

第35回NMR討論会

講演要旨集

日時 1996年11月19日（火）～11月21日（木）

会場 京都テルサ

共催 日本化学会・日本分析化学会・日本薬学会・日本生化学会
高分子学会・日本農芸化学会・日本物理学会・日本生物物理学会
日本磁気共鳴医学会

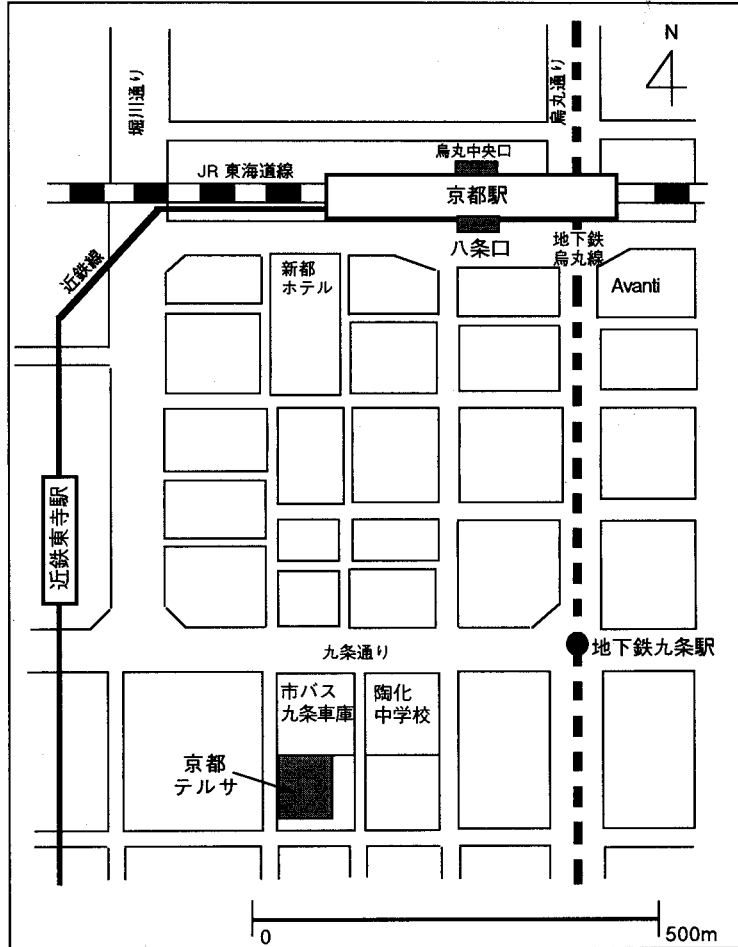
第35回NMR討論会 会場案内

京都テルサ

[京都市南区東九条下殿田町70番地]

Tel 075-692-3409

◇会場案内図



◇交通

- ☞ JR 東海道線「京都」駅下車 八条口から南へ徒歩15分
- ☞ 地下鉄烏丸線「九条」駅下車 西へ徒歩5分
- ☞ 近鉄「東寺」駅下車 東へ徒歩5分

◇連絡先

〒606-01 京都市左京区北白川追分町
京都大学大学院理学研究科
寺尾 武彦
TEL: 075-753-4011
FAX: 075-753-4000
E-mail: terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp

第35回NMR討論会 プログラム

共催 日本化学会、日本分析化学会、日本薬学会、日本生化学会、日本物理学会、
日本生物物理学会、日本農芸化学会、高分子学会、日本磁気共鳴医学会

日時 1996年11月19日(火)～21日(木)

会場 京都テルサ(京都市南区東九条下殿田町70番地)

第1日11月19日(火)

(8:55～9:00)

開会の挨拶

(9:00～10:25)

理論・測定法

座長 内藤 晶

1L1 Design of Amplitude, Phase, Frequency-Modulated RF-Fields to Reintroduce Anisotropic
Interactions under MAS …1
(京大院理) ○石井佳誉、寺尾武彦

1L2 二面角情報を得るためのCH双極子・CH双極子相関多次元固体高分解能NMR …4
(横国大工) ○藤原敏道、下村泰次、阿久津秀雄

座長 朝倉哲郎

1L3 ^{13}C 1D-MAS exchange experiments in organic solids and polymers …8
(Martin-Luther Univ. of Halle¹, Weizmann Institute of Sci.²) ○Detlef Reichert¹,
Zeev Luz², Horst Schneider¹

1L4 量子化学計算を用いた固体ペプチドの構造と ^{13}C NMR化学シフトテンソルの研究 …9
(東工大工) ○黒子弘道、武田直登、亀田恒徳、安藤 勲

—休憩—

(10:45～12:10)

構造・物性・運動

座長 堀井文敬

1L5 ^1H NMR (CRAMPS) によるポリペプチドの固体構造解析(4) …13
(群馬大工¹、日本電子²) ○木村英昭¹、尾崎拓男¹、杉沢寿志²、出口健三²、莊司 顯¹

1L6 石炭のCRAMPS法とmicroimaging法による構造解析 …16
(新日鐵先端技術研¹、プロセス技術研²) ○齋藤公児¹、畠山盛明¹、古牧育男²、松浦 慎²

座長 池田龍一

1L7 ジエン鉄カルボニル錯体誘導体の構造解析—選択的緩和法の利用— …20
(神戸薬大) ○杉浦真喜子、蔡 東玲、和田昭盛、伊藤允好

1L8 MAS/NMAS液晶二次元NMR法による[D-Ala²]Met-enkephalinの配向と構造に関する研究 …24
(阪大医¹、阪大薬²) ○木村敦臣¹、國 直人²、藤原英明¹

—昼食—

(13:10～16:30)

[ポスターセッション]

新しい測定法と装置の開発

1P1 完全標識試料から距離情報を得るための半選択的 ^{13}C 2次元双極子相関固体NMR …28
(横国大¹、都立大²) ○菅瀬謙治¹、藤原敏道¹、小野 明²、小野 晶²、甲斐莊正恒²、
阿久津秀雄¹

1P2	高速MAS法による ^{17}O スペクトル (高分子素材センター先進材料研 ¹ 、東工大工 ² 、群馬大工 ³) ○黒木重樹 ¹ 、水谷高彰 ² 、 安藤 勲 ² 、荘司 顯 ³ 、尾崎拓男 ³	…32
1P3	Modulatory resonance recoupling of heteronuclear dipolar interaction under magic angle spinning (京大院理) ○武田和行、竹腰清乃理、寺尾武彦	…34
1P4	固体 ^{13}C - ^{13}C 同種核相関NMR法による分子構造解析 (京大院理) ○野村 薫、竹腰清乃理、寺尾武彦	…38
1P5	固体NMRにおける体積磁化率効果と表面NMRへの応用 (京大院理 ¹ 、マインツ大化学 ²) ○久保 厚 ¹ 、Thomas Paul Spaniol ² 、西山裕介 ¹ 、寺尾武彦 ¹	…42
1P6	^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用の新しい測定方法とその角度情報取得への応用 (京大院理) ○平尾浩一、石井佳誉、寺尾武彦	…46
1P7	天然同位体比重水素NMRによる液晶研究 (神大自然 ¹ 、神大理 ²) ○田林一晃 ¹ 、赤坂一之 ^{1,2}	…48
1P8	^{19}F 観測 ^1H アカップルMAS固体高分解能NMR法 (日本電子) ○杉沢寿志、末松浩人、樋岡克哉	…52
1P9	四極子核スペクトルのスピニングサイドバンドに関する2、3の新しい手法 (分子研 ¹ 、筑波大物理工学 ²) ○桑原大介 ¹ 、中井利仁 ²	…56
1P10	選択的 ^{31}P -NMR観測用NMR検出器の開発 (日立基礎研) ○田村 充、清水範夫	…58
1P11	MAS-NMR法を用いたBIS-NIPAゲルの ^{13}C 測定手法 (日本電子 ¹ 、新日鉄先端技術研 ²) ○津野久幸 ¹ 、杉沢寿志 ¹ 、鴨 修 ¹ 、斎藤公児 ²	…60
1P12	溶液NMRの試料温度測定 (日本電子) ○田中良二、末松浩人、鴨 修	…62
1P13	超音波モータを用いた「8本オートサンブルチェンジャ」 (日本電子設計技術本部) ○山腰良晃、須藤 誠	…65
1P14	The Manipulation of Water Relaxation and Water Suppression in Biological Systems using the Water-PRESS Pulse Sequence (Water Research Institute) William S. Price	…67
1P15	レーザー励起ベンタセン分子を用いた動的核偏極 (京大院理、理研) ○小田真弘 ¹ 、飯沼昌隆 ¹ 、清水裕彦 ¹ 、高橋義明 ¹ 、政池 明 ¹ 、藪崎 努 ¹	…71
1P16	NMR用圧力ジャンプ装置の試作 (神大理 ¹ 、神大自然 ²) ○赤坂一之 ^{1,2} 、手塚智子 ² 、山田博明 ^{1,2}	…74
1P17	A simple method for ^{13}C CPMAS NMR measurements under high gas pressure and its application to a polymer (京大院理) ○三好利一、竹腰清乃理、寺尾武彦	…76
1P18	HR-MASを用いた合成高分子の構造解析—膨潤状態の試料への“溶液”高分解能 NMRの適用 (日本ブルカー ¹ 、住友化学工業筑波研 ²) ○佐藤 一 ¹ 、岡田明彦 ² 、横田絵美子 ² 、山内一夫 ²	…78
液晶		
1P19	^{13}C NMRを用いたコレステリック液晶の構造解析 (京大院理) ○西山裕介、久保 厚、今城文雄、寺尾武彦	…82

- 1P20 固体¹³C NMR法による液晶性ポリウレタン試料の固体構造解析 …86
(京大化研) ○石田宏之、梶 弘典、堀井文敬
- 1P21 二量体液晶の配向およびスペーサーのコンホメーション解析 …88
(東工大¹、東工大生体分子²、高分子素材セ³、東工芸大⁴) ○清水レナット宣男¹、
浅川直紀²、黒木重樹³、黒子弘道¹、古屋秀峰¹、安藤 勲¹、安部明廣⁴
- 1P22 反強誘電性液晶MHPOBCおよびTFMHPOBCの相転移に伴う分子構造と運動の変化 …91
(筑波大物理工学¹、分子研²) ○中井利仁¹、宮島清一²

運動

- 1P23 四面体遷移金属カルボニルクラスターのヒドリド配位子のダイナミクス …95
(阪大院理¹、リバプール大²) Rachel Harding¹、○中山尋量¹、江口太郎¹、中村亘男¹、
Brian T. Heaton²
- 1P24 高温での¹HMSNMR測定による H-ZSM-5 のプロトンの動的挙動 …99
(東工大¹、日本電子²) ○馬場俊秀¹、小松法人¹、杉沢寿志²、小野嘉夫¹
- 1P25 固体²⁹Siおよび¹³C NMR法による poly(di-*n*-butylsilane)の分子運動解析 …103
(京大化研) ○梶 弘典、堀井文敬
- 1P26 The Sideband Patterns of the ¹³C MAS NMR Spectra for Analysing Molecular Motion
in Solid Polymers …107
(京大化研) ○沈 伊民、梶 弘典、堀井文敬
- 1P27 シス-1,13-ジアセトキシ[13]パラシクロファンの高圧NMR …111
(神大理) 山田博昭、○室 文人、西川和義、田中作弥、椋野邦子
- 1P28 MnO₂(M=Li, K, Rb, Cs, Tl)結晶中での亜硝酸イオンの分子運動とイオン結晶の柔粘性 …113
(筑波大化) ○本多 尚、石丸臣一、池田龍一
- 1P29 ²H-NMRによるM(D₂O)₆・SnCl₆[M=Mg, Ca]結晶中の分子運動の研究 …115
(筑波大化¹、琉球大教養²) ○吉田尚弘¹、石丸臣一¹、堀内敬三²、池田龍一¹
- 1P30 ¹H-NMR法による高分子ゲルのダイナミクスに関する研究 …117
(東工大工) ○松川真吾、安藤 勲
- 1P31 固体²H NMRによる結晶中のエンケファリン分子の局所運動の解析 …120
(姫路工大理) 内藤 晶、○上平美弥、辻 暁、斉藤 肇
- 1P32 アミノ酸結晶での分子ダイナミクスに与える水素結合の効果 …124
(米国コロンビア大KAST研) ○海老沢計慶、T. Gu、A. McDermott
- 1P33 ¹³C DD/MAS NMR法によるポリマーの分子運動の温度依存性 …126
(防大化学¹、京大院理²) ○浅野敦志¹、竹腰清乃理²
- 1P34 ²H-NMRによるポリグリシンIのダイナミクス …130
(北大工) ○川瀬泰誉、平沖敏文、平山智昭、堤 耀広
- 1P35 溶液中における重水素化Poly (etyleneterephthalate) の分子運動。²H、¹³C-NMR緩和
による研究 …132
(北大工¹、富士フィルム朝霞研²) ○堤 耀広¹、宮川 泰¹、平沖敏文¹、境野佳樹²
- 1P36 ²H-NMRによるマレイン酸-スチレン交互共重合体の水溶液中における分子運動の
研究 …134
(北大工¹、北大地環研²、北大院理³、秋田高専⁴) ○堤 耀広¹、平沖敏文¹、土居信英²、
新田勝利³、大野進通⁴

物性

- 1P37 Y247系における核四重極共鳴と透過型電顕によるマイクロな構造観察 …136
(京大院理¹、東工大応用セラミックス研²) ○吉村一良¹、加藤将樹¹、大村朋彦¹、
中西 真¹、宮野敏男¹、垣花真人²、小菅皓二¹
- 1P38 数種の合成スメクタイトに吸収された水分子の挙動 …139
(筑波大化) ○石丸臣一、池田龍一
- 1P39 2次元層状ペロブスカイト強磁性体 $[R-NH_3]_2CuCl_4$ におけるスピンドダイナミクスの …141
固体NMRによる研究
(物質研) 上田貴洋、林 繁信
- 1P40 NMRによる高分子電解質の研究(1) …143
(物質研、ユアサコーポレーション中研²) ○早水紀久子¹、柳沢 勝¹、相原雄一²、落合誠二郎²
- 1P41 極低温(T=30K)¹⁵N-CP/MAS NMR …147
(分子研) ○武田 定、桑原大介、緒方啓典、持田智行、宮島清一
- 1P42 強誘電体高分子の構造相転移と¹⁹F化学シフト …148
(北大工) ○新居嗣朗、石井文明、堤 耀広
- 1P43 P(VDF_{1-x}/TrFE_{1-x})の強誘電的相転移と¹H-¹³C核磁気交叉緩和(III) …150
(北大工) ○大鋸敏雄、石井文明、堤 耀広
- 1P44 エチレンアイオノマーにおける1価及び2価カチオンの形成するイオン会合体の …152
構造解析
(名工大) ○曾我部啓介、吉水広明、木下隆利、辻田義治
- 1P45 NMRによるAlkanediyl- α, ω -bis (dimethylalkylammonium bromide) surfactantsの …155
コンホメーション解析 -ミセル形成によるコンホメーション変化
(名工大工) ○服部憲和、吉野明広、岡林博文
- 1P46 AOT誘導体の水溶液ミセルにおける塩基触媒水素-重水素交換反応-置換基の …159
反応性に及ぼす影響
(名工大工) ○神戸英宏、流石園子、吉野明広、岡林博文

生体高分子1

- 1P47 CD及び¹H-NMRによるヒト血清アルブミン (HSA) のN-B転移に関する研究 …163
(岐阜大医¹、岐阜大²) ○恵良聖一¹、曾我美 勝²、永井直樹¹
- 1P48 IRF-2のDNA結合ドメインの立体構造解析 …167
(阪大蛋白研¹、奈良先端大²、東大医³) ○古井淳一¹、上垣浩一¹、山崎俊夫¹、白川昌宏²、
原田久士³、谷口維紹³、京極好正¹
- 1P49 ¹⁵Nラベルした酸化型cytochrome c₃の連鎖帰属とヘム軸配位子の性質 …169
(三菱重工基盤研¹、横国大工²、東大院工³、北陸先端大⁴) ○大村友章¹、堀住輝男²、
河合剛太³、大久保忠恭⁴、渡辺公綱³、阿久津秀雄²
- 1P50 温度ジャンプ1D/2DNMRの進展-RNaseAのアンフォールディング中間体の検出と構造 …171
(神大自然¹、神大理²) ○川上 勝¹、赤坂一之²
- 1P51 750MHzでの高圧NMRの実験 …175
(神大理¹、神大自然²) 赤坂一之^{1,2}、○神村耕二²、手塚智子²、山田博明^{1,2}
- 1P52 大腸菌RNAポリメラーゼ α サブユニットのドメイン間リンカーのダイナミクス …177
(阪大蛋白研) ○田 栄浩、山崎俊夫、大友崇紀、京極好正
- 1P53 HIV-2ヌクレオキャプシドタンパク質のN端側部分ペプチドの構造解析 …179
(北里大理¹、北里大医療衛生²、三菱化学生命研³) ○小寺義男¹、塚原智典²、小松博義²、
戸澤秀樹²、金 載一³、佐藤一紀³、前田忠計¹、河野俊之³

- 1P54 カルシウム結合蛋白質の鉛-207NMR ……180
(北大工¹、北大院理²、カルガリー大³) ○平沖敏文¹、矢沢道生²、J. Aramini³、H. Vogel³
- 1P55 セントロメア結合蛋白質CENP-B DNA結合ドメインRP1の高次構造および ……182
その認識DNAとの相互作用の解析
(理研細胞情報伝達¹、東大院理²、名大理³) ○岩原淳二^{1,2}、木川隆則¹、舛本 寛³、
岡崎恒子³、横山茂之^{1,2}
- 1P56 Dextranの特異的K⁺イオン取込みによるゲル化と架橋構造：³⁹K-NMRおよび ……184
PFGSTE-NMRによる研究
(東水大¹、Fraunhofer-IBMT²) ○渡部徳子¹、Johannes Leisen²、Klaus Gersond²
- 1P57 固体2次元¹³C-³¹P双極子相関、³¹P同種核双極子相関NMRによるATPの³¹Pシグナルの帰属 ……187
(横国大工) ○櫻井智司、藤原敏道、阿久津秀雄
- 1P58 磁化移動法による植物組織・水性状の研究 ……191
(岐阜大¹、岐阜大医²、稻沢市民病院中検³) ○曾我美 勝、恵良聖一²、松岡三良¹、加藤一夫³
- 1P59 局所麻酔剤ベンゾカインの脂質膜中における配向と結合部位 ……195
(京大薬¹、日本新薬²、京都薬大³) 黒田義弘¹、○那須裕郷¹、目黒芳朗¹、中川照眞¹、
小川雅弘²、藤原靖弘³
- 1P60 位置・立体選択的安定同位体標識ヌクレオシドの合成とNMR構造解析への応用 ……199
(都立大理) ○小野 明、椎名桃子、片岡 新、小野 晶、楯 真一、甲斐荘正恒
- 1P61 安定同位体標識したアンチコドンアームの精密立体構造解析 ……203
(東大院工) ○井田隆史、河合剛太、渡辺公綱
- 1P62 ¹⁵N, ¹³C ラベルホロ-NCS の立体構造解析 ……205
(日本チバガイギー国際科学研¹、北陸先端大院新素材セ²、ポーラ化成工業医薬品研³、
阪大薬⁴) ○高島浩幸¹、田 榮浩¹、野坂篤子¹、大久保忠恭²、蓮田勝美³、石野哲也⁴、小林祐次⁴
- 1P63 NMR化学シフトを利用した光捕獲アンテナタンパクの構造解析 ……207
(農工大工¹、Univ. of Sheffield²、都立大理³) ○菊地 淳¹、朝倉哲郎¹、C. N Hunter²、
M. J Conroy²、M. P Williamson²、嶋田敬三³
- 1P64 固体高分解能¹³C NMRによるバクテリオロドプシン化学合成フラグメントの ……209
高次構造解析
(姫路工大理) 内藤 晶、○木村成輝、辻 暁、斎藤 肇
- 1P65 固体高分解能¹³C-NMRによるバクテリオロドプシンの膜外部位の高次構造解析 ……213
(姫路工大理) 辻 暁、○山口 悟、内藤 晶、斎藤 肇

—休憩—

(16:50~18:15)

座長 安藤 勲

- 1L9 固体高分解能NMRを用いた横緩和時間測定によるペプチド中の遅い分子運動の検出 ……217
(姫路工大理) ○内藤 晶、西村勝之、福谷 章、上平美弥、辻 暁、斎藤 肇
- 1L10 Structure of membrane-fusion peptide ……221
(Kobe Univ.¹、Kyoto Univ.²) ○P.Dubovskii¹、Li Hua¹、K.Akasaka¹、S.Takahashi²

座長 藤原英明

- 1L11 ¹³C NMRから見たリン脂質リポソームのマイクロ構造と相転移のダイナミクス ……225
(京大化研) ○岡村恵美子、若井千尋、中原 勝
- 1L12 遠隔C-Hスピン結合定数を用いた鎖状化合物の立体配置決定法 ……228
(東大院理) ○松森信明、野々村太郎、佐々木 誠、村田道雄、橋 和夫

第2日11月20日(水)

(9:00~10:00)

特別講演1

座長 赤坂一之

- 2L1 Pulsed NMR in Solids - Then and Now ...232
(Dept. of Phys. and Materials Research Lab., Univ. of Illinois at Urbana-Champaign)
C. P. Slichter

(10:00~11:00)

特別講演2

座長 引地邦男

- 2L2 Enhancement of NMR/MRI by Laser-Polarization: From Materials to Organisms ...233
(Dept. of Chem. and Lawrence Berkeley National Lab., Univ. of California) A. Pines

—休憩—

(11:20~12:20)

特別講演3

座長 亀井裕孟

- 2L3 Force Detection and Imaging in Magnetic Resonance ...234
(IBM Almaden Research Center) C. S. Yannoni

—昼食—

(15:15~16:15)

特別講演4

座長 齊藤 肇

- 2L4 Three Dimensional Structure Determination of Membrane Bound Polypeptides by Solid-State NMR ...237
(Institute of Mol. Biophys., Dept. of Chem., Center for Interdisciplinary Magn. Reson.-National High Magnetic Field Lab., Florida State Univ.) F. Kovacs,
M. Brenneman, F. Tian, R. R. Ketchem, O.T. A. Cross

(16:15~17:00)

特別講演5

座長 稻垣冬彦

- 2L5 High-sensitivity NMR spectroscopy probes using superconductive coils ...241
(Varian NMR Inst.) Howard Hill

—休憩—

(17:20~18:20)

特別講演6

座長 永山国昭

- 2L6 The Continuing Saga of Broadband Decoupling in High Resolution NMR ...242
(Dept. of Chem., Cambridge Univ.¹, Varian NMR Inst.²) ORay Freeman¹, Eriks Kupce²

(18:30~20:30)

懇親会

第3日11月21日(木)

(9:00~10:25)

タンパク質・生体分子

座長 甲斐荘正恒

3L1 ^2H 蛋白質の α 位 ^1H ラベルによる高分子量蛋白質の帰属法 ……246
(阪大蛋白研) ○山崎俊夫、朽尾豪人、古井淳一、相本三郎、京極好正

3L2 免疫系糖タンパク質の安定同位体標識および動的立体構造解析 ……247
(東大薬¹、中埜酢店²、機能水研³) ○嶋田一夫¹、加藤晃一¹、山口芳樹¹、古荘久見子¹、
高橋栄夫¹、進藤一泰¹、榛葉信久¹、古賀憲司¹、高橋禮子²、荒田洋治³

座長 京極好正

3L3 NMRを用いた筋肉蛋白質に与える低温効果の解析 ……249
(北工研¹、アルバータ大²) ○津田 栄¹、S. M. Gagne²、B. D. Sykes²

3L4 カルモアユリン-W-7 複合体の立体構造解析 ……253
(山之内製薬¹、筑波大先端学際領域セ²、トロント大オンタリオ癌研³) ○大澤巨範^{1,2}、
谷川 潤¹、M. B. Swindells¹、古谷利夫¹、間瀬年康¹、田中俊之²、伊倉光彦^{2,3}

-休憩-

(10:35~14:55)

[ポスターセッション] -この間、(12:10~13:10) 昼食-

理論

3P1 SiX_4 及び CH_3X_n ($\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, n=1-4$)の第4属元素の核遮蔽定数に及ぼす重原子効果 ……256
(三菱製紙) ○遠藤一央、山本京之介

3P2 磁気共鳴スペクトロスコピーの検出感度の限界 ……260
(シーメンス旭メディテック¹、東大医用電子研²) ○入口紀男¹、上野照剛²

3P3 Relativistic study of nuclear magnetic shielding constants (I): Hydrogen halides ……262
(京大院工) ○Charles C. Ballard、波田雅彦、金子広明、中辻 博

3P4 Relativistic study of nuclear magnetic shielding constant (II): Mercury and tungsten ……264
compounds
(京大院工) ○金子広明、C. C. Ballard、波田雅彦、中辻 博

3P5 Comparison of Intramolecular Specific Interactions C-H...N in Hetaryl Vinyl Ethers ……266
and Hetaryl Vinyl Sulphides by ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopies and Quantum-chemical
Calculations.
(阪大薬¹、阪大遺伝情報²、阪大医³) ○Alexander V. Vashchenko¹、Andrei V. Afonin¹、
高木達也²、藤原英明³

3P6 磁場依存性ケミカルシフトは23.5T(プロトン1GHz)でも無視できる程小さい ……270
(三菱製紙) ○遠藤一央、山本京之介

3P7 化学シフトの相対性効果 ……274
(北見工大) ○福井洋之、馬場雄久

3P8 $^3J_{\text{HH}}$ スピン結合定数における2面核依存性 ……278
(北見工大) ○馬場雄久、福井洋之、猪俣寿典、三浦宏一、松田弘喜

構造

3P9 ^{13}C 、 ^{15}N 選択標識オリゴペプチドの合成とNMRによる固体構造の研究(3) ……282
(群馬大工) ○荘司 顯、小川一輝

- 3P10 イットリウム化合物の⁸⁹Y-MAS、及び、static-NMR ……286
 (三菱化学横浜総研¹、化成オプトニクス²、東京水産大³) ○原園としえ¹、森 輝雄¹、
 安達隆二²、渡部徳子³
- 3P11 固体¹¹³CdNMR法によるペプチド-Cd錯体の構造解析 ……290
 (神奈川大工) ○高山俊夫、大内田 調、小池芳雄
- 3P12 メゾフェーズピッチのVACP/超高速MAS法による測定 ……293
 (九州工業技術研) ○安達芳雄
- 3P13 固体NMRによるSiH-C≡C-系ポリマーの熱硬化構造の解析 ……297
 (高分子素材センター先進材料研、三井東圧化学総研) ○黒木重樹、伊藤正義²、石川淳一²
- 3P14 層状ケイ酸塩の層間イオンのサイトと運動 ……301
 (物質研¹、筑波大物質工学²) ○林 繁信¹、里澤優敏²、国森公夫²
- 3P15 ²⁷Al NMRによる混合溶媒中でのAl(III)イオンの溶媒和 ……305
 (北見工大) ○三浦宏一、松田弘喜、梅原邦之、中谷昭典、馬場雄久、福井洋之
- 3P16 芳香族溶媒中におけるn-アルカンの化学シフトの温度依存性と分子間相互作用 ……307
 (電通大) ○稲倉秀樹、仁木国雄
- 3P17 多核銀(I)錯体の合成と固体高分解能¹⁰⁹Ag NMR ……311
 (都立大理) ○嶋田陽子、北川 進、松坂裕之、近藤 満
- 3P18 ¹³CNMR化学シフトテンソルによるペプチドおよびポリペプチドの水素結合についての研究 ……315
 (東工大工) ○亀田恒徳、黒子弘道、安藤慎治、安藤 勲
- 3P19 NQC効果によるPPA-d₁のCis-trans配位の決定 ……319
 (北大地球環境¹、北大工²) ○松波成行¹、覚知豊次¹、石井文明²
- 3P20 HMBC法の新しい応用測定-3次元NMR法の応用 ……323
 (東大院農応生化¹、日本電子²、東大分生研³) ○降旗一夫¹、阿部 敦²、瀬戸治男³
- 3P21 ペプチド・タンパク質の構造解析のためのNMR化学シフト評価法の利用 ……327
 (農工大工¹、Univ. of Sheffield²) ○岩館満雄¹、出村 誠¹、朝倉哲郎¹、M. P. Williamson²
- 3P22 ガラスプレートを用いた再構成脂質二重層と導入された配向ペプチドの角度依存 ……330
 固体NMR構造解析
 (農工大工¹、長崎大工²) ○岩館満雄¹、溝口 泰¹、堀 由美子¹、出村 誠¹、朝倉哲郎¹、
 新留琢郎²、青柳東彦²
- 3P23 固体¹³Cおよび²H NMRによる絹タンパク質の構造解析 ……333
 (農工大工¹、日本電子²) ○出村 誠¹、斉田 理¹、朝倉哲郎¹、杉沢寿志²
- 3P24 NMRによる1-ベンゾトリアゾリル-2-(p-トリル)-イソインドール誘導体の環状付加 ……335
 反応物の構造解析
 (福井大工¹、福井大教育²、金沢大薬³) ○前田史郎¹、高橋一朗¹、島田慎治¹、春吉真樹¹、
 都築幹生¹、横田 博¹、神藤洋爾¹、北嶋英彦¹、伊佐公男²、細井信造³、津田喜典³
- 磁場勾配**
- 3P25 二重共鳴を用いたパルス磁場勾配NMR装置の製作 ……337
 (分子研) ○大石 修、宮島清一
- 3P26 新しい多量子遷移フィルター法の開発、混成遷移フィルター&遷移独立分離フィルター ……339
 (筑波大物理工学¹、岡崎生理研²、北大工³) 山田 整¹、○竹内誉羽¹、田崎 明¹、
 瀬尾芳輝²、恵良田知樹³
- 3P27 広帯域反転/再結像パルスの多次元および同位体フィルター測定法への応用 ……343
 (都臨床研¹、第一製薬²) ○小椋賢治¹、寺沢宏明^{1,2}、稲垣冬彦¹

- 3P28 PFG HMBCを利用した異種核間 long range Jの測定法 …345
(日本電子) ○内海博明、熊木康裕、鴨 修、日元 徹
- 3P29 GOESY測定における分子拡散の影響 …349
(雪印乳業生物科学研¹、日本電子NM応用研²) ○中越雅道¹、熊木康裕²、内海博明²
- 3P30 磁場勾配パルスを用いたPFG-HMQC-CONOSY法 …353
(理研) ○越野広雪、森田徹一郎、鶴澤 洵
- イメージング**
- 3P31 回転座標系イメージング用ラジオ波磁場勾配発生装置 …355
(電総研) ○服部峰之、清水秀明、守谷哲郎
- 3P32 高速汎用マイクロプロセッサを用いたリアルタイムNMR画像再構成システムの開発 …357
(筑波大物理学¹、Lovelace Institutes²) ○巨瀬勝美¹、拝師智之¹、Arvind Caprihan²、Eiichi Fukushima²
- 3P33 リアルタイムNMRイメージング装置を用いた静止流体中を沈降する球体の運動の計測 …361
(筑波大物理学) ○拝師智之、巨瀬勝美
- 3P34 骨の3次元Constant-time-imaging測定法 …365
(京都府立医大整形外科¹、ブルカー²、生理研³、京都府立医大生理⁴) ○高宮尚武¹、日下義章¹、V. Lehmann²、D. Gross²、K. Zick²、村上政隆³、瀬尾芳輝⁴
- 3P35 NMR画像による薬物動態追跡-Interleaveを使った化学シフト選択- …367
(九大薬) ○金沢洋子、土井祥寛、川原靖史、植崎美智子、野田陽子、田中彬嗣
- 3P36 LECラット肝のNMRイメージング …371
(国立環境研¹、放医研²、筑波大医³、筑波メディカルセ⁴) ○三森文行¹、吉岡 大^{1,2}、女屋博昭^{1,3}、板井悠二³、土井幹雄⁴
- 3P37 H-2 DQF PFG NMRを用いたラット座骨神経内の重水運動の測定 …373
(生理研¹、テルアビブ大化学²) ○瀬尾芳輝¹、H. Shinar²、Y. Sharf²、G. Navon²
- 3P38 局所励起を可能としたge-HSQC法によるIn Vivo¹³C-MRS …377
(東芝研究開発セ¹、創価大生命研²) ○渡邊英宏¹、石原康利¹、岡本和也¹、小田正記²、押尾晃一²、金松知幸²、塚田裕三²
- 3P39 デカップリングパルス印加に伴う生体内温度変化の計測 …381
(東芝研究開発セ¹、創価大生命研²) ○石原康利¹、渡邊英宏¹、岡本和也¹、小田正記²、押尾晃一²、金松知幸²、塚田裕三²
- 3P40 植物組織の制限拡散に基づくWater Spaceの性質を表すパラメーターの画像化 …385
(食総研、日本電子アータム²、生物研³) ○石田信昭¹、小川秀次郎²、小泉美香³、狩野広美³
- 3P41 2次モーメントのイメージング …389
(筑波大物理学) ○野中正幸、福永康弘、中井利仁、松井 茂、井上多門
- 3P42 固体イメージングにおける交差分極コントラスト …393
(筑波大物理学) ○中井利仁、野中正幸、松井 茂、井上多門
- 3P43 OBSTRUCTIONモデルによる拡散係数の時間依存性の解析 …397
(東京水産大) ○福岡美香、五味雄一郎、渡辺尚彦
- 3P44 ¹H NMR イメージング法による高分子ゲル中の常磁性イオンの空間分布の研究 …399
(東工大工) ○山崎亜紀、堀田芳生、黒子弘道、安藤 勲
- 3P45 飽和移動による脳組織の高分子成分のスペクトル抽出 …402
(日女大理物生¹、国立精神神経センター神経研²) ○高橋征三¹、荻野孝史²

生体高分子 2

- 3P46 固体NMRによる核間距離精密測定法(MLEV8/8^R)を用いたプロテアーゼ複合体 (subtilisin-SSI)の局所構造の測定 ……405
(京大院理¹、都立大理²) ○石井佳誉¹、寺尾武彦¹、三宅洋子²、甲斐荘正恒²
- 3P47 CH-およびCH₂-選択二次元スペクトルとその生体分子の解析への応用 ……408
(北大農) 川端 潤、○福士江里
- 3P48 NMRによる天然型及び[Abu³]型モノリンの立体構造比較と構造活性相関研究 ……412
(味の素中研) ○水越利巳、香村正徳、鈴木榮一郎、有吉安男
- 3P49 ¹H-NMRによるナトリウムチャンネルのS4セグメントの構造解析 ……414
(東レリサーチセ) ○木村一雄、近藤洋司、丸山季浩、川口 謙
- 3P50 NMRによるAptotoxinの構造解析 ……416
(三菱化学生命研) ○小林邦子、金 載一、佐藤一紀、河野俊之
- 3P51 REDORによるEnkephalinの精密原子間距離測定と三次元構造の構築 ……417
(姫路工大理) ○西村勝之、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇
- 3P52 ヒトカルシトニンのC末端部分の構造解 ……421
(日本チバガイギー国際科学研) ○田 栄浩、金折賢治、野坂篤子
- 3P53 金属イオンによって誘起される膜蛋白質の高次構造変化；固体高分解能NMRによる解析 ……423
(姫路工大理) ○辻 暁、内藤 晶、斉藤 肇
- 3P54 NMRによるショウジョウバエSxl蛋白質RNA結合ドメインの高次構造とRNA認識機構 ……427
の解明
(東大院理¹、理研細胞情報伝達²、神大理³、京大院理⁴、都立大理⁵、千葉工大工⁶)
○武藤 裕¹、井上 真¹、伊藤拓宏¹、武田佳宏¹、金 仁実¹、智 勝焜¹、半田徳子¹、
北村 彩¹、渡部 暁¹、木川隆則²、坂本 博³、志村令郎⁴、甲斐荘正恒⁵、小野 晶⁵、
細野和美⁶、高久 洋⁶、横山茂之¹
- 3P55 Raf-1のRas結合ドメインとRasの相互作用の研究 ……429
(理研細胞情報伝達¹、東大院理²、理研遺伝生化学³、Fred Hutchinson Cancer Research
Center⁴、Univ. of Cambridge⁵) ○寺田 透^{1,2}、伊藤 隆³、白水美香子¹、木川隆則¹、
柴田武彦³、Jonathan A. Cooper⁴、Brian O. Smith⁵、Ernest D. Laue⁵、横山茂之^{1,2}
- 3P56 原がん遺伝子産物c-MybとDNAとの複合体の動的構造 ……432
(横浜市大院総合理¹、理研筑波LS²、生物分子工学研³) ○佐々木元子¹、緒方一博^{1,2}、
黒田仁志¹、中沢賢一¹、中村春木³、皿井明倫²、石井俊輔²、西村善文¹
- 3P57 Structure and Dynamics of Cross-linked Melittin Analogues ……434
(Dept. of Biochem., Univ. of Bristol) ○武井次郎、Attila Remenyi、Chris Dempsey
- 3P58 CRE結合蛋白質CRE-BP1の転写活性化ドメインの構造解析 ……437
(横浜市大院総合理¹、理研筑波LS²) ○長土居有隆¹、中沢賢一¹、奥野浩一¹、江成政人¹、
前川利男²、石井俊輔²、西村善文¹
- 3P59 ラット脳スライスの³¹P-NMR・脳細胞におけるエネルギー基質としての乳酸の評価 ……439
(大分医大生理学) ○柳井荘緑、吉岡敬太郎、西丸直子、山田和廣
- 3P60 ³J(H_W-H_{C α})および³J(H_W-C _{β})を利用したユニ活性化ペプチドの構造解析 ……443
(北大院理) ○齋藤もよこ、鈴木範男、引地邦男
- 3P61 核様体蛋白質H-NSのN端およびC端ドメインの溶液構造 ……446
(東京薬大¹、農水省生物研²、中外製薬³、分生工研⁴、名大農⁵) ○大貫 歩¹、山崎俊正²、
久保庭 均³、中村春木⁴、上口智治⁵、水野 猛⁵、佐久間千勢子¹、神藤平三郎¹

- 3P62 コリシンE6ヌクレアーゼドメインと特異的インヒビターImmE6の相互作用の解析 …448
 (東大院応生工¹、東大院理²、理研遺伝生³、理研細胞情報伝達⁴) ○大野光宏¹、
 武藤 裕²、伊藤 隆³、岩原淳二⁴、木川隆則⁴、柴田武彦³、横山茂之²、正木春彦¹、
 魚住武司¹
- 3P63 mSos1タンパク質のPHドメインの高次構造解析 …451
 (東大院理¹、理研細胞情報伝達²、Peter MacCallum Cancer Institute³) ○小柴生造^{1,2}、
 木川隆則²、金 載勲^{1,2}、白水美香子²、D. Bowtell³、横山茂之^{1,2}
- 3P64 抗腫瘍性抗生物質C-1027の二次元NMR解析 …453
 (東北大院理¹、筑波大先端学際領域研究セ²、サントリー生医研³、大鵬薬品製薬セ⁴)
 ○福田純子¹、田中俊之²、平間正博¹、今城精一³、石黒正路³、吉田健一郎⁴、大谷敏夫⁴
- 3P65 ¹H-NMRによるヘムタンパク質の三次構造の安定化に寄与するセグメント間水素結合の研究 …457
 (筑波大化) 山本泰彦

—休憩—

(15:15~17:25)

座長 嶋田一夫

- 3L5 蛋白質主鎖原子の完全緩和解析と主鎖の運動性 …461
 (都立大理) ○楯 真一、山口絵美、市川代志子、甲斐荘正恒
- 3L6 完全緩和行列法による蛋白質内H核間ベクトル運動の解析 …465
 (岐阜大医) ○桑田一夫、恵良聖一

座長 荒田洋治

- 3L7 安定同位体標識NMR技術の核酸への展開 …467
 (都立大理) ○甲斐荘正恒、小野 晶、楯 真一、小野 明、片岡 新、椎名桃子、大胡 雄
- 3L8 分子量の大きなタンパク質の高次構造解析法の開発 …468
 (理研遺伝生化学¹、ケンブリッジ大生化学²、理研細胞情報伝達および東大院理³、EMBL⁴)
 ○伊藤 隆¹、B. O. Smith²、A. Raine²、S. Teichmann²、L. Ben-Tovim²、D. Nietlispach²、
 R. W. Broadhurst²、寺田 透³、M. Kelly⁴、H. Oschkinat⁴、柴田武彦³、横山茂之³、E. D. Laue²

イメージング

座長 渡辺徳子

- 3L9 不均一磁場における超高速イメージング …472
 (筑波大物理工学) 巨瀬勝美
- 3L10 神経活動MRIの基盤技術としての電流分布MRI …476
 (東大医) ○亀井裕孟、伊良皆啓治、上野照剛

【付録】

- 著者名索引 … (1)
- キーワード索引 … (6)
- 参加者名簿 … (14)

1L1

Design of Amplitude, Phase, Frequency- Modulated RF-Fields to Reintroduce Anisotropic Interactions under MAS

京大理 ○石井佳誉、寺尾武彦

Yoshitaka Ishii and Takehiko Terao

Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Kyoto University, Kyoto 606-01, Japan

Abstract

A general approach to treat a frequency-, phase-, and amplitude-modulated rf-field is presented. Methods to restore the ^{13}C -chemical shift anisotropy and/or the ^{13}C - ^{15}N dipolar interactions are developed as simple and useful examples of this approach. Their performance is confirmed by simulations and experiments.

Recent advances of NMR spectrometers enable us to switch all of the amplitudes, phases, and frequencies of rf pulses in few micro sec. Using these functions, amplitude-, phase-, or frequency-modulated pulse sequences have been developed to invert a magnetization band-selectively^{1,2} or to increase the efficiency of decoupling³ and cross polarization^{4,5}. However, many of the reported sequences are

異方性測定、Modulation

いしいよしたか、てらおたけひこ

only the combination of a small number of rectangular pulses or its phase-cycled modifications, and the others are the amplitude-modulated pulse sequences.

In this study, we discuss a general method to design the rf-field in which the amplitude, phase, and frequency can be arbitrarily dependent on time. As a useful example, we apply this method to restoration of anisotropic interactions under MAS (magic angle spinning). Using the average Hamiltonian approach, a group of pulse sequences is produced to reintroduce anisotropic interactions under MAS.

As an example of the designed modulations, in Fig. 1 we show an amplitude-modulation to reintroduce chemical shift anisotropies under MAS. Figure 2 shows a ^{13}C spectrum obtained by this sequence for diammonium oxalate $(\text{COONH}_4)_2$ and the corresponding spectrum calculated using the reported principal values⁶. They agree well with each other, indicating that the present method works well.

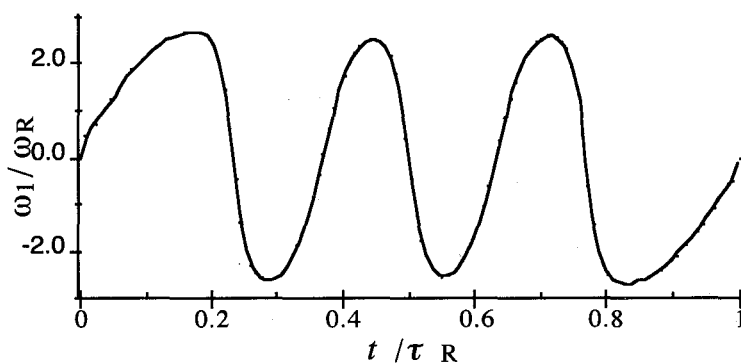


Fig. 1. Rotor-synchronously amplitude-modulated rf-field for recovery of chemical shift anisotropies, where ω_1 , ω_R , and τ_R denote the amplitude of the rf field, the rotor frequency, and the rotation period, respectively. This is repetitively applied in the experiments.

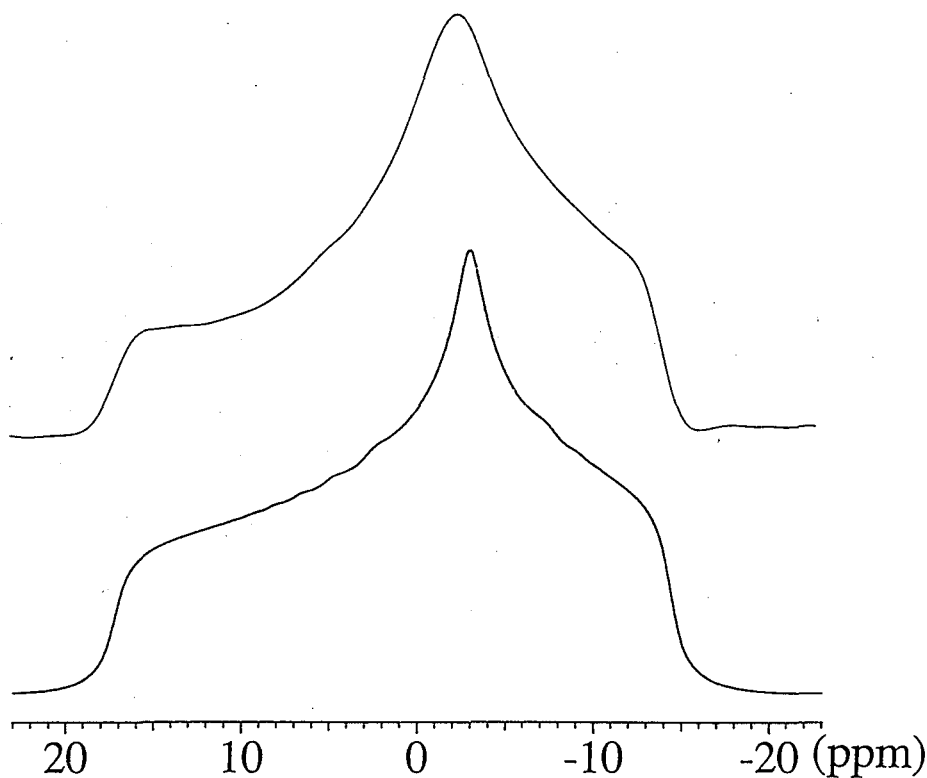


Fig. 2. ^{13}C spectrum (upper) observed for diammonium oxalate by the amplitude-modulated rf-field shown in Fig. 1 and the corresponding spectrum (lower) calculated from the principal axis values obtained by a CP experiment for the static sample⁶. The reduction factor of the chemical shift anisotropy is 1/4.3.

¹ E. Kupce and R. Freeman, *J. Magn. Reson., Ser. A* **102**, 364-9 (1993).

² A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, and R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **103**, 6951-8 (1995).

³ T. Fujiwara, T. Anai, N. Kurihara, and K. Nagayama, *J. Magn. Reson., Ser. A* **104**, 103-5 (1993).

⁴ G. Metz, X. Wu, and S. O. Smith, *J. Magn. Reson., Ser. A* **110**, 219-27 (1994).

⁵ S. Hediger, B. H. Meier, and R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **240**, 449-56 (1995).

⁶ R. G. Griffin, A. Pines, S. Pausak, and J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **63**, 1267-1271 (1975).

二面角情報を得るためのCH双極子・CH双極子相関多次元 固体高分解能NMR

(横浜国大・工) ○藤原敏道、下村泰次、阿久津秀雄

Multidimensional CH-CH Dipolar Correlation NMR under MAS Conditions for Obtaining Dihedral Angle Information in Solids

Toshimichi Fujiwara, Taiji Shimomura and Hideo Akutsu

Faculty of Engineering, Yokohama National University, Yokohama 240, Japan

Multidimensional solid-state NMR under MAS conditions was developed to correlate $^{13}\text{C}^1\text{H}$ dipolar interactions for different carbons. The pulse sequence for this experiment includes two $^{13}\text{C}^1\text{H}$ dipolar evolution periods which are connected with a period for magnetization transfer between carbon-13 spins. Numerical simulation indicates that the correlation spectra are sensitive to relative orientations of CH internuclear vectors. Thus this experiment provides information on dihedral angles about C—C covalent bonds. The high resolution due to MAS conditions enables its application to molecules isotope-labeled at multiple sites. Experimental results are presented for $\text{H}^\alpha\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta\text{H}^\beta$ in amino acid valine uniformly labeled with carbon-13 nucleus.

【はじめに】

複雑な生体分子の構造を決めるためには、多くの構造情報を得る必要がある。このためには、構造に関する情報源になる ^{13}C や ^{15}N に関する相互作用を多く持つ完全標識試料を使い、高分解能化ができるMAS条件で実験を行うことが有利である。二面角情報をそのように ^{13}C 完全標識試料についてMAS条件下で得ることができる⁽¹⁾。そのためには、双極子・双極子相互作用(DD)や化学シフト異方性(CSA)といった異方的相互作用を異なる核スピン間で相関させ、相互作用テンソルの相対配向を決める。相関させる相互作用の組み合わせとしては、CSAとCSA、DDとDD、CSAとDDが考えられる。今回はCSAとDDの組み合わせについて報告した。今回はDDとDDの組み合わせで、DDとしてCH双極子結合を用いた場合について二面角情報を得る方法についてシミュレーションと実験に基づいて検討したので報告する。対象にした分子は ^{13}C 完全標識したアミノ酸バリンで、その $\text{H}^\alpha\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta\text{H}^\beta$ の部分に注目した。この場合には、 $\text{C}^\alpha\text{—C}^\beta$ についての二面角 χ に関する情報を得ることができる。(Fig.1中の構造式)

【実験】

試料は ^{15}N と ^{13}C で完全標識したアミノ酸バリンを天然存在比のバリンで約6倍に薄めて、希塩酸溶液から結晶化したものを用いた。NMR実験は9.4Tの磁場強度でOtsuka Electronics CMX400分光計に5mmのローター用プローブを使って行った。試料回転数は約5kHz、RFの用いた最大強度は ^1H 、 ^{13}C 共に約100kHzであった。3次元NMR実験のポイント数は10(Real, t_1) \times 10(Real, t_2) \times 1024(Complex, t_3)、積算回数32で、実験時間は約5時間であった。3次

多次元固体NMR、マジック角試料回転、二面角、安定同位体標識、双極子相関

ふじわらとしみち、しもむらたいじ、あくつひでお

元フーリエ変換はFelix950で行った。 $^1\text{H}^{13}\text{C}-^{13}\text{C}^1\text{H}$ 4スピン系のシミュレーションは、自作のFORTRANソフトを用いIRIS INDIGO 2 (R4400) 上で計算した。なお、C-H結合長は0.11 nmとして計算した。

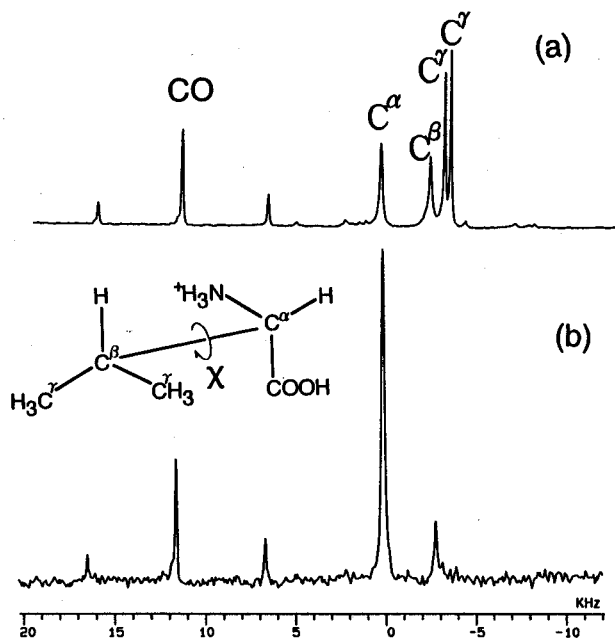


Fig. 1. (a) ^{13}C spectrum of valine uniformly labeled with ^{13}C and ^{15}N . (b) ^{13}C spectrum of valine obtained with the pulse sequence in Fig. 2 at $t_1 = t_2 = 0$.

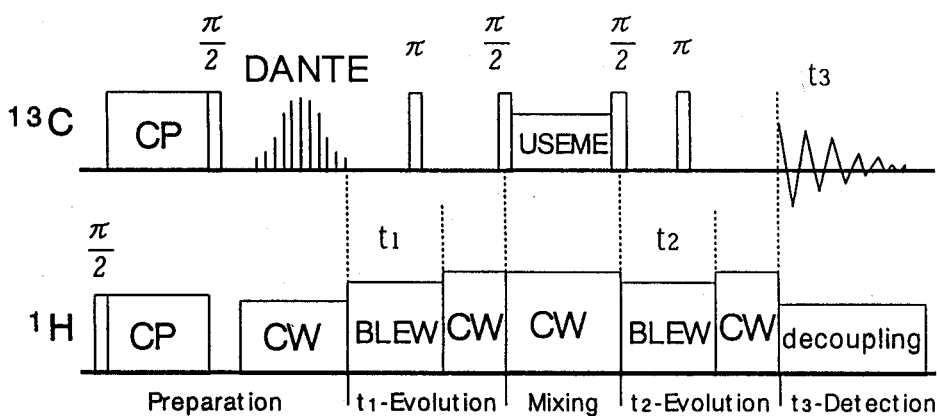


Fig. 2. 3-Dimensional pulse sequence for correlating CH dipolar interactions under MAS conditions.

【結果】

完全標識したバリンのスペクトルでは、図1 aに示すようにすべての ^{13}C シグナルが分離している。今回の相関実験では C^α と C^β の信号に関する相関を測定する。そのシフト差は約3 kHzである。

3次元の相関NMR実験に用いたパルス系列を図2に示す。準備期では、 ^1H からの交差分極とガウス型整形パルスで C^α の横磁化だけを選択励起する。 t_1 期では、 $\text{C}^\alpha\text{H}^\alpha$ の双極子相互作用のみによって展開する。その長さは2回転周期に固定している。この時 ^1H の双極子ホモデカップリングを行うために、MASの影響を消すBLEW12+/-を用いた。化学シフト異方性の影響はMASによって消し、等方性シフトは π パルスによって除いている。混合期では、パルス列USEMEの下で作用する炭素間双極子結合によって C^α から C^β へ磁化を移動させる。 t_2 期では、 t_1 期と同じパルス列を用いて $\text{C}^\beta\text{H}^\beta$ の双極子相互作用によって磁化は展開する。 t_3 期では、高分解能条件の下で信号を観測する。

図1 bに3次元実験で $t_1 = t_2 = 0$ の時のスペクトルを示す。混合時間1.2msで磁化が C^α から C^β と CO に移動しているのがわかる。3次元実験ではその C^β 信号を t_1 と t_2 の関数として測定している。図3にこの実験で得られた相関スペクトルを示す。F1=0 と F2=0の軸に沿って強い強度があることがわかる。

【シミュレーションによる解析と考察】

図4に二面角 χ を 0° から 180° に変えていった時の計算スペクトルを示す。 $\chi = 0^\circ$ の時、 CH と CH がシス配位になるように χ を定義している。このスペクトルを定性的にグループ分けすると $(0^\circ, 30^\circ)$ 、 $(60^\circ, 90^\circ, 120^\circ)$ 、 (150°) 、 (180°) の4つに分類できるであろう。 $(0^\circ, 30^\circ)$ では中央に強いピークがある。 $(60^\circ, 90^\circ, 120^\circ)$ ではF1=0の軸とF2=0の軸にそって強いピークがある。 (150°) では対角線上にピークがある。 (180°) では対角線上に強い尾根がある。この尾根は CH と CH が平行になり t_1 と t_2 期で同じ共鳴周波数を持つことから予想できる。従ってスペクトルの変化は 180° 付近で二面角 χ 変化に対して敏感であるが、 90° 付近では χ 依存性は比較的小さいといえる。

実験スペクトルをこの分類法に当てはめると $(60^\circ, 90^\circ, 120^\circ)$ と一致する。この結果は、X線結晶解析で約 60° のゴーシュを取っていることと一致している。このように、完全標識された試料でも実験でトランスとゴーシュの区別などを容易に行えることがわかる。

二面角情報を得るのに、相関させる相互作用にCSAがある場合には、CSAの主軸方向が前もって正確にわかっていないと、得られる二面角情報に不確実性が生じた。今回の双極子相互作用のみを用いる方法ではそのような問題点はない。

NHとCHなど異種核に関する双極子相互作用を相関させることも可能である。ペプチドについてはそれで二面角 ϕ に関する情報を得ることができる。

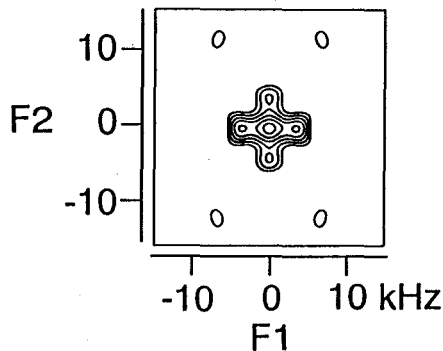


Fig. 3. Experimental 2-D cross section for correlating the $\text{C}^\alpha\text{H}^\alpha$ dipolar coupling (F1) with the $\text{C}^\beta\text{H}^\beta$ (F2) dipolar coupling, taken at the C^β resonance in F3 from a 3-D spectrum obtained with the pulse sequence shown in Fig. 2.

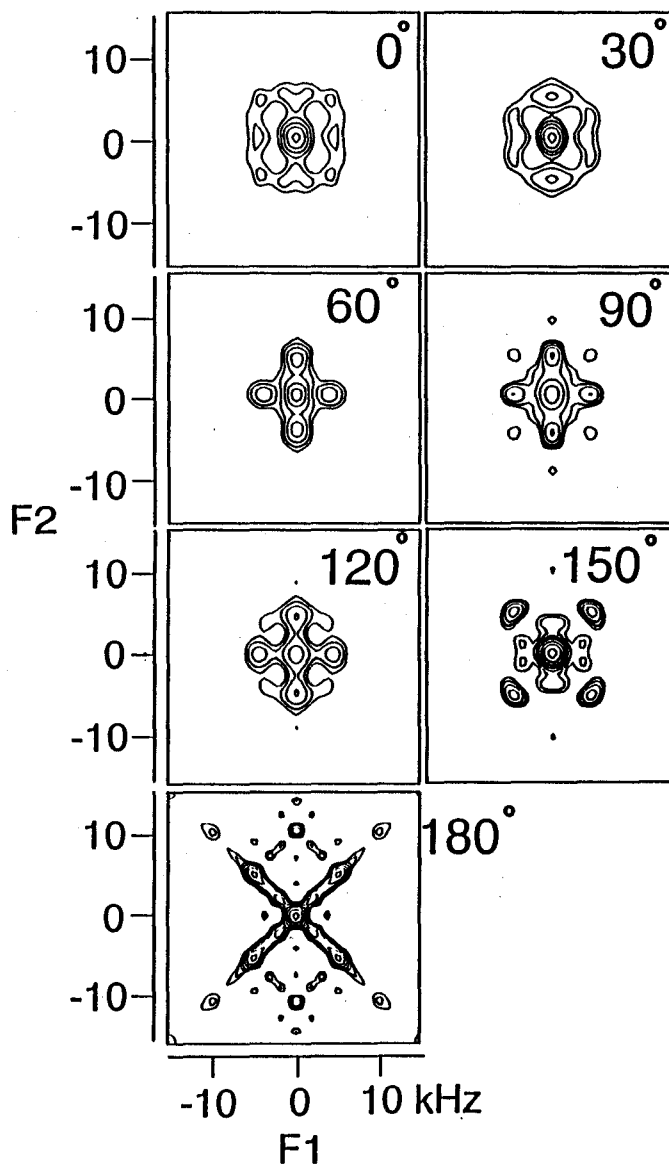


Fig. 4. Simulated spectra for the CH-CH dipolar correlation as a function of dihedral angle α .

【謝辞】 図の準備を手伝ってくれた横浜国大・工・大東靖典 君に感謝する。

【文献】 1. 下村泰次、他。第34回NMR討論会予稿集 p. 47 (1995).

2D or Not 2D:
¹³C 1D-MAS exchange experiments in
 molecular crystals and solid polymers

D. Reichert, Z. Luz[#], H. Schneider
 University of Halle, Dept. of Physics, Halle, Germany
[#] Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

The molecular dynamic of solids in the slow exchange regime ($T_2^{-1} > k > T_1^{-1}$) can be studied in very detail by Rotor-synchronized 2D-MAS exchange experiments. However, such experiments are often very time consuming and it is therefor desirable to use, whenever possible, equivalent 1D methods.

A one-dimensional magic angle spinning (MAS) exchange experiment is proposed for samples with several groups of equivalent nuclei undergoing internal exchange, such as pure reorientation (as opposed to mutual exchange). The method, which we term Time-reverse ODESSA, is an extension of the recently proposed 1D-ODESSA experiment for a single group of exchanging nuclei (ODESSA itself is a reduced 2D-MAS exchange experiment). When several different groups of spins are present, as it is usually the case for ¹³C in polymers and molecular crystals, the normal ODESSA spectrum yields phase twisted spectra which are difficult (sometimes impossible) to analyze quantitatively. This problem is solved for all families of side-bands, as long as only internal exchange need be considered.

The experiment consists of the usual three pulse sequence of 2D exchange, P1- t_1 - P2 - τ_m - P3 - t_2 (acquisition), except that the evolution time is fixed at half a rotation period, $t_1 = T_R/2$, the mixing time is synchronized with the sample rotation to $\tau_m = (N-1/2) * T_R$ and the acquisition starts at $t_2 = T_R/2$ after the detection pulse, P3.

The method is demonstrated using the ¹³C-spectra of dimethylsulfone (DMS) and is applied to both the study of the π -flip of the inner benzene ring of 1,4-diphenoxybenzene and the molecular mobility of Poly(n-buthylmethacrylate). The scope and the limitations of the method are discussed.

Keywords: solid state, exchange experiments, MAS, DMS, polymer

A NMR study of structure and ^{13}C NMR chemical shift tensors for peptides in the solid state.

Hiromichi Kurosu, Naoto Takeda, Tsunenori Kameda and Isao Ando

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

We have been developed method for measuring chemical shift tensors and their directions with high accuracy. In order to make clear the relationship between principal values, direction of principal values and higher-order structure including hydrogen bonds, we have carried out ^{13}C NMR shielding calculation by *ab initio* GIAO-CHF method.

1. 緒言

これまで、固体ペプチド、オリゴペプチドの化学シフト、化学シフトテンソルの主値と水素結合構造および分子構造との間の相関関係は詳細に研究されてきているが、主軸方向に関する研究はほとんどなされず、例えばオリゴペプチドのカルボニル炭素と ^{13}C NMR 化学シフトテンソルの主値 δ_{22} とのずれは全て 15(deg) 以内であることからほぼ一定であるとしていた。しかし、化学シフトを精度高く解析し理解し、分子構造との相関関係を明らかにするためには主軸方向の詳細な議論が重要である。

我々は化学シフトテンソルの主値と主軸方向を精度高く求める方法を開発し、いくつかのオリゴペプチドの主軸方向を求めてきた。一方、近年の計算機の性能の向上に伴い、より精度の高い大規模な計算が可能になってきた。そこで本研究では、種々の基底関数系や電子相関の有無、計算モデル(水素結合効果やパッキングの効果を検討したモデル)を変えて行った量子化学計算より、これまでに得られているアミド-アミド型の水素結合を形成しているオリゴペプチドの単結晶試料の主値、主軸方向と水素結合構造との関係を電子状態を通して理解し、この関係を通して ^{13}C 化学シフトテンソルからどこまで水素結合の構造解析が行えるかを明らかにすることを目的としている。

2. 理論・計算

本研究では ^{13}C NMR 遮蔽定数の計算に *ab initio* GIAO(Gauge Included Atomic Orbital)-CHF(Coupled Hatree Fock)を用いた。基底は HF/3-21G, HF/6-311G, HF/6-311G**, DFT/6-311G**を用いた。DFT(Density Functional Theory)の交換相関汎関数にはB3-LYPを用いている。

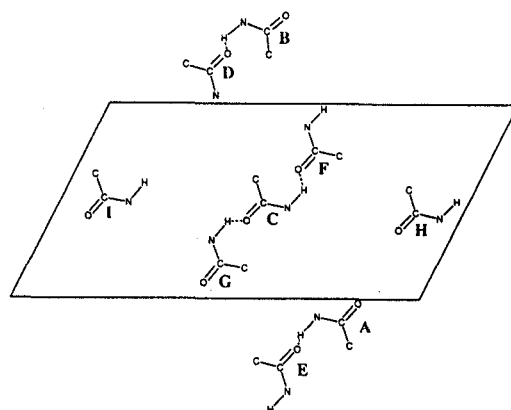


Fig.1 Packing form of a Gly-Gly crystal.

化学シフトテンソル、量子化学計算、固体ペプチド、構造

くろす ひろみち、たけだ なおと、かめだ つねのり、あんど う いさお

3. 結果及び考察

3-1 水素結合構造が電子構造に与える影響

Figure 1にグリシルグリシンのパッキング形態を示した。分子Cに対してアミド-アミド型の水素結合を形成している分子は分子F,Gであり、水素結合形態としては、アンチパラレル型をとっている。水素結合を形成している分子を増やした場合の主値 ($\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$)、化学シフト異方性 $\Delta\sigma$ ($\sigma_{33} - \sigma_{11}$)、非対称性パラメーター η ($(\sigma_{22} - \sigma_{11}) / (\sigma_{33} - \sigma_{11})$) および主軸方向の変化を計算した。実際の実験から観測される化学シフトテンソルの値 ($\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$) は基準物質からの相対的な遮蔽を示しており、量子化学計算から得られる遮蔽定数との直接的な比較は困難である。そこで、本研究では計算モデルを変化させていった時の η および $\Delta\sigma$ の値を実測の値と比較した。また、今回用いたサンプルは全て中性子散乱により原子座標が決定されているため、その座標を用いて計算モデルを作成し、構造最適化をせずに計算を行った。 σ_{33} の値はほとんど変化しないが、 σ_{22} は低磁場シフトし、 σ_{11} は高磁場シフトした。相対的な変化量としては、 σ_{11} よりも σ_{22} のほうが大きい。このため、1分子の場合と比べて $\Delta\sigma$, η は共に小さくなり実測の値に近づく傾向がみられた。

また、水素結合分子を非対称に1分子入れたモデル (type-CG) と対称的に2分子入れたモデル (type-CGF) とを比較すると、 σ_{11} は1分子モデル (type-C) よりもそれぞれ同じ大きさ (13程度) づつ高磁場シフトしているのに対し、 σ_{22} は (type-C) と (type-CG) の間で24程度の低磁場シフトがみられ、さらに分子Fを加えてやることにより9程度の低磁場シフトを示している。 σ_{33} がほとんど変化しないので、等方平均の変化量としては (type-CG) よりも (type-CGF) のほうが大きくなっている。

3.2 パッキング形態が電子構造に与える影響

Gly-GlyおよびGly-Gly·HNO₃のパッキング形態をそれぞれFigure 1, Figure 2に示した。図からわかるように、Gly-Glyでは上下のパッキング分子は半セル分ずれた位置にあるのに対し、Gly-Gly·HNO₃ではちょうど真上と真下にパッキング分子が位置している。

パッキング分子の影響を考える際には、注目している分子を取りまくパッキング分

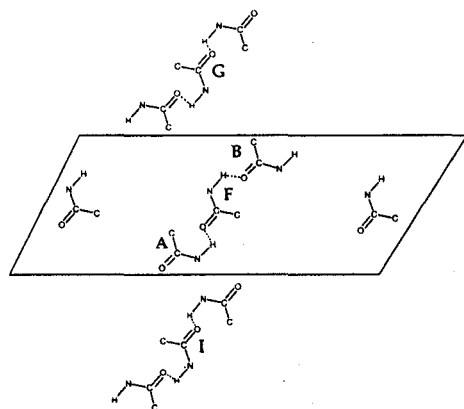


Fig.2 Packing form of Gly-Gly·HNO₃

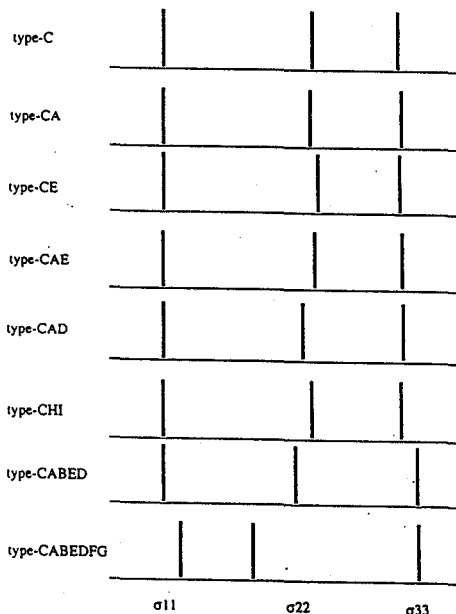


Fig.3 ¹³C chemical shift tensor components for some model compounds calculated by the 3-21G MO method.

子をできるだけ対称的に入れる必要がある。したがって、ここでは主にtype-C (1分子モデル) とtype-CABED (上下のパッキング分子を入れた5分子モデル) との比較で議論する。

パッキング形態の変化による主値の変化をFigure 3に示した。(type-CABEDFG)は上下のパッキング分子と水素結合分子の両方が入ったモデルである。まず、このモデルを除いては、 σ_{11} の値はほとんど変化していない。これは、(type-CABEDFG)では水素結合分子が入っているためにペプチド平面内での相互作用が大きく働き、 σ_{11} を高磁場シフトさせているためである。また、分子Hと分子Iは注目している分子Cをa軸方向に1セル分だけ左右に平行移動した分子であるが、分子鎖がa軸方向にのびているために末端間距離が近く、そこでの相互作用が注目しているカルボニル炭素の電子環境に影響を与える可能性があるのでパッキングモデルとして考えた。(type-C)と(type-CHI)とを比較してみると各パラメータともほとんど変化していないので、末端での相互作用は注目しているカルボニル炭素の電子環境にはほとんど影響を及ぼしていないと考えられる。

上下のパッキング分子によって σ_{11} の値がほとんど変化していないのとは対照的に、 σ_{33} の値は7ppm程度高磁場シフトしている。さらに、(type-CABED)と(type-CABEDFG)との比較において、 σ_{33} の値がほとんど変化していないことから、 σ_{33} は水素結合の効果よりもパッキングの効果を強く受けていることが分かる。これは、上下に分子が配置されることにより、中央の分子の電子が上下の電子と反発しあうことにより、上下から圧迫されたような歪みを受けるためである。そのため、 σ_{33} 方向の電子状態は密になり、高磁場シフトを受ける。このことは、上下からパッキング分子を入れたモデル、(type-CAD)と(type-CABED)が低磁場シフトしているのに対し、片側だけからパッキング分子を入れたモデルの σ_{33} に変化がないことから明らかである。

グリシルグリシンに上下に4分子入れたモデル(type-CABED)では、1分子(type-C)に比べて σ_{22} とカルボニルの間の角度が 3.5° 狭められたが、グリシルグリシン硝酸塩の場合には、上下に2分子入れたモデル(type-F*G*1*)で、1分子(type-F*)よりも 4.2° 狭められている。今回は、計算時間の都合上3分子でのパッキングしか考慮できなかったが、上下にパッキング分子を入れることにより、カルボニルからの σ_{22} のずれを狭める方向に相互作用が働くのであれば、考慮していないパッキング分子を入れることにより主軸のずれはさらに狭まる可能性がある。このことから、グリシルグリシン硝酸塩のパッキングの効果はグリシルグリシンよりも強く、この効果が大きく効いたために両者の実測の値に 5° のずれが生じたと考えられる。

3.3 ^{13}C 化学シフトテンソルの主値および主軸方向への基底関数の依存性

Table 1にグリシルグリシン1本鎖について量子化学計算の基底を変化させた時の各パラメータの変化を示した。3-21Gと6-311Gを分けて考えると、6-311Gでは、分極や電子相関を入れることにより核遮蔽定数の各成分が、同じ傾向で変化している(近似を良くすると σ_{11} は低磁場シフト、 σ_{22} は高磁場シフト、 σ_{33} は低磁場シフト)。ここで、 $\Delta\sigma$ の値は実測に近づく傾向にあるが、 η の値は実測の値から離れる傾向にある。

Table 1 Effects of basis set quality on the accuracy of *ab initio* calculations of carbonyl carbon chemical shifts for Gly-Gly

	σ_{11}/ppm	σ_{22}/ppm	σ_{33}/ppm	$\Delta\sigma/\text{ppm}$	η	$\theta(\text{deg})$
Gly-Gly	244.9	174.0	85.4	159.5	0.86	10.0
3-21G	-46.1	74.9	135.7	181.8	1.50	18.7
6-311G	-88.7	34.3	126.0	214.7	1.20	20.1
6-311G**	-78.3	41.2	109.3	187.6	1.40	20.8
DFT/6-311G**	-66.5	57.6	88.8	155.3	2.00	20.3

θ : angle between σ_{22} and C=O

$\Delta\sigma$: $\sigma_{33} - \sigma_{11}$

η : $(\sigma_{22} - \sigma_{11}) / (\sigma_{33} - \sigma_{11})$

上述したように、グリシルグリシン分子の場合、水素結合の効果は主に σ_{11} と σ_{22} に効き、パッキングの効果は σ_{22} と σ_{33} に効いているということが3-21G MO 遮蔽定数計算により明らかにされた。このため、 η の値は、水素結合およびパッキングの効果を受けて変化している。したがって、高い近似を用いて計算した時に η の値が実測の値と一致しない場合は、注目している核に水素結合やパッキングなどの効果が大きく効いている可能性がある。

これに対し、 $\Delta\sigma$ の値は、 σ_{11} と σ_{33} のみで決まる傾向にある。グリシルグリシン分子の場合、水素結合形成の効果により σ_{11} は高磁場シフトし、 σ_{33} は変化しないので $\Delta\sigma$ は小さくなる。また、パッキングの効果によって、 σ_{11} は変化せず、 σ_{33} は高磁場シフトするため $\Delta\sigma$ は大きくなる。したがって、水素結合およびパッキングの両方の効果が入ると、 $\Delta\sigma$ の値はあまり変化しないことがわかる。1本鎖において近似を良くした計算で $\Delta\sigma$ の値が実測に近づき、 η の値が実測と一致していなものは、この計算モデルに水素結合分子とパッキング分子が入っていないことによる可能性が考えられる。

以上より、*ab initio* MOを用いた遮蔽定数の量子化学計算は計算値と実測値との比較から種々の相互作用がNMRパラメータに及ぼす影響を明らかにする有用な手法であることが明らかとなった。

^1H NMR (CRAMPS) による ポリペプチドの固体構造解析 (4)

(群馬大工、日本電子*)

○木村英昭、尾崎拓男、杉沢寿志*、出口健三*、 莊司顯

Structural Analysis of Solid Polypeptides by ^1H NMR (CRAMPS) (4)

(Dept. Biological Sciences, Gunma University, and *NMR Application Lab., JEOL Ltd.)

Hideaki Kimura, Takuo Ozaki, Hisashi Sugisawa*,

Kenzo Deguchi* and Akira Shoji

Abstract: The relation between the ^1H chemical shift and the conformation of polypeptides and proteins in the solid state has been studied by the ^1H CRAMPS NMR method. It was found that the ^1H chemical shift of the H_α signal of polypeptides and proteins depends on the secondary structure such as α -helix or β -sheet form. Accordingly, the ^1H chemical shift of the H_α is also very useful for conformational analysis of proteins as well as polypeptides in the solid state.

1. 緒言

CRAMPS法は、水素(^1H)核のようなスピン1/2で、天然存在比が100%の固体高分解能NMRスペクトルを得る手法である。これまで ^1H CRAMPS法は、調整が複雑であり、分解能も低く、化学シフトスケールの値を無条件に信頼できないという理由から、有機化合物の構造解析には一般的に用いられなかったが、我々は装置の綿密な調整及び適切な内部基準を使用することにより化学シフトスケールの信頼性を向上させ、 ^1H 化学シフトを $\pm 0.1\text{ppm}$ の誤差内で決定することに成功した¹⁾。

固体高分解能NMR、特に ^{13}C 、 ^{15}N 核のNMRは、ポリペプチド及びタンパク質の固体構造解析にたいへん有用であることは良く知られている。しかし、 ^{13}C 、 ^{15}N NMR測定では、その天然存在比が小さく感度が低いため測定時間がかかるのが難点である。その点、天然存在比・感度ともに高い固体高分解能 ^1H NMR法は、 ^{13}C や ^{15}N NMRと比べ、より短い時間で測定できるため、 ^1H NMR法は極めて有効な研究手段となる。そこで我々は、前回 ^1H CRAMPS法を初めてポリペプチドの固体構造解析に適用し、 ^1H 化学シフト値とコンホメーションとの相関を明らかにした^{1,2)}。

キーワード：固体高分解能 ^1H NMR、CRAMPS、化学シフト、コンホメーション、ポリペプチド

○きむら ひであき、おざき たくお、すぎさわ ひさし、でぐち けんぞう、しょうじ あきら

今回は、モデルポリペプチドで得た主鎖のメチン(H_{α})プロトンの化学シフト値が天然タンパク質である絹フィブロインのコンホメーション解析にも有効であることを示し、さらに 1H CRAMPS法の今後の発展の可能性について述べる。

2. 実験

1H CRAMPS NMRスペクトルの測定はChemagnetics 社製 CMX 300 分光計により 300 MHzで測定した。測定条件は、パルス列：BR-24、90度パルス幅：1.3 μ s、回転速度：1.5–2.5 kHz、待ち時間：10s、積算：32回であった。シリコンゴム(δ 0.12 ppm)を内部基準とした。スケールングファクターは0.40を用いた。

Fig.1 にスケールングファクターを0.40としたときの化学シフト値の誤差を示す。この図より、単一のスケールングファクター(0.40)で近似したことによる誤差は、通常の化学シフト範囲 (0~15 ppm) 内では、 ± 0.1 ppm以内に十分収まっていることが分かる。

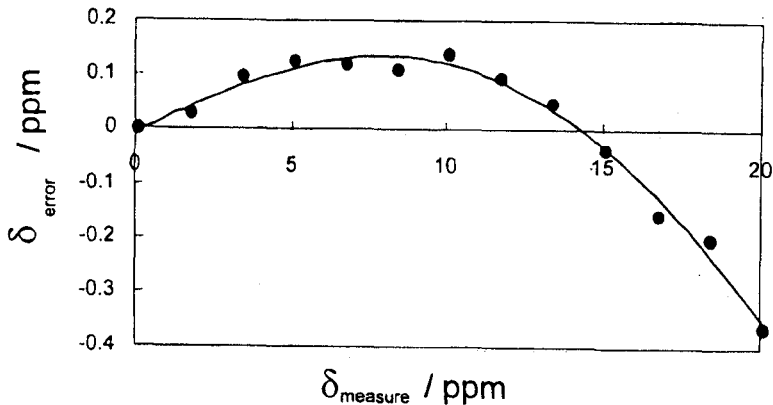


Figure 1. Plots of the 1H chemical shift error (δ_{error}) against the observed value (δ_{measure}) of the peak shift of silicon-rubber. Note: $\delta_{\text{error}} = \delta_{\text{calcd}} - \delta_{\text{measd}}$, where δ_{calcd} is the calculated chemical shift value using the scaling factor of 0.40. δ_{measd} is the chemical shift value measured from the offset frequency dependency of the peak shift.

3. 結果及び考察

Fig.2 にコンホメーションの異なる固体状態のポリ (L-アラニン) 及び柞蚕フィブロインの 1H CRAMPS スペクトルを示す。我々はすでに、コンホメーションの異なる固体状態のポリ (L-アラニン) の 1H CRAMPS スペクトルから、メチンプロトンの化学シフト値はコンホメーションに依存し (α -helix: 3.9 ppm, β -sheet : 5.1 ppm)、それが固体状態のポリペプチドのコンホメーション解析に有効な手段となることを明らかにした^{1,2)}。柞蚕フィブロインは普通の絹フィブロインと異なり、L-アラニン

含量が多く、グリシン含量が少ないため α -ヘリックスコンホメーションを形成していることが知られている。そのメチンプロトンの化学シフト値は4.0 ppmであり、これは α -ヘリックス形をとるポリ(L-アラニン)の化学シフト値と一致する。このことから、メチンプロトンの化学シフト値から、タンパク質のコンホメーション解析が可能であり、有効な手段となることを示している。

現在、このほかにも実験データを集積中であり、講演発表では、数種のコンホメーションの Silk Fibroin の測定データおよび一部のポリペプチドではアミドプロトンピークが観測できたので、アミドプロトンの化学シフトと水素結合との関係についても発表する予定である。

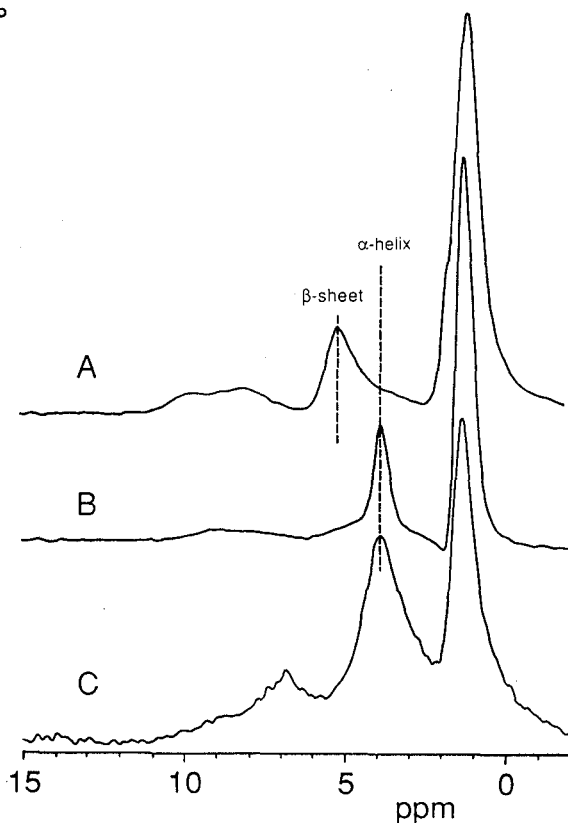


Figure 2. 300 MHz ^1H CRAMPS NMR spectra of poly(L-alanines): (A) H-[Ala]₈-NHBU (β -sheet), (B) [Ala]_n-5 (α -helix), and (C) *Antheraea Pernyi* fibroin (α -helix) in the solid state.

4. 参考文献

- (1) 莊司顯、尾崎拓男、杉沢寿志、出口健三、第34回NMR討論会講演要旨集、1-2頁、1995。
- (2) Shoji, A.; Kimura, H.; Ozaki, T.; Sugisawa, H.; Deguchi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 7604—7607.

石炭の CRAMPS 法と microimaging 法による構造解析
 新日本製鐵(株)先端技術研究所¹⁾ プロセス技術研究所²⁾
 ○齋藤公児¹⁾、畠山盛明¹⁾、古牧育男²⁾、松浦慎²⁾

The Structural Analysis of Coal by CRAMPS and Microimaging Methods
 Nippon Steel Corporation Advanced Technology Research Laboratories¹⁾
 Nippon Steel Corporation Process Technology Research Laboratories²⁾
 ○Koji Saito¹⁾, Moriaki Hatakeyama¹⁾, Ikuo Komaki²⁾ and Makoto Matsuura²⁾

Abstract: Results from two different methods(CRAMPS and Microimaging)for structural information in coal swollen with pyridine-d₅ are reported. CRAMPS spectra were deconvoluted to yield relative concentrations for individual peaks. Six separate peaks were identified. A great diversity of chemical functionality of three coal samples has been observed. In contrast, the results of Microimaging method showed spatially mapping the mobile proton distribution in coals. Two dimensional and three dimensional imaging techniques have been used. The images obtained show that considerable inhomogenities exist within the coal sample with regard to coal properties. CRAMPS and Microimaging methods give useful and important information about coal structure.

1 はじめに

石炭の分子構造はどのようになっているのかという問いかけに対して、様々な科学的な手法は、完全な答えを未だ提供できていない。NMRについても、溶媒抽出による¹H、¹³C構造解析¹⁾や¹³C固体高分解能解析²⁾、¹H広幅解析³⁾、緩和時間での解析⁴⁾等過去多くの研究がなされているが、完全な解明には至っていない。そこで我々は、少しでも石炭の分子構造の完全解明に近づくために、固体状態の試料の¹H高分解能を得る手法として注目されているCRAMPS(Combined Rotation Multi Pulse Spectroscopy)法⁵⁾と位置情報を与えるため固体材料への適応が期待されているマイクロイメージング法⁶⁾に着目し、石炭に応用していくつかの知見を得たので報告する。

2 実験

実験に用いた石炭は粘結炭であるグニエラ、非微粘結炭であるウイトバンク炭、粘結性のない非粘結炭であるオプティマムの3種類である。各々の石炭について、必要に応じて重ピリジンによる48時間の蒸気膨潤⁷⁾を行った。

CRAMPSスペクトルの測定は、Chemagnetics社製CMX-300分光計で行った。主な測定条件は、BR24のパルスシーケンスで、90度のパルス幅は1.3msec、回転速度は

石炭、CRAMPS、マイクロイメージング

○さいとうこうじ、はたけやまもりあき、こまきいくお、まつうらまこと

1.0-1.5KHz、スペクトル幅は9.3KHzであった。¹Hの化学シフトは、シリコンゴムを内部基準 ($\delta = 0.12\text{ppm}$) とした。化学シフトの測定精度は、0.1ppmであった。

マイクロイメージングの測定は、日本電子社製 α -400分光計にマイクロイメージングユニットを付帯した装置で行った。プローブは10mm対応とし、5mm試料管用のコイルを使用した。測定は室温で、パルスシーケンスは2次元及び3次元スピネコ法であり、代表的な2次元測定条件は512*512のデータサイズでスライス厚は0.5mmで、エコー時間は2msecで、パルスの繰り返し時間は0.5secであった。

3 結果と議論

1) CRAMPSの結果について

Fig.1に無処理炭で重ピリジンで膨潤した試料のCRAMPSの測定結果とその帰属と波形分離した結果を示す。帰属は、石炭の多くの研究^{1, 2, 3, 4)} から得られた知見に従った。大別すると、1.0~1.4ppm; β や γ 位メチル基など、1.8~2.5ppm; メチル基、脂肪族メチレン基など、3.5~4ppm; エーテル性メチレン基など、6.8~7ppm; 芳香族性メチン基など8.3~8.8ppm; 窒素や硫黄近傍やフェノール近傍など、10.5~12ppm; カルボン酸、ピリジン構造近傍などのようになった。石炭において通常の¹H固体NMRでは、ほぼ1本の広幅な吸収のみで、高分解能化したスペクトルは得られないが、CRAMPS法の効果が石炭に現れて高分解能化し、脂肪族と芳香族とを簡単に判別できる。またFig.2にウイトバンク炭で重ピリジンで膨潤していない試料の測定結果を示す。一般に石炭におけるピリジンでの膨潤の効果は、ピリジン分子が石炭の3次元構造に入り込み分子間相互作用等を低減しているためと考えられているが、Fig.1とFig.2の比較から、興味深いことにCRAMPSスペクトルに対しても、ピリジンでの膨潤の効果が低磁場側で明確である。

上記の方法で、3種類の石炭試料についての測定と解析と波形分離を行い、その結果をTable 1に示す。CRAMPS法は、大変再現性及び定量性が良く波形分離についても同様で、各試料について5回の測定を行ったが、5%以内の誤差であった。粘結性が高いグニエラ炭には、酸素官能基の存在量、特にカルボン酸やヘテロ官能基等が少なく、対してオプティマム炭には多いことがわかる。一般に粘結性は石炭中のmobile (軟化溶解しやすい成分) 成分が支配していると考えられ、カルボン酸やヘテロ官能基等は水素結合を引き起こす可能性が高い。fa (芳香族性値) を簡単に得られる他、従来の¹³C法ではスピニングサイドバンドの関係や感度の問題で得られにくい石炭の構造に重要なカルボン酸等の定量が、CRAMPS法で簡便にできることは非常に有用である。

2) マイクロイメージングの結果について

マイクロイメージングにおいても重ピリジンで膨潤した効果は明白である。Fig.3にオプティマム炭の¹Hのスペクトルを示すが、膨潤させたことで半値幅の低下がよくわかり、Fig.4に示したオプティマム炭のマイクロイメージングの結果にその差が良く出ている。膨潤をしていない石炭のイメージ像は全く得られなかったが、膨潤

させることでS/Nの良いイメージ像を得ることができた。白い部分はFig.3における半値幅の狭い部分にあたり、石炭の性質としてmobile成分と考えられ、粘結性のほとんどないオプティマム炭では、その存在量が少なく且つ不均一分布していることがわかった。つまりイメージングで石炭中のmobile部分の存在分布を明らかにすることができ、他の2種類の石炭を測定した結果（当日データを示す）と併せて検討した結果から、粘結性が高い石炭にはmobile成分が多く存在し、且つ均一に分布していることが明らかとなった。この結果は、先のCRAMPS法等で得られた知見と全く矛盾しない。

4 まとめ

高分子などに最近応用が展開されているCRAMPS法と生体等に展開されているマイクロイメージング法は、石炭という非常に分子レベルでは解明されていない混合物に対して、貴重な情報を与えることがわかった。鉄鋼業において、高炉法が存続する限り石炭は必須の原燃料である。石炭をコークスにして使っていかなければならない。コークス炉の寿命が21世紀初頭であるため次世代コークス炉設計のための検討が始められており、それが石炭に対して急速に熱処理する化学的な事前処理を中心としたSCOPE21プロジェクト⁸⁾である。本プロジェクトにおいて、その石炭の分子構造に及ぼすメカニズム解明に本法は適応されている。

参考文献

- 1) 例えば K.Ouchi et al Fuel Proc.Technol. 3 25 (1980)
- 2) 例えば 野村正勝ら 日本エネルギー学会誌 71 866 (1992)
- 3) K.Hayamizu et al ACS Advanced in Chemistry series No.229 296 (1993)
- 4) 例えば 真田雄三ら 第18回NMR討論会要旨集 231 (1981)
- 5) 例えば A.Jurkiewicz and G.E.Maciel Fuel 73 823 (1994)
- 6) 例えば A.G.Webb et al Fuel 72 1235 (1993)
- 7) F.Derbyshire Fuel 68 1091 (1989)
- 8) 古牧育男ら ふえらむ 1 15 (1995)

Table 1 Chemical functionality of 3 kind of coals to CRAMPS studies

(ppm)	1.0-1.4	1.8-2.5	3.5-4	6.8-7	8.3-8.8	10.5-12
Guniera coal	28.3 800	14.5 841	13.9 991	35.5 788	7.2 905	0.6 901
Wittbank coal	20.6 803	19.5 840	21.0 990	22.3 788	13.6 905	3.0 948
Optimum coal	11.5 803	17.2 838	27.5 989	20.7 788	18.6 903	4.5 997

upper : % (concentration)

low : Hz (half-width)

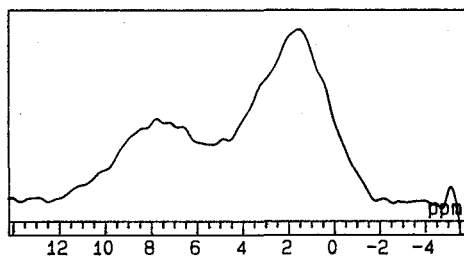


Fig.1 CRAMPS spectrum of pyridine-d₅-non-saturated coal

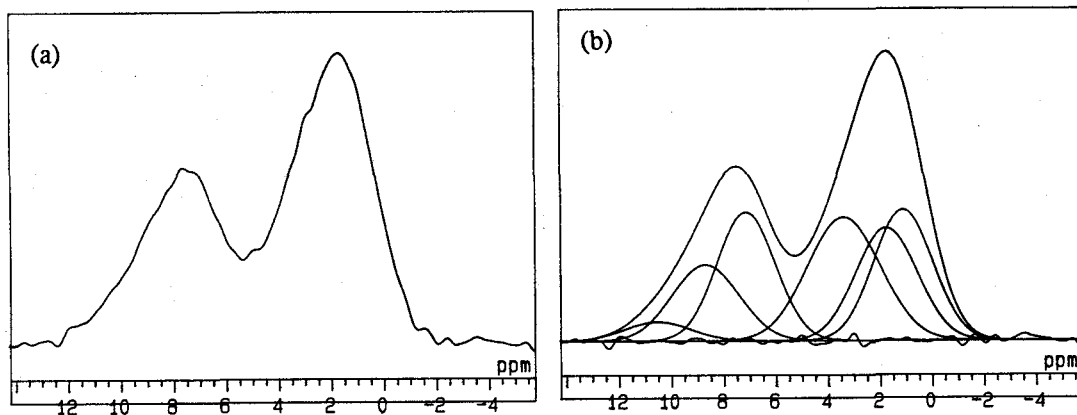


Fig.2 CRAMPS spectrum of pyridine-d₅-saturated coal(a) with deconvoluted contributions(b)

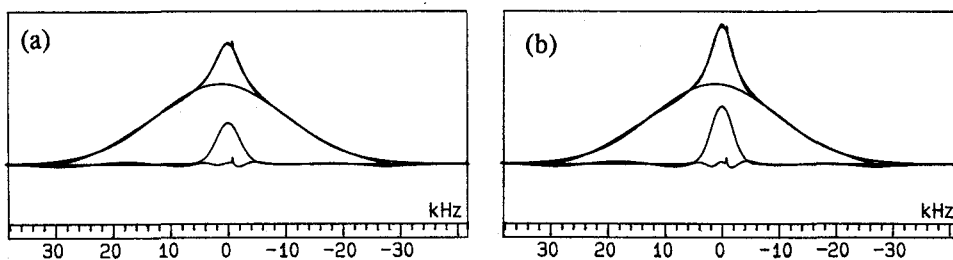


Fig.3 Proton wide line spectrum of pyridine-d₅ non- (a) and saturated coal (b)

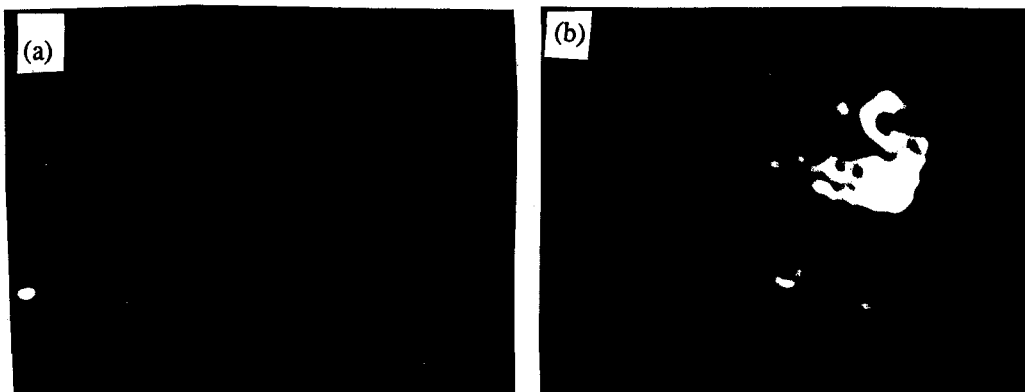


Fig.4 NMR microimages of pyridine-d₅ non- (a) and saturated coal (b)

ジエン鉄カルボニル錯体誘導体の構造解析
 — 選択的緩和法の利用 —

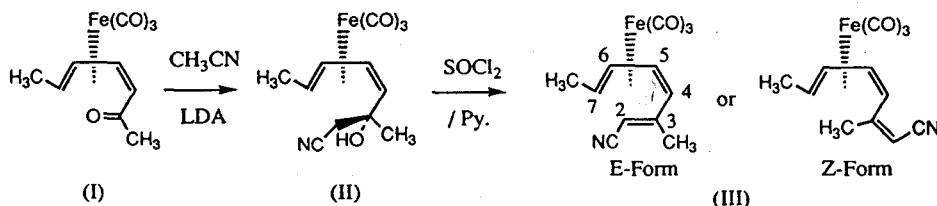
(神戸薬大) ○杉浦眞喜子, 蔡東玲, 和田昭盛, 伊藤允好

Structural and Conformational Analysis of a Dienylketone-tricarbonyliron Complex Derivative - Application of Selective Relaxation Method-

Makiko Sugiura, Tourei Sai, Akimori Wada, Masayoshi Ito
 Kobe Pharmaceutical University

Structure elucidation and conformational analyses have been carried out for dienylketone tricarbonyliron complex derivative (III). The modified selective relaxation method in which the selective non-inversion relaxation times (T_1^{SNI}) were measured to get cross relaxation (σ_{ij}), combined with the analyses of J_{H-H} and J_{C-H} , has been applied. Resulting structure of (III) is E-Form with the conformation as shown in Fig.3.

【はじめに】 ジエニルアルデヒド (またはケトン) 鉄カルボニル錯体は, 有機合成上近年とくに注目を集めている化合物である。この錯体は E,E- または E,Z- のようなジエン構造を保持したまま反応を進めることが出来るため, ポリエンの立体選択的合成に特に有用である。演者らは, 天然物合成途上以下のような鉄カルボニルケトン体と求核剤 (アセトニトリル) の付加体 (II) からの脱水素反応により生成する化合物 (III) の立体化学を明らかにする必要に迫られた。



そこで, 演者らがすでに開発している改良選択的緩和法を利用してその立体化学の決定とコンフォメーション解析を行うこととした。改良選択的緩和法は, Fig. 1 のフローチャートのように, Non-Selective T_1 (T_1^{NS}) と Selective Non-Inversion T_1 (T_1^{SNI}) の逆数の差から得られる交差緩和 (σ_{ij}) によって水素間距離 (r_{ij}) を求め, それを用いて立体化学の議論を行う方法である。

$$\frac{1}{T_1^{NS}} = R^i(\text{all}) = \sum_j R^i(ij) = \sum_j N_j \sigma_{ij} + R^i(i) = \sum_j N_j \sigma_{ij} + \sum_j N_j \rho_{ij} + \rho^i \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_1^{SNI(j)}} = R^i(k \neq j) = \sum_{k \neq j} R^i(ik) = \sum_{k \neq j} N_k \sigma_{ik} + R^i(i) = \sum_{k \neq j} N_k \sigma_{ik} + \sum_k N_k \rho_{ik} + \rho^i \quad (2)$$

$$\frac{1}{T_1^{NS}} - \frac{1}{T_1^{SNI(j)}} = R^i(\text{all}) - R^i(i \neq j) = N_j \sigma_{ij} \quad (3)$$

キーワード：ジエン鉄カルボニル錯体 選択的緩和法 交差緩和

すぎうら まきこ さい とうれい わだ あきもり いたう まさよし

この方法を化合物 (III) に適用するにあたり、必要となる分子の回転相関時間 (τ_c) は、 $^{13}\text{C}T_1$ より得ることとした。さらに、 J_{CH} の測定も行い。選択的緩和法から得られる r_{ij} と併せてコンフォーメーション解析に用いた。

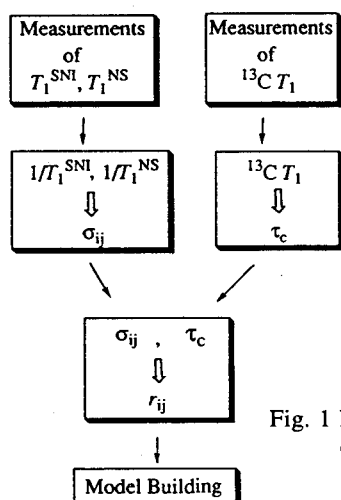


Fig. 1 Flow Chart of the Modified Selective Relaxation Method

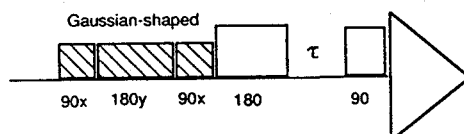


Fig. 2 A Pulse Sequence for T_1^{SNI} Measurements

【実験】 化合物 (III) は CDCl_3 に溶解し、脱ガス、溶封して測定サンプルとした。NMR の測定は Varian VXR-500 (^1H :500 MHz, ^{13}C :125MHz) を使い、 T_1^{NS} 及び $^{13}\text{C}T_1$ の測定は通常の IR 法を、 T_1^{SNI} の測定は Fig.2 に示すパルスシーケンスを用いた。Proton-coupled ^{13}C スペクトルから、一部スピンシミュレーションを行い、 J_{CH} の値を得た。

【結果と考察】 Table 1 に化合物 (III) の ^1H 化学シフト (δ_{H}) と結合定数 (J_{HH}) を、Table 2 に ^{13}C 化学シフト (δ_{C}) と C-H 結合定数 (J_{CH}) を示した。 ^1H 、 ^{13}C 化学シフト共に C_7 - C_6 - C_5 - C_4 部分についてはジエン鉄カルボニル錯体の特徴をよく示し、特に 7 位、4 位の化学シフトがいずれも異常に高磁場シフトをしている。

また Table 3 には T_1^{NS} 及び T_1^{SNI} の値を、Table 4 に $^{13}\text{C}T_1$ とそれから得られる τ_c の値を示した。Table 3 の測定値を用いて (3) 式によって得られる σ_{ij} の値及び、それらと τ_c の値より得られる r_{ij} の値を Table 5 にまとめた。これらの r_{ij} の値を満足する構造、コンフォーメーションを決めることが出来れば、それがこの化合物の構造、コンフォーメーションとなるはずである。ただしこの内の H_6 - H_5 間の距離は、予想されるよりかなり大きい。これはこれら 2 つ ^1H の化学シフトが接近しているため T_1^{SNI} の測定がうまくいっていないことによると思われる。

以上を考慮に入れた上で、分子モデルを種々検討した結果、E-Form で Fig. 3 のコンフォーメーションを取る時が、これらの水素間距離及び Table 1 の J_{HH} 、Table 2 の $^3J_{\text{CH}}$ の値を比較的良好に満足することが分かった。得られたモデルの相当する水素間距離を Table 5 に示してあるが、このコンフォーメーションは、7 位と 4 位の置換基が金属に対して反対方向にそれぞれ約 20° 程ねじれており、従来からのジエニル鉄カルボニル錯体の構造に関する知見と一致する。

Table 1. H-1 Chemical Shifts and Coupling Constants for (III)

Hi \ Hj	$\delta_{\text{Hi/ppm}}$	J_{I} / Hz						
		7Me	H7	H6	H5	H4	3Me	H2
7Me	1.533		6.5	0.1				
H7	1.989	6.5		9.5	1.0			
H6	5.418	0.1	9.5		5.5			
H5	5.322			5.5		6.7		
H4	2.944				6.7			0.7
3Me	1.888							0.7
H2	4.830					0.7	0.7	

Table 2. C-13 Chemical Shifts and C-H Coupling Constants for (III)

C \ H	$\delta_{\text{C}} / \text{ppm}$	$J_{\text{CH}} / \text{Hz}$						
		7Me	H7	H6	H5	H4	3Me	H2
7Me	19.76	127.2	2.2	4.9	0.3			
C7	60.58	5.6	161.6	2.0	8.8	0.2		
C6	95.67	5.8	2.4	165.0	1.5	9.0		
C5	78.96		3.7	1.9	171.7	1.6		
C4	57.09			9.7	3.2	152.3	4.7	9.0
C3	160.65				8.6	1.8	4.0	1.6
3Me	25.55				0.5	2.0	127.8	6.0
C2	95.36					6.7	6.0	171.3

Table 3. Observed T_1^{NS} and T_1^{SN1} Values for (III)

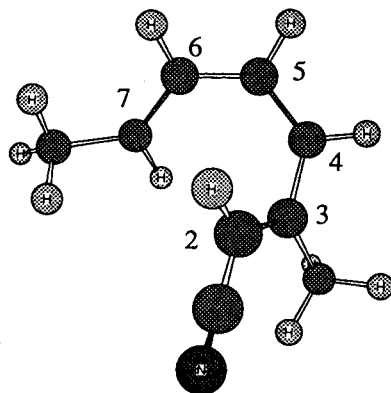
Observed (i)		7Me	H7	H6	H5	H4	3Me	H2
T_1^{NS}/s		2.294	6.764	6.785	6.349	7.643	3.315	11.050
	Selected (j)							
$T_1^{\text{SN1}}/\text{s}$	7Me		7.215	7.176	6.403	7.484	3.321	11.205
$T_1^{\text{SN1}}/\text{s}$	H7	2.333		6.993	6.385	7.803	3.290	11.917
$T_1^{\text{SN1}}/\text{s}$	H6	2.331	6.973		6.590	8.113	3.312	11.053
$T_1^{\text{SN1}}/\text{s}$	H5	2.320	6.972	6.924		8.800	3.321	11.054
$T_1^{\text{SN1}}/\text{s}$	H4	2.293	6.611	6.830	7.117		3.337	10.974
$T_1^{\text{SN1}}/\text{s}$	3Me	2.345	6.529	6.854	6.406	8.285		12.614
$T_1^{\text{SN1}}/\text{s}$	H2	2.308	6.906	6.938	6.281	7.630	3.405	

Table 4. Observed ^{13}C T_1 and The Estimated τ_c Values for (III)

	7Me	C7	C6	C5	C4	3Me	C2
CT_1 / s	3.23	2.54	2.76	2.75	2.95	7.22	2.69
$\tau_c \times 10^{11} / \text{s}$	0.48	1.84	1.69	1.70	1.58	0.22	1.74

Table 5. The Estimated cross relaxation values (σ_i) and r_i values for (III)

i	j	$\sigma_i \times 10^3$	$\sigma_j \times 10^3$	$r_i / \text{\AA}$	$r_j / \text{\AA}$	$r_i / \text{\AA}$ (Model)
H7	H6	4.43	4.39	3.20	~ 3.24	3.14
H6	H5	2.97	5.77	3.06	~ 3.42	2.47
H5	H4	17.01	17.20	2.52	~ 2.56	2.42
H2	H6	0.02	3.25	3.37	~ **	3.46
H2	H7	6.58	3.04	3.01	~ 3.45	3.20

**Fig. 3** The Estimated Model for (III)

NMR Study on Orientation and Structure of [D-Ala²]Met-enkephalin Based on the Magic-Angle and Near-Magic-Angle Spinning Two-Dimensional Spectroscopy

Atsuomi Kimurat, N. Kunitz, and Hideaki Fujiwarat

† School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

‡, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

The preferred orientation and conformation of biologically active [D-Ala²]Met-enkephalin have been studied by liquid-crystal NMR spectroscopy employing magic-angle and near-magic-angle spinning (MAS/NMAS) two-dimensional methodology. The conformation and orientation were determined in the liquid-crystal from the analysis of the ¹H-¹H direct couplings obtained under the NMAS condition and of the ¹H-¹H ROE factors obtained under the MAS condition. These data were analyzed by the minimization based on pseudoenergy analysis. While the full order matrix analysis showed two possible orientation, we could determine the preferred orientation by assuming axially symmetric motion. The comparison with the result of inactive [L-Ala²]Met-enkephalin has revealed that the tyrosine residue is not so much embedded in the liquid-crystal aggregates.

【序】 NMRによって膜中の分子構造の推定を行う際には、ミセルあるいはリポソーム等の生体膜モデルが一般に用いられてきたが、これらに比し液晶は非常に有用な系である。液晶NMRスペクトルには、液晶中に配向した分子に特有の運動の異方性にもとづく直接結合による分裂が現れるが、この直接結合は分子の構造のみならず配向に関する情報を含んでいる。したがって、超分子系における分子の構造と運動を詳細に議論できるという利点を有する。しかし、この直接結合を含むスペクトルは非常に複雑で、その解析は複雑なものとなるため液晶NMRの適用範囲は小分子(およそ9スピン程度まで)に限定されていた。

これに対し我々は、固体NMRにおいて異方性を除くために用いられるマジック角試料回転(Magic-Angle-Spinning: MAS)法を利用し二次元NMR法と組み合わせることによって、上記の液晶NMR法の適用制限を取り除くことができ¹、これまでにMet-及びLeu-enkephalinの液晶中における構造と配向を決定してきた。²そこで、本研究ではさらに活性ペプチドである[D-Ala²]Met-enkephalinの構造と配向を決定し、エンケファリンの構造-活性に関する検討を行うこととした。

【実験】 溶媒はリオトロピック液晶であるCsPFO液晶(CsPFO/H₂O/D₂O)を用い、[D-Ala²]Met-enkephalin(acetate form)を1.5%溶解させた。液晶相の確認は²H-NMRスペクトルによって行った。ROESY/MAS実験はVarian Unity-500 ナノプローブにより行った。また、NMAS条件下での測定はVarian VXR-200固体プローブを用いた。

【方法】 液晶NMRスペクトルを特徴付ける直接結合定数は(1)式で表される。

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

(キーワード)液晶NMR、エンケファリン、ROESY/MAS、Near MAS、pseudoenergy解析

○きむらあつおみ、くに なおひと、ふじわらひであき

ここで γ はプロトンの磁気回転比であり、 r_{ij} は i,j 核間距離を表す。また、 θ_{ij} は i,j 核間ベクトルと外部静磁場とのなす角度であり、(1)式における時間平均項は液晶中の構造がrigidであるとすると配向行列を用いて次式のように書き下される。

$$\frac{\langle 3 \cos^2 \theta_{ij} - 1 \rangle}{2} = \cos^2 \alpha_x^{ij} (S_{yy} - S_{zz}) + \cos^2 \alpha_y^{ij} (S_{xx} - S_{zz}) + \cos^2 \alpha_z^{ij} (S_{xx} - S_{yy}) + 2 \cos \alpha_x^{ij} \cdot \cos \alpha_y^{ij} (S_{xy}) + 2 \cos \alpha_x^{ij} \cdot \cos \alpha_z^{ij} (S_{xz}) + 2 \cos \alpha_y^{ij} \cdot \cos \alpha_z^{ij} (S_{yz}) \quad (2)$$

ここで、配向行列の要素 S_{pq} ($p,q=x,y,z$)は分子上に固定された座標軸に関する配向パラメータであり、 α_p 及び α_q は p,q 軸と核 i,j を結ぶ軸とのなす角である。この配向パラメータは任意の分子座標系において計算されるが、配向行列を対角化することにより得られる主値 S_{xx} 、 S_{yy} 及び S_{zz} は、外部静磁場(即ち、液晶超分子系の法線方向)に対する配向主軸系(x',y',z')を定義する。したがって、直接結合定数を解析することにより液晶中の分子の配向を議論することができる。(2)式における5個の独立の配向パラメータは次式で表されるpseudoenergyを最適化することにより得られる。

$$E_{DD}^i = \begin{cases} \{(D_i^{\text{calc.}}) - (D_i^{\text{exp.}} + \Delta D_i)\}^2 & \text{if } D_i^{\text{calc.}} > D_i^{\text{exp.}} + \Delta D_i \\ 0 & \text{if } D_i^{\text{exp.}} - \Delta D_i \leq D_i^{\text{calc.}} \leq D_i^{\text{exp.}} + \Delta D_i \\ \{(D_i^{\text{exp.}} - \Delta D_i) - (D_i^{\text{calc.}})\}^2 & \text{if } D_i^{\text{calc.}} < D_i^{\text{exp.}} - \Delta D_i \end{cases} \quad (3)$$

【結果と考察】

NMAS条件を利用した直接結合定数の導出と完全配向行列による解析 NMAS条件下で観測されるピークの分裂幅は次式で表されるように間接結合定数(J)と直接結合定数(D)の和となる。

$$\Delta \nu = (3 \cos^2 \theta - 1) D + J \quad (4)$$

ここで、 θ は試料回転軸と外部静磁場とのなす角度である。試料回転軸をマジック角から $+2.0^\circ$ 、 $+1.0^\circ$ 、 0.0° 、 -1.0° 、および -2.0° (即ち、それぞれ外部静磁場に対して 56.7° 、 55.7° 、 54.7° 、 53.7° 、 52.7°)傾けてHomo 2DJ実験を行い、観測された分裂幅を(4)式の角度項に対してプロットした結果の一例を図1に、また図1より求めた直接結合定数を表1に示す。

TABLE 1: Observed and Calculated Direct Couplings

vector	observed ^{a)}	calculated 1 ^{b)}	calculated 2 ^{c)}
Tyr ¹ Ar ₂ —Tyr ¹ Ar ₃	-9.6(2.3)	-11.9	-11.8
Tyr ¹ Ar ₅ —Tyr ¹ Ar ₆			
Ala ² NH—Ala ² α H	5.9(2.6)	3.3	1.3
Phe ⁴ Ar ₂ —Phe ⁴ Ar ₃	7.1(1.4)	5.7	5.0
Phe ⁴ Ar ₅ —Phe ⁴ Ar ₆			
Phe ⁴ NH—Phe ⁴ α H	6.3(1.4)	6.3	6.3
Met ⁵ NH—Met ⁵ α H	-9.6(4.0)	-5.6	-15.0

a) The standard deviations are given in the parentheses.

b) The values are fitted by 5 order parameters.

c) The values are fitted by 3 parameters($S_{z'z'}$, β and γ).

配向の計算に先立ち、300個の初期構造についてROESY/MAS実験(図2)より求めた距離情報を用いて予め構造の最適化を行い、その各々の構造について1000組の配向パラメータを発生させ、(3)式を用いて配向を計算した後で構造と配向のpseudoenergyの和を最適化した。その結果、表2に示すように2組の配向パラメータを得た。この時の直接結合定数の計算値を表1に示す。

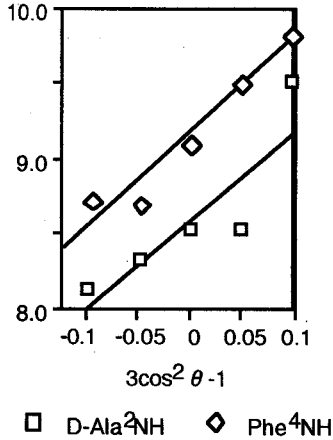


Figure 1. Dependence of splitting width upon the angle θ between the spinning axis and the external magnetic field.

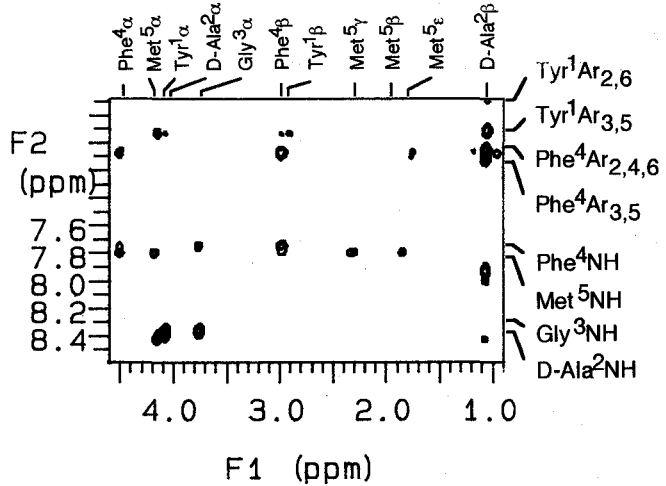


Figure 2. ROESY/MAS spectra of $[D-Ala^2]Met$ -enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal ($t_m=100ms$).

軸回転運動を仮定した3パラメータによる解析 配向主軸系(Principal Axis System of order parameters: PAS)においてz'軸に関する軸回転運動が成立していると仮定すると、独立の配向パラメータは $S_{x'x'}=-S_{z'z'}/2$ 及び $S_{y'y'}=-S_{z'z'}/2$ の関係より $S_{z'z'}$ のみとなる。この時、分子座標系における配向パラメータ(S_{mf})は次のようにPASにおける配向行列(S_{PAS})のオイラー行列(R)による直交変換によって得られるが、z'軸に関して軸回転運動を仮定しているので $\alpha=0^\circ$ となり、独立のパラメータは $S_{z'z'}$ 、 β 及び γ の3つに減じられる。

$$S_{mf} = R S_{PAS} R^\dagger$$

$$= R \begin{pmatrix} S_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & S_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & S_{zz} \end{pmatrix} R^\dagger \quad (5)$$

そこで、分子座標系を慣性主軸系にとり上記と同様に3パラメータの最適化を行ったところ収束した解を得ることができた($S_{zz}=-0.0071$, $\beta=11.7^\circ$, $\gamma=41.4^\circ$)。この時の直接結合定数の計算値を表1に併せて示す。モデル計算によって得られた $S_{z'z'}$ は負の値をとり、完全配向行列より得た値とほぼ一致したので、 $[D-Ala^2]Met$ -enkephalinの配向を表2におけるorientation 1であると結論した。

$[D-Ala^2]Met$ -enkephalinの構造と配向 以上のように決定した $[D-Ala^2]Met$ -enkephalinの構造と配向を図3に示す。 $S_{z'z'}$ の値が負でその絶対値が最も大きいことから、z'軸は液晶超分子膜の法線に直交していると考えられる。このz'軸に関してTyr側鎖の配向は、Phe及びMetの側鎖と逆の方向を向いており、 $[D-Ala^2]Met$ -enkephalinのTyr側鎖と液晶との相互作用が弱いことが示唆される。これに対し、不活性アナログである $[L-Ala^2]Met$ -enkephalinの場合、全ての側鎖は配向主軸に関して同一方向に向いていたので³、両者の際は主としてTyr側鎖と液晶との相互作用にもとづくものと思わ

TABLE 2: Principal Axes Order Parameters

	orientation 1	orientation 2
$S_{x'x'}$	0.0044	$S_{x'x'}$ -0.0025
$S_{y'y'}$	0.0016	$S_{y'y'}$ -0.0010
$S_{z'z'}$	-0.0060	$S_{z'z'}$ 0.0035

れる。

3次元構造—活性相関(3D-QSAR)解析³⁾ これまでに決定したLeu-、Met-及び[D-Ala²]Met-enkephalinの構造と配向にはいくつかの相同性が見られたので、これらのエンケファリンおよびモルヒネ関連鎮痛薬の構造よりそのδレセプター選択性についての3D-QSAR (CoMFA) 解析を行った。ここで、CoMFAとは化合物の構造から計算される3次元格子点と活性との相関を解析するもので、活性に重要な「場」を推定することができる。3D-QSAR解析の結果、得た場の等高線を図4に示す。実戦が許容領域を波線が禁制領域を示し、立体場は立体的に嵩高い置換基が活性の増強(減弱)に、また疎水場は疎水的な置換基が活性に関係する場である。立体場において2位D-Alaのメチル基は許容領域に位置するが、L-Alaのメチル基に相当する位置は禁制領域となっており、また、Tyr及びPheの芳香環の相対的な配向関係が疎水場において活性に寄与することがわかる。上記のように、液中において不活性ペプチドの配向は活性ペプチドと直交しているためPheの芳香環が活性に関係しないものと考えられる。

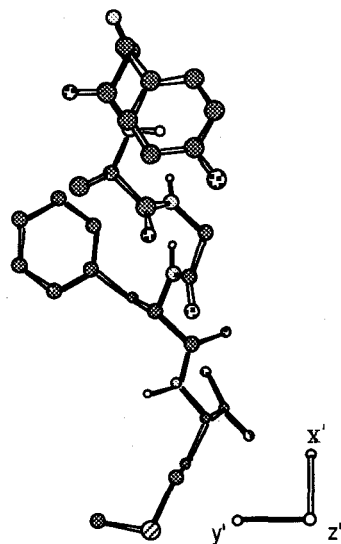


Figure 3. Structure and orientation of [D-Ala²]Met-enkephalin

a)

b)

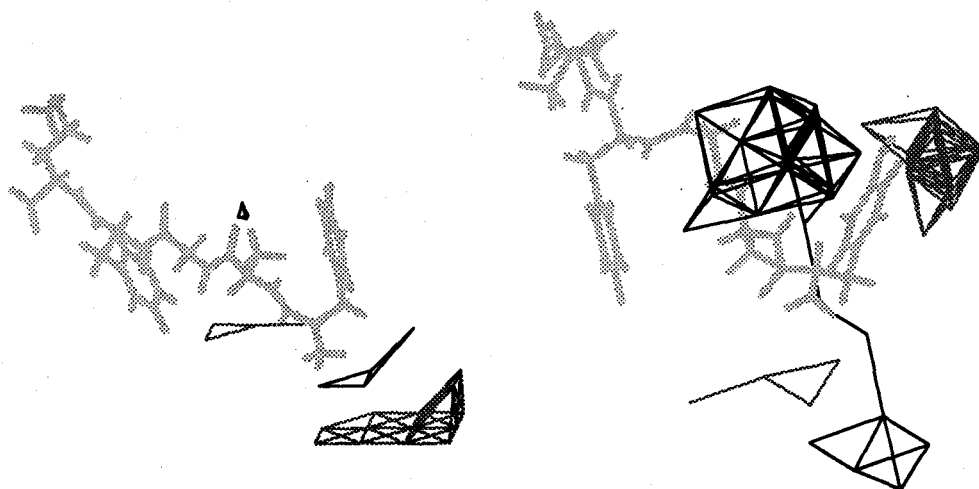


Figure 4. CoMFA field with the structure of [D-Ala²]Met-enkephalin: a) steric field, b) lipophilic field.

〈参考文献〉

- 1) a) Kimura, A.; Kuni, N.; Jikihara, T.; Fujiwara, H. *Bull. Magn. Reson.*, in press (1995).
b) Kimura, A.; Kuni, N.; Fujiwara, H. *J. Magn. Reson.* **1996**, B 112, 44.
- 2) Kimura, A.; Kuni, N.; Jikihara, T.; Fujiwara, H. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 14056.
- 3) 1996 分子構造総合討論会発表予定
- 4) 第19回構造活性相関シンポジウム発表予定

完全標識試料から距離情報を得るための 半選択的¹³C 2次元双極子相関固体NMR

(横浜国大工) ○菅瀬 謙治、藤原 敏道、阿久津 秀雄
(都立大理) 小野 明、小野 晶、甲斐荘 正恒

Two-Dimensional Semiselective Dipolar Correlation Solid-State¹³C-NMR for Obtaining the Information on Distances from Uniformly Isotope-Labeled Samples

○Kenji Sugase¹, Toshimichi Fujiwara¹, Akira Ono²,
Akira Ono², Masatsune Kainosho², and Hideo Akutsu¹

¹Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Yokohama National University

²Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University

In organic solids fully labeled with ¹³C, magnetization transfer by weak homonuclear dipolar couplings can be enhanced by suppressing the competitive strong dipolar couplings. Namely, efficient magnetization transfer needs the selectivity in the suppression tailored for the spin system targeted. We propose a π pulse train whose intervals can be optimized for the selectivity depending on the chemical shift difference and spinning frequency. 2-D NMR with the semi-selectivity by this sequence can provide information on distances for a number of spin pairs which are relevant to conformations. Experimental results are shown for 2-D correlation only between ribose and base carbons in adenosine uniformly labeled with ¹³C.

【緒言】

私たちは、安定同位体標識と多次元NMRを組み合わせることにより、固体状態の生体分子の構造情報を一度に多く得ることのできる測定法の開発を試みている。これまでの双極子相関多次元NMR法では、¹³C完全標識試料の場合、共有結合で結ばれた¹³C間の強い同種核双極子結合のためにスピン拡散や緩和が起り、双極子結合の弱い遠距離では磁化移動が観測されなかった。今回は、化学シフト差が回転共鳴条件から離れたスピン間の双極子相互作用は除去し、化学シフト差が回転共鳴条件に比較的に近いスピン間の双極子相関だけが得られる化学シフト差に半選択的な同種核双極子相関法の開発を行った。そして、この選択性が¹³C完全標識アデノシンにおいてアデニンとリボースの遠距離の情報を得るのに有効であったことを報告する。

2次元固体NMR、距離情報、安定同位体標識、マジック角試料回転、¹³C-¹³C双極子相互作用

○すがせ けんじ、ふじわら としみち、あくつ ひでお
おの あきら、おの あきら、かいのしょう まさつね

【実験】

すべてのNMR実験は、静磁場強度9.4TでChemagneticsCMX400核磁気共鳴装置を用いて行った。

¹³C同種核双極子相関¹⁾

今回、¹³C同種核双極子相関を得るために用いたパルス系列は、2次元RFDR (Fig.1) である。2次元RFDRでは、初めに交差分極CPで¹Hから¹³Cに移された磁化が、混合期において復活した¹³C同種核双極子相互作用によって¹³C-¹³C間を移動する。

Griffinらが開発したRFDR (以下RFDR-1) では、試料が1回転する間にπパルスを1回照射して、すべてのスピン間の¹³C同種核双極子相互作用をほぼ一様に復活させる。そのために、RFDR-1では化学シフト差の小さいスピン間でも磁化移動を生じ、効率的な磁化移動が実現されない。そこで、試料が8回転する間にπパルスを1回照射するようにパルス系列 (以下RFDR-8) を改良した。このように試料回転に対してπパルスの数を減らすと、選択的なrotational resonanceに近づき、RFDR-8では回転共鳴条件に近い化学シフト差のスピン間で選択的に磁化移動することができる。このことは、スピン系に合わせてπパルスの数により選択性を変えられることを意味している。

今回は、この選択性を¹³C完全標識アデノシン (Fig.2) のアデニンとリボースがsynかantiのどちらの構造であるかを決定するのに適用した。ここでは、特にC8とC5'に着目し、この距離から構造を決定しようと考えた。C8とC5'との距離は比較的離れているために、¹³C-¹³C双極子結合はリボースの¹³C-¹³C双極子結合より10倍以上弱く、これまでの測定法では、その距離情報を得ることが難しかった。しかし、アデニン由来のシグナルは120.8~154.8ppmに、リボース由来のシグナルは63.2~92.6ppmに固まって現れ、さらに、両者のシグナルは比較的離れているので、RFDR-8を用いるとリボース間の¹³C-¹³C双極子結合をデカップリングしながらアデニン (C8) とリボース (C5') 間の

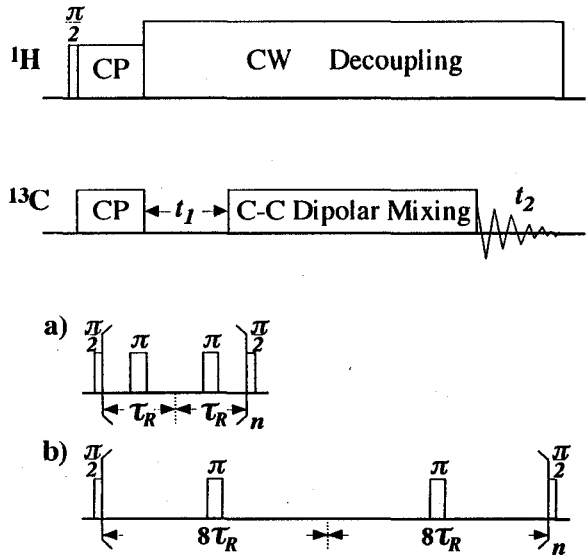


Fig. 1 Pulse Sequence for 2-D RFDR C-C Dipolar Mixing; a) RFDR-1, b)RFDR-8

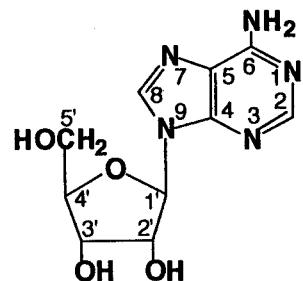


Fig.2 Structure of Adenosine

距離情報を得ることができる。

実際の実験では、2チャンネルブロードバンド用CP/MASプローブで約40mgの標識アデノシンに対してMAS条件下で測定を行った。試料回転周期は、C5'-C8シグナルの化学シフト差が7520Hzであるから、スピニングサイドバンドの重なりも考慮に入れて8kHzとした。また、 ^{13}C RF強度は50kHz、 ^1H デカップリング強度は70kHzである。CPの接触時間は2.5ms、混合時間は16ms、積算繰り返し時間は40s、1つのFIDを得るための積算回数は8回である。

【結果】

磁化移動の試料回転周期依存性

Fig. 3に、RFDR8による磁化移動の試料回転周期依存性を示す。これは、1次元RFDR-8でDANTEによりC8を選択的に励起し、C5'からC8に移動した分の磁化を試料回転周期6250Hz~8250Hzについてプロットしたものである。C5'-C8双極子結合は約100Hzと小さいのに関わらず、回転周波数が回転共鳴条件 (C5'-C8の化学シフト差7250kHz) 近傍 $\pm 0.5\text{kHz}$ (10ppm)の帯域で磁化移動が観測されている。一方、回転共鳴条件から $\pm 1\text{kHz}$ 以上離れると双極子結合の効果は1/10以下に抑制されている。すなわち、このグラフからもRFDR-8は、化学シフト差に半選択的に双極子相互作用を復活させ、磁化を移動できることがわかる。

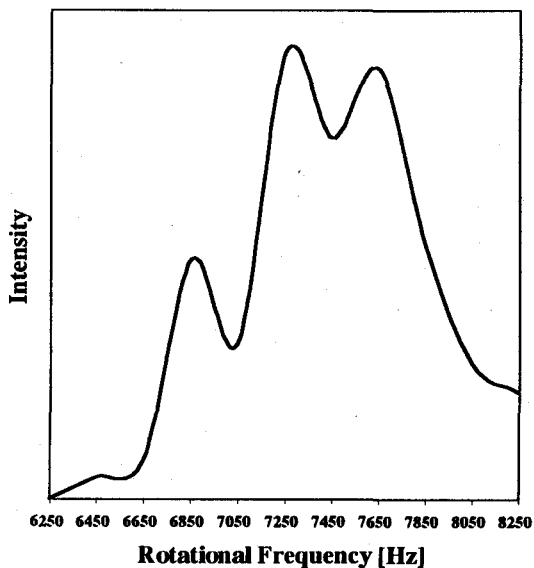


Fig. 3 Transferred Magnetization as a Function of Rotational Frequency

2次元RFDRスペクトル²⁾

標識アデノシンの2次元RFDRスペクトルをFig.4 (left, RFDR-1; right, RFDR-8) に示す。縦軸、横軸ともに ^{13}C の化学シフトである。RFDR-1のスペクトルでは、強い ^{13}C 同種核双極子相互作用と、RFDR-8に比べてパルスが多いためにリボースの領域 (63.2~92.6ppm) の対角ピークがほとんど消失している。また、アデニンとリボース間の相関ピークも、C1'とアデニンとの相関ピークを除けば何も現れていない。

一方、RFDR-8のスペクトルでは、半選択的に双極子相互作用を復活させているためにリボースの対角ピークも残っている。さらに、リボース間の双極子結合は抑制されているのでリボース間の相関ピークは現れずに、今回着目しているC5'-C8のようなアデニンとリボースの相関ピークが現れている。C5'-C8以外にも、C2'-C4, C3'-C4, C3'-C6の相関ピークが現れており、これらのピークからも、RFDR-8は回転共鳴条件近

傍の一定帯域で磁化を移動できることが分かる。

C5'-C8の距離は*syn*のときで約5.5 Å、*anti*のときで約4 Åであるが、シュミレーションの結果から、4 Åの距離では半選択的に復活させた双極子相互作用により¹³C-¹³C間を磁化が移動するが、5.5 Åでは距離が遠いためほとんど磁化移動しないことがわかっている。したがって、C5'-C8の相関ピークが現れたことは、アデニンとリボースが*anti*の構造をとっていることを意味する。

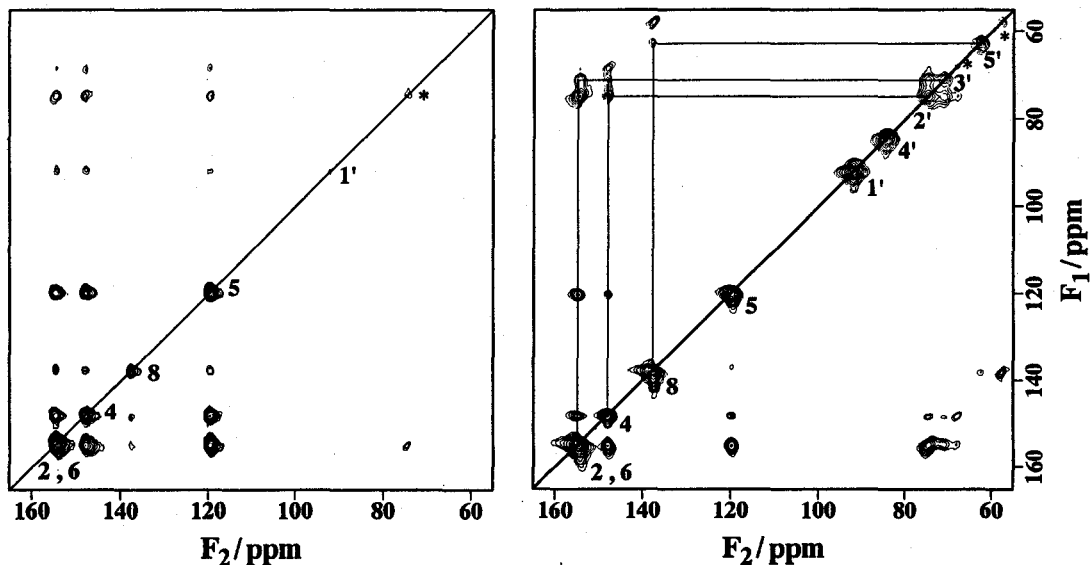


Fig.4 2-D ¹³C-¹³C Dipolar Correlation spectra Using RFDR
 at $\tau_{\text{mix}}=16\text{ms}$ and $\tau_{\text{R}}=8\text{kHz}$ *; Spinning Side Band

【考察】

完全標識試料と多次元双極子相関固体NMRを組み合わせた測定法では、一度に多くの情報を得ることができる。RFDRでは、すべてのスピン間の同種核双極子相互作用をほぼ一様に復活させているために、共有結合で結ばれたスピン間の双極子結合が、立体構造情報を与えるスピン間の結合と比べて極めて強くなっている。そのため比較的距離の離れたスピン間では磁化が移動する前にスピン拡散や緩和が起きてしまい、その距離情報を得ることが難しい。しかし、今回の手法を標識アデノシンのように化学シフトも距離も離れたスピンの存在する試料に適用すると、¹³C完全標識試料について通常のRFDRでは得ることのできなかつた距離情報が得られる。また、それと同時にrotational resonanceよりも広い帯域で、双極子結合による磁化移動を生じさせることができ、1回の実験で多くの情報が期待される。

【参考文献】

- 1) Janet M. Griffiths et al. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10178-10181 (1994)
- 2) B. F. Lai et al. *Acta Cryst.* **B28**, 1982-1989 (1982)

(財) 高分子素材センター 先進材料研¹、東工大工²、群馬大工³
 ○黒木重樹¹、水谷高彰²、安藤勲²、荘司顯³、尾崎拓男³

Solid State ^{17}O NMR Spectrum by High-Speed Magic Angle Spinning Method

(Advanced Polymer Lab., Japan High Polymer Center¹,
 Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology²,
 and Department of Biological Sciences, Gunma University³)
 S.Kuroki¹, T.Mizutani I.Ando², A.Shoji³, and T.Ozaki³

We demonstrate the high-speed magic-angle sample spinning experiment in obtaining ^{17}O solid-state NMR spectra. Typical quadrupolar MAS spectrum pattern was obtained at 40.69MHz for $\text{Mg}(\text{OH})_2$ spun at 15kHz. From theoretical simulation, we could obtain three NMR parameters, $e^2qQ/h=6.8\text{MHz}$, $\eta=0.0$, and $\delta_{\text{iso}}=25\text{ppm}$, respectively.

1. 緒言

^{17}O 核のような四極子核の固体の粉末NMRスペクトルは2次の核四極子相互作用と化学シフト異方性相互作用が重なり、核四極子結合定数(e^2qQ/h)、電場勾配の非対称パラメータ(η)、化学シフトテンソルの3つの主値(δ_{11} , δ_{22} , δ_{33})、2つの相互作用間のオイラー角(α, β, γ)、合計8つのNMRパラメータをもつ複雑な線形となり解析が困難である。通常マジック角回転によって化学シフト異方性相互作用を消去すれば核四極子結合定数(e^2qQ/h)、電場勾配の非対称パラメータ(η)、等方平均化学シフト(δ_{iso})の3つNMRパラメータのみで決定される単純な線形になるはずであり、 ^{23}Na や ^{29}Al などはMASによる測定が成功している。しかし、 ^{17}O 核の場合、核四極子結合定数(e^2qQ/h)が数MHzのオーダーであるため、4.7~11.7T程度の磁場中、数kHzの回転では0次の信号と1、-1次のサイドバンドが重なってしまい解析できない。そのため、MASによる測定はほとんど行われていない。DOR法、DAS法などにより、isotropicな信号を検出する方法もあるが、回転速度の問題はこれらの方法にも影響を及ぼす。また最近、FrydmanとHarwoodによって半整数四極子スピンをもつ核スピンの対するmultiple/single-quantum correlationを利用したisotropicな信号を検出する優れた方法が提唱されたが、実際これらの方法も四極子結合定数を最初に求めておかなければ化学シフトを得ることができず、この方法単独で成立するわけではない。今回、試料をマジック角で高速回転することにより0次の信号と1、-1次のサイドバンドの信号を分離し測定することに成功した。

2. 実験

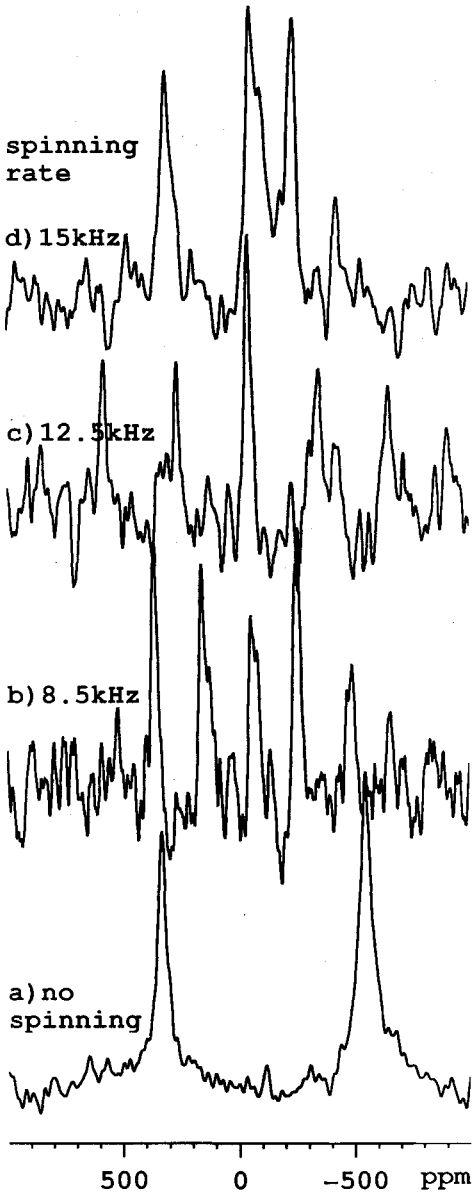
^{17}O NMRスペクトルの測定はBruker社製4mmMASプローブ付属のGSX300分光器で行った。4mmMASプローブで試料を15KHzで回転することが可能である。 ^{17}O の共鳴周波数は40.67MHzである。パルスシーケンスはCP法およびHedigerらによるD-AMCP法を用いた。

高速MAS法、 ^{17}O スペクトル、ペプチド

くろきしげき、みずたにたかあき、あんどういさお、しょうじあきら、おざきたくお

3.結果と考察

Fig.1に $Mg(OH)_2$ の試料の回転速度を変化させて測定した ^{17}O CPNMR スペクトルを示す。a)は静止スペクトルで 332.6ppm、-543.5ppm に peak top をもつ広い幅を持つスペクトルが観測される。b),c)はそれぞれ 8.5kHz および 12.5kHz で測定したものであるが、この程度の回転速度では典型的な四極子核の MAS スペクトルパターンは得られていない。



d)は回転速度 15kHz で観測したものでこの回転速度ではじめて典型的な四極子核のMAS スペクトルパターンが得られている。d) の実測スペクトルを用いて、スペクトルシミュレーションを行った。その結果を Fig.2 に示す。 $e^2qQ/h=6.8MHz$ 、 $\eta=0.0$ 、 $\delta_{iso}=25ppm$ であることがわかった。これらの値は粉末スペクトルによって行われた結果と一致している。なお、ペプチド(グリシルグリシン等)に関しては今実験が進行中であり、講演で紹介する。

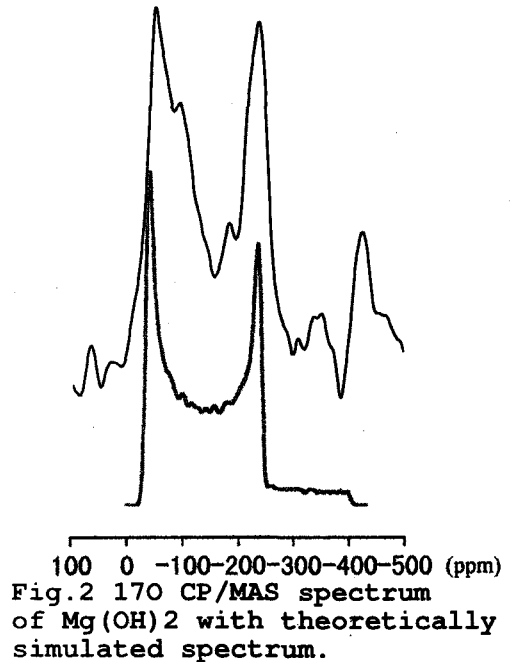


Fig.1 ^{17}O CP spectra of $Mg(OH)_2$ at various spinning rates.

1P3 Modulatory resonance recoupling of heteronuclear dipolar interaction
under magic angle spinning

(京大院理) ○武田和行、竹腰清乃理、寺尾武彦

Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Kyoto University, Kyoto 606-01

○Kazuyuki Takeda, K. Takegoshi, and T. Terao

Abstract: A new solid-state NMR scheme to reintroduce heteronuclear dipolar interactions under magic-angle spinning is proposed, in which amplitude-modulated rf irradiation is applied at the Larmor frequency of one of spin species with the modulation frequency adjusted to the spinning frequency. The notable feature of this technique is that the effect of rf field inhomogeneity on the lineshape is small as compared to techniques so far proposed. This is because the recoupling condition does not involve the intensity of the rf field. This new method is demonstrated for $2\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -doubly labeled glycine.

Introduction

Recently, several techniques have been developed to observe dipolar interactions which have been averaged out by magic-angle spinning(MAS). In these methods, the geometric part of the dipolar interaction modulated by MAS is interfered with the spin part in a certain way, making a part of the dipolar Hamiltonian time-independent. Here we propose a new scheme to recouple heteronuclear dipolar interaction based on the same principle. In this method, on-resonance amplitude-modulated continuous rf irradiation is applied at one of spin species. We show in this work that when the modulation frequency ν_{AM} matches $n\nu_r$ ($n = 1, 2$), where ν_r is the MAS frequency, the irradiated spin recouples to the rest of the spin. This phenomenon may be called as *MOdulatory REsonance*(MORE)[1].

Theory

We consider a dipolar-coupled heteronuclear 2-spin system I and S subjected to amplitude-modulated continuous rf irradiation at the I spin. For simplicity, we neglect chemical shift anisotropies. The total Hamiltonian viewed from a reference frame doubly rotating at their respective Larmor frequencies is given as

keywords: solid-state NMR, heteronuclear dipolar interaction,
amplitude-modulated rf irradiation, magic-angle spinning

○たけだ かずゆき、たけごし きよのり、てらお たけひこ

$$H(t) = H_{rf}(t) + H_d(t). \quad (1)$$

The first term denotes the rf interaction and written as

$$H_{rf}(t) = 2\pi\nu_1 \cos(2\pi\nu_{AM}t + \psi)I_Y, \quad (2)$$

where ν_1 is the intensity of the amplitude-modulated rf irradiation, ν_{AM} is the modulation frequency, and ψ is the initial phase of the modulation. The second term represents the truncated heteronuclear dipolar interaction:

$$H_d(t) = D(t)I_ZS_Z, \quad (3)$$

where $D(t)$ is the geometric part of the dipolar interaction modulated by MAS:

$$D(t) = d[G_1 \cos(2\pi\nu_r t + \phi + \gamma) + G_2 \cos(4\pi\nu_r t + 2\phi + 2\gamma)], \quad (4)$$

with $G_1 = \sqrt{2}\sin(2\beta)$ and $G_2 = \sin^2\beta$, where β and γ describe the orientation of the internuclear vector in a coordinate system fixed in the rotor, ϕ is the initial phase of the rotor, ν_r is a spinning frequency of MAS, and d is the dipolar coupling constant $(\mu_0/4\pi)(\gamma_I\gamma_S\hbar/r^3)$. By transforming $H_d(t)$ into the interaction frame with respect to $H_{rf}(t)$, we can express the dipolar interaction as

$$\widetilde{H}_d(t) = D(t)\left\{\cos\left[\frac{\nu_1}{\nu_{AM}}\sin(2\pi\nu_{AM}t + \psi)\right]I_ZS_Z - \sin\left[\frac{\nu_1}{\nu_{AM}}\sin(2\pi\nu_{AM}t + \psi)\right]I_XS_Z\right\}. \quad (5)$$

A recoupling of the heteronuclear dipolar interaction is achieved when the MORE condition $\nu_{AM} = n\nu_r$ ($n = 1, 2$) is satisfied, leading to time-independent zero-th order average Hamiltonian in the case $n = 1$ as

$$\widetilde{H}_d^{(0)} = dG_1J_1\left(\frac{\nu_1}{\nu_r}\right)\sin(\phi - \psi + \gamma)I_XS_Z + dG_2J_2\left(\frac{\nu_1}{\nu_r}\right)\cos(2\phi - 2\psi + 2\gamma)I_ZS_Z, \quad (6)$$

where J_1 and J_2 are Bessel functions. In the above expression, ν_1 that gives the maximum value of $J_1(\frac{\nu_1}{\nu_r})$ and $J_2(\frac{\nu_1}{\nu_r})$ is $\nu_1 \sim 1.8\nu_r$ and $\nu_2 \sim 3.2\nu_r$, respectively. Due to the orientational dependence in G_1 and G_2 , it is difficult to calculate the best ν_1 for the maximum recoupling. However, as will shown experimentally below, a MORE spectrum is insensitive to a slight change in the ν_1 value. Hence, we suggest to set $\nu_1 \sim 2.5\nu_r$.

For the MORE condition $\nu_{AM} = 2\nu_r$, the zero-th order average Hamiltonian becomes simpler:

$$\widetilde{H}_d^{(0)} = dG_2J_1\left(\frac{\nu_1}{2\nu_r}\right)\sin(\psi - 2\phi + 2\gamma)I_XS_Z. \quad (7)$$

In this case, the maximum recoupling is achieved when $\nu_1 \sim 6.2\nu_r$.

There are more MORE conditions, that is, $\nu_{AM} = \nu_r/(n+1)$, $\nu_{AM} = \nu_r/(2n+1)$, $\nu_{AM} = 2\nu_r/(2n+1)$ with $n = 1, 2, \dots$, although the recoupling efficiencies for larger n are small.

Experimental

$2\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -doubly labeled glycine was kindly given by Professor M. Kainosho at Tokyo Metropolitan University. Experiments were performed on a modified JEOL GSX-200 NMR spectrometer, operating at 200MHz for ^1H , 50MHz for ^{13}C , and 20MHz for ^{15}N using a home-built ^1H - ^{13}C - ^{15}N triply tuned MAS probe.

Figure 1 shows the pulse sequence used in this work. The ^{13}C transverse magnetization created by CP is observed under the on-resonance amplitude-modulated continuous rf irradiation to the ^{15}N together with a high-power ^1H decoupling. For comparison we have also carried out a rotary resonance experiment, in which the intensity of the rf irradiation onto the ^{15}N is constant and adjusted to ν_r .

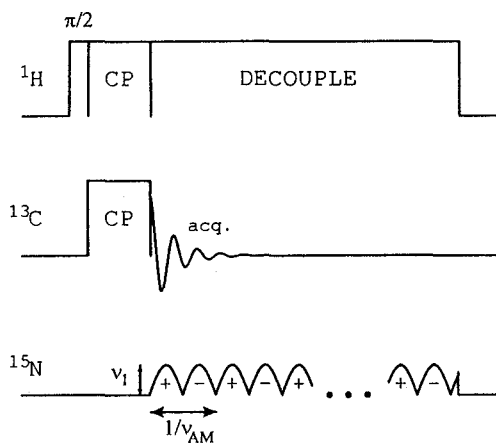


Fig.1 Pulse sequence for the modulatory resonance(MORE) experiment. The pulse sequence is applied under magic angle with a spinning frequency ν_r . The amplitude ν_1 of the rf field applied to ^{15}N spins is modulated with an audio frequency ν_{AM} . When $\nu_{AM} = \nu_r$ or $2\nu_r$, the ^{13}C - ^{15}N dipolar interaction can be reproduced.

Results and Discussion

Figs.2 (a), (b), (c), and (d) shows the conventional ^{13}C CP MAS spectrum, the spectrum obtained under the MORE condition of $\nu_{AM} = 2\nu_r$, that of $\nu_{AM} = \nu_r$, and the simulated MORE spectrum for $\nu_{AM} = \nu_r$ by multistep method, respectively. Except for the central peak, the simulation agrees with the observation. The distance between the two spins can be obtained by fitting simulated lineshapes to the outer profile of observed lineshapes. On the other hand, the rotary resonance method enables us to obtain the internuclear distance simply by measuring the splitting of the spectrum rather than fitting the simulated lineshapes. In this case, however, the intensity of the rf field ν_1 must be

adjusted in accuracy. Spectra obtained with the matched and the mismatched rotary-resonance conditions are shown in Figs.3(a) and (b). A deviation of only 200Hz from the rotary resonance condition disturbs the lineshape exceedingly. In contrast, the MORE spectra for $\nu_{AM} = \nu_r$ with $\nu_1 = 4740\text{Hz}$ and $\nu_1 = 5200\text{Hz}$ are shown in Figs.4(a) and (b). Even a deviation of 400Hz in ν_1 does not make a discernible change in the spectrum. In this case, where the values of ν_1 give nearly maxima of both $J_1(\frac{\nu_1}{\nu_r})$ and $J_2(\frac{\nu_1}{\nu_r})$, slight deviation in ν_1 does not make appreciable change in the average Hamiltonian Eq.(6) and thus in the lineshape.

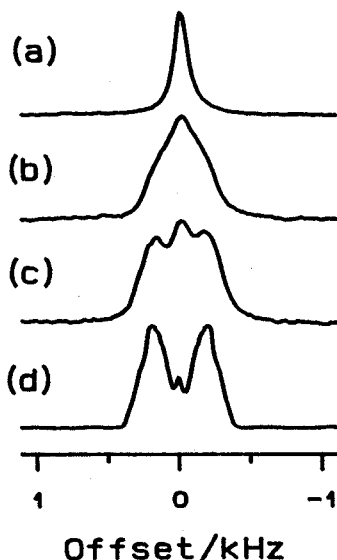


Fig.2 (a) The conventional ^{13}C CP MAS spectrum of 2- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - doubly labeled glycine, the spectra obtained under the MORE condition of (b) $\nu_{AM} = 2\nu_r$ and (c) $\nu_{AM} = \nu_r$, and (d) the simulated spectrum for $\nu_{AM} = \nu_r$. The spinning frequency ν_r was $2200 \pm 3\text{Hz}$ and the ν_1 for the MORE was 5200Hz.

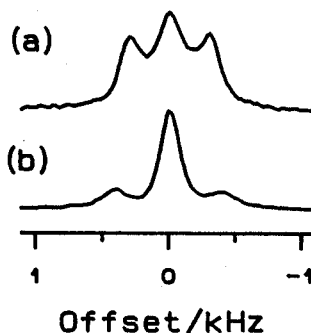


Fig.3 (a) The rotary resonance spectrum obtained at $\nu_1 = \nu_r = 3200\text{Hz}$. The spectrum (b) was obtained at a slightly off-rotary-resonance condition of $\nu_1 = \nu_r - 200\text{Hz}$.

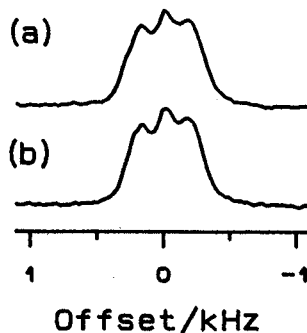


Fig.4 The MORE spectra obtained at $\nu_{AM} = \nu_r = 2200\text{Hz}$. The ν_1 was (a) 4740Hz and (b) 5200Hz, respectively.

Reference

1. Chem.Phys.Lett. 260, 331(1996)

Structural Analysis by Solid State ^{13}C - ^{13}C Homonuclear Correlation NMR

Experiments

Kaoru Nomura, K. Takegoshi, and T. Terao

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University,

Kyoto 606-01, Japan

Abstract : We demonstrate determination of a bond angle and a dihedral angle by multidimensional correlation NMR experiments in triply ^{13}C enriched L-alanine. A recent selective-recoupling method R2TR [1] (Rotational Resonance in the Tilted Rotating frame) for the homonuclear dipolar interaction under magic angle spinning (MAS) is applied to selectively observe the dipolar interaction and transfer the magnetization.

固体NMR法の特徴の一つは、核スピン間に働く各種相互作用が異方性を持つことである。これは、核スピンの座標や結合の方向に大きく依存している。化学シフトの異方性の方向は、一般に分子面や結合方向と相関がある。例えば、ペプチド結合におけるカルボキシル炭素の最大遮蔽方向 (σ_{33} 軸) はペプチド平面にはほぼ垂直な方向であり、真ん中の主値に相当する方向 (σ_{22} 軸) は酸素との結合方向にはほぼ等しい。また、双極子相互作用は核間ベクトルの方向に大きく依存している。このような異方的な相互作用を2次元相関粉末パターンにより結び付ける方法がErnstらにより報告[2]されて以来、いくつかの多様な実験が試みられている[3]。我々は、これまでに多スピン系において、これらの異方的相互作用をマジックアングルスピンニング(MAS)下で時間平均することで一旦消しておいてから一対の同種核スピン間に働く双極子相互作用のみを選択的に復活させる方法(R2TR法)を開発した。本研究では、 ^{13}C 同種核スピンに対して双極子相互作用の選択的な観測と混合期における選択的な磁化の移動にこのR2TR法を用い、 ^{13}C でトリプルラベルしたL-アラニン分子($\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$)を試料として2次元相関粉末パターンにより結合角と二面体角を決定する方法を開発したのでこれを報告する。

多次元固体NMR法 / R2TR法 / 構造解析 / 結合角

のむらかおる、たけごしきよりの、てらおたけひこ

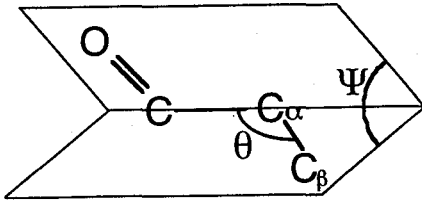


Fig.1 a diheadral angle and a bond angel in the L-alanine molecule.

1. 2次元 ^{13}C - ^{13}C 同種核双極子/ ^{13}C 化学シフト異方性相関NMR粉末パターンによる二面体角の決定

用いたパルスシーケンスを図3に示す。 t_1 次元の前にカルボキシル炭素を選択的に消した。MASの回転周波数を5717Hzに設定し、メチン炭素—メチル炭素の等方的化学シフトの平均値に強度2608Hzのラジオ波を照射することで、選択的にメチン炭素—メチル炭素核間の双極子相互作用で t_1 だけ時間推進した。さらに、混合時間でカルボキシル炭素の化学シフトの等方値から9000Hz高磁場側に強度4000Hzのラジオ波を照射することにより、カルボキシル炭素—メチル炭素間の双極子相互作用を選択的に復活させ、メチル炭素からカルボキシル炭素へ選択的に磁化を移動した。 t_2 次元においては、Tyckoらによって報告された 6π パルスシーケンス[4]を用いてカルボキシル炭素の化学シフト異方性で時間推進した。

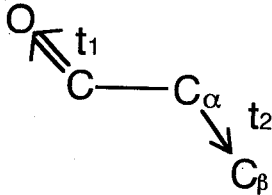


Fig.2 Schematic representation of the time dimension and the anisotropic interaction for the ^{13}C - ^{13}C dipolar/ ^{13}C CSA 2D powder pattern.

図4にこれを2次元フーリエ変換した結果得られた2D粉末パターンを示す。F1軸にはメチン炭素—メチル炭素核間の双極子粉末パターンが、F2軸にはカルボキシル炭素の化学シフト異方性粉末パターンが現れる。図4.(b)は二面体角が 64.2° の時のシミュレーション結果である。実験より得られた粉末パターンとよい一致を示している。

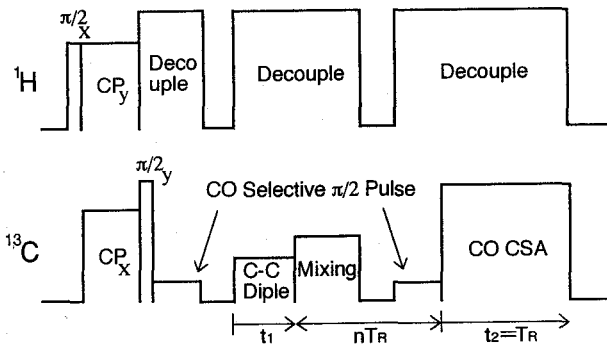


Fig.3 Pulse-sequence for obtaining ^{13}C - ^{13}C dipolar / ^{13}C CSA 2D powder patterns in rotating solids. For the cross polarization and decoupling, rf field strengths of 121.5kHz and 74kHz were employed respectively. The NMR experiments were carried out on a Chemanetics CMX-300 spectrometer operating at a resonance frequency of 75.6kHz for ^{13}C .

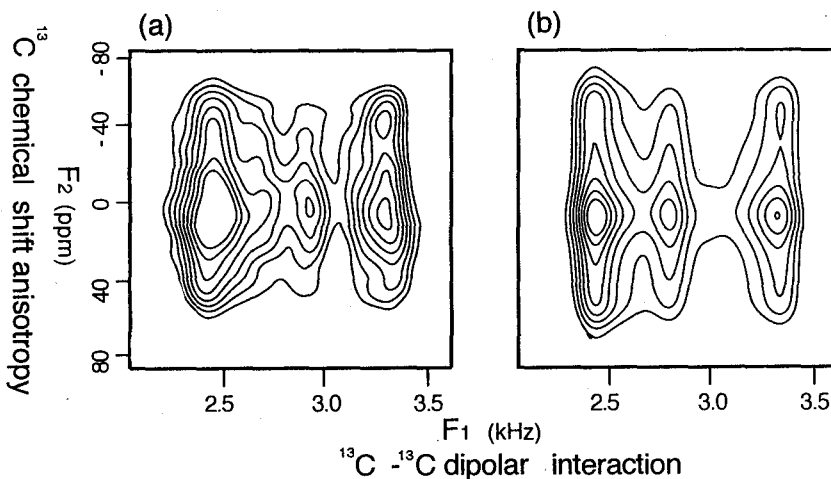


Fig.4 ^{13}C chemical shift/ ^{13}C - ^{13}C dipolar 2D powder patterns of ^{13}C enriched L-alanine.
 (a) Experimental spectrum.(b)Corresponding Simulated spectrum of Fig.4(a).

2. 2次元 ^{13}C - ^{13}C 同種核双極子/双極子相互作用相関NMR粉末パターンによる結合角の決定

用いたパルスシーケンスを図6に示す。MASの回転周波数を10.5KHzに設定し、 t_1 次元でカルボキシル炭素—メチン炭素の、 t_2 次元でメチン炭素—メチル炭素の等方的化学シフトの平均値にそれぞれ強度5118Hz、2167Hzのラジオ波を照射した。こうして、各々の次元でそれぞれの炭素核間に働く双極子相互作用で選択的に時間推進した。 t_3 次元で、 ^{13}C の等方シフトで2次元スペクトルを分離した。

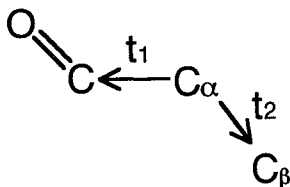


Fig.5 Schematic representation of the time dimension and the anisotropic interaction for the ^{13}C - ^{13}C dipolar/dipolar 2D powder pattern.

3DF Tの後、得られた3DスペクトルのF3軸においてメチン炭素の化学シフトの等方値でのスライスを見ることで、F1軸にはカルボキシル炭素—メチン炭素核間の双極子粉末パターンが、F2軸にはメチン炭素—メチル炭素核間の双極子粉末パターンが現れる。この2Dスペクトルの相関をシミュレーションと比較し、最もフィットするパターンを選びそのパラメータより、結合角を決定する。図7に結果を示す。図7.(b)は結合角が111.2°の時のシミュレーション結果である。実験より得られた粉末パターンとよい一致を示している。

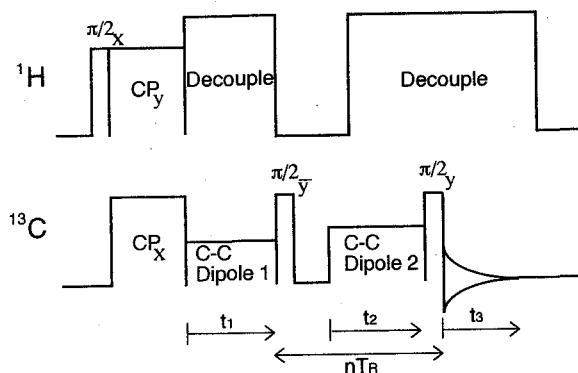


Fig.6 Pulse-sequence for obtaining ^{13}C - ^{13}C dipolar / dipolar 2D powder patterns in rotating solids. For the cross polarization and decoupling, rf field strengths of 62.5kHz and 71.4kHz were employed respectively. The NMR experiments were carried out on a Chemanetics CMX-300 spectrometer operating at a resonance frequency of 75.6kHz for ^{13}C .

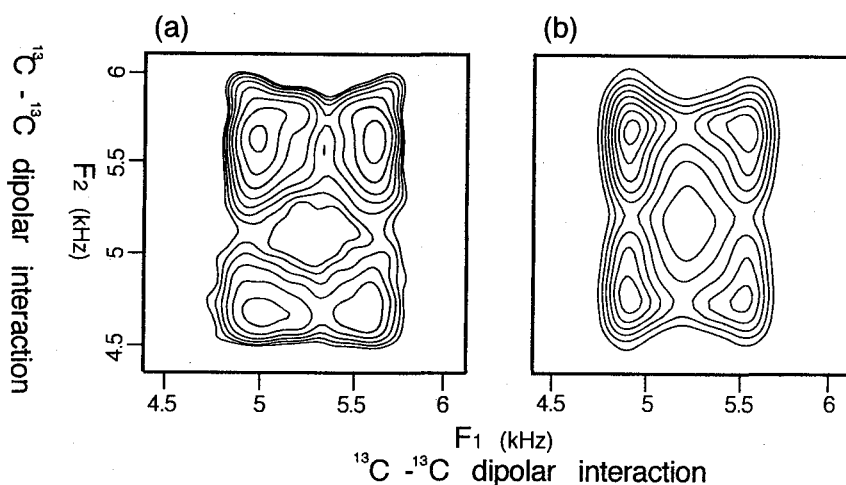


Fig.7 ^{13}C - ^{13}C dipolar/dipolar 2D powder patterns of ^{13}C enriched L-alanine. (a) Experimental spectrum. (b) Corresponding Simulated spectrum of Fig.7(a).

Reference

1. K.Takegoshi, K.Nomura, and T.Terao, Chem. Phys. Lett. **232**,424 (1995).
2. M.Linder,A.Hohener, and R.R.Ernst, J.Chem. Phys. **73**,4959 (1979).
3. T.Nakai, J.Ashida, and T.Terao, J.Chem. Phys. **88**,6049 (1988).

T. Shimomura, T.Fujiwara, H.Akutu, Proceeding of the 34rd NMR symposium (Tukuba 1995).

Y. Ishii and T.Terao, Chem. Phys. Lett. **256**,133 (1996).

4. R.Tycko, G.Dabbagh and P.A.Mirau, J. Magn.Reson. **85**,3816 (1989).

固体NMRにおける体積磁化率効果と 表面NMRへの応用

(京大院理1、マインツ大化学2) ○久保厚1、Thomas P. Spaniol 2、西山裕介1、
寺尾武彦1

Bulk-susceptibility effect in solid-state NMR and its application to surface NMR experiments, (Kyoto Univ.¹, Univ. of Mainz²) Atsushi Kubo¹, Thomas P. Spaniol², Yusuke Nishiyama¹, and Takehiko Terao¹

Abstract Bulk-magnetic-susceptibility (BMS) shift tensor is calculated for a cubic single crystal sample and for non-spherical sample containers. The anisotropy of the BMS shift tensor becomes larger near surfaces. Thus this shift can be used to image the spatial distribution of liquid molecules in a paramagnetic solution filled between packed particles with well-characterized size as silica beads.

Introduction

Sample bulk magnetic susceptibility (BMS) creates demagnetizing field [1-3] and causes the broadening of NMR resonance line. Especially this effect is significant in paramagnetic solids and can alter the spinning sideband (SSB) pattern of Magic-Angle-Spinning (MAS) NMR spectra.[4,5] The magnitude of the BMS shift has to be estimated for an accurate determination of paramagnetic dipolar shift tensor from SSB patterns. Recently the distribution of the BMS shift in a polycrystalline sample has been calculated by Schwerk et al.[6] In the following, we estimated this shift for a cubic single crystal sample and for non-spherical sample containers.

Theory and Calculations

The demagnetization field caused by a single uniformly magnetized region is given by[1]

$$\delta H(\vec{r}) = -1/4 \pi \vec{\nabla} \int_S \vec{M} \cdot d\vec{a}(\vec{r}_S) / |\vec{r}_S - \vec{r}|. \quad (1)$$

\vec{r}_S and \vec{r} are a position in the sample surface and the position where the field is calculated, respectively. $d\vec{a}$ is a surface vector directed outward. \vec{M} is the magnetization inside the surface and is given by

$$\vec{M} \approx \hat{\chi}(S) \cdot \vec{H}_0, \quad (2)$$

where $\hat{\chi}(S)$ is the volume susceptibility tensor of the region surrounded by S . Eq. (1) can be written in the following form:

$$\delta \vec{H} = -\hat{\nu}(\vec{r}, S) \cdot \hat{\chi}(S) \cdot \vec{H}_0. \quad (3)$$

$\hat{\nu}(\vec{r}, S)$ is a demagnetizing tensor. Its matrix elements $\nu_{\alpha\beta}(\vec{r}, S)$, ($\alpha, \beta = x, y, z$) are given by

$$\nu_{\alpha\beta}(\vec{r}, S) = 1/4 \pi \int_S (r_{S\alpha} - r_\alpha) / |\vec{r}_S - \vec{r}|^3 d\alpha_\beta(\vec{r}_S). \quad (4)$$

体積磁化率、固体NMR、表面

くぼあつし、Thomas Paul Spaniol、にしやまゆうすけ、てらおたけひこ

Eq. (4) can be used whether \vec{r} is inside or outside of S . $Tr\{\hat{\nu}\}$ is equal to 1 or 0, whether \vec{r} is inside or outside of S , respectively. The demagnetizing tensor have been calculated for the different shapes of the surfaces. When S is a sphere, the three principal values of $\hat{\nu}$ are $\nu_1=\nu_2=\nu_3=1/3$, if \vec{r} is inside of S . [1] If \vec{r} is outside the sphere, $\hat{\nu}$ is the dipolar field from a dipole located at the center of the sphere:

$$\hat{\nu}(\vec{r}) = V/4\pi \{1/r^3 - 3\vec{r}\vec{r}/r^5\}, \quad (5)$$

where V is the volume of the sphere. The origin of \vec{r} is taken to be the center of sphere. Analytical equations of $\hat{\nu}$ for the rectangular and triangle surfaces are also given in literature. [2,3]

NMR resonance frequency is proportional to the magnetic induction \vec{B}_m inside sample. We consider models of polycrystalline and single-crystal samples shown in Fig. 1.

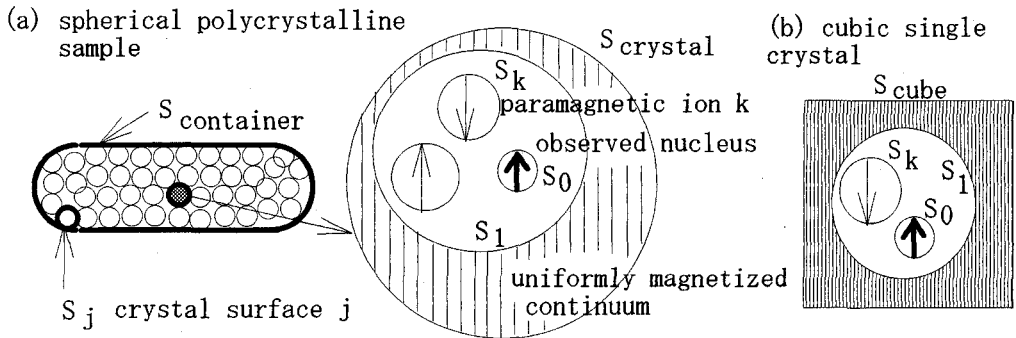


Fig. 1 Models of the uniformly magnetized regions in a spherical polycrystalline sample (a) and in a cubic single crystal (b).

\vec{B}_m is composed of the contributions from the various uniformly magnetized regions surrounded by surfaces S_i ,

$$\vec{B}_m = \mu_0(\vec{H}_0 + \delta\vec{H} + \vec{M}) = \mu_0 \left\{ 1 + \hat{\chi}(S_0) - \sum_{i=0} \hat{\nu}(S_i) \cdot \hat{\chi}(S_i) \right\} \vec{H}_0, \quad (6)$$

where S_0 is an infinitesimal sphere around the observed nucleus. The shift tensor is defined by

$$\hat{\delta} = \hat{\chi}(S_0) - \sum_i \hat{\nu}(S_i) \hat{\chi}(S_i). \quad (7)$$

For paramagnetic samples, Eq. (7) contains a Fermi contact shift, a paramagnetic dipolar shift and a BMS shift. The Fermi contact shift arises from terms relating to S_0 :

$$\hat{\delta}_{con} = 2\hat{\chi}(S_0)/3. \quad (8)$$

The paramagnetic dipolar shift is from the surfaces placed around paramagnetic ions in which paramagnetic electrons are assumed to be uniformly distributed:

$$\hat{\delta}_{\text{dip}} = 1/4 \pi \sum_{k \in S_1} \left\{ 3\bar{r}_k^i \bar{r}_k^j / r_k^5 - 1/r_k^3 \right\} \hat{\chi}_k^{\text{ion}}, \quad (9)$$

where $\hat{\chi}_k^{\text{ion}}$ is the susceptibility tensor of a k -th paramagnetic ion. The summation is over all the ions in a sphere S_1 placed inside a single crystal. The rest is defined as a BMS shift tensor.

For an isolated cubic single crystal the BMS shift tensor is

$$\hat{\delta}_{\text{bms}}^{\text{cube}}(\bar{r}) = \{1/3 - \hat{\nu}(\bar{r}, S_{\text{cube}})\} \hat{\chi}_V, \quad (10)$$

where $\hat{\chi}_V$ is the volume susceptibility tensor of the crystal. Fig. 2 shows the contour plots of largest and least principal values of $\hat{\nu}$ in a cube calculated using the formula given in Ref. [2]. The principal values deviate from $1/3$ near the surface of the cube and diverge at the edges of the cube.

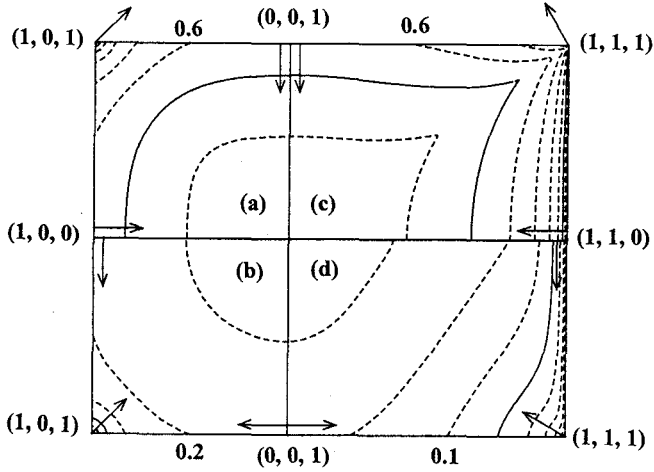


Fig.2 The spatial distributions of the largest (a,c) and the least (b,d) principal values of the demagnetizing tensor $\hat{\nu}$ in a cube of which corners are located at $(\pm 1, \pm 1, \pm 1)$. (a,d) and (c,d) are the contour plots calculated for the $(x, 0, z)$ and the (x, x, z) plane, respectively. The orientation of the principal axes at the surface points of a cube are shown by arrows. $\hat{\nu}$ is isotropic and is equal to $1/3$ at the center of the cube.

For an spherical polycrystalline sample the BMS shift tensor is

$$\hat{\delta}_{\text{bms}}^{\text{polycryst.}}(\bar{r}) = 1/4 \pi \sum_j \left\{ 3(\bar{r}_j - \bar{r})(\bar{r}_j - \bar{r}) / |\bar{r}_j - \bar{r}|^5 - 1/|\bar{r}_j - \bar{r}|^3 \right\} \hat{\chi}_V^j V_{\text{sphere}}, \quad (11)$$

where \bar{r}_j is the center of the j -th crystal. The summation over j is taken for all the crystals in a spherical sample container except the crystal which contains the observed nucleus. The full width at half-maximum (FWHM) was calculated in Ref. [6] for a model where spherical crystals occupy randomly FCC lattice positions with a probability p . When the volume susceptibility is isotropic, $\text{FWHM} = 0.16 \chi_V^{\text{iso}}$ was obtained for $p = 0.9$.

The effect of the container surface is defined as the deviation from a spherical sample container. When a powder sample or a liquid sample is filled in the container the sample volume susceptibility can be assumed as isotropic. The BMS shift tensor is written as

$$\hat{\delta}_{\text{bms}}^{\text{container}}(\vec{r}) = \left\{ \frac{1}{3} - \hat{\chi}(\vec{r}, S_{\text{container}}) \right\} \chi_V^{\text{iso}}. \quad (12)$$

Fig.3 shows the calculated NMR spectrum for cylindrical and spherocylindrical containers with various ratios of the length L and the diameter D . Their cylindrical axes are directed at a magic-angle from a static field. A long cylindrical container with $L/D \geq 10$ and a nearly spherical spherocylinder with $L/D \leq 1.05$ provides $\text{FWHM} < 0.01 \chi_V^{\text{iso}}$ and are tolerable for the measurements of the paramagnetic shift tensor.

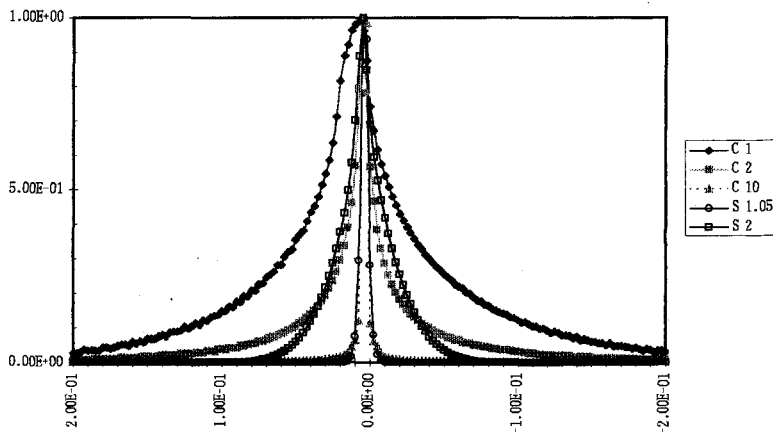


Fig. 3 Effect of container shapes on NMR spectra. C and S denote cylindrical and spherocylindrical container, respectively, and the number on the right-hand side is the ratio L/D . The horizontal axis is shown by a unit of χ_V^{iso} .

Application to Surface NMR experiments

The distribution of the field inside a sample does not depend on the sample dimension and only depends on a sample surface shape. Thus by decreasing the solid crystalline size and by observing the liquid filled between them one may be able to distinguish molecules near the surface. We used spherical silica beads and filled paramagnetic liquids between them.

References

- [1] Jackson J. D., *Classical Electrodynamics*, 2nd ed., John Wiley & Sons, 1975, Chap. 5.
- [2] C. H. Durney, J. Bertolina, D. C. Ailion, R. Christman, A. G. Cutillo, A. H. Morris, and S. Hashemi, *J. Magn. Reson.* **85**, 554 (1989).
- [3] S. N. Hwang and F. W. Wehrli, *J. Magn. Reson.* **B109**, 126 (1995).
- [4] Ganapathy S. and Bryant R. G., *J. Magn. Reson.* **70**, 149 (1986).
- [5] Grey C. P., Dobson C. M., and Cheetham A. K., *J. Magn. Reson.* **98**, 414 (1992).
- [6] U. Schwerk, D. Michel, and M. Pruski, *J. Mag. Reson.* **A119**, 157 (1996).

1P6

^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用の新しい測定方法とその
角度情報取得への応用

(京大院理) ○平尾浩一・石井佳誉・寺尾武彦

A method for measuring ^{13}C - ^{15}N dipolar interactions and its
application to determination of interbond angles

(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto
University)

Kouichi, Hirao; Yoshitaka, Ishii; Takehiko, Terao;

Abstract

A new method to recover ^{13}C - ^{15}N Pake doublet patterns under magic angle spinning is proposed. This method enables us to simultaneously measure several ^{13}C - ^{15}N distances by applying a two-dimensional NMR scheme. In addition, it is shown that this method can be used to determine bond angles and dihedral angles by correlating a ^{13}C - ^{15}N dipolar coupling with other anisotropic interactions.

[序論]

近年、天然存在比が小さくスピン1/2をもつ核を二重標識し、そのスピン間の双極子相互作用を固体NMRを用いて測定することにより、分子の構造情報を求める試みがなされている。それらのなかでも、 ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用の測定はペプチドや蛋白質などの構造情報を得るために重要であり、様々な方法が開発されてきた。しかしながら、これまで、マジック角回転下で ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用を測定するのに、静止試料のpowder patternを保ったまま観測する方法は、報告されていない。そこで今回、二次元NMRを用い、マジック角回転下で ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用によるpowder patternを復活させ、 ^{13}C 化学シフト等方値で分離する方法を開発した。これにより、複数の ^{13}C - ^{15}N がペアをなしている場合でも、それぞれのPake doubletが分離、観測でき、核間距離を決定できる。さらに、この方法で ^{13}C の化学シフトの等方値のかわりに、化学シフト異方性などの異方的な相互作用を観測し、 ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用テンソルとの相対配向を求めることで、結合角やペプチドの二面角な

固体NMR、双極子相互作用

○ひらおこういち、いしいよしたか、てらおたけひこ

どの角度情報を精密に求めることが可能となる。

[理論]

マジック角で角速度 ω_r で試料が回転しているとき、核スピンは異方的相互作用により回転系において、

$$v(t) = C_1(\Omega)\cos\omega_r t + C_2(\Omega)\cos 2\omega_r t + S_1(\Omega)\sin\omega_r t + S_2(\Omega)\sin 2\omega_r t \quad (1)$$

の周波数で歳差運動する。ここで、 Ω は核間ベクトルの静磁場に対する配向、 $C_n(\Omega)$ 、 $S_n(\Omega)$ ($n=1,2$)はそれに依存する係数。静止した試料では、歳差周波数は時間に依存しないことから、異方的相互作用の配向依存性は、 $C_1(\Omega)+C_2(\Omega)$ により決まる。これまでに、平均歳差周波数 \bar{v} が

$$\bar{v} = \chi [C_1(\Omega) + C_2(\Omega)] \quad (2)$$

となるようなパルス系列を ^{13}C に照射することにより、 ^{13}C の化学シフト異方性を求めることがTyckoら^{a)}によりなされている。ここで、 χ は、パルス系列に依存する係数である。そこで、このパルス系列を ^{15}N に照射し ^{13}C を観測した。このようにすると、 ^{13}C の ^{13}C - ^{15}N 核間相互作用による平均歳差周波数は、(2)の様に表せるが、化学シフト異方性は、マジック角での回転により平均化されて消える。これにより、 ^{13}C - ^{15}N 核間距離を測定できる。

[結果・考察]

Fig.1は、10% [$2\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$] Glycineの一次元でこの実験を行った時の実験スペクトルである。Pake doubletが観測されていることが分かる。また、10% [$2\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$] Glycineと10% [$1\text{-}^{13}\text{C}$] Glycyl- ^{15}N] Glycineの1:1混合物で実験を行った。その結果、二つの ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用によるPake doubletを同時に観測することに成功した。これにより、一つの試料中に複数の ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用があるときにも同時に測定できることが分かる。なお、当日は、二次元NMRにより異種核間双相互作用と他の相互作用テンソルの相対的な配向を求め、結合角や二面角を決定する方法への応用についても発表する予定である。

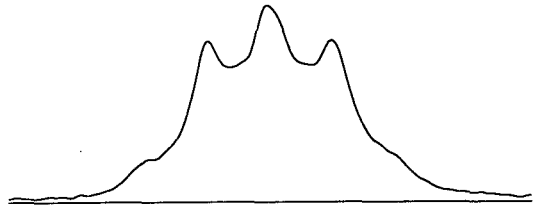


Fig.1 10% [$2\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$] Glycineの ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用による ^{13}C スペクトル。

a) R. Tycko, G. Dabbagh, P.A. Mirau, J. Magn. Reson. 85, 265 (1989).

Natural abundance ²H-NMR study of liquid crystalsKazuteru Tabayashi¹ and Kazuyuki Akasaka^{1,2}¹ Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657 and ² Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657)

Deuterium NMR (²H-NMR) has been a powerful means to analyze orientational orders of liquid crystals. Usually, this requires deuterium-enriched samples. However, the recent development of high sensitivity NMR spectrometers has enabled one to detect ²H-NMR signals of liquid crystals at natural abundance. In this report, we demonstrate the utility of the natural abundance ²H-NMR for liquid crystal studies, taking an example of the temperature dependence of microscopic ordering in the nematic phase of 4'-hexyloxy-4-cyanobiphenyl (6OCB).

1. はじめに

液晶の配向に関する研究には、重水素NMRが有力な手段となっている。この研究には、従来、重水素標識を施した液晶試料を用いて行われていた。このような液晶試料の合成は容易ではない。そのため、研究対象は極めて限られたものとなっていた。

現在では、NMR分光器の測定感度も向上し、天然の同位体存在比の重水素であっても、NMRのスペクトルを得ることは、不可能ではなくなった。天然同位体比で重水素NMRを測定することは、試料の重水素化の問題を解決するだけでなく、重水素のあまりに低い同位体存在比の為に、重水素間の双極子相互作用がないために、プロトンデカップリングすることで非常にシンプルな四極子分裂のスペクトルを得ることができるという利点がある。

本研究では、古くから液晶の研究材料として用いられてきた4'-ヘキシルオキシ-4-シアノビフェニル (6OCB)^{1,2)}を対象として天然同位体比重水素NMRスペクトルの測定を試み、その応用について考察した。

液晶 天然存在比²H-NMR 配向 四極子相互作用

たばやし かずてる・あかさか かずゆき

2、実験

^2H -NMRスペクトルは、日本電子製Lambda-400分光器（溶液測定用装置）を用い、パルス幅約6マイクロ秒（ 90° パルス約12マイクロ秒）、シングルパルスで行った。先ず、等方相（ 80°C ）で分解能調製を行い、液晶相となる温度範囲（ $58\sim 74^\circ\text{C}$ 、6OCBネマティック範囲）に温度を下げプロトンデカップリング下で測定を行った。積算は約20万回（約1日）を要した。この間、周波数ロックは行わなかった。

3、結果

得られた天然同位体比の重水素NMRのスペクトルをFig.1.に示す。重水素濃度が極めて薄い（同位体比0.015%）のに加え、重水素の核磁気回転比が小さい（プロトンの6.5分の1）為に、S/N比は悪いが、分子中の全重水素のシグナルが現われている。重水素標識試料の場合のような隣接重水素同士の間接分裂がないため、スペクトルはずっと単純なものとなっている。

重水素の共鳴周波数が小さいために起こる、アコースティックリングング^{3,4)}の問題も、適切なウィンドウ関数処理で簡易に解決できた。

得られた四極子分裂シグナルの同定は、化学シフト値（分裂の中心から求めた、二次摂動の効果は測定誤差範囲内）から求めた。この化学シフト値はプロトンのシフト値とよく一致するので ^1H -NMRで同定したが、 ^2H -NMRの測定誤差が大きいため完全な同定はできないが、分子中の特徴的な官能基ごとのシグナル同定ができた。

このようにして得られた四極子分裂から、液晶分子の局所配向を見積もることができる。希薄な重水素同位体比の故に、重水素間の双極子情報が得られない為に、四極子分裂幅のみで配向を見積もるため、分子を円筒近似とにおいて解析しなければならないが、配向の見積もりは十分可能である。このようにして求めた配向度（芳香環の配向 S_{zz} とアルキル鎖の C^2H 結合配向 S_{CD} ）の温度依存性をFig.2.に示す。

4、考察

この方法にも問題点もある。溶液用装置を用いているため、高感度で、操作性も高いが、逆に固体測定装置と比べ、パルス出力を上げられない為に、パルス幅が長く（ 90° パルス約10マイクロ秒）なり、スペクトル幅が広い四極子核の測定に不都合が生じる場合がある。今回は、信号強度を犠牲にして、 90° パルス以下の短いパルス幅を用いることでほぼ均一なパルス照射を行った。しかし、そのために測定はシングルパルス法に限定されてしまった。また、信号検出感度はかなり悪く、測定時間が長くかかるが、より高磁場の分光器を用いれば感度の上昇が期待でき、その測定時間の短縮につながる。しかも化学シフト範囲も広がるので、四極子分裂からの化学シフト値の読み取り精度も向上する。

5、まとめ

特定の重水素化作業をすることなしに、天然の同位体存在比で重水素NMRスペク

トルを測定することができた。重水素標識の困難さのためにいままで研究対象にできなかった液晶試料に対しても、重水素NMRの応用範囲を広げることができる。

参考文献

- 1) J. W. Emsley et. al., Liquid Crystals, 17(3), 303 (1994).
- 2) J. W. Emsley et. al., Mol.Phys., 56(4), 767(1985).
- 3) S. L. Patt et al, J.Magn.Reson.,49, 161 (1982).
- 4) P. S. Belton et al, J. Chem. Soc. Faraday Trans.2, 81, 63 (1985).

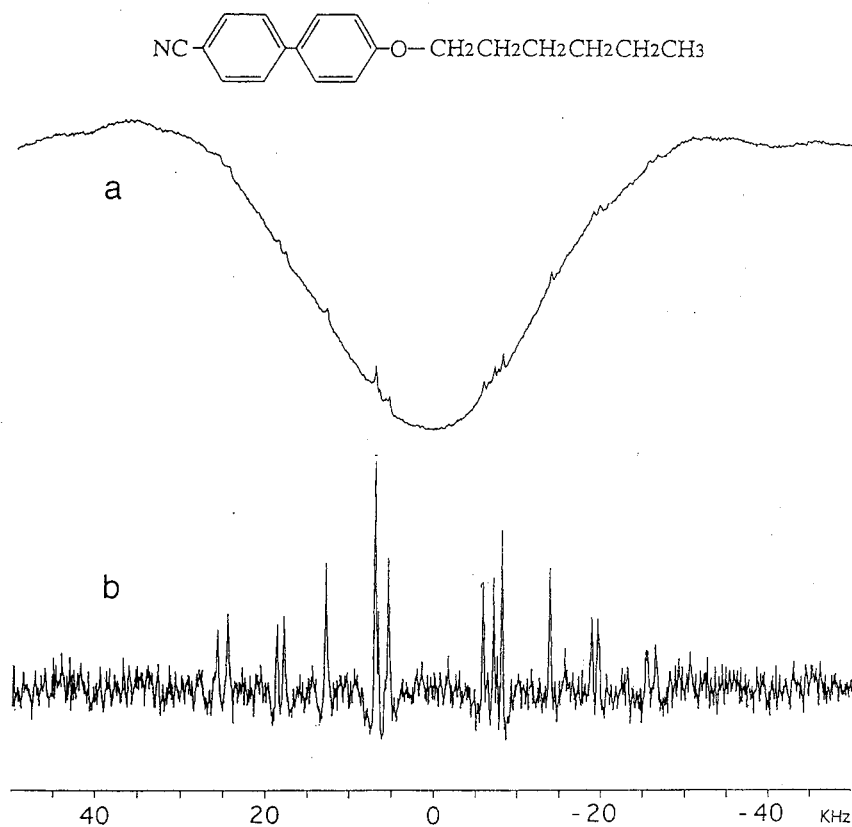


Figure 1. Natural abundance ²H-NMR spectra of 6OCB (4'-hexyloxy-4-cyanobiphenyl). The spectra were measured at 60 °C in the nematic phase with 180,000 scans. (a) under proton decoupling without a window function. (b) under proton decoupling with a window function.

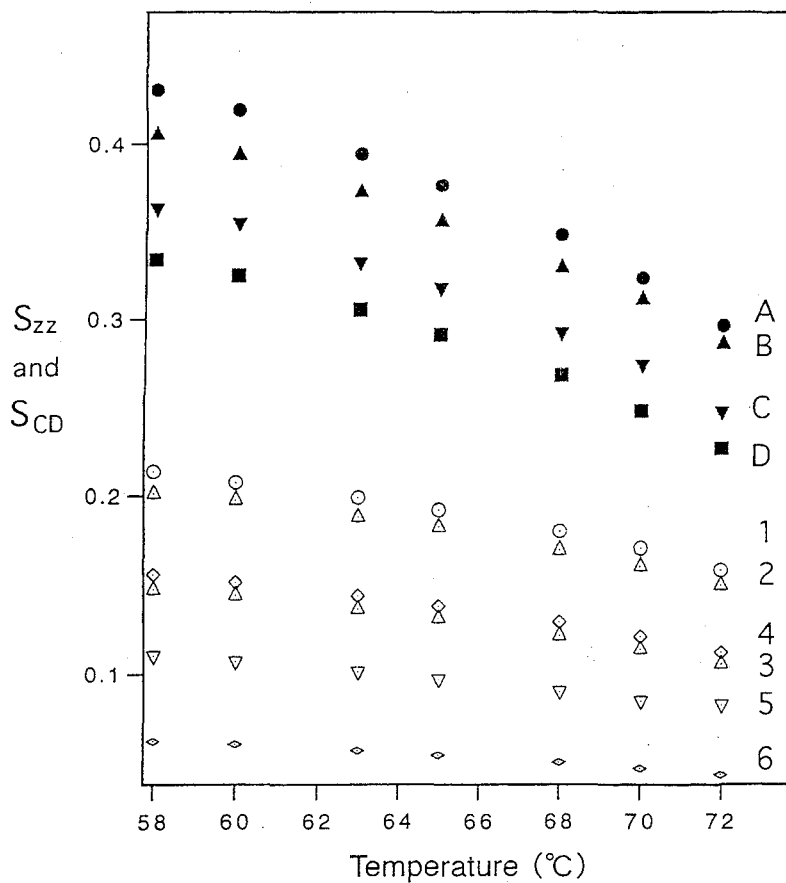
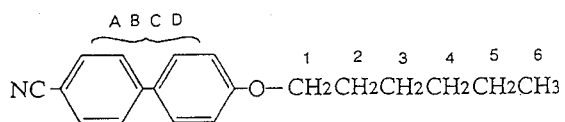


Figure 2. Plots of the order parameters of the rings (S_{zz}) and the C-2H bonds (S_{CD}) against temperature for 6OCB.

^{19}F 観測 ^1H デカップルMAS固体高分解能NMR法 (日本電子)○杉沢寿志、末松浩人、樋岡克哉

The solid-state proton-dipolar-decoupled ^{19}F MAS-NMR spectroscopy

○Hisashi Sugisawa, Hiroto Suematsu, Katsuya Hioka

NMR App. Lab., Application and Research Center

Analytical Instruments Division, JEOL Ltd.

In this report, we demonstrate ^{19}F -Observed MAS-NMR with high power ^1H -decoupling. F/H double resonance probe and F/H isolation filter developed for this purpose are evaluated. We discuss the effect of the hetero nuclear Bloch-Siegert shift under the high power ^1H -decoupling. By this method, we can obtain high resolution spectra of ^{19}F nuclear surrounded by ^1H nucleus. In future study, this method is applicable to the analysis of the local structure of organic compounds by substituting a fluorine nuclear for the proton of the specific site.

はじめに

アバダントスピン系 (^1H , ^{19}F) の固体 NMR スペクトルの高分解能化には、大きく二つの手法がある。MAS による高分解能化と、多重パルス同種核デカップリングと MAS を組み合わせた CRAMPS 法である。 ^1H 核に対して、CRAMPS 法は ^1H 密度の高い有機化合物、例えば合成ポリペプチドに適用¹⁾され、 ^1H -MAS は ^1H 密度の低い系、例えばゼオライト触媒の活性部位に適用²⁾され、有用な情報が得られることが示された。

今回は、もう一つのアバダントスピン系である固体 ^{19}F -NMR スペクトルの高分解能化について議論する。

固体 ^{19}F -NMR スペクトルの高分解能化

固体 ^{19}F -NMR スペクトルを高分解能化する手法^{3),4)}は、a) Slow-MAS、b) Fast-MAS (10kHz 以上の速度で試料管を回転させる)、c) CRAMPS 法の3つに分類できる。 ^{19}F 核は、 ^1H 核に比べ、化学シフトの範囲が非常に広いので、c) CRAMPS 法の適応には限界がある。逆に、化学シフト範囲が広いことが幸いし、MAS による部分的な線幅ナローイングによって十分にピークが分離される場合が多い。 ^{19}F 核を含む有機化合物は、 ^1H 核をも含む場合が多いので、上記3つの方法に ^1H デカップルを加える必要がある。 ^1H デカップル付きの CRAMPS 測定は、プローブに与える負荷が大きく、現実には厳しい測定となる。従って、我々の主なターゲットは、 ^{19}F -MAS に必要に応じて ^1H デカップルを付加する測定法となる⁵⁾。

キーワード : MAS、 ^{19}F 観測 ^1H デカップル、 固体 NMR
すぎさわ ひさし、すえまつ ひろと、ひおか かつや

^{19}F 観測 ^1H デカップルの問題点とその解決法

^1H デカップル ^{19}F -MAS 測定を行う際の問題点を以下に列挙する。

- $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ 二重共鳴プローブの設計
- 高速回転可能なスピニング系
- 高温温度可変測定が可能な温度制御系
- デカップル時にRFのもれを止めるためのフィルター
- ^{19}F -バックグラウンド信号の処理/削減
- 異種核プロッホシーゲートシフト

a)、b)、c)は OEUS 製 4mm Φ APEX 型プローブを使うことで解決できる。例として次の組成式を持つ ^{19}F のみを含むコポリマー PFA の ^{19}F -MAS スペクトルを示す

PFA : $(\text{CF}_2-\text{CF}_2)_{98.5}(\text{CF}_2\text{CF}(\text{OCF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3))_{1.5}$

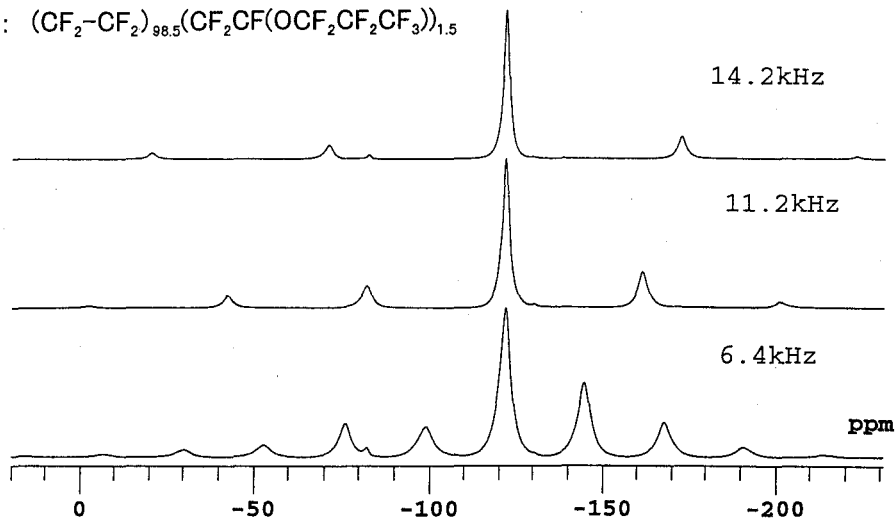


Fig.1 Rotational Frequency vs. ^{19}F -MAS spectra of PFA at 300MHz

このスペクトルより、回転速度が 14kHz を超えると、 $-\text{CF}_2$ -基由来のスピニングサイドバンドと -82ppm に現れる側鎖の $-\text{CF}_3$ 基が分離されて観測されることが分かる。

d)を解決するために、今回は2種類のハイパワー用 F/H フィルターを用意した。一つは我々の作成したトラップ型のフィルターであり、もう一つは OEUS 製の楕円型ローパス/ハイパスフィルターである。これらのプローブ及びフィルターの詳細なデータは当日、報告する。 ^{19}F のバックグラウンド信号は、主にテフロン製可変コンデンサーから発生するので、e)の問題は耐電圧とのトレードオフになる。当日、テフロンバリコンを使った高耐圧 F/H プローブと真空バリコンを使った低 B.G. プローブの比較を行う。両方のプローブに対して、 ^{19}F の B.G.信号は DEPTH シーケンス[®]を用いることで大幅に改善できる。f)は本質的な問題である。

異種核プロッホシーゲートシフト

異種核プロッホシーゲートシフト Δ は、観測核の γ 比を γ_{obs} 、デカップル磁場強度を B_2 、観測

核の共鳴周波数を ω_{obs} 、デカップル核の共鳴周波数を ω_{dec} とすると次式で表される⁷⁾。

$$\Delta = \frac{(\gamma_{obs} B_2)^2}{\omega_{obs}^2 - \omega_{dec}^2}$$

すなわち、 Δ は、デカップル磁場強度 B_2 の2乗に比例し、静磁場強度の2乗に反比例する。以下に、異種核プロット-シーゲートシフトの影響を示すために、フッ素ゴムを試料管の中心部に詰め、 ^1H のデカップルパワーとそのシフト量の関係を測定したものを図示する。

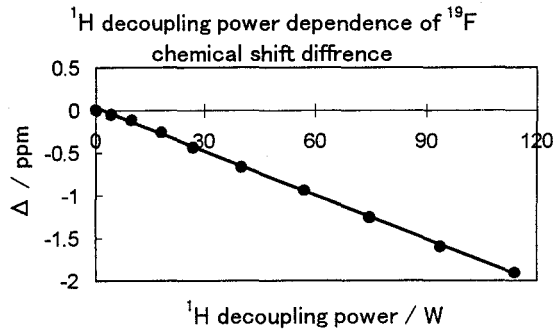


Fig.2 Bloch-Siegert Shift of ^{19}F -rubber under ^1H decoupling at 300MHz
 $\nu_{rot}=1.0\text{kHz}$, $\text{PW}_{90}=2 \mu \text{ sec}$

デカップルパワーは、デカップル磁場強度の2乗に比例するので、異種核プロット-シーゲートシフトによるピークのシフトは、デカップルパワーに比例する。理論が予測する通り、上図のデータは原点を通る直線にのっていることが分かる。

この効果は、単にスペクトル全体をドリフトさせるだけでなく、ピーク線形を変化させる。これは、試料に印可されるデカップル磁場強度 (B_2) に分布がある場合に起こる。試料に印可される B_2 磁場強度の違いに応じてシフト量が変わるからである。言い換えると、ピーク線形が B_2 磁場強度の分布を表していることになる。以下に、ヘキサフルオロベンゼンの ^{19}F 観測 ^1H デカップル-MAS スペクトルを示す。

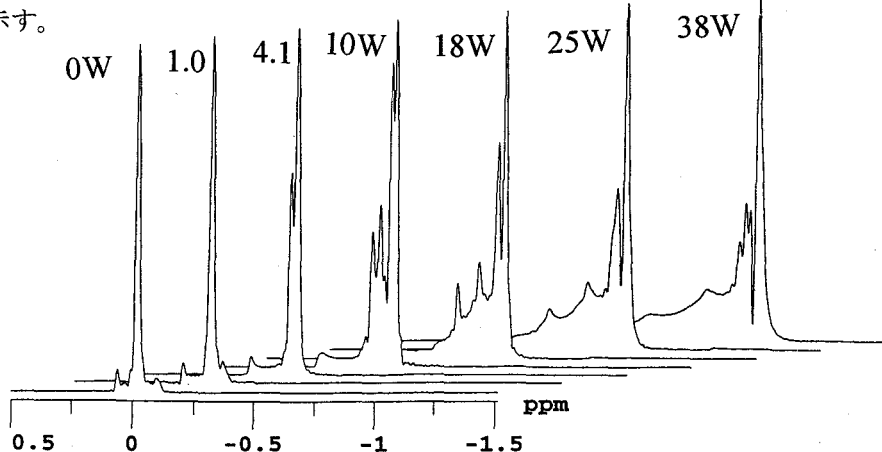


Fig.3 ^{19}F -MAS spectra of Hexa-Fluoro-Benzen under ^1H decoupling at 300MHz.
 Half Height Half Width of HFB at 0W is 3Hz. Acquisition time is 204msec.

^1H デカップルなしのとき(0W時)、シャープな 1 本のピークであったヘキサフルオロベンゼンのピークはデカップルパワーを上げるに従い、ピークのシフトと分裂が起こっている。MASプローブにはソレノイド型のコイルが用いられており、同じコイルで RF 磁場 (B_1) とデカップル磁場 (B_2) を発生させる。デカップル時のピークの分裂は、検出コイル近辺の B_1 磁場分布の疎密に対応していると考えられる。このようなピーク線形の歪みが問題になるような測定を行う場合は、試料管の中心部の B_1 磁場の均一な部分に、試料を詰めるような工夫が必要である。

まとめ

OEUS 製 4mm Φ -F/H プローブと、我々の作成した F/H フィルターまたは OEUS 製の F/H フィルターを組み合わせることで、 ^{19}F 観測時に 125kHz 以上の強い ^1H デカップリングが可能となった。本プローブは、最高 18kHz、常用 15kHz 以上の高速 MAS が可能であり、温度可変範囲も -150°C ~ 250°C と広い。従って、 ^{19}F 核と ^1H 核を両方含む広範な試料について ^{19}F 固体高分解能測定が可能となる。さらに、 ^{19}F のバックグラウンド信号を削減したタイプのプローブを使用すると、希薄な ^{19}F も観測可能となる。 ^1H デカップリングをすると、異種核プロトホシゲートシフトにより、スペクトルのドリフトおよびピーク線形の変形が起こるので、化学シフトを議論する場合、サンプリング及びデータ解釈に注意が必要である。

今後、この方法は単に、 ^{19}F 核を含む有機化合物の解析を行う際に利用されるだけでなく、通常の有機化合物の特定の ^1H をフッ素化することにより、この ^{19}F 核をモニター核として目的の有機化合物の固体状態での局所構造の解析を行うことへと発展することが期待される。

参考文献

- 1) A. Shoji et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7604(1996)
- 2) 馬場俊秀 他、1P24 第 35 回 NMR 討論会(1996)
- 3) R. K. Harris and P. Jackson, *Chem. Rev.*, **91**, 1427(1991)
- 4) J. M. Miller, *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spec.*, **28**, 255(1996)
- 5) S. A. Carss et. al., *Magn. Reson. in Chem.*, **34**, 63(1996)
- 6) D. G. Cory and W. M. Ritchey, *J. Magn. Reson.*, **80**, 128(1988)
- 7) S. A. Vierkotter, *J. Magn. Reson.*, **A118**, 84(1996)

The applications of a magic-angle-turning technique for quadrupolar nuclei having half-odd-integer spins

Institute for Molecular Science, University of Tsukuba Institute of Applied Physics

Daisuke Kuwahara, Toshihito Nakai

We exploited a novel method for unravelling the overlapping spinning sidebands (SSBs) for quadrupolar nuclei having half-integer spins based on a magic-angle-turning technique. The method also enabled us to obtain double rotation (DOR) NMR spectra without SSBs for the half-integer quadrupolar spins.

