

第36回NMR討論会

講演要旨集

日時 1997年10月29日（水）～10月31日（金）

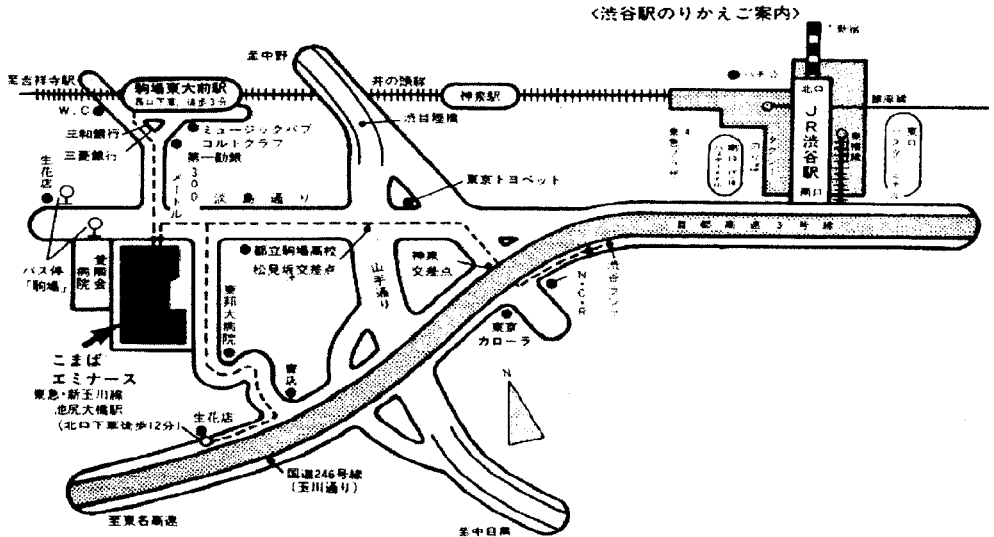
会場 こまばエミナース

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36回NMR討論会 会場案内

こまばエミナース
(東京都目黒区大橋2-19-5)
TEL: 03-3485-1411

◇会場案内図



◇交通

京王井の頭線駒場東大前駅（西口）より徒歩5分

東急新玉川線池尻大橋駅（北口）より徒歩12分

タクシー：渋谷駅（南口）より5分

バス：渋谷駅南口バスターミナル④梅ヶ丘ゆき（小田急）

①若林ゆき（東急）

⑧世田谷区民館ゆき（東急）

いずれも「こまばエミナース」で下車

◇連絡先

〒113 東京都文京区本駒込3-18-22

東京都臨床医学総合研究所

生理活性物質研究部門

稲垣冬彦

TEL: 03-3823-2101(ext.5261)

FAX: 03-3823-1247

E-mail: inagaki@rinshoken.or.jp

第 36 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 1997年10月29日(水)～31日(金)

会場 こまばエミナース(東京都目黒区大橋2-19-5)

第1日10月29日(水)

(10:00～10:05)

開会の挨拶

(10:05～11:25)

座長 引地邦男

1L1 750 MHz 高圧 NMR による蛋白質構造の研究 . . . 1
(神戸大自然科学¹、Univ. Regensburg²、神戸大理³) ○赤坂一之¹、李 華¹、P. Dubovskii¹、
手塚智子¹、井上匡子¹、鎌足雄司¹、黄地祥子¹、H. R. Kalbitzer²、山田博昭³

1L2 Pulsed Field Gradient NMR Studies of Protein Aggregation . . . 5
(機能水研) ○William S. Price、土屋文彦、荒田洋治

座長 赤坂一之

1L3 オフrezナンス照射下における¹⁵N核の緩和-βラクトグロブリンへの応用 . . . 8
(岐阜大医¹、阪大理²、コーネル大³) ○桑田一夫¹、星野 大²、後藤祐児²、C.A. Batt³、恵良聖一¹

1L4 蛋白質 χ 1角高精度解析のためのNMR手法開発 . . . 12
(都立大理¹、東海大開発工²) ○楯 真一¹、寺内 勉¹、大場 真²、松井 裕¹、西山幸三郎²、
甲斐荘正恒¹

—休憩—

(11:45～12:25)

座長 阿久津秀雄

1L5 両親媒性生理活性ペプチドにより誘起されるリン脂質二重膜の磁場配向 . . . 16
(姫路工大理¹、京大院理²) ○内藤 晶¹、岡本真名武¹、水野 敬²、永尾 隆¹、新藤由利子¹、
辻 暁¹、斉藤 肇¹

1L6 NMRによるカプトガニ血球小顆粒成分タキサイチンの構造解析 . . . 20
(北大院理¹、北工研²、九大理³) ○末武徹也¹、津田 栄²、川畑俊一郎³、河野敬一¹、
引地邦男¹、新田勝利¹

—昼食—

(14:00～16:00)

ポスターセッション(説明義務ポスター番号:3の倍数+1)

(16:00~17:20)

座長 白川昌宏

- 1L7 NMRを用いた触媒抗体の抗原結合部位の動的立体構造解析 . . . 23
(東大院薬系¹, 生物工研², 機能水研³) 榛葉伸久¹, 坂倉正義¹, 加藤晃一¹, 高橋栄夫¹,
田中富士枝², 藤井郁雄², 荒田洋治³, 〇嶋田一夫¹
- 1L8 r(UUAGGG)配列特異的な RNA 結合蛋白質 hnRNP D の構造及び RNA との相互作用の解析 . . . 25
(横浜国大工¹, 三菱化学生命研², 東工大生命理工³) 永田 崇¹, 〇片平正人¹, 栗原靖之¹,
佐伯純一¹, 長岡正司¹, 金 美希¹, 上杉晴一¹, 河野俊之², 柳田保子³, 石川冬木³

座長 横山茂之

- 1L9 分子量 50kDa の蛋白質の NMR 大腸菌転写系から 2 例 . . . 27
(阪大蛋白研¹, 国立遺伝研², ソウル大薬³, 名大理⁴) 〇山崎俊夫¹, 大友崇紀¹, 李 奉振³,
村上勝彦², 石浜 明², 饗場弘二⁴, 照屋健太¹, 京極好正¹
- 1L10 ヒト損傷 DNA 修復タンパク質 XPA の DNA 結合、タンパク質結合ドメインの立体構造解析と相互作用 . . . 28
(奈良先端大バイオ¹, 阪大細胞生体工学センター², 生体分子工学研³, 阪大蛋白研⁴) 〇白川昌宏¹,
池上貴久¹, 田中亀代次², 森川耿右³, 京極好正⁴

—休憩—

(17:40~18:20)

座長 嶋田一夫

- 1L11 RGL タンパク質の Ras 結合ドメインの高次構造解析 . . . 30
(理研細胞情報伝達¹, 東大院理², 理研遺伝生化学³, 広島大医⁴) 〇木川隆則¹, 岩堀幸太^{1,2},
幾田まり^{1,2}, 遠藤 誠^{1,2}, 森田哲史^{1,2}, 伊藤 隆³, 白水美香子¹, 菊池 章⁴, 横山茂之^{1,2}
- 1L12 アトピー性疾患原因ダニアレルゲン Der f 2 の立体構造決定 . . . 33
(都臨床研¹, 日本女子大², アサヒビール基盤研³) 市川さおり^{1,2}, 〇畠中秀樹¹, 結城敏文³,
岩本奈美子³, 小椋賢治¹, 奥村 康³, 稲垣冬彦¹

第2日 10月30日(木)

(10:00~11:00)

特別講演 1

座長 甲斐荘正恒 (M. Kainosho, Chair)

2L1 New Experiments for the Elucidation of Structure and Dynamics of Proteins and RNA . . . 34
(Institut für Organische Chemie, Universität Frankfurt¹, Department of Chemistry, Yale University²,
Center for Advanced Research in Biotechnology³) B. Reif¹, M. Hennig¹, A. Diener¹, C. Richter¹,
B. Luy¹, M. Scholz¹, J. Diener², J. P. Marino³, H. Schwalbe¹, P. Moore², ○Christian Griesinger¹

(11:00~12:00)

特別講演 2

座長 稲垣冬彦 (F. Inagaki, Chair)

2L2 Applications of Adiabatic Pulses in Biomolecular NMR . . . 35
(Varian NMR Instruments) Ēriks Kupĉe

—昼食—

(14:00~16:00)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3 の倍数+2)

(16:00~17:00)

特別講演 3

座長 荒田洋治 (Y. Arata, Chair)

2L3 Protein NMR and The Human Genome Project . . . 37
(Center for Advanced Biotechnology and Medicine and Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Rutgers University) Gaetano T. Montelione

(17:00~18:00)

特別講演 4

座長 京極好正 (Y. Kyogoku, Chair)

2L4 The Use of Selective Protonation in Structural Studies by NMR on Deuterated Large Proteins . . . 38
(Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute) ○Bennett T. Farmer II, Keith L. Constantine,
Valentina Goldfarb, William J. Metzler, Luciano Mueller

(18:30~20:30)

懇親会 (こまばエミナース3階 鳳凰の間)

第3日10月31日(金)

(9:30~10:50)

座長 齊藤 肇

- 3L1 Theory and Simulation of Vibrational Effects on Distances and Angles Obtained by Solid State NMR . . . 39
(京大院理¹、京大化研²) ○石井佳誉¹、寺尾武彦¹、林 宗市²
- 3L2 ¹³C-¹³C、¹³C-¹H 双極子相互作用を用いた多次元固体高分解能NMR二面角決定法 . . . 43
(横浜国大工) ○藤原敏道、大東靖典、阿久津秀雄

座長 安藤 勲

- 3L3 ポリペプチドの主鎖カルボニル基の¹³C NMR 化学シフトテンソルによる固体コンホメーションの研究 . . . 47
(群馬大工) ○莊司 顯
- 3L4 2次元スピン拡散 NMR 法による絹フィブロインタンパク質の局所構造解析 . . . 51
(農工大工¹、University of Nijmegen²) ○出村 誠¹、斉田 理¹、笹平理朗¹、石坂弘子¹、
朝倉哲郎¹、B. H. Meier²

—休憩—

(11:10~12:30)

座長 寺尾武彦

- 3L5 固体 NMR によるケイ素系ポリマーの構造およびダイナミックスの研究 . . . 53
(東工大工¹、ダウコーニングアジア²) ○黒木重樹¹、安藤 勲¹、村上正志²
- 3L6 二次元固体¹³C スピン拡散 NMR 法による高分子ガラスの短距離秩序構造解析 . . . 57
(京大化研) ○梶 弘典、堀井文敬

座長 堀井文敬

- 3L7 パルス磁場勾配 NMR 法によるポリエチレンオキサイド系ゲルにおけるイオンの拡散定数の測定 . . . 60
(物質研¹、ユアサコーポレーション中研²、機能水研³) ○早水紀久子¹、相原雄一²、落合誠二郎²、W.S.Price³
- 3L8 固体高分解能¹⁰⁹Ag NMR. 銀(I)錯体の立体構造と Ag NMR 化学シフトの相関 . . . 64
(都立大理) ○北川 進、嶋田陽子、松坂裕之、近藤 満、大久保貴志

—昼食—

(14:00~16:00)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3 の倍数)

(16:00~17:20)

座長 北川 進

- 3L9 赤色蛍光体、Eu ドープ Y₂O₃S、の⁸⁹Y 固体 NMR . . . 67
(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、安達隆二²、渡部徳子³
- 3L10 NMR-MOUSE 法による高分子皮膜の劣化解析 . . . 71
(新日鐵先端研¹、RWTH-Aachen²) ○齋藤公児^{1,2}、P.Bluemler²、B.Bluemich²

座長 三森文行

3L11 高速パーソナルコンピュータを用いたリアルタイム NMR 画像再構成システムの開発 . . . 75
(筑波大物理工学系) ○拝師智之、巨瀬勝美

3L12 家兎アキレス腱の H-2 DQF Spectroscopic Imaging . . . 79
(京都府立医大一生理¹・整形²、テルアビブ大化学³) ○瀬尾芳輝¹、高宮尚武²、H. Shinar³、
Y. Sharf³、G. Navon³

ポスターセッション演題

【装置・測定法】

P1	水溶液系温度ジャンプNMR装置の開発 (神戸大院自然科学) ○川上 勝、赤坂一之	・・・82
P2	酸素 17-リン 31 分極移動法による化学種特異的 ³¹ P-NMR 観測 (日立基礎研) ○田村 充	・・・84
P3	CH-, CH ₂ -, CH ₃ -選択 HETLOC (北大農) 川端 潤、○福士江里	・・・86
P4	化合物半導体を使用した超高感度前置増幅器 (日本電子) ○末松浩人、栗原範明	・・・90
P5	高磁界プローブの実装法 (日本電子) ○長谷川憲一、山腰良晃、田中良二、末松浩人	・・・93
P6	PFGB HMBP を利用した異種核間 long range J の測定法 2 (日本電子) ○内海博明、鴨 修	・・・95
P7	HMBP 法の新しい応用測定---CT-HMBP 法について (東大院農応生化 ¹ 、東大分生研 ²) ○降旗一夫 ¹ 、瀬戸治男 ²	・・・97
P8	拡散係数測定用磁場勾配パルス電源装置の改良及び製作 二重共鳴を用いたパルス磁場勾配 NMR 装置の製作 (分子研) ○大石 修、宮島清一	・・・101
P9	ダイオードレーザーアレイを用いた希ガス偏極装置の設計・試作 (電総研) ○服部峰之、平賀 隆、守谷哲郎	・・・103
P10	軽水溶液中でのタンパク質のアミドプロトン交換反応速度の決定法 (都臨床研 ¹ 、明大理工 ²) ○横地政志 ^{1,2} 、楠 正美 ² 、稲垣冬彦 ¹	・・・105

【溶液応用 (生体高分子)】

P11	大腸菌 RNA ポリメラーゼ alpha サブユニットの N 末端ドメインの構造解析 (阪大蛋白研 ¹ 、国立遺伝研 ²) ○大友崇紀 ¹ 、山崎俊夫 ¹ 、村上勝彦 ² 、石浜 明 ² 、京極好正 ¹	・・・109
P12	大腸菌 RNA ポリメラーゼの alpha サブユニット活性化ドメインと DNA の相互作用解析 (阪大蛋白研 ¹ 、国立遺伝研 ²) ○安野和浩 ¹ 、山崎俊夫 ¹ 、枋尾豪人 ¹ 、田 栄浩 ¹ 、石浜 明 ² 、京極好正 ¹	・・・110
P13	メタロプロテアーゼ阻害蛋白質 SMP I の構造決定と相互作用様式の解析 (都立大理 ¹ 、京都工繊大応用生物 ²) ○大野綾子 ¹ 、楠 真一 ¹ 、Sailaja S. Seeram ² 、平賀和三 ² 、小田耕平 ² 、甲斐荘正恒 ¹	・・・111
P14	オスモセンサー EnvZ の His kinase ドメインの NMR 構造解析 (筑波大 TARA セ ¹ 、トロント大 OCI ² 、農水省生物研 ³ 、UMDNJ ⁴) ○田中俊之 ¹ 、友森チエリ ¹ 、伊島理枝子 ² 、K. Tong ² 、D. Liu ² 、山崎俊正 ³ 、井上正順 ⁴ 、伊倉光彦 ²	・・・113
P15	安定同位体標識ペプチドを用いたペプチドと蛋白質との相互作用の解析 (三菱化学生命研 ¹ 、群馬大工 ²) ○楠 英樹 ^{1,2} 、若松 馨 ² 、佐藤一紀 ¹ 、河野俊之 ¹	・・・115
P16	HIV-2 ヌクレオキャプシドタンパク質の機能構造相関の解明 (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 ^{1,3} 、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	・・・119
P17	糖鎖結合がウナギカルシトニンの立体構造およびダイナミクスに与える影響 (旭化成基盤技術センター ¹ 、野口研 ² 、ペンシルバニア大 ³) ○橋本康博 ¹ 、錦戸條二 ¹ 、山本敬三 ² 、羽田勝二 ² 、S.Opella ³ 、K.Valentine ³	・・・122

P18	CRE 結合蛋白質 (CRE-BP1/ATF2) 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 LS ²) ○長土居有隆 ¹ 、中沢賢一 ¹ 、宇田広子 ¹ 、前川利男 ² 、石井俊輔 ² 、西村善文 ¹	・・・125
P19	NMR による hU2AF ⁶⁵ の構造解析 (東大院理) ○伊藤拓宏、武藤 裕、横山茂之	・・・127
P20	NMR による Aptotoxin VII 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	・・・129
P21	NMR 化学シフト変化の情報を用いた分子複合体モデリング (生物工研 ¹ 、都臨床研 ²) ○中村春木 ¹ 、寺沢宏明 ² 、A.Heger ¹ 、肥後順一 ¹ 、稲垣冬彦 ²	・・・131
P22	蛋白質の重水素化による TRNOE 法の改善 (群馬大工 ¹ 、三菱化学生命研 ²) ○平野利好 ¹ 、田中剛史 ¹ 、楠 英樹 ¹ 、河野俊之 ² 、若松 馨 ¹	・・・133
P23	NMR による Yeast Ubiquitin Hydrolase の解析 (理研遺伝生化学 ¹ 、三菱化学生命研 ² 、東京医科歯科大歯 ³ 、北里大理 ⁴) ○伊藤 隆 ¹ 、坂本泰一 ² 、S. Rajesh ^{1,3} 、岩本真理子 ² 、小寺義男 ^{2,4} 、土田信夫 ³ 、柴田武彦 ¹ 、河野俊之 ²	・・・135
P24	S4 ペプチドの構造解析 (東レリサーチセンター) ○木村一雄、川口 謙	・・・137
P25	¹ H-NMR による異常ヘモグロビン赤血球内・水性状の研究 (日本医大生理 ¹ 、岐阜大 ² 、岐阜大医生理 ³ 、藤田保衛大衛生 ⁴) 上坂伸宏 ¹ 、○曾我美 勝 ² 、恵良聖一 ³ 、加藤一夫 ⁴ 、永井直樹 ³	・・・139
P26	ヒト好中球 NADPH オキシゲナーゼ p47 PB2 domain の NMR 解析 (生物工研 ¹ 、九大医 ² 、東大医科研ヒトゲノムセンター ³) ○廣明秀一 ¹ 、住本英樹 ² 、伊藤隆司 ³ 、神田大輔 ¹	・・・143
P27	大腸菌 Ada 蛋白質 N 端 16K 部分の構造と DNA 認識 (生物工研) ○秋友由子、神田大輔、廣明秀一、武藤隆則、森川耿右	・・・145
P28	原がん遺伝子産物 c-Myc と DNA との複合体の動的構造 (横浜市大院総合理 ¹ 、横浜市大医 ² 、K A S T ³ 、都臨床研 ⁴ 、理研筑波 L S ⁵) ○佐々木元子 ¹ 、緒方一博 ^{2,3} 、畠中秀樹 ⁴ 、皿井明倫 ² 、石井俊輔 ⁵ 、西村善文 ¹	・・・148
P29	芳香環シグナルをプローブとした H ⁺ -ATP 合成酵素 β サブユニットの研究 (横浜国大工 ¹ 、東工大資源研 ²) ○八木宏昌 ¹ 、久松久美子 ¹ 、戸澤加江子 ¹ 、吉田賢右 ² 、阿久津秀雄 ¹	・・・150
P30	加圧によるタンパク質 BPTI の構造変化 (神戸大院自然科学 ¹ 、神戸大理 ²) ○李 華 ¹ 、山田博昭 ² 、赤坂一之 ¹	・・・153
P31	ヒト MBF1 の NMR による構造解析 (NAIST ¹ 、国立遺伝研 ² 、東工大 ³) ○三島正規 ¹ 、尾崎 淳 ¹ 、竹丸憲一 ² 、池上貴久 ¹ 、上田 均 ² 、広瀬 進 ² 、半田 宏 ³ 、白川昌宏 ¹	・・・156
P32	¹ H および ¹³ C NMR 化学シフト評価によるペプチド・タンパク質の構造解析 (農工大工 ¹ 、University of Sheffield ²) ○岩館満雄 ¹ 、出村 誠 ¹ 、朝倉哲郎 ¹ 、M. P. Williamson ²	・・・158
P33	大腸菌転写因子 PhoB の DNA 結合ドメインの立体構造解析 (横浜市大院総合理 ¹ 、阪大微生物病研 ²) ○岡村英保 ¹ 、花岡慎悟 ¹ 、長土居有隆 ¹ 、牧野耕三 ² 、西村善文 ¹	・・・159
P34	ヒトテロメア結合タンパク質 TRF1 の立体構造解析 (横浜市大院総合理 ¹ 、阪大蛋白研 ²) ○西川忠輝 ¹ 、長土居有隆 ¹ 、吉村祥子 ² 、相本三郎 ² 、西村善文 ¹	・・・161
P35	アカムシユスリカヘモグロビンの活性部位の構造 (筑波大化学系 ¹ 、東北大院理 ²) ○越川城大 ¹ 、山本泰彦 ¹ 、松岡有樹 ² 、四釜慶治 ²	・・・163
P36	<i>Arthromyces ramosus</i> Peroxidase の I および第 2 基質結合部位の解析 (東理大基礎工 ¹ 、日女大理 ² 、阪大理 ³ 、熊大医 ⁴) 細谷東一郎 ¹ 、○高橋征三 ² 、福山恵一 ³ 、板倉寛之 ³ 、佐藤康一 ⁴	・・・167

P37	無細胞タンパク質合成系による部位特異的安定同位体標識タンパク質の大量合成法の開発 (理研細胞情報伝達 ¹ 、東大院理 ²) ○矢吹 孝 ^{1,2} 、木川隆則 ¹ 、横山茂之 ^{1,2}	・・・170
P38	GTP 結合型 Ras(P34G)変異体の立体構造解析 (理研細胞情報伝達 ¹ 、理研遺伝生化学 ² 、理研生体分子解析 ³ 、東大院理 ⁴) ○森田哲史 ^{1,4} 、 寺田 透 ^{1,3,4} 、伊藤 隆 ² 、山崎和彦 ⁴ 、白水美香子 ¹ 、木川隆則 ¹ 、横山茂之 ^{1,4}	・・・172
P39	コリシン E6 の RNase ドメインとインヒビター ImmE6 のタンパク質間相互作用の解析 (東大応生工 ¹ 、理研遺伝生化学 ² 、東大院理生化 ³ 、理研生体分子解析 ⁴ 、理研細胞情報伝達 ⁵) ○大野光宏 ¹ 、伊藤 隆 ² 、寺田 透 ^{3,4} 、武藤 裕 ³ 、岩原淳二 ^{3,5} 、木川隆則 ⁵ 、柴田武彦 ² 、 横山茂之 ^{3,5} 、正木春彦 ¹ 、魚住武司 ¹	・・・174
P40	hDLG PDZ2 ドメイン-APC C 末ペプチド複合体の NMR による立体構造解析 (NAIST ¹ 、阪大 ²) ○大木 出 ¹ 、池上貴久 ¹ 、秋山 徹 ² 、白川昌宏 ¹	・・・176
P41	酸化型および還元型フェレドキシンの構造 (広島大総合科学 ¹ 、農水省生物研 ² 、金沢大理 ³) ○手島圭三 ¹ 、加藤悦子 ² 、山崎俊正 ² 、和田敬四郎 ³ 、 赤堀興造 ¹	・・・178
P42	大腸菌 RecA タンパク質に結合した単鎖 DNA の transferred NOE 解析 (理研遺伝生化学 ¹ 、理研細胞情報伝達 ² 、東大院理 ³) ○西中太郎 ^{1,3} 、伊藤 隆 ¹ 、横山茂之 ^{2,3} 、 柴田武彦 ¹	・・・182
P43	ミトコンドリア膜透過装置 rat Tom20p の cytoplasmic domain の NMR 解析 (生物工研 ¹ 、名大理 ²) ○阿部義人 ¹ 、小代俊浩 ² 、遠藤斗志也 ² 、神田大輔 ¹	・・・186
P44	発表取り消し	
P45	Grb2 SH2 ドメインと Shc 由来ペプチド複合体の溶液構造 (都臨床研 ¹ 、慶大理工 ² 、学習院大 ³ 、ニューヨーク大 ⁴) ○小椋賢治 ¹ 、土屋滋夫 ^{1,2} 、寺沢宏明 ¹ 、 湯沢 聡 ^{1,3} 、畠中秀樹 ¹ 、V. Mandiyan ⁴ 、J. Schlessinger ⁴ 、稲垣冬彦 ¹	・・・188
P46	コアクティベータ CBP の CREB 結合ドメイン(KIX)の 3 核 3 次元 NMR 法による立体構造解析 (都臨床研 ¹ 、理研ライフサイエンス筑波 ²) ○永田宏次 ¹ 、小椋賢治 ¹ 、畠中秀樹 ¹ 、高橋知巳 ² 、 秋丸裕司 ² 、戎井悦子 ¹ 、石井俊輔 ² 、稲垣冬彦 ¹	・・・189
P47	ヘパリン結合性成長因子ミッドカインのヘパリン結合様式 (都臨床研 ¹ 、ペプチド研 ² 、名大医 ³ 、生化学工業 ⁴ 、東大理 ⁵) ○岩崎わかな ^{1,5} 、永田宏次 ¹ 、 畠中秀樹 ¹ 、乾 達也 ² 、木村皓俊 ² 、村松 喬 ³ 、吉田圭一 ⁴ 、田隅三生 ⁵ 、稲垣冬彦 ¹	・・・190
【溶液応用 (生体高分子以外)】		
P48	GlcNAc(N-アセチルグルコサミン) 基を含む糖鎖分子で観測された糖の構造異性体 (工技院生命研) ○石塚靖子、M. M. Billah、中西洋志	・・・192
P49	選択的緩和方法を用いた Protoberberine 型アルカロイドの立体化学の考察 (神戸薬大) ○杉浦眞喜子、蔡 東玲、岩佐衣子	・・・194
P50	合成高分子ゲル内・水性状の研究---水への磁化移動機序 (岐阜大医生理 ¹ 、岐阜大 ² 、京都府立医大放射線医学 ³ 、藤田保衛大衛生 ⁴ 、愛知がんセンター 放射線治療部 ⁵) ○恵良聖一 ¹ 、曾我美 勝 ² 、紀ノ定保臣 ³ 、加藤一夫 ⁴ 、松島 秀 ⁵ 、 内山幸男 ⁵ 、永井直樹 ¹	・・・198
P51	¹ HNMR と ¹³ CNMR スペクトルデータベースのインターネットにおける公開 (物質研) ○早水紀久子、柳沢 勝	・・・202
P52	アラニン誘導体の構造変換機構の NMR 研究 (味の素中央研究所) ○大竹亮子、島 圭吾、井澤邦輔、鈴木榮一郎	・・・203
P53	安定同位体標識法の合成高分子への応用 -PPE と相溶化剤との反応- (住友化学工業) ○岡田明彦、横田絵美子、藤井丈志、大橋一俊	・・・205

- P54 キシロースイソメラーゼ (EC5.3.1.5) による $[2\text{-}^2\text{H}]\text{-D}$ -グルコースの分子内重水素転移反応の解析について ……209
(農水省食総研¹、日本ブルカー²) ○小野裕嗣¹、佐藤 一²、春見隆文¹
- P55 PFGを用いたセミマイクロ LC/ ^1H -NMR 法の構造解析への応用 ……213
(資生堂安全性・分析センター) ○福原忠雄、小松一男、阪本興彦、高松 翼
- P56 Bis(quaternary ammonium bromide) surfactants の会合体構造に関する研究 ……217
(名工大工) 服部憲和、○吉野明広、岡林博文
- P57 NMRによるオクチルホスホエタノールアミン塩酸塩のミセル形成によるコンホメーション変化 ……221
(名工大工) 吉野明広、○岩崎智浩、服部憲和、多賀圭次郎、岡林博文
- P58 NMRによる3-ヒドロキシブタン酸のオリゴマーの溶液構造の解析 ……225
(理研) ○李 俊、鶴沢 洵、土肥義治
- P59 細孔内拡散における obstruction 効果と温度依存性 ……229
(東水大) ○福岡美香、五味雄一郎、渡辺尚彦
- P60 化学シフトにおける相対性効果 ……231
(北見工大) ○馬場雄久、福井洋之
- P61 2次元NMRによるDNA-C-1027クロモフォア複合体の構造解析 ……233
(京大化研¹、サントリー生有研²、大鵬薬品製薬セ³) ○奥野恭史¹、杉浦幸雄¹、岩下 孝²、大谷敏夫³
- P62 Structural Peculiarity of Compounds With Intramolecular Hydrogen Bonding ……235
(阪大薬¹・遺伝情報²・医³) ○Alexander Vashchenko¹、高木達也²、Andrei Afonin³、藤原英明³
- P63 NMR分光法によるアルカリ金属臭化物水溶液中における水分子のスピンの緩和速度におよぼす濃度・温度効果 ……239
(立命館大理工¹、創価大工²) ○文野浩一¹、清水昭夫²、谷口吉弘¹

【膜・液晶・不均一系】

- P64 ナトリウムチャンネルブロッカージブカインとナトリウムチャンネルの不活性化ゲートペプチドとの相互作用 ……241
(京大薬) ○黒田義弘、石川順也、田中陽子、田中一二三、大高 章、藤井信孝、中川照真
- P65 ナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチドの溶液構造および局所麻酔薬ジブカインとの相互作用 ……244
(京大薬) 黒田義弘、○松本 大、守田理恵、那須裕郷、藤井信孝、中川照真
- P66 MAS/NMAS 液晶 NMR 法を用いたオピオイド受容体選択的鎮痛薬の設計 ……247
(阪大医) ○木村敦臣、高本研二、月城聖一、藤原英明
- P67 HRMAS とグラジェント分光による膨潤状態の高分子の異核種二次元 NMR ……251
(日本ブルカー¹、住友化学工業筑波研²) ○佐藤 一¹、山内一夫¹、岡田明彦²
- P68 溶液および固体 NMR 法を併用した光捕獲アンテナ複合体の構造解析 ……255
(農工大工¹、農水省生物研²、都立大理³、Northwestern 大⁴、Sheffield 大⁵) ○菊地 淳¹、鶴田千夏¹、朝倉哲郎¹、山崎俊正²、嶋田敬三³、P. A. Loach⁴、P. S. Parkes-Loach⁴、C. N. Hunter⁵、M. J. Conroy⁵、M. P. Williamson⁵
- P69 天然存在重水素 NMR による液晶研究。混合液晶系 ……258
(神戸大院自然) ○田林一晃、赤坂一之

【in vivo NMR とイメージング】

- P70 汎用 DSP ボードを用いた MRI 用パルスプログラムの開発 ……261
(筑波大物理工学系) ○巨瀬勝美、拝師智之

P71	MR 画像における並進運動する物体の偽像の研究 (筑波大物理工学系) ○安立直剛、拝師智之、巨瀬勝美	・・・265
P72	脳活動電流イメージング (東大院医医用生体工学 ¹ 、東大医科研 ²) ○亀井裕孟 ¹ 、伊良皆啓治 ¹ 、吉川宏起 ² 、上野照剛 ¹	・・・269
P73	NMR イメージングにおける RF 磁場不均一性補償法 (東大院医 ¹ 、シーメンス旭メディテック ²) ○三原啓明 ¹ 、入口紀男 ² 、佐々木康人 ¹ 、上野照剛 ¹	・・・271
P74	ラット大脳皮質における水分子の異方的拡散 (国立環境研) ○三森文行、山根一祐	・・・275
P75	電場処理したアサガオ種子の水の制限拡散測定 (生物研 ¹ 、農工研 ² 、食総研 ³ 、Baylor College ⁴) ○小泉美香 ¹ 、狩野広美 ¹ 、五十部誠一郎 ² 、石田信昭 ³ 、C.F. Hazlewood ⁴	・・・279
P76	検出位相を掃引する回転座標系イメージング法 (電総研) ○服部峰之、清水秀明、守谷哲郎	・・・283
P77	マルチスライス HSQC 法を用いた高感度 <i>In Vivo</i> ¹³ C 代謝物イメージング (東芝研究開発センター ¹ 、創価大生命科学研 ²) ○渡邊英宏 ¹ 、梅田匡朗 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	・・・285
P78	高磁場における化学シフト画像のための各種パルス系列の比較検討 (九大薬) ○栗林秀人、金沢洋子	・・・289
P79	NMR 顕微鏡による発芽大麦における糖の消長の追跡 (食総研 ¹ 、日本電子データム 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	・・・293
P80	¹³ C グルコースを用いた人頭部 ¹³ C-MRS&I (東芝研究開発センター ¹ 、創価大生命科学研 ²) ○岡本和也 ¹ 、梅田匡朗 ¹ 、石原康利 ¹ 、渡邊英宏 ¹ 、小田正記 ² 、金松知幸 ² 、塚田裕三 ²	・・・297
P81	ラット脳内代謝変化の 2 次元 NMR 測定 (日女大理 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	・・・301

【固体測定法の開発】

P82	Adiabatic Ramped Spin-Locking 法を用いた小さな化学シフト異方性の測定 (東工大生命理工 ¹ 、MIT Francis Bitter National Magnet Lab ²) ○浅川直紀 ¹ 、B.-Q. Sun ² 、R.G.Griffin ²	・・・304
P83	固体 ³¹ P および ¹³ C NMR 化学シフトを用いた生体膜モデルと塩基性ホモポリペプチドとの相互作用に関する研究 (東工大生命理工) ○浅川直紀、佐藤大輔、櫻井 実、井上義夫	・・・308
P84	化学シフト異方性復活パルス系列を利用した異種核間双極子相互作用の測定 (分子研 ¹ 、筑波大理工 ²) ○桑原大介 ¹ 、宮島清一 ¹ 、中井利仁 ²	・・・312
P85	REDOR による Leu-enkephalin 結晶多形の識別と立体構造構築法の開発 (姫路工大理 ¹ 、慈恵会医大 ² 、国立ガンセンター ³) ○西村勝之 ¹ 、内藤 晶 ¹ 、橋元親夫 ² 、相田美砂子 ³ 、辻 暁 ¹ 、齊藤 肇 ¹	・・・314
P86	固体における重水素交換 NMR によるガラス性結晶の構造解析 (京大院理) ○市川真史、久保 厚、今城文雄、寺尾武彦	・・・318
P87	固体 NMR 法による ¹³ C、 ¹⁵ N 多重ラベルをした粉末ペプチド試料の立体構造解析法 (京大院理) ○野村 薫、竹腰清乃理、寺尾武彦	・・・322
P88	半整数スピン核の固体高分解能 NMR を得るための二つの測定法 (DOR、MQ-MAS) の比較 (日本電子) ○杉沢寿志、樋岡克哉	・・・323
P89	¹ H NMR (CRAMPS) によるポリペプチドの固体構造解析 (6) (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	・・・326

- P90 バクテリオロドプシンのヘリックスフラグメントの脂質二重層中での構造: REDOR による解析・・・330
(姫路工大理) ○木村成輝、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇
- P91 Effects of ^1H decoupling on ^1H -driven ^{13}C spin diffusion334
(京大院理) ○竹腰清乃理、D. Reichert、寺尾武彦
- P92 固体高分解能 ^{13}C NMR によるバクテリオロドプシンの脂質および界面活性剤との相互作用の解析335
(姫路工大) ○谷生道一、辻 暁、内藤 晶、斉藤 肇
- P93 固体高分解能 ^{113}Cd -NMR によるバクテリオロドプシン中の金属結合部位の構造解析339
(姫路工大理) ○山口 悟、辻 暁、内藤 晶、斉藤 肇
- 【固体物性, 高分子, 固体イメージング】
- P94 固体状態におけるイミダゾール類の水素結合と ^{15}N 化学シフト341
(物質研¹、阪大院理²) ○上田貴洋¹、林 繁信¹、長友重紀²、増井大二²、中村亘男²
- P95 ^{13}C NMR 化学シフトとビフェニル化合物の結晶中のコンホメーションの相関345
(東工大) ○廣中俊也、安藤慎治、黒子弘道、安藤 勲
- P96 ^{13}C CP/MAS NMR 法による PHEMA/PMAA の脱水反応348
(防大化学) ○浅野敦志、江口 勝、黒津卓三
- P97 固体 NMR 法によるエチレン・ビニールアルコール共重合体のゲル状態の構造とダイナミックスの研究350
(東工大¹、奈良女生環²、クラレ物性研³) ○兼清真人¹、小林将俊¹、安藤 勲¹、黒子弘道²、石井孝弘³、網屋繁俊³
- P98 タンパク質凍結乾燥剤中のガラス転移温度と、NMR で測定される分子運動性との関係352
(国立衛試) ○吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄
- P99 パルス磁場勾配 NMR によるハイドロゲル製剤中のインスリン分子拡散の測定と放出速度との関係356
(国立衛試) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄
- P100 高分子の Xe 吸着特性と ^{129}Xe NMR360
(名工大) ○宮内 実、竹川政克、吉水広明、辻田義治、木下隆利
- P101 高圧 ^1H パルス NMR 法による PVA/水系の分子運動に関する研究363
(東工大) ○小林将俊、兼清真人、安藤 勲
- P102 合成粘土鉱物層間でのテトラメチルアンモニウムイオンの挙動366
(筑波大化) ○石丸臣一、山内美穂、池田龍一
- P103 ゴムの劣化挙動に対する評価法への固体高分解能 NMR の応用368
(愛知工大¹、東洋ゴム²) 井上真一¹、○杉江隆徳¹、鎌田恒夫²、牛尾正弘²、岡本 弘¹
- P104 結晶中での NHO 水素結合中のプロトントンネリング、 ^1H -NMR と極低温 ^{15}N -CP/MAS NMR370
(群馬大¹、ベルリン自由大²) ○武田 定¹、C. Benedict²、U. Langer²、H. H. Limbach²
- P105 2次モーメントのイメージング II371
(筑波大理工学系) ○野中正幸、松井 茂、中井利仁、井上多門
- P106 固体 ^{13}C 、 ^{15}N -NMR を用いた芳香族イミド化合物のコンホメーション解析375
(東工大) ○石井張愛、安藤慎治、安藤 勲
- P107 固体ポリペプチドの ^{13}C NMR 化学シフトテンソルと立体構造との相関 (2)378
(群馬大¹、東工大²) 松澤義治¹、○芦川幹也¹、尾崎拓男¹、莊司 顯¹、安藤 勲²
- P108 白金ジオキシム錯体を用いた一次元超格子の作製と固体 NMR 法による構造評価381
(物質研¹、東大理²) ○金久保光央¹、山本 薫²、牛島洋史¹、上田貴洋¹、鎌田俊英¹、水上富士夫¹、太田俊明²

P109	² H-MAS-NMRによる有機磁性結晶における電子スピン密度分布の研究 (群馬大工 ¹ 、阪大院理 ² 、電通大電子物性 ³) 武田 定 ¹ 、○丸田悟朗 ² 、山口 兆 ² 、井街 論 ³ 、 石田尚行 ³ 、野上 隆 ³	・・・383
P110	¹⁵ N選択標識αヘリックス形オリゴペプチドの溶液中での隣接アミノ酸残基効果の研究 (群馬大工) ○秦野賢一、木口英幸、若松 馨、莊司 顯	・・・384
P111	分子内水素結合を有する9-ヒドロキシフェナレノン類結晶における水素/重水素秩序の解析 (東邦大理 ¹ 、分子研 ² 、東大院総合 ³) ○持田智行 ^{1,2} 、桑原大介 ² 、宮島清一 ² 、菅原 正 ³	・・・388
P112	アルカリ-水素-C ₆₀ 三元系化合物のNMR (分子研) ○緒方啓典、宮島清一、今枝健一、井口洋夫	・・・391
P113	Si(OEt) ₄ -RSi(OEt) ₃ 系から得られる有機修飾セラミックスの構造に与える官能基Rの影響 (早大理工 ¹ 、物質研 ²) 菅原義之 ¹ 、中島 寛 ¹ 、○林 繁信 ² 、黒田一幸 ¹	・・・395
P114	絹フィブリン側鎖の ² Hラベリングと固体 ² H NMRによるダイナミクス解析 (農工大工 ¹ 、北大工 ²) ○大川陽平 ¹ 、出村 誠 ¹ 、朝倉哲郎 ¹ 、平沖敏文 ² 、堤 耀広 ²	・・・398
P115	NMR法を用いたジェランの2重螺旋構造のダイナミクスに関する研究 (東水大 ¹ 、東工大工 ²) ○松川真吾 ¹ 、渡部徳子 ¹ 、安藤 勲 ²	・・・400
P116	固体高分解能 ¹⁹ F NMRによる電子線照射PTFEの構造解析 (農水省生物研 ¹ 、日本電子応研 ² 、東海大工 ³ 、原研高崎 ⁴) ○加藤悦子 ¹ 、杉沢寿志 ² 、山崎俊正 ¹ 、 大島明博 ³ 、田畑米穂 ³ 、瀬口忠男 ⁴	・・・403
P117	¹²⁹ Xe- ² H-NMRによるポリカーボネートのダイナミクスの研究 (阪大院理 ¹ 、帝人構造解析センター ² 、神戸薬科大 ³ 、物質研 ⁴) ○永阪文憲 ^{1,2} 、中山尋量 ^{1,3} 、 上田貴洋 ⁴ 、江口太郎 ¹ 、中村亘男 ¹	・・・407
P118	二次元SASS法および二次元MAT法によるフェノキシ樹脂のガラス状態における分子運動解析 (京大化研) ○田井利弘、梶 弘典、堀井文敬	・・・410
P119	高分子溶液に関する凍結状態CP/MAS ¹³ C NMR解析-水素結合およびコンホメーションの解析 (京大化研) ○増田憲二、梶 弘典、堀井文敬	・・・412

【固体化学におけるNMR】

P120	ニトロアニリン類の ¹³ C CP/MAS NMRスペクトルにおける ¹⁴ Nの影響 (物質研) ○林 繁信	・・・415
P121	ジアミド配位子(ppda)を有する金属錯体の固体NMR法によるダイナミクス研究 (神奈川大工 ¹ 、愛媛大理 ²) ○高山俊夫 ¹ 、田村将銘 ² 、梶川裕治 ² 、東 長尾 ²	・・・417
P122	Ag _x Cu _{1-x} Iのイオン伝導相および超イオン伝導相におけるCu核の固体NMR (金沢大理 ¹ 、東工大工 ²) ○木村潤子 ¹ 、水野元博 ¹ 、遠藤一央 ¹ 、須原正彦 ¹ 、黒木重樹 ²	・・・420
P123	固体 ¹⁹ F-MAS-NMRを用いた含フッ素芳香族化合物の解析 (東工大工 ¹ 、日本電子 ²) ○中村邦彦 ¹ 、安藤慎治 ¹ 、安藤 勲 ¹ 、杉沢寿志 ²	・・・424
P124	固体NMRの光反応過程の研究への応用 (京大理) ○中村新治、竹腰清乃理、寺尾武彦	・・・427
P125	Ag-Yゼオライトにおけるプロトンの動的挙動と触媒作用 (東工大工 ¹ 、日本電子 ² 、ジャパンエナジー ³) ○馬場俊秀 ¹ 、小松法仁 ¹ 、森川有紀 ¹ 、小野嘉夫 ¹ 、 杉沢寿志 ² 、高橋俊朗 ³	・・・431

【付録】

著者索引
 キーワード索引
 参加者名簿

1L1 750 MHz 高圧 NMR による蛋白質構造の研究

神戸大自然科学¹、Univ. Regensburg²、神戸大理³

○赤坂一之¹、李華¹、P. Dubovskii¹、手塚智子¹、井上匡子¹、鎌足雄司¹、
黄地祥子¹、H.R. Kalbitzer²、山田博昭³

High pressure NMR study of protein structure at 750 Mhz

K. Akasaka, H. Li, P. Dubovskii, T. Tezuka, K. Inoue, Y. Kamatari, S. Ohji, H.-R.
Kalbitzer, and H. Yamada

The Graduate School of Science and Technology, Kobe University

Although our atomic-scale knowledge on static (or average) three-dimensional structures of proteins has increased dramatically over the last decade, our understanding of the flexibility and structural dynamics within folded proteins has not reached a comparable level of detail. In this regard, some pioneering works have been made using sound velocity measurements which have established relatively large compressibility of proteins and that they are correlated with internal cavities and their fluctuations (Gekko & Hasegawa, 1978;1986). However, microscopic origins of the compressibility have seldom been shown explicitly by experiments. We introduce here a generally applicable technique for clarifying the nature of microscopic volume fluctuation, and hence structural fluctuation, in a protein molecule in solution, i.e., an on-line high resolution-high pressure NMR spectroscopy operating at an extremely high magnetic field. Using this technique, we demonstrate that the hydrophobic core and hydrogen bonding are the two preferred regions of compression and structural fluctuation in proteins.

1. 高圧 NMR、二つの方法

高圧 NMR には、歴史的に二つの方法がある。一つは、高圧検出器型、すなわち高圧容器の中に検出器 (RF coil) を容れる方法(Jonas, ref.1)、もう一つは高圧セル型、すなわち検出器 (RF coil) の中に高圧容器(試料管)を容れる方法(Yamada, ref.2)である。

前者は高圧 (4-900MPa) に耐え、試料の量も多いが、分解能に劣る。後者は

現状では 2-300Mpa) に止まっており、試料量に制限があるが、分解能に優れ、市販装置のもつすべてのパルス系列を使用できる。

蛋白質への応用では、前者は圧力変性の研究に適しており、後者は後述する天然 (N) 構造内での構造変化の研究に適している。また後者は分光器を選ばないので、われわれはこれに、超高磁場 NMR 分光器 (750 Mhz) を利用することに成功した(Fig. 1) (ref.3)。これにより蛋白質の天然 (N) 構造内での、加圧による構造変化を蛋白質内のすべての原子サイトで検出することが初めて可能になった。

2. 超高磁場高圧 NMR の蛋白質への応用

(1) 蛋白質の特徴の一つは、天然 (N) 構造と変性 (D) 構造があることで、N 構造が活性をもっている。一般には、溶液中では N-D 間に平衡が成り立っている。高圧 NMR の可能性の一つは、この平衡を支配する熱力学因子を明かにすることにある(ref.4)。

(2) 高圧 NMR の可能性のもう一つは、N 構造内での構造変化を検出することである。森島らはシフト変化の大きな常磁性系に対して、このアプローチを最初に行ったパイオニアである(ref.5)が、観測できる構造変化は蛋白質分子の一部に限られていた。超高磁場 NMR に新しい高圧システムを組み込むことによって、われわれはこれを蛋白質分子の全体に拡張することに成功した。

実際に、超高磁場高圧 NMR をいくつかの蛋白質の天然構造に適用し、その二次元 NMR スペクトル上での圧力シフトの解析を行った。その結果、ほとんどの NMR 信号は圧力に対して直線的に、且つ可逆的にシフトした。この解析から、蛋白質の圧力感受性部位として、二つの領域が見つかった。その一つは蛋白質内部の疎水コア領域であり(ref.6)、もう一つは主鎖アミドの水素結合である。後者は、蛋白質の二次構造領域だけでなく、溶媒の水と相互作用する NH を含む(ref.7)。

3. 超高磁場高圧 NMR が開く新しい世界

結局、超高磁場高圧 NMR による N 構造内での構造変化の研究は、次の二つの目的に適っている。

(1) 生物の高い圧力感受性の分子機構

これを知るには、加圧下で機能性生体高分子 (ここでは蛋白質) の平均構造

が、実際にどのように変化するかをマイクロレベルで明かにしなければならない。このために超高磁場高圧 NMR は唯一の方法である。このために、化学シフトを指標とする定性的構造解析の他、スピン結合定数、NOE の定量解析に基づく、立体構造解析にも期待がもたれる。また、平均構造だけでなく、水素交換反応やスピン緩和などのダイナミックスの圧力依存性も、高圧 NMR の対象である。

(2) 常圧での蛋白質構造のゆらぎ

蛋白質の立体構造は常圧でも、常に体積変化を伴うゆらぎをもっている (ref.8)。ここで、マクロな体積ゆらぎ $(\overline{\delta V})^2$ と平衡加圧下での蛋白質のマクロな体積変化 (ΔV) との間には、(圧力 P が余り高くない範囲で) 次の関係が成り立つ。

$$\Delta V = -(\overline{\delta V})^2 P/kT$$

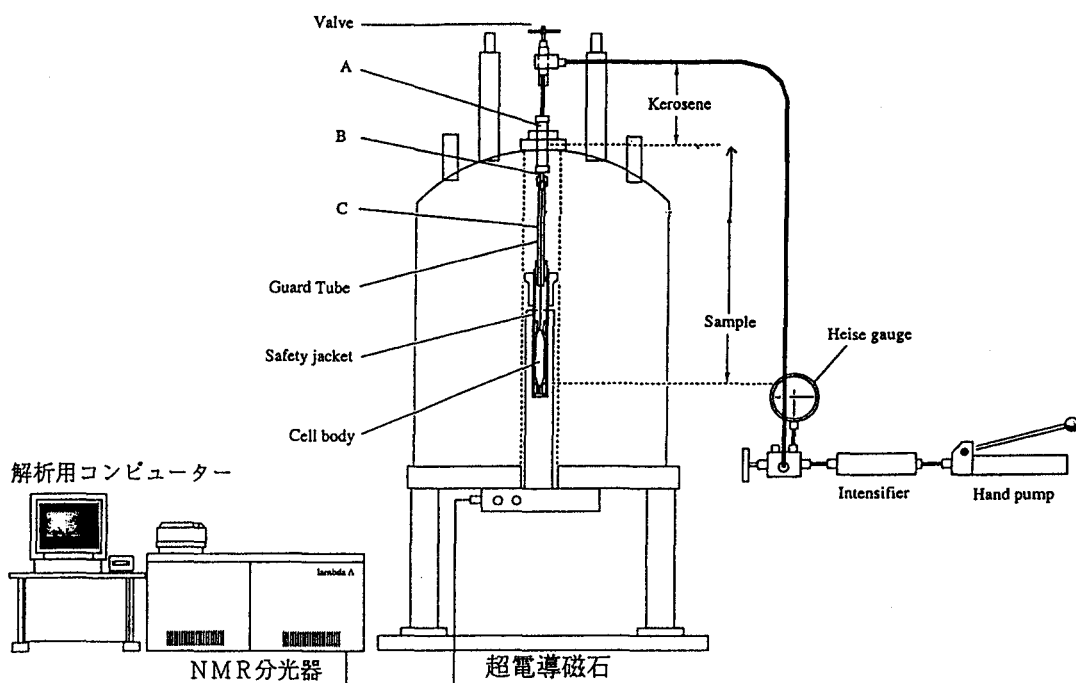
すなわち、加圧下での蛋白質の圧縮は、常圧で起こる構造ゆらぎ (の 2 乗平均) に対応している。この関係をマイクロなレベルでみると、加圧下でのマイクロな構造変化は、常圧での蛋白質のマイクロな構造ゆらぎをあらわす、ということになる。すなわち、比較的低い圧力 (1-2000 気圧) で高分解能高圧 NMR 実験を行うことにより、蛋白質のマイクロな構造揺らぎを調べるための、新しい実験法となり得る。

謝辞 本高圧 NMR 装置は文部省科学研究費補助金により開発された。

REFERENCES

1. Jonas, J., and Jonas, A. (1994) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 287-318.
2. Yamada, H. (1974) *Rev. Sci. Instrum.* 45, 640-642.
3. Yamada, H., Nishikawa, K., Sugiura, M., and Akasaka, K. (1997) *International Conference on High Pressure Science and Technology, Abstracts*
4. Yamaguchi, T., Yamada, H., and Akasaka, K. (1995) *J. Mol. Biol.* 250, 689-694.
5. Morishima, I. (1987) in *Current Perspectives of High Pressure Biology*, Academic Press, 315-333.
6. Akasaka, K. Tezuka, T., and Yamada, H. (1997) *J. Mol. Biol.* 272, 000-000.
7. Li, H., Yamada, H., and Akasaka, K. (1997) this conference.
8. Gekko, K., and Hasegawa, Y. (1979) *J. Phys. Chem.* 83, 2706-2714; (1986) *Biochemistry* 25, 6563-6571.

Fig. 1. The high resolution-high pressure NMR technique employed here is a modification of the on-line high pressure glass tube method originally reported by Yamada. The protein solution is contained in a quartz tube (inner diameter 1 mm, outer diameter 3 mm, protected by a Teflon jacket), which is separated from the pressure mediator (kerosene) by a frictionless piston (Teflon) in a separator cylinder (BeCu). The pressure can be regulated at will between 1 and 2000 bar (measured with a Heise Bourdon gauge) with a hand-pump remotely located from the 17.6 Tesla magnet (Japan Magnet Technology), and is transmitted through a six meter-long stainless steel tube containing kerosene to the sample solution in the NMR probe on a Bruker DMX-750 spectrometer operating at a proton frequency of 750.13MHz.



Pulsed Field Gradient NMR Studies of Protein Aggregation

William S. Price, Fumihiko Tsuchiya and Yoji Arata

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

Two important differences between the crystallization of small molecules and of proteins are the higher supersaturation ratios needed for protein crystallization and the phenomenon of protein aggregation. Apart from understanding crystallization, protein aggregation is an extremely important process in the food industry and in biochemistry. However, despite its fundamental importance, protein aggregation is poorly understood. Since higher oligomers necessarily have a higher molecular weight and a correspondingly larger hydrodynamic volumes and lower diffusion coefficients, translational diffusion measurements are likely to be a promising means for studying diffusion. Thus the translational diffusion coefficient obtained should reflect both the size, which includes the degree of hydration, and the shape of the diffusing species.

Importantly and in contrast to the normal NMR observables of chemical shift and relaxation time, the diffusion coefficient of a molecule provides an NMR accessible label of the whole molecule (with the exception of exchanging nuclei). Recently we have been using pulsed field gradient (PFG) NMR to non-invasively measure diffusion in aggregating protein systems such as lysozyme and the calcium binding protein, parvalbumin. In contradistinction to traditional methods such as ultracentrifugation or light scattering, it allows quick measurements at realistic concentrations and is insensitive to the presence of dust. The method measures motion in a macroscopic sense (i.e., motion that occurs on a time scale of ms to s). A simple sequence suitable for measuring diffusion is shown in Figure 1. For the case of a single freely diffusing species, the echo signal attenuation, E , can be related to the experimental variables and the diffusion coefficient, D , by the following equation,

$$E = \frac{S}{S_{g=0}} = \exp(-\gamma^2 g^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3)) \quad (1)$$

where S is the echo signal, $S_{g=0}$ is the echo signal acquired with $g=0$, γ is the magnetogyric ratio, g is the gradient strength, δ is the duration of the gradient pulse and Δ is the separation between the gradient pulses. The normalization against $S_{g=0}$ has the effect of removing the relaxation weighting. However, if the diffusing species exists in n different aggregation states (i.e., monomer, dimer... n -mer) then the observed echo intensity would be given by

Keywords: Aggregation, Diffusion, Gradient, Protein

$$S(g) = \sum_n M_{0,n} \exp(-2\tau/T_{2,n}) \exp(-\gamma^2 g^2 D_n \delta^2 (\Delta - \delta/3)) \quad (2)$$

where the subscript n refers to the aggregation state of the contributing species and M_0 denotes the equilibrium magnetization. If the relaxation time difference can be neglected then the data can be normalized as in Eq.(1). The situation can be further simplified if a particular type of diffusion coefficient distribution can be assumed. If there is a difference in the transverse relaxation times between the different oligomeric species, diffusion measurements can be performed with different values of τ while keeping Δ constant to probe the different contributions.

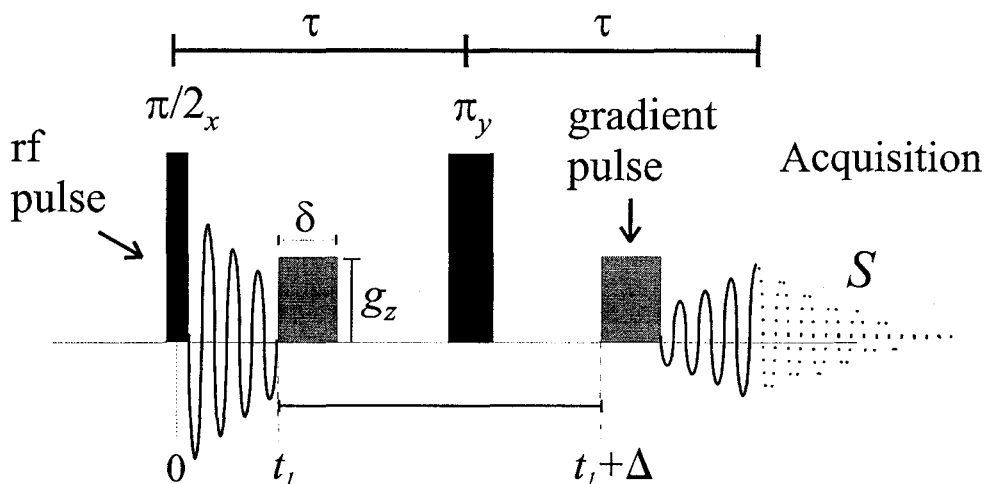


Fig. 1. The initial $\pi/2$ rf pulse rotates the magnetization into the x - y plane. This magnetization is then dephased by the first gradient pulse of magnitude g (oriented in the z -direction) and duration δ . At a time Δ later a second gradient pulse of equal magnitude is applied. The effects of the second gradient pulse exactly counteract the dephasing effects of the first gradient pulse providing that the spins have not moved in the period between the two gradient pulses (N.B. the π rf pulse has the effect of reversing the sign of the first gradient pulse). However, if the spins have moved in the direction of the gradient in the period Δ , the two gradient pulses do not cancel and a phase shift results. However, since the sample contains an ensemble of nuclei with different starting and finishing positions with respect to the time of the gradient pulses, the observed effect is an attenuated echo signal.

Recently we have been studying aggregation properties in two model protein systems: (i) the calcium binding protein carp parvalbumin PI 3.95 (MW 12000) in the presence and absence of calcium and (ii) lysozyme (MW 14320) under various experimental conditions (i.e., pH, temperature, salt and protein concentrations). For example, some translational diffusion data obtained for parvalbumin is given in Fig. 2. The simplest explanation consistent with the change in diffusion coefficient is that the parvalbumin molecules form dimers upon the removal of Ca^{2+} .

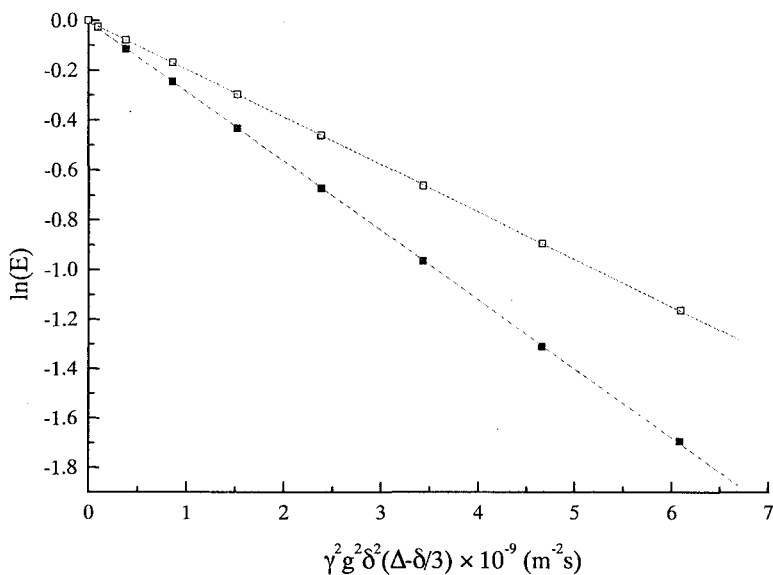


Fig. 2. A plot of $\ln(E)$ versus $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ for parvalbumin (1 mM; pH 6.5) in the presence (■) and absence of calcium (□) at 298 K. The experimental parameters used were $\delta = 3$ ms and $\Delta = 90$ ms with g ranging between 0 to 0.55 T m^{-1} . Specifically, the data is for the non-exchangeable aliphatic resonances in the region 0.5 to 1 ppm. The solid lines are the results of linear regression onto each data set. The diffusion coefficients of the calcium bound and free protein are $1.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ and $1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, respectively.

