

第33回NMR討論会

講演要旨集

日時 1994年11月26日(土)～28日(月)

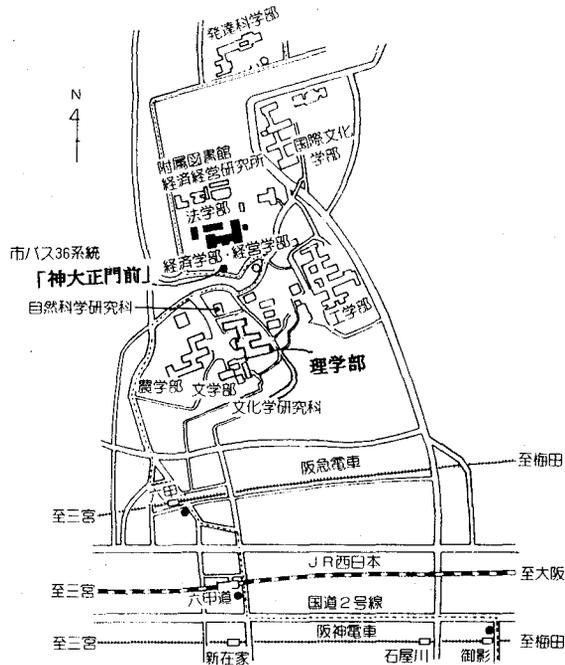
会場 神戸大学 経済・経営学部学舎

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
日本蛋白工学会

第33回NMR討論会 会場案内

神戸大学 経済・経営学部
(神戸市灘区六甲台町1-1)

【会場案内図】



【交通】

阪急電鉄「六甲」駅，JR「六甲道」駅，阪神電鉄「御影」駅より
神戸市バス36系統「鶴甲団地行」に乗車，「神大正門前」下車。

市バスご利用の場合，阪急六甲駅より約10分

JR六甲道駅より約15分

阪神御影駅より約20分。

阪急六甲駅北側，タクシー乗り場より，タクシーで約5分。

新幹線「新神戸」駅より，タクシーで約15分。

【連絡先】

〒657 神戸市灘区六甲台町1-1

神戸大学理学部化学科

赤坂 一之

TEL (078)803-0602

FAX (078)803-0839

第 3 3 回 NMR 討論会

プログラム

共催 日本化学会・日本生物物理学会・日本生化学会・日本分析化学会・日本農芸化学会
日本薬学会・高分子学会・日本物理学会・日本蛋白質工学会

日時 11月26日(土)～11月28日(月)

会場 神戸大学(経済・経営学部学舎)

神戸市灘区六甲台町2-1

【交通】阪急電鉄六甲駅, JR六甲道駅, 阪神電鉄御影駅より

神戸市バス36系統「鶴甲団地行」に乗車, 神大正門前下車

第1日(11月26日(土))

テーマ:新しい測定法

(9:00-9:05) 開会の挨拶(赤坂)

セッション:磁場勾配分光(Field-Gradient Spectroscopy)

(9:05-9:50)

座長 渡部 徳子

特別講演 1

L 1 Principles and Applications of Diffusion Ordered 2D NMR Spectroscopy 1
(Univ. of North Carolina) Charles S. Johnson, Jr.

(9:50-10:40)

座長 亀井 裕孟

L 2 Diffusion of Intracellular Molecule Measured by Pulsed Field Gradient NMR with an Actively
Shielded Gradient 5
(生理研、Bruker) ○瀬尾芳輝、D. Groß, K. Zick, 大河原 浩、村上政隆

L 3 3次元MRIによる泡構造の可視化と計測 9
(筑波大・物理工学系、横浜創英短大) ○巨瀬勝美、橋本雄幸、井上多門

—休憩—

セッション:磁場勾配分光(Field-Gradient Spectroscopy) (続き)

(11:00-12:00)

ポスター2分講演(18 POSTERS)

座長 吉崎 和男

P 1 パルス磁場勾配スティミュレイテッドエコー法によるサクランボ中の水の動態の解析 13
(生物研、食総研) ○小泉美香、石田信昭、狩野広美

P 2 制限拡散イメージ測定におけるイメージング用磁場勾配の影響 17
(食総研、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 3 固体NMRイメージングにおける分解能の向上 21
(筑波大・物理工学系) 松井 茂、○裏岡昭博、井上多門
- P 4 H₂Oを含浸させたイオン交換樹脂ポリマーの3次元固体イメージング 25
(三菱化成、日本電子) 田畑祥生、金子美和、○津野久幸、長谷川憲一、
日元 徹、今成 司
- P 5 NMRイメージングを用いた炊飯過程の研究 27
(三菱電機、東京水産大) ○竹内繁樹、前田満雄、五味雄一郎、福岡美香、三堀友雄、
渡辺尚彦
- P 6 4.7T自己遮蔽型MR装置を用いた各種植物のイメージング 29
(農水省・農研センター、オックスフォード社、シーメンス旭) ○堀金 彰、堀金明美、
松倉 潮、柳田 勉、神尾正義、A.G. Ford、入口紀男

セッション：in vivo NMR

座長 亘 弘

- P 7 NMR画像測定法の基礎的検討 31
(徳島大・医、京府医大、生理研) ○吉崎和男、原田雅史、三好弘一、早野尚志、福井義浩、
西谷 弘、亘 弘
- P 8 ラット低酸素脳におけるN-アセチルアスパラギン酸の¹H NMR
-ヘモグロビンの常磁性効果は脳神経細胞内に達している 35
(環境研、筑波大院、筑波大体育) ○三森文行、鮮干摂、崔外永、浅野勝己
- P 9 ¹⁹F in vivo NMRによる標識糖の代謝追跡 37
(九大・薬) ○金沢洋子、新村俊幸、馬屋原慶子
- P 10 部位別脳内代謝物質の2D-NMRマッピング 41
(日本女子大・理、国立精神・神経センター・神経研) ○高橋征三、角野文緒、大久保七重
荻野孝史

セッション：装置等 (Instrumentation)

座長：中村 亘男

- P 11 汎用Transient Nutations 観測アタッチメント 43
(電総研) ○亀井裕孟
- P 12 酸素17標識りん酸基の選択的りん31-NMR観測 47
(日立製作所) ○田村 充、原田義則
- P 13 低周波(Low- γ)核観測用CPMASプローブ及びシステムの開発 49
(日本電子) ○杉沢寿志、樋岡克哉、藤戸輝昭
- P 14 ²H NMRスペクトルのパルス強度依存性 53
(広島大・理、筑波大・化) ○大木 寛、奥田 勉、池田龍一

- P 1 5 AR (自己回帰) モデルによる2D NMRデータのスペクトル解析¹ 55
(日本電子、東大・海洋研) 松浦俊雄、○山崎千春、山崎俊夫、藤田憲一、今成 司、
今西祐一

セッション：高圧NMR (High Pressure NMR)

座長 舟橋 重信

- P 1 6 高圧高分解能NMR。シス-1, 12-ジ置換 [12] パラシクロファン¹の内部回転に対する
圧力効果 57
(神戸大・理) 山田博昭, 椋野邦子, ○梅田万美, 前田孝泰, 田林一晃, 世良 明

- P 1 7 常磁性イオンの存在下における線幅とシフトの圧力依存性 59
(名大・理、カルガリー大・理) ○高木 D. 秀夫、松田賀洋子、会澤宣一、舟橋重信、
Thomas W. Swaddle

- P 1 8 高圧NMRによる蛋白質の変性状態ーリボヌクレアーゼA 63
(神戸大・理) ○山口 徹、山田博昭、赤坂一之

(12:00-13:30)

昼食、ポスター貼り

(13:30-14:35)

セッション：スピン緩和 Spin Relaxation

座長 引地 邦男

- L 4 O-ROESY法による分子内部運動の解析 67
(岐阜大・医、Dept. of Chem., UCSC) ○桑田一夫、Thomas Schleich

- L 5 タンパク質におけるN-15核緩和の疑似スペクトル密度関数解析 71
(新技団、東大・教養) ○伊島理枝子、永山国昭

- L 6 緩和パラメータによるタンパク質のダイナミクス解析システムの構築 75
(東大・理、理研) ○岩原淳二、伊藤 隆、柴田武彦、横山茂之

—休憩—

(15:00-16:00)

ポスター2分講演 (24 POSTERS)

セッション：スピン緩和 Spin Relaxation (続き)

座長 国友 正和

- P 1 9 制御された雑音場における位相緩和とホールバーニング：緩和理論の実験的検証 77
(神戸大・理) ○河本敏郎、福田行男、國友正和

P 2 0 Selective Hartman-Hahn Coherence Transfer by Two Coherent Channels and Its Application to Relaxation Time Measurements 81
(新技団) ○楊代文、永山国昭

P 2 1 いくつかのセグメント運動を結合してつくった複合化分子運動のダイナミック-NMRによる解析 83
(第一薬科大学) ○加藤祐子、小川晴、野上靖純、古賀俊隆

P 2 2 ^{13}C -Labelling in the methionine Methyl groups of glycoporin A^M for studies of its secondary structure and dynamics 87
(新技団、京大院・工) ○Zhe Zhou、黒田裕久、砂本順三

セッション：交差緩和 (Cross Relaxation)

座長 山本 泰彦

P 2 3 ^1H - ^1H 交差緩和速度の常磁性ヘム蛋白質の立体構造解析への応用 91
(筑波大・化) ○山本泰彦

P 2 4 選択的緩和法による環状ペプチド-パテラマイドB及びC-の溶液中でのコンフォメーション解析 95
(神戸薬大、大阪薬大) ○杉浦眞喜子、上垣内みよ子、石田寿昌

P 2 5 交差緩和時間測定による卵白アルブミン(OVA)・molten-globule 状態の研究 99
(藤田保衛大・総医研、岐阜大・医、近畿大・生物理工) ○曾我美勝、恵良聖一、高崎昭彦、桑田一夫、梶原孝彦、小関泰平、土居悦四郎

P 2 6 タンパク質の溶液→ゲル変換における水性状の変化-磁化移動現象とスピン・格子緩和時間 103
(藤田保衛大・総医研、岐阜大・医、稻沢市民病院、日大・医) 曾我美勝、恵良聖一、○加藤一夫、高崎昭彦、桑田一夫、上坂伸宏、梶原孝彦、中村浩二

P 2 7 巨大ヘモグロビン集合体形成赤血球の分子間交差緩和現象の研究 107
(日医大、藤田保衛大・総医研、岐阜大・医、稻沢市民病院) ○上坂伸宏、曾我美勝、恵良聖一、高崎昭彦、加藤一夫、中村浩二、長谷川節夫

セッション：J Coupling and Chemical Shifts

座長 福井 洋之

P 2 8 核スピン結合定数の計算 109
(北見工大) ○福井洋之、馬場雄久、猪股寿典、三浦宏一、松田弘喜

P 2 9 ハロメタンのC-13 NMRで観測される低磁場シフトの重水素同位体効果 113
(メニコンR&D、名工大) ○中島康喜、高橋憲助

P 3 0 ab initio MO法によるバクテリオロドプシン発色団の ^{13}C 化学シフトの解析 117
(東工大・生命理工、日本クレイ) ○櫻井 実、和田光人、井上義夫、田村祐介、渡辺庸一

セッション：天然物の構造解析(Structural Analysis of Natural Products)

座長 鶴澤 洵

- P 3 1 磁場勾配パルスをコヒーレンス選択に使ったNMR測定法— ^{15}N -HMBC法と ^{13}C - ^{13}C DOFCOSY法 121
(理研) ○鶴澤 洵、越野広雪
- P 3 2 選択的励起と磁場勾配パルスを用いた2次元NMR 125
(理研) ○越野広雪、鶴澤 洵
- P 3 3 HMBC法の新しい応用測定(2)
D-HMBC、HMQC-RELAY、HMBC-RELAY法について 129
(東大・農化、東大・分生研) ○降旗一夫、瀬戸治男
- P 3 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4報)
PASS-NOESYによるユニット内NOEとユニット間NOEの区別 133
(北大・農) 川端 潤、○福士江里
- P 3 5 Modified-HOHAHAシーケンスによるオリゴペプチドの帰属 137
(立教大・理、東邦大・理、城西大・薬) ○渡邊永治、田巻 誠、秋山 稔、
野崎祐勝、村松一郎
- P 3 6 ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用(5) 141
(神奈川大・理、北陸大・薬) 釜野徳明、○羽島宏史、張 恵平、小竹文乃、木津治久
- P 3 7 ^{13}C 液晶NMRによるHistamineの構造解析 145
(阪大・薬) ○直原高広、木村敦臣、國 直人、藤原英明
- P 3 8 ^1H デカップル ^{13}C - ^{19}F J分解2D NMRおよび ^{19}F デカップル ^{13}C - ^1H J分解2D NMR 147
(旭硝子、日本電子) ○笹倉英史、米森重明、栗原範明

セッション：脂質、生体膜(Lipids & Membranes)

座長 黒田 義弘

- P 3 9 コレステロール誘導体とリン脂質との膜内相互作用の ^{31}P NMRによる研究 151
(生命研、物質研) ○名川吉信、馬場照彦、神沢千代志、中西洋志
- P 4 0 ^2H -NMRによる局所麻酔剤ジブカインの脂質膜中でのlocation及び脂質アシル鎖の
運動性への影響 153
(京大・薬、京都薬大) 黒田義弘、○小川雅弘、那須裕郷、寺島麻衣子、中川照眞、
藤原靖弘
- P 4 1 ムラミルジペプチド脂質の溶液中および膜中の構造 157
(横浜国大・工、第一製薬) ○阿久津秀雄、山口秀人、鮫島克訓、申敬花、拓植英哉
- P 4 2 NMRスペクトル法による過アルキル置換シクロデキストリンの構造解析 159
(生命研、大阪市大) ○中西洋志、金澤健治、石塚靖子、山垣 亮、玉垣誠三、太垣和一郎

(16:00-20:00)

POSTER PRESENTATION (ポスター会場)

16:00-17:00 奇数番号

17:00-18:00 偶数番号

18:00-20:00 奇数および偶数番号

Beer & snacks will be served at the Poster Sites.

第2日(11月27日(日))

テーマ: 固体NMRの新しい展開 (Solid State NMR)

(9:00-10:05)

セッション: 構造決定法(Methods for Structure Analysis)

座長 内藤 晶

L 7 固体NMR法による原子核間距離の新しい測定法 161
(京大・理) ○竹腰清乃理、野村 薫、寺尾武彦

L 8 MAS 条件下での異方的相互作用相関多次元固体NMRによる二面角決定法の開発 165
(横浜国立大・工) ○下村泰次、藤原敏道、阿久津秀雄

座長 安藤 勲

L 9 ^{13}C 固体高分解能NMRによるバクテリオロドプシンの高次構造とダイナミックスの
検討 167
(姫工大・理) 辻 暁、内藤 晶、○斎藤 肇

—休憩—

(10:45-12:30)

ポスター 2分講演 (36 POSTERS)

セッション: 構造決定法(Methods for Structure Analysis) (続き)

座長 藤原 英明/久保 厚

P 4 3 SEPARATION OF PARAMAGNETIC AND QUADRUPOLEAR INTERACTIONS 171
(京大・理) ○Spaniol Thomas P.、久保 厚、寺尾武彦

P 4 4 固体NMRによる ^{13}C - ^{15}N 核間距離の精密測定法と ^1H - ^{13}C 双極子相互作用の新しい
測定法の開発 175
(京大・理) ○石井佳誉、寺尾武彦

P 4 5 固体高分解能 ^{15}N -NMR法を用いたペプチドの水素結合の評価 179
(姫路工大・理) 内藤 晶、○福谷 章、辻 暁、斎藤 肇

- P 4 6 固体高分解能¹³C、¹⁵N-NMR(REDDOR)によるポリペプチドの三次元構造解析 183
(姫路工大・理) 内藤 晶、○西村勝之、辻 暁、斎藤 肇
- P 4 7 同核双極子相互作用を用いた固体ペプチドの構造研究 187
(東工大. ワシントン大) 浅川直紀、Christopher A. Klug, Jacob Schaefer、安藤 勲、
- P 4 8 固体¹⁵Nおよび¹³C NMRによる一軸配向タンパク質繊維の構造解析 191
(東京農工大・工、Cornell Univ., Florida State Univ.) 朝倉哲郎、○出村 誠、南 雅史、
L.K. Nicholson、T.A. Cross
- P 4 9 ¹⁵N NMRによるβ-ベンジル-L-アスパラギン酸含有ポリペプチドの固体構造解析 195
(群馬大・工、東工大・工) ○芦川幹也、莊司 顯、尾崎拓男、安藤 勲
- P 5 0 ペプチド及びポリペプチドの固体¹⁷O NMRスペクトルのコンピュータ解析：化学シフト
テンソル、核四極子相互作用と水素結合構造(2) 197
(東工大・工、群馬大・工) ○高橋昭裕、黒木重樹、安藤 勲、莊司 顯、尾崎拓男
- P 5 1 固体高分解能NMRを用いたアスパラギン酸残基を含むオリゴペプチドの水素結合
構造の研究 199
(東工大・工、群馬大・工) ○武田直登、黒木重樹、黒子弘道、安藤 勲、莊司 顯、
尾崎拓男
- P 5 2 液晶NMR法の改良と応用. NMR (Near-Magic Angle Spinning)条件下での
¹³C二次元NMR 203
(阪大・薬) ○藤原英明、木村敦臣、直原高広、國 直人
- P 5 3 MAS条件下二次元NMRによるlasalocid Aの液晶中におけるコンホメーション解析
- Magic Angle spinning 液晶NMR法- 207
(阪大・薬) ○木村敦臣、直原高広、國 直人、藤原英明
- P 5 4 ¹⁹F-固体NMRによるPhilanthotoxinとアセチルコリンレセプターとの相互作用の研究 211
(サントリー生有研, コロンビア大・化学科) ○岩下 孝、S. Choi, Y.A.Tomita,
A. E. McDermott, 中西香爾

セッション：緩和、運動 ((Relaxation, Motion))

重水素核

座長 堤 耀広

- L 1 0 Solid-State ²H NMR study of the motion of p-bis(1,3-octadecadiynyl)benzene 215
(物質研、東北大) ○W. S. Price, 早水紀久子、岡田修司、松田宏雄、中西八郎

座長 平沖 敏文

- P 5 5 固体重水素NMRによるインスリンフラグメントGly-Phe-Phe(B23-B25)のフェニル環の
動的構造解析 219
(姫工大・理、物質研) ○内藤 晶、飯塚武彦、辻 暁、斎藤 肇、W.S.Price、早水紀久子

- P 5 6 ポリ(γ-ベンジル グルタメート)ラセミ体の固体重水素NMR 223
 (北大・工)○北澤 聡、平沖敏文、堤 耀広
- P 5 7 固体重水素NMRによるα-ラクトアルブミン分子表面のメチル基の運動 225
 (北大・工、Calgary大)○瀬川和哉、北澤 聡、平沖敏文、H. J. Vogel、堤 耀広
- P 5 8 固体重水素NMR法によるポリグリシンIIの分子運動 227
 (北大・工)○平山智昭、北澤 聡、平沖敏文、堤 耀広
- P 5 9 重水素選択励起交換NMR法によるガラス性結晶の超低速分子運動の研究 229
 (京大・理)余郷敦夫、○久保 厚、今城文雄、寺尾武彦

C-13核他

座長 堀井文敬

- P 6 0 Torchiaの方法とInversion Recovery法により測定した T_1 について
 - Transient Nuclear Overhauser Effectの影響 231
 (物質研)○林 繁信、上田貴洋
- P 6 1 エチレンアイオノマーにおけるエチレン鎖の構造と分子運動 233
 (名工大・材料工学)○吉水広明、辻田義治、木下隆利
- P 6 2 一次元および二次元 ^{13}C NMR による高分子の結晶中における分子運動解析 235
 (京大・化研)○梶 弘典、堀井文敬
- P 6 3 固体高分解能 ^{13}C NMR によるポリジアセチレンの研究
 モノマーの固体内での運動性と固相重合およびポリマーの構造緩和 239
 (物質研、東北大、戸田工業)○早水紀久子、柳沢 勝、松田宏雄、岡田修司、
 中西八郎、土井孝紀
- P 6 4 1,2-ヘテロポリ化合物中に吸収されたメタノールの運動と反応 241
 (筑波大・化、阪大・理)○石丸臣一、池田龍一、中村亘男
- P 6 5 柔粘性結晶 TiNO_2 における ^{15}N NMRと分子運動 243
 (筑波大・化)○本多 尚、池田龍一、石丸臣一

セッション：固体物性 (Physics and Chemistry of Solids)

座長 早水紀久子/北川 進

- P 6 6 フラーレンアニオンラジカル塩 $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ の固体 ^{23}Na および ^{13}C NMR 245
 (東邦大・物質研, 東大・理, 東京水産大, UC Berkeley)○森山広思, 小林速男,
 林 繁信, 小林昭子, 渡部徳子, Jay Shore, Andrew C. Kolbert, Alexander Pines

- P 6 7 遷移金属カルボニルヒドリドクラスターの¹³C CP / MAS NMR 249
 (阪大・理、リバプール大、ポローニャ大) ○江口太郎、中山尋量、宮城 慧、
 中村亘男、Brian T. Heaton, Jens Nahring, Giuliano Longoni
- P 6 8 赤色蛍光体Y₂O₃:Eu の、発光特性と固体NMR による構造解析 253
 (三菱化成総研、東京水産大) ○原園としえ、横田悦造、渡部徳子
- P 6 9 緑色蛍光体Y₃Al₅O₁₂:Tb の、発光特性と固体NMR による構造解析 257
 (三菱化成総研、東京水産大) ○原園としえ、横田悦造、渡部徳子
- P 7 0 固体²⁹Si-NMR法によるポリシランの相転移研究 261
 (神奈川大・工、東工大・工) ○高山俊夫、安藤 勲
- P 7 1 NMRによるハイドロゲルのイオン添加効果の研究 263
 (新日本製鐵) ○手島志帆、斎藤公児
- P 7 2 取り止め
- P 7 3 ゼオライト中のナトリウム金属クラスターの固体 MAS NMR による研究 265
 (阪大・理、National Research Council of Canada) ○中山尋量、D.D. Klug, C.I. Ratcliffe,
 J.A. Ripmeester
- P 7 4 固体高分解能NMRによるPt / Al₂O₃表面の吸着分子種の検出の試み 269
 (阪大・理、リバプール大) ○宮城 慧、中山尋量、江口太郎、中村亘男、J.A. Iggo、
 B. T. Heaton
- P 7 5 固体高分解能¹⁰⁹Ag NMRスペクトルを用いた銀(I)錯体の研究(III) 273
 (都立大・理、近畿大・理工総研) ○本田憲治、前川雅彦、北川 進、川田 知、近藤 満
- P 7 6 カルド型ポリイミドの¹⁵N-CPMASによる構造研究 277
 (新日本製鐵) ○斎藤公児、手島志帆、篠原正昭、畠山盛明、藤城光一
- P 7 7 ¹⁰⁹Ag 及び⁶³Cu MASNMR法とX線回折法によるAg_xCu_{1-x}Iの構造解析 281
 (三菱製紙、都立大・理) ○遠藤一央、釘持基子、本田憲治、北川 進
- P 7 8 固体NMRによるアスパルテム結晶の構造研究(2) 283
 (味の素(株)、北里大・薬) ○海老沢計慶、鈴木榮一郎、公文哲、永嶋伸也、
 米田茂隆、梅山秀明

12:10-15:30

昼食およびポスター

(12:30-13:30) 昼食会

(15:30-17:00)

座長：寺尾 武彦

特別講演 2

L 1 1 Solid Materials Explored by Nuclear Polarization Transfer 285

(Eidgenossische Technische Hochschule) Richard R. Ernst

—移動—

(18:30-20:45)

懇親会 (神戸湾クルーズ)

第3日 (11月28日 (月))

テーマ：核酸、蛋白質のNMR (NMR of Nucleic Acids and Proteins)

セッション：核酸(Nucleic Acids)

(9:00-9:30)

座長 京極 好正

特別講演 3

L 1 2 NMR Studies of Non-standard Forms of DNA 289

(Tata Institute of Fundamental Research) Girjesh Govil

(9:30-10:10)

座長 森島 績

L 1 3 安定同位体利用NMRの核酸への展開 291

(都立大・理) ○甲斐荘正恒、小野 晶、楯 真一、栗田順一、ペイイルハン、小野 明

L 1 4 DNAオリゴマーの精密構造解析 —部分的な安定同位体標識の利用— 295

(阪大・蛋白研、東京薬大、都立大・理) ○児嶋長次郎、関根健志、川島悦子、
石戸良治、小野 晶、甲斐荘正恒、京極好正

(10:10-10:20)

座長 神藤 平三郎

P 7 9 立体選択的多重標識デオキシアデノシンの合成とDNA構造解析への応用 299

(都立大・理) ○栗田順一、楯 真一、小野 晶、甲斐荘正恒

P 8 0 グラジェント分光法を用いた異核種多次元NMRの標識RNA への応用 301

(日本ブルカー、東大・工、東大・院理) ○佐藤 一、河合剛太、渡部 暁、浦 敦、
渡辺公綱、横山茂之

P 8 1 核酸の光CIDNPシグナルにハロゲンイオンの及ぼす特異な効果 305

(横浜国大・工、阪大・蛋白研) ○片平正人、片平律子、京極好正

—休憩—

(10:40-11:40)

ポスター 2分講演 (25 POSTERS)

セッション：蛋白質（立体構造）(Proteins-3D Structures)

座長 小林 祐次

- P 8 2 PFG法を用いた各種三重共鳴三次元NMR法の検討 307
(シオノギ研) ○林 文晶、照井彬弘
- P 8 3 甘味抑制タンパク質グルマリンの高次構造解析 309
(京大・理、蛋白工学研、鳥取大・医、阪大・蛋白研、神戸大・理) ○新井克明、
伊島理枝子、守川壮一、宮坂明子、井元敏明、吉村笙子、相本三郎、赤坂一之
- P 8 4 ω -Conotoxin MVIIAのNMRによる立体構造解析及び ω -Conotoxin GVIAの
立体構造との比較 313
(三菱化成生命研、北里大) 河野俊之、金載一、○小林邦子、朴 南奎、小寺義男、
前田忠計、佐藤一紀
- P 8 5 プロテインキナーゼC α の制御ドメインCRD 2のNMRによる構造解析 315
(バリアン、都臨床研、横浜市大・医) ○市川さおり、畠中秀樹、竹内より子、大野茂男、
稲垣冬彦
- P 8 6 核内原がん遺伝子産物MybのDNA複合体の高次構造 317
(横浜市大・院総合理、蛋白工学研、理研・筑波LS) ○緒方一博、守川壮一、関川あい、
井上泰子、皿井明倫、石井俊輔、中村春木、西村善文
- P 8 7 Cinnamycin・リゾホスファチジルエタノールアミン複合体の¹H-NMRによる
立体構造解析 319
(群馬大・工、三菱化成、北里大・理) ○細田和男、若松 馨、大屋正尚、河野俊之、
前田忠計、猿渡 茂
- P 8 8 湾曲DNAを認識する蛋白質H-NSのDNA結合領域の溶液構造 321
(東京薬大・薬、名大・農、阪大・蛋白研、蛋白工研、中外製薬) ○岩城隆信、
神藤平三郎、松本 潮、水野 猛、相本三郎、守川壮一、中村春木、久保庭 均
- P 8 9 GDP結合型およびGTP結合型Rasタンパク質の高次構造解析 323
(理研、東大・理、萬有製薬、Univ. of Cambridge) ○伊藤 隆、岩原淳二、寺田 透、
西村 暹、柴田武彦、Ernest D. Laue、横山茂之
- P 9 0 リボヌクレアーゼHの溶液構造-X線構造との比較 325
(日本電子データム、蛋白工研、トロント大・医、東大・教養) ○藤原正子、加藤敏代、
山崎和彦、山崎俊夫、永山国昭

セッション：蛋白質（構造と相互作用）(Proteins-Structure and Interaction)

座長 嶋田 一夫

- P 9 1 NMRによるSex-lethal蛋白質 (Sxl蛋白質) とRNAの相互作用に関する研究 327
(東大・理、神戸大・理、東大・工、京大・理) ○武藤 裕、井上 真、
武田佳宏、木川隆則、坂本 博、大槻高史、河合剛太、渡辺公綱、志村令郎、横山茂之
- P 9 2 ナトリウムチャンネルのS4セグメントにおける 3_{10} ヘリックス構造の可能性 331
(東レリサーチセンター、オックスフォード大) ○川口 謙、D. Mulvey, D. Doak,
I. D. Campbell
- P 9 3 Structure of a Membrane Fusion-Active Peptide. ^1H -2D NMR Study of Aggregated and
Non-Aggregated Species in Solution. 335
(神大・理、京大・化研) ○ Peter Dubovskii、高橋 敏、赤坂一之
- P 9 4 Ca^{2+} 拮抗作用を有する蛋白質カルシセプチン(Calcisepetine)の ^1H -NMRスペクトルの
帰属と二次構造 337
(三共分析代謝研) ○高山知子、半沢宏之、春山英幸
- P 9 5 G蛋白質を活性化するペプチドの安定同位体ラベルとTRNOEへの応用 339
(三菱化成生命研、群馬大・工、北里大・理、テキサス大) ○河野俊之、楠 英樹、
田中剛史、大屋正尚、前田忠計、東島 勉、若松 馨
- P 9 6 海綿 *Theonella swinhoei* の細胞毒性ポリペプチドpolytheonamide BのNMRによる
構造解析 341
(東大・農、日本電子データム、日本電子) ○濱田季之、松永茂樹、伏谷伸宏、
藤原正子、藤田憲一
- P 9 7 ヒトカルシトニン Fibrillation のNMRによる研究 343
(日本チバガイギー) ○金折賢二、野坂篤子
- P 9 8 蛋白性プロテアーゼインヒビターSSIの全NMRシグナルの帰属 345
(都立大・理) ○三宅洋子、鎌田 創、山口絵未、楯 真一、甲斐荘正恒
- P 9 9 NMRを用いた免疫グロブリン分子の構造解析 347
(東大・薬、機能水研) ○嶋田一夫、白石美紀、進藤一泰、榛葉信久、山口芳樹、今里真実、
加藤晃一、荒田洋治
- P 1 0 0 コリシンインヒビターImmE6のコリシンとの相互作用領域の解析 349
(東大・農、東大・理) ○大野光宏、武藤 裕、横山茂之、正木春彦、魚住武司
- P 1 0 1 疎水性コアを変異した蛋白質の立体構造変化 351
(蛋工研、横浜市大) ○古川功治、織田昌幸、守川壮一、緒方一博、中村春木
- P 1 0 2 NMRを用いた細胞周期制御因子p13^{mol}の立体構造解析 353
(日立製作所、東工大・生命理工、東大・薬) ○合田浩明、内田憲孝、立花和則、
岸本健雄、嶋田一夫、原田義則

- P 1 0 3 カルシウム結合ハトリゾチームの¹H-NMR 355
 (北大・理) ○松木伸行、森安真彦、河野敬一、大木進野、津田 栄、引地邦男、
 新田勝利
- P 1 0 4 旧黄色酵素とNADP⁺との相互作用の研究 357
 (関西医大・化、熊本大・医) ○藤井 茂、黒田記代、三浦 洵
- P 1 0 5 ピルビン酸キナーゼの活性中心の構造と活性制御 359
 (鳥取大・医、阪大・医) ○飯塚舜介、野口民夫
- P 1 0 6 タンパク質構造の精度評価のための¹H-NMR化学シフト計算の応用 361
 (東京農工大・工, Univ. of Sheffield) 朝倉哲郎、○菊地 淳、出村 誠, M. P. Williamson

(11:40-14:00)

—昼食—

(14:00-15:20)

セッション：タンパク質（立体構造解析法）(Proteins-Methods for 3D Structure Determination)

座長 永山 国昭

- L 1 5 多重共鳴多次元NMRによる蛋白質の解析の至適化
 —グラジエント、重水素、異種核 cross polarization の適用による 365
 (阪大・蛋白研、日本ブルカー) ○白川昌宏、Markus R. Wälchli、田 栄治、
 清水真人、池上貴久、京極好正
- L 1 6 c-Myb 蛋白質 - DNA 複合体構造の distance geometry 計算 369
 (蛋工研、横浜市大、理研) ○守川壮一、緒方一博、皿井明倫、石井俊輔、
 西村善文、中村春木

座長 阿久津 秀雄

- L 1 7 PFG三重共鳴三次元NMRによるヒトacidic fibroblast growth factorの構造解析 371
 (都臨床研) ○小椋賢治、永田宏次、島中秀樹、稲垣冬彦
- L 1 8 安定同位体核利用 2、3 重共鳴法によるcrystatin A の構造解析
 —立体構造、内部運動、水和構造 375
 (都立大・理、青学大・理工、都臨床研、杏林大) ○楯 真一、潮田利夫、楯 直子、
 中野泰裕、鮫島達也、稲垣冬彦、甲斐荘正恒

—休憩—

(15:50-16:40)

座長 荒田 洋治

特別講演 4

L 1 9 NMR Studies of an Allosteric System: the *trp* -Repressor-*trp* Operator Complex 379
(Stanford Univ.) Oleg Jardetzky

追加

P 1 0 7 NMR Studies of Structure and Dynamics of HIV-1 Protease/Inhibitor Complexes 381
(農水省 農業生物資源研究所, NIH) Toshimasa Yamazaki, Linda K. Nicholson, Stephan Grzesiek, Ad Bax, Dennis A. Torchia

参加費 当日(一般) 7,000円 (学生) 4,000円
懇親会 11月27日(土) 18:30より 観光客船ルミナス上にて

第 1 日

1 1 月 2 6 日 (土)

新しい測定法

セッション：磁場勾配分光
(Field-Gradient Spectroscopy)

The 33rd NMR Symposium (Japan)

Principles and Applications of Diffusion Ordered 2D NMR Spectroscopy

Charles S. Johnson, Jr.
 Department of Chemistry
 University of North Carolina, Chapel Hill
 NC 27599-3290, USA

ABSTRACT

NMR spectroscopy typically reports on short range interactions such as internuclear coupling and electronic screening, while classical experiments (diffusion, chromatography, electrophoresis, *etc.*) of analytical chemistry and biophysical chemistry often give information about overall molecular size, shape, and charge. Our aim has been to encode such information into NMR data sets so that molecular characteristics can be displayed in a second or third dimension in NMR spectra. For this purpose we have used Fourier-transform, pulsed field gradient NMR (FT-PFGNMR) to detect molecular translational motion. We have focussed on tracer diffusion coefficients, that are related to molecular size through the Stokes-Einstein equation, and electrophoretic mobilities, that are related to both molecular size and charge. With appropriate data inversion transforms, we have produced "diffusion ordered" and "mobility ordered" 2D NMR spectra that are useful for the analysis of complex mixtures.^{1,2}

In the basic FT-PFGNMR experiment there are two primary field gradient pulses of duration δ and amplitude g whose leading edges are separated by the time Δ . Depending on the type of experiment, FID's or half-echoes are Fourier transformed with respect to the acquisition time to obtain a set of spectra $S(q, I, \nu)$ for different values of the gradient pulse amplitude g or the current I in the sample:

$$S(q, I, \nu) = \sum_n A_n(\nu) \cos[q\mu_n \Delta I / (\kappa_e A)] \exp[-D_n(\Delta - \delta/3)q^2] \quad [1]$$

where $q = \gamma g \delta$ is the area of a gradient pulse in cm^{-1} , I is the current flowing in the sample during Δ , and D_n and μ_n are the tracer diffusion coefficient and electrophoretic mobility of the n th species, respectively. Here $A_n(\nu)$ is the 1D-NMR spectrum of the n th species ($q = 0$) including the effects of transverse and longitudinal relaxation. According to Eq. [1] a peak for the n th species at frequency ν shows an exponential decay as q^2 is increased. Also, in an electrophoresis experiment this peak undergoes a cosinusoidal oscillation as I is increased. In the following $I = 0$, and we are concerned only with diffusion effects.

Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) requires (a) the acquisition of an undistorted 2D data set consisting of NMR spectra for different values of q^2 and (b) the transformation of this set to give a diffusion dimension. Automated DOSY experiments are now possible because of improved gradient drivers,³ actively shielded gradient coils,⁴ and new pulse sequences that minimize the effects of pulse induced eddy currents.⁵ However, the feature that distinguishes DOSY from high-performance PFGNMR is the data transformation and generation of 2D spectra.

Equation [1] reveals that $S(q, 0, \nu)$ is essentially the Laplace transform of the diffusion spectrum $A(\nu)$ with respect to the transform variable $\lambda = (\Delta - \delta/3)q^2$. When the sample contains discrete, monodisperse solutes, $A(\nu)$ can be represented by a collection of delta functions at the appropriate diffusion coefficients; but for polydisperse samples $A(\nu)$ is a continuous distribution function. In principle, the diffusion spectrum can be obtained by inverse Laplace transformation (ILT) of the data set with respect to λ ; however, this transformation is ill-conditioned and may be intractable. We have obtained satisfactory approximate ILT's in the discrete case by using the computer program SPLMOD supplemented with physical constraints and prior knowledge of the properties of the solutions.^{1,6} For polydisperse samples we have used the constrained regularization program CONTIN again supplemented with *a priori* knowledge.⁷

DOSY is especially useful for the study of complex mixtures containing a wide range of sizes of molecules and molecular aggregates. Recent applications of DOSY probably including the following will be presented:

Analysis based on molecular size and hydrophobicity.⁸ A variety of small solute molecules, *e.g.* alcohols, dissolved in D_2O have diffusion coefficients much too similar to be resolved if their NMR signals overlap. However, complete resolution can often be obtained in the NMR dimension so that the diffusion analysis involves only a single component at each chemical shift. This resolution is possible through the use of a special sample spinner that is compatible with PFGNMR. When a micelle forming surfactant is added to the mixture, the apparent diffusion coefficients change because the solutes partition into the micelles. Chemical exchange is usually so rapid that all components appear to be monodisperse. These experiments permit mixtures to be resolved on the basis of both molecular size and hydrophobicity.

The binding isotherm and size of the BSA-SDS complex.⁹ The binding of sodium dodecylsulfate (SDS) to proteins presents a more difficult problem. The DOSY display immediately gives the diffusion coefficient for the protein (BSA), but the observed diffusion coefficient for SDS is a weighted average of the diffusion coefficients of free monomer, SDS in micelles, and SDS bound to the protein. The binding isotherm for the complex is not immediately available because accurate values of the diffusion coefficients of the monomer and the micelles are not known for these conditions. We found that it is possible to calibrate the unknown diffusion coefficients by means of inert probe molecules. For example, a nonexchanging dendrimer molecule monitors the effective viscosity for the micelles. Also, the ratio of monomer to micelles is available from previous equilibrium studies. The binding isotherm was calculated and the saturation binding value was found to be 1.9 g bound SDS per 1 g of BSA in a solution with a total SDS to BSA ratio of 3g/g. Additional information about the nature of the SDS/protein complex is obtained from the SDS chemical shifts and binding of TMS to the complex.

DOSY and the characterization of phospholipid vesicles.¹⁰ Unilamellar phospholipid vesicles ranging from 30 to 100 nm were prepared with entrapped sucrose as an NMR label. The DOSY displays showed larger apparent diffusion coefficients for the phospholipid head group signals than for the sucrose signals. This is an example of T_2 weighting since the smallest vesicles exhibit the

narrowest phospholipid NMR signals. In contrast the relaxation times for entrapped sucrose are independent of the vesicle sizes. Analysis of the sucrose signals versus q^2 gives upper limits to the widths of the distributions of diffusion coefficients and vesicle radii. The distribution obtained from DOSY compared favorably with the results of electron microscopy and dynamic light scattering. Combined DOSY and electrophoresis experiments are underway to correlate electrophoretic mobilities with sizes.

DOSY of lipoproteins in human blood plasma.¹¹ The chemical shifts of the methyl and methylene protons from the lipoproteins are spread over a considerable range, and the diffusion dimension shows that smaller diffusion coefficients and hence larger particles are associated with the down field end of the range. DOSY analysis of very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), and high density lipoprotein (HDL) fractions separated by agarose gel chromatography shows diffusion coefficients varying by a factor of four. Loss of information in the diffusion dimension for the whole plasma results from the overlap of neighboring signals, *i.e.* poor resolution of chemical shifts, and probably from an averaging effect resulting from intermolecular interactions. TMS was found to partition into the lipoproteins and to show a chemical shift that is correlated with the lipoprotein methyl and methyl chemical shifts. This suggests that chemical shift differences between lipoprotein fractions result from differences in magnetic susceptibilities in the lipoprotein particles and are not directly related to particle sizes.

Acknowledgement. This work was supported under National Science Foundation (USA) Grant CHE 9222590.

- 1) Morris, K. F.; Johnson, C. S., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4291-4299.
- 2) Morris, K. F.; Johnson, C. S., Jr. *J. Magn. Reson. A* **1993**, *101*, 67-73.
- 3) Boerner, R. M.; Woodward, W. S. *J. Magn. Reson. A* **1994**, *106*, 195-202.
- 4) Gibbs, S. J.; Morris, K. F.; Johnson, C. S., Jr. *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 165-169.
- 5) Gibbs, S. J.; Johnson, C. S., Jr. *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 395-402.
- 6) Provencher, S. W.; Vogel, R. H. In *Numerical Treatment of Inverse Problems in Differential and Integral Equations*; Deuflhard, P., Hairer, E., Eds.; Birkhauser: Boston, 1983; pp 304-319.
- 7) Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.* **1982**, *27*, 229-242.
- 8) Morris, K. F.; Stilbs, P.; Johnson, C. S., Jr. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 211-215.
- 9) Chen, A., Wu, D., and Johnson, C. S., Jr. (unpublished)
- 10) Hinton, D. P.; Johnson, C. S., Jr. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 9064-9072.
- 11) Boerner, R.M.; Johnson, C. S., Jr. (unpublished)

L 2

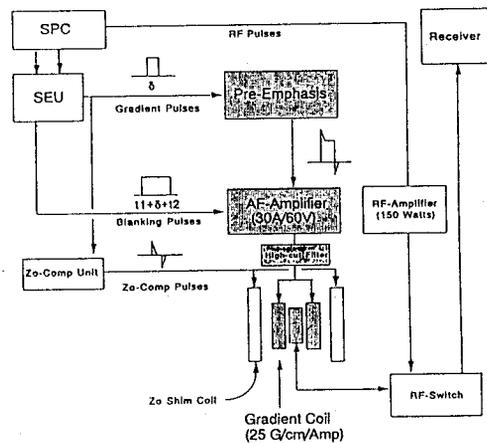
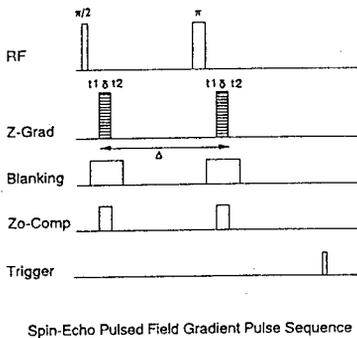
Diffusion of Intracellular Molecule Measured by Pulsed Field Gradient NMR with an Actively Shielded Gradient

Yoshiteru Seo, Dieter Groß*, Klaus Zick*, Hiroshi Ookawara and Masataka Murakami
 Dept. of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, 38 Myodaiji, Okazaki, 444 Japan, and *Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Silberstreifen, Rheinstetten 4, Karlsruhe, D-7512 Germany

Summary: Diffusion parameter is quite important to analyze signal transport, metabolism etc. Pulsed field gradient technique has several advantages to measure diffusibility of molecules in biological tissues. We have developed and tested an actively shielded gradient coil which can produce more than 500 G/cm with a gradient settling time less than 3 msec at 600 G/cm pulse. Diffusion of intracellular Na⁺ and limited diffusion of ¹⁹F labeled organic acid were analyzed.

Hardware: Basic instruments consist of an MSL-100 spectrometer with a Diff25 diffusion probe. A basic specification of the Diff25 probe are shown in Table 1. Gradient strength was calibrated by using ¹H diffusion coefficient of benzene (2.17·10⁻⁹ m²/sec at 22.5°C) and water (2.14·10⁻⁹ m²/sec at 22.5°C). There are several problems to measure diffusion with high gradient field (Table 2). Since a high sensitivity of the gradient coil (25 G/cm/Amps), thermal noise and 60-Hz line noise deteriorate reproducibility of measurement significantly. We have attached blanking units to the spectrometer to reduce these noise, and tried to reduce other noise as small as possible (Fig. 1). RF-coils (Helmholtz type, 12 mm i.d.) were designed to replace. Since sensitivity area of ¹H/¹⁹F-RF coil (13 mm) and ²³Na-RF coil (16 mm) were larger than the linear range of the gradient coil (10 mm) (Fig. 2), sample size was reduced less than 10 mm of height of Z-direction (ca. 0.6 ml in 10 mm o.d. NMR tube). Sample temperature was maintained at 22.5 ± 0.5 °C, that was monitored directly by a fluorescence thermometer (AMOS-8000, Anritsu, Tokyo) with a glass-fiber probe (1 mm in diameter) inserted into the sample.

Fig. 1. Scheme of Hardware and Pulse Sequence



Key Words: F-19, Na-23, pulsed field gradient, diffusion time, restricted diffusion, erythrocyte

せお よしてゐる、D. グロス、K. チック、おおかわら ひろし、むらかみ まさたか

Table 1. Basic Specification of Diff25 Diffusion Probe

i) Gradient strength:	25 G/cm/A in Z-axis
ii) Inductance:	60 μ H
iii) Resistance:	1 Ω
iv) Rise time:	100 μ sec
v) Settling time:	< 3 msec (600 G/cm x 2 msec)
vi) Sample size:	1 cm diameter x 1 cm length
vii) Minimum diffusion velocity:	$\approx 10^{-9}$ cm ² /sec for ¹ H

Table 2. Problem and Solution of Diffusion Measurement

<i>Problem</i>	<i>Solution</i>
Eddy Current	Actively Shielded Gradient Preemphasis Remove Conductor
Thermal Noise of AF Amplifier	Blanking of AF Amplifier
Noise of AC-Line frequency	Blanking of AF Amplifier
Noise from Air (FM, TV etc)	High-Cut Filter in Power Line
Temperature of sample	Fluorescence Thermometer Water cooling of Gradient
Arching of RF coil	

Fig. 2. Z-axis Profile of a Phantom and Calculated Gradient Strength

a) An acrylic cylinder (8 mm o.d.) with 1-mm-square-notches every 2 mm was inserted in 10 mm o.d. NMR tube, and the outer space was filled by 2 M NaCl solution. Z-profile of the phantom was measured by a read gradient (40 G/cm) with a sampling width of 200 kHz.
 b) ZX-plane ¹H image observed by a micro-imaging probe, and calculated field strength in Z- and X-directions. Sample is the same as a) except for a solution filled (1 mM MnCl₂ solution).

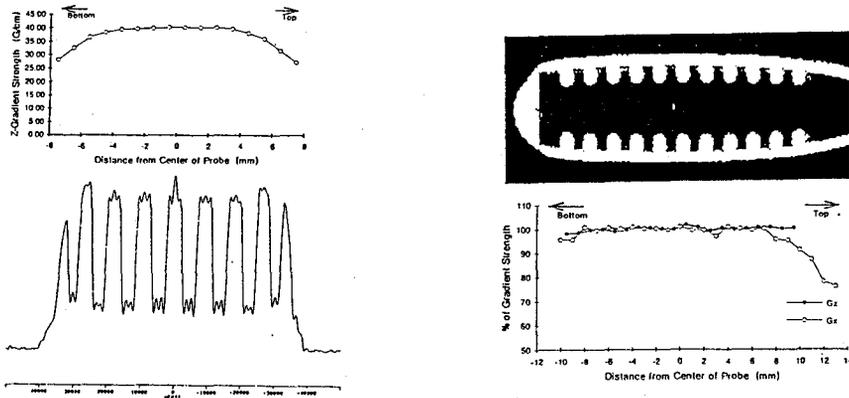
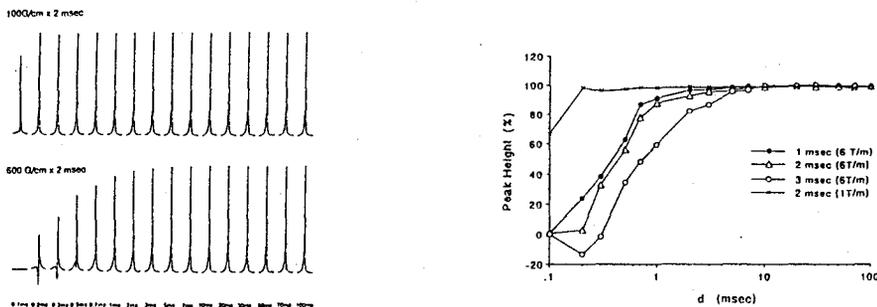


Fig. 3. Gradient Settling Time Measured by Recovery of Signal

¹H water resonance was measured after a gradient pulse by a pulse sequence (D- δ -VD-90°-Acq) where δ is pulse width of gradient pulse, VD is variable delay between the gradient pulse and a 90° pulse.



Intracellular Na in red blood cells: In the spin-echo pulse field gradient sequence (PFG; $d-90^\circ-t_1-\delta-t_2-180^\circ-t_1-\delta-t_2$ -acquire), the echo signal attenuation is written as follows,

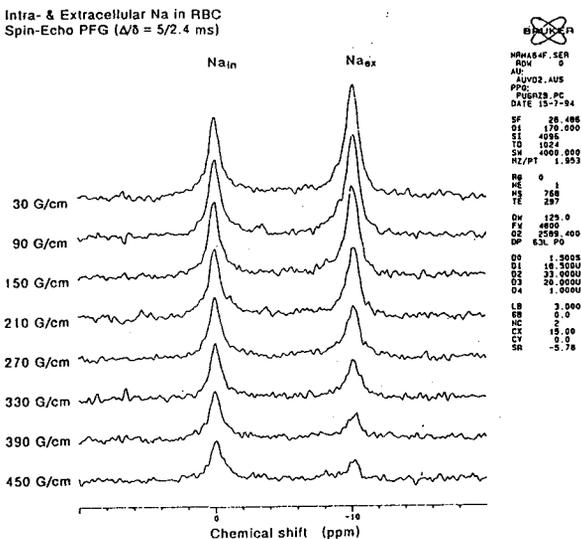
$$M = M_0 \cdot \exp[-\gamma^2 \cdot D \cdot \delta^2 \cdot g^2 \cdot (\Delta - 1/3 \cdot \delta)] \quad (1)$$

where γ is gyromagnetic ratio, D is diffusion coefficient, δ is width of field gradient pulse, g is strength of field gradient pulse and Δ ($t_1 + \delta + t_2$) is pulse distance [1]. Compared with typical ^1H probes, ^{23}Na has only a quarter of gyromagnetic ratio and a tenth of relaxation time. Thus, we need ca. 13 ($=\sqrt{42 \cdot 10}$) times pulse field strength for ^{23}Na experiment compared with ^1H experiment. This is the main reason we need a diffusion probe can produce more than 500 G/cm.

Dog red blood cells (RBC) were washed 3 times by 157 mM NaCl solution, and then washed two times by 5 mM $\text{Dy}(\text{PPPi})_2/157$ mM $\text{Na}^+/122$ mM Cl^- solution. Finally, Volume fraction of RBC was adjusted around 60%. Diffusion coefficient was measured by the spin-echo pulse fielded gradient sequence. Typical values used are observed frequency of 26.5 MHz, pulsed gradient field strengths varied from 30 to 480 G/cm (8 or 16 values were used), 90° pulse of 16 μsec , ($\Delta - 1/3 \cdot \delta$) (diffusion time) of 5 - 20 msec and δ was 0.75 - 2.4 msec. Gradient pulse strength was calibrated by a Z-direction slice profile of a known length phantom, and was confirmed by using $^1\text{H}_2\text{O}$ diffusion constant ($2.14 \cdot 10^{-5}$ cm^2/sec , 22.5°C).

Figure 4 is signal attenuation of intra- and extracellular Na in a red blood cell suspension. Diffusion coefficient of $^{23}\text{Na}^+$ in $\text{Dy}(\text{PPPi})_2$ solution is $1.12 \cdot 10^{-5}$ cm^2/sec , and almost the same as $^{23}\text{Na}^+$ in saline solution ($1.15 \pm 0.009 \cdot 10^{-5}$ cm^2/sec , $n = 4$). Diffusion coefficients of extracellular $^{23}\text{Na}^+$ (0.633 ± 0.09 , $n = 5$) did not depend the diffusion time. On the other hand, diffusion coefficients of intracellular $^{23}\text{Na}^+$ observed were $0.21 \pm 0.03 \cdot 10^{-5}$ cm^2/sec ($n = 3$) and $0.13 \pm 0.1 \cdot 10^{-5}$ cm^2/sec ($n = 2$) at diffusion times of 5 and 10 msec respectively. This strongly suggests a presence of process to restrict a free diffusion in the intracellular space.

Fig. 4. Intra- and Extracellular $^{23}\text{Na}^+$ in Red Blood Cell Suspension Observed by Spin-Echo Pulsed Field Gradient NMR



Intracellular ^{19}F labelled Organic acid: Restricted diffusion of a small organic molecules in the intracellular space was analyzed by a ^{19}F labelled derivative of para-amino hippurate, 3-trifluoromethylhippurate (TFMH).

A mean displacement of molecule in an isotropic sample during a diffusion time ($\Delta - 1/3\delta$) is

calculated as $R = (2D \cdot (\Delta - 1/3 \delta))^{1/2}$. Intracellular molecules are surrounded by cell membranes, and usual cellular diameter is in range of 6 μm to 30 μm . When we tried to measure molecular diffusion without influence of membrane boundary, we should measure diffusion coefficient in a range of 5 to 100 msec (diffusion coefficient was supposed as 1 to $2 \cdot 10^{-5}$ cm^2/sec). From the equation 1, strength of field gradient (g) should be increased by power of 1.5 to keep the same signal attenuation when Δ and δ were shortened. This is another reason we require 500 G/cm and a short settling time of gradient.

Human RBC were washed 3 times by 0.9 % NaCl solution. The sealed right-side-out ghosts were obtained by a method reported by Steck and Kant [2]. The stimulated echo pulsed field gradient sequence (STE PFG; $d\text{-}90^\circ\text{-}t_1\text{-}\delta\text{-}t_2\text{-}90^\circ\text{-}T\text{-}90^\circ\text{-}t_1\text{-}\delta\text{-}t_2\text{-}acquire$) and a micro-imaging probe with a 15 mm RF-coil were used for long diffusion time experiments. Typical values used are pulsed gradient field strengths varied from 5 to 40 G/cm (16 values), 90° pulse of 11 μsec , t_1 of 1 msec, t_2 of 17 - 15 msec, Δ (pulse distance = $t_1 + \delta + t_2 + T$) of 100 - 1000 msec and δ (pulsed gradient in X-axis) was 2 - 4 msec. A homospoiler pulse (5 G/cm for 1 msec in Y-axis) was applied between the second 90° pulse and the third one. The spin-echo pulsed field gradient sequence (SE PFG) and the Diff25 diffusion probe with a 10 mm RF-coil were used for short diffusion time experiments. Typical values used are pulsed gradient field strengths varied from 0.2 to 4.8 T/m (16 values), 90° pulse of 7 μsec , t_1 of 0.4 msec, Δ of 5.7 - 75 msec and δ (pulsed gradient in Z-axis) was 0.6 - 2.1 msec.

A ^{19}F labelled derivative of para-amino hippurate, 3-trifluoromethylhippurate (TFMH) was added to intact RBC suspension. The intracellular TFMH is a broad and shifted by 0.35 ppm to the down field from the extracellular one. Diffusion coefficients were measured with Δ of 220 msec and δ of 3 msec. The diffusion coefficient obtained for the intracellular TFMH ($0.04 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2\text{-sec}$) was significantly smaller than the value of the extracellular TFMH ($0.39 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2\text{-sec}$). Sealed right-side-out cell ghosts have almost the same size and shape, but the intracellular soluble proteins and small molecules were washed out, and the intracellular fluid composition is as the same as the extracellular saline solution with 5 mM NaPi buffer at pH 8.0. A single resonance and a single T_1 relaxation time were obtained in 5 mM TFMH in a ghosts suspension. Biexponential decay was observed by STE PFG experiment, and the slower and faster diffusion coefficients were assigned as the intra- and extracellular TFMH respectively. The slower diffusion coefficient (corresponds to the intracellular TFMH) decreased significantly when the diffusion time ($\Delta - 1/3\delta$) was increased (from 60 msec to 1 sec). On the other hand, the faster diffusion coefficient (corresponds to the extracellular TFMH) kept constant value ($0.55 \pm 0.12 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2\text{-sec}$). The calculated values of the mean displacement ($R = (2D (\Delta - 1/3\delta))^{1/2}$) were 2.6 ± 0.54 μm . Additionally, the diffusion coefficient of the intracellular TFMH obtained in the intact RBC suspension is almost the same as the value obtained in the ghost suspension with the same diffusion time. From these results, we conclude that the observed slow diffusion coefficient of the intracellular TFMH mainly explained by the restricted diffusion by the cell boundary, and the effects of viscosity of intracellular fluid and the intracellular macro-molecules are not the major factor.

1. J. Kärger, H. Pfeifer and W. Heink, *Advances in Magnetic Resonance*, 12, p. 2-89 (1988)
2. T. L. Steck and J. A. Kant, *Methods in Enzymology*, XXXI, 172-180 (1974)

L 3

3次元MR Iによる泡構造の可視化と計測

筑波大学物理工学系, 横浜創英短大* ○巨瀬勝美, 橋本雄幸*, 井上多門

3D NMR Imaging of Foam Structures

Katsumi KOSE, Takeyuki HASHIMOTO*, and Tamon INOUYE

*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba and Yokohama-Souei College**

Abstract

Two foams were measured using 3D NMR imaging. One of them was a gelatin foam and the other was a piece of sponge. Their 3D structures were visualized using maximum intensity projection for the gelatin specimen and minimum intensity projection for the sponge specimen. Many pentagons and hexagons were observed but squares were not observed in projected images of the sponge specimen, which suggested presence of the optimal structure for bulk monodisperse foam recently proposed by Weaire et. al.

1. はじめに

foam (泡) は bubble (泡粒) が集合してできたもので, 自然界の様々なところに見られる構造である。そして, 数理的な観点からみると, foamは, ある条件のもとに表面積が最小となる構造をもつため, 非常に興味深い研究対象である。また, 数 μ 以下の膜を比較的容易に生成することができるため, NMR microscopyの試料としても, 恰好の計測対象である。

ところで, 「一定の体積の立体で, 空間を隙間なく埋め尽くすとき, その表面積が最小となるのは, どのような場合か?」という問題が古くから知られている。この問題に対し, Lord Kelvinは, 正方形と正六角形を面とする14面体の稜をわずかに変形させたものが, この問題の解であることを予想した(1)。しかし, 最近, Weaireらは, $\text{Na}_8\text{Si}_{46}$ の結晶構造にヒントを得て, 計算機を用いた探索により, Kelvinの14面体よりも表面積が0.3%小さな構造を発見した(2, 3)。この構造は, 12面体と14面体を複雑に組み合わせたものである。これが, 本当に上の問題の解になっているかの数学的証明は得られていないが, ある条件のもとで作られたfoamは, この構造を実現している可能性がある。すなわち, 等しい大きさのbubbleが最初に作られ, これらが集合してfoamを形成し, 熱力学的な平衡状態が達成されれば, 自由エネルギー最小, すなわち表面エネルギー(表面積)が最小の状態が実現されるからである。

本研究では, 実際のfoamでどのような構造が実現されているかを調べるために, ゼラチンで作った泡とスポンジの空間構造を, NMR映像法を用いて撮像した。その結果, これらの3次元構造を明瞭に可視化することに成功した。定量的な解析は完了していないが, Weaireらの提案する構造が一部実現している可能性が示唆された。

2. 実験方法

試料として, ゼラチンの泡とスポンジを用いた。ゼラチンの泡は, 暖めて水に溶かしたゼラチンに, プロトンの T_1 を短縮するための硫酸銅を少量加えたものを20mm ϕ (内径18mm)のNMR用試験管に入れ, 下から空気を吹き込んで発泡させ, そして冷却・固定することによって作成した。また, スポンジ試料は, 台所用のスポンジ(ポリウレタン製)を直径約18mm, 長さ約60mmの円柱状に切り出して, 20mm ϕ (内径18mm)のNMR用試験管に挿入し, さらに, プロトンの T_1 が約200msの硫酸銅水溶液

キーワード: NMR映像法, 三次元, foam, 最大値投影, 最小値投影

こせかつみ, はしもとたけゆき, いのうえたもん

を加え、十分に脱気することにより作成した。

撮像に用いた装置は、静磁場強度4.74 T、室温開口径89mmの超伝導磁石（Oxford社製）と、能動遮蔽型の勾配コイル（Doty社製）を用いた、自作のNMRイメージング装置である。撮像パルス系列には、不均一な磁気感受率による影響を避けるためスピン・エコー法を用い、ゼラチン試料では、 $T_R=100\text{ms}$ 、 $T_E=8\text{ms}$ 、信号積算1回とし、スポンジ試料では、 $T_R=200\text{ms}$ 、 $T_E=12\text{ms}$ 、信号積算16回とした。画素数は 128^3 としたため、撮像時間はゼラチン試料では約30分、スポンジ試料では約14.5時間であった。また、撮像領域（FOV）は 19.2mm^3 、画素サイズは $(150\mu)^3$ とした。

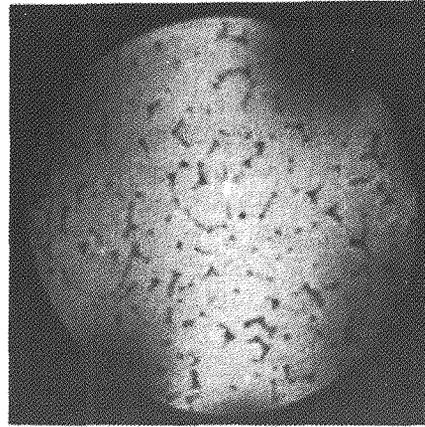


Fig.1(a) An axial slice of gelatin specimen Fig.1(b) An axial slice of sponge specimen

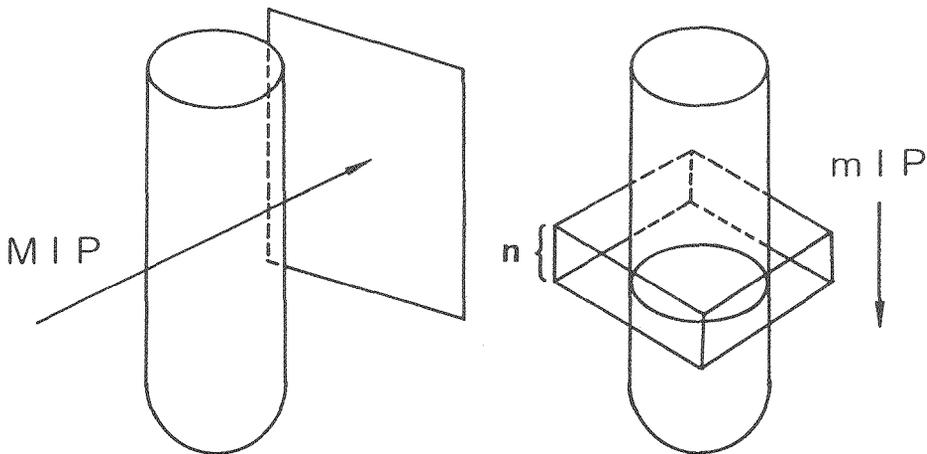


Fig.2 Maximum intensity projection (MIP) for the gelatin specimen and minimum intensity projection (mIP) for the sponge specimen. "n" represents the number of the contiguous cross-sectional images used for mIP.

3. 結果と考察

図1 (a)と(b)に、それぞれの試料の、試験管の軸に垂直な一つの断層像を示す。これらの画像を見ると分かるように、これらの断層像の集まりから泡の三次元構造を理解することは容易ではない。よって、図2に示すように、ゼラチン試料では、試験管の軸に平行な面への最大値投影像を、スポンジ試料では、試験管の軸に垂直な面への最小値投影像を作成した。図3に、ゼラチン試料において、投影方向の角度を変化させたときの最大値投影像を、図4に、スポンジ試料において、最小値投影に用いた連続する断層像の枚数を変化させたときの最小値投影像を示す。このように、いずれの場合にも、泡を形成する多面体の稜の部分のみが描出されているが、これらの投影像から、泡の3次元的構造を直感的に把握することができる。

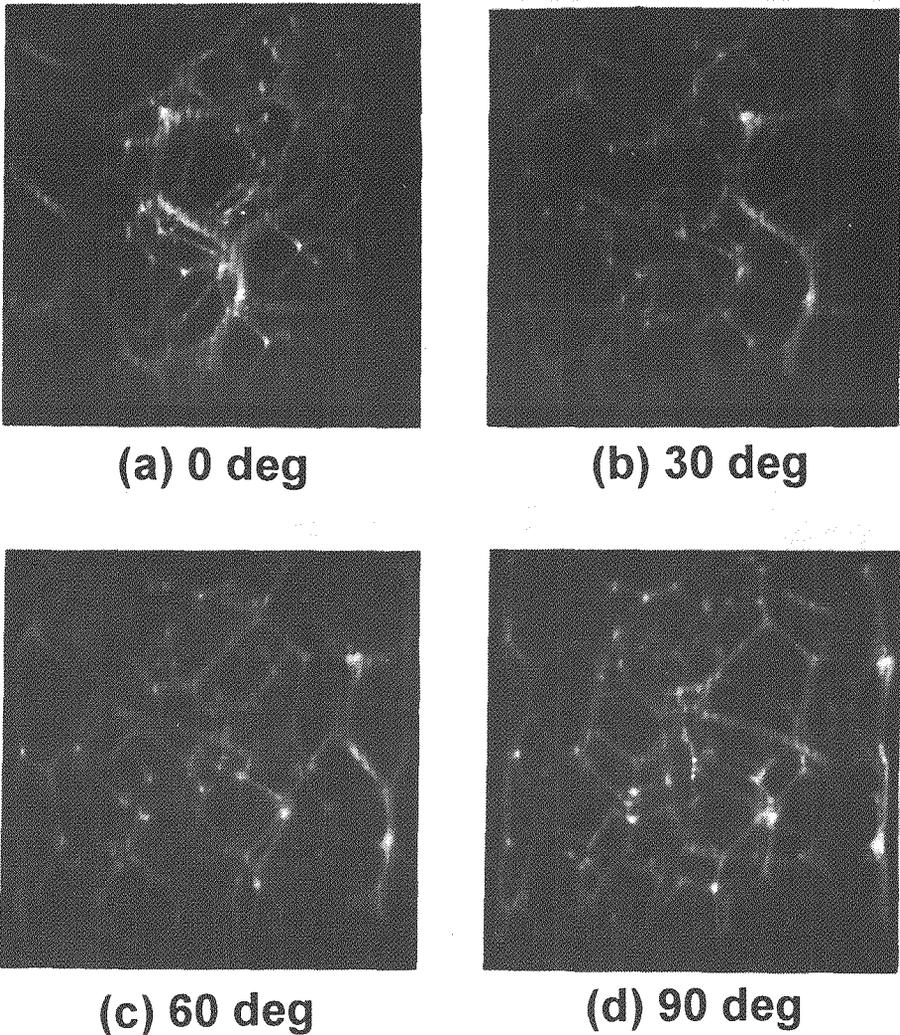
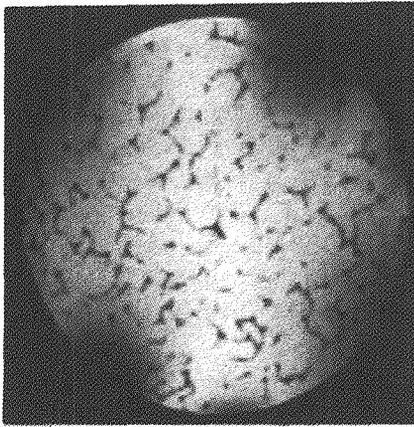
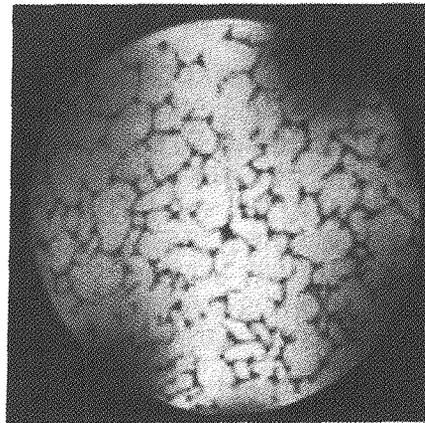


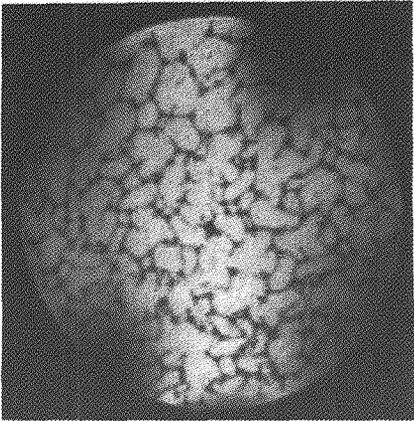
Fig.3 MIP images of the gelatin specimen projected onto planes parallel to the axis of the NMR sample tube. Captions below the figures are azimuthal angles measured from the projection direction in Fig.3(a).



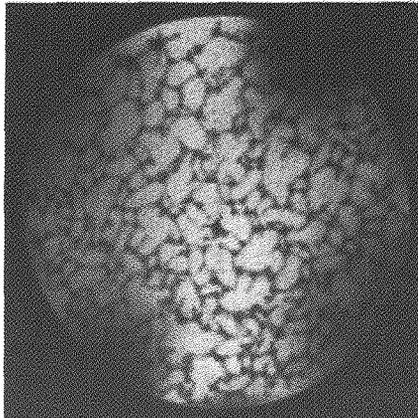
(a) $n = 2$



(b) $n = 4$



(c) $n = 6$



(d) $n = 8$

Fig.4 mIP images of the sponge specimen projected onto a plane perpendicular to the axis of the NMR sample tube. Captions below the figures are the number of contiguous images starting from Fig.1(b) and used for the mIP operation.

ところで、Weaireらは、bulkなmonodisperse foamの構造として、前書きに述べた構造を提案している。この構造では、多面体の面として、かなり多数の五角形の面と、比較的少数の六角形の面のみが存在し、四角形の面は存在しない。図4に示すスポンジ試料はbulkなmonodisperse foamに近いと想像されるが、一見したところ、五角形と六角形の面が多数存在しているが、四角形はみられない。これらの事実から、Weaireらの提案した構造に近いものが実現されている可能性がある。しかし、これ以上の議論は、得られた画像データから多面体の頂点の3次元座標を計測し、各多面体の体積と表面積を導出することによって初めて可能となるものである。よって、3次元の濃淡画像データから、泡の幾何学的構造を計測する手法の開発と、泡構造の数値モデルの構築などが今後の研究課題である。

References

- (1) W. Thomson (Lord Kelvin), *Phil. Mag.* 24, 503-514 (1887).
- (2) D. Weaire, *Phil. Mag. Lett.* 69, 107-110 (1994).
- (3) J. Gray, *Nature* 367, 598-599 (1994).

○小泉美香（生物研）、石田信昭（食総研）、狩野広美（生物研）

Analysis of water movement in cherry fruits by a pulse
gradient stimulated-echo methodMika KOIZUMI¹, Nobuaki ISHIDA² and Hiromi KANO¹¹National Institute of Agrobiological Resources and ²National
Food Research Institute

Restricted diffusion of cell-associated water in growing cherry fruits was measured by a pulse gradient stimulated-echo method by NMR microscopy. Changes of intrabarrier spacing, reduced permeability of cell membranes and diffusion constant were estimated according to the model of Meerwall-Ferguson. The values are considered to represent water in a seed at early growth stages and in a pericarp after ripening.

安定した強い磁場勾配を発生させる技術の発達は、拡散測定による生体組織中の水の動態の解析に広い可能性を与えるものと考えられる。特に制限拡散の測定は組織中の水の動態を通して、水の移動速度と組織を構成する水のコンパートメントのサイズ、細胞膜の透過性など組織の生理的な性質を知る上で重要なパラメーターを与える。そこで、本研究では、サクランボの果実の生育ステージを追って水の制限拡散を測定して果実の組織の性質を検討した。

材料と方法

植物：栽培用のサクランボの木を鉢植えにし、果実着生後、生育ステージを追って採取してサンプルとした。

測定：270 MHz超伝導NMRスペクトロメーター（JEOL GSX-270 WB）に装着可能なマイクロイメージング装置と自作のパルス磁場勾配発生装置を用いて測定した。¹H-NMRイメージは2D-FT法によって、磁場勾配58mT/m（X, Y, Z軸）、T_E 13 ms、T_R 5 sの条件で測定した。画像の分解能は50 μm x 50 μm x 1.6 mm（slice thickness）であった。イメージの測定と同時にX軸方向の中央部（Fig. 2, 矢印α）を選択励起することによって局所スペクトルを測定し、スペクトルイメージとして表示した。局所スペクトルの励起部位の分解能は1.6 mm（X軸）x 50 μm（Y軸）x 1.6 mm（slice thickness）であった。T₁はT_Rを0.5 s、1.5 s及び5.0 sに設定して、逐次飽和法で測定した。制限拡散はpulse gradient stimulated-echo法（Fig. 1）により拡散時間（Δ）を延長しながら測定した。拡散用パルス磁場勾配は111 mT/mでZ軸方向へ3 msとした。

キーワード：NMR顕微鏡、細胞の水、制限拡散、サクランボ

こいずみみか、いしだのぶあき、かのひろみ

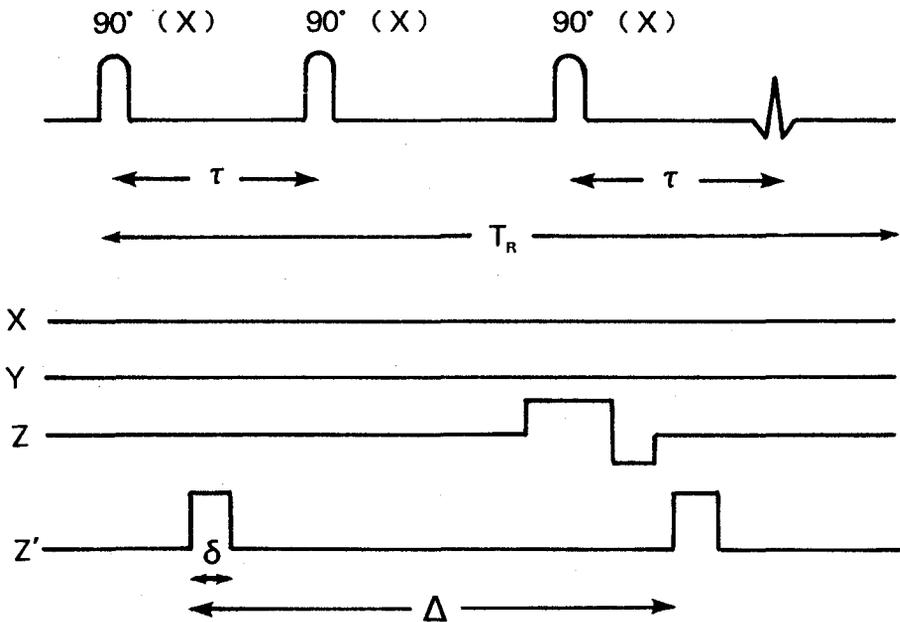


Fig. 1 The sequence for pulse gradient stimulated-echo method. Gradient of Z axis is slice gradient.

結果及び考察

果実の生育状況を示すために¹H-NMR イメージとイメージの中央 (矢印 α で示した) 部分における局所スペクトルイメージを示す (Fig. 2, A & B)。果実の生育初期には種子のシグナルが強く、生育が進むに従って相対的に種子のシグナルは弱くなり、果肉のシグナルが強くなった。即ち生育が進むにしたがって種子は水を失い果肉の水が増加した。局所スペクトルイメージによれば、生育後期の種子のシグナルは油脂 (Fig. 2B, No. 5) に由来するものと考えられる。果実の水の拡散にもとづくシグナル減衰 $\ln(A/A_0)$ と拡散時間 (Δ) の関係を Fig. 3 に示す。 $\ln(A/A_0)$ は拡散時間の延長と共に低下したが一本の直線とはならず、途中で折れて二本の直線となるように見える。これより果実内の水は Tanner が提唱するように透過性を持つバリアーに囲まれているものと推定された。 Fig. 3 の結果を Tanner の考えを発展させた Meerwall-Ferguson のモデルに従って計算し、水のコンパートメントサイズ (a)、透過性の指標となる (P) 及び仮想的な最大移動速度 (D_0) を求めたのが Table 1 である。生育のきわめて初期を除いては水のコンパートメントは $30 \mu\text{m} \sim 35 \mu\text{m}$ 程度であった。膜の透過性 (D/D_0) は生育ステージを通じて、21-33% の間にあり著しい変化は示さなかった。水の移動速度 (D_0) は生育の初期には $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ と自由水 ($2.14 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) に近いまたはそれより高い値から、生育の中期には $0.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ に低下したが、生育の後期には再び高くなる傾向を示した。しかし、 Fig. 2 に示したように果実のイメージを見ると、その内容は生育ステージで異なっていた。果実の生育時期を追った T_1 イメージを Fig. 2C に示す。拡散測定から算出されるよう

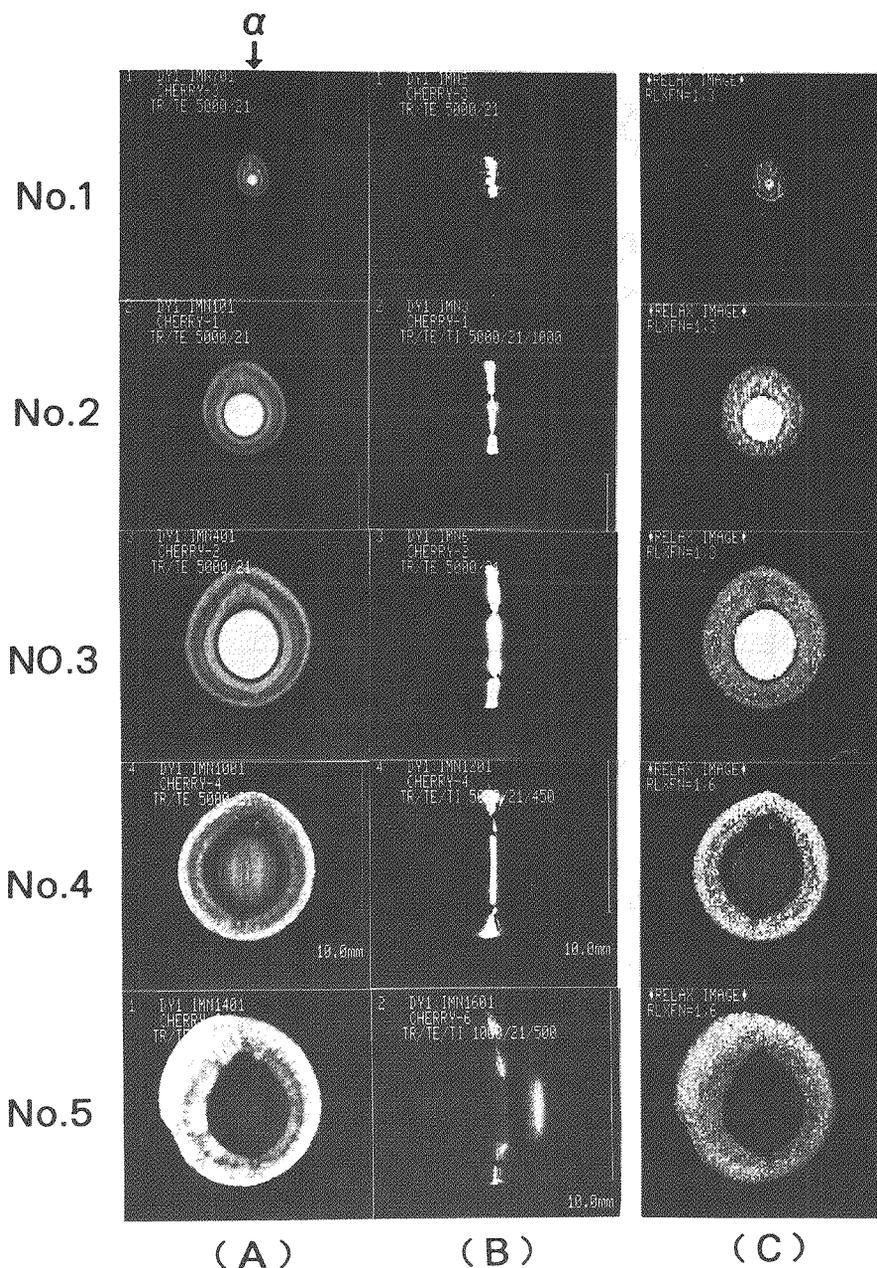


Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ images (A), localized spectral images (B) and T_1 images (C) of growing cherry fruits.

An arrow (α) indicates the places where selectively excited in measurements of the localized spectral images.

な高い移動性を持つ水は生育の初期には種子に、後期には果肉に認められた。そこで Table 1 の値を見直すと測定値は No. 1 ~ No. 3 の果実については種子の水のコンパートメントと移動速度を、No. 4 と No. 5 は熟した果肉の水を代表しているものと考えられる。果

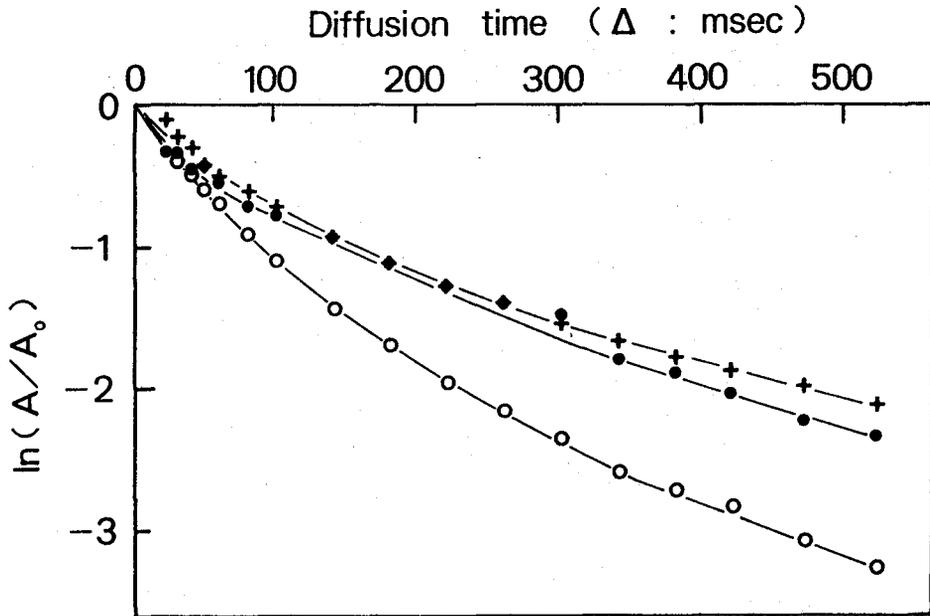


Fig. 3 Relationship between the reduction of signal intensity, $\ln(A/A_0)$ and diffusion time (Δ). Magnitude of pulse magnetic field gradient was 111 mT/m. Cherry fruits of No. 1 (●), No. 2 (○) and No. 5 (+) are indicated.

Table 1 Changes of parameters of Meerwall-Ferguson model, intrabARRIER spacing (a), reduced permeability (P) and diffusion constant (D_0) with growth of the fruits.

Fruit	a (μm)	P	D/D_0	D_0 (cm^2/s)
No. 1	23	0.26	0.21	2.5×10^{-5}
No. 2	33	0.51	0.33	2.0×10^{-5}
No. 3	35	0.29	0.23	1.5×10^{-5}
No. 4	36	0.39	0.28	0.9×10^{-5}
No. 5	32	0.39	0.28	1.3×10^{-5}

実中の水の動態をより詳しく知るためには拡散イメージによって組織別に拡散測定をすることが望ましいが現在はイメージ測定に長い時間(40分/一測定点)かかることが問題である。

文献

- Meerwall, E. and Ferguson, R.D. 1981. J. Chem. Phys. 74: 6956-6959.
 Tanner, J.E. 1978. J. Chem. Phys. 69: 1748-1754.

P 2

制限拡散イメージ測定におけるイメージング用磁場勾配の影響

○石田信昭（食総研）、狩野広美（生物研）、小川秀次郎（日本電子データム）

Effects of imaging gradients in measurement of restricted diffusion of cell-associated water by the pulse gradient stimulated-echo method.

Nobuaki ISHIDA¹, Hiromi KANO² and Hidejiro OGAWA³

¹National Food Research Institute, ²National Institute of Agrobiological Resources and ³JEOL Datum Ltd.

Restricted diffusion of cell-associated water of plant tissues was measured by the pulse gradient stimulated-echo method by NMR microscopy. The X-axis magnetic field gradient and the gradient compensating signal phases for imaging brought about stronger reduction of ¹H-NMR signals (A_0) than calculated from T_1 value. This was a problem for measurements of restricted diffusion images using long diffusion time, which was resolved by shortening the interval between the two gradients of the X-axis.

Pulse gradient stimulated-echo法による植物組織の水の制限拡散の測定は、組織内の水の移動速度、コンパートメントサイズ、膜透過性などの情報を与え、植物組織を理解する上で有効な解析方法であると考えられる。その場合、植物組織は複雑であって、隣合った細胞が異なる組織に属して異なった生理状態にある事にしばしば遭遇する。そこで、制限拡散の測定においても測定値を解剖学的な形態に合わせたイメージとして得ることが望ましい。制限拡散の測定では長い拡散時間を必要とするためにシグナルの T_1 成分の位相に対する磁場勾配の影響を観測するが、シグナルが T_1 から予測したより急速に減衰し、長い拡散時間の領域において正確な測定が困難な場合が多い。本研究では拡散測定とイメージングを組み合わせた測定においてはイメージング用の磁場勾配が拡散の効果を生み過剰なシグナル減衰を誘導して設定可能な拡散時間を短くする事を報告する。

材料及び方法

大麦は13 literのポットで10月から翌年5月まで土こう栽培をし、開花後、約30日目の子実を用いた。ブルーベリーは鉢植えとして、多数の果実の中から試料として適した比較的若く水の多いものを選んだ。制限拡散測定には、270MHz超伝導NMRスペクトロメーター（JEOL GSX-270 WB）に装着可能なマイクロイメージング装置と自作のパルス磁場勾配発生装置を用いた。¹H-NMRイメージ及び制限拡散イメージはPulse gradient stimulated-echo法で測定し、Fig. 1に示すように異なるrf照射時にイメージングスライス用磁場勾配を加える2種類のシーケンスを用いた。イメージング用磁場勾配はX、Y、Z軸に対して58mT/mであり、拡散測定用磁場勾配はZ軸方向に69mT/m～90mT/mであった。拡散係数イメージはデータをNEC PC-9801マイクロコンピュータに転送してイメージアナライザー（AVIO SPICA II）により画像化した。緩和時間（ T_1 ）の測定は T_R を0.5 s、1.5s及び5.0sに設定して逐次飽和法によって測定した。

キーワード：NMR顕微鏡、制限拡散イメージ、イメージング用磁場勾配

いしだのおあき、かのひろみ、おがわひでじろう

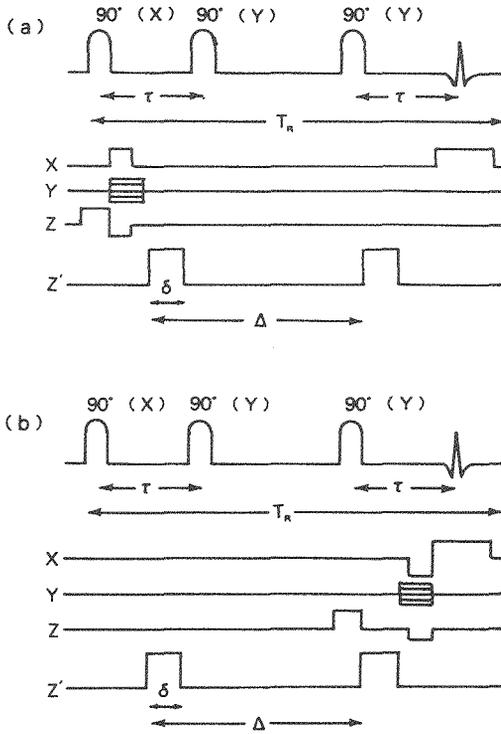


Fig. 1 Pulse sequences for the pulse gradient stimulated-echo method. Slice gradient (Z axis) was applied at the first 90° rf pulse (a) and at the third 90° rf pulse (b).



Fig. 2 An ¹H-NMR image (top), a diffusion weighted image (middle) and a diffusion coefficient image (bottom) of a 30 day old barley seed. The diffusion coefficient image was calculated by the formula of Stejskal-Tanner.

結果及び考察

Fig. 2に演者らが通常用いているFig. 1(a)のシーケンスによって測定した大麦種子の¹H-NMRイメージ、拡散イメージ及び拡散係数イメージを示した。Fig. 3には大麦の維管束(v)の¹H-NMRイメージ及び制限拡散イメージのシグナル強度の変化とT₁をもとに計算した理論的¹H-NMRシグナルの減衰曲線を示す。実測したシグナルは計算で予測した値より著しく強く減衰した。測定用のパルスシーケンスを検討することによって、この現象はX軸方向に掛けたイメージター取り込み用の磁場勾配の前方への染みだしと、そのために起こる位相の乱れを修正するためのパルス磁場勾配 (Fig. 1においてY軸エンコード及びZ軸の修正用パルス磁場勾配と同時に加えたX軸のパルス磁場勾配) の間でX軸方向に移動した水分子の位置に関する位相がrefocusされなくなり、拡散の効果が観測されたものと推定された。そこで、パルスシーケンスをFig. 1(b)のようにX軸方向の修正用磁場勾配とイメージター取り込み用の磁場勾配の間を短く変更した。Fig. 4に0.2 mMのMn²⁺溶液をPhantomとして両シーケンスによって測定した¹H-NMRシグナルの減衰曲線を示す。Fig. 1(a)のシーケンスで測定した場合はシグナル減衰が激しいが、Fig. 1(b)で測定した場合は、ほぼT₁より計算した値と一致した。これらの実測データをもとにイメージター取り込みの為の磁場勾配の前方への染みだしと、その位相修正用

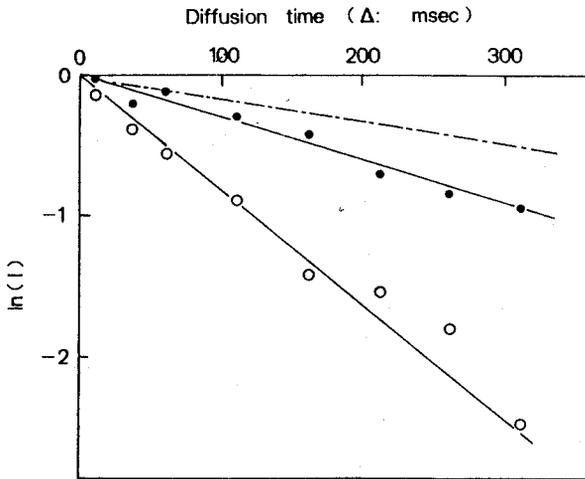


Fig. 3 Decline curves of $^1\text{H-NMR}$ signals, A_0 (closed circles), A (open circles) and theoretical value calculated on T_1 (0.6 s, measured by progressive saturation method ; broken line) against diffusion time.

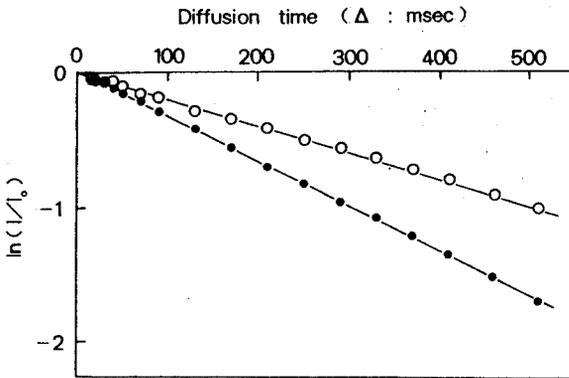


Fig. 4 Decline curves of $^1\text{H-NMR}$ signal of a phantom of 0.2 mM Mn^{2+} solution measured by sequence of Fig. 1(a) (closed circles) and Fig. 1(b) (open circles). The theoretical curves calculated based on the T_1 value (500 ms) coincided the curve measured by Fig. 1(b).

磁場勾配 (58mT/m、2ms) がどの程度のパルス磁場勾配として作用するかということを経験すると58mT/m、1.6msとなった。Fig. 5にFig. 1(b)のシーケンスで測定したブルーベリー果実の $^1\text{H-NMR}$ イメージ(left)と制限拡散イメージ(middle)、制限拡散係数イメージ(right)を示す。Fig. 1(b)のシーケンスを用いた場合は $^1\text{H-NMR}$ シグナルの減衰が少なく、比較的良好的な拡散係数イメージが得られた。制限拡散における拡散係数イメージでは拡散時間の延長とともに中心柱及び種子周辺の拡散係数が先に低下し、果肉より水のコンパートメントのサイズが小さい事を示した。

本研究の結果、NMR顕微鏡のように分解能を向上させるために強いイメージング用磁場勾配を用いて、かつ、制限拡散測定のように長い拡散時間を設定する場合はイメージングデータ取り込み用磁場勾配の前方への染みだしと修正用の磁場勾配の間で拡散によるシグナル減衰を招く事があるので注意が必要である。

文献

Callaghan, P.T. (1991) "Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy". Clarendon Press, Oxford.

Diffusion time (Δ)

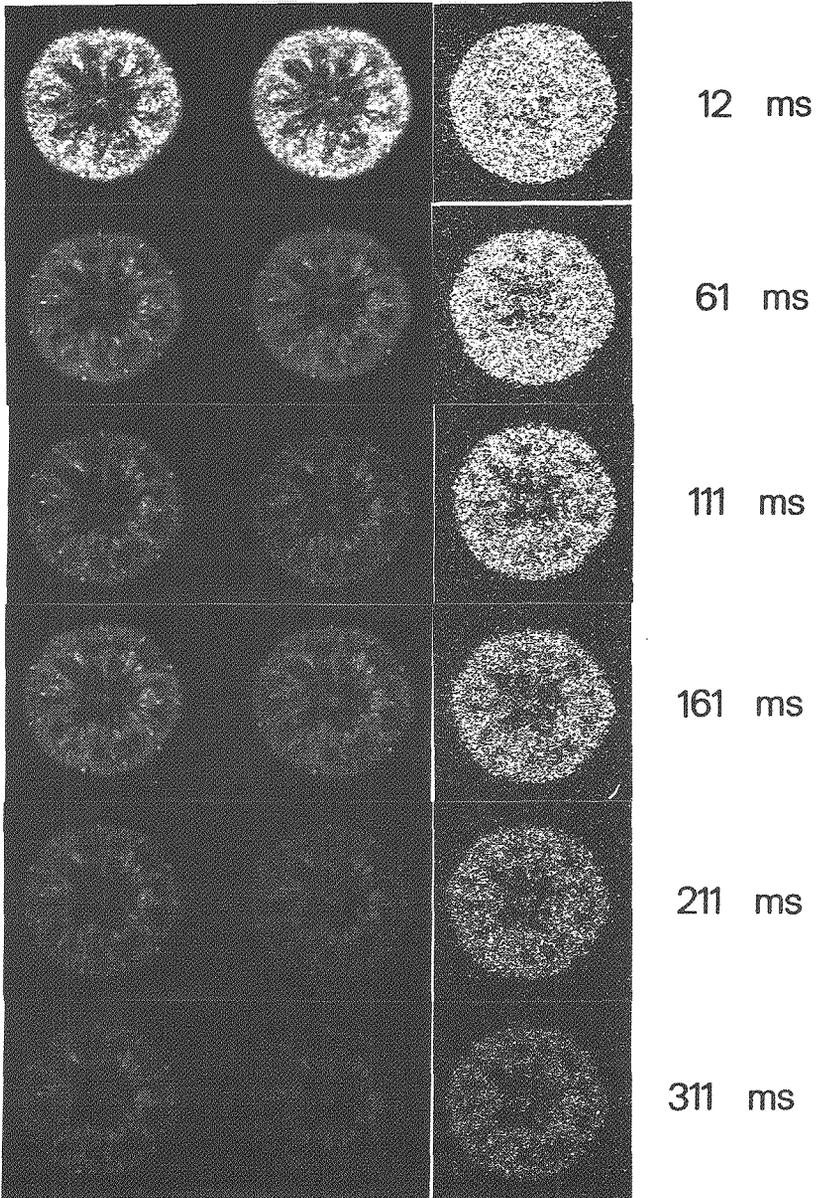


Fig. 5 $^1\text{H-NMR}$ images (left), diffusion weighted images (middle) and diffusion coefficient images (right) of a blue berry fruit measured by the sequence of Fig. 1(b).

固体NMRイメージングにおける分解能の向上

筑波大学物理工学系 松井 茂、裏岡昭博、井上多門

Improved Resolution in Solid-State NMR Imaging
by Self Phase-Encoding

S. Matsui, A. Uraoka, and T. Inouye
*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan*

INTRODUCTION

NMR imaging of solids is well recognized as a promising new tool in materials research. The variety of image contrast available only with NMR imaging arouses strong motivation for its wider and more active application. Although a few examples of advanced attempts have recently appeared [1-5], the potential utility does not seem to be fully exploited yet. One of the main reasons for this is the experimental difficulty of solid-state imaging techniques, particularly when high resolution is essential.

Line narrowing approaches are generally employed for high-resolution solid imaging [6,7]. Efficient line narrowing leads to higher resolution; however, the efficiency is limited by the experimental imperfections and further depends on molecular properties of the particular sample under investigation. As a result, it is not always possible to achieve high resolution in solid imaging.

To obtain higher resolution under a limited narrowing, one naturally resorts to the use of an increased field gradient; however, in most line-narrowing experiments with stroboscopic signal observation, the maximal amplitude of the applicable field gradient, G_{max} , is determined by the stroboscopic observation interval, t_s , and the imaging view width, l :

$$G_{max} = 2\pi/\gamma l t_s,$$

where γ is the gyromagnetic ratio. This restriction on the field gradient amplitude results from the fact that the signal observation interval, which is usually the cycle time of the line narrowing sequence t_c (or half of it), defines the Nyquist bandwidth for a imaging projection. The interval t_s can not arbitrarily be reduced due to the finite dead time of the signal receiver and to the finite switching time of the pulsed field gradient. This imposes severe limitation on the highest resolution obtainable in the line-narrowing solid-state imaging.

In fact, the highest resolution attainable with the maximal field gradient (G_{max}), Δl , is given by

$$\Delta l = l t_s / \pi T_2'^n,$$

where $T_2'^n$ denotes the transverse relaxation time prolonged by the line narrowing effect. Note that the highest resolution does not depend on the field gradient amplitude but is determined by $t_s/T_2'^n$, which corresponds to the inverse of the maximal number of signal sampling that can be made before the prolonged signal decays out. Therefore, to obtain a higher resolution under a given $T_2'^n$ one must reduce the usually unreducible interval, t_s , virtually by certain means.

Here, we present a new technique to improve the spatial resolution in solid-state imaging beyond the aforementioned limit. The technique reduces the sampling interval, t_s , effectively by performing self phase-encoding, permitting high-resolution imaging of solids even when only a moderate efficiency of line narrowing can be obtained. Preliminary experiments using multiple magic sandwich echoes (or simply magic echoes) [8-10] demonstrate the resolution improvement.

KEYWORDS: solids, imaging, magic echoes, resolution, self phase-encoding

まついしげる、うらおかあきひろ、いのうえたもん

SELF PHASE-ENCODING

Figure 1 illustrates how to achieve an N -fold resolution improvement with the self phase-encoding technique. In the usual line-narrowing imaging experiments, field gradient pulses with the amplitude of G_{\max}/S (S ; scaling factor of the line narrowing sequence) are applied during certain windows for frequency encoding and the signal sampling is made every ts (Fig. 1a). For an N -fold improvement of resolution, the field gradient is increased N times and N -step self phase-encoding is made prior to the frequency encoding, as shown in Fig. 1b. Each step of the self phase-encoding is given by $n\tau ts G_{\max}/N$ ($n=0, 1, 2, \dots, N-1$). This results in the signal sampling which is finer in time by N , giving an effectively reduced sampling interval, ts/N . The Nyquist frequency is therefore increased by N . The N self phase-encoded FID signals obtained by the N separate experiments are combined as shown in Fig. 2 to give an interleaved FID. Fourier transformation of the interleaved FID provides a projection with an N -fold improved resolution.

The principle of the resolution improvement by the self phase-encoding is valid for most methods of solid imaging based on line narrowing. However, due to interference effects between the coherent averaging and the spin phase modulation by the field gradient, the performance of the self phase-encoding technique may depend on the RF pulse sequence employed for the coherent averaging. Here, we have employed the magic sandwich echo sequences as mentioned above. A representative implement using the TREV-8 magic sandwich echo sequence [11] is shown in Fig. 3, where a 4-fold improvement is assumed. The 4-step self phase-encoding is made by making use of the 3 τ -windows. Similar implements using the TREV-4 [11] and the time-suspended TREV [8-10] magic sandwich echo sequences are obvious.

EXPERIMENTAL

Experiments were made on a home-built spectrometer, operating at 59.85 MHz for protons. In all the magic sandwich echo sequences, most of the experimental conditions were the same as before [4,10]. The pulse spacing τ was set at 30 μ s and the signal sampling interval ts was 360 μ s (12τ). The peak amplitude of the pulsed field gradient, $3G_{\max}$ (accounting for the scaling factor 1/3), was 26 mT/m in the usual experiments. In the experiments of resolution improvement, the gradient amplitude was increased by the factor of the improvement, N .

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 4 shows the experimental results of the 4-fold improvement obtained by using a test sample of adamantane ($T_2=50$ μ s) depicted as an inset in the figure. A 1 mm thick Teflon spacer is inserted in the center of the tube with an inner diameter 7 mm. Projection a was recorded with the usual TREV-8 imaging sequence without the improvement and projection b was obtained similarly but with the 4-fold improvement (Fig. 3). Comparison of sharpness in the center hole at the 1 mm Teflon spacer clearly demonstrates the expected resolution improvement. A similar improvement can be seen in projection c, which was obtained using the TREV-4 imaging sequence for comparison. Projection a is represented by 256 points interpolated from 64 points by zero-filling while projections b and c, also displayed by 256 points, were produced from the combination of the four self phase-encoded 64-point FIDs.

The signal-to-noise ratio (S/N) of the projection is reduced associated with the improvement because the significant number of pixel is increased from 64 to 256. This results in a decrease of the S/N by a factor of 4. Additional loss of sensitivity associated with the improvement is caused by the discarded initial a few echoes for the insertion of the self phase-encoding period. This loss is relatively small since the T_2^* of the test sample was about 3 ms for the TREV-4 and 4 ms for the TREV-8, and the self phase-encoding period was 0.36 ms. It should be noted that the increased number of measurement for the self phase-encoding does not necessarily lead to further loss of sensitivity: Usually, the receiver bandwidth is set at the inverse of the observation window τ while the projection bandwidth is defined by the sampling interval ts . In our case the ratio of the two bandwidths is 12. This unnecessarily wide receiver bandwidth causes noise aliased in the projection. As a result, the N -fold increased projection bandwidth results in reducing the noise aliasing, improving the S/N of the projection by \sqrt{N} . This improvement compensates for the sensitivity loss by the increased number of measurement.

Slight distortion and artifacts are noted in the projections b and c shown in Fig. 4. The distortion can mainly be ascribed to the eddy current effects, because the distortion became larger with increasing gradient amplitude. The artifacts indicated by * at quarter and half the Nyquist frequency in the resolution-improved projections b and c are concerned with the field gradient increased over the limit, G_{max} . Further details will be discussed in the presentation, together with some results obtained by using the time-suspended TREV sequences [8-10].

Another experimental example of the resolution improvement is shown in Fig. 5, where again a 4-fold improvement is demonstrated by using the test sample of polycarbonate. The projections were obtained using the TREV-8 sequence (a) without and (b) with the self phase-encoding. The center hole of projection b is much sharper than that of projection a. The T_2 ($=30 \mu s$) of the test sample was lengthened to 1.2 ms by the TREV-8 sequence under the same conditions as in the experiments on adamantane. Projection a was produced from an FID which was zero-filled from 16 to 256 points. Projection b was obtained from four 16-point FIDs which were combined into a 64-point FID and then zero-filled to 256 points. Each FID was a result of 4 accumulations for projection a and 16 accumulations for projection b. The artifacts noted in the projections shown in Fig. 4 are not visible clearly at this level of resolution.

REFERENCES

1. L. Butler, D. G. Cory, K. M. Dooley, J. B. Miller, and A. N. Garroway, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 125 (1992).
2. M. A. Hepp and J. B. Miller, *J. Magn. Reson. A*, in press.
3. E. Günther, B. Blümich, and H. W. Spiess, *Macromolecules* 25, 3316 (1992).
4. S. Matsui, Y. Ogasawara, and T. Inouye, *J. Magn. Reson. A* 105, 215 (1993).
5. F. Weigand, B. Blümich, and H. W. Spiess, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 3, 59 (1994).
6. D. G. Cory, *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 24, 87 (1992).
7. P. Blümich and B. Blümich, "NMR Imaging of Solids", NMR-Basic Principles and Progress, Springer-Verlag, Berlin (1993).
8. S. Matsui, *Chem. Phys. Lett.* 179, 187 (1991).
9. S. Matsui, *J. Magn. Reson.* 95, 149 (1991).
10. S. Matsui, *J. Magn. Reson.* 98, 618 (1992).
11. K. Takegoshi and C. A. McDowell, *Chem. Phys. Lett.* 116, 100 (1985).

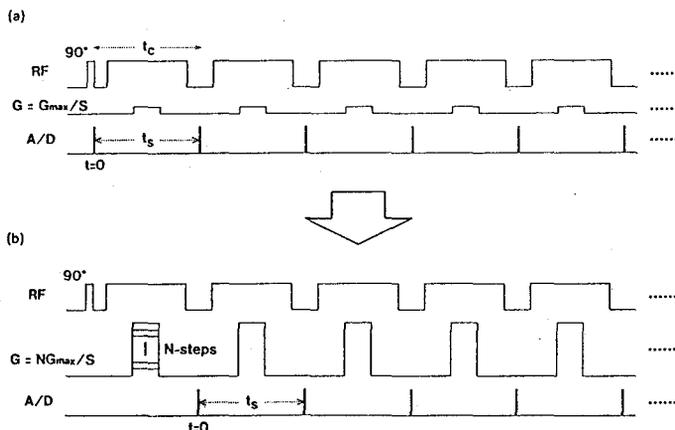


Fig. 1 Schematic representation to illustrate how to improve resolution in line-narrowing solid-state imaging with the self phase-encoding technique. a) Usual pulse sequence. b) Modified pulse sequence to improve the resolution.

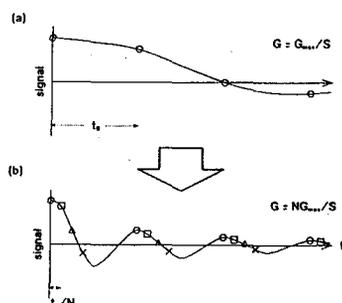


Fig. 2 Reduction of the signal sampling interval, t_s , by the self phase-encoding technique illustrated in Fig. 1. a) Usual FID. b) N -fold interleaved FID obtained by proper combination of the N self phase-encoded FIDs.

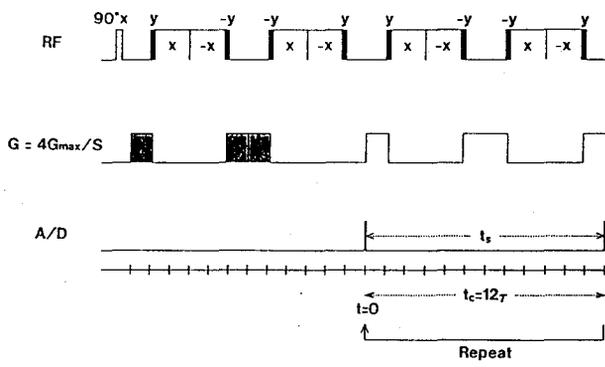


Fig. 3 Representative implement of the self phase-encoding technique using the TREV-8 pulse sequence. Strong RF irradiation along $\pm x$ are sandwiched by 90° pulses along $\pm y$ for time reversing. Four-step self phase-encoding is assumed.

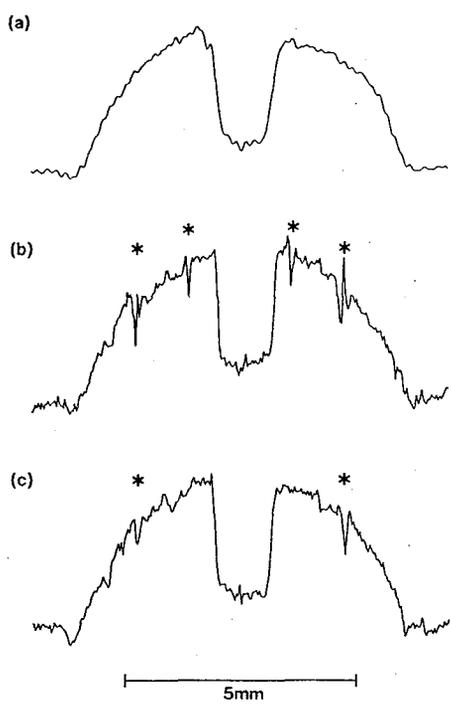
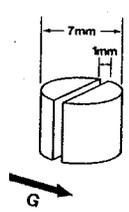


Fig. 4 Experimental results of the 4-fold resolution improvement obtained by using the test sample of adamantane shown as an inset. a) Projection of the sample recorded with the usual TREV-8 imaging sequence. b) Projection obtained by using the TREV-8 sequence with the 4-fold self phase-encoding (Fig. 3). c) Projection obtained for comparison using the TREV-4 sequence with the 4-fold improvement assumed.

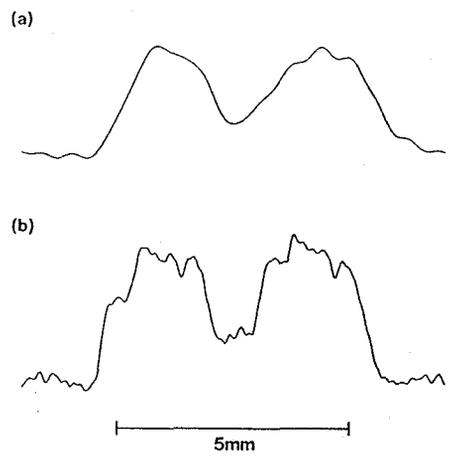
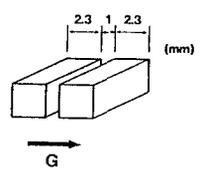


Fig. 5 Experimental results of the 4-fold resolution improvement obtained by using the test sample of polycarbonate shown as an inset. a) Projection of the sample recorded with the usual TREV-8 sequence. b) Projection obtained by using the TREV-8 sequence with the 4-fold self phase-encoding (Fig. 3).

P 4 H₂Oを含浸させたイオン交換樹脂ポリマーの3次元固体イメージング

(三菱化成総合研究所) 田畑 祥生 金子 美和

(日本電子) ○津野 久幸 長谷川 憲一 大津 真一 日元 徹 今成 司

3-dimension solid-state imaging of ion-exchange resin polymer which absorbs H₂O

3-dimension solid-state imaging of ion-exchange resin polymer which absorbs H₂O is measured using a pulse gradient spin-echo method. The sample is spherical and the diameter is 0.9mm. The observation range is 4.0mm×4.0mm×4.0mm, and the sampling points are 128×128×128 points. So the space resolution is about 31μm.

1. はじめに

NMRイメージング法は主に医学用として生体試料の観察に用いられ発展してきた。現在はこれを材料のマイクロイメージに応用する試みがなされている。NMRイメージング法では最初の90°パルスで磁化を倒してから信号を取り込むまでの勾配磁場による数百μsec程度の位相エンコードが不可欠なため、材料試料の場合この間のスピンスピン緩和 (T₂) による信号減衰が無視できない。H₂Oを含浸させたイオン交換樹脂ポリマーは、含浸された水のT₂が10msec程度であり、信号があまり減衰しない間に信号の取り込が可能である。従って、この水をイメージングできればイオン交換樹脂ポリマーについて様々な物性的知見が得られると考えられる。

2. 実験方法

サンプルは三菱化成製スチレン系強酸性陽イオン交換樹脂ポリマー (商品名: DIAION SK1B) を使用した。これを1φのガラス管にFig. 1のようにサンプリングした。この状態ではサンプルはゲル状態となっている。パルスシーケンスをFig. 2に示す。Y軸方向、Z軸方向に位相エンコード勾配磁場をかけて、3次元イメージを取り込む。実験に用いた装置は三軸方向に0.9T/mの磁場勾配をかけることが可能である。

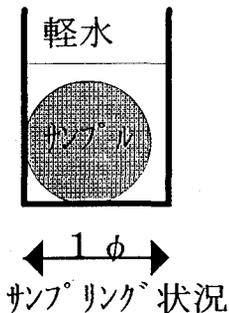


Fig. 1

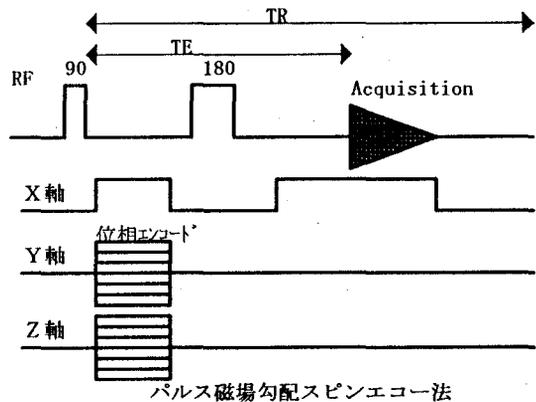


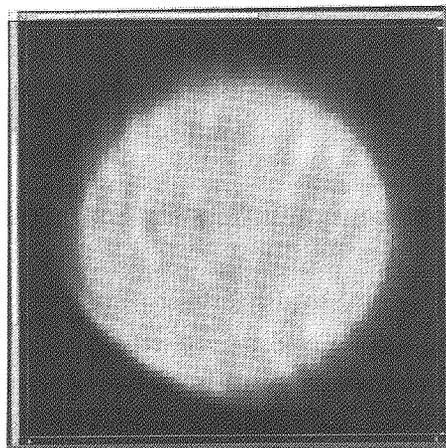
Fig. 2

キーワード イオン交換樹脂ポリマー、3次元固体イメージング

たばた さちお、かねこ みわ、つの ひさゆき、はせがわ けんいち、おおつ しんいち、ひのもと てつ、いまなり まもる

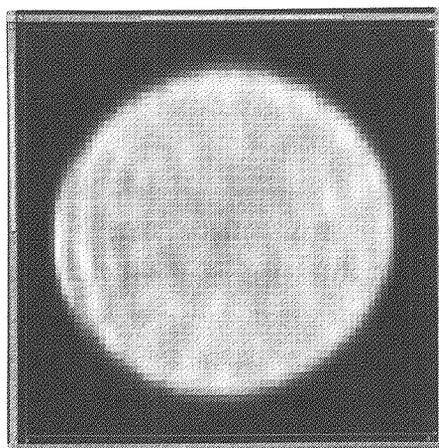
3. 結果

Fig. 3にスピン密度強調像、Fig. 4に T_1 強調像、Fig. 5に T_2 強調像を示す。測定ポイント数は $128 \times 128 \times 128$ 、観測範囲は $4\text{mm} \times 4\text{mm} \times 4\text{mm}$ 、測定核種は ^1H である。これらはすべて3次元イメージから、2次元スライスとして、範囲を $1.2\text{mm} \times 1.2\text{mm}$ にして切り出したものである。



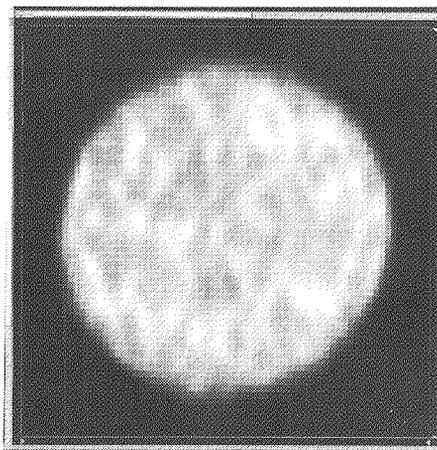
積算回数:64回、TE=2msec、TR=1.0sec

Fig. 3



積算回数:256回、TE=2msec、TR=0.3sec

Fig. 4



積算回数:64回、TE=10msec、TR=1.0sec

Fig. 5

4. 考察

空間分解能 $31\ \mu\text{m}$ で、直径 $0.9\ \phi$ のイオン交換樹脂ポリマーに含まれる H_2O の3次元イメージングを実現した。スピン密度強調像、 T_1 強調像、 T_2 強調像を得たが、得られた画像からは現在のところ特筆すべき物性的知見はない。今後さらに各種パラメータを変えたり拡散イメージを取得するなどして、追究していきたい。

参考文献

- 1) 安永秀計、黒子弘道、安藤勲 第30回NMR討論会要旨集 347(1991)
- 2) 田畑祥生、金子美和、他 第16回固体NMR材料研究会報告 (1994)
- 3) M. A. Rana, J. L. Koenig, *Macromolecules*, 27, 3727-3734(1994)
- 4) M. Ilg, B. Pfeleiderer, K. Albert, W. Rapp, E. Bayer, *Macromolecules*, 27, 2778-2783(1994)

P 5 NMRイメージングを用いた炊飯過程の研究
 (三菱電機) ○竹内繁樹、前田満雄
 (東京水産大) 五味雄一郎、福岡美香、三堀友雄、渡辺尚彦

Investigation of boiling process in a rice grain with NMR Imaging

(Mitsubishi Electric Co.) ○Shigeki Takeuchi, Mitsuo Maeda

(Tokyo Univ. of Fisherin.) Yuichiro Gomi, Mika Fukuoka, Tomoo Mihori, Hisahiko Watanabe.

The starch gelatinizing process in a grain of rice is investigated with NMR-Imaging. Using the moisture dependence of T_2 (spin-spin relaxation time), we constructed moisture distribution maps of rice grains in the boiling process from T_2 images. Comparing these data with computer simulation results, we estimated the effects of the inner structures of a rice grain for the process of starch gelatinization quantitatively. In addition, we will introduce some items for realtime-observation of the boiling process in a rice grain.

はじめに

米が炊ける過程とは、米の中のデンプンが中心部まで糊化する過程である。一般に炊飯には30分かかるが、その炊飯過程はなにによって制御されているのだろうか？ 大量炊飯によるマクロスコピックな研究はこれまでさまざまになされてきたが、米一粒のなかでどのように糊化が進行するかについての定量的な研究はこれまで行われていなかった。我々は、炊飯の進行過程を定量的に把握し、米の各内部組織が与える影響の評価を試みている。

実験方法

炊飯の過程を定量的に非破壊で研究する手段として、NMRイメージングは非常に強力である。デンプンが糊化するためには、全重量にしめる水の割合で55%以上の含水率になる必要であり、米内部のデンプンの糊化の状態および進行の様子は、その含水率分布により知ることができる。通常のスピネコー像も、水の濃度分布を表してはいるが、そのほかに横緩和時間や磁場の不均一などに強く影響されており、そのまま用いることはできない。そこで我々は、澱粉ゲル中の横緩和時間 (T_2) が含水率によって変化することに着目し、横緩和時間像をもとに炊飯の格段階における米中の含水率をマッピングした。

試料は、日本産ウルチ米(白米)を、一時間吸水させた後、100℃まで10℃/分で加熱し、炊飯途中で急速冷却によって糊化進行を停止させたものを用いた。実験はBLUKER社製AM200を用いて、試料作成の翌日行った。スピネコー像を、エコータイム12msから24msの範囲で変化させながら5点測定し、各ピクセルについて、強度の減衰を指数関数でフィッティングして T_2 を求めた。スライス厚は1.5mmで、画素の大きさは50 μ m x 100 μ mである。これはほぼ米の細胞の断面に等しい。

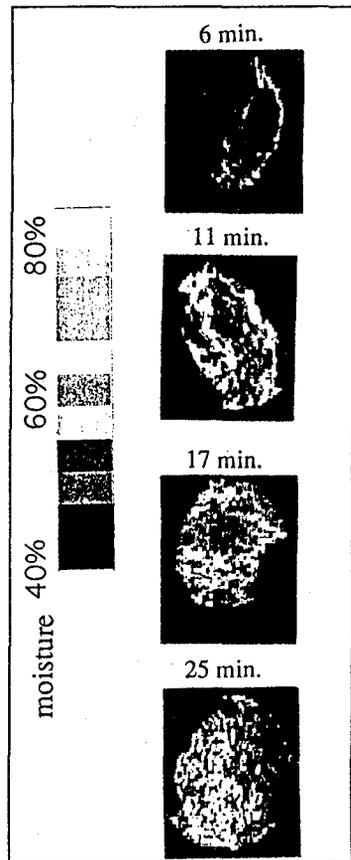


Fig 1. Moisture images of rice crops

キーワード： 米、炊飯、糊化、含水率、拡散係数、NMRイメージング、横緩和時間リアルタイム測定、加熱

たけうちしげき、まえだみつお

ごみゆういちろう、ふくおかみか、みほりともお、わたなべひさひこ

T₂像から含水率像への変換は、米デンプンゲルについてMeiboom-Gillの方法を用いて行った実験データにもとづいて変換した。

結果

各炊飯段階の米について得られた横断面の含水量像を図1に示す。図の下側が米の腹である。時間の経過に従って、中心より少し背側に位置する芯が縮小、消滅する様子が見られる。また、初期には腹側の方が速やかに含水している。

また、断面の長軸方向についての一次元マップを図2に示す。このグラフでは右側が腹になっている。25分経過以外のものでは、芯以外での含水量が大きく傾いており、高温での炊飯進行中も、水の拡散が速やかには行われていないことを示している。

このほか、セルラーゼ処理により細胞壁を破壊した米についても同様の実験を行った。長軸方向の一次元マップの傾きの減少がみられ、これは細胞壁による水の拡散阻害がなくなったためと考えられる。

リアルタイム測定実験

以上、事前に作成したサンプルを用いた実験について述べてきたが、結果の試料依存性や、試料作成後の試料内での水の再拡散の影響をなくするためには、炊飯を行いながらリアルタイムに米内部の含水量分布を取得する必要がある。

現在リアルタイム測定実験は2つの加熱セルを用いて行っている。図3aに示すのは、真空2重管のなかに送り込んだガスを、試料近くのヒーターにより加熱するものである。温度測定は試料管内の光ファイバー温度計を用いて行う。真空管の外径は20mmで、試料温度100℃においても、真空2重管外側を30℃以下に抑えることができるため、通常の20mm径のインサートを用いての測定が可能である。

図3bに示すのは、光ファイバによって導入したレーザー光によってサンプルを直接内部から加熱するレーザー加熱セルである。

リアルタイム測定では、一次元プロファイルを約1秒で取得するが、試料のサイズが小さいため、ノイズの影響を受けやすい。現在よりよい測定シーケンスを検討中である。

結言

現在、えられた含水量分布をもとに、シミュレーションを用いて解析中であるが、その結果は、炊飯過程はほぼ澱粉ゲル中の水の拡散によって律速されており、細胞壁や澱粉ミセルの膨張の効果は二次的なものであることを示唆している。今後は、データの蓄積、リアルタイム実験の高精度化、PFG法による、米粒内拡散係数の測定等を通じて、より広い視点からの研究を目指している。

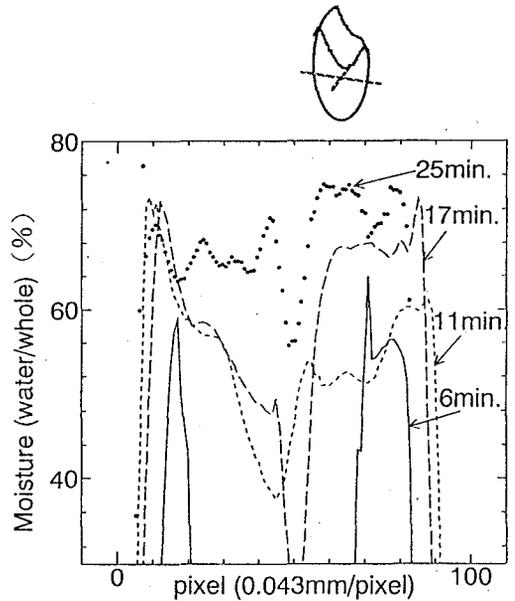
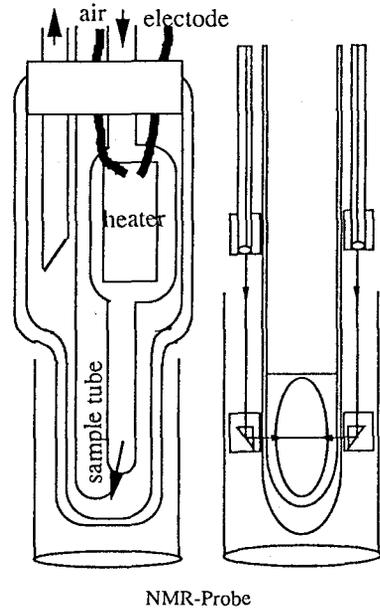


Fig 2. The one dimensional moisture distribution maps of rice grains.



3a. Gas heating cell 3b. Laser cell

Fig 3. The cells to heat up the samples.

P 6

4.7 T 自己遮蔽型 MR 装置を用いた各種植物のイメージング

○堀金 彰、堀金 明美、松倉 潮、柳田 勉、神尾 正義、
A. G. Ford¹、入口 紀男²

(農水省・農研センター、¹オックスフォード社、²シーメンス旭)

Imaging of Plants Using an Actively Shielded 4.7T MRI System.

Akira Horigane, Akemi Horigane, Ushio Matsukura, Tsutomu Yanagida,
Masayoshi Kamio, A. G. Ford¹ and Norio Iriguchi²

(National Agriculture Research Center, Oxford Instruments¹ and Siemens-
Asahi²)

A 33cm horizontal-bore imaging spectrometer(Varian UNITYplus-SIS200/330) with a 4.7T actively shielded magnet(Oxford) has been installed in a non shielded 6×7m room with open windows. As specifications, the field homogeneity is 0.2ppm/40mmDSV with the stability of 0.05ppm/hr. The host computer is a Sun SPARC station 10 with high-resolution NMR(UNITYplus)and mid-bore MRI(SIS200/330) software system. The 5 gauss zone in the elliptic long and short radius are 2.7 and 2.6m, respectively. It was resulted in the feasible installation of the entire system composed of the magnet, host computer, CRT display, acquisition computer, RF power console and gradient power supply in a limited space(6×7m). We here demonstrate a few data of plants obtained in various MRI.

限られた空間に 4.7T 水平開口イメージングスペクトロメーターを設置する可能性について検討し、自己遮蔽型磁石(Oxford)を有する MR システムを世界で最初に導入し稼働を開始した。装置は、4.7T バリアン UNITYplus-SIS200/330 で、33cm の水平開口部を有し、アプリケーションソフトウェアは、高分解能 NMR システム(UNITYplus)と中口径イメージングシステムをワークステーション(Sun SPARC10)に搭載している。5 ガウスゾーンは、長半径 2.7m、短半径 2.6m で空間サイズ 6×7m の通常の解放窓を有する一室に、磁石とホストコンピューター、CRT ディスプレイ、アキュイジションコンピューター、RF パワーコンソール、傾斜磁場電源装置等一式を設置することが可能であった。

各種植物のさまざまな断層像などの画像データを取得しているので供覧する。

キーワード：MRI、断層像、自己遮蔽型磁石、植物、発芽

ほりがね あきら、ほりがね あけみ、まつくら うしお、やなぎだ つとむ、
かみお まさよし、A. G. Ford、いりぐち のりお

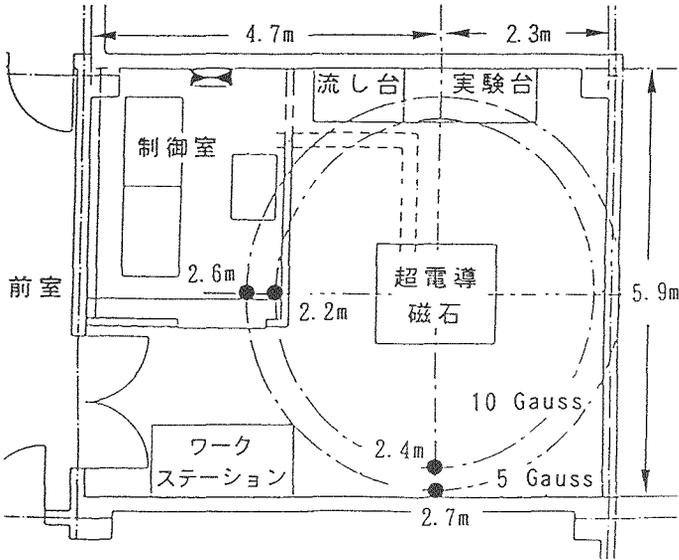


Fig.1 The layout of the laboratory and the gauss contours.

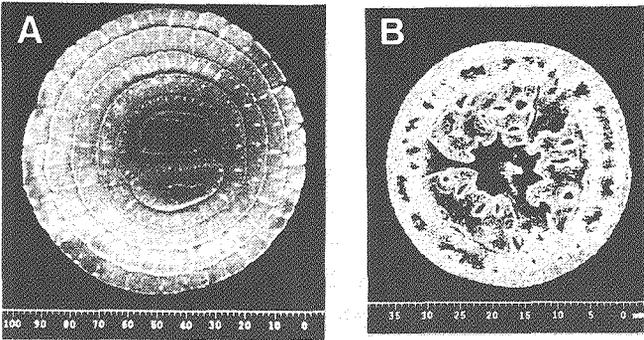


Fig.2 T_1 and T_2 weighted images(mm) of an onion(A) and a tomato(B), respectively.

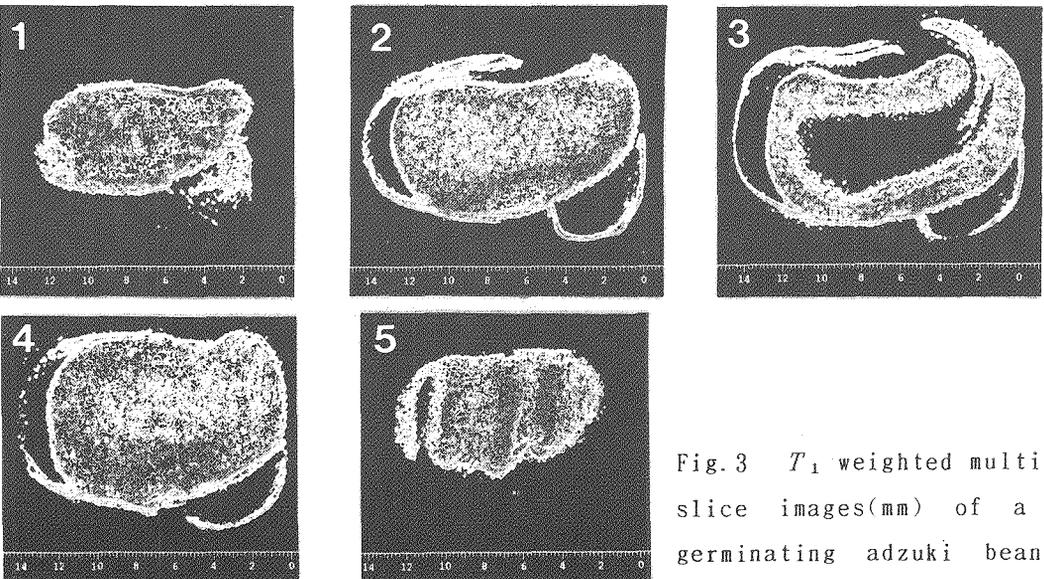


Fig.3 T_1 weighted multi-slice images(mm) of a germinating adzuki bean.

セッション : in vivo NMR

P 7

(徳島大・医・生理¹・放射線²・解剖⁴、京府医大・小児内科³、生理研⁵)
 吉崎和男¹、原田雅史²、三好弘一²、早野尚志³、福井義浩⁴、西谷弘²、
 亘弘⁵

Evaluation of Imaging Techniques of Nuclear Magnetic Resonance.
 K. Yoshizaki¹, M. Harada², H. Miyoshi², T. Hayano³, Y. Fukui⁴,
 H. Nishitani², and H. Watari⁵ (Depts. ¹Physiol., ²Radiol., and
⁴Anat., Sch. Med., Univ. Tokushima, ³Kyoto Pref. Univ. Med., ⁵Natl.
 Inst. Physiol. Sci., Okazaki).

Human brain surface structure was visualized using the spin-echo signals. The images were based on either T₂-weighted image, consisted of long echo time and thick slice, or the image constructed with multi-slices of T₁-weighted images. Activation of human brain by the exercise of finger tapping was also visualized using T₂*-weighted images of the field-echo signals.

[はじめに]

最近、ヒト脳の活動が核磁気共鳴を用いた画像法で計測可能となってきた。NMR画像測定(たとえばヒト頭部の測定)には、通常spin-echo信号が用いられてきたが、機能画像の計測にはfield-echo(あるいはgradient-echoともいう)信号が用いられる。

今回、ヒト脳の機能画像の測定を目的とし、spin-echo信号を用いたヒト大脳皮質の表面像の測定、ならびにfield-echo信号を用いた大脳皮質の機能画像の測定について報告する。

[方法]

健康成人ならびにファントムを対象とした。装置は日本電子製のイメージング装置が付属し

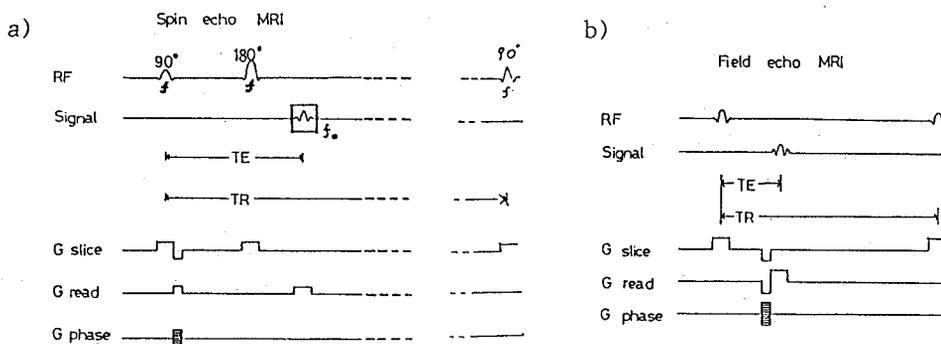


Fig. 1 The NMR imaging sequences of the spin-echo signals (a) and the field-echo signals (b).

Functional MRI, surface image, exercise, brain, human.

よしざき かずお、はらだ まさふみ、みよし ひろかず、はやの たかし、
 ふくい よしひろ、にしたに ひろし、わたり ひろし

た高分解能NMR装置(GX-200SMR、 ^1H の共鳴周波数:200 MHz)、人体用には生理研・磁気共鳴室の日立製MRI(90 MHz)、およびシーメンス製Magnetom H-15(63 MHz)を用いた。

[結果および考察]

1. ヒト大脳の表面像の計測。

ヒト大脳の表面像は片田ら¹⁾の報告した T_2 強調画像法で測定した。すなわち、脳実質のスピン・スピン緩和時間(T_2)に比べ、脳脊髄液の T_2 緩和時間が長いことを利用する。spin-echo信号による画像測定のパルス系列をFig. 1aに示す。スライス選択用の傾斜磁場(G slice)をかけ、特定の周波数帯域をもつsincあるいはgaussのRFパルス(90°)で特定の測定部位を励起する。表面構造の測定では周波数帯域をひろくして、厚いスライス面を励起する。ついで 180° パルスをかけてspin-echo信号を得る。エコー信号を得る時間(TE)を長くすると、脳実質の信号が減衰・消失し、脳脊髄液の水の信号のみとなる。この大脳表面の脳脊髄液の画像の白黒を反転表示して、脳表面構造の像を得た(Fig. 2a)。スライス厚6 cm、エコー時間150 ms、パルスの繰り返し2.5 sで1回のみ積算し、約10分の測定である。

つぎに、通常の T_1 強調画像のマルチ・スライス測定から脳表面像を作製した。1 cmおきに8 mmの厚さで大脳の断面像を測定した。 T_1 強調像ではエコー時間ならびにパルスの繰り返し時間を短くして測定する。RFパルスの繰り返し時間(TR)を短くすると、脳脊髄液の信号が飽和・減衰し、脳実質の信号が得られる。さらにマルチ・スライス法では、ある断面像の測定後の磁化の回復を待つ間に、励起されていない他の部位を次々に測定する。すなわち、Fig. 1aに示す励起するRFパルスの周波数(f)をかえて異なる部位を励起する。spin-echo信号の計測のときにはもとのreferenceの周波数(f_0)で信号を得る。したがって、一枚の画像測定でも、マルチ・スライス画像測定でも測定時間はかわらない。パルスの繰り返し時間が短いので、先ほどの T_2 強調画像の測定時間よりもむしろ短時間となる。パルスの繰り返し時間を0.7 sとし、エコー時間8 msで、4回積算して約12分の測定時間である。得られた画像のうち、脳表面の写っている3枚の画像をきりぬき、重ね合わせ、表面構造の画像を作製した(Fig. 2b)。なお、今回用いた高分解能NMR装置では観測用RFパルスと信号観測用の周波数(f および f_0)が同一周波数の設定となるために、マルチ・スライス法を用いると表示画面のread 軸のずれが生じた。

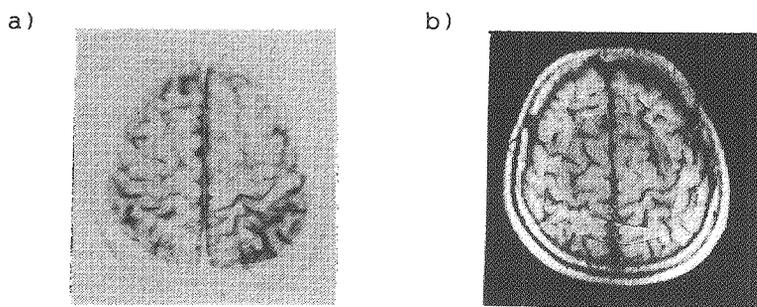


Fig. 2 Surface images of human brain obtained by spin-echo signals.

a) T_2 -weighted image with the inverted contrast.

b) T_1 -weighted image, constructed with 3 different slices.

2. ヒト大脳の機能画像の計測。

Functional MRIの測定にはfield-echo信号が用いられる。Fig. 1bに示すように、この方法はRFパルスで励起したあと、読み取り用の傾斜磁場(G read)の極性の反転に

よってNMR信号を得る方法である。したがって、このechoはfree induction decayに由来する信号である。

人体用のMRI装置で測定したグレープフルーツのspin-echo像ならびにfield-echo像をFig. 3に示す。エコー時間(TE)を34 msと比較的長くし、スライス厚2 mm、パルスの繰り返し0.5 sで、2回積算した。field-echo像では体積磁化率の変化している領域、すなわち磁場のみだれている領域のecho信号の減衰が著明である。そのために空気との界面近くの水の信号が著明に弱くなる。たとえば中心部の穴がspin-echo像よりも大きくなり、みかんの皮の信号も消失している。このように磁化率の変化により顕著に信号強度が変化するのがfield-echo法の特徴である。すなわち、field-echo法では T_2^* -weighted imageが得られ、この特性をヒト大脳の機能画像の測定に用いた。

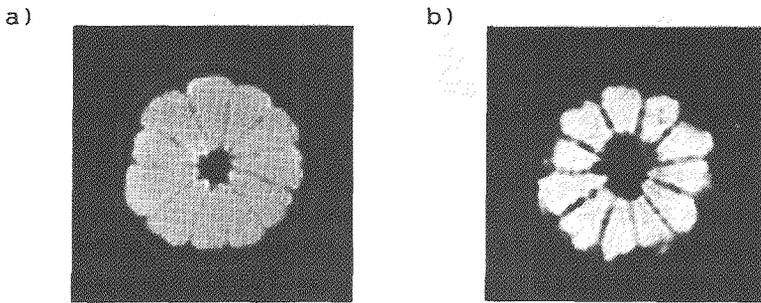


Fig. 3 NMR images of a grapefruit, obtained by the spin-echo signal (a) and the field-echo signal (b).

まず、ヒト大脳の正中断面像(Fig. 4a)で測定部位を定め、運動野を含む大脳横断面の T_1 強調像を測定した(Fig. 4b)。スライス厚は3 mmである。つぎに同一部位のfield-echo像を連続して測定した。4枚の画像の測定ごとに安静・運動状態を繰り返した。運動としては親指を各指に順にくっつけるfinger tappingをおこなわせた。各画像は35 sの測定で、パルスの繰り返しは91 ms、エコー時間は60 msでフリップ角度は 10° である。その時の最も変化した部位の信号強度の変化をFig. 4cに示す。finger tappingの運動によって約5%の信号強度が増加した。運動をやめるとこの場合には一過性の減少を示した後、もとにもどり、再び運動によって信号が増加した。そのときの運動時と安静時の画像との差画像をFig. 4dに示す。差画像8枚を加え合わせたもので、Fig. 4cの信号強度の変化は矢印の部位である。

finger tappingの運動は片手のみであり、その反対側の大脳の運動野付近ならびにその前側の広い領域の信号強度が増加した。しかし、この広い領域についての変化はあまり明白なものではなかった。Fig. 4bのspin-echo像と重ねると、信号強度の変化が著明な部位は運動野である中心前回の前側の溝の部分に一致した。すなわち溝に沿った静脈の信号強度変化が反映されているものと思われる。

運動によって信号強度が増加した原因として、Ogawaら²⁾にもとづく以下のように説明される。神経活動が活発化すると酸素消費が増加し、酸素化ヘモグロビンが脱酸素化される。その結果、ヘモグロビンの鉄原子が反磁性から常磁性に変化し、周りの水の信号強度が弱くなると予想される。しかし、実際には信号強度が増加したことから、局所血流の増加により酸素の供給過剰となり、局所の静脈血の酸素はむしろ増加し、ヘモグロビンの酸素化された割合が増加する。そのために信号が強くなったと説明される。あるいは、局所の血流が増加したために磁気飽和されていない静脈血が流れ込み、これが強い信号をあたえた、いわゆるin-flow効果が考えられる。今回はどちらの説明が妥当かは明らかではない。

以上のようにNMR画像測定法により、ヒト大脳表面の画像ならびに運動を指令する運動皮質野の活性化の測定が可能となった。

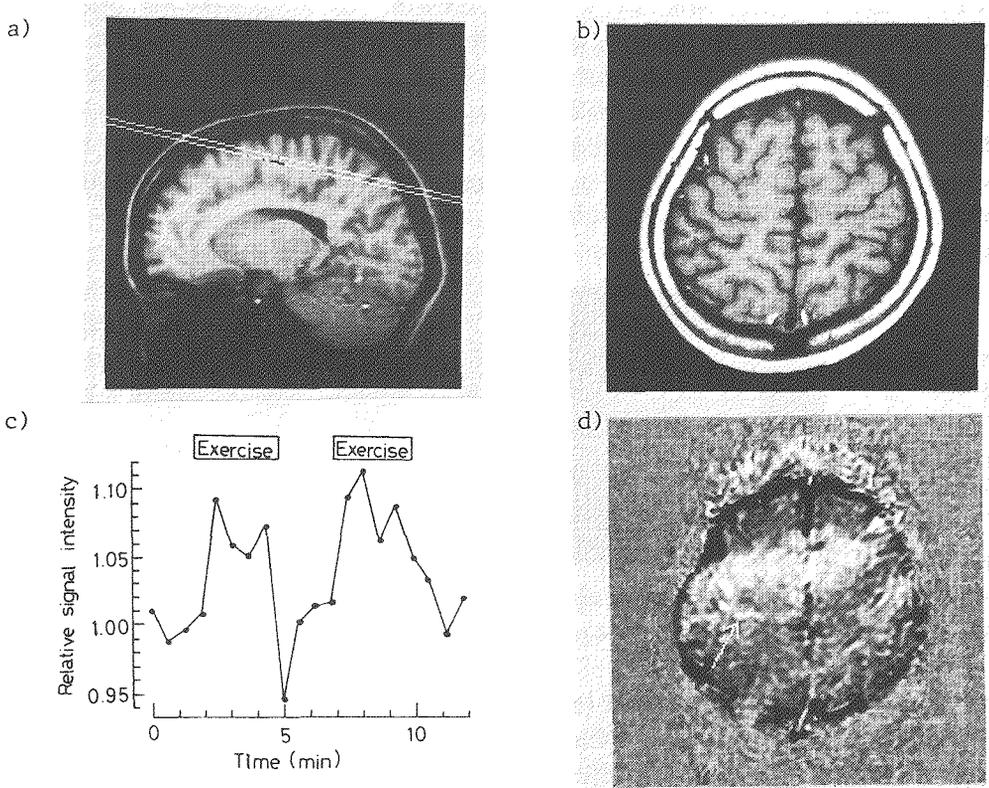


Fig. 4 Activation of human brain by an exercise of finger tapping. a) An imaging of the human brain showing the location of slice for the activation study. b) The spin-echo image of human brain showing the anatomical structure for the comparison with the field-echo images. c) The time course of the changes in the signal intensities of a location, associated with an exercise of finger tapping, in the field-echo images of the human brain. d) A difference image between the field-echo images obtained during the exercise and those during the rest, showing the activation of the primary motor cortex and other locations.

[謝辞]

本研究の一部は医学教育振興財団の援助を得た。日本電子データム・小川秀次郎、生理研・市川修、大河原浩氏の技術的援助を得た。

[文献]

- 1) 片田和広、他 (1989) 日磁医誌 9:215-225.
- 2) Ogawa, S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5951-5955.

P 8 ラット低酸素脳におけるN-アセチルアスパラギン酸の¹H NMR
—ヘモグロビンの常磁性効果は脳神経細胞内に達している

○三森文行¹、鮮干 撰^{1,2}、催 外永²、浅野勝己³
(¹国立環境研究所、²筑波大大学院、³筑波大体育科学)

¹H NMR Spectroscopy of N-acetylaspartate in Rat Hypoxic Brain - BOLD Effect on intracellular metabolites

Fumiyuki MITSUMORI¹, Sub SUNOO^{1,2}, Weyung CHOI², Katsumi ASANO³

(¹National Institute for Environmental Studies, ²Tsukuba Univ. Graduate School,

³Tsukuba Univ. Sports Sci.)

We found that the peak intensity of N-acetylaspartate (NAA) reversibly decreased in a hypoxic rat brain. The decrease was larger in the rat which has higher hemoglobin concentration. This result strongly suggests that the decrease in NAA in hypoxic brain was caused by shortened T₂ due to the BOLD effect, rather than a metabolic change. The amount of decrease was well explained by the susceptibility effect of deoxyhemoglobin estimated from T₂ changes in tissue water in the hypoxic brain. We concluded that the BOLD effect reaches to intracellular metabolites.

【はじめに】 我々は神経細胞に局在するN-アセチルアスパラギン酸(NAA)共鳴線が低酸素状態における脳で可逆的に減少することを見いだした。この理由として、1) 代謝変化によるNAA濃度の実際の減少、2) 低酸素化に伴うデオキシヘモグロビン (デオキシHb)の増大がもたらすNAAのT₂短縮による見かけの減少、の2つの可能性が考えられる。1) であれば、NAAの代謝過程への酸素の関与が考えられ、2) であれば、脳機能イメージの生成機構と考えられるHbの磁性効果、BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) コントラストが神経細胞内にも及んでいることを示すこととなり、両者の識別は興味もたれる。本研究では血中Hbを高めたラットを用いてNAA減少の理由を探った。

【方法】 ラット脳の¹H NMRスペクトルは麻酔下で頭部に二重同心円コイル (受信コイル径: 15mm) を装着し、雑音パルスにより脳部位1×1×1 cmを選択し、引き続いて11-τ-22-τ-acquisitionのスピネコー測定法 (τ=201.68msec) を用い、Biospec24/30分光計システムで測定した。麻酔は50%O₂、50%N₂Oガス吸気中に1%halothaneを用い、吸気中の酸素を窒素ガスで希釈することにより、吸気酸素濃度8%の低酸素状態を実現した。血中ヘモグロビンの増大したラット (高Hbラット) は460mmHgに気圧をさげた低圧チェンバーにラットを10時間/日、6日間/週、6か月間暴露することにより作成した。これにより血中Hb濃度は14.5g/dlから18.1g/dlに増大した。

Key Words: in vivo NMR, brain, N-acetylaspartate, hemoglobin, BOLD, hypoxia

みつもり ふみゆき、そんう そぶ、ちえ うえーよん、あさの かつみ

【結果と考察】 吸気中の酸素濃度を50%から8%へと低下させると正常ラット脳におけるNAA共鳴線強度は約11%減少するが吸気酸素濃度を50%に戻すと直ちに回復する(Fig.1)。ほぼ同時期に乳酸メチル基信号の可逆的増大も観測された。

高Hbラットで同様の測定を行うと低酸素時のNAAの減少は約28%とさらに大きくなった。

この結果はNAA共鳴線強度の減少が血中Hbの磁性効果による T_2 短縮に由来していることを強く示唆する。NAAの小さな T_2 変化を精度良く測定することは容易ではないので、脳内の水の T_2 の変化からHbの磁性が及ぼす緩和効果を算定した。すなわち、正常ラット、高Hbラットの2群で50%酸素吸入時、8%酸素吸入時のそれぞれの条件で、Carr-Purcell法によるマルチエコー画像を測定し、これより、脳皮質、基底

部位での T_2 を求めた。この結果、吸気中酸素濃度50→8%の低酸素化に伴い、正常ラット脳皮質では91→88msec、高Hb血ラットでは90→81msecとヘモグロビン濃度に依存した T_2 短縮が見られた。観測された横緩和速度を $R_{obs}(1/T_{2obs}) = R_{int} + R_{inhomo}$ (R_{int} :純スピンスピン緩和速度、 R_{inhomo} :磁場の不均一度、デオキシHbのもたらす磁化率の不均一度、組織構造のもたらす磁化率の不均一度等による緩和速度)とすると、50%と8%での緩和速度の差分は正常ラットでは $\Delta R = 0.441$ 、高Hbラットでは $\Delta R = 1.23$ と算出される。本実験条件では ΔR はデオキシHbの磁化率差が支配的と考えられる。上記の ΔR より $\tau = 201.68\text{msec}$ での共鳴線強度の減少は正常ラットで16.3%、高Hbラットでは39.2%と算出され、観測されたNAA共鳴線強度の減少をよく説明する。

【結論】

- ①低酸素脳でのNAAの可逆的減少はデオキシHbの増加がもたらす T_2 短縮による見かけの減少である…BOLD
- ②BOLD効果は神経細胞内に及んでいる
- ③高Hb血条件では脳機能イメージングの感度向上が期待できる
- ④低酸素条件下での細胞内代謝物の定量には注意を要する (T_2 weightedの場合)

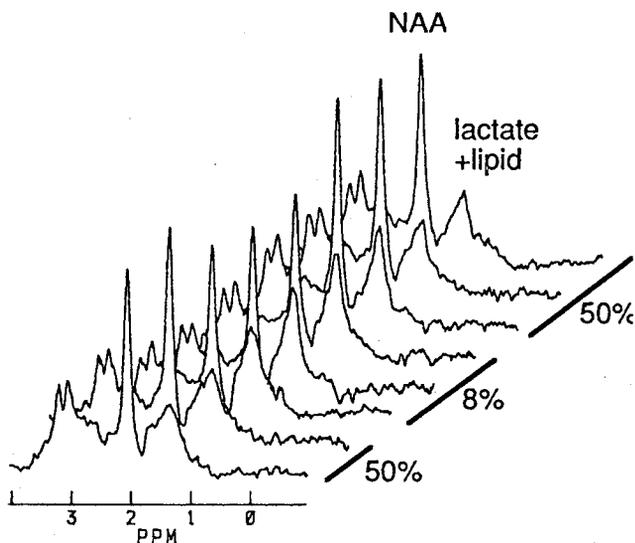


Fig. 1. A series of ^1H NMR spectra of a rat brain while the inspired O_2 content was changed from 50%→8%→50%

(九大・薬) ○金沢 洋子、新村 俊幸、馬屋原 慶子

In vivo ^{19}F NMR Observation for the Dynamical Study of Labeled Hexoses in TumorsYoko Kanazawa, Toshiyuki Shinmura and Keiko Umayahara
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University
Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812

In vivo ^{19}F NMR spectra of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (FDG) and of 2-deoxy-2-fluoro-D-galactose (FDGal) were obtained from the experimental tumors of mice at 254 MHz. We have shown that these compounds give many metabolites beyond FDG-6-phosphate or FDGal-1-phosphate, among these NDP-FDM is the main species found in tumors 2 days after injection. The present in vivo observation was focused at the detection of ^{19}F signals for the tumor detection and for the time course analyses.

[はじめに]

フッ素でOHの1つを置換したヘキソースは生体にとっては異物であり、これを使って本来の糖の代謝を論じるわけにはいかない。しかし置換の位置によっては天然のヘキソースと似た挙動を示すことから酵素活性モニタに活用出来る。中でもホツトの放射活性同位体で標識した 2-デオキシ-2- ^{18}F フルオロ-D-グルコース (^{18}F FDG) はヘキソキナーゼ活性を指標とした臨床診断試薬として使われている。一方、安定同位体 ^{19}F のNMRを分析手段とした場合には代謝物同定と同時に長時間モニタが可能であり、それによって新たな情報が得られることがわかってきた。すなわち FDG は動物体内でグルコースのように 6-リン酸化を受けるが、その後様々な化合物に変換される。まずマンノース体である FDM-6-P になるが、一方で生体構成物質の前駆体である UDP-FDG や NDP-FDM にも変換される。特に後者の反応はがんで効率よく起きる。また FDGal はガラクトースの代謝と似て、まず1-リン酸化を受け、その後 UDP-FDGal と UDP-FDG を経て NDP-FDM へまで変換されることがわかってきた。FDG の場合と同様に最終生成物である NDP-FDM はがん組織中で長時間保たれる。この化合物はがん診断に使えるだろうか。

本研究では ^{19}F で標識したヘキソースである 2-デオキシ-2- ^{19}F フルオロ-D-グルコース (FDG) あるいは 2-デオキシ-2- ^{19}F フルオロ-D-ガラクトース (FDGal) を投与したマウスの腫瘍において in vivo NMR 測定を行い、標識化合物の動態追跡の可能性を検討した。

[実験]

試薬：標識試薬は FDG と FDGal である。これらは主としてダイキン工業から提供されたものである。純度はNMRで検定した。

キーワード： ^{19}F NMR、in vivo 測定、F-標識糖、NDP-FDM、がん

かなざわ ようこ、しんむら としゆき、うまやはら けいこ

動物：実験腫瘍 Meth-A（肉腫）を腹腔内に移植した BALB/C マウス（雌性、7-8 週令、腫瘍移植後8-9日）およびMH134（肝臓がん）を腹腔移植した C3H マウス（雌性、8週令、腫瘍移植後約8日）を 16 時間絶食させた後に実験に供した。
 基礎実験：標識糖投与後の摘出臓器を用いて定量および代謝物同定を行った。定量には加熱により酵素失活させた臓器そのままあるいは遠心収集した腹水がん細胞を、物質同定にはこれらからの水抽出物を、それぞれ試料管に入れて NMR 測定試料とした。定量には JEOL FX-100 (^{19}F :94 MHz) を用いた。

In vivo 測定：FDG あるいは FDGal 投与後 1、6、24、48 時間にそれぞれ15分から 60 分間にわたる測定を行った。まず、フッ素糖投与後 10 - 15 分のマウスをエーテル麻酔下にプローブに固定した後、ハロタン麻酔 (0.5%/空気) に切り替え、NMR 測定を行った。6 時間以降の実験にはマウスを一旦ケージに移し、フッ素糖投与 4 時間以降は餌を与えた。装置は 6.3T (^{19}F :254 MHz) 径 89 mm の縦型 (JEOL GSX-270 WB) であり、直径 12 mm のサーフェスコイルを用い、次の条件下腹部からスペクトルを得た。rf パルス 8-16 μ s 矩形 (深さ 3 mm で 18-36 $^\circ$)、パルス繰り返し時間 60-200 ms、スペクトルバンド幅 10 或は 80kHz、データポイント数 8k。

【結果】

図 2 に 100 mg/kg FDG 投与マウスの下腹部の in vivo スペクトルを示す。投与物質 FDG から約 5 ppm 高磁場に 48 時間後においてもまだ十分に強度評価可能な信号が検出された。このマウスのがん細胞の水抽出物スペクトルからみて、長時間後に観測された信号は NDP-FDM に由来することがわかる。スペクトル強度より代謝物の経時変化を求めると図 2 d のようになり、摘出臓器で求めた値とよい一致を示した。

図 3 には 100 mg/kg の FDGal を投与した場合の in vivo スペクトルを示す。FDGal から FDG が生成し、さらに1日後には FDM の領域に強い信号が観測された。収集したがん細胞のスペクトルから FDG の場合と同様に 48 時間後に強い信号を与える化合物は NDP-FDM であることが示された。なお、健常な摘出臓器においてフッ素糖投与24時間以降でこの信号が観測されるのは心臓のみであった。

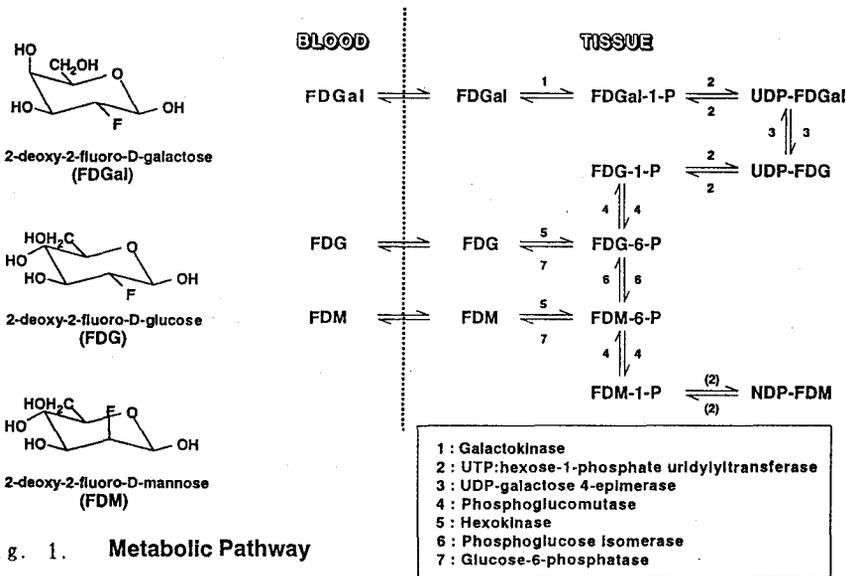


Fig. 1. Metabolic Pathway

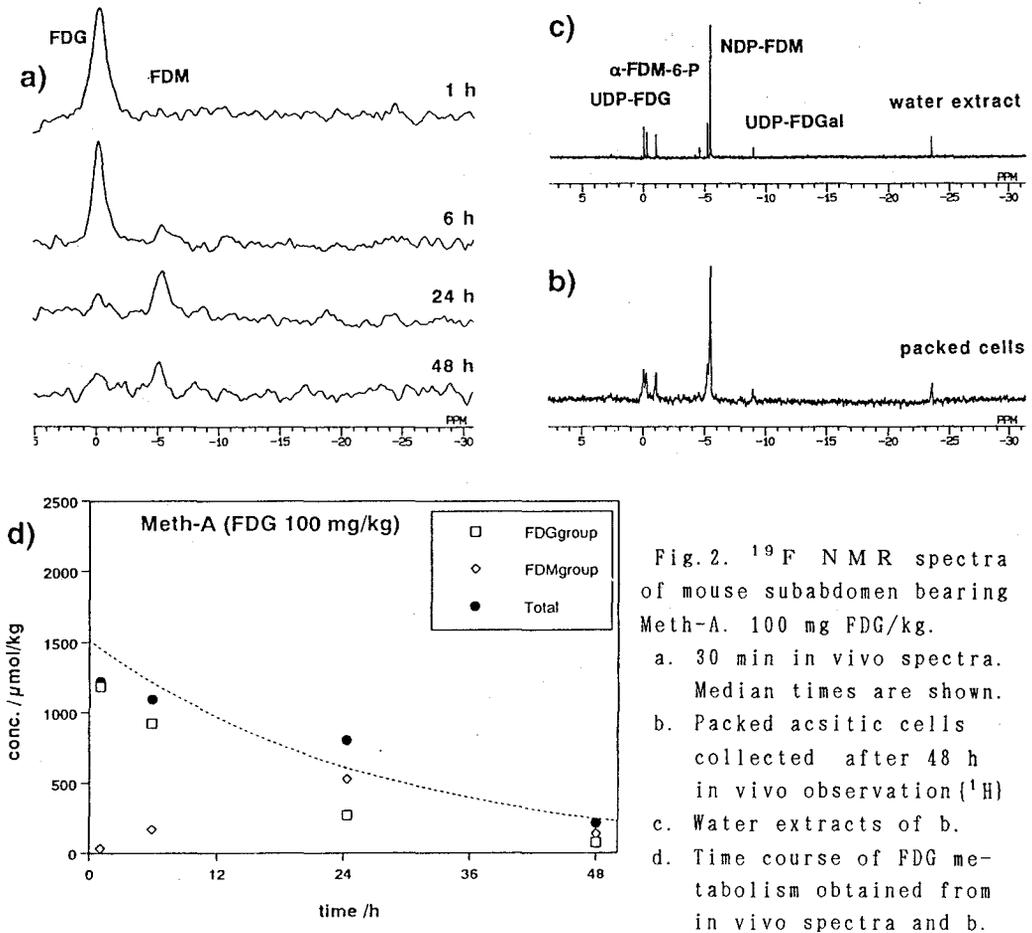


Fig. 2. ^{19}F NMR spectra of mouse subabdomen bearing Meth-A, 100 mg FDG/kg.

