R = -tm^{-1} \ln A = -tm^{-1} X (\ln \Lambda) X^{-1} \quad (2)$$

A ; $A_{ij} = I_{ij}(tm) / M_j^0$

X ; A の固有ベクトルの square matrix

$\Lambda = X^{-1} A X = \text{diag}(\lambda_i)$, $\ln \Lambda = \text{diag}(\ln \lambda_i)$

つぎに35°Cにおける ^{39}K NMR スペクトルを図4に示す。

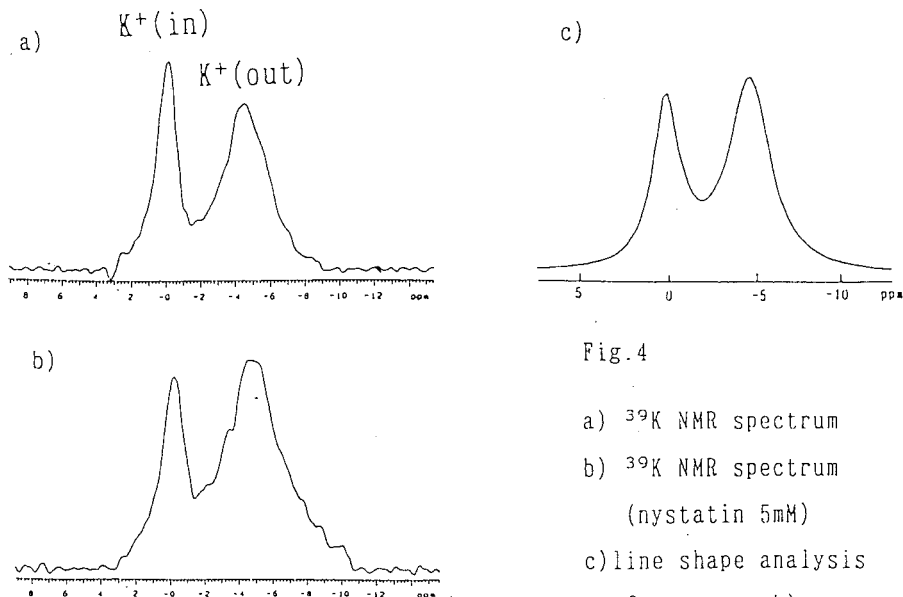


Fig.4

a) ^{39}K NMR spectrum

b) ^{39}K NMR spectrum

(nystatin 5mM)

c) line shape analysis
of spectrum b)

この系では ${}^7\text{Li}$, ${}^{23}\text{Na}$ とは異なりあまりよいピーク分離は得られず、しかも ${}^{39}\text{K}$ は低感度核であるので2D-EXSYを適用する事はできない。したがって線型解析により速度定数を求めた。

以上により求めた Li^+ , Na^+ , K^+ イオンの速度定数を表1に示す。

表1 アルカリ金属イオンの膜透過係数

	$k(\text{in} \rightarrow \text{out})/\text{sec}^{-1}$	$k(\text{out} \rightarrow \text{in})/\text{sec}^{-1}$
Li^+	0.148	0.0296
Na^+	3.74	0.640
K^+	9.15	4.75

また、この速度定数は膜透過係数と次式の関係にある。

$$P = k \times A/V \quad (3)$$

P ; 膜透過係数 A ; リポソームの表面積 V ; リポソームの内容積

(3)式において A/V の項は、in と out のピーク強度比を用いて評価した。(3)式から算出した膜透過係数は $P_{\text{Li}^+}=0.474 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$, $P_{\text{Na}^+}=12.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$, $P_{\text{K}^+}=59.3 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ であった。またナスタチンを加えない場合の Na^+ イオンの自然溶出速度は $3.33 \times 10^{-11} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ であった。

これらの結果からナスタチン-コレステロール複合体により形成されたチャンネルのイオン輸送選択性は $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ の順であり、これは水和イオンのサイズの順にしたがっていることがわかる。

参考文献

- 1) B.de Kruijff, W.J.Gerritsen, A.Oerlemans, R.A.Demel, and L.L.M.van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 30 (1974).
- 2) D.C.Shung and R.W.Briggs, *J. Magn. Res.*, 77, 491-503 (1988)
- 3) SALS研究会 (代表 小柳義夫) 東大大型計算機センター
- 4) C.L.Perrin and R.K.Gipe, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 4036-4038 (1984)

P 30 固体高分解能 ^{29}Si -NMR によるポリシランの構造研究

神奈川大工 ○高山 俊夫 東工大工 安藤 勲

A Structural Study of Long di-n-Alkyl Substituted Polysilane in the Solid State by ^{29}Si NMR

○Toshio Takayama* and Isao Ando

(*Department of Applied Chemistry, Kanagawa University, Yokohama,

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo)

The ^{29}Si CP/MAS NMR experiments have successfully provided very useful information about polysilane conformation in the solid state. In this work, we study structural behavior of long di-n-alkyl substituted polysilane, poly-(di-n-tetradecylsilane) (PDTDS), by means of ^{29}Si CP/MAS NMR spectroscopy over a wide range of temperatures. Three resonances are seen in the spectrum: One (-20.2ppm) is disordered phase (A) and the other two peaks (-15.6 and -16.7ppm) are assigned to ordered phases (C), and their Si chemical shift difference comes from two slightly different kinds of molecular packings. The ^{29}Si T_1 data indicate that there is a large differences in molecular motion between the two phases A (6.5s) and C (63~75s). In the ^{13}C GHD/MAS spectra, the two resonances which come from the crystalline and amorphous phases were observed at temperatures from -14 to 60°C . It is assumed that at high temperatures long n-alkyl side chains melt and so the main chain is in the disordered phase.

1) 結論

長い n-アルキル鎖を側鎖に有する高分子の構造・物性は側鎖の挙動によって大きく影響を受けることが知られている^{1,2)}。私共が長い間 NMR 研究の対象としてきたポリシラン³⁾の側鎖に長い n-アルキル鎖 (R) を導入した場合高分子ポリシラン $(-\text{R}_2\text{Si}-)_n$ の主鎖がどのような構造の挙動を取るのかを明らかにすることは非常に興味がある。R の炭素数が 14 であるポリ(ジ-n-テトラデシルシラン) (PDTDS) はその Si 主鎖が TG TG' 構造をとると言われている⁴⁾。しかし、PDTDS の構造解明に関してはいまだ十分に行

固体高分解能 ^{29}Si NMR・長鎖アルキル置換ポリシラン・構造解析・コンホメーション

○たかやまとしお・あんどういさお

われているとはいえない。また R によってポリシランの主鎖構造が何故異なるのかいまだ明らかにされていないなど、解明されなければならないことが多くある。

本討論会では PDTDS の構造についての詳しい情報を得るために、温度可変(VT)固体高分解能 NMR(^{29}Si ; ^{13}C) から得た化学シフト及びスピン-格子緩和時間(T_1)の温度変化から、主鎖と側鎖の構造および運動についての研究を行った。

2) 実験

2-1 PDTDS の合成: $(n\text{-C}_{14}\text{H}_{29})_2\text{SiCl}_2$ をトルエン溶媒中 金属ナトリウムと Ar 雰囲気下で縮合反応させ、 CH_3OH と $i\text{-PrOH}$ の混合溶媒にて精製した。

PDTDS の CDCl_3 溶液での ^{29}Si 化学シフトは -20.8 ppm であった。

2-2 VT-固体高分解能 NMR 測定: JEOL GSX270 装置を用いて主鎖の ^{29}Si は CP/MAS 法 (^{29}Si 観測周波数 53.54MHz) 及び側鎖の ^{13}C は CP/MAS 及び GHD/MAS 法 (^{13}C 観測周波数 67.80MHz) にて行ない、化学シフトは全て TMS 基準に換算した。測定温度はプローブ温度を酢酸サマリウム法にて補正した。スピン-格子緩和時間測定は Torchia 法と反転回復法を用いた。

3) 結果と考察

3-1 PDTDS の性質は Farmer により研究されている⁴⁾。最大吸収波長 λ_{max} は 345nm (フィルム)で Si 主鎖が all-trans であるポリ(*シ- n -ヘキシルシラン*) PDHS (炭素数=6) の λ_{max} 375nm (フィルム)と比較して短波長吸収であった。DSC 測定による構造転移温度は 55°C で、これは側鎖の融解にもとずいて Si 主鎖の disordering が生じたことによる。この温度付近でポリシランの構造が劇的に変化していることを示している。

また WAXD パターンの解析により Si 主鎖は TGTG' コンホメーションをとっていることが分かった。しかし、この研究は Si 主鎖及び側鎖の温度による構造変化を十分に解明してはいない。

この構造変化を更に深く理解するために VT-固体高分解能 ^{29}Si 及び ^{13}C NMR の測定を行った。Fig.1 に温度の関数における ^{29}Si GHDMAS と CPMAS NMR スペクトルを示す。 50°C で GHD

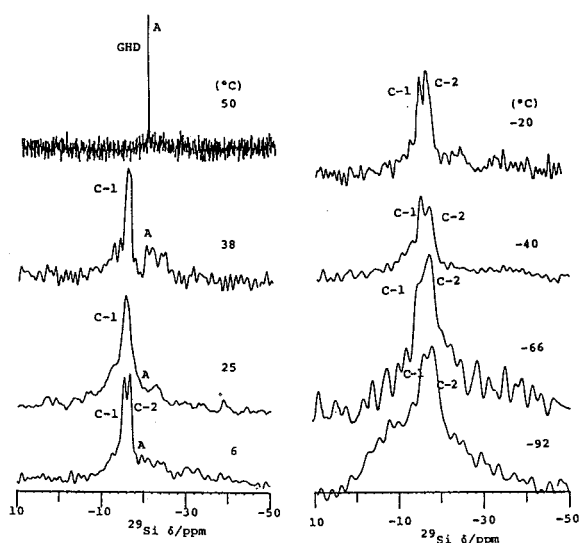


Fig.1 Temperature dependence of ^{29}Si CP/MAS (GHD at 50°C) NMR spectra of PDTDS.
A: Disordered phase; C-1: Ordered phase-1;
C-2: Ordered phase-2.

MAS 法による NMR スペクトルは一本のピークを -20.2ppm に示した。この化学シフトは溶液での化学シフト (-20.8ppm) とほぼ同じであることから、構造はほとんど disordered 状態 (A) であることが分かった。CPMAS 法では S/N 比が小さくピークを確認するのは困難であった。38°C に温度を下げると -15.6ppm に一本のピークを示し、A (-20.3ppm) のピーク強度は大きく減少した。50°C のピークより 4.6ppm 低磁場シフトしていた。このピークは PDTDS の ordered 相 (C-1) による。6°C になると -16.7ppm にも新たなピークを示した (C-2)。 -20°C から -92°C まで二本のピークはほぼ同じ強度であった。この二本のピークは PDTDS がこの温度範囲で明らかに二つの結晶状態をとっていることを示している。このことは X 線法にては解明されていない。

3-2 Si 主鎖の運動性を解明するために ^{29}Si の T_1 を測定した。50°C での T_1 測定は反転回復法にて行った。遅延時間 (τ) を変化させて測定した ^{29}Si スペクトルを Fig.2 に示す。0°C と -40°C での T_1 測定は Torchia 法にて行った。以上の方法にて得られた T_1 の値を Table 1 に示す。disordered 相 (A) の T_1 は PDHS ($T_1=5.5\text{s}$) の値とほぼ同じであり、disordered 相 (A) での Si 主鎖の運動性は置換基の炭素数の大小にはよらないことが分かった。ordered 相の C-1 及び C-2 の T_1 はほぼ同じ値であった。そして温度の上昇に伴って T_1 が減少した。このことは ordered 相 C-1 及び C-2 が BPP 理論 (T_1 と分子運動の相関関係を示す) における slow motion 範囲にあることが分かった。この T_1 の傾向は PDHS の T_1 (3.2h)⁵⁾ と比較するとはるかに小さく PDHS より構造は柔軟であると思われる。

3-3 Si 主鎖コンホメーションの変化を更に深く理解するために、側鎖の ^{13}C NMR スペクトルを測定した。Fig.3 に ^{13}C GHD/MAS NMR スペクトルの温度変化を示す。25°C での $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ 鎖の CH_3 , $\alpha\text{-CH}_2$,

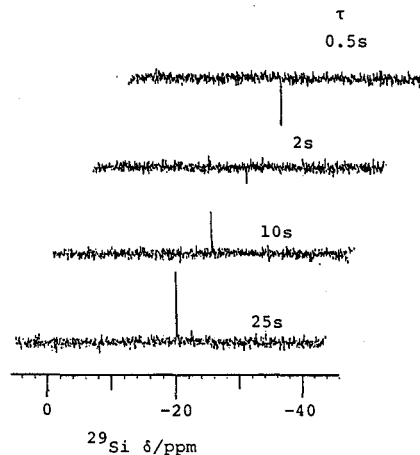


Fig.2 ^{29}Si GHD/MAS NMR spectra of PDTDS obtained by the inversion recovery method at 50°C .

Table 1
Temperature dependences of ^{29}Si Chemical Shifts and ^{29}Si Spin-Lattice Relaxation Times (T_1) of PDTDS

Structure	Temp. / °C	^{29}Si Chemical Shift / ppm	T_1 / s
disordered phase A	50	-20.2	8.5
ordered phase C-1	-40	-15.8	83
	0	-15.8	55
ordered phase C-2	-40	-17.4	75
	0	-18.8	85

int.CH₂, β-CH₂ の結晶状態(C)における¹³C 化学シフトはそれぞれ 14.8, 24.8, 33.2, 34.5ppm であるのに対して非晶状態(A)においてはそれぞれ 14.4, 23.2, 30.4, 32.5ppm の¹³C 化学シフトを示した。

-14℃ でわずかに非晶部が存在していることが分かった。さらに 12℃ で非晶部の存在が明確になり, 25℃ で結晶部と非晶部の割合がほぼ 2:1 となり, 45℃ でさらに非晶部が増大し, 60℃ ではほとんど非晶部であったが結晶部も少量存在していることが分かった。このように n-C₁₄H₂₉ 鎖は -14℃ で完全な結晶状態を形成しているのではなく非晶状態が一部存在し, そのことが Si 主鎖のコンホメーションを複雑にしている, 単一の ordered 相を形成することを阻害しているものと思われる。そして, 25~60℃ の間で n-C₁₄H₂₉ 鎖の非晶部が急激に増大することにより Si 主鎖のコンホメーションがゴーシュをとるようになり disordered 相が増大していることを示している。

以上のように, 高分子ポリシランの構造解析に主鎖(²⁹Si)と側鎖を(¹³C) VT- 固体高分解能 NMR によって同時に観測することは大変有用であることが分かった。

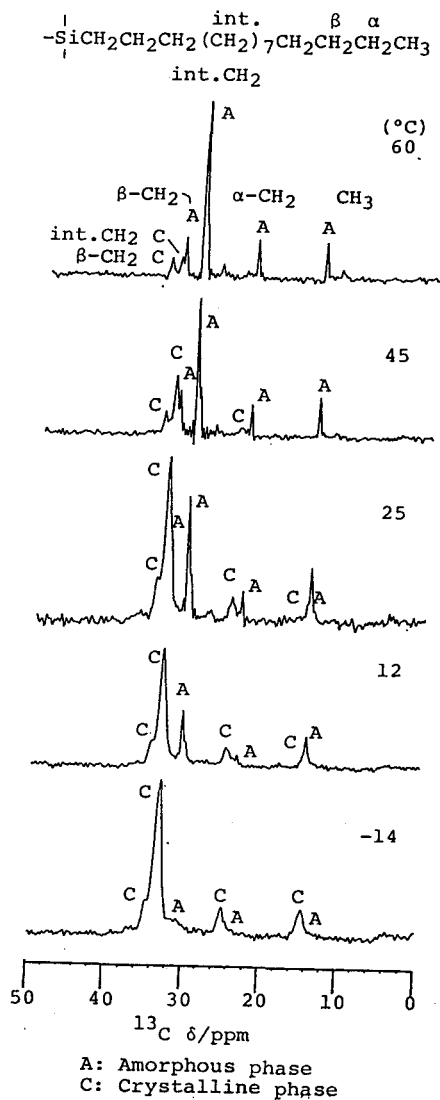


Fig.3 Temperature dependence of ¹³C GHD/MAS spectra of PDTDS.

- 1) T. Yamanobe et al., *Macromolecules*, 21, 48 (1988).
- 2) Baijayantimala Mohanty et al., *Macromolecules*, 22, 4451 (1989).
- 3) T. Takayama et al., *J. Mol. Struct.*, 222, 275 (1990); 243, 101 (1991).
- 4) B. L. Farmer et al., *Bull. Am. Phys. Soc.*, 33, 657 (1988).
- 5) F. C. Schilling et al., *Macromolecules*, 22, 3055 (1989).

P 31 単結晶試料におけるオーバートーンNMRによる¹⁴N四重極テンソルの決定 (北大 理) ○竹腰 清乃理・引地 邦男

Determination of the ¹⁴N quadrupole coupling tensor in a single crystal of *l*-alanine by overtone NMR
 K. Takegoshi and Kunio Hikichi, Department of Polymer Science, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

In this work, we demonstrated the overtone NMR approach[1] for determining the quadrupole coupling tensor of the amino nitrogen of *l*-alanine. The theoretical basis of the analysis of overtone NMR for a single crystal is given.

Angular variation of overtone resonance frequency

For simplicity, we neglect the chemical shift anisotropy and assume that the total spin Hamiltonian consists of the Zeeman and the quadrupole Hamiltonians;

$$H = -\nu_L I_Z + \sum_{m=2}^2 (-1)^m \nu_Q A_{2m} T_{2-m} \quad (1)$$

The first term denotes the Zeeman and the second denotes the quadrupole interactions. Here ν_L is the Larmor frequency and $\nu_Q = eQ/(2I(2I-1)h)$. T_{2m} is the spin part of the m -th components of irreducible spherical tensor operators with rank=2. The A_{2-m} 's are the quadrupole coupling tensor components in the laboratory frame, and can be derived from the tensor components in the crystal-fixed (XYZ) axis system of the quadrupole moment V_{2k} (Figure 1) by using a Wigner rotation matrix $D[2]$ as

$$A_{2m} = \sum_k D_{km}^2(\theta, \pi/2, \pi/2) V_{2k} \quad (2)$$

It is useful to express V_{2k} by the cartesian tensor components as:

$$\begin{aligned} V_{2,0} &= (\sqrt{6}/2) V_{ZZ}, \\ V_{2,\pm 1} &= +(V_{XZ} \pm iV_{YZ}), \\ V_{2,\pm 2} &= (1/2)(V_{XX} - V_{YY}) \pm iV_{XY}. \end{aligned} \quad (3)$$

The overtone resonance frequency is written as [3]

$$\nu_{1,-1} = 2\nu_L + (\nu_Q/\nu_L)(A_{2,-2}A_{22} - A_{2,-1}A_{21}). \quad (4)$$

When the static field B_0 rotates in the XY plane as illustrated in Figure 1, the overtone resonance frequency ν^{XY} is written by the cartesian tensor components by putting Eqs(2,3) into (4) as:

$$\begin{aligned} \nu^{XY}(\theta) &= 2\nu_L + \nu_Q/(32\nu_L) F^{XY}(\theta), \\ F^{XY}(\theta) &= 18V_{ZZ} + 32(V_{XZ}^2 + V_{YZ}^2) \\ &\quad + 5\{(V_{XX} - V_{YY})^2 + 4V_{XY}^2\} \\ &\quad + 12V_{ZZ}(V_{XX} - V_{YY})\cos 2\theta \\ &\quad + 24V_{ZZ}V_{XY}\sin 2\theta \\ &\quad - 3\{(V_{XX} - V_{YY})^2 - 4V_{XY}^2\}\cos 4\theta \\ &\quad - 12V_{XY}(V_{XX} - V_{YY})\sin 4\theta. \end{aligned} \quad (5)$$

The corresponding equations for $\nu^{YZ}(\theta)$ and $\nu^{ZX}(\theta)$ are obtained by cyclic permutation.

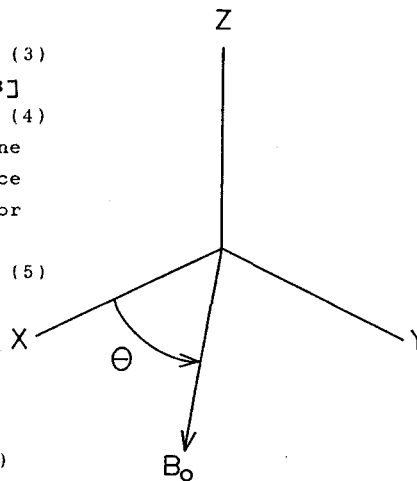


Fig.1 The experimental orthogonal axes system.

Key words: overtone NMR; quadrupole interaction; *l*-alanine; single crystal; solid-state NMR

たけこし きよのり・ひきろく にお

To determine the quadrupole coupling tensor, which is traceless ($V_{ZZ} = -V_{XX} - V_{YY}$) and symmetric ($V_{ij} = V_{ji}$), five components of the tensor should be determined experimentally, namely, V_{XX} , V_{YY} , V_{XY} , V_{YZ} , and V_{ZX} . The cartesian tensor V are diagonalized to give the quadrupole coupling tensor in the principal axis system as:

$$P = 2 \nu_Q R^{-1} V R. \quad (7)$$

The diagonalization matrix R is a 3×3 rotation matrix $R(\alpha, \beta, \gamma)$. The three Euler angles α, β, γ denote where the principal axes of the quadrupole coupling lie in the crystal-fixed axis system, in other words, how the principal axes of the quadrupole interaction relate with a local conformation of the particular quadrupole nucleus. The principal values of P ($|P_{11}| \geq |P_{22}| \geq |P_{33}|$) are $P_{11} = e^2 Qq/h$ (the quadrupole coupling constant), $P_{22} = -P_{11}(1 + \eta)/2$, and $P_{33} = -P_{11}(1 - \eta)/2$ (η is the asymmetric parameter).

Although all the five components are included in $\nu^{XY}(\theta)$, the angular variation is governed by three components, namely, V_{ZZ} , $V_{XX} - V_{YY}$ and V_{XY} . By subtracting the overtone resonance frequency at $\theta = 0$ from those at $\theta \neq 0$, one may obtain an equation easier to fit experimental data:

$$\begin{aligned} \delta \nu^{XY}(\theta) &= \nu^{XY}(\theta) - \nu^{XY}(\theta=0) \\ &= \nu_Q^2 / (32 \nu_L) \{ [12 V_{ZZ} (V_{XX} - V_{YY}) (\cos 2\theta - 1) + 24 V_{ZZ} V_{XY} \sin 2\theta \\ &\quad - 3 \{ (V_{XX} - V_{YY})^2 - 4 V_{XY}^2 \} (\cos 4\theta - 1) - 12 V_{XY} (V_{XX} - V_{YY}) \sin 4\theta \} \}. \quad (8) \end{aligned}$$

Similar to a conventional ^{14}N NMR, one can determine a quadrupole coupling tensor after analyzing the three angular variation experiments in XY , YZ , and ZX planes. Alternative approach for analysis is that to take the three angles α, β , and γ and $e^2 Qq/h$ (the quadrupole coupling constant) and η (the asymmetric parameter) as the five parameters, and to fit the observed angular variations in the three planes at once.

Angular variation of overtone transition moment

For a conventional coil arrangement in which the coil is placed perpendicular to the static field, the transition moment \underline{M} is given as

$$M_{1-1} = \langle \phi_1 | I_X | \phi_{-1} \rangle. \quad (9)$$

Here ϕ_i is the i -th eigen function of the total Hamiltonian, and is given to a first-order approximation by taking the quadrupole interaction as a perturbation:

$$\begin{aligned} |\phi_1\rangle &= |1\rangle + (\nu_Q / \sqrt{2} \nu_L) A_{21} |0\rangle - (\nu_Q / 2 \nu_L) A_{22} |-1\rangle, \\ |\phi_{-1}\rangle &= |-1\rangle - (\nu_Q / \sqrt{2} \nu_L) A_{2-1} |0\rangle + (\nu_Q / 2 \nu_L) A_{2-2} |1\rangle, \quad (10) \end{aligned}$$

where $|i\rangle$ is an eigenstate of I_Z . The transition moment is written as

$$M_{1-1} = (\nu_Q / \nu_L) A_{21}^*, \quad (11)$$

and for the XY plane, by putting Eqs.(2,3), we obtains

$$\begin{aligned} \underline{M}^{XY} &= (\nu_Q / \nu_L) \{ V_{XY} \cos 2\theta - (1/2)(V_{XX} - V_{YY}) \sin 2\theta \\ &\quad + i(V_{ZX} \cos \theta + V_{YZ} \sin \theta) \}. \quad (12) \end{aligned}$$

Corresponding expression for the YZ and ZX planes are obtained by cyclic permutation.

Experimental Single crystals of l -alanine were grown by slow evaporation at room temperature from a saturated aqueous solution. The crystal belongs to the orthorhombic space group, $P2_12_12_1$, with four molecules in the unit cell[4]. The orthogonal a, b, c crystallographic axes were chosen as the experimental axis system (XYZ).

^{14}N overtone NMR signals were obtained using a JEOL GX270 spectrometer, operating at the overtone resonance frequencies of about 39.4MHz. A specially designed double-resonance probe equipped with a very accurate goniometer was employed. A convenient 90° pulse excitation method was employed with high-power proton decoupling. About 500W of rf power was applied to produce about $80\mu\text{s}$ 90° pulse length measured when the static magnetic field is at the a axis. Typically 2000 FIDs were accumulated with 1s repetition time.

Results and Discussion.

Figure 2 shows the observed ^{14}N overtone spectra when the static magnetic field is in the crystallographic ab plane and making the angle denoted in the figure with the a axis. As have expected from the above theory, not only the line positions but also the relative intensities do depend on the orientation.

Figure 3 shows the angular variation of the ^{14}N NMR line positions when the static magnetic field was rotated in the ab , bc , and ca planes. The observed angular variations were least-squares fitted to Eq.(8) and the solid and the broken

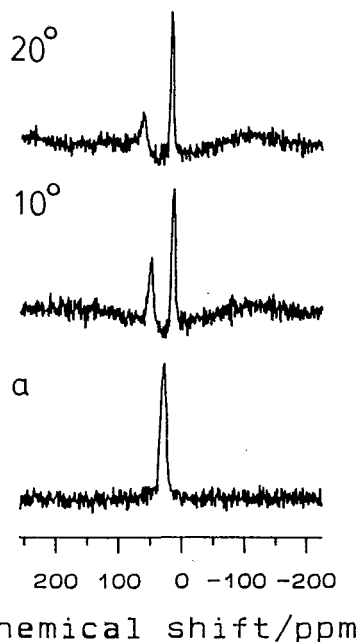


Fig.2 ^{14}N overtone NMR spectra of a single crystal of l-alanine

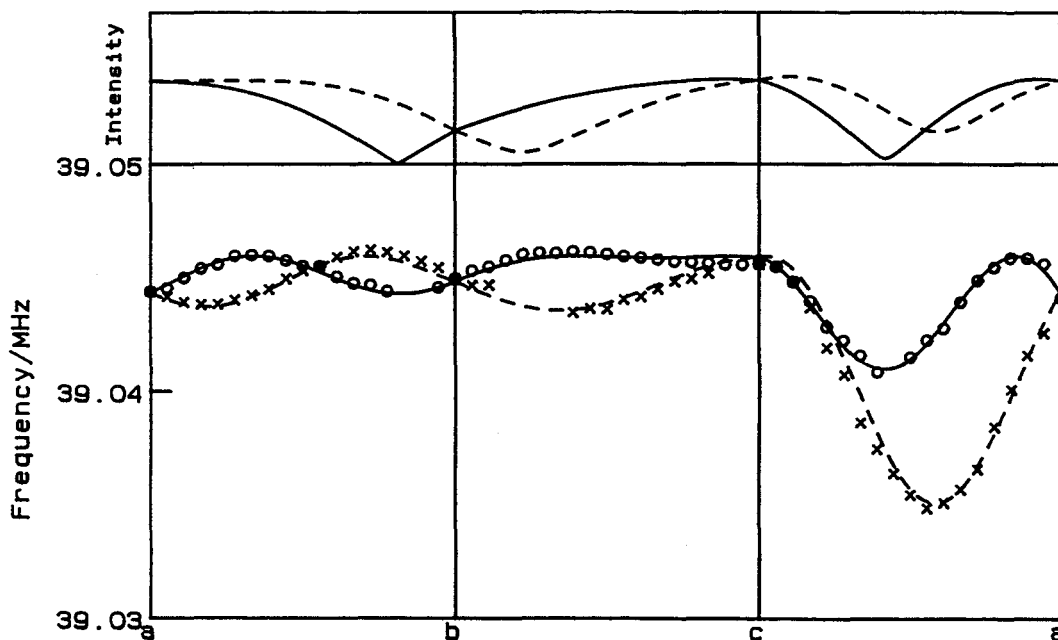


Fig.3 Angular dependence of the ^{14}N overtone line positions of a single crystal of l-alanine

lines through the data are the best fit lines. Further, from the obtained tensor components, the transition moments were deduced and its squares (intensity) are plotted together with the angular variation data. It is to be noted that there are several "missing" points in the angular variation data, which we could not obtain a overtone line. In fact, the calculated intensity from the fitted tensor data realized the "missing" points.

After diagonalization of the V matrix, we have obtained the quadrupole coupling constant e^2qQ/h of 1.148MHz and the asymmetric constant η of 0.276. These values compare favorably with the reported values ($e^2qQ/h=1.205$ MHz and $\eta=0.261$) obtained by NMQ at 77K[5]. Further, the relative orientation of the ^{14}N quadrupole tensor components and the local molecular structure was investigated. It was found that the largest principal axis makes an angle of 5.2° with the C-N bond direction.

The discrepancy between the fitted lines and the experimental points in Figure 3 may be largely due to the neglect of the chemical shielding tensor. At present, we are trying to include the shift tensor in our least-squares fitting programs. Since the chemical shift tensor shows similar angular variation to the second-order quadrupole tensor, it is not straightforward to separate the two contributions.

- [1] R. Tycko and S.J. Opella, J. Chem. Phys. 86 (1987) 1761.
- [2] M.E. Rose, Elementary Theory of Angular Momentum (Wiley, New York, 1957).
- [3] K. Takegoshi and K. Hikichi, Chem. Phys. Lett. 194 (1992) 359.
- [4] H.J. Simpson and R.E. Marsh, Acta Cryst. 20 (1966) 550.
- [5] M.J. Hunt, J. Magn. Reson. 15 (1974) 113.

P 32 天然存在比 ^2H -NMRによる液晶構造の研究

○脇田美砂子¹、中川照真¹、鳥海弥和²、赤坂一之³
(京大薬¹、東大教養²、神大理³)

Deuterium NMR Study of a Liquid Crystal at Natural Abundance.
Molecular Order and Conformation of PAA in the Nematic Phase.

W. Wakita¹⁾, T. Nakagawa¹⁾, H. Toriumi²⁾, and K. Akasaka³⁾

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹⁾; College of Arts and Sciences, University of Tokyo²⁾;
Faculty of Science, Kobe University³⁾

Proton-decoupled, natural abundance deuterium NMR spectra of p-azoxyanisole (PAA) were successfully recorded in the nematic phase at several temperatures. Because of the lack of deuterium - deuterium dipolar couplings, sharp deuterium signals were observed with distinct quadrupole couplings. This allowed estimation of orientational order for each ring of PAA and estimation of each CCD bond angle. The results were compared with those obtained for specifically deuterated PAAs, and the effects of deuteration on the orientational order and conformation were estimated.

1. 緒言

従来、 ^2H -NMRによる液晶の研究は、選択的に重水素置換した液晶分子を用いて行われてきた。このような試料の合成は容易ではない。また、重水素化した標品は同位体効果により天然の液晶の構造物性と異なる可能性もある。現在では、ニートな試料について高感度のNMR分光器を用いて十分な積算をすれば、天然に存在する重水素のNMRスペクトルを得ることは困難ではない。天然存在比 ^2H -NMRは上に挙げた重水素化の問題点を解決するだけでなく、重水素間の双極子相互作用がないため、プロトンデカップリングすれば非常にシンプルなスペクトルが得られるという利点がある。本研究では、液晶の研究材料として広く用いられてきたp-アゾキシアニソール(PAA)の天然存在比 ^2H -NMRスペクトルの測定を試み、そのスペクトルの解析により重水素化されていないPAAの配向度、分子構造に関する情報を得た。また、メトキシ基のみを選択的に重水素置換したとされるPAA-d6の ^2H -NMRスペクトルを測定したところ、芳香環に結合した重水素の弱い信号が観測されたので、その解析結果も併せて報告する。

2. 実験方法

PAA ($T_{\text{CN}}=117^\circ\text{C}$ 、 $T_{\text{NI}}=136^\circ\text{C}$)は、10φの試料管に、PAA-d6は5φの試料管に封入した。まず、等方相においてシムを調整し、温度を下げて液晶相となる範囲の温度(133°C-104°C)を設定した。試料管は1時間以上プローブ内に放置し温度を安定させてから測定した。試料温度は、サーミスター温度トレーサー(タカラ D641)を用いて校正した。温度の安定度は $\pm 0.03^\circ\text{C}$ であった。

^2H -NMRスペクトルは、日本電子GX-400分光器を用いて、試料管を回転させずに測定した。

天然存在比重水素NMR、液晶、配向秩序度、p-アゾキシアニソール

わきた みさこ、なかがわ てるみち、とりうみ ひろかず、あかさか かずゆき

3. 結果

PAAの分子構造を図1に示す。局所的な配向度を求めるため、分子内座標系を図のように定義する。PAA、及びPAA-d6の ^2H -NMRスペクトルを図2に示した。図2の各シグナルに付けた番号は、図1の重水素の番号に対応している。四極子分裂幅の大きい重水素が結合している芳香環を環A、もう一方を環Bとする。どちらの環がアゾキシ基の酸素原子に近いかは、明かではない。図2のシグナルの帰属はEmsley等の研究を参照した。¹⁾

重水素化していないPAAは、四極子分裂の他にプロトンとの双極子相互作用による分裂が重なり、非常に複雑な ^2H -NMRスペクトルを与える(a)。プロトンをデカップリングして測定すると(b)、重水素どうしの双極子-双極子相互作用による分裂がないために、四極子分裂による鋭い吸収線のみ観測された。(b)のようなスペクトルを得るには数万回の積算(6時間程度)で充分であった。芳香環のy軸(y'軸)回りの回転運動は十分速く、環の重水素のシグナルは4組しか観測されない²⁾。各温度についての信号の四極子分裂幅を用いて、PAAの配向度の温度依存性、またCCD結合角等ネマチック相における分子構造に関する情報を得た。

一方、PAA-d6の ^2H -NMRスペクトル(c)には、わずか32回の積算で、重水素化されたメトキシ基の他に重水素化されていないはずの芳香環の重水素の信号が観測された。これは試料の合成過程で環の水素の一部が重水素置換されたことを示している。プロトンをデカップリングすると(d)、四極子分裂のみ観測された。環の重水素の信号のうち、2つの強い信号はケミカルシフト値よりメトキシ基に対してメタ位の重水素 D_{1^A} 、 D_{1^B} であると帰属した。従って、(c)で観測された分裂はオルト位のプロトンとの双極子相互作用によるものである。この分裂幅は1000Hz以上あるため、環の水素を全て重水素化した試料について重水素どうしによる双極子分裂(数百Hz程度)を用いるよりも精度よく配向度を評価できる。これらのスペクトル(c)、(d)の解析から配向度、CCD結合角等を求め、スペクトル(b)の解析より得た天然存在比PAAに関する結果、及びこれまでに報告されている種々の重水素化PAAに関する結果^{2), 3), 4), 5)}と比較した。これに基づき、重水素置換がPAAの磁場に対する配向や、液晶相における分子構造に影響を与えることを明らかにした。

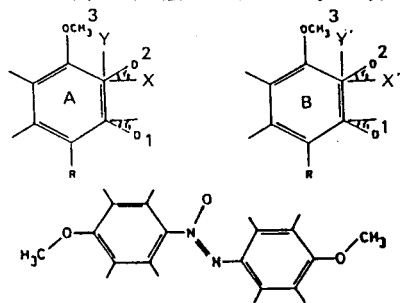


図1. p-アゾキシアニソールの分子構造及び分子内座標系

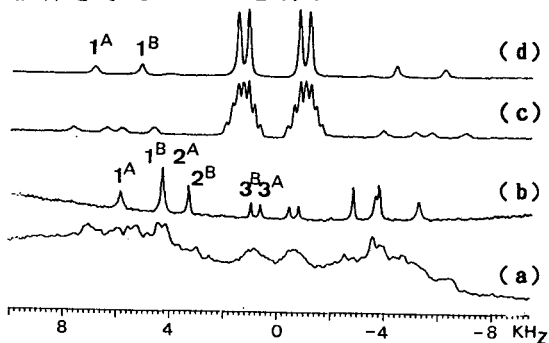


図2. PAA、及びPAA-d6の ^2H -NMRスペクトル(61.25MHz)
(a) PAA (b) PAA, ^1H -decoupled
(c) PAA-d6 (d) PAA-d6, ^1H -decoupled

4. 参考文献

- 1) Emsley, J. W., and Turner, D. L., 1981, Chem. Phys. Lett., 82, 477.
- 2) Diehl, P., and Tracy, A. S., 1975, Mol. Phys., 30, 1917.
- 3) Emsley, J. W., Hhoo, S. K., and Luckhurst, G. R., 1979, Mol. Phys., 37, 959.
- 4) Hayamizu, K. and Yamamoto, O., 1980, J. magn. Reson., 41, 94.
- 5) Rowell, J. C., Phollops, W. D., Melby, L. R., and Oanar, M., 1965, J. Chem. Phys., 43, 3442.

P 33 状態相関 2次元NMR法による液晶構造の研究 —混合液晶系—

○木村雅晴¹・河原広典²・今成 司²・内藤 晶³・赤坂一之^{1,4}
(¹京大理・²日本電子・³姫工大理・⁴神戸大理)

STATE-CORRELATED TWO DIMENSIONAL NMR SPECTROSCOPY
APPLICATION TO A MIXTURE OF LIQUID CRYSTALS
(alkylbiphenyl / phenylcyclohexane)

○M.KIMURA¹, H.KAWAHARA², M.IMANARI², A.NAITO³, and K.AKASAKA^{1,4}

¹ Faculty of Science, Kyoto University; ² JEOL, Ltd;

³ Faculty of Science, Himeji Institute of Technology; ⁴ Faculty of Science, Kobe University

We improved the efficiency of microwave irradiation on our temperature jump NMR apparatus so that the phase transition of a liquid crystal occurred within 3 milliseconds. This improvement enabled us to obtain well-resolved State-Correlated Two Dimensional NMR Spectroscopy (SC-2D) spectra of liquid crystals in which spectral mixing due to spin diffusion was considerably reduced. In the present study, we applied this technique to a 1:1 mixture of 4-n-pentyloxy-4'-cyanobiphenyl (5OCB) and 1-(4'-cyanophenyl)-4-propylcyclohexane (PCH3). We could separate complicated, overlapped signals in the nematic phase into individual proton signals, which permitted analysis of dipole-dipole couplings of individual protons. Here, we could estimate the order parameter of the core parts (rings) of 5OCB and PCH3 in the mixture to be 0.52 and 0.38, respectively (at a reduced temperature of 0.99).

1. はじめに

我々は、マイクロ波を利用した高速温度ジャンプNMR法において、液晶試料が最も効率良くマイクロ波を吸収するようにプローブ部分を中心に改良を行い、液晶相—等方相間の相転移に要する時間を、最高で僅か3ミリ秒にまで縮める事に成功した。このような高い効率を実現できたことで、より分離の良い状態相関2次元プロトンNMRスペクトルを得ることが出来るようになった。

従来の重水素置換による¹H又は²H NMR法と比べて、状態相関2次元プロトンNMR法を液晶材料に適用する場合の特長として

1. 重水素置換を必要としないため適用範囲が広い。
2. 液晶相におけるNMRシグナルの帰属が出来る。
3. 重水素化による液晶物性に対する同位体効果がない。

といった点が挙げられる。今回は、いままで実用的な面において経験的に行われてい

液晶、混合液晶、2次元NMR、相転移、マイクロ波加熱、温度ジャンプ

きむらまさる、かわはらひろのり、いまなりまもる、ないとうあきら、あかさかかずゆき

た液晶の混合に対する分子論的なアプローチの手始めとして、この方法を混合液晶系に適用することを試みたのでそれについて報告する。

2. 背景

液晶の一般的な性質として、2種類の同型の液晶分子を混合すると、それらは均一に混じり合い、その液晶相—等方相間の相転移温度が変化することが知られている。多くの場合は相転移温度は低温側にシフトし、今回対象とした系(alkylbiphenyl/phenylcyclohexane)においても単一の液晶分子における相転移温度はそれぞれ(68℃/45℃)であるのに対し、重量比1:1の混合液晶の液晶相—等方相間の相転移温度は26℃になった。これは、2種類の液晶分子を混合したことによる分子間相互作用の変化に基づくものである。

液晶構造に関する情報のひとつに配向秩序因子(Order Parameter)がある。状態相関2次元NMR法を用いることによって対象となる系が混合液晶の場合でも、等方相でのスペクトルが十分分解能良く分離されていれば、各水素原子核が液晶相でどのような双極子相互作用を受けているかを2次元スペクトルのクロスセクションから知ることが出来る。これより、配向秩序因子を得ることが出来る。

3. 装置の改良

マイクロ波の吸収効率を上げ、液晶相—等方相間の相転移をできるだけ短時間に達成するために、主に次の2点について改良を行った。

1. マイクロ波発生装置の導波管からNMRのプロープへとマイクロ波を導く同軸ケーブルを太くした。これにより同軸ケーブル内での損失を抑えることができ、より効率良くマイクロ波をプロープへと導くことが出来るようになった。

2. 周波数掃引装置を用いて、液晶試料をコイル内部に挿入することによるマイクロ波吸収効率の変化をモニターしながら、コイルの形状や試料の位置などに検討を加えた。その結果、2.45GHzのマイクロ波をより効率良く吸収させることが出来るようになった。

4. 実験

液晶試料として4-n-pentyloxy-4'-cyanobiphenyl(5OCB)と、1-(4'-cyanophenyl)-4-propylcyclohexane(PCH3)、および重量比1:1の混合液晶

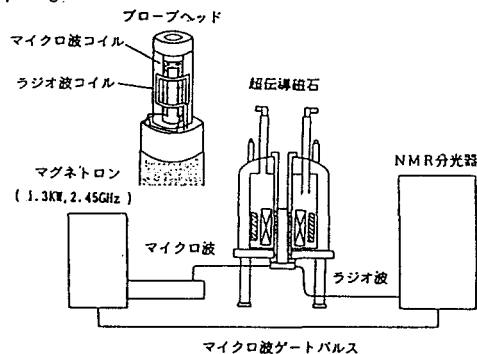


図1. マイクロ波温度ジャンプNMR装置

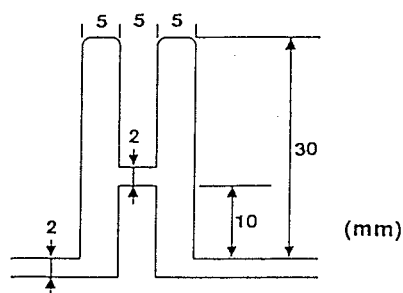


図2. マイクロ波照射用コイル

を用いた。5 OCB、PCH3の液晶相-等方相間相転移温度はそれぞれ68℃、45℃である。状態相関2次元NMRスペクトルの観測においては転移時間に5ミリ秒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。マイクロ波発生装置は東京子製IDX-2502P(1.3kW, 2.45GHz)を、また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。

5. 結果

従来、液晶相のスペクトルはシグナルの重なりのために解析が困難であったが、状態相関2次元NMR法を用いれば、液晶相での情報を含んだスピンを等方相で観測することによって各水素原子核のシグナルに分離することが出来る。図にパルス系列と混合液晶について得られた状態相関2次元NMRスペクトルを示す。等方相のスペクトルの各シグナルは、DQF-COSYなどの方法により帰属することが出来る。

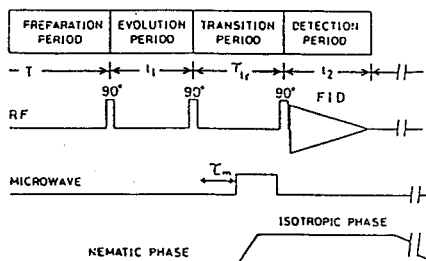
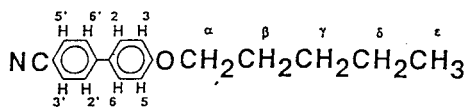
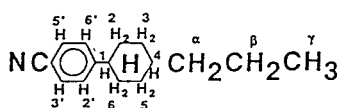


図3. 状態相関2次元NMRのパルス系列



4-n-pentyloxy-4'-cyanobiphenyl (5OCB)



1-(4'-cyanophenyl)-4-propylcyclohexane (PCH3)

図4. 試料 (5OCB/PCH3)

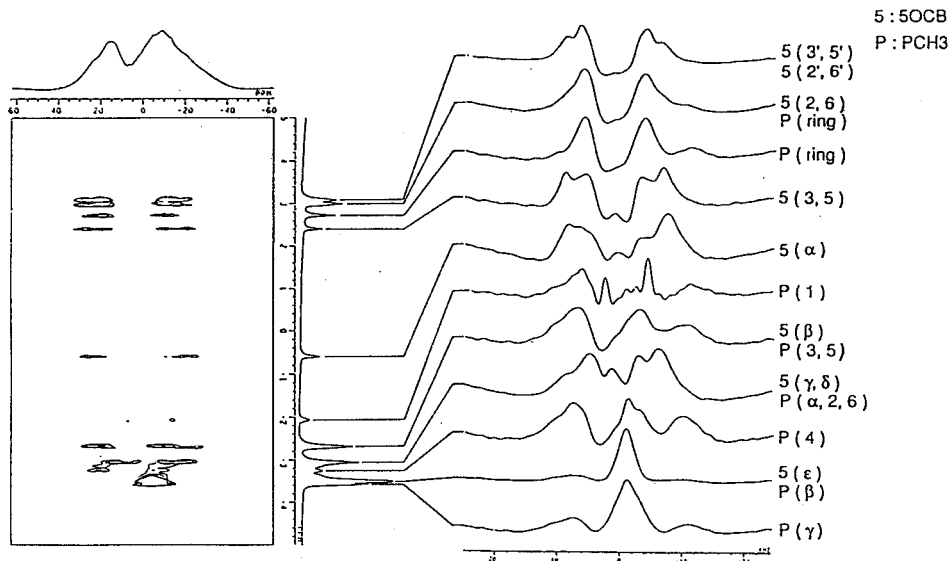


図5. 混合液晶 (5OCB/PCH3) の状態相関2次元NMRスペクトル

各水素原子核についてのクロスセクションから、近接プロトン間の双極子相互作用によるシグナルの分裂を読み取ることが出来る。双極子相互作用と配向秩序因子Sは次の式で関係付けられる。

$$\Delta\nu = \frac{3}{2\pi} \left(\frac{\gamma^2 h}{2\pi r^3} \right) S, \quad S = \frac{3\cos^2\theta - 1}{2}$$

ここで、 $\Delta\nu$ ：双極子相互作用によるシグナルの分裂幅
 γ ：水素原子核の核磁気回転比
 h ：プランク定数
 r ：双極子相互作用を及ぼす水素原子核間距離
 θ ：水素原子核を結ぶベクトルと磁場のなす角

である。

芳香環の水素原子核の双極子相互作用によるシグナルの分裂は、隣接する水素原子核との双極子相互作用を示しており、この値から5 OCB及びPCH3の混合液晶中でのそれぞれのコアの配向秩序因子を得た。

	分裂幅 (kHz)	配向秩序因子	T*
5 OCB	8.03	0.33	0.99
5 OCB (mixture)	12.75	0.52	0.99
PCH3	8.32	0.34	0.99
PCH3 (mixture)	9.44	0.38	0.99

ここで、T*はReduced Temperature $T^* = T_{ex} (K) / T_c (K)$

PCH3が、混合によってもT_c近くでの配向秩序因子にそれほど変化が見られないのに対し、5 OCBは大きく変化している。5 OCBは、分子がかなり配向した状態から一挙に等方相に転移していることがわかる。

6. 今後の課題

ここでは、混合液晶系に対する状態相関2次元NMR法の適用の一端を示した。いまのところマイクロ波の照射・吸収効率はかなり満足のいくレベルまで達しているが、分解能の点で等方相において全ての水素原子核のシグナルが分離されるまでには至っておらず、このことが混合液晶における個々の水素原子核のスペクトルの解析を困難にしている。その原因としては、コイルの形状による摂動磁場の不均一性及び実験時間が長いことによる静磁場の揺らぎが考えられる。等方相でのスペクトルが十分分解能良く分離されていれば、各水素原子核が液晶相でどのような双極子相互作用を受けているかを2次元スペクトルのクロスセクションから知ることが出来るはずである。これらの点を改良し、更に局所的な情報を得ることが出来るようにすることが今後の課題である。

東工大 O浅川直紀・黒木重樹・黒子弘道・安藤勲
群馬大 莊司顯・尾崎拓男

Hydrogen-bonding effect on ^{13}C NMR chemical shifts of cyclic dipeptides in the solid state

Naoki Asakawa, Shigeki Kuroki, Hiromichi Kurosu, Isao Ando (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152)
Akira Shoji, and Takuo Ozaki (Department of Biological Sciences, Gunma University, Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma 376)

The ^{13}C NMR chemical shifts of L-alanine-residue carbonyl-carbon (L-Ala CO) of cyclic dipeptides, c(Ala-D-Ala) and c(Ala-Ala) in the solid state, were measured, in which the "amide-amide type" hydrogen-bond and their hydrogen bond lengths ($R_{\text{N,O}}$) are all the same. From these results, it is found that the observed principal values of ^{13}C chemical shift tensor are greatly affected by their hydrogen-bond angles ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}$, $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}$).

1. 緒言

これまで我々は固体ペプチドの構造と ^{13}C 及び ^{15}N 化学シフトの相関を調べ、化学シフトを通してペプチドの水素結合やコンホメーションに関する情報が得られることを示してきた¹⁻⁷。いくつかのペプチドに含まれるグリシン残基及びL-アラニン残基のカルボニル炭素の等方平均化学シフトは水素結合距離 ($\text{N}\cdots\text{O}$ 原子間距離) の減少に伴い直線的に低磁場シフトすることが示された。さらに、いくつかのペプチドのL-アラニン残基のカルボニル炭素の化学シフトテンソル主値 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) が決定された。

固体高分解能 ^{13}C CP-MAS NMR、水素結合、ペプチド、L-アラニン

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

その結果から、水素結合距離 ($R_{N\cdots O}$) の減少に伴い δ_{22} は大きく低磁場側へシフトし、 δ_{11} は $R_{N\cdots O}$ の減少に伴いやや高磁場側へシフトするものの δ_{22} ほどの明確な相関はなく、 δ_{33} は水素結合距離の変化に敏感ではないことがわかった。これらの結果は INDO MO を用いた有限摂動理論 (FPT) による磁気遮蔽定数 ($\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$) の計算からも支持された。

しかし、FPT-INDO法による磁気遮蔽定数の計算によると、 σ_{11} 及び σ_{22} にかなりの主鎖コンホメーションの違いを反映して異なった化学シフト値を与えているが、実測の化学シフト値 δ_{11} 及び δ_{22} には計算に見られるようなコンホメーション依存化学シフトは見られなかった。これは、磁気遮蔽定数の計算は水素結合角度 ($C=O\cdots H$ と $O\cdots H-N$) を 180° に仮定しておこなったが、実際に用いた系では水素結合角度は約 $130^\circ \sim 160^\circ$ の範囲に分布していて、水素結合角度の違いがコンホメーションの違いの効果を打ち消すように δ_{11}, δ_{22} に現れたのではないかと考えられる。このような水素結合角度の違いが L-アラニン残基カルボニル炭素の化学シフトテンソル主値に実際に影響を及ぼすかどうかを調べることを本研究の目的とする。そこで、X線回折法によって構造既知である L-アラニン残基を含むペプチドのうち $R_{N\cdots O}$ が等しく水素結合角度が異なる系をいくつか選び、水素結合角度と化学シフトテンソル主値との相関を調べた。

2. 実験

試料として環状ジペプチド (ジケトピペラジン) である c(Ala-D-Ala) と c(Ala-Ala) を用いた。c(Ala-D-Ala) 及び c(Ala-Ala) はそれぞれ再結晶の方法によって結晶構造が異なることがわかっている⁸⁻¹¹。それらの幾何学的パラメータを Table 1 に示した。L-アラニン残基のカルボニル基が形成する水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ はすべて約 2.89 \AA で等しいが、水素結合角度及びコンホメーションが異なっていることがわかる。

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-270 NMR 分光器 (67.80 MHz) を使い、室温で行った。積算回数は $300 \sim 1000$ 回である。試料を $1800 \sim 1950 \text{ Hz}$ でマジックアングルスピニングさせ、Hertzfeld-Berger 解析を行い化学シフトテンソル主値を決定した。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て、その化学シフトを 29.5 ppm として、TMS 基準に換算した。

3.結果と考察

Fig.1に ^{13}C CP-MASスペクトルの例を示した。いくつかの方法で結晶化させたc(Ala-D-Ala)及びc(Ala-Ala)中のL-アラニン残基のカルボニル炭素の等方平均化学シフトは約3 ppmの範囲でばらついた。今回用いた試料はすべて水素結合距離が等しいが、各試料間で化学シフト差が生じた。このシフト差には「コンホメーションの違い」¹²及び「水素結合角度の違い」から生じたものが含まれていると考えられる。

さらに、L-アラニン残基のカルボニル炭素の周囲の立体的な分子構造に関する情報を得るために、これらの試料を1800~1950 Hzの低速でマジックアングルスピニングさせたときの ^{13}C CP-MAS測定を行った。それらのスペクトルの例をFig.2に示した。これらのスペクトル中のスピニングサイドバンドには化学シフト異方性に関する情報が含まれている。メインピークに対するスピニングサイドバンドの相対強度からHertzfeld-Bergerの方法によってシミュレーションを行い、L-アラニン残基のカルボニル炭素の化学シフトテンソルを決定した (Table 2)。 δ_{22} の測定誤差は約0.5 ppm、 δ_{11} 及び δ_{33} については約2 ppmと見積もられる。Table 1

Table 1. Geometrical parameters of c(Ala-D-Ala) and c(Ala-Ala) as determined by X-ray diffraction studies.

sample	recrystallized from	dihedral angle (deg.)			hydrogen-bond length (Å)	
		ϕ	φ	ω	R _{N-O}	R _{H-O}
c(Ala-D-Ala)	MeOH	-3.1	2.8	3.2	2.886	1.94
	H ₂ O	-2.7	2.4	2.9	2.88	1.96
c(Ala-Ala)	MeOH 5°C	4.7	-4.2	4.9	2.888	2.08
	MeOH	-32.4	20.6	8.1	2.885	1.89
	H ₂ O	-25.7	26.9	0.7	2.895	1.91
		-25	20	8	2.888	1.88
		-33	28	0	2.899	1.99

sample	recrystallized from	dihedral angle (deg.)			
		COH	CON	NHO	CHN
c(Ala-D-Ala)	MeOH	146.9	146.0	160.6	156.3
	H ₂ O	150.4	145.7	165.1	153.9
c(Ala-Ala)	MeOH 5°C	119.5	119.4	179.3	157.3
	MeOH				
	H ₂ O	120	120.4	174	
		122	119.1	168	

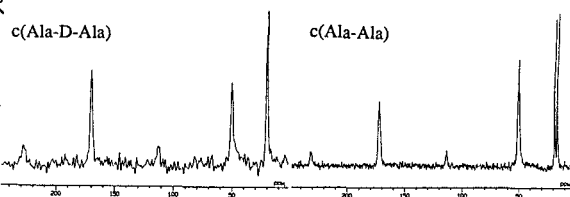


Fig. 1 67.8MHz ^{13}C CP-MAS NMR spectra of c(Ala-D-Ala) recrystallized from methanol at 5 deg. and c(Ala-Ala) form H₂O at room temperature condition. The spinning rates are 3960 and 4000Hz, respectively.