References

1. Price, W.S. "Gradient NMR" In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, G. A. Ed.; Academic Press: London, 1995, **32**, 51-142.
2. Price, W.S., Nara, M., and Arata, Y. A Pulsed Field Gradient NMR Study of the Aggregation and Hydration of Parvalbumin. *Biophys. Chem.* 1997, **65**, 179-187.
3. Price, W.S. Pulsed Field Gradient NMR as a Tool for Studying Translational Diffusion, Part 1. Basic Theory. *Concepts Magn. Reson.* 1997. (In Press).
4. Price, W.S. "Probing Molecular Dynamics in Biochemical and Chemical Systems Using Pulsed Field Gradient NMR Diffusion Measurements." In: *Recent Advances in Analytical Techniques*, Atta-Ur-Rahman, Ed.; Gordon and Breach: Amsterdam, 1998. (In Press).

1L3 オフレゾナンス照射下における¹⁵N核の緩和—
βラクトグロブリンへの応用

(¹岐阜大医、²大阪大理、³コーネル大)

○桑田一夫¹、星野大²、後藤祐児²、C.A.Batt³、恵良聖一¹

¹⁵N Relaxation Time Measurement on β- Lactoglobulin under the Off-Resonance Irradiation Field

Kazuo Kuwata¹, Masaru Hoshino², Yuji Goto², Carl. A. Batt³,
Seiichi Era¹

¹Dept. of Physiology, School of Medicine, Gifu University, Gifu 500, ²Dept. of Bi-
ology, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560, Japan,
³Dept. of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

To characterize the dynamics as well as the secondary and three dimensional structure of β-lactoglobulin, we prepared the recombinant beta-lactoglobulin using *Pichia-Pastoris* expression system. Almost 90% of backbone NH residues were assigned using 3D HNCACB and CBCACONH. Also we calculated the order parameter of Lipari-Szabo spectral density function using T1, T2 and NOE measurements. To further characterize the dynamics of β-lactoglobulin, we measured the relaxation times of backbone nitrogen spins under the various off-resonance irradiation field.

βラクトグロブリン、オフレゾナンス照射、立体構造、ダイナミクス

くわたかずお、ほしのまさる、ごとうゆうじ、Carl A. Batt、えらせいいち

β -lactoglobulin is a predominantly β -sheet protein, although it has a markedly high intrinsic preference for α -helical structure. Refolding kinetics study of β -lactoglobulin shows that a partly α -helical intermediate accumulates transiently before formation of the native β -sheets. Also secondary structure predictions indicates that β -lactoglobulin has a high α -helical preference. To explain the discrepancy between the high intrinsic preference for α -helix and the actual formation of native β -sheets, we proposed a jack-in-the-box model, which is very simple, as shown in Fig. 1. Folding intermediate has high α -helical content because local interaction is considered to be dominant. However, in the native state, non-local interaction is essential to achieve free energy minimum condition. Therefore in a intermediate state or in a partially denatured state, jack-in-the-box opens and it closes in native state.

To characterize the dynamics and the structure of β -lactoglobulin in various solvent conditions, we prepared the recombinant β -lactoglobulin using *Pichia-Pastoris* expression system. Conformational changes in various Gdn-HCl concentration detected by the ellipticity at 218 nm were almost identical. Phase sensitive COSY spectra indicated that amide chemical shifts were almost close except for several residues at N-terminal region, as shown in Fig. 2.

Almost 90% of backbone NH residues were assigned using 3D HNCACB and CBCACONH. Also we calculated the order parameter of Lipari-Szabo spectral density function using T_1 , T_2 and NOE measurements. To further characterize the dynamics of β -lactoglobulin, we measured the relaxation times of backbone nitrogen spins under the various off-resonance irradiation field.

Fig. 3 shows the trajectory under the irradiation by an adiabatically designed pulse for off-resonance spin-lock. Using this off-resonance spin-lock pulse, we can control the tilt angle, β and effective rotational frequency, ω_e , maintaining the in-phase characteristics. Also, by a nonlinear optimization of the pulse shape, we may design more sophisticated trajectories, which might modulate the relaxation process. This adiabatic off-resonance pulse were incorporated into ^{15}N $T_{1\rho}^{\text{off}}$ measurements or HSQC-O-ROESY-HSQC, that is, ^{15}N , ^{15}N , ^1H Off-ROESY. Using the former method, we may obtain the slow motion of \sim msec, because ω_e in this case is around several hundred Hz, whereas using the latter methods, we may obtain the slow motion of \sim μ sec, because ω_e is several kHz to 10 kHz. Furthermore, in our recent paper on the complete relaxation matrix analysis of off-resonance ROESY

on DNA, we incorporated two aspects of non-classical effects which may occur under the off-resonance irradiation field and may be more appropriately described using QED, that is, dressed state representation of zero-quantum transition and the geometrical phase.

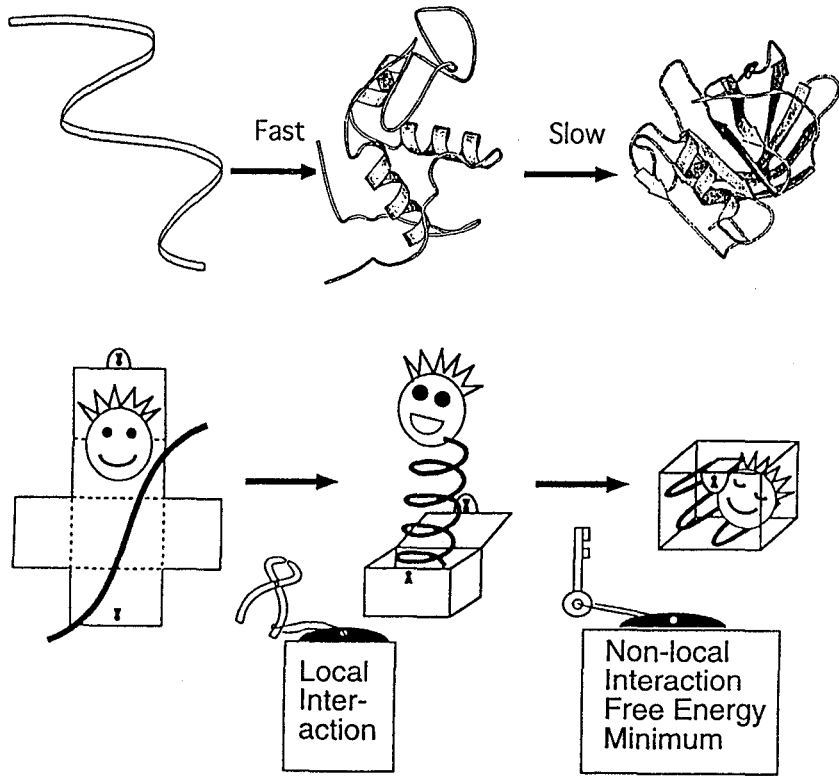


Fig. 1 Jack-in-the-box model for folding of β -lactoglobulin.

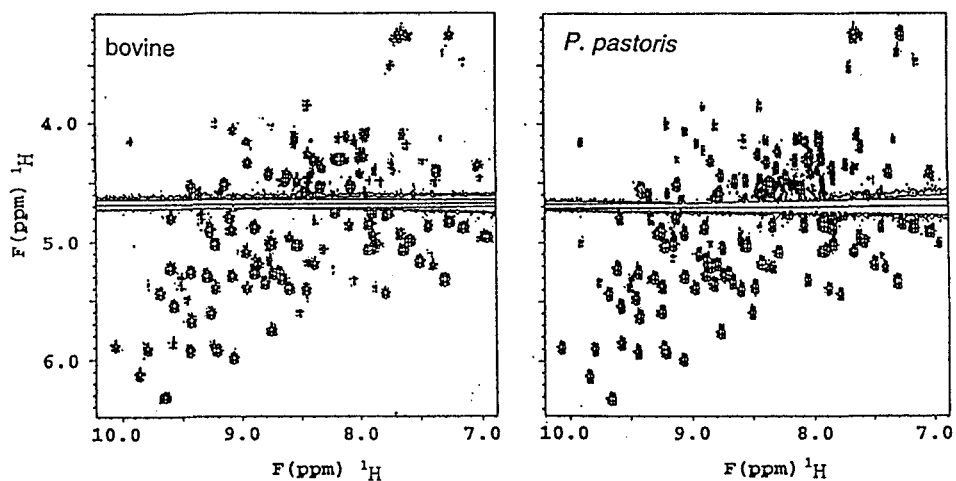


Fig. 2 Phase sensitive COSY spectra of β -lactoglobulin of bovine and *P. pastoris* at pH 2.0, 60 °C.

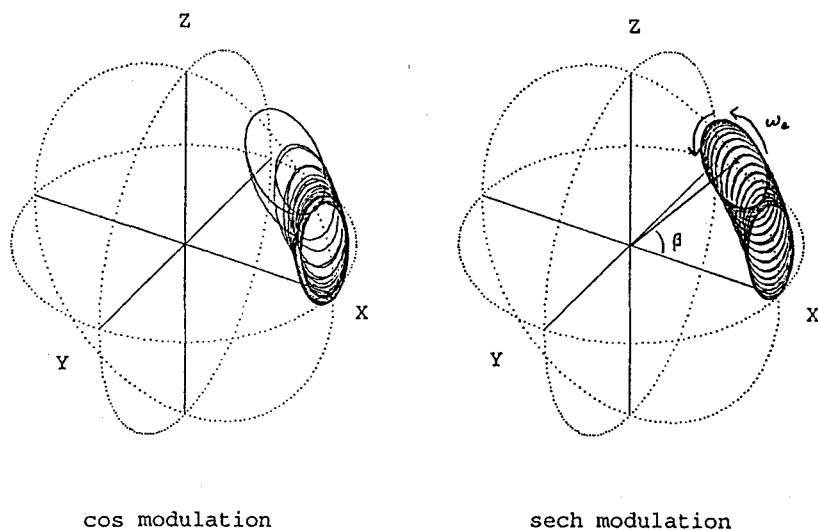


Fig. 3 Simulated trajectories under some adiabatically designed off-resonance spin-lock pulses.

蛋白質 χ_1 角高精度解析のためのNMR手法開発
 (都立大・理[#]、東海大・開発工[§]) ○楯 真一[#]、寺内 勉[#]、大場 真[§]、
 松井 裕[#]、西山幸三郎[§]、甲斐莊正恒[#]

A novel NMR approach for the quantitative elucidation of χ_1 rotamer states in a protein based on the precise measurement of homo- and hetero-nuclear spin couplings

**Shin-ichi Tate[#], Tsutomu Terauchi[#], Makoto Ohba[§], Yutaka, Matsui[#],
 Kouzaburo Nishiyama[§], and Masatsune Kainosho[#]**

**Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University
 and
 Department of Engineering, Tokai University**

Abstract : We devised a novel experimental approach for quantitatively measuring homo- and hetero-nuclear three-bond spin coupling constants determining the χ_1 dihedral angles of amino acids in a protein. In the quantitative spin coupling measurement in AMX spin system found in aromatic amino acids, the methylene group is nuisance. The spatially neighboring passive β -proton spin can cause rapid spin flip of the actively coupled target β -proton through the large dipole interaction, resulting in the systematic underestimation of the coupling constants. The large two-bond spin coupling among two methylene protons also may restrict the application of the some sorts of NMR techniques in quantitative spin coupling measurement. In our approach, stereoselective deuteration at C β site and also site specific $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ enrichment were applied to the target amino acid, currently phenylalanine, to make the ideal situation for the quantitative measurement of the spin coupling constants. Using the protein labeled with this specially synthesized phenylalanine, we measured $^3\text{J}_{\text{NH}\beta}$, $^3\text{J}_{\text{C}=\text{O}, \text{H}\beta}$ and $^3\text{J}_{\text{H}\alpha, \text{H}\beta}$ in highly quantitative way. Based on these spin coupling constants, χ_1 probability distribution function was derived for each Phe residue in this protein using various motional models with evaluation on the basis of χ_2 statistics and significance estimates.

Introduction : Protein structure dynamics is one of the central interests in the NMR study of proteins. Spin relaxation analysis is now commonly applied approach for characterizing the dynamical aspects of protein structure. From the spin relaxation analysis, however, we can not obtain the dynamical parameters directly relating to the structure itself; the generalized order parameter can not tell us the actual motional amplitude of the ^{15}N - ^1H vector motion without supporting visualization from molecular dynamics simulation. As an alternative way to see the structure dynamics is the dihedral angle analysis based on the three-bond spin coupling constants. Vicinal spin coupling constants have found widespread use in the conformational analysis of amino acids in a protein. For proteins, especially medium size proteins greater than 10kDa, the use of coupling constants has so far been limited to a qualitative dihedral angle evaluation (1-3). The limitation was mainly due to difficulties in the precise determination of coupling constants owing to the larger line widths and to the overlap of resonances. After introducing isotope-labeling, a variety of heteronuclear NMR techniques have been published to overcome these problems (4-7). Some

Keywords: 安定同位体、蛋白質構造、スピン結合定数、 χ_1 角

たて しんいち、てらうちつとむ、おおばまこと、まついゆたか、にしやまこうざぶろう、
 かいのしょうまさつね

groups have tried a quantitative evaluation of torsion angle dynamics based on these heteronuclear base NMR experiments (8,9). These analyses gave successful results about the conformational analysis based on the precise spin couplings, but they were not completely free from any errors in spin coupling measurement. In considering the spin coupling between $H\alpha$ and $H\beta$ in AMX spin systems found in aromatic amino acids side chain, the apparent spin coupling constant of $JH\alpha-H\beta^{proS}$ is reduced by the rapid spin flip of $H\beta^{proS}$ caused by the dipole interaction with the spatially neighboring $H\beta^{proR}$. This phenomenon is apparent in any type of NMR experiment for spin coupling measurement (10). And this systematic errors are difficult to be corrected without knowing the exact local motions during the whole course of NMR pulse train of almost 100 ms duration. Thus, the χ_1 torsion angle analysis of aromatics based still remains to be refined in respect to this spin flip problem.

Our approach to overcome this problem was on the usage of stereoselective deuteration at $C\beta$ site of aromatic amino acids. In the present study, we applied this labeling to phenylalanine. In this phenylalanine, each methylene proton can behave like an isolated methine proton of which spin state can not be severely perturbed by the spatially neighboring proton any more. In this ideally labeled amino acids, quite quantitative spin coupling measurement can be applied to obtain the precise three-bond spin couplings, ${}^3J_{NH\beta}$, ${}^3J_{C=O, H\beta}$ and ${}^3J_{H\alpha, H\beta}$. These obtained 3J data were analyzed with respect to different motional models for the conformational dynamics of the side chain based on χ_2 statistics and significance estimates.

Experiments:

Details of the sample preparation will be published anywhere soon (11). Here, we will focus on the NMR part of the experiments. In the present study, we used SMPI labeled with specially labeled Phe described above. SMPI is kind of metalloproteinase inhibitor of 11kDa. whose solution structure was recently determined by our own group (12). This protein has three Phe residues. All of the stereospecific assignment were established in combined use of HNHB and HN(CO)HB experiments. This stereospecific assignment is confirmed by the 1H - ${}^{13}C$ correlation spectrum of SMPI labeled with this deuterated phenylalanine.

$JH\alpha, H\beta$ spin coupling analysis : For the $H\alpha$ - $H\beta$ homonuclear spin coupling analysis, we used J-modulation spectroscopy, because in the present case, each $H\beta$ proton is effectively coupled to only $H\alpha$ proton in the same residues; the remaining methylene components are eliminated by applying the refocus delay in the HSQC part. The applies pulse scheme is shown in Figure 1a. The obtained peak modulation with fitted function curve is shown in Figure 3. As shown in Figure 2, the J coupling extraction was clearly done with the model function of $C \cos(2\pi J_{H\alpha H\beta} CT) \exp(-2CT/T_{2app})$ where C and T_{2app} are the amplitude factor and the apparent transverse relaxation time of $H\beta$ spin during constant time duration, $2CT$, respectively.

$JN, H\beta$ and $JC=O, H\beta$ spin coupling analysis : These two heteronuclear spin couplings were obtained with spin echo difference spectroscopy. The pulse scheme used for $JN, H\beta$ analysis is shown in Figure 1b. During long constant time duration to generate the intensity modulation based on the target $JN, H\beta$, the passive contribution from the large $JH\alpha, H\beta$ will attenuate the obtained cross peaks on the 2D spectrum, reducing the precision in the obtained spin couplings. Thus in the mid of this modulation course, selective refocusing of $H\beta$ spins had to be applied.

Conformational analysis of χ_1 angles with dihedral-angle probability distribution models : In the present analysis, we applied four types of motional models to describe the χ_1 angle probability distribution; 1) Rigid conformation model where χ_1 has single torsion value without angle fluctuation. 2) Gaussian angle distribution model where χ_1 angles has one specific angle with some width of angle fluctuation. 3) Bistable site jump model where two χ_1 rotamer states exist with different population. 4) Staggered site jump model where χ_1 angle state is described by the differently populated three staggered conformations (60° , -180° , -60°). The angle probability distribution and statistical test to estimate the significance of the

motional model were calculated with our own least square fitting program using optimized Levenberg – Marquardt algorithm.

Results and Discussion: Table 1 shows you the obtained spin coupling constants for all Phe residues in SMPI at 37°C. In Table 2, an example result of the angle probability distribution for F52 in SMPI. As indicated with highest statistical quality factor, the appropriate motional insight into F52 was represented with the Gaussian angle distribution model. The other two phenylalanines were also properly described with Gaussian angle distribution model. The result of the angle probability distribution is shown in Table 3. In the presentation, we will show you the details in the analysis and also discuss the significance of the obtained amplitude of the angle fluctuation in χ_1 torsions in relation to the observed χ_1 angle distribution found in some high resolution crystal structures of proteins.

Figure 1 : Pulse schemes used for the spin coupling analysis of $J_{H\alpha, H\beta}$ (a) and $J_{N, H\beta}$ (b)

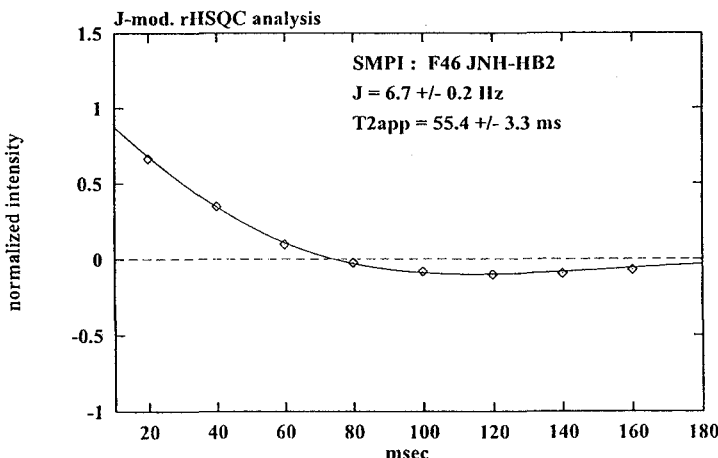
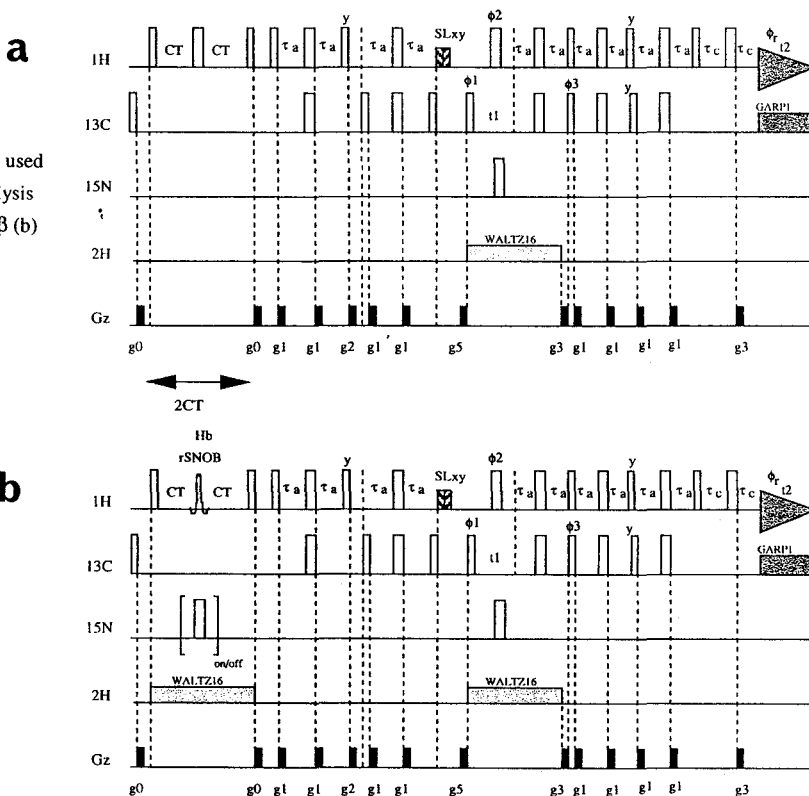


Figure 2 : $J_{H\alpha, H\beta}$ analysis based on the amplitude modulation.

Table 1 : Summary of the measured spin coupling constants of Phe residues in SMPI (37°C)

residue		$^3J_{\alpha\beta}$	$^3J_{N\beta}$	$^3J_{C'\beta}$	staggered rotamer
F46	H β 2	6.0 \pm 0.2	-3.5 \pm 0.2	2.7 \pm 0.1	+60°
	H β 3	6.7 \pm 0.2	-2.4 \pm 0.1	6.6 \pm 0.02	
F52	H β 2	5.0 \pm 0.5	-3.3 \pm 0.8	2.5 \pm 0.8	+60°
	H β 3	5.7 \pm 0.4	-2.0 \pm 0.5	8.5 \pm 0.1	
F67	H β 2	6.9 \pm 0.2	-1.6 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1	+180°
	H β 3	9.8 \pm 0.3	-2.7 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1	

Table 2 : Results of the χ_1 torsion angle analyses with different motion models.

F52	χ_1 angle	rmsd	Q [%]
Rigid rotamer model	-120.0°	1.27	67.8
Staggered-rotamer model	$\chi_1(60^\circ)$ 83.3% $\chi_1(180^\circ)$ 13.9% $\chi_1(-60^\circ)$ 2.8%	0.78	89.9
Bistable jump model	χ_{1a} 45.1° (75.5%) χ_{1b} 104.3° (24.5%)	0.72	77.9
	χ_{1a} 61.0° (77.1%) χ_{1b} 0.0° (53.5%)	0.71	80.0
Gaussian distribution model	53.3 \pm 25.1°	0.72	93.9

Table 3 : Statistically adopted conformational states of Phe residues in SMPI (37°C)

Residue	motion model	χ_1 angle
F46	Gaussian model	65.9 \pm 46.6°
F52	Gaussian model	53.3 \pm 25.1°
F67	Gaussian model	159.1 \pm 31.0°

References :

1. Nagayama, K., and Wüthrich, K. (1983) Eur. J.Biochem. **115**, 653-657.
2. Hybers, S.G., Märki, W., and Wagner, G. (1987) Eur. J.Biochem. **164**,625-635.
3. Smith, L.J., Sutcliffe, M.J., Redfield, C., and Dobson, C.M. (1991) Biochemistry **30**,986-996.
4. Montelione, G.T., Winkler, M.E., Rauenbühler, P., and Wagner, G. (1989) J.Magn.Reson. **82**,198-204.
5. Wagner, G., Schmieder, P., and Thanabal, V. (1991) J.Magn.Reson. **93**, 436-440.
6. Griesinger, C., and Eggenberger, U. (1992) J. Magn. Reson. **97**, 426-434.
7. Bax, A., Vuister, G.W., Grzesiek, S. Delaglio, F., Wang, A.C., Tschudin, R., and Zhu, G. (1994) Methods in Enzymol. **239**, 79-105.
8. Schmidt, J.M. (1997) J.Magn.Reson. **124**, 310-322.
9. Karimi-Nejad, Y., S, Schmidt, J.M., Rüterjans, H., Schwalbe, H., and Griesinger, C. (1994) Biochemistry, **33**, 5481-5491.
10. Harbison, G. (1993) J.Am.Chem.Soc. **115**, 3026-3027.
11. Tate, S., Terauchi, T., Ohba, M., Nishiyama, K., and Kainosho, M. in preparation.
12. Tate, S., Ayako, O., Sailaja, S.S., Hiraga, K., Swindells, M.B., Oda, K., and Kainosho, M., submitted.

両親媒性生理活性ペプチドにより誘起される リン脂質二重膜の磁場配向

(¹姫路工大理、²京大院理) ○内藤 晶¹、岡本真名武¹、
水野 敬²、永尾 隆¹、新藤由利子¹、辻 暁¹、斉藤 肇¹

Magnetic ordering of lipid bilayer induced by biologically active amphipathic peptides

Akira Naito¹, Manabu Okamoto¹, Takashi Mizuno², Takashi Nagao¹, Yuriko Shindo¹,
Satoru Tuzi¹ and Hazime Saito¹

¹Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

²Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Magnetic ordering of dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) bilayer incorporated with either melittin or dynorphin at a peptide to lipid molar ratio of 1:10 above the transition temperature between the liquid crystalline and gel state (T_m) is described. It is found that bilayer surface is oriented parallel to the static magnetic field in the magnetically ordered lipid bilayer. This oriented lipid bilayer allows to determine the orientation of peptides interacting with the lipid. It is, indeed, demonstrated that the helix rod of melittin is aligned parallel to both magnetic field and surface of bilayer.

【はじめに】 生理活性両親媒性ペプチドは脂質二重膜と強い相互作用を示し、電位依存性イオンチャネル機能に加えて、膜分断や膜融合を起こす性質がよく知られている。この強い膜との相互作用を分子論的に理解することは、このようなペプチドの膜中での生理活性機能を理解する上で重要である。ハチ毒中の主成分ペプチドであるメリチンとオピオイド κ -受容体と強い親和性を示す内因性オピオイドペプチドであるダイノルフィンは、いずれも膜との相互作用によってヘリックス構造をとることが NMR を含む多くの分光学的手法によって示唆されている¹⁻³。しかし、これらのペプチドの膜中での配向についてはまだ完全には解決できていない⁴。我々はこれらのペプチドが膜と相互作用を持つことによって、リン脂質二重膜面が磁場に平行に配向することを ³¹P NMR 分光法によって観測した。このような磁場に配向した膜を用いることによって、先に指摘した二重膜中のペプチドの配向に関する情報を得ることが期待できる。このような観点から、我々は両親媒性ペプチドによって誘起される新しいタイプの磁場配向膜の性質を明らかにする研究に着手した。

生理活性ペプチド、リン脂質二重膜、磁場配向、膜分断、膜融合

ないとう あきら、おかもと まなぶ、みずの たかし、ながお たかし、しんどう ゆりこ、つじ さとる、さいとう はじめ

【実験】 26 量体ペプチドメリチン (Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂) および 17 量体ペプチドダイノルフィン (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH) は ABI 社製 431A ペプチド合成機を用いて固相法で合成した。粗製ペプチドはさらに逆相 HPLC により精製した。精製ペプチドはメタノールにペプチドと DMPC を 1:10 のモル比で溶かし、完全に溶媒を除去した後、純水で水和した。こうして調整したリン脂質二重膜は凍結融解を 5 回繰り返した後 40℃ に保ち 12 時間程度熟成した。水和試料はジルコニア製試料管に詰め、接着剤で密封した状態で ³¹P および ¹³C NMR スペクトルの測定をおこなった。

【結果と考察】 図 1 に水和ダイノルフィン-DMPC 試料の光散乱強度測定の結果を示す。図 1 に示すように二重膜の大きさは液晶-ゲル転移点(T_m)付近で大きく可逆的に変化することが分かった。しかしながら、水和 DMPC 膜にダイノルフィンを加えるだけでは、光散乱強度の変化は起こらなかった。水和メリチン-DMPC 試料においても大きさの変化はダイノルフィン-DMPC 系程大きくないものの、やはり T_m の付近で可逆的に変化した。メリチンがこのような膜を分断したり、融合する性質のあることは既に知られているが⁴⁾、ダイノルフィンが同様の性質を示すことは今回初めて明らかになった。図 2 に水和ダイノルフィン-DMPC 系の ³¹P NMR スペクトルの温度変化を示す。MAS 条件下で測定した場合、34℃以上の温度では異方

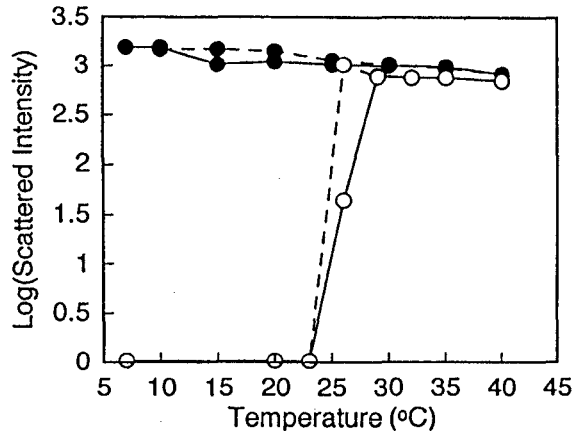


Fig. 1 Plot of light scattered intensity at 480 nm against temperature for DMPC dispersions in the presence of dynorphin. ○: Peptide is added before hydration. ●: Peptide id added after hydration.

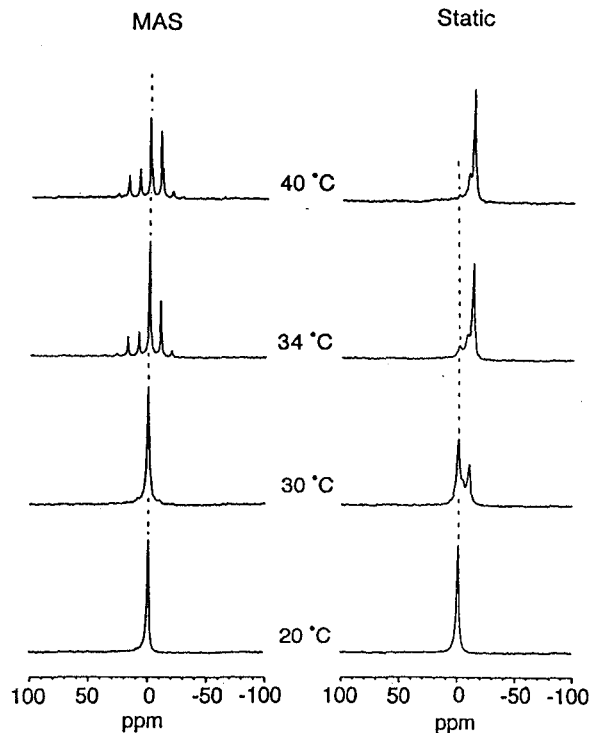


Fig. 2 Temperature variation of ³¹P NMR spectra of DMPC dispersion in the presence of dynorphin. The chemical shift values are referenced to the ³¹P NMR signal of a concentrated H₃PO₄.

性を示すサイドバンドパターンが現れたが、30℃以下ではサイドバンドは消失した。この結果は、二重膜がダイノルフィンによってT_m以下では分断され、異方性のない信号を示したのに対し、T_m以上では融合を起し異方性が現れる程度の大きさに成長していることを示している。次に、試料を静止した状態で ³¹P NMR スペクトルを観測したところ、異方性を示す温度においても -12 ppm に 1 本の先鋭な信号が現れた。T_m より温度を下げると、0 ppm 付近に新たな信号が現れ、温度の低下と共にこの信号にすべて置き換わった。この結果は T_m 以上の温度において脂質二重膜は磁場に配向していると解釈できる。図 3 に示すように同様の ³¹P NMR スペクトル変化がメリチン-DMPC 系においても観測された。メリチン-DMPC 系では温度

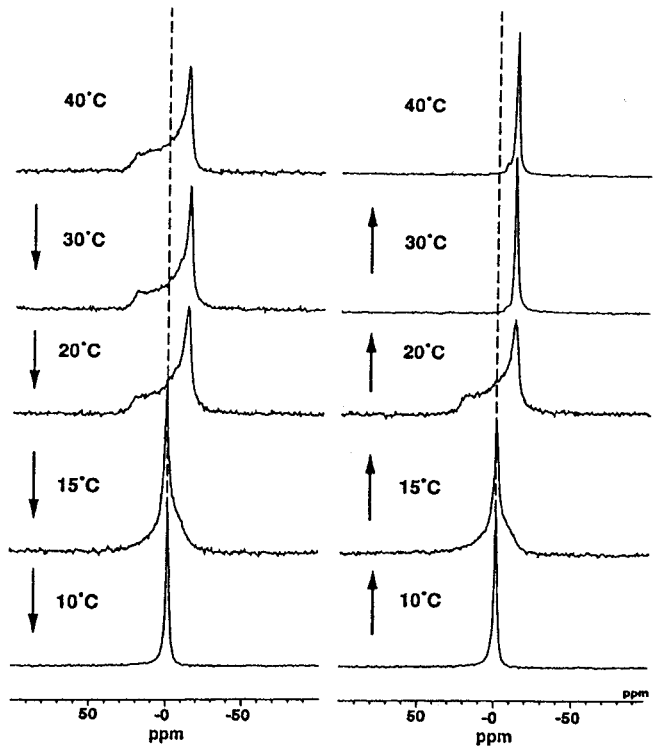


Fig. 3 Temperature variation of ³¹P NMR spectra of DMPC dispersion in the presence of melittin.

を下げる過程で膜分断は生じるが、磁場に配向する性質はあまり顕著に現れなかった。一方、低温から温度を上昇させていく過程ではダイノルフィン-DMPC系と同様磁場配向を示す先鋭な信号が -12 ppm に現れた。このように配向の挙動は少し異なるものの、ダイノルフィンとメリチンは共に脂質二重膜を配向させる性質のあることが明らかになった。メリチンが脂質二重膜を配向させる性質を用いて、メリチン自身が二重膜中でどのような配向をしているかを考察するため、[1-¹³C]Gly³, [3-¹³C]Ala¹⁵メリチンを合成し、膜中メリチンの ¹³C NMR スペクトルを観測した (図 4)。この結果、配向二重膜中で Gly³ ¹³C=O は等方化学シフト値 (173 ppm) から 6 ppm 低磁場 (179 ppm) に信号が現れた。この信号の位置は ¹³C=O 化学シフトテンソルの δ₂₂ 値と一致しており、Gly³ ¹³C=O が磁場に平行に配向していることを示唆している。C=O は α-ヘリックス軸の方向を向いていることを考慮すると、メリチンのヘリックスは磁場に平行に向いていると考えられる。一方、³¹P NMR において、配向した二重膜では ³¹P 化学シフトテンソルの δ_⊥ の位置に信号がシフトする事から、二重膜面が磁場に平行に配向していることが分かった。したがって、メリチンは二重膜の表面に平行に吸着した状態であつ磁場に平行に配向していることが明らかになった。

【まとめ】 リン脂質は負の磁気異方性を持っていることから、液晶相で秩序をもった二重膜の集合体ではアシル鎖を磁場に垂直にして配向することが可能である。実際、リン脂質に界面活性剤を混合して作成した二重膜の円盤 (bicelle) では二重膜が同様な方向で配向する報告がなされている。

メリチンにおいても Tm 以下の温度では膜分断の結果脂質二重膜がメリチンヘリックスに囲まれた円盤の形成が示唆されている⁴⁾。しかしながら、配向を示す状態は円盤が融合してより大きな二重膜の集合体になった状態であるので、円盤が形成される状態とは異なっている可能性も考えられる。一方、 α -ヘリックスは正の磁気異方性を示すので磁場に平行に配向する方が安定である。実際、ヘリックスの集合が磁場に配向する例が報告されている⁶⁾。メリチン-DMPC 系ではメリチンヘリックスは膜を貫通しているのではなく膜表面に存在し、磁場に平行に配向する事で、脂質とメリチンヘリックスの両方が磁場に対して安定な方向に配向していることが明らかになった。本研究で報告する両親媒性ペプチドを含む磁場配向二重膜は、これまでに報告されている bicelle やプレートグラス上での配向膜系に比べて、より生体膜に近いモデル膜であるので、今後詳細な磁場配向の機構解明と、膜ペプチドや膜蛋白質への応用研究が期待される。

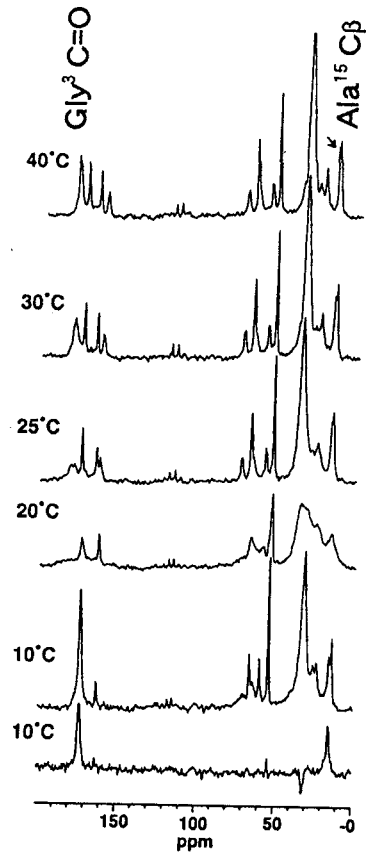


Fig. 4 Temperature variation of ^{13}C NMR spectra of DMPC dispersion in the presence of melittin in the static condition. The chemical shift values are referenced to the TMS.

References

- 1) F. Inagaki, I. Shimada, K. Kawaguchi, M. Hirano, I. Terasawa, T. Ikura, and N. Go, *Biochemistry*, 28, 5985 (1989).
- 2) A. Okada, K. Wakamatsu, T. Miyazawa, and T. Higashijima, *Biochemistry*, 33, 9438 (1994).
- 3) M.R. Tessmer and D. A. Kallick, *Biochemistry*, 36, 1971 (1997).
- 4) C.E. Dempsey, *Biochim. Biophys. Acta*, 1031, 143 (1990).
- 5) C.R. Sanders, II, and G.C. Landis, *Biochemistry*, 34, 4030 (1995).
- 6) T.A. Cross, P. Tsang, and S.J. Opella, *Biochemistry*, 22, 721 (1993).

(北大院理¹、北工研²、九大理³)○末武徹也¹、津田 榮²、川畑俊一郎³、河野敬一¹、引地邦男¹、新田勝利¹**Structural Analysis of Tachycitin, an Antimicrobial Protein from Horseshoe Crab Hemocytes**○T. Suetake¹, S. Tsuda², S. Kawabata³, K. Kawano¹, K. Hikichi¹, and K. Nitta¹*Hokkaido University¹, Hokkaido National Industrial Research Institute(HNIRI)², Kyusyu University³*

Tachycitin is an antimicrobial protein located in horseshoe crab hemocytes. Here, the solution structure of tachycitin has been investigated by ¹H-NMR conformational parameters in order to clarify its functional site. The proton resonances of 72 residues out of the all 73 residues were assigned by using 2D homonuclear NMR experiments. A three-stranded anti-parallel β -sheet, and a two-stranded anti-parallel β -sheet were suggested from NOE connectivity patterns. The distance and dihedral angle restraints were derived from NOESY and DQF-COSY experiments, and used in structure calculations. It is found in the three-dimensional structure that the β -sheet regions are located at the middle of the molecule, and N- and C- terminal regions at the surface. In contrast to the β -sheet regions, the N- and C- terminal regions were not well-defined. The amide exchange rates and the temperature coefficients of these regions showed unusual properties, which were considered to be related with the antimicrobial activity of tachycitin.

【序論】

カプトガニの体液中には血球（顆粒細胞）が存在し、その細胞質は大顆粒および小顆粒により満たされている。小顆粒中に存在する抗菌タンパク質タキサイチンは73アミノ酸残基からなる塩基性タンパク質で、1分子内に5個のジスルフィド結合が存在する。また、C末端のThrはアミド化されていることが知られている。タキサイチンは、①種々の細菌の増殖を阻害する機能（抗菌活性）、②グラム陰性菌凝集機能、③キチン結合機能を有することが知られているが、その機能発現（活性）部位は特定されていない。また、N末端側の28残基は、キチン結合ドメインをもつ植物由来のタンパク質と一次構造上の相同性がある点が指摘されている。本研究では、化学シフトの二次構造依存性（CSI）、温度係数（-ppb/K）、核オーバーハウザー効果（NOE）、横緩和時間を解析することから、タキサイチンの水溶液構造と同タンパク質の有する機能発現部位について考察を行った。

【実験】

タキサイチンは、カプトガニの血球破砕物から抽出・精製した [1]。NMRサンプルとして、脱イオン水（90% H₂O/10% D₂O）にタキサイチン約7mgとTSPを少量加え、濃度約2mM、pH4.1に調製した。NMR装置は日本電子社製 JNM-A500及び600NMR分光計を用い、2次元のDQF-COSY、TOCSY（mixing time=85ms）、NOESY（mixing time=75、120、250ms）スペクトルを測定した。実験は7℃、15℃、30℃、40℃の4点で行った。アミドプロトンの化学シフトの温度依存性から温度係数を求めた。タキサイチンの軽水溶液を凍結乾燥後に重水に溶解し、そのNOESYスペクトル

キーワード：¹H-NMR、構造解析、抗菌活性、ジスルフィド結合、 β -シート

すえたけてつや、つださかえ、かわばたしゅんいちろう、かわのけいいち、ひきちくにお、にったかつとし

を測定することで、アミド交換速度の遅い残基を同定した。NMRデータの解析はSGI Indigo2ワークステーション上で行った。2次元NMRシグナルの処理にはNMRPipeを用い、シグナルの帰属にはPIPP、STAPP、CAPPプログラム群を用いた。スピン結合定数 $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ はDQF-COSYスペクトルから見積もり、6Hz以下を(α)、8Hz以上を(β)、その中間を(-)に分類した。得られたNOEはその強度により強、中、弱に分類し、それぞれ1.6~2.7Å、1.6~3.5Å、1.6~5.0Åの束縛とした。構造計算にはX-PLOR Version 3.851を用い、束縛条件として、740個のNOEの距離情報、36個の二面体角情報、10個の水素結合情報、5個のジスルフィド結合情報を用いた。

【結果と考察】

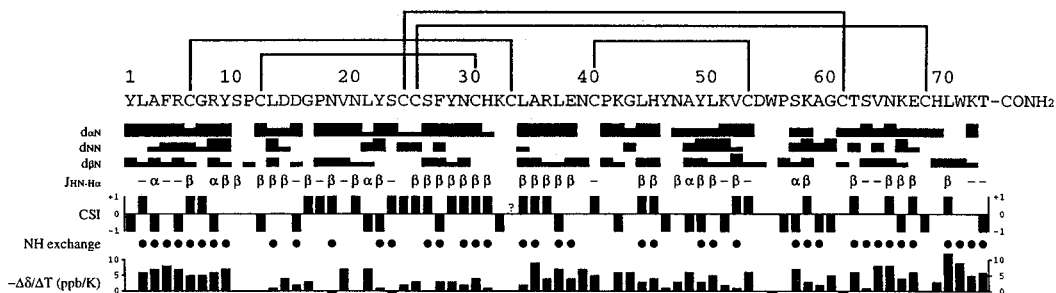


Fig. 1 Summary of the sequential NOE connectivities, coupling constants, chemical shift index for α protons, slowly exchanging amide protons, and temperature coefficients for tachycitin. $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ represents the values of $J < 6\text{Hz}(\alpha)$, $J > 8\text{Hz}(\beta)$. Intermediate J s are represented by a dash (-). $-\Delta\delta/\Delta T$ represents temperature coefficients.

タキサイチン水溶液の溶解度は、pH3.6~5.0の酸性側で高くなった。したがって、測定条件をpH4.1に選んだ。

各種二次元NMR法を用いた ^1H -NMRシグナルの連鎖帰属は73アミノ酸残基のうちCys33を除く72残基について終了した。帰属の結果得られたNMR情報を図1にまとめて示す。化学シフトの二次構造依存性 (Chemical Shift Index method; CSI) を用いた解析結果とスピン結合定数 $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ による解析結果および、 β シートに特徴的なNOEの観測によって、図2のような3本鎖逆平行 β シート (Gly16-

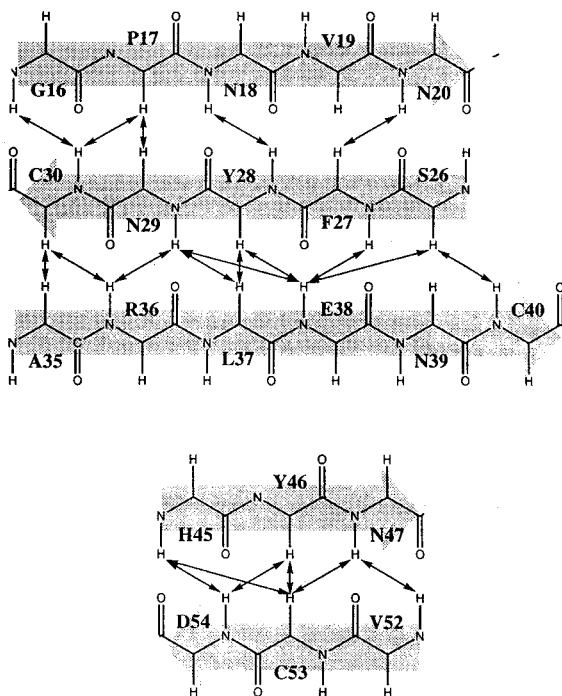


Fig. 2 Long-range NOEs observed for β -sheet regions of tachycitin.

Asn39)と2本鎖逆平行 β シート(His45-Asn47, Val52-Asp54)の存在が示された。 β シート内部で水素結合に関与すると考えられるアミドプロトンの温度係数は極めて小さかった。現在までに得たNMR情報を用いて構造計算を行った結果、 β シート領域はタキサイチンのおよそ中央に位置しており、 β シートがタキサイチンの主要な二次構造要素であることが示された(図3)。したがって、タキサイチンの骨格構造は β シートとジスルフィド結合によって形成されていると考えられる。しかし、得られた全体構造の中でN末端とC末端の領域は収束が悪く、両領域には α ヘリックス、 β シートの形成が見出されなかった。N末端側のセグメント(Leu2-Tyr9)とC末端側のセグメント(Leu70-Thr73)の温度係数はすべて連続して5ppb/K以上であった。DQF-COSYスペクトル中で、N末端側の4残基とC末端側の2残基にはピークの先鋭化が見られた。これらの結果は、タキサイチンの両セグメントが①特定の二次構造を形成していない、②分子内水素結合性の低い状態になっている、③比較的運動性の高い状態になっていることを示唆している。一方、両セグメントのアミド基の水素交換速度は遅いことが示された。この結果は、両セグメントのアミド基は溶媒に対して完全に露出した環境にはないことを示している。すなわち、タキサイチンのN、C両セグメントは分子内に折り畳まれておらず、分子間相互作用に関わる状態になっていると考えられる。本実験の高濃度水溶液条件下において、タキサイチンはN、C両セグメント部位において自己会合をしている可能性が考えられた。この自己会合は両セグメントに存在する疎水性残基同士の相互作用によりもたらされると推測された。他の多くのタンパク質について、特定の二次構造を有さず運動性の高い部位がタンパク質分子の活性に関わることが指摘されている。このことから本研究の結果は、タキサイチンが抗菌活性を示す際の標的物質との結合部位あるいは、グラム陰性菌凝集機能を示す際の細菌同士をつなぎ合わせる部位がN末端とC末端の領域にある可能性を示している。

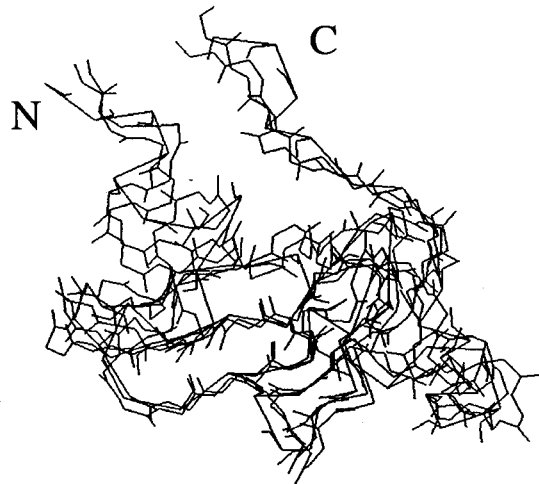


Fig. 3 Superposition of backbone atoms of 3 structures.

参考文献

- [1] Kawabata, S., Nagayama, R., Hirata, M., Shigenaga, T., Agarwala, K. L., Saito, T., Cho, J., Nakajima, H., Takagi, T. and Iwanaga, S. (1996) *J. Biochem.* **120**, 1253-1260.

(東大・院薬系) 榛葉信久, 坂倉正義, 加藤晃一, 高橋栄夫 (生物工研) 田中富士枝, 藤井郁雄, (機能水研) 荒田洋治, (東大・院薬系) 〇嶋田一夫

Dynamical Structure of Antigen Binding Site of Catalytic Antibody 6D9

Nobuhisa Shimba¹, Masayoshi Sakakura¹, Koichi Kato¹, Hideo Takahashi¹, Fujie Tanaka², Ikuo Fujii², Yoji Arata³ and 〇Ichio Shimada¹
(The University of Tokyo¹, BERI², Water Research Institute³)

Antibody 6D9 is a catalytic antibody that activates a prodrug of antibiotic (chloramphenicol monoester) to generate the active drug (chloramphenicol) by catalyzing the hydrolysis of ester bond. From the results of enzymatic and molecular biological studies for 6D9, it has been indicated that 1) the affinity of the transition state analogue (chloramphenicol phosphonate) for 6D9 is able to explain the stabilization of the transition state, 2) His27d(L) is responsible for the hydrolysis. In the present paper, we report an NMR study of the antibody-combining sites of 6D9 by using Fab analogues selectively labeled with ¹³C or ¹⁵N. On the basis of the NMR data obtained, we discuss the dynamical structures of the antibody-combining sites of 6D9 and the recognition mechanism for the substrate and the transition state analogue.

【序】免疫系において中心的な役割を担う抗体は、多様かつ厳密な抗原認識能をもつ。一方、酵素は化学反応過程における遷移状態を安定化することにより反応を促進する。したがって、遷移状態アナログを認識する抗体の中には触媒能を有するものが存在し、この様な抗体を触媒抗体と呼ぶ。

本研究で用いる抗体 6D9 は、遷移状態アナログである chloramphenicol phosphonate を特異的に認識し、chloramphenicol monoester を chloramphenicol へと加水分解する。触媒抗体 6D9 の酵素化学的および分子生物学的研究より、1) 遷移状態の安定化が遷移状態アナログの結合定数で説明できること、2) His27d(L) が触媒活性に重要な残基であることが示されている。本研究では、NMR を用いて 6D9 の抗原認識部位の動的立体構造および活性発現機構の解析を行った。

【方法】ハイブリドーマ細胞を各種標識アミノ酸 (¹³C, ¹⁵N) を含む低濃度の血清存在下の培地中で培養し、安定同位体標識された抗体を得た。得られた抗体を酵素消化することにより、6D9 の抗原結合フラグメント(Fab)を調製し NMR 測定試料とした。また、ハプテンとして chloramphenicol phosphonate (transition state analogue: TSA), chloramphenicol monoester (substrate) を用いた。今回行った

触媒抗体, 抗原認識部位, 動的立体構造解析, chloramphenicol

しんば のぶひさ, さかくら まさよし, かとう こういち, たかはし ひでお, たなか ふじえ, ふじい いくお, あらた ようじ, しまだ いちお

短時間 (2~3 時間程度) の NMR 測定では, substrate の加水分解反応の進行による NMR シグナルの経時変化は見られなかった.

【結果・考察】 1. 抗原認識部位の同定

触媒抗体の substrate 複合体, および TSA 複合体の NMR 測定を行った. ハプテン添加に伴う化学シフト変化より, substrate および TSA は, 共に V_H , V_L 界面に結合していることが示された.

2. 抗原認識部位の動的立体構造

ハプテン非存在下および Substrate 存在下において抗原認識部位に存在する Y100j(H), Y32(L)のシグナルは, 化学交換による広幅化により, 観測されないのに対し, TSA 存在下のみ観測された (Fig.1). 同様な現象は, His97(H), Phe100k(H) でも見られた. したがって, ハプテン非存在下および substrate 存在下において抗原認識部位に存在するこれらの残基には, 動的多形性が存在しているが, TSA 存在下では多形性が存在していないことが示された.

3. 基質および遷移状態アナログの結合過程の解析

ストップトフロー蛍光測定により, substrate, および TSA との結合過程の解析を行ったところ, substrate 結合は一相性の蛍光強度の変化を, TSA 結合では二相性の変化を示した. したがって, TSA の認識過程は二段階的に進行し, 二段階目の induced fit の過程が存在することで TSA をより強く認識していることが判明した.

4. His27d(L)の側鎖イミダゾール環の存在状態

6D9 の His27d(L)のアミド窒素シグナルの pH 依存性の解析したところ, substrate 存在下の pKa は, ハプテン非存在下のものと同じ値を示したのに対し, TSA 存在下では pKa が大きく低下することが明らかとなり, His27d(L)は substrate と TSA とでは異なる相互作用様式をとることが示された. また, His 残基の側鎖イミダゾール環の窒素を ^{15}N 標識した Fab を調製し側鎖 NH シグナルの検出を試みたところ, ハプテン非存在下および substrate 存在下においては, 7 個存在する His 残基のうち定常領域に位置する His199(H)のみ観測されたのに対し, TSA 存在下では, 新たに His27d(L)の側鎖 NH シグナルが観測された. したがって, TSA 存在下において His27d(L)の側鎖 NH は水素結合していることが示された. したがって, この水素結合が遷移状態を安定化していると考えた.

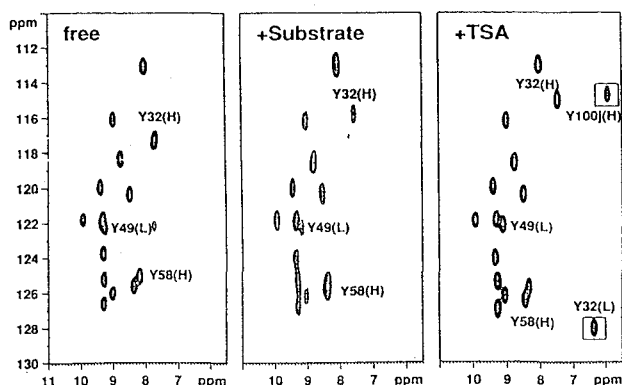


Fig. 1 1H - ^{15}N HSQC spectra for [^{15}N -Tyr] 6D9 Fab fragment

r(UUAGGG)配列特異的な RNA 結合蛋白質 hnRNPD の構造
及び RNA との相互作用の解析

(横国大・工¹、三菱化学・生命研²、東工大・生命理工³)

永田 崇¹、〇片平正人¹、栗原靖之¹、佐伯純一¹、長岡正司¹、
金美希¹、上杉晴一¹、河野俊之²、柳田保子³、石川冬木³

Structure of r(UUAGGG)-specific RNA binding protein, hnRNPD, and its interaction with RNA

Takashi Nagata¹, O Masato Katahira¹, Yasuyuki Kurihara¹, Junichi Saeki¹, Masashi Nagaoka¹, Mi Hee Kim¹, Seiichi Uesugi¹, Toshiyuki Kohno², Yasuko Yanagida³, Fuyuki Ishikawa³

¹Faculty of Engineering, Yokohama National University, ²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, and ³Faculty of Life Science, Tokyo Institute of Technology

hnRNPD protein is one of heterogeneous ribonucleoproteins complexed with pre-mRNA, and its involvement in splicing is suggested. hnRNPD binds to r(UUAGGG)_n sequence specifically. We have determined the three-dimensional structure of the RNP-motif RNA binding domain of hnRNPD, D1H. βαββαβ folding typical for the RNP-motif domain is found, a four-stranded β-sheet being supported by two α-helices on the back side. N-capping is found for the two α-helices. Two short β-strands are found between α2 and β4, additionally. Chemical shift perturbation experiments with r(UUAGGG)_n (n=1,2,4) have demonstrated that the D1H interacts with these RNAs on the side of the β-sheet. The interactions of the residues between β1 and α1 with the RNAs are suggested to be important for the specific binding. Many intermolecular NOEs are being identified by isotope-filter experiments, giving an insight of the complex structure.

(序) hnRNPD 蛋白質は、heterogeneous ribonucleoprotein (hnRNP) の 1 種であり、核内で pre-mRNA と複合体を形成している。hnRNPD は r(UUAGGG)配列に特異的に結合する。この配列は mRNA の 3' スプライシング配列に一致しており、この蛋白質のスプライシングへの関与が示唆されている。hnRNPD は RNP モチーフ型 RNA 結合ドメインを 2 つタンデムに有している。そして、N 末端側のドメイン(D1H) 単独でも塩基配列特異的な結合能を有している。そこで我々は D1H 単独の立体構造及び r(UUAGGG)配列との相互作用を NMR により解析した。

(方法) ¹⁵N 標識及び ¹³C, ¹⁵N 2 重標識した D1H(112 アミノ酸)は、大腸菌により大量生産し、各種カラムで精製した。r(UUAGGG)₄(UUAGGG 配列が 4 回繰り返した 24mer)、r(UUAGGG)₂(12mer)、r(UUAGGG)(6mer)は核酸合成機により合成し、各種カラムで精製した。各種 2 重共鳴、3 重共鳴多次元 NMR は、Bruker Drx600 及び AMX500 を用いて測定した。測定データのプロセスは Xwin-NMR、Felix 及び NMRPipe を用いた。構造計算は X-PLOR を用いた Simulated annealing により行った。

(結果と考察) **D1H の立体構造** CBCA(CO)NH, HNCACB, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY, ¹³C-及び ¹⁵N-edited NOESY-HSQC, 同 TOCSY-HSQC 等の測定に基づき主鎖と側鎖の H, C 及び N の帰属を行った。次に測定より得られた距離(約 1000 個)及び内部回転角情報に基づき、構造決定を行った(主鎖の r.m.s.d. で 0.6Å)。D1H は RNP モチーフ型 RNA 結合ドメインに共通な βαββαβ のフォールディングを有し、β-シート面を 2 本の α-ヘリックスが裏打ちした構造をとっていた(図 1)。

RNA 結合蛋白質、hnRNP、複合体、立体構造、NMR

ながたかし、かたひらまさと、くりはらやすゆき、さえきじゅんいち、ながおかまさし、きむみひ、うえすぎせいいち、こうのとしゆき、やなぎだやすこ、いしかわふゆき

2つの α -ヘリックスの始まりにはキャッピング構造が形成されていた。また $\alpha 2$ と $\beta 2$ の間には、2つの短い β 鎖が見出された。

RNAとの相互作用 ^{15}N 標識 D1H に $r(\text{UUAGGG})_4$, $r(\text{UUAGGG})_2$ 及び $r(\text{UUAGGG})$ を添加して、ケミカルシフトのパーターベーションを ^{15}N -HSQC でモニターすることにより、D1H と RNA との相互作用について調べた。D1H は長さの異なる3種の RNA のいずれとも同様な特異的相互作用をする事がわかった。パーターベーションが観測された残基を立体構造の上にマッピングした結果(図1)、D1H は RNA との相互作用を β -シート側の面で行っている事がわかった。RNP モチーフを有するが、塩基配列特異性が低い他の蛋白質における同様な実験の結果と比較すると、 $\beta 1$ と $\alpha 1$ の間に位置する残基がなす相互作用が、塩基配列の特異的な認識に参与している可能性がある。

複合体の立体構造決定に向けて、複合体における分子内及び分子間 NOE の抽出を各種他核フィルター法によって行った。^{1,2,3} 図2にダブルチューンド・ダブル-halfフィルター¹を用いた結果を示してある。図2の(a)と(b)を比較すると、(a)で見られた蛋白質分子内の NOE(RNA のシグナルは 3ppm より高磁場には存在しない)が(b)ではほとんど消えており、フィルターが効率よく働いている事が確認された。図2の(c)と(d)を比較することにより、多くの分子間 NOE が(d)で捉えられている事がわかった。他のフィルターによっても分子間 NOE を抽出し、複合体の構造に関する知見を得つつある。

1. Folmer et al. (1995) J. Biomol. NMR, 5, 427-432. 2. Ikura et al. (1992) J. Am. Chem. Soc., 114, 2433-2440. 3. Ogura et al. (1996) J. Biomol. NMR, 8, 492-498.