- a. 30 min in vivo spectra. Median times are shown.
 b. Packed ascitic cells collected after 48 h in vivo observation (^1H)
 c. Water extracts of b.
 d. Time course of FDG metabolism obtained from in vivo spectra and b.

【考察】

In vivo 測定によっても、フッ素糖投与後 1~2 日経過して健常組織からフッ素化合物が殆ど排出された時期に、がん細胞の位置で NDP-FDM を主とする NMR 信号が観測され、小動物のがん診断にこの方法が適用できることが示された。

本実験で用いた投与量のフッ素糖が時間分解能 30 分ではほぼ満足すべきスペクトルを与え、経時変化追跡が可能であることが示された。直後に収集した細胞中の濃度 (200 mg FDG/kg 投与の場合の細胞内濃度 0.9 mmol/kg、100 mg FDGal/kg 投与の場合 0.7 mmol/kg) から実際に測定されている腹部における濃度は 0.2 - 0.15 mmol/kg かそれ以下と考えられる (細胞/腹水 ~ 1/4 から計算)。FDG は大量投与により動物の生理的状態を一時的に変化させるので、投与量は 100 mg/kg 以下が望ましいが、図 1 に示すようにこの投与量でも測定は不可能ではなかった。FDGal は大量投与の影響が少ないのでこの様な実験にはより適しているといえる。

本研究の測定対象が腹水がんであるため、腸と腹水の位置関係によっては実質的な観測範囲は複雑である可能性がある。本実験条件は非常に浅い所に高感度領域を設定しており、腸の測定はしていないつもりであるが、時間追跡における信号強度のバラツキの原因はここにあるかもしれない。この点については同一個体、同一設定条件でプロトン画像を撮ってみるのが望ましい。なお、サーフェスコイ

ル近傍にあった皮膚の摘出試料からは信号は検出されていない。

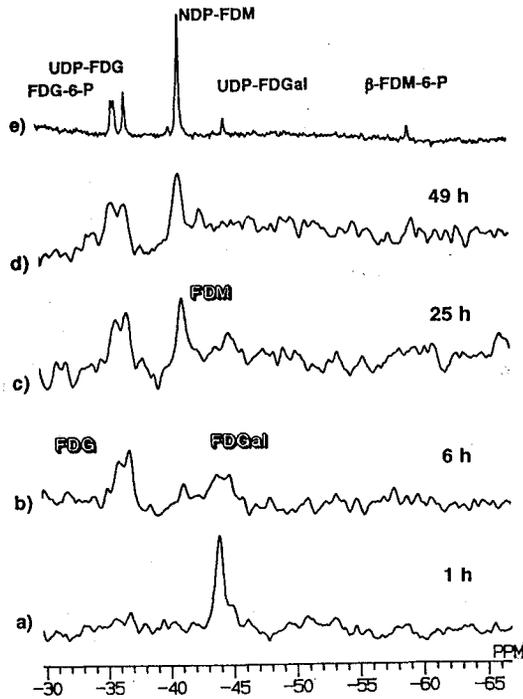


Fig. 3. ^{19}F NMR spectra of the mouse subabdomen bearing MH134 as ascites injected with 100 mg FDGal/kg.
 a-d. In vivo spectra of 30 min observations.
 e. Ex vivo spectra of packed ascite cells collected immediately after the observation d. (^1H)

【謝辞】

本研究を遂行するに当たりお世話になった次の方々にお礼申し上げます。FDGと FDGal を合成し提供下さったダイキン工業化学事業部第3研究部 下川和弘、山下恒雄両氏。マウスがん細胞を提供下さった大鵬薬品研究部。JEOL GSX-270WBの使用の便を計って下さった九州大学医学部附属病院放射線部長 増田康治教授。254 MHz 用サーフェスコイルを作成いただいた日本電子 小川秀次郎氏。

【文献】

1. Haberkorn U, Strauss LG, et al. *J. Nucl. Med.* **34**, 12 (1993) など.
2. Kanazawa Y, Monoazono Y, Kojima M, et al. *Life Sciences*, **39**, 737 ('86)
3. Shinohara S, Kanazawa Y, Kojima M, *Magn. Reson. Med.* **21**, 191 ('91).
4. Kanazawa Y, Yamada M, Umayahara K, et al. *Clinical PET in Oncology*, Matsuzawa T ed. World Scientific, 1994. pp.63
5. Shinmura T, Umayahara K, Kanazawa Y, et al. 2nd Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance, **3**, 1156 (1994).
6. 馬屋原、新村、金沢ら、第22回日本磁気共鳴医学会大会、194、大阪 1994.

P 10

部位別脳内代謝物質の 2D-NMRマッピング

○高橋征三、角野文緒、大久保七重、荻野孝史*
日本女子大・理・物生、国立精神・神経センター神経研究所*

Site Specific 2D-NMR Mapping of Metabolites in Brain

Seizo Takahashi, Fumio Sumino, Nanae Okubo, and Takashi Ogino*

Dept. Chemical and Biological Sciences, Japan Women's Univ., and
*Institute of Neuro Science, NCNP

Rat brain tissue was investigated by super-COSY spectra. The brain tissue was separated to cortex, cerebellum and hippocampus. By means of 2 dimensional spectra, most of the NMR resonances in the tissues are clearly isolated. These peaks are expressed in magnitude mode and quantitatively evaluated. Delay in the pulse train was found to enhance the resonances of different metabolites. It was also found that the peak intensities observed in the spectra depended on T₂. Thus, the peak intensities in the super-COSY spectra of different tissues should be calibrated for more precise quantitative studies of metabolites. However, peak intensities between tissues explains well with the data of biochemical analysis, suggesting that the difference in T₂ between tissues could be neglected at first approximation. The 2D-NMR enabled to quantitate the metabolites of GABA, taurine, inositol, glutamate, aspartate, etc. which was difficult by the conventional in vivo 1D-NMR method.

生体組織は複雑な形状の固体成分と細胞液からなる不均一系であり、その中に多種多様の物質が混合して存在する多成分系である。しかもこれらの成分は動的平衡にあり、時々刻々と変化すると考えられる。このような生体組織を対象とする in vivo NMRには in vivo 系固有の問題が存在する。NMRで脳の代謝機能を研究する場合、スペクトルの帰属および同定が出発点となる。脳組織から観測される¹H信号のうち、Lactose、N-Acetylaspartate、Creatine、Cholineなどの主要な信号はすでに帰属され、臨床的にも応用されている。しかし代謝機能的には重要でありながら、スペクトルの重なりなどの理由で、帰属されていないピークが多数存在する。本研究の目的は、脳組織内の多数の微量成分を 2D-NMRを用いて解析し、その分布を部位別に正確にマッピングする方法を開発することである。

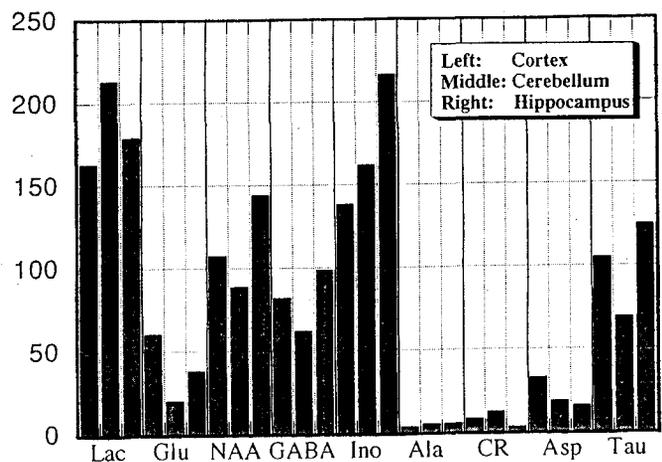
キーワード: NMR、in vivo、COSY、脳

○たかはし せいそう、すみの ふみを、おおくほ ななえ、おぎの たかし

【実験】 試料は7週令の Wister Rat の脳を用い、解剖後ただちに凍結し、皮質、小脳、海馬に分離した。それらはドライアイス冷却下約 1.5時間放置した後に、5 mm NMR 試料管に詰めて測定した。装置は Bruker AMX-400WB を用い298Kで2K×512点のsuper-COSYスペクトルを1スペクトル8回の積算で測定した。代謝物質量は Magnitude Modeで求めたフーリエ変換スペクトルから交差ピーク30個を選択し、体積強度で評価した。

【結果】 super-COSYスペクトルのdelayを変えるとピークの相対強度が顕著に変化すること、ならびに交差ピークの強度は対称的にならないことが分かった。例えば 80msでは ValineやCreatineが明瞭に観測されるが、40msではValineはほとんど見えない。また40msでは一般に対角項より左上にあるピークの方が強く出るが、80msのGlutamateのピークは右下の方が強い。同じdelayではピーク強度に再現性があるので、組織系における super-COSYスペクトル固有の性質であると思われる。線状体や microwave 処理した脳組織では信号強度が著しく低下することから、ピーク強度は組織の T₂に強く依存することが分かった。従って部位によって T₂が異なることが想定される場合には、厳密な定量解析のためには例えば過塩素酸抽出などの方法で得た結果を使って検量線を作り、スペクトル強度を補正する必要がある。同じことはスピネコーを使った 1D-NMRについてもいえるので、これは必ずしも2D-NMR固有の欠点ではない。2D-NMRではベースラインやピークの重なりによる強度変化の曖昧性を排除できるので、濃度の微小な変化や分布の違いを 1D-NMRより鋭敏に検出できる。したがって今回 super-COSYを使って部位による代謝物質濃度の違いや、代謝物質の時間変動を明瞭に示すことができた。下図に示した結果は各部位における代表的なピークを選択し、その体積強度を縦に棒グラフで示したものであるが、同じ物質についての相対的な強度比は、生化学的な分析から予想される結果とほぼ一致した。したがって上に述べた部位による T₂の違いは第1近似ではほとんど無視できよう。

多数の代謝物質を同時に定量分析するためには2D-NMR法が不可欠であり、測定時間の点でも1D-NMRより有利にすることができることが分かった。従来の1D-NMRを使った *in vivo* NMRではGABA、グルタミン酸、アスパラギン酸、イノシン酸などの代謝物質は、他のピークと重なるので定量が非常に困難であったが、2D-NMRを使えばこれらの物質の定量分析が可能であるとの見通しを得た。



セッション：装置等

(Instrumentation)

汎用Transient Nutations観測アタッチメント

(電子技術総合研究所) 亀井 裕孟

Transient Nutations Attachment to Conventional NMR Spectrometer

(Electrotechnical Laboratory) Hirotake Kamei

A system for observing transient nutations has been constructed. The unnecessary carrier rf in the observation channel has been suppressed by the use of a phase shifter and an rf balancer, and -60dB carrier suppression has been achieved. Transient nutations of ^1H and ^{13}C were observed with good S/N.

1. はじめに

Transient nutations は1949年Torrey¹⁾によって最初の観測が行われたが、観測がやや面倒なためか一般には普及していない。Transient nutations をイメージングに用いると多くの利点があることから、われわれは、既に、プロトンについてtransient nutations を用いた純回転座標系イメージングを試み、満足すべき結果を得ている。²⁾ 純回転座標系イメージングの利点は、1) 回転磁場の存在下で信号を観測する、2) 回転磁場印加時間は通常のパルスNMRに比べ長い、比較的小さな回転磁場を用いるので、照射電力は通常のパルスNMRに比べ小さいので生体に対する安全性が高い、3) 回転磁場勾配を用いるので磁場勾配のスイッチング速度が速く、 $1\mu\text{s}$ 以下のスイッチング速度が容易に得られる、従って、磁場勾配の信号に対する過渡的な影響がないので信号検出における無駄がない、4) 静磁場勾配と異なり、磁場勾配スイッチングに伴う生体内の渦電流が生体機能に与える影響を考慮する必要がなく、安全性の高い測定ができる、5) transient nutations の減衰の時定数 $1/T_n$ は、 $1/T_n = (1/T_1 + 1/T_2)/2$ であるから、一般に生体系のように T_2 が T_1 に比べて短い系ではFIDに比べて信号の検出が若干有利である、などである。一方、欠点は、1) 信号観測系の製作がやや面倒である、2) 広い帯域幅の信号検出には不向きである、3) off resonance 時の信号解析が複雑である、などである。

Transient nutations の観測には、通常、対称あるいは非対称ブリッジ検出器が用いられる。しかし、ブリッジ検出器は複数の核種を測定対象にすると、それぞれの周波数ごとに固有のものを作成しなければならず不便である。そこで、市販のNMRスペクトロメータに付属させて、広範囲の観測周波数に対して適用できるtransient nutations 観測アタッチメントを作成し、良

transient nutations, rotating frame imaging

かめい ひろたけ

好な結果を得たので報告する。

2. 方式

Transient nutations は高周波パルス印加中に観測される信号である。大きな励起高周波電圧に対し、観測される信号は非常に小さいので、transient nutations 観測のためには何らかの方

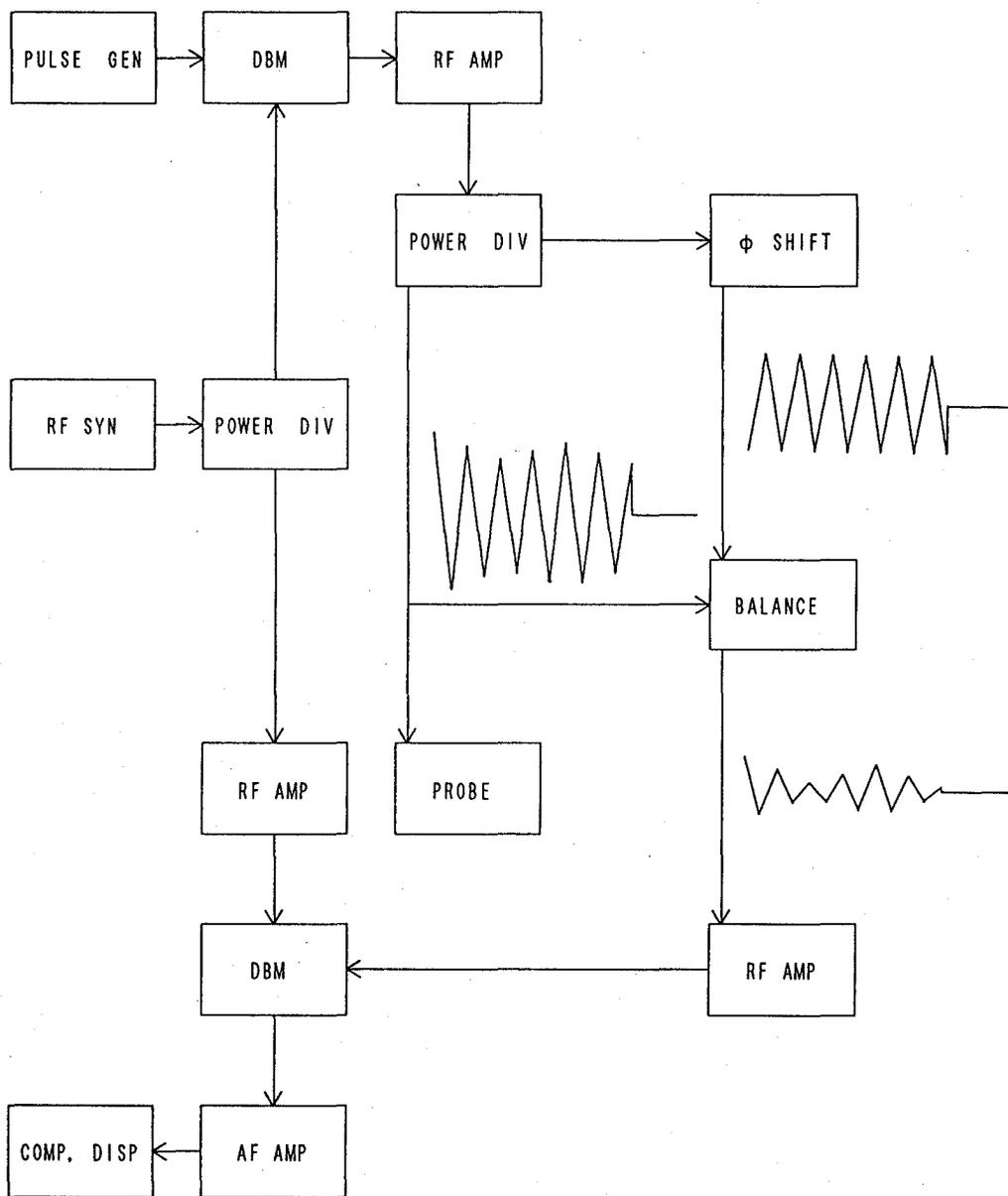


Fig. 1. Block diagram of a transient nutation spectrometer.

法で観測系に入る高周波パルスを抑圧する必要がある。ここでは高周波パルスを観測系と参照系とに2分割し、互いに逆位相になるように参照系の位相を調節して加え合わせることによって、観測系に入力される高周波パルスの抑圧を行った。

3. 構成

Transient nutations 観測系のブロック図をFig.1 に示す。高周波シンセサイザ (Anritsu MG 3633A) の出力は高周波同相分配/合成器 (R&K PD-12-3) によって2分割され、一方は位相検波の参照波に、他方はパルス変調され励起パルスとして用いた。パルス発生器には任意波形発生器 (Wavetek Model 75) を使用した。トリガパルスの発生にも同型器を用いた。複平衡変調器 D B MにはHewlett Packard 社のHP 10514A を2段使用した。パルス変調された高周波は高周波増幅器 (HP 8447D) で増幅したのち、同相分配/合成器で2分割し、一方は励起用としてJEOL GX-270スペクトロメータのプロープへ、他方は搬送波抑圧用として移相器 (R&K PS-3) へ供給した。高精度の移相制御が必要のため、移相制御電源としてFig.2の回路を使用した。R_pは10回転ポテンシオメータである。プロープおよび移相器からの出力は搬送波をできるだけ抑圧し増幅器の飽和を防ぐため平衡回路で振幅を調整して合成した。搬送波が抑圧された信号は増幅器 (HP 8447D) で約50dB増幅したのち、位相検波 (HP 10514A使用) し、試作した増幅器 (最大利得100dB) で音声周波増幅して観測した。信号はPC-9801RA で制御されたデジタルメモリ (KE 8201, 8202) で積算およびA/D変換しPCに転送、フーリエ変換等の処理を行った。

4. 結果

プロープに印加した高周波電圧は約2Vである。さらに大きな電圧が必要な場合には、高周波シンセサイザ内蔵の変調器を使用した。

このときの最大出力電圧は5Vである。

Transient nutations 観測で最も重要な条件

の一つが信号系での不要な搬送波の抑圧である。本アタッチメントの場合、簡単な回路構成であるにも拘らず平衡回路出力の搬送波抑圧比は約60dBであった。この値は通常のtransient nutations 観測には十分なものである。平衡回路の不要搬送波抑圧比の安定度は試料コイルを含む共振回路の安定度、参照系の位相の安定度などに依存するため室温の変動には敏感である。抑圧比60

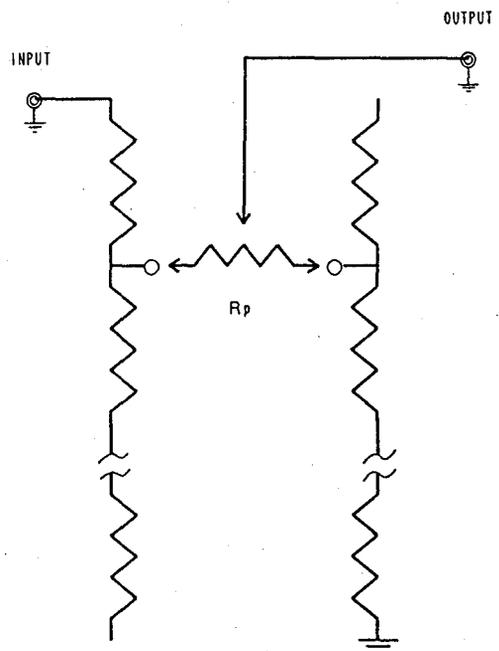


Fig.2. Voltage control circuit for the phase shifter.

dBを維持するためには、 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 程度の室温の温度制御が要求される。

Transient nutationsのS/NはFIDの観測と異なり、高周波パルスの持つ雑音に大きく依存する。このため高周波パルスの増幅には低雑音の増幅器を使用する必要がある。今回は出力は満足すべきものではないが、低雑音ということでHewlett Packard社製の前置増幅器 HP-8447D を使用し、良好な結果を得ることができた。

今回は ^{13}C および ^1H のtransient nutationsの観測を行った。例として、D-[1- ^{13}C]glucoseの ^{13}C transient nutationsを同一測定条件で観測したFIDとともにFig.3に示す。高周波パルスの雑音に十分な注意を払った結果、FIDとほぼ同様なS/Nでtransient nutationsが観測されている。

高分解能NMRスペクトロメータには一切の改造を施さないで、容易に入手し得る市販の素子を用いてtransient nutations観測を行うことのできるシステムを試作し、良好な結果を得ることができた。今後の課題はより広帯域の信号観測と静磁場勾配を利用したイメージング速度を凌ぐ超高速イメージング法の開発であろう。

[文献]

- 1) H. C. Torrey: Phys. Rev. 76, 1059 (1949).
- 2) 亀井裕孟, 片山義朗: 第31回NMR討論会講演要旨集(姫路, 1992).

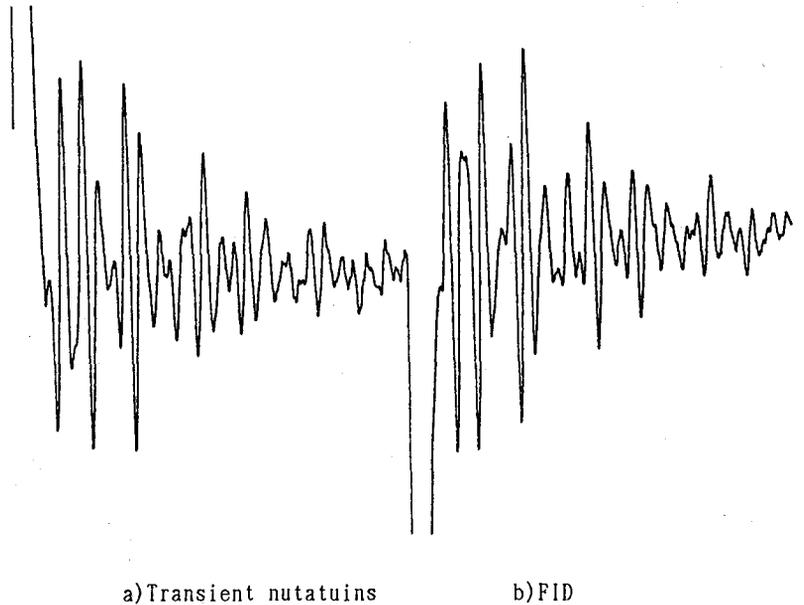


Fig.3. ^{13}C a)transient nutations and b)FID of D-[1- ^{13}C]glucose.

Chemically Specific Observation of Phosphorus-31 NMR spectrum of
 Oxygen-17 Labeled Phosphoric Acid Groups

M.Tamura, Y.Harada, *Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd.*

ABSTRACT: To separate chemically specific ^{31}P -NMR spectra in the mixture, one dimensional ^{17}O - ^{31}P HMQC¹⁾ experiments of oxygen-17 labeled phosphoric acid groups were done by a home-built ^{31}P - ^{17}O - ^1H - ^2H quadrupole resonance NMR probe connected to a commercial spectrometer. The probe structure and evaluation measurements will be presented.

1.動機、目的

りん31は天然存在比100%で、NMR核種の内では比較的高感度であり、 ^{31}P -NMRは、りん酸代謝系の *in vivo* 観測や、りん脂質膜の動態解析などに利用されてきた²⁾。生体などの混合物系において、りん酸基を含む化学種ごとの ^{31}P -NMRスペクトルの識別ができれば、代謝追跡や、膜蛋白質を含む混合りん脂質2重膜の動態解析など、個々のりん酸基が含まれる化学種ごとの経時変化や動的挙動に基づくスペクトルを分離測定できる点で利点がある。

そこで我々は、酸素17 (安定同位体、天然存在比0.037%) 標識りん酸基を対象とし、異核種スピンスピン結合を有するりん31のNMR信号を孤立スピンスピンと区別して観測することを目的に、酸素17、りん31を同時に励起可能なNMRプローブを製作した。以下、プローブ機構、標準試料による性能評価について述べる。

2.方法

(1) プローブ機構

図1に示す照射、検出コイルを有する低分解能プローブを製作した。内側の検出コイルは ^{31}P - ^1H 2重共鳴回路と、外側の照射コイルは ^{17}O - ^2H 2重共鳴回路と接続した。各チャンネルの共振周波数を表1に示す。

^{31}P - ^1H 2重共鳴回路は文献³⁾をもとに製作した。 ^{17}O - ^2H 2重共鳴回路は、お互いの周波数が接近し

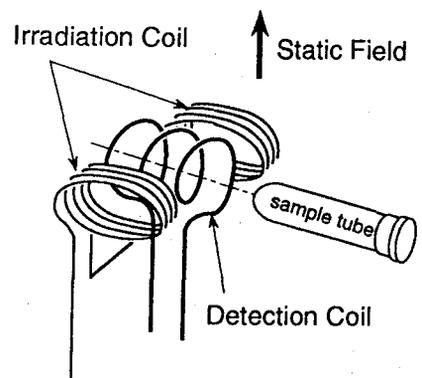


Fig. 1 Coil Assembly of the Probe

りん31、酸素17、プローブ、1次元HMQC

たむら みつる、 はらだ よしのり

ているため、新規にトラップを開発して組み込んだ(図2)。 ^{17}O チャンネル共振周波数において、このトラップの照射コイル側は高電圧、 ^2H 共振回路側は接地状態となる。

Table 1 Resonance Frequencies at 11.7T

Channel	Frequency [MHz]
31P	202.30
1H	500.13
17O	67.80
2H	78.77

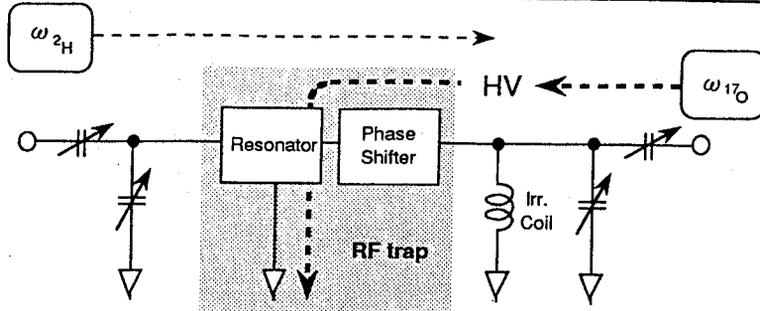


Fig.2 Internal RF trap of the 2H-17O Double Resonance Probe Circuit

(2) 1次元HMQCスペクトル観測

HMQCパルス系列の1次元バージョンを観測に用いた(図3)。受信機位相サイクリングにより孤立スピン、結合スピンを選択観測した。

^{17}O - ^{31}P HMQC の観測には 79.1 wt%, 25.7 atom% $\text{H}_3\text{P}^{17}\text{O}_4$ (Isotec, Inc.) を用いた。

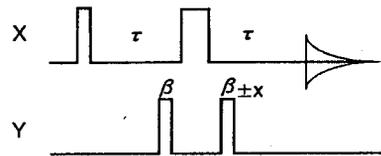


Fig. 3 1D-HMQC Pulse Sequence

3.結果

^{17}O フリップ角を変化して得られた1次元 ^{17}O - ^{31}P HMQCスペクトルを図4に示す。

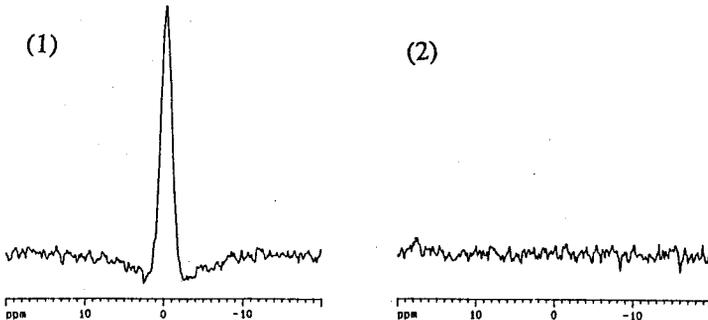


Fig. 4 ^{17}O - ^{31}P HMQC Spectra of $\text{H}_3\text{P}^{17}\text{O}_4$

(1) $\beta = 20^\circ$, (2) $\beta = 0.2^\circ$, 256 scans, 30Hz broadening

References

- 1) A.Bax, R.H.Griffey, B.L.Hawkins, *J.Magn.Reson.*, **55**, 301 (1983)
- 2) P.L.Yeagle, " ^{31}P NMR and the Phospholipid Headgroups of Membranes" in C.T.burt eds., "*Phosphorus NMR in Biology*", 95-133, CRC Press (1987)
- 3) V.J.Bartuska, G.E.Maciel, *J.Magn.Reson.*, **42**, 312-321 (1981)

Development of CPMAS probe and system for the observation of low- γ nuclei

○Hisashi Sugisawa, Katsuya Hioka and Teruaki Fujito JEOL Ltd.

CPMAS probe and observation system for low- γ nuclei was developed using typical CPMAS spectrometers. For low- γ nuclei, high RF field (B_1) is necessary to match the Hartman-Hahn condition. Long RF pulse is also desired for efficient CP because of weak dipole-dipole interaction between X-H. So the probe was designed for high RF power and long pulse duration. Duplexer was also designed suitable for low frequency observation with LC circuit. Using these systems, CPMAS spectra of ^{109}Ag is obtained with good S/N ratio at 12.6MHz.

1. はじめに

多核CPMAS法は、単に有機化合物の構造解析のみならず、無機材料のキャラクタリゼーションを含め、その応用範囲を広めてきた。利用可能な核も、 ^{31}P 、 ^{13}C 、 ^{29}Si のような ^{13}C に近い共鳴周波数を持つ核から、 ^{15}N のような共鳴周波数の低い核へと拡張されてきた。しかしながら、 ^{15}N 以下のいわゆる低周波核の観測はいまだ一般化するに至っていない。その理由としては、(1) 応用面からはCPMAS観測に適切な興味ある系および核が少なかったことによるが、(2) 技術的な面からは、プローブ等の装置に厳しい電氣的条件を必要としたからである。しかし、近年 ^{109}Ag の錯塩等の研究が発展し低周波核測定の実用性が増してきている¹⁾。ここでは、低周波核の測定条件を考察し、我々の行なった装置的工夫と ^{109}Ag 核での測定の実例について述べる。

2. 低周波核観測の条件

2-1. 測定条件の考察

1) CP条件

I-Sスピン間でのHartmann-Hahn条件は次式で与えられる。

$$\gamma_I B_{1I} = \gamma_S B_{1S} \dots \dots \dots (1)$$

ここでは、Iは ^1H 核、Sは観測核である。

この式から分かるように、低周波核でCP条件を満たすには大きなRF磁場 (B_{1S}) が必要である。

2) 交差緩和時間 (T_{IS})

スピントロッキング下でのI-S核間のCP効率、いいかえると交差緩和時間 T_{IS} は次式で与えられる²⁾。

$$\left(\frac{1}{T_S}\right)_{SL} = \frac{1}{2} \sin^2 \theta_S \sin^2 \theta_I M_2^{IS} J_{SL}(\Delta\omega_e) \dots \dots (2)$$

$$\theta_S = \tan^{-1}\left(\frac{\omega_{IS}}{\Delta\omega_{0S}}\right), \quad \theta_I = \tan^{-1}\left(\frac{\omega_{1I}}{\Delta\omega_{0I}}\right)$$

$$\Delta\omega_e = \omega_{es} - \omega_{ei} : \text{Mismatch factor}$$

$$M_2^{IS} : \text{Second moment of coupling Hamiltonian}$$

キーワード：低周波核NMR、 ^{109}Ag -CPMAS、交差緩和時間

○すぎさわひさし、ひおかかつや、ふじとてるあき

ここで、 θ_I 、 θ_S は B_1 が増すに従って増加し、 $\pi/2$ に近づく。また、 $J_{SL}(\Delta\omega_e)$ はCP条件からずれると急速に減少する。 M_2^{IS} はI-S間の双極子相互作用によるSスペクトルの2次のモーメントで、静止状態では次式で与えられる。

$$\langle \Delta\omega^2 \rangle_{IS} = \frac{1}{3} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar S(S+1) \frac{1}{N} \sum_{j,k} \frac{(1-3\cos^2\theta_{j,k})^2}{r_{j,k}^6} \dots \dots (3)$$

(2) 式と (3) 式より、交差緩和時間 T_{IS} は γ_S^2 に反比例し、I-S間の距離の6乗に比例する。したがってCP効率を維持するには、低周波核ほどコンタクト時間 (Contact Time) を長くしなければならないと考えられる。ただし、 1H の $T_{1\rho}$ は T_{IS} よりも十分長いと仮定する。

2-2 装置上満たすべき条件

共鳴周波数が低くなるほど γ_S が小さくなるので、(1) 式より、低周波核を観測する場合は、強いRF磁場 B_{1S} を必要とすることが分かる。さらに(2) (3) 式より、同様な条件下にある核に関しては、最大のCP効率を得ようとする、コンタクト時間は γ^2 に比例して長くしなければならないことが分かる。例えば、 ^{13}C と ^{15}N を比較すると、他の条件が同じならば、 ^{15}N 観測では、 ^{13}C の約6倍のコンタクト時間をとるべきである。さらに、 ^{109}Ag に関しては実に29倍にもなる。また、 ^{109}Ag の錯体では、 ^{109}Ag と 1H が直接結合していないので、Ag-H間の距離も長くなり T_{IS} がさらに長くなる。よって、低周波核を測定する場合には、高出力のパワーアンプが必要となり、プローブ及びデュプレクサは大出力で長いRFパルスに耐えるものでなくてはならない。(Fig.1) もう一つの問題はデュプレクサにある。通常のデュプレクサ方式を用いると、 $\lambda/4$ ケーブルの長さが長大になる。例えば、270MHzの装置で ^{109}Ag (12.6MHz) を観測する場合、4mになる。

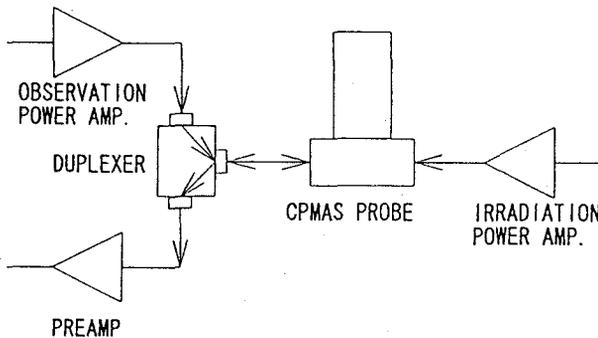


Fig.1
Block Diagram for
CPMAS measurement.

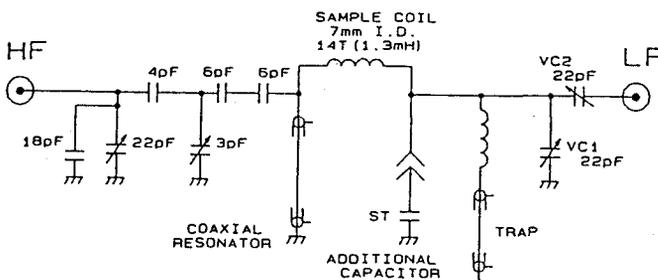


Fig.2
Circuit of low- γ probe.

3. 装置の概要

今回の実験では、Fig.1のうち、プローブ及びデュプレクサを新規設計した。また観測用高出力アンプは米国AMT社製のM3200 (6-220MHz/1kW) を使用した。使用した装置はJEOL-EX270にCPMAS用アタッチメントを付属させたものである。

3-1. プローブ回路の改良

Fig.2に低周波用プローブ回路を示す。ここで、高電力に耐える必要のある部品は、チューニング用可変コンデンサ (VC1)、マッチング用可変コンデンサ (VC2) 及び、外付けコンデンサ (ST) である。ナローボア用プローブに装填するために、いずれの部品も小型で高耐圧にする必要があった。STには村田製作所 (株) 製の高耐圧チップコンデンサGR540シリーズを使用した。また可変コンデンサはボルトロニクス社製の石英を用いたタイプのものを使用した。購入したままの可変コンデンサでは耐圧が不足していたので、パーフルオロオイルと四フッ化エチレン低分子量化合物を混合させたテフロングリースをコンデンサ内部に充填した。これによって、400W、100msのRFパルスに耐えることが可能となった。なお、周波数可変範囲は30MHz~10MHzで、観測対象核は ^{15}N (27.4MHz), ^{67}Zn (16.9MHz) ^{109}Ag (12.6MHz)、 ^{183}W (11.2MHz) であるが、STを変えれば他の核も観測可能である。

3-2. デュプレクサの改良

$\lambda/4$ ケーブルは ^{109}Ag (12.6MHz) では、4mにもなるため、これを小型化する必要があった。そこで、コイル (L)、コンデンサ (C)、ダイオード (D) の組み合わせでデュプレクサとして動作するプリント基板回路を新規に設計した。新規に作成した低周波核用デュプレクサはEX分光計のデュプレクサプラグインボックスに収納でき、使用可能な帯域は $f_0 \pm 15\%$ となった。

4. ^{109}Ag のCPMAS測定

以上のような装置改良を行ったのち、 ^{109}Ag のCPMAS測定を行った。

4-1. 測定手順

1) マジックアングルの設定

マジックアングルの調整用の試料としては、低周波で共鳴しシャープなスピニングサイドバンドが多数見られる試料が望ましい。そのような試料としてKClを選んだ。実際には、KClとシリコンゴムを混合した試料を使用した。KClの ^{35}Cl (26.5MHz) を用いてマジックアングルの調整を行い、シリコンゴムの ^1H で分解能調整及び ^1H チャンネルのパルス幅の設定を行なった。

2) パルス幅の調整

^{109}Ag の場合、パルス幅を測定するための手頃な試料が手に入らないため、KClの ^{39}K を用いてパルス幅を調整する。 ^{39}K は ^{109}Ag と共鳴周波数が40kHz程度しか変わらず、しかもS/Nが良くシングルパルスモードで1パルスで信号が現れる。 ^1H チャンネルのパルス幅は、マジックアングルの設定の際に使用したシリコンゴムで調整する。

3) 化学シフト基準の設定

^{109}Ag の化学シフト基準はAgBrを用いて設定する。この試料のピーク位置を2次基準¹⁾ (380ppm from 1mol AgClO₃/H₂O) とする。測定法はシングルパルスを使い、1パルスで信号が得られる。ただし、この試料はT₁が長いので、磁場中に試料を挿入後、10分以上待ってから測定を行なう。

4) 標準試料(CH₃COO)AgによるCP条件の調整

上記の1) 及び2) で設定した ^1H 及び ^{109}Ag のパワーアンプ出力値付近で、酢酸銀を使用してCP条件を調べた。このとき、コンタクト時間を50ms程度に設定すれば50回積算で十分なS/Nが得られた。

4-2. ^{109}Ag のCPMAS測定の特徴

1) 測定結果

Fig.3に酢酸銀を使用して400回積算したデータを示す。 $\pi/2=8\mu\text{sec}$ 、くりかえし時間が10sec、コンタクト時間90msecで十分なS/Nの信号が得られた。このときに使用したパワーは ^{109}Ag が380W、 ^1H 側が105Wであった。低周波核にもかかわらずS/Nが良いのは、CPによりS/Nが最大21.4倍($\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{Ag}}$)増大するためである。

2) コンタクト時間

コンタクト時間を変え、酢酸銀の信号強度をプロットしたものがFig.4である。90msでもまだ強度が増大しており、第2章での考察とよく一致している。このような傾向は他の銀錯体でも一般的に見られる³⁾。

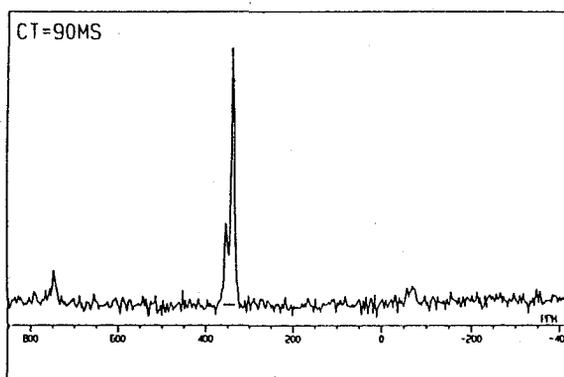


Fig.3
 ^{109}Ag CPMAS
Spectrum of
(CH_3COO)Ag.

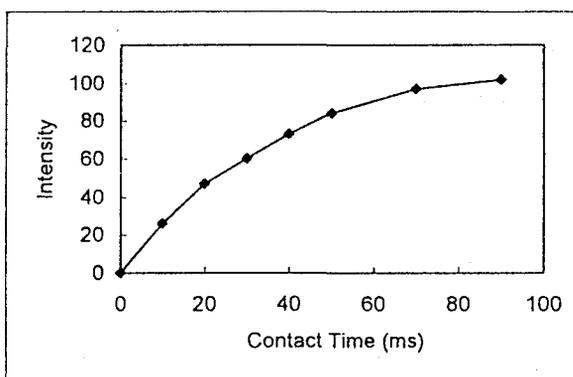


Fig.4
Contact time dependence
of ^{109}Ag -CPMAS signal
intensity.

5. おわりに

以上のように低周波核の測定では、高出力で長いパルスに耐えるプローブが必要である。またコンタクト時間は50~100msまで使用することが可能でなければならない。

なお、本研究は、都立大学北川教授との共同研究であり、試料は同教授より提供していただきました。

参考文献

- 1) 前川、本田、北川、川田、近藤； 第32回NMR討論会講演要旨集 (1992) 東京 P61
- 2) D. E. Demco, J. Tegenfeldt, and J. S. Waugh; Phys. Rev. **B 11**, 4133(1975)
- 3) L. H. Merwin and A. Sebald; J. Magn. Reson. **97**, 628(1992)

The pulse strength dependence of ^2H NMR spectrum.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University,
and Department of Chemistry, University of Tsukuba*

H. OHKI, T. OKUDA and R. IKEDA*

We solved solid echo method for ^2H analytically incorporating the finite rf pulse strength. It was revealed that the experimental spectrum cannot be reproduced by multiplying the 'sinc' function corresponded to the pulse width, since the spectrum distortion mainly comes from the excitation of double quantum coherence. This coherence can be eliminated partly by alternating the second pulse phase.

序論> 近年、 ^2H NMRを用いた分子の局所的運動の研究が盛んに行なわれている。これは重水素が四極子核で、分子運動の種類およびその速度によって、スペクトルが顕著に変化することによる。しかしrf パルス強度が核四極相互作用の大きさと同程度になるとスペクトルが顕著に歪むことが以前から経験的に知られており、このために定量的議論を困難にしている。今回我々は、パルス強度が有限であることを考慮してソリッドエコー法の解析的取扱いから、より実験に忠実なスペクトルの再現を試みた。

計算> 計算にもちいたハミルトニアンを列挙すると

$$\mathcal{H}_x = \mathcal{H}_Q + \mathcal{H}_{1x} \quad (\text{第一パルスがかかっているとき}) \quad [1]$$

$$\mathcal{H}_y = \mathcal{H}_Q \pm \mathcal{H}_{1y} \quad (\text{第二パルスがかかっているとき}) \quad [2]$$

$$\mathcal{H}_Q = \omega_Q [I_z^2 - I(I+1)/3] \quad (\text{核四極相互作用}) \quad [3a]$$

$$\omega_Q = 3e^2 Qq / \hbar [4I(2I+1)] (3\cos^2\theta + \eta^2 \sin^2\theta \cos 2\phi) \quad [3b]$$

$$\mathcal{H}_{1x} = \omega_1 I_x \quad (x \text{ パルス}) \quad [4a]$$

$$\mathcal{H}_{1y} = \omega_1 I_y \quad (y \text{ パルス}) \quad [4b]$$

$$\omega_1 = \gamma H_1 \quad [4c]$$

これらの式から二番目のパルス後 t の密度行列はパルス幅 τ_p 、パルス間隔を τ として

$$\rho(\tau_p + \tau + \tau_p + t) \propto \begin{pmatrix} a^2 - c^2 \pm i(b_Q s q^* - b_Q^* s^* q) \\ \left\{ \pm i(a+c)b^* - 2b_Q q q^* + b_Q^*(p+r)s^* \right\} \exp(+i\omega_Q t) \\ \pm i(b_Q s q^* - b_Q^* s^* q) \\ - \left\{ \pm i(a-c)b + 2b_Q^* q q^* - b_Q(p^*+r^*)s \right\} \exp(-i\omega_Q t) \\ \pm 2i(b_Q s q^* - b_Q^* s^* q) \\ - \left\{ \pm i(a+c)b - 2b_Q^* q q^* + b_Q(p^*+r^*)s \right\} \exp(-i\omega_Q t) \\ \pm i(b_Q s q^* - b_Q^* s^* q) \\ \left\{ \pm i(a-c)b^* + 2b_Q q q^* - b_Q^*(p+r)s^* \right\} \exp(+i\omega_Q t) \\ c^2 - a^2 \pm i(b_Q^* s^* q - b_Q s q^*) \end{pmatrix} \quad [5]$$

$$a = pp^* - r r^* \quad [6a]$$

$$b = (p^* - r^*)q \quad [6b]$$

$$b_Q = b \exp(+i\omega_Q \tau) \quad [6b']$$

$$c = p^* r - r^* p \quad [6c]$$

^2H NMR

おおき ひろし、おくだ つとむ、いけだ りゅういち

$$p = [\cos^2\theta \exp(i\lambda_+\tau_p) + \exp(i\omega_Q\tau_p) + \sin^2\theta \exp(i\lambda_-\tau_p)]/2 \quad [7a]$$

$$q = [\sin\theta \cos\theta \{\exp(i\lambda_+\tau_p) - \exp(i\lambda_-\tau_p)\}]/\sqrt{2} \quad [7b]$$

$$r = [\cos^2\theta \exp(i\lambda_+\tau_p) - \exp(i\omega_Q\tau_p) + \sin^2\theta \exp(i\lambda_-\tau_p)]/2 \quad [7c]$$

$$s = [\sin^2\theta \exp(i\lambda_+\tau_p) + \sin^2\theta \exp(i\lambda_-\tau_p)] \quad [7d]$$

$$\lambda_{\pm} = [-\omega_Q/3 \pm (\omega_Q^2 + 4\omega_1^2)^{1/2}]/2 \quad [8a]$$

$$\tan 2\theta = 2\omega_1/\omega_Q \quad [8b]$$

となる。ここで[2],[5]の±の符号は二番目のパルスの位相が±yであるときにそれぞれ対応する。

結果、考察>これらの式から、二量子コヒーレンスが励起されるために本質的にスペクトルは非対称であること、そしてその歪みは rf パルス強度が核四極相互作用の大きさと同じくらいになるにともなって著しくなることなどがわかる。これは Quadrature Detectionを行なうときに問題になるが、第2パルスの位相を交互に反転させて積算することで、ある程度その影響を取り除くことができる。また、エコーの生成に寄与しない項があり、スペクトルはパルス幅に対応した sinc 関数をかけただけでは再現できないこともわかる。

下図にrf 強度を変えて測定した (CD₃)₂NH₂Cl の²H NMRスペクトルおよびシミュレーションの結果を示す。rf 強度が核四極結合定数と同程度の時、スペクトルは顕著に歪むが、シミュレーションでよく再現できている。したがって、rf 強度を計算に取り入れることで、より精密に核四極相互作用定数が求まると考えられる。

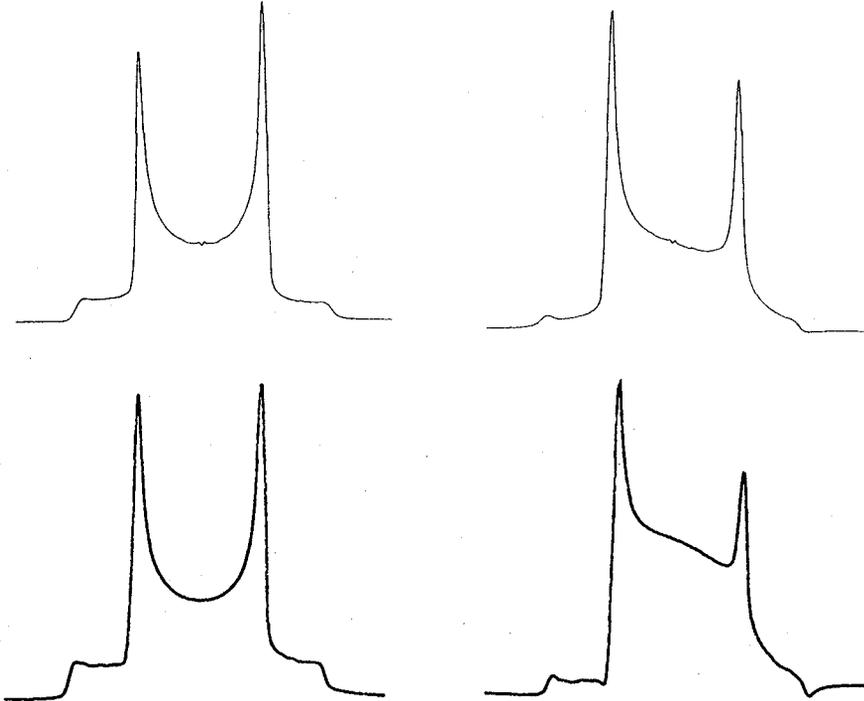


Fig. The quadrature detected ²H NMR spectra of (CD₃)₂NH₂Cl at 333K without phase alternating. At this temperature, e²Qq/h = 27 kHz, η = 0. Left : ω₁/2π = 46.3 kHz, Right : ω₁/2π = 10.0 kHz. The upper and lower rows correspond to experimental and simulated spectra, respectively.

AR(自己回帰)モデルによる2D NMRデータのスペクトル解析¹
 松浦俊雄, ○山崎 千春, 山崎 俊夫, 藤田 憲一, 今成 司, 今西 祐一*
 日本電子(株) *東大・海洋研

An Autoregressive(AR) Spectral Analysis of 2D NMR Data¹

T. Matsuura, ○C. Yamasaki, T. Yamazaki, K. Fujita, M. Imanari, Y. Imanishi*
 JEOL Ltd. *Ocean Research Institute, University of Tokyo

Abstract Many autoregressive(AR) methods, MEM², LP² and Sompi³ in Eq. (1), have been proposed for spectral analysis of 1D NMR data. The methods gave very high resolution data processing results in the data analysis. An AR model applied for 2D NMR data analysis shows high resolution spectra even it requires rather massive data processing⁴. The new method used *a priori* information, the COSY type symmetry, of 2D NMR data reduces the general 2D AR model in Eq.(2) to a 1D AR model in Eq.(3). Synthesized and observed 2D NMR data are analyzed by this method with successful results.

【序】 1D NMRデータのスペクトル解析としてARモデルに基づくMEM², 種々のLP法²および存否(そんび)法³が提案され、FFTに比べ優れた分解能を持つことが示されてきた。同様の効果が2D NMRに対するARモデルの応用に期待されLP法などでその報告が行われているが、2D NMRのデータ量の多さも加わり複雑な処理手順が要求される⁴。ここに、一次元の複素数時系列データに対応するARモデル(1)式と、二次元のハイパーコンプレックス時系列データに対応するARモデル(2)式を示す。

$$\sum_{l=0}^m a(l)x(k-l)=0 \quad (1)$$

$$\sum_{l_1=0}^{m_1} \sum_{l_2=0}^{m_2} a(l_1, l_2)x(k_1-l_1, k_2-l_2)=0 \quad (2)$$

ここで $x(k), x(k_1, k_2)$ はそれぞれ離散的な一次元複素時系列データ、二次元ハイパーコンプレックスの時系列データ、 k, k_1, k_2 はサンプリング間隔を Δt としたときの任意の時刻 $t=k\Delta t$ を示す整数、 m, m_1, m_2 はAR次数、 $a(l)$ は複素AR係数、 $a(l_1, l_2)$ はハイパーコンプレックスのAR係数を表す。

2D NMRのスペクトルは、測定法に固有なスペクトルパターンを含んでいる。我々は2D NMRデータに対するARモデルの応用に当たって、(2)式にこの先験的情報を組み合わせ、その取扱いを単純化することを考えた。本研究では、最も一般的な2D NMRデータの一つであるCOSYタイプの対称性に着目して、これを(2)式に導入し連立方程式(3)式を得た。この式は、ある k_1 または k_2 に着目すれば一次元の複素ARモデル(1)式と等価であり、容易に解くことができる。

$$\sum_{l=0}^m a(l)x(k_1-l, k_2)=0, \text{ and } \sum_{l=0}^m a(l)x(k_1, k_2-l)=0 \quad (3)$$

2D NMR, スペクトル解析, AR(自己回帰)モデル, 存否法, LP法, MEM

まつうら としお, ○やまざき ちはる, やまざき としお, ふじた けんいち, いまなり まもる, いまにし ゆういち

【実験】 COSYタイプの合成データと実測データのスペクトルを構成する波素(周波数, 減衰定数, 振幅, 位相により表される信号)の解析を行った。(3)式によりオートピークの波素の周波数, 減衰定数を求め、さらに、これらを用いて時系列データに対する最小2乗法を行い、振幅, 位相を決定した。実測データでは、部分スペクトルの時系列データを切り出し計算精度の向上を図った。クロスピークのための領域については、対応する2つのオートピーク領域で求められた周波数, 減衰定数の組み合わせを用いて最小2乗法により振幅, 位相を決定した。使用したデータの条件を以下に示す。

- 合成データ: 波素の最大, 最小振幅(パワー)比 100, 白色ノイズの分散 σ^2 100, 波素の数 6, データポイント数 $N_1=N_2=100$, $\Delta t_1=\Delta t_2=10$ ms
- 実測データ: サンプル 5%アクリロニトリル(CH₂CHCN)のCDCl₃溶液, データポイント数 $N_1=N_2=256$, $\Delta t_1=\Delta t_2=2.4694$ ms
測定法 400MHz ¹H DQF COSY(JNM A400で測定)

【結果と考察】 合成データはAR次数m(3)式のm)を既知として、mとmの前後のAR次数に対して処理を行った。この際、擬似ピークが現れるが、その振幅は最小の実ピークの振幅に比べ1/100程度で容易に判別することができた。また周波数パラメータは最大0.07%以下の誤差で求めることができた。実測データでは合成データと同様の方法で各波素のパラメータを求めた。Fig.1にCH₂CHCNのCH₂のクロスピーク領域について求めた波素のパラメータから構成した周波数スペクトル(A)と、対応するFFTスペクトル(B)を示す(便宜上全て正のピークとして表現)。両者は良く対応している。実測データの他の領域(クロスピーク領域, オートピーク領域)についても、同様の結果を得た。

【結論】 本研究では、2D NMRのスペクトル解析として2D ARモデルにCOSYタイプの対称性を取り込み、2D ARモデルを単純化し、高い精度で波素のパラメータを決定できることを示した。2D ARモデルに対しスペクトルの先験的情報を考慮に入れることは、その処理を単純化し、かつ解析結果の信頼性を高める上で有効な手段であると思われる。

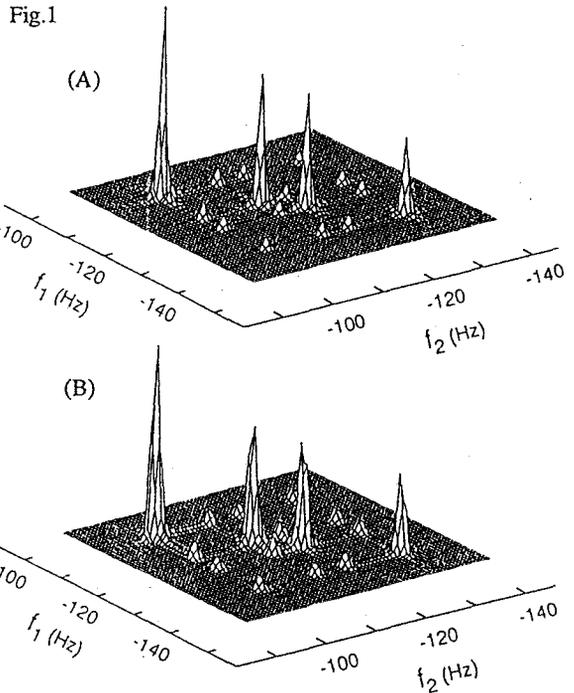


Fig. 1 (A) Reconstructed 2D spectrum of CH₂ proton of acrylonitrile by 4 x 4 peak parameters. (B) Spectrum of same portion by FFT.

References

1. Y. Imanishi, T. Matsuura, C. Yamasaki, T. Yamazaki, K. Ogura, and M. Imanari, *J. Magn. Reson.* in press.
2. D. S. Stephenson, *Prog. NMR Spectrosc.* 20, 515 (1988).
3. T. Matsuura, Y. Imanishi, M. Imanari, and M. Kumazawa, *Appl. Spectrosc.* 44, 618 (1990).
4. H. Gesmar and J. J. Led, *J. Magn. Reson.* 83, 53 (1989).

セッション：高圧NMR

(High Pressure NMR)

P 16

高圧高分解能 NMR。

シス-1,12-ジ置換 [12] パラシクロファン の内部回転に対する圧力効果

山田博昭、椋野邦子、○梅田万美、前田孝泰、田林 一晃、世良 明
神戸大 理 化

High-pressure High-resolution NMR. Pressure Effect on the Hindered Rotation in *cis*-1,12-Disubstituted [12]paracyclophanes

Hiroaki Yamada, Kuniko Mukuno, ○ Mami Umeda, Takayasu Maeda,
Kazuteru Tabayashi, Akira Sera

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University

Effect of high pressure on the rate of internal rotation of title compounds has been examined by high-pressure DNMR method. The pressure range was extended to 300 MPa (ca. 3000 atm).

The rate of internal rotation, $\ln k$, was found to increase linearly up to 300 MPa.

【序】シクロファンなどの大環状分子は、高い圧力を加えると分子骨格が変形したり、分子内運動の様子が変化すると予想されるので、高圧 NMR の測定結果から興味深い知見が得られるものと期待される。昨年我々は、表題シクロファンのジアセトキシ及びジヒドロキシ置換体について高圧 NMR を測定した結果、加圧によりベンゼン環の回転が加速されることを報告した。^{1), 2)}今回はより高圧 (3000 気圧) 下での測定をジアセトキシ置換体 (1, Fig.3 参照) について行い、その結果からベンゼン環の回転速度、及び各シグナルの化学シフトに対する圧力効果に関して若干の知見が得られたので報告する。

【実験】各置換体を 1,1,2,2-テトラクロロエタン-*d*₂ に溶かし、石英製の耐圧セル内に圧入した。昇圧は油圧ハンドポンプにより行い、圧力は石英毛细管を通してセル本体に伝達される。測定装置として JEOL JNM FX-90Q を用い、non-spinning 条件下、外部ロックにより磁場の安定化をはかった。

【結果と考察】①回転速度に対する圧力効果

今回もシグナル融合温度 T_c 付近 (105 °C) での環プロトンシグナルについて波形解析を行った。また、スピン結合定数 J_{AB} , $J_{AB'}$ はいずれも 0 であると近似し、化学シフト差 $\Delta\delta_{AB}$ は各圧力下、27 °C における $\Delta\delta_{AB}$ を元にして求め計算に使用した。¹⁾

その結果得られた計算波形と観測波形を Fig.1 に示す。300 MPa まで圧力を上げて測定を行ったが、やはり、圧力の上昇に伴いベンゼン環の回転が加速されていることがわかった。

キーワード：高圧 NMR、パラシクロファン、分子内回転、圧力効果、活性化体積、高圧石英セル

やまだ ひろあき、むくの くにこ、○うめだ まみ、まえだ たかやす、
たばやし かずてる、せら あきら

また、式 $d(\ln k) / dp = -\Delta V^\ddagger / RT$ に従い、直線の勾配から回転の活性化体積を求めると、105 °C で $\Delta V^\ddagger = -5 \sim -6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ となった (Fig.2 参照)。これは 190 MPa までの測定で得られた値¹⁾ とほぼ同じである。

Fig.1 Calculated (a) and observed (b) ¹H-NMR spectra ($\nu_0=89.55\text{MHz}$) of the aromatic protons in **1** at various pressures at +105 °C. (solv.:CDCl₂CDCl₂, conc.:6mol%)

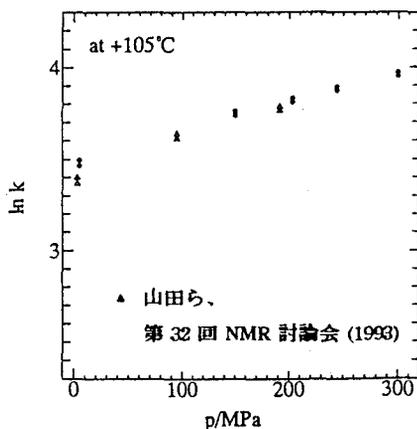
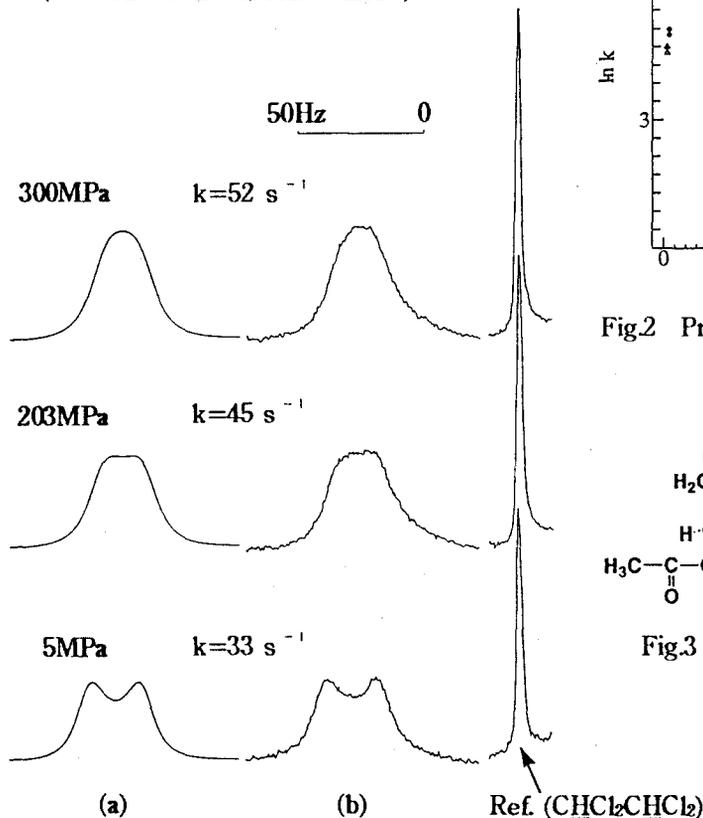


Fig.2 Pressure effect on $\ln k$ for **1**.

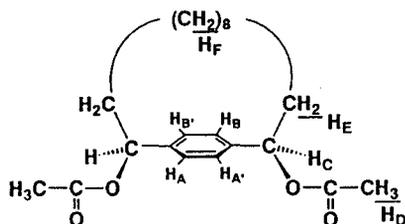


Fig.3 *cis*-1,12-Diacetoxy[12]-paracyclophane, **1**.

②化学シフト値に対する圧力効果

化合物 **1** の各シグナル (Fig.3 参照) の化学シフト値 ($\text{CHCl}_2\text{CHCl}_2$ 基準) が加圧によってどのように変化するかを調べたところ、 H_D シグナルはわずかに低磁場側へ、 $\text{H}_A, \text{H}_{A'}, \text{H}_C, \text{H}_F$ の各シグナルは高磁場側へシフトしていることがわかった。特に、炭素鎖部分のプロトン H_F シグナルの場合にそれが顕著に現れており、5 MPa から 300 MPa への加圧により 27 °C で 0.06 ~ 0.07 ppm、105 °C で 0.07 ~ 0.08 ppm もの高磁場シフトを起こしていた。加圧によるベンゼン環のコンフォメーション変化、メチレンブリッジの縮小等が化学シフトに反映されたものと思われる。

【参考文献】

- 1) 山田、棕野、梅田、前田、世良、第 32 回 NMR 討論会講演要旨集 p.81 (1993)
- 2) 山田、棕野、梅田、前田、世良、第 67 春季年会講演予稿集 II p.1121 (1994)

P 17

常磁性イオンの存在下における線幅とシフトの圧力依存性
名大理、カルガリー大理* : O高木D. 秀夫、松田賀洋子、会澤宣一、
舟橋重信、Thomas W. Swaddle*

Pressure Effects on NMR Parameters in the Presence of Inert Paramagnetic Metal Ions

Nagoya Univ. and Univ. of Calgary: Hideo D. Takagi, Kayoko Matsuda, Sen-ichi Aizawa, Shigenobu Funahashi, and Thomas W. Swaddle

(Abstract) Effects of pressure on the chemical shifts and line widths of ^1H and ^{14}N nuclei were studied with and without the presence of inert paramagnetic metal ions in solution. Tris(acetylacetonato)chromium(III) was used for the observation of ^1H on the coordinated acetylacetone, while Ni(II) was used for ^{14}N on the bulk ethylenediamine at a temperature where no chemical exchange takes place. Extra broadening was observed at elevated pressures in the presence of the inert paramagnetic metal ions in solution. It is shown that the pressure-induced extra broadening with the existence of inert paramagnetic species is evaluated as a function of volume of activation for the viscous flow [Eq. 1]. It is concluded that a proper correction of natural line widths by using Eq. 1 is necessary for the accurate evaluation of activation volumes of solvent exchange reactions when quadrupolar nucleus is used as a probe.

Introduction

NMR Measurements at elevated pressures have been utilised for the elucidation of mechanisms of ligand and electron exchange reactions.¹⁾ As most of the studies are carried out by means of the line broadening method, the reliability of the estimated rate constants highly depends on the accuracy of the evaluated natural linewidths. In the previous publication,²⁾ we reported that the line widths of the proton signals of a ligand coordinated to the paramagnetic metal ions varies with pressure.

In this study, pressure dependence of natural line widths of ^1H and ^{14}N in the presence of paramagnetic inert metal ions is reported. Extra broadening caused by the paramagnetic ions at elevated pressures were quantified by using solvent properties.

Pressure, Linewidth

たかぎひでお、まつだかよこ、あいざわせんいち、ふなはししげのぶ、とーます すわどる

Experimental

Tris(acetylacetonato)chromium(III) (acetylacetonone = 2,4-pentanedione) and tris(ethylenediamine)nickel(II) trifluoromethanesulfonate were synthesized by the literature methods.³⁾ Acetonitrile- d_3 was obtained from Merck Sharpe Dome (MSD) and distilled twice from phosphorous pentoxide in a vacuum line before use. Other perdeuterated solvents, also from MSD, were used without further purification. Ethylenediamine (Wako Pure Chemical Co. Ltd.) was purified by vacuum distillation after treated with sodium.

NMR measurements were carried out by using specially designed high pressure probeheads with Bruker WH-90 and Jeol GX-270 NMR spectrometers for the ^1H and ^{14}N observations, respectively. The temperature of the sample solutions was controlled by passing either thermostated water or air through the jackets of each probehead. Perfluorohexane was used as a pressurizing fluid for the observation of proton, while Daifloil #1 (Daikin Kogyo Co.) for ^{14}N measurements.

Results

The pressure dependence of chemical shift(δ) and line width($\Delta\nu_{1/2}$) of methyl protons on coordinated acetylacetonone in tris(acetylacetonato)-chromium(III) ion was observed at 90.02MHz in various perdeuterated solvents. Chemical shift (δ) of the methyl proton signal relative to that of the internal benzene signal as a reference was not affected by the applied pressure up to 200 MPa. Benzene was chosen as a reference material as no or very limited interaction with tris(acetylacetonato)chromium(III) ion was proven in the previous studies.²⁾

Line width ($\Delta\nu_{1/2}$) of the proton signal, however, was obviously dependent on pressure. The plots of $\ln(\pi\Delta\nu_{1/2})$ vs. pressure for the methyl proton signals on the coordinated acetylacetonone were linear as shown in Fig. 1. As tris(acetylacetonato)chromium(III) is substitution-inert, the line width change caused by the applied pressure is attributed to the variation in transverse

relaxation time of protons through the change in relaxation correlation time of molecular tumbling. As the relaxation of nuclei on the coordinated ligand occurs essentially through the scalar interaction, the correlation time for this process should be directly related to the electron spin relaxation time of central paramagnetic metal ion.

Pressure dependence of ^{14}N signal on the bulk ethylenediamine was also studied with and without the presence of Ni(II) at elevated pressures. It was reported, based on the Swift-Connick plot, that outersphere relaxation characterized by the relaxation time T_{OS} is the dominant process for Ni(II)-ethylenediamine solvent exchange system under the conditions used in this experiment.³⁾ The plots of logarithmic values of half widths ($\pi\Delta\nu_{1/2}$) against pressure with and without the presence of Ni(II) are shown in Figure 2. Both plots are obviously linear with different slopes, which suggests the extra relaxation process in the presence of Ni(II).

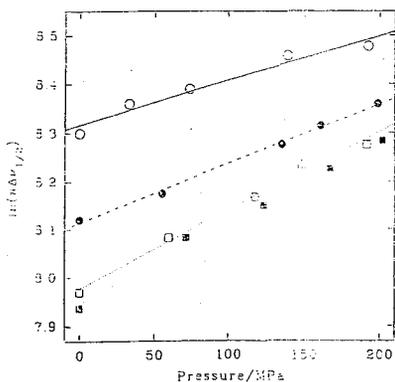


Figure 1. Pressure dependence of the line width of methyl protons. From the top to the bottom; in chloroform- d_3 , in methanol- d_4 , in acetonitrile- d_3 , and in acetone- d_6 .

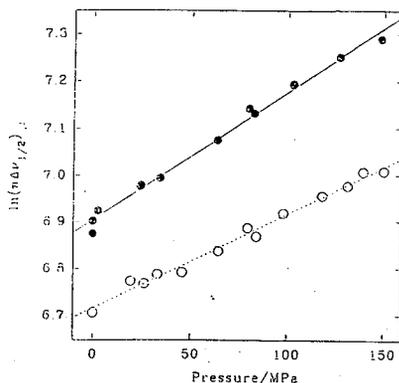


Figure 2. Pressure dependence of the ^{14}N linewidth of pure ethylenediamine(bottom) and ethylenediamine containing 0.1154 mol/kg $\text{Ni}(\text{en})_3^{2+}$ (top).

Discussion

Pressure independence of the chemical shift was proven from the theory related to the Fermi contact and Pseudo-contact shifts.

Unlike chemical shift, ^1H linewidth did exhibit a degree of pressure dependence. From the discussion of both the outersphere interaction and the intramolecular scalar interaction between ^1H and unpaired electrons, it was concluded that the pressure dependence of line width is expressed by the correlation time related to the solvent viscosity, and the line width is given by the following equation:

$$T_2^{-1}(P) = T_2^{-1}(P = 1 \text{ atm}) \times \exp\{\theta(\Delta V_v^* / RT + \kappa')(P-1)\} \quad [1]$$

where θ is the scaling factor between 0 and 1, and κ' and ΔV_v^* are the compressibility and the volume of activation of viscous flow of solvent, respectively.

For quadrupolar nuclei, Merbach et al. suggested that the scalar interaction is also the dominant relaxation process for the nuclei on the coordinated ligand. However, for the outersphere interactions it is well known that quadrupolar relaxation is usually the dominant pathway to relax for the nuclei with spins more than 1/2. Quadrupolar relaxation time, T_{2q}^{-1} , is directly proportional to the rotational correlation time, which again is related to the solvent viscosity in the motional narrowing limit. Therefore the pressure dependence of the line widths of quadrupolar nuclei is also related to the volume of activation of viscous flow of the solvent [Eq. 1]. The scaling factor θ may be explained by the stick and slip model of the solvent viscosity.

In conclusion, without proper correction of natural line widths at elevated pressures, the estimation of activation volumes by the line broadening method may be erroneous, especially when quadrupolar nuclei such as ^{14}N are used for the measurements.

References

- 1) R. Van Eldik, T. Asano and W. J. LeNoble, *Chem. Rev.*, 89, 549 (1989).
- 2) H. Doine(Takagi) and T. W. Swaddle, *Inorg. Chem.*, 27, 665 (1988).
- 3) S. Soyama, M. Ishii, S. Funahashi and M. Tanaka, *Inorg. Chem.*, 31, 536 (1992).

高圧NMRによる蛋白質の変性状態 — リボヌクレアーゼA

○山口徹, 山田博昭, 赤坂一之

神戸大学大学院自然科学研究科物質科学専攻

神戸大学理学部化学科

High Pressure NMR Study of Denatured States of Proteins — Ribonuclease A

○T.Yamaguchi, H.Yamada and K.Akasaka

Division of Material Science, Graduate Studies of Natural Science,

and Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University

In this work, temperature dependence of the equilibrium between the native and denatured conformers of ribonuclease A (RNaseA) was studied. Specially designed high pressure cell and unaltered 400MHz NMR spectrometer (JEOL GX-400) realized the experiment on protein solution under different pressures between 1 and 2000atm. His ϵ proton resonances with distinct chemical shifts for the native(N) and denatured(D) conformers were utilized to determine N-D equilibrium constants(K). And the thermodynamic parameters were obtained in the temperature range of 7.5 to 40°C. Among these, ΔC_p , the heat capacity change upon heat denaturation, decreased with increasing pressure. ΔC_p is the parameter which reflects the exposure of the hydrophobic interior of the protein to the external water. Pressure effects on the protein stability are discussed in relation to the hydrophobic interaction.

序論

蛋白質の構造安定性に関する研究において、溶媒である水の効果を考えることが重要である。溶液中では、蛋白質は溶媒との微妙なバランスによってその安定な立体構造を保持している。圧力は当然、溶媒を通じて蛋白質分子に伝わる。圧力は溶媒の構造自体に対してはもちろん、このバランスに対する摂動を与えることができる。この意味で蛋白質と溶媒の関係を研究する際には温度と並んで重要な熱力学変数である。これまで圧力は蛋白質の安定性を調べる手段としては温度に比べるとあまり利用されてこなかった。今回我々は高圧NMRの手法を用い1-2000 atmの圧力範囲で熱力学関数の圧力依存性についての研究を行った。対象としては熱力学的性質が二状態的であることが知られているribonuclease A(RNase A)を選び、圧力が変性に及ぼす影響を調べた。

Keywords : high pressure NMR, protein stability, hydrophobic interaction

やまぐちとおる, やまだひろあき, あかさかかずゆき

実験

試料はribonuclease A (Sigma, type XII-A)を二回凍結乾燥したものをを用い、試料溶液は90mg protein/ml, 0.15MKCl, pH 1.0に調製したものをを用いた。この試料をFig. 1.に示すような高压セル¹に封入し、無改造のNMRプローブを用いて JEOL GX-400 NMR分光計を用いて測定を行った。得られたスペクトルから、4つのHis εプロトンの信号強度を用いて天然(N)及び変性状態(D)間の平衡定数(K)を求めた。この平衡定数からGibbsの自由エネルギー ΔG を、 $\Delta G = kT \ln K$ の関係より求めた。さらに、一定圧力における ΔG を、次に示す Privalov らの用いた理論式(1)に対して最小二乗フィットを行い、変性の熱容量変化 ΔC_p などの熱力学関数の値を求めた。

$$\Delta G(T)_p = (1 - T/T_d) \Delta H(T_d) - (T_d - T) \Delta C_p + T \Delta C_p \ln T/T_d \quad (1)$$

ここで T_d は熱変性温度、 $\Delta H(T_d)$ は T_d における熱変性のエンタルピー変化、 ΔC_p は熱容量変化である^{2,3}。

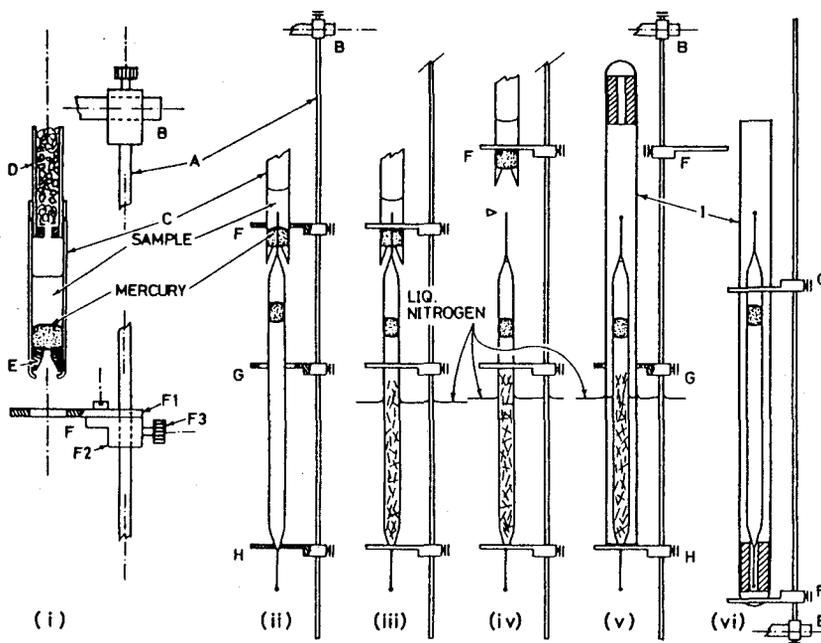


Fig. 1. Procedure of generating high pressure in the rotatable glass cells, CS1-3 and CS1P-3. A: Stainless steel rod, 2.5 mm Φ and 250–300 mm length, the top of which has a pivot B and an adjusting screw, so that the assembly can be rotated and fixed upside down position. C: Pyrex sample reservoir tube, o.d./i.d. = 7.0 \pm 0.1 mm/4.3 mm \pm 0.1 mm, length \approx 60 mm, fitted with a PTFE silica gel tube D. E: PTFE plug, o.d. = 4.1 \pm 0.1 mm, having a tapered hole ended with a 0.8 mm Φ and 1 mm length hole. The tube C has a slight constriction at the bottom mount to hold the plug E. F: Sample reservoir holder which consists of a PTFE sheet (\sim 2 mm thickness) F1, fixed on a holder (stainless steel or brass) F2, having a vertical 2.6 mm Φ hole and an adjusting screw F3. The F1 has a perforation that should just fit the tube C. G: Similar to the F except that the F1 has a 8 mm Φ perforation. H: Similar to the F except that the F1 has a 2mm Φ perforation. I: Pyrex sample container with a plastic tube at the bottom.

結果

加圧条件下で得られたスペクトルをFig. 2.に示す。各ピークの積分強度から求めた平衡定数から計算した一定圧力の下での ΔG の、温度に対する変化はFig. 3.のようになった。実線は理論曲線である。これによると、圧力を大きくすると曲線全体が下向きに動く、即ち、変性が進むことがわかる。さらに、各々の圧力で得られた熱力学関数の値はTable 1.のようになった。この表で見られるように、 ΔC_p が圧力の増加に対して減少する傾向を見せた。これは本研究で初めて明かになったことである。この ΔC_p はPrivalovらによると、蛋白質が変性する際の分子内部の疎水性残基が溶媒に露出することに由来するものである^{2,3}。この ΔC_p や、変性の体積変化 ΔV などを考察することにより、蛋白質の変性に対する圧力の影響を、疎水相互作用の観点を中心に議論する。

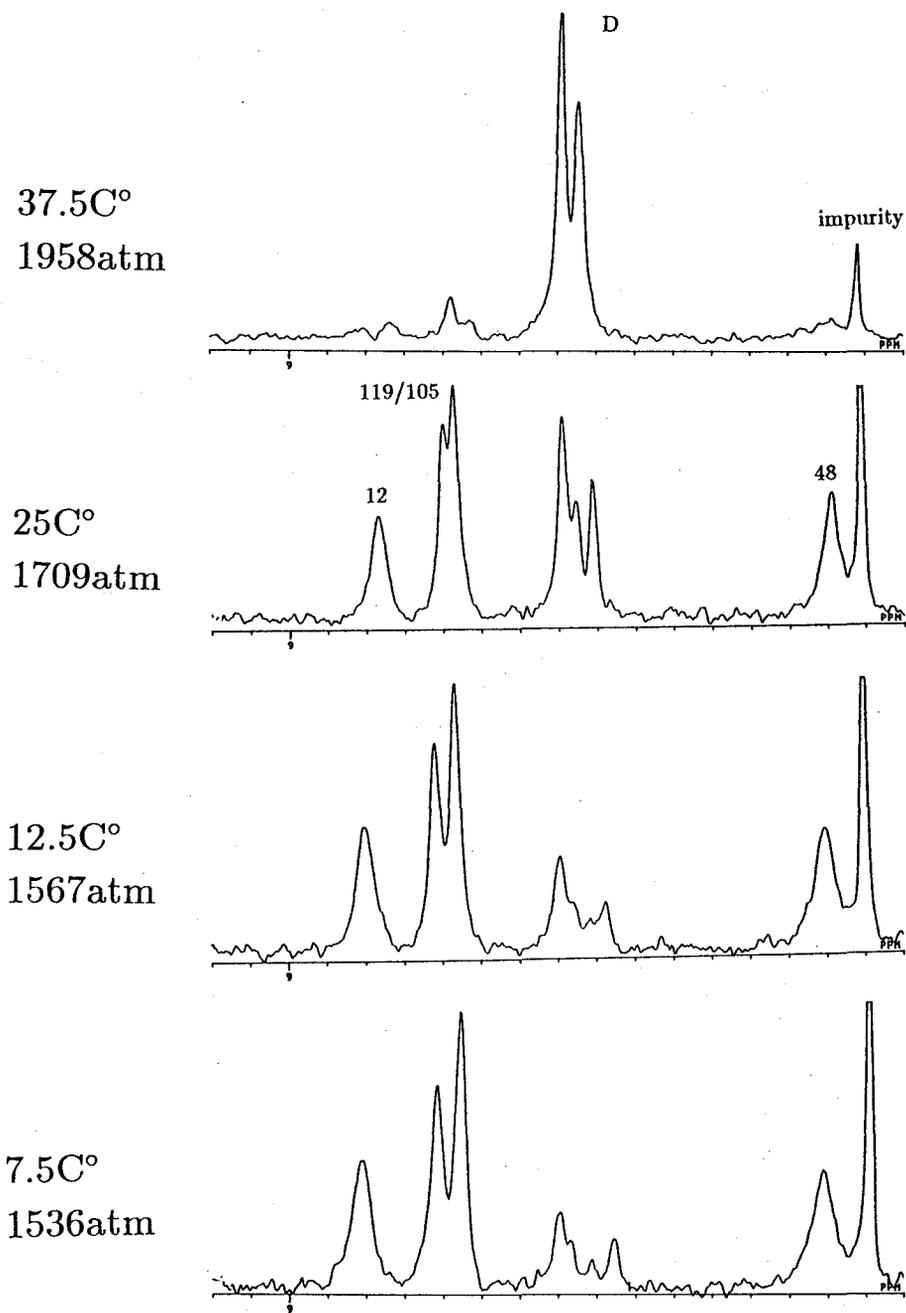


Fig. 2. His ϵ region of high pressure NMR spectrum of ribonuclease A.

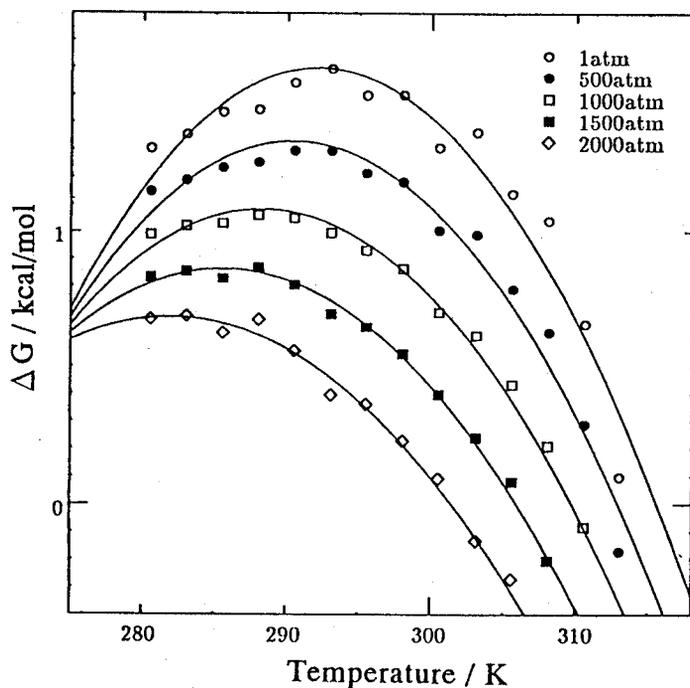


Fig. 3. Temperature dependence of Gibbs free energy, ΔG , under constant pressure.

pressure atm	T_d K	$\Delta H(T_d)$ kcal/mol	$\Delta S(T_d)$ cal/mol-K	ΔC_p kcal/mol-K	T_{max} K
1	315.60	42.36	134.24	1.74	292.10
500	312.91	36.49	116.63	1.56	290.39
1000	309.72	30.85	99.60	1.39	288.25
1500	305.91	25.57	83.60	1.21	285.51
2000	301.40	20.92	69.39	1.04	281.90

Table 1. Thermodynamic parameters of RNase A upon heat denaturation.

T_d :melting temperature, $\Delta H(T_d)$:enthalpy change, $\Delta S(T_d)$:entropy change, ΔC_p :heat capacity change, T_{max} :temperature where ΔG reaches at its maximum, respectively.

文献

1. H.Yamada et al. Rev.Sci. Instrum. 62 700-704 (1991)
2. Privalov,P.L. Adv. Protein. Chem. 33 167-241 (1979)
3. Privalov,P.L. and Gill,S.J. Adv. Protein. Chem. 39 191-234 (1989)

セッション：スピン緩和
(Spin Relaxation)

L 4

O-ROESY法による分子内部運動の解析

(岐阜大・医・2生理、Dept. of Chem., UCSC)

○桑田一夫、Thomas Schleich

Analysis of Internal Molecular Dynamics using Off-resonance Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (O-ROESY)

Kazuo Kuwata and Thomas Schleich*

Dept. of Physiology, Sch. of Med., Gifu Univ.,

*Dept. of Chemistry and Biochemistry, UCSC

Summary

For the assessment of the internal motions of macromolecules, we developed a new pulse sequence designated as O-ROESY, where the phase coherence of the pulses and the amplitude compensation for the initial magnetization were implemented. Since the contribution of the scalar coupling could be neglected at far off-resonance, pure dipole-dipole interaction could be observed in the O-ROESY spectra. Chemical exchange contribution can be also separated from the dipole-dipole interaction at certain tilt angle ($\theta = 54.7^\circ$). By a non-linear curve fitting of the cross-peak intensities or the off-diagonal elements of the relaxation matrix as a function of off-resonance frequency, internal correlation times and order parameters were obtainable.

Introduction

In a weak spin-lock field, such as 1.0 Gauss, typically used for the ROESY experiment, spin-lock axis is not along the transverse plane in the entire spectrum and the relaxation process includes somewhat NOESY contribution. Without the location of the initial magnetization along the spin-lock axis (1), spins are partially locked depending on the difference between the chemical shift of the spin and the transmitter frequency. Thus relaxation rates in this kind of experiment (homo- and heteronuclear system including ω_e effects) are explicitly calculated using the semi-classical relaxation theory (2) in the doubly rotating frame.

Incorporation of the off-resonance effects enables the evaluation of the internal motions of macromolecules in various ways. By a nonlinear curve fitting of either the off-diagonal elements of the relaxation matrix, or the cross-peak intensities (3), as a function of off-resonance spin-lock frequency (ν_{off}), both the internal correlation time (τ_i) and order parameter (S) (model free type (4)) of the specific internuclear vector can be obtained. This method does not require the isotope-

Key words: ROESY; O-ROESY; internal motion; order parameter.

くわた かずお

桑田一夫、Thomas Schleich

label procedure (5) and is potentially applicable to the long distance ROE. We designated this type of experiment as **Off-resonance Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (O-ROESY)**.

Theory

Polarization operators were transformed from laboratory frame to doubly rotating frame as follows:

$$I_z = \cos\beta I'_z + \frac{\sin\beta}{2} \exp(-i\omega_c t) I'_+ + \frac{\sin\beta}{2} \exp(i\omega_c t) I'_- \quad [1a]$$

$$I_+ = -\sin\beta \exp(-i\omega t) I'_z + \frac{\cos\beta + 1}{2} \exp(-i(\omega + \omega_c)t) I'_+ + \frac{\cos\beta - 1}{2} \exp(-i(\omega - \omega_c)t) I'_- \quad [1b]$$

$$I_- = -\sin\beta \exp(i\omega t) I'_z + \frac{\cos\beta - 1}{2} \exp(i(\omega - \omega_c)t) I'_+ + \frac{\cos\beta + 1}{2} \exp(i(\omega + \omega_c)t) I'_- \quad [1c]$$

and the Hamiltonians for the dipole-dipole interactions and for the J-couplings were reconstructed.

Relaxation matrix were calculated by a master equations as follows:

$$\frac{d\text{Tr}\{\sigma(t)M\}}{dt} = -\sum_{\alpha, \beta} \text{Tr}\left\{ \left[A_\alpha, \left[A_\beta^\dagger, M \right] \right] (\sigma(t) - \sigma^{eq}) \right\} \bullet \quad [2]$$

$$\frac{1}{t} \int_0^t d\tau \int_0^\tau dt' G_{\alpha\beta}(\tau) \exp\{i(\omega_\alpha t' - \omega_\beta(t' - \tau))\}$$

, where σ is the density matrix averaged over all identical molecules of the sample, and M is the relevant observable. G is the cross-correlation function defined as :

$$G_{\alpha\beta}(|t-t'|) = \overline{F_\alpha(t) F_\beta^\dagger(t')} \quad [3]$$

If $\alpha = \beta$ we can define the spectral density function as :

$$J_{\alpha\alpha}(\omega) = \int_0^\infty G_{\alpha\alpha}(t) \exp(i\omega t) dt \quad [4]$$

Interference terms obtained by the double commutator part of eq. [2] were fully incorporated in the relaxation matrix.

Experimental Methods and Materials

The basic features of the off-resonance ROESY experiment are shown in Fig. 1. The off-resonance spin-lock is applied in the form of a shifted laminar pulse (6) during the mixing time to maintain phase coherence with the initial $(\pi/2)_x$ pulse. For the on-resonance ROESY experiment,

the effective field B_e increasingly approaches the z-axis and at very far off-resonance B_e is aligned along the z-axis. Therefore, an on-resonance spin-lock O-ROESY experiment is identical to ROESY experiment, whereas at very far off-resonance, pure NOESY character is established. To equalize the initial magnetization in the doubly rotating frame with various tilt angle, we used the phase compensated ROESY pulse sequence (1) or adiabatic pulse. Utilized samples were lysozyme, DNA with mismatched pairs and cytochrome C (native, molten-globule and unfolded states).

Results and Discussion

Cross-peak intensities of the long distance ROEs of the lysozyme C_α proton pairs Arg-45/Thr-51(O) and Val-2/Asn-39 (●) were obtained as a function of off-resonance spin-lock frequency ($B_2 = 1.2$ Gauss), as shown in Fig.2. Cross-peak character was observed to smoothly change from ROESY-like to NOESY-like with increasing off-resonance spin-lock frequency, changing in sign from negative to positive at ca. 7 kHz off-resonance. Optimized values, (τ_i , S, $\tau_{o,eff}$) for Arg-45/Thr-51 and Val-2/Asn-39 are (1.0 ns, 0.86, 6.4 ns) and (1.2 ns, 0.82, 6.3 ns), respectively.

Crossover frequencies of the cross-peaks from negative- (ROESY-character) to positive-sign (NOESY-character) are characteristic to their internal motions, although detailed analyses are still in progress. In DNA, cross-peaks related to the mismatched region change its sign at larger off-resonance frequency than those relevant to the matched region. Most of cross-over frequencies of the native state of cytochrome C are around 8.5 kHz ($B_2=1.2$ Gauss). Whereas those of the molten globule state are between 8.0 and 7.5 kHz, indicating that molecular volume is increased and the side chain motions are slightly heterogenous in the molten globule state.

Using the full relaxation matrix analysis (7), we can construct the relaxation matrix from the observed cross peak intensities iteratively. Since only 2 spins are essentially involved in an off-diagonal element of the relaxation matrix, internal correlation time (τ_i) and order parameter (S_i) of specific internuclear vector could be obtained by a non-linear curve fitting of the cross-relaxation rates as a function of ν_{off} . Overall correlation time can be obtained by 1D-NMR experiment such as ^{13}C off-resonance rotating frame experiment (8). For the investigation of the uniqueness of the obtained values, non-linear curve fitting for the theoretically generated data was performed. τ_i or S could be obtained without a reference peak. However, if we had a reference internuclear vector with known τ_i and S and internuclear distance, we could get both parameters quite uniquely.

- (1) C. Griesinger and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **75**, 261 (1987).
- (2) A. G. Redfield, *IBM J. Res. Dev.* **1**, 19 (1957)
- (3) K. Kuwata and T. Schleich, *J. Magn. Reson.*, in press
- (4) G. Lipari and A. Szabo, *J. Amer. Chem. Soc.* **104**, 4546 (1982)
- (5) J. W. Peng, V. Thanabel and G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **94**, 82 (1991)
- (6) S. L. Patt, *J. Magn. Reson.* **96**, 94 (1992)
- (7) B. A. Borgias and T. L. James *J. Magn. Reson.* **87**, 475-487 (1990)
- (8) T. Schleich, C. F. Morgan, and G. H. Caines, in "Methods in Enzymology" (N. J. Oppenheimer and T. L. James Eds.), Vol. 176, pp 386-418, Academic Press, San Diego, 1989.

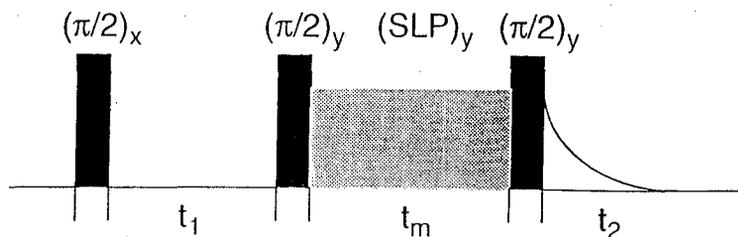


Fig. 1 Basic O-ROESY pulse sequence. The off-resonance spin-lock is applied in the form of a shifted laminar pulse (6) during the mixing time to maintain phase coherence with the initial $(\pi/2)_x$ pulse.

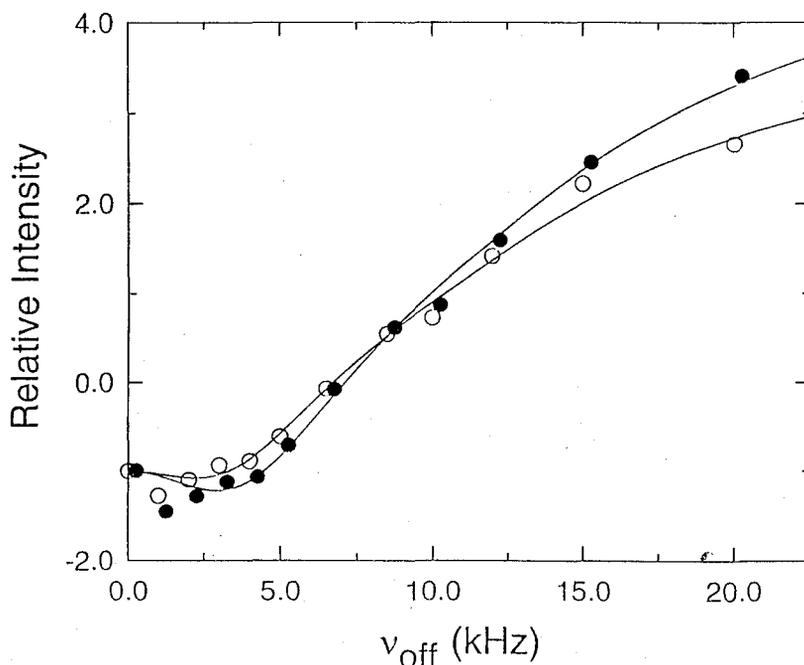


Fig. 2 Cross-peak intensities of the long distance ROEs of the lysozyme C_α proton pairs Arg-45/Thr-51(○) and Val-2/Asn-39 (●) obtained as a function of off-resonance spin-lock frequency ($B_2 = 1.2$ Gauss).

L5

タンパク質におけるN-15核緩和の疑似スペクトル密度関数解析
○伊島理枝子、永山国昭（新技団、東大教養）

Quasi spectral density function analysis for N-15 nuclei in proteins
Rieko Ishima & Kuniaki Nagayama*

(Nagayama Protein Array Project, ERATO, JRDC and *the University of Tokyo)

We performed quasi spectral density function (QSDF) analysis for amide N-15 nuclei in proteins. This provides $J(0)$, $J(\omega_N)$, and $J(\omega_H + \omega_N)$ from three relaxation times of longitudinal relaxation (T_1), transverse relaxation (T_2), and cross relaxation (RN). To evaluate motions slower than nano-second, we defined difference between $J(0)$ and $J(\omega_N)$ as $J(0; \omega_N)$. The N-15 relaxation times of proteins in literatures were evaluated by this analysis.

INTRODUCTION

The analysis of N-15 relaxation times by either the model free analysis (1,2), mapping of spectral densities (3), or T_1/T_2 evaluation (4) has been used for the evaluation of the backbone dynamics of proteins. The model free analysis is widely used because internal motions can be evaluated by a single parameter but is not yet concluded to be the best model for understanding internal motions of proteins. One of a virtue of the mapping of the spectral density function itself is the determination of the spectral density at zero frequency, $J(0)$, where nano-second or slower motions such as the molecular tumbling could be mainly reflected. However, it is difficult to get exact values because proton relaxations are needed in the analysis. The T_1/T_2 ratio itself is a qualitative index of nano-second motions, but is applicable only to large proteins.

A new method is needed to determine the $J(0)$ value clearly for the evaluation of nano-second or slower motions in proteins. Here, we introduce a quasi spectral density function (QSDF) analysis for N-15 relaxation experiments. The $J(0)$, $J(\omega_N)$, and $J(\omega_H + \omega_N)$ can be determined from one set of three relaxation times, T_1 , T_2 , and RN, which are also used in the model free analysis.

key words: NMR, N-15, relaxation, spectral density

いしま りえこ、ながやま くにあき

THEORETICAL

I. DERIVATION OF THE QSDF

The relaxation times of N-15 attached to one proton have been given for relaxations arising from both heteronuclear dipolar-dipolar interactions and chemical shift anisotropy (5,6). In our QSDF analysis, the following key equation is proposed.

$$J(\omega_{H^+}\omega_N) \approx J(\omega_H) \approx J(\omega_{H^-}\omega_N) \quad [1]$$

The relaxation times T_1 , T_2 , and RN are simplified using Eq. [1] as follows.

$$T_1^{-1} = 1/4 D_{NH} [3J(\omega_N) + 7J(\omega_{H^+}\omega_N)] + 1/3 C_{SA} [J(\omega_N)] \quad [2]$$

$$T_2^{-1} = 1/8 D_{NH} [4J(0) + 3J(\omega_N) + 13J(\omega_{H^+}\omega_N)] + 1/18 C_{SA} [4J(0) + 3J(\omega_N)] \quad [3]$$

$$RN = 1/4 D_{NH} [5J(\omega_{H^+}\omega_N)] \quad [4]$$

Here D_{NH} and C_{SA} are constants. The ω_H and ω_N are the proton and nitrogen resonance frequencies, respectively. Using Eqs. [2]-[4], the spectral densities of $J(0)$, $J(\omega_N)$, and $J(\omega_{H^+}\omega_N)$ can be determined.

Eqs. [2]-[4] are specifically appropriate for the N-15 relaxation. First of all, the difference between the three densities $J(\omega_{H^+}\omega_N)$, $J(\omega_H)$, and $J(\omega_{H^-}\omega_N)$ are negligible compared with $J(0)$ and $J(\omega_N)$ because the parameter ω_N is ten times smaller than ω_H . Equation [4], which is characterized by the $J(\omega_{H^+}\omega_N)$, is derived from Eq. [5].

$$RN = 1/4 D_{NH} [6J(\omega_{H^+}\omega_N) - J(\omega_{H^-}\omega_N)] \quad [5]$$

One may suspect that Eq. [4] has a large error since Eq. [5] consists of $J(\omega_{H^+}\omega_N)$ and $J(\omega_{H^-}\omega_N)$. We can discuss the error of Eq. [4] for two conditions, as follows.

(i) When the amplitude of the spectral density function monotonously decreases according to the increase in the frequency around $\omega_H \pm \omega_N$, Eq. [4] is always true. Because $\omega_{H^-}\omega_N$ is larger than $\omega_{H^+}\omega_N$, the value of $J(\omega_{H^+}\omega_N)$ is larger than that of $J(\omega_{H^-}\omega_N)$. Therefore, the $J(\omega_{H^-}\omega_N)$ dominates Eq. [5]. Note that ω_N has a negative value due to the opposite sign of its gyromagnetic ratio to that of protons.

(ii) If a resonant motion is present around the frequency $\omega_{H^-}\omega_N$, then $J(\omega_{H^-}\omega_N)$ becomes dominant. It is because the values of $J(\omega_{H^-}\omega_N)$ behave like those of $J(0)$ for a single rotational diffusion model and act as relaxation sinks compatible with $J(0)$. However, the case (ii) can be tested by a significant change in the RN and the resulting NOE values when observed with 500 MHz and 600 MHz NMRs.

II. DERIVATION OF $J(0; \omega_N)$ and $J(\omega_N; \omega_H + \omega_N)$

It is necessary to clarify what kind motion is represented in the $J(\omega_i)$ quantitatively. For this purpose, we defined new indices of spectral densities. First, we consider general expression of the $J(\omega_i)$ function for an interaction vector perturbed with various motional process. The final auto-correlation function is described by a sum of enormous number of exponential decays, which finally lead the spectral density to the well known form (7,8).

$$J(\omega_i) = 2/5 \sum_i^{\xi} \frac{a_i \tau_i}{1 + \tau_i^2 \omega_i^2} \quad [6]$$

Individual relaxation components are characterized by amplitudes a_i and effective correlation times the τ_i including the contribution from the overall rotation.

$$\sum_i^{\xi} a_i = 1 \quad [7]$$

$$\tau_1 > \tau_2 > \tau_3 > \tau_4 > \dots > \tau_{\xi} \quad [8]$$

When the overall rotation and internal motions are mutually independent, τ_i is expressed as $\tau_i^{-1} = (\tau_i'^{-1} + \tau_R^{-1})$. Each motional processes are safely decomposed into exponential decays (9). The τ_i is the correlation time of the i -th exponential and the τ_R is that of the overall rotation of the molecule. Note here that the i -th term in Eq. [6] does not necessarily correspond to individual i -th motional process(1,9). Using Eq. [6], the spectral densities of $J(0)$, $J(\omega_N)$ and $J(\omega_H + \omega_N)$ are described as,

$$J(0) = 2/5 [a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2 + \dots + a_{\xi} \tau_{\xi}] \quad [9]$$

$$J(\omega_N) = 2/5 \left[\frac{a_1 \tau_1}{1 + \tau_1^2 \omega_N^2} + \frac{a_2 \tau_2}{1 + \tau_2^2 \omega_N^2} + \dots + \frac{a_{N+p} \tau_{N+p}}{1 + \tau_{N+p}^2 \omega_N^2} + a_{N+p+1} \tau_{N+p+1} + a_{N+p+2} \tau_{N+p+2} \dots + a_{\xi} \tau_{\xi} \right] \quad [10]$$

$$J(\omega_H + \omega_N) = 2/5 \left[\frac{a_1 \tau_1}{1 + \tau_1^2 \omega_{H+N}^2} + \frac{a_2 \tau_2}{1 + \tau_2^2 \omega_{H+N}^2} + \dots + \frac{a_N \tau_N}{1 + \tau_N^2 \omega_{H+N}^2} + \frac{a_{H+N+q} \tau_{H+N+q}}{1 + \tau_{H+N+q}^2 \omega_{H+N}^2} \right. \\ \left. + a_{H+N+q+1} \tau_{H+N+q+1} + a_{H+N+q+2} \tau_{H+N+q+2} \dots + a_{\xi} \tau_{\xi} \right] \quad [11]$$

Here, approximation of $\tau_i^2 \omega_j^2 \ll 1$ was used. The values of τ_N and τ_{H+N} are ω_N^{-1} and ω_{H+N}^{-1} , respectively. The τ_{N+p} and τ_{H+N+q} are the arbitrary cut-off correlation times in the regions $\tau_i^2 \omega_N^2 \ll 1$ and $\tau_i^2 \omega_{H+N}^2 \ll 1$. Inspection of Eqs. [9] and [10] suggests us a new index; $J(0; \omega_N)$ as a difference value between the $J(0)$ and the $J(\omega_N)$.

$$\begin{aligned}
J(0; \omega_N) &= J(0) - J(\omega_N) \\
&= 2/5 \left[(a_1 \tau_1 - \frac{a_1 \tau_1}{1 + \tau_1^2 \omega_N^2}) + (a_2 \tau_2 - \frac{a_2 \tau_2}{1 + \tau_2^2 \omega_N^2}) + \dots + (a_{N+p} \tau_{N+p} - \frac{a_{N+p} \tau_{N+p}}{1 + \tau_{N+p}^2 \omega_N^2}) \right]
\end{aligned}
\tag{12}$$

Equation [12] describes that the $J(0; \omega_N)$ represents all of the relaxation components with correlation times slower than those which are not included in the $J(\omega_N)$. The terms with shorter τ_i than ω_N^{-1} are neglected in Eq. [12]. Only relaxation components with correlation times longer than τ_{N+p} contribute to the $J(0; \omega_N)$. Therefore, the $J(0; \omega_N)$ represents relaxation components with correlation times slower than nano-second. Increase or decrease of the values of the $J(0; \omega_N)$ depends on the re-distribution of the a_i values. Increase of the value of the $J(0; \omega_N)$ occurs in two cases : small increase of the value of a_i at large τ_i or large increase of the value of a_i at small τ_i . We define both of the two as effective increase of the motion slower than ω_N^{-1} .

Similarly, the difference between the $J(\omega_H + \omega_N)$ and the $J(\omega_N)$ is defined as $J(\omega_N; \omega_{H+N})$.

$$\begin{aligned}
J(\omega_N; \omega_{H+N}) &= J(\omega_N) - J(\omega_H + \omega_N) \\
&= 2/5 \sum_i^{H+N+q} \left[\left(\frac{a_i \tau_i}{1 + \tau_i^2 \omega_N^2} - \frac{a_i \tau_i}{1 + \tau_i^2 \omega_{H+N}^2} \right) \right]
\end{aligned}
\tag{13}$$

Correlation times longer than the ω_{H+N+p}^{-1} contribute to the $J(\omega_N; \omega_{H+N})$. Individual terms in Eq. [13] are expected to be negligibly smaller than $a_i \tau_i$ when the τ_i values satisfy $\omega_{H+N}^2 \tau_i^2 > \omega_N^2 \tau_i^2 \gg 1$. Individual terms in Eq. [13] are expected to be nearly $a_i \tau_i$ when the τ_i values satisfy $\omega_{H+N}^2 \tau_i^2 \gg 1$ and $\omega_N^2 \tau_i^2 \ll 1$. However, the $J(\omega_N; \omega_H + \omega_N)$ safely indicates contributions of the terms with correlation times longer than $\omega_H + \omega_N^{-1}$.

RESULTS AND DISCUSSION

We analyzed N-15 relaxation times published in literatures and evaluated motions. We found that the evaluation of $J(0; \omega_N)$ gives much more information for motions than the model free analysis.

1. G. Lipari, and A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546 (1982)
2. G. Lipari, and A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559 (1982)
3. J.-W. Peng and G. Wagner, *Biochemistry* **31**, 8571 (1992)
4. P. J. Kraulis, et al., *Biochemistry* **33**, 3515 (1994)
5. L.E. Kay et al., *J. Magn. Reson.*, **97**, 359 (1992)
6. M. Goldman, *J. Magn. Reson.*, **60**, 437 (1984)
7. R. King and O. Jardetzky, *Chem. Phys. Lett.* **55**, 15 (1987)
8. A.A. Ribeiro, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4040 (1980)
9. T. Fujiwara and K. Nagayama, *J. Chem. Phys.* **83**, 3110 (1985)

L 6

緩和パラメータによる タンパク質のダイナミクス解析システムの構築

○岩原淳二^{1,3}, 伊藤隆², 柴田武彦², 横山茂之^{1,3}
(¹東大・理・生物化学, ²理研・バイオデザイン, ³理研・細胞情報伝達)

Development of the System for Analysis of Protein Dynamics using NMR Relaxation Parameters

○Junji Iwahara^{1,3}, Yutaka Ito², Takehiko Shibata², Shigeyuki Yokoyama^{1,3}

¹Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo, ²Biodesign Research Group and ³Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

It is important to obtain quantitative information of protein dynamics for understanding of the mechanism of protein function. Recently several kinds of method for the analysis of protein dynamics using NMR relaxation parameters have been published. We have developed the program DABRET (Dynamics Analysis of Biomolecule using RELaxation Times) which calculates various dynamics parameters using those methods and additional new protocols. The dynamic properties of Ras obtained by the analysis using this program was found to be important for explanation of activation mechanism of Ras upon GDP to GTP exchange.

我々の研究室ではRasタンパク質の機能発現のメカニズムを明らかにするために多次元NMRの手法を用いて様々な解析を行っている。その中で我々はシグナル強度の温度依存性および磁場依存性の解析から、Rasタンパク質はGDP結合型(不活性型)とGTP結合型(活性型)ではRasの機能にとって重要な領域の運動性が大きく異なり、GTP結合型ではマイクロ秒からミリ秒オーダーの非常にゆっくりとした運動性をもつということを明らかにしてきた。

近年、¹³C核や¹⁵N核などの緩和パラメータから、タンパク質の動的性質を表す数種のパラメータを定量的に求めるいくつかの手法が提唱され応用されている。これらの手法を用いることにより、ほとんど全ての残基でピコ秒からナノ秒オーダーの速い運動の解析を行うことが可能である。

我々は、Rasタンパク質の動的構造をさらに詳しく解析するために、これらの手法を適用するとともに、これらの手法を改良することにより、タンパク質の定量的なダイナミクス情報をNMR緩和パラメータから効率的に得るためのシステムの構築を目指し、プログラムDABRET (Dynamics Analysis of Biomolecule using RELaxation Times)を開発した。このプログラムは主に以下のような計算をおこなうことができる。

(1) 緩和パラメータの計算

様々な緩和パラメータ測定のための2D ¹H-X スペクトルのピーク強度ファイルから、 $X-T_1$ ($=1/R(X_z)$), $X-T_2$ ($=1/R(X_{xy})$), $R(2H_zX_z)$, $R(2H_zX_{xy})$, $R(H_z)$, $[^1H-]X$ NOE を計算する。

(2) "Model-free Analysis"¹⁾²⁾³⁾

¹⁵Nあるいは¹³Cの緩和時間 T_1 ($=1/R(X_z)$), T_2 ($=1/R(X_{xy})$) および異核NOE ($[^1H-]X$ NOE) から、相関関数が指数関数(あるいはその和)と仮定して、オーダーパラメータ、分子全体の回転相関時間、内部運動の回転相関時間を非線形最小2乗法を用いて計算する。また、 T_2 に対する化学交換の寄与 R_{ex} を計算する。

(3) "Spectral Density Mapping"⁴⁾

$R(X_z)$, $R(X_{xy})$, $R(X_z \rightarrow H_z)$, $R(2H_zX_z)$, $R(2H_zX_{xy})$, $R(H_z)$ の6つの緩和パラメータから相関関数に特定の形を仮定せずに、 $X-^1H$ ベクトルのスペクトル密度関数 $J(\omega)$ の5ポイント $J(0)$, $J(\omega_X)$, $J(\omega_H)$, $J(\omega_H - \omega_X)$, $J(\omega_H + \omega_X)$ の値を計算する。

(4) Modified "Model-free Analysis"

model free analysisにおいては R_{ex} が低周波運動を反映する唯一のパラメータである。 R_{ex} を精度良く求めることは、タンパク質の局所的な低周波運動を調べるうえで重要であるといえる。従来の"model-free analysis"では、非線形最小2乗法の目的関数の中に $R(X_{xy})$ が含まれているために R_{ex}

緩和パラメータ, タンパク質の内部運動性

いわはらじゅんじ, いとうゆたか, しばたけひこ, よこやましげゆき

とピコ秒からナノ秒オーダーのタイムスケールの高周波運動を反映するパラメータであるオーダーパラメータ、回転相関時間を厳密には独立に求めることができない。そこで、縦磁化の緩和パラメータである $R(X_x)$ 、 $R(2H_xX_x)-R(H_x)$ 、 $R(X_x-H_x)$ で構成される目的関数を最小化することで、まずオーダーパラメータおよび回転相関時間を求め、さらに、それらから計算される理論的な $R(X_{xy})$ と実験値の $R(X_{xy})$ に有意の差があれば、その差を R_{ex} とする。

我々はこのプログラムDABRETを用いて、 ^{15}N 標識されたRasタンパク質のGDP結合型およびGMPPNP結合型の主鎖 ^{15}N に関して計算をおこない、その動的性質の比較をおこなった。その結果、次の二つの興味深いことが明らかになった。

一つは残基45-51の領域に関しては、GDP結合型では平均よりもやや遅い運動性を持ち、GTP結合型ではやや速い運動性をもつということである。表1はこの領域のふたつの残基の緩和パラメータおよびダイナミクスパラメータを示している(GDP結合型およびGTP結合型の τ_c 、 R_{ex} の値からこれらの残基の主鎖で運動性が変化していることがわかる)。この領域は変異体を用いた生化学的、細胞生物学的実験によりRasの活性に重要な領域であることが明らかにされている。他方、化学交換の解析からGTP結合型ではマイクロ秒からミリ秒オーダーのゆっくりとした運動をしていることがわかった3カ所の領域のうち、GTPase活性に関与する残基60-64の領域については、GDP結合型ではピコ秒からナノ秒オーダーの非常に速い運動をしており、GDP結合型からGTP結合型への変換にともなう運動性の変化がきわだてて大きいことがわかった。図1は我々の研究室で得られたRas・GDPの溶液中での立体構造上でこのふたつの領域の位置を示したものである。

これらの結果は他の解析法では明らかにならなかったことであり、この緩和パラメータを用いたダイナミクス解析はタンパク質の動的構造の情報を得るうえで非常に有効であるといえる。

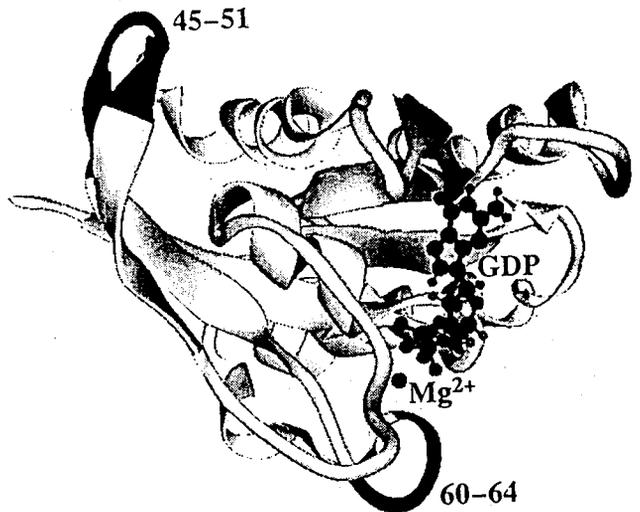
表1. D47, G48の主鎖 ^{15}N の緩和パラメータおよびダイナミクスパラメータ

(400MHz 分光計 [Bruker ARX 400] で測定)

Residue	Form	$^{15}\text{N}-T_1[\text{s}]$	$^{15}\text{N}-T_2[\text{s}]$	$\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE	S^2	$\tau_c[\text{ps}]$	$R_{ex} [\text{Hz}]$
D47	Ras・GDP	0.486	0.063	0.841	0.92	-	2.0
	Ras・GMPPNP	0.474	0.072	0.670	0.91	93.3	-
G48	Ras・GDP	0.406	0.062	0.792	0.96	-	4.2
	Ras・GMPPNP	0.431	0.071	0.739	0.97	94.0	-

図1. 本研究でRas・GDPとRas・GTPで運動性が特徴的に異なることが明らかにされた領域

	Ras・GDP	Ras・GTP
45-51:	slow	fast
60-63:	very fast	very slow



文献

- 1) Lipari, G., Szabo, A. J. *Am. Chem. Soc.* 104, 4546 (1982);
- 2) Clore, G. M., Driscoll, P. C., Wingfield, P. T., Gronenborn, A. M. *Biochemistry* 29, 7387 (1990);
- 3) Stone, M. J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., Reizer, J., Saizer, M. H., Wright, P. E., *Biochemistry* 31, 4394-4406 (1992);
- 4) Peng, J. W., Wagner, G. *J. Magn. Reson.* 98, 308 (1992)

Phase Relaxation and Spectral Hole-Burning in Well-Characterized Noise
Fields: Experimental Test of Relaxation Theories

T. Kohmoto, Y. Fukuda, and M. Kunitomo

Department of Physics, Faculty of Science, Kobe University

An experimental approach for the verification of relaxation theories is presented: (1) Phase relaxation times of proton NMR in water were measured in well-characterized noise fields, and the applicability of the conventional stochastic theory is examined. (2) Spectral hole-burning in the resonance line was observed, and motional narrowing of the hole shape is demonstrated. (3) Power broadening of the hole shape was observed, and violation of the Bloch equations in saturation regime is studied.

緩和現象について実験と理論とを直接対比させて具体的に明らかにする目的で、「統計的性質が明確に定義された制御可能な雑音場」のもとでの緩和現象の観測を行っている。パソコンで発生させた雑音を D/A 変換器を通してコイルに加え、外部磁場 (2.6 kOe) と同じ方向の磁場の揺らぎとして与えた状態で、水の中の陽子スピンの NMR 信号を観測する。時間領域における位相緩和時間の測定及び周波数領域におけるホールバーニングの観測を行い、緩和理論の検証と適用限界について考察する。

(1) 位相緩和時間とストカスティック理論の適用限界 [1]

磁場値が low と high (磁場差 h_z) の 2 つの値の間をランダムにジャンプするパルス揺動磁場 (Two State 型雑音場) を加えた実験を行った。low と high の状態にある時間は、lifetime τ_0 と τ_1 ($\tau_0 > \tau_1$) で特徴づけられる統計分布をそれぞれもつような乱数で与えた。

Fig. 1 は実験で得られた FID 信号の h_z 依存性であり ($\tau_0=180\mu\text{sec}$, $\tau_1=20\mu\text{sec}$)、揺動パルス振幅 h_z を大きくしていくと位相緩和時間 T_2 が短くなっていくが、十分大きな h_z に対しては頭打ちになっていることがわかる。Fig. 2 は横軸を $\gamma h_z \tau_1 / 2\pi$ (1 揺動パルスあたりの平均の位相のずれ)、縦軸を τ_0 / T_2 ($1/\tau_0$ で規格化した位相緩和レート) にとってプロットしたものである。 $\gamma h_z \tau_1 \ll 1$ (weak collision) のときは相関関数から導かれるストカスティック理論の結果 (破線) に一致するが、 $\gamma h_z \tau_1 \gg 1$ (strong collision) のときは大きくずれて $1/T_2$ は揺動パルスレート $1/\tau_0$ と等しくなる。Fig. 2 の実線は位相のずれを考慮し、直接信号強度を計算して得られた $1/T_2$ の結果であり、strong collision を含むすべての領域で実験結果をよく説明している。

キーワード：制御された雑音場、位相緩和時間、Motional Narrowing、パワーブロードニング

河本敏郎 (こうもととしろう)、福田行男 (ふくだゆきお)、國友正和 (くにともまさかず)

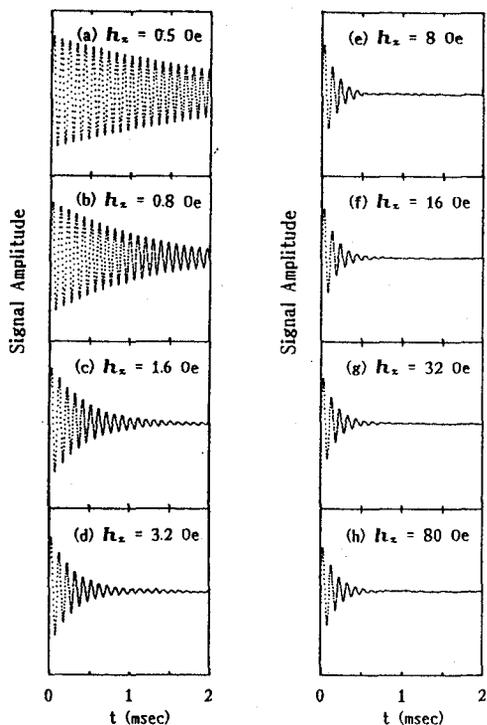


Fig. 1. Fluctuation-amplitude (h_z) dependence of the FID signal in a two-state pulse noise field, where the fluctuating field jumps randomly between the two states whose lifetimes are $\tau_0=180 \mu\text{sec}$ and $\tau_1=20 \mu\text{sec}$.

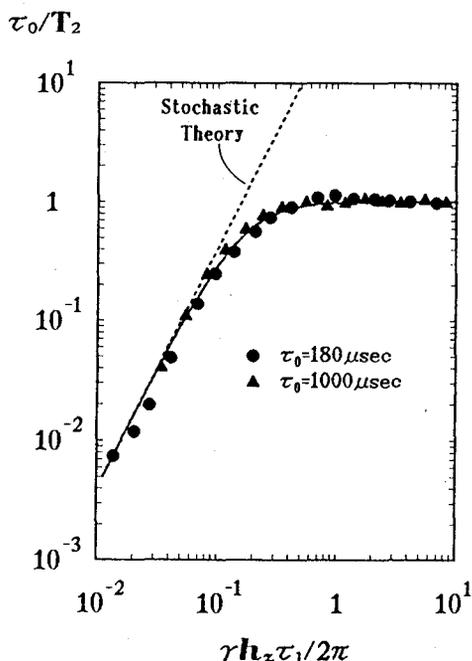


Fig. 2. Normalized plots of $1/T_2$ obtained from the FID signals in the two-state pulse noise field for $\tau_0=180 \mu\text{sec}$ and $1000 \mu\text{sec}$. The broken and solid curves represent the theoretical curves obtained from the stochastic theory and our theory, respectively.

(2) 運動による共鳴線の尖鋭化 (Motional Narrowing) [2]

不均一磁場を加えて共鳴線の幅を広げ、周波数領域におけるホールバーニングの実験を行った。低出力・長時間 (50 msec) のパルスでスペクトル線の中にホールを書き込み、高出力・短時間のパルスによる FID の形で読み出して、フーリエ変換を行うことによってホールスペクトルを得る。

Fig. 3 は Two State 型雑音場 ($\tau_0 = \tau_1 \equiv \tau$) 中において得られたホールスペクトルである。2つの状態間の周波数差 $\Delta/2\pi$ を 3.0 kHz に固定し、ジャンピングレート $W (=1/\tau)$ を変化させている。W を大きくしていくと、2つのホールがそれらの中間点で1つになり、さらに W を大きくしていくとホールの幅が狭くなっていく Motional Narrowing の振舞いがよくわかる。Fig. 3 の実線は Anderson [3] の理論曲線であり、実験結果とよく一致している。

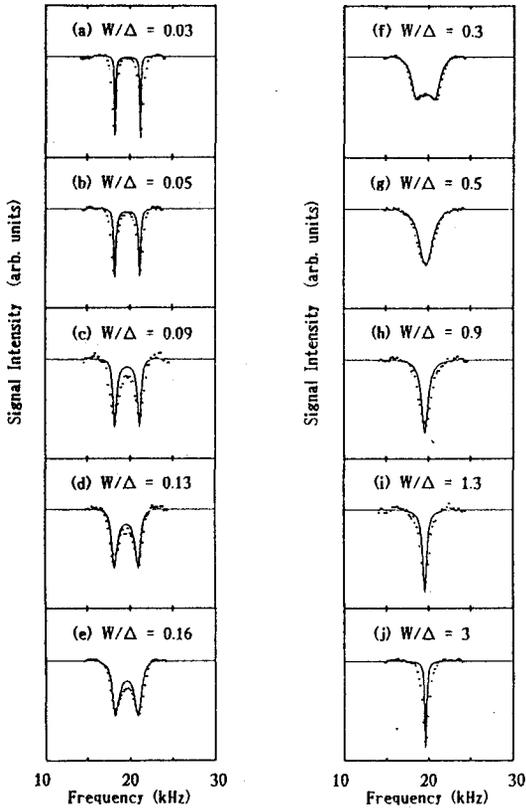


Fig. 3. Motional narrowing in the hole spectrum in a two-state noise field. The frequency difference between the two states is fixed at $\Delta/2\pi = 3.0$ kHz. The jumping rate W is changed from (a) $W = 5 \times 10^2 \text{sec}^{-1}$ to (j) $W = 5 \times 10^4 \text{sec}^{-1}$. The solid lines are theoretical lineshapes obtained from the Anderson's theory [3].

(3) パワーブロードニングと“ブロッホ方程式の破綻” [4]

相関時間 τ_c と平均振幅 h_z とで特徴づけられる統計分布をもつパルス揺動磁場 (Gauss 型雑音場) 中においてホールバーニングの実験を行い、ホールのパワーブロードニングを観測して“ブロッホ方程式の破綻”の問題 [5] を考察した。

Fig. 4 は τ_c の値が $20 \mu\text{sec}$ と $200 \mu\text{sec}$ に対するホールスペクトルのラビ周波数 χ ($=\gamma H_1$) 依存性であり、 $\tau_c=200 \mu\text{sec}$ の場合のほうが明らかにパワーブロードニングが小さい。異なる τ_c の値に対して、緩和時間 ($T_1=25 \text{msec}$, $T_2=1.0 \text{msec}$) が同じになるように h_z を調整している。Fig. 5 は 4つの τ_c の値に対するホール幅 $\delta\nu$ (HWHM) の χ 依存性であり、緩和時間 T_1, T_2 が同じでも、揺動場の統計性によってパワーブロードニングの振舞いが大きく変化し、また、 χ が大きい領域 ($\chi\tau_c > 1$) ではブロッホ方程式より導かれる理論値 (破綻) から大きくずれることを示している。図の実線は花村の理論 [6] をホールバーニングに適用して得られた理論曲線であり、実験結果をよく説明している。

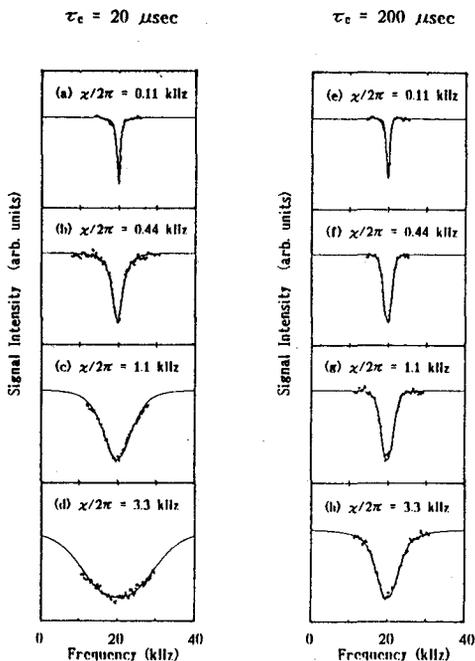


Fig. 4. Rabi-frequency ($\chi = \gamma H_1$) dependences of the hole spectrum in a Gaussian noise field for the two values of correlation time ($\tau_c = 20 \mu\text{sec}$ and $200 \mu\text{sec}$). The solid lines are theoretical lineshapes calculated from the Hanamura's theory [6].

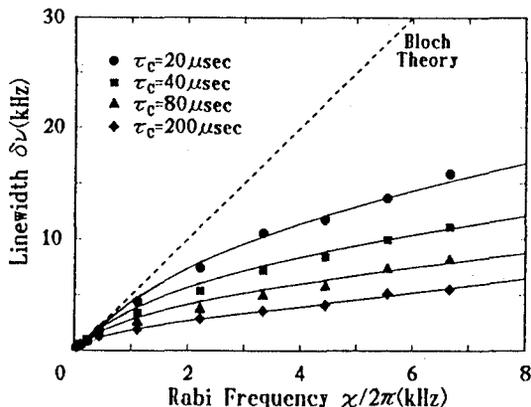


Fig. 5. Rabi-frequency ($\chi = \gamma H_1$) dependences of the linewidth (HWHM) for $\tau_c = 20 \mu\text{sec}$, $40 \mu\text{sec}$, $80 \mu\text{sec}$, and $200 \mu\text{sec}$. The values of T_1 and T_2 are 25 msec and 1.0 msec , respectively, in all cases. The solid lines are theoretical curves calculated from the Hanamura's theory [6].

- [1] T. Kohmoto, Y. Fukuda, M. Kunitomo, K. Ishikawa, M. Tanigawa, K. Ebina, and M. Kaburagi, Phys. Lett. A 181 (1993) 97.
- [2] T. Kohmoto, Y. Fukuda, M. Kunitomo, K. Ishikawa, M. Tanigawa, K. Ebina, and M. Kaburagi, Phys. Rev. B 49 (1994) 15352.
- [3] P. W. Anderson, J. Phys. Soc. Jpn. 9 (1954) 316.
- [4] T. Kohmoto, Y. Fukuda, M. Kunitomo, K. Ishikawa, K. Ebina, and M. Kaburagi, Proc. Int. Conf. on Spectral Hole-Burning and Related Spectroscopies: Science and Applications, Tokyo, August 1994, p.284.
- [5] R. G. DeVoe and R. G. Brewer, Phys. Rev. Lett. 50 (1983) 1269.
- [6] E. Hanamura, J. Phys. Soc. Jpn. 52 (1983) 2258; *ibid.* 52 (1983) 3678.

P 20 Selective Hartmann-Hahn Coherence Transfer by Two Coherent Channels and Its Application to Relaxation Time Measurements

○Daiwen Yang and Kuniaki Nagayama

Nagayama Protein Array Project, ERATO, JRDC, Tsukuba
Research Consortium, 5-9-1 Tokodai, Tsukuba, 300-26

A simple method to implement selective Hartmann-Hahn coherence transfer by using two coherent channels has been developed. This new method does not require complex pulse sequences. When this approach is combined with selective relaxation measurements, the proton relaxation times (T_1 , T_2 , and $T_{1\rho}$) of individual protons can be determined even when the signals are hidden under other resonances. An example of the use of this method for ribonuclease H is given.

In selective HOHAHA experiments [1,2], which can determine the molecular topology and relaxation times of individual protons in overlapping spectral regions, signals from protons that are not of interest can be disregarded by not passing them on in the next stage of coherence transfer. In this report, we propose a simple approach to such selective HOHAHA experiments which use the coherent channels of a JEOL JNM-A500 NMR spectrometer. A combination of selective HOHAHA and relaxation measurement, allow us to obtain in an indirect manner relaxation times (T_1 , T_2 , and $T_{1\rho}$) of nuclei that have severely overlapped resonances.

EXPERIMENTAL

Fig. 1 shows the scheme of a slightly modified multistep coherence transfer HOHAHA experiment. The schemes used for indirect relaxation measurements are shown in Fig. 2. The first part is a conventional selective pulse sequence for relaxation measurements. The second part is the pulse sequence for coherence transfer.

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 3 shows the results of coherence transfer along the chain from H^α to H^δ in isoleucine through four-step transfers. Fig. 4 shows an application of the single-step transfer experiment to ribonuclease H (18 KDa). To test the accuracy of the indirect relaxation measurement, the directly and indirectly measured relaxation times of the H^α proton in isoleucine were compared. The results show that indirect measurement using either the single or multistep coherence transfer method is reliable.

For Tyr28 in RNase H, T_1 , T_2 , and $T_{1\rho}$ were 209, 54, 61 ms for the H^δ proton, and they were 306, 74, 93 ms for the H^ϵ proton. For Tyr151, T_1 , T_2 , and $T_{1\rho}$ were 154, 38, 50 ms for the H^δ proton, and they were 231, 67, 82 ms for the H^ϵ proton. The

Key Words: Selective HOHAHA, Coherence transfer, and Relaxation time.

○やん だいうえん ながやま くにあき

relaxation times of the H δ and H ϵ protons of Tyr28 are significantly longer than those of Tyr151, suggesting that the aromatic ring of Tyr28 is more flexible than that of Tyr151. Another possibility that Tyr28 is subject to reduced dipolar interaction, however, can not be ruled out. Compared with heteronuclear relaxation measurement, the indirect selective measurement of proton relaxations provides us a simple and sensitive way to study the interesting sites in macromolecules.

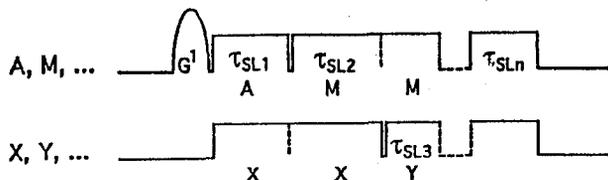


Figure 1. Pulse sequence for multistep coherence transfers. The in-phase transverse magnetization of spin A was generated by using a selective Gaussian-shaped pulse with a 270° flip angle (G^1). This was then transferred to a second proton X by applying simultaneous spin-lock fields at frequencies ω_A and ω_X for a period τ_{SL1} . After the first transfer, the transverse magnetization of spin X can be transferred to a third proton M in a simultaneous spin-lock period τ_{SL2} at frequencies ω_X and ω_M . After transfer to the third proton, the M-spin magnetization can be propagated through further couplings to the last proton in the coupling network.

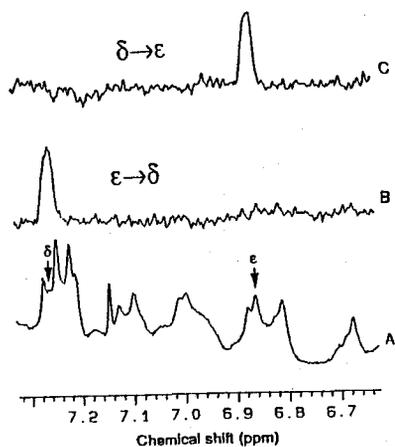


Figure 4. Coherence transfer between the H δ and H ϵ protons of Tyr28 in RNase H.

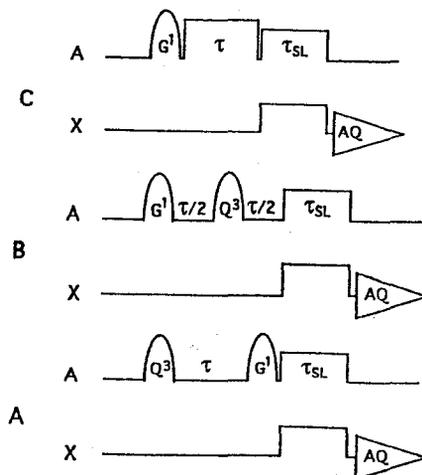


Figure 2. Pulse sequences for T_1 (A), T_2 (B), and $T_{1\rho}$ (C) measurements.

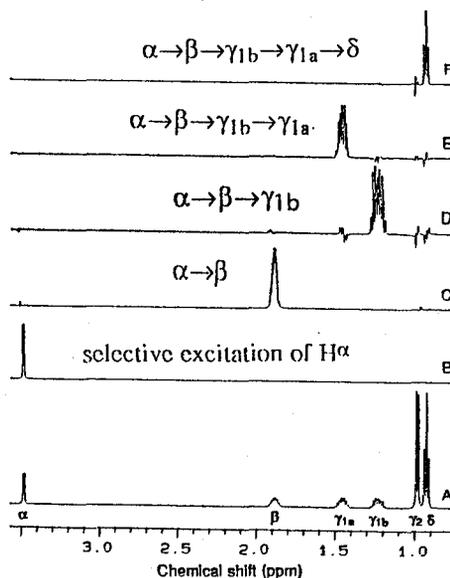


Figure 3. Four-step transfers in isoleucine. conventional 500 MHz spectrum,

REFERENCES

1. E. Kupce and R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10671 (1992).
2. V. Blechta and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **103**, 349 (1993).

P21 いくつかのセグメント運動を結合してつくった複合化分子運動の

ダイナミック-NMRによる解析

第一薬科大学 ○加藤祐子、小川 晴、野上靖純、古賀俊隆

Molecular Design of a Face-chiral Swinging Motion and the Rates Determined by D-NMR Line Shape Simulation and by Saturation Transfer

Yuko Katoh, Haru Ogawa, Yasuyoshi Nogami, and Toshitaka Koga

The Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, 815

Molecular motions are of utmost importance in biology. We have constructed a model molecule, whose conformational changes makes a closed chemical cycle consisted of at least three kinds of very mobile species (MA, FS and ST), as depicted in Fig. 6. Not only ^{13}C -NMR line shape analyses of species MA and FS, but also ^1H -NMR saturation transfer experiments conducted between species MA and ST revealed that the model system shows different motional behaviors both in flexibilities and in rates at each of the left and right hand half of the molecule, respectively. Overall motion of the cycle is a large amplitude face chiral swinging, as illustrated in Fig. 1.

面キラルな分子運動を行うモデル分子の構築 NMRは生体高分子が作りだす複雑な conformation の情報のみならず、それら conformation 間に複数の遷移や交換が起こっても、それらの速度も決定できる。光合成タンパク、バクテリオロドプシンの活性中心にあるレチニリデンシッフ塩基部分の末端の5個の sp^2 炭素は活発なセグメント運動を行うが、我々は2個のペンタジエン-3-オン基と、3個のフラン環、1個のトランス二重結合を組み込んだ24員環環状共役系 (Fig.3 MA)を構築し、分子の各セグメントで起こる運動の様式とその速さをD-NMRによる線形解析によって求めた。以下に示す3つの重要な知見が得られた。

(1) 我々のモデル分子 [24]アヌレンジオンテトラエステル ^{13}C MA

は Fig.1 の面キラル運動を起こすことが分かった。二重結合の twisting がこの運動のモチーフである (Fig.2)。Fig.1 に示した面キラル分子の運動の頻度因子は、この分子の行う交換速度に比例してくる。(2) 分子 MAは、Fig.6 に示す多交換系からなる closed chemical cycle を創りだす。FS \rightleftharpoons MA 遷移では分子の左側と右側では、異なる速度で分子交換が起こり、その交換速度は 2-site exchange program によって比較できた。(3) 多平衡系の化学サイクルでは MA, ST 間で遅い交換が起こっていることが、NMRによる飽和移動法によって明らかとなり、交換の速度は Forsén - Hoffman 法²⁾で決定した。

D-NMR に現われたモデル分子の三つの特徴 モデル分子の ^1H -及び ^{13}C -NMR スペクトルは +25°C ~ -80°C の温度範囲で共に劇的なスペクトル変化を示した。この分子の部分運動の

キーワード：面キラル分子、D-NMR、飽和移動速度

○かとう ゆうこ、おがわ はる、のがみ やすよし、こが としたか

Fig. 1 A face-chiral swinging motion could be produced by combining several segment motions as depicted in Fig. 6.

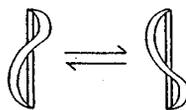
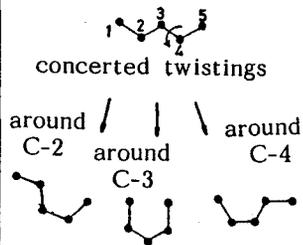
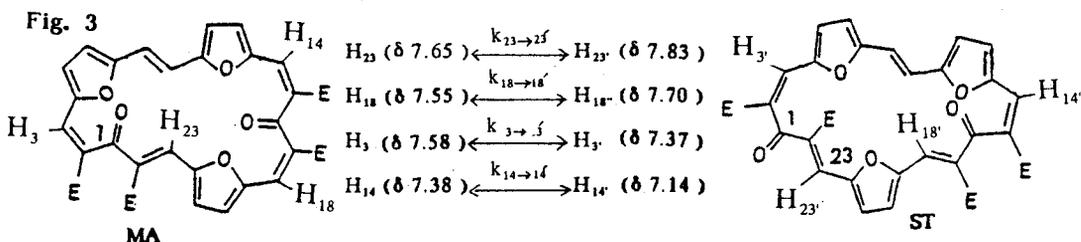


Fig. 2 Conformational changes of pentadiene-3-one segment



モードは、例えば2個のペンタジエン-3-オンセグメントではFig. 2に示す協奏的ねじれ運動、trans二重結合では内部回転、三つのフラン環ではflip-flop運動と言うように、各構成セグメントごとに異なっている。しかしモデル分子から取り出したoverallの運動は面キラル運動となった。D-NMRから次の3種の分子種が明らかとなり、それらの間の交換系と交換速度が決定できた。(1) ^1H -及び ^{13}C -NMRにおいて+25°Cで観測されたシグナルは平均シグレットであり、-80°Cで、ほぼ凍結型のスペクトルを与え、このスペクトルはMA (Fig.6)の構造を支持した。(2) -40°Cに冷却するとMA以外にFSでコード化した別の交換型の分子種が出現する。このMAとFS間の交換速度はまだ十分に速い。C-8,9位及びC-18,23位を ^{13}C -でラベルして-40°Cで ^{13}C -NMRを測定すると、分子の2個のペンタジエン-3-オンセグメントのうち分子の左側のC-23 (δ 126.70)に現われるシグナルの線幅は、分子の右側のC-18 (δ 129.87)に現われるシグナルの線幅よりもかなり広いことがわかった (Fig.4)。C-18とC-23での交換速度を2-site exchange programによって求めると、C-23 (δ 126.70)のbroad signalでは、 $k = 150 \text{ sec}^{-1}$ となり、C-18 (δ 129.87)の $k = 30 \text{ sec}^{-1}$ と較べて約5倍の速い交換を行っていることが解かった。この交換速度の不均一化はセグメント上の他のsite、例えば $\text{C}=\text{O}$ シグナルやC-3,とC-14においても同様に観測された。(3)更に興味深いことに-80°Cに冷却するとMAと非常に遅く交換するSTが出現しており、このMAとSTの交換速度は飽和移動法を利用して決定できた。



Saturation Transfer とその速度 THF- d_6 溶媒中、-80°Cで熱分割して得たMAとST両speciesのシグナルは ^1H - ^{13}C COSY及び3種の ^{13}C ラベル体の ^{13}C -NMR等を利用して、 ^1H , ^{13}C 共に帰属した。更に、差NOEのパルスシーケンスを使ってMAとSTの各サイトで対応するプロトンシグナルのpairを全て決定した (Fig. 3)。これらの分子間の交換は、 $\text{H}_{23} \rightleftharpoons \text{H}_{18}$, $\text{H}_3 \rightleftharpoons \text{H}_{14}$, の様な分子内の交換とは区別される。Fig. 3の4つのサイトの交換は、Forsén-Hoffmanの方法を利用して、分子間の飽和移動の速度を決定した。

Dobsonの式^{3,4}から、

$$A \xrightleftharpoons{k_1} B \quad I_0: \text{unperturbate の状態における } (H_i) \text{ シグナルの強度}$$

$$k_1 = (T_1^{\text{sat}})^{-1} (1 - I/I_0) / (I/I_0) \quad I: \text{perturbate された状態での } (H_i) \text{ シグナルの強度}$$

$$(T_1^{\text{sat}}): (H_i) \text{ シグナルの選択的緩和時間}$$

$k_{23 \rightarrow 23'} = 13.11 \text{ sec}^{-1}$, $k_{23' \rightarrow 23} = 22.93 \text{ sec}^{-1}$ が得られた。速度から求まる平衡定数 (K) は $K = k_{23 \rightarrow 23'} / k_{23' \rightarrow 23} = 0.572$ でこの値はMAとSTとのNMRスペクトルの存在比の(約2:1)に近似される。ここで注目すべきことは、飽和移動実験からも分子の左側では $k_{23 \rightarrow 23'} = 13.11 \text{ sec}^{-1}$, $k_{3 \rightarrow 3'} = 5.926 \text{ sec}^{-1}$ と速い速度であるが、一方、分子の右側では $k_{18 \rightarrow 18'} = 3.654 \text{ sec}^{-1}$, $k_{14 \rightarrow 14'} = 3.824 \text{ sec}^{-1}$ と遅く、交換速度の不均一化が起こることが支持された。

C-18 and C-23 ^{13}C -NMR signals of MA and ST species in THF- d_8

C-8 and C-9 ^{13}C -NMR signals of MA and ST species in THF- d_8

Simulation of the ^{13}C -NMR line shapes of C-1 and C-16 C=O signals in MA species in THF- d_8

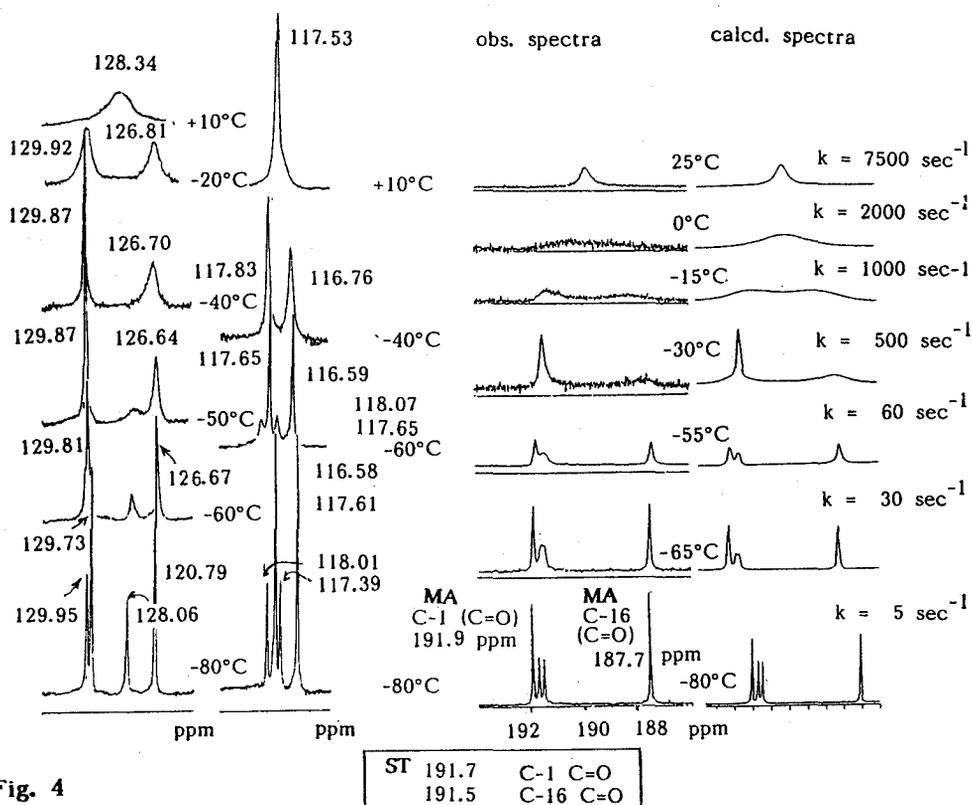


Fig. 4

Temperature dependent ^{13}C -NMR spectra of C-8, C-9 and C-18, C-23-labeled [24]annulenedione tetramethylester at 125.8 MHz in THF- d_8 .

The observed ^{13}C -NMR spectra were simulated by using 2 site exchange program, and temperature dependent rate of the exchange is evaluated in each specific region. Unequivalent line widths of the pairwise exchanging doublets of C-18 (126.70 ppm) and C-23 (129.87 ppm) were developed at -40°C , while on warming the average singlet (128.3 ppm) appeared at $+10^\circ\text{C}$ indicate that FS to MA transition takes place as a rapid cis to trans isomerization process occurred at both sides of the molecule. For the numbering of the molecule, see Fig. 6.

Computer chemistry により assist された分子の conformation NMR から得た情報から、モデル分子を Molecular Mechanics で配座を発生させたものについて、Molecular Dynamics 計算でエネルギー最小の conformation を出した。更に、PM3 で MOPAC 計算して構造を refinement した結果を Fig. 5 の 3D グラフィックスで表した。

Fig. 5

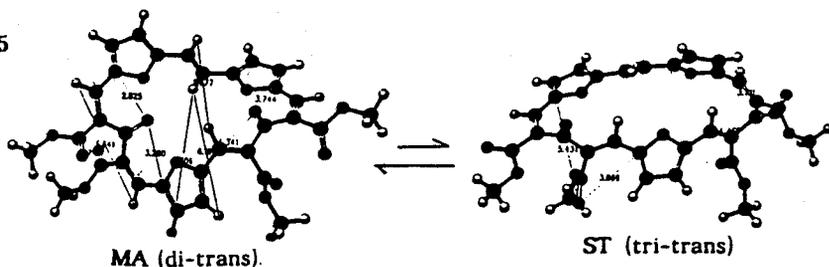
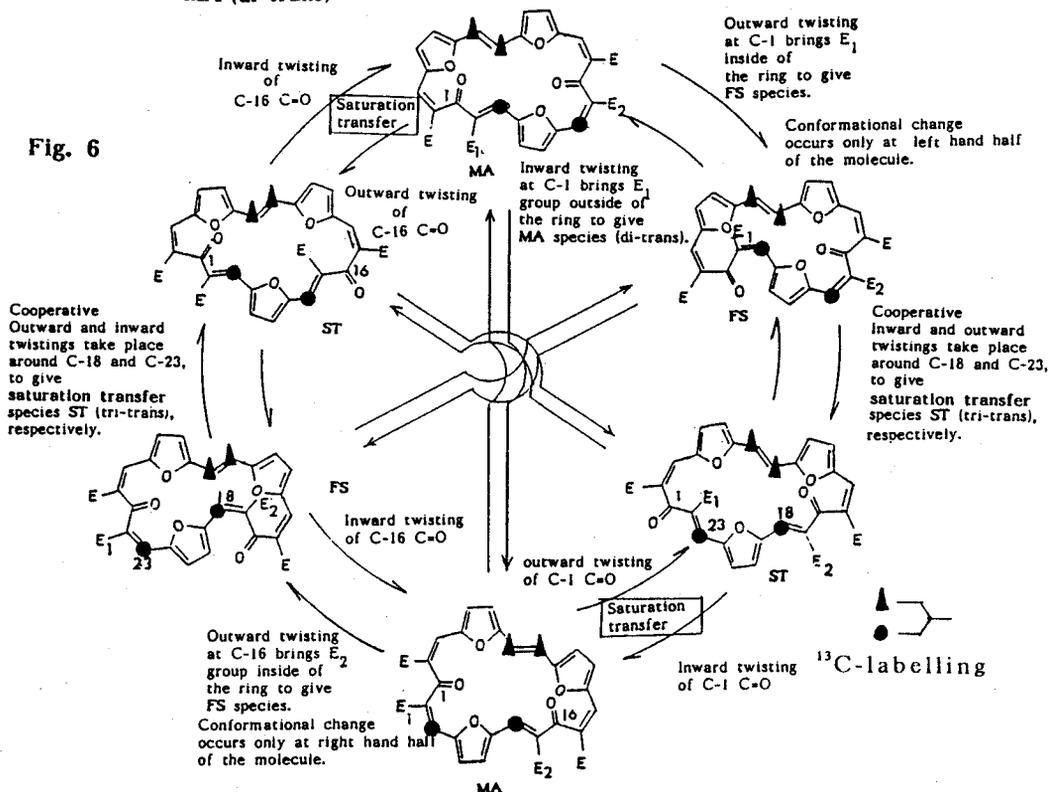


Fig. 6



Proposed exchange diagram showing dynamic NMR transitions of mono-trans [24]annulenedione-tetramethylester. The molecule takes three different transitions MA, FS, and ST as the consequence of alternative strain relief and strain addition.

結論 我々の運動モデルから取り出し得る運動様式は Fig.6 の MA 種の分子の左と右が交換する swinging motion である。この運動様式は個々のセグメント運動には本来なかった運動モードであり、本研究は運動の和から新しい運動形式を取り出しうることを有機化学的モデルから証明することに成功したと言えるだろう。

(1) 第31回NMR討論会講演要旨集 p.125 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

(2) R.Freeman, A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance. p.243 (1986).

(3) C.M.Dobson and P.A.Evans, *Biochemistry*, 23, 4267 (1984).

(4) Y.Yamamoto, R.Chûjô, Y. Inoue, T. Suzuki, *FEBS LETTER*, 71 (1992).

^{13}C -Labelling in the methionine methyl groups of glycoporphin A^M for studies of its secondary structure and dynamics

o Zhe Zhou¹, Yukihisa Okumura² and Junzo Sunamoto^{1,2*}

¹ Surface Recognition Group, Supermolecules Project, JRDC, Keihanna Plaza, Kyoto, JAPAN; ² Division of Synthetic Chemistry & Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, JAPAN

^{13}C -Labelling is a powerful technique for investigation of mobility of protein molecules. On the way of dynamic study of glycoporphin A^M in a lipid bilayer, we tried [^{13}C]-methylation of Met-8 and Met-81. Judging from the ^1H , ^{13}C and CD spectra, the A, D and E helices of the protein were partly affected, while B and C were not disturbed. ^{13}C chemical shifts of the Met-8 and -81 methyl groups were detected at the same position, 15.7 ppm; by using HMQC, the corresponding ^1H chemical shifts were assigned as 2.11 ppm. On the other hand, we tried to monitor the molecular motion of the protein in several different microenvironment such as in pure water, in aqueous micelles and in lipid bilayers, we discussed the dynamics of the membrane protein compared with that of S- [$^{13}\text{CH}_3$] methionine.

There is an immense interest in the structure-function relationship of glycoporphin A, characterization of motional phenomena in biological macromolecules is crucial for understanding of their biophysical function, by using proton-detected ^{13}C NMR, we are studying dynamics of the two methionine methyl groups, Met-8 and Met-81, of glycoporphin A^M in aqueous media as well as in aqueous micelle and lipid bilayer membrane. During the course of the investigation, we found that the labelling method, which was previously reported by Hardy and Dill as non-destructive to the structure of glycoporphin A^N, did have some problems.

Glycoporphins were isolated from homozygous MM human blood using lithium diiodosalicylate-phenol method. Glycoporphin A^M was further separated by gel filtration in the presence of lauryldimethylamine oxide. ^1H - and ^{13}C -NMR and CD spectra of the native glycoporphin A^M were almost same with the references. The methyl groups of Met-8 and -81 of glycoporphin A^M were labelled with [^{13}C]- CH_3I by using Hardy's method. The ^{13}C -labeled glycoporphin A^M showed

a decrease in the intensity of the CD spectrum. Subsequent treatment of the labeled glycoprotein A^M with 8 M urea caused further decrease in the intensity. Byers et al. reported that changes of glycoprotein CD intensity at 220 nm (θ_{220}) caused by guanidine·HCl (5~8 M) were not completely reversible; complete removal of the denaturant by dialysis resulted in 85 % recovery of θ_{220} . In our case, the recoveries of θ_{220} for the labeled glycoprotein A^M was 88 % and for the same protein separately treated with urea again was 83 %. The interpretation of the CD spectra of membrane proteins is complicated by differential light scattering and differential absorption flattening. Therefore, the secondary structure cannot be determined solely by the CD analysis.