に示すように、今回用いた試料の水素結合角度は大きく2つのグループに分けることができる。グループ1は角度 $C=O \cdots N$ と角度 $C=O \cdots H$ が約120度のもので、グループ2は角度 $C=O \cdots N$ と角度 $C=O \cdots H$ が約150度のものである。この2つのグループの化学シフトテンソル主値を比較すると、 δ_{11} 及び δ_{22} に10ppm以上のシフト差が観測された。 δ_{33} にも大きなシフト差が観測されたが水素結合角度の違いによるものではなく、したがって水素結合ではない分子間の相互作用に起因するものではないかと考えられる。詳細は講演で述べる。

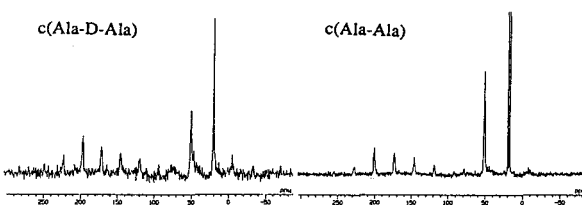


Fig. 2 67.8MHz ^{13}C CP-MAS NMR spectra of c(Ala-D-Ala) recrystallized from methanol at 5 deg. and c(Ala-Ala) form H_2O at room temperature condition. The spinning rates are 1750 and 1850Hz, respectively.

Table 2 The observed isotropic ^{13}C NMR chemical Shifts and their tensor principal values of c(Ala-D-Ala) and c(Ala-Ala).

sample	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	ppm
c(Ala-D-Ala) MeOH	169.7	261	145	104	
c(Ala-D-Ala) H_2O	170.7	265	144	103	
c(Ala-D-Ala) MeOH5deg.	170.1	255	156	99	
c(Ala-Ala) MeOH	172.9	253	160	106	
c(Ala-Ala) H_2O	172.5	251	158	108	

文献

- 1) I.Ando et al.,*Macromolecules*,17,457(1984)
- 2) S.Ando et al.,*J.Am.Chem.Soc.*,107,7648(1985)
- 3) S.Ando et al.,*ibid*,110,3380(1988)
- 4) A.Shoji et al.,*ibid*,112,4693(1990)
- 5) S.Kuroki et al.,*J.Mol.Struct.*,240,19(1990)
- 6) S.Kuroki et al.,*ibid*,245,69,(1991)
- 7) N.Asakawa et al.,*J.Am.Chem.Soc.*,114,3261(1992)
- 8) E.Sletten,*ibid*,92,172(1970)
- 9) E.Benedetti et al.,*Biopolymers*,7,751(1969)
- 10) E.Benedetti et al.,*J.Phys.Chem.*,73,2891(1969)
- 11) J.Sletten,*Acta Chemica Scandinavica*,A34,593(1980)
- 12) A.Shoji et al.,*Makromol.Chem.,Rapid Commun.*,5,799(1984)

Determination of internuclear distances for heteronuclear and
homonuclear systems

Akira Naito, Satoru Tuzi, Takashi Nakamura, and Hazime Saito
(Department of Life Science, Himeji Institute of Technology)

Rotational resonance method was examined to determine P-P distance of phosphate group in adenosine 5'-triphosphate disodium salt(Na_2ATP). The P-P distance between γ and β phosphorous nuclei was determined within the accuracy of 0.2Å after careful examination of the exchange rate of the Zeeman magnetizations. Separated local field 2D NMR spectroscopy was applied to determine N-H distances for peptide nitrogens to evaluate the strength of hydrogen bonding. Strong side band patterns were observed for peptide nitrogens whose envelope reflects magnitude of the N-H dipolar interactions. Inspection of the side band pattern made it possible to determine the N-H bond distance.

(序) 固体試料の高分解能NMRスペクトルを得るため、CP/MAS法がこれまで広く用いられてきたが、この手法のみでは原子間距離情報を含む双極子相互作用も同時に消去されてしまう。このため、高分解能のNMRスペクトルは得られるものの、原子間距離の情報は失われてしまう。そこで、複雑な分子の原子間距離情報を得るには、高分解能を保ちながら、双極子相互作用を復活させる手法を用いる必要がある。今回、我々は回転共鳴法および局所磁場分離2DNMR法を用いて双極子相互作用を復活させP-PおよびN-H原子間距離を決定するための基礎検討を行ったので報告する。

(実験) P-P間の距離を測定する試料として、アデノシン三リン酸二ナトリウム塩(Na_2ATP)を用いた。 Na_2ATP をエタノール・水(2:1)溶媒に溶かし、冷却法によって結晶を得た。得られた結晶を湿度10%および50%の環境に2日間放置した。菅原らの報告によれば湿度10%および50%に放置した結晶はそれぞれ二水和塩および三水和塩になっている。¹⁾ N-H間距離を測定する試料としてジペプチドであるグリシルアラニンとトリペプチドであるグリシルプロリルアラニンを用いた。

回転共鳴法の実験²⁾には図1(a)に示すパルス系列を用いた。実験では測定したい2本の共鳴線の化学シフト値の差にローターの回転周波数を一致させ、さらに片方の共鳴線

回転共鳴法、局所磁場分離2DNMR、原子間距離、ATP、ペプチド

ないとう あきら、つじ さとる、なかむら たかし、さいとう はじめ

を選択的に反転させた後、磁化移動による信号の強度変化を観測した。局所磁場分離2D-NMRの実験には図1(b)に示すパルス系列を用いた。展開時間ではBLEW12パルス系列を用いてプロトン間のスピン拡散を押さえ、N-H双極子分裂を観測可能にした。さらに180°パルスを入射して化学シフト相互作用を再結像により消去した。このパルス系列において準備期間から検出期間の間隔はローター回転周期の整数倍に設定することが重要であった。

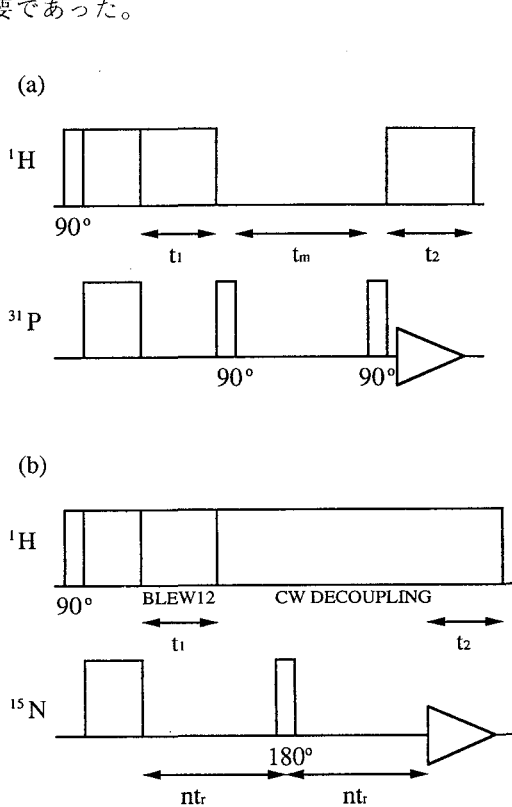


図1 パルス系列
(a)回転共鳴法
(b)局所磁場分離2D NMR

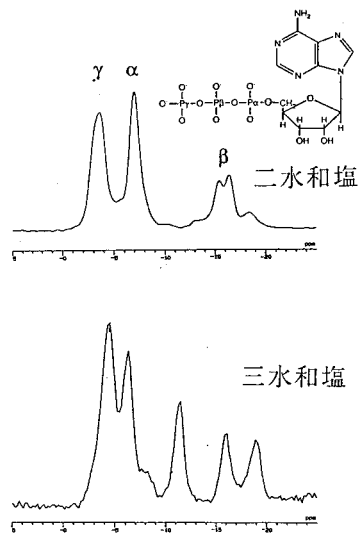


図2 Na₂ATPの³¹P NMR
スペクトル

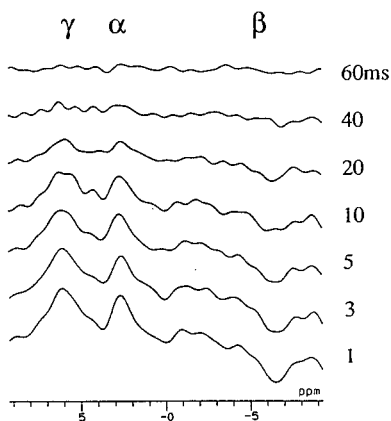


図3 Na₂ATPの回転共鳴³¹P NMRスペクトル

(結果と考察)

回転共鳴法によるP-P間距離の決定

図2に示すようなNa₂ATP二水和塩の³¹P-NMRスペクトルでは3種類の³¹P共鳴線が分裂して現われ、低磁場からそれぞれγ,α,βのリン核に帰属できる。一方、Na₂ATP三水和塩では5種類の³¹P共鳴線が現われた。X線回折の結果によれば、単位格子に存在する2種類のATP分子のリン酸基部分の配座は二

水和塩ではよく似ているのに対し、三水和塩では大きく異なっている。したがって、 ^{31}P NMRスペクトルの相違はこの配座の違いを反映していると考えられる。

Na_2ATP 二水和塩結晶について ^{31}P 回転共鳴の実験を行った。 γ 位と β 位の化学シフト値の差に等しい周波数にローターの回転周波数を設定し、さらに β 位の信号を選択的に回転させて、スピン交換により磁化の変化していく様子を観測した(図3)。このスピン交換は双極子相互作用が復活したために生じているので、この交換速度の解析から核間距離を0.2Åの精度で決定することができた。回転共鳴法において、ゼロ量子スピンスピン緩和時間や化学シフトテンソルの主値等を決定する必要があるが、これらの値が実験で得られない場合には、適当な値を仮定する必要がある。このように、回転共鳴法では、不確定な要素を含むのが欠点であるといえよう。

局所磁場分離2DNMR法によるN-H間距離の決定 直接結合したN-H間距離は水素結合の強さを反映しているので、この距離を正確に決定することは生体分子の構造を理解するうえでも重要である。しかしX線回折においてもプロトンの位置は正確に決定することはできない。本研究ではペプチド窒素の水素結合を評価する目的で、回転試料に局所磁場分離2D NMR法を適用してN-H間距離を決定する試みを行った。今回の実験はすべて天然存在比の ^{15}N NMRスペクトルを観測した。1回の測定には約20時間を要した。

図4にグリシルアラニンのアミノ窒素とペプチド窒素の局所磁場パターンを图示している。この図から分かるようにペプチド窒素の局所磁場パターンには大きなサイドバン

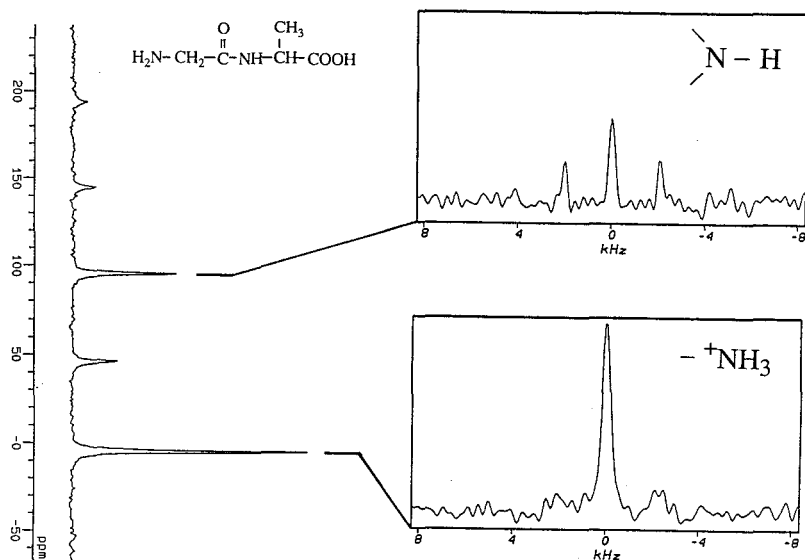


図4 グリシルアラニンの局所磁場分離 ^{15}N NMRスペクトル

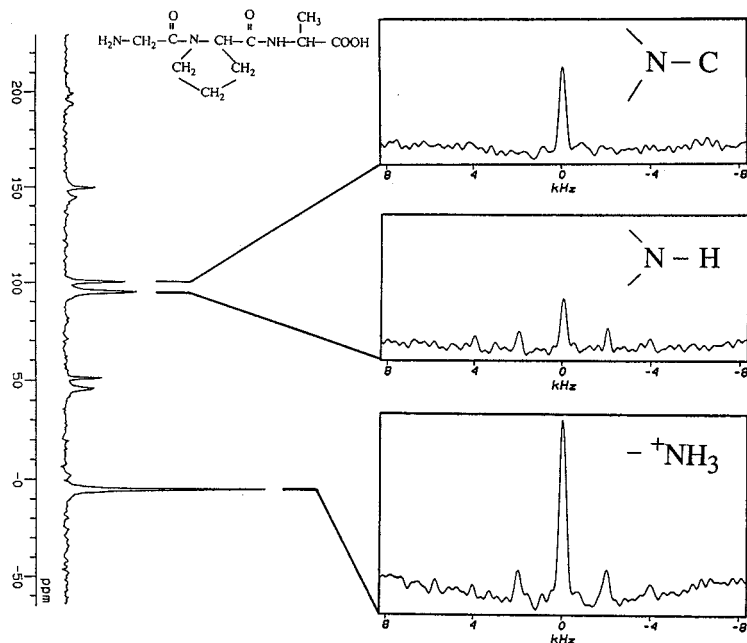


図5 グリシルプロリルアラニンの局所磁場分離 ^{15}N NMRスペクトル

ドが現われており、このサイドバンドパターンを解析することによって、N-H間距離を決定することができる。Opella等はDNAの局所磁場分離2D NMRスペクトルを報告しているが、³⁾今回のスペクトルでは、より先鋭なサイドバンドパターンを示した。この原因としては、BLEW12パルス系列のデカップリング効率が良いことと、天然存在比であるため、 ^{15}N 核間の双極子相互作用を無視できることが考えられる。図5にグリシルプロリルアラニンの各窒素核の局所磁場パターンを示す。このスペクトルではペプチド窒素でもプロリンの場合のようにプロトンと結合をもたない場合は、N-H双極子相互作用が存在しないので、局所磁場パターンにはサイドバンドが現われていない。このように窒素核のN-H双極子パターンは窒素核の環境を敏感に反映することが判明した。講演ではサイドバンドパターンの詳しい解析についても議論する。

(文献)

- 1) Y. Sugawara et al., J. Am. Chem. Soc., 113, 5440 (1991).
- 2) R. G. Griffin et al., J. Chem. Phys., 92 6347 (1990).
- 3) S. J. Opella et al., J. Am. Chem. Soc., 104, 1761 (1982).

(京大化研) ○高江洲昇・高田晃彦・堀井文敬

福田 猛・宮本武明

 ^{13}C and ^2H NMR Studies of Cellobiose Octa(decanoate) in the Liquid Crystalline States

Noboru Takaesu, Akihiko Takada, Fumitaka Horii, Takeshi Fukuda, and Takeaki Miyamoto.

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611

The molecular motion and conformation of cellobiose octa(decanoate) (CODA), which forms discotic columnar liquid crystals at 72.3–95.8°C, have been studied by solid-state ^{13}C and ^2H NMR spectroscopies. ^{13}C NMR spectra indicate that side chains of CODA have almost the same conformation in the liquid crystalline state as in solution, whereas their conformation becomes rich in trans in the crystalline state. It has also been found that the molecular motion of the side chain is highly enhanced not only in the liquid crystalline state but in the crystalline state above room temperature.

1. はじめに ある種のディスク状分子は、カラムナー液晶を形成することが知られている。我々は、セロビオースをコアとし、メチレン連鎖を側鎖とするディスク状分子を合成し、そのカラムナー液晶状態及び結晶状態の構造と分子運動について、 ^{13}C 及び ^2H NMRにより検討した結果を報告する。

2. 実験 cellobiose octa(decanoate) [CODA] (図1(a))は、ピリジン存在下でセロビオースと decanoyl chloride を反応させることにより作製した¹⁾。

また、CODAの還元末端1位のみをOH基に戻し、このOH基と、Heyningenらの方法²⁾により調製した decanoic acid- $2-d_2$ とを反応させることにより、部分重水素化CODA [CODA- d_2] (図1(b))を合成した。

^{13}C NMR測定はJEOL JNM-GSX200分光計を用い、 $\pi/4$ パルス法または、CP/MAS法により行った。また、 ^{13}C スピン-格子緩和

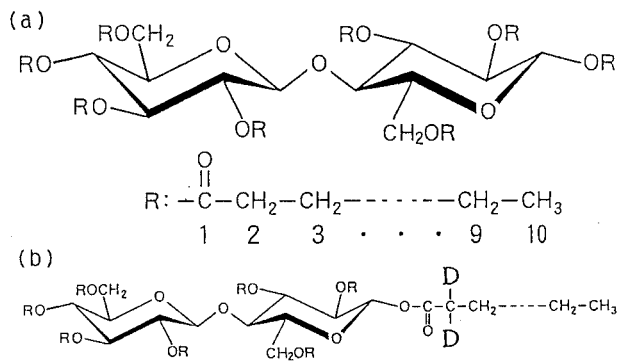


Fig.1 (a) cellobiose octa(decanoate) (CODA). (b) selectively deuterated cellobiose octa(decanoate) (CODA- d_2).

KW: CP/MAS, ^{13}C NMR, ^2H NMR, liquid crystals, 分子運動

たかえす のぼる、 たかだ あきひこ、 ほりい ふみたか、
ふくだ たけし、 みやもと たけあき

時間 $T_{1\rho}$ は CP T1 パルス系列³⁾ により測定した。 ^{13}C 90° パルス幅は $3.8\mu\text{s}$ 、MAS の回転数は約 3.0kHz である。 ^2H NMR 測定は、JEOL JNM-GX400 分光計を用い、四極子エコーパルスにより行った。 ^2H 90° パルス幅は $3.0\mu\text{s}$ である。

3. 結果と考察 図2にCODAのDSC測定の結果を示す。等方相から 0°C まで急冷 ($10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) した試料と徐冷 ($0.4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) した試料とでは、融点に若干の違いが認められるが、昇温の際の結晶-液晶転移は $72\sim 74^\circ\text{C}$ 、液晶-等方相転移は 95.8°C で起こることが分かる。

多くの液晶が磁場配向することはよく知られている。CODAの磁場配向性を調べるため、CODA- d_2 を液晶状態 (81°C) で 9.4T の静磁場中に静置し、 ^2H NMR スペクトルの時間変化を追跡した。しかし、約60時間スペクトルの形状が変化しないことから、この程度の静磁場下ではCODAは磁場配向しないと考えられる。

図3に、CODAの種々の状態における ^{13}C NMR スペクトルを示す。溶液状態における共鳴線の帰属は、 ^{13}C - ^1H 化学シフト相関及び ^1H COSY 2次元NMR法により行った。液晶状態では、セロビオースに基づくコアの共鳴線がほとんど認められない。このことは、プロトンの dipolar decoupling (DD) の振幅に対応する

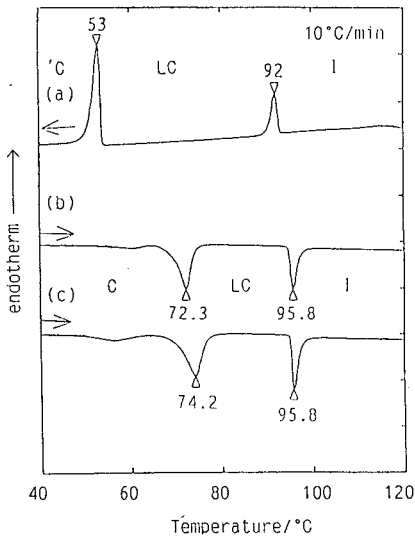


Fig.2 DSC curves of CODA; (a) cooled. (b) heated for quickly cooled CODA. (c) heated for slowly cooled CODA.

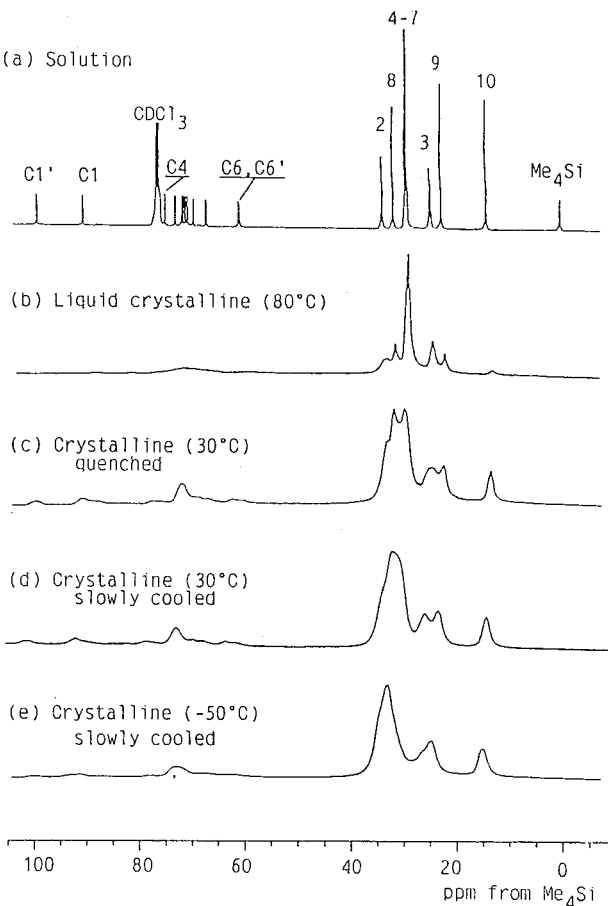


Fig.3 ^{13}C NMR spectra of CODA in different states. (a) by $\pi/4$ single pulse; (b)-(e) CP/MAS.

周波数すなわち数十kHzの分子運動のために、DDが有効に行われなことに起因すると考えられる。また、液晶状態においては、側鎖の共鳴線は溶液状態のそれらに比べてかなりブロードになるが、化学シフトはほとんど変化しない。このことから、液晶状態では側鎖は溶液状態と同様なコンホメーションをもつと考えられる。一方、液晶状態から急冷することにより作製した結晶（図2(C)）及び徐冷することにより作製した結晶（図2(D)）では、いずれも側鎖の中央部分のメチレン炭素の共鳴線は低磁場側にシフトするが、その程度は徐冷試料の場合の方が著しい。結晶状態では側鎖の中央部分のコンホメーションは、溶液状態に比べてトランスリッチになるが、徐冷した場合はその分率がより高いと考えられる。また、 -50°C においては側鎖の共鳴線はさらに低磁場シフトすることから、側鎖はよりトランスリッチなコンホメーションをもつと考えられる。

図4には、側鎖の末端 CH_3 炭素、それに隣接する CH_2 炭素9、及び CH_2 炭素3の NT_{1c} を絶対温度の逆数 T^{-1} に対してプロットした。ここで、 N は問題とする ^{13}C 核に化学結合した ^1H 数である。結晶状態における CH_2 炭素3の場合以外は、 T_{1c} 緩和曲線は指数減衰となり、単一の T_{1c} を得ることができた。結晶状態における CH_2 炭素3については、減衰曲線の初期勾配から平均の T_{1c} を決定した。図4中の破線は、DSC測定により決定された融点を示す。この温度を境界として、 T_{1c} の温度依存性が大きく変化することから、結晶-液晶転移が T_{1c} にも反映されることが分かる。この図から明らかのように、結晶状態のメチレン炭素3は T_{1c} の極小近傍、それ以外の炭素については T_{1c} の極小より高温側が観測されていると考えられる。従って、CODAの側鎖は、液晶状態だけではなく、結晶状態においても室温以上では、非常に活発な分子運動を行っていると思定される。

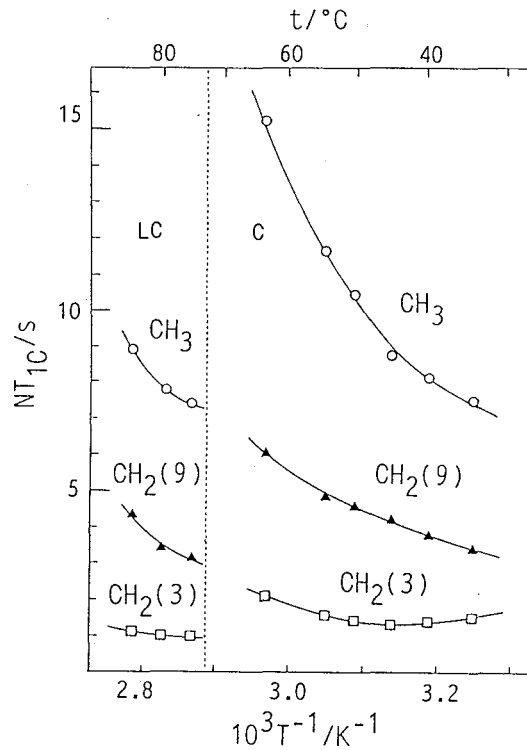


Fig.4 NT_{1c} of side chain carbons of CODA vs. T^{-1} .

図5には、種々の温度におけるCODA-d₂の²H NMR スペクトルを示す。急冷試料と徐冷試料の²H NMR スペクトルの形状には、著しい変化は認められなかった。液晶状態の共鳴線は、かなりシャープであるが、なお完全には narrowing していない。液晶状態では、非常に活発な分子運動が行われているが、なおその分子運動には異方性が存在すると予想される。一方、-90℃における共鳴線は、Pake pattern とほぼ一致することから、-90℃においては、側鎖の付け根のCH₂炭素は、剛直な状態にあることがわかる。温度が上昇するに従い、共鳴線の中央部分が徐々に盛り上がっていき、室温では中央部分が著しく盛り上がった特徴的な形状となっている。液晶状態において²HのT₁測定を行ったところ、減衰曲線は指数減衰となった。結晶状態においてはT₁の異なる2成分が存在した。しかし、これら2成分の²Hスペクトルの形状に著しい差異が無いことから、これらの2成分はいずれも側鎖の付け根付近でかなり活発な分子運動を行っている成分と考えられる。液晶状態及び結晶状態の²H NMRスペクトルの形状を説明するため、現在適当な分子運動モデルを用いたコンピュータシミュレーションを行っている。

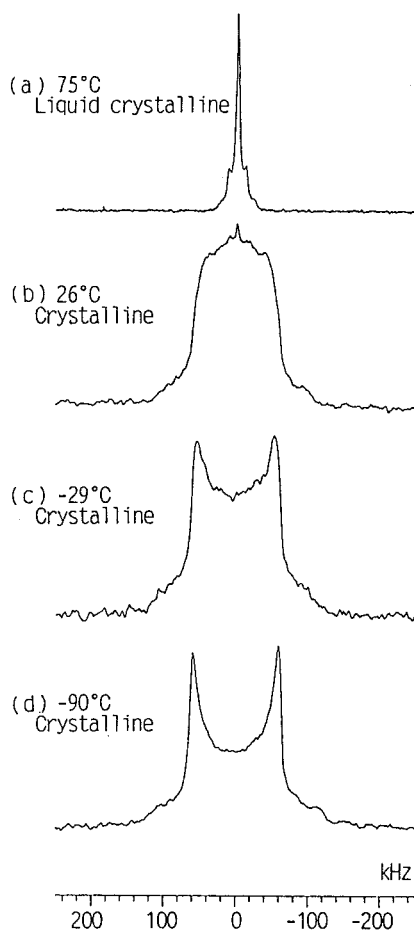


Fig.5 ²H NMR spectra of CODA-d₂.
(b)-(d) slowly cooled sample.

References

- 1) A. Takada et al., Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., **69**, 1(1991).
- 2) W.E. Heyningen et al., J. Biol. Chem., **125**, 495(1938).
- 3) D.A. Torchia, J. Magn. Reson., **44**, 117(1981).

Evaluation of Crystal Defects by 2-dimensional Nutation NMR

Univ. of Tsukuba H. Nakamura, T. Erata, and A. Tasaki

Nutation NMR is a good method for the study of quadrupolar nuclei with half-integer spin $I > 1/2$. We use this for the evaluation of defects in cubic symmetrical crystal. At ideally cubic symmetrical field, there is no electric field gradient and nuclei feels no quadrupolar interaction. Other nuclei, however, feels quadrupole interactions whose strength is widely distributed. In theory, the FID can be calculated analytically for a value of ωQ . We are doing the simulation of summing up the FID's for a various value of ωQ and compare to experimental results.

1) はじめに

我々は、2次元 Nutation NMR を用いて結晶欠陥を評価する方法について研究を行っている。

スピン I が $1/2$ より大きい原子核は電気四重極モーメントをもつ。電場勾配がない状態では、静磁場中で等間隔な $(2I + 1)$ 個のエネルギー単位が生じており、NMR 共鳴線は 1 本である。ところが電場勾配があると、電気四重極モーメントとの 1 次の相互作用により $(2I + 1)$ 個の単位は相互作用エネルギーの分だけずれて等間隔ではなくなる。そのため、NMR 共鳴線は $(2I + 1)$ 本に分裂する。

keywords : Nutation NMR, quadrupole interaction

なかむら ひろあき、えらた ともき、たざき あきら

ここで、 $I = 3/2$ の核を含む立方対称な結晶について考えてみる。結晶が理想的な部分（以下、完全結晶部と呼ぶ）では立方対称になっているため電場勾配は生じず、共鳴線は1本である。ところが、なんらかの原因によって結晶の立方対称性がくずれている部分（以下、不完全結晶部と呼ぶ）では、電場勾配が生じており、共鳴線は3本に分裂する。各々の不完全結晶部に生じる電場勾配の大きさはランダムに分布するので、共鳴線もランダムな間隔を持つ。ただし、 $m = 1/2$ と $m = -1/2$ の2つのエネルギー準位の間隔は、電場勾配がないときと同じなので、中心遷位の共鳴線（3本の真ん中の線）は完全結晶部の共鳴線と同じ周波数に現れる。ところで、実際に観測される共鳴線は結晶の各々の部分からの信号の足し合わせである。このため、不完全結晶部からの信号のうち中心線以外の吸収線はノイズになってしまい、観測できるのは完全結晶部の全ての遷位の信号と不完全結晶部の中心遷位の信号の和の1本だけである。

2次元 Nutation NMR は、電気四重極相互作用の強度が異なる核スピンの場合はパルス幅に対する核スピンのフリップ角が違ふことを利用したものである。具体的には、1パルスの実験をパルス幅を次々と変えて繰り返し行い、得られた共鳴線の強度をパルス幅でフーリエ変換する。この結果得られたスペクトルを Nutation Pattern という。これを理論から求めた Nutation Pattern と比較することにより、電気四重極相互作用の大きさ ω_Q とラジオ波磁場の大きさ ω_{rf} の比を見積もることができる。

2) 理論

Nutation NMR のパルスシーケンスは Fig. 1 のような単純な1パルスである。そしてパルス幅 t_1 をパラメータ的に変えて実験を繰り返し行う。Nutation NMR ではスピン $I = 3/2$ の場合には FID を解析的に計算することができる(*)。

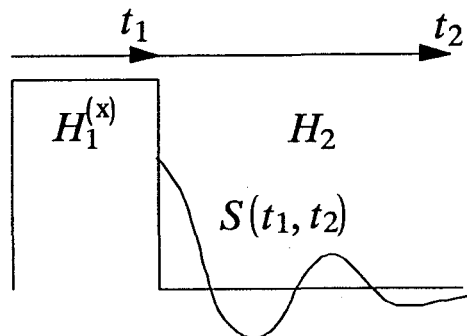


Fig. 1. The pulse sequence of Nutation NMR.

計算の結果、パルスの終端での FID の強度は

$$S^{2-3}(t_2=0, t_1) \propto (A_{2,3} \sin \omega_{2,3} t_1 + A_{1,4} \sin \omega_{1,4} t_1 + A_{1,2} \sin \omega_{1,2} t_1 + A_{3,4} \sin \omega_{3,4} t_1)$$

となる。これを t_1 でフーリエ変換すると Nutation Pattern になる。ここで $A_{2,3}$ 、 $\omega_{2,3}$ などはラジオ波磁場の強度 ω_{rf} と四重極相互作用の強度 ω_Q の比の関数になっている。その変化の様子を Fig. 2 に示す。

3) 解析

実験で得られた Nutation Pattern から ω_Q の分布を知るの簡単ではない。というのは、いろいろな ω_Q の値に対する Nutation Pattern の足し合わせになっているからである。そこで、まず ω_Q の分布を仮定し、対応する Nutation Pattern を計算するという方法をとることになる。今回は C_Q が単一の値を持つパウダーを想定してシミュレーションを行った。 ω_Q は C_Q と異方性定数 η 、電場勾配テンソルの主軸と外部静磁場との角度 θ 、 ϕ を用いて以下のような式で表される。

$$\omega_Q = C_Q (3 \cos^2 \theta - 1 + \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi) \quad C_Q = \frac{e^2 q Q}{8I(2I-1)}$$

(*) P. P. Man, Journal of Magnetic Resonance 67, 78-90(1988)

P. P. Man, Journal of Magnetic Resonance 77, 148-154(1988)

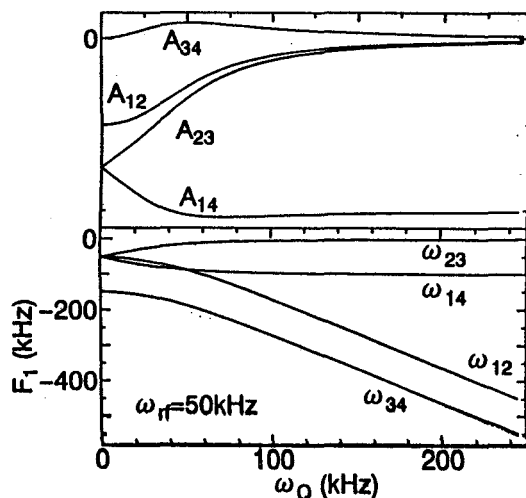


Fig. 2. Dependencies of A_{ij} and ω_{ij} on ω_Q .

CQ=1としたときのパウダーの ωQ の値の大きさに対する核スピン数の分布を Fig. 3 に示す。 η が 0.0 から 1.0 に増加するにつれて ωQ の分布はなだらかになっている。この分布をもとに、パウダーパターンを計算した。それぞれの ωQ に対応する FID を足し合わせるとネットの FID になる。これをフーリエ変換すると Nutation Pattern が得られる。 $\omega Q=100\text{kHz}$ で η を 0.0, 1.0 と変えたものを Fig. 4 に示す。なお、この図には完全結晶部 ($\omega Q=0$) の信号は含まれていない。

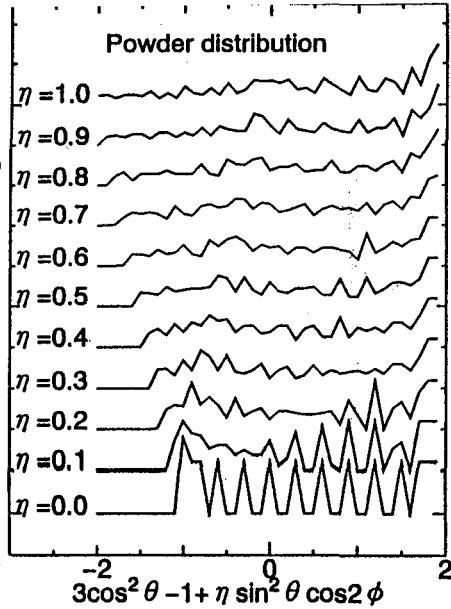


Fig. 3. Simulated distribution of ωQ of powder sample.

$\eta=0.0$ のほうを見ると、 ω_{rf} が増すに従い、 $F1=2\omega_{rf}$ のピークが2つに分裂する。これは Gas 中の ^{71}Ga 原子核の Nutation Pattern にも見られる特徴である。

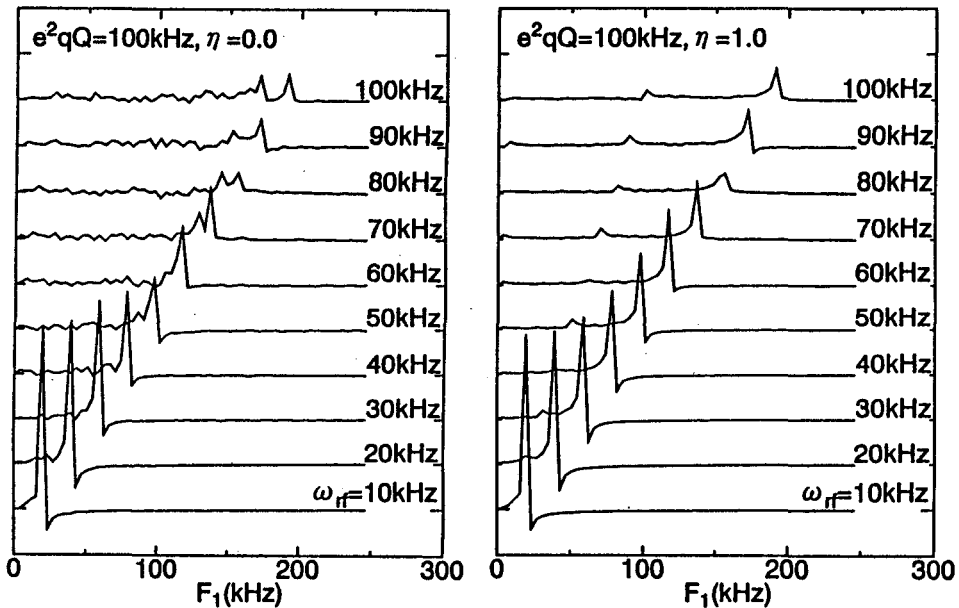


Fig. 4. Simulated powder nutation pattern for single e^2qQ value.

The analysis of the ionic motion in the super-ionic conductor by Multiple Quantum Filtered NMR

Univ. of Tsukuba H. Yamada, H. Nakamura, T. Erata, A. Tasaki

In recent studies MQF (Multiple Quantum Filtered) pulse sequence is effective to distinguish the central and satellite transitions. DQF (Double Quantum Filtered) NMR was applied to ^{23}Na in V2O5 which is super ionic conductor. In the presence of the fluctuation of electric field gradient a quadrupole nuclei such as ^{23}Na decays at least with two component. The experimental spectra was fitted by two Lorentzians which has different line width. The excellent agreements between observed and simulated spectra shows a correlation time of 1.4nsec at 200K and a quadrupolar coupling constant of 11.26MHz. The Redfield matrices and ordinal spectral density function was taken to the simulation as a simple assumption.

最近多用途に応用されるMQF (Multiple Quantum Filtered) NMRを超イオン導体であるナトリウムバナジウムブロンズ (Na-V2O5) 中のNaイオンの運動の解析に用いて実験を行った。バナジウムブロンズは、図に示すようにb軸方向に疑1次元性のトンネルを持ち、NaイオンLiイオンが、このトンネルの中を運動する事で固体電解質としての伝導性が説明される。この性質は、軽量、高効率な固体電池等に応用されており、我々は、Na原子核と電場勾配との相関時間、電場勾配の大きさ等をシミュレーションによって解析を試みた。

Na原子核は、スピンの3/2であるから、中心遷移(|1/2><-1/2|)とサテライト遷移(|±1/2><±3/2|)の遷移確率が異なり、2重指数関数的な減衰を示す事が知られている。通常の単パルス法によるスペクトルをFig.2に示す。線幅にあまり差の無い二つのコンポーネントによりフィッティングするのは、困難な事が明かである。それに対してFig.4は、位相が異なるコンポーネントの重ね合わせのため容易に、さらに正確にフィッティングが、可能である。

DQFスペクトルをシミュレートするにあたり、Redfield Matrics と通常用いられる以下のようなスペクトル密度を仮定して、密度行列を計算した。

$$J_n = 2\tau c / (1 + (n\omega_0\tau c)) \quad n=0,1,2$$

今回の実験では、Na0.8V2O5について、200Kから300Kで測定した。相関時間 τc は、低温になるにつれて大きくなっている事が、Table 1に記してある。これからの課題として、Na濃度が異なる試料、T1の測定についても検討したい。

References

- 1 G. Jaccard, S. Wimperis and G. Boudenhansen J. Chem. Phys. 85, 6282(1986)
- 2 N. Muller, G. Boudenhansen and R. R. Ernst J. Magn. Reson. 75, 297(1987)

多量子遷移NMR・超イオン導体・バナジウムブロンズ

やまだ ひとし、なかむら ひろあき、えらた ともき、たざき あきら

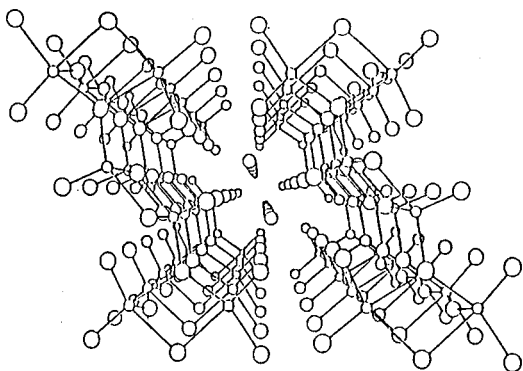


Fig. 1 The crystal structure of $\beta\text{-Na}_{0.3}\text{V}_2\text{O}_5$.

A perspective view of the tunnel structure constructed by V_2O_5 in which sodium ions lie.

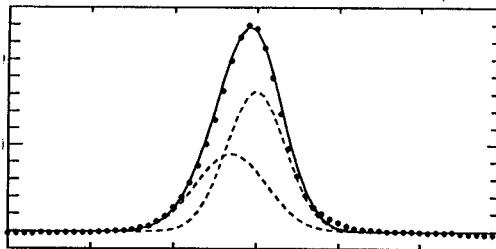


Fig. 2 Experimental and simulated spectral with conventional single pulse sequence. Dots in the fig.1 shows experimental NMR signal. The solid line is simulated spectral as the sum of two different Lorentzians (dotted lines). It is very hard to fit simulation line with conventional one pulse NMR signal .

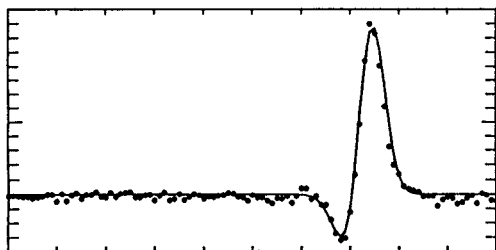


Fig.3 Experimental and simulated spectral with DQF pulse sequence. The sodium in the V_2O_5 should have at least two component as it decay. One can easily simulate with two Lorentzians because each has opposite phase. There is some offset between the center of two Lorentzians. The solid line is simulated to DQF signal (dots).

	R 1 [kHz]	R 2 [kHz]	J 0 [nsec]	J 1 [nsec]	J 2 [nsec]	$\omega_0 \tau_c$	τ_c [nsec]	eqQ [MHz]
200K	14.0	7.0	2.8	1.5	0.6	0.918	1.38	11.26
250K	8.0	5.0	1.8	1.3	0.7	0.589	0.89	10.25
280K	8.0	7.0	1.0	0.9	0.7	0.340	0.51	12.93

Table 1 Simulated results . R1 and R2 are transition rate of satellite and central transition. J0,J1,and J3 are the spectral density defined by equations above. $\omega_0 \tau_c$ indicates extreme narrowing limits. τ_c is the correlation time between the fluctuation of electric field gradient and the motion of mobile ions. The eqQ is the electric field gradient constant.

P 39 固体NMRの計算機実験プログラムの開発

京大理、Univ. of British Columbia* ○芦田淳、石井佳誉、中井利仁*
寺尾武彦

A Simulation Program for Solid-State NMR Experiments

Jun Ashida, Yositaka Ishii, Toshihito Nakai*, and Takehiko Terao

Faculty of Science, Kyoto University

Faculty of Science, University of British Columbia*

A program for simulating a variety of solid-state NMR experiments was made. The program performs exact integrations of the equation of motion for the time development operator, and simulates spectra and spin dynamics in one- or two-dimensional NMR for hetero- or homo-nuclear multi-spin systems subjected to any pulse sequences with or without sample-spinning.

固体NMRのスペクトルの計算は、双極子相互作用や化学シフト異方性などの存在、試料回転によるハミルトニアン[†]の時間依存などにより液体の場合よりも複雑である。計算が厳密に行える場合は少なく、通常、摂動理論、断熱近似、平均ハミルトニアン理論、フローケ理論等を用いた近似計算が行なわれる。しかし、近似理論は当然適用できる範囲が限られており、しかも実際には近似理論では不十分な場合も多い。

そこで、我々は小さく分割した時間ごとにハミルトニアン $H(t)$ を対角化してプロバゲーター $U(t)$ を求め、それを用いて計算したFIDをフーリエ変換することにより、様々なパルス（有限パルス幅効果を含む）の系列のもとでの、1次元あるいは2次元NMR / 同種核あるいは異種核スピン系 / 静止（粉末or単結晶）試料あるいは回転試料のスペクトルおよび磁化の振る舞いを近似理論を用いずに計算するプログラムを開発した。なお、使用言語はFORTRANであり、実際の計算はNEC系のパソコンに搭載したトランスピューターボード（コンカレントシステムズ社）を用いて行なった。

固体NMR、シミュレーションプログラム

あしだじゅん、いしいよしたか、なかいとしひと、てらおたけひこ

< 計算法の概要 >

ここでは例として、回転試料に対する計算の概略を述べる。

ハミルトニアンは

$$H(t) = H_Z + H_{CS} + H_D + H_J + H_{rf}$$

密度行列 $\rho(t)$ の運動方程式は、

$$i \frac{d}{dt} \rho(t) = [H(t), \rho(t)]$$

この式を $\rho(t)$ に関して解くと、

$$\rho(t) = U(t) \rho(0) U(t)^{-1}$$

ここでプロパゲーター $U(t)$ は、

$$U(t) = T \left[\exp \left\{ -i \int_0^t dt' H(t') \right\} \right]$$

T : Dyson の time ordering operator.

また、rotor の 1 周期を t_R とおくとハミルトニアンは

$$H(n t_R + \Delta t) = H(\Delta t)$$

となるので、プロパゲーターは

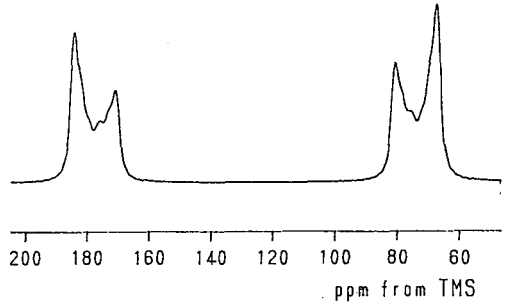
$$U(n t_R) = U(t_R)^n$$

となり、FID を t_R ごとに計算すると計算時間が短縮される。

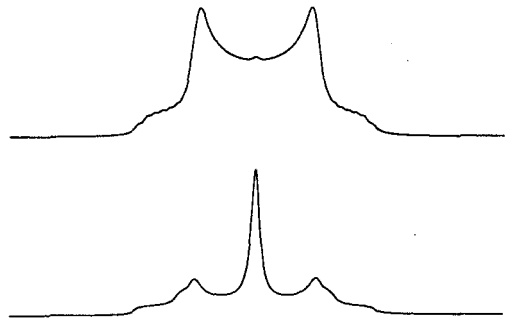
最終的に得られる FID は

$$S_+(t) = \text{tr} \{ \rho(t) S_+ \}$$

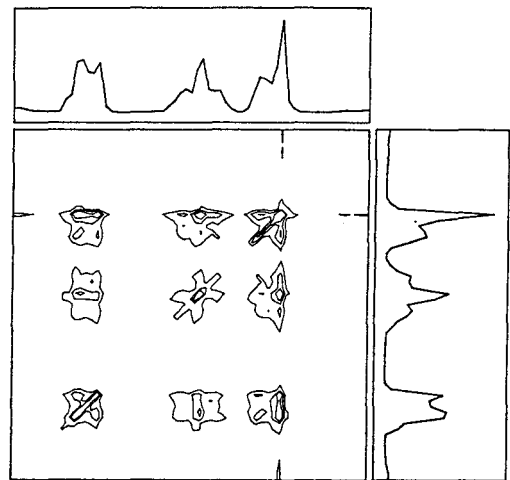
で現われ、これをフーリエ変換することにより計算スペクトルが得られる。



Rotational Resonance 条件 ($n \omega_R = \omega_1 - \omega_2$) を満たす場合に得られる ^{13}C -CPMAS スペクトル



異種核 2 スピン系での CPMG パルスのもとで得られるスペクトル (上) パルスエラーなし (下) パルスエラーあり



3 スピン系における粉末試料の 2 次元交換スペクトル

(阪大薬) ○ 藤原英明、高木達也、(日清製粉) 峯村 剛

Characterization of Zelatins from High-Resolution Solid-State NMR

Hideaki FUJIWARA and Tatsuya TAKAGI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University) AND Tsuyoshi MINEMURA (Nisshin Seifun Co., Ltd.)

^{13}C CP/MAS NMR spectra were measured for several sources of gelatins. T_1 data were also measured by the T1CP method proposed by Torchia. The alanine $C\beta$ signals supported the coexistence of the form I (β -sheet) and form II (triple helical) conformation. The ^{13}C T_1 data were discussed with regard to the physical properties of gelatins and to the arrangement in the polymer chain.

1. 序 ゼラチンは医薬品関係ではカプセルや各種製剤の基剤として汎用される他、食品や写真用として工業的に広く用いられている。これは、動物の皮や骨を原料として蛋白質を部分加水分解して得られる。このようなゼラチンの特性を、固体高分解能 NMR により評価することを目的として、種々のゼラチン原料について ^{13}C シフトと緩和時間の測定を行った。

2. 実験 固体高分解能 ^{13}C NMR の測定は、Varian VXR200 (^{13}C : 50.3 MHz) により室温にて行った。試料はゼラチン原料を細かく粉碎してローターに充填した。典型的な測定条件は、通常の化学シフト測定では、スペクトル幅 = 20 kHz、データ点数 = 2 k点、フーリエ変換点数 = 8 k点、スピニング速度 = 3 kHz、CP の接触時間 = 1 ms、パルス遅延時間 = 4 s、積算回数 = 400回 である。化学シフトの基準には、

キーワード：固体高分解能 NMR、緩和時間、ゼラチン、コンホメーション、運動性

ふじわら ひであき、 たかぎ たつや、 みねむら つよし

ヘキサメチルベンゼンのメチル基を 17.3 ppm とした。緩和時間測定は Torchia の方法に従い (パルス系列 t1cp を利用)、90° パルス = 6 μ s、パルス遅延時間 = 30 s、積算回数 = 400回 にて行った。

3. 結果と考察 今回はゼラチン原料として、ゼリー強度の異なる5つのタイプ (A~Eとする) を選び、化学シフトと T_1 測定を行った (表1と2)。ゼラチンを構成するアミノ酸の標準的組成はグリシン (Gly) 21%、プロリン (Pro) 13%、4-ヒドロキシプロリン (Hyp) 11%、グルタミン酸 (Glu) 10%、アラニン (Ala) 8%、等である。CP/MAS スペクトルの一例と、その帰属を図1に示す。帰属にはコラーゲンの報告¹⁾を参考とした。ゼラチンA~Eの全てについて、一番高磁場側の2本のピークは、強度が同程度であり、両者とも似た値の短い T_1 値を有し、Ala のメチル基に帰属された。L-Ala-Gly-Gly ポリマーのCP/MAS スペクトル¹⁾との比較から、低磁場側が Form I (β -sheet)、高磁場側が Form II (triple helix) と見なされる。

図2に T_1 測定の例を示した。 T_1 データ (表2) は、基本的には、コラーゲンの測定例²⁾と共通点が多い。ポリアミド結合の骨格にある Gly-C α の T_1 が 4~5 s であり、ゼリー強度の減少と共に、若干短くなる傾向が見られた。

Hyp-C γ の T_1 が同じ C β 炭素である Pro-C α や Ala-C α の T_1 よりも短いこと、および、Pro-C β や Pro-C γ の T_1 がおなじ C β 炭素である Gly-C α よりも短いことは、ポリアミド結合の骨格中心から離れた炭素では運動性が高いことを支持する。メチル基の T_1 は最も短い、これも内部回転の効果である。 T_1 データの大まかな傾向としては、Gly-C α を基準とし、それに対する比をとると、Pro-C β では 0.3~0.5、Pro-C γ では 0.3~0.4、Ala-C β では 0.1~0.2 であり、試料のAからEまで大体一定となっている。Hyp-C γ では、この比は 0.2~1.1 と範囲が広いが、その理由は現在の所、定かではない。

文献

1) H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, and T. Miyata, Biopolymers, 23, 2279 (1984).