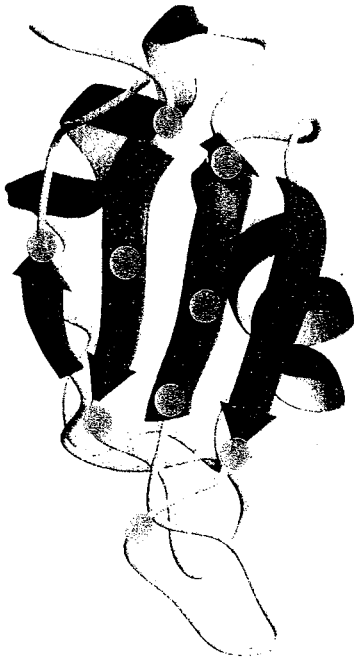


Figure 1 Mapping of the residues (circles) interacting with RNA on the D1H structure.

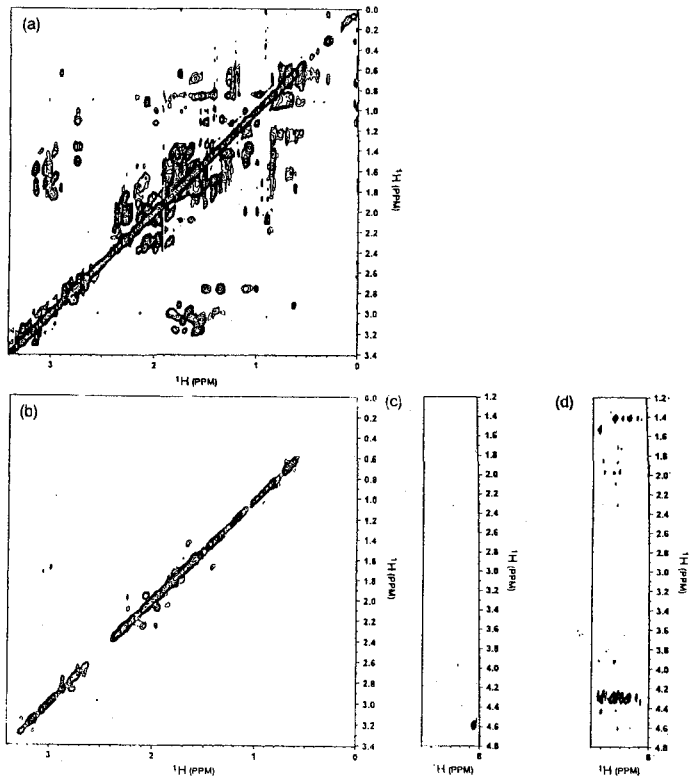


Figure 2 Double tuned-double half filter experiments. Intramolecular NOEs appear in (a) and (c), and intermolecular NOEs in (b) and (d).

分子量50kDaの蛋白質のNMR 大腸菌転写系から2例

(阪大蛋白研¹、国立遺伝研²、ソウル大薬³、名大理⁴)○山崎俊夫¹、大友崇紀¹、李奉振³、村上克彦²、石浜明²、饗場弘二⁴、
照屋健太¹、京極好正¹

NMR of 50 kDa Proteins, Two Examples from E. coli Transcription System (Institute for Protein Research, Osaka Univ.¹; National Institute of Genetics²; College of Pharmacy, Seoul National Univ.³; Faculty of Science, Nagoya Univ.⁴) Toshio Yamazaki¹, Takanori Otomo¹, Bong Jin Lee³, Katsuhiko Murakami², Akira Ishihama², Hiroji Aiba⁴, Kenta Teruya¹, Yoshimasa Kyogoku¹

For assigning resonances and solving structures of larger proteins of the 50 kDa size, deuterium labeling is introduced in addition to the ¹³C and ¹⁵N uniform labeling. We present two examples of assignment of backbone resonances of such large proteins, the N-terminal domain of the alpha subunit of E. coli RNA polymerase (a dimer of 239 amino acid residues) and cyclic AMP receptor protein (a dimer of 210 amino acid residues), which is a transcription activator. We made a 70~80 % randomly deuterated protein samples and performed CT-HNCA, CT-HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB experiments.

安定同位体¹³Cと¹⁵Nによる標識に加え、重水素化を併せ用いた方法の開発により、分子量5万程度までの蛋白質のNMR信号の帰属や構造決定が次第に可能になってきている。発表では、分子量約5万の2つの蛋白質の主鎖帰属の応用例について述べる。一つは、E. coli由来のRNAポリメラーゼαサブユニットのN末端ドメインである。239アミノ酸残基からなるダイマーである。β、β'サブユニットを集合させコア酵素を形成する。転写開始において1群の(クラス2)転写因子とも相互作用する。二つ目の例はcyclic AMP receptor proteinである。210アミノ酸残基からなるダイマーである。この転写活性化因子は多くのプロモータに付き、プロモータによってクラス1またはクラス2の転写活性化因子として働く。これらの蛋白質を70~80%の重水培地で産生しランダムに重水素化した試料を作成した。CT-HNCA, CT-HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB, ¹⁵N HSQC-NOESYなどの重水素化によってより高い分解能と高感度のスペクトルを得る実験を行った。それぞれ、2日から4日の積算で大部分の帰属ができる質のスペクトルを得た。現在帰属を行っているところである。この2例では溶媒条件を最適化することが重要であった。もともと、非特異的会合を起こしやすい蛋白質であったのでその溶媒条件、蛋白質濃度、測定温度の最適化が不可避であった。

CRP, RNA polymerase, triple resonance spectroscopy

やまざきとしお、おおともたかのり、てるやけんた、りぼんじん、むらかみかつひこ、いしはまあきら、あいばひろじ、てるやけんた、きょうごくよしまさ

ヒト損傷DNA修復タンパク質XPAのDNA結合、タンパク質結合ドメインの立体構造解析と相互作用

(奈良先端大バイオ¹、阪大細胞生体工学センター²、生体分子工学研³、阪大蛋白質研⁴) ○白川昌宏¹、池上貴久¹、田中亀代次²、森川耿右³、京極好正⁴

Structure determination of the human DNA repair factor XPA, and its interaction with DNA and Replication protein A

(¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ²Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, ³Biomolecular Engineering Research, ⁴Institute for Protein Research) Masahiro Shirakawa¹, Takahisa Ikegami¹, Kiyoji Tanaka², Kosuke Morikawa³, & Yoshimasa Kyogoku⁴

Nucleotide excision repair (NER) is the ubiquitous pathway by which a broad spectrum of DNA damage is removed from the genome. The importance of NER has been evidenced by studies on the human inherited disease, xeroderma pigmentosum (XP). The gene that complements XP group A cells encodes a zinc-finger protein XPA, which preferentially binds to UV- or chemical carcinogen- damaged DNA. XPA has also been shown to bind to other repair factors, and to act as a key element in NER complex formation at damage site. The solution structure of the central domain of XPA, which is responsible for the preferential binding to damaged DNA and replication protein A (RPA), has been determined by multi-dimensional NMR. It consists of a zinc-coordinated subdomain and a carboxyl-terminal subdomain. The NMR spectra of the complexes allowed us to identify the major DNA binding surface and a RPA binding surface.

生体内のDNAはシスプラチン等の化学物質、紫外線や活性酸素などによって常に損傷を受けている。遺伝子修復はこれらのDNA損傷を修復することにより、変異が固定化するのを防ぐ生体防御システムである。特にヌクレオチド除去修復(NER)は、原核生物から真核生物に幅広く存在し、紫外線や化学物質によって引き起こされる多様な損傷を除去する重要な修復システムである。

ヒト損傷DNA修復タンパク質XPAは紫外線、シスプラチン等によって損傷を受けたDNAに特異的に結合すること、他の幾つかの修復因子であるXPG, ERCC1, TFIIHやReplication protein A (RPA)と複合体を形成することから、NERの初期のステップにおける損傷DNAの認識と修復タンパク質複合体 (repairsome) の形成において中心的な役割を果たしていると考えられている。その重要性は*xpa*遺伝子の変異・欠失が重篤な常染色体劣性遺伝子疾患である色素性乾皮症(*xeroderma pigmentosum*)の原因となることから明らかである。

遺伝子修復、タンパク質-タンパク質相互作用、ヌクレオチド除去修復、DNA結合タンパク質、多重共鳴多次元NMR

しらかわまさひろ、いけがみたかひさ、たなかきよじ、もりかわこうすけ、きょうごくよしまさ

今回、われわれはヒトXPAの中央ドメインの立体構造を決定したので報告する。プロテアーゼによる限定分解や欠失変異体による解析から同定された中央ドメインはXPA全長273残基中の残基98-219に対応し、DNA結合、及びRPA結合活性を維持する。重水素ラベル体を含めた種々の安定同位体標識タンパク質を利用した多重共鳴多次元NMR法により、ほぼ全ての¹H, ¹³C, ¹⁵N核の帰属を行い、距離情報、2面角情報の収集を行った。さらに得られた情報を基に中央ドメインの溶液中での立体構造をシミュレーテッド・アニーリング法によって決定した。

決定された中央ドメインは立体構造はN末側のZn-fingerドメインとC末端側ドメインの2つのサブドメインからなり、両者は8アミノ酸のリンカーに繋がれている。それぞれのサブドメインの立体構造は主鎖重原子の平均構造へのR.m.s.d.で0.5 Å以内の分解能で決定している。2つのサブドメイン間には疎水性パッチによる相互作用が見られたが、サブドメイン間の配向を詳細に決定することは出来なかった。

(Cys)₄タイプのフィンガーを持つZn-fingerサブドメインは血球系の転写因子であるGATA-1やステロイドホルモンレセプターなどのDNA結合タンパク質に見られるZn-fingerと同様のZn配位や局所構造をもつ。しかし、2次構造や全体のフォールディングは構造が既知のZnフィンガー構造とは異なり、新規の立体構造を持つ事が判明した。また α/β 構造を形成するC末端サブドメインも他のDNA結合タンパク質との立体構造上での相同性を示さない。

シスプラチンによって損傷を受けたDNAとXPA中央ドメインの複合体のスペクトル解析によって、XPAのDNA結合部位を明らかにすることができた。また修復因子としても機能するRPAの持つ一本鎖DNA結合ドメインとの複合体のスペクトル解析によって、XPAのRPA結合部位の同定に成功した。これらの立体構造情報を基にDNA損傷部位におけるXPAによる修復複合体形成の機構を考察したい。

常染色体優性遺伝病である家族性線種性ポリポーシス(FAP)の原因遺伝子のコードするAPCタンパク質は細胞接着因子である β カテニンと結合することにより、細胞接着やWntシグナル伝達系を制御する癌抑制因子である。またそのC末端部分はショウジョウバエ癌抑制遺伝子産物DlgのヒトホモログであるhDlgの持つPDZ-2ドメインと特異的に結合し、制御を受けていると考えられている。APCのC末端部とhDlgのPDZ2ドメインの複合体の立体構造解析を行ったので合わせて報告する。

以上の2種の遺伝性疾患の原因遺伝子のコードするタンパク質の機能を明らかにするために、XPA-DNA, XPA-RPA, APC-hDlgなどの様々なタンパク質-核酸、タンパク質-タンパク質相互作用の解析を行った。高磁場NMRがタンパク質の立体構造決定や生体高分子間の相互作用の解析の効率をいかに向上させることが出来るか、またどのような構造パラメーターを付加できるのかについても議論したい。

RGLタンパク質のRas結合ドメインの高次構造解析

(理化学研究所・細胞情報伝達研究室¹, 東京大学大学院・理学系研究科², 理化学研究所・遺伝生化学研究室³, 広島大学・医学部⁴)

○木川隆則¹, 岩堀幸太^{1,2}, 幾田まり^{1,2}, 遠藤 誠^{1,2}, 森田哲史^{1,2}, 伊藤 隆³, 白水美香子¹, 菊池 章⁴, 横山茂之^{1,2}

Solution structure of the Ras-binding domain of RGL

T. Kigawa¹, Kohta Iwahori^{1,2}, Mari Ikuta^{1,2}, Makoto Endo^{1,2}, Tetsuhito Morita^{1,2}, Yutaka Ito³, Mikako Shirouzu¹, Akira Kikuchi⁴, and Shigeyuki Yokoyama^{1,2}

¹Cellular Signaling Laboratory, the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Saitama, ²Graduate School of Science, the University of Tokyo, Tokyo, ³Laboratory of Cellular and Molecular Biology, the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Saitama, and ⁴Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan.

Ral GDP dissociation stimulator-like (RGL) has been identified to be a target protein of Ras. The Ras-binding domain of RGL (RGL RBD; residues 632-734) binds with the effector region of Ras, as the Ras-binding domain of Raf-1 (Raf RBD) does, although they share no apparent sequence homology. The solution structure of the RGL RBD was solved by the multi-dimensional NMR spectroscopy. The overall fold of the RGL RBD consists of a five-stranded β -sheet and two α -helices, which is similar to that of the Raf RBD. Backbone chemical shift perturbation of the RGL RBD upon binding with Ras was also examined. The interaction interface (β 1, β 2, and α 1) of the RGL RBD with Ras is similar to that of the Raf RBD, although the interacting residues are slightly different.

[序]

細胞内情報伝達において、重要な役割を果たすRasの標的タンパク質の候補として同定されたRGL (RalGDS-like) タンパク質は、低分子量GTP結合タンパク質RalのGDP解離促進因子であるRalGDSと、一次構造上70%以上の相同性があり、RasからRalへの情報伝達を仲介する。RGLのRas結合ドメイン(RGL RBD)はC末端領域 (632-

キーワード：タンパク質, 高次構造, タンパク質間相互作用, RGL, Ras

きがわ たかのり, いわほり こうた, いくた まり, えんどう まこと, もりた てつひと, いたう ゆたか, しろうず みかこ, きくち あきら, よこやま しげゆき.

734アミノ酸残基)に存在し、これを介してRasのエフェクター領域と相互作用している。このドメインはRasのエフェクター領域と結合するが、ほぼ同じ領域に結合するRaf-1のRas結合ドメイン(Raf RBD)とは、一次構造レベルではほとんど相同性がない。従って、その高次構造を調べることにより、Rasの標的タンパク質の認識・識別、それによるシグナル伝達経路の選択を知ることができると考えられる。そこで本研究では、RGL RBDの高次構造をNMRを用いて決定し、更にRasとの相互作用を調べた。

[方法]

大腸菌による大量発現系を用いて、各種の安定同位体標識 (^{15}N , $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, 50% $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) をしたRGL RBDを調製した。RGL RBDは、低塩濃度ないしは酸性条件下において不安定なことがわかったため、NMRスペクトルの測定は、50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5 mM DTT中で298 Kでおこない、装置はBruker社のAMX600 および DRX500を用いた。主鎖の連鎖帰属には、3D HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NHを用い、NOEの解析には3D ^{13}C -edited NOESYおよび ^{15}N -edited NOESYを用いた。スペクトルの処理にはAzaraを用い、解析はFelix上でおこなった。高次構造は、X-PLOR 3.1を用いて、距離情報(1253個)と二面角情報(39個)を基にsimulated annealing法により決定した。

また、50% $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識されたRGL RBDと非標識のRas(D30E/E31K) •GMPPNPをモル比1 : 2で混合し、3D HNCA, HN(CO)CA, および ^{15}N -edited NOESYを用いて主鎖の帰属をおこなった。

[結果・考察]

NOEの解析より、N末端十数残基は構造を取っていないことがわかったので、構造計算は647残基以降についておこなった。収束の良い20個の構造(図1 a)の平均構造からの主鎖rmsdは、全体で0.95 Å, $\alpha 2$ を除く二次構造部分では0.61 Åであった。RGL RBDは、5つの β ストランドと2つの α ヘリックスからなり(図1・b), ユビキチンフォールドに属する、Raf RBDとよく似たフォールドであることがわかった。(図1 b, c)。また、最近、RalGDSのRas結合ドメインの高次構造が決定されたが、これとも極めてよく似ている。

さらに、Ras(D30E/E31K)•GMPPNPと結合したRGL RBDの主鎖のシグナルを、RGL RBD単独の主鎖のシグナルと比較した結果、一次構造上の非類似性にもかかわらず、RGL RBDのRas結合領域は、Raf RBDのRas結合領域とほとんど同じ領域($\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 1$, およびそれらの周辺)であることが明らかになった。しかし、残

基レベルで見ると、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 上のケミカルシフトの変化は、両RBDがほぼ同じ傾向を示すのに対して、 $\alpha 1$ 上にあるArg 681とLys 685 (Raf RBDにおいて、Rasとの結合に大きく寄与するLys 84とVal 88に相当すると考えられる)には、ケミカルシフトに大きな変化が見られない。したがって、Rasとの結合様式は、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ に関してはRaf RBDとほぼ同じであるが、 $\alpha 1$ に関しては異なっていることが示唆される。

そこで、Rasと相互作用する $\beta 1$ 、 $\beta 2$ が重なるように両者の構造を並べると、RGL RBDの $\alpha 1$ は、Raf RBDの $\alpha 1$ と比較して、よりC末端に近く位置していることがわかった (図2 a, b)。 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ に関するRasとの結合様式が、RGL RBDとRaf RBDで同じであるとする、Rasは、RGL RBDの $\alpha 1$ 、特にそのN末端側、にはアクセスしにくいと考えられ、上記の $\alpha 1$ 上のケミカルシフト変化の特徴が説明できる。このような、RGL RBDとRaf RBDにおける、Rasとの結合様式の共通性と相違性により、Rasから下流因子へのシグナル伝達経路 (Rafを介する経路とRGLを介する経路) の選択がおこなわれていると考えられる。さらに別の伝達経路を仲介するPI3 キナーゼ等のRBDの構造解析が進めば、Rasのシグナル伝達機構が、高次構造の面から明らかになると期待される。

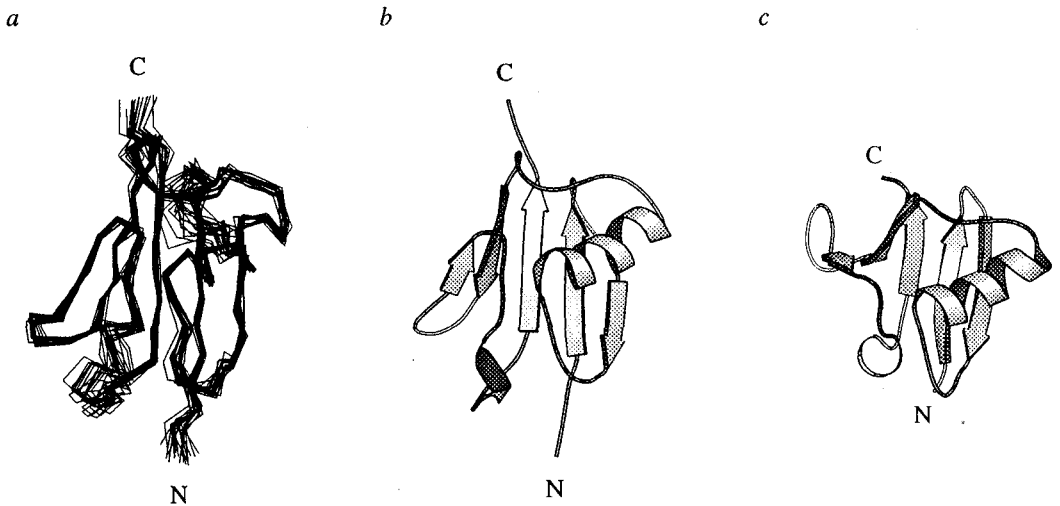


Fig. 1 (a) Best-fit superposition of the backbone of the 20 simulated annealing structures of the RGL RBD. Ribbon representation of (b) the RGL RBD and (c) the Raf RBD.

アトピー性疾患原因ダニアレルゲン Der f 2 の立体構造決定

(¹都臨床研、²日本女子大、³アサヒビール基盤研)市川さおり^{1,2}、○島中秀樹¹、結城敏文³、岩本奈美子³、小椋賢治¹、奥村康³、稲垣冬彦¹

Tertiary Structure Determination of Der f 2, the Mite Allergen for Atopic Diseases

(Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japan Women's University, Asahi Breweries Ltd.)

Saori Ichikawa^{1,2}, ○Hideki Hatanaka¹, Toshifumi Yuuki³, Namiko Iwamoto³, Kenji Ogura¹, Yasushi Okumura³ and Fuyuhiko Inagaki¹

The tertiary structure of Der f 2, the major mite allergen for atopic diseases, has been determined by using triple-resonance three-dimensional NMR techniques. Der f 2 was found to be a single-domain protein of immunoglobulin fold, and most similar to the two regulatory domains of transglutaminase structurally. This fact and other small pieces of information hinted that Der f 2 is related to the innate antibacterial defense system in mites, and we actually found that Der f 2 binds to the bacterial surface. This is the first clue to the biological function of this class of proteins including its homologs in human and other animals.

ダニは、重い喘息や皮膚炎などの症状を引き起こすアトピー性疾患に関するアレルゲンの最も重要な発生源である。我々は、治療への貢献を目的として、ダニのメジャーアレルゲン蛋白質 Der f 2 (129 残基) の構造決定を行った。

¹³C, ¹⁵N ラベルした組換え Der f 2 を大腸菌で発現させ、各種の 3 重共鳴 3 次元 NMR スペクトルや HC(C)H-TOCSY, NOESY-HSQC など測定した。CBCA(CO)NH などの 4 種の 3 次元スペクトルを半自動解析できるプログラムを用いることで、主鎖の連鎖帰属は短時間で終了した。側鎖の帰属、NOE の帰属と構造計算の後、得られた構造の RMSD (root-mean-square difference) を全残基で算出すると、主鎖(N, C α , C')について $0.90 \pm 0.15 \text{ \AA}$ 、側鎖を含む重原子で $1.44 \pm 0.17 \text{ \AA}$ となった。

決定された構造から、Der f 2 は immunoglobulin-like fold を持つ単一ドメイン蛋白質であることが判明した。Dali データベースによると最も近い構造はトランスグルタミナーゼの第 3・4 ドメインであった。第 2 ドメインがもう一つのダニアレルゲン Der f 1 と構造が似ていることは進化的に興味深い。その他の事情も考えあわせた末、我々は Der f 2 がダニ自身の自己防御系と関与していると予想して、大腸菌と結合するか調べたところ実際に結合した。Der f 2 の類縁体はダニ以外ではヒト精液、牛乳、蛾の気管で見ついているが、いずれも機能未知であり、これはこのクラスの蛋白質の機能を示唆する初めての結果である。さらに文献調査から、花粉や卵、牛乳のメジャーアレルゲンがどれもそれぞれの種の自己防御に関わることもわかってきている。

アトピー性疾患、ダニアレルゲン、Der f 2、三重共鳴三次元 NMR、立体構造

いちかわ さおり、はたなか ひでき、ゆうき としふみ、いわもと なみこ、おぐら けんじ、おくむら やすし、いながき ふゆひこ

B. Reif[†], M. Hennig[†], A. Diener[†], C. Richter[†], B. Luy[†], M. Scholz[†], J. Diener[‡], J.P. Marino[&], H. Schwalbe[†], P. Moore[‡], and C. Griesinger^{†*}

[†]Institut für Organische Chemie, Universität Frankfurt, Marie-Curie-Str. 11, D-60439 Frankfurt, Germany; [‡] Department of Chemistry, Yale University, 225 Prospect Street, P.O. Box 208107, New Haven, CT 06520-208107; [&] Center for Advanced Research in Biotechnology (CARB) 9600 Gudelsky Drive Rockville, MD 20850

Angles between two interatomic vectors are measured for structure elucidation in solution NMR. The angles can be determined directly by using the effects of dipole-dipole cross-correlated relaxation of double-quantum and zero-quantum coherences. The measured rates can be directly related to the angular geometry without a need for calibration of a Karplus-type curve as is the case for scalar J-coupling measurements and depends on the overall diffusive correlation time of the molecule as an empirical parameter. This makes the determination of torsional angles independent from the measurement of coupling constants. The two interatomic vectors can in principle be arbitrarily far apart. The method is demonstrated on the measurement of the notoriously inaccessible peptide backbone angle ψ in the protein rhodniin (1) as well as for other examples. Structural refinement based on the new cross correlated relaxation restraints will be presented.

Proton, carbon multiple quantum coherence (MQC), where all spins of heteronuclei connected by a single bond are simultaneously evolved in the transverse plane, is not relaxed by the strong dipolar interaction between these nuclei (2). This immortalization effect has recently been demonstrated for proteins (3). It will be shown that the sensitivity enhancement obtainable in constant time experiments is of the order of three for a 36mer RNA oligonucleotide (MW = 12 kDa) in MQ correlation experiments as compared to the conventional constant time HSQC sequences (4). A novel pulse sequence is used for CH₂ groups (4). The incorporation of the proposed pulse MQ-sequence building blocks into heteronuclear double and triple resonance NMR pulse sequences leads to even larger enhancement factors when applied to uniformly ¹³C labeled RNA.

Field dependent measurement of line widths provide information about fast conformational equilibria. This is used for the measurement of base opening rates in DNA. This information could be obtained so far only by adding exchange catalysts and changing the pH (5). Comparison of base pair opening of DNA duplexes in free DNA and complexes will be discussed.

- (1) Reif, B.; Hennig, M.; Griesinger, C. *Science*, **1997**, 276, 1230-33
- (2) Griffey, R. H.; Redfield, A. G. *Quant. Rev. Biophys.* **1987**, 19
- (3) Grzesiek, S.; Kuboniwa, H.; Hinck, A. P.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5312-5315; Grzesiek, S.; Bax, A. *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 335-339
- (4) J. P. Marino, J. Diener, P. B. Moore, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1997** 119, 7361-7366
- (5) Gueron, M., Leroy, L. *Methods Enzym.*, **1995**, 261

2.2 Applications of Adiabatic Pulses in Biomolecular NMR

(Varian NMR Instruments, Oxford, UK) Ěriks Kupěe

It is now widely recognized that adiabatic pulses are one of the most efficient methods for spin inversion both in wide-band and band-selective applications. The most important advantages of adiabatic pulses are a) high degree of accuracy of spin inversion and b) remarkable tolerance of RF field inhomogeneity and miscalibration. This allows one to improve the performance of many NMR experiments. For instance, adiabatic pulses have recently been extensively exploited in applications such as solvent suppression, broad band and band-selective decoupling, spin mixing, inversion, refocusing, selective excitation and suppression of multiple quantum coherences.

An overview of the basic principles of adiabatic inversion and properties of various adiabatic pulses is given. A new class of adiabatic inversion pulses [1-3], so called constant adiabaticity (CA) pulses emerges from a simple relationship which exists between the amplitude variation of the RF field and the field sweep rate :

$$k(t) = \omega_1^2(t) / q$$

where k is sweep rate, ω_1 is the amplitude variation function and q is the adiabaticity constant. This establishes a parity between the amplitude modulation and frequency modulation profiles. Essentially infinite number of pairs of amplitude and frequency modulation functions, which give excellent inversion profiles can be derived.

It is then demonstrated that adiabatic inversion pulses can be used to create extremely efficient decoupling sequences. Essentially unlimited decoupling bandwidth can be achieved [4]. On the other hand, adiabatic decoupling gives very clean off-resonance performance in homo-nuclear applications allowing decoupling of relatively wide frequency range in

close proximity to the observation bandwidth. This has been extensively used to decouple beta carbons while observing C α resonances in such important 3D experiments as HNCA, HN(CO)CA, HCCH-TOCSY and other [5].

One of the drawbacks of adiabatic decoupling is relatively strong decoupling sidebands. New techniques for sideband suppression have been developed. Particularly, it is shown that the sweep direction can strongly affect the intensity and appearance of the decoupling sidebands.

Adiabatic pulses can also be extremely useful for spin-refocusing. However, refocusing using adiabatic pulses is not as straightforward as spin inversion. It requires back-to-back pairs of adiabatic pulses. It is then shown that accurate refocusing of the J couplings can be achieved using sweep reversed pairs of adiabatic pulses [6]. Furthermore, adiabatic pulses can be used for compensation of different J couplings in particular spin systems [6,7].

To conclude, adiabatic pulses become increasingly important constituents of many popular and demanding NMR experiments.

References

1. Kupče, Ě. and Wagner, G., 1995, *J. Magn. Reson., Ser. B* **109**:329.
2. Kupče, Ě. and Freeman, R., 1996, *J. Magn. Reson., Ser. A* **117**:246.
3. Tannus, A., and Garwood, M., 1996, *J. Magn. Reson., Ser. A* **120**:133.
4. Kupče, Ě., Freeman, R. Wider, G., and Wuthrich, K., 1996, *J. Magn. Reson., Ser. A* **122**:81.
5. Matsuo, H., Kupče, Ě. and Wagner, G., 1996, *J. Magn. Reson., Ser. B* **113**:190.
6. Kupče, Ě. and Freeman, R., 1997, *J. Magn. Reson.* **127**:36.
7. Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S. J. F., Greenblatt, J., Konrat, R., and Kay, L. E., 1997, *J. Amer. Chem. Soc.* **119**:6711.

Gaetano T. Montelione, Ph.D.

(Center for Advanced Biotechnology and Medicine and Department of Molecular Biology and Biochemistry, Rutgers University)

The Human Genome Project is rapidly identifying all of the genes in humans. The products of these genes are widely recognized as the next generation of therapeutics and targets for the development of pharmaceuticals. While identification of these genes is proceeding quickly, elucidation of their biochemical functions lags far behind. Knowledge of 3D structures of gene products can provide important insights into structural homology that is not easily recognized by sequence comparisons. Thus, structure determination by NMR can provide key information connecting a protein sequence and its biochemical function, as well as setting the stage for subsequent drug development using combinatorial and/or rational design methods. We are developing technology that will significantly accelerate this process. This includes high level domain expression systems, methods for automated analysis of protein structures from NMR spectral data, and approaches for comparing new 3D structures with structures available in the Protein Data Base. This system will be capable of bringing the drug discovery process into the same time frame as the gene discovery process, which is crucial to maximize the benefit of genomics for pharmaceutical discovery. Examples illustrating the use of NMR analysis as a means of discovering biochemical functions of pharmaceutically-important RNA-binding proteins will be presented.

(Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute)

Bennett T. Farmer II, Keith L. Constantine, Valentina Goldfarb,
William J. Metzler and Luciano Mueller

Backbone resonances can be sequentially assigned in large $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled proteins (> 30-35 kDa) by the use of perdeuteration. In this area, MurB, a 347-residue flavoprotein, represents the current extreme for monomeric proteins. Backbone amide resonances have been assigned for 96% of the residues in substrate-free MurB. With these assignments, the NADP⁺ binding site on MurB has been localized from the resulting chemical-shift perturbations. At this stage, more detailed tertiary structural information, both on MurB and on the MurB-NADP⁺ complex, can only be obtained from proton-proton NOEs.

Previous theoretical studies on three perdeuterated proteins (profilin, HCA II, MurB) have characterized the ability of solely amide proton-proton NOEs to determine the protein global fold. In general, NOEs must be observed among both backbone and sidechain H_N protons out to at least 6Å. For MurB, the most favorable amide proton-proton NOEs appear limited to < 5Å. In addition, no sidechain H_N protons have yet been assigned. Therefore, backbone amide proton-proton NOEs have been supplemented with methyl- H_N and methyl-methyl NOEs involving $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ type-specifically labeled Ile, Leu and Val (ILV) sidechain groups. The rationale behind this approach will be described; studies on MurB will serve to highlight both the theoretical and experimental limits of this approach. Finally, type-specific protonation of Tyr residues in MurB has been used to obtain intermolecular NOEs in the MurB-NADP⁺ complex. Recent results will be presented on the structure of this complex.

3L1 Theory and Simulation of Vibrational Effects on Distances and Angles Obtained by Solid State NMR

(京大院理¹、京大化研²) ○石井佳誉¹、寺尾武彦¹、林宗市²

Yoshitaka Ishii and Takehiko Terao

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

Soichi Hayashi

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

Abstract

Vibrational effects on structural parameters obtained by solid state NMR are studied by theoretical calculations and molecular dynamics (MD) simulations. It is theoretically shown that the molecular librations as well as the intramolecular vibrations reduce dipolar interactions, and consequently lengthen both of the direct-bonding and remote internuclear distances obtained from the dipolar interactions (R_{NMR}), while the internuclear distances obtained by single crystal Xray or neutron diffraction (R_{Xray}) are proved to be shortened. In contrast to distances, the theoretical calculations and MD simulations demonstrate that the vibrational effects on the bond and dihedral angles determined by correlating two dipolar tensors cause very little angular deviations.

[Introduction]

Recent advances in solid state NMR enable us to determine structural parameters such as internuclear distances, bond angles, and dihedral angles by measuring the direct dipolar interaction between relevant nuclei or the mutual orientation of two interaction tensors by multi-dimensional NMR. Especially in determination of distances, the accuracy may be comparable to those by single crystal X-ray or neutron diffraction[1].

双極子相互作用、距離測定、分子運動

○いしいよしたか、てらおたけひこ、はやしそういち

However, the distances obtained by solid state NMR and diffraction studies are known to be usually different from each other beyond their experimental errors. The reason is that molecular vibrations influence measured distances depending on the measurement method, as have been already studied[2,3]. However, these studies are mainly concerned with directly bonded C-H pairs, which can be treated as isolated oscillators, while in distance measurements by recent solid-state NMR studies, a main interest is in distances between non-proton nuclei such as ^{13}C , ^{15}N , and ^{31}P which are not always directly bonded. Such a system can be no longer treated as an isolated oscillation system; all the intramolecular and the intermolecular interactions must be included. In this paper, we discuss the influence of stretching, deformation, and lattice vibrations on general solid state NMR distances and angles[4] in a molecule for the first time.

[Theory]

In this section, we outline the theory of vibrational effects on the internuclear distances. In solid state NMR, internuclear distances are obtained by measurements of dipolar interactions, which is written as follows:

$$D = \langle b[3R_Z^2/R^2 - 1] / R^3 \rangle \quad (1)$$

where b is a constant, R_α ($\alpha = X, Y, Z$) is the α component of the internuclear vector \mathbf{R} , and $R = |\mathbf{R}|$, the Z axis is along the static magnetic field. In this study, we define the solid state distance (R_{NMR}) as those determined from the unique principal value D_{33} , which is given by D when \mathbf{R} is almost along the Z axis; accordingly, using eq. (1), R_{NMR} is easily calculated from $R_{\text{NMR}} = (2b/D_{33})^{1/3}$. To estimate vibrational effects, we denote the small displacements of the internuclear vector due to intramolecular vibrations of the i -th normal mode as $L_i Q_i$, and represent the small change of the molecular orientation due to the molecular libration by Euler angles (ξ, ψ, ζ), where ξ ,

$\psi, \xi \ll 1$. Using these small displacements, we can expand R_{NMR} as[†]

$$R_{\text{NMR}} = R_e + \frac{R_e(\langle \xi^2 \rangle + \langle \psi^2 \rangle)}{2} + \sum_{i=1}^N L_i z \langle Q_i \rangle + \frac{1}{R_{e_i}} \sum_{i=1}^N (L_i^2 - 2L_i z^2) \langle Q_i^2 \rangle, \quad (2)$$

where R_e is an equilibrium internuclear distance. As a standard distance to be compared with R_{NMR} , we take a simple average of the distance $R_{\text{dis}} = \langle R \rangle$, which can be expanded as follows:

$$R_{\text{dis}} = R_e + \sum_{i=1}^N L_i z \langle Q_i \rangle + \frac{1}{2R_{e_i}} \sum_{i=1}^N (L_i^2 X^2 + L_i^2 Y^2) \langle Q_i^2 \rangle. \quad (3)$$

For direct bonding atom pairs, the amplitudes of deformations or torsional vibrations $(L_i^2 X^2 + L_i^2 Y^2) \langle Q_i^2 \rangle$ are usually much larger than those of the stretching vibrations $L_i z \langle Q_i \rangle$. Accordingly, in this case, R_{NMR} is elongated by the molecular librations and intramolecular vibrations, whether relevant atoms are proton or heavier atoms such as ^{13}C , ^{15}N and ^{19}F . For non-bonding atom pairs, the third term in eq. (2) due to the intramolecular vibrations is inversely proportional to R_e ; hence, the effect reduces as the distance increases.

Therefore, R_{NMR} is also expected to be elongated by the molecular librations, when R_e is sufficiently large. In our talk, we will also compare R_{NMR} with the X-ray distance, and discuss the theory for describing vibrational effects on angle measurements.

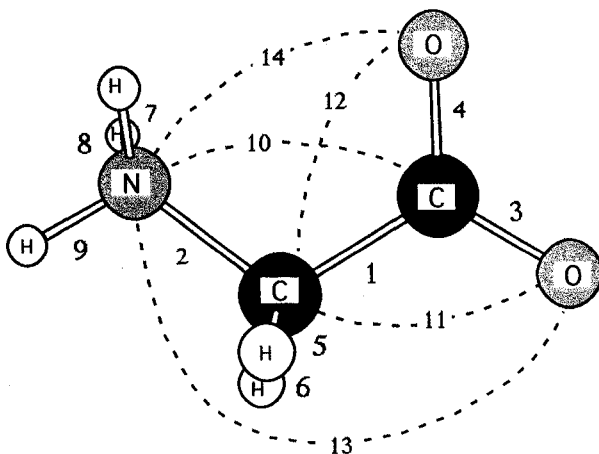


Fig. 1 α -Glycine molecule viewed along the one axis of the equilibrium inertia principal-axis frame, and distance numbers.

[†] Eq. (2) is different from the formula given by Henry and Szabo [2], because they take an inadequate approximation as pointed out by Go et. al.[5]

[MD Calculation Results]

MD simulations are carried out for glycine molecules (Fig. 1) in the α form crystal. In the calculation, we adopted the force fields by Machida et al.[6], which well reproduce both of the intra- and inter-molecular vibration spectra. From the simulated atomic trajectories during 40ps, we can exactly calculate R_{NMR} and R_{dis} . Figure 2 shows elongation factors of R_{NMR} for the vibrational effects: $(R_{\text{NMR}} - R_{\text{dis}})/R_{\text{dis}}$. For the direct bonds with proton nuclei (No.1-4), the elongation factors reach 1.6-2.7%, while they are 0.9-1.4% for those between non-proton nuclei (No.5-9). This figure also demonstrates that the vibrations cause non-negligible elongations of 0.7-1.0% even for the distances between remote atoms (No.10-14) confirming the above theory. Therefore, we can conclude that each distance exhibits a substantial elongation due to the vibrational effects, irrespective of whether it is a direct bond or not.

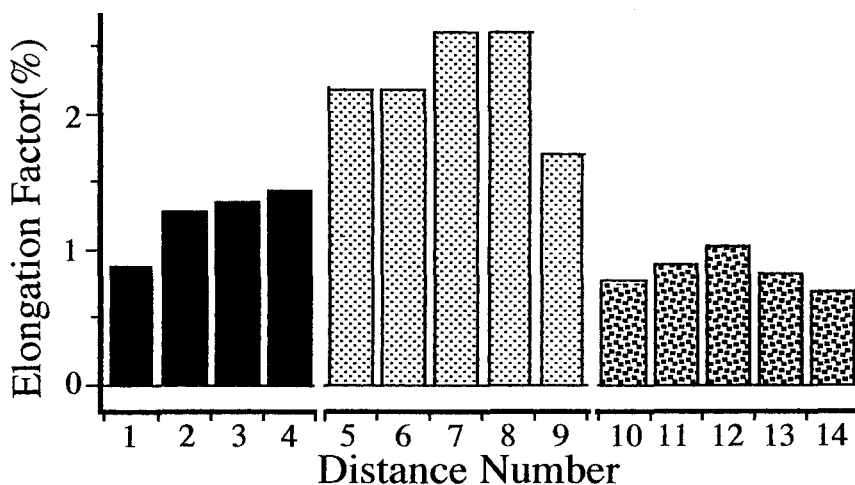


Fig. 2 Elongation factors $(R_{\text{NMR}} - R_{\text{dis}})/R_{\text{dis}}$ for the internuclear distances in an α -glycine molecule at 273K. See Fig. 1 about the distance number.

[References]

- [1] Y. Ishii and T. Terao, J. Magn. Reson. A 115 (1995) 116.
- [2] E. R. Henry and A. Szabo, J. Chem. Phys. 82 (1985) 4753.
- [3] T. Nakai, J. Ashida, and T. Terao, Mol. Phys. 67 (1989) 839.
- [4] Y. Ishii, T. Terao, and S. Hayashi, J. Chem. Phys. in press.
- [5] S. Sunada and N. Go, J. Comp. Chem. 16 (1995) 328.
- [6] K. Machida, et. al., Spectrochimca Acta 33A (1977) 569.

Multidimensional solid-state NMR for determining dihedral angle from the correlation of ^{13}C - ^1H and ^{13}C - ^{13}C dipolar interactions under magic-angle spinning conditions

Toshimichi Fujiwara, Yasunori Ohigashi, and Hideo Akutsu

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

Multidimensional solid-state nuclear magnetic resonance under MAS conditions has been developed to obtain dihedral angle information from the correlation of the ^{13}C - ^1H and ^{13}C - ^{13}C dipolar couplings in a $^1\text{H}^{\alpha 13}\text{C}^{\alpha}-^{13}\text{C}^{\beta 1}\text{H}^{\beta}$ moiety. The experimental pulse sequence includes ^{13}C - ^1H dipolar evolution periods for $^{13}\text{C}^{\alpha}$ and $^{13}\text{C}^{\beta}$, which are correlated with a coherent $^{13}\text{C}^{\alpha 13}\text{C}^{\beta}$ dipolar mixing period. Theoretical and numerical analysis indicates that the orientation of $^{13}\text{C}^{\alpha 1}\text{H}^{\alpha}$ and $^{13}\text{C}^{\beta 1}\text{H}^{\beta}$ dipolar couplings dominate the dependence of the spectra on the dihedral angle χ about the $\text{C}^{\alpha}\text{C}^{\beta}$ bond. The $^{13}\text{C}^{\alpha 13}\text{C}^{\beta}$ dipolar coupling plays an essential role in determining a unique dihedral angle in the range $0^{\circ} \leq \chi \leq 180^{\circ}$. This method enables the experimental determination of all the structural parameters for the four-spin system. The high resolution due to ^{13}C isotropic chemical shifts under MAS permits its application to molecules having a number of ^{13}C labeled sites.

【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、高感度で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。今までそのような試料から二面角に関する情報を得られることを示し⁽¹⁾、前討論会では、 $^1\text{H}^{\alpha 13}\text{C}^{\alpha}-^{13}\text{C}^{\beta 1}\text{H}^{\beta}$ の部分(図1)から二面角 χ を得る方法^(2,3)を発表した。今回、この方法から得られる構造情報について詳しく検討した。対象にした系では、6つのスピン対について双極子結合があり、これらが双極子相関スペクトルに影響している。また、双極子の相対的な配向は二面角だけでなく結合角や結合長にも依存する。各双極子相互作用や結合角・結合長が二面角決定に与える影響、スペクトルに含まれている構造情報の決定精度について解析した。これらこの方法の本質的な特徴を明らかにすることは、より複雑なスピン系に応用し構造情報を得る上で重要である。

固体NMR、二面角、安定同位体標識、マジック角試料回転、核双極子相互作用、

ふじわらとしみち、おおひがしやすのり、あくつひでお

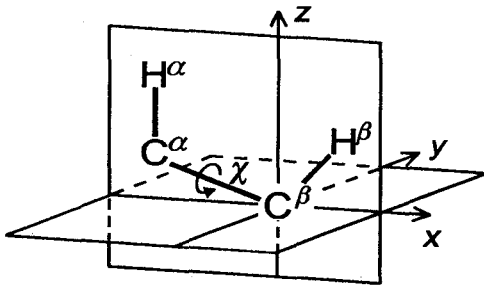


Fig. 1. The four-spin system, $H^{\alpha}C^{\alpha}-C^{\beta}H^{\beta}$. Bond angles: 110° , CH bond lengths 110 pm, CC bond length: 155 pm.

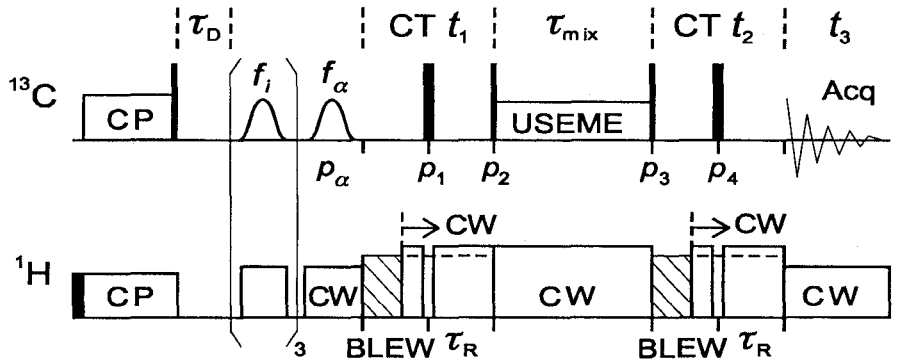


Fig. 2. Pulse sequence for correlating CH dipolar couplings with a $C^{\alpha}C^{\beta}$ dipolar mixing period.

【実験と計算】対象にした分子は ^{15}N , ^{13}C で完全標識したアミノ酸バリンで、実験は 9.4 T の静磁場で、試料回転数は約 5 kHz で行った⁽²⁾。図 2 に用いたパルス系列を示す。 t_1 と t_2 期でそれぞれ磁化は $C^{\alpha}H$ と $C^{\beta}H$ 相互作用で展開する。準備期と検出期 (t_3) で等方化学シフトの違いを利用してスピンド対を選ぶ。1.2ms ある混合期には ^{13}C ^{13}C 双極子相互作用によりコヒーレントな磁化移動が行われる。 ^1H ^{13}C - ^{13}C ^1H 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 (R10000) で計算した。1 スペクトルについての計算時間は約 10 時間であった。計算は時間領域で行い、1 試料回転を約 130 に分割した区間についてそれぞれ推進演算子を求めて行った。また、スペクトルの相似性を定量的に評価するために自乗平均根偏差 (RMSD) を用いた。

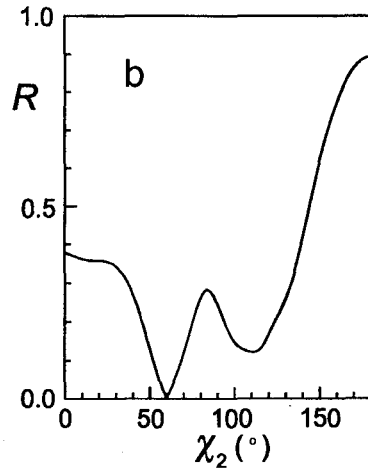
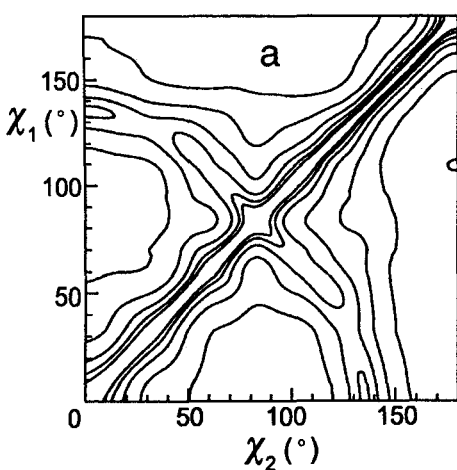


Fig. 3. (a) RMSD $R(\chi_1; \chi_2)$ between the spectra calculated for dihedral angles χ_1 and χ_2 , and (b) its cross section at $\chi_1 = 60^{\circ}$, $R(60^{\circ}; \chi_2)$.

【結果と解析】6つの双極子相互作用を含むハミルトニアンについて二面角 χ の関数としてスペクトルを計算した。それらについて自乗平均根偏差を求め等高線プロットしたのが図3aである。その $\chi=60^\circ$ での断面を図3bに示す。等高線図には対角線に沿った谷以外に $\chi=85^\circ$ で対角線と交差するもう一つの谷がある。 $C^\alpha H^\alpha$ と $C^\beta H^\beta$ 双極子相互作用のみが働いていならば、その系の対称性がよいためにそのもう一つの谷の高さも0になる。図4の破線で示したものが、そのような場合の自乗平均根差にである。しかし、6つの双極子相互作用ある場合には図3bが示すように、もう一つの谷は0以上の値を取っている。これは、 $C^\alpha H^\alpha$ と $C^\beta H^\beta$ スピン対以外の双極子相互作用により生じている。このことは、双極子相関スペクトルから χ を 0° から 180° の範囲で一義的に決められることを示している。

図4の実線で示したのは、 $C^\alpha H^\alpha$ と $C^\beta H^\beta$ 以外に $C^\alpha C^\beta$ のスピン対についても双極子相互作用がある場合について求めた $\chi=60^\circ$ のスペクトルとの自乗平均根偏差である。2つの極小値の差は0.11であり、6つの双極子相互作用がある場合(図3b)の極小値差0.12の9割になっている。また図5に示したのは異なる双極子相互作用を含む $\chi=60^\circ$ のスペクトル間の自乗平均根差を距離で表したものである。点Cは6つの双極子相互作用があるスペクトル、点Bはそこから $C^\alpha C^\beta$ 双極子相互作用のみ除いたスペクトル、点Aは6つから $C^\alpha H^\beta$ と $C^\beta H^\alpha$ 双極子相互作用を除いたスペクトルを表す。CBの距離がCAの距離の二倍以上ある。以上のことから、 $C^\alpha C^\beta$ 双極子相互作用が与える影響は $C^\alpha H^\beta$ と $C^\beta H^\alpha$ 双極子相互作用よりもかなり大きいことがわかる。スペクトルの基本的な特徴は $C^\alpha H^\alpha$ と $C^\beta H^\beta$ 、 $C^\alpha C^\beta$ の相互作用で決まっていることがわかる。したがって、 $C^\alpha H^\beta$ と $C^\beta H^\alpha$ など約200 pm以上の距離にあるCH双極子相互作用の効果は、相対的に小さいと言える。

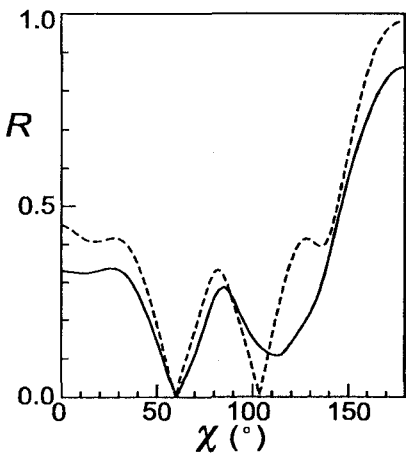


Fig. 4. RMSD $R(60^\circ; \chi)$ between the isotropic mixing spectra calculated for the Hamiltonian having the dipolar interactions only for the $C^\alpha H^\alpha$ and $C^\beta H^\beta$ pairs (dashed line), and $R(60^\circ; \chi)$ between the $^{13}C^{\alpha 13}C^\beta$ dipolar mixing spectra calculated for the Hamiltonian having the dipolar interactions only for the $C^\alpha C^\beta$, $C^\alpha H^\alpha$ and $C^\beta H^\beta$ pairs (solid line).

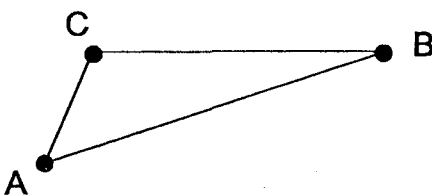


Fig. 5. RMSD distances between the spectra calculated at $\chi = 60^\circ$. Point A: isotropic mixing spectrum calculated with the $C^\alpha H^\alpha$ and $C^\beta H^\beta$ dipolar couplings, B: dipolar mixing spectrum with the $C^\alpha H^\alpha$ and $C^\beta H^\beta$ dipolar couplings, and C: dipolar mixing spectrum with the six dipolar couplings.

図6 aに実線で示したのは実験スペクトルと計算スペクトルの自乗平均根偏差であり、ほぼ $\chi=65^\circ$ に極小値がある。この極小値を初期値として、2つの結合角、3つの結合長、二面角を変数として非線形最小自乗法を行い求めた構造変数を表に示した。参考まで

に実験スペクトルを最適化した計算と実験スペクトルを図 6 b に示す。求めた結果は中性子回折の結果とよい一致を示している。このように1つの双極子相関スペクトルから $H^{\alpha}C^{\alpha}-C^{\beta}H^{\beta}$ の構造変数をすべて求めることができた。また、図 6 a に破線で示したのは、スペクトルの S/N 比が 7 から 5 に $\sqrt{2}$ 倍低下した時の自乗平均根偏差である。このようにノイズが増えても極小値はほとんど影響を受けないことがわかる。表にノイズから評価した構造の精度を示した。また、表に示した B_r は結合長などある構造変数によってスペクトル線形が自乗平均根偏差で 0.01 変化した時、その変化を二面角の変化に換算したものである。結合長について B_r が 1° より小さいことは、結合長が与える線形変化と二面角による変化が異なっていて区別できることを示している。

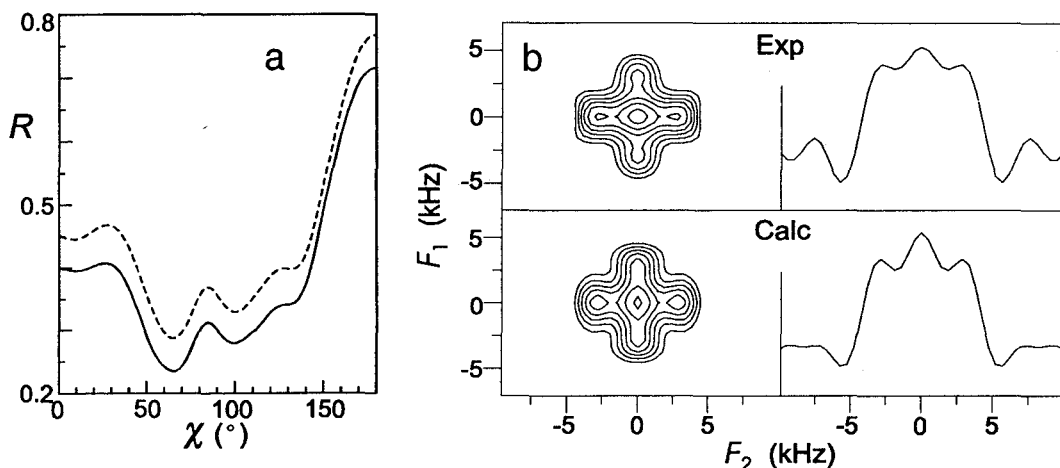


Fig. 6. (a) RMSD between experimental and simulated spectra (solid line) and RMSD altered by a noise increase in the experimental spectrum (dashed line). (b) Experimental and simulated 2D cross sections for the correlation between the $^{13}C^{\alpha}H$ dipolar couplings for C^{α} (F_1) and $^{13}C^{\beta}$ (F_2).

TABLE Structural parameters determined by solid-state NMR and neutron diffraction, and their effects on the χ determination

	NMR	Neutron ⁽⁴⁾	Precision	B_r
Dihedral angle	63.8°	67.6°	3.5°	1.0°
Bond angle ($C\alpha$)	110.0°	108.8°	2.7°	0.43°
Bond angle ($C\beta$)	107.5°	104.7°	2.5°	0.36°
$C\alpha H\alpha$ length	116 pm	111 pm	1.1 pm	0.21°
$C\beta H\beta$ length	115 pm	110 pm	0.9 pm	0.14°
$C\alpha C\beta$ length	167 pm	155 pm	7.9 pm	0.09°

【おわりに】 この方法で得られるスペクトルは $C^{\alpha}H^{\alpha}$ と $C^{\beta}H^{\beta}$ 、 $C^{\alpha}C^{\beta}$ 双極子相互作用でほぼ決まっているので、他の 1H や ^{13}C の影響つまり他の部分の構造が二面角決定にあたる影響は極めて小さい。双極子相関スペクトルには双極子相互作用の相対配向が反映されているが、補助的な実験を行わなくても結合角と結合長、二面角の効果を分離して二面角のみを正確に決められることがわかった。

【文献】⁽¹⁾T. Fujiwara, et al., J. Magn. Reson. **124**, 147 (1997). ⁽²⁾藤原敏道、他。第 35 回 NMR 討論会予稿集 p.4 (1996). ⁽³⁾X. Feng, et al., Chem. Phys. Lett. **257**, 314 (1996). ⁽⁴⁾T. F. Koetzle, et al. J. Chem. Phys. **60**, 4690 (1974).

ポリペプチドの主鎖カルボニル基の ^{13}C NMR化学シフト
テンソルによる固体コンホメーションの研究
(群馬大工) ○ 莊司 顯

Conformational Study of Polypeptides in the Solid State by ^{13}C NMR
Chemical Shift Tensor Components of Main-Chain Carbonyl Carbons.
(Gunma University) Akira Shoji

Abstract: We have studied the correlation between the ^{13}C NMR chemical shift tensor components (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) of amide carbonyl carbons and the secondary structure as well as the primary structure (neighboring amino-acid sequence) of a series of well-defined and selectively ^{13}C and ^{15}N isotope labeled α -helix octadecapeptides in the solid state. It was found that the δ_{22} is very sensitive to the neighboring amino-acid sequence, although the δ_{iso} is insensitive. Therefore, the δ_{22} is very useful for the conformational and neighboring amino-acid sequence analyses of polypeptides and natural proteins in the solid state.