Many studies have been performed in which the resonances from aromatic residues have been utilized as probes of protein conformation. Human glycoprotein A contains five His, four Tyr and two Phe. The resonances at 7.34, 7.15 and 6.84 ppm have been assigned to His (ring H-4), Tyr (ring H-2,6) and Tyr (ring H-3,5), respectively. In native glycoprotein A, the resonances of the two Phe (ring) can not be seen because they are located in highly ordered conformation which are near or in the hydrophobic domain. This agrees with a revised model for molecular organization of human glycoprotein A; there might be five helices in glycoprotein A, Phe-68 and Phe-78 are in helices B and C, respectively. These two helices are responsible for the dimerization and are very tolerant for changing pH, temperature, ionic strength; even in 6 M guanidine/4 M urea, they are still stable. If the helices B and C were disrupted, a peak of the Phe would appear at 7.3 ppm and the integral should increase greatly.

Integrals of the peaks in ¹H NMR spectrum of glycoprotein A^M at 7.34, 7.15 and 6.84 ppm represented 5, 8 and 8 protons, respectively, and they agree well with five His and four Tyr. After labelling the methionine methyl groups of glycoprotein A^M and the additional urea treatment of the labelled protein, these integral did not change, and the Phe peak was not observed. This means that the labelling does not change the B and C helical structure and does not affect the dimerization. This explains the unchanged electrophoretic pattern reported by Hardy.

Something did certainly change, however, because the resolution of the proton and carbon spectra increased, especially for the bulk of the carbohydrate region. From the carbon spectra we can exclude the possibilities of urea remained or contamination of dimethylated sulfonium form [$-S^+(^{12}CH_3)(^{13}CH_3)$], because

there were no new peaks observed around 166 and 26 ppm. Combining the results of NMR with those CD, we could conclude that parts of the helices A, D and E were certainly affected by this labelling. This conclusion is different from the Hardy and Dill's report, in which they only checked by electrophoresis. However, it is even clear that in their ^{13}C NMR spectra that the resolution from 60 to 80 ppm increases by the labelling. After labelling the glycoprotein A^N with [^{13}C]-CH₃I, they found two new peaks and assigned the resonance at 15.7 ppm to the ϵ -carbon of Met-8 and the another peak at 2.0 ppm to the ϵ -carbon of Met-81. They attributed the unusual chemical shift of the ϵ -carbon of Met-81 to the localization in the hydrophobic region.

Welsh et al. studied the intrinsic viscosity under physiological condition, and they reported that the monomer-dimer equilibrium of glycoprotein A demonstrated previously by polyacrylamide-SDS gel electrophoresis persisted even in the absence of detergent. Recently, mutagenesis studies have revealed that conservative changes at Gly79, Val80, Gly83, and Val84 of the transmembrane sequence of glycoprotein A disrupt the dimerization, while the dimerization is relatively tolerant of changes at Met81. The rotational resonance NMR studies on transmembrane domain of human glycoprotein A-lipid interactions indicate that Tyr93 orients toward the surrounding lipids and is close to the membrane surface. These results together with molecular modeling have suggested that the glycoprotein A transmembrane domain has a helical structure with Gly79 and Gly83 packed in the helix interface and Met81 facing the bulk environment.

These reports mean that, although Met-8 is in the hydrophilic part and Met-81 is in the hydrophobic portion, both face the solvent and the ^{13}C chemical shifts of the two methyl groups should not show dramatic difference. ^{13}C chemical shifts for the S*CH₃ groups of CH₃CH₂S*CH₃, ClCH₂CH₂S*CH₃ and *CH₃SCH₂CH₂OH in CDCl₃ are 15.03, 15.7 and 15.01 ppm, respectively. Thus, the peak at 2.0 ppm that Hardy and Dill found must come from an impurity. Comparing our ^{13}C NMR spectra between native and labeled glycoprotein A^M, only a new intense peak was found at 15.7 ppm for the labeled protein. It was assigned to the overlapping of Met-8 and -81 methyl groups.

The carbon-detected heteronuclear shift correlation experiment is powerful but not ideal. The spectrum is generally acquired with many data points in f_2 , the carbon dimension, and few data points in f_1 , the proton dimension. This is the

opposite of what is required since the carbons are usually well dispersed while the protons tend to be closely bunched and overlapping. Improving digital resolution in f_1 is very expensive in the experimental time, and because the low sensitivity of ^{13}C , therefore, no two-dimension ^1H - ^{13}C chemical shift correlation spectrum of glycoporphin A has been reported. From the inverse-detected spectra-HMQC (Fig. 1), we further determined that the ^1H chemical shift of the Met-8 and -81 methyl groups is 2.11 ppm, the ^{13}C chemical shift of the 50 N-acetylmethyl groups of the 16 oligosacchrides locating on the N-terminus of glycoporphin A is 23.43 ppm and the ^{13}C chemical shift for the bulk of the carbohydrate are found from 60 to 80 ppm.

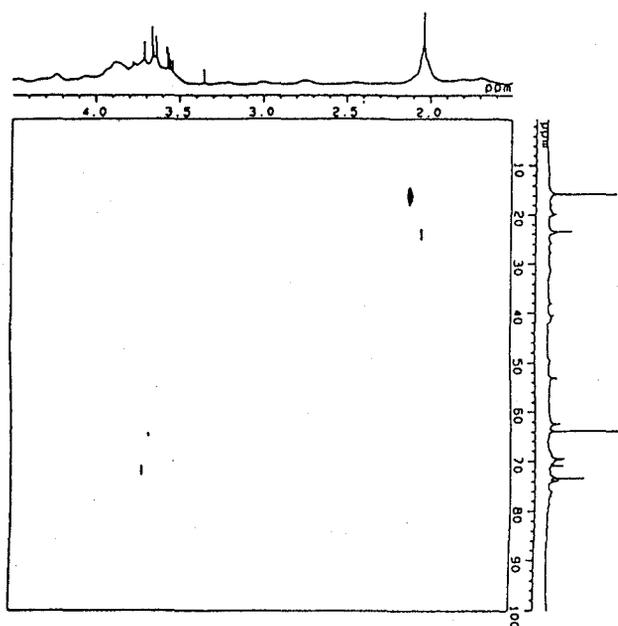


Fig. 1. HMQC spectrum of glycoporphin A labeled with ^{13}C in the methionine methyl groups.

Acknowledgments - We gratefully acknowledge Prof. H. Ogoshi and Dr. H. Kuroda for allowing us to use their NMR spectrometer. We thank Dr. M. Oki and Dr. A. Oki for the generous supply of blood cells. We also thank Mr. K. Suzuki and Mr. H. Fujita for their help.

セッション：交差緩和
(Cross Relaxation)

Application of ^1H - ^1H cross-relaxation rate to structural analysis of
paramagnetic hemoproteins

Yasuhiko Yamamoto

Department of Chemistry, University of Tsukuba

The importance of the nuclear Overhauser effect (NOE) in structural studies of biopolymers by NMR is emphasized not only by its crucial role in resonance assignments, but also by its ability to provide nonbonded constraints that form the basis of structure determination. Since the NOE depends on the ^1H - ^1H dipolar interaction as the dominant ^1H relaxation mechanism, the dominance of electron- ^1H dipolar relaxation in paramagnetic molecules has been thought to quench the NOEs in paramagnetic systems. In a paramagnetic system, the intrinsic relaxation is indeed dominated by paramagnetic effects. But paramagnetic relaxation is likely to be independent of molecular motion. Hence intrinsic relaxation and cross-relaxation are uncoupled and could be manipulated independently. The present study demonstrates that conformations of heme peripheral and the proximal His side-chains in ferric low-spin myoglobin can be determined through the analysis of cross-relaxation between interacting ^1H s.

[はじめに] 常磁性分子のNMRでは、NOEの観測は不可能であるとしてこれまで考えられていた。NOEが生じるためには、 ^1H の緩和機構として ^1H - ^1H 双極子相互作用が支配的であることが必要であるので、電子- ^1H 双極子相互作用が支配的となる常磁性分子の場合にはNOEを観測することができないと考えられていたのも無理はないことである。そして、常磁性分子のNMRで観測される超微細シフトしたシグナルの緩和速度は、電子- ^1H 双極子相互作用による緩和機構のみに関してほぼ定量的に解析することができる。しかし、ここで重要なことは、超微細シフトしたシグナルの緩和速度(Intrinsic relaxation rate)は、本質的に電子スピンの緩和速度だけに依存しており、分子の運動には無関係であるということである。さらに、常磁性分子の核の緩和機構として、その寄与は電子- ^1H 双極子相互作用に比べて少ないけれど、 ^1H - ^1H 双極子相互作用の寄与も確かに存在しているということも忘れてはならない。したがって、反磁性分子の場合には核間距離と分子運動で定式化される ^1H - ^1H 双極子相互作用を介してつながっている核の緩和速度と交差緩

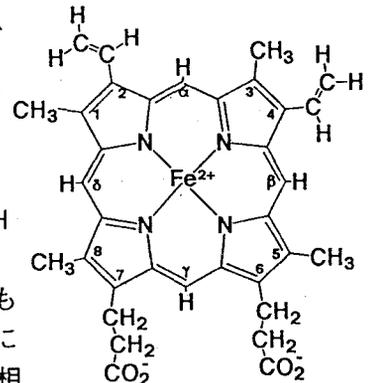


図 1 Structure of Heme

常磁性NMR, 常磁性ヘム蛋白質、交差緩和、核オーバーハウザー効果

やまもと やすひこ

和速度が、常磁性分子の場合には切り放されており、それぞれ独立させて考えることができるということになる。そこで、交差緩和速度を適当に調節し、その大きさを核の緩和速度に匹敵するくらいに大きくすることができれば、常磁性分子のNMRにおいてもNOEの観測は可能となる。具体的な例としては、たとえば分子の運動を抑制してSlow motion limitの状態にすれば、交差緩和速度に対するゼロ量子遷移の寄与が二量子遷移のものより大きくなり、常磁性分子でも符号は負で絶対値の大きなNOEが観測されるものと期待される。そこで、常磁性ヘム蛋白質を考えてみると、常磁性分子であるヘム（図1）が蛋白質に組み込まれており、ヘムの分子量は見かけ上約20倍程度になっていることがわかる。つまり、NMR的には、常磁性ヘム蛋白質の蛋白質部分は、ヘムの分子運動を遅くしてNOEの絶対値を大きくする役割をしているものであると見なすこともできる。

常磁性ヘム蛋白質について、NOEを一次元法や二次元法で測定すると、超微細シフトしたシグナル間にも多くのNOE相関が観測される（1）。これらの相関ピークは、シグナル帰属に有用であることは言うまでもない。さらに、Mixing timeを変えた一連の測定より、注目している ^1H シグナル間のNOEを観測すれば、NOEの増加速度に反映される交差緩和速度を得ることができ、それから ^1H - ^1H 距離または ^1H - ^1H ベクトルの内部運動について解析することが可能となる。また、スピン拡散の影響も同時に評価することもできる。

本研究では、常磁性ミオグロビンの活性部位にある3つのフラグメント（ヘムのビニル側鎖とプロピオン酸側鎖、近位ヒスチジンの C_α - C_β ）について、それらのコンフォメーションを ^1H - ^1H 交差緩和速度より解析した。交差緩和速度は、一次元NOE差スペクトルの照射時間依存性を解析することによって求めた。観測されたNOEの照射時間依存性は、理論式とよい一致を示し、得られた交差緩和速度から求められた核間距離より、上記3つのフラグメントのコンフォメーションを規定する二面角を決定することができた。同様の解析は、NOESYを用いても行うことが可能である。

【実験方法】 ^1H -NMRはBruker社製AC-400で行った。測定に用いたミオグロビンは、エイラクブカ（学名：*Galeorhinus japonicus*）の赤筋に存在しているものを分離精製したものである。NMR試料の溶媒は重水、蛋白質濃度は約0.5mM、そして配位子として5当量のKCNを加えた。標準的スペクトルはスペクトル幅30kHz、8kデータポイント、 90° パルス幅10.5 μs で、512回積算して測定した。水のシグナルは、0.2sの照射パルスにより消去した。一次元NOE差スペクトルは、レシーバーの位相を 180° 変えることにより、Time domainで差スペクトルをとり観測した。積算回数は約16kである。化学シフトはDSS基準で表示している。

【結果と考察】ヘム蛋白質の活性中心であるヘム鉄の反応性は、ヘムの電子構

造によりコントロールされている。ヘム側鎖のビニル基は、その電子吸引性がヘムに対する配向により変化するため、ヘムの電子構造を変化させる。ビニル基のヘムに対する配向を決定するには、図2に示されている二面角(θ)を求めればよい。 θ は、2-ビニル基のそれぞれの1Hと1-Meの1Hとの距離から求めることができる。エイラクブカメトシアノミオグロビンの1H-NMRスペクトルを図3に示す。いま注目している4つの1Hに由来するシグナルは、常磁性シ

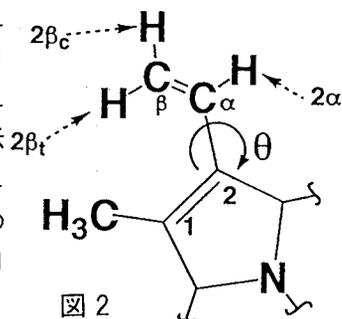


図2 The Dihedral Angle(θ)

θ is defined as the vinyl group is oriented perpendicularly to the heme plane and toward the proximal side.

フトし、蛋白質に由来するシグナルから分離して観測されている。1-Meシグナルを照射してNOEを観測した結果の一部を図4に示してある。観測されるNOEの符号は負であるので、差スペクトルでは、照射されているピークとNOEによる強度変化が起きているピークが同位相で観測されている。NOEの強度の比較より、 $2\beta_1$ の方が $2\beta_0$ より1-Meに近い位置に存在していることがわかる。1-Meと $2\beta_1$ 間そして1-Meと $2\beta_0$ 間の双極子相互作用は、ビニル基の相関時間で変調されていると考えることができるので、図4の結果からもこれら2組の核間距離を見積もることができる。図5には、 $2\beta_1$ の飽和時間を変化させてNOEを観測した結果を示してある。そして、注目している1H間で観測されるNOEの強度を $2\beta_1$ の飽和時間に対してプロットしたものを図6に示す。 $2\beta_0$ と1-Meで観測されるNOEは、交差緩和速度で立ち上がり、ある時間後一定の値に達する。一方、 2α の場合は、NOEの立ち上がりにタイムラグが生じている。このことは、 $2\beta_1$ から 2α へのNOEはPrimary NOEではないことを示している。図6のプロットより $2\beta_1-2\beta_0$ 、 $2\beta_1-1-Me$ それぞれについて求められた交差緩和速度は、 1.3 s^{-1} 、 0.09 s^{-1} であった。交差緩和速度は核間距離の六乗に反比例するので、交差緩和速度と $2\beta_1-2\beta_0$ 距離が 0.177 nm であることが

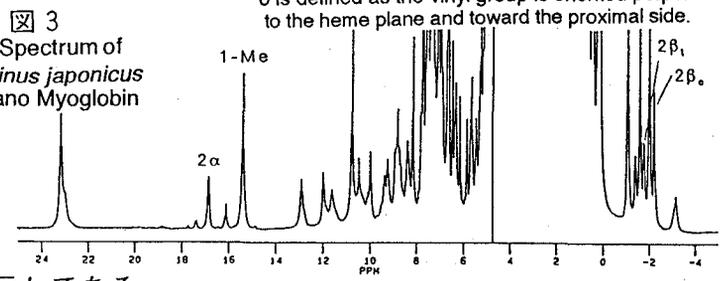
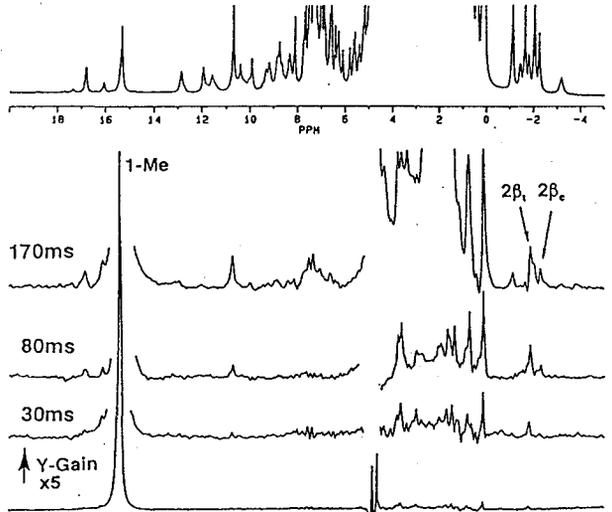


図3 ¹H-NMR Spectrum of *Galeorhinus japonicus* Met-cyano Myoglobin

図4 NOE Difference Spectra Recorded with the Saturation of 1-Me for the Indicated Time



間を変化させてNOEを観測した結果を示してある。そして、注目している1H間で観測されるNOEの強度を $2\beta_1$ の飽和時間に対してプロットしたものを図6に示す。 $2\beta_0$ と1-Meで観測されるNOEは、交差緩和速度で立ち上がり、ある時間後一定の値に達する。一方、 2α の場合は、NOEの立ち上がりにタイムラグが生じている。このことは、 $2\beta_1$ から 2α へのNOEはPrimary NOEではないことを示している。図6のプロットより $2\beta_1-2\beta_0$ 、 $2\beta_1-1-Me$ それぞれについて求められた交差緩和速度は、 1.3 s^{-1} 、 0.09 s^{-1} であった。交差緩和速度は核間距離の六乗に反比例するので、交差緩和速度と $2\beta_1-2\beta_0$ 距離が 0.177 nm であることが

ら、 $2\beta_1-1\text{-Me}$ 距離は0.28nmと求まる。 θ に対する 1-Me とビニル基のそれぞれの 1H との距離は図7のようになるので、 θ は -40° あるいは -140° であることがわかる。距離情報からだけではこのビニル基がヘム平面に対してどちらの側に向いて配向しているのかを決定することはできない。そこで、 $2\beta_1$ 、 $2\beta_c$ の常磁性シフト値を解析することによっても、ヘムに対するビニル基の配向を決定することができる(2)ので、両方法を併用するとよい。 θ に対する $2\beta_1$ と $2\beta_c$ の擬コンタクトシフトの差のプロットを図8に示す。観測シフトの差は0.27ppmなので、このシフト差が擬コンタクトシフトの差だけによるものであるとすると、図8より θ は -44° あるいは 15° であることになる。したがって、両方の測定結果を満足させる値として、 θ は約 -40° であることがわかる。また、ヘムのプロピオン酸側鎖と近位ヒスチジンの $C_\alpha-C_\beta$ のコンフォメーションについては、交差緩和速度より得られる距離情報だけで二面角の決定が行える。

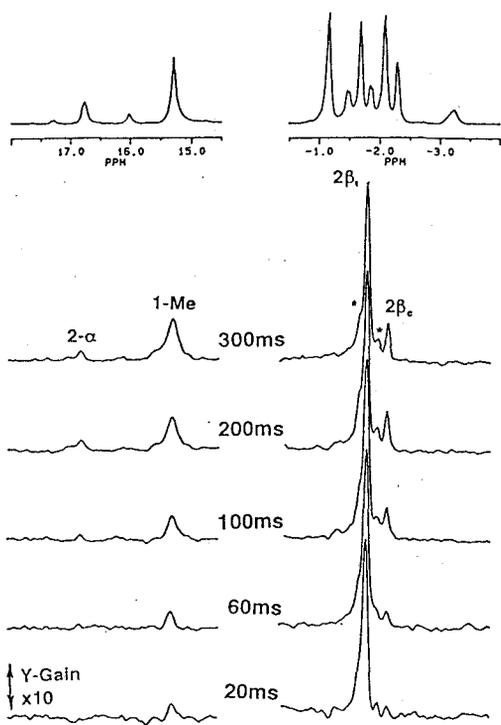


図5 NOE Difference Spectra Recorded with the Saturation of $2\beta_1$ for the Indicated Time

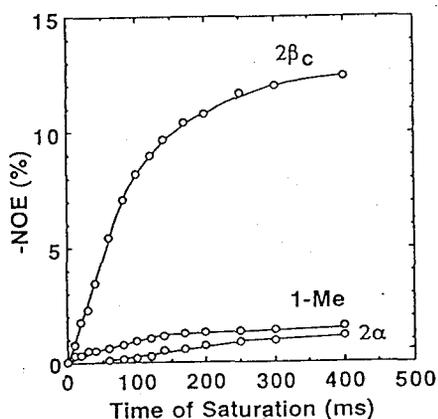


図6 NOE vs. Saturation time of $2\beta_1$

[謝辞] エイラクブカミオグロビンをご提供戴いた、高知大学理学部生物学科 鈴木知彦先生に感謝いたします。

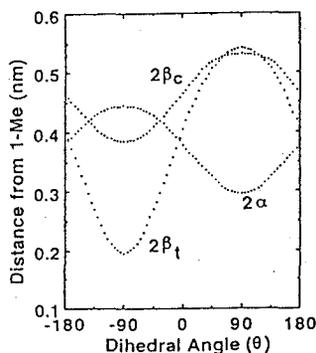


図7 θ vs. Distance from 1-Me

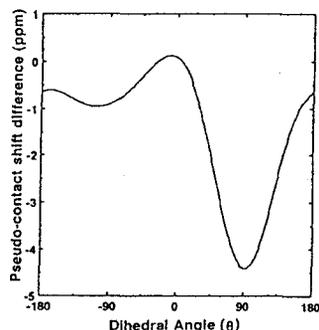


図8 θ vs. Pseudo-contact shift difference between $2\beta_1$ and $2\beta_c$ (from ref.(2))

[参考文献] (1) Yamamoto *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 198, 299 (1991).

(2) Y. Yamamoto *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1120, 173(1992).

神戸薬大・大阪薬大* ○ 杉浦真喜子 上垣内みよ子 石田寿昌*

Conformational Analyses of Cyclic Peptides - Patellamides B and C - in Solution by the Selective Relaxation Method

Makiko Sugiura, Miyoko Kamigauchi, and Toshimasa Ishida

Kobe Pharmaceutical University and Osaka University of Pharmaceutical Sciences

The Selective Relaxation Method was applied to cyclic peptides from marine organisms - Patellamides B and C - where cross relaxations (σ_{ij}) were obtained by ^1H selective and bi-selective T_1 measurements and correlation times for reorientations (τ_c) were evaluated from the frequency dependences of non-selective T_1 . The interproton distances (r_{ij}) were estimated using these σ_{ij} and τ_c values, and the models are built with these r_{ij} values by the dynamical simulated annealing calculations. The resulting proposed conformations for both peptides are Type III.

【はじめに】

海産生物から産生される一連の親油性環状ペプチドは、高い細胞毒性、また抗腫瘍活性などを有することから興味を持たれ、特にそのコンフォメーションと活性との相関という点から、種々の研究が行われている。これらは Fig.1 に示すような3種のコンフォーマーの存在が考えられるが、その化学構造によってその優位コンフォメーションが変化する。これらの内、今回はパテラマイド B 及び C のコンフォメーション解析を、我々の開発した選択的緩和法を用いておこなった。

選択的緩和法は、次ページのフローチャートに示すように、Selective $T_1(T_1^S)$ 、Bi-selective $T_1(T_1^{BS})$ を用いて交差緩和 σ_{ij} を求め、それと Non-Selective $T_1(T_1^{NS})$ の周波数依存性より得られる回転相関時間 τ_c とから H-H 間距離 r_{ij} を決定するもので、溶液中でのコンフォメーション解析に有用な方法である。今回はこのようにして決定された H-H 間距離を使って Dynamical Simulated annealing 計算法によってモデルを組立て、コンフォメーションの検討を行った。

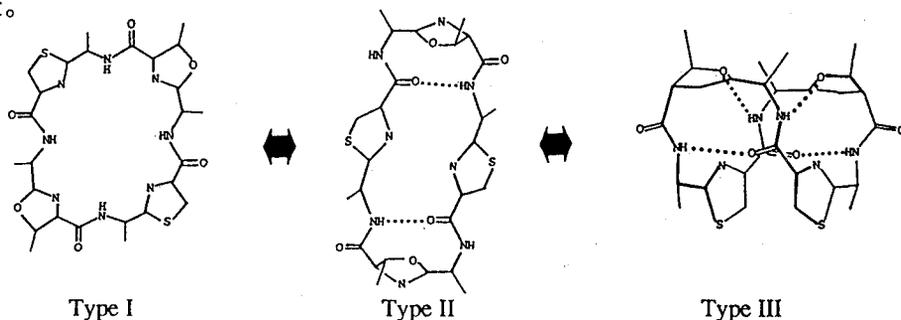
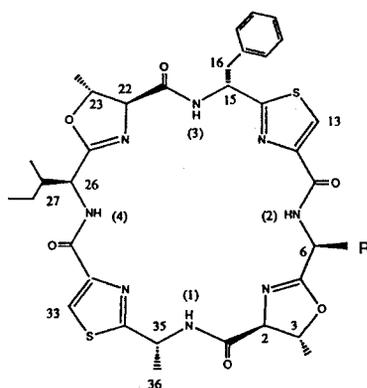
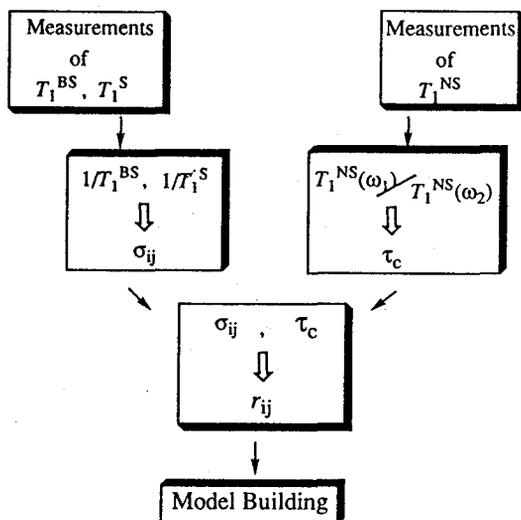


Fig. 1. Schematic illustration of possible conformational transition among Types I - III.

キーワード：パテラマイド B, C, Selective T_1 , Bi-selective T_1 , 交差緩和, コンフォメーション

すぎうらまきこ かみがうちみよこ いしだとしまさ

Selective Relaxation Method



Patellamide B : R = CH₂CH(CH₃)₂

Patellamide C : R = CH(CH₃)₂

Table 1. Observed T_1^{NS} , T_1^S and T_1^{BS} values and the τ_c values obtained for Patellamide B.

H-i	T_1^{NS}/s		$\tau_c/10^{-10}s$	T_1^S/s	T_1^{BS}/s					
	(500)	(200)			(H-i)					
NH1	0.783	0.561	1.28	0.879	0.889	0.865	0.886	0.855		
NH2	0.578		0.89	0.679	0.638	0.669	0.654	0.681	0.704	0.648
					(H-6)	(H-7h)	(H-7i)	(H-8)	(H-13)	(H-23)
NH3	0.731	0.561	1.10	0.832	0.675	0.823	0.829	0.839	0.836	
					(H-27)	(H-15)	(H-16h)	(H-16i)	(H-22)	(H-33)
NH4	0.540	0.447	0.89	0.640	0.623	0.634	0.631	0.628	0.605	0.625
H-2	2.012	1.573	1.05	2.298	2.320	2.222				
					(NH1)	(H-3)				
H-22	1.939	1.458	1.15	2.251	2.282	2.148				
					(NH3)	(H-23)				
H-26	1.140	0.858	1.15	1.549	1.369	1.386				
					(NH4)	(H-27)				
H-71	0.352	0.280	1.00	0.522	0.508	0.521	0.518			
					(NH2)	(NH4)	(N-6)			
H-27	0.611	0.459	1.16	0.816	0.805	0.776	0.800			
					(NH2)	(NH4)	(H-26)			
H-13	5.800		1.20	6.443	6.127	6.537	6.348			
					(NH1)	(NH2)	(H-36)			
H-33	4.619	3.402	1.20	5.045	5.071	5.540	5.042	4.804		
					(NH3)	(NH4)	(H-16h)	(H-16i)		
H-15	1.493	1.154	1.08	1.918	1.907	1.819	1.881			
					(NH3)	(H-16h)	(H-16i)			
H-35	1.669	1.468	0.72	2.077	2.034					
					(NH1)					
H-16h	0.404	0.303	1.16	0.572	0.567	0.545	0.572			
					(NH3)	(H-15)	(H-33)			
H-16i	0.382	0.285	1.17	0.547	0.528	0.534	0.541			
					(HN3)	(H-15)	(H-33)			

【実験】

バテラマイド B 及び C は、それぞれ約 3 mM 濃度で CDCl_3 に溶解し、脱ガス・溶封して測定サンプルとした。 T_1 の測定は Varian VXR-500 及び Gemini-200 を用い、 T_1^S 、 T_1^{BS} の測定は以前に報告したパルス系列を用いて行った。Dynamical Simulated annealing 計算は、プログラム X-PLOR によった。

【結果と考察】

測定によって得られたバテラマイド B 及び C の各水素核における T_1^{NS} 、 T_1^S 、 T_1^{BS} の値を、Table 1 及び 2 に示す。これらの内、2 種の周波数 ($\omega_1=500$, $\omega_2=200$) による T_1^{NS} を用いて (1) 式によって τ_c を得ることができるが、その得られた値を同時に Table 1 及び 2 に示した。

$$T_1^{NS}(\omega_1) / T_1^{NS}(\omega_2) = \frac{(5 + 8\omega_2^2 \tau_c^2)(1 + 5\omega_1^2 \tau_c^2 + 4\omega_1^4 \tau_c^4)}{(5 + 8\omega_1^2 \tau_c^2)(1 + 5\omega_2^2 \tau_c^2 + 4\omega_2^4 \tau_c^4)} \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_1^{BS}} - \frac{1}{T_1^S} = R^i(ij) - R^i(i) = N_j \sigma_{ij}^i \quad (2) \quad \sigma_{ij} = \frac{1}{10} \gamma^4 \hbar^2 r_{ij}^{-6} \left[\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - \tau_c \right] \quad (3)$$

一方 T_1^S 、 T_1^{BS} の測定値から (2) 式によって得られる σ_{ij} 及びその値と先の τ_c とから (3) 式によって決定される r_{ij} の値を Table 3 及び 4 に示した。

Table 3 及び 4 には Type III のコンフォメーションを示唆する値がいくつか見られるが、こ

Table 2. Observed T_1^{NS} , T_1^S and T_1^{BS} values and the τ_c values obtained for Patellamide C.

H-i	T_1^{NS}/s		$\tau_c/10^{-10}s$	T_1^S/s	T_1^{BS}/s				
	(500)	(200)			(H-j)				
NH1	0.765	0.527	1.38	0.880	0.855	0.872	0.862	0.849	
NH2	0.596	0.484	0.95	0.706	0.694	0.671	0.705	0.680	0.705
NH3	0.720	0.527	1.22	0.830	0.811	0.823	0.796	0.818	0.803
NH4	0.577	0.486	0.84	0.668	0.655	0.663	0.664	0.644	
H-2	2.034	1.509	1.19	2.400	2.316	2.265			
H-22	1.987	1.462	1.21	2.315	2.246	2.208			
H-6	1.436	1.059	1.20	1.673	1.631	1.659			
H-26	1.177	0.851	1.25	1.419	1.381	1.398			
H-7	0.694	0.512	1.20	0.880	0.825	0.854	0.874		
H-27	0.651	0.466	1.28	0.827	0.815	0.788	0.825		
H-13	6.482	4.224	1.52	6.758	6.560	6.871	6.572		
H-33	4.575	3.358	1.21	5.107	4.816	5.004	4.881		
H-15	1.616	1.196	1.19	1.955	1.907	1.904	1.931		
H-35	1.893	1.528	0.96	2.099	2.016	1.969			
H-16h	0.414	0.305	1.20	0.580	0.588	0.568	0.587		
H-16l	0.391	0.290	1.19	0.555	0.543	0.554	0.546		

これらの値を用いて Dynamical Simulated annealing 計算を行い、両ペプチド共に Fig.2 に示すようなコンフォメーションを得た。これらは Fig.1 の Type III に属するが、溶液中でのコンフォメーションとしては、このタイプのコンフォメーションを初めて決定することが出来た。

Table 3. Crossrelaxation values (σ_{ij}) and estimated r_{ij} for several proton pairs of Patellamide B

H-i	H-j	σ_{ij} /10 ⁻² s ⁻¹	σ_{ji} /10 ⁻² s ⁻¹	r_{ij} /Å
NH1	H-2	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{b)}
NH1	H-13	1.82	0.80	3.19 - 3.66
NH1	H-35	— ^{a)}	1.03	3.41 - — ^{b)}
NH1	Me-36	3.07	—	2.93
NH2	H-6	9.41	—	2.40
NH2	H-7h	2.23	—	3.06
NH2	H-7i	5.51	5.44	2.63 - 2.65
NH2	H-8	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{b)}
NH2	H-13	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{b)}
NH2	H-23	6.98	—	2.53
NH2	H-27	0.87	1.78	3.21 - 3.57
NH3	H-15	1.34	3.14	3.36 - 4.27
NH3	H-16h	0.47	1.38	3.35 - 3.99
NH3	H-16i	3.49	6.47	2.58 - 2.86
NH3	H-22	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{b)}
NH3	H-33	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{b)}
NH4	H-3	4.13	—	2.76
NH4	H-7h	1.33	—	3.33
NH4	H-7i	2.01	0.44	3.11 - 4.03
NH4	H-26	2.91	8.49	2.47 - 2.92
NH4	H-27	8.92	6.44	2.42 - 2.59
NH4	H-28	3.72	—	2.80
NH4	H-33	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{b)}
H-2	H-3	1.49	—	3.29
H-22	H-23	2.14	—	3.11
H-6	H-7i	—	1.43	3.31
H-26	H-27	7.59	2.58	2.52 - 3.01
H-13	H-36	0.23	—	4.50
H-33	H-16h	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{b)}
H-33	H-16i	1.00	2.09	3.12 - 3.53
H-15	H-16h	2.85	8.69	2.46 - 2.96
H-15	H-16i	1.04	4.63	2.73 - 3.50

a) Negligibly small values,
b) > 4 Å

Table 4. Crossrelaxation values (σ_{ij}) and estimated r_{ij} for several proton pairs of Patellamide C

H-i	H-j	σ_{ij} /10 ⁻² s ⁻¹	σ_{ji} /10 ⁻² s ⁻¹	r_{ij} /Å
NH1	H-2	3.37	1.52	2.88 - 3.29
NH1	H-13	1.05	0.45	3.49 - 4.01
NH1	H-35	2.44	1.95	3.04 - 3.14
NH1	H-36	4.21	—	2.77
NH2	H-6	2.50	1.52	3.01 - 3.29
NH2	H-7	7.35	7.51	2.51 - 2.52
NH2	H-13	0.16	— ^{a)}	4.75 - — ^{b)}
NH2	H-23	5.39	—	2.65
NH2	H-27	0.15	1.85	3.18 - 4.80
NH3	H-15	2.79	1.29	2.98 - 3.38
NH3	H-16h	0.96	— ^{a)}	3.55 - — ^{b)}
NH3	H-16i	5.12	3.79	2.69 - 2.83
NH3	H-22	1.69	1.33	3.23 - 3.36
NH3	H-33	3.96	1.18	2.81 - 3.43
NH4	H-3	2.85	—	2.92
NH4	H-7	1.16	3.49	2.87 - 3.39
NH4	H-26	0.79	1.95	3.16 - 3.62
NH4	H-27	5.49	6.11	2.61 - 2.62
H-2	H-3	2.49	—	3.03
H-22	H-23	2.09	—	3.12
H-6	H-7	0.48	0.68	3.76 - 3.99
H-26	H-27	1.03	0.31	3.51 - 4.28
H-13	H-36	0.42	—	4.05
H-33	H-16h	0.40	— ^{a)}	4.11 - — ^{b)}
H-33	H-16i	0.91	2.78	2.98 - 3.59
H-15	H-16h	1.35	3.59	2.85 - 3.36
H-15	H-16i	0.62	0.37	3.83 - 4.16
H-35	H-36	3.15	—	2.83

a) Negligibly small values,
b) > 4 Å

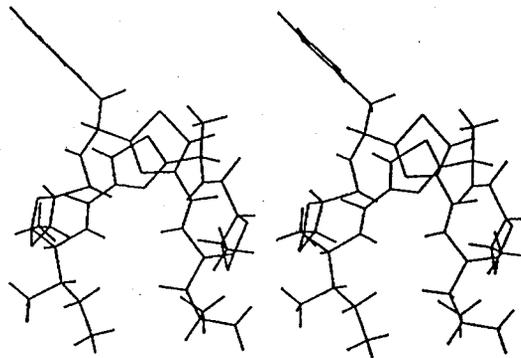


Fig. 2. Stereoscopic drawings of Patellamide B molecular conformation calculated using the r_{ij} values.

【参考文献】 T.Sai, N.Takao, and M.Sugiura, *Magn.Reson.Chem.*, 30, 1041 (1992)

¹藤田保衛大・総医研・分子生理、²岐阜大・医・生理、³近大・生物理工・生物工学

○曾我美 勝¹、恵良聖²、高崎昭彦¹、桑田一夫²、梶原孝彦¹、小関泰平³、土居悦四郎³

¹H-NMR studies on the molten-globule state of ovalbumin

¹Division of Mol. Physiol., Inst. for Compreh. Med. Sci., Fujita Health Univ., ²Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., and ³Dept. of Biotechnol. Sci., Faculty of B. O. S. T., Kinki Univ.

Sogami, M.¹, Era, S.², Takasaki, A.¹, Kuwata, K.², Kajihara, T.¹, Koseki, T.³ and Doi, E.³

Koseki et al(1988) reported that at the acidic region, such as pH 2.0, ovalbumin(OVA) is the molten-globule state which has a compact globule form with native-like secondary structure with mobile side chains(1). So, changes in the intramolecular rigidity of OVA were studied using the intramolecular cross-relaxation times($T_{1\rho}$) between irradiated and observed protein protons. $T_{1\rho}$ values for side chains at pD 3.1 were significantly long compared with those in the neutral region, indicating that the rigidity in the intramolecular structure is at least partly lost and the internal motion is liberated. So, as reported by Koseki et al (1988), OVA at pD 3.1 might be in agreement with the concept of the molten-globule state.

はじめに

Kosekiら(1988)は、OVA分子はpH 7.0(N型)からpH 2.0(E型)にすると、分子容、二次構造は、ほぼN型に等しく、芳香族側鎖の誘起CDの大幅な大きさの減少、差スペクトルの著名な変化を見いだした。Kosekiらは、OVAE型はmolten-globule(MG)状態であろうと推測した(1)。筆者らは、OVAのMG状態について、500MHz ¹H-NMRを用い、Akasakaの交差緩和時間($T_{1\rho}$)を測定し、MG状態における「ゆらぎ」増加について研究した。

実験材料と方法

OVAはSigma社Grade V 及び太陽化学社の製品を使用した。OVA溶液中の粒径分布は大塚電

キーワード: cross-relaxation time, molten-globule state, ovalbumin

そがみ まさる、えら せいいち、たかさき あきひこ、くわた かずお、かじはら たかひこ、こせえき たいへい、どい えつしろう

子社、LPA-3000/3100型動的散乱装置を用い、5mmφNMR試料管中の試料について測定した。交差緩和時間(T_{1s})は、Bruker社AM500型を用い、Akasaka(1981, 1983)(2, 3)のインバージョン・リカバリー法を用い、特定のプロトン、例えば8.65, 7.13, 0.40, -2.45 ppmを $\gamma H_2/2\pi$ 単位、39~107 Hzの f_2 照射して求めた。また、 1H -NMRスペクトル、0.008, 0.020秒のCPMGスペクトル、側鎖の T_2 値も測定した。

結果と考察

pD7.29(0.10 M Cl⁻, N型), 3.08(0.10 M Cl⁻, E型)のOVA D₂O溶液の動的散乱測定より、N, E型(1.5~5.5%)のいずれもNMR測定時間中では、ほぼ単分散であった。Kosekiら(1988)の報告によるとE型のpH 2.0に対応したpD値は2.4近傍であるが、OVAの凝集を長時間抑制するためpD 3.1近傍にした。

Akasaka(1981, 1983)(2, 3)のインバージョン・リカバリー法を用い、-2.45($\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hz), 0.40(~ 39 Hz), 7.13(~ 69 Hz), 8.65 ppm(~ 107 Hz)を f_2 照射し、各側鎖の T_{1s} 値を測定した。残念ながら、OVA NMRスペクトルの各ピークのアサイメントは充分に行われていない。筆者らはN型、E型の各側鎖プロトンの T_{1s} 値の差の表示方法について検討した。各ピークの T_{1s} 値 vs 周波数(ppm)プロットは、図1, 2に示すように、N型(●)、E型(○)の間に顕著な差が観測された。図1, 2は、それぞれ、-2.45(~ 107 Hz), 0.40 ppm(~ 39 Hz)を f_2 照射して求めた各ピークの T_{1s} 値 vs 周波数(ppm)である。7.13(~ 69 Hz), 8.65 ppm(~ 107 Hz)の測定でも、図1, 2と同様の差がN型、E型の間に観測された。ついで、図1, 2に示した、ほぼ対応した側鎖プロトンの T_{1s} 値の比、 $T_{1s}(E)/T_{1s}(N)$ vs 周波数(ppm)プロットを求めた。図3, 4は、それぞれ、-2.45(~ 107 Hz), 0.40 ppm(~ 39 Hz)の $T_{1s}(E)/T_{1s}(N)$ を示した。図3, 4のE型の T_{1s} 値は、ほぼ対応したN型ピークの約1.5倍であった。7.13(~ 69 Hz), 8.65 ppm(~ 107 Hz)の場合も図3, 4と同様の差が観測された。即ち、照射部位、強度による差はあるが、E型の T_{1s} 値はN型に比べて1.5~2倍になっている。図3, 4に対応したN型、E型の代表的側鎖プロトンの T_{1s} 値をTable 1に示した。

タンパク質分子の T_{1s} 値の延長の機序についてAkasakaら(2, 3, 4)、Eraら(5)は次のように報告している。 T_{1s} 値の増加は、高分子(タンパク質)の側鎖、セグメント等の可動性の増加、即ち高分子の「かたさ」の減少によると報告した。Kosekiら(1)は、OVA E型は、N型に比べて分子容、二次構造には変化なく、芳香族側鎖の誘起CDが大幅に減少することより、芳香族側鎖の可動性の増加を示唆していると報告した。E型における T_{1s} 値の増加は、Kosekiら(1)の結果と良く一致し、E型において、分子の「かたさ」の減少、即ち可動性の増加を示唆するだろう。上述の結果より、OVA E型は「MG状態」(6, 7)であろう。

OVA E型がMG状態であることに関連して、 1H -NMRスペクトルについて興味ある結果を説明する。N型側鎖の T_2 値はE型の T_2 値に比べて、若干長い、特にHis(C2H)、芳香族側鎖の T_2 値は、有意に長かった。このため、8 ms CPMG スペクトルで、N型、E型の差がHis(C2H)、芳香族側鎖のプロトンに有意の差が観測されたが、通常の 1H -NMRスペクトルでは、His(C2H)、芳香族側鎖のスベ

クトルはブロードであった。この機序については、検討中である。

文 献

1. Koseki, T. et al, J. Biochem. 103, 425(1988)
2. Akasaka, K., J. Magn. Reson. 45, 337(1981)
3. Akasaka, K., J. Magn. Reson. 51, 14(1983)
4. Akasaka, K. et al, Physica B 164, 163(1990)
5. Era, S. et al, Int. J. Peptide Protein Res. 26, 21(1985)
6. Dolgikh, D. A. et al, FEBS Lett. 136, 131(1981)
7. Ohgushi, M. et al, FEBS Lett. 164, 21(1983)

Fig.1 Plots of cross-relaxation times(T_{1s} (sec)) for each side chain of the N(●; pD 7.29, 0.10 M Cl⁻) and E(○; pD 3.08, 0.10 M Cl⁻) forms of ovalbumin at 25°, obtained by the f_2 -irradiation at -2.45 ppm(↓) and $\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hz, against ppm scale.

Fig.2 Plots of cross-relaxation times(T_{1s} (sec)) for each side chain of the N(●; pD 7.29, 0.10 M Cl⁻) and E(○; pD 3.08, 0.10 M Cl⁻) forms of ovalbumin at 25°, obtained by the f_2 -irradiation at 0.40 ppm(↓) and $\gamma H_2/2\pi \sim 39$ Hz, against ppm scale.

Fig.3 Plots of $T_{1s}(E)/T_{1s}(N)$ where $T_{1s}(E)$ and $T_{1s}(N)$ are cross-relaxation times for corresponding side chains of the E(pD 3.08, 0.10 M Cl⁻) and N(pD 7.29, 0.10 M Cl⁻) forms of ovalbumin at 25°, respectively, obtained by the f_2 -irradiation at -2.45 ppm(↓) and $\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hz, against ppm scale.

Fig.4 Plots of $T_{1s}(E)/T_{1s}(N)$ where $T_{1s}(E)$ and $T_{1s}(N)$ are cross-relaxation times for corresponding side chains of the E(pD 3.08, 0.10 M Cl⁻) and N(pD 7.29, 0.10 M Cl⁻) forms of ovalbumin at 25°, respectively, obtained by the f_2 -irradiation at 0.40 ppm(↓) and $\gamma H_2/2\pi \sim 39$ Hz, against ppm scale.

Fig. 1

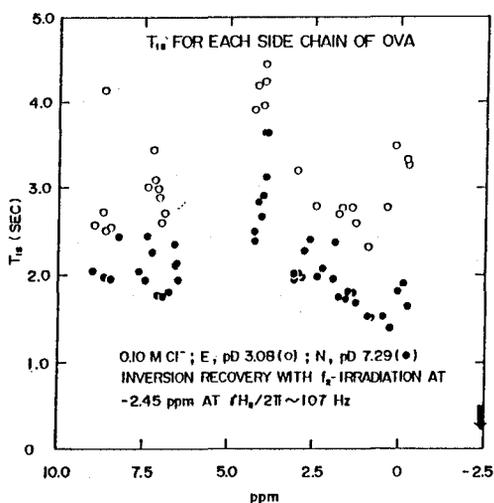


Fig. 2

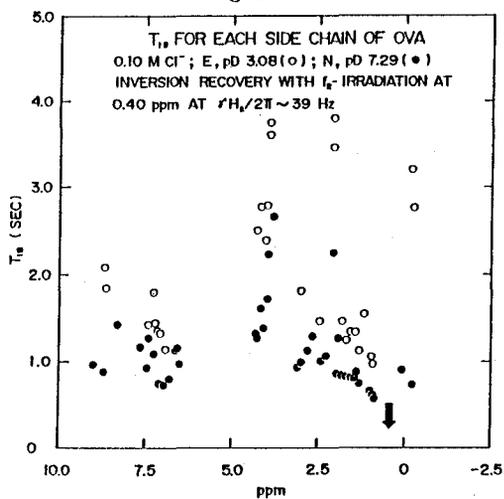


Fig. 3

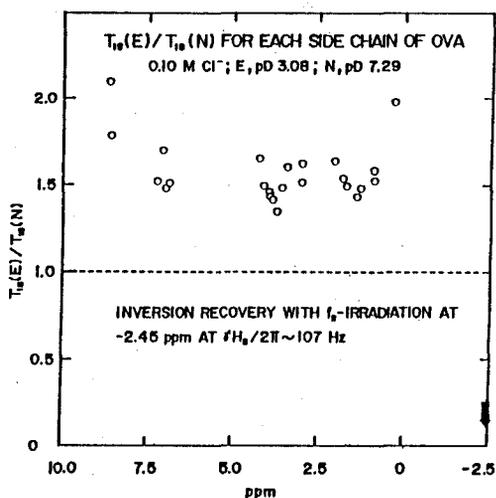


Fig. 4

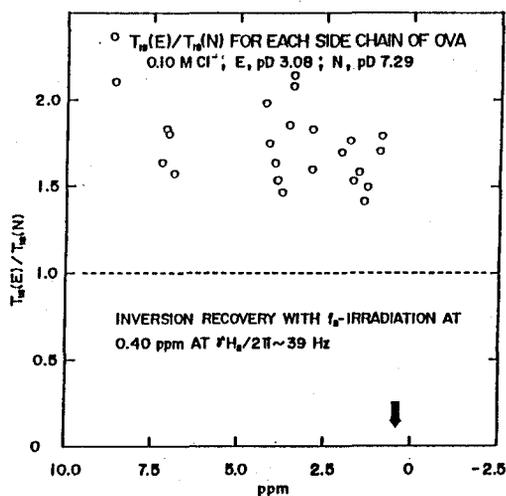


Table 1. Cross-relaxation times ($T_{1\rho}$) of ovalbumin in 0.10 M Cl^- at 25° , obtained by the inversion recovery method

pD	I_2 (ppm)	$\gamma H_2/2\pi$ (Hz)	$T_{1\rho}$ (sec)				
			$-\text{CH}_3$	$\epsilon-\text{CH}_2$	C_αH (4.14 ppm)	AROM	HIS(C2H)
7.29	-2.45	107	1.50	1.97	2.82	2.25	1.97
3.08			2.34	3.20	4.20	3.43	4.14
7.29	0.40	39	0.60	0.98	1.59	0.74	0.88
3.08			0.98	1.80	2.76	1.35	2.08
7.29	7.13	69	0.76	1.12	1.72	—	0.91
3.08			1.09	1.66	2.35	—	1.80
7.29	8.65	107	0.75	1.15	1.73	1.21	—
3.08			1.02	1.69	2.44	1.48	—

タンパク質の溶液→ゲル変換における水性状の変化——磁化移動現象とスピン・格子緩和時間

¹藤田保衛大・総医研・分子生理、²岐阜大・医・生理、³稲沢市民病院・中検、⁴日大・医・生理
 曾我美 勝¹、恵良聖²、○加藤一夫³、高崎昭彦¹、桑田一夫²、上坂信宏⁴、梶原孝彦¹、中村浩二²

¹H-NMR studies on water structure in protein solution and gel state—spin lattice relaxation times in the magnetization transfer experiments

¹Division of Mol. Physiol., Inst. for Compreh. Med. Sci., Fujita Health Univ., ²Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., and ³Clinical Laboratory, Inazawa City Hospital and ⁴Dept. of Physiol., Sch. of Med., Nihon Univ.

Sogami, M¹, Era, S², Kato, K³, Takasaki, A¹, Kuwata, K², Uesaka, N⁴, Kajihara, T¹ and Nakamura, K².

The magnetization transfer, mediated by the exchange process between the two-site, has been reported by several groups. They reported that spin-lattice relaxation times of water in the absence of exchange between the two-site ($T_{1,absc}$) are generally longer than those of conventional non-selective spin-lattice relaxation times (T_1). The present authors examined on the relation between $T_{1,absc}$ and T_1 , and found no elongation of $T_{1,absc}$. The apparent elongation of $T_{1,absc}$ might indicate protein gel and living tissues being the mixture of extremely large, intermediate and relatively small macromolecules in molecular level.

磁化移動(magnetization transfer)現象の説明にtwo-site modelが提唱された(Wolffら(1), Scholzら(2), Hajnalら(3))。彼らは、two-site間に交換がないとき、水分子プロトンのスピン・格子緩和時間(spin-lattice relaxation time in the absence of exchange between the two-site($T_{1,absc}$))は通常のインバージョン・リカバリ法によるスピン・格子緩和時間よりも、一般に長いと報告した。1989～1994年にかけて、多数の同様の報告がなされている。筆者らは、 $T_{1,absc} > T_1$ になぜなるかを、種々の系について検討した。

実験材料と方法

ウシ血漿アルブミン(BPA)、ウシ・メルカプトアルブミン(BMA)溶液およびBPAゲル(BPA*・

キーワード：交差緩和時間、水構造、タンパク質溶液→ゲル変換、磁化移動とスピン・格子緩和時間

そがみ まさる、えら せいいち、かとう かずお、たかさき あきひこ、くわた かずお、うえさかのぶひろ、かじはら たかひこ、なかむら こうじ

gel)(4)、合成高分子ゲル(ソフト・コンタクトレンズ材料、含水量: 18.4~83.1%)をBruker社AM 500型を用いて測定した。

$T_{1,absc}$ の測定法について、Akasaka(1981,1983)(5,6)の交差緩和の理論とtwo-site modelの理論が、全く同一形式であるため、Akasakaの式を用いて説明しよう。まず飽和移動法(SAT法)による交差緩和時間測定法について説明する。Akasaka法では、S, I 2スピン系を仮定し、Sスピン系プロトンをラジオ波で照射(f_2 照射)し、Iスピン系の磁化変化を観測する。Akasakaによると[1,2]式ようになる。

$$dI/dt = -(I - I_0)/T_1 - I/T_{IS}; [1]^{\S} \quad I = I_{\infty} + (I_0 - I_{\infty})\exp(-\tau/T_1^*); [2]^{\S}$$

I_0, I_{∞} はそれぞれ、長時間 f_2 照射する前、後のIスピン系の磁化、 $1/T_1^* = 1/T_1 + 1/T_{IS}$ である。Sスピン系を f_2 照射し、Iスピン系の磁化がSAT法で定常状態に到達したとき、 I_{∞}/I_0 は[3]式ようになる。

$$I_{\infty}/I_0 = T_1^*/T_1; [3]^{\S} \quad I = I_{\infty}[1 - 2\exp(-\tau/T_1^*)]; [4]^{\S}$$

前述のように、Iスピン系の磁化が定常状態に到達した後、インバージョン・リカバリー測定をすると(INV法)、観測するIスピン系の磁化変化は[4]式ようになる。[2]式と同様、 $1/T_1^* = 1/T_1 + 1/T_{IS}$ である。

ところでWolffら(1)、Hajnalら(3)は、 $T_{1,absc}$ を[3]式を用いて求めた。彼らは T_1^* を水シグナルより離れた部位を f_2 照射しながら(オフ・レゾナンス照射)、AkasakaのINV法により測定し、(I_{∞}/I_0)はSAT法を用いて求めた(INV-SAT法)。しかしながら、蛋白質ゲルの場合、分子内交差緩和現象に速い成分(かたい巨大分子集合体による)と遅い成分があり、INV法を用いると速い成分を観測することが困難である(7)。筆者らは、 T_1^* 、(I_{∞}/I_0)の何れもSAT法を用いて $T_{1,absc}$ を求め(SAT-SAT法)、INV-SAT法とSAT-SAT法を比較検討した。[\S 、式を記入する都合上、 $T_1(\text{HDO})$ 、 $T_1^*(\text{HDO})$ 、 $T_{IS}(\text{HDO})$ 、 $T_1(\text{H}_2\text{O})$ 、 $T_1^*(\text{H}_2\text{O})$ 、 $T_{IS}(\text{H}_2\text{O})$ 及びタンパク質分子の T_1 、 T_1^* 、 T_{IS} を区別せず、便宜的に「 T_1 、 T_1^* 、 T_{IS} 」とした。]

結果と考察

図1, 2は、ウシ血漿アルブミン・ゲル(BPA*-gel, D_2O)のINV-SAT法、SAT-SAT法の結果を、それぞれ示している。-8.79 ($\gamma H_2/2\pi \sim 69 \text{ Hz}$)、-13.00 ($\sim 107 \text{ Hz}$)、-18.99 ppm ($\sim 107 \text{ Hz}$)を f_2 照射し、INV-SAT法により求めた $T_{1,absc}(\text{HDO})$ の平均値($\tilde{T}_{1,absc}(\text{HDO})$)を $T_1(\text{HDO})$ に対してプロットした結果を図1に示した。 $\tilde{T}_{1,absc}(\text{HDO})$ はWolffら(1)、Hajnalら(3)の報告したように、対応した $T_1(\text{HDO})$ よりも長い。図1の破線は、 $\tilde{T}_{1,absc}(\text{HDO}) = T_1(\text{HDO})$ に対応した直線を示している。

BPA*-gelをオフ・レゾナンス照射したとき、速い分子内緩和、ついで水への分子間緩和現象をも観測し得るSAT-SAT法により求めた $\tilde{T}_{1,absc}(\text{HDO})$ は図2に示すように、対応した $T_1(\text{HDO})$ とほぼ等しかった。BPA*-gelの場合、巨大高分子集合体による速い分子内交差緩和(7,8)、ついで水分子への分子間交差緩和現象を、INV-SAT法では観測し難いため(7)、 $T_1^*(\text{HDO})$ が長くなり、 $T_1^*(\text{HDO})/(I_{\infty}/I_0)$ より求めた $\tilde{T}_{1,absc}(\text{HDO})$ が対応した $T_1(\text{HDO})$ より長くなるのであろう。ウシ血漿アルブミン溶液の場合、Eraら(7)によると、分子内交差緩和時間は、SAT法、INV法の何れによっても、ほぼ同一値を示す1成分のみであった。このため期待どおり、INV-SAT法により求めた $\tilde{T}_{1,absc}(\text{HDO})$ は、図3に示すように、対応する $T_1(\text{HDO})$ と一致した。

前述の基礎的検討を終えた後、 H_2O 系について合成高分子ゲル(ソフト・コンタクトレンズ材料、含水量: 18.4~83.1%)について $T_{1,absc}(\text{H}_2\text{O})$ と $T_1(\text{H}_2\text{O})$ について比較検討した。これらの試料では、 $\gamma H_2/2\pi \sim 69 \text{ Hz}$ を用い、7.13、-4.00、-8.79 ppmを f_2 照射した。均一な合成高分子ゲルでは、INV-SAT法、SAT-SAT法のいずれでも $T_{1,absc}(\text{H}_2\text{O})$ は、対応した $T_1(\text{H}_2\text{O})$ に等しかった。この理由は、おそらく合成高分子ゲルが均一であるためだろう。図4に、-8.79 ppm, $\gamma H_2/2\pi \sim 69 \text{ Hz}$ の結果を示したが、-4.00 ppm, $\gamma H_2/2\pi \sim 69 \text{ Hz}$ の $T_{1,absc}(\text{H}_2\text{O})$ vs $T_1(\text{H}_2\text{O})$ も図4と全く同じであった。

マウス水晶体(8週齢)、ラット肝、脳組織などのINV-SAT法($\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz, -8.79 , -4.00 ppm f_2 照射)による $T_{1,absc}(H_2O)$ は対応した $T_1(H_2O)$ よりも長かった。しかしながら、SAT-SAT法による $T_{1,absc}(H_2O)$ は、対応した $T_1(H_2O)$ と良く一致した。Wolffら(1)、Hajnalら(3)の報告した $T_{1,absc}(H_2O)$ の磁化移動測定時(INV-SAT法)の見かけの延長は、BPA*-gelで説明したと同一の機序によるのだろう。

前述の各種の検討実験より、筆者らが従来報告してきたウシ・血漿アルブミンの溶液→ゲル変換における $T_1(HDO)$ より求めたオフ・レゾナンス照射時の $T_{1s}(HDO)$ の短縮は誤りでないだろう(図5)。

文献

1. Wolff, S. D. et al, Magn. Reson. Med. 10, 134(1989).
2. Scholz, T. D. et al, Magn. Reson. Med. 29, 352(1993).
3. Hajnal, J. V. et al, J. Comput. Assist. Tomogr. 16, 7(1992).
4. Sogami, M. et al, Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130(1986).
5. Akasaka, K., J. Magn. Reson. 45, 337(1981).
6. Akasaka, K., J. Magn. Reson. 51, 14(1983).
7. Era, S. et al, Int. J. Peptide Protein Res. 33, 212(1989).
8. Akasaka, K. et al, Physica B 164, 163(1990)

Fig.1 Mean values of spin-lattice relaxation times in the **absence** of exchange between two-site ($\tilde{T}_{1,absc}(HDO)$), obtained by the INV-SAT method with 3 kinds of off-resonance irradiation (-18.99 ppm and $\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hz, -13.00 ppm and ~ 107 Hz, -8.79 ppm and ~ 69 Hz) at 25° , as a function of non-selective $T_1(HDO)$ for BPA*-gel. A broken line indicates the line corresponding to $\tilde{T}_{1,absc}(HDO) = T_1(HDO)$.

Fig.2 $\tilde{T}_{1,absc}(HDO)$, obtained by the SAT-SAT method at 25° , as a function of non-selective $T_1(HDO)$ for BPA*-gel. A solid line indicates the line corresponding to $\tilde{T}_{1,absc}(HDO) = T_1(HDO)$.

Fig.3 $\tilde{T}_{1,absc}(HDO)$, obtained by the INV-SAT method at 25° , as a function of non-selective $T_1(HDO)$ for bovine plasma albumin(\circ , BPA(pD 7.1)), bovine mercaptalbumin(\ominus , BMA(pD 3.0)) and BMA-sodium dodecyl sulfate complex(\bullet , AD₁₀(pD 5.4 or 3.9)) solutions. A solid line indicates the corresponding to $\tilde{T}_{1,absc}(HDO) = T_1(HDO)$.

Fig.4 Spin-lattice relaxation times in the **absence** of exchange between two-site ($T_{1,absc}(H_2O)$), obtained by the INV-SAT method with off-resonance irradiation at -8.79 ppm and $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz at 25° , as a function of non-selective $T_1(H_2O)$ for soft contact lenses(SCLs; \circ , $\textcircled{\circ}$, $\textcircled{\ominus}$, \bullet , \square) and GEL #WE (wet mixture of cellulose and starch, \blacksquare). A solid line indicates the line corresponding to $T_{1,absc}(H_2O) = T_1(H_2O)$.

Fig.5 $1/T_{1s}(HDO)$ values, obtained by the inversion recovery method with f_2 irradiation at -13.00 ppm and $\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hz at 25° , as a function of protein concentration (W%) for BPA*-gel(\bullet , $\textcircled{\bullet}$, $\textcircled{\ominus}$, 0.10 M Cl⁻, pD 4.01 before gelation), BMA(\circ , 0.10 M Cl⁻, pD 4.0) and BPA(\circ , 0.10 M Cl⁻, pD 7.1).

Fig. 1

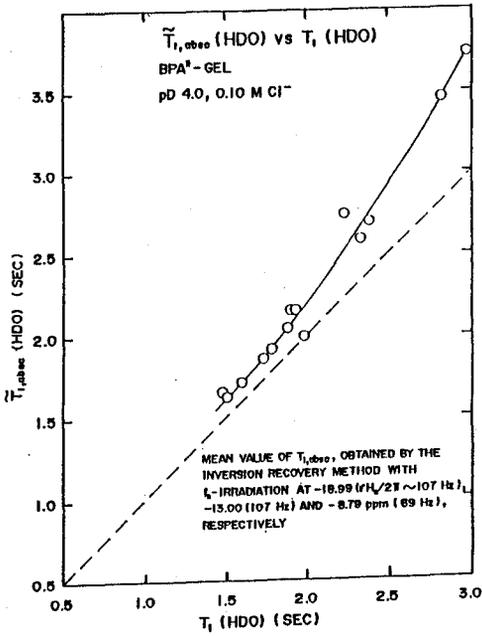


Fig. 2

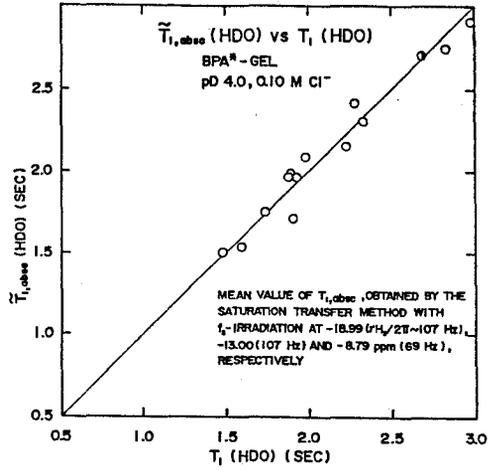


Fig. 3

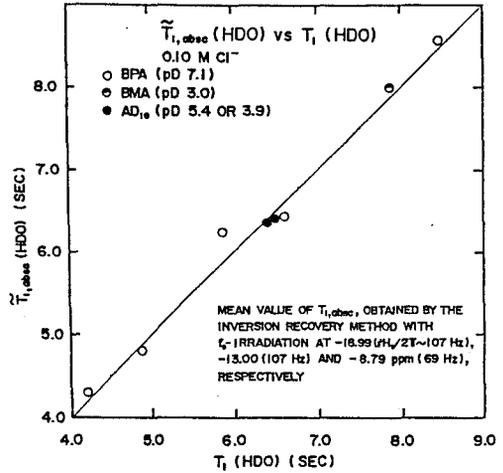


Fig. 5

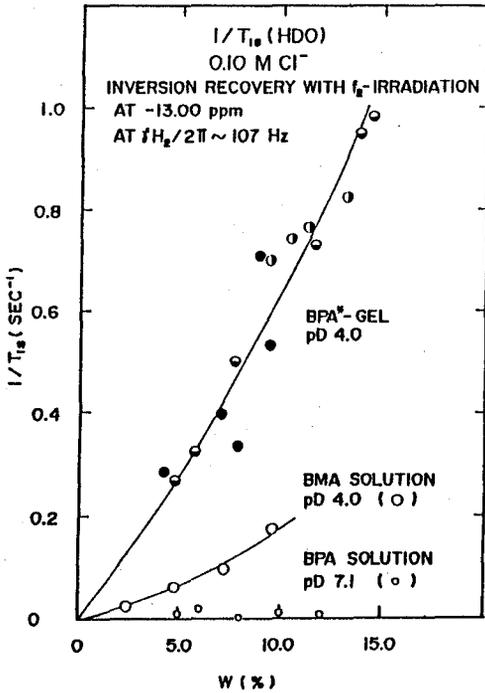
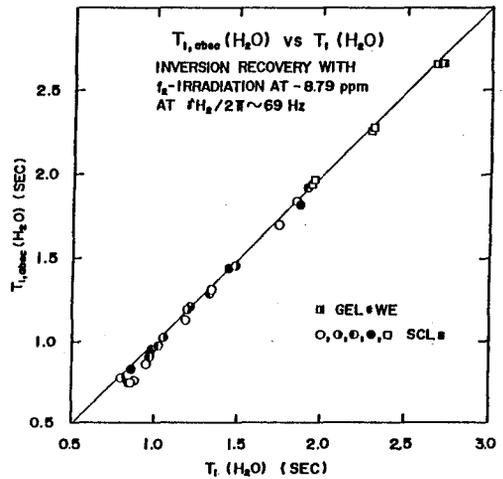


Fig. 4



P 27

巨大ヘモグロビン集合体形成赤血球の分子間交差緩和現象の研究
○上坂伸宏、¹曾我美勝、²恵良聖一、¹高崎昭彦、²加藤一夫、
²中村浩二、³長谷川節夫
日本医大・¹生理、³同3内科、¹藤田保衛大・総医研・分子生理、
²岐阜大・医・²生理

MAGNETIZATION TRANSFER CHARACTERIZATION OF HEINZ BODY-FORMING RED CELLS.

Uyesaka, N., ¹Sogami, M., ²Era, S., ¹Takasaki, A., ²Kato, K., ²Nakamura, K., and ³Hasegawa, S.

Dept. of physiol. and of ³Int. Med., Nippon Med. Sch., Tokyo, ¹Div. of Mol. Physiol., Inst. for Compreh. Med. Sci., Fujita Health Univ., Toyoake, and ²Dept. of physiol., Sch. of Med., Gifu Univ. Gifu, Japan

ABSTRACT

The magnetization transfer characteristics of Heinz body-forming red blood cells (RBC) were analysed, using RBC treated with phenylhydrazine and RBC from a patient with unstable hemoglobin (Hb) disease (Hb Yokohama), with the aim of elucidating the biophysical state of those Hb and related pathophysiologic events. We measured intermolecular cross-relaxation times (T_{IS}) from irradiated macromolecule protons to observed water protons and spin-lattice relaxation times (T₁) of water protons. We found that unlike conventional T₁ measurements, T_{IS} measurements are very sensitive for the detection of Hb-Hb interactions that are specifically due to the formation of compact large Hb aggregates within RBC, as well as amounts of bound water.

INTRODUCTION

The formation of membrane-bound Heinz bodies, i.e., the presence of precipitated, denatured hemoglobin (Hb) aggregates within red blood cells (RBC), is the primary event for hemolytic anemia in unstable Hb disease. We have recently demonstrated and confirmed a marked impairment in the deformability of Heinz body-forming RBC and conjunctival hemolytic significances, using our own developed porous thin metal filter with both 3- μ m and 5- μ m pores (1,2). In this study, we investigate the magnetization transfer characteristics of Heinz body-forming RBC to elucidate the biophysical state of those Hb, which is closely related to RBC deformability. As is well-known, RBC deformability is crucial to their performing the vital function of oxygen delivery.

MATERIALS AND METHODS

We measured intermolecular cross-relaxation times (T_{IS}) from irradiated protons to water protons with off-resonance (f₂) irradiation at 7.13, -4.00 or -8.79ppm, at a power level of $\gamma H_2/2\pi = 69$ Hz, as well as conventional spin-lattice relaxation parameter (T₁), according to the method introduced by Akasaka (3). To investigate effects of Heinz body-formation on the magnetization transfer within RBC, we used RBC treated with phenylhydrazine and RBC from a patient with unstable Hb disease (Hb Yokohama). Since the density distribution of RBC from

the patient extended over a broader range (1), the subpopulation of the RBC, i.e., light-density cells, middle-density cells and dense cells, were prepared using a discontinuous Percoll density gradient. The formation of Heinz bodies was examined by both scanning and transmission electron microscopy.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenylhydrazine-treated RBC showed dispersed formation of small Heinz bodies, while RBC from the patient with Hb Yokohama, especially dense cells, exhibited much larger, often solitary formation of Heinz bodies. Phenylhydrazine-treated RBC showed an apparent decrease in T₁s in a dose-dependent manner. Moreover, of interest is that RBC from the patient, dense cells in particular, revealed a more marked decrease in T₁s than phenylhydrazine-treated RBC; for example, T₁s value of normal control, 40mg/dl phenylhydrazine-treated RBC, and light-density cells, middle-density cells and dense cells from the patient, which were obtained with f₂-irradiation at -8.79ppm, were 20.3, 13.2, 13.4, 9.34, 3.64 sec, respectively. Nevertheless, such a pronounced difference between phenylhydrazine-treated RBC and RBC from the patient was not detected by the conventional T₁ measurements. Further, to our surprise, the T₁s value of dense cells was about the same as that of glutaraldehyde-fixed normal RBC, although the dense cells were intact (living) cells. Here, it is to be noted that T₁s values are primarily determined by spin diffusion, which strongly depends on inter-proton distances, molecular motions and molecular weights of macromolecules. Considering that Heinz bodies are very compact, large Hb aggregates, it is likely that the assembly can be regarded as a "megaromolecule" and that the Heinz body formation may markedly change inter-proton distances of Hb molecules. Also, it is noteworthy that the glutaraldehyde-fixation of RBC does not form an amorphous mass of aggregate, although the fixation usually leads to a strong restriction of molecular motions and an eventual increase in bound water molecules. Therefore, it can be concluded that T₁s measurements are very sensitive for the detection of Hb-Hb interactions that are specifically due to the formation of large Hb aggregates within RBC, as well as amounts of hydrated water within those. Thus, we propose that T₁s measurements could be of value in the study of unstable and thalassemic Hb disease.

REFERENCES

- (1) Hasegawa, S. et. al., *Biorheology* 30, 275-286, 1993
- (2) Nakamura, T. et. al., *Blood Cells* 20, 151-165, 1994
- (3) Akasaka, K. et. al., *Physica B* 164, 163-179, 1990

Key words: Nuclear magnetic resonance (NMR), Cross-relaxation times, Red blood Cells (RBC), Heinz bodies, Hemolytic Anemia.

○うえさかのひろ、¹そがみまさる、²えらせいいち、¹たかさきあきひこ、²かとうかずお、²なかむらこうじ、³はせがわせつお

**セッション : J Coupling and Chemical
Shifts**

(北見工大) ○福井洋之、馬場雄久、猪股寿典、
三浦宏一、松田弘喜

Calculation of Nuclear Spin-Spin Coupling Constants

Kitami Institute of Technology

○H. Fukui, T. Baba, H. Inomata, K. Miura, and H. Matsuda

Abstract: An *ab initio* SCF study of the angular dependence of the vicinal proton-proton coupling constants ${}^3J_{\text{HH}}$ has been carried out for ethane molecule. The four contributions to ${}^3J_{\text{HH}}$ (J^{FC} , J^{SD} , J^{OP} , and J^{OD}) have been computed using the 6-31G, 6-31G*, and [5s2p1d|2s] basis sets. The major contributions arise from the FC term. Since the SCF calculation of the FC term gives too large magnitude of coupling constants, the electron correlation corrections to the ${}^3J_{\text{HH}}^{\text{FC}}$ have been introduced to third order by using the Møller-Plesset perturbation theory. It has been shown that the third-order correction is very small compared with the second-order one.

1. Introduction

Dramatic advances in NMR spectroscopy brought about by multidimensional NMR methods have much increased the ability to measure NMR parameters such as nuclear spin-spin coupling constants. However, although it is now possible to measure many couplings, a satisfactory theoretical basis for their interpretation is lacking.

The vicinal proton-proton coupling constant ${}^3J_{\text{HH}}$ is the most useful coupling encountered in ${}^1\text{H}$ NMR spectroscopy. The widespread application of this coupling to stereochemistry rests on its strong dependence upon the dihedral angle ϕ between the coupled protons. Since the first report by Karplus¹ in 1959, many theoretical calculations of ${}^3J_{\text{HH}}$ have been published. However, most theoretical studies of ${}^3J_{\text{HH}}$ have used the semi-empirical methods of calculation and included the Fermi contact contribution alone. On the contrary, *ab initio* calculations of ${}^3J_{\text{HH}}$ are very scarce and we can enumerate only two papers^{2,3} of the angular dependence of ${}^3J_{\text{HH}}$ in ethane derivatives recently published by San-Fabian *et al.* They calculated ${}^3J_{\text{HH}}$ in ethane derivatives at the SCF level with inclusion of the four contributions to ${}^3J_{\text{HH}}$. It is well known that the SCF calculation of the Fermi contact term gives too large magnitude of coupling constants because of neglect of large electron correlation effect. So we have calculated the electron correlation effect on the angular dependence of Fermi contact contribution to ${}^3J_{\text{HH}}$ in ethane molecule.

Keyword: Coupling Constant, SCF, Correlation Effect

○ふくい ひろゆき、ばば たけひさ、いのまた ひさのり、みうら こういち、まつだ ひろき

2. Method

The intramolecular interactions that are responsible for the splitting of the nuclear spin sublevels were shown by Ramsey⁴ to be of four kinds: the Fermi contact (FC), the spin-dipole (SD), the orbital paramagnetic (OP), and the orbital diamagnetic (OD) interaction. These interactions may be grouped with respect to the order in which they contribute to nuclear spin-spin couplings in perturbation theory, the OD term contributing to first order and the remaining three to second order. The three interactions contributing to second order may further be grouped with respect to the nature of the excited states which the interaction mixes with the ground state. The FC and SD interactions have matrix elements between the ground state and the excited triplet states, but the OP term has matrix elements between the ground and the excited singlet states.

Two distinct approaches to the Hartree-Fock (HF) perturbation theory (PT), which maintain the self-consistency of the perturbed HF hamiltonian, are commonly in use in SCF calculation. One of them involves a direct self-consistent calculation of the perturbed Fock-Dirac density matrix.⁵ The other one, coupled Hartree-Fock (CHF) method, directly refers to the orbital picture.⁶ The density matrix approach has computational advantages because it offers the perturbed HF energy without the intermediate calculation of perturbed orbitals. In our SCF calculation of ${}^3J_{\text{HH}}$ we used the density matrix approach formulated by Dodds *et al.*⁷

We consider here a closed-shell system with $2n$ electrons and n doubly-occupied orbitals $\{\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_n\}$ constructed from m basis functions $\{\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_m\}$. Each of occupied and unoccupied orbital functions is expanded with m basis functions in the LCAO form:

$$\psi_p = \sum_{\mu=1}^m C_{\mu p} \chi_{\mu}, \quad p = 1, 2, \dots, m. \quad (1)$$

The coefficients $C_{\mu p}$ are given as the solution of the perturbed HF equation. We first treat the case of spin-independent perturbations and define the spin-independent density matrix R whose matrix element are given by

$$R_{\mu\nu} = \sum_{i=1}^n C_{\mu i} C_{\nu i}^*. \quad (2)$$

Dodds *et al.*⁷ presented the formulae for the perturbed HF energies in the case of two simultaneous perturbations, $h^{(1,0)}$ and $h^{(0,1)}$. If the basis set does not depend on the perturbations, one of the second-order perturbation energies $E^{(1,1)}$, bilinear in two spin-independent perturbations, is given by

$$E^{(1,1)} = 2\text{Tr}(R^{(1,0)}h^{(0,1)}). \quad (3)$$

The first-order density matrix $R^{(1,0)}$ is calculated by the following formula:

$$R^{(1,0)} = \sum_i^{\text{occ}} \sum_a^{\text{unocc}} \left[\frac{C_i^{(0)\dagger} f^{(1,0)} C_a^{(0)}}{\varepsilon_i^{(0)} - \varepsilon_a^{(0)}} (C_i^{(0)} C_a^{(0)\dagger}) + \text{Hermitian Conjugate} \right], \quad (4)$$

where $C_i^{(0)}$ and $C_a^{(0)}$ are the column vectors made from the coefficients of the unperturbed occupied and unoccupied orbitals with the unperturbed orbital energies $\varepsilon_i^{(0)}$ and $\varepsilon_a^{(0)}$. The first-order Fock matrix $f^{(1,0)}$ is given by

$$f^{(1,0)} = h^{(1,0)} + \sum_{\lambda\sigma} R_{\sigma\lambda}^{(1,0)} [2(\mu\nu|\lambda\sigma) - (\mu\sigma|\lambda\nu)]. \quad (5)$$

The matrices $R^{(1,0)}$ and $f^{(1,0)}$ must be solved iteratively.

For the case of the spin-dependent perturbations such as FC and SD interactions, we have to modify a little the definition of the density matrix. We define the spin-dependent density matrix $R^{ss'}$ by

$$R^{ss'} = \sum_{i=1}^n C_{\mu i}^s C_{\nu i}^{s'*}, \quad (6)$$

where s and s' denote the electron spin orientations, *i.e.*, α and β spin states. Equations (3) and (5) are modified to

$$E^{(1,1)} = \sum_{ss'} \text{Tr}(R^{(1,0)ss'} h^{(0,1)s's}), \quad (7)$$

$$f^{(1,0)ss'} = h^{(1,0)ss'} + \sum_{\lambda\sigma} \left[\left(R_{\sigma\lambda}^{(1,0)\alpha\alpha} + R_{\sigma\lambda}^{(1,0)\beta\beta} \right) (\mu\nu|\lambda\sigma) \delta_{ss'} - R_{\sigma\lambda}^{(1,0)ss'} (\mu\sigma|\lambda\nu) \right]. \quad (8)$$

Unperturbed orbital coefficients and energies are of course independent of the spin orientation. We must determine iteratively $R^{(1,0)ss'}$ and $f^{(1,0)ss'}$ by Eqs. (4) and (8).

3. Results and discussion

The angular dependence of the ${}^3J_{\text{HH}}$ coupling in ethane is represented as a truncated Fourier series in the dihedral angle ϕ of the form

$${}^3J_{\text{HH}}(\phi) = C_0 + C_1 \cos \phi + C_2 \cos 2\phi + C_3 \cos 3\phi. \quad (9)$$

We first calculated the four contributions to the ${}^3J_{\text{HH}}$ at 10° increments of the angle ϕ at the HF level of approximation using the 6-31G* and [5s2p1d|2s] basis sets. Both basis sets gave the same angular dependence of ${}^3J_{\text{HH}}$ ($= J^{\text{FC}} + J^{\text{SD}} + J^{\text{OP}} + J^{\text{OD}}$), *i.e.*, bell-shaped curves with maxima at $\phi \sim 0$ and $\sim 180^\circ$ and a minimum at $\phi \sim 90^\circ$. The [5s2p1d|2s] basis set gave slightly lower values of ${}^3J_{\text{HH}}$ than the 6-31G* basis at all of the angles ϕ , but the maximum difference was about 1 Hz. The individual contributions to ${}^3J_{\text{HH}}$ obtained with [5s2p1d|2s] basis were fitted to the truncated Fourier series of Eq. (9) by a least-squares method. The Fourier coefficients for the individual contributions are shown in Table 1. It is shown that the major contributions arise from the FC term.

It is well known that the HF approximation for the FC term gives too large magnitude of coupling constants. So we have corrected the Hartree-Fock value of the FC contribution to ${}^3J_{\text{HH}}$ with respect to the electron correlation. We have used the finite perturbation theory (FPT) method including two FC interactions as perturbations on the coupled nuclei. The second and third-order correlation corrections to the ${}^3J_{\text{HH}}^{\text{FC}}$ were calculated by numerical derivative of the Møller-Plesset perturbation energies obtained with unrestricted Hartree-Fock (UHF) spin orbitals. We first compared the correlation corrections for two basis sets, 6-31G and 6-31G*. Both basis sets gave the same trend of the angular dependence of ${}^3J_{\text{HH}}^{\text{FC}}$, but the 6-31G* basis showed a smaller magnitude of second-order correction by *ca.* 1 Hz

Table 1. Calculated Fourier coefficients (Hz) of Eq. (9) for the individual contributions to ${}^3J_{\text{HH}}$ in ethane.

	C_0	C_1	C_2	C_3
Hartree-Fock Value ^{a)}				
FC	9.07	-0.79	7.04	-0.07
SD	0.08	0.14	0.09	0.00
OP	0.68	-0.89	-0.04	-0.01
OD	-1.51	1.62	0.09	0.01
Correlation Corrections to the FC term ^{b)}				
2nd order	-3.59	0.48	-1.27	-0.13
3rd order	-0.14	-0.09	-0.09	0.01
Total Contributions				
calculation	4.60	0.46	5.82	-0.20
experimental value ^{c)}	8.02	-1.2	7.0	

^{a)} [5s2p1d|2s] basis used. ^{b)} 6-31G* basis used. ^{c)} Taken from ref. 2.

than 6-31G basis. The third-order correction was very small. The correlation corrections by 6-31G* basis were fitted to the truncated Fourier series and the coefficients are shown in Table 1. The correlation corrections to the non-contact contributions were neglected. The calculated Fourier coefficients of the total ${}^3J_{\text{HH}}$ are compared with experimentally determined ones in Table 1. Table 1 shows that the calculated Fourier coefficients are considerably small compared with the experimental ones. This may be due to incompleteness of the basis sets used.

References

- 1 M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **30**, 11 (1959).
- 2 J. San-Fabian, J. Guilleme, E. Diez, P. Lazzeretti, M. Malagoli, and R. Zanasi, *Chem. Phys. Lett.* **206**, 253 (1993).
- 3 J. San-Fabian, J. Guilleme, E. Diez, P. Lazzeretti, M. Malagoli, R. Zanasi, A. L. Esteban, and F. Mora, *Mol. Phys.* **82**, 913 (1994).
- 4 N. F. Ramsey, *Phys. Rev.* **91**, 303 (1953).
- 5 R. McWeeny, *Phys. Rev.* **126**, 1028 (1961).
- 6 R. M. Stevens, R. M. Pitzer, and W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.* **38**, 550 (1963).
- 7 J. L. Dodds, R. McWeeny, and A. J. Sadlej, *Mol. Phys.* **34**, 1779 (1977).

メニコンR&D*, 名工大 ○中島康喜*, 高橋憲助

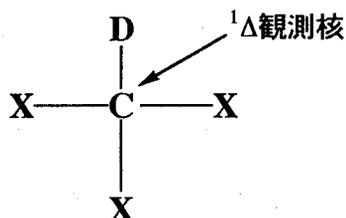
Downfield One-Bond Deuterium Isotope Effects on
¹³C NMR Chemical Shifts for some HalomethanesYasuki Nakashima[†] and Kensuke Takahashi[†]R&D Division, Menicon Co., Ltd.
Nagoya Institute of Technology.

One-bond deuterium isotope effects on ¹³C NMR chemical shifts (¹Δ) of substituted methanes were investigated in terms of substituent effects. Downfield one-bond isotope effects were observed in diiodomethane and iodoform. They are interpreted as the isotopic perturbation of heavy atom effects on ¹³C chemical shifts.

【序論】

分子中の原子をその同位体で置換すると、その近傍の原子核の NMR 化学シフトが小さく変化する。この現象は同位体シフトと呼ばれて古くから知られているが、過去のデータは精度に問題のあることが少なくない。我々は、¹³C NMR スペクトル上で観測される重水素同位体シフト (ⁿΔ: nは観測核と同位体置換サイトとの間の結合の数) を系統的に調べている¹⁾。これまでに、多くの有機化合物で ⁿΔ を精密に測定した。

今回は、ハロメタンの炭素で観測される ¹Δ について報告する。ほとんどの場合、¹Δ は高磁場シフトである。しかし、ジヨードメタンとヨードホルムにおいて、低磁場シフトの ¹Δ が観測された。



X: ハロゲンまたは水素

キーワード: ¹³C NMR、重水素同位体効果、ハロメタン、重原子効果、低磁場シフト

○なかしまやすき たかはしけんすけ

【実験】

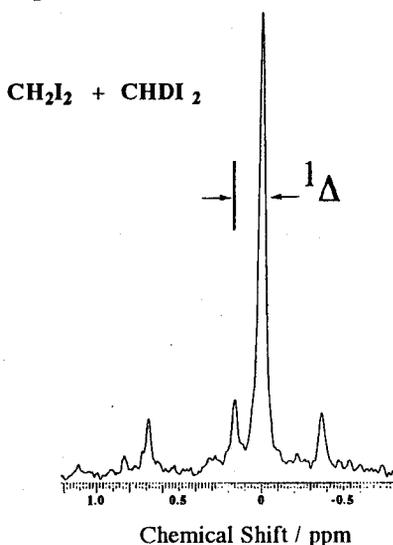


Fig.1 ^{13}C NMR Spectrum of a mixture of CHDI_2 and CH_2I_2 . Downfield $^1\Delta$ can be observed with CD coupling.

バリアン Gemini-200 FT-NMR 分光計 (50.3 MHz) を用い、水素体と重水素体の混合物を試料として、室温にて ^{13}C NMR スペクトルを得て、 $^1\Delta$ を測定した。測定精度は、0.003 ppm (3 ppb) よりも良い。 $^1\Delta$ は、重水素 1 原子当たり -472.2 から 287 ppb であった。低磁場シフトの同位体シフトの観測例を Fig.1 に示す。MNDO-PM3 分子軌道法計算は、MOPAC ver.6.02 (Ref.6) と Macintosh Quadra840AV 32ビットパソコンによって行われた。

【結果・考察】

得られた $^1\Delta$ を Table.1 にまとめる。ほとんどは重水素置換によって高磁場シフトするが、ジヨードメタンとヨードホルムでは低磁場シフトの $^1\Delta$ が観測された。また、各置換基の効果には、加減則がほぼ成立した。 $^1\Delta$ と置換基の数のプロットを Fig.2 に示す。Fig.2 より、 $^1\Delta$ に対して、メチル基は高磁場シフトの効果を与え、Cl の効果は小さく、Br、I は低磁場シフトの効果を与えることがわかる。

Br や I の重いハロゲン置換基は ^{13}C 化学シフトを大きく高磁場へシフトさせることが知られており、この効果は「重原子効果」と呼ばれている。この重原子効果に基づいて、次のような仮定をもとに、Fig.2 の $^1\Delta$ に対する置換基効果と低磁場シフトの $^1\Delta$ を説明できる。

Table.1 $^1\Delta$ for Substituted methane derivatives.

Comp.	Substituent	Number of Substituent	$^1\Delta$ / ppb ^{a)}	Solvent
CH ₃ D	--	0	-187.0 ^{b)}	(Gas phase)
CH ₂ DCH ₃	CH ₃	1	-284.0 ^{c)}	CD ₂ Cl ₂ /CS ₂
CHD(CH ₃) ₂	CH ₃	2	-375.9 ^{c)}	CDCl ₃
CD(CH ₃) ₃	CH ₃	3	-472.2 ^{c)}	CDCl ₃
CD ₂ Cl ₂	Cl	2	-199.4 ^{d)}	neat
CDCl ₃	Cl	3	-202.6 ^{d)}	neat
CD ₃ Br	Br	1	-140 ^{e)}	
CHDBr ₂	Br	2	-83	CDCl ₃
CDBr ₃	Br	3	-9	CDCl ₃
CD ₃ I	I	1	-49.0 ^{d)}	neat
CHDI ₂	I	2	162	CDCl ₃
CDI ₃	I	3	287	CS ₂

a) Per one deuteron. Negative values mean higher field shifts.

b) Ref. 2. c) Ref. 3. d) Ref.4. e) Ref.5. With large error (50 ppb).

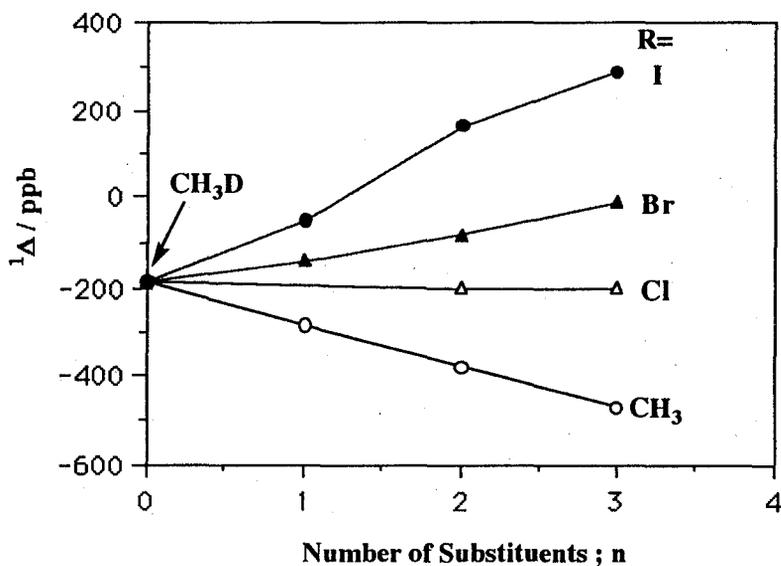
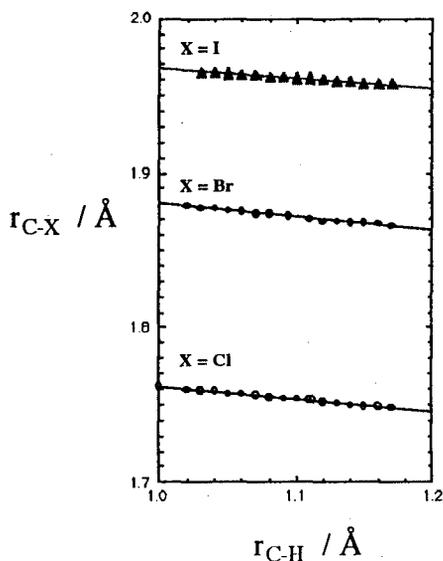


Fig.2. Substituent effects on $^1\Delta$ for CH_{3-n}DR_n (R=CH₃, Cl, Br, I).

置換される C-H の結合距離が長いほど、観測される $^1\Delta$ の高磁場シフトは大きい。これは、一般的に知られている¹⁾。ハロゲン置換基の場合は、これに加えて重原子効果の同位体摂動の影響があると考えられる。すなわち、重水素置換による二次的な同位体効果によって、C-X 結合 (X:ハロゲン) 距離が長くなり、重水素体での重原子効果が小さくなる。つまり、重原子効果が同位体摂動をうけて低磁場シフトが起こる。要するに、ハロメタンの $^1\Delta$ では、通常の高磁場シフトの要因に加え、低磁場シフトの要因も存在する。



Cl, Br, I の順に重原子効果の寄与は大きくなるので、重水素置換された時の低磁場シフト寄与が大きくなる。それゆえ、Cl, Br, I の順に $^1\Delta$ は低磁場シフト方向へ変化し、ヨウ素置換体では実際に低磁場シフトの $^1\Delta$ が観測される。

分子軌道法を用い、C-H 結合距離を固定して、C-X 結合距離を最適化すると Fig.3 のようになる。つまり、C-H 結合距離が短くなると (重水素置換された時) C-X 結合距離は長くなる。その度合いは、Cl, Br, I ではほぼ同じであり、上の仮定を支持する。

Fig.3. Plots between optimized C-X (r_{C-X}) and fixed C-H (r_{C-H}) bond lengths for CHX_3 (X=Cl, Br, and I).

【References】

- 1) Y. Nakashima *et al.*, Bull. Chem. Soc. Jpn., **62**, 1401 (1989),
Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **63**, 2025 (1990), Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **64**, 3694 (1991),
Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **64**, 3166 (1991), Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **65**, 2894 (1992),
Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **66**, 2143 (1993),
Y. Nakashima *et al.*, Magn. Reson. Chem., *in press*.
- 2) M. Alei, Jr. and W. E. Wageman, J. Chem. Phys., **68**, 783 (1978).
- 3) J. R. Wesener, D. Moskau, and H. Günther, J. Am. Chem. Soc., **107**, 7307 (1985).
- 4) J. W. Everett, Org. Magn. Reson., **19**, 169 (1982).
- 5) E. Breitmaier, G. Jung, W. Voelter, and L. Pohl, Tetrahedron, **29**, 2485 (1973).
- 6) MOPAC Ver. 6.00 (QCPE No. 445), J. J. P. Stewart, QCPE Bull. 1990, 10(4), 86;
Tsuneo Hirano, JCPE Newsletter, 1991, 2(4), 39; Revised as Ver. 6.02 by Jiro Toyoda,
for Apple Macintosh.

ab initio MO法によるバクテリオロドプシン発色団の
 ^{13}C 化学シフトの解析

○櫻井 実・和田光人・井上義夫 (東工大・生命理工)
 田村祐介・渡辺庸一 (日本クレイ)

Ab Initio Study of ^{13}C NMR Chemical Shifts for the Chromophore of Bacteriorhodopsin

○Minoru Sakurai¹, Mitsuhiro Wada¹, Yoshio Inoue¹, Yusuke Tamura² and Yoichi Watanabe²

¹Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology

²Cray Research Japan Limited

Theoretical analysis was performed for the ^{13}C chemical shifts of the retinal chromophore in bacteriorhodopsin by means of *ab initio* NMR shielding calculation, based on the localized orbital / local origin method. We carried out shielding calculation in double- ζ level for a retinal analogue in order to investigate the correlation between ^{13}C chemical shieldings and three factors; (1) change in strength of hydrogen bond between the positively charged Schiff base and its counterion, (2) conformational change about the C6-C7 single bond, and (3) electrostatic interaction between the chromophore and protein dipole. These calculations suggest that all the three factors are attributed to the chemical shift for the chromophore of bacteriorhodopsin.

1 研究目的

バクテリオロドプシン(bR)は、光プロトンポンプの駆動を担う光受容蛋白質で、活性部位にレチナール発色団をもつ。レチナール発色団は、プロトン化 Schiff 塩基結合を介して、アポ蛋白質のリシン残基に共有結合している。bR 中におけるレチナール発色団の構造・電子構造を調べるために、NMRによる実験的研究が数多く行われてきた。Fig.1 は、bR のレチナール発色団のプロトン化レチナール Schiff 塩基の化学シフト差を示したものである。この化学シフト差は、蛋白環境中におけるレチナールの構造・電子構造を反映している。逆に、このような化学シフト差を再現するような分子モデルを構築することで、蛋白環境中における発色団の構造を推測できる。本研究の目的は、精度の高い化学シフト計算を通じて、レチノイド蛋白質で観測される化学シフトを再現するような分子モデルを構築することにある。

2 計算方法

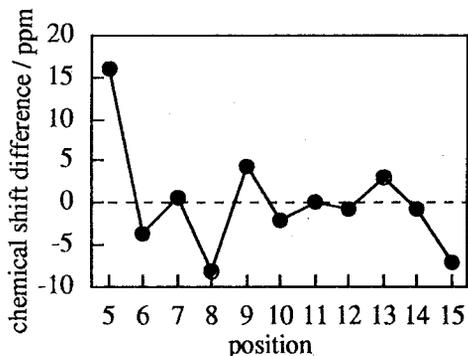


Figure 1. Plot of chemical shift difference observed between bacteriorhodopsin (Smith *et al.*, 1989) and protonated *all-trans* retinal Schiff base (Harbison *et al.*, 1985).

キーワード：バクテリオロドプシン、レチナール、 ^{13}C 化学シフト、*ab initio* MO、LORG

○さくらい みのる、わだ みつひと、いのうえ よしお、たむら ゆうすけ、
 わたなべ よういち

化学シフト計算には、HansenとBoumanの開発したLORG (Localized Orbital / Local Origin) 法)に基づくプログラムRPAC9.0をGaussian90に接続して用いた。この方法では、化学シフトの常磁性項にRPA (Random Phase Approximation) の理論を適用し、各局在化分子軌道に複素位相因子を作用させゲージ依存性をなくしている。モデル分子は、Gaussian92を用い構造最適化を行った。また、化学シフト計算、構造最適化の際には、4-31G基底関数系を使用し、Cray C90スーパーコンピュータで計算を実行した。

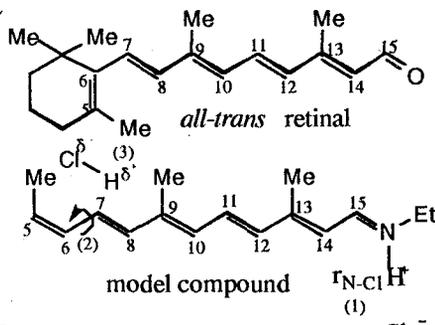


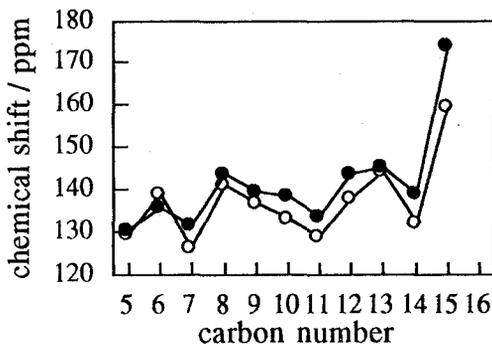
Figure 2.

レチナールのイオン環部分を簡略化したモデル分子(Fig.2)を用い、bRの吸収波長制御に関わるといわれている3つの要因 [(1) Schiff塩基と対アニオンとの距離の変化、(2) C6-C7単結合まわりのねじれ角の変化、(3) イオン環付近の双極子] と化学シフトの相関を調べた。

3 結果と考察

[レチナール Schiff塩基の化学シフト計算]

まず、化学シフト計算の信頼性を確認するために全トランスレチナール Schiff塩基の化学シフト計算を行った。Fig.3 に示すように、計算値は実験値をかなり定量的に再現する。C15の化学シフトで、計算値と実験値に大きなずれ(15 ppm)があるが、この問題は炭素・酸素の基底関数に分極関数をつけ加えることで解消される²⁾。また、プロトン化レチナール Schiff塩基についても計算値の信頼性を確認した。



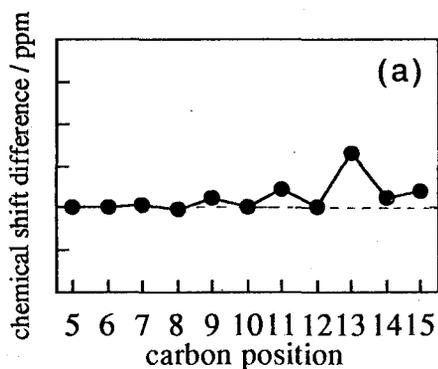
(1) Schiff塩基-対アニオン間の距離と化学シフトの相関

対アニオンとして塩素を置き、Schiff塩基-対アニオン間の距離(r_{N-Cl})と化学シフトの相関を調べた。偶数番の炭素核の化学シフト値は、 r_{N-Cl} にほとんど依存しない。それに対して、奇数番の炭素核の化学シフトは、 r_{N-Cl} 値が大きくなると低磁場シフトする。特にシフト量大きいのがC13の化学シフトで、Schiff塩基-対アニオン間の距離の変化を最も敏感に反映する。Fig.4(a)は、この距離が大きくなること($r_{N-Cl}=3.0 \rightarrow 3.5 \text{ \AA}$)に伴う化学シフト変化を図示したものである。この図からわかるように、Fig.1でみられるC13の低磁場シフトは、Schiff塩基-対アニオン間の距離が大きくなることに起因すると考えられる。

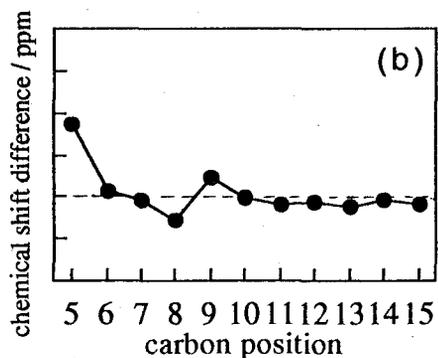
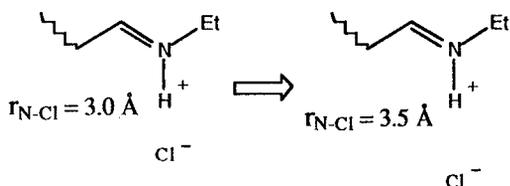
Figure 3. Comparison of the 4-31G (●) and experimental (○) [Harbison et al. (1985)] chemical shift for all-trans retinal Schiff base.

(2) レチナールのC6-C7単結合まわりのねじれ角と化学シフトの相関

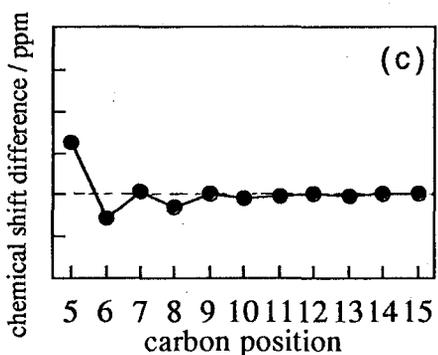
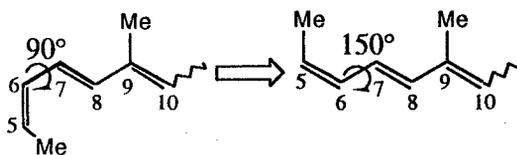
C6-C7単結合まわりのねじれ角(ϕ)と化学シフトの相関を調べた。計算の結果、C5、C8の化学シフトは ϕ の値に依存し周期的に変化することが見いだされた。特に、C6-C7単結合まわりのコンフォメーションがねじれ型($\phi \sim \pm 90^\circ$)から平面型($\phi \sim 180^\circ$)になった場合、C5化学シフトは低磁場へ、C8化学シフトは高磁場へシフトする。また、化学シフトテンソル主値の解析などから、この周期性の起源は5位メチル基と8水素と



(1) a weak interaction between the Schiff base and its counter anion



(2) planar 6-*s-trans* conformation



(3) dipole

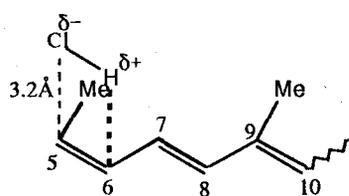
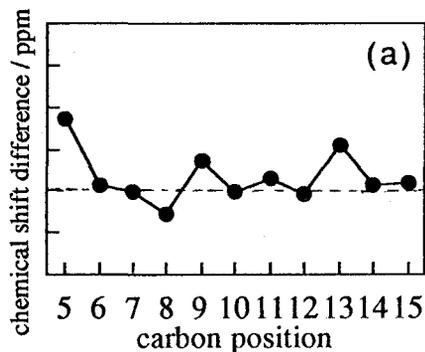


Figure. 4

の立体障害(γ -効果)にではなく共役系の分断・回復にあることを確認した。これらの事実は、イオンを有するモデル化合物(アルデヒド)について以前行った計算結果³⁾と一致する。Fig.4(b)はねじれ型($\phi = 90^\circ$)から平面型($\phi = 150^\circ$)になることに伴う化学シフト変化を图示したものである。この図からわかるように、Fig.1でみられるC5、C8の低磁場、高磁場シフトは、C6-C7単結合まわりのコンフォメーション変化でほとんど説明できる。

(3) ポリエン鎖近傍の双極子

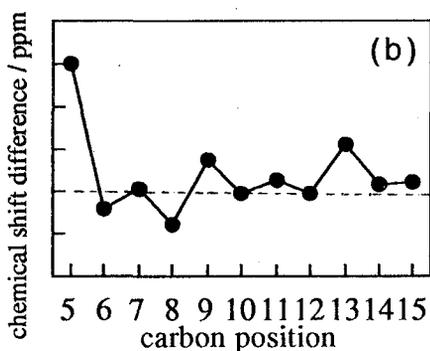
塩化水素をさまざまな位置、配向でモデル系に置き、蛋白質中の双極子がレチナル発色団の化学シフトに与える影響を調べる。双極子を二重結合を平行になるように配置した場合、化学シフトに最も大きな影響を与える。とくに、塩化水素の双極子を



(1) a weak interaction
between the Schiff base
and its counter anion

+

(2) planar 6-*s-trans*
conformation



(1) a weak interaction
between the Schiff base
and its counter anion

+

(2) planar 6-*s-trans*
conformation

+

(3) dipole

Figure 5.

C5=C6結合に平行に配置すると、Fig.1におけるC5からC8の化学シフトの挙動を説明するのに都合の良い化学シフト差が算出される(Fig. 4(c)).

[化学シフト計算の立場からみたbRのレチナール発色団の構造]

Fig.5(a)は、(1)、(2)の効果の重ね合わせを図示したものである。この二つの効果だけでもbRについて観測される化学シフト差をある程度説明できる。しかし、Fig.1におけるC5の異常な低磁場シフトの原因を十分説明することはできない。Fig.5(b)は、(1)、(2)及び(3)の効果の重ね合わせを図示したものである。この三つの効果の重ね合わせで、C5の異常な低磁場シフトも含めて、bRについて観測される化学シフト差をかなりよく再現できる。

4 結論

以上の化学シフト計算の結果から、bR中のレチナール発色団に関して次の結論が引き出された。

(1) シッフ塩基と対アニオンとの相互作用はモデル化合物に比べ弱い。

(2) 6-*s-trans*型構造をとっている。

(3) イオン環に双極子があるとすれば、C5=C6結合に平行あるいはそれに近い配向で位置し、負電荷はC5上にある。

[文献]

(1) Hansen, Aa. E.; Bouman, T. D. *J. Chem. Phys.*, 1985, 82, 5035-5047. (2) 和田、櫻井、井上、田村、渡辺 投稿準備中 (3) Wada, M.; Sakurai, M.; Inoue, Y.; Tamura, Y.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 1537-1545.

セッション：天然物の構造解析
(Structural Analysis of Natural Products)

¹⁵N-HMBC and ¹³C-¹³CDQFCOSY Spectroscopy using Pulsed Field Gradient for coherence selection

Jun Uzawa and Hiroyuki Koshino

The Institute of Physical and Chemical Research(RIKEN)

We have presented about ¹⁵N NMR observation by HMBC using Pulsed Field Gradient (PFG) at natural abundance ¹⁵N compounds (tubercidin cyclonucleoside, thiamine hydrochloride and nicotine) in the 32nd symposium last year. And then, We reported other results in some annual meeting and Experimental NMR Conference.

In this symposium, we show some experimental results about observation of ⁿJ_{H,N} values from 2D HMBC spectra, and improvement on HMBC by using a set of duration time (eg 53ms and 68ms) to avoid the null point.

¹³C-¹³CDQFCOSY spectrum of menthol at natural abundance are shown.

静磁場に磁場勾配パルス (Pulsed Field Gradient、PFG) を加える測定法は、分子の大きさの違いから拡散速度を測定する方法とコヒーレンス選択に用いて位相回しを省略して1スキャンで二次元NMRを測れるようにする方法や軽水シグナルや溶媒の信号を消すために利用されている。また、PFGを高性能ホモスポイルパルスとして、適切なタイミングに入れことによりパルスの不完全性を補正し、最小積算回数の減少を計っている。さらに、HMQCやHMBCのようないわゆるインバース測定で大きな障害となるt1ノイズ消去に威力を発揮することが発表されている¹⁾。演者らはこれまで非常に困難であった¹Hの直接結合していない天然存在比率の¹⁵N信号の検出にあって良い結果を得、昨年の本討論会で発表し、その後日本化学会、日本農芸化学会、Experimental NMR Conference等で報告してきた。今回はクロスピークからⁿJ_{H,N}を測れること、HMBC測定法において、ⁿJ_{H,N}にあわせて設定する時間(Δ)を2個組み合わせると信号が消えないようにしたことを報告する。また、t1ノイズが抑えられることによって、天然存在比率のまま¹³C-¹³CDQFCOSY法が可能になったことを示す。

装置は日本電子製α600にFGHX5プローブを、α400にFGTH5プローブを付け、内臓のパルス系列を一部変更して使用した。

キーワード Pulsed Field Gradient, PFG-¹⁵N-HMBC, ¹³C-¹³C-PFGDQFCOSY, chlorophyll a

ふりがな うざわじゅん、こしのひろゆき

① クロロフィルの¹⁵Nスペクトル

クロロフィルなどポルフィリンには4個の窒素があり、この化学シフトがわかれば中心金属の配位状態などがわかり、従来NMRで¹Hや¹³Cから間接的に得ていた情報が直接的にわかる。もし窒素から3ボンド以内にスピ結合しているプロトンがあればHMBCによりそれぞれの窒素シグナルが帰属され、化学シフトがわかるはずである。第1図にクロロフィルaの¹⁵N-HMBCスペクトルを示す。f1軸は高磁場を含めたプロジェクションであり、¹⁵NH₄⁺/¹⁵N₃/DMSOをゼロPPMとしたときの値である。

CHLa: 27mg/CDCl3+2%CD3OH F6HMBC P11=60 GR=49.4/10: 0.6ms 18min!

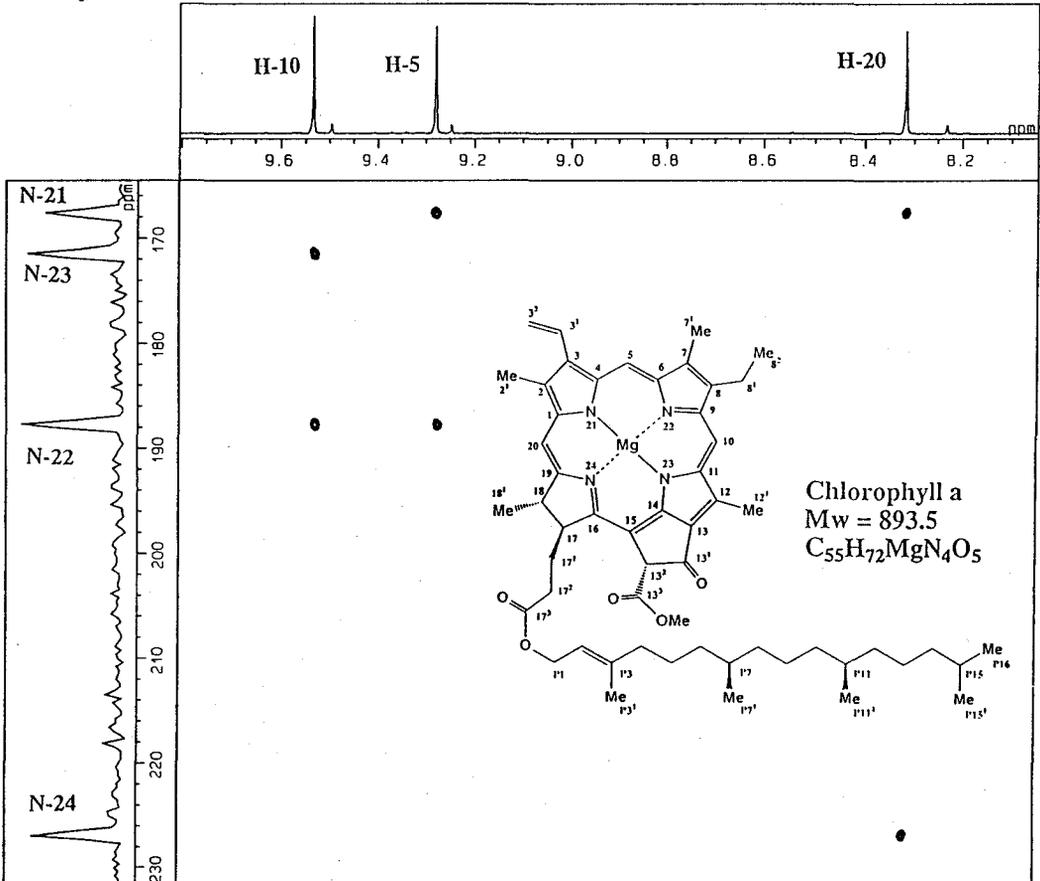


Fig.1 PFG ¹H-¹⁵NHMBC Spectra of Chlorophyll a at natural abundance
sample volume;27mg in 0.3ml CDCl₃+2%CD₃OH, △;60ms, window;sinebell -60
to 160 for f2 and no-window for f1, total measuring time 18min.

② ⁿJ_{X,H}にあわせて設定する時間を2個組み合わせるHMBC法

HMBC法は極めて有用な測定法であり、現在でも様々な改良が試みられている。PFGを使うことにより、最大の障害であったt1ノイズの問題がほぼ解決されたと言って良い。

演者らは ${}^1J_{x,H}$ にあわせて設定する時間(Δ)を2個組み合わせることで良い結果が得られたのでここに示す。良く使われる60msの場合、16.6Hzでクロスピークの強度がゼロになってしまうが、53msと68msを組み合わせるとこれを避けることができる。この組合せによりイソプロピリデンアデノシンを測定した例を第2図に示す。図中の1Dスペクトルはf2スライスであり、 ${}^2J_{N,H}$ が読み取れた。この値はINEPTで測定した値とほぼ一致した²⁾。

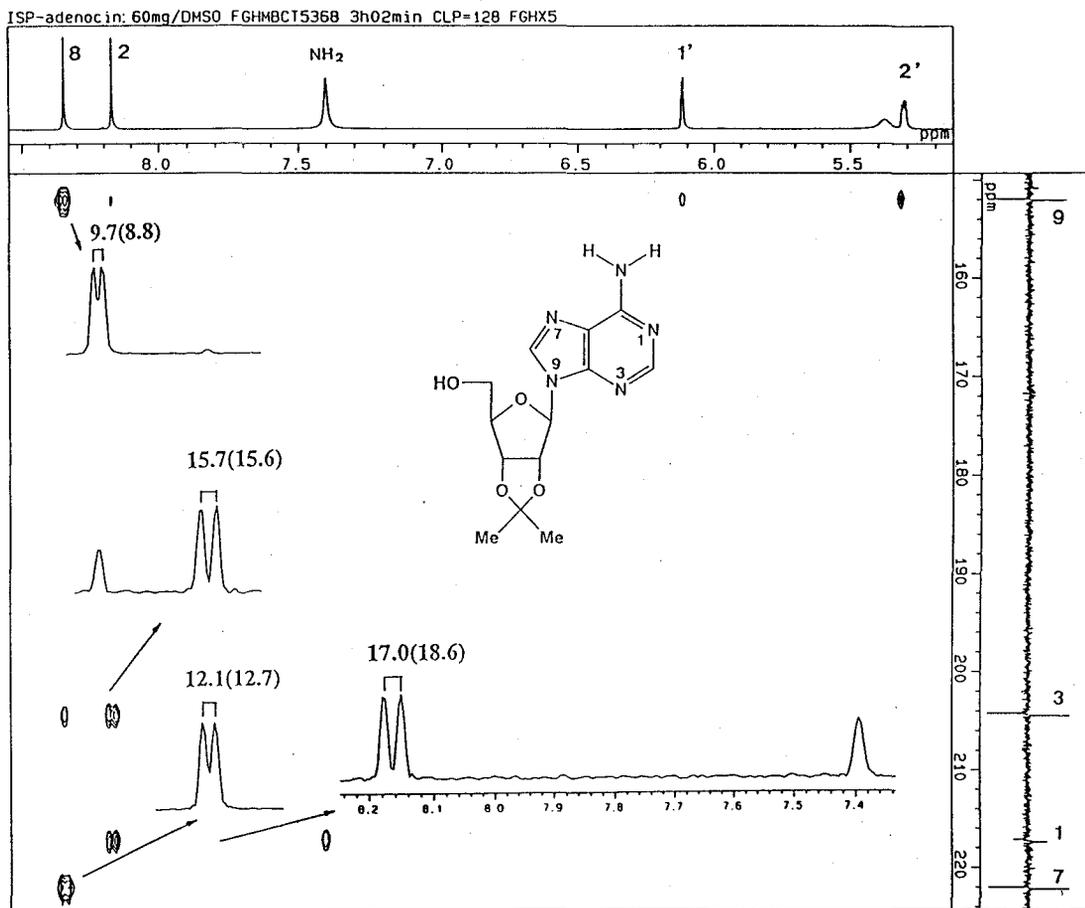


Fig.2 PFG 15N-HMBC spectra of 2'3'-O-isopropylideneadenosine
sample volume;60mg in DMSO-d6 0.5ml, Δ ;53ms and 68ms, parenthesis data
was reference 2, total measuring time;3hour.

③ ${}^{13}\text{C}-{}^{13}\text{C}$ DQFCOSY法

${}^{13}\text{C}-{}^{13}\text{C}$ の相関を通常の ${}^1\text{H}-{}^1\text{H}$ と同様にCOSY (P、N)やDQFCOSYタイプで見るとは天然存在比率のままでは不可能であり、10%以上 ${}^{13}\text{C}$ ラベルされた化合物で成功しているに過ぎない³⁾。PFGをコヒーレンス選択に使うことにより不必要な信号成分を1/10,000程度除去できれば可能となるはずである。第3図にメントールの ${}^{13}\text{C}-{}^{13}\text{C}$ DQFCOSYスペクトルを示す。

基本的な感度は ^{13}C の検出感度によって決まるが、INEPTやDEPTを組み合わせる方法、 ^{13}C -RELAY法等についても検討している。

Menthol: 290mg/CDCL3 F6DQFCS120 FGTH5 400

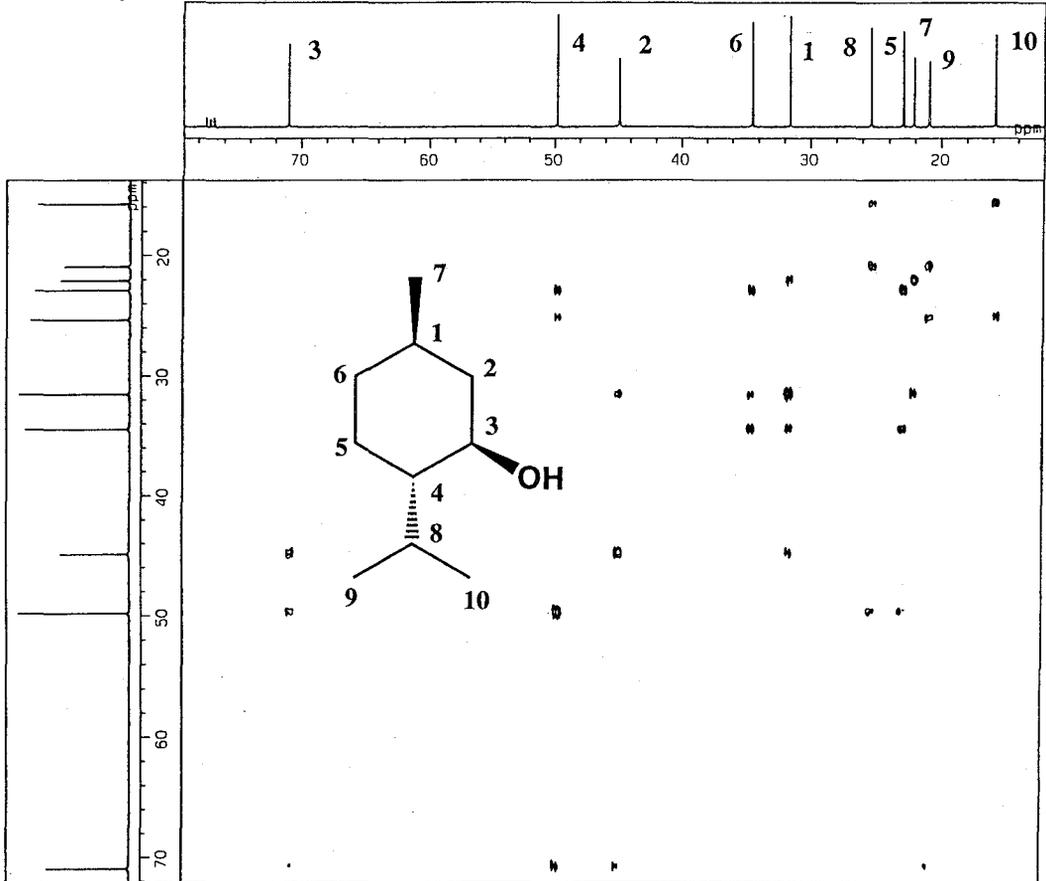


Fig.3 PFG ^{13}C - ^{13}C DQFCSIY spectra of menthol
sample volume;290mg in CDCl₃ 0.4ml, total measuring time;22hour.

結び

すでにPFGをコヒーレンス選択に使うことはタンパクのNMRによる研究で常道となってきた。HMBCやHMQCでもPFGなしでは格段の差が出てしまう。各種測定法の改良もPFGを前提に考えざるを得ない。

参考文献

1. R.E.Hurd and B.K.John, *J. Magn. Reson.*, 91, 648(1991). W. Willker and D. Leibfritz, *Magn. Reson. Chem.*, 31, 287(1993). P.L. Rinaldi and P.A. Keifer, *J. Magn. Reson. A* 108, 259(1994).
2. J. Uzawa and K. Anzai, *Can. J. Chem.*, 65, 2691(1987).
3. M. Ubukata, J. Uzawa and K. Isono, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 2213(1984).

選択的励起と磁場勾配パルスを用いた2次元NMR

(理研) O越野広雪、鷗澤 洵

Selective 2D-NMR Experiments Using Pulsed Field Gradient
 ---2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC
 and 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY---

The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

Hiroyuki Koshino and Jun Uzawa

We propose new 2D-selective(sel)-PFG-TOCSY-HMQC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC and 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY experiments together with 2D-sel-PFG-HMBC-COSY and 2D-sel-PFG-HMBC-RelayedCOSY experiments. These 2D-sel-TOCSY type pulse sequences are combinations of 1D-TOCSY using π Gaussian pulse for selective excitation and 2D-HMQC, HMBC and HMQC-COSY with pulsed field gradient (PFG) for coherence selection. These pseudo 3D experiments with 1D-sel-TOCSY for preparation period could apply to several type organic molecules at natural abundance, and may be very useful to analysis of complicated 2D-NMR data of HMBC, HMQC-COSY and HMQC-TOCSY spectra.

磁場勾配パルスを用いることによりコヒーレンス経路の選択が位相回し法で行なうよりもより正確に出来るようになり、その結果HMBC法の様なt1ノイズが大きな問題となる測定法では不要信号の消去の点で非常に優れた測定が可能になった。その一つの例として我々が昨年度から報告している天然存在比のまま測定する¹⁵N HMBCが上げられる¹⁾。また磁場勾配パルス法は最小積算回数的大幅な減少を可能にするなどの利点を有することから2次元NMRだけでなく3次元NMR法への応用も数多く報告されている。さて、複雑な天然有機化合物や糖鎖のNMR研究において2次元NMRだけではシグナルを十分に分離できない場合は数多い。実際の構造解析においては種々の2次元NMRとNMR以外のデータも含めた総合的な解析が一般的に行なわれている。この背景にはこれらの化合物は蛋白質のように¹³Cや¹⁵Nでラベルすることが困難なため、感度の面から3次元NMRが非現実的な測定法である場合が多いためである。3次元NMRを測定できない場合、この問題の一つの解決策として選択的励起パルスを用いることによる3次元NMRの2次元化が考えられる。すでに2D-sel (selective)-TOCSY-COSY, 2D-sel-TOCSY-NOESYなどが報告されている²⁾。またF1側の分解能の向上を目的に¹³Cに選択的パルスを用いたSel-HMBC法なども報告されている³⁾。

今回我々は通常の2次元NMR法では帰属が困難である化合物の解析に有用な測定法の開発を目的とし、ガウス型パルスをプロトンの選択的励起パルスとした1D-sel-TOCSY

キーワード 選択的励起、磁場勾配パルス、TOCSY、HMQC、HMBC、HMQC-COSY

こしの ひろゆき、 うざわ じゅん

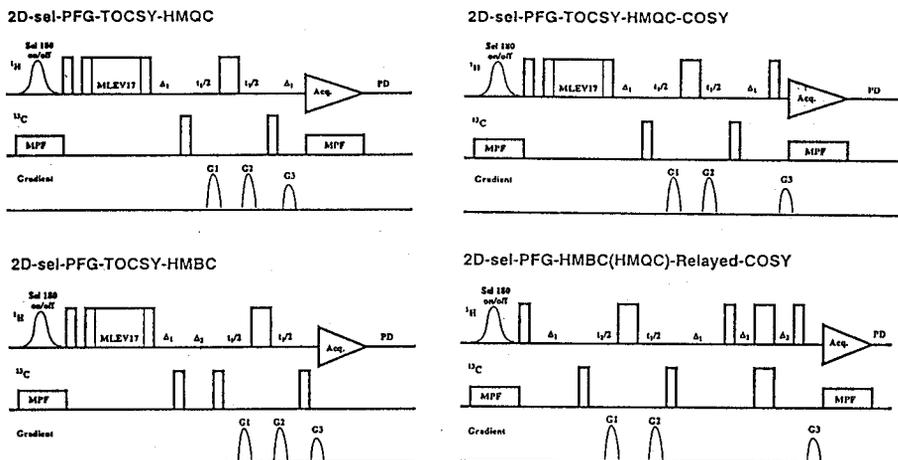


Fig. 1 Pulse sequences of 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY and 2D-sel-PFG-HMBC(HMQC)-Relayed-COSY. Ratio of gradients are G1:G2:G3 = 2:2:1.

と磁場勾配パルスを用いた2D-PFG (Pulsed Field Gradient)-HMQC法あるいはHMBC法を基本とする測定法のパルスシーケンスを作成し実験を行なったので報告する。作成したパルスシーケンスはFig. 1 に示す様に2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY法である。2D-sel-PFG-TOCSY-HMQCのパルスシーケンスをそのまま使って $\Delta 1$ をロングレンジに設定した測定は2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC-Dと表記してlow pass J filterを用い1 3 Cをデカップリングしない2D-sel-PFG-TOCSY-HMBCと区別した⁴⁾。また実用的価値は余りないと思われるが、比較のために2D-sel-PFG-HMBC(HMQC)-COSY, 2D-sel-PFG-HMBC(HMQC)-Relayed-COSY法の実験も行なった。すべての測定は日本電子製 $\alpha 600$ を用い、スペクトルは絶対値表示である。ガウス型パルスのときに1 3 Cをデカップリングしているのはそのプロトンの励起効率を良くするためと、隣接するプロトンの1 3 Cサテライトの励起を避けるためである。

プロトンの化学シフトの重なりのために帰属が困難な系のモデルとして1-heptanolと2-nonanoneの1対1混合物について1-heptanolの1位を選択的に励起した実験を行なった。結果をFig. 2に示す。2D-sel-PFG-TOCSY-HMQCでTOCSYのミキシングタイムを変化させることにより帰属が可能である。ここでは40ms, 90ms, 200msのデータを示す。さらに、2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSYの結果から2、3、6位の帰属を確実にすることが出来る。また2D-sel-PFG-TOCSY-HMBCではH-2からC-4へ、7位のメチル基のH-7からC-5への相関が見られることより4位と5位の帰属を行なうことが出来る。

次にFig.3にsucroseを用いた実験結果と磁化移動経路の説明図を示す。Fructoseユニットの3位(H-3)を選択的に励起した2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC-D, の結果を示した。前者はTOCSYで磁化移動されたユニット内の帰属を行なうのに優れているのが特徴で、後者の特徴はH-3からC-1へのロングレンジ相関が見られるようにTOCSYで磁化移動されたユニット内のプロトンからユニット内外のカーボンとの相関が観測される点である。Fig.3cにはsucroseを用いた2D-sel-PFG-HMBC-Relayed-COSY法の実験結果を示す。この測定法ではプロトンとカーボンが分離している系にお

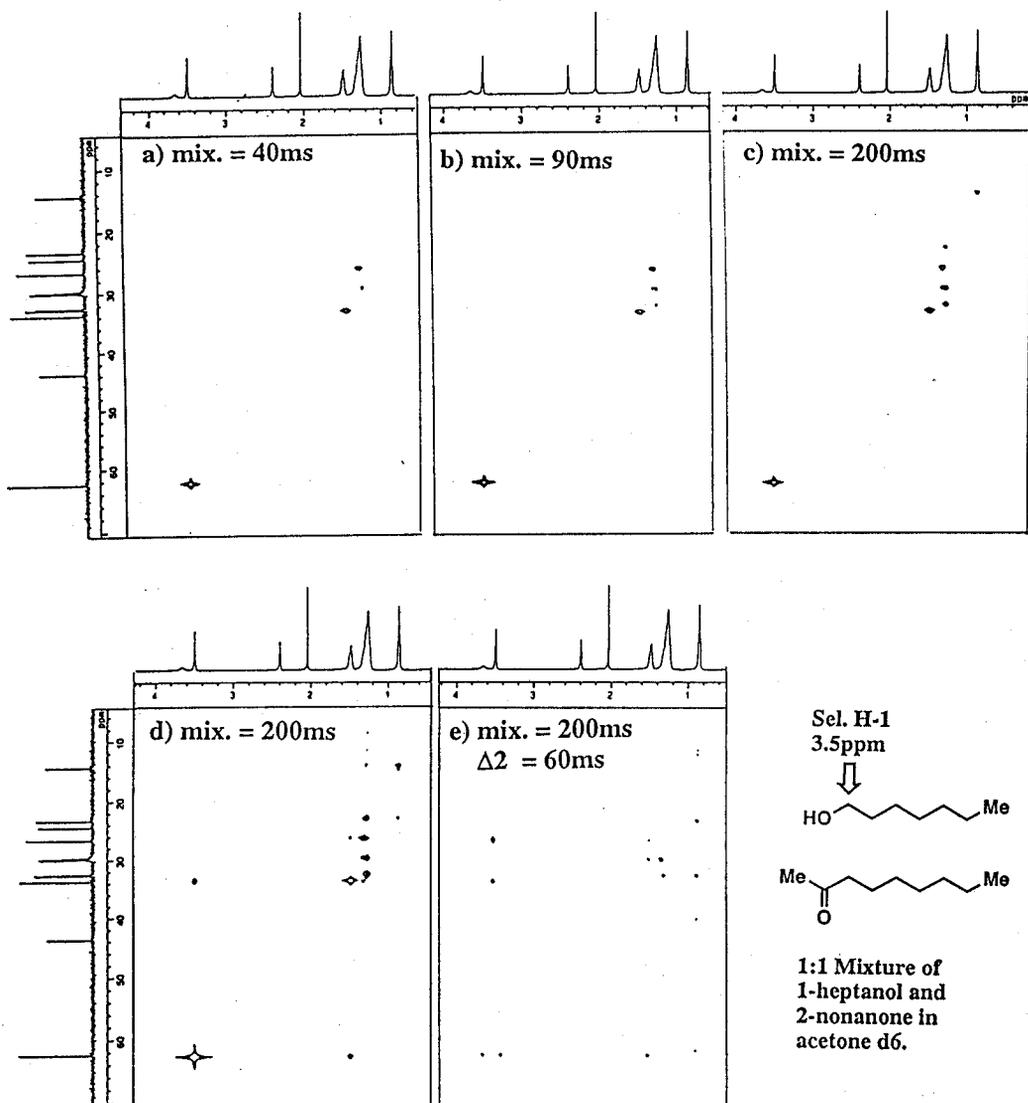


Fig. 2 a), b), c) 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC spectra of 1:1 mixture of 1-heptanol and 2-nonanone. d) 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY spectrum. e) 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC spectrum. H-1 of 1-heptanol at 3.5ppm is selectively excited with Gaussian π pulse in each experiment. All spectra measured at 600MHz using JEOL-Alpha 600.

いて、2D-sel-PFG-HMQC-Relayed-COSY法と2D-sel-PFG-HMBC-Dから得られる情報以上のものは含まれていない。このことはHMBC-COSY法やHMBC-Relayed-COSY法の特長が次の二点にあることから理解できると思われる。一つはカーボンの化学シフトが同じのためにHMQC-(Relayed)-COSY法で(Relayed)-COSYで展開されるクロスピークの帰属が出来ない場合で、このときはHMBC-(Relayed)-COSY法でロングレンジ相関によるカーボンの化学シフトによる分離が可能になる。もう一つはプロトンの化学シフトが同じのためにHMBCの帰属が出来ない場合で、HMBC-(Relayed)-COSY法によって(Relayed)-COSYで展開されるクロスピークのパターンからHMBCの帰属を行なえる。

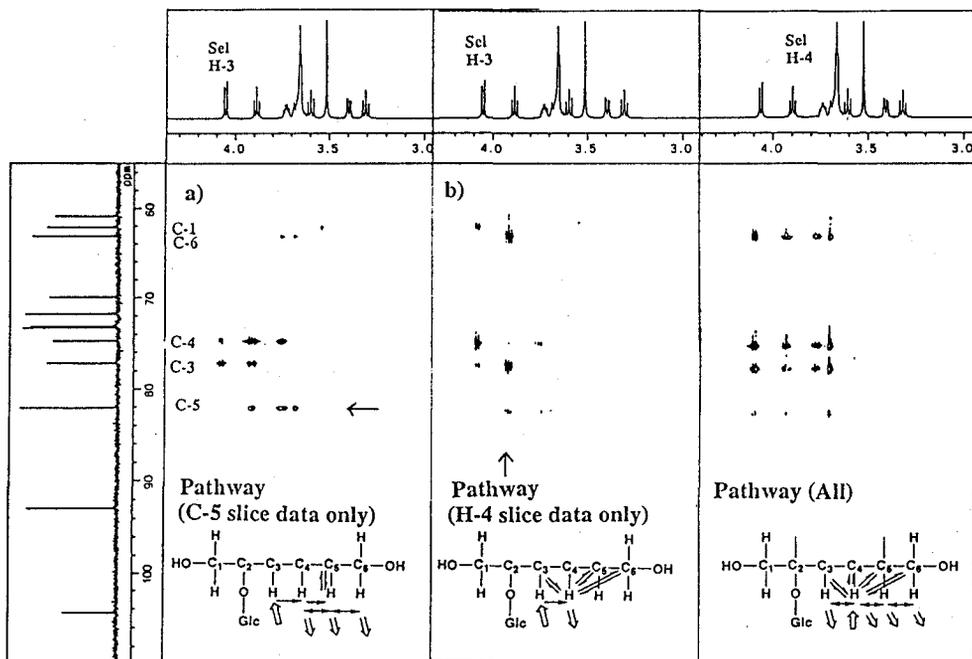


Fig.3 a) 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY spectrum of sucrose in D₂O. H-3 (fructose unit) is selectively excited. Mix. = 40ms. b) 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC-D spectrum of sucrose. H-3 is selectively excited. Mix. = 40ms, $\Delta 1 = 83$ ms. c) 2D-sel-PFG-HMBC-Relayed-COSY spectrum of sucrose. H-4 is selectively excited. $\Delta 1 = 100$ ms, $\Delta 2 = 30$ ms.

\Rightarrow selective excitation \rightarrow TOCSY \rightleftharpoons HMQC(HMBC)
 \leftarrow COSY(relayedCOSY) \Rightarrow detection

今回報告する2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMBC, 2D-sel-PFG-TOCSY-HMQC-COSY法は通常の1Dあるいは2Dの TOCSYやPFG-HMQC,PFG-HMBC法の帰属をより容易かつ確実にすることを可能にする点にあると思われる。選択性やミキシングタイムの設定条件の検討あるいは期待される S/N の予想は1D-sel-TOCSYなどで行なうことが可能である。今後2D-sel-TOCSY-COSY, 2D-sel-TOCSY-NOESY法などと合わせて解析をすることにより、ラベル化が困難でかつ通常の2次元NMR法だけで十分に解析できなかった様々な化合物へ応用できるものと期待される。

参考論文

- (1) 1a) 鶴澤 洵ら 第32回NMR討論会講演要旨集 147頁(1993). 1b) J. Uzawa et al 35th ENC Abstracts p155 (1994). 1c) H.Koshino et al 35th ENC Abstracts p101 (1994).
- (2) 2a) 降旗一夫、瀬戸治男 第28回NMR討論会講演要旨集 83頁(1989). 2b) S. W. Homans J.Magn. Reson. 90, 557(1990). 2c) J.M.Nuzillard and G. Massiot J.Magn. Reson. 91, 380(1991). 2d) C. Boumestand et al. J.Magn. Reson.A 106, 168(1994).
- (3) 3a) J.M.Bernassau and J.M. Nuzillard J.Magn. Reson. B. 103, 77(1994).
3b) J.M.Bernassau and J.M. Nuzillard J.Magn. Reson. A. 108, 248(1994).
- (4) 降旗一夫、瀬戸治男 第31回NMR討論会講演要旨集 5頁(1992).

HMBC法の新しい応用測定(2)

D-HMBC、HMQC-RELAY、HMBC-RELAY法について

東大農化、東大分生研 ○降旗一夫 瀬戸治男

NEW APPLICATION TECHNIQUES OF HMBC (2)
 ---D-HMBC, HMQC-RELAY AND HMBC-RELAY---

K. Furihata, *H.Seto

(Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

(*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo)

In order to overcome the problems of a widely used NMR technique, HMBC, we have developed a new technique named decoupled-HMBC (D-HMBC) which enables to observe ^1H - ^{13}C long-range coupling separated by four or five bonds with small coupling constants ($J < 2\text{Hz}$). Its application to structural studies of a unusual peptide antibiotic promothiocin B and a macrolide antibiotic monazomycin are described.

In addition, two new NMR techniques, HMQC-RELAY and HMBC-RELAY 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 advantage of these techniques over the HMBC method.

天然有機化合物の構造研究においてHMBC法は最も優れた測定法であるが、このデータの質が構造決定の迅速さを大きく左右する。HMBC法の問題点の一つは、強度の強いピークにおいて1-ノイズが強く現れ、解析を困難にすることである。もう一つの問題は、ブロードなプロトンシグナルについてクロスピークが観測しにくい点にある。これらの問題を解決する一つの試みとして、Decoupled-HMBC(D-HMBC)法の開発と検討を試み、新規化合物promothiocin Bの構造決定において威力を発揮することができたので報告する。また、HMBC-COSY法に続きHMBC-RELAY法を試み、良好な結果を得ることができたので合わせて報告する。

Decoupled-HMBC法について

D-HMBC法はHMQC法のパルス系列をそのまま使用する(図1)。HMBC法との大きな差はlow pass J-filterを使用せず、long rangeスピン展開時間を二カ所所設定し、更にシグナルの取得の段階で炭素シグナル全領域(0-230ppm)を広帯域デカップリングすることである。デカップリングパルスとしてはMPFを使用した。通常HMBC法ではシグナルはanti-phaseのシグナルとして観測されるため、シグナル取得の段階ではデカップリングができない。またanti-phaseシグナルの特性として、degital resolutionよりも小さなスピン結合を有するシグナルは、正負シグナル間でのキャンセリングが生じS/Nの低下を招く原因となる。D-HMBC法では、2つのスピン展開時間を設定しスピンエコーによりスピンをin-phase方向に収束させる。その段階で積算と同

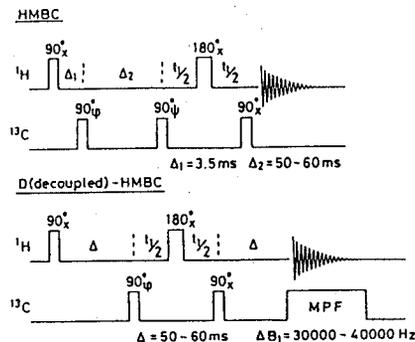


図1. パルス系列。
 a). HMBC、b). D-HMBC

D-HMBC、HMBC-COSY、HMBC-RELAY

ふりはた かずお、せと はるお

時に広帯域デカップリングを行う。この方法は anti-phase によるシグナルのキャンセルの防止、またデカップリングによるシグナルの単純化、S/Nの向上を目的としている。本方法は2つの長い展開時間を設定するため、 T_2 によりS/Nの低下が問題となる。したがって、実験をする場合は T_2 を考慮してパラメーターを設定する必要がある。

D-HMBC法のモノゾマイシンへの応用

大環状マクロライドのような化合物の構造決定における一つの問題点は、ラク톤の位置の決定が困難となることである。それは、 $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}-$ の系において $^3J_{\text{OH}}$ が小さく、サンプルが微量になると、この関係を明らかにすることが困難となってくるためである。図2にD-HMBCとHMBCのスペクトルを示す。HMBCスペクトルに対して、D-HMBCスペクトルでは、カルボニル炭素のクロスピークのS/Nが優れていることがわかる。またオキシメチン領域に観測されるクロスピークにおいても明確な差が認められる。

新規化合物promothiocin Bの構造決定

promothiocin-Bの構造決定に際し、従来のNMR測定法によって得られたデータにもとづき、図3に示す部分構造が明らかとなった。しかし、Thz(1)、Thz(2)、Oxa(1)、Oxa(2)の構造、結合位置は不明のまま残っていた。この関係を明らかにするために、展開時間を120msecに設定してD-HMBCを測定したところ、図3に示す遠距離スピン結合が新たに観測された。Thz(1)とThz(2)については、スピン結合定数が小さいためHMBCでは観測され

なかった5位のメチンプロトンから3結合離れたカルボニル炭素への遠距離スピン結合(3J)が観測され、Thz(1)とVal、Thz(2)とOxa(2)との結合が明らかとなった。また、ピリジン環の4位のメチンプロトンからOxa(2)の4位の炭素に遠距離スピン結合(4J)が観測され、Oxa(2)の4位、5位の炭素の帰属が明らかとなり、4位にN、5位にOが置換していることが確定した。更にOxa(2)の5位のメチンプロトンから、ピリジン環の2位の炭素にも遠距離スピン結合(4J)が観測された。しかし、Oxa(1)とOxa(2)の部分構造に関しては依然として証拠が得られなかったため、展開時間を500msecに設定し測定を行った(図4)。その結果、Oxa(1)の5位のメチンプロトンから4結合離れた2位の4級炭素及び4位に結合しているカルボニル炭素に遠距離スピン結合(4J)が観測され、Oxa(1)の結合位置が確定した。また、Oxa(2)のメチンプロトンから2位の炭素(3J)とピリジン環の3位の炭素(3J)にも遠距離スピン結合が観測されたことからOxa(2)の構造が判明し、本物質の全構造を図3のように決定した。

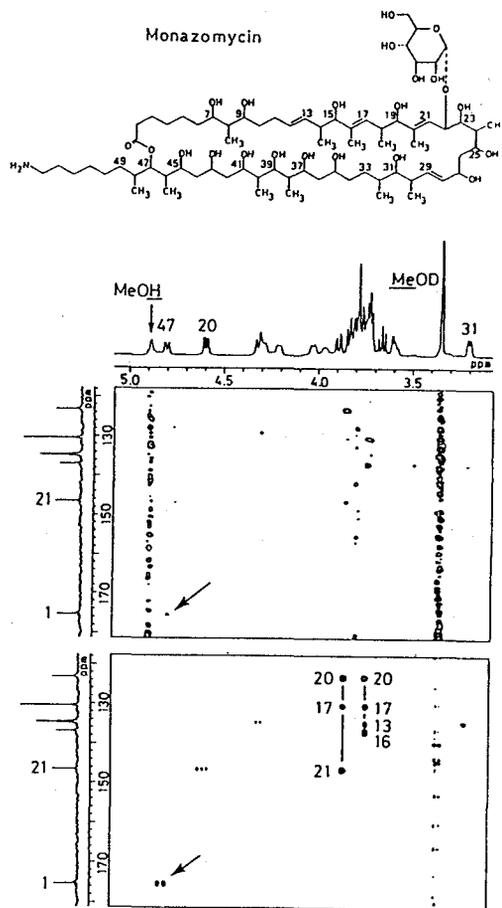


図2. モナゾマイシン。

$t_1 \times t_2 = 256 \times 512$ point

$f_1 \times f_2 = 23000 \times 4500$ Hz

times = 64 x 2, PD = 1.0 sec, 試量 30 mg

a). HMBCスペクトル。

$\Delta = 60$ msec, absolute-mode

b). D-HMBCスペクトル。

$\Delta = 120$ msec, half-absorption mode

¹³C-decoupled HMBC correlation

----- : Δ 120 msec
 ————— : Δ 500 msec

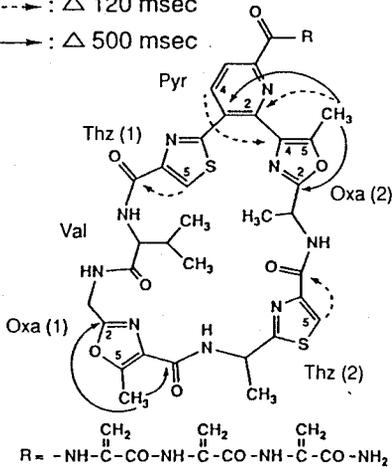


図 3. promothiocin B の構造。

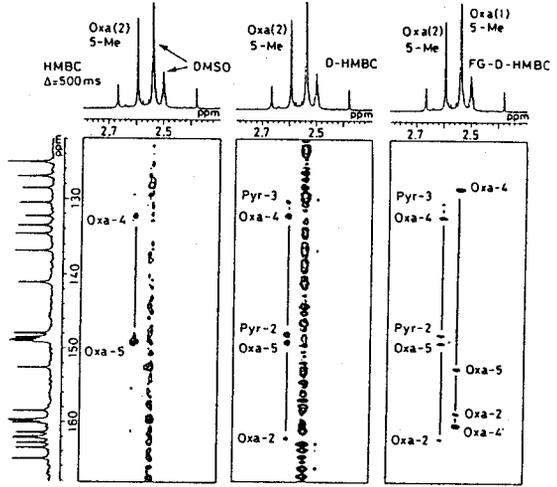


図 4. promothiocin B の D-HMBC スペクトル。
 Δ = 500msec、half-absorption mode
 a) HMBC b) D-HMBC c) FG-D-HMBC

HMQC-RELAY、HMBC-RELAY法について

¹J_{CH}を利用したHMQC-COSY、HMQC-HOHAHA法を応用した実験は多数報告されている。しかしHMQC-RELAY法の応用はほとんどなく、またlong range J_{CH}を利用したHMBC法との併用例は報告がない。今回我々はHMBC-COSY、HMBC-HOHAHA法に続きHMQC-RELAY、HMBC-RELAY法の検討を行い良好な結果を得ることができた。またNMRの新しいテクニックとしてのField Gradient法をこれらの方法に応用し、その問題点についても検討した。

図5にHMBC-RELAY法のパルス系列を示す。FGパルスを使用する場合は180パルスの前後とシグナル取得の手前にgradientを使用する。HMBC-RELAY法は、HMBC-COSY法によりスピンの展開した磁化を更にもう一度relay展開する。decouplingパルスはHMBC-COSY法同様、炭素領域全域をデカップリングするMPFを使用した。

α-サントニン

図6にα-サントニンのD-HMBC、HMBC-COSY、HMBC-RELAYスペクトルを示す。D-HMBCスペクトルでは、2位のプロトンから3結合離れた位置にある4位と10位の炭素シグナルが検出されるが、2結合離れた1位あるいは3位の炭素シグナルの検出はできていない。また6位のプロトンからは4、5、7、8、11のクロスピークが観測される。

これに対してHMBC-COSYスペクトルでは、2位のプロトンから新しく1、3、5の炭素シグナルが観測される。また6位のプロトンからは、14位と3位のシグナルが観測される。HMBC-RELAY法では、このHMBC-COSY法で観測したプロトンをRELAY展開する。2位のプロトンからは新しいシグナルが検出されていないが、

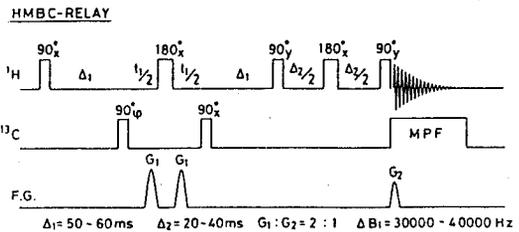


図 5. パルス系列。
 a) HMBC-RELAY

6位のプロトンからは、新しく13位のメチル基と12位のカルボニル基のシグナルが観測された。スペクトルが複雑になりシグナルが重なった場合、クロスピークの解析が困難となってくるが、その場合、6位のプロトンのように分離のよいプロトンから少しでも構造解析の手がかりとなるシグナルを検出することは重要となってくる。

ポートミシンへの応用

図7にポートミシンのHMBC-COSY、HMBC-RELAY スペクトルを示す。放線菌が生産するポリケチド化合物では、 $-\text{CH}_c-\text{CH}_b(\text{CH}_3)_a-\text{CH}_d-$ の部分構造を有するものが多くある。この場合スピン結合定数が $J_{AB}=7\text{Hz}$ 、 $J_{BC}=10\text{Hz}$ 、 $J_{BD}=2\text{Hz}$ 程度の値をとることが多い。このようなスピン系に於いては小さな値に対して、HMQC-COSY、HMQC-RELAY法は有効なクロスピークを与えない。このような化合物では、HMBC-COSY、HMBC-RELAY法は非常に有効であることが判明した。

HMBC-COSYスペクトルでは、8位のプロトンが8Me、8、7、9についてクロスピークを与えた。また6位のプロトンは、6Me、6、5、7にクロスピークを与えた。しかし、5位のプロトンからはクロスピークが観測されなかった。HMBC-RELAYスペクトルでは、8位からはHMBC-COSYでは認められなかった7位のメチルと5位のシグナルが新しく観測された。また6位からは8Me、8、7Me、5、9位の新しいクロスピークが明確に観測された。このように、6位、8位のプロトンから、この6位の炭素以外は5位から9位までの6員環の炭素シグナルすべてについてクロスピークが観測された。

また5位のプロトンからは

HMBC-COSYではクロスピークは観測されていないが、RELAY実験では2Me、2、3、3Me、4、4Me、5の側鎖由来のクロスピークが認められた。

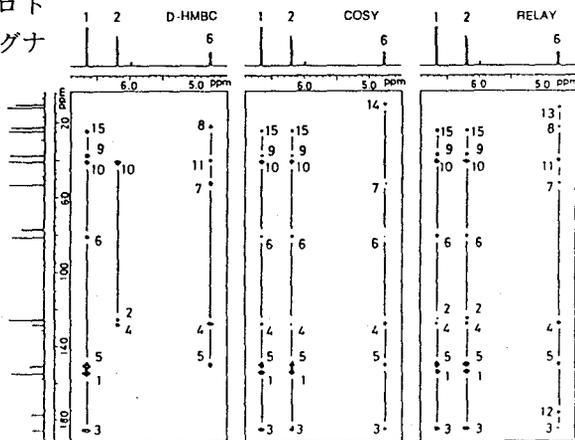
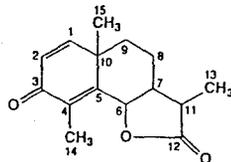


図6. α -サントニンのPFGスペクトル。

a). D-HMBC, b). HMBC-COSY, c). HMBC-RELAY
 $t_1 \times t_2 = 256 \times 512$ point, $f_1 \times f_2 = 23800 \times 3000$ Hz
 times = 16, PD = 1.0 sec, $\Delta_1 = 60\text{msec}$, $\Delta_2 = 20\text{msec}$

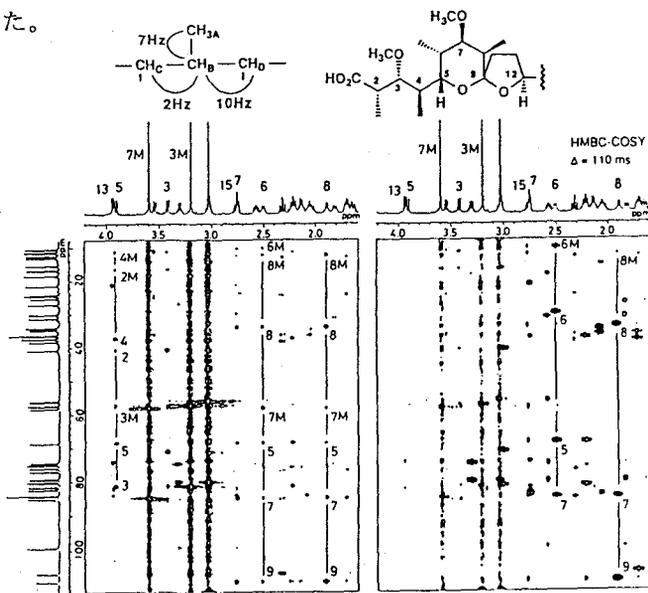


図7. ポートミシン。

a). HMBC-RELAY, b). HMBC-COSY
 $t_1 \times t_2 = 150 \times 512$ point, $f_1 \times f_2 = 14000 \times 22500$ Hz
 times = 64 x 2, PD = 1.0 sec, $\Delta_1 = \Delta_2 = 110\text{msec}$
 half-absorption mode

Structure Elucidation of C_2 Molecules from a viewpoint of the Non-equivalency of Equivalent Nuclei in NMR (Part IV).

Discrimination of Intra- and Inter-unit NOEs by PASS-NOESY

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

In a C_2 symmetric molecule containing a CbHb--CaHa--Ca'Ha'--Cb'Hb' system as a structural fragment, discrimination of intra-unit (Ha/Hb) NOE and inter-unit (Ha/Hb') NOE was achieved by PASS (Paired Satellite Selection)-NOESY (1D variant of ω_1 hetero half-filtered NOESY). The ${}^L J_{CH}$ would appear as the displacement of NOE signals in two 1D subspectra of PASS-NOESY. Hence, the difference of ${}^L J(Ca/Hb)$ and ${}^L J(Ca/Hb')$ can tell the NOE peak arising from intra- or inter-unit NOE.

1.はじめに

近年、天然有機化合物に、興味深い C_2 対称構造を持つ化合物が見出されてきている。 C_2 対称化合物は、等価な二つのユニットから成っており(Fig.1)、通常の 1H -NMR、 ${}^{13}C$ -NMRの手法では二ユニット分のシグナルが同じ位置に重なってあらわれるため、構造解析を進める上で特有の問題を生じる。そのうち、いくつかの点について、これまでの本討論会で考察して来た。今回は、ユニット内NOEとユニット間NOEの区別について報告する。

通常のNOESYまたはNOE差スペクトルでは、Fig.1のような系でH-a/H-b間にNOEが観測されたとしても、H-aとH-a'、H-bとH-b'は区別できないので、実際にNOEが存在するのはユニット内NOE(H-a/H-b)、ユニット間NOE(H-a/H-b')のどちらであるかは区別できない。

すでに私達は、高精度に ${}^L J_{CH}$ を求める方法として、PASS (Paired Satellite Selection)-TOCSY (1D ω_1 hetero half-filtered TOCSY)法を開発し報告した²⁾。PASS-TOCSY法では二つの1Dスペクトル中にあらわれる相関ピークが、選択励起した ${}^{13}C$ との ${}^L J_{CH}$ で互いにずれている。この方法は1D法なので分解能が高く、また、 J 値をピークのずれとして得るため、キャンセレーションもなく、正確な値が得られる。

${}^{13}C$ の天然存在比は1.01%と低いため、通常、分子中に1箇所だけ ${}^{13}C$ が入ったアイソトポマーを観測することになる。すなわち、Fig.1のような対称な系においてもC-a、C-a'のうち一方(C-aとする)だけが ${}^{13}C$ である非対称なアイソトポマーを選択的に観測できる。H-bとH-b'はほぼ同じ位置に重なって現れるが、 ${}^L J(C-a/H-b)$ と ${}^L J(C-a/H-b')$ は異なる値であり、PASS-TOCSY法では区別が可能であった³⁾。

そこで、あらたにPASS-NOESY法を作成し、NOEピークから得られる ${}^L J_{CH}$ の値の違いによって、H-a'/H-b'(ユニット内NOE)とH-a/H-b'(ユニット間NOE)の区別を試みた。

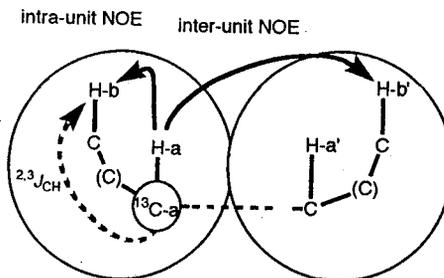


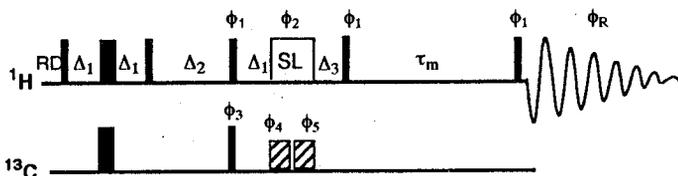
Fig.1. Intra- or Inter-Unit NOE ?

Key Words: C_2 symmetric molecule, isotopomeric asymmetry, PASS-NOESY, intra-/inter-unit NOE

かわばたじゅん、ふくしえり

2. PASS-NOESY法

PASS-NOESYシーケンス(Fig.2)はPASS-TOCSY法のTOCSY部分をNOESYに置き換えて作成した。 ^{13}C 選択パルスは、出力を減衰させた矩形パルスである。矩形パルスの不完全性や、この間の ^1H の磁化の展開による感度の損失と不要シグナルを抑えるため、選択励起部分に改良を加え、二つの ^{13}C パルスとも選択パルスとし、この間 ^1H にスピロックをかけることとした⁴⁾。選択励起した ^{13}C に直接結合した ^1H のサテライトシグナル($^1J_{\text{CH}}$ によるダブルット)の一方に ^1H の観測中心(ν_0)を置くと、ダブルットの一方のシグナルみを選択的に励起することができる(PASS (Paired Satellite Selection))。これを両サテライトについて行い、二つのサブスペクトルを測定すると、NOEピークは選択励起した ^{13}C との $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ で互いにずれてあられる。



RD=repetition delay

$\Delta_1=1/2(^1J_{\text{CH}})$

Δ_2 =BIRD delay

$\Delta_3=1/4(^1J_{\text{CH}})$

τ_m =NOE mixing time

$\phi_1=1\ 3\ 2\ 0$

$\phi_2=02\ 12$

$\phi_3=08\ 28$

$\phi_4=02\ 12\ 22\ 32$

$\phi_5=0\ 2\ 1\ 3$

$\phi_R=02\ 12\ 22\ 32$

Fig.2. Pulse sequence of PASS-NOESY

Narrow and wide bars represent 90° and 180° pulses, respectively.