<目的>半整数スピン($I=3/2, 5/2, \dots$)をもつ四極子核のNMR測定では、中心遷移に対応するNMR吸収線は1次の核四極子相互作用の影響を受けないため容易に観測することができる。このような四極子核にMAS (magic-angle spinning)あるいはDOR (double rotation)を適用してNMRを測定すると、静止粉末試料を使った時よりもより高い精度で核四極子パラメータ(核四極子結合定数 $\chi = e^2qQ/h$ および非対称軸パラメータ η)を決定できる。しかしながらMASにおいては、結合定数 χ が大きいまたはLamor周波数 ν_L が小さいと試料回転周波数 ν_r が異方性の広がりを上回ることなく、共鳴線は一連の spinning sidebands (SSBs)に分裂する。さらに各SSBは2次の核四極子相互作用による本来の周波数分布と大きく異なる線形をもち、また隣接するSSBsが互いに重なるために、観測されるスペクトルは非常に複雑で解析が困難なものとなる。DORの場合は二重ローターの外側のローターの回転周波数が高々1500HzであるためSSBsが多く発生し、しばしばスペクトル解析を困難にする。本発表ではこれらの問題を克服する方法として2次元NMR法を用いて実験的にSSBsをセンターバンドに集積する技法を報告する。

四極子核、スピニングサイドバンド、MAS、DOR

くわはらだいすけ、なかいとしひと

<方法> 2次の核四極子相互作用を受けた横磁化はMASの下では時間 t の間に角度

$$\phi = \omega_0 t + \sum_{n=1,2,3,4} (A_n / \nu_r) \cos(2\pi n \nu_r t + \psi_n)$$

だけ才差運動する。第二項はMASにより変調された項でありSSBsをもたらす。ここで、才差運動の開始時刻を試料回転周期 $t_r = 1/\nu_r$ の $k/5$ ($k=0,1,2,3,4$)倍だけずらした場合、上式中の \cos 関数の引き数には位相因子 $2\pi nk/5$ が加わる。上の5つの k に対する才差運動の角度 ϕ_k を加算することができれば \cos 項は n の値にかかわらず打ち消されSSBsが現われなくなる。本研究では t_1 時間における横磁化の才差運動が $\cos(\phi_0 + \phi_1 + \phi_2 + \phi_3 + \phi_4) = \cos \omega_0 t_1$ で与えられるような2次元NMRパルス系列を作成した。この結果は無限大の回転周波数($A_n / \nu_r \rightarrow 0$)の下で上式の第二項が除去された場合の結果と等価であり、すべてのSSBsが集積されたことを意味する。

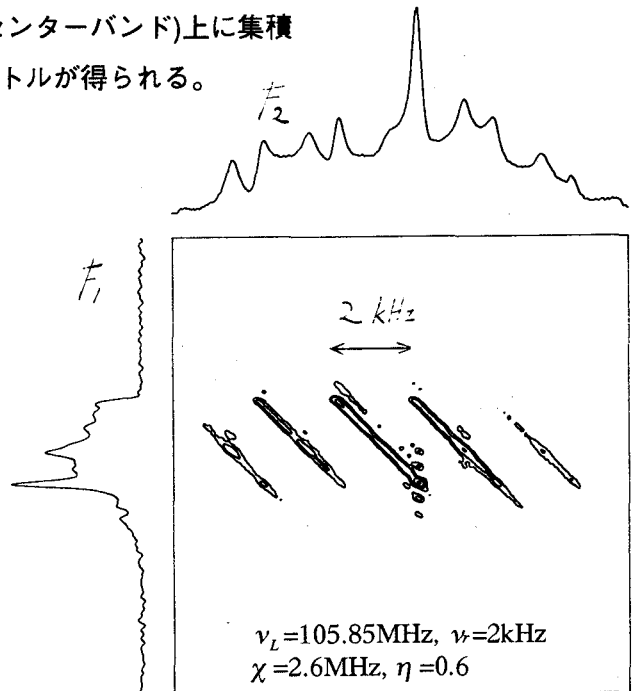
DORを行っている場合の横磁化は、二重ローターの外側のローターの回転から生じるSSBsの強度がセンターバンドの強度に比べて無視できるほどのものならば、角速度

$$\omega_{-1/2,1/2}(t) = \omega_0 + \sum_{m=-4, \dots, 4 (m \neq 0)} A_m \exp\{-im(2\pi \nu_2 t + \gamma_1)\}$$

で才差運動を行う。ここで ν_2 は外側のローターの回転周波数である。この時も同じパルス系列を用いて($t_r = 1/\nu_2$ として)2次元NMRスペクトルを測定すれば、第一の周波数軸方向にはSSBsが真のピーク(センターバンド)上に集積されて、SSBsの全くないスペクトルが得られる。

<実験結果>右図はMASを行っている Na_2SO_4 に対して上記の方法を用いて測定した実験スペクトルである。F1軸方向にはF2軸上に見られるSSBsへの分裂は全くなく、F1軸への射影はすべてのSSBsの総和となり、本来の線形が回復された。

DORスペクトルに対する実験結果および詳しい考察は会場にて発表したい。



Development of an $\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P NMR Probe
for the Chemically Specific Observation of Phosphate Mixtures

M. Tamura, N. Shimizu, Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

ABSTRACT: To improve $\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P HMQC efficiency by shortening ^{17}O irradiation pulses, an NMR probe with its RF power handling capability of more than 2000 Watts was developed. The electric configuration of the system and evaluation for $\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P HMQC experiments are presented.

1. 目的

生体反応におけるリン酸代謝系などの化学種特異的 ^{31}P -NMR 観測を目的として、現在までに $\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P HMQC を実施可能な NMR 検出器を試作し¹⁾、混合リン酸水溶液中の ^{17}O 標識リン酸基のみを選択観測した²⁾³⁾。しかし、低 γ 核からの分極移動による信号強度低下、 ^{17}O 標識による ^{31}P 線幅拡大のため、信号観測に数時間以上を要した。

そこで、 ^{17}O 励起パルス短縮を主目的として、大電力の ^{17}O 照射パルスを入力可能な NMR 検出器を開発したので、以下、装置構成、検出時間の短縮効果について述べる。

2. 方法

^{17}O - ^{31}P 単一コイル 2 重共鳴 NMR 検出器⁴⁾⁵⁾を開発し、ブルカー社 AMX-500 に接続し、かつ Y-ch 可変低出力端子に電力増幅器を増設した。装置構成を Fig.1 に示す。

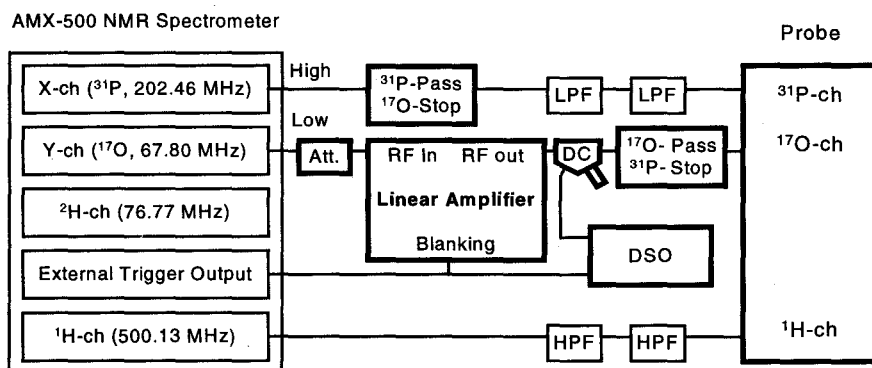


Fig.1 Block Diagram of Probe, Spectrometer and Peripherals

酸素 17 標識リン酸化合物として 79.1wt% 25.7atom% $\text{H}_3\text{P}^{17}\text{O}_4$ (Isotec, Inc.)を用いた。混合試料として、2mM 無標識 ADP, 150mM KCl, 8mM 25.7atom% $\text{H}_3\text{P}^{17}\text{O}_4$, 120mM KCl, 4mM MgCl_2 , 20mM MOPS 緩衝液(pH7.0) の水溶液を調製した。

リン 31、酸素 17、検出器、分極移動

たむら みつる、しみず のりお

3.結果

Fig.2 に、 ^{17}O -ch 高周波入力と ^{17}O -HMQC 信号強度が最大となる ^{17}O パルス幅との関係を示す。入力電力 1600W での 90° パルス幅は $2.0\mu\text{s}$ だった。HMQC パルス系列における deadtime を抑圧した結果、試作検出器と比較して、同一 S/N 比の選択観測の所用時間は約 2.5 分の 1 に短縮できた(Fig.3)。さらに信号取込中に ^{17}O デカップルすることで、最終的に S/N 比 \sim 3.3 の選択観測の所用時間を約 35 分まで短縮した。しかしながら、無機リン酸の選択観測においてパルス繰り返し時間を 8 秒以下に短縮すると信号の飽和が見られた。

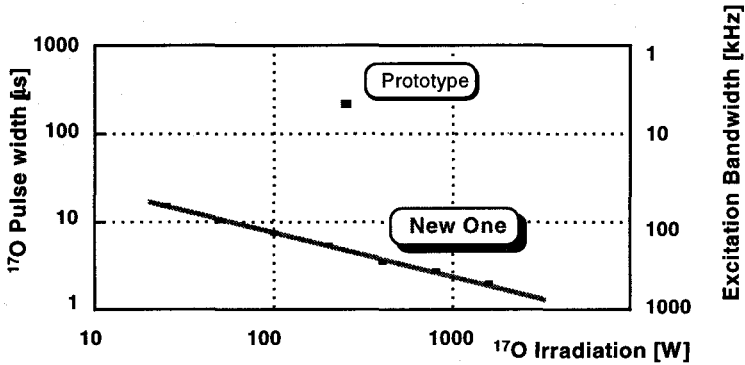


Fig.2 Relationship between ^{17}O Irradiation and 90 degree pulse widths of the newly developed probe detected by $\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P HMQC

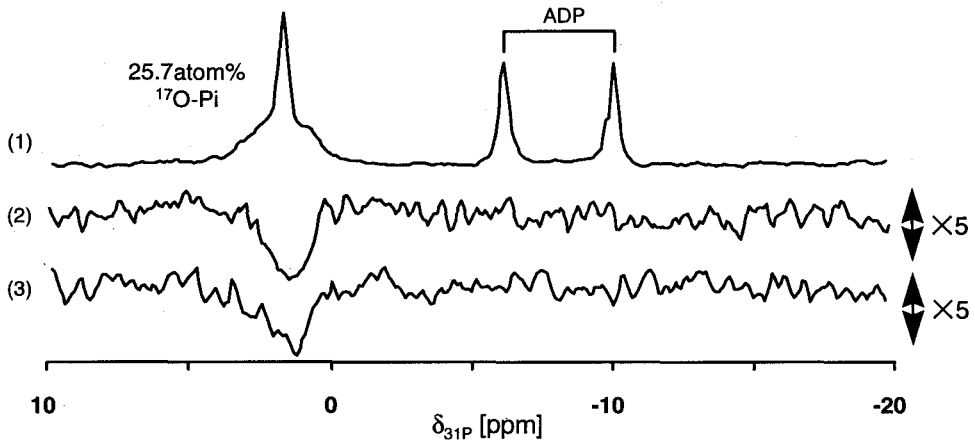


Fig.3 $\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P HMQC spectra of a phosphate mixture
 (1) conventional non-selective ^{31}P spectrum
 (2) HMQC with the prototype probe, 4096 scans
 (3) HMQC with the new probe, 1600 scans, no ^{17}O decoupling

References

- 1) 田村, 原田, “酸素 17 標識リン酸基の選択的リン 31-NMR 観測”, 第 33 回 NMR 討論会要旨(1994)
- 2) 田村, 原田, “酸素 17-リン 31 分極移動法による選択的リン 31-NMR 観測”, 第 34 回 NMR 討論会要旨(1995)
- 3) M. Tamura and Y. Harada, *J. Magn. Reson. Ser. B*, **109**, 97-99 (1995)
- 4) V. J. Bartuska and G. Maciel, *J. Magn. Reson.*, **42**, 312-321 (1981)
- 5) F. D. Doty, R. R. Inners and P. D. Ellis, *J. Magn. Reson.*, **43**, 399-416 (1981)

日本電子(株)¹、新日本製鉄(株)先端技術研究所² ○津野久幸¹、杉沢寿志¹、鴨 修¹、
齋藤公児²

¹³C measurement of BIS-NIPA gel by MAS-NMR method

(JEOL Ltd.) ○Hisayuki Tsuno, Hisasi Sugisawa, and Osamu Kamo

(Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation) Koji Saito

BIS-NIPA gel which shows phase transition at 40°C has interesting physical and chemical property. But it has not been analyzed by the conventional liquid NMR sufficiently, because it has too strong dipole-dipole interaction to observe the spin-spin interaction clearly. However, we found that it is possible to decrease the effect of dipole-dipole interaction of this sample effectively using MAS-NMR method, and we observed the DEPT spectrum of this sample.

1. はじめに

BIS-NIPA ゲルは 40°Cで相転移を示す物理的、化学的に興味深い性質を持ったゲルである。^{(1),(2)}しかし、通常の溶液 NMR 手法では双極子相互作用の影響が大きくなり十分に解析できていない。ところが MAS-NMR 法を用いると双極子相互作用の影響を小さくでき、DEPT などの解析手法が使用できることがわかった。

2. 実験

BIS-NIPA ゲルは NIPA(N-isopropyl-acrylamide)と BIS(N,N'-methylene-bis-acrylamide)の混合物に試薬を用いて 0°Cで合成される。(Fig.1) 装置は日本電子(株)製 Lambda300 型(75.5MHz)を使用し、SH30T6/VT 固体プローブを用いた。サンプル管からの ¹³C バックグラウンド信号が出ないようにするため、ゲル状サンプルが漏れ出さないように密閉するためにサンプルキャップにはダイフロン製のものを使用した。またサンプル管底プタには窒化珪素製のもの、サンプル管ローターには 6 φ のジルコニア製のものを使用した。また今回の実験は室温で行った。MAS 回転数は 2800Hz、積算回数はすべて 15000 回である。

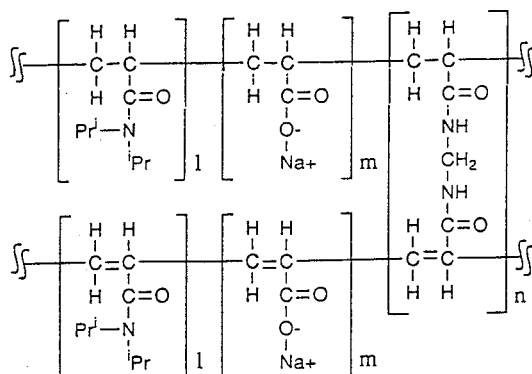


Fig.1 BIS-NIPA gel

キーワード : MAS-NMR、BIS-NIPA ゲル、DEPT

○つひさゆき、すぎさわひさし、かもおさむ、さいとうこうじ

3. 結果

(1) MAS の効果

Fig.2 に MAS を行わない溶液用プローブを用いてシングルパルスを用いたデータを、Fig.3 に MAS を行ったシングルパルスを用いたデータを示す。Fig.3 ではメチル基(22ppm)、メチン基(43ppm)のスピ結合が明瞭に観察されており、結合定数はそれぞれ 128Hz、139Hz である。また例えばメチル基の線幅は Fig.2 では 40Hz、Fig.3 では 25Hz であり、MAS の効果により双極子相互作用の影響が弱められ、かつ S/N 比も向上していることがわかる。

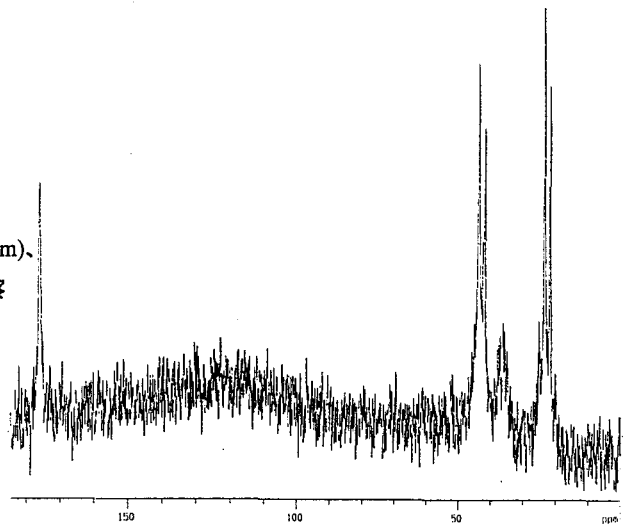


Fig.2 ^{13}C Single pulse spectrum without MAS

(2) DEPT 測定結果

Fig.4 に DEPT135° を用いたデータを示す。メチン基、メチル基は上向き、メチレン基は下向きのスペクトルとして観測されている。180ppm 付近のカルボニル基は観測されない。また Fig.3 では観察された 110ppm 付近のブロードな ^{13}C のバックグラウンドは打ち消されている。さらに S/N 比が改善され 60ppm ~ 100ppm 付近の微少ピークも観察されている。

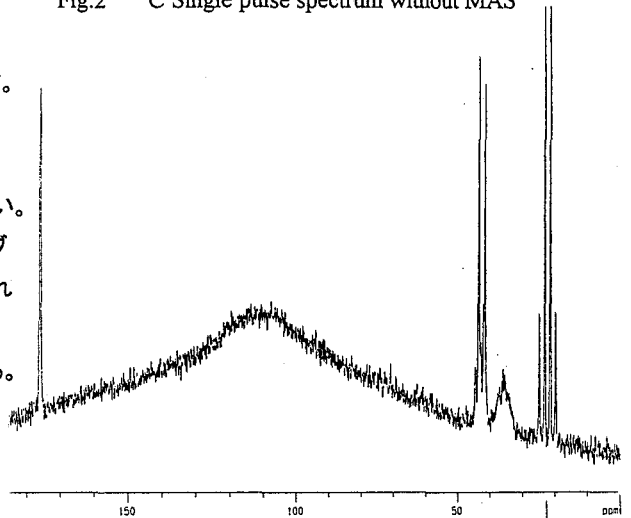


Fig.3 ^{13}C Single pulse spectrum with MAS

4. 考察

双極子相互作用の影響が大きく解析が困難とされてきたゲル状サンプルの場合でも MAS を行うことにより、解析への道が開かれることがわかった。

参考文献

(1) 斎藤公児 他

'96 EENC 予稿集 386 (1996)

(2) A.Suzuki, M.Yamazaki and Y.Kobiki

J.Chem.Phys., 1996, 104, 1751

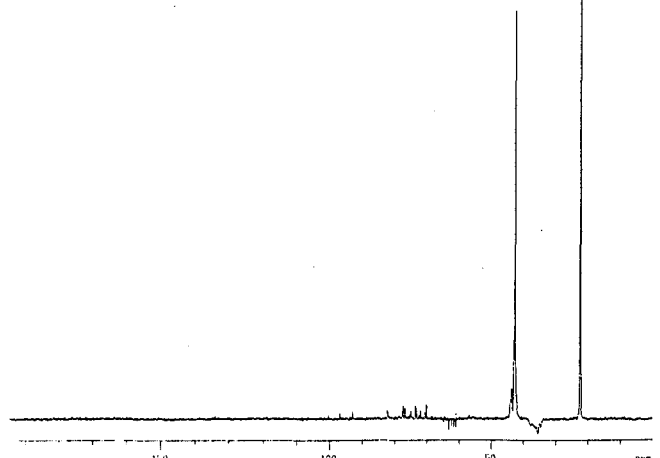


Fig.4 ^{13}C DEPT 135° Spectrum with MAS

日本電子 ○田中良二、末松浩人、鴨 修

Temperature measurement of liquid NMR sample
JEOL Ltd. ○Ryoji Tanaka, Hiroto Suematsu, Osamu Kamo

The dominant factor of temperature error of the sample in spite of good temperature control is the temperature shift due to RF irradiation. The Fiberoptic thermometer was used the temperature measurement of liquid NMR sample under RF irradiation (Fig.1, 3). Static magnetic field causes the shift of display temperature for the Fiberoptic thermometer. So we made calibration curve under various static magnetic fields by experimental measurements (Fig.2).

安定な温度コントロールが実現しているNMR測定では、試料温度の主要な誤差はRF照射による試料温度の上昇である。通常温度計はRF照射の影響を受けるため、照射した状態での試料温度を実測することは困難であった。半導体の光吸収を応用した光ファイバー温度計⁽¹⁾はRF照射による温度測定の影響を受けない。この温度計を使ってRF照射をした状態での溶液NMR試料の温度を計測した。

<測定方法>

測定には10φの試料管を使った。(Fig.1) 試料管には温度計に試料が直接接触れないように外径2φのガラス管を中心に入れ、光ファイバー温度計を挿入した。センサー部分は、光ファイバーの先端部分にある。試料管に試料を約40mm満たし、RFコイルの中央の高さの温度を計測して試料温度とした。

<表示温度の校正>

強い静磁場中では、光ファイバー温度計の表示温度は実際の温度よりも低くなる。Fig.2に磁場と表示温度との差の実測値を示す。表示温度と実際の温度との差は静磁場の強度の二次式で表すことがで

光ファイバー温度計、試料温度、温度測定

たなかりょうじ、すえまつひろと、かもおさむ

きた。この二次式の係数は温度により若干変化する。室温での校正曲線は十分な熱容量を持った試料を磁場中に出し入れすることによって得た。72.8°Cの校正曲線はButyl Hydroxyl Tolueneの融点をそれぞれの磁場中で測定して得た。磁場中での測定値はこの校正曲線をもとに換算した。

<¹H照射による試料温度の上昇>

試料管にベンゼンを満たし、室温で¹H照射と試料温度の上昇との関係を調べた。約10分間照射し続け、試料管内部が熱平衡になった状態で照射しないときからの温度上昇をプロットした。¹H照射による試料温度の上昇は照射の平均パワーに比例している。(Fig.3) この試料温度の上昇は試料やプローブの種類に依存すると考えられる。

<まとめ>

○光ファイバー温度計の校正曲線を静磁場と温度の関数として得られた。

○従来困難であった照射状態での試料温度が光ファイバー温度計を使うことによって、比較的簡単に測定できる。

<参考文献>

- (1) The NoEMI-TSTM Family Fiberoptic Thermometer Systems User's Guide, Nortech Fibronic Inc.

Fig.1 Sample preparation for Fiberoptic thermometer

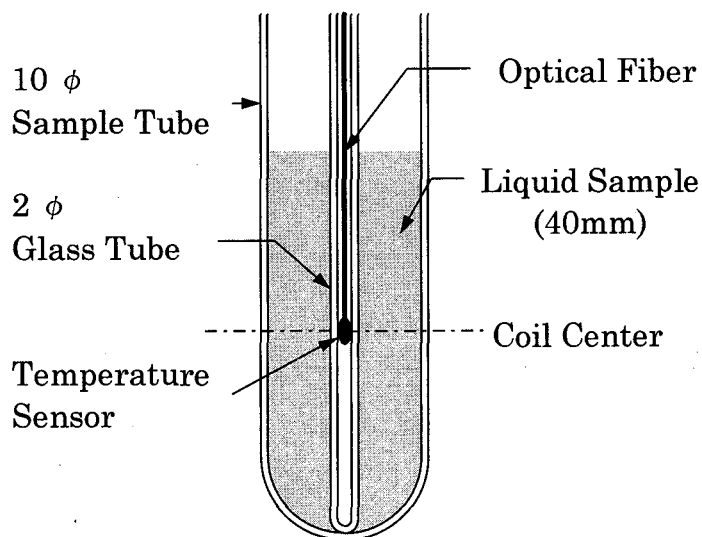


Fig.2 Calibration curves for temperature reading under static magnetic field

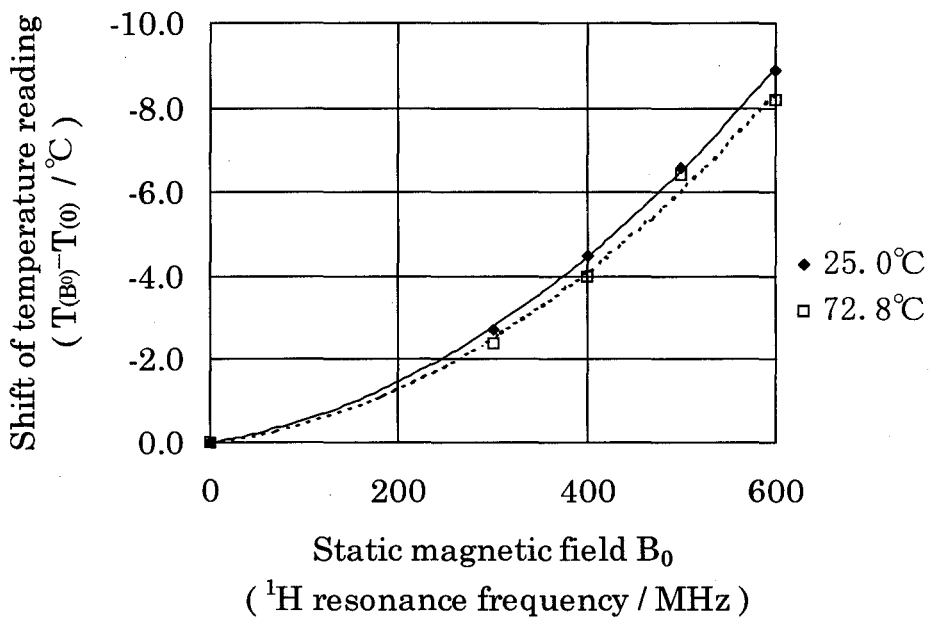
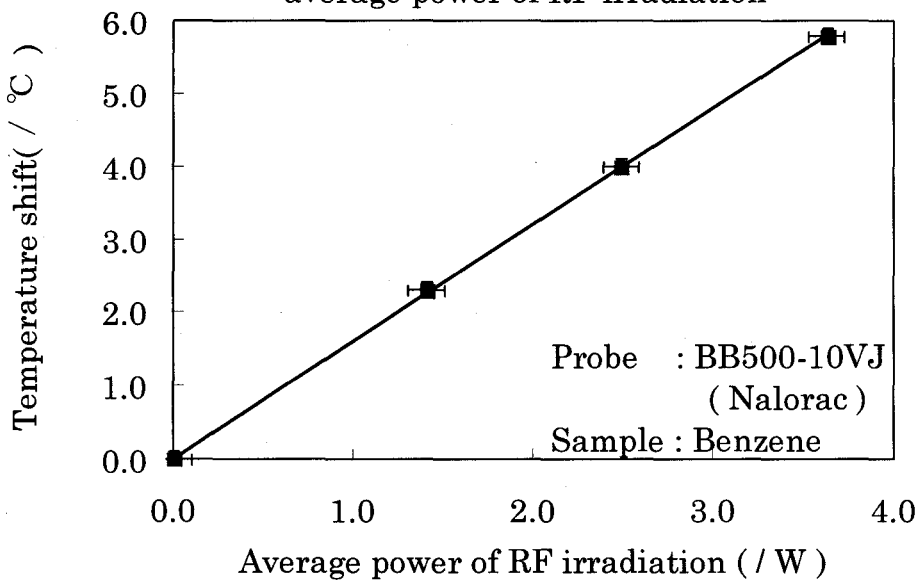


Fig.3 Temperature shift due to RF irradiation vs. average power of RF irradiation



○山腰 良晃、須藤 誠 (JEOL Ltd.)

An automatic sample changer of 8 samples consist of ultrasonic motor
Yoshiaki Yamakoshi, Makoto sudoh (JEOL Ltd.)

An automatic sample changer of NMR was developed using an ultrasonic motor. The ultrasonic motor has some advantage points such as non magnetism and quiet motion comparing with pervious driving mechanism. Therefore, the automatic sample changer has not undesirable influence such as vibration for NMR instruments. Besides, the motor allows compact design of the automatic sample changer which can be mounted on top of the magnet.

1. はじめに

最近のNMR装置のコンピュータ化に伴う、全自動オペレーション化のために、さらに自動試料交換装置 (Auto Sample Changer; ASC) の重要性が高まっている。

現在、溶液用ASCとしては、様々な種類のものが市場に出ているが、いずれも超伝導マグネットからの漏洩磁場に対する対策が不可欠となっている。動力源としては、前記のような制約から従来主にエアが用いられてきた。一般にエア源として用いられるエアコンプレッサは、設置スペースをとるだけでなく、騒音、振動などの問題をかかえている。またエア駆動では中間停止制御が難しく、多サンプル化の際の多点位置決め制御メカニズムが複雑化し装置の小型化・ローコスト化の弊害となっている。さらにエアによるASC動作時のSCMへの振動もNMR装置の性能向上により無視できなくなってきた。

これらの問題を解決すべく、新たに駆動源として超音波モータを採用し、その特長を十分に生かした新ASCを試作したので報告する。

2. 装置概要

本装置に採用した超音波モータの特長によって、本ASC試作において下記の点について大きなメリットを得る事ができた。

- 1) 非磁性構造・・・原理的に電磁気作用を使用していないので、磁気の影響を受けない。
よって電磁ノイズを出さないのので他に影響も与えない。
- 2) 静粛性が高い・・・モータ背面15cm位置で35dB。ほとんど動作音がせず静粛である。
- 3) 低速・高トルク・・・減速機構が非常に簡単となった。

その他モータが小型(薄型)・軽量なことも装置の小型化にとっておおきなメリットとなった。

図1に超音波モータの動作原理を示す。電圧を印加した際の伸び・縮みが交互に逆向きになるよう分極された圧電体が弾性体に接着されており、圧電体に超音波領域の電圧を加えると共振が起き、円環状の弾性体にたわみ進行波を生じる。弾性体の表面上の1点は進行波により楕円運動をし、これに圧接される回転子には進行波とは逆方向の摩擦力が発生する。この力を回転運動として取り出す事により駆動力が得られるものである。

常に加圧接触させているため、無通電時は回転子に接続された出力軸は保持されることになる。

オートサンプルチェンジャ

やまこし よしあき、すどう まこと

ASCは図2のように、マグネット上部に取り付けられる。

本ASCの構造を図3に示す。測定を行うサンプルは、サンプルスリーブ内に納められる。その際サンプルロータの外周部がチャッキングプレート上に係止保持された状態となる。交換動作を命令すると超音波モータの駆動力がプーリによって伝達され、ターンテーブルを回転させる。この時サンプルスリーブも一体となって回転するが、チャッキングプレートは固定の状態となっておりサンプルはサンプルスリーブにガイドされて、チャックプレート上を搬送される。プローブ直上のejectポジションにおいて、チャッキングプレートには切り欠きが設けられているため、サンプルは係止保持が解除されいつでもプローブへのloadが可能な状態となる。順次この一連の動作を繰り返す事によりサンプルの自動交換を行うことが可能となる。

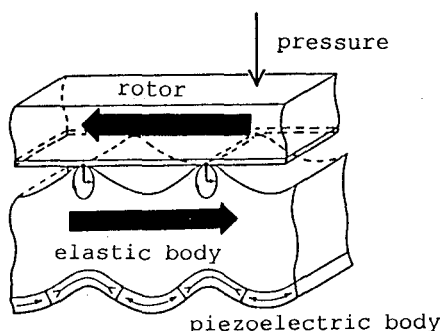


図1 進行波型超音波モータの原理図

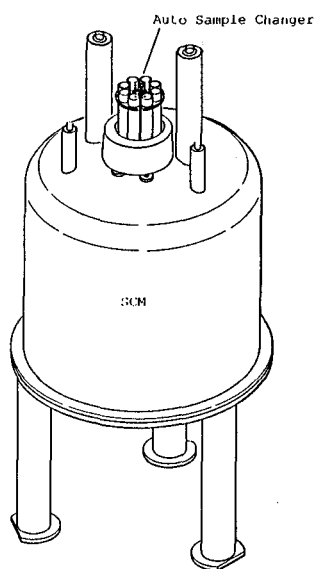


図2 Auto Sample Changer 外観図

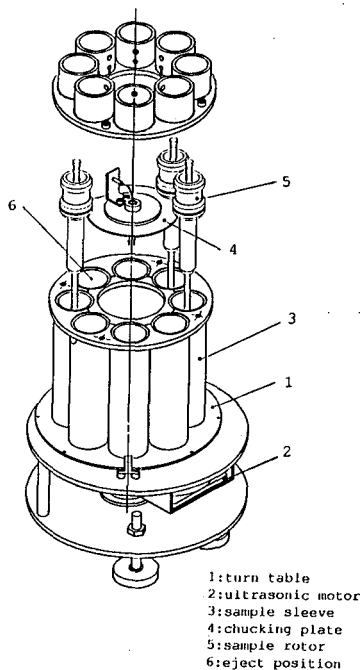


図3 Auto Sample Changer 構造図

3. まとめ

本ASCは、超音波モータを使用する事により、構造の簡略化・ローコスト化を実現した。また本ASCは非磁性構造と非常に静かで振動の無いメカニズムを持ち、NMR測定に悪影響を及ぼさない。

エア源が不要となったので、設置室の振動も軽減する。また、SCM上に簡単に装着可能であり特別な設置スペースを必要としない。今回試作のASCは8本のサンプルの装填が可能である。このASCは効率的な終夜無人NMR測定や、快適な測定環境を提供する。

1P14

The Manipulation of Water Relaxation and Water Suppression in Biological Systems using the Water-PRESS Pulse Sequence

William S. Price

Water Research Institute
Sengen 2-1-6
Tsukuba, Ibaraki 305

The water resonance is a formidable foe of biological NMR spectroscopists. It is both a necessary component of biological NMR studies and the source of huge problems in spectral acquisition. In protein NMR studies it is often desirable to observe the (exchangeable) NH or OH protons and also perhaps bound water molecules. This entails conducting the NMR experiments in a solvent consisting of ~90% H₂O solution. The large difference between the protein (~ mM range) and the water-proton (~ 100 M) concentrations directly impedes efficient spectral acquisition of the protein resonances in two ways. First, to avoid truncation of the free induction decay by the analog to digital converter the receiver gain must be set to a small value ill-suited to efficiently digitizing the weak protein resonances and secondly, the water resonance may conceal many protein resonances (especially α protons) that resonate at or near the water frequency. This second problem is compounded by the effects of radiation damping which cause the water resonance to be artificially broadened. The single largest problem in water suppression is that it is not generally possible to manipulate the water resonance independently of the solute resonances in the frequency domain.

The efficiency and selectivity of normal pulse sequence approaches for water suppression [1,2] are plagued by a combination of five factors: (1) selective pulses are neither perfectly selective and generally do not have a pure phase, (2) inhomogeneity of the rf (i.e., B_1) and static magnetic (i.e., B_0) fields, (3) spin diffusion, (4) the effects of radiation damping and as a consequence (5) the water and protein resonances have similar relaxation times. The first factor means neither selective excitation nor presaturation can be used to suppress the water resonance without affecting nearby protein resonances and in any case some α -protons resonate beneath the water resonance. Further, since the water resonance is normally artificially broadened by the effects of radiation damping, more resonances are either hidden by the water and thus greater decoupler powers are needed to presaturate the water resonance effectively bleaching out more of the protein resonances in the resulting spectrum. This problem is particularly severe in the case of high molecular weight species in which spin diffusion can rapidly propagate the effects of continuous irradiation throughout the entire spectrum.

Here we present a new method of water suppression (see Figure 1) in which homospoil pulses are used to manipulate the effects of radiation damping on the water resonance and thereby selectively alter the effective relaxation time of the water resonance with respect to the protein

Keywords: gradient, protein, longitudinal relaxation, radiation damping, water suppression

William S. Price

resonances [3]. The difference in the relaxation time of the water and biological macromolecules can then be used in an inversion recovery experiment to selectively suppress the water. The method allows the observation of protein resonances which resonate near or under the water resonance. Different than previous longitudinal relaxation based methods of suppression [4-6], this method is not sensitive to the effects of radiation damping.

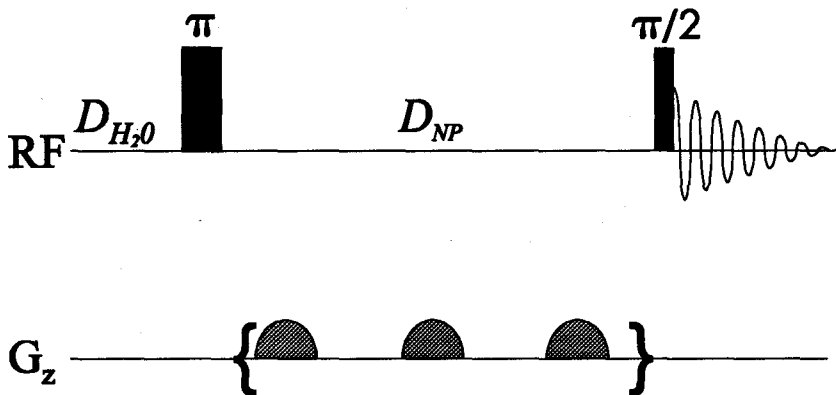


Figure 1 The Water-PRESS subunit consists of a relaxation delay (D_{H_2O}) to allow the water magnetization to reach thermal equilibrium. Next a π pulse is applied to rotate the magnetization to the -z axis. A delay (D_{NP}) of sufficient length is used to allow the water magnetization to relax to the origin. During D_{NP} a series of very weak homospoil pulses are applied so as to inhibit the effects of radiation damping. At the end of the D_{NP} the protein resonances, by virtue of their faster relaxation rate, have achieved thermal equilibrium. If, as in the present example, a non-selective $\pi/2$ pulse is applied an almost pure protein spectrum will be acquired.

In the simplest case (as depicted in Figure 1) a read rf pulse (e.g., $\pi/2$) can then be applied to observe the magnetization. In Figure 2, an aqueous solution of lysozyme is used to compare this method with presaturation and the WATERGATE sequence [7,8].

Considerable time savings are possible if we relax the requirement for having the water in a fully thermally relaxed state prior to the application of the inversion pulse. Instead we only have the requirement that the water magnetization has reached a null point at the time of the observe pulse (see Figure 3). During D_{H_2O} , which includes the acquisition time, the water magnetization M_Z starts from 0 and relaxes towards a maximum of M_0 with time constant $T_1^{H_2O}$,

$$M_Z^{D_{H_2O}} = M_0 \left(1 - \exp\left(-\frac{D_{H_2O}}{T_1^{H_2O}}\right) \right). \quad (1)$$

The 'inversion' pulse has the effect of rotating the z-component of $M_Z^{D_{H_2O}}$ about the origin so that the magnetization after the pulse is given by $M_Z^{D_{H_2O}} \cos(\theta)$ where θ is the angle of the inversion pulse (i.e., $\pi/2 < \theta \leq \pi$) and M_Z relaxes towards M_0 during D_{NP} , thus,

$$M_Z^{D_{NP}} = M_0 - \left(M_0 + M_Z^{D_{H_2O}} \cos(\theta) \right) \exp\left(-\frac{D_{NP}}{T_1^{H_2O}}\right). \quad (2)$$

To achieve a null point at the time we apply the observe pulse we require $M_Z^{D_{NP}} = 0$. We solve Eq. (2) for D_{H_2O} since D_{NP} will normally be determined by the solute relaxation time, thus,

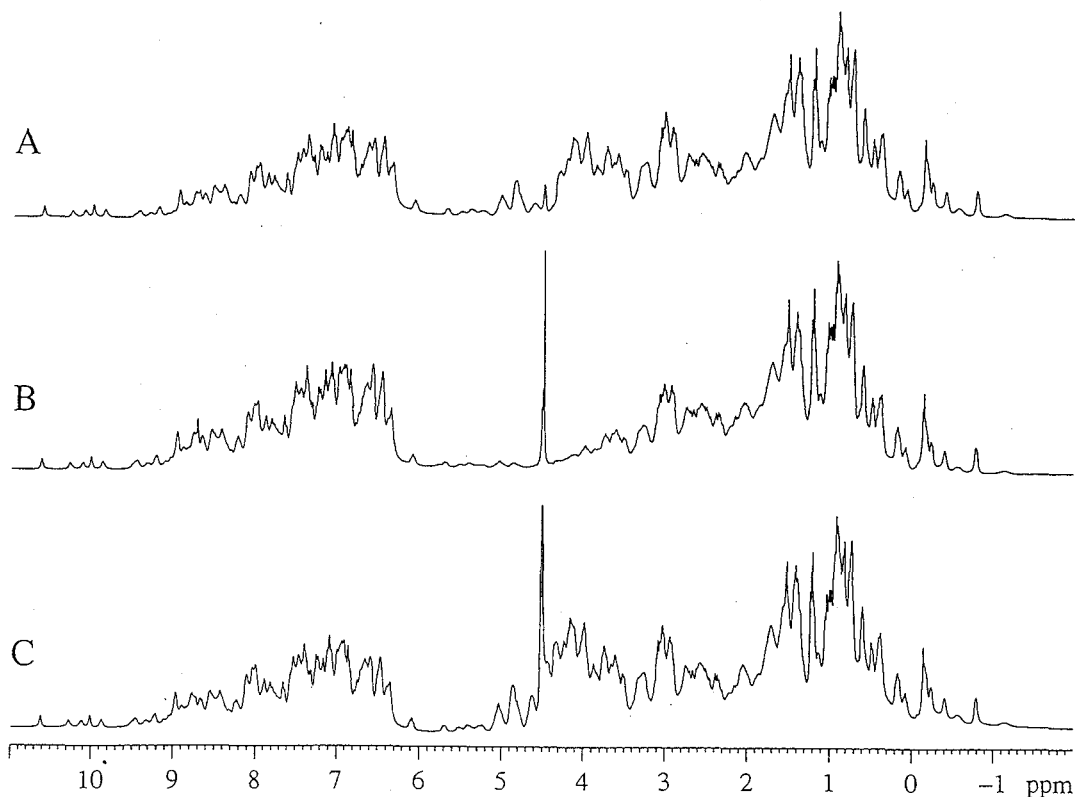


Figure 2 Examples of one-dimensional spectra of a lysozyme solution (10 mM in 10:90 $^2\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$, pH 3.66) acquired at 310 K at 300 MHz. The spectra were acquired with three methods of water suppression (A) Presaturation (B) WATERGATE (C) Water-PRESS. It can be clearly seen that the intensities of the resonances in the neighborhood are attenuated in (A) and are almost absent in (B). However, with the Water-PRESS sequence the unperturbed intensities of all resonances can be observed. In acquiring spectrum (C) an inversion delay (D_{NP}) of 2.58 s was used with a series of 0.5 ms homospoil pulses with an intensity of about 1 Gcm^{-1} . All three spectra were acquired under the same conditions as far as possible (e.g., receiver gain and number of scans).

$$D_{H_2O} = \ln \left(\frac{\cos(\theta)}{1 + (\cos(\theta) - 1) \exp\left(-\frac{D_{NP}}{T_1^{H_2O}}\right)} \right) T_1^{H_2O} - D_{NP} \quad (3)$$

It is instructive to consider the form of Eq. (3). For Eq. (3) to be valid we require

$$(\cos(\theta) - 1) \exp\left(-\frac{D_{NP}}{T_1^{H_2O}}\right) < 1 \quad (4)$$

If we set $\theta = \pi$, then the limit given in Eq. (4) becomes, as expected,

$$D_{NP} < \ln(2) \times T_1^{H_2O} \quad (5)$$

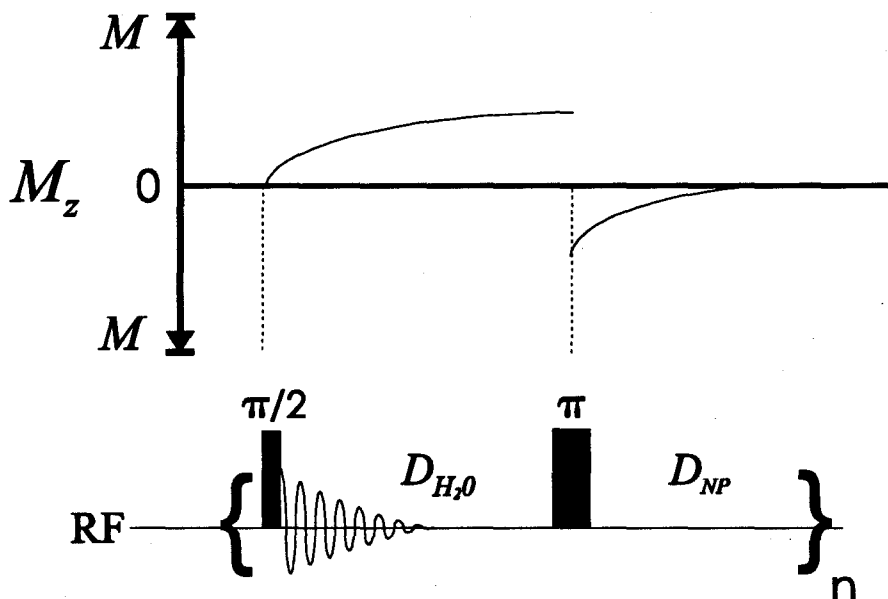


Figure 3 Steady state Water-PRESS. Under these conditions the recycle time is less than that required for the water magnetization to relax back to the state M_0 .

References

- 1 M. Guéron and P. Plateau, in: Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, eds. D.M. Grant and R.K. Harris (John Wiley & Sons, New York, 1996) p. 4931.
- 2 W.S. Price, in: Annual Reports on NMR Spectroscopy, ed. G.A. Webb (Academic Press, London, 1996) p. 51.
- 3 W.S. Price and Y. Arata, J. Magn. Reson. B 112 (1996) 190.
- 4 F.W. Benz, J. Feeney and G.C.K. Roberts, J. Magn. Reson. 8 (1972) 114.
- 5 S.L. Patt and B.D. Sykes, J. Chem. Phys. 56 (1972) 3182.
- 6 R.K. Gupta, J. Magn. Reson. 24 (1976) 461.
- 7 M. Piotto, V. Saudek and V. Sklenár, J. Biomol. NMR 2 (1992) 661.
- 8 V. Sklenár, M. Piotto, R. Leppik and V. Saudek, J. Magn. Reson. A 102 (1993) 241.

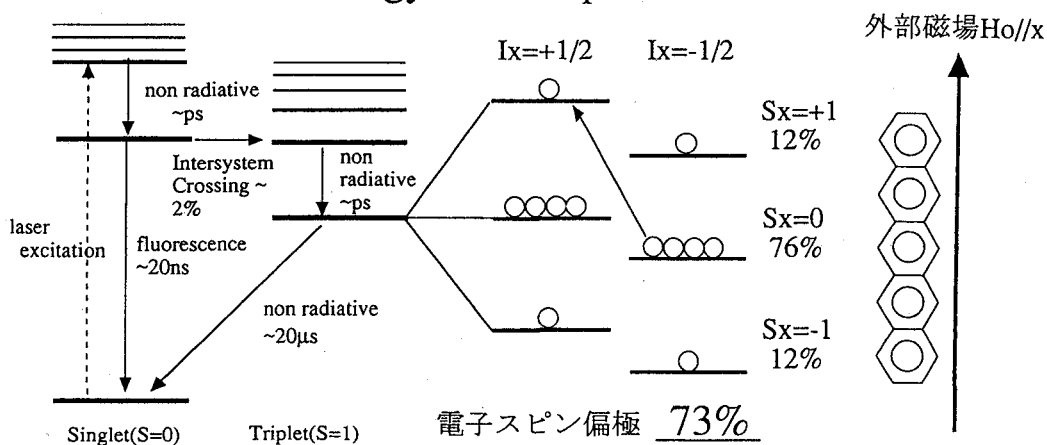
Dynamic Nuclear Polarization with Laser Excited Pentacene Molecules
 Kyoto univ.,RIKEN^A M.Oda,M.Iinuma,H.M.Shimizu^A,Y.Takahashi,
 A.Masaike,T.Yabuzaki

Abstract

To enhance NMR signal we have been pursuing high nuclear spin polarization at high temperature and a magnetic field as low as 0.3T. We have used naphthalene and p-terphenyl doped with pentacene as samples. By DNP method we have obtained the proton polarization of 0.1% for naphthalene and 1% for p-terphenyl at room temperature, and about 20% for both crystal at liquid N₂ temperature. For deuteron in naphthalene-d₈ we have obtained several hundreds of enhancement of polarization.

これまで、NMRの感度を上げるために様々な試みがなされてきた。超電導磁石を用いた高磁場化は大きな進歩をもたらしたが、クライオスタットなど、実験上大きな労力とコストが必要になる。我々はもっと手軽に核スピン偏極を得ることを目的に高温低磁場での動的核偏極法について研究を進めている。動的核偏極を行うには電子スピンの高偏極を得る必要があるが、これを高温低磁場で得るためにペンタセン分子を用いる。ペンタセン分子は基底状態では π 電子が一重項状態にあり電子スピンをもたない。これをレーザーにより第一励起状態に励起すると大部分は蛍光を發して基底状態に戻ってしまうが、項間交差により一部三重項状態に移る。ペンタセンの長軸を印加する静磁場の方向と平行にしたときには選択則により磁場温度に無関係に最大73%もの電子スピンの偏極が得られる。これにマイクロ波を照射し動的核偏極を行う。レーザー励起はパルス的に行い、マイクロ波もそれに同期してパルス的に加える。これを繰り返して核スピンを高偏極させる。

The electronic energy level of pentacene



我々はまず陽子スピンの高偏極を行った。陽子スピンの偏極度 P の増大の様子はおよそ次の式で決まると考えられる。

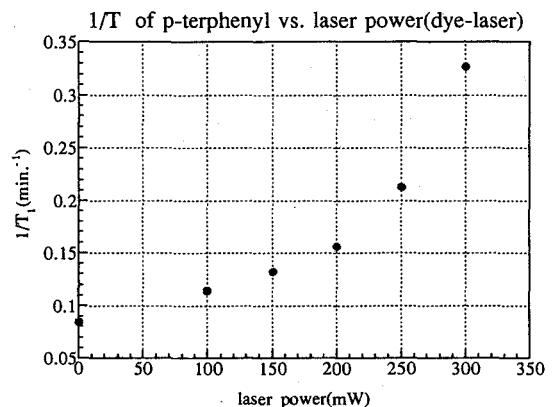
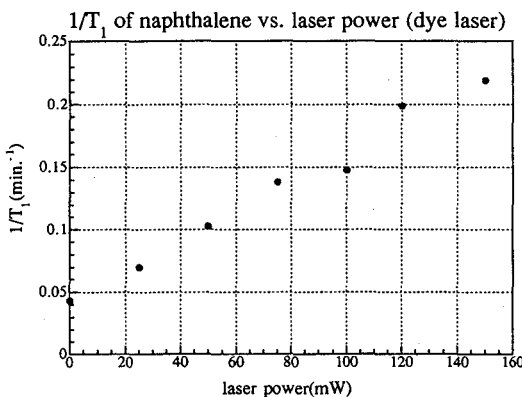
$$\frac{dP}{dt} = A(P_e - P) - \Gamma(P - P_{th})$$

P : proton polarization P_e : electron polarization ($\sim 73\%$)
 P_{th} : proton polarization (at Boltzmann equilibrium)
 A : buildup rate Γ : relaxation rate

偏極する場合、 $P \gg P_{th}$ とできるので、 P_{th} を無視して上式を解くと下のようになる。

$$P = \frac{A}{A + \Gamma} P_e [1 - \exp\{-(A + \Gamma)t\}]$$

これから高偏極を得るためには偏極効率 A が大きく、また緩和時間が長ければいいことが分かる。偏極効率を大きくするためには三重項状態のペンタセンの数を増やせばよく、ペンタセンに対する励起効率のいい波長のレーザーで高出力のものを用意する、ペンタセンの濃度をあげる、などが考えられる。我々は波長 600nm、パルスエネルギー 10mJ、パルス幅 1 μ s の色素レーザーを用意した。最大のペンタセンの濃度は母結晶によって決まってしまうのだが、今回はできるだけ多く入れるために、ペンタセンと相性のいいナフタレン、パラテルフェニルを用意した。特にパラテルフェニルはナフタレンの 10 倍のペンタセン (0.1%) を入れることができるので有利である。緩和時間は物質固有のものであるが、今の場合レーザー励起した後の無輻射遷移による温度上昇のために緩和時間が変動することが考えられる。これを見るためにレーザー出力と緩和時間の関係を測定した。その結果を下図に示す。ナフタレンは温度上昇にともない緩和時間が短くなることが知られているが、確かにレーザーの出力を上げていくとそのような傾向が見られる。一方、パラテルフェニルは常温付近では本来なら温度が上がれば緩和時間が長くなるはずであるが逆の傾向が見られる。この原因はまだ確定していないのだが、とにかくパラテルフェニルもナフタレンと同様レーザーを入れ過ぎると逆効果であることが分かる。



以上の結果からレーザー出力を上げれば偏極効率は上がるが緩和時間が短くなってしまふことが分かる。これに注意し、レーザー出力を調整して偏極実験を行った。その結果得た常温での最高偏極度は表1のようであった。ここで、偏極度は熱平衡状態のNMR信号との比較により求めた。色素レーザーの優位性を示すために窒素レーザー(337nm)、Nd³⁺:YLFレーザー(523nm)の結果も合わせて示してある。

	naphthalene		p-terphenyl	
	dye laser	N ₂ -laser	dye laser	TFR laser
laser power(mW)	350	24	350	70
repetition rate(Hz)	50	70	50	1000
DNP time(min.)	20	40	20	40
polarization(%)	0.1	0.08	1	0.5

table 1. maximum polarization at room temperature

上の結果ではレーザーの出力の最適化により最高偏極度を得たわけだが、温度を一定に保つことができればレーザーの出力を上げることができ、さらに偏極度を向上させることができると考えられる。そこで、簡単に温度を一定に保つ方法として液体窒素に結晶を浸して実験を行った。その結果、ナフタレン、パラテルフェニルともに約20%の偏極度を得ることができた。この結果は中性子透過実験によっても確認された。

今回偏極に有利なようにナフタレン、パラテルフェニルを選んだが、基本的にはペンタセンの長軸を同じ向きにして配置することができるものであれば偏極可能である。ただし核スピンの緩和時間は長い必要があり、場合によっては上の結果のように液体窒素に浸すなどしてある程度以上緩和時間を確保する必要がある。他の系への応用として現在ナフタレン-d₈、パラテルフェニル-d₁₄を用いての重水素の偏極に取り組んでいる。ナフタレン-d₈については液体窒素温度において熱平衡状態に対して数100倍の偏極度を得ている。また、液晶分子中の陽子の偏極についても検討中である。

ペンタセン、動的核偏極、レーザー、ナフタレン、パラテルフェニル

小田真弘 おだまさひろ

Design and construction of a pressure-jump apparatus
for use in NMR spectroscopy

Graduate School of Science and Technology, Kobe University

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University

○Kazuyuki Akasaka, Tomoko Tezuka, and Hiroaki Yamada

We have designed and constructed a pressure-jump apparatus with a purpose of using it in pressure-jump NMR experiments, the basic design of which is illustrated in Figure 1.

[はじめに]

温度と圧力はいずれも熱力学平衡を規定する外部パラメーターである。温度を変数とする実験はもとより、圧力を変数とする平衡系のNMR測定は既に1972年以来の歴史をもち、方法として確立されている。この方法を応用して、最近では蛋白質の圧力変性の観測も可能となった。一方、温度、圧力を可変パラメーターとする非平衡条件下でのNMR測定は、温度ジャンプNMRについてわれわれの研究室で最近開発に成功した。圧力ジャンプNMRはまだ実現していないが、圧力をパラメーターとする実験から得られる情報の重要性を考えると、その実現が望まれる。このような観点から、われわれは初の圧力ジャンプNMRの実現をめざして、NMR用の圧力ジャンプ装置を考案、試作した。

[装置 (図1参照)]

ハンドポンプ、ブルドン管圧力計よりなる昇圧系(圧媒は灯油)を(1)に接続して加圧後、バルブ(2)を閉じ、圧力ジャンプ(PJ-NMR)装置を昇圧系から切り離す。PJ-NMR装置は、NMR測定試料をいれる石英製高圧セル(5)、セパレーター(3、4)、圧力ジャンプユニット(6)、ストライカーユニット(7)、および機械式トリガー(8)から成り立っている。10テスラ程度の強磁場下での実験が可能なよう、この装置の金属部分のほとんどはSUS-316ステンレス鋼(ほぼ非磁性)を使用して制作した。

[動作原理]

200MPa(約2000atm)の加圧下では、圧力ジャンプユニット内のチェックバルブにセットした直径5mmのタングステンカーバイドボールに約230kgfの力が加わり、高圧を維持している。このボールの下方に特殊鋼製ストライカーと機械式トリガー

キーワード: NMR、高圧、圧力ジャンプ

あかさか かずゆき、てづか ともこ、やまだ ひろあき

が取り付けられており、ストライカーには非磁性スプリングあるいはゴムバンドにより上方向に3~5kgfの力が加えられている。トリガー（約50gfの力で作動する）を引くとストライカーのロックがはずれて、ストライカーピンがタングステンカーバイドのボールを打撃し、瞬間的に圧媒が噴出、圧力が低压側にジャンプする仕組みである。

〔実験結果〕

この装置の高圧系は、少なくとも300MPaの耐圧性能をもつことが判明した。圧力ジャンプ実験は現在のところマニュアルトリガーで行い、200MPaから170MPa、150MPaから常圧への圧力ジャンプ実験に成功している。圧力ジャンプNMRの測定に向け、準備を進めている。信号の積算を行うためには、トリガーの作動後（あるいはセパレーター内に置いたピストンの動きと連動し）、正確な遅延時間においてRFパルスを発生することのできるインターフェースを組み込む必要がある。

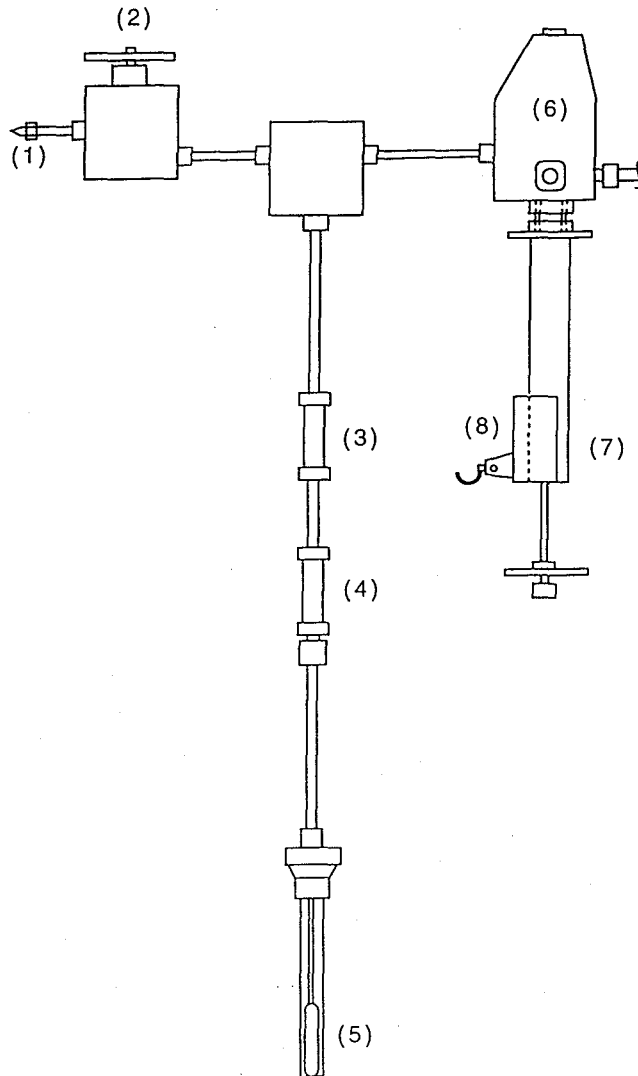


Fig.1 Pressure-Jump Apparatus

1P17

A simple method for ^{13}C CPMAS NMR measurements
under high gas pressure and its application to
a polymer

Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Kyoto University, Kyoto 606-01, Japan

T. Miyoshi, K. Takegoshi, and T. Terao

A simple high-pressure MAS(HPMAS) NMR method is proposed to investigate the polymer dynamics under high gas pressure. The effect of CO_2 gas on poly(styrene) is investigated in the pressure range of 0-7 MPa. ^{13}C $T_{1\rho}$ measurements lead us to conclude that the motional frequency of both the main chain and aromatic region of PS gets faster with increasing CO_2 gas pressure.

^{13}C CPMAS NMR spectroscopy has been used to characterize the molecular motion of polymer in a wide temperature range. However, this method has not been utilized under high pressure, because it is considered that the sample spinning is difficult and dangerous under high gas pressure.

In this study, we propose a simple High-Pressure Magic Angle Spinning(HPMAS) NMR method, and investigate the molecular dynamics of poly(styrene)(PS) in the pressure range of 0-7 MPa.

HPMAS was realized as follows: A pyrex glass tube containing a sample, whose inside and outside diameters are 3.4 and 5.8mm, respectively, was attached to a vacuum line and degassed. After that, the CO_2 gas, which is enough to give a required pressure, was transferred into the glass tube immersed in a liquid N_2 bath; then, the glass tube was sealed off. The sealed glass tube was inserted into a Chemimagetics 7.5 ϕ MAS spinner with powdered glass or KBr to well balance the spinner.

The ^{13}C NMR experiments were carried out at 35°C with a Chemimagetics CMX 300 spectrometer operating at resonance frequencies of 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C .

high pressure / gas pressure / ^{13}C CPMAS NMR / poly(styrene)

みよしとしかず、たけごしきよのり、てらおたけひこ

Fig. 1 shows the CO₂ gas-pressure dependence of ¹³C CPMAS NMR spectra of PS. The linewidth of the protonated aromatic signal broadens with increasing pressure. On the other hand, the linewidth of the main chain peak is constant up to 7MPa. The line broadening of the aromatic peak suggests that CO₂ gas induces the molecular motion of the aromatic region. Then, we measured the CO₂ pressure dependence of ¹³C T_{1ρ} of PS. We analyzed the relaxation curves of the methine and protonated aromatic carbons using single and double exponential curves, respectively. The obtained ¹³C T_{1ρ} values are listed in Table 1. For the aromatic region, the ¹³C T_{1ρ} value of the slow component decreases with increasing gas pressure. That for the main chain also decreases with increasing pressure. The ¹³C T_{1ρ} value is sensitive to the molecular motion with a frequency around the spin-locking field intensity(55kHz), and the molecular motion with the spin-locking field frequency leads to the minimum of the ¹³C T_{1ρ} value.

Therefore, the motional frequency of not only the aromatic but also the main-chain also gets faster and close to the spin-locking frequency with increasing CO₂ gas pressure. Further, the detailed analysis of the molecular motion induced by CO₂ gas is in progress for comparing with that by temperature.

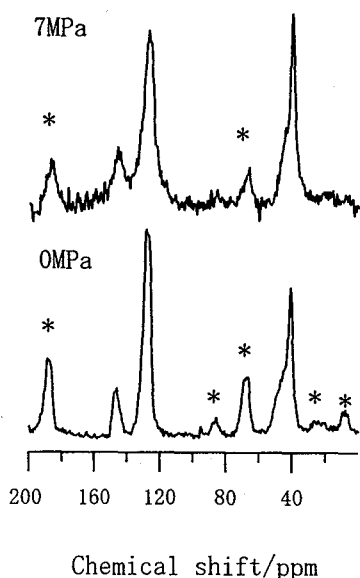


Table 1. Pressure dependence of ¹³C T_{1ρ} of PS

	methine (ms)	protonated aromatic (ms)	
0MPa	48.3±2.0	38.4±2.9(83%)	1.04±0.20
3MPa	25.3±3.0	30.7±5.2(77%)	1.49±0.43
5MPa	20.7±1.9	24.3±3.7(75%)	1.31±0.36
7MPa	7.0±0.9	4.60±0.27(75%)	0.46±0.09

Errors are 2.5σ.

Fig 1. Pressure dependence of ¹³C HPMAS NMR spectra of PS.

Structure Analysis of Synthetic Polymers by HR-MAS

- Application of High Resolution "Solution" NMR Techniques to Solvent-swollen Samples -
(¹Bruker Japan, ²Sumitomo Chemical Co. Ltd.) ○ Hajime Sato¹, Akihiko Okada², Emiko
Fukuyo-Yokota² and Kazuo Yamauchi¹

We demonstrate the application of magic angle sample spinning (MAS) for measuring high resolution solution NMR experiments in order to perform structure analysis of synthetic polymers which are only swollen but not soluble. By the combined use of 2 kHz MAS and ²H lock (HR-MAS), we found that well resolved ¹H-NMR spectra of D₂O-swollen gel were obtained and that the reproducibility of the spectra was significantly better than the static measurement. We also showed that HR-MAS method can be integrated not only into conventional 1D experiments but also into higher dimensional NMR experiments, such as HOHAHA(TOCSY). Spectra obtained by HR-MAS closely depended on solvent environment, which indicated that HR-MAS method is also useful for investigation of the interaction between polymer solute and solvents.

【はじめに】合成高分子は溶媒に溶けにくいものが多く、溶液状態で高分解能 NMR スペクトルを得ることはやさしくなかった。一方熔融状態での測定は、磁場の安定性が問題となる 2次元 NMR ではあまり実用的でない。そこで本研究では、室温で合成高分子を重水素化溶媒に膨潤させたのち、マジックアングルスピニング(MAS)を行うことにより化学シフトの異方性を平均化し、不均一な膨潤試料ながら、溶液状態に近い高分解能スペクトルが得られな
いか検討した。

【実験】膨潤はするが溶媒に溶解しない合成高分子の試料として、住友精化(株)の吸水性ゲルを用いた。高分子は室温で膨潤させたが、溶媒としては、種々の膨潤度合いを試すために重水(99.75%)のほかに重水と重メタノールの混合溶媒を用いた。このゲルは溶媒にメタノールが混ざると溶媒の吸収性が変化するという性質を持つ。

すべての NMR スペクトルは Bruker DRX-400 上で 4 mm MAS(¹H / BB (BB: ³¹P - ¹⁵N))プローブを用いて室温で測定した。サンプルは通常の CRAMPS 用ローターに詰めた。サンプルの回転数は 2 kHz に設定した。重水素ロックのチャンネルには BB チャンネルを ²H にチューニングして用いた。¹³C-NMR は、いったん重水素ロックをかけて分解能を調製してからロックを
キーワード: HR-MAS、合成高分子、膨潤状態、重水素ロック

○さとう はじめ、おかだ あきひこ、よこた えみこ、やまうち かずお

はずし、BBチャンネルを ^{13}C に再度チューニングして測定した。

HR-MAS プロブヘッドについて

最近開発されたHR-MAS用プロブは $^1\text{H}/^2\text{H}/^{13}\text{C}$ にトリプルチューン可能なコイルを用いており、重水素をロックシグナルとして観測しながらダブルレゾナンスの実験が行え

(figure 1)、また耐圧を低くする分、磁化率の補正を行うなど固体専用MASプロブに比べて高分解能化・低ノイズ化がはかられている。今回の実験は装置の都合により固体用MASプロブを用いたが、HR-MASプロブを用いればさらに高分解能のスペクトルの得られる可能性がある。一方、分解能をさらに向上させるため、ローター内部のサンプルを入れる部分が球形になっている試料管も開発されており、分解能の調整がより行いやすくなるものと期待される。

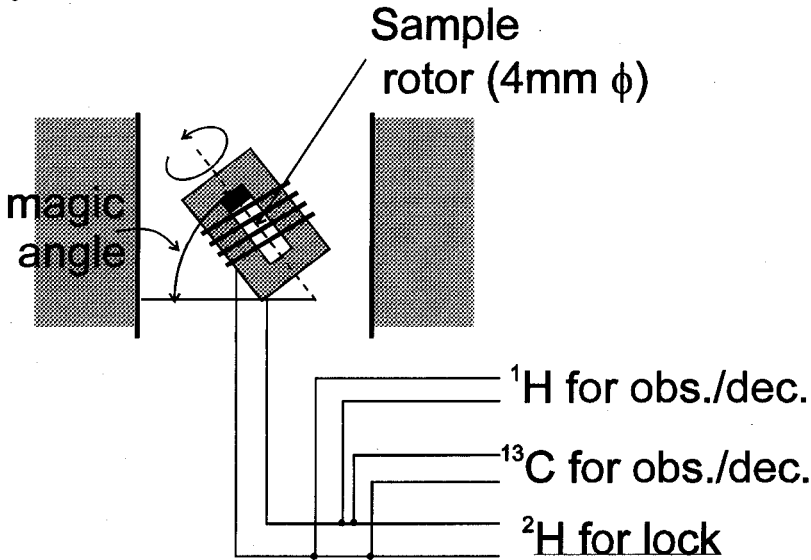


figure 1. Schematic representation of HR-MAS probehead.

【結果と考察】1. MAS の効果 MAS の効果を確かめるため、 ^1H -NMR スペクトルにおいて、サンプルの回転数を 0 Hz のものと 2 kHz のものを測定した (figure 2)。その結果、2 kHz の方が非常に高分解能であった。さらに、0 Hz のときは測定ごとに得られるスペクトルの分解能がまちまちで再現性を得ることは困難であったが、2 kHz で MAS 測定した場合は良好な再現性が得られた。なお、2 kHz で MAS 測定した試料ではスピニングサイドバンドが観測されている。化学シフトの異方性や双極子・双極子相互作用による効果は除去されているが、外部磁場の不均一性による効果と考えられる。試料管やプロブに関して固体専用のものを流用したため、シム調整が十分でなかったのではないと思われる。

2. 試料の状態とスペクトル 膨潤状態の異なる試料を作るため、(1)ポリマー：重水の比率を変えたもの、(2)ポリマー：溶媒の比率を同じにして、溶媒の組成（重水：重メタノール比）を変えたものを調製した。(1)についてはポリマーの ^1H -NMR ピークの形状に変化は見られなかったが、(2)についてはメタノールの割合が増すにつれて吸水性ゲルのピークがブロードに

なり、重水：重メタノール = 1:3 (v/v)において、もはや溶媒の吸収性を示さなくなるとともにスペクトルからピークも消失した。このように、MAS 法で見られるピークは膨潤しているポリマーの状態をよく反映していることがわかる。

3. その他の測定法 $^1\text{H-NMR}$ と同様に、 $^{13}\text{C-NMR}$ についても静止状態 (0 Hz) と 2 kHz の MAS 回転時の比較を行ったが、同様に MAS 回転によるピークの先鋭化が見られた。 $^{13}\text{C-NMR}$ の測定には一晩を要したが、ロックをかけない状態でも特に測定に支障はなかった。ただし、HMQC や HMBC など周囲の変化に敏感な測定では、ロックの効果が顕著に現れる可能性がある。一方、同種核二次元 NMR の場合は、BB チャンネルをロックに当てることができるので容易に測定が可能である。本研究では 2 kHz 回転において、2D HOHAHA (TOCSY) スペクトルを測定した (figure 3)。その結果、ポリマーのクロスピークを観測する事ができた。

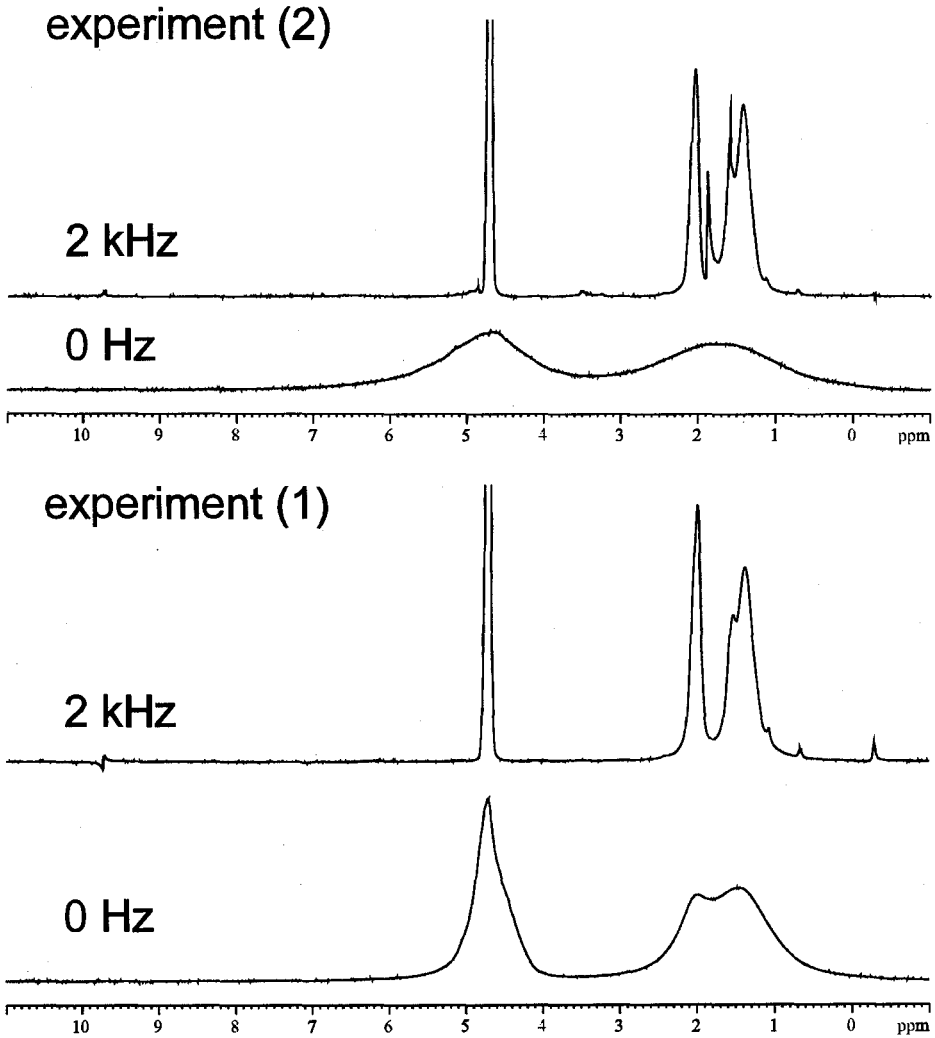


figure 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of a swollen polymer with and without MAS

【まとめ】本研究は、未知物質の構造解析法として優れた高分解能「溶液」NMRの手法と、ピークを先鋭化する手法としてのMAS法、さらに溶媒による膨潤をあわせて用いることにより、従来は構造解析が難しかった不溶不融の合成高分子が、NMRによる詳細な構造解析の対象となりうることを示した。今までなら、溶液NMRの解析対象にするためには浮遊物のないホモジニアスな溶液を得ることが必須であり、多くの合成高分子の場合、この要求を満たすことは非常に困難であった。本研究におけるアプローチは、合成高分子の構造解析のために越えなければならないハードルを大きく下げるものとして、今後の応用が期待されるのみならず、合成高分子以外の系でも溶液NMRの手法を用いた構造解析の対象分野を拡大する可能性を秘めている。

【謝辞】吸水性ゲル試料の使用を快諾下さった住友精化（株）に厚くお礼申し上げます。

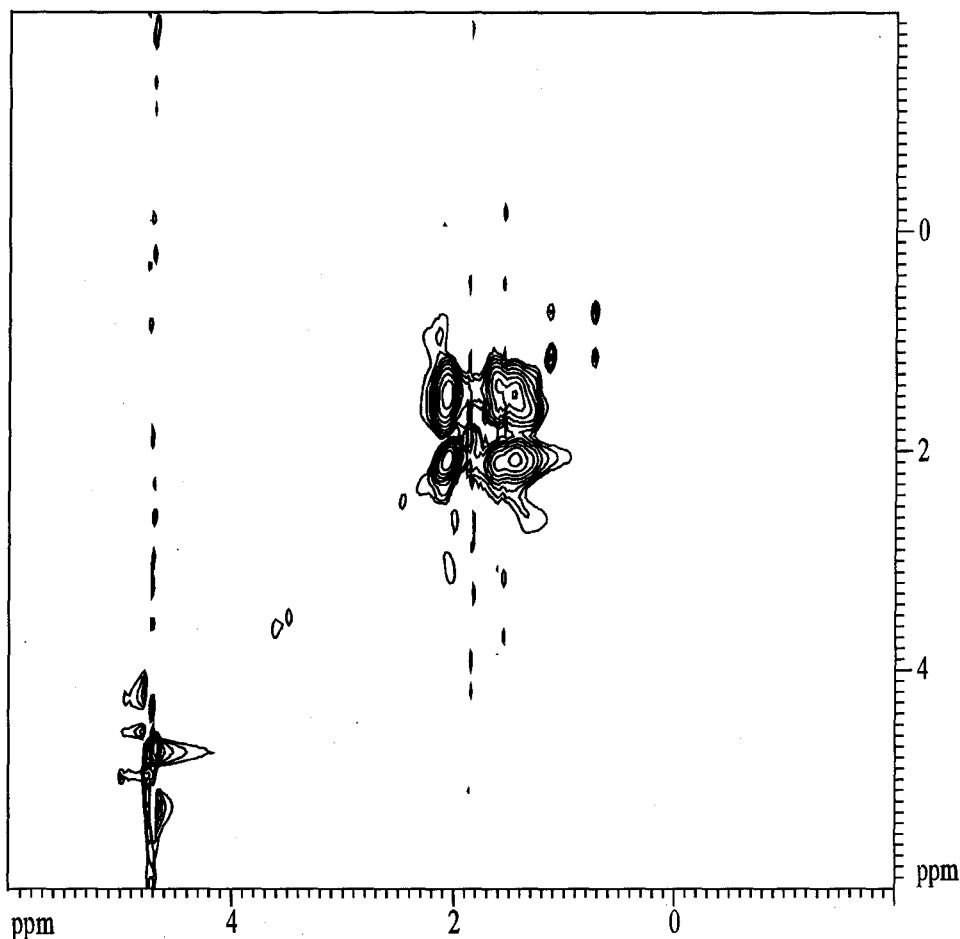


figure 3 HOHAHA(TOCSY) spectrum of a swollen polymer with MAS.

(京大院理)○西山裕介、久保 厚、今城文雄、寺尾武彦

Structural Analyses of a Cholesteric Liquid Crystal by ^{13}C NMR

(Kyoto Univ.)Yusuke Nishiyama, Atsushi Kubo, Fumio Imashiro, and Takehiko Terao

Abstract High resolution ^{13}C NMR experiments under magic-angle-spinning(MAS) and under spinning with a greater angle than the magic-angle(g-off-MAS) were performed on a cholesteric liquid mixture of p-methoxybenzylidene-p-n-butylaniline(MBBA) and Cholesteryl chloride(CC) wt. 12.0%. The shifts of peaks between the MAS and g-off-MAS spectrum were observed. The chemical shift anisotropies were calculated from the shift of the peaks, and compared with those of MBBA. For analyzing the spectra, we proposed a model of the liquid crystal ordering in a cholesteric phase.

はじめに

コレステリック液晶は、ピッチ方向にディレクターが回転しながら配向するため NMR スペクトルは、粉末パターンとなる。また、ピッチ方向に分子が拡散すると NMR 観測量も変化するため NMR スペクトルは、拡散の影響も受ける。以前に行われたコレステリック液晶の NMR による研究では、 ^{13}C の粉末パターンを重ねあわせたまま観測したり[1]、 ^2H などによるラベルを行って粉末パターンを分離して観測されてきた[2]。また、そのようにして得た NMR スペクトルの解析には拡散の影響を考慮することが不可欠であり、解析には NMR 観測量以外に拡散定数がパラメータとして必要であった。また、ピッチの長いコレステリック液晶では、分子の配向が磁場方向に偏ってしまうため NMR スペクトルは歪みを受ける[2]。そのため、パラメータとして分子の配向の偏りも考慮する必要があった。そこで我々は、コレステリック液晶の NMR スペクトルの解析に必要なパラメータを減らすためにマジックアングルよりも大きな角度でサンプルを回転(g-off-MAS)させることによってコレステリック液晶のピッチを回転軸方向にそろえて NMR スペクトルを観測した。こうして得られるスペクトルは、粉末パターンとはならず先鋭化したスペクトルとなり、拡散の影響も無視でき、さらに磁場による配向の偏りも平均化される。

このようにして得た NMR スペクトルを分子構造の解析に用いるためには、コレステリック液晶のモデルを立てて液晶分子の配向ポテンシャルを計算することが必要である。これまでに多数のコレステリック液晶の液晶場理論が提案されている。ネマティック液晶の Meier-Saupe の理論ににねじれのポテンシャルを加えてコレステリック液晶に適用したもの[3]などがある。しかしそれらの理論は、分子間相互作用を展開して議論を行ったものであり、その展開係数そのものには物理的意味は与えられず単なるパラメータとして扱われていた。そのため、分子の形や分子の静電相互作用から液晶の物理的な性質を予測することはできなかった。そこでわれわれは、液晶分子の分子間相互作用から直接コレステリック液晶分子の配向ポテンシャルを計算する理論を提案する。

本研究では、g-off-MAS によりコレステリック液晶の ^{13}C NMR スペクトルを得て、コレステリック液晶のポテンシャルエネルギーを計算して得たシミュレーションのスペクトルと比較することにより、コレステリック液晶の構造解析を行うことを目的とする。

 ^{13}C NMR、オーダーパラメーター、分子拡散、コレステリック液晶

にしやまゆうすけ、くぼ あつし、いましろふみお、てらおたけひこ

コレステリック液晶の g-off-MAS NMR スペクトル

磁場中でディレクターが磁場方向に配向するネマティック液晶 ($\Delta\chi = (\chi_{11} - \chi_{33}) > 0$) にキラルな溶質を溶かしたり、液晶分子そのものをキラルにできたコレステリック液晶は、ピッチが磁場に垂直になるように配向する (Fig.1)。こういったコレステリック液晶のピッチの方向は $\Delta\chi < 0$ のネマティック液晶として扱える。サンプルの回転軸と磁場のなす角を θ 、マジック角を θ_m としたとき 1)マジック角より大きな角度で回転させる ($\theta > \theta_m$) と、ピッチは回転軸方向に配向し、2)マジック角より小さな角度で回転させる ($\theta < \theta_m$) と、ピッチは回転軸に対して垂直方向に一樣に配向する [4]。

ここで $\theta > \theta_m$ で回転させたときのスペクトルを考える。Fig.1 のように座標系をとると NMR 観測量のテンソル異方性部分 $A_{20}^{(x,y,z)}$ は

$$A_{20}^{(x,y,z)} = \sum_{p=-2}^2 A_{2p}^{(x',y',z')} D_{p0}^2(\omega_r t + \phi_0, \theta, 0) \quad (1)$$

で与えられる。相互作用に対して試料の回転が十分速ければ時間依存の項は平均化されて

$$\int dt A_{20}^{(x,y,z)} \approx A_{20}^{(x',y',z')} D_{00}^2(\omega_r t + \phi_0, \theta, 0) = A_{20}^{(x',y',z')} P_2(\cos \theta) \quad (2)$$

となり、異方性が $P_2(\cos \theta)$ だけスケールされることが分かる。

実験

試料としてネマティック液晶 p-methoxybenzylidene-p-n-butylaniline(MBBA) および MBBA と Cholesteryl chloride(CC)(wt. 12.0%)を混合してコレステリック液晶としたものを用いた。スペクトロメーターには、Chemagnetics CMX300 を用いた。MBBA には 300.5K に MBBA と CC の混合物には 303K に温度調節された空気を試料管に吹き付け試料の温度を一定に保った。温度は MBBA および MBBA と CC の混合物は、ともに $T/T_c = 0.948$ を持つように決定した。 T_c は、液晶相-液相の相転移温度である。off-MAS は、試料管を磁場から 74 度の角度で 2kHz で回転させて実験を行った。

MBBA のマジックアングルスピンニング(MAS)および静止状態の ^1H デカップル ^{13}C NMR スペクトルを観測した。MBBA と CC の混合物は MAS および静止状態、g-off-MAS の ^1H デカップル ^{13}C NMR スペクトルを観測した。

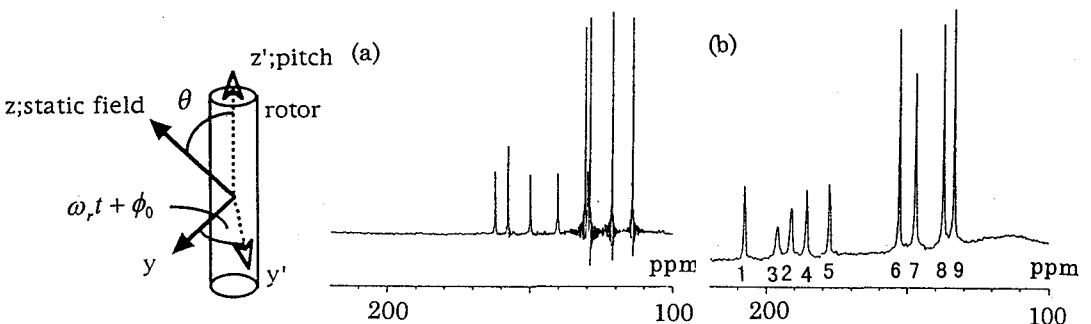


Fig.1 Relationship between the laboratory fixed (x,y,z) coordinate system and the sample fixed (x',y',z') coordinate system.

Fig.2 The ^1H decoupled ^{13}C NMR spectra of a nematic liquid crystal MBBA at 300.5K under static (a) and under 2kHz MAS(b). Only the aromatic part is shown.

実験結果と考察

MBBA の ^1H デカップル静止、および MAS ^{13}C NMR スペクトルを Fig.2 に、MBBA と CC の混合物の ^1H デカップル静止、および MAS、g-off-MAS ^{13}C NMR スペクトルを Fig.3 に示す。

化学シフトテンソルの一軸性 ($\sigma_{11} = \sigma_{22}$) を仮定して MBBA の静止スペクトルと MAS スペクトルから次の式により化学シフトテンソルの異方性 $\Delta\sigma$ を求めた。

$$\Delta\sigma = \sigma_{33} - \sigma_{11} = 3(\sigma^{\text{static}} - \sigma^{\text{iso}}) / 2 \quad (3)$$

ここで、 σ^{static} は、静止スペクトルのピークの位置であり σ^{iso} は MAS でのピークの位置である。同様に化学シフトテンソルの一軸性を仮定して MBBA と CC の混合物の MAS スペクトルと g-off-MAS スペクトルから次の式により化学シフトテンソルの異方性 $\Delta\sigma$ を求めた。

$$\Delta\sigma = \sigma_{33} - \sigma_{11} = \frac{3(\sigma^{\text{iso}} - \sigma^{\text{o-mas}})}{P_2(\cos\theta)} \quad (4)$$

ここで、 $\sigma^{\text{o-mas}}$ は g-off-MAS でのピークの位置である。 θ は磁場と試料回転の軸のなす角であり、L-alanine の異方性を測定することによって求めた。

化学シフトテンソルの異方性の大きさについて MBBA と CC の混合物と MBBA のあいだに違いは見られなかった (Fig.4)。MBBA と CC の混合物の場合、静止スペクトルをシミュレーションによって解析すれば、化学シフトテンソルの一軸性を仮定しなくても化学シフトテンソルの 3 つの主値が求まる。

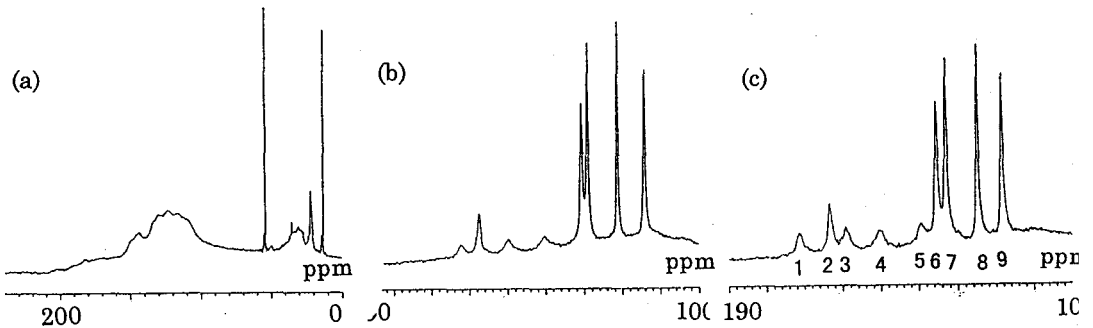


Fig.3 The ^1H decoupled ^{13}C NMR spectra of a cholesteric mixture of MBBA and CC (wt. 12.0%) at 303K under static (a), under 2kHz MAS (b) and under 2kHz spinning with 74° inclined from a static field (c). Only the aromatic parts is shown in (b) and (c). The peaks of quaternary carbons are broadened due to the molecular diffusion.

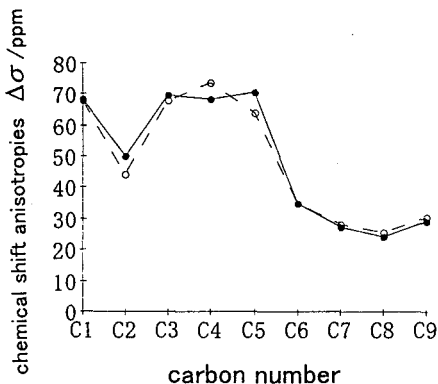


Fig.4 Experimental chemical shift anisotropy $\Delta\sigma$ for the aromatic and the methine carbons of MBBA (solid line) and a cholesteric mixture of MBBA and CC (wt. 12.0%) (dotted line). The numbering of carbons is given in Fig.2 and 3.

コレステリック相における液晶分子の配向ポテンシャル

液晶分子のモデルを立てて分子間相互作用から液晶分子の配向ポテンシャルを計算する理論を提案する。コレステリック液晶では、ディレクターの方向がピッチの軸方向の並進に対し周期的に変化する点のみがネマティック液晶と異なる。よってネマティック液晶に対する液晶分子の配向ポテンシャルの理論[5]を拡張して用いることができる。いま、ある液晶分子に着目しその分子を溶質と考え、まわりの液晶分子を溶媒と考えると溶質分子が液晶場から受けるポテンシャル $U_{ext}(\omega)$ は、

$$U_{ext}(\omega)/kT = (N/V) \int dr' d\omega' \tilde{f}(\omega', r') (1 - \exp(-U(\Omega', r')/kT)) \quad (5)$$

となる。ここで ω' は溶媒分子の配向であり、 ω は溶質分子の配向である。 r' は溶質分子と溶媒分子の相対位置を表わし、 Ω' は ω, ω' のときの溶質分子と溶媒分子の相対配向である。分子間相互作用ポテンシャル $U(\Omega', r')$ は、溶質分子をファンデルワールス半径の球状分子の集まりとして溶媒分子を円柱で近似し、両者が重なるときは ∞ それ以外は 0 の値を取ると仮定する。

$\tilde{f}(\omega', r')$ は、確率分布であり r' 依存性が入ってくるのがネマティック液晶と異なるところである。

$\tilde{f}(\omega', r')$ を Legendre の多項式 P_l で展開すると次のような式で表わされる。

$$\tilde{f}(\omega', r') = \sum_{l=0} \frac{2l+1}{2} \langle P_l \rangle P_l[\cos \theta(\omega', r')] \quad (6)$$

$$\cos \theta(\omega', r') = \vec{e}_{solvent}(\omega', r') \cdot \{\vec{e}_z \cos(2\pi x/p) + \vec{e}_y \sin(2\pi x/p)\} \quad (7)$$

ここで $\vec{e}_{solvent}(\omega', r')$ は溶媒分子の配向で、 \vec{e}_z, \vec{e}_y はそれぞれ静磁場の方向、ピッチの方向の単位ベクトルであり、 p はピッチである。

各コンフォーマーについて $U_{ext}(\omega)$ を計算し、分子の内部エネルギーとともに統計力学平均をとることによって NMR 観測量が求まる[6]。

参考文献

- [1] Metka Luzar, Bojan Lozar Robert Blinc and J. William Doane: Mol. Cryst. Liq. Cryst. 113 (1984) 291.
- [2] Zvi Yaniv, Nuno A. P. Vaz, Giuseppe Chidichimo, and J. William Doane: Phys. Rev. Lett. 47 (1981) 46.
- [3] W. J. A. Goossens, Mol. Cryst. Liq. Cryst. 12 (1971) 237.
- [4] Jacques Courtieu, D. W. Alderman, David M. Grant, and J. P. Bayles: J. Chem. Phys. 77 (1982) 723.
- [5] A. F. Terzis and D. J. Photinos: Molec. Phys. 83 (1994) 847.
- [6] J. W. Emsley, G. R. Luckhurst and C. P. Stockley: Proc. R. Soc. Lond. A 381 (1982) 117.

Solid state ^{13}C NMR analyses of the structure of liquid crystalline polyurethane samples

Hiroyuki Ishida, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii

(Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan))

Solid state ^{13}C NMR analyses of the structure have been performed for liquid crystalline polyurethane samples. The samples, polymerized from 3,3'-dimethyl-4,4'-biphenyldiyl diisocyanate, 1,10-decanediol, and 1-hexanol, were crystallized by slowly cooling from the melt through the liquid crystalline state at a rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$. $T_{1\rho}$ analyses reveal that each sample contains three components with different $T_{1\rho}$ values which correspond to the crystalline, medium, and noncrystalline regions. From the values of chemical shift, methylene chains both for the crystalline and medium components are found to be all in *trans* conformation. In contrast, those for the noncrystalline component are in alternate *trans-gauche* transition, reflecting the conformation in the liquid crystalline state.

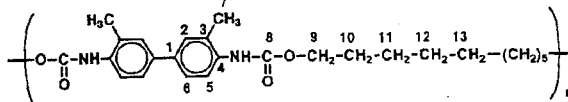
1. 目的

液晶状態では、分子は秩序のある構造を持つと同時にその分子運動性はかなり高い状態にある。したがって、高分子を液晶状態から結晶化させると、この液晶状態における構造を反映した固体構造が得られると考えられる。そこで、液晶性ポリウレタンを液晶状態から結晶化させて得られた試料の固体状態における構造および分子運動性について固体 ^{13}C NMR 法により解析を行った。

2. 実験

試料として用いたポリウレタンは、メソゲンとして 3,3'-dimethyl-4,4'-biphenyldiyl diisocyanate、スペーサーとして 1,10-decanediol、そして分子量を調節するための末端基として 1-hexanol を適当なモル比で反応させて合成したり。得られたポリウレタン (PDBDM) を、等方相である 240°C で溶融し、 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ で徐冷することにより液晶状態を経て結晶化させて作製した。

^{13}C NMR 測定は JEOL JNM-GSX200 分光計により、4.7T の静磁場下で行った。 ^{13}C スピン-格子緩和時間 $T_{1\rho}$ の測定には CPT1 パルス系列を用いた。



3. 結果と考察

図1に等方相より約 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ で徐冷した PDBDM 試料 ($M_n=11,700$) の室温で測定した CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを示す。得られた共鳴線の帰属はまず溶液スペクトルで INADEQUATE 測定により行い、この結果に基づいて CP/MAS スペクトルの帰属を行った。

各試料の結晶-非晶構造を調べるために、 $T_{1\rho}$ を測定し、最小二乗法によるフィッティングを行った。その結果、各炭素について $T_{1\rho}$ の異なる 3 つの成分が存在し、 $T_{1\rho}$ の長いものからそれぞれ、結晶成分、中間成分、非晶成分に帰属した。

次に、 $T_{1\rho}$ の差を利用して三つの成分のスペクトルを得、三成分のメチレン鎖のコンホメーション

キーワード：ポリウレタン、液晶性高分子、CP/MAS ^{13}C NMR、スピン-格子緩和時間、固体構造

いしだひろゆき、かじひろのり、ほりいふみたか

について化学シフトの違いにより検討を行った。図2は $T_{1\rho}$ の差を利用して分離した3つの成分のスペクトルである。結晶成分と中間成分は化学シフトにほとんど差異がないことから、ほぼ同じコンホメーションをとっていると考えられる。一方、非晶成分のメチレン部分の共鳴線は結晶成分や中間成分と比較するとC10、C12、C13炭素の部分が高磁場シフトしている。そこで結晶成分および非晶成分についてC9以外のメチレン炭素部分の共鳴線の波形解析を行うことにより、さらに詳細な検討を行った。初めに結晶成分について波形解析を行い、その化学シフトをも

とにして、非晶成分の共鳴線の波形解析を行った。ここで、(1)結晶成分ではメチレン鎖は図3(a)のように全て *trans* のコンホメーションをとる、(2) γ -*gauche* 効果による共鳴線の高磁場シフトは2.5ppmである、と仮定した。これらの仮定に基づいて、C10、C12、C13炭素についてのみ γ -*gauche* 効果を考慮に入れて共鳴線の波形解析を行った。その結果、非晶成分では、C11-C12結合およびC13-C13'結合に*gauche*成分が入っており、その他の結合が*trans*であると結論した。

さらに低温測定を行うことにより、C11-C12結合およびC13-C13'結合のコンホメーションについて検討した。図2に示した室温でのCP/MASスペクトルにおいて、C10,12,13炭素の共鳴線とC11炭素の共鳴線の間に存在している肩は、 γ -*gauche*効果により高磁場シフトしたC10,12,13炭素の共鳴線に対応している。 -100°C では、この肩の強度が低下した。

この結果から、室温では*trans-gauche*間の遷移が起こっているが、 -100°C ではこの遷移がほぼ凍結されていることが明らかになった。従って、非晶成分では、メチレン鎖は図3(b)のように末端部をのぞいて*trans*の結合と*trans-gauche*間の遷移を起こしている結合が交互に入るコンホメーションをとっていると結論した。また、偏光顕微鏡観察により、等方相から冷却すると液晶化は全領域で起こるものの、結晶化は全領域で起こらず、一部の領域では液晶相が残存したままで凍結されていることが分かった。従って、この非晶成分は液晶状態が凍結した成分であると結論づけた。

参考文献

1) K. Iimura, N. Koide, H. Tanabe, and M. Takeda, *Macromol. Chem.*, **182**, 2569 (1981)

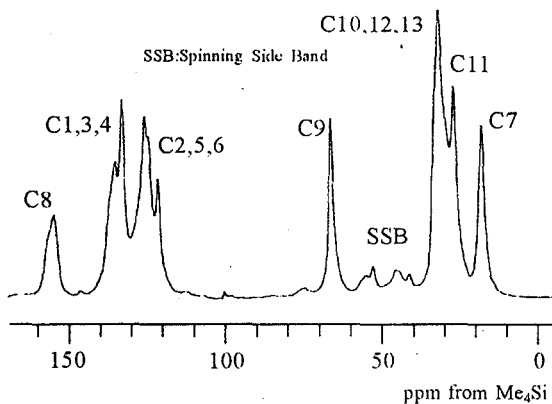


Figure 1. CP/MAS ^{13}C NMR spectrum of PDBDM.

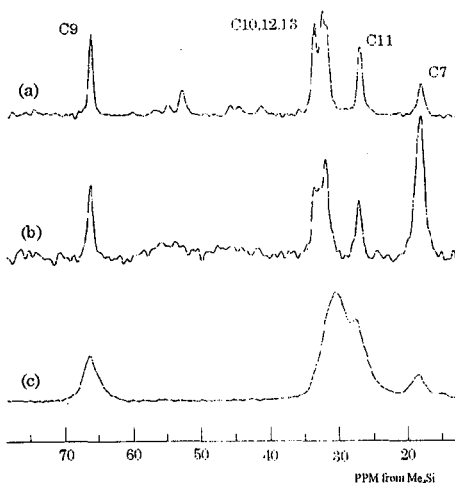


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of different components of PDBDM: (a) the crystalline component; (b) the medium component; (c) the noncrystalline component.

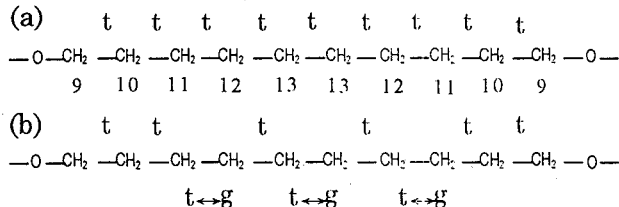


Figure 3. Conformation of the methylene chain of PDBDM: (a) the crystalline component (all *trans* conformation); (b) the noncrystalline component (alternate *trans* conformation with *trans-gauche* transition).

東工大工 ○清水レツト宣男 黒子弘道 古屋秀峰 安藤勲
 東工芸大工 安部明廣
 東工大生体分子 浅川直紀
 高分子素材センター 黒木重樹

Orientalional Characteristics and the Conformation of the Spacer of a Dimer Liquid Crystal

○Renato Norio Shimizu¹, Naoki Asakawa², Shigeki Kuroki³, Hiromichi Kurosu¹,
 Hidemine Furuya¹, Isao Ando¹ and Akihiro Abe⁴

1 Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology
 2 Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Insitute of Technology
 3 Advanced Polymer Lab., Japan High Polymer Center
 4 Department of Industrial Chemistry, Tokyo Institute of Polytechnics

The orientational behavior and the conformation of the spacer of a dimer liquid crystal namely α,ω -bis[(4,4'-cyanobiphenyl)oxy]decane (CBA-10) have been analysed by high-resolution ^{13}C NMR. The principal values of the ^{13}C chemical shift tensor have been determined by the Herzfeld-Berger method for an aromatic and for an aliphatic ^{13}C and from the analysis of the chemical shift change of these carbons it was concluded that the order parameter of the molecular axis and of the mesogenic moiety increase with decreasing temperature whereas the conformation of the spacer and the ordering of C γ -C ϵ axis remain essentially unaltered in the same temperature range. The conformational behavior of the flexible spacer has been considered in the frame of rotational isomeric state (RIS) approach. New studies regarding the dipolar coupling in a ^{13}C double labeled sample are in progress and the results will be reported at the symposium.

はじめに

我々は前報¹で二個のメソゲンをアルキル鎖でつないだ二量体液晶 α,ω -bis [(4,4'-cyanobiphenyl)oxy]decane (CBA-10, NC- $\phi\phi$ -O(CH₂)₁₀- $\phi\phi$ -NC) についてメソゲン部分の ^{13}C 化学シフトの異方性によりCBA-10の配向について高精度で解析した結果を報告した。

本研究ではメソゲン部分の情報にスペーサーからのものを併せて解析を行った。スペーサーについて δ 位の炭素に注目し、両 δ 位を ^{13}C ラベルしたサンプルを用いてその炭素の化学シフトテンソルの主値を求めた。更に、違う温度での測定により

^{13}C 固体高分解能NMR コンホメーション 回転異性状態近似 配向秩序度
 二量体液晶

○しみずれなつとのりお、くろすひろみち、ふるやひでみね、あんどういさお、あべあきひろ、あさかわなおき、くろきしげき

分子全体の配向挙動やスパーサーのコンホメーションなどを解析することを目的とした。

測定

固体高分解能¹³C NMRスペクトルは、温度可変装置付属の日本電子製GSX-270NMR (67.8MHz)分光器およびDoty社製のCP/MASプローブを用いて測定を行った。サンプルを極低速回転での測定にはBruker社製のDSX300 (75.5MHz)分光器を用いた。化学シフトの基準はアダマンタン (29.5ppm) を外部基準とし、パルスシーケンスはpulse saturation transfer法(PST法)で測定した。また、ピークを帰属するためにTOSS法およびTOSS with protonated carbon suppression法を用い、Fung²らの報告に基づいた。

結果と考察

種々の温度においてCBA-10の¹³C NMR測定を行い、得られたスペクトルをFig. 1に示した。芳香族炭素の最も遮蔽されている方向はベンゼン環に垂直であり、脂肪族炭素においては分子長軸方向にあるので、それぞれの¹³C化学シフトにみられる温度に対する変化は明らかに分子の配向によるものである。即ち、それぞれの等方相における化学シフトに対して液晶相において芳香族炭素は低磁場側へ、脂肪族炭素は高磁場側へピークがシフトしている。

等方相 (σ_{iso}) および液晶相 (σ_{LC}) における¹³C化学シフトは次式で関係付けることができる。

$$S_{zz} = \frac{(3/2)(\sigma_{LC} - \sigma_{iso})}{\{\sigma_{zz} - (1/2)(\sigma_{xx} + \sigma_{yy})\}} \quad (1)$$

ここで σ_{xx} , σ_{yy} , σ_{zz} は分子軸座標系における化学シフトテンソルの対角要素であり、主軸系から座標変換を行うことにより求められる。一方、化学シフトテンソルの主値はサンプルの低速回転により発生するスピニングサイドバンドの強度をHerzfeld-Berger法³により解析して求めた。得られた値はTable 1のとおりである。比較のためにVanderHart⁴によるn-C₂₀H₄₂の内部メチ

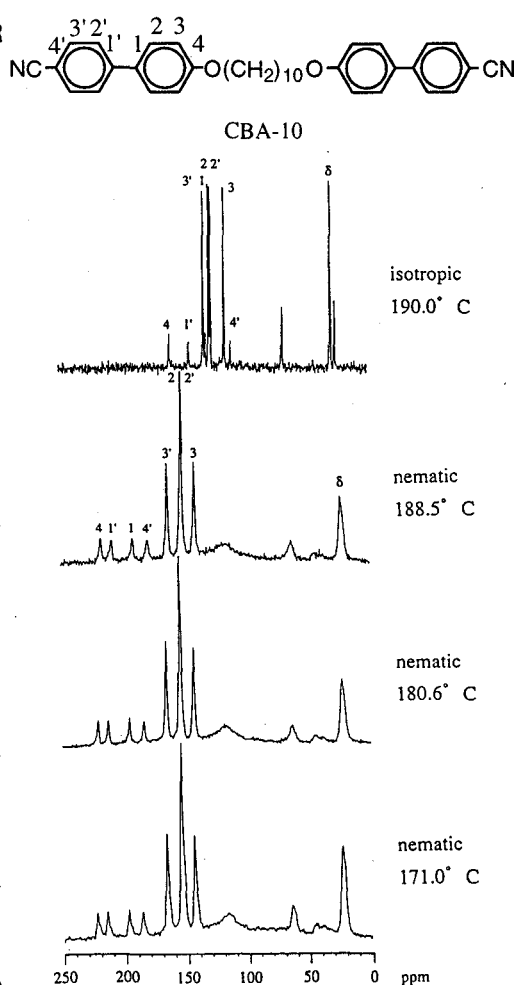


Figure 1. High-resolution solid-state ¹³C NMR of CBA-10 taken at different temperatures.

レン基についての値も併せて示した。
C₈に得られた主値とかなり違うことが
分る。

解析は以前¹と同様に分子長軸はメ
ソゲンの中心を結ぶ線の方角にあると
仮定した。化学シフトテンソルの主軸
系から分子軸系への変換はスパーサー
・コンホメーションに依存するため各
コンホマーの配向を考慮する必要があ
り、以上の解析を回転異性状態近似法
と併せて行った。まずあらゆるコンホ
マーを発生させた。ネマチック場にお
いてg+g-あるいはg-g+のようなコンホ
メーションは存在しないと仮定し、こ
のようなものは除いた。次に1式により
各コンホマーの分子軸の配向秩序度をC₁
'およびC₈の情報を用いて求めた。この
とき1.0より大きい値や負の値を示した
コンホマーは取り除いた。そしてC₁'お
よびC₈から得られる値の違いが互いにある
誤差εより小さいコンホマーの統計力
学的平均を計算した。εは約1%とし

た。各温度に得られた結果をFigure 2に示した。エラーバーは化学シフトの誤差を
考慮したものである。これから分るように分子の配向秩序度は温度の低下と共に上
昇する。更に、以上の解析からメソゲン部分の配向秩序度も分子軸同様に上昇する
ことが分った。一方、C_γ-C_ε軸のオーダーパラメータおよびスパーサーのコンホメ
ーションは温度に対してほぼ一定であった。

更にスパーサーのコンホメーションを正確に求めるため両δ位を¹³Cラベルした
CBA-10を用いてその双極子相互作用からC_ε-C_ε結合のコンホメーションの解明を試み
た。詳細は当日発表する予定である。

References

1. Shimizu, R. N., Asakawa, N., Kurosu, H., Furuya, H., Ando, I., Abe, A., *Polym. Prep., Japan*, **45**, 678(1996).
2. Poon, C. -D., Afzal, J., Gangoda, M., Fung, B. M., *Magn. Res. Chem.*, **24**, 1014(1986).
3. Herzfeld, J., Berger, A. E. *J. Chem. Phys.*, **73**, 6021(1980).
4. VanderHart, D. L., *J. Chem. Phys.*, **64**, 830(1976).

Table 1. Principal values of the ¹³C chemical shift tensor for CBA-10, relative to TMS.

Carbon	σ ₁₁ ppm	σ ₂₂ ppm	σ ₃₃ ppm
C ₁ '	228.7	162.3	36.1
C ₈	45.5	34.9	17.4
n-C ₂₀ H ₄₂ ^{a)}	50.2	38.2	17.2

a) from reference 4.

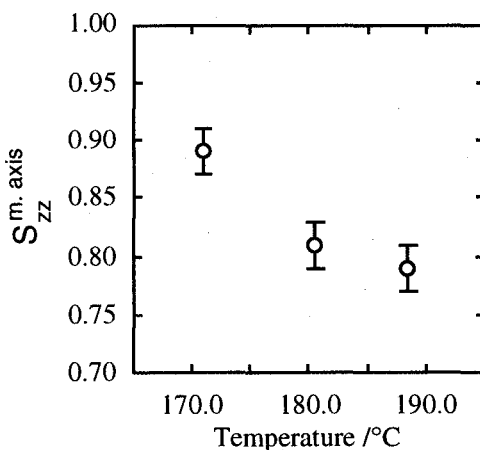


Figure 2. The dependence of the order parameter of the molecular axis on temperature.

反強誘電性液晶MHPOBCおよびTFMHPOBCの相転移に伴う分子構造と運動の変化

筑波大学理工学系、分子科学研究所

○中井利仁、宮島清一

¹³C NMR Study on Antiferroelectric Liquid Crystals MHPOBC and TFMHPOBC: Phase Transitions and Molecular Structure and Dynamics

University of Tsukuba, Institute for Molecular Science

Toshihito Nakai, Seiichi Miyajima

The molecular behavior of antiferroelectric liquid crystals MHPOBC and TFMHPOBC was studied using ¹³C NMR spectroscopy. The field-alignment-induced shifts of these compounds were measured in a wide range of temperature. The shifts for SmA, SmC*, and SmC_A phases were analyzed, and molecular biaxiality and phase biaxiality were recognized. These biaxialities reflect restricted molecular rotation as well as molecular order within smectic layers.

【序】ある種の液晶では、特定のスメクティック(Sm)相で、個々の液晶分子が持つ電気双極子モーメントの向きが揃い、巨視的な誘電分極が生じる。Sm相で実現されている分子の層構造において、層面内に含まれる誘電分極が隣り合う層の間で同じ向きに形成される場合この相を強誘電相、たがい違いに逆向きに分極形成が起こっている相を反強誘電相と参照する。またこのような性質を示す液晶をそれぞれ強誘電性液晶・反強誘電性液晶と呼び、その誘電秩序形成の機構と分子構造・運動の関連に大きな関心が寄せられている。

我々は代表的な反強誘電性液晶であるMHPOBC (4-(1-methylheptyloxycarbonyl)phenyl 4'-octylbiphenyl-4-carboxylate)に対して、¹³C NMR を用いた研究を行なってきた。前回の討論会では、MHPOBCの誘電秩序の形成に分子中のアルキル鎖の特異な構造が関与している可能性を指摘した。すなわち、MHPOBCのアルキル鎖中の¹³C核のNMR信号に着目し、ひとつのアルキル鎖が大きく分子長軸方向からずれた「折れ曲がりコンフォメーション」を取ることを見出した。この結果として分子の長軸周りの回転は降温に伴い十分に束縛を受け、強誘電相・反強誘電相で長軸と垂直な方向に電気双極子モーメントが顕在化すると推察した。

今回我々は、上記の推察を確認しさらにMHPOBC分子の束縛回転の詳細などを明らかにすることを目的として研究を行なった。分子長軸周りの自由回転が分子に固定した座標系における¹³C化学シフトテンソルを軸対称化するのに対し、束縛回転は分子に二軸性(molecular biaxiality)をもたらし、またシフトテンソルに非軸対称性を与える。以下では、静磁場の下で分子長軸が配向したMHPOBCの、コア部分に帰属される¹³C核のNMR信号の温度変化に着目し、解析を行なった結果を報告する(MHPOBCの側鎖CH₃基をCF₃基で置換したTFMHPOBCに対する解析は省略する)。

MHPOBCの相系列と相転移温度は以下の通りである。

Cry	—(73°C)—	SmC _A *	—(117°C)—	SmC*	—(122°C)—	SmA	—(150°C)—	Iso
結晶相		反強誘電相		強誘電相		常誘電相		等方液体相

反強誘電性液晶、二軸性、秩序パラメータテンソル、¹³C化学シフト、¹⁹F—¹³C双極子結合

なかい としひと、みやじま せいいち

【¹³C NMR信号の帰属】

MHPOBC分子のコア部分は、核C9～C17を含むbiphenylおよびC18～C22を含むphenyl segmentsから成る。

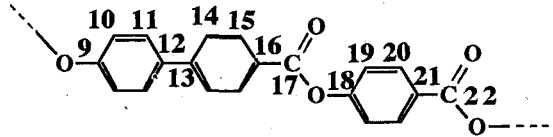
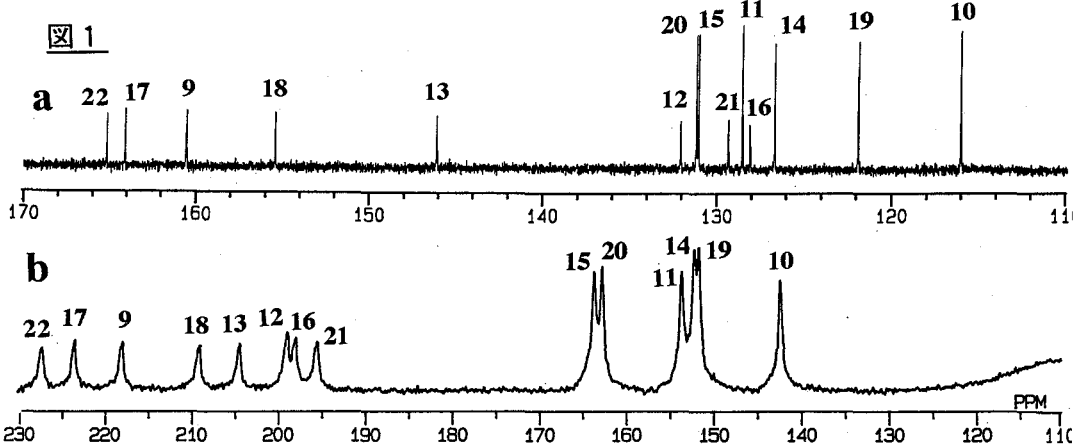


図1aにIso相における¹³Cスペクトルを示す。共鳴線の帰属はINADEQUATE法を用いて曖昧さなく決定した。一方、図1bは磁場中でIso相から徐冷して得た磁場配向静止試料の、液晶相(SmA)におけるスペクトルである。共鳴線の帰属すなわちIso相の共鳴線との対応は、大きなシフトのために困難であるが、TFMHPOBCではphenyl segmentの¹³C共鳴線が¹⁹F-¹³C双極子結合によりquartet分裂を示すことなどを利用して、決定した。

図 1



【磁場配向スペクトルの温度変化の概略】 スペクトル(図1)および共鳴線の温度変化(図2:抜粋)からわかるように、SmA相での共鳴線位置はよく知られた次の挙動を示す。

- ① すべての共鳴線は、化学シフト等方値 σ_{iso} を示すIso相の共鳴線から低磁場シフトする。
- ② σ_{iso} からのシフト(配向シフト: field-alignment-induced shifts)は、non-protonated carbonに対して大きく(50～70 ppm)、protonated carbonに対しては小さい(20～30 ppm)。
- ③ 温度降下に従って配向シフトは増加する。これは分子長軸の配向の度合を表わすorder parameter S_{00} が大きくなるためである。

一方、MHPOBCに固有の誘電秩序相における挙動は次のように述べる事ができる。

- ④ SmC*相ではSmA相と連続した配向シフトを示す。この相ではdirectorが層法線から $\theta_0 = 10 \sim 20^\circ$ 程度傾くことが知られているが、配向シフトの実験結果は分子長軸が静磁場方向に揃ったままであり、むしろ層法線が静磁場から傾くことを示している。
- ⑤ SmC*相からSmC_A*相への相転移で、共鳴線の位置は配向シフト量が小さくなるようなとびを示す。SmC_A*相では層法線に対して傾いたdirector方向が、隣り合う層ごとに交代するzig-zag構造を取る。このためSmA相と同様、層法線が静磁場方向を向く。このとき分子長軸は静磁場から傾いており、配向シフトはおおよそ $P_2(\cos\theta_0)$ (θ_0 は傾き角)だけ縮小される。
- ⑥ SmC_A*相での温度降下に伴う配向シフトの変化は、共鳴線によってまちまちである。この配向シフトの温度変化には、order parameter S_{00} や傾き角 θ_0 の温度変化が関与する。

【biphenylおよびphenyl segmentの配向シフトの詳細】 各共鳴線の配向シフトの温度変化には、biphenylおよびphenyl segmentそれぞれに共通した、次のような特徴が見られる。

- ① C9とC18、C16とC21などを比較してわかるように、biphenylに対する σ_{iso} からのシフトはphenylのものより若干大きい。配向シフトの大きさは個々の¹³Cの化学シフトテンソル成

分にも依存するが、この特徴は個々のsegmentに共通したものである。2つのsegment軸は大雑把には共に分子長軸方向を向いているが、詳細に見れば長軸となす角度 α_s (それぞれ α_b および α_p)は異なる。その結果、配向シフトは $P_2(\cos \alpha_s)$ のような因子だけ縮小されて現れる。

② 温度降下に伴うSmC*相での配向シフトの変化は微妙に異なる。たとえばC9とC18、C17とC22の比較からわかるように、biphenylの配向シフトの増加は停滞するのに対し、phenylでは相対的に大きな増加が続く。

③ SmC*相からSmC_A*相への相転移における配向シフトのどびは、一般にbiphenylで大きくphenylでは小さい。これはC9とC18の違いに最も顕著に現れている。

④ ⑥で述べたSmC_A*相での配向シフトの変化の多様性は、biphenylおよびphenylに関して大別できる。すなわちより低温相(Cry相)に近づくにつれbiphenylでは配向シフトはおおむね減少し続けるが、phenylでは増加傾向を示す。

以下では、biphenylおよびphenylの特徴を明確に表わしているC9とC18に着目し、その配向シフトを定量的に解析する。

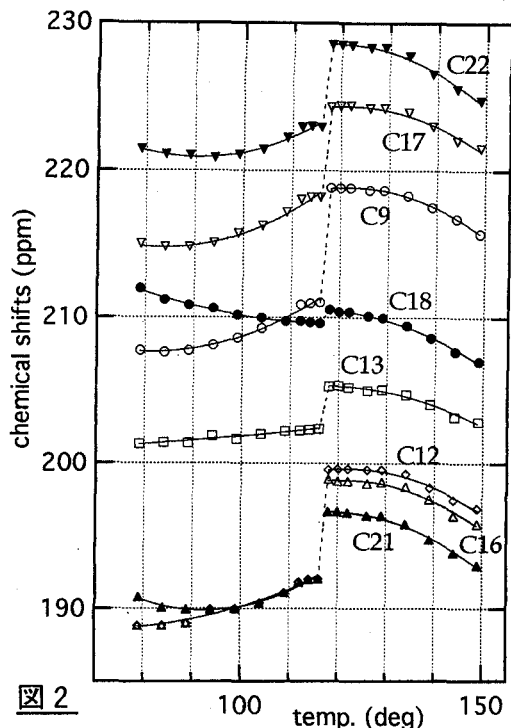


図 2

【C9とC18に対する配向シフトの解析】定量的な解析のためには、個々の¹³Cの化学シフトテンソル成分の知見が必要である。本研究ではCry相にあるMHPOBCのMAS (magic-angle spinning) スペクトルに現れるspinning sidebandを、2次元TOSS-deTOSS法を用いて分離測定し、その強度の解析により個々の化学シフトテンソル成分を決定した。

SmA相に対する配向シフト $\delta\omega(j)$ ($j=9$ or 18)は第一近似としては

$$\delta\omega(j, T) = \delta\omega^{SEG}(j) P_2(\cos \alpha_s) S_{00}(T)$$

で与えられる。ここで $\delta\omega^{SEG}(j)$ は化学シフトのsegment軸への射影成分であり、segmentが軸周りに回転するモデルでは、 $\delta\omega^{SEG}(9) = 83.7$ 、 $\delta\omega^{SEG}(18) = 100.9$ ppmである。これらの値と上式からSmA相での配向シフトを再現するためのパラメータとして、segment軸と分子長軸のなす角度が $\alpha_b = 13.3^\circ$ 、 $\alpha_p = 26.0^\circ$ と決定された(①)。結晶学的データによると両segment軸のなす角は 15.3° ($|\alpha_p - \alpha_b| \leq 15.3^\circ$)であり、我々の結果はreasonableであると言える。

しかしながら図3に示すように、計算された配向シフト(およびその外挿)は、SmA相の低温領域およびSmC*相の実験結果と必ずしも一致しない。この不一致はより低温になるほど、またC18に対してより顕著である。そこで、我々は分子が束縛回転すると考え、その結果生じる分子二軸性を反映した配向シフト

$$\delta\omega(j, T) = \delta\omega^{SEG}(j) [P_2(\cos \alpha_s) S_{00}(T) + \sqrt{3/2} \sin^2 \alpha_s \langle \cos 2\psi(T) \rangle S_{20}(T)]$$

を取り扱う。ここで ψ は長軸周りの分子の位相角であり、束縛回転では量 $\cos 2\psi$ の時間平均がnon-zero値を取り得る。すなわち $\langle \cos 2\psi(T) \rangle$ は分子二軸性の大きさの指標である。一方、 $S_{20}(T)$ は分子二軸性によって現れる分子座標系における化学シフトテンソルの非軸対称性が、実験室系の化学シフト異方性に与える寄与を表わすorder parameterである。これらの

積の項を導入することで実験結果は完全にfittingされ、その際得られた $S_{00}(T)$ および $\langle \cos 2\psi(T) \rangle S_{20}(T)$ を図4に示す。通常のorder parameter $S_{00}(T)$ はreasonableな値および変化を示している。一方、分子二軸性の寄与は温度降下に伴い増大することで、配向シフトの増加を補う。分子二軸性そのものはbiphenyl、phenylに共通であるが、segment軸がより大きく分子長軸から傾いた後者では、二軸性の配向シフトへの寄与がより大きい($\sin^2\alpha_p > \sin^2\alpha_b$)。こうして実験結果におけるC9とC18の違い(②)が説明される。

SmC_A*相での配向シフトとして、上式に因子 $P_2(\cos\theta_0)$ を乗じたものを図5に示す。当然ながらSmC*相からSmC_A*相への相転移に伴う配向シフトのとびが現れている。また分子二軸性の配向シフトへの寄与は $\sin^2\alpha_s$ の因子を持つために、biphenylとphenylで異なった挙動を示す(③④)。しかしながら、配向シフトのとびの大きさおよびSmC_A*相での温度変化の様相はまったく再現されていない。我々はこの原因が、配向試料が巨視的な二軸性(相二軸性: phase biaxiality)をもつことによると考えた。その場合の配向シフトの表式は

$$\delta\omega(j, T) = \delta\omega^{SEG}(j) [P_2(\cos\alpha_s) S_{00}(T) + \sqrt{(3/2)} \sin^2\alpha_s \langle \cos 2\psi(T) \rangle S_{20}(T)] P_2(\cos\theta_0)$$

+ $\delta\omega^{SEG}(j) [P_2(\cos\alpha_s) S_{02}(T) + \sqrt{(3/2)} \sin^2\alpha_s \langle \cos 2\psi(T) \rangle S_{22}(T)] \sqrt{(3/2)} \sin^2\theta_0 \cos 2\varphi_0$
 で与えられる。ここで第2項は相二軸性すなわちdirectorに固定した座標系での化学シフトテンソルの非軸対称性の効果を表わしている。 $S_{02}(T)$ は分子座標系での化学シフト軸対称部分からの寄与を表わすorder parameterであり、分子長軸がpreferableな方向をもってゆらぐ度合を示す。一方、 $S_{22}(T)$ は分子二軸性からの寄与を表わすorder parameterであり、分子長軸と垂直な主軸が特定の方向にfreeze-outされる効果を表わす。このような相二軸性が存在する場合でも、SmC*相のようにdirectorが静磁場方向を向いているときは実質的に $\theta_0 = 0$ となり、その効果は配向シフトに現れない。しかしながらdirectorが静磁場と傾き角 $\theta_0 \neq 0$ をもつSmC_A*相では、相二軸性の効果が配向シフトに現れる。各温度での配向シフトの実験結果を用いれば、 $S_{02}(T)$ 、 $\langle \cos 2\psi(T) \rangle S_{22}(T)$ を変数とする上式は解くことができる。逆に言えばorder parameterテンソルの成分 $S_{02}(T)$ 、 $S_{22}(T)$ の存在を仮定することで実験結果は説明される。このようにしてSmC_A*相では、directorが静磁場方向から傾いているために、試料の巨視的な二軸性つまり層法線方向の分子配向秩序に加えて層内の秩序の存在が捉えられた。

(最後に液晶試料を御提供頂いた東工大の福田敦夫先生に感謝申し上げます。)

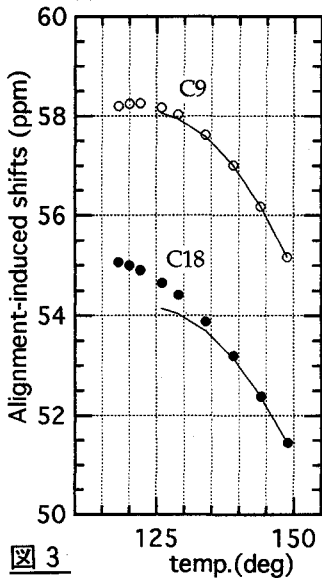


図 3

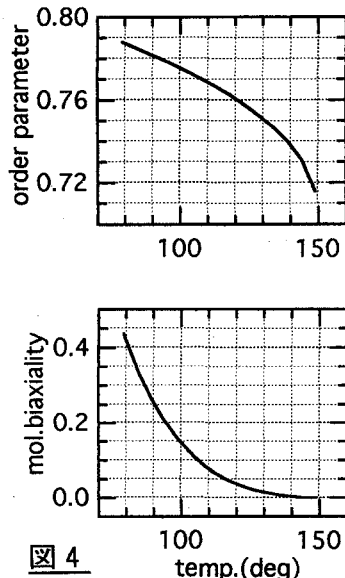


図 4

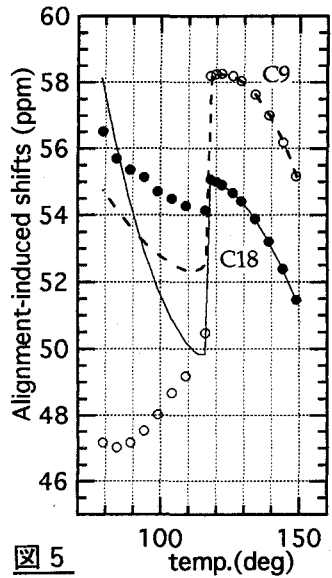


図 5

1P23

四面体遷移金属カルボニルクラスターのヒドリド配位子 のダイナミクス

(阪大院理、リバプール大*)

R. Harding、○中山尋量、江口太郎、中村亘男、B.T. Heaton*

Hydride Dynamics in Tetrahedral Transition Metal Carbonyl Clusters

Rachel Harding, Hirokazu Nakayama, Taro Eguchi, Nobuo Nakamura, and

Brian T. Heaton*

*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,
Toyonaka, Osaka 560, Japan*

and

**Department of Chemistry, University of Liverpool, Liverpool L69 3BX, UK*

Hydride motions in tetrahedral transition metal carbonyl clusters, $[\text{H}_2\text{Ru}_2\text{Rh}_2(\text{CO})_{12}]$ and $[\text{H}_4\text{Ru}_4(\text{CO})_{12-x}\{\text{P}(\text{OCH}_3)_3\}_x]$ ($x=0,1,2$) were investigated by the measurements of the variable temperature ^1H static and MAS spectra, and the ^1H T₁. In the case of $[\text{H}_4\text{Ru}_4(\text{CO})_{12-x}\{\text{P}(\text{OCH}_3)_3\}_x]$ ($x=0,1$), the spectral and the relaxation data can be explained by 2-site H-flip motion around the Ru-Ru edges with the activation energy, $E_a = 16.7 \text{ kJ mol}^{-1}$.

はじめに

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の挙動は、これらの物質が示す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の研究が盛んに行われている。今回取り上げた四面体型遷移金属カルボニルクラスターでは、4 個の金属 (M) が四面体を形成し、各金属に CO が 3 または 4 個ずつ配位し、H は、M-M に edge bridging 配位している (Fig. 1)。溶液中では、CO 同士の exchange が起こると共に H の migration が起っているが、そのメカニズムは金属の種類および CO (またはそれと置き換わった配位子) の金属四面体への配位状態によって異なる [1,2]。 $[\text{H}_4\text{Ru}_2\text{Rh}_2(\text{CO})_{12}]$ では、CO (terminal) \leftrightarrow CO (bridge) \leftrightarrow CO (terminal) の exchange および Ru(1)-H-Rh(2) \leftrightarrow Ru(1)-H-Rh(1) の 2-site jump が起っている [1]。一方、 $[\text{H}_4\text{Ru}_4(\text{CO})_{12-x}\{\text{P}(\text{OCH}_3)_3\}_x]$ ($x=0-4$) では、4 個の H の migration および $12-x$ 個の CO の exchange が起っていると推測されている [3,4]。

遷移金属カルボニルクラスター、ヒドリド、 ^1H MAS NMR、スピン-格子緩和時間

レイチェル ハーディング、○なかやま ひろかず、えぐち たろう、なかむら のぶお、ブライアン ヒートン

これらのクラスターの結晶における H 原子の migration のメカニズムを調べることは、水素化触媒機能を理解する上で重要である。固体中では CO の

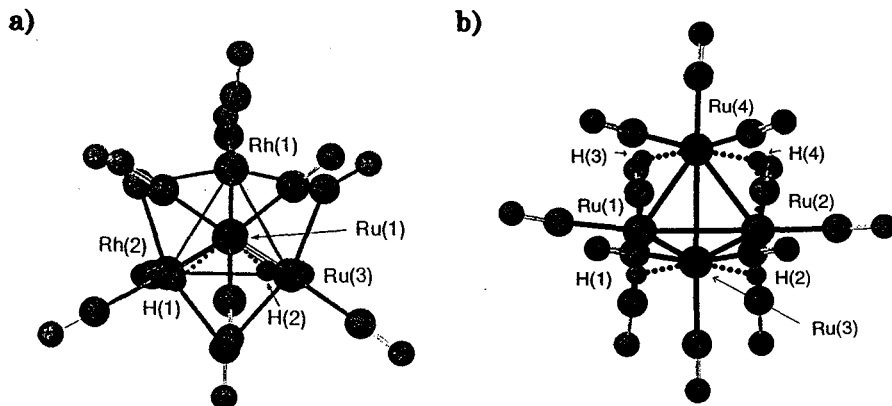


Fig. 1. Structure of a) $[H_4Ru_2Rh_2(CO)_{12}]$ and b) $[H_4Ru_4(CO)_{12}]$.

exchange はほとんど起こらないと考えられるので、NMR 法で H 原子の migration を調べることができるとは思えないが、その研究例は少ない。本研究では、中心金属 ($M=Rh, Ru$) を変えた場合や CO を bulky な配位子に変えた場合に H 原子の migration がどのような変化を受けるかを 1H Static, MAS NMR および 1H T1 測定により調べた。

実験

$[H_4Ru_2Rh_2(CO)_{12}]$ および $[H_4Ru_4(CO)_{12-x}\{P(OCH_3)_3\}_x]$ ($x=0,1,2$) は、文献 [1,3] に従って合成した。 1H static, MAS NMR スペクトルおよび 1H T1 の測定は、Bruker 社製 DSX-200 を用いて行った。MAS rate は、5-6 kHz に設定した。測定温度の校正は、MAS スペクトルに関しては、 $Pb(NO_3)_2$ の ^{207}Pb の化学シフト [5]、static スペクトルに関しては CA 熱電対により行った。温度精度は、それぞれ ± 1 K, ± 2 K である。

結果と考察

Table 1 にヒドリドのケミカルシフト値および MAS スペクトルの線幅を示す。

Table 1. 1H chemical shift and line width for the hydride of $[H_2Ru_2Rh_2(CO)_{12}]$ and $[H_4Ru_4(CO)_{12-x}\{P(OCH_3)_3\}_x]$ ($x=0,1,2$).

	δ / ppm				$\omega_{1/2}$ / Hz
	solution (rt)	solution ($T/^\circ C$)	solid	solid (rt)	
$H_2Ru_2Rh_2(CO)_{12}$	-19.2	-19.2 ^a (-30)	-19.5	38	
	-21.3	-21.3 (-30)	-21.7	31	
$H_4Ru_4(CO)_{12}$	-17.6	-17.6 (-120)	-18.0	300	
$H_4Ru_4(CO)_{11}\{P(OCH_3)_3\}$	-17.7	-17.5 ^b (-100)	-17.6	800	
		-18.1 ^c (-100)			
$H_4Ru_4(CO)_{10}\{P(OCH_3)_3\}_2$	-17.6		-17.8	1100	

^adoublet with $J(Rh-H)=19$ Hz. ^bdoublet with $J(P-H)=2.5$ Hz. ^cdoublet with $J(P-H)=12.5$ Hz.

これまで我々が報告してきた Rh, Ni カルボニルクラスター[6]と同様に、結晶中の化学シフトは溶液中での値とほぼ等しく、骨格および H 原子の結合状態に大きな変化はない。[H₂Ru₂Rh₂(CO)₁₂] では、溶液と同様に 2 種類のサイトの H 原子が区別でき、migration は存在しないことがわかる。一方、[H₄Ru₄(CO)_{12-x}{P(OCH₃)₃}_x] (x=0,1,2) では、幅広い信号が 1 本のみで溶液の結果と一致する。溶液中でヒドリドによる信号が 1 本しか存在しないのは、4 つの H 原子の exchange が起こっていると考えられているためであるが、温度変化の実験データがほとんどなく詳細なメカニズムは不明である。結晶中でも同様な exchange が起こっているかどうかを検討するためにスペクトルの温度変化を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。

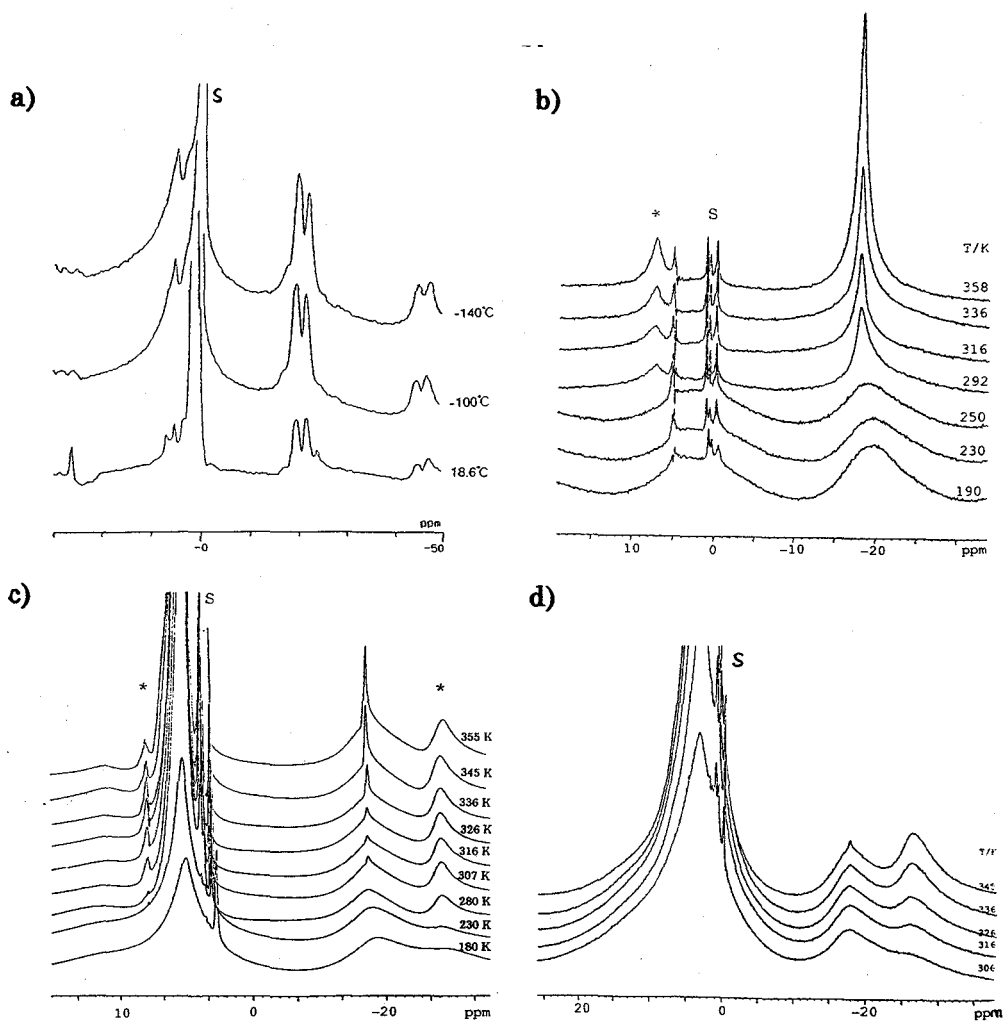


Fig. 2. Variable temperature of ¹H MAS NMR spectra of a) [H₂Ru₂Rh₂(CO)₁₂] b) [H₄Ru₄(CO)₁₂], c) [H₄Ru₄(CO)₁₁{P(OCH₃)₃}, d) [H₄Ru₄(CO)₁₀{P(OCH₃)₃}₂].

[H₂Ru₂Rh₂(CO)₁₂] では、ヒドリドのスペクトルはほとんど温度変化しない。[H₄Ru₄(CO)_{12-x}{P(OCH₃)₃}_x] (x=0, 1) では、室温付近から温度上昇に伴ってスペクトルがシャープになっていく。[H₄Ru₄(CO)₁₁{P(OCH₃)₃}] では、310 K付近から非常にシャープなピークが成長する。[H₄Ru₄(CO)₁₀{P(OCH₃)₃}₂] の場合室温付近ではスペクトルにあまり変化はみられないが、340 K 付近から非常にシャープなピークが現れる。

x=0, 1で観測される室温付近の narrowing は、static スペクトルおよび ¹H T₁ の温度変化の結果と併せ、2-site flip による motional narrowing と帰属できる (E_a = 16.0 kJ mol⁻¹)。Aime らは[7]、[H₄Ru₄(CO)₁₂] (x=0) に関して我々と同様な実験を行い、Ru₄H₄ の C₂ 軸回りの回転または、H₄ の concerted motion が起こっていると指摘し、その活性化エネルギーを 67±8 kJ mol⁻¹ と見積った。我々の結果と大きく異なる原因については不明であるが、x=0,1 の結果が類似し、その活性化エネルギーが非常に低いことから Ru₄H₄ の大きな運動が起こっている可能性は少ない。また、x=2 の化合物では、このような運動はみられない。一方、x=1, 2で観測される非常にシャープなピークは、現在のところはっきりした原因は不明であるが、CH₃ 基の ¹H の信号と P(OCH₃)₃ 基の ³¹P の信号に温度変化がないことから pre-melting effect などによるものではなく4個の H 原子の migration による可能性が示唆される。

以上をまとめると[H₂Ru₂Rh₂(CO)₁₂]では、ヒドリドの小振幅の libration が起こっているだけであるが、中心金属がすべて Ru の場合は、ヒドリドの 2-site jump が起こることがわかった。また、この運動が、配位子を CO から P(OCH₃)₃ 基に変えることによって生じるクラスターの対称性やパッキングの変化に依存していることがわかった。

References

- [1] J. Pursiainen, T. Pakkanen, B.T. Heaton, C. Seregni and R.G. Goodfellow, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 681 (1986).
- [2] R.D. Wilson, S.M. Wu and R.A. Bau, *Inorg. Chem.*, **17**, 1271 (1978).
- [3] S.A.R. Knox and H.D. Kaesz, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 4594 (1971).
- [4] H.D. Kaesz, *Chem. Britain*, 344 (1973).
- [5] A. Bielecki and D.P. Burum, *J. Magn. Reson. A*, **116**, 215 (1995).
- [6] T. Eguchi, B.T. Heaton, R. Harding, K. Miyagi, G. Longoni, J. Nahring, N. Nakamura, H. Nakayama, T.A. Pakkanen, J. Pursiainen and A.K. Smith, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 625 (1996).
- [7] S. Aime, R. Gobette, A. Orlandi, C.J. Groombridge, G.E. Hawkes, M.D. Mantle and K.D. Sale, *Organometallics*, **13**, 2375 (1994).

1P24 高温での¹H MAS NMR によるH-ZSM-5のプロトンの動的挙動

(* 東工大・工、** 日本電子) ○馬場俊秀*・小松法人*・杉沢寿志**・鈴木栄一*・小野嘉夫*

Dynamic Nature of Acidic Protons in H-ZSM-5 As Studied by ¹H MAS NMR

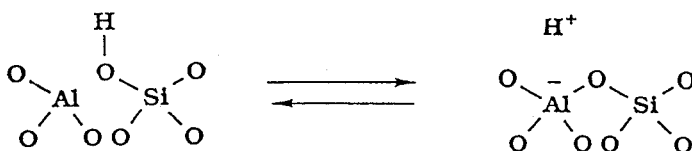
Toshihide Baba*, Norito Komastu*, Hisashi Sugisawa**, Eiichi Suzuki * and Yoshio Ono*
* Department of Chemical Engineering, Tokyo Institute of Technology, Meguro-ku, Tokyo .
** JEOL INC., Musashino, Akishima-shi, Tokyo 152.

The information of dynamic nature of the protons in H-ZSM-5 zeolites was obtained from the temperature dependence of ¹H MAS NMR upon raising the temperature of measurements from room temperature to 200°C. The line width of ¹H MAS NMR of acidic protons increased and, through a maximum, it decreased. The intensity of the side-bands monotonously decreased with temperature. These temperature dependence are theoretically explained by assuming that the mobility is the main cause of the line width. This also confirmed by the change of the line shape with spinning rate of the samples. The temperature dependence of the line shape disappeared upon introducing a small amount of Na⁺ ions into H-ZSM-5, indicating that a small amount of Na⁺ ions affects the dynamic nature of the remaining protons.

1 緒言

ゼオライトは接触分解反応をはじめとして、炭化水素が関与する多くの工業的に重要な反応に利用されている。これらの反応にはゼオライトの持つ固体酸性が特に重要な役割を果たしている。その固体酸性は酸性プロトンの存在に基づいており、室温付近では OH 基として存在していることが赤外吸収スペクトル測定によって明らかにされている。実際このOH基のプロトンはピリジンなどの塩基分子に H⁺ を与える能力があることから、OH基は非酸性OH基(シラノール)と区別され「酸性OH基」と呼ばれている。

OH 基による酸性の発現は模式的に次のように表すことができる。



実際、OH基の伸縮振動による吸収強度は、温度が高くなるにつれて減少する。これは上式の平衡が高温では右辺に移動し、OH結合の数が減少する為であると考えられる。触媒としてのゼオライトは高温で使用されることが多い。従って、反応条件下ではプロトンが解離した状態で存在している可能性が高い。

演者らは、これまでプロトン交換型のH-ZSM-5 や H-モルデナイトなどのゼオライトの ¹H MAS NMR 測定を室温から100°Cまでの温度範囲で既に行っている。1,2) その結果、次のことを明らかにした。1) 酸性プロトンのピークは温度の上昇と共にブロードニングを起こす。2) ケミカルシフトは温度に依存しない。3) H-ZSM-5 に僅かな Na⁺ や NH₃ を導入すると、ブロードニングが殆ど観測されなくなる。このとき、ケミカルシフトにも変化が観測されない。

ブロードニングを起こす原因はプロトンの運動性と関係していると思われるが、実験的根拠をさら

ばばとしひで・こまつのりと・すぎさわひさし・すずきえいいち・おのよしお
¹H MAS NMR, ゼオライト, 酸性プロトン, 運動性

に明確にする必要がある。それは酸性プロトンが酸点に固定されていると考えるか、あるいはゼオライトの細孔内を動き回っている(非局在化している)と考えるかは、触媒作用を考察する上で重要であると思われるからである。そこで本研究では、測定温度を 100°C からさらに 200°C に上げ、高温でのプロトンの動的挙動を調べた。

2 実験

H-ZSM-5 は Na 型ゼオライト(東ソー製)中の Na⁺をアンモニウムイオンで交換した後、乾燥空气中で 120°C で 3 時間、引き続いて 400°C で 5 時間焼成した。焼成後、更に同温度で 3 時間真空排気することによって NMR 測定用の試料とした。

スペクトルの測定にはガラスサンプル中に封管した試料を用いた。ここで封管するガラスサンプルは試料を焼成及び排気する処理管の側部につけてあり、処理した試料を空気や水に接触することなく、ガラスサンプル管に移し、封管することができる。

測定には JEOL CMX 300 を用いて室温(25°C)から 200°C までの範囲で行った。測定ではパルス幅を 1.65 μs、データの取り込み時間を 25 ms、待ち時間を 20 s とした。スペクトルの線形や線幅を問題にするので、スペクトルは観測される Free Induction Decay のデータをウィンドウ関数などを用いるのではなく、そのままフーリエ変換することによって得た。

3 結果と考察

3-1 ピークの線形に及ぼす温度の影響

Si/Al 比が 53 の H-ZSM-5 を用いて、¹H MAS NMR を測定した。図 1 に示すように 25°C では 4.2 ppm に酸性プロトンに帰因するピークと、1.9 ppm にはシラノール(非酸性プロトン)に帰因するピークが観測される。図 1 に示したスペクトルは温度が変化すると NMR の検出器の感度も変化するので、シラノールのプロトンのピーク強度が同じになるように示した。測定温度を高くすると酸性プロトンに帰因するピークはブロードニングを起し、更に温度を高くすると、逆にシャープな線形へと変化した。スピニングサイドバンドは温度が高くなるにつれてブロードとなり徐々に強度が減少した。シラノールに帰因するピークの線幅は殆ど変化しなかった。一方、両者のプロトンのケミカルシフトは測定温度に依存せず一定であった。

それぞれの測定温度での線幅を知るためにピークの波形分離を行ったところ、ローレンツ曲線で整理することができた。本論文では、ピークの線幅は波形分離を行うことによって求めた。

3-2 線幅とプロトンの運動性

Fenzke らは、プロトンが運動している場合の ¹H MAS NMR スペクトルが、相関時間(τ_c)とスペクトルの二次モーメント(M₂^{IS})および試料の回転速度(ν_{rot})によって理論的に記述できることを既に報告している。^{5,6)} 演者らも彼らの方法を用いて、スペクトルの Free Induction Decay の関数を仮定することによりスペクトルの線形の変化を再現することを試みた。彼らは Free Induction Decay の関数が、プロトンの運動性が関与する関数、及びプロトンとアルミニウム核との双極子相互作用が関与する関数の積で与えられると仮定した。ここで、時間 t におけるプロトンの運動は exp(-t/τ) によって記述され、系全体の Free Induction Decay は次のように表される。^{5,6)}

$$G(t) = \exp \left\{ -\frac{M_2^{IS}}{3} [2J(2\nu_{rot}, t) + J(4\nu_{rot}, t)] \right\} \quad (1)$$

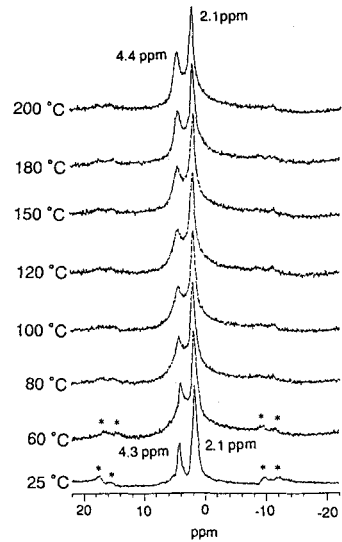


Fig. 1 Change of the ¹H MAS NMR spectrum of H-ZSM-5 (Si/Al = 53) with temperature.

ここで、 $J(2\nu_{\text{rot}}, t)$ は(2)式で与えられる。

$$\begin{aligned}
 J(2\nu_{\text{rot}}, t) &= \frac{t \cdot \tau_c}{1 + (2\pi \cdot \nu_{\text{rot}} \cdot \tau_c)^2} + \frac{\tau_c^2 (4\pi^2 \cdot \nu_{\text{rot}}^2 \cdot \tau_c^2 - 1)}{(1 + 4\pi^2 \cdot \nu_{\text{rot}}^2 \cdot \tau_c^2)^2} \times [1 - \exp(-t/\tau_c) \cos(2\nu_{\text{rot}} t)] \\
 &\quad - \frac{4\pi \cdot \nu_{\text{rot}} \cdot \tau_c^3}{(1 + 4\pi^2 \cdot \nu_{\text{rot}}^2 \cdot \tau_c^2)^2} \times \exp(-t/\tau_c) \sin(2\nu_{\text{rot}} t) \quad (2)
 \end{aligned}$$

従って、理論的に計算されるスペクトルは、(1)式をフーリエ変換することによって得られる。 M_2^{IS} を $1.5 \times 10^8 \text{ s}^{-2}$ と仮定して、 τ_c の値を変化させたときのスペクトルの線形の変化を計算した。結果を図2に示した。ピークの線形は τ_c が短くなるにつれてブロードニングを起し、更に短くなると線形は再びシャープな線形へと変化する。一方、スピニングサイドバンドは τ_c が大きい場合に観測されるのに対して、 τ_c が短くなると(プロトンの運動が激しくなるほど)観測されなくなることを示している。こうしたスペクトルの線形の変化は、図1に示したように測定温度を変化させて実際に測定された酸性プロトンに帰因するピークやスピニングサイドバンドの変化と極めてよく一致する。すなわち、温度が高くなるとブロードニングを起し、さらに高い温度ではシャープな線形へと変化する。一方、スピニングサイドバンドは温度が高くなると殆ど消失する。こうした現象は温度が高くなるほど τ_c が短くなったためであると考えられる。また、こうした変化は文献5)に報告されている結果と同じである。従って、H-ZSM-5の ^1H MAS NMRにおける酸性プロトンに帰因するピークの線幅の変化は、プロトンの運動によって引き起こされると結論できる。

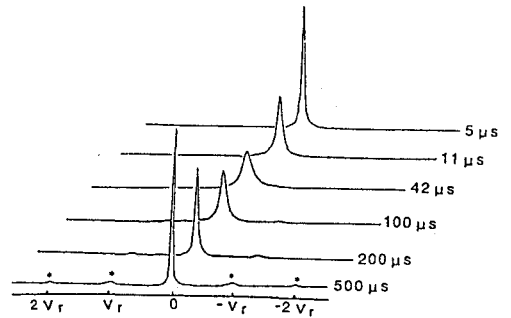


Fig. 2 Calculated MAS NMR spectra.
Rotation frequency 4 kHz.

3-4 線幅に及ぼす試料の回転速度の影響

先に述べたようにH-ZSM-5のプロトンのNMRピークの線形はローレンツ型であるので、(1)式によって与えられる Free Induction Decay から計算されるピークの線幅は(3)式で表される。

$$\Delta \nu = \frac{M_2^{\text{IS}} t}{3 \pi} \left[\frac{2\tau_c}{1 + (2\pi \cdot \nu_{\text{rot}} \cdot \tau_c)^2} + \frac{\tau_c}{1 + (4\pi \cdot \nu_{\text{rot}} \cdot \tau_c)^2} \right] \quad (3)$$

この式によれば、プロトンが運動している場合には、線幅は試料の回転速度に依存する。例えば、 $1 \ll (\nu_{\text{rot}} \tau_c)$ では、線幅は $1/(\nu_{\text{rot}})^2$ に比例する。一方、 $1 \gg (\nu_{\text{rot}} \tau_c)$ では、線幅は試料の回転速度の影響を受けない。

そこで線幅に及ぼす試料の回転速度の影響を調べた。H-ZSM-5 (Si/Al = 53)を用いて、回転速度が酸性プロトンのピークの線幅に及ぼす影響を図3に示した。温度が低い25°Cでは、線幅は回転速度の影響を殆ど受けない。このことは、25°Cではプロトンは運動を起しておらず、線形はプロト

ンの運動性以外の因子で決まっていることを示している。温度が高くなると試料の回転速度は線幅に影響を与えるようになる。この時、線幅に与える回転数の影響は温度が高いほど小さくなる。これは τ_c が短くなって $1 \gg (\nu_{rot} \tau_c)$ の状態（例えば、溶液中のプロトンの状態）に近づく為である。

試料の回転速度とそのときの線幅の値と(3)式を用いて、 τ_c と M_2^{IS} を計算することができる。100°C、150°C 及び 200°C における τ_c の値は、42 μ s、20 μ s 及び 11 μ s であった。これらの値を用いてプロトンの運動の活性エネルギーを計算すると、20 kJ/mol であった。一方、100°C、150°C 及び 200°C における M_2^{IS} の値は、それぞれ 1.5×10^8 s⁻²、 1.2×10^8 s⁻² 及び 7.2×10^7 s⁻² であった。

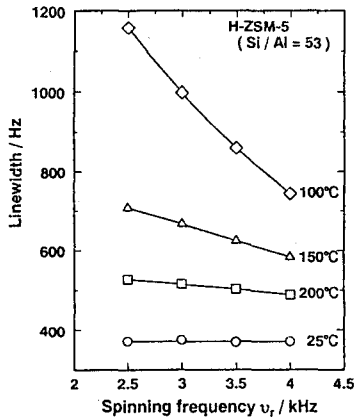


Fig. 3 The line width plotted against the spinning frequency.

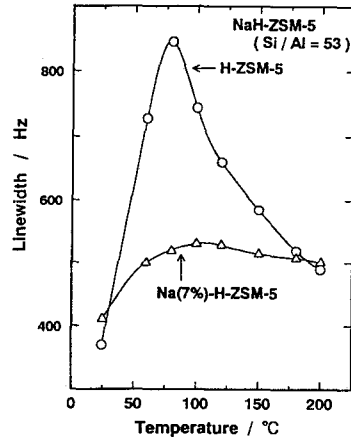


Fig. 4 Change of the ¹H MAS NMR spectrum of Na(7%)-ZSM-5 with temperature

3-5 Na⁺イオンの影響

図4は H-ZSM-5 (Si/Al = 53) の酸性プロトンの 7% を Na⁺ イオンで交換したとき、線幅に及ぼす温度の影響を示したものである。Na⁺ イオンを導入すると温度が高くなっても線幅は H-ZSM-5 の場合と比較して 200°C でも殆ど変化しない。このことは τ_c と M_2^{IS} には変化がないことを示している。実際、試料の回転数を変化させてもスペクトルの線形には殆ど変化が観測されなかったことから支持される。一方、ケミカルシフトの値も Na⁺ イオンの導入前後で各温度において変化しない。

4 まとめ

測定温度を 100°C から 200°C へ高くすることによって、次のことが明らかとなった。

- 1) 温度が高くなると酸性プロトンに帰因するピークはブロードニングを起こし、温度が更に高くなるとシャープな線形に変化する。こうした変化はプロトンが運動している為に引き起こされる。
- 2) H-ZSM-5 (Si/Al = 53) の酸性プロトンの相関時間は、100°C、150°C、200°C でそれぞれ 42 μ s、20 μ s、11 μ s であり、プロトンの運動の活性エネルギーは 20 kJ/mol であった。
- 3) シラノールに帰因するプロトンのピークの線形は温度の影響をほとんど受けない。
- 4) 酸性及び非酸性(シラノール)のプロトンのケミカルシフトは温度の影響をほとんど受けない。
- 5) Na⁺ の導入によって酸性プロトンの運動性は大きく低下する。

参考文献

- 1) T. Baba, Y. Inoue, H. Shoji, T. Uematsu and Y. Ono, *Microporous Mater.*, **3**, 647 (1995).
- 2) T. Baba, Y. Inoue and Y. Ono, *J. Catal.*, **159**, 230 (1996).
- 3) H. Pfeifer, *Colloid and Surfaces*, **36**, 169 (1989).
- 4) H. Pfeifer, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.1*, **84**, 3777 (1988).
- 5) D. Fenzke, B. C. Gerstein and H. Pfeifer, *J. Magn. Reson.*, **98**, 469 (1992).
- 6) M. Hunger, *Solid State Nuclear Magn. Reson.*, **6**, 1 (1996).

固体 ^{29}Si および ^{13}C NMR 法による
poly(di-*n*-butylsilane)の分子運動解析

京大化研 ○梶 弘典・堀井 文敬

Solid state ^{29}Si and ^{13}C NMR Analyses of the Molecular Motion
of Poly(di-*n*-butylsilane)

H. Kaji and F. Horii

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611

The ^{29}Si and ^{13}C NMR analyses of the molecular motion has been performed for poly(di-*n*-butylsilane) (PDBS) with the order-disorder transition temperature at 76°C. The ^{29}Si chemical shift anisotropy (CSA) spectra are measured with a slow magic angle spinning at a rate less than 100Hz, which is insensitive to CSA lineshapes. Almost rigid CSA spectra are observed below the transition temperature. In contrast, axially symmetric CSA spectra are observed above the transition temperature, suggesting some jump motion around the molecular axis with the frequency about 10^3Hz . Without the sample spinning, only two resonance lines appear at σ_{11} and the averaged chemical shift of σ_{22} and σ_{33} in the disordered state, suggesting the magnetic orientation of PDBS. The molecular motion of side chains is also studied by the CP/MAS ^{13}C NMR measurements.

1. 緒言

poly(di-*n*-alkylsilane)は、 σ 共役性のために、興味深い光物性を示す。Si-Si結合からなる主鎖およびC-C結合からなる側鎖のコンホメーションや運動は、この σ 共役性と密接に関係していると考えられる。したがって、分子レベルでの主鎖および側鎖のコンホメーションと運動を明らかにすることは、poly(di-*n*-alkylsilane)の物性を解明する上で、きわめて重要である。また、poly(di-*n*-alkylsilane)は、秩序-無秩序転移を示すことが知られており、この転移温度以上では、液晶状態をとることが明らかになってきた。本研究では、置換基としてブチル基をもつ poly(di-*n*-butylsilane) (PDBS)の転移前後における構造および分子運動の変化を固体 ^{29}Si および ^{13}C NMR 法により検討した。

2. 実験

試料である PDBS は、信越化学工業(株)に提供して頂いた。DSC 測定は、TA instruments DSC-2910 により行った。固体 ^{29}Si および ^{13}C NMR は、JEOL JNM-GX400、Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4T の静磁場下で行った。

キーワード : poly(di-*n*-butylsilane)、CP/MAS NMR、化学シフト異方性、低速 MAS、分子運動

かじ ひろのり、ほりい ふみたか

3. 結果と考察

3.1. DSC 測定

DSC 測定により、10°C/min の昇温過程において、-96.7°C にガラス転移が、42.3°C および 75.9°C に吸熱ピークが観測された。ガラス転移は、ブチル側鎖のガラス転移によるものであると考えられる。75.9°C の吸熱ピークは、主鎖の秩序-無秩序転移によるものであることがすでに知られている。42.3°C の吸熱ピークの原因については明確にされていないが、オクチル基より長い側鎖をもつ poly(di-*n*-alkylsilane) の場合、同様に 40~50°C 付近で吸熱ピークが観測されている¹⁾。側鎖が長い場合、poly(di-*n*-alkylsilane) は側鎖の配列により結晶を形成すると考えられ、したがって、今回 PDBS に対して観測された 42.3°C の吸熱ピークは、側鎖の融解に起因すると結論できる。

3.2. ²⁹Si NMR による主鎖の構造と運動

図 1 に固体 CP/MAS ²⁹Si NMR スペクトルの温度変化を示す。すでに Schilling らにより報告されているように²⁾、室温から 70°C で秩序相に対応する共鳴線（高磁場側）が観測され、70°C 以上で無秩序相に対応する共鳴線（低磁場側）が観測される。表 1 に CPT1 法による ²⁹Si のスピン-格子緩和時間 (T_{1s}) の測定結果を示す。秩序-無秩序転移により T_{1s} の値が不連続に小さくなっており、分子運動性が急激に高くなっていることがわかる。無秩序相では、温度上昇とともに T_{1s} は短くなっており分子運動がさらに激しくなっていることが示唆される

が、秩序相では、逆に温度上昇とともに T_{1s} が長くなる傾向が見られる。X 線測定によれば、この温度範囲で分子鎖間の距離は大きくなっている。したがって、側鎖の融解により

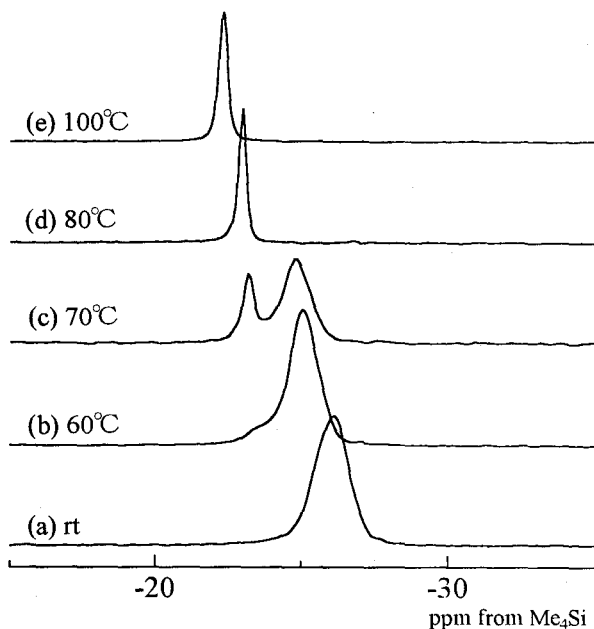


Fig. 1. CP/MAS ²⁹Si NMR spectra of PDBS at various temperatures. The spinning rate is 4kHz.

Table 1. ²⁹Si spin-lattice relaxation times (s) of PDBS at various temperatures.

phase	Temperature /°C							
	24	40	60	65	70	80	90	100
ordered phase	240	322	300	357	376	—	—	—
disordered phase	—	—	—	19	15	11	11	10

逆に分子鎖が剛直になり、その結果 T_{1Si} が長くなったのではないかと現在のところ考えている。今後、さらに低温での T_{1Si} 測定を行うことにより、詳細な検討を行う予定である。

図 2 に静止状態における化学シフト異方性(CSA)スペクトルの温度変化を示す。転移温度以下では、化学シフトの主値 σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} に対応するピークおよび肩が見られる。一方、転移温度以上では、図 2 (c)、(d)に見られるような特徴的なスペクトルが得られた。そこで、CSA の形状にはほとんど影響をおよぼさない 100Hz 以下で試料を低速回転させながら同様の測定を行った。結果を図 3 に示す。転移温度以下では、図 2 とほぼ同じスペクトルが得られているが、転移温度以上では、 σ_{22} と σ_{33} が平均化した軸対称スペクトルになっていることがわかる。主軸の帰属は明確ではないが、 σ_{11} が分子鎖軸方向に、 σ_{22} 、 σ_{33} が分子鎖軸と垂直な方向に対応すると仮定すると、転移温度以上で分子鎖軸まわりの 10⁸Hz 程度の運動が起こっていると考えられる。

図 2 (c)、(d)の共鳴線は、 σ_{11} および、 σ_{22} と σ_{33} の平均化した位置に現れている。また、Weber らは、無秩序相で PDBS は液晶状態にあると報告している¹⁾。以上より、静止状態で PDBS は磁場配向しており、分子鎖軸が静磁場方向を向いているドメインと分子鎖軸と垂直な方向が静磁場方向を向いているドメインが存在している、と推測した。DSC 測定で観測された 2つの吸熱ピークもこの2つのド

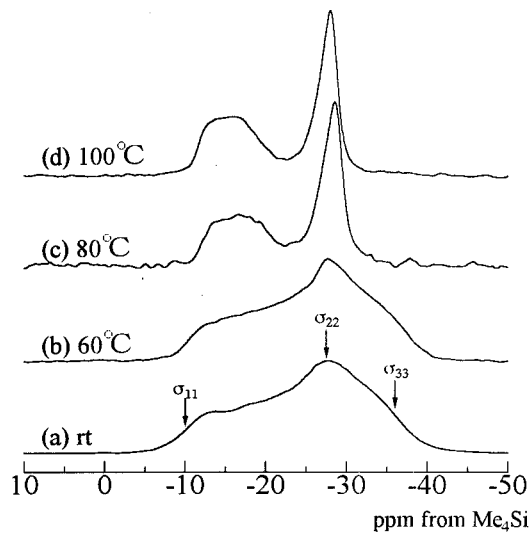


Fig. 2. Static ²⁹Si CSA spectra of PDBS at various temperatures.

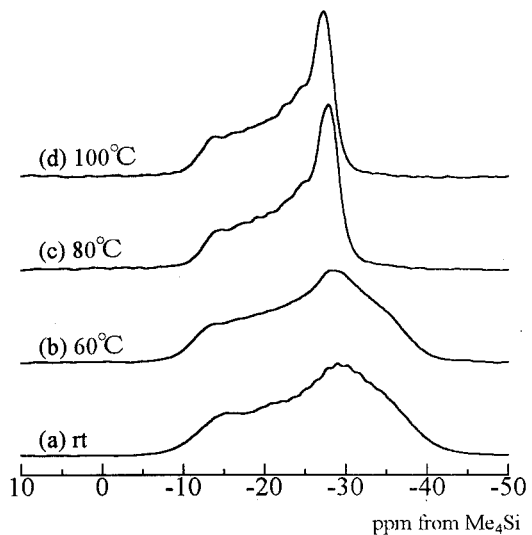


Fig. 3. Slow-MAS ²⁹Si CSA spectra of PDBS at various temperatures. The spinning rate is less than 100Hz.

メインの存在を示唆している。

3.3. ^{13}C NMR による側鎖の構造と運動

さらに、側鎖の構造と運動について CP/MAS ^{13}C NMR により検討した。図4に結果を示す。各炭素の帰属は図中に示した通りである。80°C、100°Cにおける各共鳴線の化学シフトは溶液に対する値とほぼ一致している。ガラス転移温度以下である-120°Cでは、C1、C2炭素は高磁場シフトしており、一方、C3、C4炭素は低磁場シフトしている。これは、分子モデルから推察されるように、C1、C2炭素のみが混み合った環境に存在していることを示唆している。ガラス転移温度を越えると、側鎖の運動性の増大に伴い、C2炭素の低磁場シフトおよびC3炭素の高磁場シフトが観察される。

室温では、C1、C4炭素は100°Cの場合と比べ、それぞれ高磁場側およびほぼ同じ化学シフトに1本の共鳴線として観測されている。C2、C3炭素に対しては、複数の共鳴線が観測される。したがって、この温度では、C1炭素は混み合った環境で凍結されているが、C2、C3炭素はいくつかのコンホメーション間で遅い周波数の交換運動を行っており、C4炭素はさらに運動性が高くなっていることがわかる。60°Cでは、C2、C3炭素の運動が激しくなっていることがわかるが、主鎖の運動が拘束されているため、共鳴線は幅広い。秩序-無秩序転移温度以上では、主鎖の運動に伴い、側鎖も等方的な運動が可能となることがわかる。

謝辞：試料を提供して頂いた信越化学工業（株）濱田氏に深く感謝します。

- 1) P. Weber, D. Guillon, A. Skoulios and R.D. Miller, *Polym. Prep.*, 31, 296, (1990).
- 2) F.C. Schilling, A.J. Lovinger, J.M. Zeigler, D.D. Davis and F.A. Bovey, *Macromolecules*, 22, 3055 (1989).

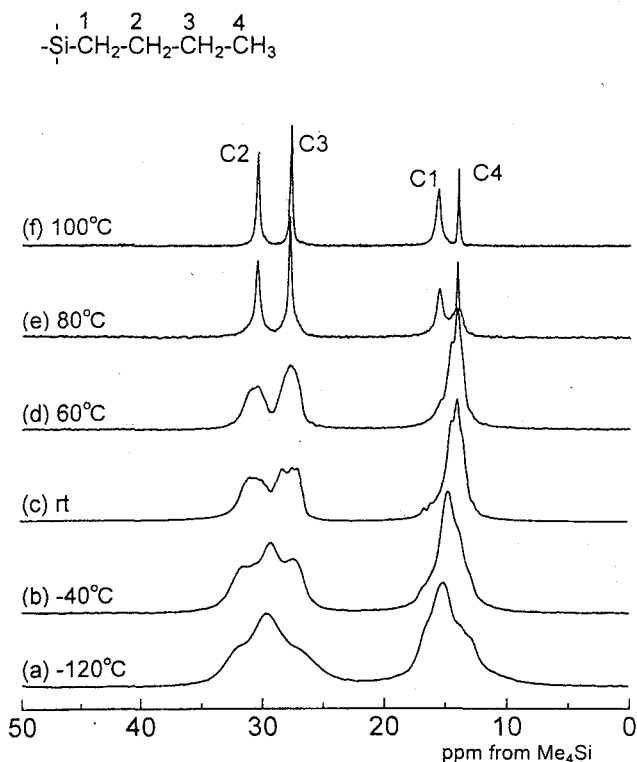


Fig. 4. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of PDBS at various temperatures.

京大化研 ○沈 伊民、梶 弘典、堀井文敬

Yimin Shen, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan

An explicit analytical expression of free induction decay has been derived for calculating the spinning sideband patterns of CP/MAS ^{13}C NMR spectra in a two-site exchange problem. The theoretical expression has been confirmed by comparing the calculated spinning sideband patterns for powdered crystalline dimethyl sulfone at different exchange rates with measured ones at various temperatures. The numerical calculations show that the introduction of the exchange matrix for the two-site exchange motion results in a slight narrowing of the centerband and broadening of sidebands compared to the case of zero exchange rate when the two FIDs are multiplied by the same exponential decaying function. Using the spinning sideband patterns analysis method to fit to experimental spectra, we can obtain information of the mode and the site exchange rate of the molecular motion.

INTRODUCTION

Analyzing the motional average of chemical shift tensors from ^{13}C NMR static powder spectra at various temperatures becomes a routine method for studying molecular motion(1-7). Magic angle sample spinning(MAS) with a sufficient number of spinning sidebands, spectra of sideband patterns, for retaining the information of anisotropic interactions can increase the NMR signal sensitivities compared to the case of a static sample. Therefore, an experimental time-saving can be expected especially in multi-dimension NMR experiments. Analyzing sideband intensities, one can obtain the principal chemical shift tensor if there is no molecular motion(8). The effect of molecular motion on the sideband patterns was first studied by Maricq and Waugh(9), and in more detail by Suwelack *et al.* (10). 2D NMR methods were also used to study slow exchange in rotating solids(11-15). Schmidt *et al.* presented a theoretical analysis based on general framework of Floquet theory describing the effect of intermediate rate exchange on line shapes in MAS spectra(16). In this paper, we present an explicit analytical expression of free induction decay(FID) for calculating the spinning sideband patterns of CP/MAS ^{13}C NMR spectra in a two-site exchange problem. In a spin system, where each spin is distributed at two-sites, e.g. site $j(j=1,2)$ with Larmor frequency ω_j , at an equal probability and jumps randomly between the two sites at the same frequency Ω , the time signal is given by (17)

$$G(t) = \mathbf{G}(0) \cdot \exp((i\Omega + \mathbf{\pi})t) \cdot \mathbf{1}, \quad [1]$$

where

$$\mathbf{G}(0) = \frac{1}{2}\mathbf{1} = \frac{1}{2}\begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{bmatrix}, \quad \pi = \Omega \begin{bmatrix} -1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}, \quad \omega = \begin{bmatrix} \omega_2 & 0 \\ 0 & \omega_1 \end{bmatrix}, \quad [2]$$

In the presence of MAS at the rate $\omega_r/2\pi$, the time signal can be rewritten as

$$G(t) = \mathbf{G}(0) \cdot \exp\left(i \int_0^t \Omega(\omega_r t') dt' + \mathbf{\pi} t\right) \cdot \mathbf{1}. \quad [3]$$

The following orthonormal matrix

キーワード: CP/MAS ^{13}C NMR、Sideband Pattern、Chemical Shift Anisotropy、Molecular Motion、Two-Site Exchange Model

Yimin Shen、かじひろのり、ほりいふみたか

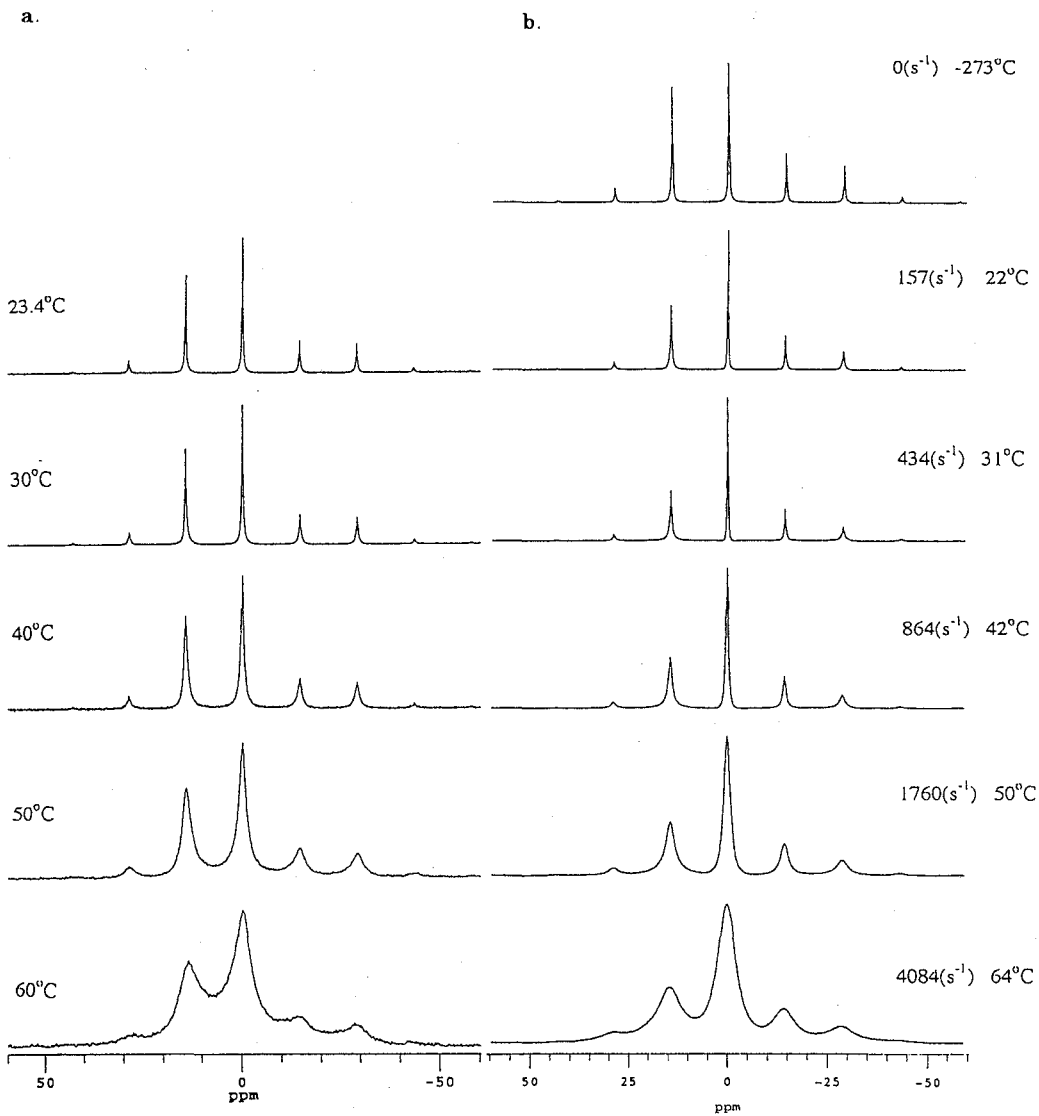


Fig.1 CP/MAS ^{13}C NMR spectra of Dimethyl sulfone at spinning speed 1450Hz. (a) Experimentally measured spectra at various temperatures; (b) theoretically calculated spectra at different site-exchange rates.

$$O = \begin{bmatrix} \frac{b}{\sqrt{2\lambda(\lambda-a)}} & \frac{b}{\sqrt{2\lambda(\lambda+a)}} \\ \frac{\lambda-a}{\sqrt{2\lambda(\lambda-a)}} & -\frac{\lambda+a}{\sqrt{2\lambda(\lambda+a)}} \end{bmatrix}, \quad [4]$$

with $\lambda = \sqrt{a^2 + b^2}$, $a = i\Phi_{\Delta}(t)$, $b = \Omega t$, diagonalizes the above exponential matrix, and then we obtain its explicit form:

$$G(t, \Omega) = e^{i\Phi_0(t)} e^{-\Omega t} \left\{ \cosh \sqrt{(\Omega t)^2 - \Phi_{\Delta}^2(t)} + \frac{\Omega t}{\sqrt{(\Omega t)^2 - \Phi_{\Delta}^2(t)}} \sinh \sqrt{(\Omega t)^2 - \Phi_{\Delta}^2(t)} \right\}, \quad [5]$$

where

$$\Phi_0(t) = \frac{1}{2} \int_0^t [\omega_2(\omega_{r,t'}) + \omega_1(\omega_{r,t'})] dt', \quad \Phi_{\Delta}(t) = \frac{1}{2} \int_0^t [\omega_2(\omega_{r,t'}) - \omega_1(\omega_{r,t'})] dt', \quad [6]$$

The concrete expressions of the resonance frequencies ω_j at sites $j(j=1,2)$ are dependent on the Hamiltonian of the system. If ω_j are time independent, Eq.[5] is the same as Becker's result(18).

The sum of two terms in the curly braces of Eq.[5] is always real if we notice the following two identities $\cosh(ix) = \cos(x)$ and $-i \sinh(ix) = \sin(x)$. The second term vanishes when $t=0$ since $\sinh(0)=0$. Therefore $G(0, \Omega)=1$. The Eq.[5] can be rewritten as

$$G(t, \Omega) = e^{i\Phi_0(t)} \cdot \frac{1}{2} \left\{ \left[1 + \frac{\Omega t}{\sqrt{(\Omega t)^2 - \Phi_{\Delta}^2(t)}} \right] \cdot e^{-\Omega t + \sqrt{(\Omega t)^2 - \Phi_{\Delta}^2(t)}} + \left[1 - \frac{\Omega t}{\sqrt{(\Omega t)^2 - \Phi_{\Delta}^2(t)}} \right] \cdot e^{-\Omega t - \sqrt{(\Omega t)^2 - \Phi_{\Delta}^2(t)}} \right\}. \quad [7]$$

The $G(t, \Omega)$ consists of one decay term and one term that does not decay. The absolute value of $G(\infty, \Omega)$ approaches unity as the second term in the curly braces in Eq.[7] goes to zero. With the aid of computer, Eq.[7] is applicable to the calculation of different FIDs reflecting the chemical shift anisotropies(CSA), dipolar interaction(19,20), quadrupolar interaction and so on. In this paper, we treat the case of chemical shift anisotropy interaction using the two-site exchange model of molecular motion.

EXPERIMENTAL

Dimethyl sulfone was obtained from Nacalai Tesque INC. and used without further purification. The CP/MAS ^{13}C spectra with a contact time of 3ms and a cycle time of 5s were taken on Chemagnetics CMX-400 solid state NMR spectrometer with a carbon frequency of 100.704MHz. The spectrum width was 20kHz. Spinning rate and sample temperature were stabilized ($\pm 2\text{Hz}$ and $\pm 0.1^\circ\text{C}$ respectively) by standard Chemagnetics apparatus. 64-512 free induction decays were accumulated for each spectrum.

RESULTS AND DISCUSSION

We use 2^9 points as the dimension of an FID which is multiplied by an exponential decaying function (decay constant T_2), Fourier-transform(FFT) it, and then obtain a spectrum of sideband patterns. The chemical shift principal values of DMS were chosen as $(\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}) = (18.67, 18.67, 37.34)\text{ppm}$ (5), assuming that two methyl groups in DMS undergo a 180° jump rotation about the C_2 axis in the molecule that leads to a 108° angle change between

the two Z axes of the chemical shift tensor. The step size of Eulerian angles was taken as 6° in the numerical integrals of powder average. The dwell time was chosen as 83.4 μ s in calculations. The decay time T_2 s used were 9.1, 9.1, 7.96, 3.5, 1.43, and 0.509ms for FIDs with site-exchange rates of 0, 157, 434, 864, 1760, and 4084s⁻¹, respectively.

Fig.1 shows the experimental spectra(a) at 1450Hz spinning speed as a function of temperature in the range from ambient temperature(23.4°C) to 60°C and the calculated spectra(b) as a function of site-exchange rate corresponding temperatures calibrated with the simulation results of static spectra from paper of Solum *et al.* (5). The calculated spectra agree with the measured ones.

Table 1 shows the effect of site-exchange rate on line widths of sideband and centerband at spinning speed 1450Hz. The high frequency sidebands correspond to positive values of sideband numbers n. If there is no site-exchange, *i.e.* the rate is equal to zero, the calculated line widths of centerband and sideband are all the same as that we impose on. Once there is two site exchange, the line width of centerband becomes smaller than those of sidebands in good agreement with experimental results. Therefore the introduction of the exchange matrix for the two-site exchange motion results in a somewhat narrowing of the centerband and broadening of sidebands compared to the case of zero exchange rate when the two FIDs are multiplied by the same exponential decaying function.

Table 1 The line widths of sideband and centerband (in Hz) at spinning speed 1450Hz

Sideband No.	2	1	0	-1	-2
No site-exchange	35	35	35	35	35
Site-exchange rate 157Hz	47	44	32	36	52
Experiment (23.4°C)	40	38	34	43	41

REFERENCES

1. A. Abragam, "The Principles of Nuclear Magnetism," Oxford Univ. Press, New York, 1961.
2. M. Mehring, "High Resolution NMR Spectroscopy in Solids", Springer, Berlin, 2nd edn, 1983.
3. K. Schmidt-Rohr and H.W. Spiess, "Multidimensional Solid-state NMR and Polymers", Academic Press, New York, 1994.
4. A. Pines, M. Gibby, and J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **59**, 569(1973).
5. M. S. Solum, K.W. Zilm, J. Michl, and D.M. Grant, *J. Phys. Chem.* **87**, 2940(1983).
6. F. Horii, T. Uyeda, T. Beppu, T. Murata, H. Odani, *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ* **66**, 317(1988).
7. F. Horii, T. Beppu, N. Takaesu and M. Ishida, *Magn. Reson. in Chem.* **32**, S30(1994).
8. J. Herzfeld and A.E. Berger, *J. Chem. Phys.* **73**, 6021(1980).
9. M. Maricq and J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **70**, 3300(1979).
10. D. Suwelack, W.P. Rothwell, and J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **73**, 2559(1980).
11. N. M. Szeverenyi, M.J. Sullivan, and G.E. Maciel, *J. Magn. Reson.* **47**, 462(1982).
12. C.E. Bronniman, N.M. Szeverenyi, and G.E. Maciel, *J. Chem. Phys.* **79**, 3694(1983).
13. A.E. DeJong, A.P.M. Kentgens, and W.S. Veeman, *Chem. Phys. Lett.* **109**, 337(1984).
14. G.S. Harbison, D.P. Raleigh, J. Herzfeld, and R.G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **64**, 284(1985).
15. J. Schaefer, E. O. Stejskal, R. A. McKay, and W. T. Dixon, *J. Magn. Reson.* **57**, 82(1984).
16. A. Schmidt, S. O. Smith, D. P. Raleigh, J.E. Reberts, R.G. Griffin and S. Vega, *J. Chem. Phys.* **85**, 4248(1986).
17. See reference 1, page 449.
18. See reference 2, page 56.
19. J. Schaefer, R.A. McKay, E.O. Stejskal and W.T.J. Dixon, *J. Magn. Reson.* **52**, 123(1983).
20. Y.M. Shen, T.L. Wu, Y.L. Yang, *Chem. Phys. Letters* **242**, 83(1995).

(神戸大理) 山田博昭、○室文人、西川和義、田中作弥、椋野邦子

High Pressure NMR Study of *cis*-1,13-Diacetoxy[13]paracyclophane

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University

Hiroaki Yamada, ○Fumihito Muro, Kazuyoshi Nishikawa,

Sakuya Tanaka, Kuniko Mukuno

Effect of high pressure on the rate of internal rotation of title compound has been examined by high-pressure D-NMR method on a 400MHz SCM spectrometer. The pressure range was extended to 180MPa(ca.1800atm) and the rate of internal rotation, $\ln k$, was found to increase. The activation volume(ΔV^\ddagger) for this compound is estimated to be $-4 \sim -5 \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$, which is less negative than that for *cis*-1, 12-Diacetoxy[12]paracyclophane.

【序】シクロファンなどの大環状分子は、加圧、あるいは加熱によって分子骨格が変化しやすく、その事が分子運動、速度、モードにも如実に反映されるものと予想される。以前、我々は[12]パラシクロファン誘導体について高圧 NMR 測定をし、ベンゼン環の回転は加圧により加速されることを報告した。今回はそれよりも環の大きい表題化合物について高圧 NMR 測定を行ったので、その結果を報告する。

【実験】熱膨張セルを用いて高圧測定を行った。デュランガラス製の耐圧セル内に、圧力指示薬であるフェニルアセチレン、水銀(セパレーター)、試料溶液(サンプル 3mol%の 1,1,2,2-テトラクロロエタン- d_2 溶液)を入れた。つづいて試料溶液を冷却、凍結させ、フェニルアセチレンをさらに吸入させた後にセルのキャピラリー部を熔封した。これを安全ジャケット内で室温に戻し、熱膨張により高圧を発生させた。測定装置には、JEOL JNM-GX 400 および BRUKER DMX-750 を使用し、non-spinning 条件下、内部ロックにより磁場の安定化をはかった。

【波形解析】シグナル融合温度 T_c 付近(0°C)での環プロトンシグナルについて波形解析を行った。今回はプロトン $H_A, H_{A'}, H_B, H_{B'}$ を磁氣的に非等価な 4 スピン系として取り扱い、解析した。その場合波形は、スペクトルの線幅、化学シフト差($\Delta\delta_{AB}, \Delta\delta_{A'B'}$)、スピン結合定数($J_{AA'}, J_{AB}, J_{AB'}$, etc.)をパラメーターとする回転速度の関数として与えられる。そのパラメーターの一つの化学シフト差についてであるが、シグナルが融合していくにつれて真の化学シフト差をスペクトルから読みとることは困難になる。より高磁場(高 ν_0)の分光計で測定するとベンゼン環の回転が「遅く見える」ため、環プロトンのシグナルが低磁場の分光計で測定したものよりも分かれて観測される。その結果、より精確な化学シフトを読みとることが出来る。そこで、速度解析には 400MHz SCM 分光計で測定したスペクトルを使用したのだが、その際、化学シフト差のみ、同じ条件下 750MHz SCM 分光計で観測した値を 400MHz に換算して用いた。

キーワード：高圧 NMR、パラシクロファン、活性化体積

やまだひろあき、むろふみひと、にしかわかずよし、たなかさくや、むくのくにこ

【結果と考察】得られた計算波形と実測波形を Fig.1 に示す。180MPa まで3点の圧力で測定を行ったが、[12]パラシクロファン誘導体同様、昇圧に伴いベンゼン環の回転は加速されていることが分かった。次に、式 $d(\ln k)/dp = -\Delta V^\ddagger/RT$ により直線の勾配から活性化体積を求めてみると、 $\Delta V^\ddagger = -4 \sim -5 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ となった。これは梅田らがシス-1,12-ジアセトキシ[12]パラシクロファンについて求めた活性化体積 $\Delta V^\ddagger = -6 \sim -7 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ よりも少し小さい。これは回転の遷移状態における体積減少が[12]ジ置換体のそれよりも小さい事を意味するが、原因については種々の因子が考えられ現在検討中である。なお Fig.2 のプロットは加圧による $\ln k$ の単調増加を示しており、この直線関係を率直に受け取ると、加圧によるポリメチレン鎖の変形(縮小)は起こっていないということになる。

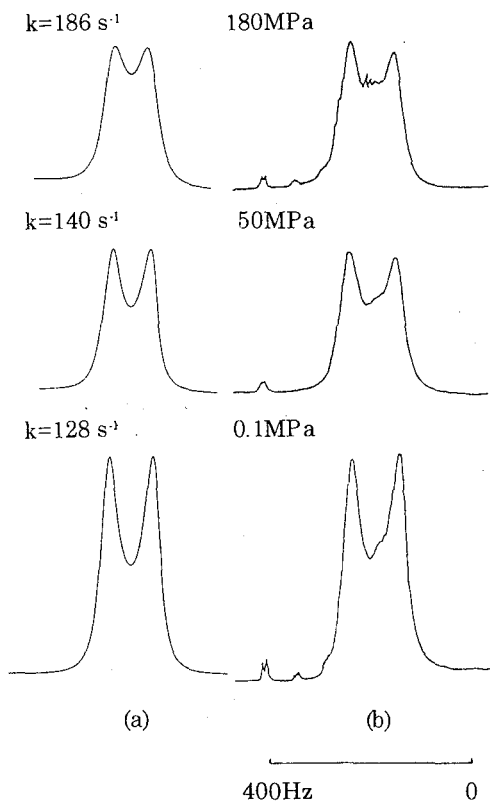


Fig.1 Calculated (a) and observed (b) $^1\text{H-NMR}$ spectra ($\nu_0 = 399.65 \text{ MHz}$) of the aromatic protons in 1 at various pressures at 0°C . (solv.: $\text{CDCl}_2\text{CDCl}_2$, ref.: $\text{CHCl}_2\text{CHCl}_2$)

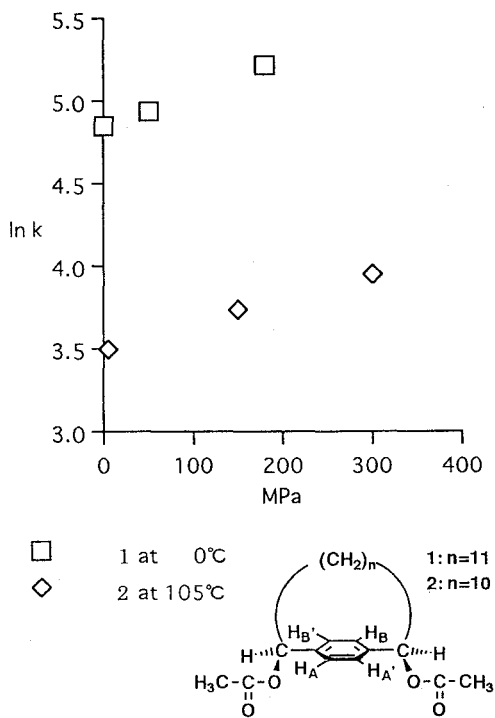


Fig.2 Pressure effect on $\ln k$ for 1 and 2.

Relationship between Plasticity and Molecular Motions of Nitrite Ions in MNO₂(M=Li, K, Rb, Cs, Tl)

○Hisashi Honda, Shin'ichi Ishimaru, and Ryuichi Ikeda

Department of Chemistry, University of Tsukuba

Metal(I) nitrites, ANO₂(A=K, Rb, Cs, Tl) are well known to form the ionic plastic phase above room temperature. In the present study, temperature dependences of ⁷Li and ¹⁵N NMR *T*₁ and spectra in LiNO₂ reported to have no plastic phase, were measured to reveal molecular motions which are expected to be different from those in the low-temperature phases of ANO₂. The observed NMR spectra of ⁷Li measured at 116.64 MHz exhibited two kinds of Li sites in crystals. *e*²*Qq*/*h* values of 17 and 12 kHz were determined from the spectra observed at room temperature. The spectrum narrowing of the central lines observed above 360 K can be attributed to the averaging of the dipole-dipole interaction between Li-Li. By measuring the electrical conductivity, ionic conduction was confirmed in LiNO₂. The temperature dependences of ⁷Li NMR *T*₁ revealed a *T*₁ minimum of ⁷Li at 116.64 MHz and *ca.* 370 K. The activation energy of 55 kJmol⁻¹ determined from the ⁷Li *T*₁ data, was larger than those of 10-20 kJmol⁻¹ observed in the low-temperature phases of ANO₂.

柔粘性結晶とは固体と液体の中間相の一つで、巨視的には結晶が柔らかく、分子レベルでは分子配向のみが融解している結晶である。これまで柔粘性は、分子の形状が球形で、分子間相互作用が弱い分子性結晶に数多く見られていた。最近、イオン結晶でも柔粘性を示す物質が見出されている。我々は、分子間相互作用の強いイオン結晶に柔粘性が現れる要因を、分子運動の観点から明らかにしてきた。

これまでの研究から亜硝酸塩(ANO₂; A=K, Rb, Cs, Tl)の柔粘性結晶ではイオンの自己拡散とNO₂イオンの等方回転運動が励起し、低温相ではNO₂イオンのフリップ運動が励起していることが明らかになった[1-4]。今回は、柔粘性結晶相を持たないLiNO₂中の分子運動を調べ、ANO₂の柔粘性結晶相の低温相で励起している分子運動と比較し、柔粘性結晶の特徴を探った。測定はBruker社製MSL-300(7.05 T)を主に用い、⁷Li(*I*=3/2)および¹⁵N(*I*=1/2)核のNMR *T*₁とスペクトル測定を行った。緩和時間の測定には飽和回復法と反転回復法を併用し、測定周波数116.64(⁷Li)、30.42(¹⁵N) MHzで120~融点(473 K)まで測定した。LiNO₂は80~融点(473 K)まで相転移は観測されていない[5]。

⁷LiのNMRスペクトルをFig. 1に示す。吸収強度を5倍に拡大したスペクトルを図中に示した。室温付近のスペクトルから明らかにLi⁺イオンには電場勾配が異なるサイトが2つ以上あることが分かった。また、温度を上げていくと360K付近から中心線の線幅が狭くなり、化学シフトの異なる2本の中心線があることが明らかになった。2組のサテライトのうち、

key words : ⁷Li Solid NMR Spectra and *T*₁, ¹⁵N Solid NMR Spectra and *T*₁, Ionic Plastic Crystal, Quadrupole Coupling Constant

○ほんだ ひさし、いしまる しんいち、いけだ りゅういち

内側は鋭く強度の強い中心線によるもので、外側のサテライトは強度が弱い中心線に対応していると考えられる。強度の大きい中心線の線幅は4.7 kHz(室温)から0.5 kHz(460 K)まで狭くなった。これはLi⁺イオンの自己拡散による磁気相互作用の平均化によるものと考えられる。交流の電気伝導度測定を行ったところ、イオン伝導を確認でき、拡散の活性化エネルギー 90 kJmol⁻¹を得た。e²Qq/hの値は外側のサテライトから17 kHz、内側から12 kHzのe²Qq/h値を室温で得た。

⁷Li T₁の温度変化をFig. 2に示す。図の低温側(250~120 K)でのT₁値は100 sより長かったことから、NMRの緩和に有効に寄与するNO₂イオンのフリップ運動は250 K以下では遅いと考えられる。⁷Li核のT₁極小が370 K付近に観測された。⁷Li核の緩和過程を電場勾配の揺らぎによるものと考え、近似的にDebye型の緩和関数を用い最適化を行った。Arrhenius型の活性化過程を仮定したところ、この運動の活性化エネルギーは55 kJmol⁻¹と求まった。¹⁵N核のスペクトルは350K付近で三つの異なった化学シフトテンソルを持つ線形で観測されたことから、この運動は窒素核の化学シフトテンソルの対称性をほとんど変化させない運動と考えることができる。柔粘性イオン結晶ANO₂の低温相では、Li塩と同様にNO₂イオンの運動が観測されている。しかし、ANO₂中での活性化エネルギーは10~20 kJmol⁻¹程度だが、Li塩では運動の活性化エネルギーが比較的大きな値であった。融点付近の分子運動に関する情報を得るために26 MHzで⁷Li T₁測定を行った。その結果、Fig. 2に示すように活性化エネルギーが30 kJmol⁻¹程度の別の運動も存在すると考えられる。

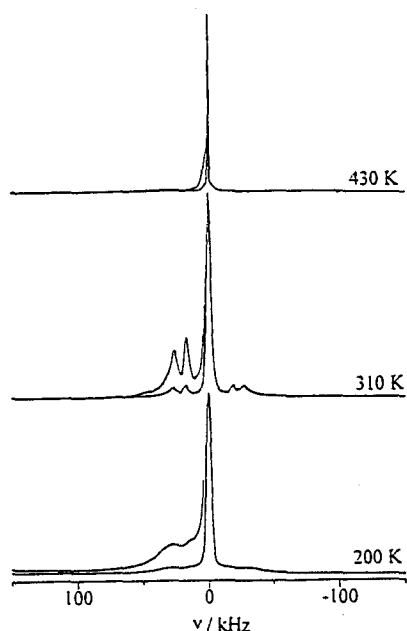


Fig. 1 ⁷Li NMR spectra in LiNO₂ observed at 116.64 MHz. Enlarged spectra(x5) are shown in the left-hand side.

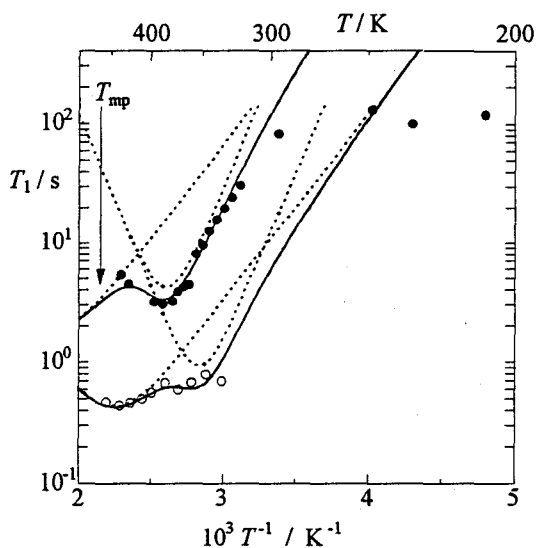


Fig. 2 Temperature dependences of ⁷Li NMR spin-lattice relaxation time, T₁ in LiNO₂ observed at 116.64(●) and 26(○) MHz. Solid and dotted lines are the best fitted theoretical values. T_{mp} is the melting point.

- [1] M. Kenmotsu, et al., *Z. Naturforsch.*, **49a**,247(1994). [2] H. Honda, et al., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **99**,1009(1995). [3] H. Honda, et al., *Z. Naturforsch.*, **50a**, 871(1995). [4] H. Honda, et al., *Z. Naturforsch.*, **51a**, 761(1996). [5] K. Moriya, et al., *Thermochim. Acta*, **132**, 133(1988).

1P29

$^2\text{H-NMR}$ による $\text{M}(\text{D}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ [$\text{M}=\text{Mg}, \text{Ca}$] 結晶中の分子運動の研究
(筑波大化・琉球大教養[‡])

○吉田 尚弘・石丸 臣一・堀内 敬三[‡]・池田 龍一

$^2\text{H-NMR}$ study of molecular motions in crystalline $\text{M}(\text{D}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ [$\text{M}=\text{Mg}, \text{Ca}$]
Yoshida, Naohiro, Ishimaru, Shin'ichi, Horiuchi, Keizo[‡], and Ikeda, Ryuichi

Department of Chemistry, University of Tsukuba,
Division of General Education, University of the Ryukyus[‡]

Temperature dependence of $^2\text{H-NMR}$ line-shape was measured on $\text{M}(\text{D}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ [$\text{M}=\text{Mg}, \text{Ca}$] in a temperature range 130-435K. The spectra explainable by the rigid D_2O model was observed at low temperatures, while, on heating, spectrum-narrowing giving a sharp doublet at the center was observed indicating the onset of new motions. These results were compared with the simulated spectra based on the 180 degrees-flip and C_2 -rotation of D_2O , and attributed to the onset of the 180 degrees-flip of D_2O molecules. At high temperatures, another narrowing due to the uniaxial rotation of the whole cation was observed. We also measured of $^1\text{H-NMR}$ relaxation time in the rotation frame ($T_{1\rho}$) on the protonated complex below room temperature, and found a clear single $T_{1\rho}$ minimum attributable to the H_2O 180 degrees-flip motion.

2価の常磁性金属 M を含む $\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ [$\text{M}=\text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}$]型錯体の $^{35}\text{Cl-NQR}$ のスピン格子緩和時間(T_{1Q})の測定から、陽イオン $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ がもつ複数の運動が T_{1Q} に影響を与えていることが予想されている。考えられる運動モードには H_2O 分子の 180° フリップ、 H_2O 分子の C_2 軸まわりの回転、陽イオンの C_3 軸、 C_4 軸まわりの回転といった陽イオン全体の一軸回転、全体回転などが予想される。これまで [$\text{M}=\text{Mg}, \text{Ca}$]の反磁性錯体について $^1\text{H-NMR}$ の測定が行なわれ、 H_2O の 180° フリップ、陽イオン全体の回転運動などの存在が示唆されている。

今回は、室温付近の領域における運動モードを完全に明らかにするため、 $\text{M}(\text{D}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ [$\text{M}=\text{Mg}, \text{Ca}$]を合成し、 $^2\text{H-NMR}$ スペクトルの温度変化の測定を 130K から 435K までの領域で行なった。又、 D_2O 分子の 180° フリップ、 C_2 軸まわりの回転、および陽イオン全体の C_3 軸、 C_4 軸まわりの回転について、 $^2\text{H-NMR}$ スペクトルのシミュレーションを行ない、実測のスペクトルと比較した。運動を確認する目的で、室温以下で $^1\text{H-NMR}$ の回転系でのスピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)をラジオ波磁場 $H_1=0.4\text{mT}$ においてスピロック法を用いて測定した。さらに、構造変化がないことを確認するため、DSC および粉末 X 線の測定も行なった。

キーワード: 固体 NMR、錯化合物、分子運動、NMR 線形、Coordinated D_2O Dynamics

○よしだ なおひろ、いしまる しんいち、ほりうち けいそう、いけだ りゅういち

実際に測定した室温以下の ^2H -NMR スペクトル(Fig.1, Fig.2)は 180° フリップを仮定したシミュレーションの線形とほぼ一致した。一方、 $T_{1\rho}$ から決定した活性化エネルギーは 21kJmol^{-1} で、報告されている T_1 の解析の結果と同じ値になった。また、室温以上(Fig.3, Fig.4)では、陽イオン全体の一軸回転が確認された。

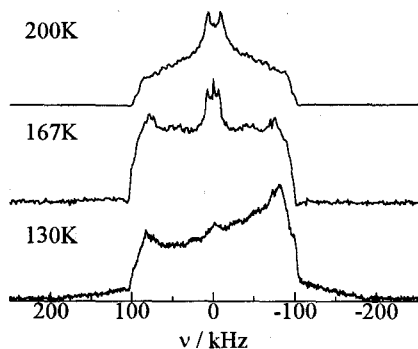


Fig.1 ^2H -NMR spectra of $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ at low temperatures.