2) 齊藤、横井、第27回NMR討論会、要旨集 p.107 (1988).

表1. 各種ゼラチンの¹³C化学シフト(ppm)

種類	A	B	C	D	E
C=O	173.3	173.8	173.5	173.9	174.0
Hyp-C γ	71.0	70.9	70.9	71.0	71.1
Pro-C α } Hyp-C α, δ }	59.5	59.8	59.6	59.6	60.3
Glu-C α	53.6	53.0	53.3	53.1	53.1
Ala-C α } Pro-C δ }	49.3	48.2	48.5	48.5	49.2
Gly-C α	43.1	42.8	43.0	43.0	43.4
Pro-C β	29.8	29.6	29.3	29.2	30.3
Pro-C γ	25.6	25.5	25.9	25.3	25.9
Ala-C β } {	20.9 18.0	21.3 19.8	20.5	20.9 17.6	21.4 18.6

表2. 各種ゼラチンの¹³C緩和時間(s)

種類	A	B	C	D	E
ゼリー強度(Bloom)	268	240	199	172	117
Hyp-C γ (71.0ppm)	2.6 \pm 1.4	1.0 \pm 0.6	4.6 \pm 2.4	3.1 \pm 1.7	2.0 \pm 0.9
Pro-C α (59.5ppm)	6.5 \pm 3.5	4.5 \pm 2.3	9.7 \pm 3.1	6.3 \pm 3.1	5.0 \pm 1.2
Gly-C α (43.1ppm)	5.0 \pm 2.3	4.5 \pm 1.2	4.3 \pm 0.5	4.9 \pm 1.3	4.0 \pm 1.3
Pro-C β (29.8ppm)	2.5 \pm 0.6	1.2 \pm 0.3	2.4 \pm 0.2	1.8 \pm 0.4	1.7 \pm 0.2
Pro-C γ (25.6ppm)	1.7 \pm 0.4	1.2 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	1.4 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2
Ala-C β (20.9ppm)	0.8 \pm 0.4	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2
(17.9ppm)	1.0 \pm 0.3	0.5 \pm 0.1	0.8 \pm 0.3		

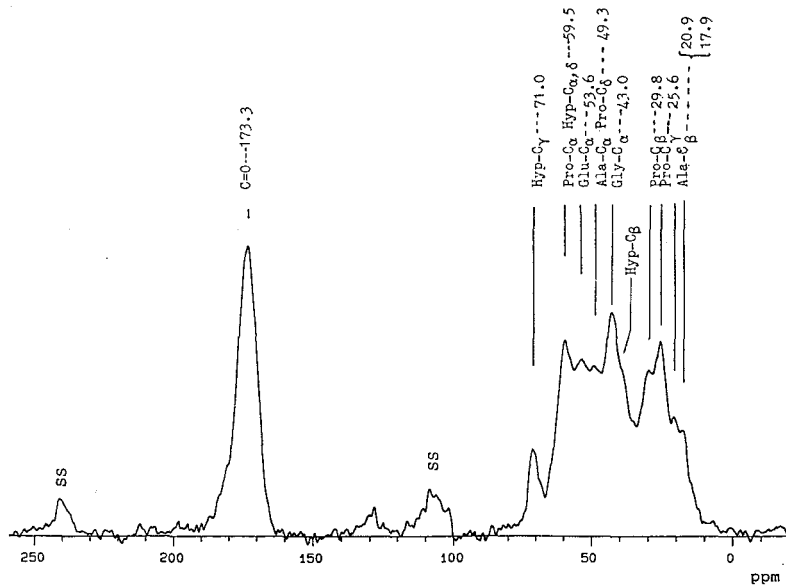


図1. ゼラチンEの¹³C CP/MASスペクトルとその帰属

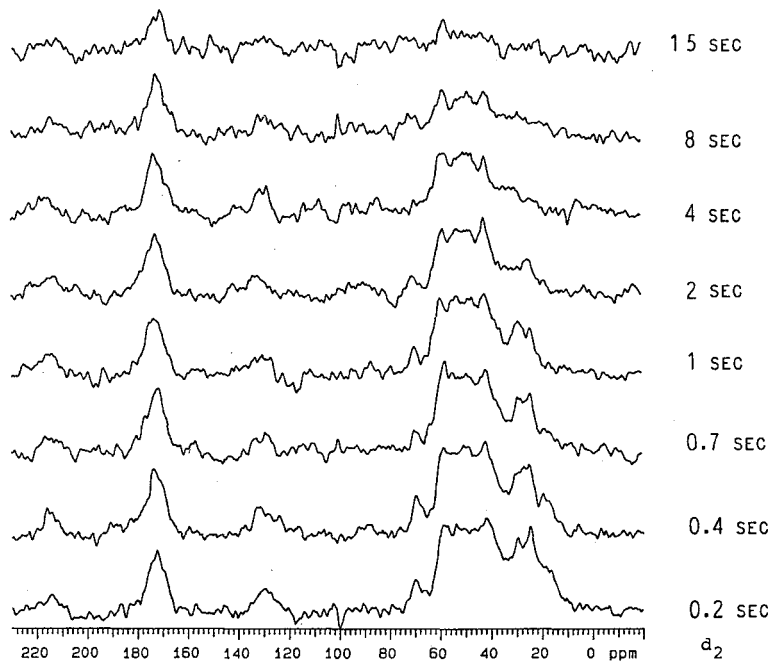


図2. ゼラチンBの緩和時間の測定 (tlcp法による)

北大工 北澤 聡、平沖敏文、堤 耀廣

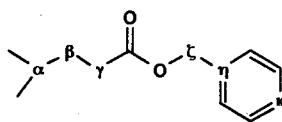
 ^2H Quadrupole Echo NMR Studies of Poly(γ -benzyl L-glutamate)So Kitazawa, Toshifumi Hiraoki, and Akihiro Tsutsumi
Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo.

Deuterium quadrupole echo spectroscopy is used to investigate the side chain dynamics of poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG) over a wide temperature range. Temperature-dependent line-shapes, their intensities, and T_1 s were employed to characterize molecular motions of the side chain terminal. The line shapes could be simulated quantitatively with the jump model. The phenyl ring at the side chain terminal undergoes small-amplitude librational motions as well as the rapid flip-flop motion about the ring axis at below room temperature. Large amplitude motions over the side chain contribute to line shapes and T_1 s at above 50°C.

固体状態におけるpoly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG)側鎖末端のフェニル環は C_ζ - C_η 軸のまわりに高速でフリップ・フロップ運動していることが重水素NMRより明らかになっている。¹⁾この運動にくわえてフェニル環の C_ζ - C_η 軸自身の運動も示唆されている。ベンジル基のパラ位はフリップ運動の影響を受けないので、パラ位の重水素NMRスペクトルには C_ζ - C_η 軸自身の運動が反映する。又、ベンジルメチレン基のスペクトルにもパラ位と同じ運動が生じると考えられる。本研究ではPBLG側鎖末端にあるベンジル基のパラ位とベンジルメチレン基をそれぞれ重水素化し、固体重水素NMRスペクトルの線形と T_1 を測定し、側鎖末端の分子運動を検討した。

用いた試料のpoly(γ -[κ - $^2\text{H}_1$]benzyl L-glutamate)(PBLG- $\kappa d1$)とpoly(γ -[ζ - $^2\text{H}_1$]benzyl L-glutamate)(PBLG- $\zeta d2$)はそれぞれベンジル基のパラ位とメチレン基を重水素化したベンジルアルコールを用いてpoly(γ -methyl L-glutamate)より調整した。固体重水素NMRスペクトルの測定はBruker MSL-200(30.7MHz)で行った。スペクトルは四重極エコー法により得た。

PBLG側鎖



固体重水素NMR、PBLG、側鎖、分子運動、libration、フリップ・フロップ運動

きたざわ そう、ひらおき としふみ、つつみ あきひろ

PBLG- κ d1とPBLG- ζ d2の重水素NMRスペクトルの温度依存性をFig.1に示す。 -65°C 以下では線形は静止状態のパウダーパターンに近く、 C_{ζ} - C_{η} 軸と C_{ζ} - ^2H 軸の運動はともに非常に遅く制限されていることを示している。しかし、スペクトルの σ_{11} 成分がなだらかで不明瞭であり、四重極分裂巾は静止状態より少し小さく、小振幅のlibrationの存在を示唆している。温度上昇に伴い、スペクトルの強度が減少するexchange broadeningが生じ、 50°C 付近でスペクトルの強度は最小になり、この温度領域で四重極相互作用の大きさと同程度の速さの運動が両試料に生じていることを示している。更に高温になると、線形が大きくなり変化し、低温の場合とは異なるsinglet-likeなスペクトルが出現する。これは高温になると大振幅の速い運動が寄与していることを示している。

Fig.2にPBLG- κ d1とPBLG- ζ d2の T_1 の温度依存性を示す。低温においてPBLG- κ d1の T_1 の値はともに数百msのオーダーであり、ベンジル基の C_{ζ} - C_{η} 軸自身もかなり速く運動していることを示している。温度上昇とともに T_1 値は減少し、室温付近から著しく減少し始め、 110°C 付近で最小になる。同様の T_1 の振舞いがPBLG- ζ d2でも観測された。

以上の線形と T_1 の結果はPBLG- κ d1とPBLG- ζ d2には同じ運動が反映していることを示している。低温では小振幅の速いlibrationが寄与している。室温付近より大振幅のMHzオーダーの運動が生じる。 γ 位を重水素化したPBLGの線形の変化はPBLG- κ d1とPBLG- ζ d2とほぼ似ており²⁾、これは側鎖全体にわたって同じ運動が線形に寄与していることを示している。このことはPBLG側鎖のガラス様転移が室温付近にあることに対応している。³⁾この場合、側鎖全体にわたり、多重のC-C結合まわりの回転運動が生じるので、側鎖末端は大振幅の運動が生じることになる。 T_1 の最小値から求めた運動の相関時間は 110°C で5nsである。

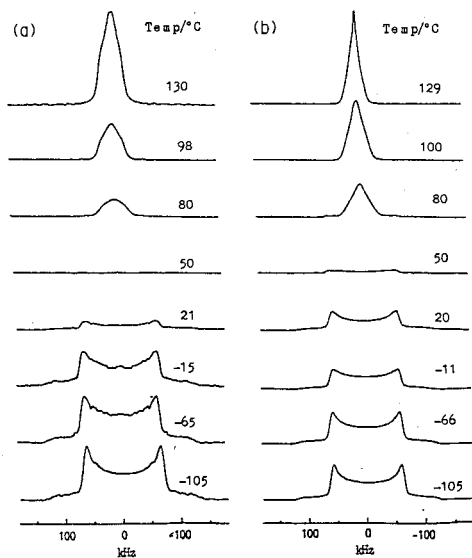


Fig.1 Temperature dependence of ^2H -NMR spectra for PBLG- κ d1(a) and PBLG- ζ d2(b).

1) K. Matsuo, et al, *Rept. Prog. Polym. Phys. Jpn.* 32, 495(1989). 2) T. Hiraoki, et al, 第28回NMR討論会(東京), 9(1989). 3) A. Tsutsumi, et al, *J. Macromol. Sci.-Phys. B8*, 413(1973).

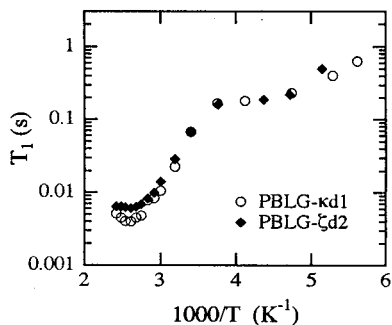


Fig.2 Temperature dependent T_1 .

(味の素(株)中研) ○海老沢計慶、鈴木榮一郎

Isotope Effect on CPMAS-¹³C-NMR Spectra of Amino Acids and Peptides

Kazuyoshi Ebisawa and Ei-ichiro Suzuki

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

Isotope effect on ¹³C-CPMAS-NMR Spectra of aspartame and L-phenylalanine has been studied. The peptide carbonyl carbon signal intensity of aspartame shows an extreme enhancement on substitution by recrystallization from deuterium oxide solution, which could be understood from the fact that there seems to be an optimum proton network condition for cross polarization enhancement in magic angle spinning. ¹⁵N substitution also gives higher intensity of this signal, which was explained in terms of the lack of ¹⁴N quadrupolar effect.

【はじめに】

固体高分解能 (CPMAS) NMR による生体分子の構造解析技術の発展は、Griffin¹⁾ および Schaefer²⁾ のグループが、回転共鳴 (rotational resonance) の手法を実用化するに及んで新しい局面を迎えた。だが、将来この方法を現在溶液で行なわれている様な、¹³C、¹⁵N 均一ラベル試料での多次元NMRへと展開するには、線幅と分解能が障碍となるであろう。即ち、Bryantら³⁾ が、リゾチームで "partial hydration" による線幅の改善を報告しているものの、一般に、固体試料中では、幾つものコンフォーマーが平均化されずに、一層の線幅の広がりを与える。

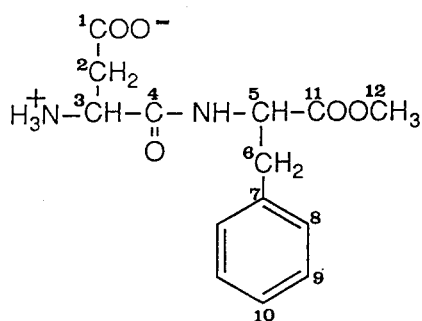
我々は、昨年の本討論会で、アスパルテーム (APM) のCPMAS-¹³C-NMRにおける同位体効果を報告した。⁴⁾ APMは、異なったコンフォーマーに基づく結晶多形を示すことが知られているが、純粋結晶形サンプルであれば、シグナルによっては、十分線幅が狭く、将来の固体状態におけるタンパク質構造研究のモデル系として適している。研究遂行上、線幅と強度および化学シフトに与える同位体効果を調べた目的は、そのシグナル帰属への応用であったが、重水素 (D) 化、重窒素 (¹⁵N) 化がいずれもペプチドカルボニル炭素シグナルの増強 (先鋭化) をもたらすことがわかり、CPMAS-NMR で得られるシグナル強度にも、実験上、未知の部分が残っていると考えられた。

そこで、今回は、主として、シグナル強度に影響を与える因子について、L-フェニルアラニン (Phe) を含め検討した結果を報告する。

フェニルアラニン、アスパルテーム、CPMAS、¹³C-NMR、同位体効果、同位体標識

えびさわ かずよし、すずき えいじろう

【方法】装置は、JEOL EX-400を使用した。まず、D化については、 N^1H 双極子の存否の影響を知る上で、実験的には最適接触時間が、各種の炭素ごとにどう違うかを調べ、次に、L-フェニルアラニンのモノマー（各種重水素化体、Phe, Phe- d_3 , Phe- d_5 等）のスペクトルではどうか、を調べた。また、 ^{15}N 化でも同様に、接触時間感受性の実験を行なった。



【結果と考察】

1) APM各炭素シグナルの接触時間感受性

本研究におけるAPM各炭素の番号付けを上に表示す。IA晶について、接触時間を5ミリ秒から1ミリ秒に変えて、メチル基 (C-12) 由来シグナルの強度を基準として、強度変化を調べた結果、分子内に3個あるカルボニル炭素、C-1, C-4, およびC-11の強度は、いずれも、13%から19%減少した。また、ベンゼン環炭素、C-7, C-8は殆ど変わらなかったが、C-9, C-10は、明らかな増加を示した。メチン炭素C-3も明らかな増加を示した。メチレン炭素については、明瞭な変化は、認められなかった。以上を総合して、ペプチドカルボニル炭素C-4だけが、他に比べ際だって接触時間に敏感という事実は見い出せなかった。

2) 各種重水素ラベル Phe の相互比較およびAPMの結果の解釈

上述したようなAPMのアミドNHの場合とは逆に、Pheのベンゼン環のCHのみすべてD化した場合 (Phe- d_5)、直接結合している炭素はもとより、周辺に対して、著しい強度減少効果を示した。これは、すべてのCHをD化した場合 (Phe- d_5) と實際上、同様な結果であり、我々の予期せぬ現象であった。考えられる可能性としては、交差分極効率は、試料中にプロトンがある程度連続的に分布しているときに良いのであって、それがベンゼン環程度の大きさのものD化によって寸断されると、著しく低下することである。このことと、アミドのD化による隣接カルボニルの強度増大とを併せ考えると、交差分極効率は、プロトンの最適密度下で最良になるという仮説が成り立つが、後者は、単純に密度と言うよりは、C-3H-(C=O)→NH→C-5Hルートのスピン拡散による損失をD化により抑制するためかも知れない。今後、更に検討すべきことと思われる。

3) ^{15}N 化の与える影響の解釈

APM アミド結合の ^{15}N 化による隣接カルボニルの先鋭化は、 ^{14}N の四極子効果の消失の影響が、 ^{15}N のカップリング効果よりも大きいことを意味している。

【文献】

- 1) J. Herzfeld, J. Lugtenburg, M.H. Levitt, R.G. Griffin, Science, 251(1991).
- 2) A.M. Christensen, J. Schaefer, K.J. Kramer, T.D. Morgan, T.L. Hopkins, J. Am. Chem. Soc., 113, 6799(1992).
- 3) S.D. Kennedy, R.G. Bryant, Biopolymers, 29, 1801(1990).
- 4) 第30回 NMR 討論会要旨集, P47, p269 (1991).

P 43 固体金属カルボニルクラスター $[\text{DCo}_6(\text{CO})_{15}]^-$ の ^2H NMR

○江口太郎・中山尋量・武田 定*・恵良田知樹**・B.T. Heaton***
(阪大教養・阪大理*・筑波大物理工学系**・リバプール大学***)

Solid State ^2H NMR of $[\text{DCo}_6(\text{CO})_{15}]^-$

Taro Eguchi, Hirokazu Nakayama, Chemistry Department, College of General Education, Osaka University,

Sadamu Takeda, Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University,

Tomoki Erata, Department of Applied Physics, University of Tsukuba,

B.T. Heaton, Department of Chemistry, University of Liverpool.

The direct location of hydrogen in transition-metal hydride clusters has been examined by neutron diffraction measurements. It has been shown that $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}]^+[\text{HCo}_6(\text{CO})_{15}]^-$ possesses the hydride inside an octahedral metal cavity. However, the proton chemical shift for the interstitial hydrogen atom in this salt has been reported to be +23.2 ppm in solution, which strongly suggests that the H atom does not locate at the centre of the Co_6 octahedron. Some motional process would induce the low-field shift. In order to shed light on this problem, we first obtained ^2H NMR spectra of the interstitial deuterium atoms of cobalt clusters, $\text{PPN}[\text{DCo}_6(\text{CO})_{15}]$ and $\text{K}[\text{DCo}_6(\text{CO})_{15}]$, in the solid state by using a MSL-400 spectrometer. A single peak with the linewidth of 0.45 kHz was observed at room temperature in the PPN salt. On the other hand, two overlapped signals were observed in the K salt. One peak shows the singlet with 11.2 kHz linewidth and another the doublet with the peak separation of 80 kHz, indicating the presence of two types of deuterium atom in the K salt.

はじめに 陰イオンクラスター $[\text{HCo}_6(\text{CO})_{15}]^-$ は、固体中では Figure 1 に示すように Co が八面体を形成し、その中央に水素原子が存在しているとされている¹⁾。PPN 塩の場合には、溶液にして ^1H NMR を測定すると、室温では信号が見えない。

$[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{DCo}_6(\text{CO})_{15}]$, $\text{K}[\text{DCo}_6(\text{CO})_{15}]$, ^2H NMR, 金属カルボニルクラスター

えぐち たろう・なかやま ひろかず・たけだ さだむ・えらた ともき・
ブライアントーマス ヒートン

しかし、冷却してゆくと -100°C 以下で 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。

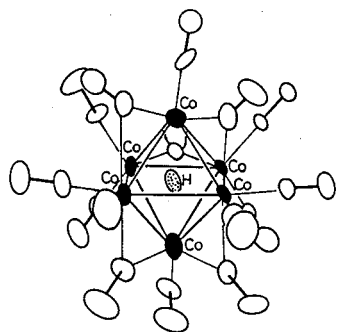


Figure 1 $[\text{HCo}_6(\text{CO})_{16}]^-$

したがって、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があるけれども、異常な電子状態による可能性も完全には否定できない。また、K 塩の場合には、中性子非弾性散乱実験^{/3/}によると、水素原子の約半数は八面体の中心に、残りはクラスター表面 (内部あるいは外部) 近傍に位置していることが示唆されている。

昨年の本討論会において、PPN 塩の固体高分解能 ^1H NMR (200 MHz ; CRAMPS) の結果 (-28 ppm の幅広い信号) を報告したけれども^{/4/}, その後 400 MHz で追試したところ、得られた信号は CRAMPS 実験に特有のサイドバンドであることが

判明した。ケミカルシフトの異方性などにより線幅が広がっている可能性があるもので、単一パルスによる測定を試みたが、バックグラウンドが大きく、ヒドリド信号は観測できなかった。

本研究では、重水素化合物を合成し、 ^2H NMR の温度変化などを測定して、これら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 および MSL-400 を使用し、 ^2H NMR 線形吸収を 30.722 と 61.424 MHz で $150\text{--}300\text{ K}$ の温度範囲で測定した。

結果と考察 Figure 2 に、室温における ^2H NMR スペクトルを示す。PPN 塩では、半値幅 0.45 kHz の単一ピークを示す。K 塩では、半値幅が 11 kHz の singlet のほかに、分裂幅が約 80 kHz の doublet が存在する。PPN 塩では、重水素原子は Co 八面体の中央にあるために^{/1/}, 核四極子結合定数 ($e^2\text{Qq}/h$) と非対称性定数 (η) が小さく、線幅の狭い信号になる。K 塩では、少なくとも 2 種類の非等価な重水素原子が存在す

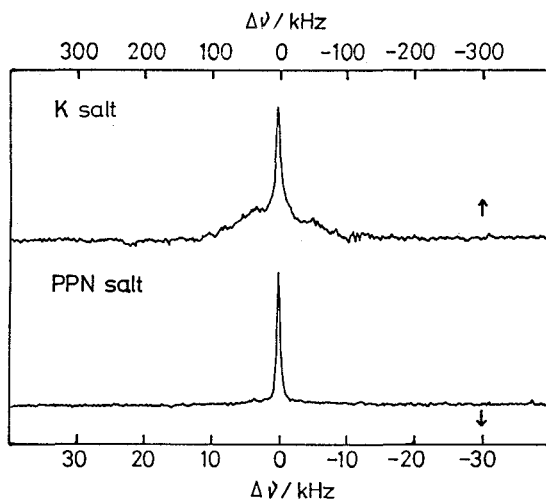


Figure 2 ^2H NMR spectra of $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{DCo}_6(\text{CO})_{16}]$ and $\text{K}[\text{DCo}_6(\text{CO})_{16}]$ at room temperature. ($\nu_0 = 61.424\text{ MHz}$)

る。線幅の狭い singlet 信号 ($< 10\text{kHz}$) は、 e^2Qq/h と η が小さいことを示唆し、Co 八面体のほぼ中央にある重水素原子によると考えられる。Doublet の信号では、

$$\Delta\nu = (3/4) e^2Qq/h$$

と近似すれば、 e^2Qq/h が 100kHz 程度ある。この値は、 D_2O の 215kHz や C_2H_6OD の 202kHz に匹敵する値である。したがって、この信号は、Co 八面体中央で

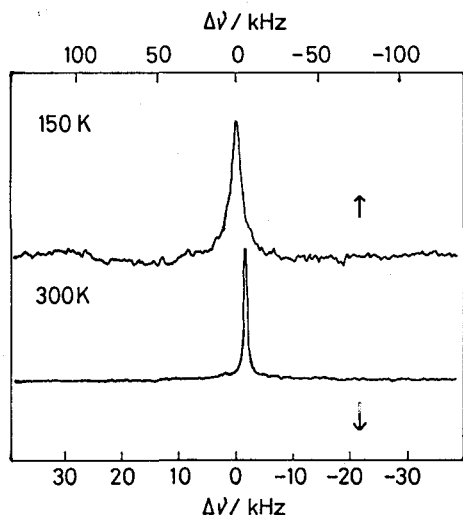


Figure 3 Temperature dependence of ^2H NMR spectra of $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{N}][\text{DCo}_6(\text{CO})_{16}]$ at the Larmor frequency of 61.424MHz .

はなく、クラスターの表面付近に存在する重水素原子に帰因したものと考えられる。信号の面積比から、この2種類の重水素原子の数の比は、ほぼ1:1である。中性子非弾性散乱^{3/}や赤外吸収スペクトル^{6/}の実験によると、Cs塩では1種類しか存在しない Co-H 伸縮振動 (1056cm^{-1})^{5/}が、K塩の場合は2種類存在する ($949, 1060\text{cm}^{-1}$)。今回の実験結果は、この事実とも一致する。K塩では、結晶学的に非等価な陰イオンクラスター、 $[\text{DCo}_6(\text{CO})_{16}]^-$ 、が存在する可能性も否定できない。しかしながら、非等価な2種類のクラスターの骨格の形が大きく異なっていなければ、 e^2Qq/h の違いを説明できないので、その可能性は低い。Figure 3に PPN 塩のスペクトルの温度変化を示す。150 K では半値幅が

10kHz と室温の約 20 倍ある。共鳴周波数が 30.722MHz でも 61.424MHz でも信号の線幅は、ほぼ同じで、磁場の大きさに比例しないので、ケミカルシフトの異方性によるものとは考えにくい。したがって、四重極相互作用が主として線幅を決めているのであろう。低温においては、重水素原子が Co 八面体の中央から少しずれて存在しているため e^2Qq/h が数 kHz あるが、室温においては、振動などの運動によって平均化されるために線幅が狭くなったものと考えられる。

まとめ 固体状態の K 塩では、Co 八面体中央にない重水素原子が存在する。この重水素原子では、 e^2Qq/h が 100kHz もあることから、八面体の表面上にある可能性が高い。また PPN 塩でも重水素原子は、完全な rigid な状態になく、八面体のなかで運動している。

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/ J. Eckert, A. Albinati and G. Longoni, *Inorg. Chem.*, **28**, 4055 (1989).
 - /4/ 中山, 江口, 武田, 中村, Heaton, 第30回NMR討論会講演要旨集, 263 (1991).
 - /5/ D. Graham, J. Howard, T.C. Waddington and J. Tomkinson, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **79**, 1713 (1983).
 - /6/ P.L. Stanghellini and G.J. Longoni, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 685. (1987).
-

P 44 固体重水素NMRによる12-モリブドリン酸ナトリウム結晶水の動的構造

阪大理 ○石丸 臣一・中村 亘男

Solid state ^2H NMR study of the dynamics of the hydrated water in $\text{Na}_3\text{PMoO}_{40}\cdot n\text{D}_2\text{O}$.

Shin'ichi Ishimaru and Nobuo Nakamura

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University

Solid state ^2H NMR spectra were measured in $\text{Na}_3\text{PMoO}_{40}\cdot 20\text{D}_2\text{O}$ and $\text{Na}_3\text{PMoO}_{40}\cdot 6\text{D}_2\text{O}$ crystals in order to clarify the dynamic nature of the hydrated water. In the low temperature region two components were observed in the spectrum of the 20-hydrated sample due to two different types of D_2O molecules, which are one is fixed probably at some particular site and another undergoes the fast 180° flip motion about the C_2 axis of the molecule. On the other hand, only one component was observed in the spectrum of the hexahydrated sample suggesting that the molecules take place the fast 180° flip motion even at low temperatures.

序) 標題の物質 $\text{Na}_3\text{PMoO}_{40}$ は、水やアルコールなどの極性分子をゲストとして結晶中に多量に取り込むことができる。このゲスト分子の取り込み方は、ゼオライトなどのように結晶中の空孔内に分子が吸収されるのではなく、結晶の格子自体が柔軟に変形して分子を取り込むという点で非常に興味深い物質である。この取り込まれたゲスト分子は、室温以上では、分子が自由に結晶内を動き回っている擬液相と呼ばれる状態にあることが知られている。¹⁾しかしながら、低温における物性の研究はまだほとんどなされていない。我々は以前にゲストとして水を取り込んだ、 $\text{Na}_3\text{PMoO}_{40}\cdot 29\text{H}_2\text{O}$ について、 ^1H と ^{23}Na の NMR の線形測定および T_1 測定の結果から、擬液相が 200K 以下の低温で凍結し、かなり運動の自由度の高い水と、結晶中に強く束縛されている水の 2 種類が存在することを報告した。^{2),3)}今回は、この低温での水分子の運動をより詳細に調べるために試料を重水置換し、D の NMR の線形の測定を行った。

実験) D 化物 $\text{Na}_3\text{PMoO}_{40}\cdot n\text{D}_2\text{O}$ は、 $\text{Na}_3\text{PMoO}_{40}\cdot 29\text{H}_2\text{O}$ を 99.9% 重水に溶解し、徐々に重水を蒸発させて再結晶させたものと、これを真空乾燥させたものの 2 種類を用いた。できた結晶は、重量分析の結果、それぞれ $n=20$ および、 $n=6$ と決定した。D 化率の計算値は 98% 以上である。NMR の測定は、Bruker 社製 MSL-200 システムを用い ^2H の共鳴周波数 30.7 MHz で行った。

結果および考察) 図 1、図 2 にそれぞれ 20 水和物、6 水和物の ^2H の NMR の線形の温度変化を示す。図 3 は水分子が運動しているときの ^2H の線形のシミュレーションの結果である。20 水和物は、室温では極度に先鋭化した 1 本のピークが観測され、結晶中の水は擬液相状態にあることが分かる。200K 以下の低温では、線形は中心に現れる細い成分と、その外側に広がっている広い成分とに分けられる。これは、結晶中に運動の様式が異なる 2 種類の水分子が存在することを表している。また、この 2 つの成分は、温度の変化と共にその割合が徐々に変化していく。線形をシミュレーションと比較してみると、180K 以下では、中

固体重水素 NMR、12-モリブドリン酸ナトリウム、水和水、分子運動
いしまる しんいち、なかむら のぶお

心の成分は水分子の C_2 軸周りの 180° flip を行っている水、外側の成分は rigid な水分子に帰属することができる。一方、6水和物については、室温でもかなり幅の広い線形が観測され、水分子は少なくとも等方的な運動をしていない、つまり、擬液相状態にないということを示している。低温では、200K 付近から 170K まで線形は変化しなかった。シミュレーションとの比較から、この温度範囲で 180° flip をしている 1 種類の水が存在することが分かった。

モリブドリン酸ナトリウムの結晶中では、水分子は Na^+ イオンの周りに配位した形をとっているものと考えられる。そうすると、6水和物では Na^+ イオン 1 個に対し 2 個の水分子が、20水和物ではほぼ 6 個の水分子が配位することになる。このため室温では、6水和物の場合、水分子は Na^+ イオンによる束縛が強く、 C_2 軸周りの回転しかできないのに対して、20水和物では 1 個の水分子に対する束縛はあまり強くなく、塩の水溶液中のイオンの周りに配位した水と同程度の自由度を持った運動をすることができる。一方、低温にすると、逆に 20水和物の方が近くにある水分子との水素結合が強く作用するためにむしろ 6水和物よりも束縛された水が現れると考えられる。

Na^+ イオンの配位数を 6 とすると、モリブドリン酸ナトリウムの水和物のうち最も含水量の多い 29水和物では Na^+ イオンに配位していない水がかなり存在することになる。これらの水は、 Na^+ イオンに配位している水とはまた異なった挙動を示すと期待できる。実際、29水和物の 1H NMR の線形測定の結果では、低温でも等方的な運動をしていると考えられる成分が存在することを確認しており、これも併せて報告する。

文献

- 1) M. Misono, Catal. Rev., 129(1987)269.
- 2) 石丸、中村、分子構造総合討論会要旨集、2D07(1991).
- 3) 石丸、中村、分子構造総合討論会要旨集、2P43(1992).

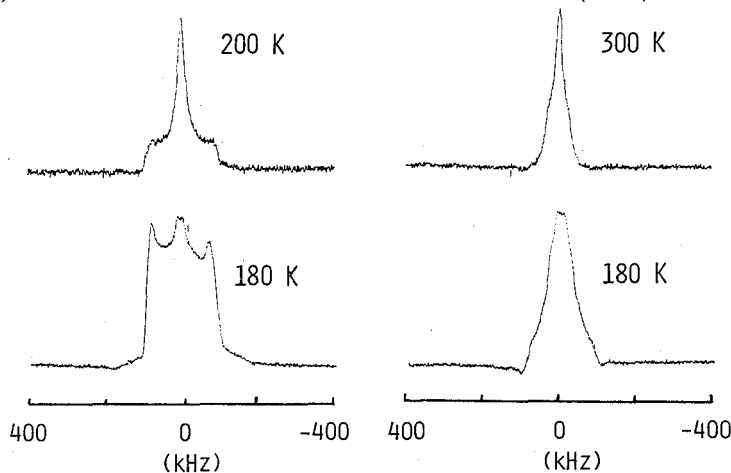


Figure 1. 2H NMR spectra of 20-hydrated sample.

Figure 2. 2H NMR spectra of hexahydrated sample.

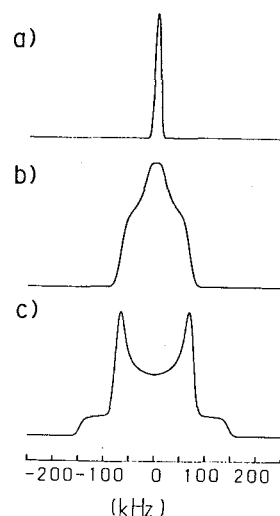


Figure 3. Simulated 2H NMR line shape for D_2O molecules which correspond to (a) undergo rotation around C_2 axis, (b) 180° flip around C_2 axis, and (c) rigid molecules.

Preparation process of cordierite ceramics by the sol-gel method.

Naoto Kikuchi, Tadanori Sei*, Toshio Tsuchiya*, Shigenobu Hayashi and
Kikuko Hayamizu

National Chemical Laboratory for Industry

*Science University of Tokyo

Cordierite ceramics ($Mg_2Al_4Si_5O_{18}$) were prepared by the sol-gel method, using metal salts and metal alkoxide as starting materials. High-resolution solid-state NMR spectra of ^{27}Al and ^{29}Si nuclei and IR spectra were measured to study structural changes during the preparation process. Cordierite wet gels are formed by $H_0-(SiO)_n-SiOH$ species without Si-O-Al bonds as the result of hydrolysis and condensation of $Si(OC_2H_5)_4$. Al ions begin to incorporate into the network, forming Si-O-Al bonds at $200^\circ C$, and the incorporation is completed at $400^\circ C$.

ゾル・ゲル法はガラス・セラミックスの新しい合成法として注目されているが、多成分系の場合には生成過程における構造変化はあまり知られていない。精密な構造制御を必要とする高機能セラミックスを作製するためには生成過程における構造変化に関する知見を欠くことができない。そこで本研究では三成分系セラミックスであるコーディエライト ($Mg_2Al_4Si_5O_{18}$) を Al, Mg の出発原料に金属塩を用いたゾル・ゲル法で合成し、 ^{27}Al , ^{29}Si 核の固体高分解能 NMR 及び IR を用いてその生成過程を検討した。

【実験】 出発原料は $Si(OC_2H_5)_4$, $(CH_3COO)_2Mg \cdot 4H_2O$, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 、溶媒にはエタノールまたはエチレングリコールを用いてゾル・ゲル法により合成した。得られたゲルを一定温度 ($55^\circ C \sim 1300^\circ C$) で 12 時間熱処理した試料について ^{27}Al , ^{29}Si MAS NMR 及び IR 測定を行った。 ^{27}Al NMR はシングルパルス法、パルス幅 $1 \mu s$ 、繰り返し時間 $1 s$ で測定した。一方、 ^{29}Si NMR は 1H デカップリングを行い、パルス幅 $4 \mu s$ 、繰り返し時間 50

ゾル・ゲル法・コーディエライト・ ^{27}Al , ^{29}Si 固体高分解能 NMR

きくちなおと・せいただのり・つちやとしお・はやししげのぶ・はやみずきくこ

sで測定した。なお、MASの試料回転数は ^{27}Al のとき12kHz、 ^{29}Si のとき3.5kHzであった。

【結果及び考察】 Fig.1に熱処理した試料の ^{27}Al NMRスペクトルを示す。(a)はエタノール、(b)はエチレングリコールを溶媒に用いた場合である。200℃までは、6配位のアルミニウムイオン(0ppm付近)が多く存在している。これは水やアルコールがアルミニウムイオンの周囲に配位した状態を示している。その後、熱処理温度の上昇とともに次第に6配位は減少し、5配位(35ppm付近)と4配位(55ppm付近)が増加する。これはシリカのネットワークへのアルミニウムイオンの取り込み過程を示していると考えられる。また溶媒により4配位のピークの成長に若干の違いが見られるが、これはエタノールとエチレングリコールの沸点の違いが影響していると考えられる。

Fig.2に ^{29}Si NMRスペクトルを示す。溶媒によるスペクトルの違いが見られなかったため、エチレングリコールを用いた場合のスペクトルのみ示している。200℃までは約-100ppmを中心とした低周波数側にピークが見られることなどから、 SiOH の縮重合が進んでいると考えられる。400℃において約-90ppmを中心とした高周波数側にピークがシフトしているが、このシフトはアルミニウムの取り込み過程によるものと考えられる。この結果は ^{27}Al NMRとIRの結果とも一致している。

以上の結果より、Al, Mgの出発原料に金属塩を用いてゾル・ゲル法によりコーディエライトを合成した場合、三成分すべてにアルコキシドを用いた場合¹⁾のようにゲル化の段階ですでに Si-O-Al の構造をとるのではなく、アルコキシドである $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ が加水分解・縮重合により $\text{HO}-(\text{Si-O})_n-\text{SiOH}$ といった末端にOHを持ったネットワークを形成し、200℃~400℃で徐々にAlイオンが取り込まれると同時に急激に縮重合が進行し、ほぼ400℃までに Si-O-Al のネットワークを形成していることがわかった。

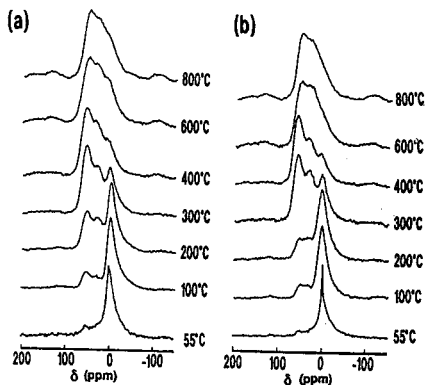


Fig.1 ^{27}Al NMR spectra of cordierite composition powders heat-treated at different temperatures for 12hr.
(a) solvent: ethanol
(b) solvent: ethylene glycol

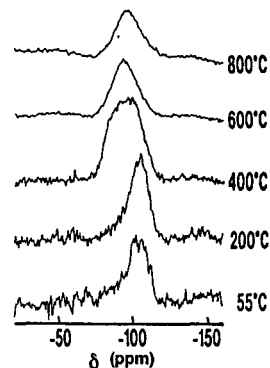


Fig.2 ^{29}Si NMR spectra of cordierite composition powders heat-treated at different temperatures for 12hr.
(solvent: ethylene glycol)

1) U. Selvaraj, S. Komarnani and R. Roy, J. Am. Ceram. Soc., 73, 3663-3669 (1990)

P 46 固体高分解能NMRによるポリピロールの構造研究

(東工大工) ○菊池瑞代・黒子弘道・安藤勲

Structural Characterization of Polypyrrole in the Solid State
by High Resolution NMR Spectroscopy

Mizuyo Kikuchi, Hiromichi Kurosu, Isao Ando

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology,
Ookayama, Meguro-ku, Tokyo152)

The ^{15}N and ^{13}C CP/MAS NMR spectra of doped and undoped polypyrroles in the solid state, prepared by electrochemical polymerization, were measured by means of high-resolution solid-state NMR. Both ^{15}N and ^{13}C signals of polypyrrole were decomposed into some peaks by computer-fitting. In order to obtain systematic information on the structure and electronic structure, a quantum chemical calculation was carried out to assist in analyzing both peaks. Further, on the basis of these results the electrical conductivity of the polymers was discussed.

1. 緒言

導電性を示すポリアセチレンフィルムの発見後、導電性高分子は非常に注目され、これまでも数多くの研究がされている。しかし、これらの高分子の構造と伝導機構の関係について十分解明されているとは言えない。ここでは、このような高分子の代表的な1つである共役複素環ポリピロールの構造と伝導機構の関係について詳細な知見を得ることを目的とした。一般にポリピロールは、Figure 1に示すような芳香族構造とキノイド構造という結合状態が異なる2つの化学構造が考えられる。両者のエネルギー状態は異なるため、未ドーピング状態では芳香族構造が優先しているが、電子アクセプターによるドーピングによって酸化状態となった場合の平衡状態は、キノイド構造の方が安定となるため優先されるようになると考えられる。^{1,2)}

固体高分解能 ^{15}N 、 ^{13}C NMR、導電性高分子、ポリピロール

きくち みずよ・くろす ひろみち・あんどう いさお

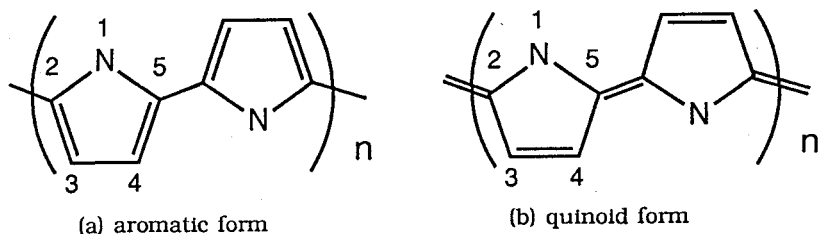


Figure 1 Aromatic (a) and quinoid (b) structures for polypyrrole

本研究では、電解重合により調製したポリピロールの構造を調べる手段として、固体高分解能 ^{15}N および ^{13}C NMRを用い、電気伝導性と対応させて構造研究を行った。さらに、これと同時に幾つかのモデルを用いて量子化学計算を行い、電子構造を通じた固体状態に関する詳細な情報を得た。この情報を実測から得られたスペクトルに対応させ、各々のピークの由来を考察した。

2.実験

ピロールをp-トルエンスルホン酸ナトリウムを支持電解質として、室温、アルゴン雰囲気下で二電極単一セルを用い、3.5Vの定電圧下で電解重合を行い、ドーピング試料を得、さらに、脱ドーピングにより脱ドーピング試料を得た。³⁾

固体高分解能 ^{15}N NMRスペクトルは、CP-MASアクセサリを付属した日本電子製GSX-500NMRスペクトロメータ（金属材料研究所）を用い、50.55MHzで、また ^{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スペクトロメータを用い、67.8MHzでいずれも室温で測定を行った。 ^{15}N NMRスペクトルは積算回数約30000回、化学シフトの基準としては外部基準として ^{15}N グリシンを用い、その化学シフトを11.59ppmとして $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ 水溶液基準に換算し、 ^{13}C NMRスペクトルは積算回数12000-16000回、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29.5ppmとしてTMS基準に換算した。電気伝導度測定は四端子法および二端子法⁴⁾により行った。

3.量子化学計算

NMR測定によって得られたデータに基づいて、より深い議論を行うため、 ^{15}N および ^{13}C NMR遮蔽定数の量子化学計算を行った。計算は局所構

造を考慮することができるFPT-INDO法⁵⁾を用いて行った。モデルはFigure 1に示した芳香族構造、キノイド構造を用いた。

4.結果と考察

Figure 2に¹⁵N CP/MAS

NMRにより得られたスペクトルを線形解析した結果を示す。それぞれのピークはこれまでにやってきたポリピロールのドーピングによるピークの強度変化と量子化学計算から、メインピーク β 、 γ はそれぞれ芳香族構造、キノイド構造、またピーク δ はピロール環の2、3位での結合に由来する信号、ピーク α は空气中で長時間放置したときに強度が増加したため酸化により二重結合が壊れたための信号と帰属してきた。⁶⁾調製した試料の電気伝導度とピーク β 、 γ の半値幅をTable 1に示す。ドーピングにより電気伝導度が増加するとき、ピーク β (芳香族構造) の半値幅には明らかな変化は見られなかったが、ピーク γ (キノイド構造) の半値幅に関しては電気伝導度の上昇に伴い半値幅が広がることが観測された。ドーピングにより、選択的にポリマー鎖中のキノイド構造が電荷を持つようになる、また、芳香族構造がキノイド構造に変化すると考えると、キノイド構造に相当するピ

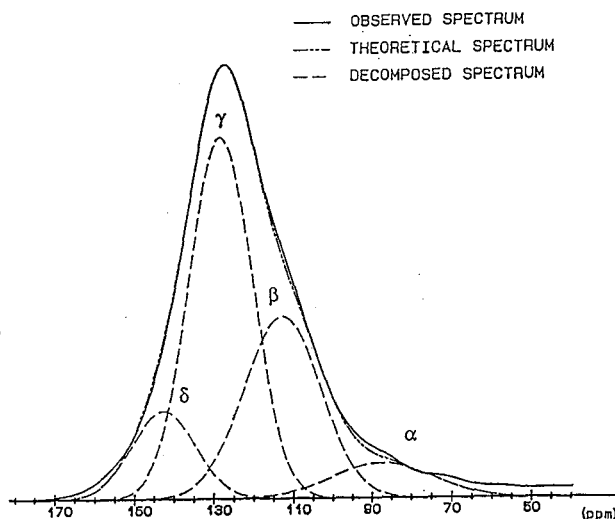


Figure 2 A 50.55MHz ¹⁵N CP/MAS NMR spectrum and a simulated spectrum of polypyrrole ($\sigma=4 \times 10^{-6}$ S/cm) in the solid state.

Table 1 Electric conductivities and half-widths in solid state ¹⁵N NMR spectra

electric conductivity(S/cm)	half-width(ppm)	
	β	γ
4 X 10 ⁻⁶	23.0	20.1
1 X 10 ⁻³	23.0	20.4
2 X 10 ⁻³	23.0	20.75
2 X 10 ⁻²	23.0	20.9

ーク γ の半値幅の増幅はドーパントの影響によるものと考えられる。
Figure 3には ^{13}C CP/MAS NMRにより得られたスペクトルを示す。 ^{13}C NMR
スペクトルについても ^{15}N NMRスペクトルと同様に量子化学計算の結果と
あわせた詳細な解析は講演で述べる。

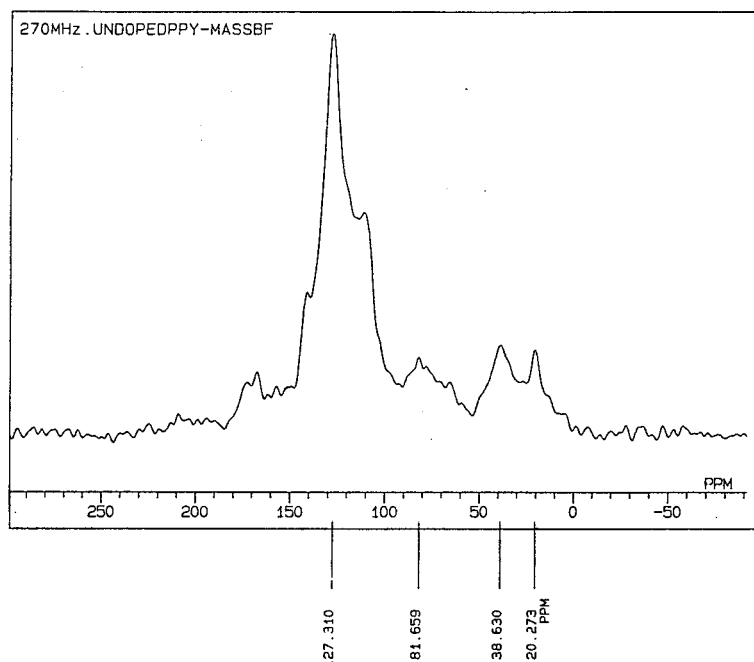


Figure 3 A 67.8MHz ^{13}C CP/MAS NMR spectrum of polypyrrole
($\sigma=4\times 10^{-6}\text{S/cm}$) in the solid state.

文献

- 1) M.G.Kanatzidis, Chemical Engineering & News, December 3, 36 (1990)
- 2) J.L.Bredas et al., Acc.Chem.Res., 18, 309 (1985)
- 3) 緒方直哉, 導電性高分子, 講談社 (1990)
- 4) 吉村進, 安島広行, 高分子, 37, 886 (1988)
- 5) I.Ando et al., Theory of NMR Parameters, Academic Press (1983)
- 6) M.Kikuchi et al., J.Mol.Struct., 269, 183 (1992)

P 47 B₄C の ¹¹B、及び ¹³C - 固体 NMR

(三菱化成総研・日本ブルカー・東京水産大) ○原園としえ・牛嶋裕次・
横田悦造・廣山幸代・渡部徳子)

Investigation of ¹¹B- and ¹³C-Solid State NMR of Boron Carbides

(Mitsubishi Kasei Research Center, Bruker Japan, Tokyo University of Marine Sciences)
o Toshie Harazono, Yuji Ushijima, Etsuzoh Yokota, Yukiyo Hiroyama, Tokuko Watanabe

¹¹B(I=3/2)- and ¹³C-solid state NMR in Boron Carbides such as B₄C(¹¹B/¹⁰B=80.42/19.58) and ¹¹B₄C(¹¹B/¹⁰B=99.5/0.5) have been studied. It has shown that the broadening of ¹¹B static NMR signal was dependent on the B-B dipole-dipole interaction because the broadening of ¹¹B signal in ¹¹B₄C was greater than that in B₄C. Simulation matched the observed spectra quite well. The B-B distance was calculated as 2.1 Å from simulation. The quadrupole coupling constant calculated from the signal position of ($\pm 1/2 \leftrightarrow \pm 3/2$) transition was 0.1 MHz. ¹¹B-MAS spectra revealed the presence of at least two additional B sites such as CBC and CBB (37 ppm and near -60 ppm) besides the icosahedral B sites (-6 ppm). The two peaks assigned to CCC and CCB appeared at 79 ppm and -0.6 ppm in ¹³C-MAS-NMR spectrum. T₁ of ¹¹B was 0.5 s, and T₁ of ¹³C in CCC and CCB were 7.8 s and 8.0 s, respectively.