1. 緒 論

固体高分解能NMRは最近著しく発展し、スピン1/2の炭素 ^{13}C ・窒素 ^{15}N ・水素 ^1H 核のNMR化学シフト (δ_{iso}) の測定からポリペプチドの固体コンホメーション解析が容易にできるようになった。特に、ポリペプチドの主鎖カルボニル ($\text{C}=\text{O}$) 炭素の δ_{iso} はアミノ酸残基の種類や隣接アミノ酸残基の影響をあまりうけないため、主に主鎖コンホメーション (二次構造) 解析に有効である。これに対し、主鎖の C_α 炭素と側鎖の C_β 炭素の δ_{iso} はアミノ酸残基の種類や側鎖構造にも依存するため、特定のアミノ酸残基ごとの情報を得ることができる¹。

最近、我々は ^{15}N 化学シフトテンソル主値 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) を得ることによりコンホメーション、アミノ酸残基の種類や隣接アミノ酸残基による影響をある程度分離して議論できることを明かにし²、これらの ^{15}N 化学シフトテンソル主値 (特に δ_{22}) を基にしたポリペプチド (またはタンパク質) の固体構造解析が注目されるようになった。しかしながら、化学シフトテンソル主値を求めるためには今のところ着目する核を同位体標識した試料を必要とするため、この種の研究例はまだ非常に少ない。

そこで本研究では、カルボニル炭素 ($1-^{13}\text{C}$) 標識アミノ酸残基を選択的に含む α ヘリックス形の単分散オリゴペプチド (18量体) を用いて、主に主鎖カルボニル炭素 ($1-^{13}\text{C}$) の等方性化学シフト (δ_{iso}) および化学シフトテンソル主値 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) と隣接アミノ酸残基の効果 (アミノ酸配列) との相関について調べた。

キーワード： ^{13}C 化学シフトテンソル、ポリペプチド、コンホメーション、
隣接アミノ酸配列効果

しょうじあきら

2. 実験

2-1 試料

試料は当研究室で合成したL-フェニルアラニン (PheあるいはF), L-ロイシン (LeuあるいはL), L-アラニン (AlaあるいはA) 残基からなる単分散オリゴペプチド (18量体) を使用した³. 8位に選択的なカルボニル炭素 (^{13}C) 標識アミノ酸残基 (Leu^{C} , Ala^{C} , Phe^{C}), 12位にアミド窒素 (^{15}N) 標識L-アラニン残基 (Ala^{N}) を含む全て右巻 α ヘリックス形の単分散オリゴペプチド (18量体) 試料のアミノ酸配列は次の通りである.

	1~6	7	8	9	10	11	12	13~18
FLA 1:	F-L-A-F-L-A-Phe-Leu ^C -Ala-Phe-Leu-Ala ^N -F-L-A-F-L-A							
FLA 2:		-Phe-Leu ^C -Ala-Phe-Ala-Ala ^N -						
FLA 3:		-Phe-Leu ^C -Ala-Phe-Phe-Ala ^N -						
FLA 6:		-Phe-Leu ^C -Leu-Phe-Leu-Ala ^N -						
FLA 7:		-Phe-Leu ^C -Phe-Phe-Leu-Ala ^N -						
FLA 8:		-Phe-Ala ^C -Ala-Phe-Leu-Ala ^N -						
FLA 9:		-Phe-Phe ^C -Ala-Phe-Leu-Ala ^N -						

2-2 固体高分解能 ^{13}C NMRの測定

^{13}C CP-MASおよび ^{13}C CP-staticスペクトルは日本電子製 JEOL EX-270WB 分光計を用い共鳴周波数は67.80 MHzで測定した. ^{13}C CP-MASスペクトルの測定条件は, 90°パルス幅: 4.5 μs , 接触時間: 2ms, 繰り返し時間: 5s, スペクトル幅: 27 kHz, データポイント: 8 K, サンプリングポイント: 1K, MAS速度: 5.0~5.9 kHz, 積算回数: 100~1500回とした. ^{13}C CP-staticスペクトルは, 試料をマジック角度に固定し静止状態で測定した. 測定条件は, 90°パルス幅: 6.0 μs , 接触時間: 2ms, 繰り返し時間: 5s, スペクトル幅: 40 kHz, データポイント: 8 K, サンプリングポイント: 4 K, 積算回数: 2100~6100回とした. ^{13}C 化学シフトはテトラメチルシラン (TMS) を基準とし, アダマンタン ($\delta=29.5$ ppm) を二次基準とした. ^{13}C 化学シフトの実験誤差は, 等方性化学シフト δ_{iso} では ± 0.3 ppm, 化学シフトテンソルの主値の δ_{22} では ± 0.5 ppm, δ_{11} および δ_{33} では ± 2 ppmである.

3. 結果及び考察

3-1 ^{13}C 化学シフトテンソル主値とアミノ酸配列との相関

FLA 1のCP-MASスペクトルおよびCP-Static (パウダーパターン) スペクトル (省略) から得た8位のアミノ酸残基の ^{13}C 化学シフト値 ($^{\text{C}}\delta_{\text{iso}}$, $^{\text{C}}\delta_{11}$, $^{\text{C}}\delta_{22}$, $^{\text{C}}\delta_{33}$) は12位のL-アラニン残基の ^{15}N 化学シフト値 ($^{\text{N}}\delta_{\text{iso}}$, $^{\text{N}}\delta_{22}$) と共にTable 1にまとめて示す.

Table 1. ^{13}C Chemical Shifts ($^{\text{C}}\delta_{\text{iso}}$, $^{\text{C}}\delta_{11}$, $^{\text{C}}\delta_{22}$, $^{\text{C}}\delta_{33}$) and ^{15}N Chemical Shifts ($^{\text{N}}\delta_{\text{iso}}$, $^{\text{N}}\delta_{22}$) of the Samples in the Solid State.

Sample	^{13}C Chemical Shifts (ppm)				^{15}N Chemical Shifts (ppm)		
	$^{\text{C}}\delta_{\text{iso}}$	$^{\text{C}}\delta_{11}$	$^{\text{C}}\delta_{22}$	$^{\text{C}}\delta_{33}$	$^{\text{C}}\delta_{11} + ^{\text{C}}\delta_{33}$	$^{\text{N}}\delta_{\text{iso}}$	$^{\text{N}}\delta_{22}$
FLA 1	176.9	240	192.4	98	338	99.3	55.1
FLA 2	176.9	240	191.2	100	340	97.9	54.4
FLA 3	177.1	240	193.2	98	338	100.6	56.0
FLA 6	176.9	240	193.4	97	337	99.5	55.9
FLA 7	177.0	240	192.4	99	339	99.3	55.9
FLA 8	176.8	241	191.2	98	339	99.3	55.5
FLA 9	176.0	241	190.1	97	338	99.2	55.5

FLAシリーズの試料の8位のアミノ酸残基の $^{\text{C}}\delta_{\text{iso}}$ はいずれも176–177 ppmの狭い範囲内に観測される。これらの $^{\text{C}}\delta_{\text{iso}}$ は α ヘリックス形に帰属される特有な値であることから、コンホメーションに大きく依存するが、隣接アミノ酸残基（アミノ酸配列）の影響は殆ど受けないことが確認できる。FLA9の $^{\text{C}}\delta_{\text{iso}}$ のみは他に比べ約1 ppmの高磁場側シフトが見られるが、これはPhe残基の側鎖構造の特性によるものと考えられる。また、 $^{\text{C}}\delta_{11} + ^{\text{C}}\delta_{33}$ の値（337–340 ppm）は試料間での差が最大3 ppmと小さい。これらは実験誤差（ ± 2 ppm）を超える大きさではないことから、 $^{\text{C}}\delta_{11} + ^{\text{C}}\delta_{33}$ の値とこれより求めた $^{\text{C}}\delta_{11}$ （240–241 ppm）と $^{\text{C}}\delta_{33}$ （97–100 ppm）の値もほぼ一定値を示すといえる。

これに対して、 $^{\text{C}}\delta_{22}$ の値は190.1–193.4 ppmの範囲に渡り、試料間で差が見られる。しかも、このシフト差（3.3 ppm）は $^{\text{C}}\delta_{22}$ の実験誤差より大きいことから、 $^{\text{C}}\delta_{22}$ は隣接アミノ酸残基（アミノ酸配列）の影響を反映していると判断できる。特に8位のL-ロイシン残基の $^{\text{C}}\delta_{22}$ は11位のアミノ酸残基の種類によって大きく影響される傾向が見られ、それより近い9位のアミノ酸残基の影響よりむしろ大きい。この結果は、 α ヘリックス形ポリペプチドに特徴的なものと考えることができ、分子内水素結合の位置関係および隣接アミノ酸残基効果の影響を直接確認できるという点で、極めて重要な知見である。

3-2 ^{13}C 化学シフトテンソル主値と ^{15}N 化学シフトテンソル主値との相関

8位のL-ロイシン残基の $^{\text{C}}\delta_{22}$ がこれと直接結合している9位のアミノ酸残基の影響よりむしろ11位のアミノ酸残基の影響を大きく受けることの原因を明らかにするために、8位のLeu^Cの ^{13}C 化学シフトテンソル主値 $^{\text{C}}\delta_{22}$ とこれと水素結合を形成している12位のAla^Nの ^{15}N 化学シフト（ $^{\text{N}}\delta_{\text{iso}}$ および $^{\text{N}}\delta_{22}$ ）との相関を調べた。 ^{15}N 化学シフトについては、特にN端側隣接アミノ酸残基の影響を大きく受けることがわかっている。

11位のアミノ酸残基の種類による化学シフト相関を見ると（試料FLA1, FLA2, FLA3）, ${}^C\delta_{22}$ が高磁場側にシフトすると ${}^N\delta_{iso}$ および ${}^N\delta_{22}$ も高磁場側にシフトし、両者の間でそれぞれほぼ直線関係が得られる。一方、9位が置換された場合には（試料FLA1, FLA6, FLA7）, ${}^N\delta_{iso}$ および ${}^N\delta_{22}$ の変化量はいずれも小さく実験誤差の範囲内と考えられるが、 ${}^C\delta_{22}$ の変化（約1 ppm）については有意差といえる。したがって、8位のL-ロイシン残基の ${}^C\delta_{22}$ がこれと直接結合していない11位のアミノ酸残基の影響を大きく受ける理由として、 α ヘリックス形ポリペプチドでは8位の残基のカルボニル基が11位の残基の側鎖と空間的に極めて近い位置関係にあるため、主にその影響によるものと考えられる。しかし、今回は、8位のLeu^cと水素結合を形成している12位のアミノ酸残基の種類を変えた実験は行っていないので、この点も含めて、更に詳細な検討が必要である。

4. 結論

1. 測定試料の ${}^{13}C$ 化学シフトテンソル主値 ${}^C\delta_{22}$ は190.1から193.4 ppmに現れ、隣接アミノ酸残基の効果の存在が確認できた。特に、8位の ${}^C\delta_{22}$ は11位のアミノ酸残基の影響を反映することが明らかになった。この理由として8位のカルボニル基と11位のアミノ酸残基の側鎖が空間的に近づき、その影響が反映されたと考えられる。この結果は、 ${}^C\delta_{iso}$ がこれらの試料間で殆ど一定であることと対照的で大変興味深い結果であり、化学シフトテンソルの研究の今後が期待できる。
2. ${}^C\delta_{11}+{}^C\delta_{33}$ の値は337から340 ppmでほぼ一定値を示した。 ${}^C\delta_{11}$ と ${}^C\delta_{33}$ の値については実験誤差が ± 2 ppmで大きいため、これ以上の議論は今のところできないが、将来これらがより正確に、精度高く求められるようになれば、 ${}^{13}C$ 化学シフトテンソル主値の有用性が明確になるであろう。

文献

- 1) H. Saito and I. Ando, in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Vol. 22 (ed. G.A. Webb), p. 209, Academic Press, London, 1989 .
- 2) A. Shoji, S. Ando, S. Kuroki, I. Ando and G.A. Webb, in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Vol. 26 (ed. G.A. Webb), p. 27, Academic Press, London, 1993 .
- 3) 莊司顯, 小川一輝, 第35回NMR討論会講演要旨集, p.282-285, 京都, 1996年.

2次元スピン拡散 NMR 法による絹フィブロインタンパク質の局所構造解析

東京農工大工 ○出村誠、斉田理、笹平理朗、石坂弘子、朝倉哲郎
University of Nijmegen B. H. Meier

Local structural analysis of silk fibroin by two-dimensional spin diffusion NMR

Makoto Demura¹, Osamu Saita¹, Michiaki Saita¹, Hiroko Ishizaka¹,
Tetsuo Asakura¹ and B. H. Meier²

¹ Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and
Technology, Koganei, Tokyo 184

² Laboratory for Physical Chemistry, University of Nijmegen,
The Netherlands

Bombyx mori and *Philosamia cynthia ricini* silk fibroins were labeled with [1-¹³C]Gly and [1-¹³C]Ala *in vivo* in order to prepare the ¹³C labeled silk fibroin samples for measurements of solid state ¹³C 2D spin diffusion NMR. Different 2D spin diffusion NMR spectra between [1-¹³C]Gly and [1-¹³C]Ala labeled *B. mori* silk fibroin fibers were observed when the silk fibroin with high silk II (antiparallel β -sheet) content was used. 2D spin diffusion NMR spectral simulation with observed chemical shift tensor values and Euler angles of ¹³C chemical shift tensor orientations calculated from atomic coordinates was performed to clarify local structures of *B. mori* and *P. c. ricini* silk fibroins at atomic level.

[緒言]

家蚕絹フィブロインの繊維構造の発現は、カイコの吐糸による準安定な Silk I型から安定な Silk II型結晶構造への構造転移を最大の特徴としている。主要シークエンスを Poly(Gly-Ala)_n と仮定した Silk II型の X線結晶構造解析は行われてきたものの、Gly や Ala 残基以外の Ser, Tyr, Val 残基ごとの主鎖内部回転角や、繊維構造中の非晶構造の詳細な情報は得られていなかった。我々は最近、角度依存固体 NMR 法と各アミノ酸残基の ¹³C および ¹⁵N 安定同位体ラベル法を組み合わせ、絹繊維の Gly, Ala, Ser, Tyr, Val 各残基の主鎖内部回転角(ϕ, ψ)の決定を行った[1-3]。一方、野蚕絹フィブロインの Ala リッチ領域はクモ牽引糸のアミノ酸シークエンスと類似しており、家蚕、野蚕絹フィブロインの構造の比較のみならず、クモ牽引糸との物性比較の面でも野蚕絹フィブロインの高次構造解析が有用となってくると予想される。

本研究では、特定アミノ酸残基の主鎖カルボニル ¹³C 核をラベルした家蚕および野蚕絹フィブロインの繊維試料について、固体 2次元スピン拡散 NMR を測定し、その結晶および非晶成分の局所構造を詳細に検討した。

[実験]

[1-¹³C]Gly, [1-¹³C]Ala を含む人工飼料を 5 齢期の家蚕および野蚕に与え、¹³C ラベル絹繊維試料を得た。¹³C ラベル絹フィブロイン繊維試料は、これを精製して得た。吐糸直前のカイコから中部絹糸腺を

スピン拡散、固体 2次元 NMR、絹フィブロイン、化学シフト異方性、逆平行 β シート構造

でむらまこと、さいたおさむ、ささひらみちあき、いしざかひろこ、あさくらてつお、Meier B. H.

抽出し、セリシンを除去後、乾燥することによって繊維化前の絹フィブロイン試料を得た。 ^{13}C 2D スピン拡散 NMR 測定は、JEOL EX 400 NMR spectrometer で static 測定用プローブを用いて行った。ミキシングタイムは 10s、室温で測定した。スペクトルシミュレーションには GAMMA プログラム[4]を用いた。

[結果と考察]

家蚕への安定同位体ラベルアミノ酸の経口投与によって、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ ラベル絹フィブロイン (Silk II 型) を得た。 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ ラベル化は ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルのカルボニル域の強度増大から、絹フィブロインの高ラベル化が十分に行われており、固体 NMR 測定用に用いることができることがわかった。絹フィブロインの固体 NMR において、AlaC β ピークの化学シフトは、コンフォメーションに著しく依存する。そのスペクトルパターンから今回作製した $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ ラベル化試料は、いずれも Silk II 型であり、AlaC β ピークのシミュレーションから、Silk II 型結晶：非晶の割合を 70 : 30 と決定した。

固体 ^{13}C static NMR スペクトルの測定から、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ ラベル部位のパウダーパターンが観測された。スペクトルシミュレーションから決定されたテンソル値はそれぞれ、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$; $\sigma_{11} = 245$ ppm, $\sigma_{22} = 179$ ppm, $\sigma_{33} = 90$ ppm, $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$; $\sigma_{11} = 242$ ppm, $\sigma_{22} = 186$ ppm, $\sigma_{33} = 96$ ppm であった。

固体 2D スピン拡散 NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。

$[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ 絹繊維では、対角ピークが主であるのに対して、

$[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ 絹繊維では ^{13}C ラベルサイト間に特徴的な化学シ

フト異方性相互作用の非対角パターンが強調された。分子構造中に局在する ^{13}C ラベルサイト間のスピン拡散を化学シフト異方性相互作用の観点から解析するために、GAMMA プログラム[5]によって、絹フィブロイン結晶構造の原子座標に基づいて、 ^{13}C スピン拡散サイト間の化学シフトテンソルのオイラー角を求め、2D スピン拡散 NMR スペクトルシミュレーションを行った。家蚕、野蚕絹フィブロインの 2D スピン拡散 NMR スペクトルと局所構造の関係、さらに各々の構造の比較について発表する。

文献

1. M. Demura et al., J. Molecure Structure, in press.
2. T. Asakura et al., Annual Reports on NMR Spectroscopy, 34, 301-346, 1997.
3. T. Asakura et al., Biopolymers, 41, 193-203, 1997.
4. S. A. Smith et al., J. Magn. Reson., A 106, 75-105, 1994.
5. J. Kümmerlen et al., Macromolecules, 29, 2920, 1996.

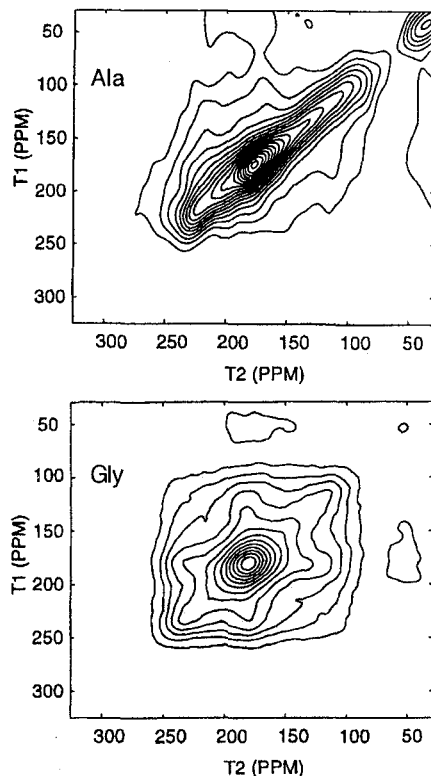


Fig. 1 Solid state 2D ^{13}C spin diffusion NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ (Top) and $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ (Bottom) labeled silk fibers with Silk II structure.

固体NMRによるケイ素系ポリマーの 構造およびダイナミックスの研究

東京工業大学¹、ダウコーニングアジア(株)² ○黒木重樹¹、安藤勲¹、村上正志²

Solid State NMR Investigation of The Structure and Dynamics of Silicon based Polymers

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology¹
and Research Center, Dow Corning Asia Ltd.²)

Shigeki Kuroki¹, Isao Ando², and Mashashi Murakami²

Poly(silmethylene)s with the repeating Si-C backbone units are one of the most well-examined carborane polymers. We synthesized two poly(silmethylene)s which are poly(diphenylsilmethylene)(PDPHSM) and poly(methylphenylsilmethylene)(PMPHSM). These two polymers have different physical properties. In this work, we measured ¹³C and ²⁹Si solid-state NMR spectra of PDPHSM and PMPHSM, and discussed the structure and dynamics of Si-C backbone and side chain of these two polymers.

1、緒言

新規に開発されたケイ素系ポリマー、ポリシルメチレンは主鎖に-Si-C-骨格をもち、メチレン鎖、シリレン鎖のみからなるポリマーとは異なった特性をもつポリマーとして期待される。例えばポリメチルフェニルシルメチレン(PMPHSM)(-Si(Me)(Ph)-CH₂-)_n は T_{d5}=450°C、ポリジフェニルシルメチレン(PDPHSM)(-Si(Ph)₂-CH₂-)_n は T_{d5}=456°Cと熱安定性も高く、その上熱可塑性樹脂のためリサイクルも可能である。粘弾性特性の測定結果からこれらの2つのポリマーは共通の主鎖骨格を持つにもかかわらず大きく物性が異なっていることがわかった。これらのポリマーの¹³C、²⁹SiNMRスペクトルを測定することによりその主鎖および側鎖の分子構造およびダイナミックスを議論した。

2、結果と考察

PMPHSMとPDPHSMの粘弾性特性の測定結果から、PMPHSMは約20°Cに現れるガラス転移領域で貯蔵弾性率が10³以上低下する。それ以外に損失弾性率のカーブにおいて-120°C前後に不明瞭なピークが観測された。また、PDPHSMは140°C付近の貯蔵弾性率の減少以外に、210°C付近、60~70°C付近に損失弾性率のカーブに不明瞭なピークが存在する。

まず、室温におけるPDPHSMとPMPHSMの¹³Cおよび²⁹SiCP/MASNMRスペクトルをFig1に示す。²⁹Siスペクトルにおいて、PDPHSMは-7.4ppmと-9.2ppmにほぼ強度比が1:1の2つの信号が観測されている。また、PMPHSMは-4.3ppmに1つの信号が観測されている。¹³Cのスペクトルにおいて、PDPHSMの側鎖フェニル基に由来する信号は複雑に分裂しており、磁気的環境の異なった数種類のフェニル基が

¹³C, ²⁹SiNMR, ポリシルメチレン、分子構造、ダイナミックス

くろきしげき、あんどういさお、むらかみまさし

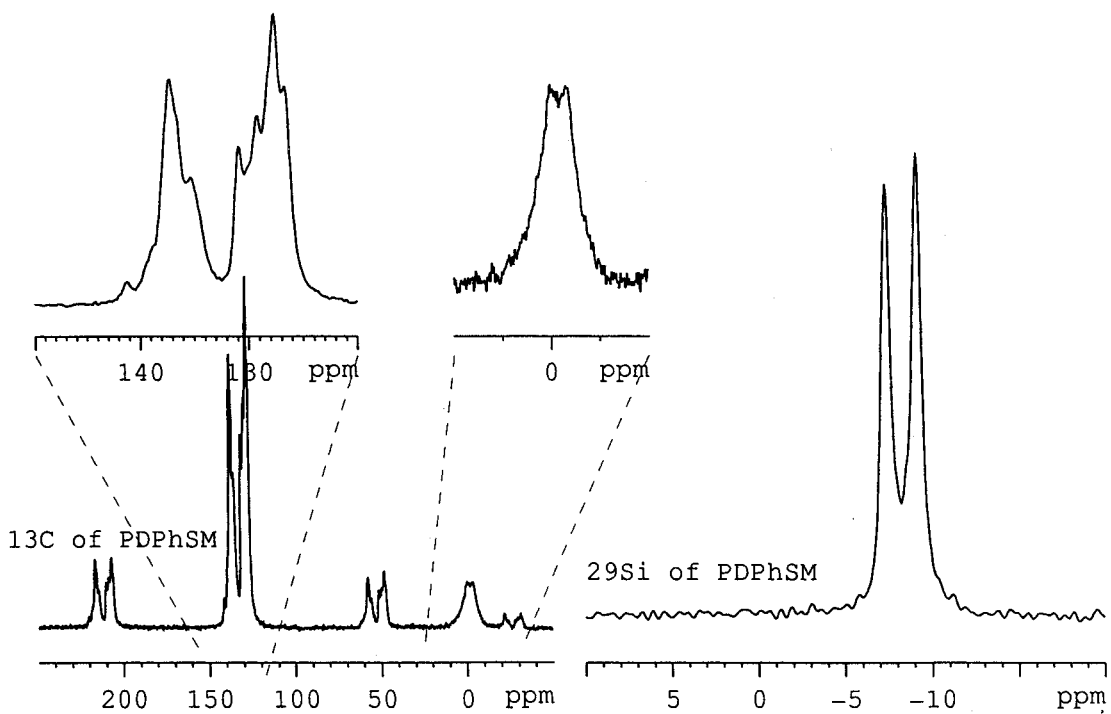
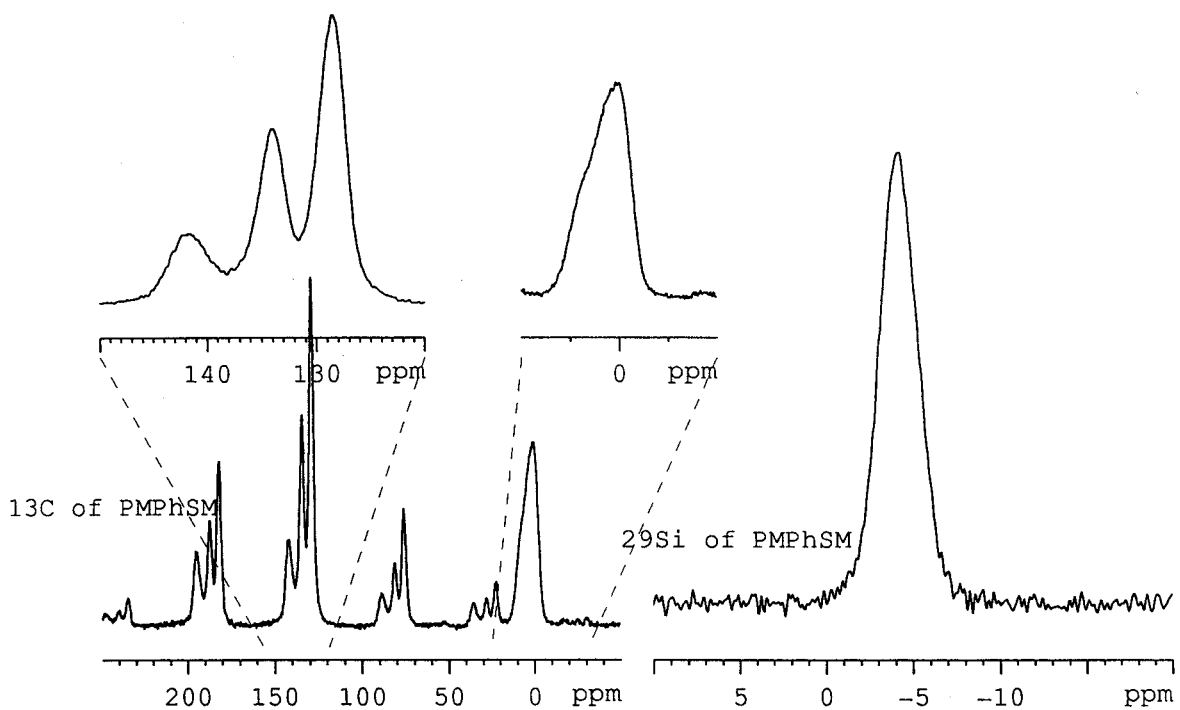


Fig.1 ^{13}C and ^{29}Si CP/MAS NMR spectra of PMPPhSM and PDPhSM.

存在していることがわかる。また、主鎖メチレンも2つの信号が観測されており、 ^{29}Si の結果も含め、磁気的環境の異なった2種類の主鎖成分があることがわかる。一方、PMPPhSMの側鎖フェニル基は低磁場側からC1、C2、C3,4由来の信号に帰属でき、主鎖メチレンからの信号も1つであった。PDPPhSMの ^{29}Si の2つの信号が何に由来するものかを明らかにするためにまずFig.2に示すPDPPhSMの ^{29}Si DD/MASスペクトルを観測した。その結果、CP/MASスペクトルで観測された2つの信号以外に-8.5ppmにショルダーピークが観測された。これは運動性の良い非晶部に由来する信号であると考えられる。また ^{29}Si T_1 測定の結果、273s(-7.4ppm)と306s(-9.2ppm)であり、 T_1 はほぼ等しくこの2つの信号はともに結晶部由来の信号であることが分かる。2つの結晶成分の主鎖由来の信号が観測されており、その強度比がほぼ1:1であることからPDPPhSMの主鎖はTTTGコンホメーションをとっていることが推測される。

Fig3に室温におけるPMPPhSMとPDPPhSMの室温およびPDPPhSMの386.5Kにおける ^{13}C CP+DDph/MAS測定の結果(フェニル領域)を示す。PMPPhSMは側鎖フェニル基のC1,C2,C3由来の信号が観測されているため、すでに側鎖フェニル基の運動が室温で起こっていることがわかる。一方、PDPPhSMでは側鎖のフェニル基に由来する信号のうちC2,C3由来の信号はほとんど観測されていない。したがって、室温においてフェニル基の回転はほとんど起こっていないことがわかる。また少なくとも3つ以上の異なったC1炭素が観測されているので、異なった磁気的環境にあるフェニル環が3種類以上存在することがわかる。386.5KにおいてはC2,C3由来の信号が観測されているためフェニル基の回転運動がこの温度では起こっていることがわかる。

Fig4に室温と386.7Kにおける ^{29}Si CP+DDph/MASスペクトルを示す。室温ではdipolar-dephasingにより両方の信号がほぼ同様の割合で減衰しているのに対して、

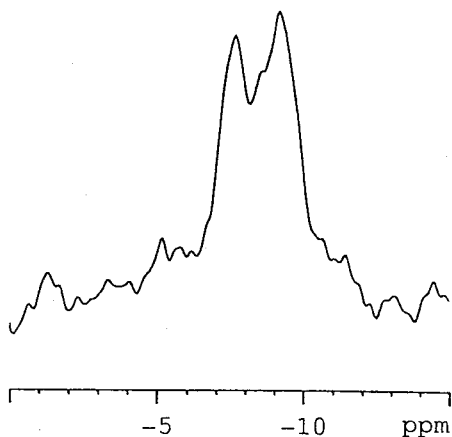


Fig.2 ^{29}Si DD/MAS spectrum of PDPPhSM at room temp.

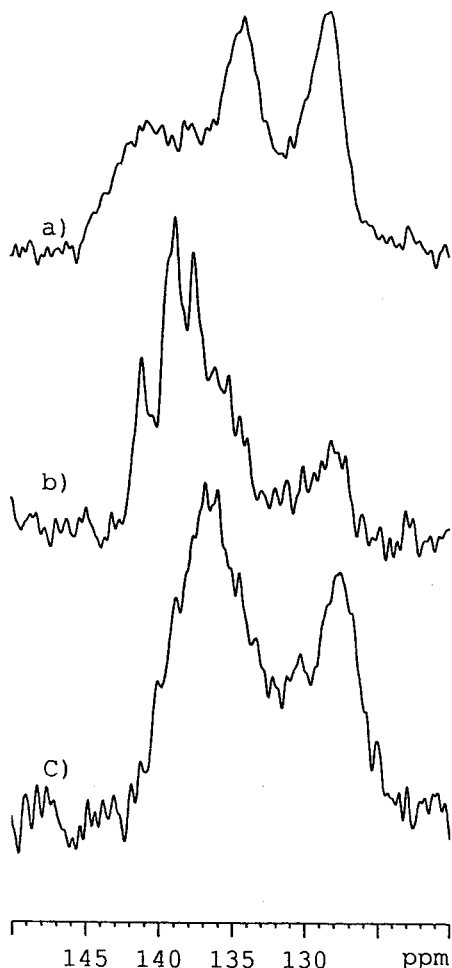


Fig.3 ^{13}C CP+DDph/MAS spectra of PMPPhSM (a) and PDPPhSM (b) at room temp. and PDPPhSM at 386.5K (c).

386.7K では高磁場側の信号は全く減衰せず、低磁場側の信号のみが減衰している。これは低磁場側の信号由来のシリコン原子が ^1H と強い双極子-双極子相互作用があるにもかかわらず、高磁場側の信号由来のシリコン原子は ^1H との双極子-双極子相互作用が小さくなっていることを示している。この温度において側鎖フェニル基の回転運動が起きていることが Fig.3 の結果からわかっているため、高磁場側の信号に由来するシリコン原子に結合したフェニル基は回転運動をしているが、低磁場側の信号に由来するシリコン原子に結合したフェニル基は回転運動をしていないことがわかる。この結果から低磁場側の信号が TT 由来の信号で、高磁場側が TG 由来の信号であることが示唆される。詳細な議論は講演にて述べる。

謝辞

本研究は、産業技術研究開発制度の一環として、(財)高分子素材センターを通じ、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る。

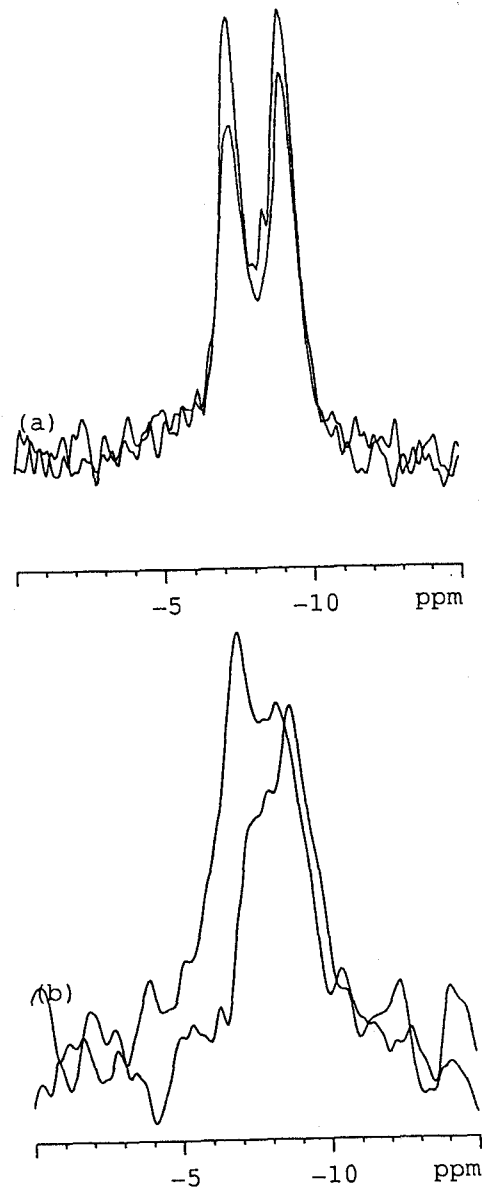


Fig.4 ^{29}Si CP DDph/MAS spectra of PDPHSM at room tem. (a) and 386.7K (b). Dipolar-Dephasing delay is 25 μs .

Analyses of Short-Range Ordered Structure of Glassy Polymers by Two-Dimensional
Solid-State ^{13}C Spin Diffusion NMR Method

Hironori Kaji and Fumitaka Horii

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

The short-range order in glassy ^{13}C carbonyl-labeled poly(ethylene terephthalate) (PET), quenched from the melt, has been investigated at room temperature by two-dimensional solid-state ^{13}C spin diffusion NMR spectroscopy. From two-dimensional ^{13}C spin diffusion spectra with various mixing times, it is suggested that there exists the ordered region within the mixing time of 3.2 s even in the glassy state, and that the disordered component increases with increasing the mixing time. Above 3.2 s, there is no orientational correlation, showing that the state reaches to a quasi-equilibrium. From the calculation of ^{13}C spin diffusion rate constant, the correlation length of the ordered region is estimated to be of the order less than twenty carbonyl carbons.

1. 緒言

高分子の構造および運動はその巨視的な物性発現の原因であり、その解明は極めて重要である。高分子の結晶および非晶状態における分子運動解析には固体 NMR 法が極めて有用であり、その分子運動の詳細が数多くの研究により明らかとなっている^{1,2)}。一方、高分子の分子レベルの構造は、結晶に対しては回折法により明らかとなっているが、ガラス状態での構造はいまだ明確にされているとは言いがたい。高分子のガラス状態における構造、特に短距離局所構造は、巨視的物性のみならず分子運動とも密接に関連しており、その解明は分子運動を明らかにする上でも不可欠である。

本研究では、カルボニル炭素を選択的にラベルしたポリエチレンテレフタレート(CO-PET) に対し、 ^{13}C スピン拡散を利用した二次元固体 NMR 法を用いることにより、PET のガラス状態における短距離構造について検討した。

2. 実験

試料は、東京農工大の朝倉哲郎教授に提供して頂いた CO-PET を 280°C、10kgf/cm² で製膜後

キーワード：ポリエチレンテレフタレート、非晶構造、化学シフト異方性、
二次元交換スペクトル、 ^{13}C スピン拡散

かじ ひろのり、ほりい ふみたか

氷水中で急冷し、一日間減圧乾燥させることにより作製した。得られたガラス状試料を NMR 測定に供した。固体 ^{13}C NMR 測定は、Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4T の静磁場下で行った。測定は、スピン拡散の角度依存性および化学シフト差依存性を消去するため、また、 ^{13}C スピン拡散を加速するため、超低速 magic angle spinning (us-MAS) (40 ± 0.17 Hz) 下で行った。測定温度は、 $22.6 \pm 1.0^\circ\text{C}$ である。

3. 結果と考察

3.1. 二次元 ^{13}C スピン拡散 NMR スペクトル

図 1 に混合時間を 0 秒から 3.2 秒に変化させた場合の二次元 ^{13}C スピン拡散 NMR スペクトルの測定結果を俯瞰図で示す。ここで観察される交差ピークに運動の寄与がないことは、ラベルをしていない PET 試料の測定により確認している。図 2 には ^{13}C スピンの拡散が起こっていない場合と、 ^{13}C スピンが完全にランダムになった準平衡状態に対するシミュレーションスペクトルを示す。混合時間が 0 秒の場合の実測スペクトルは、図 2(a) と同様、対角ピークのみが観察されており、 ^{13}C スピンの拡散が起こっていないことがわかる。一方、混合時間が 3.2 秒を超えた場合のスペクトルは、図 2(b) と一致しており、 ^{13}C スピンが完全にランダムになった準平衡状態に至っていることがわかる。混合時間が 3.2 秒以内では、混合時間の増加とともに、交差ピークの増加が明瞭に観察され、無秩序成分が増加していくことが示された。また、全成分と無秩序成分の差スペクトルから、その他の成分を検討したところ、対角ピーク線幅の広がり、 σ_{11} から σ_{22} 部分にかけての対角ピーク強度の減少が観察されるとともに、 σ_{33} 部分の強度が増加する傾向が見られた。この対角ピーク強度の変化がスピン-格子緩和時間 (T_{1c}) の主軸方向依存性によるものではないことは CPT1 測定から明らかである。シミュレーション解析の結果、フェニレン環がスタックした成分およびラベルし

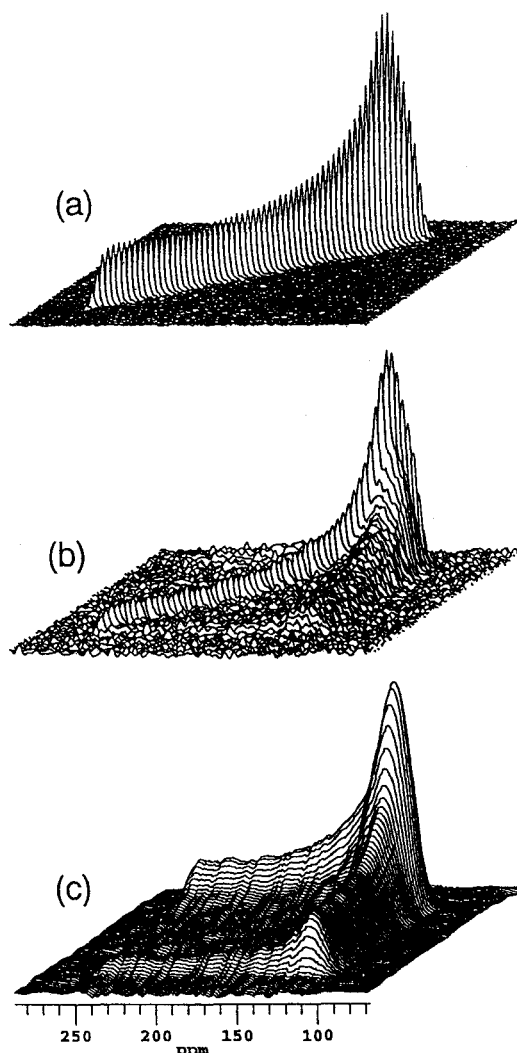


Fig. 1. Experimental 2D ^{13}C spin diffusion spectra of CO-PET in the glassy state. Mixing times are (a) 0, (b) 0.8, and (c) 3.2 s, respectively. The spinning rate is 40 ± 0.17 Hz.

た炭素間のなす角が数度以内の秩序成分の存在が示唆された。

3.2. 秩序構造領域のサイズ

このようにガラス状態においても秩序構造領域が存在していることが二次元 ^{13}C スピン拡散 NMR 法により示唆された。この秩序構造領域の大きさは、 ^{13}C スピン拡散速度定数を評価し、混合時間を実際の距離に換算することにより明らかにできる³⁾。混合時間中の平均 ^{13}C スピン拡散速度定数 \overline{W}_{ij} は、

$$\overline{W}_{ij} = \frac{1}{2} \pi s_{ij}^2 b_{ij}^2 \overline{F_{ij}(0)}$$

で与えられる。ここで s_{ij} は双極子スケージング因子、 b_{ij} は双極子カップリングの周波数、 $F_{ij}(0)$ はゼロ周波数での規格化されたゼロ量子遷移スペクトルの強度である。本実験条件(us-MAS)下では、 $s_{ij}=1$ 、

$$b_{ij}^2 = \left(-\frac{\mu_0 \gamma_s^2 \hbar}{4\pi r_{ij}^3} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{ij} - 1) \right)^2 \approx 4.6 \times 10^{-52} \times \frac{1}{r_{ij}^6}$$

$$\overline{F_{ij}(0)} = \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_p \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_q P(\omega_i|\omega_p) P(\omega_j|\omega_q) F_{pq}(0) \approx 1.0 \times 10^{-4}$$

であった。以上より、 $\overline{W}_{ij} \approx 7.2 \times 10^{-56} \times r_{ij}^{-6}$ となる。この結果から、us-MAS によって \overline{W}_{ij} は核間距離 r_{ij} のみの関数となり、核間ベクトルと静磁場のなす角 θ_{ij} および化学シフト差 $\omega_i - \omega_j$ に対する依存性を消去できることがわかった。秩序構造領域の大きさは、 $r_{ij}=4.5\sim 6 \text{ \AA}$ と仮定すると一次元方向に十数個以下程度の大きさであると見積もることができるが、より正確には r_{ij} を明らかにする必要がある。初期の速度定数は、短い混合時間における交差ピークの強度から評価できるため、角度相関を距離の関数として得ることが可能となるが、交差ピーク強度が極めて小さいため、現在検討中である。

謝辞：試料を提供して頂いた東京農工大学部の朝倉哲郎教授に深く感謝します。

References

- (1) Horii, F.; Beppu, T.; Takaesu, N.; Ishida, M. *Magn. Reson. Chem.* 1994, 32, S30.
- (2) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H.W. *Multi-dimensional Solid-State NMR and Polymers*; Academic Press: New York, 1994.
- (3) Gan, Z.; Ernst, R.R. *Chem. Phys. Lett.* 1996, 253, 13.

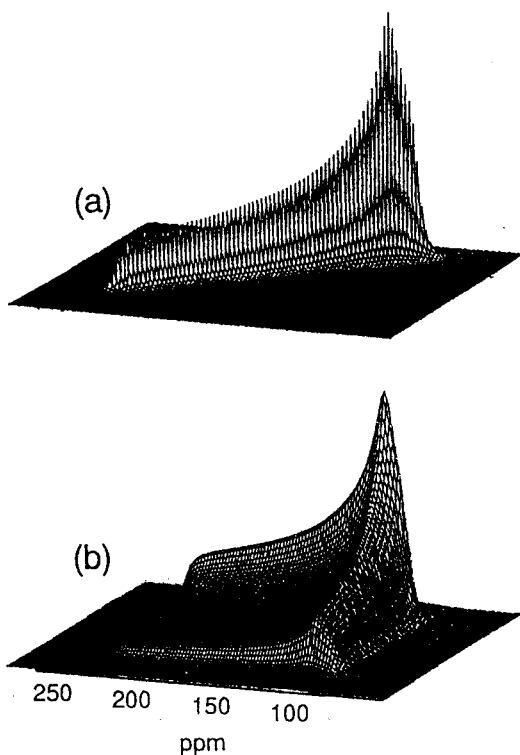


Fig. 2. Simulated 2D ^{13}C spin diffusion spectra of CO-PET in the glassy state. (a) the state without ^{13}C spin diffusion, (b) quasi-equilibrium state.

パルス磁場勾配NMR法によるポリエチレンオキサイド系
ゲルにおけるイオンの拡散係数の測定

(物質研¹、ユアサコーポレーション²、機能水研究所³)

○早水紀久子¹、相原雄一²、落合誠二郎²、W.S.Price³

Measurement of the Diffusion Coefficients of Ions in the Gels of
Polyethyleneoxides by the Pulsed Field Gradient NMR Method

Kikuko Hayamizu¹, Yuichi Aihara², Seiji Ochiai², and W. S. Price³

¹National Institute of Materials and Chemical Research, ²Yuasa Cooperation, and ³Water
Research Institute

E-mail: hayamizu@nimc.go.jp

Knowledge of diffusion is of fundamental importance for understanding active materials and the recently developed pulsed field gradient (PFG) NMR method is an excellent method for measuring diffusion coefficients. Gels are very interesting materials and their nature is half liquid and half solid, but techniques suitable for measuring diffusion in gels are limited. Gel electrolytes are very promising materials for constructing batteries. The components of the present gels are cross-linked polyethylene oxide (PEO, polymer), propylenecarbonate (PC, solvent), and LiN(SO₂CF₃)₂ (LiTFSI, salt). In this study, we have measured the diffusion coefficients of SPE and PC using ¹H PFG NMR and those of Li ion and anion by ⁷Li and ¹⁹F PFG NMR, respectively. The Li ion was observed to undergo restricted diffusion.

パルス磁場勾配法NMR法 (PFG-NMR) は物質中を拡散する原子、イオン、分子の挙動を測定する上で、非常に有効な手法であり、特に異なった核種に対して個別のデータが観測できるので、物質内部を詳細にみることができる。ゲルは固体と液体の中間領域の構造をもっているが、まだ観測手法が十分に確立しているとはいえず、構造と機能についての研究が始まったばかりである。特にゲルの中での物質移動は重要な現象である。リチウム電池においてゲル電解質は有望であると考えられている。我々は PFG-NMR 法をゲル電解質に適用した。本研究で対象にした電解質ゲルの構成物質は高分子 (架橋ポリエチレンオキサイド、PEO)、溶媒 (プロピレンカーボネイト、PC) 及びリチウム塩 (LiN(SO₂CF₃)₂, LiTFSI) であり、それぞれの拡散係数を測定したので報告する。

Diffusion Coefficient, Pulse Field Gradient, Gel electrolyte, ¹H, ¹⁹F and ⁷Li NMR

はやみず きくこ、あいはら ゆういち、おちあい せいじろう、W. S. プライス

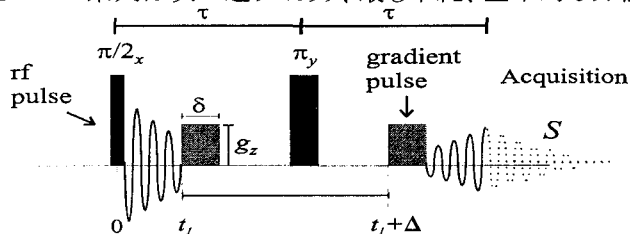
実験

PFG-NMR の測定は、日本電子製 GSH-200 (4.7T、ワイドホアSCM)を改造して TecMag 社の デイジタイザ-GALAXY とソフトウェア MacNMR と接続した本体に、日本電子製の PFG 用プローブ (マルチ+¹H 用及び F/H 用) 及びパルス磁場発生用パワーアンプを接続して行った。パルス磁場強度の較正にはシゲミスタンダード社製の二重管の内管の中央に正確に 5mm のつかえ棒をたてた特製のサンプル管を用い、イオン交換水を入れてシグナル観測時にパルス磁場を照射する方法でマルチ用プローブを較正した。最大のパルス磁場強度は 8.5T/m (850 gauss/cm) であった。次に水の拡散係数を測定し ($2.4 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$)、これを基準にして F/H 用のプローブを較正した。最大のパルス磁場強度は 10.9T/m であった。パルス磁場強度の安定性は良好で、繰り返し実験ではデータは実験誤差以内で一致している。測定は全て室温 (23° C) で行った。

電解質ゲルの作製では分子量 4,000 のポリエチレンオキサイド (PEO) の末端をアクリル化した前駆体を用いた。分量の塩を秤量して 50ml の PC に加え約 30 分攪拌して完全に溶解しさらに PEO を加えて 30 分攪拌した後に SUS304 にキャストしてから放射線ラジカル重合による化学架橋を行い目的とするゲルを作製した。これを集めてシゲミスタンダード製の二重管に高さ 5mm で挿入し熔封した。これらの工程は全てドライルームで行った。本研究では 6 種類のサンプルの測定を行った。即ちサンプル A: PC (純液体)、B: PC+1M LiTFSI (電解質溶液)、C: PC+20%PEO (ゲル)、D: PC+0.5M LiTFSI + 20%PEO、E: PC+1M LiTFSI + 20% PEO、F: PC+1.5M LiTFSI+20%PEO (D、E、F は電解質ゲル)。

PFM-NMR

今回測定に用いたパルス系列は次の通りであり、最も単純、基本的な方法である。

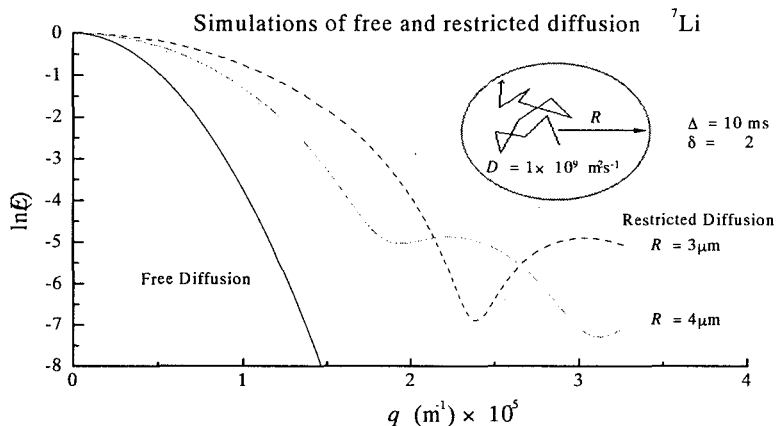


いわゆるスピナーエコー法にパルス磁場を2回照射して磁場勾配をつくる方法である。観測対象物質が位置を変えると最初の $\pi/2$ パルスした後 xy 平面に広がったスピンの位相が次のパルス磁場と π パルスした後で再集合しなくなるというのが極く単純な原理である。パルス磁場を照射した時としない時のシグナル強度の比(E/E_0)は自己拡散係数 D とすると

$$E/E_0 = \exp(-D(\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta/3)) \quad [1]$$

で与えられる。ここで γ は磁気回転比、 g はパルス磁場強度、 δ はパルス磁場の長さ、 Δ はパルス磁場の間隔である。式から明らかなように、拡散係数が同じなら γ の小さな核種では g は大きくなければならない。また SCM の作る大きな磁場のなかで付加的な磁場を照射するので、パルス磁場後に渦電流が残るとシグナルが歪んで正確な強度が得られなくなる。パルス磁場は高周波パルスの直後に照射し、渦電流の効果をなるべく受けないようにしている。 δ (small delta) と Δ (large delta) との関係において自ずと限界があり、測定可能な拡散係数にも限界がある。実際の測定ではパルス磁場強度と Δ を一定に保って δ を変化してシグナル強度 E を測定してた。パルス磁場の無い時のシグナル強度 E_0 で規格化することにより、緩和の効果を相殺し、 $(\gamma g \delta)^2 (D - \delta/3)$ で対数プロットして勾配から拡散係数 D を得ている。一

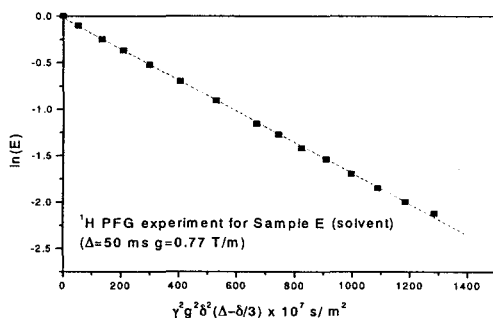
般に ^1H NMR と ^{19}F NMR では Δ は 30~30ms で、 ^7Li NMR では Δ は 10~20ms 測定した。もし拡散が無限に広い空間で起こる時には、 D の測定値は Δ や g によらないことが理論的にも実験的にも示されている。しかしながら、我々が測定したゲルのサンプルではプロットは必ずしも直線にならなかった。この時には“制限拡散”という現象が起きていると考えられる。この時の理論的な計算に基づく ^7Li NMR に対するプロットは次の通りになる。



ここでは拡散している物質は半径 R の空間に限定されていて、この外側へ移動することができないと仮定している。モデルを単純にするために $q = \gamma g \delta / 2\pi$ でプロットしてある。

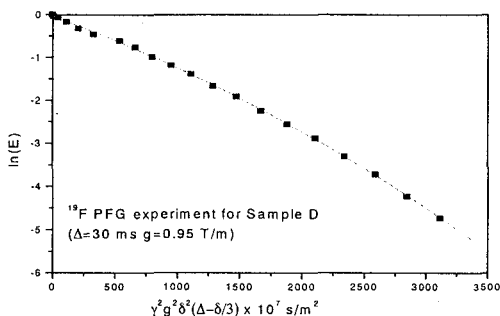
結果と考察

実際の測定例をつぎの図に示す。 ^1H NMR で測定された 1 M の塩を含むゲル中の溶媒の



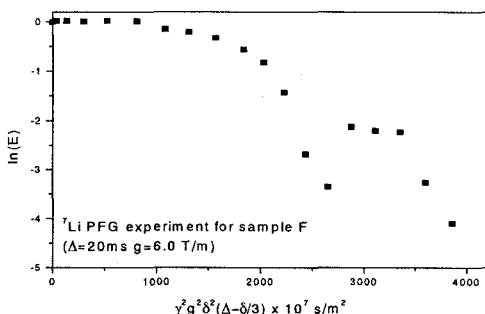
拡散は[1]式で示される現象と一致して直線になっている。拡散係数は $1.7 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ となり、純液体状態(サンプルA)の値 $5.3 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ 、電解質溶液(サンプルB)の値 $2.3 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ と比べて小さくなった。溶媒の拡散はいずれのサンプルのプロットでも直線となり、自由な拡散しているというモデルで説明できる。溶媒の拡散係数はサンプル A から F へと構成が変わるにつれて、徐々に小さくなる傾向がみられた。またポリマーの ^1H NMR スペクトルはブロードなシグナルで測定できるので、拡散係数を測定したところ溶媒よりおよそ2桁小さくなった。

しかしながら次の図で示した 0.5M の塩を含むゲル(サンプルD)の ^{19}F NMR で PFG 法の測定ではわずかに上に凸の曲線が得られた。これは陰イオン $(^-)\text{N}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ の拡散を測定していることになる。図での拡散係数はおよそ $1 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ となる。電解質溶液(サンプルB)でも同様な傾向がみられる。溶液での値 $4.8 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ と比べるとゲルでは拡散は約 1/5 にな



っている。我々は異なった溶媒と塩で構成されるゲルの系 (γ -ブチラクトンGBLとLiBF₄)で拡散係数も同じ測定条件で類似の範囲で測定しているが、¹⁹F NMR ではいつも直線になるので、曲線が観測されるのはこのゲルの系の特徴といえよう。拡散係数の値はサンプル B から F まであまり大きな変化はみられず、溶媒の拡散係数とは異なった挙動を示している。

一方⁷Li NMR の PFG の測定で電解質溶液(サンプルB)では直線が得られ、拡散係数は $2.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ がとなっているが、ゲルのサンプルでは下図に示すような回折があるパターンが得られた。理論図とは横軸の単位が異なっている。理論にあわせるためにはパルス磁



場強度を変えてNMRを測定することになる。実験条件の設定はパルス間隔 Δ (この間にスピニング移動する距離に対応しおおよその目安は $(2D\Delta)^{1/2}$) と δ が重要であり、その上でパルス磁場強度を変えていく。この実験は現在継続中である。

図で示したような⁷Li NMR で回折が明確にみえるパターンは全ての電解質ゲル(サンプル D、E、F)で観測されているが、サンプル製造後に経時変化があるようにみえるので、ゲルが安定状態にあることをみきわめなければならない。また上記の同じポリマーで異なった溶媒と塩からなるゲルの系(PEO-GBL-LiBF₄)の⁷Li NMRではこのような現象は測定されていない。従って特異なゲルでこのような現象が起こると考えられる。

制限拡散があるために回折パターンが得られることは理論的に予想され、実験的には多孔性のガラスの中での拡散や磁場に配向させた赤血球など特殊な場合に測定されているにすぎない。ゲルの拡散係数を測定したデータは僅かであり、しかもこのような明確な回折パターンは最初の実験データと考えられる。

文献

Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance Vol. 3 “Diffusion” の項、JEOL application Note 「NMR による分子拡散も測定について」熊木康裕(1996)、P.W.Kuchel et al. Magn. Reson. Med. 37, 637(1997).

High Resolution Solid State ¹⁰⁹Ag NMR Spectra of Silver(I) Complexes
Susumu Kitagawa, Yoko Shimada, Hiroyuki Matsuzaka, Mitsuru Kondo,
and Takashi Okubo

(Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University)

CPMAS ¹⁰⁹Ag NMR spectra of silver(I) complexes have been measured and their chemical shifts were examined in relation to the coordination environment of the silver(I) complexes, whose structures were determined X-ray crystallographically. The good correlation is found for two-coordinate silver(I) complexes of pyridine derivatives; the chemical shift increases with the decrease in the bond angle of N-Ag-N.