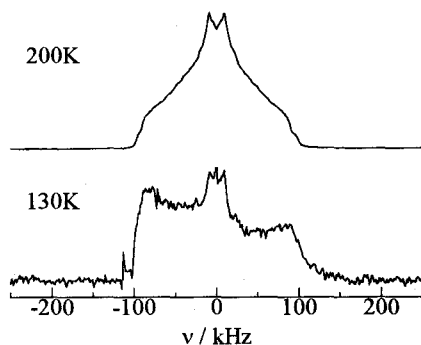


Fig.2 ^2H -NMR spectra of $\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ at low temperatures.

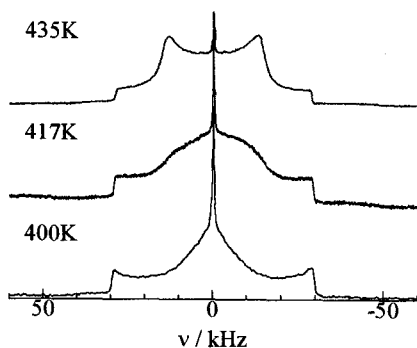


Fig.3 ^2H -NMR spectra of $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ at high temperatures.

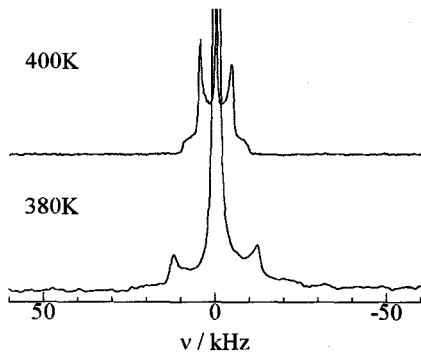


Fig.4 ^2H -NMR spectra of $\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6\text{SnCl}_6$ at high temperatures.

A Study on Dynamics of Molecules in Polymer Gel Systems by ¹H-NMR Method
 Shingo Matsukawa and Isao Ando
 Dept. of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology,
 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152

The diffusion coefficient (D) of poly(ethylene glycol)(PEG) oleyl ether (probe polymer) contained in N,N-dimethylacrylamide(DMAA)-N-stearyl itaconamide copolymerized gel was measured by pulsed-gradient spin-echo ¹H-NMR method with high field gradient (22.2 Tm⁻¹). From these experimental results it is found that D of PEG oleyl ether is strongly affected by the hydrophobic interaction between the oleyl group of probe polymer and the stearyl group of gel matrix. ¹HT₁ and T₂ of PEG in the gel were also measured to elucidate the dynamics of this system. From these results, it was suggested that the PEG group of probe polymer is in mobile motion.

1) 緒言

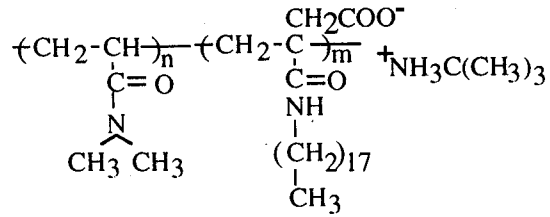
高分子ゲル内におけるプローブ高分子は、網目鎖によって抑制され、溶液中とは異なった運動挙動を示す。NMR法は、このような運動性の変化を詳細に検討する上で有力な手段となる。スピン-格子緩和時間(T₁)及びスピンスピン緩和時間(T₂)はセグメントスケールの分子運動に関する知見を与え、特に、T₁はMHzオーダーのタイムスケールの運動に敏感である。一方、磁場勾配を用いる実験では、その観測タイムスケールはパルス状磁場勾配の間隔Δによって決まるが、分子内運動による変位巾は小さく、ミリ秒オーダーのΔを用いる場合には分子全体の並進運動による変位が支配的となり、自己拡散係数を測定することとなる。既に我々は、立体的な障害が主な相互作用であるようなゲル内におけるプローブ高分子の自己拡散係数を測定し、これが網目鎖高分子の動的遮蔽距離κ⁻¹とプローブ高分子の流体力学的半径R_hの比によって、次式のように表わされたことを示した¹⁾。

$$D_{\text{in gel}} / D_{\text{in solution}} = \exp(-\kappa R_h) = \exp(-Q^{0.71} R_h) \quad (1)$$

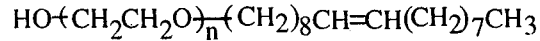
また、水素結合による相互作用が支配的である場合について、自己拡散係数と¹HT₂の測定結果を報告してきた²⁾。ここでは、次に示したハイドロゲルマトリックス中のプローブ高分子について、22.3 Tm⁻¹の超高磁場勾配NMRプローブを用いて拡散係数と緩和時間を測定し、その結果を通してプローブ高分子の運動性を解析することを本研究の目的とした。

キーワード: 拡散係数測定, 緩和時間測定, 界面活性剤, ミセル含有ゲル, 疎水性相互作用
 まつかわしんご あんどういさお

Gel Matrix



Probe Polymer



2) 実験

試料調製 ステアリルアミンと無水イタコン酸より合成した長鎖アルキルモノマー(SIA)をt-ブチルアミンで中和し、N,N'-ジメチルアクリルアミド(DMAA)、架橋剤および開始剤とともに47℃において水に溶解し、50℃で重合した。得られたゲルを50℃においてアセトンに24時間、t-ブチルアミン水溶液に24時間、重水に72時間浸漬した後、30℃において0.5wt%のポリエチレングリコール(PEG)-オレイルエーテル(PEGユニット数20; Mw≒1200)重水溶液中に保存した。また、SIAを含まないゲルとPEG-オレイルエーテルの代わりにMw=1500のPEGを用いた試料を調製した。

NMR測定 自己拡散係数Dは、試作した高磁場勾配発生装置を接続したGSX270 NMR分光器(270Mz, 日本電子製)を用い、30℃において、パルス磁場勾配スピネコー(PGSE)¹H-NMR法により、磁場勾配を22.3Tm⁻¹、磁場勾配パルスの間隔Δを30ms、磁場勾配パルスの幅δを0.001ms-0.738msまで変えて測定した。¹HT₁は反転回復法、¹HT₂はCPMG法により測定した。

3) 結果

測定例としてPEG-オレイルエーテルを含む平衡膨潤度Q=78のDMAA-SIA共重合ゲルのPGSE-¹H NMRスペクトルをFig.1に示す。小さいδ値での4.72ppmのピークの強度の変化から、HDO(重水溶媒中に微量含まれる)の拡散係数を求めた。大きいδ値での3.72ppmのピークの強度の変化からは、PEG-オレイルエーテルの拡散係数を求めた。この値は1.32ppm(メチレン基)のピークの強度変化から求めた値と一致した。

Fig.2にQの異なるDMAAゲル、DMAA-SIA共重合ゲル(Fig.2a)及び溶液中(Fig.2b)でのPEG-オレイルエーテルの拡散係数(D_{PEG-OI})及び緩和時間の測定結果を示す。溶液中においてPEG-オレイルエーテルはミセルを形成するために、その拡散係数は、同じ分子量のPEGの拡散係数より小さく、また、濃度によって観測される拡散係数が変化する。DMAAゲル中のD_{PEG-OI}は0.5wt%溶液中及び0.1wt%溶液中と同じサイズのみセルがゲル内において(1)式に従って拡散が抑制されるとして計算した値(点線)より大きい値となった。PEG-オレイルエーテルは、DMAAゲル中では溶液中と異なるコンホメーションをと

っていると示唆される。しかし、同じ分子量のPEGについて同様の計算によって得られた値（波線）より小さい値であることから、ゲル中のPEG-オレイルは一部会合しているか、または、DMAAゲルの網目鎖との間に相互作用が存在するものと考えられる。

SIAを共重合したゲル中においては、 $D_{\text{PEG-OI}}$ が非常に小さくなる。このゲル内には、SIAのミセルが共重合によって固定化されている。PEG-オレイルのオレイル基がSIAのミセル内部のステアリル基と相互作用を持ち、ミセル内に取り込まれるために拡散が強く抑制されると推測される。この時、PEG部の $^1\text{HT}_1$ は、溶液中のものと同程度であるのに対して、 $^1\text{HT}_2$ は非常に短くなっている。PEG部のセグメントスケールの分子内運動は変化しないが、分子全体の回転などの長いタイムスケールの運動が抑制されていると考えられる。詳細は討論会にて述べる予定である。

- 参考文献 1) S. Matsukawa and I. Ando, *Macromolecules*, in press(1996).
 2) 松川真吾、安藤勲、高分子討論会要旨集, 44 (8), (1995), 1614.

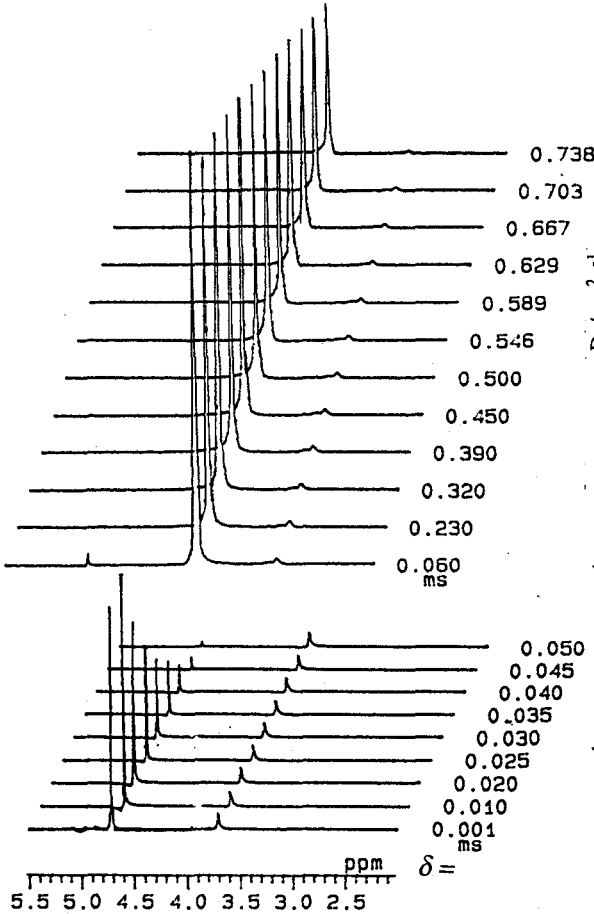


Fig.1 Spin-echo spectra of DMAA-SIA gel containing PEG-oleyl ether as a probe polymer and H₂O as solvent varying duration of magnetic field gradient pulse(δ).

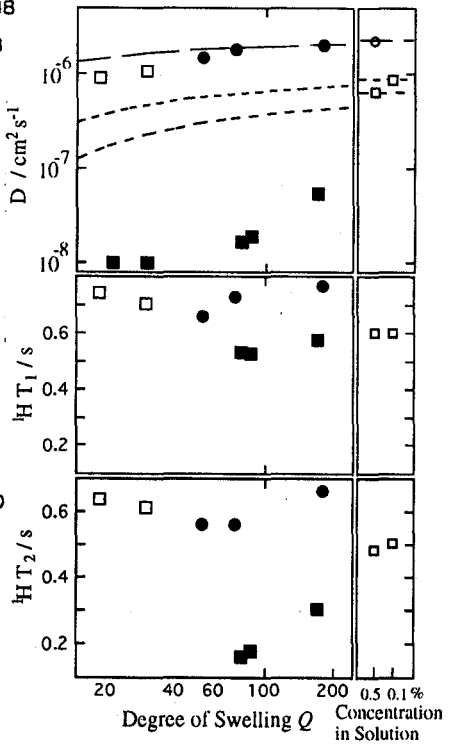


Fig.2 Plots of D , $^1\text{HT}_1$ and $^1\text{HT}_2$ of PEG-oleyl ether in DMAA-SIA gel(■), in DMAA gel(□) and in solution(●) and of PEG in DMAA-SIA gel(●) and in solution(○) against Q .

1P31

固体²H NMRによる結晶中のエンケファリン分子の
局所運動の解析
(姫工大理) 内藤 晶・○上平 美弥・辻 暁・斉藤 肇

Local motion of crystalline enkephalin as studied by ²H NMR
Akira Naito · ○Miya Kamihira · Satoru Tuzi · Hazime Saitō
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We have recorded ²H NMR spectra of Leu⁵- and Met⁵-[²H₅]Phe⁴ enkephalins crystallized from a variety of solvents. It was found that the phenylalanine side chains in all crystals have flip-flop motion with the frequency of 10³-10⁵Hz at room temperature. The values of T₁^D are, however, 0.1-0.8sec for each sample which imply the presence of high frequency motion. Low temperature ²H NMR spectra showed that the quadrupolar splittings (3e²qQ/4h) were increased with lowered temperatures. These results indicate that the phenyl rings of phenylalanines in enkephalin crystals have librational motion in the frequency range of 10⁷-10⁸Hz besides the flip-flop motion. The presence of high frequency motion was also observed as measured by T₁^C values.

エンケファリン (Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Leu⁵: Leu⁵-エンケファリン、-Met⁵: Met⁵-エンケファリン) は、モルヒネ様の鎮痛作用をもつ内因性オピオイドペプチドの一種で、その構造はオピオイドペプチドのN端に共通して見られ、また受容体に結合する際の結合部位に相当する。オピオイド受容体の構造解析は現在困難であるが、結合にはリガンド側のTyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴の配列が必要不可欠であり、Phe⁴はアドレス部として受容体認識部位であることが報告されている。エンケファリン分子の3次元構造は、すでにX線結晶構造解析によって何種類か報告されており、大きくβ-bend構造とextended構造に分類されている。しかし、同じ構造に分類される場合でも、結晶中に含まれる溶媒分子の種類や数のちがいによってそれぞれ主鎖の二面体角、側鎖の配向が異なる。また同じ結晶であっても結晶化溶媒の存在状態によって分子の構造や運動性が変化することがわかってきた⁽¹⁾。このようなエンケファリン分子の構造のフレキシビリティは、この分子の機能と相関があると考えられる。本研究では、受容体に結合するリガンドの一モデルとして、種々の結晶多形中におけるエンケファリン分子の運動性、特にPhe側鎖フェニル環の運動性について解析を行ったので報告する。

固体NMR、エンケファリン、結晶多形

ないとう あきら・○かみひら みや・つじ さとる・さいとう はじめ

[実験]

Leu⁵-エンケファリン、およびMet⁵-エンケファリンは、ABIペプチド合成機によりF-moc法で合成した後、HPLCで精製した。Leu⁵-エンケファリンについてはH₂O (I; X線回折ではβ-bend構造と報告されている)、MeOH/H₂O (II; β-bend構造)、DMF/H₂O (III; extended構造) から、Met⁵-エンケファリンについてはEtOH/H₂O (IV; extended構造) から、それぞれ結晶化を行った。重水素標識試料は、標識アミノ酸 ([²H₅] Phe) をF-moc化した後、同様に合成し結晶化を行った。固体高分解能¹³Cおよび²H NMR測定は、Chemagnetics社製CMX400 NMRスペクトロメータ (¹³Cの共鳴周波数100.7MHz、²Hの共鳴周波数61.4MHz) を用い、それぞれCP-MAS、四極子エコー法を用いた。繰り返し時間は¹³Cについては4~5sec、²Hについては1sec、¹³C測定の接触時間は1msec、測定温度は25~140°Cの間で、積算は十分なS/N比が得られるまで行った。試料は、結晶が乾燥しないように留意しながら少量の溶媒とともにジルコニア製5mφローターに詰め、アラルダイトで完全に封じて溶媒がもれない状態で測定を行った。

[結果と考察]

¹³C CP-MASスペクトル測定

試料I~IVについて¹³C CP-MASスペクトル測定を行った結果を図1に示す。各共鳴線の帰属は溶液のNMRの化学シフト値と比較することにより行った。

スペクトルの中のフェニル領域の信号は、いずれの結晶においてもPhe、Tyr C_γ、C_ε共鳴線が先鋭であるのに対し、その強度と比較してC_δおよび、C_ε共鳴線強度が著しく小さい。このことからPhe、Tyrの側鎖のフェニル環にはデカップリング周波数と干渉を起こす、50kHz程度の運動が存在することがわかる。しかし、各結晶のこれらの共鳴線強度は一樣に干渉を受けているものの、フェニル環のC_δおよび、C_ε強度は試料II、IVと比較して試料I、IIIの強度が大きいことから、これらの試料の間でフェニル環の運動性に違いが存在することがわかる。

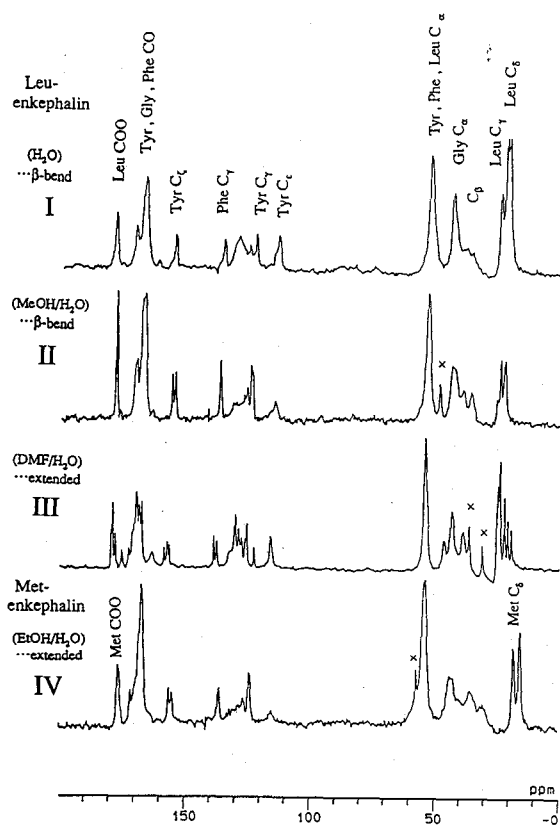


Fig.1 ¹³C CP-MAS (TOSS) spectra at room temperature

これらの試料について室温から温度を下げて、 ^{13}C CP-MASスペクトル測定を行った。試料I、II、IVについては温度を下げるにつれてフェニル領域の信号強度が徐々に大きくなる様子が観測されたが、試料IIIについては 0°C に下げることさらに強度が小さくなり、 -20°C 以下で強度の上昇が観測された。以上の結果から、Phe、およびTyr側鎖の環の運動性は試料IIIにおいて最も高く、次いで試料II、IV、そして試料Iの順であることがわかった。

緩和時間測定

各試料の T_1^{C} 測定の結果を表1に示す。Phe側鎖の炭素核について注目すると、いづれの結晶においても $\text{C}\delta$ 、 $\text{C}\epsilon$ の T_1^{C} 値は $\text{C}\gamma$ の値と比較して小さいが、フリップ・フロップ運動の影響をほとんど受けない、 $\text{C}\zeta$ の値もまた $\text{C}\delta$ 、 $\text{C}\epsilon$ と同程度である。さらに $\text{C}\delta$ 、 $\text{C}\epsilon$ 、 $\text{C}\zeta$ の値は $\text{C}\alpha$ 、 $\text{C}\beta$ 核など、プロトンと直接結合した炭素核の値とほぼ同じである。このことから、エンケファリン分子は分子全体が双極子相互作用を切断しない程度の振幅で、 $10^7\sim 10^8\text{Hz}$ 程度の周波数で振動していることが判明した。

Table 1 T_1^{C} (sec) values

	Tyr $\text{C}\gamma$	$\text{C}\delta$	$\text{C}\epsilon$	$\text{C}\zeta$	Phe $\text{C}\gamma$	$\text{C}\delta$, $\text{C}\epsilon$	$\text{C}\zeta$	Tyr, Phe, Leu,or Met $\text{C}\alpha$	Gly $\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$
I	15.8	5.50	5.09	12.1	23.3	6.83	6.06	8.94	6.26	7.00
II	28.5	18.9	14.3	22.2	36.7	17.6	12.4	10.3	12.8	11.5
III	21.2	14.7	12.5	37.9	26.1	6.12	9.13	20.4	11.6	11.1
IV	29.1	14.3	14.7	22.6	34.4	14.3	17.5	12.3	14.8	11.8

重水素NMR測定

各試料の ^2H NMRスペクトルを図2に示す。試料Iのスペクトルの分裂幅($3e^2qQ/4h$)は、 128.2kHz 、試料IIについては 125.2kHz 、試料IVについては 124.4kHz であった。スペクトルの線形を解析することにより、各試料ともにPhe側鎖フェニル環はフリップ・フロップ運動をもち、その周波数は試料Iについては $10^3\text{Hz}\sim 10^4\text{Hz}$ 程度、試料IIは $10^4\text{Hz}\sim 10^5\text{Hz}$ 程度、試料IVは 10^4Hz 程度であることがわかった⁽²⁾。このようにフェニル環のフリップ・フロップ運動は、試料Iにおいて最も遅いという結果が得られた。X

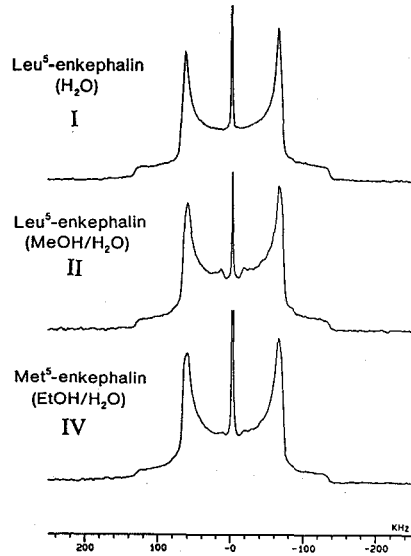


Fig.2 ^2H NMR spectra at room temperature

線結晶解析の結果をみると、この分子構造のみPheのフェニル環とTyrのフェニル環が空間的に近接している⁽³⁾。このように環どうしが接近することにより、フリップ・フロップ運動が制限されたことを示している。

これらの試料について重水素核の縦緩和時間 ($T_{1\rho}$) 測定を行い、さらにその値から相関時間 (τ_c) を求めた。この結果

を表2に示す。得られた相関時間は、線形から求めたフリップ・フロップ運動周波数より一桁～三桁程大きく、フリップ・フロップ運動に加えて別のより速い運動成分の存在が示唆された。

試料II、IVについて室温から温度を下げて同様に測定を行うと、いずれも温度の低下とともに分裂幅 ($3e^2qQ/4h$) が広がってゆく様子が観測された。同時にスペクトル強度も徐々に減少した。このことから、これらの結晶中のPhe側鎖フェニル環には、 $10^4\sim 10^5$ Hzのフリップ・フロップ運動の他に、 ^2H NMRスペクトルの線形を変化させない程度の小さい振幅のより速い運動 (10^8 Hz程度) も同時に存在することがわかる。

一方、いずれの試料においてもスペクトルの中央に天然存在の重水素核をもつ溶媒分子の先鋭な共鳴線が観測された。その共鳴線強度は温度を下げるにつれて段階的に小さくなったが、等方的に運動している成分が -140°C まで一部残存した。したがって今回測定を行った結晶内には、かなり運動性の高い溶媒分子が数種類配位していることがわかった。フェニル環、または分子全体の振動運動は、こうした溶媒分子の高い運動性に関係があると考えられる。また、温度を下げて ^{13}C CP-MASスペクトル測定を行った結果、カルボキシル共鳴線が -60°C 付近で低磁場側に新たに現れ成長してゆく様子が観測されたが、この構造変化はこうした溶媒分子の運動の凍結に伴うものと考えられる。

[まとめ]

^{13}C CP-MASスペクトルおよび ^2H NMR測定の結果から、結晶中のエンケファリン分子側鎖フェニル環には、フリップ・フロップ運動のほかに小さい振幅の速い振動運動が存在することがわかった。こうした運動性、および構造は結晶内に含まれる溶媒分子の存在に大きく影響を受けていることが判明した。

Table 2 Flip-flop frequencies determined by line shapes analysis, and correlation times (τ_c) determined by $T_{1\rho}$ values for phenyl rings.

	flip-flop motion (Hz)	$T_{1\rho}$ (sec)	τ_c (sec)
I	$10^3\sim 10^4$	0.59	3.75×10^{-7}
II	$10^4\sim 10^5$	0.19	1.20×10^{-7}
IV	10^4	0.24	1.40×10^{-7}

(1) A. Naito, M. Kamihira, S. Tuzi, and H. Saitô, J. Phys. Chem., (1995), 99, 12041-12046

(2) R. J. Schadt, E. J. Cain, and A. D. English, J. Phys. Chem., (1993), 97, 8387-8392

(3) A. Aubry, N. Birlirakis, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos and M. Marraud Biopolymers, (1989), 28, 27-40

(米国コロンビア大-(財)神奈川科学技術アカデミー研究室)

○海老沢計慶*、Zhengtian Gu、Ann McDermott

Effect of Hydrogen Bonding on Molecular Dynamics
in Crystalline Amino Acids

Kazuyoshi Ebisawa*, Zhengtian Gu, Ann McDermott

Department of Chemistry, Columbia University - KAST

*Present Address Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

The rotation rate of NH_3^+ in crystalline amino acids varies dramatically, and the corresponding activation energies are known to vary from 25 to 50 kJ / mol. The proton spin-lattice relaxation (T1) measurements were performed in order to characterize the dynamical behavior differences between DL and L Aspartic acid and also the differences between Glycine polymorphs (α -, γ -) by solid state NMR. The investigations for these crystalline suggest that the dynamical difference is due to the different hydrogen bonding environments around the NH_3^+ groups. The energy calculations of the rotational barriers were also performed using MacroModel and Cerius2 Program and gave satisfactory agreement with the above experimental values when the dielectric constant was set to 2.5 and 2.0 for Aspartic acid and Glycine crystal respectively.

【緒言】

一般にアミノ酸結晶の場合、アミノ基とカルボキシル基の間で形成される分子間水素結合は構造安定化の重要な要因であり、結晶の多形性は主にこの分子間相互作用の空間的な多様性から生じるものである。Glyには、3種類の結晶多形 (α , β , γ) があり、このうち α 晶と γ 晶では、結晶内の分子のパッキングの様子が明らかに異なり、水素結合の強さにも差があることが予想された。また、Aspでは、L-体とDL-体の結晶構造の比較から、アミノ基の回転運動がL-体で、より束縛されていると予想された。

そこで、本研究では、上記2種類のアミノ酸結晶を例に、光学活性体とラセミ体間にみられる分子間相互作用の違いや結晶多形間の水素結合様式の違いが、結晶内の分子の運動性にどのような影響を及ぼすかを固体NMRの緩和時間測定法などにより、詳しく検討したので報告する。また、各結晶形におけるアミノ基の回転エネルギー障壁を結晶の誘電率を変えて計算し、固体NMRの解析結果と比較したのでここに併せて報告する。

(KEY WORD) 結晶多形、固体NMR、緩和時間測定、構造計算

○えびさわ かずよし、Gu Zhengtian、McDermott Ann

【方法】

各結晶形について、固体NMRの反転回復法により、プロトン核のT1緩和時間を-40℃から120℃の範囲で、順次温度を変えて測定した。T1の温度依存性から分子運動の相関時間 τ_c を求め、次いで式(1)により各々の活性化エネルギーを算出した。

$$\tau_c = \tau_0 \exp(E_{act}/RT) \quad (1)$$

一方、Gly, Aspいずれの結晶も、T1緩和は主にアミノ基の回転運動に由来すると考えられるので、構造計算プログラムMacromodel (コロンビア大学 Still研にて開発) 又は Cerius2 (MSI社開発) により、アミノ基の回転障壁エネルギーを計算し、各々の実験値と比較した。また、計算値は、用いる誘電率に依存するので、誘電率を1.0~2.5の範囲で変えた場合についても検討した。

【結果と考察】

T1緩和時間測定の結果、L体のAsp結晶や γ -Gly結晶では、室温におけるT1が20秒と、DL体のAsp結晶 (5秒) や α -Gly結晶 (2秒) に比べ、明らかに緩和時間が長く、結晶内での分子の運動性がより束縛されていることが分かった。また、T1の温度依存性から算出した各結晶形の活性化エネルギーは、表1のように、23~30 kJ/molの範囲であった。

アミノ基の回転障壁エネルギーが一般に25~50 kJ/molの範囲であることを考えると、各結晶形間で観測されたダイナミックスの違いは、アミノ基を介した水素結合の強さの違いに由来していると解釈できる。

そこで、Asp, Glyの各結晶形において、アミノ基の回転障壁エネルギーを構造計算により求めたところ、結晶形間のエネルギー差 $\Delta\Delta E$ は、表2のように、実験値をほぼ良く再現することが分かった。但し、計算に用いる誘電率の設定には注意が必要であり、Gly結晶の場合には、表3に示すように、誘電率の増大に伴って、 $\Delta\Delta E$ は徐々に減少していく。実験値を最も良く再現する誘電率は、表2のように、2.0であったが、これはいくつかのアミノ酸結晶で、誘電率が2.1~2.8の範囲で実測された事実と大きく矛盾しない結果である。

表1. 各アミノ酸結晶の活性化エネルギー ΔE の比較

L-Asp結晶	27 kJ/mol	γ -Gly結晶	30 kJ/mol
DL-Asp結晶	23 kJ/mol	α -Gly結晶	24 kJ/mol
$\Delta\Delta E$	4 kJ/mol	$\Delta\Delta E$	6 kJ/mol

表2. 構造計算により求めた結晶形間のエネルギー差 $\Delta\Delta E$

$\Delta\Delta E$ (L-DL)	3 kJ/mol	(誘電率 $\epsilon=2.5$)
$\Delta\Delta E$ (γ - α)	5.2 kJ/mol	(誘電率 $\epsilon=2.0$)

表3. Gly結晶について計算した $\Delta\Delta E$ の誘電率依存性

誘電率 ϵ	1.0	1.5	2.0	2.5
$\Delta\Delta E$ (γ - α)	11.8	7.4	5.2	3.8 (kJ/mol)

1P33 ^{13}C DD/MAS NMR 法によるポリマーの分子運動の温度依存性

防大化学 ○浅野 敦志、京大院理 竹腰 清乃理

^{13}C DD/MAS NMR study of Chain Dynamics of Polymers

Atsushi Asano¹ and K. Takegoshi²

1. Department of Chemistry, National Defense Academy, Yokosuka 239, Japan

2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606-1, Japan

Abstract: The temperature dependence of solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) linewidth of polymers were examined to evaluate the chain dynamics above the glass transition temperature T_g under conditions of magic-angle-spinning (MAS) and high power proton dipolar decoupling (DD). The observed temperature dependence of the linewidth was explained by averaging the dispersion of isotropic chemical shifts and the interference between local anisotropic motion and proton decoupling. The linewidth δ was denoted as $\delta = \delta_0 + \delta_1 \tan^{-1}(\alpha(T_0 - T)) + \lambda M_2 / \pi \cdot J(\omega_1, \tau)$: M_2 is the powder average of the second moment of ^{13}C - ^1H dipolar interaction and $J(\omega_1, \tau) = \tau / (1 + \omega_1^2 \tau^2)$. The correlation time τ was assumed to be followed the Williams-Landel-Ferry (WLF) equation at temperature T : $\log(\tau/\tau_s) = -8.86(T - T_s)/(101.6 + T - T_s)$, which T_s is reference temperature. The WLF theory leads to that the T_s equals to approximately $T_g + 50\text{K}$. However, the obtained T_s from the ^{13}C DD/MAS NMR experiment was almost $T_g + 5\text{K}$. This led to that the fractional free volume of polymers at T_g is 5.1%.

緒言: 無定型ポリマーのガラス転移点 T_g から $T_g + 100\text{K}$ 程度までの運動は、一般に WLF 則に従う。WLF 式は $\log(\tau/\tau_s) = -C_1(T - T_s)/(C_2 + T - T_s)$ と書き表される。 T_s は特異温度。定数 C_1 、 C_2 をそれぞれ 8.86、101.6 とすれば、 $T_s \doteq T_g + 50\text{K}$ となることは力学、誘電緩和の実験から示唆されている¹。我々は、数十 kHz の運動が固体高分解能 ^{13}C NMR スペクトルの線幅に影響を与えることを利用し、線幅の温度依存性から WLF 式について再検討した。

実験: 用いたポリマーは重量平均分子量 $M_w = 39400$ 、 $T_g = 242.6\text{K}$ のポリビニルメチルエーテル(PVME)、 $M_w = 113000$ 、 $T_g = 289.3\text{K}$ と $M_w = 167000$ 、 $T_g = 291.9\text{K}$ のポリビニルアセテート(PVAc-1, PVAc-2)、 $M_w = 30700$ 、 $T_g = 285.5\text{K}$ のポリメチルアクリレート(PMA)、粘度平均分子量 $M_v = 420000$ 、 $T_g = 214.9\text{K}$ のポリイソブチレン(PIB)である。さらに現在数種のポリマーについて測定中。実験は Bruker DMX500 を用い、 ^{13}C 、 ^1H 核の共鳴周波数はそれぞれ 125.76MHz、500.13MHz であり、90°パルス幅は 4.5 μs (rf 磁場強度 55.6kHz) である。MAS 回転下の試料の正確な温度を知るため、300K 以下ではメタノールを、300K 以上ではエチ

keywords: ^{13}C DD/MAS NMR / Chain dynamics / Glass Transition Temperature T_g / WLF equation /

あさのあつし、たけごしきよのり

レングリコールをガラス管に封かんし MAS 条件下で温度校正を行った。MAS 回転速度は 5kHz である。その結果、220K 以下は $T' = 0.924T + 13.34$ 、225-300K では $T' = 0.9703T + 11.884$ 、305k 以上では $T' = 0.9945T + 4.1581$ となった。T は表示温度。すべての実験は試料の温度が安定するまで最低 15 分待って行った。

結果と考察： 図1に PVME の温度依存 ^{13}C DD/MAS NMR スペクトルを示した。ただし、 T_g 以下の測定は線幅に影響を及ぼす分子運動は凍結されているので、CP を併用して測定した。3 つのピークは高磁場側から CH_2 、 OCH_3 、 CH 基である。温度を上げていくと、線幅は $T_g + 30\text{K} \sim 60\text{K}$ の温度域で急激に増大し、 $T_g + 50\text{K}$ 前後で最大値を示す。その温度域を超えると徐々に溶液のスペクトルに似た線幅の細かいピークとなる。図2には PVME の側鎖 OCH_3 基の半値全幅 δ の温度依存を示した。○は実測の線幅を示している。我々は以下の方法により実測の δ を理論的に解析した。

δ は真の線幅と等方的化学シフトの分布、 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用からなる。 ^{13}C DD/MAS 実験では、 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用は rf 磁場と干渉を起こして、ポリマーの分子運動がちょうど rf 磁場と同じ強さのときに motional broadening が起こり、 δ は増大する。これらを式に表わすと、

$$\delta = \delta_0' + \delta_1 + \frac{2\delta_1}{\pi} \arctan(\alpha(T_0 - T)) + \frac{\lambda M_2}{\pi} \frac{\tau}{1 + \tau^2 \omega_1^2} \quad \text{①式}$$

となる²。ここで第 1 項の δ_0' は真の線幅、第 2、3 項は線幅が等方的化学シフトの分布に依存する項で特性温度 T_0 で δ_1 になる。 α はこの線幅の先鋭化における勾配を表わす。第 4 項は motional broadening に起因する項で M_2 は ^{13}C - ^1H 双極子相互作用の二次モーメントの空間平均で $\gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2 / (4\pi^2 \times 5r^6)$ 。r は ^{13}C - ^1H の距離で 1.1Å、h はプランク定数。 λ は二次モーメントの減少率を示す。 ω_1 は $2\pi \times 55.6\text{kHz}$ 。①式の第 1、2 項を統合して δ_0 を $\delta_0' + \delta_1$ とし、

$$\delta = \delta_0 + \frac{2\delta_1}{\pi} \arctan(\alpha(T_0 - T)) + \frac{\lambda M_2}{\pi \omega_1} \frac{\tau \omega_1}{1 + \tau^2 \omega_1^2} \quad \text{②式}$$

と変形する。ここで、運動の相関時間 τ は WLF 式

$$\log\left(\frac{\tau}{\tau_s}\right) = \frac{-C_1(T - T_s)}{C_2 + T - T_s} \quad \text{③式}$$

を用いた。パラメータ C_1 、 C_2 はそれぞれ 8.86、101.6 である。②、③式を用いて図2の実測の線幅を最小二乗フィットした。結果を実線で示してある。用いたパラメータは δ_0 、 δ_1 、 α 、 T_0 、 λ 、 $\tau_s \omega_1$ 、 T_s の 7 つである。一点破線は②式の第 3 項を表わし、点線は第 1、2 項を示す。非常に良く実測の線幅を再現することがわかる。すべてのポリマーの線幅は図2のように最小二乗された。図3には PVAc-1 の 4 つの残基における線幅の温度依存性を②、③式を用いて最小二乗した結果を示した。330-340K ですべての残基の線幅が最大値を示す。この温度は PVAc-1 の $T_g + 50\text{K}$ の範囲である。最小二乗した結果の詳細は表に示した。特異温度 T_s は、WLF 理論によれば $T_g + 50\text{K}$ となるが、NMR から得られた結果では、すべてのポリマーにおいて T_s は平均しておよそ $T_g + 5\text{K}$ となった。これは力学緩和や誘電緩和における結果に比べ特異温度が T_g 近傍に存在することを示唆している。この結果を Doolittle の粘度式に当てはめて、自由体積の分率 f を求めると、 T_g における f は 0.051 とな

る。これは T_g+50K で求めた結果の約 2 倍の値となり、ポリマーのガラス状態が系の自由体積の 5.1%に達していることを示している。また②式の第 2 項における特性温度 T_0 は側鎖平均で $T_g+22.5K$ 、主鎖平均で $T_g+32.5K$ となった(PIB の主鎖は除いた)。PIB の主鎖 4 級炭素の T_0 は T_g+5K となった。PIB は側鎖に短い 2 つの CH_3 基のみを対照的に持つので、ガラス転移による主鎖の運動の変化がほぼ同時に等方的化学シフトの分布も解消したと考えられる。これらの結果から等方的化学シフトの分布が線幅に与える影響は、 T_g を基準にとればポリマーの種類によらず $T_g+20\sim 30K$ の温度で解消することがわかった。

- 1 M.L. Williams, R.F. Landel and J.D. Ferry,
J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 3701-3707.
2 K. Takegoshi and K. Hikichi,
J. Chem. Phys., 1991, 94, 3200-3206.

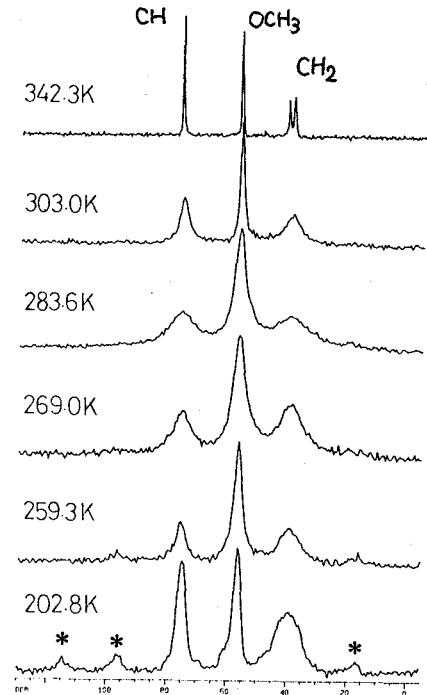


Fig.1. ^{13}C solid-state NMR spectra for PVME. The peak marked with asterisk is spinning-sideband. The spectrum at 202.8K was obtained by CP method.

Table Best fit parameters to the observed full linewidth data using equations 2 and 3.

Polymers		δ_0/Hz	δ_1/Hz	α	T_0/K	$\tau\omega/rad$	λ	T_s/K	T_g/K	T_s-T_g
PIB	CH3	508±8	500±15	0.08±0.01	232.6±0.5	221±195	0.07±0.01	220.1±9.1	214.90	+5.2
	C	164±6	145±8	0.06±0.01	220.2±1.5	352±251	0.070±0.003	219.5±6.8		+4.6
PVME	CH2	728±19	716±79	0.04±0.02	278.8±13.0	304±367	0.50±0.13	247.9±11.8	242.60	+5.3
	OCH3	246±4	180±8	0.09±0.03	261.6±3.4	89±35	0.36±0.01	247.2±3.5		+4.6
	CH	259±4	248±10	0.09±0.03	264.8±4.1	198±77	0.68±0.02	246.1±3.8		+3.5
PMA	CH	566±19	564±23	0.08±0.02	313.0±2.6	384±216	0.74±0.03	290.4±6.0	285.50	+4.9
	OCH3	185±13	132±17	0.17±0.12	307.1±4.5	132±119	0.29±0.02	290.1±8.2		+4.6
	C=O	270±12	174±18	0.21±0.16	308.7±5.2	71±35	0.66±0.35	291.6±4.5		+6.1
PVAc-1	CH3	156±7	145±7	0.08±0.01	311.7±0.9	408±310	0.140±0.006	294.7±7.4	289.30	+5.4
	CH2	498±55	502±59	0.10±0.02	321.3±1.5	664±443	0.85±0.06	296.0±6.9		+6.7
	CH	376±29	356±43	0.06±0.04	323.3±9.9	577±399	0.67±0.08	294.0±7.8		+4.7
	C=O	172±21	183±24	0.13±0.05	314.0±2.7	279±93	0.99±0.02	294.6±3.2		+5.3
PVAc-2	CH3	164±12	153±13	0.052±0.008	314.7±1.7	460±311	0.150±0.009	296.6±6.8	291.90	+4.7
	CH2	476±34	565±41	0.09±0.02	329.5±3.8	886±467	0.92±0.05	296.8±6.4		+4.9
	CH	368±15	356±52	0.05±0.05	329.8±17.2	654±443	0.64±0.12	296.0±8.0		+4.1
	C=O	179±14	171±23	0.09±0.09	320.4±17.5	305±186	0.80±0.07	296.7±7.0		+4.8

Error is σ

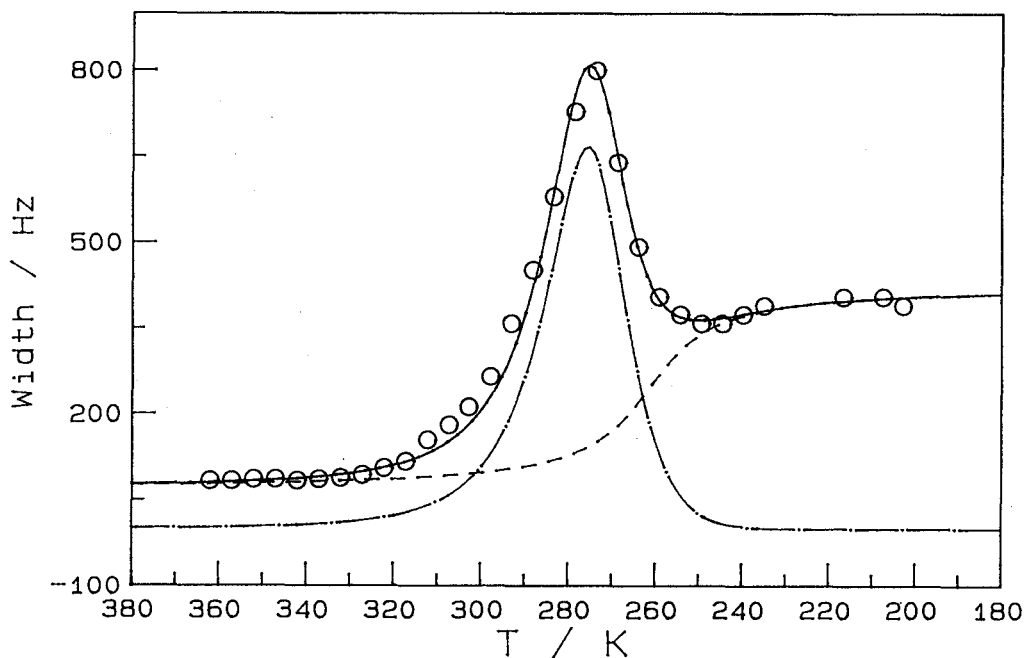


Fig. 2. Temperature dependence of the full linewidth of OCH_3 carbon of PVME. The solid curve is the "best-fit" line described by the parameters in Table. The broken and the broken-dotted lines represent the first and second terms and the third term in equation 2, respectively.

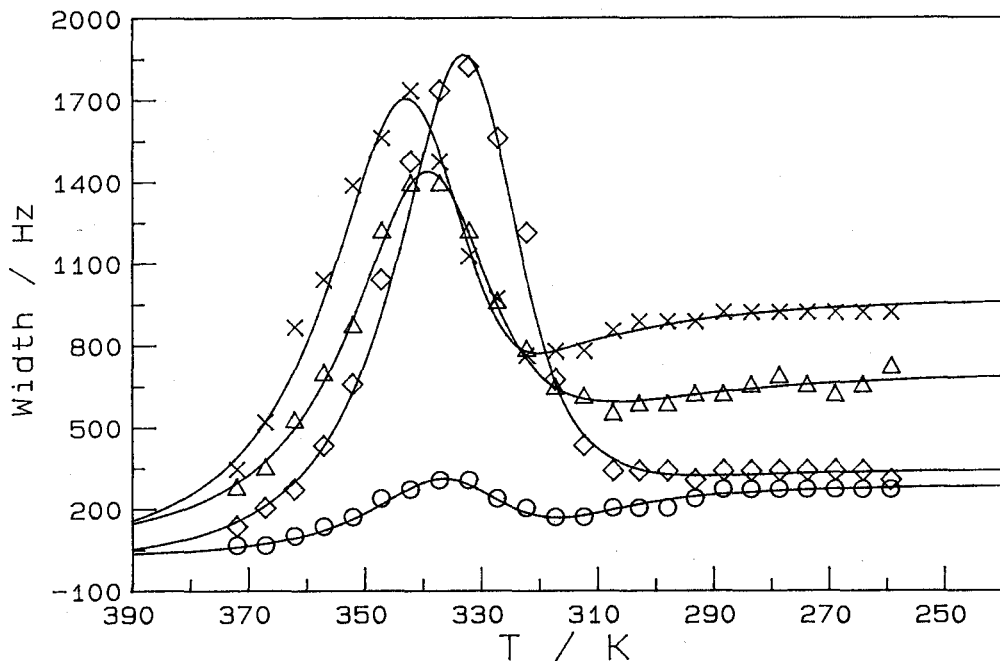


Fig. 3. Temperature dependence of the full linewidth of CH_3 (\circ), CH_2 (\times), CH (\triangle), $\text{C}=\text{O}$ (\diamond) carbons of PVAc-1. The solid curves are the "best-fit" lines described by the parameters in Table.

(北大工) ○川瀬泰誉 平沖敏文 平山智昭 堤耀広

Dynamics of Polyglycine I by Solid State ^2H -NMR

Y. Kawase, T. Hiraoki, T. Hirayama, and A. Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060

Polyglycine I deuterated in methylene group (PG I - d_2) or amide group (PG I -Nd) were investigated by solid state ^2H -NMR. ^2H -NMR spectra of PG I - d_2 show axially symmetric patterns and the quadrupole splitting slightly decreases with increasing temperature. T_1 decreases gradually with raising temperature. Both results indicate the existence of fast librational motions in the methylene groups. T_1 values of PG I - d_2 are smaller than those of polyglycine II - d_2 , suggesting that PG I is more mobile than PG II owing to the conformational constraints.

ポリグリシンには、2つのコンフォメーションが存在する。1つは β -シート構造のポリグリシンIである。もう1つは 3_1 -ヘリックスのポリグリシンIIである。ポリグリシンIIはペプチド鎖が3残基で1回転するらせん構造をなし、そのペプチド鎖が反平行に並び、隣合う分子鎖が水素結合をなして6方晶を形成している。我々はポリグリシンIIの固体 ^2H -NMR測定を行い、スペクトルが rigid pattern であり、四重極分裂幅は温度の増加とともにわずかに減少し、 T_1 も減少するので、メチレン基には小振幅の高速微小振動が、アミド基には小振幅の比較的遅い振動が存在することを示した。¹⁾ 本研究ではポリグリシンIの固体粉末試料の ^2H -NMRを測定し、スペクトルとスピン格子緩和時間から分子運動の解析を行い、ポリグリシンIIと比較検討した。

試料は、メチレン基を重水素化したポリグリシンI (PG I - d_2) と、アミド基を重水素化したポリグリシンI (PG I -Nd) を用いた。PG I - d_2 は、メチレン基を重水素化したポリグリシンII (PG II - d_2) を三フッ化酢酸中で沈殿させて得た。PG I -Nd は、ポリグリシンIIを、重水素化三フッ化酢酸に溶解し、溶媒を蒸発させて作製した。試料の同定は、IR と ^{13}C -CP/MAS 測定によって行った。固体 ^2H -NMRスペクトルは、共鳴周波数 30.7MHz で、四重極エコー法により得た。

図1に、PG I - d_2 の ^2H -NMRスペクトルの温度依存性を示す。線形は温度によらずほぼ rigid pattern である。四重極分裂幅は完全な rigid pattern における値 128kHz よ

.....

キーワード：ポリグリシン、固体 ^2H -NMR

かわせやすたか ひらおきとしふみ ひらやまともあき つつみあきひろ

りやや小さく、温度の増加とともにわずかに減少する。（ $-120 \sim 125^\circ\text{C}$ で $118 \sim 114\text{kHz}$ ） この結果は、C-D軸が微小振幅の振動をしていることを示す。PG II-d₂についても、同様な結果が得られている。

図2に、PG I-d₂のスピン-格子緩和時間 T_1 の温度依存性を示す。 T_1 は温度の増加とともに減少する。（ $-100 \sim 140^\circ\text{C}$ で $3.5 \sim 0.54\text{sec}$ ） PG II-d₂の T_1 の値を図2に重ねて示す。両者の T_1 は温度の増加とともに減少するが、 T_1 値は PG Iの方が小さく、室温で PG IIの18%である。このことは、PG IとPG IIではメチレン基の運動の速さ、もしくは振幅に違いがあるということを示している。PG IとPG IIはどちらもペプチド鎖の間に水素結合が形成されているが、PG IIでは、更にメチレン基も数残基にひとつの割合で水素結合していることが報告されている。²⁾ 従って、PG IIのメチレン基の運動がより束縛され、 T_1 が異なるものと考えられる。

PG I-Ndでは、非対称パラメーター η が0でないときの rigid pattern が観測された。PG I-Nd についてのスペクトルの温度依存性や T_1 については現在検討中である。

- 1) T. Hirayama, S. Kitazawa, T. Hiraoki and A. Tsutsumi, *Rept. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, **38**, 469 (1995)
- 2) A. M. Dwivedi and S. Krimm, *Biopolymers*, **21**, 2377 (1982)

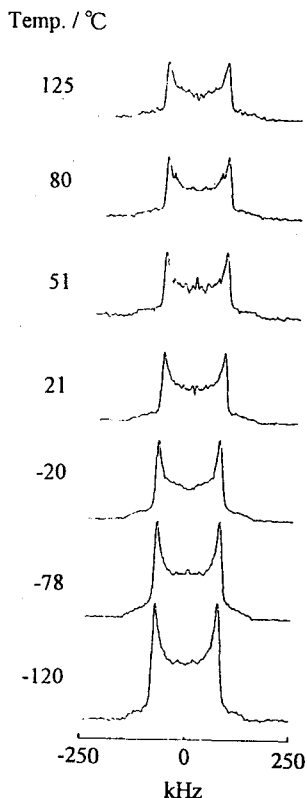


Figure 1. Temperature dependence of ²H-NMR spectra of polyglycine I-d₂.

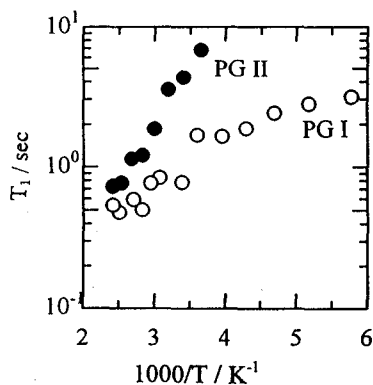


Figure 2. Temperature dependent T_1 of polyglycine I-d₂ and polyglycine II-d₂.

(北大工) 堤 耀広・宮川 泰・平沖敏文 (富士フィルム) 境野佳樹

Molecular Motion of Deuterated Poly(ethyleneterephthalate) in Solution
Studied by ^2H and ^{13}C NMR Relaxation

(Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060) A. Tsutsumi, Y. Miyagawa and T. Hiraoki (Asaka Research Laboratories, Fuji Photo Film Co., Ltd, Asaka-shi, Saitama 351) Y. Sakaino

In order to investigate the dynamical behaviors of poly(ethyleneterephthalate) in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol/dichloromethane 3:7 mixed solvent, ^2H and ^{13}C -NMR relaxations were measured at the resonance frequencies of 41.36MHz for ^2H and 67.8MHz for ^{13}C in the temperature range from -20 to 60°C . Samples were PET-Bd δ deuterated at phenyl ring and PET-Ed δ deuterated at ethylene group. ^2H and ^{13}C spin-lattice relaxation times T_1 for ethylene group showed the minimum at the room temperature. However, T_1 for phenyl group monotonically increases with increasing temperature. These experimental data were analysed using the relaxation model considering the multiple internal rotation. It was found that ethylene group undergoes the fast segmental motion with the correlation time of the order of 10^{-9} s at room temperature. Superimposed on such motion, 180° flip-flop motion with the rate 10^9 /s around the chain axis occurs at the phenyl group.

高分子試料のキャラクタリゼーションの一つとしてNMR緩和によるマイクロダイナミックスの研究が行われている。一般に高分子は分子量分布、構造の多様性により緩和は等方的単一相関時間では説明できないため、種々のモデルが用いられている。妥当なモデルを決めるため複数の周波数による測定が行われているが、多核NMRの併用も有効であることが知られている。本研究では、汎用高分子であるPoly(ethyleneterephthalate)について、その重水素化物を用い、 ^2H および ^{13}C NMR緩和から溶液中における分子運動を検討した。

試料のPoly(ethyleneterephthalate)には、phenyl ringを重水素化したPET-Bd δ とethylene groupを重水素化したPET-Ed δ を用いた。これらの試料を1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol/CH₂Cl₂ 3:7混合溶媒に溶解させ測定試料とした。 ^2H の T_1 , T_2 , および ^{13}C の T_1 , NOEはJEOL-FX270にて温度範囲 $-20^\circ\sim 60^\circ\text{C}$ で測定した。

PET-Bd δ 、PET-Ed δ のethylene groupの ^{13}C NT₁、 ^2H T₁の温度依存性をFig.1に示す。Fig.2はphenyl ringに対する同様の結果である。ethylene groupではいずれの試料も観測温度範囲内で極小値を取る。しかし、phenyl ringについては極小はより低温にシフトしていることがわかる。これはphenyl ringのほうがethylene groupより高速の運動を行っていることを示唆している。ethylene groupの T_1 極小の値は単一相関時間分布から予測される値よりも大きい。従って、ここでは便宜的にCole-Cole分布により相関時間 τ_c の分布を考慮した等方運動モデルにより解析した。得られた結果をTable Iに示す。ここで、 γ は τ_c の分布のparameterで0~1の値を持ち $\gamma=1$ で単一分布である。また、 ΔE は τ_c にArrhenius型を仮定した場合の活性化エネルギー(kcal/mol)である。 ^2H 、 ^{13}C から得られた結果はほぼ似た値であった。Fig.1の実線は計算カーブであり、実測結果を良く説明している。303Kで τ_c は2~5nsであり、主鎖は高速のセグメント運動を行っていることが分かる。一方、Table Iにはphenyl ringについての同様な解析結果も示してある。 τ_c は303Kで0.2ns程度でethylene groupより一桁短くその分布幅も狭い。また、 ΔE も小さい。これらの結果は見かけ上phenyl ringがより高速のセグメント運動を行っていることを示すが、そのかさ高くrigidな構造から考え難い。そこでphenyl ringについては、等方的なセグメ

キーワード: Poly(ethyleneterephthalate) / 重水素化 / 核磁気緩和 / セグメント運動 /
flip-flop 運動 /

つつみ あきひろ、みやがわ やすし、ひらおき としふみ、さかいの よしき

ント運動に加え、主鎖に沿った軸周りの 180° flip-flop 運動を想定した。その結果を Table II に示す。等方運動については γ 、 ΔE 、 τ_c 共に ethylene group と同様の結果が得られた。また、flip-flop の jump rate は 303K で 10^9 /s となり内部運動はかなり高速であることが分かった。

以上、 ^2H 、 ^{13}C NMR 緩和より PET の溶液中におけるダイナミクスについて詳細な情報を得た。更に、他の運動モデルについて検討、比較した結果についても報告する。

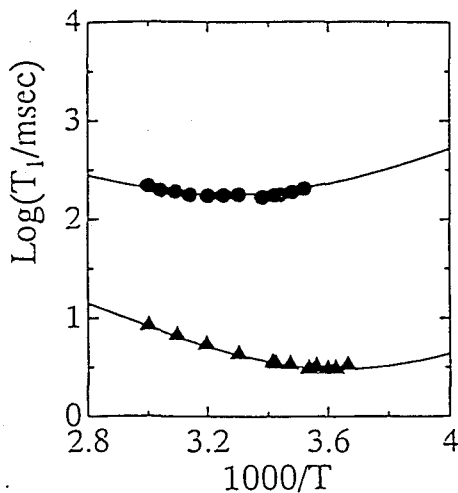


Fig.1 Temperature dependence of the spin-lattice relaxation time T_1 for ethylene group.

● : T_1 of ^{13}C for PET-Bd
▲ : T_1 of ^2H for PET-Ed

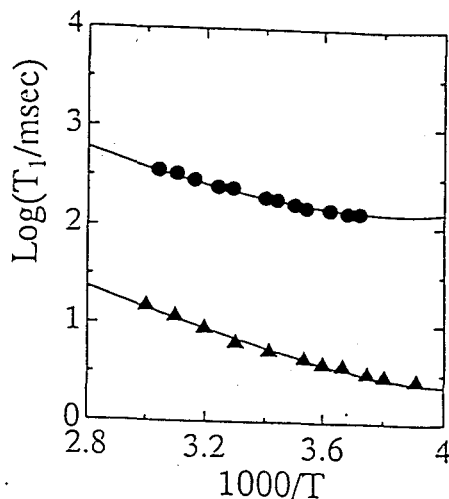


Fig.2 Temperature dependence of the spin-lattice relaxation time T_1 for phenyl group.

● : T_1 of ^{13}C for PET-Ed
▲ : T_1 of ^2H for PET-Bd

Table I. Values of parameters used to calculate ^2H and ^{13}C NMR relaxation for deuterated PET

	Ethylene group			Phenyl ring		
	γ	$\Delta E(\text{kcal/mol})$	$\tau_c(\text{nsec})^a$	γ	$\Delta E(\text{kcal/mol})$	$\tau_c(\text{nsec})^a$
^2H	0.66	9.4	4.9	0.78	6.5	0.18
^{13}C	0.60	9.7	1.8	0.74	6.6	0.21

a. at 303 K

Table II. Values of parameters used to calculate ^2H and ^{13}C NMR relaxation for phenyl ring undergoing 180° flip-flop motion.

	γ	$\Delta E(\text{kcal/mol})^b$	$\tau_c(\text{nsec})^a$	$W(10^9/\text{s})^c$	$\Delta E(\text{kcal/mol})^d$
^2H	0.60	9.0	3.7	1.14	5.5
^{13}C	0.66	9.4	4.9	1.73	5.3

a. at 303 K, b. activation energy for segmental motion, c. flip-flop jump rate, d. activation energy for flip-flop motion

(北大工) °堤耀広・平沖敏文,(北大院地環研)土居信英,
(北大院理)新田勝利,(秋田高専)大野進通

Molecular Motion of Alternating Copolymers of Maleic Acid and
Perdeuteriostyrene in Aqueous Salt Solution by $^2\text{H-NMR}$ Relaxation

(Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060) A.Tsutsumi, T.Hiraoki (Division of Bioscience, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Sapporo 060) N.Doii (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo 060) K.Nitta (Akita National College of Technology, Akita 011) N.Ohno

Dependence of the spin-lattice and spin-spin relaxation times T_1 and T_2 , respectively, on salt concentration, degree of ionization and temperature was measured for an alternating copolymers of maleic acid and perdeuteriostyrene in aqueous solution using $^2\text{H-NMR}$. T_1 and T_2 changed owing to the pH-induced conformational transition. The mode and the rate of internal motion of the backbone segment and the phenyl side chain were obtained from the analysis in terms of several models describing the motions of $\text{C-}^2\text{H}$ vector. The internal motion of the backbone segment was subjected to spatial restriction in compact form, while the rotation of the phenyl ring was not restricted.

マレイン酸-スチレン交互共重合体 (MA-St) はタンパク質のコイル-グロビュール転移への分子内疎水相互作用の寄与を検討するためのモデルとして研究されている。これまで、①第一カルボキシル基の低解離度 (α) で compact form にあり、 $\alpha=0.4\sim 0.5$ を境に expanded coil form へ転移を起こす。② compact form はフェニル基間の分子内疎水相互作用によって安定化されており、分子内にいわばフェニル基の疎水ドメインを形成している。③ compact form はグロビュールタンパク質ほどコンパクトではない、などが明らかにされている。^{1, 2)} このような高分子電解質のコホメーション転移がその内部運動に与える影響を調べるために重水素化 (MA-St) を用い $^2\text{H-NMR}$ 緩和測定により分子運動解析を行った。

マレイン酸-重水素化スチレン-d₈ (MA-DSt) 共重合体は Ohno 等¹⁾ の方法で調整された。溶媒の水には、 ^2H スペクトルへの H_2O の影響を取り除くため市販の水 (Deuterium-Depleted Water, <0.5 ppm D, ISOTEC Inc.) を用いた。試料濃度は約 55 mM である。 ^2H のスピン-格子緩和時間 T_1 、スピン-スピン緩和時間 T_2 測定は、JEOL FX-270 (共鳴周波数 41.36 MHz)、Bruker AM-500 (共鳴周波数 76.75 MHz) によって行われた。緩和時間の NaCl 濃度 I 、解離度 α および温度依存性は、それぞれ、 $I=0.05\sim 0.5\text{M}$ 、 $\alpha=0\sim 1$ および $T=30\sim 70^\circ\text{C}$ の範囲で測定された。

T_1 は解離度 α の増加と共に緩やかに増加するが、転移の起こる $\alpha\sim 0.4$ を境に低解離度側で主鎖 (methylene, methine) のほうが側鎖 (phenyl 基) より短くなっている。この違いは低解離度における主鎖と側鎖の運動性の違いを示唆している。この傾向は全ての塩濃度において見られた。 T_1 および T_2 の温度依存性を Fig. 1 に示す。緩和時間は温度上昇と共に大きくなることから、extreme narrowing

キーワード：マレイン酸-スチレン交互共重合体 / コイル-グロビュール転移 / 重水素 NMR / 核磁気緩和 / 内部運動 /

つつみ あきひろ、ひらおき としひみ、どい のぶひで、にった かつとし、おおの のぶみち

side にあることがわかる。しかし、高温で T_1 に周波数依存性が見られ、また、同一周波数の T_1 、 T_2 が異なることから単一相関時間モデル、等方的な相関時間分布では説明できない。このためModel Free Approach、多重内部回転モデルによる解析を行った。ここではModel Free Approachによる解析結果を示す。Fig.1で実線および点線はこのモデルによるfittingの一例である。得られたparameter値をTable Iにまとめた。 τ_0 は等方運動の相関時間、 τ_{em} 、 S_m および τ_{ep} 、 S_p は主鎖(methine, methylene)および側鎖(phenyl)に対する有効(internal)相関時間、オーダーパラメータである。有効相関時間の解離度依存性をみると、コンホメーション転移の影響は殆どない。しかし、低解離度で主鎖のオーダーパラメータ S_m が大きくなっていて、内部運動の空間的な束縛が示唆される。それに対し、フェニル基の S_p に変化はなくそのような束縛は全く見られない。このことは疎水ドメイン内部でフェニル環はお互いの回転を束縛するほどには密集していないことを示唆している。

以上、マレイン酸-重水素化スチレン共重合体は、Compact Formにおいて、主として、主鎖の内部運動が空間的に束縛されることがわかった。同様な結果はより具体的な多重内部回転モデルによる解析からも得られたので詳細を報告する。

- 1) N.Ohno, K.Nitta, S.Makino et al.,
J. Polym. Sci., Polym. Phys. 11,
413 (1973)
- 2) T.Okuda, N.Ohno, K.Nitta et al.,
ibid. 15, 749 (1977)

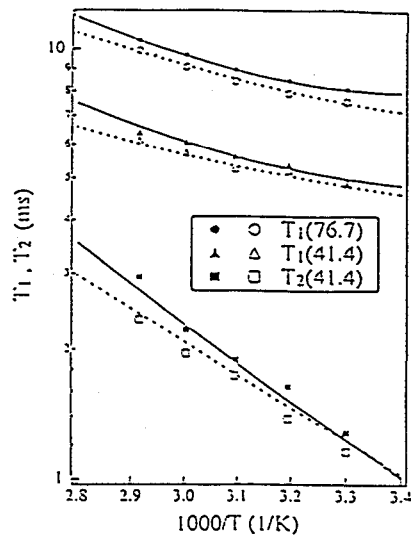


Fig.1 Temperature dependence of T_1 and T_2 at $\alpha=1.0$ and $l=0.5M$. Open and closed markers are experimental data of phenyl group and the backbone segment, respectively. Solid and dotted curves indicate the results for the backbone and phenyl group calculated by the model free approach, respectively.

Table I. Parameters for Model Free Approach at 30 °C and $l=0.5M$

α	τ_0 /ns	S_m	τ_{em} /ns	S_p	τ_{ep} /ns
0.0	8.2	0.70	0.41	0.58	0.33
0.2	8.9	0.73	0.51	0.59	0.36
0.5	10.0	0.65	0.47	0.58	0.39
0.8	10.0	0.63	0.46	0.58	0.38

1P37

Y247系における核四重極共鳴と透過型電顕による ミクロな構造観察

(京大院理¹、東工大応用セラミックス研²) ○吉村一良¹、加藤将樹¹、加藤治一¹、
大村朋彦¹、中西 真¹、宮野敏男¹、垣花真人²、小菅皓二¹

Microscopic Characterization of $Y_2Ba_4Cu_7O_{15-\delta}$

- NQR and TEM Investigation -

K. Yoshimura¹, M. Kato¹, H. Kato¹, T. Ohmura¹, M. Nakanishi¹, T. Miyano¹, M. Kakihana²
and K. Kosuge¹

Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University¹

Research Laboratory of Engineering Materials, Tokyo Institute of Technology²

Microscopic structure of $Y_2Ba_4Cu_7O_{15-\delta}$ was observed by using NQR and TEM techniques. Disordered intergrowth structures consisting of stacking faults along the c-axis have been observed more frequently for the sample with T_c of 93K (the sample B) than for that with T_c of 65K (the sample A). These stacking faults result in the micro block of Y123 or Y124 of about 5 unit cell. As a result of NQR experiments, the microscopic environment of Cu(2) site in the sample A was found to differ from either of those in the Y123 and Y124 compounds. For the sample B, however, the spectra of Cu(2) site can be analyzed to be the combination of those of Y123 and Y124, which suggests the presence of thin block of Y123 and Y124. Hence, the superconductivity of Y247 with higher T_c can be attributed to the existence of Y123 thin block in the sample.

$Y_2Ba_4Cu_7O_{15-\delta}$ (Y247) 相は、 $YBa_2Cu_3O_{7-\delta}$ (Y123) 相と、 $YBa_2Cu_4O_8$ (Y124) 相が、c 軸方向に交互に積層した構造を持つ酸化物高温超伝導体である。しかしながら、その超伝導転移温度 (T_c) には、これまで90Kおよび60Kの2種類の報告があり、研究者間で一致を見ていない¹⁻³。この T_c の違いは微視的な結晶構造または電子状態の違いにあると考えられる。そこで本研究では、この2種類の T_c をもつY247化合物を合成し、電子顕微鏡 (TEM) 観察および核磁気共鳴 (NQR) を用いて、微視的な結晶構造または電子状態を詳細に検討を行った。

試料合成は通常の固相反応法 (試料A)、および錯体重合法 (試料B) の2種類を用いた。試料の評価を粉末X線、酸素量測定をクーロメトリー法によって行った。両試料ともY247単相で、酸素量もほぼ同じ ($\delta \sim 0$) であった。まず、交流帯磁率によって T_c と超伝導体積分率を測定した結果を図1に示す。試料A、Bの T_c はそれぞれ65K、93Kであることがわかる。次に図2に2つの試料の電子線回折パターンを示す。試料Bがストリークを引いているのに比べると試料Aのパターンは非常にシャープであることがわかる。図3はこれに対応したTEM写真である。試料Aの方はところどころ格子像にディスロケーションが見られるものの、Y247の周期を保っている。それに対し、試料Bの方は数ユニットセル程度のY123、Y124の領域が存在している。図4にこれらの試料について、1.3Kで行った

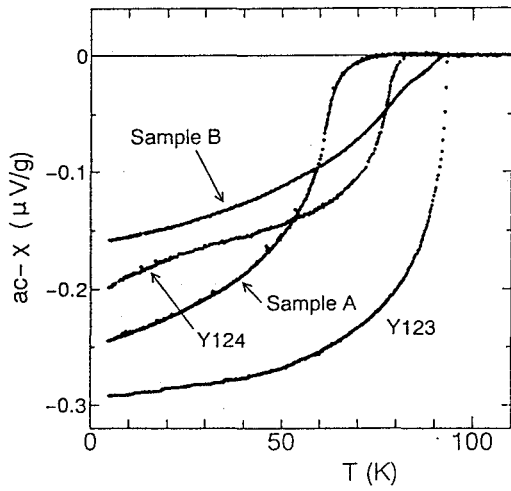
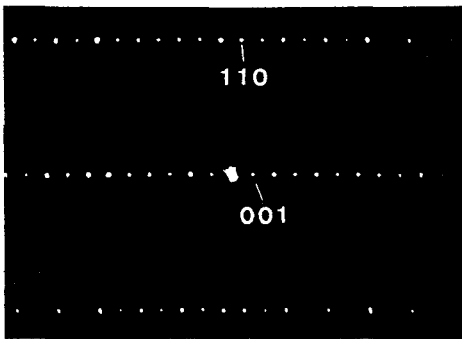
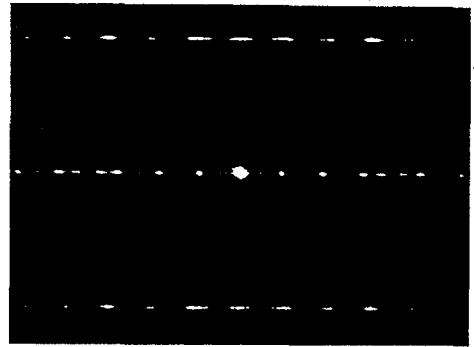


図1 Y247、Y123およびY124相の交流帯磁率

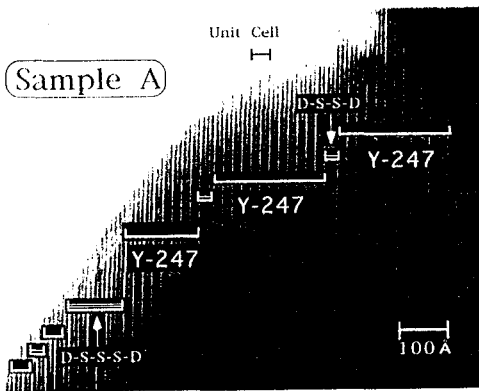


(a) 試料A

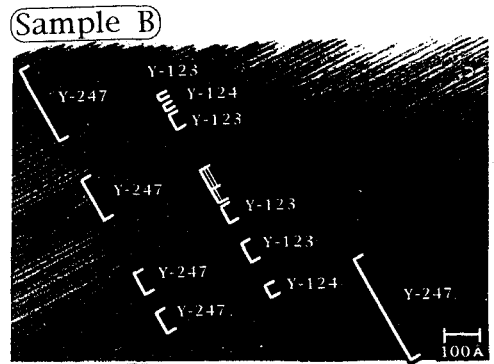


(b) 試料B

図2 Y247相の電子線回折パターン



(a) 試料A



(b) 試料B

図3 Y247相のTEM写真

Cu核のNQRスペクトルを示す。Cuには自然比が約2 : 1で同位体 ^{63}Cu および ^{65}Cu が存在し、核スピンはいずれも $I=3/2$ である。したがって、一つの結晶学的サイトに対し、強度比約2 : 1の2つのピーク ($\pm 3/2 \leftrightarrow \pm 1/2$) が観測される。以下、超伝導発現するとされている CuO_2 層のCuをCu(2)サイトと呼ぶことにする。まず、試料AのCu(2)サイトのピークは、Y123、Y124等と比べてブロードになっている。これは、理想的なY247相では、Cu(2)サイトが、結晶学的に2サイトあり、それらがほぼ同一の ν_Q を持つためであると考えられる。一方、試料BのCu(2)サイトは、Y123およびY124のCu(2)サイトの足し合せのスペクトルになっている。このNQRの結果とTEMの結果から、試料Bには、数ユニットセル程度のY123、Y124のマイクロドメインが成長していると考えられる。酸化物高温超伝導体のコヒーレンス長が、数Aと結晶の単位格子と同程度またはそれ以下であることを考えあわせると、試料Bの高い T_c はY123相 (T_c 約93K) のマイクロドメインに原因があると考えられる。また、Y123相の T_c よりも高い T_c をもつY247相も報告されているが、おそらくミクロな不規則構造によるケミカルプレッシャーにより、微視的な領域で高い T_c が実現されていると考えられる。

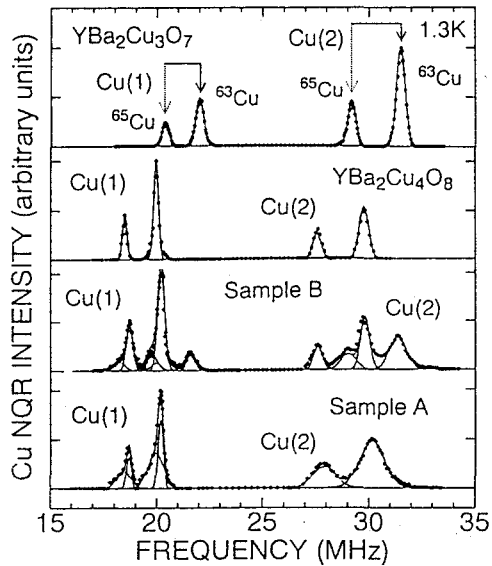


図4 Y247、Y123およびY124相のNQRスペクトル

References

- [1] Karpinski, J., Rusiecki, S., Buckner, B., Koldis, E. and Jilek, E., Physica C161(1989) 618.
- [2] Tallon, J. L., Pooke, D. M., Buckley, R. G., Presland, M. R. and Blant, F. J., Phys. Rev. B 41(1990) 7220.
- [3] Triscon, G., Genoud, J-Y., Graf, T., Junod, A. and Müller, J., Physica C201(1992) 1.

NMR Study on Dynamics of Water Molecule Absorbed
in Some Synthesized Smectites

Shin'ichi Ishimaru and Ryuichi Ikeda

Department of Chemistry, University of Tsukuba

^2H solid state NMR spectra were measured to study of the dynamics of the water molecule absorbed in some synthesized clay minerals. The ^2H spectra of D_2O saturated Na-hectrite and Na-saponite showed similar temperature dependence and the activation energies of the isotropic motion of the water molecules were determined to be c.a. 9 kJ mol^{-1} for both compounds above 260 K. On the other hand, the spectra of Cs- and tetramethylammonium-saponites showed almost no temperature dependence above 300 K.

序)スメクタイトは層状構造をとる粘土鉱物の一種で、一枚の粘土層は シリカ四面体を基本単位とする表層部とアルミナ(二八面体型スメクタイト)またはマグネシア(三八面体型スメクタイト)八面体を基本単位とする中心層からなる (fig.1)。各基本単位の中心元素 (Si,Al または Mg) はその一部が低原子価金属イオンに置き換わることにより粘土層全体が負電荷を帯び、層間に交換性の陽イオンを持つ。この層間にはまた様々な物質が吸収されることが知られている。本研究では中心層がマグネシアからなる三八面体型スメクタイトのうち、中心層の Mg が一部 Li に置換されたヘクトライト、表層の Si が Al に置換されたサポナイト、及びサポナイトの層間陽イオンを種々の陽イオンで置換したものについてその基本的な物性を明らかにすることを目的とし、層間に吸収された水分子の挙動を NMR を用いて調べた。

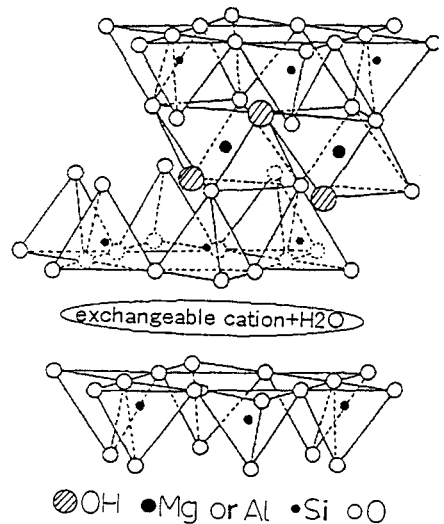


Fig. 1 The structure of smectites¹⁾.

clay minerals, saponite, hectrite, intercalated compounds

いしまる しんいち・いけだ りゅういち

試料) ヘクトライトはコープケミカル社製合成スメクタイト (ルーセントライト $\text{Na}_{0.33}(\text{Mg}_{2.67}\text{Li}_{0.33})\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)、サポナイトはクニミネ工業社製合成サポナイト (日本粘土学会参考粘土 JCSS-3501 $\text{Na}_{0.28}\text{Mg}_3(\text{Si}_{3.72}\text{Al}_{0.28})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)を用いた。サポナイトについては陽イオンである Na^+ をイオン交換法により同じ一価の陽イオンである Cs^+ 及びテトラメチルアンモニウム (TMA^+) に置換した試料を作製した。各試料は真空中で乾燥し、層間に吸収されている水を取り除いた後、重水の飽和蒸気圧下に放置することで重水を再吸収させた。各試料の重水含量は重量法によって決定した (table1)。

(結果及び考察) Na-ヘクトライトと Na-サポナイトの ^2H NMR スペクトルはよく似た挙動を示しており、約 200 K 以下で水分子の運動が見られなくなった。一方、260 K 以上の高温域ではいずれのスペクトルも構造を示さず、温度の上昇とともに線幅が狭くなっていく (fig. 2a,b) ことから水分子は遅い等方運動をしていると予想される。この温度範囲で吸収曲線の半値幅の温度変化から求めた運動の活性化エネルギーはいずれも約 9kJ mol^{-1} となった。これに対し、Cs 及び TMA-サポナイトではスペクトルに構造の見られなくなる 300 K 以上でその線幅の温度依存性は殆ど見られなかった (fig. 2c,d)。Cs⁺ (イオン半径 $r_1=180\text{pm}$) 及び TMA⁺ ($r_1=280\text{pm}$) はいずれも Na^+ ($r_1=116\text{pm}$) に比べて大きく、層間が広いことがこのスペクトルの温度依存性の相違を引き起こしているものと推定される。

Table 1 D₂O contents of D₂O saturated smectites.

Substance	D ₂ O contents / cation
Na-hectrite	14.9
Na-saponite	15.8
Cs-saponite	26.0
TMA-saponite	14.0

Reference

1) R. E. Grim, "Clay Mineralogy", McGraw-Hill, New York (1953), p.56.

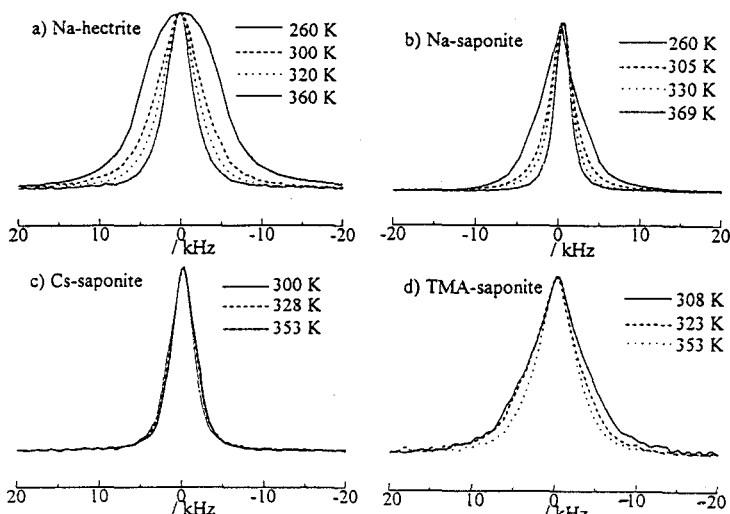


Fig. 2 Temperature dependence of ^2H NMR spectrum of D₂O saturated smectites above 260 K.

1P39

2次元層状ペロブスカイト強磁性体 $[R-NH_3]_2CuCl_4$ におけるスピンドイナミクスの固体NMRによる研究

(物質研) ○上田 貴洋、林 繁信

Solid State NMR study of Spin dynamics in 2-dimensional
layered Perovskite Ferromagnet $[R-NH_3]_2CuCl_4$

Takahiro Ueda, Shigenobu Hayashi

National Institute of Materials and Chemical Research

The frequency dependence of 1H spin-lattice relaxation times (T_1) was measured to investigate spin dynamics in 2-dimensional layered perovskite ferromagnet $[R-NH_3]_2CuCl_4$ ($R = C_6H_5, p\text{-Nitro-C}_6H_5, C_6H_5CH_2CH_2$). At the frequency region between 30 and 400 MHz, the T_1^{-1} for each compound was proportional to logarithm of the field ($\ln H_0$). This behavior on the T_1^{-1} suggested that the fluctuation of the electron spins localized on Cu(II) was described by 2-dimensional diffusion. The diffusion coefficient, which reflects exchange interaction, was evaluated from the slope of T_1^{-1} vs. $\ln H_0$ plot for each compound.

$[R-NH_3]_2CuCl_4$ は、 $CuCl_4^{2-}$ からなる無機層と有機アンモニウムイオン ($R-NH_3^+$) からなる有機層が交互に積層した層状ペロブスカイト型構造をとる (図1)。この物質ではCu(II)イオン上に存在する電子スピが無機層内において強磁性的な相互作用をしており、極低温 (< 10 K) において強磁性体へと転移することが知られている。このような低次元構造を有する系ではスピ間に働く相互作用やスピンドイナミクスにその次元性が反映され、磁性発現において重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、有機層にアニリニウムイオン ($R=C_6H_5$) (1)、p-ニトロアニリニウムイオン ($R=N_2O-C_6H_5$) (2)、およびフェネチルアンモニウムイオン ($R=C_6H_5-CH_2CH_2$) (3) を有する3種類の $[R-NH_3]_2CuCl_4$ について、電子スピ間に働く相互作用の次元性とスピンドイナミクスに関する情報を得るために、 1H スピン-格子緩和時間 (T_1) の周波数依存性を測定した。

キーワード：層状ペロブスカイト、強磁性体、スピン拡散、次元性、 $^1H T_1$

うえだ たかひろ、はやし しげのぶ

3種類の $[R-NH_3]_2CuCl_4$ 結晶(1, 2, 3)は、加熱した $CuCl_2$ の濃塩酸溶液にそれぞれのアンモニウム塩酸塩を加え、生じた結晶を加熱・溶解した後、室温にて放冷することにより得た。 1H T_1 はBruker社製MSL-400およびCXP-100分光器により、共鳴周波数12 MHz ~ 400 MHzの間で粉末試料に対し室温で測定した。

図2は、それぞれの試料に対して得られた 1H T_1 の逆数を周波数(磁場)の対数に対してプロットしたものである。いずれの化合物においても高磁場領域(30 ~ 400 MHz)で $T_1^{-1} \propto \ln H_0$ の関係が成立している。これから 1H の緩和を担うCu(II)上の電子スピンの揺らぎ(厳密には電子スピン間の相関関数 $\langle S_i(t)S_j(0) \rangle$)が2次元的な拡散挙動を示すことがわかる。すなわち、これらの物質が持つ2次元層状構造がスピン間の相互作用に顕著に反映していることを示している。この傾きから、スピン拡散の拡散定数を見積もることができた。詳細は当日述べるが、いずれの化合物においても $10^{-7} \sim 10^{-8} m^2s^{-1}$ 程度のオーダーであることがわかった。

さらに、図2の T_1^{-1} vs. $\ln H_0$ のプロットは低周波数領域(<30 MHz)においてギャップを生じ、 $T_1^{-1} \propto \ln H_0$ の関係からずれてくる。これは、高周波数領域においてその寄与が無視できていた、無機層間の双極子-双極子あるいはスピン交換相互作用が、観測周波数の低下とともに無視できなくなったことを示している。ギャップを生じる周波数 $\nu_{cut-off}$ は化合物1に対して~48 MHz、化合物2に対して~32 MHz、化合物3に対して~40 MHzであった。これらの物質の層間距離は1 < 2 < 3の順に大きくなが、 $\nu_{cut-off}$ との間には相関が見られない。すなわち、スピン間距離の関数では表わせないことから、現在のところ無機層間の弱いスピン交換相互作用がこのギャップの原因と考えている。

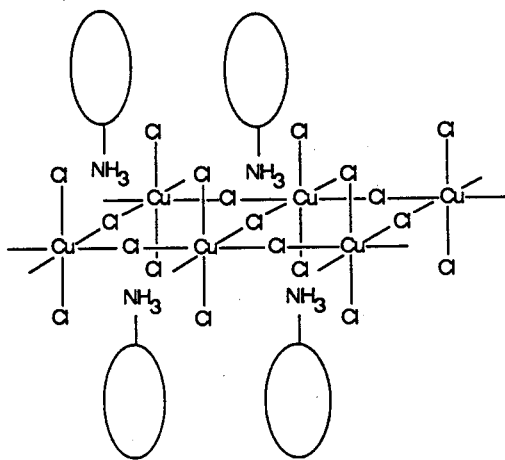


Fig. 1 Schematic representation of 2D perovskite compound.

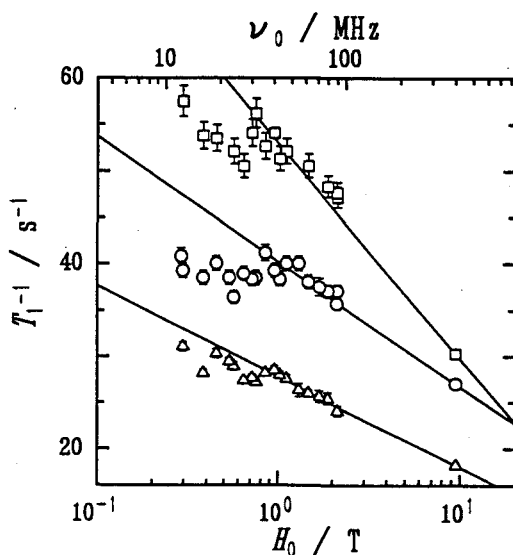


Fig. 2 T_1^{-1} vs. $\ln H_0$ plot of compound 1 (O), compound 2 (□) and compound 3 (Δ).

1P40

NMRによる高分子電解質の研究(1)

架橋したポリエチレンオキシドにLiBF₄をドーブした系

(物質研、ユアサコーポレーション中研*) ○早水紀久子、柳沢 勝、
相原雄一*、落合誠二郎*

NMR Studies on Polymer Electrolytes

(1) Cross-linked polyethylene oxides doped by LiBF₄

K. Hayamizu and M. Yanagisawa, National Institute of Materials and Chemical Research
and

Y. Aihara and S. Ochiai, Central Laboratory, Yuasa Corporation

Polymer electrolytes doped by lithium salts are expected to be used for safe and light lithium second batteries. In this study two cross-linked polyethylene oxides doped by LiBF₄ were prepared to study the mechanism and structures of the electrolytes. ¹³C, ¹H, ¹⁹F, and ⁷Li NMR spectra and T₁ were measured from ambient temperature to 110°C and the structures of the polymers and the ions, and the molecular motions are discussed together with the temperature dependence of the electron conductivity.

ポリエチレンオキシド(PEO)の様な柔軟なポリマーにアルカリ塩をドーブすると、大きな電気伝導性をもつ電解質が形成されることが1975年に初めて報告され、その後NMRの研究が数多くの報告されている。電気伝導性が大きいことから、各種の電池への応用が提案され、リチウム塩をドーブして、リチウム二次電池(充放電可能な電池)の電解質として用いることが試みられている。本研究では、ポリマー電解質のリチウムイオンとカウンターイオンである陰イオンの構造と運動の機構を明らかにするために、研究例の多いポリエチレンオキシドを修飾して架橋ポリマーを合成し、これにLiBF₄をドーブした系の¹H、¹³C、¹⁹F、⁷Li-NMRの測定を行った。

実験 分子量 4,000 のPEO(CH₂CH₂Oのユニットとして平均約90個)と分子量 11,000 のPEO(ユニット数約250個)を原料として末端を修飾したPEOを合成した。この有機溶液あるいはLiBF₄をドーブした溶液をキャスト、真空乾燥した後に、架橋構造のあるポリマーあるいはポリマー電解質を作成した。分子量 4,000 と11,000のPEOから合成した架橋ポリマーを各々SPE4とSPE11と呼ぶことにする。ポリマー電解質でのリチウムイオンの濃度はLiとエチレンオキシドの比が1:30になるように調製した。ドライボックス中で乾燥空気流でキャスト膜をNMR測定用サンプル管に溶封した。

NMRの測定は 4.7T または 9.4T の磁場中で、¹H NMR、¹³C NMR、¹⁹F NMRと⁷Li NMRの測定を行った。いずれの核種の共鳴線の線幅とも狭いので、液体モードで測定した。測定温度範囲は室温から110°Cまでの範囲である。

固体電解質、⁷Li NMR、¹⁹F NMR、¹H NMR、¹³C NMR

はやみずきくこ、やなぎさわまさる、あいはらゆういち、おちあいせいじろう

結果 DSCの測定によって、架橋ポリマーとその電解質は40℃と60℃の間で融解することが確かめられている。NMRスペクトルの線幅を測定すると本研究で観測した ^{13}C NMR、 ^1H NMR、 ^{19}F NMR、及び ^7Li NMRのすべてにおいて、融解に伴う線幅のnarrowingが観測されている。融解点以下では温度上昇に伴って徐々に線幅が狭くなるが融解点を過ぎるとその値は一定になり、今回の測定範囲では変化しなかった。融解点以下ではスペクトルはわずかに微細構造をもつブロードなsingletである。しかしながら、融解点以上の温度では、スペクトルは特徴あるパターンへと変化する。90℃の時に9.4Tの磁場で測定したSPE4とSPE11の ^{13}C NMRと ^1H NMRのスペクトルをFig. 1に示す。60℃から110℃の温度領域でほぼ同じスペクトルパターンが観測されている。

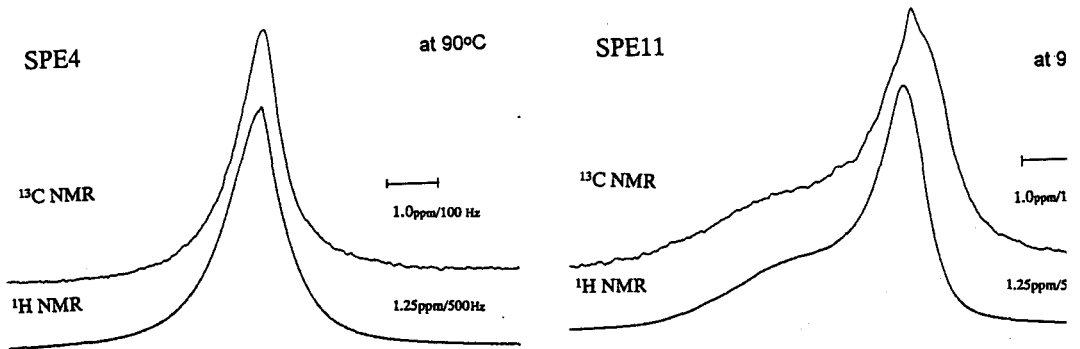


Fig. 1 ^{13}C and ^1H spectra of SPE4 and SPE11 measured at 90°C in the field strength of 9.4T

またSPE4とSPE11に LiBF_4 をドーブした電解質の ^{13}C 、 ^1H 、 ^7Li 、 ^{19}F -NMRスペクトルパターンをFig. 2に示す。

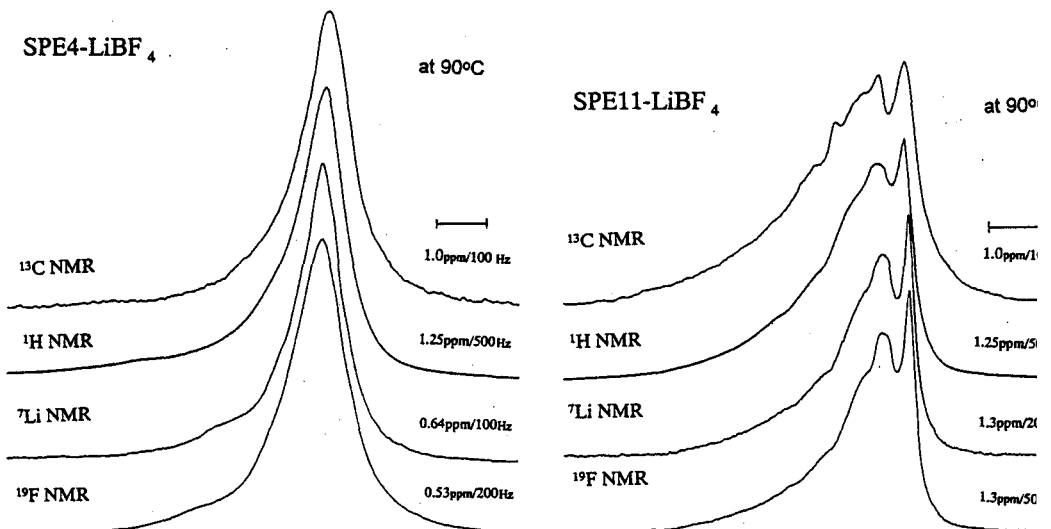


Fig. 2 ^{13}C , ^1H , ^7Li , and ^{19}F NMR spectra of the electrolytes of SPE4 and SPE11 measured at 90°C in the field of 9.4T.

磁場強度 4.7T で測定したスペクトルとの比較から、 ^{13}C NMRと ^7Li NMRの線幅はppm単位では磁

場依存性がないので、線幅は化学シフトの不均一性によって決まることが分かっている。また同様な測定から ^1H NMRと ^{19}F NMRでは双極子—双極子相互作用の寄与があることが分かっているが、スペクトルパターンを決める主な要因は化学シフトのバラツキによるといえる。Fig. 1に示されているように、架橋ポリマーの ^{13}C NMRパターンと ^1H NMRパターンが極めてよく類似していることから、炭素骨格構造とプロトン構造は1:1に対応しているといえる。また LiBF_4 をドープした系でも、Fig. 2から明らかなように、異なった核種のスペクトルパターンが驚くほど類似している。この現象は同時に測定した異なった電解質サンプルでも観測されているので、本研究で取り上げた系の一般的な特徴である。 ^7Li と ^{19}F NMR スペクトルパターンを含めて全てが類似していることは、リチウムイオン、カウンターイオンである BF_4^- の両方がポリマーの中に入り込み、構造的に満遍なく 原子数比(炭素原子/リチウム原子=15)に対応して存在することがわかる。

Fig. 1とFig. 2から分かるように、架橋ポリマー及びポリマー電解質は均一な系ではなく、多成分系である。それにかかわらず、 T_1 値を測定すると、全ての核種、全てのサンプル、また全測定温度で緩和曲線は一成分系であった。ところが、 90°C におけるスペクトルパターンは測定核種によらず、非常に類似しているにもかかわらず、 T_1 の温度依存性の挙動は核種により異なる。ポリマー電解質の ^7Li NMRの T_1 の温度変化をFig. 3に示す。

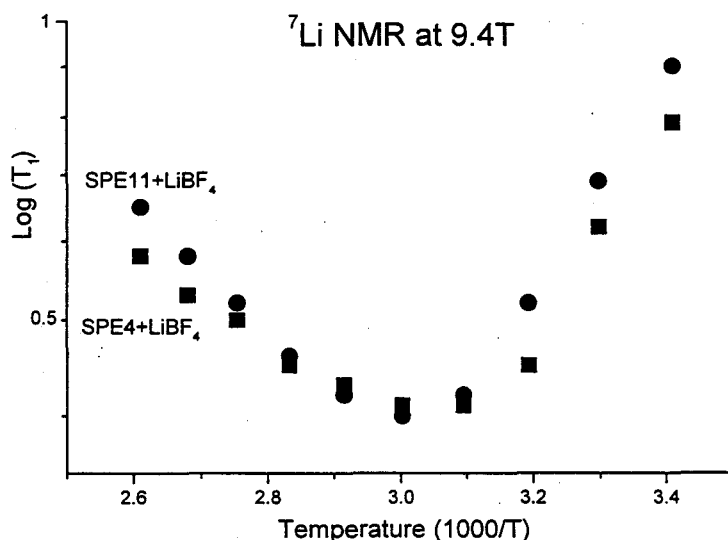


Fig. 3 Temperature dependence of T_1 of ^7Li NMR for the electrolytes of SPE4 and SPE11.

^7Li NMR の T_1 の温度依存性をみると、架橋密度が異なる2種類のポリマー電解質の極小値はともに 60°C 付近でDSCで測定した融解点より高温部である。全温度領域でSPE11電解質の方が T_1 値は長く、Table 1に示した活性化エネルギーも大きい。イオン伝導度のデータでは 60°C 付近でSPE4とSPE11の測定値の大きさに逆転がみられ、低温部ではSPE4電解質の方がSPE11電解質より大きい値をもつ。この現象は ^7Li の T_1 の傾向と一致し、極小値のより高温側では T_1 が長い方(SPE11)が相関時間は短く、逆に低温側では T_1 が長い方(SPE11)が相関時間は長くなる。イオン伝導度は ^7Li NMRの相関時間が短い方が大きくなっている。これはリチウムイオンがイオン伝導

性を担っているという仮定を支持するものである。

Table 1. Activation Energies (KJ/mole)

	^{13}C NMR	^1H NMR	^7Li NMR	
SPE4	15	18		
SPE11	(20-110°C)	(60-110°C)		
SPE4 Electrolyte	15	13	20 (20-40°C)	7.5 (60-110°C)
SPE11 Electrolyte	(40-110°C)	(60-110°C)	21 (20-40°C)	10 (50-110°C)

^{19}F NMRの T_1 はSPE4とSPE11の電解質でともに、20°Cから110°Cの温度範囲で約 0.5s から約 0.7sの間の値を持ち、僅かに上に凸の形のグラフになる。他の核種における T_1 の温度依存性とは全く異なり、温度による運動の活性化という現象では説明がつかない。従来から高分子電解質の中で電子伝導性を担うのはフッ素を含む陰イオンであると言われているが、イオン伝導性は温度変化しているので、単純な相関づけは難しい。 BF_4^- が単独で存在するのか、イオン対を構成しているのか等の考察が必要であろう。

^{13}C NMRの T_1 はmsのオーダーで、SPE4とSPE11では温度上昇に伴って T_1 値は単調に長くなり、融解点での変曲点などは観測できなかつた。いわゆる“Extreme narrowing condition”を満たしている。 ^{13}C NMRの場合には、緩和は主として直接接続しているプロトンの緩和によると仮定できるので、構造的には CH_2 炭素の緩和と見なされる。リチウム塩のドーブ効果をみると、添加により T_1 値は短くなり、30°C付近で極小値をとる。炭素骨格の運動性は非ドーブのポリマーとは異なり、運動性は減じる。これは架橋したことによってできる空隙にリチウムイオンあるいは陰イオンが入り込み、溶融した状態では構造の安定化をもたらしているのではなかろうか。50°C以上の直線部分のアレニウスプロットは非ドーブのSPE 4とSPE 11とほぼ一致する。

^1H NMRの T_1 は熱履歴に敏感であり、融解前の T_1 の温度依存性は複雑である。しかしながら60°C以上の高温部では熱履歴を少なく、アレニウスプロットが可能である。SPE4とSPE11では活性化エネルギーは実験誤差以内で一致して18KJ/mole、リチウム塩をドーブすると13KJ/mole となる。塩ドーブの電解質SPEでは緩和機構に ^{19}F との双極子相互作用が有効であるので、 T_1 値は非ドーブのサンプルより短くなると同時に活性化エネルギーにも寄与しているのであろう。 ^{13}C NMRから求めた活性化エネルギーは塩のドーブ、非ドーブに関係なく15KJ/mole であつたので、塩のドーブ効果はプロトンの周辺に顕著に現れる。

本研究で用いたサンプルは熱履歴が存在する。ここで示したデータは十分熱平衡に達した状態で測定している。またDSC、NMRの線幅の測定から融解現象は存在するが、ポリマーの形状は変化しない。

まとめ

1. 架橋PEOは形状ではポリマー(固体)であるが、NMRからみると液体に近い運動性が存在する。
 LiBF_4 をドーブすると、構造は幾分か剛直になる。
2. イオン伝導性は従来いわれている陰イオンよりも、リチウムイオンの易動性によっている。

1P41

極低温(T=30K)¹⁵N-CP/MAS NMR

(分子研) 武田 定、桑原大介、緒方啓典、持田智行、宮島清一

Ultra-low temperature ¹⁵N-CP/MAS NMR

Sadamu Takeda, Daisuke Kuwahara, Hironori Ogata, Tomoyuki Mochida and Seiichi Miyajima

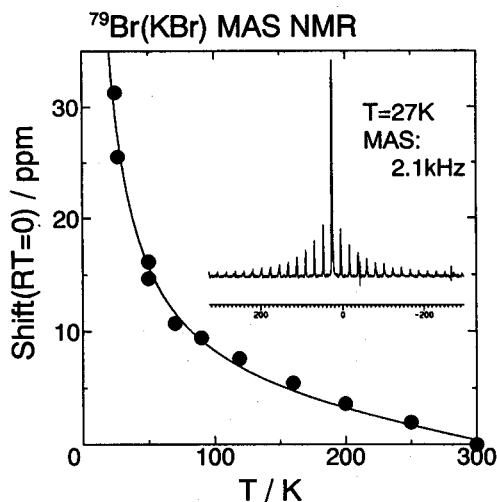
Institute for Molecular Science, Myodaiji, Okazaki 444, Japan

¹⁵N-CP/MAS NMR spectrum was measured down to 30 K for ¹⁵N-enriched (CH₃NH₃)₅Bi₂Cl₁₁ to investigate the relation between CH₃NH₃⁺ ions and phase transitions. Penguin probe (Doty) was used for the measurement and artificial shift probably due to the magnetic materials of the probe was estimated by use of ⁷⁹Br MAS NMR signal of KBr powder sample.

(CH₃NH₃)₅Bi₂Cl₁₁は温度を上げていくと310Kで強誘電、常誘電の相転移を示す。以前、非等価な三種類のCH₃NH₃⁺イオンのうちの一種類のCH₃NH₃⁺の¹⁵N化学シフトだけがこの相転移に対応した温度変化を示すことを報告したが、さらに140K近傍で他のCH₃NH₃⁺の¹⁵N化学シフトが異常な温度変化を示すことを見出した。これが昨年報告されたこの温度領域での相転移の可能性と関係するかどうかを確認するために、さらに低温での¹⁵N-CP/MAS NMRの測定を行った。ここでは¹⁵Nを25%エンリッチした試料について、Doty社のPenguin Probeを用いて測定した¹⁵N-CP/MAS NMRの結果について報告する。また、この極低温用Probeの注意点などについてもあわせて報告する。

図はPenguin Probeを用いて27Kで測定したKBr粉末試料の⁷⁹Br-MASスペクトルと見掛けのシフトの温度依存性を示す。マジック角回転数は2.1kHzで、測定にはBruker DSX400を用いた。また室温でのシフト値を0ppmとしている。他の試料についても、Penguin Probeを用いると、これと同様に極低温でシフト値が急激に低磁場シフトしていく。低温でのこのシフトは絶対温度の逆数に比例することから、プローブに使われている材質に若干の常磁性物質が含まれていると思われる。正しいシフト値を得るためにはこれを補正する必要がある。

(CH₃NH₃)₅Bi₂Cl₁₁について測定した¹⁵N-CP/MASスペクトルからは、310Kでの強誘電・常誘電相転移に関係したCH₃NH₃⁺イオンの信号がとくに100K以下で線幅が広がり、70Kではついにブロードアウトすることを見出した。精密な化学シフトの温度変化を議論するためには、上述の補正の仕方を確立する必要がある。



極低温CP/MAS NMR

たけだ さだむ、くわはら だいすけ、おがた ひろのり、もちだ ともゆき、みやじま せいいち

(北大・工) ○新居嗣朗、石井文明、堤耀広

Structural Phase Transition and ^{19}F Chemical Shift of Ferroelectric Polymer

○S.Nii, F.Ishii, Y.Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060.

To obtain more detailed information on a change of molecular chain structure in the ferroelectric phase transition for poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene), we measured ^{19}F NMR spectra of the uniaxially drawn film as a function of the alignment angle γ between the drawn direction of the film and the magnetic field by using a solid-state ^{19}F FTNMR technique and analyzed the angular dependence of the anisotropic chemical shifts ($^F\sigma_{\text{aniso}}$) of the ^{19}F spectra. The respective spectra at the angles consisted of two peaks. One peak in low magnetic field was assigned to CF_2 groups and the other in high magnetic field to CHF groups. From the theoretical analyses of $^F\sigma_{\text{aniso}}$ against γ for CF_2 group, it was confirmed that the molecular chain structure changes between trans conformation in the ferroelectric phase and the mixed one of trans and gauche in the paraelectric phase when the phase transition.

Vinylidene Fluoride (VDF) と Trifluoro Ethylene (TrFE) のランダム共重合体はキュリー温度 T_c を有する強誘電体高分子である。その強誘電的相転移の特徴は、相転移に伴って、強誘電相のトランス配位から常誘電相のトランス(T)とゴーシュ(G)の混合鎖に分子鎖形態が散漫的に変化することである¹⁾。この事に関するより詳しい知見を得るため、一軸延伸した $\text{P}(\text{VDF}_{73}/\text{TrFE}_{27})$ の ^{19}F NMR スペクトルを延伸方向 \mathbf{M} と磁場との交角 γ に対して測定し、スペクトルの異方性化学シフトの交角 γ 依存性と形態変化との関係を調べた。

試料は、VDF 73 mol% 共重合体； $\text{P}(\text{VDF}_{73}/\text{TrFE}_{27})$ をキャスト製膜し、室温で一軸延伸し、その後、真空中 135°C で 12 時間熱処理したものを用いた。延伸倍率は約 5 倍であった。分子鎖方向（結晶系 1° 軸）の配向度は Xray 測定より 0.99 で、 $\mathbf{M} // 1^\circ$ 軸である。 ^{19}F 固体 NMR 測定は Bruker ASL300 を使い、共鳴周波数は 282MHz 、 90° パルスは $4\mu\text{sec}$ 、交角 γ は $0^\circ \sim 90^\circ$ 、測定温度は $-170^\circ\text{C} \sim 130^\circ\text{C}$ であった。

Figure 1 は、C-F 結合方向にとった主軸 3 を $3 // 3^\circ$ と仮定したときの $\text{P}(\text{VDF}_{73}/\text{TrFE}_{27})$ フィルムの実験室系 ($\mathbf{M}, \mathbf{T}, \mathbf{N}$) と結晶軸系 ($1^\circ, 2^\circ, 3^\circ$) と主軸系 (1, 2, 3) と γ との関係である。ここで θ と ϕ はそれぞれ主軸 1 に対する外部磁場 \mathbf{H}_0 と延伸軸 \mathbf{M} との交角で、 ϕ は 3° とフィルム法線方向 \mathbf{N} との交角である。観測される一軸延伸フィルムの実験室系の化学シフトテンソル σ^{ob} は、 $\sigma^{\text{ob}} = A_0 + A_2 \cos 2\gamma$ (1) で簡単に表わされる。 A_0 と A_2 は結晶軸系の異方性化学シフト σ^{cr}_{ii}

キーワード：強誘電的相転移、 ^{19}F NMR スペクトル、異方性化学シフト、角度依存性、分子鎖形態

○にい しろう、いしい ふみあき、つつみ あきひろ

(ii=1,2,3) の関数で、更に σ_{ii}° は主軸系の化学シフト σ_{ii} (ii=1,2,3) と ϕ の単純な関数で表わされる。

測定温度域で測定されたスペクトルは、全て2つのピークからなり、それぞれ交角に依存した異方性化学シフトパターンを示した。これらの異方性パターンは強誘電相でブロードであるが、常誘電相になると非常にシャープに狭化した。このパターン変化は従来のキュリー温度域 $T_c(\uparrow) = 115^{\circ}\text{C}$, $T_c(\downarrow) = 80^{\circ}\text{C}$ で起こり、昇降温時に熱履歴を伴っていた。一般に、 ^{19}F 脂肪族化合物では、 ^{19}F 核の化学シフトは ^1H 核と異なり、 $-\text{CF}_3 < =\text{CF}_2 < =\text{CHF}$ の順に高磁場側に大きくシフトする²⁾。この事実から、低磁場側のピークを CF_2 基、高磁場側のピークを CHF 基と帰属した。実測 σ^{ob} は異方性パターンの一次モーメントから算出し、各温度における実測 σ^{ob} vs γ 曲線と(1)式との最適化から各温度の A_0 と A_2 の値を決定した。

CF_2 基の場合、 σ_{ii} の主値がTeflonでの $\sigma_{11} = -80\text{ppm}$, $\sigma_{22} = 10\text{ppm}$, $\sigma_{33} = 70\text{ppm}$ と同じとすると、 A_0 , A_2 の実測値から結晶系の主値 σ_{ii}° (ii=1,2,3), ϕ 及び異方性化学シフト $\Delta\sigma$ が求まる。Table I は、 -170°C , -70°C , $25^{\circ}\text{C}(\uparrow)$, $100^{\circ}\text{C}(\uparrow)$, $125^{\circ}\text{C}(\uparrow)$, $90^{\circ}\text{C}(\downarrow)$, $40^{\circ}\text{C}(\downarrow)$ における CF_2 基の $\Delta\sigma$ と ϕ の値である。 $25^{\circ}\text{C}(\uparrow)$ から $125^{\circ}\text{C}(\uparrow)$ への変化に伴って、 $\Delta\sigma$ の値は 88.21ppm から 16.55ppm へと減少し、 ϕ の値は 48.57° から 65.47° へと増加している。これらの変化は、常誘電相におけるVDF分子鎖形態が、強誘電相でのトランスから、ゴーシュとの統計混合鎖になったことに基因している、と考えられる。強誘電相での $25^{\circ}\text{C}(\uparrow)$ 以下の $\Delta\sigma$ の値は、Teflonの $\Delta\sigma = 118\text{ppm}$, 171ppm ^{3) 4)} と比較すると小さい。これは、 $\text{P}(\text{VDF}_{73}/\text{TrFE}_{27})$ が deflect トランス形態であることに基因している、と考えられる。

現在、四重極エコー法を用いて ^{19}F NMRスペクトルの再測定及び、 CF_2 , CHF に関する異方性化学シフトスペクトルのシミュレーション解析を行っており、その結果についても発表する予定である。

References. 1) K.Tashiro ; K.Takano ; M.Kobayashi ; Y.Chatani ; H.Tadokoro , *Ferroelectrics* , **57** , 297 (1984)

2) R.C.Ferguson , *J.Am.Chem.Soc.* , **82** , 2416 (1960)

3) A.J.Vega ; A.English , *Macromolecules* , **12** , 403 (1979)

4) C.W.Wilson,III , *J.Polym.Sci.* , **61** , 403 (1962)

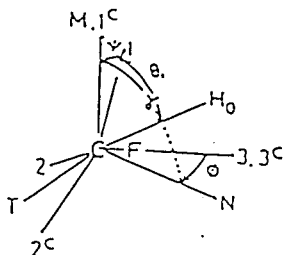


Figure 1. Co-ordinate systems for ^{19}F chemical shift. The directions M,T,N correspond to the experimental system axis, the directions 1,2,3 to the chemical shift principal axis system and the directions 1° , 2° , 3° to the crystal axis.

T (°C)	$\Delta\sigma$ (ppm)	ϕ (°)
-170	108.2	44.33
-70	104.1	45.2
25	88.21	48.57
100	40.38	59.29
125	16.55	65.47

Teflon: $\Delta\sigma = 118$ (ppm) (Vega)
 $\Delta\sigma = 171$ (ppm) (Wilson)

Table I. Calculated values of anisotropic chemical shifts ($\Delta\sigma$) and ϕ at each temperature.

1P43 P(VDF_x/TrFE_{1-x})の強誘電的相転移と¹H-¹³C核磁気交叉緩和[III]

(北大・工) ○石井文明, 大鋸敏雄, 堤耀広

Ferroelectric phase transition of P(VDF_x/TrFE_{1-x}) and ¹H-¹³C nuclear magnetic cross relaxation [III]

○Fumiaki ISHII, OOGA Tosio and Akihiro TSUTSUMI

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060

¹H-¹³C nuclear magnetic cross relaxations of copolymer of vinylidene fluoride(VDF) and trifluoroethylene(TrFE) with VDF content of 73mol% near ferroelectric phase transition temperature, have been investigated by CP/MAS NMR method. The spectra had three kinds of broad peaks at about 44, 88, 121ppm, which are due to CH₂, CHF, CF₂ groups, respectively. The ¹H spin-lattice relaxation time $T_{1\rho}(\text{H})$ and the cross-relaxation time, T_{CH} between ¹³C and ¹H systems were determined from the theoretical fitting of peak intensity against contact time. Minimization of $T_{1\rho}(\text{H})$ took place at about 120°C(heating) and 70°C(cooling), which is attributed to the ferroelectric phase transition. The minimization of $T_{1\rho}(\text{H})$ was discussed in terms of a molecular motion model of rotational motion about the chain axis accompanying with local trans-gauche transformation, because the phase transition is a first order.

目的

我々は以前、ビニリデンフルオライド(VDF)とトリフルオロエチレン(TrFE)のランダム共重合体、P(VDF_x/TrFE_{1-x})の強誘電的相転移に伴う分子鎖形態変化に、VDF基とTrFE基の分子運動が密接に関係していることを報告した¹⁾。本研究は¹³C固体高分解能スペクトルとその緩和挙動から、相転移域での分子鎖形態変化と分子運動のより詳しい知見を得ることを目的とする。

実験

試料は、ダイキン工業から提供されたVDF 73mol%のP(VDF₇₃/TrFE₂₇)である。このブタノン溶液から、キャストフィルムを生成し、約4倍に一軸延伸した後、135°Cで1日熱処理したものを測定に用いた。¹³Cスペクトルの測定はBrucker社のMSL-200および同300を用い、CP/MAS法で行なった。化学シフトはGlycineのカルボキシル基を基準とした。¹Hの90°パルス幅は4μs, ¹H-¹³C系の接触時間 t_c は0~15ms, 測定温度範囲は昇・降温時30~130°Cである。

P(VDF/TrFE), 強誘電的相転移, CP/MAS, 交差緩和, トランス・ゴーシュ形態変化

いしい ふみあき, おおが としお, つつみ あきひろ

結果と考察

^{13}C スペクトルは44, 88, 121ppm付近に CH_2 , CHF , CF_2 基によるブロードな3つのピークからなり, 昇温時, 100°C で狭化を, 降温時, 約 60°C で広幅化を起こした. 接触時間 t_c に対する各ピーク強度の変化を, Hartmann-Hahn条件下での熱力学的な取り扱いで解析し, 回転系での ^1H -格子間の緩和時間 $T_{1\rho}(\text{H})$ と, ^1H - ^{13}C 間の緩和時間 T_{CH} を理論式と実験値との最適化により求めた. Fig.1は CH_2 基の $T_{1\rho}(\text{H})$ の温度変化である. 昇温時, $T_{1\rho}(\text{H})$ は 80°C 以下領域と $80\sim 130^\circ\text{C}$ 領域で極小化が起きている. 降温時には, データのばらつきはあるが徐々に減少し, 70°C で極小値を取った後, 昇温時の値に復帰している. ここで昇温時の $80\sim 130^\circ\text{C}$ 領域, 降温時の 70°C 領域の極小化緩和過程をそれぞれ $\alpha_i(\uparrow)$ と $\alpha_i(\downarrow)$ とする. $\alpha_i(\uparrow)$ と $\alpha_i(\downarrow)$ の極小化温度は, 従来の誘電・熱測定の研究による昇・降温時の強誘電的相転移温度 $T_c(\uparrow)$ と $T_c(\downarrow)$ によく一致しており²⁾, α_i 過程が強誘電的相転移によるものであることを意味している. 相転移が一次的であることを考慮すると, 臨界揺動は無視でき, これらの極小化は分子鎖形態変化と, その分子運動によるものであると考えられる. そこで相転移域での分子鎖の運動を, 局所的なトランス・ゴーシュ形態欠陥を伴った軸回転運動であると考えて解析した. 相転移域の低温側ではトランス・ゴーシュ形態欠陥拡散運動が優勢であり, 高温側では軸回転運動が優勢と考えると, 運動の活性化エネルギーはそれぞれ, 形態欠陥拡散運動で約 10 kcal/mol , 軸回転運動で約 3 kcal/mol と評価できた.

また常誘電相でスペクトル強度の振動挙動が起きており, これらについてスピン拡散による緩和機構を考慮した交叉緩和過程によって解釈を試みている.

1) Fumiaki ISHII, OOGA Tosio and Akihiro TSUTSUMI, Polymer Preprints, Japan 45 vol. 5, 883 (1996)

2) Fumiaki ISHII and Akira ODAJIMA, Polymer Journal, 18, 539 (1986)

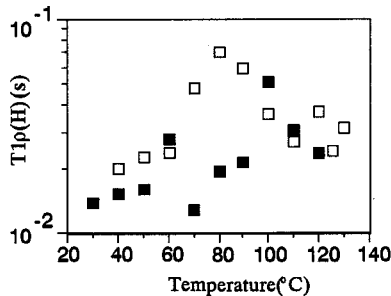


Fig.1: Temperature dependance of $T_{1\rho}(\text{H})$ CH_2 group.

Open square(□) represents heating process, and filled square(■) cooling.

1P44 エチレンアイオノマーにおける 1 価カチオン及び
2 価カチオンの形成するイオン会合体の構造解析
名工大 ○曾我部啓介、吉水広明、木下隆利、辻田義治

Structural Analysis of the Ionic Cluster of Ethylene Ionomers
with Monovalent and Bivaly Cations

Nagoya Institute of Technology,
○Keisuke Sogabe, Hiroaki Yoshimizu,
Takatoshi Kinoshita, Yoshiharu Tsujita

The aggregated ions of ethylene ionomers were studied using ^{13}C and ^{23}Na NMR spectroscopy. Ethylene / Methacrylic acid (EMAA) neutralized with Zn^{2+} or Na^+ ions were used. In ^{13}C NMR, the part of carbonyl carbons showed two peaks which were corresponding to carbons of $-\text{COOH}$ and $-\text{COO}(\text{Metal})^+$. The peak position of $-\text{COOH}$ was different between EMAA-Zn and EMAA-Na. In ^{23}Na NMR, every Na ionomers showed one peak corresponding aggregated Na ions. Peak position and width varied with neutralization and thermal treatment. The peak position shifted higher frequency at higher temperature.

1. 緒言 これまでのエチレンアイオノマーの研究で、イオン会合体はカルボニル炭素、四級炭素ともに金属塩の影響を受けたもののほうが水素結合の影響を受けている炭素よりも運動性が低いことが分かっている。また IR 測定から金属とカルボニル部分の配位構造が Zn 中和エチレンアイオノマーでは $-\text{COO}-\text{Zn}^+$ は熱処理により 4 配位構造から 6 配位構造と酸塩構造に、Na 中和エチレンアイオノマー中の $-\text{COO}-\text{Na}^+$ は 4 配位と 6 配位の構造を形成すると報告されている。

本研究では ^{13}C 、 ^{23}Na NMR 法を用い Zn アイオノマー、及び Na アイオノマーにおける $-\text{COO}(\text{Metal})^+$ 、 $-\text{COOH}$ 及び形成されるイオン会合体の中和度に対する形態の変化と温度に対する会合状態の変化について検討する。

キーワード：エチレンアイオノマー、イオン会合体、 ^{13}C NMR、 ^{23}Na NMR
○そがべけいすけ、よしみずひろあき、きのしたたかとし、つじたよしはる

2. 実験 試料—エチレンメタクリル酸共重合体 (酸含量 5.4mol%:E-0.054MAA 及び酸含量 11.2mol%:E-0.112MAA) の Zn 塩及び Na 塩 (三井・デュポン (株) より供与)。各々 20%、60%、90% 中和度のものを用いた。測定—Unity400plus NMR 分光計 (Varian) を用い、 ^{13}C ではアダマンタン(29.5ppm) を、 ^{23}Na では NaCl(s)(7.21ppm) を外部基準とした。

3. 結果と考察

Fig.1 に中和度の異なる E-0.054MAA-Zn と E-0.054MAA-Na の ^{13}C NMR スペクトルを示す。中和度の変化と共にそれぞれ高磁場側のピークが減少するのでこれを-COOH のカルボニル炭素に、低磁場側のピークを-COO-(Metal)⁺のカルボニル炭素に帰属した。しかし-COOH は全くピーク位置が異なる。これはアイオノマー中の-COOH が-COO-(Metal)⁺やその形成するイオン会合体によって影響を受けるためと考えられる。それぞれの試料を熱処理した

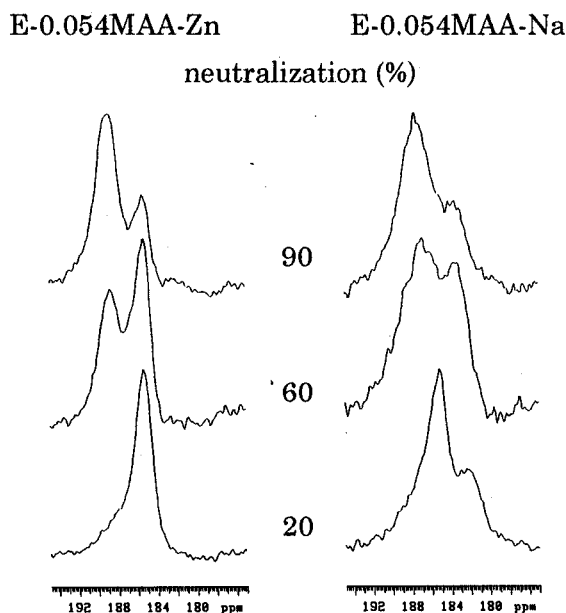


Fig.1 ^{13}C CP / MAS NMR Spectra of E-0.054 MAA-Zn and E-0.054MAA-Na with various neutralization in the carbonyl carbon region.

ものについて ^{13}C NMR 法を用いて検討した。その結果 E-0.054MAA-Zn については会合体部分は 2 本に識別できないブロードなピークへと変化した。これはイオン基の配位の変化を示すものと考えられた。また E-0.054MAA-Na でもピークは 1 本のピークへと変化した。

次に Na 核自身を直接的に観察可能な ^{23}Na NMR 法で E-0.054MAA-Na 及び E-0.112MAA-Na を異なる中和度において測定した (Fig.2)。-10ppm 付近に-COO-Na⁺の会合体を示すピークが観測され、それぞれ中和度の上昇と共に高磁場シフトした。Cooper らは Na スチレンアイオノマーを用いて ^{23}Na NMR 測定をし、孤立イオン、会合体、水和したイオンの 3 つのピークを観測した。¹⁾ 今回使用した試料では会合体を示すピークしか観測されなかった。また水和させた試料では Cooper らの報告と同じ 0ppm にピークが現れた。ピークトップの位置は中和度が

減少するほど高磁場側へと変化している。線幅を比較すると中和度が増すほど広幅になることが分かった。全て同じ回転速度の MAS で測定しているので中和度の増加と共に会合体に分布ができ線幅が広がったものと考えられる。先に述べたように温度を変化させるとイオン会合体に変化が起こる。そこで温度可変測定を行うことにより直接各温度での Na 核の挙動について観察した。E-0.054MAA-0.9Na を室温から 100℃まで 20℃毎に温度を変えて測定した結果を示す (Fig.3)。ピーク位置は温度の上昇と共に低磁場シフトし、線幅は広がった。線幅の広がりには主鎖部分の分子運動の増加により会合体部分にその運動の影響が及ぶためであると考えられる。

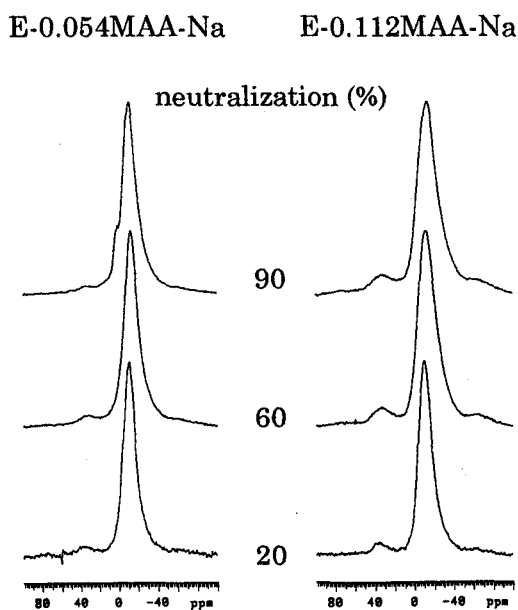


Fig.2 ^{23}Na MAS NMR Spectra of E-0.054MAA-Na and E-0.112MAA-Na with various neutralization.

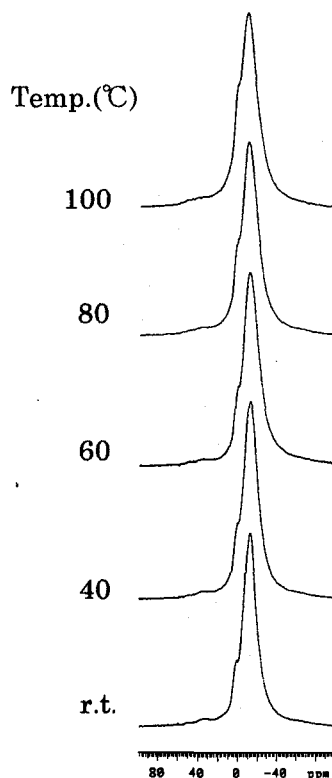


Fig.3 ^{23}Na MAS NMR Spectra of E-0.054MAA-0.9Na at various temperature.

Reference

- 1) Ellen M.Oconnell, Thatcher W.Root, and Stuart L.Cooper, *Macromolecules* 27, 5803-5810 (1994)

1P45

NMRによる Alkanediyl- α , ω -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants のコンホメーション解析——ミセル形成によるコンホメーション変化

(名工大工) ○服部憲和、吉野明広、岡林博文

Conformational analysis of bis(quaternary ammonium bromide) surfactants in aqueous solution studied by NMR Spectroscopy — Conformational change induced by micelle formation

○ Norikatsu Hattori, Akihiro Yoshino, Hirofumi Okabayashi

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

Bipolar type surfactants, in which two quaternary ammonium species ($C_RH_{2R+1}N^+(CH_3)_2$) are connected by a spacer, were synthesized. We measured ^{13}C -NMR and 1H -NMR spectra for the bipolar surfactant molecules having various spacers (flexible $(CH_2)_n$ chain and 3-type o-, m- and p- xylenes). It has been found that there exists a marked difference in the coupled ^{13}C -NMR spectra of these surfactant solutions between above and below the CMC. The conformations of surfactants in solutions have been estimated using the values of vicinal coupling constants and the surfactant molecular structure in the micellar solution has been discussed in connection with the conformation.

【はじめに】

近年、新しい世代の界面活性分子として従来の界面活性分子2つを spacer でつないだ界面活性分子(Gemini surfactants)の構造に関心がもたれている。以前我々は spacer にメチレン鎖をもちいた化合物について、その溶液構造[1]および固体構造[2]について報告した。今回は spacer に剛直なベンゼン環を導入した一連の界面活性分子を合成した。そして、重水溶液中における 1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトルを観測した結果、臨界ミセル濃度前後において、これらの化合物の 1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトルに変化が見られた。この変化はミセル形成に伴う分子のコンホメーション変化を反映していると考えられる。そこで、コンホメーションを vicinal 結合定数から解析し、種々の spacer を持つ分子のコンホメーション変化をベンゼン環の異方性効果に着目し検討することにより spacer の効果について興味深い知見が得られたので報告する。

【実験および解析方法】

3級アミンと臭化アルキルを反応させ、アミンの徹底メチル化を行うことにより、種々の spacer を持つ分子を合成した(Fig.1)。これらの化合物の略称は Figure 1 に示した。また、

1H -NMR、vicinal 結合定数、ミセル、コンホメーション変化、spacer の効果

はつとりのりかつ、よしのあきひろ、おかばやしひろふみ

spacer にメチレン鎖をもちいたものでは spacer、アルキル鎖のメチレンの数 n 、 R の値を用いて、 n - R -2-4 等と略称することにする。アルキル鎖の炭素は N 原子に近い方から C1、C2 というように記号を付けることにする。今回用いた界面活性分子はアルキル鎖中の炭素数がすべて 8 個 ($R=8$) のものである。重水溶液中における ^{13}C -NMR スペクトル、および ^1H -NMR スペクトルは Varian 社製 400-MHz Unityplus を用いて、それぞれ共鳴周波数 100.58MHz、399.96MHz で室温 (25°C) で測定した。また臨界ミセル濃度 (CMC) は電気伝導度法により求めた。

^1H -NMR の vicinal 結合定数は、それぞれ観測したスペクトルを AA'XX'系と近似し、LAOCOON III プログラムによる計算スペクトルと比較して求めた。また、回転異性体の trans および, gauche 型の割合を示す Pt および Pg は、照井らが行った計算方法[3]に従って求めた。

【結果と考察】

(1) CMC (臨界ミセル濃度)

電気伝導度法により求めた CMC の値は oxy8: $2.35 \times 10^{-2} [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$, mxy8: $2.26 \times 10^{-2} [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$, pxy8: $2.64 \times 10^{-2} [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$, n-R 3-8: $1.40 \times 10^{-2} [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$, n-R 5-8: $2.60 \times 10^{-2} [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$ であった。Spacer にキシレンを導入したものでは pxy8 の CMC が一番大きい。Spacer に短いメチレン鎖を用いたものでは、N 原子間である極性基間の距離が長くなると CMC の値は大きくなる[4]、ということが知られている。したがって、キシレンにおいて Cs がベンゼン環中のパラ位である場合には、他のオルト位、メタ位の分子に比べ極性基間の距離が長くなるコンホメーションの優位性が示唆される。極性基間距離に着目しオールトランス構造を仮定したときの極性基間距離は mxy8、n-R 5-8 においてどちらもほぼ同じ値をとるが、CMC の値は mxy8 の方が有意に小さい。よって、spacer にキシレンを用いた結果、極性基間距離が短くなるコンホメーションが優位になると考えられる。

(2) ^{13}C -NMR の化学シフト変化

(a) 立体圧縮効果

ベンゼン環と N 原子の間にあるメチレン基 Cs のシグナルは CMC 以下の濃度では oxy8: 67.27[ppm]、mxy8: 69.41[ppm]、pxy8: 69.05[ppm]であり、オルト位の化学シフトはメタ位、パラ位のものに比べ僅かに高磁場シフト (約-2ppm) しており立体圧縮効果を反映している。この傾向は CMC 以上の濃度においても確認された。この効果はベンゼン環により位置が固

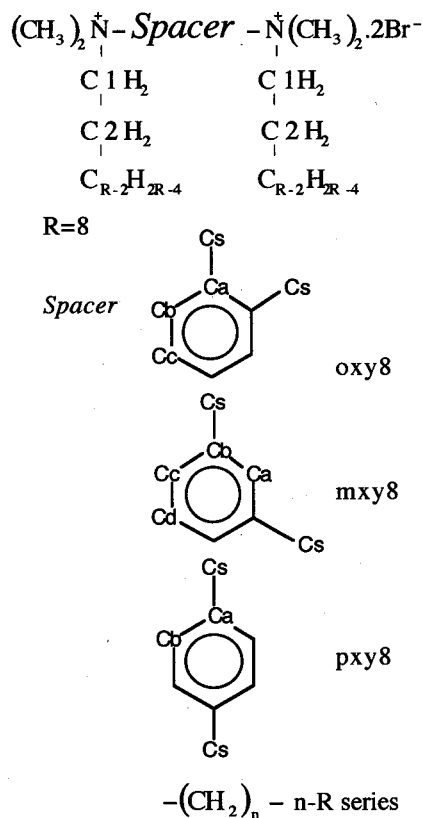


Fig.1 Gemini surfactants

定されている Cs のみならず他の部分においても観測され、ベンゼン環から離れると効果は小さくなった。CMC以下の濃度で oxy8 のシグナルは、N原子と結合している N-CH₃基部分で、pxy8 より約0.57ppm、mxy8 より約0.38ppm、また、C1 では pxy8 より約0.37ppm、mxy8 より約0.41ppm 高磁場シフトして観測されており Cs と比べると、化学シフトの差は小さい。また、アルキル鎖部分 C2 においては、それぞれの化学シフトの差は 0.02ppm 以下となっており、異方性効果はほとんど見られない。

(b) CMC 前後での各構造部分における化学シフトの変化

全ての化合物について、溶液中の界面活性分子濃度を大きくすると、各シグナルの化学シフトは低磁場シフトする傾向がみられた。しかし、濃度に対するシフトの傾向は分子の各構造部分によって異なり、ベンゼン環部分、Cs、N-CH₃、そしてアルキル鎖部分に分類してとらえることができた。oxy8 では、各構造部分において化学シフトの差がアルキル鎖部分 < ベンゼン環部分 < Cs < N-CH₃ と大きくなる傾向がみられたが、0.02ppm 以上の顕著な差は生じていなかった。pxy8 においても化学シフトの差が約 0.06ppm と、若干 oxy8 の場合より大きい程度であった。ところが、mxy8 では oxy8、pxy8 とは異なった傾向が見られた。化学シフトの差は、ベンゼン環部分 < アルキル鎖部分 < Cs < N-CH₃ となり、ベンゼン環とアルキル鎖では、逆にアルキル鎖部分の方がより低磁場シフトする傾向が見られた。さらにベンゼン環部分の各炭素において oxy8 では化学シフト変化に違いはみられなかったが、mxy8 や pxy8 では差が生じた。シフトの変化は各炭素における環境の変化が一定でないことを示していると思われる。また、アルキル鎖部分においては C1 のみに異方性効果が現れた。

(3) N原子に近いメチレン鎖の回転異性体の確率

アルキル鎖の N 原子に近い C1H₂-C2H₂ 軸まわりでのコンホメーションを求めるために、スピ系を AA'XX'系と近似して解析し求めた vicinal 結合定数、およびその値から計算したコンホメーションの割合 Pg および Pt を Table 1 に示す。また、n-R3-8 では spacer 部分である Cs1H2-Cs2H2 軸まわりでの値も示す。ここで Pg、および Pt は N 原子および C 原子が gauche および trans の配置をとる確率である。全ての界面活性分子について trans の配置が約 90% と優位であることがわかった。また、CMC 以上に濃度を大きくすると、分子の立体構造は、アルキル鎖が伸びるコン

Table 1 ¹H-NMR parameters and estimated populations

Substance	J _{AX}	J _{AX'}	J _{AA}	J _{XX'}	Pg	Pt
oxy8 1wt%	12.2	4.7	-12.2	-12.4	12	88
oxy8 3wt%	12.2	4.8	-12.4	-12.6	12	88
mxy8 1wt%	12.2	4.9	-12.8	-13.0	13	87
mxy8 4wt%	12.4	4.6	-12.9	-12.7	10	90
pxy8 1wt%	12.3	4.7	-12.5	-12.5	11	89
pxy8 3wt%	12.4	4.7	-12.7	-12.9	10	90
nR 3-8 C1-C2 0.5wt%	11.9	4.9	-8.2	-8.1	15	85
nR 3-8 C1-C2 2wt%	12.4	4.5	-10.3	-10.2	9	91
nR 3-8 Cs1-Cs2 0.5wt%	12.2	4.7	-11.1	-11.0	11	89
nR 3-8 Cs1-Cs2 2wt%	11.8	4.9	-9.8	-9.8	16	84

ホメーションがより優位になると推定される(Fig.2)。

(4) $^3J_{CH}$ 結合定数の変化

mxy8 の Cc における CMC 前後での Coupled ^{13}C -NMR スペクトルより、CMC 前では偶数に分裂したスペクトルパターンが観測され、CMC 後では奇数個に分裂されたスペクトルパターンが観測された。Cc は Cs の H 原子 2 個と、Ca の H 原子 1 個および、もう一方の Cc の H 原子 1 個と $^3J_{CH}$ スピン結合している。このうち Ca および Cc の H 原子は trans の位置に固定されており、スペクトル変化は Cc と Cs の H 原子とのコンホメーション変化によるものと考えられる。そこで、CMC 前については Cs の H 原子が tggg' の配置をとった場合、CMC 後では tgtg の配置をとった場合を考え $^3J_g=1.45[\text{Hz}]$, $^3J_t=8.54[\text{Hz}]$ としてスペクトルの計算を行った(Fig.3)。CMC 後では計算スペクトルと実測のスペクトルがほぼ一致しており、ミセル形成後分子のコンホメーションは tgtg が優位を占める。しかし、CMC 前では tggg' が優位を占めるものの一定でなく他のコンホメーションの存在が無視できない。これらの計算からミセル化によりベンゼン環に対する N 原子の立体的な配置を制御できることがあきらかとなった。

【結論】

ミセル形成により spacer を持つ界面活性分子はその spacer 構造を反映しながら、コンホメーション変化をする。ベンゼン環の異方性の効果は、化学シフト変化、vicinal 結合定数にあらわれ、CMC 前後での環境の変化は極性基に近いほど大きなことがわかった。また、ミセル形成により立体配置の確率に偏りが生じ、回転の束縛が起こることが NMR により明確にわかった。

【参考文献】

- [1]H.Hirata,N.Hattori,M.Ishida,H.Okabayashi,M.Furusaka,R.Zana,*J.Phys.Chem.***99**,17778,(1995).
- [2]服部、吉野、岡林、第34回NMR討論会講演要旨集,101,(1995).
- [3]Y.Terui,M.Ueyama,S.Satoh,K.Tori,*Tetrahedron*,**30**,1465,(1974).
- [4]R.Zana,M.Benraou,R.Rueff,*Langmuir*,**7**,1072,(1991).

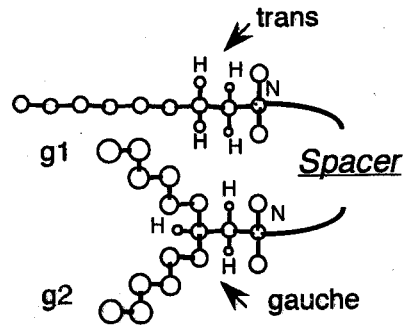
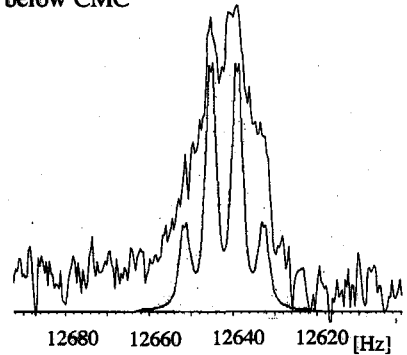


Fig.2 Schematic model of gauche and trans forms

below CMC



above CMC

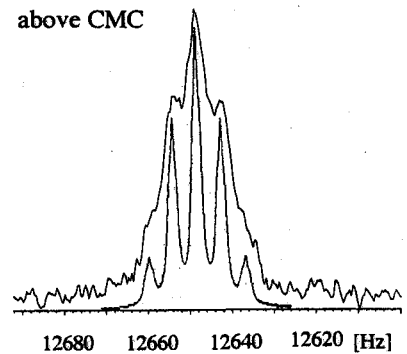


Fig.3 Cc part in observed and calculated coupled ^{13}C -NMR spectra

Base-Catalyzed Hydrogen-Deuterium Exchange Reaction in modified AOT Micellar Solutions ——The Substituent Effect on the Exchange Reaction

○Hidehiro Kanbe, Sonoko Sasuga, Akihiro Yoshino, Hirofumi Okabayashi

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

For the AOT-D₂O and modified-AOT (SDHSS)-D₂O systems in the normal micellar state, the base-catalyzed H-D exchange reaction between the AOT (or SDHSS)-¹CH proton and D₂O deuterium has been investigated in the temperature range 333 - 353 K. Kinetic analysis, based on the time dependence of the ¹H-NMR spectrum, has allowed evaluation of the thermodynamic parameters of the exchange reaction to be made. The hydrolysis reaction of the AOT- (or SDHSS-) ester portions for the two normal micellar systems has also been investigated in this temperature range. The results have been used to discuss the extent of water penetration into the ester portions of AOT- (or SDHSS-) micelles.

<はじめに> 以前、我々は逆ミセル系における AOT の ¹³C-NMR の縦緩和時間の測定結果から、可溶化した水分子と極性基部分の構造に相関があることを報告した¹⁾。さらに、逆ミセル系において AOT-¹CH セグメントの水素と D₂O-D 間で塩基触媒水素-重水素(H-D)交換反応を起こることを見出した²⁾。本研究では、常ミセル系における AOT 分子について研究を行なった。特に AOT の 2 つのエチル基を持たない AOT 類似化合物を合成し、この類似化合物の常ミセル系について、電気伝導度、¹H-NMR の化学シフトと結合定数の温度依存性からミセル構造について考察した。さらに、重水中で塩基触媒 H-D 交換反応を行い、種々の濃度と反応温度での積分強度の経時変化から AOT 類似化合物における H-D 交換反応性を比較した。また、同時に起こるエステル基の加水分解反応も観測した。これら 2 種の反応は軽水または重水の存在下でのみ起こり、水溶液ミセルの油-水界面の研究に最適であることがわかった。

<実験> 実験には SIGMA 社製の AOT(Fig.1)を泡分離法で精製して用いた。AOT 類

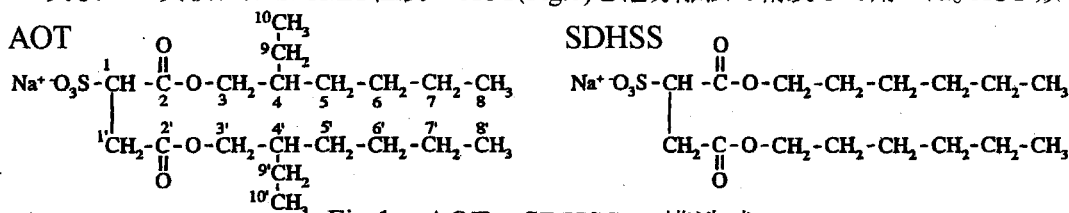


Fig.1 AOT, SDHSS の構造式

key word : base-catalyzed H-D exchange reaction, hydrolysis reaction, micelle solution

かんべひでひろ, さすがそのこ, よしのあきひろ, おかばやしひろふみ

似化合物(sodium dihexyl sulfosuccinate : SDHSS(Fig.1))は、無水マレイン酸と n-ヘキサノールを縮合させ、さらに亜硫酸水素ナトリウムを付加することにより合成した。臨界ミセル濃度(CMC)は、電気伝導度計 CM-2A を用いて測定した。25°Cにおいて AOT と SDHSS 水溶液の CMC は、AOT で 7.7mM, SDHSS で 22.8mM と決定された。

所定量の試薬を精秤し、0.005wt%に調製した水酸化ナトリウム重水溶液に溶かしたものを手製のパイレックス製アンプルに入れ封かんし、精密恒温器 DF-42 中で 60,65,70,75,80°C(±0.1°C)で所定時間反応させたものを測定試料とした。

¹H-NMR スペクトルと ¹³C-NMR スペクトルは、Varian XL-200 を用いてそれぞれ 199.975MHz と 50.289MHz にて室温(25°C)で測定した。

<結果と考察>

(1)塩基触媒 H-D 交換反応の反応サイト AOT と SDHSS は塩基触媒の存在下で、極性基に隣接する H-1 水素のみが選択的に溶媒の重水素と交換する²⁾。反応機構を検討するために AOT と SDHSS の重水溶液に塩基触媒を加えたものと加えていないものを調製し、¹³C-NMR を測定した。極性基部分に注目すると、C-1 炭素が最も大きく高磁場シフトし、次いで C-2 炭素のシフトが大きくなって

いることがわかる(Table 1)。これは、一部の H-1 水素が脱離して C-1 炭素の電子密度が増加したためと考えられる。したがって、H-D 交換反応では OD⁻が塩基触媒として H-1 水素に作用していると推定される。同様に、エステル加水分解も塩基触媒によって起こることがわかった。

Table 1 OD⁻ anion effect ($\Delta \delta = \delta_{\text{NaOH}} - \delta_{\text{without NaOH}}$)
¹³C chemical shift for C-1, 1', 2, 2'
 $\Delta \delta = \delta(\text{OH}^-) - \delta(\text{neutral})$

	AOT 10mM		SDHSS 40mM	
	NaOH 0mM	NaOH 5mM	NaOH 0mM	NaOH 5mM
	δ	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$
C1	64.63	-0.62	64.59	-0.07
C1'	40.98	-0.03	36.05	-0.01
C2	174.55	-0.10	174.52	-0.05
C2'	171.30	-0.03	171.38	-0.01

(2)AOT,SDHSS 水溶液の電気伝導度と¹H-NMR の温度依存性 AOT(10mM)と SDHSS(40mM)水溶液の電気伝導度および ¹H-NMR の温度依存性(60~80°C)を測定した。電気伝導度は、どちらも温度に対して単調に増加していることがわかる(Fig.2)。極性基付近の H-1'水素の化学シフトは、60~80°Cの範囲において温度の上昇とともに単調に低磁場シフトし(Fig.3)、H-1'水素のシグナルは ABX 系でそのビシナル結合定数は温度に関係なく一定である。このことから温度上昇に伴

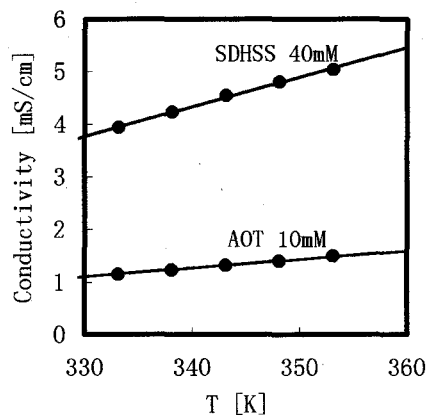


Fig. 2 Temperature dependence of the conductivity of AOT and SDHSS micelle solutions.

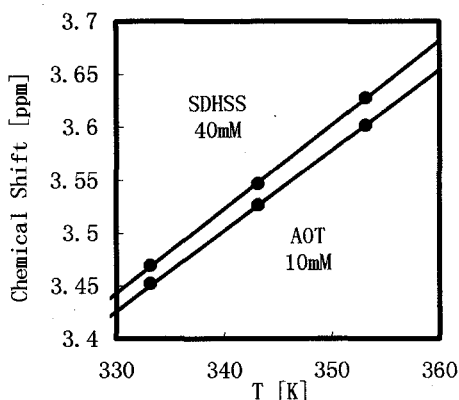


Fig. 3 ^1H chemical shifts v.s. temperature plots for H-1' proton of an AOT and SDHSS

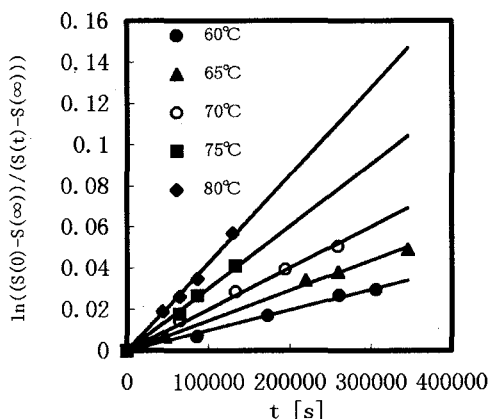


Fig. 4 McKay plots of $\ln((S(0)-S(\infty))/(S(t)-S(\infty)))$ v.s. time(t) at different temperatures.

うコンホメーション変化はないことがわかった。これらの実験事実から、AOT と SDHSS は 60~80°Cの間では水溶液中においてともにミセル構造に変化がないと推定される。

(3)塩基触媒 H-D 交換反応 H-1 と H-3,3'水素のシグナルは 4.1ppm 付近に重なっているが、H-1 水素が重水素と交換するとそれらのシグナルの積分強度が減少する。この減少量の経時変化により H-D 交換反応の速度を求めた。0.005wt%の水酸化ナトリウムを含む SDHSS(40mM)重水溶液を 60, 65, 70, 75, 80°Cにおいて反応させた結果を Fig.4 に示す。この反応は、AOT の逆ミセル系での実験で得た結果²⁾と同様に一次の反応速度式に従っている。これをもとに AOT と SDHSS について種々の濃度と反応温度での 1 モル当たりの H-D 交換反応速度を求めた(Table 2)。SDHSS (40mM)の H-D 交

Table 2 Reaction rate constants k_p ($\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) for AOT and SDHSS micellar solutions.

	CMC	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C
AOT (2.0mM)	前	3.16×10^{-1}	3.58×10^{-1}	6.65×10^{-1}	8.45×10^{-1}	1.20×10^0
AOT (10mM)	後	3.03×10^{-2}	3.83×10^{-2}	8.89×10^{-2}	1.34×10^{-1}	1.63×10^{-1}
SDHSS (40mM)	後	8.85×10^{-4}	1.32×10^{-3}	1.81×10^{-3}	2.73×10^{-3}	3.83×10^{-3}
SDHSS (148mM)	後	6.53×10^{-4}	-	1.55×10^{-3}	-	2.78×10^{-3}

換反応速度について Arrhenius plot を行なった結果を Fig.5 に示す。また、種々の濃度の AOT と SDHSS の H-D 交換反応の熱力学的パラメーターを Table 3 に示す。

(4)疎水基とミセル構造 SDHSS の構造式は AOT の疎水鎖にエチル基を持たない。したがって、CMC 以上の濃度における反応速度と熱力学的パラメーターを比較することにより、エチル基による SDHSS と AOT のミセル構造に対する影響について議論することができる。

AOT(10mM)と SDHSS(40mM)の H-D 交換反応について、反応速度は AOT の方が大きな値となっている(Table 2)。H-D 交換反応の活性化エネルギー(E_a)値を比較すると AOT の方が小さく反応しやすいことを示しており、H-1 水素の水への露出度と相関が

あるといえる。さらに、エステル加水分解に注目すると、80°Cにおいて72時間反応させた場合、AOTでは3.4%分解しているのに対し、SDHSSでは0.5%さえも分解していない。この結果は、AOTとSDHSSではエステル結合の水への露出度が異なっていることを示している。したがって、エステル交換反応の方が、H-D交換反応よりも水分子のミセル内への深い取り込みを必要とすると考えられる。

(5)H-D交換反応に及ぼすミセル形成効果 AOTについてCMCの前後でのH-D交換反応速度を比較したところ、CMC以上

の濃度の方がCMC以下よりも小さな値となっている。さらに、Ea値を比べると、CMC以上の方が大きい値となっている。この事実は、ミセルの形成によってH-I部分への水の取り込みが妨げられH-D交換反応が抑制されたことを示している。また、エステル加水分解

について比較すると、80°Cにおいて72時間反応させた場合、CMC以下(2.0mM)では8.0%分解しているのに対しCMC以上(10mM)では3.4%と加水分解反応の進行が抑制されている。この事実から、ミセル形成によりエステルの結合部分が疎水性コアの中に取り込まれて水の取り込みが妨げられていると考えられる。以上の結果、モノマーでは水分子が界面活性剤のまわりを囲んでいるため二つの反応は、ともに起こりやすいが、ミセル形成により、まず加水分解反応が抑制され、続いてH-D交換反応が抑制されると推定される。

<結論>

エチル基のないSDHSSは、AOTに比べて塩基触媒H-D交換反応が抑制された。さらに、副反応であるエステル加水分解反応については著しく抑制された。これらの結果は、ミセル構造とミセル内に取り込まれる水分子の相関によって説明できる。すなわち、AOTのエチル基はミセル内への水分子の深い取り込みをうながし、SDHSSよりも疎なミセル構造を与える。

1) A. Yoshino, H. Okabayashi, T. Yoshida, J. Phys. Chem., 98, 7036, 1994

2) A. Yoshino, H. Okabayashi, T. Uchida, T. Ogasawara, T. Yoshida, J. Phys. Chem., 100, 1418, 1996

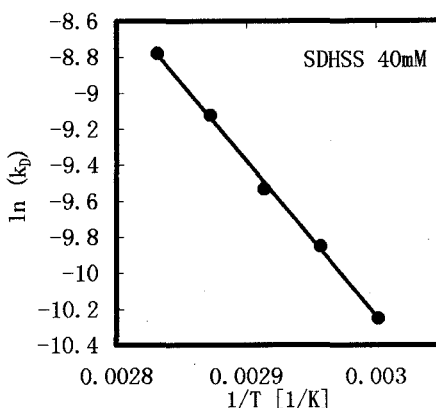


Fig. 5 Arrhenius Plots for the exchange reaction rate constant.

Table 3 Thermodynamic parameters for the H-D exchange reaction in AOT and SDHSS micelles.

	Ea	A	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger
	kJmol^{-1}	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	kJmol^{-1}	$\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
AOT(2.0mM)	68.8	3.60×10^7	66.0	-110.
AOT(10mM)	90.4	4.28×10^{10}	87.5	-50.9
SDHSS(40mM)	71.7	6.05×10^6	68.8	-125.
SDHSS(148mM)	71.0	1.36×10^7	68.1	-118.

¹岐阜大・医・生理, ²岐阜大○恵良聖一¹, 曾我美勝², 永井直樹¹CD and $^1\text{H-NMR}$ studies on the structural transition of human serum albumin (HSA) in the alkaline region — the N→B transitionSeiichi Era¹, Masaru Sogami² and Naoki Nagai¹¹Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., Gifu 500 and ²Gifu Univ., Gifu 500, Japan

There are many reports, which indicate physical differences in molecular characteristics between bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA). We have restudied on the structural transition of HSA and BSA in the alkaline region (the N→B transition ; pH 7.0→9.0), using CD-resolved secondary structure, $^1\text{H-NMR}$ spectra and T_{IS} values from irradiated to observed protein protons.

$T_{\text{IS}}(\text{B})/T_{\text{IS}}(\text{N})$ values of CH_3 , ϵCH_2 , αCH and aromatic protons for the aged form of BSA showed the following interesting results : First, $T_{\text{IS}}(\text{B})/T_{\text{IS}}(\text{N})$ values of aliphatic protons and αCH for aged form were similar to those for nonaged BSA. Second, $T_{\text{IS}}(\text{B})/T_{\text{IS}}(\text{N})$ values of aromatic protons for aged form were very close to those for HSA. So, T_{IS} -characteristics of aged form might be the chimera of HSA and BSA.

1. はじめに

これまでに筆者らも含めて多くの研究者は, ウシ血清アルブミン (BSA) とヒト血清アルブミン (HSA) の構造転移は全く同等であろうと仮定して研究を進めてきた。しかし BSA と HSA とでは, ヘリックス含量 (f_{H}) の pH 依存性 (1), 結合ビリルビンの誘起 CD のキラリティ (2), 特殊なレジンとの相互作用 (3, 4) 等に大きな差があることが報告されてきた。従って, 筆者らはアルカリ pH 領域での構造転移 (N→B 転移と呼ぶ) における BSA と HSA の分子挙動の相違を, CD と $^1\text{H-NMR}$ を用いて詳細に研究した。

キーワード : CD, $^1\text{H-NMR}$, BSA, HSA, N→B 転移

えらせいいち, そがみまさる, ながいなおき

2. 材料と方法

脱脂した BSA と HSA を用いた。血清アルブミンは分子内にフリーの SH 基を 1 個もち、アルカリ pH 域で低イオン強度ではこの SH 基が触媒となって、分子内 SH、S-S 交換反応を起こして A 型構造に変化する (5)。この反応を阻止するために、SH 基をヨードアセトアミド (IA) でブロックしたアルブミン (IA-BSA, IA-HSA) を用いた。

CD 測定は JASCO J-40S を用い、 α ヘリックス (f_α)、 β 構造 (f_β)、ランダムコイル (f_R) 量を推定した (6)。¹H-NMR 測定は Bruker AM 500 を用い、交差緩和時間 (T_{IS}) は Akasaka らの方法 (7) により求めた。

3. 結果と考察

BSA (IA-BSA) : CD 測定で、0.10 M または 0.20 M KCl 中での BSA の $[\theta]_{262}$ と $[\theta]_{268}$ は pH 7.0→9.0 で漸減したが、 $[\theta]_{290}$ と $[\theta]_{300}$ の変化は認められなかった (8)。また塩濃度が 0.10 と 0 の場合の IA-BSA の N 型での f_α と f_β 値はそれぞれ 0.70, 0.12 であった。N 型から B 型へ変化するときの Δf_α は塩濃度が 0.10 では -0.02, 塩濃度が 0 では -0.08 となり、その変化は塩濃度が 0 の方が大きかった (8)。

-2.45, 0.40, 7.13 または 8.65 p.p.m. での f_2 照射の際の BSA の N 型と B 型の側鎖の T_{IS} 値の比 ($T_{IS}(B)/T_{IS}(N)$) を求めた。その一例 (0.40 p.p.m. を 39 Hz で f_2 照射) を図 1 に示す。この図から、IA-BSA の側鎖の $T_{IS}(B)/T_{IS}(N)$ 値は塩濃度が 0.10 で ~1.1, 0 で ~1.4 であることが分かる。これらのことから、塩濃度が 0 における IA-BSA の B 型ではそのヘリックス含量が減少し、さらに側鎖の可動性が増加した状態であることが示唆された。

HSA (IA-HSA) : CD 測定による HSA の $[\theta]_{292}$ は塩濃度が 0.10, 0 のいずれの場合でも N→B 転移で減少した (9)。また塩濃度が 0.10 と 0 の場合の IA-HSA の N 型での f_α と f_β 値はそれぞれ 0.69, 0.15 であった。N 型から B 型へ変化するときの Δf_α は塩濃度が 0.10 では -0.02, 塩濃度が 0 では -0.05 となり、その変化は塩濃度が 0 の方が大きかった。ところで、血清アルブミンのビリルビンとの複合体の誘起 CD は、HSA と BSA の B 型ではその符号が全く逆であった (2)。

-2.45, 0.40, 7.13 または 8.65 p.p.m. での f_2 照射の際の HSA の N 型と B 型の側鎖の T_{IS} 値の比 ($T_{IS}(B)/T_{IS}(N)$) を求めた。その一例 (0.40 p.p.m. を 39 Hz で f_2 照射) を図 2 に示す。この図から、IA-HSA の側鎖の $T_{IS}(B)/T_{IS}(N)$ 値は塩濃度が 0 では ~1, 塩濃度が 0.10 では脂肪族側鎖、 α CH での値は ≤ 1 であったが芳香族側鎖のそれは 1.5~1.6 となり、BSA の場合とは異なり、HSA では塩濃度が 0.10 で B 型において芳香族側鎖のゆらぎの増加が示唆された。

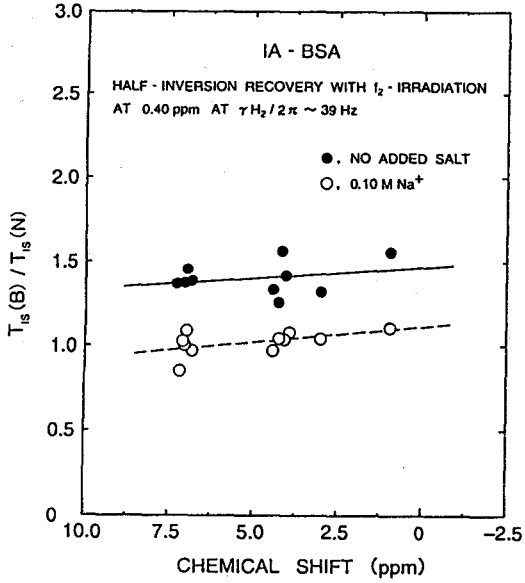
BMA (ウシメルカプトアルブミン) の A 型 (IA-A-BMA) : BSA は分子内にフリーの SH 基を 1 個もち、アルカリ pH 域で低イオン強度ではこの SH 基が触媒と

なって、分子内 SH, S-S 交換反応を起こして A 型構造に変化する (5)。IA-A-BMA の $T_{IS}(B)/T_{IS}(N)$ 値の一例 (0.40 p.p.m. を 39 Hz で f_2 照射) を図 3 に示す。A 型の $T_{IS}(B)/T_{IS}(N)$ 値は塩濃度が 0 の場合、脂肪族側鎖と α CH の値は BSA とほぼ同じ、塩濃度が 0.10 の場合は芳香族側鎖での値は HSA とほぼ同じであった。このような交差緩和時間測定の結果から、BMA の A 型構造は BSA と HSA にみられる両方の分子挙動をとっていることが明らかになった。

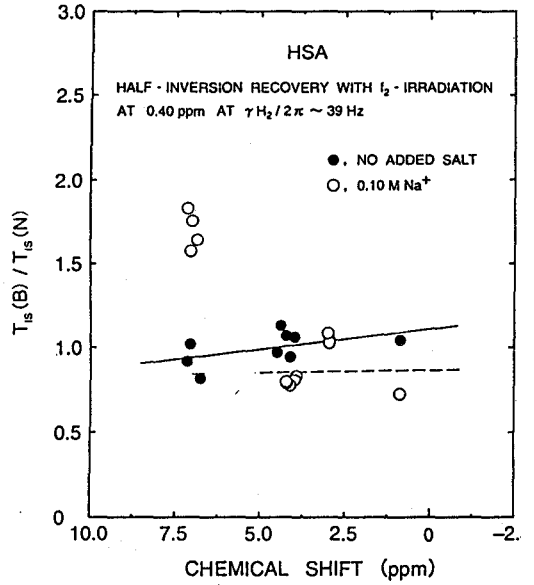
4. 文献

1. M. Sogami and S. Era (1995) 2nd Workshop "Principle of Protein Architecture" Abstracts p.67
2. D. Harmatz and G. Blauer (1975) Arch. Biochem. Biophys. 170, 375-383
3. R. J. Leatherbarrow and P. D. G. Dean (1980) Biochem. J. 189, 27-34
4. M. Sogami, S. Nagaoka, S. Era, M. Honda and K. Noguchi (1984) Int. J. Peptide Protein Res. 24, 96-103
5. S. Era, K. Kuwata, M. Sogami et al. (1991) Int. J. Peptide Protein Res. 38, 260-266; K. Kuwata, S. Era and M. Sogami (1994) Biochim. Biophys. Acta 1205, 317-324
6. S. Era, S. Nagaoka, M. Sogami et al. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 26, 21-32
7. K. Akasaka (1981) J. Magn. Reson. 45, 337-343; K. Akasaka (1983) ibid. 51, 14-25; K. Akasaka, R. Ishima and S. Shibata (1990) Physica B 164, 163-179
8. S. Era, K. B. Itoh, M. Sogami, K. Kuwata, T. Iwama, H. Yamada and H. Watari (1990) Int. J. Peptide Protein Res. 35, 1-11
9. J. Wilting, M. M. Weideman, A. C. J. Roomer and J. H. Perrin (1979) Biochim. Biophys. Acta 579, 469-473

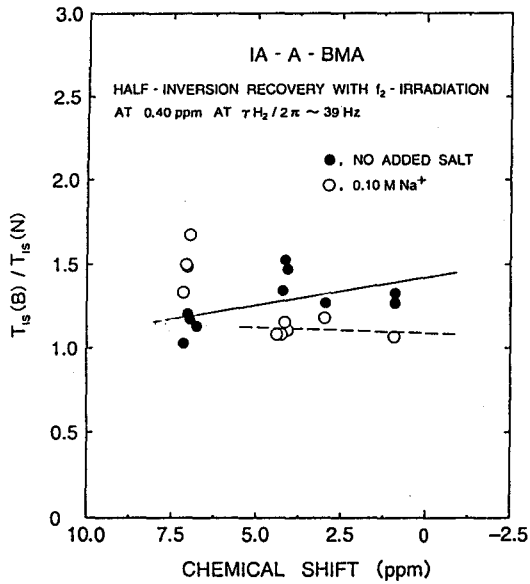
(☒ 1)



(☒ 2)



(☒ 3)



(阪大蛋白研¹、奈良先端大²、東大医³) ○古井淳一¹、上垣浩一¹
山崎俊夫¹、白川昌宏²、原田久士³、谷口維紹³、京極好正¹

Solution structure of the DNA binding domain of IRF-2

○Junichi Furui¹, Koichi Uegaki¹, Toshio Yamazaki¹, Masahiro Shirakawa²,
Hisashi Harada³, Tadatsugu Taniguchi³, and Yoshimasa Kyougoku¹

(¹ Institute for Protein Research, Osaka University, ² Nara Institute of Science and Technology,
³ Faculty of Medicine, University of Tokyo)

Interferon Regulatory Factor - 2 (IRF-2) is a transcriptional repressor of type-I interferon (IFN) gene and IFN-inducible genes, and also has the ability of activation of histone H4 gene. It binds to the target sequence located upstream of the promoter of these genes. The DNA binding domain of IRF-2 is located in the N-terminal region, which consists of about 110 amino acid residues. The solution structure of the DNA binding domain of the mouse IRF-2 protein has been determined by multidimensional heteronuclear NMR. It has three α -helices, four stranded antiparallel β -sheet and a fairly long loop between β -strand 2 and helix 2. Its global folding reveals that IRF-2 is a new member of the α + β HTH (winged HTH) family.

1、はじめに

Interferon Regulatory Factor - 2 (IRF-2) は、IRF family に属する転写因子であり、I 型 Interferon (IFN) 遺伝子及びIFN誘導遺伝子の上流配列に結合し、これらの遺伝子の転写を抑制する働きを持つ[1]。また、IRF-2 はヒストン H4 遺伝子を活性化する機能も持つことが報告され [2]、IFNによる抗ウイルス作用の調節、および細胞増殖の制御作用において重要な役割を担う転写因子である。

IRF family にはN端側にアミノ酸配列上保存の良い領域が存在し、この領域がDNA結合能を有する機能ドメインであると同定されている。このDNA結合ドメインは既に立体構造の解かれている他のDNA結合蛋白質と一次構造上の相同性がない。そこでIRF-2のDNA結合ドメインであるIRF-2(113)の溶液構造に関して知見を得るため、多核多次元NMRによる解析を行った。

2、実験

全てのNMRスペクトルは、試料として¹⁵Nおよび¹³C/¹⁵N均一ラベルしたIRF-2(113)を用い、pH 5.6, 25°C で測定を行った。主鎖の帰属はHNCA, HN(CO)CA, HCACO, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB, CBCA(CO)NHによって、側鎖の帰属はHCCH-TOCSY, HCCH-COSYを用いて行った。また、IRF-2(113)は芳香族アミノ酸残基が多

keyword : 多重共鳴多次元NMR、立体構造解析、DNA結合蛋白質

○ふるいじゅんいち、うえがきこういち、やまざきとしお、しらかわまさひろ、はらだひさし、
たにぐちただつぐ、きょうごくよしまさ

い。そこで、シグナルの重なりを軽減するためにTrp, Phe各残基をそれぞれD化したサンプルを調製し、TOCSY, NOESYスペクトルを測定して芳香族アミノ酸残基の側鎖を帰属した。距離情報は ^{13}C および ^{15}N edited NOESYと、前述のTrp, Phe D化サンプルの2D-NOESYより、二面角情報はHMQC-Jスペクトルより得た。

得られたNOEはその強度により、強、中、弱に分類し、それぞれ 1.8 \AA ~ 3.5 \AA , 1.8 \AA ~ 4.0 \AA , 1.8 \AA ~ 5.0 \AA の距離制限とした。また、立体特異的帰属のついていないメチル、メチレン、芳香環プロトンについては、pseudo atom として扱った。全部で、1720個のNOE、35個の二面角、21個の水素結合を束縛条件として、構造計算を行った。構造計算はXPLOR 3.1 上で、simulated annealing法にて行った。

3、結果と考察

収束の良い得られた15個の構造の平均構造からのrmsd値はループ領域およびN端、C端を除いて、主鎖で 0.72 \AA であった。IRF-2(113)は4本の β 鎖からなる逆平行 β シートと3本のヘリックスを持ち、それらがコンパクトに折れ畳まった構造をしていることが分かった。得られた立体構造を他のDNA結合蛋白質と比較すると、HSF [3] や ETSドメイン [4] などと類似の構造を持つことが分かり、 $\alpha+\beta$ HTH (winged HTH) ファミリーに属するDNA結合モチーフをとる事が明らかとなった。しかしながら、IRF-2(113)は2番目のヘリックスの前に長いループ領域があるのを特徴としており、これは $\alpha+\beta$ HTH モチーフを持つ他のDNA結合蛋白質には存在しない。このループ領域からは long range NOE が出来なく、フレキシブルであると考えられる。このループには IRF family 内で保存されている塩基性残基があり、DNA結合において役割を果たしている可能性がある。



Figure

Best-fit superposition of the backbone of the 15 simulated annealing structures of the DNA binding domain of IRF-2

参考文献

- [1] Harada,H., Fujita,T., Miyamoto,M., Kimura,Y., Murayama,M., Furia,A., Miyata,T. and Taniguchi,T. (1989) *Cell*, **58**, 729-739.
- [2] Vaughan,P.S., Aziz,F., van Wijnen,A.J., Wu,S., Harada,H., Taniguchi,T., Soprano,K.J., Stein,G. and Stein,J.L. (1995) *Nature*, **377**, 362-365.
- [3] Vuister,G.W., Kim,S.J., Orosz,A., Wu,C. and Bax,A. (1994) *Structural Biology*, **1**, 605-613.
- [4] Donaldson,L.W., Petersen,J.M., Graves,B.J. and McIntosh,L.P. (1996) *EMBO J.*, **15**, 125-134.

1P49

¹⁵Nラベルした酸化型cytochrome c₃の連鎖帰属とヘム軸配位子の性質

(三菱重工業・基盤研¹、横浜国大・工²、東大院・工学系³、北陸先端大・新素材センター⁴) ○大村 友章¹、堀住 輝男²、河合 剛太³、大久保 忠恭⁴、渡辺 公綱³、阿久津 秀雄²

Assignments of ¹⁵N-labeled Cytochrome c₃ and Nature of Axial Histidyl Imidazole.

○Tomoaki Ohmura¹、Teruo Horizumi²、Gota Kawai³、Tadayasu Ohkubo⁴、Kimitsuna Watanabe³、Hideo Akutsu²

(¹Mitsubishi Heavy Industries, LTD.、²Yokohama National University、³University of Tokyo、⁴JAIST, Hokuriku)

Cytochrome c₃, found in sulfate-reducing bacteria, is a small tetraheme protein and has very low redox potentials. All of the 5th and 6th ligands of the four c-type hemes are histidyl imidazoles. In order to elucidate the relationship between the structure and the redox potentials of cytochrome c₃, we have prepared the ¹⁵N-labeled cytochrome c₃ and measured the heteronuclear multi-dimensional NMR spectra. Sequential assignments were carried out for most of backbone protons. Furthermore, we have observed the histidyl imidazole ring NH proton signals. It was suggested that the imidazolate character of the imidazole rings are responsible for the low redox potentials.

「緒言」cytochrome c₃は硫酸還元菌に特有で、1分子中に4つのc型ヘムを持つ分子量約14000の電子伝達タンパク質である。このタンパク質は他のc型チトクロムに比べて著しく低い酸化還元電位を持つことから、酸化還元電位と蛋白構造の関係を明かにするため多くの研究が行われてきた。我々はヘム鉄に配位するヒスチジンの性質が酸化還元電位に影響すると考えている。これを明かにするため、¹⁵Nラベルしたcytochrome c₃を作成し、アミノ酸配列帰属を行った。

「実験」各アミノ酸のスピンの同定のため、cytochrome c₃を¹⁵Nで均一にラベル、¹⁵Nでラベルした特定のアミノ酸を含む試料 (Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Phe, Ser, Thr, Val) を作成し、90% H₂O/10% D₂O (30 mMりん酸バッファー, pH7) に溶解し2mMのNMR試料とした。¹⁵Nで均一にラベルした試料はHSQC, TOCSY-HSQC, NOESY-HSQCを、選択ラベルした試料はHSQC測定を行った。測定はBruker AM400,

Key wards: cytochrome c₃, redox potentials, ヘム軸配位子, 主鎖の帰属

○おおむら ともあき、ほりずみ てるお、かわい ごうた、おおくぼ ただやす、わたなべ きみつな、あくつひでお

AMX500およびVarian Unity 750 plusを用いた。

「結果および考察」

(1) アミノ酸配列の帰属

酸化型cytochrome c_3 は常磁性の影響で緩和時間が非常に短く、スピン系の同定は困難であった。しかし、選択的ラベルを組み合わせることで主鎖の帰属を完成した。側鎖については常磁性の影響で、 α 、 β プロトンまでしか帰属できていないものがあるため、現在DQF-COSY, TOCSYを用いて帰属を進めている。また、HSQCスペクトルにおいてAsn, GlnのNH₂を5組観測したが、これは北村らにより訂正されたアミノ酸配列 (Asn 3残基、Gln 2残基) と一致するものであった。予備的なアミドプロトンのnOeパターンは結晶構造の結果とほぼ一致したが、N末において強度パターンに差異が生じていた。我々は結晶構造と溶液構造の間で、ヘムプロトンのnOeパターンからヘム1 (N末の近傍) に局所的な構造変化が起こっていることを報告したが、これを裏付けるものである。

(2) ヘム軸配位子の性質

HSQCスペクトルで異常なシフトを示す8つのシグナルを観測した (図1)。このシグナルは温度依存性の結果から常磁性の影響を受けることが分かった。更に、8つのシグナルのうち3つはヘム軸配位子のC2プロトンとnOeを生じた。これらのことから8つのシグナルはヒスチジンのイミダゾール環のNHである。このシグナルはpH5では全て観測できるが、pH7では低磁場の4つしか観測されなかった。これは各イミダゾールの化学的性質が異なり、イミドゾレートの性質が強いことを示している。イミドゾレートの性質はヘムの酸化状態を安定化させるため、酸化還元電位を低くする。この影響を明かにするため、8つのシグナルを4つのヘムに対応させるべく帰属を進めている。

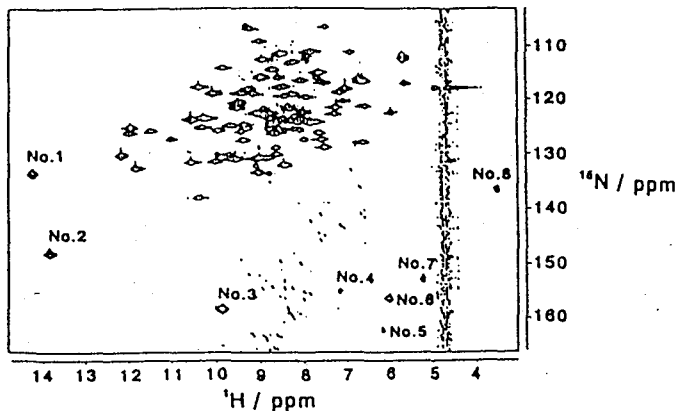


Figure 1. Section of a ^1H - ^{15}N HMQC of DvMF ferricytochrome c_3 at pH 5.0 and 30°C.

1P50

温度ジャンプ1D/2DNMRの進展
RNase Aのアンフォールディング
中間体の検出と構造

神戸大学大学院自然科学研究科
○川上 勝、赤坂 一之

Recent progress in the temperature-jump 1D/2D NMR spectroscopy
Detection and characterization of unfolding intermediates of RNase A

○Masaru Kawakami and Kazuyuki Akasaka
Graduate School of Science and Technology, Kobe University

By utilizing the recently developed microwave temperature-jump NMR probe, we have detected, for the first time, NMR signals from unfolding intermediates of ribonuclease A. The signals of the aromatic protons of the intermediates were specifically assigned by the State-Correlated 2D NMR spectroscopy. The results of the experiments indicate that the native structure of ribonuclease A is largely destroyed within 20 ms of the temperature jump. However, the conformations in the peptide segment Tyr 92-Tyr 97 and in the region involving Tyr 73 remain closely native immediately after the jump, which gradually transform into the heat-denatured conformations with time constants of approximately 200 ms and 50 ms, respectively. The former process is likely to be associated with the cis to trans isomerization reaction of the Tyr 92-Pro 93 peptide bond.

はじめに) 我々はこれまで誘電体共振器を導入したマイクロ波温度ジャンプNMR装置の開発、改良を続けてきたが、これまでに、装置の感度、静磁場の均一性及び温度ジャンプ後の試料内温度の均一性において、ほぼ実用に耐える装置の開発に成功した。本報告は、これをリボヌクレアーゼAの熱変性過程に適用し、初めてNMRによって、タンパク質のアンフォールディング過程における明確な中間体構造の検出に成功したものである。

実験) 基本となるNMR測定装置は日本電子製LA-400で、温度ジャンププローブとしては、 ^1H 回路には ^{13}C 用プローブ(JEOL NM-G40C5)の ^1H デカップリング用回路を使用し、これにラジオ波コイルとマイクロ波共振回路を自作した(第34回

キーワード: 温度ジャンプNMR、RibonucleaseA、アンフォールディング中間体、熱変性

かわかみ まさる、あかさか かずゆき

NMR 討論会予稿)。マイクロ波源は1.3 KWのマグネトロンである。マイクロ波照射時間(温度ジャンプ時間)は20ミリ秒で、温度ジャンプ幅は約20℃であった。試料管のスピンングによって温度ジャンプ後の試料の温度分布をできるだけ均一にするため試料管を新しくデザインした。これにより温度ジャンプNMRスペクトルの分解能と見かけの感度は向上した。この装置を用いて、リボヌクレアーゼAの熱変性過程を温度ジャンプ1次元NMRによって追跡した。さらに温度ジャンプを2次元NMRのシーケンスに組み込んだ『状態相関2次元NMR』によって、温度ジャンプ後の信号を、温度ジャンプ前の信号との相関によって帰属した。試料溶液は、100 mg/ml RNaseA in 99.96 % $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 3.45に調整した。温度は50℃から約70℃までジャンプさせ、FIDをサンプリングした。

結果と考察)ジャンプ直後の1次元スペクトル(Fig. 2-b)はすでにジャンプ前と大きく異なり、70℃の平衡条件下で熱変性したものと良く似た形状をしている。この時点ですでにリボヌクレアーゼAの高次構造は相当壊れていることが、直ちにわかる。しかし、詳しく検討すると芳香族プロトンの領域(6.5-7.7 ppm)の形状がランダムコイルのものとは明らかに異なり、ジャンプ後の時間経過とともにゆっくりと平衡での変性状態のものに変化してゆくのが観測された。ジャンプ前とジャンプ直後の2次元相関スペクトル(状態相関2次元NMR、Fig.3-a)から、この遅い変化を見せるシグナルは92、97と73番目のチロシン残基のものと判明した。これらの残基だけが遅れて変性状態の化学シフト位置に移るのが観測された(Fig.3-bと比較)。これらの残基は2本の β シートのちょうつがい部分にあたり、特に変化の遅い92、97番周辺の構造は、天然状態では93番に92-93のペプチド結合がシス配置をとるプロリン残基を含んでおり、このペプチド結合の遅いシストランス異性を律速過程としてその周辺の構造が壊れてゆくものと思われる。この研究によって初めて、この異性化反応には当のペプチド結合だけでなく、少なくとも92番目から97番目までの残基が関与するらしいことが明らかとなった。

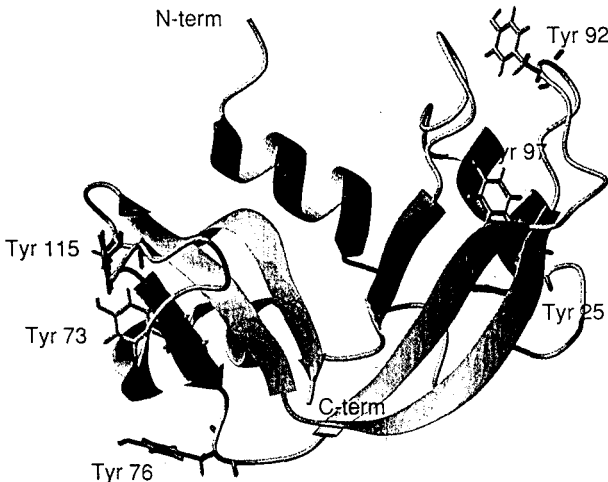


Fig.1. Schematic illustration of the native structure of bovine pancreatic ribonuclease A.

This model was taken from the brookhaven Protein Data Bank and drawn using the program MOLMOL.

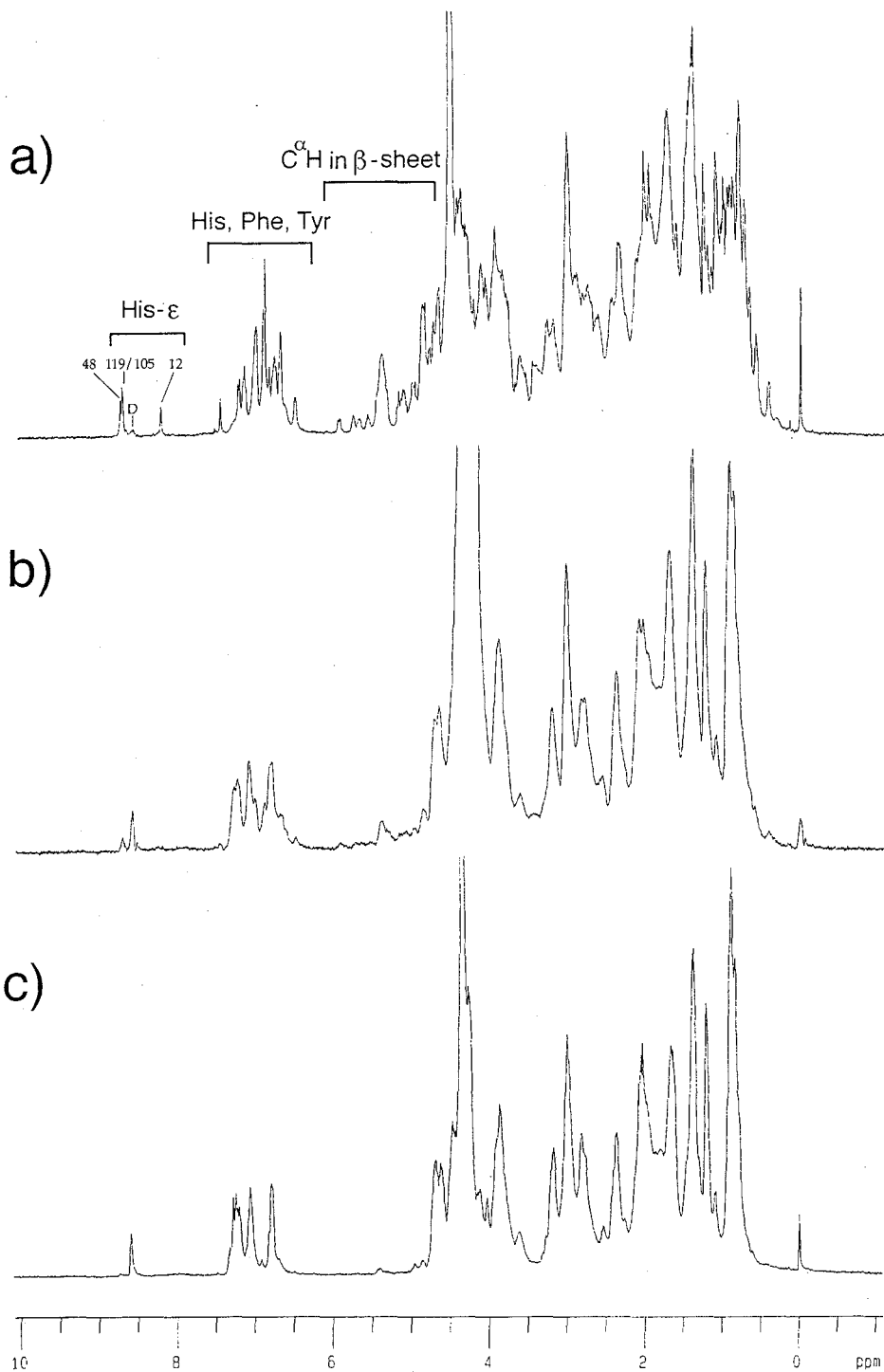
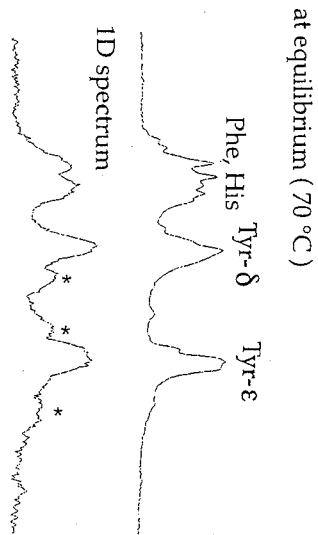
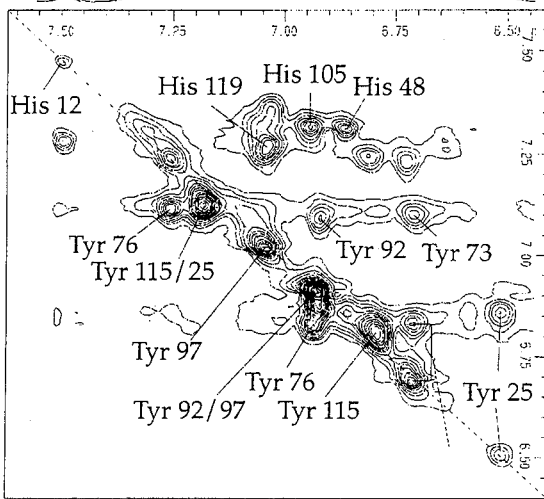


Fig . 2. 1D NMR spectra at different temperature of ribonuclease A in 2H_2O at pH 3.45. a) at 50 °C, c) at 70 °C in equilibrium and b) acquired immediately after the jump.

a)

before jump (50 °C)



b)

before jump (50 °C)

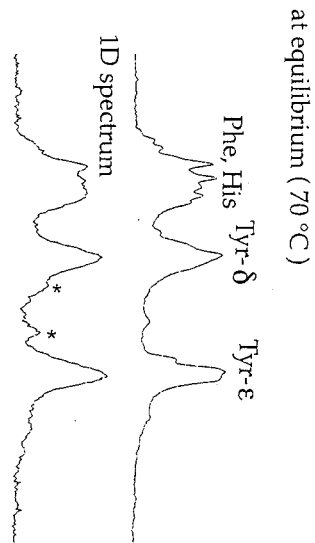
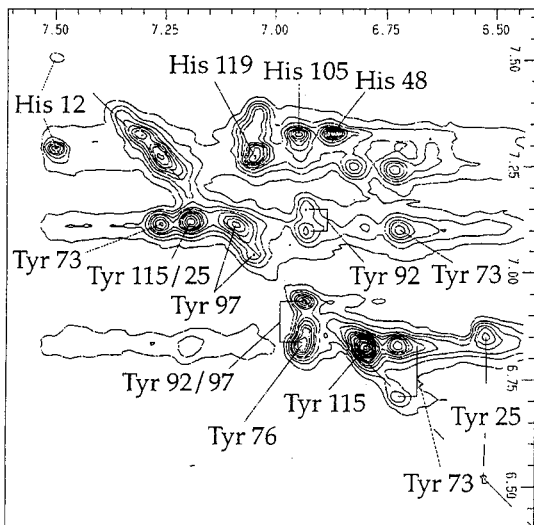


Fig. 3. Aromatic proton region of temperature-jump 2D NMR spectra of ribonuclease A in $^2\text{H}_2\text{O}$ at pH 3.45. a) between native state at 50 °C and just after the jump, b) between native state at 50 °C and 200 milliseconds after the jump.

1P51

750MHzでの高圧NMRの実験

-蛋白質構造変化の検出-

(神戸大理、自然科学) ○ 神村耕二、手塚智子、赤坂一之、山田博昭

High Pressure NMR experiments at 750 MHz

-Detection of Structural Changes in Proteins-

Graduate School of Science and Technology, Kobe University

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University

○ Koji Kamimura, Tomoko Tezuka, Kazuyuki Akasaka, and Hiroaki Yamada

We have constructed a high pressure NMR system operable at 17.6 tesla (750 MHz for proton), in which a quartz-made NMR sample cell is connected to a high pressure line outside the superconducting magnet. The pressure of the line can be manually controlled with a hand pump placed several meters away from the magnet. With this set-up, we could measure ^1H NMR spectra of proteins in solution under varying pressure from 1 to 2000 bar. One-dimensional and DQFCOSY measurements of hen egg lysozyme in $^2\text{H}_2\text{O}$ (pH 2) at 25°C as a function of pressure gave evidence that the three-dimensional structure of the protein changes with pressure within the folded manifold. In addition, pressure-induced unfolding could also be followed easily with this set-up.

蛋白質フォールディングとフォールディング構造の安定性は、遺伝子情報発現の最終段階に相当するが、未解決の重要な研究課題である。これらはまた温度、圧力、溶媒環境などの外部因子に強く依存している。これまで温度の効果がよく研究されてきたが、圧力は温度とは異なり、蛋白質変性に伴う体積変化 ΔV を測定できるなど、独自の熱力学的情報を与える。圧力下での構造安定性（圧力変性）に関する研究は主として1970年代に吸収や蛍光をプローブとした研究が行われたが、最近米国及び日本において、圧力による変性が高圧下でのNMR測定によって観測可能となり、新たな展開が始まっている。^{1,2}

一方、NMRの利点は熱力学量の測定以外にも、蛋白質の全体構造についての情報が得られることにある。圧力は、体積変化を通じて、蛋白質構造そのものの変化とも直接関係している。このような観点から、熱力学的観点のみならず、圧力をパラメーターとした構造変化の研究も、蛋白質研究にとって重要であろう。実際、変性しないフォールド

キーワード：高圧NMR、タンパク質、変性

かみむら こうじ、てづか ともこ、あかさか かずゆき、やまだ ひろあき

した条件下でも、高圧下では蛋白質分子の空間的圧縮が起こることが、様々な蛋白質の圧縮率の測定から知られている(月向らの研究)。またx線構造解析により、唯一つリゾチームについて、その全体構造が1000気圧下で変化することが、結晶状態で示されている(Richardらの研究)。

圧力によるフォールド構造の変化を構造情報源として有効なNMRによって検出できればそのメリットは大きい。ヘム蛋白質のヘム周辺の構造が圧力によって変化することが、常磁性シフトを用いた森島らの先駆的研究によって示されている。特に、特に分解能の高いNMRと組み合わせることができれば、通常の反磁性シフトによって構造の圧力依存性が測定できるかも知れない。

本研究では、山田の考案による石英製高圧セル方式を採用し、これを高圧ラインを通じて直接Bruker DMX-750の5mmプローブ内に組み込むことに成功し、超高磁場下での2000気圧までの任意の圧力下で、NMR測定可能なシステムを構築した。また実際にこれを用いて、蛋白質の圧力下での構造変化及び圧力下での変性について研究した。リゾチームの天然構造の¹H NMRスペクトルが加圧によって鋭敏に変化することを、初めてNMRによって検出することができた。この変化は、加圧によってリゾチームの天然立体構造そのものが変化することを示すものと考えられる。また、別の条件下では、加圧とともにリゾチームの天然立体構造の不安定化が起こり、圧力変性が観測された。

References

1. S. D. Samarasinghe, D. M. Campbell, A. Jonas, and J. Jonas, *Biochemistry* 1992, 31, 7773-7778.
2. T. Yamaguchi, H. Yamada, and K. Akasaka, *J. Mol. Biol.* 1995, 250, 689-694.

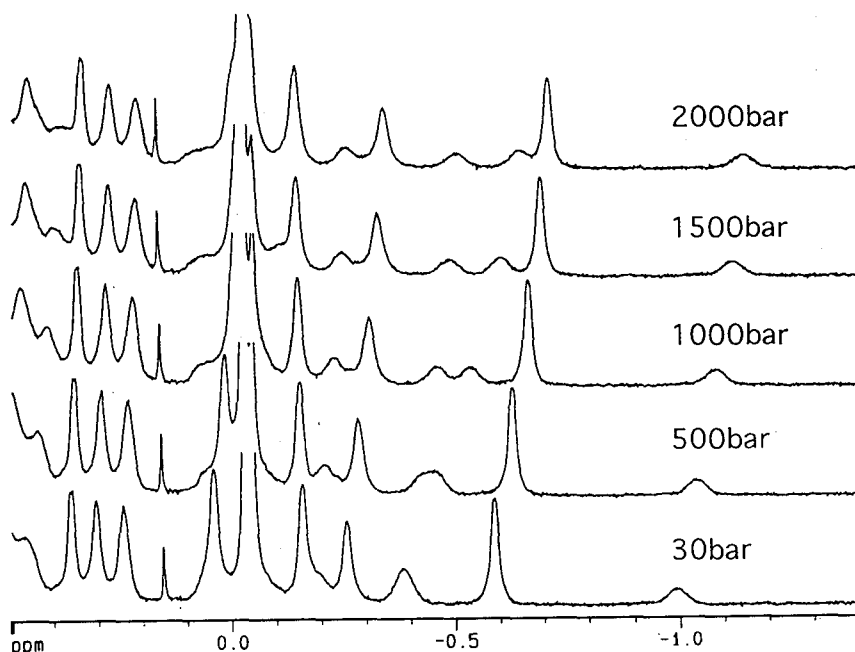


Fig.1. ¹H NMR spectra of lysozyme (pH2.0 in ²H₂O) under different pressures, measured at 750MHz at 45°C (the high field region).

1P52

大腸菌RNAポリメラーゼ α サブユニットのドメイン間リンカーのダイナミクス

Dynamics of the inter-domain linker of *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit

¹阪大蛋白研、²国立遺伝研

O田栄浩¹、山崎俊夫¹、大友崇紀¹、石浜明²、京極好正¹

OY. H. Jeon¹, T. Yamazaki¹, T. Otomo¹, A. Ishihama², Y. Kyogoku¹

ABSTRACT The dynamic properties of the C-terminal one-third of the α subunit of RNA polymerase were investigated. The intact α subunit gave almost the same NMR spectral pattern as the isolated C-terminal fragment, indicating that the C-terminal domain retains the same conformation as the isolated fragment and its motion is independent of that of the associated N-terminal domain. Analysis of the NMR dynamics data for the intact α subunit indicates that at least 13 residues between the N- and C-terminal domains showed distinctly higher motional flexibility than the structured parts. This flexible linker may provide locational freedom for the C-terminal domain in different kinds of initiation complex. The dynamics data also revealed that the residues in the contact site for DNA and transcription factors exhibited higher mobility than other secondary structural elements.

[序] 大腸菌RNA polymerase (RNAP)の α サブユニットC末端の約100残基のドメイン(α CTD)は、CRP, OxyR, OmpR等の転写因子蛋白質、また他のプロモータでは、プロモータの上流伸張部位のDNA(UP エレメント)に結合して、転写の活性化に関与することが知られている。最近 α CTD の立体構造がNMRによって決まったが¹、Phe249よりもN末端側約16残基からはlong-range NOEが見えなく、この部分は特定な構造を取っていないフレキシブルなループになっていると思われる。我々は、単離した α CTDとインタクトの α サブユニットの主鎖の運動性を調べることによって、そのフレキシブルなループが単離した α CTDだけではなく、インタクトの α サブユニット中にも存在することを示し、またその長さを調べた。

[実験] 単離した α CTDとインタクトの α サブユニットの¹H-¹⁵N相関スペクトルを用いて、この2つの分子の内部運動性を主鎖のアミドシグナルの緩和時間測定によって分析した。インタクトの α サブユニットのシグナル幅や¹H-¹⁵N NOEの結果等からフレキシブルなリンカーの長さを推定した。さらに、model free analysisと主鎖のアミド水素核の溶媒との交換の観測を行い、その結果を α CTDの立体構造上にマッピングした。

キーワード：RNAポリメラーゼ、NMR緩和時間、分子内部運動性、ドメイン間リンカー

でんよんほう、やまざきとしお、おおともたかのり、ねぎしともふみ、ふじたのぶゆき、いしはまあきら、きょうごくよしまさ

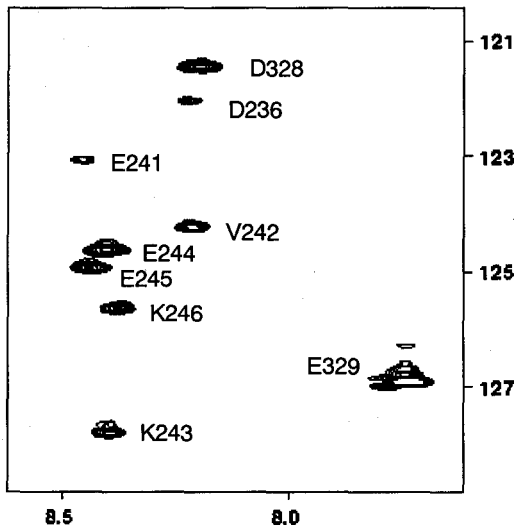


Fig.1 Signals which show the negative contour levels in the ^1H - ^{15}N NOE experiment of the α subunit. The assignments of the amide resonances are indicated.

[結果と考察]

1. α サブユニットの中での α CTDの独立的な運動性

インタクトの α サブユニットの ^1H - ^{15}N 相関スペクトルは、約100残基の単離した α CTDのスペクトルとほとんど同じシグナルを示した。つまり、普通の溶液条件では、N末端部分のシグナルは激しいブロドニングによって観測されなく、C末端部分だけが観測される。これは、N末端ドメインによる会合によって非常に大きい会合体を形成していることに起因するものと考えられる。約240残基の単離したN末端ドメインのスペクトルも同じ結果を示した。一方、C末端部分約100残基は独立的な運動性を持ち、比較的速い挙動をするため、観測可能なシグナルをあたえ、それは、単離した α CTDでのシグナルとほとんど同じものだった。

2. 両ドメイン間リンカーの運動性と長さ

単離した α CTDのF249よりもN末端側17残基は、構造を取っているドメイン部分に比べて非常に高い運動性を示し、インタクトの α サブユニットの場合も同様の結果だった。つまり、インタクトの α サブユニットの中でもフレキシブルなループが存在することが証明された。このフレキシブルなループのシグナルは、インタクトの α サブユニットの中でD236まで確認された。また、V237からN末端側はシグナルのブロドニングが激しくなり、N末端ドメインの会合体に近いと見られる。結果的に、両ドメイン間のリンカーは、最低13残基以上 ($\geq 46\text{\AA}$) の長さを持っていると考えられる。それは、異なる転写活性化メカニズムにおいて、異なる配置を可能とする自由度を与える役割を説明するものだと考えられる。

3. α CTDの運動性

Model free analysisの結果、単離した α CTDの回転相関時間 τ_m は、8.4 nsだった。 ^1H - ^{15}N ベクトルの動きの空間的な制約性を示すパラメータであるgeneralized order parameter S^2 の分析によると、E248までのN末端ループ部分以外に、M316以後のC末端ループ部分と、helix 3 と4 の間のループ部分が比較的高い運動性を示し、2つのhelical turnの部分が最も堅い構造になっていることを示した。一方、主鎖のアミド水素核の溶媒との交換は、基本的には2次構造を取っているhelixとhelical turn部分が遅いが、その中helix 1とhelix 2のN末端側半分は、早い交換を示した。その部分はhelix 3と4の間のループ部分と共にDNA結合表面を形成している。

ref) 1. Jeon, Y.H. et al. *Science* **270**, 1495-1497 (1995)

HIV-2 ヌクレオキャプシドタンパク質の N 端側部分ペプチドの構造解析

○小寺義男¹, 塚原智典², 小松博義², 戸澤秀樹², 金載一³,
佐藤一紀³, 前田忠計¹, 河野俊之³
(¹北里大・理, ²北里大・医療衛生, ³三菱化学生命研)

Structural analysis of the N-terminal zinc finger domain of HIV-2 nucleocapsid protein
Yoshio Kodera¹, Tomonori Tsukahara², Hiroyoshi Komatsu², Hideki Tozawa², Jae-II Kim³,
Kazuki Sato³, Tadakazu Maeda¹ and Toshiyuki Kohno³

^{1,2}Kitasato University, ³Mitsubishi Kagaku Inst. of Life Science

The HIV gag nucleocapsid protein promotes viral RNA dimerization and encapsidation. The protein, having two zinc finger motifs, Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys, specifically recognizes the viral RNA, the mechanism of which has not yet been clarified. As the first step to investigate this mechanism, ¹H-NMR was applied to the N-terminal zinc finger domain of HIV-2 to determine the three dimensional structure. Typical two dimensional NMR spectra have been measured and the complete sequence specific assignments was finished. The three dimensional structure of this peptide will be discussed in the conference.