序) 近年、黒鉛に B₄C (B₁₂C₃) を添加した黒鉛 - B₄C 複合材は、高強度、高耐熱性材料として注目されている。これまで黒鉛 - B₄C 複合材に関する固体 NMR の研究例は報告されていない。添加剤である B₄C に関しても、¹¹B、¹³C - 固体 NMR の研究は少なく、スペクトルの解釈や B₄C の構造についても議論が多い。^{1,2)} 今回、我々は、B₄C (¹¹B/¹⁰B = 80.42/19.58、天然存在比) と ¹¹B₄C (¹¹B/¹⁰B = 99.5/0.5) を用いて、核スピン I = 3/2 である ¹¹B の MAS -、及び S T A T I C - N M R スペクトル、¹³C - M A S - N M R スペクトル、及び ¹¹B B₄C、¹¹B₄C、¹¹B - 固体 NMR、¹³C - 固体 NMR、双極子相互作用、四極子相互作用

○はらぞのとしえ・うしじまゆうじ・よこたえつぞう・ひろやまゆきよ・わたなべとくこ

と ^{13}C の T_1 を測定した。これらの結果より、 ^{11}B -NMR スペクトルの解釈について、これまでとは違った知見を得たので報告する。

材料) B_4C はHermann C. Starck Berlin Co., LTD., $^{11}\text{B}_4\text{C}$ はEagle Pitcher Co., LTD.から購入した。粉末X線と発光分析法により、不純物として B_4C の方はグラファイトと0.7%のSi、 $^{11}\text{B}_4\text{C}$ の方はわずかの B_2O_3 と0.3%のCaが検出された。

測定) 固体NMRの測定にはBruker社製MSL-300超電導固体NMR装置を用いた。プローブは、MASの測定には4mmプローブ、STATICの測定にはSTATICプローブを用いた。 ^{11}B 、 ^{13}C の共鳴周波数は、それぞれ96.258MHz、75.468MHzであり、90°パルスはそれぞれ1.2 μs 、4.2 μs であった。測定法は ^{11}B が四極子エコー法、 ^{13}C が単一パルス法である。 ^{11}B 、 ^{13}C の T_1 はそれぞれInversion Recovery法、Saturation Recovery法を用いて測定した。

結果) B_4C は図1に示したような菱面体結晶で、 B_{12} から成る20面体が菱面体の頂点を占めている。一方、直線をなす3個のCが体心位置にある。 B_4C は $(\text{C}_3)^+(\text{B}_{12})^-$ になっているといわれている。 B_4C はB-B結合とB-C結合をしているBが1:1で存在している。図2に B_4C と $^{11}\text{B}_4\text{C}$ の ^{11}B -STATIC-NMRスペクトルを示した。 $^{11}\text{B}_4\text{C}$ の線幅の方が B_4C の線幅より広がっている。図3に B_4C のMAS-NMRスペクトルを示した。MASスペクトルは B_4C も $^{11}\text{B}_4\text{C}$ も同一のスペクトルであり、-6ppmの強いメインピークの外に少なくとも2種類のピークが存在していることが、回転数を変えた測定から明らかになった。ピーク的位置は、37ppm(Δ)と-60ppm(\circ)付近である。図4に ^{13}C -NMRスペクトルを示した。79ppmと-0.6ppmにピークが現われた。

考察)

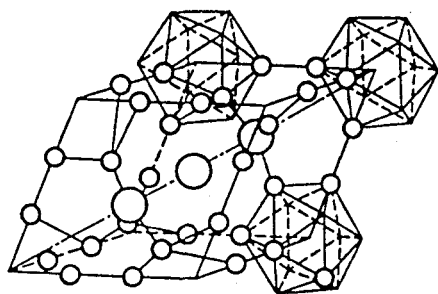


図1. B_4C の構造 ○:C、◐:B

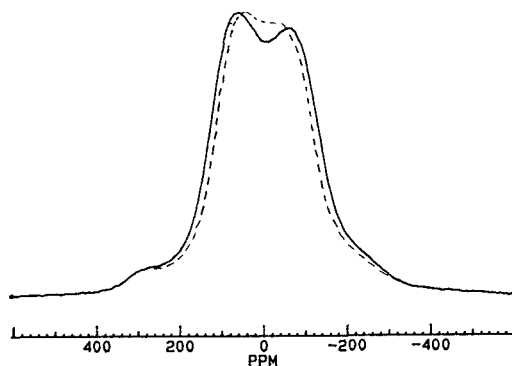


図2. B_4C と $^{11}\text{B}_4\text{C}$ の ^{11}B -STATIC-NMRスペクトル B_4C (---)、 $^{11}\text{B}_4\text{C}$ (—)

● ^{11}B - S T A T I C - N M R スペクトル

これまで、 B_4C の ^{11}B - S T A T I C - N M R スペクトルのシグナルは、 $I = 3/2$ の ^{11}B の四極子相互作用で広がっているとされていた。 ^{11}B 四極子相互作用による線幅は $(e^2qQ/h)^2/\nu$ 、双極子相互作用による線幅は γ/r^3 に比例する。ここで e^2qQ/h は四極子結合定数(Hz)、 ν は共鳴周波数(Hz)、 γ は磁気回転比(rad/gauss·sec)、 r は $\text{B}-\text{B}$ の距離(cm)、 Q は四極子モーメント($\text{m}^2\cdot\text{A}$)である。 ^{11}B と ^{10}B の γ と Q はそれぞれ次の通りである。

$$^{11}\text{B} : \gamma = 8579.4$$

$$^{10}\text{B} : \gamma = 2874.0$$

$$Q = 0.0355 \times 10^{-28}$$

$$Q = 0.074 \times 10^{-28}$$

ほとんど全て B を ^{11}B に置換した $^{11}\text{B}_4\text{C}$ の粉末X線パターンは、 B_4C のそれと全く同じで、 ^{10}B を ^{11}B に置換しても結晶構造的な変化は生じていない。すなわち、 B 核の周囲の電場環境は変化していないと考えられ、線幅の増加は四極子相互作用によるとは考え難い。従って、双極子相互作用による線幅を検討した。 $\text{B}-\text{B}$ の双極子相互作用と仮定した時のコンピューターシミュレーションを図5と図6に示した。実測とシミュレーションのスペクトルはよく一致した。これより相互作用の大きさとして B_4C が5.8 KHz、 $^{11}\text{B}_4\text{C}$ が6.5 KHzの値が得られた。*で示した所は、一次の四極子相互作用による $(\pm 1/2 \rightarrow \pm 3/2)$ 遷移であると考えられる。これより e^2qQ/h は0.1 MHzとなり、 B は非常に対称性のよい電場の中に存在していることが知られた。

● ^{11}B - M A S - N M R スペクトル

メインピークが1本なので、 $\text{B}-\text{B}$ と $\text{B}-\text{C}$ のピークはケミカルシフトがほぼ同じで、重なっていると考えられる。37 ppmと-60 ppm付近のピークは $\text{C}-\text{C}-\text{C}$ が B で置換された $\text{C}-\text{B}-\text{C}$ や $\text{C}-\text{B}-\text{B}$ に対応するものと考えられる。図7に B_4C の ^{11}B の T_1 測定スペクトルを示した。 T_1 は0.5 sであった。S T A T I C スペクトルから得

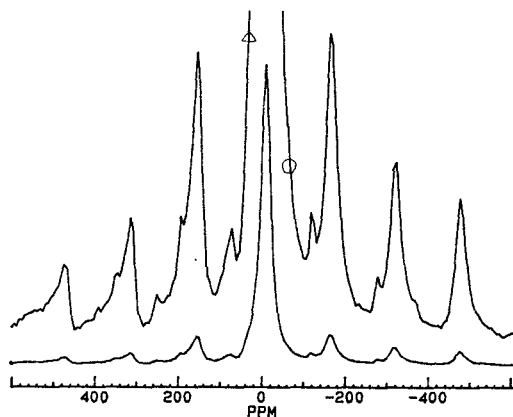


図3. B_4C の ^{11}B -MAS-NMR スペクトル
15000RPS

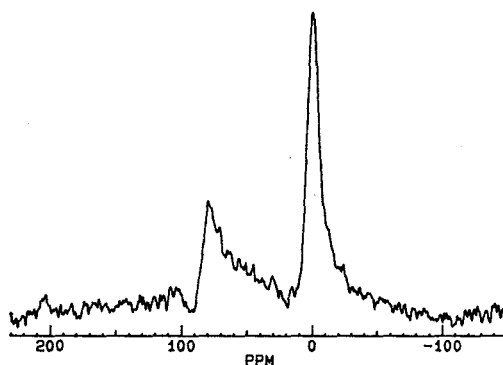


図4. B_4C の ^{13}C -MAS-NMR スペクトル
15000RPS

られた T_1 も 0.5 s であった。

● ^{13}C -MAS-NMR スペクトル

B, C の ^{13}C -MAS-NMR スペクトルを図 7 に示した。強度比から 79 ppm のピークは C-C-C (a)、-0.6 ppm のピーク C-C-C (b) の C に帰属される。図 8 に ^{13}C の T_1 測定のスぺクトルを示した。 T_1 の値は a が 7.8 s、b が 8.0 s であった。

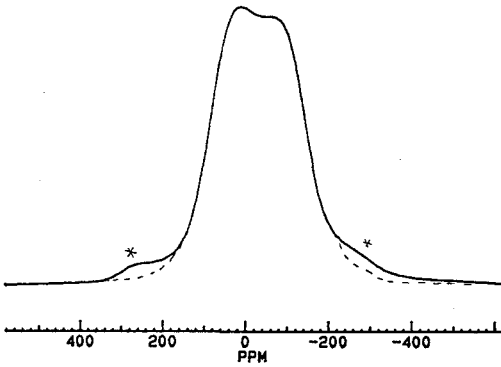


図 5. B, C の ^{11}B -STATIC-NMR スペクトルの
コンピュータシミュレーション
— : 実測、---- : シミュレーション

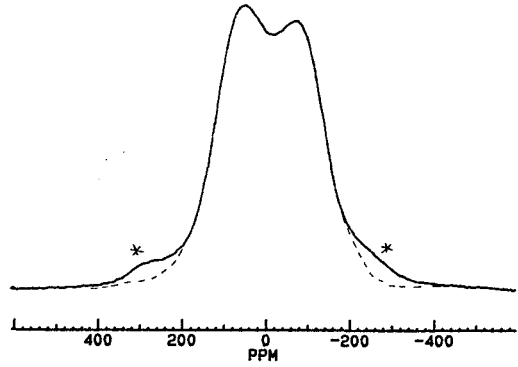


図 6. ^{11}B , C の ^{11}B -STATIC-NMR スペクトルの
コンピュータシミュレーション
— : 実測、---- : シミュレーション

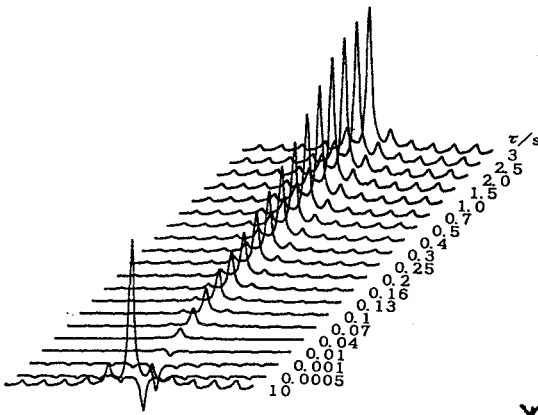


図 7. Inversion Recovery 法による B, C の ^{11}B -MAS
-NMR スペクトルの T_1 測定

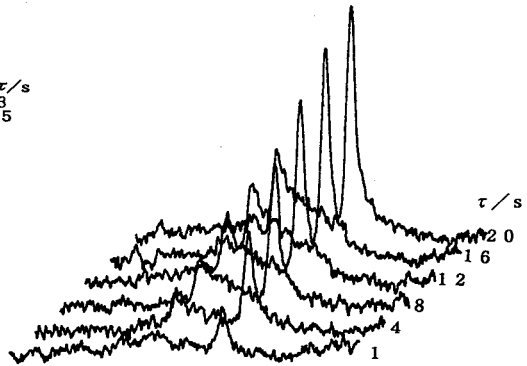


図 8. Saturation Recovery 法による B, C の ^{13}C -MAS
-NMR スペクトルの T_1 測定

(1) R. J. Kirkpatrick, T. Aselage, B. L. Phillips and B. Montez, AIP Conf. Proc., 23
1, 261 (1991).

(2) T. M. Duncan, J. Am. Chem. Soc., 106, 2270 (1984).

(東京都立大・理^{*1}, 近畿大・理工総研^{*2}・理工^{*3})○北川 進^{*1}, 前川雅彦^{*2}, 杉野秀樹^{*1}, 川田 知^{*1},
宗像 恵^{*3}Study of Silver(I) Complexes by High Resolution Solid State ^{109}Ag
NMR SpectroscopySusumu Kitagawa,^{*1} Masahiko Maekawa,^{*2} Hideki Sugino,^{*1}
Satoshi Kawata,^{*1} and Megumu Munakata^{*3}(*¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University,^{*2}
Research Institute for Science and Technology, Kinki
University, and ^{*3}Department of Chemistry, Kinki University)

High resolution solid state MAS ^{109}Ag NMR spectra of various silver(I) complexes have been first observed by using 11.7 T NMR spectrometer. The ^{109}Ag NMR spectra of eleven inorganic silver salts were also measured and the conditions for measurements were examined. The chemical shifts range from -314 to 788 ppm, very sensitive to the structure around the silver atom. The pyridine complexes show the tendency, py (543 ppm) > γ -picoline (519 ppm) ~ α -picoline (518 ppm), indicating the principal contribution of the metal-ligand π back-bonding to the Ag chemical shift.

【序論】近年、優れた機能や物性を有する種々の多核錯体や金属クラスターの合成が行なわれており、このような化合物の構造や結合状態を明らかにする新しいキャラクター化法として金属核高分解能 NMR 法が用いられている。特にこの方法は直接、錯体を構成している中心金属の状態を調べることができることから益々発展するものと考えられる。ところで 11 族に属する Ag の一価錯体は d^{10} 電子構造を有し、これまで単核のみならず多核および $\text{Ag} \cdots \text{Ag}$ 間距離が極めて短い銀クラスター錯体の合成が行なわれており、このような Ag クラスターの $\text{Ag} \cdots \text{Ag}$ 間相互作用を知る上では化学シフトや $^1J_{\text{M} \cdots \text{M}}$ を観測することが不可欠である。

しかしながら Ag 核の NMR は特殊な場合をのぞいて多くは観測されていない。この大きな原因の 1 つは表 1 に示したように極めて低い共鳴周波数を持つために感度が

[銀 (I) 錯体、銀 (I) 塩、固体 NMR、Ag NMR、高分解能 NMR、ピリジン誘導体]

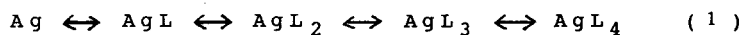
きたがわすすむ・まえかわまさひこ・すぎのひでき・かわたさとし・むなかためぐむ

悪いことによる。第2には緩和時間が極めて長いので積算に莫大な時間がかかり、FT法のメリットが生かせないことがあげられる(例えば $T_1(^{109}\text{Ag})$ 900~1000s、 AgNO_3 水溶液)。このように観測上いくつかの問題点があるが、最近溶液試料に関してINEPT法を用いて観測

表1. Ag核のNMR定数

	^{107}Ag	^{109}Ag
I	-1/2	-1/2
天然存在比(%)	51.82	48.18
共鳴周波数(MHz)	4.048	4.654
相対感度(/ ^{13}C)	4.21×10^{-3}	6.42×10^{-3}
総合相対感度	1.97×10^{-1}	2.79×10^{-1}

が行なわれ¹⁻⁵、この場合 $^{109}\text{Ag}\{^1\text{H}\}$ NMRでは400倍くらいの感度の向上が見られている。しかし、この方法による観測には $J_{\text{Ag-H}}$ ようなカップリングが観測される必要があり、これが得られない場合は使えない。さらにAg錯体は一般的にlabileであるため溶液状態で測定する場合、配位子の置換を伴うことが多く、例えば式1のような化学交換効果で平均化した吸収線を観測することが多い。すなわち、化学シフト



に濃度、温度依存性が見られることになり、正確な観測値を得ることができない。

しかしながら固体NMR法はこのようなlabileな錯体について威力を発揮することが期待される。つまり溶液では平衡があり直接測定不可能な各種配位数の銀錯体のAg NMRの観測が可能となる。しかし固体Ag NMRについては低感度であるためほとんど測定がなされておらず、極く最近、銀(I)の無機塩⁶について測定がなされているが銀(I)錯体については全くないのが現状である。

本研究ではこのような観点から ^{109}Ag 核に着目し、銀(I)錯体の構造および結合性を解明する新しい研究手段として固体高分解能 ^{109}Ag NMR法を確立するため、まず市販の銀(I)塩を用いて固体高分解能 ^{109}Ag NMRスペクトルが観測であることを明らかにし、さらに得られた ^{109}Ag NMR化学シフトと固体構造との関係を明らかにすることを試みた。また比較的簡単な構造を有する銀(I)ピリジン錯体を合成し、その ^{109}Ag NMRスペクトルの観測にも成功した。

【実験】(1) 銀(I)塩の調製 銀(I)塩としては表2に示した市販の11種の銀(I)塩をAldrichから購入しそのまま使用した。また銀(I)錯体 $[\text{Cu}(\text{py})_4]\text{PF}_6$ は5mlのピリジンに AgPF_6 を溶解した飽和溶液を数日間冷暗所にて静置することにより合成し、無色単結晶として単離した。同様に $[\text{Ag}(\alpha\text{-picoline})_4]\text{PF}_6$ 、 $[\text{Ag}(\beta\text{-picoline})_4]\text{PF}_6$ 錯体についても同様に合成し単離した。

(2) 測定 固体高分解能 ^{109}Ag NMRスペクトルの測定はJEOL GX500 NMRスペクトルメータに、低周波核専用固体観測システムNM-GSH50TL6/VTを接続し

観測周波数23.2801MHz、観測幅30000Hz(約1300ppm)、パルスdelay time 60s、point数8192、パルス幅5 μ s、観測モードMAS法およびCPMAS法にて16~2000回室温にて積算することにより行なった。試料は約0.3gの銀(I)塩および銀(I)錯体を口径6mm ϕ のセラミック性試料管に詰めて用いた。シフト基準には1M AgClO₄溶液を用いた。

【結果および考察】(1) 銀(I)塩の固体¹⁰⁹Ag NMRスペクトル 表2に本

研究で測定した11種の銀(I)塩の化学シフト値とFig.1に代表的な固体高分解能¹⁰⁹Ag NMRスペクトルを示した。極めてシャープな線幅を持つAgF(30Hz)は高々10 scansで充分S/N比の良い吸収線を与えた。一方、Ag₂Sのように幅広い吸収線を持つものもあった。この場合は約700 scansも要した。化学シフトは表2に示すように788~-250ppmの範囲にあり、線幅に対する化学シフト幅は比較的大きく、銀原子の化学的環境の変化を充分検出可能な程¹⁰⁹Ag NMRスペクトルは鋭敏であることがわかった。ここでAgIは3種のピークを与えた。これは β (Wurtzite type, hexagonal)、 γ (Zinc blendtype, cubic)型の異なる結晶形が混在するため、それを分離して観測したものと考えられる。銀(I)ハロゲン化物であるAgF, AgBr, AgIを比較したところ、各々

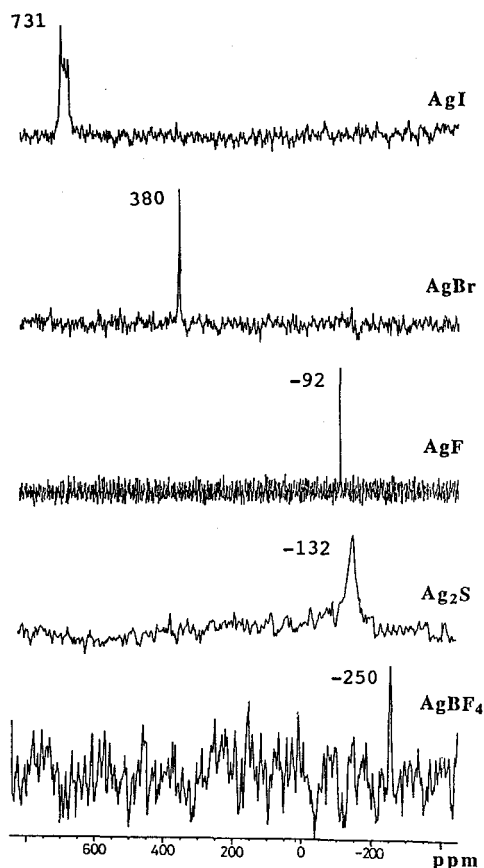


Fig. 1. Solid ¹⁰⁹Ag NMR Spectra of Silver(I) Salt

-92, 380, 731ppmに¹⁰⁹Ag NMRシグナルが観測され、AgF<AgBr<AgIの順に低磁場シフトし、spectrochemical series支配の逆ハロゲン依存の傾向を示した。また対アニオンに酸素原子を持つものは0~300ppmの範囲に、イオウ原子を持つものは-100ppm付近に、また直接イオン結合をしていないBF₄やPF₆を対アニオンに持つものは-250ppm付近に観測されることが明らかとなった。

(2) 銀(I)錯体の固体¹⁰⁹Ag NMRスペクトル Fig.2にピリジン誘導体の

Table 2. Solid ^{109}Ag NMR Chemical Shifts of Silver(I) Complexes

Silver(I) complexes	$\delta(^{109}\text{Ag}, \text{ppm})^{*1)}$	$\Delta\nu_{1/2}(\text{Hz})$
AgF	-92	30
AgCl	370 ^{*2)}	-
AgBr	380	90
AgI	731, ^{*3)} 726, 720, 710	^{*4)}
CF ₃ SO ₃ Ag	23	135
C ₂ F ₅ CO ₂ Ag	109	240
Ag ₃ PO ₄	301, ^{*3)} 319	75, 135
Ag ₂ CO ₃	326	135
AgSCN	788	300
Ag ₂ S	-132	675
AgBF ₄	-250	200
AgPF ₆	-249, -313	150, 150
[Ag(py) ₄] ₄ PF ₆	543	285
[Ag(α -picoline) ₄] ₄ PF ₆	518	285
[Ag(γ -picoline) ₄] ₄ PF ₆	519	300

*1) Observed solid ^{109}Ag chemical shifts from 1.0M AgClO₄ aqueous solution as a reference. *2) ref.(6); the aqueous solution of 9.1M AgNO₃ with 0.24M Fe(NO₃)₃ is used as a reference. *3) Main peak. *4) Overlapping signals

固体高分解能 ^{109}Ag NMR スペクトルを示した。溶液試料の場合、濃度依存性があるため、明確な化学シフト値の決定はおこなわれていないが、この方法では極めて簡便に得ることができた。Ag の化学シフトは配位子の電子供与性 (π 機構) と電子受容性 (σ 機構) の双方の寄与が考えられている⁷。塩基性の大きいメチルピリジンの方がピリジンよりも遮蔽が大きいため、 π 機構ではなく σ 機構が支配しているものと考えられる。

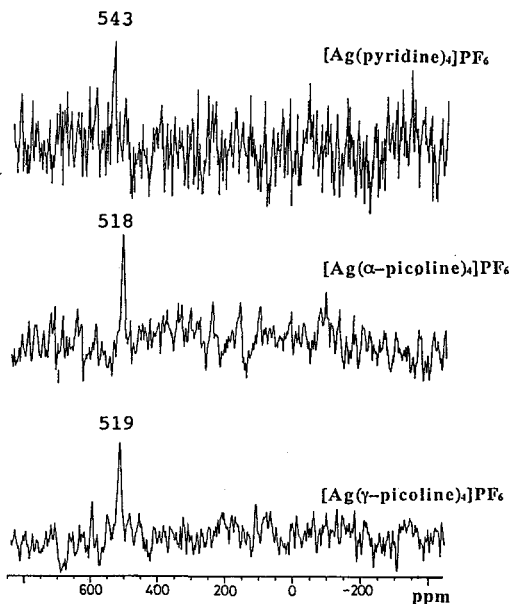


Fig. 2. Solid ^{109}Ag NMR Spectra of Silver(I) Complexes of pyridine derivatives

【文献】

- (1) C. Brevard, G. C. vanStein, and G. vanKoten, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6746(1981).
- (2) A. F. M. J. vanDerPloeg, G. vanKoten, and K. Vrieze, *Inorg. Chem.*, **21**, 2026(1982).
- (3) A. F. M. J. vanDerPloeg, G. vanKoten, and C. Brevard, *Inorg. Chem.*, **21**, 2878(1982).
- (4) S. J. B. Price, C. Brevard, A. Pagelot, and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, **24**, 4278(1985).
- (5) G. vanKoten, "Multinuclear Magnetic Resonance in Liquids and Solids", 1990, Kluwer, Netherland. pl.
- (6) H. Looser and D. Brinkmann, *J. Magn. Reson.*, **64**, 76(1985).
- (7) H. Nakatuji, K. Kanda, K. Endo, and T. Yonezawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4653(1984).

農工大工 ○朝倉哲郎・小中澤岳仁・出村誠
 蚕糸科研 小松計一
 東洋製罐綜研 伊藤卓郎

Structural Analysis of Silk Fibroin by ¹⁵N Solid State NMR

Tetsuo Asakura, Takehito Konakazawa, Makoto Demura (Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology), Keiichi Komatsu (Sericultural Science Research Institute), and Takuro Itoh (Co., R & D, Toyo Seikan Group)

The ¹⁵N solid state NMR techniques are applied to elucidate atomic resolution details of Silk II conformation of silk fibroins. Two silkworms, *B.mori* and *A.yamamai* were used. The ¹⁵N chemical shift tensors of the sites, [¹⁵N]Gly, [¹⁵N]Ala, and [¹⁵N]Tyr, were determined for the ¹⁵N labeled powder samples. ¹⁵N CP NMR spectra of the oriented silk fibroin block were observed by setting parallel and perpendicular with respect to the magnetic field. The spectra were simulated with ¹⁵N chemical shift tensors as functions of several Euler angles and distribution of fiber axis. ¹³C-¹⁵N double labeled model compound was also used to obtain the structure information. Finally, the internal rotational angles (ϕ , ψ) of site-specific amino acid residues in both the crystalline and amorphous regions of silk fibroins were determined with ¹⁵N solid state NMR.

緒言 最近、絹の固体構造(Silk II型)について、高橋ら¹⁾による精密なX線構造解析、Scheragaら²⁾によるコンフォメーションエネルギー計算の結果が報告された。MarshとPauling³⁾によって以前から提案されてきた構造と比較すると、逆平行βシート構造をとる点では一致しているものの、内部回転角を含めた詳細な点では異なっている。

本研究では、化学シフトテンソルの情報を積極的に利用した原子レベルでの固体NMR解析法を用いて、絹のSilk II型構造を、結晶、非晶に存在する種々のアミノ酸サイトごとに徹底的に解明し、最終的に各サイトごとに内部回転角(ϕ, ψ)の決定を行うことを目的とした。カイコは家蚕と天蚕を用い、¹⁵N同位体ラベル部位はGly, Ala, Tyrとした。

実験 材料；¹⁵N-Gly, AlaまたはTyrを添加した無血清培地でカイコ後部絹糸腺を旋回培養(24hr)し、特定サイトを¹⁵Nラベル化した絹フィブロイン粉末を得た。また、目的の¹⁵Nラベルアミノ酸水溶液をカイコ(5齢6日)(家蚕または天蚕)に経口投与し、繭糸を得た。これを精練後、繊維軸を厳密にそろえ、接着剤で固定した一軸配向ブロックを作製した。¹³C-¹⁵Nダブルラベル絹モデル化合物(Boc-[1-¹³C]Ala-[¹⁵N]Gly-Ala

固体¹⁵N NMR, 化学シフトテンソル、絹フィブロイン、家蚕、天蚕

あさくらてつお、こなかざわたけひと、でむらまこと、こまつけいいち、いとうたくろう

-Gly- OPac)を液相法によって合成した。

^{15}N CP NMR測定; JEOL EX-270スペクトロメーターを用い、観測周波数27.25 MHz, 通常のCP条件下で測定した。配向試料のスペクトルは、磁場と繊維軸のなす角度を0度と90度に設定して観測した。繰り返し時間は7s、積算回数は ^{15}N ラベルパウダーは1500-2000回、 ^{15}N ラベル配向試料では約10000とした。

解析⁴⁾; 解析手順をフローチャートにまとめた(Fig.1)。特定の ^{15}N 核化学シフトテンソルを決定する。続いて磁場に対して繊維軸を平行と垂直に設置した配向試料の ^{15}N スペクトルをシミュレートし、主軸系(PAS)から繊維軸系(FAS)への変換のオイラー角(α_F, β_F)を決定する。 ^{13}C - ^{15}N ダブルラベル絹モデル化合物のパウダーパターンを用いて、PASから分子軸系(MAS)への変換のオイラー角(α_D, β_D)を決定する。これらの角度情報を連続した残基について求め、最終的に特定残基の(ϕ, ψ)値を決定する。

結果と考察

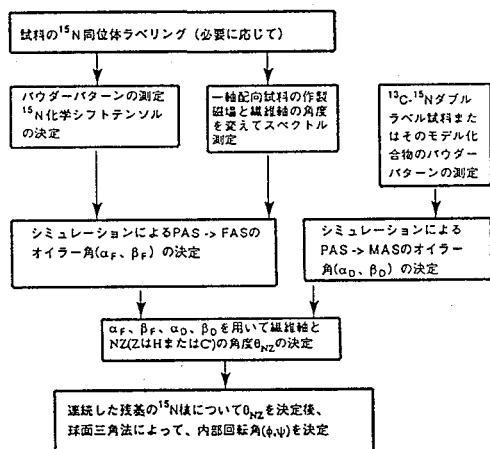


Fig.1 Flowchart of New Structure Analysis of Polymers by ^{15}N Solid State NMR

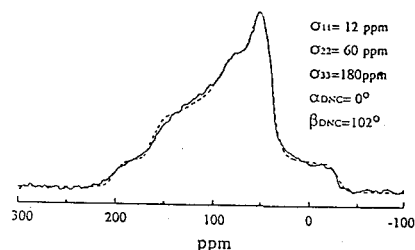


Fig.2 ^{15}N solid state NMR powder spectra of Boc-[1- ^{13}C]Ala-[^{15}N]Gly-Ala-Gly-OPac. Solid line; Observed, Broken line; Calculated.

Table 1 ^{15}N chemical shift tensors, Euler angles and Torsion angles of *B.mori* silk fibroin.

	Gly	Ala	Tyr
Chemical shift tensors/ppm			
σ_{11}	22	33	32
σ_{22}	54	56	54
σ_{33}	186	200	194
Euler angles/deg			
α_F	24 \pm 10	2 \pm 10	22 \pm 10
β_F	72 \pm 2	70 \pm 2	72 \pm 2
Torsion angles/deg			
ϕ	-141 \pm 5	-139 \pm 5	-139 \pm 5
ψ	147 \pm 5	146 \pm 5	147 \pm 5

家蚕Silk II型絹の[^{15}N]Gly, [^{15}N]Ala, [^{15}N]Tyr化学シフトテンソル、PASからFASへの変換オイラー角をTable 1にまとめた。[^{15}N]GlyサイトのPASからMASへの変換オイラー角は、 ^{13}C - ^{15}N ダブルラベル絹モデル化合物のパウダーパターンのシミュレーションから決定した(Fig.2)。これらのデータから、最終的に決定した家蚕絹フィブロインのGly, Ala, Tyr残基の(ϕ, ψ)値をTable 1にまとめた。

発表では、さらに、天蚕絹フィブロイン(Silk II)の解析結果についても報告する。

参考文献

1. Y.Takahashi et al., J.Polym.Sci.,Polym.Phys.Ed., **29**, 889(1991).
2. S.A.Fossey et al., Biopolymers, **31**, 1529(1991).
3. R.E.Marsh et al., Biochim.Biophys. Acta, **16**,1(1955).
4. L.K.Nicholson et al., Biopolymers, submitted.

P 50 NQR法によるMASプローブの温度較正

(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 for MAS probe

(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 the Magic-Angle-Spinning (MAS) probes.⁽¹⁾ However the sample spinning induces the broadening of NQR spectra for powder sample due to Berry's phase effect which gives fictitious field. We suggested to apply magnetic field along spinning axis to cancel a fictitious magnetic field arising from the sample spinning.

Using this technique, we measured the average and gradient of sample temperature to evaluate the temperature distribution over the sample.

[序論]

MASプローブでは高速回転の時, 気体軸受の摩擦により試料管に吹き付けているガスの温度と試料の温度は一般に異なっている. そのため実際のNMR測定時の試料温度を予測するには, 試料の温度を回転速度とガス温度の関数としてあらかじめ較正しておく必要がある.

我々は KClO_3 の ^{35}Cl -NQR共鳴周波数の温度依存性がこの温度較正に利用できることを報告してきた. 前回, 高速回転時において測定精度を劣化させる線幅の広がり的重要因素の一つとして, Berry's phaseによる線幅の広がりが考えられることを示唆した. そして回転軸方向に静磁場をかけて, これを打ち消すことができることを実験的に示した⁽¹⁾.

今回, 我々は実際のMASプローブに回転軸方向に適切な強度の磁場をかける装置を製作して, 高速回転時でもNQR法本来の高い精度と感度で温度計測が可能であることを確認し, これを用いて回転数と試料温度との関係を測定した. その結果, 従来の温度計測方法では測定が困難であった試料管内の温度分布が簡単により精度よく測定できることが明らかになった.

温度測定, NQR, ^{35}Cl , Berry's Phase, 温度分布

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

[実験]

実験は日本電子社製と Doty 社製の 270MHz narrow bore 用 CPMAS プローブでおこなった。試料管はともにジルコニア製で日本電子社製は外径が 6φ、Doty 社製が 7φである。KC1O₃ は市販品をそのまま粉末状態で使った。

試料管を回転させた場合は、Berry's phase による影響を打ち消すために静磁場を回転軸の方向にかけなければならない。回転軸はマジックアングルの方向なので、Fig.1 のようにヘルムホルツコイルとサドル型コイルを組み合せ、各々のコイルに流す電流を調整することによって静磁場の向きと大きさを設定できるようにした。

測定は温度が平衡状態になるように試料管を回転させてから 5 分以上待つてからおこなった。室温付近での共鳴周波数は約 28.1MHz で、周波数の温度変化は約 5.2kHz/°C である。回転軸の方向にける静磁場は、回転数 5kHz のとき 12gauss で、Tycko が理論的に示した値と一致した⁽²⁾。典型的な積算時間は約 1 分であった。

[結果と考察]

(1) 回転と温度上昇

回転数の 2 乗と温度上昇 ΔT の関係を Fig.2 に示す。スペクトルのピークを温度の代表値としてガスの温度との差を温度上昇 ΔT としてプロットした。

ΔT は回転数の 2 乗に比例している。これは過去に測定したサーモラベルでの測定結果や化学シフトを用いて報告された結果⁽³⁾ とよく一致している。気体軸受けの摩擦による発熱量は簡単な計算では回転数の 2 乗に比例することが知られている⁽⁴⁾。 ΔT がプローブの種類が違っても回転数に対して同じ傾向を示すのは、このことから説明できると考えている。

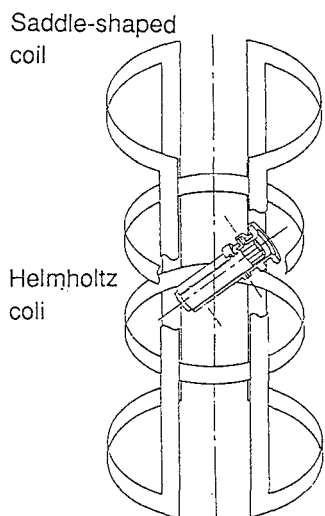


Fig.1 Coil arrangement

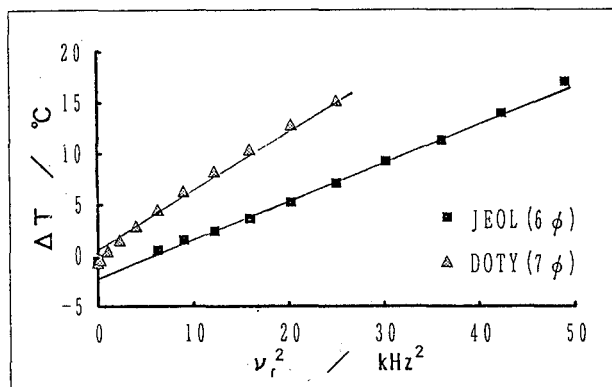


Fig.2 Temperature differences ΔT vs. the squer of the rotation frequency ν_r

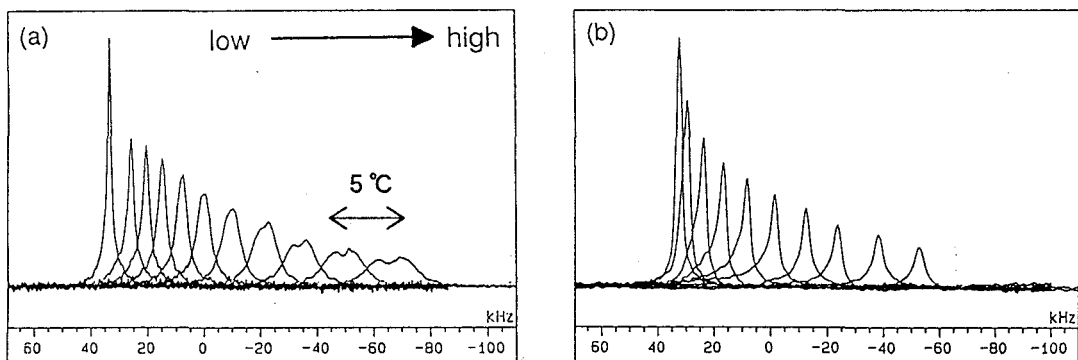


Fig.3 NQR spectra for various rotation frequencies ν_r

(center frequency 28.050MHz)

(a) JEOL 6φ $\nu_r=0, 2.5 - 7.0$ step 0.5 kHz

(b) Doty 7φ $\nu_r=0, 1.0 - 5.0$ step 0.5 kHz

(2)回転と温度分布

Fig. 3 に回転数によるスペクトルの変化を示す。回転とともに線幅が広がっているのは温度の分布が生じているためと考えている。温度分布に関しての情報は従来の測定でははっきり知ることができなかったが、NQR法では平均的な試料温度だけでなく各温度の試料がどれだけの量あるのかをスペクトルから知ることができる。

高速回転時、Doty社製のプローブでは温度の低い方に裾をひくスペクトルが得られる。KClO₃を上半分、あるいは下半分にだけ詰めて測定することによって、温度の低い部分が試料管の上部であることが明らかになった。日本電子社製のプローブでは温度の低い方のピークについて同様のことがいえる。

この原因としては、ベアリング部分ではほぼ一様な発熱が生じているのに対して、上のキャップ部分は断熱膨張で温度が下がったドライブのガスで冷やされるため試料管上部に大きな温度勾配が生じていると予想している。Doty社製のプローブでは試料管をステーターに入れた後、フタをするようになっているが、日本電子製のプローブでは取扱いの便利さからフタはない。このような構造上の違いがドライブのガスの断熱膨張による温度の低下の程度を変えているかもしれない。

この測定により試料を試料管の下半分に詰めれば温度分布の程度が改善されることがわかった。温度の一様性が特に問題となる測定では必要な手法となるだろう。その場合、KClO₃を同じように詰めて測定することによって温度の広がりを目安を得ることができる。

[結論]

今までの温度コントロールは主として温度の安定度に注目してきた。最近ではコントローラーの発達により $\pm 0.1^\circ\text{C}$ の制御が実現できるようになり、安定度の問題は以前に比べるとかなり改善された。我々は次のステップとして、コントローラーの表示温度と試料温度との差を問題としてきた。その中で、従来の温度計測方法に代えてNQR法が有利であることを主張してきた。

しかし、液晶の相転移など狭い温度範囲で大きく変化するスペクトルを測定する時には、試料温度の一様性も知っておく必要がある。今回の実験で、試料温度の計測だけでなく温度一様性の計測に対してもNQR法がすぐれた計測方

法であることを示した。また試料の詰め方を工夫することで、より温度の一様性の高い測定が可能であることがわかった。この計測方法を使ってデカップリングによる試料温度の上昇等、他の温度変化の要因についても今後検討する予定である。

- (1) 第30NMR討論会予稿集 1991, 東京 p313
- (2) R.Tycko, Phys. Rev. Lett. 58, 2281 (1987)
- (3) F.Aguilar-Parrilla, B.Wehrle, H.Braunling, H.H.Limbach,
J. Magn. Reson. 87, 592 (1990)
- (4) F.D.Doty, P.D.Ellis, Rev.Sci.Instrum. 52, 1868, (1981)

Copper NQR Study of the La214 System

Kazuyoshi YOSHIMURA, Koji KOSUGE and Hiroshi YASUOKA*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606-01

*Institute for Solid State Physics, University of Tokyo, Roppongi, Tokyo 106

The nuclear quadrupole resonance (NQR) has been investigated for Cu in $\text{La}_{2-x}\text{A}_x\text{CuO}_y$ ($\text{A}=\text{Sr}$ and Ba). Three Cu NQR lines, A, B and C, have been observed, which correspond to three different Cu sites. From the analysis of these NQR intensities, site assignments are possibly as follows. These lines A, B and C are attributed to CuO_6 octahedral, CuO_5 pyramidal and CuO_4 planar sites, respectively. The apical oxygen O(2) should be induced to transfer to the interstitial O(3) site between LaO planes when two or more Sr^{2+} ions are located in its neighboring La sites, giving the doping mechanism of carrier holes which is necessary for the occurrence of superconductivity: the excess holes doped into the CuO_2 plane are provided mainly by O(3) as well as the unpaired Sr^{2+} ion.

(序論) K_2NiF_4 型構造のLa系214化合物では $\text{La}_{2-x}\text{A}_x\text{CuO}_y$ (AはSr, Baなどのアルカリ土類金属) の形で3+イオンのLaを2+イオンで置換されることによってキャリアーとしてホールが系に導入され、 $x=0.16$ を中心に30~40Kの T_c の超伝導が出現することが知られている。この系は高温超伝導体の基本物質として、マクロな面から精力的に研究がなされているがキャリアードープの機構や超伝導発現機構を明らかにしていくためにはミクロな情報が必要不可欠である。我々は今回、 $\text{La}_{2-x}\text{A}_x\text{CuO}_y$ (AはSr, Ba) において銅の核四重極共鳴 (NQR) を行いホールドーピングに関係すると思われる結果を得たので報告する。

(実験) 試料は固相反応法により1050~1100°Cで合成された。その後、500°C 1日間酸素1気圧気流中で熱処理している。試料の相同定・格子定数決定は粉末X線回折によって行った。Sr系では $x \leq 0.5$ 、Ba系では $x \leq 0.3$ の範囲で K_2NiF_4 型構造の単一相となることが確認された。合成された試料の酸素量を熱重量分析及び炭素還元法によって酸素量の分析を行っている。超伝導性の評価は交流磁化率によって行った。NQR測定はパルス法を用いたスピネコー法によって行った。

(結果・考察) 得られた試料における酸素量 y の x 依存性をFig.1に示す。 $x < 0.2$ の組成領域では(この領域で超伝導が見れる) y はあまり大きく変化せず $y \sim 4$ となっていて $x > 0.2$ になるとほぼ $y = 4 - x/2$ の電気的中性条件と平行に y が減少していくことがわかる。実測値と $y = 4 - x/2$ との差の2倍の値 $2\Delta y$ が系に導入されている過剰ホールの量になる。

Fig.2に1.3Kにおける四重極共鳴実験の結果得られた典型的なCuのNQRスペクトルを示す。ここに示したようにA, B, Cの3種類のCu NQRラインが観測された。この系では結晶学的には1つの等価なCuサイトしかないが、NQR測定の結果はとびとびの異なった電場勾配を感じている3種類の銅サイトが存在することを示している。これらのNQRの周波数 ν_0 をFig.3に示す。 ν_0 は x に対して連続的に変化しており系が固溶系となっていることを示している。従って、これらは不純物中のCu核を観測しているのではないことになる。ラインAの ν_0 を $x \rightarrow 0$ に外挿すると、反強磁性体 La_2CuO_4 において観測されたゼロ磁場の反強磁性のNMRスペクトル中の ν_0 成分にスムーズにつながり、このラインAが本来のNQRラインであって、残りのラインB, CはSrやBaによる置換効果として発生してきたものであることがわかる。ここで、問題となるのはラインB, Cの起源である。それを調べるためにNQRの強度を x について系統的に測定し解析してみた。結果と解析をFig.4に示す。ここで強度は横緩和時間(T_2)の補正($\tau \rightarrow 0$)を行って求めた。まず単純に銅の周りのLaサイトを考えると8または10のLaサイトが存在するのかわかる。このLaサイトをSrなどで置換していく場合を二項確率で考えると、Aサイトは銅の周りにSrが0または1つ来た場合、B, Cサイトは2以上の場合に対応する事が分かった。このことは2つ以上の2価イオンで3個のLaを置換すると銅の周りで何かが変わりAサイトがBサイトとなることを意味している。ここで、我々は最も単純なモデルを取り上げ解析してみた。即ち、銅の上下の頂点酸素に注目して、その周りの5つのLaサイトの内2つ以上がSrまたはBaで置換されるとその頂点酸素が不安定になるというモデルである。これによって、銅がももとの6配位から4配位まで配位数を変え、それらがそれぞれA, B, Cサイトに対応するというモデルである。このモデルでは6, 5, 4配位となる確率 P_6, P_5, P_4 は二項確率によって下に示した次式のように書ける。

$$P_6(x), P_5(x), P_4(x) = \left[\sum_{k=0}^1 \binom{5}{k} B_k \right]^2, \left[\sum_{k=0}^1 \binom{5}{k} B_k \right] \left[\sum_{k=2}^5 \binom{5}{k} B_k \right], \left[\sum_{k=2}^5 \binom{5}{k} B_k \right]^2 \quad (1)$$

Fig.4にはこれらが実線で示してある。ここで P_6, P_5, P_4 はそれぞれラインA, B, Cの相対強度に良く対応していることが分かる。これらの解析結果よりラインA, B, Cはそれぞれ6, 5, 4配位の銅サイトに対応していることが明らかになった。この結果は La^{3+} を Sr^{2+} や Ba^{2+} で置換することによって局所的に電気的中性原理を満たしていることを意味する。Fig.1から $x < 0.2$ では y があ

キーワード: 銅酸化物超伝導, La214系, 核四重極共鳴, Cu核, ホール量

よしむら かずよし, こすげ こうじ, やすおか ひろし

まり変化しないことが分かっている。従って、頂点酸素は試料から抜けてしまうのではなくおそらくLaO面間の新たなinterstitial site, O(3)に移っているものと考えられる。このO(3)サイトは酸素を過剰に取り込んだ超伝導体 $\text{La}_2\text{CuO}_{4+\delta}$ ($T_c \sim 40\text{K}$)における過剰酸素の位置や電子ドープ系超伝導体の酸素位置と同じ位置であり超伝導機構を考える上で興味深い。

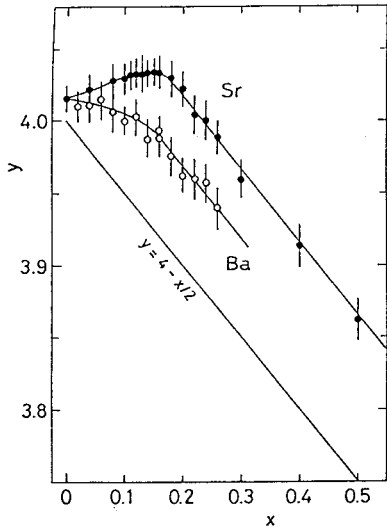


Fig.1 Oxygen Content y plotted against the Sr or Ba composition x in $\text{La}_{2-x}\text{A}_x\text{CuO}_y$ (A=Sr (●) or Ba (○)).

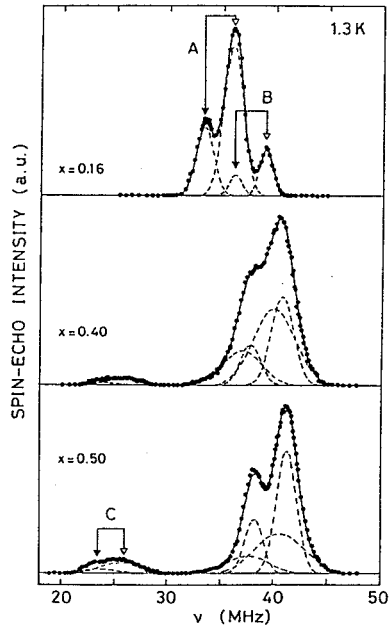


Fig.2 Typical copper NQR spectra of $\text{La}_{2-x}\text{Sr}_x\text{CuO}_y$ with ($x=0.16, y=4.03$), ($x=0.40, y=3.92$) and ($x=0.50, y=3.86$) measured at 1.3 K. These spectra can be explained by the superposition (solid curves) of three sets (dashed curves) of ^{63}Cu and ^{65}Cu NQR lines A, B and C indicated by the arrows, where open and solid arrows stand for ^{63}Cu and ^{65}Cu , respectively.

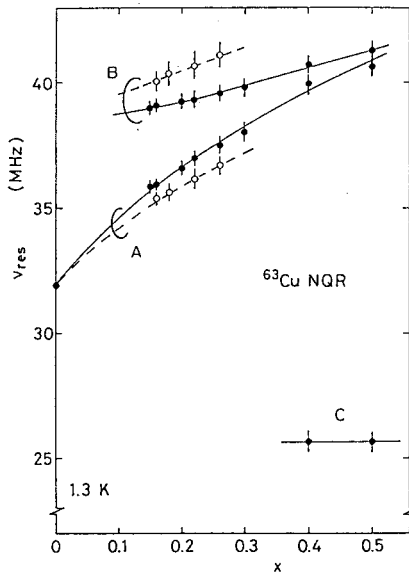


Fig.3 Composition dependence of NQR resonance frequency ν_{NQR} of the lines A, B and C for $\text{La}_{2-x}\text{A}_x\text{CuO}_y$ (A=Sr (●) or Ba (○)).

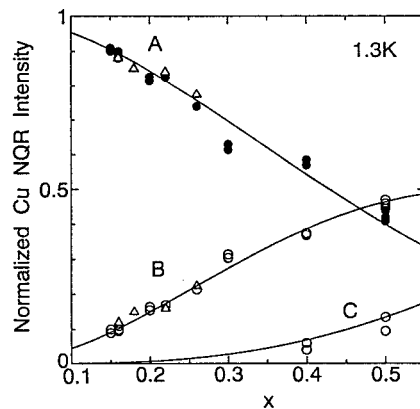


Fig.4 Composition dependence of the normalized integrated intensities $I_0(A)$, $I_0(B)$ and $I_0(C)$ after analyses of spectral decomposition and T_2 correction in $\text{La}_{2-x}\text{A}_x\text{CuO}_y$ (A=Sr (●, ○) or Ba (△)). The solid curves stand for P_6 , P_5 and P_4 .

藤原直樹、京大理

○後藤喬雄、前川 覚、京大教養

Nuclear magnetic relaxation in Haldane-gap magnetic system

Fujiwara Naoki, Department of Physics, Faculty of Science, Kyoto University

Takao Goto and Satoru Maegawa, Department of Physics, College of Liberal Arts and Sciences, Kyoto University.

The experimental results and analysis for the nuclear -spin lattice relaxation time in Haldane-gap system $\text{Ni}(\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2)_2\text{NO}_2(\text{ClO}_4)$ (NENP) are reported. The experimental results exhibit very characteristic behaviours such that the relaxation rate $1/T_1$ decreases over 4 orders of magnitude with decreasing temperature from 77K to 0.5K, which reflects the presence of a large excitation gap above the non-magnetic singlet ground state. From the data at low temperatures and high fields up to the critical field where the gap vanishes, the field dependences of the excitation gap were determined, which are found to be consistent with the theoretical prediction of field-theory treatment based on fermion model. Quite recently it has been observed that $1/T_1$ takes the maximum around the critical field of 9.5T for H//chain-axis.

最近磁性体の分野で、整数スピンを持つ1次元ハイゼンベルグ型反強磁性体(1D-HAF)における非磁性的基底1重項と磁氣的励起状態の間に存在する有限のエネルギーギャップ(ハルデンギャップ)の問題に興味を持たれているが、当講演では、この問題についての核磁気緩和による実験的研究について報告する。主な研究の対象は Ni^{+2} ($S=1$)の1D-HAFである $\text{Ni}(\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2)_2\text{NO}_2(\text{ClO}_4)$ (略称NENP)で、 ^1H の核スピン格子緩和時間 T_1 の温度並びに磁場依存性を測定した。 T_1 は通常の磁性体の場合とは著しく異なって、ギャップの存在を反映して特異な振舞いを示す。緩和率が励起三重項の最低エネルギー準位の統計的占有数に比例するとして実験結果を解釈し、これよりギャップの磁場依存性等の性質についての知見を得た。他のハルデン系物質である $(\text{CH}_3)_4\text{NNi}(\text{NO}_2)_3$ (略称TMNIN)の実験結果についても報告する。

ハルデンギャップ、NENP、NMR、核磁気緩和

ごとうたかお、ふじわらなおき、まえがわさとる
後藤喬雄、藤原直樹、前川 覚

ギャップの出現については、古典スピン ($S = \infty$) に基づくハルデンの最初の議論以来、 $S = 1$ の 1D-HAF 系に関して、有限個数の数値計算並びに理論的研究が精力的に行なわれ、第1励起状態は全スピン $S_t = 1$ の三重項で、基底1重項状態に対して $0.4J$

(J は交換相互作用) のギャップがあること、スピン間の相関が指数関数的に急激に減衰すること導かれている。ちなみに、例えば $S = 1/2$ の 1D-HAF ではスピン相関は距離に反比例して減衰する。NENP はこのようなハルデンギャップが現れている最も典型的な化合物で、現在様々な手段で実験的研究が行なわれている。図1に結晶構造を示す。結晶構造は orthorhombic で格子定数は $a = 15.223$, $b = 10.300$, $c = 8.295$ Å である。構造は b -軸に沿った $\cdots\text{NO}_2\text{-Ni-NO}_2\text{-Ni}\cdots$ 1次元鎖 ($J/k_B = -47\text{K}$) で特徴づけられ、これらの鎖は ClO_4 で充分にへだてられている為、1次元性が極めてよい。

($J/J = 10^{-4}$) 磁氣的性質は極めて特徴的で、例えば、帯磁率は低温で急激な減少を示し、強磁場中での磁化はギャップが消失する臨界磁場 ($H_c = 9.5\text{T}(H/b)$, $13.5\text{T}(H \perp b)$) まで極低温ではほとんど零で $H > H_c$ で磁場の増加につれて線型的に増加する。

我々は NENP 中の ^1H の T_1 を、温度域 $0.5\text{K} - 77\text{K}$ 、磁場域 $0.4\text{T} - 7.5\text{T}$ で測定した。実験はパルス法 NMR を用いて行ない、 T_1 はスピンエコー信号の飽和回復法で行なった。

図2はの低磁場での T_1^{-1} の温度依存性を示す。温度の低下とともに4桁にも及ぶ著しい減少を示す。この様な傾向は大きなギャップの存在を反映するもので、半整数スピン系 TMMC ($S = 5/2$) では、図3に示すように低温での反強磁性的短距離秩序の発達にともなて T_1^{-1} が著しい増大を示すのとは、極めて対照的である。図4は、特に低温での温度依存性を明瞭にするために低温高磁場での H/b -axis 及び $H \perp b$ -axis に対する実験結果 (T_1^{-1}) を $1/T$ に対してプロットしたものである。図から明かなように、低温で実験結果は、 $T_1^{-1} \sim C \exp(-E_g/k_B T)$ の曲線にフィットしている。ここで E_g , C は磁場に依存するパラメーターである。図5はフィッティングで得られた E_g の値を磁場に対してプロットした結果である。図中の実線及び1点鎖線は場の理論に基づく励起-フェルミオン模型で Tsvelik により計算された3重項の磁気励起の最低準位のモード $q = \pi$ (ギャップに相当する) を示すが、実験で得られた E_g はこれによく合っていることがわかる。(尚、ボゾン模型では H b -axis に対して違いが現れる。) このように、 T_1^{-1} から最低励起準位のギャップについての知見が得られた。また、温度依存性も含めた T_1^{-1} の全体は、次の様な簡単な式で良く説明できる。

$$T_1^{-1} \sim \frac{\kappa}{(\xi - \pi)^2 + \kappa^2} \frac{\Gamma_g}{(\hbar\omega_g - \hbar\omega_q)^2 + \Gamma_g^2} n_q$$

ここで Γ_g は、モード q の磁気励起の減衰定数、 κ はスピン相関距離の逆数、 n_q は関与する磁気励起の熱平均値である。この式はモード $q = \pi$ 近傍のエネルギー $\hbar\omega_q$ の励起の非常

に大きな減衰に伴って生じる磁氣的揺動のラーモア振動数のスペクトル成分によって核磁気緩和が起こっていることを意味している。尚、最近の12Tまでの実験で、 T_1^{-1} の磁場依存性に H_c で T_1^{-1} の極大が現れることがわかった。

又、常磁性状態であるにも拘らず、NMRスペクトルに、図6に示すような低温高磁場で大きなスプリッティングが観測されている。

図7は、TMMCと同じ結晶構造を持つTMNIN($J/k_B = -12K$)中の 1H の T_1^{-1} の温度依存性である。図3に示したTMMCにおける結果と比べて極めて対照的であり、ハルデン系としての特徴を示していると考えられる。

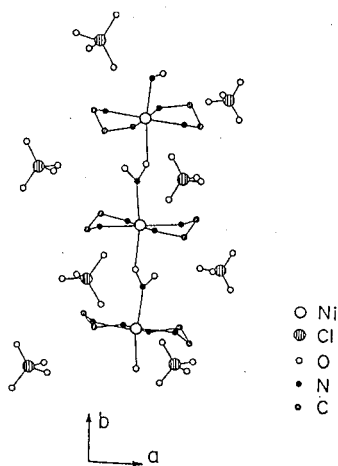


図1、NENPの結晶構造

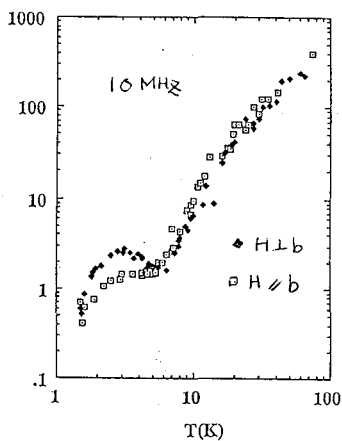


図2、NENPの 1H の T_1 (低磁場)

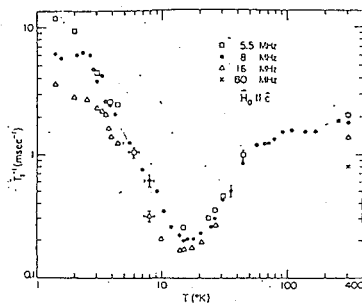


図3、TMMCの 1H の T_1

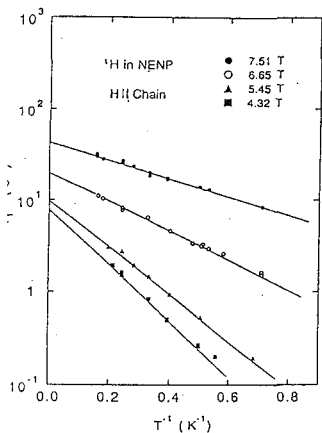


図4、NENPの 1H の T_1 (低温高磁場)

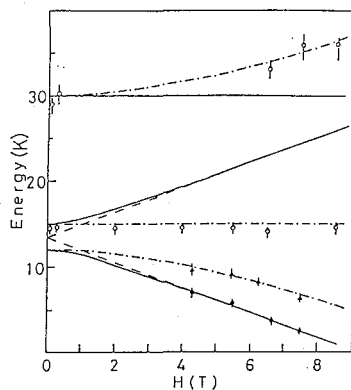
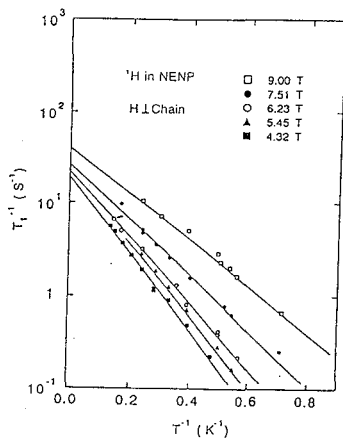


図5、励起エネルギー-磁場ダイアグラム

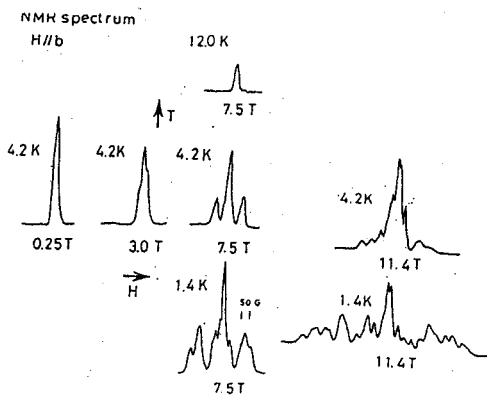


図 6、NENPの ^1H のNMRスペクトル

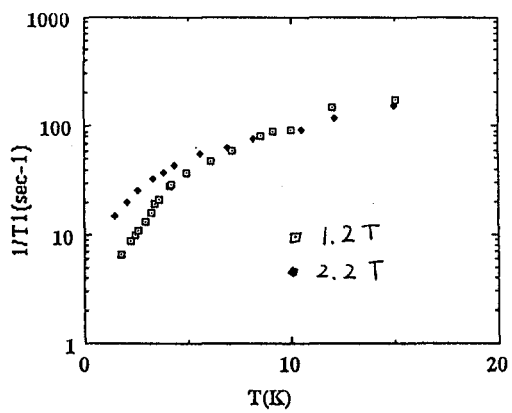


図 7、TMNINの ^1H の T_1

P 52 a

ウラン化合物超伝導体の NMR, NQR による研究

姫路工大 理学部 小堀洋 小原孝夫

NMR and NQR Studies In Heavy Fermion Superconductors

Department of Material Science, Himeji Institute of Technology

Yoh Kohori, Takao Kohara

NMR measurements of Pt, Si, Mn, and Co have been performed in heavy fermion superconductors, UPt_3 , URu_2Si_2 and U_6X ($X=Mn$ and Co). $1/T_1$ in UPt_3 and URu_2Si_2 show no enhancement just below T_c and decreases in proportion to T^3 at low temperatures. This behavior suggests that the superconducting energy gap is anisotropic disappearing on lines at the Fermi surface. $1/T_1$ in U_6X ($X= Mn, Co$) has the coherent peak just below T_c , indicating that the superconducting energy gap of U_6X system is isotropic.