【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物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Ag NMR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、緩和時間が長い為、観測が困難で、その研究は限られてきた。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らず、温度や濃度に対す

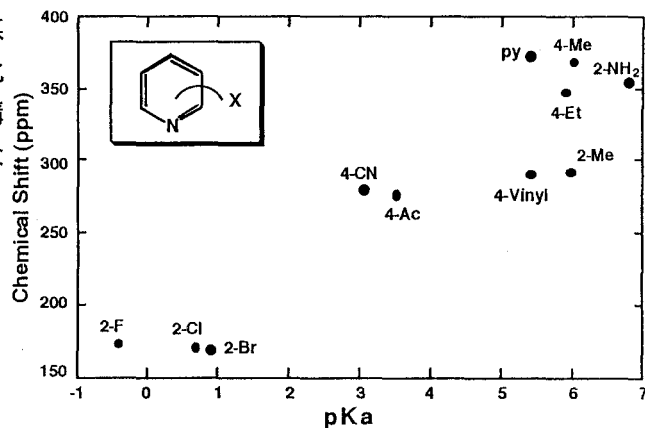


Fig.1. Correlation of observed ¹⁰⁹Ag NMR chemical shifts with pKa values of ligands

銀(I)錯体、X線構造解析、固体¹⁰⁹Ag NMR

きたがわすすむ、しまだようこ、まつざかひろゆき、こんどうみつる、おおくぼたかし

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。

現在までに、直線二配位構造を有する2-、又は4-位置換ピリジン単核銀錯体について固体高分解能 ^{109}Ag 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研究を進め、ピリジン錯体の ^{109}Ag NMRシフト値と、配位子のpKaとに良い相関のあることを見出した (Fig.1.)。この結果を受け、本研究では、配位原子部位の塩基性のみならず、銀の配位数、立体構造と化学シフトとの関連についても検討を行った。

【実験】

合成は全て、空气中・室温で行った。また、銀への配位を防ぐためアニオンは BF_4^- または PF_6^- とした。測定に用いた粉末については、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 $20\mu\text{s}$ 、dead time $26\mu\text{s}$ 、パルス幅 $8\mu\text{s}$ 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-ハーンの条件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 AgClO_4 水溶液を用いた。

【結果および考察】

2,2'-dipyridylketone(dprk)、dipyridylamine(dpya)、2-benzoylpyridine(bzpy)、anilinopyridine(anpy)をそれぞれ配位子として有するNドナー二配位型の銀(I)錯体を合成しX線構造解析を行ったところ、それぞれ、 $\{[\text{Ag}(\text{dprk})](\text{BF}_4)_n\}$ 、 $\{[\text{Ag}(\text{dpya})](\text{PF}_6)_n\}$ 、 $[\text{Ag}(\text{bzpy})_2](\text{PF}_6)$ 、 $[\text{Ag}(\text{anpy})_2](\text{PF}_6)$ の組成を有し、銀は全てNドナー二配位型となっていることが明らかとなった。

また、どの錯体についても、Ag-N距離は通常を示しているのに対し、N-Ag-N角 θ は、bzpy錯体、anpy錯体では、大きく折れ曲がっていることが明らかとなった。これら全ての錯体について、固体 ^{109}Ag NMRの測定を行い、 θ に対して化学シフト値をプロットし

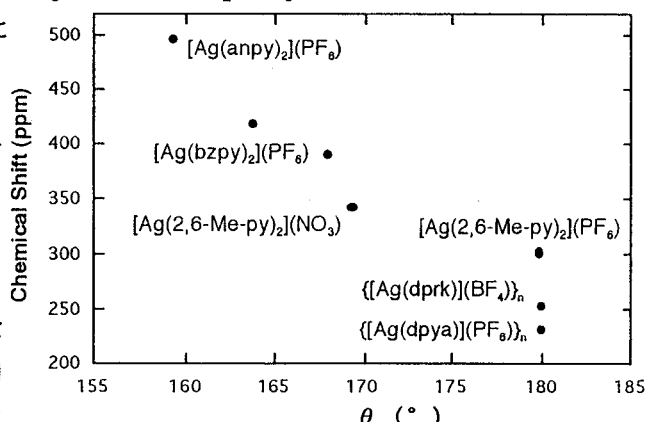


Fig.2. Correlation of observed ^{109}Ag NMR chemical shifts with N-Ag-N angles, θ (°)

たところ、 θ が小さくなる程低磁場シフトするという相関が得られた (図1)。

次に、縮合環配位子 (Fig.3.) を用いた場合についても検討を行うことを目的とし、Nドナー二配位型のポリマー及び単核錯体を合成し、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。acridine(acrd)、phenazine(phz) 及び、octahydrophenazine(ohphz) 錯体について、良好な単結晶が得られたため、X線構造解析を行ったところ、

acrd錯体、phz錯体については、Nドナー二配位型の単核錯体が形成されており、ohphz錯体については、Nドナー二配位型のポリマー構造を有していることが明らかとなった。また、何れの錯体についても、N-Ag-N角は180度と直線型になっており、Ag-N距離は同程度の値となっている。今回新たに合成した縮合環配位子を用いた銀錯体について、配位子のpKaと化学シフトとの相関をFig.4.に示した。

Nを一つ含む配位子を用いた単核錯体と、Nを二つ含む配

位子を用いたポリマーについては、2-又は4-位置換ピリジン誘導体を配位子とした錯体と同様な傾向を示したが、Nを二つ含む配位子を用いた単核錯体については、phz錯体では462 ppm、qxln錯体については342 ppmと、これまでに得られた傾向とは、大きく異なった挙動を示すことが明らかとなり、この要因についての検討も行った。

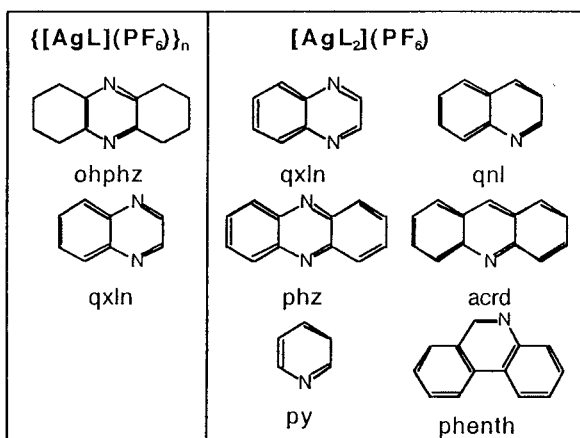


Fig.3. Ligands

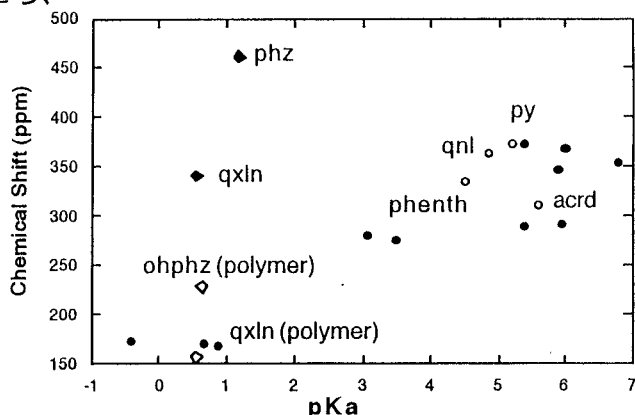


Fig.4. Correlation of observed ^{109}Ag NMR chemical shifts with pKa values of ligands

- : 2- or 4-Substituted pyridine derivatives
- : Condensed aromatic ring including one N atom donor
- ◆ : Condensed aromatic ring including two N atom donors
- ◇ : Condensed aromatic ring including two N atom donors (polymer)

赤色蛍光体、Euドーピング Y_2O_2S 、の ^{89}Y 固体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
 ・安達隆二²・渡部徳子³

^{89}Y -Solid State NMR of Red Phosphor, Eu-doped Y_2O_2S
 (Mitsubishi Chemical Co.¹, Kasei Optonix², Tokyo University of Fisheries³)
 ○Toshie Harazono¹, Ryuji Adachi², Tokuko Watanabe³

Solid state $^{89}Y(I=1/2)$ -MAS and -static NMR of a red phosphor, Eu doped- Y_2O_2S , have been studied. Besides the main peak of Y_2O_2S , another 4 peaks appeared in the Eu doped- Y_2O_2S up to 10 mol%. The 4 peaks were assigned from the relative intensity of the 4 peaks and the relationship between T_1 and Y-Eu distance. Furthermore, from the ratio of the total area of the 4 peaks to the main peak, the amount of inhomogeneously distributed Eu was estimated.

イットリウムは、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いる。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り、また、緩和時間が長い(数時間)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。これまで、著者らは、 Y_2O_3 、 $Y_3Al_5O_{12}$ 、 Y_2O_2S の ^{89}Y -MASと-static NMR¹⁾、及び、Eu-doped Y_2O_3 、Tb-doped $Y_3Al_5O_{12}$ の ^{89}Y -static NMR²⁾について報告した。今回、テレビのブラウン管用赤色蛍光体として用いられているEuドーピング Y_2O_2S ($Y_2O_2S:Eu$)の物性を調べるため、Eu/Y = 0 ~ 10 mol%のモデル化合物を合成し、 ^{89}Y -固体NMRを測定した。得られたデータは、 Y_2O_2S の ^{89}Y -固体NMRに関する最初のものである。更に、 T_1 、 T_2 、及び、シグナルの定量測定から、シグナルの帰属、緩和機構、及び、Euの分布等について新たな知見が得られたので報告する。

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³⁾。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1ppm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Bru

^{89}Y -MAS NMR、 ^{89}Y -static NMR、 Y_2O_2S 、Euドーピング Y_2O_2S 、緩和時間

○はらぞの としえ・あだち りゅうじ・わたなべ とくこ

ker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: 1.5M Y(NO₃)₃ 水溶液、デットタイム: 150 μ s、くり返し時間: 10 s (static)、1000 - 150000 s (MAS)。

結果、及び、考察:

Y₂O₂Sは図1に示したような六方晶系の結晶構造をしている。結晶中のY原子は、C_{3v}の対称性を持ち、4個のO原子と3個のS原子と結合している。今回、⁸⁹Y-固体NMRを測定したモデル化合物のサンプルリストを表1に示した。これらのサンプルの⁸⁹Y-static、及び、-MAS NMRスペクトルを図2-(a)と-(b)に示した。Euをドーブするにつれてstatic スペクトルはブロードな1本のシグナルになるが、MAS スペクトルは、③で示したmain peak (Y⁰)の他に、新たに、①②④⑤で示したピーク (Yⁱ)が1:1:2:1の比で現れた。

EuはY³⁺の位置に入り、4f⁶の電子状態をもつEu³⁺として存在する常磁性種である。固体中に常磁性種が存在する時のスピン-格子緩和は、主にdipole-dipole相互作用に支配され、スピン-格子緩和時間 (T₁)は次式で表わされる⁴⁾。

$$1/T_1 \propto N/r^6,$$

ここで、Nは緩和に寄与するEuの個数、rはYとEuの距離を表わしている。

Euをドーブした時に現れる4本のシグナルの帰属するために、saturation recovery 法でT₁を測定した。結果を表2に示した。EuがドーブされていないY₂O₂SのT₁は23800 s (6.61 h)と非常に長い値を示した。このピーク、③のT₁はEu濃度が増加するにつれて短くなったが、他の4本のピークのT₁は、Eu濃度に依存せず一定であった。Eu濃度が増加するにつれて③のT₁が短くなるのは、Nが増加すること、及び、平均のY-Eu距離が短くなることに起因する。これに対して、①②④⑤で示したピークのT₁にはEu濃度依存性がないことから、これらのピークはYとEuの距離が固定されている種によることが示唆される。1個のY原子を1個のEu原子で置換すると、Eu(-0-, -0-)Y, Eu(-S-, -S-)Y, Eu(-0-, -S-)Y, Eu-S-Y結合をしたYが、それぞれ3、3、6、

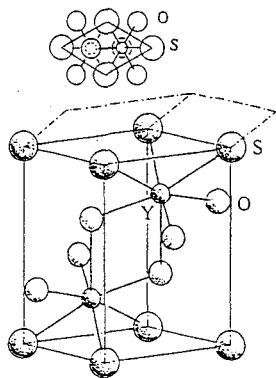


Fig.1 Crystal structure of Y₂O₂S.

Table 1. Sample list of Eu-Y₂O₂S

sample	Eu/Y mol/%	(Y _{1-c} Eu _c) ₂ O ₂ S	
		1-c	c
KR-1	0	1	0
KR-2	1	0.9901	0.0099
KR-3	2	0.9804	0.0196
KR-4	4	0.9616	0.0384
KR-5	7	0.9346	0.0654
KR-6	10	0.9091	0.0909

3個 (1:1:2:1)、計15個生ずる。ピークの面積比から④がEu(-0-, -S-)Yに帰属される。Eu(-0-, -0-)Y, Eu(-S-, -S-)Y, Eu(-0-, -S-)Y, Eu-S-Y結合のYとEuの距離は、リートベルト法によりそれぞれ、3.61, 4.31, 3.78, 5.73Åと求められた⁵⁾。N=1として、 $1/T_1 \propto 1/r^6$ の関係をプロットすると図3に示したように、ほぼ直線になった。このことより、①がEu(-0-, -0-)Y、②がEu(-S-, -S-)Y、④がEu(-0-, -S-)Y、⑤がEu-S-Yに帰属された。1個のYが1個のEuで置き変わると15個のYが生じることから、Euが均一に分布している時のY¹/Y⁰の面積比が計算される。実際のスペクトルから求められたY¹/Y⁰の面積比は計算値よりも小さい。(表2) このことは、Euの分布が均一ではないことを示している。不均一領域(A)に存在するEuの周りのY¹はシグナルが広がって検出されず、均一領域(B)に存在するEuの周りのY¹のみがシグナルとして検出されると仮定した時の、A/Bの値を表2に示した。Eu濃度が増加すると、不均一領域が増えることがわかる。更に、主軸とY-Euのなす角を θ とした時、擬コンタクト項を表わす構造因子、(1-3

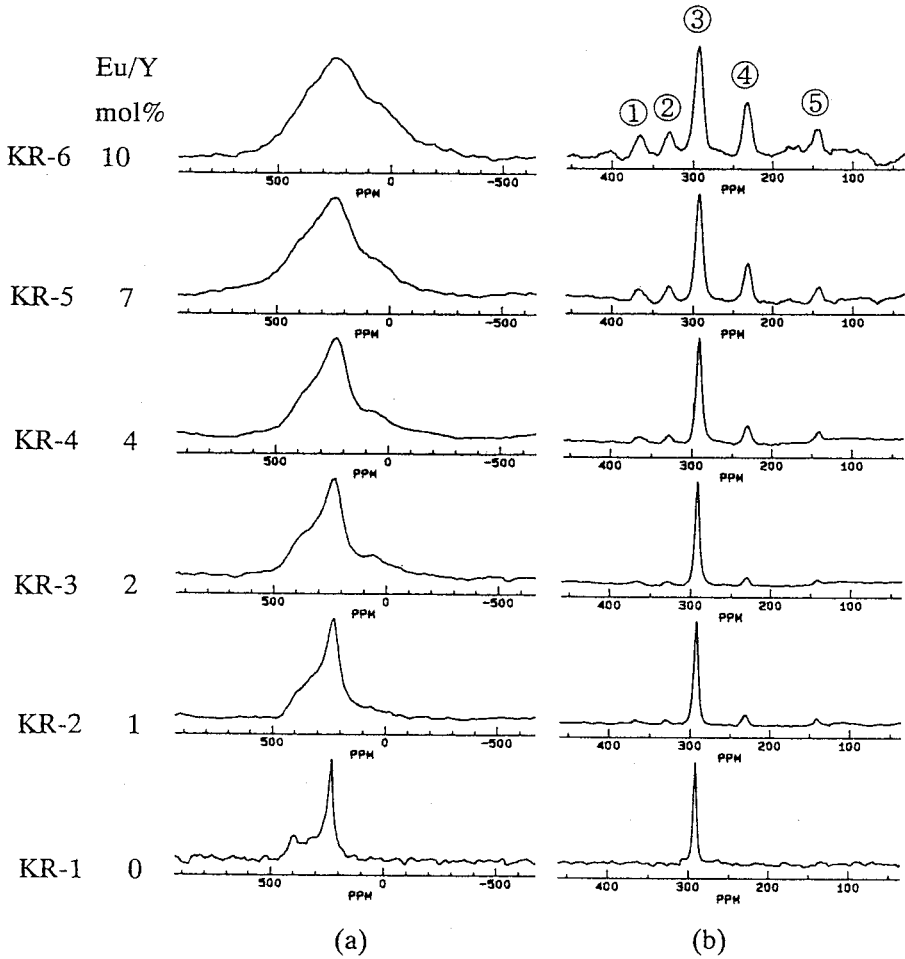


Fig. 2 ⁸⁹Y solid state NMR spectra of Eu-Y₂O₂S. (a) static (pulse width: 5 μs, recycle time: 10 s). (b) MAS (pulse width: 11 μs, recycle time: 1000 - 150000 s).

Table 2. Spin-lattice relaxation times and Y^1/Y^0 of Eu-Y₂O₂S

sample	T ₁ /s					Y ¹ /Y ⁰	Y ¹ /Y ⁰	recycle time	A/B
	①	②	③	④	⑤	calcd.	obs.		
KR-1	/	/	23800	/	/	/	/	150000	/
KR-2	20	34	2460	36	145	0.176/1	/	1000	/
KR-3	17	39	1560	36	157	0.428/1	0.25/1	7500	33/67
KR-4	17	30	890	31	143	1.494/1	0.53/1	5000	42/58
KR-5	21	42	370	33	164	small Y ⁰	0.93/1	1600	54/46
KR-6	16	46	230	36	133	small Y ⁰	1.31/1	1600	62/38
Ave.	18.2	38.2	/	34.4	148.4	/	/	/	/

A: the amount of inhomogeneously distributed Eu.

B: the amount of homogeneously distributed Eu.

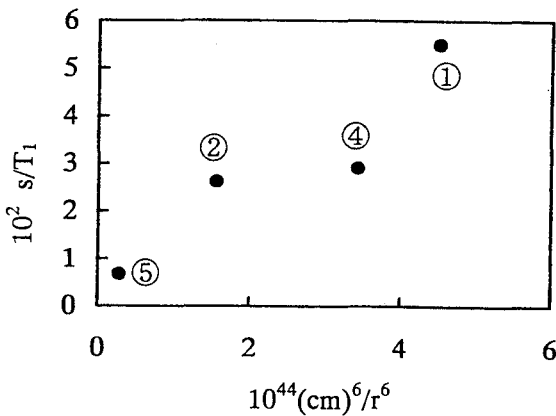


Fig. 3 Relationship between $1/T_1$ and $1/r^6$ for 4 peaks.

$\cos^2 \theta / r^3$ と4本のシグナルのシフトとの間に相関性がないことから、①②④⑤のシフトにはコンタクト項が含まれていることが明らかになった。

References

- 1) T. Harazono and T. Watanabe, Bull. Chem. Soc. Jpn., Vol. 70, No. 10, 1997, in press.
- 2) 原園、横田、渡部、第33回NMR討論会要旨集、p. 253、p. 257、1994.
- 3) 蛍光体ハンドブック、p.171、蛍光体同学会編、オーム社、1987.
- 4) A. Abragam: "The principles of nuclear magnetism", Chap.9, (1961), Oxford at the Clarendon Press.
- 5) 木島、三菱化学、未発表データ。

Weathering Investigation of PVC Coatings on Iron Sheets by the NMR-MOUSE

- 1) Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation,
 2) Magnetic Resonance Center M_{ARC}, RWTH - Aachen, D - 52056 Aachen, Germany
 ○ Koji Saito 1&2), Peter Bluemler 2), and Bernhard Bluemich 2)

Composites with ferromagnetic components are usually excluded from NMR investigations due to large magnetic field distortions. Several applications of NMR methods appear to be limited by this fact. However, a novel NMR device, the MOUSE (MOBILE Universal Surface Explorer), also works in the presence of ferromagnetics, as inhomogeneous magnetic fields are used in the first place. It is applied to relaxation measurements of polyvinylchloride (PVC) coatings on iron sheets. New and artificially weathered PVC coatings can be discriminated by different transverse relaxation times. The MOUSE design can be improved for such applications by using large-area surface coils with a low penetration depth. The weathering treatment of the samples leads to different chemical changes. The molecular mobility is thus reduced and dipolar couplings are enhanced. This explains the shorter T_2 relaxation times in the case of the aged sample.

1. はじめに

NMRは非常に多くの情報を与え、様々な分野での応用が展開されている。しかし、どうしても実験室での測定・解析となり、屋外で実際に使用されている実材料を直接解析することはできなかった。例えば重要な鉄鋼商品である鉄板上にコートしてある高分子皮膜の劣化にはNMRが有効¹⁾であることはわかっていたが、鉄板があるためNMRは適応できず、屋外ではJISの色差法で計測するか、もしくは鉄板から高分子皮膜をはがして実験室にて、IR法やNMR測定をしていた。最近BluemichらによってNMR-MOUSE(MOBILE Universal Surface Explorer)法²⁾が開発され、屋外でのゴムタイヤ等の実材料の測定・解析が可能であることがわかってきた。そこで今回我々は、鉄板上にコートされた高分子皮膜の劣化解析にNMR-MOUSE法を適応し、いくつかの知見を得たので報告する³⁾。

2. 実験

鉄板上(1.5 mm厚)に500 μ m厚のpolyvinylchloride (PVC) がコートされているものを試料とし、それらをSWOM (Sunshine Weather Of Meter) 装置にて、紫外線照射(280~450nm, 370W/m², 約2時間)と水滴噴霧(約20分)を1サイクルとする劣化処理をそれぞれ0, 100, 300, 500, 1000, 2000, 3000時間行った。

測定は自作のNMR-MOUSE装置²⁾で、 T_2 の測定は改良型steady-stateCPMGシーケンスで行った。共鳴周波数は、約17.5 MHzであった。基本となる装置構成をFig. 1に示す。鉄板の有無による影響の比較のために行った T_2 測定は、上記試料を鉄板から引き剥がした後、同様にNMR-MOUSEで行い、更に同時にChemagnetic社のCMX-300でも行った。NMR-MOUSEでの測定時間は、約2時間であった。

NMRmouse、表面情報、緩和時間

さいとうこうじ, Bluemler P., Bluemich B.

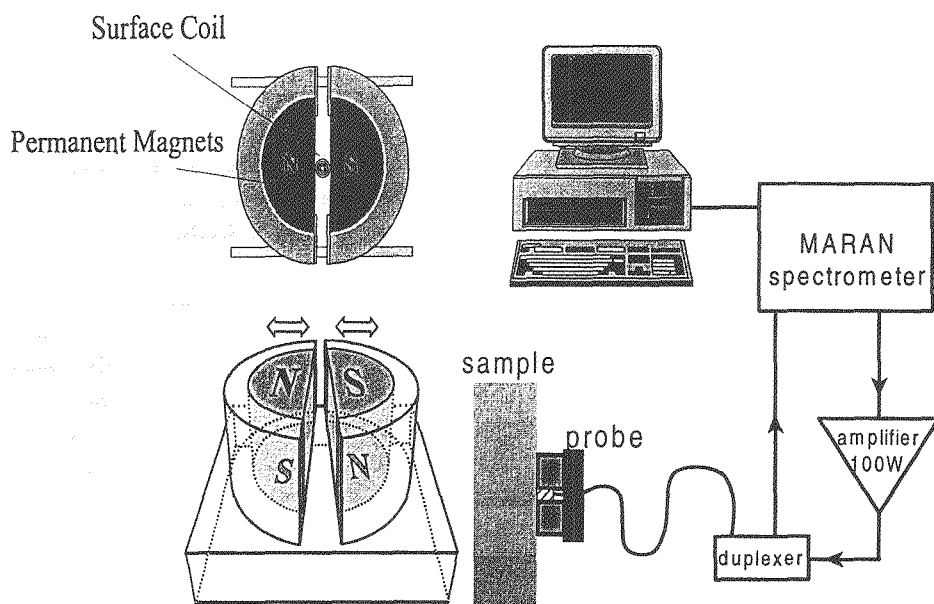


Fig.1 Setup of the NMR-MOUSE spectrometer and Experimental setup of the probe. The B_0 field is produced by the two permanent magnets, B_1 by a solenoid surface coil. The gap width determines the resonance frequency and influences also the sensitive volume.

3. 結果

鉄板の存在がNMR-MOUSEに及ぼす影響を検討する目的で、 B_0 の磁場分布を市販のソフト (QUICKFIELD: Tera Analysis) で計算したが、特に B_0 の大きさについての変化は観測されず、逆にその均一性は改善されていた。実際の実験では、eddy-currentのためのパルスゆがみやprobe-ringingが観測されたが、測定上大きな問題にはならなかった。ちなみに、鉄板上の試料は鉄板と磁石の関係によって強固に磁石に密着していた。測定結果はdouble-exponentialで緩和時間を算出すべきであるが、鉄板が存在する場合、slow成分の磁化の減衰状況がノイズが高いためにはっきりせず、結局mono-exponential関数での処理を行った。Fig. 2の上段に鉄板上の劣化処理0時間 (未処理) と3000時間の試料のNMR-MOUSE法で測定した結果を、下段に鉄板を除去した同一試料の測定結果を示す。明らかにNMR-MOUSE法で、鉄板上のPVCの T_2 を測定できていることがわかる。また3000時間の劣化処理試料の T_2 が、未処理の試料のそれと比較して短くなった。また鉄板の有無にも関わらず、fast成分の T_2 の値はほぼ一致していた。更に鉄板の有無に関係なくfast成分の T_2 について、その変化程度は劣化処理と未処理でほぼ同様であった。このことは、当初懸念された鉄板の存在に起因する鉄板と磁石が強固に密着したために生じるPVCへの影響は、 T_2 で見限る限りでは少ないと考えられ、鉄板上にコートされたPVCの劣化を本法にて評価可能であること示している。

Fig. 3に、各試料のJIS法による色差測定の結果を示す。PVCは3000時間でのSWOM劣化処理によって、未劣化試料と比較して色差が大きくなっている。またその変化が著しいのは、劣化処理時間が1000時間以上経過してからであり、劣化処理初期にはJIS法があまり有効でないことがわかる。

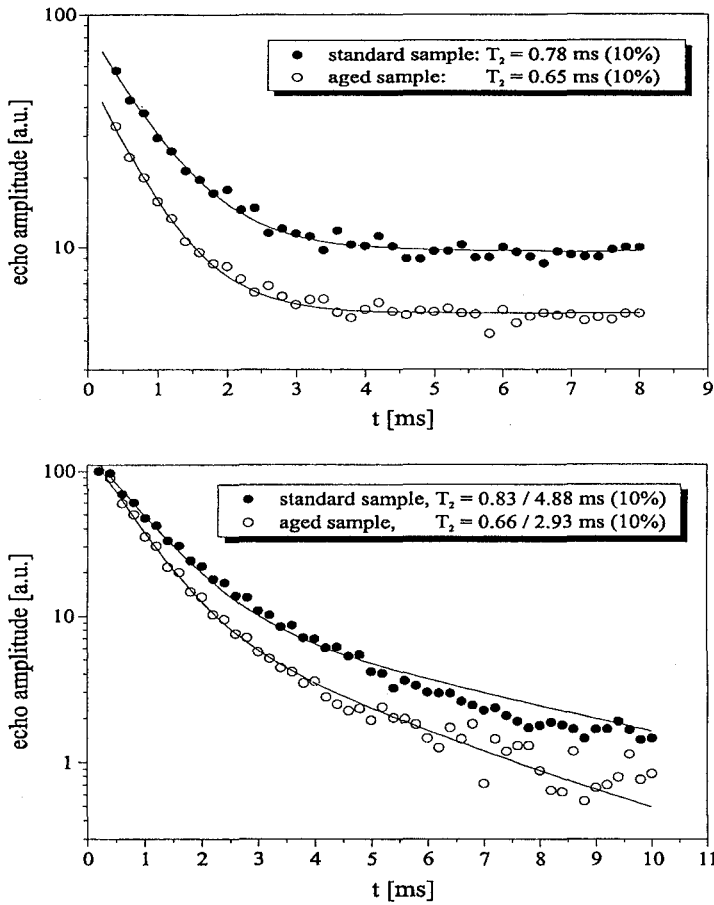


Fig.2 Transverse relaxation measured by CPMG echo trains. Upper: The decay function is about mono-exponential with iron sheets. Lower: The decay curves without iron sheets reveal an exponential character.

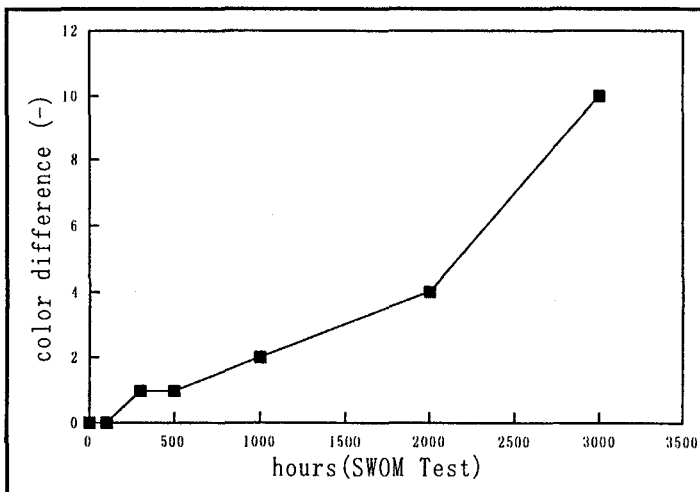


Fig.3 The relationship between SWOM periods and color difference measured by JIS method

Fig. 4に各劣化処理をした試料について、NMR-MOUSE法で鉄板有り無しの場合、及び鉄板から剥がし通常の固体NMRで測定結果を併せて示す。明らかに T_2 の絶対値は異なるが、様々な高分子の劣化について既に報告されている^{1, 4)}ように、 T_2 が減少する傾向は一致している。また、劣化処理が初期の頃に対しても、非常に鋭敏に T_2 が変化していることがわかり、JIS法よりも本法がPVCの劣化に対する感度が高いと思われる。このPVCの T_2 の減少の理由として、紫外線照射に伴うラジカル濃度の向上、それに伴う化学結合の切断、紫外線照射に伴う試料温度の上昇による揮発分の減少等が考えられ、結果としてPVCのmobilityが失われ、dipolar-coupling強調されたためと推定される。

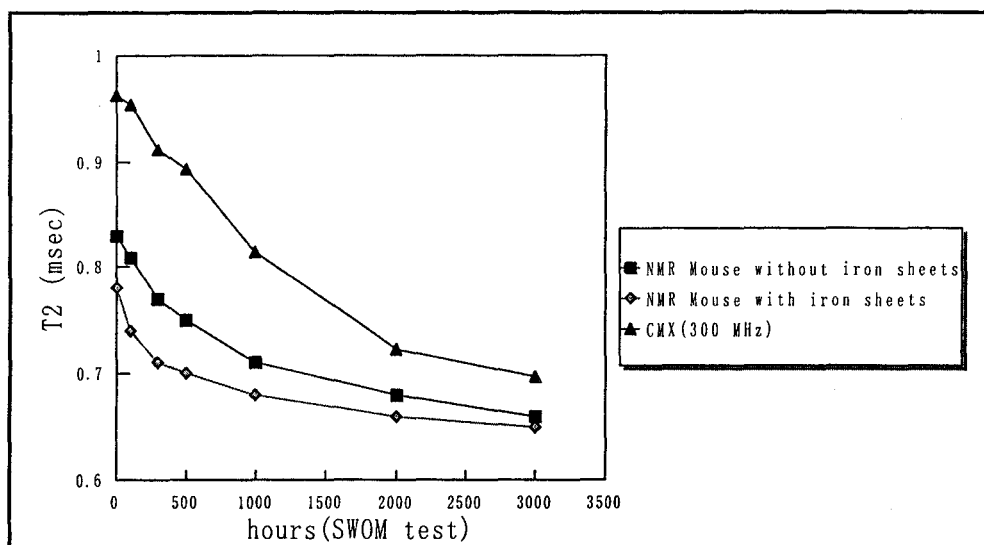


Fig.4 The relationship between SWOM periods and T_2 about individual measurement methods

4. まとめ

NMR-MOUSE法で、鉄板上にコートされたPVC皮膜の劣化程度を簡易的に判定できることがわかった。SWOMでの劣化処理は、自然の天候をモデルに作られており、鉄板上の高分子皮膜の劣化試験として広く国際的に使用されている。我々はポリエステル系の高分子皮膜でも同様の結果を得ており、今後本手法が屋外での鉄板上の高分子皮膜の劣化判定に活用できる可能性がある。しかしすべての高分子の劣化を本手法で評価できるか否かは検討が必要である。また本手法は今後更に実験室に持ち込めない、屋外での様々な実材料の解析に応用できると期待され、現在いくつかの開発が進められている。

References

- 1) S. H. Pinner, *Weathering and Degradation of Plastics*, Columbine, Manchester (1966)
- 2) G. Eidmann, R. Savelsberg, P. Bluemler, and B. Bluemich, *J. Magn. Res.*, 1996, A 122, 104
A. Guthausen, G. Zimmer, P. Bluemler, and B. Bluemich, *J. Magn. Res.*, submitted.
- 3) K. Saito, G. Zimmer, A. Guthausen, U. Schmitz, and B. Bluemich, submitted.
- 4) W. Kuhn, E. Koeller, I. Theis in *Magn. Res. Microscopy, Methods and Applications in Material Science, Agriculture and Biomedicine*, (eds.: B. Bluemich, W. Kuhn) VCH, Weinheim (1992) and references therein.

高速パーソナルコンピュータを用いた リアルタイム NMR 画像再構成システムの開発

○拝師智之, 巨瀬勝美
筑波大学物理工学系

Development of a Real-Time NMR Imaging System Using a High-Speed Personal Computer

Tomoyuki HAISHI, Katsumi KOSE

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

A real-time NMR image reconstruction system have been developed using a high-speed personal computer running under Windows95 (CPU: Pentium). The system was operated at various CPU clock frequency between 75MHz and 200MHz by changing the base clock frequency (50, 60, 66MHz) and the "over drive" factor (1.5, 2.0, 2.5, 3.0). When the CPU clock frequency was 200MHz, the time for one 128×128 pixel image reconstruction was 48 ms, and the time required for the image display was 8 ms. NMR imaging experiments were performed using this system with three NMR imaging pulse sequences (FLASH, multi-shot EPI, single-shot EPI). The obtained results demonstrate great promise of the real-time image reconstruction system using a high-speed PC.

<はじめに>

高速な NMR 撮像法によるデータ収集と、それに並行して高速に画像を再構成・表示する、いわゆる「リアルタイム MRI」がこれまでに幾例か報告されている¹⁻⁷⁾。世界で最初の報告は、1989年の Riederer らによる勾配エコー法を用いたもの(毎秒 1 枚程度)であったが、その後、商用のものを含め様々なシステムが提案されてきている。

しかし、リアルタイム NMR イメージングシステムとして報告されたほとんどのものが、UNIX ワークステーションや専用のハードウェアを用いているため、他の研究者がそれらの報告を参考にして構築することは非常に困難である。本研究では、以上の状況をふまえて、それらの欠点を解消する、高性能パーソナルコンピュータを用いたリアルタイム画像再構成・表示装置を実際に構築した。そして、その処理能力などを実験的に解析・評価し、実装上および使用上の問題点などを明らかにした。

<リアルタイム画像再構成・表示装置>

本研究で開発したリアルタイム画像再構成・表示装置のブロック図を Fig.1 に示す。このシステムは、高性能マイクロプロセッサ(Pentium:INTEL)を内蔵したパーソナルコンピュータ(DOS/V

キーワード: リアルタイム、画像再構成、NMR イメージング
はいしともゆき、こせかつみ

機)を中心としたもので、その拡張バスである ISA バスに AD 変換ボード(PC-414G:DATEL, FIFO バッファ:32Kbyte) を備えたものである。マイクロプロセッサの動作周波数は、バス・クロック(50,60,66MHz)の定数倍(1.5, 2.0, 2.5, 3.0)であり、それらを任意に設定することにより 75~200MHz に選択可能である。なお、比較のため、PentiumPro(200MHzクロック)を内蔵した PC も一部使用した。AD 変換ボードには、同時に 2 チャンネルの信号を 14bit で最高 1MHz のサンプリングレートでデジタル化が可能な、DATEL 社の PC-414G を用いた。また、このボードには AD 変換後のデータを貯えることが出来る 32Kword の FIFO バッファが搭載されている。

このシステムは、OS(オペレーティングシステム)に Windows95 を搭載しており、ソフトウェアの開発は Microsoft 社の C/C++ コンパイラ(VisualC++4.0 professional edition)を使用して行った。そして、プログラムのコンパイルの際には、処理の高速化を最優先にした最適化オプションを選択し、命令コードには、Pentium コード(32bit)を用いた。

開発した画像再構成・表示プログラムを Fig.2 に示す。このプログラムは、基本的な Windows ソフトウェアで、WinMain()関数と WndProc()関数とで構成されている。画像再構成は、AD 変換ボードからのデータ収集、DC 電圧オフセットの補正、渦電流による位相シフトの補正(EPI の場合のみ)、2次元 FFT、そして正規化を、順次行うことにより完了する。画像表示は、BITMAPINFO 構造体と StretchDIBits()関数を用いて行い、SetPixel()関数を用いて描画した場合と比較して、処理の簡略化と高速化を実現している。その際の表示画素マトリクスは、元データの画素サイズに関わらず、256×256 画素へ拡大し、階調は 7bit のグレースケールを用いている。画像データの保存は、ハードディスクに対して非圧縮で速やかに行われるため、計測後の解析も容易である。

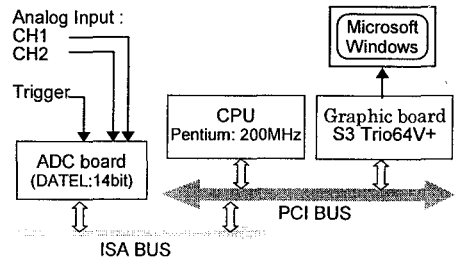


Fig.1 Block diagram of the real-time NMR image-reconstruction system using a personal computer (home built) running under Windows95.

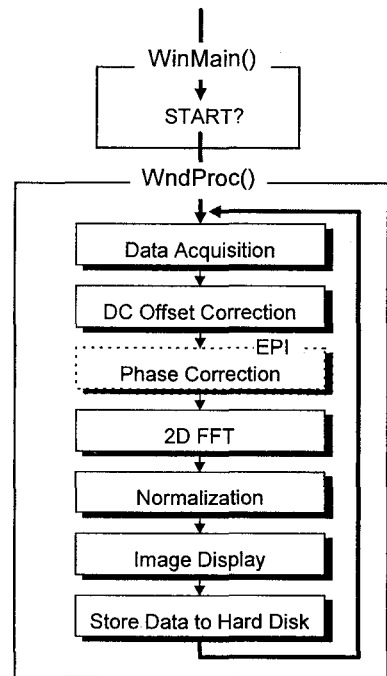


Fig.2 The flow chart of the real-time NMR image data-acquisition, reconstruction, and display program on Windows95. For EPI, phase-shift is corrected. While real-time measurements, the system control never goes back from WndProc() to WinMain(). This program was developed with Microsoft VisualC++ compiler Version 4.0 and performed under Windows95 operating system.

<実験と結果>

システムパフォーマンスの測定:

このシステムの画像再構成・表示時間を測定するため、FLASH法を用いて、128×128画素の画像について、並行した処理は行わずに、撮像・画像再構成・表示の一連のくり返し時間の計測を行った。そして、画像再構成・表示時間は、測定されたシステムの繰り返し時間から、既知であるデータ収集時間との差を取り、算出した。

Fig.3に、FLASH法を用いた時の、128×128画素の画像再構成・表示時間の、CPUの動作周波数とバスクロックの周波数による変化を示す。CPUの動作周波数が、200MHzのときの画像再構成・表示時間は56ms、75MHzのときは119msであった。なお、CPUの動作周波数が200MHzのときの、画像再構成と画像表示のそれぞれに要した時間は、他のプログラムの実行結果からそれぞれ、約48ms、8msと推定された。

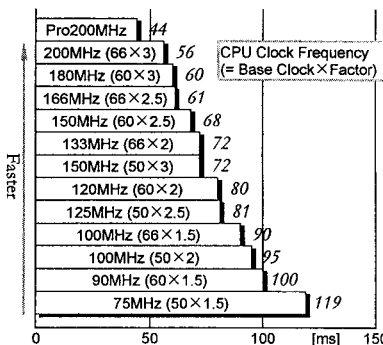


Fig.3 Image reconstruction and display time for 128×128 pixel Image (FLASH).

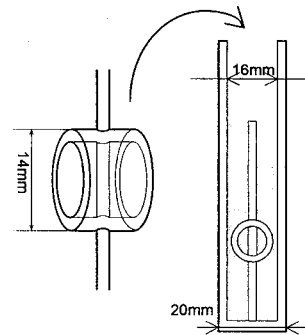


Fig.4 A water phantom used for the experiment. The T1 and T2 were about 100 ms.

撮像:

実験に用いたファントムはFig.4に示すような、全長約70cm、外径20mm、内径16mmの亚克力製円管の底を塞いで、十分に水を満たしてある底部付近に、外径14mm、内径10mm、厚さ10mmのリング状亚克力製円管を、全長10cm、外径3mmの亚克力製の棒で貫いたものを挿入したものである。また、水には、少量の硫酸銅結晶を加えて、T₁とT₂を100ms程度に調節した。このファントムを移動させるための手段として、変速機付きモーターとプーリーを用いた。RFコイルに鉛直に挿入した水ファントムの上部と、実験室の壁に設置したモーターとを、プーリーを介してナイロン製の糸で接続し、鉛直下方向に5.7mm/sの等速運動中の鉛直断面をスライス厚4mmで撮像した。

撮像に使用した装置は、静磁場強度4.74Tの鉛直な開口を持つ超伝導磁石(室温開口径89mm)と、能動遮蔽型勾配コイルを備えた、自作のMRIシステムである。使用したパルスシーケンスは、FLASH法、シングルショットEPI、そしてマルチショットEPIである。FLASHでは、くり返し時間(T_R)を4.82ms、エコー時間(T_E)を2.70ms、信号読み取り時間(T_{DAC})を2.56ms、shingle-shot EPIでは、T_R=80ms、T_E=48ms、T_{DAC}=40.96ms、multi-shot EPIでは、T_R=100ms、T_E=48ms、

$T_{DAC}=40.96\text{ms}$ とした。画像視野(FOV)はいずれも $19.2\text{mm}\times 19.2\text{mm}$ とし、画素数は FLASH と multi-shot EPI では 128×128 画素, shingle-shot EPI では 64×64 画素とした。multi-shot EPI では、4回の励起で全 k 空間のスキューンを行ない、表示には、励起毎に画像更新を行なうスライディング・ウィンドウ画像再構成法を用いた。

Fig.4 に、鉛直下方向に 5.7mm/s で等速下降する水ファントムを、3種類のパルスシーケンスで連続的に撮像した画像を示す。これらの画像において、撮像スライス面内で、 Φ 字状に撮像された水ファントムが、上から下へと等速下降してゆく様子が映像化されている。

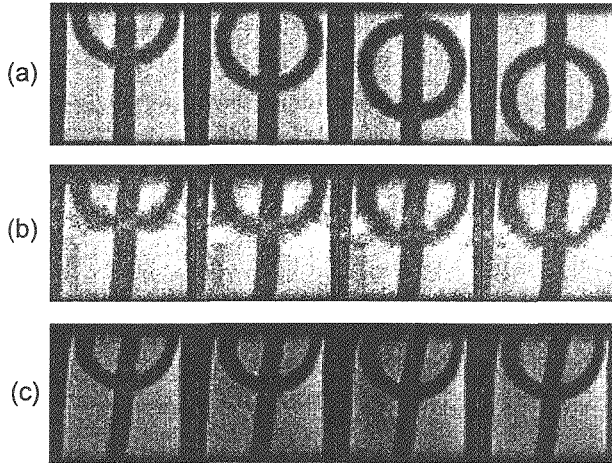


Fig.3 Image of a Water phantom moving at 5.7mm/s taken with three pulse sequences. Pulse sequence: (a)FLASH, (b)multi-shot EPI, (c)single-shot EPI, Image matrix size (refresh rate): (a) 128×128 (638ms), (b) 128×128 (100ms), (c) 64×64 (80ms), FOV: $(19.2\text{mm})^2$, Slice thickness: 4mm,

<結論>

高速なパーソナルコンピュータと AD 変換ボードを組み合わせた、リアルタイム NMR 画像再構成・表示システムを開発しその評価を行った。FLASH 法における 128×128 画素の画像再構成・表示を、 56ms という実用的に問題のない速度で実行し、また、最も短い画像更新レートは、ハードディスクへの保存も含めて 1.57 枚/秒であった。EPI を用いての再構成・表示・保存については、 128×128 画素の画像を毎秒 10 枚、 64×64 画素の場合は毎秒 12.5 枚のレートで行なうことができた。また、 128×128 画素の画像の 256×256 画素への拡大表示も、 8ms で行なうことに成功し、Windows 上での表示が遅いという従来の問題点を解決した⁷⁾。

以上の結果より、PC を用いた画像再構成・表示システムは、アナログ出力を持つ既存のシステムに接続してリアルタイム MRI を実現する際には、最良のシステムであるとの結論を得た。

REFERENCES

- 1) R. C. Wright, S. J. Reiderer, F. Fazaneh, P. J. Rossman, and Y. Liu: Magn. Reson. Med. 12, 407 (1989)
- 2) K. Kose and T. Inouye: Meas. Sci. Technol. 3, 1161 (1992).
- 3) 市川修, 巨瀬勝美, 瀬尾芳輝: 日本磁気共鳴医学会雑誌, 第 15 巻, 216(1995)
- 4) R. W. Cox, A. Jesmanowicz, and J. S. Hyde: Magn. Reson. Med. 33, 230 (1995)
- 5) 巨瀬勝美, 拜師智之: 日本磁気共鳴医学会雑誌, 第 16 巻 3 号, 98(1996)
- 6) A. F. Gmitro, A. R. Ehsani, T. A. Berchem, and R. J. Snell: Magn. Reson. Med. 33, 230 (1996)
- 7) K. Kose, T. Haishi, A. Caprihan, and E. Fukushima: J. Magn. Reson. 124, 35 (1997)

家兎アキレス腱のH-2 DQF Spectroscopic Imaging

京都府立医大・一生理¹・整形²、テルアビブ大・化学³

○瀬尾芳輝¹、高宮尚武²、H. Shinar³、Y. Sharf³、G. Navon³

H-2 DQF Spectroscopic Imaging of Rabbit Achilles Tendon

Dept. of Physiol.¹ and Dept. of Orthop. Surg.², Kyoto Pref. Univ. of Med., and Schl. of Chem., Tel Aviv Univ.³

° Y. Seo¹, H. Takamiya², H. Shinar³, Y. Sharf³ and G. Navon³

Characteristics of water in the rabbit Achilles tendon were studied by H-2 double-quantum-filter (DQF) NMR and by H-2 double-quantum-filter spectroscopic imaging (DQF-SI) NMR. A piece of Achilles tendon was equilibrated with 99% deuterated saline solution for 60 min, and was placed in a 10 mm NMR tube, and its long axis was placed parallel to the external magnetic field (7.05 T). A single compartment of ²H₂O in anisotropic motion condition was detected by H-2 DQF NMR. H-2 DQF SI clearly depicted the tendon ($\nu_q = 3$ kHz) and the skeletal muscle ($\nu_q = 0.05$ kHz). The advantages of this method are as follows: i) S/N ratio of DQF-SI is better than that of SQ imaging since DQ relaxation time is longer than SQ relaxation time. ii) DQF only select the water in the anisotropic motion condition, and iii) One can select a certain compartment of water in the anisotropic motion condition by choosing the creation time.

【はじめに】 腱組織中の水分子のH-1緩和時間はミリ秒程度で、固体状態に近い分子環境と考えられてきた。重水置換したアキレス腱組織の一量子重水素核 (SQ H-2) NMRスペクトルは、3.0 kHzの四極子分裂 (ν_q) を示す。 ν_q の大きさはコラーゲン繊維の走行の乱れに敏感であり、アキレス腱断裂後の変性・修復過程に ν_q は著しく変化する。このように、組織中の水分子はコラーゲン繊維によく配向していると考えられる。これらの変化をアキレス腱の解剖的部位に対応させて明らかにするために、二量子フィルター化学シフト画像 (DQF SI) を試みた。本法は、i)二量子緩和時間が一量子緩和時間に比べ長いために画像のS/Nが良く、ii)二量子フィルターにより等方的運動状態の重水素水を完全に除外でき、iii) creation timeを任意に選ぶことにより、特定の非等方的運動状態にある重水素水を選択的に画像化することができる利点を持っている。

キーワード：水分子、二量子フィルター、化学シフト画像、アキレス腱
せおよしてゐる、たかみやひさだけ、Shinar H.、Sharf Y.、Navon G.

【方法】 麻酔下の家兎（日本白色種）からアキレス腱を腓腹筋とともに摘出し、99%重水素生理食塩水中で60分間平衡させた。ビニール製の支持具に固定し、10 mm NMR試料管内に腱の長軸が静磁場と平行になるようにおいた。AMX-300wb (7.05 T) NMR分光計に、10 mm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℃)で測定を行った。

【結果・考察】 一量子NMRでは、図1 a)に示すように一つの四極子分裂 (3.0 ± 0.1 kHz) 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NMR [$90^\circ\tau/2-180^\circ\tau/2-90^\circ-t_1-90^\circ-t_2$ (acq)] により、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 (T_{21})を選択的に測定すると、図1 b)に示すように一つの四極子分裂 (3.0 ± 0.2 kHz) のスペクトルが測定された。この四極子分裂の大きさは、腱の静磁場に対する角度に依存し、 0° において最大値を取り、 90° で半値、 54.7° で、最小値を示した。よって、重水分子の ^2H - ^2H は、腱のコラーゲン繊維の走行とはほぼ平行していることが示された。正常腱、および、骨格筋中の重水分子の緩和時間測定結果を表1に示す。

Fig. 1 ^2H -2 SQ (a) and DQF (b) spectra of rabbit Achilles tendon.

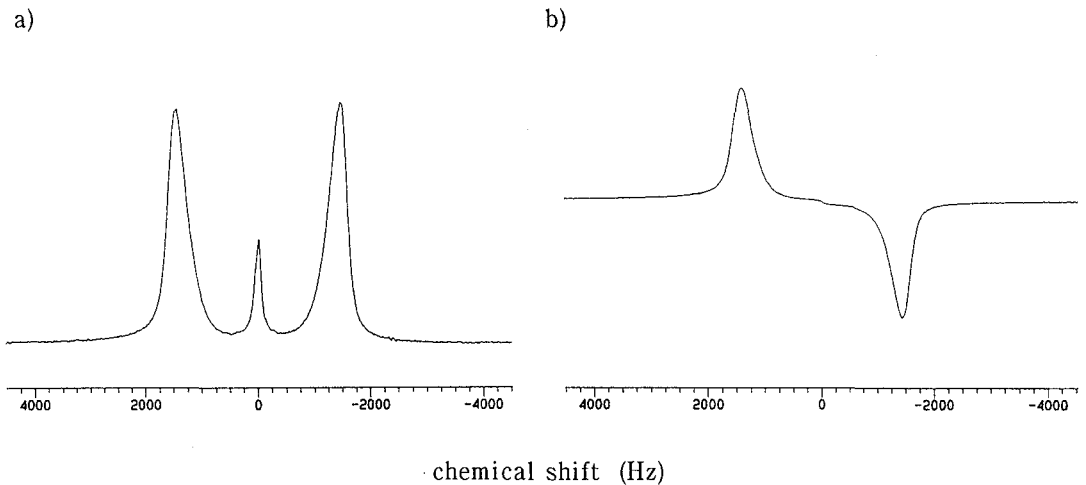


Table. 1 Relaxation parameters of $^2\text{H}_2\text{O}$ in rabbit tendon and skeletal muscle.

	Achilles tendon	Gastrocnemius muscle
ν_q	3.0 ± 0.2 kHz (n=8)	0.05 kHz (n=2)
T_2	2.6 ± 0.2 ms (n=3)	
T_{dq}	8.6 ± 1.2 ms (n=8)	47 ms (n=1)
T_1	55 ± 3.8 ms (n=3)	167 ± 1 ms (n=3)

Fig. 2 H-2 DQF Spectroscopic Imaging NMR

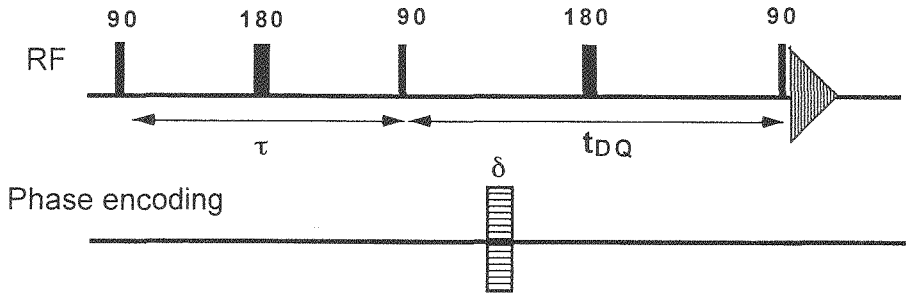
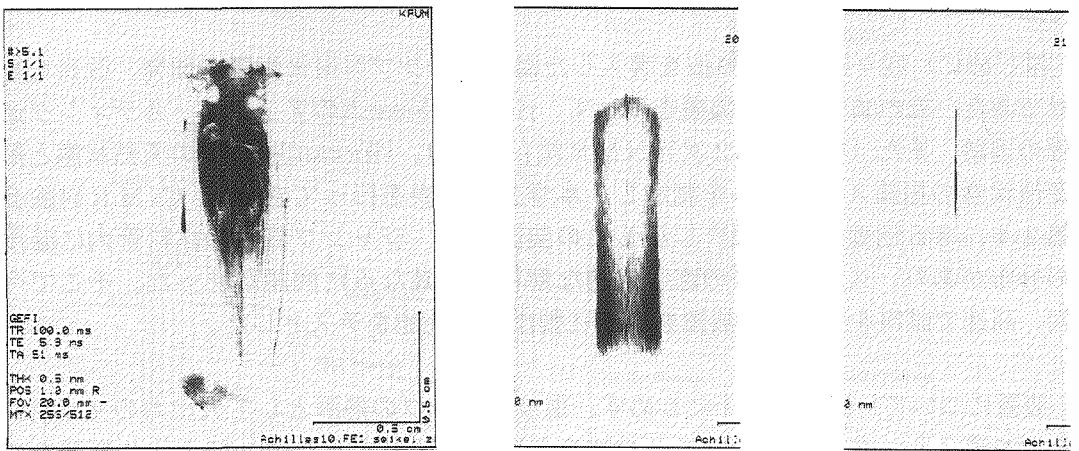


Fig. 3 H-2 DQF SI NMR of rabbit Achilles tendon and Gastrocnemius muscle

a) H-1 Gradient-Echo Imaging b) H-2 DQF-SI($\tau=0.2$ ms) c) H-2 DQF-SI($\tau=6$ ms)



3 kHz

図2に一次元二量子フィルター化学シフト画像 (1D DQF SI) を示す。位相エンコード勾配パルスは腱束長軸方向 (静磁場方向) に、DQ evolution time 間に与えた。図3に、筋腱移行部の a) H-1 磁場反転画像、b) H-2 DQF SI 画像 ($\tau = 0.2$ ms)、c) H-2 DQF SI 画像 ($\tau = 6$ ms) を示す。H-1 磁場反転画像では、上部の腓腹筋はよく描出されているが、下部のアキレス腱は殆ど描出されず、腱の T_2 緩和時間が短いことを示している。一方、1D DQF SI では、腱および筋中の水分子の緩和に最適な creation time を設定することにより、腱および、筋に対応した画像をうることができた。

【まとめ】 二量子フィルター-NMR法および二量子フィルター-化学シフト画像NMR法により、腱・骨格筋における水分子の分子環境と解剖学的構造との対応を画像化することができた。今後、組織障害・修復等の病的状態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。

神戸大学大学院自然科学研究科 ○川上 勝、赤坂 一之

A New Design of Temperature Jump NMR Probe for Aqueous Solution

Masaru Kawakami and Kazuyuki Akasaka

The Graduate School of Science and Technology, Kobe University

Through introducing a high power microwave source, we have been developing a new device of temperature jump NMR for aqueous sample solution. Immediately after the temperature jump, however, existence of temperature gradient across the sample volume was a serious problem for kinetic analysis of its spectrum. Very recently, a new instrument for rapid sample mixing have been developed and its effectiveness has been examined.

はじめに)我々はマイクロ波を導入した温度ジャンプNMR装置の開発、改良を続けてきた。これまで、この装置を用いて、ribonucleaseAのアンフォールディング過程の追跡、また「状態相関2次元NMR法」により、ribonucleaseAの天然状態と熱変性状態の相関スペクトルを測定し、本学会で発表を行ってきた。(NMR討論会第34、35回要旨集参照)しかしこの装置では、ジャンプ直後の試料管内に温度の分布があり、スペクトルの速度論的な解析が困難な点に問題があった。そこで今回、高速で試料を攪拌する装置を新たに製作し、性能をテストした。

装置について)概要を図1にしめす。温度ジャンプの熱源として大出力のマイクロ波源を導入し、さらにこのマイクロ波を効率良く照射するため、誘電体共振器をプローブ内に組み込み、マイクロ波の導体としている(図2)。今回、新たに開発した装置を図3に示す。装置の材質は全て非磁性で、外管は塩化ビニール、ベアリングは樹脂とガラスボール、シャフトはアルミを用いている。外管がシゲミ特殊管(BMS-005)の外管を固定し、内管はシャフトと接続している。内管には重水と同じ磁化率の攪拌用のガラス棒が接着されており、SCM上部からモーターで直接シャフトを回転させることで試料内の攪拌棒が回転し、試料を攪拌する。耐久性においては、50Hz程度の回転に対しても長時間、充分耐えられることを確認した。また摩擦による熱の発生はわずかで、試料の温度上昇は1度以内であった。実際に温度ジャンプNMRを測定した結果、ジャンプ直後、温度分布はかなり存在するが、以前のスピンによる方式では数百ミリ秒かかっていた均一化が、攪拌により50ミリ秒程度で到達出来ることが分かった。この装置の導入により温度の不均一性がかなり改善され、速度論的解析が充分可能な所まで装置の開発が進んだと言える。

キーワード：温度ジャンプNMR、マイクロ波、プローブ、状態相関2次元法

かわかみ まさる、あかさか かずゆき

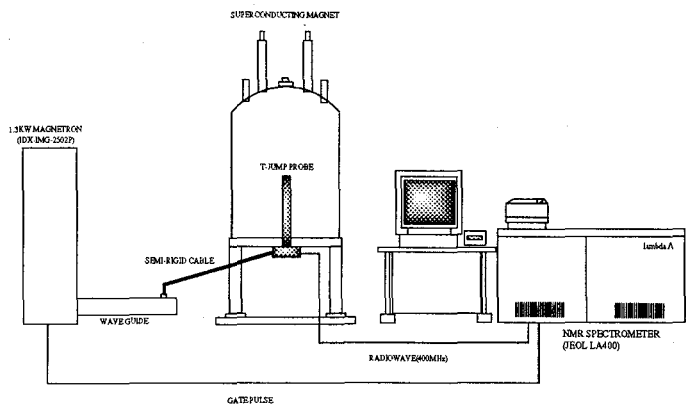


Fig. 1. Microwave Temperature-jump NMR spectrometer

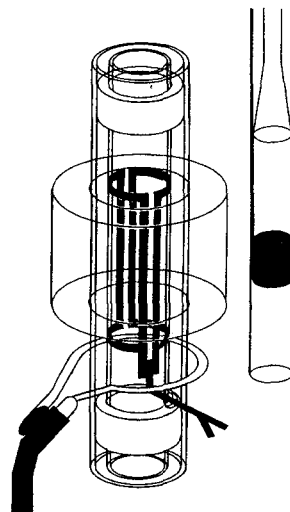


Fig. 2. Temperature Jump NMR Probehead

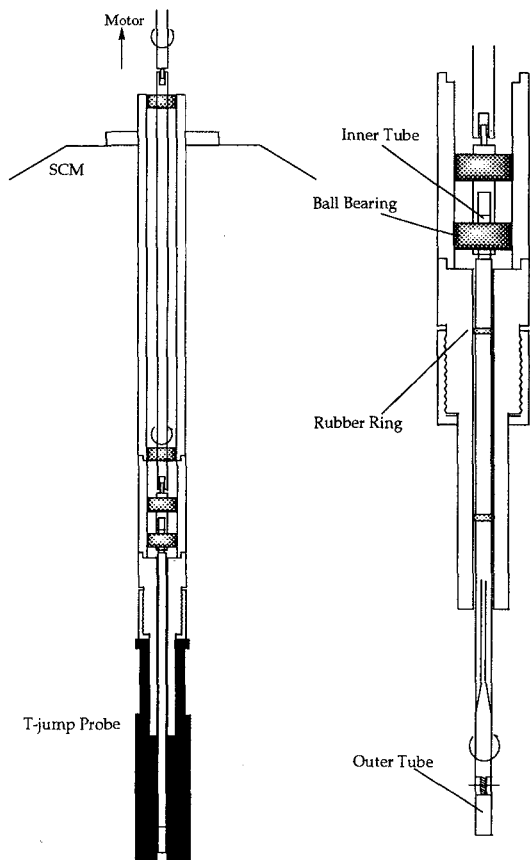


Fig. 3. Outline of Rapid Mixing Instrument

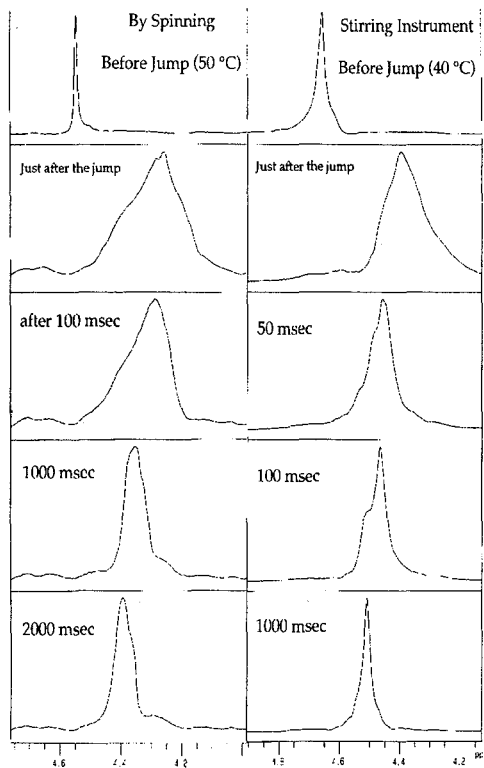


Fig. 4. Spectra of T-jump NMR (HDO)

^{17}O - ^{31}P Polarization Transfer for Chemically Specific ^{31}P -NMR

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

ABSTRACT: ^{17}O - ^{31}P HMQC experiments of synthesized β - ^{17}O Adenosine-5'-diphosphate (ADP) were done for observing chemically specific ^{31}P -NMR. Only resonances from β -phosphate of ADP were observed from a phosphate mixture with inorganic phosphoric acid.