エイズの病原ウイルスである HIV の形態形成は、ヌクレオキャプシドタンパク質 (NCタンパク質) がウイルス遺伝子 RNA に結合することによって始まる。この結合部位は HIV-1 では NCp7, HIV-2 では NCp8 と呼ばれている。両方とも C-X2-C-X4-H-X4-C (CCHC) の 14 残基からなる zinc finger motif (ZFM) を 2 つ含み、N 端側の ZFM と C 端側の ZFM は 7 残基のアミノ酸でつながれている。

72 アミノ酸残基よりなる NCp7 についてはその立体構造が NMR によって解明されている¹⁾。にもかかわらず、NCp7 が細胞内で量的に非常に多い宿主由来の RNA の中でウイルス RNA に選択的に結合するメカニズムは不明である。本研究では、現時点では NCp7 に比べて知見の著しく少ない HIV-2 の NCp8 に注目し、構造活性相関を明らかにすること。さらに、その結果と、既に研究されている NCp7 の構造を比較して HIV-1, HIV-2 両方の NC タンパク質のウイルス RNA 認識機構について議論することを目的としている。

NCp8 のアミノ酸配列を図に示す。

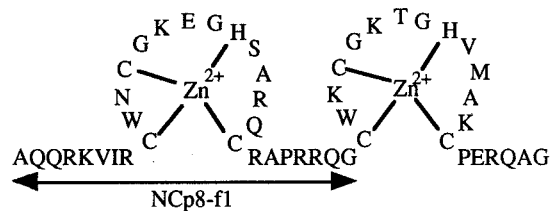
NCp8 の N 端側の ZFM を含む 29 残基からなるペプチド (NCp8-f1) は、Zn²⁺ 配位下で RNA 結合活性を示すことが知られている²⁾。NC タンパク質の RNA 認識機構研究の第一段階として、我々はまず、このペプチドの Zn²⁺ 配位状態での立体構造を決定するために NMR 測定を行った。NCp8-f1 は化学的に合成した試料を用い、CD スペクトル測定によって、水溶液中で Zn²⁺ を安定に配位させる方法を決定した。この方法を用いて NMR 試料を調製し、温度 278 K, 288 K, 298 K で ¹H-NMR 測定を行った。常法に従って全信号を帰属した結果、Zn²⁺ 配位に伴い、Zn²⁺ と直接結合する Cys, His の側鎖プロトンの chemical shift が大きく変化することを確認した。討論会では、NMR より決定した NCp8-f1 の立体構造について議論する予定である。

1) Morellet, N., Jullian, N., Recquigny, H. D., Maigret, B., Darlix, J. L. and Roques, B. P. (1992) *EMBO. J.* 11, 3059-3065

2) Komatsu, H. and Tozawa, H. (1994) *AIDS* 8, 1227-1235

HIV-2, NCp8, zinc finger motif, NMR

こでらよしお、つかはらともり、こまつひろよし、とざわひでき、きむじえいる、さとうかずき、まえだただかず、こうのとしゆき



(北大院工¹・院理²、Calgary大³) °平沖敏文¹、矢沢道生²、J. Aramini³、H. J. Vogel³

Lead-207 NMR Studies on Calcium-binding Proteins

T. Hiraoki¹, M. Yazawa², J. Aramini³, and H. J. Vogel³

¹Department of Applied Physics and ²Chemistry, Hokkaido University, Sapporo and

³Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

The Ca²⁺-binding sites of parvalbumin(Pa) and Calmodulin(CaM) were characterized by ²⁰⁷Pb NMR spectroscopy. Two and four resonances were distinctly observed in chemical shift range of over 500ppm for Pa and CaM, respectively, corresponding to ²⁰⁷Pb²⁺ bound to the helix-loop-helix Ca²⁺-binding sites. Such a large chemical shift dispersion illustrates the remarkable sensitivity of it to subtle differences in the environment of the protein bound ²⁰⁷Pb. Line width and T₁ of CaM exhibit characteristics of the chemical shift anisotropy and chemical exchange relaxations.

カルシウム結合蛋白質の中で“EF-hand”蛋白質は、共通のカルシウム結合モチーフ(helix-loop-helix)を持ち、Ca²⁺は12残基からなるloop部分に結合する。Ca²⁺結合部位の構造は分子内・蛋白質間で極めて相同性が高く、Ca²⁺に対する7個の配位子はすべて酸素原子である。この構造や動的挙動に関して、配位金属イオンを直接観測する⁴³Ca-や¹¹³Cd-NMRの測定が行われ来た。1) 本研究では、金属蛋白質を調べる新規プローブとして、I=1/2の²⁰⁷Pbを用いて、EF-hand蛋白質のparvalbuminとcalmodulinのCa²⁺結合部位を調べた。²⁰⁷Pbの共鳴周波数は11.4Tで104.4MHz、相対感度は¹³Cの約12倍、化学シフト範囲は16000ppmにもわたる。イオン半径はCa²⁺ (1.00 Å)より大きく1.19 Åである。

²⁰⁷Pb-NMRスペクトルは主に104.4 MHz (11.4T)、パルス幅~70°、観測幅100 kHz、10 mmプローブで得た。化学シフトは0.1M ²⁰⁷Pb(NO₃)₂/D₂Oを外部基準に用いた。用いた試料はcarp (pI4.25)とpike (pI5.0)のparvalbumin、大腸菌で発現させたCaMとC端側フラグメントTR₂Cである。測定は0.1M KCl, 25%D₂O中で行った。

図1に²⁰⁷Pb²⁺を飽和したparvalbuminの²⁰⁷Pb-NMRスペクトルを示す。二つのシグナルは、各parvalbuminの2個のCa²⁺結合部位(CD,EF)に結合した²⁰⁷Pb²⁺に対応する

キーワード; Pb-207、Ca結合蛋白質、化学シフト異方性

ひらおきとしふみ、やざわみちお、J. Aramini, H. J. Vogel

ことが、Ca²⁺滴定により分かった。シグナルの線幅は750~1250 Hzある。両結合部位の立体構造は極めて類似しているにもかかわらず、種により化学シフト値がかなり異なり、しかも両部位の化学シフト差が350~450 ppmもあり、²⁰⁷Pbの化学シフトがごくわずかな環境変化に極めて敏感に反映することを示している。これは両部位の化学シフト差が3~4 ppmしかない¹¹³Cd-NMRに比べ、対照的である。Lu³⁺との競合反応を利用して、高磁場側のシグナルがEF部位の²⁰⁷Pb²⁺と帰属できた。

CaMは4個のCa²⁺を結合し、C端側の2個がCa²⁺に対する強い結合部位である。アポCaMに²⁰⁷Pb²⁺を滴定すると、4個のシグナルが同時に観測され、それらのシグナル強度は4倍等量加えるまで増加する(図2)。これはCaMに対するCa²⁺とPb²⁺の結合順序が異なることを示しており、¹H-NMRにより確認された。一方TR₂Cでは2個のシグナルが観測される(図2)。これらの化学シフト値はCaMのシグナルの2つと一致するので、これらがC端側の2個の²⁰⁷Pb²⁺に帰属できる。C端側のシグナルの線幅が約1000Hzなのに対して、N端側のそれは1500~2000Hzあり、かなり異なる。線幅はB₀²依存性を示し、緩和が化学シフト依存性によるものであることを示唆している。一方、室温におけるT₁は~20ms(9.4T)であり、温度上昇にともない、線幅が増加するので、T₂には化学交換による寄与も含まれていることが判明した。

1) S. Forsén, C. Johansson, and S. Linse, *Methods Enzymol.*, 227, 107(1993); H. J. Vogel and S. Forsén, *Biol. Mag. Reson.*, 7, 249(1987); J. E. Coleman, *Methods Enzymol.*, 227, 16(1993)

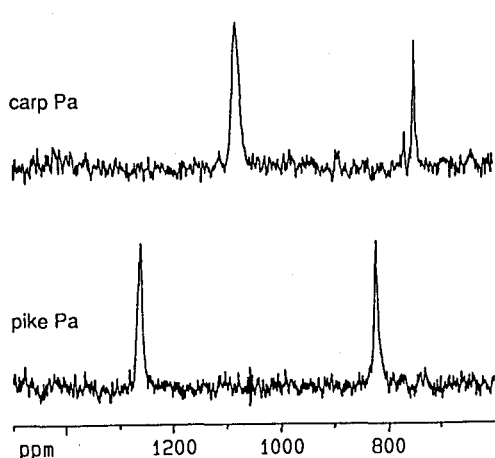


Fig. 1 ²⁰⁷Pb-NMR spectra of carp and pike parvalbumins at 24°C

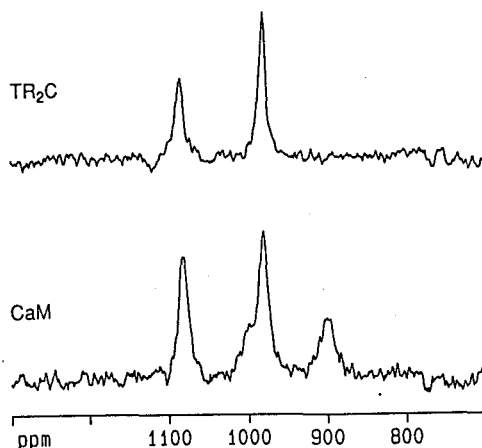


Fig. 2 ²⁰⁷Pb-NMR spectra of calmodulin and TR₂C at 24°C

セントロメア結合タンパク質CENP-B
DNA結合ドメインRP1の
高次構造およびその認識DNAとの相互作用の解析

(東大・理・生物化学¹, 理研・細胞情報伝達², 名大・理・分子生物³)

○岩原 淳二^{1,2}, 木川 隆則², 舩本 寛³, 岡崎 恒子³, 横山 茂之^{1,2}

Solution structure of human CENP-B DNA binding domain RP1
and its interaction with CENP-B box DNA

*Cellular Signaling Laboratory, the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),
Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo, and
Department of Molecular Biology, School of Science, Nagoya university*

Junji Iwahara, Takanori Kigawa, Hiroshi Masumoto, Tsuneko Okazaki,
and Shigeyuki Yokoyama

CENP-B is considered to play an important role in the centromere-structure formation of mammalian chromosomes. The N-terminal part of CENP-B is a 15-kDa DNA-binding domain (DBD), consisting of the two repeating units, RP1 and RP2. The DBD specifically binds to the CENP-B box sequence (17 bp) in the centromere DNA. In this study, we determined the solution structure of the human CENP-B DBD RP1, by multi-dimensional ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR methods. The structure of the CENP-B DBD RP1 is similar to those of transcription factors such as homeodomains and the Myb DBD repeating units, although CENP-B is not a transcriptional factor. When mixed with the DNA fragment that contains the CENP-B box, some signals in the HSQC spectrum of the CENP-B DBD RP1 disappeared or shifted. Mapping of these perturbed residues on the tertiary structure of the CENP-B DBD RP1 revealed that the DNA recognition mode of the CENP-B DBD RP1 is similar to those of the homeodomains.

染色体セントロメア領域は、染色体分配において中心的な機能を担う領域であるが、現在のところ、その構築原理に関する構造生物学的知見は、ほとんど得られていない。CENP-B タンパク質は、哺乳類染色体のセントロメア領域の構造形成に重要な役割を果たすと考えられている。CENP-B の DNA 結合ドメイン（二つのリピート構造 RP1, RP2 よりなる）と、その結合配列（CENP-B ボックス）との相互作用は、セントロメア構造形成の足場として非常に重要であると考えられる。今回、我々は、NMR により、ヒト CENP-B の DNA 結合ドメイン RP1（以下 CENP-B DBD RP1）の高次構造、および CENP-B ボックス DNA との相互作用を解析した。

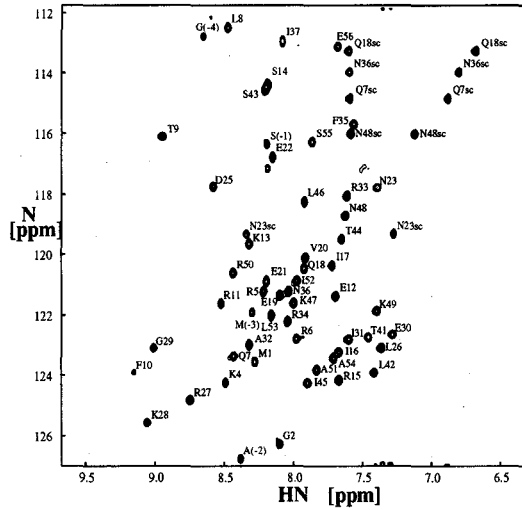
6xHis tag が付加された CENP-B DBD RP1 の大量発現系を構築して、Ni-NTA および phosphocellulose により精製をおこない、約 2 mM の CENP-B DBD RP1 試料を調製した。Bruker社 AMX-600 および DMX-500 を用いて、2D NOESY, 2D HMQC-J, 3D ¹⁵N NOESY-HSQC, 3D ¹⁵N TOCSY-HSQC, 3D HNHB, 3D ¹³C NOESY-HSQC, 3D HCCH-TOCSY, 3D CT-HNCA, 3D CT-HN (CO)CA 等のスペクトルを測定した。シグナルを帰属した後、X-PLOR による計算をおこなった。得られた 80 個の構造のうち、エネルギーの低い 20 個についての主鎖の r. m. s. d. は、平均構造に対して 0.48 ± 0.17 Å であった。

CENP-B, 溶液構造, タンパク質-DNA相互作用

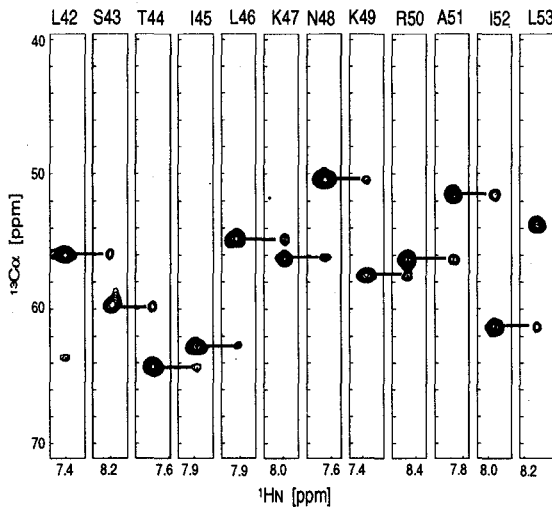
いわはら じゅんじ, きがわ たかのり, ますもと ひろし, おかざき つねこ,
よこやま しげゆき

CENP-B DBD RP1 は、4本の α ヘリックス (helix 1, F10-N23; helix 2, K28-F35; helix 3, S40-N48; helix 4, K49-A54) から構成されており、helix 2から helix 3 にかけて、「ヘリックス -ターン-ヘリックス構造」をもつことがわかった。この helix 1 から helix 3 までは、ホメオドメインや Myb の DBD と類似している。セントロメア領域の構造タンパク質である CENP-B が、転写因子と同様の DNA 結合モチーフをもつことは興味深い。

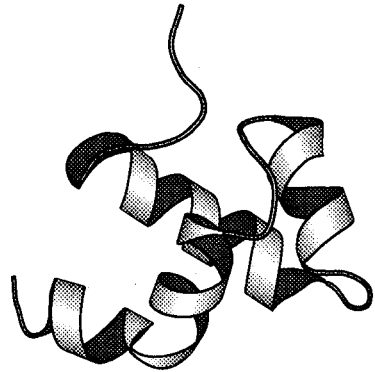
さらに、CENP-B ボックスを含む DNA フラグメントを同じ溶液条件で共存させた試料の解析から、CENP-B DBD が R5, R6 周辺および helix 3 周辺で DNA と相互作用することがわかった。したがって、CENP-B の DNA 認識様式も、ホメオドメインと類似していると考えられる。また、DNA のイミノプロトンの化学シフト変化から、CENP-B DBD RP1 が CENP-B ボックス上の配列 TCG 周辺と相互作用することがわかった。



^1H - ^{15}N HSQC spectrum of CENP-B DBD RP1
(^{15}N dimension is folded)



Sequential assignment using 3D CT-HNCA



Ribbon representation of the solution structure of CENP-B DBD RP1

1P56

Dextran の特異的 K^+ イオン取込みによるゲル化と架橋構造 :

^{39}K -NMR および PFGSTE-NMR による研究

(東水大¹, Fraunhofer-IBMT²) ○渡部徳子¹, Johanness Leisen²,
Klaus Gersonde²

Enhancement of the Gelation Process in Dextran Solutions by Selective K^+ Binding. ^{39}K -NMR and Pulsed Field Gradient Stimulated Echo (PFGSTE) NMR Study.

○Tokuko Watanabe¹, Johannes Leisen² and Klaus Gersonde²,

¹Biomaterial Chemistry, Tokyo University of Fisheries, Minato-ku 108, Tokyo, Japan and

²Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik, D-66386 St.Ingbert and Fachrichtung Medizintechnik, Universität des Saarlandes, D-66421 Homburg/Saar, Germany.

Dextran gel formation is enhanced in the presence of potassium ions. K^+ ions are selectively trapped and accumulated in cages formed by six oxygen atoms of the glucose units of the polymer chains (five oxygen atoms of hydroxyls and one of ring oxygen). The size of these cages fits perfectly to the ionic radius of K ion. An analogous situation is known for K ion captured in 18-crown-6 ether and natural ionophors. Other cations, such as Li , Na , Rb , Cs , Mg , Ca and Ba ions, do not fit and therefore are not trapped in dextrans. ^{39}K -NMR chemical shift and line width studies as well as water proton NMR diffusion measurements elucidate the gelation mechanism of dextran. Water diffusibility studies indicate that the interaction between water and cation plays an important role in the capture mechanism of K ions. The activity of K ion in dextran could be a model for the intracellular function of K ions (control of cytoplasmatic processes).

[序] バリノマイシンやクラウンエーテルのようなイオノファは特定のイオンを選択的に捕捉することが知られている。著者らはデキストランは非イオン性多糖であるにもかかわらず K^+ イオンによってのみゲル化することを明らかにした⁽¹⁾。3本の糖鎖からの3個のグルコース環中の6個の酸素原子がつくるクラウンエーテル様のポケットに K^+ イオンが取り込まれることにより架橋構造が形成されること、およびゲル骨格ドメインの密度やポアサイズを水プロトンの緩和時間やゲル中の水の拡散挙動から推定した⁽¹⁾。本報告においては、架橋点の形成過程を ^{39}K -NMR により検討することを目的とする。また、 K^+ イオン以外のアルカリ金属及びアルカリ土類金属イオンではゲル化は促進されないことが明らかとなったので、なぜ K^+ イオンのみが特異性を示すのかをあわせて議論したい。

[実験] デキストラン T70 (Pharmasia) の水溶液 (高分子濃度 5~30%) に 80°C で塩化カリウムを 0.5~2.5 M の濃度範囲で加え、よく攪拌する。室温に静置する事によりゲル化する。ゲル化に要する時間は濃度に依存し、1~4 日程度である。 K^+ イオン以外の金属イオン (Li^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}) の濃度は 1.5 M である。

NMR の測定は MSL400 (Bruker) により 23°C で行った。 ^{39}K -NMR の共鳴周波数は 18.7 MHz である。水の拡散係数の計測にはパルス磁場勾配法を用い、得られた stimulated echo を FT し、 Δ (拡散時間) = 60 ms、 δ = 1 ms、 G (磁場勾配) = 25~300 mT/m における水の信号強度の減衰から見かけの拡散係数を計算した。

ゲル、デキストラン、水、拡散、 ^{39}K -NMR

○わたなべ とくこ、ヨハネス ライゼン、クラウス ゲルゾンデ

[結果と考察] Fig.1 に KCl 水溶液 (1.5M)、デキストラン(T70/K⁺)ゲル、および 18-Crown-6/K⁺錯体水溶液の ³⁹K-NMR スペクトルを示す。デキストラン/K⁺ゲル中の K⁺イオンと 18-Crown-6/K⁺中の K⁺イオンは化学シフト、線形共に極めて類似しており、K⁺イオンの周囲のリガンドの配位状態がクラウンエーテル中のそれと同様であることが ³⁹K-NMR においても検証された。Fig.2 および Fig.3 に 1 日後のゲル試料の ³⁹K 化学シフトのデキストラン濃度依存性および K⁺濃度依存性を示す。前者においては T70 デキストラン 20w/w% 付近から、後者においては KCl 濃度 1M 付近から、ゲル形成に伴う急激な高磁場シフトが観測された。その後 2~3 日かけて徐々に平衡に達する。このゲル化の過程は、ゲル中の水の制限拡散の解析から得られた結果と一致している。いわゆる true gel が形成されるのは T70 デキストラン濃度 25w/w%、KCl 濃度 1.5M であり、この時の化学シフトは酸素に 6 配位された K⁺イオンの化学シフト値にほぼ等しい。吸収線の半値幅も化学シフトと呼応した変化を示し、ゲル形成の開始と共に急速な広幅化が見られた。

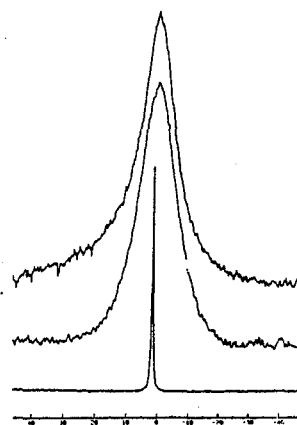


Fig. 1 Typical ³⁹K-NMR spectra (23 C). (a) 1.5 m of KCl aqueous solution, (b) crownether system with 1.5 m of KCl, $\frac{[K^+/18\text{-crown-6}]_{\text{complex}}}{[K^+]_{\text{free}]}$, (c) dextran gel at T70(30%) with 1.5M KCl. A standard of the chemical shift: infinitely diluted KCl aqueous solution. The zero value was determined by the least square fitting of chemical shifts v.s. activity of KCl aqueous solution.

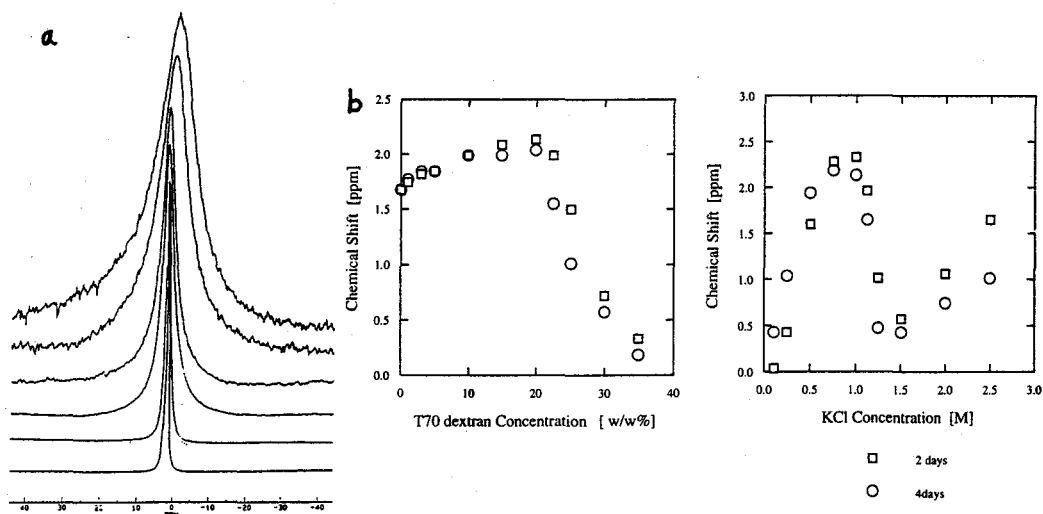


Fig. 2 (left) (a) ³⁹K-NMR spectra measured at 23C and (b) dextran T70 concentration dependence of the chemical shift. Gel has been formed in a shadowed range. Fig. 3 (right) KCl concentration dependence of the chemical shift of ³⁹K resonance in T70(30%) solution. Gel has been formed in a shadowed range.

KCl 以外のアルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオンを加えてもゲルは形成されず、粘性が高いゾル状態のままであった。このことは系中の水の拡散状態に反映された。ゲル中の水の拡散はゲル骨格により制限されるため見かけの拡散係数はゾル中のそれに比べて小さく観測される^(1, 2)。Fig.4 に種々の金属イオン 1.5M を含んだデキストラン T70(30%)水溶液中の水の見かけの拡散係数 ($\Delta=60\text{ms}$) を示した。(a)および(b)の横軸はそれぞれイオン半径および ΔE (イオンに最近接している水分子がイオンに隣接しない他の瞬間的な平衡位置に飛躍するための活性化エネルギーと、水中の水分子が隣接した平衡位置へ飛躍するための活性化エネルギーとの差)である。(a)において K^+ イオンと Ba^{2+} イオンが、また(b)においては K^+ イオンのみが一様な変化からのずれを誘起したことが読みとれる。デキストラン水和物の結晶構造から推定した架橋点の K-O 間距離 (0.233-0.309、平均 0.268nm) はちょうど 18-crown-6/ K^+ における K-O 間距離 (0.277-0.283nm) と同程度であり、また K^+ とOのファンデルワールス半径の和 (0.278nm) ともほぼ等しい。 Ba^{2+} イオンだけはこのポケットに捉えられる(架橋を形成できる)大きさをもつが、その他のイオンは大きすぎたり、小さすぎると架橋構造を形成できない。実際には Ba^{2+} イオンはゲルを形成しないので、イオン半径ばかりでなく他の要因が関連しているはずである。(b)に示したように Ba^{2+} イオンの ΔE は正、すなわち水和構造が安定であるのに対し、 K^+ イオンの ΔE は負、すなわち水和構造が不安定であることが、デキストランの形成するポケットに取り込まれるかどうかに影響していると考えられる。

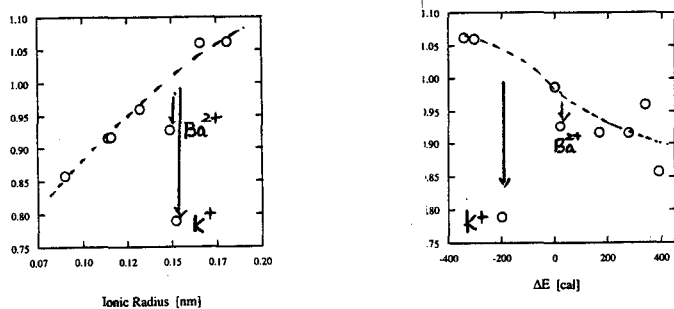


Fig. 4 Apparent diffusion coefficient of water at $\Delta=60\text{ms}$, plotted v.s. (a) ionic radius of metal ion and (b) difference between activation energy of water for free-to-free states transition and that for free-to-hydration states transition.

[結論] デキストランの糖鎖は水溶液中でイオノファ様の電子密度の高いポケットを形成することができ、とくに K^+ イオンを選択的に取り込むことが確認された。この結果、高分子濃度が充分であれば、 K^+ イオンと陰性のポケット間の電気的クーロン相互作用(K^+ -bonding と呼ぶことにする)による架橋点が連続的に形成され、ゾルからゲルに転移すると結論される。 K^+ イオンに対する選択的な結合性は他の多糖類においても観測されているが、生体内の糖鎖の関与する現象においてもデキストランで見られたような糖鎖のイオノファ的な挙動が関与しているのではないかと推定される。

[文献]

- 1) T. Watanabe, A. Ohtsuka, N. Murase, P. Barth and K. Gersonde, *Magn. Reson. Med.*, **35**, 697-705 (1996).
- 2) A. Ohtsuka and T. Watanabe, *Carbohydrate Polym.*, **26**, in press (1996)

1P57

固体 ^{13}C - ^{31}P 双極子相関、 ^{31}P 同種核双極子相関 NMRによるATPの ^{31}P シグナルの帰属

(横浜国大・工) ○櫻井 智司、藤原 敏道、阿久津 秀雄

^{31}P Signal Assignment of ATP in Solid by ^{13}C - ^{31}P
and ^{31}P - ^{31}P Dipolar Correlation NMR

○Satoshi Sakurai, Toshimichi Fujiwara, and Hideo Akutsu

Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Yokohama National University

A solid-state ^{31}P -NMR spectrum of $\text{Na}_2\text{ATP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ has three signals but the spectrum of $\text{Na}_2\text{ATP} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ has five signals. Phosphate groups in two ATP molecules in a crystal unit lattice have very similar conformations in the dihydrate state while the conformations are different in the trihydrate state. We measured two-dimensional ^{13}C - ^{31}P and ^{31}P homonuclear dipolar correlation solid-state NMR for natural abundance ATP. Signals of each hydrate state was assigned on the bases of distances. As results, three resonances for a conformer in trihydrate had chemical shifts analogous to those in dihydrate state. However, the resonance of γ -phosphorus for the other conformer was found to shift to higher field exceeding the resonance of α -phosphorus, which is different from the assignments for dihydrate and solution states.

【緒言】

溶液NMRでは、スピン間結合を利用したタンパク質など生体高分子の全構造解析を目的とした方法論が確立している。また、固体状態の生体分子を対象に同様な ^{13}C や ^{15}N のスピン間結合を利用した方法論の開発が試みられており、2次元同種核双極子相関法、2次元異種核双極子相関法などが開発されている¹⁾。そこで、分子構造と化学シフトの相関を明かにするために、X線構造解析により詳しい解析がなされている固体状態でのATPの ^{31}P -NMRスペクトルの帰属を、2次元 ^{31}P 同種核双極子相関法、2次元 ^{13}C - ^{31}P 双極子相関法を用いて行った。スピン1/2である ^{31}P は天然存在比100%なので、 ^{13}C 天然存在比のATPでスペクトルを得ることが出来た。ATPは生体中において活動のエネルギーを得るために利用されている重要な物質である。 Na_2ATP の固体

ATP、 ^{31}P -NMR、 ^{13}C - ^{31}P 双極子相関法、 ^{31}P 同種核双極子相関法

○さくらい さとし、ふじわら としみち、あくつ ひでお

^{31}P -NMRスペクトルは二水和塩では三本、三水和塩では五本のシグナルを示すことが知られている²⁾。それはX線構造解析の結果より単位格子中の2種類のATP分子のリン酸基部分の配座が二水和塩ではよく似ているのに対し、三水和塩では大きく異なっているためであると考えられている³⁾。これまでは溶液NMRとの比較で帰属が行われており、 ^{31}P シグナルが構造や電荷などの変化でよく移動することを考えれば固体NMRでの正確な帰属が必要である。しかし、固体NMRでの帰属は行われていなかった。

【実験】

すべてのNMR測定は静磁場強度9.4TでChemagneticsCMX400核磁気共鳴装置により5mmφローター用のプローブを用いて行った。試料量は約100mgである。また外部基準として ^{31}P は80% H_3PO_4 を0ppm、 ^{13}C はhexamethylbenzeneの CH_3 を17.17ppmとした。

・ Na_2ATP の1次元 ^{31}P -NMR実験

三水和塩および二水和塩の1次元 ^{31}P -NMRスペクトルをCPMAS法を用いて測定を行った。その際、三水和塩は室内の湿度に置くことで、また二水和塩はデシケーター内で五酸化二りんを用いて吸湿させながら約二ヵ月間放置することで得た。

・ Na_2ATP の2次元 ^{13}C - ^{31}P 双極子相関NMR実験

2次元 ^{13}C - ^{31}P TEDOR法では、CPによって ^1H から ^{13}C に磁化を移し、さらにTEDORの混合期に復活した ^{13}C - ^{31}P 双極子相互作用によって ^{13}C から ^{31}P へ移し ^{31}P で観測する。三水和塩および二水和塩の2次元 ^{13}C - ^{31}P 双極子相関NMRスペクトルをTEDOR法を用いて、試料回転は約5kHz、交差分極(CP)の接触時間が3ms、 ^{13}C , ^{31}P RF強度が50kHz、 ^1H のデカップリング強度が約66kHz、 ^{13}C から ^{31}P への磁化移動時間を1.2msとし、両次元ともポイント

数256で測定した。また積算回数は64回であり測定に約27.5時間かかった。

・ Na_2ATP の2次元 ^{31}P 同種核双極子相関NMR実験

2次元 ^{31}P -RFDR法⁴⁾では、CPによって ^1H から ^{31}P に移された磁化が、RFDRの混合期に復活した ^{31}P 同種核双極子相互作用によってある ^{31}P から他の ^{31}P へ移される。三水和塩および二水和塩の2次元 ^{31}P 同種核双極子相関NMRスペクトルをRFDR法を用いて、試料回転は約5kHz、 ^{31}P RF強度が50kHz、混合時間を2.8msとし両次元ともポイント数256で測定した。また積算回数は32回であり測定にはおよそ13.5時間かかった。

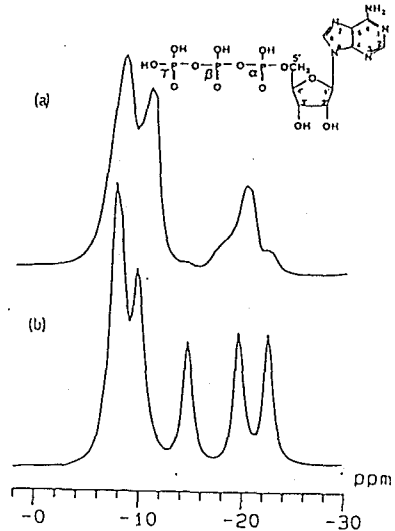


Fig. 1 CP-MAS ^{31}P -NMR spectra of Na_2ATP
: (a) dihydrate, (b) trihydrate

【結果と考察】

・Na₂ATPの1次元³¹P-NMRスペクトル (Fig. 1)

これまでに知られているように二水和塩では三本、三水和塩では五本のシグナルが観測された。

・Na₂ATPの2次元¹³C-³¹P双極子相関NMRスペクトル (Fig. 2, Fig. 3)

どちらもブロードなピークながら、³¹Pでは二水和塩の-11ppmとそのサイドバンド、三水和塩の-9.5ppmとそのサイドバンドおよびサイドバンドの23ppm付近(すなわち-8ppm付近のメインバンド)にリボースのC5'との相関と考えられるクロスピークが現れているために、それらのシグナルがα位由来であると考えられる。また、¹³Cの方ではその他にもピークが現れているのは、その他のリボースの核との相関も出ているためではないかと考えられる。なお、サイドバンドピークの方がメインピークよりも大きいのは³¹Pの異方性が試料回転数に比べて大きいからである。

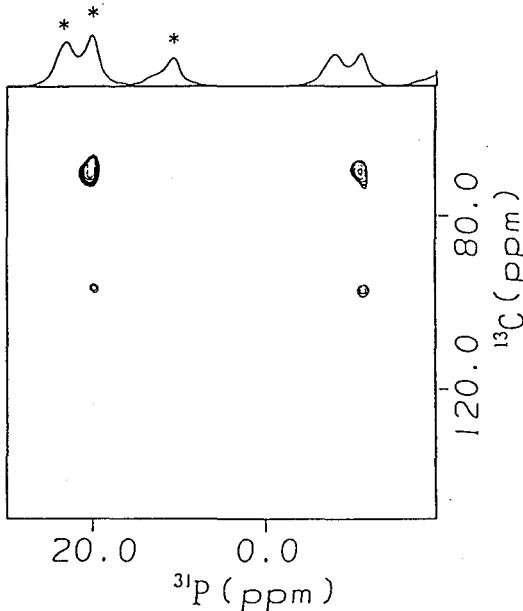


Fig. 2 2-D ¹³C, ³¹P TEDOR NMR spectrum of Na₂ATP · 2H₂O

* : spinning side bands

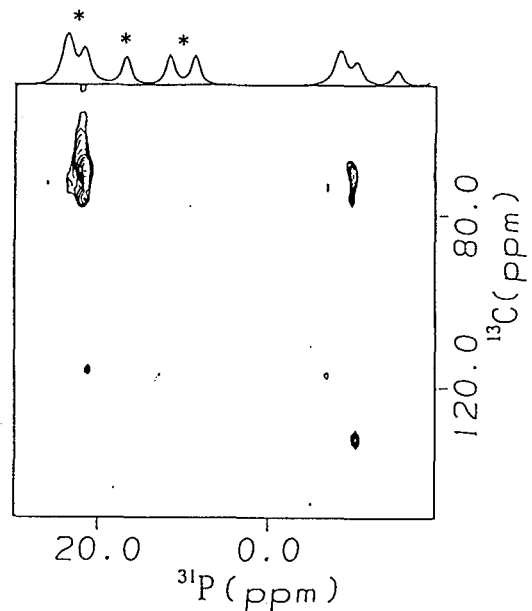


Fig. 3 2-D ¹³C, ³¹P TEDOR NMR spectrum of Na₂ATP · 3H₂O

* : spinning side bands

・Na₂ATPの2次元³¹P同種核双極子相関NMRスペクトル (Fig. 4, Fig. 5)

二水和塩ではサイドバンドピークとメインピークのために2つのクロスピークが現れており、α位由来であると帰属された-11ppmのシグナルのサイドバンドピークとクロスピーク1が現れている-20ppmのシグナルがβ位由来、そのピークとサイドバンドピークでクロスピーク2が現れている-9ppmのシグナルがγ位由来であると帰属ができる。また、三水和塩ではサイドバンドピーク内に4つのクロスピーク

が現れており、これはX線構造解析の単位格子中の2つのATP分子の構造が大きく異なるという結果と一致する。 α 位由来であると帰属された1つの-9.5ppmのシグナルを $\alpha 1$ 、もう1つの-8ppmのシグナルを $\alpha 2$ とする。 $\alpha 1$ のサイドバンドピークとクロスピーク3が現れている-19.5ppmのシグナルが $\beta 1$ 位由来、そのピークとサイドバンドピークでクロスピーク4が現れている-8ppm付近のシグナルが $\gamma 1$ 位由来であると帰属ができる。すなわち-8ppmのシグナルには $\alpha 2$ と $\gamma 1$ 位由来のシグナルが重なっていると考えられる。またもう一組を考えると、 $\alpha 2$ のサイドバンドピークとクロスピーク5が現れている-22.5ppmのシグナルが $\beta 2$ 位由来、そのピークとサイドバンドピークでクロスピーク6が現れている-14.5ppmのシグナルが $\gamma 2$ 位由来であると帰属ができる。

これらの帰属から、三水和状態での一組の信号の共鳴周波数の位置(順序)は二水合状態の時や溶液での帰属と比較して α 位と γ 位が逆転していることが分かった。

2次元 ^{31}P 同種核双極子相関NMRスペクトルにおいて、クロスピークの強度は結合している2つの ^{31}P の化学シフト異方性と、 ^{31}P - ^{31}P ベクトルの相対配向によって決まる。このことから、サイドバンドなどのクロスピーク強度を詳しく解析することによりりん酸基部分の立体構造が解析できると考えられる。

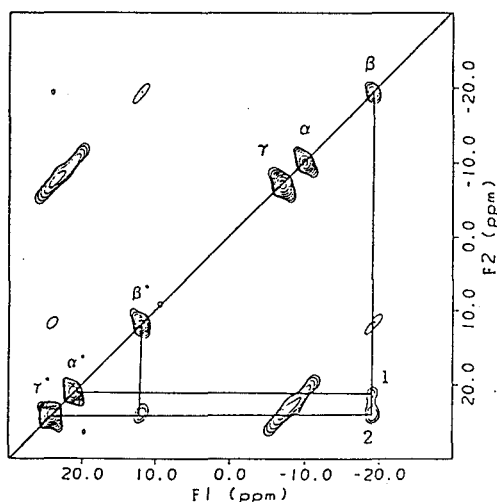


Fig. 4 2-D ^{31}P RFDR NMR spectrum of $\text{Na}_2\text{ATP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

* : spinning side bands

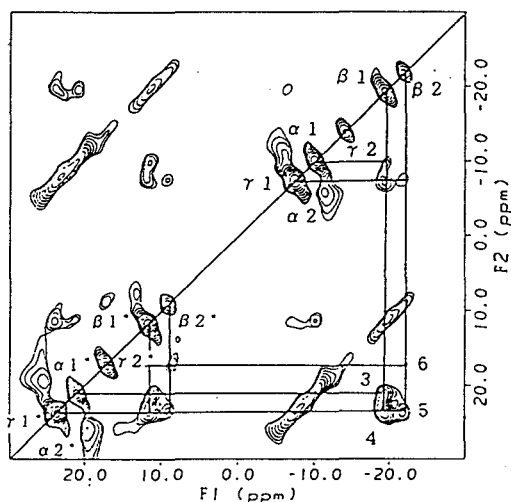


Fig. 5 2-D ^{31}P RFDR NMR spectrum of $\text{Na}_2\text{ATP} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

* : spinning side bands

【参考文献】

- 1). T. Fujiwara et.al, J. Am. Chem. Soc. 117, 11351, (1995)
- 2). 内藤 晶 他、第31回NMR討論会要旨集、241、(1991)
- 3). Y. Sugawara et.al, J. Am. Chem. Soc. 113, 5440, (1991)
- 4). 菅瀬 謙治 他、第35回NMR討論会1P1、(1996)

1.岐阜大,2.岐阜大・医・生理,3.稲沢市民病院・中検

○曾我美 勝¹, 恵良聖一², 松岡三良¹, 加藤一夫³, 永井直樹²

Magnetization transfer in bamboo culm

1.Gifu Univ., 2.Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ. and 3.Clin. Labor., Inazawa City Hosp.

Sogami, M.¹, Era, S.², Matsuoka, S.¹, Kato K.³ and Nagai, N.²

Although much is known about the magnetization transfer in animal tissues, we know little about that in plant tissues. We studied on the intermolecular cross-relaxation times($T_{1s}(H_2O)$) from irradiated macromolecular protons to observed water protons in the bamboo culm. We found that $T_{1s}(H_2O)$ values for an outer culm wall are significantly short compared with those for an inner culm wall over the stage from the development of new lateral shoots to that of new leaves. It was reported by Itoh(1) that lignification proceeds from outside to inside of the culm and difference in lignification between outer and inner culm walls is mainly observed in the above written growing stage. So, the shortening of $T_{1s}(H_2O)$ values for the outer culm wall might be attributed to the formation of extremely large hemicellulose-lignin complex.

【はじめに】 筆者らは、ウシ血漿アルブミンの溶液→ゲル変換において、水分子の T_1, T_2 が短縮するが、特に、タンパク質プロトンを f_2 照射して求めた水への分子間交差緩和時間(T_{1s})が大幅に短縮することを見いだした(2)。ついで、この現象を用い交差緩和イメージング法(MTCイメージング法)を開発した(3)。今回、植物組織交差緩和イメージングの基礎的研究として、マダケ稈 T_{1s} 値を測定した(以下、 T_1, T_2 及び T_{1s} を、それぞれ $T_1(H_2O), T_2(H_2O)$ および $T_{1s}(H_2O)$ と記載する)。

【実験材料と方法】 マダケ(*Phyllostachys reticulata* C. Koch)を用い、各成長時期の稈高のほぼ中央部位より試料を作成した。稈壁の内側及び外側(最内,最外側部位を除去)を棒状(~1X30 mm)にし、内径1.1 mmのガラス細管に挿入し、Bruker社AM 500型NMR装置(25 ± 0.05

キーワード：植物組織,水性状,交差緩和

そがみ まさる, えら せいいち, まつおか さぶろう, かとう かずお, なかい なおき

°C)を用いて測定した。 $T_{1s}(H_2O)$ 値は,7.13, -4.00, -8.79 p.p.mを $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hzで f_2 照射し, Akasakaらの方法(4)により測定した.

[結果と考察] マダケ稈壁,内側(○),外側部位(●)の $1/T_1(H_2O)$ vs 乾燥重量(%)を図1に示した.Itoh(1)によると,稈組織のリグニン堆積に,内,外側部位に差のある時期が○—○,●—●に対応している. $1/T_1(H_2O)$ 値には,内,外側部位間に殆ど差がなかった. $1/T_2(H_2O)$ vs 乾燥重量(%)プロットも,稈壁内,外側間に大きな差は観測されなかった.一般に,組成の似た試料の場合は,含水量が多いほど $T_2(H_2O)$ 値が長くなるが,図2に示すように,内,外側部位のリグニン堆積に差のある時期(●—●)に,含水量の多い内側部の $T_2(H_2O)$ 値が短縮していた.このような奇妙な現象は合成ポリマー・ゲルで観測された(未発表データ).架橋のため少量のallyl methacrylateを含む[hydroxymethyl methacrylate(HEMA) & glycerol methacrylate(GMA)],[HEMA & N-vinyl-2-pyrrolidone(N-VP)],[GMA & N-VP]と[methyl methacrylate(MMA) & N-VP]の4系統のモノマー組成を変えて,含水量の異なるゲルを合成し, $T_2(H_2O)$ を測定した.同一系列のゲルでは,含水量増加につれ $T_2(H_2O)$ は増加したが,同一含水量でも,[HEMA & GMA]→[HEMA & N-VP]→[GMA & N-VP]→[MMA & N-VP]ポリマー・ゲルのオーダーで $T_2(H_2O)$ が増加した.図2の結果は,大変ばらついているが,hemicellulose-lignin complexの堆積につれ,OH基の消失により,モデル実験と同じ結果になったのだろう.

図3A,3Bに,-8.79,-4.00 p.p.mを $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hzで f_2 照射して求めた $1/T_{1s}(H_2O)$ vs 乾燥重量(%)プロットを示した.これらの結果は,稈壁外側部の $T_{1s}(H_2O)$ が,内,外側部のリグニン堆積に差のある成長期(○—○,●—●)に有意に短縮することを示唆した.即ち,内,外側部稈壁における疎水性hemicellulose-lignin complex形成の差によるのだろう.

ご教示いただいた伊東隆夫教授(京大・木研),棚橋光彦教授(岐阜大・農)に深謝いたします.

[文 献]1. Itoh, T. (1990) *Holzforschung* **44**, 191-200

2. Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S. et al (1986) *Int. J. Peptide Protein Res.* **28**, 130-140; Era, S., Sogami, M., Kuwata, K. et al (1989) *ibid.* **33**, 214-222; Kuwata, K., Era, S., Sogami, M. et al (1996) *Biochem. Biophys. Acta* **1289**, 369-376

3. Era, S., Kato, K., Sogami, M. et al (1986) *Biomed. Res.* **7**, Suppl. **2**, 41-46; Ueshima, Y., Sogami, M., Kato, K. et al (1990) 9th SMRM Abstract p.585

4. Akasaka, K. (1981) *J. Magn. Reson.* **45**, 337-343; Akasaka, K. (1983) *ibid.* **51**, 14-25; Akasaka, K., Ishima, R. & Shibata, S. (1990) *Physica B* **164**, 163-179

Fig. 1 $1/T_1(H_2O)$ values at 25° as a function of dry weight(%) for outer(●) and inner(○) culm walls. ●—● and ○—○ are the growing stage which shows

difference in lignification between outer and inner culm walls, that is, progress of lignification proceeds from outer to inner culm walls.

Fig. 2 $[T_2(H_2O)]_{OUTER}/[T_2(H_2O)]_{INNER}$ vs $[H_2O\text{ CONT.}]_{OUTER}/[H_2O\text{ CONT.}]_{INNER}$ for culm wall. See Fig. 1 on (●—●).

Fig. 3A and 3B $1/T_{1S}(H_2O)$ values, obtained by the inversion recovery method with f_2 -irradiation at -8.79 (3A) or -4.00 p.p.m. (3B) and $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz at 25° , as a function of dry weight(%) for outer (●) and inner (○) culm walls. see Fig. 1 on (●—●) and (○—○).

FIG. 1

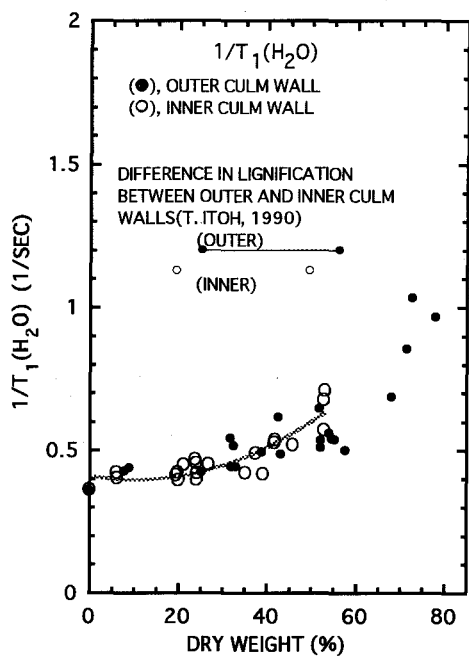


FIG. 2

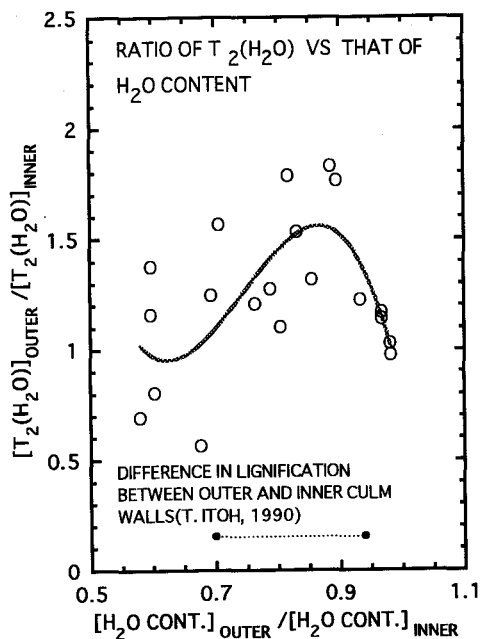


FIG. 3A

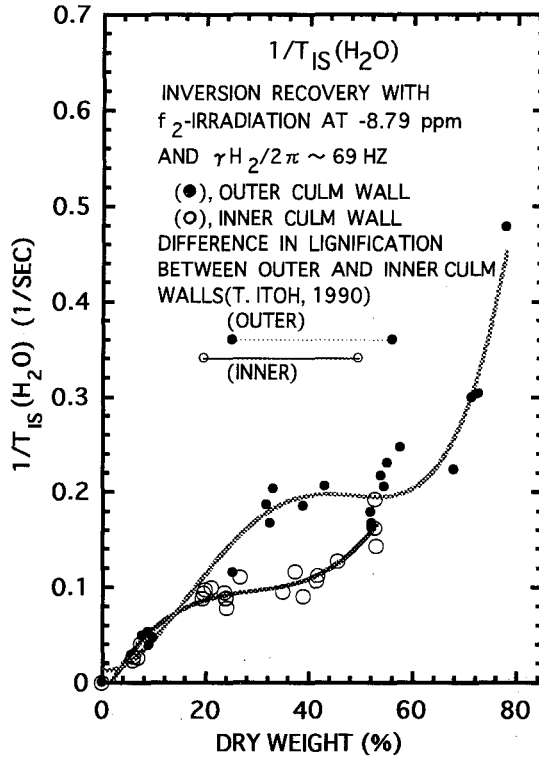
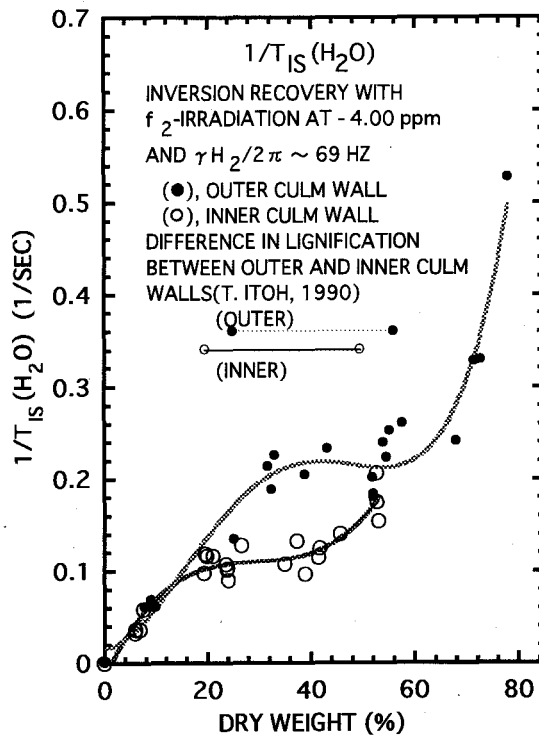


FIG. 3B



(京大 薬) 黒田 義弘、○那須 裕郷、目黒 芳郎、中川 照眞、
(日本新薬) 小川 雅弘、(京都薬大) 藤原 靖弘

Orientations and locations of local anesthetic benzocaine in phospholipid membranes

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, ²Nihon Shinyaku Co., Ltd, and ³Kyoto Pharmaceutical University

Yoshihiro Kuroda¹, ○Hirosato Nasu¹, Yoshirou Meguro¹, Terumichi Nakagawa¹,
Masahiro Ogawa², and Yasuhiro Fujiwara³

Orientations and locations of benzocaine in the phospholipid membranes have been studied by deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy. Model membranes composed of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), and phosphatidylethanolamine (PE) (PC:PS:PE=1:1:2.5 molar ratio) with and without cholesterol (phospholipids:cholesterol=7:3 molar ratio) were employed. The ²H-NMR spectra of benzocaine-d₄ and benzocaine-d₅, which are deuterated at the aromatic ring protons and at the ethyl group, respectively, have been observed in the phospholipid membranes. The ²H-NMR spectra of deuterated palmitic acids which were employed as a probe for inquiring the membrane structure, have also been observed. An order parameter, S_{CD}, for each carbon segment, was calculated from the observed quadrupole splittings.

It was concluded that the local anesthetic benzocaine is located at a polar region, but not at a hydrophobic acyl chain region of lipids.

【目的】

局所麻酔剤のNa⁺チャンネルへの作用部位に関しては2つの説が考えられている。局所麻酔剤が脂溶性で膜の流動性を変化させることから作用部位は脂質であるという説と、光学異性体を持つ局所麻酔剤においてその麻酔効果に差がみられることから作用部位はチャンネルタンパク質であるとする説である。

最近Zamponiらは、局所麻酔剤は膜タンパク質中の比較的大きな疎水性領域に芳香環が結合し、その三級アミンは電位勾配を持ったNa⁺チャンネルの孔部分に結合すると報告した[1]。我々は、Zamponiらが提唱する疎水性領域とは水との境界部分でなければならないと考え、そのような場合は疎水基と親水基とを合わせ持つ脂質で構成されているものとして研究を行っている。以前我々は、三級アミン型局所麻酔剤ジブカインの脂質膜中における配向と結合部位について検討するとともに[2,3]、Na⁺チャンネルの不活性化ゲートのゲート機構に関するチャンネルタンパクの

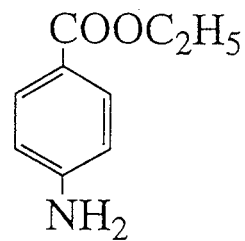


Fig.1 Chemical Structure of Benzocaine

キーワード：²H-NMR、ベンゾカイン、パルミチン酸、脂質膜、Na⁺チャンネル

くろだ よしひろ、○なす ひろさと、めぐろ よしろう、なかがわ てるみち、
おがわ まさひろ、ふじわら やすひろ

フラグメントペプチドとジブカインとの相互作用を検討した [4]。その結果、脂質の極性基付近に結合しているジブカインがチャンネルタンパク質の不活性化ゲートに関与するアミノ酸残基と相互作用して麻酔作用を発現していると結論した [5]。局所麻酔剤の電荷が不活性化ゲートにどのような影響を及ぼすのかを調べるために、今回はpKaが2.54で生理的条件下では中性型である局所麻酔剤ベンゾカイン (Fig.1) を用いて脂質膜中での配向と結合部位を $^2\text{H-NMR}$ で検討した。

【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),及びPhosphatidylethanolamine (PE)を1:1:2.5のモル比で混合させた溶液にコレステロール、重水素化パルミチン酸あるいは重水素化ベンゾカインを加えた後、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 (pH7.0)を加え約30分間vortexingを行い、その後5回freeze-thaw-vortexingを行ってNMR測定用サンプルとした。全重水素化パルミチン酸、2位、3位、5位及び6位を重水素化したパルミチン酸は市販のものを用い、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。ベンゾカインの芳香環の水素を重水素化したBenzocaine-d₄及びエチル基を重水素化したBenzocaine-d₅は合成して測定に用いた。

2) $^2\text{H-NMR}$ 測定、モーメント計算

重水素化パルミチン酸の測定はBruker AM600を用い四極子エコー法で行った。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。重水素化したベンゾカインはVarian Unityplusを用いて同様に測定した。

【結果】

1) 重水素化ベンゾカイン (Benzocaine-d₄及びBenzocaine-d₅)の $^2\text{H-NMR}$ スペクトルへのコレステロールの影響

Fig.2にBenzocaine-d₄の $^2\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。(a)のスペクトルより、コレステロールを含まない膜中においてベンゾカインの芳香環の重水素の四重極分裂幅は3.8KHz及び3.0KHzを示した。このことは、コレステロールを含まない膜中においてベンゾカインの芳香環はある程度定まった配向を取っていることを示す。(b)のスペクトルでは、(a)とは異なり明瞭なピークが現れておらず四重極分裂幅は狭まっていることが分かった。これはコレステロールを含む膜中においては芳香環の配向が定まっていないことを示すものであり、芳香環は極性基付近に存在していると考えられる。

Fig.3及び4にBenzocaine-d₅の $^2\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。Fig.3はメチレン基のスペクトルで、コレステロールによって四重極分裂幅が16.3kHzから21.6kHzへと広がることが分かった。こ

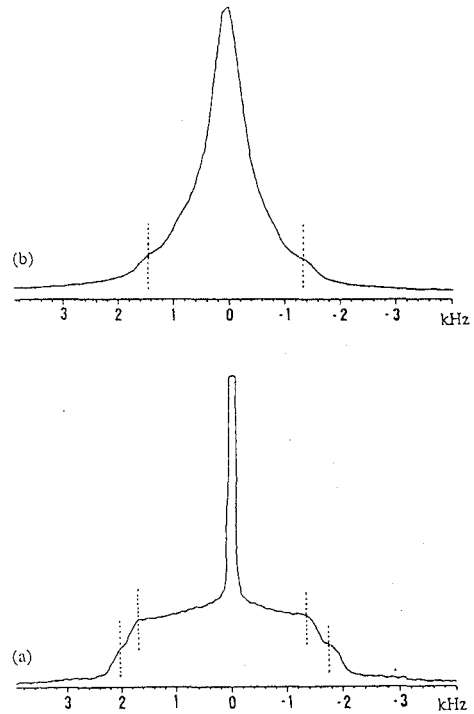


Fig.2 $^2\text{H-NMR}$ Spectra of Benzocaine-d₄ (40mM) in Mixed Lipids (PC:PS:PE=1:1:2.5 Molar Ratio) at 300K and at pH7.0:(a) without cholesterol and (b) with cholesterol(55.7mM).

の事より、ベンゾカインのカルボキシエチル基は脂質のアシル鎖内部に向くような配向を取るものと考えられる。それに対して、Fig.4に示すメチル基のスペクトルにおいては、膜中にコレステロールを含むことで四重極分裂幅が1.2kHzから0.6kHzへと狭まることが分かった。このように、メチレン基及びメチル基に対するコレステロールの影響に違いがみられた事から、メチレン基のC-D結合ベクトルは膜面の法線ベクトルに対して垂直に、メチル基は平行であると考えられることができる。

2) 全重水素化パルミチン酸 (Palmitic-d₃₁ Acid) の²H-NMRスペクトル及びモーメント計算

Palmitic-d₃₁ Acidの²H-NMRスペクトルにおける四重極分裂幅はベンゾカインによって減少する事が分かった。そこで、Palmitic-d₃₁ Acidの²H-NMRスペクトルに対してモーメント計算を行った。その結果をTable.1に示す。この表より、ベンゾカインはパルミチン酸プローブのオーダー (SCD) を減少させ、その分散値 ($\Delta 2$) を増加させることが分かる。このことから、ベンゾカインは脂質膜の流動性を増加させる働きを持っていると考えられる。膜中にコレステロールが存在する場合、これらSCD及び $\Delta 2$ 値の変化は増大した。これはコレステロールと脂質との相互作用により脂質のアシル鎖の運動性が制限され、ベンゾカインのスペーサー効果によりアシル鎖とコレステロールとの間の空間が広がり運動性が増大したと考えられる。

3) ベンゾ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

ベンゾカインによるアシル鎖の各部位のオーダーの変化を検討するため、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²H-NMRスペクトルを測定した。この²H-NMRスペクトルの四重極分裂幅から得られる配向秩序パラメーターSCDについて、ベンゾカインによる減少率 ($\Delta SCD/SCD$) を各

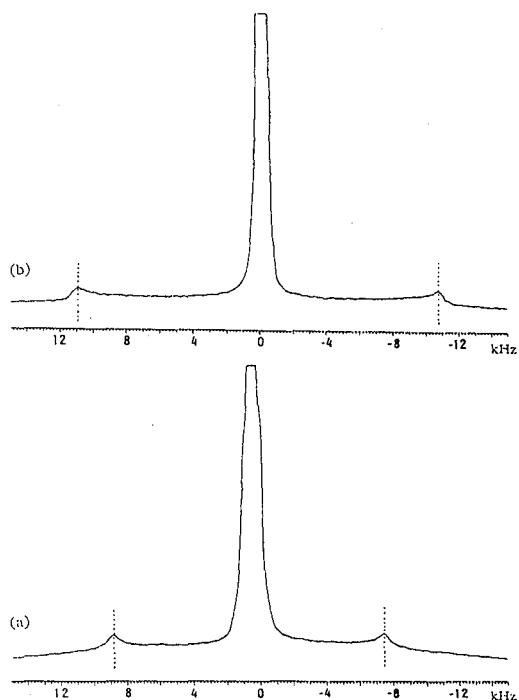


Fig.3 ²H-NMR Spectra of the CD₂ Group of Benzocaine-ds (40mM) in Mixed Lipids (PC:PS:PE=1:1:2.5 Molar Ratio 130mM) at 300K and at pH7.0: (a) without cholesterol and (b) with cholesterol (55.7mM).

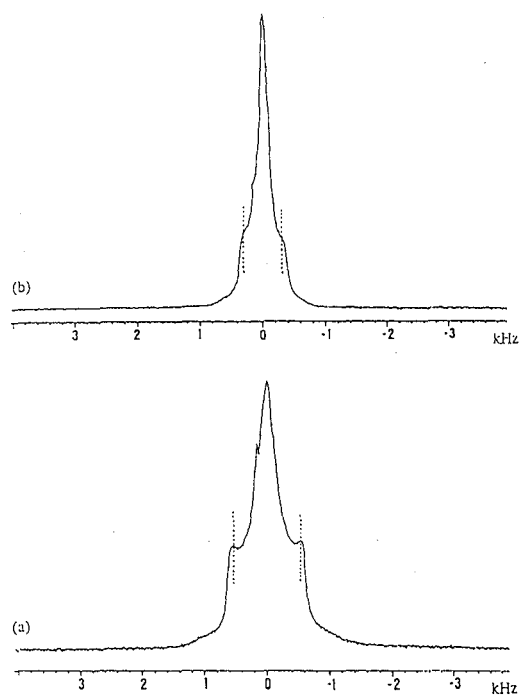


Fig.4 ²H-NMR Spectra of the CD₁ Group of Benzocaine-ds (40mM) in Mixed Lipids (PC:PS:PE=1:1:2.5 Molar Ratio 130mM) at 300K and at pH7.0: (a) without cholesterol and (b) with cholesterol (55.7mM).

Table.1 Effect of Addition of Benzocaine on the First and Second Moments ,SCD and Δ_2 for the Palmitic-d31 Acid Incorporated into Mixed Lipids

Membrane	Benzocaine(mM)	$M_1 \cdot 10^{-5}$ (rad/s)	$M_2 \cdot 10^{-10}$ (rad ² /s ²)	SCD	Δ_2
mixed lipid	0	0.686	0.664	0.226	0.0458
	20	0.678	0.660	0.224	0.0615
mixed lipid + cholesterol	0	0.785	0.837	0.259	0.00515
	20	0.738	0.755	0.244	0.0282

$a \quad M_n = \int_0^\pi \omega^n f(\omega) d\omega / \int_0^\pi f(\omega) d\omega$. $b \quad SCD = 2\sqrt{3}M_1 / (e^2 q Q / h)$; $e^2 q Q / h = 167 \text{ kHz}$. $c \quad \Delta_2 = M_2 / 1.35 M_1^2 - 1$

炭素部位についてプロットしたものを Fig.5に示す。このグラフより、脂質の末端メチルに向かうほどベンゾカインによるSCDの減少が大きくなっていることが分かる。このことは、脂質の極性基よりも末端メチル基のオーダーにベンゾカインの影響が大きくみられることを示すものである。注目すべき点は、コレステロールは本来脂質膜を硬くする働きを持っているのにも関わらず、Palmitic-d31 Acidの結果と同様にコレステロールを含んでいる脂質膜の方がベンゾカインによる影響を大きく受けている点である。

【結論】

局所麻酔剤ベンゾカインは脂質の極性基部位において、そのアミノ基を極性基側に、またそのカルボキシエチル基のエチルを脂質のアシル鎖内部に向けた配向を取って結合している。

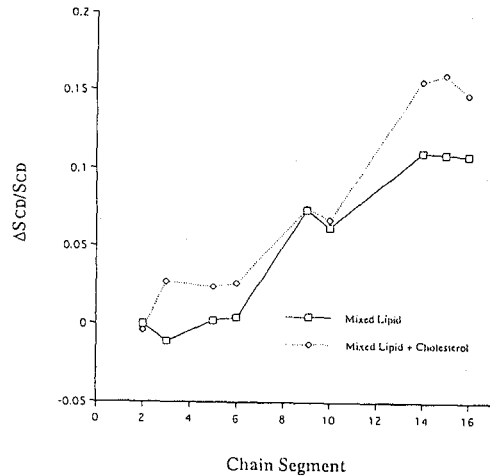


Fig.5 Plot of $\Delta SCD/SCD$ vs. Position of Deuteration for Specifically Deuterated Palmitic Acid Probes Intercalated in Mixed Lipids.

【参考文献】

1. G.W.Zamponi, and R.J.French : *Biophys. J.*, 67, 1015 - 1027 (1994).
2. Y.Kuroda, M.Ogawa, T.Kawabata, Y.Kiyama, Y.Fujiwara, and T.Nakagawa. : The 32th NMR Symposium (Japan) Tokyo, 1993, Poster Presentation No.25
3. Y.Kuroda, M.Ogawa, H.Nasu, M.Terashima, T.Nakagawa, and Y.Fujiwara. : The 33th NMR Symposium (Japan) Kobe, 1994, Poster Presentation No.40
4. Y.Kuroda, M.Ogawa, J.Ishikawa, N.Fujii, and T.Nakagawa. : The 34th NMR Symposium (Japan) Tsukuba, 1995, Poster Presentation No.104
5. Y.Kuroda, M.Ogawa, H.Nasu, M.Terashima, M.Kasahara, Y.Kiyama, M.Wakita, Y.Fujiwara, N.Fujii, and T.Nakagawa.: *Biophys. J.*, 71, 1191 - 1207 (1996).

1P60

位置・立体選択的安定同位体標識ヌクレオシドの合成
と NMR 構造解析への応用

(都立大・理) ○小野 明、椎名桃子、片岡 新、
小野 晶、楯 真一、甲斐荘 正恒

Synthesis and Applications of the Regio-/Stereoselectively Stable-Isotopically
Labeled Nucleosides for the Structural Studies by NMR

Akira "Mei" Ono*, Toko Shiina, Shin Kataoka, Akira "Sho" Ono,
Shin-ich Tate, and Masatsune Kainosho

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University
1-1 Minami-ohsawa, Hachioji, Tokyo, 192-03 Japan

Abstract : Conformational analysis around the glycosyl bond (χ -angle) of nucleic acids can be achieved by the Karplus-type relationship for the heteronuclear vicinal ^1H - ^{13}C coupling constants between ^1H at the C1' and ^{13}C of the C6 (or C2) of pyrimidine nucleotides, or ^{13}C of the C8 (or C4) of purine nucleotides. These coupling constants, however, were found to be difficult to measure precisely, especially for oligomers, without isotope labels. In order to overcome this difficulty, we have synthesized [$1'$, 6 - $^{13}\text{C}_2$; $2'$ - ^2H]-uridine in a total 17% yield from [2 - ^{13}C]-glucose. This labeled uridine has been designed specifically to afford the $J_{\text{H}1'\text{C}6}$ coupling constants precisely by the spin echo difference method, without being interfered by the interactions of the other nuclei. Usefulness of this labeling strategy will be illustrated for RNA and DNA oligomers.

[はじめに]

最近になり、蛋白質の NMR 研究における成功に刺激され、RNA や DNA オリゴマーの多核種・多次元 NMR スペクトルに関しても多大な興味が集められるようになってきた。しかしながら、 ^{13}C や ^{15}N 等の安定同位体で標識した核酸試料の調製に関しては、酵素法による均一標識体の調製法を除けば今後の開発に待つところが大きい。¹⁾ 特に、蛋白質においては汎用性に問題があるために利用が停滞していた固相合成法が、核酸合成においては極めて有効であるという利点が十分に生かされていなかったことは指摘されなければならない。プロトン密度が本質的に薄い核酸の立体構造解析にあたっては、今後はスピン結合定数の正確な測定と構造情報の取得が必須であるにも関わらず、そのような測定法の開発に必要な位置・立体選択的標識核酸類の合成法についての系統だった研究は少なかった。以上のような背景から、我々は様々な選択的標識体の固相合成法と、それらを用いた J-値の精密測定法を開発してきた。本報告は

キーワード：安定同位体標識法、DNA、RNA、 χ -角

○おの あきら、しいな とうこ、かたおか しん、おの あきら、
たて しんいち、かいのしょう まさつね

その研究の一環として行われた、ピリミジンヌクレオシド類のグリコシド結合周囲の内部回転角 (χ -角) の精密決定を目指した安定同位体標識 NMR 技術に関するものである。

【実験】

DNA/RNA オリゴマーの各残基のグリコシド結合周囲 (χ -角) に関する構造情報を得るためには $H1'$ と $C6/C2$ (ピリミジン)、或いは $C8/C4$ (プリン) とのスピン結合定数を正確に求める必要がある。スピンエコー差スペクトル法による J -値の測定を念頭に置けば、このために必要な標識体は $C1'$ と $C6/C2$ (ピリミジン)、 $C1'$ と $C8/C4$ (プリン) を ^{13}C で二重標識し、且つ $H2'$ を重水素標識した試料の利用が望ましいと考えられる (Fig. 1)。

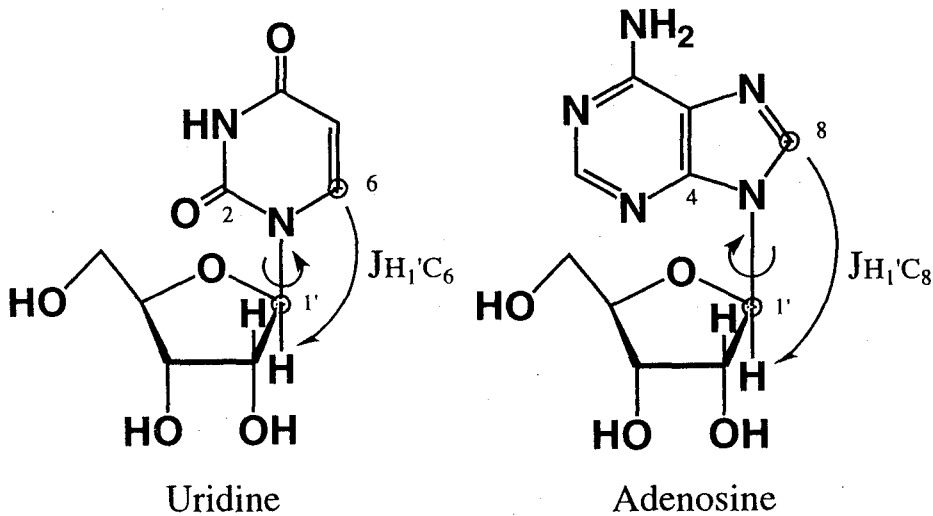


Figure 1. Structures of Pyrimidine (Uridine) and Purine Nucleosides (Adenosine)

本報告では比較的合成が容易なピリミジンヌクレオシドを例にとり、Fig.2 に示したルートに従って、目的とする同位体標識体を合成した。

【結果と考察】

Fig. 2 のルートに従って、 $[2-^{13}C]$ -Glucoseを出発原料として目的とする $[1',6-^{13}C_2; 2'-^2H]$ -Uridine を 17% の収率で合成する事ができた。得られた標識体の 1H -NMR スペクトル (糖部) において、 $1'$ -位のプロトンシグナルは "double-doubles" として観測され、 $2'$ -位の重水素化が高濃度で達成されている事を示している (Fig.3a)。このシグナルは ^{13}C -完全照射スペクトルにおいては singlet となるが、 $C1'$ の ^{13}C -シグナルを選択的に照射したスペクトルにおいては $C6$ -位の ^{13}C との vicinal スピン結合 (3.7Hz) により

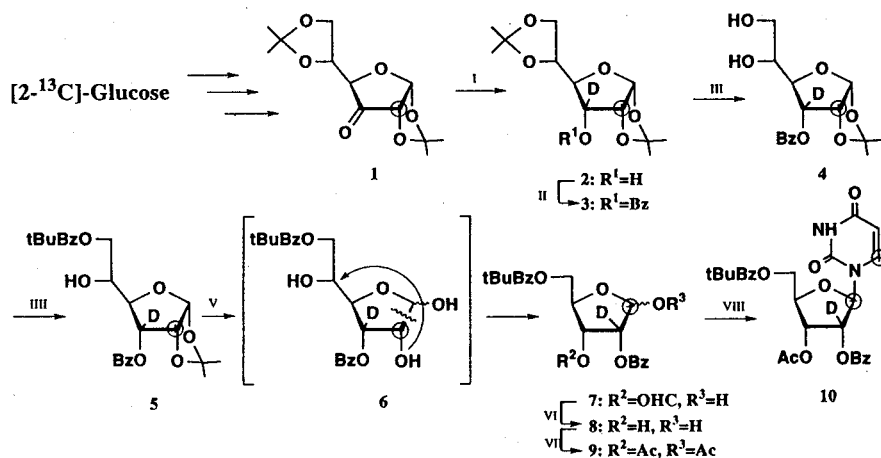


Figure 2. Synthesis of $[1',6\text{-}^{13}\text{C}_2;2'\text{-}^2\text{H}]$ -Uridine.

doublet として観測される (Fig.3b)。ピリミジンヌクレオシド類に関しては C6 -位の ^{13}C と $\text{H1}'$ とのスピ結合定数とグリコシド結合周囲の回転角 χ に関する角度依存性に

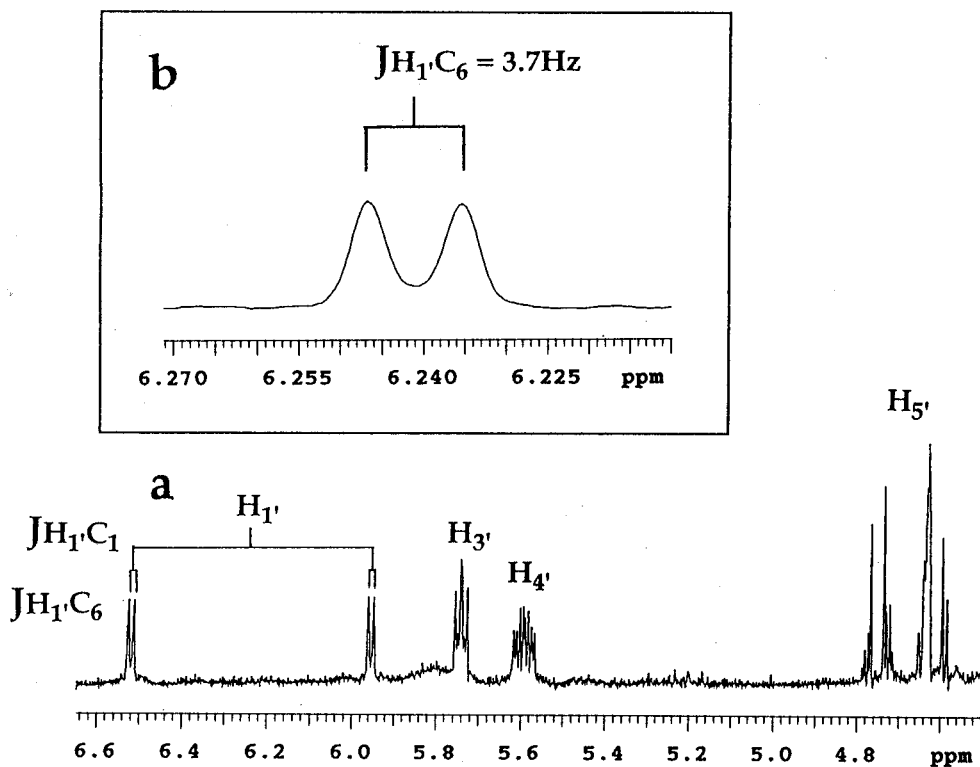


Figure 3. ^1H -NMR Spectra of $[1',6\text{-}^{13}\text{C}_2;2'\text{-}^2\text{H}]$ -Uridine. a), The sugar part of the ^{13}C -coupled ^1H -NMR spectrum; b), The $\text{H1}'$ signal with selective irradiation of the $\text{C1}'$ resonance.

関しての経験則²⁾が知られている。従って、このようにして得られた選択標識体を利用して、DNA/RNA オリゴマーの望みの位置にあるピリミジン残基に関する χ -角を決定することができる。

現在、固相法により特定の残基のみを標識ピリミジンに置換したオリゴマーを合成中である。これらを利用して、既に有効性を確認しているスピンエコー差スペクトル法³⁾を利用して、 $J_{\text{H}^1\text{C}5}$ の精密測定を実施する予定にしている。

References

- 1) Ono, A., Tate, S., Ishido, Y., Kainosho, M. *J. Biomol. NMR*, **4**, 581-586(1994).
- 2) David, B. D., Parmila R., Husaini, S. *J. Chem. Soc. PERKIN TRANS. II* 279-285(1985).
- 3) Tate, S., Kubo, Y., Ono, A., Kainosho, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7277-7278 (1995).

Structural analysis of tRNA anticodon arms by heteronuclear multidimensional experiments

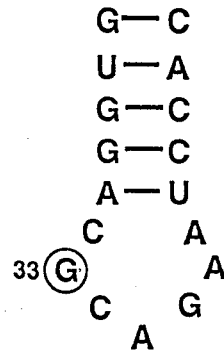
Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Tokyo

○Takashi Ida, Gota Kawai, Kimitsuna Watanabe

Codon CUG, a universal leucine codon, is translated as serine instead of leucine in asporogenic yeast *Candida cylindracea* by the tRNA^{Ser}CAG. One of the characteristics of tRNA^{Ser}CAG anticodon arm is that the position 33, the 5'-adjacent position to anticodon, is occupied by G instead of U in most other tRNAs. In order to elucidate the role of G33 in the translation of CUG codon, the structure of the anticodon arm is examined. First, the overlapped resonances of purine and pyrimidine in 2D-NOESY spectrum was resolved by 3D-HOHAHA-NOESY experiment of unlabelled RNA. Then, we obtained uniform labelled and nucleotide type selective labelled RNAs by *in vitro* transcription and 2D-HSQC, 3D-HSQC-NOESY experiments were applied. Further heteronuclear experiments are in progress.

【緒言】

普遍暗号表ではロイシンのコドンである“CUG”を、セリンとして翻訳する無胞子酵母 *Candida cylindracea* の tRNA (tRNA^{Ser}CAG) のアンチコドンアームの立体構造解析を行っている。ほとんどの tRNA のアンチコドンの5'側の隣接塩基(33位)はUであり、これによってU-ターン構造と呼ばれる33位と34位間のリン酸基における特徴的な折れ曲がり構造を安定化している。しかし、この酵母の tRNA^{Ser}CAG の33位はGであるという特徴をもっている。LeuRS は37位を認識していることが知られているが、33位がGであることにより、アンチコドンループの構造が、通常の tRNA とは異なり、LeuRS は37位を認識出来なくなっていると考えられる。そこで本研究では、NMRの測定により、この tRNA^{Ser}CAG のアンチコドンアームの精密立体構造解析を行うこととした。

Fig.1 tRNA^{Ser}CAG anticodon arm

安定同位体標識, tRNA, アンチコドンアーム, 遺伝暗号, 構造解析

いだ たかし, かわい ごうた, わたなべ きみつな

【実験】

この tRNA^{Ser}CAG のアンチコドンアーム部位を、合成機による化学合成により調製し、約 1.5mM の試料を得た。軽水中でNMRの測定を行い、1D-¹H NMRスペクトルを得た。また、この試料を重水置換して、2D-NOESY、2D-HOHAHA、3D-HOHAHA-NOESY のスペクトルを得た。

また、安定同位体標識 (¹³C, ¹⁵N) を行った。安定同位体標識されたNTP (ヌクレオシド三リン酸) を用いて、DNA鋳型からT7 RNA ポリメラーゼの転写反応を利用して、全て安定同位体標識した試料と、塩基特異的に標識した試料を調製した。これらの試料について、2D-HSQC、3D-HSQC-NOESY、3D-HEHOHEHAHA などの実験を行い帰属を進めている。測定は、Bruker AMX 500 NMR spectrometer で行った。

【結果・考察】

軽水中の測定より得られた、イミノプロトン領域の解析から、両末端各5塩基はステムを組んでいることを確認した。次に、3D-HOHAHA-NOESY により、プリンとピリミジンのスペクトルの重なりを分離できた。また、塩基特異的に標識した試料の測定から得られた 2D-HSQC から、どの塩基のスペクトルか区別している。2D-NOESY だけでは帰属が困難であったが、以上の結果より、主にステム部分の帰属に成功した。今後は、ラベルされたサンプルを用いて、帰属をすすめ、NOEから得られる距離情報をもとに、精密立体構造解析を行う。更に、33位がUのアンチコドンアームの立体構造解析も行い、両者を比較することによって、G33の存在理由を解明する予定である。

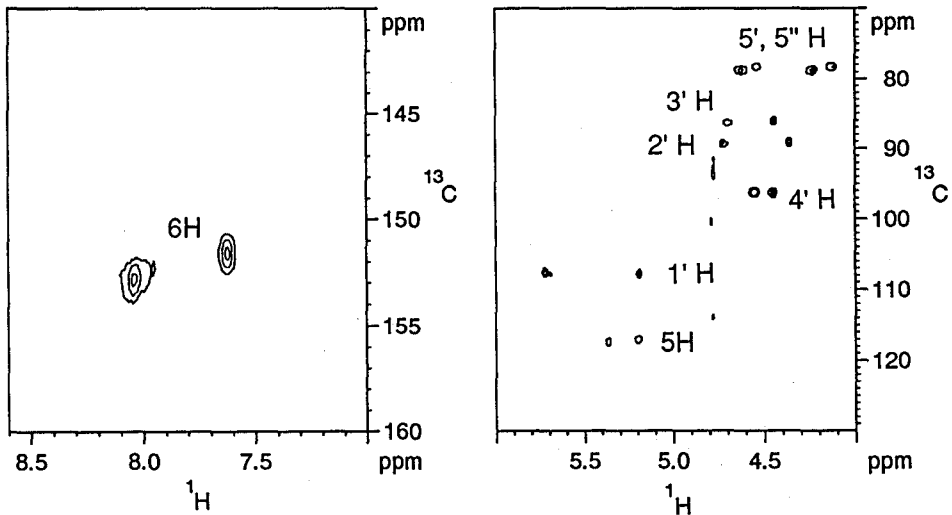


Fig.2 2D-HSQC spectra of U selective labelled anticodon arm

1P62

¹⁵N, ¹³C ラベル holo-NCS の立体構造解析

(日本チバガイギー国際科学研究所¹, 北陸先端科学技術大学院大学新素材センター², ポーラ化成工業医薬品研究所³, 大阪大学薬学部⁴)

○高島浩幸¹, 田 榮浩¹, 野坂篤子¹, 大久保忠恭², 蓮田勝美³, 石野哲也⁴, 小林祐次⁴

Three Dimensional Structure analysis of ¹⁵N, ¹³C-enriched Holo-NCS

(International Research Laboratories Ciba-Geigy Japan Ltd.¹, Center for New Materials Japan Advanced Institute of Science and Technology², Pharmaceutical R&D Laboratory Pola-Cosmetics³, Faculty of Pharmaceutical Sciences Osaka University⁴) Takashima,H.¹, Jeon, Y.H.¹, Nosaka,A.¹, Okubo,T.², Hasuda,K.³, Ishino,T.⁴, & Kobayashi.Y.⁴

Neocarzinostatin (NCS or holo-NCS) is a complexed protein, containing the non-covalently bound enediyne-containing antitumor antibiotic chromophore, that intercalates and nicks the double-stranded DNA by abstracting hydrogen atoms. Despite its intrinsic instability in the free state, even under physiological conditions, as a complex, holo-NCS, it was found to be relatively stable in vivo. We made three dimensional structure analysis of ¹⁵N, ¹³C enriched holo-NCS by multinuclear multidimensional NMR techniques. We will discuss the stabilization and activation mechanism of the labile chromophore.

ネオカルチノスタチン (NCS) は、放線菌産生の高分子性抗生物質として日本で発見された。天然型のアミノ酸のみを含む唯一の抗腫瘍性蛋白質であり、113 残基からなるペプチド部分と分子量 659 のクロモフォア部分 (NCSクロモフォア) との非共有結合性複合体である。NCSクロモフォアは、二本のアセチレン結合、二重結合、および、エポキシ結合を含み、in vitro でのDNA切断活性を持つことが知られている。また、in vivo で極めて強力な制ガン活性を示すと共に、クロモフォア単体では非常に不安定であり熱や光などの生理的条件下ですみやかに分解される。NCSの蛋白質部分は、この不安定なクロモフォアを蛋白質-リガンド相互作用によって安定化させ、腫瘍のターゲット部位まで運搬すると考えられている。そのため、キャリアープロテインとも呼ばれている。同様な、抗腫瘍活性を示す蛋白質も幾つか発見されており、それぞれ、特異な化学構造を持つクロモフォアとキャリアープロテインとの複合体であることが知られている。NCSクロモフォアの結合したNCS蛋白質は、holo-NCSと呼ばれ、一方、キャリアープロテインのみのは apo-NCS と呼ばれており、それぞれ、NMRおよび、X線単結晶解析法による構造解析がなされてきた。

holo-NCS の立体構造解析は、これまで、同種核2次元 NMR 法[1,2]、および、X線単結晶解析法[3]によって行われており、二組のβシート構造からなる蛋白質部分とクロモフォア

キーワード： ネオカルチノスタチン、holo-NCS、クロモフォア、異種核多次元NMR

たかしまひろゆき, でんよんほ一, のさかあつこ, おおくぼただとし, はすだかつみ, いしのでつや, こばやしゆうじ

アとの複合体の構造が報告されている。そして、Trp39, Leu45, Phe76, Phe78 などの疎水性側鎖との疎水性相互作用によるクロモフォア分子の溶媒からの保護と S-S 結合の関与した安定化と活性化の機構の存在が示唆されている。また、Arg70-Cys88 によって形成されるアーム状の逆平行 β シートとその根元にあたるヒンジ領域のクロモフォアの安定化と放出の機構への関与なども示唆されている。これら蛋白質による不安定化合物の保護と安定化の機構の解明は、蛋白質-リガンド相互作用のモデルおよびドラッグデリバリーシステムのモデルとしても有用と考えられる。特に、holo-NCS の機能発現の作用点である細胞核におけるキャリアープロテイン-核酸間の相互作用とそれに伴うキャリアープロテインの構造変化の機構は興味深い。これらの NCS の機能発現の機構をより詳細に解析するために、我々は、 ^{15}N , ^{13}C ユニフォームラベル holo-NCS の構造解析を行った。

holo-NCS は、 ^{15}N , ^{13}C ユニフォームラベルのクロレラ破砕物を栄養源として、産生菌である放線菌 (*Streptomyces carzinostaticus*) を用いてラベルを行った。ラベルの後、さらに、holo 体と apo 体をクロマト分画し、NMR の測定を行った。Bruker AMX-600MHz と Varian Unity-750MHz を用いて測定を行ない、 ^{15}N 核および ^{13}C 核展開の NOESY-HSQC と HNCA 法の測定を行ない、 ^1H 核、 ^{15}N 核および ^{13}C 核の帰属を行った。データ解析には、NMR-Pipe, NMR-Pipp のプログラムを用い、立体構造計算には、XPLOR を用いた。

得られた NOE と構造から、Asn48 の側鎖のアミノプロトンが、ヒンジ領域の Arg70 の主鎖アミドプロトンとの間に強固な水素結合をしていることが明らかになった。この Asn48 は、クロモフォアとの結合において重要な役割を果たす Phe52 の側鎖を結合部位の裏側から支え、ヒンジ領域との間に橋渡しの役割を持っていることがわかる。ヒンジ領域とそこから伸びるアーム部分には塩基性の側鎖が集中しており、pH などの環境変化および核酸との相互作用において重要な役割を果たすと考えられて興味深い。その他、クロモフォアの安定化と活性化の機構についての詳細な議論を行う予定である。

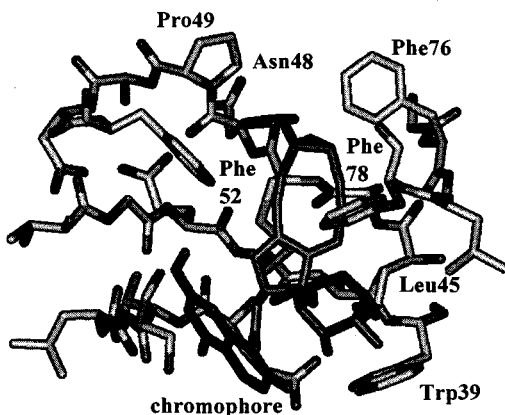


Figure
Binding site of NCS chromophore in holo-NCS.
Side chains of Trp39, Asn48, Pro49, Phe76 and
Phe78 are indicated by their three letter code and
residue numbers.

参考文献

1. Takashima, H., Amiya, S., & Kobayashi, Y. (1991) *J. Biochem.* **109**, 807-810.
2. Tanaka, T., Hirama, M., Ueno, M., Imajo, M., Ishiguro, M., Mizugaki, M., Edo, K. & Komatsu, H. (1991) *Tetrahedron Lett.* **32**, 3175-3178.
3. Kim, K.H., Kwon, B.M., Myers, A.G. & Rees, D.C. (1993) *Science* **262**, 1042-1046.

東京農工大学工学部 菊地 淳、朝倉 哲郎

University of Sheffield C.N Hunter, M.J Conroy, M.P Williamson

都立大学理学部 嶋田 敬三

Structural Analysis of Light-Harvesting Antenna Protein on the basis of the NMR Chemical Shift

Jun Kikuchi¹, Tetsuo Asakura¹, C.N Hunter², M.J. Conroy², M.P Williamson² and Keizo Shimada³

1.Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184,

2.Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK and

3. Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo 191

The antenna polypeptide, LH1 β chain from *Rb.sphaeroides* was isolated and the ¹H NMR spectrum was observed in CDCl₃/CD₃OH. The presence of α -helical structure in the LH1 β chain is expected from the higher field α proton shift than the random coil shift and the appearance of a lots of NH-NH NOE's. The spectrum was similar to the spectral pattern predicted with chemical shift calculation developed by us on the basis of X-ray diffraction co-ordinate of LH2 β chain of *Rps.acidophila*. This indicates that the crystal structure of LH2 β chain of *Rps.acidophila*. is essentially retained in the LH1 β structure from *Rb.sphaeroides* in CDCl₃/CD₃OH.

緒言

紅色光合成細菌は、細胞内膜を貫通する 2 本のアンテナタンパク (α 鎖と β 鎖 6~8kDa) と色素分子とから構成される光捕獲アンテナ複合体 (LH1, LH2) によって、光合成の初期過程である光エネルギーの捕獲を行う。近年、2 種類の紅光合成細菌の LH2 の結晶構造が決定されたものの^{1,2)}、LH1 に関しては膜タンパク質複合体の結晶化の難しさから、低分解能の 2 次元電子線回析像が得られているに過ぎない³⁾。一方、NMR 法では試料の結晶化の必要はない。しかしながら、一部の立体構造計算が成功した例を見ても、膜タンパク質の可溶化条件の設定の難しさから、水溶性タンパク質に比べて NMR によって得られる核オーバーハウザー効果、NOE やスピンカップリング定数、J の数が圧倒的に少なくなる^{4,5)}。

本研究では、*Rb.sphaeroides* について、その LH1 β 鎖を単離し、有機溶媒中において ¹H NMR 構造解析を試みた。得られた NMR 情報は限られるが、当研究室で開発してきた ¹H NMR 化学シフト計算法を相補的に用いて幾つかの知見を得たので報告する。

実験

LH1 β 鎖の単離は、LH1 のみの変異株より作成した膜小胞から、有機溶媒抽出 (CHCl₃/CH₃OH) 後、ゲルろ過、さらに透析することにより得られた。試料溶液は 1m M、CDCl₃/CDOH 溶媒を用いて、DQF-COSY, TOCSY, NOESY 等の測定を行った。NMR 装置は、Bruker AMX-500, JEOL α -500, JEOLGX-400 を用いた。¹H NMR 化学シフトは *Rps.acidophila* LH2 β 鎖の結晶構造¹⁾ を用いて計算し、その計算スペクトルと *Rb.sphaeroides* の LH1 β 鎖の ¹H NMR スペクトルを比較した。

キーワード：光合成、光エネルギー捕獲、膜タンパク質、¹H-NMR 化学シフト計算

きくちじゅん あさくらてつお C.N Hunter M.J. Conroy M.P Williamson しまだけいぞう

結果と考察

Fig.1 は有機溶媒中における *Rb.sphaeroides* LH1 β 鎖の ^1H NMR スペクトル(a)、*Rps.acidohla* LH2 β 鎖の原子座標より得られた化学シフト計算値のスペクトル(b)、並びに *Rb.sphaeroides* β 鎖のアミノ酸シーケンズからランダムコイル値を考慮して計算したスペクトル(c)を示した。(a)と(c)を比較すると、特に C α H シフト域が高磁場側にシフトしていることから、ポリペプチド鎖は有機溶媒中でもヘリックス構造をとっていることが示唆される。NH-NH 間の NOE もまた、多く観測された。また、1.0ppm より高磁場のメチル領域は(a)と(b)の場合で、良く一致した。この域のメチル基の化学シフトは特に環電流効果に由来する long range のしゃへい効果が大きいため、結晶構造におけるポリペプチド鎖の folding が、有機溶媒中でも保たれていると推測される。更に、種々の 2次元NMRスペクトルにより、現在約 30 のスピン系を同定し、A32 から Y42 の連鎖帰属を行った。特に色素分子とのリガンドである H38 付近はNHシフトの分離が良く、他の部位と比較して秩序だった構造をとっていると推測された。

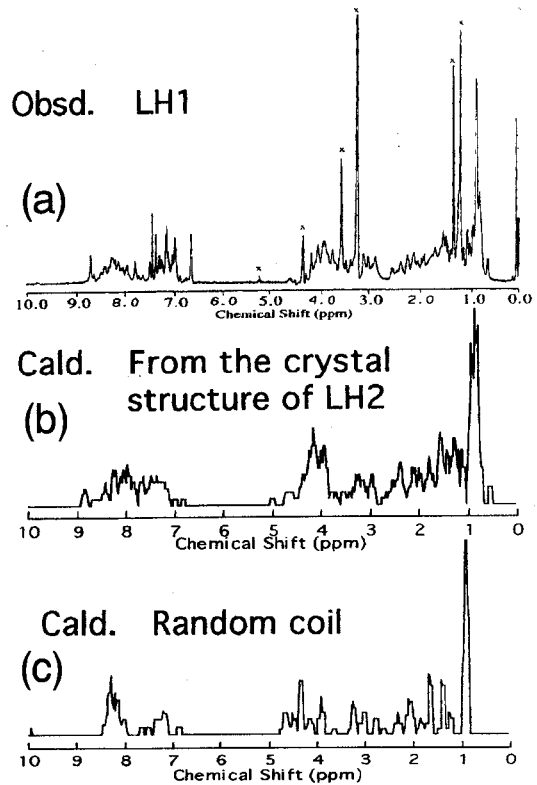


Fig. 1 (a) ^1H NMR spectrum of LH1 β chain of *Rb. sphaeroides*, (b) calculated with the co-ordinate of *Rps. acidohla* LH2 β chain and (c) calculated assuming random coil chain for *Rb. sphaeroides* LH1 β chain.

参考文献

- 1) Mc Dermott et al., Nature (1995) 374, 517-521
- 2) Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schuler, K., and Michel, H. Structure (1996) 4, 581-597
- 3) Karrasch, S., Bollough, P. and Ghosh, R. EMBO J. (1995) 14, 631-638
- 4) Girvin, M.E., and Fillinganc, R.M. Biochemistry (1995) 34, 1635-1645
- 5) Perurushin et al., Eur. J. Biochem. (1994) 219, 571-583
- 6) Asakura, T., Taoka, K., Demura, M. and Williamson, M. P. J. Biomol. NMR (1995) 6, 227-236

固体高分解能¹³C NMRによる
 バクテリオロドプシン化学合成フラグメントの
 高次構造解析
 (姫工大・理) 内藤 晶・○木村 成輝・辻 暁・斉藤 肇

A conformational study on chemically synthesized fragments of bacteriorhodopsin by high resolution solid state ¹³C NMR

Akira Naito, Shigeki Kimura, Satoru Tuzi, Hazime Saito
 (Department of Life Science, Himeji Institute of Technology)

Selectively [¹³C]Ala-A(6-42) and -D(102-131) of bacteriorhodopsin (bR) were chemically synthesized and their ¹³C NMR spectra in DMPC multibilayers were recorded. We found that ¹³C CP-MAS NMR peak of [¹³C]Ala¹⁴-A in DMPC bilayers is shifted downfield by 0.8ppm (α_{\parallel} -helix) as compared with that of powder samples obtained from TFA or HFIP (α_{\perp} -helix), although no such displacement was noted for the [¹³C]Ala¹⁸-A. Differential conformational fluctuation of the fragment A in the multibilayers was also discussed.

1. はじめに

膜内在性タンパク質は、疎水性アミノ酸の含有率が高い膜貫通の α -ヘリックスから成り、イオンポンプ、膜輸送、情報伝達などに重要な機能を果たしている。高度好塩菌Halobacterium Salinariumの紫膜に存在する膜内在性タンパク質のバクテリオロ

ドプシン(bR)は、7本の膜貫通ヘリックスから構成され(図1)、レチナルとの相互作用によりプロトンポンプ機能を持つことが知られている。本研究室では、これまでに固体高分解能NMRによる[¹³C]Ala標識bRの測定を行い、その¹³C CP-MAS NMRスペクトルの7本に分離したピークを、 α_{\parallel}

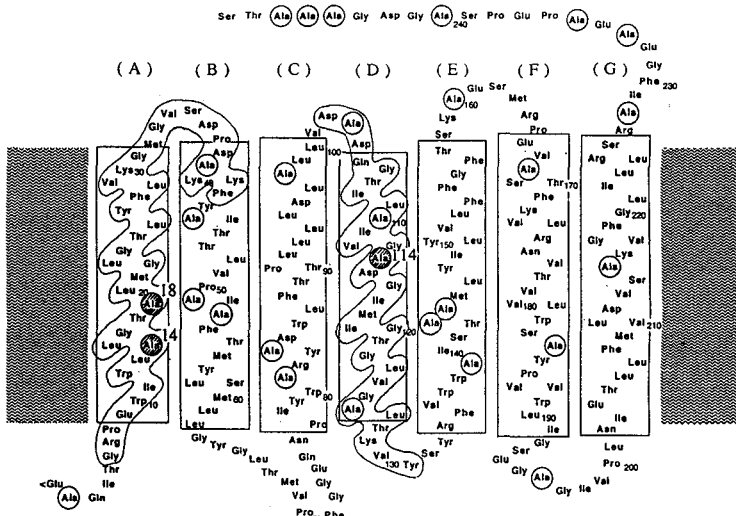


Fig1. Secondary structure of bR based on Henderson model

固体高分解能NMR、バクテリオロドプシン、構造解析、化学合成、脂質膜

ないとう あきら、きむら しげき、つじ さとる、さいとう はじめ

ヘリックス(14.5~15.5ppm)、 α_{II} ヘリックス(15.5~16.5ppm)、ループ(16.5~18.0ppm)に分類した[1, 2]。また、 ^{13}C DD-MAS NMRスペクトルでは、この他にN-およびC-末端からの信号が得られている。しかし、生合成によって標識したbRの ^{13}C CP-MAS NMRスペクトルでは、bRのアミノ酸配列中のN-およびC-末端を除く22個のAlaすべてが観測されるために、個々の信号の帰属は容易ではない。個々の位置におけるAla残基の信号帰属のために野性株と変異株のスペクトルの比較を行ってきたが、選択的に同位体標識できる化学合成フラグメントによる帰属も有用であると考えられる。ここでは、bRのAおよびD鎖におけるその実例と各部位における運動性を調べたので報告する。

2. 実験

bRの $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ または $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{18}$ -A(6-42)および $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{114}$ -D(102-131)のペプチドフラグメントをFmoc固相法により化学合成し(図1)、逆相HPLCにより精製した。これらの試料をDMSO、TFA、HFIPの各溶媒に溶解し、結晶または粉末試料を調製した。また、これらのHFIP溶媒にDMPCを混合し、脂質フィルムを作成後、水和、超音波処理あるいは凍結融解を繰り返すことで、膜への取り込みを行った。

各粉末試料は、20°CにおいてCP-MAS法により測定した。膜への再構成試料は、CP-MASおよびDD-MAS法を併用し、-80°C~30°Cの温度範囲で測定した。試料は、いずれも5mm ϕ のジルコニア製ローターに詰め、Chemagnetics社製CMX-400 NMR分光器により測定した。

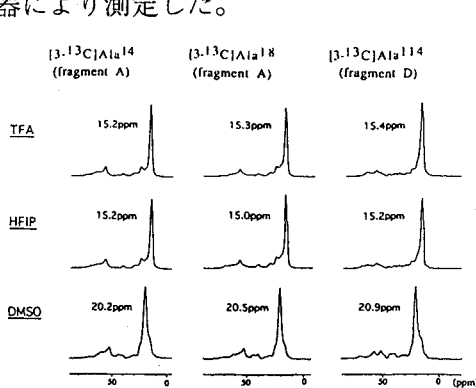


Fig2. ^{13}C CPMAS NMR spectra and chemical shift values of chemically synthesized $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -labelled bR fragments A(6-42) or D(102-131) in solid state.

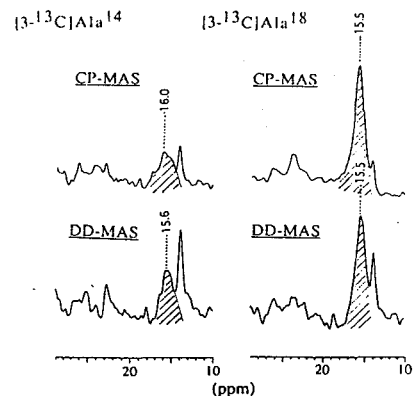


Fig3. ^{13}C NMR spectra of chemically synthesized $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ or $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{18}$ labelled bR fragments A(6-42) in DMPC bilayers, recorded at 20°C.

Table1. ^{13}C chemical shifts of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ residues of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ labelled bR fragments, recorded at 20 °C. (ppm)

	Solid			multibilayers
	from TFA	from HFIP	from DMSO	(DMPC)
$[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ -A	15.2	15.2	20.2	16.0
$[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{18}$ -A	15.3	15.0	20.5	15.5
$[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{114}$ -D	15.4	15.2	20.9	21.0, (16.3)

3. 結果と考察

図2に各粉末試料の ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを示す。A鎖のAla 14 、Ala 18 およびD鎖のAla 14 のいずれにおいても、その化学シフト値が、DMSO溶媒から得た試料は20.0ppm付近であったことから β -シート構造を、TFAおよびHFIP溶媒から得た試料は15.2ppm付近であったことから α_1 -ヘリックス構造をとることが分かった[3,4]。

図3に20°Cにおける $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ -および $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{18}$ -A(6-42)のDMPC膜中での ^{13}C NMRスペクトルを示す。また、各位置の $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ の粉末状態およびDMPC膜中での化学シフト値を表1にまとめた。膜への再構成試料では、表1に示したように標識アミノ酸残基の位置によりその化学シフトの値が大きく異なっている。この化学シフト値から、 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ -A(6-42)は図4のbRのスペクトル[1]における(a)で示した位置の信号(α_{II} -ヘリックス)に、 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{18}$ -A(6-42)は(b)で示した位置の信号(α_1 -ヘリックス)に帰属でき、bRの ^{13}C 化学シフト値の帰属に有用であることが分かった。

また、CP-MASとDD-MASのいずれの測定方法においても $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ -A(6-42)のNMR信号は、高磁場にある脂質のメチルのピークに比べ低く、ブロードであった。これは、交差分極の効率の低下ではなく、ラジオ周波数との干渉、すなわち、 10^5Hz 程度の運動の存在によることが分かる(図3)。また、図5に示したように $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ -A(6-42)の信号は、温度を下げるとシャープになった。低温では運動の束縛によりラジオ周波数との干渉領域から抜けるために、図5の10°C以下で見られるような信号強度の回復が起こったものと考えられる。一方、 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{18}$ -A(6-42)のNMR信号はいずれの温度でもシャープであったことから、Ala 18 付近ではこのようなゆらぎは存在しない。このようなゆらぎの有無は、脂質の信号が34.4ppmのゲル

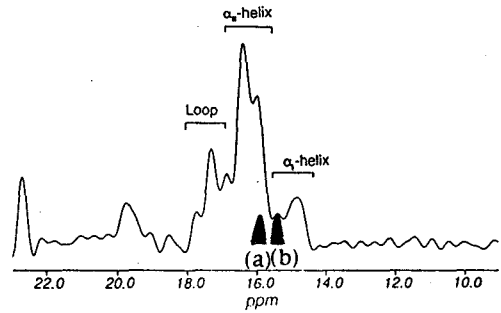


Fig4. ^{13}C CPMAS NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -labelled bR in the purple membranes, recorded at 20°C.

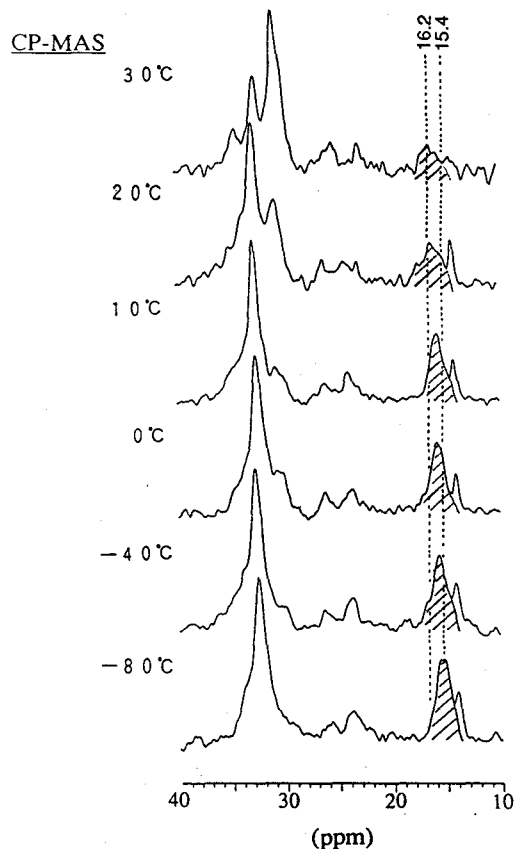


Fig5. ^{13}C CPMAS NMR spectra of chemically synthesized $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ -labelled bR fragment A(6-42) in DMPC bilayers, recorded at $-80\sim 30^\circ\text{C}$.

相から30.5ppmの液晶相への転移に対応している点で興味深い。図1.に示したHendersonのbRモデル[5, 6]からすると、Ala¹⁴とAla¹⁸はともに同じA鎖のヘリックスを形成させているが、約1ピッチだけAla¹⁴がAla¹⁸より膜表面に近い。この1ピッチの差がAla¹⁴にゆらぎを生じさせる要因と考えられる。また、図5の[3-¹³C]Ala¹⁴-A(6-42)信号の位置は、低温では α_1 -ヘリックスの化学シフト値に移行し、TFAおよびHFIP溶媒からの粉末試料の化学シフト値に近づいた。これは、Ala¹⁴における α_{II} -ヘリックスの化学シフト値は、ゆらぎによる化学シフトの平均化によって生じている可能性を示唆している。

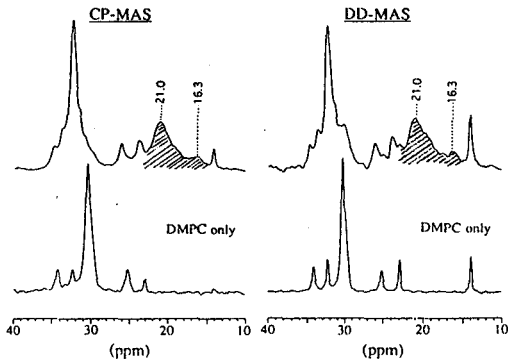


Fig.6. ¹³C NMR spectra of chemically synthesized [3-¹³C]Ala¹¹⁴ labelled bR fragment D(102-131) in DMPC bilayers, recorded at 20°C.

さらに、図6に20°Cにおける[3-¹³C]Ala¹¹⁴-D(102-131)のDMPC膜中での¹³C NMRスペクトルを示す。[3-¹³C]Ala¹¹⁴-D(102-131)のNMR信号は、CP-MAS、DD-MASともにブロードであり、21.0ppmのメインのピークの他に、わずかながら16.3ppmにも現われた。この16.3ppmの信号は α_{II} -ヘリックスの化学シフト値であるが、21.0ppmの信号は β -シートの化学シフト値である。これは、Ala¹¹⁴に隣接の親水性Aspがあり、D鎖のみでは α_{II} -ヘリックスとして膜中に安定にはとりこまれていないことを示している。

4. まとめ

本研究により化学合成フラグメントの利用により、bRのAla¹⁴、Ala¹⁸およびAla¹¹⁴の信号の帰属が可能となった。特に、DMPC膜中ではAla¹⁴とAla¹⁸は同じA鎖にあるにも関わらず、それぞれ α_{II} -ヘリックス、 α_1 -ヘリックスと、異なる構造をとっていることが分かった。bRにおいても見られるこのような差異の原因の一つとして、 α_{II} -ヘリックスは α_1 -ヘリックスの10⁵Hzの時間尺度のゆらぎによるものとの解釈も可能となった。さらに、D鎖におけるAla¹¹⁴付近は大部分が β -シート構造となったが、D鎖単独の合成フラグメントではAla¹¹⁴は親水性のAspが隣接しているため膜中でのヘリックスの安定性が悪いが、bR中ではプロトンチャンネルを形成する位置にあり、ヘリックス間の相互作用によりヘリックスが安定化しているものと考えられる。

- 1) S. Tuzi, A. Naito and H. Saito, *Biochemistry*, **33**, 15046-15052 (1994)
- 2) S. Tuzi, A. Naito and H. Saito, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 294-301 (1996)
- 3) H. Saito, *Magn. Reson. Chem.*, **24**, 835-852 (1986)
- 4) H. Saito and J. Ando, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, **21**, 209-290 (1989)
- 5) N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin and R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, **259**, 393-421 (1996)
- 6) R. Henderson, J. M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing, *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-929 (1990)

1P65 固体高分解能¹³C-NMRによるバクテリオ ロドプシンの膜外部位の高次構造解析

(姫工大・理) 辻 暁、○山口 悟、内藤 晶、斉藤 肇

A High-resolution Solid-State ¹³C-NMR Study of the Higher-order Structure of Bacteriorhodopsin at Extramembranous C-terminus.

Satoru Tuzi, ○Satoru Yamaguchi, Akira Naito and Hazime Saitô

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We have recorded ¹³C-NMR spectra of [¹³C]Ala labeled bacteriorhodopsin (bR) and papain treated bR in order to clarify the conformation of extramembranous C-terminus. We found that α_{II} -helix is formed at the extramembraneous site of C-terminus either at low pH (pH4.25) or low temperature (10°C). This helix, however, was destabilized at lower pH due to electrostatic interaction between Glu232, Glu234 and Arg225, Arg227.

【1 序論】

Halobacterium salinariumの細胞膜中には膜内在性光プロトンポンプ蛋白質であるBacteriorhodopsin (bR)が存在する。この蛋白質は膜中に三量体の状態で存在し、1分子は7本の膜貫通 α -helixを持ち、248個のアミノ酸残基から構成されている。bRについてはR.Hendersonらのグループによって二次元結晶を-268°Cの状態での低温電子顕微鏡を用いて3.5 Åの分解能で構造解析された結果があるが¹⁾膜外部位 (N末端、C末端およびループ部位) については構造の揺らぎがあり、明確な情報が得られていない。固体高分解NMRを用いることによりこのようなゆらぎの大きい膜表面部位の構造とダイナミクスに関し、詳細な情報を得られると考えられる²⁻³⁾。我々はループおよびC-末端部位には電荷を持つアミノ酸が多数局在し、静電相互作用によるコンフォメーション

固体高分解能¹³C-NMR、バクテリオロドプシン、高次構造、運動性
つじさとる、○やまぐちさとる、ないとうあきら、さいとうはじめ

ンへの影響が期待されることから、pH変化による膜表面部位の高次構造変化を固体高分解能 ^{13}C NMR法を用いて解析し、C末端部位の α -ヘリックス構造形成に関する知見を得たので報告する。

【2 実験】

試料として $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ を含む合成培地で高度好塩菌を培養してbR中のAla残基の側鎖メチル炭素を ^{13}C 標識した紫膜と、その後パパイニン処理を行い、Ala 233以降のC-末端部位を切断した紫膜を調製した。これらをpH4.25とpH6.5の5mMクエン酸緩衝液に懸濁し、遠心沈殿して試料とした。測定温度は 20°C ~ 10°C 、暗順応状態で ^{13}C NMR測定を行った。このためCross Polarization-Magic Angle Spinning (CP-MAS)法とDipolar Decoupled-Magic Angle Spinning (DD-MAS)法を用いた。

【3 結果と考察】

1) pH変化による高次構造変化

図1に $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ ラベルbRの 20°C におけるpH6.5とpH4.25のDD-MAS スペクトルを示す。スペクトルのデコンボリューションによりpH上昇と共に α_1 -ヘリックス構造に帰属される15.9ppmの信号強度が上昇し、16.9ppmのランダムコイ

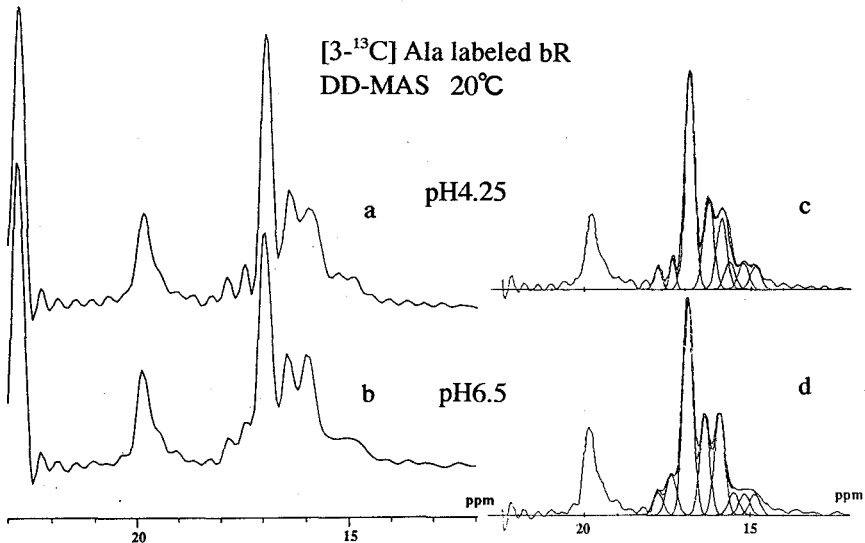


Figure1 100.7MHz ^{13}C DD-MAS spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ labeled bacteriorhodopsin recorded at 20°C (a) pH4.25. and (b) pH6.25. Spectra (c) and (d) are obtained by deconvolution of (a) and (b), respectively.

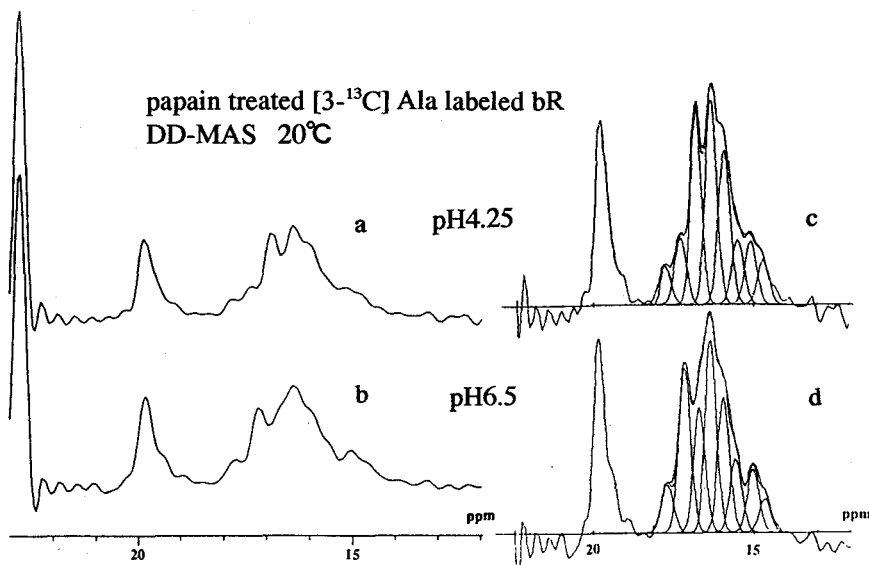


Figure2 100.7MHz ^{13}C DD-MAS spectra of papain-treated $[3-^{13}\text{C}]$ Ala labeled bacteriorhodopsin recorded at 20°C (a) pH4.25 and (b) pH6.5. Spectra (c) and (d) are obtained by deconvolution of (a) and (b), respectively.

ルの信号強度の減少とループ部位の17.4ppmの信号強度の増加が観測された。

図2にパパイン処理した $[3-^{13}\text{C}]$ AlaラベルbRの 20°C におけるpH6.5とpH4.25のDD-MASスペクトルを示す。16.9ppmおよび、15.9ppmの信号強度はC末端部位のAla残基の切除によって減少している。同時に、pH変化に伴う15.9ppmの信号強度変化も見られない。このことから、pH上昇によるランダムコイル $\rightarrow\alpha_1$ -ヘリックス構造のコンフォメーション変化は、パパインにより切除されるAla233よりC末端側の膜外部位に由来すると考えられる。pHに依存するコンフォメーション変化の原因として、荷電性側鎖間の静電相互作用が考えられる。pH4.25はGlu側鎖のpKaであり、このとき側鎖の約50%が解離していない。pHを上昇させると共に解離の度合いが大きくなり、pH6.5では約99%解離する。図1でpHの低下に伴う α_1 -ヘリックス構造の減少はC末端部位のGlu残基の電荷の減少によると考えられる。膜表面に近く、運動性が制限されていると考えられる部位に位置するGlu232, Glu234の側鎖⁴⁾はこの部分が α -ヘリックス構造をとると反対電荷を持つArg225、Arg227と近接する。Argの側鎖のpKaは12.48であり今回の実験条件においてはほぼ100%電荷を持っている。これらのことより中性において膜外C末端部位の膜表面近傍はGlu232、Glu234と

Arg225、Arg227側鎖の静電相互作用により安定化される α_1 -ヘリックス構造をとるモデルが考えられる。(図3)

またパプイン処理により消滅しない構造変化はC末端以外の膜外ループ部位のコンフォメーション変化を示唆している。

2) 温度変化による高次構造変化

低温(10℃)の条件下ではpH変化による α -ヘリックス \rightleftharpoons ランダムコイルの構造変化は観測されなくなり、15.6ppmの α_1 -ヘリックス領域の信号増加が新たに観測される。パプイン処理を行うとこのような信号強度増加が消滅することからこの変化は上述のC-末端の膜表面近傍部分の α_1 -ヘリックス構造に帰属され、膜外部分の構造に温度依存性があることが分かる。

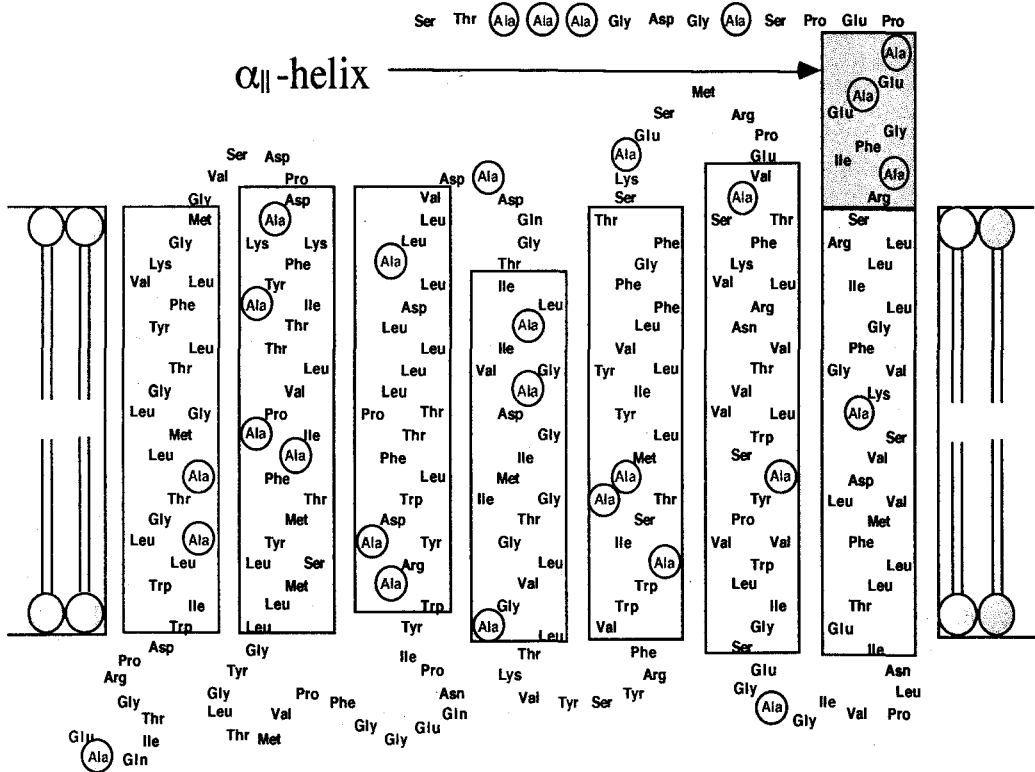


Figure3 Amino acid sequence of Bacteriorhodopsin.

- 1) N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin and R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, **259**, 393-421 (1996)
- 2) S. Tuzi, S. Yamaguchi, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi and H. Saitô, *Biochemistry*, **35**, 7520-7527 (1996).
- 3) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 294-301 (1996).
- 4) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, *Biochemistry*, **33**, 15046-15052, (1994)

固体高分解能 NMR を用いた横緩和時間測定による
ペプチド中の遅い分子運動の検出

(姫路工大理) ○内藤 晶、西村勝之、福谷 章、上平美弥、
辻 暁、斉藤 肇

Slow molecular motion detected in transverse relaxation times by
high resolution solid state NMR

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

A. Naito, K. Nishimura, A. Fukutani, M. Kamihira, S. Tuzi, and H. Saitô

Influence of ^{13}C transverse relaxation times (T_2) under CP MAS conditions was examined for a variety of solid amino acids and peptides by varying the ^1H decoupling field to detect the motional information. It was found that the ^{13}C $1/T_2$ values strongly depend on $1/\omega_1^2$ values. This results indicate that dipolar interactions dominate the relaxation mechanism when the decoupling field is weak while chemical shift interactions dominate when that is strong. It is also noted that the ^{13}C T_2 values are sensitive to the slow motion of the individual carbon moiety.

【序】 固体高分解能 NMR によって、測定される希薄核の横緩和時間には分子運動の情報が含まれているものの、ランダムな運動とコヒーレントな ^1H のデカップリング磁場との干渉の効果が含まれるため、解釈が複雑になる。このため、固体高分解能 NMR によって得られる横緩和時間から分子運動の情報を得るための詳しい検討はあまりされていない。本研究では CP MAS の条件下で、希薄核の横緩和時間から各相互作用を分離して、分子運動の情報を得るための基礎検討を行ったので報告する。

【デカップリング磁場存在下での横緩和時間】 CP MAS 条件下での ^{13}C 核の横緩和時間 T_2 は ^{13}C - ^1H 双極子相互作用の揺動による双極子項 $T_{1\text{DD}}$ と MAS 条件下での化学シフト異方性の揺動による化学シフト項 $T_{2\text{CS}}$ の和として次式で表せる^{1,2}。

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2\text{DD}}} + \frac{1}{T_{2\text{CS}}} \quad (1)$$

固体高分解能 NMR・横緩和時間・スピンエコー・双極子相互作用・化学シフト

ないとう あきら・にしむら かつゆき・ふくたに あきら・かみひら みや・
つじ さとる・さいとう はじめ

ここで、

$$\frac{1}{T_2^{\text{DD}}} = \frac{4\gamma_I^2 \gamma_S^2 h^2}{15r^6} I(I+1) \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \right) \quad (2)$$

$$\frac{1}{T_2^{\text{CS}}} = \frac{\omega_b^2 \delta^2 \eta^2}{45} \left(\frac{\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (3)$$

式 (2)、(3) において ω_I は ^1H デカップリング磁場の角速度、 ω_r はローターの角速度、 ω_b は観測核のラーモア角速度、 δ は化学シフトの異方性、 η は化学シフト相互作用の非対称パラメーターを表す。式 (2)、(3) から、もし双極子項が主な緩和機構であり、 $\omega_I \tau_c \geq 1$ の条件を満たす遅い運動が存在する場合、 $1/T_2$ は強い $1/\omega_I^2$ 依存性のあることが分かる。また化学シフト項が主な緩和機構の場合は ω_I 依存性はないが、 $\omega_r \tau_c \geq 1$ の条件を満たす遅い運動が存在する場合はスピニング周波数依存性のあることが分かる。したがって、 ω_I を変化させることによって、双極子項と化学シフト項を分離して運動の解析を容易にすることができる。

【実験】 ^{13}C 核の横緩和時間は図 1 に示す交差分極スピンエコーパルス系列を用いて測定した。マジックアングル回転(MAS)の条件下で T_2 を測定する場合、 π パルスの位置をローターの周期と同期させて、回転エコー信号の頂点から FID を観測する必要があった。測定に使用したペプチドは、ペプチド合成機により Fmoc 法で合成し、HPLC で精製した後、結晶化した。

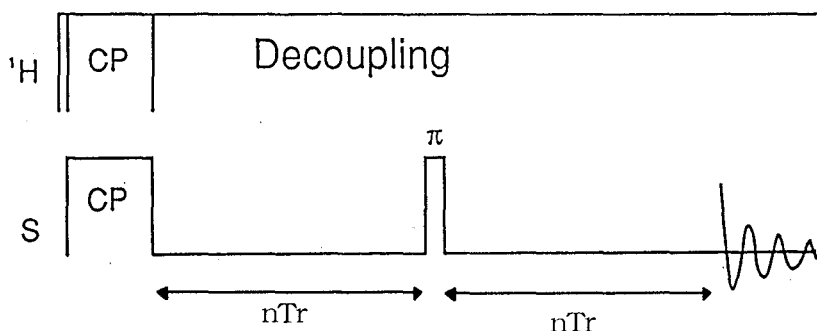


Fig. 1 Pulse sequence for measuring transverse relaxation time

【結果と考察】 図 1 に示すパルス系列を用いて測定した L-アラニンの ^{13}C 核の横磁化の減衰の様子を図 2A に示す。ここで、 $\text{CH}_3, \text{C}\alpha, \text{COO}^-$ 炭素はそれぞれ独立の T_2 値を示すことが分かった。次に、 ω_I の強度を変化させた結果、大きな

ω_1 依存性のあることが分かった。この ω_1 依存性に関して、 $1/T_2$ を $1/\omega_1^2$ についてプロットした結果を図 2B に示す。このプロットにおいて CH_3 および COO^- 炭素核はほぼ同じ傾きの直線関係を示しているが、 COO^- 炭素については強い ω_1 を照射した場合 $1/T_2$ は ω_1 に対する依存性が小さくなった。このように強い ω_1 依存性が見られることから、L-アラニンには $\omega_1 \tau_c \geq 1$ を満たす遅い運動の存在が示唆される。メチル基の運動は速いことが知られているので、この遅い運動はアミノ基の 3 回対称軸周りの運動であると考えられる³。さらに、 COO^- 炭素の $1/T_2$ が 50 kHz を越す強い ω_1 で一定の値になったのは、 ω_1 依存性のない化学シフト項の寄与が大きくなったことによると考えられる。

図 3A にはグリシンにおける COO^- 炭素の $1/T_2$ 対 $1/\omega_1^2$ の関係をプロットした。この場合も L-アラニンの場合と同様に、50 kHz を越す強い ω_1 の領域では $1/T_2$ の値が一定になった。この領域では化学シフト項が緩和に大きく寄与していると考えられるので、さらに ω_r を変化させる実験をおこなった結果、図 3B に示すように、ほとんど ω_r 依存性は存在しなかった。したがって、L-アラニンではローター周波数程度の遅い運動は存在しないことを意味する。以上の結果

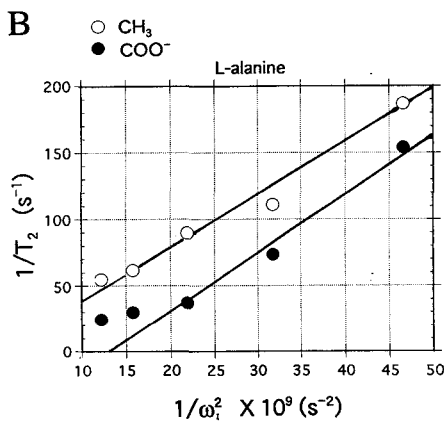
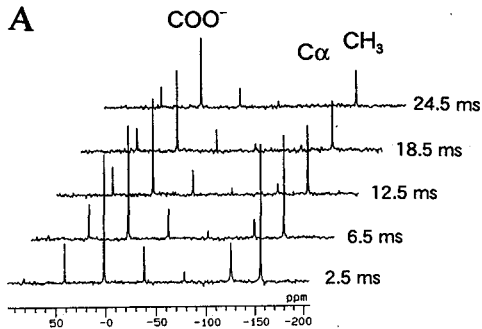


Fig. 2 A: Decay of transverse magnetization and B: Plot of $1/T_2$ vs. $1/\omega_1^2$ in L-alanine

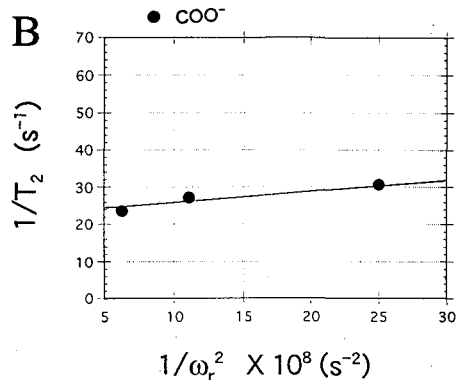
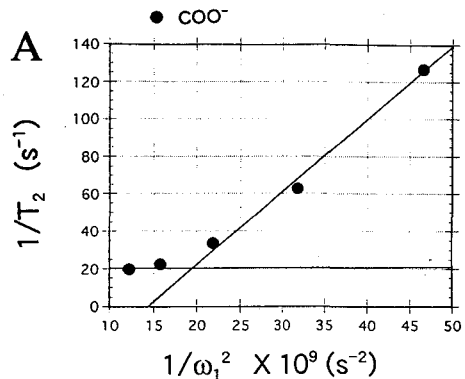


Fig. 3 A: Plot of $1/T_2$ vs. $1/\omega_1^2$ and B: Plot of $1/T_2$ vs. $1/\omega_r^2$ in glycine

から、遅い運動が存在する場合、比較的強いデカップリング磁場(50 kHz以上)を照射した場合には、COO⁻やCO炭素では化学シフト項が横緩和の主要な項になり、プロトンが炭素核に直接結合しているC α やCH₃炭素では双極子項が主要な項になると考えられる。表1には50 kHzのデカップリング磁場を照射した場合の各アミノ酸及びペプチドの¹³C T₂の値を示す。COO⁻炭素はいずれの試料においても長いT₂値を示すのに対して、CO炭素はT₂値に大きな分布を示した。CO炭素の化学シフトの異方性は試料によってあまり大きな変化がないことを考慮すると、この大きな値の変化は分子の運動性の違いによるものと考えられる。また、CO基の運動はペプチド主鎖の運動を反映していると考えられるので、GlyGlyやValGlyGlyの主鎖に比べてEnkephalinの主鎖は運動性が高いことを示している。

【まとめ】 固体高分解能NMRにおいて、¹³C核の横緩和時緩和は、スピニングパルス系列において、 π パルスの位置をローターの周期と同期させることで測定できることを示した。¹³C横緩和時間には¹Hデカップリング磁場による寄与が含まれるが、このデカップリング磁場の強度を上げることにより、運動の情報を含む双極子項と化学シフト項を分離することが可能になった。この結果、Enkephalin分子は主鎖の運動性が高いことが判明した。

Table 1. ¹³C T₂ values (ms) of amino acids and peptides at $\nu_1=50.0$ kHz

	COO ⁻	CO	C α	CH ₃
Gly	44.3			
Ala	33.5			16.3
GlyGly	32.0	16.9	3.4(Gly ¹) 7.0(Gly ²)	
ValGlyGly	28.9	15.5(Val ¹) 21.3(Gly ²)	8.7(Val ¹) 7.0(Gly ^{2,3})	
Leu-enkephalin		5.9(Tyr ¹) 4.3(Gly ³)		
Met-enkephalin		3.1(Gly ³)		

【文献】

1. W.P. Rothwell and J.S. Waugh, J. Chem. Phys., 74, 2721 (1981).
2. D. Suwelack, W.P. Rothwell and J.S. Waugh, J. Chem. Phys., 73, 2559 (1980).
3. J.R. Long, B.Q. Sun, A. Bowen, and R.G. Griffin, J. Am. Chem. Soc., 116, 11950 (1994).

Structure of membrane fusion peptide

¹H-NMR study in water, water/trifluoroethanol mixture and dodecylphosphocholine micelle.

Peter V. Dubovskii¹, Li Hua¹, Sho Takahashi³ and Kazuyuki Akasaka^{1,2*}

¹Graduate School of Science and Technology and ²Department of Chemistry Faculty of Science Kobe University, Kobe 657, Japan

³Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan

Abstract:

We studied the structure and function of 20-residue analog of a fusion peptide from haemagglutinin of influenza virus called E5 (1). This peptide itself was shown to be fusion active against phosphatidylcholine small and large unilamellar vesicles at acidic pH. To understand how the structure of E5 is related to its membrane fusion activity, structure of this peptide was studied in water, water/trifluoroethanol (TFE) mixture and dodecylphosphocholine (DPC) micelle based on ¹H-NMR and optical spectroscopic techniques. Localization of the peptide inside the DPC micelle was elucidated with the use of spin-labeled stearates. Combined with the data obtained by infra-red spectroscopy the results suggest a model for the peptide induced fusion of membranes.

Key words: fusion-peptide, DPC micelle, spin-label, 2D- ¹H-NMR

Structure in water and water/TFE mixture

The peptide was shown to be mainly monomeric at neutral pH in water at pH 6.7 for the range of concentrations up to 2.5 mM. $^1\text{H-NMR}$ -spectroscopy at 500 MHz revealed the presence of "nascent helical" structure (Fig., A). This structure was stabilized after addition of TFE. $^1\text{H-NMR}$ at 400 MHz detected an α -helical structure formed within residues 1-12 and a slight helicity in residues 14-20 (Fig, B). Spin-coupling constants $^3J_{\text{C}\alpha\text{H-HN}}$ about 7-8 Hz for residues 17-19, 4-5 Hz for residues 3-11, 14, 15 are consistent with the above conclusion. Upfield shift of α -protons was also more pronounced for residues 1-12, 14,15 but comparatively low for residues 16-20.

Structure in DPC micelle

In a DPC micellar solution, the structure of monomeric peptide was essentially the same as in the water/TFE except the helicity was more pronounced (Fig., C). Based on NMR NOE constraints the 3D-structure was calculated revealing amphiphilic helix consistent with the secondary structure suggested above.

The topology of the E5 peptide within the DPC micelle was studied by $^1\text{H-NMR}$ at 750 MHz by using spin-labeled 5-doxyl-, 10-doxyl-, 16-doxylstearates at acidic pH. The peptide helix 1-12 was found to lie nearly parallel to the surface of the micelle, the hydrophobic side of the helix probing micelle interior. The C-terminal residues with low helix-forming potential were much less perturbed by the spin-labels and are likely to be out of the micelle.

Structure of aggregated peptide

At pH about 5 in both water and water/TFE mixtures $^1\text{H-NMR}$ spectra became broadened out beyond detection showing the peptide tend to aggregate and highly heterogeneous systems are formed. IR-attenuated total reflection spectroscopy revealed precipitated peptide is mainly in the helical and conformation of extended β -pleated sheet.

Mechanism of membrane fusion

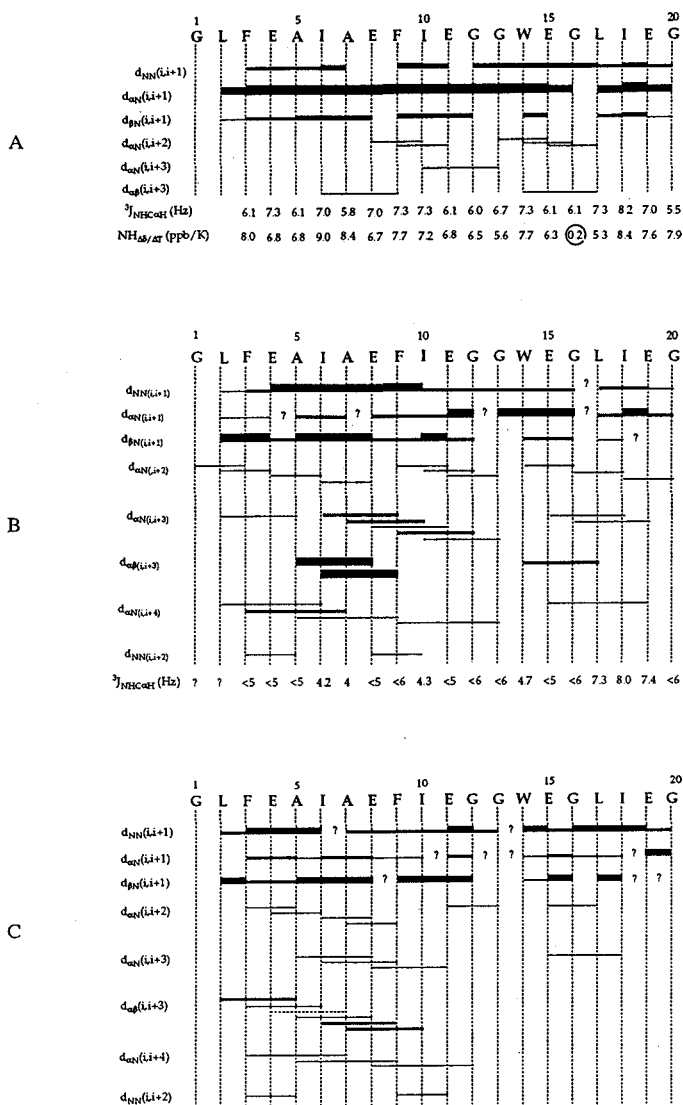


Fig. Summary of NOE data obtained for E5 (A) in H₂O/D₂O (90%/10%) at pH6.7; (B) in TFE/H₂O(75%/25%, v/v); and (C) in DPC (mole ratio of DPC/E5 is 100:1) at pH5.5. The height of the boxes is proportional to estimated NOE intensities, and question marks indicate ambiguous assignments due to spectral overlap. $^3J_{\text{HN}\alpha}$ coupling constants are indicated in each residue of E5(except the first Gly) for A and B diagrams. For A diagram, temperature gradients of amide protons are given.

The aggregation of E5 was shown recently to be important for its fusion activity (2). Taking the above data showing the E5 peptide is largely α -helical when in the monomeric form but aggregates with a formation of β -structure, the following mechanism of fusion activity of E5 peptide can be suggested. At neutral pH the E5 peptide has low tendency to aggregate in water solution and is present in mainly unbound to the membrane form. The acidification of the solution forces peptide binding to the membrane. When the monomeric E5 is bound to the membrane, probably, its C-terminal residues are probably exposed to the solvent making possible the peptide association leading to the formation of β -sheet with the C-terminal segments. The extended formation of such a structure by peptides adsorbed to surfaces of different membranes eventually lead to their fusion. These structural changes suggested for E5 peptide during membrane fusion seems to be similar to ones suggested for calcitonine analog peptides (3), according to which the peptides are bound to the membrane in the monomeric amphiphilic helical form first and then aggregate with the formation of β -structure.

References:

1. Takahashi, S. (1990) *Biochemistry*, 29: 6257-6264.
2. Ishiguro, R., Matsumoto, M., and S. Takahashi (1996) *Biochemistry*, 35: 4976-4983.
3. Bauer, H., Muller, M., Goette, J., Merkle, H. and U. Fringelli (1994) *Biochemistry*, 33: 12276-12282.

(京大化研) ○岡村恵美子・若井千尋・中原 勝

**Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study on Microstructure and
Dynamics of Phase Transition in Phospholipid Liposomes**Emiko Okamura, Chihiro Wakai, and Masaru Nakahara
Institute for Chemical Research, Kyoto University
Uji, Kyoto-fu 611

Microstructure and dynamics of nonsonicated and sonicated liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) have been investigated by ^{13}C NMR spectroscopy at various temperatures. Analyzing line widths, we have found that choline methyl group is mobile even at low temperatures, indicating strong hydration to the N^+ -methyl part, in contrast to the hydrocarbon chain region only with large mobility at high temperatures above phase transition. Chemical shift analysis has revealed the lowered transition temperature in small-sized sonicated liposomes. Finally, it has been demonstrated that the phase transition is characterized by the upfield chemical shift change of chain atoms and by the abrupt width-decrease of both hydrophilic and hydrophobic parts.

1. 緒言

NMR によるリン脂質リポソームの構造研究は、これまで主に超音波照射により作製したリポソームを対象としてきた。しかしながら、リポソームの調製方法は研究者により必ずしも定まっておらず、調製法の相違にもとづくリポソーム構造の相違について、現在まで詳細な議論は行われていない。そこで我々は、超音波照射しないものおよび種々の方法で超音波処理したリン脂質リポソームについて、広い温度範囲で ^{13}C の溶液 NMR 測定を行い、化学シフト値および線幅・ピーク強度やそれらの温度依存性の解析から、リポソームのマイクロ構造やダイナミクス、相転移挙動などの処理法による特徴や相違点を明らかにした。

リン脂質リポソーム・マイクロ構造・ダイナミクス・相転移・ ^{13}C NMR

おかむら えみこ・わかい ちひろ・なかはら まさる

2. 方法

リン脂質リポソームの調製 リン脂質にはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を用いた。Fig.1 に DPPC の各炭素の番号を示す。リポソームは、(I) DPPC に過剰量の重水 (重水素化率 99.8%) を加え (濃度 120 mM)、50°C で手で振盪させて水和させた multilamellar vesicle (MLV)、(II) I について NMR 測定をしたのち、NMR 管ごと超音波洗浄装置内で間接的に弱い超音波照射したもの、(III) 同じ試料溶液中に直接チップ (直径約 1.3 cm) を挿入して、温度 50°C、出力 80 W で 20 分間強力に超音波照射した粒径の小さい unilamellar vesicle (SUV) の3種類を作製した。

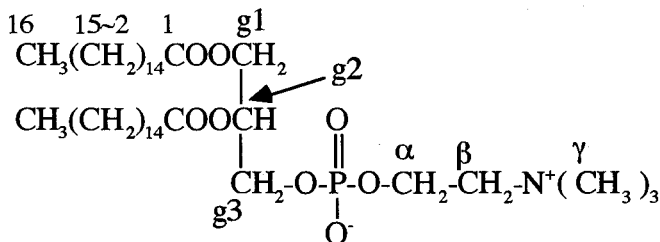


Fig.1. Notation and numbering of each carbon atom of DPPC.

NMR測定 ^{13}C -NMR測定には、日本電子製 (JEOL JNM-EX270 wide-bore type) 超伝導 NMR 装置を使用した。また、外部標準としてベンゼン (128.5 ppm) を用いた。

3. 結果 および 考察

NMRスペクトルの温度変化 Fig.2に、超音波照射しないリポソーム I および、直接超音波処理したリポソーム III の各温度における ^{13}C NMRスペクトルを示す。III では I に比べて全温度範囲にわたって全体のスペクトルがシャープであり、粒径の小さい SUV では、DPPC 分子各部分の運動性が増加していることがわかる。さらに、173 ppm にあらわれるカルボニル炭素 (C1) によるピークが MLV では 41°C 以上ではじめて認められるのに対して、SUV では 6°C ですで見られること、30~40 ppm 付近のメチレン鎖に帰属されるピークが MLV では 41°C 以上でシャープになるのに対して、SUV では 37°C で何本にも分裂すること、間接的に超音波照射したリポソーム II のスペクトルは MLV のそれと殆ど変わらないことなどから、MLV と SUV の間で、粒径や曲率の相違に基づく構造や相転移挙動の著しい相違が示唆された。

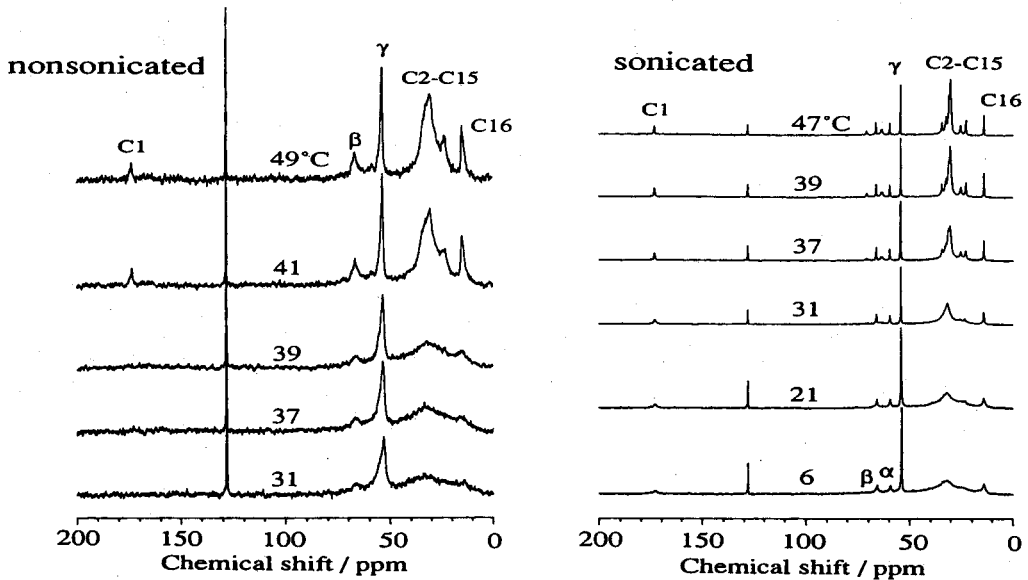


Fig.2. ^{13}C NMR spectra of nonsonicated (left) and directly-sonicated (right) liposomes at various temperatures.

相転移のダイナミクスと化学シフト値・ピーク強度 各原子 site を識別する NMR の特性を利用して、各炭素の部位ごとに化学シフト値とベンゼンに対するピーク強度の温度依存性について検討した。親水性コリン基の α , β , γ 各炭素の化学シフト値は、超音波照射の有無にかかわらず、温度とともにゆるやかに低磁場シフトするか殆ど変化しないのに対して、界面領域に存在するカルボニル C1 および疎水性炭化水素鎖の各炭素 C2~C16 のそれは、SUV (III) では 35~36°C 付近でそれぞれ低磁場および高磁場側にジャンプした。同じリポソーム III に対して FT-IR 測定を行った結果、炭化水素鎖の CH_2 逆対称および対称伸縮振動バンドの波数が同じ温度で高波数シフトしたことから、このジャンプは炭化水素鎖のゲル-液晶相転移に対応することを見出し、粒径の小さい SUV では相転移温度が一般に言われている 41°C よりも低下することを明らかにした。さらに、ピーク強度は、リポソーム I および II では部位によらず 40~41°C で増加するのに対して、III ではいずれの炭素についても 30°C 付近から増加し、各部分の原子の運動性や揺らぎが相転移の直前で著しく促進されることを見出すなど、原子 site によるダイナミックな構造の相違を明らかにすることができた。

遠隔C-H スピン結合定数を用いた鎖状化合物の立体配置決定法
 (東大院理) ○松森信明、野々村太郎、佐々木 誠、村田道雄、
 橘 和夫

Configurational Analysis of Acyclic Compounds

Based on ^{13}C - ^1H Long-Range Spin Coupling Constants

(Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo)

Matsumori, Nobuaki; Nonomura, Taro; Sasaki, Makoto; Murata, Michio; Tachibana, Kazuo

Attempts were made successfully to utilize long-range carbon-proton spin coupling constants ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$), which display dihedral angle dependency as is the case with $^3J_{\text{H,H}}$, to establish relative configurations on an acyclic carbon chain. The stereochemical relations among adjacent asymmetric carbon centers or those separated by a methylene can be determined on the basis of the dihedral angles of H/H, O/H and C/H derived from $^3J_{\text{H,H}}$ and $^{2,3}J_{\text{C,H}}$. $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ coupling constants were measured by hetero half-filtered TOCSY (HETLOC) and phase-sensitive HMBC for natural products; a stereostructurally known compound, okadaic acid, to verify efficacy of the protocol, and two others unknown. Measurement of coupling constants necessary to elucidate the relative configurations of acyclic portions of maitotoxin and amphidinol 3 led to the stereochemical assignments for the most parts of both compounds.

【序】天然有機化合物の立体構造解析に多用されているNOEは、配座が固定した系(例えば環状化合物)に対しては信頼できる実験法であり、立体配置を一義的に決定できる場合が多い。しかし、複数の立体配座が存在しうる系(鎖状化合物や大環状化合物)では、NOEの一義的解釈は一般に困難であり、正しい立体配置を決定できる確率は必ずしも高くない。そのため、多くの天然有機化合物の立体配置が未解明のまま残されている。そこで、我々はNOE以外で立体構造解析に利用できるNMRデータとしてスピン結合定数に着目し、その立体構造解析への応用を検討してきた。本研究では、遠隔スピン結合定数($^{2,3}J_{\text{C,H}}$)の二面角依存性に注目し、隣接不斉炭素間およびメチレンを挟んだ不斉炭素間の相対立体配置の決定法を開発した。さらに、この方法をマイトトキシンおよびアンフィジノール3の鎖状部分の立体配置決定に適用したので併せて報告する。

【測定法】本研究では、測定法として簡便かつ感度のよいhetero half-filtered TOCSY (HETLOC)法を主に用いた¹⁾。この測定法はHOHAHAに似たスペクトルを与えるが、各クロスピークはF1軸方向に $^1J_{\text{C,H}}$ で分裂し、F2軸方向に $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ でずれた形状をしている。したがって、このずれから容易にJ値を決定できる(Fig. 1)。ただし、HETLOC法はHOHAHAによる磁化移動を用いているため、四級炭素を含む場合や ^1H - ^1H スピン結合定数が小さい場合には適用できない。そこで、位相検波HMBC法と併用することにした。

位相検出HMBCスペクトルにおいて、ある水素(H)と炭素(Ca, Cb)とのクロスピーク強度($I_{\text{Ca,H}}$, $I_{\text{Cb,H}}$)は以下の式で表すことができる²⁾。

$$I_{\text{Ca,H}} / I_{\text{Cb,H}} = \sin^2(\pi J_{\text{Ca,H}} \Delta) / \sin^2(\pi J_{\text{Cb,H}} \Delta) \quad \text{Eq.1}$$

(Δ is an interval time in the phase sensitive HMBC pulse sequence)

ここで、 $J_{\text{Ca,H}}$ がHETLOCにより決まっていれば、他の炭素とのJ値($J_{\text{Cb,H}}$)は位相検出HMBCの相対クロスピーク強度から容易に算出することができる(Fig. 2)。つまり、HETLOCから得ら

遠隔C-Hスピン結合定数、マイトトキシン、アンフィジノール、鎖状構造、相対立体配置

まつもりのぶあき、ののむらたろう、ささきまこと、むらたみちお、たちばなかずお

れた $^2,^3J_{C,H}$ 値と位相検波HMBCのクロスピーク強度比を併用することによって、さらに多くの J 値を得ることが可能となる³⁾。

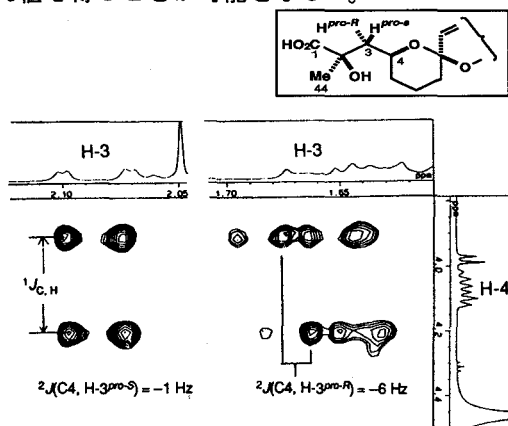


Fig.1 Expanded HETLOC spectrum of okadaic acid, showing the cross peaks between H₂-3 and H-4.

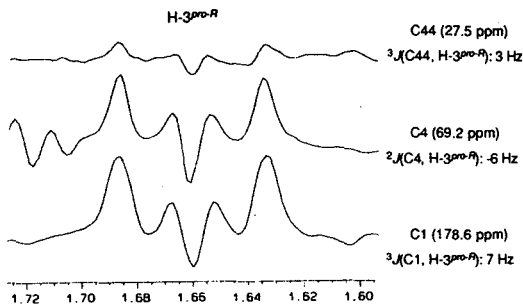


Fig.2 F2 cross sections of the phase-sensitive HMBC spectrum of okadaic acid. $^2J(C4, H-3^{pro-R})$ was obtained from the HETLOC spectrum, and the others were determined by Eq.1 and the intensity of the cross peaks.

【隣接不斉炭素間およびメチレンを挟んだ不斉炭素間の相対立体配置の決定】 $^3J_{C,H}$ は $^3J_{H,H}$ と同様の二面角依存性を示し、また $^2J_{C,H}$ も酸素とビシナル位の水素間の二面角によって変化することが報告されている (Fig.3)^{4a)}。ここで、 $^2,^3J_{C,H}$ と $^3J_{H,H}$ の測定から得られるO/H, C/HおよびH/H間の二面角情報に従ってC-C結合回りに官能基を配置すれば、隣接する不斉炭素間の相対立体配置を決定することができる。また、この操作をメチレン炭素と両側の不斉炭素の間で各々行くと、プロキラルなメチレン水素の帰属とともにメチレンを挟んだ二つの不斉炭素の立体配置を関係づけることができる。鎖状部分によくある多配座混合系においても、優先配座が存在する限りこの方法は適用可能である。

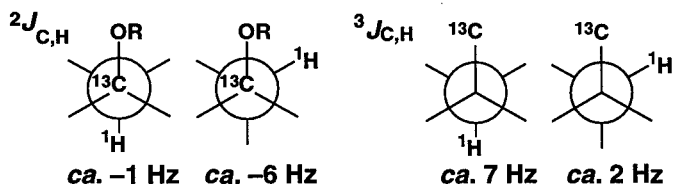


Fig.3 Typical values of $^2J_{C,H}$ for mono-oxygenated system and $^3J_{C,H}$. In a 1,2-dioxygenated system, $^2J_{C,H}$ for anti O/H is $0 \approx +1$ Hz and $^2J_{C,H}$ for gauche O/H is $-4 \approx -5$ Hz.^{4b)}

次に、X線結晶解析により立体配置が既知であるオカダ酸(25mg, 30 μ mol)を用いて、本方法の妥当性を検証した³⁾。オカダ酸の鎖状部分C27-C29について検討したところ、測定したスピン結合定数から予想されるC27とC29の相対立体配置は、実際の立体配置と一致していることが確認できた (Fig. 4)。オカダ酸の他の部分についても、本方法で推定した立体配置と立体配座は結晶構造に完全に一致し、本方法が天然有機化合物の立体配置決定について信頼性の高い解析法であることが示された。

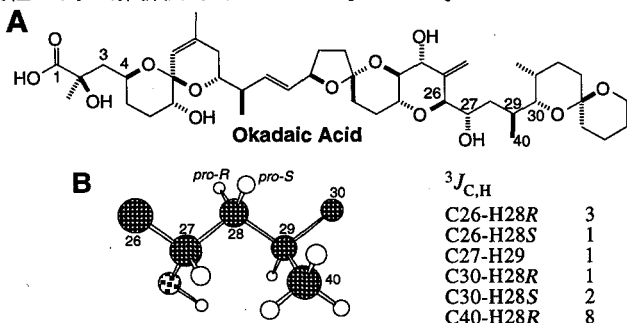


Fig.4 (A) Structure of Okadaic acid. (B) 3D structure of C27-C29 portion of okadaic acid, and the observed coupling constants.

【マイトトキシン両末端鎖状部分の立体配置決定】 上述のように、 $2,3J_{C,H}$ の二面角情報を新たに導入することによって、複雑な鎖状化合物の相対立体配置を比較的少量の試料で決定することが可能となった。そこで、天然有機化合物中最大の分子量(3422Da)と最強の毒性を有するマイトトキシン(MTX;1)に本方法を適用し、両末端鎖状部分(C1-C15, C134-C142)の立体化学の決定を行った^{5,6)}。測定試料として、 ^{13}C を4%にユニフォームエンリッチしたMTX(9mg)を用いた。ここでは、MTXのC5-C9部分の相対立体配置決定について述べる。

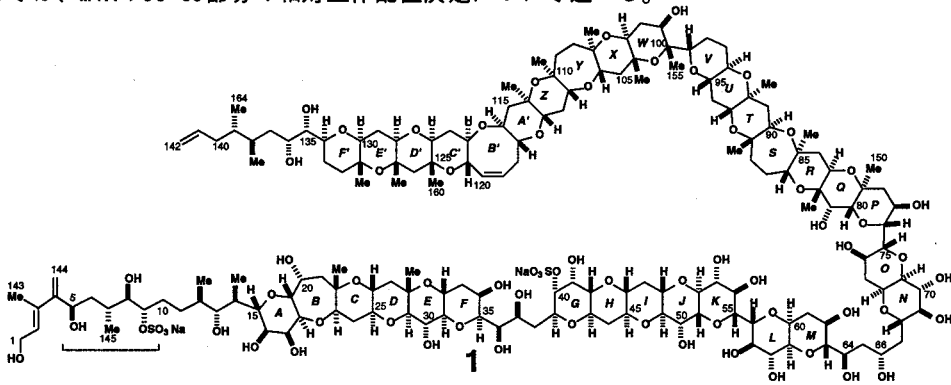


Fig.5 Maitotoxin (1) with the absolute configuration. The stereochemistry of both terminal chains (C1-C15 and C134-C142) was determined by the combination of NMR analysis and organic synthesis.

MTXのC5-C6結合に可能な3つの回転配座と予想されるスピン結合定数をFig. 6Aに示した。実測値 $^3J_{H-5/H-6b}=10$ Hzと $^2J_{C5/H-6a}=-1.5$ HzはH-5/H-6bとH-6a/5-OHが共にアンチになることを示しており、C5-C6の回転配座はIであることがわかった。同様にしてC6-C7結合に関する回転配座を特定し(Fig. 6B)、これによりC5とC7の相対立体配置を決定した。

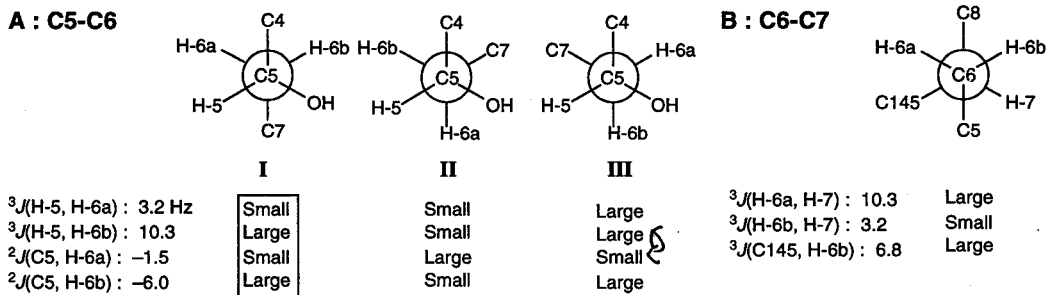


Fig. 6 Newman projections along the C5-C6 and C6-C7 bonds with the expected magnitudes of J values

C7-C8およびC8-C9部分については、NOEデータおよび中間的な $^3J_{H,H}$ 値から複数の回転配座の共存が示唆された。このような場合、スピン結合定数は各々の配座の加重平均として観測されるため、平衡に参与する配座を推定することで相対立体配置を決定できる。C8-C9部分については、 $^3J_{H-7/H-8}=6.3$ Hz、 $^2J_{H-7/C8}=-3.0$ Hzから、H-7/H-8アンチ・H-7/8-OHゴーシュとなる配座とH-7/H-8ゴーシュ・H-7/8-OHアンチとなる配座が存在すると推定された。さらに、 $^3J_{C145/H-8}=3.0$ Hzはいずれの配座においてもC145/H-8がゴーシュの関係を示しており、Fig. 7Aに示す一組の回転配座のみが以上の関係を満足する。同様にしてC8-C9部分の相対立体配置を $^3J_{H-8/H-9}$ 、 $^2J_{H-8/C9}$ 、 $^2J_{C8/H-9}$ に基づき決定した(Fig. 7B)。以上の結果、C5-C9部分の相対立体配置を5*R**, 7*R**, 8*R**, 9*S**であると決定した。

その他のC1-C15部分についても検討した結果、C13-C14を除く全ての相対配置の特定に成功した。そこで、C13-C14に関する2種類の立体異性体についてのみモデル化合物の化学合成を行ない、天然物とのNMRデータの比較によってこの部分の立体配置を決定した。C134-

C142部分についても、同様にNMR解析と有機合成を組みあわせることで立体配置を決定し、最終的に絶対配置を含む全立体化学を1のように決定した^{5,6)}。

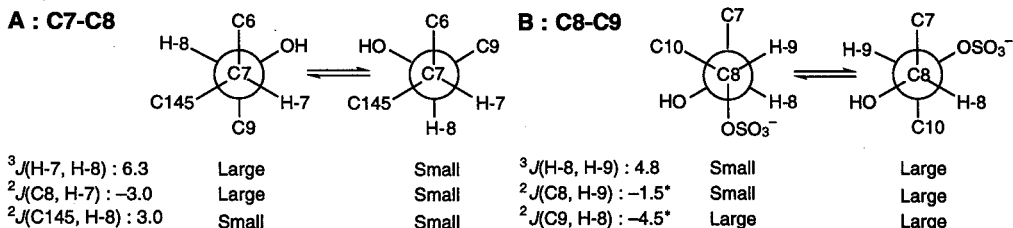


Fig.7 Two pairs of alternating rotamers for C7-C8 and C8-C9 bonds determined by coupling constants.

* $^2J_{\text{C,H}}$ is smaller due to the vicinal substitution of the oxygen functionalities (see Fig.3).

【アンフィジノール3の立体配置決定】最近、渦鞭毛藻(*Amphidinium klebsii*)より単離されたアンフィジノール3⁷⁾についても同様に立体化学の解析を進めており、以下に示す相対立体配置(C20-C27)を決定した。

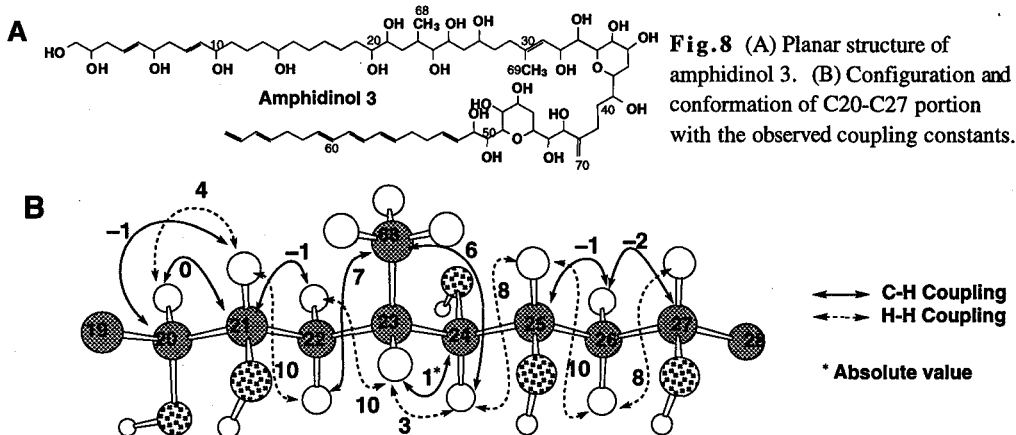


Fig.8 (A) Planar structure of amphidinol 3. (B) Configuration and conformation of C20-C27 portion with the observed coupling constants.

また、これら以外にもいくつかの天然有機化合物の鎖状部分の相対立体配置を決定し、さらに合成反応生成物の立体化学の確認にも本方法を適用した⁸⁾。このように、C-H間のスピン結合定数を新しい情報として導入することにより、従来困難とされてきた非環状化合物の立体構造解析の精度を格段に向上できることが示された。

謝辞：マイトトキシンの構造決定は東北大学農学部・安元健教授との共同研究による成果であり、また一部のHETLOC測定に関しては日本電子(株)の協力を得ました。ここに深く謝意を表します。

References

- U. Wollborn, D. Leibfritz, *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 142-146.
- a) G. Zhu, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1993**, *104A*, 353-357; b) G. Zhu, D. Live, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8370-8371.
- N. Matsumori, M. Murata, K. Tachibana, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12229-12238.
- a) T. Parella, F. Sanchez-Ferrando, A. Virgilla, *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 657-664; b) C. A. Podlasek, J. Wu, W. A. Stripe, P. B. Bond, A. S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8635-8644.
- N. Matsumori, T. Nonomura, M. Sasaki, M. Murata, K. Tachibana, M. Satake, T. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1269-1272.
- a) M. Sasaki, N. Matsumori, T. Maruyama, T. Nonomura, M. Murata, K. Tachibana, T. Yasumoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1672-1675; b) T. Nonomura, M. Sasaki, N. Matsumori, M. Murata, K. Tachibana, T. Yasumoto, *ibid.* **1996**, *35*, 1675-1678.
- a) G. K. Paul, N. Matsumori, M. Murata, K. Tachibana, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *35*, 6279-6282; b) G. K. Paul, N. Matsumori, K. Konoki, M. Murata, K. Tachibana, in "Harmful and Toxic Algae Blooms", T. Yasumoto *et al.*, eds, IOC-UNESCO, Paris, **1996**, 503-506
- M. Sasaki, N. Matsumori, M. Murata, K. Tachibana, T. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9011-9014.

Pulsed NMR in Solids — Then and Now**Charles P. Slichter**

Department of Physics,

University of Illinois, Urbana, Illinois 61801-3080

Although nuclear magnetic resonance was invented primarily as a tool for nuclear physics research, it was soon discovered that it was useful for studying condensed matter physics, and shortly thereafter found to be important for chemists wishing to solve chemical structures. The initial techniques were steady-state, but Hahn's discovery of the spin echo soon led many physicists to employ pulse techniques for the study of solids. The initial methods had important drawbacks which quickly became apparent for applications in which there was poor signal to noise. The talk will describe how these problems were overcome making possible signal averaging of weak pulsed signals. Other important developments were the discovery and demonstration of the Fourier transform theorem of NMR by Lowe and Norberg (1957) of Magic Angle spinning (1959) by Lowe and Norberg and independently by Andrew, Bradbury, and Eades.

The role of high resolution NMR in chemistry grew slowly through the 1950's, exploding in the years beginning in 1960. The discovery of Ernst and Anderson (1966) that the Fourier transform method significantly enhanced signal to noise when applied to high resolution spectra converted high resolution chemists to pulsed NMR and launched the many developments such as two dimensional NMR which are so important today for unraveling spectra of complex molecules.

Meanwhile, the desire to study problems involving very weak NMR signals associated with problems of great interest to condensed matter physicists (such as surface science on high temperature superconductors) has led to new techniques for the study of solids. Essential to their implementation have been superconducting solenoids, computer control, and digital memory. The talk will illustrate several such methods.

Keywords

pulsed NMR

solids

condensed matter

2L2 ENHANCEMENT OF NMR/MRI BY LASER-POLARIZATION: FROM MATERIALS TO ORGANISMS

Alexander Pines

Lawrence Berkeley Laboratory and the
University of California, Berkeley, CA 94720

By means of optical pumping with laser light, the nuclear magnetic resonance (NMR) polarization of gaseous helium and xenon can be enhanced by up to 100,000. The enhanced polarization has allowed novel applications of NMR and magnetic resonance imaging (MRI) in materials science, biology, and medicine. The physics of the process will be outlined including polarization and depolarization mechanisms. Examples will be presented of applications of laser-polarized helium and xenon NMR and MRI on distance scales from microns to meters. Recent experiments will be described in which polarization has been transferred from laser-polarized gases to molecules on surfaces and in solution, hereby opening the window to the enhancement of NMR and MRI of materials as well as biomolecules and organisms.

C. S. Yannoni, IBM Almaden Research Center, San Jose, California

The idea of detecting magnetic resonance by coupling the motion of spins via magnetic force to a sensitive mechanical oscillator was introduced by Sidles[1]. A remarkable result of Sidles' work was his conclusion that it should be possible to detect the NMR of a single spin, making direct determination of molecular structure a possibility. Since that time, ESR[2], NMR[3], and FMR[4] have been detected with an apparatus which resembles the idealized single-spin magnetic resonance force microscope (MRFM) shown in Fig. 1.

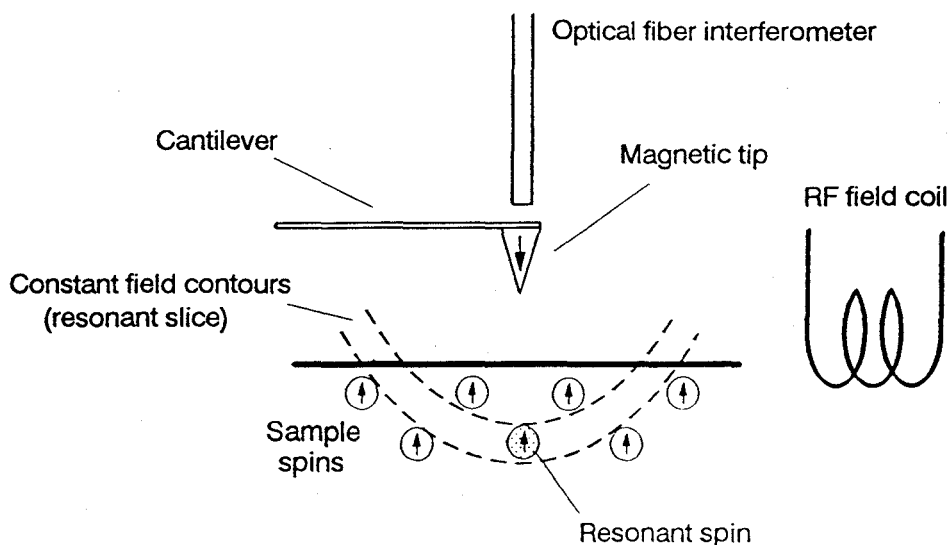


Fig. 1 Basic elements of the magnetic resonance force microscope.

Apart from the addition of an excitation coil, the apparatus shown is a magnetic force microscope,[5] an AFM that detects the force on a magnetic moment in the presence of a magnetic field gradient. The magnetic tip not only generates a field gradient to produce the force but also selects a volume of resonant spins, permitting magnetic resonance imaging. At resonance, the change induced in the sample spin magnetization alters the spin-gradient force, causing a deflection of the cantilever which is monitored with a fiber optic interferometer.

Key Words: NMR, EPR, AFM, Imaging

The first force detection of NMR, at 100 MHz for protons in a 12-nanogram sample of ammonium nitrate at ambient temperature, is shown in Fig. 2.

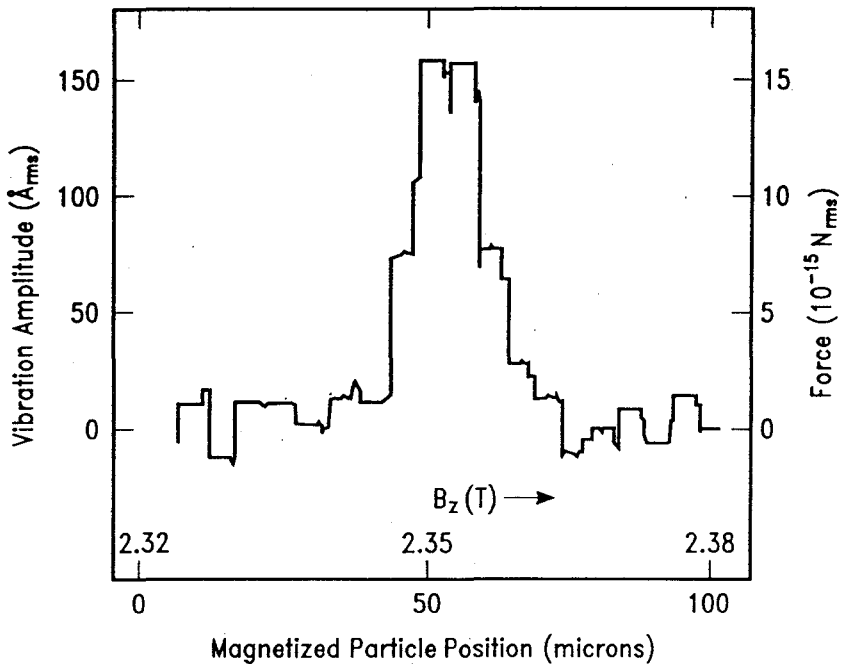


Fig. 2 Amplitude of the cantilever vibration as the magnetic field is scanned by moving the gradient source relative to an ammonium nitrate sample. The peak occurs at the proton resonance condition.

The minimum number of protons that were detectable in this experiment (signal-to-noise ratio of unity) was 1.6×10^{13} , indicating very high sensitivity, especially for a solid. High spatial resolution has also been achieved in ESR[6,7] and NMR[8] imaging experiments. Further gains in sensitivity have been realized by operating at low temperature[9]

Although the ultimate goal of this work is the development of a magnetic resonance force microscope (MRFM) capable of imaging single nuclear spins, many of the recent steps we have taken with this objective in mind have been ESR experiments and these will be discussed in terms of our progress toward single-spin imaging.

References

1. J.Sidles, *Appl.Phys.Lett.*, 1991, **58**, 2854
2. D.Rugar, C.Yannoni, and J. Sidles, *Nature*, 1992 **360** 563.
3. D.Rugar, O.Züger, S. Hoen, C.Yannoni, H.Vieth, and R.Kendrick, *Science* 1994, **264**, 1560.
4. Z.Zhang, P.C.Hammel, and P.E. Wigen, *Appl.Phys.Lett.*, 1996, **68**, 2005.
5. Y. Martin and H. K. Wickramasinghe, *Appl. Phys. Lett.*, 1987, **50**, 1455.
6. O.Züger and D.Rugar, *Appl.Phys.Lett.*, 1993, **63**, 2496.
7. O.Züger and D.Rugar, *J.Appl.Phys.*, 1994, **75**, 6211.
8. O.Züger, S.T.Hoen, C.S. Yannoni, and D.Rugar, *J.Appl.Phys.*, 1996, **79**, 1881.
9. K.Wago, O.Züger, R.Kendrick, C.S.Yannoni, and D.Rugar, *J.Vac.Sci.Tech.*, 1996, **B14**, 1197.

Three Dimensional Structure Determination of Membrane Bound Polypeptides by Solid-State NMR. *F. Kovacs, M. T. Brenneman, F. Tian, R.R. Ketchum, and T.A. Cross.* Center for Interdisciplinary Magnetic Resonance at the National High Magnetic Field Laboratory; Institute of Molecular Biophysics and

Department of Chemistry, Florida State University, Tallahassee, Florida U.S.A. 32306

The structural characterization of macromolecules in heterogeneous and anisotropic environments is very difficult for the standard techniques of x-ray crystallography and solution NMR spectroscopy. Solid-state NMR is ideally suited for studies of such environments. Several different approaches for observing structural constraints from solid-state NMR have been developed. Here, I will focus on the use of orientational constraints from uniformly aligned lipid bilayer samples in studies of the heterogeneous and anisotropic membrane environment. More than 40% of all proteins are associated with membranes and exceptionally few have been structurally characterized. This does not belittle in any way the great success of the group from Osaka University and Himeji Institute of Technology who recently published the structure of Cytochrome c Oxidase in *Science* (Tsukihara et al., 1996), but such success stories are very rare in the field of membrane proteins.

The NMR observables, such as anisotropic chemical shifts, dipolar and quadrupolar interactions have a well defined orientation dependence with respect to the magnetic field direction. In uniformly aligned samples a unique molecular axis, here the bilayer normal and the channel axes are aligned parallel with the magnetic field. In these samples it is the Z component of the interaction tensor that is observed and in this way the tensors are constrained with respect to the magnetic field direction, the bilayer normal and the channel axis. Furthermore, since the tensors are fixed within the local molecular frame, this frame is constrained with respect to the channel axis and the laboratory frame of reference - a unique type of structural constraint from NMR spectroscopy.

Orientalional constraints are very precise and quite accurate provided that the tensor orientation with respect to the molecular frame is known. With this information, the assembly of local molecular structure is not difficult. If the peptide planes are assumed to be planar, the observation of two dipolar interactions within the plane is sufficient to define the orientation of the plane with respect to B_0 and the channel axis, albeit with some ambiguities. Such ambiguities are eliminated by covalent geometry constraints (i.e. bond angles) and additional solid-state NMR data such as ^{13}C and ^{15}N chemical shifts. The three-dimensional structure is assembled by the sequential analysis of the peptide planes. The accuracy of the constraints is demonstrated by the quality of the initial structure so generated. For instance, the residue, i to $i+6$ hydrogen bonds in the structure described later have an rms deviation from ideal β -sheet hydrogen bond distances of just 0.5Å. Considering that the characterization of each i to $i+6$ hydrogen bond is dependent on 14 dipolar constraints between these residues this suggests that the quality of these constraints is exceptional. In fact, these experimental constraints are very different from either solution-state NOE constraints or solid-state NMR-derived distance constraints which relate one part of the macromolecule to another part. Orientalional constraints relate each part of the molecular structure directly to the laboratory frame of reference.

Consequently, errors in each constraint do not sum rapidly because each constraint is independent of the other constraints.

Likewise each torsional angle in the side chains is solved through observation of orientational constraints. To maintain the quality of the structural solutions it is necessary to accurately characterize all molecular motions of significant amplitude that average the spin interaction tensors. Fast frozen samples avoid distortion associated with lowering samples slowly through the liquid-crystalline to gel phase transition of the lipid bilayers. Global motions cease just below the phase transition and all librational motions cease below 200 K except for motions such as, methyl group motions about the C-CH₃ bond which can occur far below liquid nitrogen temperature. Through the temperature dependence analysis of side chain spectra it is possible to define the molecular motions and with such information to accurately characterize the side chain structure.

With an initial structure described (Ketchem et al., 1993; 1996a) it is possible to refine the molecular structure against all of the experimental data plus average β -sheet hydrogen bond distances and the CHARMM global energy. Such a refinement protocol has led to very small all atom rmsd values (0.48 Å) between a all-inclusive group of 40 refinement runs (Ketchem et al., 1996b). In this way a unique high resolution molecular structure is achieved. The structure is a β -strand, but because the sequence of 15 amino acids has an alternating pattern of D and L stereochemistry all of the side chains are on one side of the strand. As a result the strand is forced into a helix with 6.5 residues per turn. Since both

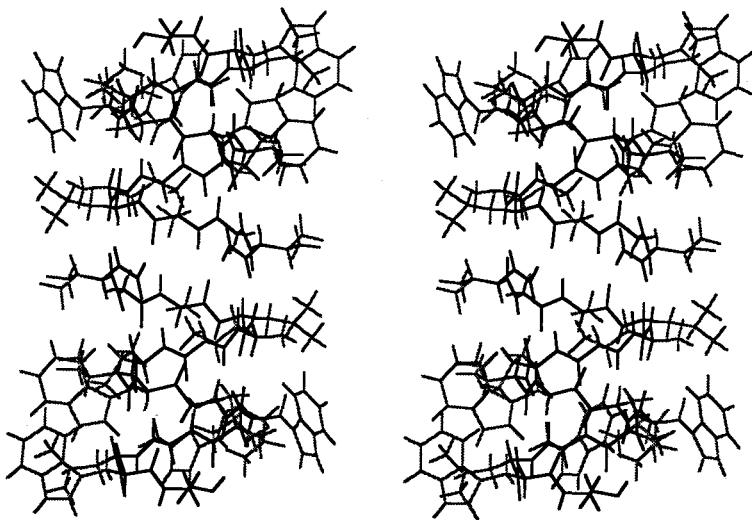


Figure 1: Side view of the refined structure of the Gramicidin A cation channel in stereo. The structure is a dimer with the formylated amino termini at the center of the bilayer. The sidechains radiate toward the lipid environment and the indole nitrogens hydrogen bond to the bilayer surface. The pore which is lined with the polypeptide backbone is 4Å in diameter.

termini are blocked there are no formal charges and the only polar residues are the 4 tryptophan residues near the C-terminus. The channel structure is an N-terminus to N-terminus dimer that generates a symmetric channel with the C-terminal residues near the bilayer surface.

Such an approach for structural elucidation has been demonstrated through the characterization of the gramicidin A channel conformation in a fully hydrated lipid bilayer environment. The achievement of a high resolution structure in this environment has provided numerous insights into the differences of this environment with the typically studied isotropic aqueous phase. We have demonstrated that non-minimum energy conformers can be kinetically trapped in this environment (Arumugam et al., 1996). Moreover, the importance of tryptophans in this environment is clearly demonstrated by gramicidin. The single stranded dimer conformation is induced by the presence of the indoles. The dominance of the right-handed helical sense is the result of the indoles. These same indoles stabilize the orientation of the helix parallel to the bilayer normal and finally the dipole moment of the indoles is responsible for substantially increasing the efficiency of cation conductance by lowering the potential energy barrier at the bilayer center (Hu & Cross, 1995).

Not only have we learned about the lipid bilayer as an environment for proteins, but we have also learned a great deal about ion conductance. Cations do not significantly distort the channel structure upon binding, in fact the binding site appears to be a "preformed" cation binding site - one that provides adequate solvation for the cation to attract it from the aqueous environment, but not an ideal binding site such that it would be difficult to move the cation from the binding site on through the channel (Tian et al., 1996). Another major finding was that the timescales for librational motion of the peptide planes and hence the carbonyl groups is coincident with the timescale for cation translocation from one carbonyl binding site to another along the channel pore. Therefore, there is the potential that the kinetic rate of the cation is correlated with the molecular dynamics of the polypeptide backbone (North & Cross, 1995). Not only may such correlations be important for cation channels, but also for numerous other kinetic processes that occur on the surface or within macromolecules.

From this background of the gramicidin A cation channel we are now studying the cation channel formed by a tetramer of the M2 protein. This is a 97 amino acid protein from Influenza A virus which is activated by low pH and inhibited by the antiviral agent, amantadine (Lamb et al., 1985). Our initial studies of the transmembrane α -helical segment of this protein will be reported. From a limited data set it has been possible to estimate the tilt of the helices with respect to the bilayer normal and the handedness of the packing arrangement of the α -helical bundle.

Solid-state NMR is shown to have great demonstrated potential for characterizing both structure and dynamics of macromolecules in anisotropic environments. Not only can such information be obtained, but complete three-dimensional structure can be obtained. It has also been shown that high resolution structure and dynamics leads to unique understanding of the membrane environment and biological function.

Acknowledgments:

We are indebted to J. Vaughn, R. Rosanske and T. Gedris of the FSU NMR Facility and to U. Goli and H. Henricks of the Bioanalytical Synthesis and Services Facility for their expertise and help in this effort. T.A.C. gratefully acknowledges the support from the National Institutes of Health (AI 23007) and National Science Foundation (DMB-9317111).

References:

- Arumugam, S., Pascal, S., North, C.L., Hu, W., Lee, K.-C., Cotten, M. Ketchem, R.R., Fu, X., Brenneman, M., Kovacs, F., Tian, F., Wang, A., Huo, S. & Cross, T.A. "Conformational Trapping in a Membrane Environment: A Regulatory Mechanism for Protein Activity?" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5872-5876.
- Hu, W. & Cross, T.A. (1995) "Tryptophan Hydrogen Bonding and Electric Dipole Moments: Functional Roles in the Gramicidin Channel and Implications for Membrane Proteins" *Biochemistry* 34:14147-14155.
- Ketchem, R.R., Hu, W. & Cross, T.A. (1993) "High-Resolution Conformation of Gramicidin A in a Lipid Bilayer by Solid-State NMR" *Science* 261:1457-1460.
- Ketchem, R.R., Lee, K.-C., Huo, S. & Cross, T.A. (1996) "Macromolecular Structural Elucidation with Solid-State NMR Derived Orientational Constraints" *J. Biomol. NMR* - in press.
- Ketchem, R.R., Roux, B. & Cross, T.A. (1996) "Computational Refinement Through Solid-State NMR and Energy Constraints of a Membrane Bound Polypeptide" in *Membrane Structure and Dynamics* (K.M. Merz & B. Roux, Eds.) Birkhauser, Boston. pp. 299-322.
- Lamb, R.A., Zebedee, S.L. & Richardson, C.D. (1985) "Influenza Virus M2 Protein is an Integral Membrane Protein Expressed on the Infected-Cell Surface" *Cell* 40:627-633.
- Lazo, N.D., Hu, W. & Cross, T.A. (1995) "Low-Temperature Solid-State ^{15}N NMR Characterization of Polypeptide Backbone Librations" *J. Magn. Reson.* B107:43-50.
- North, C.L. & Cross, T.A. (1995) "Correlations between Function and Dynamics: Time Scale Coincidence for Ion Translocation and Molecular Dynamics in the Gramicidin Channel Backbone" *Biochemistry* 34:5883-5895.
- Tian, F., Lee, K.-C., Hu, W. & Cross, T.A. (1996) "Monovalent Cation Transport: Lack of Structural Deformation Upon Cation Binding" *Biochemistry* - in press.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) "The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8Å" *Science* 272:1136-1144.

High-sensitivity NMR spectroscopy probes using superconductive coils

Howard Hill
Varian Associates, Palo Alto CA 94304

The sensitivity of NMR probes has been dramatically improved by the use of detection coils made from the high-temperature superconductor $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_7$ (YBCO). The low resistance of the coils and a low operating temperature of about 25K combine to reduce the noise generated in the coil and more than make up for the loss of filling factor caused by the planar geometry of the coils and the need to provide thermal isolation from a room temperature sample. For non-conductive samples, sensitivity gains of more than a factor of four have been realised over conventional probes with 5mm diameter samples. Characteristics of the coils and their application in probes for the observation of proton, fluorine and carbon resonances will be described.

key words: probe; sensitivity; superconductive

The Continuing Saga of Broadband Decoupling in High Resolution NMR

Ray Freeman* and Eriks Kupče**

*Cambridge University, U.K. and **Varian NMR Instruments, U.K.

From the earliest days of high resolution NMR spectroscopy of carbon-13, broadband proton decoupling has been used to simplify the spectra and also improve the sensitivity. This was made possible by the introduction of noise decoupling by Ernst¹ in 1966, using a pseudo-random modulation of the decoupler phase. At that time the total range of proton chemical shifts spanned little more than 1 kHz and this could be adequately covered by noise decoupling without undue radiofrequency heating of the sample, except for some aqueous ionic solutions. Since then, the unrelenting progress to higher magnetic fields has increased the proton chemical shift range by almost an order of magnitude, and, more importantly, many modern experiments demand carbon-13 (or nitrogen-15) decoupling with observation of the proton spectrum. This is particularly important for the study of isotopically-enriched proteins. The chemical shift range of carbon-13 (in kHz) is about five times wider than that of protons, and for equivalent decoupler coil parameters, the radiofrequency power required to reach the same decoupler field is increased by a factor $(\gamma_H/\gamma_C)^2 = 16$. This presents a serious challenge if sample heating is to be kept within acceptable limits.

The first breakthrough came with the concept of composite pulse decoupling.² Consider the simple case of decoupling one spin species *I* while observing a second spin species *S*. The *S* spin spectrum can be represented by two vectors α and β corresponding to the two quantum states of the *I* spin. The idea is to invert the *I* spins repeatedly, so as to refocus the natural divergence of the α and β vectors. If this is achieved rapidly enough, that is to say, fast compared with J_{IS} , then the sampled *S* spin signal will have a negligible splitting and we say that it is decoupled. In order to be able to achieve such a result with simple 180° pulses, they would have to be impossibly intense to cover a reasonable chemical shift range, but the use of composite 180° pulses³ increases the effective bandwidth by a large factor and renders the method feasible in practice. To avoid cumulative errors arising from slight imperfections in the radiofrequency pulses, the composite 180° pulses are assembled into a "magic cycle" of the form

broadband decoupling high-resolution NMR

$$R R \bar{R} \bar{R} \quad (\text{MLEV-4}) \quad [1]$$

where R is a composite spin inversion pulse and \bar{R} is its phase-inverted counterpart. Levitt⁴ showed that the performance could be significantly improved by grouping these magic cycles into a supercycle⁴, for example,

$$R R \bar{R} \bar{R} \bar{R} R R \bar{R} \bar{R} \bar{R} R R \bar{R} \bar{R} R \quad (\text{MLEV-16}) \quad [2]$$

This intuitive concept was later justified by an exact theory of decoupling presented by Waugh.⁵

In practice the MLEV decoupling sequences give effective decoupling bandwidths about five times wider than the equivalent noise decoupling scheme but they require careful attention to the accuracy of the 90° radiofrequency phase shifts employed for the composite inversion pulses. Soon a much more "user friendly" composite pulse was devised by Shaka,⁶ made up of the sequence,

$$R = 90^\circ(+x) 180^\circ(-x) 270^\circ(+x). \quad [3]$$

This is written as $1 \bar{2} 3$ in a shorthand notation based on the number of 90° elements, and may be assembled into the magic cycle:

$$1 \bar{2} 3 \quad 1 \bar{2} 3 \quad \bar{1} 2 \bar{3} \quad \bar{1} 2 \bar{3} \quad (\text{WALTZ-4}). \quad [4]$$

Further expansion by cyclic permutation of a 90° pulse, followed by phase inversion, gives the widely-used WALTZ-16 decoupling scheme⁶ that offers a further 30% increase in operating bandwidth.

These broadband decoupling techniques were designed with the goal of minimizing the residual splitting of the S spin resonances over a reasonably wide range of I spin chemical shifts. Many routine chemical applications are rather less concerned about small residual splittings (since they were anyway hidden within the instrumental linewidth) but demand a still wider effective decoupling bandwidth. Computer optimization was used to design the GARP decoupling sequence⁷ which offers an effective decoupling bandwidth 2.4 times wider than that of WALTZ-16.

Adiabatic decoupling

It seemed for a while that this might be about the best one could do, but the NMR spectroscopists still felt that broadband decoupling posed a serious risk of overheating biological samples in high-field spectrometers, particularly when ions were present. (We "cooked" a priceless sample of a snake venom neurotoxin through over-zealous decoupling.) A giant leap forward came with the realization that the spin inversion element R could be implemented by an adiabatic sweep⁸⁻¹⁰ instead of a composite radiofrequency pulse. Magnetization can be carried from the +z axis to the -z axis if the frequency offset ΔB of the decoupler field B_2 is swept sufficiently slowly to satisfy the adiabatic condition,

$$\left| \frac{d\theta}{dt} \right| \ll \omega_{\text{eff}} \quad [5]$$

where θ is the inclination of the effective field B_{eff} with respect to the +x axis of the rotating frame, and

$$\omega_{\text{eff}} = \gamma B_{\text{eff}} = \gamma(B_2^2 + \Delta B^2)^{1/2} \quad [6]$$

Typically an adiabatic sweep might have a duration of 1 ms. A linear frequency sweep is quite suitable for the purpose¹¹ and the decoupler intensity B_2 can be constant, except for a rounding of the discontinuities at the extremities of the sweep.¹² A useful envelope for the decoupler intensity is the sausage-shaped function

$$A = \pm A_0 \{ 1 - |\sin \theta|^n \} \quad [7]$$

where n is an integer that may be as low as 2 and as high as 240. Variation of n affords considerable flexibility in the operational parameters. For example $n = 2$ gives results similar to those obtained with the popular hyperbolic secant scheme¹³⁻¹⁵ whereas $n = 240$ achieves an extremely wide decoupling bandwidth at the expense of some other practical considerations. This family of decoupling sequences¹⁶⁻¹⁸ is called WURST (after the German word for sausage). It can be shown that for all adiabatic decoupling methods the effective bandwidth is proportional to the square of the intensity of the decoupling field B_2 , in contrast to composite-pulse methods where there is only a linear relationship. This explains why a very broad chemical shift range can be covered, as high as 1 MHz in an extreme case.¹⁹

Cycling sidebands

Slight imperfections in the spin inversion during an adiabatic sweep may be compensated by a magic cycle or supercycle. One commonly-used 20-stage supercycle employs the (0° , 150° , 60° , 150° , 0°) sequence of Tycho *et al*²⁰ nested within the MLEV-4 cycle. The improvement in performance through this procedure is obtained at the expense of weak spurious modulations at the cycling frequencies, which Fourier-transform into low-level "cycling sidebands" in the decoupled spectrum, just as sample spinning achieves improved linewidths in a high resolution NMR spectrum but inevitably introduces spinning sidebands. Cycling sidebands can eventually limit the attainable sensitivity of the method; fortunately the appropriate adjustment of the operating parameters can reduce the level of cycling sidebands below 0.05% of the intensity of the decoupled resonances. This permits the detection of very weak cross peaks in two-dimensional nuclear Overhauser spectra in the presence of broadband heteronuclear decoupling.²¹ Perhaps the decoupling saga is nearing its end after 30 long years ?

- ¹ R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **45**, 3845 (1966).
- ² M. H. Levitt and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **43**, 502 (1981).
- ³ M. H. Levitt and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **33**, 473 (1979).
- ⁴ M. H. Levitt, R. Freeman and T. Frenkiel, *J. Magn. Reson.* **47**, 328 (1982).
- ⁵ J. S. Waugh, *J. Magn. Reson.* **50**, 30 (1982).
- ⁶ A. J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **52**, 335 (1983).
- ⁷ A. J. Shaka, P. B. Barker and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **64**, 547 (1985).
- ⁸ T. Fujiwara, T. Anai, N. Kurihara and K. Nagayama, *J. Magn. Reson. A* **104**, 103 (1993).
- ⁹ Z. Starčuk, Jr., K. Bartušek and Z. Starčuk, *J. Magn. Reson. A* **107**, 24 (1994).
- ¹⁰ M. R. Bendall, *J. Magn. Reson. A* **112**, 126 (1995).
- ¹¹ E. Kupče and R. Freeman, *J. Magn. Reson. A* **115**, 273 (1995).
- ¹² J. M. Böhlen and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. A* **102**, 293 (1993).
- ¹³ S. L. McCall and E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **183**, 457 (1969).
- ¹⁴ J. Baum, R. Tycko and A. Pines, *Phys. Rev. A* **32**, 3435 (1985).
- ¹⁵ M. S. Silver, R. J. Joseph and D. I. Hoult, *Phys. Rev. A* **31**, 2753 (1985).
- ¹⁶ E. Kupče and R. Freeman, *J. Magn. Reson. A* **117**, 246 (1995).
- ¹⁷ E. Kupče and R. Freeman, *J. Magn. Reson. A* **118**, 299 (1996).
- ¹⁸ E. Kupče and R. Freeman, *Chem. Phys. Lett* **250**, 523 (1996).
- ¹⁹ E. Kupče, R. Freeman, G. Wider and K. Wüthrich, *J. Magn. Reson. A* **120**, 264 (1996).
- ²⁰ R. Tycho, A. Pines and R. Gluckenheimer, *J. Chem. Phys.* **83**, 2775 (1985).
- ²¹ E. Kupče, R. Freeman, G. Wider and K. Wüthrich, *J. Magn. Reson. A*. (in press).

Assignment method for larger proteins by $^1\text{H}_\alpha$ labeling of ^2H protein

T. Yamazaki, H. Tochio, J. Furui, S. Aimoto, Y. Kyogoku, (Institute for Protein Research, Osaka University)

The double and zero quantum coherences of a ^{13}C - ^1H pair is not affected by ^1H - ^{13}C dipolar interaction in the case of a large molecule and its relaxation is slow. Moreover, when surrounding ^1H nuclei are replaced by ^2H , the relaxation of the zero/double quantum coherence of an isolated ^{13}C - ^1H pair becomes very slow. We put ^1H on H_α positions in all residues in a protein sample. The long-life $^{13}\text{C}_\alpha$ - $^1\text{H}_\alpha$ double/zero quantum coherence was used for correlation experiments of backbone nuclei. A combination of HACAN, HACACO, HACA(N)CO, and HACACB gave sequential backbone connectivities and the backbone assignments were successfully obtained for a slowly tumbling protein.

高分子量の蛋白質では、 ^{13}C 磁化の横緩和が大きな ^1H - ^{13}C 双極子間相互作用のためにとっても速い。それは、多くの NMR 測定法で分解能と感度の低下をもたらす。しかし、 ^{13}C - ^1H の組の 0 または 2 量子コヒーレンス (H_xC_x などの項) は、大きな分子では、 ^1H - ^{13}C 双極子間相互作用に影響を受けず、その緩和は遅い。ただし ^1H 部分は周りにある ^1H 核とのスカラー結合と双極子間相互作用による緩和のために減衰する。さらに周りを囲む ^1H 核を ^2H に置換することによって、それらの原因を除くことによって ^1H - ^{13}C の 0/2 量子コヒーレンスの緩和は大変遅くなる。 ^{13}C - ^1H の 0/2 量子コヒーレンスは ^{13}C 横磁化と同様に化学シフト、隣り合う核との間のスカラー結合を得るために用いることができる。つまり、HSQC 型のパルスシーケンスを HMQC 型のものに替える事によって多くのスカラー結合を辿る実験法を改良することができる。蛋白質の主鎖を帰属する実験法に応用するために全ての残基の H_α に ^1H をそれ以外に ^2H で標識した蛋白質試料を作った。もちろん、 ^{13}C ^{15}N 標識も同時にされている。この長寿命コヒーレンスを用いる新しいタイプの HACAN, HACACO, HACA(N)CO, HACACB を開発した。HACAN は $^{13}\text{C}_\alpha$ から残基内と次残基のアミド ^{15}N との結合をあたえ、残基間結合が得られる。HACACO と HACA(N)CO は $^{13}\text{C}_\alpha$ から残基内と前残基のカルボニル ^{13}C の結合を与え、残基間結合がさらに得られる。HACACB は $^{13}\text{C}_\alpha$ から残基内の $^{13}\text{C}_\beta$ の結合を与え、アミノ酸の種類を知ることができる。これらを組み合わせることによって主鎖の核の帰属ができる。ほぼ完全な帰属を得ることができた。

 ^2H labeling, NMR

やまざきとしお、とちおひでひと、ふるいじゅんいち、あいもとさぶろう、きょうごくよしまさ

3L2

免疫系糖タンパク質の安定同位体標識および動的立体構造解析

(東大薬1, (株)中埜酢店2, 機能水研3) ○嶋田一夫1, 加藤晃一1, 山口芳樹1, 古荘久見子1, 高橋栄夫1, 進藤一泰1, 榛葉信久1, 古賀憲司1, 高橋禮子2, 荒田洋治3

Analyses of dynamical structure for glycoproteins in immune system as studied by stable isotope aided NMR

Ichio Shimada, Koichi Kato, Yoshiki Yamaguchi Kumiko, Furusyo, Hideo Takahashi, Kazuyasu Shindo, Nobuhisa Shimba, Kennji Koga, Noriko Takahashi, and Yoji Arata

Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, GlycoLab, Nakano Vinegar Company Ltd., Water Research Institute

Immunoglobulin G (IgG) is a glycoprotein, which plays an important role in immune system. We have studied the antigen recognition mechanism and the interaction of the Fc fragment with IgG binding proteins and soluble Fc receptor by using antibodies labeled with ^{13}C and/or ^{15}N amino-acid specifically, which are expressed in hybridoma cells. In the present study, we will discuss the strategy for the stable isotope labeling of the sugar chain in the glycoprotein and for the investigation of the dynamical structure of the glycoprotein by using multinuclear NMR.