重いフェルミオン超伝導体の超伝導発生機構を理解するために、ウラン化合物超伝導体において、NMR, NQRの研究をおこない、ナイトシフトK, 核スピン格子緩和時間 T_1 ,及び磁気秩序状態での内部磁場を測定をした。それぞれの化合物についての結果を以下に示す。

(1) UPt_3 UPt_3 は0.5Kの超伝導転移温度, T_c , を持つ典型的な重い電子系超伝導体である。Ptの $1/T_1$ の温度変化を図1-1(常伝導状態), 図1-2(超伝導状態)に示す。10K以上ではUイオンが局在化し, $1/T_1$ は温度変化しない。また8K以下の低温では常伝導状態で $1/T_1$ はTに比例する。このことは低温で UPt_3 がフェルミ液体状態にあることを示している。中性子線回折の実験により5Kで反強磁性が発生すると報告されているが, $1/T_1$ にはスピン密度波(SDW), 反強磁性発生にともなう臨界発散等の異常は見られない。超伝導状態において, $1/T_1$ は T_c 直下で急激に減少し, 通常の超伝導体において観測される増大は見られない。 T_c 以下低温では, $1/T_1$ は指数関数ではなく T^3 に比例して減少する。このような振舞は, 超伝導エネルギーギャップが線で消える大きな異方性を持つためと解釈されている。ためしに $\Delta = \Delta_0 \cos\theta$ の形の超伝導エネルギーギャップを仮定し, $\Delta_0 = 5.4kT_c$ とすると実験結果とよく一致する。 T_c 直下で $1/T_1$ の増大が無いこと, 及び低温で T^3 に比例することは, 他の重い電子系超伝導体 $CeCu_2Si_2$, UBe_{13} でも同様に成り立っている。Ptのナイトシフトは常伝導状態で負の大きな値(0~-10%)を持っている。K- α プロットによって, 低温のシフトの大部分は伝導電子のスピン帯磁率により誘起されていることが分かる。超伝導状態では図2に示すようにシフトはほとんど減少していない。 UPt_3 のナイトシフトは通常のスピン一重項超伝導体における振舞を持たず, このことは, UPt_3 がスピン三重項超伝導体もしくはスピン一重項超伝導体なら不純物等により大きなスピン軌道散乱を受けていることを意味している。

(2) URu_2Si_2 URu_2Si_2 の $1/T_1$ の温度変化(図3)から, 60K以上では系が局在化しているが, 60K以下ではフェルミ液体になっていること($1/T_1 \propto T$), また18KでSDWが発生しフェルミ面上の状態密度が T_N 以上の値の30%に減少していることが分かる。 URu_2Si_2 においても超伝導状態で T_c 直下の $1/T_1$ の増大が見られない。

(3) U_6X U_6X ($X=Mn$ and Co)における $1/T_1$ の温度変化を図4に示す。 $1/T_1$ は常伝導状態でTに比例し, 系が高温までフェルミ液体にあることが分かる。また超伝導状態において通常の超伝導体で観測される T_c 直下の $1/T_1$ の増大が存在し, U_6X 系の超伝導が通常のS波超伝導であることを示している。

キーワード NMR NQR T_1 ナイトシフト 重い電子系超伝導体 U化合物

こほり よう

こほら たかお

小堀洋

小原孝夫

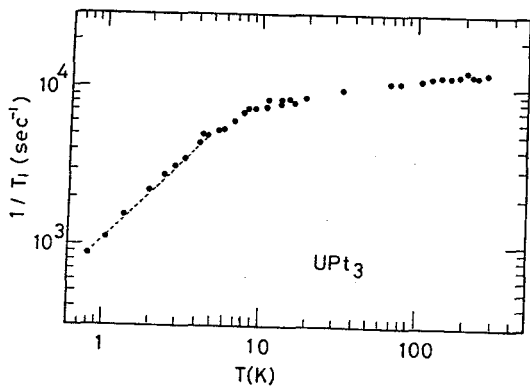


Figure 1-1

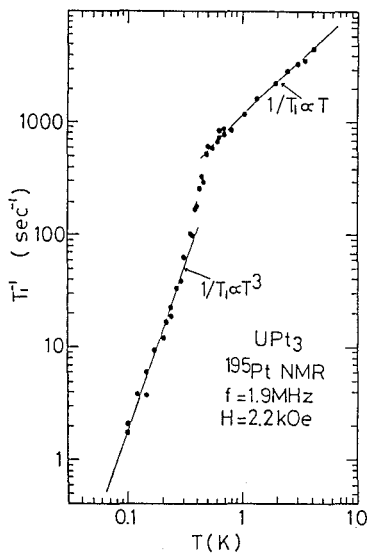


Figure 1-2

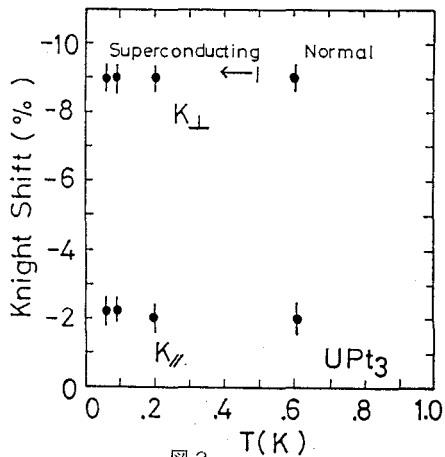


Figure 2

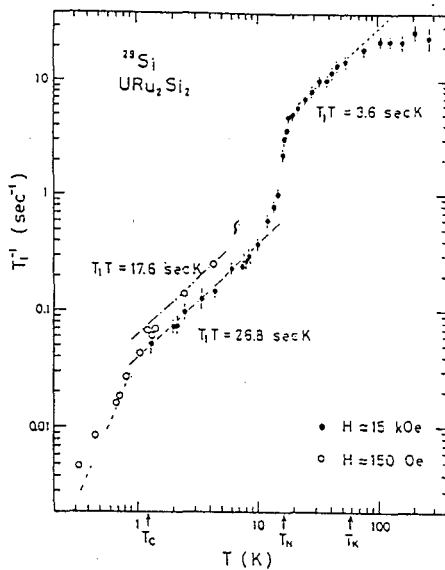


Figure 3

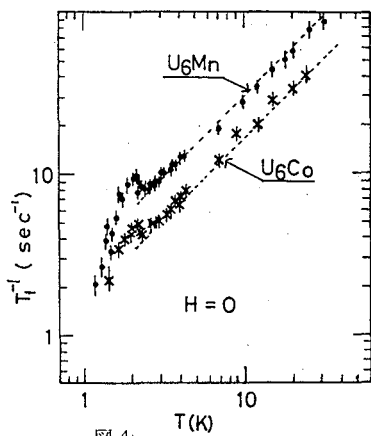


Figure 4

農工大工 ○朝倉哲郎・出村誠・萩原健一・田村亨

シェフィールド大 Michael.P.Williamson

¹H NMR Chemical Shift Calculation of Proteins;

Tetsuo Asakura, Makoto Demura, Kenichi Hagiwara, Toru Tamura (Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology), and Michael.P.Williamson (University of Sheffield, UK)

We describe ¹H chemical shift calculation of proteins on the basis of the concept of atomic anisotropies developed by Pople, rather than bond anisotropies. The ¹⁵N and ¹³C chemical shift tensors of amide groups reported by solid-state NMR are used for the chemical shift calculation. The magnetic anisotropies and orientations for nitrogen and carbon atoms of the amide group obtained experimentally from solid state NMR are highly consistent. The magnetic susceptibility of the oxygen atom of amide groups was determined from the observed CαH proton chemical shifts of eight proteins. This is a unique method to determine the magnetic susceptibility and therefore the chemical shift tensor of the oxygen atom. By adding the magnetic anisotropies of nitrogen and carbon atoms of the amide group to that of the oxygen atom, the magnetic anisotropy effect of the amide group on ¹H chemical shifts of proteins can be obtained.

緒言 既に我々はX線回折法によって決定されたタンパク質の原子座標から、その¹H NMR化学シフトを環電流効果、電場効果、磁気異方性効果の和として評価し、実測と比較して良好な一致を得てきた¹⁻⁵。このような化学シフト計算法を確立すれば、タンパク質の新たな帰属や溶液構造と結晶構造の局所的な違い、タンパク質の機能と関連した構造変化などの新たな知見を得ることができ、タンパク質の構造解析の有力な方法として位置づけることができる。

最近、磁気異方性効果の計算にあたって必要なアミド結合の¹⁵Nと¹³C化学シフトテンソル値と、分子軸-テンソル間の角度が固体NMRにより実験的に得られるようになってきた。そこで本研究では、化学シフトテンソルから¹⁵Nならびに¹³C原子の磁化率を決定するとともに、タンパク質の¹H化学シフトの実験データから、従来報告例のないアミド結合の酸素原子の磁化率を求めることを試みた。

計算 8個のタンパク質について、あわせて665個のCαHプロトンの化学シフトは、環電流効果(σ^{ring})、磁気異方性効果(σ^{ani})、電場効果(σ^{E})の和として計算した¹⁻⁵。タンパク質またはポリペプチドについて報告されてきたアミド結合の固体¹⁵Nおよび¹³C化学シフトテンソルの実測値を各々平均した後、それをPopleの理論に従うと仮定して、最終的に磁化率に変換した^{6,7}。

¹H NMR化学シフト、タンパク質、磁気異方性、酸素原子の磁化率

あさくらてつお、でむらまこと、はぎわらけんいち、たむらとおる、M.P.ウィリアムソン

その際、化学シフトテンソルと分子軸間の角度は、同様に固体NMRの報告例に従って決定した。なお、酸素原子の化学シフトテンソル値およびテンソルと分子軸間の角度については報告例がないので、その角度は、磁化率の主軸の一方向をC=O結合方向に一致させた場合(Fig.1)とO原子の非共有電子対方向を考慮した場合の2つを仮定した。タンパク質のC^αHプロトン化学シフトの実測値を用いて、酸素原子の磁化率のみをパラメータとした化学シフトの最適化を行ない、最終的にその値を決定した。

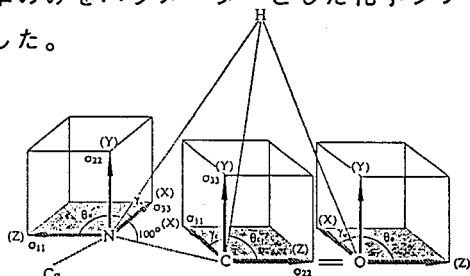


Fig.1 Definition of direction of the ¹⁵N ¹³C and ¹⁷O chemical shift tensors with respect to the molecular reference frame.

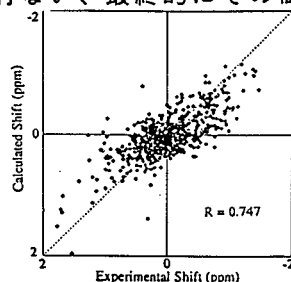


Fig. 2 Correlation between experimental and calculated shift for 665 C^αH protons.

結果と考察 ¹⁵Nおよび¹³C固体NMR測定から決定された化学シフトテンソル(家蚕絹フィブロイン、グラミシジンA、ジペプチドおよびポリペプチド)の平均値は、それぞれ、 $\Delta\sigma_1^N(\sigma_{11}-\sigma_{22}) = 22.2 \pm 6.5$, $\Delta\sigma_2^N(\sigma_{33}-\sigma_{22}) = -142.5 \pm 5.0$, $\Delta\sigma_1^C(\sigma_{22}-\sigma_{33}) = 74.0 \pm 9.9$, $\Delta\sigma_2^C(\sigma_{11}-\sigma_{33}) = 151.1 \pm 2.9$ (ppm)であった。Popleの理論式を用いて¹⁵Nおよび¹³Cの磁化率はそれぞれ $\Delta\chi_1^N = -1$, $\Delta\chi_2^N = 4$, $\Delta\chi_1^C = -3$, $\Delta\chi_2^C = 6(\times 10^{-30} \text{ cm}^3)$ と決定された。

C^αHプロトン化学シフト計算において、酸素原子の化学シフトテンソルの主軸の一方向をC=O結合方向とした場合、8つのタンパク質(665のC^αHプロトン)のプロトン化学シフトの最適化から、酸素原子磁化率は $\Delta\chi_1^O(\chi_{ZZ}-\chi_{YY}) = 22$, $\Delta\chi_2^O(\chi_{XX}-\chi_{YY}) = 21 (\times 10^{-30} \text{ cm}^3)$ と決定された。相関係数は0.747、標準偏差は0.33 ppmであった(Fig.2)。なお、非共有電子対の方向を考慮して磁化率の主軸を設定した場合、その相関係数はより低い値であった。このようにして求めたアミド結合の各原子の磁化率を用いて内部回転角(ϕ , ψ)の関数として計算されたN-acetyl-L-alaninemethyl amideのC^αHプロトン化学シフトは、従来報告されてきた化学シフトの出現傾向(α -ヘリックス構造のC^αHプロトン化学シフトは β シート構造より高磁場に出現)と一致していた。

なお、本研究を進めるにあたり、種々御教唆いただきました東工大工 安藤勲教授に感謝致します。

参考文献

1. T.Asakura, E.Nakamura, H.Asakawa, and M.Demura, *J.Magn.Reson.*, **93**, 355(1991).
2. M.P.Williamson and T.Asakura, *J.Magn.Res.*, **94**, 557(1991)
3. M.P.Williamson, T.Asakura, E.Nakamura and M.Demura, *J.Biomolecular NMR*, **2**, 83(1992).
4. M.P.Williamson and T.Asakura, *FEBS Lett.*, **302**, 185(1992).
5. M.P.Williamson and T.Asakura, *J.Magn.Reson.*, in press.
6. T.Asakura, Y.Niizawa and M.P.Williamson, *J.Magn.Res.*, **98**, 646(1992).
7. I.Ando, A.Nishioka and M.Kondo, *Bull.Chem.Soc., Jpn.*, **47**, 1097(1974).

P 54 がん原遺伝子産物 Myb DNA結合領域の異種核NMRによる構造解析

(横浜市大・総合理¹、阪大・蛋白研²、蛋工研³、理研・ライフサイエンス⁴) ○緒方一博^{1,4}、鉛谷裕子¹、相本三郎²、中村春木³、皿井明倫⁴、石井俊輔⁴、西村善文¹

Structural analysis of a DNA-binding region of c-Myb protooncogene product by heteronuclear multi-dimensional NMR.

Kazuhiro Ogata^{1,4}, Yuko Ametani¹, Saburo Aimoto², Haruki Nakamura³, Akinori Sarai⁴, Shunsuke 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)

c-Myb is a transcriptional regulator with sequence-specific DNA-binding activity. The DNA-binding region of c-Myb consists of three imperfect repeats, R1, R2 and R3, among which R2 and R3 are essential for DNA binding and R3 is critical for specific recognition of DNA, while R1 supports or regulates the protein-DNA interaction. Recently, we determined the solution structure of R3 by ¹H-NMR, including a helix-turn-helix-related motif¹. In this study, using ¹H, ¹⁵N-2D and 3D NMR, we analysed the overall DNA-binding region, R23 and R123, and revealed that R1 and R2 also consist of three helices as R3, but R2 is less stable. The values of T₂ relaxation time on amide ¹⁵N of backbone and indole ¹⁵N of tryptophan residues are R3 > R1 > R2.

〔はじめに〕 c-*myb*は主に幼若血液細胞で発現されるがん原遺伝子で、これに対応するウイルス由来の v-*myb*はトリに骨髓芽球性（赤芽球性）白血病を発症させる。c-*myb*産物（c-Myb）は分子量約7万、N端側にDNA結合領域、C端側に転写調節領域を有し、細胞の増殖、分化制御に関与している。c-MybのDNA結合領域は52アミノ酸残基よりなる3つのリピート（N端側よりR1, R2, R3と名付ける）で構成され、それぞれのリピート内にはトリプトファン残基が一定の間隔で存在している。DNAとの結合にはR23領域が必須で、R3はDNAの配列特異的認識に関与すると考えられ、R2の結合が特異的か非特異的かは現在までのところ不明である。R1はR23とDNAとの結合を補強、あるいは調節している可能性が考えられている。R3単独の立体構造は既に決定し、R3に

がん原遺伝子産物、c-Myb、DNA結合タンパク質、DNA結合領域、異種核NMR、動的構造

おがた かずひろ、あめたに ゆうこ、あいもと さぶろう、なかむら はるき、
さらい あきのり、いしい しゅんすけ、にしむら よしふみ

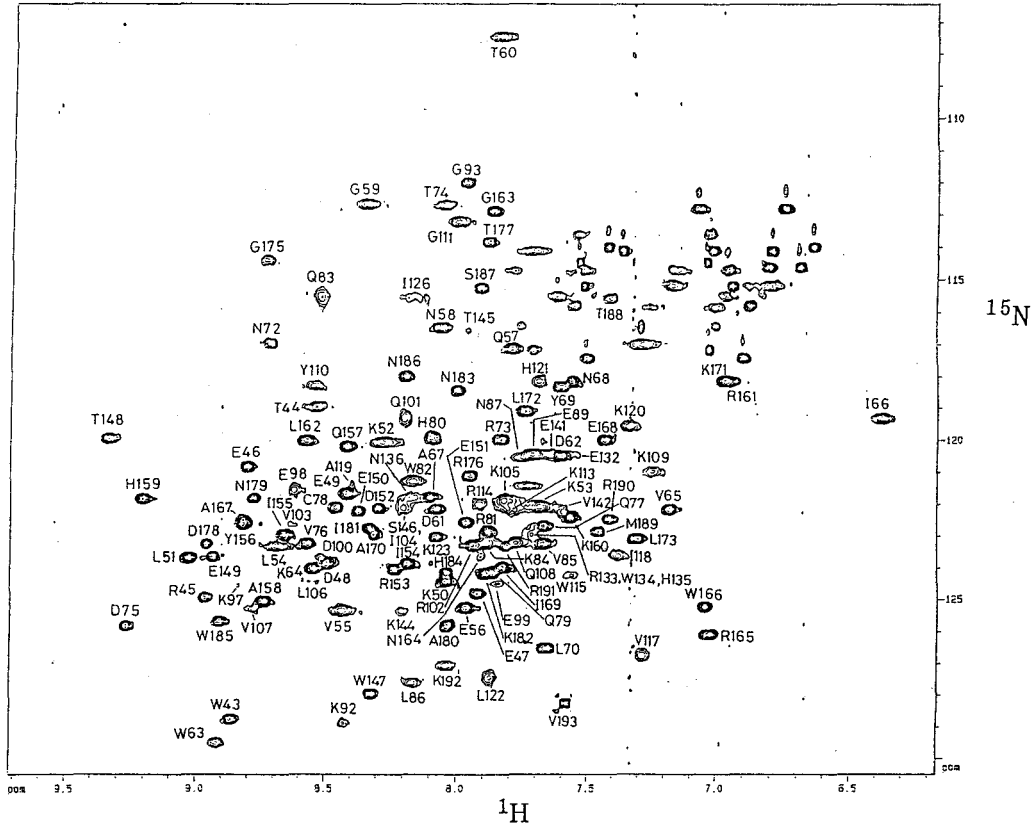


図1 ^{15}N -R123のHSQCスペクトル (300K)

は3つのヘリックスが存在すること、第2から第3ヘリックスにかけての部分はヘリックス・ターン・ヘリックス類似の構造をとり、第3ヘリックス内の残基がDNAを特異的に認識すると考えられること、3つのトリプトファン残基はヒスチジンや他の疎水性残基とともに疎水性コアを形成していること等が明らかになった¹。今回我々は ^{15}N で均一ラベルしたR23及びR123について多次元NMRにより全DNA結合領域の二次構造を明らかにし、各リピート間の安定性の差についても検討したので報告する。

[実験] R23及びR123タンパク質の大腸菌大量発現系をT7プロモーター支配下のR23、R123をコードする遺伝子をもつプラスミドをBL21細胞に導入することにより作成した。R23、R123の精製はPセルロース、ゲルろ過、CMセルロースにより行なった。2mMの ^{15}N -R23及びR123についてpH6.8、300Kと290KでHSQC、3次元NOESY-HMQC、TOCSY-HMQC、HMQC-NOESY-HMQCの各スペクトルを測定した。ペプチド骨格及びトリプトファン残基のインドール環における ^{15}N の T_2 緩和時間の測定には ^{15}N 核上でのCPMGを含む ^1H - ^{15}N 2次元展開スペクトルを用いた。また骨格アミドプロトンやインドールイミノプロトンの溶媒プロトンとの交換速度を見積るため、jump and returnパルスを用いたHMQCやspin lock purgeパルスを用いたHSQCにpresaturationを加えることによるシグナルの強度変化を調べた。

[結果・考察] HSQC上で、R2由来のシグナルは300KではS/Nが悪いため、290KでのR23のスペクトルを基に帰属を行ない、R1とR3領域の帰属には300KでのR123、R23のスペクトルを用いた。その結果、R23領域では全ての残基を、R1領域においても大部分の残基をHSQC上で帰属することができた(図1)。これを基にNOESY-HMQCとHMQC-NOESY-HMQCによりR123の二次構造を調べた(図2)。これによるとR1領域にはR3と同様3つのヘリックスが存在し、それぞれの位置も第3ヘリックスがTrpよりC端側でやや不安定である他はほぼ対応していた。R2領域は第1から第2ヘリックスにかけてはR1、R3にほぼ対応していたが、全体に線幅が広く、とくに第2ヘリックスN端側のTrp周辺で著しかった。

また第2ヘリックスよりC端側はターンというよりはループで、続いてR123中で最も不安定で短い第3ヘリックスの後、第3ループが存在していた。このように各リピート間でシグナルの線幅の差異が見られたため、 ^{15}N 核の T_2 緩和時間の分布を調べた(図3)。その結果、緩和時間はリピート単位で明らかに異なっており、 $R3 > R1 > R2$ の順で短縮していた。図3には300Kでのデータが示してあり、この温度ではR2領域のシグナルはS/Nが悪く、一部の残基についてのみ測定が可能であった。290KでのデータではR2領域の第3ヘリックス周辺が最も短い T_2 値を示した。HMQC、HSQCシグナルへのpresaturationの影響を290Kと300Kとで調べたところ、R3ではヘリックス領域ではプロトンの交換が遅くなっているのに対し、R2ではヘリックス領域でもその両端においてプロトン交換が比較的速く、ヘリックスの水素結合による安定化の程度が小さいことが考えられた。また疎水性コアの安定性では、R3ではTrpとHisを中心としたコアはイミダゾール環の荷電状

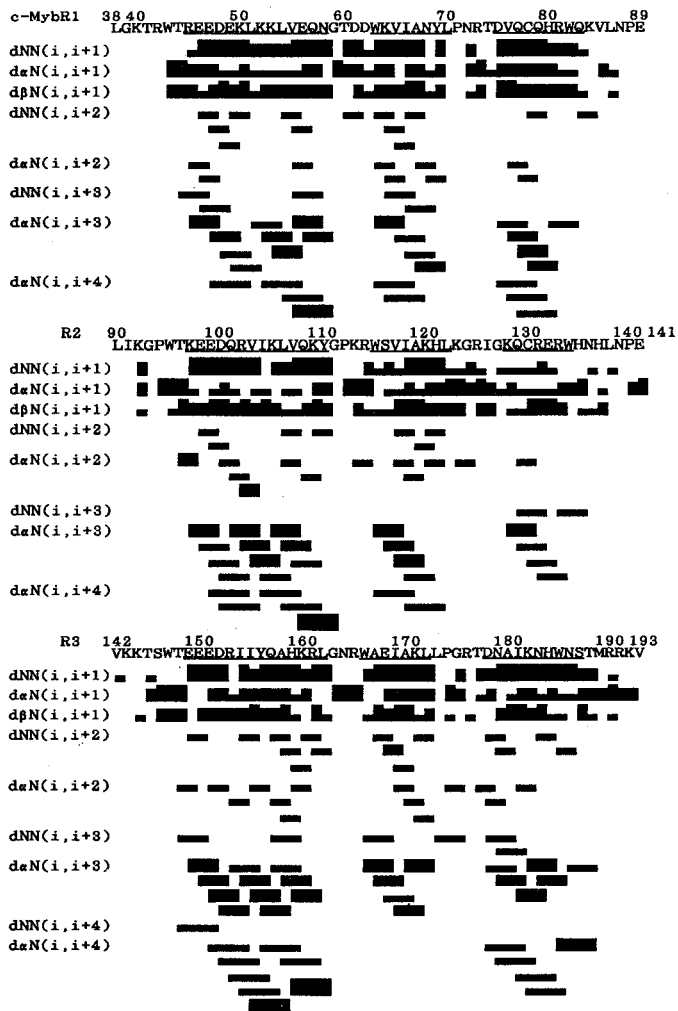


図2 R123領域の近残基間NOEのまとめ

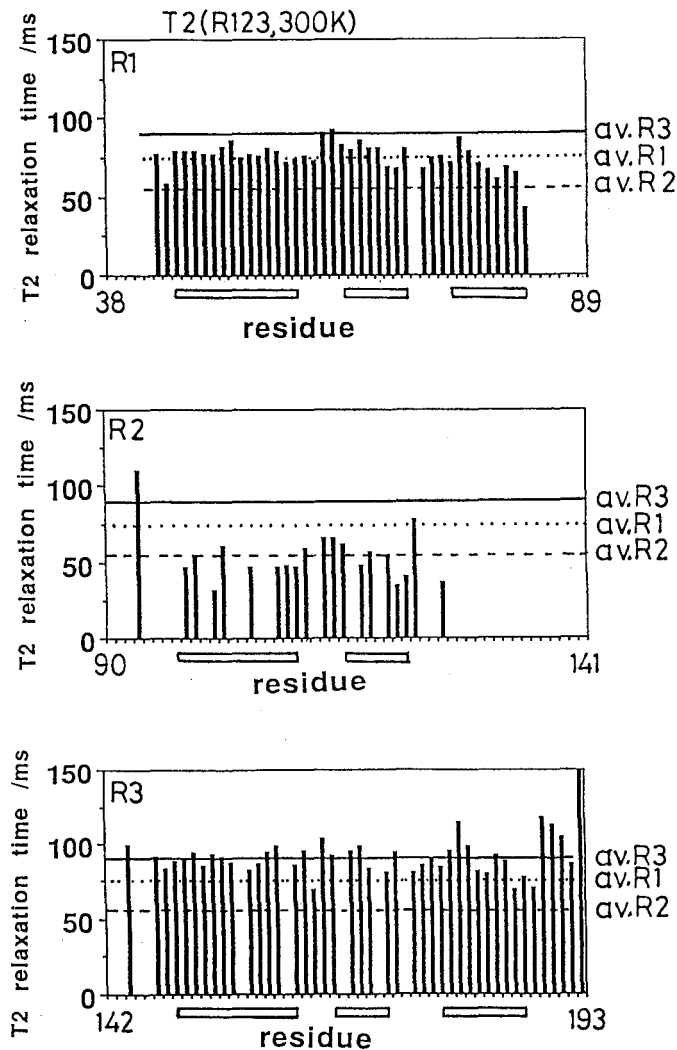


図3 ^{15}N -R123における骨格アミド ^{15}N 核の T_2 緩和時間

態によらず安定であるのに対し、R2では第2ヘリックス中のHisのプロトン化に伴う高次構造の不安定化が見られた。以上の様に各リピート単位はその安定性において異なり、R3が最も安定であるのに対しR2は不安定で特に第3ヘリックス周辺が最も揺らいでいると考えられた。なおR3単独の構造はR23、R123中でもほぼ保存されていることも確かめられた。現在R1単独の立体構造（R123中でも保存されている）も解析中である。

文献

- (1) Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6428, 1992.

武田薬品工業(株)筑波研究所

○井ノ岡 博、遠藤聡史、北田千恵子、水田栄治

Conformational study of PACAP27 and VIP in SDS micelles

Hiroshi Inooka, Satoshi Endo, Chieko Kitada, Eiji Mizuta

Tsukuba Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.

The conformations of PACAP27 and VIP in SDS micelles were determined by ^1H NMR and distance geometry. Both PACAP27 and VIP form α helix in residues 17-26 although these do not have so defined conformations as the whole molecules. The conformational difference between these peptides is found in two regions; one is the region in residues 5-8 where PACAP27 forms α helix but VIP falls into conformational disorder, and the other is the region in residues 12-15 where PACAP27 falls into disorder but VIP forms a helical structure. The PACAP molecule was found to be located near the micelle surface through the interaction with SDS throughout the molecule except N-terminal residues by the analyses of NOE and reduction in signal intensity by pre-irradiation of SDS proton signals.

[序]

PACAP27は宮田らによって羊視床下部より見いだされた新規生理活性ペプチドで、消化管弛緩作用を持つVIPと一次構造上68%の相同性を持つ^{1,2}(図1)。これらのペプチドはアデニル酸シクラーゼ活性化作用を持つが、視床下部では、PACAP27の方がVIPより1,000倍以上強力である。今までに、PACAP選択的な受容体とPACAP・VIPを同程度結合させる受容体が同定されているが³、このように相同性の高いペプチドのどの部分のどのような立体構造をそれぞれの受容体が認識しているのかに関心がある。ジスルフィド結合等の分子内架橋を持たないこれらのペプチドは、水溶液中ではほとんど定まった立体構造を形成せず、メタノール-水のような両親媒的な溶液やミセル中でヘリックスに富む構造を形成することを調べ^{4,5}、25%メタノール中での立体構造を報告した⁵。ペプチドが受容体に相互作用するまでの過程で、まず生体膜中にペプチドが入り、受容体との結合に適した立体構造に変化し、生体膜中の拡散により受容体に接近し相互作用するモデルが近年提唱されている。この考えに基づき、相互作用状態により近い生体膜類似のSDSミセル中でのPACAP27とVIPの立体構造を調べることにした。さらにペプチドとSDSミセルとの結合様式及び結合部位について検討した。

keyword: SDS, PACAP27, VIP, ^1H NMR, distance geometry

いのおかひろし、えんどうさとし、きただちえこ、みずたえいじ

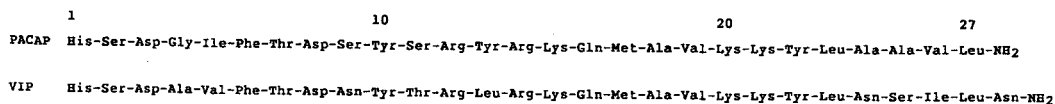


図1 PACAP27とVIPの1次構造

[方法]

(1) 試料調製

PACAP27は固相法により合成し、HPLCにより分離精製した。VIPは、ペプチド研究所から購入し、混入している酢酸を酸性条件で溶媒をevapolateする事により取り除いて用いた。両ペプチドとも試料のコンデションを一致させ、約2mM/150~170mM SDSミセル、20及び30℃、pH6.2~6.8の条件で軽水及び重水中においてNMR測定を行なった(ミセル中では中性条件でもアミドプロトンの交換速度が比較的遅い)。

(2) 立体構造解析のためのNMR測定

測定はBrukerAM500分光器を用いて行なった。各種2次元NMRスペクトル(DQF-COSY, HOHAHA, NOESY(τ_m=60, 120, 180ms))を測定し、連鎖帰属法によりプロトン信号の帰属を行なった。ミセルとの相互作用のため相関時間の増大に伴い線巾が広がり、高分解能(512w×8k)で測定したDQF-COSYスペクトル(F1方向2kにzero filling)でも結合定数J_{Nα}を求めることが不可能であったので、J-deconvolution処理を行い評価した。βメチレンプロトンの立体特異的帰属に必要なJ_{αβ}, J_{αβ'}は、高分解能E-COSYスペクトル(1k×4k、F1方向4kにzero filling)のRowスライス64kにzero fillingして見積もった。

(3) ディスタンスジオメトリー計算

NMR解析から得られたNOEと結合定数による距離情報を入力して、ディスタンスジオメトリープログラムDADASにより、それぞれ70個のランダムな初期構造より、立体構造計算を行ない、最もバイオリーションの小さな7個の構造を取り出し評価した。

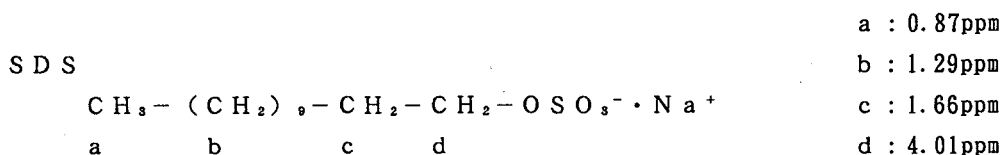
(4) ペプチド-ミセル間の相互作用部位の特定

ミセルとの相互作用部位の特定とミセル中のペプチドの相対配置を調べるために、軽SDSミセル:重SDSミセル=1:1の試料(軽S)と重SDSミセル試料(重S)

(各170mM SDS, 1mMペプチド)を準備し、以下の実験を行なった(ダイナミックレンジの問題で100%軽SDSミセルを用いなかった。現時点ではPACAP27のみ実行)。

①軽Sと重S試料のNOESYの測定により、直接軽SDSミセルとペプチド間のNOEを評価する。重S試料はSDSプロトンとペプチドプロトン間のNOEとペプチドプロトン間のNOEを区別するために用いる。

②軽SDS信号位置(下記のa, b, c, d)を選択的照射(30L, 1秒)してNOESYを測定し、各残基毎のペプチドプロトン信号の減衰を、残基内α-βプロトン間の相関ピークの強度変化により半定量的に評価する。重S試料は、軽SDS信号選択的照射時に同時に照射されてしまうペプチドプロトンの信号強度の基準として用いる。



[結果及び考察]

(1) PACAP 27 (P) とVIP (V)
の立体構造の特徴及び差異

図2に30°CでのPのNOESYスペクトルのNH- α H領域を帰属と共に示す。SDSミセルとの相互作用による分子量増大により線巾の広いピークを与えるため、信号強度は体積で評価し、オーバーラップした信号に関しては20°Cのデータや結合定数値を参考にした。得られたNOEの概略を図3に示す。結合定数の解析から得られた ϕ , χ^1 の情報をあわせ、P、Vに関して、それぞれ残基内97,100個、隣接残基間72,73個、非隣接残基間37,28個、計206,201個の距離情報を取り出した。

これらの情報をもとにDADAS計算を行ない、最終的にNMR情報を良く満たす7個ずつの立体構造を取り出した(距離情報に対するviolationの和は共に1.1Å)。P、Vとも分子全体の立体構造の収束は悪く、主鎖原子間のRMSDは共に4.9Åであったが、図4のように17-26位の領域ではどちらも α ヘリックスを形成し、立体構造は良く収束した(主鎖原子間のRMSDは共に0.2Å、両者間では0.8Å)。P、Vの立体構造の差異は以下の2箇所で見られる。5-8位でPが α ヘリックスを取るのに対し、Vは構造の乱れが大きく定まった構造を取らない。逆に12-15位では、Vがヘリックス様の構造を取るのに対し、Pは定まった構造を取らない。

Pは以前報告した25%メタノール中では20, 21位のLysの部位で立体構造が乱れ、12-19位と22-24位の2個のヘリックスが観察された。SDSミセル中ではこのLysが主要な α ヘリックスの中央部を占め、その他に5-8位でもヘリックスが認められるので、メタノール中とSDSミセル中では大きく構造が異なる。

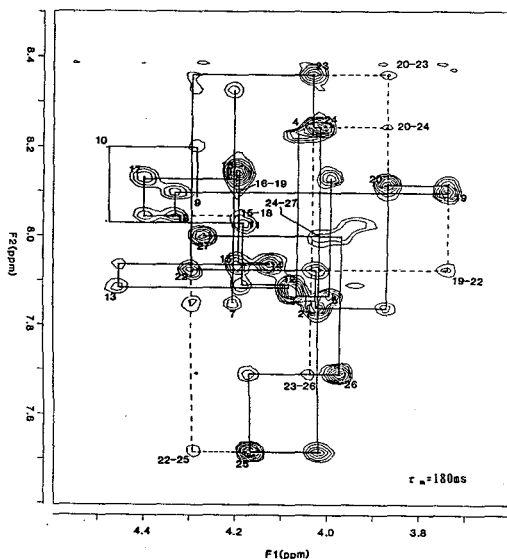


図2 SDSミセル中のPACAP 27のNH- α H領域のNOESYスペクトル

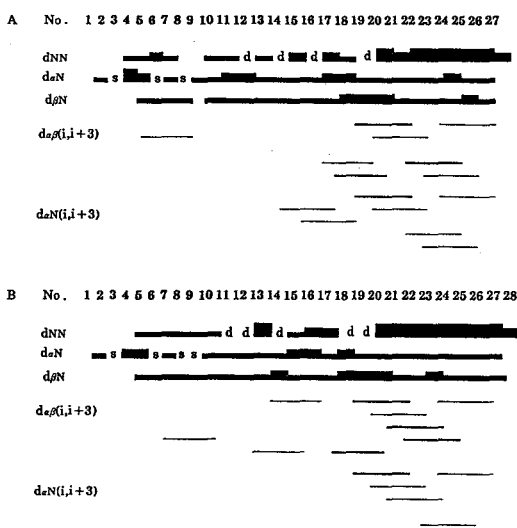


図3 SDSミセル中でのPACAP 27 (A)とVIP (B)のNOEパターン図

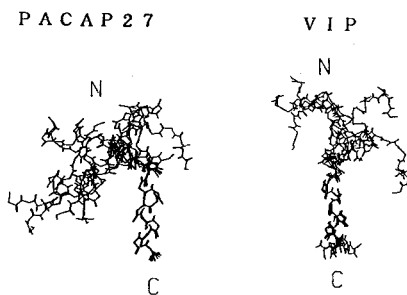


図4 SDSミセル中でのPACAP 27とVIPの立体構造(主鎖のみ表示)

Residue No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
a																											
b										○									◎				◎				◎
c						○	◎			○	○			◎	◎												
d						○	○					○					○					○					○*

表1 軽SDSミセル信号選択的照射時のPACAP27のプロトン信号の減衰
NOESYの残基内 α H- β Hクロスピーク強度が15%以上減衰したものを○、25%以上減衰したものを◎で示した。*は、 α H- γ Hの相関を示している。

(2) PACAP27 (P) と軽SDSミセル (軽S) の相互作用部位の特定

① 軽Sの b, c, dプロトンとPのプロトン間で以下のようなNOEが観察された。

- b : $^5\text{Ile } \delta \text{CH}_3$ 、 $^6\text{Phe}(2,6\text{H},3,5\text{H},4\text{H})$ 、 $^{10}\text{Tyr}(\alpha \text{H},\beta \text{H},2,6\text{H})$ 、 $^{17}\text{Met } \gamma \gamma' \text{H}$ 、 $^{22}\text{Tyr}(2,6\text{H},3,5\text{H})$ 、 $^{23}\text{Leu } \beta \text{H}$
c : $^{10}\text{Tyr}3,5\text{H}$ 、 $^{14}\text{Arg } \delta \delta' \text{H}$ 、 $^{21}\text{Lys } \epsilon \epsilon' \text{H}$
d : $^8\text{Asp } \beta \beta' \text{H}$ 、 $^{19}\text{Val } \beta \text{H}$ 、 $^{22}\text{Tyr } \beta \beta' \text{H}$

aとPのプロトン間にはNOEが観察されなかった。Pとb, c, dとのNOEは上記以外にも観察されたが、信号のオーバーラップのため同定することができなかった。

② 残基内の α - β プロトン間のNOE信号強度が、軽Sプロトン信号の選択的照射により減衰するかどうかを調べ、15%以上減衰したピークと照射位置を表1に示した。

①②より、Pは軽SとN末4残基を除くすべての部位で相互作用し、それはミセル表面に近い領域に限られることが判明した。5-8位の α ヘリックスは主に軽Sのc, dメチレンと近接し、相互作用はミセル表面に限定されるのに対し、17位以降の α ヘリックスでは19,23,26位の α β プロトンと軽Sのbメチレンが近接し、ややミセル内部と相互作用している(但し22,27位とdメチレンの相互作用から、ヘリックスの軸は、SDSミセル表面と平行な方向にある)。12,14,15,20,21位にあるLys, Argの α β プロトン及び側鎖先端のメチレンプロトンは、軽Sのcメチレンプロトンと強く相互作用しているので、側鎖正電荷とSDS硫酸基の負電荷の相互作用が示唆される。このようなPと軽Sの相互作用は、生体膜中の拡散を経てリセプターと接近するモデルでのペプチドと生体膜の相互作用に良く対応し、SDSミセルを膜類似体として用いることに妥当性が得られたと考えている。

[文献]

- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M. D. & Coy, D. H. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 567-574
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N. & Arimura, A. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 643-648
- Ohtaki, T., Watanabe, T., Ishibashi, Y., Kitada, C. Tsuda, M., Gottschall, P. E., Arimura, A. & Fujino, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 838-844
- Fry, D. C., Madison, V. S., Bolin, D. R., Greeley, D. N., Toome, V. & Wegrzynski, B. B. (1989) *Biochemistry* 28, 2399-2409
- Inooka, H., Endo, S., Kitada, C., Mizuta, E. & Fujino, M. (1992) *Int. J. Peptide Protein Res.* in press.

P 56 LINEAR PREDICTIONの多次元NMRへの応用

—展開時間の初期値、シグナル位相に対する依存性—

住友化学(株) 筑波研 岡田 明彦

An Approach to High-Resolution Multi-dimensional NMR using Linear Prediction Calculation

AKIHIKO OKADA

Tsukuba Research Laboratory, Sumitomo Chmical Co.,

Tsukuba, Ibaraki 300-32

Linear Prediction calculation based on singular value decomposition (LPSVD) was applied to the multi-dimensional NMR processing. LPSVD program with negative time elongation algorithm of G. Zhu *et al.* was made. Using computer-generated FIDs, I found that RMS difference between the true value and the LPSVD calculated value was almost linearly increased when the initial evolution time or the phase of the signal was deviated from the optimum value, but that there was no such dependency without negative time elongation.

[LINEAR PREDICTION] LINEAR PREDICTIONは、N個の測定データをもとに、K個の係数 a_k を計算し、次の式からFIDの延長を行う計算手法である。

$$x_n = \sum_{k=1}^K a_k x_{n-k}$$

LINEAR PREDICTIONの必要性は、多次元NMRによって高まった。なぜなら、高磁場NMRの現実的な積算時間の上限を考慮すれば、直接観測しない時間軸について十分な分解能を得るにはほど遠いからである。BaxらもFFTとLINEAR PREDICTIONとを組み合わせる用いることにより、解析に十分な分解能を持つ4次元スペクトルを得ている¹⁾。最近では、少ない測定ポイント数でより高い分解能を得るために、N個の測定データとその複素共役数とを用い、2N個のデータでLINEAR PREDICTIONを行う方法をG. Zhuらが報告している²⁾。本研究では、彼らの方法に従って作成したプログラムをもとに、LINEAR PREDICTIONの有効性を確かめるとともに、LINEAR PREDICTIONを用いるための実験条件の

[キーワード] LINEAR PREDICTION; 多次元NMR;

おかだ あきひこ

設定や、パルスシーケンスについて考察を行った。

【プログラムについて】まずsingular value decomposition (SVD)法を³⁾用いて得られた係数 a_k で次のような方程式

$$z^k - a_1 z^{k-1} - \dots - a_k = 0$$

を作り、その根 z を求めた。そして根に対して以下のような変換

$$z' = \begin{cases} z & (|z| \leq 1) \\ \frac{z}{|z|^2} & (|z| > 1) \end{cases}$$

を施し⁴⁾、得られた z' を根として持つような方程式の係数 a_k' を再構成し、これを LINEAR PREDICTION 係数とした。

言語はFORTRANを用い、SVD計算、複素係数の方程式の根の計算は、IMSL社のMATHライブラリを用いて行った。計算にはVAX8530およびVAXstation 4000を用いた。

【模擬データ】プログラムの特性を理解するために、次の式に従い計算機で発生させたノイズを持つ模擬FIDを用いてLINEAR PREDICTION計算を行った。

$$x_n = \sum_{m=1}^M A_m \exp(-2\pi i \nu_m [(n-1)\Delta t + t_{ini}] + \delta_m i) + 2A_{Noise} (\text{rand}[-\frac{1}{2}, \frac{1}{2}] + i \text{rand}[-\frac{1}{2}, \frac{1}{2}])$$

なお、 $\text{rand}(x, y)$ とは、区間 $[x, y)$ の擬一様乱数を示す。

シグナルは表1に示す10成分とした。データポイント数に関しては、(1)16複素ポイントを64複素ポイントに延長する場合(4次元NMRを想定)と、(2)32複素ポイントを128複素ポイントに延長する場合(3次元NMRを想定)を計算した。ノイズは(1) $R(=A_m/A_{Noise})=\infty$ 、(2) $R=10$ 、(3) $R=1$ の場合について計算した。 Δt は200 μ sに固定し、 t_r 、 δ_m を変化させた。ノイズは、ポイント数や t_r 、 δ_m を変えるごとに異なる系列で発生させている。

表1 模擬FIDの内容

ピーク	ν (Hz)	A
1	2300.0	10000.0
2	1800.0	10000.0
3	1300.0	10000.0
4	800.0	10000.0
5	300.0	10000.0
6	-200.0	10000.0
7	-700.0	10000.0
8	-1200.0	10000.0
9	-1700.0	10000.0
10	-2200.0	10000.0

また、FIDの真の値とLINEAR PREDICTION計算によって得られたFIDの値とのずれを示す指標として、RMSDを次のように定義した。

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N'-N} \sum_{n=N+1}^{N'} |x_n^{lp} - x_n^*|^2}$$

なお、 M はLINEAR PREDICTION前のポイント数、 N' はLINEAR PREDICTION後のポイント数、 x_n^{lp} はLINEAR PREDICTIONで得られたデータ、 x_n^* は真の値である。

【結果】1. 複素共役データの使用の有無による比較 まず $t_1 = \Delta t/2$ 、 $\delta_m = 0$ の理想的な場合と比較した。(1)データ数が16複素ポイントの場合は、複素共役データを用いない場合($K=6$)、ノイズの大きさに関わらずLINEAR PREDICTION係数が0に近くなり、zero-fillingしたときと同じような結果になった(図1)。しかし、複素共役データを用いた場合($K=14$)は、正しくLINEAR PREDICTION計算を行うことができた。

(2)データ数が32複素ポイントの場合、複素共役データを用いても用いなくてもLINEAR PREDICTION計算は正常に終了した(図2)。RMSDで比較すると、複素共役データを用いた方がわずかであるが真の値を良く再現した。

2. t_1 に対する依存性 複素共役データを使用した場合、ノイズのないときには、 t_1 が $\Delta t/2$ からずれるにしたがって、RMSDは直線的に増加した。 $R=10$ のときは、ノイズのためにRMSDが増減し、 $0.48\Delta t < t_1 < 0.52\Delta t$ の範囲では顕著な t_1 依存性は現れなかった(図3)。一方、複素共役データを使わない場合、 t_1 に対する依存性は認められなかった。

3. δ_m に対する依存性 複素共役データを用いたときは、 $\delta_m = 0$ からずれるにしたがって、2.同様直線的にRMSDが増加し(図4)、複素共役データを用いないときよりRMSDが小さいのは、位相のずれが $\pm 3^\circ$ 以内のときであった($R=10$)。

【考察】1. 複素共役データの有効性 計算結果から、複素共役データが有効なのは、

(1)測定データのポイント数に比べてピークの数が多いとき。

(2) $t_1 = \Delta t/2$ 、 $\delta_m = 0$ の条件が満たされているとき。

であった。特に δ_m には正確さが要求されることがわかった。TOCSYやROESYなど、スピン

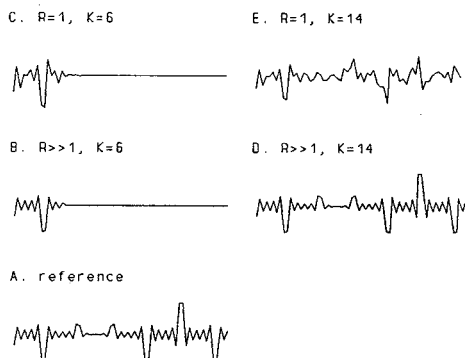


図1 LINEAR PREDICTIONの結果(データ数:16ポイント)

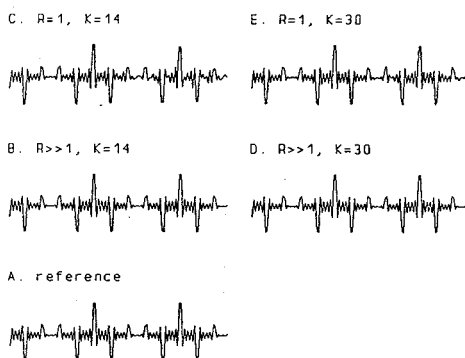


図2 LINEAR PREDICTIONの結果(データ数:32ポイント)

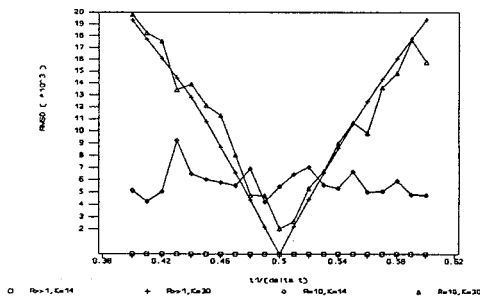


図3 LINEAR PREDICTIONの t_1 依存性(データ数:32)

ロック磁場の位相が通常の 90° パルスの位相とずれている場合は十分な微調整が必要である。 t_1 が理想値からずれる原因は、パルスをかけている時間(10 μ s程度)の見積り方だけであるから、 t_1 はLINEAR PREDICTION計算に影響を与えるほど理想値からずれることはないと考えられる。複素共役データは、測定データポイント数が少ないときはもちろん利用すべきであるが、測定データの数が十分多いときは $t_1 = \Delta t/2$ 、 $\delta_m = 0$ の条件が満たされているときのみ用いるべきである。

2. パルスシーケンスの工夫 複素共役データを用いたLINEAR PREDICTIONを利用するための条件として、

(1) シグナルに微細構造(ピーク分裂)がないこと(ピークの本数を減らすため)。

(2) ピークの位相が一致していること。

が今回の模擬実験でわかった。その他にも原理上、

(3) シグナルが減衰しないこと。

が必要である。これらの条件を満たすパルスシーケンスの一例として、展開(t_1)時間を一定としたHMQCシーケンスを考案した(図5)。この方法は、3次元、4次元シーケンスにも組み込むことが可能である。

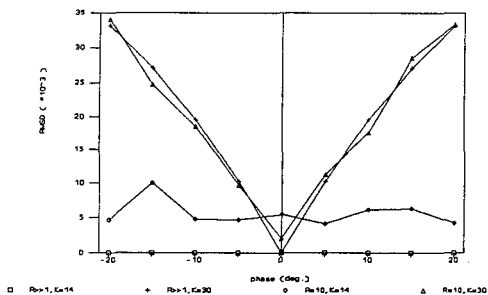


図4 LINEAR PREDICTIONのシグナル位相依存性

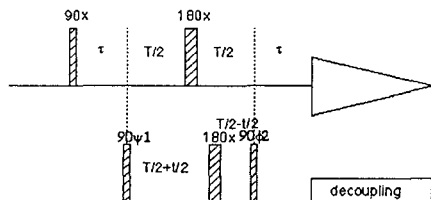


図5 LINEAR PREDICTIONを利用するHMQCシーケンス
Phase cycleは、 $\psi_1 = x, -x$; $\Phi_2 = 2(x), 2(x)$; Acq. = $x, -x, -x, x$ で、 f_1 方向は ψ_1 をインクリメントすることにより、States-TPPI法で取り込む。

1. L. E. Kay, et al. *J. Magn. Reson.* **91**, 422-428 (1991)
2. G. Zhu, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **90**, 405-410 (1990)
3. H. Barkhuijsen, et al. *J. Magn. Reson.* **61**, 465-481 (1985)
4. M. A. Delsuc, et al. *J. Magn. Reson.* **73**, 548-552 (1987)

(東北大理¹, 東北大分析セ², 日本電子³, サントリー生医研⁴)

○ 田中俊之¹, 平間正博¹, 上野昌子², 藤田憲一³, 今城精一⁴, 石黒正路⁴

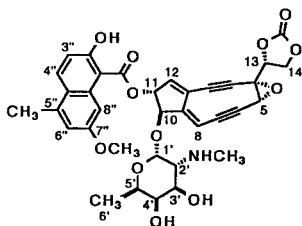
Three-dimensional Structure of Neocarzinostatin Complex

Toshiyuki Tanaka¹, Masahiro Hiram¹, Masako Ueno¹, Ken-ichi Fujita², Seiichi Imajo³, Masaji Ishiguro³

¹Faculty of Science, Tohoku University, ²Analytical Instruments Division, JEOL Ltd., ³Suntory Institute for Biomedical Research

The three-dimensional structure of NCS complex has been determined by the 2D-NMR analyses and the distance geometry calculations. Apo-NCS consists of three antiparallel β -sheet structural domains, i.e., the external three-strand β -sheet, the internal four-strand β -sheet, and the small two-strand β -sheet. The internal β -sheet forms the hydrophobic pocket (12 x 9 x 9 Å), in the bottom of which there is a vale formed by the main chains, Val34-Gly35-Gln36, Leu97-Gly96-Val95, and Gly107. The C5"-C7" site of the naphthoate dips in this vale, and the aminosugar and the carbonate group face outwards. Possible binding interactions between the substituents of NCS-chr and the side chains pointing up the pocket are the hydrogen-bonding between C7"-OMe and OH of Ser98, the H- π hydrogen-bonding between C2"-OH and Trp39 aromatic ring and/or the edge-to-face interaction between the aromatic rings, the CH- π interaction between C7"-OMe and aromatic ring of Phe52, and the salt-linking between methylamino group and carboxyl of Asp33. These interactions and the shape of the bottom of the pocket must play an important role in the specific and tight binding of NCS-chr to apo-NCS.