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}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^{2) 3)}、大電力の ^{17}O 照射パルスを入力可能な NMR 検出器を開発して検出時間を約 30 分に短縮した⁴⁾。この測定法を生体エネルギー代謝系の経時追跡に応用することで、生体のリン酸代謝機能を反映した分光法が可能であると考え、エネルギー代謝系に参与するリン酸化合物を ^{17}O 標識したモデル溶液試料を測定対象とした実験を開始した。発表では混合リン酸溶液中の β - ^{17}O 標識 ADP の選択観測について述べる。

2. 方法

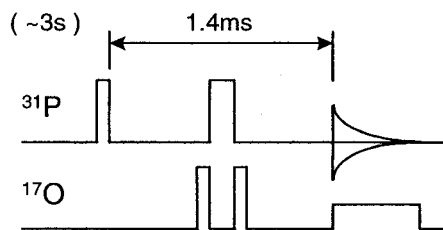
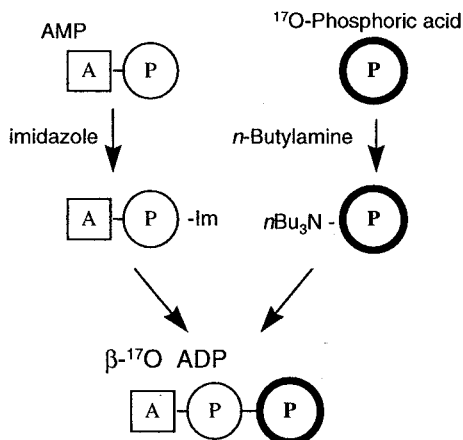
ブルカー社 AMX-500 の照射側 Y-ch 可変出力端子に電力増幅器を増設し、 ^{17}O - ^{31}P NMR 検出器⁴⁾を接続した。検出器の入力電力 600W 程度で ^{17}O に対する 90° パルス幅として $4\mu\text{s}$ が得られ、観測パルス系列中の分極移動の展開期間を 93% 以上確保した。検出信号受信中は ^{17}O を連続デカップリングした。主な測定条件とパルス系列を Fig.1 に示す。

β - ^{17}O 標識 ADP は、ATP 合成法⁵⁾を参考に AMP と 25.7% ^{17}O 標識 $\text{H}_3\text{P}^{17}\text{O}_4$ (Isotec, Inc.) から室温で合成、精製した [Fig.2]。混合試料の組成は、 4mM β - ^{17}O 標識 ADP、 2mM 無標識無機リン酸、 120mM KCl、 4mM MgCl_2 、 20mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) とした。

試料は外径 5ϕ 、長さ 20mm ガラス管 (シゲミ HS-001 加工品、内容積 $260\mu\text{L}$) に充填し、フッ素ゴムキャップで封じた。

リン 31、酸素 17、分極移動、ADP

たむら みつる

Fig.1 ^{17}O - ^{31}P HMQC experimentFig.2 Scheme of β - ^{17}O ADP synthesis

3.結果

測定結果を Fig.3 に示す。測定に使用した NMR 検出器の固有分解能が約 30Hz のためスペクトル中の ^{31}P 同核 J など微細構造が観測されていないが、(1)の非選択的ノンデカップリング測定において約-6ppmの ADP の β -リン酸基の共鳴線が広幅化しており、検出中に ^{17}O をデカップリングした(2)では α -リン酸基とほぼ等しい線幅に変化しているため、ADP の β -リン酸基のみが ^{17}O と結合していることが明らかである。

$\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P HMQC 法による(3)では ADP の β -リン酸基由来の共鳴線のみが位相反転して観測され、他のリン酸基の信号は熱雑音以下に消去された。現状の装置および周辺機器構成では、(3)の選択観測中の ^{17}O デカップリング電力に制約があり、さらに装置および測定条件を最適化して実験を継続したい。

4.謝辞

^{17}O 標識リン酸化合物合成に関し、同仁化学研究所 志賀匡宣氏に多大の助力をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

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) 田村, 清水, “選択的リン 31-NMR 観測用 NMR 検出器の開発”, 第 35 回 NMR 討論会要旨 (1996)
- 5) D. E. Hoard and D. G. Ott, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**(8), 1785-1788 (1965)

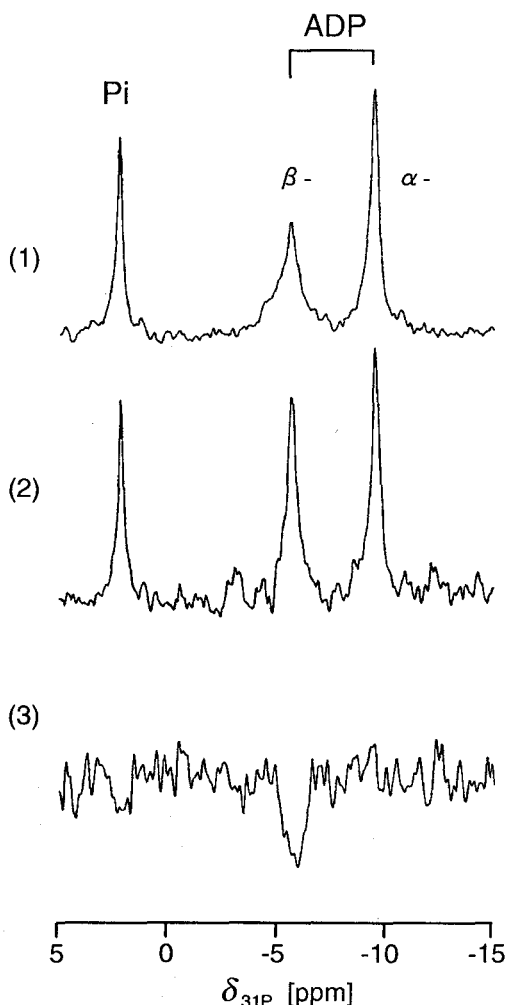


Fig.3 Chemically specific ^{31}P -NMR

- (1) Non-specific ^{31}P -NMR without ^{17}O -decoupling (4096scans)
- (2) Non-specific ^{31}P -NMR with ^{17}O -decoupling (4096scans)
- (3) $\{^{17}\text{O}\}$ - ^{31}P HMQC (16384 scans)

Phase-sensitive CH- and CH₂- selected HETLOC (E-HETLOC) spectra were obtained by modification of E-HSQC. In this sequence, unwanted ¹²C-¹H signals were suppressed by gradient selection. The magnitude-mode CH₃-selected HETLOC spectrum was also obtained by applying a quadruple quantum filter using a pulsed field gradient.

1. はじめに

近年、NOEの他にプロトン間(J_{HH})および遠隔CH結合($2-3J_{CH}$)の値を用いて鎖状の天然有機化合物の立体構造を解析する方法が提唱され、いくつかの化合物について応用が試みられている[1]. 遠隔CH結合定数の測定には HETLOC (ω_1 hetero half-filtered TOCSY) [2]が有効であるが、ピークの重なりにより結合定数が読み取れないケースも多い. そこでピークの重なりを軽減しスペクトルを単純化する方法論として、著者らはすでに1D化法である PASS-TOCSY 法を提案した[3]. 今回は editing 法を用いて2Dのままスペクトルを簡略化する目的で CH-, CH₂-, CH₃-選択HETLOCについて検討した.

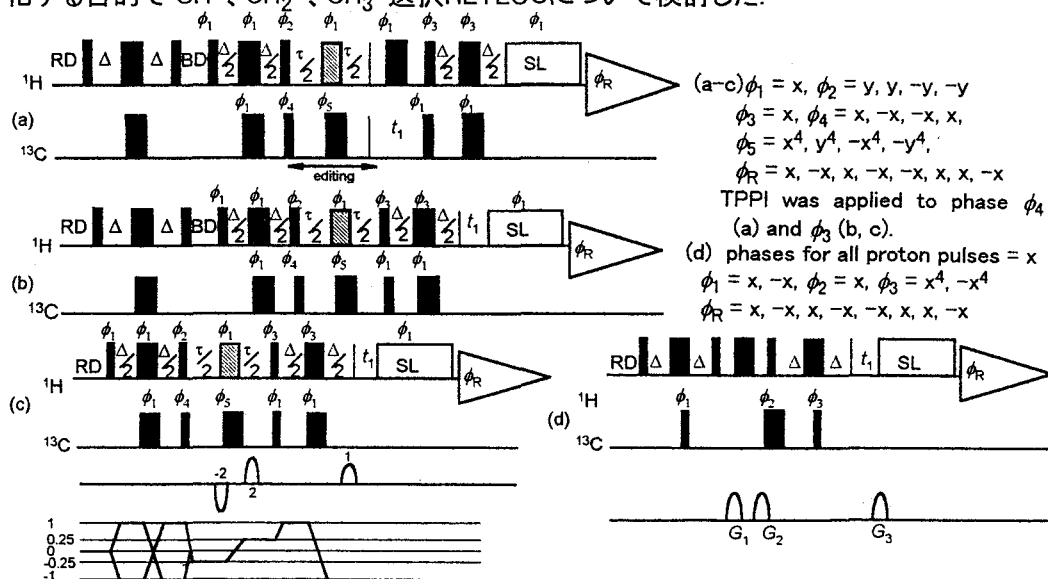


Fig. 1. Pulse sequences for E-HSQC-TOCSY (a) and E-HETLOC (b-d). Narrow, wide, and hatched bars represent $\pi/2$, π , and variable pulses with a flip angle of β , respectively. The delays RD, BD, Δ , and τ represent a repetition delay, a, BIRD delay for eliminating ¹²C-bonded proton, $1/2^1J_{CH}$, and variable delay, respectively. (b-c) Phase sensitive E-HETLOC sequences; $\tau=1/1^1J_{CH}$, $\beta = \pi$ (CH, CH₃ positive, CH₂ negative); $\tau=1/1^1J_{CH}$, $\beta = \pi/2$ (CH-selected); $\tau=1/2^1J_{CH}$, $\beta = \pi$ (CH₂-selected). (d) Magnitude mode E-HETLOC sequences; $G_1:G_2:G_3=1:-5:5$ (CH- selected); $1:-5:11$ (CH₂-selected); $1:-5:17$ (CH₃- selected).

keywords : HETLOC, editing, long-range CH coupling

かわばたじゅん、ふくし えり

2. CH₁-、CH₂- 選択HETLOCスペクトル(位相検波)

昨年の本討論会で報告したE-HSQC-TOCSY法(Fig.1(a))[4]では、CH₂シグナルを CH、CH₃ と逆の位相で得た場合に起こりうるシグナルの相殺の回避にCH₁-、CH₂- 選択スペクトルが有効であった。この t_1 をスピロックの直前に移した E-HETLOC (Fig.1(b)) でも CH、CH₂、CH₃ シグナル強度の τ 、 β 依存性はE-HSQCと同じであり、 $\tau=1/{}^1J_{\text{CH}}$ 、 $\beta=\pi$ のとき全相関(CH、CH₃ 由来シグナルがCH₂由来シグナルと逆の位相)を、 $\tau=1/{}^1J_{\text{CH}}$ 、 $\beta=\pi/2$ 、 $\tau=1/2{}^1J_{\text{CH}}$ 、 $\beta=\pi$ の時にそれぞれ CH₁-、CH₂- 選択HETLOCスペクトルを別々に得ることができた。モデル化合物として20mg酪酸(1)+80mgリンゴ酸(2)/0.5ml DMSO-d₆を用い、Fig.1(b)のシーケンスで得た全相関スペクトルをFig.2(a)に示す。

この Fig.1(b) の editing 部分では¹³C核の反位相磁化を経るため、¹²Cに直接結合したプロトンシグナルをグラジエントパルスにより消去することができ(Fig.1(c))、BIRDパルスを使用せずに天然存在比で良質なHETLOCスペクトルを得ることができた。同じ試料の、Fig.1(c)のシーケンスによる全相関スペクトルをFig.2(b)に、CH₁- および CH₂-選択スペクトルをそれぞれ Fig.2(c)、(d)に示す。

3. CH₃-選択HETLOCスペクトル(絶対値表示)

editing部分の τ 、 β を変化させる方法ではCH₁-、CH₂- 選択スペクトルは得られるがCH₃-選択スペクトルは得ることができない。Parellaらはグラジエントパルスを用いて多量子コヒーレンス選択を行い CH₁-、CH₂-、CH₃-選択HMQCスペクトルを得る方法を報告している[5]。ただし、この方法では位相のねじれが強いため絶対値表示スペクトルしか得ることができない。次に、CH₃-選択スペクトルを得る目的で、選択絶対値表示HETLOCを作成した(Fig.1(d))。本法では G1:G2:G3を変えることでCH₁-、CH₂-、CH₃-それぞれのスペクトルを得ることができるが、CH₁-、CH₂-選択スペクトルはFig.1(c)のシーケンスによる位相検波スペクトルの方が感度、質とも良好であった。上記の試料をFig.1(d)のシーケンスにより測定したCH₃-選択HETLOCスペクトルをFig.2(e)に示す。

4. 天然物の合成セグメント3の構造解析への応用[6]

化合物3の配座解析にあたり²⁻³J_{CH}を求めるためにHETLOCスペクトルを測定した。しかし $\delta_{\text{H}}=1.15-1.65$ ppmの範囲に多くのCH、CH₂シグナルが重なり合っておりこのスペクトルの解析は困難であった。そこで CH₁- (Fig.3(a))、CH₂- (Fig.3(b)) 選択HETLOCスペクトルを別々に測定することとした。

7位のメチンプロトン(H-7)は5位の非等価メチレンプロトンの高磁場側のシグナル(H-5h)と δ_{H} が近接しており、通常の測定では(F1/F2)=(H-5h/H-6)と(F1/F2)=(H-7/H-6)の相関ピークは重なってしまう。CH₁-選択HETLOCスペクトルではメチレン(H-5h)由来のピークは抑えられ(H-7/H-6)の相関ピークから ${}^2J_{\text{C-7/H-6}}=-1\text{Hz}$ を得ることができた。同様にCH₂-選択HETLOCスペクトルでは(H-5h/H-6)のみの相関ピークから ${}^2J_{\text{C-5/H-6}}=-2\text{Hz}$ を得ることができた。同様に、(H-3/H-5h)の相関ピークと重なっていた(H-17h/H-16h)の相関ピークをCH₁-選択スペクトルで抑え、 ${}^3J_{\text{C-3/H-5h}}=+2\text{Hz}$ の値を得た。

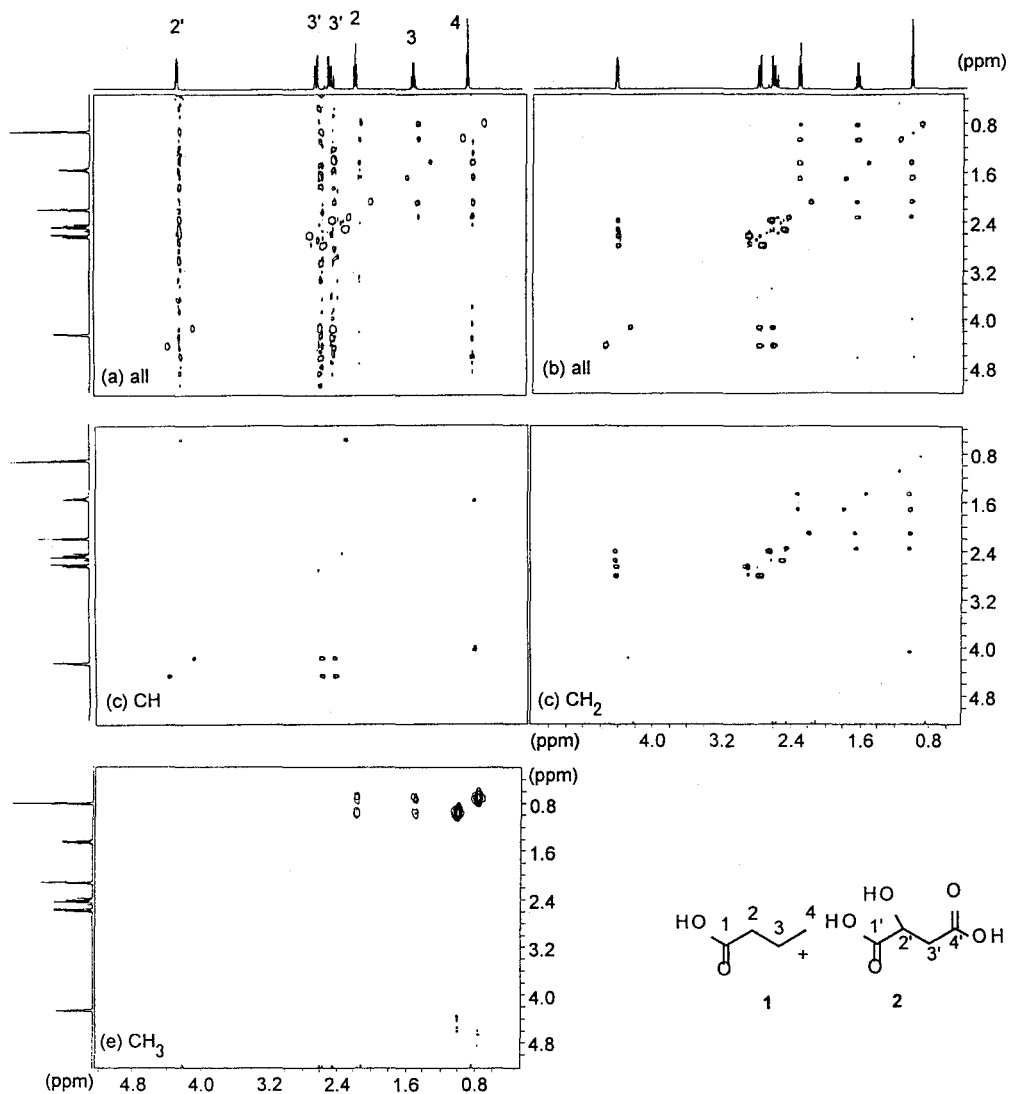


Fig.2. E-HETLOC spectra of a mixture of butyric acid (1, 20 mg) and malic acid (2, 80mg) / 0.5 ml DMSO- d_6 . (a, b) CH, CH₃ positive, CH₂ negative spectrum obtained by the sequence Fig.1(b) and (c), respectively ($\tau=3.8$ ms ($1/{}^1J_{CH}$), $\beta=14.4$ μ s (π)). Positive and negative peaks are drawn without distinction. (c) CH-selected spectrum obtained by the sequence Fig.1(c) ($\tau=3.8$ ms ($1/{}^1J_{CH}$), $\beta=7.2$ μ s ($\pi/2$)). (d) CH₂-selected spectrum obtained by the sequence Fig.1(c) ($\tau=1.9$ ms ($1/2{}^1J_{CH}$), $\beta=14.4$ μ s (π)). (e) CH₃-selected spectrum obtained by the sequence Fig.1(d), using the gradient strength $G_1=2.5$, $G_2=-12.5$, $G_3=42.5$ G/cm. Each of the 128 t_1 increments was accumulated using 4 (a-d) and 16 (e) transients: The total measurement time were *ca.* 28 (a-d) and 110 (e) min.

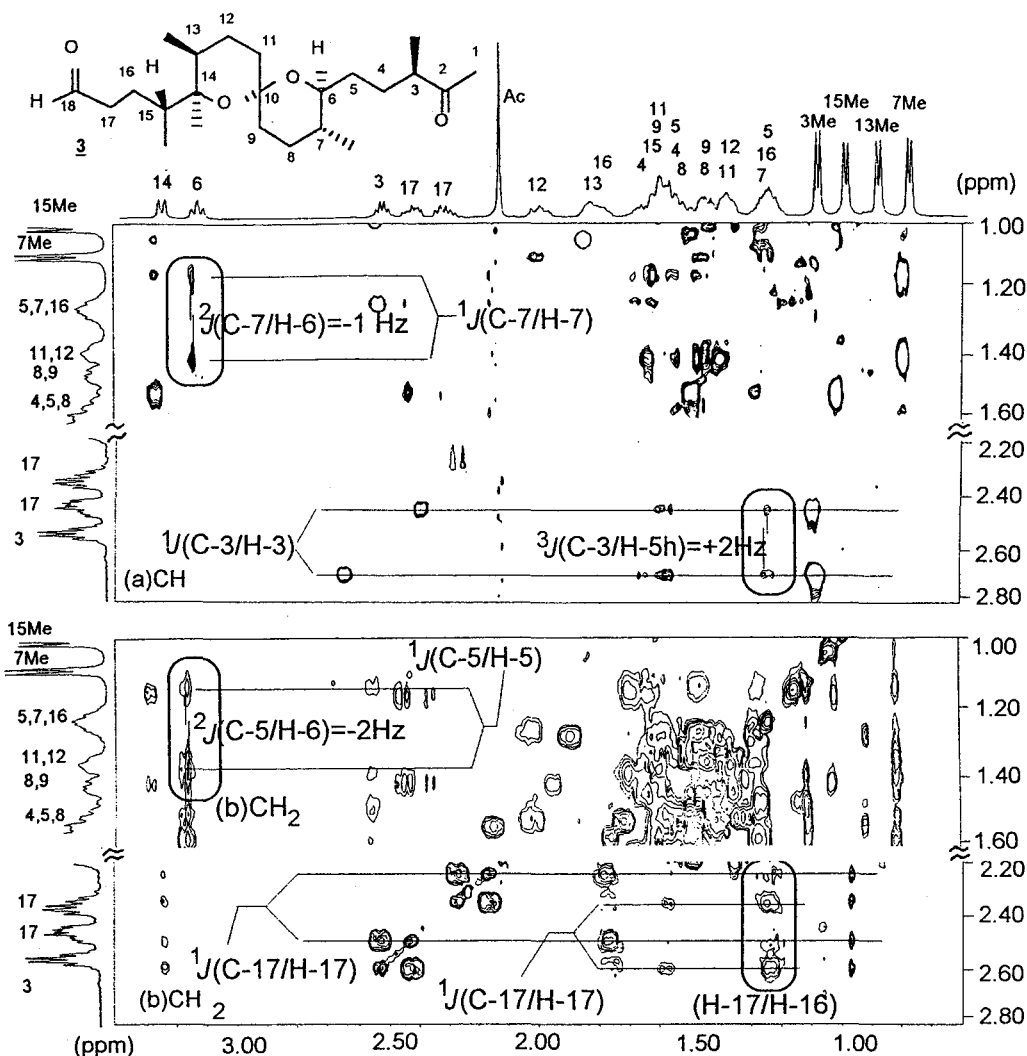


Fig.3. Part of the CH(a)- and CH₂(b)-selected E-HETLOC spectra of **3** (10 mg/0.5 ml chloroform-*d*) obtained from the sequence Fig.1(c). (a) CH-selected spectrum ($\tau=3.8$ ms ($1/{}^1J_{\text{CH}}$) $\beta=7.2$ μs ($\pi/2$)). (b) CH₂-selected spectrum ($\tau=1.9$ ms ($1/2{}^1J_{\text{CH}}$), $\beta=14.4$ μs (π)). Each of the 250 t_1 increments was accumulated using 256 transients. The total measurement time was ca. 48 h each.

References

1. R. Sakai, H. Kamiya, M. Murata, and K. Shimamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 4112-4116 (1997)
2. M. Kurz, P. Schmieder, and H. Kessler, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **30**, 1329-1331 (1991).
3. E. Fukushi and J. Kawabata, *J. Magn. Reson., A* **108**, 103-105 (1994).
4. 川端 潤、福士江里、第35回NMR討論会(京都)、要旨集p.408-411 (1996).
5. T. Parella, F. Sanchez-Ferrando, and A. Virgili, *J. Magn. Reson., A* **117**, 78-83 (1995).
6. H. Oikawa, Y. Yoneta, E. Fukushi, J. Kawabata, and A. Ichihara, *Tetrahedron Lett.*, submitted.

Ultra Low Noise Preamplifiers using GaAs HEMT
(JEOL LTD.)○Hiroto Suematsu, Noriaki Kurihara

Ultra low noise preamplifiers using GaAs HEMT have been developed to observe ^1H or ^{19}F signals for NMR spectrometers from 300MHz up to 1GHz.

The noise figure of these preamplifiers was reduced to the range between 0.2dB and 0.4dB at room temperature.

The signal loss due to T/R switch was also reduced.

The sensitivity of ^1H has been improved more than 20% comparing with our former system.

300MHz から 1GHz までの NMR 装置にて ^1H および ^{19}F を効率良く観測するため、化合物半導体(GaAs High Electron Mobility Transistor)を使用した超高感度前置増幅器を開発した。

前置増幅器自体の雑音指数は常温にて 0.2dB~0.4dB に改善された。

例として 600MHz 用前置増幅器単体の雑音指数を[Fig.1]に、1GHz 用を[Fig.2]に示す。

同時に T/R switch における信号損失も改善した。例として 600MHz 用のフロントエンド部(T/R switch + 前置増幅器 + バッファアンプ)の雑音指数を[Fig.3]に示す。

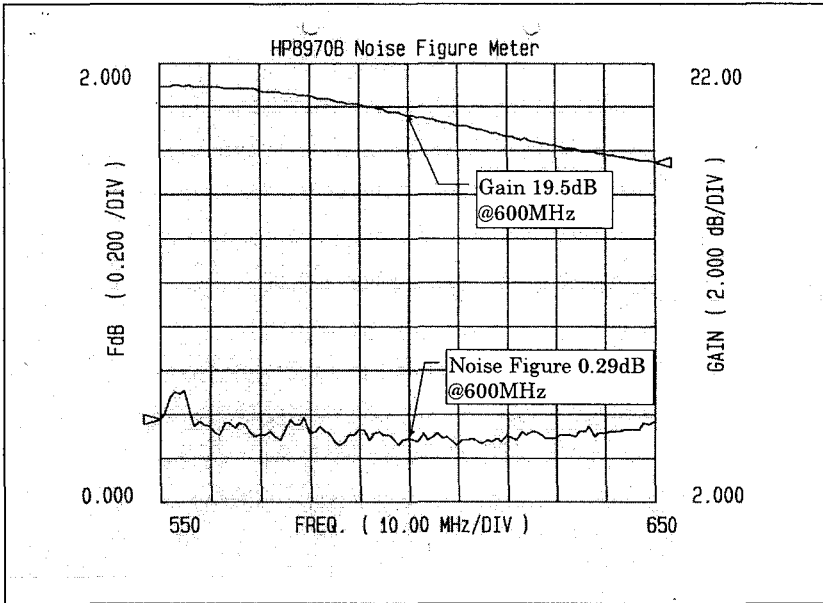
全体で 従来に比べ ^1H 感度は 20%以上改善された。

例として 600MHz 装置(Alpha600)における 0.1% エチルベンゼン ^1H 感度の改善を[Fig.4]に示す。

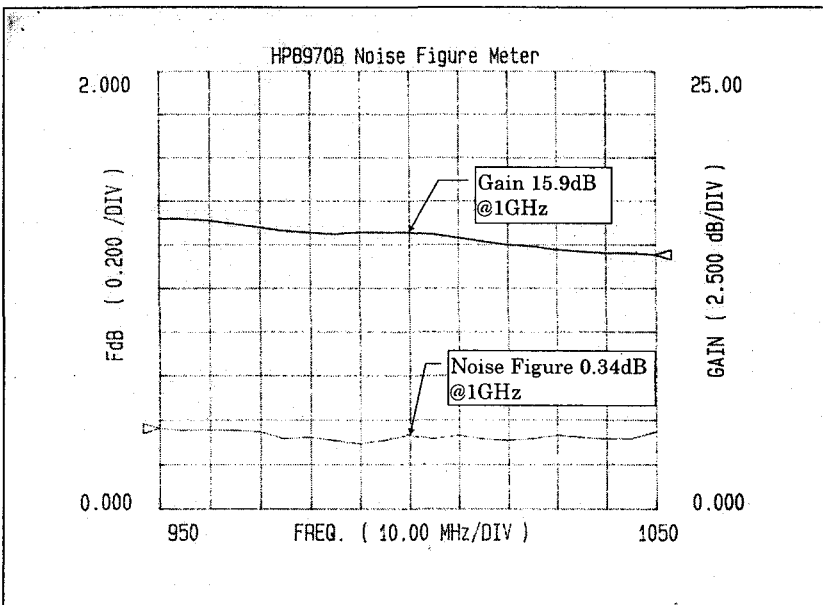
ポスターでは更に詳しい電気試験データと NMR データを示す。

感度、化合物半導体、前置増幅器

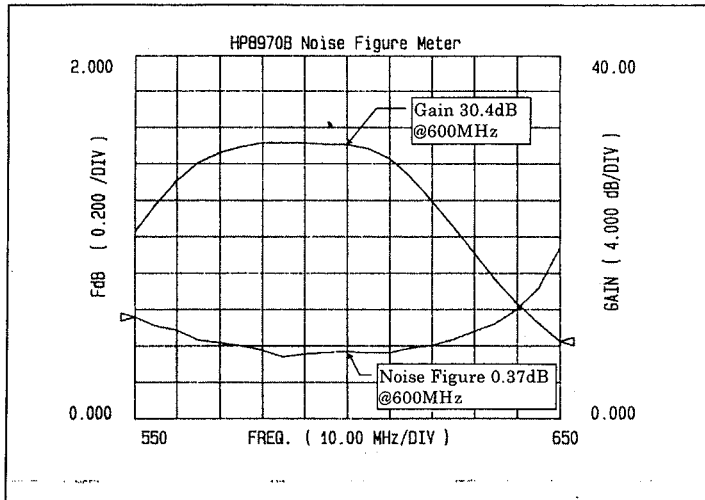
すえまつ ひろと、くりはら のりあき



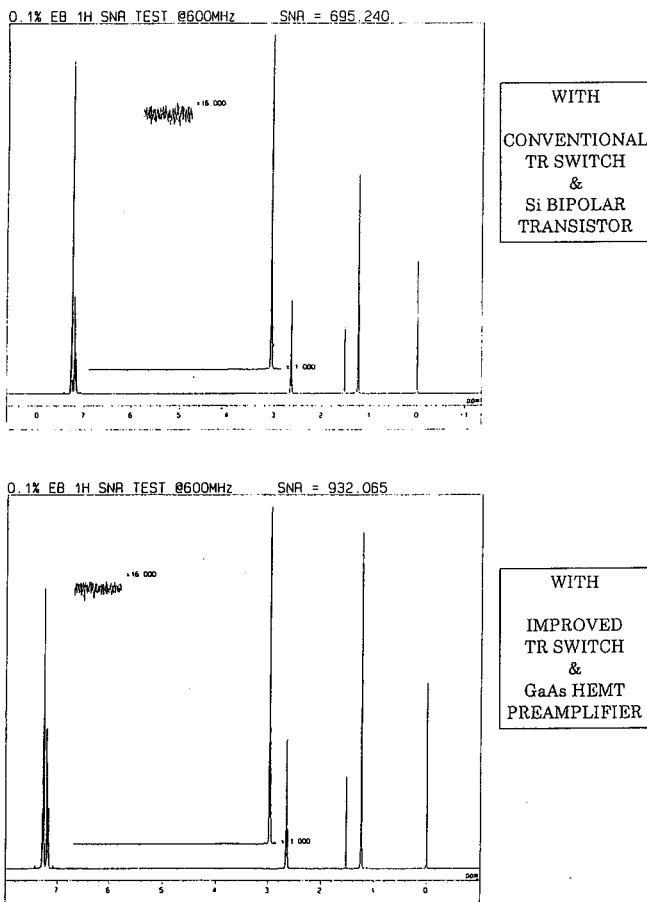
[Fig.1]Gain & Noise Figure of 600MHz Preamplifier



[Fig.2]Gain & Noise Figure of 1GHz Preamplifier



[Fig.3]Gain & Noise Figure of 600MHz TR switch + Amp.



[Fig.4]Improvement of ^1H sensitivity at 600MHz

Cylindrical ground on high frequency probe

JEOL.Ltd ○Ken-ichi Hasegawa, Yoshiaki Yamakoshi, Ryoji Tanaka, Hiroto Suematsu

For the use of Very High Frequency(VHF) probe such as 600MHz, low impedance ground is very important to reduce the power loss in a part of receiver circuit. We have designed a special cylindrical ground of low impedance, taking the following 2 items into consideration.

1. Simple structure.
2. Easy assembly of electric circuits and mechanical parts.

As a result of the above design, the 90deg pulse width could be reduced to about 80% of the width in the receiver circuit of conventional ground.

はじめに

高磁界NMRの共鳴周波数はVHF、UHF帯域に属し、電気回路が集中定数回路から分布定数回路へ変わる周波数である。この帯域の電気回路は集中定数回路として設計が可能ではあるが、分布定数回路のようにグラウンド・インピーダンスを考慮して、部品を配置する必要がある。プローブの電気回路も同様にUHF帯域としての考慮を行う必要がある。しかし従来のプローブ設計では、円板と支柱により構成された内部フレームを回路グラウンドとして使用していた。グラウンド電流が複雑な経路を流れる事によりグラウンド・インピーダンスが大きくなり、電力損失が大きくなってしまふ。そこで、グラウンド・インピーダンスを小さくおさえるために、簡単な構造の円筒形フレームで構成されたプローブを試作した。

1 従来構造の問題点

従来構造のプローブの内部フレームの概略図を Fig.1 に示す。図に示すような多くの金属製円板や支柱などで構成されたフレームを高周波回路のアースとして使用している。この複雑な構造のフレームが電気回路のグラウンドであるので、そのインピーダンスを小さくするために、できるだけ太い支柱を使用する事が望まれる。しかし、実際には電気部品の実装スペースの関係から、あまり太い支柱は使用できない。そのため、電気部品のインピーダンスに比較して、支柱は無視できないインピーダンスをもってしまふ。この余分なインピーダンスにより以下の問題が起こる。

- (1)高い共鳴周波数を得にくい
- (2)電力損失による感度低下
- (3)余分な共振モードの発生による感度低下

高磁界プローブ、グラウンド、グラウンド・インピーダンス、パルス幅

はせがわ けんいち、やまこし よしあき、たなか りょうじ、すえまつ ひろと

2 解決策

グラウンド・インピーダンスを小さくするため、Fig.2 に示すような円筒形フレームに置きかえた。電気部品はこの円筒形フレームの内側に、直接半田付けを行う。高周波回路実装で用いられるグラウンド・プレーンと同様に、この円筒形のフレームは表面が広くて高周波電流の経路が単純なため、グラウンド・インピーダンスが小さくなる。そのためグラウンド・インピーダンスに起因する問題が軽減する事が期待できる。

3 試作品

仕様 X核照射 ^1H 観測 600MHz 5mmプローブ FG付き
 ^1H パルス幅 = $6\mu\text{sec}$
従来構造のプローブと比較して、20%程度の改善。

まとめ

従来構造の複雑なフレームを単純な円筒形フレームに置き換えた。パルス幅が短くなった事により、グラウンド・インピーダンスが小さくなった事を確認できた。今後より高い周波数でこのフレーム適用すれば、より高い効果が期待できる。

Fig.1 inside of conventional probe

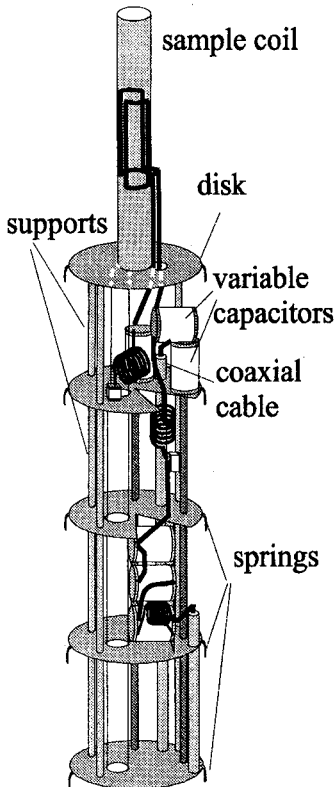
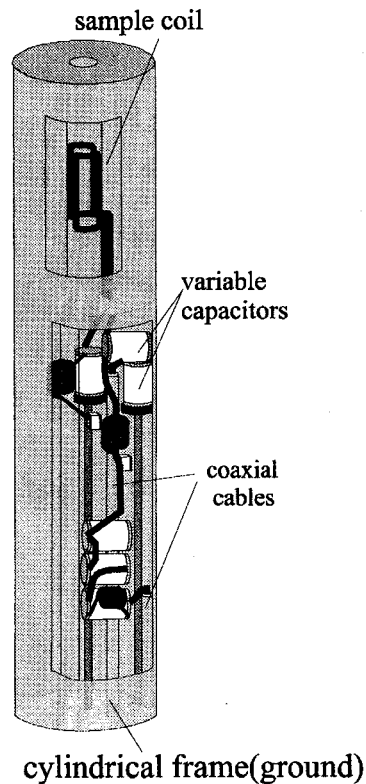


Fig.2 inside of cylindrical ground frame probe



(日本電子(株))○内海博明、鴨 修

Determination of Heteronuclear long range scalar
coupling constants using PFG J -HMBC spectram II

○Hiroaki Utsumi, Osamu Kamo(JEOL.Ltd)

abstract

Heteronuclear long range scalar coupling constants are important parameters for structural elucidation of organic molecules .

Last year, we proposed J-HMBC method in order to measure the long range coupling . However this method have week points that ^1H - ^1H multiple signal is poor sensitivity and F1 resolution , because of ^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C J modulation . This is common week point of conventional HMBC .

We tired to solve this problem to use HSQC-based HMBC and ^1H selective excitation pulse .

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}C - ^1H 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 観測の手法では解析に足る充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(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に、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。

我々は、昨年度、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を求める方法を報告した。今回は、前回の結果を踏まえて、その欠点を分析し改良したものを報告する。

欠点の分析

前回、J-HMBCのデータにおいて、解析する上で、いろいろな問題点がわかった。

キーワード : HMBC, long range scalar bonding constant , pulsed field gradient

うつみ ひろあき、かも おさむ

特に多糖類に関しては、以下の点が特に問題であった。

(1)信号がブロードであり多糖類を解析する上での十分な信号の分離を得られない場合がある。

(2) ^1H が多重線に分離している場合、信号強度の低下が著しい。

これらの、問題点はHMBC固有の欠点と考えられる。一般的に通常のHMBC測定法における固有の欠点は以下のこととされている。

(1)F1軸に ^1H - ^1H Jのモジュレーションが生じ、信号がブロードになりF1軸の分離を悪くする。

(2)t1展開時に $^1\text{J}_{\text{CH}}$ のモジュレーションも生じ、 ^1H が直接結合している ^{13}C の信号強度を低下させている。

(3) ^1H - ^1H の同種核カップリングによる ^1H - ^1H Jモジュレーションが観測する ^1H 信号を分散波形にし感度を低下させている。

これらの問題点は、特に多糖類のように、 ^1H も ^{13}C も化学シフトが接近し、かつ ^1H - ^1H カップリングが強いようなサンプルに関して、感度の低下やF1軸の分離の悪化を生じさせている。

実験

このような欠点を補う対策としてつぎのような提案がされている(11)(12)。

(a)(1),(3)に関しては、注目すべき ^1H の信号を選択励起することによって ^1H - ^1H の同種核カップリングを消去する。

(b)(2)に関しては、展開時間を $0.6/\text{J}_{\text{CH}}\sim 1.4/\text{J}_{\text{CH}}$ の間に限定するか、もしくは、HMQCベースのHMBCではなくHSQCベースのHMBCにする。

今回、我々は多糖類の解析を前提にHSQCベースのJ-HMBC作成し測定した。また、J-HMBCにおける選択パルスの有効性についても実験、考察をおこなう。

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)
- (11)A.Bax,K.A.Farley,G.S.Walker.,J.Magn.Reson,A119,134(1996)
- (12)W.Kozminski,D.Nanz.,J.Magn.Reson.,124,383(1997)

東大院農・応生化、*東大・分生研

○降旗一夫、*瀬戸治男

CONSTANT HMBC (CT-HMBC), A NEW TECHNIQUE USEFUL FOR IMPROVING SEPARATION OF CROSS PEAKS

K. Furihata and H. Seto*

Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo

*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo

We present a new version of the HMBC technique named constant HMBC (CT-HMBC). This method enables to improve the separation of carbon signals in the F_1 axis.

One of the problems of HMBC is that J-modulation due to H-H coupling causes line broadening of ^{13}C -signals in the F_1 axis through coupling to the relevant protons during t_1 period. This undesirable effect together with poor separation of carbon signals may sometimes result in the difficulty for analysis of cross peaks. In order to solve this problem, we have developed a new technique, constant HMBC (CT-HMBC). Its application to complicated molecules proved the usefulness of this new technique.

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、プロトン-プロトンのJ-couplingを有するシグナルは、 t_1 の展開期においてプロトン-プロトンのJ-modulationを受け、 F_1 軸側の炭素シグナルの上にプロトン-プロトンのJ-couplingを検出し、線幅を広げてしまうことである。そのため、分離の悪い炭素シグナルが存在するときは、クロスピークの帰属が困難になることがしばしばある。この問題は、 t_1 軸のdigital分解能を増加することにより解決されることもあるが、digital分解能を増加すればするほど、J-modulationの効果は増大し、S/Nが低下する。この問題はHSQCタイプのパルスモードで、long rangeのHSQC(HSMBC)を測定すれば解決されると考えられるが、

この測定は複雑なサンプルではS/Nが非常に悪くなり実用的ではない。この問題を解決するための一つの方法として、constant time method^{1,2)}をHMBC法に応用し、新しい応用測定(CT-HMBC)を試みた結果、良好な結果を得ることができたので報告する。

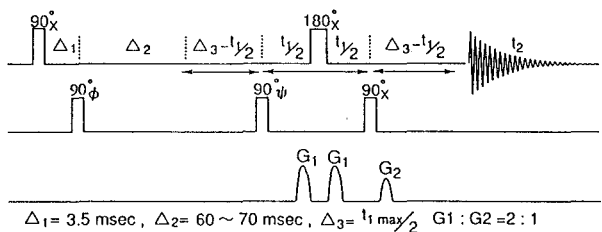
CT-HMBC法 パルス系列と方法

図1にCT-HMBC法のパルス系列を示す。constant time法のポイントは、2D evolution time (t_1)の展開期において、J-modulationの効果を一定にし、スピン

キーワード CT-HMBC

ふりはた かずお、せと はるお

CT-HMBC-1



CT-HMBC-2

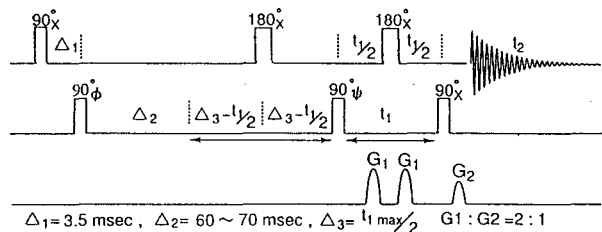


図1. パルス系列

(a) CT-HMBC-1 (b) CT-HMBC-2

結合での展開を固定することである。

この目的のために、 $-1/2(\Delta-t_1) - 180 - 1/2(\Delta-t_1) -$ のパルスを導入する。そして、化学シフトのみをrefocusし（符号を反転する）、スピン結合に対しては時間展開する（符号を反転しない）。

化学シフトの展開

$$t_1 + 1/2(\Delta - t_1) - 1/2(\Delta - t_1) = t_1 \quad \text{----- } t_1 \text{時間展開}$$

スピン結合の展開

$$t_1 + 1/2(\Delta - t_1) + 1/2(\Delta - t_1) = \Delta \quad \text{----- 一定時間}$$

パルス系列としては、いくつか考えられるが、ここでは、CT-HMBC-1とCT-HMBC-2の二種類の方法を示す。

CT-HMBC-1では、従来型HMBCパルス系列の基本構成と同一の最もシンプルなパルス系列である。このパルスでは、spin 展開時間 (Δ_2)と evolution time (t_1)の全期間を constant 期間として、プロトン-プロトンのJ-modulationの変化を一定にしている。しかし、このconstant期間において、HMBCシグナルはプロトンと炭素との間で時間変数 t_1 の J-modulation 受けるため、 f_1 軸においては炭素シグナルが J_{C-H} の coupling定数によって変調を受けるという問題が残る。しかし、実際は J_{C-H} が非常に小さいために通常測定では検出されない。CT-HMBC-2の場合は、プロトン-プロトンおよびプロトン-炭素の J-modulationの時間変化を一定にしている。この場合 spin 展開時間 (Δ_2)に続き、プロトンの180度パルスを導入している。この $-1/2(\Delta-t_1) - 180^\circ - 1/2(\Delta-t_1) -$ の段階は、 ^{13}C に対しては decouple するという効果を持っている。どの方法においても constant spin 展開時間 (Δ_2)を設定する。

CT-HMBC-1の方法では、constant 期間 Δ_3 の間においてもプロトンと炭素との J-modulationが生じ、HMBCシグナルが励起される。そのため、constant 期間 (Δ_3)の変化量を考慮して spin delay time (Δ_2)を設定すれば、S/Nの低下を押さえることができる。これに対してCT-HMBC-2では、spin delay time (Δ_2)と constant期間 (Δ_3)

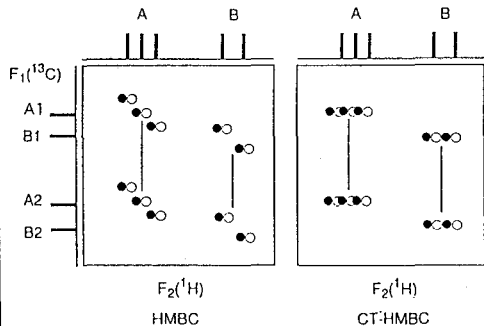


図2. CT-HMBCクロスピーク模式図

J_{C-H} : ●○ J_{H-H} : ●●

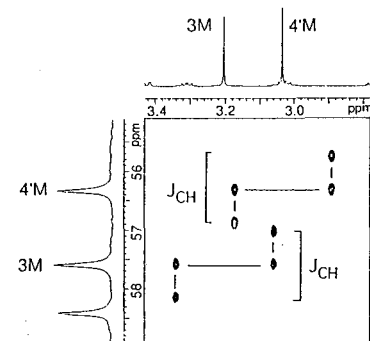


図3. CT-HMBC-1スペクトル $^1J_{C-H}$ のクロスピーク

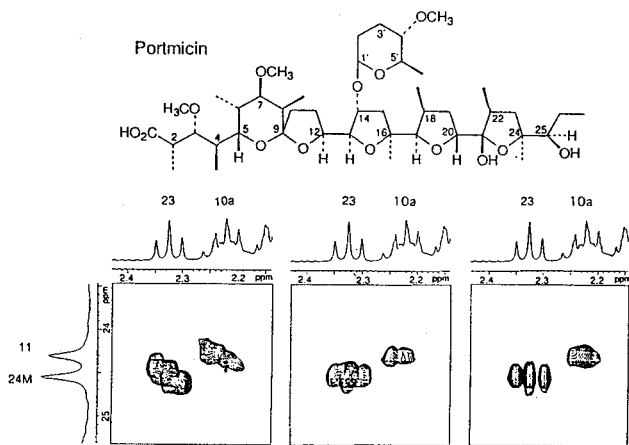


図4. CT-HMBCスペクトル

ポートミシン23/24Mのクロスピーク

2D-HMBC(左)、CT-HMBC-1(中)、CT-HMBC-2(右)

$F_1 \times F_2 = 14000 \times 2250 \text{ Hz}$, point=1024 x 256 $\Delta = 60 \text{ ms}$

$\text{Hz/point}(F_1) = 13.67 \text{ Hz}$ constant time= 36.6 x 2 msec

の二つの固定パラメーターを設定する。spin delay time (Δ_2)は通常のHMBC法と同様、HMBCシグナルを励起するための重要なパラメーターである。constant 期間(Δ_3)は F_1 軸のdigital resolutionに依存し、HMBCシグナルの励起とは無関係である。 Δ_3 を長く設定した場合は、 T_2 によるS/Nの低下を考慮しなければならない。

CT-HMBC法

図2にHMBCとCT-HMBCのスペクトル模式図を示す。HMBCスペクトルでは、 F_2 軸ではプロトン-プロトンとプロトン-炭素のJ分裂シグナルが検出され、 F_1 軸ではプロトン-プロトンのJ分裂シグナルがプロトンのJ-分解法と同様に傾斜して観測される。 F_1 軸の分解能を高めると、J分裂は鮮明となるが炭素シグナルの分離は改善されない。このJ分裂によるシグナルの重なりにより、炭素シグナルの帰属が困難となる。これに対してCT-HMBC法では、図2に示すように、 F_1 軸のプロトン-プロトンのJ分裂シグナルが消去されて一重線となるため、 F_1 軸の分離能を高めれば、炭素シグナルの分離が改善されるため、シグナルの帰属が容易になる。図3に

CT-HMBC-1パルス系列で測定した場合のスペクトルにおいて、 F_1 軸の炭素シグナルが J_{C-H} によってどのように観測されるかを示す。しかし、実際のHMBCスペクトルにおいては J_{C-H} が非常に小さいために、このようなシグナルパターンとして観測されることはほとんどない。図4にHMBCとCT-HMBC-1、CT-HMBC-2のスペクトルを示す。サンプルとしてportomicinを使用した。明らかに、23/24-Mとのクロスピークにおいて、HMBCでは45度傾いたプロトン-プロトンのカップリングパターンが認められる。これに対してCT-HMBC-1と-2では、 F_1 軸においては J_{H-H} は消去されるため F_1 軸の分離能が改善されている。しかし、CT-HMBC-2と比較するとクロスピークの山の形は膨らみを持っている。これは、long range J_{C-H} による分裂が寄与しているためと考えられる。CT-HMBC-2では J_{C-H} も消去されるために、トリプレットの形が鮮明に観測されている。

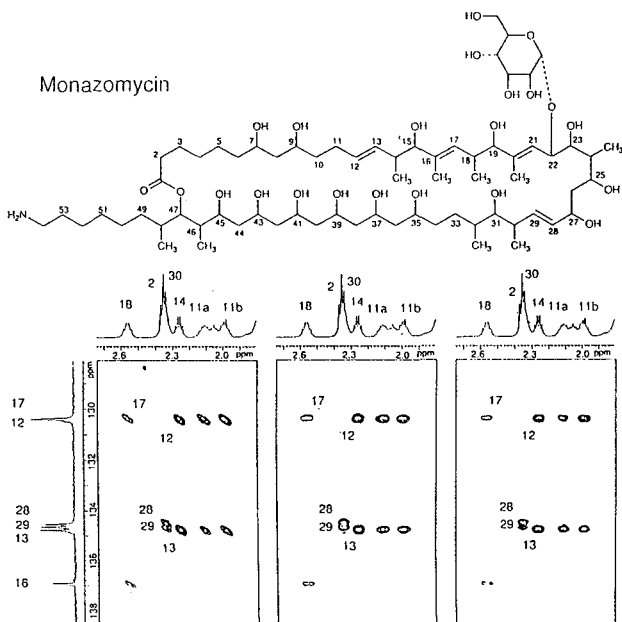


図5. モナゾマイシン CT-HMBC

2D-HMBC(左)、CT-HMBC-1(中)、CT-HMBC-2(右)
 $F_1 \times F_2 = 23000 \times 2900\text{Hz}$, point = 1024 x 512 $\Delta 2 = 50\text{ms}$
 F_1 linear prediction 2046 x 512, $\text{Hz/point}(F_1) = 11.3 \text{ Hz}$
 constant time = 22.2 x 2 msec scans = 16

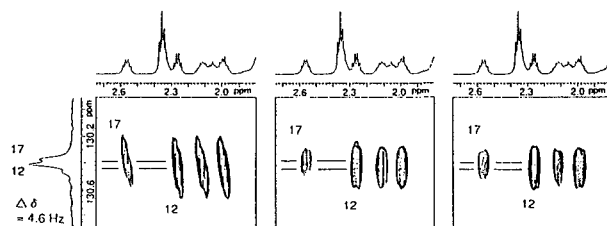


図6. モナゾマイシン CT-HMBCスペクトル拡大図

C-12 (130.41 ppm), C-17 (103.37 ppm)
 $\Delta \delta = 4.6 \text{ Hz}$

モノゾマイシンへの応用

図5はモノゾマイシンのFGHMBCとCT-HMBCのスペクトルを示す。CT-HMBC法ではconstant timeを44.4msecに設定して測定した。このconstant timeはF1軸のデータポイントに依存している。 ^{13}C -NMRスペクトルでは、28,29,13位の三個の炭素シグナル134.5ppm、134.7ppm、134.8ppmが重なっている。その化学シフト差は $\Delta\delta_{28,29}=15.7\text{Hz}$ 、 $\Delta\delta_{29,13}=16.7\text{Hz}$ であった。通常のHMBC測定において、digital resolutionが低い場合はこれらのシグナルを区別することは困難である。また、12,17位の炭素は

130.41ppmと130.37ppmと重なっており、実際のHMBC法ではこのシグナルを区別することは極めて困難である。データはdigital resolution 22.6Hzで測定し、データ処理において、linear prediction法を使用し、digital resolutionを11.3Hzに高めている。図6は12,17位の炭素領域の拡大図である。12位と17位の化学シフト差は $\Delta\delta=4.6\text{Hz}$ であるが、このスペクトルに示されるように、digital resolutionを11.3Hzまで高めることによりこのシグナルの区別が可能であった。これには $J_{\text{H-H}}$ の分裂が押さえられていることが大きく貢献している。図7にはCT-HMBCスペクトルのH-14からのF₁軸スライススペクトルを示す。小さなスピン結合を対象にしたconstant time法では、基本的にはS/Nが低下する傾向にあるが、CT-HMBC-1ではHMBCスペクトルと比較してほとんどS/Nが低下していない。CT-HMBC-2ではHMBC, CT-HMBC-1と比べS/Nが低下し、長いconstant timeを使用した場合はこのS/Nの低下は避けられない。その意味では、複雑な化合物ではCT-HMBC-1を使用する方が得策である。

まとめ

HMBC法の問題点の一つは、プロトン-プロトンのJ-couplingを有するシグナルでは、F₁軸側の炭素シグナルにプロトン-プロトンのJ-couplingが検出されるため、線幅が広がってしまうことである。この問題を解決するための一つの方法として、constant-HMBC(CT-HMBC)法の新しい応用測定を試み、良好な結果を得ることができた。CT-HMBC法の問題点は従来型HMBC法に対してS/Nが低下すると考えられることである。そのため、constant timeを如何に設定するかが重要な問題となってくる。constant timeを長く設定した場合はS/Nが低下するが、CT-HMBC法(CT-HMBC-1)は、constant timeを長く設定しても、目的とするシグナルを感度よく測定することが可能であり、実用に耐え得る方法である。

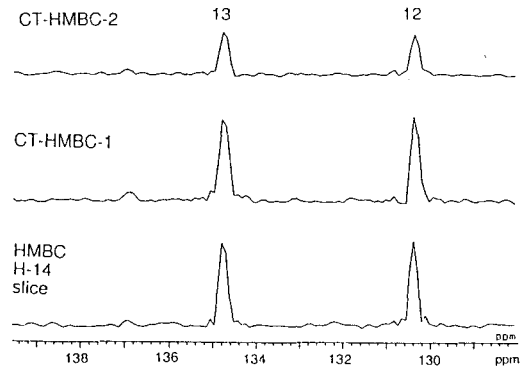


図7. モノゾマイシン CT-HMBC H-14 F₁スライススペクトル 2D-HMBC(下)、CT-HMBC-1(中)、CT-HMBC-2(上)

1) A. Bax, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 44, 542 (1981).

2) M. Rance, G. Wagner, O. W. Sorensen, K. Wuthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 59, 250 ((1984).

(分子科学研究所) ○大石 修, 宮島 清一

Construction of a current generator for field gradient pulses for the measurement of self-diffusion coefficient

by Osamu Oishi and Seiichi Miyajima

(Institute for Molecular Science, Myodaiji, Okazaki, 444, Japan)

Pulse current driver for pulsed field gradient NMR self-diffusion measurement was improved. Use of high power MOS-FET and a newly constructed driving circuit enabled a well-balanced field gradient pulses as intense as 11.3 Tm^{-1} . Automated measurement of self-diffusion coefficient has been made possible.