序

糖タンパク質は、免疫、発生、分化、形態形成など、生命現象の様々な局面で重要な役割を演じている。糖タンパク質の機能発現メカニズムの解明に必要なことは、糖タンパク質分子内および分子間における糖鎖-ペプチド鎖間、糖鎖-糖鎖間の相互作用様式を立体構造の観点から原子レベルの分解能で把握することである。

現在、NMRによる構造生物学的研究の多くは大腸菌を用いた大量発現システムを利用している。しかしながら、糖タンパク質の高次構造を解析するためには、動物細胞を用いた安定同位体標識法の確立が必須となる。

本研究では、免疫系において中心的働きを担っている糖タンパク質である免疫グロブリンG (IgG) を研究対象として取り上げ、糖タンパク質の高次構造解析に有効なNMR戦略を確立を目指し、同時に構造生物学的観点から、糖タンパク質におけるペプチド鎖および糖鎖の存在様式・相互作用様式を明らかにすることを目的とする。

結果および考察

動物細胞を用いた糖タンパク質ペプチド主鎖の安定同位体標識

既にわれわれは、安定同位体標識アミノ酸を含んだ無血清培地で抗体産生細胞を培養することに

キーワード：NMR, 糖タンパク質, 安定同位体標識, 動的立体構造

しまだいちお, かとうこういち, やまぐちよしき, ふるしょうくみこ, たかはしひでお, しんどうかずやす, しんばのぶひさ, こがけんじ, たかはしのりこ, あらたようじ

より、アミノ酸選択的に安定同位体を IgG に導入できることを示し、本手法を用いて、抗原認識部位および抗体結合性タンパク質の結合部位の同定などの成果をあげてきた。ここでは、タンパク質分子全体からの構造情報を抽出することを目的として、抗体産生細胞を用いたペプチド主鎖の均一安定同位体標識法について検討した。K¹⁵NO₃ および ¹³CO₂ を用いて培養された藻体の酸加水分解物由来であるアミノ酸混合物を、活性炭処理および陰イオン交換樹脂を用いて精製し、細胞毒成分を除去した後、¹⁵N-Glu から酵素反応により合成した ¹⁵N-Gln を加えて抗体産生細胞の培養を行い、均一安定同位体標識体の調製に成功した。この様にして確立した手法に基づき、たとえば、抗原結合に伴うタンパク質全体に誘起される構造変化の解析が可能になった。

動物細胞を用いた糖タンパク質糖鎖の安定同位体標識

IgG の Fc 領域に普遍的に結合している一対の複合型糖鎖は、エフェクター機能（補体の活性化、レセプターとの結合）の発現に不可欠であることが明らかとなっている。そこで、IgG の生物活性発現メカニズムを理解するためには、IgG 分子の高次構造形成において糖鎖の果たしている役割、すなわち、*in situ* の状態で糖鎖の高次構造・運動性を解析することが重要と考えた。そのためには、IgG の糖鎖部分に由来する NMR シグナルを解析プローブとして活用することが考えられる。そこで、1) あらかじめ安定同位体標識した前駆物質 ([1-¹³C] Glc, [¹⁵N] GlcN) を化学合成し、これらを抗体産生細胞に取り込ませる方法、2) 安定同位体標識された単糖（たとえば、[1-¹³C] Gal) を糖転移酵素を用いて Fc の糖鎖に結合させる方法を併用することにより、糖鎖が安定同位体標識された Fc を調製し、その異種核シフト相関スペクトルを測定することにより、各糖残基のアノメリック位、および GlcNAc 残基のアミド位に由来するシグナルの観測に成功した。さらに、化学合成された [1-¹³C] GlcN を用いることにより、糖残基特異的な NMR シグナルの観測にも成功した (Fig. 1)。これらのシグナルは、IgG 分子中の糖鎖の高次構造・運動性を原子レベルの分解能で解析するための有用なプローブとなる。以上の戦略は、IgG のみならず様々な糖タンパク質の高次構造解析に適用可能であると考えられる。

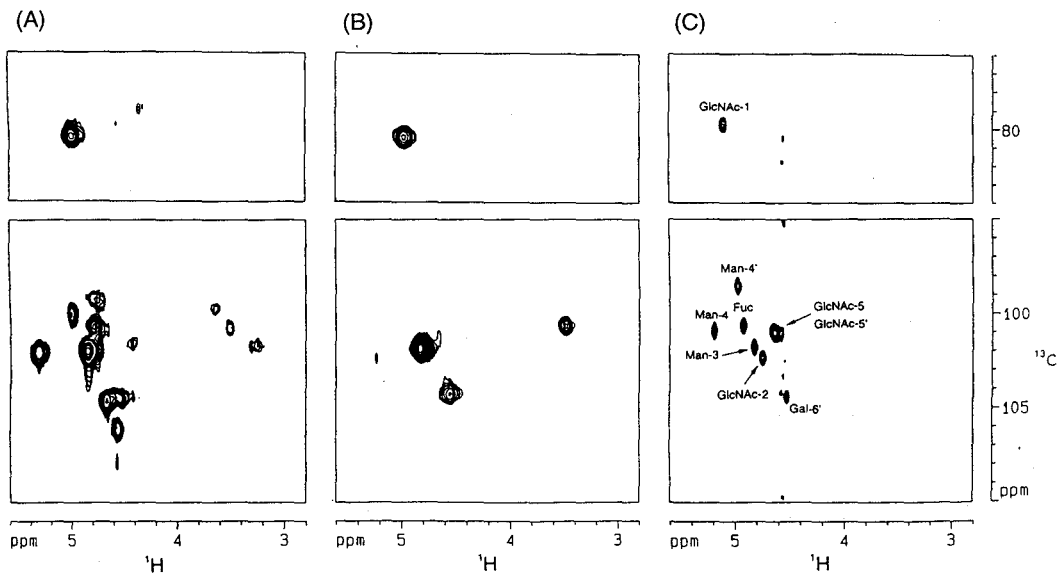


Fig. 1 ¹H-¹³C HSQC spectra observed for (A) the labeled Fc fragment prepared by using [1-¹³C] Glc, (B) the labeled Fc fragment prepared by using [1-¹³C] GlcN, (C) purified glycans released from the same sample used in (A)

(北工研¹、アルバータ大学²) ○津田 栄¹、S.M.Gagné²、B.D.Sykes²*Low-Temperature Effect on the Structure and the Dynamics of
Chicken Skeletal Muscle Troponin C.*(Bioscience and Chemistry Division, Hokkaido National Industrial Research
Institute (HNIRI), Department of Biochemistry, University of Alberta)
Sakae Tsuda, S.M. Gagné, and B.D. Sykes

A variety of 1D- to 3D-NMR experiments has been carried out to clarify the low-temperature effect on the structure and the dynamics of a Ca^{2+} -binding protein, N-domain (1-90) of chicken skeletal muscle Troponin C (NTnC), the NMR structure of which has been solved at 30°C previously (Fig.1)[1]. The full assignment of the ^1H - and ^{15}N -resonance of NTnC was completed at 4°C. The following results were obtained by decreasing temperature from 30°C to 4°C. 1) The main-chain resonance of Val65-Asp66 and that of the N- and C-terminal portions show a large difference in chemical shift. 2) The line-shape of the ring-current shifted side-chain resonance of Phe26 is extremely broadened while that of Phe72 shows no significant change. 3) The order parameter of the Ca^{2+} -binding site II increases while that of the site I does not. These results indicate that the low-temperature effect is not uniform on the structure and molecular motion of NTnC.

【序】 一般に常温から零°C近傍への温度低下は蛋白質の機能を低下させる。一方ある種の蛋白質(例:低温活性酵素)は零°C近傍で機能を発揮することが知られている。なぜ蛋白質の種類により活性発現温度が異なるのだろうか?常温蛋白質を低温適応型へ改変することは可能だろうか?この問題を検討するために、我々は30°Cでの水溶液構造が明らかにされている筋肉蛋白質トロポニンCの調節ドメイン(1-90番目;NTnCと略)(図1)をモデル物質[1]として選び、その立体構造と分子運動に与える低温効果をNMR法により解析した。

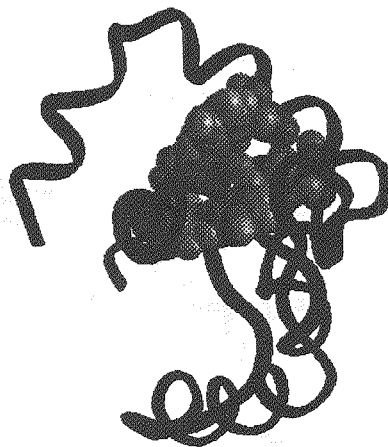


Fig.1. NMR structure of apoNTnC at 30deg. The CPK model represents the aromatic side-chains.

【装置】 実験には日本電子社製アルファ500型NMR装置とバリアン社製UNITY600NMR装置を用いた。低温実験は高精度・長時間型温度可変装置により行い、温度校正にMethanolの化学シフト値を用いた。多次元NMR信号処理はNMRPipe(F.Delaglio)により行い、シグナ

キーワード : 3D-NMR、トロポニンC、カルシウム結合、低温効果、緩和時間
著者ふりがな : つださかえ、ステファン・ガグネ、ブライアン・ザイクス

ルの帰属と ^{15}N - ^1H 間のNMR緩和時間解析はPIPPソフト群(D. Garrett)により行った。スペクトル密度と運動の相関時間算出は非線形最小二乗法により行い、また線形解析には自作の波形分離ソフト(竹腰ら)を用いた。

【方法】 常温-低温間での蛋白質構造と運動の違いを与えるNMR情報には、化学シフト、交換速度定数、 $(5/2)J(0)/\tau_c$ (Order Parameter) [2] 等がある。またNOEと二面体角情報は低温下での蛋白質立体構造を与え常温構造との比較を可能にする。これらのNMR情報を得るために、本研究では ^{15}N -NTnCと $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -NTnC試料の2mM水溶液 ($\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}=9:1$, $[\text{EDTA}]=5\text{mM}$, $\text{pH}=6.7$, $[\text{NaA3}]=2\text{mM}$) に対し 4°C (部分的に 30°C) において2次元と3次元のパルスNMR実験を行った。ここで、EDTAはNTnCの非カルシウム状態(アポ状態)の達成のために加え、これにより後述の ^{15}N -NMRの縦緩和時間に対するアポ-カルシウム結合状態の構造交換の項を除いた。アミド ^{15}N -NMR信号に対する縦、横緩和時間およびNOEの測定を 30°C と 4°C で行い、両温度でのスペクトル密度 $J(0)$ 、等方性運動の相関時間(τ_c および τ_e)、そして $(5/2)J(0)/\tau_c$ を算出した。

【結果】 NTnCに対する 4°C での3次元のCBCACONNHと ^{15}N -filtered NOESYおよび2次元のTOCSY実験から、N末端残基(Ala-1)を除くNTnCの全てのアミノ酸残基の ^1H と ^{15}N の共鳴線を帰属した。図2に ^{15}N -filtered NOESYの解析結果を示す。横軸はアミノ酸残基番号を示し、縦軸は ^1H の化学シフトを示す。連続的なdNNや αN -NOEのパターンは連鎖帰属の妥当性を示す。現在のデータから 4°C におけるNOEに関する立体構造情報の取得を行っている。

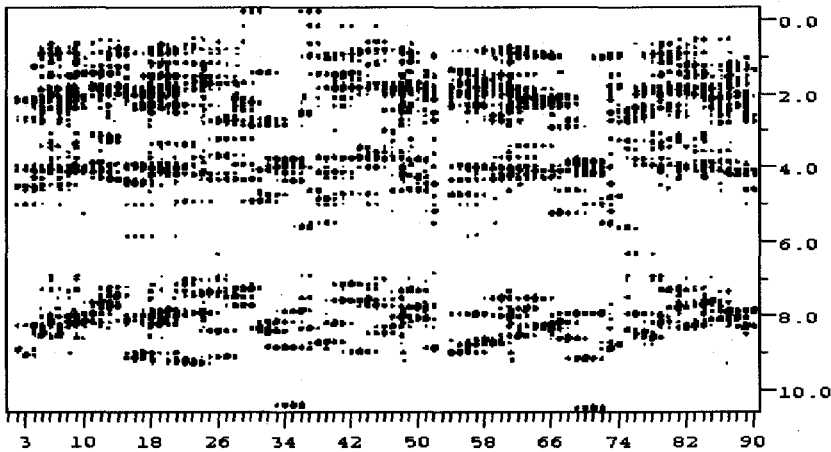


Fig.2. The strips representation of the ^{15}N -filtered NOESY spectra of apoNTnC at 4°C ($[\text{NTnC}]=2\text{mM}$, $[\text{KCl}]=25\text{mM}$, $\text{pH}=6.7$, 600MHz).

図3はNTnCの1次元NMRスペクトルの温度依存性(芳香環領域)を示す。 30°C において 6.60ppm に観測されるPhe26の δ -ring由来NMR信号は温度下降に伴い線幅を増大しながら高磁場側(図3の右方向)に移動した。同信号はこのときPhe75の δ -ring由来の共鳴位置(6.40ppm)に現れPhe75信号と重複した。このことは、温度低下に伴いPhe26の δ -ringを

含む局所部位の立体配座が特異的な変化を起こすことを示している。線形解析から15℃での構造交換速度は100~250Hzと見積もられた。

図4はNTnCの主鎖¹⁵N-, NH-, CaH-NMRの化学シフトの30℃と4℃の差の平均値を残基番号に対してプロットしたものである。この図は30℃から4℃への温度低下に伴い4~9番目の領域(第一ヘリックス部位)と75~90番目の領域(第5ヘリックス部位)およびVal65-Asp66近傍(第2Ca²⁺結合部位)の化学シフト値が特異的に変化することを示している。このことは、これら3つの領域が温度低下に伴い局所構造の変化を示唆している。

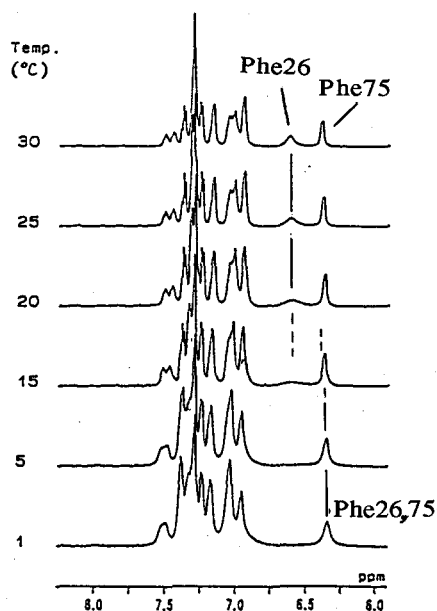


Fig.3. The temperature dependence of the ¹H-NMR spectrum of apo NTnC (aromatic region).

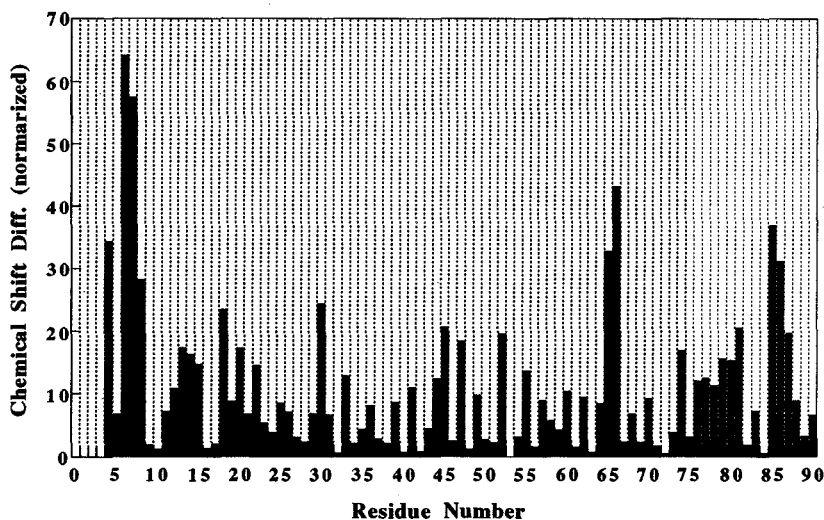


Fig.4. Normalized chemical shift difference of the ¹⁵N-, NH-, and CaH-resonance of apoNTnC between 30deg and 4deg.

NTnCの¹⁵N-NMRの縦、横緩和時間およびNOEのデータから、NTnC全体の(等方的)運動の相関時間 τ_c は4.5ns (30℃) および11.4ns (4℃) と求めた。これらの比が約2倍になっていることは、30℃と4℃での溶媒(水)の粘性率の比が約1/2(およそ1.6および0.8/mPas)であることに関係すると考えられる。図5にアミド基の(運動の方向をランダムと仮定したときの)分子運動に対する束縛の程度を示す変数 $(5/2)J(0)/\tau_c$ の30℃と4℃での差を残基番号に対してプロットした結果を示す。縦軸は温度低下に伴う運動束縛の大きさを示している。図5はNTnCの4~12番目(Nヘリックス)と80~90番目(Dヘリックス)

ス)及び65番目付近(第二Ca²⁺結合部位)の運動が、温度の低下に伴ってより強く束縛されることを示している。これらの部位は温度低下に伴う構造変化が示唆された部位(図4)と一致しており、温度低下がNTnC分子に対して部位特異的な構造と運動の変化をもたらすことを示唆している。

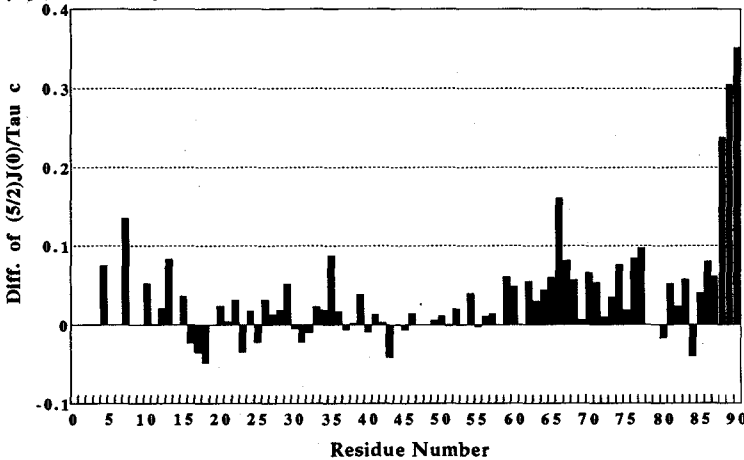


Fig.5. Difference in Order Parameter of apoNTnC between 30 and 4deg. The vertical axis shows the degree of restriction on the NH-group wobbling motion of apoNTnC.

【考察】これまでのNTnCに対するX線結晶構造解析[3]およびNMR[1]の結果は、室温付近においてNTnC分子中のN、C両末端部位と二つのCa²⁺結合部位は他の部位よりも運動性が高いことを示している。本NMR研究の結果は、これらの部位のうちNとC両末端および第二Ca²⁺結合部位の運動性だけが温度低下により大きく抑制され、第一Ca²⁺結合部位については抑制が小さいことを示した。このことは、タンパク質分子の内部運動は温度低下に伴って一様に低下するのではなく部位による違いがあることを示している。Suarezら[4]は、NTnCのCa²⁺結合定数 ($K_b = K_{on}/K_{off}$) が温度低下に伴って大きくなることを明らかにした。K_{on}は拡散限定反応式[5]によるので温度低下に伴い通常小さくなる。従って、温度低下に伴うNTnCの構造変化とはk_{off}が小さくなるような変化であり、これは上で述べた第二Ca²⁺結合部位の運動性の硬直化に関係すると考えられる。またこのことは、第一Ca²⁺結合部位の運動性が第二Ca²⁺結合部位と同じになるような改変(あるいはその逆)により、低温下でも常温下と変わらないCa²⁺結合能を有するNTnCをデザインできる可能性を示している。

【参考文献】

1. Gagné, S.M., Tsuda, S., Li, M.X., Smillie, L.B., and Sykes, B.D. *Nature Structural Biology*, 2, 784-789 (1995).
2. Lipari, G. and Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546-4558 (1982).
3. Herzberg, O. and James, M.N.G. *Nature*, 313, 653-655 (1985).
4. Suarez, M.C., Barbosa, C., Foguel, D., Sorensen, M., Smillie, L.B., and Silvia, J.L. *Protein Engineering*, 8, 36 (1995).
5. Glasstone, K., Laidler, K., and Eyring, H. "Theory of Rate Process", McGraw-Hill (1941).

(¹山之内製薬、²筑波大先端学際領域セ、³トロント大オントリオ癌研)
 ○大澤匡範^{1,2}、谷川 潤¹、Mark B. Swindells¹、古谷利夫¹、
 間瀬年康¹、田中俊之²、伊倉光彦^{2,3}

Solution structure of Calmodulin - W-7 complex

¹Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., ²Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, ³Ontario Cancer Institute, University of Toronto.

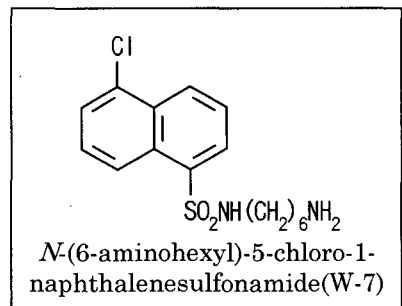
○Masanori Osawa^{1,2}, Jun Tanikawa¹, Mark B. Swindells¹, Toshio Furuya¹, Toshiyasu Mase¹, Toshiyuki Tanaka², and Mitsuhiko Ikura^{2,3}

The solution structure of the complex between calcium-bound calmodulin (Ca²⁺-CaM) and its antagonist, *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide(W-7) has been determined by NMR spectroscopy. The two domains of CaM (residues 5 to 74 and 84 to 145) connected by a flexible linker remain essentially unchanged upon complexation. Titration and NOE data suggest that two W-7 molecules bind to Ca²⁺-CaM, one in each domain. The complex is mainly stabilized by the hydrophobic interaction in each domain between the naphthalene group of W-7 and the hydrophobic pocket responsible for binding of target proteins. Therefore, W-7 inhibits the CaM-mediated activation of the target proteins by competing with key amino acid residues of the target which anchor to CaM at the heart of the hydrophobic pocket in each domain.

[序]

カルモデュリン(CaM)は、148 アミノ酸からなる EF ハンド型カルシウム結合蛋白質で、真核細胞においてカルシウム依存的に標的酵素を活性化することにより核酸代謝、筋収縮、分泌、細胞分割などといった様々な生理現象を調節する。Ca²⁺が結合した CaM(Ca²⁺-CaM)の結晶構造¹では、構造が類似した2つのドメインが8ターンのαヘリックスで隔てられた鉄亜鈴のような構造をとっている。各ドメインには2つのヘリックス-ループ-ヘリックス Ca²⁺結合領域(EF ハンドモチーフ)があり、各 EF ハンドモチーフに1個ずつ、計4個の Ca²⁺が CaM に結合する。細胞内 Ca²⁺濃度が上昇すると Ca²⁺が CaM に結合し、CaM にコンフォメーション変化が起こり疎水性領域が露出する。この変化により CaM と標的酵素との相互作用が可能となり、Ca²⁺シグナルを伝達する。

N-(6-アミノヘキシル)-5-クロロ-1-ナフタレンスルホンアミド(W-7)は、最も強力な CaM 阻害剤の1つである。Ca²⁺-CaM 1分子に対して2~3分子のW-7が結合する(解離定数11 μM)。W-7を用いたCaM研究は現在まで盛んに行われてきたが、W-7とCaMの相互作用は立体構造の見地からは明らかになっていない。本研究では、CaM - W-7複合体の立体構造解析を行い、W-7のCaM阻害



NMR、カルモデュリン - W-7 複合体、立体構造解析、疎水性相互作用

おおさわまさのり、たにかわじゅん、マーク スウィンデルス、ふるやとしお、
 ませとしやす、たなかとしゆき、いくらみつひこ

機構を明らかにすることを目的とする。

[方法]

NMR スペクトルは、Bruker AMX-600 を用いて、308K で測定した。

^{15}N で均一にラベルした *Xenopus laevis* CaM を用いて、1.5mM CaM, 100mM KCl, 10.6mM CaCl_2 , pH6.8 の水溶液を作成し、W-7 による滴定を行い、 ^{15}N - ^{1}H HSQC スペクトルでシグナルの変化を調べた。

^{15}N あるいは $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ で均一にラベルした CaM を用いて、1.5mM CaM, 7.5mM W-7, 100mM KCl, 10.6mM CaCl_2 , pH6.8 の水溶液(H_2O または D_2O)を用いて、主鎖および側鎖の帰属のために CBCA(CO)NH, HNCACB, HCCH-TOCSY などの測定を行った。距離情報は mixing time 100ms の 2D homonuclear NOESY および ^{13}C edited NOESY HMQC, ^{15}N -edited NOESY HMQC, ^{13}C F1-edited F3-filtered HMQC NOESY スペクトルから、2 面体角の情報は HNHA スペクトルおよび Chemical Shift Index から得られた。スペクトルのプロセッシングと解析には NMRPipe, Pipp などを用いた。

NOE、水素結合、 Ca^{2+} 配位の距離制限、および $^3J_{\alpha\text{NH}}$ スピン結合定数と CSI からの 2 面体角の制限を用いて、X-PLOR version3.1 上で Simulated Annealing(SA) 法により構造計算を行った。Lys75 から Glu82 の領域は柔軟で、なおかつ N 端と C 端のドメイン間の NOE は観測されなかったため、各ドメインの構造は別々に計算した。

[結果と考察]

Figure 1 に、CaM - W-7 複合体の溶液構造を示す。最安定 20 構造の主鎖および非水素原子の RMSD は、残基番号 5~74 でそれぞれ 0.8Å, 1.4Å、83~146 でそれぞれ 0.7Å, 1.4Å

である。ヘリックス I (残基番号 5~19) が N 端ドメインの中心に向かって動いた以外は、CaM の主鎖のフォールディングトポロジーは W-7 との複合体形成に伴いほとんど変化しない。Figure 2 に主鎖のアミド基の $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N

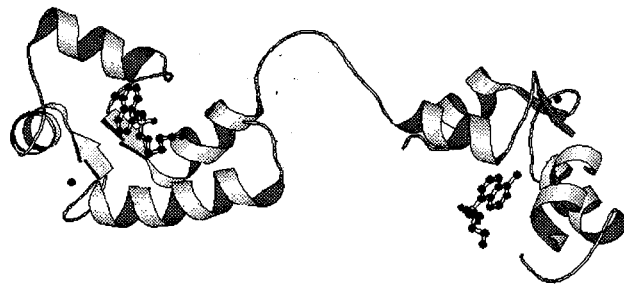


Figure 1. A schematic ribbon drawing of the solution structure of calmodulin (ribbon) complexed with W-7(ball and stick). The relative orientation of the two domains is arbitrary due to the flexibility of the central linker. The figure was generated using MOLSCRIPT.

heteronuclear NOE を残基番号順に示す。75 番から 83 番の領域の NOE が大きく、この領域の運動性が大きいことがわかる。両ドメイン間の NOE が発見できないことを考え合わせると、両ドメインの配向が定まっていない可能性が高い。

CaM と W-7 の分子間 NOE は主として CaM の疎水性ポケットの内部にあるメチル基と W-7 のナフタレン環の間に観測されており、CaM 溶液の W-7 滴定の結果も考慮すると、W-7 は CaM の各ドメインに 1 分子ずつ結合していると考えられる。各ドメインに W-7 1 分子ずつを含めた SA 計算の結果、W-7 は各ドメインの疎水性ポケ

ットに結合しており、W-7のクロロナフタレンとCaMの疎水性アミノ酸側鎖との間の疎水性相互作用で安定化している。CaMの両ドメインの主鎖を重ね合わせると、W-7は各ドメインの対応する疎水性ポケットに結合しており、相同のアミノ酸側鎖と相互作用しているが、その配向は異なっている。これは、両ドメインのアミノ酸配列の違いによるW-7結合部位の構造の違いを反映している。

CaM-smMLCK ペプチド複合体の結晶構造²とCaM - W-7 複合体の溶液構造を主鎖で重ね合わせると、N端およびC端各ドメインのW-7結合部位にsmMLCK ペプチドのトリプトファンおよびロイシンの側鎖が存在している。W-7は標的酵素の疎水性側鎖と競合することにより、CaMと標的酵素との相互作用を阻害していると考えられる。

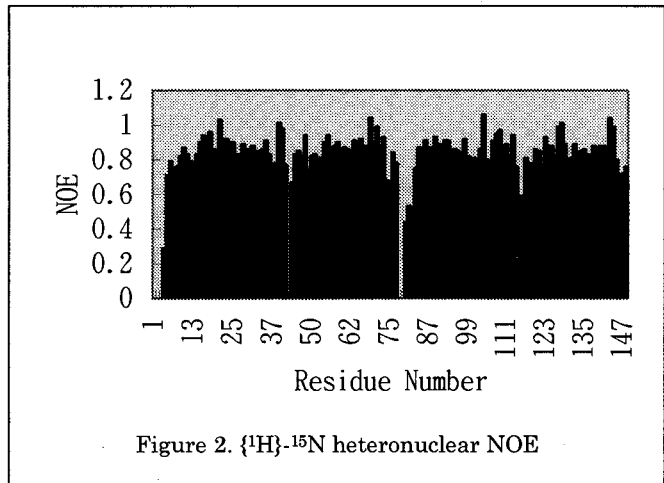


Figure 2. $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE

Trifluoperazine(TFP)はW-7に並ぶ最も強力なCaM阻害剤である。CaM-TFPの結晶構造^{3,4}とCaM - W-7複合体の溶液構造を主鎖で重ね合わせると、TFPとW-7はCaMのC端ドメインの同じ疎水性ポケットに結合しているが、厳密には結合位置が異なる。これは、W-7やTFPといった疎水性基をもつ阻害剤、あるいはトリプトファンなどの芳香族側鎖の結合部位はかなり柔軟で、相互作用する分子によって構造を変えうると示唆される。

本研究により、CaM - W-7複合体では、CaMの各ドメインに1分子ずつのW-7が結合していること、両ドメインをつなぐ領域は運動性が大きく両ドメインの配向が決まっていない可能性が高いこと、W-7のクロロナフタレン基がCaMと疎水相互作用をしておりスルホンアミド基から4個以上離れたメチレン基はCaMとの特異的相互作用に大きな影響を及ぼしていないことなどが明らかになった。CaM分子に結合している2分子のW-7の末端のメチレン基は互いに近い位置にすることが可能である。これらの知見は、W-7より強くCaMに結合し、高いCaM阻害活性をもつ分子のデザインのために有用な情報となる。

References

1. Babu, Y. S. *et al. Nature* 315, 37-40(1985).
2. Meador, W. E. *et al. Science* 262, 1718-1721(1993).
3. Cook, W. J. *et al. Biochemistry* 33, 15259-15265(1994).
4. Vondonselaar, M. *et al. Nat. Struct. Biol.* 1, 795-801(1994).

SiX₄ 及び CH_{4-n}X_n (X=Cl, Br, I; n=1-4) の第 4 属元素の核遮蔽定数に及ぼす重原子効果
(三菱製紙(株)筑波研究所) ○遠藤一央、山本京之介

Heavy Atom Effect on 14 Group Nuclear Shielding Constant of SiX₄ and CH_{4-n}X_n (X= Cl, Br, I; n=1, 2, 3, 4)
(Tsukuba Research Laboratory, Mitsubishi Paper Mills. LTD.)
Kazunaka Endo and Kyonosuke Yamamoto

A sum-over-states third-order perturbation theory using a semiempirical wavefunction parameteric method³ was applied to ²⁹Si and ¹³C nuclear magnetic shielding constants of SiX₄ and CH_{4-n}X_n (X=Cl, Br, I; n=1, 2, 3, 4), respectively. The other new spin-orbit (LS) term, $\sigma_{LS}(A)$, was proposed to come from the cross term involving the halogen spin-orbit coupling, Fermi I·S interaction and the external field-(carbon or silicon) orbit interaction. The values using the MO method predicted substantial contribution (25 %) of $\sigma_{LS}(Si \text{ or } C)$ to the $\sigma_{LS}(X)$ as already given. The results were in considerably good agreement with the experimental values, indicating the importance of the spin-orbit effect on the chemical shifts of molecules containing halogen heavier atoms.

Theory

The basic derivation of LS (spin-orbit) shift was already given in the previous paper¹ from the general perturbation-theory expressions. We assume that the exact wavefunctions for the corresponding electronic states in the following equation (1) are approximately built from Hartree-Fock MO's. The wavefunctions² for the ground and lowest excited states are written as a single determinant of the form, as mentioned previously.¹ The MO is expanded as a linear combination of the atomic orbitals. The shielding constant of the atom A is obtained from usual third-order perturbation theory

$$\begin{aligned} \sigma_k = & (\partial^2 / \partial \mu_k \partial H_k) \{ \langle {}^1\Phi_0 | h | {}^1\Phi_0 \rangle \\ & - \sum_i^{\text{Occ}} \sum_j^{\text{Unocc}} (\langle {}^1\Phi_0 | h | {}^1\Phi_{i \rightarrow j} \rangle \langle {}^1\Phi_{i \rightarrow j} | h | {}^1\Phi_0 \rangle (E_{j_i} - E_0)^{-1}) \\ & + \sum_i^{\text{Occ}} \sum_{j j'}^{\text{Unocc}} [\langle {}^1\Phi_0 | h | {}^{1(\text{or } 3)}\Phi_{i \rightarrow j} \rangle \langle {}^{1(\text{or } 3)}\Phi_{i \rightarrow j} | h | {}^{1(\text{or } 3)}\Phi_{i \rightarrow j'} \rangle \langle {}^{1(\text{or } 3)}\Phi_{i \rightarrow j'} | h | {}^1\Phi_0 \rangle \\ & \times \{ ({}^{1(\text{or } 3)}E_{j_i} - E_0) ({}^{1(\text{or } 3)}E_{j'_i} - E_0)^{-1} - \langle {}^1\Phi_0 | h | {}^1\Phi_0 \rangle \\ & \times \sum_i^{\text{Occ}} \sum_j^{\text{Unocc}} [\langle {}^1\Phi_0 | h | {}^{1(\text{or } 3)}\Phi_{i \rightarrow j} \rangle \langle {}^{1(\text{or } 3)}\Phi_{i \rightarrow j} | h | {}^1\Phi_0 \rangle ({}^{1(\text{or } 3)}E_{j_i} - E_0)^{-2}] \}]_{\mu=H=0}. \end{aligned} \quad (1)$$

NMRケミカルシフト、スピンの軌道効果、SiX₄ CH_{4-n}X_n

えんどうかづな、やまもときょうのすけ

where h is the total hamiltonian, ${}^1\Phi_0$ denotes the total wavefunction for the ground state, 1 (or 3) $\Phi_{i \rightarrow j}$ represents a singlet (or triplet) state; the subscript $i \rightarrow j$ labels excitation of a single electron from MO φ_i to MO φ_j . We think that if we obtain the exact wavefunctions of the molecules, we can reproduce the experimental NMR chemical shieldings using the Eq. (1).

For the third-order contribution including the spin-orbit coupling interaction, we can obtain four shielding constants^{1,3} which intervene Fermi, spin-dipolar, electron-spin Zeeman interactions and the vector potential of nuclear dipole, respectively. We, here, consider the dominant term involving the Fermi interaction and neglected the other three terms, since the terms are smaller.^{1,3} We propose the other new LS shift, $\sigma_{LS}(A)$, which indicate to come from the cross term involving the halogen spin-orbit coupling, silicon (or carbon) I'S interaction and external field-silicon (or carbon) orbit, with the previous LS shift, ${}^1\sigma_{LS}(X)$. The expression was rewritten in this case,

$$\begin{aligned} \sigma_{LS}^{uv} = & \sigma_{LS}(A)^{uv} + \sigma_{LS}(X)^{uv} = -(4\pi\alpha^2\lambda/3)|S(0)|^2 \left\{ \sum_i \sum_{jj'}^{OccUnocc} [C_i^X \times C_j^X]_u \{ [C_j^A \times C_{j'}^A]_v + [C_j^X \times C_{j'}^X]_v \} C_{sj}^A C_{si}^A \right. \\ & \times \{ [({}^3E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0)]^{-1} + [({}^1E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0)]^{-1} \} \\ & + \sum_i \sum_{jj'}^{OccUnocc} \{ [C_i^A \times C_j^A]_u + [C_i^X \times C_j^X]_u \} C_{sj}^A C_{sj'}^A [C_{j'}^X \times C_i^X]_v \{ ({}^3E_{ji} - E_0)({}^1E_{j'i} - E_0) \}^{-1} \\ & - \sum_{ii'} \sum_j^{OccUnocc} \{ [C_i^A \times C_j^A]_u + [C_i^X \times C_j^X]_u \} [C_{i'}^X \times C_i^X]_v C_{sj}^A C_{si}^A \{ ({}^3E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0) \}^{-1} \\ & + [({}^1E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0)]^{-1} - \sum_{ii'} \sum_j^{OccUnocc} \{ [C_i^A \times C_j^A]_u + [C_i^X \times C_j^X]_u \} \\ & \times C_{si'}^A C_{si}^A [C_j^X \times C_{i'}^X]_v \{ ({}^3E_{ji} - E_0)({}^1E_{j'i} - E_0) \}^{-1} \\ & + 2 \sum_{imm'} \sum_j^{OccUnocc} \{ [C_i^A \times C_j^A]_u + [C_i^X \times C_j^X]_u \} [C_m^X \times C_m^X]_v C_{sj}^A C_{si}^A \{ {}^3E_{ji} - E_0 \}^{-2}, \end{aligned} \quad (2)$$

where the components of the vectors, C_i^A and C_i^X , are the coefficients of the corresponding p_x , p_y and p_z AOs of i -th MO in the atoms A and X, respectively, C_{sj}^A is the coefficient of the s AO of j -th MO in the atom A, and $|S(0)|^2$ is the electron orbital probability density of the atom A at $r_{Ak} = 0$. λ is the spin-orbital constant.

Results and Discussion

We calculated the H, C and Si chemical shifts of HX , $CH_{4-n}X_n$ and SiX_4 ($X = Cl, Br, I; n = 1-4$) compounds, respectively. The geometries of (CHX_3, CH_3X) , CH_2X_2 and (CX_4, SiX_4) were optimized under their C_{3v} , C_{2v} and T_d symmetries by the PM3 method.¹⁵ In the calculation of the chemical

shift, we modified a PM3 program to output the singlet and triplet excitation energies from all occupied MOs to all unoccupied MOs, and considered only the one-electron term of the spin-orbit. This is enough for calculating the isotropic terms for the diamagnetic, paramagnetic and the LS terms including Fermi contact interaction. The shielding constant of CX_4 and SiX_4 is gauge-independent because of their T_d symmetry.^{4, 5} We used quantities (the spin-orbit coupling constant of halogen⁶ and the hyperfine coupling constant of proton, carbon and silicon atoms)⁷ which were required for a calculation of the LS term in Eq. (2).

(a) H chemical shifts of HX

For the LS term, we used the $\sigma_{LS}(X)$ as already given. We compared in Fig. 1 the proton chemical shifts calculated with and without the LS term to the experimental values⁸. The chemical shift values are given relative to the HCl molecule. Our calculated shifts including LS term agree well with experimental values: the spin-orbit effects are significant for HBr and HI.

(b) C chemical shifts of $CH_{4-n}X_n$

Fig. 2 showed the calculated C chemical shieldings of $CH_{4-n}X_n$ ($X = Cl, Br, I$) with the experimental values.^{9, 10} In $CH_{4-n}X_n$ molecules except CX_4 , the gauge origin is located on the halogen atom. Our calculated values show considerably good agreement with experiment. The agreement is obtained by considering the LS terms. Our evaluated largest LS shielding was given as the contribution of 330.6 ppm ($\sigma_{LS}(X)$ 271.5 and $\sigma_{LS}(C)$ 59.1) to the total shielding for Cl_4 .

In $CH_{4-n}X_n$ compounds, the contribution of the electronic states to the LS shielding can be considered as well as done in the following section of SiX_4 .

(c) Si chemical shifts of SiX_4

In SiX_4 compounds, the origin of the ^{29}Si chemical shifts has not been explained theoretically, although some investigators¹¹ observed the high-field shifts of $SiBr_4$ and SiI_4 . We showed in Fig. 3 the comparison between the calculated and the experimental values. Our calculated values of the LS shielding for SiI_4 predicted the substantial contribution as 510.9 ppm ($\sigma_{LS}(X)$ 420.9 and $\sigma_{LS}(Si)$ 90.0) to the total shielding. Fig. 3 showed the silicon chemical shifts with and without LS shifts together with experimental ones. The calculated values are in good accordance with the experimental ones. Thus, we can see that the origin of the high-field shift was interpreted by the LS term.

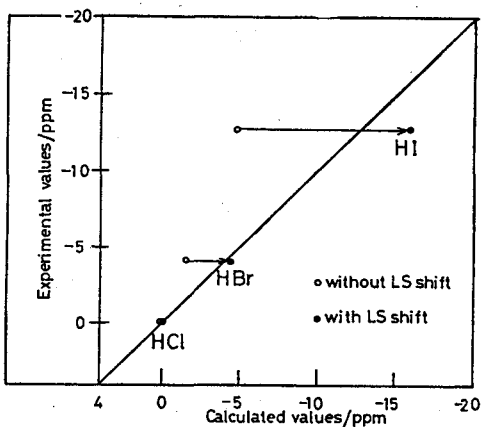


Fig. 1. ^1H chemical shifts in HX ($\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) compared between the experimental and the calculated values with and without the spin-orbit (LS) shift.

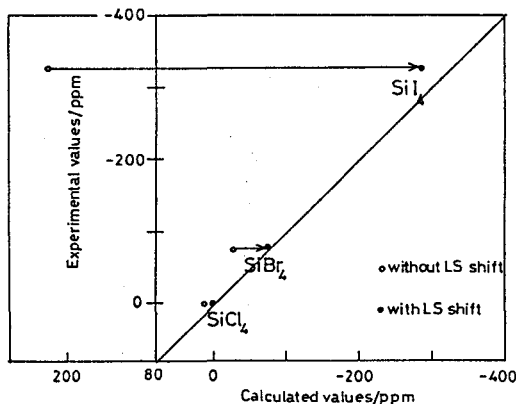


Fig. 3. ^{29}Si chemical shifts in SiX_4 ($\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) compared between the experimental and the calculated values with and without the spin-orbit (LS) shift.

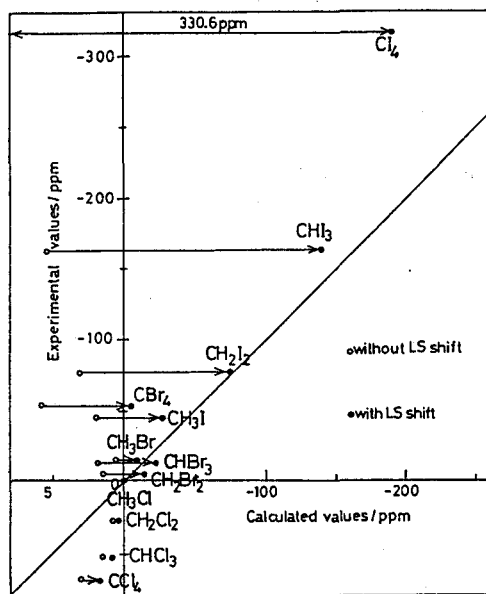


Fig. 2. ^{13}C chemical shifts in CH_4-nX_n ($\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}; n=1-4$) compared between the experimental and the calculated values with and without the spin-orbit (LS) shift.

References

1. I. Morishima, K. Endo and T. Yonezawa, *J. Chem. Phys.* **59**, 3356 (1973).
2. C. C. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.* **23**, 69 (1951).
3. M. I. Volodicheva and T. K. Rebane, *Theor. Exp. Chem.* (English Transl.) **14**, 348 (1978).
4. M. Sugimoto and H. Nakatsuji, *J. Chem. Phys.* in press.
5. T. Higashioji, M. Hada, M. Sugimoto and H. Nakatsuji, to be submitted.
6. C. P. Slichter, *Principle of Magnetic Resonance*, (2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1978), p298; Moore, C. E., "Atomic Energy Levels" National Bureau of Standard: Washington, 1971.
7. W. D. Knight, *Solid State Phys.* **2**, 120 (1956).
8. W. G. Schneider, H. J. Bernstein, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **28**, 601 (1958).
9. U. Niemann and H. C. Marsmann, *Z. Naturforsch.* **30b**, 202 (1975).
10. W. M. Litchman and D. M. Grant, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1400 (1968).
11. O. W. Howarth and R. J. Lynch, *Mol. Phys.* **15**, 431 (1968). (*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **68** (1995) 3341 掲載)

(シーメンス旭メディテック(株) 1、東大医用電子研 2) ○入口紀男1、上野照剛 2

The achievable limit of the magnetic resonance sensitivity

N. Iriguchi¹ & S. Ueno² *Siemens-Asahi Medical Technologies Ltd.*¹ and *University of Tokyo*²

The achievable limit of the signal-to-noise ratio (SNR) is formulated by an equation with spin-spin relaxation time T_2 (s) and electric conductivity σ (S/m) only. The equation will provide real answers for some important feasibility studies that involve detecting NMR signals especially when some difficulties are associated with the experiments.

緒言

磁気共鳴の検出感度は、磁気共鳴の有用性を決定する大きな要因である。試料が導電性を有するとき、磁気共鳴の検出感度には限界(上限値)が存在する。たとえ純度100%の理論純水でも、 $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$ のわずかな解離によって 5.50×10^{-6} S/m程度の導電率をもっている。そこで、試料の導電性に着目して磁気共鳴の検出感度の理論的限界を明らかにする。

信号

試料が静磁場 B_0 の中にあつて、コイルに単位電流を流して得られるRF磁場 B_1 によって原子核スピンの励起され磁化が 90° 倒れるとき、スピンの歳差運動によってコイルには $\xi_s = -(\partial/\partial t)(B_1 \cdot M_0)$ の起電力 ξ_s が誘導される。ここで M_0 は試料の単位体積あたりの磁化のベクトル $M_0 = n\gamma^2 (h/2\pi)^2 I(I+1) B_0 / 3kT_s$ であり、 n は磁気共鳴にあずかる単位体積あたりの原子核スピンの数、 h はプランクの定数(6.63×10^{-34} Js)、 k はボルツマンの定数(1.38×10^{-23} J/K)、 T_s は試料の絶対温度(K)である。被検体の微小体積 dV について $d\xi_s = \omega_0 \int_V B_1 M_0 dV$ であり、 B_1 が試料の全体積 V について一様であるときは、 $\xi_s = 10^3 \omega_0^2 v c A \gamma (h/2\pi)^2 I(I+1) B_1 / (3kT_s)$ である。ここで、 v は試料の検出に關与する体積(m^3)、 c はスピン濃度(M)、 A はアボガドロの定数(6.02×10^{23})である。

雑音

磁気共鳴の検出に用いられるRFコイルは抵抗 R_c をもっている。電子の熱運動に伴う雑音の実効値 ξ_N は、古くからJ. B. Johnsonの研究によって知られている。励起されたスピンの歳

検出感度 信号雑音比 導電率

いりぐち のりお うえの しょうごう

差運動を行なうとき、試料には、磁場の変化に伴って渦電流による誘導損失等価抵抗 R_i が惹起される。 R_i は、コイルの純抵抗 R_c に対して直列に加わる ($R = R_c + R_i$)。揺乱電流は、周囲に揺乱磁束を発生し、RFコイルによって雑音として検出される。たとえば、半径 r_0 の球状の試料を考え、その中で軸の周りに断面が半径方向に dr_0 、軸方向に dz の微小な面積を有するリングを考えると、リングのコンダクタンス dG は、 $dG = \sigma dr_0 dz / (2\pi r_0)$ と表される。半径 r_0 のリングを貫く磁束 B_1 によってリングに誘導される起電力 V は、 $V = -\pi r_0^2 \partial B_1 / \partial t = \pi r_0^2 \omega_0 B_1 \sin(\omega_0 t)$ であり、電力の実効値 P^* は $P^* = (1/4) \pi r_0^3 \omega_0^2 B_1^2 \sigma dr_0 dz$ と表わされる。単位体積では、 $P^* = (1/8) \sigma r_0^2 \omega_0^2 B_1^2$ であり、半径 r_0 の球における値 P は、体積積分によって、 $P = 2\pi \int_{-r_0}^{r_0} \int_0^{(r_0^2 - z^2)^{1/2}} \bar{P}^*(r_0) r_0 dr_0 dz$ と表わされる。ここで、 B_1 は単位電流 i によって生起される磁束密度の波高値であり、 $(i/\sqrt{2})^2 R_i = P$ であるから、 $R_i = 2P = (2/15) \pi \sigma r_0^5 \omega_0^2 B_1^2$ となり、この値が雑音の実効値 $\xi_N = \sqrt{4kT_s \Delta f R_i}$ を与える。

検出感度の限界

磁気共鳴によって得られた誘導起電力 ξ_s は、ピーク値 (FID信号の初期値) であって、その後 T_2 緩和によって減衰する。FID信号に最適フィルターをかけてフーリエ変換したとき単位周波数あたり信号雑音比 (SNR) ψ は、 $\psi = (T_2/2)^{1/2} \xi_s / \xi_N$ と表わされる。抵抗 R として試料の抵抗 R_i のみを考慮しRFコイルの抵抗 R_c をゼロとして、最大信号雑音比 (SNR) ψ_{\max} は、次式で与えられる。

$$\psi_{\max} = (125/6) \sqrt{15} \pi^{-5/2} A h^2 k^{-3/2} T_s^{-3/2} T_2^{1/2} c v \omega_0 \gamma I(I+1) \sigma^{-1/2} r_0^{-5/2}$$

結語

上式を用いて、たとえば試料が1mlの水であり、温度 $T_s = 293$ K (20°C)、導電率 $\sigma = 5.50 \times 10^{-6}$ S/m であるときは、信号雑音比の上限値 ψ_{\max} はプロトン(^1H)に対して、たとえば500MHzで $\psi_{\max} = 4.68 \times 10^{12} \sqrt{T_2}$ であると考えられる。また、試料が温度 $T_s = 310$ K (37°C)、導電率 $\sigma = 0.50$ S/mの生体試料であるときは、 $^1, ^2$ 信号雑音比の上限値 ψ_{\max} は、 $\psi_{\max} = 6.17 \times 10^{-12} T_2^{1/2} c v \omega_0 \gamma I(I+1) r_0^{-5/2}$ であり、この式で与えられる値は、特に生体試料が円筒RFコイルの中に収められてその直径の2/3以上を占めるとき、1T以上の磁場強度(^1H 共鳴周波数約42MHz以上)で日常的に経験される信号雑音比に近い。

1. N. Iriguchi, "The power sensitivity of magnetic resonance experiments."

J. Appl. Phys., 73: 2956, 1993

2. N. Iriguchi, et al., "The NMR sensitivity achievable with a slotted-tube resonator,"

Magn. Reson. Mater. (MAGMA), 1: 122, 1993

3P3

核磁気遮蔽定数の相対論的研究(I)；ハロゲン化水素

(京大工) ○C. C. Ballard、波田雅彦、金子広明、中辻 博

Relativistic study of nuclear magnetic shielding constants (I); Hydrogen halides (Faculty of Engineering, Kyoto University)

○C. C. Ballard, Masahiko Hada, Hiroaki Kaneko, Hiroshi Nakatsuji

Quasi-relativistic calculations on the proton shielding constants of Hydrogen Halides, HX (X=F, Cl, Br and I) are presented. The relativistic terms are represented through the one-electron terms of the two-component spin-free relativistic no-pair Hamiltonian (SFR), due to Sucher¹ and Hess², under Foldy-Wouthuysen (free-particle projectors) and Douglas-Kroll (external field projectors) transformations, and the quasi-relativistic the one-electron spin-orbit (SO) operator.

The procedure employed was a modification of the SO-UHF (Unrestricted Hartree Fock) method³, involving the replacement of the non-relativistic kinetic energy and potential. No new terms are required for the shielding constant. The implementation of the two-component SFR in standard computational cost occurring in the integral evaluation. The one-electron SFR has been used in atomic and molecular calculations and shown to reproduce well the results of relativistic Dirac-Fock calculations^{2,4,5}, the neglected two electron terms having a small effect⁵. The use of the quasi-relativistic SO operator is not expected to effect the conclusions of this study. The extension of the method to include the two-electron terms of the SO operator would reduce the SO interaction.

The correlation between theory and experiment for the proton chemical shifts are shown in figure 1 for the three basis sets employed in this study. The SO effect is important particularly for Br and I, and indeed is necessary to obtain the normal halogen dependence. The SFR has a smaller effect, essentially being localised to the halogen. The improved orbital description of the halogen atom, the higher angular momentum valence orbitals experience a lesser interaction with the nucleus, reduces the spin orbit effect, offering a slight improvement in the calculated values.

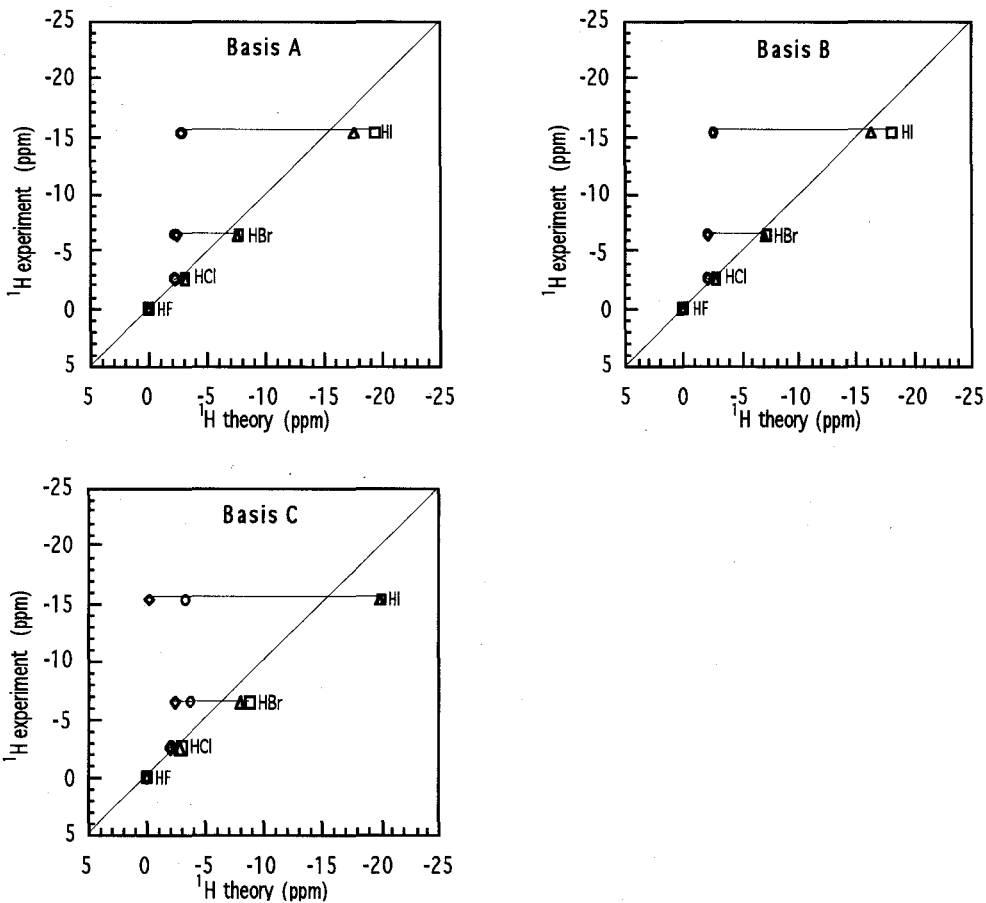


Figure 1: Comparison between theory and experiment for the proton chemical shift of the hydrogen halides. Values are relative to HF. The relativistic calculations are due to the external field projection SFR, and the gauge origin is on the halogen.

○ non-relativistic Hamiltonian, ◇ relativistic spin-free Hamiltonian, □ non-relativistic Hamiltonian with spin-orbit term, △ relativistic spin-free Hamiltonian with spin-orbit term.

¹ J. Sucher, Phys. Rev. **A22**, 348 (1980).

² B. A. Hess, Phys. Rev. **A32**, 756 (1985); B. A. Hess, Phys. Rev. **A33**, 3742 (1986).

³ H. Nakatsuji, H. Takashima, and M. Hada, Chem. Phys. Letters **235**, 13 (1995).

⁴ C. L. Collins, K. G. Dyall, and H. F. Schaefer III, J. Chem. Phys. **102**, 2024 (1995).

⁵ R. Samzow, B. A. Hess, and G. Jansen, J. Chem. Phys. **96**, 1227 (1992).

relativistic effects, spin-orbit interaction, hydrogen halides, SFR, SO-UHF

Ballard C. C., はだ まさひこ, かねこ ひろあき, なかつじ ひろし

Relativistic study of nuclear magnetic shielding constants (II); Mercury and tungsten compounds (Faculty of Engineering, Kyoto University)

○Hiroaki Kaneko, C. C. Ballard, Masahiko Hada, Hiroshi Nakatsuji

We have recently proposed a relativistic *ab initio* computational method of the magnetic shielding constant by combining the relativistic spin-free no-pair theory of Sucher and Hess and the spin-orbit unrestricted Hartree-Fock (SO-UHF) method developed in our laboratory, and applied it to the calculations of the ^{199}Hg and ^{183}W magnetic shielding constants of HgX_2 ($\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}$, and I), WX_6 ($\text{X}=\text{F}, \text{Cl}$) and WO_4^{2-} . In this study we have shown that relativistic terms, both the spin-free relativistic (SFR) term and SO term, are important for the calculation of the magnetic shielding constants and the chemical shifts for compounds having heavy resonant nuclei.

当研究室ではNMR化学シフトの理論的研究を進めて、多くの化学シフトのデータが示す規則性や多様性のメカニズムを明らかにしてきました。1) 最近では、相対論的効果の一つであるスピン-軌道相互作用(SO)を考慮した方法論(SO-UHF法)²⁾により、NMR化学シフトにおけるこの効果の重要性を明らかにしました。

今回、我々はSucherやHessのrelativistic spin-free no-pair theoryを用いてSO相互作用以外の相対論的効果をSO-UHF法の枠組みの中で取り入れることにより、SO相互作用だけでなくそれ以外の相対論的効果を考慮したNMR化学シフトの計算を可能にしました。3) この方法によって、共鳴原子核そのものが重金属であるためにSO相互作用以外の相対論的効果である運動量補正(Mass velocity)項やDarwin項等のSFR(spin-free relativistic)項が重要になると予想される水銀化合物やタングステン化合物のNMR化学シフトの計算を行いました。その結果、図1と図2が示すように重金属核NMR化学シフトを定量的に求める上で、実際にこれらの相対論的効果が不可欠である事が分かります。

例えば、Hg化合物では、SO相互作用だけでなくSFR項も考慮することで初めて化学シフトの傾向が再現できており、W化合物においてもSFR項を考慮することで、化学シフトの値がより実験値に近くなっていることが分かります。また、Hg化合物においては、SO相互作用を加えることによって高磁場にシフトする幅が、相対論ハミルトニアンを考慮した場合の方が大きいことから、SO相互作用と他の相対論的効果が強くカップリングしている事が分かっています。このカップリングの効果は、Hgの内殻の基底関数の自由度を上げることでさらに顕著となることも明らかになっていますが、カップリング効果の発現メカニズム等の解明については、さらに検討を進めることが必要になってくると考えられます。

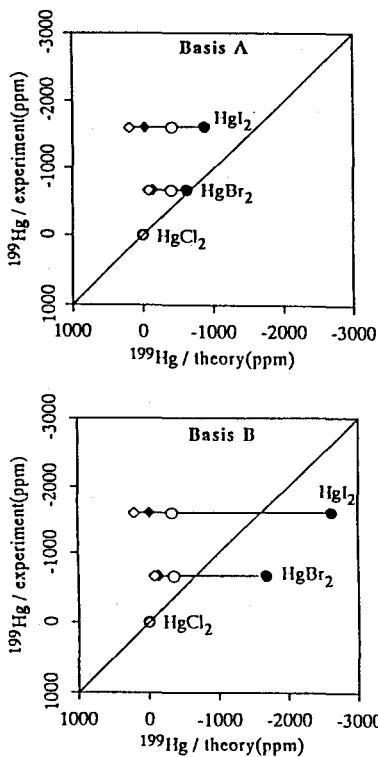


Fig. 1. Correlations between theory and experiment for ^{199}Hg chemical shifts in mercury dihalides. Basis B have larger flexibility in the inner core orbitals near the heavy nucleus than Basis A.

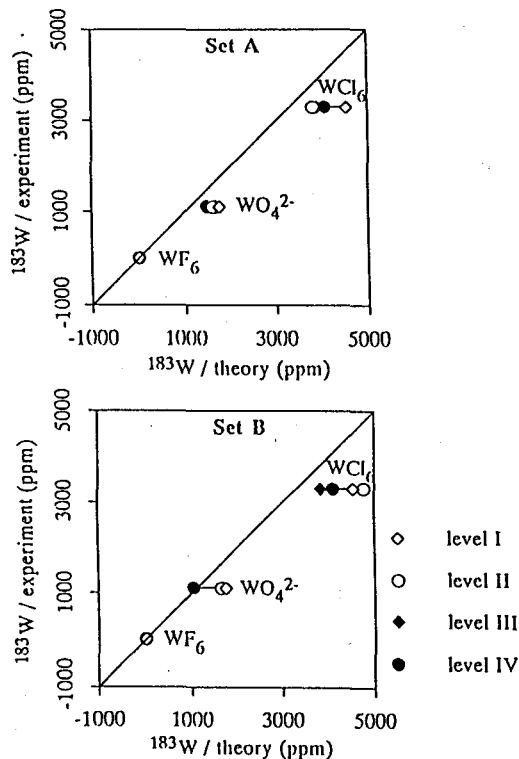


Fig. 2. Correlations between theory and experiment for ^{183}W chemical shifts in tungsten hexahalides and tetraoxide. Set B have larger flexibility in the inner core orbitals near the heavy nucleus than Set A.

We have calculated in four different levels of approximations, namely,

level I: non-relativistic Hamiltonian, level II: non-relativistic Hamiltonian with the SO term, level III: relativistic spin-free no-pair Hamiltonian, level IV: relativistic spin-free no-pair Hamiltonian with the SO term.

- 1) H. Nakatsuji, Nuclear magnetic shielding and molecular structure, ed. by J. A. Tossell (Kluwer, Dordrecht, 1993) p.263.
- 2) H. Nakatsuji, H. Takashima and M. Hada, Chem. Phys. Letters 233 (1995) 95.
- 3) C. C. Ballard, M. Hada, H. Kaneko and H. Nakatsuji, Chem. Phys. Letters 254 (1996) 170

SO-UHF、SO、Mass velocity項、Darwin項、NMR化学シフト

かねこ ひろあき、Ballard C. C.、はだ まさひこ、なかつじ ひろし

3P5

Comparison of Intramolecular Specific Interactions C-H...N in
Hetaryl Vinyl Ethers and Hetaryl Vinyl Sulphides by ^1H and ^{13}C
NMR Spectroscopies and Quantum-chemical Calculations.

(阪大薬¹、阪大遺伝情報²、阪大医³)

Andrei V. Afonin¹, ○Alexander V. Vashchenko¹, 高木達也²,
藤原英明³.

Comparison of Intramolecular Specific Interactions C-H...N in
Hetaryl Vinyl Ethers and Hetaryl Vinyl Sulphides by ^1H and ^{13}C
NMR Spectroscopies and Quantum-chemical Calculations.

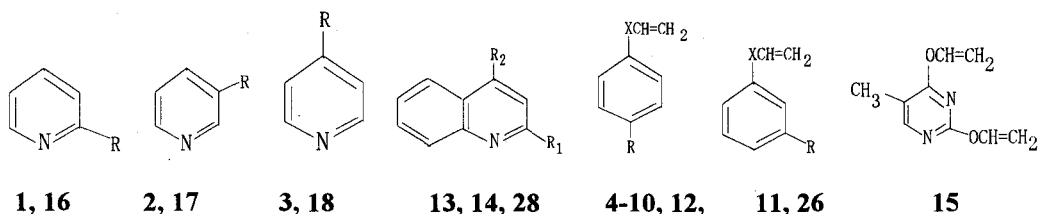
Faculty of Pharmaceutical Sciences ¹, Genome Information Center ², Faculty of Medicine ³,
Osaka University.

Andrei V. Afonin¹, ○Alexander V. Vashchenko¹, Tatsuya Takagi²,
and Hideaki Fujiwara³.

Abstract: The ^1H and ^{13}C NMR spectra have been reported on aryl (heteroaryl) ethers and aryl (heteroaryl) sulphides. It was defined that the hydrogen bond-like intramolecular specific interaction exists in 2-vinyloxy and 2-vinylthiopyridines. The ^1H and ^{13}C NMR data as well as quantum-chemical calculations indicate that interaction in 2-vinyloxypyridine is more intensive (~1.5 times) in comparison with 2-vinylthiopyridine due to greater electronegative effect of oxygen. The theoretical barrier of internal rotation around bond C₂-O(S) was calculated by *ab initio* method in D95 basis set. The energy of the hydrogen bond-like intramolecular specific interaction was estimated.

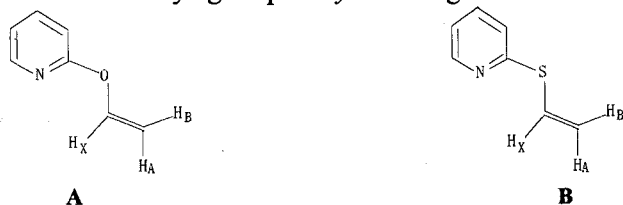
There were investigated the wide series of aryl and hetaryl vinyl ethers by ^1H , ^{13}C , ^{15}N , and ^{17}O spectroscopies and quantum-chemical calculations ¹). The hydrogen bond-like intramolecular specific interaction between α -hydrogen of vinyl group and endocyclic nitrogen was discovered in hetaryl vinyl ethers having the vinyloxy group neighbouring to the endocyclic nitrogen. A number of spectral effects arise owing to this interaction. The downfield shift of α -proton signal, the upfield shift of α -carbon signal, and the increase of their one-bond coupling constant ¹) are the most important of them. For a long time it was discussed whether or not C-H...X (X = O, N, and F) interaction can be classified as "hydrogen bond" ^{2,3}). If the intramolecular interaction C-H...N in 2-vinyloxy pyridine actually has the nature of hydrogen bond, the decreasing of C-H bond polarity by substitution of oxygen by sulphur having the less electronegative effect should leads to decreasing of the interaction intensity ^{4,5}). In this investigation the ^1H and ^{13}C NMR data of aryl (heteroaryl) vinyl ethers and aryl (heteroaryl) vinyl sulphides are analyzed in order to study the intramolecular interaction Y-C-H...N (Y = O or S) and to recognize the effect of Y heteroatom on its intensity.

The ^1H and ^{13}C NMR parameters of the vinyloxy group of ethers 1-15 and vinylthio group of sulphides 16-28 were investigated.



1,2,3 R=OCH=CH₂; 4 R=H, X=O; 5 R=Cl, X=O; 6 R=CH₃, X=O; 7 R=OCH=CH₂, X=O; 8 R=phthalimide, X=O; 9 R=Br, X=O; 10 R=p-N=N-Ph-p-N(CH₃)₂, X=O; 11 R=NHSO₂Ph, X=O; 12 R=NO₂, X=O; 13 R₁=OCH=CH₂, R₂=H; 14 R₁=R₂=OCH=CH₂; 16, 17, 18 R=SCH=CH₂; 19 R=H, X=S; 20 R=Cl, X=S; 21 R=p-CH₂-Ph-p-SCH=CH₂, X=S; 22 R=p-O-Ph-p-SCH=CH₂, X=S; 23 R=p-Ph-p-SCH=CH₂, X=S; 24 R=p-S-Ph-p-SCH=CH₂, X=S; 25 R=p-N=N-Ph-p-SCH=CH₂, X=S; 26, 27 R=NO₂, X=S; 28 R₁=SCH=CH₂, R=H.

The chemical shifts of vinyl group of β -protons (H_A and H_B) in ethers 2-12 vary within the range 4.33-4.69 and 4.67-5.00 ppm, respectively. The chemical shift of the vinyl group of α -proton (H_X) in ethers 2-12 changes in the narrow range from 6.49 to 6.69 ppm. Although, in 2-vinyloxypyridine 1 the H_X signal is drastically shifted by 0.9-1.1 ppm to the lower field. The H_A and H_B signals of this ether have no anomalous shifts. The anomalous down field shift of H_X proton in 1 is explained by the intramolecular specific interaction C-H...N between the H_X hydrogen and endocyclic nitrogen¹). The intramolecular specific interaction C-H...N in 1 occurs due to the *s-trans* conformation of vinyl group at *syn*-arrangement of nitrogen (Scheme A).



In isomeric 3- and 4-vinyloxypyridines 2 and 3 the vinyloxy group is far removed from nitrogen. It is impossible to induce the interaction in question. Hence, the H_X chemical shift in 2 and 3 takes "ordinary" values. In ethers 2-12, and 14b the δ H_A and δ H_B values are correlated with $\delta^{13}\text{C}_\beta$ value, which reflects the intensity of p- π conjugation of aromatic ring with vinyl group⁶):

$$\delta\text{H}_A = 0.073 \delta^{13}\text{C}_\beta - 2.56; \quad r=0.990, \quad n=12 \quad (1)$$

$$\delta\text{H}_B = 0.072 \delta^{13}\text{C}_\beta - 2.117; \quad r=0.973, \quad n=12 \quad (2)$$

Consequently, the δ H_A and δ H_B values also reflect the efficiency of p- π conjugation with vinyl group. The δ H_A and δ H_B values in ethers 1, 13, 14a, and 15a,b (the symbol "a" denotes the 2-vinyloxy group, and symbol "b" denotes 4-vinyloxy group) reveal the steady deviation from equations (1) and (2) towards larger magnitudes by 0.10-0.16 and 0.20-0.25 ppm, respectively. These deviation amount to 7 times the standard deviation level. Therefore, it can not be explained by random factors.

The one-bond ¹³C-¹H coupling constants with participation of β -carbon of the vinyl group (¹J_{C β H_A and ¹J_{C β H_B) vary in the narrow range from 161.2 to 162.8 Hz and from 157.4 to 159.3 Hz, respectively. There are no noticeable deviations of the}}

$^1J_{C\beta HA}$ and $^1J_{C\beta HB}$ values in **1**, **13**, **14a**, and **15a,b** from those in other ethers. The one-bond coupling constant $^1J_{C\alpha HX}$ in ethers **2-12**, and **14b** shows a good linear dependence upon $^{13}C_\beta$ chemical shift:

$$^1J_{C\alpha HX} = 0.684 \delta^{13}C_\beta + 117.745; \quad r=0.985, \quad n=12 \quad (3)$$

The points of **1**, **13**, **14a**, and **15a,b** fall outside regularity (3) towards larger values. The deviation value is 5.8-8.0 Hz and amounts to 30-40 times the parameter s of equation (3). It rules out the possibility of random occurrence of observed deviations. The $^1J_{C\alpha HX}$ deviation magnitude for **1**, **13**, **14a**, and **15a,b** may be interpreted as the additional positive contribution to the $^1J_{C\alpha HX}$ coupling constant arising from the intramolecular specific interaction C-H...N.

The chemical shifts of $^{13}C_\alpha$ and $^{13}C_\beta$ carbons in ethers **2-12**, and **14b** are also interrelated.

$$\delta^{13}C_\alpha = -0.667 \delta^{13}C_\beta + 211.879; \quad r=0.988, \quad n=12 \quad (4)$$

The relationship (4) reflects charge redistribution in these compounds. The C_α and C_β atoms under the electronic effect either of the aryl- or the hetaryl moiety, i.e. the diminution of the charge on C_β atom incites the increasing of the charge on C_α atom and vice versa. The points of **1**, **13**, **14a**, and **15a,b** again fall outside the line dependence (4). The deviation magnitude is 3.5-5.0 ppm and amounts to 15-20 times the standard deviation of equation (4). It proves the regular character of these deviations. The correlation between $^{13}C_\alpha$ and $^{13}C_\beta$ chemical shifts has been observed in any aryl vinyl ethers, sulphides and selenides⁷⁾.

The same regularities are observed in 1H and ^{13}C NMR parameters of vinyl groups for the similar series of vinyl sulphides **16-28**. The coefficients in equations (1-4) and (5-8) have the same sign and close in absolute magnitudes.

$$\delta H_A = 0.058 \delta^{13}C_\beta - 1.424; \quad r=0.984, \quad n=11 \quad (5)$$

$$\delta H_B = 0.050 \delta^{13}C_\beta - 0.472; \quad r=0.984, \quad n=11 \quad (6)$$

$$^1J_{C\alpha HX} = 0.434 \delta^{13}C_\beta + 123.59; \quad r=0.979, \quad n=11 \quad (7)$$

$$\delta^{13}C_\alpha = -0.704 \delta^{13}C_\beta + 213.299; \quad r=0.986, \quad n=11 \quad (8)$$

It is possible to compare the effects of intramolecular specific interaction O-C-H...N in ethers **1**, **13** and S-C-H...N in isostructural sulphides **16**, **28** upon the δH_X , $\delta^{13}C_\alpha$, and $^1J_{C\alpha HX}$ parameters. The average δH_X value in ethers **2-12** is 6.60 ppm. In 2-vinylpyridine **1** the H_X signal is shifted to lower field by 0.95 ppm from the indicated average value. The average δH_X value in sulphides **17-27** is 6.53 ppm. In 2-vinylthiopyridine **16** the H_X signal reveals downfield shift by 0.58 ppm. The ratio of δH_X downfield shift in ether **1** to that in sulphide **16** amounts to 1.63 due to intramolecular specific interaction. The ratio of the $\delta^{13}C_\alpha$ average deviation in ethers **1** and **13** to that in isostructural sulphides **16** and **28** amounts to 1.39 and the ratio of the $^1J_{C\alpha HX}$ average deviation in the same compounds is 1.53. Thus, the effect of intramolecular specific interaction upon the δH_X , $\delta^{13}C_\alpha$, and $^1J_{C\alpha HX}$ parameters in ethers is approximately as much as 1.5 times larger than the such effect in sulphides. The effect

on the spectral parameters is directly proportional to intramolecular specific interaction intensity⁸). Thus the replacement of sulphur by oxygen in Y-C-H...N moiety strengthens the intramolecular specific interaction approximately to 1.5 times, due to the higher electron-withdrawing property of oxygen.

The specific interaction (Y-H...X) energy E can be expressed by the following equation⁹)

$$E = K \frac{\mu_{Y-H} \Delta I}{R} \quad (9)$$

where μ_{Y-X} is the dipole moment of the Y-X bond, ΔI is the difference between ionization potential of X lone-pair and that of the noble gas atom in the row of X heteroatom, R is equilibrium distance between H and X, K is coefficient.

Equation (9) is used for the qualitative estimation of the intramolecular specific interaction energy O-C-H...N and S-C-H...N in compounds 1 and 16. Parameter Δq in equation (10) was selected as a probe showing the electron-accepting property rather than the dipole moment of C-H bond.

$$\Delta q = 2 (1 - P_{S_C S_H}^2) \quad (10)$$

where $P_{S_C S_H}^2$ is the total bond order of the C-H bond. The Δq , ΔI , and R values calculated by MNDO method¹⁰) for equilibrium structure. The ratio of $(\Delta q \Delta I/R)_O$ expression for ether 1 to $(\Delta q \Delta I/R)_S$ expression for sulphide 16 leads to quantitative estimation of intramolecular interaction energies O-C-H...N and S-C-H...N. It amounts to 1.42 that is in an excellent agreement with the experimental observation. The *ab initio*¹¹) estimation of the intramolecular interaction energies gives 7.4 kcal/mol in 2-vinyloxy pyridine 1 and 2.5 kcal/mol in 2-vinylthiopyridine 16.

References

1. Afonin A.V., Vashchenko A.V., and Fujiwara H., *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **69**, 933 (1996).
2. R.Taylor and O.Kennard, *J.Amer.Chem.Soc.*, **104**, 5063 (1982).
3. T.Steiner, *J.Chem.Soc., Perkin Trans. 2*, **1995**, 1315.
4. F.M.Slasinski, J.M.Tustin, F.J.Sweeney, A.M.Armstrong, Q.A.Ahmed, and J.P.Lorand, *J.Org.Chem.*, **41**, 2693 (1976).
5. R.D.Green, "Hydrogen bonding by C-H groups", Macmillan, London (1974).
6. M.V.Sigalov, B.A.Trofimov, A.I.Mikhaleva, and G.A.Kalabin, *Tetrahedron*, **37**, 3051 (1981).
7. V.M.Bzhezovskii, B.L.Finkelshtein, D.F.Kushnarev, G.A.Kalabin, and B.A.Trofimov, *Zh. Org. Khim.*, **26**, 19 (1990).
8. T.Schaefer, *J.Phys.Chem.*, **79**, 1888 (1975).
9. L.C.Allen, *J.Amer.Chem.Soc.*, **97**, 6921 (1975).
10. M.J.S.Dewar, E.G.Zoebisch, and E.P.Healy, *J.Am.Chem.Soc.*, **107**, 3902 (1985).
11. M.J.Frisch, G.W.Trucks, M.Head-Gordon, P.M.W.Gill, M.W.Wong, J.B.Foresman, B.G.Johnson, H.B.Schlegel, M.A.Robb, E.S.Replogle, R.Gomperts, J.L.Andres, K.Raghavachari, J.Baker, J.J.P. Stewart, and J.A.Pople, Gaussian 92, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1992.

Key words: NMR, quantum-chemical calculation, intramolecular interaction, lone pair.

エイホニン アンドレイ, ヴァシエンコ アレクサンダー, たかぎ たつや, ふじわら ひであき。

Relativistic Contribution to Nuclear Chemical Shielding.
 Field-Dependent Chemical Shielding is Negligibly Small
 (Tsukuba Research Laboratory, Mitsubishi Paper Mills, LTD.)
 Kazunaka Endo and Kyonosuke Yamamoto

We dealt with the field-dependent chemical shift of square of the magnetic field due to spin-orbit(SO) effects as a part of relativistic corrections by the fifth-order perturbation expression. The new type of the field-dependent shielding constant, $\tau_2 H_0^2$, and the other term, $\tau_1 H_0^2$ (which was proposed by Ramsey), were presented in the MO expansion. The results show that the field-dependent chemical shift at 23.5 T (^1H NMR frequency 1.000 GHz) is negligibly small even in the diamagnetic molecules where the excitation energy is smaller, the isotropic hyperfine coupling constant is larger and the spin-orbit coupling parameter is larger.

We were very interested in relativistic effects¹⁾ on NMR heavy atom chemical shieldings for molecules. Especially in SiX_4 molecule, ^{29}Si high-field shift(500 ppm) of SiI_4 was explained by the spin-orbit(SO) effect on the shifts of the molecules containing heavier halogen atoms.²⁾ The SO shift as derived by the third-order perturbation theory comes from the cross term involving the external-field-orbit interaction, the halogen spin-orbit coupling and Fermi I·S interaction.

Since Ramsey³⁾ proposed a small field dependence of the magnetic shielding in higher resolution NMR experiments in strong magnetic fields, there exists still no study about it. He pointed out that the nuclear magnetic shielding of diamagnetic substances becomes a nonlinear relationship between the resonance frequency and the external field: the total shielding(σ^T) is given by a Taylor expansion of the magnetic field: $\sigma^T = \sigma + \tau H_0^2 + \dots$, (1)

where ($\tau = \tau_1 + \tau_2$ in this study) is a molecular coefficient. The shielding(τ_1) was derived by Ramsey³⁾ as the dependency of square of the magnetic field with the fourth-order perturbation theory. The shift was evaluated from the cross term involving the external-field-orbit interaction and the vector potential(which generates the field of magnetic (dipole) moment)-orbit interaction, but the term in

磁場依存性核シフト、スピノ軌道効果、 Pb_2 、 SiI_4 、

えんどうかづなか、やまもときょうのすけ

the MO expression was not derived.

The present study dealt with the field-dependent chemical shift of square of the magnetic field due to SO effects as a part of relativistic corrections by the fifth-order perturbation expression.⁴ We also present the new type of the field-dependent shielding constant, $\mathcal{T}_2 H_0^2$, and the other term, $\mathcal{T}_1 H_0^2$, in the MO expansion. We, here, omitted the derivation of τ_1 without the SO effect from the fourth-order perturbation theory. We assume that the exact wavefunctions in eq. 2 are approximately built from Hartree-Fock MO's. The wavefunctions⁵⁾ for the ground and lowest excited states are written as a single determinant of the form, as mentioned previously.²⁾ The MO is expanded as a linear combination of the atomic orbitals. The field-dependent shielding, $\mathcal{T}_2(1)H_0^2$, due to the SO effect gives as

$$\tau_2(1)H_0^2 = H_0^2 \sum_I^{Occ} \sum_{jj'}^{Unocc} [\partial^2 / (\partial \mu_k \partial (H_k^2))] \langle \Phi_0 | h_1 | \Phi_{i-j} \rangle \langle \Phi_{i-j} | h_1 | \Phi_{i-j'} \rangle \langle \Phi_{i-j'} | h_1 | \Phi_{i-j} \rangle \times \langle \Phi_{i-j} | h_2 | \Phi_{i-j} \rangle \langle \Phi_{i-j} | h_3 | \Phi_0 \rangle \{ (E_{ji} - E_0) (E_{j'i} - E_0) (E_{j'i} - E_0) (E_{j'i} - E_0) \}^{-1}]_{\mu=H=0}, \quad (2)$$

$$\text{where } h_1 = (e/2mc) \sum_{k=1}^n H \cdot L_k, \quad h_2 = \sum_{k=1}^n \lambda L_k \cdot S_k \quad \text{and} \quad h_3 = (16/3) \beta \pi \sum_{k=1}^n (S_k \cdot \mu_A) \delta(r_k).$$

The $\mathcal{T}_2(1)H_0^2$ term corresponds to one of 20 pairs of the matrix elements.

We applied to the field dependent shieldings of Pb_2 and SiI_4 with sum-over-states (SOS) based on the fourth- and fifth-order perturbation theory using a semiempirical wavefunction parameteric method (PM3).⁶⁾ Although there was an accurate calculation including configuration interaction (CI) for Pb_2 ,⁷⁾ we used the wavefunction of Pb_2 by the semiempirical MO method in this complicated perturbation calculation.⁸⁾ The geometries of molecules, Pb_2 and SiI_4 , were optimized using a PM3 program, and the geometry for SiI_4 done under the T_d symmetry. The optimized bond-lengths were approximated as $R_{Si-I} = 2.414$ A and $R_{Pb-Pb} = 2.970$ A ($R_{Si-I} = 2.437$ A for the experimental value). In the calculation of the shieldings, we modified a PM3 program to output the singlet and triplet excitation energies from all occupied MOs to all unoccupied MOs, and considered only the one-electron term of all matrix elements. This is enough for calculating the isotropic terms for the \mathcal{T}_2 term. Table I showed quantities (the spin-orbit coupling constant, hyperfine coupling constant and $\langle 1/r^3 \rangle_{np}$) which were required for the two terms.

Our field-dependent expression, $\tau_2 H_0^2$, are explicitly given as

$$\begin{aligned} \tau_2 H_0^2 = & (16/3) \pi \alpha^4 \lambda_{A(\text{or } X)} H_0^2 |s(0)|^2 \left\{ 2 \sum_i^{\text{Occ}} \sum_{jj'j''}^{\text{Unocc}} [C_i^A \times C_j^A]_z \right. \\ & \times [C_j^A \times C_{j'}^A]_z [C_{j'}^A \times C_{j''}^A]_z [C_{j''}^A \times C_{s_i}^A] \{ ({}^1E_{ji} - E_0) ({}^1E_{j'i} - E_0) ({}^1E_{j''i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) \}^{-1} \\ & + \{ ({}^1E_{ji} - E_0) ({}^1E_{j'i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) \}^{-1} + \{ ({}^1E_{ji} - E_0) ({}^3E_{j'i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) \}^{-1} \\ & + \{ ({}^3E_{ji} - E_0) ({}^3E_{j'i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) \}^{-1} + 2 \sum_i^{\text{Occ}} \sum_{jj'j''}^{\text{Unocc}} [C_i^A \times C_j^A]_z [C_j^A \times C_{j'}^A]_z \\ & \times [C_{j'}^A \times C_{j''}^A]_z C_{s_i}^A C_{s_i}^A [C_{j''}^A \times C_i^A]_z \{ ({}^1E_{ji} - E_0) ({}^1E_{j'i} - E_0) ({}^1E_{j''i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) \}^{-1} \\ & + \{ ({}^1E_{ji} - E_0) ({}^1E_{j'i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) \}^{-1} + \{ ({}^1E_{ji} - E_0) ({}^3E_{j'i} - E_0) \\ & \times ({}^3E_{j''i} - E_0) ({}^1E_{j''i} - E_0) \}^{-1} + \{ ({}^3E_{ji} - E_0) ({}^3E_{j'i} - E_0) ({}^3E_{j''i} - E_0) ({}^1E_{j''i} - E_0) \}^{-1} \\ & + 2 \sum_i^{\text{Occ}} \sum_{jj'j''}^{\text{Unocc}} [C_i^A \times C_j^A]_z [C_j^A \times C_{j'}^A]_z C_{s_i}^A C_{s_i}^A [C_{j''}^A \times C_{j'}^A]_z [C_{j'}^A \times C_i^A]_z \{ ({}^3E_{ji} - E_0) ({}^3E_{j'i} - E_0) \\ & \times ({}^1E_{j''i} - E_0) ({}^1E_{j''i} - E_0) \}^{-1} + \{ ({}^1E_{ji} - E_0) ({}^3E_{j'i} - E_0) ({}^1E_{j''i} - E_0) ({}^1E_{j''i} - E_0) \}^{-1} \left. \right\}, \quad (3) \end{aligned}$$

where the components of the vectors C_i^A , C_i^A are the coefficients of the corresponding p_x , p_y and p_z AOs of the i -th MO in A and X atoms including the A atom, respectively. $C_{s_i}^A$ is the coefficient of the s AO of the i -th MO in atom A, and $|s(0)|^2$ is the electron orbital probability density of the atom A at the $r_{Ai} = 0$.

The results in Table II show that the field-dependent chemical shift at 23.5 T (^1H NMR frequency 1.000 GHz) is negligibly small even in the diamagnetic molecules where the excitation energy is smaller, the isotropic hyperfine coupling constant is larger and the spin-orbit coupling parameter is larger. Thus, we can neglect the field-dependence of the magnetic shielding of all the diamagnetic molecules in high resolution NMR experiments, even if one may observe the field-dependent Pb NMR shielding constant of gas Pb_2 relative to the H shielding constant of H_2 at $H_0 = 23.5$ and 1.0 T.

Table I. Quantities which are required for the evaluation of the field-dependent chemical shieldings (a.u.).

	Spin-orbit coupling constant ^{a)} $\lambda_{A(\text{or } X)}$	$ s(0) ^2$ ^{b)}	$\langle 1/r^3 \rangle_{np}$ ^{c)}
Pb	0.0354	13.8	16.0
Si		2.06	2.31
I	0.0232		

^{a)}The spin-orbit coupling constant was evaluated from Moore's Table.⁹⁾

^{b)}The value was calculated from the corrected hyperfine splitting constant given by Knight.¹⁰⁾

^{c)}The value was obtained from the SCF functions by Clementi *et al.*¹¹⁾

Table II. Field-Dependent Chemical Shieldings at $H_0 = 23.5$ (T).

	$\tau_1 H_0^2$ (without SO effect)	$\tau_2 H_0^2$ (with SO effect)
Pb_2	3.66×10^{-9} (0.86 mG) ^{a)}	2.58×10^{-9} (0.61 mG) ^{a)}
SiI_4	1.56×10^{-10} (0.037 mG) ^{a)}	2.53×10^{-11} (0.0059 mG) ^{a)}

^{a)}Values at $H_0 = 23.5$ T.

References

- 1) I. Morishima, K. Endo and T. Yonezawa: J. Chem. Phys. 59 (1973) 3356; M. I. Volodicheva and T. K. Rebane: Theor. Exp. Chem. (English Transl.) 14(1978) 447; A. A. Cheremisin and P. V. Schastnev: J. Magn. Reson. 40(1980) 459; K. Endo, K. Yamamoto, K. Deguchi and K. Matsushita: Bull. Chem. Soc. Jpn. 60(1987) 2803; P. Pyykko, A. Gorling and N. Rosch: Molec. Phys. 61(1987) 195.
- 2) K. Endo, K. Yamamoto and H. Okada, Bull. Chem. Soc. Jpn. 68(1995) 3341.
- 3) N. F. Ramsey: Phys. Rev. A1(1970) 1320.
- 4) E. U. Condon and G. H. Shortley: The Theory of Atomic Spectra (Cambridge U. P. Cambridge, 1935).
- 5) C. C. J. Roothaan: Rev. Mod. Phys. 23(1951) 69.
- 6) J. J. P. Stewart: J. Comp. Chem., 10(1989) 289.
- 7) K. Balasubramanian and K. S. Pitzer: J. Chem. Soc. 321 (1983) 78.
- 8) The electronic mechanism of nuclear shieldings for IVb group complex is p-excitation of s^2p^2 electronic configuration.¹² This means the NMR chemical shielding of the complex is explained dominantly by electronic states in valence-electron region. The present calculation, thus, gives considerably exact result by a semiempirical MO program for all valence electrons.
- 9) C. E. Moore: "Atomic Energy Levels" National Bureau of Standard: Washington, 1971; Vol. 3.
- 10) W. D. Knight: Solid State Phys. 2(1956) 120; C. J. Jameson and H. S. Gutowsky: J. Chem. Phys. 40(1970) 1714.
- 11) E. Clementi, D. L. Raimondi and W. P. Reinhardt: J. Chem. Phys. 47(1987) 1300.
- 12) H. Nakatsuji and T. Nakao: Int. J. Quantum Chem. 48, (1993) 279.

(*J. Phys. Soc. Jpn.* 64(1995) 4053 掲載)

Relativistic Effects on Nuclear Magnetic Shieldings.

Kitami Institute of Technology

○H. Fukui and T. Baba

Abstract: The relativistic mass correction effects on the nuclear magnetic shielding tensors were calculated for the hydrogen halides; HF, HCl, HBr, and HI. The results showed that the relativistic mass correction contributions are less than the Fermi-contact contributions reported in our previous paper.

I. INTRODUCTION

There is now growing interest in relativistic effects on the nuclear magnetic resonance (NMR) parameters.¹⁻⁴ The rising of interest is partially due to the recent development of experimental techniques in NMR spectroscopy. Following the relativistic mass correction (RMC) effect theory on the nuclear magnetic shieldings which was shown in our previous paper of this series,⁵ we perform in this work a numerical estimation for the RMC effect on the nuclear magnetic shieldings. We present our numerical results for the RMC contributions to the nuclear magnetic shieldings in the hydrogen halides; HF, HCl, HBr, and HI.

II. THEORY

In this section we survey our relativistic theory of magnetic shieldings prior to calculation of the RMC contributions to the nuclear magnetic shieldings within the framework of coupled Hartree-Fock.

A. Relativistic magnetic shielding

Our previous paper⁵ showed that the relativistic nuclear magnetic shielding tensor element σ_{uv}^N ($u, v = x, y, z$) is calculated by the following equations:

$$\begin{aligned} \sigma_{uv}^N &= (\partial^2 E / \partial B_{0u} \partial \mu_{Nv})_{B_{0u}=0, \mu_{Nv}=0} \\ &= \langle 0 | H_{uv}^{(1,1)} | 0 \rangle + 2 \sum_n \frac{\langle 0 | H_u^{(1,0)} | n \rangle \langle n | H_v^{(0,1)} | 0 \rangle}{E_0 - E_n}, \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} H_{uv}^{(1,1)} &= \sum_i \left\{ (\mu_0 / 4\pi) (e^2 c^2 / 2) (E_p^0(i))^{-1} r_{iN}^{-3} [(\vec{r}_{i0} \cdot \vec{r}_{iN}) \delta_{uv} - r_{i0v} r_{iNu}] \right. \\ &\quad \left. - (\mu_0 / 4\pi) (e^2 \hbar^2 c^4 / 2) (E_p^0(i))^{-3} l_{i0u} r_{iN}^{-3} l_{iNv} \right\}. \end{aligned} \quad (2)$$

Keyword: Relativistic Effect, Chemical Shift, Coupled Hartree-Fock

○ふくい ひろゆき, ばば たけひさ

$$H_u^{(1,0)} = \sum_i (e\hbar c^2/2)(E_p^0(i))^{-1} l_{i0u}, \quad (3)$$

$$H_v^{(0,1)} = \sum_i (\mu_0/4\pi)(e\hbar c^2)(E_p^0(i))^{-1} r_{iN}^{-3} l_{iNv}, \quad (4)$$

$$E_p^{(0)}(i) = [m_e^2 c^4 + c^2 \vec{p}_i^2]^{1/2}, \quad (5)$$

$$\vec{r}_{i0} = \vec{r}_i - \vec{R}_0, \quad \vec{r}_{iN} = \vec{r}_i - \vec{R}_N, \quad (6)$$

$$\vec{l}_{j0} = -i\vec{r}_{j0} \times \vec{\nabla}_j, \quad \vec{l}_{jN} = -i\vec{r}_{jN} \times \vec{\nabla}_j, \quad i^2 = -1. \quad (7)$$

Here \vec{B}_0 is an external magnetic flux density; $\vec{\mu}_N (= \gamma_N \hbar \vec{I}_N)$ is the nuclear magnetic moment of the nucleus N ; \vec{R}_0 is the gauge origin; \vec{R}_N is the position of the point dipole $\vec{\mu}_N$; μ_0 is the permeability of the vacuum; c is velocity of light; $-e$ and m_e are the electric charge and the rest mass of electron, respectively. In Eq. (1) $|0\rangle$ and $|n\rangle$ are the ground and excited eigenstates of the unperturbed Hamiltonian $H^{(0)}$ defined below, respectively. E_0 and E_n are the eigenvalues for the eigenstates $|0\rangle$ and $|n\rangle$, respectively. The unperturbed Hamiltonian $H^{(0)}$ is given by

$$H^{(0)} = \sum_i \left[E_p^0(i) - m_e c^2 + \sum_a (-Z_a e^2 / 4\pi \epsilon_0 r_{ia}) \right] + \sum_{i < j} (e^2 / 4\pi \epsilon_0 r_{ij}). \quad (8)$$

Our previous paper⁵ proved that the gauge invariance of the shielding tensor σ^N is satisfied for the exact eigenstates of $H^{(0)}$. At the limit of infinite value of c , the relativistic shielding tensor is equal to the nonrelativistic one.

B. Coupled Hartree-Fock scheme

A convenient approach to the problem of taking relativistic effects into account is to use the coupled Hartree-Fock (CHF) approximation for the many-electron wave function. We approximate the perturbed ground state by a single Slater determinant Ψ under influence of the two kinds of perturbations, B_{0u} and μ_{Nv} . The ground state wave function Ψ can be written as a doubly-occupied Slater determinant $||1\bar{1} \cdots i\bar{i} \cdots n\bar{n}||$.

We construct n doubly-occupied orbitals $\{\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_n\} = \psi$ from m ($m > n$) basis functions $\{\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_m\} = \chi$. Using LCAO approximation we set up ψ from χ by

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^m C_{\mu i} \chi_{\mu}, \quad i = 1, 2, \dots, n. \quad (9)$$

Using the Fock matrix F and the overlap integral matrix S , the perturbed SCF one-electron eigenvalue equation can be written as

$$FC = SC\epsilon. \quad (10)$$

We adopt here the density matrix approach formulated by Dodds *et al.*⁶ The density matrix R is defined by

$$R_{\mu\nu} = \sum_{i=1}^n C_{\mu i} C_{\nu i}^*, \quad \mu, \nu = 1, 2, \dots, m. \quad (11)$$

We use in this work the fixed gauge origin scheme. So the used basis functions χ are all real and do not depend on the two perturbations, B_{0u} and μ_{Nv} . We can show that in this case σ_{uv}^N is given by

$$\sigma_{uv}^N = 2\text{tr}(H_{uv}^{(1,1)}R^{(0)} + H_v^{(0,1)}R_u^{(1,0)}), \quad (12)$$

where $H_{uv}^{(1,1)}$ and $H_v^{(0,1)}$ are the matrix representations for the one-electron perturbation Hamiltonian operators defined by Eqs. (2) and (4), respectively. $R_u^{(1,0)}$ are the first-order perturbation density matrix due to B_{0u} . $R_u^{(1,0)}$ is given by⁶

$$R_u^{(1,0)} = \sum_i^{\text{occ}} \sum_a^{\text{unocc}} \frac{C_i^{(0)\dagger} F_u^{(1,0)} C_a^{(0)}}{\varepsilon_i^{(0)} - \varepsilon_a^{(0)}} (C_i^{(0)} C_a^{(0)\dagger} - C_a^{(0)} C_i^{(0)\dagger}), \quad (13)$$

where $C_i^{(0)}$ and $C_a^{(0)}$ are real column vectors made from the linear combination coefficients of the unperturbed occupied and unoccupied orbitals, respectively. The matrix $F_u^{(1,0)}$ is given by

$$F_u^{(1,0)} = H_u^{(1,0)} + G_u^{(1,0)}, \quad (14)$$

$$G_{u,\mu\nu}^{(1,0)} = (\epsilon^2/4\pi\epsilon_0) \sum_{\lambda\sigma} R_{u,\sigma\lambda}^{(1,0)} [2\langle\mu\lambda|\nu\sigma\rangle - \langle\mu\lambda|\sigma\nu\rangle], \quad (15)$$

$$\langle\mu\lambda|\nu\sigma\rangle = \int \chi_\mu(1)\chi_\lambda(2)r_{12}^{-1}\chi_\nu(1)\chi_\sigma(2)d\tau_1 d\tau_2. \quad (16)$$

III. RESULTS AND DISCUSSION

The LCAO approximation adopted in this work uses a matrix representation for the relevant operators in a basis of suitably chosen one-electron functions χ . We construct the matrix representation in the coordinate space as usual. However, the operators including E_p^0 are too complicated to be calculated directly. So we replace an operator multiplication by the matrix multiplication in the space spanned by the orthonormal basis functions (Löwdin basis functions) $\tilde{\chi}$ which is made from $\chi^{7,8}$ by using the usual orthogonalization technique. At the use of a complete system of orthonormal basis functions the multiplication of matrices is exactly equal to their operator multiplication.

We calculated the relativistic and nonrelativistic nuclear magnetic shieldings in the hydrogen halides; HF, HCl, HBr, and HI. The result are shown in Table I. The RMC contribution is given by the difference between the relativistic and nonrelativistic shieldings. Evidently the calculated shielding constants of HBr and HI bear the large gauge origin dependence. We are now calculating the magnetic shieldings in HBr and HI with extended basis sets. However, it was shown that the RMC contributions are less than the Fermi-contact contributions reported in our previous paper.⁴

TABLE I. Relativistic and nonrelativistic magnetic shieldings (in ppm) in hydrogen halides.

Molecule	Basis set	Nucleus	Gauge Origin		Nonrela.	Rela.	Rela.–Nonrela.
HF	[10s17p10d/4s6p]	F	F	σ_{\perp}	379.8	379.9	0.1
				σ_{\parallel}	481.9	483.4	1.5
				σ_{av}	413.8	414.4	0.5
		F	H	σ_{\perp}	379.7	379.7	0.0
				σ_{\parallel}	481.9	483.4	1.5
				σ_{av}	413.8	414.3	0.5
HCl	[10s17p10d/4s6p]	Cl	Cl	σ_{\perp}	849.7	851.0	1.3
				σ_{\parallel}	1149.0	1158.7	9.7
				σ_{av}	949.5	953.6	4.1
		Cl	H	σ_{\perp}	856.9	858.1	1.2
				σ_{\parallel}	1149.0	1158.7	9.7
				σ_{av}	954.2	958.3	4.0
HBr	[10s8p4d/4s2p]	Br	Br	σ_{\perp}	2317.0	2326.0	9.0
				σ_{\parallel}	3126.6	3196.1	69.5
				σ_{av}	2586.9	2616.0	29.1
		Br	H	σ_{\perp}	2482.1	2491.6	9.5
				σ_{\parallel}	3126.6	3196.1	69.5
				σ_{av}	2696.9	2726.4	29.5
HI	[11s8p4d2f/4s2p]	I	I	σ_{\perp}	3787.2	3744.5	-42.7
				σ_{\parallel}	5506.9	5665.4	158.5
				σ_{av}	4360.5	4384.8	24.3
		I	H	σ_{\perp}	3968.9	3977.5	8.7
				σ_{\parallel}	5506.9	5665.4	158.5
				σ_{av}	4481.6	4540.2	58.6

References

1. G. A. Aucar and J. Oddershede, *Int. J. Quant. Chem.* **47**, 425 (1993).
2. M. Kaupp, V. G. Malkin, O. L. Malkina, and D. R. Salahub, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1851, 8492 (1995).
3. H. Nakatsuji, H. Takashima, and M. Hada, *Chem. Phys. Lett.* **233**, 95 (1995).
4. H. Fukui, T. Baba, and H. Inomata, *J. Chem. Phys.* **105**, 3175 (1996).
5. H. Fukui and T. Baba, *J. Chem. Phys.*, submitted to the editor.
6. J. L. Dodds, R. McWeeny, and A. J. Sadley, *Mol. Phys.* **34**, 1779 (1977).
7. B. A. Hess, *Phys. Rev. A* **32**, 756 (1983).
8. B. A. Hess, *Phys. Rev. A* **33**, 3742 (1986).

Dihedral Angular Dependence of Vicinal Proton-Proton Coupling Constants

Kitami Institute of Technology

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

Abstract: *Ab initio* SCF and electron correlation studies of the angular dependence of the vicinal proton-proton coupling constants $^3J_{\text{HH}}$ have been carried out for methyl alcohol and methyl amine molecules. The four contributions to $^3J_{\text{HH}}$ (J^{FC} , J^{SD} , J^{OP} , and J^{OD}) have been computed with the $[5s3p1d/3s1p]$ and $[7s4p2d/5s2p]$ basis sets. The major contribution was due to the FC term. Since the SCF calculation of the FC term gave too large magnitude of coupling constants, the electron correlation corrections to the FC term have been introduced through third order by using the Møller-Plesset perturbation theory. It has been found that the third-order correction is very small compared with the second-order one.

I. 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 ^1H 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 for $^3J_{\text{HH}}$ vs. ϕ have been published. However, most theoretical studies of $^3J_{\text{HH}}$ have used the semi-empirical methods of calculation and included the Fermi contact (FC) contribution alone. On the contrary, *ab initio* calculations of $^3J_{\text{HH}}$ are very scarce and we can enumerate few papers²⁻⁴ which calculated the angular dependence of $^3J_{\text{HH}}$ in ethane and ethane derivatives. We present in this work *ab initio* SCF and electron correlation studies of the angular dependence of $^3J_{\text{HH}}$ in methyl alcohol and methyl amine molecules. It is well known that the FC contribution needs well electron correlated calculations. So we introduce the electron

Keyword: Coupling Constant, SCF, Correlation Effect

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

correlation effects on the FC contribution to the ${}^3J_{\text{HH}}$ as the perturbation through third order.

II. METHOD

The intramolecular interactions that are responsible for the splitting of the nuclear spin sublevels were shown by Ramsey⁵ to be of four kinds: the Fermi contact (FC), the spin-dipole (SD), the orbital paramagnetic (OP), and the orbital diamagnetic (OD) interactions. 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.

There are two distinct approaches to the SCF perturbation theory. One of them involves a direct self-consistent calculation of the perturbed Fock-Dirac density matrix.⁶ The other one, coupled Hartree-Fock (CHF) method, directly refers to the orbital picture.⁷ The density matrix approach has computational advantages because it offers the perturbed SCF energy without the intermediate calculation of perturbed orbitals. In our SCF calculation of ${}^3J_{\text{HH}}$ we used the density matrix approach which was first formulated by Dodds *et al.*⁸ for spin independent perturbations and extended by us⁴ to the case of spin dependent perturbations.

III RESULTS AND DISCUSSION

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

$${}^3J_{\text{HH}}(\phi) = C_0 + C_1 \cos \phi + C_2 \cos 2\phi + C_3 \cos 3\phi + S_1 \sin \phi + S_2 \sin 2\phi. \quad (1)$$

We first calculated the four contributions to the ${}^3J_{\text{HH}}$ at 30° increments of the angle ϕ at the SCF level of approximation using the [5s3p1d/3s1p] and [7s4p2d/5s2p] 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 $\phi \approx 0$ and $\sim 180^\circ$ and minima at $\phi \approx 90$ and $\sim 270^\circ$. The [5s3p1d/3s1p] basis set gave slightly lower values of ${}^3J_{\text{HH}}$ than the [7s4p2d/5s2p] basis at all of the angles ϕ , but the maximum difference was about 0.5 Hz. The individual contributions to the ${}^3J_{\text{HH}}$ were fitted to the truncated Fourier series of Eq. (1) by a least-squares method. The Fourier coefficients for the SCF calculations of the total and individual contributions obtained with the [7s4p2d/5s2p] basis are shown in Table 1 and 2 for methyl alcohol and methyl amine, respectively. It was shown that the major contribution is due to the FC term.

It is well known that the SCF approximation for the FC term gives too large magnitude of coupling constants. So we have corrected the SCF value of the FC contribution to the ${}^3J_{\text{HH}}$ with respect to the electron correlation. We have used the finite perturbation (FP) method including two FC interactions as perturbations on the coupled nuclei.

The second- and third-order correlation corrections to the FC term were calculated by the numerical derivative of the Møller–Plesset (MP) perturbation energies obtained with unrestricted Hartree–Fock (UHF) spin orbitals. We first compared the second-order correlation corrections obtained with the two basis sets, $[5s3p1d/3s1p]$ and $[7s4p2d/5s2p]$. Both basis sets showed the same trend of the angular dependence, but the $[7s4p2d/5s2p]$ basis gave a larger value of the second-order correlation by *ca.* 0.5 Hz than the $[5s3p1d/3s1p]$ basis. The third-order correction was very small. The second- and third-order correlation corrections to the FC term obtained with the $[7s4p2d/5s2p]$ basis are shown in Tables 1 and 2. The correlation corrections to the non-contact contributions were not estimated. The calculated Fourier coefficients of the total ${}^3J_{\text{HH}}$ are compared with experimentally determined ones in Tables 1 and 2. Tables 1 and 2 show that the calculated Fourier coefficients are considerably small compared with the experimental ones. This may be due to incompleteness of the basis sets used. It seems that addition of several tight *s*-type functions is necessary to get more improved results.

References

1. M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **30**, 11 (1959).
2. J. San-Fabián, J. Guilleme, E. Díez, P. Lazzeretti, M. Malagoli, and R. Zanasi, *Chem. Phys. Lett.* **206**, 253 (1993).
3. J. San-Fabián, J. Guilleme, E. Díez, P. Lazzeretti, M. Malagoli, R. Zanasi, A. L. Esteban, and F. Mora, *Mol. Phys.* **82**, 913 (1994).
4. H. Fukui, H. Inomata, T. Baba, K. Miura, and H. Matsuda, *J. Chem. Phys.* **103**, 6597 (1995).
5. N. F. Ramsey, *Phys. Rev.* **91**, 303 (1953).
6. R. McWeeny, *Phys. Rev.* **126**, 1028 (1961).
7. R. M. Stevens, R. M. Pitzer, and W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.* **38**, 550 (1963).
8. J. L. Dodds, R. McWeeny, and A. J. Sadlej, *Mol. Phys.* **34**, 1779 (1977).
9. G. Govil, *Indian J. Chem.* **9**, 824 (1971).

TABLE 1. Calculated Fourier coefficients (Hz) for the total and four individual contributions to ${}^3J_{\text{HH}}$ in ethyl alcohol.

Basis set Fourier Ccoefficients	[7s4p2d/5s2p]			
	C_0	C_1	C_2	C_3
SCF values				
FC	6.77	-2.93	7.27	0.05
SD	0.11	0.19	0.19	0.02
OP	2.27	-2.38	-0.03	-0.01
OD	-2.44	2.46	0.15	0.01
total	6.70	-2.65	7.57	0.07
2nd order correlation				
FC	-2.52	1.31	-1.95	-0.15
3rd order correlation ^a				
FC	0.05	-0.21	-0.01	0.02
Total contribution				
calculation	4.06	-1.06	6.01	-0.21
exptimental value ^b	5.40	-1.50	5.20	

^a [5s3p1d/3s1p] basis used. ^b Taken from Ref. 9.

TABLE 2. Calculated Fourier coefficients (Hz) for the total and four individual contributions to ${}^3J_{\text{HH}}$ in ethyl amine.

Basis set Fourier Ccoefficients	[7s4p2d/5s2p]					
	C_0	C_1	C_2	C_3	S_1	S_2
SCF values						
FC	8.63	-2.49	8.12	0.03	-0.09	-0.38
SD	0.09	0.18	0.14	0.01	0.02	-0.03
OP	1.93	-1.81	-0.03	-0.01	0.01	-0.03
OD	-2.10	1.91	0.11	0.01	-0.03	0.00
total	8.55	-2.20	8.33	0.05	-0.10	-0.43
2nd order correlation						
FC	-3.69	1.22	-2.06	-0.15	0.15	0.14
3rd order correlation ^a						
FC	0.04	-0.15	-0.05	0.01	-0.02	0.01
Total contribution						
calculation	4.88	-1.01	6.26	-0.06	0.03	-0.28
exptimental value ^b	5.35	-1.80	4.45			

^a [5s3p1d/3s1p] basis used. ^b Taken from Ref. 9.

^{13}C , ^{15}N 選択標識オリゴペプチドの 合成とNMRによる固体構造の研究 (3)

(群馬大工) ○莊司 顯, 小川一輝

Synthesis of Model Oligopeptides Containing ^{13}C and ^{15}N Labeled
Amino-Acid Residues and Their Structural Study with Solid-State NMR (3)

(Dept. Biological Sciences, Fac. Engineering, Gunma University)

Akira SHOJI and Kazuteru OGAWA

Abstract: We have studied the correlation between the ^{15}N chemical shifts (isotropic chemical shifts (δ) and principal values of the chemical shift tensors (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})) of the ^{15}N -labeled L-alanine residue (Ala^{N}) and the neighboring amino-acid sequence with a series of well-defined α -helical octadecapeptides containing Ala^{N} , and ($1\text{-}^{13}\text{C}$)-labeled L-leucine (Leu^{C}), L-alanine (Ala^{C}) or L-phenylalanine residue (Phe^{C}) at two specific positions. It was found that the δ of the Ala^{N} in the α -helical peptides depend mainly on the nearest N-side neighboring amino-acid sequence. It was also found, on the other hand, that the σ_{22} may be affected by a long-range neighboring amino-acid sequence effect.

1. 緒言

最近、多核NMRの発展はめざましく、タンパク質や核酸など生体高分子の新しい固体構造解析手段として注目されるようになった。特に、 ^{15}N NMRは窒素核近傍の影響を敏感に捉えることや水素結合の直接的情報をも得られなどその情報の質的価値が高くユニークであるため、 ^{15}N 核は今最も注目されている核種の一つである。

したがって、固体高分解能 ^{15}N NMRの化学シフト-固体コンホメーション相関が明らかにできれば、固体 ^{15}N NMR法は今後の生化学の発展にますます重要な研究手段となるものと期待できる。

以上の観点から、我々は種々の精密なモデルポリペプチドを用いて固体高分解能(^{13}C ・ ^{15}N ・ ^1H) NMR化学シフトと固体構造との相関を明らかにしてきた¹⁻⁷⁾。

本研究では、着目したい部位に $1\text{-}^{13}\text{C}$ 選択標識アミノ酸残基 (Leu^{C} , Ala^{C} , Phe^{C}) (N末端より8残基目) と ^{15}N 選択標識L-アラニン残基 (Ala^{N}) (12残基目) を導入した、アミノ酸配列の明確な単分散オリゴペプチド (18量体: α -ヘリックス) を分子設計し合成し試料として用いた。

キーワード: α -ヘリックス・ポリペプチド・ ^{15}N 化学シフト・
 ^{15}N 化学シフトテンソル・アミノ酸配列効果

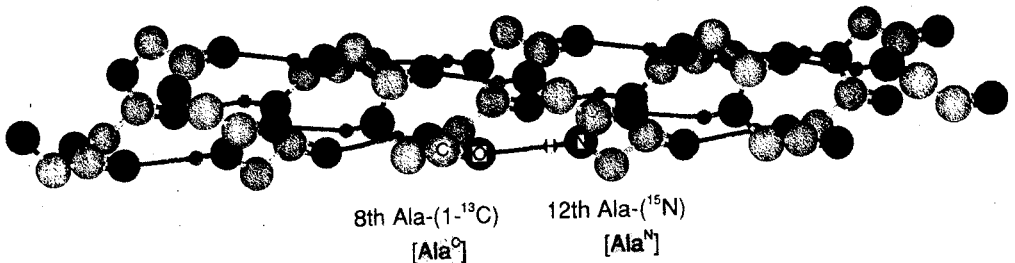
○しょうじ あきら・おがわ かずてる

その上で、 ^{15}N 等方性化学シフト (δ) および ^{15}N 化学シフトテンソル主値 (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) に及ぼす隣接アミノ酸残基 (配列) の影響を研究した。その結果, (1) δ 値は Ala^{N} のN端側隣接アミノ酸残基による影響を大きく受け, その他の隣接残基の効果は小さい, (2) 隣接アミノ酸残基の δ に及ぼす影響の大きさは, コンホメーションに依存する, (3) σ_{22} はより遠距離の隣接アミノ酸残基の影響を敏感に感知する, ことを明らかにした。従って, ^{15}N 化学シフト (δ , σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) から, ポリペプチドやタンパク質のコンホメーションとアミノ酸配列を同時に知る手がかりが得られた。

2. 実験

2-1. 試料の合成 本研究で用いた $1\text{-}^{13}\text{C}$, ^{15}N 選択標識単分散オリゴペプチド (18量体) 試料は, PerSeptive Biosystems社製全自動ペプチド固相合成装置 (9050 Plus PepSynthesizer) を用い, Fmoc(9-Fluorenylmethyl methoxy- carbonyl) 法により合成した。Fmoc-ONSu(9-Fluorenylmethyl N-Succinimidyl Carbonate), その他の試薬類は購入した。

合成したオリゴペプチドのアミノ酸配列をScheme 1に示す。



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
FLA1 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	-Ala	-Phe	- <u>Leu</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA2 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	-Ala	-Phe	- <u>Ala</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA3 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	-Ala	-Phe	- <u>Phe</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA4 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	-Ala	- <u>Leu</u>	- <u>Leu</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA5 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	-Ala	- <u>Ala</u>	- <u>Leu</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA6 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	- <u>Leu</u>	-Phe	- <u>Leu</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA7 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	- <u>Phe</u>	-Phe	- <u>Leu</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA8 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Ala^C</u>	-Ala	-Phe	- <u>Leu</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA9 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Phe^C</u>	-Ala	-Phe	- <u>Leu</u>	- Ala^N	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA10 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	-Ala	-Phe	- <u>Leu</u>	- Ala^N	- <u>Leu</u>	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala
FLA11 :	Phe	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala	-Phe	- <u>Leu^C</u>	-Ala	-Phe	- <u>Leu</u>	- Ala^N	- <u>Ala</u>	-Leu	-Ala	-Phe	-Leu	-Ala

Scheme 1. Amino-acid sequence of α -helical octadecapeptides containing Ala^{N} (12th) residue and Leu^{C} , Ala^{C} , or Phe^{C} (8th) residue .

2-2. 固体高分解能NMRおよび赤外スペクトルの測定

固体高分解能 ^{13}C および ^{15}N NMR測定はJEOL EX-270WB分光計を用いて67.80 MHzと27.25 MHzで測定した。 ^{13}C CP-MAS NMRの測定は、 90° パルス幅：4.5 μs 、接触時間：2ms、繰り返し時間：5s、MAS速度：5.5~6.0 kHzの条件下で行った。

^{13}C 化学シフトはTMSを基準(δ 0)とし、アダマンタン(δ 29.5)を二次基準とした。実験誤差は ± 0.3 ppmである。

^{15}N CP-MAS NMRの測定条件は、 90° パルス幅：6.3 μs 、接触時間：2ms、繰り返し時間：5s、MAS速度：3.5~4.5kHzとした。 ^{15}N Static NMRの測定条件は、それぞれ、6.3 μs 、2ms、5s、0 kHzとした。 ^{15}N 化学シフトは $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (δ 0)を基準とし、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (δ 18.0)を二次基準とした。 ^{15}N 化学シフトの実験誤差は δ 及び σ_{22} では ± 0.3 ppmである。 σ_{11} 及び σ_{33} の実験誤差は ± 2 ppmと大きいため、今回はこれらについては議論しない。

赤外(IR)スペクトルの測定は、JASCO A-702型分光計を用い、KBr錠剤法で4000~200 cm^{-1} で行った。

3. 結果及び考察

3.1 ^{13}C , ^{15}N 標識オリゴペプチド試料(FLA1~FLA11)の特性解析

本研究で用いた単分散 ^{13}C , ^{15}N 選択標識オリゴペプチドのカルボニルピーク (Ala^{C} , Leu^{C} , Phe^{C}) の ^{13}C 化学シフト値の解析結果、いずれも α -ヘリックス形(δ 177 \pm 0.2)のみが観測でき、 β -シート形(δ 171~172)のピークは全く検出できなかった。このことから、合成した試料の ^{13}C , ^{15}N 標識部はすべて α -ヘリックス形を形成していることが確認できた。

3.2 標識オリゴペプチドの ^{15}N 標識L-アラニン残基 (Ala^{N}) の ^{15}N 等方性化学シフト (δ)

選択標識オリゴペプチドの Ala^{N} の ^{15}N CP/MAS NMR (省略) の解析結果、すべての試料でシャープな単一ピークが確認できた。Figure 1に示すように、 Ala^{N} ピークの δ は、そのN端側隣接アミノ酸残基の影響を受け、Phe残基が隣接したFLA3ではLeu残基が隣接したFLA1より約1.3 ppm低磁場シフトし、Ala残基が隣接したFLA2ではFLA1より逆に約1.4 ppm高磁場シフトすることがはじめて明らかとなった。

一方、 Ala^{N} のN端側に2残基以上離れた隣接アミノ酸残基の影響および Ala^{N} のC端側に隣接した残基の影響は小さいことが明らかになった。

3.3 オリゴペプチドの Ala^{N} の ^{15}N 化学シフトテンソル主値(σ_{22})

選択標識オリゴペプチドの Ala^{N} のアミノ酸配列と σ_{22} との関係は図2に示すように、定性的には δ と似た傾向が見られるが、 δ より遠い残基の影響を受けて、 δ 値は高磁場シフトと低磁場シフトを交互に繰り返す傾向が見られ興味深い。この原因は今のところ明らかではないが、 σ_{22} 値はいずれもAla残基の α -ヘリックス形(54~59 ppm)の範囲内にあることは間違いない³⁾。

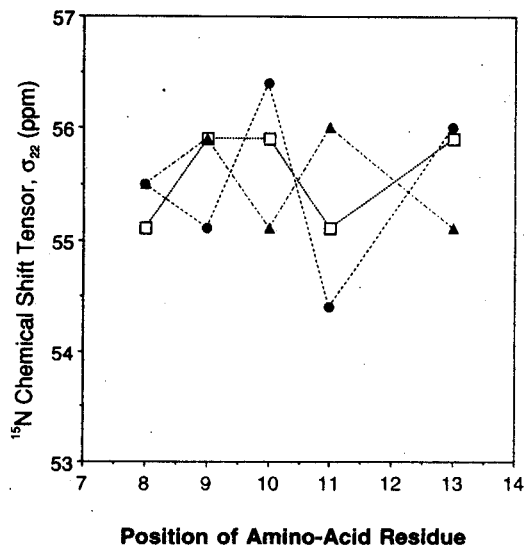
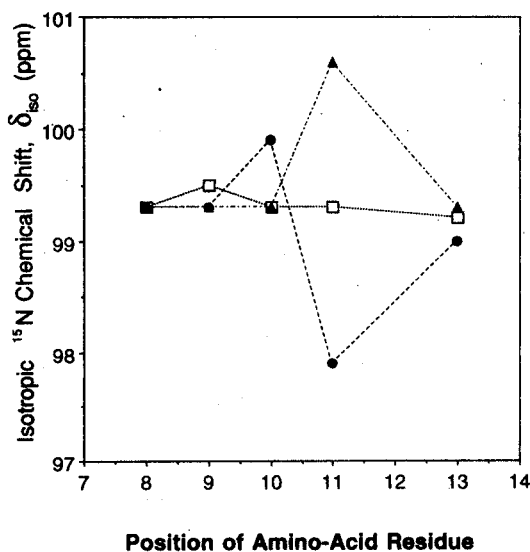


Figure 1. Plots of the δ_{iso} value of the Ala^{N} of solid oligopeptides against the position of the amino-acid residue (amino-acid sequence).

Figure 2. Plots of the σ_{22} value of the Ala^{N} of solid oligopeptides against the position of the amino-acid residue (amino-acid sequence).

従って、 ^{15}N 等方性化学シフトや化学シフトテンソル主値より隣接アミノ酸残基の配列効果のある程度見積ることが可能となった。つまり、これを応用することで固体ポリペプチドの特定部位のアミノ酸配列を決定できる可能性が示唆された。

4. 参考文献

- 1) A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi and I. Ando, *Macromolecules* 20, 2441 (1987).
- 2) A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, S. Ando and I. Ando, *Macromolecules* 22, 2860 (1989).
- 3) A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, S. Ando and I. Ando, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4693 (1990).
- 4) A. Shoji, S. Ando, S. Kuroki, I. Ando and G. A. Webb, in *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (Ed. G. A. Webb), Academic Press, London, 1993, Vol.26, 55-98.
- 5) 莊司顯「固体高分解能 NMR によるポリペプチドの構造研究」, 旭硝子財団研究報告, 61巻, 35-43頁, 1992年.
- 6) A. Shoji, H. Kimura, T. Ozaki, H. Sugisawa, and K. Deguchi, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7604 (1996).

3P10 イットリウム化合物の ^{89}Y -MAS、及び、static-NMR
(三菱化学横浜総研¹・化成オプトニクス²・東京水産大³) ○原園としえ¹・森
輝雄¹・安達隆二²・渡部徳子³

^{89}Y -MAS and -static NMR of Yttrium Compounds

(Mitsubishi Chemical Co.¹, Kasei Optonixs², Tokyo University of Fisheries³)

○Toshie Harazono¹, Teruo Mori¹, Ryuji Adachi², Tokuko Watanabe³

Solis State $^{89}\text{Y}(I=1/2)$ -MAS and -static NMR of Y_2O_3 , $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$, and $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$ has been studied. The analysis of spectra revealed that ① the isotropic chemical shifts (σ_{iso}) calculated from static spectra were well consistent with the chemical shifts of MAS signals; ② the chemical shift anisotropy is more influenced by the bond character than the crystallographic symmetry; ③ σ_{iso} was well explained by the coordination number and the elements around Y.

イットリウムは、これまで超伝導体や蛍光物質の母体等のセラミックスとして広く用いられてきた。これらの物質の結晶構造や物性を調べる上で、イットリウム-89をプローブとした固体NMRの研究は特に重要であると思われる。しかしながら、 ^{89}Y は天然存在比100%、核スピン、 $I=1/2$ 、であるにもかかわらず、共鳴周波数が4.9 MHz (^1H :100MHz)、 ^1H に対する相対感度が 1.18×10^4 と感度の低い低周波数核であることから、 ^{89}Y の固体NMRはこれまでほとんど研究されていない。今回、著者らは、主に蛍光体の母体として用いられている Y_2O_3 、 $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ 、及び、 $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$ の ^{89}Y -MAS、及び、-static NMRを測定し、ケミカルシフトとその異方性を結晶構造の観点から論じた。

試料及び測定方法：本研究で用いた試料は従来の方法で作成した。¹⁾ 不純物濃度はSeiko-SPS-1200A ICP と Rigaku 3370 蛍光X線で定量した。不純物は、すべて ppm 以下の濃度であった。結晶構造は Philips PW1700 X線回折装置で、解析、確認した。固体NMRの測定は Bruker 社製 MSL-300 固体NMR装置に static、及び、低周波数用 CP-MAS プローブを装着して行なった。測定条件は以下の通りである。共鳴周波数：14.706MHz、90°パルス：11 μ s(MAS)、15 μ s(static)、回転数：5000 rps、0 ppm: 1M $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液、デットタイム：150 μ s、くり返し時間：20-150000 s、パルス幅：5-11 μ s、パルス系列：シングルパルス。

^{89}Y -MAS NMR, ^{89}Y -static NMR, $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$, Y_2O_3 , $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$

○はらぞの としえ・もり てるお・あだち りゅうじ・わたなべ とくこ

結果: Y_2O_3 、 $Y_3Al_5O_{12}$ 、及び、 Y_2O_2S の結晶構造と配位状態の模式図を図1と図2に示した。また、 ^{89}Y NMRスペクトルを図3-図5に示した。 Y_2O_3 、 $Y_3Al_5O_{12}$ の static スペクトル、及び、 Y_2O_2S の MAS、及び、static スペクトルは、今回初めて測定された新規データである。表1には、Yの回りの対称性、MAS シグナルのケミカルシフト、及び、static スペクトルから求めた等方的ケミカルシフト (σ_{iso}) と $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ 、または、 $\sigma_{\parallel}-\sigma_{\perp}$ から求めたケミカルシフトの異方性を示した。

考察: static-NMR スペクトルの帰属 Y_2O_2S 、 $Y_3Al_5O_{12}$ のYの対称性は、いずれも軸対称であるので $\sigma_{11} = \sigma_{22} = \sigma_{\perp}$ 、 $\sigma_{33} = \sigma_{\parallel}$ とすると、 σ_{\perp} と σ_{\parallel} は図4と5に示したように帰属される。static シグナルのスペクトルから求めた等方的ケミカルシフト (σ_{iso}) は MAS シグナルのケミカルシフトとよく一致した。一方、 Y_2O_3 は 24d サイトと 8b サイトに2種類のYが存在し、それぞれ、 C_2 (三方異方) と S_6 (軸対称) の対称性を持っている。24 サイトと 8b サイトのY原子の数の比が3:1であることと、それぞれのYの対称性から、static スペクトルを図3に示したように帰属した。これより求めた σ_{iso} は MAS シグナルのケミカルシフトと実験誤差内でよい一致を示した。

ケミカルシフトの異方性 6、または8個のOが軸対称に配位している Y_2O_3 と $Y_3Al_5O_{12}$ のYの異方性は 1500-1700 Hz (100-120 ppm) であるが、4個のOと3個のSが軸対称に配位している Y_2O_2S のYの異方性は、2360 Hz (161 ppm) と大きい。このことから、異方性には、Y-OとY-S結合様式 (電子密度) の違いの方がより大きく影響していることがわかった。

等方的ケミカルシフト SiやAlのケミカルシフトは、共有結合性が増すか、配位数が増すかすると、高磁場にシフトすることが知られている。²⁾ 更に、O配位からS配位になると低磁場シフトする。³⁾ 軸対称性酸素 (O) 8配位の $Y_3Al_5O_{12}$ の $\sigma_{iso} = 239$ ppm であり、6配位の Y_2O_3 (8b) の $\sigma_{iso} = 289$ ppm である。酸素7配位軸対称化合物の σ_{iso} は両者の間にくると予測されるが、 Y_2O_2S の場合、3個分の酸素が硫黄 (S) に置換されているため低磁場シフトし、293 ppm に観測されたと説明される。これらのことより、Yのケミカルシフトの傾向は、これまでのSiやAlのケミカルシフトと同様であることがわかった。一方、結晶中のY-Oの結合距離の平均値は、 $r(Y_{24d}-O) = 2.283$ Å、 $r(Y_{8b}-O) = 2.289$ Å で、両者に違いが見られないにもかかわらず、斜方対称酸素6配位の Y_2O_3 (24d) が最も低磁場 (330 ppm) にシフトした。このことより、斜方対称酸素6配位の Y_2O_3 (24d) は、軸対称酸素6配位の Y_2O_3 (8b) と比べて有結合性が小さいといえる。

1) 蛍光体ハンドブック、蛍光体同学会編、オーム社、1987。

2) M.Mägi, E.Lippmann, A.Samoson, G.Engelhardt, and A.-R.Grimmer, *J.Phys.Chem.*, 88,1518(1984).

3) 原園、徳永、安達、渡部、第34回NMR討論会要旨集、p. 145。

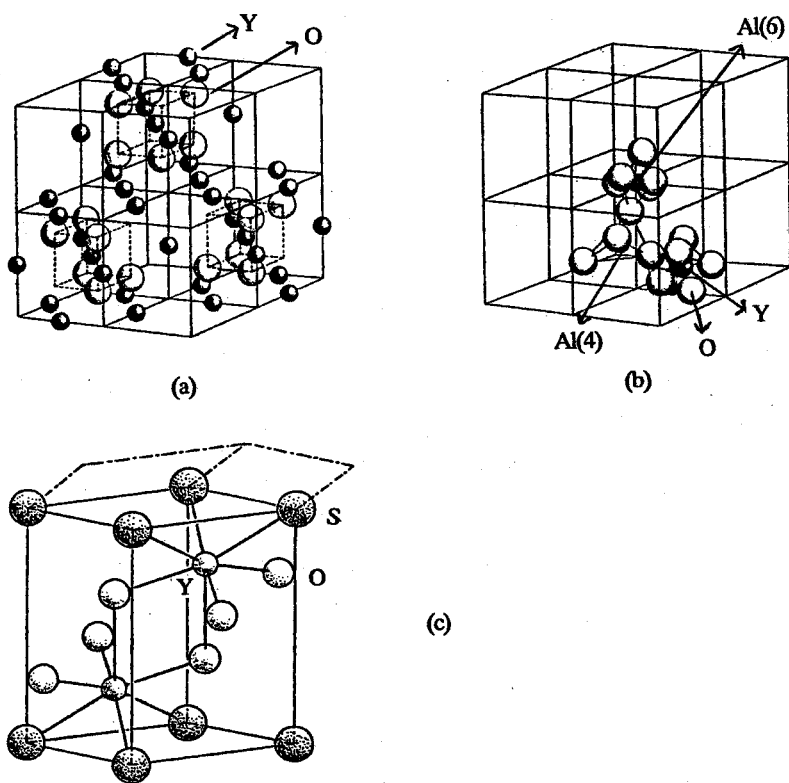


Fig.1 Crystal structure of Y_2O_3 (a), $Y_3Al_5O_{12}$ (b), and Y_2O_2S (c).

Table.1 Crystallographic characteristics, chemical shifts of ^{89}Y -MAS signals, σ_{iso} calculated from static signals, and chemical shift anisotropy for yttrium compounds.

compound	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Y_2O_3 (24d)	6(O6)	C_2 (r.s)	330	328	1710 (116)
Y_2O_3 (8b)	6(O6)	S_6 (a.s)	289	284	1500 (102)
$Y_3Al_5O_{12}$	8(O8)	C_{8v} (a.s)	239	237	1510 (103)
Y_2O_2S	7(O4, S3)	C_{3v} (a.s)	293	287	2360 (161)

(1) coordination number.

(2) crystallographic symmetry, (a.s): axial symmetry, (r.s): rhombohedral symmetry.

(3) chemical shift in ppm of ^{89}Y -MAS signal.

(4) isotropic chemical shift (σ_{iso}) in ppm calculated from ^{89}Y -static signal.

(5) chemical shift anisotropy in Hz, () in ppm.

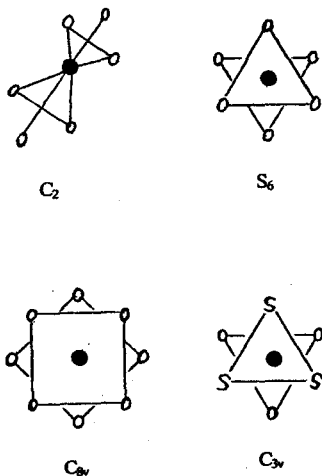


Fig. 2 Coordination schemes of Yttrium compounds.

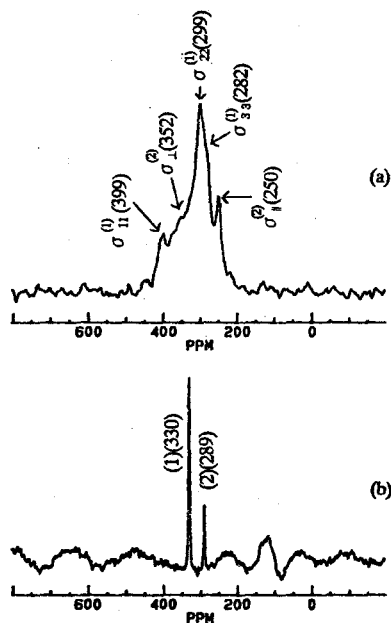


Fig. 3 Solid state NMR of Y_2O_3 . (a): static; (b): MAS.

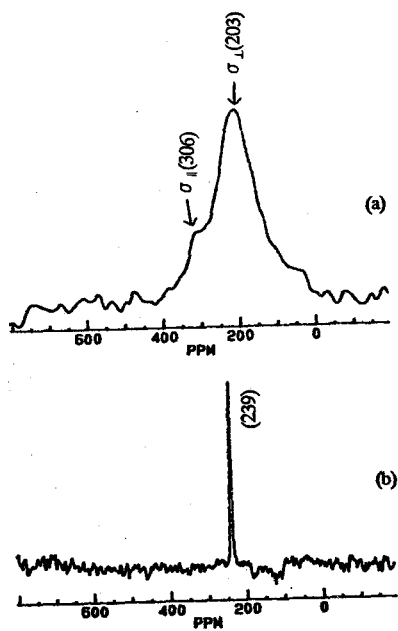


Fig. 4 Solid state NMR of $Y_3Al_5O_{12}$. (a): static; (b): MAS.

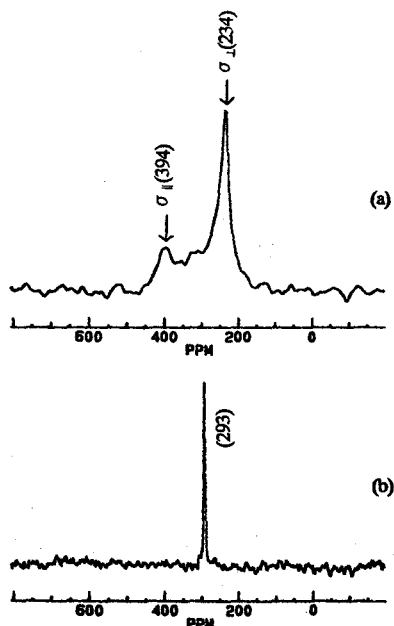


Fig. 5 Solid state NMR of Y_2O_2S . (a): static; (b): MAS.

3P11 固体 ^{113}Cd NMR 法によるペプチド-Cd 錯体の構造解析

神奈川大工 ○高山 俊夫, 大内田 調, 小池 芳雄

A Structural Study of Peptide-Cd Complexes in the Solid State by ^{113}Cd NMR

○Toshio Takayama, Shirabe Ohuuchida, and Yoshio Koike

(Department of Applied Chemistry, Kanagawa University, Yokohama 221)

The ^{113}Cd CP/MAS NMR experiments have successfully provided very useful information about structure of cadmium complexes in the solid state. In this work, we study structural analysis of various peptide-Cd complexes in the solid state by means of ^{113}Cd CP/MAS sideband intensities in NMR spectra. The distribution maps of ^{113}Cd NMR parameters for chemical shift anisotropy ($\Delta\delta$) versus isotropic chemical shift (δ_{iso}) and δ_{iso} versus asymmetry parameter (η) were presented.

1) 緒論

生体内における 金属蛋白質・酵素基質と金属イオンとの相互作用の基礎的な研究の一方法として、小分子ペプチドを基質モデル化合物とした金属イオンとの相互作用の解明という方法が行われている。金属イオンとして生体内で重要な役割を持つ亜鉛族金属、なかでも NMR 測定が可能であり Zn のプロトイオンとしての Cd に注目した。 ^{113}Cd -NMR 法は構造解析及金属-配位子間相互作用の直接的情報を得る方法として期待されるが、ペプチド-Cd 結合が溶液中では置換活性であり、特に溶液の pH 変化に敏感に対応した平衡化学種が多数存在することが分かっている。これらのことは溶液 NMR によるペプチド-Cd 結合の構造及相互作用の議論において障害でもあり、結合構造と NMR 化学シフトとの相関の詳細な解明が必務となっている。また、固体状態で得られる ^{113}Cd -NMR パラメータを得ることは、構造解析を行なうにあたって Cd 周りの分子配列を直接反映した情報を得ることになり非常に有用である。昨年の NMR 討論会では X 線法による構造と NMR パウダパタンの傾向を数種のペプチド-Cd 錯体に注目して Cd 周りの構造を議論したが、得られた結果をさらに確かなものにするため数多くのデータを集める必要性があった。そこで、本討論会では数多くの錯体の ^{113}Cd シフトテンソルの等方値 (δ_{iso})、主値 ($\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$)、異方性 ($\Delta\delta$) 及び非対称パラメータ (η) を決定し、その傾向と構造を議論する。

^{113}Cd NMR、パウダパタン、ペプチド-Cd 錯体、構造解析

たかやま としお、おうちだ しらべ、こいけ よしお

2) 実験

2-1 錯体合成: $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$:ジペプチド (1 : 2) を水に溶解し 1M NaOH 溶液で pH(6,9) を調整後、有機溶媒を用いた拡散法により結晶化させた。

2-2 ^{113}Cd 固体 NMR 測定: JEOL EX270 装置を用いて観測周波数 59.79MHz, 化学シフトは基準物質として CdCl_2 ($\delta = 0.0$) を用いた。

3) 結果と考察

^{113}Cd CP/MAS NMR スペクトルは ^{13}C , ^{15}N -NMR に比べて化学シフト異方性が大きく、Cd 周りの分子配列を反映した特徴的なスピニングサイドバンド(SSB)を与える。そこで、得られた SSB から化学シフトテンソルを求めるために Herzfeld¹⁾ による方法を採用した。

例として $\text{Cd}(\text{AlaAla})\text{Cl}$ の ^{113}Cd CP/MAS スペクトルを Figure 1 に示す。 δ_{iso} を 0 番目として高磁場側の SSB を順に -1, -2, -3, ..., 低磁場側の SSB を順に +1, +2, +3, ... とし、各 SSB のピーク強度の δ_{iso} ピーク強度との比 (I_N/I_0) ($N = \pm 1, 2, 3, \dots$) を求めた。全 SSB のピーク強度比を Herzfeld の Contour Plots を用いてプロットし、プロットの重なる点の μ, ρ を読み取り以下の式に従い算出した。算出は各錯体ともサンプル回転数約 6000Hz, と約 3000Hz の 2 つの場合について行い、プロットの重なりがより密であった方の値を採用した。

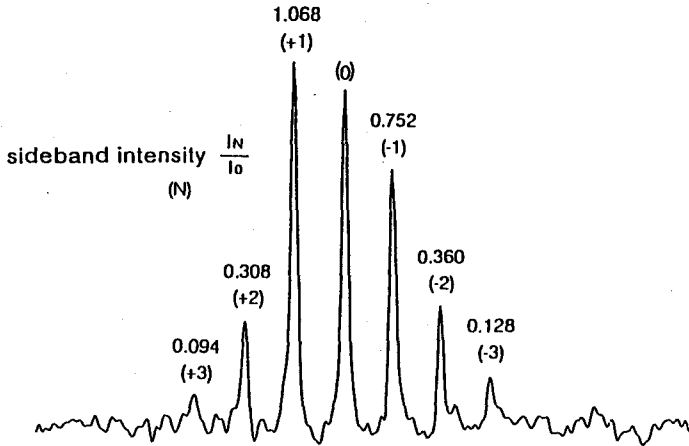


Figure 1. Calculated ^{113}Cd sideband intensities for $\text{Cd}(\text{AlaAla})\text{Cl}$.

$$\mu = (\gamma H_0) (\delta_{33} - \delta_{11}) / \omega_r, \quad \rho = (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}) / (\delta_{33} - \delta_{11}),$$

$$\delta_{\text{iso}} = (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}) / 3.$$

γ = 磁気回転比; $-5.933(10^7 \times \text{radT}^{-1}\text{s}^{-1})$, H_0 = 外部磁場; 6.35T (1H; 270MHz),

ω_r = サンプル回転数, δ_{iso} = サンプル回転数に独立な δ 値.

化学シフトテンソルの異方性 ($\Delta\delta$) は (1) 式より、また化学シフトテンソルの対称性を表わす非対称パラメータ (η) は (2) 式より算出した。

$$\Delta\delta = |\delta_{33} - \delta_{11}| \quad (1), \quad \eta = |\delta_{22} - \delta_{11}| / |\delta_{33} - \delta_{\text{iso}}| \quad (2).$$

SSB法による化学シフトテンソル算出の最大の利点は、錯体分子中に非等価なCdが複数存在する場合でも化学シフトテンソルの解析が可能であることである。

δ_{iso} と $\Delta\delta$ との関係をFigure 2に、また η と δ_{iso} との関係をFigure 3にそれぞれ示す。 $(\delta_{iso}-\Delta\delta)$ 図より $(\eta-\delta_{iso})$ 図の方が各データの分布が多少密になっておりより判断しやすくなっている。これより、5員環キレートをもつ2つの歪んだ6配位8面体型錯体($Cd(GG)_2 \cdot 2H_2O$, $Cd(Met)_2$, $Cd(Asn)_2$, 図中●印)の $\Delta\delta$ が他のCd錯体に比べて大きく化学シフトテンソルが広がっており特徴的なSSBを与えることがわかった。また楕円で囲った $Cd(Gly-X)_2$ ($X=Ala, Leu, Ile$), $Cd(Gly-X)_2$ ($X=Val, Phe$), $Cd(X-Gly)Cl \cdot 0.5H_2O$ ($X=Val, Leu, Phe$)のグループが両分布図において類似の場所に位置し、算出したNMRパラメータを用いたグループ分けの方法で類似構造を決定することが可能であることを示している。グループ分布から大きくはずれた錯体(例えば NO_3^- 配位)は特異的な結合様式を取っているものと考えられる。これらの分布図は視覚に頼ったパウダーパターン分類を精密化したものであり、 $^{113}Cd-NMR$ によるCd錯体の類似構造の決定は、 δ_{iso} , $\Delta\delta$, η の3つの要素が一致することが必要条件であることが分かった。Cd錯体のデータをさらに加えていくことにより、今後のCd錯体の構造解析に重要な一方法となると考えられる。

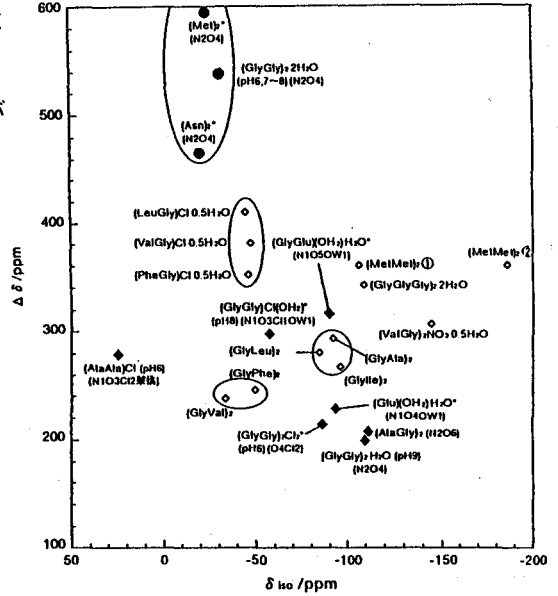


Figure 2. Distribution map of various Cd(II) complexes for ^{113}Cd anisotropy($\Delta\delta$) against isotropic ^{113}Cd chemical shift(δ_{iso}). (●) and (○) indicate the donor atoms and similar structure, respectively. ◆: Complexes with known structure. ●: Complexes of 6-coordinate distorted octahedral with two 5-membered chelate rings. ○: Complexes with unknown structure.

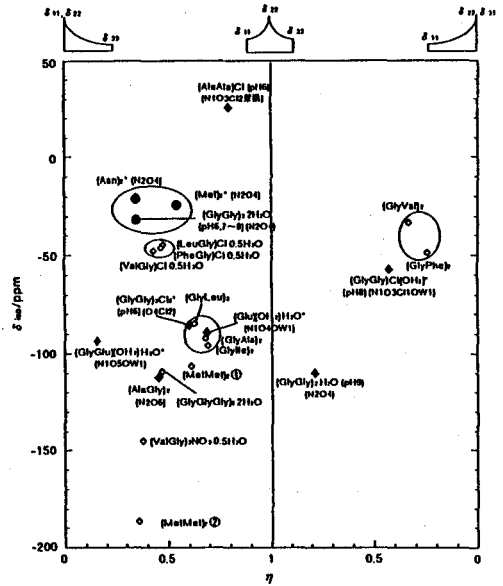


Figure 3. Distribution map of various Cd(II) complexes for asymmetry parameter(η) against isotropic ^{113}Cd chemical shift(δ_{iso}). (●) and (○) indicate the donor atoms and similar structure, respectively. ◆: Complexes with known structure. ●: Complexes of 6-coordinate distorted octahedral with two 5-membered chelate rings. ○: Complexes with unknown structure.

1) J.Herzfeld and A.E.Berger, J. Chem. Phys., 73, 6021 (1980).

¹³C-NMR study of Mesophase Pitch using Variable Amplitude
Cross Polarization and high speed Magic Angle Spinning
(Kyushu National Industrial Research Institute) ○Yoshio Adachi

Mesophase Pitch used as a material of carbon fiber has the interesting property to form easily anisotropic regions in its pyrolysis stage. Solid state ¹³C-NMR using cross-polarization (CP) and magic angle spinning (MAS) is one of the most variable measurements to study solvent-insoluble and complex organic mixture, but several spinning sidebands (SSB) of aromatic carbons appear in a high field measurement, and make the interpretation of spectra difficult. The high speed MAS is a powerful technique for reducing the intensity of SSB, but affects the efficiency of CP. In this paper, we applied a variable amplitude (VA) CP pulse sequence with high speed MAS to Mesophase Pitch and discussed the problems to analyze the chemical structure of Pitch.

1. はじめに

ピッチ系炭素繊維の原料として用いられているメゾフェーズピッチは、熱分解過程で異方性領域を形作る興味深い特徴を有する。交差分極 (CP) 法とマジック角回転 (MAS) 法による固体高分解能NMRは、このような溶媒に難溶性で複雑な有機混合物であるピッチ類の化学構造の解析には有用である。しかし、高磁場の測定においては芳香族炭素のSpinning Sideband (SSB) が多数現れ、そのスペクトルの解釈を困難にしている。TOSS法はSSBを消去する有用な手段であるが、吸収帯の強度の信頼性が失われる。高速MAS法もまたCPにおける磁化の移動を妨げ、感度の大幅な低下を引き起こす。今回は、メゾフェーズピッチの¹³C-固体高分解能NMRスペクトルを、CP時に¹Hチャンネルの強度に変調を加えるVACP法¹⁾を用い、マジック角での回転速度やCPの接触時間 (Contact Time、 t_{CP}) の影響を調べるとともに、VACP/高速MAS下でのダイポーラ・ディフェーゼィング (Dipolar Dephasing、DD) 法の測定を行い、ピッチ類の化学構造解析への問題点を検討した。

2. 実験

メゾフェーズピッチは、丸善石油化学製MP-N (軟化点252°C) を用いた。

固体高分解能NMR装置はブルカー社DSX300 (¹³C核共鳴周波数: 75MHz) を、試料管は外径4mmのジルコニア製ローターを用いた。測定条件は、繰り返し時間は4sとし、CPの接触時間: 0.25~5ms、MASの回転数: 5~13kHz、積算回数: 2~4kの範囲とした。DD法の遅延時間 (Delay Time、 t_d) は、10~200 μ sの範囲とした。

(キーワード) Mesophese Pitch、Carbonaceous Solid、CP/MAS NMR、High speed MAS

○あだちよしお

3. 結果と考察

Fig.1に、回転数5kHz(a)と11kHz(b)でのConventional CP法、および回転数11kHz(c)でのVACP法によるMP-Nピッチの ^{13}C -スペクトルを示した。回転数5kHzのスペクトル(a)では、126ppmの芳香族炭素のバンドの周りにはかなりの強度を持つ4本のSSBが観測される。高磁場側の1次と2次のSSBの間10~50ppmに脂肪族炭素による2本のバンドが観測され、20ppm付近のバンドがメチル基、芳香族に対し α 位のメチレン基と、30ppm付近のバンドは芳香族に対し β 位より遠いメチレン基と帰属される。これに対し、回転数11kHzのスペクトル(b)では、-15ppm付近、270ppm付近に弱いSSBが観測されるが、脂肪族炭素と芳香族炭素のバンドを完全に分離することが可能となる。しかし、(a)と比較すると(b)では強度が著しく減少していることがわかる。これに対し、VACP法を用いたスペクトル(c)は(a)と比較して、SSBを含めた強度では減少するものの、芳香族炭素のセンターバンドを比較するとほとんど強度の減少が見られない。

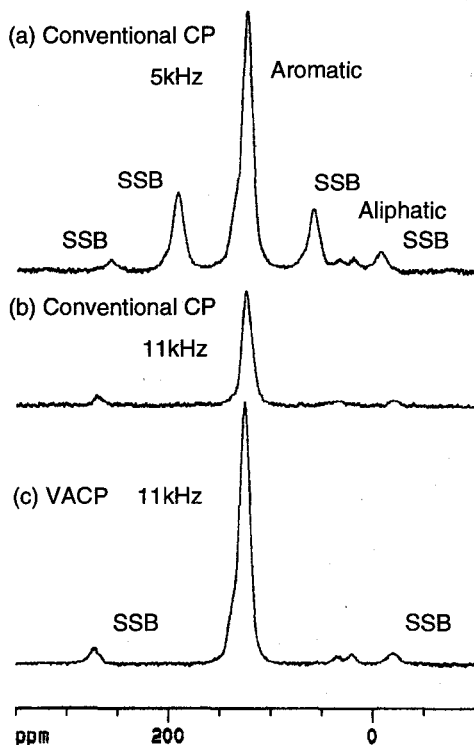


Fig.1 ^{13}C -NMR spectra of MP-N pitch

Fig.2にConventional CP法とVACP法による芳香族炭素のセンターバンドの積分強度とMASの回転速度の関係を示した。Conventional CP法では、回転速度の増加に従って著しく積分強度は減少するが、VACP法ではSSBの強度がセンターバンドに復帰する事により、9kHzまでは増加傾向を示した。その後、12.5kHzまではあまり変化が見られないが、13kHzで急激に減少した。ピッチ類の化学構造を示す重要なパラメータであるfa (芳香族炭素分率、Aromaticity) はいずれも0.95付近で大きな変化は示さなかった。

CP法においては、シグナル強度は接触時間 (t_{CP}) の関数として次式に従う。

$$M(t_{CP}) = M_0 \lambda^{-1} (1 - \exp(-\lambda t_{CP}/T_{CH})) \exp(-t_{CP}/T_{1\rho}^H)$$

T_{CH} は分極移動の時間、 $T_{1\rho}^H$ は ^1H 核の回転系でのスピン格子緩和時間、 $\lambda = 1 - T_{CH}/T_{1\rho}^H$ によって、シグナル強度は ^1H 核から ^{13}C への分極移動に従って増加するとともに、スピンロックしている ^1H 核の緩和に従って減少する。Fig.3に、VACP法における芳香族炭素、脂肪族炭素バンドの積分強度に対する t_{CP} の影響を調べた。その結果、芳香族炭素の積分強度は1.75msで、脂肪族炭素の積分強度は0.5msで最大を示した。これらの値は、低磁場の炭素類

の測定値とほぼ同程度²⁾で、高速MASでもVACP法を用いることにより速やかに磁化が移動されることが確認された。また、 $T_{1\rho}^H$ による強度の減衰もあまり大きくなく、 f_a の値は、 t_{CP} が1~2msの範囲であり大きく異ならない。なお、Single Pulse法による測定も試みたが、ベースラインが平坦にならず、 f_a 値を比較することはできなかった。

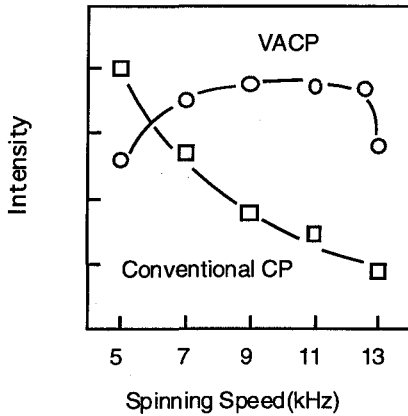


Fig.2 Variation in Intensity of Aromatic Center Band with spinning speed.

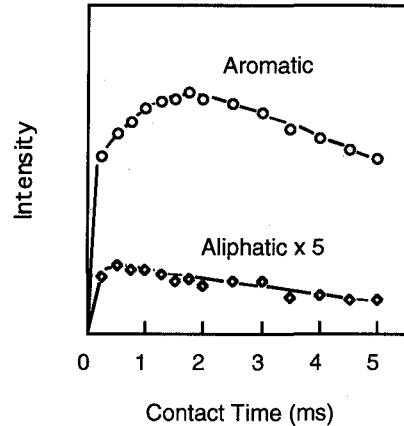


Fig.3 Variation in Carbon Signal Intensity with contact time.

ピッチの化学構造の解析にあたってはOllivierらにより提唱された方法³⁾を用い、Fig.4に示した。この式に示されるように、化学構造の解析にあたっては、 $f_{Q/T}^{ar}$ (nonprotonated carbon(NC)/protonated carbon(PC))、および R_S (芳香族環に付いている置換基の数)を求める必要がある。 $f_{Q/T}^{ar}$ を求めるためにDD法が用いられる。DD法は、CTの後遅延時間 (t_d)をあけてFIDの取り込みを行う。この t_d の間、 1H 核のハイパワーディカップルを切ると、 1H 核が直接付いている炭素のシグナルは位相が乱れて強度が減衰することを利用したものであり、その強度は t_d の関数として次式のように表現されるとされている。

$$M(t_d) = M_{PC} \exp(-0.5(t_d/T_{PC})^2) + M_{NC} \exp(-t_d/T_{NC})$$

Fig.5にMASの回転数12.5kHzでVACP法を用い、 t_d を10~100 μ sの範囲としたときのMP-Nピッチの芳香族炭素の積分強度と t_d の関係を示した。これまでの低磁場での測定結果では、protonated carbonは40~70 μ sで消失するとされている²⁾。Fig.5では70 μ sに屈曲点を有しており、その後はほとんど減衰が見られなかった。この結果、約40%がnonprotonated carbonであることがわかる。なお、100~200 μ sにおいてはエコーによると思われるシグナル強度の増加が見られた。

ピッチの芳香族炭素吸収帯においては、135ppm付近にアルキル基が置換した芳香族炭素のショルダーバンドが観測される。そこで、Conventional VACP法によるスペクトルのディコンボリューションを行い、Fig.6に示した。この結果から、Fig.4に示した置換係数 R_S を求めた。

DD法により求めた $f_{Q/T}^{ar}$ 、およびディコンポリューションより求めた R_S を用い、Fig.4に示した手順で計算した結果、MP-Nピッチはアントラセン程度の芳香族環に1つのアルキル基が置換した化合物と算出された。

* Ratio of quaternary to tertiary aromatic carbons

$$f_{Q/T}^{ar} = (C_S^{ar} + C_B^{ar}) / C_P^{ar}$$

* Substitution Coefficient

$$R_S = C_S^{ar} / (C_P^{ar} + C_S^{ar})$$

* Number of Aromatic Rings : $N_R = N^2$

$$N = (a - 1) + \sqrt{a^2 - a + 1}$$

$$a = (1 + f_{Q/T}^{ar}) (1 - R_S)$$

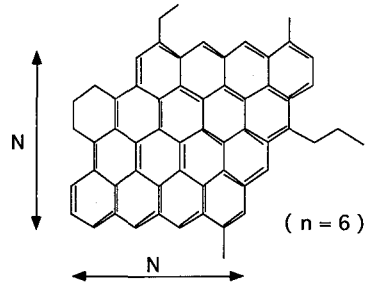
* Number of Substituents

$$n = 2R_S(2N + 1)$$

C_P^{ar} : Number of Protonated Aromatic Carbons

C_S^{ar} : Number of Substituted Aromatic Carbons

C_B^{ar} : Number of Bridgehead Aromatic Carbons



Logenge Model

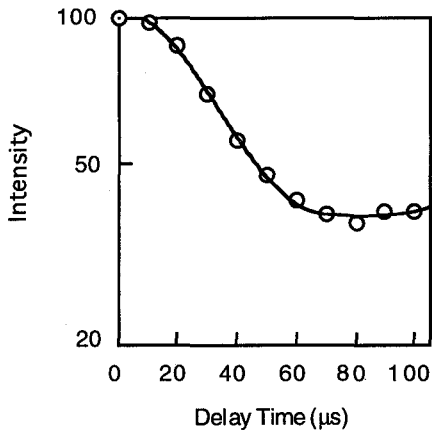


Fig.5 Variation in Aromatic Carbon Intensity with delay time.

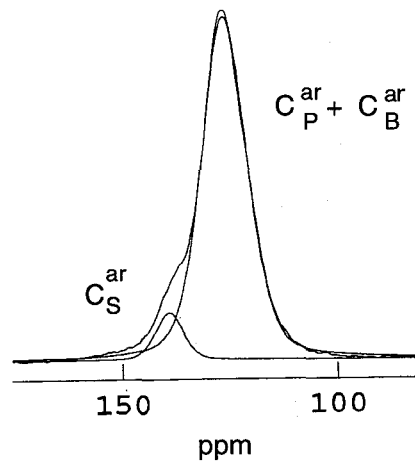


Fig.6 Curve-fitting of Aromatic Carbons

参考文献

- 1) O.B.Peersen, et. al. Proceeding of 34th Experimental NMR Conference, p.153 (1993)
- 2) M. Pruski, B.C.Gerstein and D. Michel, Carbon, **32**, 41 (1994)
- 3) P.J.Ollivier and B.C.Gerstein, Carbon, **24**, 151 (1986)

固体NMRによる SiH-C≡C-系ポリマーの熱硬化構造の解析

高分子素材センター 先進材料研¹、三井東圧総研²

○黒木重樹¹、伊藤正義²、石川淳一²

Solid State NMR Investigation of Thermal Hardening Structure of SiH-C≡C- Polymer

(Advanced Polymer Lab., Japan High Polymer Center¹
and Central Research Institute, Mitsui Toatsu Chemical, Inc²)
Shigeki Kuroki¹, Masayoshi Itoh², and Jun-ichi Ishikawa²

Poly(phenylsilylene ethynylene-1,3-phenylene ethynylene) which contains Si-H and C≡C bonds becomes a very highly thermally stable polymer by 400°C treatment for 2hr. in argon atmosphere. This thermal hardening polymer is not soluble in any solution. In this study, we observed ¹³C and ²⁹Si solid state NMR spectra and determined thermal hardening structure of this polymer. From the elemental analysis and the IR result, we assumed two thermal hardening reactions which are 1) the hydrosilyl reaction between Si-H and C≡C and 2) the Diels-Alder reaction between Ph-C≡C and C≡C. ²⁹Si CP/MAS NMR spectrum of no treatment sample has three resonances, which are -70.3ppm, -65.0ppm, -60.8ppm that correspond to non-protonated Si, SiH, and SiH₂, respectively. The spectrum of 400°C treatment sample has a very broad resonance at -11.9ppm. The T_{dd}(dipolar-dephasing relaxation time) of protonated Si in no treatment sample is 0.437ms, and that of non-protonated Si is 1.776ms. T_{dd} of Si in 400°C treatment sample is 1.298ms, so that this resonance came from non-protonated Si. The hardening structure of 1) contains non-protonated Si, but 2) contains protonated Si. Consequently, non-protonated Si signal came from the hydrosilyl reaction between Si-H and C≡C.

1、緒言

MgOを触媒に用い、フェニルシランとm-ジエチニルベンゼンの脱水素重縮合によって得られた分子内に Si-H 結合と C≡C 結合を有するケイ素系ポリマー [ポリ(フェニルシリレンエチニレン-1,3-フェニレンエチニレン)] (-SiPhH-C≡C-Ph-C≡C-) _n (MSP-1) はアルゴン雰囲気下、400°Cで2時間処理することにより、極めて高い耐熱性、熱安定性を有するようになる。しかし、熱処理試料は溶媒には不溶なため構造解析の有力な手法である溶液NMR法は用いられない。そこで、熱硬化による構造の変化を固体高分解能NMR法を用いて解析した。

2、結果と考察

元素分析の結果、熱処理の前後で元素組成の変化はなく、熱分解等による脱水素、脱ベンゼンは起こっていないことがわかっている。また、IRの結果から熱処理温度の上昇により Si-H 結合と C≡C 結合の両方の減

SiH-C≡C-系ポリマー、熱硬化構造、固体 NMR

くろきしげき、いとうまさよし、いしかわじゅんいち

少が認められ、熱処理温度 500°Cでは全結合が消失した。さらに、モデル化合物を熱処理して得られた生成物の分析結果、および計算化学による検討結果から、低温領域 (200°C付近) では主として 1) SiH と C≡C のヒドロシリル化による架橋硬化反応 (Fig.1)、さらに高温領域では 2) C≡C と Ph-C≡C の分子間ディルスアルダー反応による架橋硬化反応 (Fig.2) が起きていると推定された。

まず、MSP-1 の未処理試料及び 400 °C 処理試料の ^{29}Si CP/MAS NMR スペクトルを Fig.3 に示す。未処理試料では低周波数側から -70.3 ppm、-65.0 ppm、-60.8 ppm (シヨルダ) と各々、枝分かれに由来する 4 級 Si、SiH、末端 SiH_2 が観測されている。400°C 処理試料では -11.9 ppm にトップをもつほぼ等方的なブロードな信号 (半値幅 2969 Hz) が観測される。ここで、MSP-1 の未処理試料と 400°C 処理試料の ^{29}Si Dipolar-Dephasing による緩和時間 (T_{DD}) を測定した。その結果を Fig.4 に示す。未処理試料の水素と直接結合した Si の T_{DD} は 0.437 ms であり、水素と結合していない枝分かれに由来する 4 級 Si の T_{DD} は 1.776 ms であった。一方、400°C 処理試料の Si の T_{DD} は 1.298 ms であり、この Si は水素と直接結合し

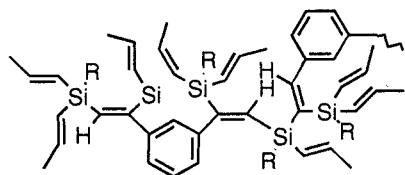


Fig.1 The expected thermal hardening structure of SiH-C≡C-polymer by the hydrosilylation reaction between SiH and C≡C.

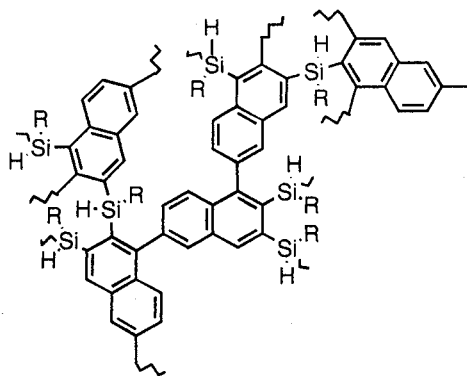


Fig.2 The expected thermal hardening structure of SiH-C≡C-polymer by the Diels-Alder reaction between Ph-C≡C and C≡C.

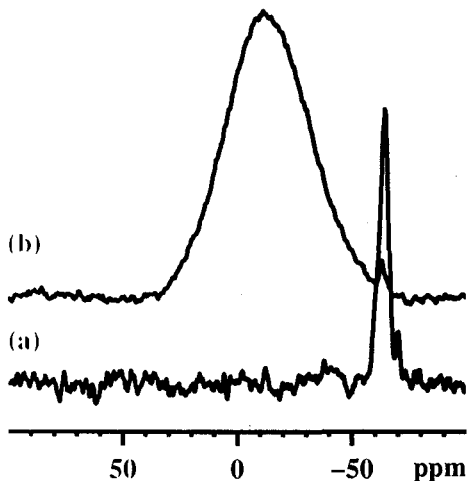


Fig.3 ^{29}Si CP/MAS NMR spectra of MSP-1. no treatment sample (a) and 400 deg. treatment sample (b), respectively.

ていないことがわかる。1) SiH と $C\equiv C$ のヒドロシリル化による架橋構造の場合、Si は4級になるが、2) $C\equiv C$ と $Ph-C\equiv C$ の分子間ディルスアルダー反応による架橋構造では Si は水素と直接結合している。 T_{DD} 測定の結果から 1) SiH 結合と $C\equiv C$ 結合のヒドロシリル化架橋により Si は4級になると推論される。

Fig.5 に熱処理温度を $150^{\circ}C\sim 400^{\circ}C$ まで変化させて調製した MSP-1 の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。熱処理により $C\equiv C$ 結合由来の信号 ($87.1ppm$ 、 $107.2ppm$) が減少して $400^{\circ}C$ でほぼ消失していることがわかる。また、 $122.2ppm$ の $C\equiv C$ に結合したフェニル基の炭素の信号も減少している。そして $137\sim 150ppm$ に新たな信号が観測されるようになる。この段階ではこの化学シフトはヒドロシリル化によって現れる $C=C$ 結合および $C=C$ と結合したフェニル基の炭素の信号と推定した。

次に、Dipolar-Dephasing 法により 1H と双極子-双極子相互作用の大きい炭素の信号を消去させる測定を行った。その結果を Fig.6 に示す。未処理試料では側鎖フェニル基の炭素 ($129ppm$ 、 $135ppm$) (早い回転運動によりプロトンとの双極子双極子相互作用が消去) および

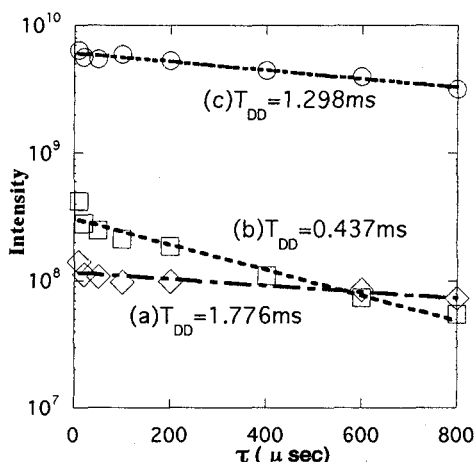


Fig.4 The dipolar dephasing decays of no-protonated Si signal(a) and protonated Si signal(b) of no treatment sample, and Si signal of $400^{\circ}C$ treatment sample(c), respectively.

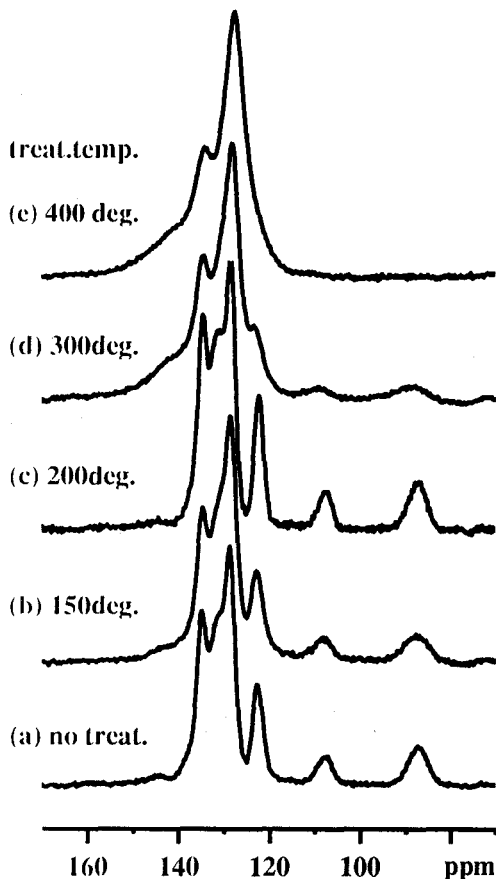


Fig.5 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of MSP-1.

主鎖中の水素と直接結合していない炭素由来の信号のみが観測されている。熱処理により生じる新たな信号は硬化反応によって生じる主鎖中の水素と直接結合していない炭素由来のものと考えられる。150°C処理試料では新たに132ppmと140ppmに信号が観測された。熱処理温度が上昇するのにしたがい、この2つの信号強度は強くなり、特に140~150ppmの信号強度が強まっている。1)SiHとC≡Cのヒドロシリル化による架橋構造では132ppmに化学シフトをもつ炭素は存在しない。一方、2)C≡CとPh-C≡Cの分子間ディルズアルダー反応による架橋構造ではナフタレン環の水素と直接結合していない中央部の炭素がこの化学シフトをもつ。したがって、2)の硬化反応が既に150°Cで起きていることがわかる。また、150ppm前後に化学シフトをもつ炭素は2)の架橋構造では存在しないので、これは1)の架橋構造中のC=C*-Siに由来するものであることがわかる。固体NMRスペクトルから、SiH-C≡C-系ポリマーは1)、2)の硬化反応が低温領域から同時進行していることがわかった。

謝辞

本研究は、産業技術研究開発制度の一環として新エネルギー産業技術総合開発機構から委託を受けて実施したものであり、新エネルギー産業技術総合開発機構の産業技術研究員として、研究開発業務に従事した結果である。

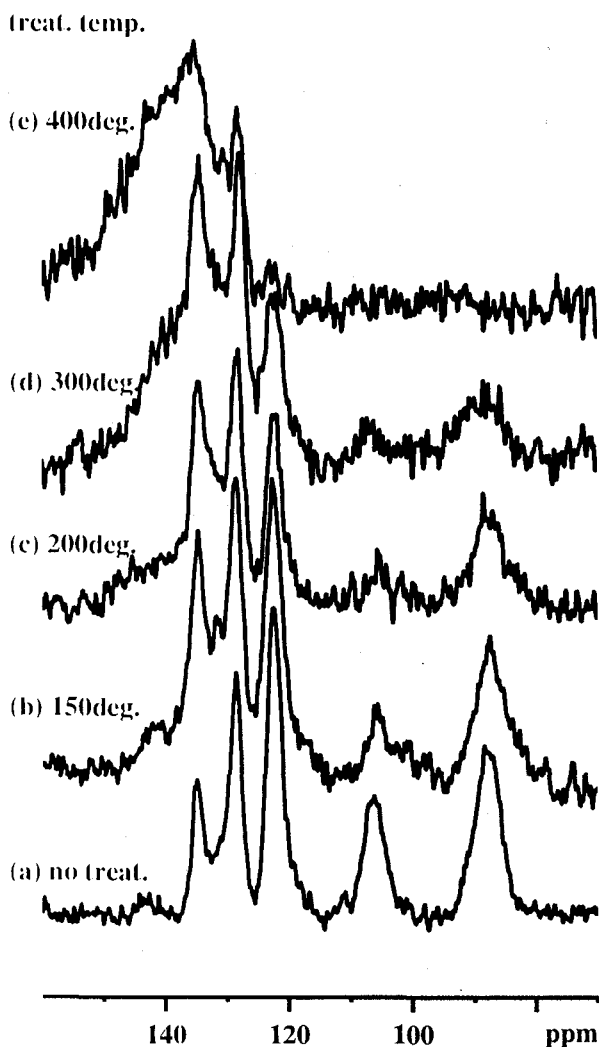


Fig.6 ^{13}C CP/MAS+DDph spectra of MSP-1.

(物質研¹、筑波大物質工²) ○林 繁信¹、里澤優敏²、国森公夫²

Location and dynamics of interlayer cations in layered silicates

(National Institute of Materials and Chemical Research¹, University of Tsukuba²)

Shigenobu Hayashi¹, Masatoshi Satozawa², and Kimio Kunimori²

Kanemite, $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, is a layered material consisting of single layers of SiO_4 tetrahedra. Location and dynamics of interlayer Na ion and H_2O have been studied for three samples with different drying conditions by means of ^{23}Na , ^1H and ^{29}Si NMR. ^{23}Na two dimensional (2D) nutation spectra for static samples and 2D triple quantum spectra for spinning samples indicated the presence of two types of Na ions with different quadrupole interactions. The quadrupole parameters were estimated from simulation of one dimensional spectra. Both ^{23}Na and ^1H spectra demonstrated that mobilities of interlayer species, Na ion and H_2O , decrease with decrease in the H_2O content. ^{29}Si spectra suggested that the structure of the SiO_4 layer is sensitive to the amount of H_2O .

層状ケイ酸塩では、層が負電荷を帯び、層間に陽イオンが存在することが多い。ここでは、層状ケイ酸塩としてカネマイトを取り上げた。カネマイトは、メソポーラス物質 FSM-16 を合成する際の出発物質であり、最近注目されている。カネマイトの理想組成は $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ であり、シリカ層 1 層と層間陽イオンが交互に積層していることは知られているが、構造の詳細はまだ確立されていない。層と層は、強い O-H...O の水素結合で結ばれていると考えられている。陽イオンとして Na^+ イオンが層間に存在し、容易にイオン交換が可能である。また、水分子も層間に存在しており、容易に脱離する。

本研究では、カネマイトの層間における Na^+ イオンや水分子の挙動を固体 NMR によって調べた。

実験

測定に用いたカネマイトは、水ガラスを焼成した後水に分散することによって合成した。含水量の影響を調べるため、風乾 (Sample S)、空气中 40°C で 3 時間乾燥 (Sample A)、 80°C で 3 時間乾燥 (Sample B) の 3 種類の試料について調べた。NMR 測定は、ブルカー社製 MSL400、ASX400 および ASX200 を用いて室温で行った。 ^{23}Na 、 ^1H 、 ^{29}Si の 3 つの核種について 2 つの異なる磁場下で測定を行った。

層状ケイ酸塩、カネマイト、層間イオン、固体 NMR

はやし しげのぶ、さとざわ まさとし、くにもり きみお

結果および考察

Fig. 1 に、 ^{23}Na MAS NMR スペクトルを示した。Sample A は Sample S と同じパターンを示した。異なる磁場下で測定したスペクトルの比較から 2 次の核四極相互作用で広がっている成分の存在が確定されるが、スペクトルの形は他の成分の存在を示している。静止試料のスペクトルも同様に単一の成分では説明がつかないパターンを示した。

異なる成分の存在を確認するために、静止試料の二次元 Nutation スペクトルの測定と、MAS 下での二次元三量子遷移スペクトルの測定を行った。

Fig. 2 に、Sample A の静止状態での二次元 Nutation スペクトルを示した。Sample S も同様のスペクトルを示した。核四極相互作用の強い Na と非常に弱い Na が共存していることがわかった。Sample B では、核四極相互作用の弱い成分は消失しており、相互作用の強い成分のみが観測された。

Fig. 3 に、Sample S の二次元三量子遷移スペクトルを示した。Nutation スペクトルでは 2 つの成分が観測されたが、ここでは 1 つの成分しか観測されなかった。核四極相互作用の非常に弱い成分のシグナルが観測されなかったためと解釈できる Fig. 4 に、Sample B の二次元三量子遷移スペクトルを示した。Nutation スペクトルでは 1 成分しか観測されなかったが、ここでは核四極相互作用の大きさの異なる 2 つの成分が区別して確認された。

2 種類の固体二次元 NMR スペクトルの結果から、Sample S と Sample A には核四極相互作用の強い成分と非常に弱い成分の 2 種類が存在すること、Sample B には核四極相互作用が強いがその大きさの異なる 2 つの成分が存在することがわかった。このようにして二次元スペクトルから得られた知見を基にして、一次元スペクトルのシミュレーションを行い核四極パラメータを見積もった。核四極結合定数が 2.05 MHz、非対称定数が 0.63 である成分がどの試料においても全体の 80% をしめていた。残りの 20% が水分子の影響を強く受け、乾燥状態によって核四極パラメータが大きく変化することがわかった。

Sample S および Sample A ではスペクトルの線形に対する ^1H デカップリングの効果はなかったが、Sample B ではデカップリングの効果が見られ ^1H - ^{23}Na 間の双極子相互作用が確認された。含水量が減るにつれて水分子の動きが封じられたためと考えられる。

^1H MAS NMR スペクトルには、TMS 基準で 5 ppm に水分子、15 ppm に水酸基に帰属されるピークが観測された。水酸基の 15 ppm という値は水素結合が非常に強いことを示している。カネマイトを乾燥させるにつれて、5 ppm のピーク強度は低下していき、それとともにピークの線幅が増加する。線幅の磁場依存性は、双極子相互作用によって線幅が増加していくことを示していた。水分子の減少とともに水分子の運動性が低下していくことがわかった。

^{29}Si MAS NMR スペクトルでは、Sample S、Sample A ともに TMS 基準で -97 ppm にシグナルが観測された。Sample B では -97 ppm のシグナルの他に新たに -95 ppm にシグナルが現れた。シグナル位置から層構造は保たれているが、水分子の減少によりシリカ層の構造が少し歪んだものと考えられる。

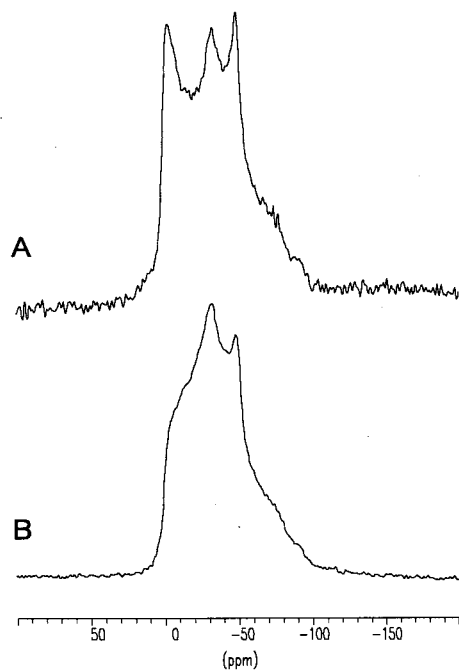


Fig. 1. ^{23}Na MAS NMR spectra of kanemite, measured at 52.94 MHz. (A) The sample S and (B) the sample B. Spinning rates were both 12.00 kHz

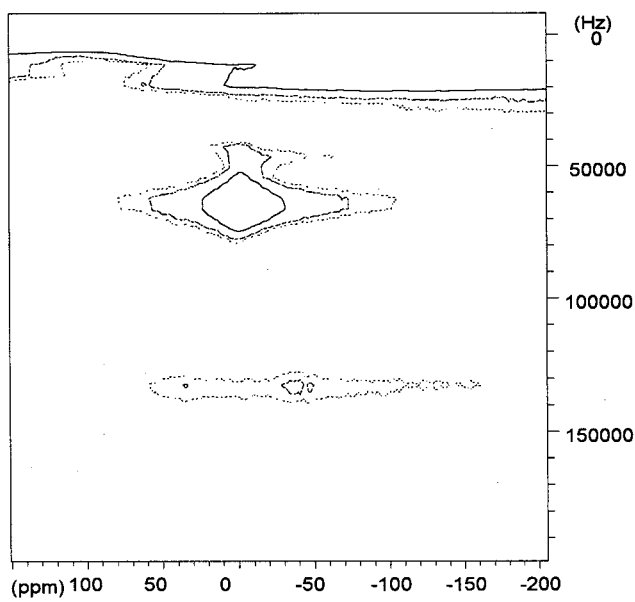


Fig. 2. ^{23}Na 2D nutation NMR spectrum of the sample A in a static state, measured at 52.94 MHz.

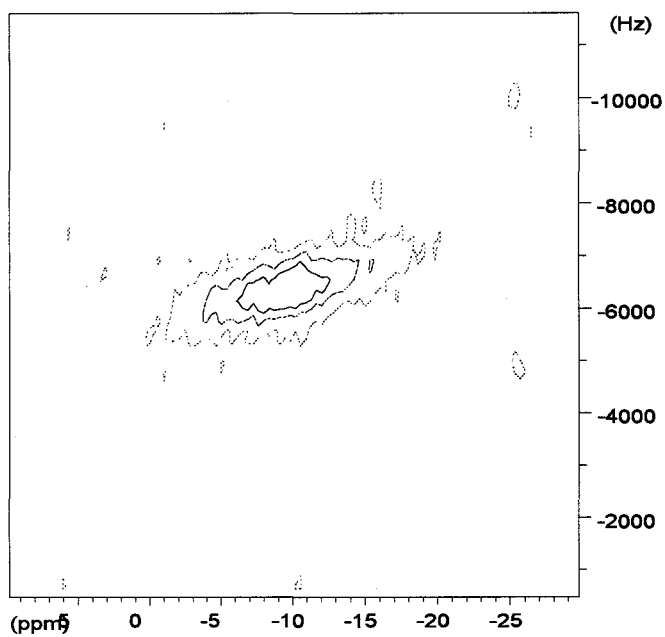


Fig. 3. ^{23}Na 2D triple quantum/MAS NMR spectrum of the sample A, measured at 105.84 MHz.

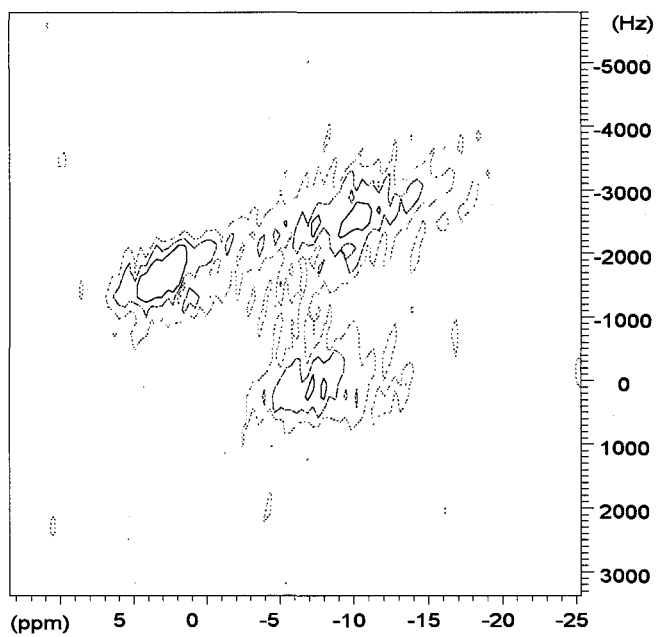


Fig. 4. ^{23}Na 2D triple quantum/MAS NMR spectrum of the sample B, measured at 105.84 MHz.

3P15

^{27}Al NMR による混合溶媒中での Al(III) イオンの溶媒和
(北見工大) ○ 三浦 宏一、松田 弘喜、梅原 邦之、
中谷 昭典、馬場 雄久、福井 洋之

^{27}Al NMR Study on Al(III) Ion Solvation
in Mixed-Solvent Systems

K. Miura, H. Matsuda, K. Umehara, A. Nakaya, T. Baba and H. Fukui
(Kitami Institute of Technology)

^{27}Al NMR spectra were used to investigate the solvation of Al^{3+} in water-DMF, water-DMSO, and water-formamide (FA) solvent mixtures. The ^{27}Al spectrum is in the slow-exchange limit at room temperature, which permits us to observe several peaks corresponding to different solvated ions, $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_{6-i}(\text{Solv})_i]^{3+}$ ($i = 0-6$, Solv; DMF, DMSO, FA). The successive equilibrium constants for Al ion solvation in water and organic solvents mixtures have been evaluated by analyzing the ^{27}Al peak areas of spectra measured for various molar ratios of two solvents.

【緒論】

金属イオンを含む電解質溶液中でのイオンの溶媒和に関して、NMR 分光法を適用した研究は古くから多く行われている。特に最近10数年間は、高磁場での測定を含めた装置の発達により、溶媒和しているイオンを直接観測する多核 NMR 測定が多く行われ、溶媒和殻構造や、金属イオンとアニオンのイオンペアに溶媒が配位した錯体種などについて詳細な情報が得られるようになってきている。

多核測定の中でも、 ^{27}Al NMR は Al 核の NMR 感度が高いことや、 Al^{3+} が比較的小さなイオン半径と高電荷を有することにより溶液中で配位子と強い結合をつくることから多種の研究が行われている。¹ この Al イオンと配位子間の強い結合による配位子交換速度の遅さが、溶液中に存在する複数の Al^{3+} 錯体種を反映する化学シフトの異なるピークとして観測される場合がある。² 我々は、この現象を混合溶媒中での Al(III) イオンの競合的溶媒和現象の研究に適用した。

【実験】

試料は水と有機溶媒 (DMF, DMSO, FA) の割合を変えた混合溶媒に、Al 塩として

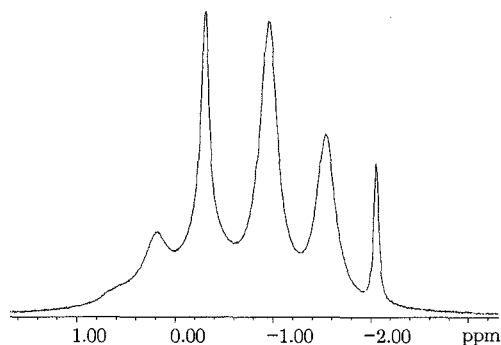


Figure 1. ^{27}Al spectrum for $\text{Al}(\text{ClO}_4)_3$ in water-DMF binary solvent mixture. The molar ratio of Al^{3+} , H_2O and DMF is 1:20:80.

キーワード : Al イオン、溶媒和、溶媒和平衡

○ みうら こういち、まつだ ひろき、うめはら くにゆき、なかや あきのり
ばば たけひさ、ふくい ひろゆき

Table 1. Successive Equilibrium Constants for Al³⁺-Water-DMF Systems.

mole ratio Al:H ₂ O:DMF	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ^{1/6} ^a
1:80:20	7.69	3.41	1.57	0.671			
1:70:30	7.61	2.81	1.07	0.568			
1:60:40	6.46	2.71	1.02	0.432	0.185		
1:50:50	3.77	3.08	0.768	0.388	0.173		
1:40:60	4.20	2.20	0.807	0.306	0.146		
1:30:70		2.13	0.881	0.257	0.163	0.0455	
1:20:80			0.880	0.211	0.152	0.0483	
1:15:85			1.10	0.207	0.145	0.0497	
av. K _i	5.94	2.72	1.01	0.380	0.161	0.0478	0.603

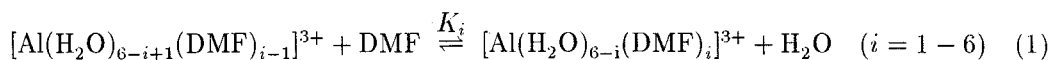
$$^a K^{1/6} = (\prod K_i)^{1/6}.$$

Al(ClO₄)₃ · 6H₂O を溶解した溶液を調整した。

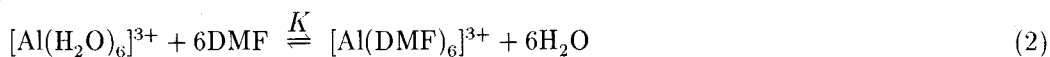
²⁷Al NMR スペクトルは、JEOL A-500(²⁷Al 130.3 MHz) を用いて、室温 (25°C) で測定した。化学シフトは外部標準として用いた 0.1 M Al(ClO₄)₃ 水溶液の Al ピークを 0 ppm とした。

【結果と考察】

水-DMF 混合溶媒中で測定した²⁷Al NMR スペクトルの一例を Fig. 1 に示す。配位子の交換速度が遅いため各溶媒和状態に応じた複数の Al ピークの存在が確認できる。混合溶媒の組成比を変えて測定した一連のスペクトルを見ると、各ピークの強度は連続的に変化していることがわかる。Al³⁺ に対する溶媒和数は 6 であることから、これらのピークは溶媒和状態の異なる [Al(H₂O)_{6-i}(DMF)_i]³⁺ (i = 0 - 6) の Al³⁺ に対応している。各ピークの分離は不十分なので、測定スペクトルが再現されるようにシミュレーションを行った。シミュレーションから得られた各溶媒和 Al イオンのピークから次のように溶媒和平衡を仮定した。



(1) 式の i = 1 - 6 の各段階について加え合わせると



$$K = K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6 \quad (3)$$

となる。得られた各ピークの面積から求めた逐次溶媒和平衡定数 K_i (i = 1 - 6) と、各 K_i の平均値から算出した K^{1/6} を Table 1 に示す。この系では K^{1/6} < 1 であることから、平均として水の方が DMF よりも幾分優先的に Al³⁺ に配位することが示された。

水-DMSO 系、水-FA 系についての結果は討論会で報告する。

【謝辞】

本研究にあたり、NMR 測定に便宜を図っていただいた工業技術院北海道工業技術研究所、津田 栄 博士に深謝いたします。

【参考文献】

1. J. W. Akitt, *Progr. NMR. Spectrosc.*, 1989, **21**, 1.
2. Sloan, J. B.; Cannon, S. A.; Delionback, E. C.; Dechter, J. J. *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 883.

芳香族溶媒中における n-アルカンの化学シフトの温度依存性と分子間相互作用

(電気通信大学) ○稲倉 秀樹、仁木 國雄

Temperature Dependence of Chemical Shifts of n-Alkanes in Aromatic Solvents and Intermolecular Interactions

○Hideki Inakura and Kunio Nikki
University of Electro-Communications

Temperature dependence of ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts of a series of n-alkanes (carbon numbers are 5 to 12) were observed in Toluene- d_6 . The singlet proton peak associated with the methylene groups of the chain was split into a doublet in Toluene at low temperature. The intermolecular alkane-aromatic interactions were discussed.

Introduction

芳香族溶媒中における n-アルカンの ^1H および ^{13}C -NMR の化学シフトについては系統的な研究がなされており、1-Cl-Naphtalene 中では炭素数 15 以上でプロトンのメチレン基ピークが 2 本に分裂することが知られている⁽¹⁾。また、炭素数 8 前後ではメチレン基のシグナルに特異な高磁場シフトが見られる。 ^{13}C -NMR では炭素鎖が短いほど高磁場シフトを示し、特にメチル基から数えて 3 番目の炭素がもっとも大きくシフトする。また、炭素鎖が長くなるのに従って低磁場へとシフトし、中心部の炭素ほど低磁場シフトが大きい。この現象については既に報告しており、短いアルカンと 1-Cl-Naphtalene との間に引力的相互作用がありそのために高磁場シフトを受けるという仮定を提案した⁽²⁾。

ところで、西尾らが α -フェネチル- γ -ブチルスルホキシドの立体配座の研究において提案した“CH/ π 相互作用⁽³⁾”に関して、その後、多くの研究がなされ、単なる分散力だけでなく電子の非局在化による相互作用も含まれるという報告もある⁽⁴⁾。これらの相互作用の実験的証拠の多くは分子内の CH/ π 相互作用に関係するものであるが、その他の種々の相互作用やエントロピー効果なども無視できないと考えられる。

今回、できるだけ単純な系で CH/ π 相互作用を検討するためアルカンとベン

芳香族溶媒、n-アルカン、分子間相互作用、温度依存性

いなくら ひでき、につき くにお

ゼン環の相互作用を考えたが、前述の現象は常温では 1-Cl-Naphtalene などの縮合多環芳香族溶媒中でしか見られず、ベンゼン中では観測されない。そこで、低い温度領域で測定するために液体の温度範囲が広い Toluene を溶媒として化学シフトの温度依存性の測定を行った。

測定

炭素数 5-12 のアルカンについて Toluene- d_6 を溶媒として ^1H および ^{13}C -NMR の -90°C から 100°C での温度変化の測定を行った。サンプルはアルカンの濃度 1% として真空ラインにより封管したものをを用いた。また、測定には Varian UNITYplus 500MHz を使用した。

結果

図 1 は 1-Cl-Naphtalene, Benzene および Chloroform を溶媒とした炭素数 8、22、32 のアルカンの ^1H -NMR スペクトルである。Chloroform 中ではメチレン基の強度がメチル基に対し相対的に大きくなる他には炭素鎖が長くなったことによる変化は見られないが、芳香族溶媒中の $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$ ではメチレンのピークの分裂がみられ、 $\text{C}_{32}\text{H}_{66}$ では分裂したピークの低磁場側の強度が増大している。また、カーボンとの二次元 NMR の測定により外側から少なくとも 5 番目までのメチレン基は ^1H のスペクトルでの高磁場側であることも確認できており、内側のメチレンは芳香族溶媒による磁気異方性効果をあまりうけていないために低磁場に分裂すると考えられる。

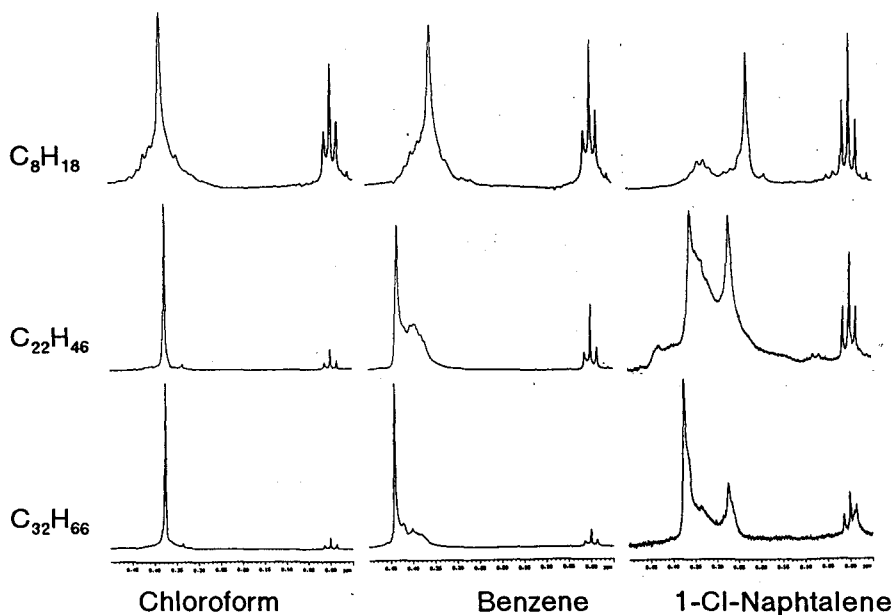


図 1. アルカンの ^1H -NMR スペクトル (Temp. 30°C)

図2は Toluene-d₈を溶媒としたときのオクタンの¹H-NMRにおけるスペクトルの温度変化である。低温になるに従ってメチル基に対して、メチレン基が高磁場シフトするのが見られ、また、メチル基のとなりのメチレン基より内側のメチレン基がより大きな高磁場シフトを示し、ピークが離れていくことが確認できる。炭素数5から12のアルカンについて測定したが、すべてに同様の変化が見られる。炭素数10以上のアルカンではほぼ温度に比例して高磁場シフトが短いアルカンほど低温になるに従い高磁場シフトが大きくなる。

図3は Toluene-d₈を溶媒としたときの炭素数5から12のアルカンの¹³C-NMRのメチル基とメチレン基の化学シフトの差の温度依存性をグラフにしたものである。

図3は Toluene-d₈を溶媒としたときの炭素数5から12のアルカンの¹³C-NMRの温度変化によるメチル基とメチレン基の化学シフトの差をグラフにしたものである。ここでも温度が下がるのにもなって高磁場シフトが見られるが、低温ではしだいにその傾きが小さくなり、中心付近のメチレンでは低温において逆にメチル基に対して高磁場への変化となる。高磁場へのシフトはメチル基から数えて3番目の炭素がもっとも大きく、傾きの変化は4番目が一番大きくなった。

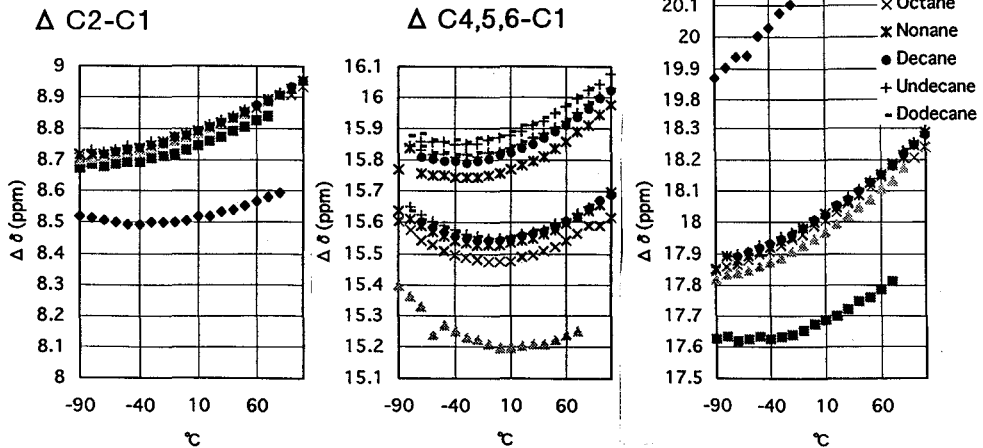


図2. オクタンの¹H-NMRスペクトル

図3. Toluene-d₈中のアルカンの¹³C-NMRでの温度変化

以上の測定結果をまとめるとオクタンのメチル基プロトンNMRシグナルは室温の1-Cl-Naphthalene中と -90°C のToluene中とで大変似かよっていること、温度が低くなるに従い内側のメチレン基シグナルがメチル基およびその隣のメチレン基より大きな高磁場シフトを示すことがわかった。また、室温の1-Cl-Naphthalene中ではオクタンの高磁場シフトが一番大きい、 -90°C のToluene中では測定した中で最も短い鎖長のペンタンが一番大きな高磁場シフトを示すことがわかった。

これらの結果より、直鎖状アルカンとベンゼン環との分子間相互作用はアルカンの鎖長に見合った大きさの芳香環との場合に最も安定になることが示唆される。

References

- (1)a)R-J. Liu, J. Polym. Sci. Part A-2, 5,1209(1967)
b)I. Ando, A. Nishioka and M. Kondo, Bull. Chem. Soc. Jpn.,47, 1097(1974)
c)M.A. Winnik, A. Mar, W.F. Reynolds, Ph. Dais, B. Clin and B. Caussade, Macromolecules, 12, 257(1979)
- (2)K. Nikki,第27回NMR討論会要旨集, 157(1988)
- (3)Y. Kodama,K. Nishihata,M. Nishio,Y. Iitalca, J. Chem. Soc., Perlcin2, 1976, 1490
- (4)T. Takagi, A. Tanaka, S. Matsuo, H. maezawa, M. Tani, H. Fujiwara and Y. Sasaki, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1987, 1015

(東京都立大学 理学部) ○嶋田陽子 北川進 松坂裕之 近藤満

Syntheses of Polynuclear Silver(I) Complexes and Solid State ¹⁰⁹Ag NMR Spectra
(Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University)
Yoko Shimada, Susumu Kitagawa, Hiroyuki Matuzaka, and Mituru Kondo

Silver(I) complexes have been of special interest in photographic materials and ionic conductors. CPMAS ¹⁰⁹Ag NMR spectra for several silver coordination polymers have been measured. The ¹⁰⁹Ag chemical shifts are found to be sensitive to the geometry of silver ion.