【序】ネオカルジノスタチンは、強力な複合体型の抗癌剤であり、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質(アポNCS)から構成されている(図1)。クロモフォアは単独では非常に不安定であり、容易に分解してしまう。アポNCSは、このクロモフォアを特異的にしかも強く結合して安定化し、キャリアーとしての機能を果たしている。アポNCS単独の構造解析は報告されているが¹⁾、クロモフォアの結合部位を含めた複合体の詳細な高次構造は明らかにされておらず、分子認識の観点からも解明が待たれていた。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²⁾。また、二次元NMR法とディスタンス・ジオメトリー計算を駆使した解析も続けている^{3,4)}。今回、この複合体の詳細な高次構造と、結合・安定化機構に関して得られた興味深い知見について報告する。



1

Ala- Ala- Pro- Thr- Ala- Thr- Val- Thr- Pro- Ser- Gly- Leu- Ser- Asp- Gly- Thr- Val- Val- Lys-	10	20
Val- Ala- Gly- Ala- Gly- Leu- Gln- Ala- Gly- Thr- Ala- Tyr- Asp- Val- Gly- Gln- Cys- Ala- Trp- Val-	30	40
Asp- Thr- Gly- Val- Leu- Ala- Cys- Asp- Pro- Ala- Asn- Phe- Ser- Ser- Val- Thr- Ala- Asp- Ala- Asn-	50	60
Gly- Ser- Ala- Ser- Thr- Ser- Leu- Thr- Val- Arg- Arg- Ser- Phe- Glu- Gly- Phe- Leu- Phe- Asp- Gly-	70	80
Thr- Arg- Trp- Gly- Thr- Val- Asn- Cys- Thr- Thr- Ala- Ala- Cys- Gln- Val- Gly- Leu- Ser- Asp- Ala-	90	100
Ala- Gly- Asp- Gly- Pro- Glu- Gly- Val- Ala- Ile- Ser- Phe- Asn	110	

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, 二次元NMR, ディスタンス・ジオメトリー計算, 分子認識

たなか としゆき, ひらま まさひろ, うえの まさこ, ふじた けんいち,
いまじょう せいいち, いしぐろ まさじ

【方法】

1. アポNCS部分の構造計算

二次元NMR解析によって得られた849個の距離情報と65個の二面角情報に、68個の水素結合(34組)、6個のジスルフィド結合(2組)の距離情報を併せて、DADAS90プログラム(MolSkop, JEOL社)を用いて計算した。

2. NCS複合体の構造計算

DADAS90計算で得られた最良の構造を鋳型とし、前述の距離情報の他に、クロモフォア内の24個および分子間(クロモフォア-アポNCS間)の61個の距離情報を考慮して、複合体全体の計算(DGEOMプログラム, Dupont社)を行った。

【結果と考察】

1. アポNCS部分の構造

ランダムに発生させた初期構造から計算を行ったところ、全重原子のRMSD値が1.0Å以内と良い収束構造が得られた。距離侵害値およびファンデアワールス侵害値はそれぞれ0.5Å、0.3Åを越えなかった。

NCS複合体中のアポタンパク部分は、主に3つの逆平行型βシート構造から構成されている。このうち2枚のβシートがβバレル構造をとっており、12×9×9Åの大きさの非常に疎水性の高いポケットを内側に有したゆりかご状となっている。そのフォールディングと形状は、類似タンパク質のアクチノキサンチンやオーロモイシンと非常に良く似ており、これら複合体型抗癌剤の基本構造と考えられる。そして、ポケットの底には一段と深い主鎖が露出した溝が、βシートの一部: Val34-Gly35-Gln36, Leu97-Gly96-Val95およびGly107によって形作られ、Trp39, Leu45, Phe78, Phe5,2からなる疎水性の壁とAsp33, Ser98からなる親水性の壁が存在している。

2. NCS複合体の構造

得られた最良の構造を図2-図4に示す。クロモフォアは、その疎水部であるナフトエートをアポNCSの疎水性ポケットの底に、親水部であるアミノ糖とカルボ

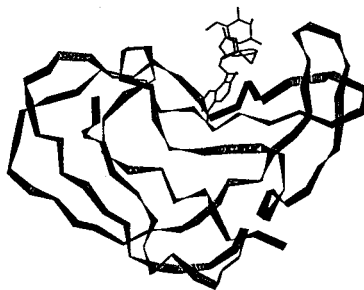


図2. NCS複合体の立体構造
(アポタンパク部分はリボンで示す)

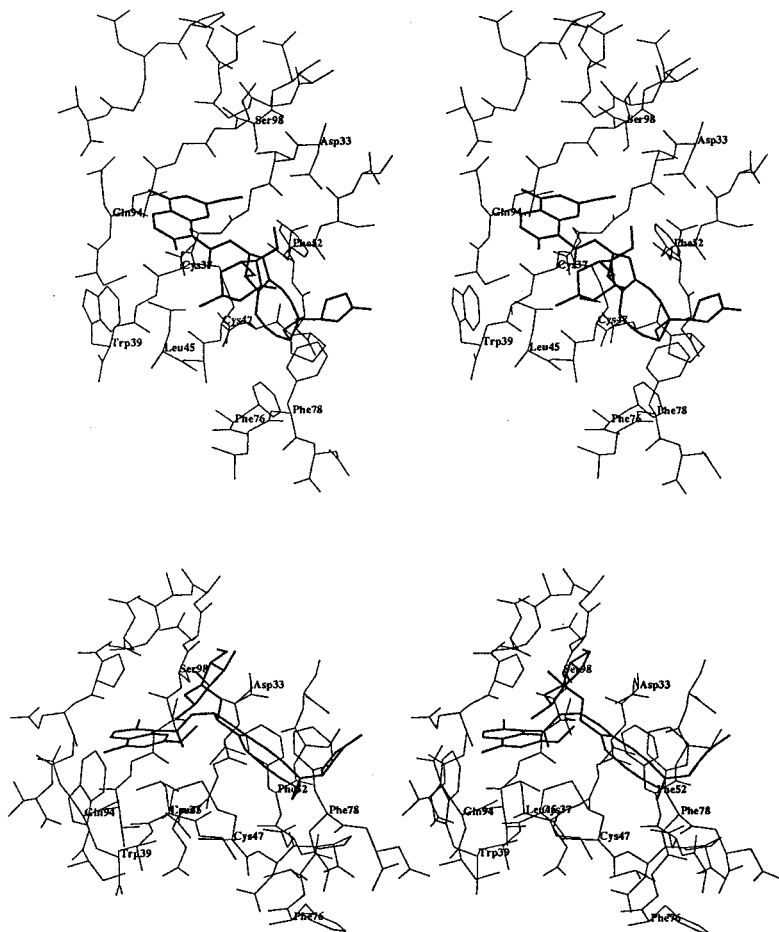


図 3. NCS 複合体中のクロモフォア結合構造
 (アポタンパク部分は、クロモフォアより5 Å以内の残基のみを示す)

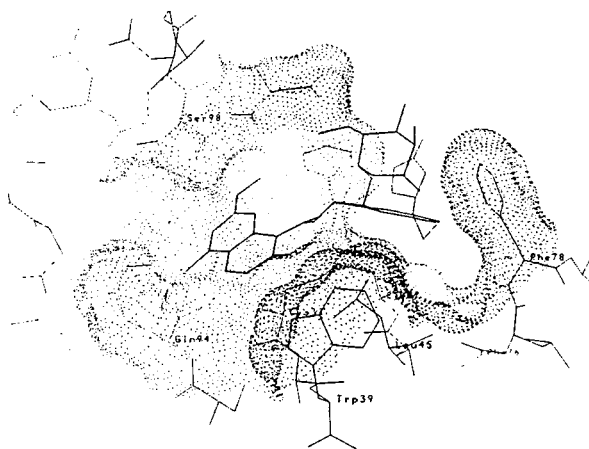


図 4. NCS 複合体中のクロモフォア結合構造
 (アポタンパク部分は分子表面も示す)

ネットを上にして結合しており、ナフトエートが両者の強固な結合に重要な役割を果たしていることが推定された(図3, 4)。

さらに細かに見ると、ナフトエートは、C5"-C7"側を前述のGly35, 96, 107からなる溝に差し込む形で結合している。そして、C7"-OMe基とSer98側鎖のOH間(約2.9Å)には水素結合が可能である。また、C5"-MeはGln94のβメチレンに囲まれ、C2"-OHとC3"-HとはTrp39側鎖芳香環と近いので(それぞれ約4.8Å, 5.0Å)、ナフトールOHとのH-π水素結合または芳香環同士のedge-to-face相互作用(CH-π)が可能である。さらに、複合体中のOMe基の化学シフトは2.75ppmであり、溶液中の3.76ppm(重メタノール/重水=2/1中)と比較すると著しく高磁場にシフトしている。これは、近傍のPhe52による磁気異方性シフトと考えられ、OMe基とPhe52芳香環との間にCH-π相互作用が働いていると考えられる。これらクロモフォアとの相互作用に寄与しているアポNC S側の残基(Trp39, Phe52, Ser98)は、類似タンパク質のアクチノキサンチンやオーロモマイシンでは保存されておらず、これら残基との相互作用が、NC SクロモフォアがアポNC Sに特異的に結合するのに必要な因子と考えられる。また、ナフトエートが結合している溝を形成する[Gly36, Gly96, Gly107]は、アクチノキサンチンとオーロモマイシンではそれぞれ[Ala, Gly, His], [Gly, Gly, Ala]と一部が側鎖を有するアミノ酸残基となっており、ポケットの底の形状も特異的相互作用に寄与していると考えられる。

3. クロモフォア安定化機構

クロモフォアは、12位に求核剤の付加を受けてエポキシドが閉環し、一連の連鎖反応(→エンインクムレン→炭素ピラジカル発生→水素引き抜き)を起こして分解する。したがって、これを防ぐには12位とエポキシドを保護すれば良い。図3からわかるように、12位は自身のアミノ糖のメチルアミノ基(アンモニウム塩として存在)とアミノ酸側鎖(Ser98, Asp33, Phe52等)によって遮蔽されている。また、エポキシドはポケットの底を向いており、酸触媒の攻撃から保護されている。アポNC Sとの結合によりクロモフォアの活性部位がうまく保護される仕組みが明らかである。また、類似タンパク質でも保存されているジスルフィド結合(Cys37-Cys47)は、コアのアセチレン結合とファンデアワールス接触の距離に位置し、両者間に何らかの安定化相互作用が寄与している可能性もある。

参考文献

- 1) X.Gao, W.Burkhart, *Biochemistry*, 30, 7730 (1991); X.Gao, *J. Mol. Biol.*, 225, 125 (1992).
- 2) M.Ishiguro, S.Imajo, M.Hirama, *J. Med. Chem.*, 34, 2366 (1991).
- 3) T.Tanaka, M.Hirama, M.Ueno, S.Imajo, M.Ishiguro, M.Mizugaki, K.Edo, H.Komatsu, *Tetrahedron Lett.*, 32, 3175 (1991).
- 4) 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, 第30回NMR討論会講演要旨集, 209 (1991).
- 5) Actinoxanthin: V.Z.Plemev, A.P.Kuzin, S.D.Trakhanov, P.V.Kostetsky, *Biopolymers*, 21, 287 (1982); Auromomycin: P.V.Roey, T.A.Beerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6587 (1989).

(東薬大, 京都薬大¹, 名大. 農², 中外製薬³) 家田了一, 胡桃坂仁志,
 ○神藤平三郎, 佐久間千勢子, 今本文男¹, 五島直樹¹, 水野 猛²,
 久保庭 均³.

NMR Spectral Assignments and Structural Analysis of Histone-like Proteins, H-NS and HU from *E. coli*, (Tokyo College of Pharmacy, Kyoto Pharmaceutical University, Nagoya University and Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.), R. Ieda, H. Kurumizaka, H. Shindo, C. Sakuma, F. Imamoto, N. Goshima, T. Mizuno and H. Kuboniwa.

[Abstract] Partial secondary structures of H-NS and HU were determined by the analyses of NOESY, DQFCOSY and (¹H-¹⁵N) HMQC spectra. It was found that H-NS has antiparallel β -sheet structure from 94 to 108 in the a.a. sequence, and that it is α -helix from 117 to 121 a.a. residues. There were observed only about 60 peaks out of 136 peaks expected for the protein. The lack of the observable peaks is probably due to self association of H-NS in solution. The interaction of both proteins with oligo DNA are also discussed.

[序] 原核細胞中に比較的豊富に存在する一群のDNA蛋白質はヒストン様蛋白質と呼ばれている。これらの蛋白質は遺伝子の核様体形成に重要な役割を果たしていると思われるが、最近の研究によれば、遺伝子の発現、組み換え、外来遺伝子の組み込みの諸過程において調節因子として固有の機能を有することが示された。HUはアミノ酸90残基からなる塩基性蛋白質であり、H-NSはアミノ酸136残基からなる中性蛋白質である。HUは非特異的DNA結合蛋白質であるが、ATrichなDNAに対して高い親和性を有する。いずれの蛋白質もDNAの高次構造を認識すると言う点で興味ある蛋白質である。

今回、蛋白質大量発現系を用いた¹⁵Nの均一標識および選択的標識の助けで、H-NSおよびHUの部分構造を明かにしたので報告する。

[試料および実験方法] H-NS およびHUはそれぞれの蛋白質の大腸菌による大量発現系から分離精製した。¹⁵Nで均一に標識したものおよび(Ala, Val, Leu, Ile, Arg, Lys, Thr, Ser)の9種の標識蛋白質を得た。H-NS試料は、10 mM KPi, 0.3 M NaCl, pH 5.5の溶液に対して透析、濃縮してNMRの測定に供した。HU試料は、水に対して透析、凍結乾燥したのち、その適当量を10 mM NaPi, 0.1 M NaClに溶かし、pH 5.0になるように調整した。NOESY, DQFCOSY およびHOHAHAの測定には日本電子製GX-500を、¹H-¹⁵N HMQCの測定にはBruker製AM-500を用いた。

[結果および考察] H-NS 蛋白質：この蛋白質は1分子中に3種の芳香族アミノ酸残基(1 Trp, 3 Tyr, 1 Phe)を持つ。これらのring protonは容易に帰属できるので、指紋領域におけるNH-C α protonの連続帰属の基準点として利用した。図1はDQFCOSYとNOESYを重ね合わせたスペクトルである。図に示されるように、Tyr108からGlu104まで、Tyr96, Tyr98を基準点としてAsp100からAla94まで連続帰属ができた。これら2つの鎖の間でいくつかの強いNOEが観測されたことは、これらが逆平行 β -sheetを形成

Keywords: H-NS protein, HU protein, Secondary structure, Two dimensional proton NMR, ¹H-¹⁵N HMQC

しんどう へいさぶろう, いえだ りょういち, くるみざか ひとし, さくま ちせこ,
 いまもと ふみお, ごしま なおき, みずの たけし, くばにわ ひとし

することを示す。もう一つの連鎖帰属は、Val117からAla121まで可能であり、この帰属は異常に高磁場シフトしたIle118の α protonを基準に用いた。この帰属は、HMQCのピーク位置と矛盾しなかった。Val117からAla121まで α -helix構造であることは、図2の残基間NOEの観測から明かである。

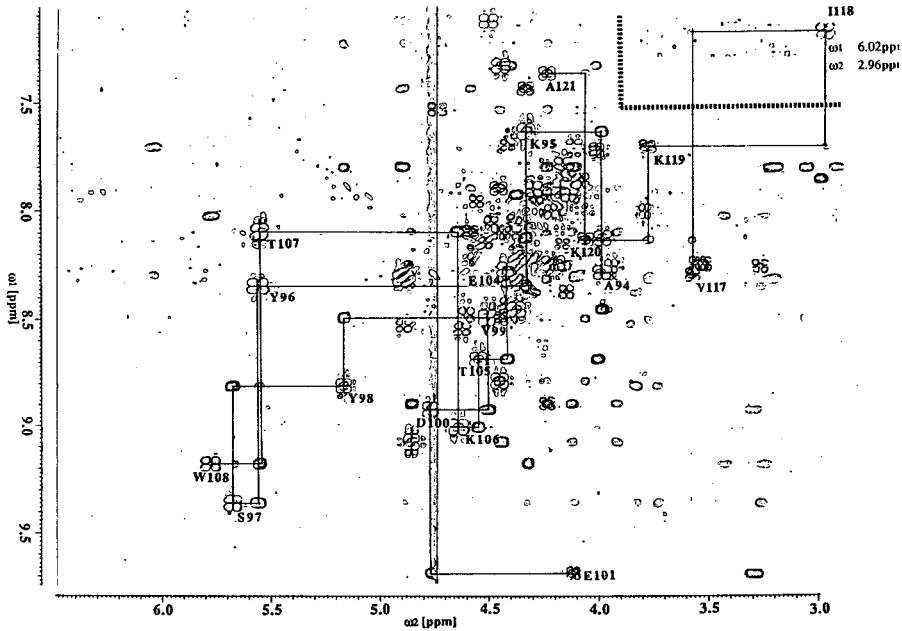


図1. H-NSのDQFCOSYおよびNOESYの指紋領域

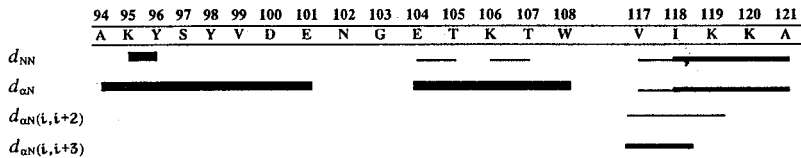


図2. 二次構造中の残基間で観測された ^1H - ^1H NOE

NMRによるH-NSの構造解析には一つの大きな問題がある。それは、分子を構成するアミノ酸から予想されるピークの数に比べ観測されるピークが約半分であることである。例えば、NH-C α DQFCOSY cross peak及びHMQC peakとも約60個しか観測されない。もっと極端な場合、Leucine残基を選択的に標識した試料のHMQCスペクトルは、分子中に14個のLeucinesが含まれるにもかかわらず、2個のピークしか観測されなかった。観測ピーク数に及ぼすpHおよび温度の影響を検討したが、基本的にはその影響は認められなかった。それゆえ、観測ピークが少ないのは、アミドプロトンの交換よりも自己会合に基づく分子運動の低下によるものと思われる。H-NSのC末端側で連続帰属が可能であったことから、N末端側に比べC末端側は運動性に富んでいるものと思われる。

HU蛋白質：現在スペクトルの帰属は進行中である。

P 59

球状蛋白質 BPTI の動的立体構造の計算機シミュレーションをもとにした C^α 原子のスピン格子緩和時間の計算

(日本電子・生体研) 入佐 正幸 (京大・理) 郷 信広

Computer Simulation of Conformational Dynamics and Relaxation Time T_1 of Carbon NMR in a Small Globular Protein, Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor

IRISA.M.* and GÖ.N.

Department of Chemistry, Kyoto University, Japan

*Present Address: Biometrology Laboratory, JEOL Ltd., Japan

NMR spin-lattice relaxation times (T_1 values) of main chain C^α atoms in a small globular protein, bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI), is calculated based on computer simulation of the conformational dynamics. At first, normal mode analysis is used to calculate T_1 values. Hydrogen atoms directly bonded to a carbon atom is found to have a dominating role to determine the value of T_1 . Site dependence of the calculated result is compared with literature value of experimental observation. The location of three large peaks at residues 15, 46, and 58 agree with the experiment. The mean square fluctuations of the orientational motions of the interatomic vectors from C^α to H^α calculated by the normal mode analysis are smaller than those estimated from the experimental T_1 values. This suggests additional contributions from anharmonic motions of the protein in which time scale is of nano second or longer.

小さな球状蛋白質、bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) の動的立体構造の計算機シミュレーションをもとにした、主鎖の C^α 原子のスピン格子緩和時間 (T_1 値) を計算した。蛋白質の NMR 実験における ^{13}C 原子の緩和時間 T_1 は、その ^{13}C 原子からすぐそばの 1H 原子をむすぶ原子間ベクトルの動きのパワースペクトルによって決定される。分子量が 6500 であるこの蛋白質を 500MHz のスペクトロメーターで測定した場合、内部運動の緩和が外部運動 (overall tumbling) の緩和よりも十分速いと仮定すると、個々の炭素原子の T_1 は二つの因子の積として与えられる¹⁾。一つは、overall tumbling を反映した因子であり、もう一つは、その炭素原子からすぐそばの水素原子へのベクトルの、分子に固定された座標系からみた熱平衡状態での揺らぎの大きさによって決定される因子である。これらの二つの因子を分子の静的構造と、シミュレーションによる動的構造からそれぞれ計算した。まず最初に、規準振動解析^{2,3)}を T_1 値の計算⁴⁾に使った。炭素原子に直接結合している水素原子が、その T_1 値の決定に支配的な役割を持っていることが分かった。その他の全ての水素原子を無視すると、非グリシン残基の T_1 の値を約 7% 過大評価することになる。計算した結果の部位依存性を文献による実験値^{5,6)}と比較した。残基番号 15, 46, 58 に存在する大きなピークの位置が実験と一致した。規準振動解析によって計算した、 C^α 原子から H^α 原子への原子間ベクトルの向きの動きの平均自乗揺らぎの大きさは、 T_1 の実験値から見積られたものよりも小

蛋白質、規準振動解析、モンテ・カルロ・シミュレーション、調和運動、非調和運動

入佐正幸 (いりさまさゆき)、郷信広 (ごうのぶひろ)

さかった。二番目に、モンテ・カルロ・シミュレーション⁷⁾を T_1 の計算に用いた。モンテ・カルロ・シミュレーションによって計算した、 C^α 原子から H^α 原子への原子間ベクトルの向きの動きの均自乗揺らぎの大きさは、 T_1 の実験値から見積られたものよりも小さかった。これは、ナノ秒以上のタイムスケールを持つ蛋白質の非調和運動⁸⁾からの寄与があることを示している。

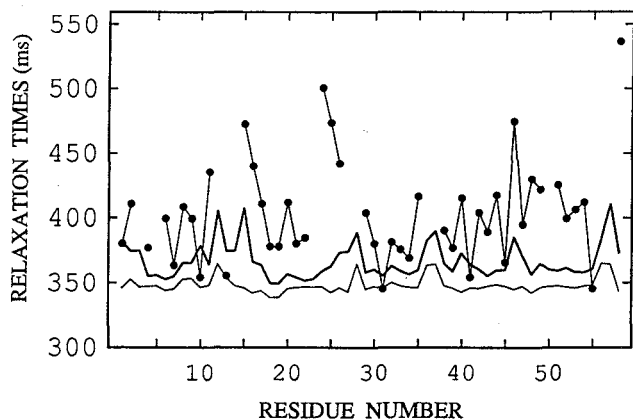


図 1

それぞれの C^α 原子に対する緩和時間 NT_1 。全ての水素原子からの寄与を計算した。太線は規準振動解析によって計算した C^α 原子の NT_1 の値を示す。細線は蛋白質分子に内部運動が全く無いと仮定した場合の NT_1 の値を示す。黒丸は NT_1 の実験値を示す。

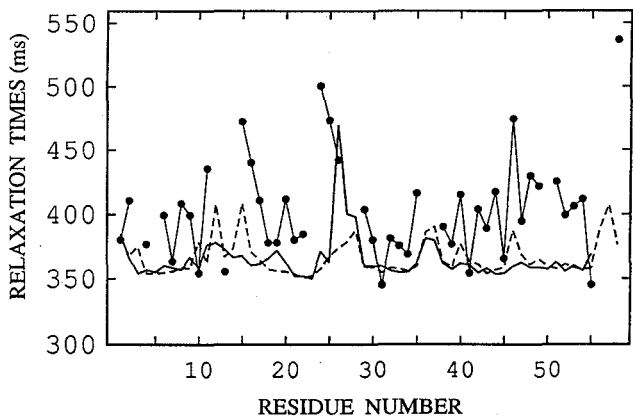


図 2

それぞれの C^α 原子に対する緩和時間 NT_1 。 C^α 原子に直接結合している水素原子からの寄与を計算し、その値を一様に 6.8% (グリシンは残基は 1.5%) 短くすることでその他の水素原子からの寄与を取入れた。実線はモンテ・カルロ・シミュレーションによって計算した C^α 原子の NT_1 の値を示す。破線は対応する規準振動解析の NT_1 の値を示す。黒丸は NT_1 の実験値を示す。

REFERENCES

1. Lipari, G. & Szabo, A. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546-4559
2. Gö, N., Noguti, T. & Nishikawa, T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3696-3700
3. Nishikawa, T. & Gö, N. (1987) *Proteins* **2**, 308-329
4. Henry, E.R. & Szabo, A. (1985) *J. Chem. Phys.* **82**, 4753-4761
5. Nirmala, N.R. & Wagner, G. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7557-7558
6. Wagner, G. & Nirmala, N.R. (1989) *Chemica Scripta* **29A**, 27-30
7. Noguti, T. & Gö, N. (1985) *Biopolymers* **24**, 527-546
8. Noguti, T. & Gö, N. (1989) *Proteins* **5**, 97-103

○若杉桂輔^a, 石森浩一郎^a, 森島績^a, 増田潤一^b, 大野靖^b
 (京都大学工学部^a, 島津製作所^b)

NMR Study of Recombinant P450cam Mutants

Keisuke Wakasugi^a, Koichiro Ishimori^a, Isao Morishima^a, Jun-ichi Masuda^b, Yasushi Ohno^b
 (^a Graduate School of Engineering, Kyoto University; ^b Shimadzu Corporation)

Site-directed mutants of P450cam, in which threonine-252 had been changed to alanine or valine, were employed to study the role of the hydroxy amino acid in the monooxygenase reaction¹⁾. In a reconstituted system with putidaredoxin and its reductase, the amount of exo-5-hydroxycamphor formed decreased in the mutant enzymes with respect to the wild-type enzyme and most of the O₂ consumed were recovered as H₂O₂¹⁾. In order to investigate the structural difference between wild-type and mutant enzymes and the relationship between structural and functional changes, we utilized ¹H-NMR spectroscopy. The NMR data showed that the electronic states and the structures of the mutants were almost the same as those of the wild-type enzyme, except for the difference of the heme environmental structures.

1. 緒言

P450cam は、*d*-camphorの水酸化を触媒する分子量45000の一原子酸素添加酵素である。この酵素の反応サイクルは図1のように考えられている。

P450cam の252番目のThrは、結晶構造²⁾に基づき、酸素化型(図1-C)の酸素と近距離に位置していると予想され、しかも、酸塩基触媒またはプロトン供与体になりうるために、酸素の活性化機構に重要な働きをしていると考えられる。

そこで、この252ThrをAla, Valに置換したP450camを作製し、酵素活性を調べた結果、Ala変異体、Val変異体ともに、camphorの水酸化活性が、野生型に比べ、非常に低下し、消費された酸素の大部分は、H₂O₂に還元されていることがわかった¹⁾。しかし、Ala変異体の酸素消費速度は、野生型とほぼ同程度であるが、Val変異体の場合は、野生型の約1/3程度まで遅くなっていることが明らかにされた¹⁾。そこで、このような野生型、Ala変異体とVal変異体との酸素消費速度の違いが、構造上の違いに起因しているのかどうか検討するために、今回、¹H-NMRスペクトルを測定し、構造解析を行なった。

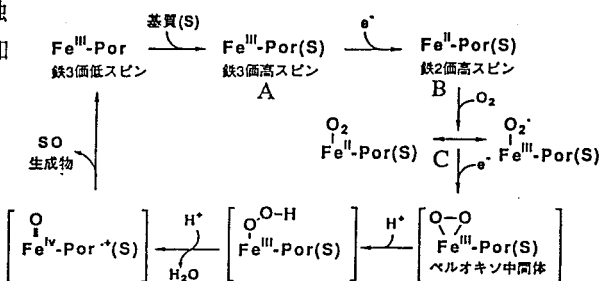


図1 P450camによる反応サイクル

keyword : P450cam、NMRスペクトル、鉄2価低スピン、鉄3価高スピン、鉄3価低スピン

氏名: わかすぎけいすけ いしもりこういちろう もりしまいさお ますだじゅんいち
 おおのやすし

2.結果と考察

反応サイクルの初期の段階での違いについて検討するために、まず、比較的安定な鉄三価高スピン状態 (図1-A) を調べた。野生型のNMRスペクトルには、ヘムメチルに帰属されるシグナルが、40ppmと60ppm付近 (HDO基準) にそれぞれ2本ずつ観測された。これらのシグナル位置は、Ala 変異体、Val 変異体でわずかにシフトするものの、全体のスペクトルパターンにはほとんど変化がみられないことから、鉄三価高スピンのヘムの電子状態は、変異体でも、野生型とほぼ等しいことがわかった。次に、一電子還元された鉄二価高スピン状態 (図1-B) のNMRを測定した結果、鉄二価高スピンにおいても、ヘムの電子状態には、ほとんど違いがみられないことが明らかになった。酸素が結合した段階

(図1-C) では、野生型と変異型との酸素の活性化の違いを考えるうえで、より有用な情報が得られると考えられる。しかし、酸素化型P450cam (図1-C) は不安定であるため、同じ鉄二価低スピンである一酸化炭素体P450camのNMRスペクトルを測定した。この状態のNMRスペクトルには、ヘム近傍に位置するアミノ酸残基のシグナルが、ヘムの環電流効果を受け、高磁場シフトして観測される。野生型で、-6ppm付近に分離して観測されたシグナルは、 β 位にメチル基のないAla 変異体では大きく強度が減少し、 β 位にメチル基のあるVal 変異体では野生型とほぼ同じ強度であることから、252Thrの β 位のメチル基に由来することが示唆された。さらに、シグナルの帰属を行なうために、NOESY

(図2) などの二次元NMRの測定を行なった。これらのデータの解析を行なった結果、-6ppmのシグナルには、5、6種類のアミノ酸残基のシグナルが重なっていること、また、Val変異体では、ヘムポケットの軸配位子側においても構造変化していることが明らかになった。より詳細に配位子が結合した低スピン状態の立体構造について解析するために、常磁性シフトが現われるシアン体 (鉄三価低スピン) のNMRスペクトル

を測定した。野生型のスペクトルにおいて、28.3ppmに観測された線幅の広いシグナルを、最近報告されたクロロペルオキシダーゼでの帰属³⁾をもとに、軸配位子である357番目のCysの β 位のプロトンに帰属した。このシグナルは、Ala 変異体では、野生型とほぼ等しい位置に現われたが、Val 変異体では、3.5ppmも高磁場側にシフトして現われた。また、ヘム由来のシグナルも、Val 変異体でのみ、野生型からシフトして観測された。以上のことから、Val 変異体のヘム近傍構造は、Ala変異体に比べ、より大きく変化していると考えられる。このようなヘムポケットの軸配位子側にまで及ぶ大きな構造変化のために、Val変異体では、酸素消費速度が遅くなっていると考えられる。

3.参考文献

1) Imai, M. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7823-7827; 2) Poulos et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 16122-16130; 3) Dugad et al. (1992) *Biochemistry* 31, 1651-1655

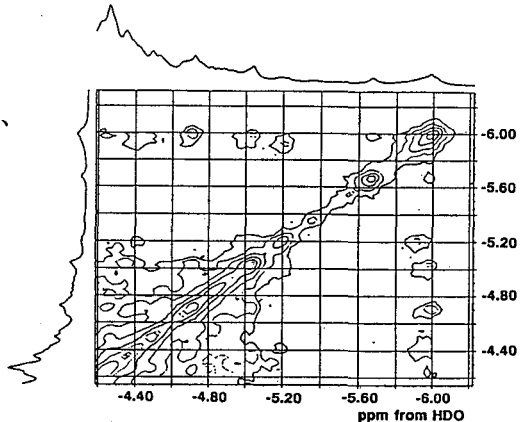


図2 一酸化炭素体P450camのNOESY

P 61 リン脂質ミセルに埋め込まれた糖脂質のコンホメーション
-緩和行列とディスタンスジオメトリーによる解析-

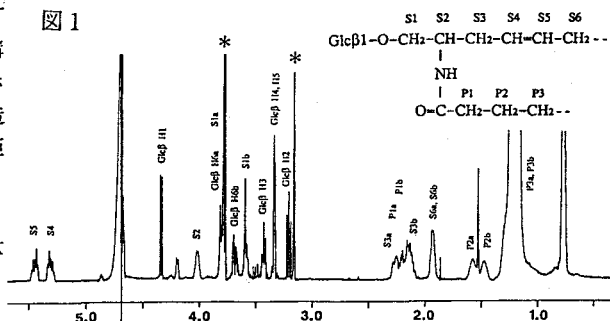
(都臨床研) ○稲垣冬彦、神田大輔

Conformation of glycolipids embedded in phospholipid micelles -Analysis by relaxation matrix and distance geometry calculations-, F. Inagaki and D. Kohda, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

Conformation of glucosylceramide embedded in perdeuterated phospholipid micelles was analyzed by relaxation matrix and distance geometry calculations. The conformation of the ceramide moiety determined the orientation of the glucose residue which protruded from membrane surface with 30-45 degree. This orientation permits the extension of glycolipids only through Gal β 1-4Glc β 1-Cer not through Gal β 1-4Gal β 1-Cer.

糖脂質は細胞膜の構成成分として、細胞相互の認識や情報の伝達をはじめ高次の生命現象に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。これら糖脂質の持つ生理的機能は糖鎖部分が担っており、糖鎖の配向は細胞表層のレクチン様蛋白質や抗体による糖脂質糖鎖の認識を考えていくうえで重要なファクターとなる。我々は生体膜のモデルとして全重水素化ドデシルホスホコリンミセルを用い、その中にグルコシルセラミドを埋め込み、セラミドのコンホメーションを明らかにすると共に糖鎖の配向を決定した。**実験** 糖脂質としてグルコシルセラミド、3-デオキシグルコシルセラミドを取り上げた。それぞれ2 mgを40倍モルの全重水素化ドデシルホスホコリン(DPC)を含む重水溶液に溶解し、NMR試料とした。NMRの測定には日本電子製GX600および α 600 600 MHz 1 H NMR分光計を用いた。測定温度は28°C、pHは7.2である。混合時間25 ms、50 ms、75 ms、150 ms、200 ms、300 msを用い、NOESYの測定を行ない、対角ピーク、交差ピーク強度の混合時間依存性を求めた。なお、データ処理にはNMR2を用い、ピーク強度として体積を用いた。緩和行列の解析にはFortran 77によるプログラムを作製し、Sun Sparc Station 330上で処理を行なった。構造計算はIris 4D/35上でX-PLORを用いて行なった。

結果 DPCは1 mM以上の濃度では約40分子よりなるミセルを形成する。本実験条件下では1個のミセルに1分子の糖脂質が埋め込まれている。図1は3-デオキシグルコシルセラミドの化学構造と、全重水素化DPCに埋め込まれた時のNMRスペクトルを示す。全重水素化DPCを用いているため40倍モルのミセル存在下でも糖脂質のシグナルは明瞭に観測されていること、糖脂質とリン脂質相互のスピン拡散を無視できるため、定量的な解析に適している。3-デオキシグルコシルセラミドの構造、特に糖鎖の配向はセラミド部分のコンホメーションに依存している。この部位の構造を決定するためには1.8-3.5 Å程度の近距離情報を求める必要がある。特に分子内にメチルグループが近接していることもあり、スピン拡散の効果も考慮に入れた、より定量的なNOEの解析が必要となる。そこで



糖脂質、コンホメーション、緩和行列、交差緩和、ディスタンスジオメトリー

いながき ふゆひこ、こうだ だいすけ

モデルフリーな緩和行列を用いた解析を適用した(1、2)。initial build-up rate法に比較してS/Nのよいところで実験を行なうことができることも緩和行列法の利点である。

解析方法 混合時間 τ_m におけるNOESYピークの強度よりなる行列 $A(\tau_m)$ は

$$A(\tau_m) = A_0 \exp(-R\tau_m) \quad (1)$$

で表される。ここで A_0 は $\tau_m=0$ における強度、 R は緩和行列であり次式で与えられる。

$$R = \begin{bmatrix} \rho_1 & \sigma_{12} & \dots & \sigma_{1n} \\ & \rho_2 & \dots & \sigma_{2n} \\ & & \rho_3 & \dots & \sigma_{3n} \\ & & & \dots & \rho_n \end{bmatrix} \quad (2)$$

ここで ρ_i 、 σ_{ij} は自己緩和および交差緩和速度である。(1)式より R を求めると

$$R = -1/\tau_m \{U I n(\Lambda) U^{-1}\} \quad (3)$$

$$\Lambda = U^{-1} \{A(\tau_m) / A_0\} U \quad (4)$$

で与えられる。これより対角および交差ピークの強度が求められれば、緩和行列を求めることができる。

逆に緩和行列が求められれば、 τ_m におけるピーク強度は(5)式で与えられる。

$$A(\tau_m) / A_0 = U' \exp(\Lambda') U'^{-1} \quad (5)$$

ここで

$$\Lambda' = U'^{-1} R U' \quad (6) \text{である。}$$

計算結果 図2に3-グルコシルセラミドの混合時間300msにおけるNOESYスペクトルを示す。 A_0 は混合時間0への強度の外挿値より求めた。混合時間50msのNOESYスペクトルと比較するとS1a、S1b、S2、S3aおよびS3bのプロトン間でスピン拡散が生じていることが解かる。図2より求めた対角ピークと交差ピーク強度を要素とする行列 $A(\tau_m)$ と A_0 を(1)-(4)式に基づき解析し、緩和行列 R を求めた。非等価メチレンプロトン間の交差緩和速度は他に比較して10倍以上となる。300msのNOESYスペクトルで観測された(S1a、S1b)、(S3a、S3b)プロトン間の顕著なスピン拡散を良く説明している。300msのNOESYの解析より求めた緩和行列に基づき、(5)、(6)式に従い、ピーク強度の τ_m 依存性を計算した。計算値と実験値の対応は満足すべきものであり、300msで求めた緩和パラメーターの妥当性を示した。

リン脂質ミセルに埋め込まれた糖脂質の構造 非等価メチレン

プロトン間の距離を1.8Åとしてプロトン間の距離を求めた。プロトン間の距離情報および二面角情報を用い、X-PLORにより構造計算を行なった。セラミド部分が膜面に垂直に埋め込まれているとすると、グルコース部位は膜面に対し30-45度方向に突き出ていることが明かとなった。このようなグルコースの配向は糖脂質糖鎖の伸張方向を規定している。Gal β 1-4Glc β 1-Cerは糖脂質の基本骨格として見いだされているのに対し、Gal β で始まる糖脂質としてはGal β 1-4Gal β 1-Cerは存在せずGal β 1-6Gal β 1-Cerのみが見いだされている。糖脂質のセラミドのコンホメーションは糖脂質糖鎖の基本骨格を規定していると考えられる。またここで明らかにした糖脂質糖鎖の配向は糖鎖認識タンパク質と糖脂質糖鎖との相互作用を考えていくうえでも重要である。

文献

- (1) P. A. Mirau, J. Magn. Reson., 80, 439-447 (1988).
- (2) P. A. Mirau, J. Magn. Reson., 96, 480-490 (1992).

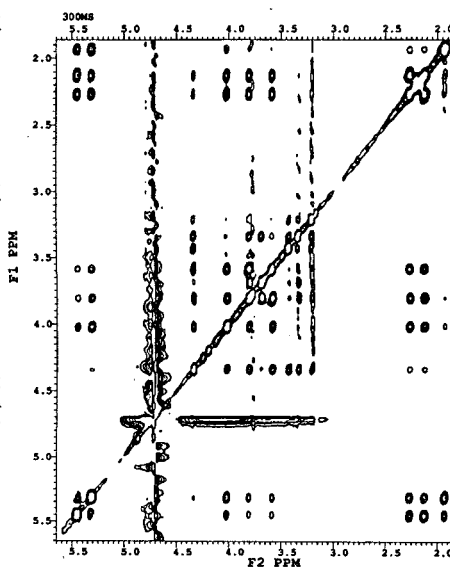


図2 3-デオキシグルコシルセラミドのNOESYスペクトル(混合時間は300ms)

P 62 リボヌクレアーゼHの ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 核の完全帰属と化学シフトと構造の関係

○山崎俊夫、永山国昭 日本電子(株)・生体計測学研究室

Complete assignment of ^1H , ^{13}C , ^{15}N magnetic resonance and relationship between chemical shifts and conformation

Toshio Yamazaki, Kuniaki Nagayama, Biometrology Lab., JEOL Ltd.

A 155 residue protein, ribonuclease H from *E. coli*, includes 973 ^1H , 762 ^{13}C , and 227 ^{15}N nuclei which can be separately observed by NMR. Approx. 95% of them were assigned by the combined use of several kinds of heteronuclear 3D NMR experiments. This included reported experiments and the originally devised ones, 3D HCH, 3D Y-X- ^1H HSQC/HSQC, 3D ^{13}C - ^{13}C - ^1H HSQC/homoSQC. The chemical shifts are affected by charge state and local conformation. The ^{15}N chemical shifts of N(delta-1) and N(epsilon-2) of His residues shows that only H144 is in the neutral state (N(epsilon-2)H form) among the 5 His residues. The ^{13}C chemical shifts of C(alpha), C(beta) depends largely on the local secondary structures. Alpha-helical structures cause downfield shifts of C(alpha) nuclei and left-handed helix structures cause upfield shifts of C(beta) shifts.

155残基からなる水溶液中のタンパク質の ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 核からの共鳴をほぼ全て帰属することができた。このタンパク質は大腸菌由来のリボヌクレアーゼHでRNA-DNA二重螺旋のRNAを分解する酵素である。このタンパク質の構造は既にX線結晶回折により決定され、またNMRからも同様な二次構造とトポロジーが得られている。この酵素でリン酸ジエステルを加水分解するために主要な役割を果たしているのが3つのカルボン酸、D10, D70, E48である。メカニズムを解明する上でこれらの側鎖の解離定数等の性質を知ることが重要である。また基質の結合に正電荷のリジン、アルギニンが重要な役割をしている。これら、機能に関係した情報を取り出すためには水素核以外の帰属が必要である。

リボヌクレアーゼHでは973の水素核、762の炭素核、227の窒素核が条件さえ許せばNMR的に区別して観測することができる。側鎖の帰属のために次の実験を行っ

リボヌクレアーゼH、3D NMR、化学シフト、電荷、構造

やまざき としお、ながやま くにあき

た。 $(-CHm)_n$ 鎖の帰属には 3D HCH, 3D HCCH-COSY, 3D HCCH-TOCSY の実験を用いた。また水素の付いていない炭素核、窒素核 (付いている水素核が観測できない場合を含む) の帰属には、3D X-Y- 1H HSQC/HSQC を用いた。この実験は共有結合で結ばれた、X-Y- 1H の3つの核を検出するものである。ここで (X, Y) は ($^{13}C, ^{15}N$), ($^{15}N, ^{13}C$), ($^{13}C, ^{13}C'$) ($^{13}C'$ と ^{13}C は化学シフトが大きく違うもの) のどれかである。

^{13}C - ^{15}N - 1H はアルギニンの C(zeta)、アスパラギンの N(delta-2)、グルタミンの N(epsilon-2)、 ^{15}N - ^{13}C - 1H はリジンの N(zeta)、プロリンの主鎖の N、 $^{13}C'$ - ^{13}C - 1H はアスパラギン、アスパラギン酸の C(gamma)、グルタミン、グルタミン酸の C(delta)、芳香族残基の C(gamma) の帰属に用いた。また ^{13}C - ^{13}C - 1H の3核を検出するために 3D ^{13}C - ^{13}C - 1H HSQC/homoSQC を新たに考案し、用いた。homoSQC は同種核用の SQC シークエンスである。これはチロシンの C(zeta)、トリプトファンの C(delta-2), C(epsilon-2) の帰属に用いた。

上記の実験の結果、919 の水素核、749 の炭素核、200 の窒素核を帰属することができた。これは全体の約95%である。帰属されなかった部分はアルギニンの $(-N(eta)H_2)_2$ の大部分 (R46 の片方の N(eta)H₂ が NOE から帰属された)、リジンの N(zeta) の多く (分離している3残基は帰属できた)、緩和が速く、信号の極めて弱いところであった。

得られた化学シフトと電荷、構造との間に重要な相関がみられた。同種の核 (同種のアミノ酸残基の同一の核) で最も大きな分散を持っていたのは、ヒスチジンの N(delta-1) であった。窒素核の化学シフトは電荷に極めて敏感である。H114 は N(epsilon-2) に水素が付いているが、N(delta-1) には付いていない中性の状態であることがわかった。そのほかの4残基は両方に水素が付いている正電荷の状態であった。炭素核の化学シフトの分散は主鎖の核で大きく、C(alpha), C(beta) は主鎖の2次構造を強く反映している。 α ヘリックス内では C(alpha) は低磁場にシフトする (表1)。左巻きヘリックス内 (ϕ が正) では C(beta) は高磁場にシフトする (表2)。

表1

Averages and rmsd (in parenthesis) of secondary shifts in the secondary structures

structure	#res	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C'	N'	H $^{\alpha}$	H $_N$
α -helix	51	2.4 (1.2)	-1.3 (1.2)	2.1 (1.4)	-4.5 (3.4)	-0.53 (0.37)	-0.36 (0.63)
β -strand	36	-1.69 (0.8)	1.43 (1.3)	-1.01 (1.3)	1.1 (4.0)	0.58 (0.43)	0.32 (0.61)
all	132	0.29 (2.2)	-0.43 (2.2)	0.49 (1.9)	-2.1 (4.9)	-0.06 (0.61)	-0.11 (0.71)

表2

Secondary shifts of backbone nuclei of residues which have positive ϕ angles

res#	R29	G89	W90	K95	N100
ϕ	7.39	68.0	59.2	64.6	58.6
ψ	-125.3	35.6	47.0	29.0	31.1
C $^{\alpha}$	0.5	0.5	-0.5	1.2	1.6
C $^{\beta}$	-3.4		-6.1	-4.9	-2.9
C'	1	0.9	-1.2	-1.4	0.9
N'	0.6	-2	-10.8	-13	-7.4
H $^{\alpha}$	-0.6	-0.04	-1.28	-0.69	-0.47
H $_N$	1.1	-0.61	0.47	-0.35	0.7

P 63 エンドセリンの立体構造形成における core-tail 相互作用の重要性

○遠藤聡史、井ノ岡博、菊池 崇、今田 岐、脇舛光廣、水田栄治
(武田薬品工業(株)筑波研究所)

Solution Conformation of Endothelins Studied by ^1H NMR spectroscopy: The Tail Region Stabilizes the Conformation of the Core Region.

Satoshi Endo, Hiroshi Inooka, Takashi Kikuchi, Takashi Imada,
Mituhiko Wakimasu and Eiji Mizuta
Tsukuba Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.

ABSTRACT: Solution conformations of endothelin-3(ET-3) and ET-1(1-15) NH_2 have been determined by ^1H NMR spectroscopy and distance geometry and compared with the conformation of ET-1. Although overall conformation in the core region(residues1-15) is similar, difference has been found in the conformation of the helical region(residues9-15). In both ET-3 and ET-1(1-15) NH_2 , the helical structure is less regular than that in ET-1 and conformational fluctuation has been increased. Carboxypeptidase digestion experiments have shown that the interaction between the core and the tail(residues15-21) regions is weak in ET-3 compared with that in ET-1. These results suggest that the interaction between the core and the tail regions stabilizes the α -helical conformation in the core region.