SL and striped bar represent spin lock pulse and selective 90° pulse, respectively.

p-dimethylaminocinnamaldehyde(1)のPASS-NOESYサブスペクトル

はじめに、非対称なモデル化合物p-dimethylaminocinnamaldehyde(1)のC-8位のPASS-NOESYサブスペクトルを測定した(Fig.3)。得られた二つのサブスペクトルでH-8/H-9のNOEピークが $^{\text{LR}}J_{\text{C-8/H-9}}=+24\text{Hz}$ だけずれてあられることを確認した。この値はPASS-TOCSYサブスペクトルで求めた値と一致した。

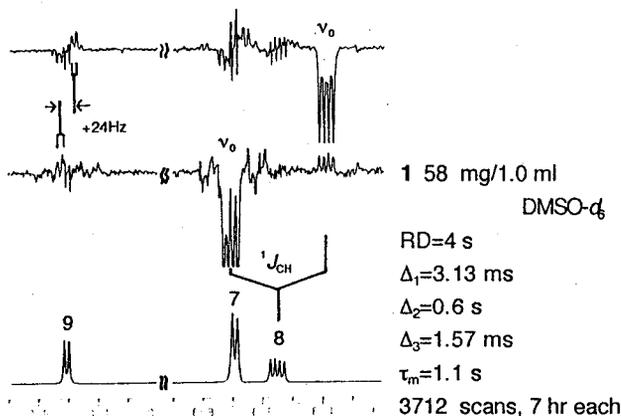
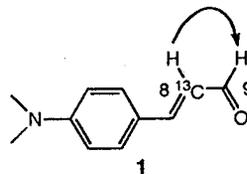


Fig.3. Part of PASS-NOESY Spectra of 1



E-stilbene(2)のPASS-NOESYサブスペクトル—ユニット間NOE

次に、対称なモデル化合物E-stilbene(2)のC-7位のPASS-NOESYを測定した(Fig.4)。さきに述べたように、7位のカーボンの一方(C-7とする)が ^{13}C であるアイソトポマーが観測される。ユニット内NOE(H-7/H-2,6)によるシグナルでは $^3J_{\text{C-7/H-2,6}}$ だけの「ずれ」があり、ユニット間NOE(H-7/H-2',6')ではほとんど「ずれ」がない($^4J_{\text{C-7/H-2',6'}} \sim 0\text{Hz}$)はずである。実際のサブスペクトルでは「ずれ」はみられず、ユニット間NOEが強くあらわれていることがわかった。分子モデル(Fig.5)からは、H-7/H-2,6は 0.25nm 、H-7/H-2',6'は 0.18nm と、ユニット間のH-7/H-2',6'の方が近接しており、測定の結果を支持した。

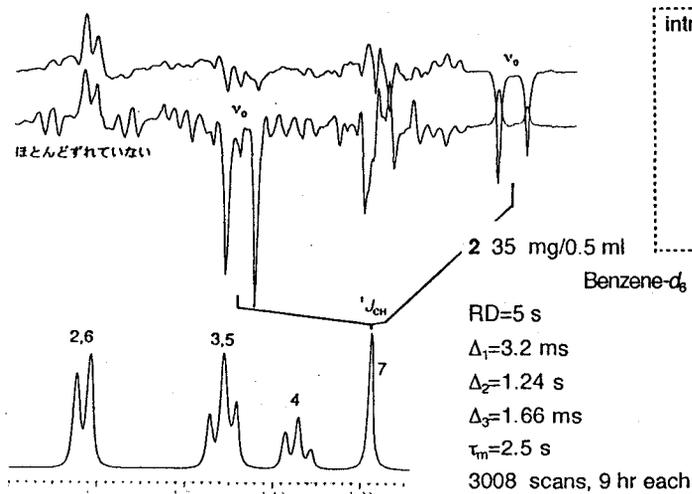


Fig.4. Part of PASS-NOESY Spectra of 2

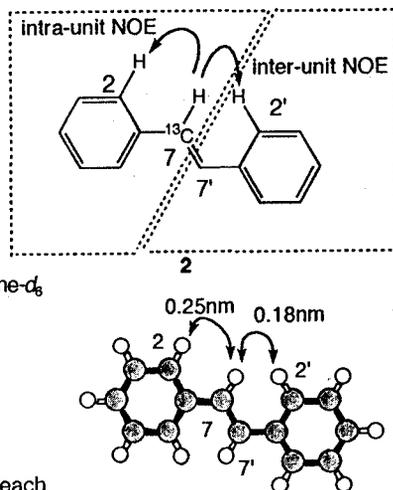


Fig.5. Molecular Model of 2

cycloshizukaol A (3)のPASS-NOESYスペクトル--ユニット内NOE

cycloshizukaol A (3)は、チャラン科植物ヒトリシズカから得られたセスキテルペン二量体である。等価なH-9/H-9'間にNOEが存在することから、分子全体は中心の12員環に対し向こう側へ折れ曲がっていることがわかっている⁵⁾。この化合物の通常のNOESY、NOE差スペクトルで観測されるH-9(9')/H-1(1')のNOEが、ユニット内NOE、ユニット間NOEのどちらであるかを区別するため、3のC-9位のPASS-NOESYを測定した(Fig.6)。得られたサブスペクトルのH-1位のピークは+6Hzだけずれていることから、これはユニット内のNOE($^3J_{C-9/H-1}=+6\text{Hz}$)であることがわかった。

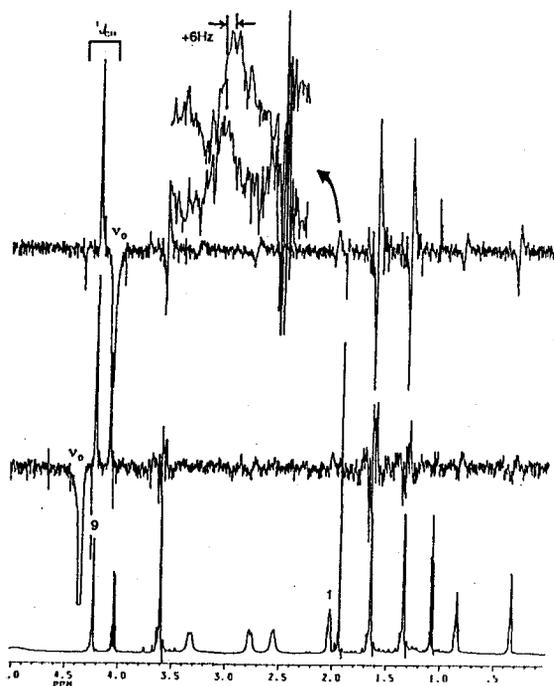
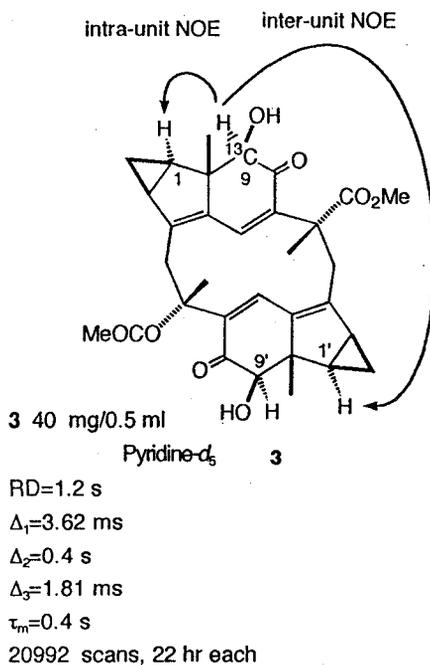


Fig.6. Part of PASS-NOESY Spectra of 3



3.おわりに

今回、PASS-NOESY法の二つのサブスペクトルにおけるNOEピークのずれから高精度に ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ が得られることを利用して、 C_2 対称化合物のユニット内NOEとユニット間NOEの区別に初めて成功した。ただし、この方法でユニット内NOE(Fig.1のH-a/H-b)、ユニット間NOE(Fig.1のH-a/H-b')の区別ができるのはNOEピークのずれとしてあらわれる ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ の値、 ${}^{\text{LR}}J(\text{C-a/H-b})$ と ${}^{\text{LR}}J(\text{C-a/H-b}')$ が有意に異なる場合に限られる。

Reference

- 1) M. Kurtz, P. Schmieder and H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 1329 (1991)
- 2) E. Fukushi and J. Kawabata, *J. Magn. Reson.*, **A108**, 103-105 (1994)
- 3) 川端 潤、福士江里、第32回NMR討論会講演要旨集、P.315 (1993)
- 4) J. -M. Bernassau and J. -M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.*, **A104**, 212-221 (1993)
- 5) J. Kawabata, E. Fukushi and J. Mizutani, *Phytochemistry*, **32**, 1347-1349 (1993)

P 35

Modified-HOHAHAシーケンスによるオリゴペプチドの帰属
 ○渡邊永治¹, 田巻誠², 秋山稔¹, 野崎祐勝³, 村松一郎¹
 (¹立教大・理, ²東邦大・理, ³城西大・薬)

Assignment of oligopeptide by means of modified-HOHAHA

Eiji Watanabe¹, Makoto Tamaki², Minoru Akiyama¹,
 Sukekatsu Nozaki³ and Ichiro Muramatsu¹

¹ Department of Chemistry, Rikkyo University, Nishi Ikebukuro, Toshimaku, Tokyo 171,

² Department of Chemistry, Toho University, Miyama, Funabashi, Chiba 274,

³ Faculty of Pharmaceutical Science, Josai University, Sakado, Saitama 350-02

Sequential-specific assignment techniques are in widespread use for the analysis of peptides. It is generally difficult to assign the signals of same chemical shifts in the NOESY and ROESY spectra. Kessler et al., determined the sequence of the peptide with the cross peaks from NH^i to NH^{i+1} using the TORO pulse sequence combining TOCSY and ROESY. In the present work, in order to assign the 1H -NMR spectra of endo-Tyr^{4*}-GS, we used HOHAHA, ROESY and TORO, and analyzed the region of NH-side chain cross peaks.

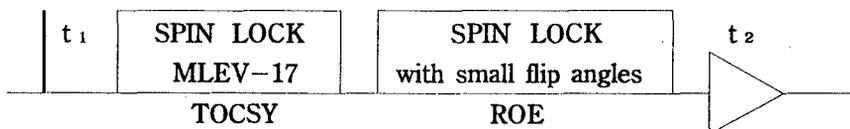


Fig.1. TORO Pulse Sequence¹⁾

<序>

溶液中でのペプチドの構造解析においては、通常、連鎖帰属を行う。HOHAHAスペクトルでは、あるスピン系において1つのプロトンの区別ができれば、その系の帰属が可能となる。しかし、化学シフトの等しい、いくつかのアミドプロトンあるいはαプロトンが存在する場合、NOESYやROESYスペクトルの帰属が困難となる。

キーワード: HOHAHA, ROESY, TORO, assignment, peptide

わたなべ えいじ、 たまき まこと、 あきやま みのる、
 のざき すけかつ、 むらまつ いちろう

Kessler¹⁾のグループによって、混合時間の初めに、HOHAHA遷移のためのスピ
ンロックを行ない、連続してROESYで用いられているスピ
ンロックを行なうパ
ルスシーケンスTOROが報告されている。対角ピークに対して、対称的に現れないN
HⁱとNHⁱ⁺¹のクロスピークから6残基のペプチドの帰属を行っている。

本研究では、このパルスシーケンスを使用し、環状ペプチドであるグラミシジンS
の誘導体であるendo-Tyr^{4*}-GSについて¹H-NMRスペクトルの帰属を
行った。

このペプチドは、グラチシンと関連ペプチドのハイブリッドアナログで、抗菌活性
が強いことが知られている。²⁾

また、TOROスペクトルでは、側鎖のプロトンとアミドプロトンのクロスピーク
に注目した。

<実験>

試料は、一般的な液相法で合成したペプチド(Fig. 2)を用いた。
溶媒にはDMSO-d₆を用い、20mg/0.5mlに調整した。温度は、30℃に
設定した。装置は、JEOL GSX-400を使用した。スピ
ンロック磁場強度は、
HOHAHA、ROESYでそれぞれ6.9KHz、3.2KHzにした。HOHAHA、
ROESYの各スペクトルの積算は16回、TOROスペクトルは128回行った。

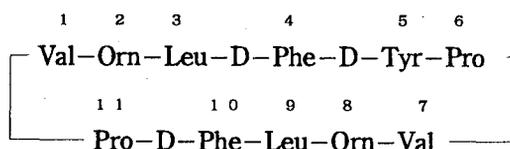


Fig.2. Primary Structure of the endo-Tyr^{4*}-GS

<結果と考察>

Fig. 3にTOROスペクトルを示した。TOCSY、ROEの混合時間はそれ
ぞれ30msec、150msecであった。Fig. 4のROESYスペクトル
(混合時間150msec)と比較すると、TOROスペクトルでは、いくつかのク
ロスピークが新たに出現している。これらは、J結合によってHβⁱからHαⁱに磁化
移動し、さらにROEによってHαⁱからNHⁱ⁺¹に磁化移動したため生じたクロス
ピークである。従って、このような、TOROスペクトルの情報を用いるとFig. 4
のROESYスペクトルの帰属が容易となる。なお、Fig. 3とFig. 4では、
ネガティブなピークのみ図示した。

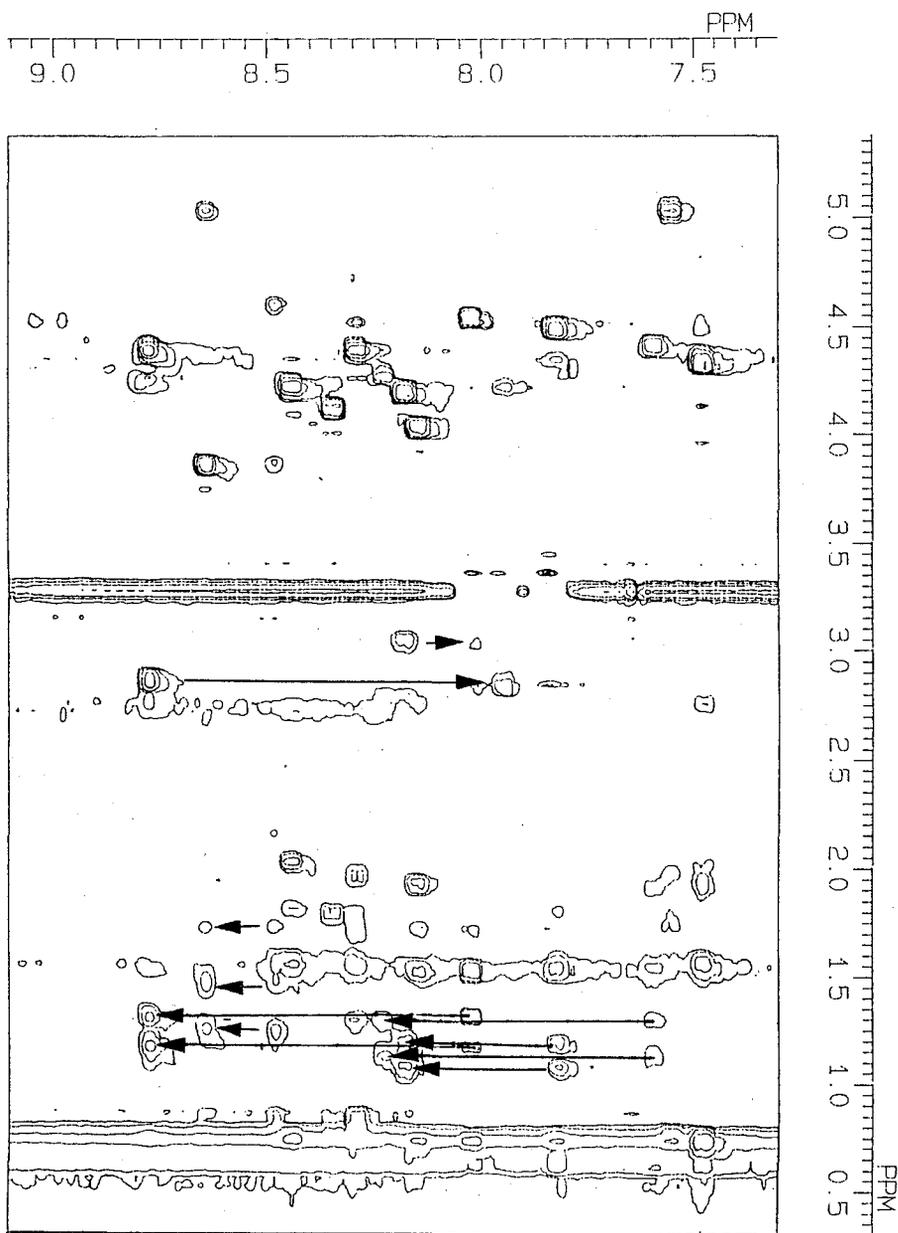


Fig.3. TORO Spectrum of the endo-Tyr⁴-GS

また、5.0ppm付近のピークは、cisのProの α プロトンと考えられる（環電流効果による低磁場シフト）ので、Proがcis、transの場合について、それぞれの帰属を行なうことができる。

Fig. 4で、cisについてはイタリック体の数字で示した。

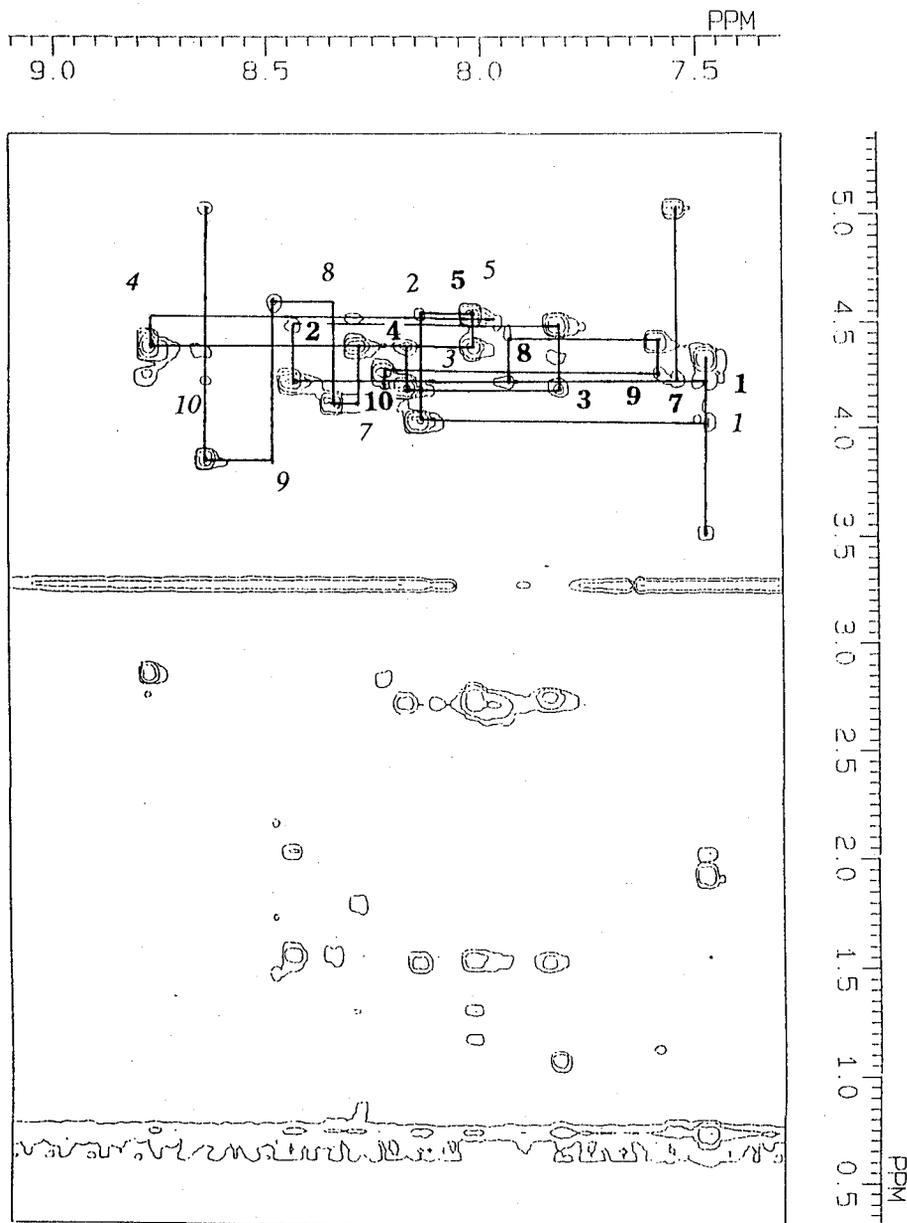


Fig.4. ROESY Spectrum of the endo-Tyr^{4*}-GS

- 1) H.Kessler, G.Gemmecker, and B.Haase, *J. Magn. Reson.*, 77, 401-408 (1988).
- 2) M.Tamaki, S.Akabori, I.Muramatsu, in "Peptide Chemistry 1990", ed by Y.Shimonishi, Protein Research Foundation, osaka (1991), pp 281-284.

ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる 帰属とその応用(5)

(神奈川大理) 釜野徳明、○羽島宏史、張恵平、小竹文乃
(北陸大薬) 木津治久

Structural Assignment and Application of The Toad Poison
Bufadienolides by 2D NMR Spectra(5)

Yoshiaki Kamano, ○Hirofumi Hashima, Hui-Ping Zhang,
and Ayano Kotake
(Faculty of Science, Kanagawa University)
Haruhisa Kizu
(Faculty of Pharmacy, Hokuriku University)

We wish to present the perfect structural determination of cinobufagin 3-oxime isomers (2a and 2b) and 14 α -artebufogenin 15-oxime(4), and their conformation were discussed (Fig.1). For structural assignment, 2D NMR spectral techniques were used, in addition to 1D NOE difference spectra. In Fig.2 and 4, stereochemical structures of 3-oxime isomers(2a and 2b) and 15-oxime(4) with 1D NOE difference spectra were illustrated. Also, in Fig.3, HMQC spectra of 2a and 2b were shown. It was very interest that 3-oxime(2) and 15-oxime(4) showed the inhibitory activity against Human Liver Cancer Cell (PLC/PRF/5) at ED₅₀(μ g/ml)4.2 \times 10⁻² and 22, respectively.

緒言 ガマ毒bufadienolideはステロイド17 β 位に α -pyrone環を有し、A/B cis、C/D cisのユニークな構造を持ち、NMRも特有のスペクトルを示す。演者らは、今までに漢薬センソCh'an Suの主要なbufadienolideについて、400 MHz 2D NMRスペクトル(¹H-¹H COSY、¹H-¹³C COSY、NOESY、HMBC、HMQC、COLOCなど)を測定、化学構造を帰属し立体的考察をおこなった。¹⁾ ついでその応用として、一連の α -pyrone環開裂体の構造を明らかにし、²⁾³⁾ 3-oxo-cinobufagin(1)より合成した2種のA環ラクトン体(2,3-lactoneと3,4-lactone)の構造を解明した。⁴⁾

今回、医薬の開発をめざした構造・活性相関の研究の一環として、新たに3-oxo-cinobufagin(1)より合成した新規oxime体(2)と14 α -artebufogenin(3)より合成した15-oxime体(4)の構造を詳細なNMRにより解析し、更に立体的考察を行い新しい知見を得た。また、合成した誘導体のヒト肝癌由来細胞PLC/PRF/5に対する殺細胞活性を検討し有意義な知見を得たので併せて報告する。

反応 3-oxo-cinobufagin(1)をEtOH中、AcONaとNH₂OH \cdot HClで1時間、加熱還流して得られた生成

キーワード:ガマ毒、bufadienolide、オキシム、2D NMR、NOE、殺ヒト肝癌由来細胞

かまのよしあき、○はしまひろふみ、ちょうけいへい、こたけあやの、きづはるひさ

物(2)を常法で処理し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。生成物(2)は、TLC上で 2 spotの互変異性体として得られ混合物のまま構造解析した。

14- α -artebufogenin(3)をEtOH中、AcONaとNH₂OH・HClで3時間、加熱還流して得られた生成物(4)を常法により処理、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた生成物(4)は、TLC上で 1 spotであった。

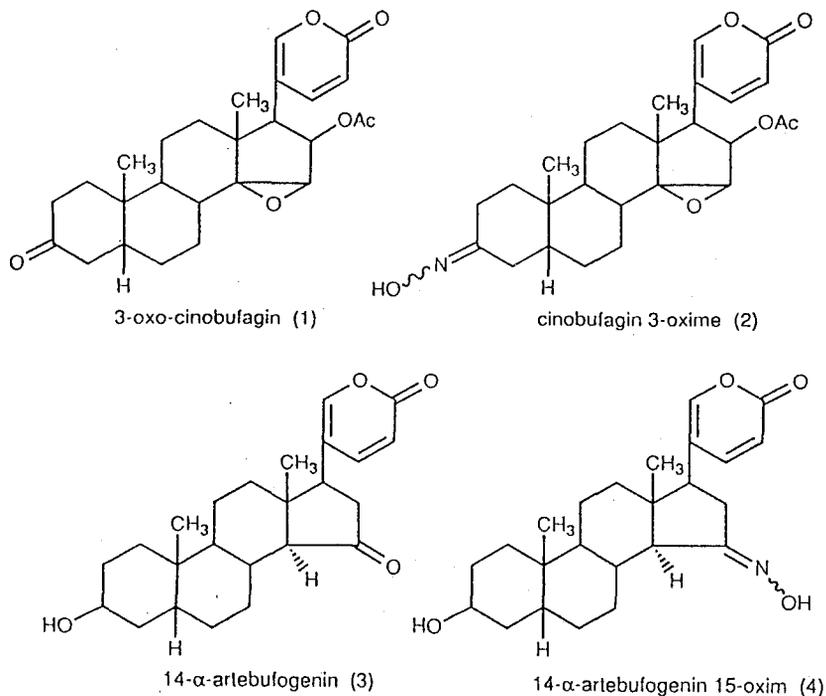


Fig. 1

実験 機種: JNM-EX400スペクトロメーター 試料を重クロロホルムに溶解、内部標準としてTMSを用いた。測定法: ¹H-NMRは399.45MHzで、¹³C-NMRは100.40MHzで記録、NOE差スペクトルはcinobufagin 3-oxim (2)に対しては照射パワー250, 300, 450を用い、14- α -artebufogenin 15-oxime(4)に対しては350を用いた。

結果

I. cinobufagin 3-oxime isomers (2a and 2b)の構造決定

前述したように、2a と 2b はTLC上でそれぞれ違ったスポットを与えるが、容易に異性化する互変異性体であり、混合物のまま構造解析を行った。混合比は、NMRにおける19-CH₃プロトン及び他のプロトンの強度から 9:7 であることが分かった。主として¹H-¹H COSYとHMQC(Fig. 3)及び1D NOE差スペクトルより、それぞれ 2aと 2b の構造を決定した。¹H 及び ¹³C のchemical shiftとNOE data から 2aは *syn*(*Z*型)、2b は *anti*(*E*型)と決定した。(Fig. 2)

II. 14- α -artebufogenin 15-oxime(4)の構造決定

生成物(4)は、TLC上 1 spotでありスペクトルからも異性体の混在は見られなかった。NMRスペ

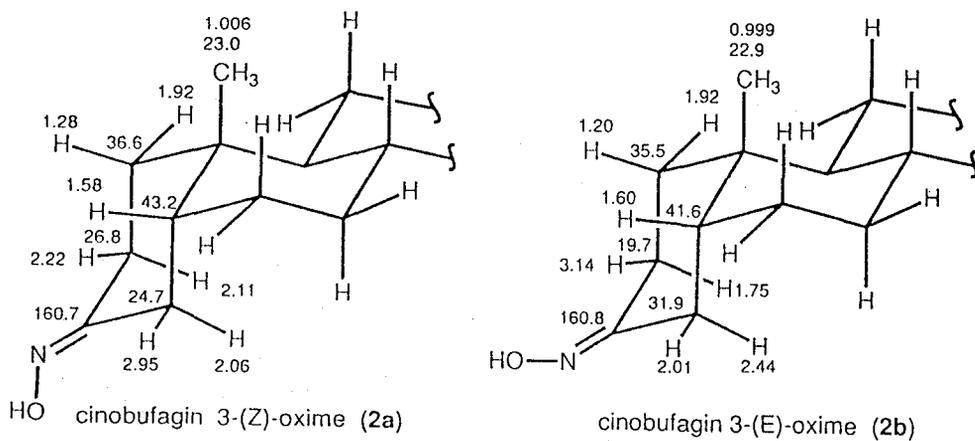


Fig.2

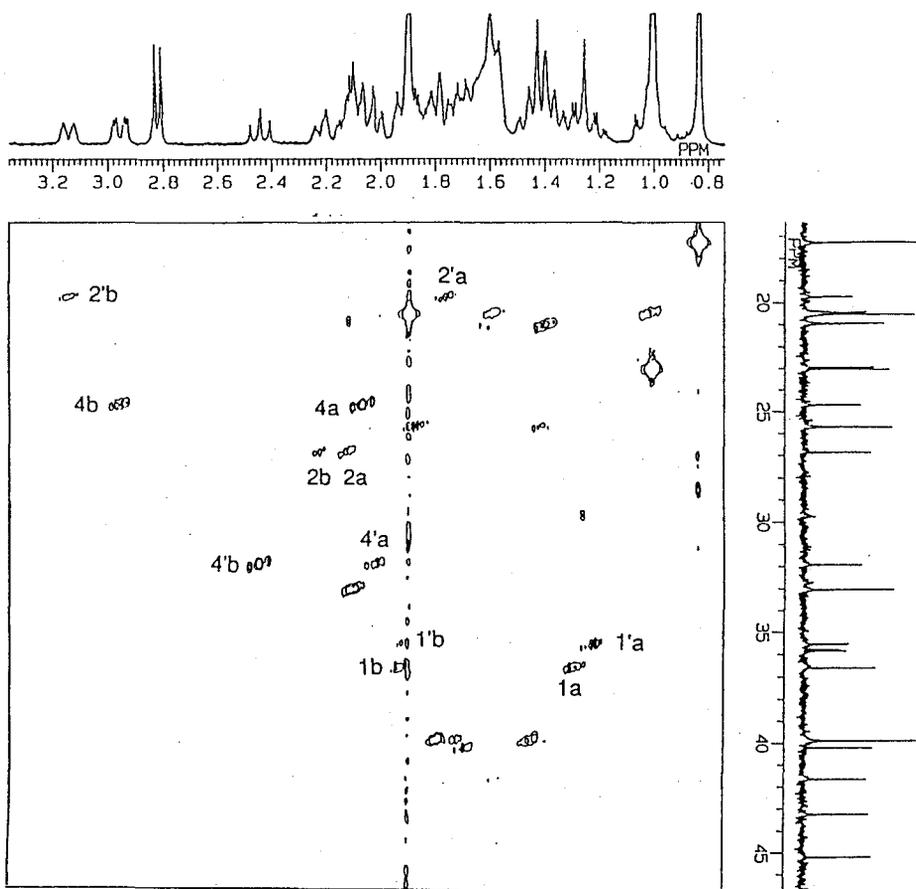


Fig. 3 The HMQC Spectrum of Cinobufagin-3-Oxime (2a and 2b)

クトルの検討より最終的に決定した(4)の部分構造式をFig. 4に示す。オキシムのOHの向きはスペクトルの結果からおそらくB環側、すなわち *syn*(*Z*型)と考えられる。

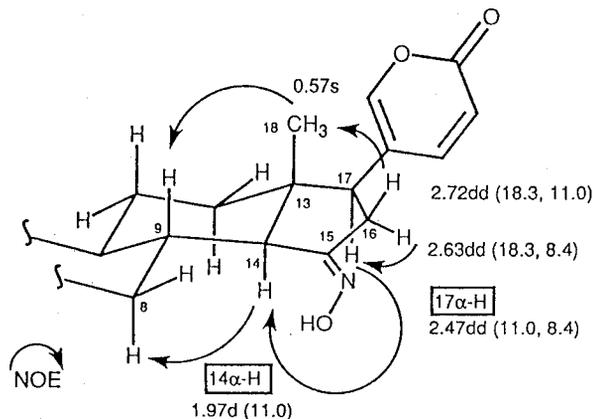


Fig.4 14 α -artebufogenin-15-keto-oxime (4)

III. 生物活性

ガンマ毒bufadienolideとその誘導体の化学構造と生理活性相関の興味から、ヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 (in vitro) に対する活性を検討した。

cinobufagin 3-oxime (2aと2bの混合物) のED₅₀($\mu\text{g/ml}$)の値は、3-oxo-cinobufagin (1, ED₅₀: $5.6 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$) よりも高い 4.2×10^{-2} という強い活性を示した。一方、14 α -artebufogenin 15-oxime(4)の活性は、ED₅₀($\mu\text{g/ml}$)値が22であり、原料(3)の活性 (ED₅₀: $8.2 \mu\text{g/ml}$) よりも弱かった。しかし、14 β , 15 α -dihydroxy体 (15 α -hydroxy-bufalin) の活性 (ED₅₀: $35 \mu\text{g/ml}$) よりも強く、興味ある知見が得られた。

考察 cinobufagin 3-oxime isomer (2aと2b) の=N-OHのそれぞれの配位を11Hおよび 13C chemical shifts値より推定したが、結果を確実にするために可能ならば=N-OH基の直接NOE実験を行いたい。14 α -artebufogenin 15-oxime(4)の場合、15-oxime基と14 α Hに弱いNOEが観察されたが、さらに詳細な実験を行いたい。14 α H-15-oxime体(4)が一種のみ得られたことは、立体構造に関係しているものと思われ、14 β -artebufogeninの15-oxime体を合成中である。

文献

- 1) 「ガンマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用」(神奈川大理・北陸大薬) 張 恵平、小竹文乃、釜野徳明、木津治久 日本化学会第65春季年会(平成5年3月29日、東京)、講演2H1 11要旨集 P. 503.
- 2) 「ガンマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用(2)・主に側鎖 α -pyrone環開裂化合物の構造について」(神奈川大理・北陸大薬) 張 恵平、釜野徳明、小竹文乃、木津治久 第32回NMR討論会(平成5年11月4日、東京) 講演要旨集、P. 285.
- 3) 「ガンマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用(3)・側鎖 α -pyrone環開裂化合物の構造について 2」(神奈川大理・北陸大薬) 釜野徳明、張 恵平、木津治久 日本化学会第67春季年会(平成6年3月29日、東京)、講演2E1 31要旨集 P. 850.
- 4) 「ガンマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用(4)」(神奈川大理・北陸大薬) 釜野徳明、張 恵平、羽島宏史、木津治久 日本生薬学会第41回年会(平成6年9月14日、札幌)、講演2P-40要旨集 P. 280.

P37

^{13}C 液晶 NMR による Histamine の構造解析
(阪大・薬) ○直原高広、木村敦臣、國直人、藤原英明

Conformation and Orientation of Histamine in a Lyotropic Liquid Crystal.
A ^{13}C NMR study.

Takahiro Jikihara, Atsuomi Kimura, Naohito Kuni, and Hideaki Fujiwara
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

Conformational and orientational analysis of Histamine has been performed by means of ^{13}C liquid crystal NMR spectroscopy. Liquid crystal medium, which mimics biomembrane environment, was composed of potassium laurate, decanol, KCl, and D_2O . Multiple splittings originating from dipole-dipole interactions were observed. A proton selectively decoupled ^{13}C NMR spectrum assisted the ^{13}C assignment. Two methylene carbons exhibited strikingly different spectra owing to the different direct couplings with their attached protons, which showed preferential existence of a gauche form.

[序論]

ヒスタミンはオータコイドとして炎症やアレルギーなどに関与する生理活性物質であり、その構造と機能に関して広く興味を持たれている。今回、溶媒として用いたリオトロピック液晶は水と両親媒性物質を主成分とするため、その構造が生体膜に近く、モデル系とみなせる。また、液晶が磁場に対して配向するため、溶質の運動も異方的になり、等方溶液中において分子の運動によりゼロに平均化され観測できなかった直接結合定数(D)を観測することが出来る。このDは距離と角度に関する情報を含んでいる。これらのことから液晶中でのヒスタミンの構造解析は膜中の構造を考える良い手がかりとなると考えられる。

以前報告した ^1H NMR解析では、スペクトルのシミュレーションから得られた間接結合定数(J)を用いて、トランス/ゴーシュの存在比を決定した¹⁾。今回更なる解析を行うため、得られる直接結合定数(D)を用いて解析を行うこととした。 ^1H NMRから得られる情報量は、分子の複雑な運動を解析するには不十分であったため、 ^{13}C NMRを測定した。 ^{13}C NMRの測定では、液晶の性質上十分な試料を溶かすことが出来ないため高いS/N比は得られないが、広い有効ケミカルシフトのため1次に近い分裂が得られ、 ^1H NMRに比べて容易に分裂幅を読みとることが出来る。

[実験]

ヒスタミンは Free Base 体を試料として用い、液晶中で加熱することにより、溶媒中

[キーワード] ヒスタミン、液晶NMR、回転異性体

じきはら たかひろ、きむら あつおみ、くに なおひと、ふじわら ひであき

の重水素と置換した(Fig.1)。液晶は Potassium Laurate(PL)系液晶として、PL, decanol, KCl, D₂O を重量比 30:6:4:60 で用いた²⁾。液晶の pH は 11.3 でヒスタミンは中性型で存在する。試料の濃度は 3% に調製した。測定は 25°C で行った。

NMR測定は Varian VXR-200 にてデカップルオフで行った。また、帰属の参考にするため H 5 をデカップルしながらの測定も行った。

[結果と考察]

天然存在比で ¹³C NMR を測定する場合、高濃度に試料を溶かすことが要求されるが、液晶 NMR の場合それが必ずしも良い結果に結びつくとは限らない。4% 溶液では、²D NMR において四極子由来の 2 本のピークから液晶の形成を確認できたが、温度変化に対して不安定であったため、きれいなチャートを得ることが出来なかった。3% 溶液では、15-35°C の温度範囲で液晶の形成を確認した。デカップリング測定中に、温度変化に起因すると考えられる液晶の構造破壊が生じたが、これはリオトロピック液晶の組成中に塩が高濃度に存在し高い電気伝導度を持つためと考えられている³⁾。そのため、デカップルオフで測定を行った。

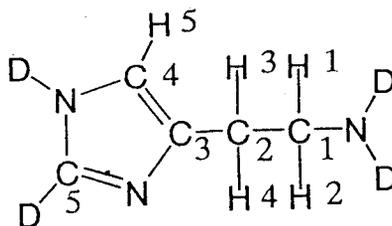


Fig.1. Structure of Histamine.

Fig.2 にヒスタミンのデカップルオフ ¹³C NMR スペクトルを示す。このスペクトルにおいて双極子-双極子相互作用による高次分裂が観測された。C 2 部位では triplet triplet doublet のパターンが観測された。また、H 5 をデカップルしながら測定を行うと、これらのパターンが triplet triplet になることから、大きい triplet はジェミナル、小さい triplet はビシナルと帰属を行った。H 1 と H 2 及び H 3 と H 4 が等価に観測されたことから、メチレン部位の回転運動が NMR のタイムスケールより速いことがわかる。C 1、C 2 部位の分裂幅は特徴的に異なっている。回転異性体が 100% トランスと仮定すると、等しい ¹D (c-m) が得られると考えられるため、ゴーシュの寄与が示唆される。現在複雑な回転異性を包括的に取り扱うプログラムを作製中であり、詳細な解析結果とあわせて報告する。

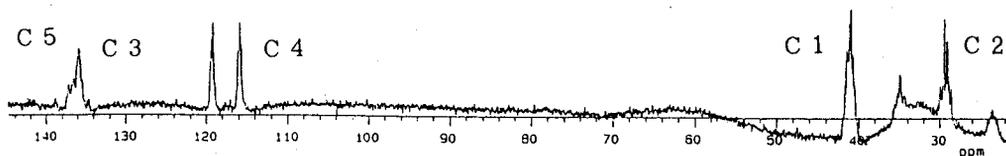


Fig.2. ¹³C NMR spectrum of Histamine in Liquid Crystal. ¹H decoupler-off.

[参考文献]

- 1) 第 26 回 NMR 討論会講演要旨集 P. 9 (1987).
- 2) R.C.Long, JR., *J. Magn. Reson.* **12**, 216 (1973).
- 3) J.S.Lewis and E.Tomchuk, *J. Magn. Reson.* **78**, 321 (1988).

(旭硝子、日本電子*) ○笹倉 英史、米森 重明、栗原 範明*

Two kinds of J resolved 2D NMRs (^1H decoupled ^{13}C - ^{19}F and ^{19}F decoupled ^{13}C - ^1H) are established to study hydrofluorocarbons. Using this technique, ^{13}C -NMR peaks of 1,1,2,2,3-pentafluoropropane (PFP) have been assigned to its structure. The number of F and H atoms directly bonding to each carbon atom are determined by the J resolved 2D NMRs, respectively. The number of F atoms bonding to adjacent C atom is also determined because of the large coupling constant ($2J_{\text{CCF}} = 30 \sim 50$ Hz) between the F and C atoms. In addition, hydrofluorocarbon polymers such as VdF-HFP copolymer and VdF-HFP-TFE terpolymer, have been analyzed.

1. 緒言

H原子とF原子の両方を含む含フッ素有機化合物の構造解析においては、 ^{19}F -NMRやGC/MS法などが用いられている。一次元 ^{19}F -NMRにおいては構造が複雑な化合物や混合物・異性体などはスペクトルが複雑になりスペクトルの帰属が困難であったり、解析のための経験を必要とした。またGC/MS法においては、フッ素樹脂などの高分子量化合物は直接測定できず、異性体の混合物は質量数が同じために絶対構造が決まらない場合がある。そこで ^{19}F -2D NMR法はこれらの点を補う意味で重要であり、我々はChlorotrifluoroethylene 3量体混合物の構造解析に ^{19}F -COSY法を適用し、物質を分離することなく各異性体の同定を行った¹⁾。トリプルレゾナンス異種核COSY法はPoly(vinylidene fluoride)の構造解析に用いられているにすぎない²⁾。今回我々は含フッ素有機化合物の構造解析をさらに簡便にするため、C原子に直接結合しているH原子数およびF原子数を解析できる ^1H デカップル ^{13}C - ^{19}F J分解2D NMR法および ^{19}F デカップル ^{13}C - ^1H J分解2D NMR法の検討を行った。

キーワード：トリプルレゾナンス、J分解、 ^{19}F 核、フッ素化合物、

○ささくらひでし、よねもりしげあき、くりはらのりあき

2. 試料および装置

J 分解法のモデルサンプルとして PCR 社製 1,1,2,2,3-Pentafluoropropane (PFP、純度：98%min.) を用い、測定には重クルルホルムに 10vol% 溶解させたものを使用した。含フッ素ポリマーとして Vinylidene fluoride ($-\text{CF}_2\text{CH}_2-$, VdF) - Hexafluoropropylene ($-\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)-$, HFP) copolymer および VdF - HFP - Tetrafluoroethylene ($-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$, TFE) terpolymer を用い、測定には重アセトンに 20wt% 溶解させたものを用いた。

測定に用いた装置は、日本電子社製核磁気共鳴装置： $\alpha-600$ 、プローブは 5mm のサンプル管用 $^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^1\text{H}$ トリプルレゾナンスプローブを用いた。使用したパルスは、Fig.1 に示す通りである。このときの ^{19}F 核のデカップリングには MPF³¹ パルスを用いた。

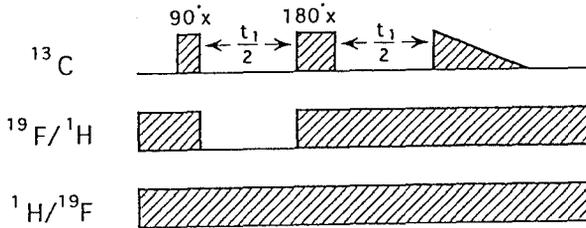


Fig.1 Pulse sequence of triple resonance J resolved 2D NMR

3. 結果および考察

(a) モデルサンプル：PFP の測定

H 原子と F 原子を同一分子内に有する PFP をモデルサンプルとして、J 分解 2D NMR スペクトルを測定した。(Fig.2,3,4)

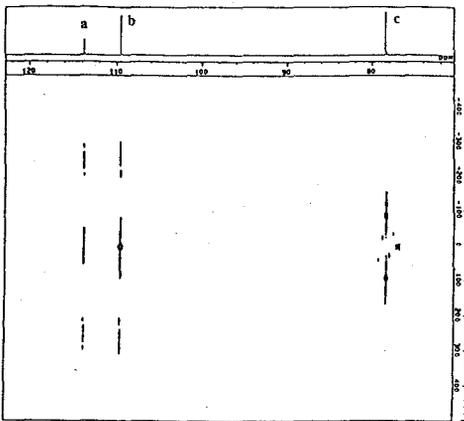


Fig.2 ^1H decoupled ^{13}C - ^{19}F J resolved spectrum of PFP

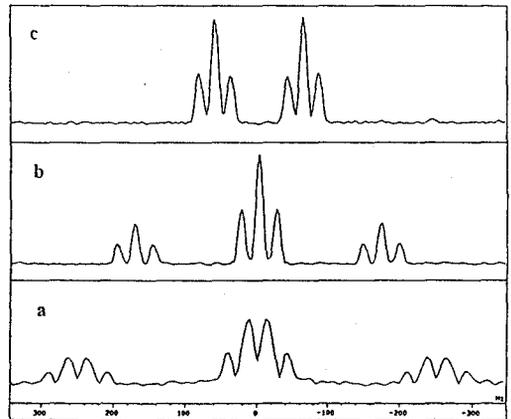


Fig.3 Sliced spectra shown in Fig.2 at a, b and c positions

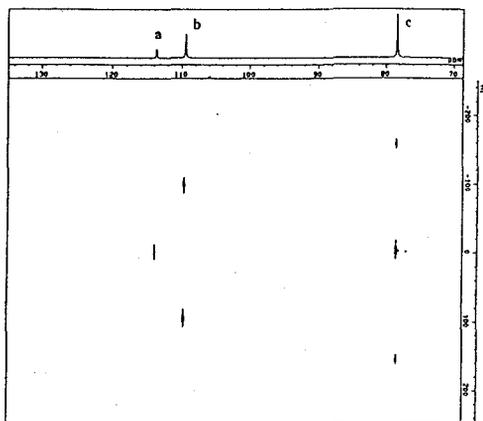


Fig.4 ^{19}F decoupled ^{13}C - ^1H J resolved spectrum of PFP

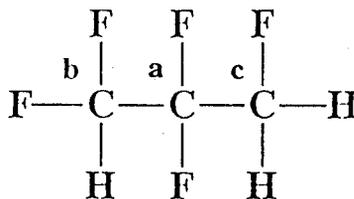


Fig.5 Structure of PFP

Fig.2よりCに直接結合しているF原子数が解析でき、Fig.4よりC原子に直接結合しているH原子数が解析できる。よってピークaはFが2原子、ピークbはFが2原子、H1原子、ピークcはFが1原子、H2原子が直接結合していることが分かり、ケミカルシフトを考慮しなくてもa~cのピークはFig.5に示すように容易に帰属できる。また2ボンドを隔てたCFの結合定数は、CHと異なり $^2J_{\text{CCF}} = 30 \sim 50 \text{ Hz}$ と大きく、F1軸側の分解能と比較して充分大きいため、Jによる分裂がスペクトル上に現れる。よって隣接炭素に結合した $^2J_{\text{CCF}}$ がほぼ同じ値であれば、隣接炭素に結合したF原子数も解析可能である。

(b) VdF-HFP copolymerの構造解析

^1H デカップル ^{13}C - ^{19}F J分解スペクトルをFig.6に示す。モデルサンプルの測定と同様にC原子に結合したF原子数および隣接したF原子数が容易に解析できる。J分解2Dスペクトルの分裂パターンから ^{13}C -NMRスペクトルのピークはFig.7に示すように帰属される。

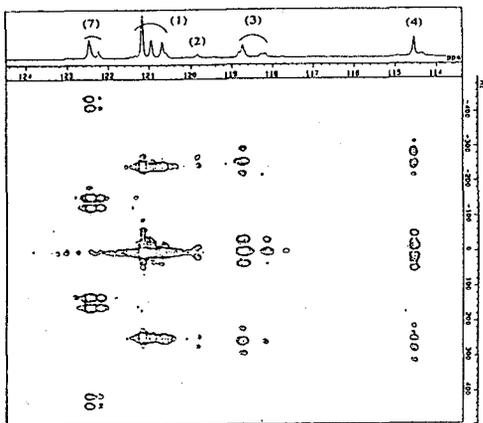


Fig.6 ^1H decoupled ^{13}C - ^{19}F J resolved spectrum of a VdF-HFP copolymer

	CH_2CF_2 :VdF	$\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)$:HFP	
	⊙	⊙	⊙
	⊙⊙	⊙⊙	⊙⊙
	⊙⊙⊙	⊙⊙⊙	⊙⊙⊙
	⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙
	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙
	⊙⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙⊙
	⊙⊙	⊙⊙	⊙⊙

- (1) $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CF}_2-$
- (2) $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)-$
- (2) $-\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)\text{CF}_2\text{CH}_2-$
- (3) $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)-$
- (3) $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CH}_2-$
- (4) $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)-$
- (5) $-\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)\text{CH}_2\text{CF}_2-$
- (6) $-\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)\text{CF}_2\text{CH}_2-$
- (7) $-\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)-$

Fig.7 Splitting pattern of a VdF-HFP copolymer in ^1H decoupled ^{13}C - ^{19}F J resolved spectrum

(c) VdF-HFP-TFE terpolymerの構造解析

^1H デカップル $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$ J分解スペクトルをFig.8に示す。C原子に結合したF原子数および隣接したF原子数が容易に解析でき、Fig.9に示すように帰属される。

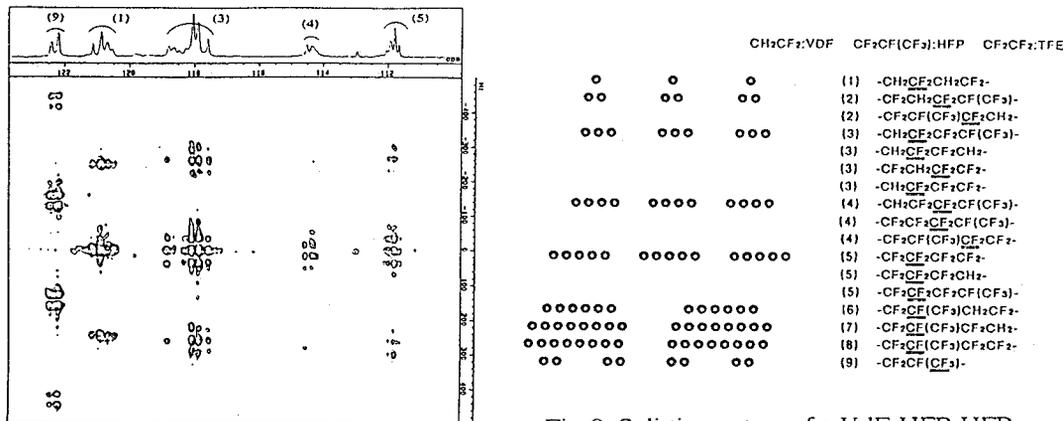


Fig.8 ^1H decoupled $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$ J resolved spectrum of a VdF-HFP-TFE terpolymer

Fig.9 Splitting pattern of a VdF-HFP-HFP copolymer in ^1H decoupled $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$ J resolved spectrum

4. 結 言

^1H デカップル $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$ J分解 2D NMRおよび ^{19}F デカップル $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ J分解 2D NMRの検討を行った。F原子およびH原子を同一分子内に含む含フッ素有機化合物の構造解析において、本方法が有用であることを示した。さらにVdF-HFP, VdF-HFP-TFEの2種類の含フッ素ポリマーについて測定を行い、J分解2D法で多くの結合情報が得られることを示した。本方法に ^1H デカップル $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$ COSY法や ^1H デカップル ^{19}F COSY法を併用することにより、複雑な構造や微細な構造の解析が容易になると思われる。

5. 参考文献

1)H.Sasakura, S.Yonenori, 14th International Symposium on Fluorine Chemistry, Abstract,289(1994)
 2)加藤、安藤、小椋、第32回 NMR 討論会 講演要旨集(1993).
 3)T.Fujiwara, T.Anai, N.Kurihara, K.Nagayama, *J.Magn.Reson.*, A 104,103(1993)

セッション：脂質，生体膜
(Lipids & Membranes)

P 39

コレステロール誘導体とリン脂質との膜内相互作用の

³¹P NMRによる研究

(生命研、*物質研) ○名川吉信、馬場照彦*、神沢千代志*、中西洋志

³¹P NMR Study on the Interaction between Cholesterol Derivatives and Phospholipids in Lipid Membranes

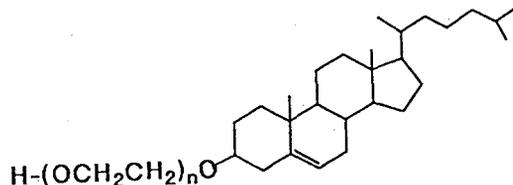
Yoshinobu Nagawa, Teruhiko Baba*, Chiyoshi Kamizawa*, Hiroshi Nakanishi
National Institute of Bioscience and Human-Technology, *National Institute of
Materials and Chemical Research

Cholesterol is an important determinant of membrane properties in cells, and is utilized in stabilization of liposomes. In this paper, the effect of cholesteryl derivatives with oligoxyethylene (OE) group (Chol-En, n=0-5, n:number of the oxyethylene unit) on the structure of phosphatidylcholine (DPPC) is studied by ³¹P NMR spectroscopy. The ³¹P chemical shift anisotropy measured for the DPPC headgroup shows that Chol-En as well as cholesterol induces the structural transition of DPPC membrane from L(β') phase to L(β) phase. The conformation and molecular packing at the surface of the lipid membrane will also be discussed.

【緒言】コレステロールは細胞膜における膜流動性の調節など生体内で重要な役割を担っている。また、DDSにおけるリポソームを安定化するためにも利用されている。我々は、コレステロールの親水基修飾によるリポソーム膜物性への影響を検討してきた。今回は、種々の鎖長のオリゴオキシエチレン (OE) 基を導入したコレステロール誘導体 (Chol-En, n=0-5, n:OE基重合度) のリン脂質極性基の状態に対する影響を³¹P NMR法によって検討した結果、興味ある知見が得られたので報告する。

【実験】リン脂質としてはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を用い、これとChol-En (n=0-5) を種々のモル比で混合し、MOPS緩衝液 (pH:7.2) 中で多重膜リポソームを調製した。

³¹P NMRスペクトルの測定はJEOL GSX-400装置 (³¹P観測周波数: 161.7MHz) で行ない、化学シフトの異方性 (CSA) を主な指標として DPPC極性基の状態変化を考察した。



Chol-En

キーワード: ³¹P NMR、コレステロール、オリゴオキシエチレン基、リン脂質

○ながわよしのぶ、ばばてるひこ、かみざわちよし、なかにしひろし

【結果および考察】 コレステロール (Chol-E0) およびOE鎖長が2であるChol-E2 について、DPPCとのモル比とCSAの関係をFig. 1に示す。30℃におけるDPPC膜の場合、10モル%まではCSAが急激に減少することがわかった。それ以上のモル比では、Chol-E2の場合はCSAが増加し、コレステロールの場合はCSAが減少することが認められた。OE鎖長が4であるChol-E4においてもChol-E2と同じ傾向が見られた。コレステロールはDPPC膜のL (β') 相に10モル%程度混入することでL (β) 相を誘起する性質が知られているが、Chol-Enも相誘起の性質を保持していると考えられる。一方、50℃におけるDPPC膜 (L (α) 相) においては、0-50モル%の範囲でChol-E2の添加により、CSAは単調に増大することがわかった。リン脂質の極性基のコンフォメーションによりCSAが変化することが知られている。L (α) 相および高濃度のL (β') 相におけるCSAの増加は、OE基の存在によりDPPCの極性基の平均的配向が膜表面から水相側に傾くことによって起こると考えられる。

以上のようなOE基のDPPC極性基に対する立体的影響を検討する目的で、50モル%、30℃の条件下において、OE鎖長を変化させてCSAを求めた。結果をFig. 2に示すが、 $n=3$ で極大値をとり、 $n=4$ 以上では逆に減少することがわかった。 $n=2$ までのCSAの単調な増大は、先に述べたDPPCの極性基の平均的配向の変化を支持する。ところで、分子モデリングの考察によると、 $n=3$ 以上でOE基が膜面から水相側にでると考えられる。このことから、OE鎖長増加に伴うCSAの減少は、極性基領域の分子間パッキングの変化によるものと推測される。 $n=5$ の場合には1%程度の等方性のシグナルが観測された。このことはSUVのような小さな会合体が自発的に形成することを示している。Chol-E5分子の幾何学的形状がこの現象に影響していると考えられる。

【謝辞】 ^{31}P NMRスペクトルのシュミレーションに協力していただいた物質工学工業技術研究所 林 繁信博士に感謝いたします。

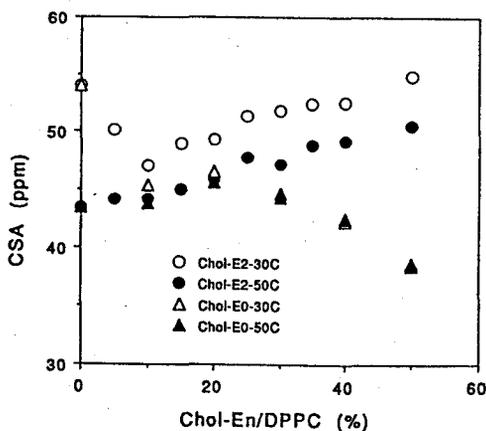


Fig. 1 Chol-En concentration dependence of the chemical shift anisotropy (CSA) by ^{31}P NMR spectroscopy.

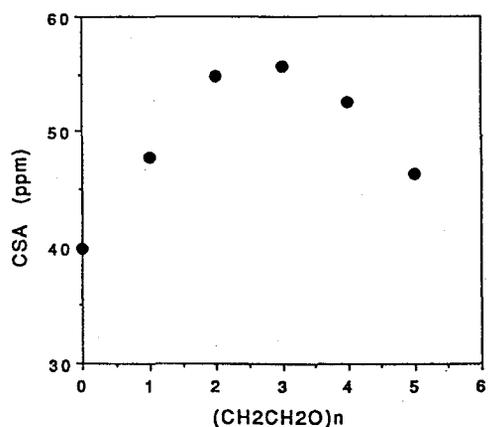


Fig. 2 OE chain length (n) dependence of the chemical shift anisotropy (CSA) of 50 mol% mixture at 30 °C.

黒田 義弘、○小川 雅弘、那須 裕郷、寺島 麻衣子、中川 照眞、
藤原 靖弘
京大 薬、京都薬大

Location of local anesthetic dibucaine in the phospholipid membrane and the influence of dibucaine on the mobility of acyl chains of phospholipid as studied by ^2H -NMR

Yoshihiro Kuroda, ○Masahiro Ogawa, Hirosato Nasu, Maiko Terashima, Terumichi Nakagawa and Yasuhiro Fujiwara

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, 606-01 and Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto 607

Effects of dibucaine on the orientational order of methylene groups of multilamellar dispersions of phospholipids have been studied by deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy. Deuterated palmitic acids were employed as a probe for inquiring the membrane structure. A model lipid composed of phosphatidylcholine(PC), phosphatidylserine(PS), and phosphatidylethanolamine (PE) (PC:PS:PE=1:1:2.5 molar ratio) which contains cholesterol (phospholipids:cholesterol=7:3 molar ratio) was employed. A molecular order parameter, S_{mol} , for each carbon segment, was calculated from the quadrupole splitting in the ^2H -NMR spectrum. It was found that dibucaine decreases the S_{mol} with increasing distance from the head group; moreover, the charged form was found to affect the S_{mol} greater than does the uncharged form. From the present and the previous [1] data, it was concluded that the quinoline ring of the dibucaine is located at the polar region intercalating the butoxy group into the lipid bilayer.

【目的】局所麻酔剤の Na^+ チャンネルへの作用機序として、 Na^+ チャンネル周辺の脂質の構造変化により間接的に Na^+ チャンネルの機能に障害をもたらす、という説がある。この説を支持する報告としては、以前から、リン脂質膜に局所麻酔剤を添加することによる脂質膜の疎水性領域のオーダーの減少や相転移温度の低下などがあり、この作用のみで麻酔作用を発現するとは言い

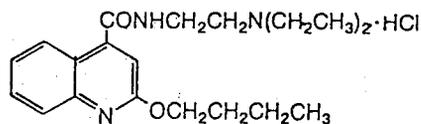


Fig.1 Chemical Structure of Dibucaine · HCl

キーワード： ^2H -NMR、ジブカイン、脂肪酸プローブ、リン脂質

くろだ よしひろ、○おがわ まさひろ、なす ひろさと、てらしま まいこ
なかがわ てるみち、ふじわら やすひろ

難しいものの、作用機序に何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

我々はこの説に着目し、麻酔作用機序解明の1つのアプローチとして、局所麻酔剤と脂質膜との相互作用を検討した。局所麻酔剤としてジブカイン (Fig.1) を用い、特に、ジブカイン添加による脂質アシル鎖のオーダーの変化について検討した。加えて、酸性・中性条件の間でオーダーの変化の程度を比較し、カチオン型・分子型のジブカインが脂質膜の運動性に及ぼす影響の違いを検討した。最後に脂質膜中でのジブカイン分子のロケーションについて考察を加えた。

【実験】1) モデル脂質膜の作成

クロロホルム/メタノール混合溶媒に溶かしたPhosphatidylcholine (PC)、Phosphatidylserine (PS)、Phosphatidylethanolamine (PE)を1:1:2.5のモル比で混合させ(60mM)、その溶液中にコレステロール(26mM) 重水素化パルミチン酸(20mM)を加えて溶解させ、その後に溶媒を除去して脂質薄膜を作成した。この薄膜にdeuterium depleted waterで調製した310mOsmリン酸buffer (pH7.2,5.2)を加え約30分vortexingを行い、その後3時間放置してNMR測定用サンプルとした。ジブカインを添加した試料はこの懸濁液にジブカイン(3mM)を加え5回 freeze-thaw-vortexingして調製した。全重水素化パルミチン酸、2位及び3位を重水素化したパルミチン酸は市販のものを用い、4位、6位、9位及び10位を重水素化したパルミチン酸はコルベ電解反応により合成した。

2) ^2H -NMR測定、モーメント計算

測定はBrukerAM600、溶液用プロードバンドプローブを用い四極子エコー法で行った。スペクトルのモーメント計算はAM600で得られたスペクトルをX-32でJCAMP-DXの基準に従ったASCII形式にフォーマット変換した後、IRIS INDIGOにより行った。

3) 分配係数の測定

分配係数は限外ろ過法により脂質膜に分配していないジブカインの蛍光強度を測定することにより濃度を求め、計算した。励起波長325nm、蛍光波長405nmで測定した。

【結果】

1) 全重水素化パルミチン酸 (Palmitic- d_{31} Acid)の ^2H -NMRスペクトル及びモーメント計算

Fig.2にモデル脂質膜中に挿入したPalmitic- d_{31} Acidのジブカイン添加前(a)及び1mM添加後(b)、3mM添加後(c)の ^2H -NMRスペクトルを示す。このスペクトルにおいて、明確に認められるピークはパルミチン酸のメチレン基の数より少ないが、これは同じような四重極分裂幅を持つメチレン基のピ

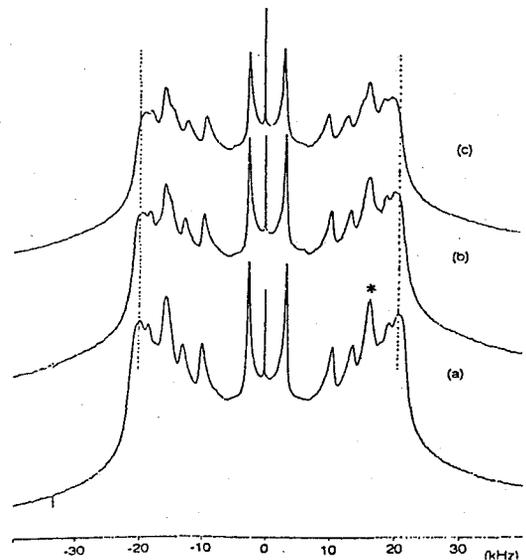


Fig.2 ^2H -NMR Spectra of Palmitic- d_{31} Acid (20mM) in Lipid Mixture (PC:PS:PE=1:1:2.5 Molar Ratio 60mM) with Cholesterol (Total Lipids : Cholesterol=7:3 Molar Ratio) at 300K and at pH7.2, prepared in the absence (a) or in the presence of (b) 1mM dibucaine, (c) 3mM dibucaine.

ークが重なっているためである。この3つのスペクトルの比較から、ジブカイン添加により1つのピーク(*)を除き四重極分裂幅が小さくなっていることがわかった。pH5.2のときも同じ傾向が見られた。

次にpH7.2及び5.2におけるPalmitic-d₃₁ Acidの²H-NMRスペクトルのモーメント計算を行った。Table 1にその結果を示す。pH7.2では、ジブカイン添加前はS_{CD}=0.042、添加後はS_{CD}=0.037であり、orderが減少した。pH5.2の場合も、ジブカイン添加前はS_{CD}=0.283、添加後はS_{CD}=0.238で同じように減少した。つまり、カチオン型ジブカインも分子型ジブカインも脂質アシル鎖のオーダーを減少させることがわかった。

Table 1 Effect of Addition of Dibucaine on the First and the Second Moments and S_{CD} for the Palmitic-d₃₁ Acid Incorporated into Mixed Lipids at pH 7.2 and pH5.2

	pH 5.2		pH 7.2	
	without Dibucaine	with Dibucaine(3mM)	without Dibucaine	with Dibucaine(3mM)
M ₁ (10 ⁻⁵ rad/s)	0.858	0.721	0.798	0.710
M ₂ (10 ⁻¹⁰ rad ² /s ²)	1.014	0.706	0.833	0.671
S _{CD}	0.283	0.238	0.264	0.234

$$M_n = \int_0^{\infty} \omega^n f(\omega) d\omega / \int_0^{\infty} f(\omega) d\omega$$

$$S_{CD} = 2\sqrt{3}M\sqrt{(e^2qQ/\hbar)} ; e^2qQ/\hbar = 170\text{kHz}$$

2) ジブカインによるパルミチン酸のアシル鎖の各部位におけるオーダーの変化

ジブカインによるアシル鎖の各部位のオーダーの減少を検討するため、アシル鎖の各部位を重水素化したパルミチン酸を用いて、四重極分裂を求めた。Fig.3及びFig.4にpH7.2における、2位及び9位重水素化パルミチン酸のジブカイン添加前(a)及び添加後(b)のスペクトルを示す。四重極分裂幅から得られる分子軸配向パラメーターS_{mol}について、ジブカインによるS_{mol}の減少率(ΔS_{mol}/S_{mol})を各炭素部位について、プロットしたものをFig.5に示す。これを見ると、pH7.2及び5.2どちらの条件も脂質の極性基部位から離れる程、ジブカインによるS_{mol}の減少が大きくなるのがわかる。このことは、ジブカインは脂質の極性基よりも末端メチル基のオーダーに大きく影響を及ぼしていることを示すものである。ここで、もしジブカインのキノリン環のようなかさばった部分が脂質アシル鎖の中間領

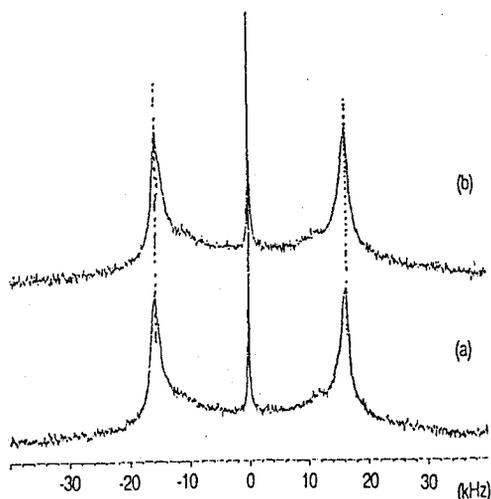


Fig.3 ²H-NMR Spectra of Palmitic-2,2-d₄ Acid (20mM) in Lipid Mixture (PC:PS:PE=1:1:2.5 Molar Ratio 60mM) with Cholesterol (Total Lipids : Cholesterol=7:3 Molar Ratio) at 300K and at pH7.2, prepared in the absence (a) or in the presence of (b) 3mM dibucaine.

域に位置するとすれば、その領域は大変リジッドになり、ジブカイン添加によりオーダーが高くなると考えられる。しかし、今回の実験結果ではそのような傾向は見られない。また S_{mol} の減少率がアシル鎖の末端へ行く程大きくなったという結果が得られたため、キノリン環はアシル鎖よりももっと上部の極性基部位に位置していると考えられる。

さらに注目すべきことは、pH5.2における S_{mol} の減少率のほうがpH7.2におけるそれよりも全体的に高いことである。このことは、カチオン型ジブカインの方が分子型よりも、脂質のアシル鎖のオーダーにより大きく影響を及ぼしていることを示している。しかし、膜に分配するカチオン型のジブカインの量が分子型よりも多いためにこのような結果になった、とも考えられる。

そこで、これを確認するため、ジブカインの脂質膜と水との間の分配係数を求めた。その結果をTable 2に示す。これを見るとpH5.2の条件の方がpH7.2の条件よりも膜への分配量が少ない。従って、ジブカインはカチオン型の方が脂質アシル鎖のオーダーにより大きく影響を与えることが確認された。この要因は、現在検討中であるが、カチオン型ジブカインと脂質のリン酸基との強い静電相互作用がアシル鎖のオーダーの変化により大きな影響を与えたと考えられる。

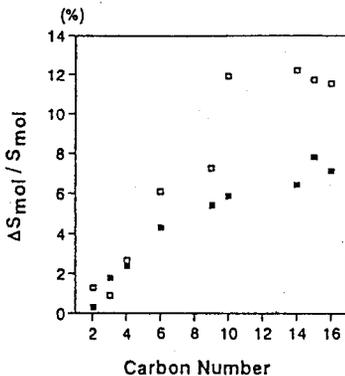


Fig.5 Plot of $\Delta S_{mol} / S_{mol}$ vs. position of deuteration for specifically deuterated palmitic acid probes intercalated in mixed lipids with cholesterol at (■) pH7.2 and (□) pH5.2.

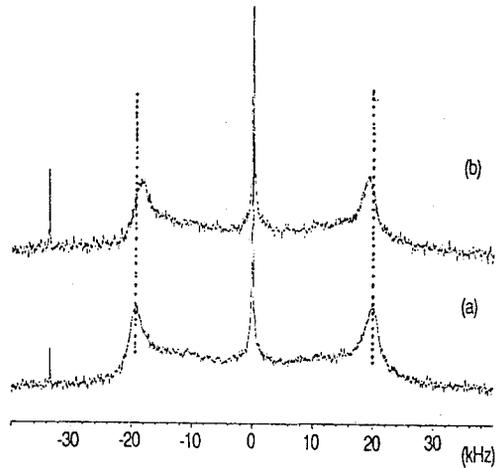


Fig.4 $^1\text{H-NMR}$ Spectra of Palmitic-9,9-d, Acid (20mM) in Lipid Mixture (PC:PS:PE=1:1:2.5 Molar Ratio 60mM) with Cholesterol (Total Lipids : Cholesterol=7:3 Molar Ratio) at 300K and at pH7.2, prepared in the absence (a) or in the presence of (b) 3mM dibucaine.

Table 2 Partition coefficients of dibucaine in the bilayer of lipid mixture ^a with cholesterol ^b and palmitic acid ^c at pH 7.2 and 5.2

Lipid	Kp	
	pH7.2	pH5.2
PC:PS:PE	1108	557.1

^a PC:PS:PE = 1:1:2.5 molar ratio.

^b Total lipids : cholesterol = 7:3 molar ratio.

^c Total lipids : palmitic acid = 3:1 molar ratio.

【参考文献】

1. Y.Kuroda, M.Ogawa, T.Kawabata, Y.Kiyama, Y.Fujiwara and T.Nakagawa, The 32th NMR Symposium (Japan), Tokyo, 1993, Poster Presentation No.25

P 41

ムラミルジペプチド脂質の溶液中及び膜中の構造

(横浜国大工) ○阿久津秀雄、山口秀人、鮫島克訓、
申敬花、(第一製薬探索研) 柘植英哉

STRUCTURES OF MURAMYLDIPEPTIDE LIPIDS IN SOLUTION AND MEMBRANES;
Hideo Akutsu, Hideto Yamaguchi, Yoshinori Samejima, Kyonghwa Shin (Yokohama National University), Hideya Tsuge (Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd.);

The structure of muramyl dipeptide lipids (MDP) in DMSO solution and in phosphatidylglycerol membranes was investigated by ¹H-NMR and ²H-NMR. The conformation and the structural dynamics have been found different for the acid type and amide type MDP.

【はじめに】

細胞壁ペプチドグリカンは、適当な条件下で免疫原性や細胞性免疫を誘導するアジュバント活性を示すことが知られている。多くの研究の結果、結核菌の細胞壁に多く存在するN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (MDP)が細菌細胞壁のアジュバント活性を支える最少単位であることが示された。

NeromeらはこのMDPの糖の6位に一本の分岐脂肪酸を付加し両親媒性にし、人工膜を調製し、これにウイルスの膜表面蛋白質を埋め込み、人工ウイルス膜ワクチン (Virosome vaccine) として利用することを試みた。その結果、人工ウイルス膜ワクチンは、従来のワクチンに比べると体液性免疫を増強し、かつ細胞性免疫をも誘導することが明らかになった。

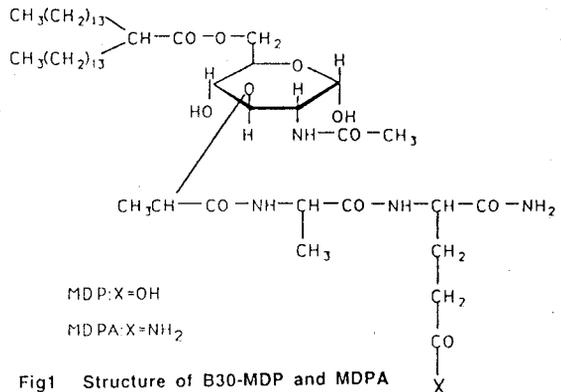


Fig1 Structure of B30-MDP and MDPA

本研究では2種類のムラミルジペプチド脂質、酸型B30-MDPと酸アミド型B30-MDPAについて、人工ウイルス膜の物性とムラミルジペプチド脂質の構造との関連を明らかにすることを目的とした

【結果と考察】

(1) ムラミルジペプチド脂質の溶液構造

2次元NOESY、2次元ROESY法によって得られたNOEクロスピークパターンは酸型と酸アミド型では溶液構造が異なっていることを示す。酸型に比べ酸アミド型はペプチド先端部位のNOEがNOESYの高運動性領域ではなく、ROESYスペクトルにでている。この結果は酸アミド型のペプチド末端は酸型に比べ運動性が低下していることを示す。このNOEパターンを用いて分子動力学計算をした。酸型では2位のN-アセチル基のカル

ムラミルジペプチド、人工ワクチン、リポソーム、NMR、溶液構造、膜構造

あくつひでお、やまぐちひでと、さめじまよしのり、しんぎょんふあ、つげひでや

ポニルとアラニンのアミドプロトン間で水素結合が形成され、糖部位とペプチド部位による環状構造ができていると推定された。それに対し酸アミド型は糖の4位の水酸基とペプチド部位のカルボニルとアミドプロトンとで電子双極子クラスター様の構造をとっていると推定された。このことから酸型はペプチドの根本の部位と糖部位とで非常にリジットな構造を形成していて、ペプチド末端は比較的自由的な状態にあると予想される。それに対し酸アミド型はペプチド全体と糖の4位の部位とで大きなクラスターを形成しているためペプチド末端は酸型に比べ運動性が低下しており、極性基全体の体積は酸型に比べ大きく、ペプチドや糖の極性の高い基がほとんどクラスター形成に参加しているため極性基は非常に疎水性が高くなっていると考えられる。

(2) ムラミルジペプチド脂質含有人工膜のNMRによる解析

酸型-フォスファチジルグリセロール (PG) 系と酸アミド型-PG系人工膜の2次元HOHAHAスペクトルを測定した。前者をFig2に示す。酸型は脂質の全スピン系およびムラミルジペプチド脂質のペプチド部位及び糖部位のスピン系が観測されている。それに対して酸アミド型では脂質部位は同様に全スピン系が観測されているが、ムラミルジペプチド脂質に関してはペプチド部位のみで糖部位のスピン系が観測されていない。分子運動が大きい程シグナルの線幅は狭くなることから、酸型に比べ酸アミド型では糖部位の運動が抑制された環境にあることが分かる。また2次元NOSEYの測定より酸型はペプチド末端のGluの α プロトンとPGの α 位のメチレンとの間にNOEが観測された。酸アミド型ではGlnの側鎖の γ プロトンとPGの α 位のメチレンとの間にNOEが観測された。これは酸型では α 位の酸アミドプロトンとPGのりん酸基との間に水素結合が形成され、また酸アミド型ではペプチド末端の側鎖のアミドプロトンとPGのりん酸との間に水素結合が形成されていることを示唆する。

酸型と酸アミド型の人工膜の緩和試薬によるシグナルの変化より、酸型では膜の外側では酸型:PG=2:1のモル比で存在しており、酸アミド型では酸アミド:PG=1:1のモル比で存在することが明らかになった。

以上の結果より次の結論が導きだせる。酸型の系では極性基のチャージの反発により容易に近づけなく、そのため強制的に小さくすると、膜の曲率を稼ぐため表面積の大きなMDPが膜の外側に多く存在する。また単分散した時の溶液構造と膜中の構造には大きな差はない。それに対して酸アミド型は極性基チャージがないためPGと容易に近づける。そのためMDPAとPGはカップルして一つのユニットとして膜を形成していると考えられる。また、溶液中でとっていたクラスター構造はユニットを形成するために不利なため壊れていると予想される。

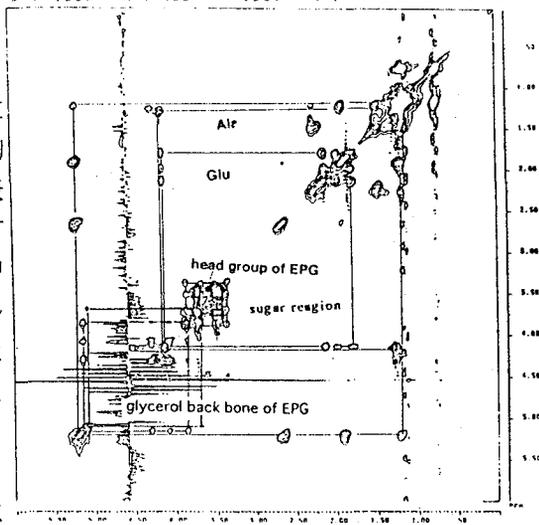


Fig.2 HOHAHA spectrum ofMDP-PG liposome in 50mM Phosphate buffer at 303K mixing time=50msec

P 42 NMRスペクトル法による過アルキル置換シクロデキストリンの構造解析

生命研、大阪市大

○中西洋志、金澤健治、石塚靖子、山垣亮、玉垣誠三、太垣和一郎

NMR Structural Analyses of Cyclodextrin Derivatives Substituted by Per-alkyl Groups

National Institute of Bioscience and Human-Technology and Osaka City University

○Hiroshi NAKANISHI, Kenji KANAZAWA, Yasuko ISHIZUKA, Toru YAMAGAKI,

Seizo TAMAGAKI, Waichiro TAGAKI

Studies about the structures and dynamic behaviour of cyclodextrin (CD) derivatives substituted by long chain N-alkyl groups were made in aqueous solution by NMR spectroscopy. ^1H NMR spectrum of γ -CD with eight N-butyl groups (I) shows unusual broad signals of the protons in the butyl groups and relatively sharp splitted signals of glucose protons. The line broadenings of all signals become dramatically large, when the alkyl group changes to C_8H_{17} , C_4H_9 , and C_6H_{13} . The longer alkyl substitutions ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ and $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$) cause to the broader proton signals in both N-alkyl groups and the CD ring.

These large ^1H NMR line-shape changes caused by the N-alkyl substitution on the γ -CD ring indicate the existence of the molecular aggregation of a micelle type.

1 [序] シクロデキストリン(CD)はグルコースが環状になった化合物であり、色々な包接錯体を形成することが知られている。我々は先にCDとフラーレン化合物(C60)の包接錯体のNMRスペクトルについて報告した^{1,2)}。今回は、 γ -CDに8本のアルキル鎖が結合した誘導体を合成し、そのNMRスペクトルを測定したところ、非常に興味ある現象を見出したので報告する。

2 [実験] 試料； γ -CDのグルコース基の6位のOH基を臭素化し、アルキルアミンと高温で反応させクロマトグラム法で精製した。アルキル基としては直鎖の C_4H_9 (I), C_6H_{13} (II), C_8H_{17} (III), $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ (IV) 及び $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ (V) の γ -CD誘導体を合成した。

NMRスペクトルの測定：NMR分光器はJEOL α -500 (^1H : 499.65 MHz, ^{13}C : 125.5 MHz) を使用した。溶媒は、重水リン酸緩衝液を用いた。

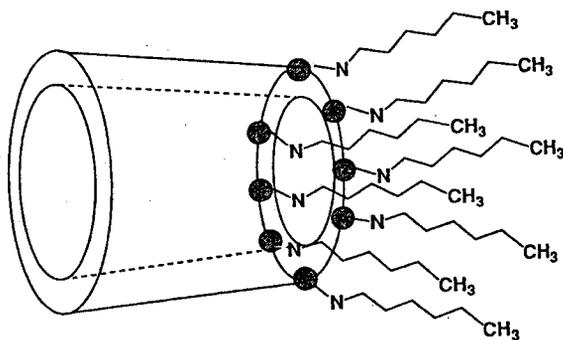
3 [結果と考察] アルキル基が直鎖のブチル基であるIの ^1H NMRスペクトルは、重水溶液、pD: 4.6, 濃度 5.7 mM, 25 °Cの測定条件下で独特のシグナルパターンを示す。n-ブチルアミノ基のシグナルは強いブロードニング現象を起こしており、 β - CH_2 のシグナルは大きく分裂している。また α - CH_2 のシグナルも線幅が異常に広い。これに比較して、

アミノアルキルシクロデキストリン、NMR、線形解析、会合状態、分子間相互作用、ミセル状態

なかにしひろし、かなざわけんじ、いしづかやすこ、やまがきとおる、
たまたがきせいぞう、たがきわいちょう

CD環のグルコース基のシグナルはかなり鋭く、スピнкаップリングによる分裂も観測できる。この結果は、Iのアルキル部分とシクロデキストリン部分の挙動(運動)が水溶液中で非常に異なっていることを示している。N-アルキルアミン部分のシグナルが異常にブロードニングしていることは、Iが水溶液系で二重膜型の会合を起こしている可能性を示唆している。アルキル鎖を C_4 , C_6 , C_8 , C_{12} , C_{16} と長くした化合物のスペクトルを測定すると、上述したシグナルのブロードニングは、 C_6 (II)では C_4 (I)と少しの変化であるが、 C_8 (III)になると非常に激しいブロードニングを示す。グルコース領域のシグナルの変化も激しい。 C_{12} (IV)になると、グルコースの7個のプロトンのシグナルは、非常にブロードな一山のシグナルになってしまう。これらの現象は、アルキル鎖が C_8H_{17} になると急激に分子の会合度が増大することを示している。更に長い $C_{12}H_{25}$ になると、分子会合の程度が更に増大しNMR的に見て巨大分子群になり、シグナルが平均化し一山のようなブロードなシグナルとなると解釈できる。

Iの水溶液の濃度を $C=5.7mM$ から $17.1mM$ 変えて 1H NMRスペクトルを測定すると、グルコース基及びブチル基の二つの領域に大きな変化(シグナルの融合化、新しいピークの出現、ブロードニング化)が見出された。これらの結果を総合すると、会合体が複数あること、会合の形態がアルキル基同志が対面した形(ミセル型)であることが示唆される。この結果は、これらのCD誘導体がクロロホルムなどの有機溶媒中でCD環同志が対面した形(逆ミセル型)で会合している結果³⁾とまったく逆の現象であり、非常に興味深い。



- 文献: 1) K. Kanazawa, H. Nakanishi, Y. Ishizuka, T. Nakamura and M. Matsumoto, *Fullerene science & Tech.*, **2**, 189-194 (1994)
- 2) H. Nakanishi, K. Kanazawa, Y. Ishizuka and W. Tagaki, *Materials Science & Engineering*, (1994) in press
- 3) 金澤健治、山垣亮、石塚靖子、前田昌徹、玉垣誠三、太垣和一郎、中西洋志 第22回構造有機化学討論会、1994.10 (福岡)

第 2 日

11月27日（日）

固体NMRの新しい展開

セッション：構造決定法

(Methods for Structure Analysis)

Rotational Resonance in a Doubly Tilted Rotating Frame

Department of Chemistry, Faculty of Science,

Kyoto University, Kyoto 606, Japan

K. Takegoshi, Kaoru Nomura, and T. Terao

ABSTRACT: We propose a new technique to recouple a particular pair of homonuclear spins in a multiple spin system. It is based on a phenomenon what may be called as rotational resonance in a doubly tilted rotating frame. A weak radio-frequency field is applied continuously to spins under magic angle spinning. Its off-resonance frequency and intensity are chosen to realize rotational resonance for a particular pair of spins in the doubly tilted rotating frame.

1. Introduction

To gain structural informations from a powdered sample, several solid-state NMR techniques have been proposed. Most of these techniques observe a dipole-dipole coupling, which is a function of a distance between spins. Among them, only the rotational resonance technique can determine a distance of a particular pair of spins in a multiple spin system. In rotational resonance experiments, one has to adjust the spinning frequency $\omega_r = \Delta/n$, where Δ is the frequency difference of the isotropic chemical shift of the two spins concerned and n is an integer number, usually 2~3, and ω_r is the spinning frequency. Difficulties would arise when the chemical-shift difference is small. Not only it is nontrivial to create a proper polarization gradient between the two magnetizations, but also the spinning speed is not fast enough to decouple the other spins. We show in this work that this difficulty can be overcome

rotational resonance/ solid-state NMR/ distance measurement

たけごし きよのり、のむら かおる、てらお たけひこ

by applying a suitable radio-frequency(rf) field. The recoupling phenomenon may be called as Rotational Resonance in a Doubly tilted rotating frame (R2D2).

2. Theory

We consider a dipolar coupled homonuclear two-spin I - S system under a rf irradiation with an intensity of ω_1 at ω . For simplicity, we neglect a chemical shift anisotropy. The total Hamiltonian in a doubly tilted rotating frame (DTR) under MAS may be given as

$$H^{DTR}(t) = H_z + H_D(t). \quad (1)$$

The first term is the Zeeman interaction and is written as:

$$H_z = -\omega_{eI} I_z - \omega_{eS} S_z, \quad (2)$$

where ω_{eX} is the strength of the effective field for the X spin:

$$\omega_{eX} = (\omega_1^2 + \Delta\omega_X^2)^{1/2}. \quad (3)$$

Here, $\Delta\omega_X$ denotes the off-resonance frequency for the X spin ($X=I$ or $X=S$). The second term denotes the homonuclear dipole interaction and is given as:

$$H_D(t) = D(t)T^{DTR}. \quad (4)$$

The geometric part $D(t)$ can be written as:

$$D(t) = G_1 \cos(\omega_r t) + G_2 \cos(2\omega_r t), \quad (5)$$

where G_i are functions of the principal values and orientation of the dipole interaction. The spin part T^{DTR} is given as:

$$T^{DTR} = A I_z S_z + B(I_+ S_- + I_- S_+) + R I_z S_x + S I_x S_z + Q(I_+ S_x + I_- S_-), \quad (6)$$

with

$$A = \cos\beta_I \cos\beta_S - (1/2)\sin\beta_I \sin\beta_S, \quad (7a)$$

$$B = -(1/8)(1 + \cos\beta_I \cos\beta_S - 2\sin\beta_I \sin\beta_S), \quad (7b)$$

$$R = -(1/4)(\sin\beta_I \cos\beta_S + 2\cos\beta_I \sin\beta_S), \quad (7c)$$

$$S = -(1/4)(\cos\beta_I \sin\beta_S + 2\sin\beta_I \cos\beta_S), \quad (7d)$$

$$Q = (1/8)(1 - \cos\beta_I \cos\beta_S + 2\sin\beta_I \sin\beta_S), \quad (7e)$$

$$\text{and } \beta_X = \arctan(\omega_1 / \Delta\omega_X). \quad (8)$$

The "rotational resonance" effect in DTR can be envisioned when we transfer the Hamiltonian into a interaction frame by $K = \exp[-i(\omega_{eI} I_z + \omega_{eS} S_z)t]$ as:

$$\begin{aligned} H^{INT}(t) &= K H^{DTR}(t) K^{-1} \\ &= D(t) \{ A I_z S_z + B(I_+ S_- \exp(i\Delta t) + I_- S_+ \exp(-i\Delta t)) \} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &+ RI_+S_+ \exp(\mp i \omega_{es} t) + SI_+S_+ \exp(\mp i \omega_{e1} t) \\
 &+ Q(I_+S_+ \exp(-i \Sigma t) + I_-S_- \exp(i \Sigma t)) \quad , \quad (9)
 \end{aligned}$$

where $\Delta = \omega_{e1} - \omega_{es}$ and $\Sigma = \omega_{e1} + \omega_{es}$.

Several R2D2 conditions may be deduced from Eqs. (5) and (9). When $\Delta = \pm \omega_r$ or $\pm 2\omega_r$, the flip-flop term would not be averaged to be zero by MAS. This is a DTR analogue of the conventional rotational resonance in a rotating frame. When $\omega_{es} = \pm \omega_r$ or $\pm 2\omega_r$, the I_+S_+ term revives, and when $\omega_{e1} = \pm \omega_r$ or $\pm 2\omega_r$, the I_+S_+ term remains. The "flop-flop" term ($I_+S_+ + I_-S_-$) becomes time-independent when $\Sigma = \pm \omega_r$ or $\pm 2\omega_r$.

3. Experimental

Triply ^{13}C labeled *I*-alanine ^1H was kindly provided by Prof. M. Kainosyo at Tokyo Metropolitan University. NMR experiments were carried out on a Chemagnetics CMX-300 spectrometer operating at resonance frequency of 75.6MHz for ^{13}C , using a home-built MAS probe.

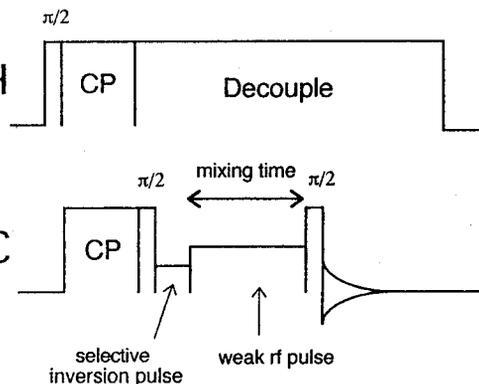


Fig.1 Pulse sequence

4. Results and Discussion

The chemical shift difference of the C_α and the C_β resonances is 2340Hz. To recouple them, we applied a rf field with an intensity of 3032Hz at the center of the two carbon resonances. The effective field strength is 3250Hz for the two carbons. The spinning frequency is $\omega_r = 6500\text{Hz}$, thus satisfying the R2D2 condition of $\Sigma = \omega_r$. The effective field strength for the C=O carbon spin is 11155Hz, and none of the R2D2 conditions is satisfied for the C=O carbon. Figure 2 shows the observed mixing time dependence of the magnetizations of C=O (\square), C_α (\circ), and C_β (\times). During the mixing time, all magnetizations rotate about the corresponding effective field. At the same time, the magnetizations of the C_α and the C_β carbons decay to almost zero, while that of the C=O carbon stays almost constant. The decays of the former magnetizations are caused by the flop-flop motion of the magnetizations. The solid lines through the data points are the simulated ones. For comparison, the

calculated lines without the dipole interactions are shown in Figure 3, where only the rotation around the effective field is appreciable. These simulations have been done for a three spin system. We have done a simulation including only two spins, C_α and C_β . The calculated lines are in good agreement with those calculated for the three spin system (not shown). This shows that we can simulate the R2D2 experimental data for a multiply labeled sample by considering only the two spins concerned.

To conclude, the present R2D2 method enable us to recouple a pair of spins whose chemical shift difference is too small to apply the conventional rotational resonance method. The current R2D2 experiment may be understood as a selective homonuclear Hartman-Hahn experiment under MAS.

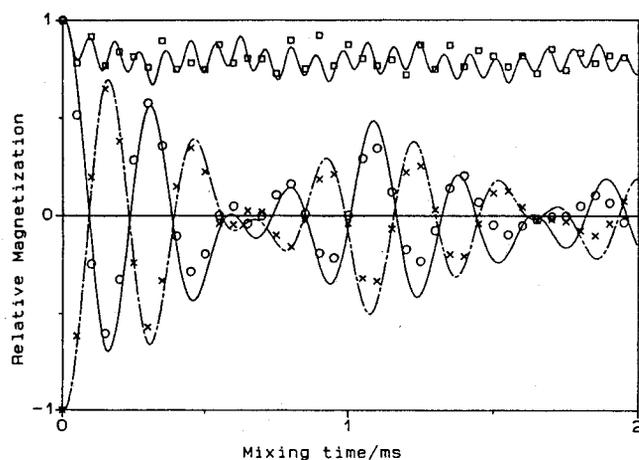


Fig.2 Mixing time dependence of the C_α (\circ), C_β (\times) and $C=O$ (\square) magnetizations. The solid lines are calculated ones.

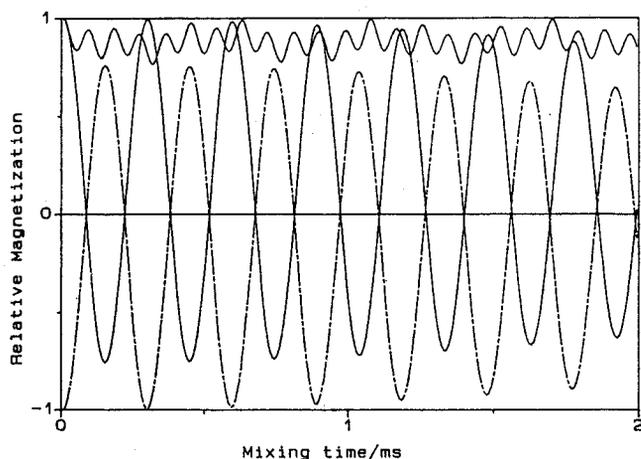


Fig.3 The calculated mixing time dependence for the R2D2 experiment simulated without dipole interactions.

L 8

MAS条件下での異方的相互作用相関多次元固体NMRによる 二面角決定法の開発

横浜国立大学・工学部

○下村泰次、藤原敏道、阿久津秀雄

The development of multi-dimensional solid-state NMR for determining dihedral angles by correlating anisotropic interactions under MAS conditions

Taiji Shimomura, Toshimichi Fujiwara and Hideo Akutsu
Faculty of Engineering, Yokohama National University

Multi-dimensional NMR spectroscopy has been developed for correlating anisotropic interactions of different spins in rotating solids. In this experiment, the evolution periods for anisotropic interactions, such as heteronuclear dipolar couplings and chemical shift anisotropies, are connected by a mixing period during which magnetizations are transferred between spins. The spectra obtained with the experiment depend on mutual orientations of tensorial interactions which specify dihedral angles. These correlation spectra are resolved by additional isotropic chemical-shift evolutions. Thus, this method provides information on dihedral angles for a number of spin pairs distinguished by isotropic shift.

Rf multi-pulse sequences for recovering anisotropic interactions under MAS conditions were newly designed for this experiment. Simulated and experimental results are presented for powdered amino acids labeled with ^{13}C nuclei.

NMRから得られる分子の立体構造を決める情報には、核間距離と二面角などの角度がある。固体NMRでは、 ^{13}C などで標識した分子については回転共鳴法などでコンフォメーションを決めるような核間距離が測定できるようになってきたが、角度情報を得るための系統的な方法は確立されていない。

そこで、私たちは異なるスピンについて双極子相互作用や化学シフト異方性など異方的相互作用のテンソルの相対的配向を決めることから、二面角情報を得る方法の開発を行っている。この方法の分解能・感度を高くするためには、シグナルがシャープで等方化学シフトの違いで分解できるマジック角試料回転(MAS)条件下で観測を行うことが有利である。MAS条件下ですべての実験を効率的に行うためには、MASにより平均化され弱まってしまう異方的相互作用が弱まらないように工夫する必要がある。このために、新しく高速MASを行いながら化学シフト異方性のみ作用するパルス列とCH双極子結合のみ作用するパルス列を数値シミュレーションに基づいて設計した。また、この方法では化学シフト異方性やCH双極子相互作用など大きな相互作用から構造情報を得ているので、 ^{13}C を多数同位体標識し弱い ^{13}C 間相互作用が増えた試料についても二面角情報を得ることが可能と考えられる。

マジック角試料回転、多次元固体NMR、二面角

しもむら たいじ、ふじわら としみち、あくつ ひでお

今回、 ^{13}C ラベルしたアミノ酸の主鎖にこの多次元NMR法を適用し、基礎的な検討を行ったので報告する。

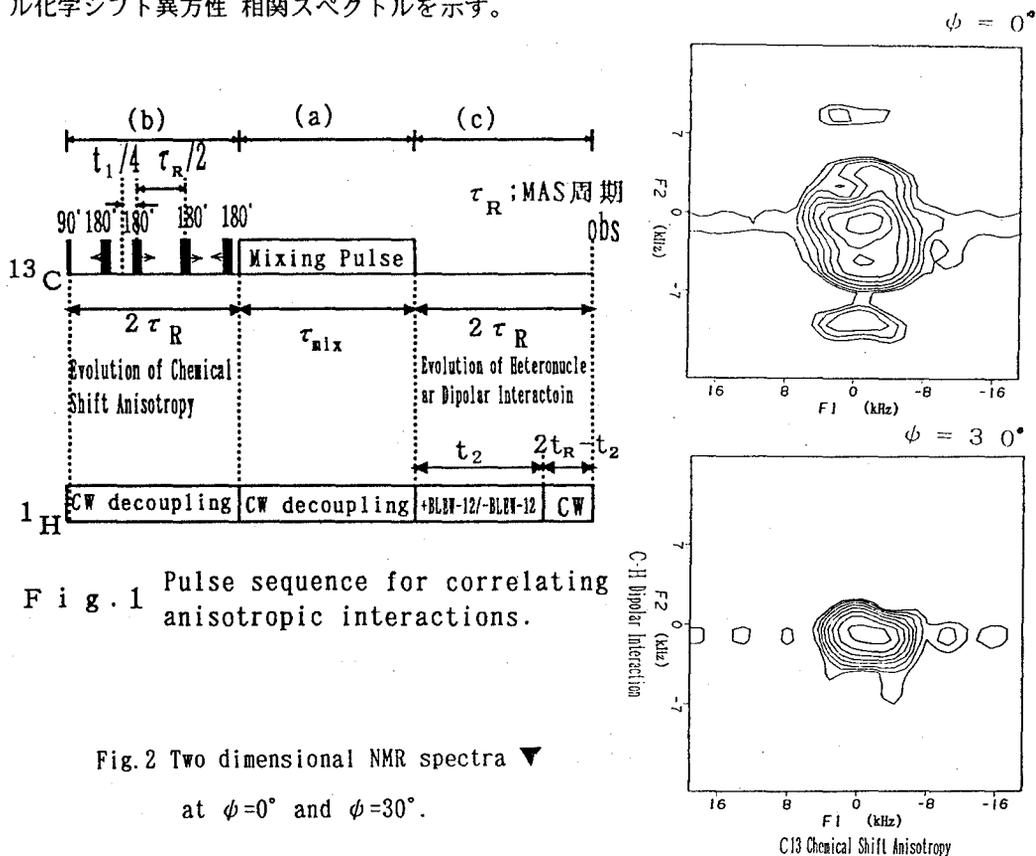
この多次元NMR法の基本となるパルス系列は、CH双極子結合あるいは化学シフト異方性による展開期を、スピン間で磁化移動を行う混合期で結びつけたものである。これにより異なるスピンについての異方的相互作用の相関スペクトルが得られる。さらにこの相関スペクトルを等方化学シフトの違いで各スピン対へ分解するために、等方化学シフト展開期や選択励起法と組み合わせる。

混合期：化学シフトに依存しない炭素間スピン結合による磁化移動法、例えば双極子あるいはJ結合によるHOHAHAパルス列などを用いる。(Fig. 1, a)

異方的化学シフト展開期：展開期の実時間は $2\tau_R$ (τ_R は試料回転周期)で一定であるが4つの π パルスを仮想時間とともに移動させることで異方的化学シフトのみが展開する(Fig. 1, b)。

CH双極子結合展開期：CH双極子結合が働く期間中は $\tau_R/2$ ごとにプロトンに照射するホモデカップリング・パルス列BLEW12(+)とBLEW12(-)を切り替えることで、MASによる双極子結合の平均化を防いでいる(Fig. 1, c)。ここで、BLEW12(+)とBLEW12(-)では残る異種核双極子結合の符号が異なるようにrfパルス位相を変えている。

Fig. 2に上記の方法で得たアミノ酸主鎖の二面角 ϕ に依存するC-H双極子結合-カルボキシル化学シフト異方性 相関スペクトルを示す。



L9

^{13}C 固体高分解能NMRによるバクテリオロドプシンの高次構造とダイナミックスの検討

(姫工大・理) 辻 暁、内藤 晶、○斉藤 肇

Conformation and Dynamics of Bacteriorhodopsin as Studied by High Resolution Solid State ^{13}C NMR Spectroscopy

S. Tuzi, A. Naito and H. Saito

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We have recorded ^{13}C CP-MAS and DD-MAS NMR spectra of untreated [$3\text{-}^{13}\text{C}$]- and [$1\text{-}^{13}\text{C}$]Ala-, [$1\text{-}^{13}\text{C}$]Leu- and Val-labelled bacteriorhodopsin(bR) and those cleaved with carboxypeptidase A and papain, to gain insight into conformation and dynamics of the transmembrane α -helices, loops and C-terminus. It turned out that the C-terminus does not contribute to the ^{13}C CP-MAS NMR peaks of bR recorded at ambient temperature. The observed ^{13}C CP-MAS NMR signals were thus ascribed to the α_1 (20%) and α_{11} (60%) helices and loops (20%). The ^{13}C NMR signals from the C-terminal residues were significantly enhanced by the DD-MAS NMR spectra. It was found that the terminal end, residues 245-248, takes random coil whereas the inner segment (231-244) participates in an ordered conformation.

PMにおけるbRのようなタンパク質と脂質の複合体では、有効分子量が大きくかつ3次元結晶の作成が容易でなく、タンパク質構造解析の標準的手法ともいふべき溶液における多次元NMRやX線回折による解明が容易ではない。固体高分解能NMRはこのような系の解析に適した方法ではあるが、bRにおいては光反応にともなうクロモフォア-の構造変化の研究が主になされ、オプシンの構造変化に焦点をおいた研究はほとんどなされていない。われわれの研究室では、固体における特定の原子間距離を回転エコー二重共鳴(REDOR)法により精密に測定し、その結果をもとに分子の三次元構造を組み立てるための基礎的な検討と¹⁾、その手法の膜タンパク質構造への応用を目標として研究をすすめている。本研究では、そのための第一歩として種々の受容体タンパク質研究のモデルとしてbRを選び、 ^{13}C 標識と標識位置の異なる高次構造サイトへの信号の帰属、ならびにそのダイナミックスを調べる研究を進めており²⁻⁴⁾、そこで得られた結果の一部を報告する。

(1) ^{13}C 標識bR

それぞれ[$1\text{-}^{13}\text{C}$]Leu, -Val -Alaによって標識したbRの ^{13}C NMRスペクトルは、図1に示

固体高分解能NMR, バクテリオロドプシン、コンホメーション、ダイナミックス

つじ さとる、ないとう あきら、さいとう はじめ

すように多数のスペクトル線からなる。これまでに得られているモデル系の信号位置から、170-172ppm、175ppmより低磁場側の信号は、それぞれ β シート、膜貫通 α ヘリックスに帰属される。LeuおよびVal残基については β シート構造の存在が明らかであること、さらにはLeu残基における信号の広がりや他に比べて少ないのが特徴で、その理由はこの残基のほとんどが膜貫通ヘリックス内に局在していることによる。

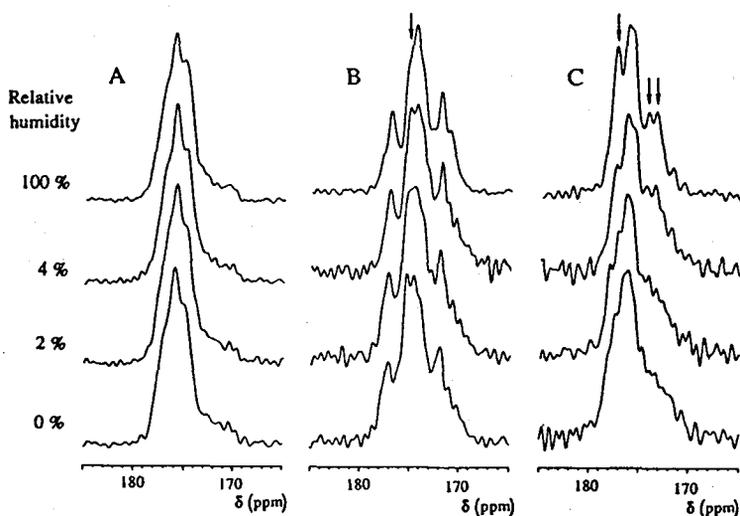


図1 [1- ^{13}C]Leu(A), Val(B), Ala(C)標識bRの ^{13}C CP-MAS NMRスペクトル

(2) 膜貫通 α ヘリックス

図2に示すように、[3- ^{13}C]Ala標識bRの相対湿度100%における ^{13}C CP-MAS NMRスペクトルは、構成する各成分へのdeconvolutionにより、少なくとも4本のピークに分けられる。Ala C β 信号における通常の α ヘリックス(α_1 ヘリックス)の信号位置は、固体(Ala) $_n$ における値から14.9 ppmであるにもかかわらず、図2における信号強度が最も強いピークは16.3 ppmと、1.4ppmと有意の違いが見られる。KrimmらはIRスペクトルに基づき、bRにおける膜貫通ヘリックスは通常の α_1 とは異なり、(Ala) $_n$ のヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)溶液中でとるねじれた α ヘリックス(α_{11} ヘリックス)であると提案している。実際、HFIP溶液中での(Ala) $_n$ におけるAla C β ^{13}C 化学シフトは15.8 ppmに観測され、固体と溶液における差を考慮すると、上記の16.3 ppmピークは α_{11} ヘリックスに帰属するのが妥当である。一方、最も高磁場に出現しているピークは14.9 ppmであり、これが通常の α_1 ヘリックスであることは自明である。

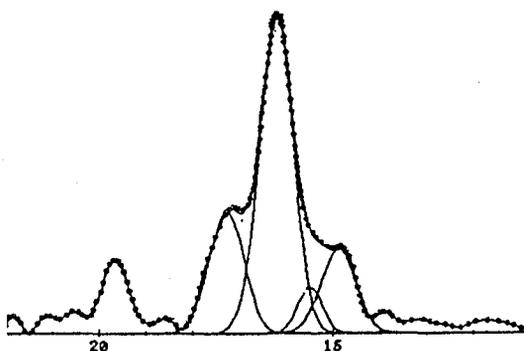


図2 [3- ^{13}C]Ala-bRの ^{13}C CP-MAS NMRのdeconvolution

(3) C末端部位およびループ

一般に、標準的な固体高分解能NMRの手法である交差分極マジック角回転(CP-MAS)法では、特定の部分に速い揺らぎがある場合にはその部分の信号が消滅することが知られている。C末端部位のコンホメーションについては、蛍光標識の結果から速い揺らぎの状態

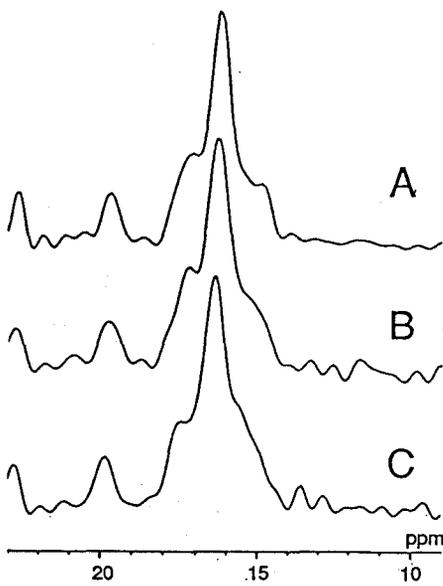


図3 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala-bR}$ の ^{13}C CP-MAS NMR
 スペクトル(A)未処理、(B)カルボ
 シルペプチダーゼA処理、(C)パパイ
 ン処理。

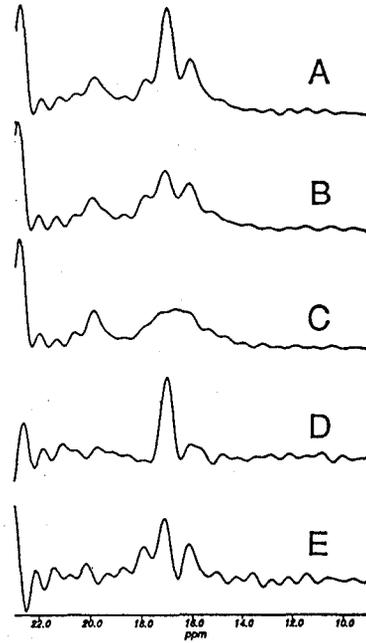


図4 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala-bR}$ ^{13}C DD-MAS NMRスペクトル
 (A)-(C):図3と同じ、(D)A-B、(E) B-C

にあるとのデータと、特定の高次構造をとり揺らぎが制限を受けるとの相反する結果が出されていた。図3の ^{13}C CP-MAS NMRスペクトルは、未処理、タンパク質分解酵素によりC末端の一部、C-末端のほとんどを除去したものを比べているが、そのスペクトルパターンに変化が現れていないことがわかる。すなわち、CP-MAS NMRスペクトルにはC末端部位に由来するAla残基からの信号の寄与がほとんど見られないことを意味している。このような分子運動の存在による信号が消滅する場合、高出力プロトンデカップリングのみのDipolar decoupled (DD)-MASの実験により、失われた信号の回復が期待出来る。実際、図4Aに示すように、未処理試料では17.0 ppmに強い信号が見られるが、カルボキシペプチダーゼA処理によって、その信号が消滅することがわかる(水和量100 wt%)。この間の事情は、図4Dに示すA-Bで示す差スペクトルをとることにより明確にわかる。すでに調べられているモデル系の化学シフトデータから、切断されるべき部位245-248にあるAla残基はランダムコイル構造をとることが結論できる。一方、B-Cの差スペクトルは残基231-244に関する情報を与えるが、17.016.1 17.8 ppmにより明確な信号が見られ、ランダムコイルの他 α ヘリックス、ターンをふくむfolding構造をとることがわかった。このことは、従来の2種類の蛍光標識実験にも対応している点で興味深い。

図2、図3に見られる17.1-17.8 ppmに現れる信号は、これまでの議論から明かなようにヘリックス間をつなぐループ位置にあるAla C β からのものである。現在のところ、ターンに関するreference化合物に由来する ^{13}C 化学シフトデータの集積には至っていないもの

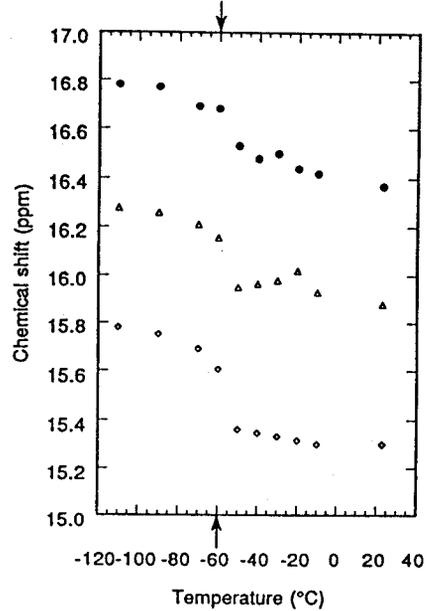
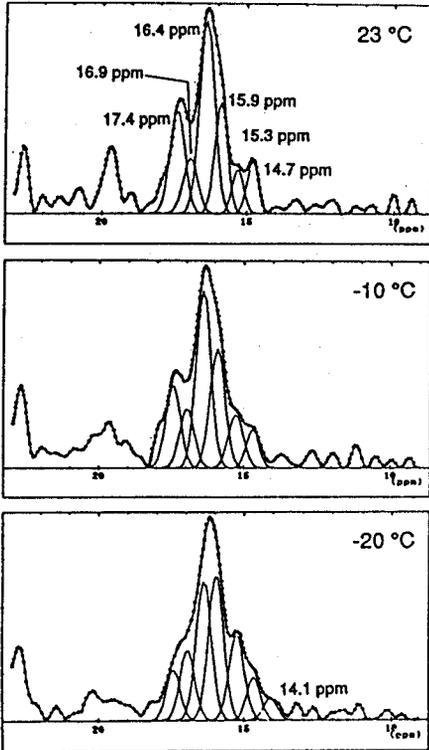


図5 (左) ^{13}C CP-MAS NMRスペクトルの温度変化とそのdeconvolution

図6 (上) ^{13}C 化学シフトの温度変化

の、これらの部位にあるAla残基への帰属はreasonableであると考えられる。

(4) 温度変化

HendersonらによるbRの3次元構造モデルは、 $-200\text{ }^\circ\text{C}$ における電子顕微鏡測定データに基づいている。それゆえ、常温におけるbRの ^{13}C NMR測定データが、低温における値と同一であるか、もし変化があるとすればどのような違いが見られるのか、常温におけるbRの高次構造とその揺らぎに関連して重要な問題である。図5は5mM HEPES, 10mM NaCl存在下のbRの ^{13}C NMRスペクトルの温度変化と、そのdeconvolutionスペクトルを示す。よりnativeな測定条件を反映して、スペクトルの分解能が向上しており図2の場合に比べてその成分の数が増えている。温度変化の第一の特徴は、majorな α_{11} ヘリックスをとる16.4, 15.9ppmの相対強度が23度から -40 度の間で10%程度の変化が見られること、第二に図6に示すように、 α ヘリックスピークの化学シフトが -60 度を中心に大きく変化することがわかる。これは、膜貫通 α ヘリックス構造が常温と低温の間で異なることを示している。さらに、これら異なるタイプのヘリックス構造が、揺らぎによって平均化されず、少なくとも 10^2 s^{-1} よりもおそい時間尺度で個々の状態で存在していることがわかる。なお、上記の第二の特徴でのべた温度変化挙動は、これまでに発表されている中性子散乱における非調和運動の開始と軌を一にしており、bRの生物活性との関連で興味深い。

1) 斉藤 肇、内藤 晶、生物物理、33, 274-279 (1993). 2) S. Tuzi, A. Naito, H. Saito, Eur. J. Biochem., 218, 837-844(1993). 3) S. Tuzi, A. Naito, H. Saito, Biochemistry, in press. 4) S. Tuzi, A. Naito and H. Saito, Manuscript in preparation.

SEPARATION OF PARAMAGNETIC AND QUADRUPOLEAR
INTERACTIONS

P 43

京大理・O Spaniol Thomas P., 久保 厚, 寺尾 武彦

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University
Thomas P. Spaniol, Atsushi Kubo, Takehiko Terao

A new two-dimensional, ^2H magic-angle-spinning NMR experiment for studying paramagnetic compounds is presented. This technique allows to extract parameters of the anisotropic paramagnetic shift via the two-dimensionally spread spinning sidebands.

NMR spectroscopy of paramagnetic compounds has the potential to provide information about the molecular structures. It also can serve as a tool to investigate the electronic environment of the observed nucleus [1]. The anisotropy of this interaction can directly be obtained from experiments in the solid state. The parameters of the paramagnetic shift can be extracted from magic-angle-spinning (MAS) NMR spectra via the intensity pattern of spinning sidebands [2]. At present, only few studies are carried out in this field due to the expected low resolution, especially for ^1H -NMR spectroscopy.

We are observing the ^2H resonance in selectively deuterated compounds, because generally a high resolution is expected for ^2H compared to ^1H . For this spin system, the additional quadrupolar interaction will lead to spectra with complicated lineshapes. In addition, the tensors describing these interactions will generally be oriented differently with respect to each other. If one interaction is dominant, the simulation of the spinning sideband pattern cannot give reliable parameters of the two interactions (without very high experimental accuracies). This problem, however, can be solved by separating the two tensors using two-dimensional (2D) NMR spectroscopy.

Method

We present a new magic-angle-spinning 2D-NMR experiment, for separating paramagnetic and quadrupolar interactions, based on the pulse scheme

$$(90^\circ)_{\phi_1} - (t_1) - (180^\circ)_{\phi_2} - (t_2, \text{acquisition})_{\phi_x}$$

$$(\phi_1, \phi_2, \phi_x) = (x, x, y), (-x, x, -y), (y, x, x), (-y, x, -x)$$

(which may be combined with CYCLOPS)

During the evolution time t_1 and the acquisition time, the density operator evolves under a quadrupolar and a chemical

キーワード: 常磁性 NMR, 四極子, 二次元 NMR, 重水素
シュバニオール トーマス, くぼ あつし, てらお たけひこ

shift Hamiltonian. The FID signal is given by:

$$S(t_1, t_2) = \text{Tr}\{I^+U(t_2)P(180^\circ)U_1(t_1)I^+U_1^{-1}(t_1)P^{-1}(180^\circ)U_2^{-1}(t_2)\},$$

described by the propagator $U(t) = \exp\{-i \int [H_Q(t) + H_C(t)] dt\}$.

If pulse imperfections are ignored, the FID can be expressed by:

$$S(t_1, t_2) = \cos[\theta_Q(0, t_1) + \theta_Q(t_1, t_1+t_2)] \exp[-i \theta_C(0, t_1) + i \theta_C(t_1, t_1+t_2)]$$

where $\theta_Q(t_a, t_b) = \int_{t_a}^{t_b} \omega_Q(t) dt$ and $\theta_C(t_a, t_b) = \int_{t_a}^{t_b} \omega_C(t) dt$ contain the quadrupolar and paramagnetic-shift interaction parameters which are time-dependent due to magic-angle sample spinning.

The 2D spectrum obtained by 2D Fourier-transforming $S(t_1, t_2)$ is such that the two interactions appear almost separately along the different diagonals.

When we take the effects of finite pulse width into account, our calculations indicate the appearance of some additional signals. Errors due to mis-setting of the pulse flip angle also lead to slight off-diagonal peak positions.

The same experimental results can be obtained using the pulse sequence

$$(90^\circ)_{\phi_1} - (t_1) - (54.7^\circ)_{\phi_2} - (125.3^\circ)_{\phi_3} - (t_2, \text{acquisition})_{\phi_r}$$

$$(\phi_1, \phi_2, \phi_3, \phi_r) = [n\pi/2, 0, m\pi/2, (m-n)\pi/2] \text{ with } n, m = 0, \dots, 3$$

This experiment can be carried out using a mixing time τ between the 2. and the 3. pulse. Thereby, a 'rotor synchronized' experiment with $\tau = nT_r$ and a 'time-reversed experiment' with $\tau = nT_r - t_1$ may be combined, in order to obtain phase sensitive spectra [3]. For the latter experiment, the following phase cycling is used:

$$(\phi_1, \phi_2, \phi_3, \phi_r) = [n\pi/2, 0, m\pi/2, (m+n)\pi/2] \text{ with } n, m = 0, \dots, 3$$

Experiments

We present spectra recorded with the pulse sequence $\pi/2-t_1-\pi-t_2$ for the CD_3 -group of metal acetates. The NMR measurements were performed on a Chemagnetix CMX300 spectrometer at a deuterium frequency of 46.12 MHz. The spinning speed was stabilized to 3333 ± 2 Hz. A π -pulse width of 8 μs was used.

Results

For $\text{Zn}(\text{CD}_3\text{COO})_2$ (Fig. 1), all major spinning sidebands are found along the diagonal, corresponding to the quadrupolar interaction. As expected, no contributions from an anisotropic paramagnetic shift are detected. For this system, chemical shift interactions [4] are negligible compared to the quadrupolar

coupling constant e^2qQ/h of ca. 53 kHz. The sidebands along the other diagonal are due to effects of the finite pulse width, as shown by simulation.

For $\text{Pr}(\text{CD}_3\text{COO})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fig. 2), the spectrum shows two resolved, independent peaks. Compared to the one-dimensional NMR spectrum, the resolution is increased. The ^{13}C NMR experiment of this compound also shows the presence of only two separate acetate groups [5]. In the crystal structure, two acetate ligands occupy similar positions, while the third one is binding in a different way [5]. Our spectrum shows a wide spread of off-diagonal spinning sidebands, which are caused by the anisotropic paramagnetic interaction. This spectrum can be simulated, based on the known crystal structure [5]. To do this, the magnetic properties of the lanthanide atoms are assumed to be identical to those of the free ions [6], and an isotropic magnetic susceptibility for Pr(III) is used [7]. To obtain an acceptable agreement with the experimental result, effects of the finite pulse width and the pulse flip angle errors must be taken into account. The results are presented on our poster.

We are currently trying to estimate, to which extent the dipolar coupling with residual ^1H -atoms may interfere, as well as effects from an anisotropic bulk magnetic susceptibility.

Outlook

This method shall provide ^2H -NMR spectra of paramagnetic compounds with good resolution, especially where the ^1H nucleus would be unsuitable to be studied. A special interest lies in the potential determination of the electron spin density distribution in coordination compounds. The method also offers the chance to straightforwardly extract the quadrupolar coupling constant, where the anisotropic paramagnetic contribution strongly dominates.

Acknowledgments

T.P.S. would like to thank the Japan Society for the Promotion of Science for the award of a postdoctoral research fellowship, and the Alexander von Humboldt-Foundation for kind help.

Literature

- [1] G.N. La Mar, W.DeW. Horrocks Jr. R.H. Holm, *NMR of Paramagnetic Molecules*, Academic Press, New York (1973).
- [2] A. Nayeem and J.P. Yesinowski, *J. Chem. Phys.* 89, 4600 (1988).
- [3] A.S. Hagemeyer, K. Schmidt-Rohr and H.W. Spiess, *Adv. Magn. Reson.* 13, 85 (1989).
- [4] T.M. Duncan, *A Compilation of Chemical Shift Anisotropies*, Farragut Press, Chicago (1990).
- [5] S. Ganapathy, V.P. Chacko, R.G. Bryant and M.C. Etter, *J. Am. Chem. Soc.* 108, 3159 (1986).
- [6] A.R. Brough, C.P. Grey and C.M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 7318 (1993).
- [7] B. Bleaney, *J. Magn. Reson.* 8, 91 (1972).

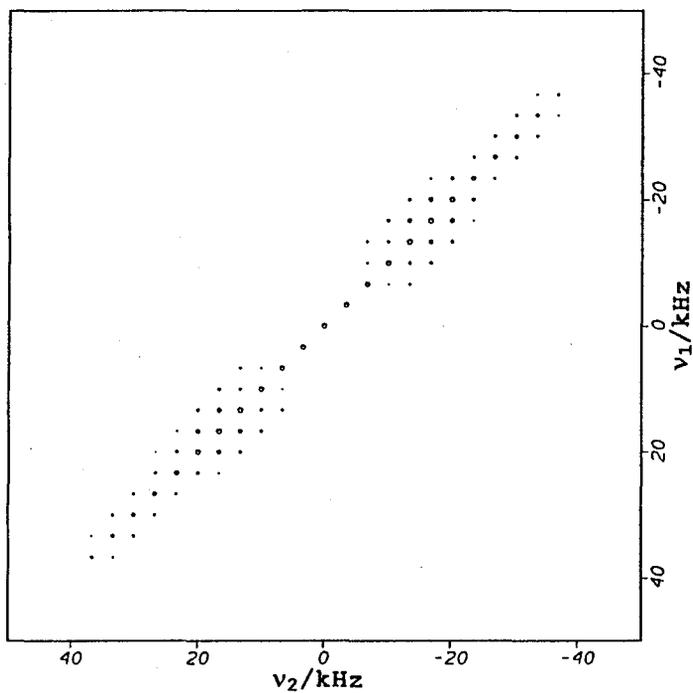


Fig. 1 Contour plot of the experimental spectrum of $\text{Zn}(\text{CD}_3\text{COO})_2$

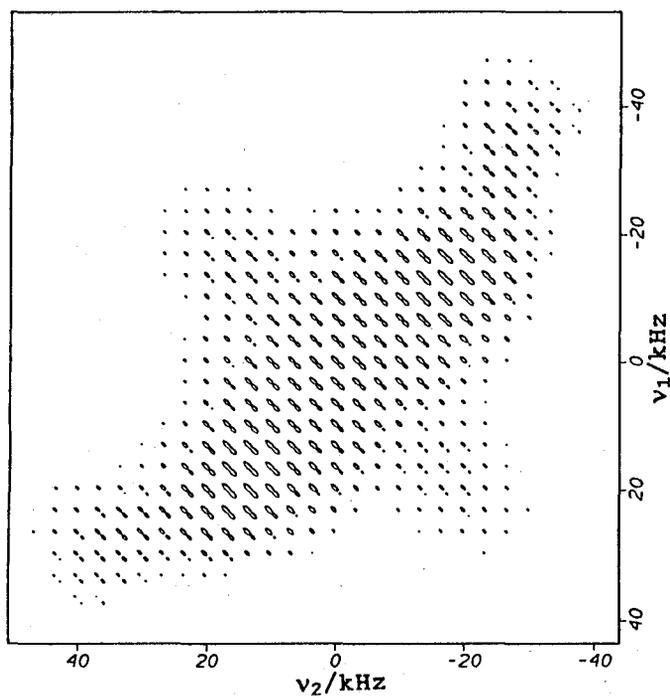


Fig. 2 Contour plot of the experimental spectrum of $\text{Pr}(\text{CD}_3\text{COO})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

P 44

固体NMRによる ^{13}C - ^{15}N 核間距離の精密測定法と
 ^1H - ^{13}C 双極子相互作用の新しい測定法の開発

京大理

○石井佳誉、寺尾武彦

Measurements of dipolar spectra for ^{13}C - ^{15}N using the MLEV8/8R sequence with composite pulses and for ^{13}C - ^1H using the combined use of the WIM-12/FSLG-2 sequence and MAS

○Yoshitaka Ishii and Takehiko Terao

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University

A triple-resonance NMR method is proposed, which enables us to accurately measure a ^{13}C - ^{15}N internuclear distance by observing the Pake doublet pattern. It is shown that a simple way of applying the Carr-Purcell trains to both spin systems yields a superposition of two Pake doublets because of a finite pulse-width effect. The proposed sequence MLEV8/8R, in which the MLEV8 pulse cycle and the reversed one are coincidentally applied to ^{13}C and ^{15}N , respectively, provides a single Pake doublet, also highly compensating off-resonance effects and flip-angle errors. Using this sequence, the 2- ^{13}C - ^{15}N bond distance in glycine was determined to be $r=1.498\text{\AA}$ (-0.001, 0.002). In addition, a new pulse sequence is proposed to obtain a ^{13}C - ^1H dipolar spectrum under MAS.

[序論] 我々は本研究において、高磁場下で、Carr Purcell改良系列を ^{13}C 、 ^{15}N に同時に照射することにより、 ^{13}C 、 ^{15}N のケミカルシフトを消去し、核間距離のみに依存する ^{13}C - ^{15}N 間の双極子相互作用を精度よく求めるアプローチを検討した。

固体NMRの実験を行う際にその精度を低下させるものとして、ラジオ波 (rf) の不均一性、オフレゾナンス効果、rfパルスが有限の幅をもつ効果、デカップリングの不完全性の効果などの実験の非理想性が存在する。前年のNMR討論会で我々はこれらの及ぼす効果を徹底的に検討し、従来発表されているCarr-Purcell改良系列を ^{13}C 、 ^{15}N に同時に照射した場合、実験の非理想性が距離測定の精度に大きく影響を与えることを示し、それらを解消するMLEV8 / 8Rパルス系列を発表した。しかし、高磁場下でのカルボニル炭素など、ケミカルシフト異方性に起因する大きなオフレゾナンスを持つ試料に対して、若干精度が落ちることが問題であった。そのため、更に補償性能の良い、コンポジットパルスを組み込んだMLEV8 / 8Rパルス系列を検討した。

また、REDOR、SEDRAなどでも大きな問題になっており、前年触れなかったデカップリングの不完全性の効果を定量的に議論し、その解決策を示す。

キーワード：固体 ^{13}C -NMR、CPMG、精密距離決定、異種核間双極子相互作用
○いしいよしたか、てらおたけひこ

また、マジック角回転 (MAS) の下で、 $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ の双極子相互作用を静止サンプルと近似的に同じ形で復活させ、 $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ の双極子パウダーパターンを観測するための新しいパルス系列を考案した。

< $^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ 核間距離の精密測定>

[理論] 今回検討した、コンポジット π パルス $R(90y240x90y)$ を組み込んだMLEV8 / 8^R パルス系列は (^{13}C : $\tau\text{-}R\text{-}2\tau\text{-}R\text{-}2\tau\text{-}\bar{R}\text{-}2\tau\text{-}\bar{R}\text{-}2\tau\text{-}\bar{R}\text{-}2\tau\text{-}R\text{-}2\tau\text{-}R\text{-}2\tau\text{-}\bar{R}\text{-}\tau$ / ^{15}N : $\tau\text{-}\bar{R}\text{-}2\tau\text{-}R\text{-}2\tau\text{-}R\text{-}2\tau\text{-}\bar{R}\text{-}2\tau\text{-}\bar{R}\text{-}2\tau\text{-}\bar{R}\text{-}2\tau\text{-}R\text{-}2\tau\text{-}R\text{-}\tau$)により表される。ここで 2τ はパルスのインターバルである。0次のアベレージハミルトニアン計算により、観測される双極子相互作用によるベークダブレットの分裂幅 Δ は次の式で表される。

$$\Delta = D_{CN} \{1 - (\tau w_{90} + \tau w_{240}) / (2 * \tau w_{90} + \tau w_{240}) d\} \quad (1)$$

$$D_{CN} = \mu_0 \gamma_I \gamma_S h / (8\pi^2 r_{CN}^3)$$

ここで、 r_{CN} はC-Nの核間距離、 d はデューティファクター、 τw_{90} と τw_{240} はそれぞれ90度、240度パルスのパルス幅を示す。したがって、観測されるダブレットは実際よりも若干スケールダウンされたものとなる。

非理想性に対する補償性能を示すため、ベークダブレットのピークの位置に対応する単結晶に対し、非理想性を含めた条件でのマルチステップシミュレーションを行ないスペクトルを得た。式(1)を用いて得られた見かけの核間距離のフリップ角依存性とオフレゾナンス依存性を、それぞれFig.1a, bに示す。 ^{13}C , ^{15}N に照射したrf場の強度 H_1 は33.3kHzと弱いにも関わらず、コンポジット π パルスを組み込んだMLEV8 / 8^R パルス系列により十分な補償性能が得られていることがわかる。

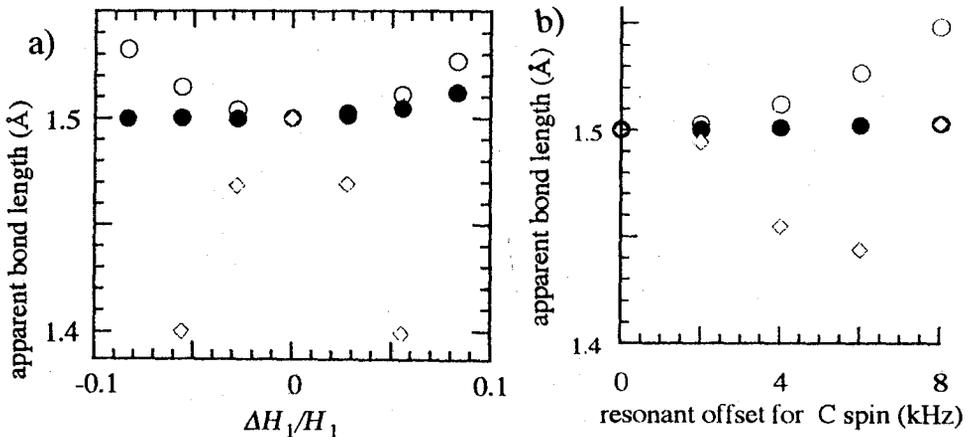


Fig. 1. Flip-angle (a) and Off-resonance (b) dependence of apparent internuclear distances obtained from the single-crystal spectra numerically calculated by a multistep method. Diamonds: double Carr-Purcell sequence, open circles: MLEV8/ 8^R sequence with simple π pulses, filled circles: MLEV8/ 8^R sequence with composite pulses $(\pi/2)_y(4\pi/3)_x(\pi/2)_y$. H_1 for π pulses was assumed to be 33.3kHz for the both spins. ΔH_1 was added to H_1 for both spins, while offset frequencies were changed only for the I spin. $\tau_c = \tau_w + 2\tau = 125\mu\text{s}$ for all.

このような ^{13}C マルチパルス実験では ^{13}C に照射したパルスと ^1H デカップリングが干渉を起こし、 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用を復活させる(リカップリング)。この効果を π パルス幅内の ^1H - ^{13}C 双極子の0次の平均ハミルトニアン \bar{H}_{DIS} を算出することにより見積もった。ここでは簡単のため ^1H - ^{15}N は無視して、REDOR, SEDRAなどの多くの実験に適用できる単純な π パルスを照射した場合について示す。

$$\bar{H}_{DIS} = \sum_{j=1}^N \pi D_j (p I_Z S_Z + q I_Z S_Y + r I_Y S_Z + s I_Y S_Y)$$

$$p = -\sin\phi / (\phi + \pi) - \sin\phi / (\phi - \pi)$$

$$q = (\cos\phi + 1) / (\phi + \pi) - (\cos\phi + 1) / (\phi - \pi)$$

$$r = (\cos\phi + 1) / (\phi + \pi) + (\cos\phi - 1) / (\phi - \pi)$$

$$s = \sin\phi / (\phi + \pi) - \sin\phi / (\phi - \pi) \quad (2)$$

ここで $\phi = \omega_H \tau_W$, τ_W は π パルス幅, ω_H は ^1H のrf強度。さらに、2次モーメントの計算により、スペクトルの線幅 ν を見積もった。それによると

$$\nu(\phi, D_j) \approx \ln \left\{ 1 - \sum_{j=1}^N (\pi \tau_w D_j)^2 (p^2 + q^2 + r^2 + s^2) / 8 \right\} \quad (3)$$

Fig.2に $\nu(\phi, D_j)$ をプロットした。 $\phi = 3\pi$, つまり ^{13}C のパルスに対し3倍のデカップリング場を照射したときリカップリングによる影響が無くなると推測できる。

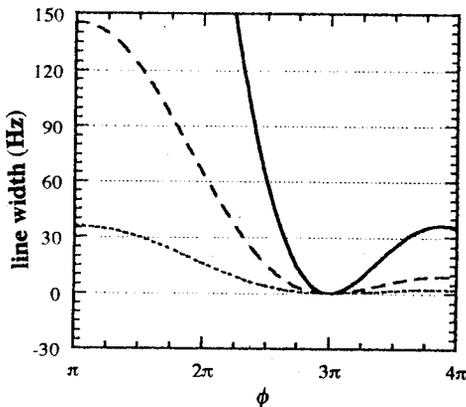


Fig.2. ϕ dependence of the line width for Double Carr Purcell experiments using simple π pulses, which is calculated from eq(3). The I-S dipolar couplings are 5kHz (dotted line), 10kHz (broken) and 20kHz (solid). $\tau_c = 125\mu$, $\tau_w = 15\mu$

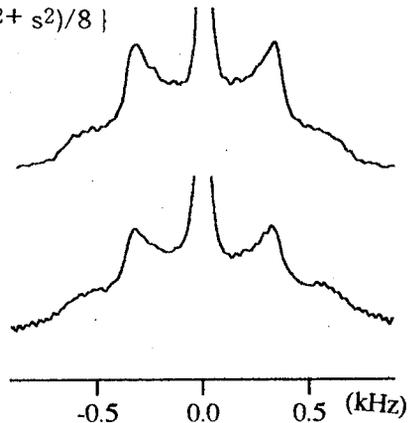


Fig. 3. ^{13}C spectra of 10% 2- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ doubly labeled glycine, which were obtained using MLEV8/8^R with $(\pi/2)_y (4\pi/3)_x (\pi/2)_y$. $\tau_c = 130\mu\text{s}$, $\tau = 45\mu\text{s}$ and $H_{1C} = H_{1N} = 33\text{kHz}$. For ^{13}C , offset is 0kHz for the upper spectrum and 12kHz for the lower one. The difference between them is only small distortion seen in the lower one, that is ascribed to the imaginary component of the center band due to sampling at every pulse interval.

[実験] Chemagnetics CMX300 spectrometerに自作の3重共鳴プローブを組み込み実験を行い、10% Doubly labeled $2\text{-}^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ glycine 粉末試料に対してFig.3 上段のスペクトルを得た。下段に ^{13}C のオフセットを12kHzにしたときのスペクトルを示す。大きなオフセットも関わらずほとんど変化は見られない。また、様々な τ の条件で実験を行ない、 Δ の d 依存性を求めた。式1による最小二乗フィットした結果、C-N間距離を1.498Å (-0.001, 0.002)と精度よく決定した。示された誤差はランダムエラーだけでなく、 $\pm 2\text{kHz}$ のオフセットと $\pm 5^\circ$ のフリップ角エラーを仮定したときの系統的な誤差を含んでいる。また、リカップリングの影響を実験により検証した (Fig. 4.)。

[結論] 非理想的条件下でもコンポジットパルスを組み込んだMLEV8 / 8^R パルス系列により精度良く測定できることを明らかにした。X線結晶解析や溶液のNMRでは低い精度でしか測定できない大きな分子の局所構造を高精度で決定できることがこの方法により期待できる。発表では、MLEV8 / 8^R と比較すべきREDOR法の非理想的条件下での測定精度、さらにMLEV8 / 8^R による遠い核間距離の測定を検討し、MLEV8/ 8^R の有用性を示す。

<MAS下での $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ の双極子パウダーパターン測定法の開発>

マジック角回転 (MAS) の下で、 $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ の双極子相互作用を静止サンプルと近似的に同じ形で復活させ、 $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ の双極子パウダーパターンを観測するための新しいパルス系列を考案した。これはCPの後に [WIM12-WIM12-FSLG2-WIM12-WIM12] Nを ^1H に照射し、 ^{13}C を観測するものである。ただし、[] は1ローターサイクルに照射され、WIM12は $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ と $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ の両方の双極子相互作用を消去し、FSLG2は $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ のみを消去するよう働く。 ^{13}C エンリッチした蟻酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{HCOO})_2$) に対し、実験を行い、スケールされた $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ の双極子相互作用によるベークダブレットをMAS下で観測することに成功した (Fig.5)。他のMAS下での実験と組み合わせた2次元exchange法など、構造情報を取り出すための可能性も言及する予定である。

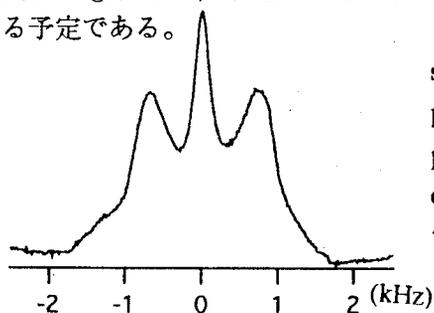


Fig. 5. ^{13}C spectra of 10% ^{13}C enriched $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$, which was obtained under MAS by irradiating ^1H spins with {2WIM12-FSLG2-2WIM12} N , where { } is applied during a rotor cycle.

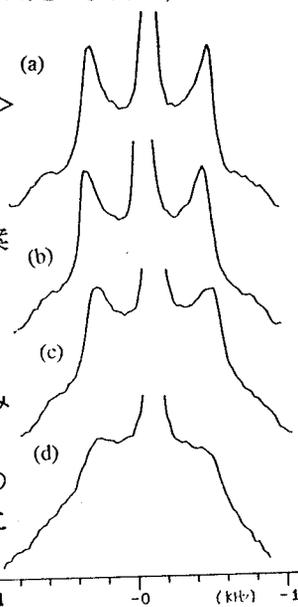


Fig. 4. ϕ dependence of the $^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ dipolar spectra obtained by MLEV8/ 8^R with simple π pulses. The ratio of H_{1H} to H_{1C} during the π pulse was changed a)3.0, b)2.4, c)2.1, d)1.8. H_{1H} during the other period was fixed to 100kHz. $\tau_w=15\mu\text{s}$ (33.3kHz) and $\tau=55\mu\text{s}$.

P 45 固体高分解能¹⁵N-NMR法を用いたペプチドの水素結合の評価 (姫路工大・理) 内藤 晶、○福谷 章、辻 暁、斉藤 肇

Evaluation of hydrogen-bond strength in peptides by high resolution solid state ¹⁵N-NMR

Akira Naito、○Akira Fukutani、Satoru Tuzi、Hazime Saito
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We have measured the N-H bond lengths and the principal values of ¹⁵N chemical shift tensors in amide nitrogens of glycine residues of some simple peptides by high resolution solid state ¹⁵N-NMR spectroscopy, in order to gain insight into a relationship with the strengths of their hydrogen bonds. We found that the longer N-H bond lengths show the stronger hydrogen bondings. A new pulse sequence, MPSEDOR (Multiple Pulse Spin Echo DOuble Resonance), is proposed to determine N-H bond lengths accurately.

1.序論

ペプチドやタンパクの高次構造の形成において水素結合は重要な役割を果たしており、その強さを評価することは重要である。これまで固体高分解能NMR分光法では、¹³C-NMRや¹H-NMRの化学シフト値から水素結合の強さを評価する試みがなされている。さらに最近では固体¹⁵N-NMR法により水素結合の強さを評価する試みが行われている。(安藤¹⁾、荘司²⁾、内藤³⁾今回は、固体高分解能¹⁵N-NMR法を用いてペプチドのグリシン残基のアミド窒素の化学シフトテンソルおよびN-H距離測定を行い水素結合の評価を行ったので報告する。

2.実験

試料の調製

グリシンのアミド窒素を¹⁵Nで安定同位体標識した試料として分子間水素結合(βシート)を形成するGly-[¹⁵N]GlyおよびTyr-[¹⁵N]Gly-Gly-Phe-Leu、分子内水素結合(ヘリックス)を含むGly-L-Pro-D-Leu-[¹⁵N]Glyをペプチド合成機により固相法で合成し、粗製試料をHPLCで精製した。Gly-[¹⁵N]Glyは水とエタノールの混合溶媒で、Tyr-[¹⁵N]Gly-Gly-Phe-LeuおよびGly-L-Pro-D-Leu-[¹⁵N]Glyは水とメタノールの混合溶媒で多結晶を調製した。

固体高分解能¹⁵N-NMR法

¹⁵N化学シフトテンソルの主値(δ_{11} , δ_{22} , δ_{33})は、CPを用いた粉末パターンから解析し、N-H原子間距離(r_{NH})測定はSLDF(Separated Local Dipolar Field)法およびMPSEDOR(Multiple Pulse Spin Echo DOuble Resonance)法を用いて行った。各々のパルス系列をFig.1に示す。SLDF法は¹Hに対して展開期に多重パルス(BLEW12)による同種核デカップリングを行い、検出期にcwデカップリングを行う2次元NMR法で、CP-

¹⁵N化学シフトテンソル, N-H距離, 水素結合, 双極子相互作用, SLDF法, MPSEDOR法

ないとう あきら、○ふくたに あきら、つじ さとる、さいとう はじめ

MASを併用し、CPとFIDの検出の間に ^{15}N に π パルスをあてる。このパルス系列で得られる2DスペクトルにおいてF1軸には r_{NH} に依存する ^{15}N - ^1H の双極子サイドバンドパターンが、F2軸には ^{15}N の固体高分解能スペクトルが現われる。なおスピニング周波数は1500Hzで測定した。MPSEDOR法は、CPとエコー検出の間に ^1H と ^{15}N の両方同時に π パルスをあて化学シフト相互作用を消去して、N-H双極子相互作用のみを復活させる。さらに ^1H はエコー検出の間に多重パルスを照射して同種核 ^1H をデカップリングする。図1においてCP以下を1サイクルとして繰り返し、エコーの頂点で検出を行い、得られるFIDをフーリエ変換すると双極子相互作用に基づくPake型の粉末パターンが得られる。N-H間距離は、SLDFのF1軸を、MPSEDORのスペクトルとともにシミュレーションと比較して決定した。

3. 結果

^{15}N 化学シフトテンソル主値

各ペプチドのグリシンのアミド窒素の ^{15}N 化学シフトテンソルの主値($\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$)はFig.2に示す ^{15}N -NMR粉末パターンから決定した。図2の粉末パターンにおいてGly-Pro-D-Leu- ^{15}N Glyでは軸対称のパターンを示すがGly- ^{15}N Gly, Tyr- ^{15}N Gly-Gly-Phe-Leuでは軸対称からずれたパターンを示した。また ^{15}N のCP-MASから ^{15}N 化学シフト等方位 δ_{iso} を求めた。結果はTable 1に示す。

N-H原子間距離測定

まずSLDFによる測定結果(スペクトル)をFig. 3に示す。F1軸のシミュレーションスペクトルは、ローターの周期(1500Hz)、N-H間距離(r_{NH})、スケーリングファクター(BLEW12では0.475)などの各パラメータを代入し、N-H核間ベクトル方向を1周期時間積分してFIDを計算し、フーリエ変換行って得た。F2軸には ^{15}N の化学シフト異方性に由来するサイドバンドがローターの周期ごとに現われるので、それらのF1クロスセクションをすべて足し合わせたスペクトルとシミュレーションスペクトルを比較して r_{NH} を $\pm 0.01\text{\AA}$ の精度で決定した。結果は、Table 1にまとめた。

次に、MPSEDORスペクトルをFig.4に示す。双極子相互作用に基づくPake型の粉末パターンの分裂幅(双極子結合定数)が、N-H間距離(r_{NH})の関数で表わされるのでSLDFと同様にこの粉末パターンをシミュレーションスペクトルと比較して r_{NH} を決定した。結果は、Table 1にまとめた。

4. 考察

安藤¹⁾らはN-H間距離と ^{15}N 化学シフト等方位が比例関係にあると報告しているが、本研究(Table 1)ではむしろ逆の傾向が見られた。これが一般に当てはまる傾向にあるかどうかを判断するにはもう少しデータの蓄積が必要であろう。

荘司²⁾らのオリゴペプチドの研究によると ^{15}N 化学シフト等方位はペプチドの配向とあまり相関がないと報告している。荘司らのデータによると特にグリシン残基の場合、 ^{15}N 化学シフト等方位 δ_{iso} よりも ^{15}N 化学シフトテンソルの主値($\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$)とペプチドの二次構造に相関がある。すなわち δ_{22} は α ヘリックスでは高磁場に、 β シートでは低磁場に現われ δ_{33} はその逆の傾向がある。一般に β シートは α ヘリックスよりも強い水素結合を形成すると考えられるので、ペプチド中のグリシン残基の ^{15}N 化学シフト値は強い水素結合を形成するほど軸対称からはずれたパターンになる傾向にあることを示している。本研究での結果(Fig.2)において、Tyr- ^{15}N Gly-Gly-Phe-Leuの ^{15}N パターンが軸対称からもっともずれている。このことは荘司らの結果と比較する

と水素結合の強さはGly-L-Pro-D-Leu-[^{15}N]Gly、Gly-[^{15}N]Gly、Tyr-[^{15}N]Gly-Gly-Phe-Leuの順に強くなっていると結論できる。さらにN-H結合距離に注目すると水素結合が強くなるにつれてN-H間距離は長くなっている傾向が見られる。これは、以前に我々が報告した結論³⁾と一致する。従ってN-H間距離や ^{15}N 化学シフトテンソルの主値も水素結合の強さを評価するパラメータとなることを指摘したい。

参考文献

- 1) S. Kuroki, S. Ando, I. Ando, A. Shohji, T. Ozaki, G.A. Webb, *Journal of Molecular Structure*, **240**, 19-29 (1990).
- 2) A. Shoji, S. Ando, S. Kuroki, I. Ando, G.A. Webb, in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, **26**, 55-98, (1993) Academic Press Limited.
- 3) A. Naito, S. Tuzi, H. Saito, *Bull. Chem. Soc. JPN.*, **66**, 3309-3313, (1993).

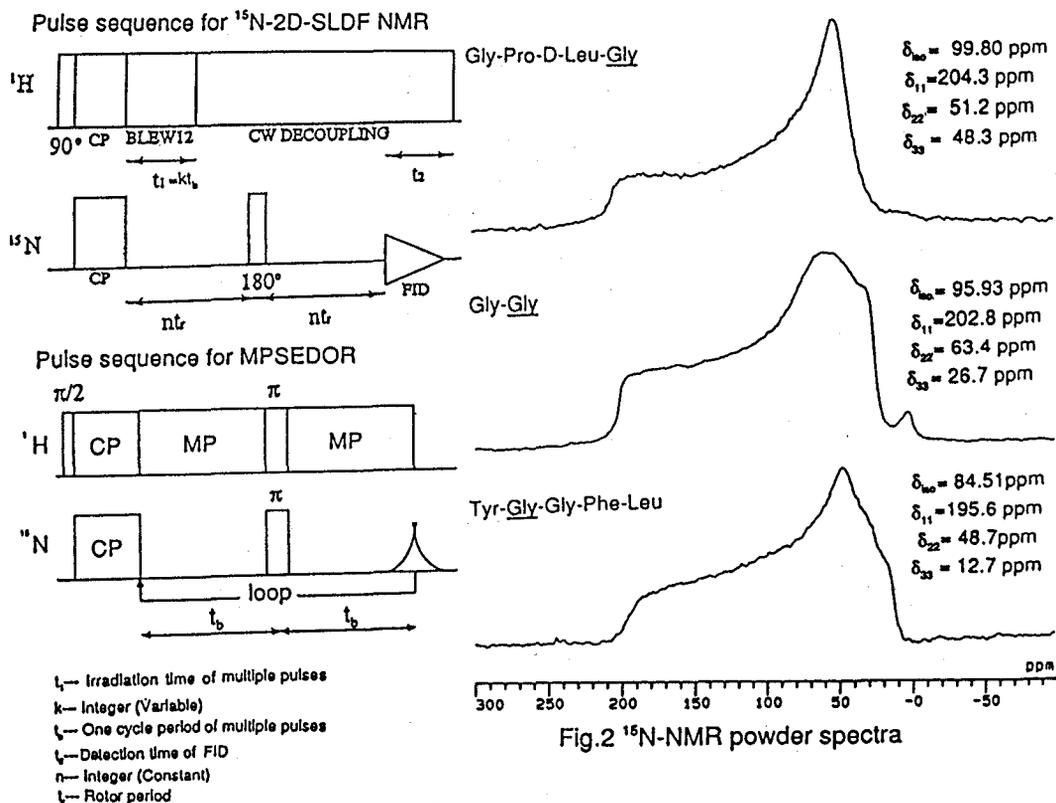


Fig.2 ^{15}N -NMR powder spectra

Fig.1 Pulse sequences for determination of N-H bond lengths

Table1 Results of determination of δ_{aa} , δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} and N-H bond lengths

Sample	Structure Hydrogen-Bond	r_{NH} (Å)	δ_{aa} (ppm)	δ_{11} (ppm)	δ_{22} (ppm)	δ_{33} (ppm)	N...O distance(Å)
Gly-Pro-D-Leu-Gly	helix	1.00	99.80	204.3	51.2	48.3	2.86
	Intramolecular (1.00)*						
Gly-Gly	β -sheet	1.02	95.93	202.8	63.4	26.7	2.94
	Intermolecular (1.02)*						
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	β -sheet	1.06	84.51	195.6	48.7	12.7	—
	Intermolecular (1.03)*						

* Determined by MPSEDOR

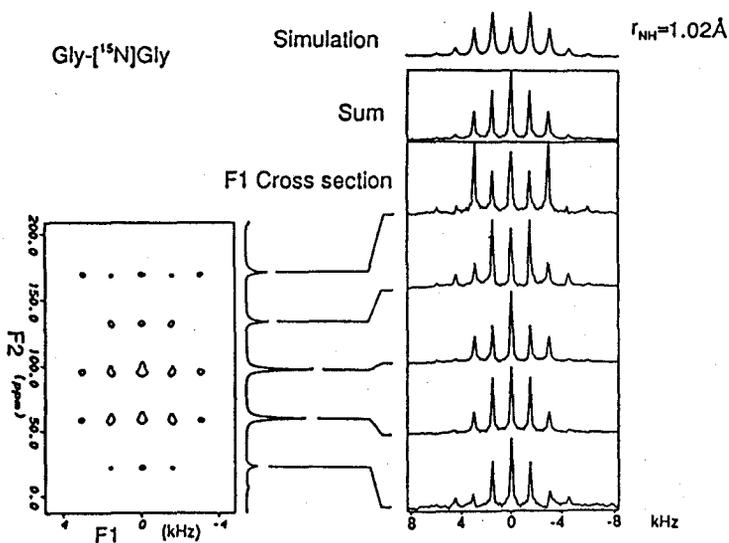


Fig.3 2D-SLDF spectrum, the slices of F1 dimension and simulated spectrum

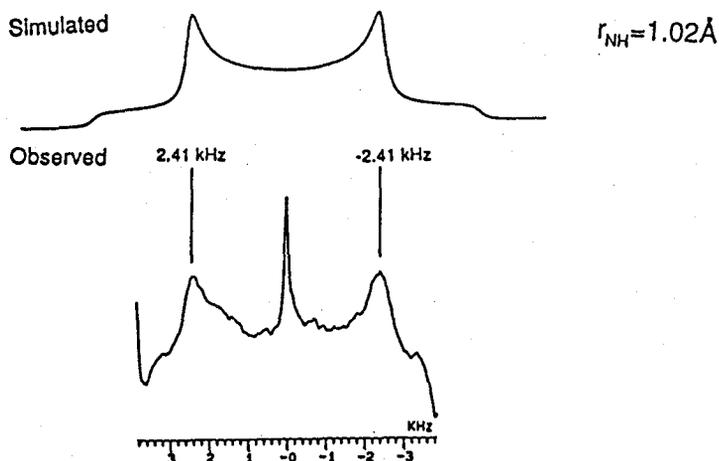


Fig.4 ^{15}N -MPSEDOR spectrum of amide nitrogen in Gly[^{15}N]Gly.

P 46

固体高分解能¹³C,¹⁵N-NMR(REDOR)による ポリペプチドの三次元構造解析

内藤 晶、○西村 勝之、辻 暁、斉藤 肇 (姫路工大 理)

Analysis of three-dimensional structure of polypeptide by ¹³C, ¹⁵N-high resolution solid state NMR(REDOR)

Akira Naito, ○Katsuyuki Nishimura, Satoru Tuzi, and Hazime Saito,
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We report here that REDOR method can be used to determine the C-N distance with accuracy of 0.02A for a simple ¹³C, ¹⁵N doubly labeled peptide. We estimated the REDOR effect by an intermolecular contribution from the labeled nuclei of neighboring molecules, by a dilution experiment. After removing the intermolecular contribution, we determine interatomic distance precisely. We further determined 3-dimensional structure of a simple peptide using the distances determined by REDOR experiment together with conformational energy map. Finally, a strategy to analyze 3-dimensional structure of biopolymers was proposed.

我々はこれまで¹³Cと¹⁵Nで二重標識したペプチドを試料としてREDOR法によってC-N原子間距離の精密測定を行い±0.05Aの精度で2-6Aの距離の決定が行えることを報告してきた。これに続き、今回REDOR法の基礎検討として分子間標識同位体の寄与の見積りと分子内天然安定同位体の寄与見積りの再検討を行った。さらに、REDOR法により得られる原子間距離を基にペプチド主鎖の立体構造決定のプロトコルについて検討したので報告する。

実験

[試料] 試料(1)[1-¹³C]N-acetyl-Pro-[¹⁵N]Gly-Phe、試料(2)N-acetyl-[¹³C]-Gly-[¹⁵N]Phe、試料(3)[1-¹³C]N-acetyl-Pro-Gly-[¹⁵N]Pheの三種類の100%二重標識試料を以下の手順で合成した。まずそれぞれの標識アミノ酸をFmoc-OSuと反応させることによりFmoc化を行い、それを用いてABI社のペプチド合成機により固相法で各二重標識Pro-Gly-Pheを合成し、無水酢酸とDMFからN-acetylationを行った。さらにメタノール溶媒から結晶化を行い微結晶にした。また試料(1)に関しては非標識同ペプチドを用いて希釈し60%、30%二重標識試料を調製した。

[測定] NMR測定は三重共鳴プローブを用いてChemagneticsCMX-400スペクトロメータにより行った。¹H、¹³C、¹⁵Nの共鳴周波数はそれぞれ400.17MHz、100.64MHz、40.55MHzであった。図1に示すようにoff

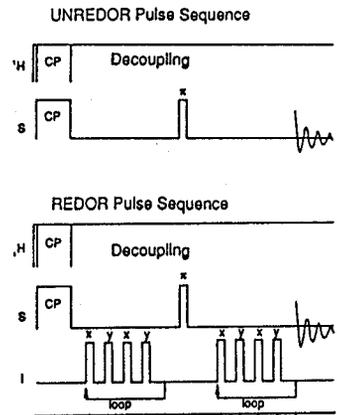


Fig 1 REDOR pulse sequence combined with XY-4 pulses.