【序論】

銀(I)錯体は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、その物性を支配する銀-配位子結合性について有用な知見を得ることのできる方法は非常に限られている。

その中でもAgNMRは有効な手段として期待されるが、実際には銀核は感度が悪い上、緩和時間が長いため、観測が困難で、その研究は非常に限られてきた。特に、溶液状態においては、化学交換、溶媒との相互作用などにより平均化された値しか得られず、配位構造及び電子状態に関する詳細な情報を得るには適していない。

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¹⁰⁹Ag 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、現在までに、直線二配位構造を有する各種ピリジン単核銀錯体について固体高分解能¹⁰⁹Ag NMRを測定し、それらの構造と電子状態、化学シフト値の相関などについて報告をしてきた。ピリジン錯体の¹⁰⁹Ag NMRシフト値と、配位子のpKaとの相関についてFig.1.に示す。配位子のpKaの上昇に従い化学シフトも低磁場側にシフトしている。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¹⁾。配位子のpKaの上昇に従い化学シフトが低磁場側にシフトするこの傾向は、σ機構がより支配的であることを表しているといえる。

このような結果を受け、本研究では、新たに、多核錯体についても検討を行うことを

銀(I)錯体、X線構造解析、固体¹⁰⁹Ag NMR

しまだようこ、きたがわすすむ、まつざかひろゆき、こんどうみつる

目的とし、ピリジンユニットを有するNドナー二配位型のポリマー及びそのユニットとなる単核錯体を合成し、構造を明らかにするとともに、固体銀NMRの比較検討を行った。

【実験】

多核錯体を作る配位子として、2,2'-ジピリジルケトン(dpyk)、ジピリジルアミン(dpya)、対応する単核錯体の配位子としては、2,2'-ベンゾイルピリジン(bzpy)、アニリノピリジン(anpy)を用いた。また、銀への配位を防ぐため、アニオンはBF₄またはPF₆とした。測定に用いた粉末、又は微結晶については、元素分析により同定した。装置はJEOL GSX270スペクトルメータを用いた。

【測定】 観測周波数12.5751MHz、観測幅20000Hz、point数8192、delay time 20 μs、dead time 26 μs、パルス幅8 μsにて測定を行った。サンプルは試料の密度によって0.25g-0.35g（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。接触時間は50msとし、繰り返し時間はそれぞれのサンプルによってそれぞれ20-30sの範囲で設定した。シフト基準には1M AgClO₄水溶液を用いた。

【結果および考察】

dpyk錯体とdpya錯体についてX線構造解析を行った結果、それぞれ、{[Ag(dpyk)](BF₄)_n、{[Ag(dpya)](PF₆)_nという組成であることが明らかとなった。{[Ag(dpyk)](BF₄)_nの結晶構造をFig.2.に示す。ピリジン環の二つのNがそれぞれ別の銀に配位しており、dprkは互い違いに銀を架橋し、全体として、一次元ポリマーを形成している。Ag-N距離は2.18Åで、通常の値となっており、N-Ag-N角は

180度で、銀は直線二配位構造となっている。また、Ag-O距離は、2.56Åとなっており、非常に弱く銀に配位していると考えられる。この錯体のNMRスペクトルを、Fig.3.に示す。このように、dpyk錯体については252 ppm、また、dpya錯体については232 ppmにそれぞれ単一のシグナルを得た。これらの値は今まで観測してきた2位置換ピリジン誘導体を配位子とするNドナー二配位錯体と比べて、やや高磁場側に位置していることがわかった。これらの値が、多核錯体特有のものであるかを確認するために、配位子として、bzpy、anpyを

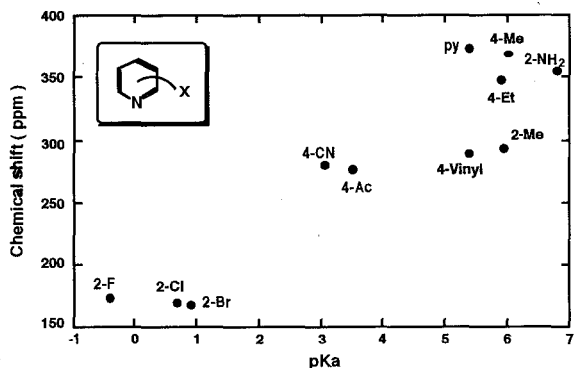


Fig.1. Correlation of observed ¹⁰⁹Ag NMR chemical shift with pKa values of ligands

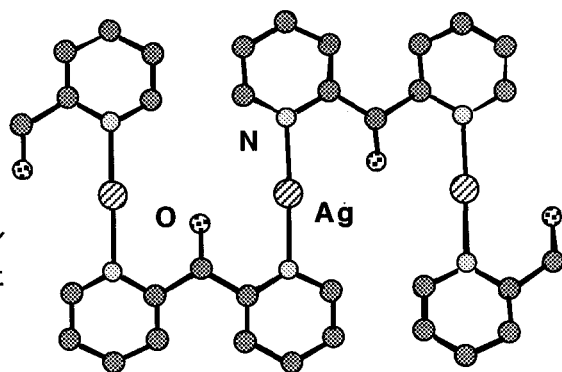


Fig.2. Crystal structure of {[Ag(dpyk)](PF₆)_n

用いて、そのユニットとなる単核錯体を合成し、固体 ^{109}Ag NMRを測定した。その結果、anpy錯体では496 ppmに単一のシグナルを、また、bzpy錯体では418 ppm、391 ppmに二本のシグナルを得た (Fig. 4.)。これらの値は、対応する配位高分子錯体に比べて約150~200 ppmも低磁場シフトをしていることがわかった。また、今まで観測してきたピリジン誘導体を配位子として有するNドナー二配位型の単核銀錯体と比べても、かなり低磁場側に位置していることが明らかとなった。加えて、bzpy錯体では、二本のシグナルが観測されたことから、この錯体中に、二種類の非等価な銀が含まれていることが示唆された。そこで、このbzpy錯体について、X線結晶構造解析を行ったところ (Fig.5.)、bzpy錯体では、実際に、配位子と銀が2対1の同じ組成を持つてはいるものの、結晶学的に相異なる分子が2つ存在することが明らかとなった。Ag-N及びAg-O距離は、図中に示した様な値となっており、ともに、対応する配位高分子錯体のものと同程度の値となっている。また、N-Ag-N角は、163.8、168度と直線からかなり折れ曲がっていることが明らかとなった。

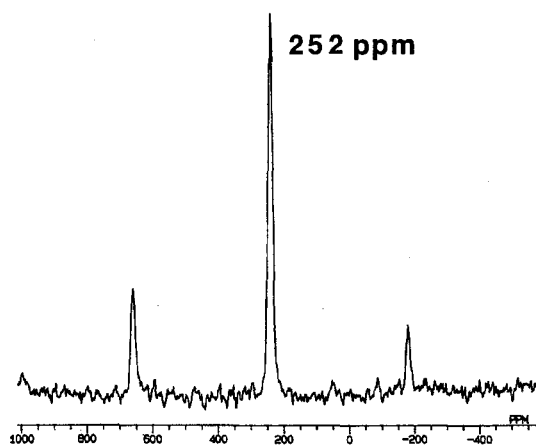


Fig.3. ^{109}Ag NMR spectra of $\{[\text{Ag}(\text{dpyk})](\text{PF}_6)_n\}$

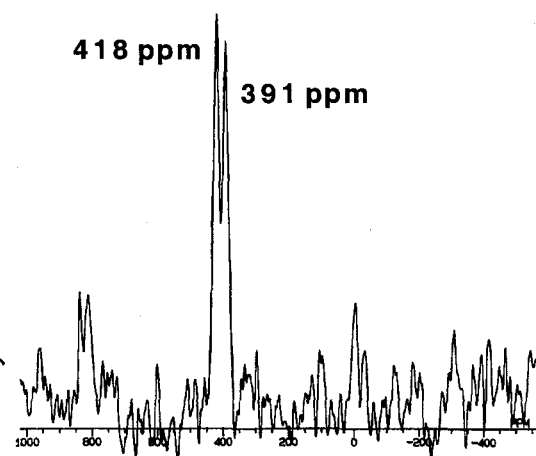


Fig.4. ^{109}Ag NMR spectra of $[\text{Ag}(\text{bzpy})_2](\text{PF}_6)$

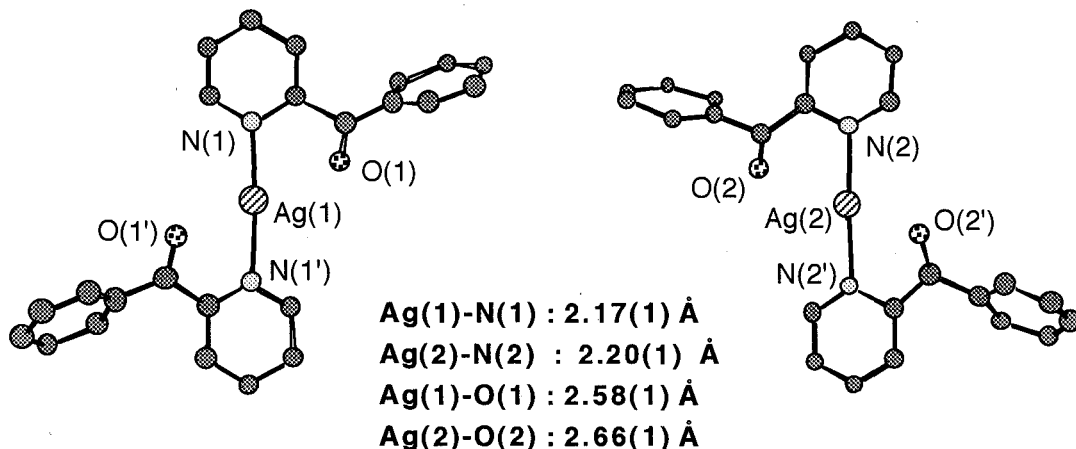


Fig.5. Crystal structures of $[\text{Ag}(\text{bzpy})_2](\text{PF}_6)$

dprk多核錯体及びbzpy単核錯体について、銀の配位環境の違いをFig.6.に示す。配位高分子錯体の方では、N-Ag-N角、O-Ag-O角ともに180度で、図に示した全てのAg、N、Oは同一平面上にのっていることがわかった。一方単核錯体では、N-Ag-N角、O-Ag-O角がそれぞれ、図中に示したような値となっており、非常にゆがんだテトラヘドラル型をしていることがわかった。

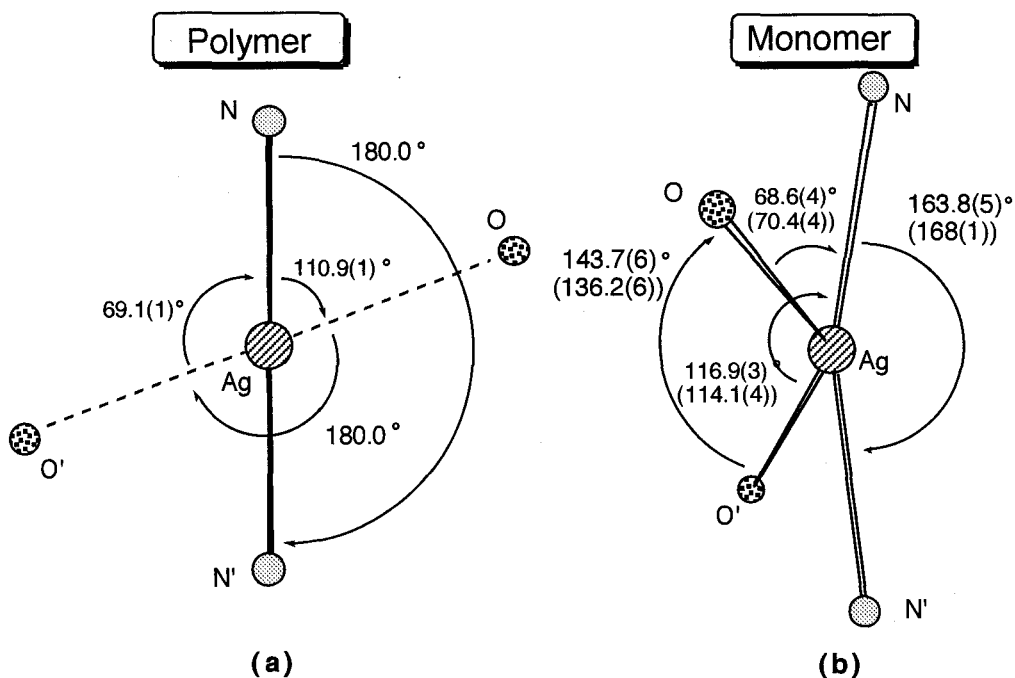


Fig.6. Coordination geometries of (a)[Ag(dpyk)](PF₆)_n and (b)[Ag(bzpy)₂](PF₆)

単核錯体では、N-Ag-N角が180度から大きく折れ曲がることにより、カルボニル酸素が、テトラヘドラル的に配置され、その結果、銀がより4配位に近くなったことが、大きな低磁場シフトもたらしたものと考えられる。X線構造解析では、Agのみに注目すると、N₂そしてO₂が弱く関与した同様の構造でも、銀NMRは極めて鋭敏にその差を示すことが明らかとなった。anpy錯体でも、496 ppmと非常に低磁場側にシグナルが観測された。こちらの錯体については、良好な単結晶がまだ得られておらず、結晶構造解析はまだ行っていないが、アミン上の不対電子が銀核に何らかの影響を与えていることが示唆された。

(1)H.Nakatsuji, et. al. J.Am.Chem.Soc.,106,4653(1984).

¹³C NMR化学シフトテンソルによる
ペプチドおよびポリペプチドの水素結合についての研究

(東工大工) ○亀田恒徳、黒子弘道、安藤慎治、安藤 勲

¹³C NMR Chemical Shift Tensors of Amide Carbonyl Carbon in Peptides and Polypeptides, and Its Application to the Helical Conformational Analysis

T. Kameda, H. Kurosu, S. Ando and I. Ando

*Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology,
Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152*

Abstract

¹³C chemical shift tensor components (δ_{11} , δ_{22} and δ_{33}) of glycine (Gly) residue carbonyl carbons (C=O) of peptides and polypeptides covering a wide range of hydrogen-bond lengths ($R_{N\cdots O}$) in the crystalline state have been measured by slow magic-angle-spinning solid-state ¹³C NMR. From these experiments, it is found that δ_{22} which lies approximately along the amide C=O bond moves linearly downfield with a decrease in $R_{N\cdots O}$. Using this relationship, the ¹³C NMR chemical shift (δ_{22}) contour maps of Gly amino acid residue carbonyl carbons in polypeptides as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ) in the vicinity of the α -helix conformation were made, and were applied to the helical conformational analysis.

Introduction

From the experimental results reported previously [1-4], it has been shown that the isotropic ¹³C chemical shifts (δ_{iso}) of Gly, Ala, Val, Leu, and Asp residues move linearly downfield with a decrease in hydrogen-bond length ($R_{N\cdots O}$) between nitrogen and oxygen atoms in an amide type hydrogen-bond. On the other hand, it has been demonstrated that the ¹³C NMR chemical shifts on the C α , C β and the amide carbonyl (C=O) carbons of peptides, polypeptides and proteins in the solid state are strongly affected by the main-chain conformation, that is the dihedral angles (ϕ , ψ) of the skeletal bonds [5]. From these previous results, it can be said that the ¹³C chemical shift on the amide carbonyl carbon in polypeptides is closely related to not only the main-chain conformation, but also the hydrogen-bond length. In the helical region it is apparent from the structural requirement that in the helical conformation formed by intramolecular interactions there is close relationship between the dihedral angles (ϕ , ψ) and hydrogen-bond length for the peptides and polypeptides. Therefore, if in the right-handed helix region (the dihedral angles ($\phi = -110^\circ \sim -20^\circ$ and $\psi = -110^\circ \sim -20^\circ$)) the dihedral angles (ϕ , ψ) are fixed, the hydrogen-bond length and angle are immediately determined. This means that the conformation-dependent ¹³C chemical shift of the amide carbonyl carbon comes from the hydrogen-bond length change through a change of the dihedral angles (ϕ , ψ).

From such a point-of-view, at first, we aim to study systematically the hydrogen-bonding effects on the principal values of the ¹³C chemical shift tensor for Gly residue carbonyl carbons of peptides and polypeptides in the crystalline state and to elucidate the relationship between the tensor components and hydrogen bond length. Secondly, we aim to make the ¹³C chemical shift contour map of the amide carbonyl carbon of some amino acid residues as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ) in the vicinity of the helix region by

キーワード：固体NMR、化学シフトテンソル、ペプチド、量子化学計算、水素結合
かめだつねのり、くろすひろみち、あんどうしんじ、あんどういさお

using the relationship between the ^{13}C chemical shift and hydrogen-bond length reported previously and to justify whether this contour map reasonably explains the experimental ^{13}C chemical shift behavior or not.

Experimental

Materials and ^{13}C NMR measurement : A series of peptides containing Gly residue, for which the crystal structures had previously been determined by X-ray diffraction, was used. ^{13}C CP-MAS (cross polarization-magic angle spinning) NMR spectra were recorded at room temperature using a JEOL GSX-270 NMR spectrometer at 67.8 MHz with a CP-MAS accessory. Samples were contained in a cylindrical rotor and spun at 1530~1750 Hz. ^{13}C chemical shifts were calibrated indirectly through the adamantane peak observed at upperfield (29.5 ppm relative to tetramethylsilane ((CH_3) $_4\text{Si}$)). The ^{13}C chemical shift tensor components were determined from the slow MAS sideband intensities by the Herzfeld and Berger method [9].

Calculation of the hydrogen-bond lengths and angles as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ) : Polypeptides with the helical conformation form intramolecular hydrogen bonds for stabilizing its conformation. The hydrogen-bond length and angle are closely related to the main-chain helical conformation with any specified dihedral angles (ϕ , ψ) in the vicinity of the α -helix form. Thus, when the standard geometries are used for the bond lengths and bond angles [6], the main-chain conformation and also the hydrogen-bond length and angle can be immediately determined by giving the dihedral angles (ϕ , ψ) [7].

In geometrical calculations on intramolecular hydrogen-bond length ($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$) between nitrogen and oxygen atoms in the $>\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}<$ form and hydrogen-bond angle ($\angle\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}$), we adopted a pentapeptide molecule as the model of polypeptides. The α -helical conformation for the pentapeptide is shown in Fig. 1, where the dotted line shows the intramolecular hydrogen bond. The bond lengths and bond angles are assumed to be same for all of the amino acid residues except for $\angle\text{C}(=\text{O})-\text{C}_\alpha-\text{N}$ (θ). The bond lengths for $\text{N}-\text{C}_\alpha$, $\text{C}_\alpha-\text{C}(=\text{O})$, $\text{C}(=\text{O})-\text{N}$ and $\text{C}=\text{O}$ bonds are assumed to be 1.453, 1.530, 1.325 and 1.230Å, respectively, and the bond angles for $\angle\text{C}_\alpha-\text{C}(=\text{O})-\text{N}$, $\angle\text{O}-\text{C}-\text{N}$, $\angle\text{O}-\text{C}-\text{N}$, $\angle\text{C}_\alpha-\text{C}=\text{O}$ and $\angle\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{C}_\alpha$ are assumed to be 115.0°, 124.5°, 120.5° and 121.0°, respectively [6]. As the bond angle θ , 111.0° for the Gly residue is used [6]. The angle ω is fixed to be 180° for all of the amino acid residues. By using these bond lengths and bond angles, the hydrogen-bond length and angle for any specified helix forms in polypeptides can be calculated as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ) in the skeletal bonds. The calculations were carried out at intervals of 1° by changing the dihedral angles (ϕ , ψ) from -110° to -20° in the vicinity of the right-handed α -helix form ($\phi=-57.4^\circ$ and $\psi=-47.5^\circ$). The obtained hydrogen-bond lengths and bond angles are shown as the contour map as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ) in Fig. 2.

Results and Discussion

Correlation between the hydrogen-bond length and ^{13}C chemical shift tensor components of Gly, Val, Leu, and Asp residue carbonyl carbons : Fig. 2 shows the plots of the ^{13}C chemical shift tensor components (δ_{11} , δ_{22} and d_{33}) against $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ for Gly residues. The δ_{22} for Gly residues moves linearly downfield with a decrease in $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ [5]. The expression for the relationship as determined by the least-mean squares method for the oligopeptides containing Gly residue is expressed as follows

$$\delta_{22} = 262.9 - 30.2R_{\text{N}\cdots\text{O}} \quad (\text{correlation coefficient} = 0.89) \quad (1)$$

where δ_{22} and $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ are in ppm and Å, respectively. This relationship indicates that $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ can be determined through the observation of ^{13}C chemical shift tensor of δ_{22} for the

carbonyl carbon of Gly residue in oligopeptides within an error of ± 0.7 ppm. It should be noted that the Gly C=O carbon chemical shifts for poly(Gly) with β -sheet form and 3_1 -helix form are located on a straight line as expressed by eq.(1). This shows that the relationship can be applied to polypeptides.

^{13}C chemical shift contour maps for the carbonyl carbon of the Gly residue : The bold solid line in Fig. 3 shows the $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ contour maps as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ) for the Gly residue in the vicinity of the right-handed α_{R} -helix form, respectively. $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ is expressed in \AA at 0.1\AA intervals in the range from 2.5 to 3.0\AA . It can be seen that the contour lines on the map distributes from the left upside ($\phi = -110^\circ$, $\psi = -20^\circ$) and the right downside ($\phi = -20^\circ$, $\psi = -110^\circ$) in Fig. 3, and the region of the contour line decreases with a decrease in $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$. As shown in Fig. 3, as the dihedral angles (ϕ , ψ) are changed, the hydrogen-bond angle is changed together with a change of $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$. The broken lines in Fig. 3 shows the hydrogen-bond angle ($\angle\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}$) contour map as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ). The angle $\angle\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}$ is expressed in degree ($^\circ$) at 20° intervals in the range from 90° to 180° . As seen from these figures, the deviation of the dihedral angles(ϕ , ψ) from ($\phi=-57.4^\circ$, $\psi=-47.5^\circ$) (the α -helix form) leads to the deviation of the angle $\angle\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}$ from 180° (the linear hydrogen-bond). Using eq. (1) and the calculated $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ map for the Gly residue (Fig. 3), the δ_{22} contour map for polyglycine (poly(Gly)) was made as functions of the dihedral angles(ϕ , ψ) as shown in Fig. 4. From this result, it can be said that the possible dihedral angles (ϕ , ψ) for unknown conformations of polypeptides can be predicted by the δ_{22} contour map (Fig. 4) for the amide carbonyl carbon.

The hydrogen-bond angle is within any specified range, in which the hydrogen-bond forms. Most of the $\angle\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}$ values for oligopeptides and polypeptides used in our previous works [1-4] is within the range from 145° to 165° , and the averaged value and the standard deviation are 156° and $\pm 4^\circ$, respectively. From this limitation, the acceptable region in the δ_{iso} contour maps is between the hydrogen-bond angle contour lines at $\angle\text{C}=\text{O}\cdots\text{N} = 152^\circ$ and 160° , and so the optimum dihedral angles (ϕ , ψ) are predicted to be the cross point of the hydrogen-bond angle contour line at $\angle\text{C}=\text{O}\cdots\text{N} = 156^\circ$ and the ^{13}C chemical shift contour line.

Similarly, using the linearly relationship between the δ_{iso} and $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$, and the calculated $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ map for the *L*-Ala, *L*-Leu, *L*-Val, and *L*-Asp residues, the δ_{iso} contour maps for poly(*L*-Ala), poly(*L*-Leu), poly(*L*-Val) and poly(*L*-Asp) were made as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ), and was applied to the helical conformational analysis. These will be presented in the poster.

References

- [1] S. Ando, T. Yamanobe, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki, R. Tabeta and H. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, 107(1985)7648 [2] N. Asakawa, S. Kuroki, H. Kurosu, I. Ando, A. Shoji, and T. Ozaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 3261 [3] K. Tsuchiya, A. Takahashi, N. Takeda, N. Asakawa, S. Kuroki, I. Ando, A. Shoji and T. Ozaki, *J. Mol. Struct.*, 350 (1995) 233 [4] T. Kameda, N. Takeda, S. Kuroki, H. Kurosu, S. Ando, A. Shoji and T. Ozaki, *J. Mol. Struct.*, in press [5] For example, (a)H. Saito, T.Tabeta, A. Shoji, T.Ozaki, I. Ando and T. Asakura, in 'Magnetic Resonance in Biology and Medicine', eds. G.Govil, C.L.Kheterapal and A. Saran, Tata McGraw-Hill, New Delhi, (1985)195 ; (b)H. Saito and I. Ando, *Ann. Rept. NMR Spectroscopy*, Vol.26, p.349, Academic Press, London(1989) ; (c)I. Ando and S. Kuroki, in 'The Encyclopedia of NMR', p.4458, John-Wiley, New York(1996) [6] F.A. Momany, R.F. MacGuire, A. W. Burgess and H.A. Sheraga, *J. Phys. Chem.*, 79 (1975) 2361 [7] A. G. Walton, in 'Polypeptides and Protein Structure', ed. R.Glasgow, Elsevier North Holland, (1981) [9]J.Herzfeld and A.E.Berger, *J.Chem.Phys.*, 73(1980)6021

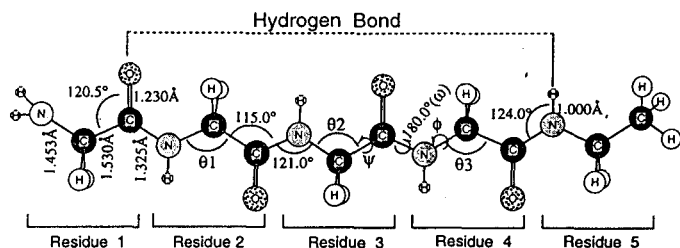


Fig.1 Molecular structure of a pentapeptide molecule. The possible hydrogen bond in forming the α -helix form is shown by the dashed line. The definition of the dihedral angles (ϕ , ψ) is indicated. As the bond angle θ ($\angle C(=O)-C\alpha-N$), 111.0° for the Gly residue and 109.3° for the *L*-Ala, *L*-Leu, *L*-Val and *L*-Asp residues are used.

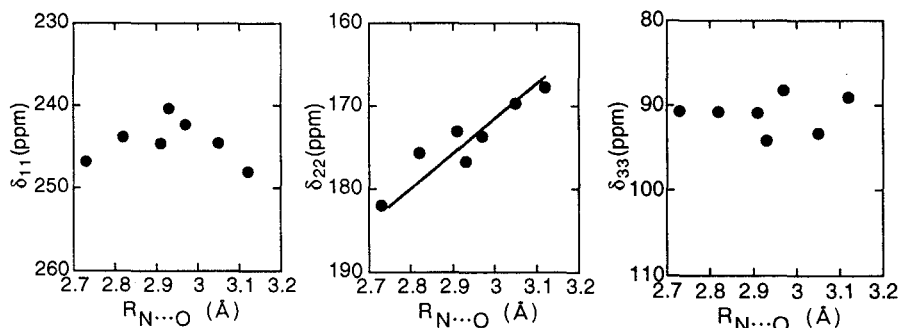


Fig.2 Plots of the observed ^{13}C chemical shift tensor components (a) δ_{11} , (b) δ_{22} , (c) δ_{33} for the amide carbonyl carbon in the Gly residue in Gly-containing peptides and polypeptides against the $\text{N}\cdots\text{O}$ hydrogen-bond length.

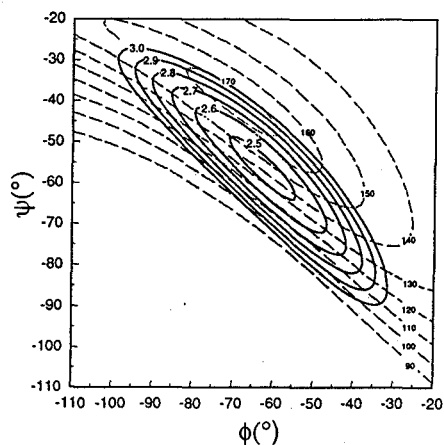


Fig.3 The hydrogen-bond length ($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$) and angle contour maps as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ) for the Gly residue. The hydrogen-bond length and angle contour line are represented by the solid and dotted lines, respectively. The $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ and angle are expressed by \AA and degree ($^\circ$), respectively.

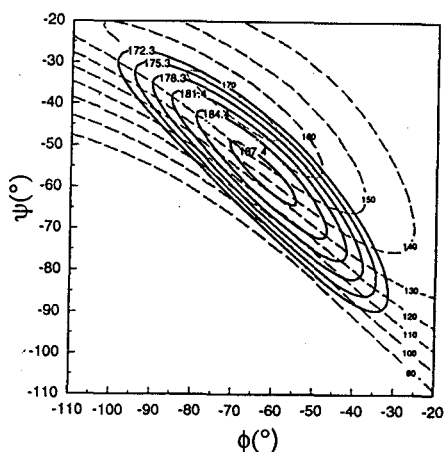


Fig.4 The δ_{22} contour maps for Gly residue carbonyl carbon as functions of the dihedral angles (ϕ , ψ).

Determination of Cis-Trans Conformation in PPA-d₁ by NQC EffectShigeyuki Matsunami¹, Toyoji Kakuchi¹, and Fumiaki Ishii²¹ Division of Bioscience, Graduate School of Environmental Earth Science,² Department of Applied Physics, Faculty of Engineering,

Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060, JAPAN

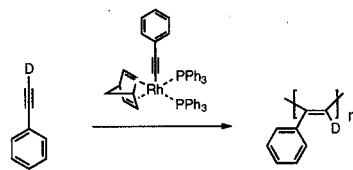
Chain configurations due to thermal isomerization for poly (phenyl-acetylene-d₁) (PPA-d₁) were investigated by ²H solid state NMR. The observed ²H NMR line shapes at -100 ° C for PPA-d₁ and its annealing sample, An-PPA-d₁ consisted of both large and small Pake-doublet-peaks, which were attributed to the static segments and the mobile end-groups in the polymer chain, respectively. Deuterium nuclear quadrupole coupling constants of the large doublet peaks for PPA-d₁ and An-PPA-d₁ were the values of 164 and 168 kHz, respectively. The quadrupole coupling constants and the formation energies of various chain configurations were calculated from semiempirical molecular orbital methods. Agreement between theory and experiment confirmed that an exothermic peak at 177 ° C in the DSC thermogram for PPA-d₁ is due to the *cis-trans* isomerization from the *cis-transoidal* form to 80 ° -deflected *trans-transoidal* one.

【序論】

置換ポリアセチレンはその主鎖骨格にポリエンを有し, *cis-trans*異性化によって導電性, 非線形光学特性, 磁性などの物性を向上させることが期待されている。特に, 発熱反応により置換ポリアセチレンは *trans*形態に異性化すると考えられているが, ポリ(アセチレン)と異なりその実験的検証がほとんどない。我々はRh触媒で合成された*cis*-ポリ(フェニルアセチレン-d₁)の²H-NMRを測定し, 発熱ピーク後の²H核の四重極相互作用定数(NQCC)の増加を確認した。この増加が熱異性化後の*trans*主鎖構造によっていることを半経験的分子軌道法(AM1, PM3)による, 主鎖の分子鎖配座とNQCCとの関係から決定できたので報告する。

【実験】

試料はRh(C≡C-C₆H₅)(Ph₃P)₂触媒で合成された*cis*-ポリ(フェニルアセチレン-d₁)(PPA-d₁)である。アニーリング試料(An-PPA-d₁)は, ガラス管内で窒素雰囲気のもと, 180 ° Cで1時間加熱し調製された。加熱後, An-PPA-d₁はクロロホルムに溶解させ, *n*-ヘキサンで再沈殿し精製された。分光器はBruker ASX-300 (²H共鳴周波数: 46.07MHz)で, ²Hスペクトルは四重極エコーシーケンズ(90_x-τ₁-90_y-τ₂-aq)を用い, 90度パルスは3.8 μs, エコー時間は20 μs, 繰り返し時間は5sで測定された。半経験的分子軌道計算はMOPACver.6の



Scheme 1

キーワード: ポリ(フェニルアセチレン-d₁), 重水素NMR法, 半経験的分子軌道法, デフレクト構造

○まつなみ しげゆき, かくち とよじ, いしい ふみあき

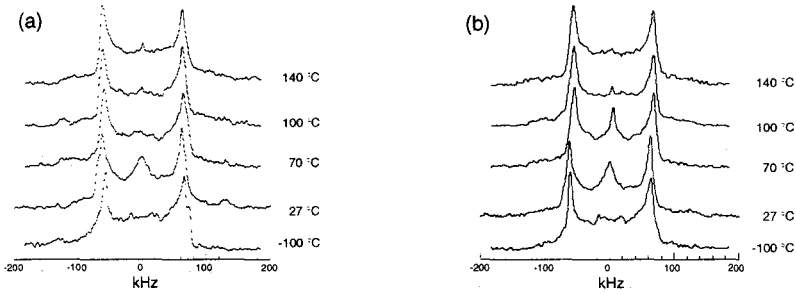


Fig. 1. Temperature dependence of ^2H quadrupole echo NMR spectra of (a) PPA- d_1 and (b) An-PPA- d_1 at 46.07 MHz.

AM1とPM3を用い、NQCC, D核の電子密度, C-Dの結合次数, C-D bond長, および生成エンタルピーの値をPPA- d_1 の5量体をモデルとし, その周期的境界条件下で評価した。

【結果および考察】

A. ^2H -NMRの線形

Fig.1は-100, 27, 70, 100, そして140 °CにおけるPPA- d_1 とAn-PPA- d_1 の ^2H -NMRスペクトルである。

-100 °Cにおいて, 各試料の ^2H -NMRの線形は2つのPake軸対称スペクトルからなり, そのダブルレットピークから算出した四重極相互作用定数(NQCC)はPPA- d_1 で164 kHzと44 kHz, An-PPA- d_1 では168 kHzと48 kHzの大きさを示した。各試料に対するアウターのダブルレットピークは温度変化によらずその幅が一定であるが, インナーのピークは昇温するにつれてブロードなシングレットになり, 70 °C以上になると狭化するとともに強度が減少した。これらのことは, アウターとインナーピークのスペクトルがそれぞれポリマー内のstaticとmobileな二つの領域のC-D部位に寄っていることを示している。

B. 四重極相互作用定数

An-PPA- d_1 に対するstatic C-D部位のNQCC($e^2q_D Q_D/h$)はPPA- d_1 のものよりも4kHz大きいので, 我々は半経験的分子軌道計算を用い, NQCCと分子鎖配座の関係を調べた。一般に, NQCCの電場勾配 q_D は分子軌道 ψ^k ($k = 1, 2, \dots, N$)を用いて

$$q_D = -e \sum_i N_i \left\langle \psi^k \left| \frac{(3 \cos^2 \theta_k - 1)}{r_k^3} \right| \psi^k \right\rangle + e \sum_{K=1}^N \frac{Z_K (3 \cos^2 \theta_K - 1)}{r_{DK}^3}, \quad (1)$$

$$= q_D^{\text{elec.}} + q_D^{\text{nucl.}}$$

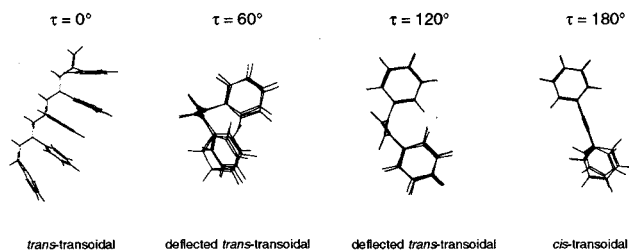
と表される。第1項と第2項は, それぞれ電子 k からの寄与($q_D^{\text{elec.}}$)と核 D のまわりに存在する核 K からの寄与($q_D^{\text{nucl.}}$)で, N は電子の数である。LCAO-MO近似をおこなうと(1)は

$$q_D = \sum_i N_i \left\{ \sum_k c_{ik} q_k^e + \sum_k c_{ik} q_k^e + \sum_{j,c} c_{ij} c_{jk} q_D^e + \sum_{j,c} c_{ij} c_{jk} q_D^e \right\} + q_D^{\text{nucl.}}, \quad (2)$$

となる。ここで, c_{ij} は i 番目の原子関数 $\phi_i(r = \alpha, \beta)$ の展開係数である。(2)で

$$q_D^{\text{elec.}} = e \left\langle \phi_i \left| \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{r^3} \right| \phi_j \right\rangle, \quad (\alpha, \beta = i, j, k), \quad (3)$$

であり, 添字 i は重水素核 D の軌道を, また j, k は他の核の軌道を示している。CottonとHarris²⁾らと同様に多



Scheme II

中心積分についての簡略化とMullikenの関係を用いると、 q_D は

$$q_D = \sum_j f_j \left\{ q_D^j + \frac{P}{\sum_j f_j} \right\}, \quad (4)$$

となる。ここで棒印は非コア軌道についての電場勾配を表し、 P を含む項はSternheimer効果で重水素核では無視しうる。係数 f_j は

$$f_j = \sum_k N \left\{ |c_k|^2 + \sum_{\alpha\beta} c_{k\alpha} c_{k\beta} S_{\alpha\beta} \right\}, \quad (5)$$

で与えられる。(5)の第1項と第2項はそれぞれ核Dにおける電子密度と結合次数で、 $S_{\alpha\beta}$ は重なり積分である。従って、NQCCは

$$\frac{e q_D Q_D}{h} = \sum_j f_j \left\{ \frac{e q_D^j Q_D}{h} \right\}, \quad (6)$$

となる。MO計算において、ポリマーの構造はtrans-transoidal, trans-cisoidal, cis-transoidal型の共役平面構造と、単結合まわりに正負の順で回転したデフレクトトランス構造とした。主鎖の二重結合に関する二面角をデフレクト角(τ)と定義し、分子鎖配座を $\tau = 0^\circ$ (trans-transoidal)から 180° (cis-transoidal)まで 10° おきに変化させ、構造最適化したものがScheme IIに示されている。

Fig.2は生成エンタルピー $-\Delta H_f$ のデフレクト角依存性を示している。AM1では $\tau = 130^\circ$ の時に ΔH_f の最小値219.19 kcal/molとなり、その後 80° と 90° の間で222.00 kcal/molのステージをとった。一方、PM3では 100° で211.23 kcal/molの最小値をとった。両者の計算結果は、デフレクト主鎖構造が各共役平面構造よりも安定であることを示している。

Fig. 3はNQCCとC-D bond長のデフレクト角依存性を示している。C-D bond長のデフレクト角依存性はAM1とPM3で等しかった。デフレクト角がcis-transoidalからtrans-transoidalに移行するにつれてC-D bond長は短くなり、 90° 以下の角度では一定値 1.095\AA となった。

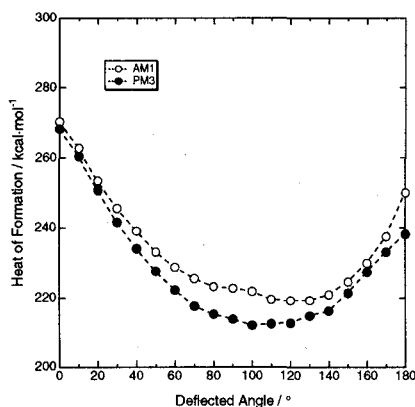


Fig. 2. Deflected angle dependence of the heat of formation energy in PPA of 5-conformers using AM1 and PM3 Hamiltonian.

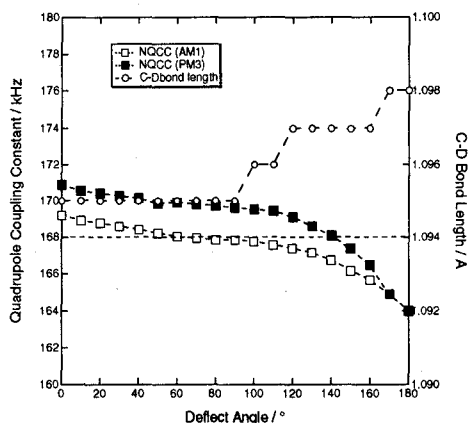


Fig. 3. Deflected angle dependencies of the nuclear quadrupole coupling constant (NQCC) and C-D bond length in PPA of 5-conformers using AM1 and PM3 Hamiltonian.

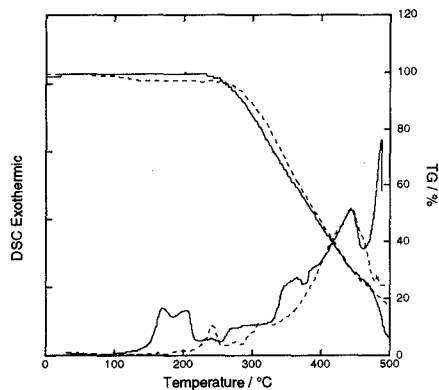


Fig. 4. Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) measurements of PPA- d_1 (solid line) and An-PPA- d_1 (dashed line) under flowing N_2 .

方, NQCCは90°と180°の間で急激に増加し, 90°以下で僅かずつ増加する。このことは, C-C単結合まわりの配座の変化が, C-Dボンド長や主鎖のC=C結合の電子状態に深く寄与し, NQCC変化に密接に反映している。点線は実測のNQCCの値, 168 kHzである。この実験値をMO計算で得られた計算値と比較すると, AM1では $\tau = 80^\circ$ で, PM3では $\tau = 140^\circ$ で一致している。この角度に相当する生成エンタルピーはAM1では222 kcal/mol, PM3では215 kcal/molとなっている。この ΔH_f は, AM1では最小値の ΔH_f より3 kcal/mol大きいのにに対し, PM3では4 kcal/mol大きい。AM1の計算結果はPM3より1 kcal/mol小さいので, 80°-デフレクト *trans-transoidal*構造は140°-デフレクト構造より安定であると解釈できる。従って, 発熱反応後のNQCCの4kHzの増加は *cis-transoidal*構造から80°-デフレクト *trans-transoidal*構造に異性化することに起因していることが明らかとなった。

C. DSC測定

Fig.4はPPA- d_1 とAn-PPA- d_1 のDSCおよびTGA測定のチャートである。PPA- d_1 のDSCでは, 177と212°Cに7 kcal/molの発熱ピークが観測された。その後, 280°C以上で重量減少が始まり, それとともに大きな発熱反応が生じた。一方, An-PPA- d_1 では, 244°Cに0.6 kcal/molの発熱ピークが測定されたが, PPA- d_1 とは異なり230°C以下には発熱反応は確認されなかった。重量減少は290°Cから発熱反応を伴って始まった。先に示したMO計算の結果とあわせ, PPA- d_1 におけるDSCの177°Cの発熱反応が *cis-transoidal*からdeflected *trans-transoidal*構造へ異性化することを検証できた。これは以前, 我々が報告したクラウン型ポリアセチレンの双極子相互作用から計算した結果とも一致していた。³⁾

[References]

- 1) Y. Kishimoto, P. Eckerle, T. Miyatake, T. Ikariya, and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 12131.
- 2) F. A. Cotton and C. B. Harris, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1966, **56**, 12.
- 3) S. Matsunami, T. Kakuchi, F. Ishii, to be submitted to *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*

3P20 HMBC法の新しい測定法、---- 3D-HMBC法の開発

東大農・応生化、⁺日本電子、*東大・分生研

○降旗一夫、⁺阿部敦、*瀬戸治男

DEVELOPMENT OF A NEW TECHNIQUE, 3D-HMBC

K. Furihata, ⁺A.Abe and H. *Seto

Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo

⁺JEOL, Ltd.;

*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo

In order to overcome the problems of HMBC associated with the setting of delay time for observing small long range couplings and short T_2 with broad methylene proton signals, we have developed a new technique, 3D-HMBC. In the pulse sequence of this method, delay time (Δ), which has to be fixed to an appropriate value (typically 60msec) in the conventional 2D-HMBC, is replaced by a variable parameter (t_1). This modification enables to cover wide delaytime range needed to observe from small to large long range couplings and thus gives better HMBC spectra than obtained by the conventional method.

はじめに

天然有機化合物の構造解析において、良好なHMBCスペクトルを得ることが構造研究の重要なポイントになっている。HMBC法の問題点の一つは、予想されるスピン結合に対応したスピン展開時間 (Δ) を設定しなければならない。スピン展開時間 (Δ) の設定値が不適切な場合は、シグナルは観測されない。また観測するプロトンが多数のプロトンとスピン結合してブロードなシグナルとなっている場合、あるいは炭素とのスピン結合が小さい場合はクロスピークの観測がしばしば困難となる。

また、 T_2 の短いブロードなプロトンはシグナルの減衰が速いために、観測されないことがしばしばある。今回はこれらの問題を解決するための一つの試みとして、新しいHMBCの応用測定、3D-HMBC法を検討し、良好な結果を得ることができたので報告する。

3D-HMBCパルス系列と方法

図1に3D-HMBC法のパルス系列を示す。このパルス系列は、2D-HMBCのパルス系列の Δ_2 を t_1 、 t_1 を t_2 に置き換えて3D-HMBCパルス系列としたものである¹⁾。3D-NMRは、二つの2D-NMR法の組み合わせからなる。この場合は、singlパルス2D-NMR法と2D-HMBC法である。HMBC法では、スピン展開時間 (Δ) が重要な設定パラメーターである。スピン展開時間 (Δ) に適合しないプロトンは観測されない。3D-HMBC法は、このスピン展開時間 (Δ) を t_1 として時間展開する方法である。

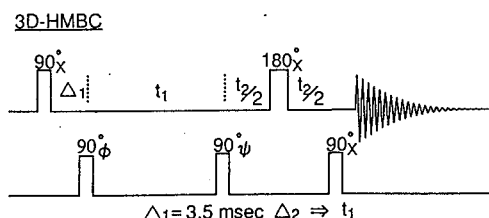


図1. パルス系列

HMBC、3D-HMBC

ふりはたかずお、 あべあつし、 せとはるお

3D-NMR法では、複雑な2D-NMRのクロスピークを三次元空間に拡大し、スペクトルの解析を容易にする。3D-HMBCスペクトルでは、 F_1 軸がプロトン、 F_2 軸が炭素、 F_3 軸がプロトンの3D-NMR (図2) となる。 F_1 軸のプロトン H_A のスライススペクトルではプロトン H_A からのHMBCスペクトルが得られ、同様にプロトン H_B のスライススペクトルではプロトン H_B からのHMBCスペクトルが得られ、複雑な二次元NMRが非常に単純化されている。図2には F_2/F_3 軸projectionデータを示す。

しかし今回の我々の目的はこのような3D-HMBCスペクトルのスライスデータを得ることではなく、このprojectionデータ (図2右) を得ることにある。3D-HMBC法では F_1 の観測領域をプロトンの化学シフト($\Delta t_1=200\text{usec}\sim 500\text{usec}$) で展開し3D-NMRデータを得る。この場合は、多数のデータ点を取得しないとJ変調の効果を F_2 軸に移行させることができない。これに対して、 F_1 の観測領域の化学シフトを無視し、 $\Delta t_1=5\sim 10\text{msec}$ で16~32点展開する。その結果、小さなマトリックスのスペクトルとなり、しかも、効果的に long range J-変調の効果を F_2 軸に移行させることができる。

3D-HMBCスペクトル

図3にポートミシンの3D-HMBC projectionスペクトルを示す。測定条件は $F_1(^1\text{H}) \times F_2(^{13}\text{C}) \times F_3(^1\text{H}) = 2200 \times 1400 \times 2200 \text{ Hz}$ 測定ポイントは $64 \times 150 \times 256$ 、積算回数2回、PFGを使用して約8時間測定した。

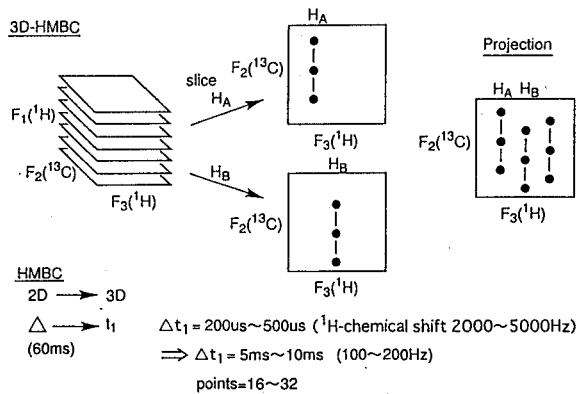


図2. 3D-HMBCクロスピーク模式図

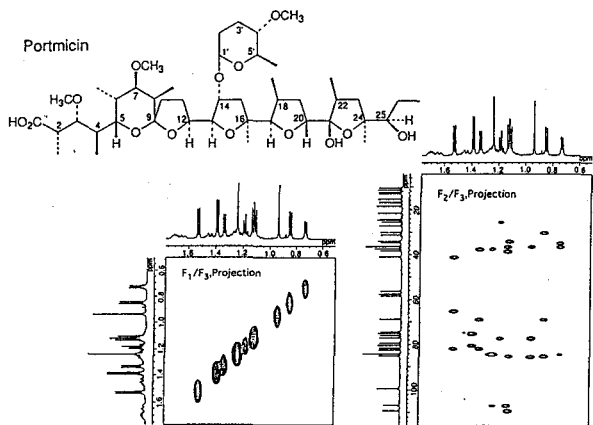


図3. ポートミシン3D-HMBC投影スペクトル F_1/F_3 Projection(左)、 F_2/F_3 Projection(右) $F_1 \times F_2 \times F_3 = 2250 \times 14000 \times 2250 \text{ Hz}$, point=64 x 150 x 256 $\Delta t_1=0.44\text{ms}$, scans=2

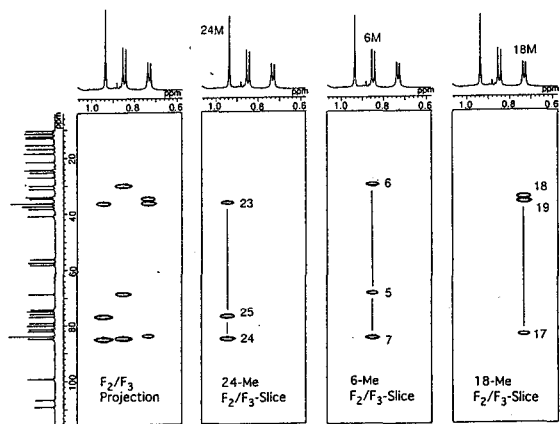


図4. ポートミシン3D-HMBCスライススペクトル 3D-HMBCの F_2/F_3 Projection spectrumと F_1 プロトン24Me,6Me,18Meからの slice F_2/F_3 spectrum

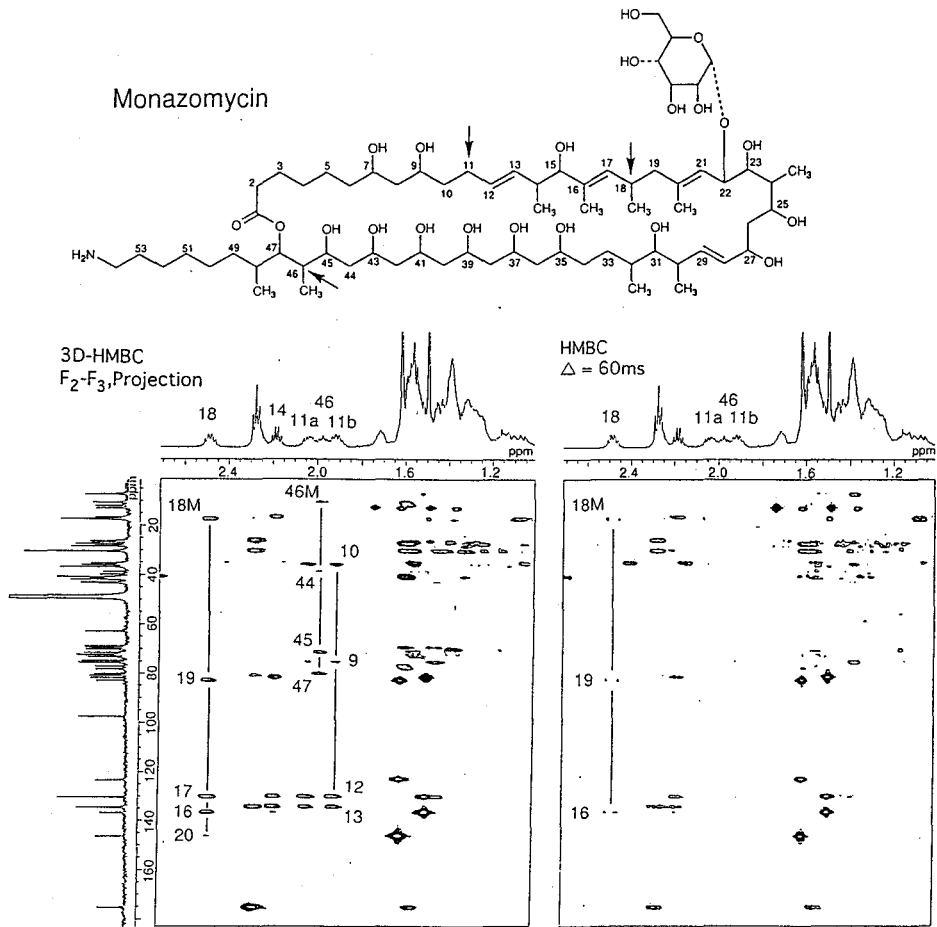


図5. モナゾマイシン 3D-HMBC

F₂/F₃ Projection(左)、2D-HMBC(右)

F₁ × F₂ × F₃ = 125 × 23000 × 2900Hz, point = 16 × 256 × 512

Δt_{ini} = 20ms, Δt₁ = 4ms, scans = 4

F₁/F₃ projectionデータではプロトン-プロトンの化学シフトが対角軸に観測されるのみである。F₂/F₃ projection、F₁/F₂ projectionでは、通常のHMBCスペクトルと同様なスペクトルが得られる。図4にはポートミシンの3D-HMBCスペクトルで得られたF₂/F₃ projection拡大スペクトル(左)とF₁軸のプロトンの24Me, 6Me, 18Meからのスライスを示す。Projectionスペクトルと比較して、スライススペクトルでは分離のよい単純なスペクトルになっていることが容易にわかる。

このように、3D-NMRスペクトルでは複雑な2D-NMRスペクトルを次元を高めることにより、スペクトルを単純化できるため、解析を容易にする。しかし、ここでの目的は、このスライスデータを得ることではなく、projection手法を使用して良好な2D-HMBCスペクトルを得ることにある。

モナゾマイシンへの応用

図5にモナゾマイシンの3D-HMBC projectionスペクトルを示す。

$F_1 \times F_2 \times F_3 = 125 \times 23000 \times 2900$ Hz
 で測定したデータである。測定ポイント
 は $16 \times 256 \times 512$ point である。
 t_1 の初期値として 20msec を設定し、
 $\Delta t_1 = 4$ msec で展開した。測定時間は
 7時間である。2D-HMBCスペクトル
 (図5右) は、 Δ を 60msec に設定
 し同一時間で測定した。

2D-HMBCスペクトルでは18位、
 46位、11位のブロードなシグナルか
 らはクロスピークが観測されてい
 ない。これに対して、3D-HMBC

スペクトルでは、18位のプロトンからは18Me、19、17、16のクロスピークが観測され、46位のプロトンからは、46Me、44、45、47のクロスピークが観測される。11位のプロトンはメチレン2D-HMBCスペクトルではクロスピークが全く観測されないが3D-HMBCスペクトルでは、11位のプロトンから、9、10、12、13が観測されるため、これらの関係が容易に明らかとなる。特にメチレン-メチレンの結合関係の証明は、シグナルの T_2 が速く、しかもスピンの複雑に分裂するため、複雑な化合物では困難になることが多いが、この問題の解決に3D-HMBCが秀れた手段であることがわかる。

図6に18位のプロトンについてのスライスデータを示す。

通常の2D-HMBCスペクトル(下)では微弱にクロスピークが観測されているに過ぎないが、3D-HMBCスペクトル(上)ではシグナル強度が非常に高まっていることがわかる。2D-HMBC法では、スピン展開時間(Δ)を一つの値(通常60msec程度)に設定するため、この値に適合しないシグナルは観測されない。この Δ の値を種々のスピンの最適値に設定することは困難であるが、3D-HMBC法ではこのスピン展開時間の設定の問題は存在しない。

まとめ

我々は、HMBC法におけるスピン展開時間定数を時間変数パラメーターとした3D-HMBC法を開発した。この新手法によりスピン展開時間定数の制限に由来する問題点を解決することを可能にした。3D-NMRスペクトルからprojectionデータを取り出すことにより、2D-NMRスペクトルとしての解析が可能となるスペクトルが得られる。この場合、小さなマトリックスを得るために、スピン展開ポイントを $\Delta t_1 = 5 \sim 10$ msec で16~32点展開する。PFGを使用すれば1scan測定が可能となり、一つの3D-NMRに要する測定時間は数時間程度となり、実用的に価値の高い手段であると考えられる。

1. A. Bax and M. F. Summers, J. Am. Chem. Soc., 108, 2093-2094 (1986).

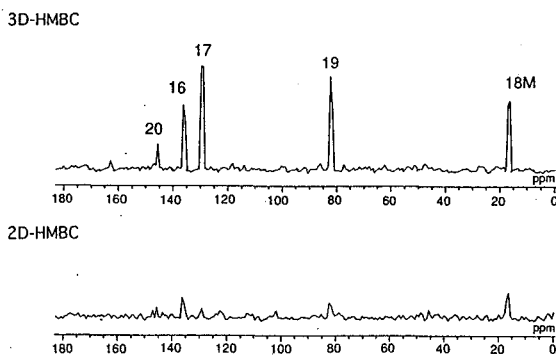


図6. モノマイシン 3D-HMBC
 3D-HMBC F_2/F_3 Projection spectrumからの
 H-18(F_3)のslice F_2 spectrum (上)
 2D-HMBCからのH-18(F_2)のslice F_1 spectrum (下)

ペプチド・タンパク質の構造解析のためのNMR
化学シフト評価法の利用

東京農工大工学部
University of Sheffield

○岩館満雄、出村誠、朝倉哲郎
M.P. Williamson

Application of NMR Chemical Shift Evaluation Method To Structure Analyses of
Peptides and Proteins

Mitsuo Iwadata¹, Makoto Demura¹, Tetsuo Asakura¹ and 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, UK

The NMR chemical shifts involve a lots of structural information and can be used as a key parameter in determinations of peptide and protein structures as well as the parameters such as NOE. In this study, the ¹³C NMR chemical shift contour maps are prepared as a function of torsion angles, Φ and Ψ for the individual amino acid residue in proteins. These are based on the chemical shift values and PDB data of 20 proteins. The effective uses of these ¹³C NMR chemical shift contour maps as well as ¹H NMR chemical shift calculation in structural biology with NMR are described.

緒言 これまで当研究グループでは、タンパク質やペプチドの α, β ならびにNHプロトンについて¹H NMR化学シフトの定量的評価法を提案してきた。その際、評価式に用いた各種パラメーターを、多くのタンパク質の¹H NMR化学シフトの実測値とPDBデータを用いて最適化することによって決定することがポイントであった⁽¹⁾。

一方、¹³C NMR化学シフトの利用に関してはSykesらのChemical Shift Index(CSI)⁽²⁾によるタンパク質の局所構造予測法が報告され、タンパク質のNMR構造解析のプロセス中にルーチ的に使われるようになってきている。さらに、Andoら⁽³⁾ならびにOldfieldら⁽⁴⁾によって、量子化学的な側面からの¹³C NMR化学シフトの詳細な検討がなされてきた。また、Baxら⁽⁵⁾はタンパク質の¹³C NMR化学シフトの実測データとPDBデータを組み合わせて化学シフトの(Φ, Ψ)マップを提案しており、CSI法よりも一歩進んで¹³C化学シフトからタンパク質の原子座標を決定する方向に踏み出してきている。しかしながら、そのマップ作成の基本となるデータはタンパク質4個のみからなっており、例えば、アミノ酸毎の化学シフトマップの違いを論ずることはデータ数の不足から不可能であった。実際、Oldfieldら⁽⁴⁾は二量体モデル化合物の¹³C化学シフトのAb initio計算から、化学シフトの(Φ, Ψ)マップはアミノ酸残基毎にかなり異なることを強調している。また、Andoら⁽³⁾も、化学シフトと水素結合長との関係

キーワード：NMR化学シフト ¹³C α および¹³C β 化学シフト二面角依存マップ 環電流効果 磁気異方性効果

いわだてみつお でむらまこと あさくらてつお マイケルP ウィリアムソン

は、アミノ酸毎にかなり異なることを報告している。

そこで、本研究ではタンパク質の¹³CNMR化学シフトの有効利用を一層進めるために、データの母集団を増やし、20個のタンパク質についての最新データに基づいて、¹³CNMR化学シフトの(Φ, Ψ)マップをアミノ酸残基毎に作成することを試みた。さらに、その有効利用について種々の試みを行った。

計算方法 ¹³CNMR化学シフトの(Φ, Ψ)マップ作成の手順を以下にまとめた。

1. 20個のタンパク質について¹³C化学シフトとPDBデータ (Φ, Ψ値に変換) を取得し、初期のデータベースを作成する。
2. 実測値とランダムコイルシフト値 (文献値) との差をとり、これを二次シフト値、 $\delta(\Phi_k, \Psi_k)$ とする。
3. 各タンパク質毎に以下の式に従い $\delta(\Phi, \Psi)$ を計算する。

$$\delta(\Phi, \Psi) = \frac{\sum_k \delta(\Phi_k, \Psi_k) \cdot \exp(-((\Phi - \Phi_k)^2 + (\Psi - \Psi_k)^2)/450)}{\sum_k \exp(-((\Phi - \Phi_k)^2 + (\Psi - \Psi_k)^2)/450)}$$

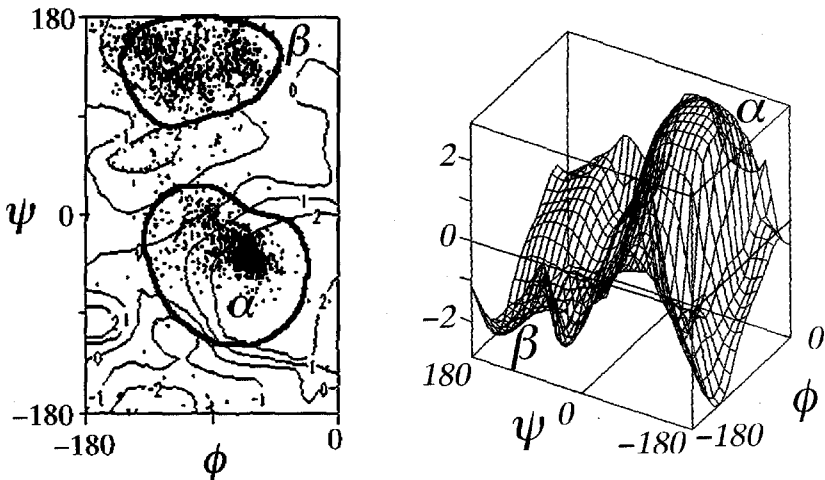
そしてデータベースの精度を上げるために、計算値、 $\delta(\Phi, \Psi)$ と実測値、 $\delta(\Phi_k, \Psi_k)$ との差が著しく大きい残基のデータをデータベースから除く。

4. 20種の全タンパク質のデータベースに基づき、再度、上式を用いて20種の全タンパク質で平均化された $\delta(\Phi, \Psi)$ 値を、 α 及び β 炭素毎に決定する。それから各タンパク質毎に、実測値、 $\delta(\Phi_k, \Psi_k)$ と平均化された $\delta(\Phi, \Psi)$ 値との差を最小にする補正值を算出する。そして α 及び β 炭素毎に求めた補正值の平均を各タンパク質毎の補正值とする。

5. データベースに基づいて、化学シフトのΦ, Ψマップを作成する。

結果および考察

化学シフトマップ 一例として、Ala残基についてのC α 化学シフトマップを示した。 α ヘリックス及び β 構造の違いによる化学シフトの傾向やシフト差を良く再現しており、化学シフトの有効利用に用いることができる。これらのマップは、アミノ酸残基毎にかなり異なる。



化学シフトマップの構造解析への利用

化学シフトマップや化学シフト計算の有効利用について試みた。

1. NMRデータに基づく立体構造の計算において化学シフトを構造パラメーターとして定量的かつ積極的に用いる。すなわち、アミノ酸残基毎に作成した¹³CNMR化学シフトの(Φ, Ψ)マップと¹HNMR化学シフト計算と合わせて、より精度の高い構造予測法を提案する。特に、NMR測定から得られるNOEの数が少ない、運動性の高いペプチドや逆に高分子量のタンパク質の場合など、NMRと分子動力学を組み合わせた一連の構造解析プロセスの中に化学シフトマップや化学シフト計算を組み込む。低分子ペプチド、ニューロキニンAの解析例を示す。

2. タンパク質のNMR化学シフトが既知であるが、その立体構造が未だ決定されていない場合、このタンパク質と相同性のあるタンパク質ファミリーの中から、そのPDB座標と化学シフトマップや化学シフト計算を用いて、各タンパク質についてNMR化学シフトを予測する。続いて、構造未知のタンパク質の実測化学シフトとの誤差を計算し、誤差のできるだけ少ないタンパク質を特定し、最終的に、構造未知のタンパク質のおおまかな立体構造とその特徴を把握する。hG-CSFタンパク質の例を示す。

3. タンパク質の立体構造が既知(PDBデータ有)で、NMR化学シフトが報告されている場合、論文中の化学シフトデータのタイプミス等の指摘や異常な局所構造や電子状態を検討することができる。すなわち、立体構造に基づき予想した化学シフトと実測の化学シフトとの差を残基毎に計算した時、全残基について、その差の符号が同一で絶対値が大きい場合には、化学シフトの基準がずれていると結論される。化学シフト基準は他のタンパク質の化学シフトデータと比較する際に問題となる。さらに符号が同一でなくその差が著しく大きい場合には論文中の化学シフトデータのタイプミスの可能性がある。一方、タイプミスでない場合は、その残基あるいは近傍が異常な局所構造や電子状態であることを意味しており詳細な検討を通して極めて価値のある構造情報を引き出すことが可能となる。

参考文献

- (1) T.Asakura,K.Taoka,M.Demura and M.P.Williamson, J.Biomol.NMR(1995),6,227.
- (2) D.S.Wishart and B.D.Sykes, METHODS IN ENZYMOLOGY (1994),239,364.
- (3) K.Tsuchiya,A.Takahashi,N.Takeda,N.Asakawa,S.Kuroki,I.Ando,A.Shoji and T.Ozaki, J.Mol.Structure (1995),350,233.
- (4) A. C. de Dios and E. Oldfield, J.Am.Chem.Soc.,(1994),116,5307.
- (5) S.Spera and A.Bax, J.Am.Chem.Soc.,(1991),113,5490.

ガラスプレートを用いた再構成脂質二重層と導入された配向ペプチドの角度依存固体NMR構造解析

東京農工大工学部 ○岩館満雄、溝口泰、堀由美子、出村誠、朝倉哲郎
長崎大工学部 新留琢郎、青柳東彦

Solid State NMR Analysis of Peptides Oriented in Reconstituted Lipid Bilayer with Glass Plate

Mitsuo Iwadata¹, Yasushi Mizoguchi¹, Yumiko Hori¹, Makoto Demura¹, Tetsuo Asakura¹, Takuro Niidome², Haruhiko Aoyagi²

1 Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo

2 Department of Applied Chemistry, Nagasaki University, Nagasaki, Nagasaki

It is important to determine the structure of functional peptides oriented in lipid bilayer in relation to confirmation of structure-function relationship of these peptides. In this study, in order to obtain basic information about this problem, the structures of two kinds of peptide samples with different forms, α helix and β sheet, were determined in solution, solid state and in lipid bilayers oriented between glass plates with NMR spectroscopies. The former sample was 4₃ peptide; Ac(Leu-Ala-Arg-Leu)₃-NH₂ and the latter silk model peptide; Boc-Ala-Gly-Ala-Gly-OBzl. These samples were isotope-labeled for solid state NMR analysis of oriented peptide-lipid system.

緒言 膜中に埋め込まれた状態でペプチドの立体構造解析を行うことは、膜中のペプチドの機能発現の機構を解明する上で必要不可欠である。実際、Opella⁽¹⁾, Killian⁽²⁾, Cornell⁽³⁾, Cross⁽⁴⁾らはこの手法を用いて配向した膜ペプチドならびに膜タンパク質について、固体NMR解析を行い、その構造と束縛条件下での運動、イオンとの相互作用に関して詳細な知見を得ている。

本研究では、溶液、固体中でのペプチドの構造が脂質共存下で配向した時にどのように変化するか、そのドライビングホースは何か、また、それがどのように機能発現にかかわるのかを検討することを目的とした。そのために、脂質二重層中で、イオンチャンネル形成能を有することが報告されてきた両親媒性ヘリックスペプチド、Ac(Leu-Ala-Arg-Leu)₃-NH₂⁽⁵⁾と β 構造を形成し易いシルクモデルペプチド、Boc-Ala-Gly-Ala-Gly-OBzl⁽⁶⁾を取り上げ、NMRを用いて、溶液中ならびに固体の構造決定を行うとともに、ガラスプレート中、脂質共存下で配向したこれらのペプチドの構造解析を行い、各々、比較した。

実験

試料: 4₃ペプチドおよびシルクモデルペプチドは、液相法によって合成し、前者はAla₆残基が、後者はGly₂残基が¹⁵Nラベルされている。CD測定によると、4₃ペプチドは、水中でランダムコイル、SDS共存下およびメタノール中では、約50%ヘリックスであった。4₃ペプチドは、固体NMR

キーワード：固体NMR、再構成脂質二重層、膜ペプチド、配向、ガラスプレート

いわだてみつお みぞぐちやすし ほりゆみこ でむらまこと あさくらてつお
にいどめたくろう あおやぎはるひこ

およびIR測定によると固体バルク状態では、ランダムコイルであった。一方、Boc-Ala-Gly-Ala-Gly-OBzlは、固体バルク状態で、 β 構造をとる。

ガラスプレートで配向させた試料の作成：

リン脂質としてジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)を、可溶性有機溶媒としてメタノールを用いた。⁴¹DMPCとペプチドをメタノールに溶解、それをガラスプレート上に展開、乾燥後、水を加えながら積み重ねる。それを、60%水和下、サンプル管中に密封し、45°Cのインキュベーター中に数日間、置いた後、NMR測定に供した。

NMR測定： 4₃ペプチドの溶液NMR測定は、JEOL-ALPHA500を用い、重水素化d₂₅-SDSミセル中、濃度5mMで行った。DQF-COSY, HOHAHA, NOESYを用いて4₃ペプチドの帰属を行い、さらに距離情報を採取した。NHピークの温度係数やスピニング定数の情報を加え、最終的にディスタンスジオメトリー法を用いて溶液の立体構造を決定した。

固体NMR測定はJEOL GX-400を用い、バルク試料は、¹³Cおよび¹⁵NCP/MASNMRを測定した。また、配向試料については、コイル直径が6.5mmのものを使用し、測定核は³¹Pと¹⁵Nとした。³¹P測定は、脂質の配向を確認するためであり、ガラスプレート面を磁場に対して0°~90°まで15°間隔で角度を変化させた。¹⁵N測定は、脂質中のペプチドの構造解析のために用い、ガラスプレート面と磁場との位置関係は、平行と垂直とした。

結果および考察

溶液構造決定： 4₃ペプチドについて重水素化SDS存在下でNOESYを測定したところ、NH-NHの領域に連続した残基間のNOEがすべて観測され、ヘリックス構造を取ることが確認された。連鎖帰属を完了するとともに、130個のNOEを採取し、さらに距離制限ファイルを作成した。NH温度係数やカップリング定数の情報を加味して、ディスタンスジオメトリー計算を行い、両親媒性ヘリックス構造を決定した(Fig.1)。N末端が、よりきつく巻かれており、Arg側鎖が一方方向に突き出た構造を有する。¹H縦緩和時間ならびにシフト試薬の添加実験からヘリックスの凝集を確認した。

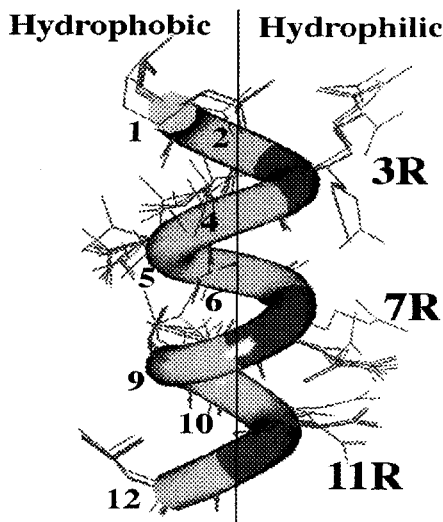


Fig.1 Solution Structure of 4₃ Peptide in SDS Determined with 2D ¹H-NMR and Distance Geometry Calculation.

脂質配向： ガラスプレートで配向させた脂質、DMPCの固体³¹P NMR主ピークはシャープであり、脂質とガラス面の方向を変えると、直線的にピーク位置がシフトする。従ってDMPCが十分に配向していることを確認した。ペプチドが共存すると、若干、パウダーパターンが増加するが、依然として主ピークは、配向パターンを示す。ピーク位置から、脂質のアシル鎖がガラスプレートにほぼ垂直になるように配向していることが分かった。

配向した脂質二重層中でのペプチドの構造解析： 配向脂質二重層中に存在するBoc-Ala-[¹⁵N]Gly-Ala-Gly-OBzlの¹⁵N固体NMRスペクトルをガラスプレート面と磁場との角度が、0°と90°の場合についてFig.2に示した。スペクトルは各々著しく異なり、脂質二重層中でこのペプチドは、十分に配向していることがわかった。配向系の固体NMR解析⁷⁾に基づいて、配向軸と化学シフトテンソルのなす角度 α_f, β_f を各々、25°と65°、配向軸の分布を18°と決定した。さらに、類似したモデル化合物について決定した¹⁵N化学シフトテンソルとN-H結合のなす角度⁷⁾と組み合わせることにより、

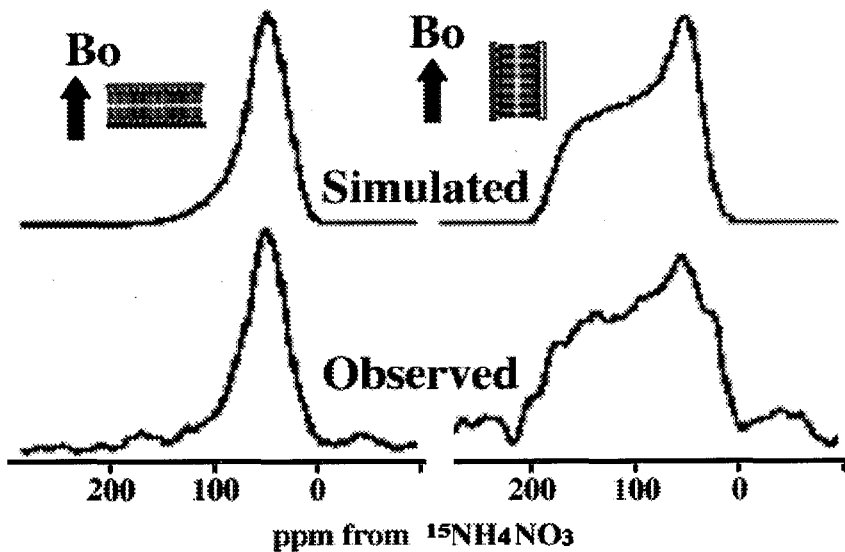


Fig.2 Observed (down) and Simulated (up) ^{15}N CP NMR Spectra of Boc-Ala- ^{15}N Gly-Ala-Gly-OBzl in the oriented DMPC Bilayer.

最終的に配向軸とN-Hの角度を 81° と決定した。すなわち、Boc-A-G-A-G-OBzlペプチド分子は β 構造をとり、脂質のアシル鎖にほぼ平行に配向していることが明らかになった。

一方、 4_3 ペプチドの場合は、ガラスプレート面と磁場との角度が、 0° と 90° の場合、いずれも ^{15}N パウダーパターンを与える。今後、脂質二重層の作成方法の工夫によって、 4_3 ペプチドの配向を試みる予定である⁽⁸⁾。

参考文献

- (1) S.J.Opella, in Biological Magnetic Resonance, eds L.J.Berliner and J.Reuben, Plenum Press, New York, (1990),177.
- (2) J.AKillian, Biochim.Biophys.Acta.,(1992),1113,391.
- (3) B.A.Cornell, F.Separovic, A.J.Baldassi and R.Smith, Biophys. J.,(1988),53,67.
- (4) T.A.Cross in Annual Reports on NMR Spectroscopy,Vol. 29, Academic Press, London, (1994) 123.
- (5) S.Lee, T.Tanaka, K.Anzai, Y.Kirino, H.Aoyagi and G.Sugihara, Biochim.Biophys.Acta.,(1994)1191,181.
- (6) H.Saito, R.Tabeta, T.Asakura, T.Iwanaqa, A.Shoji, T.Ozaki and I.Ando,Macromolecules,(1984),17,1405.
- (7) L.K.Nicholson, T.Asakura, M.Demura and T.A.Cross, Biopolymers, (1993),33,847.
- (8) C.R.Sanders II and G.C.Landis, J.Am.Chem.Soc.(1994),116,6470.

東京農工大学工学部 ○出村 誠、斉田 理、朝倉哲郎
日本電子 (株) 杉沢寿志

Structural Analysis of Silk Protein Using Solid State ^{13}C and ^2H NMR

Makoto Demura¹, Osamu Saita¹, Tetsuo Asakura¹ and Hisashi Sugisawa²

1. Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184
2. NMR Application Laboratory, Analytical Instructions Division, JEOL Ltd., Akishima, Tokyo 196

The solid state ^2H NMR spectra of three kinds of ^2H labeled silk proteins, $[2,2\text{-}^2\text{H}_2]\text{Gly}$, $[3,3,3\text{-}^2\text{H}_3]\text{Ala}$ and $[2,3,5,6\text{-}^2\text{H}_4]\text{Tyr}$ labeled *B.mori* silk fibroins were observed in order to characterize the dynamics and conformation. The segmental motion of the backbone chain monitored by solid state ^2H spectrum of Gly site was not detected except for libration with small amplitude at temperature range of 30°C to 80°C. Contrary, the ^2H spectral change of $[2,3,5,6\text{-}^2\text{H}_4]\text{Tyr}$ labeled *B.mori* silk fibroin was observed with increasing temperature and the line shapes were analyzed on the basis of co-existence of the flip-flop motion with log-Gaussian rate distribution and static portion. Two-dimensional ^{13}C chemical shift anisotropy correlation spectra of carbonyl ^{13}C enriched silk fibroin fibers were observed to study Silk I structure.

緒言

絹は逆平行 β シート構造を有する分子鎖の配向、配列の十分に制御された優れた特性を備えたタンパク質である。我々はこれまでこのような絹タンパク質の繊維構造を検討するために、 ^{13}C および ^{15}N 安定同位体ラベル絹試料を作製し、角度依存固体 NMR 法を用いて主鎖骨格のコンフォメーションの解析を行ってきた。結晶性領域の主要成分である Gly, Ala 残基、さらに割合の少ない Ser, Tyr, Val 残基について主鎖内部回転角のとりうる角度制限マップを作成することができた¹。

本研究は、これまでの ^{13}C および ^{15}N NMR 構造情報に、 ^2H ラベル絹タンパク質繊維の固体 ^2H NMR から得られる C- ^2H 結合の角度制限情報を加えて、主鎖内部回転角決定の際の精度向上を目指す。また、Tyr 側鎖について、そのコンフォメーションとダイナミックスを、各々、配向系の固体 ^2H NMR とその温度変化の測定によって、詳細に検討する。さらに、 $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{Gly}$ または $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{Ala}$ ラベル絹タンパク質繊維の固体 2D ^{13}C 化学シフト異方性相関スペクトルを測定し、絹の Silk I 構造について検討する。

実験

絹の ^2H ラベル試料、3 種類、 $[2,2\text{-}^2\text{H}_2]\text{Gly}$, $[3,3,3\text{-}^2\text{H}_3]\text{Ala}$, ring $[2,3,5,6\text{-}^2\text{H}_4]\text{Tyr}$ の作製については、既報に示した²。 ^2H ラベル絹フィブロイン試料の固体重水素 NMR 測定は、JEOL GX-400 NMR 分光計を用い、四極子エコーのパルスシーケンスを用いた。90°パルスは 3.4 μs 、90°パルス間隔は 34 μs とした。固体 2D ^{13}C 化学シフト異方性相関スペクトルは、JEOL EX-400 および CMX-300 NMR 分光計を用い、室温で測定した。CMX の 90 パルスと混合時間は、各々、3.3 μs 、10s であった。CMX の場合、5mm-MAS Lプローブを用い、試料管を回転させずに測定した。

キーワード ; 固体 NMR、絹タンパク質、安定同位体ラベル、配向、スピン拡散

でむらまこと さいたおさむ あさくらてつお すぎさわひさし

結果と考察

1. 固体²H NMR 角度制限を加えた Ala および Gly 残基(ϕ, ψ)マップの精密化

[1-¹³C]Ala および [¹⁵N]Ala 各ラベル絹タンパク質繊維についての配向系の固体 NMR から得られた構造情報と ¹³C-¹⁵N ダブルラベル試料のパウダーパターン解析の結果を組み合わせ得られた Ala 残基の (ϕ, ψ) 制限マップ上に、[3,3,3-²H₃]Ala ラベル配向繊維の固体 ²H NMR から得られた角度制限を加えることによって、Ala 残基の (ϕ, ψ) 値のとりうる範囲を更にせばめることができることがわかった。さらに、固体 ²H NMR 角度情報は、[2,2-²H₂]Gly についても同様に制限として用いることができた。

2. [2,3,5,6-²H₄]Tyr ラベル絹配向繊維試料の固体 ²H NMR による Tyr 側鎖(χ_1, χ_2) の決定

[2,3,5,6-²H₄]Tyr ラベル絹配向繊維の ²H NMR スペクトルから四極子分裂幅を測定し、 β シート間で側鎖運動の制限された Tyr 側鎖の C-²H 結合の配向角について χ_1 - χ_2 制限マップを作成した。さらに、既に、固体 ¹⁵N NMR の研究より得られている Tyr 主鎖の (ϕ, ψ) 制限マップと χ_1 - χ_2 制限マップを組み合わせ、側鎖の配向方向を Fig.1 のように決定した。

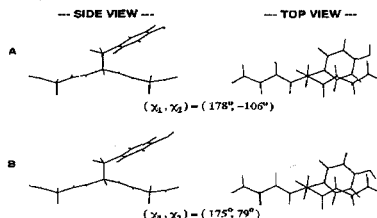


Fig. 1 Side chain conformation of tyrosine residue of silk fibroin

3. 重水素化絹タンパク質繊維の Ala, Gly, Tyr 残基の固体 ²H NMR スペクトルの温度依存性と側鎖のダイナミクス

固体 ²H NMR 研究から、主鎖 Gly C α -²H₂ 結合の場合、小さい振幅のライブラレーション運動のみが存在すること、Ala C α -C β 結合は、そのまわりの速い回転とともに小さい振幅のライブラレーション運動が存在することがわかった。一方、Tyr の側鎖芳香環の運動は、温度を上昇させる毎に、Static 成分が減少するとともに、逆に Flip-Flop 運動の成分の割合が上昇し、その速度も増加することがわかった。絹フィブロイン中の Tyr 残基の 80% は Gly-Tyr-Gly- という結晶部末端シークエンス中に存在する。従って、Static 成分の殆どは、 β -sheet 構造中で運動が凍結された Tyr 芳香環、Flip-Flop 運動成分の殆どは非晶部に存在する Tyr 芳香環であると考えられる。現在、絹の Ser C β -²H₂ のラベル化を進めており、次に、Ser 側鎖のダイナミクスと配向構造の解析を行う予定である。

4. 絹タンパク質繊維の固体 2D ¹³C 化学シフト異方性相関スペクトル

Meier らは、クモの ¹³C ラベル絹糸の固体 2D ¹³C 化学シフト異方性相関スペクトルを測定し、これが未知構造の解明に有力であることを示した³。Fig.2 は、家蚕絹モデル化合物の Boc-Ala-Gly-Ala-[1-¹³C]Gly-OPac のカルボニル域 2D ¹³C 化学シフト異方性相関スペクトルである。¹³CCP/MAS 測定から β シート構造をとることがわかっているが、 β シート構造のクモの場合同様、化学シフト異方性を示すカルボニル ¹³C の相関ピークは観測されなかった。この手法を家蚕絹の Silk I 型構造の検討に用いる予定である。

参考文献

- (1) T. Asakura, M. Demura and N. Nishikawa, Ann. Reports on NMR Spec., in press.
- (2) T. Asakura, M. Minami, R. Shimada, M. Demura, M. Osanai, T. Fujito, M. Imanari and A. Ulrich, Macromolecules, will be submitted.
- (3) J. Kummerlen, J. D. van Beek, Vollrath and B. H. Meier, Macromolecules (1996) 29, 2920.

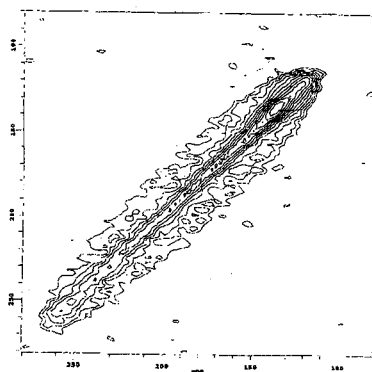


Fig. 2 Solid state two-dimensional CSA correlation spectrum of silk model compound.

NMRによる1-ベンゾトリアゾリル-2-(*p*-トリル)イソインドール誘導体の
環状付加反応物の構造解析

(福井大工、福井大教育*、金沢大薬**)

○前田史郎、高橋一朗、島田慎治、春吉真樹、都築幹生、横田 博、
神藤洋爾、北嶋英彦、伊佐公男*、細井信造**、津田喜典**

Molecular structure analysis of the cycloadduct of 1-benzotriazolyl-2-(*p*-tolyl)-isoindole derivative
by using NMR

○S.MAEDA, I.TAKAHASHI, S.SHIMADA, M.HARUYOSHI, M.TSUZUKI,
H.YOKOTA, Y.SHINDO, H.KITAJIMA, K.ISA*, S.HOSOI**, Y.TSUDA**

Faculty of Engineering, Fukui University; Faculty of Education, Fukui University*;

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University**.

The molecular structure of the cycloadduct produced by reacting 1-benzotriazolyl-2-(*p*-tolyl)-
isoindole with $\text{MeO}_2\text{CC}\equiv\text{CCO}_2\text{Me}$ in solution was determined by using NMR.

1.はじめに

1-ベンゾトリアゾリル-2-(*p*-トリル)イソインドールとアセチレンジカルボン酸ジメチルエステルとの環状付加反応物【dimethyl 11-aza-1-benzotriazolyl-11-(4-methylphenyl)-tricyclo-[6,2,1,0^{2,7}]-undeca-2,4,6,9-tetraene-9,10-dicarboxylate】1の分子構造解析を行った。

高橋らは、1の単結晶X線構造解析の結果、ベンゾトリアゾリル基(Bt)が1位で置換している(1-置換体)ことを明らかにした(図1)。一方、溶液の¹Hおよび¹³C NMRスペクトルを検討したところ、Btが2位で置換している類似化合物と似た吸収があることから、1は溶液中でBtが解離あるいは2位で置換しているように思えた。通常、この系統の化合物の異性化では、カチオンを経由するとされているが、1の場合、Btの結合した橋頭位はsp³炭素であるから、この橋頭位が溶液中でカチオンとなり、1位から2位への転位が起こるとは考えにくい。そこで、1次元および2次元NMRを用いた1の溶液中での構造解析を試みた。COSY、NOESY、FG-HSQC、FG-HMBCなどの2次元NMRスペクトルおよび多結晶粉末の¹³C CP/MASスペクトルを測定・解析の結果、溶液中での構造も単結晶と同じ1-置換体であることが分かった。

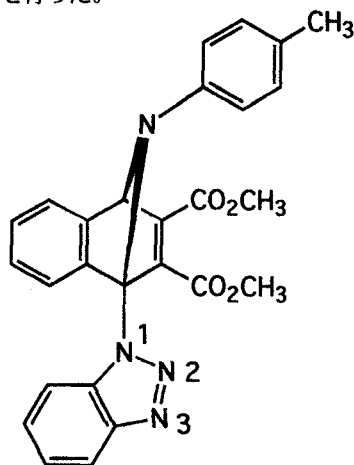


Fig.1 Molecular structure of 1

2.実験

[試料] 1-ベンゾトリアゾリル-2-(*p*-トリル)イソインドールとアセチレンジカルボン酸ジメチルエステルとの環状付加反応物から1を精製した。測定には、その試料をそのまま用いた。

[NMR測定] 溶液のNMR測定には、JEOL GX-270 (磁場強度 6.35T、共鳴周波数 ¹H:270MHz、¹³C:68MHz) および JEOL LA-400 (磁場強度 9.39T、¹H:400MHz、¹³C:100MHz) を用いた。

KEY WORDS : 2次元NMR、固体高分解能NMR、構造解析

まえだしろう、たかはしいちろう、しまだしんじ、はるよしまさき、つづきみきお、よこたひろし、しんどうようじ、きたじまひでひこ、いさきみお、ほそいしんぞう、つだよしすけ

テトラメチルシラン (Me_4Si) を内部基準とし、溶媒には CDCl_3 を用いた。GX-270 では、通常の ^1H および ^{13}C -1 次元 NMR の他に DEPT を、2 次元 NMR では、COSY、NOESY、 ^1H - ^{13}C COSY、ブロードバンドデカップルド(BD)- ^1H - ^{13}C COSY 等を用いた。LA-400 では FG-HSQC、FG-HMBC を用いた。 ^{13}C CP/MAS(TOSS)測定には、Chemagnetics CMX-300 (磁場強度 7.05T、共鳴周波数 ^{13}C :75.5MHz) を用いた。

3. 結果および考察

1 には多くの四級炭素と窒素が含まれており、これらが連結しているために、通常の 1 次元および 2 次元 NMR スペクトルから構造を決定することは困難であった。しかし、 ^{13}C CP/MAS や FG-HMBC を用いることにより分子構造解析を行うことができた。

まず、温度や Repetition Period (RP) を変えた様々な条件における 1 の溶液中での ^{13}C NMR スペクトルを測定した。温度を上げると、室温では確認できなかったいくつかの信号強度の小さい吸収線が現れるので、1 は溶液中で分解しているか、あるいは Bt が解離しているのではないかと考えた。そこで、 ^{13}C CP/MAS スペクトルを測定し溶液のスペクトルと比較したところ、通常の溶液 ^{13}C NMR スペクトルと同じ吸収線が見られる他に、後者ではほとんど確認できなかった吸収線が、 ^{13}C CP/MAS スペクトルでは他の吸収線と同等な強度を示した。このことから、1 は溶液中で解離しているのではないと判断した。【図 2(a): ^{13}C CP/MAS スペクトル、図 2(b): 室温における溶液 ^{13}C NMR スペクトル、RP=2s。 ^{13}C CP/MAS スペクトルでは、ラベル付けした吸収線の強度が大きい。】図 2(c)に、RP=32 s で測定した溶液の ^{13}C NMR スペクトルを示す。図 2(b)と図 2(c)を比較すると、後者では RP を長くしたことで吸収線 e・y の強度が大きくなっている。したがって、この信号強度が室温で小さい原因は、緩和時間が長いことに起因しているであろう。

通常の ^1H - ^{13}C COSY($J_{\text{CH}}=8\text{Hz}$)などを用いて吸収線の帰属を試みたが、S/N が悪く遠距離 CH 相関を決定することが困難であり、ゆえに、部分構造しか求めることができなかった。そこで、FG-HMBC スペクトルの測定を試みた結果、遠距離 CH 相関を決定することができ、1 の溶液中の分子構造をほぼ明らかにすることができた。その結果、Bt の 6 個の環炭素が非等価であることから Bt は 2 位ではなく 1 位で結合しており、したがって、1 は溶液中でも単結晶と同じ 1-置換体であることが分かった。

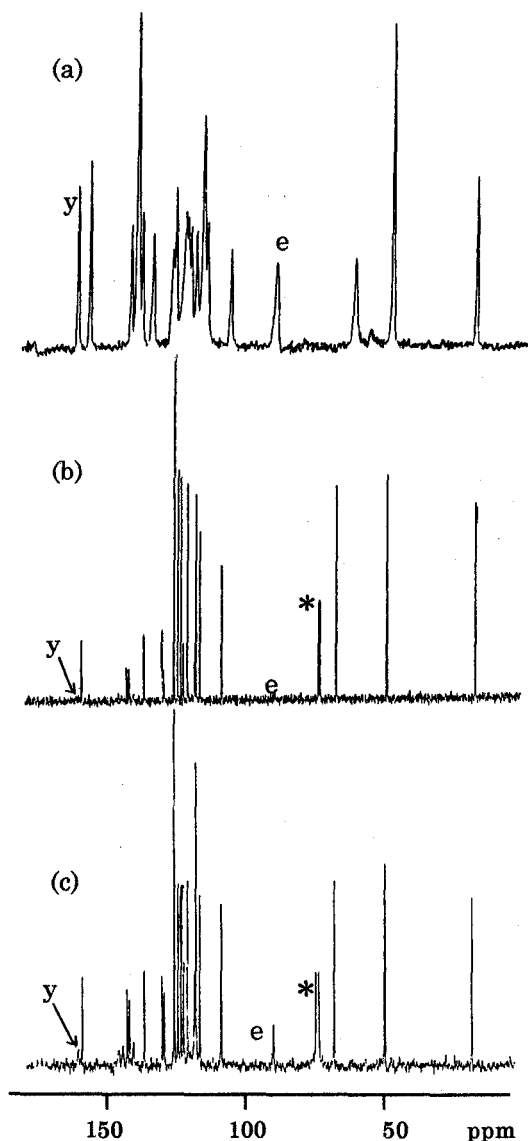


Fig.2 (a) ^{13}C CP/MAS Spectrum of 1 at room temperature. (b) ^{13}C NMR Spectrum in CDCl_3 at 50°C . Repetition period is 2s. (c) ^{13}C NMR Spectrum in CDCl_3 at 50°C . Repetition period is 32s.

The peak marked with an asterisk is a signal from solvent.

Construction of pulsed field gradient NMR spectrometer for $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ double resonance

by Osamu Oishi and Seiichi Miyajima

(Institute for Molecular Science, Myodaiji, Okazaki, 444, Japan)

Pulsed field gradient NMR spectrometer with a $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ double resonance option has been constructed for the measurement of slow and anisotropic self-diffusion coefficient tensor in liquid crystals and plastic solids.

【はじめに】

パルス磁場勾配(PFG)NMR法を用いて異方的な拡散係数テンソルを測定することができる。液体では T_2 が長いこと容易にスピネコーを観測でき、また長い磁場勾配パルスを打つ事が可能である。一方液晶やプラスチック結晶などは通常の ^1H 測定では T_2 が $100\ \mu\text{s}$ 以下であるためスピネコーを観測する事ができない。双極子相互作用を消去して T_2 を長くする方法にはマルチパルス法や魔法角回転法等がよく知られているが、液晶のスメクティックA相の拡散係数測定に対しては魔法角配向法が使用可能である¹⁾。この方法とPFGを用いて液晶の異方的拡散係数が測れる事を昨年の本討論会で発表した^{2,3)}。一方、配向させて魔法角に傾けてもすぐに再配向するネマティック液晶や、配向させる事ができないプラスチック結晶に対しては魔法角配向法を用いる事はできず、これらの T_2 を長くするには二重共鳴法が有効であると考えられる。今回、最大 $12\ \text{T m}^{-1}$ の磁場勾配を発生させる磁場勾配NMR装置を $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 二重共鳴用に改造した。

【二重共鳴型PFG-NMR装置】

強いNMR信号を得るためには超伝導磁石を用いてより強い磁場中で実験を行うのがよいのは明らかだが、本研究では $1.4\ \text{T}$ の鉄芯電磁石を用いて $60\ \text{MHz}$ (^1H), $15\ \text{MHz}$ (^{13}C)の周波数で行った。このような比較的低磁場で実験を行った理由は以下の点にある。

PFG-NMRによる拡散係数測定において空間分解能を決めるのは、磁場勾配の強さ(G)、である。大きなGを得るためにコイルに大電流を流すことにより、装置及び試料はこの電流と静磁場 B_0 の積に比例する強い電磁力を受ける。拡散測定においては、この力に抗して試料が静止していることが不可欠であり、このため比較的小きな B_0 を用いて、堅牢なプローブヘッドを製作することが求められる。空間分解能を重視

SELF-DIFFUSION, DOUBLE-RESONANCE, FIELD-GRADIENT

おおいしおさむ・みやじませいいち

してS/Nを求めない場合は弱い B_0 、その逆の場合は強い B_0 というのが設計指針である。また本装置の磁場勾配は強度以上にその均一性に重点をおいて設計されており設計値、実測値の両方において誤差が1%以下である事が証明されている。Frydman⁴⁾らが昨年発表した類似の装置は我々とは逆の考え方に立っており、7.1 Tの B_0 を用い 2 T m^{-1} という限定されたGを用いた。空間的に均一度の高いGを実現するという点でも我々の方法の方が優れていると考えている。

プローブヘッドの設計は基本的に、文献¹⁾のものである。

Fig.1は実際の装置のブロック図であり、現在はこの装置の製作を終了したところである。今回はこの装置とこの装置によって測定したスタンダードサンプルのデータについて報告する。現段階では信号強度の問題から自然存在比の ^{13}C による液晶の異方的拡散係数測定は成功していないが、この問題が解決できれば合わせて報告する。

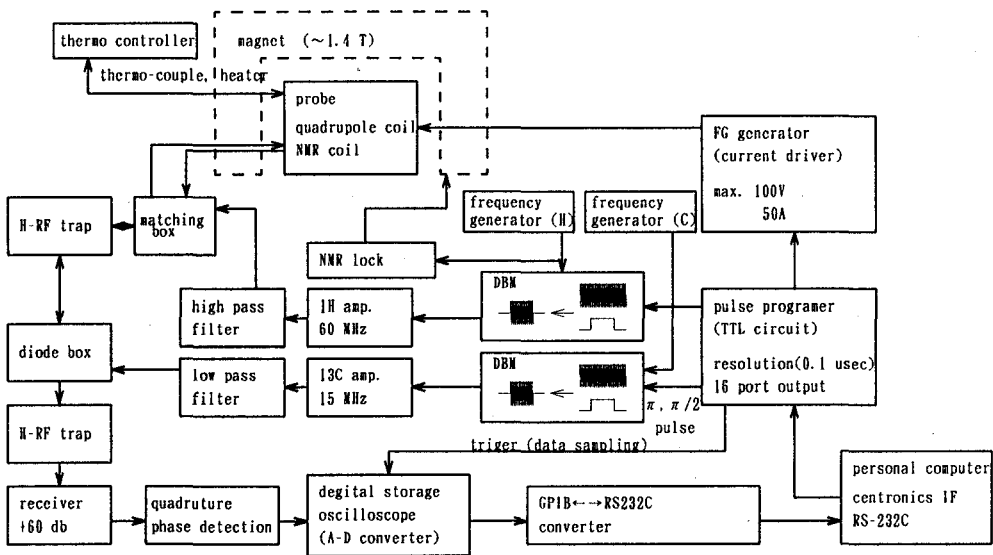


Fig.1 Block diagram of the PFG-NMR spectrometer for $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ double resonance.

- 1) O. Oishi and S. Miyajima, J. Magn. Reson. A 123 (1996) in press
- 2) 宮島清一、大石修, 第34回NMR討論会講演要旨集 (1995), 67
- 3) 大石修、宮島清一, 第34回NMR討論会講演要旨集 (1995), 69
- 4) M. Zhou and L. Frydman, Solid State Nuc. Magn. Reson. 4 (1995) 301

Novel Multi-Quantum NMR spectroscopy

—Mixed Coherence Transfer and Independently Transition Selection—

HITOSHI YAMADA, ○JOHANE TAKEUCHI, AKIRA TASAKI, ¹YOSHITERU SEO, AND ²TOMOKI ERATA
*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba*¹*Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Science*²*Graduate School of Engineering, Hokkaido University*

Intensive studies of the quadrupolar relaxation have been done to know about a motional correlation time of nuclei. We developed new filtration technique to study the isotropic bi-exponential relaxation of the nucleus with a spin $I = 3/2$. The Mixed Coherence Transfer (MCT) method is a simple version of a double-quantum filter for a spin $3/2$. This method can be easily extended to the 2D experiment and this 2D version of MCT allows the separation of the bi-exponential relaxation into the single exponential decay signals in contrast to a ordinal double quantum filtration. We named this technique as Independently Transition Selection (ITS). These new methods are demonstrated through the simulations and the experiments in this report.

1 序論

一般に四重極モーメントを持つ核では、運動による共鳴線の先鋭化の条件が満たされている時には、その NMR 緩和は単純な指数関数的になる。しかしながら等方的でかつゆっくりとした運動条件の場合、多重指数関数的に NMR 緩和をおこす。このような効果は普通 (生体) 高分子などの系で良くみられる。特にスピンの $3/2$ の系 - ⁷Li, ²³Na, ³⁵Cl, ³⁷Cl, ³⁹K, ⁸⁷Rb - の横緩和は、サテライト遷移と中心遷移の二つの緩和率 (R_1, R_2) の指数関数の和で表される。このように多重指数関数で緩和する系では多量子遷移が誘起されており、これを応用することにより四重極相互作用そのものについて知ることなく運動の相関時間について知見を得ることがで

きる。この最初の研究は G. Jaccard, S. Wimperis, G. Bodenhausen 等によりなされた [1]。

我々は特に核スピン $3/2$ の系において、一般的な二量子、あるいは三量子遷移フィルター (Double-, Triple-Quantum Filter; DQF, TQF) よりも効率がよく単純な混成遷移フィルター (Mixed Coherence Transfer; MCT) を開発した。さらにこのフィルターの特性を生かして二次元 NMR 法に拡張することで、二つの遷移率 (R_1, R_2) を独立に分離するフィルター (Independently Transition Selection; ITS) になることを示す [2, 3]。

2 理論

ここで用いる緩和関数、Redfield 行列等の導出と表式については文献 [1] を参照して頂きたい。

以下、核スピン $3/2$ の系で、緩和に寄与する運動の相関時間 τ_c が以下の条件を満たすとする。

$$\omega_0^{-1} \leq \tau_c \leq \omega_Q^{-1} \quad (1)$$

ω_0 はラーモア周波数であり、 ω_Q は四重極相互作用の大きさを表す。このような条件下では、ランク $l = 2$ を含む緩和関数は Redfield 行列の対称性より

多量子遷移フィルター、混成遷移フィルター、遷移独立分離フィルター

やまだひとし、たけうちよはね、たさきあきら、
せおよしてる、えらたともし

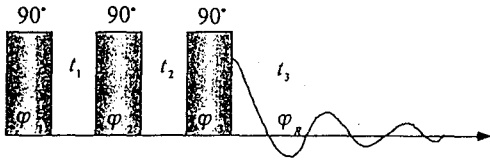


図 1: Pulse sequence consisted of three 90° pulses. $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3$ stand for the phase of the each pulse and φ_R is the receiver phase.

除外できる。この場合は単パルス法では緩和関数

$$f_{11} = \frac{1}{5} [3 \exp(R_1 t) + 2 \exp(R_2 t)] \quad (2)$$

が自由誘導減衰信号として観測される。これを対して、今回開発した MCT や DQF、TQF NMR によって観測される信号は第三ランクの関数で

$$f_{13} = f_{31} = \frac{\sqrt{6}}{5} [\exp(R_1 t) - \exp(R_2 t)] \quad (3)$$

となる。

2.1 混成遷移フィルター (MCT)

この系での FID 信号は、第 3 ランク迄を含む緩和関数 f_{1l} の和として表すことができる。

$$\begin{aligned} \text{Signal}(t) &= \sum_{l=1}^3 c_l \cdot f_{1l}(t) \\ &= E \cdot \exp(R_1 t) + F \cdot \exp(R_2 t) \end{aligned} \quad (4)$$

c_l, E, F はパルス系列によって変わる係数である。そこで図 1 で表されるパルス系列での三つの 90 度パルスと受信器の位相の全ての組み合わせ (64 通り) について詳細に検討した結果、新しい実験方法を開発することができた。

MCT と DQF あるいは TQF との最大の違いは $t_2 = 0$ であることである。我々の計算結果ではスピン 3/2 の系で緩和関数 f_{31} を得るには、 t_2 の時間をゼロとしても DQF と同じ結果になることが示される。結果のみを示せば、

$$\begin{aligned} \text{Signal} &= \alpha(\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3, \varphi_R) f_{31}(t_1) f_{13}(t_3) \\ &+ \beta(\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3, \varphi_R) f_{11}(t_1) f_{11}(t_3) \end{aligned} \quad (5)$$

となり、これをパルスと受信器の位相を変えて二回積算すれば、DQF と同じ第 3 ランクを含む緩和関数 f_{31} のみをフィルターできる。

2.2 遷移独立分離フィルター (ITS)

一回の MCT Sequence により得られる信号 (式 5) は DQF と異なり t_2 に関する項を含まないので非常に単純である。このことから MCT のパルス系列を巧く利用すれば、緩和関数 f_{11} や f_{31} から fitting により緩和率を同定するより直接的に、サテライト遷移あるいは中心遷移のみを NMR 分光器上で選択することが可能になる。

ここで適当な二つの位相の組を考える。この時、式 5 の (α, β) を $(\alpha_1, \beta_1), (\alpha_2, \beta_2)$ 等とし、二つの信号をそれぞれ c_1, c_2 倍して足しあわせる。さらに、時間 t_3 に注目し

$$\begin{aligned} \text{Signal}_{\text{total}} &= c_1 \text{Signal}_1 + c_2 \text{Signal}_2 \\ &= E \exp(R_1 t_3) + F \exp(R_2 t_3) \end{aligned} \quad (6)$$

と変形することを考える。そこで、

$$\begin{aligned} \text{Signal}_{\text{total}} &= k f_{31}(t_3) + l f_{11}(t_3) \\ &= \left(k \frac{\sqrt{6}}{5} + l \frac{3}{5} \right) e^{R_1 t_3} \\ &+ \left(-k \frac{\sqrt{6}}{5} + l \frac{2}{5} \right) e^{R_2 t_3} \end{aligned} \quad (7)$$

とする。次に t_1 については $f_{31}(t_1) = -f_{11}(t_1)$ が成り立つ場合を考える。この条件を満たす $t_1 = t_{eq}$ は常に存在し、

$$t_{eq} = \frac{\ln\{(\sqrt{6} + 3)/(\sqrt{6} - 2)\}}{R_2 - R_1} \quad (8)$$

となる。

この条件下で式 7 の第二項をゼロにするには、

$$\frac{k}{l} = -\frac{c_1 \alpha_1 + c_2 \alpha_2}{c_1 \beta_1 + c_2 \beta_2} = \frac{\sqrt{6}}{3} \quad (9)$$

すなわち、

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{-\alpha_2 - \frac{\sqrt{6}}{3} \beta_2}{\alpha_1 + \frac{\sqrt{6}}{3} \beta_1} \quad (10)$$

ならば、サテライト遷移のみを得ることができる。同様に式 7 の第一項をゼロにすれば、中心遷移のみをフィルターできる。サテライト遷移並びに中心遷移のそれぞれのフィルターに対し $c_1/c_2 = -3.21, \dots, -0.15, \dots$ であるが、これを $c_1/c_2 = -3, -0.2$ と有理数化して信号の積算に取り込むことができる。この時、 t_1 を若干 t_{eq} よりずらせば、実際の実験には支障はない。

3 検証

3.1 実験の概要

実験は室温において Bruker 社製 MSL400NMR 分光器により行った。図 1 に示される DQF 実験に加え、さらに図 2 で表される MCT、ITS の実験を行った。さらに位相回しを行うに当たっては CYCLOPS を取り入れた。

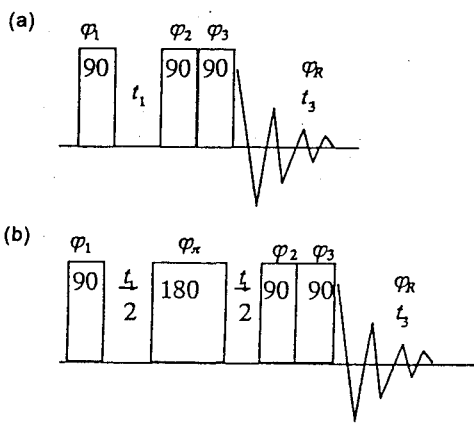


図 2: Pulse sequences used in the (a)MCT and the (b)ITS experiments.

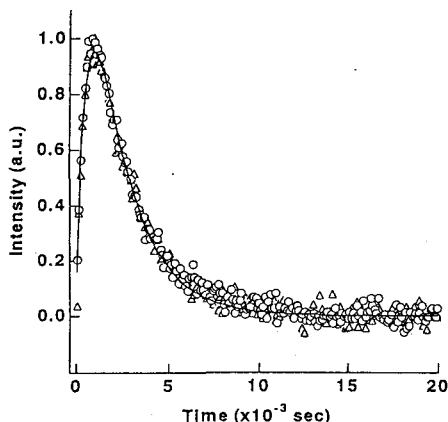


図 3: FID of ^{23}Na in the albumine gel with the pulse sequence of DQF (triangles) and MCT (open circles) and theoretical line (solid line).

3.2 混成遷移フィルター (MCT) の検証

MCT 実験は、アルブミンのパウダーを 500mM の NaCl 水溶液に 50%(w/w) の濃度で攪拌しゲル状にしたもので行った。この試料は「等方的でゆっくりとした」運動を行う Na イオンを観測する際に最も典型的なものである。

図 3 は MCT で得られた信号と DQF で得られた信号が同じものであることを示す。さらに緩和関数 f_{31} で fitting を行い理論線としている。

MCT の特徴は得られる FID が DQF と同じ緩和関数 f_{31} であるのに対し、そのパルス系列の組立が容易であることにある。このことは MCT を MRI 等のより高次のパルス系列へ応用する際実質的な感度向上をもたらすものと期待される。

3.3 遷移独立分離フィルター (ITS) の検証

ITS 実験は寒天のパウダーを 4%(w/w) の濃度で 500mM-RbCl 水溶液に攪拌しゲル状になったものを使用し、 ^{87}Rb の信号を観測した。

実際の ITS 実験は t_1 を擬似的な二次元 NMR の展開時間とし、以下のような手順で行った。

1. t_1 を変化させながら t_3 時間で FID 信号を取り込む。この時 c_1/c_2 は固定しておく。
2. $\text{Signal}_{\text{total}}$ の自然対数を取り直線となるところが $t_1 = t_{eq}$ である。そのときに設定した比 c_1/c_2 によりサテライト遷移あるいは中心遷移のみが得られる。

また、リフォーカスのための 180 度パルスを加えたが、理論上は FID が反転するだけであり、実質的に影響はない。

まず t_{eq} を見つけなければならないが、MCT 実験の fitting から得られた値を用いて $t_{eq} = 910\mu\text{sec}$ を予測できる。実際に図 4 より対数プロットが $t_1 = 900\mu\text{sec}$ において直線になることがわかる。さらにこの値を用いて ITS 実験を行い、その結果を DQF によるスペクトルと比較した。これを図 5 に示す。各遷移とも DQF と良く一致している。ITS、DQF による、それぞれの R_1 、 R_2 等の値を表に示すが、これも良く一致している。

以上から、ITS 実験が設計通りに直接的にサテライト遷移または中心遷移を選択していることがわかる。

	R_1 (Hz)	R_2 (Hz)	τ_c (psec)	J_0 (psec)	J_1 (psec)	J_2 (psec)	e^2qQ/h (kHz)
DQF	3235	823	2.2	4.3	1.0	3.2	780
ITS	3015	702	2.3	4.6	1.0	3.0	740

表 1: Microscopic parameters of ^{87}Rb ionic motion are derived from the each experiment. The asymmetry parameter is assumed to be zero.

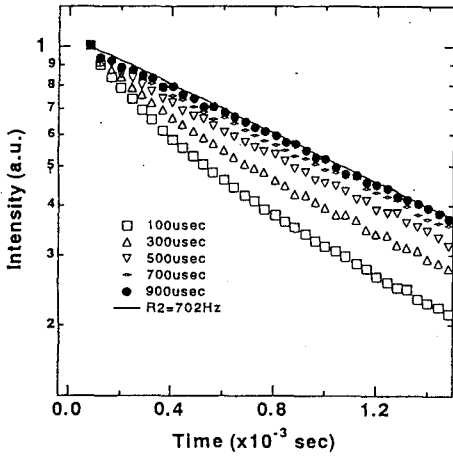


図 4: Obtained FID of ^{87}Rb in agar gel using a central transition filtering sequence in logarithmic plot.

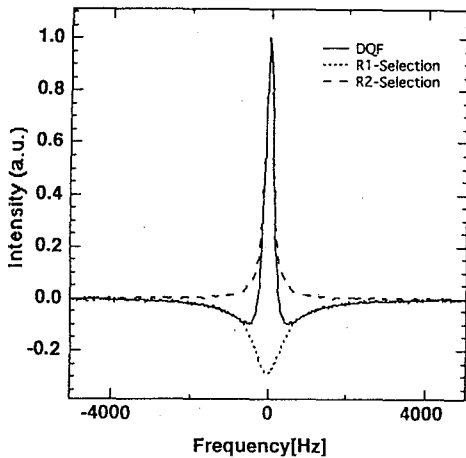


図 5: Obtained Spectra of ^{87}Rb in agar gel with R_1 and R_2 selection and DQF sequence.

4 まとめ

新しい多重指数関数的な NMR 緩和の計測法を開発した。MCT は核スピン 3/2 の系において DQF よりも単純でありながら同等の性能を持ったパルス系列である。ITS は緩和関数の fitting によらず、NMR 分光器上でサテライト遷移と中心遷移を選択できるものであり全く新しいものである。以上の新たな計測法について実験により検証し、その有効性を確認した。

参考文献

- [1] G. Jaccard, S. Wimperis and G. Bodenhausen, *J. Chem. Phys.* **85**, 6282 (1986)
- [2] 山田 整 「NMR における四重極相互作用を利用した新しい計測法の開発」(筑波大学大学院博士課程工学研究科博士論文) 1996 年 3 月
- [3] H. Yamada, J. Takeuchi, Y. Seo, A. Tasaki, and T. Erata, 投稿準備中.

3P27

広帯域反転／再結像パルスの多次元および同位体フィルター測定法への応用

(¹都臨床研, ²第一製薬) ○小椋賢治¹, 寺沢宏明^{1,2}, 稲垣冬彦¹

APPLICATION OF BROADBAND INVERSION AND REFOCUSING PULSES TO MULTI-DIMENSIONAL AND ISOTOPE-FILTERED NMR EXPERIMENTS

¹Kenji Ogura, ^{1,2}Hiroaki Terasawa and ¹Fuyuhiko Inagaki

¹Department of Molecular Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 18-22, Honkomagome 3-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan; and ²Basic Technology Research Laboratory, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 16-13, Kitakasai 1-Chome, Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan.

Pulsed field gradients (PFGs) have been incorporated into the ¹³C edited multi-dimensional pulse schemes to reduce experimental phase cycling, to eliminate undesirable artifacts, and to suppress the H₂O resonance. The HSQC-type pulse scheme is more preferable to accommodate PFGs into the pulse schemes than the HMQC-type. However, mainly due to additional 180° pulses in the HSQC-type experiments, which are not ideal near the edge of the ¹³C spectrum, the sensitivity of the HSQC-type experiments is much reduced, especially for aromatic and methyl signals. In the case of the ¹³C isotope-filtered experiments, detection of both aromatic and aliphatic protons has not been generally performed partly because tuning to both coupling constants for aliphatic groups (125~140Hz) and aromatic groups (~170Hz) was rather difficult and partly because a suitable pulse was lacking which simultaneously inverted the magnetization of aliphatic and aromatic carbons.

These inconveniences arise from the limitation of the excitation range with the ¹³C rectangular 180° pulses. Recently some shaped broadband inversion and refocusing pulses have been proposed to overcome this limitation. We propose here application of the shaped broadband inversion and refocusing pulses to the ¹³C edited multi-dimensional and ¹³C isotope-filtered experiments.

FULLY ¹³C-REFOCUSED MULTI-DIMENSIONAL EXPERIMENTS

Figure 1 shows the fully ¹³C-refocused 2D ¹H-¹³C HSQC pulse scheme (1). In this pulse scheme, two kind of shaped pulse are used; one is a hyperbolic-secant inversion pulse and another is a broadband refocusing pulse described in Table 2.C of Ref. (2), denoted by "V1" in here. The hyperbolic secant pulse inverts the longitudinal ¹³C magnetization and V1 pulse refocuses the ¹³C transverse magnetization for the wide chemical-shift range. Hence, these shaped pulse are effective for the measurement of ¹H-¹³C HSQC experiments without sensitivity loss. This pulse scheme have several advantage against the recent developed pulse schemes; (1) because the folded and unfolded signals appear in the same phase, it makes

広帯域反転パルス, 多次元NMR, 同位体フィルター

おぐらけんじ, てらさわひろあき, いながきふゆひこ

spectral handling easy, (2) we can incorporate the pulsed field gradient z-filter to suppress the solvent derived signals. Furthermore, this fully ^{13}C refocused ^1H - ^{13}C HSQC pulse scheme was incorporated to the pulse scheme for three-dimensional ^{13}C edited NOESY and four-dimensional $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ edited NOESY experiments. These pulse schemes were demonstrated on the N-terminal SH3 domain of Grb2 dissolved in 90 % $\text{H}_2\text{O}/10$ % $^2\text{H}_2\text{O}$ and in $^2\text{H}_2\text{O}$.

IMPROVED ISOTOPE-FILTERED EXPERIMENTS

Figure 2 shows the improved isotope-filtering pulse scheme (3) which was developed in combination with the double-tuned filter, the hyperbolic secant inversion pulse, and the z-filter with pulsed field gradient. This ^{13}C filtering pulse scheme is effective for the wide chemical-shift range from the methyl region to the aromatic region, simultaneously. We incorporated this filtering pulse scheme to several one-, two-, and three-dimensional experiments, which were applied to the $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ uniformly labeled N-terminal SH3 domain of Grb2 complexed with the unlabeled Sos-derived peptide. Proton resonances of the Sos-derived peptide were unambiguously assigned using the isotope-filtered DQF-COSY, TOCSY and NOESY spectra. Furthermore, isotope-filtered, isotope-edited 3D-NOESY identified intermolecular NOEs between the labeled protein and the unlabeled peptide. Through these applications, high filtering efficiency of the present pulse scheme was demonstrated.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Eriks Kupce and Peter Sándor for discussion about the V1 refocusing pulse.

REFERENCES

- (1) K. Ogura, H. Terasawa, and F. Inagaki, *J. Magn. Reson. B* **112**, 63 (1996).
- (2) D. Abramovich and S. Vega, *J. Magn. Reson. A* **105**, 30 (1993).
- (3) K. Ogura, H. Terasawa, and F. Inagaki, *J. Biomol. NMR* in press.

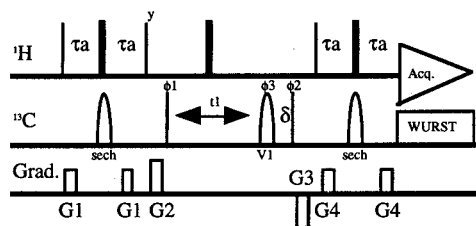


Figure 1. Pulse scheme for the fully ^{13}C -refocused 2D ^1H - ^{13}C HSQC experiment. Wide lines and narrow lines are rectangular 90° pulses and 180° pulses, respectively. The shaped pulse labeled by sech and V1 denote the hyperbolic-secant inversion pulse and the V1 refocusing pulse (2), respectively. All ^{13}C pulses are applied with 20 kHz RF strength. τ_a is set to 1.6 ms. δ is a refocusing delay, set to be equal to $\tau_{\text{H}180^\circ}$. Phase cyclings are $\phi_1 = x, -x, \phi_2 = 2(x), 2(-x), \phi_3 = 4(x), 4(-x), \text{rec.} = x, 2(-x), x$. Unlabeled pulses are applied from the x axis. All PFGs have rectangular shapes. PFG delays and strength are $G_1 = (0.5 \text{ ms}, 8 \text{ G/cm}), G_2 = (1.0 \text{ ms}, 25 \text{ G/cm}), G_3 = (1.0 \text{ ms}, -30 \text{ G/cm}), G_4 = (0.5 \text{ ms}, 10 \text{ G/cm})$.

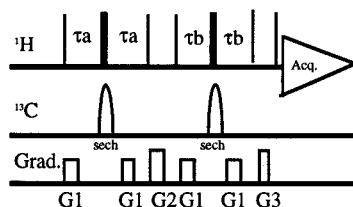


Figure 2. Pulse scheme for one-dimensional experiment with ^{13}C double tuned PFG z-filter. All the pulses are applied along the x-axis. The shaped pulses indicate the hyperbolic secant inversion pulses which have pulse width of 360 μs and field strength of 20 kHz. The ^{13}C carrier frequency is set on the center of the aromatic and aliphatic ^{13}C chemical shift regions ($\sim 75 \text{ ppm}$). τ_a and τ_b are set to typical values of $1/4J_{\text{CH}}$ which are tuned for the aliphatic and aromatic carbons, respectively. In our experimental condition, τ_a and τ_b are set to 1.85 ms and 1.45 ms, respectively. PFGs of G_2 and G_3 eliminate the unwanted transverse magnetization. PFG of G_1 cancels imperfection of the 180° pulses. All PFGs are applied with rectangular shape. PFG strength and length are: $G_1 = (10 \text{ G/cm}, 0.5 \text{ ms}), G_2 = (20 \text{ G/cm}, 0.5 \text{ ms}), G_3 = (25 \text{ G/cm}, 0.5 \text{ ms})$.

PFG HMBCを利用した異種核間 long range Jの測定法

(日本電子(株))○内海博明、熊木康裕、鴨 修、日元 徹

Determination of Heteronuclear long range scalar coupling constants using PFG J -HMBC spectram

○Hiroaki Utumi, Yasuhiro Kumaki, Osamu Kamo, Tesu Hinomoto
JEOL.Ltd

abstract

Heteronuclear long range scalar coupling constants are important parameters for structural elucidation of organic molecules .

We used modified J-HMBC 3D pulse sequence as J-HMBC 2D sequence in order to measure the longrange coupling constants. the signal amplitude of modified PFG J -HMBC 2D spectrum is fitting to $A\sin(\pi J_{\text{CH}} \delta)$. Therefore ,this method is simple and expandable .

初めに

異種核間のロングレンジ スカラー結合定数(long range J) は、有機分子の立体構造の決定に重要な役割を担っている。そのため、特に $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ のロングレンジ スカラー結合定数を求める方法に関しては、 ^{13}C 観測の手法がいろいろ提案されてきた(1),(2),(3)。しかし、解析対象分子が大きくなり、NMRスペクトル(特に ^1H スペクトル)が複雑になるにつれ、 ^{13}C 観測の手法では十分なデータが得られなくなってきた。

そこで、HMBCの信号強度がロングレンジ スカラー結合定数に依存することを利用した方法が近年提案されている方法である(7),(8),(9)。しかし、これらの方法も、ダイレクト相関信号とロングレンジ相関信号の強度比から計算する手順が、緩和時間を考慮にいれなければならないため、簡単とは言い難い。

そこで、我々は、文献(10)のJ-HMBCの3次元測定法を2次元法に変更し、比較的容易にロングレンジJを求める方法を考案したのでここに報告する。

装置

装置に、PFGユニット付きのJNM-Alpha 500 ,JNM-Lambda 400を用いた。プローブとしてはJNM-TH5FG,JNM-NH5XFGを用いた。

実験内容

パルスシーケンスはFig.1に示す。

キーワード : HMBC, long range scalar bonding constant ,pulsed field gradient

うつみ ひろあき、くまき やすひろ、かも おさむ、ひのもと てつ

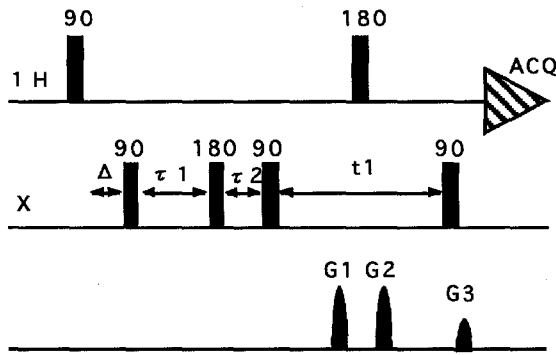


Fig.1, pulse sequence for the PFG J-HMBC 2D experiment
 $\tau_1 + \tau_2 = \text{constant time (CT)}, \Delta = 1/2J$

このパルスシーケンスは通常のPFG HMBCに比較して2番目のX180パルスを追加している。このX180パルスの位置を移動することによって、 $^1\text{H-X}$ の磁化移動効率に変化することになる。 $\tau_1 + \tau_2$ を一定にするのは $^1\text{H}-^1\text{H}$ のJ変調を一定に保つためである。このシーケンスにおいては、HMBCのロングレンジ相関信号強度をI、ロングレンジ スカラ結合定数を nJ_{HX} とした場合、以下の式で信号強度は変化することになる。

$$I = |A \sin(\pi^n J_{\text{HX}} \delta)| \dots\dots\dots \text{式(1)}$$

Aは絶対信号強度
 δ は $(\tau_1 - \tau_2)$

Aは絶対値信号強度、 δ は $(\tau_1 - \tau_2)$ である。従って、前提としてロングレンジ スカラ結合定数が一定の範囲内(12.0~0.0Hz)にあることを前提にすると、 δ を3点以上測定し、そのJ-HMBC信号強度変化が解るとA及び nJ_{HX} が決定されることが解る。この方法の有利な点は、(1)HMBCの相関信号が存在すれば、原理的にロングレンジ スカラ結合定数が求められることと、(2)信号強度変化からのみ、スカラ結合定数が得られるため計算が簡単である、ことである。
 そこで、我々は、まず、簡単な有機化合物を用いて、従来方法で得たJ値とPFG J-HMBC 2Dで得たJ値を比較することによって、その精度を求めた。また、 δ の測定点数による精度の変化を調べた。

実験結果

サンプルは10mg 4-methyl umbeliferone/d6-DMSOを用いた。 τ は $(\tau_1 + \tau_2) = 300 \text{ msec}$ に固定し、 δ を20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 msecと変化させた。HMBCの相関信号の強度変化を調べた。この強度変化を最小二乗法で式(1)にfittingした。3J(H6-C8)の結果をFig.2に示す。

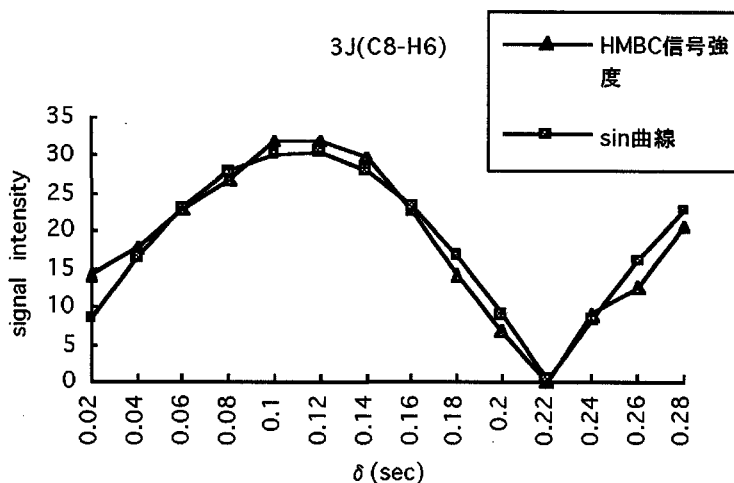


fig.2, 3J(C8-H6)のfitting結果

この結果から、 $3J(H6-C8)$ は4.5Hzと算出される。ちなみに、 1H non decoupling の ^{13}C -nmrより直接読み取った値は 4.1 ± 0.26 Hz、従来法のロングレンジスペクトル⁽¹⁾から得られた値は 4.8 ± 0.31 Hzであった。

table 1 に(A)従来法のロングレンジスペクトルと(B) 1H -non decoupling ^{13}C -nmrそして(C)PFG J-HMBC 2D法で求めたロングレンジスカラー結合の値を示す。

結論および今後の予定

このように、14点でPFG J-HMBC 2Dの強度変化をfittingすることで、正確なロングレンジスカラー結合定数が得られることが解った。今後は強度変化の点数を減らした場合の影響に関して調べる予定である。

参考文献

- (1) A. Bax, R. Freeman, J. Am. Chem. Soc., 104, 1099 (1982)
- (2) J. Jippo, O. Kamo, N. Nagayama, J. Magn. Reson., 66, 344 (1986)
- (3) T. Parella, F. Sanchez-Ferrando, A. Virgili, Magn. Reson. Chem., 30, 823 (1992)
- (4) M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 30, 1329 (1991)
- (5) U. Wollborn, D. Leibfritz, J. Magn. Reson., 98, 142 (1992)
- (6) G. T. Montelione, M. E. Winkler, P. Rauenbuehler, G. Wagner, J. Magn. Reson., 82, 198 (1989)
- (7) G. Zhu, A. Bax, J. Magn. Reson., 104A, 353 (1993)
- (8) G. Zhu, A. Renwick, A. Bax, J. Magn. Reson., 110A, 257 (1994)
- (9) G. Zhu, D. Live, A. Bax, J. Am. Chem. Soc., 116, 8370 (1994)
- (10) W. Willker, D. Leibfritz, Magn. Reson. Chem., 33, 612 (1995)

	A(Hz)	B(Hz)	C(Hz)
3J(H11-C10)	6.2	6.0	6.1
3J(H3-C10)	0.6	-	-
2J(H5-C10)	4.1	-	3.9
3J(H6-C10)	0.5	-	-
3J(H8-C10)	0.9	-	1.1
3J(H3-C11)	5.6	5.6	5.5
4J(H11-C2)	0.3	-	0.6
2J(H3-C2)	5.6	4.9	4.5
3J(H11-C3)	5.6	5.7	5.2
5J(H6-C3)	0.3	-	-
2J(H11-C4)	3.8	-	3.7
2J(H3-C4)	7.2	-	6.7
3J(H5-C4)	1.2	-	1.1
4J(H6-C4)	8.1	-	7.9
4J(H8-C4)	4.7	-	4.3
4J(H11-C5)	0.0	0.0	0.2
4J(H3-C5)	0.6	-	-
4J(H6-C5)	0.9	0.0	0.2
4J(H8-C5)	0.0	0.0	-
2J(H5-C6)	0.0	0.0	-
3J(H8-C6)	5.3	4.8	4.8
3J(H5-C7)	10.9	10.9	10.9
2J(H6-C7)	2.2	1.9	2.2
2J(H8-C7)	4.1	3.3	3.5
4J(H5-C8)	0.0	0.0	0.2
3J(H6-C8)	4.8	4.1	4.5
3J(H5-C9)	10.2	10.1	10.2
4J(H6-C9)	1.2	1.0	1.2
2J(H8-C9)	4.4	4.4	4.2

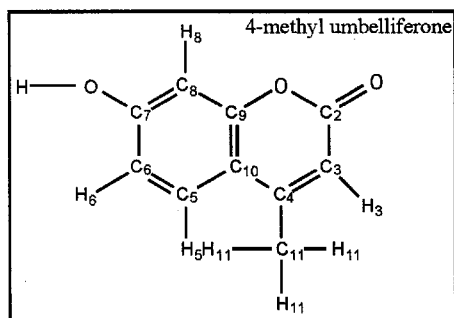


table 1
各種測定法に置けるロングレンジスカラー結合定数。

A : original long range J spectrum
±0.31Hz

B : ¹H-non decoupling ¹³C spectrum
±0.26Hz

C : J_HMBC 2D spectrum

1)雪印乳業(株) 生物科学研究所、2) 日本電子(株) 分析技術本

Effect of the diffusion in GOESY method

Masamichi Nakakoshi¹⁾, Hiroaki Utumi²⁾, Yasuhiro Kumaki²⁾

1) Snow Bland Ltd. 2) Jeol Ltd.

GOESY is 1D NMR method using selective pulse field gradient echo that was reported by Stonehouse et al. This method gives a better spectrum which contain no subtraction artifacts, but NOE enhancement is the lower than the conventional difference method by some factors (field gradient strength and the self diffusion etc). Especially, in case of small moleculars, the diffusion during mixing time gives influence to NOE enhancements. To relate of the diffusion and NOE enhancement of GOESY on β -D-glucose pentaacetate in CDCl_3 and DMSO-d_6 was discussed.

<はじめに>

選択励起を利用した各種差スペクトル測定は、対象とする信号の選択励起と非励起のスペクトルの差をとることで、スペクトルを得ているため信号の消え残りが現れる。この問題を解消する方法として考案された選択的磁場勾配エコーを利用した1次元測定¹⁾²⁾³⁾は、消え残りの抑制において差スペクトルより優れている。しかしながら、コヒーレンス移動経路の選択¹⁾、磁場勾配パルス条件及び混合時間における分子拡散により感度が低下¹⁾⁴⁾⁵⁾することが知られている。コヒーレンス移動経路の選択による感度低下は、サンプル及び測定条件に依存せず常に1/2になる。磁場勾配パルス条件では、磁場勾配強度及びパルス幅に影響される。また、混合時間における分子拡散の影響は、サンプルの自己拡散係数及び混合時間の長さに影響される。特に、混合時間の長いGOESY(Gradient enhanced nuclear overhauser effect spectroscopy)は、分子拡散の影響による感度の低下がStonehouseら¹⁾により指摘されているが、分子拡散における感度低下の程度については、何ら具体的記載はない。このことから、GOESY測定における感度低下の主原因のひとつである分子拡散の影響を調べる目的で同一サンプル即ち β -D-glucose pentaacetateを用い、サンプル濃度並びに磁場勾配条件を一定にし、粘度の異なる CDCl_3 及び DMSO-d_6 中での温度上昇に伴う分子拡散の増大とシグナル強度の減衰について、transient NOE difference(Tra-NOE)のシグナル強度との比較を行った。

キーワード GOESY PFG 分子拡散

なかこしまさみち、うつみひろあき、くまきやすひろ

<実験方法>

β -D-glucose pentaacetate 50mgは、それぞれ500 μ lの $CDCl_3$ 及び $DMSO-d_6$ に溶解し5 mm ϕ サンプルチューブを用い、積算回数はすべて32回で測定した。また、GOESY測定では、 $G1=6.35G/cm, G2=-6.35G/cm, G3=6.35G/cm, G4=12.7G/cm$, パルス幅=1msecで測定した。装置は、JEOL alpha-500を使用した。

Fig.1は、GOESY法¹⁾のパルスシーケンスを示した。尚、選択励起パルスはgausse pulseである。自己拡散係数は、PFG stimulated-echo法⁶⁾により測定した。

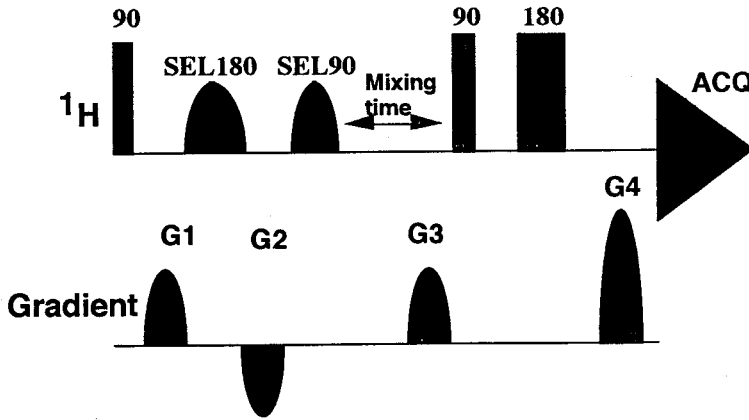


Fig.1 Pulse sequence for GOESY(Gradient enhanced nuclear overhauser effect spectroscopy)
Selective pulse is a gaussian pulse.

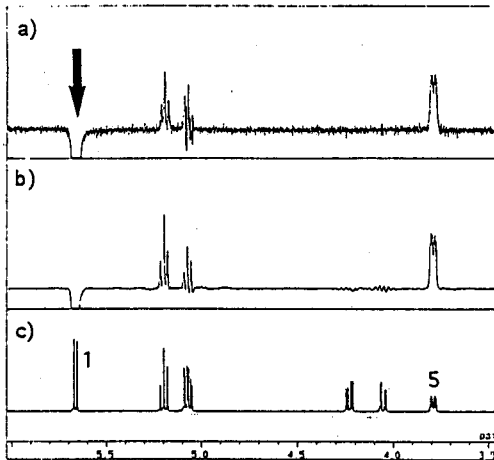


Fig.2 NMR spectra of β -D-Glucose pentaacetate 50mg in $CDCl_3$ at 30°C.

- a) is GOESY spectrum.
PFG strength=6.35G/cm, Pulse width=1msec,
Mixing time=800msec, Time=32, PD=7.4sec
- b) is transient NOE difference spectrum.
Mixing time=1200msec, Time=32, PD=7.4sec
- c) is 1H -NMR spectrum.

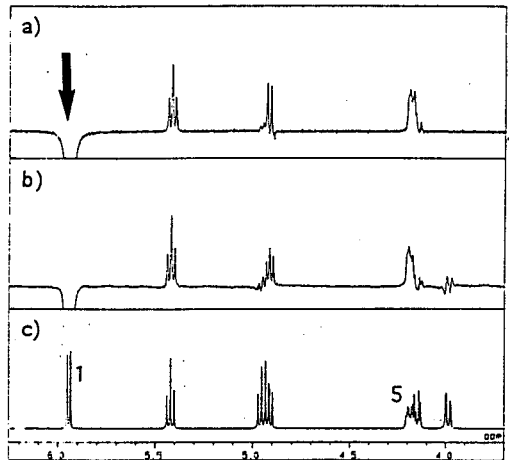


Fig.3 NMR spectra of β -D-Glucose pentaacetate 50mg in $DMSO-d_6$ at 30°C.

- a) is GOESY spectrum.
PFG strength=6.35G/cm, Pulse width=1msec,
Mixing time=800msec, Time=32, PD=5.8sec
- b) is transient NOE difference spectrum.
Mixing time=1400msec, Time=32, PD=5.8sec
- c) is 1H -NMR spectrum.

<結果及び考察>

Fig.2及び3は、CDCl₃及びDMSO-d₆中でのβ-D-glucosepentaacetate(以下Gluと略す)の¹H-NMR、Tra-NOE及びGOESYの各スペクトルを示した。Tra-NOE及びGOESYについては、Gluの1位プロトンを選択的に励起し5位プロトンのNOEシグナルを観測した。GOESYのシグナル強度は、Tra-NOEのシグナル強度と比較するとCDCl₃では、約30% DMSO-d₆中では、約50%であり溶媒の粘性の違い、即ちより粘性の低いCDCl₃での感度低下が観察された。

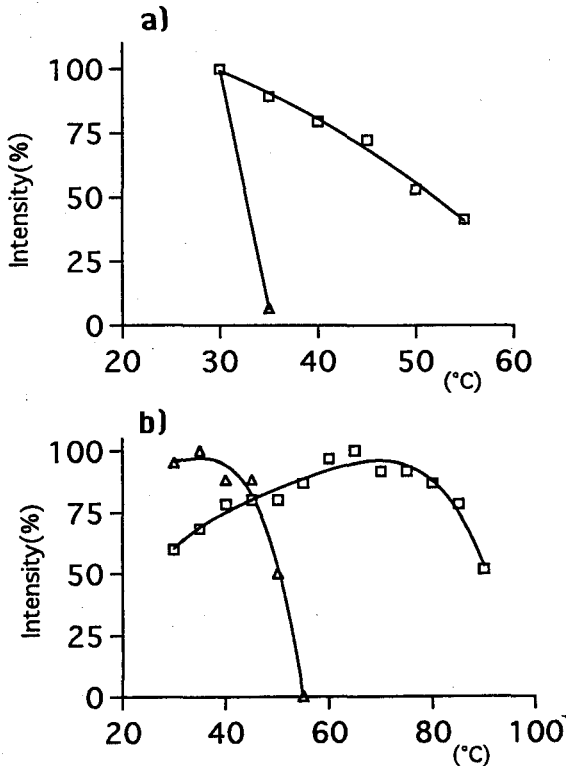


Fig.4 The effect of temperature to b-D-Glucose pentaacetate 5-¹H signal intensity of GOESY (△) and Transient NOE difference spectra (□). a) was measured in CDCl₃.

GOESY spectra;
Intensity of 100% at 30°C
Pulse width=1msec,
PFG strength=6.35G/cm
Mixingtime=800msec
Transient NOE difference spectra;
Intensity of 100% at 30°C,
Mixingtime=1200msec
b) was measured in DMSO-d₆.

GOESY spectra;
Intensity of 100% at 30°C
Pulse width=1msec,
PFG strength= 6.35G/cm
Mixingtime=800msec
Transient NOE difference spectra;
Intensity of 100% at 65°C
Mixingtime=1400msec

Fig.4は、温度を上昇させて観測したシグナル強度の変化を示した。尚、Tra-NOE及びGOESYのシグナル強度は、それぞれ最も高いシグナルを100%とした時の相対強度である。その結果、CDCl₃では、35°Cでシグナルが観測されなかった。DMSO-d₆においては、55°Cからシグナル強度が減衰し、60°Cでは殆どシグナルとして観測されなかった。したがって、磁場勾配強度、PFGパルス幅及びサンプル濃度が一定であることから、GOESYでのシグナル強度減衰の要因は、溶媒の粘性の違い及び温度上昇に伴う自己拡散の増大によることが明らかになった。そこで、それぞれの溶媒中での本サンプルの温度上昇に伴う拡散係数の変化を測定した。その結果、Fig.5に示される様にシグナル消失温度、即ちCDCl₃は35°C、DMSO-d₆は60°Cでの拡散係数は、ともに約 $1 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1}$ であることが判明した。

<まとめ>

GOESY測定は、サンプルの自己拡散がシグナル強度の減衰に影響を及ぼすことが明かとなった。このことから、自己拡散係数の大きなサンプル(低分子)または低粘性溶媒の測定は、磁場勾配量を少なくすると共に混合時間を極力短くし分子拡散の影響を少なくすることで、より良いスペクトルを得られると考えられる。また、サンプル濃度が一定であれば、磁場勾配強度、パルス幅及び混合時間を考慮することでTra-NOEのbuildup曲線からGOESYのシグナル強度を予測できると考えられることから、Tra-NOEのシグナル強度からGOESYのシグナル強度をシュミレーションし実験値との比較を検討する予定である。

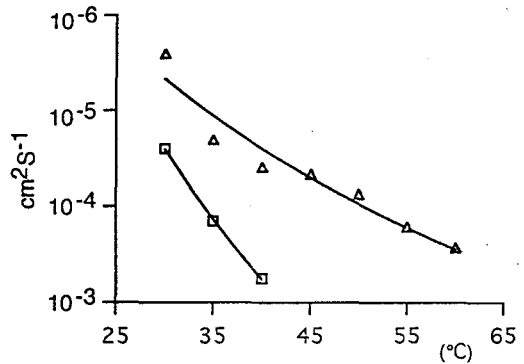


Fig.5 The effect of temperature to diffusion of β -D-Glucose pentaacetate in CDCl_3 (□) and DMSO-d_6 (△).

Diffusion was measured by PFG stimulated echo method.

- 1) J. Stonehouse, p. Adell, J. Keeler, A. J. Shanka, J. Am. Chem. Soc., 116, 6037 (1994)
- 2) T. Facke, S. Berger, J. Magn. Reson., A113, 257 (1995)
- 3) C. Dalvit, J. Magn. Reson., A113, 120 (1995)
- 4) P. Adell, T. Parerlla, F. Sanchez-Ferrando, J. Magn. Reson., 108, 77 (1995)
- 5) P. C. von Zijl, C. T. W. Moonen, J. Magn. Reson., 87, 18 (1990)
- 6) J. E. Tanner, J. Chem. Phys. 69, 1748 (1978)

HMQC-CONOESY Experiment Using Pulsed Field Gradient
Hiroyuki Koshino, Tetsu-ichiro Morita, Jun Uzawa

HMQC-COSY and HMQC-NOESY experiments are efficacious methods for structural studies of organic molecules. There is a limit to use HMQC-COSY and -NOESY experiments routinely owing to consuming data accumulation time. To alleviate the problem of long experimental time, HMQC-COSY and HMQC-NOESY experiments are combined by simple modification of HMQC-NOESY pulse sequence. Namely HMQC-COSY data acquisition time is placed in the mixing time of HMQC-NOESY pulse sequence and HMQC-NOESY data are separately accumulated and stored. In this combined HMQC-COSY and HMQC-NOESY experiment named HMQC- CONOESY, pulsed field gradient (PFG) is applied for coherence selection to improve the spectral quality.

複雑な天然有機化合物などで ^1H -NMRの信号の帰属が困難な場合、 ^1H の信号の重なりを ^{13}C などの化学シフトによって分離できるHMQC-COSYやHMQC-NOESY法は有効である。しかし天然存在比の試料で良好なスペクトルを得るには比較的長時間の測定を行う必要がある。測定時間の短縮を目的に ^1H - ^1H COSYとNOESYの測定を同時に行い測定時間の短縮ができるCOCONOSY (COMBINED CORRELATED AND Nuclear Overhauser enhancement Spectroscopy) 法¹⁾の手法を異種核2次元NMRのHMQC-COSYとHMQC-NOESYに応用し、さらに磁場勾配パルス(PFG)²⁾をコヒーレンス選択に用いたPFG-HMQC-CONOESY法のパルス系列を作成し実験を行ったので報告をする。

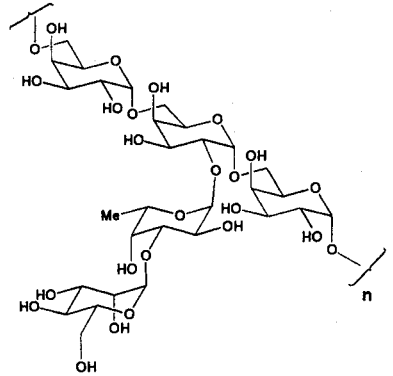
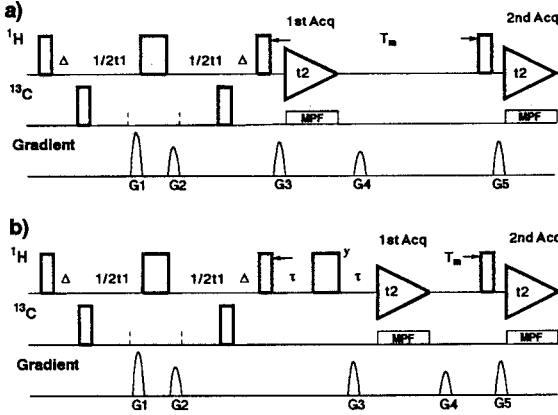
パルス系列はFig. 1に示した。a)はPFG-HMQC-CONOESYで、b)は ^1H の 180° パルスを加えてRelayタイプにしたPFG-HMQC-R-CONOESYであるPFG-HMQC-CONOESYのパルス系列では最初のデータ取り込みまでPFG-HMQC-COSYと同じで、PFG-HMQC-COSYのデータ取り込み後、磁場勾配パルスG4を加えNOESYの混合時間の後に ^1H の 90° パルスと磁場勾配パルスG5を加え、PFG-HMQC-NOESYのデータを取り込む。PFG-HMQC-COSYとPFG-HMQC-NOESYのデータは別々に保存し、別個にデータ処理を行う。このパルス系列では通常のPFG-HMQC-NOESYの測定時間とまったく同じ測定時間でHMQC-NOESYの他にHMQC-COSYの測定が可能である。したがって比較的長い測定時間を要するHMQC-NOESYとHMQC-COSYの測定を効率的に行うことが可能である。PFG-HMQC-CONOESYのパルス系列で使用される磁場勾配パルスの比率はG1 : G2 : G3 : G4 : G5 = 5 : 3 : 4 : 2 : 4などが可能である。短所としてはパルス系列の性質からデータ取り込み時間とNOESYの

キーワード：磁場勾配パルス, HMQC-CONOESY, CONOESY, polysaccharide

こしの ひろゆき, もりた てついちろう, うざわ じゅん

混合時間に制限があることである。

応用例として分子量約15kDaのpolysaccharideであるfomitellan C³⁾の測定結果をFig. 2に示した。パルス系列はPFG-HMQC-R-CONOESYを用い、 $\tau=62.5\text{ms}(4\text{Hz})$ 、NOESYの混合時間は400 ms、測定時間は38hr21minであった。今回報告する測定法は総合的に測定時間を短縮でき有効な測定法である。



Structure of Fomitellan C

Fig. 1 Pulse sequence for PFG-HMQC-CONOESY(a) and relay type PFG-HMQC-R-CONOESY(b).

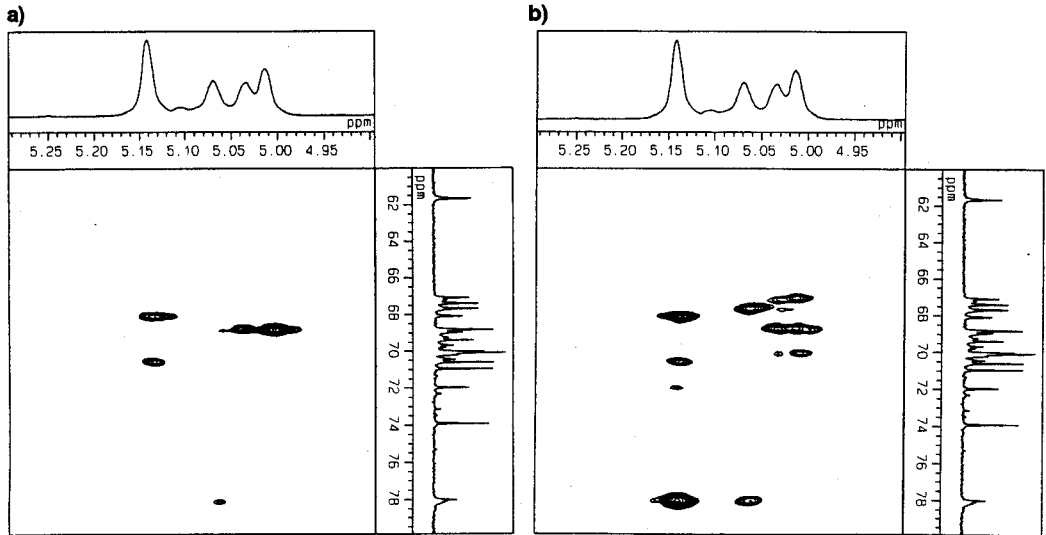


Fig. 2 PFG-HMQC-R-CONOESY spectra for Fomitellan C. a) HMQC-COSY spectrum. b) HMQC-NOESY spectrum.

謝辞

パルス系列の作成に関し御助言をいただきました日本電子 阿部 教氏、ならびにfomitellan Cを供与していただきましたKIST生命工学研究所 齋 益東博士に感謝致します。

参考文献

- 1) C. A. G. Haasnoot, F. J. M. VAN DE VEN, and C. W. Hilbers, *J. Magn. Reson.* 56, 343(1984).
- 2) R. E. Hurd and B. K. John, *J. Magn. Reson.* 91, 648(1991).
- 3) 投稿準備中.

Development of spectrometer for rotating-frame imaging

Mineyuki Hattori, Hideaki Shimizu, and Tetsuo Moriya

Electrotechnical Laboratory, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN

New configuration of transmitter and receiver coils for two- and three-dimensional rotating-frame imaging experiments is proposed. The probe and the attachments to the conventional high resolution NMR spectrometer were developed.

<序論> 回転座標系イメージングでは、位置情報のエンコードにラジオ波磁場勾配を利用する。静磁場勾配が変動するとき起こる、渦電流の影響を測定対象に与えないという点から、神経などの活動を阻害することなく代謝計測を行う方法として期待されている。Hoult による回転座標系ズーグマトグラフィ[1]においては、 x 軸方向のラジオ波磁場勾配と z 軸方向の静磁場勾配を用いて、二次元イメージングを行っている。位相変調回転座標系イメージング[2]においては、一軸方向に勾配をもった X 軸 θ 度パルスにより $Y-Z$ 軸上に展開した後(振幅変調)、 Y 軸 90 度パルスにより $X-Y$ 面上に展開し(位相変調)、 θ を段階的に変えた一連の実験を行い、一次元の化学シフト分布を得ている。さらに、一回の測定で断続的にラジオ波磁場勾配パルスを印加し、nutaton を擬 FID として得て振幅変調を行う、より高速な方法へも発展している[3,4]。ここでは、静磁場勾配を用いなくて、二次元以上の分光学的イメージングを高速に行うことをめざす。

<装置> Fig. 1 に分光計全体のブロック図を示す。分光計は、日本電子 GX-270 を基本とした。位相検波器への参照信号から二系統のラジオ波 cw 信号を取り出し、分光計本体のパルス発生器と同期したパルス発生器でタイミングを制御した。スイッチで切り出された RF パルスは、それぞれ、増幅されコイルへと送られる。

ラジオ波磁場勾配を発生するコイルとして、これまでに、表面コイル、コーン型コイル(z 軸)、非対称鞍型コイル(x,y 軸)、鞍型コイルを中央からずれた位置で使用する(z 軸)、などが提案されている。均一ラジオ波磁場照射用・検出用の鞍型コイルと、直交配置に置かれた表面コイルによる実験[3]では、試料を回転して投射再構成法を行うことを提案しているが、同心円上に置かれた大小二つの表面コイルによる実験[5]では、結合の問題は回避されている。Fig. 2 に試作したプローブヘッドを示す。プローブは、日本電子のプロトン・低周波数核種二重共鳴用(W/B)を基本とし、プローブヘッドを保護しているガラスチューブのまわりに一回巻き、三回巻きの非対称対向ヘルムホルツコイル二組を直交に、うち一組のコイルが標準のプロトン用、照射・検出コイルと同軸になるように配置した。

回転座標系、イメージング、ラジオ波磁場勾配

はっとりみねゆき、しみずひであき、もりやてつお

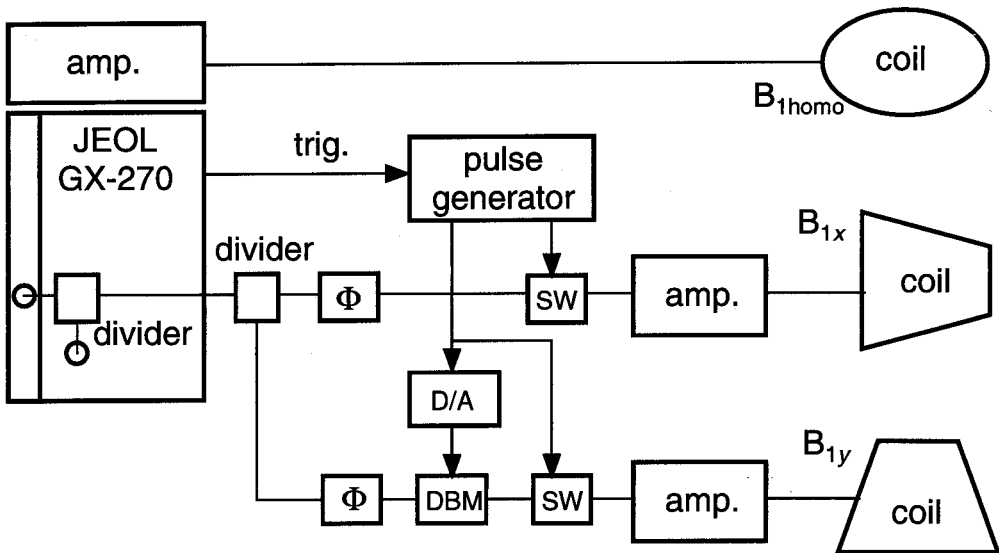


Fig. 1 Block diagram of the spectrometer for the rotating-frame imaging

<議論> X軸方向の位置エンコードに位相変調[2]を、Y軸方向の位置エンコードに勾配ラジオ波照射による rotary echo 法 [6]を適用したシーケンスを提案し、検証した。今後、位置情報エンコードの手法の検討を進め、静磁場勾配に比べると、立ち上がり、立ち下がり要する時間が格段に短いというラジオ波磁場勾配の特徴を活かした、高速イメージング法への発展が期待される。

<参考文献>

- [1] D. I. Hoult, J. Magn. Reson. 33 , 183 (1979).
- [2] M. J. Blackledge, B. Rajagopalan, R. D. Oberhaensli, N. M. Bolas, P. Styles, and G. K. Radda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 , 4283 (1987).
- [3] P. Maffei, P. Mutzenhardt, A. Retournard, B. Diter, R. Raulet, J. Brondeau, and D. Canet, J. Magn. Reson., A107 , 40 (1994).
- [4] K. R. Metz, J. P. Boehmer, J. L. Bowers, and J. R. Moore, J. Magn. Reson. B103 , 152 (1994).
- [5] P. Styles, M. B. Smith, R. W. Briggs, and G. K. Radda, J. Magn. Reson. 62 , 397 (1985).
- [6] I. Solomon, Phys. Rev. Lett. 2, 301 (1959).
- [7] P. Mansfield and I. L. Pykett, J. Magn. Reson. 29 , 355 (1978).

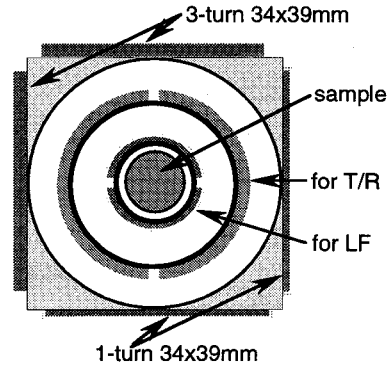


Fig. 2 Probe for two-dimensional rotating-frame imaging

3P32

高速汎用マイクロプロセッサを用いた リアルタイム画像再構成システムの開発

○巨瀬勝美¹, 拝師智之¹, Arvind Caprihan², Eiichi Fukushima²

1. 筑波大学物理工学系, 2. The Lovelace Institutes

Development of Real-Time NMR Image Reconstruction Systems using High-Speed Personal Computers

Katsumi KOSE¹, Tomoyuki HAISHI¹, Arvind CAPRIHAN², Eiichi FUKUSHIMA², 1.

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 2. The Lovelace Institutes

Two real-time NMR image reconstruction systems have been developed using high-speed personal computers. The first one was made on a MS-DOS system (CPU: Pentium, clock freq. 100 MHz) with a home-built frame memory board. The second one was made on a MS-Windows system (CPU: Pentium, clock freq. 133 MHz). The reconstruction time for one 128 x 128 pixel image was about 310 ms for the DOS system and 110 ms for the Windows system. On the other hand, the time required for the image display was about 30 ms for the DOS system and 120 ms for the Windows system. NMR imaging experiments for observation of unsteady particle or bubble motion in fluids were performed using these systems. The obtained results demonstrate great promise of these real-time image reconstruction systems.

<はじめに>

ほとんどのNMRイメージング装置では、一連の撮像シーケンスが終了してから画像再構成と表示が行われている。いっぽう、高速な撮像法を用いて、データ収集と並行して画像を再構成・表示する、いわゆる「リアルタイムMRI」は、非常に魅力的かつ有用なシステムとして期待されている。

その最初の試みは、Riedererらによるもので、彼らはこれをMR fluoroscopyと名付けた¹⁾。彼らは、高速勾配エコー法でデータを収集し、アレイプロセッサを用いることにより、128×128画素の画像を毎秒約1枚の速度でリアルタイムに表示することに成功した。いっぽう、Koseらは²⁾、エコー・プラナー法でデータを収集し、デジタル信号処理専用のプロセッサ(DSP)を用いることにより、64×64画素の画像を、毎秒約7枚の速度でリアルタイムに表示することに成功した。なお最近では、専用のハードウェアを用いたシステム³⁾や、ワークステーション(WS)を用いたシステム⁴⁾も報告されている。

キーワード：NMRイメージング，リアルタイム画像再構成，EPI

こせかつみ，はいしともゆき，アーヴィンド・カプリハン，ふくしまえいいち

以上のように、リアルタイム画像再構成装置として、これまで、さまざまなものが発表されているが、それぞれいくつかの欠点も見られる。たとえば、専用のハードウェアを用いた場合³⁾は、画像再構成時間は飛躍的に短縮されるものの、開発に多大の時間とコストを要するという欠点がある。また、WSを用いた場合には、そのOS(UNIX)の性格上、時間的応答性に難点がある。

本研究では、以上の状況をふまえて、近年、処理速度の向上と低価格化の著しいパーソナルコンピュータを用いた画像再構成システムを開発した。その結果、低価格でも十分な処理速度を有するシステムを短期間で開発することに成功した。以下に、システムの構成と、これらを用いて行った実験結果を述べる。

<画像再構成システム>

本研究で開発したリアルタイム画像再構成システムを、Fig.1-2に示す。Fig.1は、クロック周波数100MHzのマイクロプロセッサ(Pentium)内蔵のパーソナルコンピュータ(PC-9821Xa9:NEC)の拡張バスに、AD変換ボード(ADM-8498BPC, 12-bit, 2 hannel, マイクロサイエンス)と、画像表示のための自作のフレームメモリボードを備えたシステムである。このシステムのソフトウェアの開発は、MS-DOS ver.6.2上で、Microsoft社のCコンパイラ(MS-C ver.6)を使用して行った。

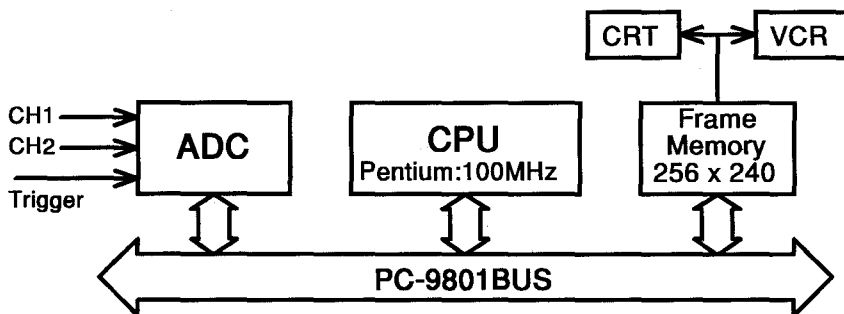


Fig.1. Block diagram of the real-time image reconstruction system made on the DOS-PC. Reconstructed images are stored in a RAM disk as well as recorded on a VCR.

Fig.2は、クロック周波数133MHzのPentium内蔵のウィンドウズPC(XPS-P133c:DELL)の拡張バスに、AD変換ボード(PC-414G3, 14-bits, 2 channel, DATEL)を備えたシステムである。このシステムでは、再構成された画像は、MS-Windows上に作られたウィンドウに表示されるため、特別な表示システムは必要としない。なお、このシステムのソフトウェアの開発は、Windows3.1およびWindows95上において、MicrosoftのVisual C++1.5もしくはBorlandのBorland C++4.0を使用して行った。

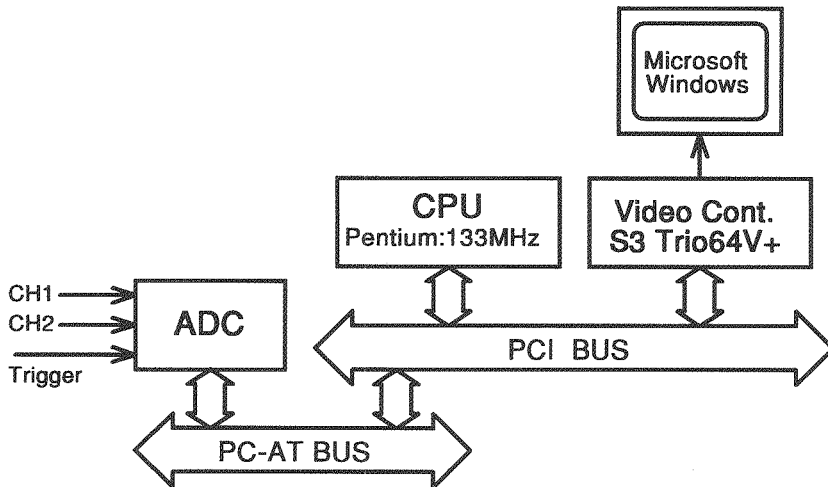


Fig.2. Block diagram of the real-time image reconstruction system made on the Windows PC. Reconstructed images are displayed on a Windows client area of the CRT and stored in a RAM disk.

<実験と結果>

DOSのシステムを使用した実験の被写体は、少量のセルロースを加えて粘性を上昇させた水を内径18mmのNMR用試験管に入れ、上方から、直径3.2mmと6.4mmのナイロン球を投入したものである。なお、 T_1 を短くするために、少量の硫酸銅を加えた。撮像には、静磁場強度4.74 Tの鉛直開口の超伝導磁石と、能動遮蔽型勾配コイルを備えた自作のシステムを用いた。パルス系列には、繰り返し時間4.72ms、エコー時間2.70ms、フリップ角 30° のFLASHシーケンスを用いた。

Fig.3に、1.0秒の時間間隔で、試験管軸を含む鉛直断層面で撮像した結果を示す。撮像においては、リアルタイム表示されている画像を見ながら、大きい球体を断層面に捉えるように試料を回転した。その結果、(a)では断層面から中心が離れていた大きい球体が、回転後には(d)に示すように断層面内に中心が来ている。なお、この実験では、1枚の画像の撮像時間に604.16ms、画像再構成に約310ms、画像表示に約30msを要した。

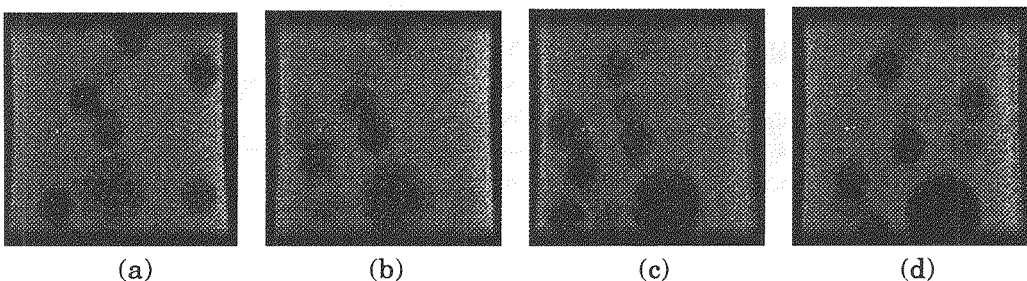


Fig.3. Spheres sinking through a viscous fluid in a test tube measured every 1.0 s. FOV: $(19.2 \text{ mm})^2$, Slice thickness: 4 mm, Image matrix: 128 x 128.

Windowsのシステムを使用した実験の被写体は、液状洗剤の中の気泡である。この液体をガラス容器に満たし、気泡の注入のためのチューブを容器中央部に鉛直に固定した。そして、画像をリアルタイムに観察しながら、チューブが正確に断層面内に来るように容器をRFコイルの中に固定した。撮像には、1.9Tで31cmの水平開口径をもつ超伝導磁石を使用したNaloracのシステムを用いた。パルス系列には、繰り返し時間6.0ms、エコー時間3.0ms、フリップ角30°のFLASHシーケンスを用いた。

Fig.4に、1.12秒の時間間隔で、鉛直断層面で撮像した結果を示す。撮像においては、リアルタイム表示されている画像を見ながら、注射器で空気を送り込み気泡を発生させた。その結果、気泡がチューブから発生する瞬間が、図に示すように捉えられている。また、この実験では、1枚の画像の撮像時間に768ms、画像再構成に約110ms、画像表示に約120msを要した。

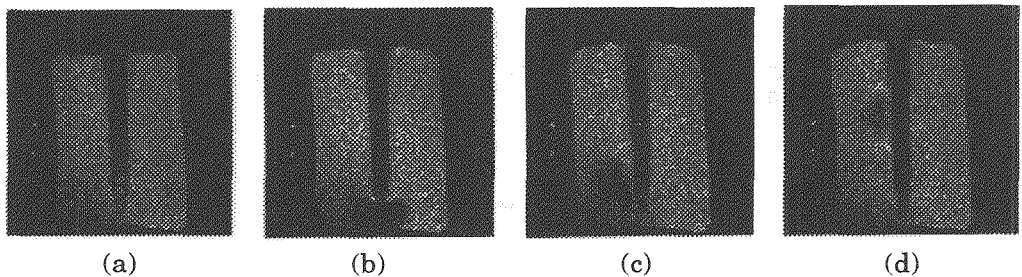


Fig.4. An air bubble in a Dawn soap solution measured every 1.12 s. FOV: (89 mm)², Slice thickness: 6.5 mm, Image matrix: 128 x 128.

<むすび>

高速なマイクロプロセッサを搭載したパーソナルコンピュータを用いて、リアルタイムNMR画像再構成システムを開発した。本システムは、検波後の2チャンネルのNMR信号と、データサンプリングのためのトリガー信号以外は必要としないため、既設のMRIシステムにも接続することが可能である⁵⁾。今後、開発現場や実験室などを中心に、このようなシステムが普及していくことが期待される。

References

- 1) Wright RC, Riederer SJ, Fazaneh F, et al: Real-time MR fluoroscopic data acquisition and image reconstruction. *Magn Reson Med*, 12, 407-415, 1989.
- 2) Kose K, Inouye T: A real-time NMR image reconstruction system using echo-planar imaging and a digital signal processor. *Meas Sci Technol* 3, 1161-1165, 1992.
- 3) Gmitro AF, Ehsani A, Bercham T: A real-time reconstruction system for Magnetic Resonance Imaging, *Magn Reson Med* 35, 734-740, 1996.
- 4) Cox RW, Jesmanowicz A, Hyde JS: Real-time functional magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*, 33, 230-236, 1995.
- 5)市川修, 巨瀬勝美, 瀬尾芳輝: 動物用MRIにおける高速画像再構成実験, *日磁医誌*, 15, 216-220, 1995.

*This work is to be published in *Journal of Magnetic Resonance*.

3P33 リアルタイムNMRイメージング装置を用いた 静止流体中を沈降する球体の運動の計測

筑波大学物理工学系 ○拝師智之, 巨瀬勝美

Measurements of motion of spheres sinking through static fluids
using a real time NMR imaging system

Tomoyuki HAISHI, Katsumi KOSE,

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

Motion of particles in fluids is widely observed in nature. To understand their dynamic properties, measurements of flow around the particles are essentially important. For the first step, we measured flow around a sphere sinking through a static fluids using echo-planar imaging (EPI) with special tagging pulses. Flows around sinking spheres were successfully visualized with the deformation of the tags for Reynolds numbers from 40 to 270.

<はじめに> 多数の固体粒子が、流体中を運動する現象は自然界において広く見られる。このような現象を解析するためには、個々の粒子の周囲の流れを明らかにすることが非常に重要である。その第一歩は、三次元物体として最も基本的な形状を有する、球体によって生成される流れについて研究することであろう。しかしながら、最も単純な系の一つと思われる、静止した流体中を沈降する球体のまわりの流れさえも、非定常な領域に置いては、全く定量的な計測はされていないのが現状である。そこで本研究は、磁気標識パルスとエコー・プラナー法を用いて、円管内に満たした流体中を沈降する球体のまわりの流れを、定量的に計測することを目的として行った。

<実験方法> 測定対象は、「鉛直におかれた円管内の静止流体中を、沈降する流体のまわりの流れ」である。円管はアクリル製で、底部はふさがれており、内径16mm、外径20mm、全長約600mmである。作業流体として、硫酸銅の水溶液にスクロースを溶かした6種類の流体を作成した。これらの作業流体の動粘度は、ウベローデ粘度計を用いて計測した。また、以下に述べるNMR画像計測とは独立に、円管容器中の作業流体の中を沈降するナイロン球(後述)の速度を、ストップウォッチで数回計測し、その平均値と動粘度を用いて球体のレイノルズ数を算出した。作業流体の特性をTable1に示す。なお、これらの計測、および以下のNMR計測において、作業流体の温度は、常にほぼ25℃に保持した。

キーワード: NMRイメージング, EPI, DANTEパルス
はいしともゆき, こせかつみ

球体はナイロン製で、直径は6.35mm、密度は1.125g/cm³である。この球体を、流体容器下部の観測領域の中央部に正確に導くための「試料ガイド」として、流体容器の内部に、さらに、内径8mm、外径12mm、長さ約600mmのアクリルパイプを挿入した。撮像は、ナイロン球を、この試料ガイドの中に、10~20秒の間隔で1個ずつ静かに投入し、作業流体表面から約30cm下の、管軸を含む鉛直断面(スライス厚2mm)において行った。

撮像に用いた装置は、静磁場強度4.74T、室温開口径89mmの鉛直な開口をもつ超伝導磁石(Oxford社)と、アクティブシールド型勾配コイル付きRFプローブ(Doty社)を使用した、自作のイメージング装置である。撮像に用いたパルス系列は、Fig.1に示すような、エコー時間20ms、データ収集時間40.96ms、繰り返し時間200msのEPIシーケンスである。なお、流れは、90度励起パルスの約50ms前に印加した、空間標識パルス(DANTEパルス)によって生成した格子状の反転磁化パターンを用いて可視化した²⁾

信号計測・画像再構成計算・画像表示は、当研究室で開発した、リアルタイム画像再構成システムを用いて行った。このシステムは、高速のパーソナルコンピュータ(PC-9821Xa9:CPU Pentium 100MHz)を使用したもので、128×128画素の勾配エコー法の画像再構成は約310ms、64×64画素のEPI画像の前処理・画像再構成は約80msで行うことができる^{3,4)}。

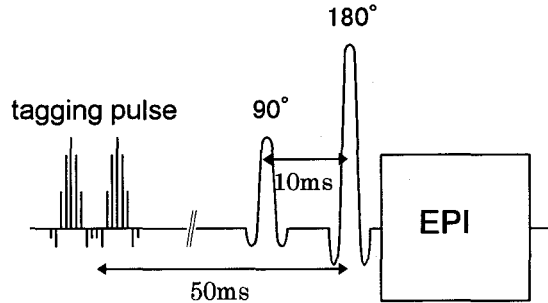


Fig.1 RF pulse sequence.

working fluids	A	B	C	D	E	F
sucrose density(M/l)	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6
fluid density(g/cm ³)	1.118	1.109	1.100	1.091	1.081	1.071
viscosity (cst)	2.15	1.98	1.81	1.70	1.56	1.44
sinking speed(cm/s)	1.30	2.44	3.53	4.44	5.38	6.24
Reynolds number	40	80	120	170	230	280
T ₁ (ms)	61	62	67	70	70	75
T ₂ (ms)	30	30	31	31	34	34

Table1 Working fluids used in the experiment. (25°C)

<実験結果> Fig.2, Fig.3およびFig.4に実験結果を示す。いずれも撮像領域は19.2mm×19.2mm、画素数は64×64である。また、tagの間隔は2.0mmである。

Fig.2の画像は、作業流体Dを用いたときに撮像した200ms間隔で連続する4枚の画像である。Fig.2において、(a)落下球は、まだ撮像領域に達しておらず、DANTEパルスによって格子状に標識された作業流体は静止している、(b)流体は、進行方向および水平方向に押し退けられている、(c)球背後の後流により作られた、流速が著しく異なる境界面が確認できる、(d)球が通過した後も、円管の中心付近で、鉛直下方向への流れが存在しているが、画面上方になるにつれて、流速は遅くなっている。なお、1画素の大きさは0.15mm×0.15mmであるので、連続した画像を比較することにより、球体の落下速度を決定することができる。この場合、Fig.2(b),(c)において、球の中心間の距離が、0.9cmを移動しているので、落下速度は4.5cm/sと推定した。これは、ストップウォッチによる計測とよい一致を示した。Fig.3は、(a)~(d)およびその後の断層画像を鉛直方向に10枚連続させたものである。重複する部分を取り除くことにより、球背後の後流を全体として捉えることができた。

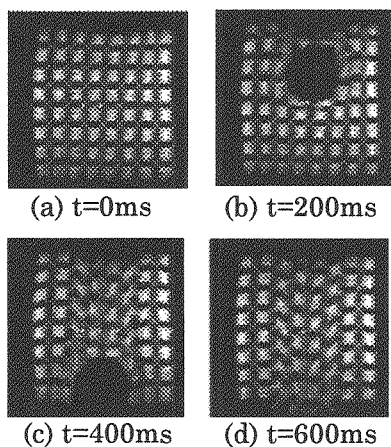


Fig.2 Four successive instants of a sphere sinking through a static fluids measured every 200ms. Re is about 170.

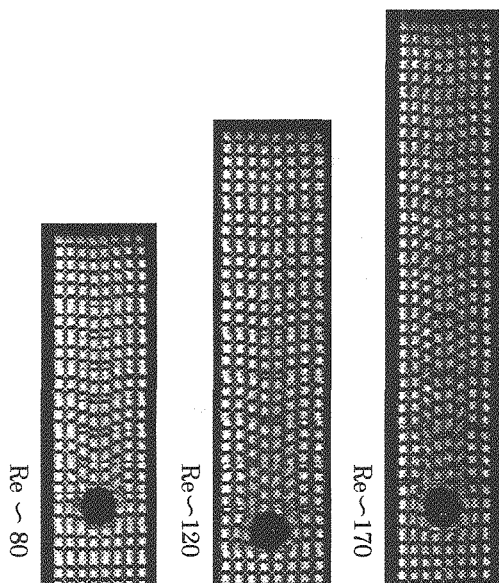


Fig.3 Synthesized images made from image sequences of sinking spheres. Wakes behind the spheres are clearly visualized.

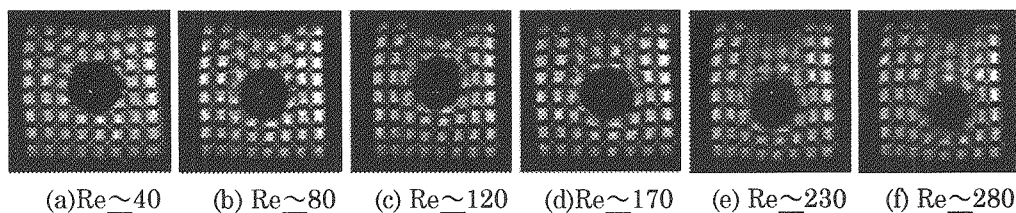


Fig.4 Flows around spheres at various Reynolds numbers.

次に、作業流体A~Fを用いたときの画像をFig.4(a)-(f)に示す。画像上部の中央部分がかけているのは、励起されていない作業流体が流れ込んだためである。Fig.4(a)-(d)においては、球背後の格子パターンが、鉛直方向を軸として対称であるので、流れは完全に定常である。ところがFig.4(f)では球の運動は非定常で、後流におけるパターンは非対象となり、蛇行運動の一部が観測されている。球が小さく見えるのは、スライス面からずれているためである。

<考察> 本研究で用いた装置では、 64×64 画素の画像データを、エコー・プラナー法を用いて、繰り返しリアルタイム計測できる最短時間は約180msであった。そこで、繰り返し時間としては200msを用いたが、個々のレイノルズ数を決定するためには、球の沈降速度を再構成画像から求める必要がある。そのためには、最低2枚の連続した球の画像が必要であるので、許される球の落下速度は、可視化されてる領域の鉛直方向への長さが約16mmであることから、約8cm/s以下である。今回、計測を行った球体の落下速度は、最大約6.2cm/sであったので、ほとんどの場合において、落下速度は計測可能であった。ただし、NMR信号の計測時間が40.96msと幅をもつため、位置の計測精度がどの程度かをコンピュータシミュレーションなどで確認する必要がある。

さらに時間分解能を向上させるために、繰り返しを短くし、一連の計測の後に画像再構成を行う方法が考えられる。しかし今回のような、流体を対象とした実験においては、速い繰り返しによる勾配コイルの発熱が原因となる、作業流体の温度上昇が無視できないため、試料や勾配コイルの冷却が必要となる。

<むすび> 高速なパーソナルコンピュータを用いた、リアルタイムNMRイメージング装置を用いて、静止流体中を沈降する球体まわりの流れの計測を行った。エコー・プラナー法と標識パルスを組み合わせることで、レイノルズ数が約40~270の間について、球体まわりの流れを、200msの時間間隔で可視化することに成功した。

今後の課題として、コンピュータシミュレーションなどを用いて計測精度を確認すること、格子パターンの動きを計測することにより、面内の流れのベクトルの分布を求めること、そしてさらに大きなレイノルズ数における計測を行うこと、他の流れの計測手段(位相法)との比較を行うことなどがあげられる。

References

- 1) G. Kuwabara, S. Chiba and K. Kono, J. Phys. Soc. Jpn. 52, 3373 (1983).
- 2) K. Kose, J. Magn. Reson. 98, 599 (1992).
- 3) 巨瀬勝美, 拝師智之, 日本磁気共鳴医学会雑誌, 第16巻3号, 98 (1996).
- 4) K. Kose, T. Haishi, A. Caprihan, and E. Fukushima, J. Magn. Reson. Submitted for publication in 1996.

3P34 骨の3次元Constant-time-imaging法

京都府立医科大学¹整形整形外科・⁴第一生理学、

²Bruker Analytische、³生理学研究所。

○高宮尚武¹、日下義章¹、平澤泰介¹、V.Lehmann²、D.Gross²、K.Zick²、村上政隆³、
瀬尾芳輝⁴

3D constant-time-imaging of bone.

Departments of ¹Orthopaedic surgery and ⁴Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, ²Bruker Analytische, ³National Institute for Physiological Sciences.

Hisatake Takamiya¹, Yoshiaki Kusaka¹, Yasusuke Hirasawa¹, V.Lehmann², D.Gross², K.Zick², Masataka Murakami³, Yoshiteru Seo⁴.

Constant-time-imaging (CTI) or single-point-imaging (SPI) is a new imaging modality which allows to use an echo time less than 100 μ second by acquiring single point data with the 3D-phase encoding. In the present study, we imaged the proximal femur of a rat using the 3D-CTI method and compared the image with that of the 3D-gradient-echo (GE) method. Imaging was performed using AMX-300 spectrometer and a micro 5 micro imaging probe. The 3D-CTI method clearly visualized the cortical bone as well as trabecular structure within the femoral head. Furthermore, the CTI method has no artifact caused by magnetic susceptibility. The 3D-GE method visualized only negative contrast of the cortical bone and trabeculae, and the chemical shift artifact from fat in the bone marrow obscured the bony structures. In conclusion, the 3D-CTI method is quite useful to image bony tissue because its relaxation time is very short and it is susceptible to chemical shift artifact and magnetic susceptibility.

【目的】

骨組織の磁気共鳴イメージングは、骨組織内の水、脂肪組織による化学シフトや磁化率のちがいによるアーチファクトの問題、また、非常に速いT2緩和時間を有しているため従来の方法ではエコー時間に制約を受けることから、撮像は困難であり、整形外科領域においても長年の研究課題であった。Constant-time-imaging(CTI)法あるいはSingle-Point-Imaging(SPI)法は、3次元位相エンコーディングと、1回の位相エンコーディングで1点のデータサンプリングを行うことを特徴とし、実質的なエコー時間を100マイクロ秒以下にすることができる。今回、われわれは、ラット大腿骨近位部を3D-CTI法で撮像し、3D-gradient-echo(GE)法による画像との対比を行ったので報告する。

【方法】

装置は、AMX-300wbスペクトロメーターとmicro5マイクロイメージングプローブ(RFコイル径12mm)を、NMR試料管は10mm径のものを使い、ラットから摘出した大腿骨近位部を撮像した。(Fig.1)に撮像パルス系列を示す。撮像パラメーターは、FOV 0.8×0.8×1.6cm、画素数 64×64×128、位相エンコーディング磁場勾配は

Key words: 骨組織 (bone tissue)、CTI (constant-time-imaging)、固体イメージング (solid imaging)

たかみやひさたけ、くさかよしあき、ひらさわやすすけ、Lehmann V.、Gross D.、Zick K.、むらかみまさたか、せおよして

ランプタイム 0.3ms、磁場安定化時間 0.3ms、最大磁場磁場強度 +92.5G/cm、位相エンコーディング時間 0.1ms、測定周波数幅 125kHz、励起パルス $1.5\mu\text{s}$ (Flip 角 8 度)、パルス繰り返し時間 25ms、積算回数は3回とした。逐次点法のごとくデータ採取を行うために、撮像時間は11時間を要した。

【結果および考察】

GE法による画像 (エコー時間 4ms) では、軟骨は描出されたが、骨皮質は全く陰性画像となり、骨髓内の脂肪・水が主たる画像信号であった。骨組織には水、脂肪組織が混在しているために、化学シフトの影響を受けやすく、磁化率による水、脂肪組織と骨組織間でのアーチファクトを生じ易い。また骨組織のT₂緩和時間が非常に短いため、従来ではエコー時間に制限を受け、骨組織そのものからNMR信号を得ることは困難であった。

Fig.2 にCTI法でのZ-X面のスライス画像 (a) と3次元再構築結果 (b) を示す。1ボクセルは、 $125\mu\text{m}^3$ であったが、積算回数は3回で、ほぼ十分なS/Nとなっており、骨皮質は明確に描出され、骨頭内部の骨梁構造も観察可能であった。CTI法は磁化率や化学シフトの影響を受けず、実質的なエコー時間を100マイクロ秒以下にすることができ、骨組織のNMR信号により画像を得ることが可能であった。

本法に様々なPreparation Pulseを組み合わせることで、種々の病態における骨組織の質的な変化をMRIにより明らかにすることが可能であると考えられる。

Fig.1 Pulse sequence of constant-time-imaging.

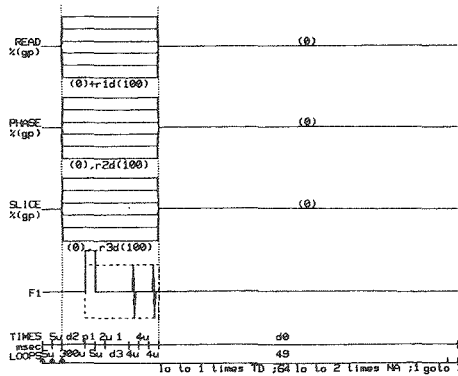
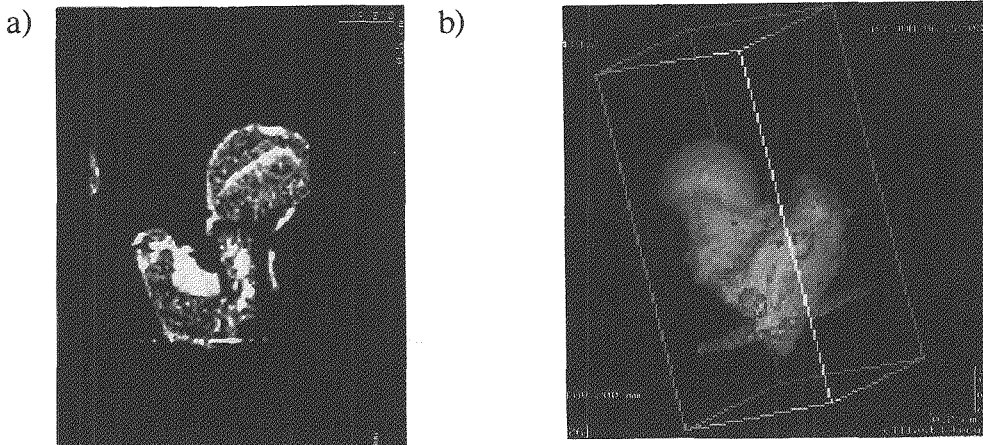


Fig.2 Constant-time-imaging of the femoral bone of a rat.



九大薬 ○金沢洋子, 土井祥寛, 川原靖史, 檜崎美智子, 野田陽子, 田中彬嗣

Pharmacokinetics by NMR Imaging

- ^{19}F Chemical Shift Imaging of Antitumor Drug 5-FU and UFT in Mice -

Yoko Kanazawa, Yoshihiro Doi, Yasuhumi Kawahara, Michiko Narazaki, Yoko Noda
and Yoshitugu Tanaka

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-82

Chemical shift imaging is a useful method for the visualization of spatial distribution of chemical species. The improvement of this technique is awaited in the field of biology or medicine where the information on the regional metabolism of drugs or intrinsic substances including its time course is important. The difficulty is in the detection of compounds in low concentration in multidimensional detection, (3+1)D, within a reasonable accumulation time. We employed a method of alternate sampling of 2 signals in the chemical shift selection for ^{19}F spin echo images. It reduced the total accumulation time, and solved the problems in Dixon method including the effect of inhomogeneous susceptibility in the sample, which we reported last year. A pharmacokinetic study was performed on the anti-cancer drugs, 5-FU and UFT (FT+uracil, 1:4) in tumor bearing mice at 9.4T. The metabolic processes of 2 systems and the difference in drug dynamics were shown on the ^{19}F images.

NMR 化学シフト 画像は複数の化合物の空間分布を視覚化するのに理想的な方法といえる。一方でこれを薬物動態追跡に適用するにあたっては低濃度物質の4次元情報をいかにして短時間に得るかが問題である。昨年の本討論会で報告した単純な化学シフト選択画像ならびにDixon法を発展させる方向として、今回は2信号を交互に励起検出することで比較的長い縦緩和時間を持つ系のパルス繰り返し時間の制約および試料内の磁化率の不均一に基づく画像強度のむらなどの問題の解決を狙った。本研究で用いた系は制がん剤である5-フルオロウラシル (5-FU or FU) とそのプロドラッグである1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT) の製剤 UFT (FT + ウラシル, 1:4) のマウス体内の代謝プロセスである。

^{19}F NMR による5-FU系薬品の研究としてはWolfらによる *in vivo* 測定[1], Martinoらによる代謝物同定[2] が古くから行われており、最近ヒトの肝臓、腫瘍における代謝追跡に進んでいる。[3] 画像化は1995年に Brix らがラットにおいて 1.5 mmol/kg 5-FU投与直後にFUを、その次に代謝物の信号を選択し成功した。[4] 一方 FTおよびその製剤 UFT の *ex vivo* ならびに *in vivo* NMRによる評価は黒木らが報告した。[5]

5-FU 系の制がん剤は従来分解代謝産物による急性毒性が問題とされてきた。従って初期分解生成物のうちNMR検出の容易なF-β-アラニン(FBAL)が注目されていた。一方、最近のソリブジン事件でみられた毒性はソリブジンの代謝物による5-FUの分解抑制が強く、その結果造血機能に障害を与えたものといわれる。これは薬品の有効濃度と危険濃度の範囲の厳しい管理、即ち代謝物を含めた薬物体内濃度のモニタの重要性を示した例である。

キーワード： ^{19}F NMR画像, 化学シフト画像, 薬物動態, 5-FU, マウス

かなざわようこ, といよしひろ, かわはらやすふみ, ならさきみちこ, のだようこ, たなかよしつぐ

【実験】

薬品：FU および FT は大鵬薬品より得、ウラシルは市販のものを用いた。投与にはこれらを 0.5 % CMC 溶液に懸濁させたものを経口投与剤として用いた。

動物：健康マウスおよびMH134腫瘍細胞を移植した 6-9 週令の C3H 雌性マウスを用いた。それぞれ 3-6 時間絶食後、FU 換算で 1 mmol/kg の薬品を経口投与した。大半の実験ではエーテル麻酔下に NMRプローブに固定し、NMR 測定中は 0.5 % ハロタンで麻酔を維持したが、一部ではベントバルビタール腹腔投与を用いた。測定後直ちに腫瘍あるいは臓器を摘出し、10 mm NMR試料管中で加熱することにより酵素失活させた。これを用いて組織内薬物およびその代謝物の定量を行った。

NMR測定：*In vivo* 測定には Varian 社製 Unity 400 plus と縦型 89 mm の磁石を用いた。代謝物定量には JEOL社製 FX-100 を使い、既報の方法[6]に従って¹⁹F 濃度を決定した。

In vivo ¹⁹F スペクトル測定：直径 12 mm のサーフェスコイルを肝臓あるいは腫瘍位置の皮膚に密着させて測定した。測定条件はシングル矩形パルス 20 μs であるがこれはコイル表面より 3mm で約 90°, 6mm で 45° に相当する。用いた Tr 0.2 s では表面より 5-6mm あたりの感度が最も高くなる計算になる。

¹⁹F 化学シフト画像測定：外径 40 mm 高さ 35 mm の ¹⁹F/¹H tunable volume coil と自己遮蔽型勾配コイルを使用した。測定シーケンスは Gaussian pulse で化学シフト選択した単純なスピンエコーである。反応系と生成系を交互にサンプリングした。64 x 16 data point、スライスは 10mm あるいはなし。

In vivo 緩和時間測定：Volume coil で 376 MHz 発信、12 mm 遮蔽型サーフェスコイル受信で行った。

【結果と考察】

1. 12 mm サーフェスコイルを用いて測定した腹水腫瘍マウスの肝臓および下腹部の信号を主な反応経路とともに図 1 に示す。5-FU のヌクレオシドとヌクレオチド類の信号は *in vivo* スペクトル上で識別できないので、まとめて F-nuc として表した。5-FU と UFT 投与マウスの肝臓における代謝は 1 分毎に追うことができ、既存の研究から期待された結果[5]が確認されている。下腹部でのスペクトル測定は肝臓測定の後で行ったが、FUH₂ 以外の重要な代謝物が観測された。なお、腹水腫瘍測定にはコイルを下腹部に設定したが、肝臓を完全に避けることを重視したため膀胱からの信号が一部混入しているかも知れない。

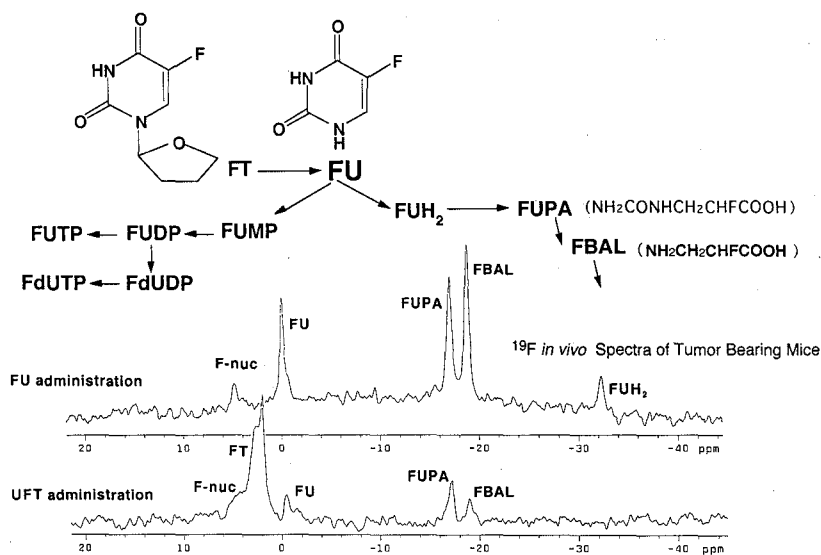


図 1. 5-FU あるいは UFT 投与マウスの *in vivo* ¹⁹F スペクトル

2. 40mm $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ tunable プローブで測定した ^1H 画像、 ^{19}F スペクトル、Spin Echo 法による ^{19}F 化学シフト選択画像を図2に示す。画像はcoronal で ^1H と ^{19}F は同一位置で得たものであるが ^{19}F 画像はスライスなしである。 ^{19}F の化学シフト選択周波数は左側がFUあるいはFT、右側が F-ureido propionic acid (FUPA) と F- β -alanine (FBAL) である。なお、画像に添付したスペクトルは画像測定直前の2-5分測定の結果であるが、高さ35 mm の volume coil を用いているため、画像強度との直接の対応は期待できない。

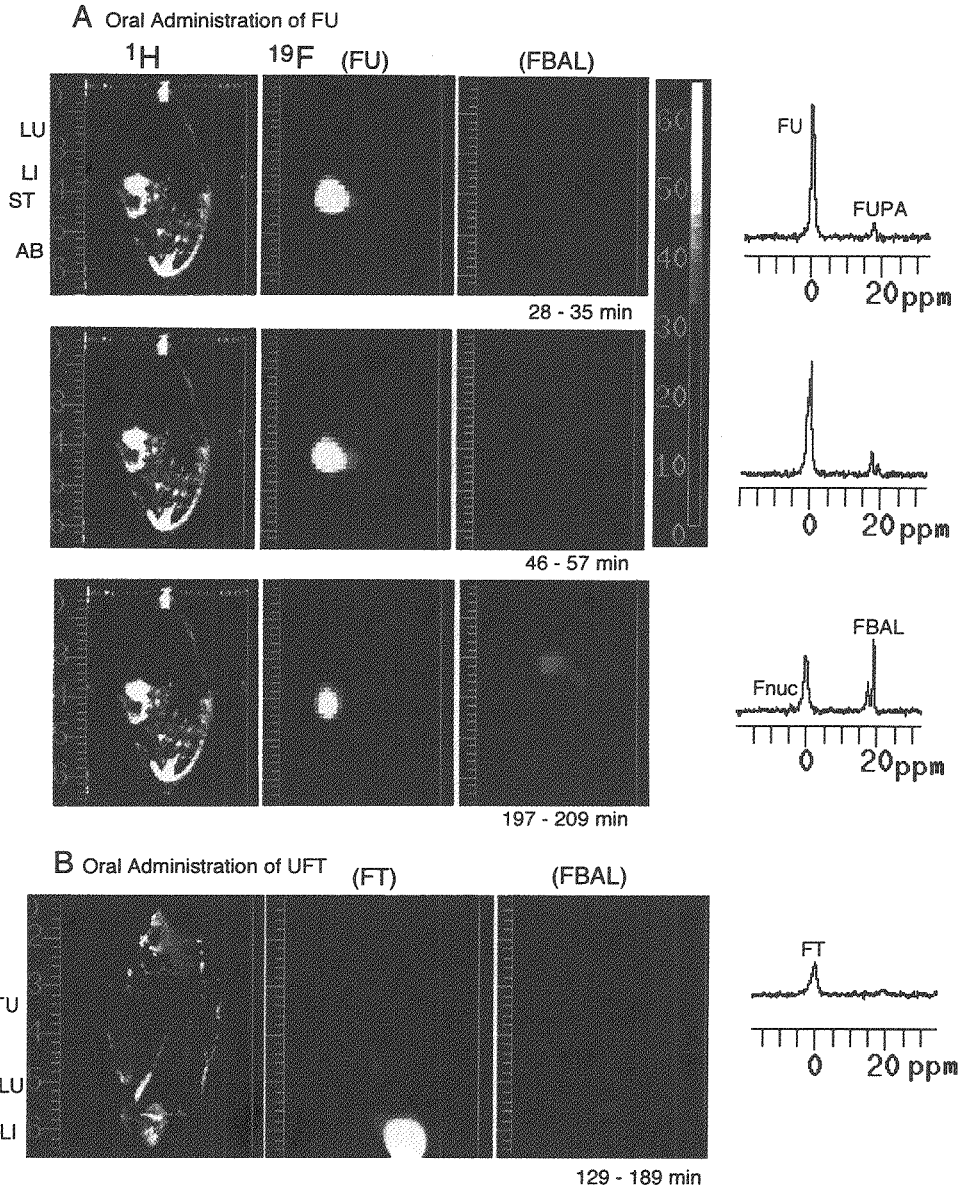


図2. FU あるいは UFT 投与マウスの ^1H および ^{19}F 画像、 ^{19}F スペクトル

A. FU 投与健常マウスの画像: 胃(左方)でのFUと肝での代謝物生成過程が示される。

画像後摘出した胃でのFU濃度は約 0.16 mmol/kg, F-nuc は 0.01 mmol/kg であった。

B. UFT 投与の皮下腫瘍マウスの画像: 腫瘍(左上)位置で FT が画像化されている。

3. 健常、腫瘍マウス共に薬品投与直後には7-8分の積算によって胃の位置にFUあるいはFTの画像が得られた。ついで肝臓への集積と代謝過程がわかる画像が得られた。腫瘍位置の信号はFU投与では得られていないが、UFT投与の場合にはFT選択で観測できた。

4. 今回の1 mmol/kg 単回経口投与の条件では、それぞれの薬物と代謝物の動態が、10分以内の測定で画像化できた。5-FUの肝臓代謝を除けば、この系の測定に時間分解能はそれほど高い必要はないので、投与量を減らすことは可能と考えられる。

5. この系の化合物の T_2 を生きたまま測定したところ、FU や FBAL では 20 - 40 ms 程度であった。F-nucの値はこれらより短いと考えられる。有効代謝物である F-nuc の画像化へ向けては、生成濃度の問題の他に化学シフト選択条件の厳しさ、 T_2 の短さなどを克服する必要がある。よりよい測定条件を探索中である。

[結論]

マウスのような小動物において、 ^{19}F 画像が臓器単位での薬物動態を表すことが示された。画像による代謝情報収集は、サーフェスコイルによる局所スペクトル測定よりも長い測定時間を必要とするものの、目的化合物の分布状況を知る上での意義は大きいといえる。

[文献]

1. Presant CA, Wolf W, Waluch V et al. The Lancet 343 1184 (1994).
2. Lemaire L, Martino R, De Forni Met al. Br. J.Cancer 66, 119 (1992).
3. Wolf W, Waluch V, Presant CA et al. Abstracts of ISMRM 375 (1996).
4. Brix G, Bellman ME, Haberkorn U et al. Magn.Reson.Med. 34, 302 (1995).
5. Kanazawa Y, Kurogi S, Shinohara S et al. Chem.Pharm.Bull. (1994).
6. Kanazawa Y, Yamane H, Shinohara S et al. J.Neurochem. (1996).

○三森文行¹、吉岡 大^{1,2}、女屋博昭^{1,3}、板井悠二³、土井幹雄⁴
 (¹国立環境研究所、²放医研、³筑波大、⁴筑波メディカルセンター)

NMR imaging of liver in the LEC rat

F. Mitsumori¹, H. Yoshioka^{1,2}, H. Onaya^{1,3}, Y. Itai³, M. Doi⁴

(¹National Institute for Environmental Studies, ²National Institute of Radiological Sciences, ³Tsukuba Univ., ⁴Tsukuba Medical Center)

The Long-Evans Cinnamon (LEC) rat is a new mutant strain which abnormally accumulates copper in the liver and spontaneously develops hepatic lesions including hepatocellular carcinoma (HCC). Therefore, it could be a good model animal to study the development of those hepatic lesions. However, there have been few studies of NMR imaging of the LEC rat livers. The aim of this study is to characterize NMR appearance of hepatic lesions developed in the LEC rats and to establish the basis of differential diagnosis of hepatic lesions.

【はじめに】 LECラットは銅の代謝異常から肝臓に大量の銅を蓄積する、新しく樹立された突然変異動物である。急性肝炎、慢性肝炎を経て、最終的に肝細胞癌を含む各種肝疾患を発症する。このため、肝疾患の発症過程を研究する上で有用なモデル動物になると期待される。本動物を用い、NMR分光法による肝疾患のさまざまな非侵襲的解析が考えられるが、まず、LECラットに発生する肝疾患の識別と同定が必要である。そこで本研究では第一段階として、LECラット肝のNMRイメージ測定を行い、病理診断との比較からLECラットに発症する肝疾患のキャラクタリゼーションを試みた。

【方 法】 ラット肝イメージの測定のために、内径85mmの変形 Aldermann-Gran型のNMR信号検出器を作製した。この信号検出器を口径30cmの水平ボア磁石を有するBruker Biospec24/30 NMR分光計に接続して測定を行った。磁場勾配コイルはMagnex社の自己シールド型 AGRAD 255/178を用いた。上記測定システムを用いて、T₁強調画像(TR/TE=306/13ms, データ256×256または256×128)、T₂強調画像(CPMG法, 8エコー, TR/TE=2112ms/15-120ms)を測定した。FOVは8cm、スライス厚は2または3mm。またGd(DTPA)を造影剤として用いたダイナミックスタディをスピンエコー法(TR/TE=156/13ms, データ256×64)により実施した。Gd(DTPA)はラットの大腿静脈に挿入したカニューレより0.3mmole/kg体重注入し、70秒ごとに5回の測定を行った (TR/TE=156/13 msec、データ256×64)。またこの後、造影後のT₁強調画像を測定した。

NMR imaging, LEC rat, liver, hepatocellular carcinoma, Gd(DTPA)

みつもりふみゆき, よしおかひろし, おなやひろあき, いたいゆうじ, どいみきお

【結果と考察】 LECラットの肝には1mmol/kg以上の銅イオンが蓄積されているにもかかわらず、そのプロトンイメージには常磁性イオンの影響は認められない。このことは、LECラット肝に存在する銅イオンが反磁性であることを示唆する。液体クロマトグラフィーの結果から、ほとんどすべての銅がメタロチオネイン(MT)結合型で存在していることを確認している。X線分析の結果からMTに結合した銅イオンは1価であると報告されており、イメージングの結果はこれを支持する。慢性肝炎期のLECラット11匹の肝のNMR画像と、病理診断の比較により、胆管線維症(cholangiofibrosis)、肝紫斑症(peliosis hepatis)[1]、高分化型の肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、嚢胞(cyst)、脂肪変性など多彩な病変が画像上で正常部位と区別できた。図1に肝紫斑症とHCCの併発例のT₂強調画像を示す。画像上でのこれらの疾患の相互識別には、その形態のほか、T₁、T₂強調画像、造影後T₁強調画像におけるコントラストが利用可能である。定量的解析には、T₁強調画像における肝筋の信号強度比、T₂、緩和試薬注入後の経時的な信号強度の増加率を用いた。図1の例では、正常肝でのT₂値が42.9msに対して、肝紫斑症部位では75.7ms、HCC部位で65.4msと延長していた。胆管線維症、肝紫斑症、HCCはGd(DTPA)投与後のT₁強調画像で信号強度の増強がみられるが、前2者が投与90秒後に最大信号を示し、その増強が10分以上にわたって継続するのに対し、HCCは初期相のみにおいて造影され、後期にはかえって周囲の肝実質より低信号を示すという特異的な造影パターンを示した(図2)。これらの結果から、画像診断により、胆管線維症や肝紫斑症とHCCを識別することは可能と考えられ、同一動物での継続的観察による肝細胞癌の発症過程の追跡が可能となった。

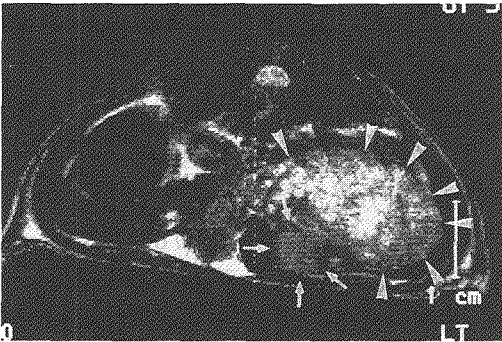
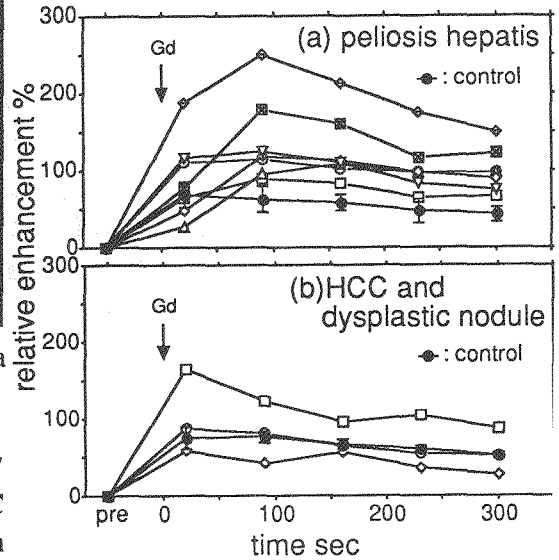


Fig.1(↑). T₂-weighted image of liver in a 104w-old LEC rat. Arrowheads show peliosis hepatis, and arrows show HCC. Fig.2(→). Time-intensity curve of (a) 7 cases of peliosis hepatis, and (b) 1 HCC and 2 dysplastic nodules in LEC rats in dynamic studies using Gd(DTPA).

【文献】

[1] H. Yoshioka, Y. Itai, H. Onaya, M. Doi, F. Mitsumori, Magn. Reson. Imaging, 14, 429 (1996).



3P37

H-2 DQF PFG NMRを用いたラット座骨神経内の重水運動の測定

生理研¹、テルアビブ大・化学²

○瀬尾芳輝^{1*}、H. Shinar²、Y. Sharf²、G. Navon²

Discrimination of Water in Sciatic Nerve - A H-2 DQF-PFG NMR Study.

Dept. of Molec. Physiol., Natil. Inst. for Physiol. Sci., and Schl. of Chem., Tel Aviv Univ.