[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り、ET-1、ET-2、ET-3の3種が知られている(図1)。一方、レセプターに関しては、ET-1、ET-2に選択的な親和性を示すET_Aレセプター、ET-1、ET-2、ET-3に同等の親和性を示すET_Bレセプターの存在が明らかにされている。我々は昨年の本討論会において¹⁾、33%エチレングリコールを含む水溶液中のエンドセリンの立体構造について報告し、①Lys9-Cys15部分が典型的な α ヘリックス構造をとっていること、②Leu6、Val12、Leu17の疎水性残基がクラスターを形成していること等を明らかにした。さらに、カルボキシペプチダーゼ(CPase)によるC末端から

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、いまだたかし、わきますみつひろ、みずたえいじ

の逐次限定分解反応の解析から、C末端の tail 部分 (His16-Trp21) と N 末端側の core 領域 (Cys1-Cys15) の間の相互作用が、core 領域の立体構造の形成に重要な役割を果たしていることを示唆した。今回、CPase 消化により

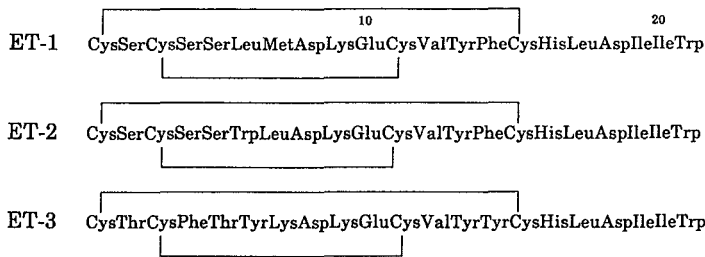


図1: エンドセリンの3つのアイソペプチド(ET-1, ET-2, ET-3)のアミノ酸列

誘起される core 領域の立体構造変化を具体的に明らかにすること、ET-1とET-3のレセプターに対する親和性の違いを立体構造の視点から明らかにすること、を目的として、ET-1の tail 部分を除去したET-1(1-15)NH₂およびET-3について、¹H NMR とディスタンスジオメトリーによる立体構造決定、CPase によるC末端からの逐次限定分解反応の解析、アミドプロトンのH-D交換反応の解析を行なった。

[実験]

(1) NMR 測定

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溶液にペプチドを溶解して試料とし、測定にはBruker社AM-500を用いた。ET-3、ET-1(1-15)NH₂について、各種2次元NMRスペクトル(DQF-COSY、HOHAHA、NOESY)の解析から、連鎖帰属法によりプロトンシグナルの帰属を行なった。一部のβメチレンプロトンについては、dNβ、dNβ'の大きさとE.COSYスペクトルから求めたJαβ、Jαβ'の値に基づいて、立体特異的帰属を行なった。アミドプロトンのH-D交換反応はET-1、ET-3、ET-1(1-15)NH₂について、ペプチド濃度0.5mM、pH4.0、温度30℃の条件で行なった。ET-3についてはさらに、core領域とtail領域の間の相互作用についての情報を得るために、CPase Y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(手順は昨年報告した通り¹⁾)。

(2) 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。距離情報は、ET-3については残基内133個、隣接残基間60個、非隣接残基間34個の合計227個、ET-1(1-15)NH₂については、残基内76個、隣接残基間46個、非隣接残基間18個の合計140個であった。

[結果と考察]

(1) ET-1(1-21)とET-1(1-15)NH₂の立体構造の比較

図2に示すように隣接残基間NOEのパターンはよく似ているが、(1-15)体ではLys9-Cys15の部分について、dαN(i, i+3)の強度がdαN(i, i+1)に比べて小さくなっていること、³J(NH-αH)の値がET-1の値に比べて、いずれも大きくなっていること、Val12、Tyr13、Phe14のアミドプロトンのH-D交換速度がET-1の場合の約3倍になっていること、などの差異が観察された。その結果、全体としてはET-1と類似した立体

構造をとっているが、Lys9-Cys15の α ヘリックス部分について、(1-15)体では規則性が低下し、構造の揺らぎが増大していることがわかった。このことは、*tail*部分を除去することにより α ヘリックス構造が不安定化すること、逆に言えば、ヘリックス構造の安定化に、*core-tail*相互作用が重要な役割を果していることを示している。

(2) ET-1とET-3の立体構造の比較

ET-3では、図2に示すように、9-15位の $d_{\alpha N(i, i+1)}$ の強度は一律に大きくなり、 $d_{NN(i, i+1)}$ と同程度かそれ以上であった。さらに、9-15位の $d_{\alpha N(i, i+3)}$ の強度が弱くなっていること、Val12、Tyr13のアミドプロトンのH-D交換速度はET-1の約3-4倍になり、Tyr14のアミドプロトンはD₂O中で直ちに重水素と交換したことなどから、ET-3でもET-1(1-15)NH₂と同様に、9-15位のヘリックス構造の規則性が低下し、揺らぎが増大していることがわかる。なお、ET-3でも、ET-1の場合と同じく*core*領域とC末端の4残基の間の相互作用はNOEとしては観測されず、*tail*部分の配向を決定することはできなかった。

図3に示すように、Trp21が遊離する前後での化学シフト変化は、ET-1ではC末端のみならず、分子全体に及んでいたのに対して、ET-3では、C末端以外では限られた残基に変化が見られただけであった。Ile19が遊離するステップでも同様に、ET-3ではシフト変化が小さかった。このことはET-3ではET-1に比べて、*core-tail*相互作用が弱くなっていることを示している。ET-1の場合と同様に、ET-3でも6、12、17位の疎水性残基はクラスターを形成している。しかしながら、ET-3では6位がLeuからTyrに置換しており、この置換により疎水性クラスターの構造が変化して、*core-tail*相互作用の様式に変化が生じ、*tail*によるヘリックスの安定化効果が失われたと考えることができる。ET_Aレセプターの結合には、ヘリックス領域のAsp8、Glu10、Phe14が重要な役割を果たしていることが知られており、この部分のコンホメーションの差異がET-1とET-3のET_A結合性の違いの原因となっている可能性がある。

(3) 化学シフトと2次構造の関係

最近、タンパク質の2次構造と化学シフトの相関について注目されており、 α ヘリックス部分では、 α プロトンの化学シフトはランダムコイルのシフトに比べて、有意に高磁場シフトしていることが報告されている²⁾。図4に示すように、ET-1(1-21)とET-1(1-15)NH₂を比較すると、確かにヘリックス構造が安定な(1-21)体の方が、9-15位

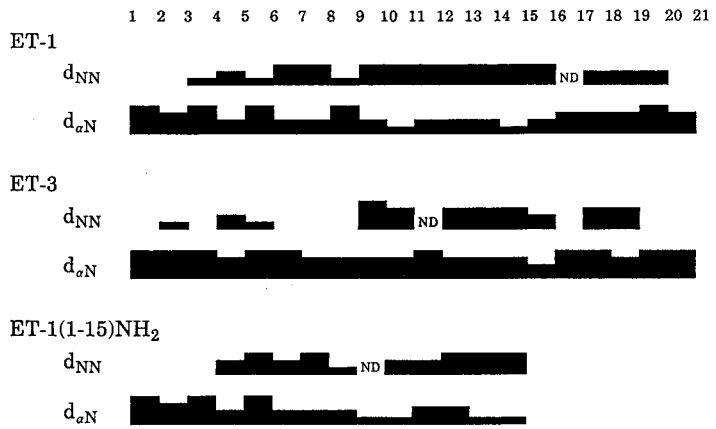


図2: 隣接残基間NOEの比較
NDは対角ピークに近いために、クロスピークが観測できなかった部分

の α プロトンが高磁場側に観測される。ET-1とET-3の比較でも、同様の結果である。一方、C P a s e 消化に伴う化学シフト変化について見ると、ET-1のLeu17が遊離する段階での9-15位の α プロトンのシフト変化は、それぞれ+0.09, +0.05, +0.02, +0.21, -0.03, +0.09, +0.04ppm (+は低磁場、-は高磁場シフトを示す)であり¹⁾、13位以外すべて低磁場シフトしている。これは α ヘリックス構造が不安定化する方向であり、t a i l の除去により、ヘリックス構造が不安定化するという(1)の結果と一致する。このように、2次構造と化学シフトの相関に着目すれば、C P a s e 消化の方法により、少なくとも2次構造をとっている部分については、個々の分子種を単離して構造解析することなく、化学シフト変化の方向と大きさから、構造変化の方向(2次構造が安定化するか、不安定化するか)とその大きさについても議論できると考えられる。

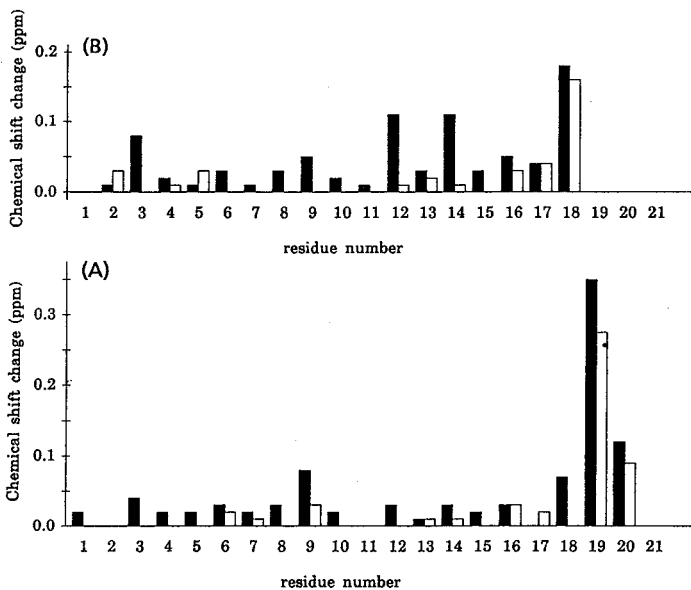


図3: (A)Trp21、(B)Ile19の各遊離ステップにおける化学シフト変化の比較
各残基について、化学シフト変化の最も大きいプロトンのシフト変化を絶対値でプロットした。■がET-1、□がET-3のシフト変化を示す。

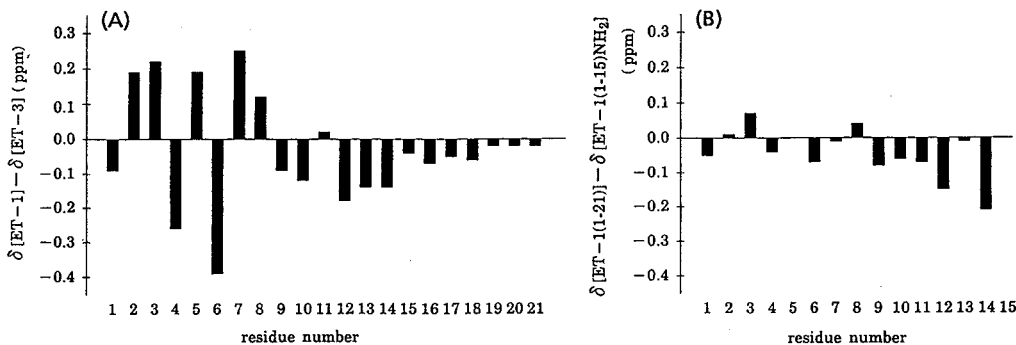


図4: (A) ET-1とET-3、(B) ET-1とET-1(1-15)NH₂の α -プロトンの化学シフトの比較
マイナス側はET-1の化学シフトの方が高磁場に観測されることを示す。

[文献]

- 1) 遠藤聡史、井ノ岡博、菊池崇、脇舛光廣、水田栄治、藤野政彦 第30回NMR 討論会要旨集 pp165-168 (1991)
- 2) Szilagyi, L. and Jardetzky, O. (1989) J. Magn. Reson. 83, 441-449
Nelson, J. W. and Kallenbach, N. R. (1989) Biochemistry 28, 5256-5261

P 64 固体表面に吸着した蛋白質のH-D交換と溶液中高分解能NMRによる解析

(九大・歯, 九大・薬*) ○永留初実, 河野敬一, 寺田善博, 植田正*, 井本泰治*

IDENTIFICATION OF THE ADSORBING SITE OF HEN LYSOZYME ONTO THE HYDROXYAPATITE SURFACE USING HYDROGEN EXCHANGE AND ^1H NMR

(Faculty of Dentistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University)
Hatsumi Nagadome, Keiichi Kawano, Yoshihiro Terada, Tadashi Ueda, Taiji Imoto

We describe a new methods that identify the adsorbing sites of protein on to the solid surface using H-D exchange and ^1H NMR.

The H-D exchange reaction was initiated by transferring lysozyme adsorbed onto the hydroxyapatite powder from H_2O into D_2O . Some residues exchange more slowly in the hydroxyapatite-lysozyme complex than free lysozyme. It seems that the lysozyme adsorbed onto the hydroxyapatite at around these residues. This part of the lysozyme positioned backside of the active site.

This unique method makes feasible measurements of the adsorbing sites and conformation of protein adsorbed onto a solid-surface.

1. はじめに

ハイドロキシアパタイト (HAP) はアパタイトクロマトグラフィーの担体として蛋白質の分離等に広く用いられている。しかし、HAP表面への蛋白質の吸着部位やそのコンフォメーションについては未だに明らかにされていない。

固体表面の蛋白質の構造を調べる方法はFTIR、電子顕微鏡等限られたものしか存在せず、残基レベルでの微細構造に関する情報は与えてくれない。またCP-MAS法のような固体高分解能NMRでも感度と分解能の面で情報を得るのは困難である。

今回、我々は蛋白質が固体表面にの吸着した状態でのH-D交換とそれを脱着させた溶液の2D-NMRを測定することにより吸着状態を予測するという新しい方法を開発したので報告する。

2. 実験

ハイドロキシアパタイト (Bio-Rad社, Bio-gel-HTP) 1gをカラム (1.0 × 4.5 cm) に充填し、ニワトリ卵白リゾチーム (Sigma社, 1 mM)

表面、吸着、重水素交換、ハイドロキシアパタイト

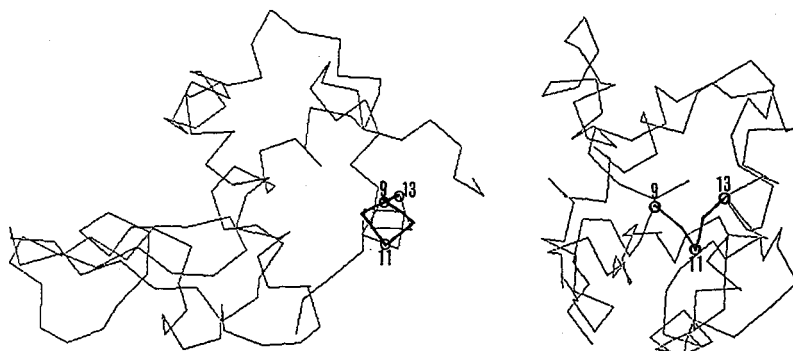
ながどめ はつみ、かわの けいいち、てらだ よしひろ、うえだ ただし、
いもと たいじ

2 ml を吸着させた。その後、未吸着のリゾチームを 1 mM リン酸バッファーで洗い出した。このリゾチームが吸着したカラムを重リン酸バッファー (pD = 7.0, 1 mM) で置換し H-D 交換を開始させた。各インキュベーション時間 (30 分~7 日間) の後、吸着リゾチーム (バウンド) を重酢酸バッファー (pD = 3.8, 100 mM) で脱着させると同時に H-D 交換を止めた。この溶出溶液 (約 10 ml) を限外濾過により 0.5 ml に濃縮し、直ちに DQF-COSY (Bruker 社, AM-400) を測定した。測定されたアミドプロトンと α プロトンのクロスピークを体積積分することにより H-D 交換の定量を行い、速度係数を求めた。またヒドロキシアパタイトに吸着させないで H-D 交換させたリゾチーム (フリー) の H-D 交換速度係数と比較した。

3. 結果および考察

DQF-COSY スペクトルのアミドプロトンと α プロトンのクロスピークの 30 分、2 時間でのフリーとバウンドの比較ではほとんど差はみられなかった。24 時間では、Ala-9, Ala-11, Lys-13 の 3 個の残基でバウンドの H-D 交換がフリーより遅くなった。また、Leu-83 は 7 日間でバウンドの方がフリーより遅くなっていた。その他の残基では差はみられず、これら 4 残基はリゾチームのヒドロキシアパタイトへの吸着に関与していると考えられる。これら 4 残基の速度係数から k_{free}/k_{bound} を求めるとその値は 4~13 であった。また Lys-13 ではもっとも H-D 交換が遅くなっており、Lys の正電荷で吸着していると考えられる。この部位には他に Arg-128, Arg-14 が存在し、これらの正電荷も吸着に関与している可能性がある。

またこの部位はリゾチームの活性部位の裏側に当たることからリゾチームの活性は残っていると考えられる。



ニワトリ卵白リゾチームのヒドロキシアパタイトに吸着して H-D 交換の遅くなった残基 (白丸)

P 65

回転系におけるプロトンスピン-格子緩和時間を用いた
タンパク質フラジエリンの末端セグメントの運動性の評価

伊島理枝子（京大理、現・日本電子）、赤坂一之（京大理、
現・神戸大理）、相沢慎一（新技団、現・帝京大理工）、
Ferenc Vonderviszt（新技団、現・ハンガリアカデミーオブサイエンス）

Mobility of the Terminal Segments of Flagellin Evaluated using the Proton
Spin-Lattice Relaxation Times in the Rotating Frame.

Ishima R., Akasaka K., Aizawa S.-I.* and Vonderviszt F.* (Kyoto University
and *ERATO. Present address is Kobe University, JEOL Ltd., Teikyo Univer-
sity and Hungarian Academy of Science, respectively).

Bacteria has several flagellar filaments to swim in solution. This
filament is composed of a single kind of a protein, flagellin. We measured
proton spin-lattice relaxation times in the rotating frame of the mono-
meric flagellin and succeeded to evaluate the mobility of the N- and C-
terminal segments in flagellin though there are sometimes difficulties of
evaluation in proton relaxation. Results were available to consider the
self-assembly process of the flagellin into the flagellar filaments.

【序】バクテリアのフィラメントは一種類のタンパク質フラジエリンから成る。フラジエリンのフィラメントへの重
合はタンパク質濃度やpHによらず、必ず短い重合体であるtipを必要とする。このtipが
あれば、異なる温度間で可逆的に重合、脱重合を繰り返すことができる。この点で、
チューブリンやアクチンと異なる重合メカニズムを持つと考えられ、興味をもたれている。

そこで、我々はフラジエリンの重合過程を知る為に、まずモノマー状態のフラジエリンの主鎖、
側鎖のダイミックスをプロトン回転系でのスピン-格子緩和時間より調べた。

【試料及び測定方法】サルモネラ菌 SJW1103株由来のフラジエリン (MW 54000) と、その酵素
分解断片、F40断片、F45断片、F47断片 (MWはそれぞれ40, 45, 47 kDa) を用いた。
これらの断片は重合機能を失っており、F40断片までは容易に酵素分解されることか
ら、フラジエリンとF40の差であるN-末端側66残基とC-末端側44残基は重合に必要な不可欠
な領域であると考えられている [1, 2]。プロトン1次元NMR測定、回転系でのスピン-格子緩
和時間測定 (spin-locking field, 2.3 Gauss) を JEOL GX-400分光計を
用いて 400 MHz 25°C で測定した。熱変性したフラジエリン (熱変性温度約50°C) につい
ても58°Cで測定した。

プロトンNMR、回転系でのスピン-格子緩和時間、タンパク質

伊島 理枝子、 赤坂 一之、 相沢 慎一、 Ferenc Vonderviszt
いしまりえこ、あかさかかずゆき、あいざわしんいち、ふえれんっふおんだびっ

【結果・解析】フラジエリンの1次元スペクトルにはF40断片に無いシャープな信号が見られる。各断片のスペクトルを比較するとシャープな成分の強度、N-,C-末端領域に特異なアミノ酸残基の比較から、このシャープな成分はフラジエリンとF40断片との差、即ちN-,C-末端セグメントに由来する事がわかった。

フラジエリンと各断片の回転系での磁化の時間変化を2つの指数関数的減衰に近似し、各ピークについてシャープな成分とブロードな成分の2つのプロトン-格子緩和時間を求めた。即ち、

$$I_{total}^0(t) = I_{sharp}^0 \exp(-t/T_{1\rho_{sharp}}) + I_{broad}^0 \exp(-t/T_{1\rho_{broad}}) \dots (1)$$

とした。また単一の相関時間（見かけの相関時間）を用いると $T_{1\rho_{sharp}}$ は以下のように表される。

$$T_{1\rho_{sharp}}^{-1} = [J_0(0) + 10J_1(\omega) + J_2(2\omega)] \dots (2)$$

$$J_m(\omega) = \sum_j K_m \gamma^4 r_{ij}^{-6} \tau_{eff} / (1 + \omega^2 \tau_{eff}^2) \dots (3)$$

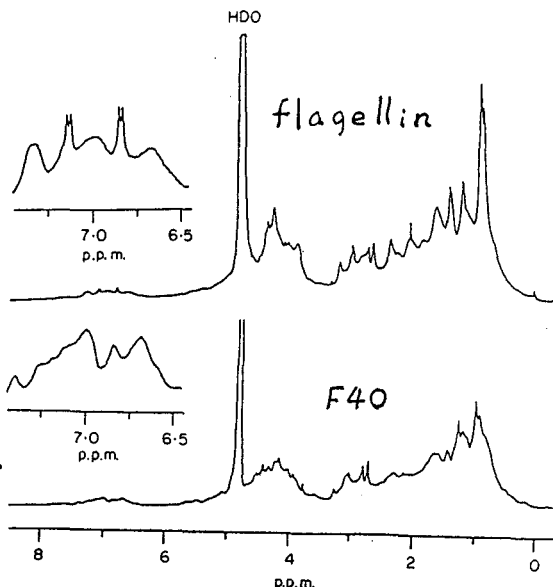
フラジエリンモノマーの3次構造はわかっていない。飽和移動実験をおこなったところ、シャープな成分に残基間の飽和移動が見られなかったことから、アミノ酸残基内だけのプロトン双極子相互作用を仮定し、各20種のアミノ酸残基についてそれぞれ10個のエレキ-最小構造から $\sum r_{ij}^{-6}$ を与えた。これより、フラジエリンとその断片のシャープな成分について、実験値 $T_{1\rho_{sharp}}$ から各ピークの τ_{eff} を得た。熱変性したフラジエリンについては、その値を25°C相当に換算した。

その結果、フラジエリンのN-,C-末端セグメントは、よく折り畳まれたF40領域に比べて極めて熱変性した状態に近いことがわかった。それは、相関時間にして4-5倍速い。しかし、ランダムコイル状態には至っていないことが明らかになった。

【結論】他の事実と組み合わせる[1]と、フラジエリンの約25%にあたるN-,C-末端セグメントは、熱変性に近い状態にあって互いに重合を妨げているが、ひとたび重合が始まると安定な α -ヘリックス構造となり互いの重合を促進すると考えられる。

プロトン緩和時間を用いた運動性の評価の場合、定性的な議論しかなされないことが多い。交叉緩和によって各プロトンの運動性が平均化されるからである。しかしながら、タンパク質中に大きな運動性のある場合はいくつかの仮定を置くことによって運動性を取り出すことができる。本研究はその1例であると考えられる。

[1] Vonderviszt, F., Kanto, S., Aizawa, S.-I. and Namba, K., J. Mol. Biol., 209, 127-133 (1989) [2] Ishima, R., Akasaka, K., Aizawa, S.-I., Vonderviszt, F., 266, 23682-23689 (1991)



P 66 NMRによるコリシンE3免疫タンパク質の高次構造解析

○矢嶋俊介¹、武藤裕²、横山茂之²、正木春彦¹、魚住武司¹

(¹東大・農・応用生命工学、²東大・理・生化)

NMR studies on the structure of Colicin E3 Immunity protein

Shunsuke Yajima¹, Yutaka Muto², Shigeyuki Yokoyama², Haruhiko Masaki¹ and Takeshi Uozumi¹

(¹Department of Biotechnology, and ²Department of Biophysics and Biochemistry, The University of Tokyo)

Colicins E3 and E6 kill *E.coli* by the RNase activity carried on their C-terminal T2A domains. The colicin-producer cells are protected from this action by specific inhibitor proteins, ImmE3 and ImmE6, which bind to E3-T2A and E6-T2A, respectively. Our genetic analysis revealed that the binding specificity between T2A and Imm is determined by only a few amino acid residues on each protein. Here we report the ImmE3 structure determined by the stable isotope-aided NMR spectroscopy. One third portion of the molecule is folded into a four-stranded antiparallel β -sheet, whose one side forms a hydrophilic surface of the molecule. All the specificity-determining residues are included within this β -sheet, protruding their side groups to the surface.

はじめに

コリシンは、大腸菌Colプラスミドが生産し、他の大腸菌を殺すタンパク質性毒素である。殺菌スペクトルをもとに分類されたE群コリシンファミリーの中で、コリシンE3とE6は、リボソームに対するRNase活性によって殺菌作用を示す。コリシンは551残基からなるタンパク質であるがそのRNase活性は、C末端97残基のT2A領域に局在している。Colプラスミドを持つ大腸菌は、自らが作るコリシンの作用から免れる「免疫性(immunity)」を備えている。この実体は、アミノ酸84残基からなるインヒビタータンパク質、Immであり、ImmがT2A領域に結合することによりRNase活性が抑えられる。

コリシンE3とE6は一次配列全域に渡って高い相同性を有し、その違いはわずかにT2Aとその近傍の12アミノ酸のみであり、一方これに結合するImmもE3とE6の間で相同性が高く、12アミノ酸のみが異なっている。しかしながら、E3とE6の免疫特異性(即ちT2A領域とImmの結

コリシンタンパク質・タンパク質間相互作用・NMR

やじましゅんすけ、むとうゆたか、よこやましげゆき、まさきはるひこ、うおずみたけし

合特異性)は全く異なっている。このことから、T2A-Immの結合では、相手タンパク質の認識が僅かな数のアミノ酸残基によって規定されていると考えられる。

このように、分子量が共に約一万でヘテロダイマーを形成し、しかも僅かな数のアミノ酸によって分子間の認識が行なわれているT2AとImmは、タンパク質間相互作用の実体を明らかにするための良いモデル系になると考え、我々は遺伝学的、構造化学的両面からの解析を行っている。今回ImmE3タンパク質の高次構造が明かとなったので報告する。

材料と方法

コリシンタンパク質とImmをコードする遺伝子は、元来SOSプロモーターに支配され、両タンパク質を複合体の形で大量に発現する。¹⁵N均一標識ImmE3タンパク質を得る場合は、複合タンパク質を精製し、6M尿素でImmE3を解離させ、透析により尿素を除いて再生させた。非標識タンパク質を得る場合には尿素変性を避けるため、ImmE3遺伝子をlacプロモーターに繋いで大量発現させた。精製における尿素変性過程の有無でHOHAHAスペクトルに差の無いことを確認した。サンプル濃度は、4 mM、pHを6.0とした。

NMR測定は、Bruker社AM-600スペクトロメーターを用い、30°Cで行なった。連鎖帰属、構造解析のために通常の¹H-¹H二次元スペクトルに加えて、¹H-¹⁵N HMQC、二次元HMQC-HOHAHA、HMQC-NOESY、三次元HOHAHA-HMQC、NOESY-HMQCスペクトルを測定した。アミドプロトンのH-D交換実験では、4°Cで12時間、限外濾過によりバッファーを重水に置換した後、HOHAHAスペクトルを測定した。また、HMQC-Jスペクトルにより³J_{HNα}のスピン結合定数を測定した。

結果と考察

a. ImmE3の高次構造

常法に従って主鎖シグナルの連鎖帰属を行なった。¹H-¹H二次元スペクトルでは、シグナルが重なり合って帰属が困難な場合には、¹H-¹⁵N二次元、三次元スペクトルを援用した。(Fig. 1にHMQCスペクトルを示した。)現在までにGly-18を除くすべての主鎖の¹Hと¹⁵N及び約95%の側鎖の¹Hの帰属を終えた。H-D交換実験では、重水置換を開始してスペクトルの測定が終了するまでに約30時間かかっており、水素結合を形成しているアミドプロトンのみが観察されたと考えられる。

隣接残基間NOE及び二次構造に特徴的なNOEをもとに、ImmE3の二次構造を明らかにした(Fig. 2)。その結果、ImmE3は、4本鎖からなる逆平行β-シート構造を主要モチーフとしており、ヘリックスは短いものが一つのみ存在した。

β-シートを構成するアミノ酸は一つおきにその側鎖をシート的一方に突き出す。ImmE3 β-シートでは、親水基と疎水基が交互に出現する傾向が明らかに見られ、β-シートの片側が親水的環境を、反対側が疎水的環境を形成していると考えられた(Fig. 3)。

隣接残基間、三

次元NOEからの距離情報、H-D交換による水素結合情報、HMQC-Jスペクトルから得られた二面角情報をもとに、EMBOSSプログラムによってディスタンスジオメトリーの計算を行なった（蛋白工学研・中村春木、中井孝尚両博士との共同研究による）。その予備的な結果から

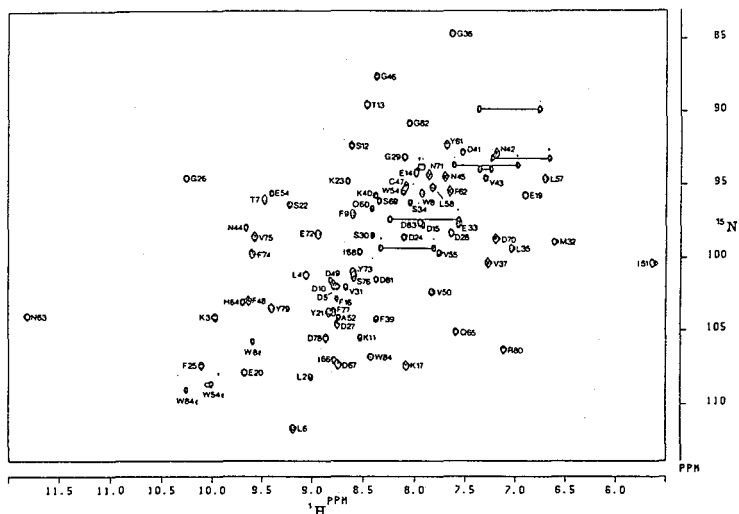


Figure 1: ImmE3タンパク質の¹H-¹⁵N HMQCスペクトル

の4本鎖のβ-シートを主たる骨格とし、残りの残基に関しては、β-鎖を繋ぐ2本の長いループ構造と1本の短いループ構造が、いずれもβ-シートの疎水環境面に位置していることが分かった。ヘリックスは、二本の長いループのうちの一方向のほぼ中間に存在した。即ち、β-シートの片面は親水的な分子表面を構成し、他の疎水面は3本のループ構造と共に分子のコアを形成していた。

b. ImmE3の特異性決定領域

前述のように、コリシンE3とE6は一次構造上非常に相同性が高く、違いが見られるT2A、Imm領域でもその数は僅かである。しかしながら、その結合特異性は厳密でE3-T2AはImmE3と、E6-T2AはImmE6とのみしか結合できない。これは、T2AそしてImm上の僅かな数のアミノ酸残基がE3とE6の違いを見分けるのに重要な役割を果たしていると考えられる。既に我々の行なった分子遺伝学的手法を用いた結果から、ImmE3、ImmE6において結合特異性を決めているアミノ酸残基が明かとなっている^{2,3)}。ImmE3においては、Cys-47が主要でGlu-19が補助的に、ImmE6ではAsp-5とTrp-47が特異性決定に重要である。

興味深いことに上記の両Immタンパク質における結合特異性決定に重要な5、19、47位のアミノ酸残基は、ImmE3においてβ-シートのほぼ中央部に集まり、しかもいずれもその側鎖を親水面側に突き出していた。即ち、β-シートのこの領域が、T2Aとの結合面であり、特異性決定領域であると推定された。今後、安定同位体標識したImmタンパク質、あるいはT2A領

域を用いてNMRによりT2A-Immタンパク質間の相互作用の解析を進めていく予定である。

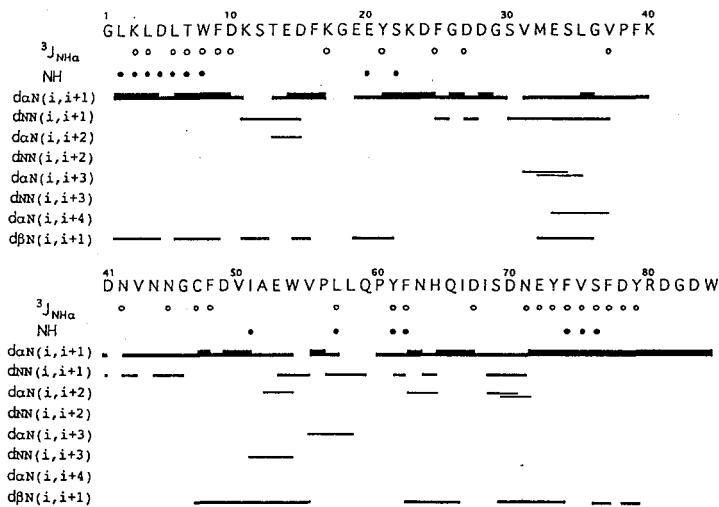
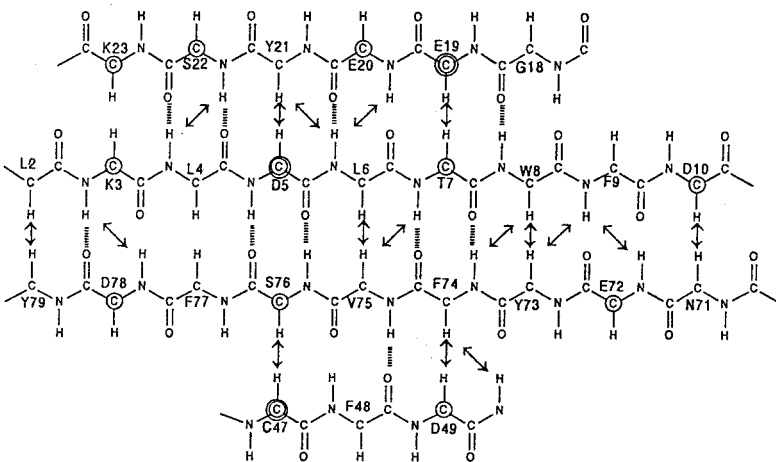


Figure 2:
1mmE3タンパク質における
隣接残基間NOE

黒丸は、水素結合を形成していると考えられるアミドプロトンを、白丸は $^3J_{NH\alpha}$ が8Hz以上であることを示す。

Figure 3:
1mmE3タンパク質中の
 β シート構造

丸で囲んだ残基は親水性であることを示す。二重丸は結合特异性決定基の5、19、47位のアミノ酸を示す。



参考文献

- 1) Yajima, S. et al. (1992) *Biochemistry* **31**, 5578-5586.
- 2) Akutsu, A. et al. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 6430-6436.
- 3) Masaki, H. et al. (1991) *Gene* **107**, 133-138.

(実験と計算方法) NMR 測定はエルカトニンの 5mM, 40% TFE/60% H₂O 溶液を用いて JEOL GSX500 ですべて 25°C でおこなった。スペクトルの計算と NOESY クロスピーク強度の積分は NMR2 (New Method Research, INC) でおこなった。2D-NOESY のシミュレーションにはプログラム CORMA(1) を、また実測の NOE 強度からプロトン間距離への変換は次に述べるプログラム MARDIGRAS(2) をもちい、ディスタンスジオメトリ計算は JEOL MolSkop でおこなった。以上の計算はすべて TITAN3000 コンピュータ上にて行った。

今回、緩和行列解析に用いたプログラム MARDIGRAS は、Borgie らによって提案された方法である。

NOESY スペクトル中のピークの強度と各プロトン間距離はつぎのように関係づけられる。

$$I_{ij} = [e^{-R \cdot t_m}]_{ij} \quad \dots(2)$$

ここで I は mixing time が 0 の時 E となるように normalize された NOE matrix であり R は緩和行列でその対角項、非対角項はそれぞれ

$$R_{ii} = \frac{2\pi\gamma^4 h^2}{5} \sum_{j=1, j \neq i} [J_{ij}^0(\omega) + 3J_{ij}^1(\omega) - 6J_{ij}^2(\omega)] \quad \dots(3)$$

$$R_{ij} = \frac{2\pi\gamma^4 h^2}{5} [6J_{ij}^2(\omega) - J_{ij}^0(\omega)] \quad \dots(4)$$

で表される。ここで運動のモデルは単一の相関時間をもった等方的回転拡散を仮定するとスペクトル密度はプロトン間距離と関係づけられる。

$$J_{ij}^n(\omega) = \frac{1}{4\pi r_{ij}^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + (n\omega\tau_c)^2} \right] \quad \dots(5)$$

このように NOESY スペクトル中の全てのピーク強度が解れば全てのプロトン対について、距離を算出することができるが、実際には S/N やピークの重なりのため完全な I を実測することは無理である。このため、MARDIGRAS では適当なモデル (ISPA 法で得られた粗い構造など) によって構築された緩和行列 R から始めて既知の情報とおきかえながら R と I を相互に計算することによって距離の最適値をもとめている。この最適値に対して、プロトン間距離の許容範囲を実測データの S/N をもとに計算し、構造計算のための距離の上限値および下限値としている。

実測データの質と量を増すため測定に用いる t_m は長いほうがよいが、ピーク強度に対するスピン拡散の効果が支配的になると、各クロスピークのもつ情報の個性がマスクされ、距離の最適値を得ることが出来ない。そこでつぎのような計算機実験によって最適な mixing time を探すことにした。初期構造からいくつかの mixing time で NOESY スペクトルをシミュレートし疑似的な実測データをつくり、逆にプログラム MARDIGRAS で距離に換算して初期構造中のプロトン間距離と比較する。初期構造を再現できる最長の mixing time を実測にもちいることにする。

(結果と考察) 初期構造はすでに報告した100ms NOESY スペクトルをもとに計算された構造のうち、最も構造情報を満たしたものをもちいた(3)(図1)。運動のモデルは単一の相関時間をもった等方的回転拡散を仮定し、 τ_c は非選択的 IR 法とHahnのスピンエコー法によって1D上でよく分離している、Leu3, Val8, Leu12, Leu16のアミドプロトンについて T_1, T_2 をそれぞれ測定し、 $\tau_c = 2\omega^{-1}(3T_2/T_1)^{\frac{1}{2}}$ によって 1.1ns の値を得た。

次に mixing time を 50ms から 500ms の間で 50ms ごとに変えた NOESY スペクトルをシミュレートし、疑似的な実測データとしてアミドプロトンとメチル基に関するピーク強度を抽出した。この疑似的な実測データをプログラム MARDIGRAS でプロトン間距離に換算した。これらを各 mixing time について初期構造中のプロトン間距離と比較して、最大のずれが 1Å を越えない条件をみたすスペクトルのうち最も長い mixing time は 300ms であったのでこれを最適値として採用した。この 300ms NOESY スペクトルを再度帰属し、各クロスピークの強度を体積積分によってもとめた。スペクトルの S/N が向上し 100ms NOESY にくらべ大幅に観測されるピークの数が増大した。たとえばアミド領域では通常ヘリックスに見い出される $d_{NN}(i, i+1), d_{NN}(i, i+2)$ に加えて $d_{NN}(i, i+3), d_{NN}(i, i+4)$ に対応するピークが観測され、また従来法では距離情報の不足で収束していなかった部分 (Thr22-Gly28) にも long range の NOE が観測された。この NOE 強度を再びプログラム MARDIGRAS を用いて距離制限に換算したところ、表1のように距離情報が ISPA 法に比べて約二倍に増加し、また距離の上限値と同数の距離の下限値を構造計算に用いることができた。距離の制限に11個の水素結合情報と10個の二面角の制限を加えて MolSkop でディスタンスジオメトリ計算を行った。

100個のランダムな初期構造から計算を始め構造情報をよく満たした5個の構造について結果を表1と図1に示す。得られた構造を ISPA 法で計算されたものと比較してみるとヘリックス部分 (Thr6 - Thr21) についてはそれほど大きな変化はない。N末端の環状部分は ISPA 法では Asu の Bridge のみが制限だったためかなり広がった2つの構造に収束していたが、今回の計算で turn の連続する構造に収束し Asu Bridge で形成される環がかなり小さいことがわかった。また Pro23 - Asp26 には β -turn がみられ、このため C 末端がヘリックスの方向に戻っている。この部分は ISPA では全く収束していなかった部分である。

このように静的な構造の精密化はスピン拡散の効果を考慮することで達成できた。ここで用いた運動のモデルでは局所的な運動は考慮していないが、完全緩和行列を計算する際、他の運動のパラメータを設定すればより realistic な蛋白質の描像に迫ることができる。これについては現在検討中である。

表1 ISPA とMARDIGRAS による構造計算の比較。

	No. of distance constraints			R. M. S. D (main chain/ Heavy atoms) (Å)		
	intra	sequential	inter	Ser2-Ser5	Thr6-Thr21	Tyr22-Gly28
ISPA	55	78	42	0.41 / 1.04	0.61 / 1.78	2.99 / 3.06
MARDIGRAS	118	91	112	0.13 / 0.55	0.27 / 0.91	1.34 / 2.15

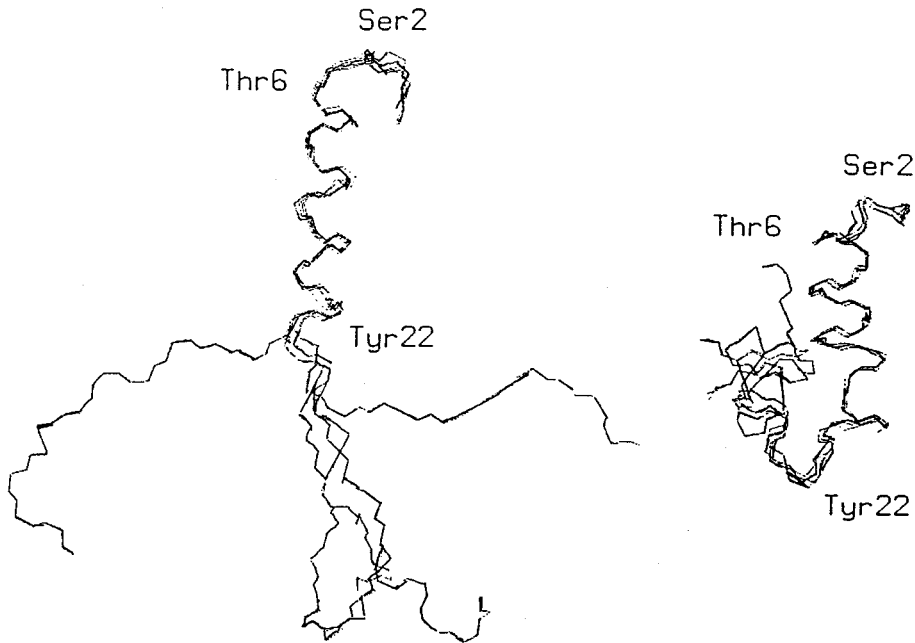


図1 ISPA (左) とMARDIGRAS (右) によって計算されたエルカトニンの溶液構造。ISPAではSer2-Thr21、MARDIGRASではSer2 - Gly28 について、主鎖構造間のRMSD が最小になるように重ねあわせた。

- 1)J. W. Keepers and T. L. James, *J. Magn. Reson.* 57,404 (1984)
- 2)B. A. Borgias and T. L. James, *J. Magn. Reson.* 87,475 (1990)
- 3)K. Ogawa et. al., *Peptide Chemistry* 1991,89 (1992)

常磁性 ^1H -NMR 飽和移動法によるフェリ型ミオグロビンの
酸-塩基平衡のダイナミックスの研究

(東工大生命理工、西東京科学大理工、高知大理) ○山本泰彦、
中條利一郎、井上義夫、鈴木知彦

Kinetic characterization of the acid-alkaline transition in Dolabella auricularia ferric myoglobin using ^1H -NMR saturation transfer experiments

(^aDept. of Biomolecular Engineering, Tokyo Inst. of Technol., ^bDept. of Material Engineering, Nishi-Tokyo Univ., ^cDept. of Biology, Kochi Univ.) Yasuhiko Yamamoto^a, Riichirô Chûjô^b, Yoshio Inoue^a and Tomohiko Suzuki^c

The acid-alkaline transition in ferric myoglobin of the mollusc, Dolabella auricularia, exerts the changes in both the coordination and spin states of the heme iron. Slower transition rate, compared to the NMR time scale, in this myoglobin allowed the observation of separate signals arising from the two forms and pH titration yielded a pK value of 7.8. ^1H -NMR saturation transfer experiments have been successfully used not only to provide the first signal assignments for the heme methyl proton resonances of the met-hydroxyl form of the myoglobin, but also to determine the kinetics of the transition.

[はじめに]

高スピンフェリ状態 ($S=5/2$) のヘム蛋白質のヘム鉄には、2種類の配位状態が存在する。水分子がヘム鉄に配位した六配位状態、そして、配位子を持たない五配位状態である。どちらの配位状態になるかは、ヘム鉄近傍の構造化学的特性に依存すると考えられる。また、pHを上げると、 OH^- がヘム鉄に配位し、高スピンフェリ状態は低スピンフェリ状態 ($S=1/2$) に変換される。この相互変換反応は、フェリ型ヘム蛋白質の酸-塩基平衡と呼ばれ、単純にpH変化によりスピン状態が可逆的に変化する。酸-塩基平衡の熱力学に関しては、分光法、ESR、NMR、磁化率の測定により詳細に研究されているが、反応速度の決定には、温度ジャンプ法、NMRシグナルの線幅の解析等によるしかなく、測定結果の解釈が困難であったり、精度が良くないなど、測定法に問題があった。

我々は、飽和移動法によるヘム蛋白質の酸-塩基平衡の速度論的解析が可能であることを見いだしたので、軟体動物腹足類の一種、ツツナミガイ (学名: Dolabella auricularia) のミオグロビンの場合を例にとって実験結果について報告する。

キーワード: NMR, ミオグロビン, 飽和移動, 酸-塩基平衡, 超微細シフト

やまもとやすひこ、ちゅうじょうりいちろう、いのうえよしお、すずきともひこ

[実験方法]

ミオグロビン試料の調製：ツツナミガイの咀嚼胃をホモゲナイズし、遠心分離で水抽出物を得た。次に、60-95%飽和硫酸アンモニウムで沈殿した分画をゲルろ過後、イオン交換カラムにより精製した。ミオグロビンをフェリシアン化カリウムで酸化し、ゲルろ過後、限外ろ過により約 1mM濃度に濃縮、重水置換してNMR測定試料とした。NMR測定：¹H-NMR測定は、日本電子製GSX-500で行った。標準的スペクトルは、スペクトル幅、60kHz、興味の対象としているシグナルの緩和時間を考慮し0.1s⁻¹の速度で約3千回積算して得た。選択的スピン格子緩和時間(T_{1s})は、選択的ラジオ波照射を用いた飽和回復法により測定した(図1)。飽和移動の実験には、基本的にはNOE差スペクトル測定用のパルスシーケンスをそのまま用いた。低スピン錯体に由来するシグナルを飽和させ、高スピン錯体由来するシグナルに飽和移動を観測する場合、飽和移動因子(I/I₀)の値は照射時間<50msで定常状態になった。

[結果と考察]

フェリ型高スピン状態のツツナミガイミオグロビンの¹H-NMRスペクトルのpH依存性を図2に示す。A~Dは、ヘムのメチルプロトンに由来するシグナルであり、他のミオグロビンのスペクトルと比較することにより、それぞれ、A(8-Me), B(5-Me), C(3-Me), D(1-Me)と帰属できる。pH上昇とともに、それらのシグナル強度は減少し、A'~D'の強度が増大していく。A'~D'は、OH⁻が配位した低スピン状態のミオグロビンのヘムのメチルプロトンに由来するシグナルである。また、シグナル強度の比較により酸-塩基平衡のpK値は7.8と決定された。A'~D'の帰属は、飽和移動法を利用して行うことができた(図3)。A~Dを順次ラジオ波照射により飽和させることにより、B', A', C', D'に飽和移動が観測される。したがって、A'(5-Me), B'(8-Me), C'(3-Me), D'(1-Me)と帰属できる。反応(低スピン→高スピン)速度(k_{BA})の決定は、C'を照射しCへの飽和移動の観測により行った。I/I₀=0.52, CのT_{1s}=3.3msを、k_{BA}=(T_{1s})⁻¹(1-I/I₀)/(I/I₀)に代入してk_{BA}=280s⁻¹と求まった。逆反応の速度は、k_{BA}、pH、平衡定数より算出することができる。

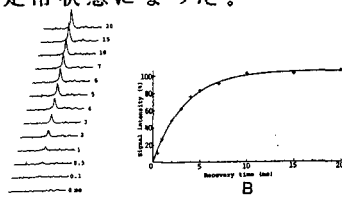


図1; T_{1s}の測定。(A) Partially relaxed spectra. (B) Non-linear plot.

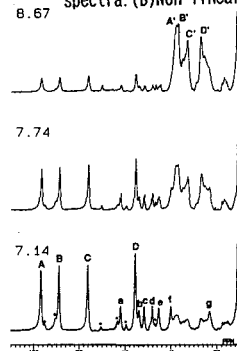


図2: ¹H-NMR スペクトルのpH依存性.



図3; 飽和移動差スペクトル。下向きの矢印で示されているシグナルが照射されている。

○依田恵子、春山英幸、桑野晴光、浜野潔¹、丹沢和比古¹
 (三共・分析代謝研、¹醸酵研)

Conformational analysis of A new cyclic depsipeptide, Leualacin

Keiko Yoda, Hideyuki Haruyama, Harumitsu Kuwano ,
 Kiyoshi Hamano¹ and Kazuhiko Tanzawa¹
 (Sankyo Co., Analytical and Metabolic Research and
¹ Fermentation Research Laboratories)

The three-dimensional structure of Leualacin, a novel calcium channel blocker from *Hapsidospora irregularis* was determined in CDCl₃. Based upon the dihedral angle constraints from the analysis of ³J_{H-H} and ³J_{C-H}, and the distance constraints deduced from ¹H-¹H NOEs and ¹³C-¹H NOEs, the conformers completely satisfying the NMR data could be obtained by the grid search algorithm in SYBYL program. The conformation was characterized by the γ - and β -turn like structures on the analogy of cyclic peptides. The trans-annular hydrogen bonds closing them are formed between L-leucine and β -alanine. The RMSDs calculated for backbone atoms were about 0.4 Å. L-N-methylphenylalanine and L-leucic acid were connected by the cis peptide bond, and the ring current effect of side chain was reproduced by the calculation according to Bovey's formula.

I 緒言

Leualacin は *Hapsidospora irregularis* 菌の培養液から単離されたカルシウムチャンネルブロッカーであり、L-leucine, β -alanine, L-N-methylphenylalanine, D-及び L-leucic acid から構成された新規 depsipeptide 化合物である¹⁾。我々は、¹H-¹H NOE, ³J_{H-H} に基づく制限に加えて、¹³C-¹H NOE によって同定された水素結合位置、及び ¹³C-¹H 間距離、³J_{C-H} による二面角の制限を行い、これらの NMR 情報を満足する三次元構造モデルを構築した。

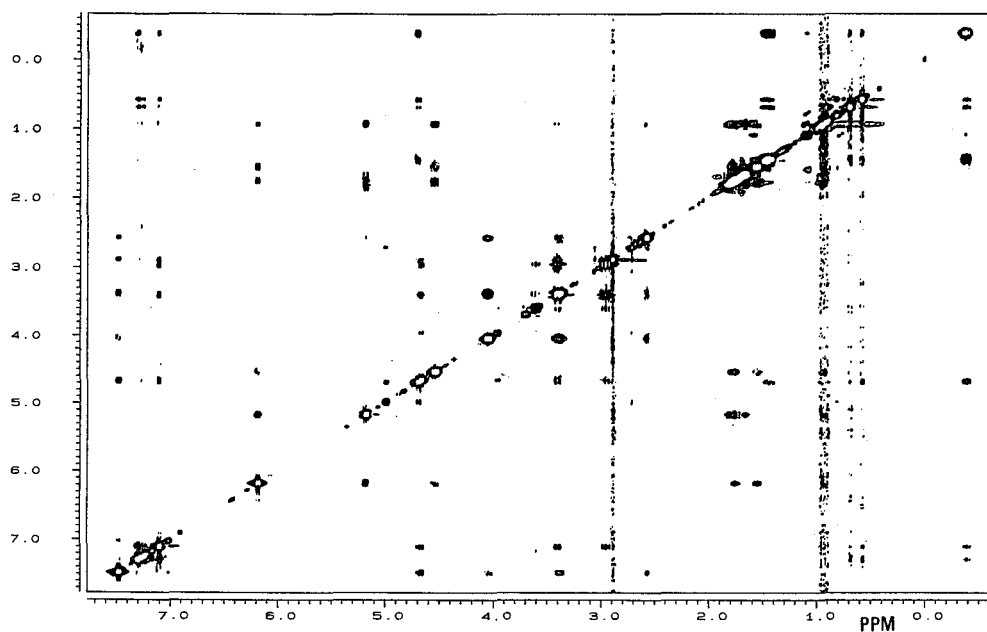
NMR、三次元構造決定、環状 depsipeptide、NOE、 γ -turn、 β -turn 構造

よだけいこ、はるやまひでゆき、くわのはるみつ、はまのきよし、たんざわかずひこ

II 実験

目的に応じて 35~780 mM の CDCl_3 溶液を試料として用い、JEOL JNM-GX500 及び GX400 分光計にて、30°C で、NOESY、 ^{13}C - ^1H ロングレンジ J 分解、 ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE 差スペクトル等を測定した。三次元モデルを構築する際の二面角の制限範囲は、カップリング定数 ($^3J_{\text{H-H}}$, $^3J_{\text{C-H}}$) から Karplus-like の式を用いて算出した値 $\pm 20^\circ$ とした。H-H 間距離は、2 回測定した mixing time 300 ms での NOESY クロスピーク体積を NMR2 の surface fitting により求め、ジェミナルプロトン間距離を 1.8 Å と仮定し、NOE が距離の 6 乗に反比例することを利用して算出した。 ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE から C-H 間距離を算出する場合は、同様に、ペプチド結合部位のアミドプロトンとカルボニル炭素間距離、2.08 Å を基準に用いた。

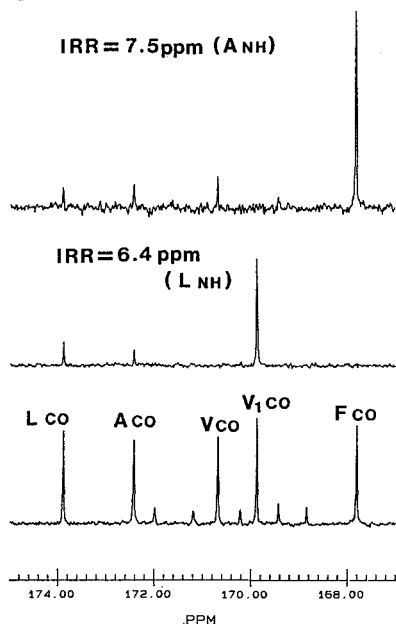
分子モデリングには、Tripos 社の SYBYL プログラムを用いた。まず、側鎖間 NOE が観測された N-methylphenylalanine と L-leucic acid 部分について systematic search²⁾ (rotatable bond を次々に回転させて派生するコンホメーションの中から条件を満足するコンホマーを探索するアルゴリズム) を行い、NMR 情報を満足するコンホメーションを得た。次いで、この部分の二面角を得られた範囲に限定し、分子全体について ring closure (閉環の条件を付加した grid search) を行い、Leualacin の三次元構造モデルを構築した。更に、側鎖の環電流効果を Bovey らの方法に従って計算し、実測値を満足するコンホメーションを選択した。得られたコンホマーについて、H-N-O 角を水素結合可能な範囲に制限しつつ、エネルギー極小化を行った。



< Fig. 1 > NOESY spectrum of Leualacin in CDCl_3

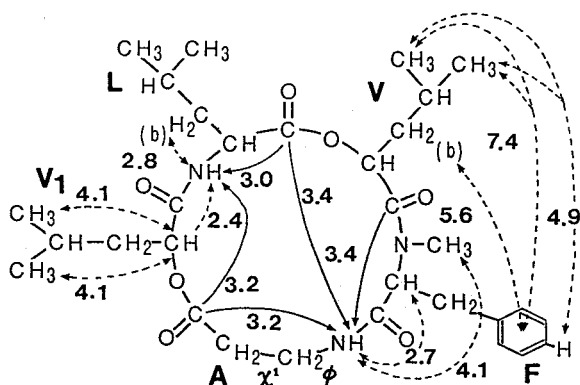
III 結果と考察

Fig. 1 にピーク判定に用いた、mixing time 300, 500, 800 ms で測定した NOESY の和のスペクトルを示し、Fig. 2 に ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE 差スペクトルを示した。157 mM での ^{13}C の NT_1 は 0.8 ± 0.2 s であり、 τ_c が分子内でほぼ一定であると考えられるため、NOE が距離の 6 乗に反比例することを利用して ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C 距離を算出した。Fig. 3 に三次元構造モデリングに用いた、補正後の距離の制限を示した。アミドプロトン化学シフト値の温度依存性が重クロロホルム中で $0.2 \sim 0.6 \times 10^{-3}$ ppm/°C であったことから、水素結合の形成が示唆され、Fig. 3 に示した C-H 間距離から、以下に述べる計算によって水素結合位置を同定した。



<Fig. 2>

^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE difference spectra (top and second) and complete decoupled ^{13}C -NMR spectrum of Leulacin in CDCl_3 (bottom).