REDOR、精密距離測定、ペプチドの3D構造決定

ないとう あきら、○にしむら かつゆき、つじ さとる、さいとう はじめ

resonance効果およびラジオ波強度の変動を補償するXY4パルスシーケンスを用いた。180°パルス長は ^{13}C 、 ^{15}N 核についてそれぞれ14us、24usであった。試料はそれぞれおよそ150mgを内径7mmφの試料管に詰め、付属の回転周波数コントローラーにより2000±1Hzに調節して行った。NMR測定はREDORとUNREDORの実験を行い、データの解析では(UNREDOR-REDOR)/REDORを $\Delta S/S_0$ としてプロットした。実際のスペクトルでは化学シフト異方性によりSSBが多数存在するので、全空間の寄与を考慮するため、センターバンドと全てのSSBの和をとり、REDORの解析をおこなった。

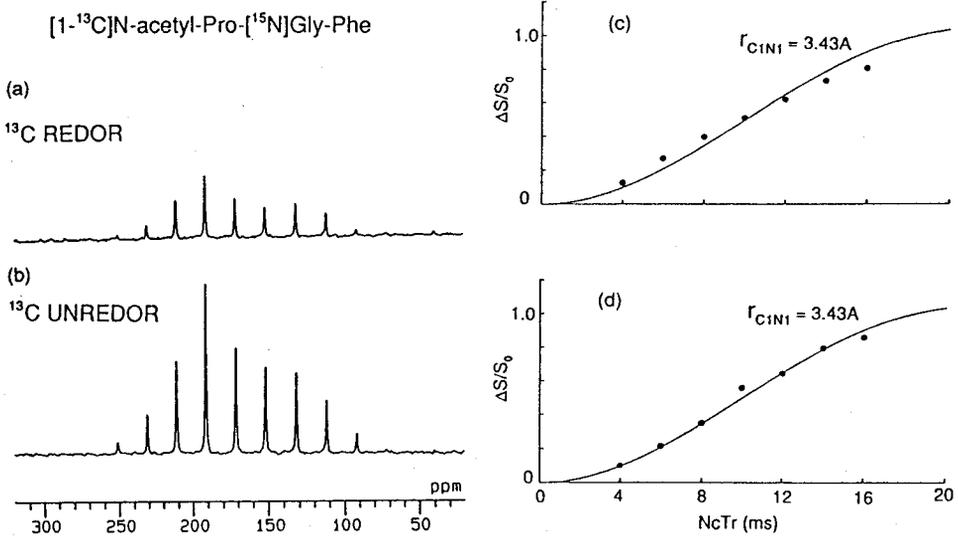


Fig 2 (a) ^{13}C REDOR spectrum. (b) ^{13}C UNREDOR spectrum.
(c) plot of $\Delta S/S_0$ against NcTr for the sample (1) without dilution.
(d) plot of $\Delta S/S_0$ against NcTr for the sample (1) diluted infinitely.

結果及び考察

[分子間標識同位体の寄与] 図2(c)に試料(1)について測定したREDORの結果と孤立した ^{13}C 、 ^{15}N 対のみを考慮した理論曲線を示す。図2(a)、(b)では大きなREDOR効果が現われており、この効果は各SSBについてわずかに異なっていることを示している。これまでREDORの測定においてシグナルの感度を上げるために100%二重標識試料を用いてきた。しかしながら図2(c)に示すように実験値 $\Delta S/S_0$ に理論曲線からの一定のズレが存在し、理論曲線のフィッティングの際、実験値の上限あるいは下限を採用するかによって±0.05Aの誤差が生じた。そこで我々はこの理論曲線からのズレはこの分子間標識同位体の寄与が原因であると推定し、この寄与を実験的に見積る試みを行った。まず100%,60%,30%二重標識試料のREDOR測定を行い。図3に示すようにこれらの実験値を外挿して0%二重標識試料のREDOR値を最小二乗法

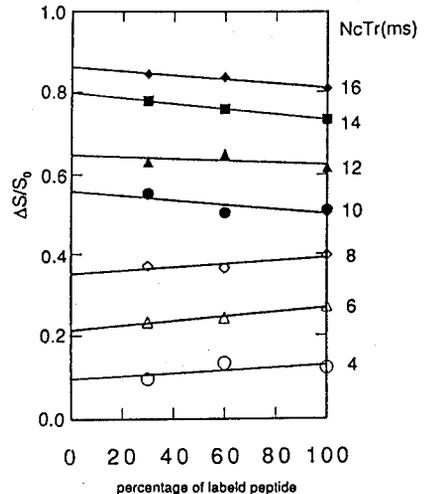


Fig 3 $\Delta S/S_0$ plot against various percentages of labeled peptide in unlabeled one.

により求めた。この操作により分子間標識同位体の寄与は削除できた。図2(d)に外挿値を用いた最適な理論曲線フィッティングを示す。100%二重標識試料の測定値から0%への外挿値の差が分子間標識同位体の寄与ということになるが、この値は各点で異なり分子間標識同位体の寄与は単純に付加的ではないことがわかる。そこで、この現象を正確に解析するために観測核が二つの異なる同種核に同時に双極子結合している3スピン系を考え、そのハミルトニアンを解いてREDOR効果の理論計算を行った。¹⁾ その結果、測定している分子内異種核双極子に対して、分子間異種核双極子の大きさと共に核間ベクトルのなす角度の両方が変数となり、REDOR値が変動されることが分かった。

[分子内天然同位体の補正] これまで行われてきた分子内天然同位体の補正は、観測核に対し異種核双極子結合を有する分子内天然同位体のREDOR値を2スピン系として求め、これに天然存在比をかけた値の和とされてきた。²⁾ 本研究では天然同位体間の双極子結合は、十分無視できる大きさであるため、上述の観測核に二つの異なる同種核が同時に双極子結合している3スピン系を適用して、この天然同位体の寄与を見積った。¹⁾ この結果、表1に示すように、分子内天然同位体の補正はこれまでの見積りに比べて¹³C観測時には非常に小さくなり全く無視できることがわかった。また、¹⁵N観測時の補正も十分小さくなることが判明した。¹⁵N観測時の補正值が¹³C観測時の補正值より大きいのは、ペプチドやタンパク分子において、炭素核は窒素核に比べ多数存在することに加えて、炭素核の天然存在比が窒素核より大きいためである。以上の解析の結果、試料(1),(2),(3)の距離は各々3.43A,3.66A,4.45A±0.02Aと決定した。

Table 1 Contributions of $\Delta S/S_0$ from natural abundant nuclei.

	NcTr (ms)			
	4	8	12	16
¹³ C-REDOR ($\Delta S/S_0$) _{obs}	0.124	0.396	0.618	0.808
	($\Delta S/S_0$)	0.003	0.003	0.003
	($\Delta S/S_0$)*	0.004	0.004	0.006
¹⁵ N-REDOR ($\Delta S/S_0$) _{obs}	0.154	0.461	0.736	0.860
	($\Delta S/S_0$)	0.037	0.050	0.049
	($\Delta S/S_0$)*	0.041	0.070	0.093

* estimated according to Ref 2.

[ペプチドの立体構造決定] 我々はREDOR法をペプチドまたはタンパク質の立体構造決定に適用する場合、以下の手順で実験を進めることが最も有効かつ正確であると考え実行した。あるアミノ酸のC α 炭素の前に位置するペプチド面のカルボニル炭素と後に位置するペプチド面のアミド窒素をそれぞれ¹³Cと¹⁵Nで標識し、この4ボンド離れたC-N間距離をREDORで精密測定する。この距離からC α の二面角 (Φ, Ψ) を決定する。この操作を各C α について行うことにより、ペプチド鎖の全ての二面角を決定することができる。そこで、今回は試料(1)を[1-¹³C]N-acetyl-Pro-[¹⁵N]Gly-Phe、試料(2)をN-acetyl-[¹³C]-Gly-[¹⁵N]Pheの位置で二重標識した。これからProとGlyの二面角の決定を行った。REDORで求めた距離 r_{CN} を示す二面角 (Φ, Ψ) の全

ての組み合わせはPro、Gly各々図4a、bに示される黒く塗られた環上のみ存在する。これに各々ファンデルワールス反発を考慮したN-acetyl-N-methyl-Ala-NH₂、N-acetyl-N-methyl-Gly-NH₂のコンホーションマップを重ね合わせる。またProの場合には環形成により二面角 Φ の自由度はなくなり、構造が最も安定な $\Phi=-75^\circ$ (puckered down)に固定することができる。これにより可能な二面角 (Φ 、 Ψ) の組み合わせは、各々図4a、bで黒環とコンホーションマップの最も安定な斜線の領域と重なる領域で示され、Proでは1ヶ所に、Glyでは2ヶ所に限定される。さらに主鎖の構造決定の強い抑制条件として水素結合が考えられる。我々はアセチル基のカルボニル炭素とフェニルアラニンのアミノ基の窒素原子との間で水素結合を考え、試料(3)を[1-¹³C]N-acetyl-Pro-Gly-[¹⁵N]Pheとし、この距離も抑制条件として用いた。これらの3つの距離の抑制条件を同時に満たす二面角 (Φ 、 Ψ) の組み合わせは1組しか存在しないため、このペプチドの立体構造がユニークに決定でき、配向は β -turn type IIであることが分かった。

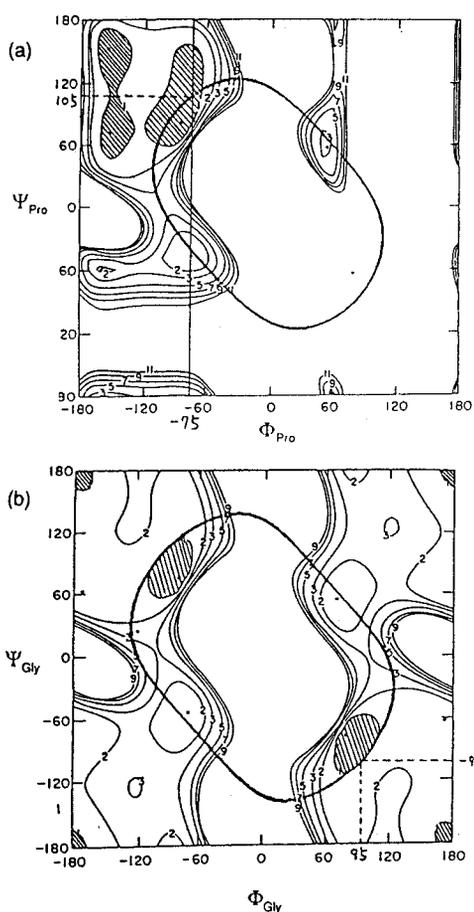


Fig 4 (a) Conformational map of N-acetyl-N-methyl-Ala-NH₂³⁾ and distance map of Pro ($r_{CN}=3.43\pm 0.02A$).
 (b) Conformational map of N-acetyl-N-methyl-Gly-NH₂³⁾ and distance map of Gly ($r_{CN}=3.66\pm 0.02A$).

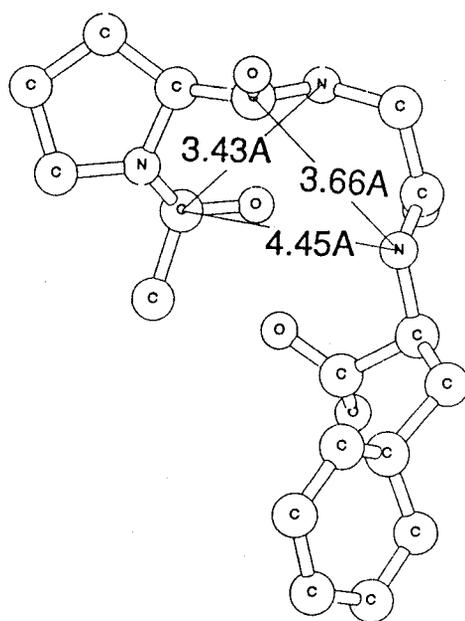


Fig 5 Three dimensional structure of N-acetyl-Pro-Gly-Phe determined by REDOR experiment.

- 1) A. Naito, K. Nishimura, S. Tuzi, and H. Saito, Chem. Phys. Lett. (1994) in press
- 2) Y. Pan, T. Gullion and J. Schaefer, J. Magn. Reson. 90, 330-340 (1990).
- 3) S. S. Zimmerman, M. S. Pottle, G. Nemethy, and H. A. Scheraga, Macromolecules, 10, 1-9 (1977).

P 47 同核双極子相互作用を用いた固体ペプチドの構造研究

(Washington Univ.) O浅川直紀*, Christopher A. Klug, Jacob Schaefer

(東工大) 安藤勲 *現在、東工大

Intermolecular Distance Measurements of [1-¹³C]Glycyl-glycine by Compensated XY8-DRAMA Pulse Sequence

We have tried to determine the distances between the intermolecular carbonyl-carbons of 10% labeled [1-¹³C]glycyl-glycine powder sample through the observation of ¹³C-¹³C homonuclear dephasing. For this purpose, we developed the pulse sequence, dipolar restoration at the magic angle combined with the XY8 π pulse scheme(XY8-DRAMA). We confirmed that XY8-DRAMA enables us to detect the dipolar coupling between nuclei of which chemical shift anisotropies are large, and also succeeded in the detection under the condition where the system has ¹³C carrier frequency offsets. Although the concentration of ¹³C labeled sites was not high, the internuclear distances up to 5.6 Å were successfully determined; for XY8-DRAMA with small rotor cycles($N_c \leq 48$), effects of the residual natural abundant ¹³C on the homonuclear dephasing were able to be ignored.

1.序論

近年の固体NMR法の発展はめざましく、特にマジックアングルスピニング(MAS)のような試料回転下での固体中のスピン1/2の異種核および同種核の双極子カップリングを検出するための様々な方法が開発されてきている。Rotational-Echo Double Resonance(REDOR)法および、Transfer-Echo Double Resonance(TEDOR)は孤立スピン1/2異種核の双極子カップリングの測定法として、タンパク質の活性中心の構造解析や、バクテリアの細胞壁の構造研究などに使われてきている。それに対して、同種核スピンの組の

キーワード：ペプチド、双極子カップリング、XY8-DRAMA

あさかわなおき、クリストファー A. クラッグ、ジェイク シェーファー
あんどういさお

場合の同様な実験は、異種核の場合よりも必要なチャンネル数が少なくなるため技術的には単純となる。しかし、双極子ハミルトニアンフリップフロップ項が無視できないために、磁化の時間発展の計算が複雑になる。現在、CROWN, DRAMA, rotational resonance(R²), SEDRA, CERDA, t-SEDRAなどの方法がある。しかし各々の方法には一長一短があり、改良の余地が残っている。

2.XY8-DRAMA法

DRAMA法は、双極子カップリングしているspin pairのそれぞれの化学シフト異方性(CSA)が小さく、しかも等方平均化学シフトの差が0である場合にのみ威力を発揮する。したがって、DRAMA法によってカルボニル炭素間のカップリングを測定することは困難であった。さらに、キャリア周波数オフセットが存在する場合にもカップリングの測定が困難であった。今回私共はこれらの欠点を補うためにXY8-DRAMA法を開発し、[1-¹³C,10%]Gly-Gly微結晶粉末試料を用いて分子間距離の測定を試みた。

XY8-DRAMA法のパルスシーケンスを図-1に示した。Sスピンの磁化はIスピンの磁化からのCross-Polarizationによって生じさせるものとした。図-1(a)はMASに同期させたHahnエコーのシーケンスで、偶数回のローター周期の終わりでエコーを生じさせる。図-1(b)はXY8-DRAMA-fullエコーのシーケンスで、XY8(XYXYXYX)の π パルス系列によって、CSAに起因する共鳴オフセットを再結させる。図-1(c)はXY8-DRAMA-dephasedエコーのシーケンスで、(b)のシーケンスに2つの90度パルスを加えることによってつくられる。2つの90度パルスはdephasingを最大にするためにローター周期の1/4,3/4の位置で印加する。パルスシーケンスはローター周期

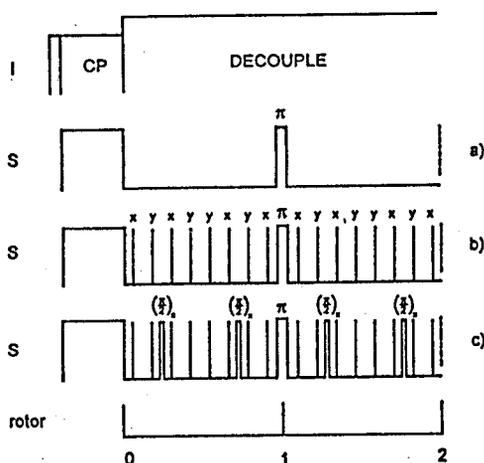


Fig.1 Pulse sequences for XY8-DRAMA. S spin magnetization is assumed to be established by an I-S matched cross-polarization transfer(with spin temperature alternation). (a) A rotor-synchronized S-spin Hahn echo, (b) a XY8-DRAMA full echo, and (c) a XY8-DRAMA dephased echo.

(N_c) が2の場合を示したが、実際の測定では、 $N_c=16, 32, 48, 64, 80, 96$ で行った。その際に、Hahnエコーに用いる π パルスはXY8の位相サイクルで印加した。

3.結果と考察

図-2(a)-(c)に図-1(a)-(c)のパルスシーケンスで測定した $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly-Gly}$ のスペクトルを示す。図-2(b)のように、Gly-1のカルボニル炭素の信号強度は図-2(a)にみられる強度の約90%であった。しかしエコーの放絡線から、XY8-DRAMA-fullエコーも N_c の増加に伴い T_2 緩和で減衰していくことがわかる。そこで、XY8-DRAMA-fullエコーで得られる信号強度を S_0 として、XY8-DRAMA-dephasedエコーで得られる強度(S)との比をdephasingの割合(S/S_0)とした。図-2(c)にdephasedエコーで得られたスペクトルを示した。信号に見られる多少の分裂はMASで平均化できない ^{14}N - ^{13}C 間の双極子相互作用によるものである。図-3に N_c に対して S/S_0 をプロットした。10%の ^{13}C ラベル試料にもかかわらず、 N_c の大きい範囲では10%をはるかに超えるdephasingが観測された。そこで、天然存在の ^{13}C が S/S_0 に与える影響を調べるために ^{13}C 天然存在のグリシンを用いて有機合成したGly-GlyのXY8-DRAMA

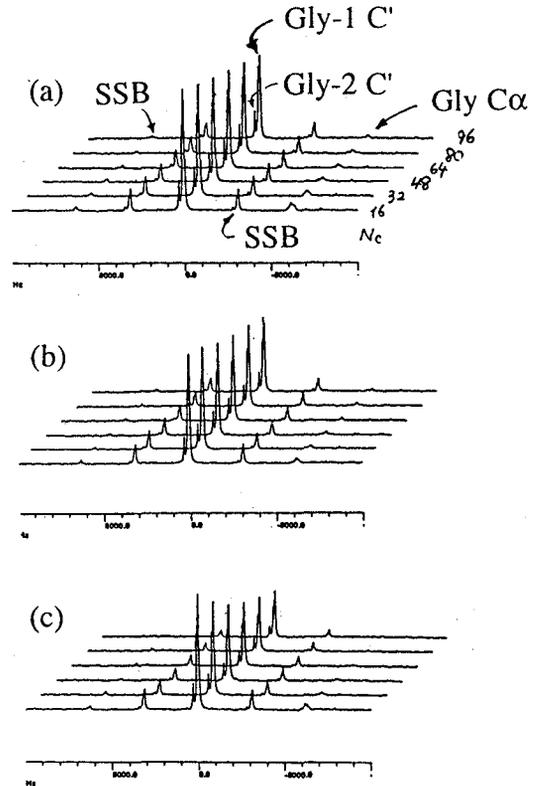


Fig.2 50.3MHz ^{13}C cross-polarization magic-angle spinning spectra of 10% labeled $[1-^{13}\text{C}]\text{glycyl-glycine}$ measured by (a) a rotor-synchronized Hahn echo, (b) a XY8-DRAMA full echo(S_0), (c) a XY8-DRAMA-dephased echo(S) sequences, respectively. The spectra are plotted as a function of the rotor cycles(N_c). Magic-angle spinning was at 3205Hz. The ^{13}C rf field intensity was 38kHz and the ^1H decoupling field intensity was 89kHz. The ^{13}C carrier frequency was at the Gly-1 carbonyl-carbon signal.

測定を行った (図-4 (a),(b))。図-4より、 $N_c \leq 48$ の範囲では天然存在の ^{13}C の影響はほとんど無いことがわかる。X線回折による結果をもとに、Average Hamiltonian Theoryを用いて δ パルスを仮定した場合のスペクトルシミュレーションを行った (図-3の線)。このように、XY8-DRAMA法を用いることによって、ペプチド中の分子間距離を測定することができた。

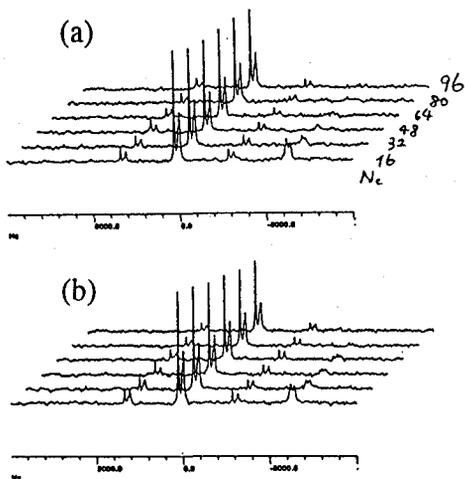


Fig.4 Control test for XY8-DRAMA pulse sequences. ^{13}C natural abundance version of glycyl-glycine was used for this purpose. For the small rotor cycles ($N_c < 48$), the effect of natural abundance ^{13}C site on S/S_o was able to be ignored. (a) A XY8-DRAMA-full echo and (b) a XY8-DRAMA-dephased echo were shown; N_c is the number of rotor cycles.

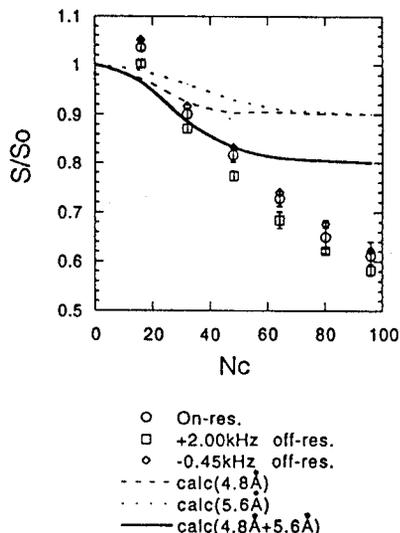


Fig.3 XY8-DRAMA dephasing (S/S_o) for $[1-^{13}\text{C}, 10\%]$ glycyl-glycine with magic-angle spinning at 3205Hz. The ^{13}C carrier frequency was at on-resonance for Gly-1 carbonyl-carbon (open circle), +2.00kHz off-resonance (open square), and -0.45kHz off-resonance (open diamond). Calculated DRAMA dephasing assumed δ -function pulses and two dipolar ^{13}C - ^{13}C couplings of 68Hz (4.8Å) and 43Hz (5.6Å). The calculation was performed for the pulse sequence in Fig.1(c) and is independent of all shift tensors.

固体¹⁵Nおよび¹³C NMRによる一軸配向タンパク質 繊維の構造解析

東京農工大学工学部 朝倉哲郎、[○]出村誠、南雅史
Cornell University L. K. Nicholson
Florida State University T. A. Cross

Structure Analysis of Uniaxially Oriented Protein Fibers Using ¹⁵N and ¹³C Solid State NMR

Tetsuo Asakura¹, Makoto Demura¹, Masashi Minami¹, L. K. Nicholson², T. A. Cross³

1. Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and
Technology, Koganei, Tokyo 184

2. Department of Biochemistry, Cornell University, Ithaca, NY, USA

3. National High Magnetic Field Lab., Florida State University, Tallahassee, FL, USA

Atomic resolution structural details are obtained from solid state NMR data in the form of bond orientations, which yield the relative positions of specific atoms within the molecule. In this study, the ϕ and ψ torsion angles of five amino acid types (glycine, alanine, serine, tyrosine and valine) in *Bombyx mori* silk fibroin have been constrained by solid state NMR studies of fiber preparations. This data supports an anti-parallel β -sheet structure based on both ¹⁵N and ¹³C isotopically labeled samples. The isotope labeling of the silk protein is performed by the oral administration or the cultivation of the silkglands from the silkworm in amino acid medium. The block samples of uniaxially aligned fibers have been prepared for the solid state NMR analysis. This analysis takes advantage of the orientation dependence of both chemical shift and dipolar interaction tensors. Orientations of the fiber axis parallel and perpendicular to the magnetic field have been used.

緒言

固体¹⁵N及び¹³C NMR化学シフト異方性と¹⁵N-¹³C双極子相互作用のデータを組み合わせることにより原子レベルでの詳細な構造情報が得られる。我々はこの新しい固体NMR解析法をもちいて一軸配向タンパク質の構造を各アミノ酸残基毎に解明し、そのアミノ酸サイト毎に内部回転角(ϕ , ψ)を決定することを目的とした。本研究では、絹フィブロインを材料とした。従来のX線回折法を用いた絹フィブロイン繊維の構造解析は、主鎖を-(Gly-Ala)_n-から成るものと仮定してきた。しかしながら、含量はより低いもののSer、Tyr、Valなど(それぞれ12, 4.8, 2.1 mol%)のアミノ酸残基についても、絹の優れた繊維性能や反応性の解明を考えると、その構造情報を得ることが必要不可欠となる。本研究では、新たにSer、Val残基の¹⁵Nラベル試料を絹糸腺培養により得、アミノ酸残基ごとの配向角度情報を解析した。さらに、これまでに報告してきた¹⁵NラベルGly、Ala残基の角度情報のほかに、今回¹³CラベルGly、Ala残基の角度情報を加え、絹のアミノ酸毎の構造情報を解明し、最終的に各サイト毎の内部回転角(ϕ , ψ)を決定する。

キーワード：角度依存固体NMR ¹⁵N ¹³C 一軸配向タンパク質 内部回転角 絹

あさくらてつお でむらまこと みなみまさし L.K. ニコルソン T.A. クロス

実験

各アミノ酸残基毎に構造情報を求めるために、本固体NMR法では、絹の¹⁵Nまたは[1-¹³C]核の同位体ラベルを行った¹。そのために、5齢4日の*Bombyx mori*カイコ4頭分の絹糸線をSer、Valの¹⁵Nラベルアミノ酸を添加した無血清培地中で、24時間旋回培養を行った。最終的に生産された同位体ラベル化絹フィブロインは、常法の延伸法で一軸配向させた。絹フィブロインの[1-¹³C]ラベリングはラベル化Gly、Alaのカイコへの経口投与で作製した。¹⁵Nおよび¹³Cラベル試料から一軸配向ブロック試料を作製した。固体¹⁵N (40MHz) 及び¹³C (100MHz) CP NMRの測定はJEOL GX-400スペクトロメーターに固体GSX NMR測定ユニットを付けて測定した。配向ブロック試料の配向軸と磁場との方向はゴニオメーターで調整した。CP時間は3 ms、積算の繰り返し時間は7sとした。

絹フィブロイン配向試料の配向軸と静磁場とのなす角度に依存した¹⁵N 及び¹³C 固体NMRスペクトルのシミュレーションのためのフローチャートを、Fig.1に示した。

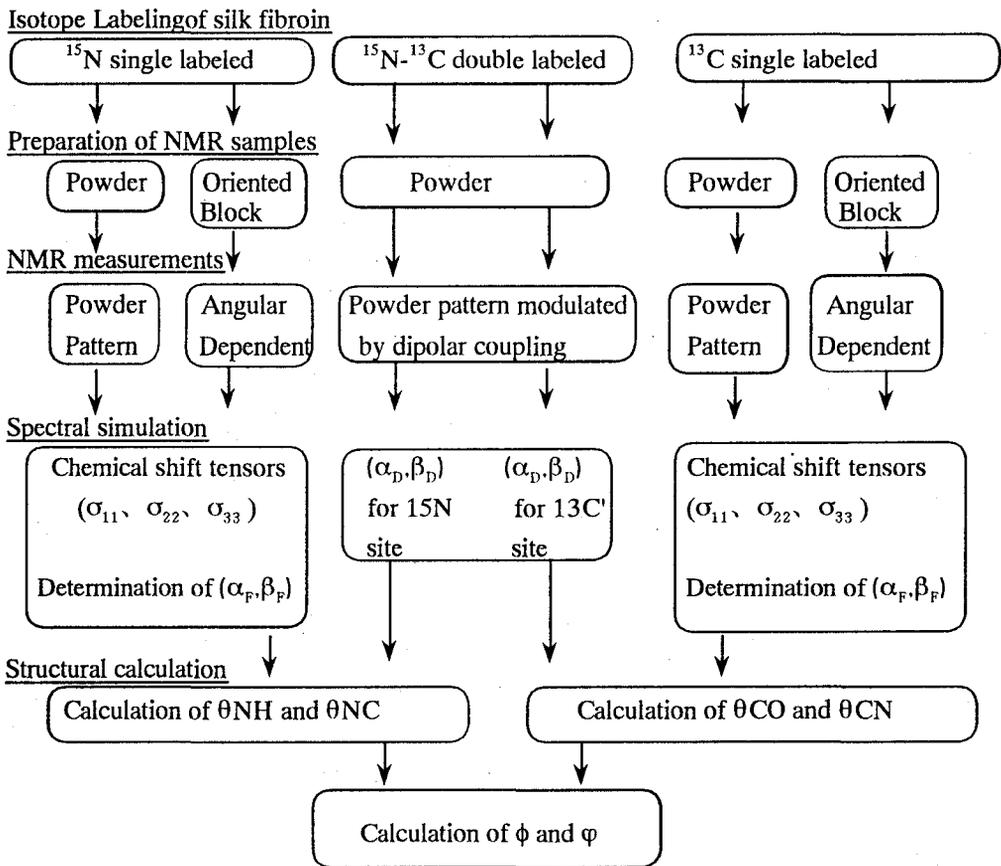


Fig. 1 Flowchart for determination of bond orientaton of the uniaxially oriented protein fiber based on the ¹⁵N and ¹³C chemical shift anisotropies

結果と考察

カイコ体内でのアミノ酸代謝の盛んなSer残基、絹フィブロイン中で組成比の小さいVal残基について絹糸腺培養により高ラベル率の絹フィブロインが得られた。絹フィブロイン繊維のSer, Val残基を各々 ^{15}N 同位体ラベルした絹の配向ブロック試料を作成した。繊維軸が磁場に平行と垂直の場合のSer残基の場合の ^{15}N CP NMRスペクトルをパウダーパターンスペクトルとともに示した (Fig.2)。このスペクトルパターンおよびVal残基の場合も角度依存性がこれまでに報告してきたGly, Ala, Tyrの ^{15}N ラベル試料のスペクトルパターン場合と同様であったことから、Ser, Val残基も逆平行 β シート構造を取ることが予測される。パウダーパターンから決定された ^{15}N 化学シフトテンソル値を基にして、角度依存スペクトルのシミュレーションを行うことによって、化学シフトテンソルの主軸系と繊維軸（磁場方向）とのなすオイラー角 (α_F, β_F) を決定することができた。実際のシミュレーションでは、繊維軸の分布 p を考慮して計算することによって、平行設置のスペクトルパターンの非対称性や垂直設置の場合の高磁場側のシャープなピークが再現された (Fig. 2)。得られた各 ^{15}N ラベルサイトの (α_F, β_F) 及び (α_D, β_D) を用いて、繊維軸とNH及びNC結合とのなす角、 θ_{NH} 、 θ_{NC} を計算した (Table 1)。これまでに決定されている絹フィブロイン繊維のAlaまたはGly残基の θ_{NH} 、 θ_{NC} 値と今回決定された値は、ほぼ同様な大きさであることから、Gly, Alaに比べてマイナー組成のSer, Val残基でも逆平行 β シート構造をとることが明らかになった。

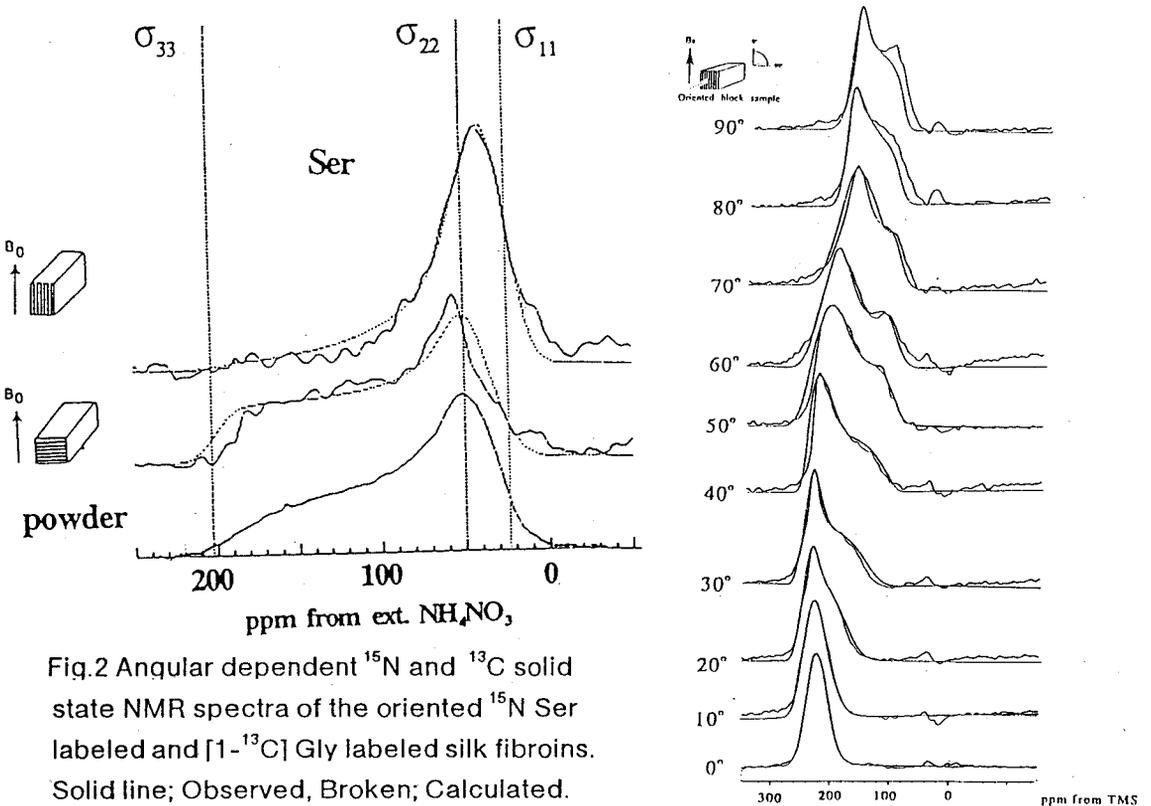
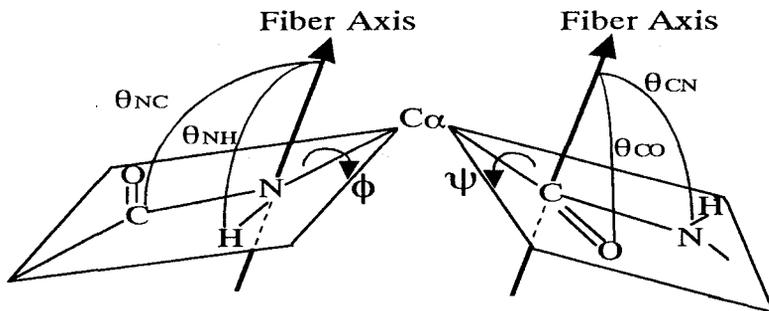


Fig.2 Angular dependent ^{15}N and ^{13}C solid state NMR spectra of the oriented ^{15}N Ser labeled and $[1-^{13}\text{C}]$ Gly labeled silk fibroins. Solid line; Observed, Broken; Calculated.

Table 1 Orientational angles, θ_{NH} , θ_{NC} , and θ_{CN} , of the amino acid residues of *B. mori* silk fibroin.

θ_{NZ}	Gly		Ala		Ser		Tyr		Val	
θ_{NHa}	88.5	91.5	97.0	83.0	96.2	83.8	85.9	94.1	95.0	85.0
θ_{NCa}	40.5	139.5	39.0	141.0	39.2	140.8	35.2	144.8	37.0	143.0
θ_{CNb}	40.5	139.5	37.5	142.5						
θ_{COb}	89.0	91.0	89.5	90.5						

Calculations with the data for ^{15}N (a) and $[1-^{13}\text{C}]$ (b) labeled silk fibroins.



Ser, Tyr, Val残基のシーケンスはGly-X-GlyであることがNMR解析からわかっている。Table 1で示されているように、側鎖が長く、かさ高くてもGly残基が両側に位置することによって、空間が保持され、なお、シート構造を形成している事を示している。

^{15}N 同位体ラベルした絹フィブロインと同様に、特定残基のカルボニル ^{13}C の化学シフト異方性が解析できれば、特定残基の角度情報を増やすことができる。我々は、Gly及びAla残基のカルボニル ^{13}C をラベルした絹フィブロイン配向試料の固体 ^{13}C NMRスペクトルを測定し(Fig. 2)、 ^{13}C 化学シフト異方性に基づくスペクトルシミュレーションから ^{13}C サイトの繊維軸とC'N及びC'O結合とのなす角 θ_{CN} , θ_{CO} を計算した (Table 1)。この値は、すでに報告されている絹フィブロイン繊維のX線回折の構造解析結果とよく一致することが明かとなった。さらに、絹糸腺培養法で得られた $[1-^{13}\text{C}]$ Gly - ^{15}N Alaダブルラベル絹フィブロインの一軸配向処理に成功し、この配向ブロック試料の ^{15}N 固体NMRスペクトルの双極子カップリングの解析からは、Ala残基の θ_{NC} は 141° となり、本研究の角度依存NMRスペクトルの解析法の妥当性を示している。

これまでX線回折法では、絹フィブロインタンパク質を(Gly-Ala) n と仮定し、内部回転角を算出していたが、安定同位体ラベル法と本角度依存固体NMR解析法を併用することによって、Ala, Glyのみならず、これまで解析できなかったマイナー組成のアミノ酸残基(Ser, Tyr, Val)の角度情報が直接得られるようになった。

参考文献

1. T.Asakura, R.Sakaquchi, M.Demura, T.Manabe, A.Uyama, K. Ogawa, and M.Osanai, *Biotechnol.Bioeng.*, 41, 245 (1993)
2. L.K.Nicholson, T.Asakura, M.Demura and T.A.Cross, *Biopolymers*, 33, 847 (1993)
3. T. Asakura, M. Demura, Y. Hiraishi, K. Ogawa, and A. Uyama, *Chem.Lett.*, to be published.

P 49 ^{15}N NMR による β -ベンジルL-アスパラギン酸含有 ポリペプチドの固体構造解析

(群馬大工) $^{\circ}$ 芦川幹也・莊司 顯・尾崎拓男 (東工大工) 安藤 勲

Structural Analysis of Solid Polypeptides Containing β -Benzyl L-Aspartate Residue by ^{15}N NMR.

Mikiya Ashikawa, Akira Shoji, Takuo Ozaki, and Isao Ando*

Department of Biological Sciences, Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma 376
and *Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152

Abstract : In order to elucidate the relation between the ^{15}N NMR chemical shift and the chemical structures (conformation and amino-acid sequence) of solid polypeptides, we have synthesized poly(β -benzyl L-aspartate) $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*]_n$ and some copolypeptides $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*, \text{X}]_n$ containing ^{15}N -labeled β -benzyl L-aspartate ($\text{Asp}(\text{OBzl})^*$) residue and other amino acid residue (X: natural abundance of ^{15}N). It was found that the ^{15}N chemical shift of $\text{Asp}(\text{OBzl})^*$ residue depends not only on main-chain conformation (includes helical sense), but also on neighboring amino acid sequence effects.

1. 緒 言

われわれはこれまでに、アルキル側鎖を有するアミノ酸残基からなるポリペプチドの ^{15}N 化学シフトがコンホメーション、アミノ酸残基の種類およびアミノ酸配列を反映することを報告してきた¹⁻⁴。本研究では、ベンジルエステル側鎖を有する β -ベンジルL-アスパラギン酸残基に着目し、そのホモポリペプチド $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*]_n$ およびコポリペプチド $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*, \text{X}]_n$ ($\text{Asp}(\text{OBzl})^*$: ^{15}N 標識 β -ベンジルL-アスパラギン酸, X: 天然存在比アミノ酸) の $\text{Asp}(\text{OBzl})^*$ 残基の ^{15}N 化学シフトとポリペプチドのコンホメーション、および ^{15}N 化学シフトと共重合アミノ酸残基の種類・含量との関係について検討した。その結果、(1) $\text{Asp}(\text{OBzl})^*$ 残基の σ_{iso} はポリペプチドのコンホメーション解析に有効であること、(2) 共重合アミノ酸残基がD-アミノ酸の場合、 σ_{iso} はL-アミノ酸の場合に比べかなり高磁場に現われることからL- $\text{Asp}(\text{OBzl})^*$ 残基の σ_{iso} はポリペプチドのヘリックスセンスや隣接残基の配列効果を反映することが明らかになった。

2. 実 験

本研究で用いた ^{15}N 標識(99%) $\text{Asp}(\text{OBzl})^*$ 残基を含むポリ(β -ベンジルL-アスパラギン酸) $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*]_n$ および ^{15}N 標識 β -ベンジルL-アスパラギン酸と他のアミノ酸(X = Gly, L-Ala, L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Lys(Z), L-Glu(OBzl), D-Ala, D-Val, D-Leu)とのコポリペプチド $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*, \text{X}]_n$ はN-カルボキシアミノ酸無水物法により合成した。各試料のコンホメーション解析は、赤外吸収スペクトルおよび ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルにより行なった。

固体高分解能 ^{15}N NMR・化学シフト・コンホメーション・ β -ベンジルL-アスパラギン酸

あしかわ みきや、しょうじ あきら、おざき たくお、あんどう いさお

^{13}C および ^{15}N CP-MAS NMR スペクトルの測定は、JEOL EX-270 WB 型分光計により、それぞれ 67.8 MHz および 27.3 MHz で行なった。 ^{15}N CP-MAS NMR スペクトルの測定条件は、 90° パルス幅：6.0 μs 、接触時間：2ms、繰り返し時間：5 s、スペクトル幅：40 kHz、データポイント：16K、サンプリングポイント：4K、MAS 速度：5.5~6.5kHz、積算回数：313~7000 回とした。 ^{15}N 化学シフトは $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ を基準 ($\delta = 0$ ppm) とし、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ($\delta = 18.0$ ppm) を二次基準とした。

3. 結果および考察

各コポリペプチド $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*, \text{X}]_n$ の L-Asp(OBzl)* 残基の ^{15}N 等方性化学シフト (σ_{iso}) を Figure.1 に示す。共重合アミノ酸残基 (X) が L-アミノ酸の場合、 β -シートのピーク (102.4~102.5ppm) は、 α -ヘリックスのピーク (93.8~97.6ppm) と分離して低磁場側に現われ、両者間のシフト差は 4.8~8.7ppm であった。この結果は、L-Val* 残基や L-Leu* 残基を含むコポリペプチドの場合と同様であり、このことから Asp(OBzl)* 残基の σ_{iso} はコポリペプチドのコンホメーション解析に有効であることが確認できた。

また、共重合アミノ酸残基が D-アミノ酸の場合、左巻 α -ヘリックスをとる試料 (X = D-Ala, D-Leu) の σ_{iso} は右巻 α -ヘリックスの試料 (X = L-Ala, L-Leu) よりもかなり高磁場に現われることが明らかになった。また、 β -シートの試料 (X = D-Val) でも、同じ β -シートの試料 (L-Val) に比べ大きい高磁場シフト (8.9ppm) が見られた。以上の結果より、L-Asp(OBzl) 残基の σ_{iso} はポリペプチドのヘリックスセンスや隣接残基の配列効果を反映することが明らかになった。

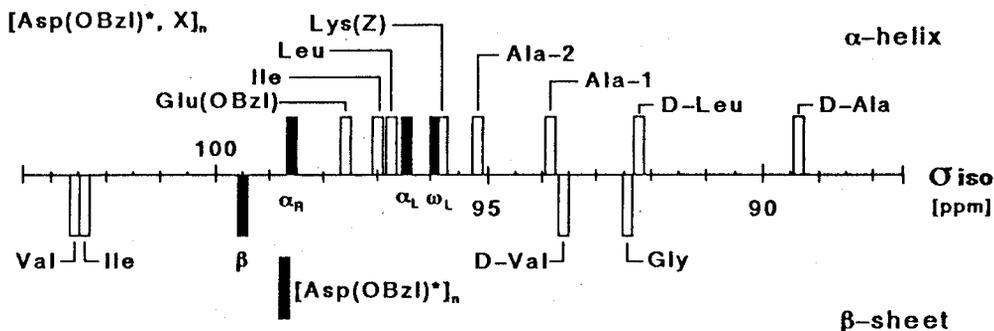


Figure 1. Diagram of the observed isotropic ^{15}N chemical shift (σ_{iso}) of Asp(OBzl)* residue of some copolypeptides $[\text{Asp}(\text{OBzl})^*, \text{X}]_n$ in the solid state.

文 献

1. A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, I. Ando, *Macromolecules* 1987, 20, 2441.
2. A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, S. Ando, I. Ando, *Macromolecules* 1989, 22, 2860.
3. A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, S. Ando, I. Ando, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 4693.
4. A. Shoji, S. Ando, S. Kuroki, I. Ando, G. A. Webb, *Ann. Rcp. NMR Spectroscopy* 1993, 26, 55.

P 50

ペプチドおよびポリペプチドの固体¹⁷O NMRスペクトルの コンピュータ解析:

化学シフトテンソル、核四極子相互作用と水素結合構造(2)

(東工大) ○高橋 昭裕・黒木 重樹・安藤 勲
(群馬大工) 荳司 顕・尾崎 拓男

Computer Analysis of Solid State ¹⁷O NMR Spectroscopy of Peptides and Polypeptides:
Chemical Shift Tensor, Quadrupolar Interaction and Hydrogen-bonding Structure(2)

Akihiro Takahashi^{a)}, Shigeki Kuroki^{a)}, Isao Ando^{a)}, Akira Shoji^{b)}, and Takuo Ozaki^{b)}

a) Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama,
Meguro-ku, Tokyo 152

b) Department of Biological Science, Gunma University, Tenjin-cho, Kiryu-shi,
Gunma 376

We have demonstrated that solid state ¹⁷O CP static NMR provides useful information about hydrogen-bonded structure of polypeptides and oligopeptides in the solid state such as polyglycines [forms I (β -sheet structure) and II (3_1 -helix structure)] and oligopeptides containing glycine residue.

In this work, we have measured solid state ¹⁷O CP static NMR spectra of ¹⁷O-labeled poly(L-alanine)s [α -helix and β -sheet] and oligopeptides containing L-alanine residue in the solid state. From the spectra, we have obtained separately chemical shift tensor and quadrupolar interaction by computer simulation. From these experimental results, it is shown that the NMR parameters of ¹⁷O chemical shift tensor and quadrupolar interaction greatly depend on the hydrogen-bonded structure and further that solid state ¹⁷O NMR is a very useful tool to get information about the hydrogen bonding structure. Details of discussion will be present.

【序】

最近、我々¹⁾はスピン量子数 $I = 5/2$ の¹⁷O核に注目し、ポリグリシン (β -シート、 3_1 -ヘリックス)、及びグリシン残基を含むオリゴペプチドについて研究を行い、¹⁷O NMRが水素結合について有用な情報を与えることを示した。今回はポリグリシンとは異なる構造 (α -ヘリックス、 β -シート) をとるポリ(L-アラニン) [PLA]、及び L-アラニン残基を含むオリゴペプチドの固体¹⁷O NMRスペクトルを測定し、その解析を通して水素結合構造について研究することを目的とした。

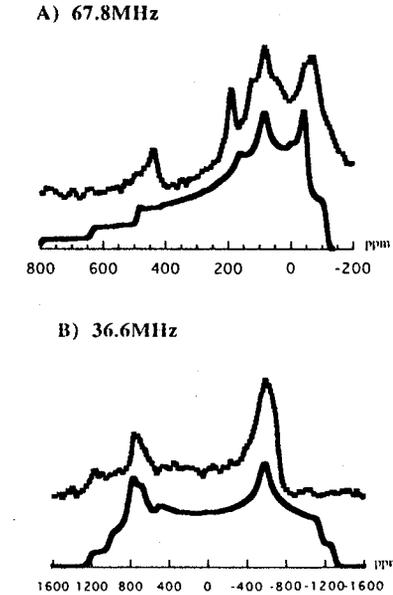
固体¹⁷O NMR/ポリアラニン/水素結合/コンピュータ解析/コンホメーション

たかはしあきひろ くらきしげき あんどういさお しょうじあきら おざきたくお

【実験】

L-アラニ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 アラニンを得て、N-カルボキシアミノ酸無水物(NCA)法によりPLAの ^{17}O エンリッチサンプルを合成した。L-アラニ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。この試料の static ^{17}O NMRスペクトルを日本電子製GSX-270NMR分光器(観測周波数36.6MHz)及びGSX-500NMR分光器(観測周波数67.8MHz)を用いて、室温で測定した。化学シフトの外部基準として H_2O を用い、その化学シフトを0ppmとした。パルスシーケンスは交差分極法を用いた。そして ^{17}O NMRスペクトル解析プログラムを作成し、Sun Sparc Station 5を用いて計算したスペクトルと実測のスペクトルを比較し、化学シフトテンソルと核四極子相互作用を分離した。

Fig.1

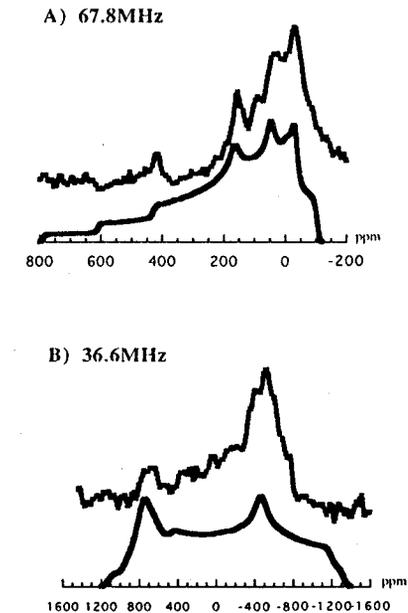


Observed ^{17}O CP static NMR spectra of solid PLA (α -helix) with theoretically-simulated spectra at 36.6MHz and 67.8MHz.

【結果・考察】

^{17}O NMR スペクトルに含まれる化学シフトテンソルと核四極子相互作用を分離するために2つの異なる周波数のNMR測定を行った。そのPLAの(A)67.8MHz、および(B)36.6MHzのスペクトルをFig. 1および2に示す。核四極子相互作用の大きさは磁場強度の違いにより見かけ上異なって現れ、そのため67.8MHzと36.6MHzのスペクトルでは分裂幅が異なり、特に36.6MHzのスペクトルは観測幅一杯にまで広がっていることがわかる。また α -ヘリックス(Fig. 1)と β -シート(Fig. 2)のスペクトルパターンは異なっている。このようなスペクトルパターンの違いは α -ヘリックスと β -シートの水素結合構造の違いから来る。Fig. 1, 2に示した理論スペクトルのシミュレーションから得られた核四極子結合定数と化学シフトテンソルを用いて、水素結合構造について詳しい議論を講演で行う。

Fig.2



Observed ^{17}O CP static spectra of solid PLA (β -sheet) with theoretically-simulated spectra at 67.8MHz and 36.6MHz.

【参考文献】

1)Kuroki, S et al., *J. Mol. Struct.* 1994, 323, 197

P 51 固体高分解能NMRを用いたアスパラギン酸残基を含むオリゴペプチドの水素結合構造の研究

(東工大) ○武田直登・黒木重樹・黒子弘道・安藤 勲
(群大工) 莊司 顯・尾崎拓男

Hydrogen-Bonding Effect on ^{13}C NMR Chemical Shift of Aspartic Acid Residue in Peptides as Studied by High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR Spectroscopy

Naoto Takeda, Shigeki Kuroki, Hiromichi Kurosu, Isao Ando (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152)

Akira Shoji, Takuo Ozaki (Department of Biological Sciences, Gunma University, Kiryu-shi, Gunma 376)

The ^{13}C NMR chemical shifts of the aspartic acid residue carbonyl carbons (Asp CO) of peptides in the crystalline state were measured. From these experimental results it is found that the observed isotropic ^{13}C chemical shifts of Asp CO in the amide-type hydrogen bond moves linearly downfield with a decrease of hydrogen bond length. This linear relationship agree with the previous results on glycine, L-alanine, leucine and valine residues.

1. 緒言

当研究室では、固体状態におけるグリシン残基¹⁾、L-アラニン残基²⁾、ロイシン残基、バリン残基を含む分子間水素結合に関する研究を行い、アミドカルボニル炭素の等方平均 ^{13}C 化学シフト (δ_{iso})は水素結合距離 ($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$)の減少に伴い直線的に低磁場シフトすることがわかった。しかし、タンパク質中には多くのアミノ酸残基があるので、タンパク質の構造解析を行うためには、上述したような側鎖にアルキル基を持つアミノ酸残基のみで議論を終わらせずに、構造が複雑なアミノ酸残基についても調べる必要がある。そこで、本報告では側鎖にカルボキシル基を持つアスパラギン酸残基のアミドカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトを測定し水素結合距離 $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ に対する変化を調べ、上記のアミノ酸残基の場合と比較する。

固体高分解能 ^{13}C CP-MAS、水素結合、アスパラギン酸

たけだなおと、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

2. 実験

試料として、Table.1に示したようにアスパラギン酸残基中のカルボニル基がアミド結合をしているペプチドを合成した。今回用いた試料はすでにX線回折により構造が明らかになっているもので、すでに報告されている方法で再結晶した。

また固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルは、CP-MASアクセサリーを付属した日本電子GSX-270NMRスペクトルメータを用い、67.8MHZ、室温で測定を行った。積算回数は200~800回である。スピニングサイドバンドによって信号の帰属が困難であった場合にはTOSS法のパルスシーケンスを用いた。

なお、化学シフトは外部基準として固体アダマンタンを用い、その化学シフトを29.5ppmとし、TMS基準に換算した。

Table.1 Observed ^{13}C chemical shifts of oligopeptides containing L-aspartic acid residue in the solid state and their geometrical parameters determined by X-ray diffraction studies.

Sample	^{13}C chemical shift (ppm)	Geometrical parameters				ref.	
		C=O	Hydrogen bond length (Å)		dihedral angle (deg.)		
			$R_{\text{N...O}}$	ϕ	ψ		ω
Asp-Gly	170.1	2.98	---	147.1	171.6	3)	
Asp-Ala	170.5	2.89	---	132.3	175.2	4)	
Asp-Arg-Val-Tyr	169.8	3.07	---	153.2	162.0	5)	
Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	172.3	2.84	-153.2	162.0	174.0	6)	

3. 結果と考察

固体状態のオリゴペプチドの ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルの例として Asp-GlyのスペクトルをFig.1に示した（他のペプチドについても同様のスペクトルが得られた）。スペクトルより得られたアスパラギン酸残基中のカルボニル炭素の等方平均化学シフト (δ_{iso})を、用いたペプチドの幾何学的パラメータと共にTable.1に示した。幾何学的パラメータのうち、いくつかはX線回折法により決定された結晶格子と原子座標を用いて計算した。X線回折法によって得られている水素結合距離 ($R_{\text{N...O}}$) に対して AspC=Oの δ_{iso}

をプロットしたものをFig.2に示した。Fig.2に示されるように、 $R_{N...O}$ が減少するに伴い δ_{iso} が直線的に低磁場側へシフトしている。これは側鎖がアルキル基である残基で見られた傾向によく一致している。従って、アスパラギン酸残基の場合もグリシン残基、L-アラニン残基、ロイシン残基、バリン残基と同様に残基中の「コンホメーション効果」や「水素結合角度の効果」や「隣接するアミノ酸残基の効果」は相対的に小さく、「水素結合距離の効果」が大きく効いていることが予想される。また、Fig.2において最小二乗法により求めた傾きを他の残基の傾きと共に、Table.2に示す。Table.2から分かるように直線の傾きは残基により多少異なっている。

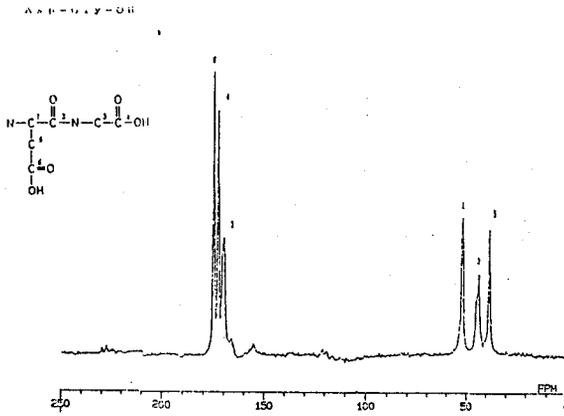


Fig.1 typical 67.8MHz ^{13}C CP/MAS NMR spectrum of aspartyl-glycine in the solid state.

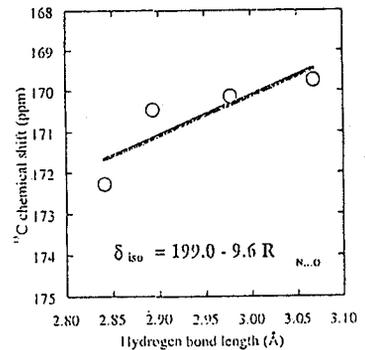


Fig. 2 Plots of the observed ^{13}C chemical shift of the carbonyl carbons in aspartic acid residue of oligopeptides in the solid state against hydrogen bond length.

Table.2 equation of relation between δ_{iso} and $R_{N...O}$

residue	equation
Gly	$\delta_{iso}=206.0-12.4R_{N...O}$
Ala	$\delta_{iso}=237.5-21.7R_{N...O}$
Val	$\delta_{iso}=215.4-14.2R_{N...O}$
Leu	$\delta_{iso}=202.2-10.0R_{N...O}$
Asp	$\delta_{iso}=199.0-9.6R_{N...O}$

また、固体化学シフトを分子構造及び電子構造と結び付けて解釈するために、アスパラギン酸-ジペプチドモデルを用いてFPT-INDO法により量子化学計算を行った。Fig.3に水素結合距離を変化させたときのTotal energyの変化、Fig.4に水素結合距離を変化させたときの磁気遮蔽定数の変化を示した。さらに、他の残基と傾向を比較するために水素結合距離を変化させたときの各残基の磁気遮蔽定数の変化をFig.5に示した。Fig.3によるとINDO法による計算でのエネルギーが安定な領域は、水素結合距離が2.3~2.5Å範囲であり、Fig.4において、この範囲では水素結合距離と磁気遮蔽定数との間に直線関係があり、これは実測のデータ結果をよく支持している。

このようにして得られた等方平均¹³C化学シフト (δ_{iso}) と水素結合距離 ($R_{N...O}$) との相関は水素結合を形成しているタンパク質の構造解析に適用できるものと考えられる。

4.参考文献

- 1) S.Ando et al.,J.Am.Chem.Soc.,110,3380(1988)
- 2) N.Asakawa et al.,J.Am.Chem.Soc.,114,3261(1992)
- 3) D. S.Eggleston,E.J.Valente and D.J.Hodgson., Acta.Cryst.,B37,1428(1981)
- 4) C.H.Gorbitz.,Acta.Chem.Scandinavica.,B41,679(1987)
- 5) S.H.Feldman and D.S.Eggleston.,Acta.Cryst.,C46,678(1990)
- 6) W.B.T.Cruse,E.Egert,M.A.Viswamitra and O.Kennard.,Acta.Cryst.,B38,1758(1982)

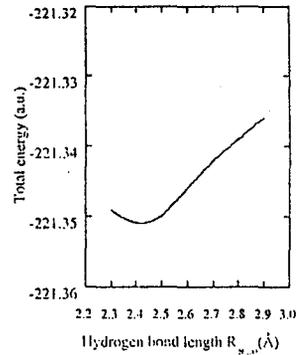


Fig. 3 Variation of the calculated total energy against the hydrogen bond length ($R_{N...O}$)

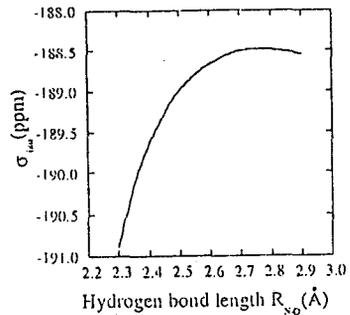


Fig. 4 Variation of the calculated ¹³C isotropic shielding constant against the hydrogen bond length

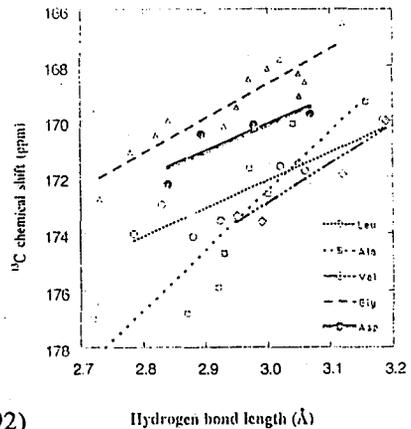


Fig.5 Correlation between ¹³C chemical shifts of carbonyl carbons in Gly,Ala,Val,Leu and Asp residues of oligopeptides in the solid state and hydrogen bond length.

P 52

液晶NMR法の改良と応用。 NMA S (Near-Magic-Angle Spinning) 条件下での ^{13}C 二次元NMR

阪大(薬) ○藤原英明、木村敦臣、直原高広、國 直人

Development and Application of the Liquid Crystal NMR.
 ^{13}C 2D-NMR under Near-Magic-Angle Sample Spinning

Hideaki FUJIWARA, Atsuomi KIMURA, Takahiro JIKIHARA, and Naohito KUNI

A new version of the liquid crystal NMR spectroscopy has been developed and applied which utilizes sample spinning at near-magic-angle. The ^{13}C spectroscopy are examined for a molecule of p-chlorobenzaldehyde dissolved in nematic phase ZLI1167 from one- and two-dimensional NMR varying the angle of sample rotation around just the magic-angle. COSY(C-H as well as H-H) and hetero-2D-J-resolved spectra are tested with encouraging results for future wider application of the LC NMR to complexed molecules.

液晶中に配向した分子の、直接結合定数 (D_{ij}) を含む、NMRスペクトルを解析する「液晶NMR法」は、液晶中に配向した分子の構造や配向に関する情報を提供してくれるので、生体膜や他の生体組織中での活性コンホメーション研究の有力な手段であり、また、組織化された有機分子の集合体(超分子系) そのものの研究にも有効であるが、幅広く応用されるためには、基礎的手法の確立が急務である。

我々は、昨年の本討論会で、いわゆる液晶NMR法の改良のための、マジック角近くでの試料回転の利用について、 ^1H NMRによる研究を報告した。1) ここでは、液晶NMRスペクトルに特有の複雑なパターンの単純化と、直接結合定数Dを介してCOSYスペクトルに超長距離間の交差ピークが出ることを確認し、J分解スペクトルの微細な分裂パターンからDを決定することを試みた。今回は、 ^{13}C スペクトルからの検討を行ったのでその結果を報告する。

[実験]

用いた試料はネマティック液晶(ZLI1167)中のp-Chlorobenzaldehydeである。NMRの測定はVarian VXR-200により固体プローブを用い

キーワード: 液晶NMR、 ^{13}C 二次元NMR、マジック角回転

ふじわら ひであき、きむら あつおみ、じきはら たかひろ、くに なおひと

て行った。試料温度はスピニング用エアーを35°Cにコントロールすることにより一定とした。試料のスピニング速度は2k~3kHzである。

[結果と考察]

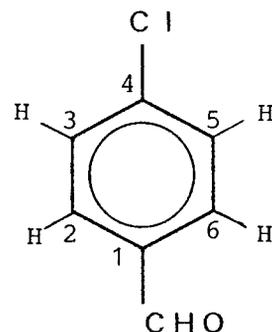
マジック角に丁度等しい角度で試料回転して測定した ^{13}C スペクトル (just MAS スペクトル) は Fig. 1の通りである。通常の ^1H デカップル条件ではプロトンとの大きな双極子-双極子相互作用が完全には消去されないので、溶媒のピークは幅広いバックグラウンドとして現れるのみである。

just MAS 条件下でのC-H COSY (hetcor) スペクトル (Fig. 2) では、C-2とC-3のシフトが近いが、 ^1H の低磁場ピークと ^{13}C の低磁場ピークとの対応が明確に認められる。

マジック角から約1°ずらせたNMAS条件下でのH-H COSYスペクトルでは (Fig. 3)、ベンゼン環プロトンのうちアルデヒド基に近いプロトンが低磁場側のピークを与えることが明白となる。これら双方のCOSYスペクトルでは、液晶自身のピークはブロードであり、測定上大きな問題とはなっていない。

^{13}C 各ピークの分裂パターン測定のための ^{13}C J分解スペクトル (het2dj) を Fig. 4に示す。各ピークのパターンは、A: doublet、B: singlet、C: doublet、D: doublet triplet、E: doublet triplet である。DとEには高次分裂の影響が見られ一次の単純パターンから若干ひずんだ形となっている。これは、 ^1H スペクトルに起因するものであり、同条件下での ^1H スペクトルには、H-2とH-3との間に高次分裂パターンが見られる (Fig. 5)。just MAS からのずれを小さくすれば、この高次パターンは消失する。例えば、 $\text{MA}+1^\circ$ の ^{13}C スペクトル (Fig. 6) からは、A: doublet ($\Delta\nu=177.0\text{ Hz}$)、B: triplet ($\Delta\nu=10.7\text{ Hz}$)、C: doublet triplet ($\Delta\nu=29.0\text{ Hz}$, 6.5 Hz)、D: doublet ($\Delta\nu=170.1\text{ Hz}$)、E: doublet ($\Delta\nu=175.5\text{ Hz}$) が観察出来る。従って、 ^{13}C の帰属は: A=CHO、B=C-4、C=C-1、D=C-2 & C-6、E=C-3 & C-5、と結論される。C-1とC-4の区別が、CHOプロトンとの直接結合定数の有無により明確に決定出来ることが分かる。

直接結合定数を精度良く測るためには、MAから大きくずらす方が有利であるが、観測パターンを単純化するためには just MA に近い方が良く、実際の例では、個々の場合に応じて just MA からのずれを適当に調節するのが得策となろう。また、単純な化合物では、 ^{13}C の一次元測定から分裂幅を読み取ることが出来るが、複雑な化合物では二次元測定が不可欠となろう。



p-Chlorobenzaldehyde

文献

- 1) 鹿野、高木、木村、藤原、第32回NMR討論会、要旨集 p.141 (1993).

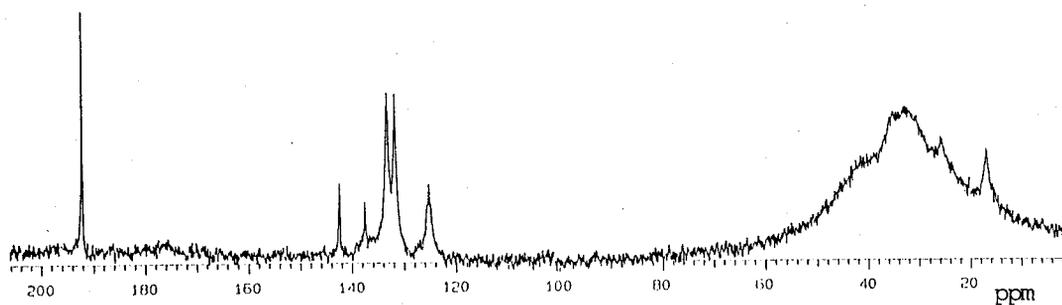


Fig. 1 ^{13}C NMR Spectrum of p-Chlorobenzaldehyde in ZLI1167.
30°C, just MAS

Fig. 2

^{13}C hetcor Spectra
of p-Chlorobenzaldehyde in ZLI1167
just MAS

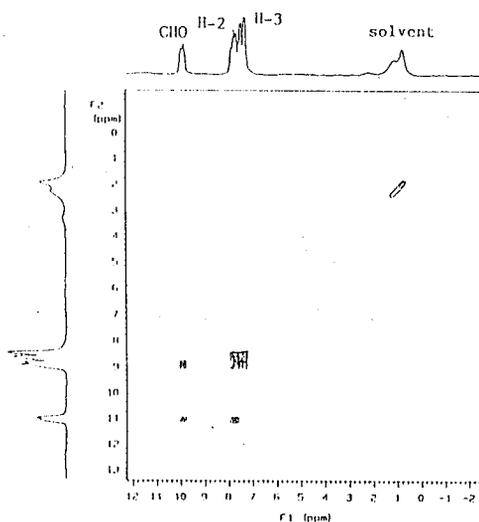
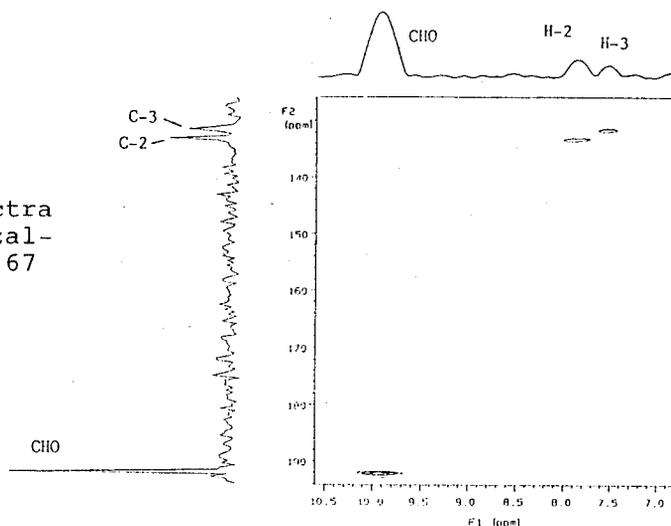


Fig. 3 H-H COSY Spectra of p-Chlorobenzaldehyde in ZLI1167
NMAS: MA + 1°

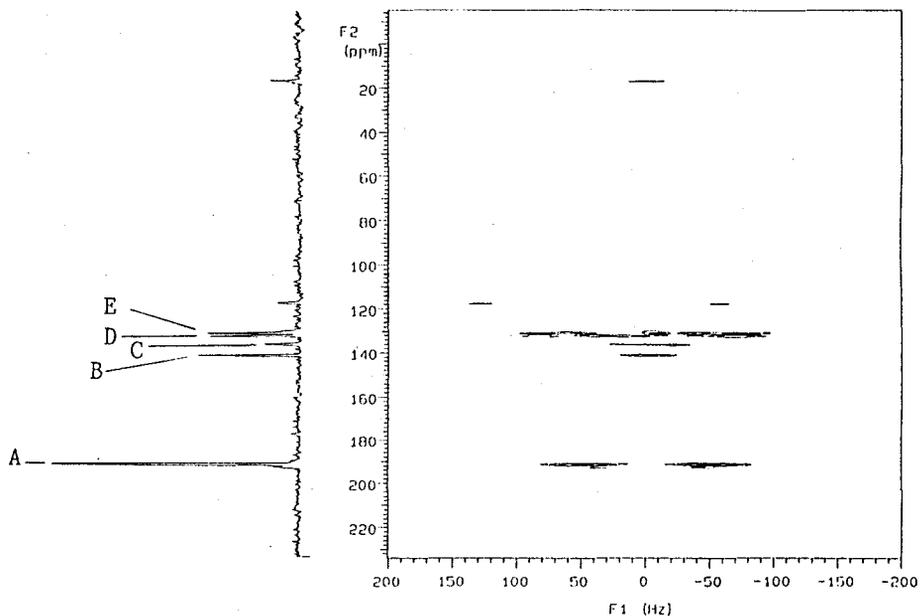


Fig. 4 C-H Het2dj Spectra of p-Chlorobenzaldehyde in ZLI1167
 NMAS:MA + 4°

Fig. 5 ¹H Spectrum for
 the same sample as
 in Fig. 4

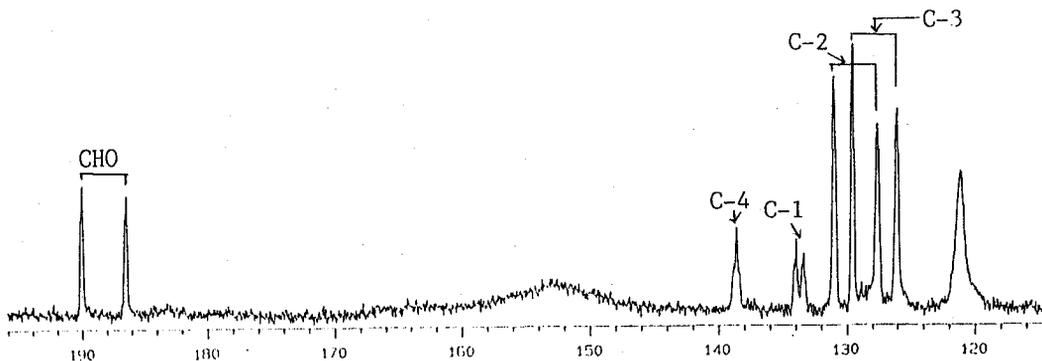
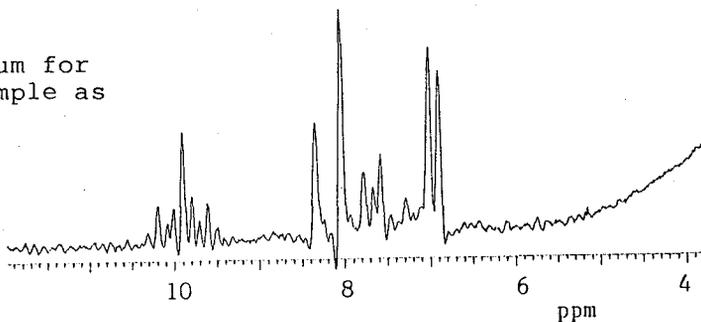


Fig. 6 ¹³C Spectrum of p-Chlorobenzaldehyde in ZLI1167
 Non Decoupling of ¹H, NMAS; MA + ca. 1°

MAS条件下二次元NMRによる lasalocid Aの液晶中における
コンホメーション解析

— Magic Angle Spinning 液晶NMR法 —

(阪大・薬) ○木村敦臣、直原高広、國 直人、藤原英明

The conformational analysis of the micelle-associated lasalocid A
using two dimensional NMR under MAS conditions.

— Magic Angle Spinning Liquid Crystal NMR Spectroscopy —

○Atsuomi Kimura, Takahiro Jikihara, Naohito Kuni and Hideaki Fujiwara

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

It has been demonstrated that a usefulness of liquid crystal NMR spectroscopy is improved extensively by measuring two dimensional NMR under magic angle sample spinning. Informations about the space proximity and bond connectivity are obtained for the solute lasalocid A, a typical carboxylic polyether antibiotics, under the anisotropic environment. Such a new version of liquid crystal NMR, i.e., the magic angle spinning liquid crystal NMR spectroscopy, is expected to be applied more widely to more complexed molecules.

序論

液晶中に配向した溶質のNMRスペクトルを特徴付ける、直接結合定数Dにもとづく、カップリングはスペクトルを非常に複雑にするため、液晶NMR法の適用範囲を限られたもの(9スピン程度の系まで)としている。我々は、これまでにこの欠点を克服するため、マジック角近くでの試料回転を利用したNMA S (Near Magic-Angle Spinning) 2D NMR法を提唱してきたが、今回はMAS条件下での二次元液晶NMR法の有用性を提唱したい。

今回は、複雑な一般の医薬品分子を対象とすることを考え lasalocid Aを溶質としてとり上げた。lasalocid A (Fig.1) は天然に存在するイオノホアで、イオンと錯形成し擬似環状分子となることによりイオンの膜透過を促進し、活性発現に至ると考えられている。そこでこの lasalocid Aのリオトロピック液晶および等方溶液(CDCl₃)中におけるコンホメーションを解析し、イオンの膜透過促進機構を考察する手がかりとすることとした。

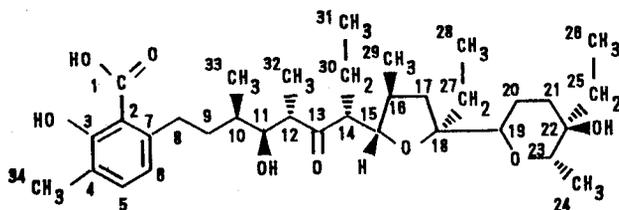


Fig.1 Lasalocid A

キーワード：マジック角回転、液晶NMR、二次元NMR、 lasalocid A

きむら あつおみ、じきはら たかひろ、くになおひと、ふじわら ひであき

実験

溶媒にはリオトロピック液晶であるCesium Perfluorooctanoate(CsPFO)を用いた。このため、溶質であるlasalocid AはCs塩に変更して用いた。

NMR測定はCsPFO液晶サンプルについてはVarian Unity-500 ナノプローブにより、35°Cおよび50°Cにおいて測定を行った。帰属はCDCl₃溶液中の帰属を参考にスメクティック相およびミセル相の両相において¹H-¹H COSYおよびROESYにもとづいて行った。またCDCl₃溶液サンプルについてはVarian Unity-600により測定温度30°Cにて測定を行った。¹Hおよび¹³C NMRスペクトルの帰属を¹H-¹H COSY、ROESY、HMBCおよびHMQC測定により行った。

結果と考察

CsPFO液晶サンプルの²H-NMRスペクトルは35°Cでは2本に分裂したピークを、50°Cでは1本のシグナルを与えた。したがって今回用いたCsPFO液晶サンプルは35°Cではスメクティック相、50°Cではミセル相を形成していることが確かめられた¹⁾。

lasalocid AのCsPFO液晶中における¹H-NMR通常測定のスเปクトルは、液晶中における分子の運動の異方性を反映した双極子-双極子相互作用により、明瞭なピークを与えず解析は困難であったが、マジック角での試料回転を行い測定すると、等方溶液(CDCl₃)中(Fig.2a)、あるいは等方(ミセル)相でのスペクトル(Fig.2b)に近い分解能が得られた(Fig.2c)。Fig.2cにおいて、線幅の広幅化および芳香族領域に直接結合による残余分裂がなお残存していることが確かめられるが、これは測定の際の若干のマジック角からのずれを反映するものであろう。

同様の条件でミセル相あるいは液晶相において¹H-¹H COSYおよびROESY測定を行ったところ、多数のクロスピークが明瞭に観測され(Fig.3)、コンホメーション解析に応用可能なスペクトルが得られた。なお液晶相の¹H-¹H COSYスペクトルにおいて、ミセル相ではみられない19位-24位、14位-29位および21位-24位のプロトン間に相関が見られた。これは残余直接結合による空間を介しての磁化移動によるものと考えられ、したがって just magic angle条件だけではなくnear magic angle条件下での測定の有用性をも示唆するものである。

Fig.1に示したCDCl₃溶液中とCsPFOミセル中のスペクトルとを比較した場合、8位のケミカルシフトが大きく変化しており、ミセル相では芳香環に対し比較的等価に位置しているものと考えられる。またミセル相では23位と9位のプロトンとの間にROEが観測されたのに対し、CDCl₃溶液中ではそのような遠隔距離情報を得ることが出来なかった。したがって lasalocid Aはミセル中ではCDCl₃溶液中に比してコンパクトなコンホメーションをとっているものと考えられるが、コンホメーションについてはROE情報をもとに現在詳細に解析中である。

以上の結果はMAS条件下での液晶NMR法の有用性を示唆するものであり、今後、一般の医薬品を始め様々な生理活性物質の液晶中におけるコンホメーション解析に応用することにより、生理活性発現の場における貴重な構造情報を得る手段としてMAS条件下の液晶NMR法が幅広く応用可能となると期待される。

謝辞

600MHzおよび500MHzの測定に際しご協力いただきました大阪大学理学部化学科の小田雅司教授、バリアンジャパンリミテッドの串田克彦氏に感謝いたします。

参考文献

1) N. Boden, P. H. Jackson, K. McMullen, *Chem. Phys. Lett.*, **65**, 476-479 (1979)

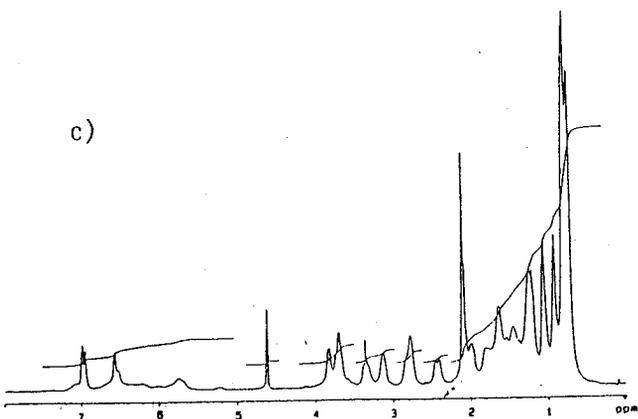
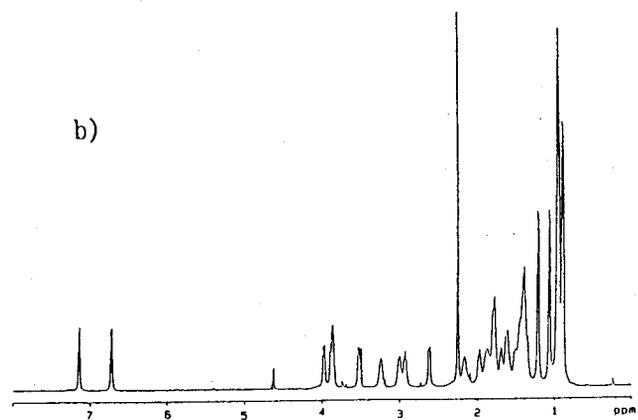
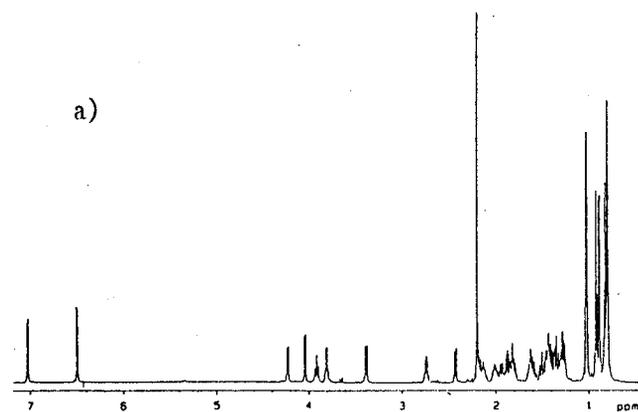


Table 1 Observed mean ^1H chemical shifts for lasalocid A-Cs salt.

^1H	in $\text{CDCl}_3^{\text{a)}$	in $\text{CsPFO}^{\text{b)}$
5	7.02	7.15
6	6.50	6.72
8A	3.92	3.24
8B	2.17	3.00
9A	1.59	1.80
9B	1.43	1.62
10	1.64	1.69
11	4.23	3.97
12	2.74	2.93
14	2.44	2.63
15	4.04	3.89
16	2.13	2.18
17A	1.88	1.96
17B	1.35	1.38
19	3.38	3.54
20A	1.94	1.85
20B	1.45	1.50
21A	1.84	1.64
21B	1.51	1.35
23	3.81	3.87
24	1.04	1.20
25A	1.41	
25B	1.28	
26	0.92	0.96
27A	1.80	1.78
27B	1.37	1.43
28	0.82	0.92
29	1.03	1.06
31	0.80	0.90
32	0.89	0.97
33	0.79	0.95
34	2.20	2.25

Fig.2. ^1H -NMR spectra of lasalocid A-Cs salt.

a) in CDCl_3 solution at 303K

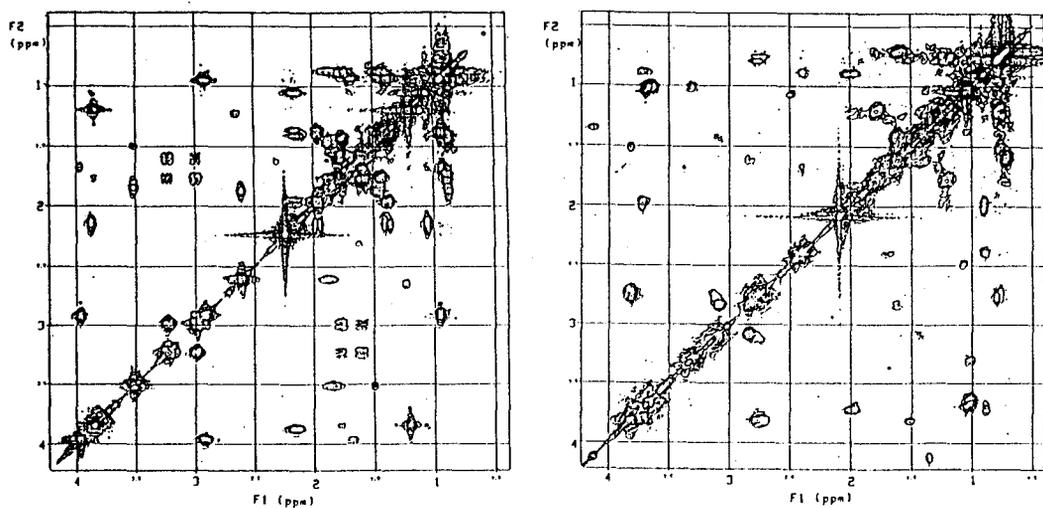
b) in 35wt.% $\text{CsPFO}/\text{D}_2\text{O}$ at 323K

c) " " at 308K

a) see Fig.2 a)

b) see Fig.2 b)

a)



b)

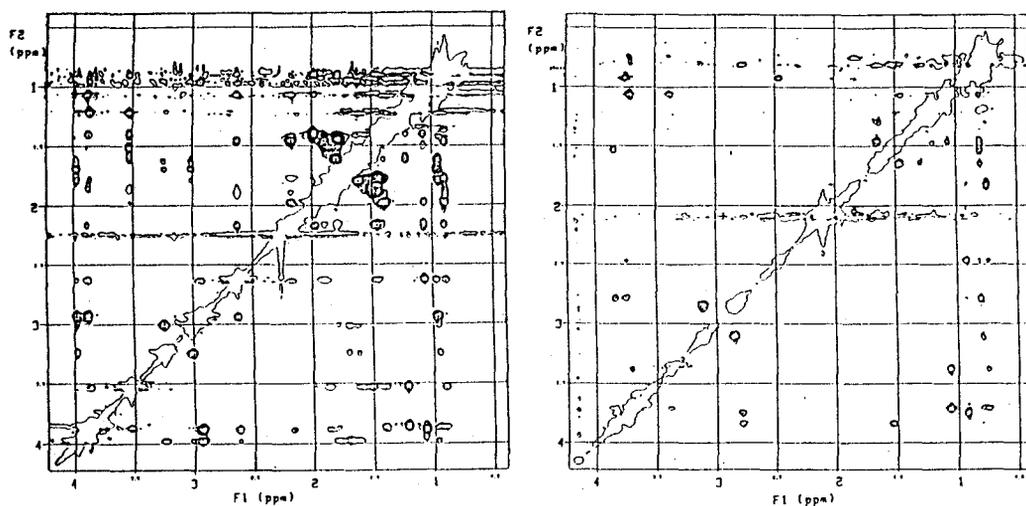


Fig.3 a)'H-'H COSY spectra of lasalocid A in CspFO micelle.

left, at 323K; right, at 308K

b) ROESY spectra at the same conditions as in a).

mixing time; 0.1s

P 54

¹⁹F-固体NMRによるPhilanthotoxinとアセチルコリンレセプターとの相互作用の研究

(財)サントリー生有研) ○岩下 孝

(コロンビア大学化学科) S. Choi, Y. A. Tomita,
A. E. McDermott, 中西香爾

¹⁹F Solid-State NMR Study of Ligand (Philanthotoxin) Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptor

(Sunbor) ○T. Iwashita, (Dept. of Chemistry, Columbia University) S. Choi, Y. A. Tomita, A. E. McDermott, K. Nakanishi

¹⁹F Solid-State NMR (SSNMR) was used to characterize ligands bound to the nicotinic acetylcholine receptor (nACh-R). Philanthotoxin (PhTX) analogs were synthesized with F-probes which were located in various positions of the molecule, and were incubated with Torpedo nACh-R. After washing out of the excess ligand, the SSNMR spectra were measured at high spinning speed (approximately 8 KHz). Two signals were observed for the ligand in the presence of receptor. The competition experiments with chlorpromazine, which bound to the same site, revealed the specifically bound fraction of F-PhTX. We were able to detect a single -CF₃ group in a 1-2mg size sample of the 270 KDa protein.

はじめに

ニコチン性アセチルコリン受容体(nACh-R)は脊椎動物の神経筋接合部やシビレエイ(Torpedo)の電気器官に多く存在しており、陽イオン選択的なイオンチャンネルである。神経伝達物質作動イオンチャンネルのスーパーファミリーの中ではニコチン性アセチルコリン受容体は薬理学的にも構造化学的にも最もよく研究されている。このレセプターは膜結合性の270kDaの糖タンパクであり、二つのアゴニスト結合部を持ち、リング状に配置された五つのサブユニット($\alpha, \alpha', \beta, \gamma, \delta$)からなるイオンチャンネル部分を持つ。各サブユニットは四つの脂質二重膜貫通領域から成っており、主に α -ヘリックスであると信じられている二番目のM2領域は内部に空隙を形作っている。チャンネルは二つの α サブユニットにアセチルコリンが結合したときに開く。

ジガバチ(*Philanthus triangulum*)の毒液成分から単離されたPhilanthotoxin-433 (PhTX-433)はニコチン性アセチルコリン受容体やグルタミン酸受容体(Glu-R)のイオンチャンネルによる情報伝達を阻害する生理活性のある化学物質である。PhTX-433の化学構造(図-1a)は種々のスペクトルデータおよび全合成によって明らかにされた。PhTX-433は、構造活性相関(SAR)研究の目的で図-1aに示すような四つの領域に分けて100以上の誘導

キーワード：F-固体NMR、Philanthotoxin、アセチルコリン受容体

○いわした たかし、S. ちよい、Y. A. とみた、A. E. まくだーもつと、
なかにし こうじ

体が合成された。SARの結果は図-1aにまとめてある。最近のnACh-Rを使ったSARの結果はポリアミン部分が空隙へ挿入され、領域IIIおよびIVは立体化学的に制限を受けていない疎水的な領域、おそらくはシナプスの細胞質ゾルの側または疎水ポケットに位置しているとするモデルに一致している。チャンネルの中においてはアミン部分はおそらく空隙を形成している五つの膜貫通(M2) α -ヘリックスの Ser, Thr, Glu, Gln 残基から成る”親水的リング”と相互作用している。予備的なフォトアフィニティラベルの結果によると、領域IIIのアジドフェニル部分はサブユニット α のサイトプラズミックループの近くに存在しており、選択的にフォトラベルすることが出来る。この選択的なラベルはサイトプラズミックな43kDaのタンパクの存在如何により左右され、このことは開口部の所に領域IIIとIVが位置するというモデルと一致する。加えて、 α サブユニットのフォトラベルはchlorpromazineとの競争的結合によって抑制され、ポリアミンがチャンネルに結合するという結論を支持している。この受容体の三次元モデルの見地からフォトラベルの結果を説明するために、我々はNMRによって受容体中のPhTXのコンフォメーションの決定をめざし、リガンド対受容体の相互作用の性質について明らかにしようとした。

実験

1. nACh-Rの調製

nACh-Rはシビレエイの電気器官より単離した。ショ糖グラジエントにより濃縮されたnACh-R膜画分はpH11に調整して0°Cで一時間振蕩し、43kDaのサイトプラズマタンパクを除去した。nACh-Rの純度は α -¹²⁵I-ブンガロトキシンによる試験とSDS-PAGEにより評価した。

2. ¹⁹F-PhTXの合成と生物活性試験

¹⁹F-PhTXは化学合成し、その純度はMS,¹H-,¹⁹F-,¹³C-NMRで検定した。生物活性は文献に従ってバッタ筋肉のグルタミン酸受容体を用いた。化合物1,2,3,および4のIC₅₀は、それぞれ23.0,230,230,5.8 μ Mであった。(図-2)

3. 試料調製

F-NMR試料の調製法は次のとおりである。バッファー(250 mM NaCl, 5 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, pH 7.0)に懸濁された受容体の濃縮された膜画分(3 ml; 2.75 mg タンパク/ml 懸濁液)は同じバッファーに溶かされたspermine.4HCl 5 mg およびPhTX-343-Gly-CH₂CF₃.3HCl 1 mgと混合され、4°Cで一時間振った。四時間の超遠心(55 Krpm)の後、上澄みをペレットからすばやく除去した。競争試験の時にはchlorpromazineを6 mMの濃度でnACh-R/PhTXと混合した。F-NMRの実験のためにはペレットをそのまま固体NMRのローター(120 μ l)に充填した。初期の回転によって染み出てきた水分を除去し、測定を行った。NMR測定後タンパク量を検定したところ約5.4 mg 総タンパクあるいは約1.3 mg nACh-Rであった。

4. NMR測定

NMRスペクトルはCMX-400 (Chemagnetics Otsuka, Ft. Collins CO)スペクトロメーターにDoty"supersonic" ¹H-¹⁹F二重共鳴プローブ(¹⁹F;373 MHz)および高出力用フィルターを組み合わせて測定した。測定温度は約300°K、ローターの回転速度は約8 KHz、パルスの長さは4 μ sであった。検出期にCWプロトンデカップリング(80 KHz)を行いながら、Bloch decay あるいは

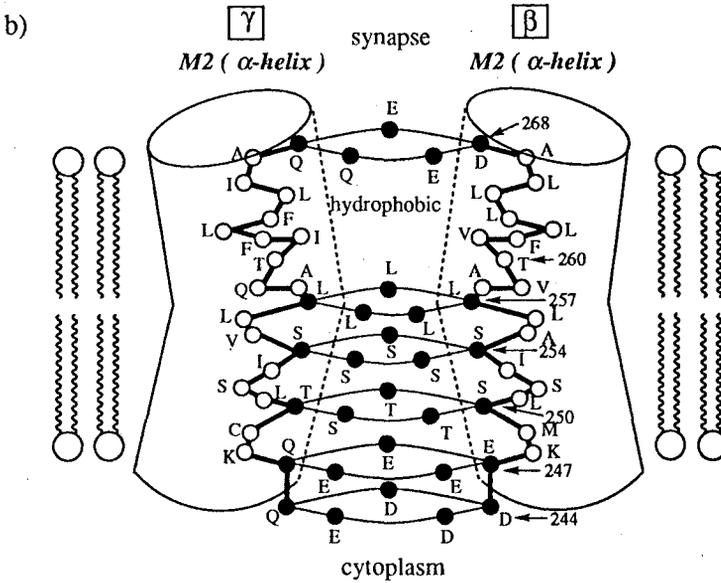
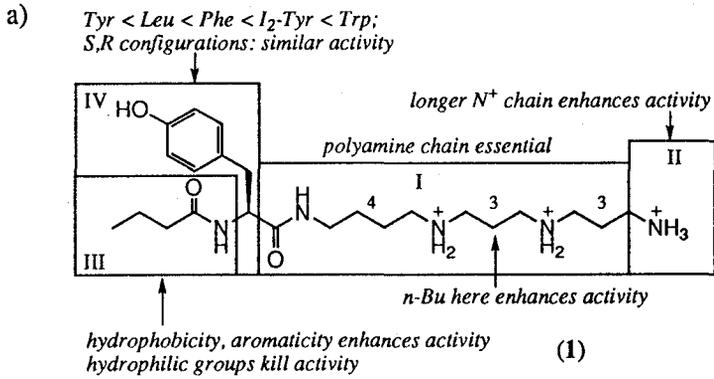


Fig.-1a) The structure of philanthotoxin-433 (1) with results of SAR.
b) A schematic model of the channel portion of nicotinic acetylcholine receptor.

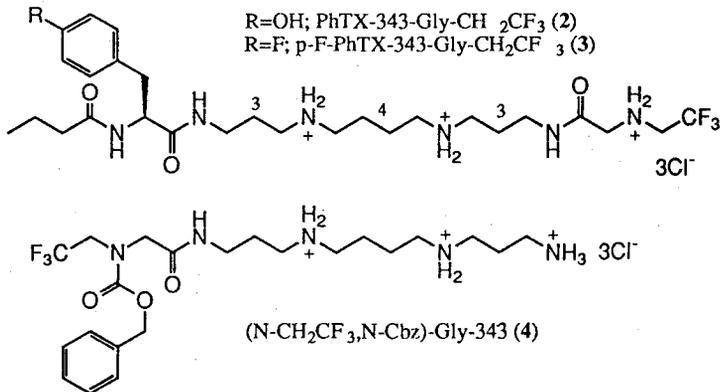


Fig.-2 The structures of three additional philanthotoxin analogs used in this study.

Chemical Shift Echo パルス配列を用いて測定した。FIDデータのデジタル化速度は約500 KHz、緩和回復時間は2sとした。それぞれのスペクトルは約10,000回の積算によるものである。

結果

nACh-Rに結合したPhTXの ^{19}F -固体NMRスペクトルは図-3のように二つのシグナルを示した。二つのシグナルのうち低磁場側のピークは溶液のときの化学シフトに近いことから非選択的結合によるものである可能性が高い。小さい方のピークは小さいスピニングサイドバンドを持っており溶液中のPhTXに比べるとかなり高磁場にシフトしている。(-73.6 ppm vs -70.7

ppm) このシグナルは低磁場側シグナルに比べると二倍も弱い。マジックアングルスピニングなしで測定すると、結合状態であると帰属された方のピークは非常に弱くなってしまい低磁場側シグナルはあまり小さくならなかった。さらに重要なことには、図-3に示すように結合状態のピークはchlorpromazineの存在下で競争実験を行ったとき消滅してしまった。既知量の ^{19}F -PhTXをNMR測定試料にさらに添加し、定量を行った。その結果、結合状態のPhTXはNMRシグナルの積分より約6 nmoleであることが分かった。この量はPhTXとnACh-Rが化学量論的に1:1であることを示唆している。フッ素の化学シフトはタンパクとの結合によって高磁場側または低磁場側に約8 ppmシフトすることが知られている。低磁場側への大きなシフトはファンデルワールス接触によるとされ、結合場所が混み合っていることを示している。高磁場側へのシフトは水に比べて立体的な込み合い方が軽減されたものかまたは（プロトンまたはカチオンが側にいて）プラスの電場が増加したものと考えることが出来る。結合状態の分子種のスピニングサイドバンドが予想より二倍ほど小さいのは結合状態において CF_3 グループのコンフォメーションが動き易い状態にあると考えられ、結合ポケットの中がそれほど混み合っていないという解釈と一致する。

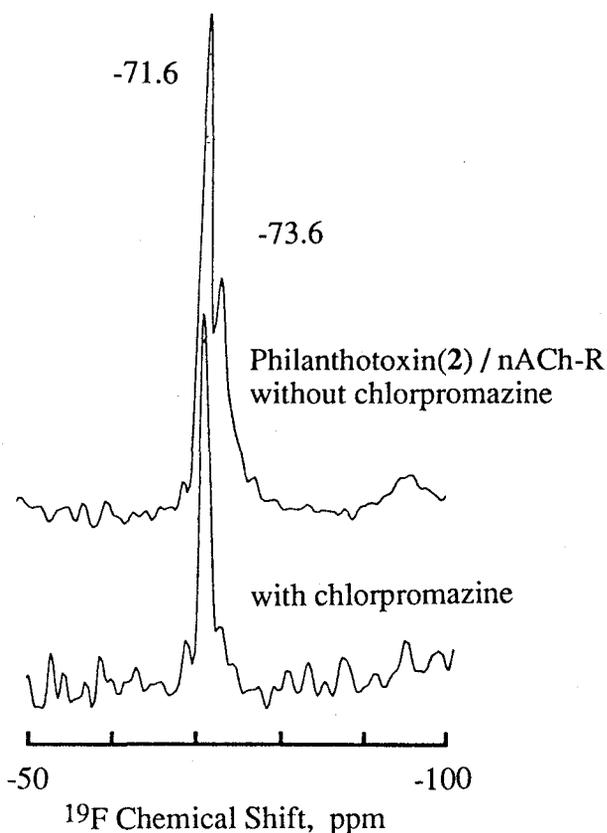


図-3 ^{19}F Solid-State NMR spectra

セッション：緩和，運動
(Relaxation, Motion)

重水素核

C-13 核他

L10

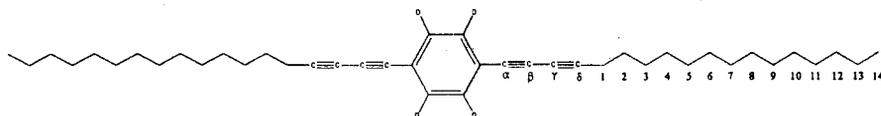
Solid-State ^2H NMR study of the motion of p-bis(1,3-octadecadiynyl)benzeneW. S. Price, K. Hayamizu, S. Okada[†], H. Matsuda and H. Nakanishi[†]

National Institute of Materials and Chemical Research, 1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305;

[†]Institute of Chemical Reaction Science, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku,

Sendai 980-77

In an attempt to produce a polydiacetylene (PDA) with larger third order non-linear optical properties the polymer precursor, p-bis(1,3-octadecadiynyl)benzene (14-2A-B-2A-14; see below), was synthesized.



It was found, however, that neither thermal treatment nor γ -ray irradiation at 298 K were able to promote solid-state polymerization. Similar polymer precursors have been found to polymerize via the 1-4 addition mechanism. It is known that for this mechanism to be effective the monomers must be properly aligned. In an effort to understand the poor polymerizability of 14-2A-B-2A-14 a detailed analysis of the motion and the effects of thermal treatment and γ -ray irradiation was conducted using differential scanning calorimetry, solid-state cross-polarization magic-angle-spinning (CP-MAS) ^{13}C and solid-state ^2H NMR.

^{13}C CP-MAS measurements were performed for a range of temperatures from 273 to 343 K. The measurements revealed that below 298 K the alkyl chains had a high degree of alignment but this alignment was lost above 298 K (see Fig. 1).

Keywords: Polydiacetylene, ^2H NMR, solid-state cross-polarization magic-angle-spinning ^{13}C NMR

プライス ウィリム S.、はやみず きくこ、おかだ しゅうじ、まつだ ひろお、
なかにし はちろう

Also at 298 K the aromatic CH carbons went through an intensity minimum. This is indicative of increased molecular motion of the phenyl ring.

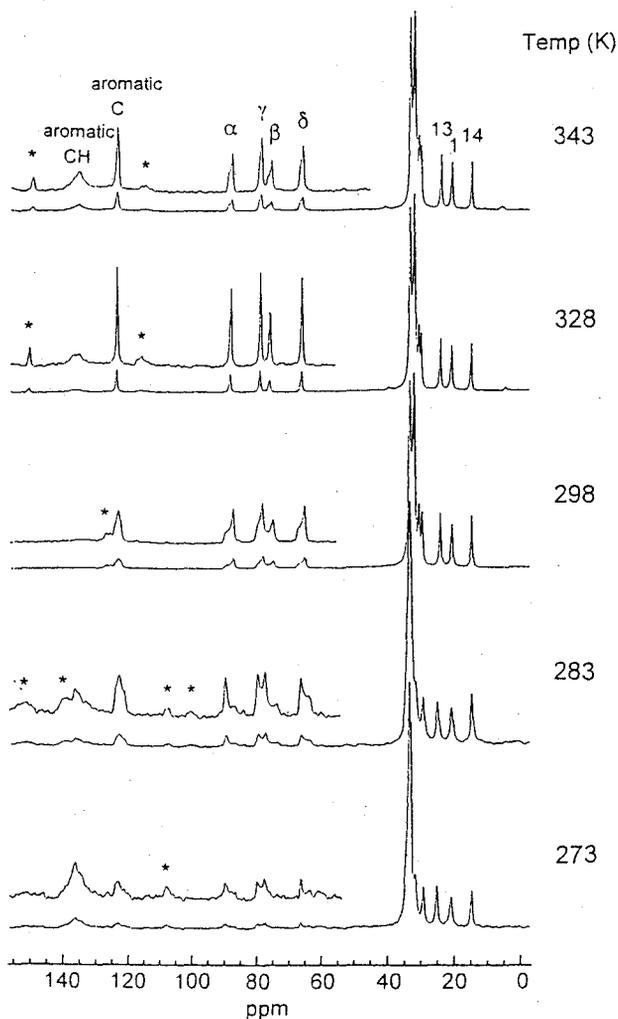


Figure 1. ^{13}C CP-MAS spectra acquired at 50.23 MHz and various temperatures of 14-2A-B-2A-14. Asterisks denote spinning side-bands or background signals. Significant temperature dependent spectral changes are noted. At 273 K the aromatic CH resonances are clearly visible and the acetylenic resonances have significant shoulders. However as the temperature increases the aromatic CH resonances go through an intensity minimum at around 298 K. The shoulder patterns of the acetylenic resonances move from higher to lower frequencies as the temperature is increased. The aliphatic resonances at about 33 ppm, while appearing as a single line with a shoulder below 298 K, split into numerous lines above this temperature.

To better characterize the phenyl ring dynamics, a monomer sample with a specifically ^2H labeled phenyl ring moiety was synthesized (see above) to allow solid-state ^2H NMR measurements to be performed. ^2H NMR spectra were recorded over a range of temperatures from 260 to 360 K. The experimental spectra were simulated using a program written in C⁺⁺. Some representative experimental and simulated spectra are shown in Figure 2.

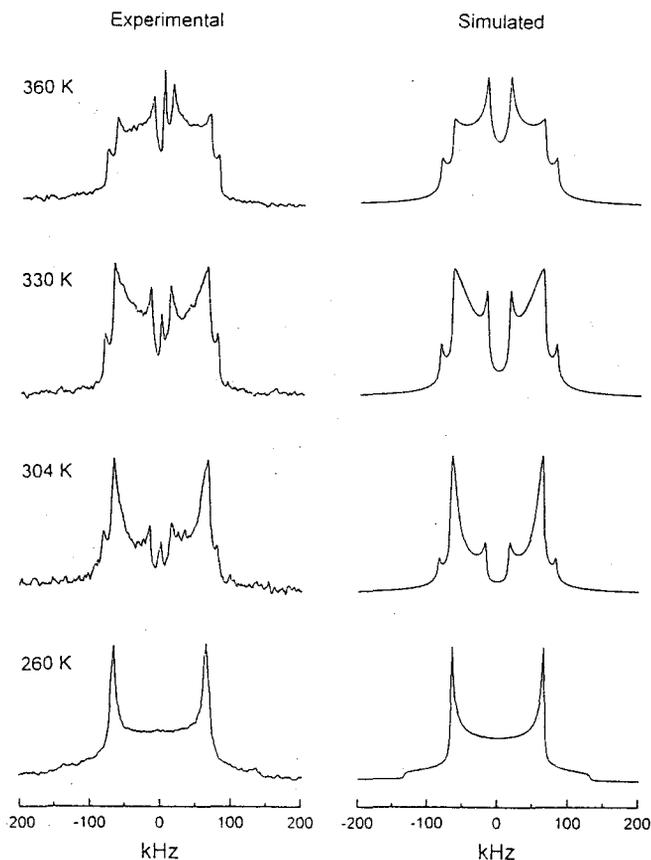


Figure 2. (A) Experimental (acquired at 61.4 MHz) and (B) simulated ^2H NMR spectra of the 14-2A-B-2A-14 monomer at various temperatures. The parameters used in the simulations were quadrupolar coupling constant 175.5 kHz, $\eta = 0$. The values of τ_c used at the respective temperatures were: $1.0 \times 10^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ (260 K); $1.1 \times 10^{-4} \text{ Hz}^{-1}$ (304 K); $1.8 \times 10^{-5} \text{ Hz}^{-1}$ (330 K); $2.8 \times 10^{-6} \text{ Hz}^{-1}$ (360 K). The simulated spectra were calculated using 1° increments of the azimuthal and polar angles. The peaks at zero frequency in the experimental spectra are artifacts.

It was found that below 300 K the monomer undergoes small amplitude motions only. Above 300 K the sp-bonded benzene ring undergoes π flips around the long axis of the molecule at an intermediate rate with respect to the NMR time scale ($\tau_c < 2 \times 10^{-5} \text{ Hz}^{-1}$) with an activation energy of 60 kJ mol^{-1} (see Fig. 3).

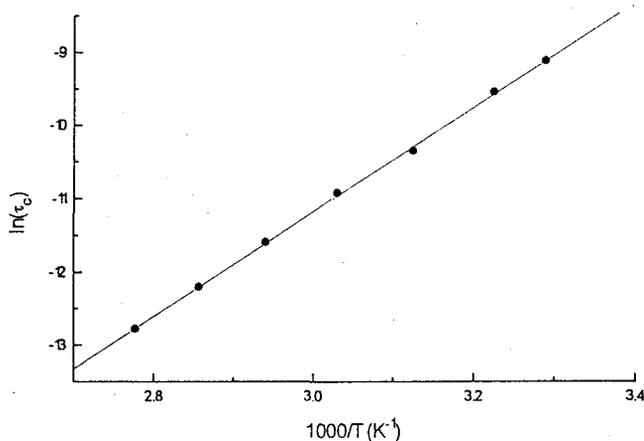


Figure 3. A plot of $\ln(\tau_c)$ versus inverse temperature. The solid line represents regression of the formula, $\tau_c = \tau_0 \exp(E_A/kT)$, onto the data. The points below 304 K were excluded from the calculation. The energy of activation for the flipping motion of the phenyl ring was determined to be $60 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$ with $\tau_0 = 6.5 \times 10^{-15} \text{ Hz}^{-1}$.

It was found that the onset of the rapid rotational motions of the phenyl ring moiety coincided with the crystalline-plastic to plastic phase transition observed at 300 K using differential scanning calorimetry. Thus, rotation of the phenyl ring moiety sterically inhibits the proper alignment of the alkyl chains necessary for the 1-4 addition mechanism. The results of this study lead to the successful polymerization of the monomer by using γ -ray irradiation but at low temperature.

References:

1. W. S. Price, N. Kikuchi, H. Matsuda, K. Hayamizu, S. Okada and H. Nakanishi. To be submitted to *Macromolecules*.
2. W. S. Price and K. Hayamizu, *J. Magn. Reson.* Submitted.

固体重水素NMRによるインスリンフラグメント
Gly-Phe-Phe(B23-B25)のフェニル環の動的構造解析

○内藤 晶、飯塚武彦、辻 暁、斉藤 肇、W.S. Price*, 早水紀久子*
(姫路工大・理・生命、物質工学工業技術研究所*)

Phenyl Ring Dynamics of Insuline Fragment Gly-Phe-Phe(B23-B25) by Solid State Deuterium NMR

Akira Naito, Takehiko Iizuka, Satoru Tuzi, Hazime Saito,
W.S. Price*, and Kikuko Hayamizu*
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology
and National Institute of Chemical Research*

Phenyl ring dynamics of insuline fragment Gly-Phe-Phe(B23-B25) were investigated using solid state deuterium NMR spectroscopy. We observed that the phenyl rings were rigid even at 100 °C both for Gly-[d₅]Phe-Phe and Gly-Phe-[d₅]Phe in the hydrated crystals. When temperature was raised at 120 °C, hydrated water was removed from the crystal and flips of the phenyl rings started undergoing. Spectral simulation was performed to characterize the motion in the peptides. It turned out that the ring of Gly-[d₅]Phe-Phe was more flexible than that of Gly-[d₅]Phe-Phe in the dehydrated crystal. It is of interest to note that Phe-Phe residues in a peptide can be quite rigid when hydrophobic interaction around the Phe-Phe residues is strong.

序 Gly-Phe-Phe(B23-B25)は、インスリンB鎖中に含まれるフラグメントであり、インスリンの生理活性に大きな役割を果たしていると考えられている。このペプチド鎖は、結晶中でC₂軸上に存在する水分子と水素結合を形成して、ヘリックス構造を安定化している。本研究では、Gly-Phe-Pheの2つのフェニル環の運動に注目し、固体重水素NMRより、このペプチド鎖の運動性を解析する試みを行なった。

実験 重水素標識したGly-[d₅]Phe-Phe (1), Gly-Phe-[d₅]Phe (2) を固相法によりペプチド合成機で合成し、飽和水溶液からそれぞれ結晶を調製した。固体重水素NMRスペクトルはChemagnetics CMX-400 NMR 分

重水素NMR, フェニル環の運動、インスリン、核四重極子エコー

ないとう あきら、いづか たけひこ、つじ さとる、さいとう はじめ、
おらいす W.S.、はやみず きくこ

光器を用い、核四重極子エコーパルス系列を用いて、 90° パルス長 $2.0 \mu\text{sec}$ の条件で測定した。測温度可変の測定は、 $-140 \sim 140^\circ\text{C}$ の範囲で行なった。

結果 測定の結果、図1に示すように試料(2)の結晶のフェニル環の重水素は、縦緩和時間が長く、 120°C まではまったくフリップ運動のないNMRスペクトルを示した。温度を 140°C まで上げると、緩和時間が短くなり、フリップ運動を反映したスペクトルに変化した。試料(1)についても 100°C までは緩和時間が長く 120°C になって初めてフリップ運動のあるスペクトルに変化した。この結晶の熱分析を行なった結果、 100°C でペプチド1分子に対して0.5分子の水和水の脱離が観測された。X線回折の報告によると結晶中ではペプチド2分子に対して1分子の水が水和している。したがって、 140°C および 120°C でスペクトルが変化したのは結晶水の脱離によることが判明した。さらに、水和水が脱離することにより、結晶が壊れるのかどうかを確かめるため、光学顕微鏡で水和水が脱離する前後の結晶の状態を観測した。この結果、結晶は水和水が脱離しても風化しないことが判明した。次に、結晶水が脱離した状態の結晶について、温度可変を行なった重水素NMRの結果を図2に示す。この場合、温度を下げていくにつれてスペクトルの変化が観測され、 -140°C に下げてようやくフリップ運動の止ったスペクトルを

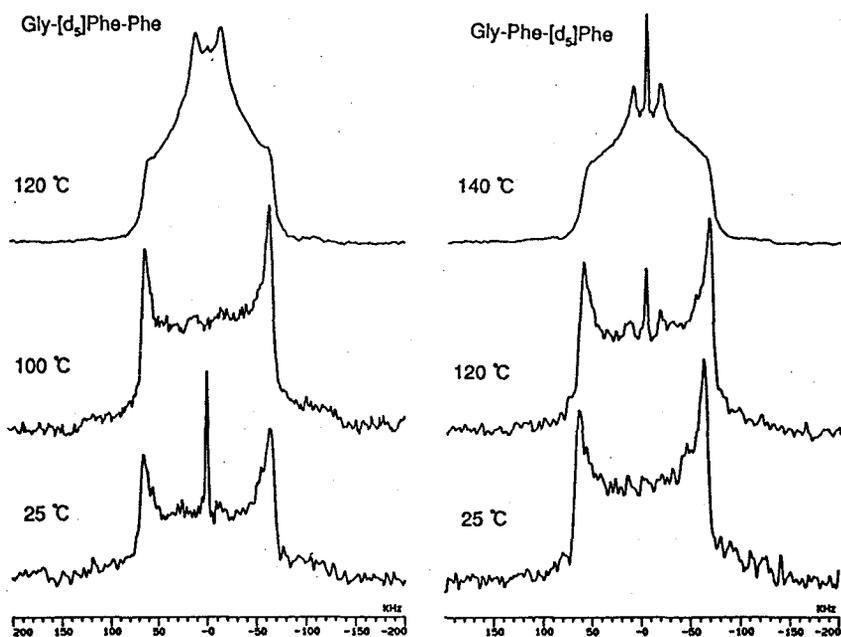


Fig. 1 Deuterium NMR spectra of Gly-[d_5]Phe-Phe and Gly-Phe-[d_5]Phe in the hydrated crystals.

示した。したがって、結晶水が脱離した無水物では、フェニル環の運動性が高くなっていることが判明した。このことは結晶水の有無がペプチド鎖の運動性に寄与していることを示している

考察 水和結晶においては、温度を上げても水和水が脱離するまでスペクトルの変化は観測されなかった。一方、水和水が脱離した後の結晶については、温度によってスペクトルの変化が観測できたので、この運動状態を解析するため、スペクトルのシミュレーションを試みた。シミュレーションに用いたパラメーターは、 $QCC=180\text{kHz}$, $\eta=0.03$ を用いた。運動は、オルト位とメタ位の重水素に対しては180度フリップのみとし、パラ位の重水素には運動がないとして、フリップ速度と強度の割合を変数としてシミュレーションを行なった。この変数は、縦緩和時間が違うために、各重水素のスペクトル強度の寄与に違いがあることを考慮するためである。シミュレーションの結果を図3に示す。この結果、実際のスペクトルに一致させるためには、パラ位とオルトおよびメタ位の重水素の比率を1:4から大幅に変えてやる必要があった。さらにフリップ運動の速度はGly-[d₃]Phe-Pheの方が速いことが判明した。

X線回折の結果によれば、水分子が2つのペプチドC端のカルボキシルと水素結合を形成して2つのペプチド分子を結び付け、フェニル環同

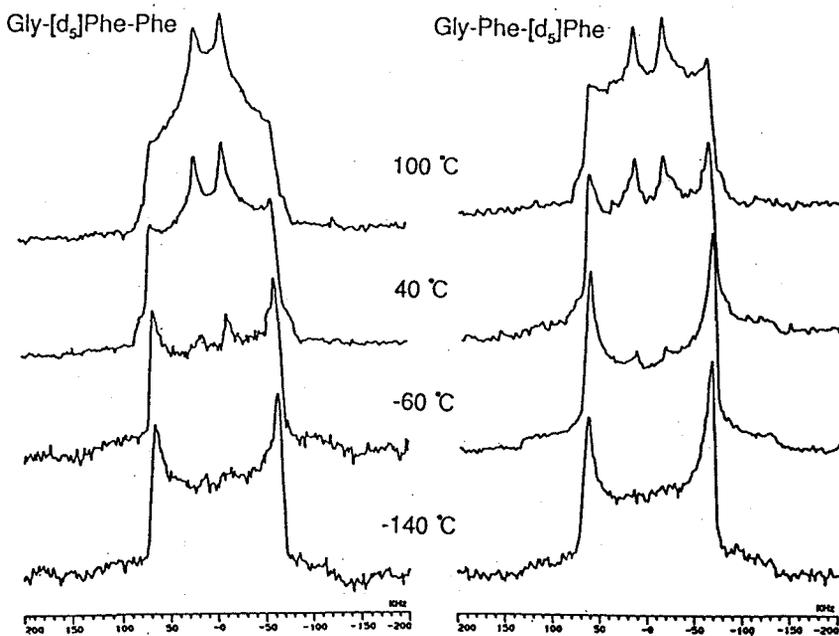


Fig. 2 Deuterium NMR spectra of Gly-[d₃]Phe-Phe and Gly-Phe-[d₃]Phe in the dehydrated crystals.

士の疎水性相互作用を強めて、固い分子構造を保っている。このため、フェニル環の運動は強い制約を受けて、フリップ運動がない状態に保たれると考えることができる。これに対して、水分子が脱離することにより、2つのペプチドを結び付ける相互作用がなくなり、フェニル環付近のパッキングが緩み、フェニル環の運動が起りやすくなったものと考えられる。インスリン結晶においてもPhe(B24)は近傍の側鎖と接近して、フェニル環やチロシン環同士で固い疎水性コアを形成し、B鎖の β ターンと β ストランドの配向を安定化している。今回の重水素NMRの結果から、Phe-Pheフラグメント付近で強い疎水結合が形成される場合、この付近では、非常に固い構造になることを示唆している。Phe-Pheフラグメントがsubstance-Pやsomatostatinといった神経ペプチドに多く見られるのは、その立体構造の保持にPhe-Pheフラグメントが重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

Pheが2つ連続してつながったペプチドの結晶中で、フェニル環が100°Cの高温でも静止している例はまだ報告されておらず、このフラグメントの役割を理解するうえで興味深い。

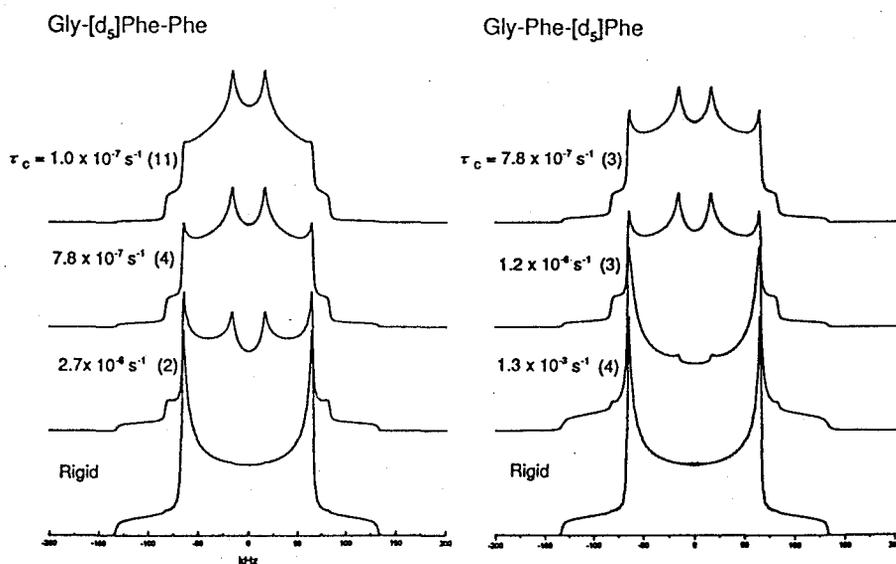


Fig. 3 Simulated deuterium NMR spectra of Gly-[d₅]Phe-Phe and Gly-Phe-[d₅]Phe in the dehydrated crystals. Numbers in parentheses indicate the relative intensity of ortho- and meta-deuterons.

P56 ポリ(γ -ベンジル グルタメート) ラセミ体の固体重水素NMR

北大工 北澤 聡、平沖敏文、堤 耀広

The Study of Racemic Poly(γ -benzyl glutamate) by Solid State ^2H -NMR

So Kitazawa, Toshifumi Hiraoki, and Akihiro Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060.

Racemic poly(γ -benzyl glutamate)(PBG) has been believed to form the stacking of the phenyl rings in the solid state and the stacking breaks down at above 90°C . Deuterium NMR lineshape and T_1 were measured to study the structure and dynamics of side chains in the racemic PBG deuterated in γ , ζ , and phenyl ring positions, respectively. T_1 of racemic PBG comprises short T_{1S} and long T_{1L} components for all samples. As T_{1S} are almost equal to the T_1 values of L form, T_{1S} and T_{1L} can be attributed to non-stacking and stacking residues, respectively. About 70% of side chains participate in the stacking and this fraction decreases drastically at a transition temperature to accompany the start of large amplitude motions. Phenyl rings undergo the rapid 180° flip-flop motion even below a transition temperature.

固体中で主鎖が α -helix構造をとるpoly(γ -benzyl glutamate)(PBG)のラセミ体は、そのL体やD体とはかなり異なった物性を示す。SquireとElliotらは、 α -helixのscrew senseが互いに反対方向の隣接するD体とL体の側鎖のフェニル環同士が重なり合って規則構造を形成するstackingモデルをX線解析の結果から提唱した。¹このstacking構造の崩壊に伴うと考えられる転移は 90°C 付近で起こる。²stacking状態でも側鎖末端のフェニル環はかなりの程度の運動状態にあることが ^{13}C CP/MAS NMR法により明らかにされている。³本研究では固体重水素NMRの線形とスピン緩和時間 T_1 を測定し、ラセミPBG中における側鎖の構造及び運動について検討した。

試料は側鎖のフェニル環の5個の水素を重水素置換したPBLGとPBDGとのラセミ体PBDLG- d_5 、 ζ 位メチレン基を重水素化したPBLGとPBDGとのラセミ体PBDLG- ζd_2 、及び γ 位メチレン基を重水素化したPBLGとPBDGとのラセミ体PBDLG- γd_2 である。混合比はいずれも1:1である。

PBDLG- d_5 、 ζd_2 及び γd_2 の T_1 の温度依存性をそれぞれFig.1、2及び3に示す。いずれの試料も T_1 は2成分から成る。PBDLG- ζd_2 と γd_2 については短い成分の T_{1S} はそれぞれPBLG- ζd_2 と γd_2 の値とほぼ等しく、 T_{1S} と長い成分の T_{1L} はそれぞれ、stackingしていない側鎖としている側鎖に対応すると考えられる。 T_{1L} と T_{1S} の分率は室温から約 90°C までほぼ一定で、両試料とも約0.7:0.3である。この値はSquireとElliotらのモデルから計算した値と一致する。 90°C 付近で分率は大きく変化し、 T_{1S} の割合が大きくなる。これはこの温度域で側鎖のstacking構造の崩壊が起り、それまで束縛されていた側鎖が急に内部回転運動を始めるためと考えられる。PBDLG- ζd_2

キーワード：固体重水素NMR、ラセミPBG、側鎖、stacking構造

〇きたざわ そう、 ひらおき としふみ、 つつみ あきひろ

の場合には90°C以上で T_{1L} と T_{1S} の値はほぼ一致し単一成分となるのに対し、PBDLG- γd_2 の場合は90°C以上でも約10%の T_{1L} 成分が残っている。これは γ 位の運動には側鎖全体の大振幅の運動に伴い、隣り合う側鎖の立体障害による束縛が存在することを示唆している。

PBDLG- d_5 の T_1 も2成分から成り、室温から80°Cまでは T_1 の値はほとんど変化しない。転移温度の90°C付近で長い成分は急に消失し120°C付近から再び2成分になる。PBDLG- d_5 の場合にはフェニル環の p 位の重水素はflip-flop運動の影響を受けないため、 o 、 m 位の4つの重水素と分離して考える必要がある。解析の結果、21°Cでは全フェニル環の69%、70°Cでは約100%が高速のflip-flop運動をしており、stackingしている側鎖のフェニル環は転移温度以下でも既に高速のflip-flop運動をしていることを示している。

1. J. M. Squire and A. Elliott, *J. Mol. Biol.*, **65**, 291 (1972).
2. T. Fukuzawa, I. Uematsu, and Y. Uematsu, *Polym. J.*, **6**, 537 (1974).
3. M. Yamaguchi and A. Tsutsumi, *Polym. J.*, **25**, 427 (1993).

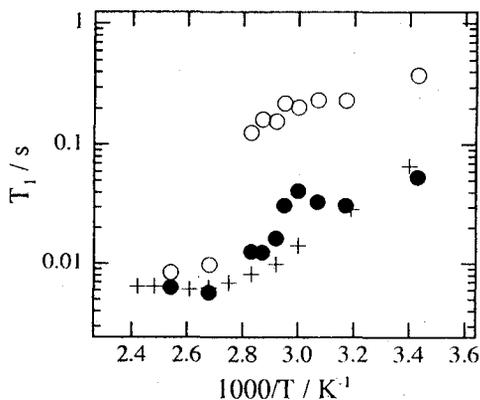


Figure 2 Temperature dependent T_1 for PBDLG- ζd_2 . (○) T_{1L} , (●) T_{1S} and (+) PBLG- ζd_2 .

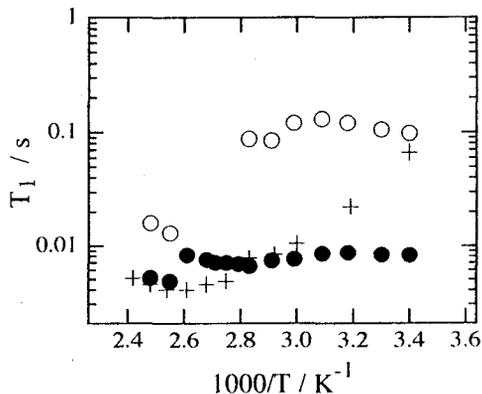


Figure 1 Temperature dependent T_1 for PBDLG- d_5 . (○) T_{1L} , (●) T_{1S} and (+) PBLG- κd_1 .

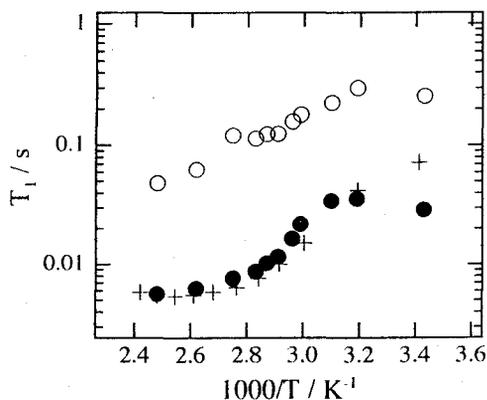


Figure 3 Temperature dependent T_1 for PBDLG- γd_2 . (○) T_{1L} , (●) T_{1S} and (+) PBLG- γd_2 .

固体重水素NMRによる α -ラクトアルブミン
分子表面のメチル基の運動

(北大・工、Calgary大) ○瀬川 和哉、北澤 聡、平沖 敏文、H. J. Vogel、堤 耀広

Methyl Group Dynamics on the surface of α -Lactalbumin by Solid State Deuterium NMR

K. Segawa, S. Kitazawa, T. Hiraoki, H. J. Vogel*, and A. Tsutsumi

*Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060 Japan and *Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.*

Solid-State ^2H -NMR was used to investigate the dynamics of twelve lysyl and an N-terminal amino groups di-deuterio-methylated in bovine α -Lactalbumin. The temperature-dependence of the ^2H -NMR line shape and T_1 were employed to characterize the reorientation of methyl groups on the surface of the protein. The methyl groups rapidly reorient the three-fold jump about their C_3 axis, and give the activation energy of 12 kJ/mol. In addition, small-amplitude fast librational motions of the C_3 axis and slow motions in the side-chains contribute to the line shapes. The temperature-dependence of T_1 shows the existence of the correlation time distribution, which reflects on the distribution of local environments.

固体重水素NMRは特定の部位を重水素置換することで、その局所的な分子運動を調べるのに有効な方法である。本研究では固体状態にある蛋白質分子表面の動的挙動を調べるため、牛 α -Lactalbumin (α -Lac) の12個のリジン側鎖末端とN末端のアミノ基を重水素ジメチル化してその分子運動を調べた。リジン側鎖は分子表面に位置し、1) この化学修飾により電荷数、酵素活性、高次構造は変わらないので、2) 導入された大部分のメチル基は分子表面に露出していると考えられる。

牛 α -Lacのアミノ基の重水素ジメチル化はJentoftとDearbonの方法³⁾に従い D_2O 中で行った。凍結乾燥試料の固体重水素NMRの測定はBruker MSL-200 (30.7MHz)、MSL-400 (61.4MHz)で行った。スペクトルは四重極エコー法でもとめ、 90° パルス幅はMSL-200で $1.5\mu\text{s}$ 、MSL-400で $3.1\mu\text{s}$ である。

Fig. 1に ^2H -NMRスペクトルの温度依存性を示す。 -60°C 以下では約36kHzの四重極分裂幅をもつ粉末平均スペクトルが観測され、アミノ基の窒素原子に結合している2個のメチル基がそれぞれ C_3 軸のまわりを十分速く回転していることを示している。この36kHzの分裂幅は理論値42kHzよりも少し小さく、 C_3 回転以外に C_3 軸自身の小振幅のlibration運動の存在を示している。昇温に伴い分裂幅は減少しline shapeも大きく変化して、室温ではかなりブロードなスペクトルを示す。これは、 C_3 軸に C_3 回転とlibration以外に10kHz程度の遅い運動が存在することを示唆している。

キーワード；固体重水素NMR、 α -ラクトアルブミン、ジメチル化、リジン、アミノ基

○せがわ かづや、きたざわ そう、ひらおき としふみ、ハンス・J・ボーゲル、
つつみ あきひろ

Fig. 2 に ^2H -NMR スペクトルの σ_{\perp} 成分の T_1 の温度依存性を示す。20°C から -70°C までほぼ直線的に変化する。-20°C 以下では σ_{\perp} 成分と σ_{\parallel} 成分の T_1 は異なり、メチル基の C_3 回転が自由拡散ではなく 3-site jump であることを示している。4) この運動の活性化エネルギー E_a は 11.6 kJ/mol であり、この値が poly (DL-valine) や poly (L-leucine) の炭素原子に結合したメチル基の場合⁵⁾ よりも大きいことから、窒素原子に結合した 2 個のメチル基の C_3 回転は炭素原子に結合した場合に比べ制限されていることを示している。Fig. 2 の実線と破線はそれぞれ 30.7 MHz と 61.4 MHz でのメチル基の T_1 の理論曲線を、 $E_a = 11.6$ (kJ/mol) を用いて単一の相関時間で計算したものである。4) -80°C 以下での実測値は理論曲線からずれているので、低温域ではメチル基の C_3 回転の相関時間に分布が存在することを示唆している。

詳細な運動機構と T_1 の温度依存性の解析は講演で発表する予定である。

References.

- 1) K. R. Acharya, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **208**, 99 (1989).
- 2) T. A. Gerken, *Biochemistry* **23**, 4688 (1984).
- 3) N. Jentoft and D. G. Dearbon, *J. Biol. Chem.* **254**, 4359 (1979).
- 4) D. A. Torchia and A. Szabo, *J. Magn. Reson.* **49**, 107 (1982).
- 5) M. A. Keniry, *et al.*, *Biochemistry* **23**, 288 (1984).

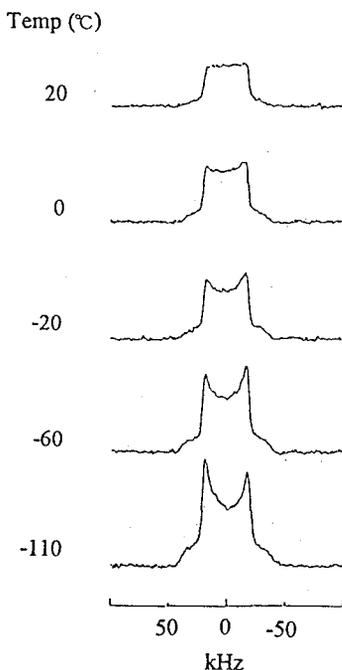


Fig. 1. Temperature dependence of ^2H -NMR spectra at 30.7 MHz for dideterio-methylated α -lactalbumin.

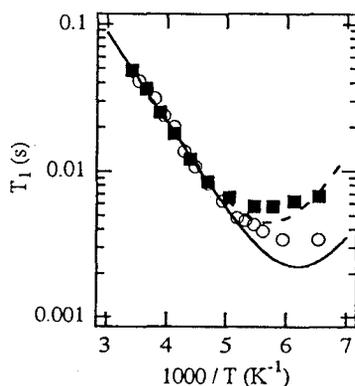


Fig. 2. Temperature dependence of T_1 at 30.7 (○) and 61.4 (■) MHz. Solid and dashed lines represent theoretical values at 30.7 and 61.4 MHz, respectively.

(北大・工) ○平山智昭、北澤 聡、平沖敏文、堤 耀広

Polyglycine II Dynamics by Solid State ^2H -NMR○T. Hirayama, S. Kitazawa, T. Hiraoki, and A. Tsutsumi
Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060

In order to study the main chain dynamics of polyglycine II (PG II), we measured ^2H -NMR spectra of PG II deuterated in methylene groups. Axially symmetric powder line-shapes are observed with the quadrupole splitting of about 116kHz in the temperature range of -60 to 140°C. The quadrupole splittings are slightly smaller than that in rigid state, showing the presence of fast librations. The spin-lattice relaxation time decreases with increasing temperatures. These results show that the C- ^2H bonds of PG2 undergo small-amplitude fast librations.

ポリペプチド主鎖の規則構造のdynamicsに関して、 α -helix構造についてはpoly(γ -benzyl L-glutamate)で調べられ、N- ^2H 軸にはペプチド面に垂直な小振幅のlibrationが存在すると報告されている。¹⁾しかしながらその他の規則構造のdynamicsの実験的研究はほとんどなされていない。ポリグリシン(PG II)は type I (β -sheet)とtype II (3_1 -helix)の2つの構造をとることが知られている。 α -helix構造が分子内水素結合であるのに対し、PG IIは六方晶配列をしているポリペプチド鎖同士がCO基とNH基との間で分子間水素結合した 3_1 -helix構造である。本研究ではポリグリシンIIの分子運動を調べるために、メチレン基を重水素化したPG IIの固体重水素NMRの測定を行い、スペクトルの線形とスピン-格子緩和時間 (T_1) を検討した。

メチレン基が重水素化されたグリシンを用いてDPPA法によりポリグリシンを合成した。これを飽和LiBr水溶液に溶かし、多量の水に注いで沈殿させてPG IIを得た。²⁾ type IIであることはIRと ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルにより確認した。固体重水素NMR測定は、Bruker MSL-200 (30.7MHz)で行い、四重極エコー法を用いた。 T_1 の測定はinversion-recovery四重極エコー法及び、saturation-recovery四重極エコー法を用いた。

重水素NMRのスペクトルの温度依存性をFig.1に示す。-60~140°Cの温度域で、線形は約116kHzの四重極分裂幅を持つ軸対称なスペクトルを示し、PG IIのC- ^2H 軸はかなり制限された運動状態にあることを示している。

Keyword : 固体重水素NMR、ポリグリシンII、 3_1 -helix、dynamics、libration

○ひらやま ともあき、きたざわ そう、ひらおき としふみ、つつみ あきひろ

Fig.2に四重極分裂幅 $\Delta\nu_q$ の温度依存性を示す。温度上昇に伴い、 $\Delta\nu_q$ は僅かに減少する。 $\Delta\nu_q$ はrigid状態の値(128kHz)よりも少し小さく、速い小振幅のlibrationの存在を示している。スペクトルの積分強度は-60°Cを基準にとると20°Cで55%、140°Cで37%になり、温度上昇に伴い減少し、遅い運動の存在を示唆している。

T_1 の温度依存性をFig.3に示す。0~140°Cの温度域で、温度を上げるに伴い、 T_1 は短くなる。 T_1 の値は0°Cで~7s、140°Cで~700msである。

これらの測定結果は、ポリグリシンIIには小振幅の速い運動と遅い運動の2つの運動が存在することを示している。これらの運動を定量的に検討するために線形シミュレーションを行い、ポスターに発表する予定である。

- 1) M.G. Usha, *et al.*, *Biochemistry*, **30**, 3955(1991)
- 2) A. Elliott and B.R.Malcolm, *Trans. Faraday Soc.*, **52**, 528(1956)

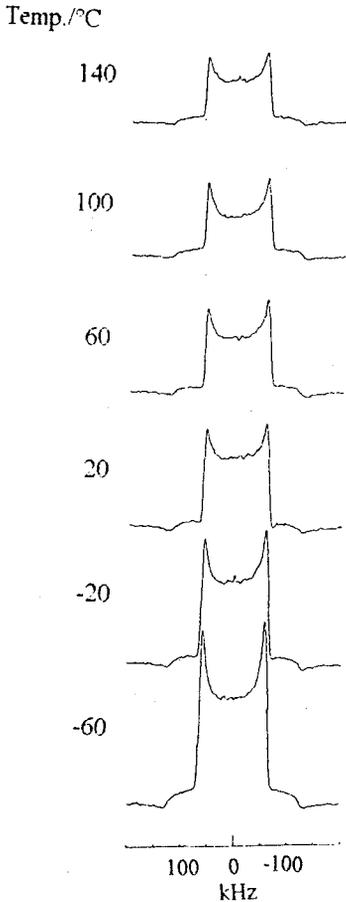


Fig.1 Temperature dependence of ^2H -NMR spectra

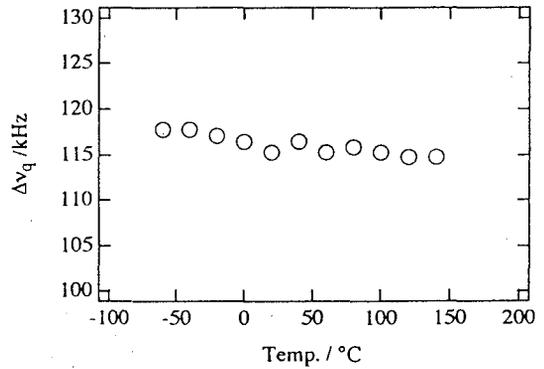


Fig.2 Temperature dependence of quadrupole splitting

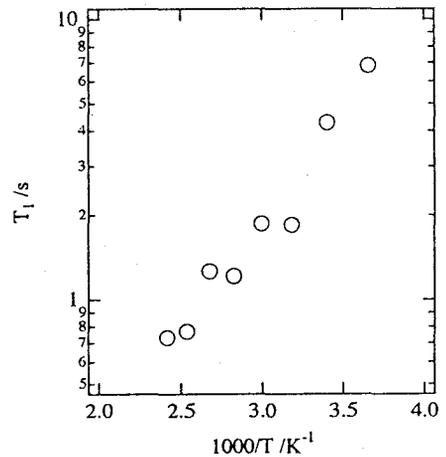


Fig.3 Temperature dependence of T_1

P 59 重水素選択励起交換NMR法によるガラス性結晶の
超低速分子運動の研究。

京大理・余郷 敦夫、○久保 厚、今城 文雄、寺尾 武彦

Slow molecular motions in a glassy crystal, $CD_3C_6Cl_5$ studied by deuterium selective excitation quadrupolar order exchange experiments.

A. Yogo, A. Kubo, F. Imashiro, and T. Terao,

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606.

The single crystal D NMR spectrum showed the three peaks at $-66.4^\circ C$. The spectrum can be interpreted by assuming that the molecule occupies the three sites related by the rotation around the pseudo-six fold axis, with the populations 43, 31, and 26%. We determined the rates of the molecular reorientations between these three sites by the deuterium selective excitation quadrupolar order exchange experiments for the various temperatures from $-65^\circ C$ to $-110^\circ C$.

序：ガラス状態では分子運動の相関時間が非アーレニウス型の温度依存性を示したり、分布をもつことが報告されている。〔1〕近年、このような分子運動の相関時間の振る舞いについて分子動力学等の方法で研究がなされている。〔2〕ガラスは分子の並進及び回転の自由度の両方に乱れがあるが、ガラス性結晶と呼ばれるものでは配向の自由度のみが乱れた状態にある。したがって、ガラス性結晶のほうが理論的取り扱いが容易となることが予想される。本研究ではガラス性結晶 $CD_3C_6Cl_5$ について単結晶重水素NMR法により、分子運動を詳細に調べた。

実験：試料は重水素化トルエンを塩素化して合成した。ベンゼン溶液を冷蔵庫（約 $7^\circ C$ ）でゆっくり蒸発させることにより $1.5 \times 4 \times 30 mm$ の単結晶を得た。重水素NMRの実験はCMX300スペクトロメーターをもちい、共鳴周波数 $46.12 MHz$ で行った。

結果： $CD_3C_6Cl_5$ の単結晶重水素NMRスペクトルは結晶の長軸を静磁場に垂直に配向させた時、 $-50^\circ C$ 以下で3対（図1 a）、 $20^\circ C$ 以上で1対のダブルットを示した。これらの信号はこの分子が単結晶X線構造解析のなされている1,2,4-Trichloro-3,5,6-trimethylbenzeneと同形の結晶構造〔3〕を有するとして説明できる。3対の信号のそれぞれの信号強度から、メチル基は低温で擬6回軸まわりに3つの配向をそれぞれ26、31、43%の割合で占めていることが明らかとなった。また $40^\circ C$ から $70^\circ C$ の粉末試料のスペクトルは軸対称パターンとはならなかった。（図1 b）このことより高温においてもこれら3つのサイトの占有率は等しくないことがわかった。

次に選択励起交換NMR法により低温の3つのサイトの間の交換運動の速度を決定した。図2のパルス・シーケンスを用いた。 $400 \mu s$ の長さのガウシアン・ソフト・パルスを用いてダブルットの信号の一方を照射し、四重極秩序を生成した。ダブルットのどちらを照射するかにより生成する四重極秩序の符号が反転する。SNを上げるために3つの選択パルスを用い、3つダブルットについて（+++）、（++-）、（+-+）の符号の四重極秩序を生成した。交換時間、 t_m の間だけ待った後、 $(\pi/4) - \tau - (\pi/2) - \tau$ のパルスでエコーを観測した。通常の2次元交換NMR法では長い測定時間を

要するが、この方法では3時間で20個の異なる交換時間のデータを収集できた。
 -65°Cから-110°Cで選択励起交換NMRの測定を行った。

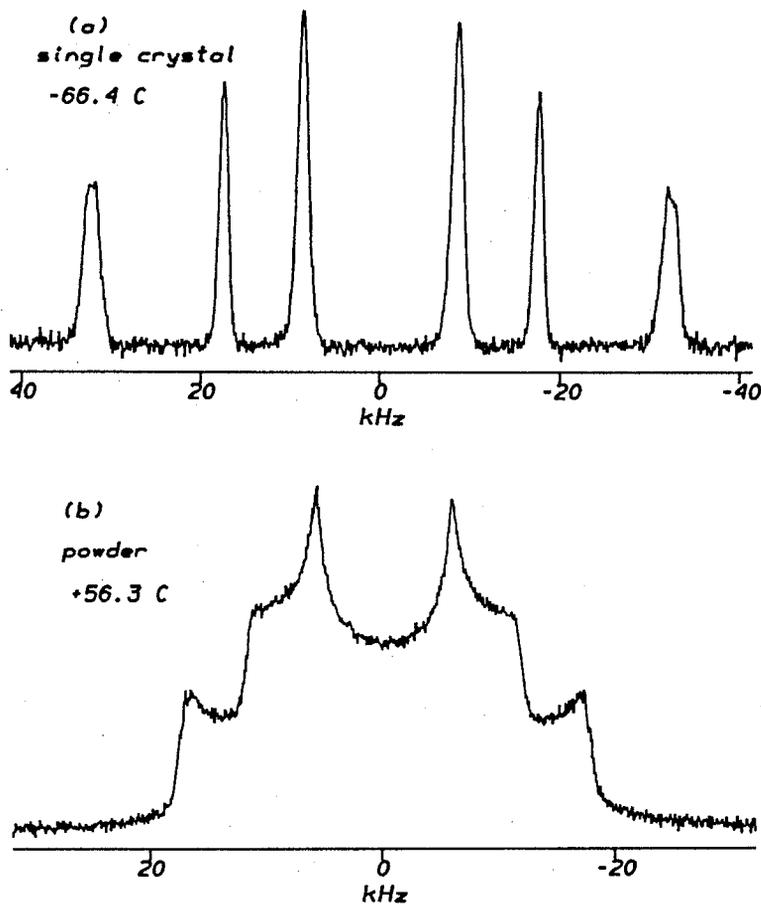


Fig. 1 The deuterium NMR spectra of $\text{CD}_3\text{C}_6\text{Cl}_5$ at -66.4°C , single crystal (a) and at $+56.3^\circ\text{C}$, powder sample (b).

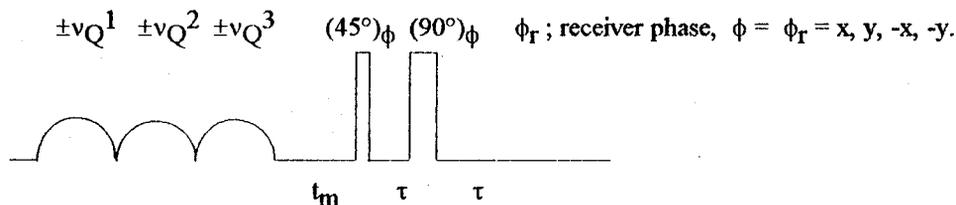


Fig. 2 Pulse sequence of the deuterium selective excitation quadrupolar order exchange NMR experiments. The quadrupole orders for the three components were generated by using three Gaussian soft pulses with three different offset frequencies.

- [1] R. Böhmer, K. L. Ngai, C. A. Angell, and D. J. Plazek, *J. Chem. Phys.* **99** 4201 (1993).
- [2] T. Odagaki, J. Matsui, and Y. Hiwatari, *Phys. Rev. E*, **49**, 3150 (1994).
- [3] G. Charbonneau and J. Trotter, *J. Chem. Soc. A*, **1967**, 2032.

Spin-lattice relaxation times measured with Torchia's and inversion recovery methods: Effect of transient nuclear Overhauser effect (National Institute of Materials and Chemical Research) Shigenobu Hayashi and Takahiro Ueda

^{13}C spin-lattice relaxation times have been measured for kaolinite:dimethyl sulfoxide (DMSO) intercalation compound, adamantane and dimethylmalonic acid with both inversion recovery and Torchia's methods. We found discrepancies in the T_1 values obtained with the two methods in methyl carbons of kaolinite:DMSO and dimethylmalonic acid, but not in adamantane. We discuss the origin of the discrepancies.

固体高分解能NMRにおいて、Torchiaの T_1 測定法はたいへん有効であり、非常に長い T_1 でも測定することができる。 T_1 測定法には他にいくつかの方法があるが、通常、異なる方法で測定してわざわざ比べるということはない。今回、Torchiaの方法とInversion Recovery法とを同一試料に用いる機会があり、得られた T_1 を比較したところ実験誤差を大幅に超える相違を観測した。試料によっては非常によい一致を示し、その相違が試料に依存していることがわかった。そこで、2つの方法による T_1 の測定結果を報告するとともに、その相違の原因について検討を加えたい。

試料として、カオリナイト：ジメチルスルホキシド (DMSO) 層間化合物、アダマンタン、ジメチルマロン酸を取り上げた。 ^{13}C の T_1 測定は、ブルカーMSL400及びASX200を用いた。 ^{13}C 核の共鳴周波数はそれぞれ100.61 MHz、50.32 MHzである。

Fig. 1に、カオリナイト：DMSOの緩和曲線を示した。2つの非等価なメチル基のうちの高周波数側のピークについてプロットした。Inversion recovery法では単一の指数関数的減衰をみせ、 T_1 は387 msと見積られる。一方、Torchiaの方法では、指数関数的減衰からわずかにずれる。指数関数的に減衰しているとして T_1 を見積ると500 msとなり、2つの方法で得られる T_1 値の相違は明らかに実験誤差を超えている。

Torchiaの方法でもInversion recovery法でもシグナルを取り込む間は ^1H デカップリングを行なった。パルス照射における大きな違いは、クロスポーラリゼーション (CP) のためのミリ秒オーダーのパルスを照射するかどうかである。CP時に試料が加熱されて T_1 が変化した可能性を調べるために、コンタクト時間を変えて T_1 の測定を行なった。わずかな非指数関数的な挙動を無視して求めた T_1 値をFig. 2に示した。2つのメチル基のそれぞれの T_1 を2つの測定周波数について求めた。Inversion recovery法 (コンタクト時間0の点) では2つの測定周波数について得られた T_1 は実験誤差の範囲内で一致した。ところが、Torchiaの方法で得られた T_1 は系統的な変化を示さずばらついた。 T_1 値とコンタクト時間に何らの相関がないことから試料が加熱された可能性はない。

同様の現象が他の化合物でも観測されるかどうかを、アダマンタン (Torchiaの論文で用いられた) とジメチルマロン酸について調べた。Fig. 3にアダマンタンの29.5 ppmのシグナルの緩和曲線を示した。Inversion recovery法、Torchiaの方法とも単一の指数関数的減

スピナー格子緩和時間、Torchiaの方法、反転回復法、 ^{13}C NMR

はやし しげのぶ ・ うえだ たかひろ

衰を示し、 T_1 はそれぞれ2.92 s、2.89 sと非常によい一致を示した。38.6 ppmのシグナルについても同様に両方法とも1.66 sの T_1 を示した。Fig. 4に示したジメチルマロン酸の22.6 ppmのシグナルの緩和曲線は、Inversion recovery法で T_1 が0.558 sの指数関数的減衰を示すのに対し、Torchiaの方法では非指数関数的な減衰を示した。tが小さい領域では両方法で傾きが一致している。

T_1 の相違が試料に依存していることから、装置的な問題ではなく試料の性質による現象と考えられる。いずれもメチル基の ^{13}C において相違が観測されているため、メチル基のなんらかの性質が T_1 の相違を生じる原因になっていると思われる。現時点では、Transient Nuclear Overhauser Effectである可能性が高いと考えている。

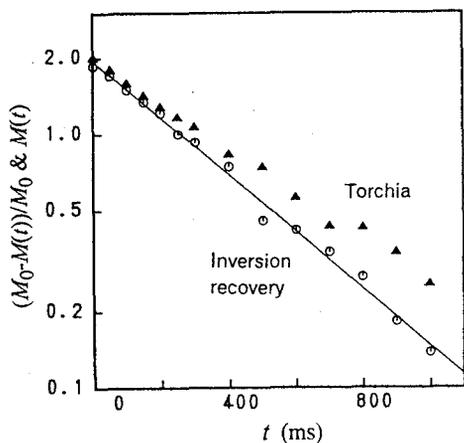


Fig. 1. Relaxation curve for the 44 ppm signal in kaolinite:DMSO, measured at 100.61 MHz and at 294K. Contact time in Torchia's was 4 ms.

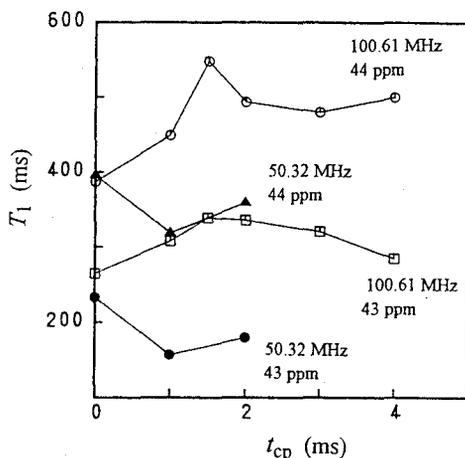


Fig. 2. Contact time dependence of the observed T_1 for kaolinite:DMSO. Numbers in the figure indicate Larmor frequency and chemical shift.

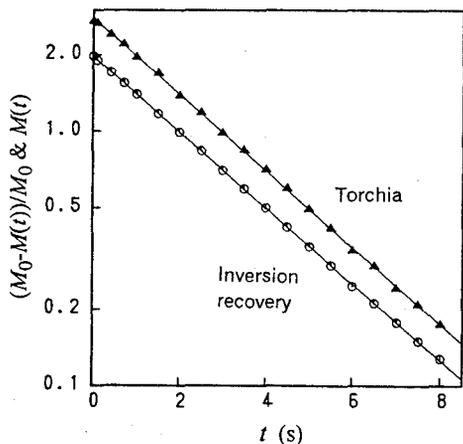


Fig. 3. Relaxation curve for the 29.5 ppm signal in adamantane, measured at 100.61 MHz and at 294K.

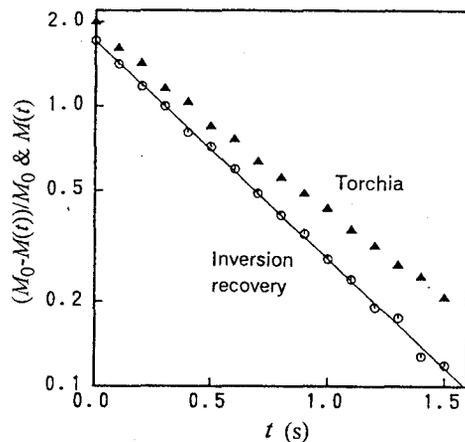


Fig. 4. Relaxation curve for the 22.6 ppm signal in dimethylmalonic acid, measured at 100.61 MHz and at 294K.

P 61 エチレンアイオノマーにおけるエチレン鎖の構造と分子運動
(名工大 材料工学科) ○吉水広明、辻田義治、木下隆利

The Structure and Dynamics of Ethylene chains in Ethylene-ionomer

Hiroaki YOSHIMIZU, Yoshiharu TSUJITA, and Takatoshi KINOSHITA

Department of Materials Science & Engineering, Nagoya Institute of Technology

The high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectra of ethylene ionomers were measured in order to clarify the structure and molecular dynamics of the ionomers in more detail. The ^{13}C spin-lattice relaxation time of the crystalline region of ionomer was shorter than that of polyethylene. This finding is suggested that size of crystal in the ionomers were relatively small than that in polyethylene. Similar interpretations on the crystal size of the ionomers were obtained from the discussion about ^1H spin-diffusion with ^1H spin-lattice relaxation times in the laboratory and rotating frames.

1)エチレンアイオノマーはエチレン-メタクリル酸共重合体を金属イオンによって中和したものである。中和されるに従いイオン会合体が形成され、諸物性が大きく変化する。従って、イオン会合体の形成に伴いエチレン鎖の構造や分子運動性が変化するのかを検討することは重要である。実際、我々は最近DSCを主に用いて、エチレンアイオノマーには、熔融状態からの冷却過程で生成する結晶と冷却後室温で生成する結晶という生成過程のことなる2種類の結晶が存在することを報告した¹⁾。本研究ではエチレン-メタクリル酸共重合体及びそのZn塩アイオノマーのマトリックス相の構造と分子運動性を、固体高分解能 ^{13}C NMR法を用いて検討した。

2)今回用いた試料は酸含量5.4 mol%のエチレン-メタクリル酸共重合体(EMAA)及びそのZn塩(EMAA-0.9Zn:中和度は90%)及び低密度ポリエチレン(LDPE)である。固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルの測定はバリアン社製UNITY 400 plus NMR分光計を用いて、100.58 MHzにて行なった。試料回転速度は約4 kHzであった。

3)Fig.1にEMAA及びEMAA-0.9Zn、LDPEの ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示す。31及び33 ppm付近にメチレン炭素由来の大きなピークが、15及び47 ppm付近にメチル炭素及び四級炭素由来の小さなピークがそれぞれ観測されている。2本のメチレン炭素ピークは、ポリエチレンのデータを参考にして、低磁場側を結晶部に高磁場側を非晶部にそれぞれ帰属した。各ピークの化学シフト値は全試料とも同じで、結晶形の違い

キーワード: 固体高分解能 ^{13}C NMR、エチレンアイオノマー、分子運動、緩和時間
よしみず ひろあき、 つじた よしはる、 きのした たかとし

はないものといえる。次にメチレン炭素のスピン-格子緩和時間($T_{1\rho}^C$)の測定を行なった。Fig.2にピーク強度を回復時間に対してプロットしたものを示す。非晶部は直線に減衰しているのに対し、結晶部は曲線を描いている。結晶部が多成分減衰曲線を示す理由として、一つには分子運動の分布が考えられる。そしてこの分布には結晶サイズの分布が寄与していると思われる。例えば小さなサイズのもの全体が揺れるような運動をし、これが核スピンの緩和挙動に反映されているものと考えられる。Table 1に $T_{1\rho}^C$ の値をまとめた。ここで結晶部については便宜上2成分解析で数値を決定した。非晶部の $T_{1\rho}^C$ は各試料とも同程度の値であるのに対し、結晶部の $T_{1\rho}^C$ は、LDPEのものはEMAA及びEMAA-0.9Znのそれらよりも長く、これは、結晶サイズの違いを反映したものと考察される。そこでEMAA-0.9Znを80℃、78時間熱処理して、できるだけ系内の結晶を成長させた試料(EMAA-0.9Zn-ann)を調製し、 $T_{1\rho}^C$ を測定した。結果はTable 1に示してあるが、結晶部の値は未処理のものよりも長くなっている。さらに、 $T_{1\rho}^H$ 、 $T_{1\rho}^H$ の測定を行ない、EMAA及びEMAA-0.9Znには十数Åから百Å程度のものが多く、熱処理を施すと、そのサイズが増大することが指摘された。一方、イオン会合体の存在がエチレン鎖の運動性を著しく変化させてはいなかった。

文献 1)奥村久雄、吉水広明、武井美幸、辻田義治、木下隆利、第24回中化連講演予稿集pp. 302 (1993)

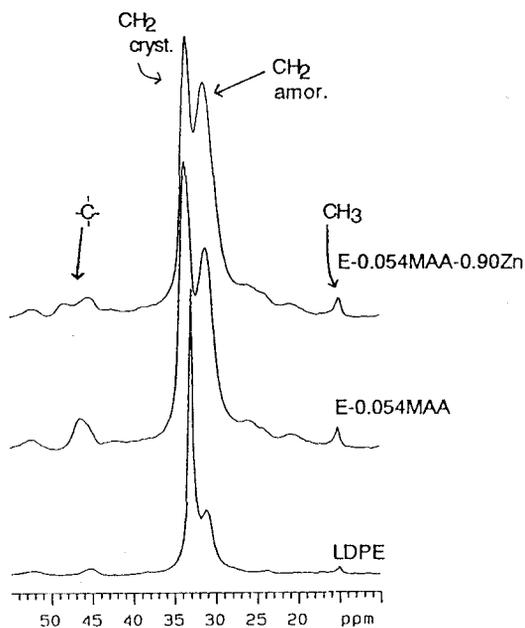


Fig.1 ^{13}C CP/MAS NMR spectra.