【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 が長いいため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 T_2 が短いために出来るだけ短い時間に可能な限り強い磁場勾配パルスを打つ事が要求される。磁場勾配を強くするためには効率的な磁場勾配コイルの形状を設計すると同時に、出来るだけ大きな電流を磁場勾配コイルに流せるようにしなければならない。一方電流を大きくしていくと、要求される電流の精度も厳しくなっていく。今回報告する改良型のパルス電源により100V入力で 10.5 Tm^{-1} までの磁場勾配を安定的に出力できるようになり、コンピュータ制御による拡散係数の自動測定が可能になった。

【パルス電源装置】

パルス電源の概要を図1に示す。100V、10Aの安定化電源に菊水を用いているが、通常の安定化電源では大電流を高速にスイッチしながら出力する事はできないため、出力された電荷は一旦コンデンサに蓄えられる。目的のパルス電源の電圧安定度を上げるにはコンデンサの容量はできる限り大きいほうが良いが、現段階では50Aの電流を5ms流した場合に電圧降下を全体の2%以下に抑える容量としてアルミ電解コンデンサ0.125F (125V)を用いている。蓄えられた電荷は高速大容量MOS-FET (日立 2SK1527)を用いてスイッチング出力される。パルス幅とタイミングの制御は時間分解能 $0.1 \mu\text{sec}$ のパルスジェネレータ¹⁾を用いて行う。

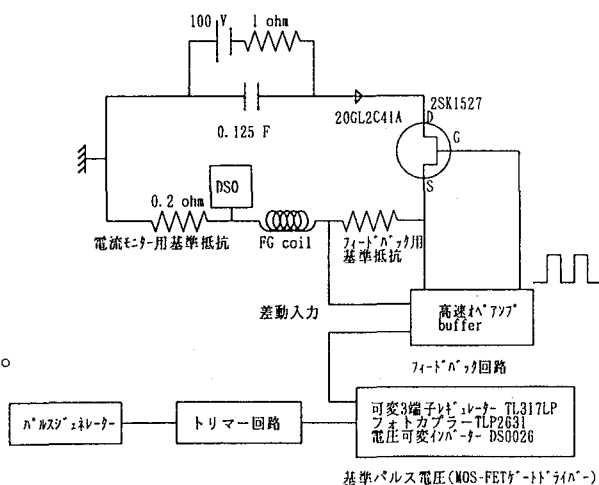


図1 磁場勾配用パルス電源

SELF-DIFFUSION-COEFFICIENT, PULSED-FIELD-GRADIENT

おおいしおさむ・みやじませいいち

前述の電圧降下分を補うために通常は第2のパルス長を $0.1 \mu \text{ sec}$ 刻みで変えて第1パルスより長くする。著しく強い磁場勾配下において要求される磁場勾配パルスの面積強度の精度がこれでは間に合わない場合にはトリマー回路を入れてパルス長をアナログに微調整する。パルスジェネレーターより送られるTTLレベル信号はフォトカプラーTLP2631 (東芝) を介して、DS0026 (National Semiconductors) で増幅され、MOS-FETをドライブする。ドライブ電圧はTL317LP (Texas Instruments) で設定される。またコンデンサの電圧降下が大きい場合や磁場勾配パルスの形状が基準パルスと大きく異なる場合には、基準抵抗による電圧降下と設定電圧とを比較して高速オペアンプによりフィードバックをかける。またMOS-FET出力の振動防止及び保護ダイオードとして東芝20GL2C41Aを入れている。またトリマー回路、ゲートドライバ、MOSFET等はそれぞれモジュールとして作っているため故障時の修理、電源特性の規格変更が容易である。

現在の最大定格はコンデンサと電源を除けば、500V、MOS-FET1個あたり45A) である。一方、プローブを冷却しない場合、100V、45Aの磁場勾配電流を 2.5 msec 2発づつ2秒繰り返して打つと、プローブヘッドは 23°C から 68.5°C (5秒繰り返して 48.5°C) まで上昇した。強力な磁場勾配を用いる場合、強制冷却が必要である。

【磁場勾配NMR装置】

上記のパルス電源とプローブ中の四極コイルの他の装置は本討論会で発表した60MHzの電磁石を用いた装置^{2,3)}を用いた。磁場勾配発生用の四極コイルの線材には内径 0.46 mm ϕ のテフロン被膜銅線を用い、コイル径と長さは以前と同じままで、直径 15 mm 、長さ 15 cm の物を使用した。このコイルの抵抗は測定値で 2.2Ω (23°C) でありコイルインダクタンスは $0.2 \mu \text{ H}$ であった。また磁場勾配コイルのコイル定数はNMR試験管内のグリセリン (内径 4.2 mm) のイメージングから求めた値で $0.25 \text{ Tm}^{-1} \text{ A}^{-1}$ であった。

【磁場勾配強度及びその安定性】

ポリジメチルシロキサンに強力な磁場勾配パルスかけた時のスピンエコーを図2に示す。この物質は室温で殆ど並進拡散しない。しかし、スピンエコー強度は1発目と2発目の磁場勾配パルスの面積強度に差がある場合その不均衡によって減衰する。このためこの物質を使ってパルス不均衡のチェックが出来る。今回の実験では、時間分解能 $0.1 \mu \text{ sec}$ のパルスジェネレーターを使ってパルス長を微調整した。その結果不均衡によるスピンエコーの減衰は、最適条件から $0.1 \mu \text{ sec}$ 外した条件下で最大磁場勾配をかけた時、2%程度であった。ほぼ自動測定を可能にする結果である。またパルスが最大電圧の半分まで立ち上がる時間は磁場勾配コイルのコイルインダクタンスにより $10 \mu \text{ sec}$ 程度であった。

(パルス電源自体のパルスの立ち上がりは $1 \mu \text{ sec}$ 以下であることを確認している)

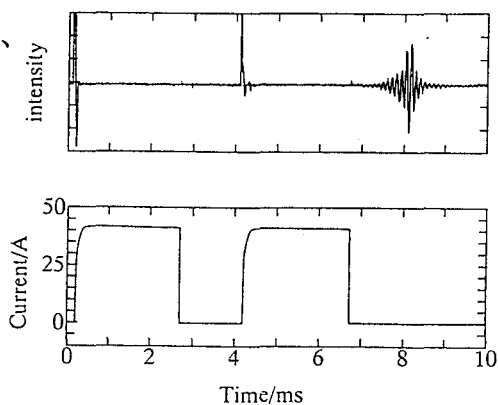


図2 ポリジメチルシロキサンのFG-NMRスペクトル及びパルス電源特性

- 1) T. Toyoda, Yoshida, O. Oishi and S. Miyajima, Rev. Sci. Instrum., **68**, 3140-3142 (1997)
- 2) O. Oishi and S. Miyajima, J. Magn. Reson. **A 123** (1996) 64-71
- 3) 大石修、宮島清一、第34回NMR討論会講演要旨集 (1995), 69

ダイオードレーザーアレイを用いた希ガス偏極装置の設計・試作
 電子技術総合研究所 超分子部 磁気スペクトロスコピーラボ
 ○服部峰之、平賀隆、守谷哲郎

Design and prototype of apparatus for polarization of noble gas nuclear spin using high-power diode laser arrays

Mineyuki Hattori, Takashi Hiraga, and Tetsuo Moriya
 Electrotechnical Laboratory, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN

An apparatus for the polarization of noble gas nuclear spins using high-power diode laser arrays was designed. The high-power diode laser arrays (794.7nm, 12W) was applied for effective excitation of the higher density Rb vapor. The prototype of this apparatus was constructed and the performance for the polarization of natural abundant Xe gas was evaluated.

<序論> 近年、³He, ¹²⁹Xeといった、核スピが1/2の希ガスについて、NMR信号を飛躍的に増強した実験が、盛んに行われるようになってきている。AlbertらによるMRIへの応用では、肺などの生体内の空洞の画像が得られている[1]。Pinesのグループは、NMR・MRIの一般的な感度増強法として、多くの基礎的実験を報告している[2]。いずれも、Happerらが行った、光ポンピングしたアルカリ金属原子とのスピン交換による、希ガスの偏極実験[3]を採用して行われている。ここでは、高い比率で偏極した希ガスのスピン偏極を、試料の観測核スピン系へ移動し、高感度でマイクロイメージング実験を行うことを目的として、この原理に基づいた希ガススピン偏極装置の設計を行った。

<原理> Fig. 1 にRb のD₁線(5²S_{1/2}-5²P_{1/2})の光ポンピングを行って、Xe核を偏極させ、Xe核を担体として、観測核スピン系のNMR信号の増強する過程の概略図を示す。Rbの電子スピンのXe核への移動は、Xe,Rbの衝突時に起こる[3]。Xe核のスピンを観測核へ移動する実験は、Pinesらにより示されている[2]。Xe核の偏極効率を決める要素としては、励起光強度、希ガス濃度、クエンチャー(N₂)濃度、不純物(H₂O,O₂など)濃度などが考えられる。励起光強度を高くできれば、Rb濃度を高めることができ、Xe核との衝突回数も増大させられ、偏極効率を効果的に上昇させられる。出力数十WのGaAlAsダイオードレーザーを励起源とした装置としては、³Heの偏極実験[4,5]、¹Heをバッファースガスに用いて¹²⁹Xeを運び偏極させ液体窒素でトラップして貯蔵する装置[6]の報告がある。

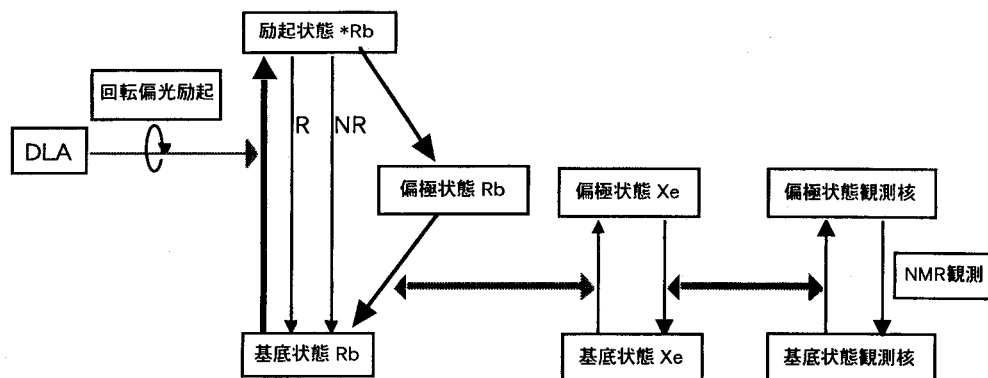


Fig. 1 NMR信号のRbの光ポンピングによる増強法の過程図

希ガス、¹²⁹Xe、光ポンピング、回転偏光

はっとりみねゆき、ひらがたかし、もりやてつお

<装置> Fig. 2 に今回試作した希ガス偏極装置の概略を示す。Xe, N₂ガス(日本酸素:99.995%高純度ガス)は、マスフローコントローラー(MKS:M-310-01C, M-100-11C)で、流量(Xe:~1sccm, N₂:~0.1sccm)を制御した。その後、ラインで混合され、ベーキングしたモレキュラーシーブ(3A)の乾燥器と精製器(millipore:WPRV200-SI)を通し、Rb気化器から放出されるRb金属(フルウチ化学:99.99%)の蒸気を加え、ヘルムホルツコイル(~160G)中に置かれた、石英またはバイレックス製の励起用セル(~5mmx10mmx40mm)へ導入される。気化器からセルにかけては、100-180°C程度の温度に保った。混合ガスのセル中の滞在時間は、2分程度と見積もられる。励起光には、GaAlAsダイオードレーザー(Optopower:OPC-D012-795-HBHS:794.7nm, 12W)を使用した。5mmx5mm角の平行光ビームをλ/4波長板(CVI:QWPO-795-10-4-R15)を通して回転偏光にした後、シリンドリカルレンズで一軸方向だけ10倍に拡大し(5mmx50mm)、セルの10mm厚の方向から入射した。セルを出た後の混合ガスは、冷却されRb蒸気は除かれる。こうして、生成した偏極Xeの偏極率を電磁石(0.3T)を利用した、自作のAFP型NMR装置を使って、時間をおってモニターした。

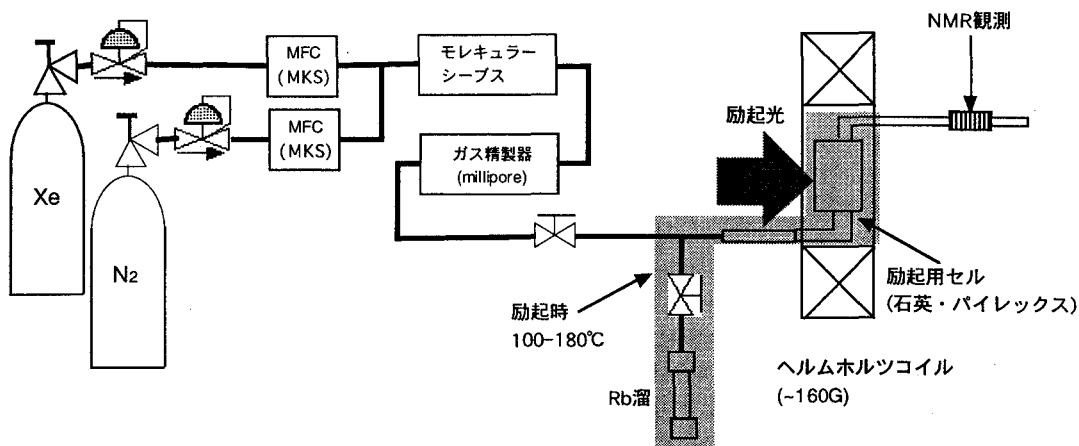


Fig. 2 ¹²⁹Xe核スピンを偏極するための装置の概略図

<まとめ> 高出力のダイオードを利用した、高効率の希ガス偏極装置の基本的な設計を行った。この装置を用いて、希ガスの偏極実験における基礎過程の研究、条件・材質の最適化、そして、高感度な希ガスのNMR実験、プロトン、¹³C-NMRの高感度化等々、多くの基礎実験を行うことができると期待される。

<参考文献>

[1] M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer Jr., and A. Wishnia, Nature **370**, 199 (1994).
 [2] G. Navon, Y.-Q. Song, T. Room, S. Appelt, R. E. Taylor, and A. Pines, Science **271**, 1848 (1994).
 [3] W. Happer, E. Miron, S. Schaefer, D. Schreiber, W. A. van Wijngaarden, and X. Zeng, Phys. Rev. **A29**, 3092 (1984).
 [4] M. E. Wagshul and T. E. Chupp, Phys. Rev. **A40**, 4447 (1989).
 [5] W. J. Cummings, O. Häusser, W. Lorenzon, D. R. Swenson, B. Larson, Phys. Rev. **A51**, 4842 (1995).
 [6] B. Driehuys, G. D. Cates, E. Miron, K. Sauer, and W. Happer, Appl. Phys. Lett. **69**, 1668 (1996).

[Abstract]

It is generally difficult to separate magnetization transfer caused by exchange and cross-relaxation processes. We propose here a novel method to determine the exchange rates and relaxation rates of amide protons in H₂O solution using various isotope filterings and radiation damping phenomenon. This method was applied to the analysis of the amide proton exchange with water and relaxation processes in the ¹³C/¹⁵N labeled human ubiquitin at 25°C and pH7.93. Some arithmetic models can explain the time dependency of relaxation of whole experiments.

[序論]

重水素交換では測定できない速やかに消失するアミドプロトンの交換速度を定量的に見積もる測定法を検討した。これまでに開発されていた軽水中で交換速度を見積る測定法は、スピン拡散に阻まれて測定の精度は十分にあがらなかった。特に生体高分子を高磁場NMRで観測する時にスピン拡散が起きやすいため、実際には交換していないアミドプロトンまで検出してしまう可能性が高く、混合時間は短く限定されてきた。そこで同位体フィルターを駆使し、出来るだけいろいろな初期条件、緩和条件のもとで様々な実験を統合することで、混合時間の限界をこえて、交換過程、緩和過程を精度高く検出する方法の開発を目指した。

[方法：同位体フィルター]

この実験で使用した同位体フィルター付きHMQCは合計10種類である。全ての同位体フィルターは混合時間の始まりにアミドプロトンの磁化を消去するように設計する。また¹H-¹³CのJ結合を利用して¹³Cに結合したプロトンの磁化を制御するパルス列を必要に応じて挿入する。これで水の信号と重なりあうαプロトンを磁化の方向を選別できる。 τ_a 、 τ_b はそれぞれ $1/4J(\text{NH})=2.5[\text{ms}]$ 、 $1/2J(\text{CH})=3[\text{ms}]$ に設定する。以下に2つの例を示す。

WFB_CH+ Filter (Fig.1a)

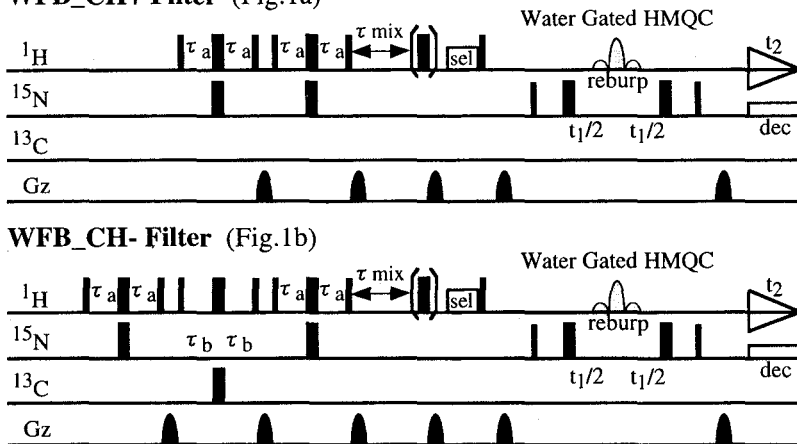


Fig.1aのWFB_CH+実験は混合時間の直前で水の磁化を静磁場方向、同じく¹³Cに結合したプロトンを静磁場方向に向ける働きがある。2重にアミドプロトンにフィルターをかけるのはアミドプロトンの消磁の効率を上げるためである。

Fig.1bのWFB_CH-実験は混合時間の直前で水の磁化を静磁場方向、¹³Cに結合したプロトンを反静磁場に向ける働きがある。

※キーワード：アミドプロトン，H-H交換，同位体フィルター

※よこまさし、くすのきまさみ、いながきふゆひこ

このようなフィルターの組み合わせで、水の初期磁化、¹³Cに結合したプロトンの初期磁化の状態を決定する。また弱い飽和パルスで混合時間中に入れて、その間の水の磁化を0に保つ実験も可能になる。さらに水の磁化を反静磁場方向に倒した後で弱い磁場勾配をかけることにより、混合時間中に Radiation damping を制御できる。フィルターの機能を以下にまとめる。

Effect of Isotope Filtering (Table 1)

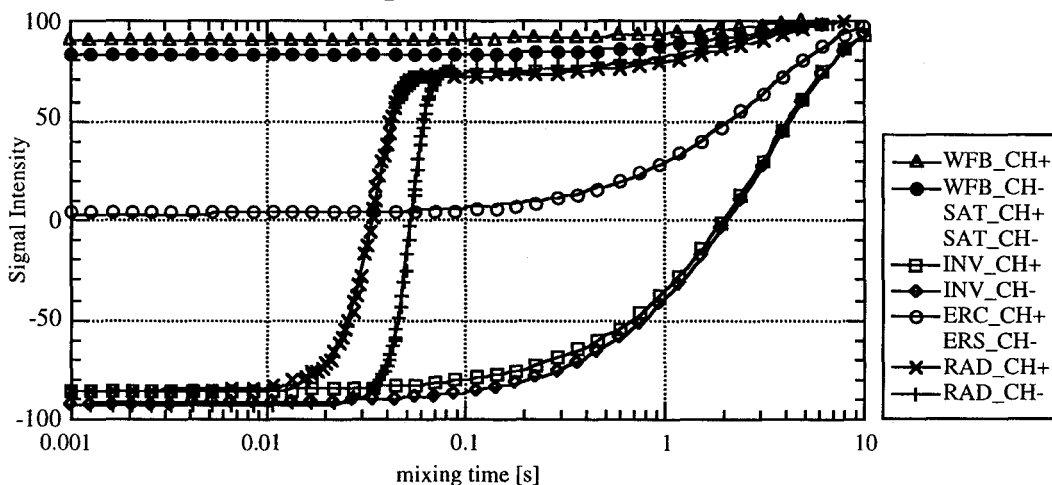
Filter	H2O	Saturation	CH	Radiation Damping
WFB_CH+	+Z		+Z	
WFB_CH-	+Z'		-Z'	
SAT_CH+	0	active	+Z''	
SAT_CH-	0	active	-Z'''	
INV_CH+	-Z'		+Z'	
INV_CH-	-Z		-Z	
ERC_CH0	0		0	
ERS_CH0	0	active	0	
RAD_CH+	-Z'		+Z'	active
RAD_CH-	-Z		-Z	active

' または'' は初期磁化の大きさが熱平衡状態を基準にして、やや強度が落ちることを意味する。

[結果：水のフィルター実験]

同位体フィルター、混合時間ののち、90パルスをかけて、フィルターを通ったあとの水の磁化の時間変化を測定した。

Isotope Filter Effect of H₂O Signal (Fig.2)



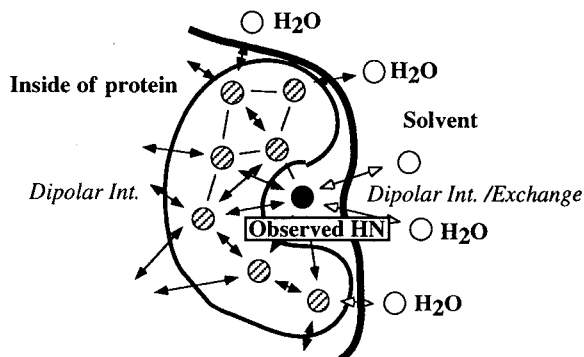
複雑な双極子-双極子間のネットワークの緩和現象は多重指数関数で記述されるだけであるが、Radiation damping を起こしている水の磁化は非指数関数的な回復を示している。理論上、比較的長い縦緩和(3.2[s])を無視すればRadiation damping を起こしている水の磁化の時間変化は双曲線正接関数に従うことが知られている。この特徴的な水の磁化の反転は、交換しているアミドプロトンの磁化に強く反映されるため、Radiation damping を起こした実験とそうでない実験との差は価値ある情報である。

[解析モデル]

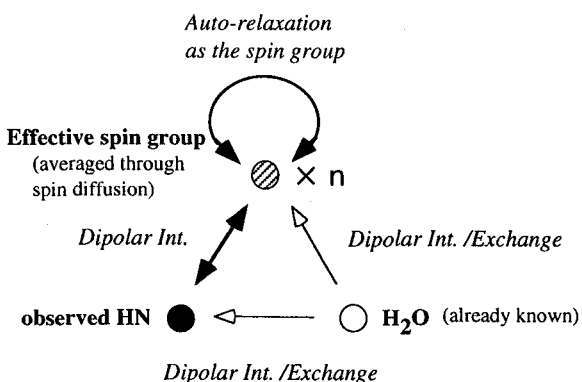
フィルター付きHMQCでアミドプロトンの磁化の時間変化を測定し、そのデータを解析するには上記の実験を統合するモデル計算が必要になる。Fig.3のようにアミドプロトンは、その周りを主に¹³Cに結合したプロトンに囲まれている。スピン拡散によってアミドプロトンに影響するプロトンは限定され

る。そこでアミドプロトンの磁化の時間変化を記述するには、Fig.4 に示すように観測しているアミドプロトンの磁化、実験的に得られた水の磁化、フィルターによって制御された主に¹³Cに結合したプロトンから構成されるスピン群の磁化の間の交換や緩和現象を取り入れた微分方程式を解くことが必要である。

Magnetization transfer model (Fig.3)



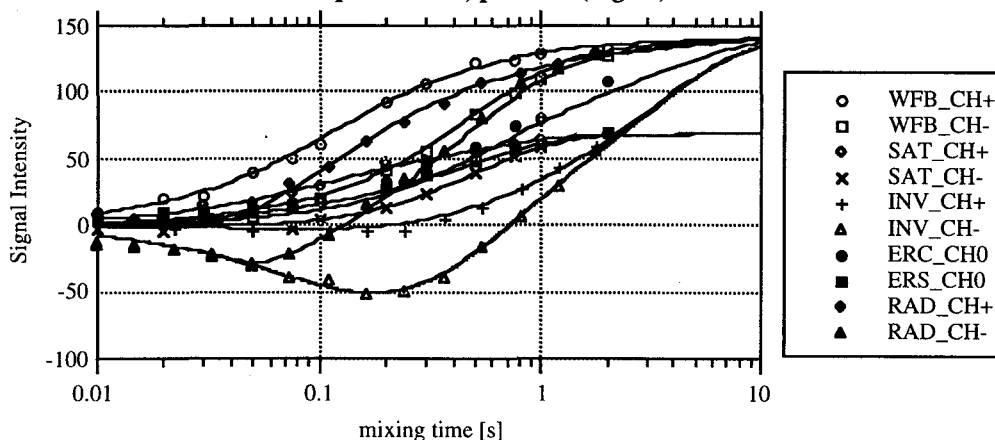
Arithmetic model (Fig.4)



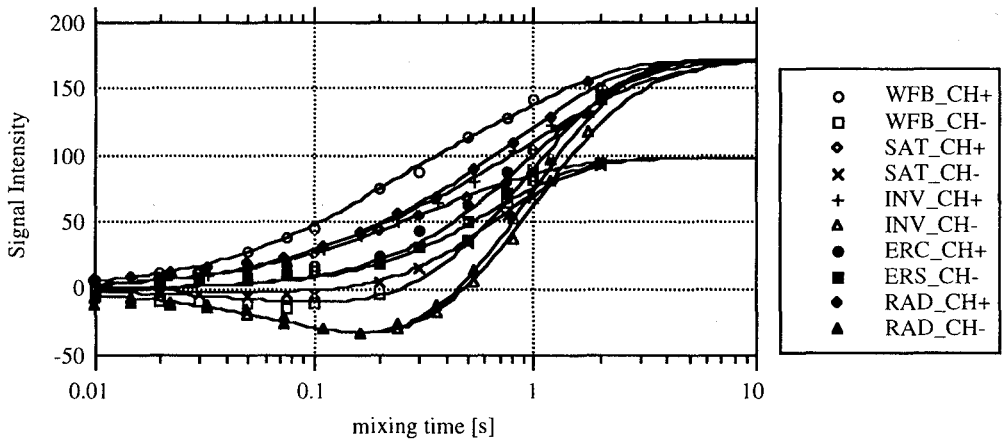
[結果：アミドプロトンのフィルター実験]

Fig.4 の図式で示したモデルを使ってデータをフィッティング解析した例を示す。Fig.5a に示す Gln2 はユビキチンでは比較的交換速度が速い。また Fig.5b に示す Leu15 は交換速度が遅い。

Time Dependency of Gln2
Human Ubiquitin 25°C, pH7.93 (Fig.5a)



Time Dependency of Leu15
Human Ubiquitin 25°C, pH7.93 (Fig.5b)

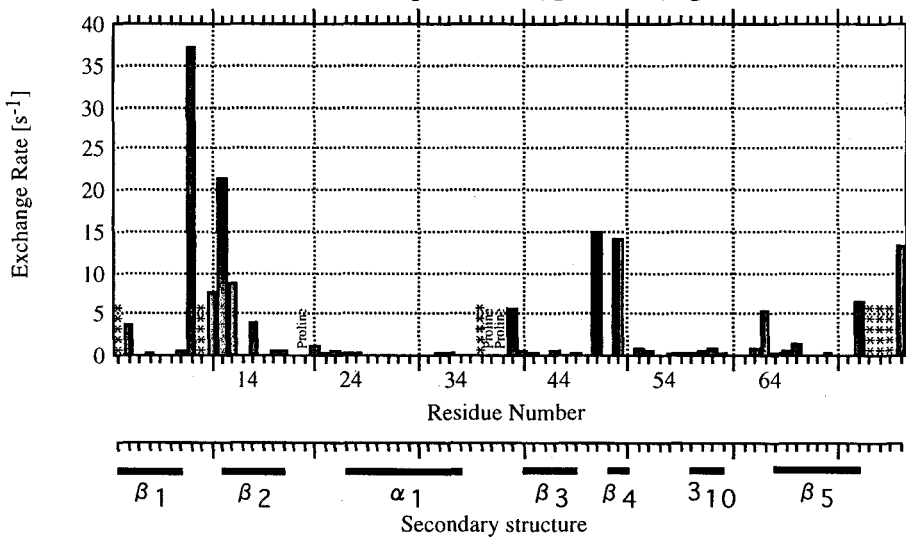


同じ初期磁化の状態から出発する実験の組み合わせであるINV_CH-とRAD_CH-の実験を比較すると、交換速度の違いによる変化が最も顕著に現れる。Gln2 の場合 50 [ms] を境にして、Radiation damping を起こした急激な水の磁化の変化を、交換しているアミドプロトンの磁化が水の磁化を追いかけるように増加している。一方、交換が起こらない Leu15 のアミドプロトンは外界で起きている水の磁化の変化には無関心であるように振る舞うのが良くわかる。

同様な比較がINV_CH+とRAD_CH+の実験の組み合わせでも説明できる。

Fig.6 に 66 個の残基について交換速度を示す。(全残基 76、そのうちプロリンは 3 残基)

Fitting Parameter (Exchange Rate)
Human Ubiquitin 25°C, pH7.93 (Fig.6)



****: Not observed because of rapid exchange

今回検討した同位体フィルターを用いた実験の他に、重水素交換実験、Off Resonance ROESY実験からも、交換速度を求めた。その結果、本実験の交換速度と良い相関があることが示されている。しかし pH7.93 という条件下において、ほぼ全ての残基について統一的に交換過程を解析できるのは、この同位体フィルターを用いた実験だけである。

大腸菌RNAポリメラーゼ α サブユニットの N末端ドメインの構造解析

(阪大蛋白研¹、国立遺伝研²)

○大友崇紀¹、山崎俊夫¹、村上勝彦²、石浜明²、京極好正¹

Structural analysis of the amino terminal domain of the alpha subunit
of E.coli RNA polymerase

○Takanori Otomo¹, Toshio Yamazaki¹, Katsuhiko Murakami²,
Akira Ishihama², Yoshimasa Kyougoku¹

(¹Institute for Protein Reserch, Osaka University,
²National Institute of Genetics)

The amino terminal domain of the alpha subunit of E.coli RNA polymerase (α NTD) plays a key role in assembly of the core enzyme. α NTD is 26kDa protein, and forms a dimer. But this protein aggregates at an NMR concentration. We examined the solution condition using ¹H-¹⁵N HSQC spectra, PFG NMR diffusion measurements and analytical ultracentrifuge, and determined the optimal solution condition. We have performed NMR signal assignment of the protein backbone nuclei using ²H labelled sample.

α NTDはRNAポリメラーゼの各サブユニットを集結させる機能を持つ分子量26kDa、アミノ酸239残基の蛋白質であり、2量体を形成することがわかっている。この蛋白質はNMR濃度になると非特異的に自己会合する性質があり、この会合をほどくことが重要であった。我々は溶媒条件の検討を行い会合をほどく溶媒条件を決定した。この際¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを用いて大まかな条件を求めた。その結果胆汁酸を骨格に持つ界面活性剤が有効であることがわかった。そのうち有効性の高かったものはコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、CHAPS などである。さらにそれらの界面活性剤を用いて、NMRによって蛋白質の拡散係数を求める実験を行った。界面活性剤の濃度を振り拡散係数をプロットをとった。そのプロットから拡散係数の最大値をあたえる界面活性剤の種類、及びその時の濃度を最終的にNMR条件とした。蛋白質の濃度及びpHはサンプルの安定性から最も良い条件を求めた。(20mM Tris pH8.5、0.1mM EDTA、7mM デオキシコール酸ナトリウム、0.6mM α NTD) この条件で超遠心分析を行ったところ、 α NTDは2量体であることが確認された。

決定した条件でシグナルの帰属をするため、¹³C, ¹⁵N ラベル体を作製し、各種3D実験を行った。さらにこの蛋白質は2量体であることから分子量が52kDaと非常に大きくなるために80%のD化を行い、 β のデータをとるのに用いた。実験はDRX600で行い、一部DRX800も用いた。HNCA, HN(CO)CA, ¹⁵N-edited NOESY, をダブルラベル体で、CT-HNCA, CT-HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB, ¹⁵N-edited NOESYをトリプルラベル体で測定し、非常に良いスペクトルが得られた。これらのデータからシグナルの帰属を行い、主鎖原子の80%の帰属を完了した。

keywords: RNAポリメラーゼ、界面活性剤、並進拡散、重水素化

○おおもたかのり、やまざきとしお、むらかみかつひこ、いしはまあきら、
きょうごくよしまさ

大腸菌 RNA ポリメラーゼの alpha サブユニット活性化ドメインと
DNA の相互作用解析
(阪大蛋白研¹、国立遺伝研²)

○安野和浩¹、山崎俊夫¹、朽尾豪人¹、田栄浩¹、石浜明²、京極好正¹

Analysis of the interaction between the activator contact domain of
Escherichia coli RNA polymerase α subunit and the UP element DNA
○ Kazuhiro Yasuno¹, Toshio Yamazaki¹, Hidehito Tochio¹, Yong Ho Jeon¹,
Akira Ishihama², Yoshimasa Kyogoku¹

¹Institute for Protein Research, ²National Institute of Genetics

The C-terminal domain of the *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit (α CTD) plays a key role in transcription regulation by a group of protein transcription factors and DNA enhancer elements (UP element DNA). We investigated the interaction between α CTD and the UP element DNA. The UP element DNA is an AT rich sequence of about 25 base pairs. We designed DNA sequences and investigated their interaction with α CTD by monitoring the ¹⁵N-HSQC signals of α CTD. The interaction surface on α CTD monitored by NMR coincided with the data from mutagenesis. The strength of their interaction depended on the length of the AT region, longer AT sequence exhibited stronger interaction, but did not depend on their sequence. We observed intermolecular NOE on the interaction between ¹³C labeled α CTD and a designed DNA by isotope filtering method. We found many NOEs, showing contacts between some side chains of α CTD and the DNA sugar protons.

大腸菌 RNA ポリメラーゼ (RNAP) の alpha サブユニット C 端ドメイン (α CTD) は、様々な転写因子やプロモーター上流にある AT rich な DNA 配列 (UP element DNA) と結合することにより、目的遺伝子の転写を活性化していると報告されている¹⁾。この α CTD と UP element DNA の結合様式を調べた。

α CTD の構造はすでに NMR により決定されている²⁾。そして、¹⁵N ラベルされた α CTD 溶液に UP element DNA 25bp を混合したところ、残基特異的に ¹⁵N-HSQC シグナルのブロードニングが観測され、相互作用の確認とともにブロードニングを受けた残基は mutation 実験³⁾から予想されていた相互作用部位と同じ表面に位置していた。

さらに詳細な情報を得るため、特に AT 配列の長さに着目して DNA 配列を操作し、DNA と α CTD との相互作用の様子を、¹⁵N-HSQC 上で調べたところ、AT 塩基が長く続くほどシグナルのブロードニングが激しくなり、逆に短くすると α CTD のシグナルがふたたび現れ、free のときは異なった位置にシフトしたスペクトルが得られた。しかし、そのシフトの大きさは AT 配列を短くして行くほど小さくなり結合力が弱くなっているようであった。また、シフトの様子は AT 部位の長さには依存していたが、AT の並びによる変化はなかった。連続した AT 塩基対 7bp を含む DNA を α CTD に対して滴定したところ、一分子の DNA に独立で等価な 2 個の α CTD 結合箇所があるとして解析した場合、解離定数が 10^{-4} M 程度の滴定曲線が得られた。

次に UP element DNA のような AT rich な配列に α CTD がどのように結合しているか探るため、¹³C, ¹⁵N ラベルされた α CTD を 5'-CGCGAAATTTTCGCG-3' という二重鎖 DNA 配列と 2 : 1 の割合で混合した溶液で種々の 3D, 2DNMR 測定により蛋白質、DNA のプロトンシグナルの帰属を行い、さらに同位体フィルター法により蛋白質-DNA 間の NOE を測定したところ、 α CTD の側鎖プロトンの幾つかから、DNA の糖部分へ多くの NOE が観測された。現在、解析を進めているところである。

1) Ross, W. et al. Science, 262, 1407-1413 (1993)

2) Jeon, Y. H. et al. Science, 270, 1495-1497 (1995)

3) Murakami, K. et al. EMBO J. 15, 4358-4367 (1996)

RNA polymerase, DNA-Protein interaction

やすの かずひろ、やまざき としお、とちお ひでひと、じょおん よんほう、
いしはま あきら、きょうごく よしまさ

メタロプロテアーゼ阻害蛋白質 SMPI の構造決定と相互作用様式の解析
 (都立大・理1、京都工繊大・応用生物2) ○大野 綾子¹、楯 真一¹、
 Sailaja S. Seeram²、平賀 和三²、小田 耕平²、甲斐荘 正恒¹

The Structure and Inhibition Mechanism of Metalloproteinase Inhibitor ,SMPI

(Faculty of Science, Tokyo Metropolitan Univ¹, Faculty Textile Science, Kyoto Institute of
 Technology²) Ayako Ohno¹ Shin-ichi Tate¹, Sailaja Seeram², Kazumi Hiraga²,
 Kohei Oda², and Masatsune Kainosho¹

Abstract

The solution structure of *Streptomyces* metalloproteinase inhibitor, SMPI, which is a potent inhibitor of thermolysin, is determined by NMR spectroscopy. SMPI is essentially composed of two β -sheets, each consisting of four antiparallel β -strands. The structure can be considered as two Greek key motifs, with two-fold internal symmetry. In the absence of sequence similarity the SMPI structure showed the clear similarity to the both domain of an eye lens crystallins, both domains of the calcium sensor protein-S, as well as the single domain yeast killer toxin. SMPI has the proteolytic cleavage site on the protruding loop from the globular core. In modeling the docking structure of SMPI with thermolysin, we found this loop of SMPI is complimentary in shape and surface charge to the active cleft of thermolysin simultaneously fulfilling the required interaction between P1'(SMPI) and S1'(thermolysin) sites and the coordination of P1 carbonyl oxygen to catalytic zinc in thermolysin.

[序] SMPI は、アミノ酸残基 102 からなり、2つのジスルフィド結合を持つ蛋白質性インヒビターであり、小田らにより初めて分取された。この蛋白質は、サーモリシンなどのメタロプロテアーゼを広く阻害する。しかし、このような基質類似型のメタロプロテアーゼインヒビターの構造および阻害様式は、これまで解かれた例はなく、他の阻害蛋白質ともアミノ酸配列相同性がなかった。近年になって、小田らによる切断実験により C64-V65 であると同定された。また、変性実験により、このインヒビターの P₁' サイト (V65) が疎水性残基であることが、明らかとなった。そこで、本研究では NMR による溶液中の立体構造を決定し、その構造よりサーモリシンとの相互作用様式について検討することを目的とした。

[構造決定] NMR による立体構造決定は、定法にのっとり約 1500 個の距離及び角度情報を用いて DYANA1.1・X-PLOR3.8 を併用して行った。

Keywords 安定同位体、蛋白質構造、プロテアーゼインヒビター、緩和時間

おおのあやこ、たて しんいち、Sailaja S. Seeram、ひらがかずみ、おだこうへい、
 かいのしょうまさつね

[結果と考察] 構造決定の結果、SMPIは、N末端側に3本、C末端側に4本の逆平行 β シート構造を持ち、さらに活性部位近傍に1対の小さな β シートが存在している。これらの β シートはGreek keyモチーフを持っている。また、N、C-末端構造部の間には、1本の α ヘリックス構造がある。既に小田らにより同定されている阻害活性部位は、大きくコア部分より突出したループ領域に存在しており、立体構造側から見てもプロテアーゼとの相互作用が容易な部分に存在していることがわかる。また、この活性ループは緩和時間解析により運動性が低いことが分かった。次に、SMPIとプロテアーゼとの相互作用様式を検討するために Matthewsらにより1993年に発表されているサーモリシンとV-Kジペプチドとの複合体の結晶構造を用いて、サーモリシンへのSMPIの活性ループ接近様式について検討した。この複合体のジペプチドのV-Kに対応するペプチドユニットが、SMPIの活性部位近傍のV65-R66に見られるため、計算機上でSMPIのV65-R66が、結晶構造中のジペプチドに最も重なり合うように接近させたところ、大きな立体障害なくSMPI活性部位がサーモリシンの活性クレフトにうまく入り込むことが分かった。(Fig1)さらに、切断活性部位とサーモリシンとの相互作用様式を詳細に調べたところ、SMPIの P_1 サイトのカルボニルが、サーモリシンの活性部位内の亜鉛イオンへ正四面体の配向性を保って接近することが可能であることが、明らかとなった。このサーモリシンの亜鉛イオンへの配向性は、プロテアーゼの切断機構において重要な役割を果たしていることが既に知られている。また、このSMPIの P_1 'サイト(V65)の側鎖が、サーモリシンのポケットにうまく入り込んでいることが分かった。これにより、SMPIの活性ループが、うまくサーモリシンの活性部位に入り込む要因となっていることが示唆される。さらに、構造以外の相互作用を調べるために2つの蛋白質の表面電荷分布について調べたところ、SMPIの活性ループ領域は正電荷、サーモリシンの活性部位は負電荷を帯びていることが分かった。よって、2つの蛋白質は静電的相互作用を通して、接近することが分かった。以上により、SMPIの活性ループは、静電的相互作用を通して立体障害なくうまくサーモリシンの活性クレフトに入り込むことにより、活性ループ内の P_1 サイトのカルボニルが亜鉛イオンに正四面体型の配向性を保ちながら接近し、複合体を形成することにより基質類似型の阻害を行っている複合体モデル構造より推測された。

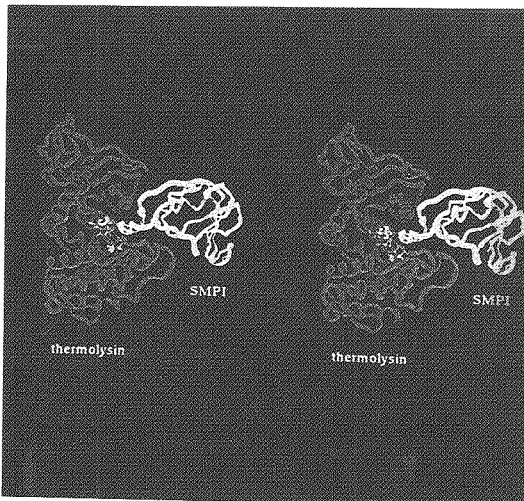


Fig1 The model structure of SMPI with Thermolysin

オスモセンサー-EnvZのHis kinaseドメインのNMR構造解析
 (筑波大TARAセ¹、トロント大OCI²、農水省生物研³、UMDNJ⁴)
 ○田中俊之¹、友森チエリ¹、伊島理枝子²、Kit Tong²、Dingjiang Liu²、
 山崎俊正³、井上正順⁴、伊倉光彦²

NMR Structural Study of the His Kinase Domain of EnvZ

Center for Tsukuba Advanced Research Alliance and Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba¹, Division of Molecular and Structural Biology, Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto², National Institute of Agrobiological Resources³, and Department of Biochemistry, Robert Wood Johnson Medical School⁴

Toshiyuki Tanaka¹, Chieri Tomomori¹, Rieko Ishima², Kit Tong², Dingjiang Liu², Toshimasa Yamazaki³, Masayori Inouye⁴ & Mitsuhiko Ikura²

EnvZ, a 49-kDa transmembrane protein, serves as an osmosensor in Escherichia coli. The secondary structure of its His kinase domain (290-450) has been determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. It consists of four α -helices, seven β -strands, and also a long loop region between the C-terminal two helices.

EnvZ is a transmembrane osmosensor which regulates the production of two major outer membrane porin proteins, OmpF and OmpC in *Escherichia coli*¹. EnvZ is an autokinase that becomes phosphorylated at His243 by ATP through a transphosphorylation reaction between two EnvZ molecules, and thus is called a histidine kinase. The phosphate group is subsequently transferred to OmpR, which activates this transcription factor to allow regulation of the *ompF* and *ompC* genes. In addition to its autokinase and phosphotransferase activities, EnvZ can also act as a phosphatase which dephosphorylates phosphorylated OmpR, and thus inactivates OmpR.

EnvZ consists of 450 amino acid residues, and its topology is typical of a transmembrane histidine kinase protein: a periplasmic sensor domain (residues 47 to 162), two transmembrane regions (16-46 and 163-179), a linker region (180-222), and a cytoplasmic catalytic domain (223-450)². We have started the NMR structural analysis of the catalytic domain to elucidate the molecular mechanism of signal transduction by EnvZ, and already revealed that its N-terminal region (223-289) is responsible for the homodimer formation of EnvZ³. Here, we present the secondary structure of the C-terminal kinase domain (290-450) obtained by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy.

Uniformly ¹⁵N- or ¹³C/¹⁵N-labeled, or unlabeled protein was dissolved to 1.5 mM in either 95% H₂O/5% ²H₂O or 99.996% ²H₂O containing 20 mM sodium phosphate, 50 mM KCl, 0.5 mM AEBSEF, 50 μ M sodium azide, 5 mM MgCl₂, and 5 mM ATP (pH 7.0). NMR

ヒスチジンキナーゼ、EnvZ、多次元NMR

たなか としゆき、とももり ちえり、いしま りえこ、キット トング、ディンジャン リウ、
 やまざき としまさ、いのうえ まさより、いくら みつひこ

spectra were recorded at 25 °C on a four-channel UNITY-plus 500, UNITY-600, or DMX-750 spectrometer. All data were processed using the software nmrPipe and nmrDraw, and the data analysis was assisted by the software Capp and Pipp. The backbone assignments have been made by analyzing four triple resonance experiments, (HB)CBCA(CO)NNH, HNCACB, (HB)CBCACO(CA)HA, and HNCO. Assignment of the side-chain resonances was carried out using the 3D HCCH-TOCSY and ^{13}C -edited NOESY-HMQC spectra. NOEs were assigned from 2D homonuclear and 3D ^{13}C - and ^{15}N -edited NOE spectra, and $^3J_{\text{NH}\alpha}$ coupling constants were measured from $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HMQC-J spectrum. Slowly exchanging amide protons were identified by recording a series of gradient-enhanced $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC experiments at different time points immediately after exchanging H_2O for D_2O by an ion-exchange column at 4 °C.

The secondary structure elucidated from $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\beta$ chemical shifts according to Venters *et al.*⁴ is shown in Figure 1. The His kinase domain of EnvZ consists of four α -helices and seven β -strands. This secondary structure is consistent with the other NMR parameters, such as medium- and long-range backbone NOEs, $^3J_{\text{NH}\alpha}$ coupling constants, and amide hydrogen exchange data. It is noted that there is a long loop region between the C-terminal two helices. This region contains one of the glycine-rich boxes (G2), which are thought to be involved in the nucleotide binding. Another box, called G1, exists at the end of the strand E. Preliminary three-dimensional structure reveals that these boxes is closed in space to Asn347, which is responsible for the kinase activity of EnvZ.

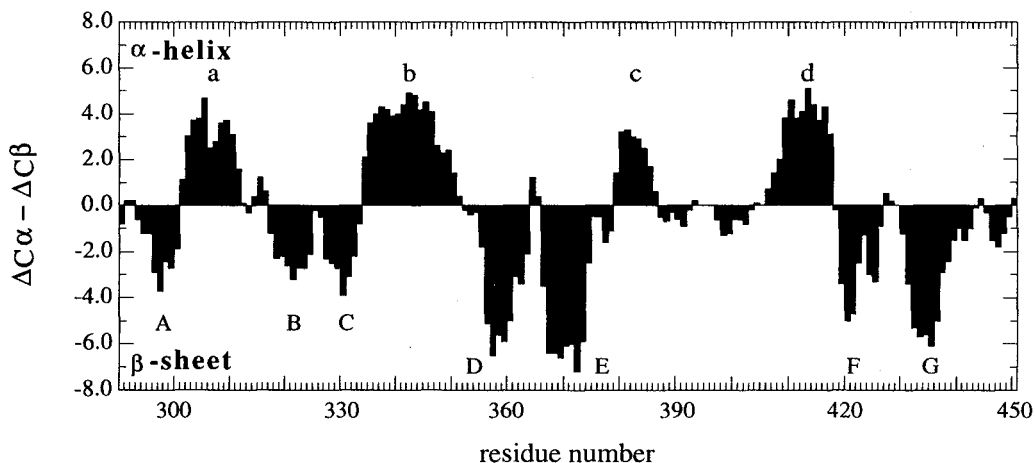


Fig. 1 Secondary structure of the His kinase domain of EnvZ elucidated from the $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\beta$ chemical shifts.

References

1. Pratt, L.A. and Silhavy, T.J. In *Two-Component Signal Transduction* (Hoch, J.A. and Silhavy, T.J., eds), pp. 105-127, ASM Press (1995).
2. Forst, S. *et al.* *J. Biol. Chem.* **262**, 16433-16438 (1987).
3. Tomomori, C. *et al.*, unpublished results.
4. Venters, R. A. *et al.* *J. Mol. Biol.* **264**, 1101-1116 (1996).

P15

安定同位体標識ペプチドを用いたペプチドと蛋白質との相互作用の解析

(三菱化学生命研¹, 群大工²)

○楠英樹^{1,2}, 若松馨², 佐藤一紀¹, 河野俊之¹

Analysis of Peptide-Protein Interactions Using a Peptide Uniformly Enriched with Stable Isotopes

○Hideki Kusunoki^{1, 2}, Kaori Wakamatsu², Kazuki Sato¹, Toshiyuki Kohno¹

(Mitsubishi kasei Institute of Life Sciences¹, Faculty of Engineering, Gunma University²)

Transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE) has been used to analyze conformations of peptides bound to large proteins. However, this method often suffers from poor signal dispersion of peptide proton resonances since peptide molecules in a free state, through which the information about peptide's bound conformation is monitored, are primarily in a random coil state. To overcome such a drawback, we analyzed peptide-protein interaction by heteronuclear TRNOE experiments of peptides uniformly enriched with ¹⁵N and/or ¹³C. In the present study, we analyzed the Gi1 α -bound conformation of mastoparan-X (MP-X), which can activate Gi1 α . We could determine precisely the structure of MP-X bound to Gi-protein by solving the overlapping problem.

[序論]

大きな蛋白質に結合したペプチドの構造を解析する有用な方法の1つに Transferred NOE (TRNOE) 法がある。しかしながらこの方法を用いた場合、観測されるペプチドシグナルはランダムコイル状態の化学シフトに現れるので、シグナルの分離が悪いことがある。本研究ではこの問題を解決するため、安定同位体ラベルしたペプチドを調製し、ペプチドと蛋白質との相互作用を多核多次元のTRNOE法で解析した。蛋白質はG蛋白質を、ペプチドにはG蛋白質を直接活性化できるマストパランXをそれぞれ用いた。

[実験]

(a) マストパランXの調製。我々は ¹⁵NH₄Cl, ¹³C-Glucose を含んだ最小培地で大腸菌を培養し、以下に示す方法で安定同位体ラベルしたマストパランXを調製した。マストパランX をユビキチン (N末端に Histidine-tag を付けてある) との融合蛋白質として大腸菌内に安定かつ大量に発現させた。その融合蛋白質を Ni-カラムで精製した後、酵母ユビキチン切断酵素でマストパランX を切り出した。アミ

ド化酵素でこのペプチドの C 末端をアミド化した後、逆相カラムで精製した。

(b) NMR 測定と構造計算. NMR 測定は Bruker AMX-500 または ARX-400 を用いて 20°C でおこなった. シグナルを帰属するため, 2D ^1H -TOCSY, HSQC, 3D CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCO, TOCSY-HSQC をそれぞれ測定した. 距離情報を得るため, 混合時間 100 ms の 2D ^1H -TRNOESY, ^{15}N -TRNOESY-HSQC, ^1H , ^{15}N -HMQC-TRNOESY-HMQC, ^{13}C -TRNOESY-HMQC をそれぞれ測定した. スペクトルの processing と解析には UXNMR software または NMRPipe を用いた. NOESY のクロスピーク強度は Trp³ の 4H-5H (2.5 Å) を基準として強, 中, 弱の三段階に分け, それぞれの距離の上限を 2.7, 3.6, 4.5 Å とした. 構造計算は X-PLOR 3.1 Program を用いておこなった.

[結果・考察]

短いペプチドは水溶液中でランダムコイル状態にあるためプロトンシグナルが重なり, 帰属の困難な場合がある. 本研究で用いたマストパランX (Fig. 1) も水溶液中でランダムコイル状態にあるため, そのアミドプロトンシグナルは ^1H -NMR スペクトルの中で著しく重なり, 帰属が困難であった. そこで, 我々は安定同位体ラベルしたマストパランXの多核多次元 TRNOE を用いて, このペプチドと G 蛋白質との相互作用の解析を試みた. 最初に, 我々は ^{15}N で一様にラベルしたマストパランX の ^{15}N -HSQC スペクトルを測定した. その結果, ^{15}N の化学シフトでそのアミドシグナルを完全に分離することができた (Fig. 2). また, G 蛋白質存在下で ^{15}N -TRNOESY を測定したところ, 2D ^1H -TRNOESY において重なりが著しかったシグナルを分離することができ, 多くの NOE を新たに帰属することができた. ^1H -TRNOESY の aliphatic 領域もまた, プロトンシグナルが重なっているため, ^{13}C , ^{15}N でダブルラベルしたマストパランXを調製し, ^{13}C -TRNOESY を用いて解析をおこなった. すると, 2D ^1H -TRNOESY の中で重なっていたため帰属できなかった TRNOE クロスピークを容易に帰属できるようになった. これらの TRNOE から得られた 151 個の距離制限をもとに G 蛋白質に結合したマストパランXの構造を X-PLOR 3.1 Program で計算した. その構造は Trp³ から C 末端の Leu¹⁴ まで両親媒性の α ヘリックスを形成していた. α ヘリックスを形成する領域での主鎖原子の r.m.s.d. は 0.27 Å, 全重原子の r.m.s.d. は 0.93 Å であった. 一方, ^1H -TRNOESY だけから得られた距離制限 (全部で 116 個) をもとに上と同じ方法で構造計算をおこない, 上で得られた構造と比較した. その結果, ここで計算された構造の収束は悪く, その r.m.s.d. は主鎖原子について 1.70 Å, 全重原子で 2.84 Å であった. それぞれの制限を基に計算された構造を Fig. 3 に示す. 以上より, ペプチド-蛋白質相互作用の解析において, 短いペプチドを安定同位体ラベルして多

核多次元 TRNOE の解析をおこなうことは非常に有用であることが示された。

INWKGIAAMAKKLL-NH₂

Fig. 1. Amino acid sequence of mastoparan-X (MP-X).

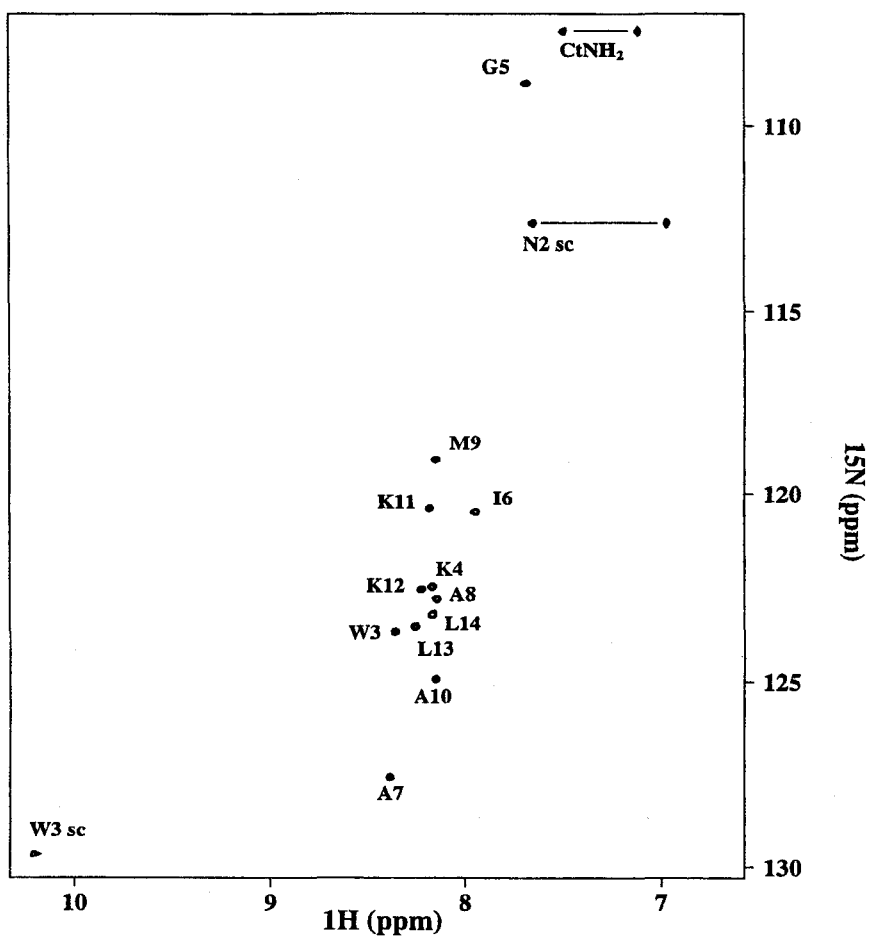


Fig. 2. [¹H, ¹⁵N] HSQC spectrum of MP-X uniformly enriched with ¹⁵N.

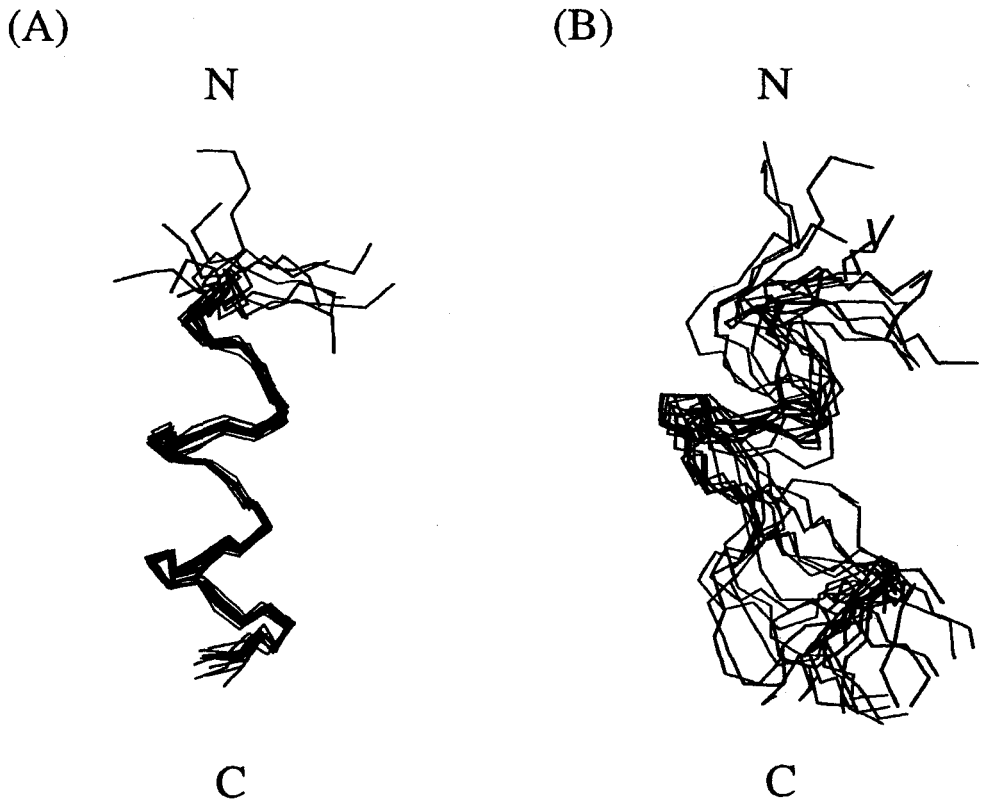


Fig. 3. Comparison of the calculated G protein-bound structures of MP-X, (A) isotope-enriched and (B) non-enriched.