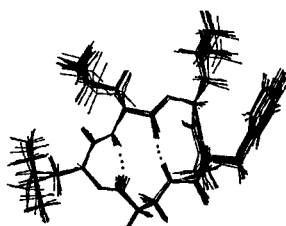
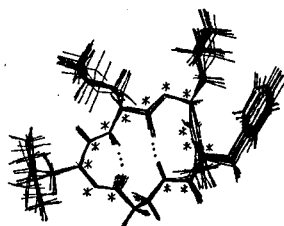


<Fig. 3>

The distance constraints deduced from ^1H - $\{^1\text{H}\}$ NOEs (\dashrightarrow) and ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOEs (\longrightarrow). The arrows point from ^{13}C to ^1H .

実験の項に述べた 2 段階の grid search を行った結果、NMR に基づく二面角と Fig. 3 に示した 13 コの距離の制限を満足するコンホマーとして、CPU time 約 41 時間で 839 コのコンホマーが得られた。次いで、 $\text{V}\beta$ (b)プロトン (-0.41 ppm、Fig. 3 参照) の環電流効果が L 及び V_1 の β 位プロトンとの化学シフト差 ($-1.9 \sim -2.2$ ppm) の範囲内にあるものを選択した結果、143 コのコンホマーが得られた。NOE と二面角の組合せを考慮すると Fig. 3 上の $\text{A}\phi$ と $\text{A}\chi^1$ の二面角は、 $\text{A}\phi$ が 120° のとき $\text{A}\chi^1$ が 60° (type A)、 $\text{A}\phi$ が -120° のとき $\text{A}\chi^1$ が -60° (type B) の 2 通りに限られ、143 中 41 コのコンホマーが該当した。

これらについてエネルギー極小化を行い、水素結合 (H-O 間) 距離が 2.8 \AA 以上であるコンホマーを除外した結果、最終的に type A が 14、type B が 18、計 32 コのコンホマーが得られた。任意の代表コンホマー 8 コを、type A について図 4 に、type B について図 5 に示した。これらは、本質的には 1つのコンホメーションであると考えられる。

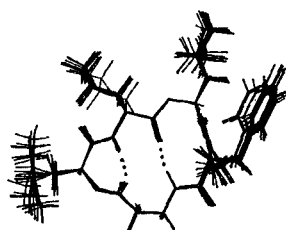
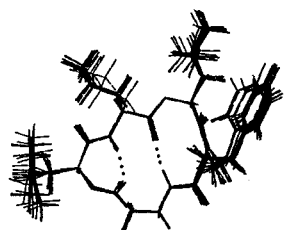


< Fig. 4 >

Stereoplots of the type A conformations in CDCl_3 . (RMSD= 0.17)

*: The atoms used for RMSD calculations

··· : Hydrogen bonds



< Fig. 5 >

Stereoplots of the type B conformations in CDCl_3 . (RMSD= 0.12)

Leualacin の 16 員環主鎖は、ペプチドの γ -turn と β -turn に相当する構造から構成され、両者の境界にあたる β -alanine と L-leucine 間の二つの水素結合により固定されていることが判った。得られた構造の主鎖 RMSD の平均値は、約 0.4 \AA であった。L-N-methylphenylalanine と L-leucic acid は、シス型にペプチド結合しており、側鎖の環電流効果を計算により確認できた。

References

1) K. Hamano, M. Kinoshita, K. Furuya, M. Miyamoto, Y. Takamatsu, A. Hemmi and K. Tanzawa, *J. Antibiotics*, **45** (6), 899-905, 1992

K. Hamano, M. Kinoshita, K. Tanzawa, K. Yoda, Y. Ohki, T. Nakamura and T. Kinoshita, *J. Antibiotics*, **45** (6), 906-913, 1992

2) R. A. Dammkoehler, S. F. Karasek, E. F. B. Shands and G. R. Marshall, *J. Comput-Aided Mol. Des.*, **3**, 3-21, 1989

半沢 宏之、春山英幸、渡辺一義*、鶴藤丞*
 (三共 分析代謝研、サイトシグナル研*)

Structural analysis of CINC by homonuclear 3D-NMR

Hiroyuki Hanzawa, Hideyuki Haruyama, Kazuyoshi Watanabe
 and Susumu Tsurufuji.

(SANKYO Co., Ltd. Analytical & Metabolic Research
 and Cytosignal Research)

In the course of the ^1H -NMR study for the solution structure of CINC, a chemoattractant for the neutrophil existing as homo dimer (72 amino acids per monomer), the 3D NOESY-HOHAHA and HOHAHA-NOESY spectra were applied to overcome the difficulties arising from the overlapping of signals. The advantage of those 3D techniques for the unambiguous assignments could be substantiated at all stages of the analysis, sequential assignments, secondary structure identification and the collection of long range NOEs.

1、はじめに

CINC (Cytokine induced neutrophil chemoattractant) はラットにおいて、IL-1, TNFの刺激により産生され、好中球の誘走を活性化し炎症の初期過程において重要な役割を担う mediator である。IL-8 family と呼ばれる1群のタンパク質に属し、すでに3次元構造の明らかになっているヒトIL-8とは47%の相同性を有する¹⁾。ただし、CINCはヒトIL-8と異なりT細胞を活性化しないこと、1次構造上同じ family に属するヒトMGSA (GRO) と相同性が高いことから、ラットにおけるMGSA (GRO) と考えられている。ヒトMGSA (GRO) はCINCと同じく、好中球には作用するがT細胞には作用しないサイトカインである。CINC, MGSAのIL-8との機能の相異を構造との相関により明らかにする目的で、CINCの構造解析を行なっている。

CINCは72残基からなる比較的小きなタンパク質ではあるが、水溶液中で2量体を形成していることから線幅が広く、シグナルの重なるのために通常の2次元のみの解析では完全な帰属ができなかった。CINCは適当な発現系がなく安定同位体標識ができないため、同種核3次元NMRの適用を試みた。同種核3次元NMRはこれまでその適用例は多くはないが、安定同位体標識のできない系においては有力な方法に

同種核3次元NMR 2量体, chemoattractant, IL-8

はんざわひろゆき、はるやまひでゆき、わたなべかずよし、つるふじすすむ

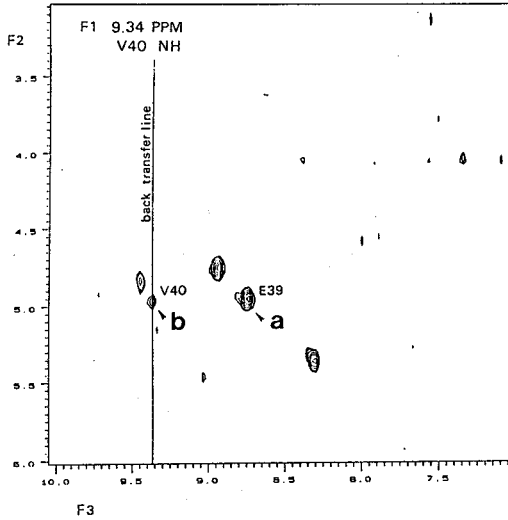
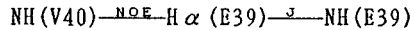


図 1

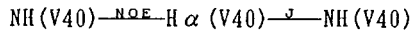
F2F3 plane of NOESY-HOHAHA

F1=9.34 PPM NH(V40)

ピーク a



ピーク b



なり得ると思われる。今回、同種核 3 次元 NMR を用いることにより sequential assignment を行ない、二次構造を同定することができたので報告する。

2、方法

試料は化学合成によって得られたものを用いた。NMR 測定には、最終的に pH 5.2 200mM NaCl を含む重水または軽水（ロックのため 10% D₂O を含む）の溶液にした。J E O L の G S X - 5 0 0 を用い、DQF-COSY, HOHAHA, NOESY, および 3 次元 NMR の測定を行なった。軽水信号の消去には主にダンテパルスを用いた。

3 次元の NOESY-HOHAHA および HOHAHA-NOESY はデータポイント 128×128×512 または 128×64×512 で測定し、F1 と F2 をそれぞれ 2 倍にゼロフィルしてフーリエ変換を行なった。データ処理は NMRi 社の NMRZ を用いた。mixing time は NOE

150msec, HOHAHA 45msec で測定した。タンパク濃度は 5mM、積算を各 8 回もしくは 16 回で行ない、測定に 8 日を要した。

3、結果、考察

3、1 連鎖帰属

連鎖帰属は定法に従い、NOESY を用いて解析を進めた。アミドプロトンのシグナルの重なりは温度を変えて測定することによりかなり克服できたが、αプロトンの重なりが激しく 2 次元スペクトルのみでは解析が困難であったので、3 次元 NMR を適用した。隣接残基の α プロトンが重なると残基内の NOE と隣接残基間の NOE、

αN(i, i+1), が重なってしまい、一義的に帰属を進めていくことはできない。この 2 個のシグナルの分離は 3D-NOESY-HOHAHA を用い、αプロトンの磁化を HOHAHA により、それぞれのアミドプロトンに移すことにより可能となった。図 1 に一例を示す。図 1 は F1 = δNH(V40) における F2F3 plane である。αプロトンの化学シフト値が偶然一致した V40、E39 間の NOE（ピーク a）と V40 の残基内 NOE（ピーク b）が分離して観測され明確な連鎖帰属が可能となった。ここにピーク a, b はそれぞれ

$\text{NH(V40)} \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}\alpha(\text{E39}) \xrightarrow{\text{J}} \text{NH(E39)}$, $\text{NH(V40)} \xrightarrow{\text{NOE}} \text{H}\alpha(\text{V40}) \xrightarrow{\text{J}} \text{NH(V40)}$ の磁化移動の経路を経て観測されたものである。同様にプロリン残基の帰属において αδ(i, i+1) の NOE のシグナルの解析にも有用であり、NOESY-HOHAHA スペクトルを用いることにより連鎖帰属を終えることができた（図 2）。

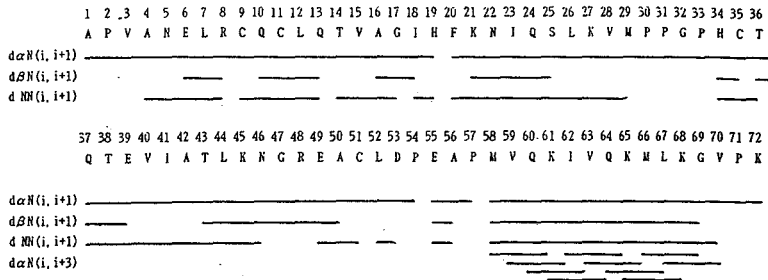


図2 CINCの一次構造と連鎖帰属

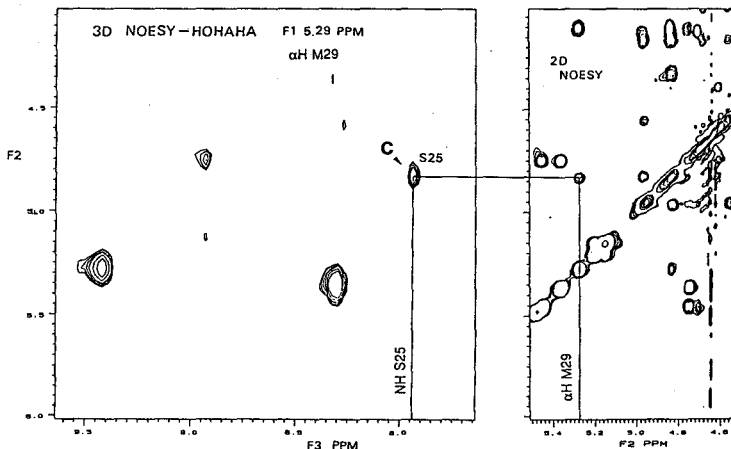


図3 3D NOESY-HOHAHAによる
H α (M29)-H α (S25) NOEの帰属

3、2 二次構造の同定

C末端に α ヘリックスが存在することが $\alpha N(i, i+3)$, $\alpha\beta(i, i+3)$ といった特徴的なNOEによって明らかになった。また $\alpha\alpha$ の領域に強いNOEが観測されることからヒトIL-8と同様 β シートを形成していることがわかった。ヒトIL-8では β シートのところで2量体を形成していることから、CINCにおいても β シートを同定するために、サブユニット内とサブユニット間のNOEを注意して分類する必要がある。サブユニット内とサブユニット間のNOEを三次元構造情報なしで一義的に分類することはできないので、まずNOEシグナルの帰属を明確に行ない、その後1量体としては説明不可能なNOEを、2量体の β シート界面として解釈する必要がある。この過程でも3次元NMRが有用であった。例えば、M29 α プロトンから4.8PPMに強いNOEが観測されたが、4.8PPMには5個の α プロトンが重なっており、2次元NMRだけでは帰属することはできなかった。一方、3D-NOESY-HOHAHAのF1=5.29PPM; H α (M29)におけるF2F3 planeを図3に示す。(δNH , $\delta\alpha H$)の組み合わせが(7.90, 4.83)である残基はS25に限定されることに注意すれば、図中cのピークはH α (M29) $\xrightarrow{\text{NOE}}$ H α (S25) $\xrightarrow{\text{NH}}$ NH(S25)の経路を磁化移動したものと解釈され、このNOEは異なるサブユニットに属するH α (M29)-H α (S25)間NOEに一義的に帰属できた。これらにより、図4に示す β シート構造が明らかになった。

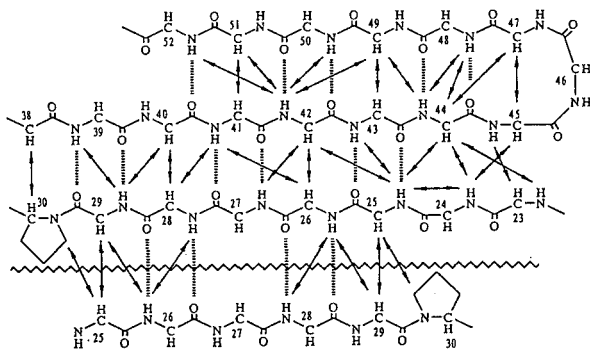


図4 CINCのβシート領域
 ∩∩∩ は2量体形成部位を示す。

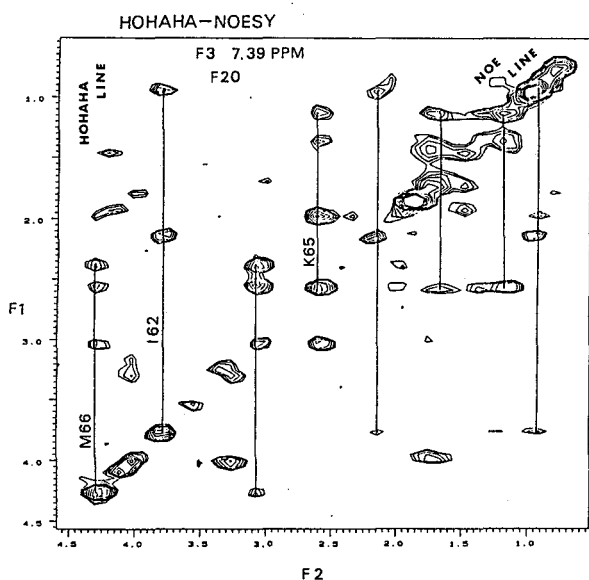


図5
 F1F2 plane of HOHAHA-NOESY
 F3=7.39 PPM εH of F20
 F20からのロングレンジ NOE を
 帰属できる

3、3 ロングレンジ NOE

現在CINCの3次元構造を決定するためのNOEを収集しており、その際も、3次元NMRを用いて解析を進めている。同種核の3次元NMRは分解能を上げるために積算時間を多く要することから、S/N比はあまり良くなく、弱いlong-range NOEを帰属するには不利である。しかしながら高磁場側のシグナルの多い領域のNOEを解析するには十分有用性がある。図5に重水中で測定したHOHAHA-NOESYのF1F2 planeを示す。F3=7.39 PPMでF20のεHからのNOEが観測されており、HOHAHAのtransferにより、I62、K65、M66らを明確に同定することが容易に可能である。

以上のように同種核3次元を用いてCINCの構造解析を進めることができ、実際の系においても有用であることが明らかになった。同種核3次元は分解能の問題から積算時間を要するのが欠点であるが、分子量1万程度のタンパク質では、安定同位体標識を必要とせず、実用的な方法であると思われる。

1) Watamabe, K., et al J. Biol. Chem. 264 (19), 19559-19563

○小島正樹¹, 田之倉 優¹, 武藤 裕¹, 宮野 博², 鈴木榮一郎²,
浜谷 徹³, 滝沢登志雄³, 高橋健治¹

(¹東大・理・生化, ²味の素・中研, ³明治製菓・生科研)

Conformational Analysis of *A. niger* Non-Pepsin-Type Acid Proteinase by Multi-Dimensional NMR

Masaki Kojima¹, Masaru Tanokura¹, Yutaka Muto¹, Hiroshi Miyano²,
Ei-ichiro Suzuki², Toru Hamaya³, Toshio Takizawa³, and Kenji Takahashi¹

¹Faculty of Science, University of Tokyo, ²Central Research Laboratories,
Ajinomoto Co., Inc., ³Bioscience Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

Proteinase A secreted by the fungus *Aspergillus niger* var. *macrosporus* is a non-pepsin-type acid proteinase. It consists of two polypeptide chains, a light chain of 39 residues and a heavy chain of 173 residues. They are bound non-covalently to each other. In order to elucidate the characteristics of the three-dimensional structure of the enzyme, the conformational analyses of the enzyme and its light chain were performed by NMR spectroscopy. The ¹H NMR spectra and HMQC spectra (¹⁵N-¹H and ¹³C-¹H) obtained for the native enzyme suggested that the enzyme was rich in β -sheet structure and may have a rigid core in the molecule. As for the light chain, sequence-specific assignments were carried out for the 2D ¹H NMR spectra in the dimethylsulfoxide.

【序】クロコウジカビ (*Aspergillus niger* var. *macrosporus*) が産生するプロテアーゼ A は、軽鎖 (39 残基) と重鎖 (173 残基) の 2 本鎖から成り、酸性下で作用する。従来のペプシン型酸性プロテアーゼとは、酵素学的性状が大いに異なり、また他の蛋白質と一次構造上の相同性が殆どない。本酵素の溶液中における立体構造を解明するため、¹H 2 次元 NMR (NOESY, TOCSY, DQF-COSY)、及び非同位体ラベル酵素による ¹⁵N-¹H HMQC, ¹³C-¹H HMQC の測定を行った。また DMSO 中で軽鎖のみの 2 次元 NMR (NOESY, TOCSY, DQF-COSY) を測定し、シグナルの帰属を行った。

【方法】プロテアーゼ A はプロクターゼ原末より精製した。軽鎖は中性条件下で重鎖から分離した後 HPLC で精製した。2D NMR (NOESY, TOCSY, DQF-COSY) 測定は Bruker AM-400 及び A-MX-600 分光計を用いた。プロテアーゼ A については 3mM (重水中) 及び 5mM (軽水中), 45 °C, pH 4.6 で、軽鎖については 2mM (DMSO-d₆ 中), 25 °C で測定した。

【結果】図 1 にプロテアーゼ A の TOCSY スペクトルの指紋領域を示す。(a) の軽水中のスペクトルでは α プロトンとアミドプロトンとの交差ピークが 200 個前後存在し、このうち半数

A. niger, 非ペプシン型酸性プロテアーゼ, 2D NMR

こじまさき たのくらまさる むとうゆたか みやのひろし すずきえい ちろう
はまやとおる たきざわとしお たかはしけんじ

近くが(b)の重水中でも溶媒と交換せずに観測されることから、プロテアーゼAはnative状態において分子内に堅固なコアを有することがわかった。また(a)における上記 α プロトンとアミドプロトンとの交差ピークの多くは、溶媒のシグナルよりも低磁場側に観測され、プロテアーゼAが β シート構造に富むことを反映している。このことはCDスペクトルの解析結果とも一致した。なお(a)のHのシグナルは、プロテアーゼAに1個だけ存在するHis残基のC2プロトンとC4プロトンとの交差ピークであるが、pH滴定の結果、この残基の巨視的pKa値は6.9であり、変性の中点pHである6.5よりも高かった。現在プロテアーゼAの活性部位や反応機構は不明であるが、上記の結果はHis残基が酵素の触媒作用や構造安定化には直接には関与していないことを意味する。プロテアーゼAの2DスペクトルはNOESY, DQF-COSY以外に、天然存在比を利用したHMQC (^{15}N - ^1H , ^{13}C - ^1H ; 10mM) スペクトルにおいてもよく分離したシグナルを与え、 ^{15}N - ^1H HMQCでは130個程度の交差ピークが観測された(図2)。これらのスペクトル上のシグナルの同定を、3D NMR測定を試みと共に現在行なっている。

図3に軽鎖単独のTOCSYスペクトルを示す。NOESYにおいてアミドプロトン間にNOEが観測されることから、軽鎖単独で規則構造をとっていると考えられるが、nativeコンフォメーション中の軽鎖の構造と同一かどうかは不明である。一次構造に基づき連鎖帰属を行なった。各残基の α プロトンとアミドプロトンの化学シフト値のみ表1に示した。現在距離情報に基づき立体構造を計算している。

【謝辞】 ^{15}N - ^1H HMQC, ^{13}C - ^1H HMQCスペクトルを測定して頂きました島津製作所応用技術部の大藪又茂氏に深く感謝致します。

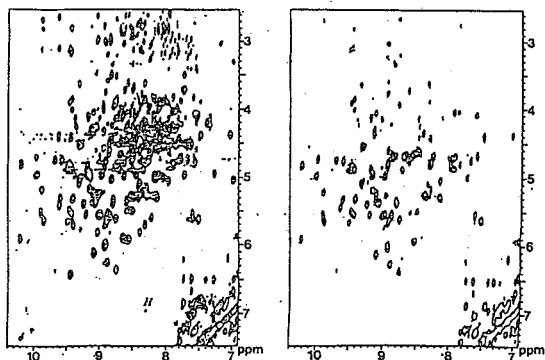


図1. プロテアーゼAのTOCSYスペクトル(44ms)

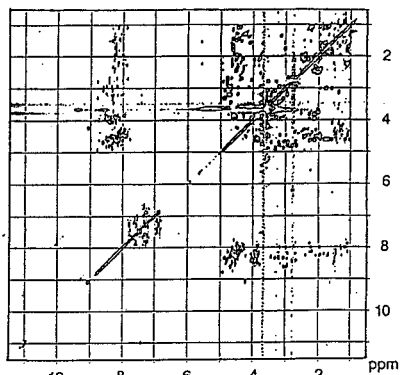


図3. 軽鎖のTOCSYスペクトル(44ms)

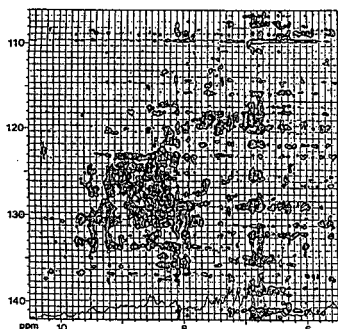


図2. プロテアーゼAの ^{15}N - ^1H HMQCスペクトル(10mM, 37°C)

表1. 軽鎖主鎖シグナルの化学シフト値(ppm)

	NH	α H	NH	α H	NH	α H	NH	α H
Glu1	7.92	4.50	Val11	7.74	4.31	Thr21	8.07	4.36
Glu2	8.40	4.37	Leu12	8.03	4.31	Gly22	8.23	3.85
Tyr3	8.22	4.60	Ile13	7.84	4.26	Glu23	7.94	4.32
Ser4	8.36	4.45	Gly14	7.94	3.77	Phe24	8.18	4.69
Ser5	8.37	4.46	Asp15	8.15	4.33	Thr25	8.06	4.35
Asn6	8.26	4.64	Gly16	8.30	3.85	Val26	7.84	4.46
Trp7	8.15	4.51	Tyr17	8.02	4.51	Pro27		
Ala8	8.07	4.25	Thr18	8.96	4.06	Ser28	7.62	3.60
Gly9	8.23	3.66	Lys19	8.07	4.45	Val29	8.00	4.47
Ala10	8.16	4.35	Val20	7.97	4.22	Ser30	8.11	4.41
						Ala31	7.94	4.44
						Gly32	8.41	3.79
						Ser33	8.07	4.45
						Ser34		
						Gly35		
						Ser36		
						Ser37		
						Gly38		
						Tyr39	7.64	4.25

○山崎和彦¹, 外山洋一¹, 小塩尚代¹, 武藤 裕¹, 吉垣純子¹,
 白水美香子¹, 伊藤 隆¹, 河合剛太², 渡辺公綱², 西村 暹^{3,4},
 宮澤辰雄⁵, 横山茂之¹ (¹東大・理, ²東大・工, ³国立がんセンター研・
 生物, ⁴現 萬有製薬つくば研, ⁵蛋白工学研)

NMR STUDIES OF HUMAN c-Ha-Ras MUTANT PROTEINS

Kazuhiko Yamasaki¹, Yoichi Toyama¹, Hisayo Oshio¹, Yutaka Muto¹, Junko Fujita-Yoshigaki¹,
 Mikako Shirouzu¹, Yutaka Ito¹, Gota Kawai², Kimitsuna Watanabe², Susumu Nishimura^{3,4},
 Tatsuo Miyazawa⁵, and Sigeyuki Yokoyama¹

¹Faculty of Science, University of Tokyo, ²Faculty of Engineering, University of Tokyo, ³National Cancer
 Research Institute, ⁴Present Address: Banyu Tsukuba Research Institute in Collaboration with Merck Research
 Laboratories, ⁵Protein Engineering Research Institute.

A proto-oncogene *ras* product (Ras) is a guanine nucleotide-binding protein (21kDa); the GTP-bound form is active while the GDP-bound form is inactive in the signal-transducing activity. The "effector region" that is essential for the activity includes residues from Tyr32 to Tyr40 of Ras. Recently, we have assigned all the HSQC signals due to backbone amide groups both in GDP-bound and GTP-bound states using amino acid-selective ¹⁵N-labeling method. Thus, we have found a conformational polymorphism in the effector region of the GTP-bound Ras protein. In the present study, we prepared effector-region mutant proteins and analyzed their structural features by NMR spectroscopy. P34G and T35S mutant Ras, which are inactive in signal transduction, showed conformations similar to each other but much different from that of the wild-type protein, and the conformational polymorphism was not observed. Thus, we concluded that these residues (P34 and T35) are essential for proper conformational change of Ras upon GDP/GTP exchange.

【序】 Rasタンパク質は、189残基からなるグアニンヌクレオチド結合タンパク質で細胞の増殖や分化に関わるシグナル伝達系において重要な役割を果たしている。GTPを結合したRasタンパク質は活性型であり、シグナル伝達のターゲット分子と相互作用するが、GDPを結合したものは不活性型である。Rasタンパク質がターゲットと相互作用するとき直接的な役割を果たす主な領域は、エフェクター領域と呼ばれ、Tyr32からTyr40までとされている。この領域のコンフォメーションがGDP結合型とGTP結合型で異なり、それをターゲットが認識すると考えられる。私たちは、すでに、エフェクター領域に含まれる38~40位がGDP型では逆平行β-シート構造をとるが、GTP型ではこの構造がほどけることをNMRにより見いだしている(1)。さらに、安定同位体標識の手法を用いて、主鎖¹H-¹⁵Nクロスピークの帰属を完了しており(2-4)、GTP結合型においては、コンフォメーションの局所的多形性のため、エフェクター領域やリン酸基

Rasタンパク質、部位特異的変異導入

やまさきかずひこ, とやまよういち, おしおひさよ, むとうゆたか, よしがきじゅんこ, しろうずみかこ, いとうゆたか, かわいごうた,
 わたなべきみつな, にしむらすむ, みやざわたつお, よこやましげゆき

結合部位の主鎖 ^1H - ^{15}N クロスピークがブロードニングしていることを示している(4).

エフェクター領域の中央に存在するThr35をSerに置換した変異体(T35S)は、シグナル伝達活性を失うことが知られているが、本研究では、この変異が高次構造にどのような影響を及ぼすかをNMRを用いて調べた。さらに、Thr35に隣接するPro34について変異体(P34G)を作製し、シグナル伝達活性および高次構造について調べた。

【方法】 部位特異的変異導入はKunkelの方法で行なった。シグナル伝達活性は、PC12細胞の樹上突起形成を観察することによって調べた。NMR測定に用いたRasタンパク質はC末端18残基を除いた171残基からなる短鎖型のものを用いた。ユニフォームに ^{15}N 標識および ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識したタンパク質は大腸菌TG1株およびJM109株を用いて調製した。アミノ酸選択的 ^{15}N 標識は、栄養要求性の変異株DL39 (Ala, Asx, Tyr), AT2457 (Gly) およびME8156 (Arg) を用いて行なった。GTP結合型としては、非水解のアナログGMPPNPを用いた。

測定はすべて37°C, pH5.5の条件で行なった。HSQC, ^1H - ^{15}N 3D NOESY-HMQCおよび ^1H - ^{15}N 3D HOHAHA-HMQCはAM400 (Bruker) を、HNCAおよびHNCOはAMX600 (Bruker) を用いて測定した。3次元スペクトルのフーリエ変換は、ソフトウェアNMRZ (NMRI) をIRIS-4D/25 (Silicon Graphics) 上で用いて行なった。

【結果・考察】 ユニフォームに ^{15}N 標識した変異体Rasタンパク質T35Sについて ^1H - ^{15}N 3D NOESY-HMQC, ^1H - ^{15}N 3D HOHAHA-HMQC (Fig.1) を測定し、ユニフォームに ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識したタンパク質についてHNCA (Fig.2) を測定し、さらに5種類のアミノ酸選択的 ^{15}N 標識 (Ala, Arg, Asx, Gly, Tyr) を行なうことにより、主鎖 ^1H - ^{15}N クロスピーク (Fig.3) の帰属を完了した。 ^1H および ^{15}N の化学シフトを野生型と

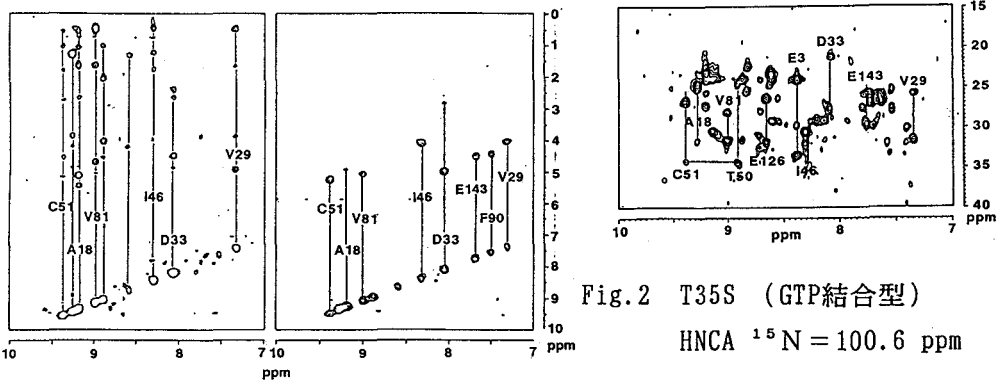


Fig.2 T35S (GTP結合型)
HNCA $^{15}\text{N} = 100.6$ ppm

Fig.1 T35S (GTP結合型) ^1H - ^{15}N 3D NOESY-HMQC (左)
 ^1H - ^{15}N 3D NOESY-HMQC (右) $^{15}\text{N} = 102.1$ ppm

比較したところ、T35SのGDP結合型は野生型のGDP結合型と非常によく似ているが、GTP結合型では野生型と異なっており、コンフォメーションの多形性も見られず、全てのクロスピークをシャープに観察することができた (Fig.3, Fig.4) .

P34G変異体は、T35S変異体と同様にシグナル伝達活性を失っていた。P34GのGTP結合型について3次元スペクトルにより主鎖 ^1H - ^{15}N クロスピークの帰属を行なったところやはりコンフォ

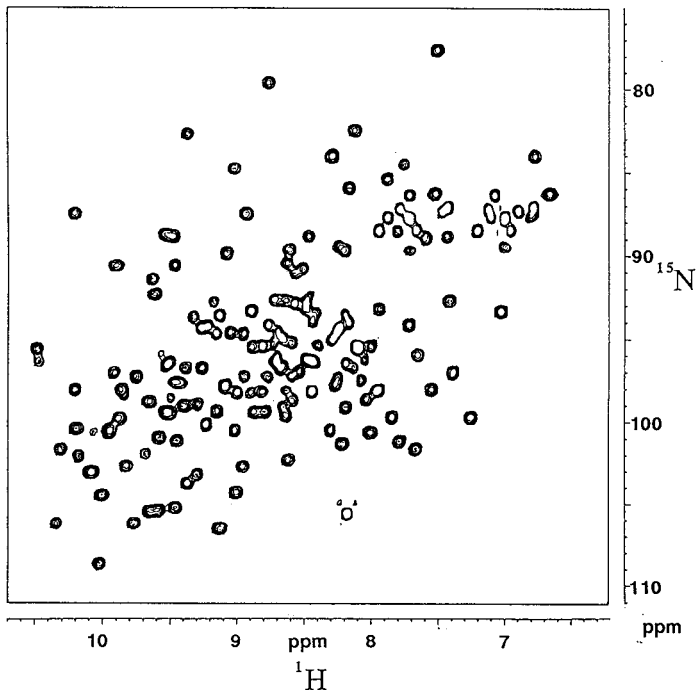
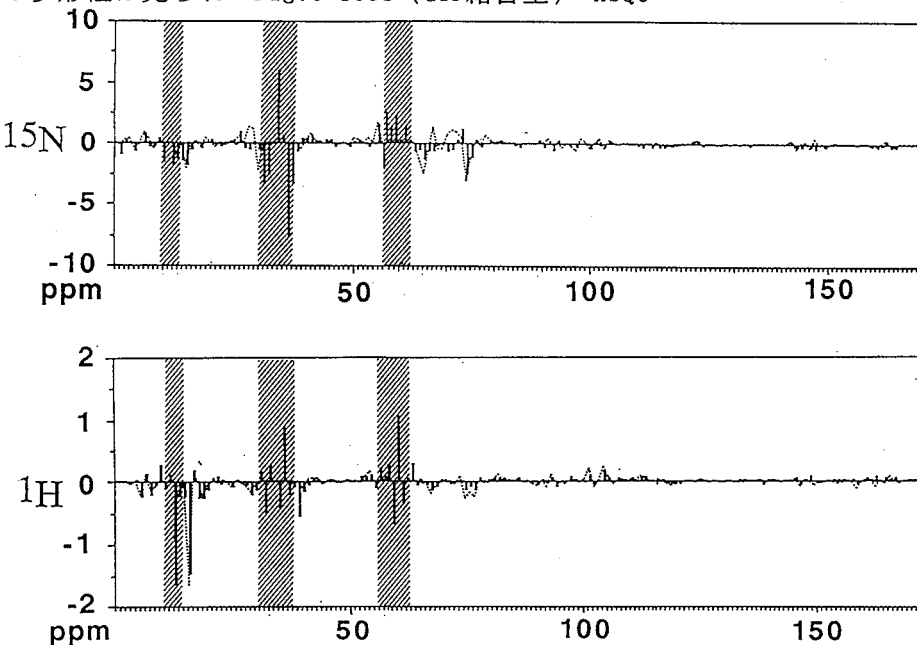



Fig.3 T35S (GTP結合型) HSQC

メーションの多形性は見られず、T35SのGTP結合型とよく似た ^{15}N 化学シフトを示した。さらに、これらの変異体は共通にいくつかの領域において野生型のGDP結合型とGTP結合型の中間の



化学シフトを示した (Fig.5) .

Fig.4 T35S (GTP結合型) の野生型 (GDP結合型) に対する化学シフト差線は野生型 (GTP結合型) .  は野生型 (GTP結合型) において、局的多形性のためHSQCクロスピークの観察されない領域

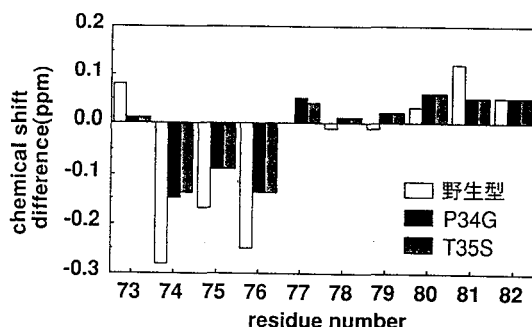


Fig.5 GTP結合型タンパク質の野生型 (GDP結合型)に対する化学シフト差 (^1H)

野生型Rasタンパク質についてはX線結晶解析がなされており, Thr35の側鎖は, GDP結合型においては分子の外側を向いているが, GTP結合型においては分子の内側を向いてヌクレオチドのγ-リン酸基と相互作用することが示されている(5,6). 本研究の結果, この相互作用により, GDP結合型からGTP結合型になる際の正常なコンフォメーション変化がおこなわれると結論された. これには局所的多形性が含まれ, その結果, シグナル伝達が正常に行なわれると考えられる. さらに, Pro34もThr35の

側鎖とγ-リン酸基との相互作用に重要な役割を担うと考えられる.

現在, これらの変異体の構造情報を集積し, 水溶液中での構造決定を進めている.

【謝辞】 NMRの測定に関してお世話になりました日本ブルカーのM.Wälchli博士, 蛋白質工学研の大久保忠恭博士, 大腸菌の栄養要求性変異体を分譲いただいたYale大学のB.J.Bachmann博士, 国立遺伝研の西村昭子博士に感謝いたします.

【参考文献】

- 1) Yamasaki, K., Kawai, G., Ito, Y., Muto, Y., Fujita, J., Miyazawa, T., Nishimura, S., & Yokoyama, S. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 1054-1062.
- 2) Yamasaki, K., Muto, Y., Ito, Y., Wälchli, M., Miyazawa, T., Nishimura, S., & Yokoyama, S. (1992) *J. Biomol. NMR* **2**, 71-82.
- 3) Muto, Y., Yamasaki, K., Ito, Y., Wälchli, M., Yajima, S., Masaki, H., Uozumi, T., Nishimura, S., Miyazawa, T., & Yokoyama, S., submitted.
- 4) 伊藤 隆, 武藤 裕, 山崎和彦, 河合剛太, 宮澤辰雄, M.Wälchli, 西村 暹, 横山茂之 : 第30回NMR討論会講演要旨集 P191.
- 5) Milburn, M. V., Tong, L., de Vos, A. M., Brünger, A., Yamaizumu, Z., Nishimura, S., & Kim, S.-H. (1990) *Science* **247**, 939-945.
- 6) Schlichting, I., Almo, S. C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E. F., Petsco, G. A., & Goody, R. S. (1990) *Nature (London)* **345**, 309-315.

P 73 大腸菌 tRNA の同核 3 次元 NMR

○河合剛太¹, 林宣宏¹, 新美達也², 宮澤辰雄³, 渡辺公綱¹, 横山茂之²
¹東京大学・工, ²東京大学・理, ³蛋白工学研究所

Homonuclear 3D-NMR of *E. coli* tRNA

Gota Kawai¹, Nobuhiro Hayashi¹, Tatsuya Niimi²,
Tatsuo Miyazawa³, Kimitsuna Watanabe¹ and Shigeyuki Yokoyama²

¹Faculty of Engineering and ²Faculty of Science, University of
Tokyo, ³Protein Engineering Research Institute

Homonuclear 3D-NMR experiments were performed for tRNAs from *E. coli*. NOE crosspeaks between H6 and ribose proton resonances were resolved by the 3D-HOHAHA-NOESY experiment. This experiment is based on the fact that crosspeaks between H5 and H6 resonances are resolved well on 2D-HOHAHA spectra of tRNAs. The utility of 3D-NMR experiments including 3D-HOHAHA-NOESY and 3D-NOE-NOESY experiments for the signal assignments of tRNAs will be discussed.

【目的】 tRNA は、タンパク質生合成過程において遺伝暗号を解読する分子であり、その立体構造について原子座標のレベルでの解析を行うことは重要である。しかしながら、tRNA は分子量 2 万 5 千を超える巨大な分子であるために、シグナルの重なりが激しく同核 2 次元 NMR においてもシグナルの分離は多難である。そこで本研究では、大腸菌の tRNA について同核 3 次元 NMR 法を適用し、シグナルの分離を改善し、帰属を進めることを試みている。

【手法】 核酸のシグナルの帰属を行うためには、残基にそって塩基のプロトンとリボースのプロトンの間の NOE を交互にたどる必要がある。tRNA の 2 次元 NMR において、ピリミジン塩基の H6 と H5 のシグナル間の HOHAHA クロスピークはかなりよく分離して観測できる。そこで、これらの分離したクロスピークを利用して塩基とリボースのプロトン間の NOE を観測するために、3D-HOHAHA-NOESY の測定を行った。この測定においては、2 次元の HOHAHA と NOESY で同一の化学シフトに観測されたシグナルが同一のプロトンに由来するものかどうかを確認することも可能であると考えられる。さらに、よく分離した修飾ヌクレオチドのシグナルを出発点として 2 段階の NOE によって帰属を進めるために、3D-NOE-NOESY の実験を試みた。

キーワード：tRNA, 3D-NMR, HOHAHA-NOESY

かわいごうた, はやしのおひろ, にいみたつや, みやざわたつお, わたなべきみつな, よこやましげゆき

【結果】 図1に大腸菌 tRNA^{Lys}の 3D-HOHAHA-NOESYスペクトルのF2F3断面 (F1=5.2ppm) を示した。図中の a, bおよびcはそれぞれ対角ピーク, HOHAHAピークおよび戻り転移ピーク (Backtransfer peak) を示している。また, 軸ab, bcおよびacは, それぞれHOHAHA軸, HOHAHA-NOE軸および戻り転移軸である。すなわち, HOHAHAによってH5(a)からH6(b)に転移した磁化が, つづくNOESYによってH6(b)からリボースプロトン (HOHAHA-NOE軸上) に転移しているのである。このように, 2D-NOESYでは激しい重なりによって分離できなかった塩基H6からリボースプロトンへのNOEが, よく分離して観測できることがわかった。またこれとは別に, 大腸菌 tRNA^{Lys}の2次元スペクトルにおいて, 5.7ppmと7.7ppmのシグナル間のHOHAHAピークおよび7.7ppmと8.2ppmのシグナル間のNOESYピークが観測されるが, 3次元HOHAHA-NOESYの実験においては8.2→7.7→5.7の磁化移動が観測された。ことから, 7.7ppmのシグナルは共通であることが確認できた。これまでの2次元NMRの解析によって, 8.2ppmのシグナルはアンチコドン1字目の修飾ウリジン (mm⁵s²U, 34位) のH6に帰属されているので, 7.7ppmおよび5.7ppmのシグナルはそれぞれアンチコドン2字目のU残基 (35位) のH6およびH5に帰属されることが確認できた。

【考察】 3D-HOHAHA-NOESYの実験は, ピリミジン塩基のH6, H5からのNOEを分離して観測するために有効であることが分かった。一方, 3D-NOE-NOESYの実験を予備的に行った結果, 2段階のNOEを利用することによって特定のプロトンからのNOEを分離して観測することができることを確認している。これらの手法は, 長い測定時間を必要とするが, 得られる情報は貴重なものである。今後さらに分解能を上げるためには, データ処理にLinear Prediction法などを導入すること, および安定同位体標識と併用することなどが必要であると考えられる。

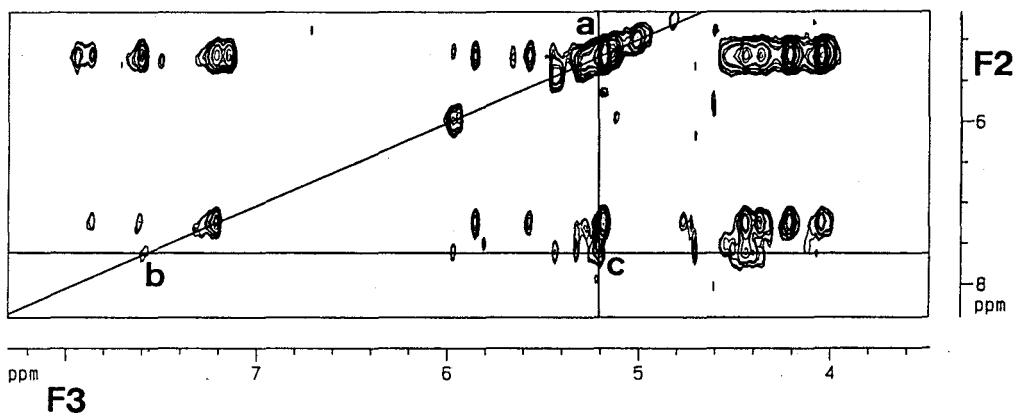


図1. 大腸菌 tRNA^{Lys}の500MHz 3D-¹H-HOHAHA-NOESYスペクトル。F2F3断面 (F1=5.2ppm)。128×64×1024語のFIDを測定し, 256×256×2048 (実部は128×128×1024) 語のスペクトルを得た。

索引

A

安倍未央 109
 合田浩明 111
 相本三郎 301
 相沢真一 333
 赤坂一之 75, 231, 233, 333
 阿久津秀雄 93
 始谷裕子 301
 安藤勲 1, 59, 63, 223, 237, 273
 荒井俊之 17
 J.M. Aramini 91
 荒田洋治 111
 朝日豊 137
 浅川直紀 237
 朝倉哲郎 55, 209, 285, 299
 朝山邦輔 29
 朝芦淳也 255
 芦川幹也 59

B

別府隆幸 47
 朴璋洙 93

C

千葉惇 175
 秩父志行 175
 中條利一郎 343

D

出口健三 287
 R. Deslauriers 89
 T. Drakenberg 91

E

海老沢計慶 263
 江口太郎 265
 栄喜俊夫 123
 遠藤聡史 305, 327
 惠良聖一 193, 205
 惠良田知樹 193, 249, 253, 265

F

P.E. Fagerness 157, 159, 161
 V. Ferenc 333
 藤井茂 97
 藤田憲一 313
 藤戸輝昭 41, 47, 287
 藤原英明 219, 257
 藤原正子 83
 藤原直樹 293
 藤原敏道 41, 83
 藤原靖弘 217
 福田耕治 163
 福田猛 245
 福井洋之 201
 福永守高 141
 福岡美香 183

福士江里 133
 降旗一夫 5

G

岳克 91
 後藤喬 33, 293
 五島直樹 317
 郷信広 319

H

浜野潔 345
 浜谷徹宏 353
 半沢園と之 349
 原山英幸 277
 春山谷川幸一 345, 349
 長谷水紀久子 145
 早早野尚久子 67, 189, 271
 林満男 171
 林宣宏 339
 林繁信 359
 林繁信 67, 271
 B.T. Heaton 265
 樋口啓一郎 145
 引地邦男 227
 日元徹博 145
 平間正敏 313
 平沖敏文 91, 261
 平澤政明 93
 廣山幸代 277
 檜山行雄 157, 159, 161
 堀井文敬 47, 245

I

市川和彦 123
 出家村誠一 55, 285, 299
 池田博 317
 今田博岐 145
 今井一 327
 今本一文 205
 今成司男 317
 今城文雄 145, 233
 今城精一 37, 43
 井本治 313
 井垣冬彦 125, 331
 井ノ上義博 101, 323
 井上義夫 305, 327
 犬伏俊郎 343
 入佐正幸 17
 石田正昭 319
 石黒正信 179
 石井佳路 313
 石井俊誉 255
 伊島理輔 301
 石丸臣枝子 333
 石森浩一 269
 伊藤隆一郎 321
 伊藤卓郎 113, 355
 和泉光則 55, 285
 和泉光則 123

J
T.L. James 87

K
甲斐 莊正 恒 109
梶 裕之 101
鎌田 創 109
龜井 裕孟 史 13
榊原 洋大 129
神田 勝宏 輔 323
加野 廣美 323
狩野 義朗 93
片山 寬 179
加藤 寬一 夫 13
加藤 晃一 史 59
加藤 智史 代 193
加藤 敏祐 子 111
加藤 端潤 廣 213
川河 剛雄 典 83
河村 剛志 夫 125
川村 三知 喜 133
川田 佳瑞 代 233
氣菊 菊池 崇直 人 355, 359
金夏 載一 敦 213
木村 雅雅 臣 281
木岡 護千 惠 145
木北 千進 127
北川 澤一 幸 271
北澤 頭山 泰 111
鬼林 林次 介 219
木小 林祐 介 233
小古 賀俊 孝 209
小小 原堀 孝洋 305
小兒 島長 正 181
小小 島修 計 261
小小 松一 岳 17
小小 中澤 尚代 二 仁 217
小小 塩尚 皓二 一 339
小小 菅野 敬厚 均 201
小河 久保 厚庭 均 125
久保 谷泉 代 23, 297
熊田 記義 弘 297
黑田 義重 弘 79
黑木 重道 仁 353
黑子 弘道 仁 75
胡椒 桃坂 仁 285
草場 里奈 志 285
 291
 331
 37
 317
 75
 97
 217
 59, 63, 237
 1, 237, 273
 317
 125

桑原大介 37, 43
桑野晴光 345
桑田一好 193, 205
京極好正 79, 105, 339

L
M.D. Likar 157

M
前川英己 213
前川寬覺 33, 293
前川雅春 281
前川木潤 彦 335
正田弘喜 321
增松茂元 201
松井本一枝 185, 187
松永千浩 193
松尾道雄 111
松谷茂剛 行 105
松峯三三三 文 75
三三三 浦瀧 一 郎 9
三三三 浦宏 一 郎 257
三三三 浦洋 子 19
三三三 宮野 博 75
三三三 宮澤 辰 201
三三三 宮野 章 109
三三三 宮野 猛 245
三三三 宮野 榮 87, 353
三三三 宮野 純 113, 355, 359
三三三 宮野 武 209
三三三 宮野 治也 317
三三三 宮野 茂 305, 327
三三三 宮野 武 133
三三三 宮野 廣 17
三三三 宮野 武 171
三三三 宮野 績 117, 321
三三三 宮野 勇 105
三三三 宮野 惠 281
三三三 宮野 政 167
三三三 宮野 隆 197
三三三 宮野 裕 113, 335, 353, 355

N
永留初実 331
永山国昭 41, 83, 325
永内藤晶 51, 75, 233, 241
中上川寧照 193, 205
中井利真 仁 217, 231
中島康喜 255
中本弘幸 141
中村春木 149
中村弘輝 301
中村浩二 249, 253
中村浩男 205
中村巨男 269
中村高志 149, 241
中村尋量 265
中山智紀 111
新美達也 359

西村善文
西村重德
西村暹三
西村科安
西村上勝
西野呂靖
西野呂優規
美

○ 尾高麻乃 111
小形稔一 159
小緒方博 301
小川晴次 125
小川秀次郎 179
小川潔弘 339
小川雅一 217
小荻原健明 299
小岡田彦男 309
小尾村善四郎 121
小尾田善光 171
小野靖宏 209
大塚章宗 153, 321
大薮又茂 197
大山幸仁 101
小山田明 153
尾崎拓男 101
尾崎 33
尾崎 59, 63, 237

R
A. Ranamooty 41
呂奏洪 55

S
齊藤肇 51, 241
佐久間千勢子 317
鮫島達也 101
皿井明倫 301
佐藤恭介 97
澤田正實 121
猿渡茂 83
清忠師 271
瀨尾芳輝 167
瀨川康治 105
瀨野治男 5
鹿野哲司 219
嶋田一夫 111
嶋田信二三 183
下川繁平 213
神藤一三郎 317
進藤一昌 111
白川昌宏 105
白美香子 355
莊司顯潔 59, 63, 237
志賀美勝 97
曾我野秀樹 193, 205
杉野壽志 281
杉木榮一 41, 47, 287
鈴木惠理郎 87, 263, 353
鈴木惠子 111
鈴木 141
鈴木 343

T
田高晃彦 245
高江洲達也 245
高木榮夫 219, 257
高橋健一 111
高橋憲成 87, 353
高橋誠一 129, 141
高橋誠一 121
高橋誠一 101
高井嘉夫 101
高進昭彦 121
高崎山昭彦 149
高武田定清 193
竹腰清由乃 223
滝沢由登 265
滝沢村厚夫 227
滝田村亨 109
田村亨 353
田中良二 75
田中俊比古 111
田丹沢倉一 299
田之真崎明 137
楯田善博 287
寺照彬 313
寺尾武彦 345
寺下盛弥 87, 353
富田海山 101
鳥外土敏 193, 249, 253
鶴堤藤丞 331
辻 9
辻 37, 43, 255
辻 153
辻 125
辻 71, 231
辻 355
辻 271
辻 349
辻 261
辻 51, 241

U
内山喬夫 121
上田貴広 67
植田正浩 331
上垣浩一 105
上野昌子 313
魚住武司 335
牛嶋裕次 277
内海博明 145

V
H. J. Vogel 91

W
若杉桂輔 321
脇舩光廣 327
脇田美一 217, 231
渡辺公義 349
渡辺公綱 355, 359
渡辺尚彦 183

渡部 德子	197,277
亘 弘	193,205
M. Waelchli	109,113
G.A Webb	1
M.P. Williamson	299

Y

矢嶋 俊介	335
山田 浩美	149
山田 整	253
山本 泰彦	343
山崎 和彦	113,355
山崎 敏夫	325
柳沢 勝	189
安岡 弘志	27,291
依田 惠子	345
横田 悦造	277
横山 茂之	113,335,355,359
横山 敏夫	213
吉田 正	9
吉垣 純子	355
吉村 一良	291
吉野 明広	129
吉野 厚子	111
吉崎 和男	171