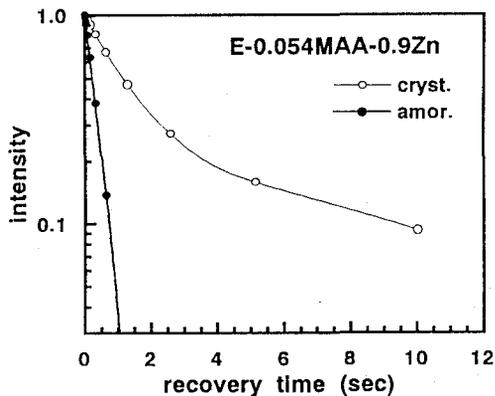


Fig. 2 Peak intensity vs. recovery time.

Table 1 ^{13}C spin-lattice relaxation times, $T_{1\rho}^C$, of LDPE, E-0.054MAA, and E-0.054MAA-0.90Zn

sample	region	$T_{1\rho}^C$ (s)
LDPE	Cryst.	188.0
	Amor.	0.35
E-0.054MAA	Cryst.	6.78
	Amor.	0.32
E-0.054MAA-0.90Zn	Cryst.	7.18
	Amor.	2.03
E-0.054MAA-0.90Zn-ann	Cryst.	25.0
	Amor.	0.33

一次元および二次元 ^{13}C NMR 法による
高分子の結晶中における分子運動解析

京大化研 ○梶 弘典・堀井 文敬

1D and 2D ^{13}C NMR Analyses of Molecular Motion
in the Crystalline Region for Polymers

H. Kaji and F. Horii

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

1D and 2D ^{13}C NMR analyses of the crystalline-noncrystalline structure and molecular motion in the crystalline region have been performed for isothermally crystallized poly- ϵ -caprolactone (PCL) and poly(tetramethylene oxide) (PTMO). $T_{1\text{C}}$ and $T_{2\text{C}}$ analyses reveal that both PCL and PTMO are composed of crystalline, interfacial, and rubbery amorphous components. ^{13}C chemical shift anisotropy (CSA) whose shape is related to the molecular motion with the order of 10^3 Hz has been measured by 2D switching angle sample spinning method for each carbon of PCL. The CSA spectrum for the carbonyl carbon of PCL thus obtained almost agree with the rigid CSA spectrum even at room temperature. In contrast, CSA spectra for the methylene carbons exhibit higher mobility. CSA spectra of PTMO obtained with off-MAS also reveal the characteristic molecular motion of this polymer. The ultra slow molecular motion with about 1 Hz has also been investigated by the measurements of 2D CSA exchange spectra.

1. 緒言

高分子の巨視的性質の多くは、主鎖の分子運動に密接に関係していると考えられている。したがって、高分子の固体状態における分子運動を明らかにすることは、高性能高分子材料を設計する上で極めて重要である。最近、ポリエチレン¹、ポリプロピレン²、ポリオキシメチレン³等の高分子については、結晶中の特徴的な分子運動が明らかにされつつある。本研究では、試料として等温結晶化したポリ- ϵ -カプロラクトン (PCL) およびポリテトラメチレンオキシド (PTMO) を用い、メチレン連鎖の分子運動に対するエステル基およびエーテル酸素導入の影響について調べることを目的とした。測定手段としては 1D および 2D 固体 ^{13}C NMR を用い、 $T_{1\text{C}}$ および $T_{2\text{C}}$ 測定、2D switching angle sample spinning (2D SASS) 法による各炭素に対する化学シフトの異方性 (CSA) の測定、および特定の炭素原子に対する選択励起 SASS 法⁴ を用いた 2D CSA 交換スペクトルの測定を行った。 $T_{1\text{C}}$ 値は 10^8 Hz 程度の運動に、1D CSA スペクトルは 10^3 Hz 程度の運動に、また 2D CSA 交換スペクトルは 1 Hz 程度の運動に関与している。したがって、これらの測定を組み合わせることにより、様々な運動のモードおよび周波数をかなり正確に知ることができる。

2. 実験

2.1. 試料: PCL は、ユニチカ (株) から提供された試料 ($\bar{M}_n = 80,000$) を 100°C で 1 時間熔融し、 50°C で 4 日間等温結晶化させた。PTMO は、Polymer Laboratories 社製標準試料 ($\bar{M}_n = 66,000$),

キーワード: ポリ- ϵ -カプロラクトン、ポリテトラメチレンオキシド、分子運動、
化学シフト異方性、固体二次元 NMR

かじひろのり、ほりい ふみたか

$\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1.04$) を 65 °C で 1 時間溶融し、20 °C で 6 日間等温結晶化させた。得られた試料の融点は、PCL が約 70 °C、PTMO が約 42 °C であった。

2.2. NMR 測定: ^{13}C NMR 測定は、JEOL JNM-GSX200 分光計により、4.7 T の静磁場下で行い、2D SASS による CSA および 2D CSA 交換スペクトルの測定には、Doty Scientific, Inc. 製 DAS プロブを用いた。 T_{1C} の測定には、CPT1 パルス系列を用い、選択励起には DANTE のパルス系列を用いた。また、SASS では magic angle と 45° の間で試料の回転軸の切り換えを行った。

3. 結果および考察

3.1. 結晶-非晶構造の解析

まず、PCL の結晶-非晶構造を明らかにするために、定量的に全成分を反映したスペクトルを ^{13}C の熱平衡磁化を利用することにより測定した。得られた室温における ^{13}C NMR スペクトルを図 1 に示す。各炭素の帰属は溶液の帰属に基づいて行った。また、結晶・非晶成分の帰属は T_{1C} の測定により決定した。結晶および非晶ピークから評価した T_{1C} の値を表 1 に示す。結晶領域では、C3 および C5 炭素の T_{1C} の値が大きく、C4 および C6 炭素の T_{1C} の値が小さいことがわかる。これは、 T_{1C} の関与する 10^8 Hz 程度の主鎖のねじれ運動が起っていること、およびその運動に節があることを反映しているものと推定される。非晶成分に対する T_{1C} の値は、非晶ピークを明確に分離できた C1, C6 炭素に対してのみ記してあるが、結晶-非晶が分離できなかったその他の炭素に対しても、非晶成分の存在が確認できた。C6 炭素の非晶成分に対する T_{1C} は、バルク結晶化ポリエチレン (BCPE) の非晶成分に対する値⁵ とほぼ一致していることから、非晶領域での運動性は、BCPE の場合とそれほど変わらないものと思われる。また、スピンエコー法により T_{2C} を測定した結果、メチレン炭素の非晶ピークには T_{2C} が数 ms および数十 μs の 2 成分が存在することが明らかになった。同様な 2 成分が BCPE でも認められる⁵ ことから、BCPE の場合と同様 T_{2C} の長い成分をゴム状無定形成分、 T_{2C} の短い成分を界面成分に帰属できる。

図 2 には PTMO の室温における CP/MAS スペクトルを示す。PTMO の T_{1C} の値は、すでに

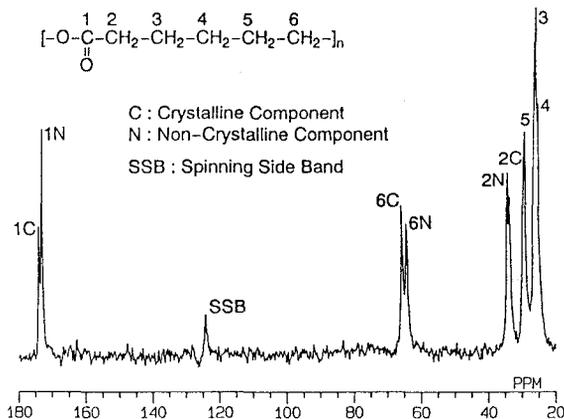


Fig. 1. Gated decoupled/MAS ^{13}C NMR spectrum of solid PCL with a spinning rate of 2.5 kHz.

Table 1. Values of T_{1C} (s) for each carbon of PCL.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Crystalline	128	138	140	114	159	111
Noncrystalline	3.27	-	-	-	-	0.24

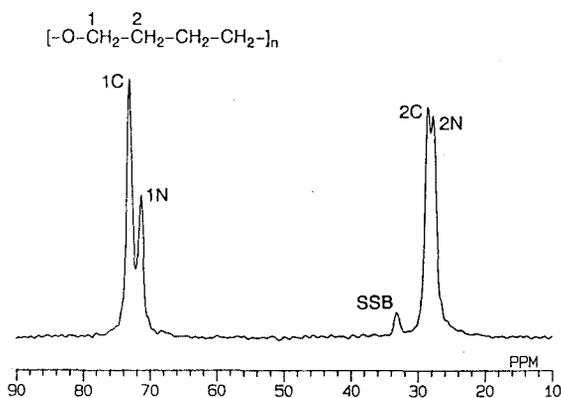


Fig. 2. CP/MAS ^{13}C NMR spectrum of solid PTMO with a spinning rate of 2 kHz.

報告されている⁶ように C1 炭素、C2 炭素ともに結晶成分については 209 s、非晶成分については約 0.15 s であり、 10^8 Hz 程度の運動性については PCL のメチレン炭素とそれほど変わらないことがわかる。また、PTMO についても数 ms および数十 μ s の 2 成分の T_{2C} が認められることから、ゴム状無定形成分および界面成分の存在が明らかになっている。

3.2. 2D SASS による CSA の測定

図 3 に、PCL に対する室温での 2D SASS の測定結果を示す。ここでは、簡単のため F_2 軸に示した結晶成分に対する高分解能共鳴線のそれぞれについて、CSA をスライスとして示した。C1 (カルボニル) 炭素のみに対してはスライスデータがうまくとれなかったため、Torchia のパルスによりその結晶成分の CSA を測定した。 F_1 軸については試料の回転角 θ_S は 45° であるため、得られた共鳴線は共鳴中心を中心としてスケーリング因子 $f_S = (3 \cos^2 \theta_S - 1)/2 = 1/4$ だけスケールされている。

結晶中における各炭素の 10^3 Hz 程度の運動性をこれらの CSA から考察した。C1 炭素の CSA はスペクトルの幅はやや狭くなっているものの、その形状は剛直状態の CSA とほぼ一致しており、カルボニル基はほとんど運動をしていないことがわかる。その他すべてのメチレン炭素に対しては、主値 σ_{11} と σ_{22} が等しい、軸対称スペクトルになっている。PCL に対しては、まだ主軸の帰属はできていないが、その結晶構造がポリエチレンとほとんど同じであることから、 σ_{33} が分子鎖軸方向に対応していると考えられる。したがって、 $\sigma_{11} = \sigma_{22}$ であることは、分子鎖軸まわりの少なくとも 90° のジャンプ運動が起っていることを示唆している。また、C6 炭素のこの運動は -90° $^\circ$ においても凍結されなかった。C3, C4, C5 炭素に対しては σ_{11} と σ_{22} の平均化に加え、 σ_{33} に対してもかなり平均化が起っており、分子鎖軸まわりのジャンプ運動に加えて C-C 結合まわりのジャンプ運動も起っていることが示唆される。

図 4 には off-MAS により測定した、室温、 -90° $^\circ$ および -140° $^\circ$ における PTMO 結晶成分の CSA スペクトルを示す。試料の回転角 θ_S は 49.6° 、スケーリング因子 f_S は 0.13 である。C1 炭素

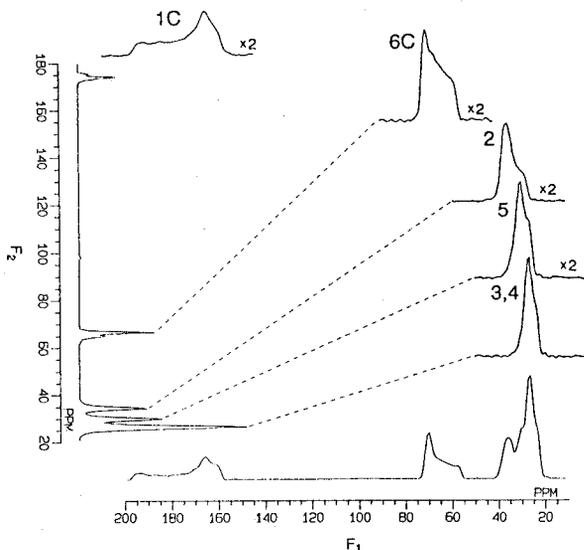


Fig. 3. 2D SASS ^{13}C spectrum of solid PCL with a spinning rate of 3.8 kHz.

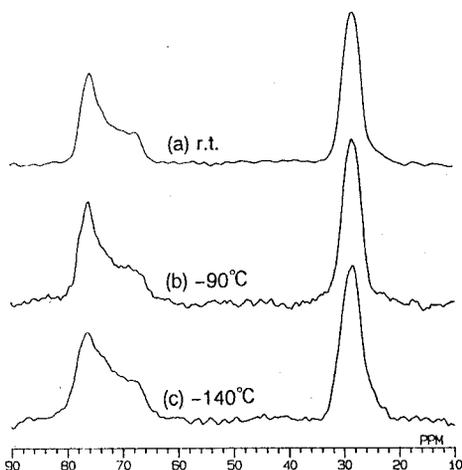


Fig. 4. ^{13}C CSA spectrum of the crystalline component in solid PTMO. (a) room temperature, (b) -90° $^\circ$ and (c) -140° $^\circ$. The spinning angle is 49.6° .

は、室温では軸対称に近いスペクトルであるが、PCLのC6炭素よりも線幅が広く、運動性が低いことがわかる。 -140°C では σ_{11} と σ_{22} の違いに基づくショルダーが現われること、および線幅の広がりから 10^3 Hz程度の運動はほぼ凍結していると考えられる。一方、PTMOのC2炭素は -140°C においてさえ等方スペクトルである。これは、PCLに対してはC3, C4, C5炭素の分子鎖軸方向を平均化するような分子運動がある程度制限されていることと比べて、PTMOではこの分子運動がかなり活発であることを示す。

今後、主軸の帰属を明確にするとともに、低温測定によって得られる剛直粉末図を基にしたコンピューターシミュレーションを行うことにより、これらのメチレンの運動についてさらに詳細に検討する予定である。

3.3. 2D CSA 交換スペクトルの測定

PCLについて、さらに低速の分子運動をC1およびC6炭素の結晶成分に対する2D CSA交換スペクトルの測定により検討した。mixing timeは1sとした。図5に室温でのC6炭素の測定結果を示す。対角線上に1D CSAスペクトルが認められるが、分子の再配列に起因する交差ピークは存在していないように思われる。 10^3 Hz程度の運動が凍結されているC1炭素に対しても同様の結果が得られた。したがって、PCLに関しては、2D交換スペクトルの形状に影響を及ぼす1 Hz程度の超低速運動は、室温では起こっていないように思われる。また、PTMOについては室温でC1炭素に対して測定を行った(図6)。mixing timeを10sとしたが、この場合も明確な交差ピークが出現していないことがわかる。

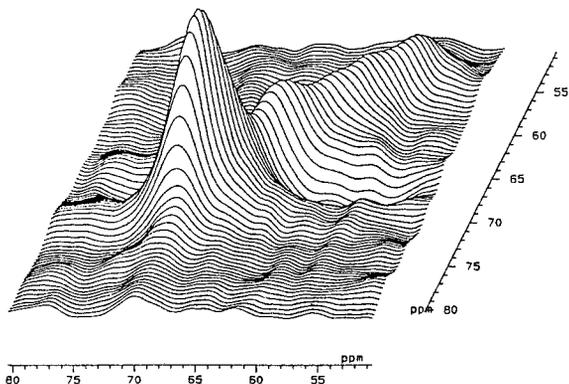


Fig. 5. Selective excitation 2D CSA exchange spectrum for the C6 carbon of solid PCL with a spinning rate of 3.8 kHz.

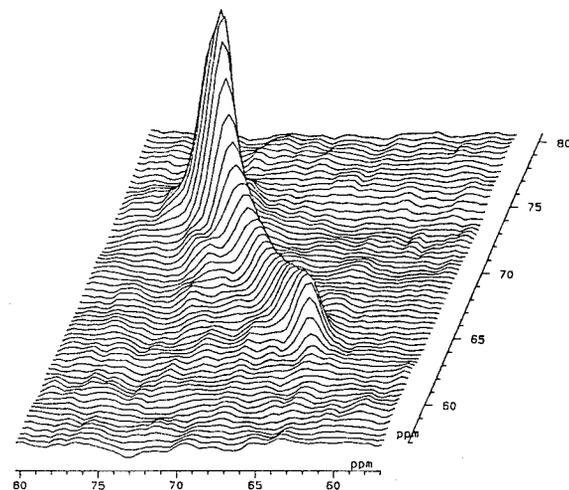


Fig. 6. 2D CSA exchange spectrum for the C1 carbon of solid PTMO with a spinning rate of 2 kHz. The spinning angle is 49.6° .

References

- 1) H. T. Edzes and J. P. C. Bernardis, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1515 (1984).
- 2) D. Schaefer et al., *Macromolecules*, **23**, 3431 (1990).
- 3) B. Blumich et al., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **93**, 1189 (1989).
- 4) F. Horii et al., *Magn. Reson. Chem.*, in press.
- 5) R. Kitamaru et al., *Macromolecules*, **19**, 636, (1986).
- 6) A. Hirai et al., *Macromolecules*, **23**, 2913, (1990).

P 63

固体高分解能 ^{13}C NMRによるポリジアセチレンの研究 モノマーの固体内での運動性と固相重合およびポリマーの構造緩和

(物質研) ○早水紀久子、柳沢 勝、松田宏雄
(東北大・反応研) 岡田修司、中西八郎
(戸田工業) 土井孝紀

High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR Spectra of Polydiacetylenes Molecular Motions of Monomers related with Solid-State Polymerization and the Structural Relaxation of the Polymers

K.Hayamizu, M.Yanagisawa and H.Matuda(NIMC),
S.Okada and H.Nakanishi(Tohoku Univ.) and T.Toi(Todakogyo)

Polyacetylenes synthesized from octatetrayns (4A) were studied by high resolution solid-state ^{13}C NMR spectra and found that the alignment and mobility of the monomers are important to form the polymers in the solid state in the scheme of 1,4-polymerization. The polymers experience long-term structural relaxation after the polymerization.

ポリジアセチレン (PDA) は一般には共役アセチレン (ジイン、2A) 固体を光照射、 γ 線照射あるいは加熱によって合成される特異なポリマーであり、共役系が大きいことから大きな三次の非線形光学特性をもつために注目されている。固相重合するモノマーには特殊な構造が必要であることが知られており、結晶学的な研究からアセチレン結合を中心に分子が配列している。そのために側鎖として水素結合が可能な構造、アルキル長鎖、ベンゼン環の分子間相互作用が仮定できる構造のものに限られ、側鎖のタイプとしては約10種類ほどが報告されている。我々は共役系を大きくする目的でアセチレン結合が4個共役しているオクタテトライン (4A) をモノマーとして固相重合の研究を行っている。化学構造と分子内運動を固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルによって詳細に研究したので、モノマー構造とポリマーの時間経過に伴う構造変化を報告する。本研究では主にウレタン結合を含む側鎖をもつPDAでメチレンの数の相違によるモノマーとポリマーの構造について述べる。この系においてはモノマーにおいては分子間の水素結合、ポリマーにおいては分子内での側鎖間の水素結合が仮定できる。

実験

固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルは JEOL-GSH200 測定し、 ^1H の90°パルス幅4.5 μs 、

ポリジアセチレン、固相重合、構造緩和、 ^{13}C NMR

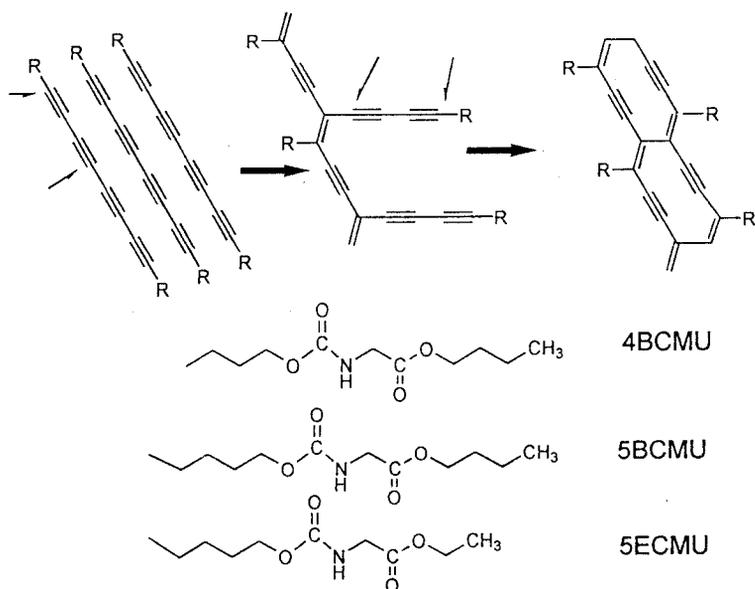
はやみず きくこ、 やなぎさわ まさる、 まつだ ひろお、 おかだ しょうじ、 なかにし はちろう、 どいたかのり

MAS速度4.5 KHzである。測定は CPMAS 法、シングル励起法 (SEMAS)、および双極子デフェーシング法 (CPMAS/DD) を組み合わせて行った。溶液状態のスペクトルをスペクトルデータベースシステム (SDBS) によって帰属し、これに基づいてモノマー固体のスペクトルを帰属した。またポリマーの¹³CNMRの帰属は側鎖部分はモノマーに準じて行ったが、部分的にピーク位置の入れ替わることもあったので、SEMAS や CPMAS/DD などを併用して決定した。

結果と考察

4Aの構造と重合反応のスキームとモノマー構造を下図に示す。固相重合は1,4一位で起こりこのスキームは我々の共役アセチレン化合物の場合には共通である。第1段階目の反応はγ線照射、光照射、加熱などで起こり、第2段階は熱重合が一般的である。アルキル長鎖をもつヘキサイン化合物 (14-6A) は室温で反応が進行するので1992年の本討論会で固体¹³CNMRスペクトルを発表している。

図に示してあるが、4BCMU-4A と 5BCMU-4A ではアセチレン結合とウレタン結合の間のメチレン数が4と5の違いであり、5ECMU-4A と 5BCMU-4A では末端がブチルであるかエチルであるかの相違であるが、モノマー固体の¹³CNMRスペクトルの比較から水素結合による構造の配列の違いがみられる。4BCMU-4A ではモノマーのアセチレンシグナルは複雑に分裂して水素結合が均一でないことを示唆している。一方 5BCMU-4A は均一な構造になっていると同時に固体化に伴う低磁場シフトがみられる。また 5ECMU-4A は一部のシグナルはダブルットに分裂しているが、室温で固相反応が進行し生成したポリマーの均一性は良好である。一方 4BCMU-4A では固相反応後に年単位で構造が変化することが固体高分解能¹³CNMRで繰り返し測定することによって明らかになった。ポリマーの構造を詳細に研究しているうちに、固相重合で得られるポリマーはモノマーの構造が大きく影響していることがわかった。新規ポリジアセチレンの合成を目指して類似化合物の合成が試みられているが、必ずしも成功していない。結晶解析からモノマー配列の重要性は示されているが、同時に¹³CNMRの研究からモノマーの運動性も重要な要因になることを明らかにできた。



○石丸 臣一、池田 龍一、中村 亘男*
筑波大化・阪大理*

Solid State NMR Study of Dynamics and Reaction of Methanol Molecule
Absorbed in 12-Heteropoly Compounds

Dynamics and reaction of methanol molecule absorbed in trisodium 12-molybdophosphate ($\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) were studied by solid state ^1H , ^2H , ^{13}C , and ^{31}P NMR broadband and CPMAS spectra. It was found that there are two types of methanol molecules. One type is highly mobile and the other is fixed its C-O bond direction. The ^2H line shape of $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 6\text{CH}_3\text{OD}$ and ^{13}C and ^1H chemical shift of $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 9\text{CH}_3\text{OH}$ showed that the electron transfer from methanol molecule to the heteropoly anion occurs even at room temperature. Dimethylether and ester of methanol and heteropoly anion were detected by ^{13}C CPMAS measurement in the sample after heating up to 200°C .

12-ヘテロポリ酸及びその塩は、様々な有機反応に対し、高い触媒活性を持っており、工業的にも実用化されている物質である。特に、水溶性の塩については、その結晶中に極性有機分子をゲストとして大量に取り込むことができることがわかっており、物性的にも興味深い物質である。しかしながら、吸収された分子の挙動についての詳しい研究はあまりなされおらず、その触媒機構には未だ不明な点が多い。我々は以前、最も単純な系として12-モリブドリン酸ナトリウムの水和物を取り上げ、水和数の違いによって水分子の運動状態が大きく変化することを報告した[1]。今回、我々はより実用化されている触媒反応に近い系として、12-モリブドリン酸ナトリウムにメタノールを吸収させたもの ($\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot n\text{CH}_3\text{OH}$) について、結晶中でのメタノール分子の運動と反応を固体状態での ^1H , ^2H , ^{13}C , 及び、 ^{31}P のNMRスペクトルを用いて調べた結果を報告する。試料は、12-モリブドリン酸ナトリウムのメタノール溶液を減圧溜去することによって得た。メタノールの吸収量 n は、重量法によって決定した。NMR測定は、Bruker社製MSL-200及びMSL-300システムを用いて行った。

図1に $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 6\text{CD}_3\text{OD}$ の ^2H NMRスペクトルの温度変化の様子を示す。238K以上では、等方的な回転運動をしていることを表わす中央の鋭いピークと、幅の広い成分の2種類の成分が観測された。この二つの成分は、温度の変化と共にその強度比が変化していき、137Kでは外側の幅の広い成分のみが観測された。線形の解析から、この幅の広い成分はC-O結合周りに一軸回転しているメチル基に帰属された。一方、 $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 6\text{CH}_3\text{OD}$ の低温での ^2H NMRスペクトルは複雑な線形を示し、メタノール分子の単純な運動では説明できない。このことは、ヒドロキシル基の電子状態がfreeのメタノールとは異なった状態にあることを示している。

次に、上の結果に基づき実際の反応を調べるために ^1H , ^{13}C , ^{31}P の広幅及びMAS NMRスペクトルの測定を行った。図2は $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 9\text{CH}_3\text{OH}$ と、これをテフロンの密閉容器中 200°C で約1時間加熱した後の試料の ^{13}C CPMASスペクトルである。加熱前の試料の ^{13}C 化学シフトの値、52ppmは液体のメタノ-

キーワード：CPMAS, DNMR, ヘテロポリ化合物, 分子運動, 触媒反応

○いしまる しんいち・いけだ りゅういち・なかむら のぶお

ルについて報告されている値47.1ppm に比べて低磁場シフトしており、炭素核の周りの電子密度が低くなっていることを示している。この傾向は、 ^1H のスペクトルに対してさらに顕著にあらわれていた。一方、 200°C 加熱後の試料では、51ppm および 60ppm 付近に幅の広いピークが、74ppm付近に非常に幅の広いピークが観測された。51ppm のピークは加熱前のメタノールの ^{13}C 化学シフトと一致しており、未反応のメタノールと考えられる。また、60ppm と 74ppm付近のピークは、化学シフトの値からそれぞれ反応生成物であるジメチルエーテルおよび中間生成物と考えられるモリブドリン酸イオンとメタノールのエステル状態の化学種に帰属した。試料の外観は、加熱前には鮮やかな黄色だったものが加熱後には、モリブドリン酸イオンが還元されたことを示す濃青色に変わっていたこと、および加熱前後での ^{31}P の化学シフトの変化から、室温でもアニオンの強い酸化力がメタノール分子の電子状態に影響を与え、反応に対する触媒作用を担っていると考えられる。

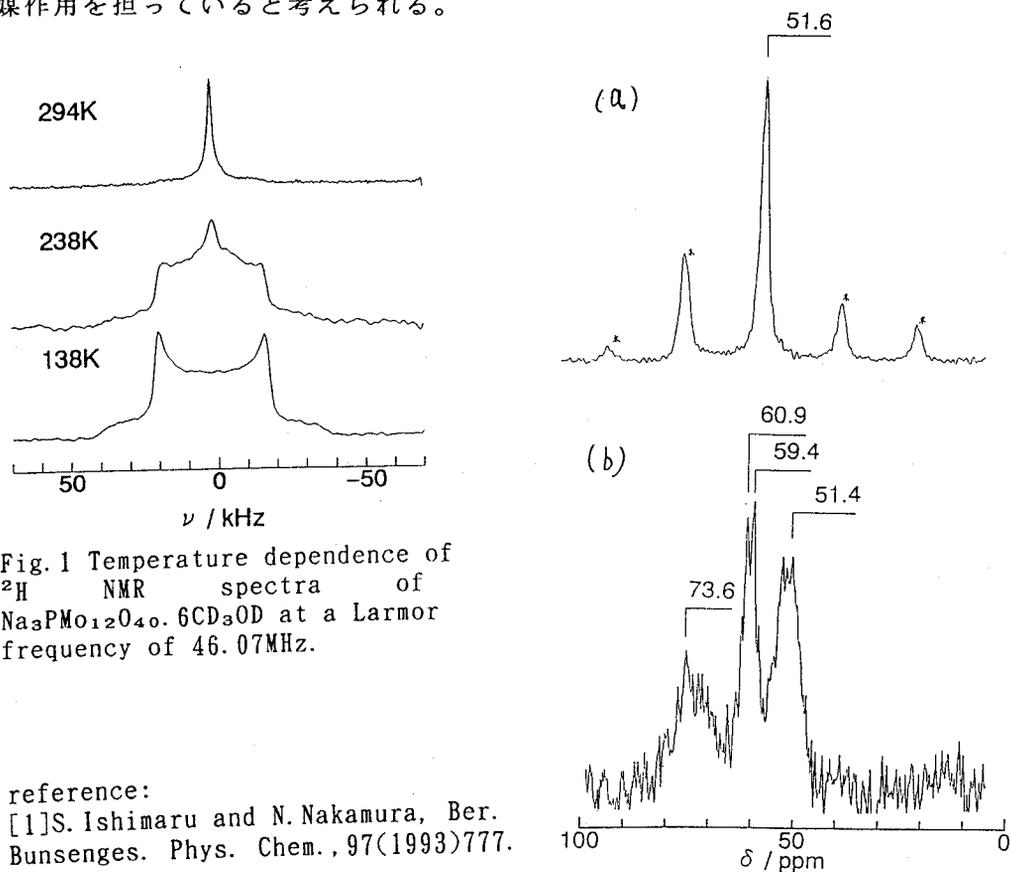


Fig. 1 Temperature dependence of ^2H NMR spectra of $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 6\text{CD}_3\text{OD}$ at a Larmor frequency of 46.07MHz.

reference:
[1] S. Ishimaru and N. Nakamura, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 97(1993)777.

Fig. 2 Room temperature ^{13}C CPMAS spectrum of ^{13}C -enriched $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 9\text{CH}_3\text{OH}$ before (a) and after heating to 573K for 1 hour (b). The marked (*) peaks are spinning side bands.

P 65 柔粘性結晶TiNO₂における¹⁵N NMRと分子運動

(筑波大化) ○本多 尚・池田龍一・石丸臣一

Ionic Dynamics in Plastic Crystal TiNO₂ Studied by ¹⁵N NMR

○Hisashi Honda, Ryuichi Ikeda, Shin'ichi Ishimaru
Department of Chemistry, University of Tsukuba

The temperature dependences of ¹⁵N NMR T₁ and spectra in solid Ti¹⁵NO₂ forming a plastic phase above room temperature as observed in MNO₂(M=K,Rb,Cs), were measured to reveal ionic dynamics. The observed results were shown in Figs. 1 and 2. In the low-temperature phase obtained below 282.4K, a T₁ minimum of ¹⁵N was observed at 210K. Around the same temperature, a T₁ minimum of Ti NMR has been reported[1]. There minima can be attributed to a motion of NO₂⁻ ions, which has been shown to have activation energy of 13.9kJmol⁻¹. The ¹⁵N NMR spectra exhibited three different principal components of chemical shift tensor in the whole temperature range of the low-temperature phase studied. In the high-temperature phase (Plastic Phase), a narrowed sharp spectrum was observed, indicating the existence of isotropic reorientation of NO₂⁻ ions whose activation energy was determined to be 7.5kJ mol⁻¹ from ¹⁵N T₁.

我々は、これまで室温以上で柔粘性結晶相を形成することが知られているアルカリ金属亜硝酸塩(MNO₂; M=K, Rb, Cs)について、NMR測定を行い、相転移点におけるNO₂⁻イオンの運動の変化について研究してきた。今回取り上げた化合物TiNO₂も上記化合物同様、固相の最高温相が柔粘性結晶相(282.4K~465K)である。熱容量の測定により、固相間の転移において、大きな転移のエントロピー(23.8JK⁻¹mol⁻¹)、および転移点の低温側に約100Kの広がりを持つ熱容量曲線のテイルが観測されている[2]。このことからNO₂⁻イオンの運動の自由度が温度上昇と共に大きく変化することが期待される。本研究では、核スピンの1/2である¹⁵Nを導入したTi¹⁵NO₂を合成し、¹⁵N NMR のT₁とスペクトルの温度変化を測定し、化学シフト異方性の温度依存性から分子運動に関する情報を得ることを試みた。

測定にはBruker社製MSL-300(7.05T)を用い、飽和回復法により測定周波数30.42MHzにおいて¹⁵NのT₁を求めた。磁化回復曲線は測定温度範囲(140K~340K)内で指数関数的に減少した。T₁の温度変化をFig. 1に示す。Fig. 2に各温度でのスペクトルを示す。¹⁵Nの化学シフトの標準は、4.5M¹⁵NH₄NO₃の3N塩酸溶液を用いた(δ_r=-354ppm)。

II相(<282.4K)について

II相で誘電分散の異常、およびTi核のT₁極小が観測されている。¹⁵N NMR T₁測定により、Fig.1に示すように210Kに極小が観測された。TiのT₁極小(測定周波数34.613MHz)が220Kに観測されているので、T₁と¹⁵NのT₁極小は同じNO₂⁻イオンの運動によるものと予想される。化学シフトの異方性による緩和を仮定して(1),(2)式を用いて実測値のフィッティングを行った。

$$T_1^{-1} = C \omega^2 \tau (1 + \omega^2 \tau^2)^{-1} \quad (1)$$

$$\tau = \tau_0 \exp(E_a/RT) \quad (2)$$

Key Words: ¹⁵N Solid NMR T₁, ¹⁵N Solid NMR Spectra, Plastic Phase, Chemical Shift Anisotropy

○ほんだ ひさし、いけだ りゅういち、いしまる しんいち

フィッティング結果をFig. 1に示す。得られた活性化エネルギーは、 13.9kJmol^{-1} となった。誘電分散、TlのNMR T_1 測定から求められている活性化エネルギーは、それぞれ 18kJmol^{-1} [2]、 17kJmol^{-1} [1]である。またFig.2に示すように、異なった三つの主値の化学シフトテンソル成分を持ったスペクトルがII相で得られ、その線形は T_1 極小の高温側、低温側で変化しなかった。線幅は温度上昇に伴い減少する傾向が見られた。以上の結果より、II相では電気双極子モーメントの方向が大きく変化するが、化学シフトの異方性の変化が小さい運動が存在していることが明らかになった。

I相($282.4\text{K} < T < 465\text{K}$)について

I相では、すでに報告したK塩、Rb塩、Cs塩と同様に液体なみの鋭い一本のスペクトルが観測された。これはI相で NO_2^- イオンの等方回転が存在していることを示している。また T_1 の温度変化の傾きから活性化エネルギー、 7.5kJmol^{-1} が(1),(2)式より得られた。同じ温度領域でTlの T_1 が観測されており、その温度変化から自己拡散の活性化エネルギーとして 47kJmol^{-1} が報告されている[1]。一方、 KNO_2 の場合、柔軟性結晶相で ^{15}N 核は NO_2^- イオンの等方回転により緩和しており、その活性化エネルギーの値が 9.6kJmol^{-1} である[3]ことから、今回の測定で得られた 7.5kJmol^{-1} は NO_2^- イオンの等方回転の活性化エネルギーであると考えられる。

[1]Y. Furukawa and H. Kiriyama, *Chem. Phys. Letters*, **93**, 617(1982).

[2]K. Moriya, T. Matsuo, H. Suga, and S. Seki, *Chem. Letters*, 1427(1977).

[3]M. Kenmotsu, H. Honda, H. Ohki, R. Ikeda, T. Erata, A. Tasaki, and Y. Furukawa, *Z. Naturforsch.*, **49a**, 247(1994).

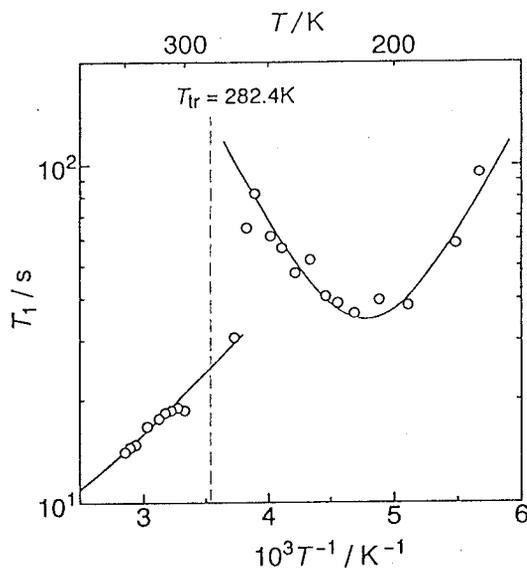


Fig. 1. ^{15}N NMR T_1 measured at a Larmor frequency of 30.42MHz in $\text{Tl}^{15}\text{NO}_2$. The solid lines are the best-fitted curves by use of eqs.(1) and (2).

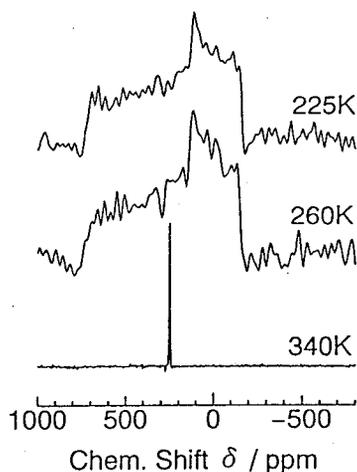


Fig. 2. The temperature dependence of ^{15}N NMR spectra in $\text{Tl}^{15}\text{NO}_2$ measured at 30.42MHz . The reference was a 4.5M solution of $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ in 3N hydrochloric acid.

$$\delta \text{ (ppm)} = \delta_0 - (-354)$$

セッション：固体物性

(Physics and Chemistry of Solids)

P 66

フラーレンアニオンラジカル塩 $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ の
固体 ^{23}Na および ^{13}C NMR

(東邦大理) ○森山広思、小林速男、(物質研) 林 繁信、(東大理) 小林昭子、
(東水大) 渡部徳子、(University of California, Berkeley) Jay Shore, Andrew C. Kolbert,
Alexander Pines

Solid-state ^{23}Na and ^{13}C NMR Investigations on Fullerene Anion
Radical Salts: $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$

Hiroshi Moriyama¹, Hayao Kobayashi¹, Shigenobu Hayashi², Akiko Kobayashi³,
Tokuko Watanabe⁴, Jay Shore⁵, Andrew C. Kolbert⁵, Alexander Pines⁵

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Toho University,

² National Institute of Materials and Chemical Research

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, The University of Tokyo

⁴ Department of Chemistry, Tokyo University of Marine Science

⁵ Department of Chemistry, University of California, Berkeley

The facile and simple wet-chemical synthesis of single crystals of alkali-metal doped fullerenes was developed by means of diffusion in organic admixed solvents of C_{60} in chlorobenzene and alkali-metal tetraphenylborate in THF. The single-crystals $\text{M}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ ($\text{M}=\text{Na}, \text{K}$) possess a hexagonal unit cell and ESR spectra showed the existence of a typical broad signal due to the C_{60} anion radical. The solid-state ^{23}Na and ^{13}C solid-state NMR on $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ gave a singlet signal, $\delta = -6.9$ ppm and $\delta = 158$ ppm (in addition to two signals $\delta = 81.7$ and 41.0 ppm from THF), respectively, which also revealed the homogeneity of the single crystal. Although the compounds are very conducting (ca. 50 Scm^{-1} at room temperature), no significant chemical shifts (Knight shifts) have been observed in both spectra. The T_1 value of ^{13}C nuclei of C_{60} anion radical was shortened to be 166 ms.

^{23}Na NMR, ^{13}C NMR, Fullerene, C_{60} , anion radical, single-crystal, conducting material,
 T_1

もりやまひろし、こばやしはやお、はやししげのぶ、こばやしあきこ、わたなべ
とくこ、ジェイ・ショー、アンドリュ・コルベルト、アレクサンダー・パインズ

The discovery of fullerene and the superconductivity of alkali metal doped C₆₀ has provoked great interest in these novel carbon cluster compounds. ¹⁾ Fullerene anion radicals play an important role in fullerene based superconductivity. However, in spite of the recent rush of publications, unavoidable inhomogeneity and extreme instability of doped C₆₀ has hampered complete characterization of the nature of fullerene superconductivity, and little is known about the molecular and electronic structure of the material mainly due to the lack of the single-crystal data. While trying to synthesize single crystals of fullerene anion radicals as part of an investigation of novel superconductivity, we found that rather stable single crystals of the C₆₀ anion radical of bulky cation, PPN⁺ (N[P(C₆H₅)₃]₂⁺) salts, ²⁾ were obtained by electrocrystallization. Considering the electron-withdrawing nature of C₆₀, alkali metal tetraphenylborate is suitable for the source of alkali metal in the synthesis of doped fulleride in homogeneous solution phase. It should be noted that B(C₆H₅)₄⁻ is recognized as a typical non-coordinating anion, which in turn should accelerate the release of alkali metals with its concomitant reduction in solution. We observed first that the dropwise addition of chlorobenzene solution of C₆₀ to the THF solution of NaB(C₆H₅)₄ caused a sudden fade out of the magenta color and simultaneous production of a dark-brown precipitate. In the light of this observation, we tried to produce a single-crystal of this material. In a typical preparation, NaB(C₆H₅)₄ dissolved in degassed THF was added dropwise on to the purified C₆₀ set in a diffusion-type glass cell by dissolving it in chlorobenzene under nitrogen. The mixture, without agitation, was stored at room temperature in the dark. After one day black needle-like crystals began to grow at the interface of the two solutions (C₆H₅Cl / THF). At the end of the reaction (ca. 2 weeks) the magenta color had disappeared completely, as the interface of the solutions disappeared gradually, and black lustrous needle-like single-crystals of Na_xC₆₀(THF)_y were isolated in surprisingly high yield (ca. 80 % ! for Na_xC₆₀(THF)_y).

Our very simple method for synthesizing alkali-metal doped fullerene is based on the idea that the alkali metal cation is coordinated in the form of a contact ion pair in homogeneous solution phase. We have recently reported the electrocrystallizing formation of a new metallic compound, Na_xC₆₀(THF)_y ³⁾ from a electrocrystallization technique in similar solutions. The scanning electron micrograph of single-crystals Na_xC₆₀(THF)_y shows clearly the shape of the crystalline compound (Figure 1).

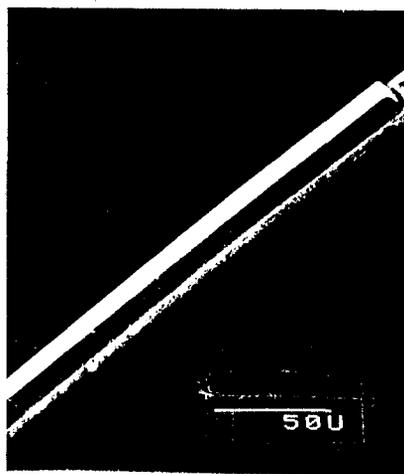


Fig. 1. SEM of single-crystal Na_xC₆₀(THF)_y

Solid-state NMR spectra were measured at 105.8 MHz for ^{23}Na NMR and 100.6 MHz for ^{13}C NMR. The incorporation of THF as crystalline solvent was clearly confirmed by the solid-state ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy, in which two peaks at $\delta = 81.7$ and 41.0 ppm from THF, in addition to the ^{13}C signal ($\delta = 158.0$ ppm) of C_{60} anion radical, were clearly observed. The T_1 value of ^{13}C nuclei of C_{60} anion radical, measured to be 166 ms, is shorter in comparison to that of neutral C_{60} . A single-crystal of $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ isolated under an inert atmosphere indicated a metallic conductivity (ca. 50 Scm^{-1}) at room temperature. A sharp increase in the conductivity, as much as one order of magnitude, was observed at ca. 170 K. The significant difference between our compound $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ and recently reported $\text{NaC}_{60}(\text{THF})_5$ ⁴⁾ is the results of the solid-state NMR spectroscopy. Although the g -factor ($g=1.999$, $\Delta H_{\text{pp}}=\text{ca. } 35 \text{ Hz}$) of the broad ESR signal ascribable to C_{60}^{\bullet} at room temperature is fairly similar and the phase-transition below 200 K have been observed in both cases, ^{23}Na

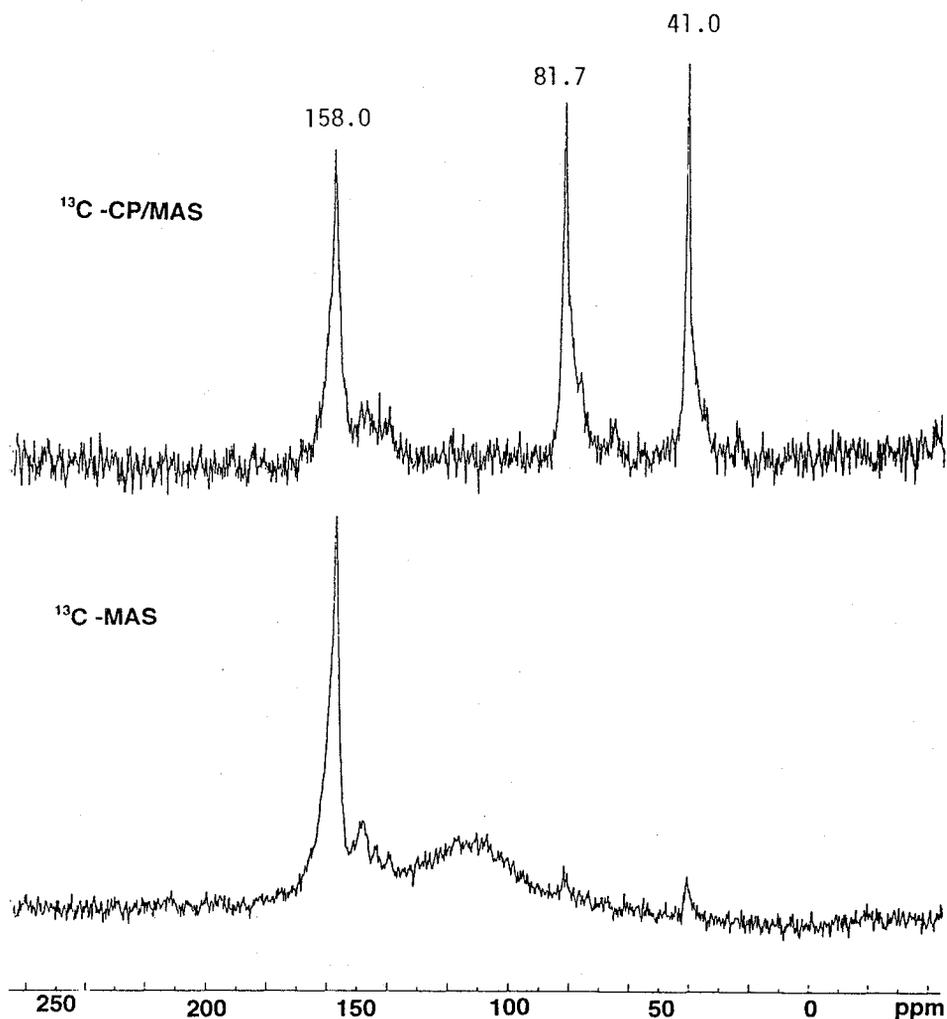


Fig. 2. Solid-state ^{13}C NMR of $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$

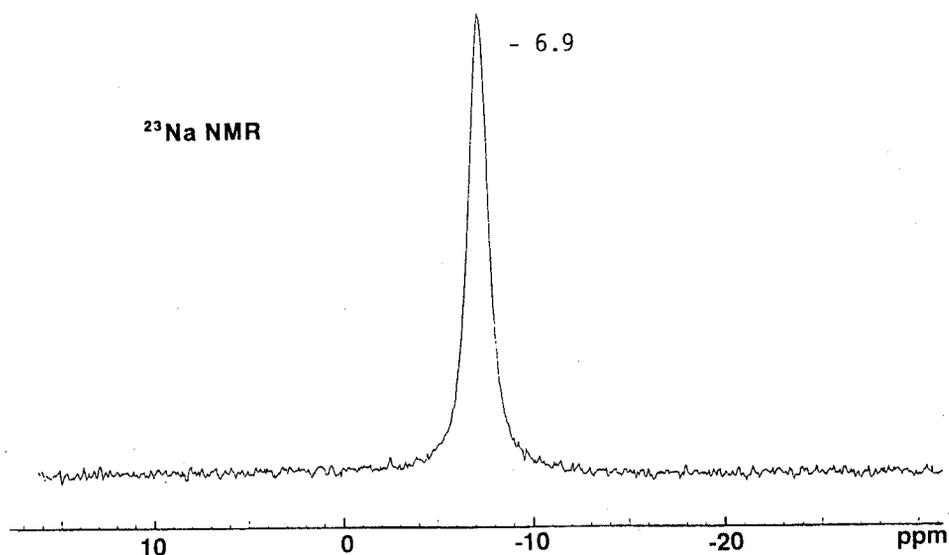


Fig. 3. Solid-state ^{23}Na NMR of $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$

MAS NMR spectrum of $\text{NaC}_{60}(\text{THF})_5$ suggested at least two different sites ($\delta = -23$ and $+9$ ppm) in the crystal, ⁴) whereas only one rather sharp singlet signal at $\delta = -6.9$ ppm was observed for our $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$. Furthermore, the chemical shift differences are significant not only for ^{23}Na NMR, but also for ^{13}C NMR ($\delta = 158$ ppm for $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ and $\delta = 188$ ppm for $\text{NaC}_{60}(\text{THF})_5$). The most striking feature is that the both ^{23}Na and ^{13}C chemical shifts of $\text{Na}_x\text{C}_{60}(\text{THF})_y$ demonstrated no strong paramagnetic shifts (Knight shifts) in spite of the high conductivity of the compound. The compound is quite unstable, as the conductivity should be easily lost under atmosphere. It was found that the compound easily decomposes partly to give neutral C_{60} within approximately one month even under nitrogen.

References

- 1a) Kroto, H.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* 1985, **318**, 162-163. 1b) Krätschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R. *Nature* 1990, **347**, 354-358. 1c) Haddon, R. C.; Hebard, A. F.; Rosseinsky, M. J.; Murphy, D. W.; Duclos, S. J.; Lyons, K. B.; Miller, B.; Rosamilia, J. M.; Fleming, R. M.; Kortan, A.; Glarum, S. H.; Makhija, A. V.; Muller, A. J.; Eick, R. H.; Zahurak, S. M.; Tycko, R.; Dabbagh, G.; Thiel, F. A. *Nature* 1991, **350**, 320-322. 1d) Hebard, A. F.; Rosseinsky, M. J.; Haddon, R. C.; Murphy, D. W.; Glarum, S. H.; Palstra, T. T. M.; Ramirez, A. P.; Kortan, A. R. *Nature* 1991, **350**, 600-601. 2) Moriyama, H.; Kobayashi, H.; Kobayashi, A.; Watanabe, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, **115**, 1185-1187. 3) Kobayashi, H.; Tomita, H.; Moriyama, H.; Kobayashi, A.; Watanabe, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, **116**, 3153-3154. 4) Douthwaite, R. E.; Brough, A. R.; Green, M. L. H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1994, 267-268.

Acknowledgments

H. Moriyama is grateful to the Foundation of Promotion of Industrial Science of the Institute of Industrial Science, University of Tokyo for financial support to conduct a collaboration work.

P 67

遷移金属カルボニルヒドリドクラスターの

^{13}C CP/MAS NMR

(阪大理、リバプール大*、ポローニャ大**)

○江口太郎、中山尋量、宮城 慧、中村亘男、Brian T. Heaton*,
Jens Nahring*, Giuliano Longoni**

^{13}C CP/MAS NMR Study on Transition Metal Carbonyl Clusters
Containing Interstitial Hydride(s)

T. Eguchi^a, H. Nakayama^a, K. Miyagi^a, N. Nakamura^a, B.T. Heaton^b,
J. Nahring^b, and G. Longoni^c

a) Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University

b) Department of Chemistry, University of Liverpool, UK.

c) Dipartimento di Chimica Fisica ed Inorganica, Bologna, Italy

^{13}C CP/MAS, ^1H MAS, and ^2H NMR measurements on various transition metal (Ni, Co, Ru) carbonyl clusters containing interstitial H/D were performed in order to investigate CO/H mobility in these anion clusters in the solid state. Sharp and strong ^{13}C signals of CO groups were detected only in $\text{Ni}_{12}\text{-H}_2$ cluster, $(\text{NEt}_4)_2[\text{Ni}_{12}(\text{CO})_2\text{H}_2]$, whereas no CO signals in $\text{PPN}[\text{Co}_6(\text{CO})_{15}\text{H}]$ and $\text{PPN}[\text{Ru}_6(\text{CO})_{18}\text{H}]$. In this report, we will discuss 1) the site symmetry of hydride, 2) possible migration of CO/H in the metal cluster, and 3) packing of cations and anions in the crystalline lattice in relation to the cross polarization between ^{13}C and ^1H .

遷移金属カルボニルクラスター化合物中のカルボニル基やヒドリドは、水素化触媒機能と関連して注目されており、NMRによる溶液中での配位状態や運動状態の研究が盛んに行われている。これらの化合物における ^1H の化学シフトは+23~-20ppmの広い範囲に分布しており、水素が金属クラスター内部に配位しているのか、外面に配位しているのかが論争の中心になっている(クラスター化合物以外の通常の錯体の場合、ヒドリド信号は高磁場に現われる)。低温中性子回折によると、 $(\text{PPN})_2[\text{Os}_{10}\text{H}_4(\text{CO})_{24}]$ の4個のヒドリドは金属クラスター外面に配位している¹。一方、DuerとWalesは、 $\text{Ru}_6\text{-H}$ と $\text{Co}_6\text{-H}$ クラスターの ^1H 低磁場シフトを理論的に解析し、Hは正八面体内部に配位していると結論づけている²。本研究では、中性子回折で結晶内のH位置が決められている化合物を取り上げ、 ^1H MASおよび ^{13}C CP/MAS NMR (MSL200)を測定し、溶液中でのカルボニル基やヒドリドの配位状態、運動状態と比較検討した³。

CP/MAS, 遷移金属カルボニルクラスター, ヒドリド, 配位子の運動, 結晶構造

○えぐち たろう、なかやま ひろかず、みやぎ けい、なかむら のぶお、ブライアン ヒートン、
エンス ナーリング、ジュリアーノ ロンゴニ

得られた $^1\text{H}/^2\text{H}$ 化学シフトをTable 1に示す。PPN $[\text{Ru}_6(\text{CO})_{18}\text{H}]$ および $(\text{NEt}_4)_2[\text{Ni}_{12}(\text{CO})_{21}\text{H}_2]$ では溶液中の値とほぼ一致し、PPN $[\text{Co}_6(\text{CO})_{15}\text{H}]$ の場合だけ溶液中の値から大きくずれている。また、HをDで置換した化合物の ^2H 共鳴は、 $\text{Ru}_6\text{-D}$ 、 $\text{Co}_6\text{-D}$ クラスタでは核のまわりの電場勾配が非常に小さい場合の線形を与え、線幅はそれぞれ1.0と5.4 kHzであったが、 $\text{Ni}_{12}\text{-D}_2$ クラスタでは ^2H の信号は観測できなかった。結晶構造を調べると、 $\text{Ru}_6\text{-H}$ 、 $\text{Co}_6\text{-H}$ 、 $\text{Ni}_{12}\text{-H}_2$ クラスタの順に、ヒドリドを内包した八面体のひずみが大きくなっており(Fig. 1)、それに伴い固体の ^1H 化学シフトの位置が低磁場から高磁場へと変化する。したがって、 ^1H 化学シフトの値だけではヒドリドが金属クラスタ内部に配位しているのか、外面に配位しているのかは決定できない。 $\text{Co}_6\text{-H}$ クラスタの場合だけ溶液と固体とで ^1H 化学シフトに大きな違いが生じる原因としては、 Co_6 八面体の対称性の変化、あるいは、HやCOが運動していることによる平均化などが考えられる。

Table 1. $\delta(^1\text{H}/^2\text{H})$ for the hydride resonances of transition metal carbonyl clusters in solution and the solid state

Cluster	Cation	$\delta(^1\text{H}/^2\text{H})/\text{ppm}$	
		solution($T/^\circ\text{C}$)	solid(25 $^\circ\text{C}$)
$[\text{Co}_6(\text{CO})_{15}\text{H}]^-$	PPN^+	+23.2(-70)	+1
$[\text{Ru}_6(\text{CO})_{18}\text{H}]^-$	PPN^+	+16.4(40)	+15.5
$[\text{Ru}_6(\text{CO})_{18}\text{D}]^-$	Ph_4As^+		+18.5 \pm 1
$[\text{Ni}_{12}(\text{CO})_{21}\text{H}_2]^{2-}$	$(\text{NEt}_4)_2^{2+}$	-18.3(40)	-19.9
$[\text{Ni}_{12}(\text{CO})_{21}\text{H}]^{3-}$	$(\text{Ph}_4\text{P})_3^{3+}$	-24.4(40)	

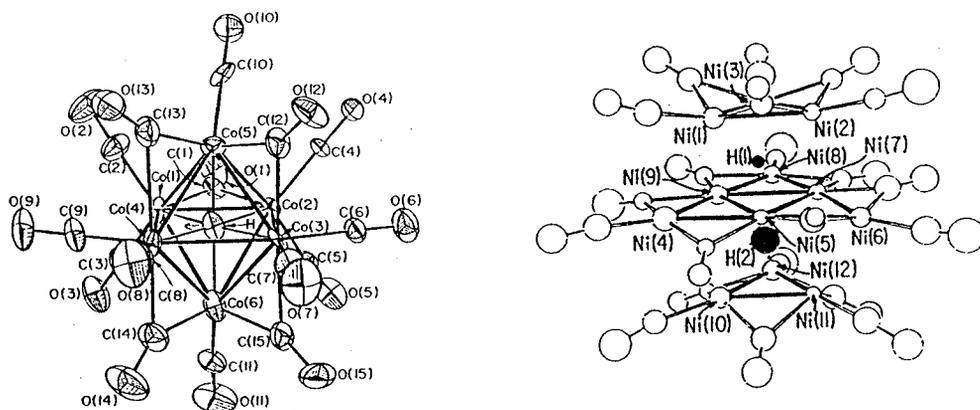


Fig. 1. Structure of the $\text{Co}_6\text{-H}$ and $\text{Ni}_{12}\text{-H}_2$ Clusters as Determined by the Neutron Diffractions ^{4,5}

^{13}C CP/MAS NMRの結果をFig. 2に示す。Ru₆-HとCo₆-Hクラスターの場合 (a, b)、陽イオンのPPNによる信号しか観測できなかった。これらの物質ではカルボニル基の ^{13}C と ^1H の間のcross polarization がほとんど起こらないことがわかる。

一方、Ni₁₂クラスターの場合、陽イオンのエチル基によるピーク(7.6, 54.0ppm)に加えて、COによるピークが明瞭に観測された。とくに、Ni₁₂-H₂化合物(Fig. 1参照)ではスペクトル強度も強く(c)、190 (Ti:189.3), 198 (To:196.0), 222 (Bo:219.3), 240 (Bi:239.9), 246 ppmに5本のピークが現われる(d)。かつこ内には-81℃の溶液のスペクトルの帰属, T: terminal, B: bridge, i: inner layer, o: outer layer, と化学シフトの値を示した⁶。246 ppmのピーク以外はよく一致しており、金属クラスター表面でのCO基のexchange (terminal-bridge) などは起こっていないことがわかる。この246 ppmのピークは溶液中では観測されておらず、Ni₁₂-H₂クラスターのinner layerのbridging-COが結晶中で非等価になる可能性を示唆している。

ヒドリドが1個少ないNi₁₂-H化合物, TMBA₃[Ni₁₂(CO)₂₁H], の場合、溶液のスペクトルにはNi₁₂-H₂化合物と同様に-80℃で4本のピークが現われる。もしヒドリドの位置がinner layerをはさんだ二つの八面体サイト(Fig. 1: ●)の一方に片寄っているとすれば、上下のouter layerのカルボニル基が非等価になるのでピークは4本以上現われるはずである。溶液試料の低温における実験結果はヒドリドが二つのサイトに等しく分布する(運動する)として解釈されている。温度を上げると、Ni₁₂-Hクラスターのouter layerのterminal-COとbridging-COの間のexchangeがNMRの時間スケールより速くなるのでouter layerの信号が広がって観測できなくなり、-30℃では2本のピーク(191.8, 248.2 ppm)だけになる⁶。

Ni₁₂-H化合物の結晶試料の場合、中性子回折によると(Ph₄P)₃塩ではヒドリドは二つの八面体サイトの一方に片寄っていると考えられている⁵。ところが、 ^{13}C CP/MAS スペクトルのカルボニル領域には予想に反して2本の幅広いピーク(199, 237 ppm)しか観測されなかった(e)。また、 ^1H MAS NMRでもヒドリドのピークは観測できなかった。このことから、1) 固体中でヒドリドの運動に加えて、溶液と同じようなCO基のexchangeが起こっている、または、2) 陽イオンが異なると結晶中の陰イオンクラスターのpackingが変化し、カルボニル基の ^{13}C と ^1H の間のcross polarizationに影響を与える、のどちらかであると考えられる。

References

- 1) A. Bashall et al., *Angew. Chem. Internat. Ed.*, 1991, 30, 1164.
- 2) M.J. Duer and D.J. Wales, *Polyhedron*, 1991, 10, 1749.
- 3) T. Eguchi et al., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1994, submitted.
- 4) D.W. Hart et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 1458.
- 5) R.W. Broach et al., *Adv. Chem.*, 1978, 167, 93.
- 6) G. Longoni et al., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1980, 1537.

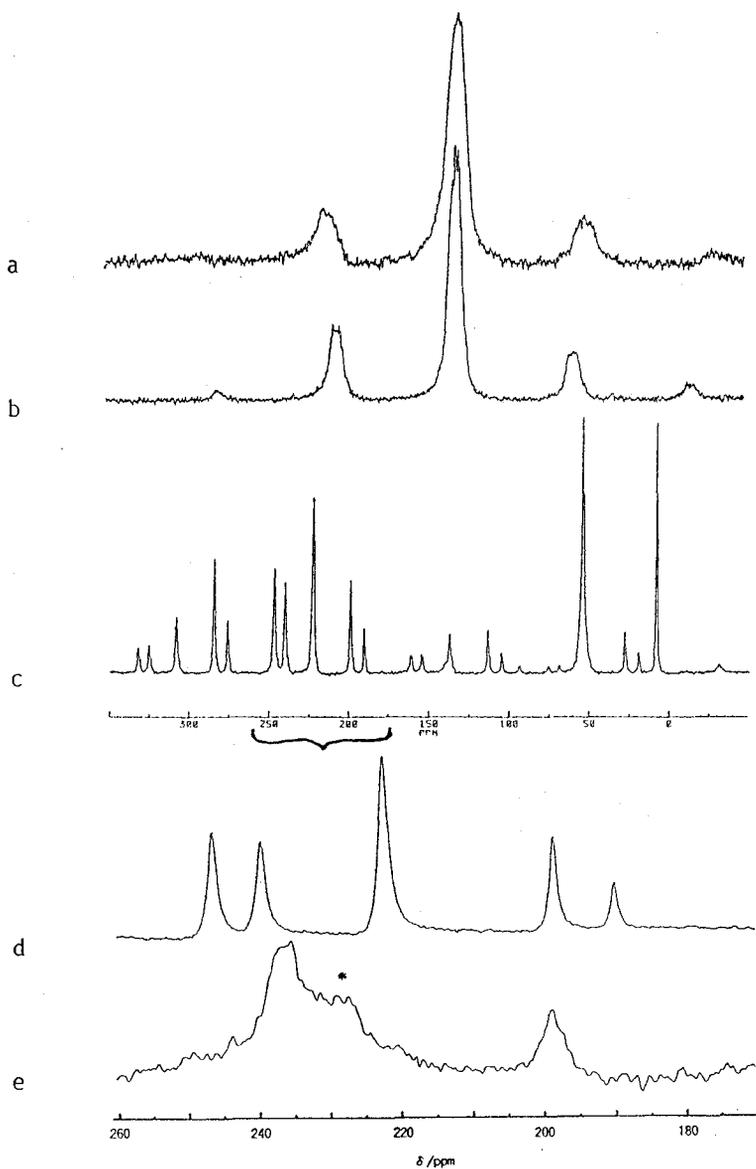


Fig. 2. ^{13}C CP/MAS NMR Spectra of Transition Metal Carbonyl Clusters Containing Interstitial Hydride(s)

- a) $\text{PPN}[\text{Ru}_8(\text{CO})_{18}\text{D}]$, Spinning rate=4.0 kHz, 2703 scans.
- b) $\text{PPN}[\text{Co}_6(\text{CO})_{15}\text{H}]$, Spinning rate=3.7 kHz, 9052 scans.
- c) $(\text{NEt}_4)_2[\text{Ni}_{12}(\text{CO})_{21}\text{H}_2]$, Spinning rate=4.3 kHz, 10848 scans.
- d) Carbonyl region of spectrum c.
- e) $\text{TMBA}_3[\text{Ni}_{12}(\text{CO})_{21}\text{H}]$, Spinning rate=5.0 kHz, 2370 scans.

Luminous characteristics and ^{89}Y Solid state NMR
of red phosphor, $Y_2O_3:Eu$

(Mitsubishi Kasei Research Center, Tokyo University of Marine Sciences*) ○ Toshie Harazono, Etsuzo Yokota, Tokuko Watanabe*

$^{89}Y(I=1/2)$ STATIC NMR in red phosphor, $Y_2O_3:Eu$ (Eu doped Y_2O_3) has been studied. In addition to a signal of $\underline{Y}(-O-Y_2)_6$, (A), signals of $\underline{Y}(-O-Y_2)_5(-O-Y, Eu)$, (B), and $\underline{Y}(-O-Y_2)_4(-O-Y, Eu)_2$, (C) appeared with increasing of Eu concentrations. It has been elucidated that 1) linebroadenings of ^{89}Y signals are caused by the paramagnetic relaxation of Eu^{3+} , 2) the linewidth is more broader in a homogeneous distribution of Eu than in the inhomogeneous case, 3) a sample with broader linewidth of ^{89}Y signal has a stronger brightness, and 4) the intensity of brightness is mainly dominated by the Eu distribution than the amounts of lattice defects.

序：赤色蛍光体 (Y, Eu) $_2O_3$ は投写管や、3波長ランプに用いられている。蛍光体に対する市場ニーズは、最近の映像機器の大型化、(例えば、投写型大型テレビ、及び、ハイビジョンテレビ)に伴い、より微細粒子化と共に、特に高輝度化が強く望まれている。従来の蛍光体で、画面上で精細な明るさを保つためには、電子線の入力を増加しなければならないが、入力を増加すると、時間の経過と共に、蛍光体の発光効率が低下するという問題が生じる。一方、入力を増加しないで精細な明るさを保つためには、高輝度特性を持つ蛍光体を用いる必要がある。高輝度、高精細特性を持つ蛍光体を開発するためには、まず、発光中心の場や構造を解明しなければならない。従来の組成分析法や粉末X線法では、発光特性と相関するデータが得られていない。著者らは、固体NMRを用いて、発光中心であるEuの存在状態や分布状態、及び、蛍光体結晶の微細構造を明らかにした。さらに、ESRを用いて、格子欠陥の種類と量を見積もった。本研究によって、蛍光体の評価技術、即ち、発光中心原子の結晶中での存在状態、及び分布状態を評価する手法が初めて確立された。得られた結果のうち、今回は、発光特性と発光中心の存在状態、及び、分布状態との関係について発表する。

試料：本研究に用いた試料は、所定の Y_2O_3 と Eu_2O_3 、及び、融剤を混合し、 $1450^\circ C$ で数時間焼成して得られた。得られた試料の組成を表1に示した。これらの試料のうち、MK1~MK7までは、乾式法、MK8~MK13までは、共沈法で合成した。後者の試料は、合成条件を種々変えて、輝度の違う試料を得た。輝度の値も表1に示した。なお、ここで用いた原料の不純物濃度は、

○はらその としえ、よこた えつぞう、わたなべ とくこ

全てppm以下であり、得られた試料のY/Eu(モル比)は、仕込量と実験誤差内で一致した。

装置、及び測定：試料のY/Eu(モル比)、及び、不純物濃度は、Seiko SPS-1200 A ICP装置とRigaku 3370 蛍光 X-線装置を用いて定量した。さらに、Philips PW1700 X-ray 回折装置で結晶構造を確認した。発光スペクトルと輝度は、TOPCON ABT-32 電子線励起装置で測定した。粒径の大きさは、Model PA-2 コールターカウンターで測定した。NMRの測定にはBruker社製MSL-300 固体NMR装置を用いた。 ^{89}Y の共鳴周波数は14.706MHzで、測定には、STATICプローブを用いた。Y(NO_3)₃水溶液(0ppm)の90°パルスは20 μs であったので、試料の測定には5 μs のパルスを用いた。ESR測定はJEOL JES-FE2XG ESRスペクトロメーターで行った。

結果、及び考察：

図1に Y_2O_3 の結晶構造を示した。1つの単位格子の中には、24個のY(C_2)、8個のY(S_6)、及び、48個のOが存在する。 Y_2O_3 に Eu^{3+} (4f⁶)をドープした時の発光スペクトルを図2に示した。Euをドープしても、X線回折パターン、及び、発光スペクトルの形には変化がなかった。図3はMK1のESRスペクトルであるが、 $g=2.004$ のシャープな1本のシグナルが現れた。これは、酸素欠陥(+2価)に電子がトラップされた F^+ センターであると帰属された。¹⁾図4はEu濃度に対する $\ln[I]$ (I: Intensity)のプロットであるが、1次の減衰式で表された。重いEu原子がはいることによって原子の自己拡散が抑えられ、格子欠陥が減少するものと考えられる。図5にMK1~MK7の ^{89}Y STATIC NMR スペクトルを示した。 ^{89}Y は核スピン、 $I=1/2$ であり、MK1では299ppm(A)に軸対称形のシグナルが現れた。MK2になると、シグナルの形は、ほぼガウス型になり、MK3からは(100~110)ppm付近(B)に肩が現れる。さらに、MK5~MK6になると、-80ppm付近(C)に第2の肩が現れてくる。Eu濃度が増加しても(A)のケミカルシフトが変化しない、(A)と(B)、(B)と(C)のケミカルシフト差がほぼ同じであることから、(A)のピークは図6に示した $\underline{\text{Y}}(-\text{O}-\text{Y}_2)_6$ の $\underline{\text{Y}}(0$ 置換Eu)、(B)のピークは $\underline{\text{Y}}(-\text{O}-\text{Y}_2)_6(-\text{O}-\text{Y}, \text{Eu})$ の $\underline{\text{Y}}(1$ 置換Eu)、(C)のピークは $\underline{\text{Y}}(-\text{O}-\text{Y}_2)_4(-\text{O}-\text{Y}, \text{Eu})_2$ (2置換Eu)であると帰属した。次に、これらのピークの重なりをガウス型関数で分離して、ピーク(A)~(C)の線幅を求めた。これらの線幅からMK1の(A)の線幅を差し引いたものを、Eu濃度に対してプロットし、これを図7に示した。図から明らかなように、 ^{89}Y の線幅の広がり、Eu濃度に対して一次である。このことから、 ^{89}Y の線幅の広がり、 Eu^{3+} (4f⁶)の常磁性緩和によって引き起こされている、と考えられる。次に、Eu濃度が3.5mol%の試料の(A)のピークの線幅の広がり、輝度の関係を図8に示した。線幅が広いほど、輝度が高いという相関性が見られた。このことは図9に示した様なEuの分布の違いでよく説明される。即ち、Euの分布が不均一な試料と均一な試料を比較すると、不均一な試料の方が、Euが多数Yの回りに存在しているYの確率が高く、そのようなYの緩和は非常に速く、シグナルは広がって観測されない。一方、0置換EuのYは、Euからの距離が遠くなり、また、Euの個数が少なくなるので線幅は狭くなる。これに対して、Euの分布が均一であれば、0置換EuのYの線幅は広がる。分布が不均一であれば、Eu-Euの濃度消光がおり、輝度が低下する。 F^+ センターの量と輝度との間には、相関性が見られなかった。

結論：

- ・ Yの線幅の広がりはEuの常磁性緩和で起こる。
- ・ Euが均一に分布している方がYの線幅が広がる。
- ・ 線幅が広い方が輝度が高い。
- ・ 輝度を支配する主な因子は、Euの分布状態で、格子欠陥は2次的な因子である。

Table 1. Sample list of $Y_2O_3:Eu$

sample	$(Y_xEu_{1-x})_2O_3$		granular size $d_{50}/\mu m$	brightness %
	X	1-x		
MK1	1.00	0	-	1
MK2	0.99	0.01	6.08	83
MK3	0.97	0.03	5.52	91
MK4	0.95	0.05	5.82	84
MK5	0.93	0.07	7.19	75
MK6	0.90	0.10	5.95	56
Mk7	0.70	0.30	-	4
MK8	0.965	0.035	3.54	88
MK9	0.965	0.035	5.56	79
MK10	0.965	0.035	3.48	57
MK11	0.965	0.035	4.23	78
MK12	0.965	0.035	4.80	62
MK13	0.965	0.035	3.31	71

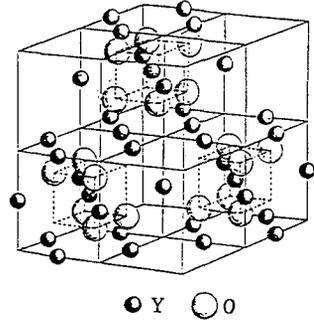


Fig.1 Crystal structure of Y_2O_3 .

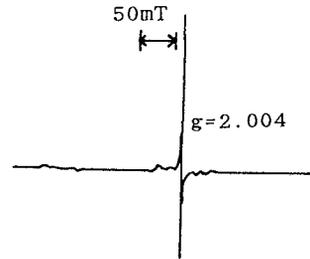


Fig.3 ESR spectrum of MK1.

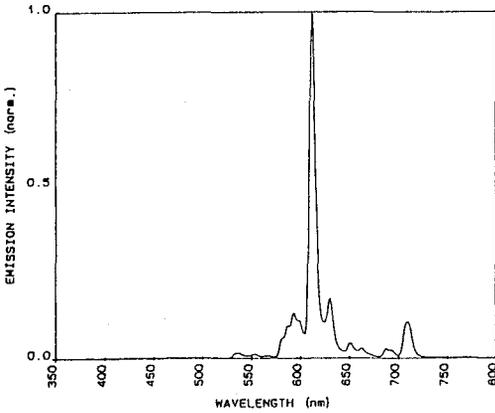


Fig.2 Emission spectrum of $Y_2O_3:Eu$.

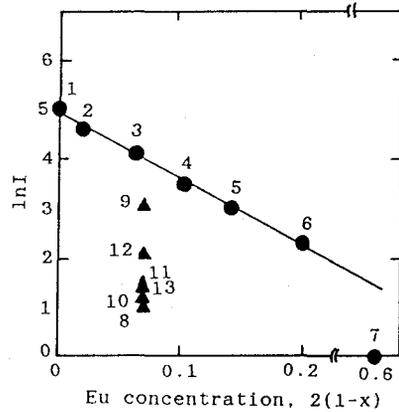


Fig.4 Plot of $\ln I$ vs. Eu concentration.

1) M. Tamatani, N. Tsuda, K. Nomoto, T. Nishimura, and K. Yokota, *J. Lumines.*, 935, 12/13(1976).

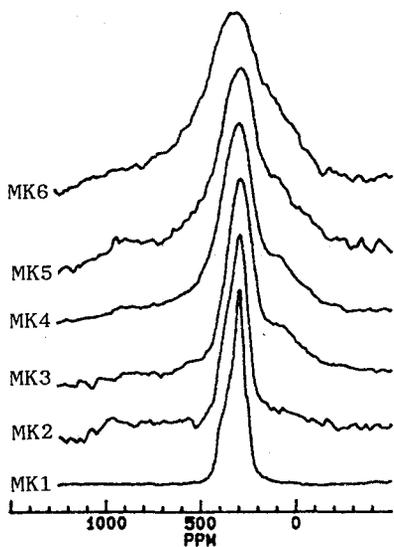


Fig.5 ^{89}Y STATIC NMR spectra of MK1-MK6.

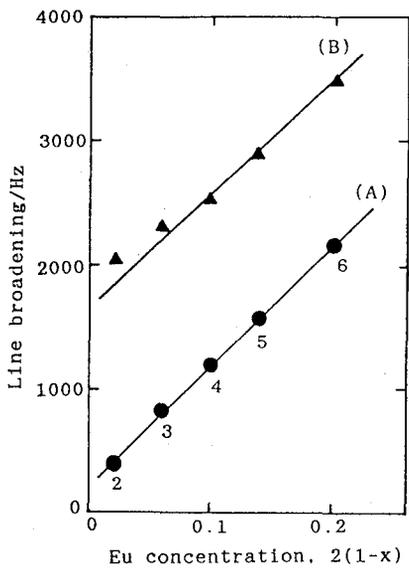


Fig.7 Line broadening of ^{89}Y vs. Eu concentration.

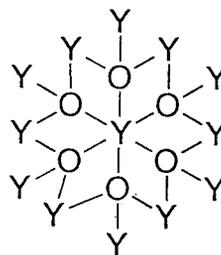


Fig.6 Structure of Y-O-Y bonds.

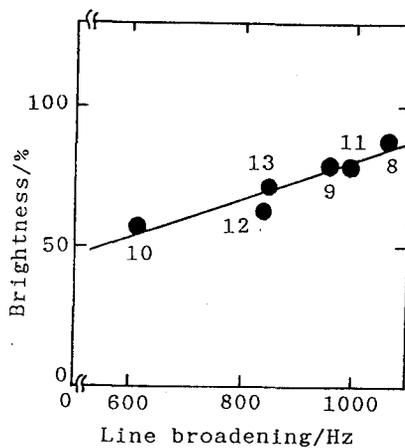


Fig.8 Plot of brightness vs. line broadening.

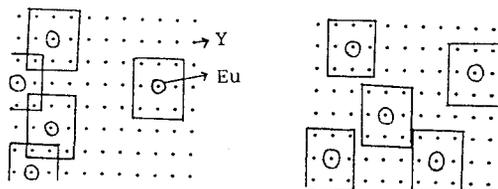


Fig.9 Eu distribution.

P 69

(三菱化成総研・東京水産大*) ○原園としえ・横田悦造・渡部徳子*

Luminous characteristics and, ^{27}Al and ^{89}Y Solid state NMR of green phosphor, $Y_3Al_5O_{12}:Tb$

(Mitsubishi Kasei Research Center, Tokyo University of Marine Sciences*) O Toshie Harazono, Etsuzo Yokota, Tokuko Watanabe*

^{27}Al ($I=5/2$) MAS NMR and ^{89}Y ($I=1/2$) STATIC NMR in green phosphor, $Y_3Al_5O_{12}:Tb$ (Tb doped $Y_3Al_5O_{12}$) have been studied. It has been shown that 1) linebroadenings of ^{27}Al in octahedral site and ^{89}Y signals are caused by the paramagnetic relaxation of Tb^{3+} , on the other hand, those of ^{27}Al in tetrahedral site are dependent on both the paramagnetic relaxation of Tb^{3+} and the variation of fine structure, 2) the linewidth is more broader in a homogeneous distribution of Tb than in the inhomogeneous case, 3) a sample with broader linewidth of ^{27}Al signal has a stronger brightness, and 4) the intensity of brightness is mainly dominated by the Tb distribution.

序: 前項で既に述べたように、著者らは、赤色蛍光体 $Y_2O_3:Eu$ の発光特性と、 ^{89}Y 固体NMRのシグナルの線幅の広がり間により相関性があることを見だし報告した。緑色蛍光体 (Y, Tb) $_3Al_5O_{12}$ は、主に投写型大型テレビブラウン管に用いられている。著者らは、高輝度特性を有する蛍光体を開発するために、 ^{27}Al 、及び、 ^{89}Y 固体NMRを測定して、発光中心である Tb の存在状態や分布状態、及び、結晶の微細構造を明らかにした。これらに関して、新しい知見が得られたので報告する。

試料: 本研究で用いた試料は、所定の Y_2O_3 、 Tb_4O_7 、 Al_2O_3 、及び、融剤を混合し、 $1470^\circ C$ で数時間焼成して得られた。得られた試料の組成と輝度を表1に示した。これらの試料のうち、MK1~MK6は乾式法、MK7は湿式法で合成した。なお、ここで用いた原料の不純物濃度は、全てppm以下であり、得られた試料の Y/Tb (モル比) は、仕込量と実験誤差内で一致した。

装置、及び測定: 試料の Y/Tb (モル比)、及び、不純物濃度は、Seiko SPS-1200 A ICP装置とRigaku 3370 蛍光 X-ray 装置を用いて定量した。さらに、Philips PW1700 X-ray 回折装置で結晶構造を確認した。発光スペクトルと輝度は、TOPCON ABT-32 電子線励起装置で測定した。粒径の大きさは、Model PA-2 コールターカウンターで測定した。NMRの測定にはBruker社製MSL-300固体NMR装置

○はらぞの としえ、よこた えつぞう、わたなべ とくこ

を用いた。 ^{27}Al の共鳴周波数は、78.205 MHzで、測定には4 mm MASプローブを用いて、15000 rpsの回転数で測定した。 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液(0 ppm)の90°パルスが3 μs だったので、測定には0.6 μs のパルスを用いた。 ^{89}Y の共鳴周波数は14.706 MHzで、測定には、STATICプローブを用いた。 $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液(0 ppm)の90°パルスは20 μs であったので、試料の測定には5 μs のパルスを用いた。

結果、及び考察：

図1に $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ の結晶構造を示した。1つの単位格子中には、16個の四面体配位Al(4配位Al)、24個の八面体配位Al(6配位Al)、及び、24個の12面体配位Y(8配位Y)が存在している。 $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ に Tb^{3+} (4 f⁸)をドープした時の発光スペクトルを図2に示した。 Tb^{3+} をドープしても、X線回折パターン、及び、発光スペクトルの形には変化がなかった。 Tb 濃度を変化させた試料の ^{27}Al (I=5/2) MAS NMRスペクトルのメインピークを図3に示した。MK1のスペクトルの0 ppmのシャープなシグナルは6配位Al、{Al(6)}、20~60 ppmのシグナルは4配位Al、{Al(4)}である。ここで、Al(6)、及び、Al(4)のピークがそれぞれ左右対称になるようにピーク分割を行い、ケミカルシフトと半値幅を求めた。ケミカルシフトを図4に示し、さらに、シグナルの半値幅からMK1の半値幅を差し引いた、 Tb が入ったことによる線幅の広がりを図5に示した。図4から明らかなように、Al(6)のケミカルシフトは Tb が増加しても一定であった。Al(4)のケミカルシフトは Tb 濃度が0.3 mol%まで、 Tb が増加するにつれて高磁場シフトし、それ以上の Tb 濃度の範囲ではほぼ一定であった。また、図5に見られるように、Al(6)の線幅の広がりは、 Tb 濃度に対して1次で増加した。一方、Al(4)の線幅の広がりは、 Tb 濃度が0.3 mol%まで急に増大し、それ以上の Tb 濃度ではAl(6)よりやや小さい傾きで増加した。なお、MK7のAl(6)とAl(4)の線幅は同じ Tb 濃度であるMK5よりも広がっていた。 Tb 濃度を変えた時のMK1~MK5の ^{89}Y NMRシグナルを図6に示した。図から明らかなように、 Tb 濃度を増加してもケミカルシフトは一定であった。これに対して、線幅の広がりは図7に示したように、 Tb 濃度に対して一次で広がった。MK6と7のシグナルは線幅が広がって、観測できなかった。ケミカルシフトの挙動から、 ^{27}Al 、 ^{89}Y NMRシグナルはいずれもAl-O-X、または、Y-O-XのXが Tb で置換されていないAl、または、Yに帰属された。Al(6)とYの線幅の広がりは、 Tb^{3+} (4 f⁸)の常磁性緩和によって広がるが、Al(4)の線幅には、常磁性緩和の他に構造的ずれが含まれていることが示唆された。このことは、Al(4)のケミカルシフトが Tb が入ることにより高磁場シフトすることからも明らかである。また、MK5とMK7は Tb 濃度が同じであるが、 ^{27}Al の線幅はMK7のほうが広がっている。この違いは、 Tb の分布状態の違いに起因すると思われる。即ち、線幅が広い方が Tb が均等に分布しており、狭い方は Tb が特定のAlの回りに集中して置換されていると考えられる。また、線幅が広がっている方が輝度が高いことから、輝度は Tb が均等に分布している方が高くなることが期待される。 Tb が集中していると濃度消光が起こり、輝度が減少するものと考えられる。

結論：

- ・Al(6)、Yの線幅の広がりは Tb の常磁性緩和で起こる。
- ・Al(4)の線幅の広がりは、 Tb の常磁性緩和と構造のずれで起こる。
- ・線幅が広い方が輝度が高い。
- ・輝度を支配する主な因子は、 Tb の分布状態である。

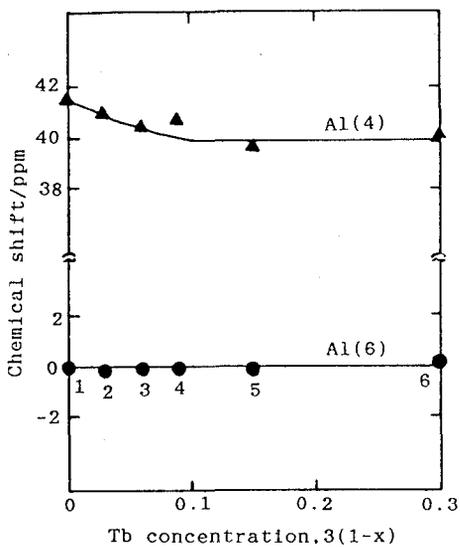


Fig.4. Chemical shift of ^{27}Al vs. Tb concentration.

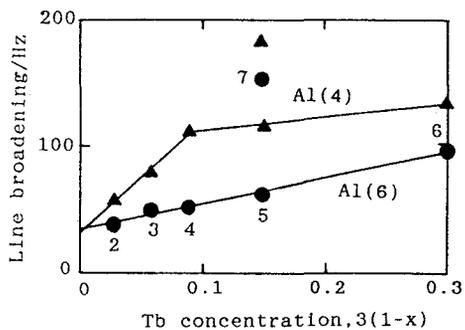


Fig.5. Line broadening of ^{27}Al vs. Tb concentration.

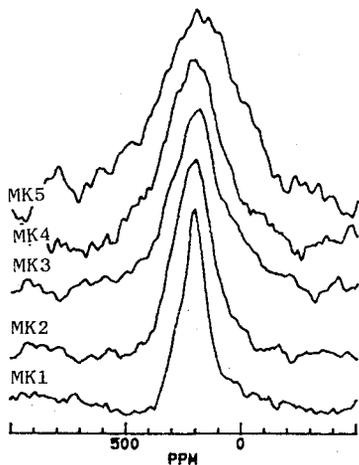


Fig.6. ^{89}Y STATIC NMR spectra of MK1-MK5.

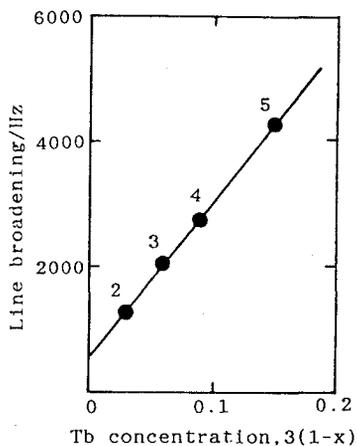


Fig.7 Line broadening of ^{89}Y vs. Tb concentration.

Table 1. Sample list of $Y_3Al_5O_{12}:Tb$

sample	$(Y_xTb_{1-x})_3Al_5O_{12}$		granular size $d_{50}/\mu m$	brightness %
	X	1-x		
MK1	1.00	0	4.40	-
MK2	0.99	0.01	4.44	49
MK3	0.98	0.02	4.20	59
MK4	0.97	0.03	4.20	73
MK5	0.95	0.05	4.21	74
MK6	0.90	0.10	4.22	73
MK7	0.95	0.05	4.32	100

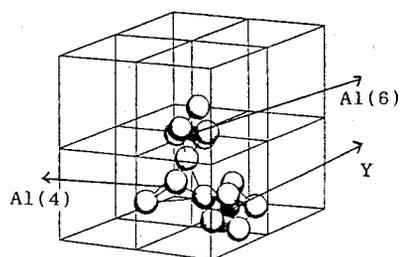


Fig. 1 Crystal structure of $Y_3Al_5O_{12}$.

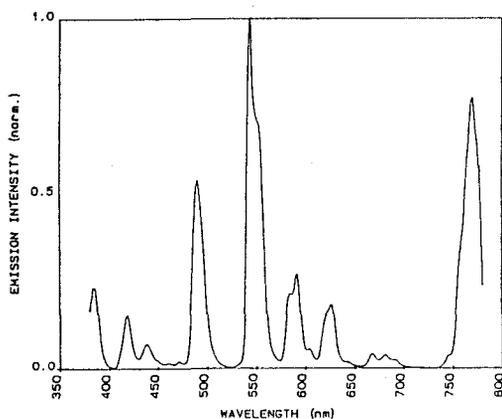


Fig.2 Emission spectrum of $Y_3Al_5O_{12}:Tb$.

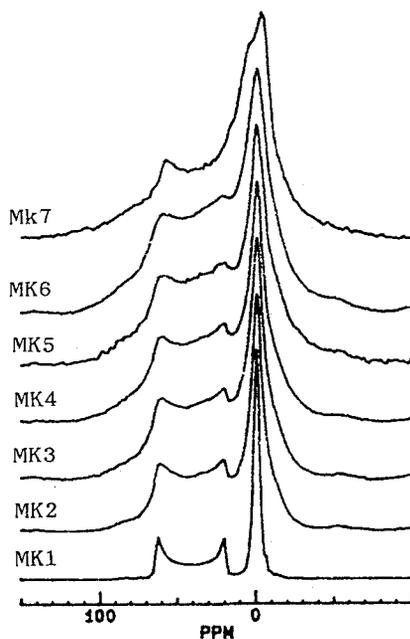


Fig.3 ^{27}Al MAS NMR spectra of MK1-MK7.

A Phase Transition Study of 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 conformation of polysilanes in the solid state. In this work, we study phase-transitional behavior of poly(methyl-n-propylsilane) (PMPS) by means of ^{29}Si CP/MAS NMR spectroscopy over a wide range of temperatures. PMPS takes both well-ordered and disordered phases in the solid state at -20°C . As an increases of temperature the disordered phase increases slowly and then the ordered phase of PMPS is completely converted to the disordered phase at 45°C . By the DSC method phase transition is observed during $33.1\sim 44.3^\circ\text{C}$ but by the ^{29}Si NMR method the structural change has been observed from -20°C .

1) 結論

直鎖状高分子ポリシランはSi-Si主鎖骨格のとりうるコンホメーションによって大きくその性質を変えることが知られている。ポリシランの相状態の違いによって、そのSi-Si主鎖骨格コンホメーションに相違があり、結晶相でトランス平面型、非晶相ではゴーシュ型を取ると言われてきた。しかし、近年結晶相におけるコンホメーション構造は真のトランス平面から少しずれた構造を取っていることが明らかになった。そして、n-アルキル置換ポリシランの構造が今日まで信じられてきたことよりやや複雑であることが分かってきた。本討論会では、ポリ(メチル-n-プロピルシラン)(PMPS)に着目し、相転移の要因である主鎖骨格のとりうる構造について、固体 ^{29}Si NMR法及びNMR化学シフトをより深く理解するための量子化学計算法(FPT CNDO/2 MO)¹⁾を用いて、明らかにする。

2) 実験

2-1 PMPSの合成は Trujillo²⁾の方法にて行った。

2-2 VT-固体高分解能NMR測定: JEOL EX270装置を用いてCP及びwithout CP/MAS法(^{29}Si 観測周波数53.54MHz, ^{13}C 観測周波数67.8MHz)にて行ない、化学シフトは全てTMS基準に換算した。スピナー格子緩和時間(T_1)測定はTorchia法にて行った。

3) 結果と考察

示差熱(DSC)測定によりPMPSの相転移は $33.1\sim 44.3^\circ\text{C}$ の範囲で1.5cal/gramの吸熱ピークを示すことが分かった。この相転移温度でのPMPSの構造変化を明らかにするために固体高分解能 ^{29}Si 及び ^{13}C NMRスペクトルを測定した。まず、Si-Si主鎖骨格部分をみるために ^{29}Si CP及びwithout CP/MASNMRの20, 33, 45°C におけるスペクトルをFig.1に示す。20 $^\circ\text{C}$ のCP/MASスペクトル(a)では-31.3ppmに大きなピーク(o)と-33.1ppmに肩ピーク(d)を示した。-31.3ppmのピークの T_1 が40sであることからOrder(O)相であり、肩ピークはwithout CP/MASスペクトル(b)のピーク(d)の化学シフトと一致したことよりDisorder(D)相に相当することが分かった。次に、33 $^\circ\text{C}$ ではdのピーク強度が増大し、この温度でD相がさらに増加したことを示す。この状態を分子運動の

固体高分解能 ^{29}Si NMR・アルキル置換ポリシラン・構造解析・相転移・ T_1

○たかやまとしお・あんどういさお

観点より確かにするためにコンタクトタイムを0.5msから10msの範囲で測定したところ10msのときピークdのピーク強度が最も増大した。これはピークdの分子運動が大きいことを意味しておりこの部分がD相であることを示す。さらにコンタクトタイムを10msとしてstatic測定を行ったところ、ピークdのスペクトルは軸対称のパウダーパターンを示し、D相が速い分子運動をしていることを支持している。そして、45℃になるとピークd(-32.3ppm; $T_1=16.8s$)のみになり、この温度で全てD相になったことを示した。

次に、側鎖部分を見るために ^{13}C CP及びwithout CP/MASNMRの33と45℃におけるスペクトルをFig.2に示す。without CP/MASスペクトル(b)の各ピーク強度がいずれの温度でもほとんど変わっていないのに対して、CP/MASスペクトル(a)のCH₂基(1,2)のピーク強度は33℃から45℃と温度の増加に伴って激しく減少した。そして(1,2)はさらに温度が上昇すると再びピークが出現していた。これは(1,2)の分子運動の速さがちょうどデカップリングの周波数(約40kHz)と同程度になって、線幅が広がったことによる。

次に、相転移をコンホメーション変化として理解するために ^{29}Si 化学シフトについて考察する。33℃でのCP/MASスペクトル(Fig.1 a)で示されたO相(-30.9ppm)とD相(-32.3ppm)の化学シフトの差はコンホメーションの違いによる。この化学シフトの傾向を理解するためにモデル化合物を用いて計算したMOの結果をFig.3に示す。トランス構造($\theta=180^\circ$)より θ ($130^\circ < \theta < 180^\circ$)が少しずれると ^{29}Si 化学シフトは高磁場シフト(σ 値:大)していることが分かる。即ちO相はトランス構造、D相はトランス構造から少し歪んだ構造をとっていることを示している。

以上より、DSC法から理解されたPMPSの相転移は33.1~44.3℃の範囲でおきるのであるが、NMR法からは-20℃ですでにD相が存在し、温度の上昇に伴ってD相が徐々に増大して33℃でO相とD相がほぼ半数になっていることが分かった。そして、この状態になって始めてDSCピークが現れてくることも分かった。

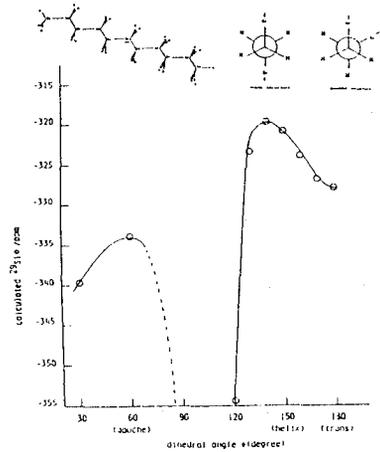


Fig.3 The calculated ^{29}Si nuclear shieldings for the central Si atom in the model compound $Si(CH_3)_2(CH_2)_2$ as a function of the dihedral angle θ by the FPT CNDO/2 method.

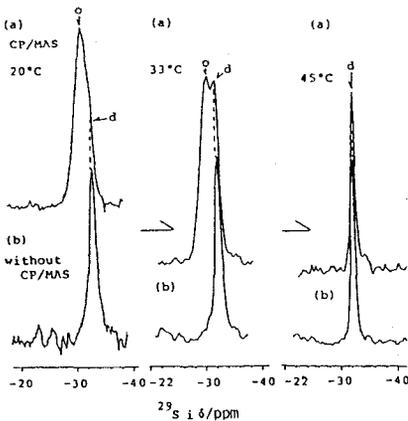


Fig.1 ^{29}Si CP/MAS(a) and without CP/MAS(b) spectra of PMPS in the solid state at 20, 33, and 45°C.

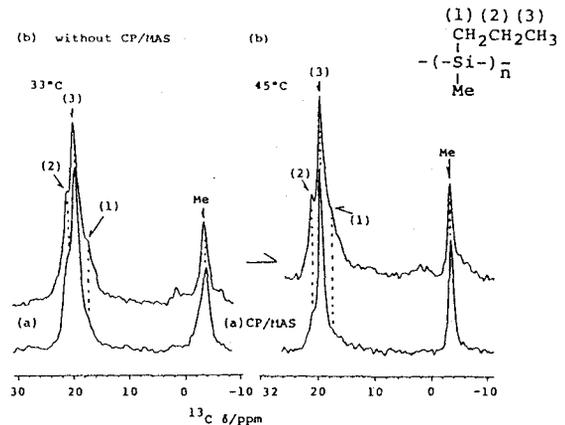


Fig.2 ^{13}C CP/MAS(a) and without CP/MAS(b) spectra of PMPS in the solid state at 33 and 45°C.

- 1) T. Takayama and I. Ando, J. Mol. Struct., 222, 275 (1990); 243, 101 (1991).
- 2) R. E. Trujillo, J. Organomet. Chem., C27, 198 (1980).

P71 NMRによる hidroゲルのイオン添加効果の研究
 (新日本製鐵(株)先端技術研究所) ○手島志帆、斎藤公児

A NMR study into the effect of cations on gel generation
 Shiho Teshima, and Koji Saito

Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

Gellan gum polysaccharide generates hydrogel, which is widely used as food or culture medium. It is well known that cation addition affects the strength of gel formed, and the mechanism of gel generation induced by a divalent cation is considered to be different from that of by a monovalent cation. We studied the effect of cation addition on gel generation, and report on the difference in polysaccharide conformation induced by the cations.

〔緒言〕 組織培養などに広く用いられるゲランガムは2つのグルコース、グルクロン酸、ラムノースからなる4糖であり、hidroゲルを生成する。そのゲルにカチオンを添加するとゲル強度が高まるが、特に二価イオンが一価イオンよりも強度増加に効果があることが知られ、これらのゲル生成機構は異なると推定されている¹⁾。我々はゲランガムにおいて添加カチオンにより引き起こされる糖鎖構造の違いについて調べた。その結果、イオンが糖鎖の高次構造に影響すると示唆される結果を得たので報告する。

〔実験〕 溶液試料：5%の粉末ゲランガムを90度のイオン交換水に溶解し、塩化ナトリウム、塩化マグネシウムの溶液をそれぞれ100mM、1mMの濃度まで添加した。ゲル化を防ぐため90℃で測定を行った。装置はJEOL α -400を使用した。

ゲル試料：10%のゲランガムをオートクレーブにて1時間加熱し溶解した。塩化ナトリウム、塩化マグネシウムをそれぞれ100mM、1mMまで添加し十分冷却し、ゲルを得た。装置はJEOL EX-400、Chemagnetics CMX-300を使用した。測定には¹³C-CPMAS法(積算：2000-10000回、コンタクトタイム8msec)と¹H-CRAMPS法を用いた。

〔結果と考察〕

1.ゲランガムの溶液構造

溶液試料を用いて¹³C、¹Hスペクトルの帰属を行った。帰属にはDQF-COSY, C-H COSY, COLOC, HOHAHA, NOESY, 1D-HOHAHAを用いた。

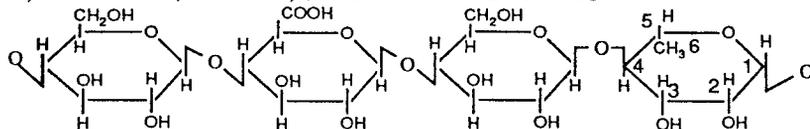


Fig.1 Gellan gum : β -D-glucose1 β -D-glucuronic acid, β -D-glucose2, α -L-rhamnose

Na⁺添加、Mg²⁺添加、カチオン添加なしの3種類の溶液試料について¹³C化学シフトの変化を調べた。90℃ではこれら3種の試料に有意な化学シフト差(～0.1ppm)は観測されなかった。50℃でも同じく化学シフト差はみられなかった。これらから、溶液中のゲランガムはカチオンに影響されるような構造変化を受けないと考えられた。

次にゲルと溶液の¹³C化学シフトを比較した。各糖残基のC(1)とC(4)の化学シフトに有意な変化が観測された。これは1-4グリコシド結合のねじれ角の変化によるものと考えられ²⁾ 溶解状態にあるゲランガム分子はゲルを形成することでその二次構造を変えることが示唆された。

固体高分解能¹³C NMR、ゲル、多糖、

てしま しほ、 さいとう こうじ

2. グランガムハイドロゲルの構造

Fig.2, Fig.3に3種のゲル試料の ^{13}C -CPMASスペクトルを示す (Na^+ 添加、 Mg^{2+} 添加、カチオン添加なし)。これらからゲル試料はいくつかのピークの線形に変化があるとわかり、そのピークの帰属をTable1に示した。その結果、ラムノースに対応するピークはカチオン添加による変化が顕著であった。また、ゲルを風乾した試料ではラムノースのC(1)だけが化学シフト変化を示した。ラムノースは糖鎖中唯一の疎水基としてメチル基をもつことから、水素結合網の変化をうけやすいと考えられる。また、カチオンの添加による変化がラムノース領域に多く観測されることは、カチオンは糖鎖の高次構造変化に影響することを示唆すると考えられた。

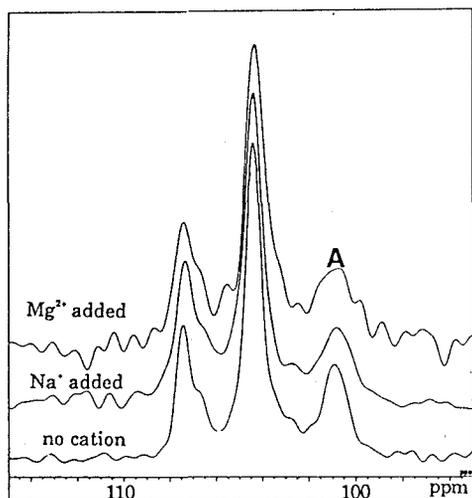


Fig.2 ^{13}C -CPMAS spectra of gellan gum (anomeric region)

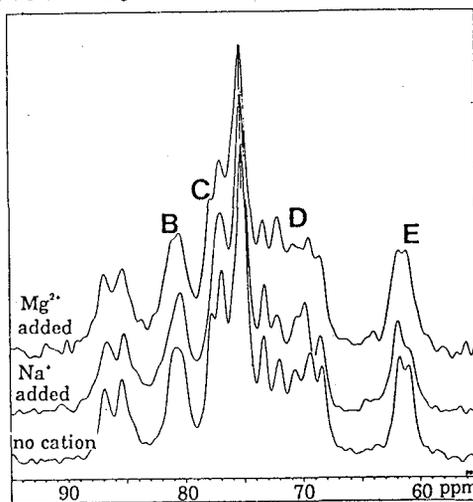


Fig.3 ^{13}C -CPMAS spectra of gellan gum (55-95ppm)

次に、グルクロン酸のカルボキシル基とイオンの配位の可能性について乾燥したゲル試料を用いて検討した。ゲル化を受けない粉末試料についてはカルボキシルプロトンが観測されず、糖鎖は特定の構造をとっていないと推定されたが、ハイドロゲルについてはカチオンの添加により異なる化学シフトを示した。このことはカチオン添加がグルクロン酸のカルボキシル基を含む糖鎖水素結合網に影響することを示唆する。

Table 1 peak assignments of gels that were induced by cation addition

peak	chemical shift	peak assignment
A	102 ppm	C(1) of rhamnose
B	82 ppm	unassigned
C	78-79 ppm	C(5) of glucose 1, 2 or glucuronic acid
D	71-74 ppm	C(2,3,5) of rhamnose, or C(4) of glucose1
E	62 ppm	C(6) of glucose2

[結論] グランガムではゲル化に伴う構造変化は溶液からゲルへのゲル生成時に起こり、主に二次構造変化が引き起こされると考えられた。この時添加カチオンはカルボキシル基の相互作用やラムノースといった疎水性領域に変化を与え、糖鎖の水素結合網を含む高次構造に影響することが示唆された。

[謝辞] CMX-300NMR分光器の測定に協力をいただきました日本電子(株) 杉沢寿志氏に感謝致します。

[参考文献]

- 1) 大橋司郎ら、フードケミカル、1986-12、61-68
- 2) John A. Ripmeester, Journal of Inclusion Phenomena, 4, 129-134 (1986).
- 3) Hazime Saito, Biopolymers, 31, 933-940 (1991).

P 73 **ゼオライト中のナトリウム金属クラスターの
固体 MAS NMR による研究**

(阪大理*、National Research Council of Canada)
○中山尋量*、D.D. Klug, C.I. Ratcliffe, J.A. Ripmeester

Sodium Metal Clusters in Zeolite as Studied by MAS NMR

Hirokazu Nakayama,* Denis D. Klug, Chris I. Ratcliffe and
John A. Ripmeester

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University,
Toyonaka, Osaka, Japan 560**

and

*Steacie Institute for Molecular Sciences, National Research Council
of Canada, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0R6*

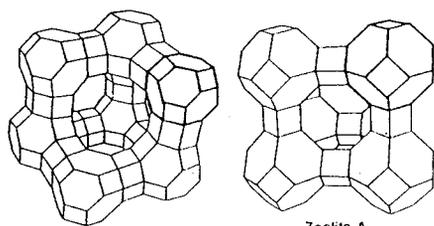
^{23}Na MAS NMR methods were used to search for new Na species in dehydrated NaY and NaA zeolites loaded with alkali metals by vapor deposition. In Na-loaded Y zeolites a signal near +50 ppm was attributed to a diamagnetic species, most probably located in the sodalite cage. As the level of metal-loading increases, the signal intensity first increases, and then decreases in much the same way as that of the EPR signal attributed to the paramagnetic Na_4^{3+} cluster observed for the same sample. In NaA zeolite loaded with potassium metal a signal observed at -65 ppm in both static and spinning samples was attributed to the sodide ion, Na^- .

はじめに Kasai は、1965 年に NaY ゼオライトに X 線を照射するとゼオライトが着色することを発見した¹⁾。ESR 測定から、ゼオライト中の Na^+ が部分的に還元されて Na_4^{3+} クラスターを形成することが明らかになった。翌年 Rabo らは、同じクラスターが、NaY ゼオライトにナトリウム金属蒸気を作用させても生成することをみつけた²⁾。Edwards らはこの系を ESR によって詳細に調べ、 Na_4^{3+} クラスターがゼオライトの β cage (Fig. 1) の中でできていること、すなわち、 β cage をもたないゼオライトではこの反応は起こらないことや、NaX, NaA ゼオライトでは、

ゼオライト、アルカリ金属クラスター、 ^{23}Na MAS NMR

○なかやま ひろかず、デニス クルグ、クリス ラットクリフ、ジョン リップミースター

Na_5^{4+} や Na_6^{5+} クラスターの形成を発見した³⁾。この研究に端を発し、さまざまな観点から多数の研究が最近なされている。例えば、金属原子でゼオライト cage 中



Faujasite (zeolites X and Y)

Zeolite A

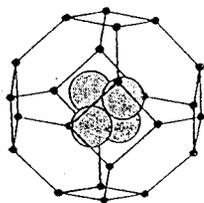


Fig. 1 Structures of Zeolites NaY and NaA (Top); Thick lines shows β cage. Na_4^{3+} in β cage (Bottom).

を周期的に修飾することによって電気的性質やその光学的性質に量子効果 (Quantum Confinement) の発現を期待する研究、また非常に均一に金属を分散させた触媒としての特性⁴⁾などが関心を集めている。

しかしながら、まだまだ疑問点も多い。例えばクラスターは β cage のなかに存在すると考えられているが、X線回折で直接確かめられたわけではなく、触媒作用を調べた論文ではそれに異議を唱えるものもある⁴⁾。また、なぜ NaY と NaX では生成するクラスターが異なるのか、あるいは常磁性のクラスターが存在するにも拘わらず鋭い (幅の狭い) ^{23}Na NMR 信号が観測されているのはなぜかといった点は説明されていない⁵⁾。

本研究では、クラスター形成に伴う構造変化を調べるプローブとしてナトリウム核の有用性を検討した。そして ^{23}Na MAS NMR 法を用いて、いくつかの新しい化学種を発見したので報告する。

実験 生成物は、空気にふれるとすぐ分解する (酸素と水の影響) ので、石英の反応セルに 5 mm のサイドアームを取り付けたセルを製作した。サイドアームは石英製の ESR チューブを用い、同じ試料で NMR と ESR の測定を可能にすると共に Na NMR 測定の際にバックグラウンドスペクトルにガラスのナトリウムピークが出ないようにした。このセルに市販 (Union Carbide) の合成ゼオライト NaY (または NaA) を入れ 500 °C、 1×10^{-6} Torr の条件下で一昼夜脱水した。次にそのセルに既知量の金属ナトリウム (またはカリウム) を入れ、再び 1×10^{-6} Torr に排気し封じ切った。これを 250 °C (カリウムの場合は 200 °C) の電気炉の中に入れ、数日間反応させた。得られた試料は、反応セルから直接サイドアームに移し封じ切った。

^{23}Na , ^{27}Al MAS NMR の測定は Bruker MSL-200 および AMX-300 を使用した。石英チューブに封じ切った試料の MAS NMR の測定をするため Chemagnetics の CP/MAS プローブを使用した。

結果 ナトリウムを作用させた NaY ゼオライトの ^{23}Na MAS NMR のスペクトルを Fig. 2 に示す。 Na^+ のピークがいずれの試料でも -10 ppm に観測される。それに加えて、 $x = 8, 11$ では、+50 ppm に新たなピーク (*) が見られる。 ^{27}Al MAS NMR のスペクトルはナトリウムを作用させてもゼオライト骨格は変化しないことを示しており、ゼオライトの分解などによるものではない。このピークは static

試料では観測されず (Fig. 2f)、MAS の実験で初めてみつけたものである。ケミカルシフトの値は、磁場が 4.7 T でも 7.0 T でも変化がないことから二次の四極子効果ではなく、新たな化学種によるケミカルシフトであることを示している。通常の ^{23}Na のケミカルシフト値 (10 ~ -20 ppm) から大きくはずれており、常磁性クラスターと何らかの関係があると考えられる。実際、このピークは Na_4^{3+} による 13 本の ESR スペクトルの現れる x の領域に現れる。仮に、このシグナルが Na_4^{3+} クラスターによるものであるとすれば、その常磁性シフトの影響は、

$$\Delta B/B = -g \mu_B S(S+1) a_N / 3g_N \mu_N kT$$

から見積もることができる。しかしながら、計算値は、金属ナトリウムのナイトシフト (+1126 ppm) よりも遙かに大きく、+50 ppm よりも 2 桁大きい。したがって、このシグナルは Na_4^{3+} によるものではない。そこでこの信号が新たな反磁性クラスター Na_m^{n+} (n+m even) による可能性を考えてみる。 Na_m^{n+} が α cage (NaY 中の一番大きな cage; Fig. 1) に存在するとすれば、 β cage 中の Na_4^{3+} との相互作用が生じる。相互作用の大きさとして金属ナトリウムと反応させたソーダライトの ESEEM から見積もった超微細結合定数 0.1 mT⁶) を用いると、上の式から常磁性シフトとして +30 ppm と妥当な値が得られる。ただし、式の上では常磁性シフトの大きな温度依存性が観測されるはずであるが 200 K でもシフト値に変化はなかった。したがって単純な常磁性シフトでは説明できないが、反磁性クラスターと Na_4^{3+} の相互作用による可能性は高い。

図 3 にカリウムを反応させた NaA ゼオライトの ^{23}Na MAS NMR のスペクトルを示す。NaA では、-14 ppm に Na^+ のピークが観測される。このピークは、反応させるカリウムの量を増やしてゆくと x = 169 では 0 ppm まで

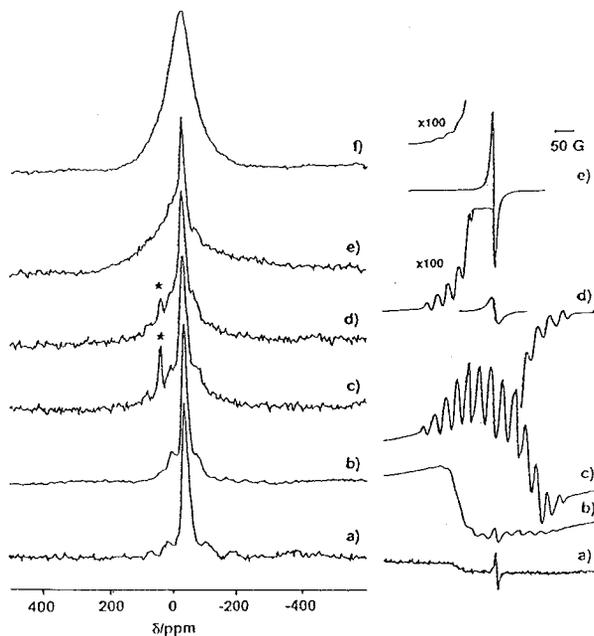


Fig. 2 ^{23}Na MAS NMR (left column) and ESR (right column) of NaY zeolites loaded with increasing quantities of Na metal vapor, x equals the number of Na per unit cell; (a) x=0, (b) x=3, (c) x=7, (d) x=11, (e) x=22, (f) x=7 (static sample).

常磁性シフトする。これは、 β cage に形成されている Na_4^{3+} との相互作用で、 Na^+ のピークが常磁性シフトしたためと考えられる。 $x = 98, 169$ では、 -65 ppm にシャープなピークが現れる。 ^{27}Al MAS NMR のスペクトルは、ナトリウムを作用させても僅かな常磁性シフトが観測されるのみでゼオライト骨格が変化することはないことを示している。したがって、このピークは、ゼオライトの分解などによるものではない。クラウンエーテルなどにとりこまれた Na^+ などの信号は $-58 \sim -63$ ppm の領域に観測されるので、このピークはゼオライト中に存在する Na^+ に帰属できる。ゼオライト中のカチオンは、アルカリ金属により部分的に還元されてクラスターを形成するが、この試料では、大過剰のカリウムの存在下で還元が更に進んだ可能性が高い。X線構造解析によると大過剰のカリウム ($x = 169$ に対応する) と反応させた NaA では、 Na^+ は K^+ と完全に置換して KA ゼオライト中に K_4^{3+} の生成が報告されている⁷⁾。しかしながら同じ条件で反応させた

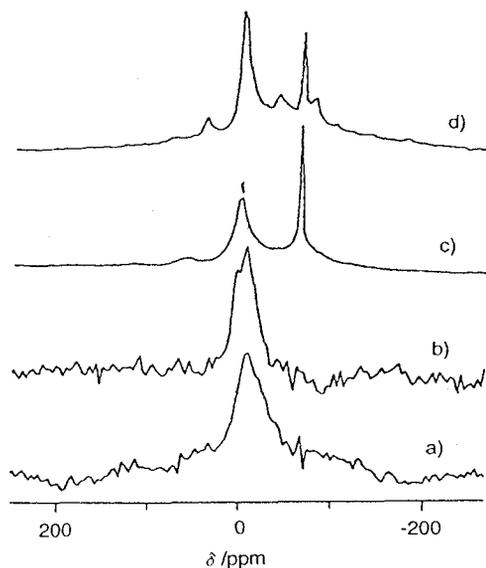


Fig. 3 ^{23}Na MAS NMR of NaA zeolites loaded with increasing quantities of K metal vapor, x equals the number of K per unit cell; (a) $x=0$, (b) $x=6$, (c) $x=88$, (d) $x=169$.

今回の試料 (ただし X線構造解析では単結晶を用いている) では、大きな ^{23}Na の信号が観測されており、完全に K^+ と交換した可能性は低い。

ゼオライト中の金属クラスター形成に伴う構造変化のプロブとしてナトリウム核を検討し、その有用性を確認した。 ^{23}Na MAS NMR 法によりゼオライト中に新たな化学種を発見し、アルカリ金属を作用させたゼオライトは、ESR で確認された常磁性クラスター形成だけでは説明されないことがわかった。

References

- 1) P.H. Kasai, *J. Chem. Phys.*, **43**, 3322 (1965).
- 2) J.A. Rabo, C.L. Angell, P.H. Kasai and V. Schmaker, *Discussion Faraday Soc.*, **41**, 329 (1966).
- 3) M.R. Harrison, P.P. Edwards, J. Klinowski, J.M. Thomas, D.C. Johnson and C.J. Page, *J. Solid State Chem.*, **54**, 331 (1984); P.A. Anderson and P.P. Edwards, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10608 (1992).
- 4) L.M.R. Martens, P.J. Groblet and P.J. Jacobs, *Nature*, **315**, 568 (1985).
- 5) E. Trescos, F. Rachdi, L.C. Menoval, F. Fajula, T. Nunes and G. Feio, *J. Phys. Chem.*, **97**, 11855 (1993).
- 6) R.E.H. Breuer, E. Boer, G. Geismar, *Zeolites*, **9**, 336 (1988).
- 7) T. Sun and K. Seff, *J. Phys. Chem.*, **97**, 10756 (1993).

固体高分解能NMRによるPt/Al₂O₃表面の
吸着分子種の検出の試み

(阪大理・リバプール大*)

○宮城 慧、中山 尋量、江口 太郎、中村 巨男、

J.A. Iggo*, B.T. Heaton*

Detection of Adsorbate on Pt/Al₂O₃
by Solid State High-Resolution NMR

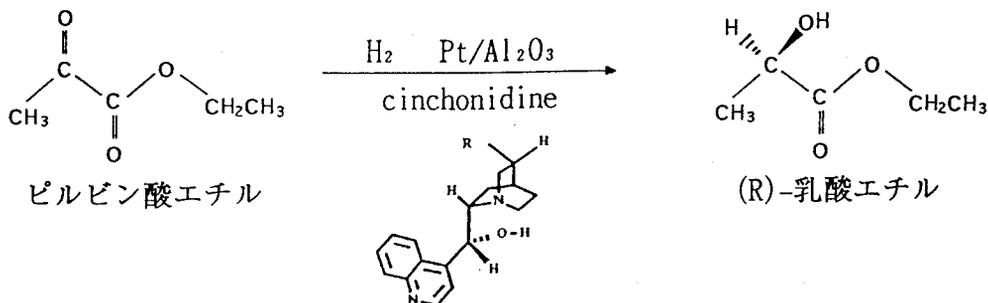
○ Kei Miyagi^{a)}, Hirokazu Nakayama^{a)}, Taro Eguchi^{a)}, Nobuo Nakamura^{a)},
J.A. Iggo^{b)} and B.T. Heaton^{b)}

a) Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University

b) Department of Chemistry, University of Liverpool, UK.

In order to obtain microscopic information about the structure and the adsorption state of adsorbates on the enantioselective Pt catalyst we tried to observe ¹³C CP/MAS and ¹H MAS NMR spectra of ethyl pyruvate on Pt/Al₂O₃ and on Al₂O₃. Very broad ¹H static and MAS spectra were attributed to the adsorbate molecules. ¹³C CP/MAS spectra on both catalysts resemble each other. These spectra differ considerably from the ¹³C spectra of pure ethyl pyruvate but are very similar to that of ethyl lactate. This fact suggests strongly that the hydrogenate reaction of ethyl pyruvate takes place on Al₂O₃ regardless of the existence of activated platinum.

Pt (5%)/Al₂O₃にシンコニジンを吸着させた触媒を用いて、ピルビン酸エチルの水素化反応を行うと、(R)-乳酸エチルが選択的に生成する。^{1) 2)}



CP/MAS, 立体選択性触媒, Pt/Al₂O₃, 吸着

○みやぎ けい、なかやま ひろかず、えぐち たろう、なかむら のぶお、ジョン イゴ、ブライアン ヒートン

このような立体選択性触媒を用いた反応の反応機構に関する実験的^{3) 4)}、理論的⁵⁾研究が盛んになりつつあるが、反応機構を知るためには触媒表面の吸着分子種の構造や分子種間の相互作用をミクロな立場から調べることが不可欠である。具体的には、次の二つの問題点が考えられる。

1. シンコニジンがPt表面にどのように吸着しているか?
2. 不斉水素化反応が起こるとき、シンコニジンとピルビン酸エチルはどのような状態(相対配置)をとり、水素はどこから近づくのか?

本研究では、このような問題を取り上げるための予備実験としてピルビン酸エチルのPt表面における吸着状態を¹³C CP/MAS 及び¹H MAS NMRで調べた。

実験

Pt(5%)/Al₂O₃を水素ガスを流しながら400℃まで加熱、活性化し、これを脱ガスしたピルビン酸エチルのエタノール溶液(10%)に水素雰囲気下で30分浸した。その後上澄みを抜き取り、1時間減圧(10⁻²~10⁻³Torr)乾燥した。触媒による酸化反応を防ぐため、試料は窒素雰囲気下でMASローターに詰めた。¹³C CP/MAS 及び¹H MAS NMR スペクトルをBruker社製 MSL200型分光計により測定した。Pt表面の効果をみるために同様の操作及び測定を白金を含まないAl₂O₃粉末についても行った。また溶媒のスペクトルを区別するため、エタノール、トルエンのみを吸着させた試料についても同様の実験を行った。

結果と考察

¹H static NMRでは、いずれの試料についても幅広い(>10kHz)ピークのみが観測され、溶媒による鋭いピークは見られなかった。このことからPt/Al₂O₃(およびAl₂O₃)に吸着した分子種のみがNMRで観測されていることがわかる。¹H MAS NMRのスペクトルはstaticに比べてやや鋭く(5~10kHz)なった。しかし、ピーク位置から正確に化学種を同定するのは困難であった。

溶媒のエタノールあるいはトルエンを吸着させた試料の¹³C CP/MASスペクトルは単純である。エタノールはPt/Al₂O₃、Al₂O₃に吸着させても液体と同じ位置に鋭いピークが観測された。一方、トルエンはPt/Al₂O₃に吸着させると水素化してメチルシクロヘキサンになるが、Al₂O₃の場合はトルエンのままである。いずれのピークも鋭く、化学シフトの値は液体と同じである。トルエンは触媒によって水素化されることがわかったので、以後の試料調製にはエタノールを溶媒として用いた。

ピルビン酸エチルを吸着させた試料のスペクトルは複雑である。ピルビン酸エチルをPt/Al₂O₃とAl₂O₃に吸着させた試料の¹³C CP/MASスペクトルをそれぞれ図1(a), (b)に示す。比較のために、ピルビン酸エチルと乳酸エチルの¹³C スペクトルを図1(c), (d)に示す。ピルビン酸エチルをPt/Al₂O₃に吸着させた試料(a)では、カルボニル炭素による2本のピーク(161, 192 ppm)(c)が消え、新たに175 ppm付近に強く幅広いピークが現れた。Al₂O₃に吸着させた試料のスペクトル(b)とPt/Al₂O₃の場合(a)を比較すると、強度の強いピーク(12, 22, 60, 82, 175 ppm)は(a)、(b)のどちらにも観測された。これらのスペクトルのパターンは乳酸エチルのもの(e)に非常に似ているので、(a)、(b)のスペクトルはピルビン酸エチルが水素化されて生成した乳酸エチルによるものであると考えられる。しかし、カルボニル基がAl₂O₃表面に吸着したためカルボニル炭素による2本のピークがシフトし、1本のピークになった可能性も完全には否定できない。また(a)、(b)両者には幾つかの違いがみられる。Pt/Al₂O₃に吸着させた試料のスペクトル(a)にはAl₂O₃の場合(b)には見られなかったピークが43 ppmと67 ppmに観測された。またAl₂O₃(b)では、96, 120 ppmにPt/Al₂O₃(a)に見られないピークが現れた。これらのことから、Al₂O₃上ではPt微粒子の存在にかかわらずピルビン酸エチルの水素化がおこるのか、あるいはAl₂O₃には他の化合物(微量の不純物)が吸着しているのか、というようにいくつかの問題が生じる。

References

- 1) Y. Orito, S. Imai and S. Nitta, *J. Chem. Soc. Jpn.*, **1979**, 1118.
- 2) Y. Orito, S. Imai and S. Nitta, *J. Chem. Soc. Jpn.*, **1980**, 670.
- 3) J. T. Wehrli, A. Baiker, D. M. Monti, H. U. Blaser and H. P. Jalett, *J. Mol. Catal.*, **57**, 245(1989).
- 4) R. L. Augustine, S. K. Tanielyan and L. K. Doyle, *Tetrahedron Asymmetry*, **4**, 1803(1993).
- 5) O. Schwalm, B. Minder, J. Weber and A. Baiker, *Catal. Letters*, **23**, 271(1994).

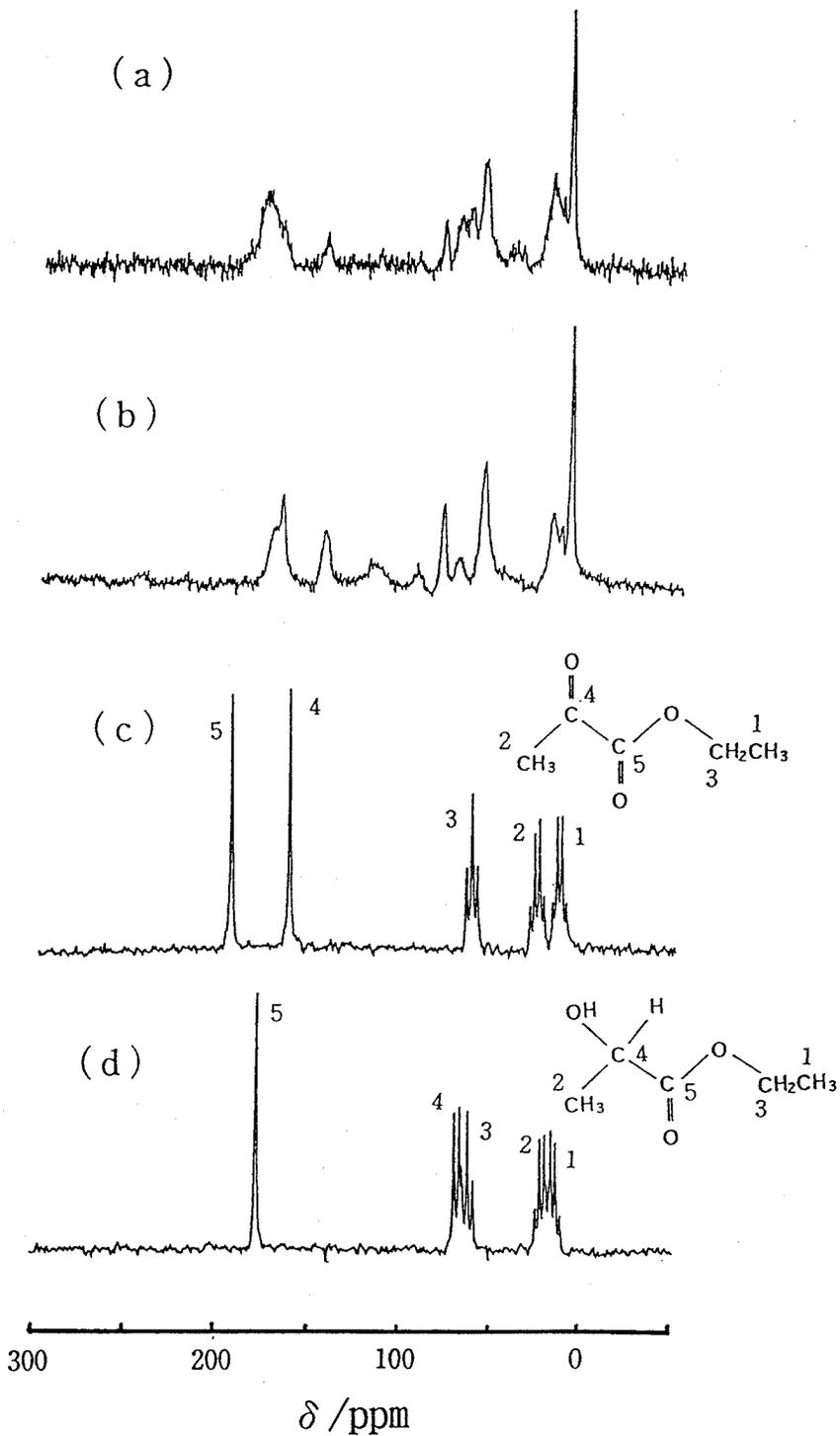


Fig.1. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of ethyl pyruvate on (a)Pt/ Al_2O_3 , (b) Al_2O_3 and ^{13}C NMR spectra (without decoupling) of neat liquids of (c)ethyl pyruvate, (d)ethyl lactate.

P 75 固体高分解能¹⁰⁹Ag NMRスペクトルを用いた銀(I)錯体の研究(III)

本田 憲治¹ 前川 雅彦² 北川 進¹ 川田 知¹ 近藤 満^{1,2}

*1東京都立大学 理学部 *2近畿大学 理工総研

High Resolution Solid State ¹⁰⁹Ag NMR Spectra of Silver(I) Complexes

Kenji Honda,¹ Masahiko Mackawa,² Susumu Kitagawa,¹ Satoshi Kawata,¹
and Mitsuru Kondo¹

(¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, ²Research Institute for Science and Technology, Kinki University)

High resolution Solid state CP/MAS ¹⁰⁹Ag NMR spectra of various silver(I) pyridine complexes and some silver(I) polynuclear complexes were measured. The pyridine complexes mainly show the downfield shifts with increasing pka value, but in detail observation, upfield shifts with decreasing π^* level were observed. This indicate that either π and σ mechanism play important role in this system. Spectra obtained on silver(I) polynuclear complexes which had been characterized by X-ray crystallography are very sensitive to the structure around the silver atom.

【序論】 近年、種々の多核錯体や金属クラスターの合成がなされており、それらが特異的な反応や種々の優れた物性を有するため各種分野から注目を集めている。このような化合物の構造や電子状態などを明らかにする手段として様々な分光法が用いられているが、中でも金属核高分解能NMR法は錯体を構成している中心金属の状態を、直接的かつ非破壊的に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、銀(I)錯体は銀の優れた光学的特性や固体中のイオン伝導性などの興味ある特性により各種分野から注目されている錯体であり、これまで単核のみならず銀クラスターを含む多核錯体の合成が行なわれている。しかし、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。これは主に次の三つの理由によるものである。第一に、Ag核には¹⁰⁷Agと¹⁰⁹Agがあるが、いずれの核も極めて低い共鳴周波数を持つために感度が非常に悪い。第二に緩和時間が極めて長いいため積算に多大な時間がかかりFT法のメリットが生かせない。

[銀(I)錯体、¹⁰⁹Ag NMR、固体高分解能NMR、ピリジン誘導体、銀-配位子結合性]
ほんだけんじ、まえかわまさひこ、きたがわすすむ、かわたさとし、
こんどうみつる

第三に Ag 錯体は一般に labile であるため、溶液中では常に配位子の置換が起こっており、その結果、ケミカルシフトは各化学種の平均化したものを与える。このため、温度、濃度、溶媒などに対する依存性が非常に大きく明確な化学シフト値を求めることができないことが多い。その他にハードウェアの観点から、パワーアンプやプローブの特殊性により観測ユニットが汎用機種として市販されていないことも上げられる。

本研究では、このような特徴を有する銀(I)錯体の NMR 測定手段として固体高分解能 ^{109}Ag NMR を用いた。この手法では、錯体を固体状態で測定するため、溶液状態でのような化学交換が起こらず、温度や濃度に対する依存性がないため、明確なシフト値を求めることができる。さらに CP 法を用いることにより理論的には 20 倍以上の感度向上が見込まれる上に、繰り返し時間を劇的に短くすることができる。このようにして、直線二配位構造を有する各種ピリジン錯体について固体高分解能 ^{109}Ag NMR を測定し、金属-配位子結合性について考察した。また、いくつかの多核銀錯体について測定を行い、そのシフト値と結晶構造との相関について考察した。

【実験】 ピリジン錯体 各種ピリジン錯体に関しては既知の方法により合成し、元素分析により同定した。これらのピリジン錯体のうちいくつかのメチル置換体に関しては単結晶 X 線構造解析により構造を決定した。

多核銀錯体 測定を行った多核錯体を Table 1 に示す。このうち二核錯体は既知化合物であり、それ以外のポリマーについては単結晶構造解析により自ら構造を決定したものである。二核錯体については元素分析により、それ以外のものは粉末 X 線解析により同定した。

装置 固体 ^{109}Ag NMR 測定を行なうために固体低周波数プローブを試作した。

おもな点は以下の様である。(a) プローブ部に高耐圧、大容量小型可変コンデンサーを組み込む、(b) パワーアンプ、プローブ、プレアンプ間を結合させる低周波数用方向性結合器、(c) 二重共鳴系のチューニング問題の解決を計った。(d) ローター径を 7 mm Φ にしてサンプル量を増やした。装置は JEOL GSX270 スペクトルメータを用いた。

測定 観測周波数 12.620 MHz、観測幅 20000 Hz、point 数 8192、delay time 60 ms、dead time 20 ms、パルス幅 8 ms にて測定を行った。サンプルは試料の密度によって 0.25 g-0.35 g (ローターに入る最大量) を用いた。ハートマン-ハーンの設定は酢酸銀で設定しその他のサンプルも同じ条件で測定した。ただし、接触時間と繰り返し時間はそれぞれのサンプルによってそれぞれ 10-50 ms、10-20 s の範囲で設定した。シフト基準には 1 M AgClO_4 を用いた。

Table 1 Solid ^{109}Ag NMR Chemical Shifts of Silver(I) Polynuclear Complexes

complex	$\delta(^{109}\text{Ag}, \text{ppm})^*1)$
<i>dimer</i>	
$[\text{Ag}_2(\text{Formamidine})_2]$	612
$[\text{Ag}_2(\text{Naphthyridine})_2][\text{PF}_6]_2$	307
<i>hexamer</i>	
$[\text{Ag}_6(4,6\text{-Me-mpym})_6]^*2)$	994
<i>polymer</i>	
$[\text{Ag}_4(\text{mpy})_4(\text{PF}_2\text{O}_2)_3][\text{PF}_6]_n^*3)$	741, 797, 831
$[\text{Ag}_2(\text{DHBO})_n]^*4)$	236
$[\text{Ag}_2(\text{CA})_n]^*5)$	146
$\{[\text{Ag}(\text{Dipyridyl amine})][\text{PF}_6]_n$	232

*1) Observed solid ^{109}Ag NMR chemical shifts from 1.0 M AgClO_4 aqueous solution as a reference.

*2) mpym: 2-Mercaptopyrimidine

*3) mpy: 2-Mercaptopyridine

*4) DHBO: Dihydroxybenzospinone

*5) CA: Chloranilic acid

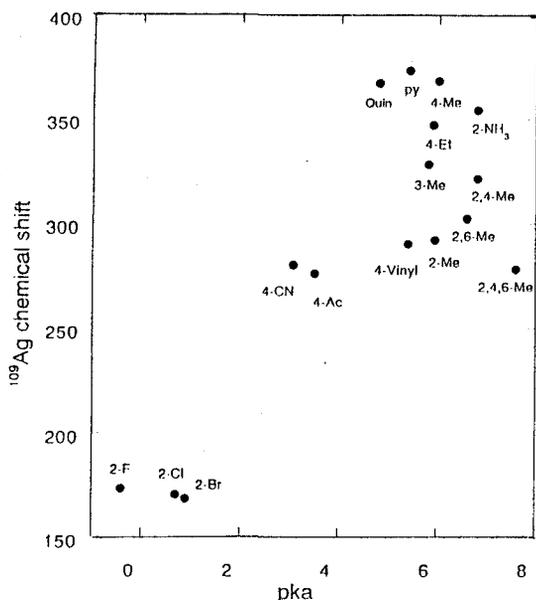


Figure 1 Correlation of observed ^{109}Ag NMR chemical shift with pK_a values of the ligands

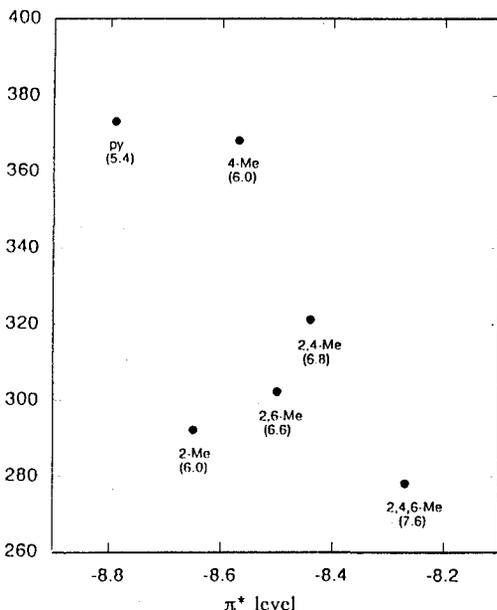


Figure 2 Comparison between $\pi^*(b_1)$ level and ^{109}Ag NMR chemical shift of silver(I) complexes

【結果および考察】 ピリジン錯体 様々な直線二配位型ピリジン錯体について ^{109}Ag NMR測定を行った。得られたシグナルはいずれも一つのメインピークといくつかのサイドバンドからなっており、メインピークの線幅は150-300Hzであった。錯体のアニオンはすべて銀に配位しない PF_6^- とした。これはアニオン効果を防ぐためである。Figure 1に測定したピリジン錯体の ^{109}Ag NMRシフト値と配位子の pK_a との相関について示した。この図を見ると第一次近似としては、配位子の pK_a の上昇に従い化学シフトも低磁場側にシフトしている。しかし、詳細に検討すると同種置換基を持つ配位子ではかなりの逆転傾向が見られる。そこで、メチル置換基を持つ配位子について、配位子の π^* レベルと化学シフトの相関を調べた。その様子をFigure 2に示す。この図を見ると相対的には、配位子の π^* レベルが下がるにつれ化学シフトも高磁場側にシフトしていると考えられる。ただしここで2位や6位への置換基の導入による立体効果についても考慮しなければならない。これは ^{113}Cd NMRでは見い出されている¹⁾この立体効果は金属-配位子間の結合を弱める方向に働く。そこでこれらの錯体について各々単結晶構造解析を行い結合距離、角度を比較した。Table 2にその結果を示す。この結果から置換基の導入により若干結合距離がのびる傾向はあるが、化学シフトに大きな影響を与えるほどのものではないと判断した。以上の結果からこの系における ^{109}Ag NMRシフト値の機構について以下のように考えられる。Agの化学シフトは配位子の電子供与性(σ 機構)と電子受容性(π 機構)の双方の寄与が考えられている²⁾。配位子の pK_a の上昇に従い化学シフトが低磁場側にシフトする傾向は σ 機構が支配的であるといえる。しかしながら、pyと2,4,6-Me-pyで約100ppmもシフト差があることからわかるように、Me導入による π^* 準位の変化にともなう π -back bondingが弱まることから生じる高磁場シフト(π 機構)も少なくない寄与があるといえる。

このように σ 機構と π 機構が同時に存在すること、有機配位子、特に π 構造を持つものでは π 機構が重要になってくる事が理解される。

多核銀錯体 Figure 3に $[\text{Ag}_2(\text{DHBQ})]$ の単結晶構造を示す。このようにDHBQの二つのO原子が架橋配位した三次元配位高分子を形成している。これに対して $[\text{Ag}_2(\text{CA})]$ では大きなCl原子の立体障害のためにCAの四つのO原子全てが架橋配位した構造をとっている。

$[\text{Ag}_2(\text{DHBQ})]$ ではAg原子は歪んだ三配位構造をとっており四つめのO原子が弱く結合しているが、 $[\text{Ag}_2(\text{CA})]$ では歪んだ平面四配位構造をとっている。Figure 4にそれぞれの ^{109}Ag NMRスペクトルを示した。 $[\text{Ag}_2(\text{CA})]$ はHが無いため積算に多大な時間がかかるのに対し、 $[\text{Ag}_2(\text{DHBQ})]$ はAg-H距離が2.66 Åと非常に短いためCP法により短時間で良好なS/Nのスペクトルを得ることができた。それぞれの化学シフト値は146ppm, 236ppmでこれは、配位数が大きくなるほど低磁場シフトするという傾向と一致している。Table 2の $\{[\text{Ag}_4(\text{Mcr})_4(\text{PF}_2\text{O}_2)_3](\text{PF}_6)\}_n$ はAgとSからなる八員環が重なったカラム型構造をとっており、四つの非等価なAg原子を持っている。スペクトルを見ると三つのシグナルが2:1:1の比で現れており、四つのAg原子のうちの一組は磁氣的に似た環境にあることがわかる。このように ^{109}Ag NMRは固体状態の銀の状態を鋭敏に反映して観測しうることが、これを例に良く理解され、錯体、無機化学の分野のみならず、固体材料の分野への応用についても有用であるといえる。

Table 2 Ag-N distance and N-Ag-N angles of silver(I) pyridine complexes

Compound	d(Ag-N)	(N-Ag-N)
$[\text{Ag}(\text{2-Me-Py})_2]\text{PF}_6$	2.120(4), 2.118(4)	178.1(2)
$[\text{Ag}(\text{2,4-Me-Py})_2]\text{PF}_6$	2.131(9)	174.1(9)
$[\text{Ag}(\text{2,6-Me-Py})_2]\text{PF}_6$	2.144(6)	179.8(4)
$[\text{Ag}(\text{2,4,6-Me-Py})_2]\text{PF}_6$	2.140(7)	180.0

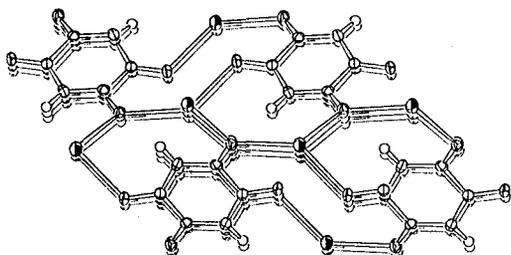


Figure 3 The structure of $[\text{Ag}_2(\text{DHBQ})]_n$

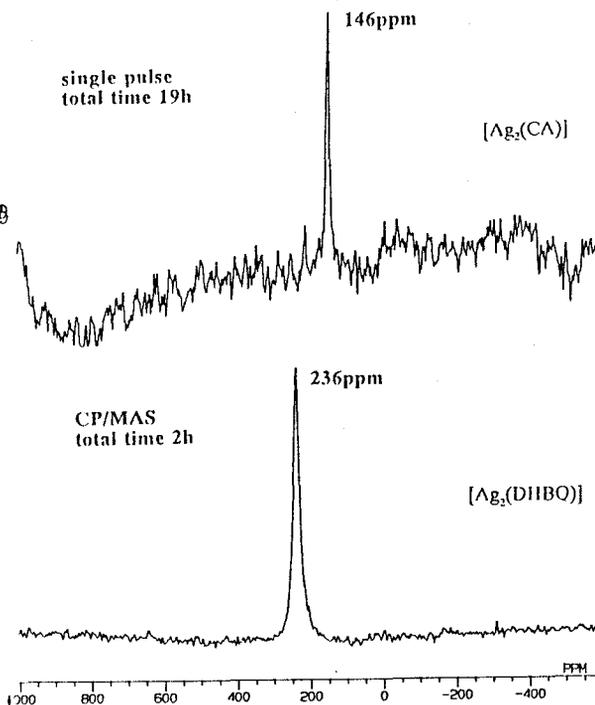


Figure 4 ^{109}Ag NMR spectra of silver(I) polymer

(1) M. Munakata, S. Kitagawa, F. Yagi,
Inorg. Chem., **25**, 964 (1986)

(2) H. Nakatsuji, K. Kanda, K. Endo, and
T. Yonezawa, J. Am. Chem. Soc.,
106, 4653 (1984)

Structural Study on Cardo-type polyimides by ^{15}N Solid-State NMR

Okaji Saito, Shiho Teshima, Masaaki Shinohara, Moriaki Hatakeyama and Koichi Fujishiro
Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

We developed fluorene-based cardo polymers which had an excellent permselectivity for oxygen permselective property. In last the 32nd NMR conference, we showed that gas separation prospectively depended on the molecular vibration about 10^{-8} sec of time scale by ^{13}C Solid-State NMR. And then, we measured a series of cardo-type polyimides by ^{15}N Solid-State NMR, as looking for the reason of gas separation mechanisms. The ^{15}N chemical shift parameters at imide nitrogen had a good correlation to the gas separation coefficient of this series of polymers. Therefore, gas permselectivity for oxygen permselective property mainly depends on the three dimensional structure of this cardo-type polyimides.

1. 緒論

当社が開発しているカルド構造を持つポリイミドは、耐熱性が高いだけでなく、酸素/窒素のガス分離性及びガス透過性にも優れている。我々は、フィルム状のカルド型ポリイミドの T_g に代表される運動性が、ガスの透過性を支配していることを ^{13}C -CPMAS法にて明らかにした¹⁾。しかし ^{13}C の化学シフト等からは、ガスの分離性についての機構解明をすることはできなかった。そこで ^{15}N の化学シフトが構造に非常に敏感²⁾で且つそのシフト幅が ^{13}C と比較して非常に大きいことから、ポリイミドのイミド部分を ^{15}N -CPMAS法にて測定・解析することとした。一般に ^{15}N は磁気回転比が小さくまたその天然存在比も低いことから、天然存在下での測定は困難な場合が多く、特にイミド化合物は周辺に水素核が存在しないため、過去測定例はほとんどなかった³⁾。そこでコンタクトタイムと待ち時間(h°N と h°N の繰り返し時間)の適正な条件の確立を図った。その条件を活用して種々のフィルム状のカルド型ポリイミドの測定・解析を実施し、ガスの分離性と構造の関係についていくつかの知見を得たので報告する。

2. 試料と実験

(1) 試料

^{15}N ラベル(99%)されたフタルイミドカリウムはISOTEC社製のものをそのまま用いた。種々のフィルム状カルド型ポリイミドはそのまま6φジルコニア製試料管に挿入し、測定した。

(2) 実験

装置はスピコントローラーを付帯した日本電子(株)製EX400型スペクトロメータ(^{15}N : 40.45 MHz)を使用した。回転数は5.0 KHz, 温度は室温で測定された。化学シフトの基準は外部基準として NH_4Cl を18.0 ppmとした。典型的な測定条件はスペクトル幅: 3 KHz, データ点数: 2 K点, フーリエ変換点: 8 K点, 90度パルス: 4.1 μsec , 繰り返し時間: 30秒, コンタクトタイム: 20 msec, ^{15}N ラベルされたフタルイミドカリウムの積算回数: 1000回, 天然存在量でカルド型ポリイミド試料の ^{15}N の積算回数: 10000-20000回であった。

^{15}N -CPMAS, カルド型ポリイミド, ガス分離

○さいとうこうじ, てしましほ, しのはらまさあき, はたけやまもりあき, ふじしろこういち

3. 実験結果

(1) ^{15}N ラベルフタルイミドでの適正測定条件の確立

Fig. 1に ^{15}N -CPMASの測定し得られた吸収線から計算された吸収強度と待ち時間及びコンタクトタイムの関係を示す。コンタクトタイムが15 msec程度までは直線的に、待ち時間が長ければ長いほど、またコンタクトタイムを長くすれば長くするほど吸収強度が上昇していることがわかる。これは蛋白質などのアミド化合物の場合²⁾と大きく異なっている。一般に吸収の強度 (I_t) と T_{NH} 及び $T_{1\rho}$ の関係式は下記のように考えられている⁴⁾。

$$I_t = I_0 (1 - e^{-t/T_{\text{NH}}}) e^{-t/T_{1\rho}}$$

よってFig. 1のような結果は、フタルイミドカリウムの水素核の緩和時間 ($T_{1\rho}$) が非常に長いこととクロスポーラリゼーションに活用される水素核がイミド窒素近傍に存在しないことに起因すると考えられる。また吸収強度は、20 msec以上のコンタクトタイムの場合には待ち時間を長くしてもあまり大きくならない。よって限られた時間内になるべく良いS/Nのスペクトルを得るためには、適正なコンタクト時間として20 msec、待ち時間は30 sec程度が現実的と考えられる。

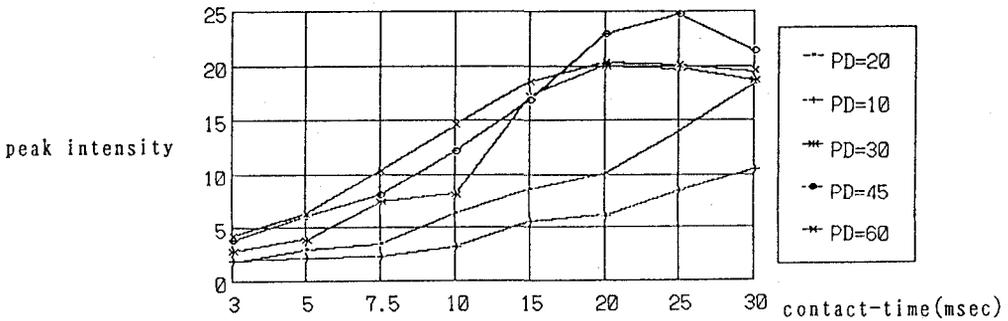


Fig. 1 The relationship between contact-time and normalized spectralline intensity at various kinds of repetition-time

(2) 種々のカルド型ポリイミドの結果

測定を実施したカルド型ポリイミドの代表的な構造をFig. 2に示す。まず先に決定した適正条件をベースに、ポリマー、糸状に延伸したもの、フィルム状にしたものの3種類の試料について、 $T_{1\rho}$ を測定し ^{15}N -CPMASスペクトルを測定した。その結果をFig. 3及びTable 1に示す。

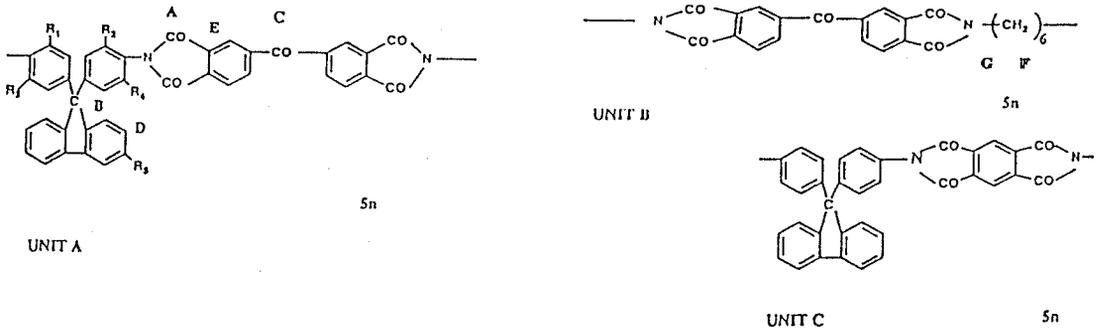


Fig. 2 Chemical structure of cardo-type polyimides

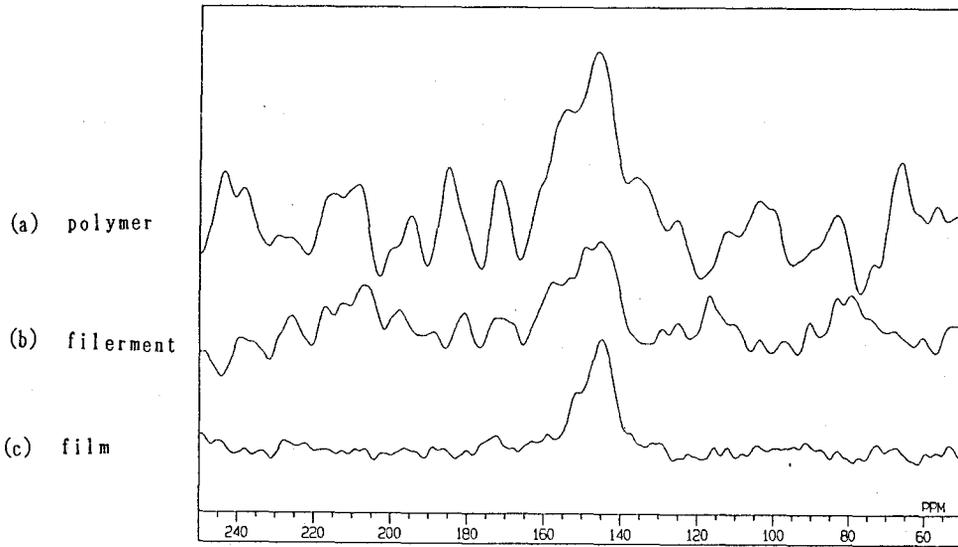


Fig. 3 ^{15}N -CPMAS NMR spectra of (a) polymer, (b) filerment and (c) film types of HA55BT (UNITA+UNITB) cardo-type polyimides

Table 1 The NMR parameters of polymer, filerment and film types of HATTBT (UNITA+UNITB) cardo-type polyimides

	polymer	filerment	film
chemical shift $T_{1\rho\text{H}}$	144.7, 155.9 ppm 430 msec	143.5, 147.3, 160.2 459 msec	145.9, 155.3 ppm 398 msec
α pO_2 barrer	6.1 0.09	8.2 0.14	6.4 0.11

通常に合成したポリマー試料、延伸した糸状試料と脱溶媒の過程が非常にゆっくりしたフィルム状試料は各々配向が異なることがわかっている。Table 1の結果から ^{13}C の化学シフトでは僅かな変化でも ^{15}N の化学シフトの値が3種でかなり異なっており、 ^{15}N の化学シフトがポリマーの構造に非常に敏感であることがわかった。また糸状はかなり多くの状態が存在していることがわかった。

次にガスの酸素/窒素分離係数の異なる種々のフィルム状カルド型ポリイミドの $T_{1\rho}$ を測定し、その値を活用して ^{15}N -CPMASの測定を行った。それらの値をTable 2に示す。 ^{15}N の化学シフトとガスの酸素/窒素分離係数の関係をFig. 4に示す。 ^{13}C -CPMASでのイミド部分のカルボニル炭素の化学シフトでは、化学シフトの変化幅も1 ppm程度と小さく、化学シフトとガス分離係数との関係に明確な傾向が見られなかった。対して、 ^{15}N の化学シフトでは9 ppm程度の変化があり、ガスの分離係数と ^{15}N 化学シフトは非常によい相関があり、ガス分離の係数は ^{15}N 化学シフトに代表されるようなポリマーの3次元構造に敏感であることがわかる。ガスの透過速度はイミド部分の分子の運動性に依存していることから、酸素/窒素のガスの分離の選択はイミド窒素近傍の3次元的な構造により決まっていると推定される。

Table2 The NMR parameters of some films of cardo-type polyimides

	UNIT A CF ₃ -C- CF ₃	UNIT A UNIT B	UNIT A R1=R2 =R3=R4 =Et	UNIT A R ₁₋₅ =H	UNIT A R5= COOH	UNIT A UNIT C	UNIT A R5= COOMe	UNIT A R5= COO C ₆ H ₁₃	UNIT A R1=R2 =Me
chemical shift	146.8	153.0	144.1	150.6	152.6	147.0	149.3	149.2	150.0
α	4.4	9.0	4.3	6.3	7.3	5.0	5.9	5.2	6.1
pO ₂ barrer	16.7	0.11	13.0	2.3	0.53	7.0	1.3	2.0	2.2

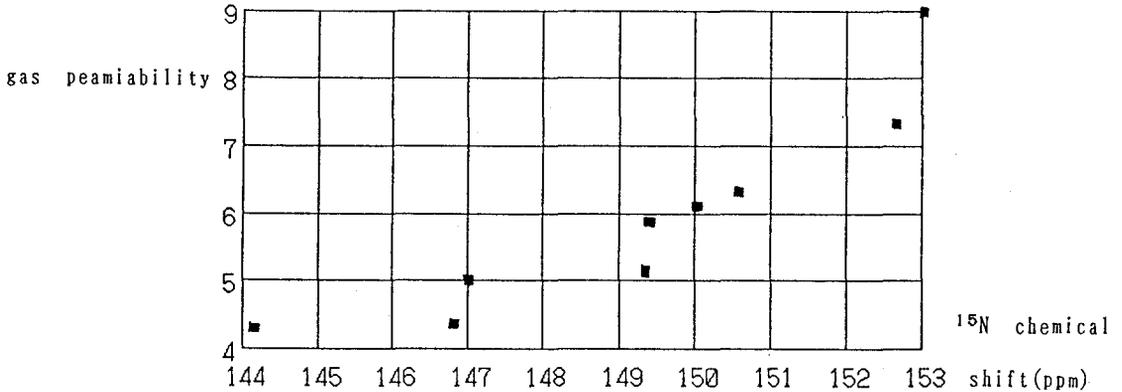


Fig.4 The relationship between ¹⁵N chemical shift at imide nitrogen atom and gas permeability for oxygen permselective property

4. 結論

- ① ¹⁵N-CPMAS スペクトルを S/N 高く短時間で測定するための適正な条件を確立した。イミド化合物の場合、水素核の T_{1ρ} に依存するが、30 sec 程度の待ち時間とかなり長い 20 msec 程度のコンタクトタイムが必要である。
- ② イミドの ¹⁵N の化学シフトはポリマーの配向が異なる形状（ポリマー、糸状、フィルム状など）に非常に敏感である。
- ③ フィルム状カルド型ポリイミドの酸素/窒素のガス分離能は、イミド窒素の ¹⁵N 化学シフトと非常に良い相関があり、ガス分離の性能はポリマーの立体的な構造に起因すると推定される。

謝辞

ロングコンタクトタイム用のパルスシーケンスを作成していただきました日本電子（株）杉沢寿志様にこの場を借りて感謝いたします。

参考文献

- 1) 斎藤ら 第32回NMR討論会要旨集 32 115-118 (1993)
- 2) 例えば A. Shoji et al. J. Am. Chem. Soc., 112 4693-4697 (1990)
- 3) 朝倉ら 第32回NMR討論会要旨集 32 185-188 (1993)
P. D. Murphy et al. Macromolecules 27 279-286 (1994)
- 4) Mehring, M Ed. "Principles of High Resolution NMR of Solid" Springer-verlag; New York (1976)

P 77 ^{109}Ag 及び ^{63}Cu MASNMR 法と X 線回折法による $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ の構造解析

三菱製紙(株)・筑波研、東京都立大・理学部化学科*、

遠藤一央[○]、鈕持基子、本田憲治*、北川進*、

Structure Analysis of $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ Mixed Crystal by ^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR and X-Ray Diffraction Method

Tsukuba Research Laboratory, Mitsubishi Paper Mills, Ltd and

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

K. Endo, M. Kenmotsu, K. Honda* and S. Kitagawa*

^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR and X-ray diffraction methods have been used to perform a structure analysis of mixed crystals, $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$. The mixed crystals were prepared and analyzed as a complete solid-solution by the X-ray diffraction method. ^{109}Ag and ^{63}Cu signals shifted to a low field around 28-73 ppm relative to solid AgI , and around 6-33 ppm relative to $\text{Ag}_0.75\text{Cu}_0.25\text{I}$, respectively, as the lattice constant decreased. The shift can be explained by considering components which involved the second-order chemical shielding or quadrupolar coupling tensors. The tensors are seen to be caused by changing from T_d of $-(\text{Ag}-\text{I}_4)-$ species to its C_{3v} and C_{2v} symmetries due to replacing Ag with Cu in the crystal, and for $-(\text{CuI}_4)-$ species and vice versa.