○Y. Seo¹, H. Shinar², Y. Sharf² and G. Navon²

Characteristics of water in the rat sciatic nerve were studied by H-2 double-quantum-filter (DQF) NMR and by H-2 double-quantum-filter pulsed-field-gradient (DQF-PFG) NMR. A piece of sciatic nerve was equilibrated with 99% Deuterated saline solution for 30 min, and was placed in a 100 μ L capillary, and its long axis was placed parallel to the external magnetic field (11.7 T or 7 T). Three compartments of D₂O in anisotropic motion condition were detected by H-2 DQF NMR. The observed residual quadrupole splitting were 467 ± 16 , 123 ± 23 and 8.7 ± 0.9 Hz at 24°C which were assigned as D₂O in epineurium, endoneurium and axon respectively. The 3 DQF signals showed anisotropic diffusion. Only the diffusion of axoplasm water represented restricted diffusion, and the inner-diameter of axon was estimated as 7.5 μ m.

【はじめに】 生体組織中の水には種々の存在形態が考えられ、結合水・自由水と言った概念もその一つである。従来、軽水素水についてH-1核磁気緩和時間を用いた測定・解析が行われてきた。重水素核は四極子核モーメントが比較的小さく分子の運動や配向の測定に適した核種である。今回、代表的な末梢神経組織であるラット座骨神経において、3種類の異なる運動モードを持つ分画からのスペクトルを検出し、解剖学的構造との対応を行った。また、パルス磁場勾配法を併用し、特定の運動モードの重水分子の並進拡散運動を測定することができ、神経繊維の走行に対応した運動の異方性を検出することができた。

【方法】 Wistar系ラットから麻酔下に座骨神経（湿重量約40 mg）を摘出、99%重水素生理食塩水中で30分間平衡させた後、100 μ Lの毛細管ピペット内に封入し、NMR試料管内に神経束の長軸が静磁場と平行になるようにおいた。ARX-500 (11.7 T)またはAMX-300wb (7.05 T) NMR分光計に、5mm多核種プローブまたは、10mm Micro5マイクロイメージングプローブを用い、室温(24°C)で測定を行った。

キーワード：水分子(Water)、二量子フィルター(Double-Quantum Filter)、パルス磁場勾配法(Pulsed-Field Gradient)、末梢神経(Peripheral Nerve)

せお よしてる、Shinar H.、Sharf Y.、Navon G.

*現所属：京都府立医科大学・第一生理

【結果・考察】 一量子NMRでは、図1に示すように、二つの四極子分裂（470, 125 Hz）と一つの等方的吸収線からなるスペクトルが測定された。二量子フィルターパルス系列 [90- $\tau/2$ -180- $\tau/2$ -90-t₁-90-t₂ (acq)] とコヒーレンス選択経路を図2に示す。配向した重水素核の四極子相互作用がゼロに平均化されない場合に生じる 2nd rank SQ coherence (T₂₁) を選択的に測定する。よって、溶媒の重水素水の信号はもちろん、分子相関時間が長くて等方的運動状態にある重水素核は、このフィルターを通ることはできない。また、creation time (τ) を任意にとることにより、特定の緩和時間を持つ成分を選択的に測定することができる。図3に示すように、非等方的運動状態にある重水素を選択的に測定することにより、中央の大きな等方的吸収線に隠されていた小さい四極子分裂（9 Hz）を持つ成分の検出に成功した。各信号の緩和時間の測定結果を表1に示す。

²H SQ Spectrum of Rat Sciatic Nerve

Fig. 1

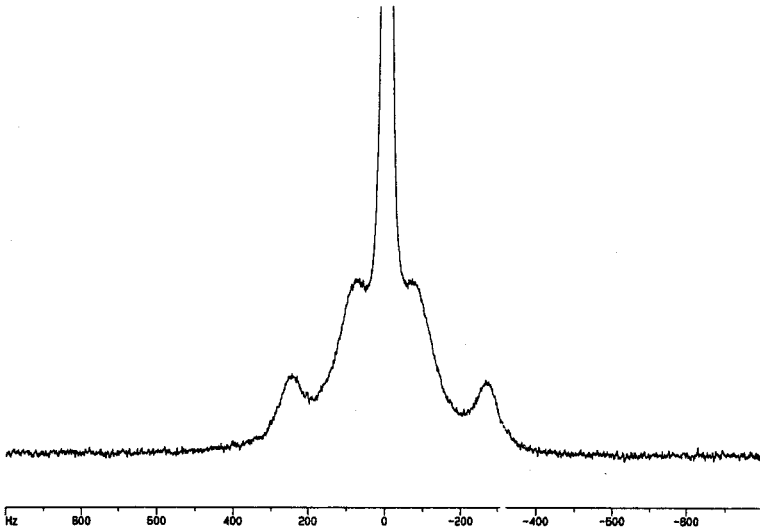


Fig. 2

Double-Quantum Filtered NMR & Coherence Transfer Pathway

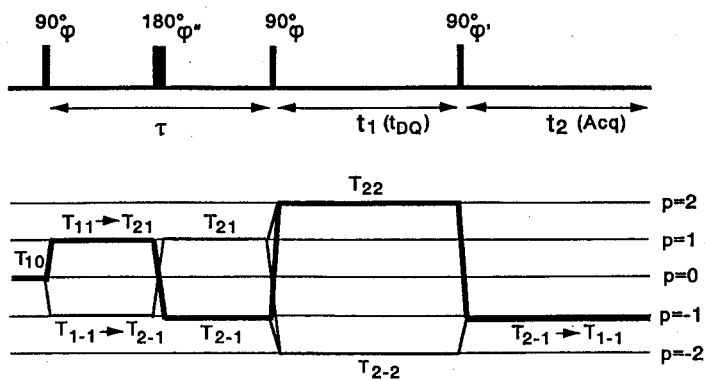


Fig. 3 H-2 DQF spectra of rat sciatic nerve

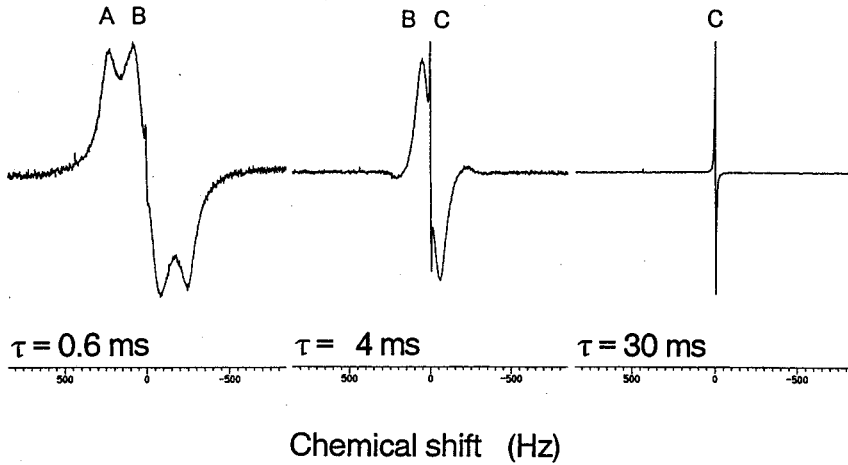


Table 1 Relaxation parameters of $^2\text{H}_2\text{O}$ water in rat sciatic nerve

	(A)	(B)	(C)
	endoneurium	epineurium	axon
ν_Q (Hz)	467 ± 16 (n=8)	123 ± 23 (n=5)	8.7 ± 0.9 (n=7)
T_{2QE} (ms)	3.6	4.3	72
T_{DQ} (ms)	41	167	232

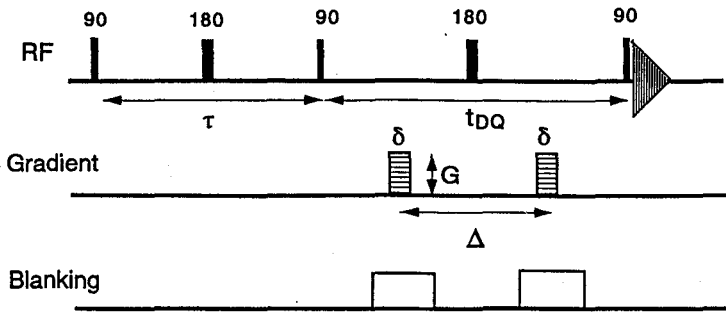
$$1/T_{2QE} = 1/4 \chi^2 (3J_0 + 3J_1 + 2J_2)$$

$$1/T_{DQ} = \chi^2 (J_1 + 2J_2)$$

座骨神経組織は、大きく3つの解剖学的区画 (epineurium、endoneurium、axoplasm) に分けられる。epineuriumは、疎で太いコラーゲン繊維からなる神経の外側を覆う外套組織である。endoneuriumは血管内皮細胞様細胞からなるperineuriumに囲まれたている。epineuriumは神経血液関門を形成し、外界との拡散障壁となっている。内部には神経繊維と、神経繊維に平行して走っている細かいコラーゲン繊維とが存在している。各々の神経繊維(axon)はミエリン鞘で覆われ、axoplasm内にはマイクロフィラメントが神経繊維に平行して走っている。重水素水/軽水素水置換・化学シフト剤 (CoCl₂・CoEDTA) ・磁気緩和剤 (MnCl₂) ・生化学的処理 (コラゲナーゼ) 等の実験により、この3種類の異なる運動モードを持つ水は、epineurium ($\nu_q = 125$ Hz)、endoneurium (470 Hz)、および axoplasm (9 Hz) の水分子であることがわかり、解剖学的構造と対応した水構造が明らかになった。また、コラゲナーゼ処理により、四極子分裂が減少・消失すること等から、これらの水分子は、コラーゲンに“結合”し分子運動が束縛されている状態にあることが示唆された。

Fig. 4

Double-Quantum Filtered Spin-Echo Pulsed-Field Gradient NMR



$$\ln (A_{\Delta, G} / A_{\Delta, 0}) = -\gamma^2 p^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D$$

$$p = 2$$

図4に二量子フィルターパルス磁場勾配パルス系列を示す。磁場勾配パルスはDQ evolution time (t_{DQ})に与えた。表1に示すように、SQ T_2 緩和時間に対してDQ T_2 緩和時間は著しく長いので、長い拡散時間についての測定も容易に行える。また、二量子コヒーレンスに対しては、磁場勾配強度が2倍に作用するので、200 G/cm程度の小さい磁場勾配強度しか発生できない装置であっても、広い範囲のGradient productの設定が行える利点がある。

epineurium、endoneurium、および axoplasm内の重水素水の拡散速度を測定した。すべての成分について、神経繊維の長軸に垂直な方向の拡散速度 (D_{90}) が神経繊維の長軸方向の拡散速度 (D_0) よりも小さく、拡散の異方性を示した。しかしながら、5から50ミリ秒の拡散時間について、axoplasm内の重水素水のみが、拡散時間に依存した減少を示した(制限拡散)。円筒型の拡散障壁内の制限拡散モデルを用いると、円筒内径は7.5 μm と推定され、解剖学的な神経繊維の内径とよく一致した。

【まとめ】 二量子フィルターNMR法および二量子フィルターパルス磁場勾配NMR法により、生体内局所における水分子の分子環境を明らかにすることができた。今後、組織障害・修復等の病理的状态における各区分における水の動態について検討していく予定である。

In Vivo ^{13}C -MRS

○渡邊英宏¹, 石原康利¹, 岡本和也¹, 小田正記², 押尾晃一², 金松知幸², 塚田裕三²
¹(株)東芝研究開発センター, ²創価大生命科学研究所

In Vivo ^{13}C -MRS Using Localized ge-HSQC

H. Watanabe¹, Y. Ishihara¹, K. Okamoto¹,
 M. Oda², K. Oshio², T. Kanamatsu², Y. Tsukada²

¹Toshiba R&D Center, ²Institute of Life Science, Soka University

Localized ge-HSQC sequence is proposed. It is a 3 dimensional spatial localization spectroscopy method with three notable features: good proton sensitivity, good metabolite separation, and good localization. *In vivo* carbon spectra with proton sensitivity from monkey's brain were obtained, using this method. After Glc-1 was injected intravenously to anesthetized monkey, localized ge-HSQC signals were acquired. Lipid's peaks from the head skin, which were contaminated using non-localized ge-HSQC, were gone and several amino acid's peaks, such as glutamate C-2,3,4 and glutamine C-4, could be detected. Glutamate C-4 appeared after the glucose injection, the appearance of Glutamate C-2,3 and Glutamine C-4 following.

1. はじめに

^{13}C -MRS (Magnetic Resonance Spectroscopy)は、例えば ^{13}C 標識グルコースの投与により非侵襲に脳内のグルコース代謝、すなわちグルコースからグルタミン酸やグルタミン等といったアミノ酸への代謝過程を追うことの可能な方法であり、有力な代謝診断法として期待されている。しかし、感度が低いという問題がある。 ^{13}C に結合した ^1H を観測する ^1H 観測法は感度の点で原理的に最良の方法であり、これまで POCE (1), HMQC (2), HSQC (3)といった方法が提案されている。

この中で、POCE は、 ^{13}C の反転パルスを印加した際の ^1H スピンエコー信号と反転パルス非印加の際のスピンエコー信号の差分により、 ^{13}C に結合した ^1H 信号を選択する方法である。しかし、この方法では代謝物ピークの分離を ^1H 周波数軸上で行うため、グルタミン酸やグルタミン等のピーク分離が困難である。これに対して、 ^1H と ^{13}C の相関スペクトロスコピー法である HMQC、HSQC では ^{13}C 化学シフト情報を利用することが可能なため、ピーク分離が容易である。HMQC と HSQC では展開期のスピンの状態が異なる。一般に展開期の緩和速度は SQC (Single Quantum Coherence)の方が遅く、展開期の信号減衰は HSQCの方が小さい。すなわち、HSQCが高 S/N化

法として最良である。

しかし、INEPT (4)と Inverse INEPT より構成される従来の HSQC シーケンスは、生体への応用の際に重要な局所化が難しく、*in vivo* ^{13}C -MRS への応用が困難であった。従来の HSQC シーケンスは、効率良く分極移動を起こすために準備期 (INEPT) の 90° パルスと 180° パルスの時間間隔を $1/(4J)$ に設定する必要がある。この間隔は例えばグルタミン酸では約 1.8 ms と短く、臨床機では局所励起のための選択励起パルスやスライス勾配磁場パルスの印加が困難であった。

これに対し、我々の提案する局所励起 ge-HSQC シーケンスは、臨床機においても分極移動の効率を損なわずに局所励起を可能とする方法である。以下、本方法の説明およびサル脳内の *in vivo* ^1H 観測 ^{13}C -MRS 実験について言及する。

2. 局所励起 ge-HSQC 法

局所励起 ge-HSQC シーケンスの特徴は、従来の HSQC シーケンスの準備期 (INEPT) の ^1H と ^{13}C の 2 つの 180° パルスの役割の明確化により、両者の分離印加を可能とした点にある。準備期の 180° (^1H) パルスは ^1H 化学シフトを再結像する役割、 180° (^{13}C) パルスは ^{13}C スピンを反転させる役割を有する。そこで、 ^{13}C 反転パルスを ^1H のエコー時刻の $1/(4J)$ 前に印加すれば、 $1/(2J)$ よりも長い ^1H の TE でも $2IzSz$ を生成する、すなわち効率良く分極移動を起こすことが可能となる。この結果、臨床機においても準備期の 3 つの ^1H パルス (Fig. 1 の点線内) を選択励起パルスとすることができ、かつ準備期内にスライス勾配磁場パルス、スポイラー勾配磁場パルスを印加することが可能となる (Fig. 1)。

局所励起 ge-HSQC シーケンスでは、準備期により空間 3 次元の限定された領域内で $2IzSz$ を生成し、これに続く展開期で ^{13}C 化学シフト情報が付与される。さらに、 ^1H に分極移動を起こし、 ^1H 感度での観測が可能となる。また、 ^1H 軸方向と ^{13}C 軸方向の 2 次元化を行い、

代謝物ピークの分離を容易としている。水信号除去は、勾配磁場パルスをを用いた遷移選択法と位相サイクルを組み合わせて行っている。

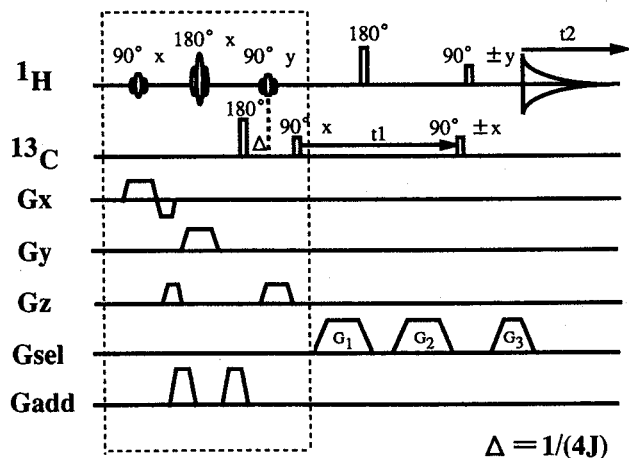


Fig. 1. Localized ge-HSQC Sequence

3. 方法

実験は、2 T ^{13}C スペクトロスコピー研究用全身用 MRI (東芝製) を用いて行った。RF 分布に起因する信号損を防ぐため、送信用プローブには互いに直交配置された ^1H 用と ^{13}C 用の鞍型コイル(ϕ 140 mm)を用い、感度向上のため、受信用プローブには ^1H 用サーフェスコイル(ϕ 60 mm)を用いた。

局所励起の評価のため、まず上記プローブをケタラール麻酔下のカニクイザルに設定後、磁石内に設置し、ge-HSQC 信号 (非局所励起) を取得した。この後、体重 1 kg 当たり 1 g の $[1-^{13}\text{C}]\text{D}$ -グルコースを静注投与し、局所励起 ge-HSQC 信号の取得を開始した。各々のスペクトルの観測時間は、10 分で、投与後 130 分まで代謝計測を行った。

局所励起領域は、脳内の $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ (8 ml) の領域とした。TR は 1.2 s とした。マトリックスサイズは 128×128 で、ゼロフィリングにより 256×256 ($F_1 \times F_2$) として再構成した。周波数帯域は、 F_1 、 F_2 共に 2 kHz とした。水除去は、勾配磁場パルスによる遷移選択と位相サイクルを組み合わせて行った。遷移選択のための勾配磁場パルスの比率は、 $0 : 4 : 1$ ($G_1 : G_2 : G_3$) とした。勾配磁場強度は 8.5 mT/m で、 G_2 印加時間は 10 ms とした。位相サイクルは 4 位相サイクルで、第 3 の ^{13}C パルスの位相 ($x, -x, x, -x$)、第 5 の ^1H パルスの位相 ($y, y, -y, -y$)、受信位相 ($x, -x, -x, x$) とした。

4. 結果

4-1. 局所励起の効果

ge-HSQC スペクトルでは頭皮脂肪の CH_3 および CH_2 の各ピークが混入したのに対して、局所励起 ge-HSQC スペクトルでは脂肪信号が除去された。また、 ^1H 周波数軸上では分離不可能な各アミノ酸のピーク (グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸) が、 ^{13}C 周波数軸方向との 2 次元化によって良好に分離された。

4-2. グルコース代謝の観測

脳に取り込まれたグルコースは TCA 回路を経てグルタミン酸、グルタミンに代謝される。 ^{13}C -MRS ではまずグルタミン酸の 4 位 (Glu-4) が標識され、この後グルタミンの 4 位 (Gln-4) が標識される様子を観測することができる。局所励起 ge-HSQC 法を用いた本実験においても同様な結果が得られ、グルコース投与直後から、4 位のグルタミン酸が増加し、これに続いて 4 位のグルタミンが増加する様子をとらえることができた (Fig. 2)。この結果、局所励起 ge-HSQC 法により脳内のグルコース代謝の観測が可能であることがわかった。

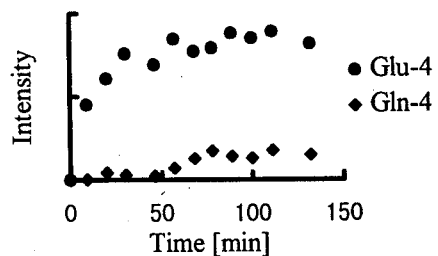


Fig. 2. Glutamate and Glutamine C-4 Labeling Timecourses

5. 結論

局所励起 ge-HSQC 法は、空間 3 次元局所励起が可能な方法であり、高感度、代謝物ピークの良好な分離という特徴を有し、非侵襲脳代謝計測用ツールとして有用である。

謝辞

本研究開発は、医療福祉機器技術研究開発制度の一環として、新エネルギー・産業技術開発機構(NEDO)からの委託により実施したものである。

参考文献

1. Bendall, M.R. et al., J.Am.Chem.Soc.,103,934,1981
2. Bax, A. et al., J.Magn.Reson., 55, 301, 1983
3. Bodenhausen, G., et al., Chem.Phys.Letters., 69, 185, 1980
4. Morris, G.A., et al., J.Am.Chem.Soc., 101,760,1979
5. Watanabe, H., et al., 4th Annual Meeting, ISMRM, 1220, 1996

in vivo, ^{13}C -MRS&I, HSQC, 局所励起, ^1H 観測法

わたなべひでひろ, いしはらやすとし, おかもとかずや,
おだまさのり, おしおこういち, かなまつともゆき, つかだやすそう

デカップリングパルス印加に伴う 生体内温度変化の計測

○石原康利¹, 渡邊英宏¹, 岡本和也¹, 小田正記², 押尾晃一², 金松知幸², 塚田裕三²
¹(株)東芝 研究開発センター, ²創価大学 生命科学研究所

Temperature Mapping for Evaluating Inner Body Heating Induced by Decoupling Pulses

Y. Ishihara¹, H. Watanabe¹, K. Okamoto¹, M. Oda², K. Oshio², T. Kanamatsu², Y. Tsukada²
¹TOSHIBA R&D Center, ²Institute of Life Science, SOKA University

New temperature measurement procedures were developed for evaluating inner body heating induced by decoupling pulses. These methods use the temperature dependence of the water proton chemical shift, and make effective use of the phase mapping method in order to detect a minute chemical shift change with temperature. Using these methods, temperature changes induced by decoupling pulses were measured with an accuracy of more than 0.5 °C as 1-dimensional and 2-dimensional distributions during phantom and *in-vivo* experiments.

【緒論】¹³C-MRSにより脳内アミノ酸代謝を*in-vivo*で観察できるが、スペクトル/N向上等の目的で印加する¹Hデカップリングパルスによる生体内の発熱が懸念されている。現在、被検体に印加可能な高周波電力は、SAR(Specific Absorption Rate)を指標に制限されているが、生体内の温度上昇は組織血流・組織熱伝導度等の温熱生理パラメータによって大きく異なるため、被検体の安全を確保して¹³C-MRSを行うには、個々の被検体について温度変化を計測することが望まれる。

これまでに、プロトン密度・緩和時間・自己拡散係数等の温度依存性を利用した計測法が検討されているが、これらのNMRパラメータの温度依存性が組織・臓器によって異なるため正確な温度情報を得ることができない、計測時間が長い等の問題が指摘されている。

我々は、水プロトン化学シフトの温度依存性を利用した高速・高精度温度分布画像化法を提案し、その有用性を報告してきた⁽¹⁾⁻⁽³⁾。今回、本手法を応用してデカップリングパルス印加毎の生体内温度変化を誤差0.5°C以下で計測できることを確認した。

【計測原理】水プロトンの化学シフトは、物質に依らずほぼ一定の温度依存性(-0.01 ppm/°C)を示すことが報告されている⁽⁴⁾。温度変化に伴う微小な周波数変化をスペクトルの移動量から検出することは計測精度・計測時間の点で困難であるため、周波数変化を画像情報の位相変化に反映させるPhase Mappingパルスシーケンス(図1)を用いることを提案した⁽¹⁾⁻⁽³⁾。Phase Mappingにより、温度変化に伴う周波数変化(化学シフト磁場の変化 ΔB_c)を $|t_1 - t_2|$ に比例した位相差 $\Delta\theta$ として拡大して計測でき、計測精度の向上が図れる。温度変化 ΔT は、水プロトン化学シフトの温度依存性 α [ppm/°C]を基に、次式から算出できる。

$$\Delta T(\vec{r}) = T(\vec{r}) - T_0(\vec{r}) = \frac{\Delta B_c[\Delta T(\vec{r})]}{\alpha B_0} = \frac{\Delta\theta[\Delta T(\vec{r})]}{\alpha \gamma B_0 \tau}$$

\vec{r} : 空間ベクトル, α : 温度依存性, γ : 核磁気回転比,
 T_0 : 参照温度分布, B_0 : 静磁場強度, θ : 位相画像,
 τ : $t_1 - t_2$

(1)

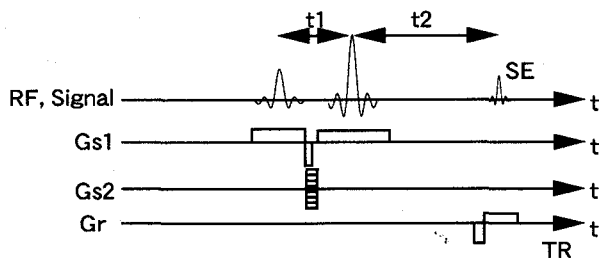


Fig. 1. Phase mapping pulse sequence to measure temperature changes. A minute frequency change with temperature is measured as a phase change increased in proportion to $|t1-t2|$.

【温度変化計測パルスシーケンス】 テカップリングパルス印加に伴う生体内の温度変化を高速に収集するために、図1のPhase Mappingパルスシーケンスに局所励起1次元パルスシーケンスを導入する(図2)。テカップリングパルス印加直後に2方向の局所励起を行った後、柱状領域から観測されるスピノエコー信号に奥行き方向の読み出し傾斜磁場を印加し、テカップリングパルス印加に伴う温度変化を1次元分布として繰り返し観測する。

テカップリングパルスの印加が繰り返されるTR時間内の温度変化が微小であれば、TR時間内にスライス選択フィールド・エコーパルスシーケンスを挿入した図3に示すパルスシーケンスを用いて平面内の温度変化を画像化できる。

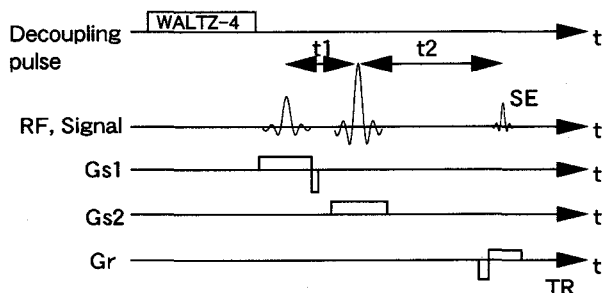


Fig. 2. Localized 1-dimensional temperature mapping pulse sequence. To provide adequate temporal resolution to measure temperature changes induced by the decoupling pulses, a rectangular volume is excited by a localized spin echo pulse sequence. The spin echo signal is observed immediately after the decoupling pulse every TR seconds as a 1-dimensional temperature distribution by applying the read gradient.

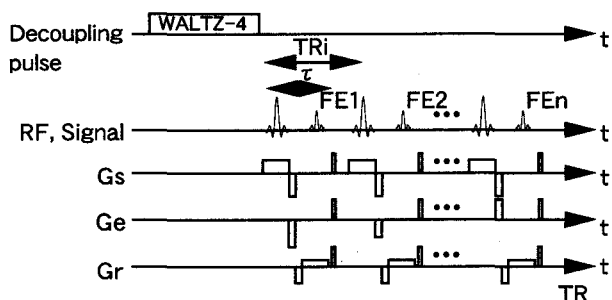


Fig. 3. 2-dimensional temperature mapping pulse sequence. To acquire 2-dimensional temperature changes induced by decoupling pulses, a slice selective field echo pulse sequence with spatial encoding steps following decoupling pulses is used.

【実験方法】 上記1次元温度変化計測法、ならびに、2次元温度変化計測法の有用性を確認するために、ファントム実験、*in-vivo*実験を行った。

実験には東芝製2 T ^{13}C スペクトロスコピー研究用装置を使用し、被検体として寒天ファントム(3% agar+1% NaCl)、ケタミン麻酔下の体重0.3-0.5kgのラット、ならびに、体重2.2kgのカニザルを用いた。表面コイル(^1H : $40 \times 60\text{mm}$ 8字型、 ^{13}C : $\phi 50\text{mm}$ 2ターン)を被検体上部に設定し、WALTZ4テカップリングパルス印加に伴う生体内の温度変化を1次元温度変化計測パルスシーケンス($\text{TR}/\text{TE}=1000/32\text{ms}$, $\tau=(t1-t2)=16\text{ms}$, 温度変化データ収集時間=7.6 ms, 局所励起領域= $5 \times 5\text{mm}-10 \times 10\text{mm}$, $\text{FOV}=100\text{mm}$, 空間マトリクス=256), 2次元温

度変化計測パルスシーケンス (TR(TRi)/TE=1300(26)/20ms, τ =TE=20ms, 温度変化データ収集時間=800ms, スライス厚10mm, FOV=100×100mm, 空間マトリクス=リード方向128×エンコード方向32)を用いて計測した。

今回の実験ではデカップリングパルスによる磁化の乱れを考慮し、 ^1H デカップリングパルス電力と等価なパルスを ^{13}C 表面コイルから印加し、信号観測に必要な高周波励起パルスを ^1H 表面コイルから印加した。温度変化を生じさせるため、 ^{13}C スペクトルを観測するのに必要なWALTZ4デカップリングパルス電力に比べて過剰な高周波電力 (5W-14W) を印加した。

被検体内に光ファイバ式温度プローブを刺入し、本手法の計測精度を評価した。

【結果・考察】 図4に、デカップリングパルス印加に伴う寒天ファントム内の温度変化を1次元温度変化計測法で計測した結果を示す。光ファイバ式温度計で計測した温度計測値との比較から、本手法による温度変化計測誤差が 0.5°C 以下であることを得た。同様に、生体内の温度変化計測誤差も 0.5°C 以下であり (図5), 本手法の有用性が確認された。

また、本実験により、デカップリングパルス印加に伴うTR時間内の温度変化が微小であることが示され (温度上昇時定数 $0.1^\circ\text{C}/\text{秒}$ 以上), 図3に示す2次元温度変化計測パルスシーケンスを用いて温度変化を画像化できることが示唆された。

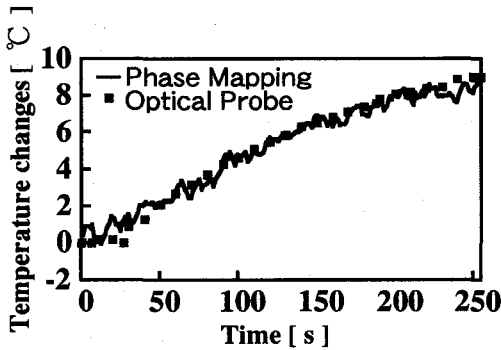


Fig. 4. Temperature changes induced by decoupling pulses in an agar phantom measured by the 1-dimensional temperature mapping method. The measurement values show temperature changes at the point where the fiber-optic probe was set. Measurement errors of less than 0.5 degrees were obtained.

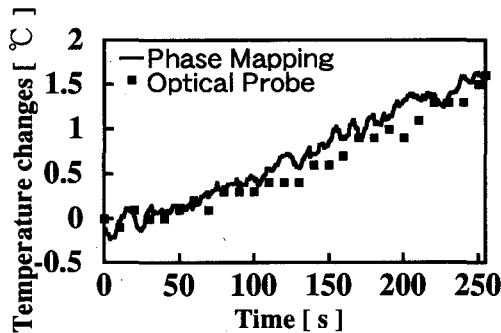


Fig. 5. Temperature changes induced by decoupling pulses in a rat's head measured by the 1-dimensional temperature mapping method. The measurement values show temperature changes at the point where the fiber-optic probe was set. Measurement errors of less than 0.5 degrees were obtained even with the living systems.

デカップリングパルス印加に伴う温度変化を2次元画像として収集した結果、被検体上部に置かれた表面コイルの元素付近から温度が上昇している様子が捉えられた。寒天ファントム、ラットを用いた実験から、2次元温度変化計測法による計測誤差が 0.5°C 以下であることが得られ (図6, 図7), 局所的な温度変化が予想される場合に本手法が有効であることが確認された。

一方、脳内の ^{13}C スペクトルを観測するために必要な ^1H デカップリングパルス電力と等価な場合には、 1°C 以下の温度上昇であることを本手法を用いて確認し、このデカップリング条件下で良好な ^{13}C スペクトルを得ることができた。

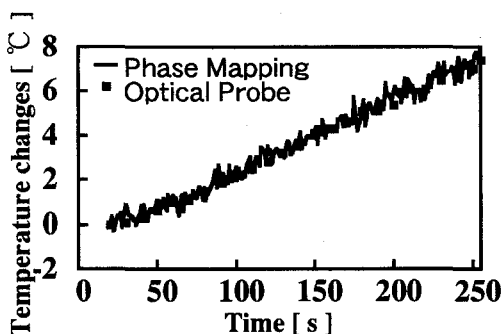


Fig. 6. Temperature changes induced by decoupling pulses in an agar phantom measured by the 2-dimensional temperature mapping method. The measurement values show temperature changes at the point where the fiber-optic probe was set. Measurement errors of less than 0.5 degrees were obtained.

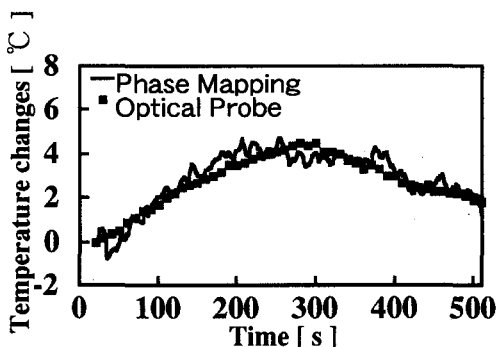


Fig. 7. Temperature changes induced by decoupling pulses in a rat's head measured by the 2-dimensional temperature mapping method. The measurement values show temperature changes at the point where the fiber-optic probe was set. In this case, decoupling pulses were irradiated on the rat's head only from time 0 to 270 seconds. The heating and cooling processes could be observed with measurement errors of less than 0.5 degrees.

【結論】 本手法により、デカップリングパルス印加に伴う生体内の温度上昇を時系列的にかつ精度良く計測できる。本手法はデカップリングパルスのみならず、FSE(Fast Spin Echo)パルスシーケンス等の多重パルスを用いる場合の発熱分布を計測できるため、被検体の温度モータとして、また、生体内の温度上昇を許容値内に抑えたRFパルス系列の設計を行う際に有用である。

【謝辞】 本研究開発は、医療福祉機器技術開発制度の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) からの委託により実施したものである。

【参考文献】

- (1)石原 他, 日磁医誌, 12, S-1, 96 (1992)
- (2)Y. Ishihara, et al., Proc., SMRM, 11th Annual Meeting, 4803 (1992)
- (3)Y. Ishihara, et al., Magn. Reson. Med. 34, 814(1995)
- (4)K. Kuroda, et al., Med. Biol. Eng. Comput. 29, 902(1991)

温度計測, 水プロトン化学シフト, 温度依存性, Phase Mapping, デカップリングパルス

いしはらやすとし, わたなべひでひろ, おかもとかずや,
おだまさのり, おしおこういち, かなまつともゆき, つかだやすぞう

植物組織の制限拡散に基づくWater Spaceの性質を表すパラメーターの画像化

○石田信昭・小川秀次郎^a・小泉美香^b・狩野広美^b
 (食総研・^aJEOLデータム・^b生物研)

Parameter images from restricted diffusion analysis of cell-associated water in plant tissues.

Nobuaki Ishida, ^aHidejiro Ogawa, ^bMika Koizumi and ^bHiroimi Kano
 (National Food Research Institute, Tsukuba Science City, Ibaraki 305; ^aJEOL Datum, Akishima, Tokyo 196; ^bNational Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba Science City, Ibaraki 305, Japan.)

Restricted diffusion of water in growing kidney bean seeds was measured and data were analysed using Meerwall and Ferguson's modification (1981) of the model of Tanner (1978). Parameters consisting of the model, spacing between membrane barriers (a), permeability of the membrane (D/D_0) and transport rate of water (D_0) were calculated by curve-fitting using a micro-computer. The images of the parameters were recreated on a 256 x 64 matrix and displayed on a TV monitor. D_0 ranged from 0.8 to $1.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$, a was approximately 55 μm and D/D_0 was from 25 % to 35%. These parameters are considered to indicate properties of individual tissues in plant materials.

生体組織の水の制限拡散を適切なモデルを用いて解析することにより、高分子ネットワークによって仕切られた水のスペースに関する情報をコンパートメントサイズ、膜の透過性、水の移動速度などのパラメーターとして得ることが可能である (Ishida et al. 1995)。本研究では、このような解析を行うに際して、植物組織がAnatomicalに不均質な組織で構成されている事を考慮して、イメージングと制限拡散の測定を組合せ、解析によって得られたパラメーターの値をイメージとして再構築することを試みた。

【材料及び方法】

植物：インゲン (*Phaseolus vulgaris*) を pH (6.0) を調節したパーミキュライト中で発芽させ、子葉展開後、昼30°C、夜25°Cのグリーンハウスで水耕栽培した。子実の着生後、生育ステージを追って子実を採取して試料とした。

測定：270MHz NMRスペクトロメーター (JEOL GSX-270 WB) と、それに装着可能な自作のNMRマイクロイメージング装置 (Ishida et al. 1991) を用いて測定し、イメージプロセッサー (JEOL JIM-270) によってイメージを構成した。イメージはSpin-echo 2D FT法で、拡散測定は拡散時間を12 ms、Gを270mT/mに設定したPulse gradient spin-echo法と、拡散時間を変化させたPulse gradient stimulated-echo法によって測定した。Gは68mT/mであった。拡散測定データはマイクロコンピューターに転送してStejskal-Tanner (1965) の式で拡散係数を求め、Meerwall & Ferguson (1981) の式を用いてCurve-fittingによってコンパートメントのサイズ、コンパートメントを構成する膜の透過性及び水の移動速度を解析した。解析結果はイメージアナライザー (AVIO SPICA II) によって画像として再構築した。

キーワード：制限拡散、細胞の水、NMRイメージング、植物組織、インゲン

著者：いしだのぶあき、おがわひでじろう、こいずみみか、かのひろみ

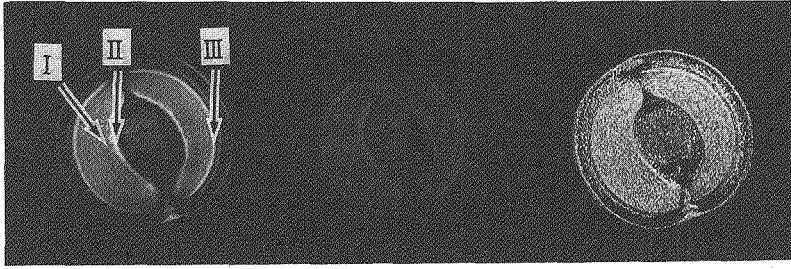


Fig. 1 ^1H -NMR image (left), diffusion-weighted image (middle) and diffusion coefficient image (right) of kidney bean at middle growth stage. Diffusion-weighted image was measured by the pulse gradient spin-echo method. Images were recreated on a 256 x 256 matrix.

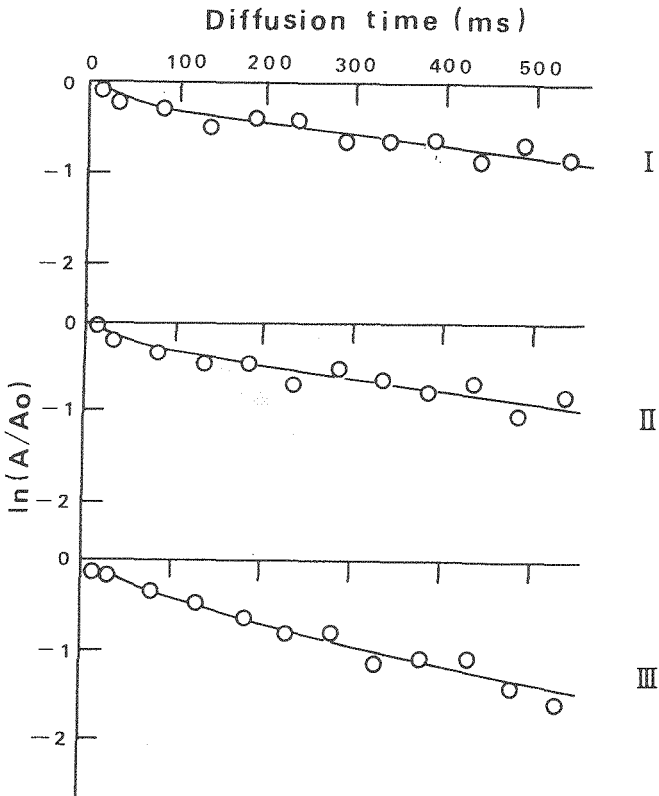


Fig. 2 Curve-fittings of restricted diffusion data for Meerwall & Ferguson's modification (1981) of the model of Tanner (1978). Symbols correspond to those on the Fig. 1. left.

【結果及び考察】

生育中期のインゲンの¹H-NMRイメージ、Pulse gradient spin-echo法で測定したDiffusion-weighted イメージ及びDiffusion coefficientイメージをFig. 1に示す。イメージは256 x 256のマトリックス上で構成した。¹H-NMRイメージによれば、この生育ステージでは果肉には比較的多量の水が存在していたが、種子の水は少なくなっていた。Diffusion coefficientイメージでは各組織間の差は少なくなった。水が少ない種子において水の移動速度は果肉に比べて低下するが、その差は水の量の差ほど大きくない事が示された。測定後、サンプルはジオメトリーを変えずにPulse gradient stimulated-echo法による制限拡散の測定に供された。本測定において、拡散時間は13 msから532 msの間で12段階に変化させた。データポイント256、32エンコードでデータを取り込んで、ゼロフィリングにより256 x 64のマトリックス上でイメージを構築した。¹H-NMRイメージ (Fig. 1 left) 上の矢印 (I, II, III) におけるln (A/Ao) を拡散時間に対してプロットしたのがFig. 2である。シグナルは直線的には減衰しないで、ゆるくカーブした曲線となった事から水の細胞内における移動は部分的に透過性を持つ膜を通して起こるものと考えられる。そこで、水の動態をTanner (1978) のモデルで描写し得るものと考えて、このモデルをMeerwall & Ferguson (1981) が使いやすい形に変形した次式を用いてCurve-fittingによって解析を行った。

$$A/A_0 = \text{Exp}[-(\theta^2 D_0 \Delta / a^2)(\sin^2 \alpha + A)] \cdot 2 / (\pi^2 d^2) \cdot \{1 - \cos \pi d + 2 \sum [1 - (-1)^n \cos \pi d / (1 - n^2 / d^2)^2 \cdot \text{Exp}(-n^2 \pi^2 D_0 B \Delta / a^2)]\}$$

$$\theta = \gamma \delta G a \quad d = (\theta / \pi) |\cos \alpha| \quad A = \cos^2 \alpha / (1 + 1/P) \quad B = 1 / (1 + P)$$

パラメーター、水の移動速度 (Do)、コンパートメントサイズ (a) 及び膜の透過性 (D/Do) のイメージをFig. 3に示す。生育中期 (middle stage) はFig. 1と同一子実であり、Young ステージは生育初期の子実である。生育中期においてDoイメージはFig. 1のDiffusion coefficientイメージと対応し、水が少なくなった種子の移動速度が低下し始めていることが解る。それに対してaは水の存在量が少ない種子や皮層内部においても果肉と変わらない値を示した。水の量とDoの関係及び均一なコンパートメントサイズは生育ステージが異なる若い子実でも同様であった (Table 1)。水のコンパートメントサイズが水が少ない組織においても小さくならないのは興味ある事実である。膜の透過性は水の量が多い所で高い値を示したが全体として25%から35%の間にあり著しくは異なるない。これらのパラメーターは生育ステージ、植物種などが異なる試料について測定データを蓄積をすると植物組織の構造的な特徴を示す有効な指標となるものと考えられる。

Table 1 Diffusion coefficient (Do), intrabarrier spacing (a) and reduced permeability (P or D/Do) of water space in the kidney bean.

Growth stage & Tissue	a (µm)	P	D/Do (%)	Do (cm ² /sec)
Middle stage				
I	57	0.56	36	1.3 x 10 ⁻⁵
II	57	0.32	24	0.8 x 10 ⁻⁵
III	51	0.39	28	1.6 x 10 ⁻⁵
Young stage				
I	56	0.39	28	1.2 x 10 ⁻⁵
II	53	0.43	30	1.6 x 10 ⁻⁵
III	61	0.38	27	0.8 x 10 ⁻⁵

Symbols I, II and III are correspond to those on the ¹H-NMR images of Fig. 1 left (middle stage) and Fig. 3 right IMG (young stage).

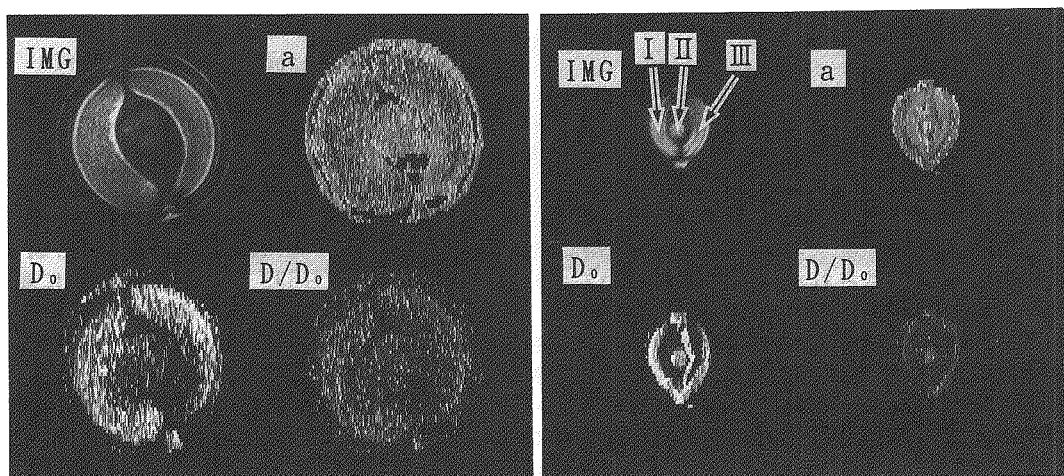


Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ images (IMG), diffusion coefficient (D_0), intrabARRIER spacing (a) and permeability (D/D_0) images at the middle (left) and the young (right) stages.

The material for the left data is the same as Fig. 1 & 2. Images were recreated on a 256 x 64 matrix.

植物組織の制限拡散を測定する場合の最大の問題は、組織を長時間同じ状態に保持することが困難なことである。そこで短時間の内に十数点の拡散時間の異なるデータを測定しなければならない。本研究ではエンコードステップを32とし、 x 、 $-x$ 、 y 、 $-y$ の位相回しを設定して、一拡散時間に対してA及びA₀イメージを約20分で測定した。12点の異なる拡散時間を持つ一セットのデータの測定には約4時間必要であり、インゲンの生理を考慮すると安定して取り扱える最長の時間である。画質向上のためにエンコードステップを増加させる事はエンコードのために測定時間が長くなるばかりでなく、本試料ではVOXEL容量減少に伴うシグナルのS/N比の著しい低下を招いた。また、測定時間短縮のためにrfのフリップアングルを小さくする試みもS/N比の著しい低下を招いた。

文献

1. Ishida N. et al. (1995) *Magn. Reson. Imag.*, **13**: 745-751.
2. Ishida N. et al. (1991) *Anal. Sci.*, **7**(suppl.):817-820.
3. Stejskal E.O., Tanner J.E. (1965) *J. Chem. Phys.*, **42**:288-292.
4. Meerwall E., Ferguson R.D. (1981) *J. Chem. Phys.*, **74**: 6956-6959.
5. Tanner J.E. (1978) *J. Chem. Phys.*, **69**:1748-1754.

IMAGING OF THE SECOND MOMENT

M.Nonaka, Y.Fukunaga, T.Nakai, S.Matsui and T.Inouye

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba 305

The second moment (M_2) of proton dipolar spectra is employed as a new image contrast parameter in solid-state NMR imaging. Three approaches utilizing the magic-echo technique are proposed and demonstrated experimentally. The first is based on the 2D FT experiment where the time variable t_1 refers to the dipolar interaction giving dipolar spectra and the other variable t_2 to imaging yielding spatial resolution. The space-dependent M_2 can be calculated from the spatially resolved dipolar spectra. The second approach, which is a quasi 2D experiment requiring only a few number of signal measurements, relies on the time-domain echo signal shape. The magic-echo peak shape represented by several data points is spatially resolved and the space-dependent M_2 can be evaluated from the resolved peak shapes by a curve fitting procedure. The third is a fast experiment requiring only a single measurement. It collects multiple magic-echo peaks at a time which are converted by a suitable data processing to the same data as those obtained by the second approach.

【はじめに】

固体NMR(Nuclear Magnetic Resonance)イメージング(MRI)は、材料評価の新しい方法として注目されており、特に高分子に対する様々な応用が発表されている。現在、固体MRIの空間分解能は、技術的な困難により $100\mu\text{m}$ 程度に制限されている。この分解能はÅのorderである電子顕微鏡の分解能などに比べるとかなり劣っている。しかし、分解能が比較的悪いにもかかわらずMRIが用いられる最大の理由は、NMRのスペクトロスコーピーとしての情報、例えば緩和時間、化学シフト、双極子相互作用、四極子相互作用などにより、得られた画像に多様なコントラストをつけられることにある。

我々の研究室では、マジックエコーという方法に基づいた分解能の向上(1,2)の他に、MRIで得られる様々なコントラストについても研究を行ってきている。今回は、新しいイメージングコントラストとして2次モーメントを取り上げ、予備的な実験を行った結果を発表する。

キーワード： 固体イメージング、2次モーメント、マジックエコートレイン

のなかまさゆき、ふくながやすひろ、なかいとしひと、まついしげる、いのうえたもん

【2次モーメント】

2次モーメント(M_2)は通常、NMRスペクトルの線形 $f(\omega)$ により次式のように定義される。

$$M_2 = \frac{\int \omega^2 f(\omega) d\omega}{\int f(\omega) d\omega}$$

スペクトルの線形は固体の場合、プロトン間の双極子相互作用によって決まっている。もし分子運動性が増大すれば線幅は狭くなり M_2 は減少する。このように M_2 はサンプル内の分子運動性の定量的な指標となる。また、 M_2 から例えばelastomerの劣化の程度を反映するcross-link densityを決定することができる(3)。

一方、2次モーメントは周波数領域のスペクトル $f(\omega)$ とFourier Transform (FT)の関係にある時間領域のNMR signalであるFree Induction Decay (FID)からも求めることができる。FIDはVan Vleckのmomentを用いて次のように展開をすることができる(4)。

$$s(t) = 1 - \frac{M_2}{2!}t^2 + \frac{M_4}{4!}t^4 - \frac{M_6}{6!}t^6 + \dots$$

したがって、 M_2 はFIDより次式の関係を用いて得られる。

$$M_2 = -\lim_{t \rightarrow 0} \frac{d^2 s(t)}{dt^2}$$

$t=0$ 近傍のFIDは観測困難であるから、実際にはFIDの代わりにエコーを用いる。以下の実験ではマジックエコー(1,2)信号を用いた。

【 M_2 イメージング実験】

M_2 イメージング法として次の3つの方法が考えられる。第一の方法はいわゆる2D(2次元) FT NMR法に基づくもので、時間変数 t_1, t_2 に関する2次元信号を測定する(図1)(5)。変数 t_1 はdipolarスペクトルを反映するもので、 t_2 は空間分解能を与えるイメージング用である。測定データを2D FTすることにより空間的に分解されたdipolarスペクトルを得ることができ、空間に依存した M_2 をそれぞれの位置で計算することができる(図2)。

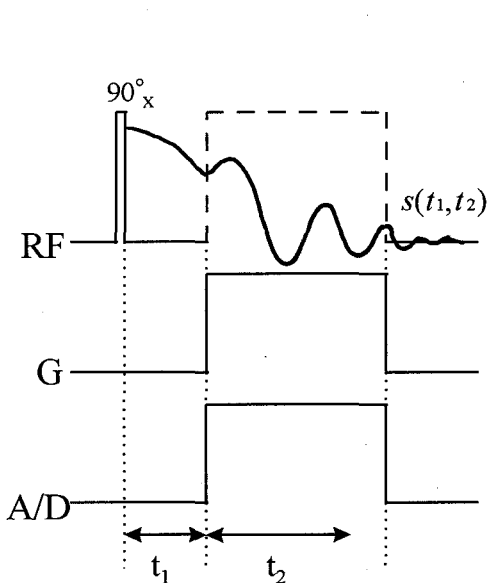
第二の方法は時間領域のエコーまたはFIDの形を利用するものでquasi-2D法と呼ぶことにする(図3)。この方法では数回で測定が完了するので、最初の方法に比べてかなり測定時間を短くできる。空間依存した M_2 はそれぞれの位置でエコーピークを2次曲線でcurve fittingすることにより求められる(図4)。

第三の方法は1回の測定のみで計測が完了する高速な方法である(図6)。この方法では多数のエコーを一度に測定する必要がある。得られた多重エコーは適切なデータ処理により、第二の方法によって得られたデータと同様の形にすることができる。

全ての実験は ^1H の共鳴周波数60MHzの自作の装置を用いて行った。図5に図4の結果から計算した M_2 の空間分布を示す。得られた結果(図2,4,5)はいずれも、アダマンタン($M_2=1.39\text{G}^2$)、ヘキサメチルベンゼン($M_2=2.92\text{G}^2$)を試験管に入れたテストサンプルによるものである。

文献

- (1) S.Matsui, Chem.Phys.Lett. 179 (1991) 187.
- (2) S Matsui, A.Uraoka and T.Inouye, J.Magn.Reson.A 120 (1996) 11 and references therein.
- (3) S.Hafner and P.Barth, Magn.Reson.Imag. 13 (1995) 739.
- (4) J.G.Powles and J.H.Strange, Proc.Phys.Soc. 82 (1963) 6.
- (5) S.Matsui, J.Magn.Reson. 95 (1991) 149.



$$f(\omega_1, \omega_2) = \int s(t_1, t_2) \exp(-i\omega_1 t_1 - i\omega_2 t_2) dt_1 dt_2$$

fig.1 2D FT approach pulse sequence

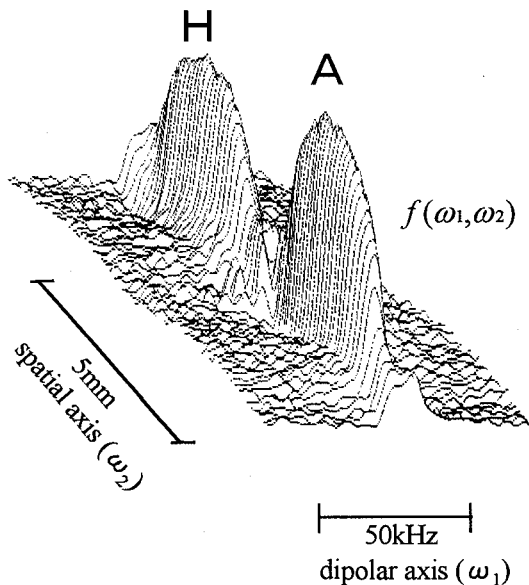
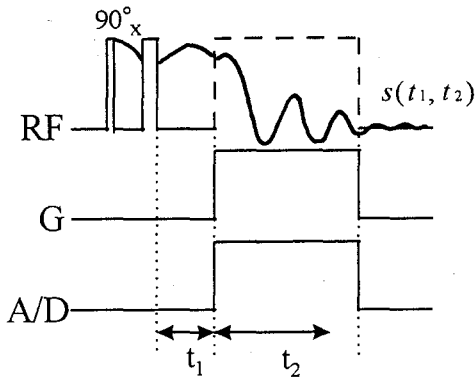


fig.2 two dimensional plot



$$f(t_1, \omega_2) = \int s(t_1, t_2) \exp(-i\omega_2 t_2) dt_2$$

fig.3 quasi-2D pulse sequence

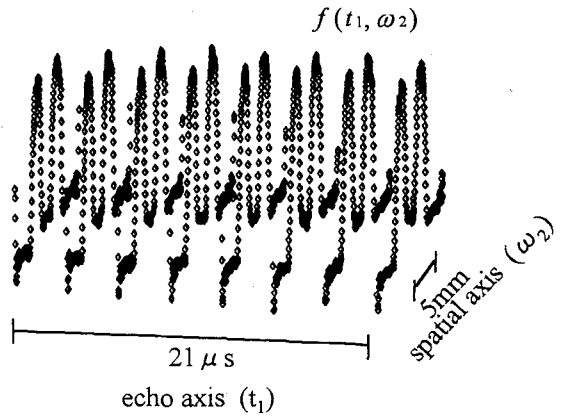


fig.4 two-dimensional plot

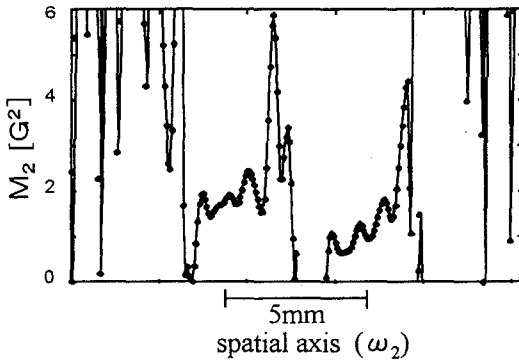
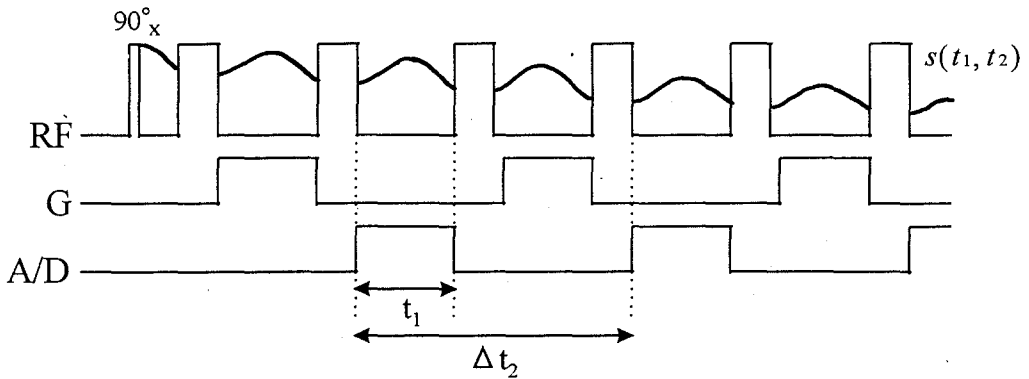


fig.5 space-dependent M_2 evaluated from fig.4



$$f(t_1, \omega_2) = \int s(t_1, t_2) \exp(-i\omega_2 t_2) dt_2$$

fig.6 fast approach pulse sequence

CROSS POLARIZATION CONTRAST IN SOLID-STATE PROTON IMAGING*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba 305*

Toshihito Nakai, Masayuki Nonaka, Shigeru Matsui, and Tamon Inouye

Cross polarization (CP) between proton and carbon spins has been employed as a new image contrast parameter in solid-state proton imaging. To enhance the CP efficiency, phase-alternating multiple contact (PAMC) CP has been studied by simulation assuming a spin temperature and by corresponding experiments. It has been shown that the PAMC CP can selectively destroy the proton magnetization, producing a useful level of contrast in the proton image acquired following the CP. The selectivity is two-fold and based on differences in the CP time constant and in the carbon chemical shift. Further detailed aspects which are essential for optimizing the PAMC CP imaging experiments have also been disclosed.

<はじめに>

高分子を中心とした材料評価における新分析法として、固体NMRイメージングに対する期待は大きい。しかし今のところ、その期待は十分に満たされているとは言えない。これは現在、技術的困難のため得られる分解能 ($\sim 100 \mu\text{m}$) が十分でないことによるものであり、より高分解能化に向け更なる研究が必要である。空間分解能の向上と同様に重要な研究課題は、NMRスペクトロスコピーの特徴を活かした多種多様なイメージコントラストの導入である。

今回我々は、プロトンイメージングに先立って ^{13}C - ^1H 交差分極(CP: cross polarization)を行ない、プロトンの磁化を選択的に破壊し、プロトンのイメージにコントラストを導入する試みを行なった。これにより交差緩和時間 $T_{1\rho}$ の違いによるコントラスト、さらに ^{13}C 化学シフトに関するコントラストを得ることができ、従来容易には得られなかった情報を含んだプロトンイメージが測定できるものと期待される。本発表では研究の第一段階として、プロトン磁化のCPによる破壊に関する理論的シミュレーション、またそれに対応した実験の結果を報告する。

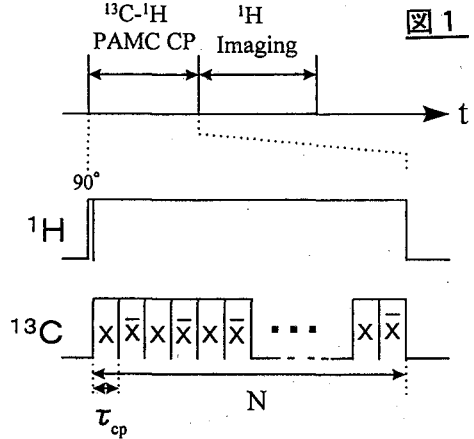
キーワード： 固体イメージング、イメージコントラスト、交差分極

なかいとしひと、のなかまさゆき、まついしげる、いのうえたもん

<位相反転多重コンタクト交差分極>

プロトン磁化の破壊をより高い効率で行うために、我々は通常のCPとは異なる位相反転を伴う多重コンタクト(Phase - Alternating Multiple Contact: PAMC) CP を取り上げた。図1にPAMC CPのパルス系列を示す。1回のコンタクト時間 τ_{CP} 毎に ^{13}C の rf 磁場の位相を反転する。これにより、CPの結果生じた ^{13}C の磁化の減衰を待つことなく、効率よく 1H 磁化を破壊できる。

このようなPAMC CPの結果、生き残る 1H 磁化は、 1H 、 ^{13}C の両スピン系がCPの時定数 T_{IS} で指数関数的に共通のスピン温度に向かって時間変化すると仮定することにより定式化できる。初期磁化を M_{0I} としたとき、 N 回のコンタクト後の磁化は(回転系縦緩和 $T_{I\rho}$ の効果を無視した場合)、次式で与えられる。



$$M_{II}^{(N)} = M_{0I} \left[1 - \varepsilon \left(\frac{1 - \delta^2}{1 + \delta^2} \right)^2 \right]^{-1} \left[\left(\frac{1}{1 + \varepsilon} \right)^N \left\{ 1 - \varepsilon \left(\frac{1 - \delta^2}{1 + \delta^2} \right)^2 + \varepsilon \exp \left(-\frac{\tau_{CP}}{T_{IS}} \frac{1}{1 + \delta^2} \right) \left[1 + \varepsilon \left(\frac{1 - \delta^2}{1 + \delta^2} \right)^2 \right] \right\}^N - \varepsilon \left(\frac{1 - \delta^2}{1 + \delta^2} \right)^2 \exp \left(-\frac{N\tau_{CP}}{T_{IS}} \frac{1}{1 + \delta^2} \right) \right] \quad [1]$$

ここで ε は ^{13}C 、 1H スピン系の熱容量の比すなわちCPに關与する ^{13}C 、 1H スピンの個数の比 N_S / N_I であり、また δ は ^{13}C rf 磁場強度を単位とする ^{13}C オフセット周波数 $\Delta\nu / \nu_1$ である。特に、 ^{13}C にオンレゾナンスrf磁場を照射する場合 ($\delta = 0$)、式[1]は次のように簡単化される。

$$M_{II}^{(N)} = M_{0I} \left(\frac{1}{1 - \varepsilon} \right) \left[\left(\frac{1}{1 + \varepsilon} \right)^N \left\{ 1 - \varepsilon + 2\varepsilon \exp \left(-\frac{\tau_{CP}}{T_{IS}} \right) \right\}^N - \varepsilon \exp \left(-\frac{N\tau_{CP}}{T_{IS}} \right) \right] \quad [2]$$

PAMC CPパルス系列では一般に、2回目以後のコンタクトの初期状態で ^{13}C の磁化が負の方向を向いていること、および $\tau_{CP} \gg T_{IS}$ でないためスピン系は必ずしも平衡状態に達しないことに注意すべきである。 T_{IS} に比べじゅうぶん長いコンタクト時間 τ_{CP} を用いた場合は

$$M_{II}^{(N)} = M_{0I} \left(\frac{1}{1 - \varepsilon} \right) \left(\frac{1 - \varepsilon}{1 + \varepsilon} \right)^N \approx M_{0I} \exp [-(2N - 1)\varepsilon] \quad [3]$$

となり、通常多重コンタクトの場合の磁化減衰因子 $\exp(-N\varepsilon)$ に比べ、約2倍の効率が見られることがわかる。

式[2]を用いて計算した、さまざまなコンタクト時間 τ_{CP} に対する磁化の減衰を図2に示す。ただし、合計のコンタクト時間 $N\tau_{CP}$ をもう一方の座標軸方向に取っている。図から明らかなように、合計のコンタクト時間が一定であれば、1回のコンタクト時間 τ_{CP} をより短く設定した方が、上で述べたじゅうぶん長いコンタクト時間 ($\tau_{CP} \gg T_{IS}$) を用いた場合よりも、さらに速い磁化の減衰が見込まれる。ただし、理論的取り扱いではスピン温度を仮

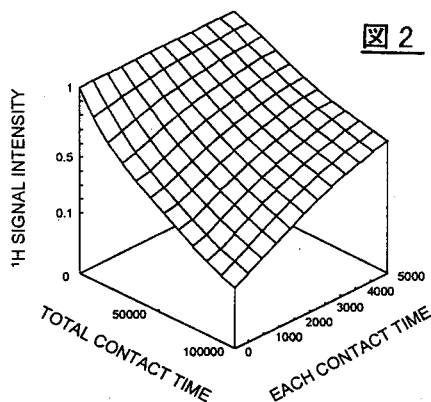


図 2

定しているため、極端に短いコンタクト時間 ($\tau_{CP} \rightarrow 0$ の極限) に対して上式は 現実のスピ
ン系の挙動を必ずしも反映していない。したがって、効率良い磁化の減衰は、なるべく短い
 τ_{CP} でしかもスピ
ン系が準静的に振る舞う程度
に長い τ_{CP} を用いた場合に対して理論的に保証
されると言える。

<1H磁化減衰に関する実験結果とシミュレーション>

我々はまず、上記の理論式が実際のスピ
ン系の挙動を正しく記述していることを確認
するために、さまざまなコンタクト回数 N に対する 1H磁化の強度を測定し、理論との比較を
試みた。図 3 にコンタクト時間を $\tau_{CP} = 100 \mu s$ に固定した場合の実験および対応するシ
ミュレーション結果を示す。実験はアダマンタンに対して行ない、1Hおよび13Cの共鳴周波
数はそれぞれ300.53、75.57 MHzである。実験では13Cの照射rf磁場をオンレゾナンスとし、
計算は式[2]を用いた T_{IS} として通常のCP実験により求めた値 $1100 \mu s$ を使って行なった。
実験と計算の一致は、

CPに
関与するスピ
ン個数比が $\epsilon = 0.0125$
として得られた。ア
ダマンタン $C_{10}H_{16}$
では全スピ
ンの個数比
が0.0069であり、こ
のシミュレーション
結果は13Cの近傍の限
られた領域にある1H
がCPに参加している
ことを示している。

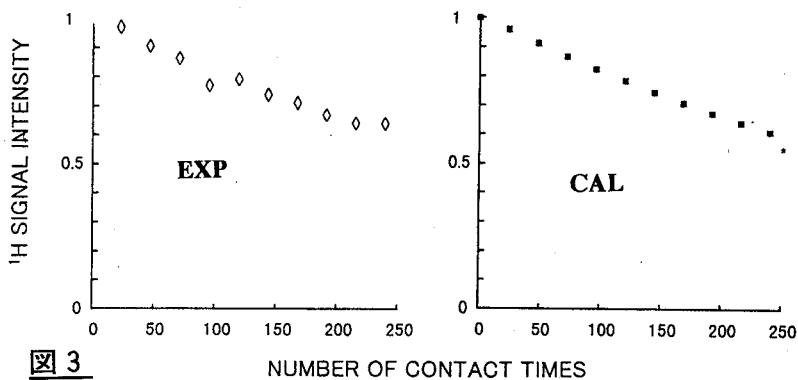


図 3

また、より長いコンタクト時間を用いて行なった実験では、理論の予測するように1H
磁化減衰が鈍化することが確認された。したがって上記の理論式は、 $\tau_{CP} = 100 \mu s$ 程度の短
いコンタクト条件の場合を含めて、実際のスピ
ン系の挙動を正しく表わしていると言える。

< T_{IS} の違いを利用したコントラスト>

交差緩和時間 T_{IS} が異なる物質に対しては、スピ
ン系の熱平衡が達成される前にCPコン
タクトを中断することにより、1H磁化の減衰に違いが生じ、プロトンイメージにコントラ
ストが導入される。定性的に理解できるように、 τ_{CP} に比べてじゅうぶん短い T_{IS} をもつ物質で
は毎回のコンタクトでほぼ平衡が達成され、1H磁化の減衰は顕著である。一方、 τ_{CP} より
じゅうぶん T_{IS} が長い物質では磁化はあまり減衰しない。図 4 aに T_{IS} が異なる物質間の磁化減

衰の違いを、 $\tau_{CP} = 100 \mu s$ とした場合について計算により示す。図より明らかなように、 $T_{IS} = 100 \mu s$ の試料とそれよりずっと長い T_{IS} をもつ試料の磁化の強度は大きく異なり、イメージにはっきりしたコントラストが導入できることが見込まれる。同時に、この条件では測定対象がたとえば $T_{IS} = 1000 \mu s$ と $T_{IS} = 10000 \mu s$ をもつ物質から成る場合、これらのコントラストは明確でないことがわかる。この問題は図4bに示すように、実験条件としての τ_{CP} を変更することで解消される。このように、測定対象に応じて接触時間を適切に設定することにより、最も効果的なコントラストが導入される。

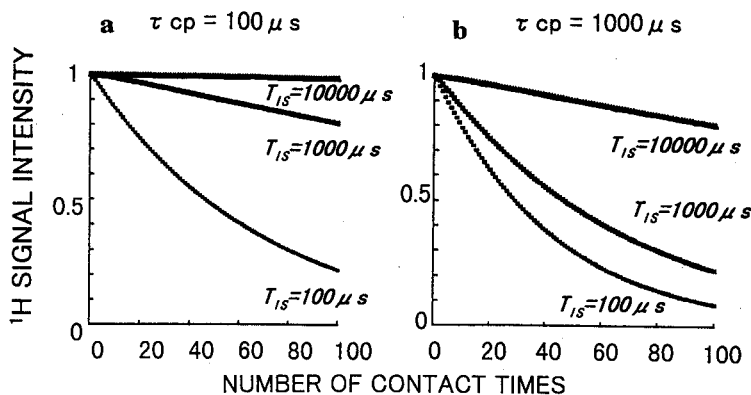


図 4

<¹³C化学シフトの違いを利用したコントラスト>

プロトンイメージにコントラストを導入する手法として、CPに關与する¹³Cの共鳴周波数と¹³Cスピン系へのrf磁場照射周波数の差(オフセット周波数) $\Delta\nu$ が、物質によって異なることを利用できる。すなわち物質に特徴的な¹³C化学シフトに關するコントラストを考える。CPにおける磁化の移行は、¹³Cスピン系への照射周波数が¹³Cの共鳴周波数に一致するとき、最も効率よく起こる。理論式における T_{IS} はそのような条件下における交差緩和時間であり、オフセットがある場合は $T_{IS}(1+\delta^2)$ となる(ただし $\delta = \Delta\nu/\nu_1$)。すなわち照射rf磁場の強さ ν_1 と同程度かより大きなオフセットを伴う¹³Cスピンに対しては、実効上交差緩和時間が大きくなったものと見なせるため、前節と同様に磁化減衰の度合いが劣化する。

このような磁化減衰の効果は、固定した¹³C照射周波数を用いて¹³C化学シフトの異なる物質間にコントラストを導入するものであるが、ここではpresentationとしてアダマンタンに対し¹³C照射周波数を逐次変更して実験的に得た¹H磁化の変化を示す(図5)。¹³C照射周波数が共鳴周波数($\Delta\nu = 0$)からある程度離れると¹H磁化の減衰は見られなくなる。このような¹³C化学シフト選択性の幅は照射磁場 ν_1 を弱くするほど高められることが、上の説明から理解できる。図5のa、bはそれぞれ ν_1 を25および10 kHzとして得たものであり、後者はより選択的になることが確認された。

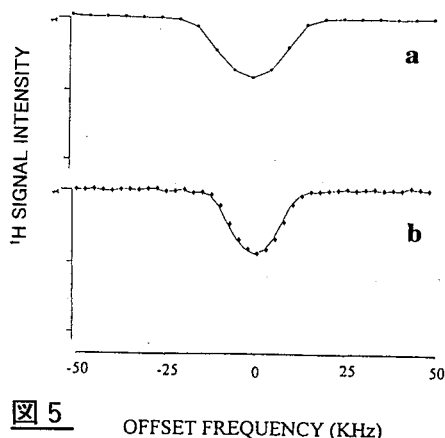


図 5

このような化学シフトを利用したコントラストは、化学シフト変化範囲の小さな¹Hでは不明確であり、特に固体では共鳴線の線幅が広いため導入が困難である。しかしながら本研究で示したように、CPを介してはるかに変化範囲の大きな¹³C化学シフトを利用することにより、プロトンイメージにコントラストを導入することができる。こうして物質の違い、たとえばaromatic-richな物質とaliphatic-richな物質を区別するイメージングが実行できる。

Random walk simulation of transient obstruction effect on moisture diffusion

Mika Fukuoka, Yuichihiro Gomi and Hisahiko Watanabe, Tokyo university of Fisheries

Apparent diffusion coefficient of moisture has been measured at diffusion times ranging from 19ms to 1.2s, in fish jelly product using pulsed-field-gradient NMR method. The results clearly showed diffusion time dependent. In this work two dimensional random walk simulation of transient obstruction effect on moisture diffusion in food materials is conducted via numerical calculation.

はじめに

食品工業において加工、保存における物性値の変化を予測し、制御することが期待されているにもかかわらず、実際には達成されていないのが現状である。その理由としては食品素材が多成分系で、構造も不均一であること、また加工、保存中に容易に物性、構造が変化し物性値の特定が難しいことによる。特に加工、保存操作においては、水の移動を伴う場合がほとんどであり、水の拡散係数が重要なパラメータになる。よって食品素材中の水の拡散係数を構造に対応させて知ることが必要である。NMR法による拡散係数の測定は拡散時間を変化させることで構造に対応した拡散時間依存性を示すので、biological systemおよび食品素材の有するmicro-structureのprobeとなりうる。この時間依存性を解析することにより構造に対応させた食品中の水の存在状態を明確にできることが期待される。本研究では試料に数ミクロンオーダーの間隙からなる網目構造を有するかまほこを用いた。かまほこは塩溶性タンパク質のアクチンとミオシンがアクトミオシンとなって網目構造を形成し粘弾性を有するものであり、この網目構造中に多量の水が保持されている。PFG-NMR法によりかまほこ内の水の拡散係数を測定した。水分子の拡散が受ける網目構造によるobstruction効果をシュミレートし、測定結果の解析を行なった。

実験方法

まずモデル試料として直径90 μm 及び6 μm のLatex Beads (Polystyrene) の研濁水溶液を用い、それぞれ直径5mmのNMR試験官に入れNMRの測定試料とした。また、

PFG-NMR、Obstructionモデル

ふくおかみか、ごみゆういちろう、わたなべひさひこ

かまぼこは日本水産（株）より供与された2種（A:ゼリー強度1480g・cm、B:ゼリー強度410g・cm）を用いた。それぞれ直径10mmの試験管に入れ、これをRFコイルの中心にセットした。

NMRの測定は、Bruker AM200WB（4.7 Tesla、マイクロイメージングアクセサリ付き）を用い、RFコイル直径15mm、測定温度21.7°C、stimulated echo法によった。拡散時間は20msから1200msまで変化させた。

結果及び考察

Fig. 1は各観測時間における拡散係数 D_{app} （見かけ拡散係数）を拡散時間（ $\Delta\delta/3$ ）に対してプロットしたものである。見かけの拡散係数は拡散時間（ $\Delta\delta/3$ ）の増加とともに減少し時間依存性を示した。

Fig. 1に示された拡散係数の時間依存性は、魚肉タンパク質（アクトミオシン）のフィラメントが形成する網目構造が水分子の拡散に及ぼすobstruction effectの結果であると見なしてモデルを設定した。モデルは二次元に正方形の障害物（obstacle）を等間隔に配列したものである。obstacleの繰り返しのサイズLと間隙のサイズとの比を開孔比とした。この間隙に均一に粒子を配列し、二次元のランダムウォークシミュレーションによる数値計算を行なった。しかしながら実際に観測時間数十msの拡散現象をシミュレートするためには非常に多数回の計算が必要となる。そこで時間軸及び見かけ拡散係数を無次元化したマスターカーブを作成した。マスターカーブに含まれるパラメーターである自由拡散係数値 D_{free} 、定常状態の拡散係数値 D_{∞} 、及びobstacleの繰り返しのサイズLを、拡散係数の実験値との最小二乗法により決定した。得られたパラメーターの一つであるobstacleの繰り返しのサイズLは、電子顕微鏡で観察したかまぼこの網目構造を構成するフィラメント間空隙のサイズと良く一致し、シミュレーションに用いたモデルがある程度妥当であると言える。

またモデル試料として用いた Latex Beads 研濁液では、Beads の直径が $90\mu\text{m}$ のものでは拡散係数の時間依存性が観測され、同様の解析を行なった結果、パラメータとして $L=50\mu\text{m}$ 、 $D_{free}=2.1\times 10^{-5}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ 、 $D=8.85\times 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ が得られた。

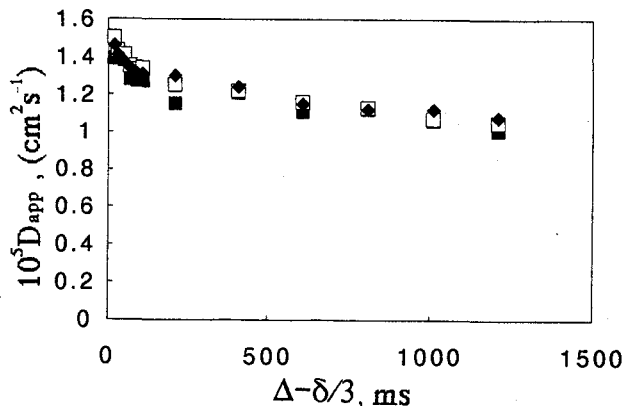


Fig. 1 Apparent diffusion coefficient against diffusion time ($\Delta\delta/3$).

東工大

○山崎亜紀 堀田芳生 黒子弘道 安藤勲

Image Analysis of Spatial Distribution of Paramagnetic Mn²⁺ Ion in a PMAA Gel with the Application of a dc Electric Field by ¹H NMR Imaging MethodDepartment of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology
A. Yamazaki, Y. Hotta, H. Kurosu, and I. Ando

The ¹H T₂ images for a transverse slice of a PMAA hydro gel with paramagnetic Mn²⁺ ion under the application of a 3V dc electric field were observed as a function of the elapsed time by means of 270 MHz ¹H NMR Imaging. By using the relationship between the concentration of Mn²⁺ ion and ¹H T₂ of water in the gel obtained by ¹H pulse NMR, the ¹H T₂ image was converted to the Mn²⁺ ion concentration image. From these experiments, the spatial distribution of paramagnetic Mn²⁺ ion in the gel was obtained as a function of the elapsed time.

1. はじめに

私共はハイドロゲルに応力を印加したときの歪みの変化、また電場を印加したときの収縮機構を¹H NMR イメージング法を用いて研究し、¹H NMR イメージング法がゲルの刺激-応答の解析に優れた方法であることを明らかにしてきた。^{1)~3)}

本研究では、硫酸マンガン水溶液で膨潤させた架橋ポリメタクリル酸(PMAA)ゲルに3Vの直流電圧を印加した経時変化を¹H NMR イメージング法を用いて¹H スピン密度と¹H T₂の空間分布を測定することにより、高分子ゲル中の常磁性イオン (Mn²⁺) の空間分布の経時変化を解析することを目的とした。

2. 実験

本研究で用いる架橋ポリメタクリル酸 (PMAA) ゲルは、開始剤 (K₂S₂O₈) 0.03mol/l を少量の純水に溶解しラジカルを生成し、架橋剤 (MBAA) 0.01mol/lを加え、モノマーであるメタクリル酸 (MAA) 3mol/lを加え、純水で以上の濃度に試料を調製した後、試料をアンプル管に流し込み、ラジカル反応を止めるO₂を取り除くために凍結脱気を繰り返した後、アンプル管を封管し恒温槽中で24時間、318Kに保ち、重合した。得られたゲルは多量の純水中で洗浄後、乾燥させ硫酸マンガン水溶液で平衡膨潤させた。得られたゲルの膨潤度Qは、ゲルの膨潤時の重量M_{swollen}と乾燥時の重量M_{dry}より $Q = M_{swollen} / M_{dry}$ と定義され、本研究で用いたゲルの膨潤度は平均42であった。

¹H NMR イメージング法、高分子ゲル、常磁性イオン、運動性、直流電場

やまざきあき、ほったよしお、くろすひろみち、あんどういさお

また、常磁性イオン (Mn^{2+}) の濃度とPMAAゲル中の水の $^1H T_2$ との関係を調べるために、様々な濃度の硫酸マンガン水溶液中で膨潤させたPMAAゲルの $^1H T_2$ をBruker minispec PC-20(20MHz)のパルス 1H NMRを用いて、CPMG法により測定した。

さらに本研究では、Fig.1に示される電圧印加装置を用いてゲルに3Vの直流電圧を印加し、その 1H スピン密度と $^1H T_2$ の空間分布の経時変化を 1H NMRイメージング法により測定した。 1H NMRイメージング測定は、NM-GIM270イメージングシステム（日本電子製）を接続したGSX-270NMR分光器（270MHz、日本電子製）を用い、 $220mTm^{-1}$ の磁場勾配を印加しスピネコー法により行われた。分解能は $0.02mm$ である。また電圧印加前の試料はFig.2に示される直径8mm、長さ7mm、円筒状のゲルで、 1H NMRイメージング測定における切断面は電流の流れる向きに対して平行にとった。

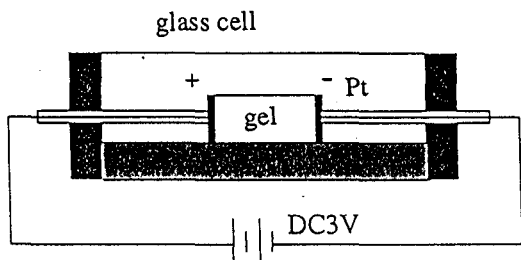


Fig.1 Glass cell for applying an electric field to a PMAA gel

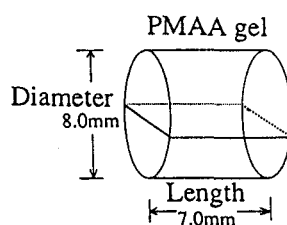


Fig.2 PMAA gel image of transverse slice to be observed

3.結果及び考察

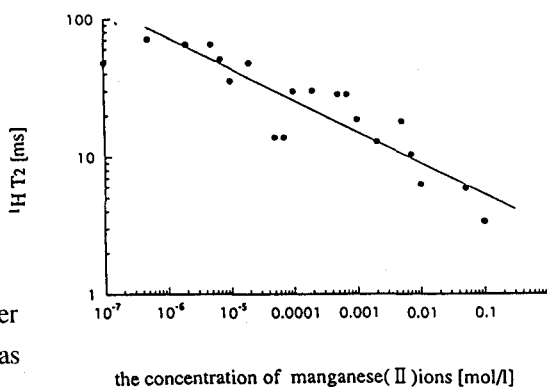
本研究で用いたPMAAゲルを様々な濃度の硫酸マンガン水溶液中で膨潤させパルスNMR法により測定した結果、硫酸マンガン水溶液の濃度($C[mol/l]$)と $^1H T_2$ との関係はFig.3に示したようになり、

$$T_2(^1H) = 7.24 C^{-0.163}$$

と表される。

すなわち、常磁性イオン (Mn^{2+}) の濃度が高いほど $^1H T_2$ が短くなり、この式から $^1H T_2$ 値より Mn^{2+} の濃度が決定できる。

Fig.3 The dependence of $^1H T_2$ of water in a PMAA gel on Mn^{2+} concentration as observed by 1H pulse NMR method



硫酸マンガン水溶液で膨潤させたPMAAゲルに3Vの直流電圧を印加し、 1H スピン密度と $^1H T_2$ の空間分布の経時変化を 1H NMRイメージング法を用いて測定した結果、硫酸マンガン水溶液で膨潤させたPMAAゲルのプラス極側の $^1H T_2$ が増大し、マイナス極側の $^1H T_2$ が減少した。これは、ゲル中の Mn^{2+} が電圧印加時にマイナス極側に移動し、

析出するために、ゲル内の Mn^{2+} の濃度に分布が生じ、 $^1H\ T_2$ が不均一になるためと考えられる。

1H NMRイメージング測定で得られた $^1H\ T_2$ の空間分布の経時変化とFig.3からえられた硫酸マンガン水溶液の濃度と $^1H\ T_2$ との関係から、高分子ゲル中の常磁性イオン(Mn^{2+})の空間分布が明らかになった。Fig.4に硫酸マンガン水溶液で膨潤させたPMAAゲルに電圧印加したときのゲル内の Mn^{2+} の存在空間分布を示す。

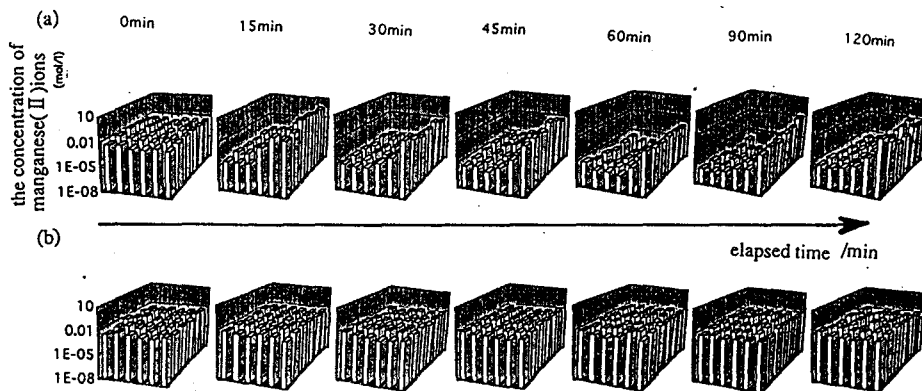


Fig.4 Elapsed-time dependence of spatial distribution of the concentration on manganese(II) ions for a transverse slice of a PMAA gel swollen by aqueous manganese(II)sulfate with(a) and without(b) the application of an electric field

したがって、ゲルに電圧を印加したときの常磁性金属イオンの空間分布の変化が 1H NMRイメージング法を用いて、 $^1H\ T_2$ の空間分布を測定することにより解析された。これより常磁性イオンの空間分布の解明に 1H NMRイメージング法が有用な手法となることが明らかになった。

参考文献

- 1) H. Yasunaga, H. Kurosu, and I. Ando, *Macromolecules*, **23**, 2445 (1990)
- 2) T. Shibuya, H. Yasunaga, H. Kurosu, and I. Ando, *Macromolecules*, **28**, 4377 (1995)
- 3) H. Kurosu, T. Shibuya, H. Yasunaga, and I. Ando, *Polymer Journal*, **28**, 80 (1996)

飽和移動による脳組織の高分子成分のスペクトル抽出
(日本女子大学理学部、国立精神・神経センター神経研究所)

○高橋征三、荻野孝史

Macro-Molecular Components In Brain Tissue Revealed
by Saturation Transfer.

(*Dept. Chemical and Biological Sciences, Japan Women's Univ.,
National Institute of Neuroscience, NCNP)

*Seizo Takahashi, Takashi Ogino

Brain tissues comprises many components with various molecular weights. *In vivo* NMR studies have focused on low molecular weight metabolites in the tissues so far. In this study, two methods, i.e., CPMG difference experiment and saturation transfer experiment, were investigated as a first step to get insight into macro-molecular components in the tissues. The results suggested that the low molecular weight metabolites are in a dynamic equilibrium with those bound to macromolecules.

脳組織はさまざまな分子量の多種類の分子種から構成される混合系である。従来の *in vivo* NMR では、おもに低分子成分を測定対象にしてきたが、高分子成分を解析すれば、低分子代謝成分の分析からでは得られないような脳組織の機能情報を得られる可能性がある。そのためには混合物の中から選択的に高分子成分をスペクトル抽出する方法を確立しなければならない。そこで、その高分子成分を抽出する方法として、今回は飽和移動スペクトルとして捉えることを試みた。

〔実験〕 5-7週令のラット脳の代謝をマイクロウエーブで瞬間的に停止し、解剖後その約 200mg を 5mm の NMR 試料管に詰めた。NMR は、Bruker AMX-400WB を用い 298K で測定した。

〔結果〕 組織と抽出液の COSY スペクトルを比較したところ、高分子成分由来の信号と思われるピークが幾つか散見された。また CPMG 法で T_2^* を測定したところ、ほとんどのピークが 2 成分で説明でき、かつ T_2^* の短い成分は 60ms 前

キーワード：飽和移動、*in vivo* NMR、脳組織、高分子成分

たかはし せいぞう、おぎの たかし

後の値で、ピークによって大きくばらついた。この結果は、種々の分子量の高分子成分が混ざって観測されていることを示唆する。

緩和の速い成分を抽出するのに有効であるとされている DEFT は低分子成分を十分に抑えることができなかった。 T_2 の短い成分だけを強調したスペクトルを得るために、CPMG 法で待ち時間を変えて、その待ち時間の違いによる差スペクトルを測定した。得られたスペクトルは、もとのスペクトルとほとんど違わなかった。そこで高分子成分の輪郭を磁気飽和移動法を用いて捉えることを試みた。照射の有無による差スペクトルの結果では、水の信号を除いて、照射位置に関係なくスペクトルパターンに大きな違いは観測されなかった。

「考察」 従来、in vivo NMR では脂質やたんぱく質などの信号は邪魔ものとして、それらの成分を抑制する工夫をしつつ目的の代謝成分を定量していた。しかし最近では勾配磁場の高速化により、高分子成分を定量的に捉えられる可能性がでてきた。脳で観測される主な高分子成分は脂質やたんぱく質であるが、これらの信号を選択的にとらえ帰属することができれば、脳機能研究における新たな情報を提供できる可能性がある。

脳組織は不均一構造体であり、 T_2^* は短い T_1 および T_2 は比較的長いという特徴を持つ。したがって磁場の不均一にもとづく要因を避けつつ T_1 や T_2 の短い成分を選択的に捉えることができれば組織内の高分子成分をスペクトル抽出することができると考えられる。

DEFT は T_2 の長い成分をz軸に残し、 T_2 の短い成分を選択的に抽出する方法として広く用いられている。しかし脳組織の場合、 T_2 の長い成分を完全に抑制することができなかった。この方法は予め T_2 が長くて強い信号を飽和して使えば有効であろう。

T_2 の短い成分を強調して抽出するためには CPMG 法で待ち時間の違いによる差スペクトルを測定すれば有効であろう。しかし結果としては、もとのスペクトルとほとんど同じスペクトルパターンが得られた。飽和移動スペクトルを求めるために、照射しないものとの差スペクトルを測定したところ、やはりスペクトルパターンはもとのスペクトルとほとんど違わなかった。この結果は、脳組織で観測されるスペクトルにおいて、遊離の状態で存在する低分子の代謝物質は、たんぱく質などの高分子と結合したものと動的平衡にあることを示唆する。

このことを確認するために、照射位置を変えたとき得られるアクションスペクトルを求めたり、すべての信号を非選択的に照射し飽和させた、Saturation Recovery で T_1 の短い成分を強調したスペクトルを求める実験を進めている。

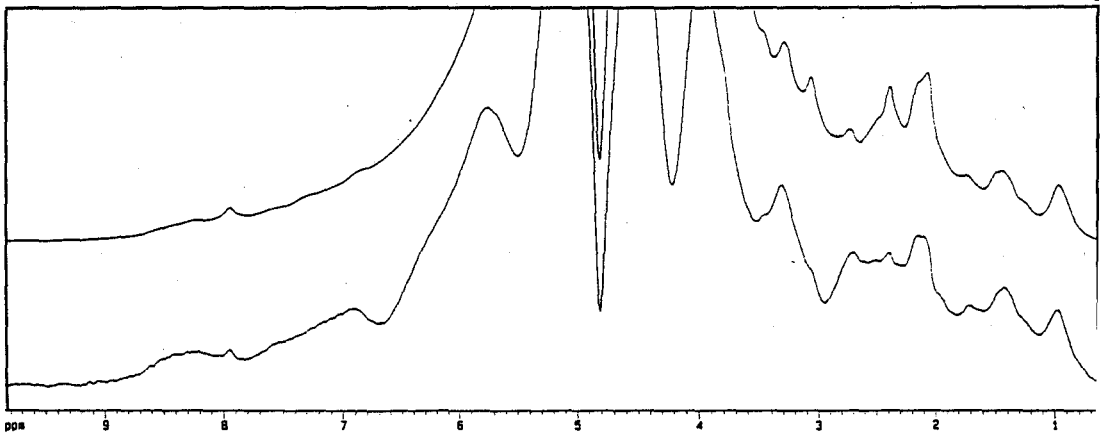


Fig. 1 Short T_2 Enhanced Spectrum of Rat Brain Tissue.

Upper; Normal CPMG Spectrum With Echo Time of 2ms.

Lower; Difference CPMG Spectrum Between Echo Times of 2ms and 6ms.

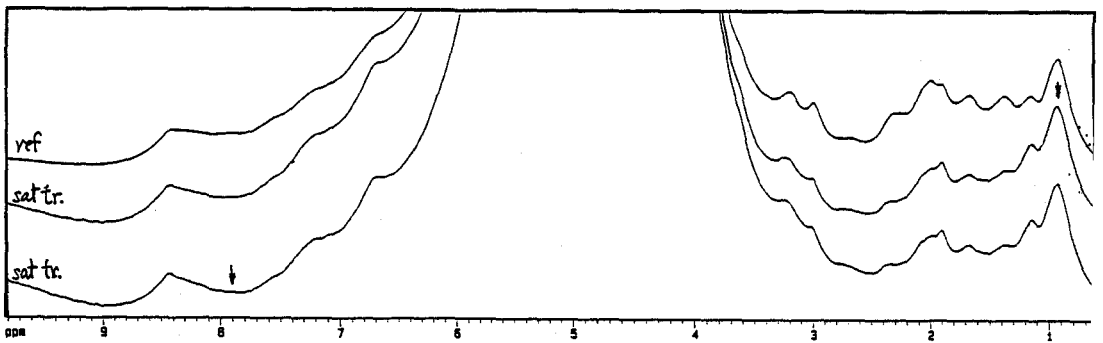


Fig. 2 Saturation Transferred Spectra of Rat Brain Tissue.

Upper; Normal Spectrum. Middle and Lower; Difference spectrum between Normal and Irradiated Ones at the Position Indicated by Arrows.

3P46

固体NMRによる核間距離精密測定法
(MLEV8/8R) を用いたプロテアーゼ複合体
(subtilisin-SSI)の局所構造の測定

京大院理 1、都立大理 2、○石井佳誉 1、寺尾武彦 1、
三宅洋子 2、甲斐荘正恒 2

**Measurement of the local structure in a protease-inhibitor complex
subtilisin-SSI by MLEV8/8R**

Yoshitaka Ishii and Takehiko Terao,

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University
and

Yoko Miyake and Masatsune Kainosho,

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

Abstract

A structural study by solid state NMR was performed on a protease-inhibitor complex: subtilisin-SSI (Streptomyces Subtilisin Inhibitor). The ^{13}C - ^{15}N distance in the scissile bond of SSI was measured by MLEV8/8R method (Y. Ishii and T. Terao, *J. Magn. Reson. A* **115**, 116-118 (1995).) using doubly labeled sample. The information on the local structure of SSI in the complex state was obtained through determination of the ^{13}C - ^{15}N distance. In addition, to reduce a loss of signal-to-noise ratio which is usually caused in multipulse experiments, a noise-reduction software filter was developed and applied to the present experiments.

Introduction

蛋白性プロテアーゼインヒビターのその阻害機能の原因を解明するために、そのターゲットのプロテアーゼとの複合体との構造化学的研究は多くの研究者によりなされてきた。特にセリンプロテアーゼインヒビターについては、Free及びプロテアーゼとの複合体の構造が数多くX線結晶

双極子相互作用、距離測定、局所構造解析、SSI、

いしいよしたか、てらおたけひこ、みやけようこ、かいのしょうまさつね

回折により明らかにされ、その活性部位（切断結合）の微妙な構造の歪みが阻害機能発現の原因であるとの説もある。しかしX線結晶回折はその性質上、活性部位の微細な構造を議論するのに適していない。一方で、固体NMRにはタンパク質などの大分子中の局所構造を原理的に低分子と同じ高精度で測定できるというX線結晶回折にはない特徴がある。本研究では、セリンプロテアーゼの一種である Subtilisin とその Streptomyces 由来のインヒビターである Streptomyces Subtilisin Inhibitor (SSI) の複合体の切断部位の構造を固体NMRを用いて検討する。高精度で ^{13}C - ^{15}N 核間距離の測定を可能とするMLEV8/8Rパルス系列を用いた ^{13}C - ^{15}N 核間距離測定を通して、SubtilisinとSSIの複合体における活性部位の局所構造に対する精密な情報が得られることを示す。また、感度低下を防ぐためマルチパルス用の noise-reduction software filterを開発した。

Noise Reduction Software Filter

CRAMPSやMLEV8/8Rのようなマルチパルス実験ではパルスとパルスの間で信号をモニターするが、パルスのリングングを早く減衰させて信号を観測するためaudio filterの値をスペクトルのバンド幅に比べ、通常はかなり大きく設定する。しかし、これによりスペクトルのS/N比は低下する。今回の実験では試料が分子量78000という巨大なプロテアーゼ複合体であり、 ^{15}N のラベル率が約40%と低いことから、S/Nの低下は深刻な問題となる。これを防ぐためnoise-reduction software filterを開発した。まず、ハードウェア的にはaudio filterの値を大きく設定し、パルスの照射されている区間のみを避けて連続的に信号を取り込む。audio filterの値は非常に大きく設定されているため、パルスリングングの問題はない。取り込まれた信号を特殊なウインドウをかけて、filteringすることで、不必要なノイズを落とす。これにより分子量78000という巨大なプロテアーゼ複合体に対してもMLEV8/8Rにより核間距離を測定することが可能となった。また、CRAMPSなどに対する応用も可能である。

Experiments

測定には甲斐荘らにより開発されたダブルラベル法で $[1-^{13}\text{C}]\text{Met}$ と

^{15}N ValをラベルしたSSI(Free-SSI:分子量23000)を用いた。これにより被切断結合に当たる ^{13}C - ^{15}N を選択的にダブルラベルする事ができた。ransaminaseの影響により、 ^{15}N -Valのラベル率は約40%となる。この ^{13}C Met, ^{15}N Val SSIとSubtilisinの混合物の溶液より、 ^{13}C Met, ^{15}N Val SSI-Subtilisin complex(SSI-complex:分子量78000)を作成した。ほぼ全てが2:2のcomplexを形成していることはHPLCのパターンにより確認した。

測定にはChemagnetics社CMX-300と自作の ^1H , ^{13}C , ^{15}N 3重共鳴プローブを用いた。MLEV8/8Rは ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用によるPake doubletを得ることで精密な核間距離を得ようという方法であるが、今回の実験の場合以下に述べる二つの点が問題となった。(i)非常に分子量が大きい試料であるため、天然存在の ^{13}C のスペクトルが

目的のPake doubletを覆い隠してしま

う。(ii)数日間に及ぶ長期の積算の間に回路のデチューニングが起きてrf強度が変化する。(i)の問題は ^{13}C にパルス照射した場合(^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用on)と照射しない易場合(^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用off)の差スペクトルをとることで、解決した。(ii)の問題については、

MLEV8/8Rはかなりのrf-fieldの分布を補償するので、

$\pm 0.01\text{\AA}$ 程度の精度でならば測定することは可能であった。Fig.1にMLEV8/8Rによって得られたFree-SSIとSSI-complexのスペクトルを示す。核間距離や局所構造についての検討等は当日発表する。

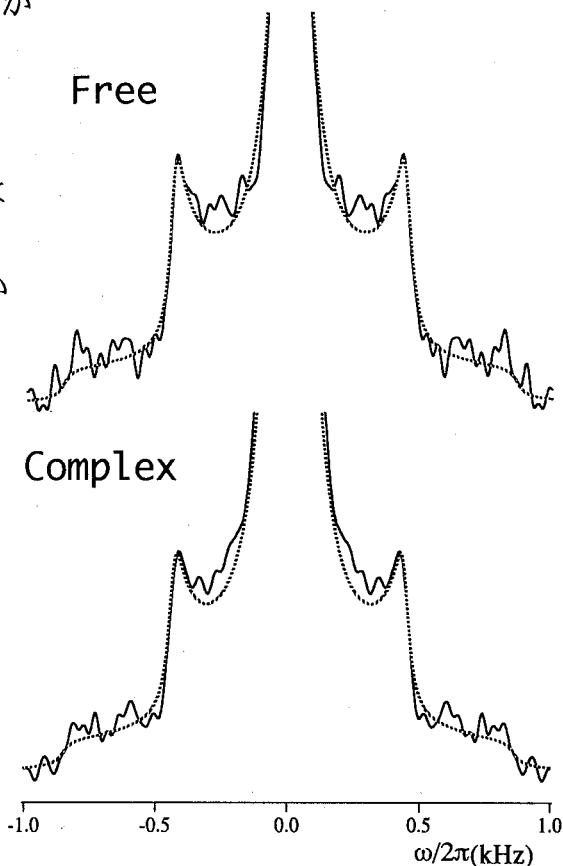


Fig. 1 MLEV8/8R differential spectra(solid lines) for ^{13}C Met, ^{15}N Val SSI (upper) and the ^{13}C Met, ^{15}N Val SSI-Subtilisin complex(lower) and the corresponding simulations(dotted lines).

CH- and CH₂-selected 2D spectra and their application to biomolecule analysis
Jun Kawabata and Eri Fukushi (Fac. Agric., Hokkaido Univ.)

Each of the CH- and CH₂-selected 2D HSQC spectrum was obtained by setting proper delays and ¹H-pulse angle of editing sequence in the E-HSQC. This method solved the cancellation problem caused by overlapping of the opposite phase peaks. It also reached the relatively high resolution in F₁ axis by limiting the F₁ spectral width. Efficiency of the methods for analysis of complex natural products such as oligosaccharides and peptides in which signal overlapping is severe was also presented.

1. はじめに

インバースCH相関法においてCH, CH₃相関をCH₂相関と逆位相に得る手法としてDEPT-HMQC(1), E(editing)-HMQC(2), E-HSQC(3)法などが知られており, 近接するCHまたはCH₃とCH₂の帰属に有効である。しかしこれらの方法では逆位相のピークの重なりによる感度低下やCH₃とCHの区別の問題がある。そこで解決法としてCH-およびCH₂-選択スペクトルを測定する方法を検討した。さらに, それらを応用しておこなった構造解析について述べる。

2. E-HSQC によるCH, CH₂-選択

E-HMQC, DEPT-HMQC法にはeditingパルス(βH)が含まれ, CH, CH₂, CH₃シグナル強度のβ依存性が報告されている。さらにDEPT-HMQC法においてはグラジエントパルスをかえると, β依存性が変化することも知られている(4)。

今回はF₁方向の線幅が狭くピーク分離の点でHMQC法より有利なHSQC法について検討した。オリ

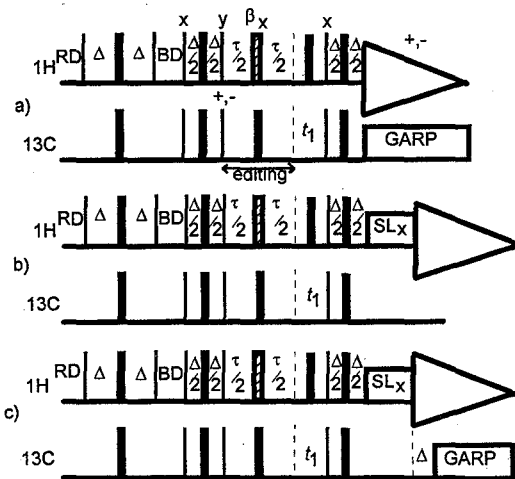


Fig.1. Pulse sequences for E-HSQC (a), ¹³C-coupled E-HSQC-ROESY (b), and E-HSQC-TOCSY (c). Narrow, wide, and hatched bars represent $\pi/2$, π , and variable pulses with a flip angle of β , respectively. The delays RD, BD, Δ , and τ represent a repetition delay, a BIRD delay for eliminating ¹²C-bonded proton, $1/2^1J_{CH}$, and variable delay, respectively.

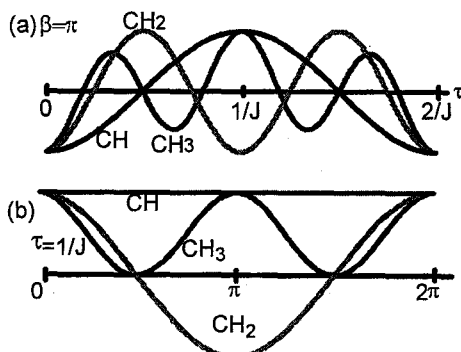


Fig.2. Signal dependency of different ¹H multiplicities on τ and β using a sequence of Fig.1(a). (a) $\beta = \pi$, (b) $\tau = 1/J$.

keywords: E-HSQC, editing, oligosaccharide, peptide

かわばた じゅん, ふくし えり

シグナルの E-HSQC法はHSQC法の t_1 展開の前に $-(\tau/2)-(\pi C, \beta H)-(\tau/2)-(\tau=1/J, \beta=\pi)$ から成る editing シーケンスが挿入されている (Fig.1(a)). この待ち時間 τ とプロトンパルス角 β を変化させたときの CH , CH_2 , CH_3 シグナル強度を、モデル化合物を用いた測定 ($t_1=0$ とおいた 1D 実験) およびプロダクトオペレーター解析により調べた。その結果、最終的にシグナルを与える磁化成分の editing 部分に由来する係数は以下のものであった。

$$\begin{aligned}
 I_S & 1-(1-\cos\beta) \cos^2(\pi J\tau/2) \\
 I_{2S} & 1/2 \{ \sin^2(\pi J\tau) + \cos^2(\pi J\tau) \cos\beta + \sin^2(\pi J\tau) \cos^2\beta \} \\
 I_{3S} & 1/4 [3 \sin^2(\pi J\tau) \cos^2(\pi J\tau/2) + \cos^2(\pi J\tau/2) \{ 1 - 3\cos(\pi J\tau) \}^2 \cos\beta \\
 & + \sin^2(\pi J\tau/2) \{ 1 + 3\cos(\pi J\tau) \}^2 \cos^2\beta + 3 \sin^2(\pi J\tau) \sin^2(\pi J\tau/2) \cos^3\beta]
 \end{aligned}$$

$\beta=\pi$ のときの各シグナルの τ 依存性は Fig. 2(a), $\tau=1/J$ のときの β 依存性は Fig.2(b) のような曲線となる。以上により、E-HSQC法で $\tau=1/2J$, $\beta=\pi$ と設定すると CH_2 -選択スペクトル、 $\tau=1/J$, $\beta=\pi/2$ と設定すると CH -選択スペクトルが得られることがわかった。以下、これらの応用例をあげる。

3. CH_2 -選択 E-HSQC スペクトルによりオリゴ糖のメチレンを帰属した例

フラクトオリゴ糖 1 (ca. 10mg/0.5 ml D_2O) の NMR シグナル帰属の過程で、各フラクトース残基 6 位のメチレンプロトンは多くのシグナルと重なり合った領域にあり、これらを COSY で帰属することはできなかった。先に帰属したカーボンから HMQC、HSQC により対応するプロトンの帰属を試みたが、これらカーボンの δ_C も近接していたためシグナルを分離することはできなかった。1 には 7 個のメチレンがあるが、それらの δ_C が狭い範囲に集中していることに着目し、 CH_2 -選択スペクトルでカーボン軸方向の分解能向上を試みた。

まず、DEPT-HMQC法で CH_2 -選択スペクトルを測定したが、HMQC法はカーボン軸方向に J_{HH} による分裂および線幅の広がりが見られるため、カーボン側の測定範囲を狭く設定し分解能を上げても、相関ピークを分離することはできなかった。そこで、 CH_2 -選択 E-HSQC スペクトルを測定し、3 組の F6 メチレンプロトンの δ_H を決定した (Fig.3)。このスペクトルでは、カーボンの一次元スペクトルで分離しなかった 63.3 ppm の 2 組のメチレン (フラクトース 1 位のうちひとつとグルコース 6 位) も分離することができた。

このように特定のシグナルを選択することは、カーボン軸方向 (縦軸) の測定範囲を狭く設定でき、限られた測定時間、データサイズでの高分解能測定を可能とするメリットを持つ。1 では各糖残基のメチレンシグナルが非常に狭い範囲に集中して現れたため NMR 解析上問題となったが、逆にこのことがメチレン選択スペクトルによる分解能向上を可能にした。

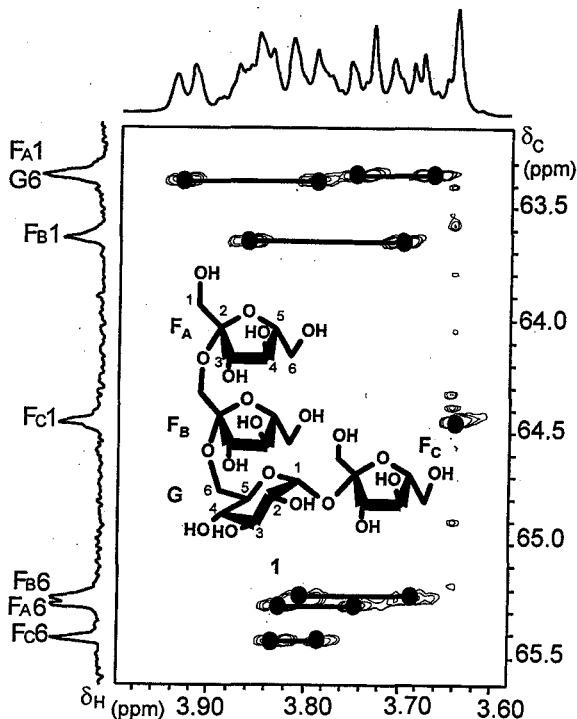


Fig.3. CH_2 -selected E-HSQC spectrum of 1.

3. CH-選択 E-HSQC-ROESY法によりオリゴペプチドの α H/NHのROEを観測した例

ペプタペプチド 2 (ca. 4mg/0.5 ml DMSO- d_6) は、グルタミン残基(Q₁, Q₂, Q₃)側の立体構造の手がかりとなる Q₂とQ₃のNH、およびQ₁とQ₂の α Hの δ_H が近接していた。通常のROESYスペクトルではこの部分の相関ピークを分離できなかったため、カーボン軸へのピークの分離を期待してHMQC-ROESY(5)を測定した。しかし、週末測定でも十分な分解能と感度を満たすことはできなかった。そこで、2にはメチンカーボンが各アミノ酸残基の α カーボンのみであることに着目し、CH-選択スペクトルを測定することで感度と分解能の問題の解決を試みた。E-HSQCにROESYを繋いで、2D E-HSQC-ROESYを作成し(Fig. 1(b))、 $\tau=1/J$, $\beta=\pi/2$ としてCH-選択スペクトルを測定した。F₁側のスペクトル幅が約1/3になったのでF₁側のデータ数を1/2としても分解能は向上する。F₁側のデータ数を減らした積算回数を多くとり測定した。その結果、Q₁ α /Q₂N, Q₂ α /Q₃Nの相関を分離して得、この部分のアミド結合をトランスと決定できた(Fig. 4)。

HMQC-ROESY(NOESY)法は δ_H が近接した場合のNOE観測に有効であるが、感度が低いため非ラベルの天然物へ応用した例は少ない。このように特定のシグナルを選択することによりF₁の測定範囲を狭く設定すれば、分解能を犠牲にすることなく積算回数を多くとることができ、試料量の多くない化合物にも応用が可能となる。

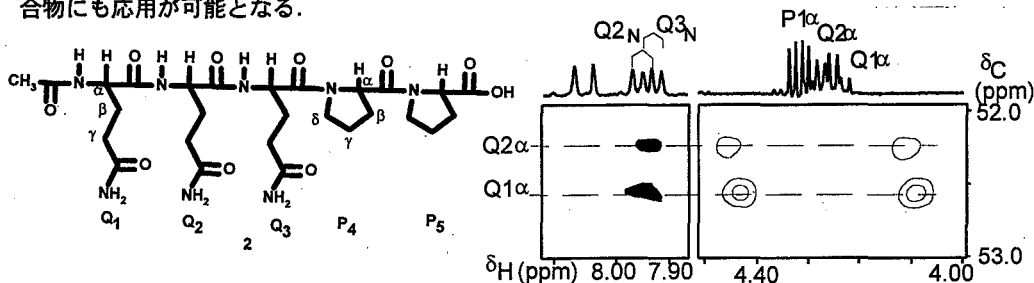


Fig. 4. Part of CH-selected E-HSQC-ROESY spectrum of 2. Positive and Negative peaks are drawn with open and filled plots, respectively.

5. CH-CH₂-選択 E-HSQC-TOCSY法により近接する逆位相シグナルの相殺を回避した例

Fig. 4(a)はコレステロール(3)(19 mg/0.5ml chloroform- d)のE-HSQCスペクトルである。 $\tau=1/J$, $\beta=\pi$ としてCH, CH₃をCH₂と逆位相で得、前者を塗り潰して表した。 $\delta_C=32$ ppmにCHとCH₂が重なっているが、相関ピークが逆位相に出るためこれらを区別して帰属できるので、editing法の有効性を示す例としてよく用いられる。ところが、3のHSQC-TOCSYスペクトルを測定すると、逆位相のピークが相殺されて感度低下を引き起こす(Fig. 5(b))。注目しているピークは8位(CH)と7位(CH₂)であるが、相対的に強度の小さい8位由来のシグナルが得られていない。そこでこれを解決するためCH-CH₂-選択 E-HSQC-TOCSYスペクトルを別々に測定した。その結果、CH-選択スペクトル(Fig. 5(c))で8位からの、CH₂-選択スペクトル(Fig. 5(d))で7位からのTOCSY相関をそれぞれ観測することができた。なお、Fig. 4(b)-(d)では¹³Cに直接結合するプロトンシグナルを、FIDの取得開始から $\Delta=1/2J$ 時間遅らせてカーボンデカップリングをすることで消した(6)。

このようにCH-, CH₂-選択 E-HSQC-TOCSYスペクトルを別々に測定することで、近接する逆位相シグナルの相殺による感度低下を解決することができた。また、3のCHカーボンは分離がよいのでFig. 4(c)ではF₁方向のデータ数をFig. 4(b)の1/4に減らし、Fig. 4(d)ではF₁スペクトル幅が約1/5になったのでF₁方向のデータ数を1/2にしても分解能を2倍以上高くとることができる。

6. おわりに

E-HSQC法の editing 部分の待ち時間およびプロトンパルス角を変化させることで、CHおよびCH₂-選択スペクトルを別々に測定できることをプロダクトオペレーター解析により明らかにした。特定の

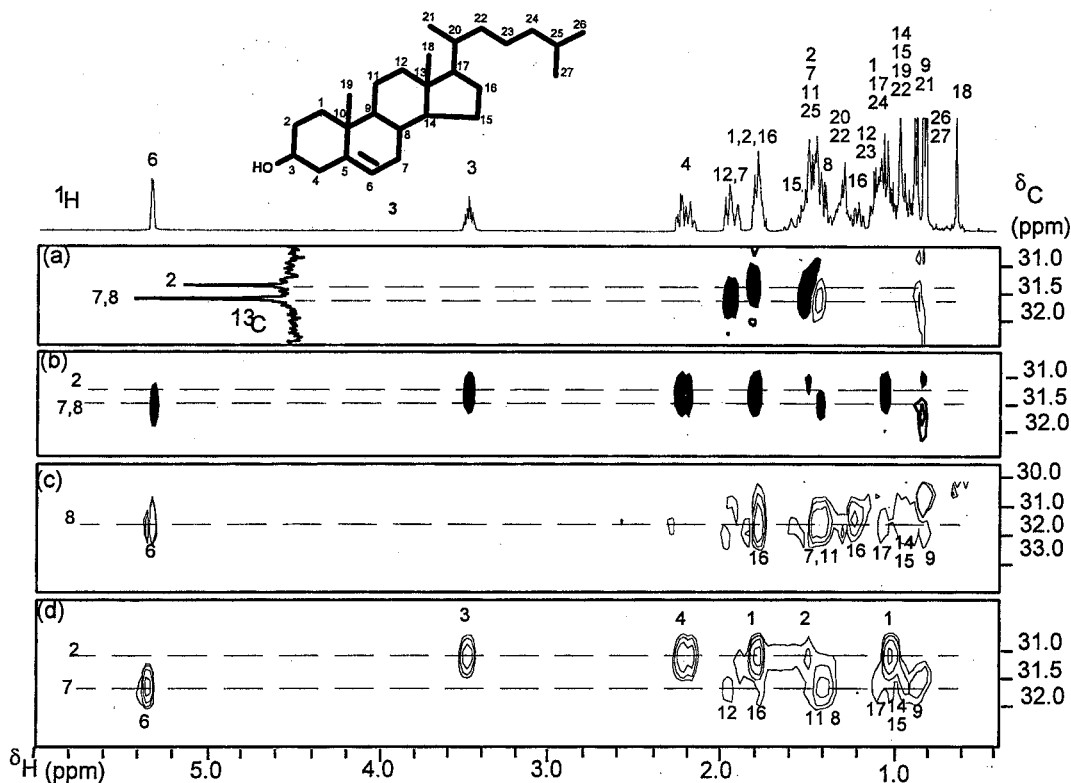


Fig. 5. (a-b) Part of E-HSQC (a) and E-HSQC-TOCSY (b) spectra of **3**. (c-d) part of the CH-(c) and CH₂-(d) selected E-HSQC-TOCSY spectra of **3**. Positive and Negative peaks are drawn with open and filled plots, respectively.

シグナルのみのスペクトルとすることで F_1 方向のスペクトル幅を狭く設定することができ、限られた測定時間、データサイズでの高分解能測定が可能であった。また、低感度なため天然物への応用例の少なかったHMQC-ROESY(NOESY)法においても、 F_1 の測定範囲を限定することで、分解能を犠牲にすることなく積算回数を多く設定して測定できた。 F_1 方向のスペクトル幅を限定する方法としては半選択的2D法(7)がある。インバースCH相関の半選択的2D法は、カーボンの一定の帯域を均一に選択励起できる高性能な選択励起ユニットが必要であるが、editingによる場合はそれらは必要ない。

また、特定のシグナルのみを選択することでカーボンの分離がよくなる場合には F_1 方向のデータ数を減らして短時間に測定した。さらに、通常のediting法で問題となる近接する逆位相ピークの相殺による感度低下を、別々に測定することで回避することができた。

References

1. H. Kessler, P. Schmieder and M. Kurz, *J. Magn. Reson.*, **85**, 400-405 (1989)
2. X. Zhang and C. Wang, *J. Magn. Reson.*, **91**, 618-623 (1991)
3. D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **91**, 665-672 (1991)
4. T. Parella, F. Sanchez-Ferrando, and A. Virgili, *J. Magn. Reson.*, **B109**, 88-92 (1995)
5. J. Kawabata, E. Fukushi, and J. Mizutani, *J. Am. Chem. Soc.*, 1115-1117 (1992)
6. L. Lerner and A. Bax, *J. Magn. Reson.*, **69**, 375-380 (1986)
7. H. Kessler, S. Mronga and G. Gemmecker, *Magn. Reson. Chem.*, **29**, 527-557 (1991)

NMR Studies on Tertiary Structure Comparison between Wild Type and [Abu^{B7}]
Monellin and Structure-Activity Relationship

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

○Toshimi Mizukoshi, Masanori Kohmura, Ei-ichiro Suzuki, Yasuo Ariyoshi

Monellin, an intensely sweet protein, is several thousand times sweeter than sugar on a weight basis. It consists of two polypeptide chains, the A chain with 44 amino acids residues and the the B chain with 50 residues, and its crystal structure is already known. In our previous studies, we proved that the carboxyl group of Asp^{B7} was essential to exhibit a sweet taste, by synthetic studies of many analogs with solid-phase synthesis and NMR studies on tertiary structure comparison between wild type and [Abu^{B7}] monellin which possesses no sweetness. In our NMR studies, there are little NOE information around the active residue and it suggests that it has higher conformational flexibility. So, we estimated its internal mobility by model free analysis with selective ¹⁵N labeled monellin.

[序論] モネリンは1972年に西アフリカ原産のつる植物 *Dioscoreophyllum cumminsii* の果実から単離された呈味物質であり、ショ糖と比べ重量比で約3,000倍の甘味を有する¹⁾。甘味蛋白質の活性部位を明らかにする事は、甘味レセプター部位の予測やそれにフィットする新たな甘味物質のデザイン研究へとつながるため、重要である。モネリンの一次構造は、44残基のアミノ酸からなるA鎖と、50残基のアミノ酸からなるB鎖が非共有結合した二本鎖ポリペプチドであり²⁾、三次元構造はX線結晶構造解析により決定されている³⁾。固相合成によるモネリン変異体での構造活性相関研究の結果、その呈味活性残基は、Asp^{B7}であると推定した。そこで、Asp^{B7}のカルボキシル基がメチル基である Abu(Aminobutylic acid)^{B7}体(甘味活性なし)と天然体の構造比較をNMRで行い、両者の立体構造に大きな差違が無かった事から、Asp^{B7}のカルボキシル基が甘味レセプターとの結合親和性に重要な役割を持つ事を証明し、前回報告した⁴⁾。その際、活性残基周辺にNOE情報が乏しく、構造的な揺らぎが示唆された。モネリンの立体構造は既に解っているため、活性残基とそれと比較しうる残基を選択的に¹⁵Nラベル化すれば、固相合成でも分子内部運動評価の考察が可能であると考えた。そこで活性残基と幾つかの残基を選択的に¹⁵Nラベル化し、緩和解析で活性残基の内部運動を他残基のそれと比較評価した。

[キーワード] モネリン、固相合成、選択的ラベル、緩和解析

みずこしとしみ こうむらまさのり すずきえいいちろう ありよしやすお

[実験結果] 活性残基が Asp である事から、Asp の全残基と、側鎖の保護が必要なく ^{15}N ラベル体が安価に入手できる Gly とをラベルする事にした。各々の ^{15}N ラベル体の保護体 (N-Fmoc, 側鎖 t-butyl エステル保護化 Asp, N-Fmoc 保護化 Gly) を調製し、既知の方法に従い固相合成で Asp (全 5 残基 Asp^{A16}, Asp^{A22}, Asp^{A26}, Asp^{B7}, Asp^{B21})、Gly (8 残基中 5 残基 Gly^{A5}, Gly^{A31}, Gly^{A39}, Gly^{B16}, Gly^{B30}) ラベル化モノリンを合成した。固相合成で選択的にラベル化するメリットとしては、(1) 望む残基をラベル化でき、(2) HSQC シグナルの重なりが無いためにシグナルの帰属が容易で、(3) 高い解析精度が得られる、等があげられる (Fig.1)。

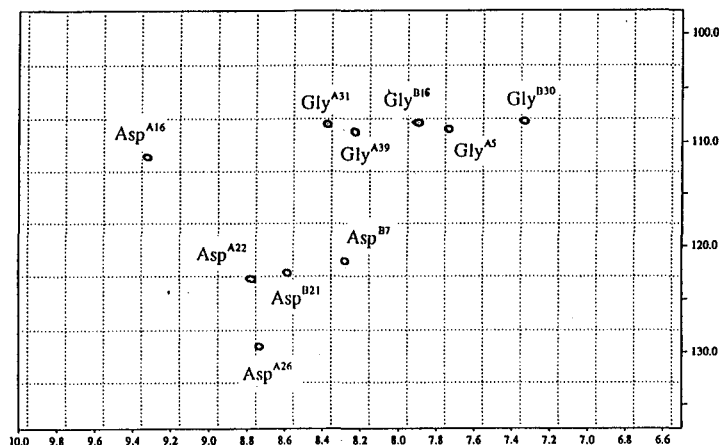


Fig.1 ^1H - ^{15}N HSQC

アミド ^{15}N 核の T_1 、 T_2 、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE を測定し、立体構造と比較した。その結果、緩和時間はモノリンの二次構造をよく反映していた。また、これらの値から order parameter S^2 の値を算出した (Fig.2)⁵⁾。その結果、活性残基は他のラベルした残基よりも高い内部運動を示した。この揺らぎのため活性残基周辺では NOE 情報が乏しかったと考えられる。

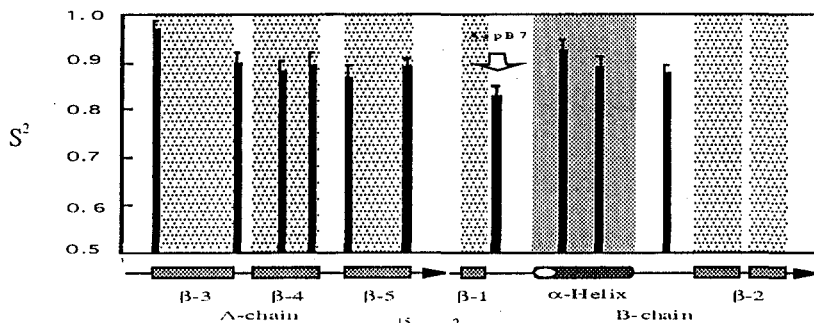


Fig.2 ^{15}N - S^2 of Monellin

[参考文献]

- 1) J. A. Morris, R. H. Cagan, *Biochim. Biophys. Acta*, 261, 114 (1972)
- 2) G. Fank, H. Zuber, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357, 585 (1976)
- 3) C. Ogata, M. Hatada, G. Tomlinson, W. -C. Shin, S. -H. Kim, *Nature*, 328, 739 (1987)
- 4) 第34回NMR討論会 p.343 (1994)
- 5) 植真一、甲斐荘正恒 蛋白質核酸酵素 vol.39, No.7, P.1066 (1994)

3P49

¹H NMRによるナトリウムチャネルの

S 4セグメントの構造解析

(東レリサーチセンター) ○木村 一雄、近藤 洋司、

丸山 季浩、川口 謙

High resolution ¹H NMR study of the micelle-bound structure of the S4 segment of the sodium channel protein.

Kazuo Kimura, Yoji Kondoo, Toshihiro Maruyama and Ken Kawaguchi

Toray Research Centre, 1111 Tebiro, Kamakura 248, Japan

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 and the mutants corresponding to the S4 sequence have been analyzed by 2D NMR. A considerable number of α_1 -NH₊2 NOEs were observed besides the NOEs characteristic of α helix, indicative of 3₁₀ helical structure. The structure was supported by the comparison of the chemical shifts between the wild type and the mutants.

【はじめに】

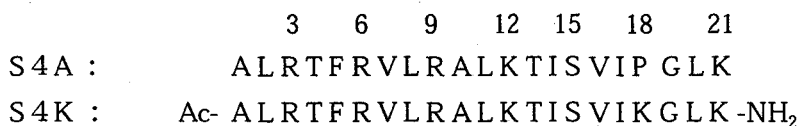
ナトリウムチャネルは電位依存性のイオンチャネルで、そのS 4セグメントは電位センサーと推定されている。S 4セグメントを含む各セグメント(S 1~S 6)は膜貫通ヘリックスと考えられている。我々はこれらのセグメントと同じアミノ酸配列をもったペプチドを合成し、それらがミセルに結合した状態での立体構造をNMRで検討している。ここではS 4ペプチドについて報告する。S 4は、その配列上で3残基ごとにArg, Lysが現われるという際立った特徴をもっている。このためにS 4は膜電位センサーと考えられているが、センサーの機構は明らかにはなっていない。いろいろなモデルが提唱されているが、推測の域を出ていない。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。

ラット脳由来ナトリウムチャネルの第1番目のモジュールのセグメントに対応

キーワード：ナトリウムチャネル、S4、ミセル、ヘリックス、ペプチド

○きむら かずお、こんどう ようじ、まるやま としひろ、かわぐち けん

する S4A は Pro を含むため (P18)、ヘリックス構造が不安定になることを一昨年
の本討論会で報告した。今回は、Pro を Lys に変え、さらに N 端をアセチル化し C
端をアミド化したペプチドを合成し S4K と名づけて解析した。



【方法】

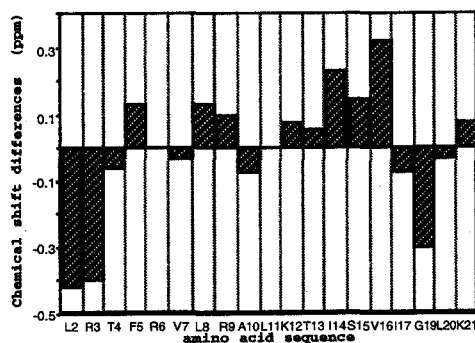
ミセルとして全重水素化ドデシルホスホコリン (d₃₈) を用いた。ペプチドとミ
セルのモル比を 1 : 50 として、25℃、90% H₂O、10% D₂O 中において測定した。
NMR 装置は varian UNITY INOVA 600 を用いた。NOESY スペクトルはジャンプ&
リターン法を用い、25~200 ms の混合時間で測定した。なお、今回のジャンプ&
リターン法では、水ピークを PFG によって dephase するパルスを組み込んだシーク
エンスを作成し使用した。

【結果と考察】

S4A、S4K ともに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。S4K も S4A と同様に
 $\alpha N(i, i+2)$ の NOE が多く見い出され、₃10ヘリックスの特徴が見られた。S4K と S4A
のアミドプロトンの化学シフトを比較すると下図のようになった。図では、S4K と
S4A の化学シフトの差をプロットしてある。アミノ酸配列の 18 番目が Pro から Lys
に変異しているため、Lys18 のアミドプロトンはヘリックス形の水素結合を形成し
ていると考えられる。ここでは Val 16 のアミドプロトンの化学シフト値の変化が大
きいことから、Lys18 と Ser 15 の間で水素結合が生じていると考えられる。このこと
は ₃10ヘリックス構造を支持している。また同様に N 端をブロックしているアセチル
基も Arg3 と水素結合を形成していることが考えられる。今後、NOE、H-D 交換、
¹³Cカルボニルシフトの解析を進めていく予定である。

【文献】

D.G. Doak, D. Mulvey, K. Kawaguchi,
J. Villalain and I. D. Campbell,
J.Mol.Biol. , 258, 672-687 (1996)



The chemical shift differences of amide protons between S4K and S4A in the micelles.

NMR による Aptotoxin の構造解析

(三菱化学生命研) ○小林邦子、金載一、佐藤一紀、河野俊之

Structural Analysis of Aptotoxin by NMR

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

○Kuniko Kobayashi, Jae-Il Kim, Kazuki Sato, and Toshiyuki Kohno

Aptotoxins are insecticidal peptides derived from a venom of the trap-door spider. Seven of nine toxins isolated from the venom cause flaccid paralysis of insects and then these are lethal. But, the modes of action for these peptides are not known.

Aptotoxin VII (Aps VII) is one of these toxins, and has six Cys residues which form three disulfide bonds. In this study, we have analyzed conformation of Aps VII in aqueous solution.

We have found that Aps VII has some β -strands. Its tertiary structure is under calculation.

Aptotoxin は、カリフォルニアに生息するトタテグモの毒液由来のペプチドである。このクモ毒から単離された9種類のペプチドのうち7種類が、昆虫に筋肉麻痺を起こし、死に至らせることがわかっている。しかし、詳しい作用は未だ解明されていない。

これらのペプチドのうちの一つ、Aptotoxin VII (Aps VII) は32アミノ酸残基から成る (Fig.1)。6個のCysを持ち、それらが分子内で3個のジスルフィド結合を形成している。今回、我々はこのAps VIIの構造解析を試みた。

実験は、Aps VII を化学合成し、水溶液 (軽水、及び重水) 中での2次元TOCSY、NOESY、DQF-COSY 等を測定した。測定温度は288 K、298 K、310 Kの3種類である。併せて重水素置換の実験も行った。

常法に従って、プロトンシグナルの帰属を行った。そのシグナルパターンの解析により、Aps VII は β 鎖に富むという知見を得た。現在、立体構造の計算に着手している。

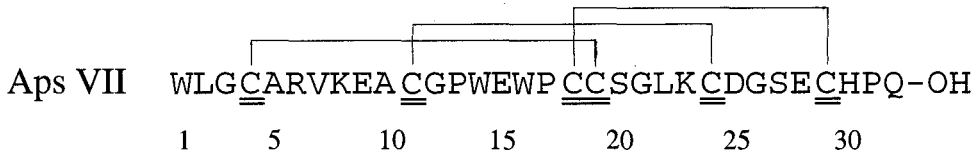


Fig. 1. Primary structure of Aps VII

キーワード：NMR、Aptotoxin、ペプチド、構造、ジスルフィド結合

○こばやし くにご、きむ じえいる、さとう かずき、こうの としゆき

3P51

REDORによるEnkephalinの精密原子間距離測定と三次元構造の構築

(姫路工大 理) ○西村 勝之、 内藤 晶、 辻 暁、 斉藤 肇

Three Dimensional Structure of Crystalline Enkephalin Based on Accurate Interatomic Distances by REDOR

○Katuyuki Nishimura, Akira Naito, Satoru Tuzi, Hazime Saito,
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

Interatomic distances for six kinds of ^{13}C , ^{15}N doubly labeled Leu-enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) crystallized from MeOH/ H_2O solution were measured by using REDOR method to determine the three dimensional structure of enkephalin in the crystalline state. Interatomic distances were then converted into a set of the dihedral angles for the individual three amino acid residues, resulting in three dimensional structure of Leu-enkephalin. It was found that conformation of Leu-enkephalin thus obtained has quasi-extended form whose C and N termini are completely extended and the central portion is slightly bent. This structure is different from the β -bend form reported for the crystals prepared by a similar manner as previously demonstrated by X-ray diffraction.

序論

我々はこれまでに ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識ペプチド試料にREDOR法を適用し、Schaefer¹⁾、Garbow²⁾らの取扱とは異なり、天然存在比の同位体からの磁気双極子相互作用の寄与³⁾、隣接分子の標識同位体からの磁気双極子相互作用の寄与を考慮した3スピン系の解析³⁾、および π パルスの有限長効果⁴⁾等の検討を加え、C-N原子間距離が $\pm 0.05\text{\AA}$ の精度で決定できることを示して来た^{3,4)}。さらにこの精密原子間距離情報に基づいたペプチド主鎖の三次元構造決定のためのプロトコルを報告した⁴⁾。本報告では種々の結晶多形構造におちいり易いenkephalinについて、原子間距離のみならず化学シフトのデータを加え、各アミノ酸残基における二面角の選択を行うより有効なプロトコルと、MeOH/ H_2O 結晶中での主鎖の三次元構造を報告する。

固体高分解能NMR、REDOR、原子間距離測定、enkephalin、三次元構造決定

にしむら かつゆき、ないとう あきら、つじ さとる、さいとう はじめ

実験

異なる位置に ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識を行った6種類のLeu-enkephalinを固相法で合成した。[1- ^{13}C]Tyr-Gly-[^{15}N]Gly-Phe-Leu (I)、Tyr-[1- ^{13}C]Gly-Gly-[^{15}N]Phe-Leu (II)、Tyr-Gly-[1- ^{13}C]Gly-Phe-[^{15}N]Leu (III)、Tyr-[^{15}N]Gly-[1- ^{13}C]Gly-Phe-Leu (IV)、Tyr-Gly-[^{15}N]Gly-[1- ^{13}C]Phe-Leu(V)、Tyr-[^{15}N]Gly-[2- ^{13}C]Gly-Phe-Leu(VI)の各々に対し100%およびこれらを30%に希釈した試料を調製した。図1に試料の標識位置を示す。 ^{13}C 、 ^{15}N 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、それらを用いてABI社のペプチド合成機により固相法で合成した。さらにMeOH/H₂Oにより結晶化を行い、微結晶を得た。

^{13}C -REDOR測定は三重共鳴プローブを用いてChemagnetics社製CMX-400型NMRスペクトロメータにより行った。 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N の共鳴周波数はそれぞれ400.16MHz,100.64MHz,40.55MHzであった。 ^{15}N 核の照射にはOff resonance効果およびパルスのフリップ角のエラーを補償する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10.8 μs 、11.8 μs であった。試料はそれぞれおよそ30mgを内径5mm ϕ の試料管中央部6mmの幅に詰めた。回転速度は付属の回転周波数コントローラーにより4000 \pm 3Hzに調節した。NMR測定はREDORとFull echoの実験を行い、データはT₂の寄与を削除するために(Full echo - REDOR)/REDOR \approx S/S₀としてREDOR効果を解析した。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の解析を行った⁴⁾。

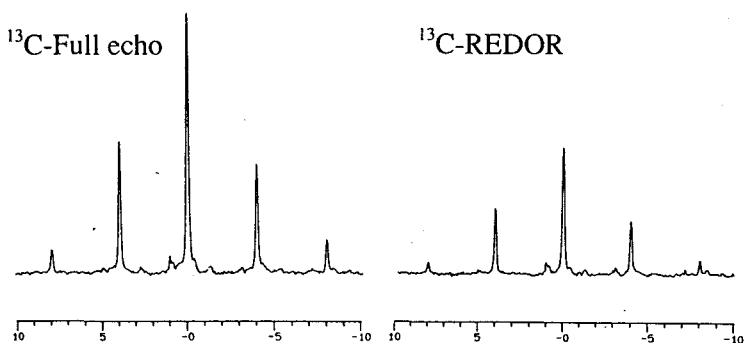
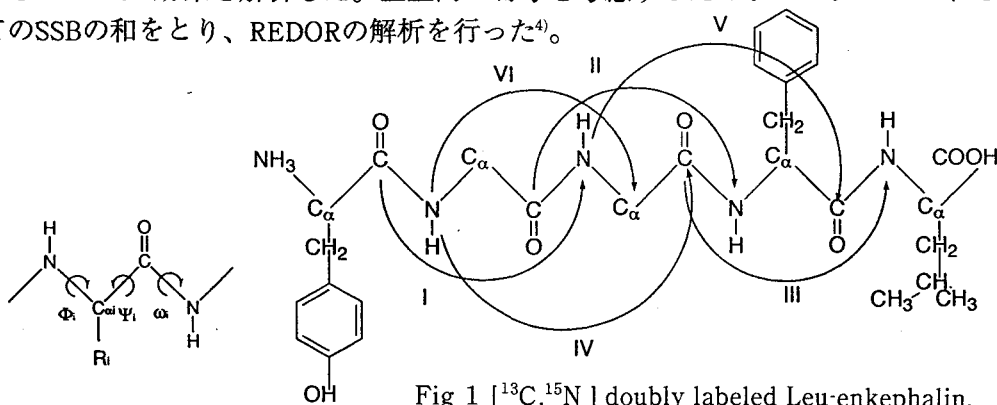


Fig.2 ^{13}C -REDOR and Full echo spectra of sample I at NcTr=20ms.

結果と考察

緩和時間の測定結果から、本結晶における分子運動はそれほど深刻でないことが分かった⁵⁾。標識位置が異なる各試料が常に同一のコンホメーションをとっているかどうかは、等方的化学シフト値が一致するかどうかにより確認した⁶⁾。図2に試料Iの $NcTr=20ms$ での ^{13}C -REDORと Full echo スペクトルを示す。二重標識試料は、結晶状態では隣接分子中の標識同位体からの磁気双極子相互作用の寄与が無視できないため、各試料をそれぞれ100%、30%希釈試料において測定し、無限希釈への外挿によってその有無を確認した³⁾。図3に試料Iの外挿直線を、図4にその外挿点とそれらの点に最もよく一致するエコー強度変化の理論曲線を示す。これらの手順に従って一連の試料の原子間距離を決定した。(表1)

Table 1 Interatomic distances determined by REDOR method.

sample	I	II	III	IV	V	VI
Extrapolated (A)	4.72	3.61*	5.10	5.40	5.60	4.60

* Obtained from undiluted sample..

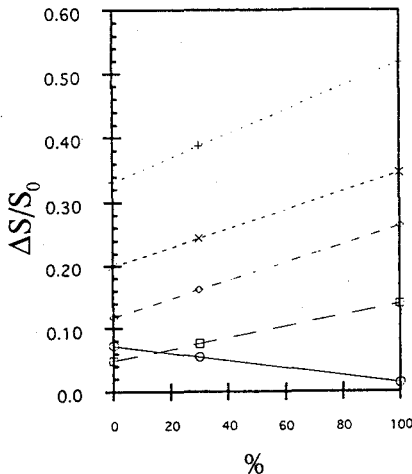


Fig.3 $\Delta S/S_0$ plot against concentration of sample I.

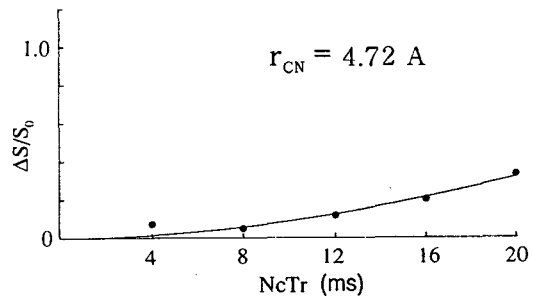


Fig.4 The best fit curve for $\Delta S/S_0$ values (infinitely diluted) of sample I.

次にこれらの原子間距離から既存の化学結合長、結合角を用いて、各アミノ酸残基における二面角を求めた。図5に各試料の二面角依存性と二面角を決定した手順を示す。まず試料IVの二面角図に $\omega_{Gly2}=180^\circ$ を適用し、 Ψ_{Gly2} 角を決定した。この Ψ_{Gly2} を試料I、試料IVの二面角図に適用し、各々 Φ_{Gly2} 、 Φ_{Gly3} を決定した。次に Φ_{Gly3} を試料IIの二面角図に適用し、 Ψ_{Gly3} を決定した。さらに Ψ_{Gly3} を試料Vの二面角図に適用し、さらに $\omega_{Gly3}=180^\circ$ とすることで Φ_{Phe} を決定することができた。最後に Φ_{Phe}

を試料IIIの二面角図に適用し、 Ψ_{Phe} を得た。また各段階で生じる複数の二面角の組み合わせから、標識位置の ^{13}C 化学シフト値と二次構造の相関関係を用いて可能な組み合わせを選択した。こうして得られたペプチド主鎖の三次元構造を図6に示す。このようにして得られたLeu-enkephalinは、X線回折により報告されている β -bend formと異なる立体構造をとっていることが分かった。すなわちC、N末端ともに完全なextended formにであるのに対して、 Gly_3 周辺ではわずかにbendした構造をしている。この構造は分子内水素結合をとる代わりに、 β -bend formとextended formの間に位置する立体構造で、分子間水素結合によって安定化された構造である。これはペプチドのような小分子においては、同じ結晶化条件であっても多数の結晶形が存在し得ることを示している。また多数の多形構造の識別を含めNMR法による構造決定は極めて有用であることを示している。

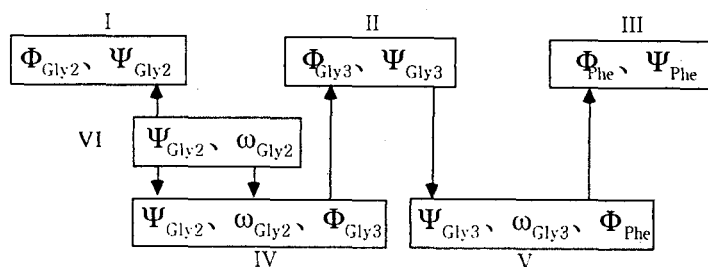


Fig.5 A procedure for determining the dihedral angles based on interatomic distances.

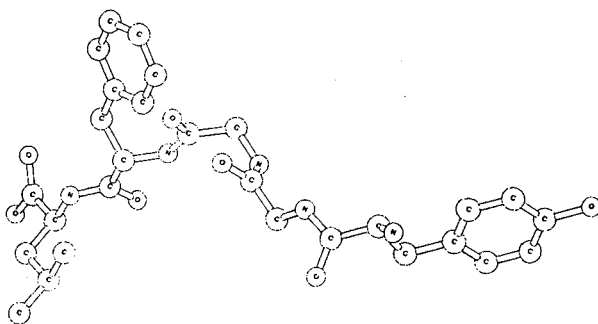


Fig.6 Three dimensional structure of enkephalin determined by REDOR.

- 1) T. Gullion and J. Schaefer, J. Magn. Reson. 92,439(1991)
- 2) J. R. Garbow and C. A. Mcwherter, J. Am. Soc. 115, 238(1993)
- 3) A. Naito, K. Nishimura, S.Tuzi, and H. Saito., Chem. Phys. Letters 229,506 (1994)
- 4) A. Naito, K. Nishimura, S. Kimura, S.Tuzi, N.Yasuoka, M. Aida, and H. Saito., J.Phys. Chem., 100,15005(1996)
- 5) A. Naito, M. Kamihira, K. Nishimura, S.Tuzi, H. Saito., Peptide chemistry 445,(1996)
- 6) A. Naito, M. Kamihira, S.Tuzi, and H. Saito., J.Phys. Chem. 99,12041(1995)

(日本チバガイギー (株)、国際科学研究所)

O田 栄浩、金折賢治、高島浩幸、野坂篤子

Structural characterization of the C-terminal part of human calcitonin by proton NMR spectroscopy

International Research Laboratories, Ciba-Geigy Japan Ltd.

OY.H. Jeon, Kenji Kanaori, Hiroyuki Takashima, Atsuko Y. Nosaka

[要約] The solution structure of C-terminal part of human calcitonin (hCT) was investigated by ^1H NMR spectroscopy. The temperature coefficients of the amide proton signals and the analysis of exchange of amide protons with deuterium in D_2O and 60% $\text{D}_2\text{O}/40\%$ trifluoroethanol (TFE) solutions suggest that the C-terminal part of hCT actually takes a definite secondary structure. Based on the NOE distance information, the three dimensional structure of hCT was elucidated in 60% water/40% TFE solution. The results indicate that a sharp turn structure is present from Thr25 through the C-terminus.

[序論] ヒトカルシトニン (hCT)は32アミノ酸残基からなるペプチドホルモンで、カルシウムーリン代謝に重要な役割を果たしている。水溶液中では特定の構造を取らないが、Trifluoroethanol (TFE)等の有機溶媒中ではLeu9からPhe22まで α ヘリックス構造を取ることが知られている¹。hCTは溶液中で容易に会合し不溶性の繊維として沈殿する。前回報告したように繊維化過程においては、分子の会合はN末端と中央部領域から始まり、C末端は会合の初期段階には関与しない²⁻⁴。これは、C末端部が分子間相互作用しにくいような構造をとっているためではないかと推測される。今回、我々は、hCTのアミドプロトンの温度係数と重水および60% $\text{D}_2\text{O}/40\%$ TFE溶液中でのアミドプロトンのH-D交換速度を観測して両溶媒中でC末端が特定の構造を取っていることを確認した。さらに、NOEによる距離情報に基づいて60%水/40%TFE溶液中でのhCTのC末端部分の立体構造を求めることを試みた。

[実験] hCTは化学合成したものをを用いた。NMR測定にはBruker AMX-600を使用した。重水と60% $\text{D}_2\text{O}/40\%$ TFE溶液中でのhCTのアミドプロトンのH-D交換速度の測定は283K(pH 2.8)で行った。両溶媒中でアミドプロトンの化学シフト値の温度変化を(283K-313K)観測し、温度係数を求めた。60% $\text{H}_2\text{O}/40\%$ TFE溶液中での $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESYスペクトルを283Kで測定し、その距離情報に基づいて、Distance

キーワード: ヒトカルシトニン、繊維化、H-D交換、温度係数

でんよんほう、かなおり けんじ、 たかしま ひろゆき、 のさか あつこ

Geometry法で構造計算を行った。計算にはプログラムDIANA (version1.1)を使用した。

また、両溶媒中での繊維化に伴うシグナルの変化を観測し繊維化過程を比較した。

〔結果と考察〕 重水と60% D_2O /40%TFE溶液中でのhCTのアミドプロトンのH-D交換は、ランダムな構造であると予測されていたC末端部分の方がN末端部及び、中央部のヘリックス領域のものより遅いことが明らかになった。交換が特に遅い残基は、水溶液中ではIle27, Gly28, Val29, Gly30であり、60% D_2O /40%TFE溶液中ではThr25, Ile27, Val29, Gly30, Ala31で、両溶媒でほぼ同じ領域であった。また、この領域のアミドプロトンの温度係数はヘリックス構造を取る中央部領域 (Leu9-Phe22)のアミドプロトンと同様な値を示した。これらの実験結果は、C末端部のアミドプロトンが水素結合に関与しているかあるいは溶媒の重水素と交換しにくいような特定の構造を取っていることを示唆している。

さらに詳細な構造を調べるために60% H_2O /40%TFE溶液中で 1H - 1H NOESYを測定した。NOESYから得られた距離情報を基に構造計算を行った結果、Thr25からAla31のC末端領域がシャープなターン構造を形成していることが明らかになった。全距離情報289個のうち44個がこのC末端(Gln24-Ala31)領域の残基から得られた。C末端部分を中心に15個の最適構造を重ね合わせた場合、その主鎖のRMSDは、 2.0\AA だった。

以上の結果からhCTのC末端領域が水溶液及び60% H_2O /40%TFE溶液中で特定の構造を取っていることが明らかになった。hCTの繊維化は中央部の両親媒性の α ヘリックスの疎水部間の相互作用により進行すると考えられている。分子の会合に伴い、N末端と中央部のシグナルの線幅は広くなりやがて観測できなくなるがC末端部のシグナルは両者に比べて遅くまで観測可能である。これはおそらくC末端部がターン構造を形成しているためこの部分の分子間の相互作用が妨げられるためであると考えられる。

〔文献〕

- (1) Doi, M., Yamanaka, Y., Kobayashi, Y., Kyoqoku, Y., Takimoto, M., & Goda, K. (1990) Peptides: Chemistry, Structure & Biology, 11th Proc. Am. Pept. Symp., July 9-14, 1989, La Jolla, CA (Rivier, J.E., & Marshall, G.R., Eds.) pp165-167, ESCOM, Leiden, The Netherlands.
- (2) Kanaori, K., & Nosaka, Y.A. (1995) *Biochemistry* 34, 12138-12143.
- (3) Kanaori, K., & Nosaka, Y.A. (1995) *Bull. Magn. Reson.* 17, 274-275.
- (4) Kanaori, K., & Nosaka, Y.A. (1996) *Biochemistry* in press.

Conformational Change of Membrane Protein Induced by Metal Ion Binding; High-resolution Solid-state NMR Study

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

○Satoru Tuzi, Akira Naito and Hazime Saitô

We have recorded ^{13}C NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -labelled bacteriorhodopsin (bR) in biomembrane by binding with different amount of metal cations, to examine how conformation and dynamics of the membrane protein vary with metal ion binding. The conformational changes observed for a deionized blue membrane and those observed during Ca^{2+} titration suggest the presence of more than one specific binding sites of divalent cation in the protein.

Conformational exchanges between α_{II} -helix, loop and random coil induced by cation binding suggest that the changes occur mainly in the vicinity of membrane surface, and the cation binding sites should be located near the membrane surface.

序論

生体膜中に存在し、信号受容、伝達、ポンプ機能等を担う膜貫通型蛋白質は、生体内において重要な役割をはたしているが、脂質-蛋白質複合体として有効分子量が大きく、また良質の三次元結晶をえることが難しいため、X線構造解析、溶液多次元NMRによる高次構造解析は容易でない。固体高分解能NMRを用いることで、これらの難点にかかわらず、生理状態に近い生体膜中における膜蛋白質の構造を解析し、さらにダイナミクスに関する情報を得ることができる。我々はこれまでに固体高分解能 ^{13}C NMRを用い、膜貫通型光プロトンポンプ蛋白質バクテリオロドプシンの生体膜中における高次構造の帰属と解析を行い、生理的条件に近い条件下におけるバクテリオロドプシンの高次構造とダイナミクス、また、懸濁液組成、温度、水分含量等の環境条件による構造への影響を解析しうることを示してきた。¹⁴ ここでは、二価金属イオンが生体膜中のバクテリオロドプシンの動的構造に与える影響を固体高分解能 ^{13}C NMRによって解析し、膜蛋白質の生理条件下における高次構造と運動性に対する金属イオンの寄与を考察した。

バクテリオロドプシンは高度好塩菌 (*Halobacterium salinarium*) の紫膜に含まれる光プロトンポンプ蛋白質で、膜を貫通する7本の α -ヘリックスとヘリックスを結ぶ膜外のループ構造からなり、生体中で蛋白質：脂質の重量比3：1の組成を持つ蛋白質二次元結晶に近い紫膜の状態で存在する。蛋白質、蛋白質中に共有結合しているレチナール分子および脂質分子の一部の低温下 (-268°C) における立体構造はHendersonらによる低温電子顕微鏡による研究で報告されているが、蛋白質または脂質に結合し、バクテリオロドプシンの機能に影響を与えることが知られている二価カチオンの結合部位および構造に対する影響については明確な知見が得られていない。二価カチオンの除去によりバクテリオロドプシンの吸収極大は568 nmから604 nmに移り、光プロトンポンプ活性を持たない青膜となる。このような変化を引き起こす機構として、蛋白質内の高親和性サイトへの二価カチオンの結合による蛋白質

固体高分解能NMR、膜蛋白質、高次構造、金属イオン、バクテリオロドプシン

つじ さとる、 ないとう あきら、 さいとう はじめ

の高次構造変化、または負電荷を持つ膜表面への二価カチオンの結合による紫膜表面のpH変化が考えられている。ここでは固体高分解能 ^{13}C NMRを用い、二価カチオンの結合の有無による蛋白質の構造とダイナミックスの変化および二価カチオンの結合部位を解析した。

実験

^{13}C 標識バクテリオロドプシンは $[\beta\text{-}^{13}\text{C}]$ アラニンを含む合成培地中で培養した高度好塩菌より遠心分離により紫膜を分離精製して得た。

二価カチオンを含まない青膜は紫膜を純水中に懸濁し、イオン交換樹脂 (Dowex-50W-X8) により処理して得た。得られた青膜への二価カチオンの付加は懸濁液中に 1 mM CaCl_2 または MnCl_2 を添加することで行った。

NMR測定は標識紫膜懸濁液 (5mM HEPES, 10 mM NaCl, 0.025 % (w/v) NaN_3 , pH7.0) または標識青膜懸濁液 (純水) より遠心沈殿したペレットを試料として 20°C 、遮光下で行った。測定方法として、CP-MAS法、DD-MAS (single pulse excitation Dipolar Decoupled-MAS)法を用い、 ^{13}C 核の T_1 測定はTorchiaの方法で行った。

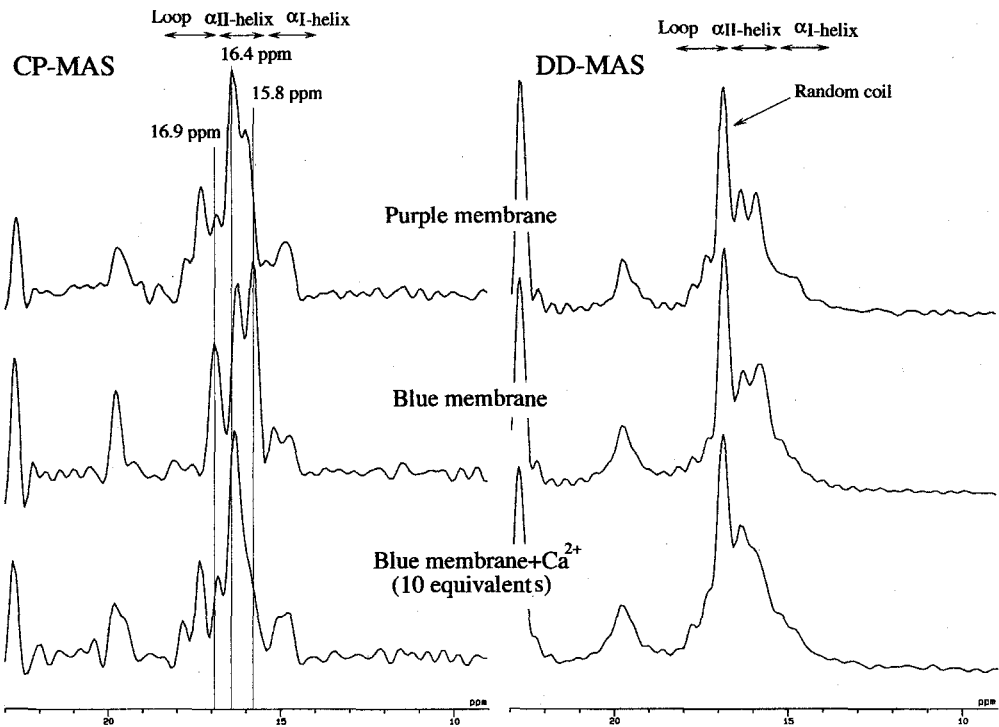


Fig. 1 CP-MAS and DD-MAS NMR spectra of $[\beta\text{-}^{13}\text{C}]$ Ala-labeled bacteriorhodopsin in the purple membrane, deionized blue membrane and blue membrane treated with 10 equivalents of Ca^{2+} .

結果

Fig. 1に紫膜、青膜および10当量の Ca^{2+} を結合した青膜中のアラニン側鎖メチル炭素のCP-MASおよびDD-MASスペクトルを示す。紫膜の信号上に帰属されている二次構造に対応する信号の位置を示す。CP-MASスペクトルより、二価カチオンの除去により膜貫通ヘリックスの主要部分を占める α_{II} -ヘリックスの信号 (紫膜: 16.0 および16.4 ppm) は15.8および16.2 ppmにシフトするとともに高磁場側ピークの信号強度

増大を示す。また、紫膜では 16.9, 17.3 および 17.8 ppm に三本見られるループ部位の信号は 16.9 ppm の単一の信号となる。同様の变化は DD-MAS スペクトルにおいても観測され、二価カチオン除去は膜貫通ヘリックスと膜外ループ部位の双方に構造変化を誘起することがわかる。青膜への Ca^{2+} の添加により、信号は紫膜の線形に近づくが、CP-MAS, DD-MAS とともに 15.9-16.0 ppm の信号は再生しない。

Table 1 に示すように青膜の CP-MAS スペクトルで観測される 16.9 ppm の信号は紫膜の対応する信号に比べ $T_{1\rho}$ は等しいが交差緩和時間および回転系のスピン格子緩和時間 $T_{1\rho}^H$ が長く、遅い揺らぎが大きいことがわかる。

Fig. 2, 3 は異なる当量の Ca^{2+} を結合した膜の DD-MAS スペクトルの間の差スペクトルを示す (Fig. 2: 0 当量 - 1 当量, Fig. 3: 1 当量 - 3 当量)。3 当量以上の Ca^{2+} 結合によるスペクトル変化は見られなかった。1 当量の Ca^{2+} 結合により、15.7 ppm の α_{II} -ヘリックスと 16.8 ppm のランダムコイルが減り、17.2 ppm のループ構造が増える。

1 当量から 3 当量の結合量増加による変化は 0 ~ 1 当量の変化と異なり、主に α_{II} -ヘリックス構造 (15.8 ppm) の減少とランダムコイル (17.0 ppm)、 α_{II} -ヘリックス (16.5 ppm) とループ構造 (17.5 ppm) の増加として現われる。同様の傾向の線形変化が CP-MAS スペクトルでも観測される。

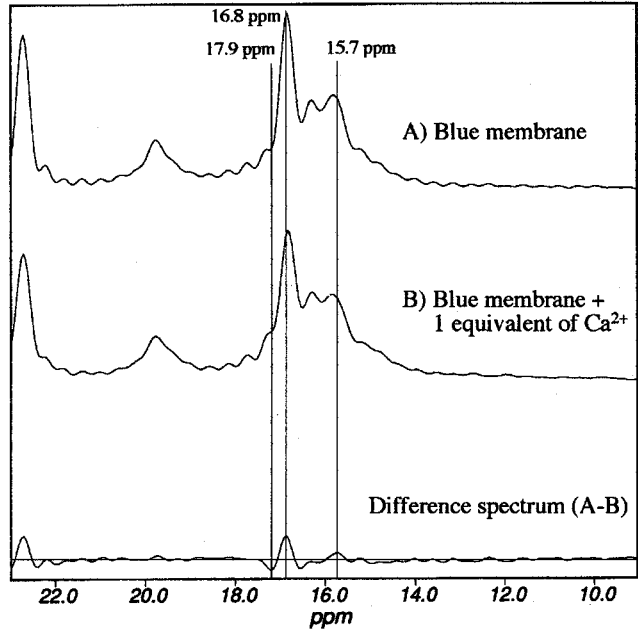


Fig. 2 ^{13}C DDMAS NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ labelled bacteriorhodopsin in the blue membrane (A) and blue membrane treated with one equivalent of Ca^{2+} (B), and difference spectrum between A and B.

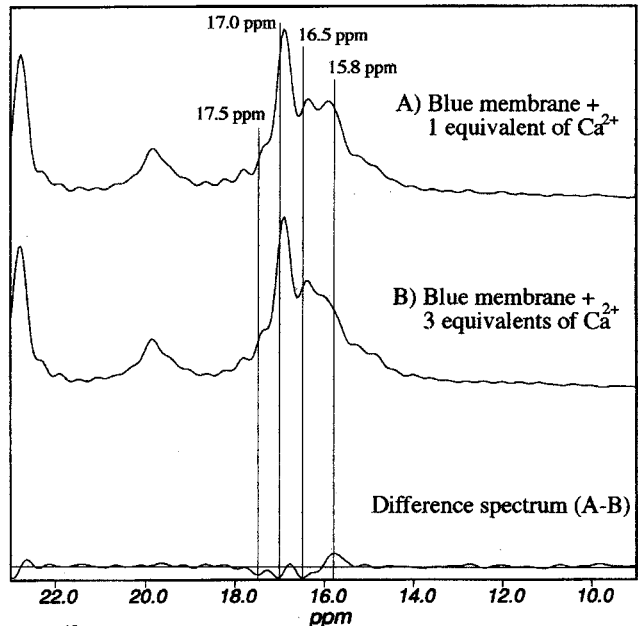


Fig. 3 ^{13}C DDMAS NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ labelled bacteriorhodopsin in the blue membrane treated with one equivalent of Ca^{2+} and three equivalents of Ca^{2+} (B), and difference spectrum between A and B.

二価カチオンとして常磁性を持つMn²⁺を付加した場合、Fig.1のスペクトルと比較して1当量では α_{II} -ヘリックス部位(15.8-16.5 ppm)およびランダムコイルまたはループ部位(16.9-17.1 ppm)に主な信号の減少が見られるのに対し、3当量の付加ではランダムコイル(16.9 ppm)の信号に非常に大きい減少が見られる。

Table 1: Relaxation Parameters of bR in the Purple Membrane and Deionized Blue Membrane

	Chemical shifts (ppm)				
	17.2	16.9	16.5	16.3	15.0
purple membrane					
T1c (s)	0.38		0.55		0.59
TCH (ms)	0.13		0.12		0.12
T1 ρ H (ms)	6.5		5.9		7.4
Blue membrane					
T1c (s)		0.52		0.51	0.43
TCH (ms)		0.45		0.12	0.10
T1 ρ H (ms)		43.3		4.9	4.6

考察

紫膜から二価カチオンを除去することによる吸収極大波長の長波長シフトに対応して、NMRスペクトル(Fig.1)より立体構造上は15.8ppmのシフトを持つ α_{II} -ヘリックス構造および表面近傍のループ、ランダムコイルに主な構造変化があることがわかる。特に、CP-MASスペクトルで青膜に特徴的な16.9 ppmの信号は大きな揺らぎを示唆する緩和パラメータを示し(Table 1)、紫膜に無い新たなランダムコイル部位の生成を示している。青膜に10当量のCa²⁺を添加したときに15.9 ppmの信号がHEPES緩衝溶液(pH7)中の紫膜の信号強度を再現しない点は、純水に懸濁した青膜の表面pHが低い(pH4)ことによるC末端近傍の構造変化によると考えられる(講演1P65参照)。Ca²⁺による滴定と差スペクトルによる構造変化の解析は、3当量以下の低いCa²⁺結合量でのみ蛋白質高次構造変化があることを示し、蛋白質中の特定サイトへの二価カチオン結合とその高次構造維持への関与を示している。1当量のCa²⁺結合による α_{II} -ヘリックス、ランダムコイルからループ構造への変化は構造変化が膜表面近傍で起きていることを示す。Mn²⁺滴定は二価カチオン結合部位が α_{II} -ヘリックス構造付近であることを示すことを考慮すると、結合サイトは α_{II} -ヘリックスの膜表面近傍と考えられる。1-3当量のCa²⁺結合による構造変化は表面部位における α_{II} -ヘリックスからループ、ランダムコイルへの変化と α_{II} -ヘリックス間の構造変化を含む。1当量の結合時と異なる構造変化は蛋白質中に複数の結合サイトが存在することを示唆している。またMn²⁺の結合による信号変化は二価カチオン結合サイトの一部がC末端部位にがあることを示している。

ここで観測されたような金属イオンの結合によるバクテリオロドプシンの大きな高次構造変化とその固体NMRスペクトルへの影響は、膜蛋白質の生理的状態における高次構造維持に金属イオンが重要に寄与をしている可能性と、固体NMRによる金属イオン結合と高次構造変化の様式の詳細で容易な解析が可能であることを示している。

- 1) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, *Eur. J. Biochem.*, 218, 837-844 (1993)
- 2) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, *Biochemistry*, 33, 15046-15052 (1994)
- 3) S. Tuzi, S. Yamaguchi, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi, and H. Saitô, *Biochemistry*, 35, 7520-7527 (1996)
- 4) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, *Eur. J. Biochem.*, 239, 294-301 (1996)
- 5) N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin and R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, 259, 393-421 (1996)

3P54 NMRによるショウジョウバエSxl蛋白質RNA結合ドメインの高次構造とRNA認識機構の解明

(¹東大・理, ²理研・細胞情報伝達, ³神戸大・理, ⁴京大・理, ⁵東京都立大・理, ⁶千葉工大・工) ○武藤 裕¹, 井上真¹, 伊藤拓宏¹, 武田佳宏¹, 金

仁実¹, 智 勝輝¹, 渡部 暁¹, 北村 綾¹, 木川隆則², 坂本博³, 志村令郎⁴, 甲斐荘正恒⁵, 小野 晶⁵, 細野和美⁶, 高久洋⁶, 横山茂之¹

NMR Analysis of the Interaction between an RNA -Binding domain of the Sxl Protein and Target RNA Molecules

(¹Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo, ²Cellular Signaling Laboratory RIKEN, ³Faculty of Science, Kobe University, ⁴Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, ⁵Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, ⁶Chiba Institute of Technology)

○Y. Muto¹, M. Inoue¹, T. Ito¹, Y. Takeda¹, I. Kim¹, S. Chi¹, S. Watanabe¹, A. Kitamura¹, T. Kagawa², H. Sakamoto³, Y. Shimura⁴, A. Ono⁵, M. Kainoso⁵, K. Hosono⁶, H. Takaku⁶ & Shigeyuki Yokoyama¹

ABSTRACT: The Sex-lethal (Sxl) protein from *Drosophila melanogaster* has two RNA-binding domains (RBDs). By replacement of Phe166 by Tyr, we constructed a highly soluble mutant, which exhibits the same RNA-binding properties as those of the wild type. By using this mutant protein, we performed NMR measurements, and elucidated the secondary structure of Sxl RBD1. The $\beta\alpha\beta-\beta\alpha\beta$ folding pattern is conserved in Sxl RBD1 as in other reported RBD structures. On the other hand, Sxl RBD1 has an Ile residue at the second position of RNP2, which is generally occupied by an aromatic amino acid residue in RBDs and suggested to be involved in their RNA binding. Furthermore, the loop region between $\beta 2$ and $\beta 3$ of Sxl RBD1 exceptionally has a cluster of aromatic amino acid residues, in place of the normal basic amino acid cluster. In contrast, the second RBD of Sxl does not exhibit these characteristic features.

[序] ショウジョウバエの性決定に関与するSxl蛋白質は、RNA binding domain (RBD)をタンデムに二つもつRNA結合蛋白質であり、*tra* 遺伝子のpre-mRNAのオールタナティブスプライシングを調節し、ショウジョウバエの性決定を行なっている。RBDをタンデムに3つもつU2 auxiliary factor (U2AF)と呼ばれる蛋白性因子とSxl蛋白質は、ポリウリジンを含むほぼ共通の核酸配列を認識する。これらの蛋白質が、役割分担を行っている現象は、オールタナティブスプライシングによる生体機能の制御を明らかにする上で非常に興味深い問題である。本研究では、Sxl蛋白質のタンデムに繋がったRBD分子によるRNA分子の認識を明らかにするため、RBDI-RBDIIについてNMR法による構造解析を試みた。

[実験] (1) NMR法による構造解析：RBDIIについては、すでにその高次構造が明らかにされている(1)。RBDIの構造解析のために変異体RBDIを用いてNMR法による構造解析をおこなった。解析のために¹⁵N安定同位体標識を行った試料を変異体RBDIおよび変異体RBDI-RBDIIについて作製した。測定は、Bruker社製 AMX-600を用いて、測定温度25°Cで行った。(2) 選択的¹⁵N標識したウリジンの作製：結合配列は、ポリウリジンを含む配列であり、シグナルの帰属のために3-¹⁵N標識したウリジンのアミダイトユニットをXavierらの方法によって作製した。このウリジンユニットを用いることにより、位置特異的に¹⁵N標識した、結合配列(GU₈C)を作製した。

[結果および考察] . RBDIの高次構造：RBDIの高次構造は、RBDIIと類似しており、四本の β

Key Words : Alternative splicing, Sxl protein, NMR, SPR, RNA binding domain

むとう ゆたか, いのうえ まこと, いとう たくひろ, たけだ よしひろ, キム インシル, ジ スーウンスク, わたなべ さとる, きたむら あや, きがわ たかのり, さかもと ひろし, しむら よしろう, かいのしょう まさつね, おの あきら, ほその かずみ, たかく ひろし, よこやま しげゆき

RNP2							loop 3											RNP1						
RBD1	L ¹²⁷	I ¹²⁸	V ¹²⁹	N ¹³⁰	Y ¹³¹	L ¹³²	D ¹⁵⁹	Y ¹⁶⁰	K ¹⁶¹	T ¹⁶²	G ¹⁶³	Y ¹⁶⁴	S ¹⁶⁵	F ¹⁶⁶	G ¹⁶⁷	Y ¹⁶⁸	A ¹⁶⁹	F ¹⁷⁰	V ¹⁷¹	D ¹⁷²	F ¹⁷³			
RBD2	L ²¹³	Y ²¹⁴	V ²¹⁵	T ²¹⁶	N ²¹⁷	L ²¹⁸	D ²⁴⁵	K ²⁴⁶	L ²⁴⁷	T ²⁴⁸	G ²⁴⁹	H ²⁵⁰	P ²⁵¹	H ²⁵²	G ²⁵³	V ²⁵⁴	A ²⁵⁵	F ²⁵⁶	V ²⁵⁷	H ²⁵⁸	Y ²⁵⁹			
aliphatic	99	11	96	6	1	96	17	19	19	13	4	10	7	8	0	11	35	1	98	6	9			
aromatic	0	83	1	3	2	2	2	3	2	0	2	2	0	1	0	80	0	95	0	2	91			
basic	0	1	0	32	6	0	10	30	17	4	14	55	8	83	4	2	0	1	0	9	0			
acidic	0	0	0	1	8	0	54	16	23	12	7	2	4	1	2	0	0	0	0	33	0			
neutral	1	3	3	14	63	2	16	16	33	70	12	27	72	8	7	7	5	3	2	50	0			
small	0	1	0	43	20	0	2	15	5	2	62	5	9	0	88	0	60	0	0	0	0			

Table1: Amino acid types (%) in the RNP2 (A) and loop 3 & RNP1 (B) regions of 161 RBDs homologous to RBD1 or RBD2. Amino acid categorization: aliphatic (A, V, L, I, and M), aromatic (F, Y, and W), basic (K and R), acidic (D and E), neutral (S, T, C, N, Q, and H), and small (G and P). Non-consensus amino acid residues of RBD1 are shown in open letters. The highest percentage for each residue is indicated in bold letters.

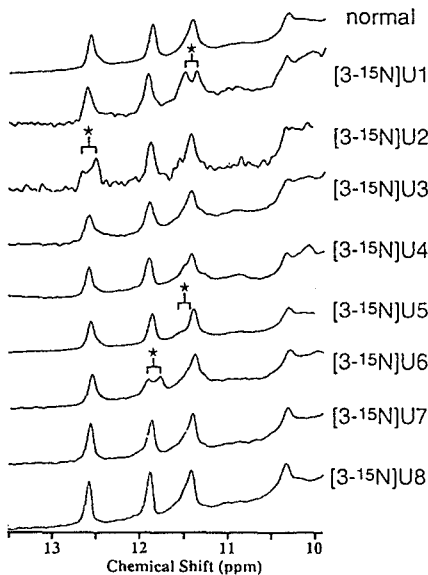


Figure 1: The imino proton regions of the 600-MHz proton NMR spectra of a series of GUUUUUUUUC samples, with and without a site-specific substitution of [3-15N]uridine in the complex, with the mutant RBD1-RBD2. The observed doublet signals are indicated with asterisks.

ストランドによって構成される逆平行βシート構造を二本のαヘリックスが裏打ちしている構造をとることがわかった。しかし、アミノ酸構成をみるとRBDIは、従来から知られているRBDとは、異なるいくつかの特徴をもつ。一般にRBDは、RNP1, RNP2と呼ばれる共通配列(それぞれ3番目と1番目のβストランドに対応する)を持ち、RBDIIは、この特徴を備えているのに対して、RBDIは、RNP1, RNP2にあたる部分の保存が悪いことがわかる(Table 1)。とくにRNP2の芳香族アミノ酸がIle残基に置換している。また、一般にRBDでは、2番目と3番目のβストランドをつなぐループ部分に荷電を持った

アミノ酸がよく現れるのに対して、RBDIでは、この部分に芳香族アミノ酸が富んでいることがわかる。結合したRNAのイミノプロトンの帰属：野生型RBDI-RBDIIに結合配列であるGU₈Cを加えるとタンパク質との間に形成された水素結合に由来すると思われるイミノプロトンのシグナルが観察されることが報告されている⁽²⁾。われわれが解析に用いた変異体RBDI-RBDIIも同じイミノプロトンのシグナルを観測することができ、野生型と変異体の間で同様のRNA認識機構をもつことがわかった。このイミノプロトンのシグナルの帰属を行うために選択的に¹⁵N標識を行ったウリジンを含む結合配列を合成してイミノプロトンの帰属を行ったところ、2, 3, 6, 7番目のウリジンのイミノプロトンが水素結合の形成に関与していることが明らかになった(Figure 1)。以前われわれは、RBDII単独の場合には、ポリウリジン配列に対して、一義的な結合配置に固定されていないことを示しているが、RBDI-RBDIIでは、ポリウリジンを含む配列に対して特異的な結合が形成されていることが明らかになった。

【参考文献】

- (1) Lee, A. L. et al *Biochemistry* 33, 13775-13786 (1994)
 (2) Kanaar, R. et al. *EMBO Journal* 14, 4530-4539 (1995)

3P55

Raf-1 の Ras 結合ドメインと Ras の相互作用の研究

○寺田 透^{1, 2}, 伊藤 隆³, 白水美香子¹, 木川隆則¹, 柴田武彦³, Jonathan A. Cooper⁴, Brian O. Smith⁵, Ernest D. Laue⁵, 横山茂之^{1, 2}

¹理研・細胞情報伝達, ²東大・院・理, ³理研・遺伝生化学, ⁴Fred Hutchinson Cancer Research Center, ⁵University of Cambridge.

An NMR study on the interaction between Ras-binding domain of Raf-1 (Raf-RBD) and Ras

○Tohru Terada^{1, 2}, Yutaka Ito³, Mikako Shirouzu¹, Takanori Kigawa¹, Takehiko Shibata³, Jonathan A. Cooper⁴, Brian O. Smith⁵, Ernest D. Laue⁵, and Shigeyuki Yokoyama^{1, 2}

¹Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-01, Japan. ²Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan. ³Laboratory of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-01, Japan. ⁴Fred Hutchinson Cancer Research Center, 1124 Columbia Street, Seattle, WA 98104, U. S. A. ⁵Cambridge Center of Molecular Recognition, Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QW, U. K.

It has been shown that Glu31 of Ras is important for the signal-transducing activity of Ras²⁾. Recent studies have shown that Ras exhibits 67-fold tighter binding to Raf-RBD than Rap1A, and in the crystal structure of the Raf-RBD/Rap1A (E30D/K31E) complex, Glu31 of the Rap1A mutant forms a tight salt bridge with Lys84 of Raf-RBD, which is not involved in the complex formation in the crystal structure of the Raf-RBD/Rap1A (wild-type) complex^{3), 4)}. In the present study, we examined backbone chemical shift perturbation of Raf-RBD upon introduction of the complementary mutation D30E/E31K into Ras. The largest perturbation was observed for Val88 of Raf-RBD, which suggests that the hydrophobic interaction between Raf-RBD and Ras is affected by the mutation.

chemical shift perturbation, interaction surface, Ras-binding domain, Raf, Ras.

てらだ とおる, いとう ゆたか, しろうず みかこ, きがわ たかのり, しばた たけひこ, じよなさん えい くーぱー, ぶらいあん おう すみす, あーねすと でいー らうえ, よこやま しげゆき.

原癌遺伝子産物である Raf-1 は、分子量 74kDa の serine/threonine kinase で、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras のターゲットであり、GTP 結合型の Ras に特異的に結合して活性化される。Raf-1 の N 末端付近、アミノ酸残基 51～131 番の領域は、単独で GTP 依存的に Ras と結合することが知られており、Ras 結合ドメイン (Ras-binding domain, Raf-RBD) と呼ばれている。Raf-RBD の立体構造は既に NMR 法により決定されており、GTP 結合型の Ras を加えていくと Raf-RBD のシグナルがブロードニングを起こすことから、Ras との interaction surface が報告されている¹⁾。

Rap1A は K-Ras による細胞のトランスフォーメーションを抑制するものとしてクローニングされた Ras のホモログである。これは高い相同性にもかかわらず、Raf と結合できるけれども活性化できないことが知られている。Ras と Rap1A ではターゲットとの相互作用に重要とされる effector region (アミノ酸残基 32～40 番) の残基は完全に保存されているが、その周辺にはいくつか保存されていない残基が存在する。これらの残基のうち、31 番は Ras 型 (Glu) から Rap1A 型 (Lys) に置換すると Ras が Rap1A 様の活性、すなわち Ras のシグナル伝達経路を抑制する活性を示すようになることから注目されてきた²⁾。最近になって、Ras の Raf-RBD に対する親和性は Rap1A より 67 倍強いこと、Raf-RBD と 30、31 番を Ras 型に置換した Rap1A の変異体との複合体の結晶構造中には、野生型との複合体では Rap1A と分子間相互作用をしていなかった Raf-RBD の Lys84 と Rap1A 変異体の Glu31 との間に静電相互作用が形成されていることが明らかになった。ここから Ras と Raf-RBD の相互作用においても、Ras の Glu31 と Raf-RBD の Lys84 の間の静電引力が重要であることが示唆された^{3), 4)}。本研究では、野生型および D30E/E31K 変異体 Ras との複合体における Raf-RBD の主鎖の帰属を行い、両者の間のケミカルシフト差から、Ras に Rap1A 型残基を導入したときに複合体の構造に与える影響を解析した。

【方法】

$^2\text{H}/^{15}\text{N}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識された Raf-RBD および非標識の Ras (wild-type), Ras (D30E/E31K) を精製し、Raf-RBD/Ras (wild-type) のサンプルはモル比で 1:1, Raf-RBD/Ras (D30E/E31K) のサンプルは、Ras (D30E/E31K) の Raf-RBD に対する親和性がやや弱いために、モル比で 1:1.5 で混合し NMR を測定した。Raf-RBD の主鎖の帰属には 3D HNCA, 3D HN(CO)CA, 3D ^{15}N -edited NOESY, 3D $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ -separated NOESY スペクトルを用いた。Raf-RBD/Ras (wild-type) と Raf-RBD/Ras (D30E/E31K) の主鎖のアミドプロトンおよびアミド窒素のケミカルシフト差から Ras の変異による Raf-RBD と Ras の複合体の構造変化を考察した。

【結果・考察】

Raf-RBD/Ras (wild-type)と Raf-RBD/Ras (D30E/E31K)の主鎖のケミカルシフトの比較の結果, Raf-RBD の Val88 に大きなケミカルシフト差が観察された. Val88 は Ras との結合に伴うケミカルシフトの変化の大きさと Raf-RBD と Rap1A の複合体の結晶構造から interaction surface に含まれていると考えられているが, Val88 以外の分子間相互作用を担っていると考えられる残基 Asn64, Gln66, Thr68, Val69 および Arg89 には, 大きなケミカルシフト差は観察されなかった. Raf-RBD と Rap1A の結晶構造によれば, 分子間相互作用は立体構造上2つの領域に分けられることが知られている. 1つは Rap1A の Ile36, Glu37, Asp38, Ser39 および Arg41 と Raf-RBD の Asn64, Gln66, Arg67, Thr68, Val69 および Arg89 の間の水素結合を介した相互作用 (領域 I) で, もう1つは Rap1A の Val21, Ile27 および Val29 と Raf-RBD の Val88 の間の疎水的相互作用 (領域 II) である³⁾. ここから Raf-RBD の Lys84 と Ras 変異体の Lys31 の反発によって領域 II の相互作用が影響を受けたと考えられた. Ras (D30E/E31K)は Raf-1 活性化能が顕著に低下していることから, 領域 II の相互作用が Raf-1 活性化に重要であることが示唆された.

【参考文献】

- 1) Emerson, S. *et al.* (1995) *Biochemistry* 34, 6911-6918.
- 2) Shirouzu, M. *et al.* (1992) *Oncogene* 7, 475-480.
- 3) Nassar, N. *et al.* (1995) *Nature* 375, 554-560.
- 4) Nassar, N. *et al.* (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 723-729.

(横浜市大・院総合理¹, 理研・筑波LS², 生物分子工学研³)
 ○佐々木元子¹, 緒方一博^{1, 2}, 黒田仁志¹, 中沢賢一¹,
 中村春木³, 皿井明倫², 石井俊輔², 西村善文

Backbone Dynamics of Myb-DNA Complex

(¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, ²Tukuba Life Science Center, Institute of Physical and Chemical Research, ³Biomolecular Engineering Research Institute)

Motoko Sasaki¹, Kazuhiro Ogata^{1,2}, Hitoshi Kuroda¹, Kenichi Nakazawa¹, Haruki Nakamura³, Akinori Sarai², Shunsuke Ishii², Yoshifumi Nishimura¹

A protooncogene product, c-Myb, which is a transcription regulator in the myeloid lineage, can bind specifically to DNA with the consensus sequence AACxG. The DNA-binding domain of c-Myb consists of three imperfect tandem repeats of 52 residues (R1, R2, R3). The solution structure of the free and DNA bound form of R2R3 have been solved. Interestingly, only R2 in the free state is fluctuating. Here, we have examined the backbone dynamics of R2R3-DNA complex (T_1 , T_2 , $T_1\rho$, and ^1H - ^{15}N steady-state NOE). The reduction of the conformational fluctuation of R2 was observed on specific DNA binding. For the stability-function relationship, it is concluded that the packing of hydrophobic side-chains of R2 is optimized not in the free state, but in the DNA-complexed form.

[はじめに]

原がん遺伝子 *c-myb* の遺伝子産物 (c-Myb) は核タンパク質で、DNA に配列特異的に結合し、転写を調節する。c-Myb は未分化の造血系細胞で発現しており、分化に伴いその発現がなくなることから、造血系の未分化状態維持に関与している可能性がある。そのDNA結合領域は3つのリピート (R1, R2, R3) からなっており、塩基の特異的認識にはR2とR3の両方が必須である。各々のリピートはヘリックス・ターン・ヘリックス変異体構造をもつ類似した立体構造をとっている^{1) - 3)}。しかし熱力学的にはR2がR1, R3に比べて不安定で、NMRの緩和データは構造変換を伴う揺らぎの存在を示している⁴⁾。立体構造解析

原がん遺伝子産物, c-Myb, DNA結合領域, 複合体, 動的構造

ささき もとこ, おがた かずひろ, くろだ ひとし, なかざわ けんいち,
 なかむら はるき, さらい あきのり, いしい しゅんすけ, にしむら よしふみ

の結果から、この構造的な揺らぎは、R 2 の疎水性コア内に存在するキャビティが原因であると考えられた。

また、キャビティを埋めた変異タンパク質 R2R3(V103L)を作製したところ、野生型(R2R3WT)に比べ明らかに高い熱安定性を示し、構造変換を伴う揺らぎも抑えられていた⁵⁾。このことは熱安定性と構造変換を伴う揺らぎ、さらに疎水性コア内部のキャビティの存在との間に相関があることを示している。

次に、R2R3WT と R2R3(V103L) の DNA に対する特異的な結合能を比較したところ、R2R3(V103L) では解離定数が約 3 倍増加していた⁵⁾。また、c-Myb の標的遺伝子の一つである c-myc のプロモーターを用いて CAT アッセイにより転写活性化能を調べると、R2R3WT に比べ R2R3(V103L) では活性が約 5 倍低下していた⁵⁾。

このような DNA 結合活性や転写活性化能の低下は立体構造の観点から、R 2 の DNA 結合に伴う構造変化に起因すると考えられる。単体と複合体での R 2 の構造を比較することにより、野生型の R 2 の疎水性コア内部に存在するキャビティは、DNA との結合に伴いトリプトファンのインドール環が移動して埋められることが認められる⁵⁾。以上のことから、R 2 の構造変化が DNA との複合体形成に必要であることを示唆した⁵⁾。

そこで今回、タンパク質の揺らぎと DNA 結合との関連を更に詳しく調べるために、NMR を用いて複合体での動的構造解析を行なった。

[実験]

¹⁵N ラベルした R2R3WT は大腸菌大量発現系を用いて M9 培地で培養を行い精製した。また、DNA は DNA 合成機で合成し精製した。NMR 測定条件を 310 K、pH 6.8、サンプル濃度 2.3 mM とし、T₁、T₂、T_{1ρ}、NOE の測定を行った。

[結果・考察]

複合体の緩和測定の結果から、タンパク質単体では個々のリポートをつないでいるループ部分に速い揺らぎが見られたが、複合体を形成するとこのループは DNA のリン酸骨格と結合し、速い揺らぎが抑えられていた。また、マイクロ秒からミリ秒程度の比較的遅い揺らぎに関しては、単体の R 2 ではリポート全体にわたって認められたが、複合体では R 2 の揺らぎが減少した。このことから、タンパク質と DNA の塩橋や水素結合による構造の安定化に加え、R 2 の疎水性コアのパッキングがより密になることによる構造的安定化が R 2 の揺らぎの減少に寄与していると考えられる。

[文献]

- 1) Ogata, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6428-6432 (1992).
- 2) Ogata, K. et al., *Nature struct. biol.* **2**, 309-320 (1995).
- 3) Ogata, K. et al., *Cell* **79**, 639-648 (1994).
- 4) Sarai, A. et al., *Biochemistry* **32**, 7759-7764 (1993).
- 5) Ogata, K. et al., *Nature struct. biol.* **3**, 178-187 (1996).

Structure and Dynamics of Cross-linked Melittin Analogues

Department of Biochemistry and Molecular Recognition Centre, University of Bristol, England

O Jiro Takei, Attila Remenyi, Chris Dempsey

Introduction

Melittin is a 26 amino acid peptide toxin from bee venom which exhibits a broad range of biological activities, including voltage gated ion translocation across lipid bilayers, cell lysis and disc micellisation [1]. The peptide is amphipathic and is thought to lie parallel to the membrane surface under equilibrium conditions [2]. In water, melittin forms either a tetrameric four helix bundle at high pH or high ionic strength, or a monomeric random coil at low pH; no stable dimer of melittin has been found to date. To investigate ion channel stabilisation by cross-linking melittin monomers, we synthesised two melittin analogues with a cysteine residue in the native sequence, and investigated the structure and behaviour of the disulphide dimerised analogue in solution and in phospholipid vesicles. Comparison to native melittin was also made.

Melittin: GIGAV₅ LKVLT₁₀ TGLPA₁₅ LISWI₂₀ KRKRQ₂₅ Q-NH₂
 K23C: GIGAV₅ LKVLT₁₀ TGLPA₁₅ LISWI₂₀ KRCRQ₂₅ Q-NH₂
 (mltK23C)
 K23Q/Q25C: GIGAV₅ LKVLT₁₀ TGLPA₁₅ LISWI₂₀ KRQRC₂₅ Q-NH₂
 (mltQ25C)

Figure 1. Sequence of melittin and analogue peptides used in this study. Mutation points are underlined.

mltK23C (Lys 23 to Cys) was designed to incorporate a disulphide bridge on the helix-helix interface that was found in the crystal structure [3], and was expected to retain the tetrameric arrangement (as a dimer of dimers) in solution. Because the disulphide bridge connects the non polar helix surfaces (expected to be directed away from the channel lumen in a channel state) retention of ion channel activity would require some unwinding of the C-terminal residues as found in a previous study [2]. The disulphide bond of the mltQ25C dimer lies on the polar surface and might be expected to be accommodated better in a channel state.

Key words: melittin analogues, solution structure, in situ amide exchange analysis, membrane leakage

Jiro TAKEI, Attila REMENYI, Chris DEMPSEY

Results and Discussion

Fig. 2 shows the amide–amide region of the NOESY spectrum of mltK23C dimer in water at pH 1.7 under condition where monomeric peptide is unstructured. The spectrum indicates that the dimer is largely α -helical. The CD spectrum under a similar condition indicates that the two helices are interacting with each other and has spectral feature similar to that of coiled–coil. At high pH, although the CD spectrum is not significantly different, 1D NMR and fluorescence spectra indicate self association of dimers into a pseudo–tetramer (dimer of two cross–linked dimer), perhaps in a similar manner to native melittin. On the other hand, the structure of mltQ25C is not well defined in H₂O at low pH and only takes helical conformation at high pH, in the presence of trifluoroethanol and in methanol. In high pH aqueous media the dimer forms non–discrete aggregates. In a mltK23C dimer coiled–coil structure the cysteine lie at "position d" which is naturally the preferred site for coil stabilities by disulphide linking, as shown by Zhou et al. [4]. On the contrary, the disulphide bridge of mltQ25C dimer is on the hydrophilic side. It may be unable to make intra–dimer helix–helix association and exposing its hydrophobic side to solvent which leads to formation of non specific large aggregation.

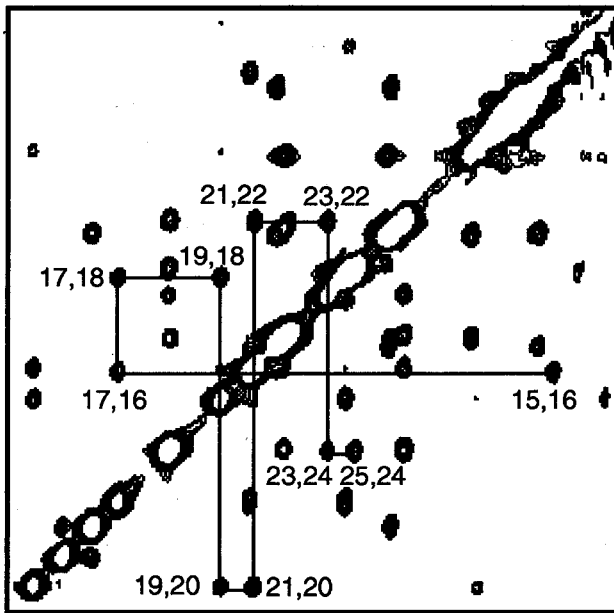


Figure 2. NH–NH connectivities of mltK23C dimers. Crosspeak assignments are shown from Ala 15 to Gln 25.

The mltQ25C dimer has a higher affinity for phospholipid vesicle membranes, releasing entrapped fluorescent dye more efficiently than mltK23C dimer which itself has higher activity than melittin. Dye release by melittin requires dimerisation as the rate limiting step as indicated by the second order dependence of dye release on peptide concentration. This is consistent with the observation that on dimerisation, first order dependence is found for mltK23C. Ion conductivity experiment showed

that mltQ25C forms ion-channels in planar lipid bilayers, which were more stable than native melittin channels. mltK23C dimer, however, failed to display conductivity under the current experimental condition. This is due to the very high stabilities of the pseudotetramer at high ionic strength required for channel measurements, which limits membrane partitioning. The results are so far consistent with the amphipathic helical structure of melittin: (i) Introducing a disulphide bond connecting the non-polar surfaces greatly stabilised the dimeric and tetrameric states in solution (ii) Introducing a disulphide in the polar surface disrupts optimal helix interaction in solution but may be incorporated in an ion-channel state resulting in stabilisation.

Acknowledgements

We thank Prof. Gunther Boheim at Ruhr Universitat Bochum, Germany, for the collaborative work on ion-channel conductivity and Dr. Graham Bloomberg for synthesis of the peptide analogues.

References

- [1] Dempsey, C. E. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 143–161, The actions of melittin on membranes.
- [2] Dempsey, C. E. & Butler, G. S. (1992) *Biochemistry* 31, 11973–11977, Helical structure and orientation of melittin in fully dispersed membranes from amide exchange analysis in situ.
- [3] Terwilliger, T. C. & Eisenberg, D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6016–6022, The structure of melittin II; Interpretation of the structure.
- [4] Zhou, N. E., Kay, C. M. & Hodges, R. S. (1993) *Biochemistry* 32, 3178–87, Disulfide bond contribution to protein stability: Positional effects of substitution in the hydrophobic core of the two-stranded α -helical coiled-coil.

3P58

CRE 結合蛋白質 CRE-BP1 の転写活性化ドメインの構造解析

(横浜市大・院総合理¹、理研・筑波 LS²)

○長土居有隆¹、中沢賢一¹、奥野浩一¹、江成政人¹、前川利男²、
石井俊輔²、西村善文¹

STRUCTURAL ANALYSIS OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION DOMAIN OF CRE-BP1

¹Yokohama City Univ., Graduate School of Integrated Science, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236 Japan, ²The Institute of Physical and Chemical Research, Tsukuba Life Science Center, 3-1-1 Koyadai, Tsukuba 305 Japan

A.Nagadoi¹, K.Nakazawa¹, K.Okuno¹, M.Enari¹, T.Maekawa², S.Ishii² and Y.Nishimura¹,

The CRE-BP1 consists of 505 amino acids and has two functional domains : DNA binding and transcriptional activation domains in the C and N termini, respectively. The DNA binding domain in the C terminus forms b-Zip structure. The CD experiments revealed that the transcriptional activation domain in the N terminus requires Zn²⁺ ion for maintaining a tertiary structure. Here, we have analyzed the structure of the transcriptional activation domain in the N terminus of CRE-BP1 consisting of 88 amino acids (CRE-BP1N88). Using the uniformly ¹⁵N and ¹⁵N/¹³C labeled proteins, we have measured the 3D double and triple resonance experiments. The assignments of the signals for backbone atoms are now in progress.

【序論】

CRE 結合蛋白質 (CRE-BP1) は細胞内 cAMP の増加に応答する遺伝子 (cAMP response element: CRE) に結合して転写調節を行う蛋白質であり、また細胞の成長や増殖にも関わっている¹⁾。主な発現場所としては、サル脳、ラットの再生肝、ヒトのガン組織などが知られている²⁾。最近 CRE-BP1 欠損マウスによる研究が報告され、CRE-BP1 は骨格形成、そして中枢神経系の発達に対して不可欠であるということがわかった³⁾。CRE-BP1 は 505 個のアミノ酸残基から成り、その N 末端側には転写活性化ドメイン、

【キーワード】 CRE 結合蛋白質、転写活性化ドメイン、多次元 NMR、構造解析

○ながどい ありたか、なかざわ けんいち、おくの ひろかず、えなり まさと、
まえかわ としお、いしい しゅんすけ、にしむら よしふみ

C末端側にはDNA結合ドメインを持っている。DNA結合ドメインはb-Zip構造をとっており⁴⁾、アデノウィルスの初期遺伝子産物E1Aと相互作用することがわかっている⁵⁾。一方、そのN末端側の転写活性化ドメインは、構造の形成にZn²⁺イオンが必要であり、またその1次配列よりZnフィンガー様モチーフをとることが示唆されている。b-Zip構造のDNA結合ドメインの立体構造に関しては、他の転写因子でDNAとの複合体(GCN4、c-FOS/c-Junなど)で解析がなされているが、転写活性化ドメインに関するZnフィンガー様モチーフの構造解析は全く報告がない。そのため、我々はCRE-BP1のN末端側の転写活性化ドメインを含む88アミノ酸残基(CRE-BP1N88)についての立体構造解析を始めた。

【実験】

1) CRE-BP1N88の発現と精製

CRE-BP1N88を産生するために、大腸菌BL21(DE3)による大量発現系を用いた。¹⁵N及び¹³C/¹⁵Nで均一ラベルしたCRE-BP1N88は、窒素及び炭素源として¹⁵NH₄Cl(1.5g/L)、¹³C-glucose(2.0g/L)を含むM9培地で培養した。超音波処理で菌体破碎した後、各種イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、2.0~5.0mMのNMRサンプルを得た。

2) NMR測定

NMR測定は、20mMリン酸緩衝液、200mM NaCl、5mM d-DTT、30 μ M ZnCl₂、0.4mM NaN₃、pH6.3のbuffer条件下で行った。Bruker AMX-500とDMX-600を使用し、温度300KでNMRスペクトルを測定した。¹⁵Nでラベルしたサンプルに関しては、TOCSY-HMQC(τ m=100ms)、NOESY-HMQC(τ m=50, 100, 150ms)の3次元2重共鳴測定を行い、¹³C/¹⁵Nでダブルラベルしたサンプルに関しては主鎖の連鎖帰属のために、HNCBCA、CBCA(CO)NH、HNCO、HNCA、HN(CO)CAの3次元3重共鳴測定を行った。

【結果と考察】

円偏光2色性(CD)の結果から、CRE-BP1N88の2次構造は β シート構造を含むことが推定され、構造の安定化にZn²⁺イオンが必要であることが判った。さらに詳細な構造を調べるために、3次元2重共鳴、3重共鳴の測定結果から得られたNMRスペクトルの帰属を行っている。現在までに、主鎖の連鎖帰属より約80%のアミノ酸残基の同定が終了している。今後、CRE-BP1N88の主鎖の全シグナルの帰属及び、高次構造の解析をすすめる。

【文献】

- (1) Maekawa, T. et al., *EMBO J.* **8**, 2023-2028(1989).
- (2) Takeda, J. et al., *Oncogene*. **6**, 1009-1014(1991).
- (3) Liu, F. et al., *Nature*. **368**, 520-525(1994).
- (4) Vinson, C. R., et al., *Science*. **246**, 911-916(1989).
- (5) Reimold, A. M., et al., *Nature*. **379**, 262-265(1996).

3P59

ラット脳スライスの³¹P NMR

-- 脳細胞におけるエネルギー基質としての乳酸の評価 --

(大分医大・生理) ○柳井莊緑、吉岡敬太郎、西丸直子、山田和廣

LACTATE AS AN ENERGY SUBSTRATE IN RAT BRAIN SLICES STUDIED BY ³¹P NMR

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Oita Medical University

YANAI, S., YOSHIOKA, K., NISIMARU, N. and YAMADA, K.

We used ³¹P NMR to examine the changes in high energy phosphates in rat brain slices superfused with a solution including lactate as an energy substrate. Brain slices were superfused continuously with artificial cerebro-spinal fluid (ACSF) at 25°C in the NMR tube. Stimulation was produced by increasing the potassium concentration in ACSF to 60 mM. In brain slices treated with Iodo acetic acid (IAA) and supplied with lactate, the phosphocreatine (PCr) level decreased after application of high potassium but returned to normal during the subsequent recovery period. These changes were quite comparable to those in brain slices superfused with glucose without IAA treatment. These results suggest that lactate can serve as an energy substrate in rat brain slices.

1 序論

乳酸は嫌氣的解糖の結果生じる代謝産物であるが、これが脳におけるエネルギー基質としてはたらきうることが報告されている。1988年、Shurrらはラット脳海馬スライス標本において乳酸がシナプス伝達を支持し得ることを示し¹⁾、1994年、Izumiらはおなじくラット脳海馬スライスで乳酸はシナプス伝達を支持するだけでなく、グルコース枯渇による病理的な変化をも防ぎ得ることを示した²⁾。しかし一方、Tanakaらは、モルモット脳海馬スライスで乳酸はPhosphocreatine (PCr) やAdenosine triphosphate (ATP) レベルを保つことはできるがシナプス伝達は支持し得ないと報告している³⁾。以前われわれは、ラット脳スライスにおいて細胞外高カリウム刺激がPCrやATPの可逆的な減少を引き起こすことを³¹P NMRスペクトロスコピーを用い観察し報告した⁴⁾。今回われわれは乳酸をエネルギー基質とした際の高カリウム刺激にともなう細胞内高エネルギー磷酸の変化を経時的に観察し、グルコースをエネルギー基質とした場合と比較することにより、乳酸のラット脳スライスにおけるエネルギー基質としての能力を評価した。

2 実験

雄のWistar ratから頸椎脱臼後直ちに大脳を取りだし4℃の人工脳脊髄液 (ACSF) にて冷却し、2つのブロックにわけ厚さ400μmの冠状断スライスを得た。ACSFでよく洗浄した後 Fig. 1 に示した試料管に入れ、NMR磁石内へ挿入した。1回の実験には3匹のラットを使用し、得られた脳スライスの含水重量は 2.87±0.44 g

(mean ± SD) であった。脳スライスはACSFにより流速毎分約16mlで灌流し、ACSFは恒温槽で25℃に保温し95%O₂と5%CO₂でバブリングした。標準ACSFの組成はNaCl 124 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1.3 mM, CaCl₂ 2.4 mM, NaHCO₃ 26 mM, HEPES 5 mM, glucose 10 mM, pH 7.4であった。これらの条件では脳スライスの³¹P-NMRスペクトルは約1時間の過程でスライス作成時の低酸素状態から回復しその後6時間ないし7時間は変化がない³⁾。乳酸をエネルギー基質としたACSFは、10 mMのL-乳酸を水酸化ナトリウムで中和し、浸透圧をNaClを減らすことで調節した。残存したglucoseやglycogenがエネルギー基質として利用されるのを防ぐため、0.2 mM ヨード酢酸で解糖系をブロックした。ヨード酢酸はGAPDHを不可逆的に失活させることにより解糖系をブロックすることが知られている (Fig. 2)。60 mM カリウム液は浸透圧平衡とドナン平衡を保つようKCH₃SO₃を用い調製した。Bruker AMX 300 WBを用いflip angle 45°、繰返し時間3.8秒で4分間で64個のFIDを1ブロックとし隣の1次元スペクトルを得た。

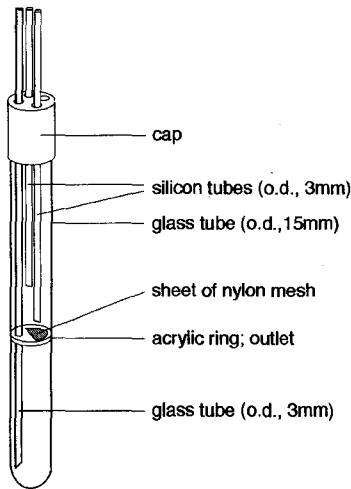


Fig. 1 Chamber for superfusing brain slices and for NMR measurements. Brain slices of 400 μm thickness were placed beneath the acrylic ring and superfused with Artificial Cerebro-Spinal Fluid (ACSF).

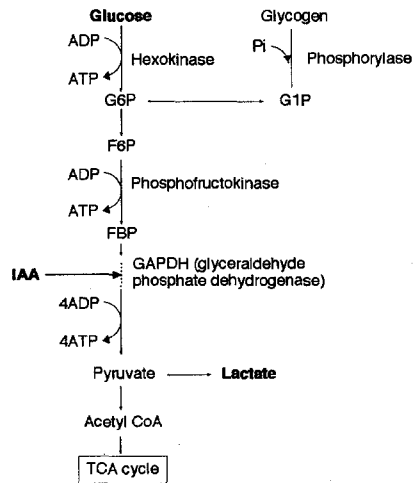


Fig. 2 Scheme of glycolysis and glycogenolysis. Lactate is produced through anaerobic glycolysis. Iodo acetic acid (IAA) was used to block the glycolytic pathway.

3 結果と考察

Fig. 3 は標準ACSF (グルコース基質) で高カリウム刺激をした時のスペクトルの変化を示している。PCrが刺激により可逆的に減少しているのが観察される。Fig. 4 は0.2 mM ヨード酢酸を含むACSFで12分間灌流した後、高カリウム刺激をした際の、エネルギー基質が乳酸の場合とグルコースの場合の比較を示している。乳酸の場合、Fig. 3 と同様にPCrの減少は可逆的である。

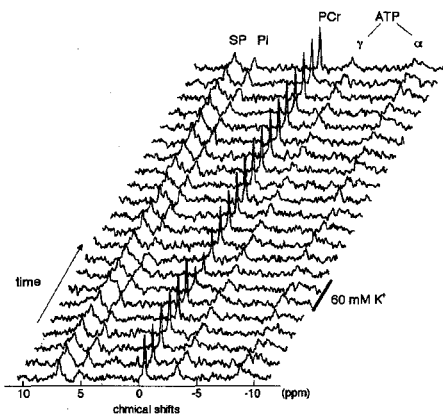


Fig. 3 Stacked plotted spectra of ^{31}P NMR before, during and after high K^+ stimulation from the brain slices superfused with the standard ACSF (energy substrate; glucose). PCr decreased in response to the high K^+ stimulation but recovered to the normal level thereafter. Abbreviations; ATP, adenosine triphosphate; SP, sugar phosphates; Pi, inorganic phosphate.

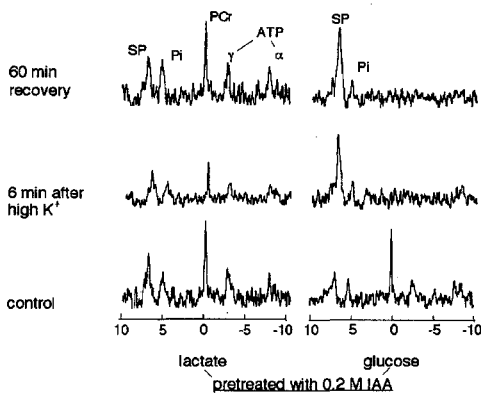


Fig. 4 Spectral changes associated with high K^+ stimulation in the brain slices pretreated with IAA and fueled with lactate or glucose. Slices in lactate showed a good recovery of PCr while those with glucose did not.

Fig. 5 はPCr の変化を示したものである。乳酸を加えた場合は解糖系をブロックしてもグルコースが基質である場合とほぼ同様の回復を示している。これらの結果から、乳酸がラット脳スライスにおける高エネルギー-磷酸生成過程にグルコースと同様にエネルギー-基質として働き得ることが判明した。

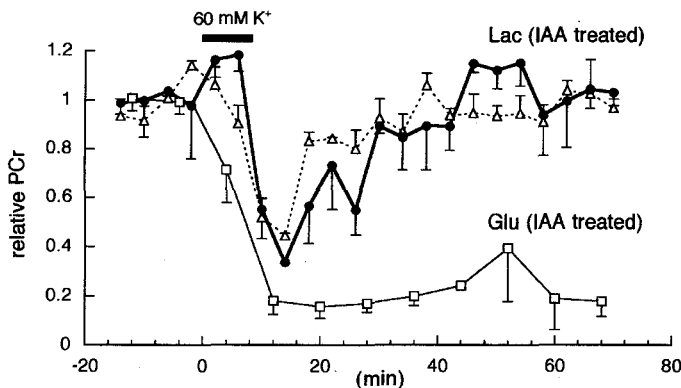


Fig. 5 Time course of changes in PCr level in the slices in different energy substrates. While that of IAA-treated slices in glucose (Glu) showed no recovery after high K^+ stimulation, that of IAA-treated slices in lactate (Lac) showed recovery almost comparable to that of non IAA-treated slices in glucose (indicated by dotted line with triangles). Error bars represent S.E.M. ($n=3$).

われわれは乳酸がエネルギー基質として働き細胞内高エネルギーリン酸レベルを保つことができるという点でTanakaら³⁾と同様の結果を得た。Tanakaらの場合高エネルギーリン酸レベルは、スライスの迅速凍結標本の抽出液を酵素法で計測しているのだが、われわれの場合NMRを用いたため非破壊的かつ経時的に観察し得た。しかし一方Tanakaらは、乳酸がエネルギー基質の場合、シナプス伝達は支持されないことも示した。これは細胞内高エネルギーリン酸レベルと神経細胞の活動性とは解離があることを示している。われわれの結果でも乳酸が基質の場合の方が回復がやや遅い傾向も認められた (Fig. 5)。今後、NMRを用いて時間分解能やコンパートメント (神経細胞、グリア細胞など) の選択性を改善することにより、脳の代謝活動における乳酸の役割がより明らかになるとと思われる。

References

1. Shurr A, West CA and Rigor BM (1988) Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240:1326-1328
2. Izumi Y, Benz AM, Zorumski CF and Olney JW (1994) Effects of lactate and pyruvate on glucose deprivation in rat hippocampal slices. *NeuroReport* 5:617-620
3. Tanaka T and Okada Y (1995) Effects of deprivation of oxygen or glucose on the neural activity in the guinea pig hippocampal slice - intracellular recording study of pyramidal neurons. *Brain research* 683:109-116
4. Takei M, Kawano Y and Yamada K (1992) Phosphorus nuclear magnetic resonance studies on the calcium-dependent energy metabolism of rat cerebrum under conditions of increased potassium in vitro. *Neuroscience research* 12:596-605

key words

乳酸、エネルギー基質、ラット脳スライス、高エネルギーリン酸、³¹P-NMR

やないそうろく、よしおかけいたろう、にしまるなおこ、やまだかずひろ

3P60

$^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}^{\alpha}})$ および $^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta})$ を利用したウニ精子活性化ペプチドの構造解析

○齋藤もよこ、鈴木範男、引地邦男(北大・理)

Structure Analysis of a Sperm-Activating Peptide of Sea Urchin Eggs Using The Values $^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}^{\alpha}})$ and $^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta})$

○Moyoko Saito, Norio Suzuki, and Kunio Hikichi (Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University)

[序] ウニ精子活性化ペプチドは、ウニ卵子を囲む透明な寒天質の保護層(厚さ 40 μm)の構成物質である。受精に際して、ウニ精子がこの保護層に到達し、通過すると、ペプチドは精子の呼吸や運動性を促進し、精子の細胞内のリン脂質代謝・精子先体反応の特異的補助といったことを行うことが知られている。数多くのウニ精子活性化ペプチドが発見され、その一次構造が決まっているが、その立体構造は未だ明らかにされていない。精子活性化ペプチドは細胞膜上の特異的レセプターに結合して作用するものと考えられている。このペプチドがどのような立体構造を持ち、レセプターに作用しているのかを検討することを目的とする。

正形垂網ガンガゼ目のペプチドについて、NMRにより構造解析を行うことにした。このペプチドはアミノ酸 9 残基(GCPWGGAVC)からなり、2 残基目と 9 残基目のシステインが-S-S-結合している環状構造をとっている。

[実験] 構造決定の情報をペプチド残基内のプロトン間の距離およびアミノ酸主鎖の 2 面体角度から求めることにした。空間的に近いプロトン間の距離の情報(NOE)を得るためにまず NOESY スペクトルを測定した。しかし、クロスピークは全く観測されなかった。その理由として、ペプチドが小さいために分子の運動の相関時間 τ が短いことが考えられる。そこで相関時間が短い場合にも距離情報が得られる ROESY スペクトルを測定した。その結果ミキシングタイムは 600msec、温度は 30 $^{\circ}\text{C}$ で、クロスピークを観測することができた。

アミノ酸主鎖の 2 面体角度 各アミノ酸残基の主鎖の 2 面体の情報は NMR によって測定可能な原子間スピン結合定数 J (より Karplus の式から得られる。

$$^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}^{\alpha}})=9.4\cos^2(\phi-60)-1.1\cos(\phi-60)+0.4$$

$${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta})=4.7\cos^2(\phi+60)-1.5\cos(\phi+60)+0.2 \quad [1b]$$

$${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\gamma})=5.7\cos^2(\phi-180)-2.7\cos(\phi-180)+0.1 \quad [1c]$$

${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}\alpha})$ (各アミノ酸残基内の $\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}\alpha}$ 3 ボンド結合 J) は E.COSY2 次元法を、 ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta})$ (各アミノ酸残基内の $\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta}$ 3 ボンド結合 J) は HETLOC2 次元法を、そして ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\gamma})$ (各アミノ酸残基内 $\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\gamma}$ 3 ボンド結合 J) は HMQC2 次元法を用いることにした。E.COSY2 次元法に関しては F2 側のポイント数を数多くとり、さらにゼロフィルをすることによって、観測されたピークに関してはよく分離ができ、J の値を測定することができた。HETLOC(^{13}C -filtered TOCSY)のパルスシーケンスを用い、測定条件を決めるため重水溶液で測定を行った。 H^{N} との結合を測定するために 90% H_2O 溶液中で測定を行う必要がある。大きな水のピークを消すために、ダンテシーケンスを付加し、改良した。その結果、観測されているピークに関しては J の値を測定することができた。また、HMQC2 次元法で観測されたクロスピークの強度から得られる ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\gamma})$ の値を現在測定している。

[結果] プロトン間の距離 NOE の距離情報は各アミノ酸残基内とその隣接残基の相関、および一次配列上は遠距離にあるアミノ酸残基間で得られた(Fig.1).

アミノ酸主鎖の 2 面体角度 E.COSY2 次元法および HETLOC2 次元法で得られた ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}\alpha})$ 、 ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta})$ の値(Hz)を Table.1 に示す。各実験の結果に対して観測されなかったクロスピーク、およびこれらの方法が適応されない残基(E.COSY、HETLOC とともに Gly、Pro)を合わせると、得られない情報がかなりある。得られている情報 Cys、Ala、Trp に対しては適応できる ϕ の値をどの程度の範囲でとるかを考察中である。

	1Gly	2Cys	3Pro	4Trp	5Gly	6Gly	7Ala	8Val	9Cys
${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}\alpha})[\text{Hz}]$	—	7.4	—	7.4	—	—	6.5	8.8	7.3
${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta})[\text{Hz}]$	—	1.0	—	1.6	—	—	2.4	ピークなし	0.4

Table.1 ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{C}\alpha})$ and ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}-\text{C}^{\beta})$ values.

ROE correlations

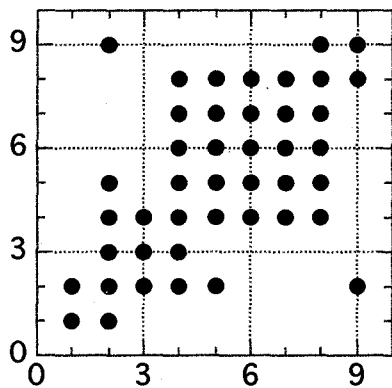


Fig.1

Schematic representation of ROESY spectra showing cross peaks between amino acids. Both axes represent the number of amino acid.

3P61

核様体蛋白質H-NSのN末端およびC末端ドメインの溶液構造

○大貫 歩¹、山崎 俊正²、久保庭 均³、中村 春木⁴、
上口 智治⁵、水野 猛⁵、佐久間 千勢子¹、神藤 平三郎¹
(東京薬大¹、農水省生物研²、中外製薬³、分生工研⁴、名大農⁵)

Solution structures of N- and C-terminal domains of a nucleoid protein H-NS

○A. Ohnuki¹, T. Yamazaki², H. Kuboniwa³, H. Nakamura⁴,
C. Ueguchi⁵, T. Mizuno⁵, C. Sakuma¹, H. Shindo¹

(Tokyo University of Pharmacy and Life Science¹, National Institute of Agrobiological Resources², Chugai Pharmaceutical Co.Ltd.³, Molecular Bio-Engineering Research Institute⁴, Nagoya University⁵)

H-NS protein composed of 137 a.a. has been implicated as a major component of *E. coli* nucleoid as well as a general repressor for many genes. Trypsin-digestion experiment suggested that H-NS has distinct N- and C-terminal domains, the latter of which, HNS47C(91-137), was found to be a DNA binding domain. Three dimensional solution structure of HNS47C was previously determined by 2D ¹H-NMR spectroscopy¹⁾. In order to further elucidate biological properties of two domains we prepared two mutant proteins, N-terminal deletion mutant HNS 78C(60-137) and C-terminal deletion mutant HNS101N(1-101). We characterized their structures and binding affinity to DNA using multi-dimensional NMR spectroscopy.

大腸菌の染色体DNA凝集に関わる一群の蛋白質はヒストン様蛋白質と呼ばれている。H-NSはその一種とされる中性蛋白質で、分子量15400、137残基よりなり、DNA凝集以外にも広範囲の遺伝子の転写制御因子として機能する。H-NSは、転写開始点近傍にしばしば存在する湾曲DNAに対して特異的に結合し、遺伝子発現を制御することが知られている。さらに他の転写因子と異なり、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の認識という点で、その構造に興味をもたれてきた。

我々はNMRによりH-NSの構造解析を行ってきたが、H-NSの多量体形成のためにNMRの測定は困難だった。そこで、H-NSの酵素消化による断片化を試み、得られたC末端側断片(HNS47C(91-137))の構造については以前報告した¹⁾。H-NSのドメイン構造およびDNA結合能を検討すべく、N末端側欠失断片HNS78C(60-137)とC末端側欠失断片HNS101N(1-101)の二種類の欠失変異体蛋白質の大量発現系を構築した。これらの変異体について多次元NMR測定を行い、その構造について検討した。

Key words: H-NS蛋白質、欠失変異体、NMR、構造解析

おおぬき あゆみ、やまざき としまさ、くぼにわ ひとし、なかむら はるき、
うえぐち ちはる、みずの たけし、さくま ちせこ、しんどう へいさぶろう

<試料および実験>

HNS101NおよびHNS78Cの大量発現系を用いて ^{15}N 標識および ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識したHNS101NとHNS78Cを精製した。スペクトルの測定は10mM Na-Phosphate (pH 5.5)、10mM EDTA、2mM DTT、2mM NaN_3 、300mM NaCl、7% D_2O 中で行い、装置はBrucker製DMX750を用いた。主鎖原子の連鎖帰属には3D HNCACB、CBCA(CO)NHを用い、NOEの測定には3D ^{15}N -edited NOESY-HSQCを用いて行った。

<結果および考察>

^{15}N 標識したnative H-NSの ^{15}N - ^1H HSQCスペクトルにおいて、観測されたピークは構成アミノ酸の数から予想される数に比べて約半分であった。一方C末端側断片HNS78Cスペクトルでは期待される数のピークが観測された。これら2つのスペクトルの比較から、native H-NSで観測されたピークは全てC末端側の残基に帰属された。これらの結果はnative H-NSのN末端側ドメインが構造多形をとっていることを示唆している。このことを確かめるために、現在、N末端側断片HNS101NのNMR測定を進めている。また、 ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識したHNS78CについてHNCACB、CBCA(CO)NHを用い主鎖原子の帰属を行った。得られた $\text{C}\alpha$ と $\text{C}\beta$ の ^{13}C 化学シフト値より二次構造を予測したところ、C末端側は以前報告したHNS47Cの二次構造と矛盾のない結果を得た(図1)。しかし図1からわかるように、N末端側にのびた領域(約30残基、60-90)は顕著な構造を示していない。この領域内の69-76においてのみNHプロトンからの弱い残基間NOEが観測された。これらの結果は、このN末端側にのびた領域(60-90)は事実上ランダムな構造であることを示している。現在、DNA結合部位を明らかにするために、HNS 78C-DNA複合体の ^{15}N - ^1H HSQCスペクトルを測定し、複合体形成により誘起されるアミドプロトン、アミド ^{15}N の化学シフト変化を調べており、DNA結合部位の詳細についても発表する予定である。

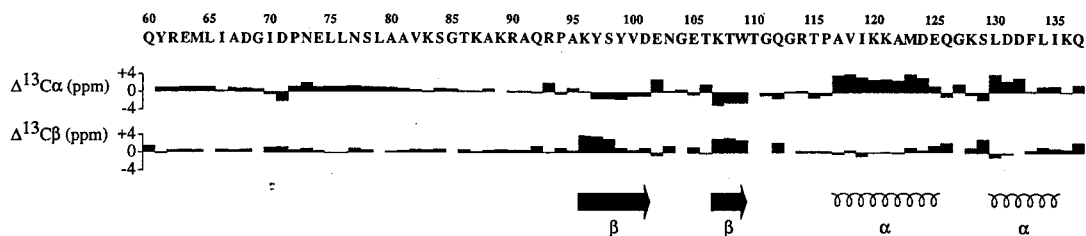


Figure 1. Secondary-structural elements predicted by the observed displacements of $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}\beta$ chemical shifts for the deletion mutant HNS78C from values in the random coil.

① Shindo et al., *FEBS Lett.*, 360, 125(1995)

3P62

コリシンE6ヌクレアーゼドメインと特異的 インヒビターImmE6の相互作用の解析

(東大院応生工¹、東大院理²、理研・遺伝生化学³、理研・細胞情報伝達⁴)
○大野光宏¹、武藤 裕²、伊藤 隆³、岩原淳二^{2,4}、木川隆則⁴、柴田武彦³、
横山茂之^{2,4}、正木春彦¹、魚住武司¹

NMR analysis of the nuclease-domain of colicin E6 interacting with its specific inhibitor ImmE6

○Mitsuhiro Ohno¹, Yutaka Muto², Junji Iwahara^{3,4}, Takanori Kigawa⁴, Takehiko Shibata², Shigeyuki Yokoyama^{3,4}, Haruhiko Masaki¹, Takeshi Uozumi¹
¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, ²Laboratory of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Physical and Chemical Research, ³Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research, ⁴Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo

ColE6-plasmid-coded colicin E6, which holds nuclease activity targeting 16S RNA, specifically inactivates ribosomes of sensitive *E. coli* cells and eventually causes cell-death. The nuclease activity of E6 is located on the C-terminal domain, T2A. The colicin E6 producing cells protect themselves from suicide by producing a specific inhibitor, ImmE6, which binds to T2A.

Previously we constructed the over-co-expression system of the T2A/Imm complex and examined the interacting area of ImmE6 facing to E6-T2A by NMR. In the present study, we examine the interacting area of E6-T2A facing to ImmE6 by analyzing backbone chemical shift perturbation on the binding of ImmE6. As the result, E40, G41, K42, G52, K53, R54, A55, S70 and H72 show larger perturbation than others. S70 and H72 existing near the enzymatic active-site. Preliminary structural calculation suggests that the residues showing showing large perturbation are involved in the same area on the 3D-structure of E6-T2A.

キーワード；構造解析, リボソーム, コリシン, ヌクレアーゼ, 相互作用

おおのみつひろ、むとうゆたか、いとうゆたか、いわはらじゅんじ、きがわたかのり、
しばたたけひこ、よこやましげゆき、まさきはるひこ、うおずみたけし

【緒言】 コリシンE6とE3は、Colプラスミドを持つ大腸菌が生産する殺菌性のRNaseである。RNase活性はC末端のT2Aドメインに局在し、コリシン生産菌はこのドメインに特異的に結合するインヒビターImmを同じプラスミドから同時に生産して、自殺を免れている。T2AとImmの結合は非常に強く特異的であり、それぞれのImmタンパク質 (ImmE6,ImmE3) は交差阻害活性を示さない (一方のImmが他方のコリシン活性を阻害することはない)。こうした性質から、T2AとImmの相互作用系は、タンパク質間の特異的相互作用及び水溶液中における阻害機構を解析する興味深い系である。そこでT2AとImmをコンプレックスで生産する系を構築し、コンプレックス及び遊離の状態のサブユニットを調製したが、それぞれのサブユニット (T2A, Imm) は、単独でもコンプレックスとしても、リン酸緩衝液に対する溶解度が大きく、NMRによる解析に適していた。そしてこれまでに、ImmE6タンパク質の側のE6-T2Aとの相互作用領域を同定し、94年度の本討論会において報告した。今回E6T2Aの遊離の状態における構造解析を進め、更にE6-T2A/Immコンプレックス中におけるE6-T2Aの主鎖のシグナルの帰属を行うことにより、コンプレックス形成前後での主鎖のシグナルのケミカルシフト変化を調べ、E6T2A側の相互作用領域について検討をしたので報告する。

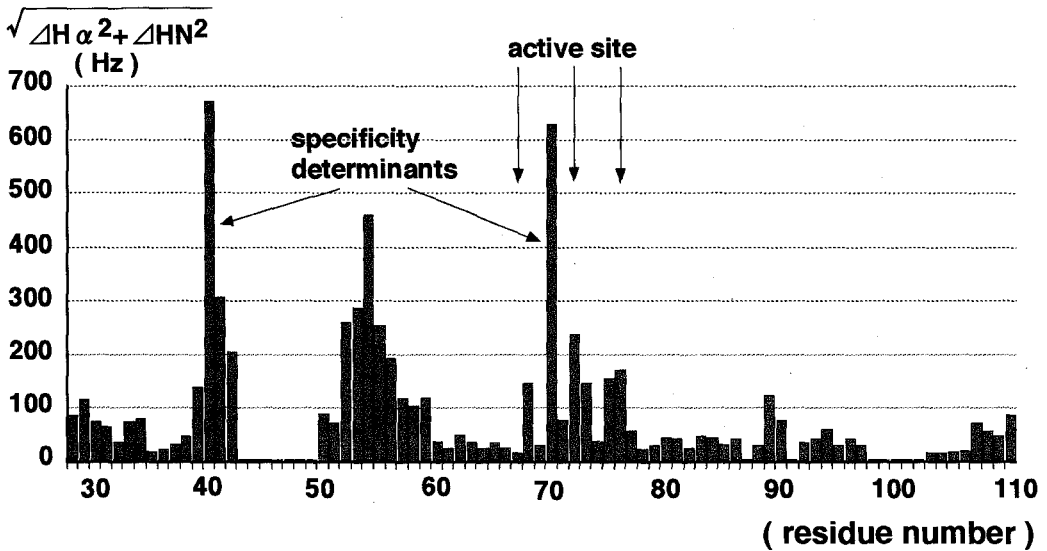
【方法】 遊離のE6-T2Aは、E6-T2A/Immコンプレックスを6Mの尿素存在下でそれぞれのサブユニットに分離し、変性状態のE6T2Aを尿素を除去して再生することにより調製した。遊離の状態のE6-T2Aの主鎖のシグナルの帰属は、3D-HNCA, 3D-HNCOCA, 3D-HNCACB, 3D-HNHB, 3D-NOESY-HSQC, 3D-TOCSY-HSQCにより行った。更に重水中の2D-NOESY, 2D-TOCSY, 3D-HSQC-NOESY-HSQC, HMQC-Jの情報をもとに構造計算を進行中である。

コンプレックス中の主鎖の帰属は、¹³C,¹⁵N均一二重標識したコンプレックスの3D-HNCA, 3D-HNCOCA, 3D-HNCO, ¹⁵Nアミノ酸 (Gly, Phe, Leu, Ile, Val, Tyr) 特異的標識したコンプレックスのHMQC、特異的アミノ酸 (His, Lys) をネガティブ標識したコンプレックスのHMQC、及びE6-T2Aだけを¹⁵N均一標識した再構成コンプレックスの3D-NOESY-HSQC, 3D-TOCSY-HSQCにより行った。

【結果と考察】

遊離状態とコンプレックス中でのE6-T2Aのシグナルの帰属結果から、ケミカルシフトの移動度を計算したところ、特定の領域に大きな変化が見られた。(次頁図)

ケミカルシフトが大きく変化したのは、Immタンパク質を見分けている特異性決定基であるE40, S70、その近傍のG41, K42, H72、更にG52, K53, R54, A55であり、S70, H72は活性中心近傍に存在する。そして、これらの残基は全て、立体構造上の近接した領域に存在することが明らかとなった。E6-T2Aの立体構造は、おおよそ4~5本からなる逆並行βシート様の基本骨格を成した構造をしていることがわかってきているが、相互作用領域はこのβシート様構造のシート面の側面に位置するループから構成される事が示唆される。E6-T2AはLysに富んだ塩基性蛋白であり、ImmE6は酸性蛋白であることから、これらの相互作用には静電的な要因が大きいと想像されていたが、ImmE6及びE6-T2Aの相互作用領域にはこうした残基は集中しておらず、疎水性相互作用のような異なる結合様式が基本であることが予想される。静電的に引き寄せられたE6-T2AとImmE6それぞれのループ領域が構造変化を起こしながら強く結合するのではないだろうか。今後は相互作用様式を決定するため、T2A-Imm間の分子間NOEに焦点を当て解析を進めていく予定である。



Chemical Shift Perturbation Analysis of E6-T2A

3P63

mSos1タンパク質のPHドメインの高次構造解析

(東大理¹、理研細胞情報伝達²、Peter MacCallum Cancer Institute³)

○小柴生造^{1, 2}、木川隆則²、金載勲^{1, 2}、白水美香子²、D. Bowtell³、横山茂之^{1, 2},

The Solution Structure of the Pleckstrin Homology Domain of Mouse Sos1.

Seizo Koshiba^{1,2}, Takanori Kigawa², Jae-Hoon Kim^{1,2}, Mikako Shirouzu², David Bowtell³, and Shigeyuki Yokoyama^{1,2}

¹Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo; ²Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN); ³Peter MacCallum Cancer Institute

The solution structure of the pleckstrin homology (PH) domain of mouse Sos1 (mSos1), a guanine nucleotide exchange factor for Ras, was determined by multidimensional NMR spectroscopy. The structure of the mSos1 PH domain involves the fundamental PH fold, consisting of seven β -strands and one α -helix at the C-terminus, as determined for the PH domains of other proteins. By contrast, the mSos1 PH domain showed two major characteristic features. First, the N-terminal region, whose amino acid sequence is highly conserved among Sos proteins, was found to form an α -helix, which interacts with the β -sheet structure of the fundamental PH fold. Second, there is a long unstructured loop between β 3 and β 4. We also studied the binding of the mSos1 PH to inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃), and found that Ins(1,4,5)P₃ binds mainly to the β 1/ β 2 loop and the N- and C-terminal parts of the long β 3/ β 4 loop.

<序論>

Sosタンパク質は、低分子量Gタンパク質Rasに働くGDP/GTP交換因子で、細胞の増殖及び分化において重要な役割を果たすタンパク質である。このSosには、PH (pleckstrin homology) ドメインと呼ばれるアミノ酸約110残基から成るモジュールが存在する。PHドメインは細胞内情報伝達及び細胞骨格に関与する多数のタンパク質に存在するドメインで、細胞内で重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、SosのPHドメインの機能構造を解明するために、このドメインの高次構造、及びイノシトール3リン酸の結合部位をNMRを用いて決定した。

<方法>

まず、mouse Sos1のPHドメイン(134残基)を、GST融合タンパク質として大腸菌で

PH domain、mSos1、多次元NMR、立体構造決定、

こしばせいぞう、きがわたかのり、きむじえふん、しろうずみかこ、デイビットボウテル、よこやましげゆき、

発現させ、精製する系を確立した。次に、安定同位体標識した試料を用いて、2重、3重共鳴各種多次元NMRスペクトルを測定した。測定試料は、約2 mMのmSos PH、20 mMリン酸カリウムバッファー (pH 6.5)、2 mM DTTを用いた。測定はBruker社のAMX600及びDMX500を用いて、20 °Cで行った。主鎖の帰属は、3D HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、CBCA(CO)NH、¹⁵N-edited NOESY および¹⁵N-edited TOCSY スペクトルを用いて行い、側鎖の帰属は、主に3D HCCH-TOCSY と¹⁵N-edited TOCSY スペクトルを用いた。距離情報は、3D ¹⁵N- 及び ¹³C- edited NOESYスペクトルから得た。構造計算はX-PLOR Ver. 3.1を用い、simulated annealing法で計算した。またイノシトール3リン酸の結合部位を同定するために、イノシトール3リン酸の添加に伴う主鎖アミドプロトンの化学シフトの変化を調べた。

<結果及び考察>

mSos1のPHドメインの立体構造は、7本のβストランド(β1-7)と2本のαヘリックス(α1 and 2)から構成されており、N端側の4本のβストランドが最初のβシートを、C端側の3本のβストランドが後のβシートを構成している(図)。この2つのβシートが重なり合い、さらにC端側のαヘリックスとともに中心の疎水性のコアを構成しているが、この構造はこれまでに報告された他のPHドメインの構造と似ている。一方、mSos1のPHドメインに特徴的な点としては、第一にN末端にαヘリックスが存在し、第二に3本目と4本目のβストランドの間のループが非常に長いことである。これらの特徴がmSos1のPHドメインに特徴的な機能において何らかの役割を果たしていると考えられる。またイノシトール3リン酸は、PHドメインのN端側の主に2つのループ(β1/β2 and β3/β4 loops)と結合していることが明らかになった。この領域は正の電荷を帯びており、イノシトール3リン酸は主に静電的な相互作用で結合していると考えられる。

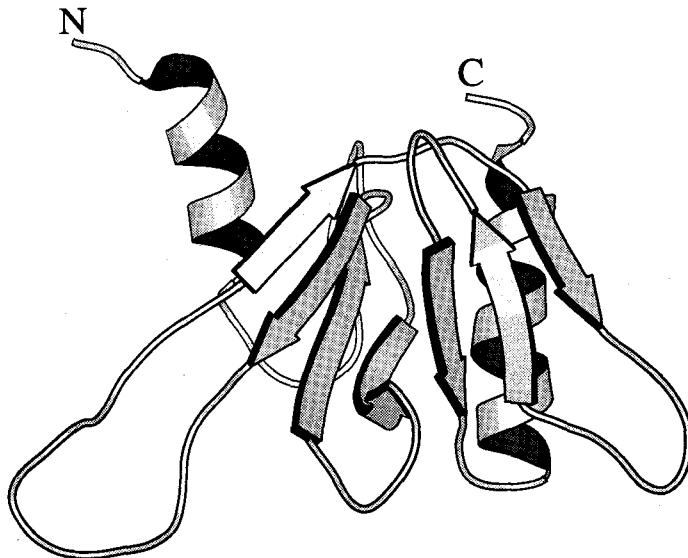


Figure : Ribbon representation of the solution structure of the mSos1 PH.

3P64

抗腫瘍性抗生物質C-1027の二次元NMR解析

(東北大院理¹・筑波大学先端学際領域研究セ²・サントリー生医研³・大鵬薬品製薬セ⁴) ○福田純子¹・田中俊之²・平間正博¹・今城精一³・石黒正路³・吉田健一郎⁴・大谷敏夫⁴

Two-dimensional NMR Study on C-1027, a Chromoprotein Antitumor Antibiotic. Sumiko Fukuda¹, Toshiyuki Tanaka², Masahiro Hirama¹, Seiichi Imajo³, Masaji Ishiguro³, Ken-ichiro Yoshida⁴, Toshio Otani⁴ (¹Faculty of Science, Tohoku University, ²Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, ³Suntory Institute for Biomedical Research, ⁴Tokushima Research Center, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.)

Abstract: C-1027, a potent antitumor antibiotic, consists of an unstable chromophore with DNA cleavage activity and an apoprotein which stabilizes the chromophore by tight and specific binding. To reveal the binding structure and stabilizing mechanism, we analyzed the apoprotein and the complex composed of the apoprotein and the aromatized chromophore (aro-chr) by two-dimensional NMR. The apoprotein has three antiparallel β -sheets and hydrophobic pocket formed by two β -sheets and two loops. The protein folding and shape of apoprotein is quite similar to those of neocarzinostatin and actinoxanthin. The computer modeling of the complex based on the several intermolecular NOEs observed between apoprotein and aro-chr reveals that the pocket binds aro-chr with the conformation in which its core sits on the bottom of the pocket and the aminosugar and the benzoxazine group face outwards. It is suggested that the hydrophobic interaction between aro-chr and apoprotein is one of the most important interaction to form the complex.

<序論>C-1027は*Streptomyces globisporus* C-1027が産生するクロモフォアタンパク複合型のクロモプロテイン系抗生物質であり、DNA切断活性を持つ不安定なクロモフォア (1) ^{1, 2)}と、これを特異的に結合して安定化するアポタンパク (アミノ酸110残基) ³⁾から構成される (Figure 1)。このクロモフォアは、9員環エンジイン骨格を持つため、光、熱などにより速やかに芳香環化しDNA切断活性を失うが、アポタンパクと結合することにより安定化される。我々は、アポタンパクがクロモフォアのどの部分を認識し、どのように安定化しているかを解明するために、C-1027の二次元NMR解析を試みた。しかし、通常のNMR条件下においてC-1027は不安定であり、良好なデータを得ることはできなかった。そこで、コアが芳香環化した安定なクロモフォア (2) ^{2, 4)}とアポタンパクの複合体を天然体のモデルとし、その構造解析を行った。C-1027クロモフォアの9員環エンジインは、パラベンザインピラジカルと平衡にあるため (Scheme 1) ⁵⁾、芳香環化クロモフォア複合体は、天然のC-1027複合体とほぼ同じ構造を取っていると考えられる。また、クロモフォア放出機構についての知見を得るため、アポタンパクのみの二次元NMR解析も行った。

C-1027、クロモプロテイン、二次元NMR、芳香環化クロモフォア、疎水性ポケット

ふくだ すみこ・たなか としゆき・ひらま まさひろ・いまじょう せいいち・いしぐろ まさじ・よしだ けんいちろう・おおたに としお

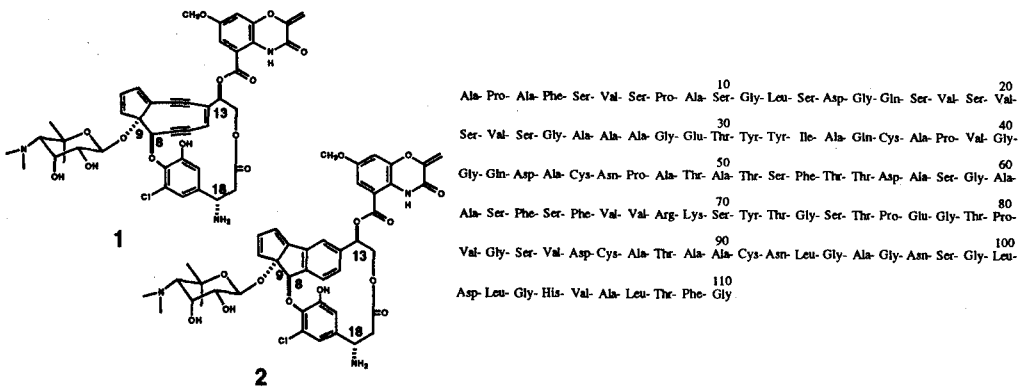
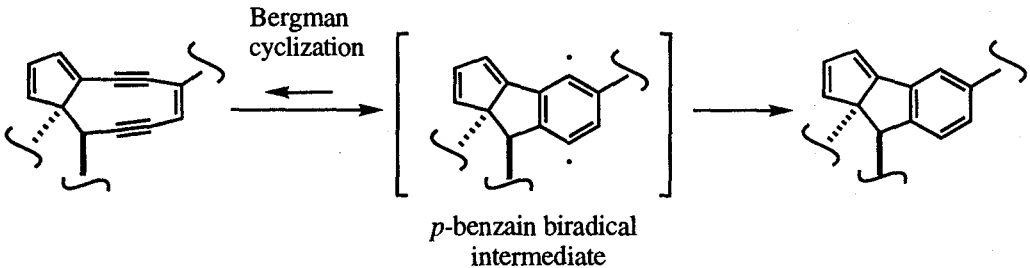


Figure 1 Structures of C-1027 chromophore (1) and its aromatized product (2), and amino-acid sequence of C-1027 apoprotein.



Scheme 1 Mechanizm of the Bergman cyclization of endiynes system.

<方法>芳香環化クロモフォア-アポタンパク複合体の7.8mM溶液 (H₂O及びD₂O、pH5.0) をNMR試料とし、Bruker AM600を用いて二次元NMRスペクトル [COSY、HOHAHA、NOESY (200ms)] を30℃で測定した。また、アポタンパクの7.6mM溶液 (H₂O及びD₂O、pH 5.0) を調製し、同様に二次元NMR測定を行った。なお、軽水ピークの除去は通常のpre-saturation法を用いた。

<結果と考察>

アポタンパクの解析

シグナルのスピンの同定と連鎖帰属は常法⁶⁾に従って行い、ほぼ100%の帰属が完了した。また、NOESYスペクトルの解析によって、885個の距離情報が得られた。これに46個の水素結合 (23組) と6個のジスルフィド結合 (2組) の距離情報を併せ、ランダムな初期構造からX-PLORを用いて構造計算を行ったところ、全重原子のRMSD値が1.5 Å以内と比較的良好な収束が得られた。C-1027アポタンパクは3つの逆平行型βシートから構成されており、このうちの2枚のβシートと2つのループから疎水性の高いポケットが形成されている (Figure 2)。このフォールディングと形状

は、我々のグループによって既に構造解析された類似タンパク質のネオカルジノスタチン^{7, 8)} や、アミノ酸のホモロジーが90%以上あるアクチノキサチン⁹⁾ と非常に良く似ている。

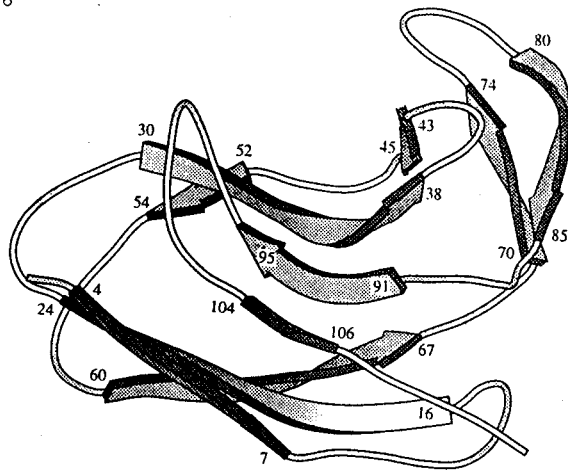


Figure 2 . Ribbon diagram of the C-1027 apoprotein.

芳香環化クロモフォア-アポタンパク複合体の解析

タンパク由来のシグナルの帰属はアポタンパクの時と同様にして行い、約9割のシグナルの帰属が完了している。また、クロモフォア由来のシグナルはすべて帰属した。アポタンパク単独の時と比べて、主鎖あるいは側鎖の一部のプロトンの化学シフトが0.1ppm以上シフトしているアミノ酸残基は、アポタンパクの構造解析によって明らかにされた疎水性ポケット (Figure 2) に集中しており、この部位が、ネオカルジノスタチン^{7, 8)} と同様に、クロモフォア結合部位であると考えられる。芳香環化クロモフォアとアポタンパク間に観測されたNOEを基にして、クロモフォア-ア

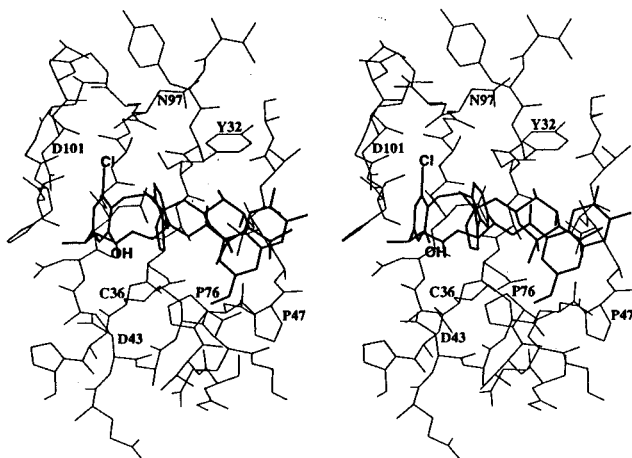


Figure 3 The NOE-restrained refined binding-structure of **2** with apoprotein.

ポタンパク複合体の結合構造をコンピューターモデリングにより求めた (Figure 3)。その結果、予想通り、クロモフォアはアポタンパクの疎水性ポケットに結合しており、コアのベンゼン環と β チロシンを内側に、アミノ糖とオキサジンを外側に向けている。クロモフォアのコア部は疎水性が非常に高いことから、両者の間の疎水性相互作用が結合の大きな要因となっていると考えられる。また、アミノ糖とY32側鎖間にNOEが観測されていることから、アミノ糖のN-ジメチル、もしくは6位のジメチルとY32芳香環との間のCH- π 相互作用も両者の結合に関与している可能性がある。クロモフォア安定化機構と放出機構に関してさらに詳細な知見を得るため、芳香環化クロモフォア複合体のX-PLOR構造計算と、アポタンパク単独の構造の精密化を現在検討している。

<参考文献>

- 1) Y.Minami, K.Yoshida, R.Azuma, M.Saeki and T.Otani, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 2637 (1993).
- 2) K.Iida, S.Fukuda, T.Tanaka, M.Hirama, S.Imajo, M.Ishiguro, K.Yoshida, T.Otani, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 4997 (1996).
- 3) N.Sakata, S.Ikeno, M.Hori, M.Hamada and T.Otani, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1592 (1992).
- 4) K.Yoshida, Y.Minami, R.Azuma, M.Saeki and T.Otani, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 2633 (1993).
- 5) K.Iida, Ph.D. Thesis, Tohoku University (1994).
- 6) K.Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley: New York. 1986.
- 7) T.Tanaka, M.Hirama, K.Fujita, S.Imajo and M.Ishiguro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1205 (1993).
- 8) T.Tanaka, M.Hirama, S.Imajo and M.Ishiguro, In *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol. 4*, (Y.Murakami ed.), pp.287- 309, Pergamon: Oxford. 1996.
- 9) V.Z.Pletnev, A.P.Kuzin, S.D.Trakhanov and P.V.Kostetsky, *Biopolymers*, **21**, 287 (1982).

3P65

^1H NMRによるヘムタンパク質の三次構造の安定化に寄与する
セグメント間水素結合の研究

(筑波大 化学系) 山本泰彦

^1H NMR of inter-segmental hydrogen bonds in sperm whale and horse myoglobins
Yasuhiko Yamamoto
Department of Chemistry, University of Tsukuba

Internal hydrogen bonds contribute to the stabilization of protein folding. NMR signals arising from labile protons directly involved in such hydrogen bonds serve as potentially sensitive probes for investigating the tertiary structure of proteins in solution. His B5 N δ H and His EF5 N ϵ H protons in myoglobin are located in "the inter-segmental hydrogen bonds" at the interfaces between the B helix and the GH corner and between the EF corner and the H helix, respectively. Temperature dependence and pH profile of the shift and line width of their signals are closely correlated to the strength of hydrogen bonds. The comparison of these signals between the holo- and apo-proteins revealed that removal of prosthetic group largely alters the structure of the EF-H interface. The present study provides another fragmentary, but rather specific, description of the apoprotein structure.

【はじめに】 タンパク質のフォールディングと熱力学的安定性の分子論的解明を目指す研究では、水溶液中のミオグロビン (Mb) の詳細な高次構造解析が活発に行われている。Mbの補欠分子族であるヘムは、このタンパク質の機能発現に不可欠であるばかりではなく、タンパク質部分 (アポMb) の高次構造の安定化にも重要な役割を担っていることが様々な実験事実により明らかになっている。しかし、アポMbの構造で解明されているのは、ホロタンパク質 (\equiv Mb) に比べてヘリックス含量が約30%少ないということのみで、詳細な分子構造 (ヘムの有無によりタンパク質の高次構造がどのように変化するのか、あるいはヘムの除去により顕著な構造変化が誘起されるある特定の部分が存在するのか) については明らかにされていない。アポMbは不安定であるので単結晶の調製は困難であり、 ^1H NMRスペクトルでのシグナルの激しい重なりからNMRによる構造解析もあまり進んでいない。アポMbの構造化学的研究におけるこれらの状況は、その機能と構造との相関関係に関して最も詳細に解明されている蛋白質のひとつであるMbの場合とはまったく対象的である。

分子内水素結合、ミオグロビン、アポミオグロビン、タンパク質のフォールディング、タンパク質の変性

やまもとやすひこ

本研究では、MbとアポMbの高次構造を比較し、両者の熱力学的安定性の相違を構造化学的に解明するためのプローブとなるシグナルの検出と帰属を行った。一般に、分子内水素結合に関与するHis側鎖のイミダゾール環のNHプロトンに由来するシグナルは低磁場シフトし、タンパク質のシグナルが激しくオーバーラップする領域からは分離して観測される。X線結晶構造によれば、一般的な哺乳類のMbでは、そのようなシグナルを生じる可能性のあるプロトンは3個ある (Fig. 1)。これらのプロトンが関与する分子内水素結合は、いずれもヘリックスとランダムコイル部分の間に形成され、タンパク質の高次構造を安定化していることがわかっている。

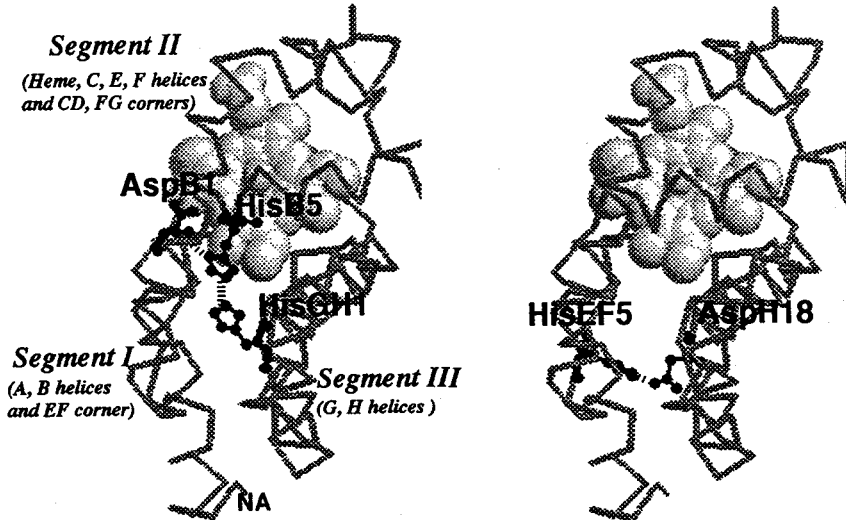


Fig. 1. The inter-segmental hydrogen bonds of AspB1-HisB5-HisGH1 (left) and HisEF5-AspH18 (right). Brookhaven file 4MBN (T. Takano (1977)) was used to draw the structure of sperm whale Mb. Except the residues involved in the hydrogen bonds, only the back-bone folding was drawn and heme is indicated by space-filling model. NA, in the left drawing, indicates the N-terminal of the protein. The structure of Mb is roughly divided into three segments; I (A and B helices and EF corner), II (Heme and C, E, F helices and CD and FG corners) and III (G and H helices). Hydrogen bonds are indicated by thick broken-lines. The resonances of HisB5 N δ H proton, the proton between N ϵ 's of HisB5 and HisGH1, and HisEF5 N ϵ H proton are expected to be resolved from the protein envelope.

【実験方法】 マッコウクジラとウマ由来のMbは、市販のものをそのまま使用した。Mbの一酸化炭素化物(CO体)は、Na₂S₂O₄によるヘム鉄の還元後、COガスを吹き込み調製した。アポMbは、塩酸-2-ブタノン法で調製した。限外ろ過によりタンパク質濃度を約0.1mMに濃縮後、溶媒に10%D₂Oを加えNMR試料とした。NMR測定は、Bruker社製AC-400Pにより行った。スペクトルは、Jump & Returnパルスなどのソフトパルスを利用して観測した。

【結果・考察】 クジラMb、ウマMbのCO体の¹H-NMRスペクトルの低磁場領域(10~15ppm)には、化学交換性プロトン由来の三本のシグナルがそれぞれ観測される

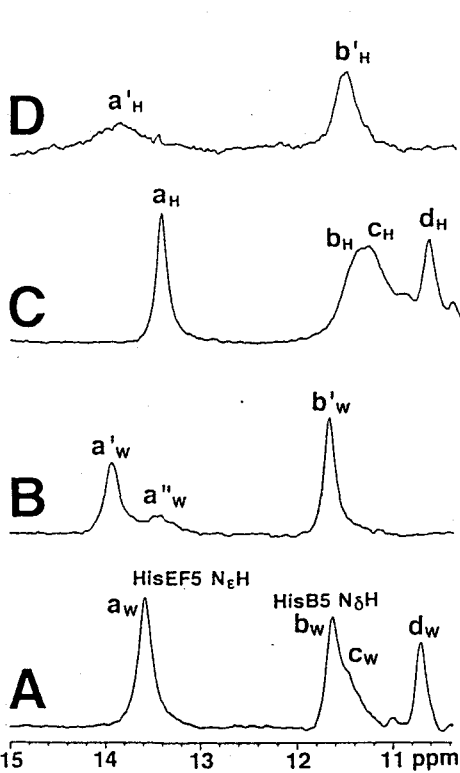


Fig. 2. The downfield portions of the 400 MHz ^1H NMR spectra of sperm whale and horse Mb(CO)s and apoMbs at 5°C: (A) sperm whale Mb(CO), pH 8.22; (B) sperm whale apoMb, pH 9.48; (C) horse Mb(CO), pH 8.50; (D) horse apoMb, pH 9.49. Exchangeable proton signals are labeled.

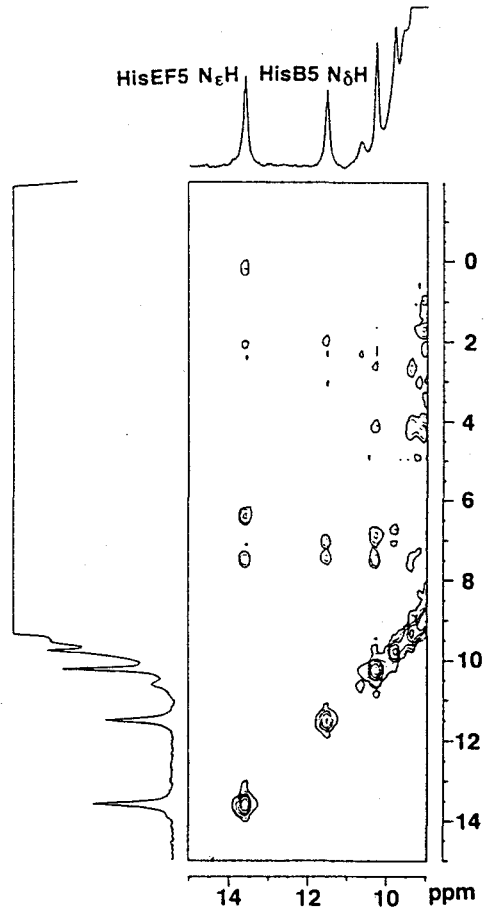


Fig. 3. NOESY spectrum of sperm whale met-aquo Mb, pH 8.43, at 5°C. The mixing time of 50 ms was used.

(Fig. 2)。これらのシグナルのうち二本は、シフト値、水素交換反応速度($\ll 3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$)、温度変化とpH依存性、アポMbのスペクトルとの比較、異なる生物種由来のMbとの一次構造の相同性とスペクトルの比較、NOE相関の観測(Fig. 3)から、HisB5 N_δH 、HisEF5 $\text{N}_\epsilon\text{H}$ プロトンに帰属された。また、クジラのアポMbでは、HisEF5 $\text{N}_\epsilon\text{H}$ プロトンシグナルの分裂 (a'_w, a''_w ; Fig. 2B)が観測された。これらのシグナルの T_2 緩和速度が大きいことにより、NOESYではクロスピークは観測できなかったが、それぞれのシグナルをラジオ波パルス照射することにより測定したNOE差スペクトルには、 $\text{C}_\epsilon\text{H}$ と C_δH プロトンシグナルへの明確なNOEが観測されている(Fig. 4)。Figs. 4B & 4Cよりわかるように、ピーク a'_w, a''_w をそれぞれ照射した時にNOEが観測されるシグナルの化学シフトは異なる。もし a'_w, a''_w がともにHisEF5 $\text{N}_\epsilon\text{H}$ プロトンに帰属されるならば、クジラのアポMbでのHisEF5のイミダゾール環は異なる二種類の電子構造で存在し、両者は相互変換 (反応速度は $> 7 \text{ s}^{-1}$) していることになる。 a''_w のHisEF5 $\text{N}_\epsilon\text{H}$ プロトンへの帰属に関しては、検討を要するものと思われる。

アポMbのスペクトルで、HisB5 N_δHとHisEF5 N_εHシグナルがともに観測されることは、AspB1-HisB5-HisGH1とHisEF5-AspH18の水素結合は、ヘムが除去されても保持されていることを示している。ただし、Fig. 2のMbでの対応するシグナルとの比較からもわかるように、シフト値及び、線幅に関して両者の間で差が見られる。これらのプロトンシグナルのシフト値は、ドナーとアクセプター間の水素結合様式の相違に関して単純に構造化学的に解釈することはできないが、線幅の違いは明らかにアポMbでのこれらのプロトンの化学交換反応速度の増大を示している。アポMbでのシグナルの線幅の広がり、HisB5 N_δHよりはHisEF5 N_εHの方に顕著（特にウマのアポMbの場合）であることから、ヘムが組み込まれることによりHisEF5-AspH18セグメント間水素結合が安定化されることがわかる。また、EF-Hインターフェースの構造が、高次構造変化の影響を受けやすいことは、変性剤添加によるアポMbの変性過程で、HisEF5 N_εHシグナルが低濃度の変性剤で、Exchange broadeningにより消失することからも確認することができた。さらに、同一溶液条件では、ウマのアポMbのシグナルは、クジラのアポMbでの対応するシグナルより線幅が広い。この結果は、これらのプロトンが直接関与する水素結合強度が両者で異なることを示しているが、クジラのアポMbの方が熱力学的により安定であることと矛盾しない。クジラのアポMbのアミドプロトンの化学交換反応速度の解析から、ヘリックスA, B, G, Hは安定な疎水性コアを形成していることが明らかになっている(F. M. Hughson *et al.*, *Science*, 249, 1544 (1990))。EF-H インターフェースの構造が少なくともHisEF5-AspH18水素結合が形成される程度に保持されているという本研究での結果を考え合わせると、アポMbではヘリックスFも部分的には形成されていることになる。

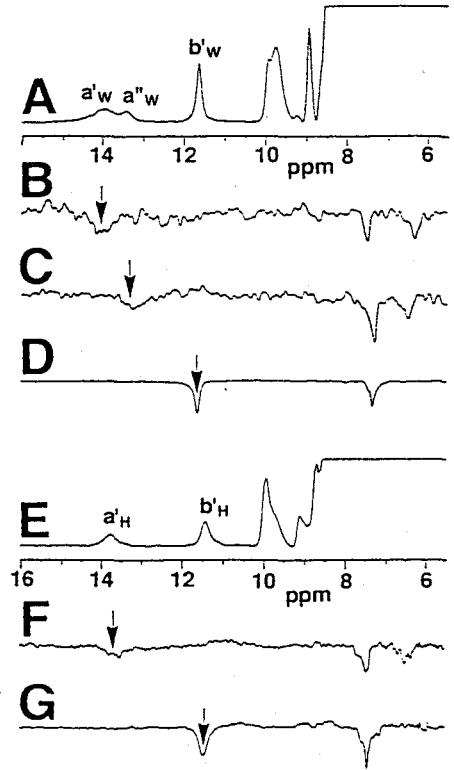


Fig. 4. (A) The downfield portion of ¹H-NMR spectrum of sperm whale apoMb, pH 8.55, at 5°C. (B) The NOE difference spectrum resulting from saturation of peak a'w, HisEF5 N_εH proton signal. The peaks at 6.22 and 7.51 ppm exhibit NOEs. (C) The NOE difference spectrum resulting from saturation of peak a''w, possibly HisEF5 N_εH proton signal. The peaks at 6.44 and 7.34 ppm exhibit NOEs. (D) The NOE difference spectrum resulting from saturation of peak b'w, HisB5 N_δH proton signal. The peak at 7.41 ppm exhibits NOE. (E) The downfield portion of ¹H-NMR spectrum of horse apoMb, pH 9.40, at 5°C. (F) The NOE difference spectrum resulting from saturation of peak a'H, HisEF5 N_εH proton signal. The peaks at 6.52 and 7.46 ppm exhibit NOEs. (G) The NOE difference spectrum resulting from saturation of peak b'H, HisB5 N_δH proton signal. The peak at 7.43 ppm exhibits NOE. The arrow indicates the peak being saturated.

A Novel Experimental Approach for the Spin Relaxation Analysis of All Backbone Atoms in a Protein

**Shin-ichi Tate, Emi Yamaguchi, Yoshiko Ichikawa,
and Masatsune Kainosho**

**Department of Chemistry, Faculty of Science
Tokyo Metropolitan University**

1-1 Minami-Ohsawa, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

Abstract : Spin relaxation parameters are fruitful for the elucidation of the protein structure dynamics. The amide ^{15}N spin relaxation is now commonly used in the structure dynamics analysis of a protein due to the simplicity in NMR experiments and the interpretation of the obtained relaxation parameters. However, of course, we require the relaxation parameters of other backbone atoms to obtain the comprehensive insight of the backbone dynamics of a protein. The existence of the large spin couplings between $^{13}\text{C}\alpha$ - $^{13}\text{C}\beta$ and $^{13}\text{C}\alpha$ - $^{13}\text{C}=\text{O}$ has prohibited the extensive elucidation of the spin relaxation parameters of these backbone atoms, $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}=\text{O}$, so far. In this presentation, we will show you the novel experimental approach to overcome these intrinsic problems in the complete evaluation of the spin relaxation parameters of these remaining backbone atoms. The obtained view of protein backbone dynamics based on these complete data set would be discussed.

Introduction:

The elucidation of the backbone dynamics of a protein is one of the most exciting field of NMR application in expecting for its relation to the biological process. Recent NMR works have successfully provided us with experimental insight of the backbone dynamics of a protein mainly based on the amide ^{15}N spin relaxation analysis. Currently, these amide ^{15}N spin relaxation parameters are used as representative probes for the backbone dynamics of

Keywords: NMR, stable isotope, deuteration

たて しんいち、やまぐち えみ、いちかわ よしこ、かいのしょう まさつね

a protein, but there is no reason on that usage. Other backbone atoms, C α and C=O, should have possibilities to behave differently from amide ^{15}N . So far, due to the experimental difficulties in measuring $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}=\text{O}$, especially $^{13}\text{C}\alpha$, the comprehensive analysis of all backbone spins have not been reported. In our study, first of all, we prepared the appropriated labeled sample for the elucidation of the backbone ^{13}C spin relaxation. In our case, we used uniformly 15% ^{13}C enriched protein sample for the $^{13}\text{C}\alpha$ spin analysis. In this sample, practically there is little perturbation on the T_2 spin relaxation profiles of $^{13}\text{C}\alpha$ carbons, giving us precise transverse relaxation parameters of $^{13}\text{C}\alpha$ which could not be extracted without using the highly concentrated sample to observe natural abundant ^{13}C . Second, the glycine residue has two attached protons in its C α site, which give strong dipolar mediated cross correlation onto their attached $^{13}\text{C}\alpha$ spin relaxation. To avoid this artifact on the $^{13}\text{C}\alpha$ spin relaxation times of glycine residue, we applied stereoselective deuteration at glycine $^{13}\text{C}\alpha$ site to replace one of the methylene proton with deuterium. The attached deuterium, should enhance the T_2 spin relaxation process of $^{13}\text{C}\alpha$ by the process of the 'scalar relaxation of the second kind', but this process can be completely eliminated by the commonly used CPMG loops with 500 μsec delay duration; this relatively high duty CPMG loop can effectively decouple ^{13}C - ^2H scalar coupling, meaning no need tedious ^2H -decoupling during T_2 experiment. About $^{13}\text{C}=\text{O}$ spin relaxation, there exist pulse schemes for measuring $^{13}\text{C}=\text{O}$ T_1 and T_2 relaxation time based on HNC(O) experiment published by Wagner's group. And recently, $^{13}\text{C}\alpha$ -C=O homonuclear NOE observation was published by two groups of Zwietersweg and Marion. We measured T_1 , $T_{1\rho}$ and T_2 relaxation times of $^{13}\text{C}=\text{O}$ and $^{13}\text{C}\alpha$ -C=O, ^{15}N - $^{13}\text{C}=\text{O}$ NOEs with modified pulse schemes which are optimized for the application to the larger molecular weight proteins.

The collected set of comprehensive relaxation parameters are used for the extraction of the motional parameters such as order parameters to compare the motional character of each backbone atoms. In this kind of analysis using $^{13}\text{C}\alpha$ relaxation parameters, we required some of the modification to the protocol adopted for the ^{15}N relaxation analysis. The detailed process will be discussed in the presentation.

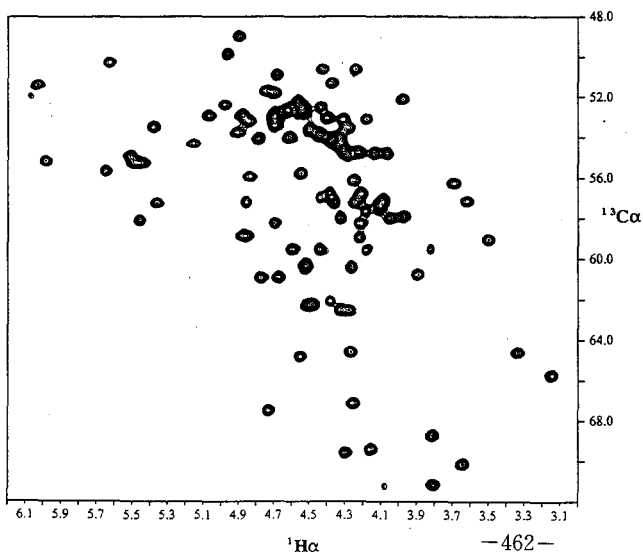


Figure 1. ^1H - ^{13}C correlation spectrum with T_1 delay of 21.2ms

15% ^{13}C uniformly enrichment for the studies of $^{13}\text{C}\alpha$ relaxation:

The uniformly 15% enrichment of ^{13}C could practically eliminate the overlay of the ^{13}C - ^{13}C J coupling modulation on the T_2 relaxation profile of $^{13}\text{C}\alpha$ relaxation. Figure 1 shows the representative data used for the $^{13}\text{C}\alpha$ T_1 relaxation analysis. Though the ^{13}C enrichment is limited, the observed signal intensity is enough for the analysis. Examples of T_2 relaxation profile are shown in Figure 2, demonstrating the T_2 decay free from ^{13}C - ^{13}C coupling modulation.

$^{13}\text{C}\alpha$ spin relaxation analysis using stereoselectively deuterated glycine:

For the $^{13}\text{C}\alpha$ relaxation analysis of glycine residue, to eliminate the large dipolar interaction among spatially neighboring methylene protons are essential to avoid the dipolar cross correlation effect on the $^{13}\text{C}\alpha$ relaxation. In the present study, the stereoselective deuteration was applied to selectively replace *pro-R* proton with deuterium. Figure 3 shows the comparison of the protein spectra with non-deuterated protein (a) and selectively deuterated protein (b). In this sample, all glycine residues have methine $\text{H}\alpha$ protons, which are appropriate for the relaxation analysis.

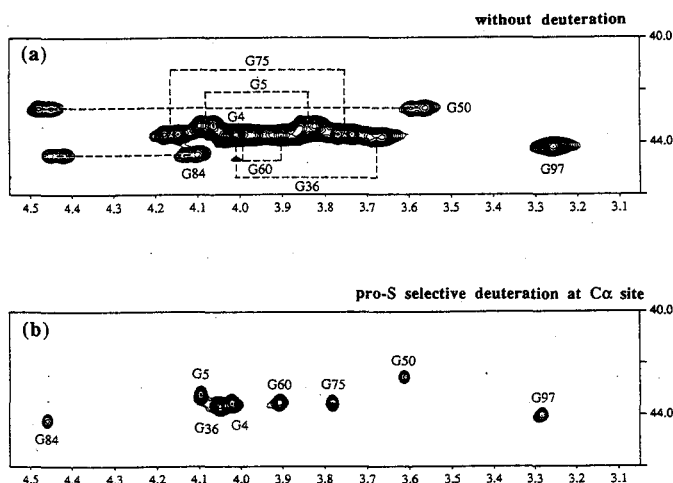
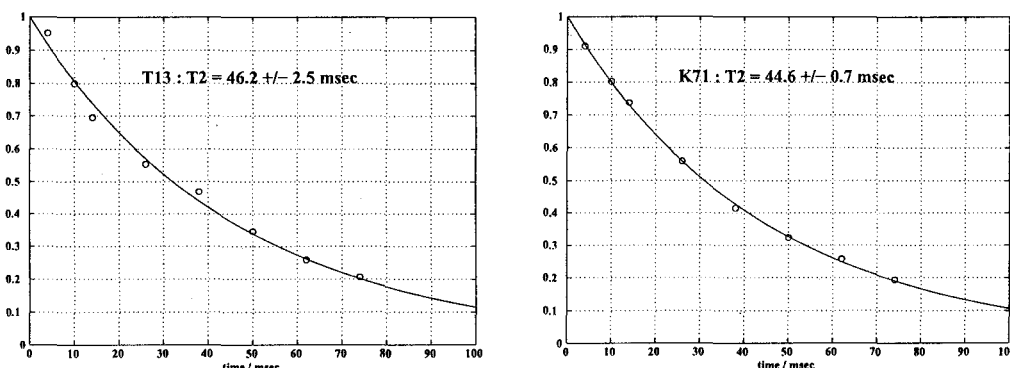


Figure 2. T_2 relaxation profile of T13 and K71 $^{13}\text{C}\alpha$.

Figure 3. ^1H - ^{13}C correlation spectra of a protein labeled with (a) non-deuterated and (b) stereoselectively deuterated ^{13}C glycine.

¹³C=O spin relaxation analysis using ¹⁵N, ¹³C fully enriched protein:

Figure 4 depicts the pulse scheme used for ¹³C=O T₁ relaxation analysis. In this pulse sequence polarization has started from ¹³C=O. In the HNC(O) type experiment, we need push and back type magnetization transfer between ¹⁵N and ¹³C=O, giving rise to two times longer coherence transfer delays compared with the present scheme in Figure 4. Thus, in the case of the larger molecular weight protein, this longer delays will lead to the severe reduction of the observed signal intensity even if ¹H polarization is used. Actually, ¹³C=O driven spectrum gives enough sensitivity for the spin relaxation analysis of ¹³C=O, as shown in Figure 5. This pulse scheme, of course, can be applied any type of relaxation measurement including T₁, T₂, T_{1ρ} and homo-/hetero-nuclear NOEs.

In the presentation, we will discuss about the order parameter evaluation optimized for ¹³Cα. And all obtained dynamical parameters on each backbone atom will be compared and discussed in relation to the backbone structure.

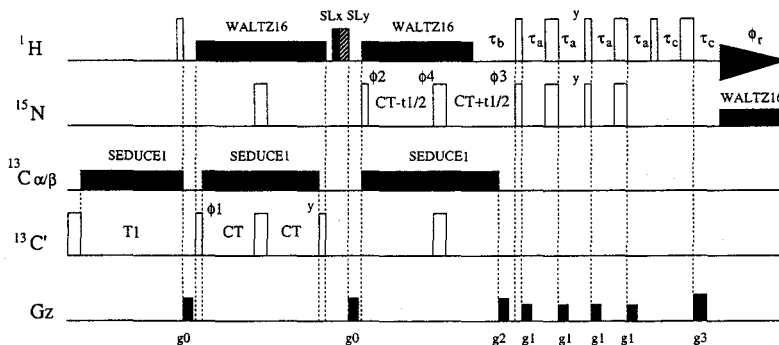


Figure 4. The pulse scheme used for the ¹³C=O T₁ relaxation analysis.

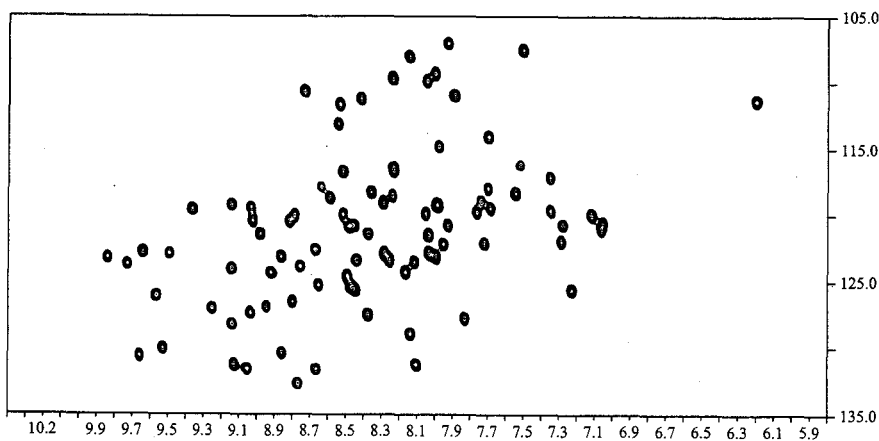


Figure 5. ¹H-¹³C correlation spectrum used for ¹³C=O T₁ relaxation analysis

(岐阜大学・医学部・生理学第二講座) ○桑田一夫、恵良聖一

Studies on the Motions of Intramolecular Interproton-Vectors in Biological
Macromolecules using a Complete Relaxation Matrix Analysis.
Department of Physiology, School of Medicine, Gifu University
Kazuo Kuwata and Seiichi Era

Using an off-resonance ROESY (O-ROESY) method, we tried to extract the information on the dynamics of the internuclear vectors in DNA fragment and BPTI. To accommodate the spin-diffusion effect, we made two programs for complete relaxation matrix analysis, MARDIGRAS-O-ROESY and NONLINEAR-O-ROESY (K. Kuwata, H. Liu, T. L. James, T. Schleich) and analyzed the O-ROESY spectra using them. We clearly observed the variations in the rotational correlation times of internuclear vectors in DNA. Also we investigated the effect of slow motion of millisecond order in BPTI using a far off-resonance spin-lock pulse. Furthermore we tried to design the shaped pulses for spin-lock, such as adiabatic pulse to increase the sensitivity of the method.

蛋白質は熱力学的に安定な立体構造、即ち、天然構造の周辺で揺らいている。蛋白質の機能はその構造変化を通じて実現されるものであるから、蛋白質内部の熱揺らぎを明らかにすることは、その機能を理解する上で極めて重要である。

一般に、蛋白質とそれを取り巻く水分子は大変複雑な力学系を形成している。この描像によると、蛋白質の準安定な構造とは位相空間における個々の原子核の安定な軌跡であり、また蛋白質の動的構造は、原子核の軌跡間の相互相関関数により記述される。

Liouville 空間における核スピンの軌跡及びその緩和過程は、スピン・ロックに用いるラジオ波をデザインすることにより制御出来る。一方、位相空間における原子核の軌跡は、核スピンの位相に干渉する効果がある。この干渉効果は、核スピン間の相互相関関数の変化を通じて、核磁気共鳴法 (NMR) の多次元緩和スペクトルにより観測が可能である。

蛋白質を構成する原子核の運動様式を明らかにするため、まず、最も単純な形状のオフ・レゾナンス・パルスデザインし、スピン・ロックに使用した。多次元で行った場合には、この方法を O-ROESY 法と名づけた(Kuwata et al., 1995)。

前回述べたように、我々は水素原子間でのスピン拡散の寄与を取り除くため、O-ROESY 法のための完全緩和行列法のプログラム (1.CORMA-O-ROESY, 2.MARDIGRAS-O-ROESY, 3.NONLINEAR-O-ROESY) を Fortran で作成した。1 は蛋白質または核酸の pdb

フォーマット・ファイルから2次元 O-ROESY スペクトル強度を算出する。2 は、2次元 O-ROESY 実験から得られた強度から各核間ベクトルの交差緩和時間を完全緩和行列法により算出する。3 は、オフ・レゾナンス・スピン・ロック周波数の関数としての2の出力(交差緩和時間)に理論曲線を非線型カーブ・フィットすることにより、スペクトル密度関数(Lipari-Szabo type)中のオーダー・パラメーター及び内部回転緩和時間(psec. ~ nsec.)を算出する。2種類の静磁場を用いた場合の3の出力のユニークネスは完全探索法により確認した(Kuwata et al., 1996)。

理論面では、今回は主にオフ・レゾナンス・スピン・ロックに伴うスカラー・カップリングの影響及び遅い(msec. オーダー)運動の影響を考察した。前者は3 kHz以上のオフ・レゾナンス・ラジオ波照射場では、殆ど無視し得る事が分かった。また遅い運動は、基本的に原子核の位相空間内での軌跡と、核スピンの位相との干渉を通じて特徴づけることが可能であることが分かった。

実験では、DNAフラグメントを用い、完全緩和行列法による解析を試みた。またウシ膵臓トリプシン・インヒビター(BPTI)を用い、数十種類のオフ・レゾナンス・スピン・ロック・パルスを使用し、O-ROESY スペクトルを測定した。その結果、蛋白質内部の比較的固い部分に、回転系の周波数で数 kHz から数十 kHz の吸収が見られた。

また、O-ROESY スペクトルを最適化する目的で、Bloch 方程式の解から逆にスピン・ロック・パルスのデザインを試みた。

References

Brooks, D., Ladam, P., Kuwata, K., Schleich, T., Reevaluation of the off-resonance rotating frame spin-lattice proton NMR relaxation and magnetization transfer, *J. Magn. Reson. A*, 117, 307-310, (1995)

Kuwata, K., Schleich T., Polarization operator formalism description of the off-resonance ROESY experiment, *J. Magn. Reson. A*, 114, 219-229, (1995)

Kuwata, K., Liu, H., Schleich, T., James, T. L., Complete relaxation matrix analysis for O-ROESY experiment-contribution of macromolecular internal motion to the structure determination, 37th ENC abstract, 27, (1996)

安定同位体標識NMR技術の核酸への展開
 (都立大・理) ○甲斐荘正恒、小野 晶、楯 真一、小野 明、片岡 新
 椎名桃子、大胡 雄

Recent Development in Stable Isotope Aided NMR Spectroscopy for Nucleic Acids

Masatsune Kainosho, Akira "Sho" Ono, Shin'ichi Tate, Akira "Mei" Ono,
Shin Kataoka, Toko Shiina, and Yu Oogo

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University
 1-1 Minami-ohsawa, Hachioji, Tokyo, 192-03 Japan

Abstract : The preparation of isotopically labeled nucleic acid oligomers by solid phase synthesis has been firmly established in our laboratory. During the last couple of years, our efforts have been directed toward developing methods for determining various homo- and heteronuclear spin coupling constants, which are necessary to supplement insufficient NOE constraints in the structural determination of nucleic acids in solution. Oligomers having an isotopically labeled residue at the selected site are useful for unambiguous assignment as well as for precise structural analyses of the labeled moiety. The *regio-* and *stereoselectively* $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ -doubly labeled nucleosides have been shown to be particularly useful for these purposes. Some examples from our recent work will be presented to illustrate the usefulness of the selective isotope labeling techniques for NMR studies of nucleic acid oligomers.

蛋白質の多核種・多次元NMR法の発展は著しく、現在においては分子量3万程度までの高分子量蛋白質のNMRシグナルの帰属も可能となってきた。一方、核酸に関しては多くの興味は集められてはいるものの、安定同位体標識試料の調製技術の未発達のためもあり、蛋白質への取り組みと較べて立ち遅れていることは確かである。核酸の同位体標識法の開発において最も重視すべきは、蛋白質の場合とは異なり、固相法による自動合成が極めて有効である点であろう。多くのグループは酵素法を利用して調製した均一標識体を利用する、いわば蛋白質において開発された方法論の援用を指向しているが、核酸の立体構造決定の問題点を考えればこのような方向は必ずしも適切ではないと我々は考えている。核酸は、蛋白質と比較すれば、プロトン密度が低く、従ってNOEベースの立体構造決定のアルゴリズムには限界がある。むしろ、核酸においては蛋白質以上にスピ結合定数や緩和速度等を構造情報として取り入れる必要がある。このような、蛋白質の構造情報としては副次的な重要性しか与えられていないNMRパラメーターを、NOEによる距離制限と同等以上に重視するとするならば、当然それらのパラメーターの測定精度の向上が要求されることになる。本報告では、過去数年間続けてきた選択的安定同位体標識報を利用したDNA、RNAオリゴマーの研究例を紹介しつつ、今後の展開について述べたい。

キーワード : RNA、DNA、安定同位体標識、多次元NMR

かいのしょう まさつね、おの あきら、たて しんいち、かたおか しん、しいな
 とおこ、おおご ゆう

分子量の大きなタンパク質の高次構造解析法の開発

(理化学研究所遺伝生化学研究室, ²Cambridge Centre for Molecular Recognition, Department of Biochemistry, University of Cambridge, ³理化学研究所細胞情報伝達研究室および東京大学大学院理学系研究科, ⁴EMBL)

伊藤 隆,¹ Brian O. Smith,² Andrew Raine,² Sarah Teichmann,² Liat Ben-Tovim,² Daniel Nietlispach,² R. William Broadhurst,² 寺田 透,³ Mark Kelly,⁴ Hartmut Oschkinat,⁴ 柴田 武彦,¹ 横山茂之,³ Ernest D. Laue²

An approach to global fold determination using limited NMR data from larger proteins selectively protonated at specific residue types

Yutaka Ito,¹ Brian O. Smith,² Andrew Raine,² Sarah Teichmann,² Liat Ben-Tovim,² Daniel Nietlispach,² R. William Broadhurst,² Tohru Terada,³ Mark Kelly,⁴ Hartmut Oschkinat,⁴ Takehiko Shibata,¹ Shigeyuki Yokoyama,³ and Ernest D. Laue²

¹Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Institute of Physical and Chemical Research(RIKEN), 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-01, Japan. ²Cambridge Centre for Molecular Recognition, Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QW, U.K. ³Cellular Signalling Laboratory, Institute of Physical and Chemical Research(RIKEN), 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-01 and Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan. ⁴European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69012 Heidelberg, Germany.

A combination of calculation and experiment is used to demonstrate that the global fold of larger proteins can be rapidly determined using limited NMR data. The approach involves a combination of heteronuclear triple resonance NMR experiments with protonation of selected residue types in an otherwise completely deuterated protein. This method of labelling produces proteins with α -specific deuteration in the protonated residues, and the results suggest that this will improve the sensitivity of experiments involving correlation of sidechain and backbone amide resonances. It will allow the rapid assignment of backbone resonances with high sensitivity and the determination of a reasonable structural model of a protein based on limited NOE restraints. The method that we propose should also be of utility in extending the use of NMR spectroscopy to determine the structures of larger proteins.

序

最近のNMR測定技術と解析法の進歩によって、タンパク質を均一に¹³C/¹⁵N標識し、triple resonance NMRの手法を用いることで、150-200残基のタンパク質の詳細な高次構造決定が可能になってきている。NMRの手法をさらに大きな分子量のタンパク質(200-300残基)に応用する際の有力なアプローチとして重水素化が数年前から注目を集めている。既にタンパク質の全て

Keywords: タンパク質, 重水素標識, 高次構造解析

共同研究者ふりがな: いたうゆたか, Smith, B. O., Raine, A., Teichmann, S., Ben-Tovim, L., Nietlispach, D., Broadhurst, R. W., てらだとおる, Kelly, M., Oschkinat, H., しばたたけひこ, よこやましげゆき

の非交換性のプロトンを全て重水素に置換することによって、非交換性のプロトンの磁化を介さずに主鎖および側鎖 ^{13}C の磁化を主鎖アミドプロトンに転移させて観測するタイプの実験において最も感度良く観測できることが報告されている[1-4]。一方で我々は、50%程度のランダムな重水素化が、側鎖プロトンと主鎖アミドプロトンの相関や、側鎖プロトンとアミドプロトンの間のNOEを観測するような実験において、最も高い感度を示すことを示した[5]。また、前述のような非交換性プロトンの完全な重水素化によって、アミドプロトン間のNOEを感度よく観測し、少ない距離情報を用いて低分解能の構造を決定する試みが報告されている[6,7]。

そもそも200-300残基のタンパク質の構造決定の際に問題になる要因としては、(1)観測可能な核の総数が増大し、シグナルの分離が困難になること、(2)NOEの強度の低下(特に ^{13}C 標識タンパク質では深刻である)、の2点があげられる。私たちは今回、以上の2つの問題点を克服し、大きな分子量のタンパク質についての迅速な高次構造決定を可能にするアプローチを提案する。この方法は、数種類のアミノ酸残基(例えば、タンパク質の疎水的コア部分を形成する、aliphatic残基およびaromatic残基)をプロトン標識し(アミノ酸選択的プロトン標識と略記)、残りの残基を重水素化したサンプルを調製し、シグナルの分離を容易にするとともに緩和によるNOE強度の低下を軽減するものである。今回はアミノ酸選択的プロトン標識タンパク質の調製と評価、今回の高次構造決定法のシミュレーションによる評価を行なったので報告する。

結果と考察

アミノ酸選択的プロトン標識。 アミノ酸選択的プロトン標識の有効性を調べるためにhuman c-Ha-Rasタンパク質(19.4 kDa)を用いて実験を行った。調製したサンプルは次の通りである。

- (1). ILV $\text{FY-}^1\text{H}^2\text{H-background/u-}^{15}\text{N-Ras}$ ($^{15}\text{N-ILV+FY-Ras}$ と略記)。
- (2). ILV-($^1\text{H},^{13}\text{C}$)/ $\text{FY-}^1\text{H}^2\text{H-background/u-}^{15}\text{N-Ras}$ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N-ILV},^{15}\text{N-FY-Ras}$ と略記)。

試料(1)においては, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr (ILV+FYと略称)がプロトン標識され、残りの残基は均一に重水素標識されている。また全ての窒素原子は ^{15}N で標識されている。試料(2)においては, Ile, Leu, Val (ILVと略称)についてはプロトンおよび ^{13}C で標識され、Phe, Tyr (FYと略称)はプロトンのみで標識されている。

上記のサンプルのスペクトルを解析した結果、ILV+FY残基は効率良くプロトン標識されており、かつ他の残基も効率良く重水素標識されていることがわかった。各種NOESYスペクトルを完全にプロトン化された試料で測定したものと比較した結果、(当然のことながら)シグナルの分離は劇的に向上していた。また α プロトンについては、Leu残基については例外的に29%であったが、他の4種の残基については平均として69%が重水素化されていることがわかった。高い α 位の重水素化率は、例えばHCC(CO)NNH, CBCA(CO)NNHなどの測定の感度を上昇させ、ILV残基の帰属を容易にすると期待される。現在、ILV+FY選択的プロトン標識試料について、Ras•GDP, Ras•GMPPNP-RafRBD (32 kDa)の双方の系で解析が進行中である。

構造計算。 実際の測定データを用いて解析を行なう前に、アミノ酸選択的プロトン標識タンパク質についての測定で得られる構造情報を用いて立体構造決定を行った場合、どの程度の精度

で構造が求められるかを評価するために、2種類の構造計算を行って解析を試みた。

第1に、既に構造が決定されているRas•GDPの座標を用い、アミノ酸選択的プロトン標識サンプルで観測されると想定されるNOEを発生させ、構造計算を行った。この場合には全てのNOEは分離されかつ帰属されていることが想定されている。以下の5種のケースで計算を行った。

- (1). アミドプロトン間のNOE($\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$, cut off = 6Å)のみを用いた場合。
- (2). $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$ に加えて、全ての残基の側鎖プロトンと主鎖アミドプロトン間のNOE($\text{NOE}_{\text{SC-HN}}$, cut off = 6 Å)を用いた場合。
- (3). (2)の条件で $\text{NOE}_{\text{SC-HN}}$ のcut offを5 Åにした場合。
- (4). $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$ に加えてILV+FY残基の側鎖と全ての主鎖の間のNOE($\text{NOE}_{\text{ILV-FY-HN}}$, cut off = 6 Å), およびILV+FY残基側鎖プロトン間のNOE($\text{NOE}_{\text{ILV-FY-ILV}}$, cut off = 5 Å)を用いた場合。
- (5). (4)の条件で $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-HN}}$ のcut offを5 Å, $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-ILV}}$ のcut offを4 Åにした場合。

(2), (3)は1試料あたり1種のアミノ酸をプロトン標識したものを20種作成し、測定を行なうことを想定している。(4), (5)はILV+FY選択的プロトン標識を行なったことを想定している。

(1)では平均構造と元の構造の主鎖のRMSD(SA_{AV} vs NMR)が14Å程度と悪いのに対し、(2), (3)では1.0-1.3Åという精度で構造が決定できることがわかった。アミノ酸選択的プロトン標識試料を想定した(4), (5)でも、1.5-2.0Å程度の精度で構造を決定できることを示した。

第2に、Ras•GDPの構造決定に用いたNOEを用い、アミノ酸選択的プロトン標識サンプルで観測されると想定されるNOEを抽出し、高次構造計算を行った。また、同時に $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$ の化学シフトから2次構造を予測し、主鎖の2面角の情報として計算に用いた。さらに、 ^{13}C 標識されていない試料については、側鎖プロトンの帰属が曖昧になる可能性を考慮して、距離情報は曖昧なまま用い、Nilgesの方法[8]を用いて計算を行なった。以下の4種のケースを想定した。

- (1). $\text{u-}^2\text{H/u-}^{15}\text{N-Ras}$ の場合。 $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$ のみを用いる。
- (2). $\text{ILV-FY-}^1\text{H,}^{13}\text{C}^2\text{H-background/u-}^{15}\text{N-Ras}$ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N-ILV+FY-Ras}$ と略記)の場合。 $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$ に加えて、 $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-HN}}$ と $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-ILV}}$ を用いる。NOEの帰属には誤りがないとする。
- (3). $^{13}\text{C}/^{15}\text{N-ILV,}^{15}\text{N-FY-Ras}$ の場合。 $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$, $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-HN}}$, $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-ILV}}$ を用いるが、この内FY残基に関わるNOEは曖昧さを含むものとする。
- (4). $^{15}\text{N-ILV+FY-Ras}$ の場合。 $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$, $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-HN}}$, $\text{NOE}_{\text{ILV-FY-ILV}}$ を用いるが、この内側鎖に関わるNOEは曖昧さを含むものとする。

$\text{u-}^2\text{H/u-}^{15}\text{N-Ras}$ を調製し $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$ を解析することも想定し、人為的なNOEデータを加えた場合についても計算を行なった。

この結果、(1)では主鎖のRMSD(SA_{AV} vs NMR)が13Åと悪く、(2)では2.1Å(1.8Å), (3)では5.0Å(1.7Å), (4)では9.3Å(3.4Å)であった。括弧内は、人為的な $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$ 情報を付け加えた際の計算結果である。計算の結果得られた構造を図に示す。これらの計算の結果、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N-ILV,}^{15}\text{N-FY-Ras}$ や $^{15}\text{N-ILV+FY-Ras}$ についても、Nilgesの方法を用い、かつ $\text{u-}^2\text{H/u-}^{15}\text{N-Ras}$ で帰属した $\text{NOE}_{\text{HN-HN}}$ を構造情報に加えることで、主鎖のRMSDで2-3Å程度の精度で構造を決定できることが明らかになった。

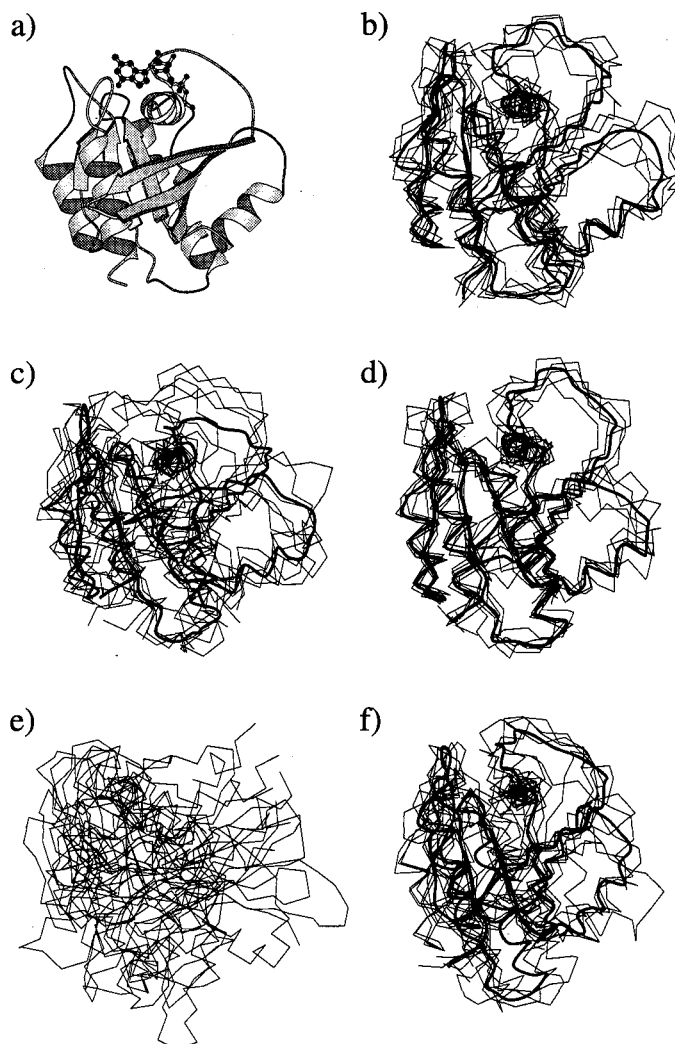


Figure. Solution structures of Ras•GDP. Superpositions of five structures, as well as their mean structure (in bold), after a least squares fit are shown in panels (b) - (f). In each case the backbone, computed using the different restraints sets from the selectively protonated (ILV+FY) proteins, is shown. In panel (a) a schematic representation using Molscript of the structure determined using all the restraints is shown in the same orientation. Panels (b), (c) and (e), show structures computed using Restraints Sets (2), (3), and (4), respectively, obtained from the selectively protonated (ILV+FY) protein samples only; for Restraints Sets (3) and (4), the structures computed with the extra $H_N - H_N$ restraints obtainable from a completely deuterated protein are also shown in (d) and (f), respectively. (Note that in each case only five structures are shown for clarity and that in all cases restraints to the GDP were not included. In (e), the mean structure is not meaningful and is not shown.)

参考文献

- (1) Grzesiek, S. *et al.* (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4369-4370. (2) Yamazaki, T. *et al.* (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 6464-6465. (3) Yamazaki, T. *et al.* (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 11655-11666. (4) Farmer, B. T. and Venters, R. A. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 4187-4188. (5) Nietlispach, D. *et al.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 407-415. (6) Venters, R. A. *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9592-9593. (7) Grzesiek, S. *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9594-9595. (8) Nilges, M. (1995) *J. Mol. Biol.* 245, 645-660.

Ultrafast NMR imaging in inhomogeneous magnetic fields

Katsumi Kose, Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

The pai-EPI (echo-planar imaging) sequence of which data-acquisition time was 66 ms for one 64 x 64 pixel image was implemented on a small-bore high magnetic-field MRI system. NMR images free from geometric distortion were acquired at a high time resolution (250 ms).

<はじめに>

1秒以下の時間で二次元画像データを計測する超高速イメージング法としては、EPI¹⁾とFLASH²⁾が代表的な手法である。しかしながら、物理学や工学の応用においては、1秒程度の計測時間では充分でなく、100ms以下の計測時間が必要とされる場合も多い。このような場合には、これまで、EPIのみが有効な方法であり、乱流や非定常流れの計測などに用いられてきた³⁻⁷⁾。

しかしながら、EPIは、静磁場の不均一性にきわめて敏感であり、このため、非定常流の計測においては、撮像の対象が限られてきた。すなわち、磁化率の分布により誘起される磁場が、被写体の中で様になるような物体(円管、二重円筒など)に適用されてきた。そこで本研究では、静磁場の不均一性に影響されない超高速イメージング法として、EPIにおける磁場勾配反転を180°パルスで行う方法である、いわゆる π -EPI法を試みた。この方法は古くから提案され^{1,8)}、臨床機では、 T_2 を過度に強調した撮像法であるRAREとして知られているが⁹⁾、臨床機におけるRAREではスピン・エコー間の間隔は通常10ms程度以上であるため、100ms以下の時間での撮像例はこれまで全く報告されていない。

<実験方法>

パルス系列としては、Fig.1に示すものを用いた。(a)では、毎回、 k 空間のゼロエンコードのラインから、各エコー独立に位相エンコードを行うのに対し、(b)では、EPIと同じく、トラジェクトリが前回のエンコードの位置から行われる。本質的な違いはないように思われるが、後で述べるように、実際には大きな違いが生じる。

被写体としては、試料①：外径15 mm、内径14 mmのNMR用試験管に、直径6.35mmのテフロン球を入れ、さらに硫酸銅水溶液を深さ18 mm程度まで満たしたもの、試料②：外径15 mm、内径14 mmのNMR用試験管に硫酸銅水溶液と植物油を入れたもの、試料③：外径20 mm、内径18 mmのNMR用試験管に硫酸銅水溶液と

キーワード：NMRイメージング，EPI，超高速イメージング

こせかつみ

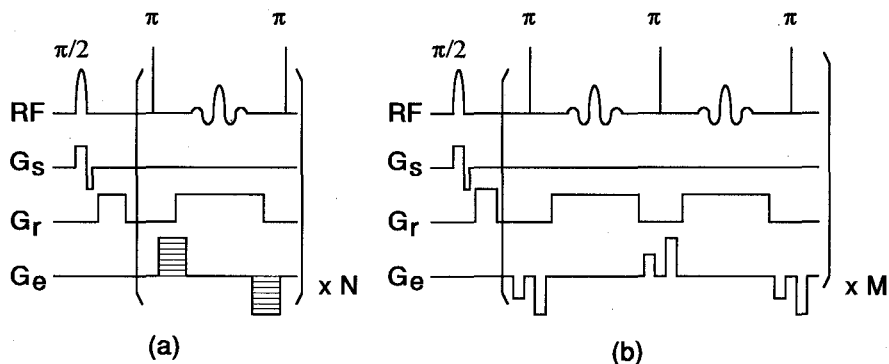


Fig.1 π -EPI sequences used in this study. G_s , G_r , and G_e are gradients for slice, readout, and phase encode. 33 spin-echoes are used for reconstruction of one 64 x 64 pixel image by using Hermitian symmetry of the NMR signal in k space. The periods between 180° pulses are 2 ms.

植物油を入れたもの、の3種を使用した。また試料③においては、上方より、外径12 mm、内径8 mmの亚克力パイプをガイドとして使用して、直径6.35mmのテフロン球を試験管の軸に沿って投入した。

これらの試料を、RFプローブの中に鉛直に挿入し、中心軸を通る鉛直断層面(スライス厚2mm)を、FLASH, EPI, π -EPIの各パルスシーケンスによって撮像した。FLASHでは、繰り返し時間(T_R)を2.2 ms, エコー時間(T_E)を1.8 ms, 信号読み取り時間(T_{DAC})を1.28 ms, EPIでは、 $T_R=250$ ms, $T_E=20$ ms, $T_{DAC}=40.96$ ms, π -EPIでは、 $T_R=250$ ms, $T_E=2$ ms, $T_{DAC}=66$ msとした。いずれの場合も、画像視野(FOV)は19.2 mm x 19.2 mm, 画素数は64 x 64とした。 π -EPIでは、33個のエコーを計測し、k空間における計測データのエルミート対称性を用いて、64 x 64画素の画像再構成に必要なデータを作成した。

撮像に用いた装置は、静磁場強度4.74 Tの鉛直開口径(89 mm)をもつ超伝導磁石(Oxford社製)と、アクティブシールド型勾配コイル付きRFプローブ(Doty社)を用いた、自作のイメージング装置である。

<実験結果>

Fig.1(a)のパルス系列を使用した場合には、特に顕著なアーティファクトは見られず、また、 H_1 の変化や不均一性の影響も少なかった。しかし、Fig.1(b)のパルス系列を使用した場合には、 H_1 の変化や不均一性の影響が極めて大きく、 H_1 の調整が不十分な場合には、stimulated echoによると思われる、画像中央部に発生するライン上のアーティファクトが顕著であった。しかし、いずれの場合でも、磁場勾配のスイッチングに伴って発生する B_0 の時間的变化による核磁化の位相変化を考慮した

上で、CPMGの条件が満たされるように、RFパルスの位相を調整することが不可欠であった。よって以下の結果は、Fig.1(a)のパルス系列を使用したものである。

Fig.2(a)-(c)に、試料①を各方法で撮像した結果を示す。それぞれの計測時間は、140.8 ms, 40.96 ms, 66 msである。EPIで取得した画像では、磁化率の急激な変化により誘起された不均一磁場による画像の変形が著しいが、他の方法で取得した画像では、幾何学的変形はみられない。なお、FLASHでは、磁化の飽和による著しい画像S/Nの低下が見られるが、 π -EPIで取得した画像のS/Nは極めて良好である。

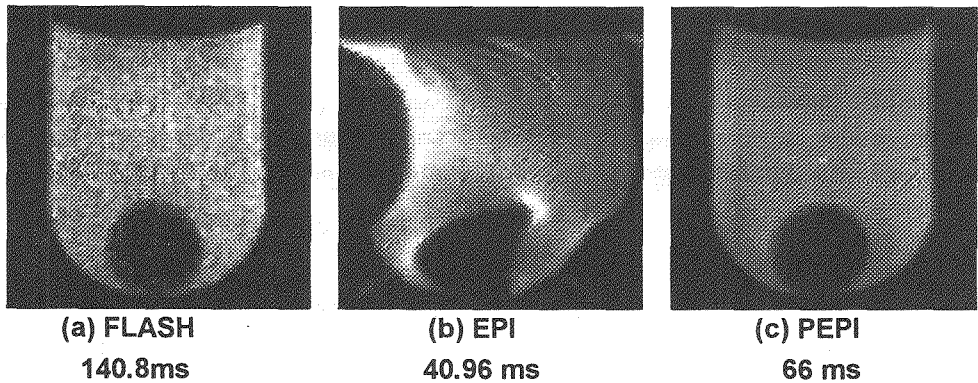


Fig.2 Images of water in a test tube with a teflon sphere at the bottom of the tube taken by (a) FLASH, (b) EPI, and (c) π -EPI sequences.

Fig.3(a)-(c)に、試料②を各方法で撮像した結果を示す。水と植物油の磁化率の差は小さいため、EPIの画像においても、画像の幾何学的変形は少ないが、プロトンのケミカルシフトの差により、植物油のプロトンの画像は、位相エンコード方向に大きくシフトしている。しかしながら、 π -EPIで取得した画像の幾何学的変形はほとんどみられない。

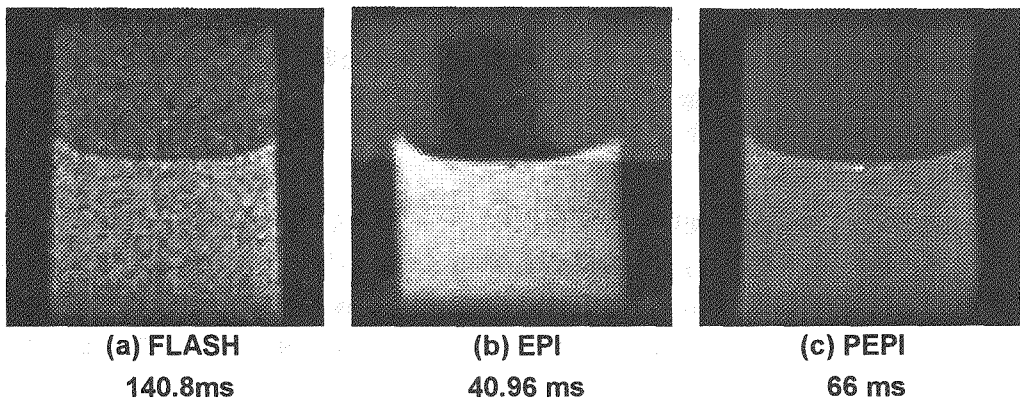


Fig.3 Images of water and oil in a test tube taken by (a) FLASH, (b) EPI, and (c) π -EPI sequences.

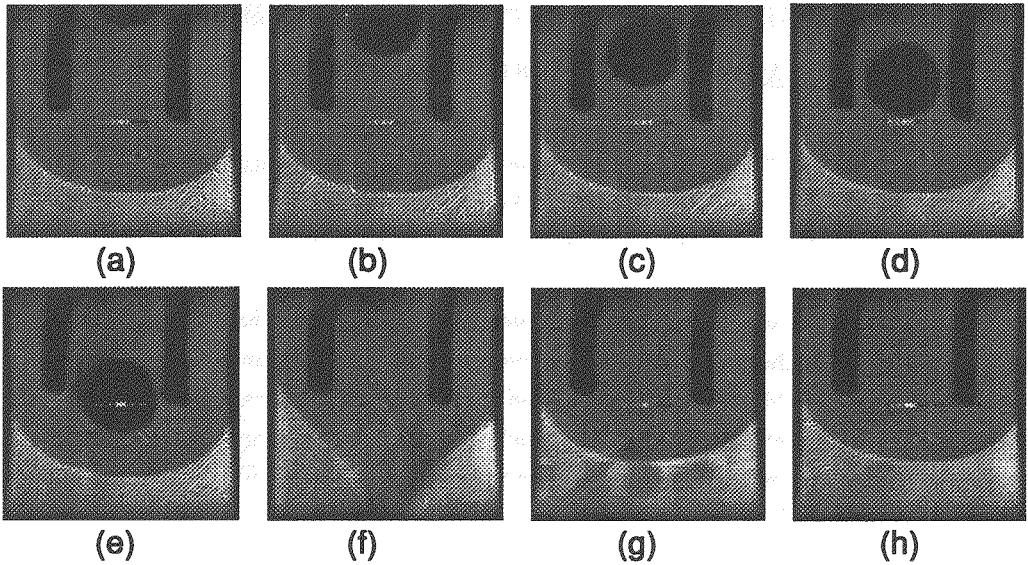


Fig.4 Successive time instants of a teflon sphere sinking through the interface between water and oil in a test tube taken by the π -EPI sequence at 250 ms time-intervals.

Fig.4に、試料③において、水と植物油の界面をテフロン球が沈降していく様子を、 π -EPI法で250msの時間間隔で連続的に撮像した画像を示す。水と植物油のプロトンは大きくケミカルシフトが異なり、またテフロン球と水および植物油とは磁化率が大きく異なるものの、ほとんど幾何学的変形は見られず、界面において、植物油が球体の後流に引きずられて変形している様子が明瞭に捉えられている。

<むすび>

多数の 180° パルスを用いた π -EPIシーケンスを用いることにより、計測時間が100ms以下で、かつ静磁場の不均一性および化学種の分布の影響が少ない手法を実現した。この手法は、複雑な形状をした系や、物質界面など、磁化率の空間分布が急激に変化するような被写体における、非定常な現象の計測に極めて有効な手法であると思われる。

References

- 1) P. Mansfield, *J. Phys. C*10, (1977) L55-58.
- 2) A. Haase, J. Frahm, D. Matthaei, W. Hänike, and K.-D. Merboldt, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 258-266.
- 3) K. Kose, *J. Magn. Reson.* 92 (1991) 631-635.
- 4) K. Kose, *Phys. Rev. A*44 (1991) 2495-2504.
- 5) K. Kose, *J. Magn. Reson.* 96 (1992) 596-603.
- 6) K. Kose, *J. Magn. Reson.* 98 (1992) 599-603.
- 7) K. Kose, *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994) 1467-1470.
- 8) D. N. Guilfoyle and P. Mansfield, *J. Magn. Reson.* 97 (1992) 342-358.
- 9) J. Henning, A. Nauerth, and H. Friedburg, *Mag. Res. Med.* 3 (1986) 823-833.

Current Distribution MRI: Basic Technique for Neuronal Active
Current Distribution Imaging

(Inst. Med. Electronics, Univ. of Tokyo) H.Kamei, K.Iramina and S.Ueno

The present study was undertaken to prove the possibilities of the magnetic resonance imaging for the distribution of neuronal active currents in the brain. Measurement of internal magnetic field deformations caused by an electric current in a sample was performed using a method based on the nuclear magnetic resonance imaging technique. A current dipole 90nAm has been detected with good S/N. The results lend some support to the development of the neuronal active current distribution MRI.

【はじめに】

NMRを利用した脳機能計測技術には差分NMR法, fMRI (機能MRI), MRSなどがある。差分NMR法およびfMRIは脳活動に伴う血流量の変化や血液の酸素化の度合いの変化などを画像に反映させたもので、代謝の間接情報を画像化したものといえることができる。MRSは代謝の直接情報を与えてくれる優れた手法であるが、十分なS/Nの信号が得難いという難点がある。これらNMRを用いた計測技術に対し、SQUID磁束計の開発によって測定可能となったMEG (脳磁図) からは神経活動そのものを反映した情報が高い時間分解能で得られるという大きな利点があるが、形態情報が得られない欠点がある。このため磁場源推定結果をMR画像に投影することが一般的に行われている。

MEGでは誘発磁場源は電流双極子として、数100nAm程度と推定される場合が多い。この程度の大きさの磁場源であれば、高い時・空間分解能を持ったMRI手法を用いることによって、活動電流分布を可視化することが可能であると推測される。そこで、われわれは「活動電流MRI」の可能性を検証するための簡単なモデル実験を行い、良好な結果を得ることができたので報告する。

【電流源】

脳を測定対象に考えた場合、活動電流MRIで観測される電流源はMEGで観測され

キーワード：神経活動MRI、電流分布MRI、脳機能、MRI

かめい ひろたけ、いらみな けいじ、うえの しょうごう

ているものとはほぼ同様な活動電流を想定している。

【測定・試料】

MRIシステムは JEOL GX-270を母体とし、磁場勾配発生系、画像処理系等を付加した試作システムを使用した。プロトン観測周波数：270MHz、磁場勾配：約300mT/m、撮像法：SE、3D-FT(128×128×128)。試料：外径10mmのNMR試料管に水を満たし、その中に底辺が直線（長さ4.5mm）のU字型に折り曲げた絶縁導線を挿入し、これに電流を流した（Fig.1）

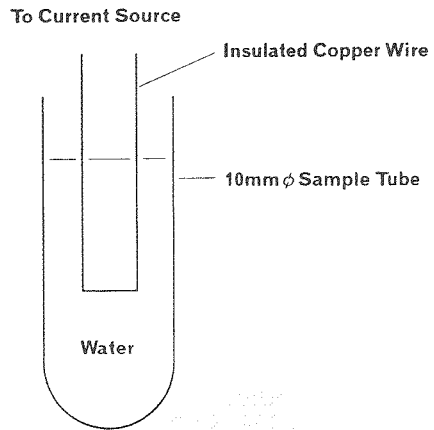


Fig.1. The phantom which was imaged, drawn roughly to scale.

【結果と考察】

ここで示す画像は全て静磁場に対して垂直なスライス面である。無電流、電流印加（電流双極子：450nAm）、およびそれらの画像間の差分画像の例をFig.2に示す。これら銅線を含むスライス面から240 μ m下方のスライス面のものである。電流印加による画像の変化が明瞭に示され、高いS/Nを持った差分画像が得られている。信号強度変化の様子は銅線近傍における投影スペクトルによってより明瞭に捉えることができる。

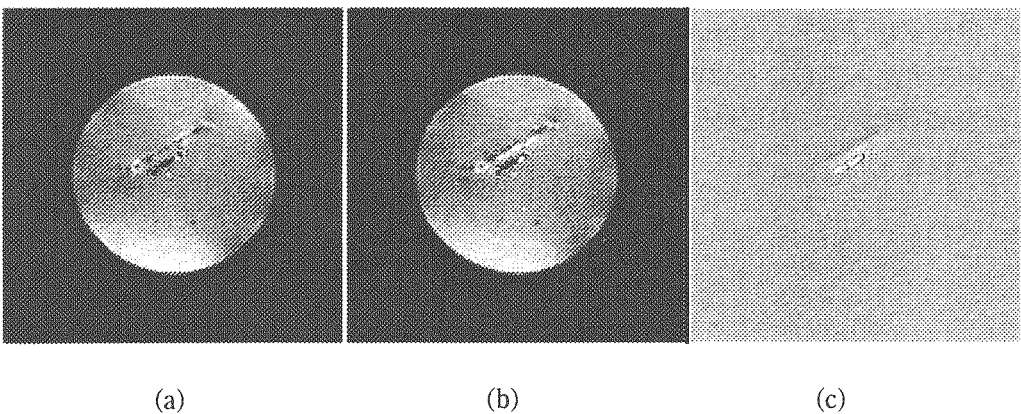


Fig.2. Proton images of a thin transverse section 240 μ m apart from the copper wire. (a)Current off, (b)current on (459nAm), (c)subtraction image ("on" minus "off").

Figure 3 に銅線を含む面, およびそれから上方の240, 120 μm , 下方の120, 240 μm の距離にあるスライス面について銅線近傍の投影スペクトルを示す. 銅線を含む面に対し上下面での信号の反転など予測される通りの変化を示している. Figure 4に電流双極子90nAmのときの差分画像を示す. 電流印加に伴う信号強度変化が明瞭に描出されている.

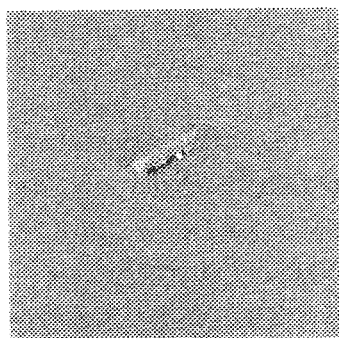


Fig.4. Subtraction image of the phantom with 90nAm current dipole at 120 μm under copper wire level.

【結語】

電流双極子として90nAmまで検出することができた. このことは脳活動電流の空間分布をMR画像として可視化できる可能性を示している.

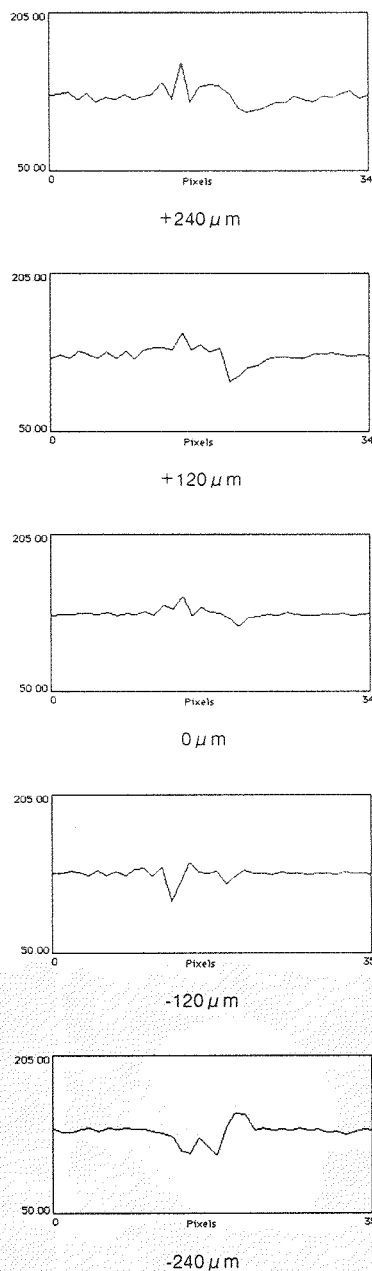


Fig.3. Profile plots of the transverse images at five levels through the phantom with 450nAm current dipole. The level of copper wire is denoted by 0 μm .

著者索引

- (あ)
- 相原雄一 1P40
 相本三郎 3L1
 青柳東彦 3P22
 赤坂一之 1P7
 赤坂一之 1P16
 赤坂一之 1P50
 赤坂一之 1P51
 阿久津秀雄 1L2
 阿久津秀雄 1P1
 阿久津秀雄 1P49
 阿久津秀雄 1P57
 浅川直紀 1P21
 朝倉哲郎 3P21
 朝倉哲郎 3P22
 朝倉哲郎 3P23
 朝倉哲郎 1P63
 浅野敦志 1P33
 安達芳雄 3P12
 安達隆二 3P10
 安部明廣 1P21
 阿部 敦 3P20
 荒田洋治 3L2
 有吉安男 3P48
 安藤 勲 1L4
 安藤 勲 1P2
 安藤 勲 1P21
 安藤 勲 1P30
 安藤 勲 3P18
 安藤 勲 3P44
 安藤慎治 3P18
- (い)
- 飯沼昌隆 1P15
 伊倉光彦 3L4
 池田龍一 1P28
 池田龍一 1P29
 池田龍一 1P38
 伊佐公男 3P24
 石井俊輔 3P56
 石井俊輔 3P58
 石井文明 1P42
 石井文明 1P43
 石井文明 3P19
 石井佳誉 1L1
 石井佳誉 1P6
 石井佳誉 3P46
- (う)
- 石川淳一 3P13
 石黒正路 3P64
 石田信昭 3P40
 石田宏之 1P20
 石野哲也 1P62
 石原康利 3P38
 石原康利 3P39
 石丸臣一 1P28
 石丸臣一 1P29
 石丸臣一 1P38
 板井悠二 3P36
 井田隆史 1P61
 市川代志子 3L5
 伊藤拓宏 3P54
 伊藤允好 1L7
 伊藤正義 3P13
 伊藤 隆 3L8
 伊藤 隆 3P55
 伊藤 隆 3P62
 稲垣冬彦 3P27
 稻倉秀樹 3P16
 井上多門 3P41
 井上多門 3P42
 井上 真 3P54
 猪俣寿典 3P8
 今城精一 3P64
 今城文雄 1P19
 伊良皆啓治 3L10
 入口紀男 3P2
 岩館満雄 3P21
 岩館満雄 3P22
 岩原淳二 1P55
 岩原淳二 3P62
- (え)
- 上垣浩一 1P48
 上口智治 3P61
 上田貴洋 1P39
 上野照剛 3L10
 上野照剛 3P2
 魚住武司 3P62
 鵜澤 洵 3P30
 内海博明 3P28
 内海博明 3P29
 梅原邦之 3P15
- 江口太郎 1P23
 江成政人 3P58
- (お)
- 海老沢計慶 1P32
 恵良聖一 1P47
 恵良聖一 1P58
 恵良聖一 3L6
 恵良田知樹 3P26
 遠藤一央 3P1
 遠藤一央 3P6
- 大内田 調 3P11
 大石 修 3P25
 大鋸敏雄 1P43
 大久保忠恭 1P62
 大久保忠恭 1P49
 大胡 雄 3L7
 大澤匡範 3L4
 大谷敏夫 3P64
 大友崇紀 1P52
 大貫 歩 3P61
 大野進通 1P36
 大野光宏 3P62
 大村友章 1P49
 大村朋彦 1P37
 岡崎恒子 1P55
 岡田明彦 1P18
 緒方一博 3P56
 緒方啓典 1P41
 岡林博文 1P45
 岡林博文 1P46
 岡村恵美子 1L11
 岡本和也 3P38
 岡本和也 3P39
 小川一輝 3P9
 小川秀次郎 3P40
 小川雅弘 1P59
 萩野孝史 3P45
 奥野浩一 3P58
 小椋賢治 3P27
 尾崎拓男 1L5
 尾崎拓男 1P2
 押尾晃一 3P38
 押尾晃一 3P39
 小田正記 3P38
 小田正記 3P39
 小田真弘 1P15
 落合誠二郎 1P40
 女屋博昭 3P36
 小野 明 1P1
 小野 明 1P60

小野 明 3L7
 小野 晶 1P1
 小野 晶 1P60
 小野 晶 3L7
 小野 晶 3P54
 小野嘉夫 1P24

(か)

甲斐莊正恒 1P1
 甲斐莊正恒 1P60
 甲斐莊正恒 3L5
 甲斐莊正恒 3L7
 甲斐莊正恒 3P46
 甲斐莊正恒 3P54
 垣花真人 1P37
 覚知豊次 3P19
 梶 弘典 1P20
 梶 弘典 1P25
 梶 弘典 1P26
 片岡 新 1P60
 片岡 新 3L7
 加藤一夫 1P58
 加藤晃一 3L2
 加藤将樹 1P37
 金折賢治 3P52
 金沢洋子 3P35
 金松知幸 3P38
 金松知幸 3P39
 金子広明 3P3
 金子広明 3P4
 狩野広美 3P40
 上平美弥 1L9
 上平美弥 1P31
 神村耕二 1P51
 亀井裕孟 3L10
 亀田恒徳 1L4
 亀田恒徳 3P18
 鴨 修 1P11
 鴨 修 1P12
 鴨 修 3P28
 河合剛太 1P49
 河合剛太 1P61
 川上 勝 1P50
 川口 謙 3P49
 川瀬泰誉 1P34
 川端 潤 3P47
 川原靖史 3P35
 神戸英宏 1P46

(き)

木川隆則 1P55
 木川隆則 3P54
 木川隆則 3P55
 木川隆則 3P62
 木川隆則 3P63
 菊地 淳 1P63
 北川 進 3P17
 北嶋英彦 3P24
 北村 彩 3P54
 木下隆利 1P44
 金 載一 1P53
 金 載一 3P50
 金 載勲 3P63
 木村敦臣 1L8
 木村一雄 3P49
 木村成輝 1P64
 木村英昭 1L5
 京極好正 1P48
 京極好正 1P52
 京極好正 3L1

(く)

日下義章 3P34
 國 直人 1L8
 国森公夫 3P14
 久保 厚 1P19
 久保 厚 1P5
 久保庭 均 3P61
 熊木康裕 3P28
 熊木康裕 3P29
 黒木重樹 1P2
 黒木重樹 1P21
 黒木重樹 3P13
 黒子弘道 1L4
 黒子弘道 1P21
 黒子弘道 3P18
 黒子弘道 3P44
 黒田仁志 3P56
 黒田義弘 1P59
 桑田一夫 3L6
 桑原大介 1P9
 桑原大介 1P41

(こ)

小池芳雄 3P11
 小泉美香 3P40
 河野俊之 1P53
 河野俊之 3P50

香村正徳 3P48
 古賀憲司 3L2
 越野広雪 3P30
 小柴生造 3P63
 小菅皓二 1P37
 巨瀬勝美 3L9
 巨瀬勝美 3P32
 巨瀬勝美 3P33
 小寺義男 1P53
 小林邦子 3P50
 小林祐次 1P62
 古牧育男 1L6
 小松法人 1P24
 小松博義 1P53
 五味雄一郎 3P43
 近藤 満 3P17
 近藤洋司 3P49

(さ)

斉田 理 3P23
 齋藤公児 1L6
 斎藤公児 1P11
 斉藤 肇 1L9
 斉藤 肇 1P31
 斎藤 肇 1P64
 斎藤 肇 1P65
 斉藤 肇 3P51
 斉藤 肇 3P53
 斎藤もよこ 3P60
 蔡 東玲 1L7
 境野佳樹 1P35
 坂本 博 3P54
 佐久間千勢子 3P61
 櫻井智司 1P57
 佐々木 誠 1L12
 佐々木元子 3P56
 流石園子 1P46
 佐藤一紀 1P53
 佐藤一紀 3P50
 佐藤 一 1P18
 里澤優敏 3P14
 皿井明倫 3P56

(し)

椎名桃子 1P60
 椎名桃子 3L7
 柴田武彦 3L8
 柴田武彦 3P55
 柴田武彦 3P62

嶋田一夫 3L2
 嶋田敬三 1P63
 島田慎治 3P24
 嶋田陽子 3P17
 清水範夫 1P10
 清水秀明 3P31
 清水裕彦 1P15
 清水レナット宣男 1P21
 志村令郎 3P54
 下村泰次 1L2
 莊司 顯 1L5
 莊司 顯 1P2
 莊司 顯 3P9
 田 榮浩 1P52
 田 榮浩 1P62
 白川昌宏 1P48
 白水美香子 3P55
 白水美香子 3P63
 進藤一泰 3L2
 神藤平三郎 3P61
 神藤洋爾 3P24
 榛葉信久 3L2

(す)

末松浩人 1P8
 末松浩人 1P12
 菅瀬謙治 1P1
 杉浦真喜子 1L7
 杉沢寿志 1L5
 杉沢寿志 1P8
 杉沢寿志 1P11
 杉沢寿志 3P23
 杉沢寿志 1P24
 鈴木榮一郎 3P48
 鈴木範男 3P60
 須藤 誠 1P13

(せ)

瀬尾芳輝 3P26
 瀬尾芳輝 3P34
 瀬尾芳輝 3P37
 瀬戸治男 3P20

(そ)

曾我部啓介 1P44
 曾我美 勝 1P47
 曾我美 勝 1P58

(た)

高木達也 3P5
 高久 洋 3P54
 高島浩幸 1P62
 高橋一朗 3P24
 高橋征三 3P45
 高橋禮子 3L2
 高橋栄夫 3L2
 高橋義朗 1P15
 高宮尚武 3P34
 高山俊夫 3P11
 武井次郎 3P57
 竹内誉羽 3P26
 竹腰清乃理 1P3
 竹腰清乃理 1P4
 竹腰清乃理 1P17
 竹腰清乃理 1P33
 武田和行 1P3
 武田 定 1P41
 武田直登 1L4
 武田佳宏 3P54
 田崎 明 3P26
 橋 和夫 1L12
 楯 真一 1P60
 楯 真一 3L5
 楯 真一 3L7
 田中作弥 1P27
 田中俊之 3L4
 田中俊之 3P64
 田中彬嗣 3P35
 田中良二 1P12
 谷川 潤 3L4
 谷口維紹 1P48
 田林一晃 1P7
 田村 充 1P10

(つ)

塚田裕三 3P38
 塚田裕三 3P39
 塚原智典 1P53
 辻 暁 1L9
 辻 暁 1P31
 辻 暁 1P64
 辻 暁 1P65
 辻 暁 3P51
 辻 暁 3P53
 辻田義治 1P44
 津田 栄 3L3
 津田喜典 3P24

都築幹生 3P24
 堤 耀広 1P34
 堤 耀広 1P35
 堤 耀広 1P36
 堤 耀広 1P42
 堤 耀広 1P43
 津野久幸 1P11

(て)

出口健三 1L5
 手塚智子 1P16
 手塚智子 1P51
 出村 誠 3P21
 出村 誠 3P22
 出村 誠 3P23
 寺尾武彦 1P19
 寺尾武彦 1L1
 寺尾武彦 1P3
 寺尾武彦 1P4
 寺尾武彦 1P5
 寺尾武彦 1P6
 寺尾武彦 1P17
 寺尾武彦 3P46
 寺沢宏明 3P27
 寺田 透 3L8
 寺田 透 3P55
 田 榮浩 3P52

(と)

土居信英 1P36
 土井幹雄 3P36
 土井祥寛 3P35
 戸澤秀樹 1P53
 朽尾豪人 3L1

(な)

内藤 晶 1L9
 内藤 晶 1P31
 内藤 晶 1P64
 内藤 晶 1P65
 内藤 晶 3P51
 内藤 晶 3P53
 中井利仁 1P9
 中井利仁 1P22
 中井利仁 3P41
 中井利仁 3P42
 永井直樹 1P47
 中川照眞 1P59
 中越雅道 3P29

(3)

中沢賢一	3P56	馬場雄久	3P15	堀井文敬	1P25
中沢賢一	3P58	馬場俊秀	1P24	堀井文敬	1P26
中辻博	3P3	林繁信	1P39	堀内敬三	1P29
中辻博	3P4	林繁信	3P14	堀住輝男	1P49
長土居有隆	3P58	早水紀久子	1P40	堀由美子	3P22
中西真	1P37	原園としえ	3P10	本多尚	1P28
中原勝	1L11	原田久士	1P48		
中村亘男	1P23	春吉真樹	3P24		(ま)
中村春木	3P56	半田徳子	3P54	前川利男	3P58
中村春木	3P61			前田史郎	3P24
中谷昭典	3P15		(ひ)	前田忠計	1P53
中山尋量	1P23	樋岡克哉	1P8	政池明	1P15
那須裕郷	1P59	引地邦男	3P60	正木春彦	3P62
榑崎美智子	3P35	日元徹	3P28	舛本寛	1P55
		平沖敏文	1P34	間瀬年康	3L4
(に)		平沖敏文	1P35	松井茂	3P41
新居嗣朗	1P42	平沖敏文	1P36	松井茂	3P42
新留琢郎	3P22	平沖敏文	1P54	松浦慎	1L6
西川和義	1P27	平尾浩一	1P6	松岡三良	1P58
西丸直子	3P59	平間正博	3P64	松川真吾	1P30
西村勝之	1L9	平山智昭	1P34	松坂裕之	3P17
西村勝之	3P51			松田弘喜	3P8
西村善文	3P56	(ふ)		松田弘喜	3P15
西村善文	3P58	福井洋之	3P7	松波成行	3P19
西山裕介	1P19	福井洋之	3P8	松森信明	1L12
西山裕介	1P5	福井洋之	3P15	丸山季浩	3P49
仁木国雄	3P16	福岡美香	3P43		(み)
新田勝利	1P36	福士江里	3P47	三浦宏一	3P8
		福田純子	3P64	三浦宏一	3P15
(の)		福谷章	1L9	水越利巳	3P48
野坂篤子	1P62	福永康弘	3P41	水谷高彰	1P2
野坂篤子	3P52	藤原敏道	1L2	水野猛	3P61
野田陽子	3P35	藤原敏道	1P1	溝口泰	3P22
野中正幸	3P41	藤原敏道	1P57	三森文行	3P36
野中正幸	3P42	藤原英明	1L8	宮川泰	1P35
野々村太郎	1L12	藤原英明	3P5	三宅洋子	3P46
野村薫	1P4	藤原靖弘	1P59	宮島清一	1P22
		降旗一夫	3P20	宮島清一	1P41
(は)		古井淳一	1P48	宮島清一	3P25
拝師智之	3P32	古井淳一	3L1	宮野敏男	1P37
拝師智之	3P33	古莊久見子	3L2	三好利一	1P17
蓮田勝美	1P62	古谷利夫	3L4		
畠山盛明	1L6	古屋秀峰	1P21		(む)
波田雅彦	3P3			棕野邦子	1P27
波田雅彦	3P4	(ほ)		武藤裕	3P54
服部憲和	1P45	細井信造	3P24	武藤裕	3P62
服部峰之	3P31	細野和美	3P54	村上政隆	3P34
馬場雄久	3P7	堀田芳生	3P44	村田道雄	1L12
馬場雄久	3P8	堀井文敬	1P20		

室 文人	1P27	吉野明広	1P46	Kupce E.	2L6
		吉水広明	1P44	Laue E. D.	3L8
(め)		吉村一良	1P37	Laue E. D.	3P55
目黒芳朗	1P59			Lehmann V.	3P34
		(わ)		Leisen J.	1P56
(も)		若井千尋	1L11	Luz Z.	1L3
持田智行	1P41	和田昭盛	1L7	McDermott A.	1P32
森田徹一郎	3P30	渡辺公綱	1P49	Navon G.	3P37
森 輝雄	3P10	渡辺公綱	1P61	Nietlispach D.	3L8
守谷哲郎	3P31	渡部 暁	3P54	Oschkinat H.	3L8
		渡部徳子	1P56	Pines A.	2L2
(や)		渡部徳子	3P10	Price W. S.	1P14
矢沢道生	1P54	渡辺尚彦	3P43	Raine A.	3L8
柳井莊緑	3P59	渡邊英宏	3P38	Reichert D.	1L3
柳沢 勝	1P40	渡邊英宏	3P39	Remenyi A.	3P57
薮崎 努	1P15			Schneider H.	1L3
山内一夫	1P18	(A~Z)		Sharf Y.	3P37
山口絵美	3L 5	Afonin A. A.	3P5	Shinar H.	3P37
山口 悟	1P65	Akasaka K.	1L10	Slichter C. P.	2L1
山口芳樹	3L2	Aramini J.	1P54	Smith B. O.	3L8
山腰良晃	1P13	Ballard C. C.	3P3	Spaniol T. P.	1P5
山崎亜紀	3P44	Ballrad C. C.	3P4	Swindells M. B.	3L4
山崎俊夫	1P48	Ben-Tovim L.	3L8	Sykes B. D.	3L3
山崎俊夫	1P52	Bowtell D.	3P63	Takahashi S.	1L10
山崎俊夫	3L1	Brenneman M.	2L4	Teichmann S.	3L8
山崎俊正	3P61	Brian O. S.	3P55	Tian F.	2L4
山田和廣	3P59	Broadhurst R. W.	3L8	Vashchenko A.V.	3P5
山田 整	3P26	Caprihan A.	3P32	Vogel H.	1P54
山田博明	1P16	智 勝煜	3P54	Williamson M. P.	1P63
山田博昭	1P27	Conroy M. J.	1P63	Williamson M. P.	3P21
山田博明	1P51	Cross T. A.	2L4	Yannoni C. S.	2L3
山本京之介	3P1	Dempsey C.	3P57	沈 伊民	1P26
山本京之介	3P6	Dubovskii P.	1L10	Zick K.	3P34
山本泰彦	3P65	Freeman R.	2L6		
		Fukushima E.	3P32		
(よ)		Gagne S. M.	3L3		
横田絵美子	1P18	Gersonde K.	1P56		
横田 博	3P24	Gross D.	3P34		
横山茂之	1P55	Gu T.	1P32		
横山茂之	3L8	Harding R.	1P23		
横山茂之	3P54	Heaton B. T.	1P23		
横山茂之	3P55	Hill H.	2L5		
横山茂之	3P62	Hua L.	1L10		
横山茂之	3P63	Hunter C. N.	1P63		
吉岡敬太郎	3P59	Jonathan A. C.	3P55		
吉岡 大	3P36	Kelly M.	3L8		
吉田健一郎	3P64	Ketchem R. R.	2L4		
吉田尚弘	1P29	金 仁美	3P54		
吉野明広	1P45	Kovacs F.	2L4		

キーワード索引

2次モーメント	3P41
2次元NMR	3P24
2次元NMR	3P64
2次元固体NMR	1P1
2D- ¹ H-NMR	1L10
3次元NMR	3L3
3次元構造決定	3P51
3D-HMBC	3P20
χ-アングル	1P60

(A)

AFM	2L3
Alイオン	3P15
amplitude modulated irradiation	1P3
Aptotoxin	3P50
ATP	1P57

(B)

BIS-NIPAゲル	1P11
broadband decoupling	2L6
BSA	1P47

(C)

¹¹³ CdNMR	3P11
¹³ C- ¹³ C双極子相互作用	1P1
¹³ C- ³¹ P双極子相関法	1P57
¹³ C CP/MAS	1P17
¹³ C NMR	1L11
¹³ C NMR	1P19
¹³ C NMR	1P40
¹³ C NMR	1P44
¹³ C化学シフト	1P22
¹³ C固体高分解能NMR	1P21
¹³ C-MRS&I	3P38
¹³ CNMR	1P35
¹³ C _α および ¹³ C _β 化学シフト 二面角依存マップ	3P21
C-1027	3P64
c-Myb	3P56
Ca結合蛋白質	1P54
Carbonaceous Solid	3P12
CD	1P47
Cell-associated water	3P40
CENP-B	1P55
CH _{4-n} X _n	3P1

Chemical Shift Anisotropy	1P26
chemical shift perturbation	3P55
condensed matter	2L1
CONOESY	3P30
Coordinated D ₂ O Dynamics	1P29
coordinated histidyl imidazole	1P49
CP/MAS	1P43
CP/MAS ¹³ C NMR	1P20
CP/MAS ¹³ C NMR	1P26
CP/MAS NMR	1P25
CP/MAS NMR	3P12
CRAMPS	1L6
CRE結合蛋白質	3P58
CTI	3P34

(D)

[D-Ala ²]Met-enkephalin	1L8
Darwin項	3P4
deflect構造	3P19
DEPT	1P11
Diffusion-weighted image	3P40
dipolar recoupling	1P3
DMS	1L3
DNA	1P60
DNA	3L7
DNA結合蛋白質	1P48
DNA結合領域	3P56
DNMR	1P38
DOR	1P9

(E)

E.COSY	3P60
E-HSQC	3P47
editing	3P47
Enkephalin	3P51
EPI	3L9
EPR	2L3
exchange experiments	1L3

(F)

¹⁹ F	3P35
¹⁹ F- ¹³ C双極子結合	1P22
¹⁹ F NMR	1P40
¹⁹ F観測 ¹ Hデカップル	1P8
¹⁹ FNMRスペクトル	1P42
ferromagnet	1P39
folding	1L10

fusion	1L10		(J)	
				$^3\text{J}(\text{H}_\text{N}-\text{C}_\beta)$ 3P60
	(G)			$^3\text{J}(\text{H}_\text{N}-\text{H}_{\text{C}\alpha})$ 3P60
GOESY	3P29			JC-H 1L7
gradient	1P14			
			(L)	
	(H)			LECラット 3P36
^1H CRAMPS	1L5			^{39}K -NMR 1P56
^1H NMR	1P40			^7Li NMR 1P40
^1H NMRイメージング法	3P44			^7Li Solid NMR Spectra and T_1 1P28
^1H 化学シフト	1L5			lone pair 3P5
^1H 観測法	3P38			longitudinal relaxation radiation damping 1P14
^1H -NMR	1P45			
^1H -NMR	1P46			
^1H -NMR	1P47		(M)	
^1H -NMR化学シフト計算	1P63			MAS 1L3
^1H MSNMR	1P24			MAS 1P3
^2H labeling	3L1			MAS 1P8
^2H 標識	3L8			MAS 1P9
^2H -NMR	1P35			MAS-NMR 1P11
^2H -NMR	1P36			Mass velocity項 3P4
^2H -NMR	1P59			melittin analogues 3P57
^2H -NMR	1P7			membrane 1L10
H-NS蛋白質	3P61			membrane leakage 3P57
HETLOC	3P60			Mesophase Pitch 3P12
high gas pressure	1P17			Modulation 1L1
high-resolution NMR	2L6			Molecular Motion 1P26
HIV-2	1P53			MRI 3L10
HMBC	3P20			mSos1 3P63
HMQC-CONOESY	3P30			multiheme protein 1P49
holo-NCS	1P62			
HR-MAS	1P18		(N)	
HSA	1P47			^{15}N relaxation 1P52
HSQC	3P38			^{15}N Solid NMR Spectra and T_1 1P28
human calcitonin	3P52			^{15}N 化学シフト 3P9
hydrogen halides	3P3			^{15}N -NMR 1P41
				^{23}Na NMR 1P44
	(I)			N \rightarrow B転移 1P47
Imaging	2L3			N,N'-ジメチルアクリルアミドゲル 1P30
in situ amide exchange analysis	3P57			n-アルカン 3P16
in vivo	3P38			Na^+ チャンネル 1P59
in vivo NMR	3P45			NCp8 1P53
in vivo 測定	3P35			NMAS 1L8
interaction surface	3P55			NMR 1P16
intramolecular interaction	3P5			NMR 1P53
Ionic Plastic Crystal	1P28			NMR 2L3
				NMR 3L1

NMR	3L2		
NMR	3L4		
NMR	3P28		
NMR	3P5		
NMR	3P50		
NMR	3P61		
NMRイメージング	3L9		
NMRイメージング	3P32		
NMRイメージング	3P33		
NMRイメージング	3P36		
NMRケミカルシフト	3P1		
NMR化学シフト	3P21		
NMR化学シフト	3P4		
NMR線形	1P29		
			(Q)
		Quadrupole coupling constant	1P28
		quantum-chemical calculation	3P5
			(R)
		R2TR法	1P4
		Raf	3P55
		Ras	3P55
		Ras-binding domain	3P55
		REDOR	3P51
		redox potential	1P49
		ribonucleaseA	1P50
		relativistic effect	3P3
		RNA	1P60
		RNA	3L7
		RNA結合タンパク質	3P54
		ROESY/MAS	1L8
			(S)
		S4	3P49
		sensitivity	2L5
		SFR	3P3
		Sideband Pattern	1P26
		SiH-C≡C-系ポリマー	3P13
		Si ₄	3P6
		Simulation	3P40
		SiX ₄	3P1
		SO	3P4
		SO-UHF	3P3
		SO-UHF	3P4
		solids	2L1
		solid state	1L3
		solid state NMR	1P3
		solution structure	3P57
		spacerの効果	1P45
		spin-orbit interaction	3P3
		SSI	3P46
		superconductive	2L5
			(T)
		transcription factor contact	1P52
		tRNA	1P61
		Two-Site Exchange Model	1P26
			(U)
		Ultra Highspeed MAS	3P12
		UP element	1P52
			(O)
¹⁷ O	1P2		
O-ROESY	3L6		
Obstructionモデル	3P43		
off-resonance	3L6		
oligosaccharide	3P47		
			(P)
³¹ P同種核双極子相関法	1P57		
³¹ P-NMR	1P57		
³¹ P-NMRスペクトロスコピー	3P59		
P(VDF/TrFE)	1P43		
Pb ₂	3P6		
pb-207	1P54		
peptide	1L10		
peptide	3P47		
PFG	3P28		
PFG	3P29		
PFG-NMR	3P43		
PFGSTE-NMR	1P56		
Phase Mapping法	3P39		
PHdomain	3P63		
poly(di- <i>n</i> -butylsilane)	1P25		
polymer	1L3		
polymer	1P17		
polysaccharide	3P30		
probe	2L5		
protein	1P14		
pseudoenergy解析	1L8		
pulsed NMR	2L1		
Pulse gradient stimulated-echo法	3P40		

	(V)		(う)	
vicinal結合定数		1P45	運動性	1P24
	(W)		運動性	1P65
water suppression		1P14	運動性	3P44
WLF式		1P33	(え)	
	(X)		エチレンアイオノマー	1P44
X線構造解析		3P17	エネルギー基質	3P59
	(Y)		エンケファリン	1P31
⁸⁹ Y-MAS NMR		3P10	液晶	1P5
⁸⁹ Y-static NMR		3P10	液晶	1P7
Y ₂ O ₂ S		3P10	液晶	3P25
Y ₂ O ₃		3P10	液晶性高分子	1P20
Y ₃ Al ₅ O ₁₂		3P10	遠隔C-Hスピン結合定数	1L12
YBCO		1P37	(お)	
	(Z)		オーダーパラメーター	1P19
zinc finger motif		1P53	オーダーパラメーター	3L3
	(あ)		オートサンプルチェンジャ	1P13
アポミオグロビン		3P65	温度ジャンプNMR	1P50
アンチコドンアーム		1P61	温度依存性	3P16
アンフィジノール		1L12	温度依存性	3P39
アンフォールディング中間体		1P50	温度係数	3P52
圧力ジャンプ		1P16	温度計測	3P39
安定同位体ラベル		3P23	温度測定	1P12
安定同位体標識		1L2	(か)	
安定同位体標識		1P1	カネマイト	3P14
安定同位体標識		1P61	ガラスプレート	3P22
安定同位体標識		3L2	カルモデュリン・W-7複合体	3L4
安定同位体標識		3L7	回転異性状態近似	1P21
安定同位体標識		3P54	回転座標系	3P31
安定同位体標識法		1P60	化学シフト	1L9
	(い)		化学シフト	3P7
イオン会合体		1P44	化学シフトテンソル	1L4
イミノプロトン		3P54	化学シフトテンソル	3P18
イメージコントラスト		3P42	化学シフト異方性	1P25
イメージング		3P31	化学シフト異方性	1P54
インターカレーション		1P38	化学シフト画像	3P35
異種核間longrange J		3P28	化学合成	1P64
異種核多次元NMR		1P62	拡散係数	3P25
遺伝暗号		1P61	拡散係数	3P43
異方性化学シフト		1P42	拡散係数測定	1P30
異方性測定		1L1	角度依存性	1P42
			加水分解	1P46
			画像再構成	3P32
			画像再構成	3P33

活性化体積	1P27	コンホメーション	3P9
完全緩和行列法	3L6	コンホメーション変化	1P45
環状ペプチド	3P60	交差緩和	1L7
環電流効果	3P21	交差緩和	1P43
緩和解析	3P48	交差緩和	1P58
緩和時間	3L5	交差分極	3P42
緩和時間	3P52	光合成	1P63
緩和時間測定	1P30	広帯域反転パルス	3P27
緩和時間測定	1P32	構造	1L4
肝	3P36	構造	3P50
肝細胞癌	3P36	構造解析	1P37
		構造解析	1P4
		構造解析	1P53
		構造解析	1P61
		構造解析	1P64
		構造解析	3L3
		構造解析	3P11
		構造解析	3P24
		構造解析	3P58
		構造解析	3P61
		構造解析	3P62
		構造計算	1P32
		高エネルギー磷酸	3P59
		高圧	1P16
		高圧NMR	1P27
		高圧NMR	1P51
		高温	1P24
		高温超伝導	1P37
		高次構造	1P55
		高次構造	1P65
		高次構造	3P53
		高次構造解析	3L8
		高速MAS法	1P2
		高分子ゲル	3P44
		高分子成分	3P45
		合成高分子	1P18
		固相合成	3P48
		固体 ¹⁰⁹ Ag NMR	3P17
		固体 ² H-NMR	1P34
		固体NMR	1P29
		固体NMR	1P31
		固体NMR	1P32
		固体NMR	1P5
		固体NMR	1P6
		固体NMR	1P8
		固体NMR	3P13
		固体NMR	3P14
(き)			
絹タンパク質	3P23		
距離情報	1P1		
距離測定	3P46		
強誘電性	1P41		
強誘電の相転移	1P42		
強誘電の相転移	1P43		
局所構造解析	3P46		
局所励起	3P38		
極低温CP/MAS NMR	1P41		
金属イオン	3P53		
金属クラスター	1P23		
銀(I)錯体	3P17		
(く)			
クロモフォア	1P62		
クロモプロテイン	3P64		
鎖状構造	1L12		
(け)			
ゲル	1P56		
欠失変異体	3P61		
結合角	1P4		
結晶多形	1P31		
結晶多形	1P32		
検出感度	3P2		
検出器	1P10		
原がん遺伝子産物	3P56		
原子間距離測定	3P51		
(こ)			
コリシン	3P62		
コレステリック液晶	1P19		
コンホメーション	1L5		
コンホメーション	1P21		

固体NMR	3P18	試料温度	1P12
固体NMR	3P22	信号雑音比	3P2
固体NMR	3P23	神経活動MRI	3L10
固体イメージング	3P34		
固体イメージング	3P41	(す)	
固体イメージング	3P42	スピニングサイドバンド	1P9
固体ペプチド	1L4	スピン-格子緩和	1P39
固体構造	1L5	スピン-格子緩和時間	1P20
固体構造	1P20	スピンエコー	1L9
固体高分解能 ¹³ C-NMR	1P65	スピン拡散	1P39
固体高分解能NMR	1L9	スピン拡散	3P23
固体高分解能NMR	1P23	スピン軌道効果	3P1
固体高分解能NMR	1P33	スピン軌道効果	3P6
固体高分解能NMR	1P64	スピン結合定数	3P8
固体高分解能NMR	3P24	スペクトル	1P2
固体高分解能NMR	3P51	スペクトル密度	3L3
固体高分解能NMR	3P53	スメクタイト	1P38
固体高分解能NMR	3P9	水性状	1P58
固体二次元NMR	1P25	水素-重水素交換反応	1P46
固体電解質	1P40	水素間距離	1L7
骨組織	3P34	水素結合	3P18
混成遷移フィルター	3P26	水溶液ミセル	1P46
	(さ)		(せ)
再構成脂質二重層	3P22	ゼオライト	1P24
錯化合物	1P29	石炭	1L6
酸素17	1P10	繊維化	3P52
	(し)	選択的ラベル	3P48
ジェン鉄カルボニル錯体	1L7	選択的緩和法	1L7
ジスルフィド結合	3P50	遷移独立分離フィルター	3P26
ショウジョウバエ	3P54		(そ)
脂質膜	1P59	双極子相関	1L2
脂質膜	1P64	双極子相互作用	1L9
磁気異方性効果	3P21	双極子相互作用	1P6
磁場依存性ケミカルシフト	3P6	双極子相互作用	3P46
磁場勾配	3P25	層間イオン	3P14
磁場勾配パルス	3P30	層状ケイ酸塩	3P14
重水素NMR法	3P19	層状ペロブスカイト	1P39
重水素ロック	1P18	相互作用	3P62
重水素化ポリエチレン		相対性効果	3P7
テレフタレート	1P35	相対立体配置	1L12
重水素化マレイン酸-		相転移	1L11
スチレン交互共重合体	1P36	疎水性ポケット	3P64
植物組織	1P58	疎水性相互作用	3L4
触媒	1P24		
常磁性イオン	3P44		

	(た)		(に)	
ダイナミクス		1L11	二軸性	1P22
ダイナミクス		1P23	二重共鳴	3P25
タンパク質		1P51	二面角	1L2
タンパク質		3L8	乳酸	3P59
タンパク質のフォールディング		3P65	二量子フィルター	3P37
タンパク質の変性		3P65	二量体液晶	1P21
体積磁化率		1P5		
多次元NMR		1P55	(ぬ)	
多次元NMR		3L7	ヌクレアーゼ	3P62
多次元NMR		3P27		
多次元NMR		3P58	(ね)	
多次元NMR		3P63	ネオカルチノスタチン	1P62
多次元固体NMR		1L2	熱硬化構造	3P13
多次元固体NMR法		1P4	熱変性	1P50
多重共鳴多次元NMR		1P48	粘土鉱物	1P38
多量子遷移フィルター		3P26		
蛋白質		3L3	(の)	
蛋白質とDNAの相互作用		1P55	脳機能	3L10
蛋白質運動性		3L5	脳組織	3P45
	(ち)		(は)	
秩序パラメータテンソル		1P22	パウダーパタン	3P11
超高速イメージング		3L9	バクテリオロドプシン	1P64
直流電場		3P44	バクテリオロドプシン	1P65
	(て)		バクテリオロドプシン	3P53
デカップリングパルス		3P39	バラシクロファン	1P27
デキストラン		1P56	バラテルフェニル	1P15
転写活性化ドメイン		3P58	パルス磁場勾配法	3P37
電子相関効果		3P8	パルミチン酸	1P59
電流分布MRI		3L10	配向	1P7
	(と)		配向	3P22
トランス・ゴーシユ形態変化		1P43	配向	3P23
糖タンパク質		3L2	配向秩序度	1P21
動的核偏極		1P15	半経験的分子軌道法	3P19
動的構造		3P56	反強誘電性液晶	1P22
動的立体構造		3L2		
同位体フィルター		3P27	(ひ)	
同位体標識		3L5	ビシナル結合定数	1P46
導電率		3P2	ヒドリド	1P23
	(な)		光エネルギー捕獲	1P63
ナトリウムチャネル		3P49	光ファイバー温度計	1P12
ナフタレン		1P15	表面	1P5
			(ふ)	
			部位特異的アミノ酸置換	3P54
			複合体	3P56

分極移動	1P10	末梢神経	3P37
分子運動	1P25		
分子運動	1P29	(み)	
分子運動	1P33	ミオグロビン	3P65
分子運動	1P34	マイクロ構造	1L11
分子運動	1P35	ミセル	1P45
分子運動	1P36	ミセル	3P49
分子拡散	1P19	水の拡散	1P56
分子拡散	3P29	水プロトン化学シフト	3P39
分子間相互作用	3P16	水分子	3P37
分子鎖形態	1P42		
分子内水素結合	3P65	(も)	
		モネリン	3P48
(へ)			
ペプチド	1P2	(や)	
ペプチド	3P18	薬物動態	3P35
ペプチド	3P49		
ペプチド	3P50	(よ)	
ペプチド-Cd錯体	3P11	溶媒和	3P15
ヘリックス	3P49	溶媒和平衡	3P15
ベンゾカイン	1P59	緩和時間	1L9
ペンタセン	1P15	四極子核	1P9
変性	1P51	四極子相互作用	1P7
(ほ)		(ら)	
ポリ (フェニルアセチレン-d ₁)	3P19	ラジオ波磁場勾配	3P31
ポリアクリル酸ゲル	1P30	ラット脳スライス	3P59
ポリウレタン	1P20		
ポリエチレングリコール	1P30	(り)	
ポリグリシン	1P34	リアルタイム	3P32
ポリペプチド	1L5	リアルタイム	3P33
ポリペプチド	3P9	リボソーム	3P62
芳香環化クロモフォア	3P64	リン31	1P10
芳香族溶媒	3P16	リン脂質リボソーム	1L11
飽和移動	3P45	立体構造解析	1P48
膨潤状態	1P18	立体構造解析	3L4
		立体構造決定	3P63
(ま)		流体計測	3P33
マイクロイメージング	1L6	量子化学計算	1L4
マイトトキシン	1L12	量子化学計算	3P18
マウス	3P35	隣接アミノ酸効果	3P9
マジックエコートレイン	3P41		
マジック角試料回転	1L2	(れ)	
マジック角試料回転	1P1	レーザー	1P15
膜タンパク質	1P63		
膜ペプチド	3P22		
膜蛋白質	3P53		

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
Mohammad M. Billah	工業技術院 生命工学工業技術研究所 生体物質部 生体物質化学研究室 〒305 つくば市東1-1	billah@nibh.go.jp	0298-54-6136	0298-54-613
Timothy A. Cross	National High Magnetic Field Lab 〒 1800 E. Paul Dirac Dr. Tallahassee, FL 32306	cross@magnet.fsu.edu	904-644-0917	904-644-136
David Doty	Doty Scientific, Inc. 〒 700 Clemson Road Columbia, S.C. 29223 USA	david@doty.usa.com	803-788-6497	803-736-545
Judy Doty	Doty Scientific, Inc. 〒 700 Clemson Road Columbia, S.C. 29223 USA	judy@doty.usa.com	803-788-6497	803-736-545
Ray Freeman	Department of Chemistry University of Cambridge 〒 Cambridge CB2 1EW UK	rf110@cus.cam.ac.uk	01223-336450	01223-33631
Ciliro Garcia Martinez	物質工学工業技術研究所 〒305 つくば市東1-1	garcia@nimc.go.jp	0298-54-4525	0298-54-452
Howard Hill	Varian NMR Instruments 〒 3120 Hansen Way, Palo Alto, CA94304 USA	howard.hill@nmr.varian.com	415-424-5428	415-424-467
Waelchli Markus	日本ブルカー(株) アプリケーション部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	mrw@bruker.co.jp	0298-52-1235	0298-58-032
Pae Il-Han	東京都立大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒192-03 八王子市南大沢1-1	pae@kataoka.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-252
Alexander Pines	Chemistry Department University of California 〒 Berkeley, CA 94750 USA	pines@cchem.berkeley.edu	510-642-1220	510-486-572
William S. Price	機能水研究所 〒305 つくば市千現2-1-6	wprice@wri.co.jp	0298-58-6186	0298-58-612
Detlef Reichert	Martin-Luther-University of Halle Department of Physics 〒 Friedemann-Bach Platz 6 06108 Halle Germany	reichert@physik.uni-halle.d400.de	+49-345-37761	+49-345-552
German Sandakov	物質工学工業技術研究所 〒305 つくば市東1-1	german@nimc.go.jp	0298-54-4525	0298-54-452
Dennis Sandoz	NALORAC CORPORATION 〒 841A Arnold Dr. Martines CA 94553	sales@nalorac.com	001-1-510-229-	001-1-510-229-
沈 伊民	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部門III 〒611 宇治市五ヶ庄	ymshe@modyck.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-112
Charles P. Slichter	Department of Physics University of Illinois at Urbana-Champaign 〒 Urbana, IL 61801 USA	cps@physics.uiuc.edu	217-333-3834	217-333-852
Alexander Vashchenko	大阪大学 薬学部 〒565 吹田市山田丘1-6	sacha@prost.phs.osaka-u.ac.jp	06-879-8159	06-879-815
Constntino S. Yannoni	IBM Almaden Research Center 〒 650 Harry Road San Jose, CA 95120 USA	yannoni@almaden.ibm.com	408-927-2450	408-927-212
合原 眞	福岡女子大学 人間環境学部 〒813 福岡市東区香住ヶ丘1-1	aihara@fwu.ac.jp	092-661-2411	092-661-242
赤路眞佐子	京都大学 薬学部 超伝導NMRスペクトロメータ室 〒606-01 京都市左京区吉田下阿達町46-29	無	075-753-4516	075-761-262
阿久津秀雄	横浜国立大学 工学部 物質工学科 阿久津・藤原研究室 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156	akutsu@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	045-335-1451	045-338-112

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
阿久津政明	(株)エルエイシステムズ 〒323 栃木県小山市駅東り1-6-2	khlas@po.iijnet.or.jp	0285-24-9731	0285-24-9751
朝倉克夫	千葉大学分析センター 〒263 千葉市稲毛区弥生町1-33	casakura@nature.s.chiba-u.ac.jp	043-290-3810	043-290-3813
朝倉哲郎	東京農工大学 工学部 〒184 東京都小金井市中町2-24-16	asakura@cc.tuat.ac.jp	0423-88-7025	0423-83-7733
浅野教志	防衛大学校 化学教室 〒239 横須賀市走水1-10-20	asanoa@cc.nda.ac.jp	0468-41-3811	0468-44-5901
芦田 淳	バリアンジャパンリミテッド 〒108 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	jun.ashida@jpsso.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
足立恭子	(株)海洋バイオテクノロジー研究所 〒424 清水市袖師町1900	QZD14024@niftyserve.or.jp	0543-66-9213	0543-66-9255
安達芳雄	九州工業技術研究所 〒818 佐賀県鳥栖市宿町	adachi@kniri.go.jp	0942-82-5161	0942-83-0850
阿部 悟	日本曹達(株) 機能製品研究所 〒290-01 千葉県市原市五井南海岸12-54	hsuzuki@po.globe.or.jp	0436-23-2145	0436-21-9706
荒木通啓	京都大学 化学研究所 生体反応設計研究部門2 〒611 京都府宇治市五ヶ庄	otsuka@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1247
荒田洋治	機能水研究所 〒305 つくば市千現2-1-6	arata@wri.co.jp	0298-58-6183	0298-58-6166
安藤 勲	東京工業大学 工学部 高分子工学科 〒145 東京都目黒区大岡山2-12-1	iando@o.cc.titech.ac.jp	03-5734-2139	03-5734-2889
安藤慎治	東京工業大学 工学部 高分子工学科 〒145 東京都目黒区大岡山2-12-1	sando@o.cc.titech.ac.jp	03-5734-2137	03-5734-2889
池田龍一	筑波大学 化学系 〒305 つくば市天王台1-1-1	ikedata@staff.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-4250	0298-53-6503
石井佳誉	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	ishii@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4014	075-751-2085
石川順也	京都大学 薬学部 薬品分析学教室 〒606 京都市左京区吉田下阿達町	ishikawa@pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4531	075-753-4578
石田信昭	食品総合研究所 〒305 茨城県つくば市観音台2	nobu@nfri.affrc.go.jp	0298-38-8035	0298-38-7996
石田宏之	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部門III 〒611 宇治市五ヶ庄	hiro@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1164
石塚靖子	工業技術院 生命工学工業技術研究所 生体物質部 生体物質化学研究室 〒305 つくば市東1-1	ishizuka@nibh.go.jp	0298-54-6125	0298-54-6135
石丸臣一	筑波大学 化学系 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1	ishimaru@staff.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-4487	0298-53-6503
井田隆史	東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	ida@ushi.kwl.t.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5800-6950
市川真史	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	ichi@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4014	075-751-2085

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
伊藤 隆	理化学研究所 遺伝生化学研究室 〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1	ito@louise.riken.go.jp	048-467-9538	048-467-5694
稲垣冬彦	東京都臨床医学総合研究所 生理活性物質研究部門 〒113 東京都文京区本駒込3-18-22	inagaki@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1244
稲倉秀樹	電気通信大学 〒182 東京都調布市調布ヶ丘1-5-1	inakura@dust.pc.uec.ac.jp	0424-83-2161	0424-84-7404
井上匡子	神戸大学 大学院自然科学研究科 物質科学専攻 〒657 神戸市灘区六甲台町1-1	kyokoino@icluna.kobe-u.ac.jp	078-803-0145	078-803-0834
井上眞一	愛知工業大学 応用化学科 〒470-03 豊田市八草町八千草1247	sh-inoue@aitech.ac.jp	0565-48-8121	0565-48-0074
井ノ岡 博	武田薬品工業(株) 開拓第一研究所 〒305 茨城県つくば市和台10番地	Inooka_Hiroshi@takeda.co.jp	0298-64-5025	0298-64-5004
猪原武男	小野薬品工業(株) 水無瀬総合研究所 〒618 大阪府三島郡島本町桜井3-1-1	inohara@magical.egg.or.jp	075-961-1151	075-962-9314
井町美佐子	日本ブルカー(株) アプリケーション部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	imachi@bruker.co.jp	0298-52-1235	0298-58-0324
岩下 孝	(財)サントリー 生物有機化学研究所 〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1	takashi@minase.SUNTORY.co.jp	075-962-3742	075-962-2114
岩瀬由紀子	福岡大学 薬学部 〒814-80 福岡市城南区七隈8-19-1	pp034557@psat.fukuoka-u.ac.jp	092-871-6631	
岩館満雄	東京農工大学 工学部 〒184 東京都小金井市中町2-24-16	iwadate@cc.tuat.ac.jp	0423-88-7025	0423-83-7734
植木定雄	日本ブルカー(株) マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	ueki@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0324
上田貴洋	物質工学工業技術研究所 〒305 茨城県つくば市東1-1	tueda@nimc.go.jp	0298-54-4515	0298-54-4524
植松朋子	積水化学工業(株) 研究本部 京都技術センター評価試験室 〒601 京都市南区上鳥羽上調子町2-2	uematu04@smile.sekisui.co.jp	075-662-8536	075-662-8544
鷗澤 洵	理化学研究所 分子構造解析室 〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1	uzawa@rikenmr.riken.go.jp	048-467-9361	048-462-4624
江口太郎	大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒560 豊中市待兼山町1-16	eguchi@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-850-5778	06-850-5784
海老澤計麿	味の素(株) 中央研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	im_ebisawa@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-7614
恵良聖一	岐阜大学 医学部 第2生理学教室 〒500 岐阜市司町40	era@cc.gifu-u.ac.jp	058-267-2225	058-267-2914
恵良田知樹	北海道大学 工学研究科 分子化学専攻 〒060 札幌市中央区北13条西8丁目	erata@moby.hokudai.ac.jp	011-706-6566	011-706-6544
大石 修	分子科学研究所 分子集団動力学 〒444 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38番地	oishi@ims1.ims.ac.jp	0564-55-7427	0564-54-2244
大島曜子	東邦大学 薬学部 〒274 船橋市三山2-2-1	sakamoto@phar.toho-u.ac.jp	0474-72-1282	0474-72-1244

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
大隅信三	花王(株) 〒640 和歌山県和歌山市湊1334	307893@kastanet.kao.co.jp	0734-26-8527	0734-26-8626
大竹亮子	味の素(株) 中央研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	lm_ootake@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-7609
大貫 歩	東京薬科大学 〒192-03 八王子市堀内1432-1		0426-76-4542	0426-76-4542
大野光宏	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 育種生産工学研 〒113 東京都文京区弥生1-1-1	mohno@mcb.bt.a.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5684-0387
大野 靖	日本たばこ産業(株) 医薬総合研究所 〒569-11 高槻市紫町1-1	ohno@xjt.isrl.jti.co.jp	0726-81-9736	0726-81-9725
岡村恵美子	京都大学 化学研究所 界面物性研究部門I 〒611 宇治市五ヶ庄	emiko@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-32-0854
小川 潔	旭化成工業(株) ライフ総研 創薬研究所 〒410-23 静岡県田方郡大仁町三福632-1	ogawa@life_kikaku.asahi-kasei.co.jp	0558-76-7085	0559-76-2947
小川雅弘	日本新薬(株) 薬剤研究部 〒601 京都市南区西大路通り八条下がる	無	075-321-1111	075-321-9038
荻野孝史	国立精神神経センター 神経研究所 〒187 東京都小平市小川東4-1-1	ogino@ncnpja.ncnp.go.jp	0423-41-2711	0423-42-7521
奥田昌宏	バリアンジャパンリミテッド 〒532 大阪市淀川区西中島4-2-26 天神第1ビル	m.okuda@tau.bekkoame.or.jp	06-305-6552	06-305-6556
奥野恭史	京都大学 化学研究所 生体反応設計研究部門2 〒611 京都府宇治市五ヶ庄	otsuka@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1247
小椋賢治	東京都臨床医学総合研究所 生理活性物質研究部門 〒113 東京都文京区本駒込3-18-22	kogura@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
小田中友紀	昭和大学 薬学部 分析センター 〒142 東京都品川区旗の台1-5-8	無	03-3784-8271	無
小田真弘	京都大学 大学院理学研究科 物理学 宇宙物理学専攻 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	oda@bird.scphys.kyoto-u.ac.jp	075-753-3810	075-753-3769
小野 明	東京都立大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒192-03 八王子市南大沢1-1	ono@raphael.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-2525
小野 晶	東京都立大学 理学部 化学科 〒192-03 八王子市南大沢1-1	akira@raphael.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2545	0426-77-2525
小野田義人	科学技術庁 無機材質研究所 〒305 茨城県つくば市並木1-1	onoday@nirim.go.jp	0298-51-3351	0298-54-9062
甲斐荘正恒	東京都立大学 理学部 化学科 〒192-03 八王子市南大沢1-1	kainosho@raphael.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2544	0426-77-2525
垣田信吾	協和発酵工業(株) 東京研究所 〒194 東京都町田市旭町3-6-6	無	0247-25-2555	0427-25-2559
梶 弘典	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部門III 〒611 宇治市五ヶ庄	kaji@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1164
片岡 新	東京都立大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒192-03 八王子市南大沢1-1	shin@kataoka.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-2525

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
片平正人	横浜国立大学 工学部 物質工学科 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156	katahira@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	045-335-1451	045-338-3120
片平律子	協和発酵工業(株) 東京研究所 〒194 東京都町田市旭町3-6-6	無	0247-25-2555	0427-25-2555
加藤晃一	東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	kkato@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-3815-6540
門 良一	京都産業大学 理学部 物理学科 〒603 京都市北区上賀茂本山	kador@cc.kyoto-su.ac.jp	075-705-1634	075-705-1640
金沢洋子	九州大学 薬学部 〒812-82 福岡市東区馬出	kanazawa@pch.phar.kyushu-u.ac.jp	092-641-1151	092-641-8150
狩野広美	農業生物資源研究所 〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2	無	0298-38-8378	0298-38-7400
上平美弥	姫路工業大学 理学研究科 生命科学専攻 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1	kamihira@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0182	07915-8-0180
神村耕二	神戸大学 大学院自然科学研究科 化学専攻 〒657 神戸市灘区六甲台町1-1	kamimura@icluna.kobe-u.ac.jp	087-803-0602	078-803-0830
亀井裕孟	東京大学 医学部 医用電子研究施設 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	kamei@medes.m.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5689-7210
亀田恒徳	東京工業大学 工学部 高分子工学科 〒145 東京都目黒区大岡山2-12-1	tkameda@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2880
唐沢裕之	日本電子(株) 大阪支店 分析機器グループ 〒532 大阪市淀川区西中島5-14-5 新大阪INビル11階	ei2h-krsw@asahi-net.or.jp	06-304-3943	06-304-7377
河合剛太	東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	gota@kwl.t.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5800-6900
川上 勝	神戸大学 大学院自然科学研究科 〒657 神戸市灘区六甲台町1-1	kmasaru@icluna.kobe-u.ac.jp	078-881-1212	078-803-0830
川口 謙	(株)東レリサーチセンター 〒248 神奈川県鎌倉市手広1111	kawaguchik@vxoa1.scc.toray.co.jp	0467-32-9974	0467-32-0400
川口哲朗	日本ブルカー(株) 大阪事務所 〒564 大阪府吹田市豊津町17-5 江坂タガミビル4階	無	06-339-7008	06-339-7010
川島裕之	資源環境技術総合研究所 〒305 つくば市小野川16-3	h-kawa@nire.go.jp	0298-58-8413	0298-58-8400
川端 潤	北海道大学 農学部 生物機能化学科 〒060 札幌市北区北9条西9丁目	junk@chem.agr.hokudai.ac.jp	011-706-4140	011-716-0800
河原郁子	日本ロシュ(株) 研究所機器分析グループ 〒247 神奈川県鎌倉市梶原200	fumiko.kawahara@roche.com	0467-47-2209	0467-45-6800
神戸英宏	名古屋工業大学 大学院工学研究科 物質工学専攻 〒466 名古屋市昭和区御器所町	r02ach06@mail.edsys.center.nitech	052-732-2111	無
菊地 淳	東京農工大学 工学部 生命工学科 〒184 小金井市中町2-24-16	kikuchij@cc.tuat.ac.jp	0423-83-7733	0423-83-7700
菊池純子	塩野義製薬(株) 創薬第一研究所 物理化学部門 〒553 大阪市福島区鷺州5-12-4	junko.kikuchi@shionogi.co.jp	06-458-5861	06-458-0980

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
比川 進	東京都立大学 理学部 化学科 無機化学第一研究室 〒192-03 東京都八王子市南大沢1-1	kitagawa-susumu@c.metro-u.ac.jp	0426-77-2550	0426-77-2525
比原 治	武田薬品工業(株) 開拓第一研究所 〒305 茨城県つくば市和台10番地	Kitahara_Osamu@takeda.co.jp	0298-64-5025	0298-64-5000
梶巻明生	(株)マルゴ検査センター 東京技術部 〒335 埼玉県戸田市川岸2-2-50 田辺製薬内	無	048-433-2771	048-433-2775
金 錫萬	横浜国立大学 工学部 物質工学科 阿久津・藤原研究室 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156	kim@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	045-335-1451	045-338-1190
木村敦臣	大阪大学 医学部 〒565 大阪府吹田市山田丘2-2	kimura@prost.phs.osaka-u.ac.jp	06-879-8159	06-879-8159
木村一雄	(株)東レリサーチセンター 〒248 神奈川県鎌倉市手広1111	kimura@blab.toray.co.jp	0467-32-9974	0467-32-0414
木村成輝	姫路工業大学 理学部 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1	shigeki@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0182	07915-8-0182
木村雅晴	住友化学工業(株) 生物環境科学研究所 分析物性グループ 〒554 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号	kimuram@ohsun01.sumitomo-	06-466-5172	06-466-5459
木村由美子	日本大学 薬学部 分析センター 〒274 千葉県船橋市習志野台7-7-1	無	0474-65-7362	0474-65-7362
木山泰範	日本新薬(株) 薬剤研究部 〒601 京都市南区西大路通り八条下がる	無	075-321-1111	075-321-9038
串田克彦	バリアンジャパンリミテッド 〒108 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	katsuhiko.kushida@jpsso.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
久保 厚	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	a.kubo@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4014	075-751-2085
黒木重樹	(財)高分子素材センター 先進材料研究所 〒305 つくば市千現2-1-6 (株)つくば研究支援センター内	mxe04003@niftyserve.or.jp	0298-58-6107	0298-58-6107
黒子弘道	東京工業大学 工学部 高分子工学科 〒145 東京都目黒区大岡山2-12-1	hkurosu@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
黒田幸夫	日本ブルカー(株) 技術サービス部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	kuroda@bruker.co.jp	0298-52-1236	0298-58-0322
黒田義弘	京都大学 薬学部 薬品分析学教室 〒606-01 京都市左京区吉田下阿達町46-29	yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4530	075-753-4578
桑野晴光	(株)科学技術研究所 分析部 〒140 東京都品川区北品川3-10-2	無	03-3474-6662	03-3474-6650
桑原和弘	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部III 〒611 宇治市五ヶ庄	kuwaba@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1164
小泉美香	農業生物資源研究所 〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2	無	0298-38-7014	0298-38-7408
河野俊之	三菱化学(株) 生命科学研究所 構造解析研究室 〒194 町田市南大谷11号	tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp	0427-24-6285	0427-24-6317
小坂研一	バリアンジャパンリミテッド 〒532 大阪市淀川区西中島4-2-26 天神第1ビル	無	06-305-6552	06-305-6556

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
越野広雪	理化学研究所 分子構造解析室 〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1	koshino@postman.riken.go.jp	048-462-1111	048-462-4627
巨瀬勝美	筑波大学 物理工学系 〒305 つくば市天王台1-1-1	kose@bukko.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5335	0298-53-5205
小寺義男	北里大学 理学部 物理学科 〒228 神奈川県相模原市北里1-15-1	kodera@medcc.kitasato-u.ac.jp	0427-78-9540	0427-78-9400
小林邦子	三菱化学(株) 生命科学研究所 構造解析研究室 〒194 町田市南大谷11号	kuniko@libra.lis.m-kagaku.co.jp	0427-24-6285	0427-24-6317
小林琢弓	京都薬科大学 大学院薬学研究科 薬学専攻 〒607 京都市山科区御陵中内町5	myama@alles.or.jp	075-595-4660	無
斉藤彰良	東亜合成(株) つくば研究所 応用研究部 〒300-26 茨城県つくば市大久保2	saitoh@tsukuba.toagosei.co.jp	0298-65-2605	0298-65-2606
齋藤一樹	科学技術振興事業団 横山情報分子プロジェクト 〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1 理化学研究所内	GFD02755@niftyserve.or.jp	048-462-1111	048-462-4671
齋藤公児	新日本製鐵(株) 先端技術研究所 〒211 川崎市中原区井田1618	saito@lab1.nsc.co.jp	044-777-4111	044-752-634
斉藤 肇	姫路工業大学 理学部 生命科学科 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出置1479-1	saito@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0181	07915-8-0181
坂倉正義	東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	無	03-3812-2111	03-3815-654
佐久間千勢子	東京薬科大学 中央分析センター 〒192-03 東京都八王子市堀之内1432-1	sakumac@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-3044	0426-76-304
櫻井智司	横浜国立大学 工学部 物質工学科 阿久津・藤原研究室 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156	無	045-335-1451	045-338-119
笹川拓明	神戸大学 大学院自然科学研究科 化学専攻 〒657 神戸市灘区六甲台町1-1	sasakawa@icluna.kobe-u.ac.jp	078-803-0602	078-803-083
佐々木雅人	日本ブルカー(株) マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	sas@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-032
佐々木元子	横浜市立大学 大学院総合理学研究科 西村研究室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2	motoko@yokohama-cu.ac.jp	045-787-2188	045-787-218
佐藤明啓	藤沢薬品工業(株) 基盤技術研究室 〒532 大阪市淀川区加島2-1-6	akihiro_sato@rnd.fujisawa.co.jp	06-390-1326	06-304-1192
佐藤 一	日本ブルカー(株) アプリケーション部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	one@bruker.co.jp	0298-52-1235	0298-58-032
沢辺紀子	東京理科大学 薬学部 分光室 〒162 新宿区市ヶ谷船河原町12番地	無	03-3260-6725	03-3268-304
椎名桃子	東京都立大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒192-03 八王子市南大沢1-1	shiina@raphael.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-251
七野藤美	日本商事(株) 研究開発本部 薬物動態研究室 〒567 大阪府茨木市庄2丁目24-3	無	0726-22-4941	0726-22-491
篠崎孝夫	花王(株) 生物科学研究所 〒321-34 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606	301621@kastanet.kao.co.jp	0285-68-7425	0285-68-74

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
嶋田一夫	東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷7-3-1		03-3815-6540	03-3815-6540
		shimada@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp		
嶋田慎治	福井大学 工学部 生物化学工学科 〒910 福井県福井市文京3-9-1		0776-27-8635	0776-27-8747
		shinji@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp		
嶋田治男	資生堂 医薬品研究所 分析研究グループ 〒236 横浜市金沢区福浦2-12-1		045-788-7276	045-788-7280
		shimada_haruo@po.shiseido.co.jp		
嶋田陽子	東京都立大学 理学部 化学科 無機化学第一研究室 〒192-03 東京都八王子市南大沢1-1		0426-77-2549	0426-77-2525
		yshimada@comp.metro-u.ac.jp		
清水弘樹	理化学研究所 国際フロンティア糖情報工学研究チーム 〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1		048-467-9620	048-467-9620
		hshimizu@postman.riken.go.jp		
清水レナット 圭男	東京工業大学 工学部 高分子工学科 〒142 目黒区大岡山2-12-1		03-5734-2889	03-5734-2889
		rshimizu@polymer.titech.ac.jp		
下川繁三	(有)テクノサイエンスラボ 〒069 北海道江別市大麻中町22-18		011-385-4855	011-386-4855
		無		
申藤平三郎	東京薬科大学 〒192-03 八王子市堀内1432-1		0426-76-4542	0426-76-4542
		shindo@ps.toyaku.ac.jp		
秦葉信久	東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷7-3-1		03-3812-2111	03-3815-6540
		shimba@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp		
菅瀬謙治	横浜国立大学 工学部 物質工学科 阿久津・藤原研究室 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156		045-335-1451	045-338-1190
		sugase@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp		
菅間 恒	(株)ツムラ中央研究所 〒300-11 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586		0298-89-3834	0298-89-2158
		MHH01571@niftyserve.or.jp		
杉浦眞喜子	神戸薬科大学 〒658 神戸市東灘区本山北町4-19-1		078-441-7591	078-441-7592
		makiko-s@kobepharmaceutical-u.ac.jp		
杉江隆徳	愛知工業大学 応用化学科 〒470-03 豊田市八草町八千草1247		0565-48-8121	0565-48-0076
		無		
杉岡真紀子	小野薬品工業(株) 水無瀬総合研究所 〒618 大阪府三島郡島本町桜井3-1-1		075-961-1151	075-962-9314
		無		
杉原広子	富士写真フィルム 富士宮研究所 〒418 富士宮市中大里200		0544-26-7642	0544-26-7691
		sugihara@flcsun.tomiken.fujifilm.co.jp		
杉本恭子	不二製油(株) つくば研究開発センター 〒300-24 茨城県筑波郡谷和原村絹の台4丁目3番地		0297-52-6324	
		sugimoto@fujioil.co.jp		
杉本岳彦	愛知工業大学 応用化学科 〒470-03 豊田市八草町八千草1247		0565-48-8121	0565-48-0076
		takehiko@aitech.ac.jp		
鈴木榮一郎	味の素(株) 中央研究所 分析研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1		044-244-7145	044-211-7609
		lm_suzuki@te10.ajinomoto.co.jp		
関 宏子	千葉大学分析センター 〒263 千葉市稲毛区弥生町1-33		043-290-3810	043-290-3813
		seki@crystal.cac.chiba-u.ac.jp		
関 充男	バリアンジャパンリミテッド 〒108 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル		03-5232-1236	03-5232-1264
		smitsuo@po.lijnet.or.jp		
曾我美 勝	〒502 岐阜市鷺山1719-7		058-232-6997	058-232-6997
		無		

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
田井利弘	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部門III 〒611 宇治市五ヶ庄	tai@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1164
高石直樹	東京都立大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒192-03 八王子市南大沢1-1	naoki@kataoka.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-2525
高倉暁彦	丸善石油化学(株) 研究所 分析室 〒290 千葉県市原市五井南海岸3番地	dekunobo@lib.bekkoame.or.jp	0436-22-3242	0436-21-9732
高橋憲助	〒465 名古屋市長東区植園町1-50		052-782-7273	052-782-7273
高橋征三	日本女子大学 理学部 物質生物化学科 〒112 東京都文京区目白台2-8-1	t_seizo@sakura.jwu.ac.jp	03-3943-3131	03-3942-6116
高橋谷洋	神戸大学 大学院自然科学研究科 化学専攻 〒657 神戸市六甲台1-1	tanihiro@icluna.kobe-u.ac.jp	078-881-1212	078-803-0835
高橋栄夫	東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	hid@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-3815-6540
高橋義朗	京都大学 大学院理学研究科 物理学専攻 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	yitakahashi@kytvax.scphys.kyoto-	075-753-3745	075-753-3765
高山俊夫	神奈川大学 工学部 応用化学科 〒221 横浜市神奈川区六角橋3-27-1	takayama@cc.kanagawa-u.ac.jp	045-481-5661	045-413-9770
高山知子	三共(株) 分析代謝研究所 〒140 東京都品川区広町1-2-58	hiroyu@shina.sankyo.co.jp	03-3492-3131	03-5436-8561
高山陽子	塩野義製薬(株) 創薬第一研究所 物理化学部門 〒553 大阪市福島区鷺州5-12-4	yohko.takayama@shionogi.co.jp	06-458-5861	06-458-0987
武井次郎	Dept of Biochem., Univ. of Bristol 〒BS8 Department of Biochemistry, School of Medical	J.Takei@bris.ac.uk	+44-117-928-	+44-117-928
竹内蒼羽	筑波大学 物理工学系 田崎・喜多研究室 〒305 茨城県つくば市天王台1-1	takeuchi@riko.tsukuba.ac.jp	0298-53-5243	0298-53-6111
竹腰清乃理	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-751-208
武貞啓子	味の素(株) 中央研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	lm-takesada@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-760
武田和行	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	takeda@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-751-208
武田 定	分子科学研究所 錯体化学実験施設 〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38	stakeda@ims.ac.jp	0564-55-7222	0564-54-225
楯 真一	東京都立大学 理学部 化学科 〒192-03 八王子市南大沢1-1	tate@raphael.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-252
田中 鍬	帝人(株) 構造解析センター 〒191 東京都日野市旭が丘4-3-2	無	0425-86-8121	0425-86-812
田中俊之	筑波大学 先端学際領域研究センター 〒305 つくば市天王台1-1-1	ttanaka@tara.tsukuba.ac.jp	0298-56-7708	0298-56-770
田中彬嗣	九州大学 薬学部 〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1	無	092-641-1151	092-641-811

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
田之倉 優	東京大学 生物生産工学研究センター 〒113 東京都文京区弥生1-1-1	utanok@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5689-7225
田畑祥生	三菱化学(株) 四日市総合研究所 第1研究所 物性分析第2研究室 〒510 三重県四日市市東邦町1番地	2100502@cc.m-kagaku.co.jp	0593-45-7106	0593-45-7189
田林一晃	神戸大学 大学院自然科学研究科 〒657 神戸市灘区六甲台町1-1	tabayasi@icluna.kobe-u.ac.jp	078-881-1212	078-803-0839
田村友美	日本ブルカー(株) 大阪事務所 〒564 大阪府吹田市豊津町17-5 江坂タガミビル4階	tot@bruker.co.jp	06-339-7008	06-339-7010
田村 充	(株)日立製作所 基礎研究所 〒350-01 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520	tamura@harl@hitachi.co.jp	0492-96-6111	0492-96-6006
丹所正孝	科学技術庁 無機材質研究所 〒305 茨城県つくば市並木1-1	tansho@nirim.go.jp	0298-51-3351	0298-52-7449
千葉 創	日本バイオ・ラッドラボラトリーズ サドラー事業部 〒116 東京都荒川区東日暮里5-7-18	hajime_chiba@jp.bio-rad.com	03-5811-6287	03-5811-6273
辻 暁	姫路工業大学 理学部 生命科学科 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1	tuzi@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0182	07915-8-0182
津田 栄	工技院 北海道工業技術研究所 〒062 札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1	tsuda@hniri.go.jp	011-857-8912	011-857-8983
鄭 建明	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部門III 〒611 宇治市五ヶ庄	tai@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1164
手塚亮典	バリアンジャパンリミテッド 〒108 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	akinori.tezuka@jpsso.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
手塚智子	神戸大学 大学院自然科学研究科 化学専攻 〒657 神戸市灘区六甲台町1-1	tezuka@icluna.kobe-u.ac.jp	078-803-0602	078-803-0839
出村 誠	東京農工大学 工学部 〒184 東京都小金井市中町2-24-16	demura@cc.tuat.ac.jp	0423-88-7025	0423-83-7733
寺尾武彦	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4011	075-751-2085
寺沢宏明	第一製薬(株) 東京研究開発センター 創薬基盤研究所 〒134 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号	hterasaw@mb.tokyo.infoweb.or.jp	03-3680-0151	03-5696-4266
寺田 透	理化学研究所 細胞情報伝達研究室 〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1	terada@louise.riken.go.jp	048-467-9538	048-467-5692
寺田秀夫	日本ブルカー(株) 大阪事務所 〒564 大阪府吹田市豊津町17-5 江坂タガミビル4階	ht@bruker.co.jp	06-339-7008	06-339-7010
照井彬弘	塩野義製薬(株) 創薬第一研究所 物理化学部門 〒553 大阪府福島区鷺州5-12-4	無	06-458-5861	06-458-0987
土井美弥	(株)武田分析研究所 〒532 大阪市淀川区十三本町	mdoi@osk.threewebnet.or.jp	03-300-6537	03-300-6839
堂本竹雄	日本ブルカー(株) マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	td@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
土江松美	大阪市立大学 理学部 分析室 〒558 大阪市住吉区杉本3-3-138	matsumi@cubane.sci.osaka-cu.ac.jp	06-605-2597	06-605-2522

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
富樫義弘	名菱テクニカ(株) 代表取締役社長 〒461 名古屋市中区矢田南五丁目1番14号	togashi@mtco.mei.melco.co.jp	052-722-4820	052-722-8511
富岡 貢	昭和大学 薬学部 分析センター 〒142 東京都品川区旗の台1-5-8	無	03-3784-8271	無
友森チエリ	筑波大学 大学院農学研究科 応用生物化学専攻 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1 TARAセンター共同研究棟A306	ctomomor@tara.tsukuba.ac.jp	0298-53-6070	0298-53-6065
鳥澤拓也	東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	無	03-3812-2111	03-3815-6540
内藤 晶	姫路工業大学 理学部 生命科学専攻 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1	naito@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0180	07915-8-0180
中井利仁	筑波大学 物理工学系 〒305 つくば市天王台1-1-1	nakai@bukko.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5048	0298-53-5200
中越雅道	雪印乳業(株) 生物科学研究所 〒325-09 栃木県下都賀郡石橋町下石橋516	snows@tokyo.infoweb.or.jp	0285-52-1344	0285-53-1311
永阪文惣	帝人(株) 構造解析センター 〒191 東京都日野市旭が丘4-3-2	bunsow@kk.hino.teijin.co.jp	0425-86-8121	0425-86-8121
長田敏明	武田薬品工業(株) 創薬研究本部 合成技術研究室 〒532 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85	Toshiaki_Nagata@takeda.co.jp	06-300-6307	06-300-6875
永田親清	芝浦工業大学 工学部 工業化学科 〒108 東京都港区芝浦3-9-14	無	03-5476-2432	03-5476-2432
中谷貴子	京都大学 薬学部 超伝導NMRスペクトロメータ室 〒606-01 京都市左京区吉田下阿達町46-29	無	075-753-4516	075-761-2690
長土居有隆	横浜市立大学 大学院総合理学研究科 西村研究室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2	maritaka@yokohama-cu.ac.jp	045-787-2188	045-787-2188
長縄竜一	通産省工技院資源環境技術総合研究所水圏環境保全部 〒305 つくば市小野川16-3	naganawa@nire.go.jp	0298-58-8336	0298-58-8336
中西洋志	工業技術院 生命工学工業技術研究所 生体物質部 生体物質化学研究室 〒305 つくば東1-1	nakanisi@nibh.go.jp	0298-54-6136	0298-54-6136
仲野靖浩	旭化成工業(株) 高分子科学研究所 〒569 大阪府高槻市八丁囃町11-7	a8912351@ut.asahi-kasei.co.jp	0726-85-4567	0726-85-4567
中村新治	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	nakashin@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-751-2000
中村巨男	大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒560 豊中市待兼山1-16	nobuo@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-850-5791	06-850-5791
中村春木	(株)生物分子工学研究所 〒565 吹田市古江台6-2-3	nakamura@beri.co.jp	06-872-8212	06-872-8212
中村好邦	大正製薬(株) 創薬研究所 分子科学研究室 〒330 大宮市吉野町1-403	s13219@ccm.taisho.co.jp	048-663-1111	048-652-7111
中山尋量	大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒560 豊中市待兼山町1-16	hiro@pochi.ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-850-5779	06-850-5779
名川吉信	工業技術院 生命工学工業技術研究所 生体物質部 〒305 つくば市東1-1	nagawa@nibh.go.jp	0298-54-6125	0298-54-6125

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
那須裕郷	京都大学 大学院薬学研究科 薬品分析学教室 〒606-01 京都市左京区吉田下阿達町46-29	nasu@pharmsun.pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4531	075-753-4578
新村奈美	山之内製薬(株) 分子化学研究室 〒305 茨城県つくば市御幸が丘21	niimura@yamanouchi.co.jp	0298-54-1623	0298-52-9585
西村勝之	姫路工業大学 理学部 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1	nisimura@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0182	07915-8-0182
西村善文	横浜市立大学 大学院総合理学研究科 西村研究室 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2		045-787-2188	045-787-2188
西山裕介	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	nishi@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-751-2085
仁木國雄	電気通信大学 〒182 東京都調布市調布ヶ丘1-5-1	nikki@e-one.uec.ac.jp	0424-83-2161	0424-84-7403
二宮 博	(株)UBE 科学分析センター 有機分析グループ 〒755 山口県宇部市大字小串1978-5	22866u@ube-ind.co.jp	0836-31-6568	0836-31-6601
丹羽 浩	東ソー(株) 四日市研究所 〒510 三重県四日市市霞1-8	niwa@tosoh.co.jp	0593-63-1622	0593-65-5205
野中正幸	筑波大学 物理工学系 〒305 つくば市天王台1-1-1	nonaka@ctlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5398	0298-53-5205
野引政芳	昭和電工(株) 総合研究所 〒267 千葉県緑区大野台1-1-1	nobiki@ctl.sdk.co.jp	043-226-5223	043-226-5222
野村 薫	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	nomura@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4014	075-751-2085
拝師智之	筑波大学 物理工学系 〒305 つくば市天王台1-1-1	haishi@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5214	0298-53-5205
長谷川 淳	第一製薬(株) 創薬基盤研究所 〒 東京都江戸川区北葛西1-16-13	PFH02003@niftyserve.or.jp	03-3680-0151	03-5696-4266
畑中 稔	京都大学 大学院理学研究科 生物物理学専攻 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	hatanaka@photo2.biophys.kyoto-u.ac.jp	075-753-4211	075-753-4210
服部憲和	名古屋工業大学 応用化学科 岡林・吉田研 〒466 名古屋市昭和区御器所町	r02ach03@edsys.center.nitech.ac.jp	052-732-2111	052-735-5247
服部峰之	工業技術院 電子技術総合研究所 超分子部 〒305 茨城県つくば市梅園1-1-4	mhattori@etl.go.jp	0298-58-5537	0298-58-5540
馬場雄久	北見工業大学 〒090 北見市公園町165番地	e70003@cc.kitami-it.ac.jp	0157-26-0862	0157-26-0862
馬場俊秀	東京工業大学 工学部 化学工学科 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	無	03-5734-2625	03-5734-2878
浜島 斉	(株)三和化学研究所 〒511-04 三重県員弁郡北勢町塩崎363番地	無	0594-72-6221	0594-82-0072
林 繁信	物質工学工業技術研究所 〒305 茨城県つくば市東1-1	hayashi@nimc.go.jp	0298-54-4515	0298-54-4524
早水紀久子	物質工学工業技術研究所 〒305 つくば市東1-1	hayamizu@nimc.go.jp	0298-54-4525	0298-54-4525

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
原園としえ	三菱化学(株) 横浜総合研究所 〒227 横浜市青葉区鶴志田町1000	harazono@rc.m-kagaku.co.jp	045-963-3166	045-963-426
原田治幸	京都大学 大学院工学研究科 分子工学専攻 〒606-01 京都市左京区吉田本町	haruyuki@mds.moleng.kyoto-u.ac.jp	075-753-5937	075-751-761
春山英幸	三共(株) 分析代謝研究所 〒140 品川区広町1-2-58	haru@shina.sankyo.co.jp	03-3492-3131	03-5436-856
半沢宏之	三共(株) 分析代謝研究所 〒140 東京都品川区広町1-2-58	hiroyu@shina.sankyo.co.jp	03-3492-3131	03-5436-856
日名田良一	京都大学 薬学部 超伝導NMRスペクトロメータ室 〒606-01 京都市左京区吉田下阿達町46-29	rhinata@pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4516	075-761-269
日元 徹	日本電子(株) 〒196 東京都昭島市武蔵野3-1-2	hinomoto@jeol.co.jp	0425-42-2236	0425-46-806
平沖敏文	北海道大学 大学院工学研究科 量子物理工学専攻 〒060 札幌市北区北13条西8丁目	hiraoki@sunz.huap.hokudai.ac.jp	011-706-6640	011-716-617
平尾浩一	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	hirao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-751-208
広田豊彦	第一製薬(株) 試験研究センター 〒134 東京都江戸川区北葛西1-16-13	無	03-3680-0151	03-5696-83
胡 梅	工業技術院 生命工学工業技術研究所 生体物質部 生体物質化学研究室 〒305 つくば市東1-1	billah@nibh.go.jp	0298-54-6136	0298-54-61
福井洋之	北見工業大学 〒090 北見市公園町165番地	e70000@cc.kitami-it.ac.jp	0157-26-9402	0157-24-77
福岡美香	東京水産大学 食品生産学科 〒106 東京都港区港南4-5-7	fukuoka@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0624	03-5463-04
福士江里	北海道大学 農学部 〒060 札幌市北区北9条西9丁目	JAH02422@niftyserve.or.jp	011-706-4134	
福島 透	三井東圧化学(株) 大阪研究所 〒592 大阪府高石市高砂1-6	無	0722-68-3528	0722-68-32
福田純子	東北大学 大学院理学研究科 化学専攻 有機化学講座 有機分析化学研究室 〒980-77 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉	fukuda@ykbsc.chem.tohoku.ac.jp	022-217-6564	022-217-65
福永康弘	筑波大学 物理工学系 〒305 つくば市天王台1-1-1	fuku@ctlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5398	0298-53-52
福本圭子	(株)豊田中央研究所 分析計測部 〒480-11 愛知県長久手町大字長湫字横道41-1	e4336@mosk.tytlabs.co.jp	0561-63-6140	0561-63-6
藤井 茂	関西医科大学 化学教室 〒573 枚方市宇山東町18-89	fujii@makino.kmu.ac.jp	0720-56-2121	0720-50-0
藤川昭彦	藤沢薬品工業(株) 基盤技術研究室 〒532 大阪市淀川区加島2-1-6	akihiko_fujikawa@rnd.fujisawa.co.jp	06-390-1326	06-304-11
藤倉一繁	バリアンジャパンリミテッド 〒108 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	kazushige.fujikura@jpsso.varian.co	03-5232-1238	03-5232-1
藤田春雄	京都大学 大学院工学研究科 合成・生物化学専攻 〒606-01 京都市左京区吉田本町	無	075-753-5643	075-753-5

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
藤森裕基	分子科学研究所 〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38	fujimori@ims.ac.jp	0564-55-7427	0564-54-2254
藤原敏道	横浜国立大学 工学部 物質工学科 阿久津・藤原研究室 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156	g00888@sinet.ad.jp	045-335-1451	045-338-1190
藤原英明	大阪大学 医学部 医用工学講座 〒565 吹田市山田丘	a62242a@center.osaka-u.ac.jp	06-879-8159	06-879-8159
藤原靖弘	京都薬科大学 〒607 京都市山科区御陵中内町5	無	075-595-4637	075-595-4766
峰旗一夫	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 〒113 東京都文京区弥生1-1-1	furihata@mcb1.iam.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-3816-0453
古木隆生	神奈川県産業技術総合研究所 基盤技術部 生体分子チーム 〒243-04 神奈川県海老名市下今泉705-1	tfuruki@madonna.kanagawa-iri.go.jp	0462-36-1500	0462-36-1525
古田浩祐	杏林製薬(株) 中央研究所 〒329-01 栃木県下都賀郡野木町御手洗2399-1	無	0280-56-2201	0280-57-1293
逸見 光	食品総合研究所 〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2	henmi@nfri.affrc.go.jp	0298-38-8075	0298-38-7996
星野鉄哉	日立化成工業(株) 〒300-42 つくば市和台48	無	0298-64-4000	0298-64-4008
細田和男	(株)エルエイシステムズ 〒323 栃木県小山市駅東1-1-6-2	khlas@po.ijnet.or.jp	0285-24-9731	0285-24-9751
堀井文敬	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部門III 〒611 宇治市五ヶ庄	horii@modyck.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-32-3111	0774-33-1164
堀 一之	秋田県総合食品研究所 〒010-16 秋田市新屋町字砂奴寄4-26	hori@arif.pref.akita.jp	0188-88-2001	0188-88-2008
本多 尚	筑波大学 化学系 無機物理化学講座 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1	honda@ipchemgw.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-4487	0298-53-6503
本田瑞穂	(株)カネカテクノロジー 〒652 神戸市兵庫区吉田町1-2-80	BYS11370@niftyserve.or.jp	078-652-4077	078-652-4079
前田史郎	福井大学 工学部 生物化学工学科 〒910 福井市文京3-9-1	maeda@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8635	0776-27-8747
藤崎 守	バリアンジャパンリミテッド 〒108 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	mamoru.makizaki@jpsso.varian.com	03-5232-1236	03-5232-1264
正木春彦	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 〒113 東京都文京区弥生1-1-1	hmasaki@mcb.bt.a.u-tokyo-ac.jp	03-3812-2111	03-3816-0453
増田勝彦	三菱化学(株) 鹿島事業所 機能商品工場 医薬開発研究所 物性分析Aグループ 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14	2505186@cc.m-kagaku.co.jp	0479-46-4621	0479-46-4639
松川真吾	東京工業大学 工学部 高分子工学科 〒145 東京都目黒区大岡山2-12-1	smatsuka@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889	03-5734-2889
松田弘喜	北見工業大学 〒090 北見市公園町165番地	e70002@cc.kitami-it.ac.jp	0157-26-0862	0157-26-0862
松田裕生	帝人(株) 構造解析センター 〒191 東京都日野市旭が丘4-3-2	無	0425-86-8121	0425-86-8123

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
松原康史	三菱化学(株) 筑波研究所 物性分析研究室 〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町中央8-3-1		0298-87-0946	0298-87-3257
		3709437@cc.m-kagaku.co.jp		
松本 大	京都大学 大学院薬学研究科 薬学専攻 〒606 京都市左京区吉田下阿達町		075-753-4531	075-753-4578
		masaru@pharm.kyoto-u.ac.jp		
松森信明	東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻 〒113 東京都文京区本郷7-3-1		03-5800-6898	03-5800-6898
		matumori@chem.s.u-tokyo.ac.jp		
真弓 剛	田辺製薬(株) 分析研究所 〒532 大阪市淀川区加島3-16-89		06-300-2632	06-300-2629
		無		
丸山亮介	東京都立大学 大学院理学研究科 化学専攻 〒192-03 八王子市南大沢1-1		0426-77-1111	0426-77-2525
		mar@comp.metro-u.ac.jp		
三浦宏一	北見工業大学 〒090 北見市公園町165番地		0157-26-0862	0157-26-0862
		e70001@cc.kitami-it.ac.jp		
水口千代子	(株)エルエイスシステムズ 〒323 栃木県小山市駅東り1-6-2		0285-24-9731	0285-24-9751
		las@po.ijnet.or.jp		
水越利巳	味の素(株) 中央研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1		044-244-7145	044-211-7605
		lm_mizukosi@te10.ajinomoto.co.jp		
三森文行	国立環境研究所 環境健康部 〒305 つくば市小野川16-2		0298-50-2532	0298-50-2571
		mitumori@nies.go.jp		
峯尾 泰	富士写真フイルム(株) 〒250-01 神奈川県南足柄市中沼210		0465-73-7080	0465-73-7921
		RXG06630@niftyserve.or.jp		
三宅洋子	東京都立大学 理学部 化学科 〒192-03 八王子市南大沢1-1		1426-77-1111	0426-77-2521
		miyake@raphael.chem.metro-u.ac.jp		
宮島清一	分子科学研究所 〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38		0564-55-7423	0564-54-2251
		miyajima@ims.ac.jp		
三好利一	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町		075-753-4015	075-751-2081
		miyoshi@kuchem.kyoto-u.ac.jp		
村田ツヨシ	(株)ユニチカ リサーチラボ分析技術部 〒611 京都府宇治市宇治小桜23		0774-25-2218	0774-25-2351
		tsuyoshi@murata-jp.com		
村林秀樹	(株)武田分析研究所 〒532 大阪市淀川区十三本町		03-300-6537	03-300-6839
		himura@sun-inet.or.jp		
室 文人	神戸大学 理学部 〒657 神戸市灘区六甲台町		078-803-0600	078-803-0601
		fumihito@gradis.scitec.kobe-u.ac.jp		
持田智行	分子科学研究所 〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38番地		0564-55-7399	0564-54-2251
		mochida@ims.ac.jp		
森田徹一郎	理化学研究所 分子構造解析室 〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1		048-462-1111	048-462-4621
		tmorita@postman.riken.go.jp		
八島秀仁	日本ブルカー(株) マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5		0298-52-1234	0298-58-0311
		yas@bruker.co.jp		
安永秀計	京都工芸繊維大学 工芸学部 物質工学科 〒606 京都市左京区松ヶ崎御所海道町		075-724-7562	075-724-7561
		yasunaga@ipc.kit.ac.jp		
山内一夫	日本ブルカー(株) アプリケーション部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5		0298-52-1235	0298-58-0311
		yam@bruker.co.jp		

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
山口 悟	姫路工業大学 理学部 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1	無	07915-8-0182	07915-8-0182
山口 徹	塩野義製薬(株) 創薬第一研究所 物理化学部門 〒553 大阪市福島区鷺州5-12-4	tohru.yamaguchi@shionogi.co.jp	06-458-5861	06-458-0987
山口芳樹	東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	無	03-3812-2111	03-3815-6540
山崎亜紀	東京工業大学 工学部 高分子工学科 安藤研究室 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	ayamazak@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
山野光久	武田薬品工業(株) 製薬研究所 〒532 大阪市淀川区十三本町2丁目17-85	無	06-300-6299	06-300-6251
山本昭彦	日本ブルカー(株) 〒305 茨城県つくば市二宮3-21-5	ay@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
山本雅祥	京都薬科大学 大学院薬学研究科 薬学専攻 〒607 京都市山科区御陵中内町5	myama@alles.or.jp	075-595-4660	無
山本泰彦	筑波大学 化学系 〒305 つくば市天王台1-1-1	yash@sakura.cc.tsukuba.ac.jp	0298-53-6925	0298-53-6925
横井貴子	山之内製薬(株) 分子化学研究室 〒305 茨城県つくば市御幸が丘21	yokoit@yamanouchi.co.jp	0298-52-5111	0298-52-9585
吉岡桂子	資生堂 医薬品研究所 分析研究グループ 〒236 横浜市金沢区福浦2-12-1	yoshioka_keiko@po.shiseido.co.jp	045-788-7276	045-788-7280
吉崎和男	徳島大学医学部第一生理学教室 〒770 徳島県徳島市蔵本町3丁目18-5	無	0886-33-7054	0886-32-5043
吉田尚弘	筑波大学 化学系 池田研 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1	s955227@ipe.tsukuba.ac.jp	0298-53-4487	0298-53-6503
吉田信行	国際基督教大学 教養学部 理学科 〒181 東京都三鷹市大沢3丁目10-2	yoshidan@icu.ac.jp	0422-33-3259	0422-33-1449
好田真由美	協和発酵工業(株) 東京研究所 〒194 東京都町田市旭町3-6-6	無	0247-25-2555	0427-25-2559
吉野明広	名古屋工業大学 工学部 応用化学科 〒466 名古屋市昭和区御器所町	yoshino@ach.nitech.ac.jp	052-735-5241	052-735-5247
吉村一良	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 無機物性化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	kyhv@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-3991	075-751-2085
李 華	神戸大学 大学院自然科学研究科 物質科学専攻 〒657 神戸市灘区六甲台町1-1	li@icluna.kobe-u.ac.jp	078-803-0145	078-803-0839
李 俊	理化学研究所 高分子化学研究室 〒351-01 埼玉県和光市広沢	lijun@postman.riken.go.jp	048-467-9403	048-462-4667
渡邊永治	立教大学 理学部 化学科 秋山研究室 〒171 東京都豊島区西池袋3-34-1	eiji@rikkyo.ac.jp	03-3985-2368	03-5992-3434
渡部徳子	東京水産大学 水産学部 食品生産学科 〒108 東京都港区港南4-5-7	tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643	03-5463-0643
渡辺尚彦	東京水産大学 食品生産学科 〒108 東京都港区港南4-5-7	hw@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0618	03-5463-0497

第35回 NMR 討論会講演要旨集

発行日 1996年10月30日

発行者 第35回 NMR 討論会
世話人 寺尾 武彦
京都大学大学院理学研究科化学専攻
〒606-01 京都市左京区北白川追分町
TEL : 075-753-4011
FAX : 075-753-4000
E-mail : terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp

印刷 昭和堂印刷所
代表 田村 徹
京都市左京区百万遍交差点上ル東側
TEL : 075-721-4541
FAX : 075-711-0331