It is well-known that mixed crystals are produced so as to change the property of the material as a single-component crystal. For example, in photographic materials,¹ in order to increase the sensitivity and image quality, we first synthesized solid-solution silverbromochloride, then converted silver iodochloride and the core-shell type of silver iodobromide emulsions. As necessary conditions to form mixed crystals, we know that the crystal lattices resemble each other and that the atomic radii in the crystals are slightly different. AgI and CuI crystals in this work were of cubic zinc-blende structure. Those crystals satisfy such conditions. We thus produced a complete solid-solution crystal by the melt-annealing method. Here, we demonstrate that the ^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR method can be used to determine the local crystal structure of mixed $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$.

^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR, X-ray diffraction, Mixed crystals $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$

えんどうかつ* なか、けんもつもとこ、ほんだけんじ、きたがわすすむ

Experimental

A complete solid-solution of mixed $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ crystal was prepared at 600°C by the melt annealing method from AgI and CuI . The CuI used here was commercially available. ^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR spectra of mixed crystals were measured at ^{109}Ag and ^{63}Cu frequencies of 12.45 and 71.47 MHz, respectively, using JEOL GX-270 spectrometer; 120 and 40 transients were accumulated using 8.5 and $5.5\ \mu\text{s}(90^\circ)$ pulses for ^{109}Ag and ^{63}Cu NMR, respectively.

All of the spectra were obtained under the conditions of proton gated decoupling and magic angle spinning at a speed of about 5 kHz; 8K datapoints were collected over bandwidths of 20 and 50 kHz for ^{109}Ag and ^{63}Cu NMR, respectively. All measurements carried out at 23°C and solid AgI and CuI were used as external references. The Ag/Cu for mixed crystals was estimated using the X-ray fluorescence method. X-ray diffraction measurements were performed using a Rigaku RAD C.

Results and Discussion

X-Ray diffraction profiles of the crystal indicated that the mixed crystal has a cubic zincblende structure. These diffraction patterns showed that the lattice parameter changes linearly with the Ag and Cu concentration without any change in the crystal structure. The unit cell dimension in Fig. 1 follows well the Vegard² law. Thus, the $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ crystal is a complete solid-solution.

^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR signals of the mixed crystal shifted with broadening to a low field relative to AgI and to $\text{Ag}_{0.75}\text{Cu}_{0.25}\text{I}$, respectively. The shift differences and half widths for Ag/Cu ratios of 1/3, 1/1, and 3/1, respectively, are in Table 1. The reason can be explained by considering the components which involve the second-order chemical shielding or quadrupolar coupling tensors. The tensors are caused by changing from tetrahedral symmetry of $-(\text{AgI}_4)-$ or $-(\text{CuI}_4)-$ species due to replacing Ag with Cu and vice versa in the unit lattice.

Let us consider the local atomic structure of a unit lattice by replacing a Ag atom with Cu, in order to explain the chemical shift dependency of the ^{109}Ag and ^{63}Cu spectral peaks for different AgI/CuI ratio in the crystal. As shown in Fig. 2, we can suppose that five types of species, $-(\text{Cu}_4\text{I}_4)-$, $-(\text{Cu}_3\text{AgI}_4)-$, $-(\text{Cu}_2\text{Ag}_2\text{I}_4)-$, $-(\text{CuAg}_3\text{I}_4)-$ and $-(\text{Ag}_4\text{I}_4)-$ exist in the unit lattice. In case (a), four T_d $-\text{CuI}_4-$ species are seen to exist. For (b), three $-\text{CuI}_4-$ species become C_{3v} symmetry by the movement of the location for the common I atom between three $-\text{CuI}_4-$ and $-\text{AgI}_4-$; since a species of $-\text{AgI}_4-$ exists. In (c) of Fig. 2, the existence of two species of $-\text{AgI}_4-$ produces two

C_{2v} species of $-CuI_4-$. In case (d), since there are three $-AgI_4-$ species, a $-CuI_4-$ species becomes another C_{3v} symmetry. For (e), four T_d $-AgI_4-$ exist. We therefore believe that four kinds of symmetries of $-AgI_4-$ and $-CuI_4-$ may be observable as spectral intensities by ^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR, respectively.

The existence of the five species((a) to (e) in Fig. 2) will follow the probability equation in proportion to the ratios of AgI/CuI . The probability for each case((b)-(e) or (a)-(d)) corresponds to the ^{109}Ag and ^{63}Cu NMR intensity of four kinds of $-AgI_4-$ and $-CuI_4-$ symmetries. The equation is given by

$$P_{Ag_iCu_{4-i}I_4} = {}_4C_{4-i} X_{Ag}^i X_{Cu}^{4-i}, \quad (1)$$

where X_{Ag} and X_{Cu} denote the molar ratios of silver and copper, respectively. The subscript and superscript(i and $4-i$) correspond to the numbers of silver(Ag) and copper (Cu) and i ranges from 0 to 4: for example, we define $Cu_0=Ag_4=1$, $X_{Ag}^0X_{Cu}^4=X_{Cu}^4$ and so on. In Table 2, we show the calculated probability for the existence for the five species versus the ratio of AgI/CuI in the crystal. Then, four symmetries of $-AgI_4-$ in the table for the AgI/CuI ratios of 3/1, 1/1 and 1/3, respectively, can be considered to correspond to the NMR spectral intensities. Thus, the shift in Table 1 for each AgI/CuI ratio was considered to correspond to C_{3v} AgI_4 in a $-Ag_3CuI_4-$ cell, C_{2v} AgI_4 in a $-Ag_2Cu_2I_4-$ cell, and C_{3v} AgI_4 in a $-AgCu_3I_4$ cell, respectively.

In this complete solid-solution, if there are four species of $-AgI_4-$ or $-CuI_4-$ symmetries individually, we are supposed to observe four signals for such $-AgI_4-$ or $-CuI_4-$ symmetry by these ^{109}Ag and ^{63}Cu MASNMR method: We were able to obtain three or four split signals for each AgI/CuI ratio by considering the half width, 85 and 256 Hz for pure AgI and CuI , respectively. The results were, however, single component-like broader signals with the low field shifts. This indicates that there are four species of $-AgI_4-$ or $-CuI_4-$ symmetries with slightly small deviation in the complete solid-solution. We can thus observe only a single component broader signal.

References

1. T. H. James, "The Theory of the Photographic Process," 4th ed., Macmillan, New York (1977).
2. L. Vegard and G. Skoftealand, Arch. Math. Naturv., **45**, 163(1942).

Table 1. Ag and Cu Chemical Shifts, Half-Widths, Quadrupole Coupling Constants and AgI_4 and CuI_4 Symmetries of the Mixed Crystal for AgI/CuI Ratios

	AgI/CuI ratio				AgI
	CuI	1/3	1/1	3/1	
Ag Chemical Shift(ppm)		-72.6	-43.1	-28.0	0.0
Ag Half-Width(Hz)		200	120	120	85
Cu Chemical Shift(ppm)	-32.9	-18.8	-6.0	0.0	
Cu Half-Width(Hz)	256	1608	1805	1427	
e^2qQ (MHz)		0.27	0.37	0.41	
AgI_4 or CuI_4 Symmetry	T_d	C_{3v}	C_{2v}	C_{3v}	T_d

Table 2. Existence Probability of Five Species for Complete Solid-Solution $Cu_xAg_{1-x}I$ Crystal in Proportion to Ratio of CuI/AgI

CuI/AgI ratio	$-Cu_4I_4-$	$-Cu_3AgI_4-$	$-Cu_2Ag_2I_4-$	$-CuAg_3I_4-$	$-Ag_4I_4-$
3/1	0.316	0.422	0.211	0.047	0.004
1/1	0.063	0.250	0.375	0.250	0.063
1/3	0.004	0.047	0.211	0.422	0.316

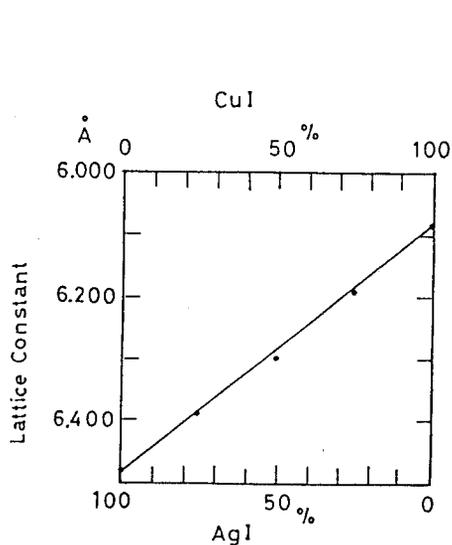


Fig. 1. The unit cell dimension of complete solid-solution $Cu_xAg_{1-x}I$ crystal versus CuI/AgI ratios: The solid line is Vegard law.

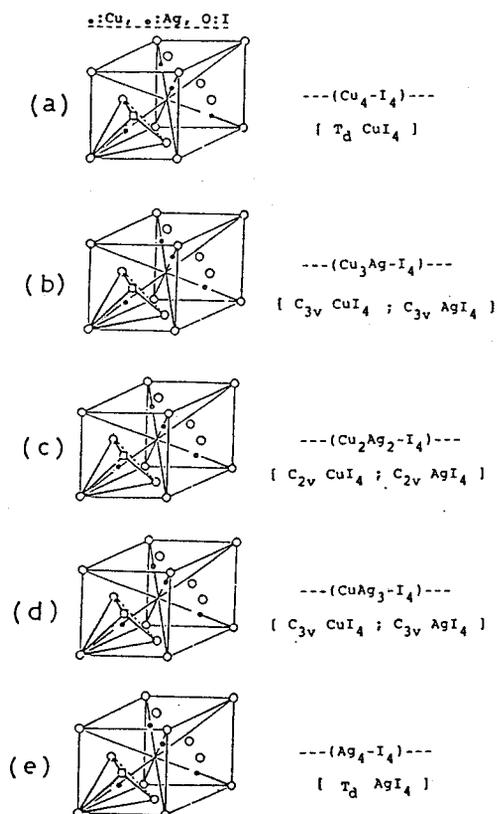


Fig. 2 The local atomic crystal structure of the unit lattice due to replacing Cu with Ag in the mixed $Cu_xAg_{1-x}I$ crystal.

P 78 固体NMRによるアスパルテーム結晶の構造研究 (2)

(味の素(株)・中研) ○海老沢計慶、鈴木榮一郎、公文 哲、永嶋伸也、
(北里大・薬) 米田茂隆、梅山秀明

Structural Studies on Aspartame Crystal by Solid State NMR (2)

Kazuyoshi Ebisawa*, Eiichiro Suzuki*, Satoshi Kumon*, Nobuya Nagashima*
Sigetaka Yoneda**, Hideaki Umeyama**

* Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

** School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University

Aspartame (AP) exists in some crystal forms (polytypism) such as IA, IB, IIA, IIB. X-ray crystallographic studies have revealed that the space group of IIA form is P41. In the last symposium we presented a kind of structure model of IIA form which can explain a doublet signal of amide carbonyl carbon observed in ^{13}C -CPMAS NMR. On the other hand we have studied the reason for high stability in heating IIA form and recently we found a wide range existence of IIA form in the heating process. The details will be presented in this symposium.

【緒言】

アスパルテーム (L- α -aspartyl-L-phenylalanine methylester: 以下、APと略す。分子構造はFig 1.を参照) には、IA, IB, IIA, IIBという主に結晶水含有率の違いに基づくいくつかの結晶型が存在し、このうちIIB晶以外は全てX線構造解析により、その結晶構造が得られている。昨年の本討論会では、このうち最も座標精度の高いIIA晶について、固体NMRと分子動力学 (MD) 計算を用いた研究結果を発表した。その概要を以下に記す。

- 1) IIA晶の空間群はP41であり、単位格子中には4分子のAPがb軸方向の4回らせん軸周りに同一配座で存在し、結晶水は4回らせん軸(2種あるうちの一方) 付近の親水性チャンネルに2分子、存在する。(AP \cdot 1/2H₂Oと表記)
- 2) MD計算の結果、結晶の対称性は結晶水の影響により完全なP41対称とはならず、ペプチド結合部の分子間水素結合状態には、微小差ながら2状態が存在した。
- 3) ^{13}C -CPMAS測定時のペプチドカルボニル炭素のシグナル分裂は、隣接窒素原子による四重極分裂の可能性もある中、上記の水素結合状態の差によるものと推察した。一方、我々はIIA晶のエネルギー的安定性を構造的視点から考察する目的で、固体NMRと粉末X線による温度変化測定、及び熱測定を行った結果、上記の結果の延長線上にあると思われる知見を得たので報告する。

(KEY WORD) アスパルテーム、固体高分解能NMR、熱測定

○えびさわ かずよし、すずき えいいちろう、くもん さとし、ながしま のぶや
よねだ しげたか、うめやま ひであき

【結果】

Fig1にIIA晶の室温及び40℃における¹³C-CPMAS測定の結果を示す。室温では1本であったPhe側鎖のγ炭素シグナルが40℃では明瞭に2本に分裂(約100Hz)している他、他のベンゼン環炭素も分裂を示している。実際の試料温度は、JEOLで作成された資料*から50℃付近と考えられるが、粉末X線パターンは45℃では完全なIIA晶パターンを示し、50℃でもほぼIIA晶のパターンを保持している。そこで、IIA晶の熱測定による重量変化を調べた結果、室温では1/2水であったIIA晶は、40℃～50℃付近で1/3水の状態となり、55℃付近からIIB晶(無水)への転移を開始することなどが明らかとなった。(Fig2参照)

【考察】

APのIIA晶は非常に安定であり、加熱により調製したIIB晶も室温放置により容易にIIA晶に復元する。このようなIIA晶の安定性は、今回、明らかとなったように、結晶水含量に1/2水～1/3水という許容幅があることが1つの重要な要因であろう。また、Fig1に示した40℃の状態は、粉末X線及び熱測定の結果から考えて、結晶格子はIIA晶のまま、結晶水含量が1/3水となった状態であろう。従って、このPheγ炭素シグナルの分裂は結晶水の状態変化を反映した結果であると考えている。

【文献】

- 第30回NMR討論会要旨集(p.269)
- 第31回NMR討論会要旨集(p.263)
- 第32回NMR討論会要旨集(p.139)
- *固体ユーザーズミーティング資料(1992年)

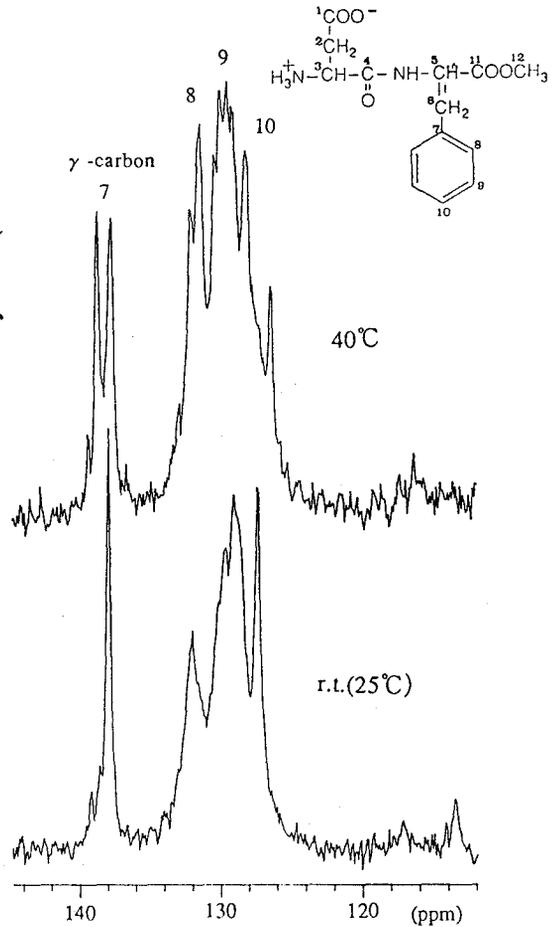


Fig1. ¹³C-CPMAS NMR spectra of AP in IIA form (aromatic region) (JEOL EX-400)

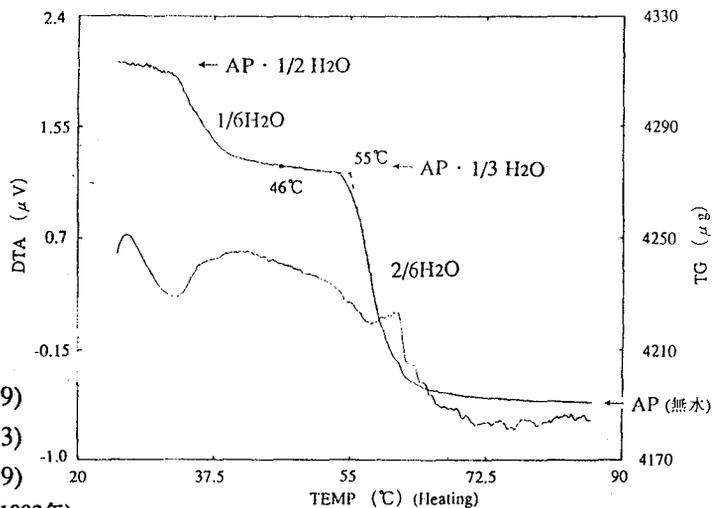


Fig2. TG/DTA data of AP in IIA form (SEIKO TG/DTA220)

特別講演 2

L11

**SOLID MATERIALS EXPLORED
BY NUCLEAR POLARIZATION TRANSFER**

R.R. Ernst, B.H. Meier, R. Meyer, M. Baldus,
S. Hediger, T.O. Levante, P. Robyr, and M. Tomaselli

Laboratorium für Physikalische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule
8092 Zurich, Switzerland

Procedures are described for manipulating the nuclear spin dynamics in solid materials. The goal is an enhanced transfer efficiency of spin order through the dipolar interaction under sample spinning conditions and radio-frequency pulse sequences. The procedures are designed in particular for rare spin with weak mutual interactions and for the heteronuclear transfer between different spin species. Applications concern the local structure in partially ordered materials, such as polymers and polymer blends. The mobility of spin atoms is used as an alternative approach for studying structural features of solid materials. In addition, dynamic processes inherent in molecular solids are studied by combining NMR measurements and quantum dynamical calculations.

第 3 日

11月28日(月)

核酸, 蛋白質のNMR

セッション：核酸
(Nucleic Acids)

特別講演 3

L12 NMR Studies of Non-standard Forms of DNA

Girjesh Govil

Tata Institute of Fundamental Research
HOMI BHABHA ROAD, BOMBAY 400 005
INDIA

NMR STUDIES OF NON-STANDARD FORMS OF DNA

ABSTRACT

Girjesh Govil

Tata Institute of Fundamental Research,
Hom1 Bhabha Road, Bombay 400005, India

The double helical structure of DNA proposed by Watson and Crick in 1953 served as the only model for explaining biological behaviour of nucleic acids for almost three decades. However, with the availability of tailored made synthetic oligonucleotides and development of new tools to probe DNA structures, this view has changed significantly. In addition to the polymorphic forms of antiparallel double-stranded DNA (A, B, C, D, Z etc), radically different structures such as parallel duplexes, triplexes and single-stranded hairpin structures have been characterised experimentally. The fact that these unusual or non-standard form of DNA may have a crucial role in regulation of a variety of biological processes, has prompted interest in detailed studies of such structures. NMR is ideally suited for this purpose, not only because of the fact that it provides detailed conformational structure in aqueous solutions, the milieu of biological processes, but also because subtle changes in DNA conformation can often be driven by minor environmental perturbations such as concentration of the sample, pH, temperature or ionic concentration.

We have been interested in the flexibility of DNA backbone and unusual DNA structures for a number of years. It is therefore natural that in my talk, I shall be using examples from the work from my own laboratory, though this is one of the most active field of research in structural biology today. The methodologies for NMR spectral assignments, extraction of conformational dependent NMR parameters and utilisation of such parameters as constraints in structural simulations have been developed over the last decade and are now fairly standard. After a brief review of the methodologies, including some recent advances, I propose to discuss some specific examples of unusual DNA structures, covering the following areas:

- (1) Sequence dependent variations of conformation of canonical B-DNA sequences which are recognised by restriction enzymes.
- (2) Structural perturbations caused by mismatches.
- (3) Concentration dependent unfolding of certain DNA sequences into single stranded ordered hairpin structures.
- (4) Strategies of tailoring molecules to adopt parallel duplexes.
- (5) pH dependent ordering of DNA sequences into triplexes.

L13

安定同位体利用NMRの核酸への展開

○甲斐荘正恒、小野 晶、楯 真一、栗田順一、ペイ イハン、小野 明
(都立大・理)

Stable Isotope Aided NMR Spectroscopy in Nucleic Acids

Masatsune Kainosho*, Akira Ono, Shin-ichi Tate, Jun-ichi Kurita,

Pae Il-Han, Akira Ono

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

1-1 Minamiosawa, Hachioji, Tokyo, 192-03 Japan

ABSTRACT In order to develop more sophisticated heteronuclear multidimensional NMR experiments, we have established useful methods to prepare uniformly ^{13}C or $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled DNA monomers in sufficient amounts to synthesize labeled DNA oligomers by solid phase synthesis at a reasonable cost. The labeled DNA oligos have been used for the NMR experiments, such as HCCH-E. COSY, $\text{H}1'\text{C}1'\text{N}9\text{H}8$, etc.

はじめに

核酸の溶液内立体構造の決定技術の開発は、蛋白質に比べて著しく立ち遅れている。最近になりRNA に関しては、生化学的手法により同位体(^{15}N , ^{13}C) 標識したオリゴマーを調製する技術が確立し、合成収率がRNA 配列に大きく依存すること、また特定の位置のみに標識することが困難なこと等の重大な欠点があるにもかかわらず、多次元NMR 解析技術の発展を促した。一方、DNA においては菌体内の存在量がRNA に比べ少ないこと等から、NMR 測定に必要な量の標識DNA を生化学的手法により調製することは困難である。DNA の溶液内ダイナミクス、DNA-蛋白質間の分子認識過程など、DNA の動的立体構造と機能に関する研究の重要性が高まったことを背景にして、昨年度から安定同位体標識核酸オリゴマーの合成技術の開発、及び標識核酸オリゴマーを利用する多次元NMR 技術の開発に着手した。本講演においては、プロジェクトの現状とこれまでの成果について紹介したい。

キーワード: isotopically labeled DNA、HCCH-E. COSY、 $\text{H}1'\text{C}1'\text{N}9\text{H}8$ 、HCP、HCP-CCH-COSY
かいのしょう まさつね、おの あきら、たて しんいち、くりたじゅんいち、
ペー いるはん、おの あきら

安定同位体標識DNA/RNA 合成のストラテジー

我々の基本的戦略は標識DNA/RNA オリガマーを化学的手法（固相合成法）により合成するという点に集約される。標識したモノマーからの合成試薬が一度揃えば、配列に依存せず殆ど随意的に必要な量のオリガマーが入手できる点は合成法の最大の利点である。しかも、全ての残基を標識することも、必要な位置の残基のみを選択的に標識体に置換することも自由に選択できる。市販の固相合成機は高い信頼性で合成を短時間に終了することができるために、酵素を利用する生化学的手法のような、実験の再現性に関する慎重な配慮を必要としない。問題は標識したRNA/DNA モノマー（モノヌクレオチド）の多量・安価な調製法の開発にある。図-1 は我々が現在進めている標識ヌクレオチドの合成スキームの概略を示したものである。

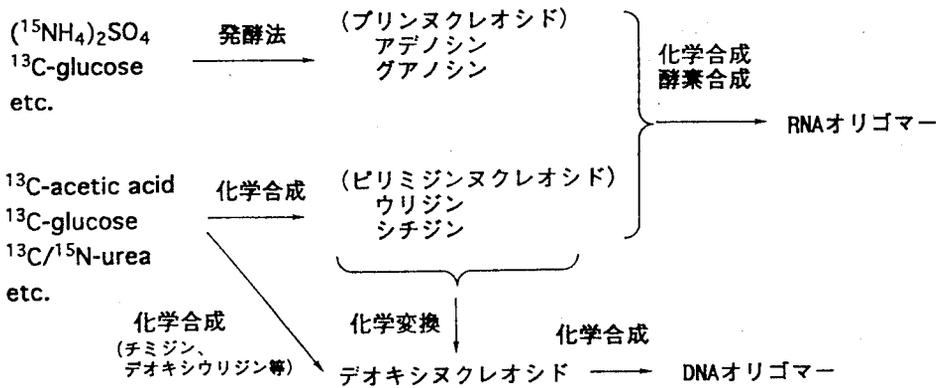


図-1 安定同位体標識 RNA/DNA オリガマー合成

我々は図-1に示した方法により、同位体標識したアデノシン、デオキシアデノシン、グアノシン、デオキシグアノシンの調製に関しては十分な経済性を持つプロセスを確立した。ピリミジンヌクレオチド（チチジン、デオキシチチジン、ウリジン、デオキシウリジン）に関しては塩基部分と糖部分をそれぞれ完全合成する必要があり、現在のところ糖部分を¹³C-標識したチチジンの多量合成を終了している。これらを用いて、固相合成法により、部位選択的に標識した様々なDNA オリガマーを調製した。このようにして合成したDNA オリガマーの多元NMR技術への応用について以下に述べる。

安定同位体標識DNA オリガマーの多次元NMR

(1) DNAの糖部分のピナリスピン結合定数の高精度測定: ¹⁾我々は d(CGCGAATTCGCG)に含まれるT残基を、98% ¹³C-均一標識したデオキシリボースを持つチチジンに置換したデオキシチチジンを合成した。核酸オリガマーの糖部分の立体配座解析は隣接プロトン間のピナリスピン結合を測定し、その二面角依存性を用いて解析する手法がとられる。しかしながら、通常のプロトン二次元NMR法(DQF COSY等)においては、線幅の拡がりやシグナルの重なり等の理由から、必ずしも必要な全てのスピ

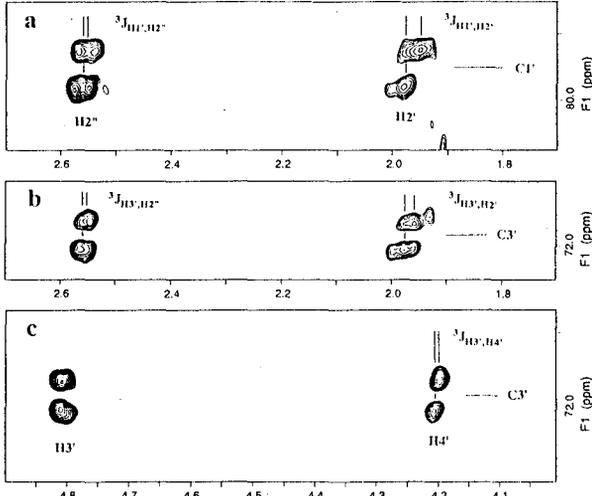


図-2 1.4mM d(CGCGAAT*TCGCG)₂ 2D HCCH-E. COSYスペクトル:
(a) C1'-H2' 2"; (b) C3'-H2' 2"; (c) C3'-H3'

方向のdisplacementにより観測できるため、全てのプロトン間のエンタル結合定数が精度良く求められる。図-2はデオキマーの7-位のチミンのみを¹³C-標識したデオキマーのHCCH-E. COSYの一部を示したものである。通常は求めにくいH3'-H4'間のスピ結合定数も精度良く決定できることが明らかであろう。

(2) スピ結合を介した糖-塩基シグナルの相関: 2) 前項と同じデオキマーのA5、A6の両残基のみを均一に¹³C、¹⁵N-二重標識したチキチデオキシに置換したものを合成した。この標識体においては二組のチミン由来のシグナルが得られる。標識体の合成に要する時間や労力を考慮すれば、同時に複数の残基を標識する標識DNAを用いて構造化学的知見が得られることは好ましい。しかしながら、この場合には得られたシグナルの帰属が必要となる。DNA糖部分のシグナルは事項に述べる手法により、スピ結合を介した磁化移動法により帰属することができる。一方、従来は塩基部分のシグナルと糖部分のシグナルの相関に関しては空間距離情報 (NOE)を利用

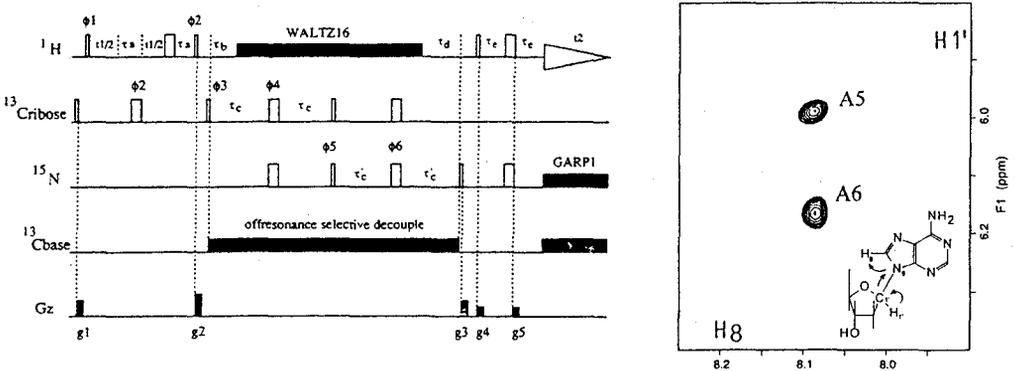


図-3 2D H1' C1' N9H8 パルス列及び、d(CGCG AATTCGCG)₂のスペクトル

結合を正確に測定できるわけではない。一方、特定残基のみの糖部分を高濃度に¹³C-標識したオリゴマーを用いれば、シグナルの重なりや帰属の問題は存在せず、また値の大きい¹³C-¹³Cスピ結合を介したHCCH-E. COSYを利用できるために、プロトン間のエンタルスピ結合定数が直接に結合した¹H-¹³C間の大きなスピ結合定数により完全に分離したピークの¹H-軸

する方法のみが利用されており、一義的帰属の問題点となっていた。しかしながら、この試料のように、塩基部分の窒素を含み均一に ^{13}C 、 ^{15}N -二重標識されているリボヌクレオチド残基では、図-3 のスペクトル中に示した磁化移動径路により同一残基内のH1' とH8との相関を決定することができる。"H1' C1' N9H8"と名付けたパルス列(図-3)はRNA について報告されたパルス に比べ著しく単純であり、従って高感度である。

(3) ^{31}P -シグナルを介するDNA の配列帰属法:³⁾

^{13}C 、 ^{15}N - 均一標識したヌクレオチドを、同時に複数組み入れたDNA オリガマー 場合、NMR シグナルの配列特異的な帰属には、3'- 及び5'- 端側のヌクレオチドが共通のリ核酸エステル 結合により連結していることを利用する。デオキシリボース 環炭素を ^{13}C -標識することにより、 ^1H - ^{13}C - ^{31}P 間の磁化移動が可能となり、様々な三重共鳴実験が可能となる。同一残基内の磁化の移動はスピン結合の大きい $J(^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C})$ を用いるために高感度である。図-4はそのようなパルス 列を示し

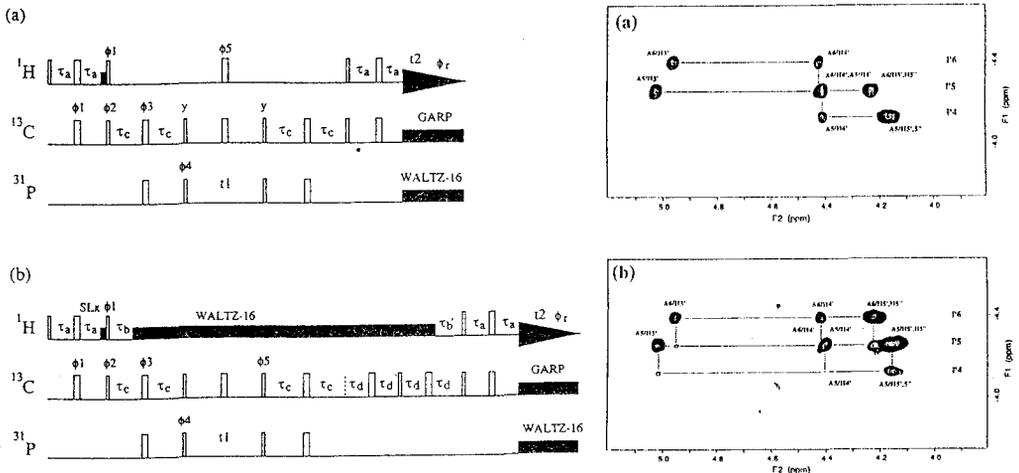


図-4 (a)2D HCP、(b)2D HCP-CCH-COSY パルス、及び $d(\text{CGCGGAATTCGCG})_2$ のスペクトル

たものである。(a) のパルス [HCP] では、 ^1H から起動した磁化は ^{31}P - ^{13}C スピン 結合を介して ^{31}P の化学シフト 情報をもたらす。パルス (b)[HCP-CCH-COSY] では、更に ^{13}C 上の磁化を ^{13}C - ^{13}C 間にCOSY Relay後に ^1H -検出するため、HCP のH4' - ^{31}P に加えて、スペクトル (b) に示したように、配列帰属は H3' - ^{31}P 、H5' 5" - ^{31}P 間の計3ヶ所で可能となる。この手法の ^{13}C -周波数ラベル を加えた3D HCP-CCH-COSY は均一標識DNA の一括帰属に有効であろう。

参考論文

- (1) A. Ono, S. Tate, Y. Ishido, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, **4**, 581(1994)
- (2) S. Tate, A. Ono, and M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5977(1994)
- (3) S. Tate, A. Ono, and M. Kainosho, submitted for publication

DNAオリゴマーの精密構造解析 —部分的な安定同位体標識の利用—

○児嶋長次郎、*関根健志、*川島悦子、
*石戸良治、**小野晶、**甲斐荘正恒、京極好正
(阪大・蛋白研、*東京薬大、**都立大・理)

Precise Analysis of the DNA Structure by NMR - Application of Selective ^2H and ^{13}C Labeling Techniques -

Chojiro KOJIMA, Takeshi SEKINE*, Etsuko KAWASHIMA*, Yoshiharu ISHIDO*,
Akira ONO**, Masatsune KAINOSHO** and Yoshimasa KYOGOKU

Institute for Protein Research, Osaka University

**Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Tokyo College of Pharmacy*

***Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University*

The three dimensional coordinates of a DNA decamer, d(GCATTAATGC)₂, were determined by minimizing experimental errors in NOESY spectra. The calculations were performed by the programs MARDIGRAS and X-PLOR using the relaxation matrix refinement module with a single correlation time model. However, the calculated structures do not completely reflect the dynamic characters of the oligomer such as the N/S conversion of the sugar conformation. Here, the selective ^2H and ^{13}C labeling of the DNA sugar was introduced to obtain accurate and precise ^3J values of the sugar protons, and the followed analysis of the sugar conformer showed that the S-type is predominant (70~90%) in the DNA.

<序> 核酸はX線結晶回折で決定された構造とNMRで決定された溶液中での構造とが異なっている場合が多い。それは核酸が分子間相互作用等によって容易に変形する"やわらかい""かたち"を持っている事に起因する。これは蛋白質による、あるいは薬剤による誘導適合の様な核酸認識の機構を解明する上での鍵でもあり、解析を困難にしている点でもある。NMRは本来様々な時間域での運動様式を解明できる可能性を持つが、これまでにNMRで決定された核酸構造の分解能はX線結晶回折で得られるものと比較すると著しく低い上に、可塑性を含めた運動様式を表現していない。そこで我々はまず核酸構造の高分解能化を目的として、NOEを高精度で定量化し、第一近似として単一相関時間モデルを用いて構造を求めた。次に核酸の構造多形、特にデオキシリボースにおけるコンフォーマーの存在比を得るために ^3J 値の精密化を行った。この過程で ^2H ラベルまたは ^{13}C ラベルしたDNAオリゴマーを用い、極めて良好な結果を得たのでここに報告する。

キーワード：核酸構造、精度、NOEの信頼性、 ^3J 値の精密化、 $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ ラベルDNA

○こじま ちょうじろう、せきね たけし、かわしま えつこ、いしど よしはる、
おの あきら、かいのしょう まさつね、きょうごく よしまさ

<実験>

試料 DNAデカマー-d(GCATTAATGC)₂をモデル系として取り上げた。この配列は溶液中でB型様構造をとることが知られており、X線構造解析が行われているB型DNAの、d(CGATTAATCG)₂をおよびd(CCATTAATGG)₂に塩基配列が似ていることから選ばれた。

NOEの定量化 NOESYピークの積分値を定量化するためにまず誤差評価法を考案した。導入にあたっては、積分値はスペクトルのS/N比に対して依存性が低い(表示しきい値に依存しない)ものであるべきという再現性に関する要請⁽¹⁾と、NOESYの交差ピークは対称的⁽²⁾ ($R_{ij} = R_{ji}$)に現われるべきで、built-up curveは混合時間の変化に対してスムーズ⁽³⁾であるべきという要請に基づいた。以下では条件⁽¹⁾を積分再現性、条件⁽²⁾をNOE対称性、条件⁽³⁾をNOE連続性と略記する。実際の定量には上記評価法に従って様々な因子(積分方法、窓関数、デジタル分解能、ZQコヒーレンス、待ち時間)による誤差を最小化する手順を用いた。

構造計算 単一相関時間モデルによる完全緩和行列法で構造精密化を行った。相関時間としては蛍光分光法やUV散乱分光法で既に得られている全体回転運動の相関時間を用いた。また計算されたプロトン間距離の解析と相関時間とR⁶(NOEの実験再現度)因子との関係を考察する事によって、単一相関時間モデルの妥当性を検討した。実際の計算は標準的なプログラムであるMARDIGRASおよびX-PLORを用いた。

³J値の精密化 2'R-²Hまたは2'S-²HラベルしたDNAオリゴマーを各々作成し、通常行われているDQF-COSYやE.COSYを³¹Pデカップル条件下で測定し、シミュレーションによって比較検討する事で線幅とカップリング定数を決定した。ラベルされていないDNAオリゴマーについても同様の操作を行い、線幅とカップリング定数を決定した。チミンのデオキシリボースを¹³CラベルしたDNAオリゴマーに関しては、HCCH-E.COSYから³J値を得た。上記の様々な実験から決定された³J値とその精度を比較検討し、N/Sコンフォーマー互変モデルで解析した。

<結果と考察>

NOEの定量化 積分値は積分方法に依存する。例えば単純な領域内強度和法(最も良く用いられている手法)は積分再現性が悪く、表示しきい値を低くかつ積分領域を注意して選ばないと積分値自体の信頼性が無い。我々は積分再現性の良いFitting法を用いて積分する事で、比較的楽に精度良い結果(誤差5%未満)を得た。さらに部分的に重なっているピークに対してもNOE連続性が良く、積分可能なピーク数を増やす事が可能であった。Fig.1には積分値に及ぼす窓関数の影響が示されている。窓関数を用いないと積分再現性とNOE対称性が悪い。通常t2(real time)軸の観測点数がt1軸を上回るため、J-couplingで多数に分裂したピークがt2軸に在る時はこの様なばらついた積分値を得る(Fig.1左)。これを回避するためにはt1/t2軸の観測点数を同じにするか、強い窓関数を掛ける(Fig.1右)必要がある。デジタル分解能は高い方が良いが、5%未満誤差での定量化に要求されるのは線幅5 Hzの場合2 Hz/point程度である。これは線幅に依存するので線幅が細ければ分解能はより高くなければならない。ZQコヒーレンスの影響を見るために3種類のNOESYパルスを用いたが、シミュレーションで予測されていた通り5%未満誤差では有為な差は観測されなかった。待ち時間は最低でもT1値の2.5倍程度必要である。待ち時間がT1値程度ではNOE対称性が悪くなり誤差100%以上のピークが現われる。

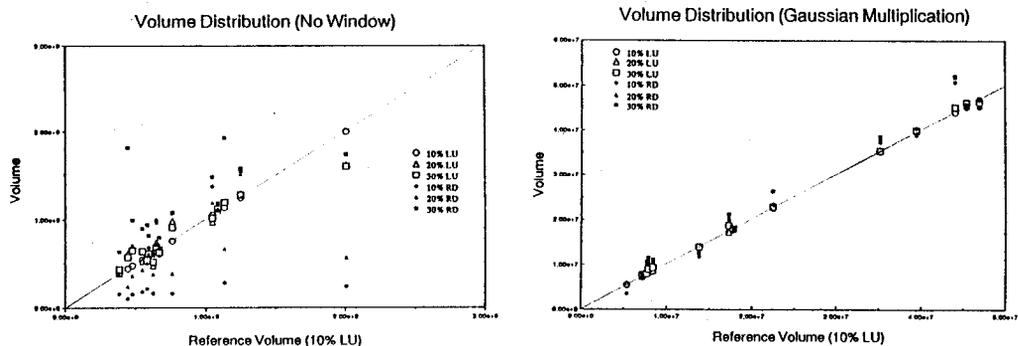


Fig.1 Effect of the window function to the relative volume intensity. The volume intensities of some DNA peaks measured in the spectra with different threshold values are plotted against those of the corresponding peaks appeared in the left upper (LU) area of the p-type NOESY spectrum with 10% threshold. Left: without window function, right: with Gaussian function window. Percentage: threshold level against the maximum peak intensity; LU: left upper peak of the p-type NOESY; RD: right down peak of the p-type NOESY.

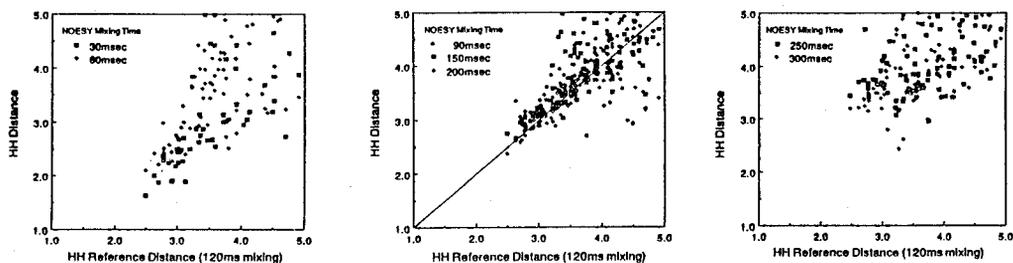


Fig.2 All ^1H - ^1H distances calculated by MARDIGRAS. The distances determined by using 120 msec mixing time NOESY peak volumes were compared with those calculated by the volumes of short (30, 60 msec), medium (90, 150, 200 msec) and long (250, 300 msec) mixing times.

構造計算 本来単一相関時間モデルを用いて計算するのは第一近似であるので、モデルの妥当性を検討しなければならない。そこでまずMARDIGRASを用いて ^1H 間距離を計算し、その結果をFig.2に示した。NOESYの混合時間が短い時(左)は、基準とした120msecの混合時間で得られたピーク積分値から計算された距離と比較すると歪みが生じ、相対的な距離が縮まった様に計算されている。これは入力積分値の中で値の大きなもの程大きく見積られている事を意味しており、相対的な積分値のS/N依存性が出てしまったものと考えられる。既に述べたように積分値自体は出来る限り積分再現性を持つ様にしたが、短い混合時間では歪みを除く事が出来なかったと言える。基準とした混合時間120msec近辺(中央)では、精度は低いものの単一相関時間モデルで説明されている。長い混合時間の場合(右)は単一相関時間モデルが破綻している様に見える。今回の計算には帰属出来なかった糖の5'5"プロトンや重なり激しいピークを入力出来なかったため、本当に破綻しているかどうかは判定出来ない。MARDIGRASを使った相関時間に関するグリッドサーチの結果、相関時間が長い程 R^6 因子が小さくなった。これは内部運動を考慮に入れる必要性を示唆しており、高次の近似によりさらに改善される可能性を示す。以上の解析から単一相関時間モデルが第一近似として妥当であると考え、X-PLORの完全緩和行列計算ルーチンにより構造精密化を行った。Fig.3には実際計算された構造を示す。用いた入力積分値はNOESY混合時間90~200msecから得た。

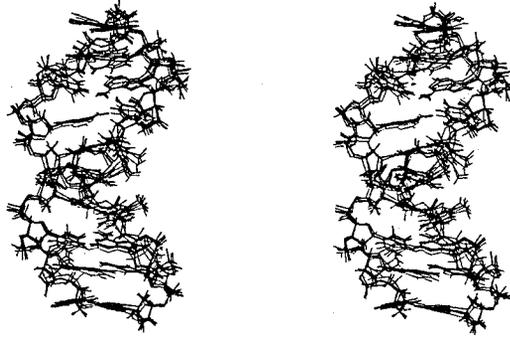


Fig.3 All structures were calculated by X-PLOR with NMR relaxation refinement protocol without use of the NOEs from exchangeable protons. Isotropic rotation model with a fast motion of the methyl group was adopted for the structure calculations by using 90, 120, 150 and 200 msec mixing time NOESY peak volumes.

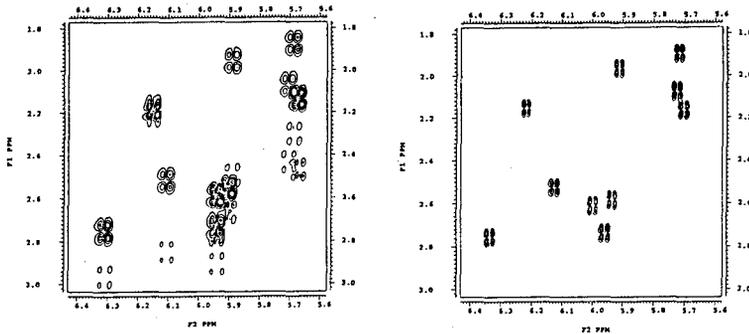


Fig.4 ^1H - ^1H DQF-COSY under ^{31}P -decoupled condition for (left) non-labeled and (right) 2R - ^2H -labeled DNA oligomers

^3J 値の精密化 構造計算によって座標が得られたが、上述の様に内部運動を明確に同定する事で構造自体の精度が向上する可能性がある。最も良く研究されている内部運動の一つにデオキシリボースのN/Sコンフォーマー互変運動がある。これはとても早い運動で ^3J 値が平均化されてしまうので、カップリング定数を精密に読み取って運動自体を同定する手法が採られている。今回我々は 2R - ^2H または 2S - ^2H ラベルしたDNAオリゴマーを用いて ^3J 値の精密化を行い0.2Hz程度まで精度が向上した。ラベルされていないDNAオリゴマーを用いて決定される線幅とカップリング定数の精度が高々1 Hzであった事を考えると格段に精度が向上している。また、この ^2H ラベルはデカップリングとして働くと同時に緩和時間を伸ばす(約1.5倍)働きがあり一見してこのラベルの有意性が判る (Fig.4)。分子量6千の試料に関して直接カップリング定数を読んでも誤差0.5Hz程度にまで精度は向上している。 ^{13}C ラベルしたDNAオリゴマーに関しては、蛋白質の系で示されていた通りHCCH-E.COSYから0.2Hz精度で ^3J 値が得られた。最終的に得られた ^3J 値からSコンフォーマーの占有率を計算した結果70-90%であり、これはコンフォーマー間のエネルギー差が0.5kcal程度である事を示している。

P 79 立体選択的多重標識デオキシアデノシンの合成とDNA構造解析への応用

○栗田 順一、 楯 真一、小野 晶、甲斐荘正恒
東京都立大学・理学部

Synthesis of the stereo-specific multiply isotope labeled 2'-deoxyadenosine and application to DNA structural analysis using multidimensional heteronuclear NMR methods.

○Jun-ichi Kurita, Shin-ichi Tate, Akira Ono, Masatsune Kainosho
Tokyo Metropolitan University

ABSTRACT : Deuterium was stereo-selectively introduced into the 2'-position of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled 2'-deoxyadenosine to yield multiply labeled 2'-deoxyadenosine analogues which were incorporated into DNA dodecamer, 5'-d(CGCGAAATTCGCG)-3' (A = labeled 2'-deoxyadenosine). The dodecamers were used for multidimensional heteronuclear NMR study.

「はじめに」

近年、 ^{13}C や ^{15}N 等の安定同位体で標識したタンパク質を用いる多核種多次元NMR法が進歩し、分子量～3万程度のタンパク質の溶液構造を、X線結晶構造と同程度の精度で解析することが可能となった。また、極近年、安定同位体標識RNAオリゴマーの調製法が開発され、RNAの多核種多次元NMR研究が行われるようになった。しかしながら、安定同位体標識DNAオリゴマーの調製法が確立していなかったことから、DNAの多核種多次元NMR研究は進んでいなかった。そこで我々は、安定同位体標識DNAオリゴマーの合成法について検討し、化学合成法と微生物発酵法を併用する方法を確立し、NMR研究に応用することに成功した^{1,2}（本年度NMR討論会L13発表参照）。本発表では、より精度の高い構造解析法の確立を目的として、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -標識法と立体選択的重水素化法を併用する手法について検討した。即ち、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -標識 2'-deoxyadenosine (図1、1) の2'-位のproS, proRプロトンのそれぞれを立体選択的に重水素化した化合物 (図1、2, 3) を合成し、それらを含むDNAオリゴマー、5'-d(CGCGAAATTCGCG)-3' (A = labeled nucleoside) を合成した後、NMRによる糖部の構造解析を行った。

「実験方法及び結果」

1、標識DNAオリゴマーの合成

標識ヌクレオシドの合成： $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識アデノシンは微生物発酵法により得た³。このものをRobinsらの方法に準じて2'-位を化学的にデオキシ化することにより標識2'-deoxyadenosine (1) を得た⁴。また、同様の反応を重水素化試薬を用いて行うことにより2を得た。また2'-水酸基を反転させた後デオキシ化することにより3を得た⁵。標識DNAオリゴマーの合成：上記の標識2'-deoxyadenosineは定法に従い保護、亜リン酸化することによりアミダイトユニットとし、DNA成機を用いてDNAオリゴマーとした。DNAオリゴマーは定法に準じて脱保護、精製した後NMR研究に用いた。1 μmol 合成により下記NMR測定を行うに十分なオリゴマーを得た。

2、多次元多核種NMR

CT-HSQC スペクトル：標識DNAオリゴマーI, II, IIIのCT-HSQCスペクトルを測定したところ、標識糖部由来のシグナルのみが選択的に観測された。各スペクトルの2'-位シグナル領域を図1に示した。このスペクトルより重水素化反応が立体選択的に進んだことが確認された。

安定同位体標識、DNA、多核種NMR、多次元NMR、HCCH-E.COSY

くりた・じゅんいち、たて・しんいち、おの・あきら、かいのしょう・まさつね

HCCH-E.COSY スペクトル： HCCH-E.COSYスペクトルを測定することにより糖部プロトン間の結合定数を測定することが可能である⁶。図2にオリゴマーI（スペクトルa）及びII（スペクトルb）のHCCH-E.COSYスペクトのH2'-C1'クロシグナル領域を示した。この測定においては2ヶに分裂したクロシグナルが得られるが、F2軸上の分裂幅が³J_{H1',H2'}に対応する。スペクトルaでは2'-位ビシナルプロトン間のカップリングの影響により正確な結合定数の読み取りが困難であった。一方スペクトルbにおいては、立体選択的重水素化を行うことによりビシナルプロトン間のカップリングが消失したことから結合定数の読み取りが容易になった。

糖部配座の解析： HCCH-E.COSYスペクトルより得られた結合定数より、Rinkel & Altonaの方法⁷に準じて標識糖部の配座を解析したところC3'-exoであった。

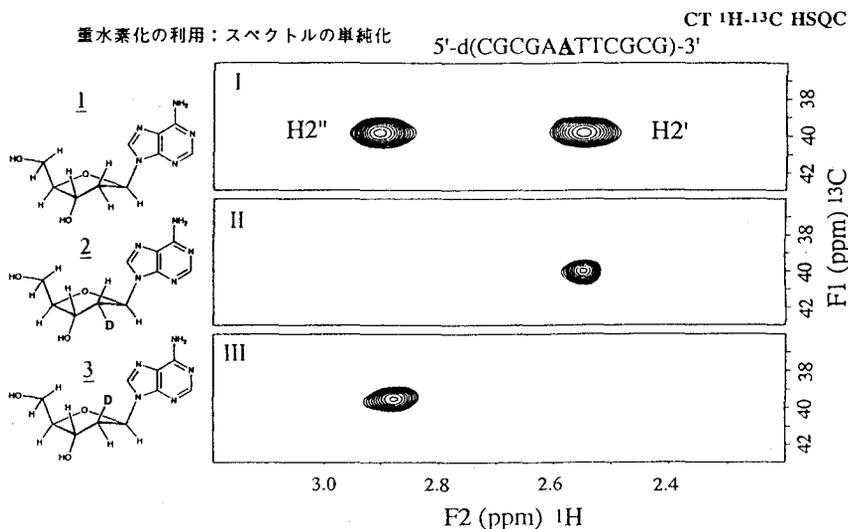


図1.

References

1. Ono, A., Tate, S., Ishido, Y., Kainosho, M. (1994), *J. Biomol. NMR*, **4**, 581-586.
2. Tate, S., Ono, A., Kainosho, M. (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5977-5978.
3. Japanese Patent, No. 30797 (1993).
4. Robins, M. J., Wilson, J. S., & Hansske, F. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4059-4065.
5. Kawashima, E., Sekine, T., Miyahara, M., Aoyama, Y., Kainosho, M., Ono, A., Kyogoku, Y., Kojima, C., & Ishido, Y. (1994), *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, No. 30. in press.
6. Griesinger, C. & Eggenberger, U. (1992) *J. Magn. Reson.*, **97**, 426.
7. Rinkel, L. J. & Altona, C. (1987) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **4**, 621-649.

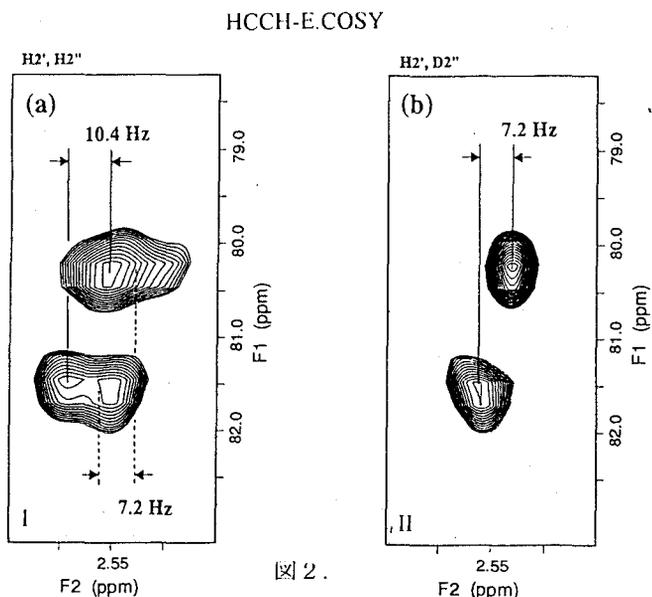


図2.

P 80 グラジエント分光法を用いた
異核種多次元NMRの標識RNAへの応用

○佐藤一¹, 河合剛太², 渡部暁³, 浦敦²,
渡辺公綱², 横山茂之³
(¹日本ブルカー, ²東大・工, ³東大・院理)

**Application of Heteronuclear Multidimensional NMR
with Pulsed-Field Gradient Techniques
to Stable-Isotopic Labeled RNA**

○Hajime SATO¹, Gota KAWAI², Satoru WATANABE³, Atsushi
URA², Kimitsuna WATANABE², and Shigeyuki YOKOYAMA³
(¹Bruker Japan, ²Faculty of Engineering, University of Tokyo,
³Graduate School of Science, University of Tokyo)

In order to simplify and assign the NMR signals of RNA, we have to introduce new techniques, especially the stable-isotopic labeling. Only with such RNA molecules, we can resolve the signals much more by using heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy and assign them unambiguously through direct couplings. In the present study, we prepared [¹³C, ¹⁵N]-labeled RNA molecules and the techniques mentioned above were applied. In order to enhance the results, a combination with pulsed-field gradient spectroscopy must be useful.

Introduction

Multidimensional multiple resonance experiments have been developed for the structure analysis of stable-isotopic labeled proteins. Especially, methods of sequential main-chain assignment have been published by Bax and co-workers. They do not depend on the conformation of proteins because of using the unambiguous direct couplings. And two kinds of techniques to assign the side-chain resonances have been found lately, which are called HCCH-TOCSY (Bax *et al.*, 1990; Fesik *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1990; Olejniczak *et al.*, 1992; Pardi & Nikonowicz, 1992) and HEHOHEHAHA (Majumdar *et al.*, 1993), respectively. The former is based on INEPT for magnetization transfer, while the latter is based on heteronuclear cross polarization (HCP). Large one-bond scalar coupling constants are used in both techniques.

**Keywords : RNA, Stable-Isotopic Labeling, NMR, HCCH-TOCSY,
HEHOHEHAHA, Pulsed-Field Gradients**

○さとうはじめ・かわいごうた・わたなべさとる・うらあつし・
わたなべきみつな・よこやましげゆき

In the present study, we considered whether such techniques described above are also useful for labeled RNAs. However, it is not so easy for RNAs in solution to analyze the NMR signals, because all the ribose protons, except for H1' resonances, resonate in a very narrow spectral region (~1.5ppm). And the very small H1'-H2' three-bond coupling (~2Hz) normally found in an A-form RNA helix often makes it impossible to observe H1'-H2' correlations. In contrast, stable-isotopic labeling of RNAs allows very efficient transfer of magnetization between proton and carbon, as well as carbon and carbon, through large one-bond couplings (~150Hz and ~50Hz, respectively). In the case of ribose (or deoxyribose), all protons belong to spin systems through carbons, indicating that the HCCH type experiments must be useful for the identification of each ribose spin systems.

Experiments

An RNA dimer was prepared from RNase A digests of [¹³C, ¹⁵N]-labeled *E. coli* ribosomal RNA. A 31-mer RNA, which is a model molecule of Group I intron active site, was prepared by *in vitro* transcriptions (Watanabe *et al.*, 1994). The experiments were run on Bruker AMX-500 or AMX-600 spectrometers.

Results and Discussions

First, we have compared HCCH-TOCSY with HEHOHEHAHA for the dimer. As the result of those experiments, we have found out that HEHOHEHAHA gave higher sensitivity and more cross peaks on the 2D spectra than HCCH-TOCSY (Fig.1) even with such a small molecule.

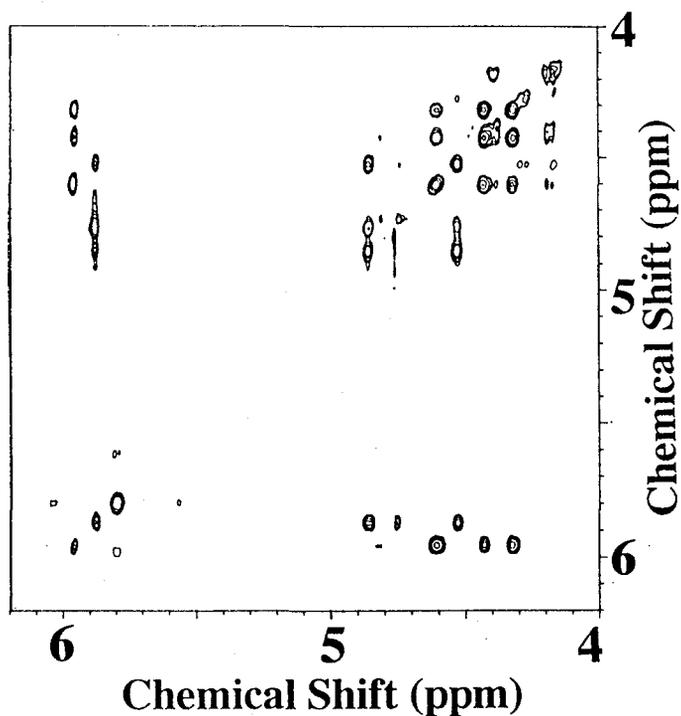
Second, we have obtained a HEHOHEHAHA spectrum (Fig.2) for the 31-mer. This was significantly superior to the spectrum of HCCH-TOCSY as already shown for proteins.

The introduction of pulsed-field gradient techniques to such experiments described above is now in progress.

References

- Bax *et al.* (1990) *J. Magn. Reson.*, **88**, 425.
- Fesik *et al.* (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 886.
- Kay *et al.* (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 888.
- Majumdar *et al.* (1993) *J. Biomol. NMR*, **3**, 387.
- Oleniczak *et al.* (1992) *J. Biomol. NMR*, **2**, 655.
- Pardi & Nikonowicz (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9202.
- Watanabe *et al.* (1994) *Nucleic Acids Symp. Series*, in press.

(A)



(B)

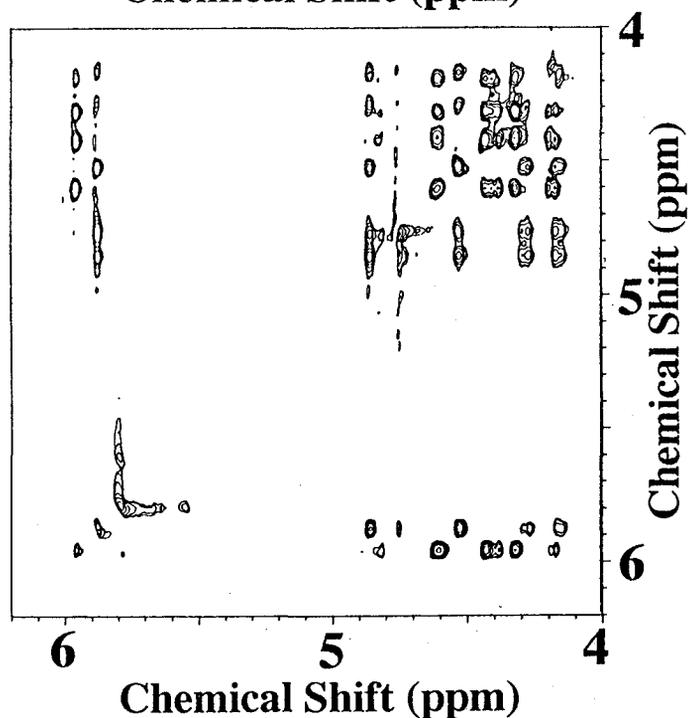


Fig.1 500 MHz 2D spectra (ribose region) of an RNA dimer (1 mM) obtained by using HCCCH-TOCSY (A) and HEHOEHAHA (B) at 298K. Durations for ^{13}C - ^{13}C mixing were 10 ms and 8.7 ms for (A) and (B), respectively. Duration for ^1H - ^{13}C cross polarization was 6.5 ms for (B).

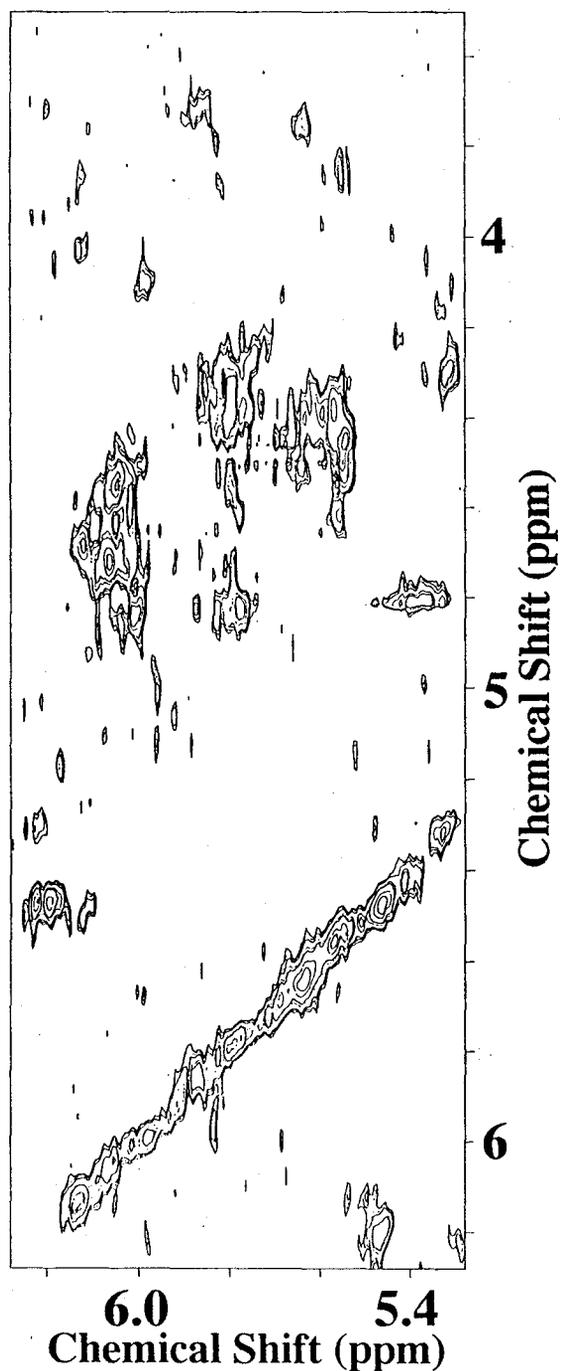


Fig.2 600 MHz 2D HEHOHEHAHA spectrum ($H1'$ region for $F2$ direction) of an RNA 31-mer (0.4 mM) at 298K. Durations for ^{13}C - ^{13}C mixing and 1H - ^{13}C cross polarization were 6.5 ms and 4.9 ms, respectively.

○（横浜国大・工）片平正人、（阪大・蛋白研）片平律子、京極好正

Newly found unique effects of halogen ions on photo-CIDNP signals of nucleic acids

Masato Katahira, Ritsuko Katahira^a and Yoshimasa Kyogoku^a

Faculty of Bioengineering, Department of Engineering, Yokohama National University and ^aInstitute for Protein Research, Osaka University

We have already demonstrated that a photo-CIDNP method can be applied successfully to nucleic acids in order to study their structures and their interactions with drugs [1]. Here we report a newly found unique effect of halogen ions on the CIDNP signals of the nucleic acids. The Cl^- , Br^- and I^- ions cause the inversion of the CIDNP signals of nucleic acids, when the concentrations of those ions are raised. The order of the strength of causing the effect is $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$, which indicates a correlation between the ionic radii and the strength of the effect. Production of another kind of radicals (for example, a protonated radical) on the addition of the halogen ions could explain the unique phenomenon.

(序)

光CIDNP法は従来タンパク質の構造研究に主に用いられてきた。我々は既に光CIDNP法が、核酸の構造研究及び核酸と薬剤の相互作用の研究にも応用できる事を示した[1]。この研究を遂行中我々は、高濃度のNaClが核酸のCIDNPシグナルの符号の反転を引き起こす事に気づいた。その後実験を重ねた結果、この効果は Cl^- による事、 Br^- 、 I^- も同様な効果を及ぼす事、効果を及ぼす強さは $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$ の順である事等がわかったのでここに報告する。

(結果と考察)

図1はNaCl濃度を上げていったときの5' GMPの光CIDNPシグナルの変化をあらわした。photo-CIDNP、nucleic acids、halogen ion

かたひらまさと、かたひらりつこ、きょうごくよしまさ

らわしている。符号が正から負に反転しているのがわかる。同様な符号の反転が5' AMPの光CIDNPシグナルについても生じる。この符号の反転はNaCl、KCl、MgCl₂では生じるが、NaClO₄およびNa₂SO₄では生じない事がわかった。従って符号の反転を引き起こしているのはCl⁻だと結論された。

同様な符号の反転がNaBr及びNaIを加えた時にも観測され、ハロゲンイオンに共通した効果である事がわかった。シグナルを反転させるのに必要なハロゲンイオン濃度はイオン種によって異なり、反転効果を及ぼす強さはCl⁻ < Br⁻ < I⁻である事がわかった。イオン半径の大きいもの程強い効果を及ぼしており、反転を引き起こすメカニズムを考える上で興味深い。この様なCIDNPシグナルの符号の反転は核酸モノマーだけではなく核酸オリゴマーにおいても観測された。

図2はCl⁻の効果により負に反転した5' GMPのCIDNPシグナルが、pHを上げる事により正に再反転する事をあらわしている。この結果はprotonatedラジカルとdeprotonatedラジカルとの間の平衡が、符号反転と密接に関係している事を示唆する。

光CIDNP法を生体分子の構造研究に応用する際、ハロゲンイオンによる符号反転効果を考慮する事が、得られた結果を正しく解釈する上で大切だと考えられる。目下ハロゲンイオンによって引き起こされた異種ラジカル間（例えばprotonatedラジカルとdeprotonatedラジカル）の平衡の移動として、光CIDNPシグナルの反転を説明する事を検討中である。

[1] Masato Katahira, Ritsuko Katahira, Fumiaki Hayashi, Seichi Uesugi and Yoshimasa Kyogoku (1991) J. Am. Chem. Soc., **113**, 8647-8651.

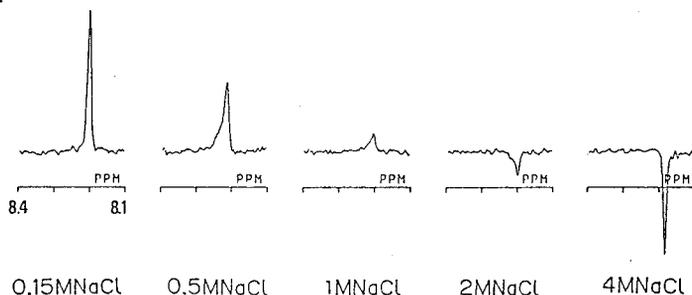


Fig.1 Inversion of the CIDNP signal of 5'GMP by adding NaCl.

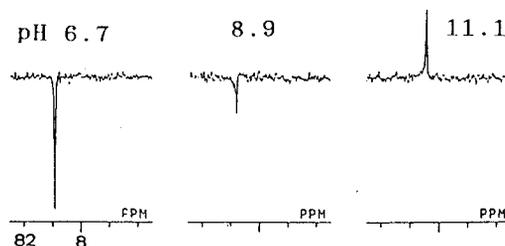


Fig.2 Re-inversion of the CIDNP signal of 5'GMP by raising pH.

セッション：蛋白質（立体構造）

(Proteins-3D Structures)

P 82 PFG法を用いた各種三重共鳴三次元NMR法の検討

○林 文晶、照井 彬弘 (シオノギ研)

Optimization of Heteronuclear Three Dimensional NMR Spectra.

Fumiaki Hayashi, Yoshihiro Terui

Shionogi Research Laboratories

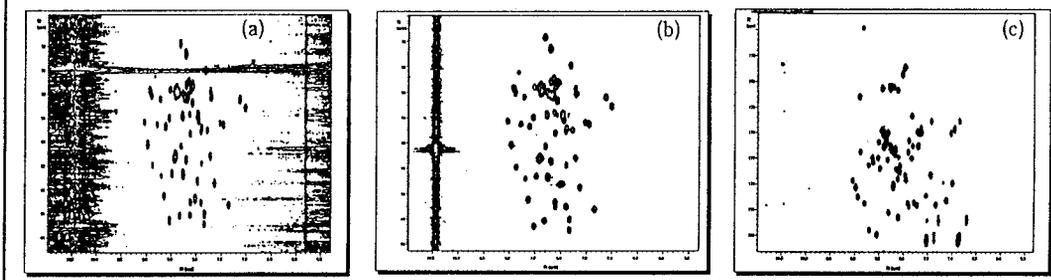
The quality of heteronuclear triple resonance 3D experiments were checked in two points of view ; elimination of artifacts and sensitivity. For elimination of artifact pulsed field gradients were used in various ways along with monitoring the intensity of a solvent signal. Several methods to improve sensitivity were incorporated into 3D experiments and the results were estimated quantitatively.

[序] 三重共鳴三(多)次元NMR法は、1990年にはじめて導入されて以来、その帰属法としての強力さゆえに、蛋白質、核酸等の生体高分子の解析には必須のものとなってきた。これまでに、より効率の良い解析法を目指して多くの、より複雑な pulse sequence が開発されてきた結果、これまで数カ月、一年単位の仕事であった蛋白質の帰属が、例えば、主鎖のみの帰属ならば一日以内で終わることが可能となり始めている。我々は、これまでに報告されてきた三次元NMRの pulse sequence の内主要なものを作成し、その特徴、有効性について検討してきた。その結果明らかになってきたことは、例えば、CBCANH等の新しく報告された、より効率の良い測定法は、当初より報告されている HNCQ等のSNの良い測定法に比べて、感度は1/10程度と悪く、最近報告されている各種の感度の向上およびartifact除去の技術をうまく組み合わせて用いなければ、その感度の悪さゆえに使える範囲がかなり限定されてしまうことである。そこで今回我々は、これまでに報告されている主な感度向上、artifact除去法を順次取り込み、その結果スペクトルがどの程度改善されたかを半定量的に見積り、それらの個々の手法がどの程度有効か、そしてそれらを組み合わせて用いたときどの程度改善されるかについて検討した。

[試料と方法] 試料は、 ^{13}C , ^{15}N 安定同位体ラベルされたPOU homeodomain (POUH, 67残基、分子量約7000)を用い、測定条件は、1.3mM/0.2ml, 20℃で行った。測定はすべて3 channel RF構成のVarian社製Unity-600にPFG unitを装備したNMR装置で行った。

[結果と考察] スペクトルの質を上げるには、artifactの除去(とくにこの場合は軽水消去)効率を上げることおよび、シグナルの実際の感度を上げるという二つのapproachが考えられる。今回、artifactの除去法としてpulsed field gradient (PFG)の利用とその成果について、また、感度向上法としてsensitivity enhancement法、

Fig. 1 Projection (F2/F3) from HN (CO) CA spectra. For solvent suppression (a) spinlock purge pulse and presaturation, (b) pulsed field gradients were used. (c) Projectin (F2/F3) from HNCQ spectra with coherence transfer selection achieved via gradient pulses.



キーワード： 異種核三次元NMR、pulse field gradient、sensitivity enhancement、SEDUCE1

○はやし ふみあき、てるい よしひろ

SEDUCE1 および shaped pulse の利用、磁化移動の経路の変更等の方法を実際に三次元 NMR に応用したときの効果について調べた。

PFG の利用による artifact の除去: PFG 法による artifact の除去法としては良く知られているように、(1) 180° pulse をはさんで用いるものや homospoil 的に用いる感度に影響を与えない使い方、(2) coherence selection に用いるような感度に影響を与える使い方の 2 種類ある。(2) の場合は、感度の低下を防ぐために sensitivity enhancement 法と組み合わせて用いた。図 1 に (a) spin lock purge pulse と presaturation を用いて軽水消去した HN (CO) CA、(b) PFG の (1) の方法で軽水消去した HN (CO) CA、(c) PFG の (1) と (2) を組み合わせて軽水消去した HNCO の projection スペクトルを示す。noise level に対する水のピークの高さの比較より、(c) は (b) の約 10 倍、(b) は (a) の約 10 倍効率良く消去されていることがわかった。

感度の比較: 感度を上げるための試みとして、ここでは (1) sensitivity enhancement 法と decoupling pulse の選択性を上げる方法、(2) 磁化移動の経路を変える方法についてその適用の効果について示したい。

(1) SEDUCE1 は WALTZ16 の 90° pulse element の各々を、sine square 関数様の shaped pulse で置き換えた pulse で、図 2 のような励起 profile をもつものを用いた。図 3 に HNCO へ、それらを適用したものとししないものの CO 軸の線幅と感度の比較を示す。通常の SEDUCE1 の利用は coherence quenching のため逆効果であったが、cosine modulated SEDUCE1 を用いたものでは図 3 (b) の様に、SE 法の感度向上の効果も合わせて、従来法でとった HNCO に比べて感度が約 2 倍上がった。SEDUCE1 による感度向上の理由として、CO の展開時間において、CO を緩和時間の短い α C に対して inphase に保てることによる緩和の効果と、decoupling pulse の選択性の良さによっていると考えている。

(2) この方法が有効な N と α C 間の磁化移動を伴う pulse sequence のうち、CBCANH と SE · HNCACB の例を図 4 に示す。図 4 (a) のとおり、分子内のいずれの領域でも SE · HNCACB の法が感度が 2 ~ 2.5 倍高かった。これは、CBCANH が $H \rightarrow \beta C$ への磁化移動の際、H の multiplicity の異なる β H に対して refocus させねばならないこと、磁化移動に伴う核種の緩和時間の差等が主に効いているものと思われる。

[謝辞] POUH の安定同位体ラベル、精製に関してご指導いただいた大阪大学蛋白質研究所 森田勇人博士 (現 蛋工研)、白川昌弘博士、また、POUH を三次元 NMR 開発用の試料として用いることを許可していただいた京極好正教授に感謝いたします。

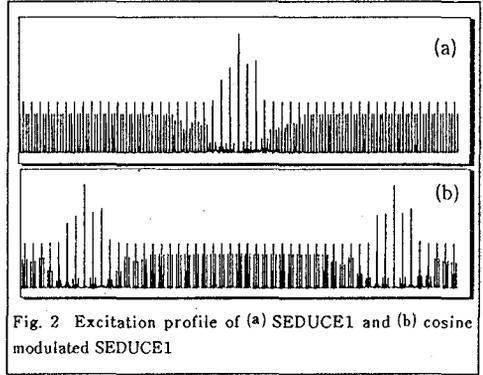


Fig. 2 Excitation profile of (a) SEDUCE1 and (b) cosine modulated SEDUCE1

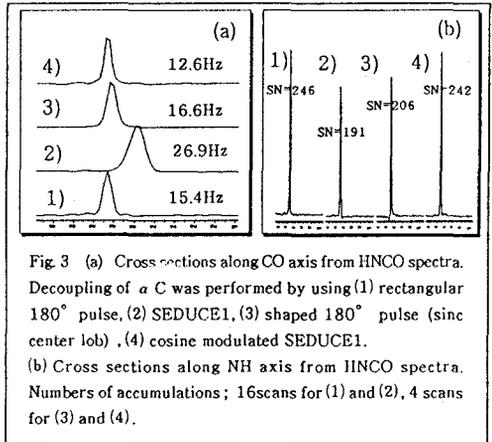


Fig. 3 (a) Cross sections along CO axis from HNCO spectra. Decoupling of α C was performed by using (1) rectangular 180° pulse, (2) SEDUCE1, (3) shaped 180° pulse (sinc center lobe), (4) cosine modulated SEDUCE1. (b) Cross sections along NH axis from HNCO spectra. Numbers of accumulations; 16scans for (1) and (2), 4 scans for (3) and (4).

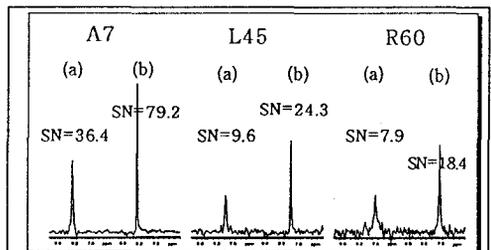


Fig. 4 (A) Cross sections along NH axis from (a) CBCANH and (b) HNCACB spectra.

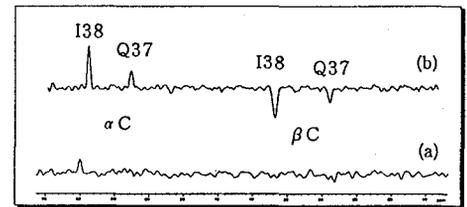


Fig. 4 (B) Cross sections for I38 residue along C axis from (a) CBCANH and (b) HNCACB spectra.

甘味抑制タンパク質グルマリンの高次構造解析

○新井克明¹、伊島理枝子¹、守川壯一²、宮坂明子³、井元敏明³、
吉村 篤子⁴、相本三郎⁴、赤坂一之⁵ (¹京都大理、²蛋白工学研
究所、³鳥取大医、⁴大阪大蛋白研究所、⁵神戸大理)

Three-dimensional structure of gurmarin, a sweet taste-suppressing polypeptide.

○Katsuaki Arai¹, Rieko Ishima¹, Soichi Morikawa², Akiko Miyasaka³, Toshiaki Imoto³,
Shoko Yoshimura⁴, Saburo Aimoto⁴, and Kazuyuki Akasaka⁵

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University; ²Faculty of Medicine,
Tottori University; ³Protein Engineering Research Institute; ⁴Protein Research Institute,
Osaka University; and ⁵Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University.

The solution structure of gurmarin was studied by two-dimensional proton NMR spectroscopy at 600 MHz. Gurmarin, a 35 amino acid residue polypeptide recently discovered in an Indian-originated tree *Gymnema sylvestre*, suppresses selectively the neural responses of the rat to sweet taste stimuli. Sequence-specific resonance assignments were obtained for all the backbone protons and for most of the side-chain protons. The three-dimensional solution structure was determined by simulated-annealing calculations on the basis of 135 interproton-distance constraints. The structures fold into a well-defined structure with a triple-stranded anti-parallel β -sheet. Positions of three disulfide bridges, which could not be determined chemically, were estimated on the basis of the NMR constraints.

1. 緒言

古来、インドで肥満や糖尿病によく効くとされてきた植物にガガイモ科のギムネマシルベスタがあり、この葉からは甘味抑制作用を持つギムネマ酸が抽出されることが知られている。最近、この植物の葉からギムネマ酸以外の甘味抑制物質が発見され、グルマリンと命名された¹⁾。グルマリンは、ギムネマ酸と異なり、ヒトやチンパンジーには感受性がなく、ラットに作用する。また、グルマリンは、甘味応答の回復が遅く、微量でも強力な抑制作用を持っている。このため、他の阻害物質とは異なる作用

key words: three-dimensional structure, simulated annealing, sweet taste-suppressing polypeptide, *Gymnema sylvestre*

○あらい かつあき、いしま りえこ、もりかわ そういち、みやさか あきこ、
いもと としあき、よしむら しょうこ、あいもと さぶろう、あかさか かずゆき

機構を持っている可能性がある。

グルマリンは、分子量4209、35残基からなるペプチドで、6つのCys残基が含まれており、17と18番目に連続してCysが存在している²⁾。3つのジスルフィド結合が存在すると考えられるが、その位置は特定できていない。

以上の一次構造上の知見にもかかわらず、グルマリンのX線構造は今日まで得られておらず、その立体構造について興味を持たれている。したがって、本研究では、NMRによる溶液中でのグルマリンの立体構造決定を目的とした。まず、2次元NMRの手法DQF-COSY、HOHAHA、NOESYを使ってグルマリンのプロトンの信号の帰属を行なった。その後、NMRスペクトルから得られる構造情報を用い、水溶液中における構造を決定した。

2. 方法

NMRの測定はすべて、Bruker社、AM600を用いて行った。試量は3mMのペプチド濃度に調製し、軽水および重水に溶解した。pH2.9、測定温度は35°Cとした。すべての主鎖プロトンと7つの残基を除く側鎖プロトンについて帰属が行えた。また、6つの残基のβプロトンに関して立体特異的帰属を行った。

構造計算には、NOE135個、 $^3J_{HN}$ 、 $^3J_{\alpha\beta}$ より得られる二面角 ϕ 、 χ_1 の制限16個、水素結合3個を用いた。3つ存在すると考えられるS-S結合はどこにも形成されていないとした。構造計算は、4次元空間でシミュレーテッド・アニーリングを行うことにより最適構造を探索するプログラム EMBOSS ver.4.0を用いた。

3. 結果と考察

(1) グルマリンの三次構造

100個のランダムな初期構造について計算を行い、得られた構造の中からviolationの最も小さい10個の構造を採用した。この10個の構造間のr.m.s.d.は、主鎖原子(N, C α , C)のみで1.65±0.39 Å、すべての重原子で2.95±0.27 Åであった。グルマリンは、8-11、22-26、30-34番目の残基が3本鎖からなる逆平行βシートを形成している。残基別のr.m.s.d.を調べてみると、これらの残基と6つのCys残基では小さな値を示し、これらの部位は溶液中での構造も堅固であると考えられる。一方、1-2、12-16、27-29番目の残基では残基別のr.m.s.d.の値が大きかった。これらの残基は、N末やβシートとCys残基(12)あるいはβシート同士(13)を繋ぐループ部分に相当する。また、これらの残基は、主鎖のアミドプロトンの交換速度が速いことから他の部分よりも運動性が高いと考えられる。

(2) S-S結合の位置

採用した10個の構造に関し、硫黄原子間の距離をすべての可能な15通りの組み合わせ

せについて求めた。Cys残基の組み合わせ(3,18)、(10,23)、(17,33)の硫黄原子間の距離が最も小さく、S-S結合の位置はこの組み合わせであると推定される。

(3) グルマリンの構造と機能の関係

グルマリンの機能発現に際して、グルマリンがどの分子とどの部位で結合するかということは現在までわかっていないが、種特異的に甘味刺激を抑制することからグルマリンは味細胞膜上のいわゆる甘味レセプターと相互作用すると考えられる。ループ部分12(残基12-16)、13(残基27-29)はそれぞれ2つのTyr残基と2つのTrp残基を含んでおり、

これらの残基の側鎖はすべて外側を向いている。一つの可能性として、これらとLeu 9、Ile 11、Pro 12の側鎖が疎水的なクラスターを形成し、このクラスターがレセプター蛋白質と相互作用するということが考えられる。

(4) グルマリンと ω -conotoxinとの比較

グルマリンとCys残基の配置が似ているペプチドがいくつか発見されている。特に貝毒の一種で、Ca²⁺チャンネルのプロッカーである ω -conotoxinはS-S結合の位置が化学的に決定されており³⁾、その溶液中の構造も提出されている⁴⁾。今回得られたグルマリンのS-S結合の位置は、 ω -conotoxinのものと一致しており、グルマリンのS-S結合しているCys残基の組み合わせが(3,18)、(10,23)、(17,33)であることを支持している。また、グルマリンと ω -conotoxinの構造も、3本鎖からなる逆平行 β シートの配置など非常によく似ていることがわかった。このことは、グルマリンがラットの甘味抑制作用だけでなく他の機能をもっている可能性を示すものであり、今後解明されることが期待される。

Table 1. All distances between sulfur atoms.

The combinations of cysteine residues	The distance (Å)
(3, 10)	14.85±0.63
(3, 17)	8.04±0.61
* (3, 18)	3.98±0.42
(3, 23)	12.45±1.49
(3, 33)	9.61±0.80
(10, 17)	9.75±0.75
(10, 18)	14.23±0.84
* (10, 23)	4.26±0.72
(10, 33)	7.83±0.48
(17, 18)	5.72±0.51
(17, 23)	6.93±0.87
* (17, 33)	3.91±0.40
(18, 23)	11.17±1.01
(18, 33)	8.60±0.55
(23, 33)	6.69±0.80

* shows the combination which are considered to be the positions of disulfide bridges.

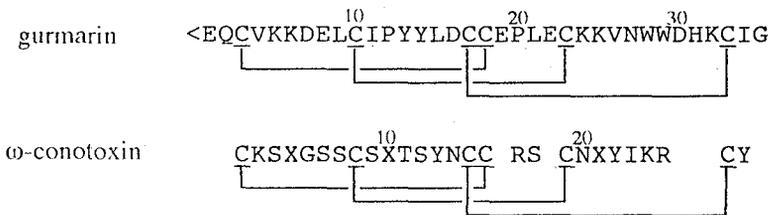


Fig. 1. Amino acid sequences and the positions of three disulfide bridges of gurmarin and ω -conotoxin.

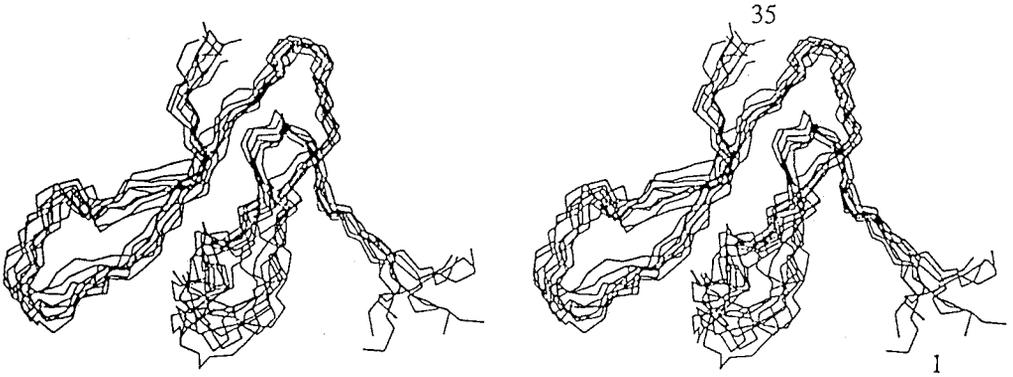


Fig. 2. Stereoview of the backbone atoms (N, C α , C) of the 10 converged structures of gurmarin.

参考文献

- 1) Imoto, T., Miyasaka, A., Ishima, R., et al. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **100**, 309. (1991).
- 2) Kamei, K., Takano, R., Miyasaka, A., et al. *J. Biochem.*, **111**, 109. (1992).
- 3) Nishiuchi, Y., Kumagaye, K., Noda, Y., et al. *Biopolymers*, **25**, S61. (1986).
- 4) Pallaghy, P. K., Duggan, B. M., Pennington, M. W., et al. *J. Mol. Biol.*, **234**, 405. (1993)

(三菱化成生命研, 北里大) 河野俊之, 金載一, ○小林邦子, 朴南奎, 小寺義男, 前田忠計, 佐藤一紀

Structural analysis of ω -conotoxin MVIIA by NMR and Comparison of the Structure of ω -conotoxin MVIIA and ω -conotoxin GVIA

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, Kitasato University

Toshiyuki Kohno, Kim Jae-II, ○Kuniko Kobayashi, Nam-Gyu Park, Yoshio Kodera, Tadakazu Maeda and Kazuki Sato

ω -Conotoxin GVIA (ω -CTX GVIA) and ω -conotoxin MVIIA (ω -CTX MVIIA) are toxins obtained from cone snails which block the N-type calcium channel. In a series of studies on structure-activity relationships of conotoxins, we have recently reported that Arg2 and Tyr13 are essential for the binding of ω -CTX GVIA to the calcium channel. ω -CTX MVIIA is similar to ω -CTX GVIA as for the location of cysteines, but total amino acid homology is very low except for six cysteines, Arg2, Gly5 and Tyr13. In this study, we have analyzed conformation of ω -CTX MVIIA and compared the structure with that of ω -CTX GVIA which is already reported. We have found that ω -CTX MVIIA has three β -strands such as ω -CTX GVIA and the location of two amino acid residues, Arg2 and Tyr13, is similar to that in ω -CTX GVIA.

[序論] ω -Conotoxin GVIA (ω -CTX GVIA) および ω -Conotoxin MVIIA (ω -CTX MVIIA) は南洋産のイモ貝より単離されたペプチド毒で、ともに神経のN型カルシウムチャンネルを特異的に阻害する。 ω -CTX GVIA は27残基 (X=Hyp), ω -CTX MVIIA は25残基のアミノ酸よりなり、分子内に3本のSS結合を持っている (Fig. 1)。我々は、N型カルシウムチャンネルの構造に関する情報を得るため、そのリガンドであるこれらのペプチド毒に注目し、構造と活性の両方から研究を進めてきた。そして、 ω -CTX GVIA がカルシウムチャンネルに結合するのに必要な活性残基が、2番目のリジンと13番目のチロシンであることを明らかにしてきたが、これらの残基は ω -CTX MVIIAにも保存されている数少ない残基であることが興味深い。本研究では、 ω -CTX MVIIAの水溶液中の立体構造をすでに報告されている ω -CTX GVIAのものと比較することにより、これらペプチド毒の構造活性相関を明らかにすることを目的に解析を進めた。

キーワード: $^1\text{H-NMR}$, Conotoxin, calcium channel blocker, tertiary structure

こうのとしゆき, きむじえいる, ○こばやしくにこ, ばくなむぎゆ, こでらよしお, まえだただかず, さとうかずき

[実験] ω -CTX MVIIA は、化学的に合成したものを用い、水溶液中での¹H-NMRの測定を行った。測定としては、軽水中のCOSY, TOCSY, NOESY, 重水中のCOSY, TOCSY, NOESY, PE-COSYおよび、H-D交換の測定を行った。測定に使用したNMR装置はBRUKERのAMX-500, pHは3.5, 温度は288Kと298Kの両方で行った。

常法に従い、シグナルの帰属を行い、X-PLORを用いて構造計算を行った。

[結果と考察] ω -CTX MVIIAのスペクトル解析の結果235個のNOEシグナルを帰属し、23個の角度情報を得た。NOEのうちわけは、残基内93個、隣接残基間76個、それ以外65個である。これらの制限事項をもとにX-PLORで計算を行い、ランダムな100個の初期構造から始めて15個ほどの最終構造が得られた。得られた構造の平均構造に対するRMSDは、主鎖で0.40 Å, 全重原子で1.11 Åであった。

得られた ω -CTX MVIIAの立体構造より、 ω -CTX MVIIAは、 ω -CTX GVIAと同様に3本の β -strandからなる β -sheetを持っていることがわかった。 ω -CTX GVIAと ω -CTX MVIIAの2次構造を比較してFig. 2.に示した。図に示すように、基本的な2次構造はほぼ一緒であるが、 β -sheetの長さに関する違いが見られる。また、 ω -CTX GVIAの活性残基であるArg2とTyr13の空間的な配置については、両者ともほぼ同じであり、 ω -CTX MVIIAの活性残基もこの2つであることが強く示唆された。

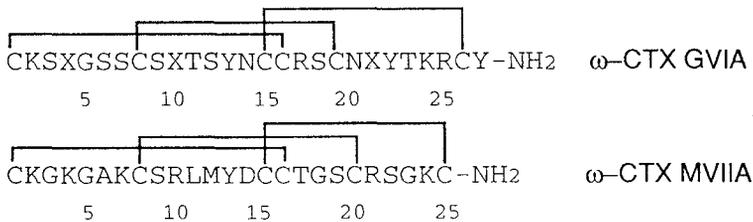


Fig. 1. Primary structure of ω -CTX GVIA and MVIIA (X=Hyp).

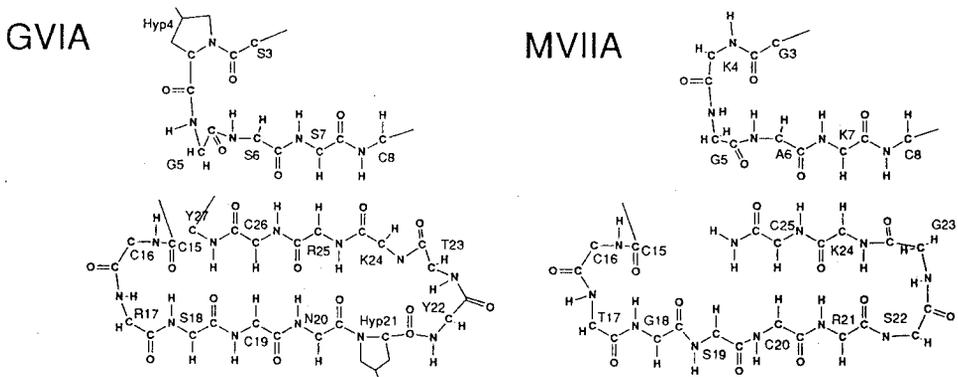


Fig. 2. Comparison of the secondary structure of ω -CTX GVIA and MVIIA.

P 85 プロテインキナーゼC α の制御ドメインCRD2のNMRによる構造解析

(バリアン、¹都臨床研、²横浜市大・医)

○市川さおり、¹ 梶中秀樹、² 竹内よりこ、² 大野茂男、¹ 稲垣冬彦

Solution Structure of Cystein-Rich Domain of Protein Kinase C α

Varian Japan Ltd., ¹Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,

²Yokohama City University School of Medicine

S. Ichikawa, ¹H. Hatanaka, ²Y. Takeuchi, ²S. Ohno, and ¹F. Inagaki

Three-dimensional structure of the second cystein-rich domain of protein kinase C α was determined in aqueous solution by 2D proton NMR and simulated annealing based calculations. The molecular scaffold is maintained by a triple stranded twisted β -sheet packed against an α -helix and two independent zinc-binding sites formed by His8, Cys38, Cys41, Cys57 and Cys21, Cys24, His46, Cys49, respectively. It should be noted that the metal ligands from two sites are interleaved and is thought to be a new structural motif of zinc finger domain. Based on the resultant structure, we discuss the interaction site of the cystein-rich domain of protein kinase C with diacylglycerols and phorbol esters.

<序> プロテインキナーゼC(PKC)は、種々のホルモンや神経伝達物質による細胞内情報伝達系でタンパク質のリン酸化を司っている酵素である。その酵素活性はホスファチジルセリン(PS)とジアシルグリセロール(DAG)の存在下で飛躍的に高まり、また発がんプロモーターであるホルボールエステル(TPA)によっても制御されている。現在までに約10種類の分子種が同定されており、すべてN端側の制御ドメインに2つのシステインリッチモチーフ(CRD)を有することが知られている¹⁾。このCRDにはZnフィンガー様の配列があり、DAGやTPAの結合部位を形成している。今回我々は、PKC α の制御ドメインCRD2(アミノ酸65残基)について、立体構造決定とDAGおよびTPAの結合部位の同定を目的として、NMRによる構造解析を行なったので報告する。

<実験> サンプルは20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.0を含む軽水および重水に溶解して2mMとし、NMR試料とした。測定温度は27℃と32℃、pHは7.4である。NMRは日本電子JNM α 600, Varian Unity500を用い、DQF-COSY, TOCSY(45ms, 80ms), NOESY(75ms, 200ms)を測定した。なおデータ処理はFelixを用い、構造計算はXPLORを用いて行った。

<結果と考察>

2次構造 DQF-COSY, TOCSY, NOESYスペクトルを用い、定法に従ってシグナルの帰属を行った。隣接残基間のNOEマップを Fig.1 に示す。CRD2は主に5つの β シートと1つの α ヘリックスをもつことがわかった。また、観測されるアルファプロトン間のNOEの数が少ないので、CRD2の β シートはねじれた構造をとっていると思われる。

3次構造 759個のプロトン間距離情報を用いて、XPLORにより構造計算を行った。得られた構造は残基番号1-7, 16-17, 30-34, 55-65を除いてよく収束しており (Fig. 2) 平均構造に対するRMSDは主鎖で0.55 Åであった。

プロテインキナーゼC Znフィンガー

いちかわ さおり、はたなか ひでき、たけうち よりこ、おおの しげお、いながき ふゆひこ

Zn結合部位 PKCファミリーのCRDには6つのシステインと2つのヒスチジンが保存されており、1つのCRDに対して2モルのZnが結合する²⁾。EXAFSの実験よりZnはそれぞれ3つのシステインと1つのヒスチジン残基に配位していることが示されている³⁾。PKC α のCRD2の場合、得られた3次構造からHis8, Cys38, Cys41, Cys57とCys21, Cys24, His46, Cys49の2箇所Znが配位している。このZnフィンガーモチーフでは2個のZnの配位部位は互いにとりこんだ形をしており、従来のものと異なる新しいモチーフをとっている。

ジアシルグリセロールやホルボールエステルとの結合部位 CRDには前述のようにZnに配位している6個のシステインと2個のヒスチジンが保存されているが、そのほかに13個の疎水性アミノ酸残基が保存されている。その中でPhe10, Met36, Met43, Val45とVal53は2つのZnの配位を安定化するための疎水性コアを形成している。また残りのTyr15, Pro18, Phe20, Leu27, Leu28, Tyr29, Leu31, Gln34は長いヘアピンループの上にある。このヘアピンループは3つの β 鎖からなる β シートと α ヘリックスの上に覆いかぶさるように位置している(Fig. 2)。ヘアピンループ上の疎水性残基の側鎖は溶媒側につきだしており、またPDB結合性のないCRD相同配列ではこれらの疎水性残基が保存されていないことより、このヘアピンループはジアシルグリセロールやホルボールエステルとの結合に関与していると考えられる。

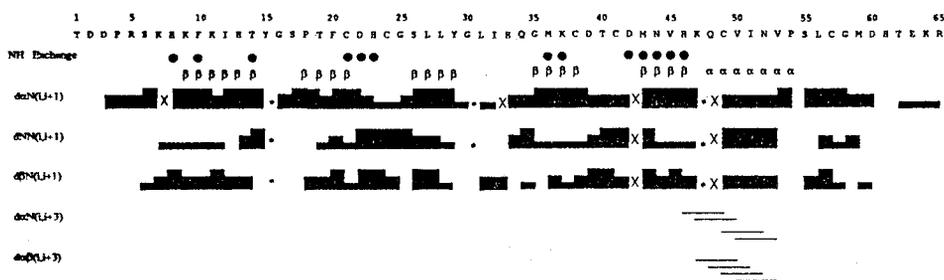


Fig. 1 Summary of the sequential NOE connectivities. The character X indicates the NOE that is not clearly observed due to overlapping with other peaks. The asterisk indicates the connectivity that amide proton is not observed. Filled circles indicate slowly exchanging NH protons.

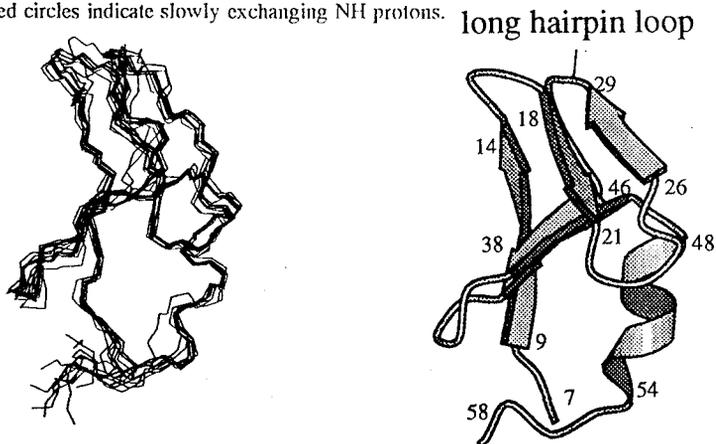


Fig. 2 Best-fit superposition of a set of calculated structures and ribbon diagram of CRD2.

(References)

- 1) Quest, A.F.G., et al., J. Biol. Chem., 267, 10193-10197 (1992)
- 2) Hubbard, S.R., et al., Science. 254, 1776-1779 (1991)
- 3) Quest, A.F.G., et al., J. Biol. Chem., 269, 2953-2960 (1994)

Solution Structure of a Specific DNA Complex of the Myb DNA-binding Domain.

(¹Yokohama City Univ., ²Protein Engineering Research Inst., ³RIKEN)K. Ogata^{1,3}, S. Morikawa², A. Sekikawa¹, T. Inoue¹, A. Sarai³, S. Ishii³,
H. Nakamura², Y. Nishimura¹

Summary

Three-dimensional solution structure of a complex between the DNA-binding domain of c-Myb and its cognate DNA site has been determined using ¹⁵N or ¹³C-¹H heteronuclear multi-dimensional NMR. The Myb DNA-binding region consists of three imperfect tandem repeats of 52 amino acids (R1, R2 and R3 from N-terminus). Among these repeats, R2 and R3 regions are necessary for specific DNA binding. From the comparison of HSQC spectra of the bound and unbound states of R1R2R3 with DNA, it is indicated that R2R3 region is tightly bound against DNA, while the interaction between R1 region and DNA is weak. The resulting structure of distance geometry calculations with a total set of 1732 NOE restraints (1205 intra-protein, 461 intra-DNA and 66 protein-DNA intermolecule) reveals that the recognition helices of R2 and R3 are closely packed each other into major groove of DNA and the interactions between the recognition helices, as well as between the recognition helix and the bases of DNA, are observed.

プロトオンコジーン *c-myb* の発現は組織特異的で、主に未分化血液細胞に見られる。その遺伝子産物 *c-Myb* は核タンパク質で、種々の遺伝子 (*mim-1*, *c-myc* 等) のプロモーター領域に配列特異的に結合する転写調節因子として機能している。*c-Myb* が認識するコンセンサス配列は 5' - AACxG - 3' で、このうち特に第1、3、5番目の塩基対に対する特異性が高い。*c-Myb* タンパク質は分子量約7万で、DNA結合領域はそのN末端側に存在する。DNA結合領域は52アミノ酸からなる3つの繰り返し(リピート)配列をとっており、N末端側からR1, R2, R3と名付ける。DNAとの特異的結合にはR2とR3が必須で、R1は欠落してもDNA結合活性の大きな低下はみられない。各リピートはDNA非存在下ではそれぞれ独立した構造単位を形成しており、その精密な立体構造は既に決定した(R3に関しては文献1参照)。得られた構造からそれぞれのリピートは3つのヘリックスからなり、折れた

キーワード *c-Myb* DNA 複合体 高次構造 動的構造

おがたかずひろ、もりかわそういち、せきかわあい、いのうえたいこ、さらいあきのり
いしいしゅんすけ、なかむらはるき、にしむらよしふみ

たみ構造はよく類似していた（それぞれのリピート間のペプチド骨格のRMSDは0.5~0.6Å）。全てのリピートの第2から第3ヘリックスにかけては1群のDNA結合タンパク質にみられるヘリックス・ターン・ヘリックス（HTH）モチーフに類似するがターン領域が長いHTH variant構造をとっていた。

今回、我々はR1R2R3-DNAとR2R3-DNA複合体についてNMR測定をし、構造解析を行なった²⁾。測定したスペクトルは2D ¹H-NOESY, ¹H, ¹⁵N/¹³C-HSQC, 3D ¹H, ¹⁵N/¹³C-NOESY-HMQC, ¹H, ¹³C-double-half-filtered NOESYで、free R1R2R3とR1R2R3-DNA複合体のHSQCスペクトルの比較から、R2R3領域とDNAとの結合がtightであるのに対してR1とDNAとの相互作用は弱いことが明らかになった。そこでR2R3-DNA複合体についてディスタンス・ジオメトリー計算を行なった。計算に用いたNOE距離制限は全部で1732コで、R2R3タンパク質内部で1205コ、DNA内部で461コ、R2R3タンパク質-DNA間で66コ同定した。得られた25構造のRMSDはR2R3タンパク質骨格とDNAを含めて1.3Åで、R2とR3のそれぞれのリピートごとではタンパク質骨格で0.5~0.6Åの収束を示した。R2, R3の各リピートは第3ヘリックスを認識ヘリックスとしてDNAのmajor grooveに連続的に結合し、それぞれのリピートのN末端ループ、第1および第2ターン、C末端ループの側鎖あるいはペプチド骨格がDNAのリン酸と相互作用していた。特異的な結合は、認識ヘリックス内の残基のうちR3のAsn183とDNAのコンセンサス配列の1番目のアデニン、R3のLys182と3番目のシトシンの対鎖のグアニン、R2のLys128と5番目のグアニンとの間で認められた。さらに今まで構造が明らかになったタンパク質-DNA複合体の認識ヘリックスでは見だされていない、認識ヘリックス間の相互作用（salt bridgeと水素結合）も認められた。このようにR2とR3はZnフィンガードメインの様にそれぞれ別々にDNAを認識しているのではなく、互いに協同して結合していることが明らかになった（我々はこれらのヘリックスをcooperative recognition helicesと命名した）。またこのようなコンパクトな配置をとっているために認識ヘリックスはDNAの長軸の方向に大きく傾いていた。DNAの構造はR2R3タンパク質の結合部位でmajor grooveが開大し、らせんがゆるんでいた。

複合体の動的構造は、¹H-¹⁵N steady-state NOEの測定から、DNA非存在下ではリピートのN末端、C末端ループとリピートを繋いでいるループには速い揺らぎがみられたが、複合体を形成することによりN末端とリピートを繋いでいるループ（R3のN末端）はDNAのリン酸骨格と結合することにより速い揺らぎが比較的抑えられていた。しかしリピートを繋いでいるループではまだ軽度の値の減少は認められ、DNA複合体においても速い揺らぎがまだ少し残っていることを示している。また遅い揺らぎに関しては、DNA非存在下でR2領域にみられたexchange contributionによる（昨年の本討論会でmodel free解析により示した）¹⁵N核のT2緩和時間の短縮はDNAとの複合体では抑えられ、R2とR3領域とでT2緩和時間の明らかな差はなくなった。

1) K. Ogata, H. Hojo, S. Aimoto, T. Nakai, H. Nakamura, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6428.

2) K. Ogata, S. Morikawa, H. Nakamura, A. Sekikawa, T. Inoue, H. Kanai, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura, *Cell* in press.

P 87

Cinnamycin・リゾホスファチジルエタノールアミン複合体の¹H-NMRによる立体構造解析

○細田和男¹、若松馨¹、大屋正尚¹、河野俊之²、
前田忠計^{2,3}、猿渡茂³
(¹群馬大・工、²三菱化成生命研、³北里大・理)

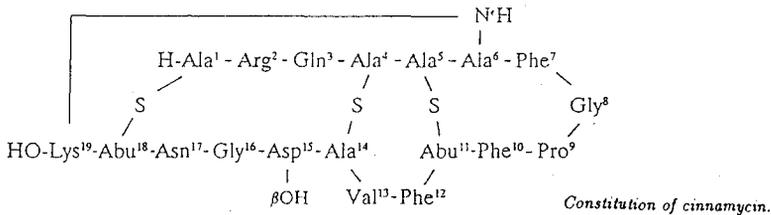
Structure determination of cinnamycin-lysophosphatidylethanolamine complex by ¹H-NMR

K.Hosoda, K.Wakamatsu, M.Ohya, T.Kohno, T.Maeda, S.Endo
Gunma Univ., Mitsubishi Kasei Inst. of Life Science, Kitazato Univ.

Cinnamycin is a nonadecapeptide immunopotentiator produced by *Streptovorticillium griseovorticillatum* which shows anti-tumor and anti-microbial activity. This peptide has been shown to interact with (lyso)phosphatidylethanolamine (1:1 mol/mol) very specifically and strongly, causing hemolysis. To investigate the highly specific and strong nature of the interaction, we determined the three-dimensional structure of the cinnamycin / lysophosphatidylethanolamine (LPE) complex by ¹H-NMR combined with distance-geometry calculations. Residues Phe⁷ through HO-Asp¹⁵ were found to form a pocket which accommodates glycerophosphoethanolamine head group of LPE. The ethanolamine moiety was fixed by Phe⁷, Gly⁸, Pro⁹, and HO-Asp¹⁵, while the glycerol moiety was surrounded by Pro⁹ and Val¹³, contacts which result in the specific binding of LPE to cinnamycin. A comparison will also be made of the structures of cinnamycin in the free state and the complexed state.

[はじめに]

Streptovorticillium griseovorticillatum より産生されるcinnamycin (Ro 09-0198)は、T細胞に対する免疫増強物質として発見された。その後、cinnamycin には、抗生物質のとしての活性もあることが見いだされ、また、ホスファチジルエタノールアミン (PE) と特異的に結合することにより赤血球を溶血させる作用がある事がわかっている¹⁾。cinnamycin は PE とモル比 1 : 1 で結合し²⁾、PEのグリセロホスホエタノールアミン頭部を厳密に認識する。Cinnamycin はアミノ酸19残基からなり、lanthionine, 2個のβ-methyl-lanthionine、lysinoalanineによる4本の分子内架橋が存在する。また、β-hydroxyaspartic acidという異常アミノ酸も含まれている。このアミノ酸19個のcinnamycinがどのようにしてPEを認識して結合しているかを明らかにするために、cinnamycin とリゾPE (LPE) との complex を¹H-NMR で測定し、立体構造計算をした。



キーワード : cinnamycin, lysophosphatidylethanolamine, complex, peptide

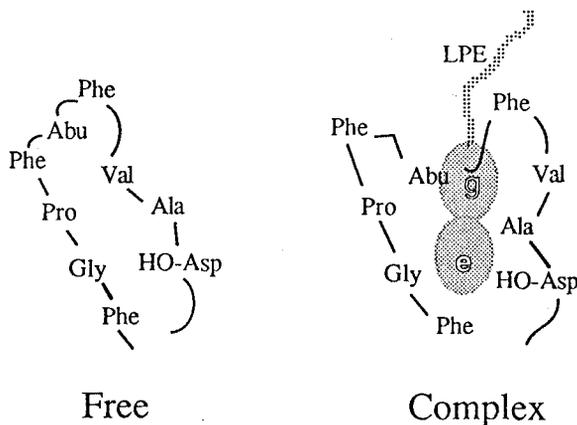
○ほそだ かずお、わかまつ かおり、おおや まさなお、こうの としゆき、
まえだ ただかず、えんどう しげる

[NMR測定&構造計算]

Cinnamycin とドデシルリゾホスファチジルエタノールアミン (C12-LPE) とのcomplex の DMSO 溶液について、2次元 ¹H-NMR (DQF-COSY, NOESY, HOHAHAなど) を測定した。これら測定からの距離制限、角度制限を基に、DADAS90 ver4.0 で以下の手順で構造計算をおこなった。まず、cinnamycin 単体について NOE からの分子内距離制限をかけて complex 中の構造を計算し、次にその構造と LPE 分子の2分子の系で分子間の距離制限、角度制限をかけてさらに計算し、構造を得た。今回用いた制限は、cinnamycin の分子内 NOE 202個、φ-angle 5個、χ₁-angle 11個、cinnamycin と LPE の分子間 NOE 38個である。

[計算結果と考察]

Complex 中で cinnamycin は、Phe⁷ から HO-Asp¹⁵ までのループで LPE のホスホエタノールアミン頭部を挟み込むポケットを形成し、LPE のエタノールアミン部分を Phe⁷、Gly⁸、Pro⁹ と HO-Asp¹⁵ が固定し、またグリセロール部分を Pro⁹、Val¹³ が固定していた。ちなみにこのポケットには余分のメチルやメチレン1個分のスペースもない。また、Ala¹-S-Abu¹⁸、Ala⁵-S-Abu¹¹、Ala⁶-N-Lys¹⁹ の架橋は、LPE 結合部位とは反対側の分子の裏側に存在し、cinnamycin の構造を支えているように見える。一方、free の cinnamycin の構造 (水溶液中) は Kessler らによって解析されているが³⁾、free の状態では上記のポケットは閉じている。free と complex では Ala⁴-S-Ala¹⁴ と Ala⁵-S-Abu¹¹ の架橋の向きが変わっており、この変化によって LPE の入るポケットが形成されると思われる。



- 1) Chung, S.Y., Kobayashi, T., Inoue, I., Takemoto, K., Ishitsuka, H., and Inoue, K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* **940**, 180-187
- 2) Wakamatsu, K., Chung, S.Y., Kobayashi, T., Inoue, K., Higashijima, T., and Miyazawa, T. (1990) *Biochemistry*, **29**, 113-118.
- 3) Kessler, H., Seip, S., Wein, T., Steuernagel, S., and Will, M. (1991) in *Nisin and Novel Lantibiotics* (Jung, G. and Sahl, H.-G. eds.), pp. 76-90.

○岩城隆信¹⁾、神藤平三郎¹⁾、松本 潮¹⁾、水野 猛²⁾、相本三郎³⁾、
守川莊一⁴⁾、中村春木⁴⁾、久保庭均⁵⁾

¹⁾ 東京薬大・薬、²⁾ 名大・農、³⁾ 阪大・蛋白研、

⁴⁾ 蛋白工研、⁵⁾ 中外製薬

Solution structure of the DNA binding domain of H-NS protein which recognizes bent DNA

○T. Iwaki¹⁾, H. Shindo¹⁾, U. Matsumoto¹⁾, T. Mizuno²⁾, S. Aimoto³⁾,
S. Morikawa⁴⁾, H. Nakamura⁴⁾, H. Kuboniwa⁵⁾

¹⁾ Tokyo College of Pharmacy, ²⁾ Nagoya Univ.,

³⁾ Institute for Protein Research, Osaka Univ., ⁴⁾ Protein Engineering Research Institute,

⁵⁾ Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.

H-NS protein has high affinity for bent DNA and it functions as a general transcription regulator. Its trypsin-digested fragment HNS47C (Ala91-Gln137) was found to be the DNA binding domain. We have determined three-dimensional structure of HNS47C using ¹H-NMR spectroscopy. This domain has a stable folded structure through a hydrophobic core which consists of 4 aromatic residues, Ile and Val. DNA binding sites in H-NS are discussed on the basis of the structure.

大腸菌の染色体DNAの凝集にかかわる一群のタンパク質はヒストン様タンパク質と呼ばれる。H-NSは、そのうちの一種とされる中性タンパク質で、分子量15400、137残基よりなり、DNA凝集以外に、広範的な転写制御因子として機能すると考えられている。このタンパク質は、転写開始点近傍に多くみられる湾曲DNAに対して特異的に結合し、遺伝子発現の制御を行なっているという報告がなされている。H-NSは、他の転写制御因子とは異なり、塩基配列特異的な認識ではなくDNAの湾曲という高次構造を認識しているという点で、その高次構造に興味をもたれてきた。

我々はNMRによるH-NSの構造解析を行なってきた。しかし、IntactなH-NSでは予想されるピークの約半数しか観測されないため、NMRの解析は困難であった。そこで、H-NSをトリプシンで部分消化した結果、C末側47残基を残した欠失断片

キーワード：H-NS, ¹H-NMR, 立体構造, NOE, トリプシン消化, 合成ペプチド

○いわきたかのぶ, しんどうへいさぶろう, まつもとうしほ,
みずのたけし, あいもとさぶろう, もりかわそういち,
なかむらはるき, くぼにわひとし

HNS47Cが得られ、その二次構造については本討論会で昨年報告した。今回、NOEデータからHNS47Cの三次構造を決定したので報告する。また、上記断片を10残基分N末側へ延ばした断片HNS57Cを化学合成し、2次元NMR測定を行なったので、その結果も併せて報告する。

<試料および実験>HNS47Cについては、大腸菌による大量発現系から得られたH-NSを1/5000のトリプシンで部分消化後、Heparin-sepharoseカラムで精製したものを水に対して透析した後、凍結乾燥を行なって試料とした。HNS57Cについては化学合成したものを試料とした。上記試料を10mM Kpi / pH5.5, 100mM NaClのbufferに溶かしてNMR測定に供した。スペクトルの測定は、HNS47Cでは日本電子製GX-500を、HNS57Cではバリアン製UNITY plus 500を用いた。構造計算はNOEによる距離情報に基づきEMBOSSを用いて行なった。

<結果および考察>HNS47CについてNOESY, DQF-COSY, HOHAHAの各スペクトルを測定し、常法に基づいた¹Hシグナルの連鎖帰属を行なった。さらに150 msの混合時間で得られるNOESYにおいて299個のクロスピークを帰属し、その強度を測定した。299のNOEの内訳は、sequential ($i - j = 1$)が111, medium range ($2 \leq i - j \leq 4$)が32, long range ($i - j \geq 5$)が77, intraresidueが79であった。以上の情報をもとにEMBOSSによる構造計算を行なった。得られた200個の構造から距離のviolationの低い40個の構造を選び、拘束条件付き分子運動力学によりエネルギー極小化を行なった。そのうち良い構造20個の平均構造を図1に示した。

この構造は、N端側から β シート・ループ・ α ヘリックス・ループ・ 3_{10} ヘリックス・C末端へと連なり、芳香環を中心とした疎水性コアによって安定な構造をとっている。水野らによる部位特異的変異体を用いた実験によって、Arg90-Lys96およびThr110-Thr115がH-NSの機能に重要な領域だと推察されているが、構造上この2つの領域は同じ方向に突き出ており、DNA結合領域の一部をなしていると考えられる。事実、ゲルシフトアッセイによるDNA結合実験において、HNS47Cは弱いながらもDNA結合能を有していることが示された。

さらに、DNA結合領域の構造をより明瞭にするためにC末57残基分のペプチドHNS57Cを化学合成した。DNA結合能はHNS47Cに比べ50倍程強い。本討論会では、その二次構造について議論する予定である。

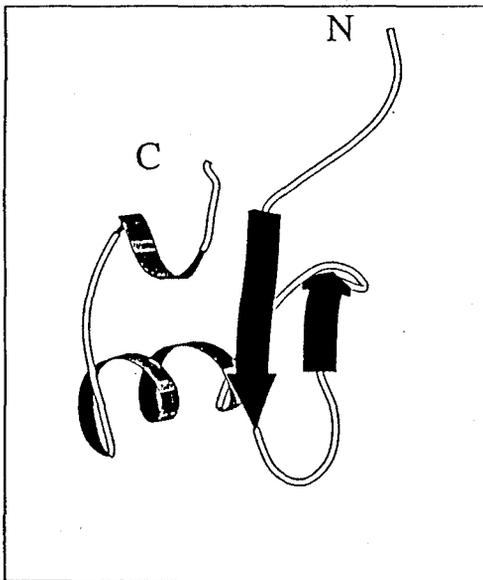


図1 : Ribbon drawing of HNS47C

GDP結合型およびGTP結合型Rasタンパク質の高次構造解析

○伊藤 隆¹, 岩原淳二^{2,3}, 寺田 透^{2,3}, 西村 暹⁴, 柴田武彦¹
Ernest D. Laue⁵, 横山茂之^{2,3} (¹理研・バイオデザイン, ²東大・理
³理研・細胞情報伝達, ⁴萬有製薬・つくば研, ⁵Univ. of Cambridge)

NMR study of GDP-bound and GTP-bound Ras Proteins

Yutaka Ito¹, Junji Iwahara^{2,3}, Tohru Terada^{2,3}, Susumu Nishimura⁴, Takehiko Shibata¹, Ernest D. Laue⁵, Shigeyuki Yokoyama^{2,3}

(¹Biodesign Research Group, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), ²Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo, ³Cellular Signaling Laboratory, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), ⁴Ban-yu Tsukuba Research Institute in Collaboration with Merck Research Laboratories, ⁵Department of Biochemistry, University of Cambridge)

The backbone ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonances of a truncated human c-Ha-Ras protein (residues 1-171) bound with GDP or GMPPNP have been sequence-specifically assigned by using triple-resonance 3D/4D NMR spectroscopy. As a next step, we assigned the side-chain ¹H-¹³C resonances of Ras•GDP by 3D/4D HCCH-type experiments. A solution structure of Ras•GDP has been determined by simulated annealing. The RMSD between 39 final structures were 0.69Å for the backbone heavy atoms of residues 1-165 and 1.79Å for all non hydrogen atoms of residues 1-165. C-terminal residues were disordered in the solution structure. Differences in the backbone dynamics between Ras•GDP and Ras•GMPPNP were examined by ¹H-¹⁵N two-dimensional NMR relaxation studies. Residues 59-64 exhibit relatively fast motion in the GDP-bound form, and, in contrast, exhibit conformational polymorphism in the GTP-bound form. Site-directed mutagenesis studies suggest that the target-binding activity of Ras is closely related to this localized conformational polymorphism of Ras•GMPPNP.

ヒトc-Ha-Rasタンパク質は、アミノ酸189残基、分子量約21Kのタンパク質である。RasはGDP結合型とGTP結合型の2つの状態をとり、前者は生物活性を持たないのに対して、後者は負の調節因子と考えられるp120-GAP, NF1, シグナル伝達経路の下流のエフェクター分子と考えられるc-Raf-1, PI 3-kinaseと結合することが明らかになっており、最終的に細胞の増殖や分化を引き起こす。GDP結合型とGTP結合型の活性の顕著な差は、2つの状態の高次構造の差に依存していると考えられる。私たちはNMRを用いて、GDP結合型とGNPPNP (GTPの非水解アナログ) 結合型の高次構造の差異を解析してきた。これまでに、GDP結合型とGNPPNP結合型では、GAP, NF1, Raf-1, PI3 kinaseとの相互作用に重要な「エフェクター領域」や、GTPase活性の触媒部位の構造が異なっており、GDP結合型ではほぼ一形に固定されているのに対し、

Ras, solution structure, dynamics, conformational polymorphism

いとうゆたか, いわはらじゅんじ, てらだとおる, にしむらすすむ, しばたけひこ, よこやましげゆき

GNPPNP結合型では、複数の安定なコンフォメーションが存在し、比較的遅い速度 (micro~milli 秒オーダー) で交換していることを明らかにした。

今回は、GDP結合型とGNPPNP結合型の、動的性質を含めた高次構造の差を詳細に解析するために、水溶液における高次構造の決定と、タンパク質主鎖のダイナミクスの解析を行った。

まず、GDP結合型の高次構造の決定を行った。側鎖、 ^1H , ^{13}C シグナルは3D/4DのHCCHタイプの実験と、3D/4D HCC(CO)NNH, 3D C'-edited ^{13}C - ^{13}C TOCSY等を組み合わせることで解析することにより帰属を行った。NOE情報は、3D ^{15}N -edited NOESY, 3D ^{13}C -edited NOESY等を解析することで得た。また χ_1 angleの決定は、3D HNHB, 3D HN(CO)HBを解析することによって行った (表)。その結果、C末端側数残基については、水溶液中では、決まった高次構造を取っていないことが分かったが、この数残基を除いた領域については主鎖重原子のRMSDで0.69Å, 側鎖重原子のRMSDで1.79Åの精度で高次構造を決定することができた (図)。

また、主鎖 ^{15}N 原子の T_1 , T_2 緩和時間, $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOEの解析を行うことによって、GDP結合型とGNPPNP結合型では、前述の「GTPase触媒領域」において、主鎖の運動性が大きく異なることを明らかにした。

さらに私たちは、Rasの生物活性やGTP結合型における「構造多形性」に影響を与える変異体についても解析を行っており、高次構造と生物活性の相関を明らかにすることをめざしている。

NOE-derived distance restraints	
Ras(1-171)	2368
(intra-residue)	745)
(sequential)	681)
(short-range)	362)
(long-range)	580)
GDP	7
Ras(1-171) <-> GDP	6

	total 2381
H-D bond distance restraints	
	118
Dihedral angle restrains	
ϕ angle	90
χ_1 angle	64

	total 154
Additional restraints	
Ras <-> Mg $^{2+}$ <-> GDP	11*

	total 2664

(*) These restraints were derived from literature data.

Table: Distance Restraints for Structure Calculation



Figure: Solution Structure of Ras(1-171)·GDP

○藤原正子、加藤敏代、山崎和彦¹、山崎俊夫²、永山国昭³
 日本電子データム(株)、¹蛋白工学研究所、²トロント大(医)、³東大(教養)

Solution Structure of Ribonuclease H
 — The Comparison with X-ray Structures —

Masako Fujiwara, Toshiyo Kato, Kazuhiko Yamasaki, Toshio Yamazaki and Kuniaki Nagayama

Dept. of Analytical Instruments Engineering, JEOL DATUM Ltd.

Protein Engineering Research Institute, Dept. of Medical Genetics, University of

Toronto, Dept. of Pure and Applied Sciences, The University of Tokyo

Assignments of main and side-chain NMR signals of RNase H from E. coli have been completed for ¹H, ¹⁵N and ¹³C nuclei. Based on these assignments, 1429 NOE constraints, 105 torsion angle constraints, and 132 distance constraints for hydrogen bonds were determined. Solution structure of the RNaseH was calculated with DADAS90 program equipped in MolSkop system (JEOL). The average Rmsd of the all pairs of 15 structures was 1.3 Å for backbone atoms, excluding the C-terminal region and the region between helix III and helix IV. Global folding well defined among the 15 structures were compared with crystal structures.

リボヌクレアーゼH (RNaseH)はDNA-RNAハイブリッド分子のRNA部分のみを特異的に切断する酵素である。この酵素はアミノ酸155残基から成り、分子量17.6kDaである。X線結晶解析による立体構造解析から、RNaseHは5本の α -helixと5本の β -strandから構成されることが示された^{1,2)}。一連の部位特異的突然変異実験からは、活性に携わる残基が明らかにされ、最近では変性-再生の実験等により動的な挙動についても関心が持たれている。

我々は、RNaseHの溶液中の構造を明らかにするために、NMR距離解析法による構造決定を行なった。すでに同位体標識法と多次元NMR法により、大腸菌由来のRNaseHを用い、NMRで観測できる核(¹H, ¹⁵N, ¹³C)のうち殆どの核の帰属を完了している³⁾。これらの帰属結果を基に3次元NOESYスペクトルを解析することにより、NOE情報を収集した。NMR測定については去年の本会で発表したの今回では構造計算を中心に報告をする。NOE解析からは水素原子間の距離制約条件として1429個、またJ結合値から求められる ϕ 値に対する条件と立体特異帰属が行なえた11個の χ^1 値を含めて105個の二面角制約条件が得られた。

さらにH-D交換実験から水素結合を持つペアが66個同定されたのでこれらも原子間の距離制約条件として加えた。これらの条件を取り込んだ目的関数を極小化して行くことによって制約条件を満たす構造を求めた。構造計算はMolSkopシステム(JEOL)に組み込まれたDADAS90プログラムを用いた。まずランダムな二面角を持つ初期構造

キーワード：リボヌクレアーゼH、タンパク質構造、NMR距離解析、多次元NMR

ふじわらまさこ、かとうとしよ、やまさきかずひこ、やまざきとしお、ながやまくにあき

を2000個発生させ、制約条件を取り込んでいく過程で目的関数の大きな値の構造ははずしていき、最終的には制約条件を殆ど満たす構造を15個得た。残基毎の二面角の ϕ および ψ の値を調べてみると(下図)、14~17, 90~100, 123~126, 151~155番(下図*印)については15個の構造間で大きく値がばらついていることがわかった。これらの領域は最後のC末端を除いては、二次構造をつなぐ部分であるが、基質分子との相互作用の部位であることが示唆される。上記の部分を除いて主鎖原子を対象にRmsd値を計算すると、15構造間の平均で1.3Åである。最も良くNMR条件を満たした構造とX線構造とのRmsd値は1.1Åとなった。二次構造は比較的良好に構造が決まるが、5本のhelixの中ではhelix IIIが揺らぎが大きかった。また水素結合を考慮しないNMR条件のみで、同様なDADAS90計算を行なったRmsd値は15構造間では1.5Åであり、 β 構造は水素結合によって安定化されていることがわかった。His124の側鎖の向きについては、2つのX線構造の間で議論があったが、NMR構造では溶液中に突き出た形で揺らいでおり、2)のX線構造を支持するものとなった。さらにX線構造との相違について細部の比較を行う。これらは溶液状態でのRNaseHの活性を議論する上で重要と思われる。

References

- 1) Yang, W., Henderson, W. A., Crouch, R. J. and Satow, Y. (1990) *Science*, **249**, 1398-1402
- 2) Katayanagi, M., Miyagawa, M., Ishikawa, M., Matsushima, M., Kanaya, S., Nakamura, H., Ikehara, M., Matsuzaki, T., and Morikawa, K., (1992) *J. Mol. Biol.*, **223**, 1029-1052
- 3) Yamazaki, T., Yoshida, M., and Nagayama, K., (1993) *Biochemistry*, **32**, 5656-5669

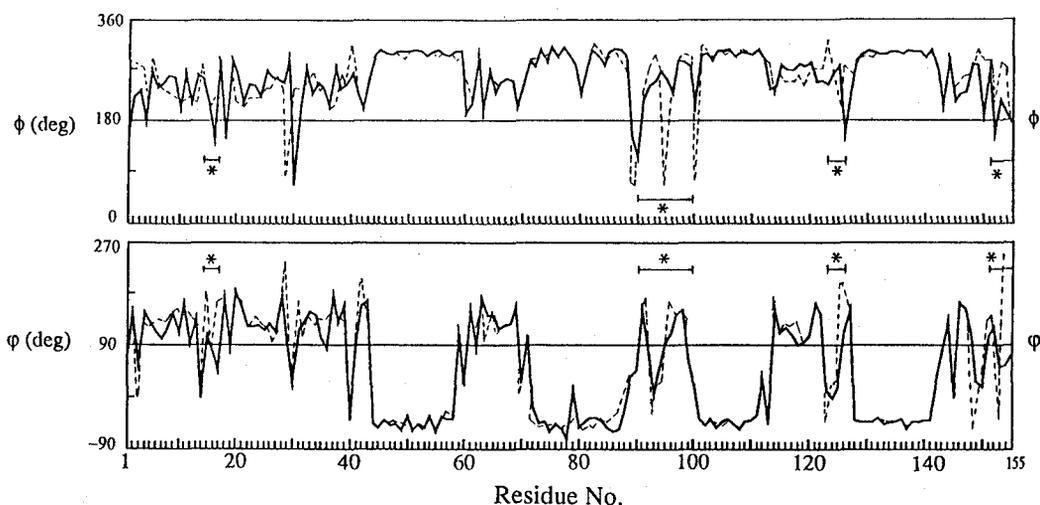


Figure 3 Angle plots of RNase H

— Average of solution structures
 --- X-ray structure

セッション：蛋白質（構造と相互作用）

(Proteins-Structure and Interaction)

P91

NMRによるSex-lethal蛋白質 (Sxl蛋白質) とRNAの相互作用
に関する研究

¹東大・理, ²神戸大・理, ³東大・工, ⁴京大・理

○武藤 裕¹, 井上 真¹, 武田佳宏¹, 木川隆則¹, 坂本 博²,
大槻高史³, 河合剛太³, 渡辺公綱³, 志村令郎⁴, 横山茂之¹

NMR Analysis of the Interaction between RNA Binding Domain
of the Sxl Protein and RNA molecules

Yutaka Muto¹, Makoto Inoue¹, Yoshihiro Takeda¹, Takanori Kigawa¹,
Hiroshi Sakamoto², Takashi Otsuki³, Goto Kawai³, Kimitsuna
Watanabe³, Yoshiro Shimura⁴ and Shigeyuki Yokoyama¹

¹Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science,
University of Tokyo, ²Faculty of Science, Kobe University,
³Faculty of Industry, University of Tokyo, ⁴Faculty of Science,
Kyoto University

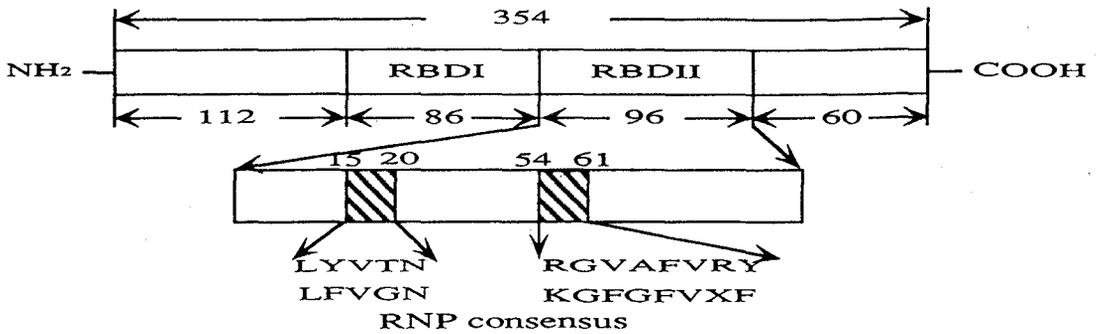
The Sex-lethal (Sxl) gene product (the Sxl protein) is crucial for
sexual differentiation of *Drosophila melanogaster*, regulating
alternative splicing of Sxl and tra pre-mRNAs. The Sxl protein
has two tandemly linked RNA-binding domain (RBD), which consists
of 90-100 amino acid residues. We determined the global folding
of the second RBD (RBD II) of the Sxl protein. By ¹H-¹⁵N HMQC
method, chemical shift perturbations were examined for all
resonances upon binding with several RNA sequences. Thus, it
was indicated that not only the UUUUUUUU sequence but also the
CUAGUG sequence bind to RBD II and the four stranded antiparallel
 β -sheet structure is important for RNA binding.

【序】ショウジョウバエの性決定に関与する遺伝子として知られているSxl蛋白質は, *tra*のpre-mRNAのスプライシングを調節することにより, ショウジョウバエの性決定を行っている¹⁾. Sxl蛋白質は, アミノ酸約90残基程度からなるRNA結合ドメインをタンデムに持つ(RBD I, RBD II) (Fig.1). このふたつのRBD部分によって*tra* pre-mRNAの3'-スプライス部位にあるGUUUUUUUUCUAGUG配列が認識される. このRBDとRNAとの相互作用の解明は, RNAと蛋白質との相互作用を解明する上で興味深い題材であると考えられる. われわれはすでに, Sxl蛋白質の二番目のRNA結合に関与するドメイン(RBD II, アミノ酸96残基)について安定同位体を利用したNMR分光法を用いることにより, その二次構造を決定し, 報告している. これによるとSxl蛋白質のRBD IIは, 従来から構造の知られているRBDと同じように $\beta\alpha\beta-\beta\alpha\beta$ のモチーフを持っている. 今回,

Sxl蛋白質 安定同位体標識 二次元, 三次元NMR分光法

むとうゆたか いのうえまこと たけだよしひろ きがわたかのり さかもとひろし おおつきたかし かわいごうた わたなべきみつな しむら
よしろう よこやましがゆき

Figure 1 Diagrammatic representation of Sxl protein



これらU1A蛋白質²⁾, hnRNP C蛋白質³⁾およびA1蛋白質⁴⁾の構造を互いに比較し, さらに¹H-¹⁵N HMQCスペクトルを利用し各種のRNAとの相互作用について考察した.

【材料および方法】¹⁵N, ¹³C標識した試料は, 大腸菌BL21(DE3)株を用いたT7ポリメラーゼによる発現系によって調製した. 精製したSxl蛋白質のRBD IIは, 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(50mM トリス塩酸緩衝液, pH6.5, 10% ²H₂O)への溶媒置換を行った. 相互作用を観察するためのRNA分子は, 化学合成によって作成した. 測定は, すべて25°CでBruker社製AMX600を用いて行なった.

【結果および考察】

(1) Sxl蛋白質のRBD IIの構造

¹⁵Nおよび¹³C標識を行なった試料を用いて三次元NOESY-HMQCを測定することにより1345個のNOE情報を集めた. また, 60個の二面角情報と併せて構造計算を行なった. この結果RBD IIは, 四本のストランドからなる逆平行βシート構造と二本のαヘリックスからなる構造をとっていることがわかった. このなかでβ3ストランドに位置するY61, β2ストランドに位置するI39, α1に位置するF33およびα2に位置するA70がコアを作っていることがわかった. また, これらの残基は, 他のRBDモチーフにも保存されており, RBDの構造を支える上で重要なアミノ酸残基であることがわかる. すでに二次, 三次構造が報告されているU1A蛋白質のRBD²⁾, hnRNP C蛋白質のRBD³⁾および二次構造が最近報告されたA1蛋白質のRBD I⁴⁾との違いを比較すると, β2とβ3の間のループ部分に大きな差異が認められる. 特に, ふたつのRBDをタンデムにもつ蛋白質のRBDが長いループを持つRBDモチーフに属することは, 興味深い(Fig.2).

Figure 2 Comparison of RBDs

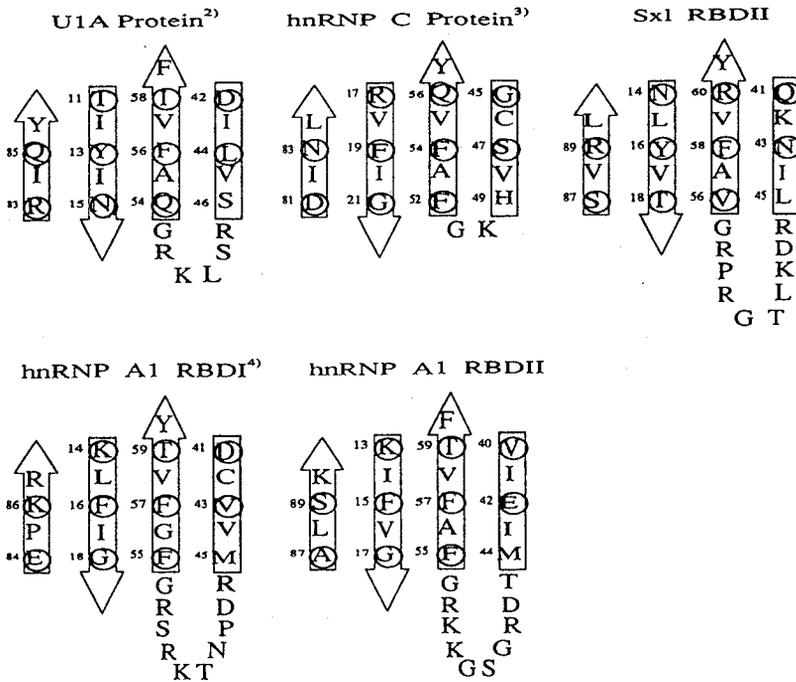
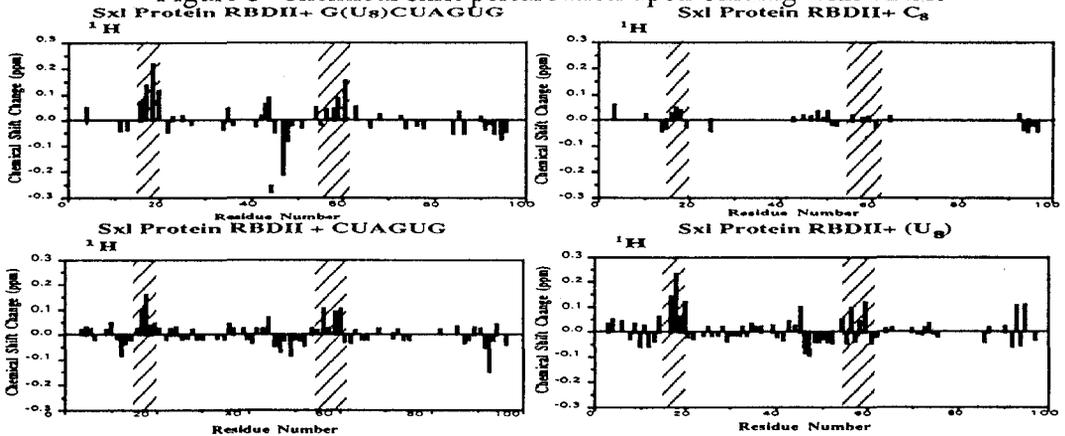


Figure 3 Chemical shift perturbation upon binding with RNAs



RNP1 and RNP2 are indicated by hatched regions.

(2) RNA分子との相互作用

まず、RBDIIによるRNA分子の認識部分について考察するため、結合配列であるGUUUUUUUUCUAGUGを加えた場合とCCCCCCCCを加えた場合でのHMQCスペクトルのシグナルの変化を比較した。CCCCCCCC配列では、¹H、¹⁵Nにおいて顕著な化学シフトの変化が現れていないのに対して、GUUUUUUUUCUAGUGを加えた場合では、主に逆平行βシート構造部分に顕著な化学シフトの変化が起こっていた。この比較から、結合配列が特異的にRBDIIと相互作用すること、およびその相互作用に逆

平行 β シート部分で広く関与することがわかった (Fig.3) .

一般にRBDの多くは、ポリピリミジン配列を認識する場合が多いと考えられている。そこで、この結合配列の中での、各ヌクレオシド残基の結合様式を考察するため、以下のようなRNA配列を合成して同様の実験を行った。

(i) UU,UUUU,UUUUUUUU,UUUUUUUU

(ii) CUAGUG,GUUUUUUCUAGUG,GUUUUCUAGUG

(i)の系列により、Uで構成されるポリピリミジン部分についての結合に対する寄与を調べ、(ii)では、CUAGUG部分の結合にたいする寄与を調べることを目的とした。

(i)の系列の実験から、ポリUでは、配列の長さが6残基を超えると顕著な化学シフト変化が現れることがわかった。また、配列の長さが2, 4などの短い場合、 β シート構造のなかでもY16を中心として β 1ストランドとC末端部分に影響が現れ始めるが、逆平行 β シート構造全面に影響が現れるわけではないことがわかる。さらに、(ii)の系列からポリU配列を含まないCUAGUGでもRBD IIによって認識され ^1H , ^{15}N の化学シフトに変化が現れることがわかった。しかし、この場合の変化は、GUUUUUUUCUAGUGと異なり、 β 3ストランドの近辺には大きな影響が及んでいないことがわかった。

また、これらの結合配列をRBD IIに加えた場合、逆平行 β シート構造部分の他に、構造をとっていないと考えられるN末端部分やC末端部分にも影響が現れている。Sxl蛋白質によるRNA分子の強い認識には、RBD I, RBD IIが必要であることがわれわれによって明らかにされている。RBD IIのN末端部分は、RBD IとRBD IIの繋ぎ目にあたる部分であり、Sxl蛋白質のRNA分子の認識に、重要な役割を果たしていることが考えられる。現在、RBD I-RBD IIについても発現系を作成しており、今後は、このRBD I-RBD IIについても解析を進める予定である。

【文献】

- (1) Inoue et al. (1991) Nature 344, 461-463.
- (2) Nagai et al. (1990) Nature 348, 515-520.
- (3) Wittekind et al. (1992) Biochemistry 31, 6254-6265.
- (4) Garrett, et al. (1994) Biochemistry 33, 2852-2858.

P 92

ナトリウムチャンネルのS 4セグメントにおける
3₁₀ヘリックス構造の可能性

○川口 謙, D. Mulvey, D. Doak, I. D. Campbell
東レリサーチセンター, オックスフォード大学

It is possible that the S4 segment of the sodium channel protein adopts a 3₁₀ helical structure.

Ken Kawaguchi, Denise Mulvey, David Doak and Iain D. Campbell
Toray Research Centre, 1111 Tebiro, Kamakura 248, Japan and
Dept. of Biochemistry, University of Oxford, South Parks Road,
Oxford OX1 3QU, UK.

The S4 segment of the voltage-gated sodium channel has been assumed to be the voltage sensor of the channel. In order to evaluate the models of the mechanism of voltage-gated channel, the micelle-bound structure of the synthetic peptide corresponding to the S4 sequence has been analyzed by 2D NMR and structure calculation. A considerable number of α_i -NH_{i+2} NOEs were observed besides the NOEs characteristic of α helix, indicative of 3₁₀ helical structure. The structure was supported by NH exchange experiment and CD spectrum.

【はじめに】

ナトリウムチャンネルは電位依存性のイオンチャンネルで、そのS 4セグメントは電位センサーと推定されている。S 4セグメントを含む各セグメント (S 1 ~ S 6) は膜貫通ヘリックスと考えられている。我々はこれらのセグメントと同じアミノ酸配列をもったペプチドを合成し、

キーワード: Na⁺チャンネル, 3₁₀ヘリックス, ミセル

○かわぐち けん, デニス マルビー, デイビッド ドーク,
イエン キャンベル

それらがミセルに結合した状態での立体構造を NMR で検討している。ここでは S4 ペプチドについて報告する。アミノ酸配列は下記のとおりで、ラット脳由来のナトリウムチャンネルの第一番目のモジュールのセグメントに対応している。



S4 は、その配列上で 3 残基ごとに Arg, Lys が現われるという際立った特徴をもっている。このために S4 は膜電位センサーと考えられているが、センサーの機構は明らかにはなっていない。いろいろなモデルが提唱されているが、推測の域を出ていない。このような問題に対して、構造上の実験的な知見を提供することを目的としている。

【方法】

ミセルとして全重水素化ドデシルホスホコリン (d_{38}) を用いた。ペプチドとミセルのモル比を 1 : 50 として、pH 3.5、30°C、90% H₂O、10% D₂O 中において測定した。NMR 装置は Bruker AM600 を用いた。NOESY スペクトルはジャンプ&リターン法を用い、100 ms の混合時間で測定した。帰属を完了した後に X-PLOR 3.0 を用いて立体構造を計算した。

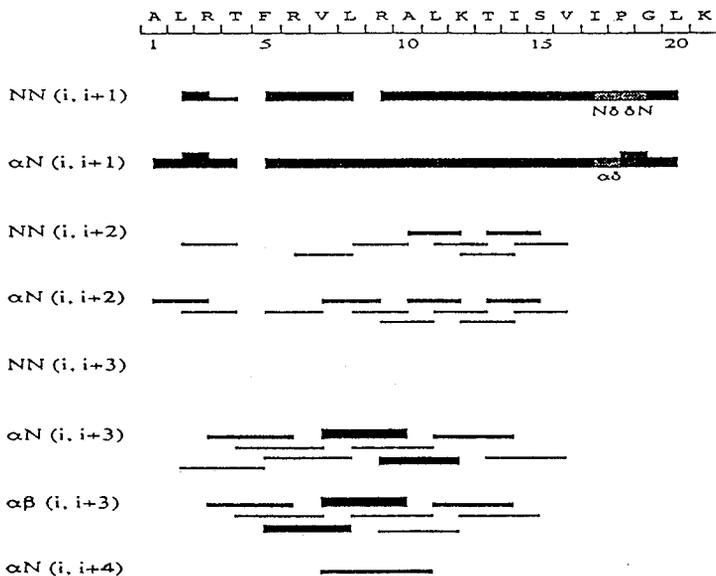


Fig. 1 The block diagram of NOEs observed for S4 bound to micells.

【結果と考察】

S4 セグメントに相当するペプチドは水中ではランダム構造であったが、ミセルを添加すると規則的な高次構造をとり、ヘリックスの NOE パターンが観測された。図 1 は NOE のブロックダイアグラムであるが、 $\alpha N(i, i+2)$ の NOE が多く観測されている。これは 3_{10} ヘリックスの特徴とされている。なおこの NOE は、S4 の TFE (トリフルオロエタノール) 溶液の場合ではほとんど観測されなかった。

S4 の TFE 溶液では α ヘリックス構造をとることが明らかとなっているので¹⁾、ミセルに結合した S4 セグメントは α ヘリックスとは別のヘリックス構造をとっている可能性がある。なお、S4 の CD スペクトルも、ミセルと TFE 中とは一致しなかったことから、異なったヘリックス構造を示唆している。

アミドプロトンの H-D 交換実験では、2 時間以内にほとんどのアミドプロトンが交換されてしまうものの、3 残基ごとにややゆっくりと交換される疎水性アミノ酸残基が観測された。このことは、3 残基ごとの疎水性アミノ酸残基 (Leu, Ile など 3 残基の周期をもっている) がミセル内に比較的深く埋もれていることを意味し、 3_{10} ヘリックス構造の可能性を支持している (図 2 参照)。

図 3 はランダム構造を初期構造

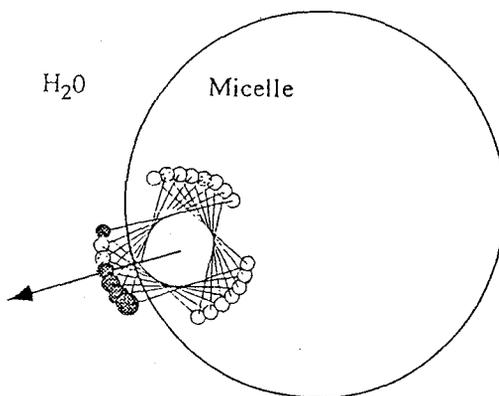


Fig. 2 Schematic helical wheel of idealized 3_{10} helix for S4 in micelles. Basic residues are shaded grey.

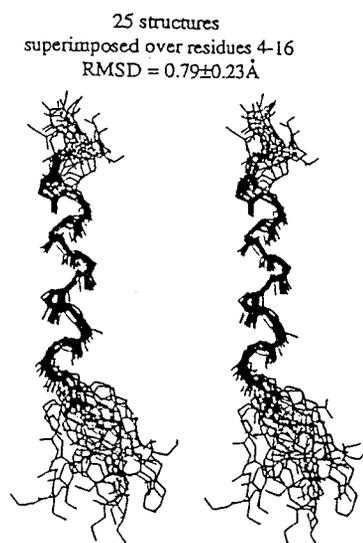


Fig. 3 The structure of S4 in micelles.

として計算し、収束した結果を示している。アミノ酸残基番号で4～16を重ねて書いてある(図上側がN端)。C端側はプロリン残基の存在(Pro 18)のために収束していない。得られた構造は、しかし、 3_{10} ヘリックスとも α ヘリックスとも判定し難いものであった。この理由として、実際に球状蛋白質で見出されている 3_{10} ヘリックス構造は、理論的(理想的)な構造とかなりずれた構造であることが揚げられる。またアミドプロトンの交換実験から分かるように、安定なヘリックス構造になっていないことも、計算結果に影響を及ぼしたと考えられる。なお構造計算は、 3_{10} ヘリックスと α ヘリックスの水素結合を拘束条件に入れた場合も行った。図4は上記の構造のラマチャンドラン・プロットである。●印が図3の構造に対応している。主鎖二面角の値からみると、 3_{10} ヘリックスと α ヘリックスの差は ψ の角度にある。 3_{10} ヘリックスの ψ の値は概ね -30° 以上で、 α ヘリックスの値よりも大きい(絶対値では小さい)。図4の●印は、この意味では 3_{10} ヘリックス構造の特徴を備えている。

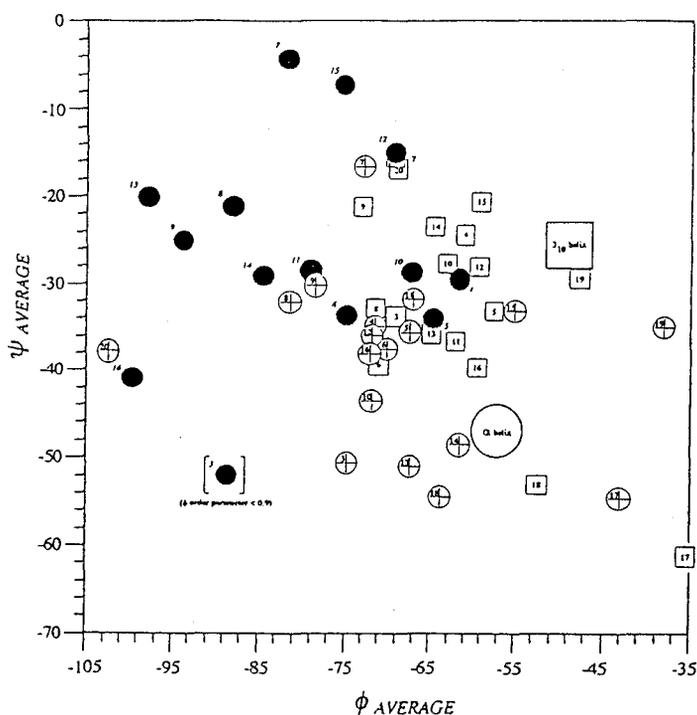


Fig. 4 Partial Ramachandran plot in calculated S4 (micelles) structures.

● : corresponding to the structure shown in Fig. 3.

【文献】 1) D. Mulvey et al., FEBS Lett., 257, 113 (1989)

P93 Structure of a Membrane Fusion-Active Peptide. ¹H-2D NMR study of Aggregated and Non-Aggregated Species in Solution.

**P.Dubovskii, *S.Takahashi and K.Akasaka
(Department of Chemistry, Faculty of Science,
Kobe University and *Institute for Chemical
Research, Kyoto University)**

The structure of an N-terminal 20-residue peptide analog of haemagglutinin of influenza virus was analyzed in the water and water/TFE mixtures. In the monomeric state (c=2mM, pH 6.7, 25°C) the peptide was shown to be disordered in water solution, but is structured in the water/TFE mixture (30% v/v) with a helix extended from 2 to 11 residues. The latter finding fits well to the secondary structure predictions obtained with different algorithms. Increasing concentration of the water solution of the peptide at pH 6.7 resulted in the aggregation of peptide molecules with a formation of β -pleated sheet structure.

INTRODUCTION

Among the 20-residue peptide analogs of the N-terminal moiety of haemagglutinin of influenza virus, the peptide having the amino acid sequence: GLFEAIAEFIEGGWEGLIES, was shown previously (Takahashi S., Biochemistry. 1990. V.29. P.6257-6264) to be highly soluble in the water and to have the ability of inducing membrane fusion of small unilammelar vesicles of egg PC at acidic pH. The membrane fusion-activity of the peptide was considered to be related to its ability to form some ordered structure in the presence of membranes. In order to obtain clues to the ordered structures of this peptide, first we studied the conformation of the peptide in the absence of membranes. Here we report the formation of the ordered structures of the peptide molecules induced by trifluoroethanol (TFE) and by aggregation.

Key words: two-dimensional NMR, membrane-fusion peptide, peptide structure

RESULTS AND DISCUSSION

By a combined use of CD and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, the peptide was shown to be monomeric in the water solution at pH 6.7 ($c=2\text{mM}$, 25°C) but aggregated at lower pH or higher concentrations. By acquiring two-dimensional NMR spectra (NOESY, ROESY, DQF-COSY, HOHAHA) of the peptide at pH 6.7, all of the resonances except the aromatic protons of Phe residues were assigned. The absence of the cross-peaks in the NH-NH region of the NOESY (ROESY) spectra up to mixing times of 500 ms (300 ms), together with values of spin-coupling constants $J_{\text{H}\alpha\text{-NH}}$ and the temperature coefficients of the amide proton chemical shifts, led us to conclude that the peptide takes a random coil conformation in water under the chosen condition.

Addition of the TFE (30% v/v) to the water solution of the monomeric peptide induced an ordered structure with intense NH-NH NOESY cross-peaks (Fig.1). Assignment of the resonances by the use of HOHAHA and NOESY measurements resulted in the identification of a helical structure extended from residues 2 to 11. The number of cross-peaks in the NOESY spectra were characteristic for both α -helix and 3_10 helix, suggesting the fluctuation between the two helices formed. No ordered structure was found in the region from 12 to 20 amino acid residues.

Increasing concentration of the peptide at pH 6.7 ($c=4\text{mM}$) resulted in the aggregation as evidenced by the broadening of the $^1\text{H-NMR}$ spectra and by CD spectral changes. Two-dimensional $^1\text{H-NMR}$ studies gave no evidence for the helix formation, but suggested the formation of a β -pleated sheet.

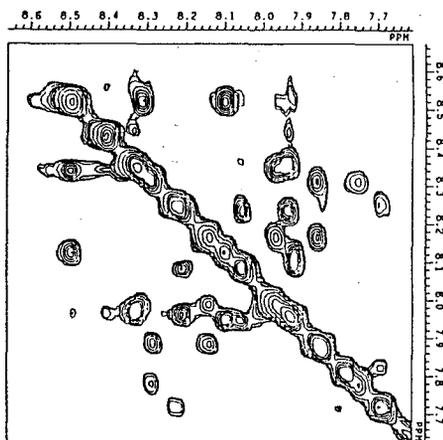


Fig.1. NH-NH region of 200 ms 400-MHz NOESY spectrum of peptide 3 in TFE- d_3 /water (30% v/v, $c=2\text{mM}$, $\text{pH}^*6.7$, 25°C).

P 94

Ca²⁺拮抗作用を有する蛋白質カルシセプチン (Calciseptine) の¹H-NMRスペクトルの帰属と二次構造

三共 (株) 分析代謝研究所 ○高山 知子 半沢 宏之 春山 英幸

¹H-NMR Study of Calciseptine, a Small Protein with Calcium Channel Blocker Activity, Identification of Secondary Structures

○T. TAKAYAMA, H. HANZAWA, H. HARUYAMA, .
Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd

Calciseptine is a small protein isolated from the venom of black mamba (*Dendroaspis polylepis polylepis*), containing 60 amino acid residues with four disulfide bridges. In spite of a relatively high sequence homology with short neurotoxins, calciseptine exhibits no affinity to acetylcholine receptor, but is a specific blocker of the L-type calcium channel. In this report, assignment of the ¹H-NMR spectrum and identification of secondary structures will be described. Based upon the secondary-structure dependent NOE patterns, a short β sheet and a long triple-stranded β sheet are identified as commonly seen in known neurotoxins. However, non-trivial structural differences were also recognized. The non-conservative sequences were found to be localized at the tips of flexible loop regions.

《はじめに》 カルシセプチンは black mamba (*Dendroaspis polylepis polylepis*) のヘビ毒液中から単離された60残基からなる蛋白質で4つのS-S結合を含み、short neurotoxin類と高いホモロジーを示す。1) 一連のneurotoxin類がアセチルコリンレセプターに作用するのに対して、カルシセプチンはアセチルコリンレセプターに対する親和性を示さず、1、4ジヒドロピリジン系のL型Ca²⁺チャネルブロッカーであるニトレンジピンの結合を競合的に阻害する。一方、neurotoxin類はCa²⁺チャネルには作用しない。このことから、受容体識別の機構について興味もたれる。今回は、各種同種核2D-NMRにより¹Hシグナルの帰属を行い二次構造が得られたので、他のneurotoxin類との構造比較を行った。

《実験》 カルシセプチンは(株)ペプチド研で合成されたものをそのまま用いた。2) サンプルは、90% H₂O/D₂Oまたは100%D₂Oに溶解し、濃度は約4.8 mM、pHは10 mM酢酸バッファで4.5に調整した。測定温度には20℃、30℃を用いた。NMR測定はJEOL GSX-500, A-500を用い、DQF-COSY, HOHAHA (30 ms, 60 ms), NOESY (100 ms)を得た。D₂Oサンプルは60℃で10分加熱し、3回凍結乾燥を繰り返したものをを用いた。

《結果》 1D-NMRにおいて、NHおよびH α プロトンの化学シフトの分散が大きかったことや、主鎖間のロングレンジNOEが多く観測されたことより、他のneurotoxin類と同様な β シートに富んだ構造をとっていると予想された。¹H-NMRの帰属は、DQF-COSY, HOHAHA, NOESYスペクトルを用いて Wuethrich らによる定法に従って行った。また、上記の手順で

キーワード: カルシセプチン、L型Ca²⁺チャネルブロッカー、二次構造連鎖帰属

○たかやま ともこ はんざわ ひろゆき はるやま ひでゆき

調製したD₂OサンプルのHOHAHAスペクトル上に極めて交換の遅いNHプロトンが11個観測された。それらの結果をもとに二次構造を同定したところ図1に示す2組の逆平行βシート構造が得られた。すなわち、C3~I5, A13~L15からなる2本鎖の短いβシートとT21~I27, E36~G40, Y48~K54からなる3本鎖の長いβシートであった。S35~E36はβバルジ構造をとっていた。また、交換の遅いNHプロトンのうち9個は残基間水素結合に関与していることがわかった。さらに、Y23のベンゼン環プロトンシグナルは35℃においてかなりブロードニングしていたことから分子内にゆらいでいる部分があることが予想された。

《考察》 neurotoxin類は共通する三次元構造として、3本のループ部分とコア部分からなり、4つのS-S結合によってループが束ねられた偏平なディスク構造をとることが知られている。カルシセプチンの二次構造を約45%のシーケンスホモロジーを示す同じヘビ由来の神経毒であるα-neurotoxinと重ね合わせてみると、βシート構造の位置は基本的に一致した。よって3本のループはループI：1~17、ループII：21~40、ループIII：42~54、と考えられた。しかし、詳細に観察すると、カルシセプチンではβシート構造がループIでは1残基分、ループIIではS35~E36はβバルジ構造をとっていることより3残基分それぞれ短くなっていて先端部分のコンフォメーションの自由度が増加していると考えられた。また、neurotoxin類がアセチルコリンレセプターと相互作用を行うのはループIIの先端部分であるという報告もあり、この領域のアミノ酸シーケンスを比較すると、保存されたアミノ酸は、R28, R31のみと少なく、アセチルコリンレセプターとの相互作用に重要と考えられているW27はIに、D29はTに、G32はEにそれぞれ変わっていることがわかった。これらのことよりカルシセプチンは表面の柔軟なループ部分の配列と構造を変化させることにより受容体の識別を可能にしているものと推測された。今後はカルシセプチンの三次元構造解析を進め、受容体との相互作用についても考察する予定である。

《文献》 1) J. R. de Weille et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 2437-2440 (1991)

2) H. Kuroda et al., *Peptide Reserch*, **5**, 265-268 (1992)

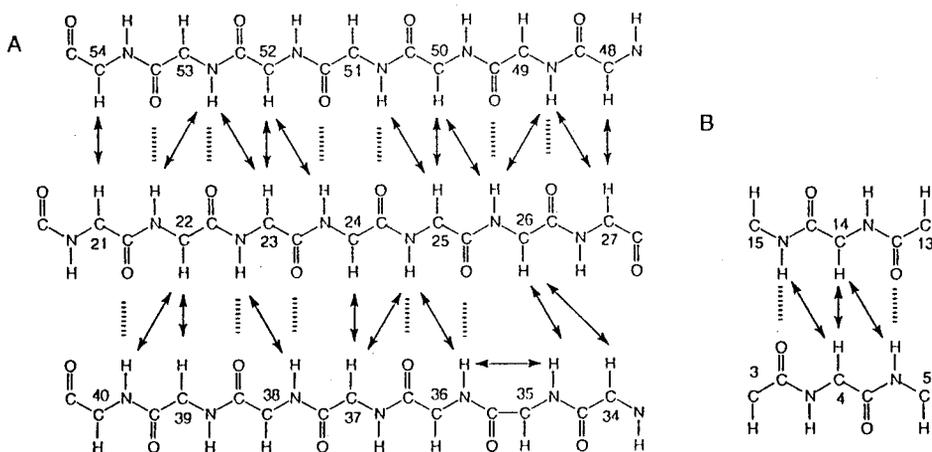


Fig.1 Schematic representation of two hydrogen-bonded secondary structure elements in Calciseptine in H₂O (pH 5.5; 4.8mM; 20°C)

P 95 G蛋白質を活性化するペプチドの安定同位体ラベルとTRNOEへの応用

(三菱化成生命研, 群馬大・工, 北里大・理, テキサス大)
○河野俊之, 楠英樹, 田中剛史, 大屋正尚, 前田忠計, 東島勉, 若松馨

Stable Isotope Labeling of G Protein-Activating Peptides and Their Application to TRNOE Analyses

Mitsubishi Kasei Inst. of Life Sciences, Gunma Univ., Kitasato Univ., Univ. of Texas
Toshiyuki Kohno, Hideki Kusunoki, Takeshi Tanaka, Masanao Ohya, Tadakazu Maeda,
Tsutomu Higashijima, and Kaori Wakamatsu

It has recently been recognized that peptide fragments from proteins often retain an activity of the parent proteins to interact with their target proteins. Although the interactions between the peptide fragment and the target protein can be analyzed by transferred NOE (TRNOE) experiments, this approach often suffers from poor proton signal dispersion of the peptide because short peptides are usually in a "random coil" state. So we have set up a system for expression and isotope-labeling of peptides to overcome such a drawback of the TRNOE approach. We first prepared uniformly ^{15}N -labeled mastoparan-X and a β -receptor fragment peptide which, respectively, activate G_i and G_s . Though the amide proton signals of either peptides in a 1D spectrum were severely overlapped, amide signals were fully resolved in a [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$] HSQC spectrum. We have also prepared doubly labeled peptides with ^{13}C and ^{15}N to resolve both NH and CH signals. The application of the labeled peptides to the TRNOE experiments in the presence of G proteins will be presented.

[序論] 最近, 蛋白質・蛋白質相互作用の系で一方の蛋白質のフラグメントのペプチドが, 元の蛋白質と同じ様に, ターゲットの蛋白質を活性化できるものが多いことが認識され, 蛋白質・蛋白質相互作用のモデルとして重要な解析方法となってきた. このようなモデル系では, transferred NOE (TRNOE) 法を用いて, ターゲット蛋白質に結合したモデルペプチドの構造を, NMRで解析することが可能である. しかし, この系で TRNOE 法を適用すると, ペプチドのシグナルの重なりが激しく, 帰属が著しく困難である. というのは, この系では, モデルペプチドは, フリーのランダムコイル状態と蛋白質に結合し構造をとった状態との平衡にあるからである.

この問題を回避するためには, ペプチドを安定同位体ラベルし, 多次元のTRNOE解析を行うことが有効であると考えられる. しかし, 現状では, 安定同位体ラベルを行えるのは, 生物による大量発現系がほぼ唯一の方法であり, しかも, 10数残基のペプチドを安定して大量に発現させるのは, 巨大な蛋白質を発現させるのよりかえって困難である.

キーワード: ペプチド発現, 融合蛋白質, G蛋白質, 安定同位体ラベル, TRNOE

○こうの としゆき, くすのき ひでき, たなか たけし, おおや まさなお, まえだ ただかず, ひがしじま つとむ, わかまつ かおり

我々は、このような蛋白質・蛋白質相互作用系におけるモデルペプチドを安定同位体ラベルできるような発現系を構築し、ラベルしたペプチドを用いてTRNOEを用いた解析を試みた。

〔方法〕 モデルペプチドを、そのN端側アフィニティタグを付けた小さな蛋白質に融合させて大腸菌内に安定かつ大量に発現させ、簡便に精製するシステムを構築した。この系を用いることで、安定同位体ラベルしたモデルペプチドをmgスケールで1週間以内に調製することが可能になった。

我々は、この発現系を用いて、まず、マストバラン-X及びβレセプターのフラグメントペプチド（それぞれGi, Gsを活性化できる。アミノ酸配列はFig. 1.）の¹⁵Nラベル化を行い、[¹H,¹⁵N]HSQCや3次元TRNOESY-HSQCなどの測定を試みた。

〔結果と考察〕 マストバラン-X及びβレセプターのそれぞれのアミドプロトンのシグナルは、¹H-NMRスペクトルにおいては、著しく重なり、帰属が困難であったが、[¹H,¹⁵N]HSQCスペクトルでは、完全に分離することができた（Fig. 2）。またGs存在下で、3次元TRNOESY-HSQCの測定を行ったところ、2次元のNOESYにおいて重なりが著しかった部分を、きれいに分離することができた（Fig. 3.）。我々はさらに、¹³Cと¹⁵Nのダブルラベルを行ったサンプルを調製し、現在解析を進めている。このように、モデルペプチドを安定同位体ラベルして多次元のTRNOEの解析を行うことは、非常に有用であり、さまざまな複合体の系に広く応用できると考えられる。

β-Receptor fragment	I-N-W-K-G-I-A-A-M-A-K-K-L-L-NH ₂
Mastoparan-X	I-V-Y-R-E-A-K-E-Q-I-R-K-I-L-NH ₂

Fig. 1. Amino acid sequences of model peptides

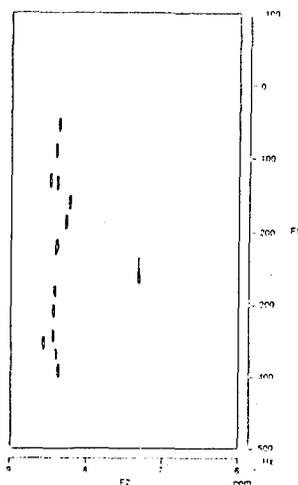


Fig. 2. [¹H,¹⁵N] HSQC spectrum of β-receptor fragment

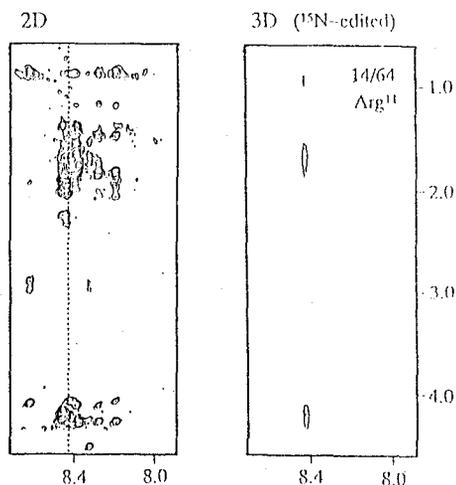


Fig. 3. Comparison of NOESY of non-labeled β-receptor fragment (left) and a slice of 3D TRNOESY of labeled β-receptor fragment (right) in the presence of Gs protein.

polytheonamide B の NMR による構造解析

(東大農) ○濱田季之・松永茂樹・伏谷伸宏

(日本電子データム) 藤原正子

(日本電子) 藤田憲一

Structure Elucidation of Polytheonamide B, A Highly Cytotoxic Polypeptide from the Marine Sponge *Theonella swinhoei*, by NMR Spectroscopy.

Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo

Toshiyuki Hamada, Shigeki Matsunaga, and Nobuhiro Fusetani

JEOL DATUM Ltd.

Masako Fujiwara

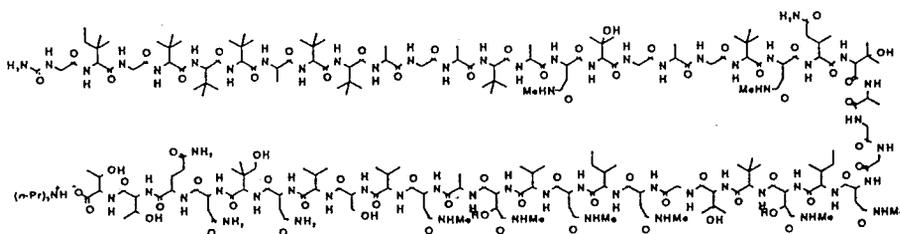
Molskop Project, JEOL Ltd

Kenichi Fujita

Polytheonamide B^{1),2)}, a highly cytotoxic polypeptide was isolated from the sponge *Theonella swinhoei*. It was a linear 48-residue peptide with *N*-terminus blocked by a carbamoyl group. Polytheonamide B contain unusual amino acids such as *t*-Leu, β -methylGln, β -methylIle, β -hydroxyVal, β -hydroxyAsn, and γ -hydroxy-*t*-Leu. Polytheonamide B has a helix of six to seven residues per turn. The three-dimensional conformation of polytheonamide B in solution has been determined by the distance geometry method used DADAS90 program.

われわれは八丈島産の海綿 *Theonella swinhoei* から強力な細胞毒性を示すアミノ酸 48 残基からなるポリペプチド polytheonamide B^{1),2)} を単離した。Polytheonamide B には多数の異常アミノ酸が含まれており、加水分解物のアミノ酸分析や NMR データにより、構成アミノ酸の同定およびその配列を決定した。

Polytheonamide B は DMSO-*d*₆ 中と CDCl₃-CD₃OH (1:1) 中では大きく異なる NMR データを与える。DMSO-*d*₆ 中の NOESY スペクトルでは隣接残基間の NH- α H と NH-NH のクロスピークがいずれも強く観測されるが、CDCl₃-CD₃OH (1:1) 中のスペクトルでは NH- α H のみが認められ NH-NH のクロスピークは非常に弱い。DMSO-*d*₆ 中の NMR データを解析し、異常アミノ酸残基の構造ならびにアミノ酸配列を決定した。



polytheonamide B

海綿・*Theonella swinhoei*・細胞毒性・ポリペプチド・異常アミノ酸・ β ヘリックス・三次元構造・Molskop・DADAS90

はまだとしゆき まつながしげき ふせたにのおひろ ふじわらまさこ ふじたけんいち
濱田季之・松永茂樹・伏谷伸宏・藤原正子・藤田憲一

加水分解物のキラル試薬を用いるクロマトグラフィーによる分析で、polytheonamide B の構成アミノ酸には D 型と L 型が混在する事実を確認した。そこで、部分加水分解物を精査し、各アミノ酸残基の DL を決定した。さらに、 $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OH}$ (1:1) 中の polytheonamide B の NMR データを解析し、 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ に加えて 6 残基離れたアミノ酸との間の $\text{NH-}\alpha\text{H}$ のクロスピークの存在により、チャンネル形成性ペプチドのグラミシジン A と同様の β ヘリックス型コンフォメーションをとることが示唆された。

NMR データから三次元構造を解析するために MolSkop システムを使用し、DADAS90 プログラムにより構造計算を行った。構造計算には NOE データから得られた約 200 個の距離制約条件および約 40 個の $\text{HNC}\alpha\text{H}$ の二面角制約条件を用いた。Fig. 2 に計算結果の一例を図示する。

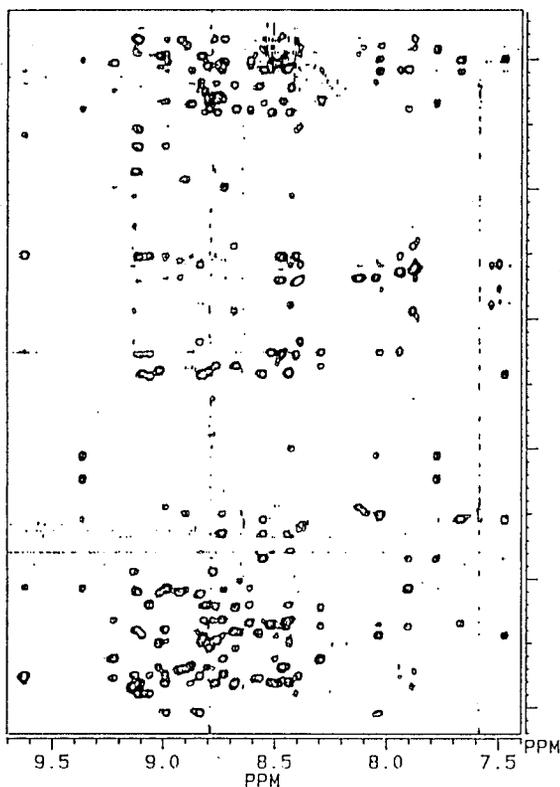


Fig.1 NOESY spectrum of polytheonamide B
in $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OH}$ (1:1)

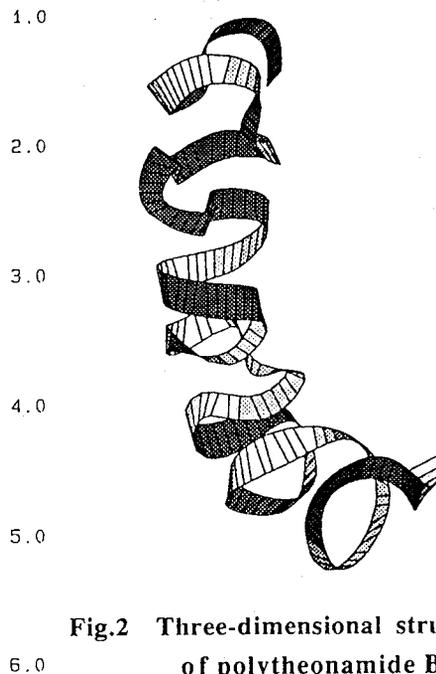


Fig.2 Three-dimensional structure
of polytheonamide B

文献

- 1) Hamada, T.; Sugawara, T.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 719.
- 2) Hamada, T.; Sugawara, T.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 602.

P 97

ヒトカルシトニン Fibrillation の NMR による研究
 (日本チバガイギー, 国際科学研究所) 金折賢二, 野坂 篤子

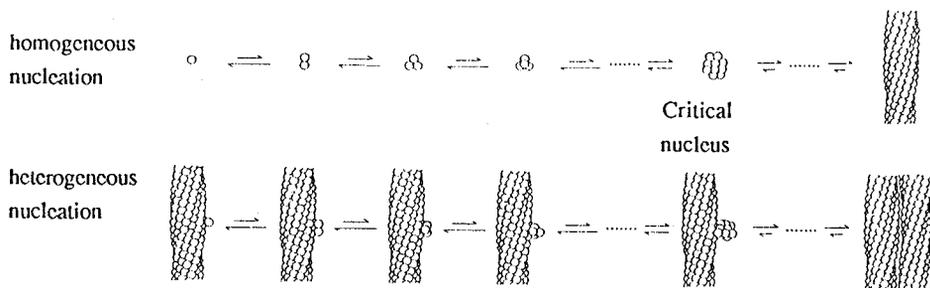
Kenji Kanaori and Atsuko Y. Nosaka
 International Research Laboratories, Ciba-Geigy Japan Ltd.

ABSTRACT: The fibrillation of human calcitonin (hCT) was studied by NMR at 600 MHz. The NMR spectra in the process of fibrillation showed a gradual broadening of the peptide peaks, followed by a rapid broadening and disappearance of the peaks. The two step broadening would correspond to an association around the formation of a critical nucleus in the homogeneous nucleation proposed in double nucleation mechanism¹⁾. However, all of the peaks did not disappear simultaneously in course of the fibrillation. Peaks broadening and disappearing fast are assigned to the N-terminal (Cys¹-Pro²³) region, and peaks broadening slowly are originated from the C-terminal region (Gln²⁴-Pro³²). The signal broadening feature suggests that the environment or the structure around the N-terminal region is different between monomer and fibril hCT. At first, the N-terminal region would be involved in the formation of the critical nucleus, and the C-terminal subsequently takes part in the fibrillation. Additionally, time dependence of ROESY spectra indicates that residues, Cys¹, Leu^{4,9}, Met⁸, Tyr¹², Asp¹⁵, and Phe^{16,19,22}, dominantly participate in the formation of the critical nucleus, and H-D exchange experiment suggests the formation of hydrogen bonds caused by intermolecular interaction. The amphiphilicity of the peptide may play an important role in the molecular association.

カルシトニン (CT) は32残基からなるペプチドホルモンである。Cys¹とCys⁷の間にジスルフィド結合があり, C末端はアミド化されている。CTはカルシウムーリン代謝に重要な役割を果たしており, 骨粗鬆症の薬剤として用いられている。ヒトカルシトニン (hCT) は水溶液中で容易に会合し, 不溶性の繊維として沈殿する。最近, hCTの繊維化のメカニズムが電子顕微鏡と濁り度の測定により研究され²⁾, hCTの繊維化は Scheme I に示すような二段階核形成機構 (double nucleation mechanism)¹⁾ に従うことが明らかにされた。また, Arvinte らは, CD, 蛍光, FTIR 等を用いて, hCTが繊維形成においてα-ヘリックスとβ-シート構造をとることを示し, N末端部分がα-ヘリックス, C末端部分がβ-シート構造をとると推測した²⁾。

我々は, NMRを用いて原子レベルで更に詳細に hCTの繊維化を研究し, Arvinte らの結果と比較した。

Scheme I double nucleation mechanism



fibrillation, double nucleation mechanism, States-TPPI, amphiphilicity

かなおり けんじ, のさか あつこ

<実験>

hCTは化学合成したものをを用いた。NMR測定は全てBruker AMX-600を用いて300K (pH3.3)にて行った。水溶液中のhCTのシグナルの同定にはDQFCOSY, HOHAHA, NOESY等のパルス系列(TPPI法)を用いた。2Dスペクトルの経時変化の実験にはStates-TPPI法を用いて位相まわしなしでHOHAHAとROESYを測定した。256(t1) X 512(t2)のデータを測定するのに約5分を要した。

<結果と考察>

繊維形成条件下(100 mg/ml)におけるhCTのID ¹H-NMR スペクトルの時間変化を Figure 1 に示す。hCTのシグナルの線幅は溶解後60分までは徐々に広がるが、60-70分間に溶液のゲル化を伴って、急激に広くなりシグナルは観測されなくなる。同時に、水のシグナルもブロードになり低磁場シフトした。これらの変化は Scheme I の homogeneous nucleation における繊維の核形成の前後に対応するものと考えられる。60分までのゆっくりとした線幅の広がりは繊維の核形成前の熱力学的に不安定な会合状態を反映し、それ以降の急激な線幅の広がりは核形成後の繊維の成長を反映していると考えられる。

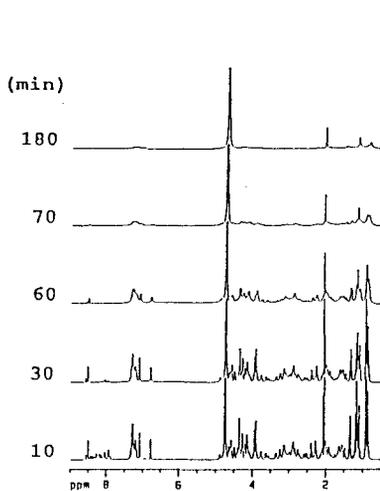


Figure 1 Time dependence of the ¹H-NMR spectra of hCT (100 mg/ml).

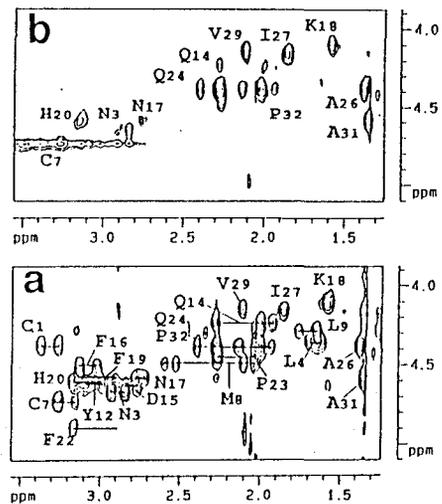


Figure 2 The aliphatic region of the ROESY (200ms) spectra of hCT for 7-13 min (a) and for 41-47 min (b).

2D HOHAHA スペクトルでは70分以降でもいくつかの交差ピークは消失しないで残った。残ったピークは、ほとんど全てC末端領域(Gln²⁴-Pro³²)由来のものであり、N末端領域(Cys¹-Pro²³)由来のピークは消失していた。繊維形成条件下における線幅の広がりは単分子と会合状態間の化学交換か、もしくは化学シフトの不均一性によるものと考えられる。この結果は、hCT分子の環境や構造は単分子状態と会合状態で異なる、ということを示し、まず最初にN末端領域が繊維の核形成に関与し、次いで繊維の成長段階において、ゆっくりとC末端領域が繊維化に関与していくことを示している。また、2D ROESY スペクトルの時間変化を調べると(Figure 2), N末端領域の残基のなかでもCys¹, Lcu^{4,9}, Met⁸, Tyr¹², Asp¹⁵, Phe^{16,19,22}の交差ピークは速く消失した。これらの残基はすべて、CTがとると考えられる両親媒性ヘリックスの疎水性側に存在する残基であることから、N末端領域の疎水性残基の分子間相互作用により分子が会合し、繊維の核が形成すると考えられる。

<文献>

- 1) Ferron, F.A., Hofrichter, J., and Eaton, W.A. (1985) *J.Mol.Biol.* 183, 611-631.
- 2) Arvintc, T., Cudd, A., and Drake, A.F. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 6415-6422.

P 98

蛋白性プロテアーゼインヒビター-SSIの全NMRシグナルの帰属
(都立大・理)○三宅洋子、鎌田創、山口絵未、楯真一、甲斐荘正恒

Assignment of NMR Signals of Protein Protease Inhibitor SSI

Yoko Miyake, Hajime Kamada, Emi Yamaguchi, Shinichi Tate and Masatsune Kainosho
(Tokyo Metropolitan University)

We have tried to assign the NMR signals of isotopically labeled SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) using recently developed multidimensional NMR methods. Based on the already established carbonyl carbon assignment, sequential back-bone and side-chain assignments have been efficiently established. Stereospecific assignment of the prochiral groups has also been made using specifically labeled amino acids.

【序】

SSI(*Streptomyces subtilisin inhibitor*)は、微生物起源の蛋白性プロテアーゼインヒビターであり、サブチリシン族、キモトリプシン族等、種々のプロテアーゼと強く結合し、安定な複合体を形成する。サブユニットあたり 113 残基から成り、二量体として分子量 23,000 で存在する。SSIの " 反応部位" は、Met73-Val74 の主鎖ペプチド結合(切断結合と呼ばれる)であり、二量体のSSIのそれぞれに1つずつプロテアーゼが結合し、2:2 複合体となる。

蛋白性プロテアーゼインヒビター-SSIの、注目したい" 反応部位" が主鎖のペプチド結合であること、及び、SSI-プロテアーゼ複合体が、例えばSSI-サブチリシンBPN' 複合体で分子量 78,000 と、通常の逐次帰属NMR手法では不可能な大きさになることから、我々は今までは、主鎖カルボニル炭素の部位特異的標識を中心に、複合体形成に伴う誘起シフトや J_{CN} の値等から、SSIの構造と機能に関する情報を得てきた。

しかし、遊離のSSIの溶液中での構造を詳細に検討するには、やはり側鎖を含めた全てのNMRシグナルに着目する必要がある。又、近年、 ^{13}C 、 ^{15}N で二重に均一に安定同位体標識した蛋白質を用いて多次元NMR手法により、分子量2万程度までのNMRシグナルの逐次帰属が可能になってきた。そこで我々は、これまでに得たカルボニル炭素の情報を生かしながら、SSIの全NMRシグナルの帰属を行った。

【実験】

試料の調製

安定同位体標識アミノ酸は、以下のように調製した。各種 $[1-^{13}C]$ アミノ酸は、 $Na^{13}CN$ より化学合成した。各種 ^{15}N 標識したアミノ酸は、 $^{15}NH_4SO_4$ 、 $^{15}NH_4Cl$ を窒素源としたアミノ酸発酵により、また、均一に ^{13}C 標識したアミノ酸は、均一 ^{13}C 標識グルコースまたは均一 ^{13}C 標識酢酸を炭素源としたアミノ酸発酵により得た。各種 $[1,2-^{13}C_2]$ アミノ酸は、 $[1,2-^{13}C_2]$ 酢酸より化学合成した。均一 ^{15}N 標識アミノ酸混合物、および均一 ^{13}C 、 ^{15}N 二

安定同位体標識法、多次元NMR、プロテアーゼインヒビター、SSI

みやけ ようこ、かまだ はじめ、やまぐち えみ、たて しんいち、かいのしょう ま
さつね

重標識アミノ酸混合物は、 $^{13}\text{C}_2$ 及び $^{15}\text{NHSO}_4$ を栄養源として培養した二重標識クロレラ菌体を加水分解、精製して得た。ブロック標識したバリン及びロイシンは、99% 均一 ^{13}C 標識グルコースとその二倍量の非標識グルコースを炭素源としてアミノ酸発酵により調製した。 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ グリシンは $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ 酢酸から化学合成し、 $[2\text{-}^{13}\text{C}, 2\text{-}^2\text{H}_2]$ グリシンは $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ グリシンを重水中白金触媒下加熱することにより得た。

各種標識蛋白質SSIは、各種標識アミノ酸を含んだアミノ酸混合培地で放線菌 *S. albobriseolus* S-3253 を培養し培養ろ液を精製して得た。

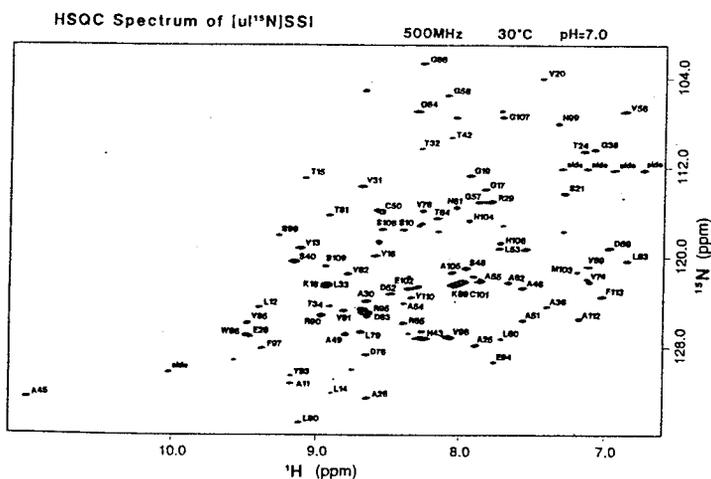
測定

各種部位特異的標識したSSIについては、 $2\text{D-}^{13}\text{C-}^{13}\text{C-INADEQUATE}$, $^1\text{H}^{13}\text{C}|\text{HSQC}$, $^1\text{H}^{15}\text{N}|\text{HSQC}$, $^{13}\text{C}|\text{N}|\text{HMQC}$ 2D-HCCHtocsy 等を測定した。均一に ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識したSSIについては、 3D-HNCO , HNCA , $\text{HN}(\text{CO})\text{CA}$, 2D-HCACO , 3D-HCCHtocsy , HCCHcosy を測定した。NMR装置は、Varian Unity-300 及び Bruker AMX-500 を用いた。

【結果】

各種部位特異的標識したSSIを用いて、ダブルラベル法によって帰属の確定しているカルボニル炭素を起点として、 $[1, 2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ アミノ酸で標識したSSIの $2\text{D-}^{13}\text{C-}^{13}\text{C-INADEQUATE}$ 測定により α 炭素へ、カルボニル炭素を残基特異的に ^{13}C 標識しその他を均一に ^{15}N 標識した $[X, \text{ul}^{15}\text{N}]$ SSI の $^{13}\text{C}|\text{N}|\text{HMQC}$ 測定によりアミド窒素へ帰属をつなげた。残基特異的に ^{13}C 均一標識したSSIの $^1\text{H}^{13}\text{C}|\text{HSQC}$ 測定により、それらを側鎖の炭素及び水素原子へ、残基特異的または均一に ^{15}N 標識したSSIの $^1\text{H}^{15}\text{N}|\text{HSQC}$ 測定によりアミド水素へつなげることができた。それとは独立に、均一に ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識したSSIを用いて 3D-HNCO , HNCA , $\text{HN}(\text{CO})\text{CA}$, 3D-HCCHtocsy , HCCHcosy 測定により、シグナルの逐次帰属を行った。

Val、Leu 残基のメチル基のプロキラルな帰属については、*pro-R* のメチル基がメチン炭素 (Valの β 位、Leuの γ 位) と組で ^{13}C 標識されているブロック標識体を用いて、その INADEQUATE , または $\text{CT-}^1\text{H}^{13}\text{C}|\text{HSQC}$ 測定により行った。Gly、Ser 残基のメチレン水素のプロキラルな帰属については、 $[2\text{-}^{13}\text{C}, 2\text{-}^2\text{H}_2]$ グリシンを用いてそれが蛋白質生成過程においてその *pro-S* の水素が溶媒と交換することを利用して $^2\text{H-decoupled } ^1\text{H}^{13}\text{C}|\text{HSQC}$ 測定により非常に容易に行うことができた。



P 99

NMRを用いた免疫グロブリン分子の構造解析

○嶋田一夫, 白石美紀, 進藤一泰, 榛葉信久, 山口芳樹,

今里真実, 加藤晃一, 荒田洋治¹⁾

東大・薬, 機能水研究所¹⁾

Structural analyses of immunoglobulin molecules as studied by multinuclear NMR

Ichio Shimada, Miki Shiraiishi, Kazuyasu Shindo, Nobuhisa Shimba, Yoshiki
Yamaguchi, Mami Imazato, Koichi Kato, and Yoji Arata¹⁾

Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,
Water Research Institute¹⁾

Immunoglobulin G (IgG) is a multifunctional protein, which plays an important role in immune response. We have studied the dynamical structure of the antibody combining site and the hing region of mouse anti-dansyl antibodies labeled with ¹³C and/or ¹⁵N at the backbone. In the present study, we will discuss the molecular mechanizm of the affinity maturation of the immune response and the interactions between antibodies and IgG binding proteins by using multinuclear NMR.

はじめに

免疫グロブリンG (IgG) は、免疫系において外来異物を認識し、これを排除する多機能糖タンパク質である。IgGの基本構造は、ほぼ無限と考えられる外来異物を認識するFab, 補体系の活性化などエフェクター機能を司るFcおよびこれらを連結するヒンジ領域から構成されている。われわれは、NMRによる高分子量タンパク質の高次構造解析法を開発することにより、抗ダニシル抗体の抗原認識機構の解明、IgGのヒンジ領域の動的構造解析など抗体が水溶液中でいかに振る舞いそして機能を発現しているかを高次構造の観点から解析してきた。

本発表では、抗ニトロフェニルアセチル (NP) 抗体のFabフラグメント (分子量50K) を用いた親和力増大機構およびFcフラグメント (分子量50K) と抗体結合性タンパク質との相互作用について議論する。

1. 抗NP抗体の抗原結合部位の高次構造解析

抗体には免疫経過に伴い抗原に対する親和性が増大する現象が知られている。親和性増大機構を高次構

しまだ いちお, しらいし みき, しんどう かずやす, しんば のぶひさ, やまぐち よしき, いまざと まみ, かとう こういち, あらた ようじ

免疫グロブリン, 安定同位体標識, 抗原認識, 親和性増大機構, 抗体結合性タンパク質

造の観点から解析するため、親和力の異なる3種類の抗NPモノクローナル抗体 (N1G9: $K_a = 5.0 \times 10^5 [M^{-1}]$, 3B44: $3.3 \times 10^6 [M^{-1}]$, C6: $1.0 \times 10^8 [M^{-1}]$) を取り上げ、NMRによる解析を行った。

Fig. 1にTyr残基の主鎖アミド窒素を ^{15}N で標識したN1G9 Fabフラグメントの ^{15}N - ^{13}C シフト相関スペクトルを示す。1次構造上期待されるすべての相関ピークが観測されている。さらにH鎖・L鎖組み替え実験および2重標識法を組み合わせることにより、これら相関ピークの部位特異的帰属が完了した。同様に他の2種類の抗NP Fabフラグメントに関してTyr残基およびTrp残基の帰属を行い、スピラベルハプテン結合実験を行ったところ、N1G9, 3B44, C6のいずれもH1, H3, L1, L3ループにより抗原結合部位が形成されていることが判明した。さらにNOE実験の結果より、抗原結合部位を形成しているTyr残基数と親和力の相関が明らかになった。

2. Fcフラグメントと抗体結合性タンパク質の相互作用

細菌細胞壁表面に発現されるタンパク質の中には、抗体と特異的に結合するものが数多く知られている。黄色ブドウ球菌由来のプロテインAおよび連鎖球菌由来のプロテインGはともにpHに依存して抗体のFc領域と結合する。またプロテインAのBドメインおよびプロテインGのドメインII単独の水溶液中における立体構造はすでに決定されている。Bドメインの立体構造は3本の α ヘリックスからドメインIIは1本の α ヘリックスおよび1枚の β シートから構成されている。

Fcフラグメントと抗体結合性タンパク質の相互作用を解析するために、Fcフラグメントに関して主鎖カルボニル炭素を ^{13}C に、BドメインおよびドメインIIに関しては主鎖アミド窒素を ^{15}N に安定同位体標識した。Fig. 2に主鎖カルボニルを ^{13}C 標識したFcフラグメントのBドメイン添加実験の結果を示す。Bドメインの添加に伴い、化学シフトの変化が観測される。このような複合体形成に伴う化学シフト変化の解析の結果、BドメインおよびドメインIIはともにヘリックス部位でFcフラグメントと結合し、Fcフラグメント上の結合部位は、BドメインおよびドメインIIともにCH2, CH3の境界領域であることが判明した。

[M] IgG2a Fc

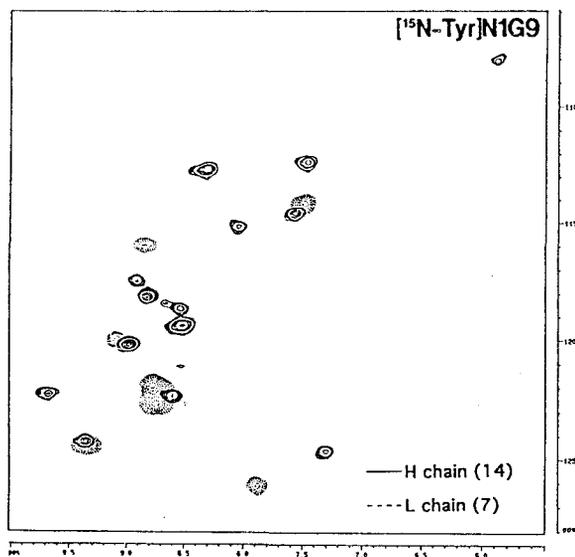


Fig.1 SQC spectrum of [^{15}N -Y]N1G9 Fab

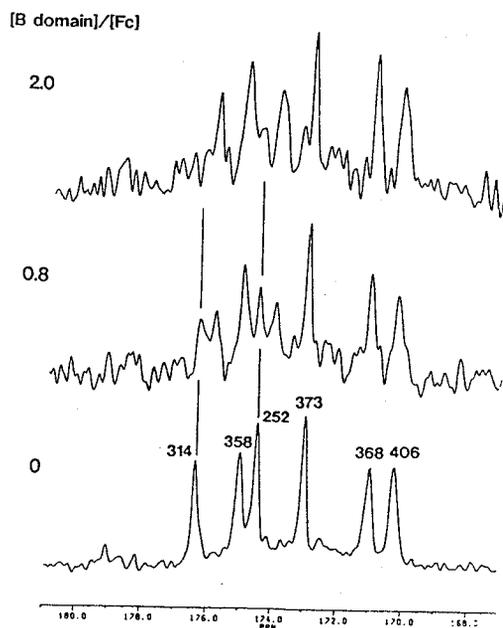


Fig.2 ^{13}C -NMR spectra of [^{13}C -M]Fc in the presence of B domain

○大野光宏、武藤裕*、横山茂之*、正木春彦、魚住武司
(東大・農・応用生命工学、*東大・理・生化)

NMR analysis of the ImmE6 protein interacting with colicin E6 as a specific inhibitor

○Mitsuhiro Ohno, Yutaka Muto,* Shigeyuki Yokoyama,* Haruhiko Masaki and Takeshi Uozumi
Department of Biotechnology, and *Department of Biophysics and Biochemistry, The University of Tokyo

ColE6-plasmid-coded colicin E6 has an RNase activity in the C-terminal T2A domain, which specifically inactivates ribosomes of sensitive *Escherichia coli* cells. The colicin producer cells are protected from lethality by producing a specific inhibitor, ImmE6, which binds to T2A. We prepared an ¹⁵N-labeled small hetero-dimer composed of E6-T2A (110 residues) and ImmE6 (84 residues), and exchanged each component with non-labeled one through urea-denaturation, separation and reconstitution steps, giving rise to a pair of hemi-labeled hetero-dimers. Comparison of HMQC spectra of the totally labeled native dimer and reconstituted hemi-labeled dimers indicated reversibility of the denaturation. Chemical shift perturbation analysis of ¹⁵N-ImmE6 on the binding with T2A suggested the contact area of ImmE6 facing T2A, which was consistent with the analysis of slowly exchanging amide protons on the complex formation.

【背景】 コリシンE3とE6は、Colプラスミドが生産する相同性が非常に高い殺菌性RNaseであり、その酵素活性は、それぞれのC末端、T2Aドメインに局在する。コリシン生産菌は、T2Aドメインを認識する蛋白質性インヒビター、ImmE3あるいはImmE6を同時に生産して致死を回避している。

我々はコリシンE3とE6のT2A(110残基)とImm(84残基)をタンパク質間相互作用の優れたモデルとして捉え、それぞれのT2A/Immヘテロダイマーの大量精製系を確立した。既にNMRにより遊離のImmE3の三次構造及びImmE6の二次構造は決定しているため、この複合体の全立体構造の決定を含めた種々の解析を進めることにより、ヘテロダイマーを構成するそれぞれの分子の構造変化と機能の相関を明らかにできると考えられる。

今回、ImmE6のT2Aドメインへの結合領域が決定できたので報告する。

コリシン、インヒビター、タンパク質間相互作用、HMQC、chemical shift perturbation

おおのみつひろ、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

【方法及び結果】 精製したヘテロダイマーは6M尿素変性条件下で2つのサブユニット(T2AとImm)に分けることが出来るが、こうして単離したサブユニットから *in vitro* で再構成したヘテロダイマーが、未変性ダイマーと同じ構造をとるということを前年の本討論会において示唆した。

今回、この事実を確認し、更にこのことを利用してImmE6だけを ^{15}N 均一標識したダイマーのNOESY-HMQC, TOCSY-HMQC スペクトル、そして ^{13}C , ^{15}N 二重標識したnativeなダイマーのHNCA, HNCOCAスペクトルから、ヘテロダイマー中のImmE6のシグナルの帰属を完了した。

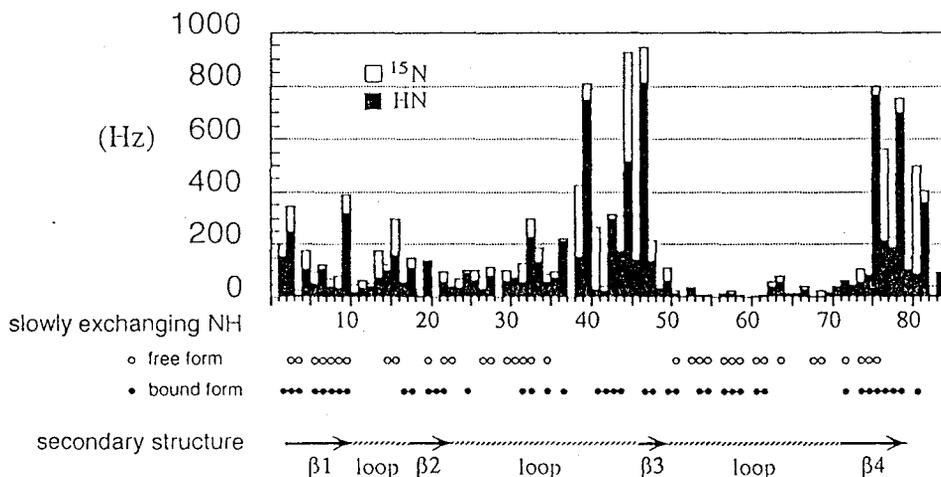
次に、既に4本鎖逆平行 β -シート構造をモチーフとしていることを明らかにした遊離のImmE6と、ヘテロダイマー中のImmE6の、 ^1H , ^{15}N のケミカルシフトとの比較から、相互作用に参与している領域を β 3鎖と、そのN末端側のループ部分及びC末端部分という、立体構造上近接した領域であると推定した。

更に、遊離の標識ImmE6と、非標識T2Aと複合体を形成した標識ImmE6の双方について、重水中のHMQCスペクトルを測定したところ、複合体を形成したことにより、新たにH-D交換が阻害されてシグナルとして観測される様になったImmE6上の領域は、上記のケミカルシフトが大きく変化した領域と一致した。また、これらのシグナル強度は経時的に減衰するが、この減衰は、解離平衡によるそれぞれのサブユニットの遅い交換が存在することを示唆している。

以上のことから、ImmE6におけるE6-T2Aドメインとの相互作用領域を同定できた。

参考文献

- 1) Yajima, S. et al. (1992) *Biochemistry* **31**, 5578-5586
- 2) Yajima, S. et al. (1993) *FEBS Lett.* **333**, 257-260



Chemical Shift perturbation Analysis of ImmE6 & Inhibition of NH Exchanging Rate on the Binding with E6-T2A (forming the complex)

P 101 疎水性コアを変異した蛋白質の立体構造変化

○古川功治¹、織田昌幸¹、守川壮一¹、緒方一博²、中村春木¹
(¹蛋白質工学研、²横浜市立大)

Structural Changes of a Protein Caused by a Mutation in the Hydrophobic Core

K. Furukawa¹, M. Oda¹, S. Morikawa¹, K. Ogata², H. Nakamura¹
(¹Protein Engineering Res. Inst., ²Yokohama City Univ.)

The DNA-binding domain of *c-myb* protooncogene product consists of three repeats (R1, R2, R3) of 51 or 52 amino acids. The third repeat, R3 has three helices that form a helix-turn-helix structure maintained by a hydrophobic core which includes three isoleucines (I155, I169, I181). R3 was specifically expressed in *E. coli*, and then, three isoleucines were individually or simultaneously replaced by Leu via site-directed mutagenesis to generate seven mutant proteins. I155L was the only mutant protein which was stabilized by the mutation. We have determined the three-dimensional structure of I155L in aqueous solution by NMR. In comparison of the structure of I155L with that of the wild-type, it is suggested more closed packing of the hydrophobic core by the substitution of I155 to Leu.

【目的】プロトオンコジーン産物 *c-Myb* のDNA 結合領域はそれぞれ約50残基の3つのリピートからなっている。その第3リピート、R3の立体構造は合成ペプチドを用いたNMR解析から既に決定されており、3本の α -ヘリックスを含むhelix-turn-helix (HTH)構造を有している。このHTH構造を保持していると考えられる疎水性コアにはLeuがなく、ヘリックス中の3つのIleが関与している。本研究では、ヘリックスに存在するIleと立体構造安定化との相関関係を明らかにすることを目的として、R3のIle残基をLeuに置換した変異体を作成し、その構造変化をNMRを用いて解析した。

【方法および結果】54残基からなる(残基番号140~193)からなるR3の大腸菌での大量発現系を構築し、PCR法を用いて3つのIle残基(I155, I169, I181)を個々に、もしくは、組み合わせてLeuに置換した変異型R3を7種類作成した。これら変異型R3のうちI155Lのみが野生型よりも発現率や水への溶解度が高くなっていた。遠紫外CDの測定を行ったところ、I155Lのヘリックス含量は野生型よりも高くなっていた(Fig. 1)。プリバロフ型カロリメーターDASM-4を用いて測定した可逆的熱変性における熱容量変化のプロファイル(Fig. 2)から、各熱力学パラメーター(Table I)を求めた。I155Lの変性中間点の温度、 T_d は野生型より2℃上昇していた。熱変性における ΔH , $T\Delta S$ がと

キーワード : Myb, helix-turn-helix 構造、疎水性コア

ふるかわ こうじ、おだ まさゆき、もりかわ そういち、おがた かずひろ、なかむら はるき

もに上昇していることから、変異導入によってアミノ酸残基間相互作用が増加するとともに構造の自由度が減少したことが示唆された。I155Lの ^1NMR 測定を行い、 $\alpha\text{-}^1\text{H}$ のケミカルシフト値を野生型のもの compared としたところ、主に変異部位を含むコア部分にケミカルシフト変化が見られた (Fig. 3)。主鎖及び側鎖の二面角に関するデータ、372個の残基間NOEデータを用いてEMBOSSによるディスタンスジオメトリー計算を行い、I155Lの立体構造を決定した。全体として野生型との大きな構造的違いはなく、3本の α -ヘリックスからなるHTH構造をとっていた。疎水性コア部分を野生型と比べると、変異を導入した155番の側鎖の χ^1 -angleが120度変わっており、また、Ileでは見られなかった新たなNOEが、導入されたLeuの片方の δ -メチルに見られた。さらに、コア中のTrp残基の側鎖にも配向の変化が見られ、両者のパッキングの違いを示している。表1の結果を考慮すると、Ileよりも側鎖の自由度の高いLeuの導入により、155番の側鎖まわりのパッキングがより整然と収まるようになったことを示唆している。現在、I155Lの ^{15}N 置換体を用いた構造の精密化を進めており、蛋白内部のパッキングについてさらに詳しい議論ができると考えている。

Table I
Thermodynamic parameters from DSC curves

Enzyme	T_d °C	ΔH^{cal} kcal/mol	$T\Delta S$ kcal/mol	ΔG kcal/mol
wild-type	57.3	34.8	34.8	0.0
I155L	59.5	44.2	43.9	0.3

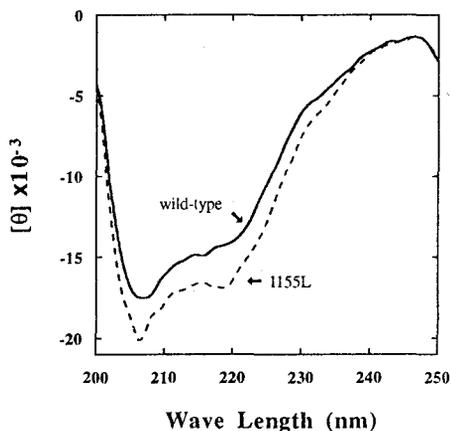


Fig. 1. CD spectra in the far UV range

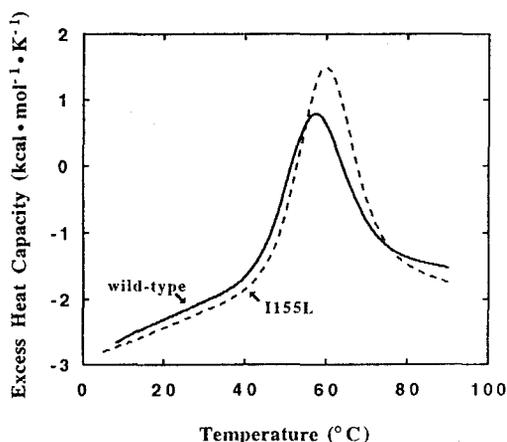


Fig. 2. DSC curves of I155L and the wild-type

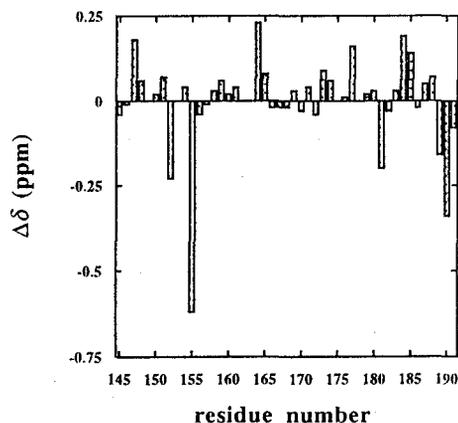


Fig. 3. Effect of mutation on δ of $\alpha\text{-}^1\text{H}$

P 102

NMRを用いた細胞周期制御因子p13^{suc1}の立体構造解析

○合田浩明¹⁾、内田憲孝¹⁾、立花和則²⁾、岸本健雄²⁾、
嶋田一夫³⁾、原田義則¹⁾

1) (株) 日立製作所・基礎研究所、2) 東工大・生命理工、3) 東大・薬

NMR study on the p13^{suc1} protein using stable isotope labeling technique

¹⁾Hiroaki Gouda, ¹⁾Kenko Uchida, ²⁾Kazunori Tachibana, ²⁾Takeo Kishimoto,

³⁾Ichio Shimada and ¹⁾Yoshinori Harada

¹⁾Advanced Research Laboratory, Hitachi Ltd.

²⁾Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

³⁾Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

p13^{suc1} is a cell cycle regulatory protein, which binds strongly to the p34^{cdc2} kinase.

In order to elucidate the mechanism of interaction between these two proteins, p13^{suc1} protein was investigated by isotope-aided NMR experiments. For assignment of backbone ¹H and ¹⁵N resonances, 3D ¹H-¹⁵N TOCSY-HSQC and ¹H-¹⁵N NOESY-HSQC experiments were performed. The secondary structure of p13^{suc1} protein will be discussed.

1. はじめに

suc1遺伝子産物p13^{suc1}は酵母からヒトに至る各種真核生物から見つかっており、細胞周期の制御に主要な役割を果たしているcdc2キナーゼの阻害因子あるいは活性化因子であると考えられてきた。最近、このp13^{suc1}はこれらcdc2キナーゼの基質のリン酸化を選択的に阻害する因子であることが報告され、p13^{suc1}はcdc2キナーゼの阻害因子であると同時にcdc2キナーゼに選択性を持たせる因子である可能性が考えられるようになった。しかし現在のところ、p13^{suc1}の立体構造およびcdc2キナーゼとの相互作用部位が明らかでない。そこで筆者らは分裂酵母由来のp13^{suc1}の立体構造解析およびcdc2キナーゼとの相互作用解析を目標として実験に着手した。

2. 材料および方法

[試料調製] アミノ酸113残基からなるp13^{suc1}蛋白質の立体構造解析には、¹⁵N

p13^{suc1}蛋白質 安定同位体標識 二次元、三次元NMR

ごうだひろあき うちだけんこう たちばなかずのり きしもとたけおしまだいちお はらだよしのり

等の安定同位体標識が有効である。そこで、p13^{suc1}蛋白質の発現プラスミドを保持した大腸菌 (BL21) を¹⁵N標識塩化アンモニウムを唯一の窒素源とするM9培地を用いて培養し、蛋白質分子に均一に¹⁵Nを導入した。

[測定] NMR測定は、Bruker社製 AMX500を用いて行った。¹⁵Nで均一に標識した試料について、2D ¹H-¹⁵N HSQC、Double-DEPT、3D ¹H-¹⁵N TOCSY-HSQC (混合時間40ms)、3D ¹H-¹⁵N NOESY-HSQC (混合時間100ms) の測定を、測定温度25°Cで行った。

3. 結果と考察

2D ¹H-¹⁵N HSQC、Double-DEPTスペクトルの解析から、Pro残基を除く105残基中96残基の主鎖アミド基由来のシグナルが判別できた。同時に、Asn、Gln側鎖、Trp側鎖、Arg側鎖(ε)由来のシグナルをすべて区別できた。3D TOCSY-HSQCスペクトルにおいて、82残基のαプロトン、そのうち39残基についてはβプロトンまで化学シフトを同定できた。現在、3D NOESY-HSQCスペクトルを用いて、判別しやすいスピン系をもつ残基を基準に連鎖帰属が進行中である。図1に連鎖帰属の一部を示す。

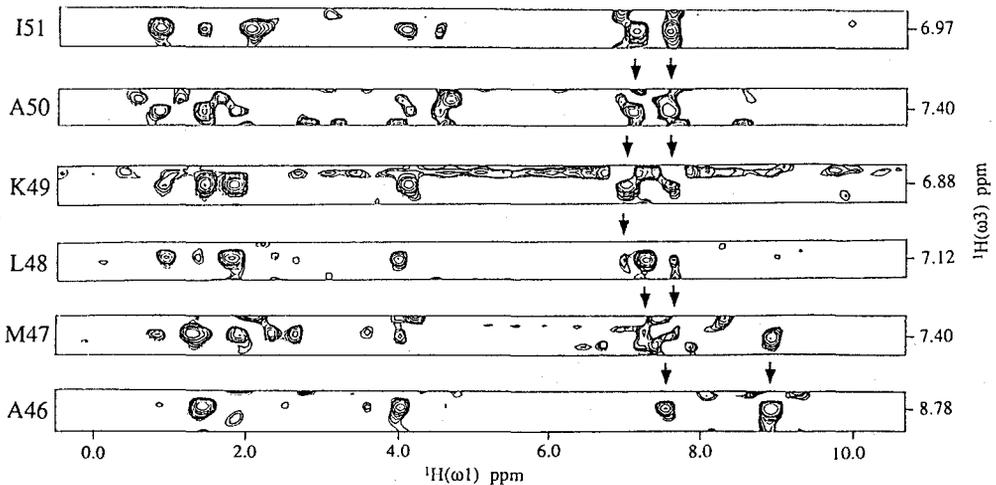


Figure 1 : ¹H(ω₁), ¹H(ω₃) cross sections of a 100ms 3D NOESY-HSQC spectrum of an α-helical region of [¹⁵N] p13^{suc1}

○松木伸行、森安真彦、河野敬一、大木進野、津田 栄、
引地邦男、新田勝利
(北大理)

¹H-NMR of pigeon egg-white lysozyme

○Nobuyuki Matsuki, Masahiko Moriyasu, Keiichi Kawano, Shin-ya Ohki,
Sakae Tsuda, Kunio Hikichi and Katsutoshi Nitta

Pigeon egg-white lysozyme has been reported to be a type c lysozyme. It consists of a single polypeptide chain of 127 amino acid residues with a molecular weight of about 14,500. The amino acid sequence is 47% homologous with that of chicken egg-white lysozyme. Pigeon egg-white lysozyme binds one molar calcium ion. In this respect, it is more similar to α -lactalbumin, another evolutionally related protein, than chicken egg-white lysozyme. It is interesting to compare the calcium ion binding form of pigeon egg-white lysozyme with that of α -lactalbumin. In this study, it is investigated with 2-D NMR spectroscopy.

リゾチームは広く動物界に存在し、細胞壁のペプチドグリカンを分解する酵素である。このタンパク質はその分子特性によって三つのタイプ(タイプc、タイプg、phageタイプ)に分類されており、ハト卵白リゾチームはニワトリ卵白リゾチームと同じタイプ(タイプc)に属している。

一般的にニワトリ型リゾチームと一次構造上約40%の相同性があり、互いに進化論上類縁関係にあると考えられる α -ラクトアルブミンがカルシウム結合タンパク質であるのに対して、一般的にリゾチームはカルシウム非結合タンパク質であるとされてきた。

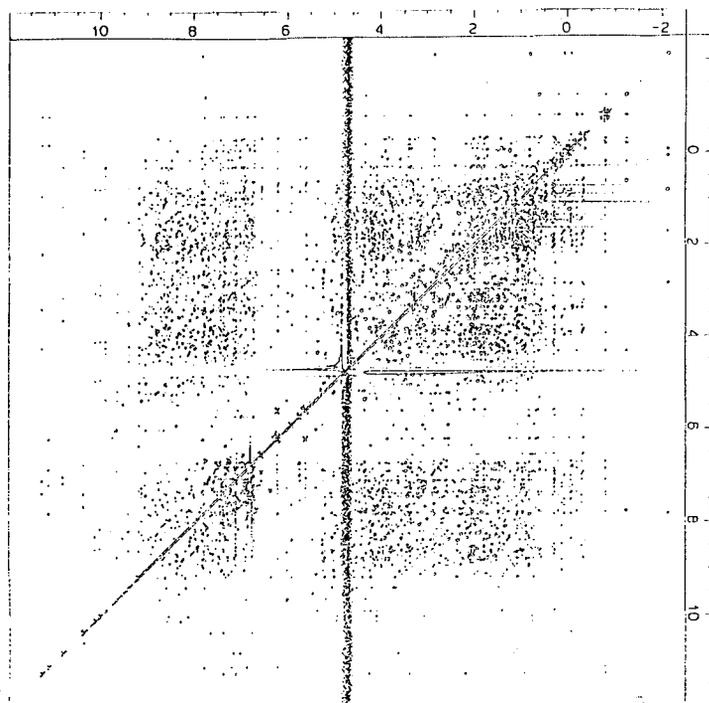
キーワード：二次元NMR、カルシウム結合タンパク質、ハト卵白リゾチーム

まつきのぶゆき、もりやすまさひこ、かわのけいいち、おおきしんや、つださかえ、ひきちくにお、にったかつとし

X線結晶解析により α -ラクトアルブミンのカルシウム結合部位の構造が、ニワトリ卵白リゾチームの対応する部位である（カルシウムが結合していない）ループの構造に類似していることが見いだされた。この結合部位では、 α -ラクトアルブミンは三つのAspがカルシウムに配位しているのに対し、ニワトリ卵白リゾチームではSer、あるいはAlaに置き換わり、カルシウム結合能が欠如していると考えられてきた。例外的にハト、ウマ等のリゾチームでは三つのAspが存在し、カルシウム結合能が保たれている。

今回用いたハト卵白リゾチームはニワトリ卵白リゾチームと同じタイプのリゾチームではあるが、カルシウム結合能をもつという点においては、ウマ等のリゾチームなどとともに α -ラクトアルブミンに近い存在である。この点からニワトリ型リゾチームはカルシウム結合型とカルシウム非結合型のリゾチームに分かれて存在することが予想される。これらの研究のためにNMRを用い、 α -ラクトアルブミン、ニワトリ卵白リゾチームとの構造上の相違点を検討することは興味深い。

今回、ハト卵白リゾチームをカルシウム結合性リゾチームのサンプルとして用い、pH 5.5、35°Cの条件下で10 mMの塩化カルシウム四水和物に加え、日本電子 $\alpha 600$ を用いて重水、軽水の両溶媒中で二次元 ^1H -NMRスペクトル（DQF-COSY, NOESY, HOHAHA）を測定し、現在帰属をすすめている。



<FIGURE>
600-MHz NOESY spectrum of
nonexchanged pigeon
egg-white lysozyme

P 104 旧黄色酵素とNADP⁺との相互作用の研究

(関西医大・化学) ○藤井 茂、黒田 記代
(熊大・医学部・一生化) 三浦 洸

Interaction of Old Yellow Enzyme with NADP⁺

Shigeru FUJII,¹ Kiyoo KURODA,¹ and Retsu Miura²

(¹Laboratory of Chemistry, Kansai Medical University; ²Department of Biochemistry, Kumamoto University School of Medicine)

Old yellow enzyme (OYE) from Brewer's yeast, a flavoenzyme, was reconstituted with ¹³C-enriched FMNs and 8-demethyl-8-fluoro-FMN. Interaction of the reconstituted OYEs with NADP⁺ was investigated by F-19 and C-13 NMR spectroscopy. By the complex formation of OYE with NADP⁺, 8-¹⁹F NMR signal shifted to higher field, and remarkable changes of 4a- and 10a-¹³C NMR signals were observed.

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

今回用いた旧黄色酵素(OYE)は、ビール酵母より精製されたもので、分子量49000のサブユニットあたり1分子のフラビンモノヌクレオチド(FMN)を補酵素に持つ。われわれは、旧黄色酵素(OYE)の活性域研究の一環として、本酵素の補酵素であるFMNのフラビン環の8位のメチル基をフッ素で置換した8F-FMNやC-13標識したFMNで再構成したOYEとOYEへの電子供与体であるNADPHの酸化型のNADP⁺との相互作用を多核NMRによって調べた。

【実験】 図1に示した8位のメチル基をフッ素で置換した8F-FMNおよび2-, 4-, 4a-, 10a-の炭素をそれぞれC-13で標識したFMNを文献記載の方法で化学合成した。これらのFMNで再構成したOYEとNADP⁺との相互作用を、F-19, C-13 NMR測定することにより調べた。化学シフトは、C-13およびF-19の外部標準としてそれぞれTSPのメチルシグナルとNaFのF-19シグナルを用いた。測定温度は、22~23 °Cであった。

C-13, F-19, NMR, Flavin, electron transfer

ふじい しげる、くろだ きよ、みうら れつ

【結果と考察】 8 F-FMNで再構成したOYEにNADP⁺溶液を加え滴定したところ、Fig. 2に示すようにNADP⁺の添加に伴い遊離のOYEに由来する8 F-FMNのF-19 NMRシグナルは減少し、高磁場側にシフトした新たなシグナルが現われた。この結果は、OYEとNADP⁺の複合体形成により8 F-FMNのF-19 NMRシグナルが高磁場シフトすることを示しており、このF-19 NMRシグナルの変化から、OYEとNADP⁺との複合体の解離定数は約10 mMと求められた。

C-13標識FMNで再構成したOYEに対しても、NADP⁺溶液を加え滴定した。2-, 4-位のC-13 NMRシグナルに関しては、NADP⁺の添加に伴う変化はほとんど観測されなかった (Fig. 3)。遊離のOYEに由来する4a-, 10a-位のC-13 NMRシグナルは、NADP⁺の添加に伴い減少した (Figs.3,4)。これらの結果は、OYEへのNADP⁺の結合により、2-, 4-位のカルボニル基の水素結合の強さにはほとんど変化が起こっていないにもかかわらず、反応に大きく関与する4a-, 10a-位のミクロ環境が変化していることを示唆している。また、OYEとNADP⁺の複合体形成により8 F-FMNのF-19 NMRシグナルが高磁場シフトすることから、複合体形成によりフラビン環の電子がキシレン部分に流れやすくなっていることも考えられ、反応機構との関連において興味深い。

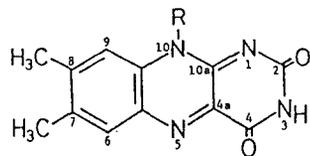


Fig. 1 Numbering of atoms in the flavin nucleus

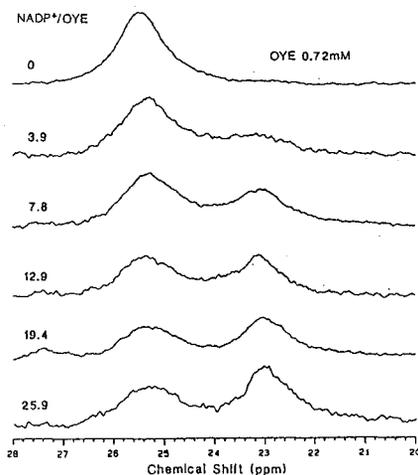


Fig. 2 F-19 NMR spectral changes of OYE reconstituted with 8-F-FMN upon addition of NADP⁺

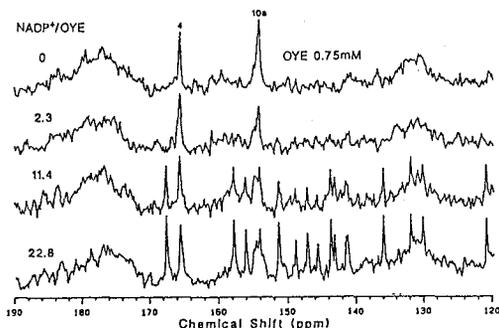


Fig. 3 C-13 NMR spectral changes of OYE reconstituted with [4,10a-¹³C₂]FMN upon addition of NADP⁺

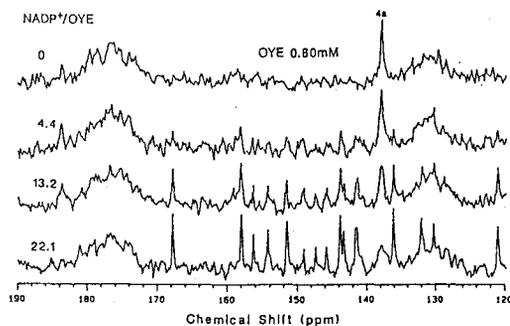


Fig. 4 C-13 NMR spectral changes of OYE reconstituted with [4a-¹³C]FMN upon addition of NADP⁺

P 105 ピルビン酸キナーゼの活性中心の構造と活性制御

(鳥取大・医) ○飯塚 舜介 (阪大・医) 野口 民夫

Structure of the Active Site and the Regulation of Activity of Pyruvate Kinase

Shunsuke Meshitsuka and Tamio Noguchi
Tottori University School of Medicine and Osaka University School of Medicine

Pyruvate kinase type M2 of which activity was regulated allosterically was purified from ascites hepatoma cells of rats of Donryu strain. Rabbit muscle pyruvate kinase type M1 was purchased from Boehringer. NMR spectra of pyruvate kinase were obtained by Varian Unity 500 spectrometer. Sharp C²H signal of M1 was assigned to His-4 in N domain of the contact region between subunits owing to lack of the signal in NMR spectra and in amino acid sequence of M2. Two histidine residues were observed around the active site of pyruvate kinase. One was assumed to be assigned to His-273 which was near the PEP binding site. The other was assigned to His-77 tentatively.

ピルビン酸キナーゼは解糖系の律速酵素の一つで最後の段階に位置しているため、この酵素の活性制御はエネルギー代謝系において重要である。ピルビン酸キナーゼは哺乳動物では4種(M1、M2、R、L)のアイソザイムが知られている。いずれも約240kDaの分子量をもっており、それぞれ等しい大きさのサブユニット4つからなっている。おのおののサブユニットはA、B、C、およびNの4つのドメインからなっている^{1,2)}。動物種によるアミノ酸配列の違いは比較的少なく、相互に比較するのに適している。また、M1以外のアイソザイムはアロステリックな制御を受けることが知られている。M1とM2は同じ遺伝子から転写後の過程でつくられることがわかっており、アミノ酸配列の違いはCドメインに限られている。X線解析の報告があり、530残基のポリペプチド鎖のうち残基1-42は4量体におけるサブユニット接触領域となる小さなドメインNをなしている。そして続く残基が(α/β)8バレルを形成し基質結合部位と接触部位となっている。

key words: ピルビン酸キナーゼ、アロステリック制御、活性中心

めしつか しゅんすけ、 のぐち たみお

ウサギ筋肉のピルビン酸キナーゼM1についてはヒスチジンのC2Hのみ分離が可能で、6本観測されている³⁾。pH滴定から各々のpK'値が求められた。このうち3本は特徴的な挙動を示した。そのうちの1つのC2Hのみ基質のリンエノールピルビン酸(PEP)の結合によって高磁場シフトし、pK'値が0.4単位減少する。pK'値の減少はPEPの陰電荷による効果とは逆方向であるため、PEPと直接の結合ではなく、PEPの結合に必須の2価の金属イオンによる効果か、基質の結合によるコンフォメーションの変化で間接的に引き起こされたものであると推察された。Ni²⁺イオンを2価の活性化イオンとして結合させたとき、このC2HのT1に対する常磁性効果から距離を計算すると~6Åであった。このこともさきほどの推論を支持する。このC2HのシフトのPEPの濃度依存性から、PEPの解離定数を求めたところ74μMであった。この値は反応速度論で、あるいは超遠心法で求められた値とよく一致していた。もう一つのC2Hは基質類似体であるCrATPの結合によって選択的に線幅が広がる。そして、続いてPEPを加えると、圧倒的に結合の強いPEPが結合部位に重なりのあるCrATPを追い出す。その結果C2Hに対する常磁性効果がなくなり、シグナルが回復してくる。このことから、ATPの結合部位の近傍にあると推察された。

ラットのM2タイプのピルビン酸キナーゼはドンリュウラットの腹水肝がん細胞から精製した(以下M2と略)。ウサギのM1タイプはベーリンジャーから購入した(以下M1と略)。酵素活性は乳酸脱水素酵素とのカップリング反応を用いて測定した。500MHzのNMRスペクトルを測定した(Varian Unity500)。

アミノ酸配列の比較をするとM1はM2より3つヒスチジンが多い、この3つのうち2つはCドメインのαヘリックスにあり、残りの1つはN末端から4番目に位置している。残りのヒスチジンは保存されているから、M1にのみ観測される半値幅が約5HzであるHis(1)は運動の自由度の大きいHis-4のC2Hであると帰属した。M1タイプのアイソザイムにおいて、活性部位を構成、あるいは近傍に位置すると推察されている残基はHis-77、およびHis-273である。X線解析でピルビン酸の結合部位の近くにあることが示されたHis-273はNMRでPEPの近傍にあるとしたHis(3)であろう。一方、X線解析ではATPの結合部位については何もわかっていないが、CrATPの影響から考えてHis(2)はHis-77であろう。アミノ酸配列の相同性が高いことから推察されるが、M1とM2で観測されるヒスチジンは同じ位置にある可能性が高い。pK'値がよく一致していることもこれを支持している。M2ではフルクトース1,6ビスリン酸(FDP)によってアロステリック効果が観測されることが知られている。FDPを加えると一方のC2Hがシフトするが、pK'(6.08)は変わらなかった。このことは、FDPの結合により活性中心の近傍のコンフォメーションが変化したことを示している。

- 1) T.M.Larsen, T.Laughlin, H.M.Holden, Ivan Rayment, G.H.Reed. *Biochemistry* 33, 6301 (1994).
- 2) H.Muihead, D.A.Clayden, D.Barford, C.G.Lorimer, L.A.Fothergill-gilmore, E.Schiltz, W.Schmitt. *EMBO J.* 5, 475 (1986).
- 3) S.Meshitsuka, G.M.Smith, A.S.Mildvan. *J Biol Chem* 256, 4460 (1981).

P 106 タンパク質構造の精度評価のための¹H NMR化学シフト計算の応用

東京農工大工学部 朝倉哲郎、菊地淳、出村誠
University of Sheffield M.P. Williamson

Application of ¹H NMR chemical shift calculation to measure the quality of protein structure

Tetsuo Asakura¹, Jun Kikuchi¹, Makoto Demura¹, M.P. Williamson²

1 Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo

2 Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield, U.K.

We have developed a program that can calculate ¹H NMR chemical shifts of proteins, using a set of coordinates provided from X-ray or NMR structure. When this program applies to crystal structures, the standard deviation of calculated to observed shifts (SD) correlates to the quality of structure as measured by resolution or by stereochemical quality. When this program applies to NMR structures, agreement between calculated and observed shifts is generally less good, and is of the same quality as that for crystal structures of resolution roughly between 2.0Å to 3.0Å. Refinement methods such as energy minimization and the use of relaxation matrices and back calculation produce little or no improvement in SD. The calculation has several applications, particularly as an independent means of measuring the quality of structure (either in the crystal or in solution), and in identifying possible assignment errors. The converse approach, of using a crystal structure to guide NMR assignments, is possible if applied with caution.

緒言 Williamsonらが初めてNMR法によりタンパク質の立体構造を決定した日¹から10年弱の月日が経過している。これまでにタンパク質の立体構造解析に関する成書も著され^{2,3}、その解析法はルーチン化されつつある。NMRから得られた溶液構造を結晶学者の行っているような原子レベルで議論するためには、如何にしてNMRから得られる情報を活用していくかが最重要課題である^{4,5}。我々は既に化学シフトの情報も距離制限として用いることにより、化学シフトがもつ立体構造情報を満足し得る新たなタンパク質の立体構造計算法を提案した⁶。

本発表では、立体構造計算のみならず” NMRによりタンパク質分子の構造とその活性発現機構を評価する” システムを開発するために化学シフト計算法が一つの有効なアプローチとなり得ることを提案する。ここでは、特に¹H NMR化学シフト計算法を既に報告されている種々のタンパク質の立体構造の精度の評価法として応用するとともに、局所的な構造refinementや帰属の妥当性の評価に用いることができることを示した。

キーワード：¹H NMR化学シフト計算 化学シフト予測 タンパク質の構造評価

あさくらてつお きくちじゅん でむらまこと M.P.ウイリアムソン

計算方法 我々がこれまでに発表してきた化学シフト計算プログラムは、 $C\alpha H$ 化学シフトについて環電流効果、磁気異方性効果、電場効果の和として計算し、Wüthrichらによって報告されているランダムコイルシフト値²を考慮した実測値と比較するものである⁷。この計算プログラムについて、実測の化学シフト値を書いたファイルおよびPDB(Brookhaven Protein Data Bank)⁸形式で書き込まれた座標データを入力することにより、タンパク質の全水素原子について化学シフト計算ができるように改良した⁹。最終的に、我々は図1に示すような化学シフト計算法を用いたタンパク質の構造決定、評価システムの開発を目指している。

ここではまず第一に、PDBに登録されている結晶構造について、 $C\alpha H$ 化学シフト計算の結果がどのようにその分解能と対応するかを調べた。また、同様な比較をプログラムPROCHECK¹⁰も用いて行った。さらに、卵白リゾチームについて結晶構造を用い全てのAla残基の脂肪族水素の実測および計算化学シフトをCOSYタイプにプロットし、帰属の妥当性の評価について検討した。

第二に、PDBに登録されている溶液構造について $C\alpha H$ 化学シフト計算の結果に基づいて以下の検討を行った。1) 同じタンパク質について異なるRefinementの方法(経験的エネルギー計算、緩和行列によるNOEの精密化等)により得られた構造。2) 平均構造と収束構造。3) 構造計算に用いた制限の数との依存性。4) 収束性を示すR.M.S.D.値との依存性。ここでは、特に1)の結果についてのみ示す。

結果および考察

(1) 結晶構造への化学シフト計算法の適用

NMR化学シフトは局所的な構造の違いを鋭敏に反映する。従って同じタンパク質でも構造解析の精度が異なると化学シフト計算の結果が異なる。卵白リゾチームの各々独立に発表された

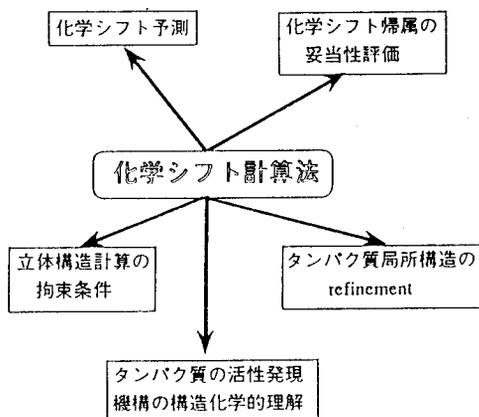


Figure 1. Structure analysis of proteins applied with chemical shift calculation

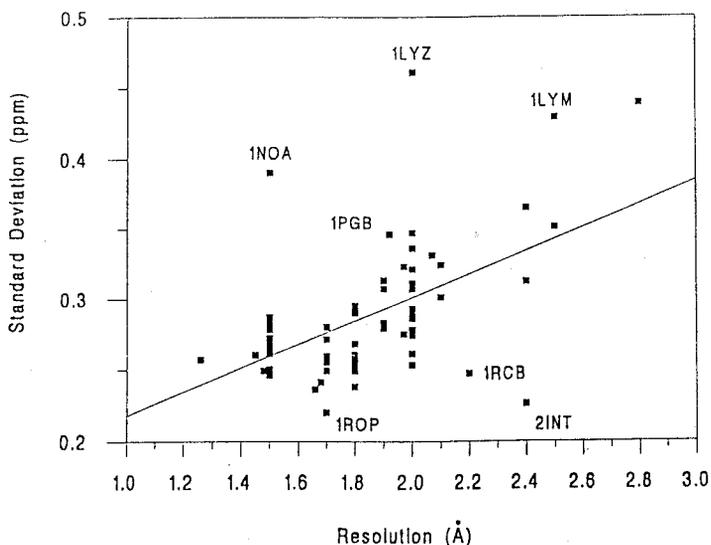


Figure 2. The relationship of the standard deviation of calculated to observed $C\alpha H$ shift on structure quality for 72 different crystal structures. The lines are best fit lines.

17個の構造について、それらの分解能またはPROCHECKによる精度評価の値とC α H化学シフト計算の結果(標準偏差)とをプロットすると、良い相関関係が得られた(Data not shown)。また、76個の結晶構造について同様なプロットを試みたところ、分解能やPROCHECKで用いられる精度と標準偏差の値には相関関係が見られた(図2)。なお、 α -helixリッチであるタンパク質や卵白リゾチームの古い構造については相関が良くない。また、実測化学シフトの報告にタイプミスがあった1PGB^{11,12}や1NOA^{13,14}については回帰直線から離れた位置にプロットされる。このような結果から、結晶構造が既に得られているタンパク質のC α H化学シフトを帰属した場合、その分解能から考えて適当な化学シフト計算の結果が得られるかどうかを調べることによって、帰属の妥当性について議論することができる。

また、化学シフト計算法は高分解能の結晶構造が得られている場合に、その座標をもとに実測化学シフトの予測をすることができる。図3は卵白リゾチームについての例であるが、破線で結んだ2つの高磁場シフトしたシグナルと1つの低磁場シフトしたシグナルは化学シフト計算法により残基番号特異的に帰属を行うことができる。このような化学シフトの予測法は半自動的化學シフト帰属のプログラム中に組み入れることができる。

(2) 溶液構造への化学シフト計算法の適用

NOEという定量性に乏しい情報を用いる現在のタンパク質立体構造解析法は、その性質から様々な構造refinementの方法が提案されている。例えば、X線回折法とNMR法により初めて同時に立体構造が決定されたタンパク質、tendamistatの場合、

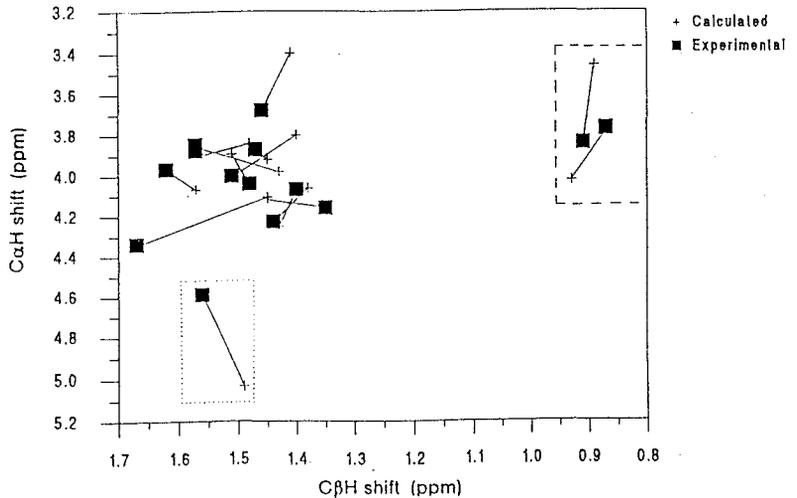


Figure 3. Plot of chemical shift for C α H and C β H protons of alanines in hen lysozyme, calculated from the crystal structure(crosses) and observed in solution(squares).

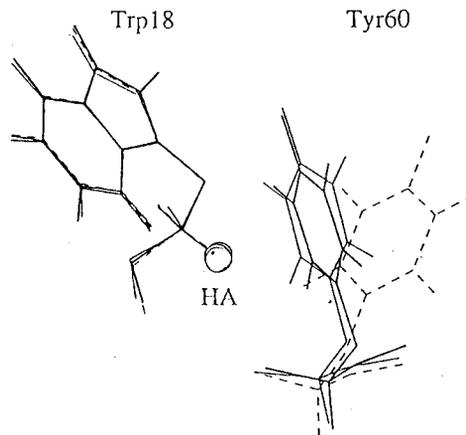


Figure 4. The residue around C α H of Trp18 of tendamistat, showing the different positions of the Tyr18 ring in the starting structure(2AIT:thick lines), AMBER minimized structure(3AIT:thin lines) and FANTOM minimized structure(4AIT:dashed lines)

実測データのみからDISMANにより構造決定されたもの(2AIT)¹⁵、またプログラム AMBERのエネルギー力場を用いて計算されたもの(3AIT)¹⁶、さらにプログラム FANTOMのエネルギー力場を用いて計算されたもの(4AIT)¹⁶の三種類の座標がPDBに登録されている。これら全ての場合について化学シフト計算法を適用すると、4AITの場合に著しい実測値と計算値との差を生じる (Data not shown)。これは他のモデルでは比較的良く再現されていたW18の高磁場シフトが、4AITの場合に再現されていないことに起因する。三者の構造を詳細に比較すると、この高磁場シフトの主原因であるY60の芳香環の向きが大きく異なっていることがわかる (図4)。この例はタンパク質の活性部位 (tendamiststの場合はW18-Y20のループ部位と考えられている¹⁷) の局所的な構造変化が、実測および計算化学シフトに極めて鋭敏に反映されることを端的に示している。このような結果から化学シフト計算法は活性発現にともなう構造変化を定量的に説明する方法としての期待がもてる。

参考文献

- 1 Williamson, M.P., Havel, T.F., & Wüthrich, K. (1985) *J. Mol. Biol.* **182**, 295-315
- 2 Wüthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*. Willey, New York
- 3 Roberts, G.C. (1993) *NMR of Macromolecules*, Oxford University Press
- 4 Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1993) *J. Mol. Biol.* **231**, 82-102.
- 5 Zhao, D. & Jardetzky, O. (1994) *J. Mol. Biol.* **239**, 601-607
- 6 菊地淳、朝倉哲郎、藤田憲一、Williamson, M.P. (1994) 高分子論文集 **51**, 409-413
- 7 Williamson, M.P. & Asakura, T. (1993) *J. Magn. Reson. Ser. (B)* **101**, 63-71
References therein
8. Abola, E., Bernstein, F.C., Bryant, S.H., Ketzle, T.F., & Weng, J. (1987) Protein Data Bank. In *Crystallographic databases - information content, software systems, scientific applications* (Allen, F.H., Bergerhoff, G. & Sievers, R. Eds.), pp.107-132. Data commission of the international union of crystallography, Bonn.
9. Williamson, M.P., Kikuchi, J. & Asakura, T. manuscript in preparation
10. Morris, A.L., MacArthur, M.W., Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. (1992) *Proteins* **12**, 345-364
11. Gallagher, T., Patrick, A., Bryan, P., & Gilliland, G.L. (1994) *Biochemistry* **33**, 4721-4729
12. Gronenborn, A.M., Filpula, D.R., Essig, N.Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P.T., & Clore, G.M. (1991) *Science* **253**, 657-660
13. Van Roey, P. & Beerman, T.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **36**, 6587-6591
14. Adjadj, E., Mispelter, J., Quiniou, E., Dimicoli, J., Favaudon, V., & Lhoste, J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **190**, 263-271
15. Kline, A.D., Braun, W., & Wüthrich, K. (1988) *J. Mol. Biol.* **204**, 675-724
16. Billeter, M., Schaumann, T., Braun, W., & Wüthrich, K. (1990) *Biopolymers* **29**, 673-692
17. Pflugrath, J.W., Wiegand, G., & Huber, R. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 383-386

セッション：蛋白質（立体構造解析法）

(Proteins-Methods for 3D Structure Determination)

L15

多重共鳴多次元NMRによる蛋白質の解析の至適化 ———

グラジエント、重水素、異種核cross polarizationの適用による

○白川昌宏、Markus R. Walchli*、田榮浩、清水真人、池上貴久、京極好正
(阪大・蛋白研、*日本ブルカー)

Optimization of multi-dimensional multi-resonance NMR for the studies of protein structures by the use of pulsed field gradients, deuterium labeling and decoupling, and heteronuclear cross polarization

○M. Shirakawa, M.R. Walchli*, Y.H. Jeon, M. Shimizu, T. Ikegami, and Y. Kyogoku (Institute for Protein Research, Osaka University; *Bruker Japan)

Optimization of multi-dimensional multi-resonance NMR for proteins was achieved by incorporation of several techniques, such as pulsed field gradient spectroscopy, deuterium labeling of proteins and heteronuclear cross polarization. The combined method was applied to several DNA binding proteins. The results demonstrated that the combination of the techniques significantly improves the practical sensitivity of multi-resonance experiments.

序論

1990年にTriple-resonance法、HCCH法などの多重共鳴3次元NMRが蛋白質の解析に導入されてから、すでに4年を経た。その間、この手法は数多くの改良を経て、今や分子量2万強までの蛋白質の構造決定については標準的な方法といえるほど広く普及してきている。

オリジナルのHNCA、HNCO、HCCH-TOCSYなどの測定法に加えて、多くのパルス配列が考案されており、どのパルス配列をいかに組み合わせて使うかの選択は、蛋白質の構造解析を効率よく行うのに極めて重要になってきている。

加えて、基礎的なテクニックの大きな改良として導入されたものとして、

- (1)四次元への次元性(dimensionality)の拡張によるシグナル分離の向上
- (2)グラジエント・エンハンス法の導入による溶媒消去と感度上昇
- (3)異種核cross polarization法の導入によるコヒーレンス移動の至適化
- (4)重水素ラベルとD-decouplingによる¹³C核緩和時間の延長と、それによる感度上昇が挙げられる。

3重共鳴法、グラジエント、異種核cross polarization、重水素デカップリング

しらかわまさひろ、まるくす・べるひりー、でん・よんほう、しみずまさと、いけがみたかひさ、きょうごくよしまさ

昨年の本会において我々は4次元NMRへの拡張について議論したので、今回は上記(2) - (4)の点についての蛋白質構造解析の至適化を行ったので発表する。さらにそれらの手法を適用して、酵母pho4蛋白質DNA結合ドメイン、大腸菌ポリメラーゼ α サブユニットDNA結合ドメイン、 λ ファージCro蛋白質などのDNA結合蛋白質に適用した結果を示す。その際、どの実験の組み合わせが効率よい解析を可能にするかを議論したい。

実験

酵母pho4蛋白質DNA結合ドメイン、大腸菌RNAポリメラーゼ α サブユニットDNA結合ドメイン、 λ ファージCro蛋白質およびその変異体はいずれもT7ファージ ϕ 10プロモーター、または大腸菌tacプロモーターの下流に対応する遺伝子を組み込むことにより大腸菌で発現させた。安定同位体ラベルは大腸菌を培養するM9合成培地に $15\text{NH}_4\text{Cl}$ 、または 13C -グルコースを加えることにより行った。蛋白質の重水素化は大腸菌を60% D_2O / 40% H_2O で生育させることにより行った。

NMR測定は主にBruker AMX-500 spectrometerを用い、グラジエントの測定はz磁場勾配用のコイル付き $1\text{H}/15\text{N}/13\text{C}$ triple-resonanceプローブを使用した。

結果と考察

(1) グラジエント・エンハンス法の導入による溶媒消去と感度上昇

溶媒消去については、簡便な溶媒消去法として使われるzz-filter, z-filterおよびWATERGATE法を適用した場合よりも、coherence transfer pathway selectionとして、2つの磁場グラジエントパルスを用いる方がより優れていると思われた。この際、coherence transfer pathway selectionとしてのグラジエントパルスはRance-Kayの方法(Kay et al. J. Am. Chem. Soc., 114, 10663 (1992); Muhandiram et al., J. Mag. Reson. B, 103, 203 (1993))を用いることにより、感度上昇を達成している。またこの際、溶媒消去もほぼ完全であるので量子化ノイズの軽減によるS/N比上昇も達成されている。

現在、我々が主鎖の帰属に用いているCBCA(CO)NH, CBCANH, HBHA(CBCACO)NH, HBAHA(CBCA)NHなどの多くのアミドプロトン観測の3次元NMR法に、このテクニックを適用して全てに良い結果を得ている。図1に大腸菌RNAポリメラーゼ α サブユニットDNA結合ドメインのCBCA(CO)NH, CBCANHスペクトルを利用した主鎖の帰属を示す。

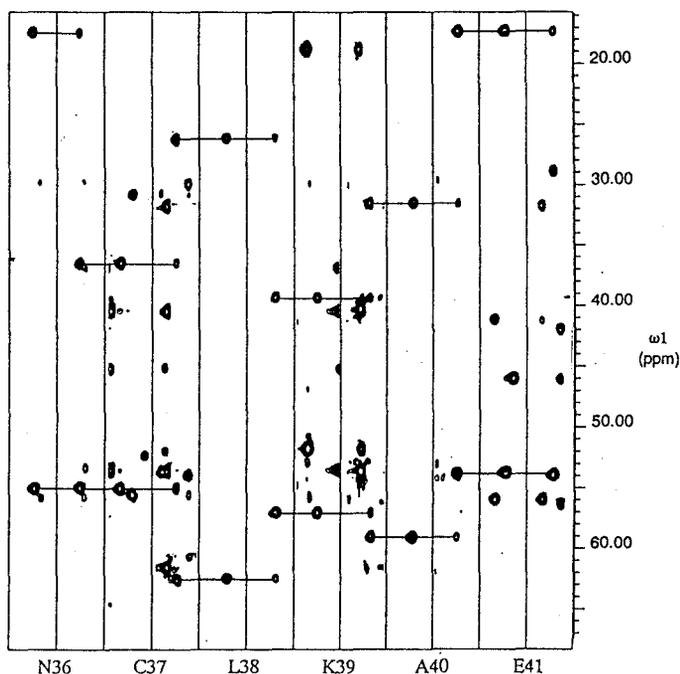


Figure 1. Selected $^{13}\text{C}(\omega_1)$, $^1\text{H}(\omega_3)$ cross sections of the 3D CBCA(CO)NH and 3D CBCANH spectra of [U- ^{15}N , ^{13}C]Pol α DNA binding domain.

(2) 異種核cross polarization法の導入によるコヒーレンス移動の至適化

従来の多くのTriple-resonance法、HCCH法では異種核間のコヒーレンス移動にINEPTなどのpulsed transferが用いられてきたが、最近、異種核cross polarization(HCP)を用いるパルス系列が用いられ始めてきた。そのひとつにHCCH-TOCSYのHCP版であるHEHOHEHAHAがある(Majumdar et al., J. Bio.NMR, 3, 387 (1993))。このHEHOHEHAHAをHCCH-TOCSYと比較したところ劇的な感度の上昇を得た。また一般にpulsed transferでは効率の悪いHCANH実験もHCPを用いた方法(Richardson et al., J. Magn. Reson. B, 101, 223 (1993))では感度が良いことを1Dスペクトル上で確認できた。HCPによる感度上昇の原因としては

- (i) RF inhomogeneityの改善
- (ii) off-resonance効果の改善
- (iii) パルス幅などの不完全さの補償

などの理由が挙げられると思う。

種々のHCPを利用した実験を考案して、モデルペプチド、蛋白質等に適用してみた。結果をHCPの可能性と共に議論する。

(3) 重水素ラベルとD-decouplingによる ^{13}C 核緩和時間の延長と、それによる感度上昇

Triple-resonance法の大きな蛋白質への適用に関して最大の問題点の一つは α 炭素の短い横緩和時間にある。これは主に $H\alpha$ との双極子-双極子相互作用によるものなので、 $H\alpha$ を重水素化する事によって改善することが出来る。但しその際、重水素によるスカラー緩和が引き起こされるので、重水素核のデカップリングをする必要がある。

我々は重水素化した酵母pho4蛋白質DNA結合ドメインについて重水素核のデカップリングを用いたHN(CA)NNH(Weismann et al., J. Bio. NMR, 3, 113(1993))を行った。originalのHN(CA)NNHでは α 炭素が横磁化である時間は50msecとかなり長く、重水素化しない蛋白質の測定では α 炭素の短い横緩和時間により感度が低いことが予想された。

図2に重水素デカップリング無しの1D HN(CA)NNHスペクトル(上)と重水素デカップリング1D HN(CA)NNHスペクトル(下)を示す。重水素でカップリングによる感度上昇が顕著であることが分かる。

HNCANNH with and without 2H decoupling

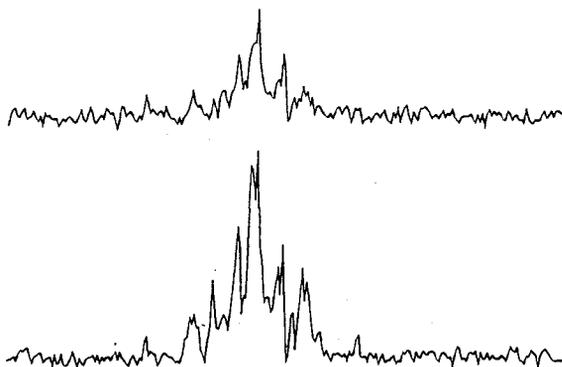


Figure 2. Comparison of $(\omega_1 - \omega_2)$ 1D HN(CA)NH spectra of yeast pho4 protein DNA binding domain. Without (upper) and with (lower) deuterium decoupling.

様々な実験系での重水素ラベルとD-decouplingによる感度上昇の可能性について議論したい。また特に、現在進めつつある実験は、この重水素化の手法と異種核cross polarization (HCP)の併用である。前述のように特に、 α 炭素からNに磁化を移すステップのある実験の場合、 $C\alpha-N$ のHCPを使うとかなりの感度改善が期待できる。特に、重水素化された蛋白について適用した場合、重水素照射なしに重水素デカップリングを達成することができる。これについてはHN(COCA)NHというパルスを考案したので重水素化した蛋白質に適用した結果を議論したい。

L16

c-Myb 蛋白質 - DNA 複合体構造の distance geometry 計算

(¹蛋白工学研、²横浜市立大、³理研)

○守川壯一¹、緒方一博²、皿井明倫³、石井俊輔³、
西村善文² 中村春木¹

Distance geometry calculation of the c-Myb protein and DNA complex

(Protein Engineering Research Institute¹, Yokohama City University²,
The Institute of Physical and Chemical Research³)

○ S. Morikawa¹, K. Ogata², A. Sarai³, S. Ishii³, Y. Nishimura², H. Nakamura¹

The NMR - distance geometry calculation of a protein structure with the 4-dimensional simulated annealing (4D-SA) method has two advantages : (1) the independency from the initial structure and (2) good convergence based on its wide sampling space. Here, the 4D-SA method was applied to determine of a complex structure of c-Myb R2R3 fragment with DNA 16mer duplex. The present method have a good sampling property and the complex structures can be generated satisfying experimental NMR data, regardless of the randomized initial structures of the protein.

Distance geomtry 計算には、(1) 初期構造に依存せずに、(2) 効率よく、NMR 実験データを満たす構造をもれなく導き出すことが要求される。それらの要件を満足する計算手法の一つとして、我々は 4-Dimensional simulated annealing (4D-SA) 法を用いるプログラム EMBOSS を開発し、種々の蛋白質の構造決定に用いてきた¹⁾。4D-SA 法とは、現実にある 3 次元空間に仮想的な座標次元を加えることにより、構造の探索空間を拡大する方法である。この手法の蛋白質構造決定への適用に関してはすでに十分な結果を得られている。今回の発表では、前記の要件をより厳しく達成する必要性のある、分子複合体の構造決定への 4D-SA 計算法の適用を、c-Myb 蛋白質 DNA 結合ドメイン (R2R3) と DNA 16mer 二重鎖の複合体分子に対して行ったので報告する²⁾。この DNA 16mer には c-Myb 蛋白質が特異的に結合する塩基配列 (AACXG) が含まれている。

初期構造として、c-Myb 蛋白質はランダム・コイル構造、DNA は B 型構造とした。計算スキームは、(a) (Fig. 1a) 各分子の構造をその分子内 NOE データのみを用いて別個に数個ずつおこした後に、それらの出力構造を空間的配向がランダムになるように配置して、分子間の NOE データを加えてあらためて計算する方法 "Multi-Step" と、(b) (Fig. 1b) 両者の初期構造から、すべての NOE データを用いて一気に複合体構造を算出する方法 "Single-Step" の 2 種類について検討した。開始時の蛋白質ランダム・コイル構造は、主鎖と側鎖の二面角をランダムに設定したすべて異なる構造である。束縛条件として、NMR 測定実験による NOE データとともに、間接的な実験データとして DNA 塩基の Watson - Crick 対形成距離束縛と、リン酸骨格の右巻きヘリックスを

キーワード : Myb, DNA, Complex, Distance geometry

○もりかわそういち、おがたかずひろ、さらいあきのり、いしいしゅんすけ、
にしむらよしふみ、なかむらはるき

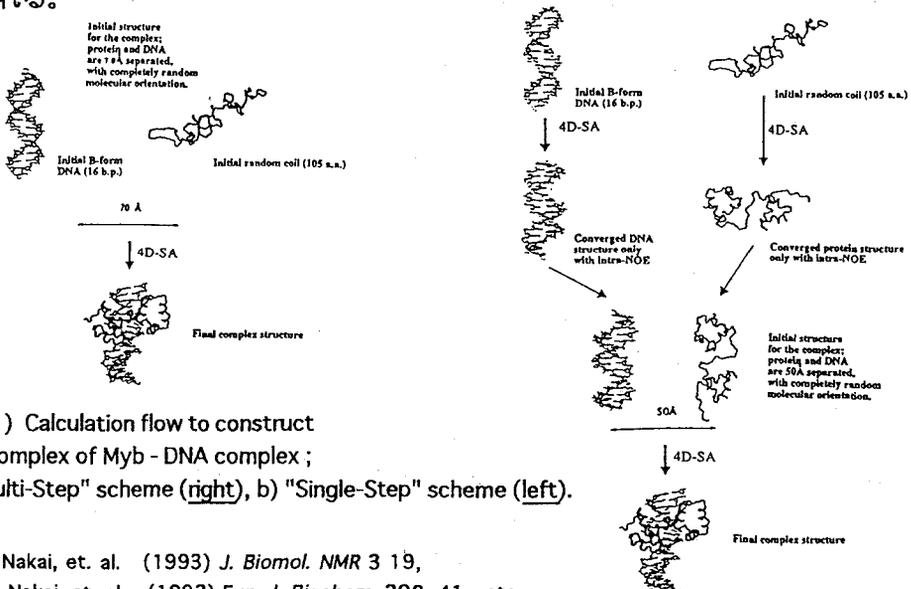
保つための二面角束縛³⁾を用いた。構造の収束判別は、単体分子 (max. violation < 0.3 Å)、複合体分子 (max. violation < 0.4 Å) とした。

なお、予備的な計算として、DNA 二重鎖分子単体について、初期構造を A, B, Z 各型としたものを行ったが、それらの初期構造に依存せず、ほぼ同等の効率で B 型シミュレーション・データをみたま構造を得られたため、DNA の初期構造は B 型とした。また、この蛋白質 - DNA 複合体の系を通常の 3 次元空間で SA 計算したところ、収束した構造は得られなかった。

このようにして構築された出力構造群とそれぞれの初期構造との間には有意な相関がみられず、スキーム (a), (b) の出力構造群の間にも偏りはみられなかった。これらのことから、4D-SA 計算結果は初期構造に依存せず、効率よく実験データを満たす構造を探索していることが示され、初期構造の任意性による出力構造の偏りの問題は十分に排除されていると考えられる。

ただし、複合体を計算する段階において、スキーム (a) "Multi-Step" では十分な収束率で構造構築を行えたが、スキーム (b) "Single-Step" ではそれに比べて低い収束率であった。この原因は、蛋白質分子のみの global chirality が逆転した複合体構造が約 50%、加えて c-Myb 蛋白質の R2 - R3 ドメイン間の遠距離 NOE 実験データが比較的少なかったために、各ドメインの一方のみの global chirality が逆転した構造が約 50% の確率で出力されたためである。

計算の初期構造として通常よく使われる、複合体のモデリング構造や X 線結晶解析構造を用いることに比べると、今回示した方法による 4D-SA 計算手法は、冒頭に述べた要求を満たしており、極めて客観的で信頼できる立体構造を効率良く構築できる手法と考えられる。



(Fig. 1) Calculation flow to construct the complex of Myb - DNA complex ;
a) "Multi-Step" scheme (right), b) "Single-Step" scheme (left).

- (1) T. Nakai, et. al. (1993) *J. Biomol. NMR* 3 19,
T. Nakai, et. al. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 41, etc.
- (2) 緒方一博ほか 第33回 NMR 討論会 ポスター P86 (1994),
K. Ogata, et. al. submitted
- (3) A. M. Gronenborn, G. M. Clore (1989) *Biochemistry* 28, 5978

L17

PFG三重共鳴三次元NMRによるヒト acidic fibroblast growth factorの構造解析

(都臨床研) ○小椋賢治, 永田宏次, 畠中秀樹, 稲垣冬彦

PFG triple resonance three dimensional NMR study on structure of human acidic fibroblast growth factor

Kenji Ogura, Koji Nagata, Hideki Hatanaka, and Fuyuhiko Inagaki

Department of Molecular Physiology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

We introduced the pulsed field gradient technique (PFG) for some triple resonance experiments. PFG was used as coherence path selection and unwanted signal purging. In the case of amide proton detection experiments, sensitivity enhancement method was used simultaneously. We applied these techniques to assign the signals of aFGF, and tried to complete the assignment by using a single sample that dissolved in 90% H_2O . The spectral quality is good, so that most of the signals were assigned in short time as compared with the case of conventional non-PFG experiments.

[はじめに]

pulsed field gradient(PFG)をタンパク質の三重共鳴実験に組み込むことによるメリットとして次の二点があげられる。

(1)溶媒飽和パルスが不要になるため、アミドプロトンおよび溶媒直下信号の観測が可能となる。

(2)pulse imperfection由来のartifactを除去できるため、スペクトルの質が向上する。結果として、非PFG三重共鳴実験系において必要であった重水溶媒試料が不要となることが期待される。そのことは、測定試料量を減らすことができるだけでなく、溶媒の違いによる化学シフト値のずれを生じさせないという利点がある。今回われわれは、ヒト acidic fibroblast growth factor (aFGF)をターゲットとして、そのダブルラベル軽水溶媒試料のみを用いて、PFG三重共鳴三次元スペクトルを測定し、全信号の帰属およびNOEの収集を完了することを目的とした。

[実験]

ヒトaFGF (134残基)は大腸菌により発現した。 ^{13}C グルコースと $^{15}NH_4Cl$ にて培養し、 $[^{13}C,^{15}N]$ 均一ラベル体を作成した。90% H_2O /10% D_2O 溶媒に溶解し、シゲミ製マイクロセル型サンプル管を使用し、NMR測定試料は1.5mM, pH6.3とした。

NMR測定は、すべてバリアンUNITY500分光計によりおこなった。RFユニットは3チャンネル構成であり、カルボニルまたは α 炭素のオフセット励起には、位相変調パルスを用いた。帯域選択デカップルには、SEDUCE-1パルス系列を必要に応じて位相変調パルスとして使用した。プローブは5mm径三重共鳴プローブ (z軸PFGコイル付)

pulsed field gradient / triple resonance / aFGF

おぐら けんじ, ながた こうじ, はたなか ひでき, いながき ふゆひこ

を使用した。PFGは矩形波、最大強度30G/cmにて使用した。室温シムはレゾナンスリサーチ製ウルトラシムを使用した。溶媒飽和パルスは使用しなかった。

coherence path選択実験により得られるP/N型のデータ並びはC言語によるソートプログラムでhypercomplex型に変換したのち、VNMR (バリアン), FELIX(Biosym)またはNMRPipe(Delaglio,NIH)により処理した。

[amide proton検出型パルス系列]

PFGによるコヒーレンス経路選択は、artifactを完全に除去できる反面、感度減少をともなう。アミドプロトン観測においてはsensitivity enhancement method(SE)を併用することで、コヒーレンス経路選択にともなう感度減少を回復することができる(1,2)。この手法はアミドプロトン観測型の三重共鳴実験すべてに適用することができ、今回われわれは、以下の測定法にPFGとSEを組み込んだ。

3D HNCA, 3D HN(CO)CA, 3D HN(CA)HA, 3D CBCANH, 3D CBCA(CO)NH(2), 3D HBHA(CBCACO)NH, 3D C(CO)NH, 3D H(CCO)NH, 3D ¹⁵N NOESY-HSQC.

図1,2に例として、HBHA(CBCACO)NHと3D C(CO)NHのパルス系列を示す。

[aliphatic proton検出型パルス系列]

CH₂およびCH₃のプロトン検出については、SEは有効ではない。したがって、コヒーレンス経路選択のためにPFGを使用することは望ましくない。PFGは不要な横磁化消去のために使用することになる。今回われわれは、以下の測定をおこなった。

3D HCCH-TOCSY(3), 3D ¹³C NOESY-HSQC(4).

これらの測定法は従来、重水溶媒試料にておこなわれていたが、PFGを併用することで、軽水溶媒試料にて測定できるようになった。HCCH-TOCSYにおいては溶媒磁化を消去するためには、¹HスピンロックとPFGの組み合わせが極めて有効である。

[結果]

HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, CBCANHスペクトルから、ひとつのN-Hペアに関して、C α (i), C β (i), C α (i-1), C β (i-1)の4炭素の化学シフト値が確定する。これらの値を使用して、ペプチド主鎖を連鎖的に帰属した。図3-4にスライスを示す。図5に、CBCANHスペクトル上での連鎖帰属作業の例を示す。Proで連鎖がとぎれる以外は、すべての残基間の連鎖が完成した。

側鎖帰属は、3D HCCH-TOCSY, 3D HBHA(CBCACO)NH, 3D C(CO)NH, 3D H(CCO)NHによりおこなった。図6-8に、代表的な測定結果を示す。

このようにほぼすべてのaliphatic carbonおよびproton信号を帰属することができた。

[まとめ]

PFG使用により、質の高いスペクトルが短時間にて得られ、また重水溶媒試料を使用しなくとも信号の帰属をおこなうことができた。

[文献]

- (1) L.E.Kay et al., J.Am.Chem.Soc. 114,10663(1992).
- (2) D.R.Muhandiram et al., J.Magn.Reson.B 103,203(1994).
- (3) L.E.Kay et al., J.Magn.Reson.B 101,333(1993).
- (4) D.R.Muhandiram et al., J.Magn.Reson.B 102,317(1993).

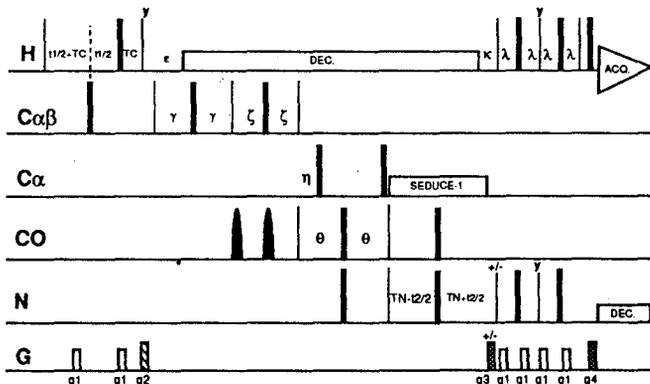


Fig.1 Pulse scheme of PFG HBHA(CBCACO)NH.
 TC=1.5ms, ϵ =2.1ms, γ =3.3ms,
 ζ =3.6ms, η =4.7ms,
 θ =11.4ms, TN=11.4ms,
 κ =5.5ms, λ =2.25ms.

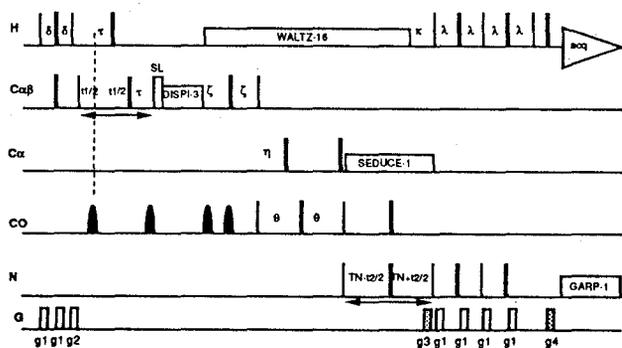


Fig.2 Pulse scheme of PFG C(CO)NH. Coherence path is selected by g3 and g4.
 δ =1.5ms, τ =1.05ms, SL=1ms.
 Carbonyl carbon is decoupled by shaped π pulses.

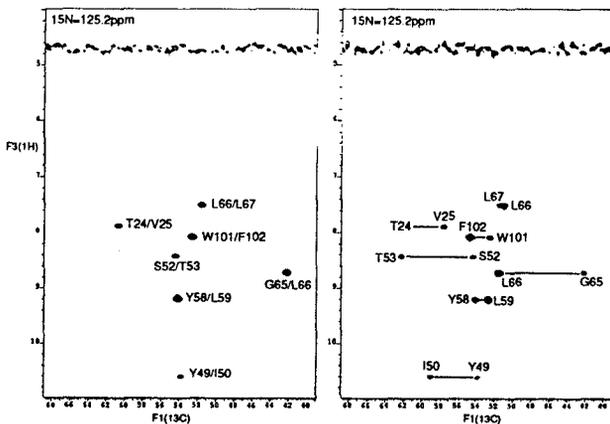


Fig.3 Sliced HN(CO)CA (left) and HNCA (right) of aFGF dissolved in 90% H_2O .
 Presaturation pulses were not applied.
 8scans for each transient.

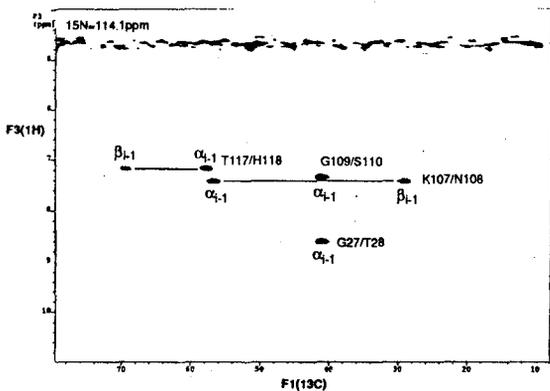


Fig.4 Sliced CBCA(CO)NH of aFGF dissolved in 90% H_2O .
 Presaturation pulse was not applied.
 16scans for each transient.

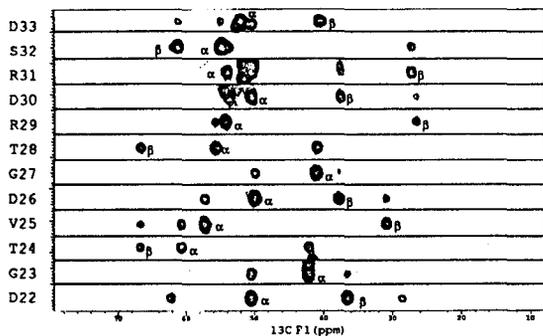


Fig.5 Stripped CBCANH of aFGF. Assignment of main chain is shown.

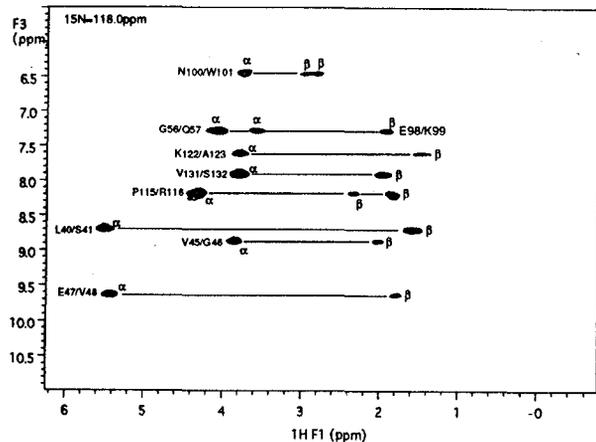


Fig.6 HBHA(CBCACO)NH of aFGF. 16scans for each transient.

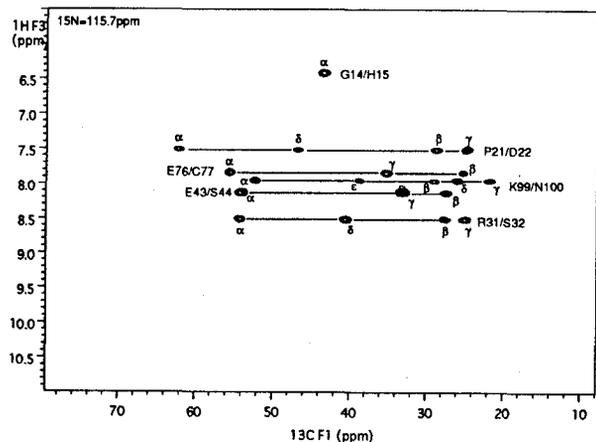


Fig.7 Sliced C(CO)NH of aFGF. DIPSI-3 mixing time=15.4ms.

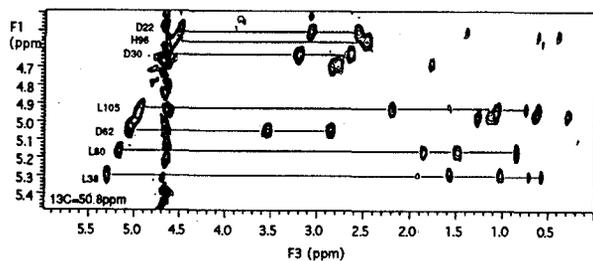


Fig.8 HCCH-TOCSY of aFGF dissolved in 90% H_2O . Presaturation pulses were not applied.

L18

安定同位体核利用 2、3 重共鳴法による cystatin A の構造解析
立体構造、内部運動、水和構造

○楯 真一、潮田利夫*、楯 直子、中野泰裕、鮫島達也*、稲垣冬彦#、
甲斐荘 正恒 (都立大・理、*青学大・理工、#都臨床研)

**Structural analysis of human cystatin A by double- and triple-
resonance NMR spectroscopy
- structure, internal motion and hydration**

**Shin-ichi Tate, Toshio Ushioda*, Naoko U. Tate, Yasuhiro Nakano,
Tatsuya Samejima*, Fuyuhiko Inagaki#, and Masatsune Kainosho**

* Aoyama Gakuin University, Faculty of Science and Engineer

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

1-1 Minami-Ohsawa Hachioji, Tokyo 192-03

Japan

ABSTRACT: We have determined the three dimensional structure of human cystatin A, a kind of cystein proteinase inhibitor with its molecular weight of 11 kDa. Several kinds of elaborate double- and triple- resonance experiments were applied to the spectral analysis. During the course of the present study, we have developed several new NMR methods for the stereospecific assignment of β protons and methyl groups of leucine and valine residues. According to the 'model free approach', we have analyzed the internal dynamics of cystatin A on the basis of the ^{15}N relaxation data. In addition, we analyzed the bound water location in cystatin A by the water-NOE/ROE experiments.

Introduction : Recent progress of stable isotope aided NMR techniques has provided us several efficient ways for the spectral assignments, resulting in the reduction of the labor in the structure determination of a protein up to around 20 kDa. The additional improvement in the NMR experiments given by the progress in isotope aided techniques and the introduction of pulsed field gradient (PFG) has also appeared in J-measurement, relaxation analysis and in the observation of hydrated water in a protein. In the present study, we applied these elaborate methods for the wide range of structural analysis of cystatin A.

キーワード : cystatin A, isotope aided NMR, relaxation time, hydration

たて しんいち、うしおだ としお、たて なおこ、なかの やすひろ、さめじま たつや、
いながき ふゆひこ、かいのしょう まさつね

For resonance assignment, we used several kinds of well established double and triple resonance experiments, and obtained all ^1H , ^{15}N and $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, and $^{13}\text{C}'$ assignments of cystatin A. To carry out the stereospecific assignments of $\text{H}\beta$ protons, we have developed a new NMR method, HBHA(CO)NH-J, which qualitatively clarify the $^3\text{J}_{\text{C}=\text{O}, \text{H}\beta}$ and $^3\text{J}_{\text{N}, \text{H}\beta}$ through the intensity modulation dependent on the relating J-values. In addition, we present here an alternative procedure for the assignment of methyl groups in Leu and Val in a stereospecific manner. This procedure is on the use of 'block labeling' which is originally published by Wüthrich's group [1] and at nearly the same time independently developed by our group. On the basis of the distance and angle constraints obtained from the above experiments, we could determine the spatial structure of cystatin A which consists of five anti-parallel β -sheets and one α -helix. To further characterize this protein from its dynamical points of view, we analyzed its mobility on the basis of ^{15}N relaxation data. The result has shown the active loops plausibly involved in the interaction with papain are significantly more mobile than the other parts. And the hydration analysis on cystatin A showed us that one bound water is trapped in a loop part around D61NH, which has a residence time greater than ~ 500 psec.

In this paper, we will show the example results used in the spectral analysis and give short description about our newly developed NMR methods. Other subjects including the structural determination, the analysis of the internal mobility of cystatin A, the amide exchange analysis and the hydration water observation will be discussed in detail with their biological meanings in the oral presentation.

1. Main chain and Side chain signal assignment :

For the assignment for the main chain signals was carried out on the basis of the CBCA(CO)NH and CBCANH with gradient sensitivity enhancement [2-4]. The side chain assignment was carried out on HCCH-TOCSY/COSY spectra. The example result of HCCH-TOCSY was shown in Fig. 1. From those data and other supplemented results, we could assign all main chain and side chain signals.

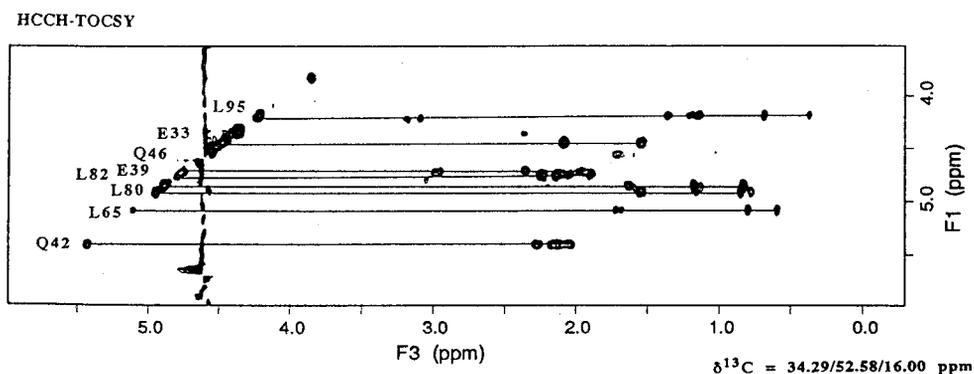


Fig. 1 : HCCH-TOCSY of cystatin A (1.5 mM, 37°C)

2. An alternative stereospecific assignment approach for H β protons

For the stereospecific assignment of H β protons, several experimental approaches have been already published [5-8]. Some of these are on the principle of E.COSY [5, 6, 9, 10], others are on the long range coherence transfer [7, 8]. The E.COSY experiment using the C-C coherence transfer, HCCH-E.COSY, is an excellent experiment where large ^{13}C - ^1H splitting is used for the passive splitting along the indirect dimension thus robust for the line broadening [7, 8]. In practical situation, however, the appearance of the splitting of each signal sometimes leads to the complex overlaps of signals if the C α shifts are less dispersed. On the other hand, the long range coherence transfer experiments as HNHB [7] and HN(CO)HB [8] give us ambiguous information when any expected long-range correlation signals are not observed due to the relaxation of ^{15}N and ^{13}C '. Thus an alternative for those experiments we have developed the HBHA(CO)NH experiment, Fig. 2, where H β signals are amplitude modulated according to the three bond J couplings among H β - ^{15}N and H β - $^{13}\text{C}'$ [11]. The obtained result is shown in Fig. 3. Details of this pulse sequence will be discussed in our presentation.

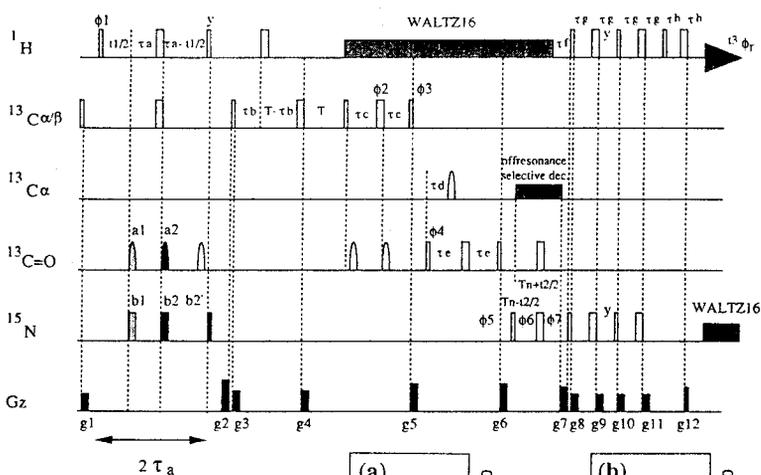
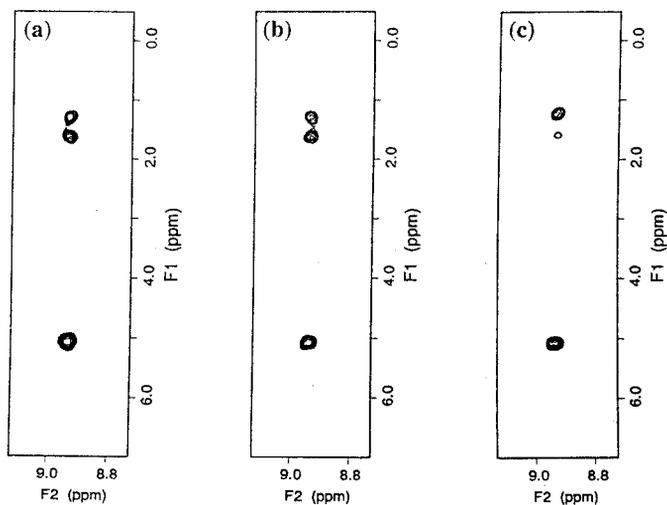


Fig. 2: Pulse scheme for HBHA(CO)NH-J

Fig. 3: The result of HBHA(CO)-J

for L65 of cystatin A

- (a) N and C' decoupled
- (b) N - coupled
- (c) C' - coupled



3. Block labeling based pro-chiral assignment for Leu and Val methyl groups

According to the 'block labeling' procedure, we can label the Leu and Val side chain carbons as shown in Fig. 4. Wüthrich's group has published the relating pro-chiral assignment procedure based on the observation of the splitting caused by the ^{13}C - ^{13}C spin coupling on Pro-R methyl carbons [12]. We have developed as an alternative methodology for the pro-chiral assignment of these methyl groups with higher resolution and sensitivity. Our method is based on the CT-HSQC experiment [12]; during constant time evolution the ^{13}C - ^{13}C passive coupling leads to the amplitude modulation of the observed signals and in the case of the block-labeled Leu and Val, this passive J-modulation does occur on the pro-R methyl but not on pro-S methyl. Thus the appropriate adjustment of the constant time duration can easily discriminate the methyl groups as shown in Fig. 5 (a) and (b).

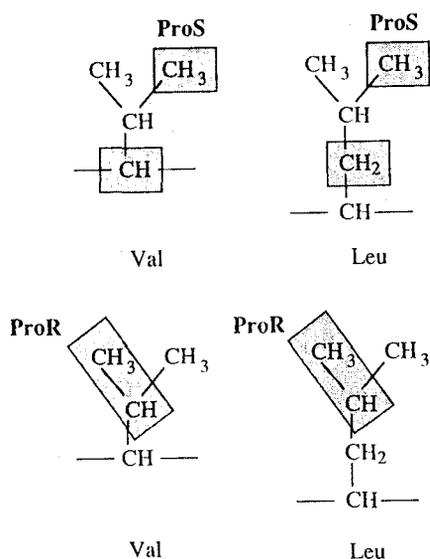
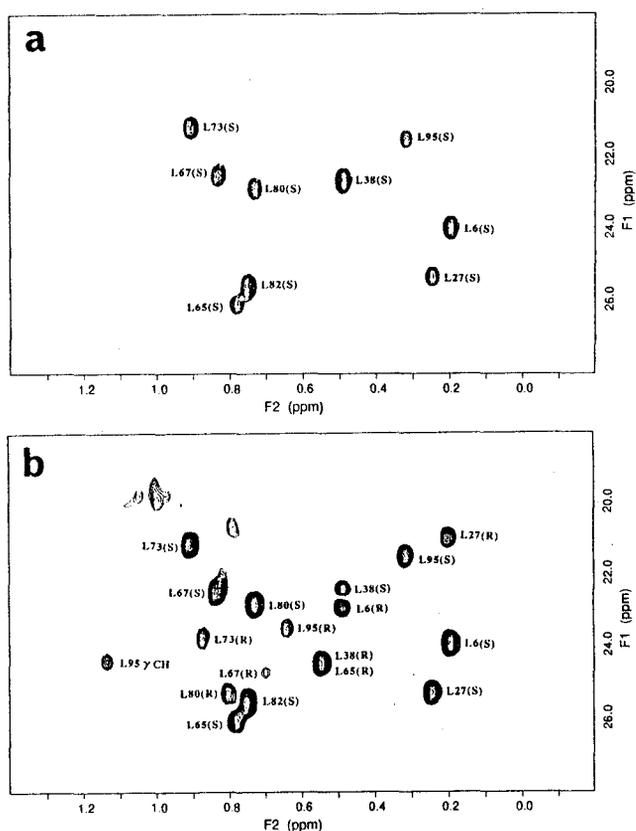


Fig. 4: The block labeled Leu and Val

Shaded parts are labeled with ^{13}C

Fig. 5: (a) Pro-S selective observation

(b) Pro-S (+)/ Pro-R (-) observation



References: 1. Neri et al. *Biochemistry* **28**, 7510 (1989); 2. Grzesiek and Bax *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6291(1992); 3. Grzesiek and Bax *J. Magn. Reson.* **99**, 201(1992); 4. Muhandiram and Kay *J. Magn. Reson.* **B103**, 203(1994); 5. Griesinger and Eggenberger *J. Magn. Reson.* **97**, 426(1992); 6. Eggengerger et al. *J. Biomol. NMR* **2**, 583(1992); 7. Archer et al. *J. Magn. Reson.* **95**, 636(1991); 8. Grzesiek et al. *J. Magn. Reson.* **96**, 215(1992); 9. Griesinger et al. *J. Chem. Phys.* **85**, 6837(1986); 10. Griesinger et al. *J. Magn. Reson.* **84**, 14(1989); 11. Tate et al. in preparation; 12. Tate et al. in preparation.

特別講演 4

L19

NMR Studies of an Allosteric System: the *trp*-Repressor-*trp* Operator Complex

Hong Zhang,¹ Daqing Zhao,¹ Matthew Revington,² Weontae Lee,²
Xin Jia,¹ Cheryl Arrowsmith,² and Oleg Jardetzky¹

¹Stanford Magnetic Resonance Laboratory, Stanford, CA 94305-5055, U. S. A.

²Division of Molecular and Structural Biology, Ontario Cancer Institute,
and Department of Medical Biophysics, University of Toronto
Toronto, Ontario M4X 1K9, Canada

The solution structures of the complex between *Escherichia coli trp* holorepressor and a 20 base pair consensus operator DNA were determined. The majority of proton chemical shifts of the *trp* holorepressor and operator DNA were assigned from homonuclear 2D NOESY spectra of selectively deuterated analog-operator DNA complexes and the 3D NOESY-HMQC spectrum of a uniformly ¹⁵N labeled repressor-operator DNA complex. The structures were calculated using restrained molecular dynamics and sequential simulated annealing with 4086 NOE and other experimental constraints. The root-mean-squared deviation (RMSD) among the calculated structures and their mean is 0.9 ± 0.3 Å for the repressor backbone, 1.1 ± 0.5 Å for the DNA backbone, and 1.3 ± 0.3 Å for all heavy atoms. The DNA is deformed to a significant extent from the standard B DNA structure to fit the helix-turn-helix (HTH) segment of the repressor (helices D and E) into its major grooves. Little change is found in the ABCF core of the repressor on complexation in comparison to the free repressor, but changes in the cofactor L-tryptophan binding pocket and the HTH segment are observed. The N-terminal residues (2-17) are found to be disordered and do not form stable interactions with DNA. Direct H-bonding to the bases of the operator DNA is consistent with all of our observed NOE constraints. Hydrogen bonds from NH η 1 and NH η 2 of Arg69 to O6 and N7 of G2 are compatible with the solution structure, as they are with the crystal structure. Other direct H-bonds from Lys72, Ala80, Ile79, Thr83 and Arg84 to base pair functional groups can also be formed in our solution structures.

○Toshimasa Yamazaki^{1,2}, Linda K. Nicholson², Stephan Grzesiek³, Ad Bax³
and Dennis A. Torchia²

¹Department of Applied Physiology, National Institute of Agrobiological Resources,
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

²Bone Research Branch, National Institute of Dental Research and ³Laboratory of
Chemical Physics, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney
Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA

Abstract

We report high resolution NMR studies of solutions of highly purified, isotopically labeled HIV-1 protease complexed to symmetric high affinity inhibitors DMP323 and P9941. DMP323, a novel cyclic urea based compound, is a highly specific, orally bioavailable HIV protease inhibitor. DMP323 and its related compounds are currently undergoing clinical trials. In the past year we have assigned the entire backbone and most sidechain signals of the protease bound to each of the two inhibitors. The signal assignments have permitted us to carry out an extensive set of NMR experiments which have shown that (a) the conserved structural water molecule found in all reported crystal structures of protease/inhibitor complexes is absent in the protease/DMP323 complex, but is present in the protease/P9941 complex; (b) significant molecular motions of the protease flap domains occur even when the protease is complexed with high affinity inhibitors; (c) the catalytic aspartyl residues are both protonated when the protease is bound to DMP323, and have pKa values of ca. 8. In addition, the determination of the high resolution solution structure of the protease/DMP323 complex is nearly completed. The current rmsd of 16 refined structures is 0.7 Å for all backbone atoms.

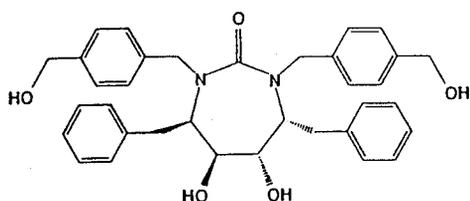
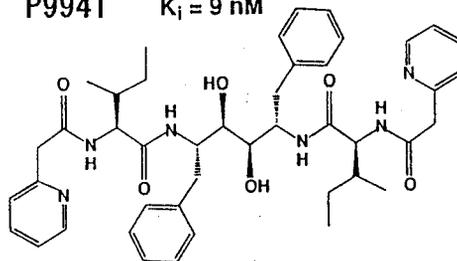
Introduction

The availability of numerous high-resolution X-ray structures of the HIV protease and HIV protease/inhibitor complexes has stimulated a major effort in structure-based drug design. Recently, our collaborators at DuPont Merck have developed a series of high affinity, non-peptide, orally bioavailable HIV protease inhibitors that contain a novel cyclic urea ring. One such inhibitor, DMP323, having a subnanomolar binding affinity was developed in a series of steps, starting from the linear symmetric diol P9941, based upon careful examination of available X-ray structures.

Key Words

HIV Protease, Heteronuclear Multidimensional NMR, Solution Structure, Protein Dynamics, pKa

Toshimasa Yamazaki, Linda K. Nicholson, Stephan Grzesiek, Ad Bax, Dennis A. Torchia

DMP323 $K_i = 0.27 \text{ nM}$ **P9941** $K_i = 9 \text{ nM}$ 

The rationale behind the design of DMP323 was that the urea oxygen of the inhibitor would mimic and replace the oxygen of the bound water molecule. Because a structured water molecule is not found in mammalian protease/inhibitor complexes, it was further reasoned that steric interactions with the DMP323 urea oxygen would hinder formation of mammalian protease/DMP323 complex. Measured binding constants indeed show that the affinity of DMP323 to HIV protease is 10^4 to 10^5 times greater than to mammalian proteases. Hence, because of the high specificity and affinity of DMP323 for the HIV protease, there is great interest in understanding the detailed interactions of DMP323 and its analogs with HIV protease, in order to develop more effective antiviral compounds. During the past year we have carried out detailed heteronuclear multidimensional NMR studies of HIV protease bound to DMP323 and to its precursor P9941. Our work has focused upon the following four areas: (1) identification of structured water molecules; (2) protein dynamics; (3) determination of pKa values of the catalytic Asp residues; (4) determination of the three-dimensional structure of the protease/DMP323 complex in solution.

Identification of Structured Water Molecules

Until the development of the cyclic urea class of protease inhibitors, a common feature observed in the structures of all protease/inhibitor complexes was a structural water molecule which forms a network of hydrogen bonds with the amide protons of the Ile50/50' residues of the protease (prime is used to distinguish a residue in the one protease monomer from the other) and with the carbonyl groups of the inhibitors. This water molecule is believed to play a critical role in closing the flaps of the HIV protease over the inhibitor or substrate. It is noteworthy that a corresponding water molecule has not been observed in mammalian aspartic proteases.

Using new and sensitive 2D NMR experiments designed to identify bound water molecules in proteins, we have shown that the structural water molecule is absent in the protease/DMP323 complex. In contrast, we have observed this water molecule interacting with the Ile50/50' amide protons in the protease/P9941 complex. In addition, we have determined that a residence time of the bound water to be in the range of 10^{-1} to 10^{-8} seconds on the protein. Independently, X-ray diffraction studies have shown that the bound water is absent in the crystal structure of the protease/DMP323 complex. The crystal structure of the protease/P9941 complex has not been solved.

Protein Backbone Motions in the Protease/Inhibitor Complexes

The HIV protease contains two identical monomers (1–99/1'–99'). For both DMP323 and P9941 complexes residues X and X' have equivalent chemical shifts, demonstrating that the average dimer conformation is symmetric when bound to each symmetric inhibitor. We have measured ^{15}N relaxation parameters (T_1 , T_2 and NOE values) using inverse detection pulse schemes for 86 amide sites of the backbone residues in the HIV protease complexed with DMP323 and with P9941. Data were not obtained for six proline residues, for six residues in each complex whose signals were poorly resolved, and for Leu5 whose signal was not observed because it is severely exchange broadened. The analysis of the relaxation data using the model-free approach of Lipari and Szabo shows that the overall correlation times of the two complexes are nearly the same, 9.16 ± 0.06 and 9.25 ± 0.06 ns respectively for the DMP323 and P9941 complexes. In addition, the residue specific order parameters are virtually indistinguishable for the two complexes. Most residues have order parameters, S^2 , in the range of 0.80 to 0.95, indicating that protease backbone is equally well ordered in the two complexes, even though P9941 has 30-fold larger K_i value. This results suggest that the difference in their K_i values arises from the difference in the flexibility of the inhibitors in the free state. Presumably the more flexible P9941 pays a higher entropic price to bind than DMP323, whose rigid cyclic urea ring limits the freedom of its substituents in positions suited for protease binding.

While most residues in both complexes are well ordered, $S^2 > 0.80$, twelve residues in the DMP323 complex and nine residues in the P9941 complex undergo large amplitude internal motions, $0.50 < S^2 < 0.76$, on the 1–100 ps timescale corresponding to NH bond reorientation of 50° – 70° (using cone model to interpret S^2). Most residues executing large amplitude motions are in loops of the protease. The residues having the smallest order parameters, Leu38–Trp42, form the largest cluster of residues in this class and are located in the loop terminating one of the strands that make up the flap that folds over the active site. These four residues also have $S^2 < 0.76$ in the P9941 complex. Fifteen residues affected by chemical exchange on the ms to μs timescale were also identified for the protease/DMP323 complex from the analysis of the relaxation data. Most of these residues are either involved in intermonomer contacts or interact with the inhibitor, although a cluster extends across the β -sheet core (residues 62, 62, 75, 76). Other residues affected by chemical exchange are stabilized in the crystal structures by a crucial hydrogen bond network holding together parts of the helix (85–88), active site loop (29–31), and N-terminal loop of the opposing monomer (8'–10'). Essentially the same residues in the protease/P9941 complex required the inclusion of an exchange term to fit the relaxation data. Correlation of backbone dynamics with structural and functional information provides new insights into protease function, interactions with inhibitors, and regions outside the active site that are potential drug targets.

pKa Values of Asp and Glu Sidechains in the Protease/DMP323 Complex

The pKa values of all Asp and Glu sidechains of the protease bound to DMP323 were determined from (a) measurements of the pD dependence of the chemical shifts of the Asp and Glu sidechain carbons, (b) the H/D isotope effects upon the carboxyl carbon chemical shifts, and (c) information about the environment of the carboxyl sidechains in the crystal structure of the complex.

Except for Asp25/25' and Asp 29/29' whose pKa values are shifted by at least 2 pD units, the acidic residues have pKa values in the range of 3.1 to 4.9, typical for solvated sidechains. The low pKa of Asp29/29', ca. 2, is consistent with the Asp29/29'–Arg8',87/8,87' salt bridges identified in the crystal structure. These observations and the inactivity of mutant proteases in which residue 29 is not Asp, indicate that the salt bridges made by this residue are structurally and functionally significant.

The chemical shifts of the Asp25/25' carboxyl carbons and their observed H/D isotope shifts, combined with the observation that these sidechains are completely buried in a region of the crystal structure devoid of positive charges and interior water molecules, are strong evidence for the fact that both Asp25 and Asp25' carboxyl groups are neutral (protonated) with pKa > 7.5. In the crystal structure, the Asp25/25' carboxyl sidechains and the diol groups of DMP323 are oriented so that a hydrogen bond network having nearly ideal donor/acceptor bond angles and internuclear oxygen distances can be formed when these Asp residues are protonated. Calculations using the CHARMM force field indicate that this hydrogen bond network stabilizes the formation of the protease/DMP323 complex. A minor rearrangement of the hydrogen bonding protons yields an alternative hydrogen bond network with a slightly higher energy, as calculated using the CHARMM force field. Rapid equilibrium between two nearly isoenergetic networks would make a favorable contribution to complex formation.

The high pKa value observed for the catalytic Asp residues is interesting because DMP323 is a transition state analog and pH dependent rate studies of the reaction catalyzed by the HIV protease have yielded distinct pKa values of 3.5 and 5.7 for the free protease. Our data shows that inhibitor binding can strongly displace the pKa values of the catalytic Asp residues from values observed in the free enzyme, and that it is essential to measure the Asp ionization states in order to understand protease/inhibitor interactions at the molecular level.

Solution Structure of the HIV Protease/DMP323 Complex

Although structures of over one hundred HIV protease/inhibitor complex have been solved in the crystalline state, a three-dimensional structure of a HIV protease/inhibitor complex has not been determined in solution. On the basis of over 4000 NMR derived distance and angle restraints, we have determined the three-dimensional structure of the HIV protease/DMP323 complex in solution. Sixteen refined structures have an rmsd of 0.7 Å for all backbone atoms and 1.0 Å rmsd for all heavy atoms.

References

1. Yamazaki, T.; Nicholson, L.K.; Torchia, D.A.; Stahl, S.J.; Kaufman, J.D.; Wingfield, P.T.; Domaille, P.J.; and Campbell-Burk, S. *Eur. J. Biochem.* 1994, 219, 707–712.
2. Grzesiek, S.; Bax, A.I.; Nicholson, L.K.; Yamazaki, T.; Wingfield, P.T.; Stahl, S.J.; Eyermann, C.J.; Torchia, D.A.; Hodge, C.N.; Lam, P.Y.-S., Jadhav, P.K.; and Chang, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 1581–1582.
3. Yamazaki, T.; Nicholson, L.K.; Wingfield, P. T.; Stahl, S.J.; Kaufman, J.D.; Eyermann, C.J.; Hodge, C.N.; Lam, P. Y.-S.; Ru, Y.; Jadhav, P.K.; Chang, C.-H.; Weber, P.C.; and Torchia, D.A. *J. Am. Chem. Soc.* in press.

索

引

(あ)

会澤 宣一	59
相本 三郎	309
相本 三郎	321
赤坂 一之	63
赤坂 一之	309
赤坂 一之	335
秋山 稔	137
阿久津秀雄	157
阿久津秀雄	165
浅川 直紀	187
朝倉 哲郎	191
朝倉 哲郎	361
浅野 勝己	35
芦川 幹也	195
新井 克明	309
荒田 洋治	347
安藤 勲	187
安藤 勲	195
安藤 勲	197
安藤 勲	199
安藤 勲	261

(い)

飯塚 武彦	219
池上 貴久	365
池田 龍一	53
池田 龍一	241
池田 龍一	243
石井 俊輔	317
石井 俊輔	369
石井 佳誉	175
石田 寿昌	95
石田 信昭	13
石田 信昭	17
石塚 靖子	159
石戸 良治	295

伊島理枝子	71
伊島理枝子	309
石丸 臣一	241
石丸 臣一	243
市川さおり	315
伊藤 隆	75
伊藤 隆	323
稲垣 冬彦	315
稲垣 冬彦	371
稲垣 冬彦	375
井上 泰子	317
井上 多門	9
井上 多門	21
井上 真	327
井上 義夫	117
猪股 寿典	109
今里 真実	347
今城 文雄	229
今成 司	25
今成 司	55
今西 祐一	55
井元 敏明	309
入口 紀男	29
岩城 隆信	321
岩下 孝	211
岩原 淳二	75
岩原 淳二	323

(う)

上坂 伸宏	103
上坂 伸宏	107
上田 貴洋	231
魚住 武司	349
鵜澤 洵	121
鵜澤 洵	125
潮田 利夫	375

内田 憲孝	353
馬屋原慶子	37
梅田 万美	57
梅山 秀明	285
浦 敦	301
裏岡 昭博	21

(え)

江口 太郎	249
江口 太郎	269
海老沢計慶	285
恵良 聖一	99
恵良 聖一	103
恵良 聖一	107
遠藤 一央	281
猿渡 茂	319

(お)

大河原 浩	5
大木 進野	355
大木 寛	53
大久保七重	41
大津 真一	25
大槻 高史	327
大野 茂男	315
大野 光宏	349
大屋 正尚	319
大屋 正尚	339
岡田 修司	215
岡田 修司	239
緒方 一博	317
緒方 一博	351
緒方 一博	369
小川 晴	83
小川秀次郎	17
小川 雅弘	153

荻野 孝史	41	神沢千代志	151	栗田 順一	291
奥田 勉	53	亀井 裕孟	43	栗田 順一	299
奥村 幸久	87	河合 剛太	301	栗原 範明	147
小椋 賢治	371	河合 剛太	327	黒木 重樹	197
尾崎 拓男	195	川口 謙	331	黒木 重樹	199
尾崎 拓男	197	川島 悦子	295	黒子 弘道	199
尾崎 拓男	199	川田 知	273	黒田 記代	357
織田 昌幸	351	河野 敬一	355	黒田 義弘	153
小野 晶	291	川端 潤	133	桑田 一夫	67
小野 晶	295	(き)		桑田 一夫	99
小野 晶	299	木川 隆利	327	桑田 一夫	103
小野 明	291	菊地 淳	361	(け)	
(か)		岸本 健雄	353	劔持 基子	281
甲斐荘正恒	291	北川 進	273	(こ)	
甲斐荘正恒	295	北川 進	281	小泉 美香	13
甲斐荘正恒	299	北澤 聡	223	合田 浩明	353
甲斐荘正恒	345	北澤 聡	225	河野 俊之	313
甲斐荘正恒	375	北澤 聡	227	河野 俊之	319
梶 弘典	235	木津 治久	141	河野 俊之	339
梶原 孝彦	99	木下 隆利	233	河本 敏郎	77
梶原 孝彦	103	金 載一	313	古賀 俊隆	85
片平 正人	305	木村 敦臣	145	越野 広雪	121
片平 律子	305	木村 敦臣	203	越野 広雪	125
加藤 一夫	103	木村 敦臣	207	児島長次郎	295
加藤 一夫	107	京極 好正	295	巨瀬 勝美	9
加藤 晃一	347	京極 好正	305	小関 泰平	99
加藤 敏代	325	京極 好正	365	小竹 文乃	141
加藤 祐子	83	(く)		小寺 義男	313
金折 賢二	343	楠 秀樹	339	小林 昭子	245
金沢 健治	159	國 直人	145	小林 邦子	313
金沢 洋子	37	國 直人	203	小林 速男	245
金子 美和	25	國 直人	207	五味雄一郎	27
狩野 広美	13	國友 正和	77	近藤 満	273
狩野 広美	17	久保 厚	171	(さ)	
鎌田 創	345	久保 厚	229	斉藤 公児	263
釜野 徳明	141	久保庭 均	321	斉藤 公児	277
神尾 正義	29	公文 哲	285		
上垣内みよ子	95				

斉藤 肇	167
斉藤 肇	179
斉藤 肇	183
斉藤 肇	219
坂本 博	327
櫻井 実	117
笹倉 英史	147
佐藤 一紀	313
佐藤 一	301
鮫島 達也	375
鮫島 克訓	157
皿井 明倫	317
皿井 明倫	369
(し)	
直原 高広	145
直原 高広	203
直原 高広	207
篠原 正昭	277
柴田 武彦	75
柴田 武彦	323
嶋田 一夫	347
嶋田 一夫	353
清水 真人	365
志村 令郎	327
下村 泰次	165
莊司 顯	195
莊司 顯	197
莊司 顯	199
白石 美紀	347
白川 昌宏	365
申 敬花	157
進藤 一泰	347
神藤平三郎	321
榛葉 信久	347
新村 俊幸	37

(す)	
杉浦真喜子	95
杉沢 寿志	49
鈴木榮一郎	285
砂本 順三	87
角野 文緒	41
(せ)	
瀬尾 芳輝	5
瀬川 和哉	225
関川 あい	317
関根 健志	295
瀬戸 治男	129
世良 明	57
(そ)	
曾我美 勝	99
曾我美 勝	103
曾我美 勝	107
鮮干 撰	35
(た)	
高木 D. 秀夫	59
太垣和一郎	159
高崎 昭彦	99
高崎 昭彦	103
高崎 昭彦	107
高橋 昭裕	197
高橋 憲助	113
高橋 敏	335
高橋 征三	41
高山 俊夫	261
高山 知子	337
竹内 繁樹	27
竹内より子	315
竹腰清乃理	161
武田 直登	199
武田 佳宏	327
立花 和則	353

楯 真一	291
楯 真一	299
楯 真一	345
楯 真一	375
楯 直子	375
田中 剛史	339
田畑 祥生	25
田林 一晃	57
玉垣 誠三	159
田巻 誠	137
田村 充	47
田村 祐介	117
(ち)	
崔 外永	35
張 恵平	141
(つ)	
拓殖 英哉	157
辻 暁	167
辻 暁	179
辻 暁	183
辻 暁	219
辻田 義治	233
津田 栄	355
堤 耀広	223
堤 耀広	225
堤 耀広	227
津野 久幸	25
(て)	
手島 志帆	263
手島 志帆	277
出村 誠	191
出村 誠	361
寺尾 武彦	161
寺尾 武彦	171
寺尾 武彦	175
寺尾 武彦	229

寺島麻衣子 153
寺田 透 323
照井 彬弘 307
田 栄治 365

(と)

土居悦四郎 99
土井 孝紀 239

(な)

内藤 晶 167
内藤 晶 179
内藤 晶 183
内藤 晶 219
中川 照眞 153
中島 康喜 113
永嶋 伸也 285
永田 宏次 371
中西 香爾 211
中西 八郎 215
中西 八郎 239
中西 洋志 151
中西 洋志 159
中野 泰裕 375
中村 浩二 103
中村 浩二 107
中村 亘男 241
中村 亘男 249
中村 亘男 269
中村 春木 317
中村 春木 321
中村 春木 351
中村 春木 369
中山 尋量 249
中山 尋量 265
中山 尋量 269
永山 国昭 71
永山 国昭 81
永山 国昭 325

名川 吉信 151
那須 裕郷 153

(に)

西谷 弘 31
西村 勝之 183
西村 暹 323
西村 善文 317
西村 善文 369
新田 勝利 355

(の)

野上 靖純 83
野口 民夫 359
野坂 篤子 343
野崎 祐勝 137
野村 薫 161

(は)

朴 南奎 313
羽島 宏史 141
橋本 雄幸 9
長谷川憲一 25
長谷川節夫 107
畠山 盛明 277
畠中 秀樹 315
畠中 秀樹 371
馬場 雄久 109
馬場 照彦 151
濱田 季之 341
林 繁信 231
林 繁信 245
林 文晶 307
早野 尚志 31
早水紀久子 215
早水紀久子 219
早水紀久子 239
原園としえ 253
原園としえ 257

原田 雅史 31
原田 義則 47
原田 義則 353
春山 英幸 337
半沢 宏之 337

(ひ)

樋岡 克哉 49
東島 勉 339
引地 邦男 355
日元 徹 27
平冲 敏文 223
平冲 敏文 225
平冲 敏文 227
平山 智昭 227

(ふ)

福井 洋之 109
福井 義浩 31
福岡 美香 27
福士 江里 133
福田 行男 77
福谷 章 179
藤井 茂 357
藤城 光一 277
藤田 憲一 55
藤田 憲一 341
藤戸 輝昭 49
藤原 敏通 165
藤原 英明 145
藤原 英明 203
藤原 英明 207
藤原 正子 325
藤原 正子 341
藤原 靖弘 153
伏谷 伸宏 341
舟橋 重信 59
降旗 一夫 129
古川 功治 351

(へ)
ペイイルハン 291

(ほ)
細田 和男 319
堀井 文敬 235
堀金 彰 29
堀金 明美 29
本田 憲治 273
本田 憲治 281
本多 尚 243

(ま)
前川 雅彦 273
前田 孝泰 57
前田 忠計 313
前田 忠計 319
前田 忠計 339
前田 満雄 27
正木 春彦 349
松井 茂 21
松浦 俊雄 55
松木 伸行 355
松倉 潮 29
松田賀洋子 59
松田 宏雄 215
松田 宏雄 239
松田 弘喜 109
松永 茂樹 341
松本 潮 321

(み)
三浦 宏一 109
三浦 洌 357
水野 猛 321
三堀 友雄 27
三森 文行 35
南 雅史 191
宮城 慧 249

宮城 慧 269
三宅 洋子 345
宮坂 明子 309
三好 弘一 31

(む)
椋野 邦子 57
武藤 裕 327
武藤 裕 349
村上 正隆 5
村松 一郎 137

(め)
飯塚 舜介 359

(も)
守川 壮一 309
守川 壮一 317
守川 壮一 321
守川 壮一 351
守川 壮一 369
森安 真彦 355
森山 広思 245

(や)
柳沢 勝 239
柳田 勉 29
山垣 亮 159
山口 絵未 345
山口 徹 63
山口 秀人 157
山口 芳樹 347
山崎 和彦 325
山崎 千春 55
山崎 俊夫 55
山崎 俊夫 325
山崎 俊正 381

山田 博昭 57
山田 博昭 63
山本 泰彦 91
楊 代文 81

(よ)
余郷 敦夫 229
横田 悦造 253
横田 悦造 257
横山 茂之 75
横山 茂之 301
横山 茂之 323
横山 茂之 327
横山 茂之 349
吉崎 和男 31
吉水 広明 233
吉村 笙子 309
米田 茂隆 285
米森 重明 147

(わ)
若松 馨 319
若松 馨 339
和田 光人 117
渡邊 永治 137
渡辺 公綱 301
渡辺 公綱 327
渡辺 暁 301
渡部 徳子 245
渡部 徳子 253
渡部 徳子 257
渡辺 尚彦 27
渡辺 庸一 117
亘 弘 31

(A-Z)
Bax, Ad 381
Campel, I. D. 331
Choi, S. 211

Cross, T. A.	191	Zick, K.	5
Doak, D.	331		
Dubovskii, Peter	335		
Ernst, R. R.	287		
Ford, A. G.	29		
Govil, Girjesh	289		
Gro , D.	5		
Grzesiek, Stephan	381		
Heaton, B. T.	249		
Heaton, B. T.	269		
Iggo, J. A.	269		
Jardetzky, Oleg	379		
Johnson, Charles S.	1		
Klug, Christopher A.	187		
Klug, D. D.	265		
Kolbert, Andrew C.	245		
Laue, Ernest D.	323		
Longoni, Giuliano	249		
McDermott, A. E.	211		
Mulvey, D.	331		
Nahring, Jens	249		
Nicholson, L. K.	191		
Nicholson, L. K.	381		
Pines, Alexander	245		
Price, W. S.	215		
Price, W. S.	219		
Ratcliffe, C. I.	265		
Ripmeester, J. A.	265		
Schaefer, Jacob	187		
Schleich, Thomas	67		
Shore, Jay	245		
Spaniol, Thomas Paul	171		
Swaddle, Thomas W.	59		
Tomita, Y. A.	211		
Torchia, Dennis A.	381		
Vogel, H. J.	225		
Walchli, Markus R.	365		
Williamson, M. P.	361		
Zhou, Zhe	87		