キーワード： 安定同位体標識ペプチド, 多核多次元TRNOE法, 構造決定, 蛋白質
小分子相互作用

くすのき ひでき, わかまつ かおり, さとう かずき, こうの としゆき

(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^{1,3}, 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

Structural characterization of the minimum active region of the HIV-2 Nucleocapsid protein NCp8 studied by ¹H NMR

○Yoshio Kodera, Tomonori Tsukahara, Hiroyoshi Komatsu, Hideki Tozawa, Jae-II Kim, Kazuki Sato, Tadakazu Maeda, Toshiyuki Kohno

Retroviral nucleocapsid protein, NCp8, of the human immunodeficiency viruses type II (HIV-2) is essential for RNA genome packaging and infectivity of the viruses, and includes two zinc fingers of the type C-X₂-C-X₄-H-X₄-C. The derived synthetic peptide NCp8-f1, which includes the first zinc finger, is the minimum active region to recognize the viral RNA. In this study, the three-dimensional structure of NCp8-f1 was determined by two-dimensional ¹H NMR spectroscopy with simulated annealing calculations. Interestingly, four Arg residues in the C-terminal part expose to solvent and locate in the same side of the peptide. We will discuss the mechanism of viral RNA recognition by NCp8-f1 from the structural point of view, comparing the determined structure with those of the nucleocapsid proteins of HIV-1 and other retroviruses.

I. 序

HIV (HIV-1, HIV-2) のヌクレオキャプシドタンパク質 (NCタンパク質) は, 2つの C-X₂-C-X₄-H-X₄-C (CCHC) タイプの zinc finger motif (ZFM) と, その間をつなぐ塩基性アミノ酸残基に富む 7 残基のアミノ酸 (linker 領域) から構成されている (Fig. 1). このタンパク質は, ウイルス RNA の二量体形成, RNA のウイルス粒子内へのパッケージングをはじめ, ウイルス増殖に重要な様々な働きを担っていることが報告されている [1]. しかし, HIV-1 の NC タンパク質 (NCp7) は立体構造解析が行われているが [2], その機能発現機構についてはほとんど解明されていない. HIV-2 の NC タンパク質 (NCp8) は, アミノ酸配列, 機能において NCp7 に非常によく似た特徴を持っている. しかし, NCp8 の立体構造解析は, N 端側の ZFM 領域について二次構造解析を行った 1 つの報告 [3] 以外に研究例が無い.

当研究では NCp8 の立体構造解析を行い, NCp7 の立体構造と比較して両タンパク質の機能発現機構を解明することを目的としている. その第一段階として, ウイルス RNA を認識するための最小単位の部分ペプチド (NCp8-f1: N 端側の ZFM と linker 領域を含む 29 アミノ酸残基のペプチド) の立体構造を決定した.

II. 実験方法

試料) NCp8-f1 は Fmoc 法により化学合成し, TOF-MS による質量分析で分子量の確認を行った.

キーワード: HIV-2, ヌクレオキャプシドタンパク質, 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

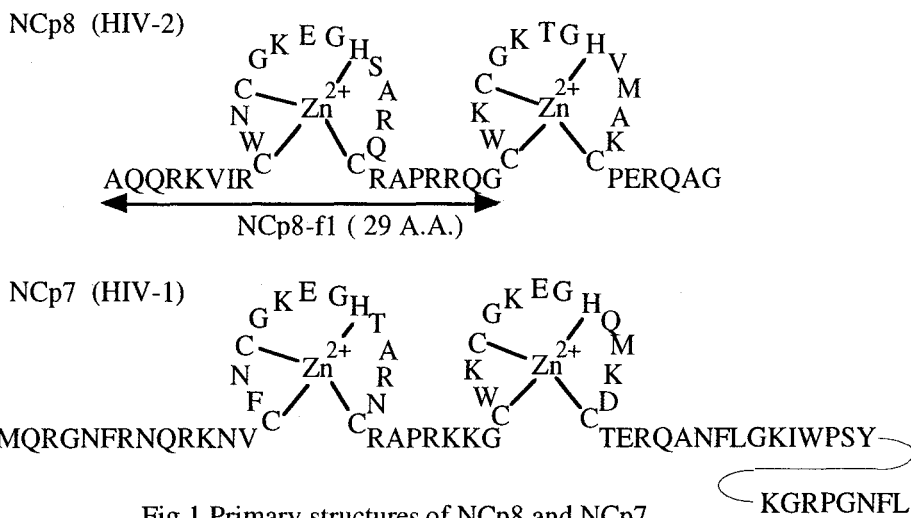


Fig.1 Primary structures of NCp8 and NCp7

NCp8-f1 への Zn^{2+} の配位は、NCp8-f1 の水溶液 (pH 3.0 以下) に相当量の $ZnCl_2$ を添加後、pH を 5.7 まで上昇させて行った。CD スペクトルおよび 1 次元 NMR 測定によって Zn^{2+} の配位の確認を行った。

NMR 測定) NMR 測定は、濃度約 5 mM, pH 5.7 で行った。溶媒は 99.65 % 2H_2O または 90 % $H_2O/10\% ^2H_2O$ を用いた。全ての NMR スペクトルは (1 次元測定, DQF-COSY, PE-COSY, TOCSY, NOESY) は Bruker 製 DMX-500 NMR 装置を用いて温度 278 K, 288 K および 298 K で測定した。

立体構造計算) 常法に従って NMR 信号の帰属を行った。構造計算に必要な距離制限情報は主に 288 K (mixing time :100 ms, 200 ms) の NOESY スペクトルから求めた。 Zn^{2+} と Cys 残基の S' 核, His 残基の N^{ϵ} 核との結合距離は, Arseniev らの方法 [4] に従ってそれぞれ 2.3 Å, 2.0 Å とした。立体構造計算は simulated annealing 法 (X-PLOR 3.1 [5] 使用) によって行った。

III. 結果と考察

距離制限情報 (331個) と角度制限情報 (12 個) をもとに計算した NCp8-f1 の立体構造を Fig. 2 に示す。これは 100 個の計算結果の中から最も収束した 16 個の構造を ZFM 領域 (Cys 9 ~ Cys 22) の主鎖で重ね合せたものである。主鎖の N, C^{α} , C 核と Zn^{2+} に結合している Cys 9, Cys 12, His 17, Cys 22 の側鎖を表示した。Ala 1 から Val 6 までは距離制限情報が少なく、構造が収束しなかったために除いている。16 個の構造の平均構造に対する RMSD (root mean square difference) を Ile 7 ~ Gly 29 について求めた結果、主鎖の N, C^{α} , C 核に対して 0.36 ± 0.08 Å, 全ての重原子に対して 1.36 ± 0.14 Å となった。また、Lennard-Jones van der Waals energy の平均値は -55 kcal/mol であった。

この結果より、NCp8 と NCp7 の ZFM 領域はほぼ同じ立体構造を持っていることがわかった。また、C 端側の linker 領域は loop 様の構造を持っていることがわかった。同領域が rigid な立体構造を持っていることは今までに報告されていない。NCp8, NCp7 とともに linker 領域が活性発現に非常に重要であることは多くの研究で明らかにされている [1]。ウイルス RNA 認識およびその他の機能発現機構を解明するために、今回得た linker 領域の loop 様の構造が重要な手がかりを与えると考えられる。Fig. 3 に Fig. 2 に示した 16 個の立体構造の平均構造を示した。C 端側の 4 つ

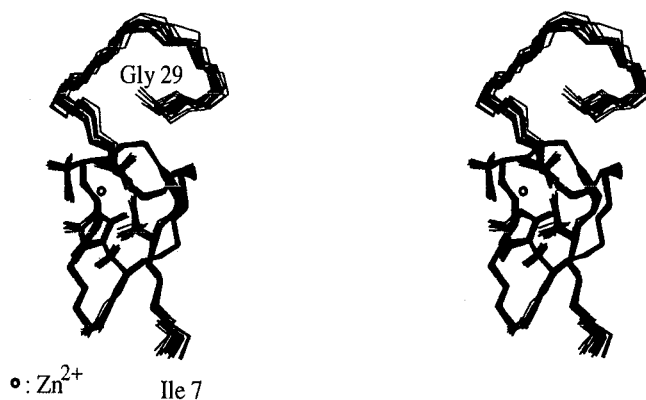


Fig.2 Stereopair of backbone heavy atoms for the 16 converged structures of NCp8-f1.

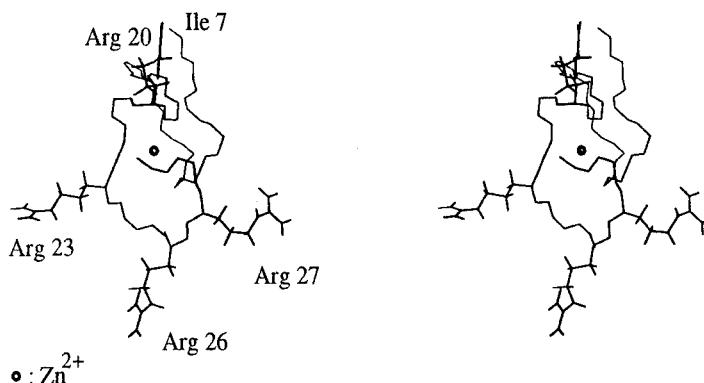


Fig. 3 Mean structure of NCp8-f1

の Arg 残基 (Arg 20, Arg 23, Arg 26, Arg 27) の側鎖も同時に表示している。全ての Arg 残基が溶媒に露出しており、その立体配置は他のレトロウイルスの NC タンパク質の塩基性アミノ酸残基の立体配置と非常によく似ている。

発表では、ウイルス RNA 認識に必要な NC タンパク質の立体構造要素について、NCp8 と NCp7 およびその他のレトロウイルスの NC タンパク質とを比較して議論する。

- [1] Darlix, J. L., Lapadat-Tapolsky, M. Rocquigny, H. D. and Roques, B. P. (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 523-537
- [2] Morellet, N., Rocquigny, H. D., Mely, Y., Jullian, N., Demene, H., Ottmann, M., Gerard, D., Darlix, J. L., Fourinie-Zaluski, M. C. and Roques, B. P. (1994) *J. Mol. Biol.* 235, 287-301
- [3] Laussac, J. P., Peyrou, G. Mazarguil, H., Erard, M., Bourdonneau, M. and Cung, M. T. (1993) *New. J. Chem.* 17, 607-612
- [4] Arseniev, A., Schultze, P., Wörgötter, T., Braun, W., Wagner, G., Vasak, M., Kägi, J. H. R. and Wüthrich, K. (1988) *J. Mol. Biol.* 201, 637-657
- [5] Brünger, A. T. (1993) *X-plor Manual*, Version 3.1, Yale University, New Haven, CT.

P17

糖鎖結合がウナギカルシトニンの立体構造および
ダイナミクスに与える影響

(旭化成・基盤技術センター) ○橋本康博、錦戸條二

(野口研) 山本敬三、羽田勝二

(ペンシルバニア大) S.Opella、K.Valentine

Effects of Glycosylation on the Structure and the Dynamics of eel Calcitonin

(Asahi Chemical Analytical Research Laboratories) Yasuhiro Hashimoto, Joji Nishikido

(The Noguchi Institute) Keizo Yamamoto, Katuji Haneda

(University of Pennsylvania) S.Opella, K.Valentine

The 3D structures of eel calcitonin(CT), CT-GlcNAc* and CT-M6* have been determined under sodium dodecyl sulfate(SDS) using 750MHz NMR in order to obtain the information about effects of the glycosylation on the peptide conformation. Each peptide has been found to have the same conformation characterized by an amphipathic α helix ranging from Thr6 to Leu19 followed by an extended random region at C-terminal decapeptide. Detailed analysis of NOE data showed that the overall conformation of peptide moiety is not affected by glycosylation. Nevertheless, comparison of the relative exchange rates of amide protons shows that the fluctuation of α helix is reduced by glycosylation. Some NOEs, which have been observed between sugar and peptide moiety of CT-GlcNAc and CT-M6, and chemical shift data suggest that the sugar moiety has interactions with the peptide chain, which may contribute to conformational stabilization of α helix.

*CT-GlcNAc ; N-acetylglucosaminyl calcitonin

CT-M6 ; calcitonin containing high-mannose type oligosaccharide

1. 緒言

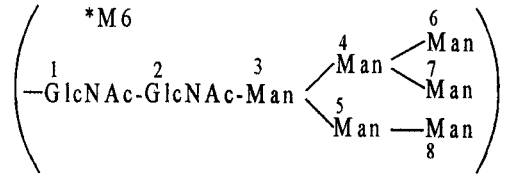
糖タンパクにおいて、糖鎖が重要な役割を果たしていることが知られている。その一つとして、糖鎖がペプチドの立体構造の安定化に寄与していることが示唆されている。近年、NMRによる糖タンパクの立体構造解析がなされはじめ、その結果、糖鎖部分がペプチド鎖と相互作用するようなコンフォメーションをとる例や、また、アミドプロトンの交換速度から、糖鎖の結合がペプチドのコンフォメーションの安定化に関与している例が示されている^(1, 2, 3)。しかし、これらのように糖タンパクの立体構造が、糖鎖の役割との観点から解析された例はまだ少なく、詳細が明らかではない。そこで我々は、モデルペプチド・糖鎖を用いて、糖鎖のペプチド立体構造安定化メカニズムに関する知見を得ることを試みた。モデルペプチドとして、32アミノ酸残基からなりカルシウム調節ホルモンであるウナギカルシトニンを選んだ。その Asn3 に GlcNAc を結合させたもの、およびM6糖鎖を結合させたものを合成し、それぞれの立体構造(ペプチド立体構造、糖鎖配向性)およびダイナミクスをNMRで詳細に比較し、糖鎖の結合がペプチド鎖におよぼす影響を解析した。

キーワード ; ウナギカルシトニン、GlcNAc、M6、重水素交換

○はしもとやすひろ、にしきどじょうじ、やまもとけいぞう、はねだかつじ、K.Valentine、S.Opella

2. 試料

- ① CT (ウナギカルシトニン)
- ② CT-GlcNAc (CT の Asn3 に GlcNAc が結合)
- ③ CT-M6 * (CT の Asn3 に M6 が結合)



3. 実験

サンプルは SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)とモル比 1:100 で混合し、10%D₂O を含む軽水に溶解させた。2D¹H-¹H-DQFCOSY、TOCSY、NOESY 解析により全ペプチドプロトンの帰属を行った。糖鎖の一部プロトンは、シグナルの重なりにより未帰属に終わった。距離情報は NOESY から得た。糖鎖残基間で得られた NOE 距離情報も立体構造計算に取り入れた。立体構造計算は X-PLOR あるいは InsightII-Discover でデイスタンス・オミトリー・シミュレイテッド・アニーリング法を用いて行った。重水素交換実験は、サンプルを重水素に溶解させた後、NOESY (1 測定約 7 時間) を連続して 4 測定行い、その時のピーク強度を見た。

4. 結果と考察

①ペプチド部分立体構造

図 1 に CT、CT-GlcNAc、CT-M6 の SDS 溶液中での計算結果を示した。3 サンプルともに中央部(Thr6-Leu19)が α ヘリックス、C 末端側がランダム構造で特徴づけられる構造である。NOE パターンを詳細に比較しても相違は見られず、GlcNAc、M6 糖鎖が結合することによって、ペプチドの立体構造に影響を与えていないことが分かった。

②糖鎖の配向

(a)CT-GlcNAc

GlcNAc 残基プロトン(1,2,3,5 位)と Thr6 メチルプロトンとの間に NOE が観測された。Thr6 は α ヘリックスの導入部分に相当し、GlcNAc がヘリックスにキャップをしたようなコンフォメーションをとることがわかった。このことは、GlcNAc の付加によるアミドプロトンの化学シフト変化が Thr6 付近で大きいことから支持される (図 2)。

(b)CT-M6

CT-M6 についても、CT-GlcNAc と同様に、GlcNAc1 と Thr6 メチルとの間に NOE が観測された。その他の糖鎖残基とペプチド鎖との間には、NOE が観測されず、ペプチド鎖との強い相互作用が無いことがわかった。しかし、図 2 に示すように、化学シフト変化が起きているアミドプロトンの領域が CT-GlcNAc よりも広く、 α ヘリックスの中央部まで影

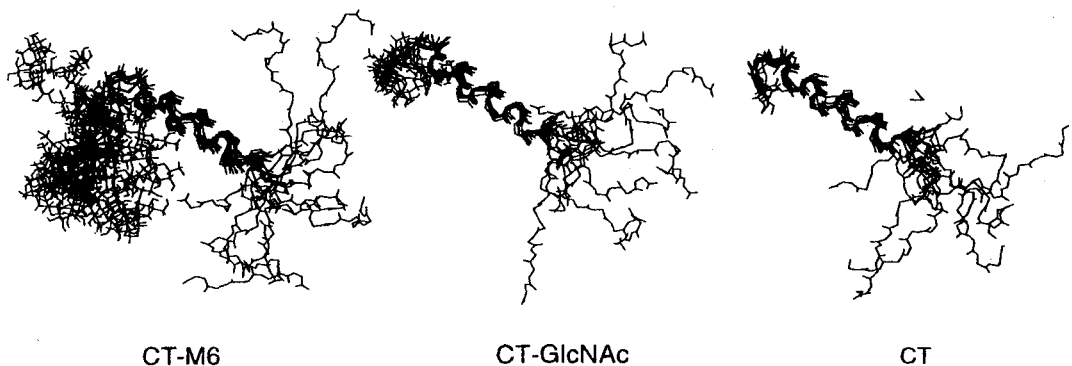


Fig.1 Superimposed structures of CT, CT-GlcNAc and CT-M6

響がある。このことは、糖鎖がペプチド (α ヘリックス) と比較的近接するようなコンフォメーションをとることによるものと考えられる。

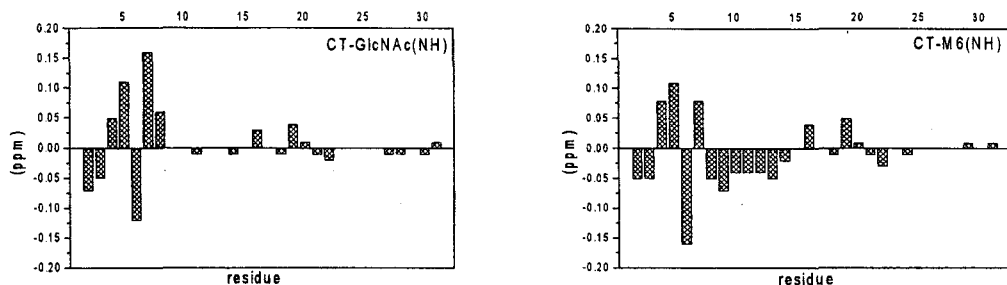


Fig.2 Amide proton chemical shift differences between CT, CT-GlcNAc and CT-M6

③ペプチド立体構造の安定性

糖鎖がペプチド立体構造安定性にどのような影響を及ぼすかを解析するために、重水素交換実験を行った。サンプルを重水素に溶解させた後の、時間とともに減少する NOE ピーク強度をプロットした (図3)。左がすべての NH プロトンの NOE ピーク強度の合計、そして右がスペクトル上で分離のよい Leu12 の α H-NH の NOE 強度をそれぞれプロットしたものである。減衰する速度は、CT、CT-M6、CT-GlcNAc の順に遅くなっており、糖鎖が結合している方が遅い。この速度差は、とくに α ヘリックスの中央部に位置する Leu12 のピークで顕著であり、 α ヘリックスのフレキシビリティが、糖鎖が結合することにより抑制されていると推測される。このことは、糖鎖がペプチド鎖と相互作用するようなコンフォメーションをとることと関係があると考えられる。ただし、CT-GlcNAcの方がCT-M6よりも、重水素交換速度が遅いことについては理由は明らかではない。

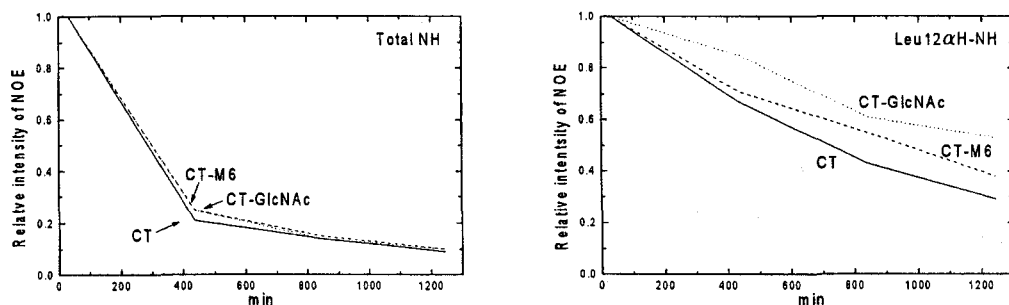


Fig.3 NOE intensity decay in D2O with passage of time

参考文献

- (1) Daniel F. Wyss, et al ; Science, 1995, 269, 1723-1277
- (2) Pauline M. Rudd, et al ; Biochemistry, 1994, 33, 17-22
- (3) Georges Mer, et al ; Structural Biology, 1996, 3, 1, 45-53

謝辞；本研究は、通産省の産業科学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より委託を受けて実施したものである。

P18

CRE 結合蛋白質 (CRE-BP1/ATF-2) の転写活性化ドメインの構造解析

○長土居有隆¹、中沢賢一¹、宇田 広子¹、前川利男²、石井俊輔²、西村善文¹

(横浜市大・大学院総合理1、理研・筑波 LS 2)

STRUCTURAL ANALYSIS OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION DOMAIN OF CRE-BP1/ATF-2

A.Nagadoi¹, K.Nakazawa¹, H.Uda¹, T.Maekawa², S.Ishii² and Y.Nishimura¹

1. Yokohama City Univ., Graduate School of Integrated Science, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236 Japan

2. The Institute of Physical and Chemical Research, Tsukuba Life Science Center, 3-1-1 Koyadai, Tsukuba 305 Japan

CRE-BP1/ATF-2 is a transcriptional activator that bind to the cyclic AMP response element, which is an inducible enhancer of the genes in response to increases in the intracellular cAMP level. The CRE-BP1/ATF-2 has two functional domains : DNA binding and transcriptional activation domains in the C and N termini, respectively. The transcriptional activation domain requires Zn^{2+} ion for maintaining a tertiary structure. We have studied the solution structure of the transcriptional activation domain (88 amino acids) by NMR. Structural calculation is now in progress to present the tertiary structure.

【序論】

CRE 結合蛋白質 (CRE-BP1/ATF2) は細胞内 cAMP の増加に应答する遺伝子 CRE (cAMP response element) 配列に結合し、転写調節を行う蛋白質として同定された。CRE-BP1/ATF-2 は細胞の成長や増殖に関わり、その主な発現場所として、サル脳、ラットの再生肝やヒトのガン組織などにその存在が確認されている。そして、最近 CRE-BP1/ATF-2 欠損マウスによる研究が報告され、CRE-BP1/ATF-2 は骨格形成や中枢神経系の発達に対して不可欠であることや、紫外線照射等による DNA 損傷のストレスにより核内原がん遺伝子産物の c-Jun とともに活性化されることも判ってきた。

CRE-BP1/ATF-2 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、C 末端側には塩基性ロイシンジッパー (b-Zip) 構造の DNA 結合ドメインを持っている。CRE-BP1/ATF-2 は、b-Zip を介して自分自身とホモダイマーを形成したり、c-Jun とヘテロダイマーを形成する。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 Zn^{2+} イオンが必要であり、そのドメインの N 末側約半分はアミノ酸の一次配列より C2H2 型の Zn フィンガー様モチーフを持っている。又、転写活性化ドメインの C

末側には、JNK(c-Jun N-terminal kinase)でリン酸化されるトレオニンがあり、転写活性化ドメインと DNA 結合ドメインが分子内で直接結合してお互いの機能をマスクしていると考えられている。我々は CRE-BP1/ATF-2 の転写制御の詳細を調べるために、CRE-BP1/ATF-2 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】

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。 ^{15}N 又は $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で均一ラベルした CRE-BP1N88 は、窒素源及び、炭素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1.5g/L)、 ^{13}C -glucose (2.0g/L) を含む M9 培地で培養した。超音波破碎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て、2.0~5.0mM の NMR サンプルを得た。多次元 NMR 測定には、分光計 Bruker DMX-600 を使用し、条件は 20mM リン酸緩衝液 pH6.3, 200mM NaCl, 5mM d-DTT, 30 μM ZnCl₂, 0.4mM NaN₃ で、温度は 300K で行った。 ^{15}N でラベルしたサンプルに関して、TOCSY-HMQC ($\tau\text{m}=100\text{ms}$)、NOESY-HMQC ($\tau\text{m}=50, 100, 150\text{ms}$) の 3 次元 2 重共鳴の測定を行い、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で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 と CBCA (CO)NH、アミノ酸残基のスピン系の同定には HBHA (CO)NH、HCCH-TOCSY などの 3 次元 3 重共鳴測定を行い、その NMR スペクトルを帰属した。現在、NMR スペクトルの解析より得られた情報をもとに蛋白質構造計算ディスタンス・ジオメトリーを行っている。

【結果と考察】

円偏光 2 色性 (CD) の実験と $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC の二次元 NMR の実験より、CRE-BP1N88 の構造安定化に Zn²⁺ イオンが必要であることが判った。構造計算ディスタンス・ジオメトリーの結果、CRE-BP1N88 の N 末側の Zn フィンガー様の立体構造は他の蛋白質の DNA 結合ドメイン中に見出された C2H2 型の Zn フィンガーの立体構造とほとんど同じであった。DNA 結合ドメイン中の Zn フィンガーでは DNA 主鎖と相互作用する塩基性アミノ酸が CRE-BP1N88 では系統的に他のアミノ酸に置換されていた。CRE-BP1N88 中のリン酸化部位を含んだ C 末側は特定の構造を取っていないようで、この部位は他の蛋白質と相互作用して始めて特定の構造をとるように変化すると考えられる。

【キーワード】

CRE 結合蛋白質、転写活性化ドメイン、多次元 NMR、立体構造解析

ながと いりたか、なかざわ けんいち、うだ ひろこ、まえかわ としお、
いしい しゅんすけ、にしむら よしふみ

NMRによるhU2AF⁶⁵の構造解析
 ○伊藤拓宏、武藤 裕、横山茂之
 東大・院・理

Structural analysis of hU2AF⁶⁵ by NMR spectroscopy

Takuhiko Ito, Yutaka Muto, and Shigeyuki Yokoyama

Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science,
 University of Tokyo

The hU2AF⁶⁵ (the large subunit of human U2 snRNP auxiliary factor) is one of the essential splicing factors. It binds to pyrimidine rich sequences near the 3' splice site in pre-mRNA and makes a core for the assembly of spliceosome. hU2AF⁶⁵ has three RNA-binding domains (RBDs) and we constructed a fragment consisting of the N-terminal two RBDs. We performed NMR measurements and determined the secondary structure of both RBD1 and RBD2, which have the typical folding pattern of RBD, $\beta\alpha\beta$ - $\beta\alpha\beta$. Both RBD1 and RBD2 have two aromatic amino acid residues side by side on the β -sheet surface, β 1 and β 3. Interestingly, RBD1 has a long loop, which consists of about 20 amino acid residues between β 2 and β 3, while RBD2 has a normal-length loop.

【序論】

hU2AF⁶⁵はスプライシングの際にpre-mRNAの3'スプライス部位の近傍に結合し、スプライソソーム形成の核となる分子量約54kDaの蛋白質である。hU2AF⁶⁵はRNA結合ドメイン(RBD)を連続して3つもち、約10残基ほどのピリミジン塩基に富んだ一本鎖RNA配列を特異的に認識し、結合する。我々はN末端側の2つのRBDをつながった状態で大量に発現し、可溶化する事に成功した。また、このRBD1-RBD2のみで標的RNAに結合する事を確認した。我々はつながった複数のRBDによる一本鎖RNAの認識機構を明らかにし、Sxl蛋白質などの他のRNA結合蛋白質とRNAの結合様式を比較するため、hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2のNMRによる構造解析を試みた。

【実験】

解析のために¹³C、¹⁵N二重安定同位体標識をした試料を作成した。測定は90% H₂O-10% D₂O 100mM リン酸バッファー (pH 6.5) 中、測定温度25°Cで行った。主鎖の帰属はHNCA, HNCOCA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCO, HNCACO, ¹⁵N-edited NOESYを用いて行った。側鎖の帰属はHBHA(CO)NHとHCCH-TOCSY, HCCH-COSYを用いて、二次構造の決定は¹⁵N-edited NOESY, ¹³C-edited NOESYを用いて行った。RBD1の部分の側鎖の帰属を助けるために、非標識のRBD1の試料も作成し、同様の条件で2D-NOESY, 2D-TOCSYを測定した。

【結果及び考察】

主鎖については、RBD2の領域については完全に帰属することができたが、RBD1については全体的にシグナルがブロードであり、数残基について帰属することができなかった。また約30アミノ酸残基からなるドメイン間のリンカー部分については、ほとんど帰属することができなかった。側鎖については、現在までに、RBD1に関してはC α 、C β 、H α を、RBD2に関してはC α 、C β 、H α 、H β を帰属し、現在も解析中である。二次構造については、帰属されたアミノ酸残基についてHN, H α に関してシグナルを解析したところ、現在までにRBD1とRBD2ともに図のような β シート構造を確認した (Figure)。また隣接残基のHN間のNOEなどから、RBD1とRBD2の両ドメインともに、 β 1と β 2の間と β 3と β 4の間にそれぞれ α ヘリックスを形成していることが示唆された。

Key Words : Splicing, hU2AF⁶⁵, RNA binding domain

いとう たくひろ、むとう ゆたか、よこやま しげゆき

RBD1、RBD2ともに、 β シート上の $\beta 1$ と $\beta 3$ に芳香族アミノ酸が並んで存在している。この領域はそれぞれRNP2、およびRNP1 (RBDに見られる保存配列)の一部にあたり、このような構造は、今までに三次構造が報告されている他のRBDにも見いだされている。hU2AF⁶⁵の場合にも、このように芳香族アミノ酸が隣接する β シート構造がRNAの認識に重要な役割を果たしていることが予想できる。

また、図のような β シートが確認されたことにより、RBD1の $\beta 2$ と $\beta 3$ の間には約20アミノ酸残基から成る長いループ構造が存在することが推測される。RBD1において帰属することのできなかつたアミノ酸はこのループ領域に集中していることや、一般的にRBDによるRNAの認識にはこの領域が重要であることが数々の実験から示唆されていることから、このループはhU2AF⁶⁵ RBD1のRNA認識機構を解明するうえで重要であると考えられる。

一方RBD2については典型的なRBDの配列及び二次構造を保存していることが示唆された。

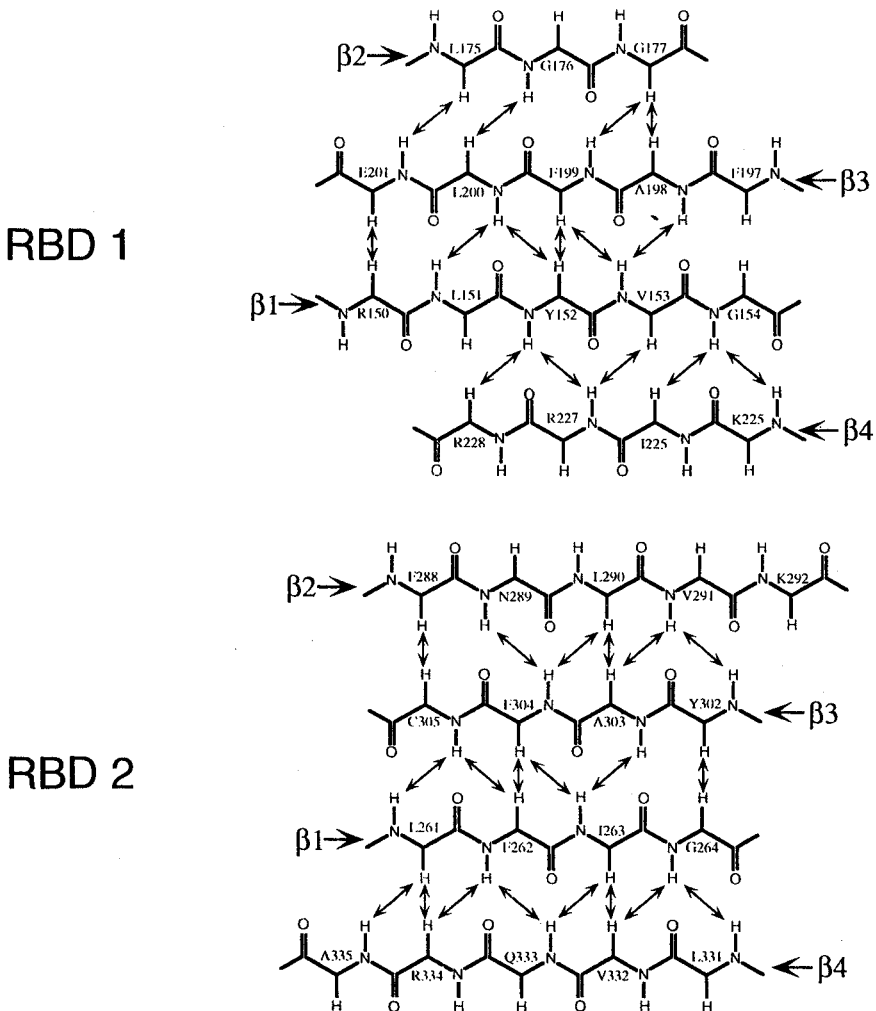


Figure The β -sheet structure of RBD1 and RBD 2 of hU2AF⁶⁵

Structural Analysis of Aptotoxin VII by NMR

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

○Kuniko Kobayashi, Jae-II 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. But, the modes of action for these peptides are not known.

Aptotoxin VII (Aps VII) is one of these toxins. It has 32 a. a. residues including 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 a three-stranded antiparallel β -sheet. The conformation is similar to that of ω -Conotoxin MVIIA determined in our previous study.

[序]

Aptotoxin VII 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。このクモ毒からは9種類のペプチドが単離されている。このうちの7種類は昆虫に筋肉麻痺を起こす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。この7種類のペプチドのうちの一つがAptotoxin VII (Aps VII) である。Aps VIIは32アミノ酸残基から成り、6個のCysが分子内で3本のジスルフィド結合を形成している。このCysのトポロジーは、我々がこれまでに構造決定したイモ貝の毒液由来のペプチド、 ω -Conotoxin MVIIA (ω -CTX MVIIA) と共通している。このことに注目してAps VIIの立体構造解析を行った。

Fig. 1. Primary structures of Aps VII and ω -CTX MVIIA.

キーワード：Aptotoxin VII、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

[実験]

ペプチドを化学合成し、重水および軽水中での2次元NMR測定を行った。DQF-COSY、TOCSY、NOESYを、各々288 K、298 K、310 Kの温度で測定した。併せて、288 Kにおいて、 ^{13}C -PFG-HSQCの測定と、重水素置換の実験も行った。

[結果と考察]

X-PLORでの計算の結果、最終構造17個を得た。RMSDは、主鎖原子で $0.68 \pm 0.11 \text{ \AA}$ 、全重原子で $1.48 \pm 0.15 \text{ \AA}$ であった。Aps VIIには3本の β ストランドから成る β シート構造が存在することがわかった。これと同様の β シートが ω -CTX MVIIAにも存在し、位置も共通している。また、全体の立体構造もよく似ていた。

Aps VIIでは、まだ活性部位がどこであるかわかっていない。一方、25残基から成る ω -CTX MVIIAでは、活性残基が同定済みであり、それはループ上に位置するTyr13である。Aps VIIにおいても同様のループが存在し、 ω -CTX MVIIAの活性残基Tyr13に相当する位置に、同様の芳香環を持つTrp16が存在している。このことから、Trp16はAps VIIの活性残基である可能性がある。

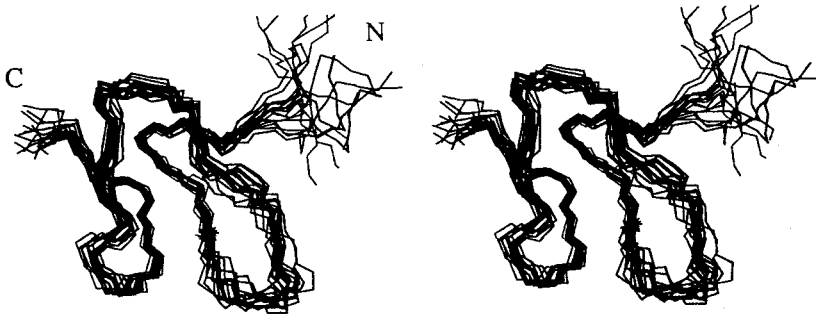


Fig.2. Stereopairs of backbone heavy atoms for the 17 converged structures of Aps VII.

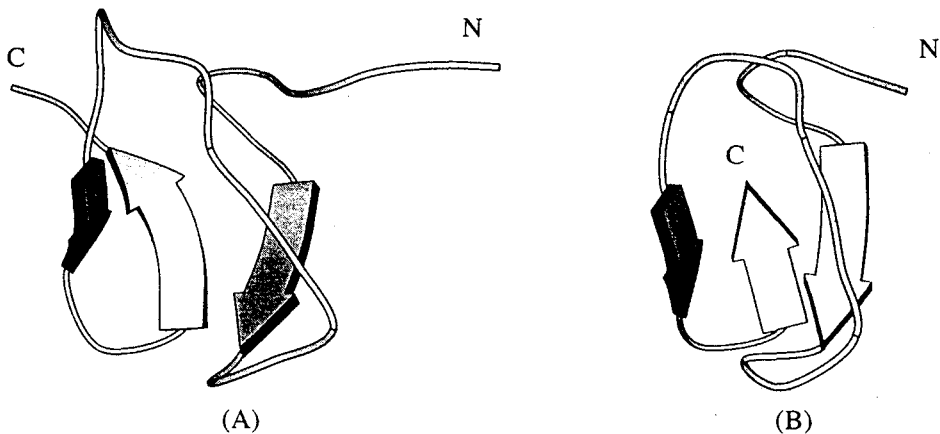


Fig.3. Comparison of the Molscript diagrams of (A) Aps VII and (B) ω -CTX MVIIA.

NMR 化学シフト変化の情報を用いた分子複合体モデリング
(生物工研¹、都臨床研²) ○中村春木¹、寺沢宏明²、A. Heger¹、
肥後順一¹、稲垣冬彦²

Complex structure modeling using NMR chemical shift change information
(BERI¹ and Tokyo Metropolitan Inst. Med. Sci.²) ○Haruki Nakamura¹, Hiroaki, Terasawa²,
Andreas Heger¹, Junichi Higo¹, and Fuyuhiko Inagaki²

Upon tight binding of two molecules, it is frequently observed that NMR chemical shifts change significantly. We propose a novel method that incorporates this information in the model building procedure, so that the atomic model of the complex structure is built without human manipulation. When the chemical shift of an atom is changed significantly, we call it an active atom. Then, we have added a heuristic restraint in the simulated annealing procedure. It gives no penalty when the active atom of a molecule is near at least one of active atoms in the other molecule, but it imposes a large penalty when the active atom is far from the other molecule. The structures of the individual molecules are formed and maintained by the intramolecular distance restraints. Results are shown for a model system and the actual Grb2-N SH3 domain with 1-Sos peptide, in which the complex structures can be rebuilt.

タンパク質-タンパク質あるいはタンパク質-核酸の相互作用における特異的分子認識機構の理解は、分子生物学における重要な課題であり、X線結晶解析法およびNMR-distance geometry法によって、分子複合体の立体構造が決定されつつある。しかし、NMR-distance geometry法においては、複合体界面が親水性の場合、多くの分子間距離情報を得るのが困難であるという本質的な問題がある。一方、複数の分子が複合体を形成する場合、界面およびその近隣の原子のNMR化学シフトには、しばしば大きな変化が観測される。この情報は、distance geometry法と異なり相手原子が特定されないため、従来のdistance geometry法における2つの原子間の距離制限に換えて、複合体形成のための制限である新たな E_{dock} という制限関数を導入した。 E_{dock} は、化学シフト変化が観測された片方の分子内の原子には、別の分子内のやはり化学シフト変化が観測された原子の少なくともどれか一つが、近隣にあるという制約を課す。また、それぞれの分子には、分子内距離制限を設け、立体構造を維持しておく。

このアルゴリズムの有効性を調べるため、立体構造が精度よく決定されているSH3とポリプロリン・ペプチドの複合体において、化学シフト変化が期待される界面およびその近隣の水素原子を拾い出し、モデル計算を行った。その結果、適宜なパラメータの選択によって、もとの複合体構造を再現することができた。この手法によって、Grb2-N SH3-1Sos複合体に対し、分子間NOE情報を使わずに、分子内NOEと主鎖/側鎖原子の化学シフト変化の観測値のみを用いた複合体構造の再構築を試みたので、その結果を報告する。

molecular docking, model building, chemical shift perturbation, simulated annealing, SH3

なかむら はるき、てらさわ ひろあき、アンドレアス ヒーガー、ひご じゅん
いち、いながき ふゆひこ

Use of deuterated proteins in TRNOE experiments

(Faculty of Engineering, Gunma University¹, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences²)○Riko Hirano¹, Takeshi Tanaka¹, Hideki Kusunoki^{1,2}, Toshiyuki Kohno²,Kaori Wakamatsu¹

Transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE) has been used to analyze conformations of peptides bound to large proteins. However, this method is suspected to show indirect NOEs relayed via protein protons. In addition, leakage of peptide proton magnetization to proteins decreases intensity of (direct) TRNOE cross peaks. Since deuteration of proteins is considered to solve these problems, we prepared a deuterated protein and analyzed the effect of protein deuteration on TRNOE spectra. Comparison of TRNOE spectra of mastoparan-X in the presence of deuterated and non-deuterated Gi1 α demonstrated that the protein deuteration can eliminate indirect TRNOE via protein and increase (direct) TRNOE cross peak intensities.

<序論>

蛋白質に結合したペプチドの構造を解析する方法の1つにTRNOEがある。しかしこの方法には蛋白質のプロトンを経由した間接的なNOEが生じる可能性がある。またペプチドの磁化が蛋白質に流れてNOE強度が低下することが予想される。これらの問題は蛋白質を重水素化することで解決できると考えられる。そこで本研究では重水素化したG蛋白質を調製し、G蛋白質を直接活性化できるマストパランX (MP-X)を用いて、MP-XのTRNOEに及ぼす蛋白質の重水素化の効果を調べた。

<実験>

重水素化蛋白質の調製: Gi1 α (Histidine-tag 付き) は大腸菌を用いて大量発現した。蛋白質の重水素化にはグルコース (10 g/L) を炭素源とした100%重水のM9最小培地を用いた。培養後の精製はすべて軽水 Buffer 中で行った。TOF-MSで分子量を決定したところ交換不可能な水素原子のうち69%が重水素化されていることがわかった。

NMR測定: NMRの測定はBruker社ARX-400を用いて20℃で行った。重水素化Gi1 α と重水素化していないGi1 α の存在下でMP-Xの2D¹H-TRNOESYを測定した(混合時間100~300ms)。サンプル条件は6.4 mM MP-X、0.125 mM Gi1 α 、10 mM 酢酸ナトリウム、0.1 mM DTT、pH 6.0である。

<結果・考察>

重水素化していない Gi1 α 存在下、混合時間 300 ms の TRNOE スペクトルには 7 Å 以上離れたプロトン間の間接的な NOE が観測されたが (Fig. 1B、矢印)、重水素化 Gi1 α 存在下でのスペクトルにはこのシグナルは観測されなかった (Fig. 1A)。そこで蛋白質の重水素化は間接的な NOE を除去するために有効であることが確認された。また混合時間 100 ms の TRNOE スペクトルを比較すると重水素化 Gi1 α を用いたほうが 1.5~2 倍ほど NOE 強度が増加していた。これらのことから、蛋白質の重水素化は TRNOE 実験において間接的な NOE を除去するだけでなく、直接的な NOE の強度を増大させるためにも効果的であると考えられる。

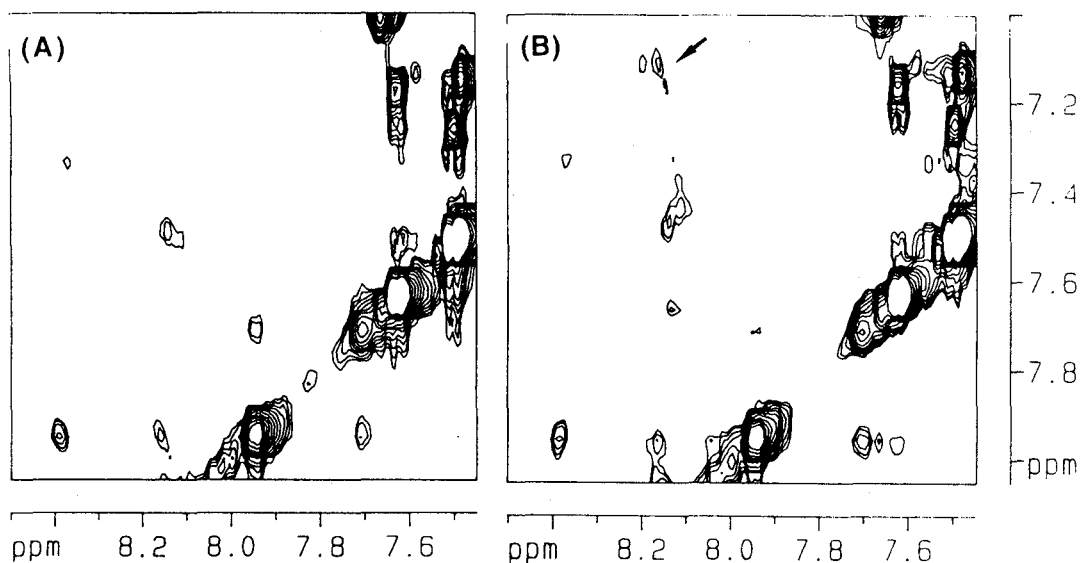


Fig. 1. ^1H -TRNOESY spectra of MP-X in the presence of deuterated (A) and non-deuterated (B) Gi1 α ($\tau_m = 300$ ms)

TRNOE 法、重水素化蛋白質、蛋白質小分子相互作用

ひらの りこう、たなか たけし、くすのき ひでき、こうの としゆき
わかまつ かおり

NMRによる Yeast Ubiquitin Hydrolase の解析

(¹理研・遺伝生化学, ²三菱化学生命研・構造解析, ³東京医科歯科大・歯, ⁴北里大・理・物理・分子動力学)

○伊藤 隆¹, 坂本泰一², Sundaresan Rajesh^{1,3}, 岩本真理子², 小寺義男^{2,4}, 土田信夫³, 柴田武彦¹, 河野俊之²

NMR studies of Yeast Ubiquitin Hydrolase

Yutaka Ito¹, Taiichi Sakamoto², Sundaresan Rajesh^{1,3}, Mariko Iwamoto², Yoshio Kodera^{2,4}, Nobuo Tsuchida³, Takehiko Shibata¹ and Toshiyuki Kohno²

¹Laboratory of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),

²Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, ³Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University,

⁴Department of Physics, Kitasato University

Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH, 236 amino acid residues, 27kDa) is involved both in the processing of ubiquitin precursors and ubiquitin-protein fusions. YUH recognizes and hydrolyses a peptide bond at the C-terminal glycine of ubiquitin. The amino acid sequence of YUH lacks significant similarities to other known proteins, including other ubiquitin-specific processing proteases.

We present here the backbone/sidechain assignment of YUH, obtained from triple-resonance three dimensional NMR experiments with deuterium decoupling on a 50%-²H/¹³C/¹⁵N-labelled sample. The secondary structure of YUH has also been examined by the Chemical Shift Index method and the analysis of sequential NOEs obtained from three dimensional NOE experiments on a 50%²H/¹⁵N-labelled YUH.

Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH, アミノ酸 236 残基)は, polyubiquitin として発現される ubiquitin 前駆体や ubiquitin との fusion タンパク質を認識し, ubiquitin ドメイン C 末端の Gly 残基の後ろでペプチド結合を切断する活性を持つ。YUH は, 酵母において同様の活性を有する UBP ファミリーを含め, 既知の protease と一次構造上の相同性が低いことから, ペプチド鎖切断のメカニズムは不明である。われわれは YUH の高次構造を NMR 法で解析し, ubiquitin ドメインとの相互作用のメカニズム, および酵素活性発現のメカニズムを解明することを目指している。

試料の調製および NMR 測定 分子量約 27k の YUH について解析を行うために, YUH を ¹³C/¹⁵N でユニフォーム標識するのに加えて, さらに ²H で 50%標識を行った。また ¹⁵N-separated NOESY 等の測定のために, 50%-²H/¹⁵N 標識 YUH も調製した。

主鎖および側鎖シグナルの帰属のために, 50%-²H/¹³C/¹⁵N-YUH について, HNCA, HN(CO)CA, CBCANNH, CBCA(CO)NNH, CC(CO)NNH, HBHA(CBCACO)NNH, H(CCCO)NNH, HA(CACO)NNH の測定を行った。NOE 情報の収集のためには, 50%-²H/¹⁵N-YUH について 3D ¹⁵N-separated NOESY-HSQC, 3D ¹H-¹⁵N HSQC-NOE-HSQC の測定を行った。

Keywords: ランダム重水素標識, 選択的プロトン標識, triple-resonance NMR

いとう ゆたか, さかもと たいいち, Sundaresan Rajesh, いわもと まりこ, こでら よしお, つちだ のぶお, しばた たけひこ, こうの としゆき

結果および考察 現在までに、N末端の Met 残基と 11 個の Pro 残基を除く 224 残基のうち、215 残基 (96%) について、主鎖 $^1\text{H}_\text{N}$, $^{13}\text{C}_\alpha$, ^{15}N 核の帰属を完了した. 図には CBCANNH, CBCA(CO)NNH を用いた帰属の一部を示した. 主鎖 $^1\text{H}_\alpha$ については約 85% について帰属した. 側鎖については、約 87% の ^{13}C 核、約 75% の非交換性 ^1H 核について(芳香環の ^1H , ^{13}C 核を除く)帰属を行うことができた. 50%- ^2H 標識を導入することによって、27kDa の YUH においても感度良く (H)CC(CO)NNH, H(CCCO)NNH の測定を行うことができ、分離のよい主鎖 ^{15}N 核の化学シフトを用いることによって、容易に帰属を行うことができた.

帰属された $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^1\text{H}_\alpha$ 核についての Chemical Shift Index, および $\text{NOE}(\text{H}_{\alpha(i-1)}-\text{H}_{\text{N}(i)})$, $\text{NOE}(\text{H}_{\text{N}(i-1)}-\text{H}_{\text{N}(i)})$ のパターンから YUH の 2 次構造を推定した. この結果, YUH にはランダムコイルになっている領域が比較的多いと考えられる.

YUH の 3 次構造解析については、選択的 ^1H 標識試料を用いて、global fold の決定を試みている. YUH-ubiquitin 複合体については、YUH 側と ubiquitin 側の結合インターフェイスの同定を行っており、最終的には 35kDa の複合体の構造解析を目指す.

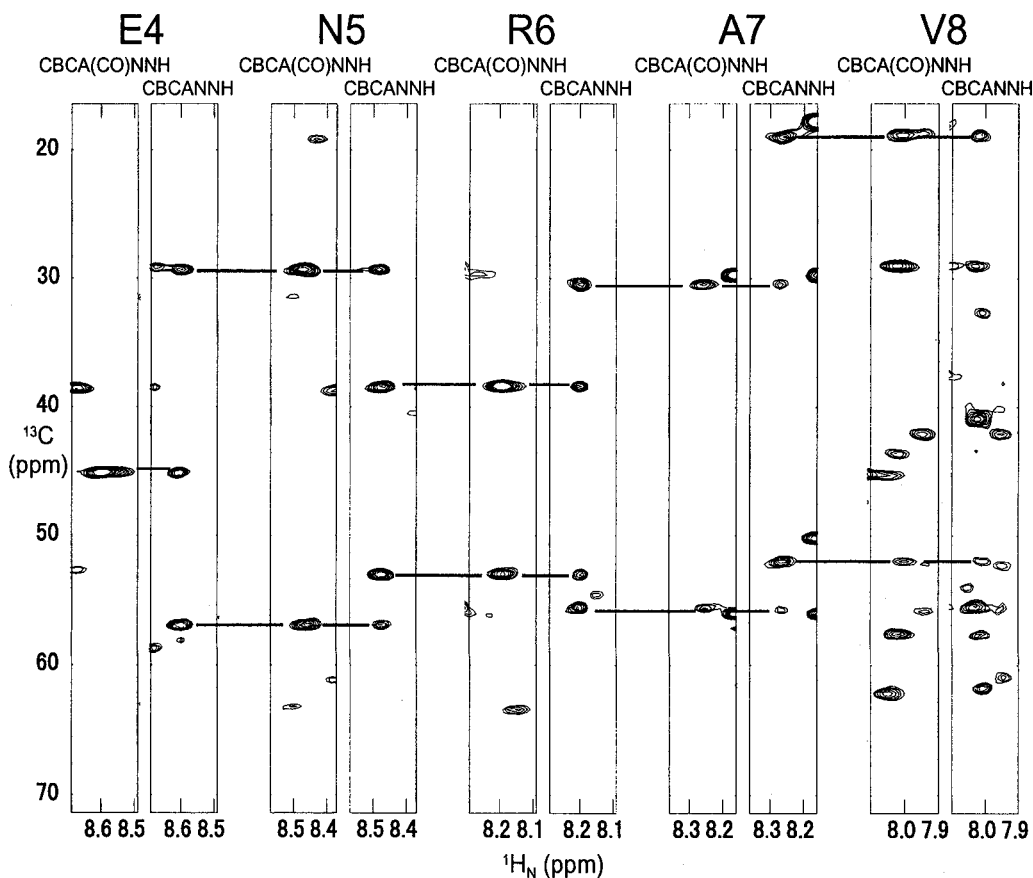


Figure: $^1\text{H}_\text{N}(\text{F}_3)-^{13}\text{C}(\text{F}_2)$ cross-sections corresponding to the ^{15}N frequencies (F_1) of residues E4 – V8 of the 3D CBCA(CO)NNH and CBCANNH spectra of 50%- $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled YUH. Intra- and interresidue connectivities are represented by lines.

High resolution ^1H NMR study of the micelle-bound structure of the S4 segment of the sodium channel protein.

Kazuo Kimura and Ken Kawaguchi

Toray Research Center, 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 $\alpha_i\text{-NH}_{i+2}$ NOEs were observed besides the NOEs characteristic of α helix, indicative of 3_{10} helical structure. The structure was supported by the comparison of the chemical shifts between the wild type and the mutants.

【はじめに】

ナトリウムチャンネルは電位依存性のイオンチャンネルで、そのS4セグメントは電位センサーと推定されている。S4セグメントを含む各セグメント(S1~S6)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S4ペプチドについて報告する。S4は、その配列上で3残基ごとにArg, Lysが現われるという際立った特徴をもっている。このためにS4は膜電位センサーと考えられているが、センサーの機構は明らかにはなっていない。いろいろなモデルが提唱されているが、推測の域を出ていない。このような問題に対して、構造上の実験的な知見を提供することを目的としている。

・ラット脳由来ナトリウムチャンネルの第1番目のモジュールのセグメントに対応するS4AはProを含むため(P18)、ヘリックス構造が不安定になる。今回は、ProをLysまたはSer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

キーワード：ペプチド、S4、ナトリウムチャンネル、ミセル、ヘリックス

○きむら かずお、かわぐち けん

チドを合成し、それぞれ S4Kおよび S4S と名づけて解析した。

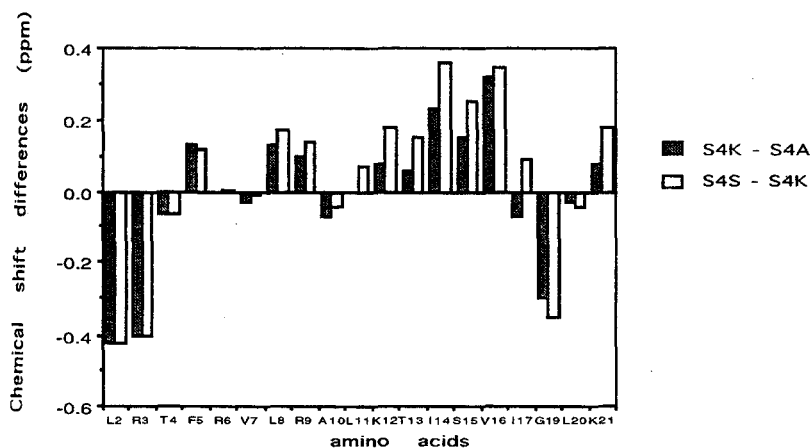
	3	6	9	12	15	18	21
S4A :	ALRTFRVLRALKTISVIP GLK						
S4K :	Ac- ALRTFRVLRALKTISVIKGLK -NH ₂						
S4S :	Ac- ALRTFRVLRALKTISVIS GLK -NH ₂						

【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&リターン法または wet 法を用い、25~200 ms の混合時間で測定した。なお、ジャンプ&リターン法では、Shaped Pulse と PFGによって水ピークを選択的に dephase するパルスを組み込んだシーケンスを作成し使用した。wet-NOESYはLC-NMRで用いられているシーケンスを使用した。

【結果と考察】

S4ペプチドはすべて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, S4S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。Pro18 からLys18またはSer18に変異しているため、Lys18/Ser18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きことから、Lys18/Ser18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_{3,10}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示唆される。今後、HETLOCによる2面角の解析を進めていく予定である。



The amide chemical shift differences between S4A and S4K or S4S

¹H-NMRによる異常ヘモグロビン赤血球内・水性状の研究

(¹日本医大・生理, ²岐阜大, ³岐阜大・医・生理, ⁴藤田保衛大・衛生)
上坂伸宏¹, ○曾我美 勝², 恵良聖一³, 加藤一夫⁴, 永井直樹³

Magnetization Transfer Characteristics in Red Blood Cell with Normal or Abnormal Hemoglobin

(¹Dept. of Physiol., Nippon Med. Sch., ²Gifu Univ., ³Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., ⁴Sch. of Health Sci., Fujita Health Univ.) N. Uyesaka¹, ○M. Sogami², S. Era³, K. Kato⁴, N. Nagai³

Hemoglobin (Hb)-water interaction in red blood cells (RBC) with normal or unstable Hb, such as Hb Yokohama (Hb-Y), Hb Koeln (Hb-K), has been studied using intermolecular cross-relaxation times ($T_{IS}(H_2O)$) from irradiated protein protons to observed water protons (f_2 -irradiation from -100 to 100 ppm; $\gamma H_2/2\pi \sim 250$ Hz). (1) Cross-relaxation spectra ($1/T_{IS}(H_2O)$ vs f_2 (ppm)) showed that $1/T_{IS}(H_2O)$ values increase in the following order: normal RBC \ll RBC (Hb-K) $<$ RBC (Hb-Y), indicating the presence of Hb aggregates, including Heinz bodies, in RBC (Hb-Y). (2) Light, middle and dense fractions (L-, M- and D-fr.) of RBC (Hb-Y) and/or RBC (Hb-K) were prepared using a discontinuous Percoll density gradient. Plots of $T_{IS}(H_2O)[L\text{-fr.}]/T_{IS}(H_2O)[D\text{-fr.}]$ or $T_{IS}(H_2O)[M\text{-fr.}]/T_{IS}(H_2O)[D\text{-fr.}]$ vs f_2 (ppm) were parallel to the abscissa except the trough from -10 to 15 ppm. Parallel and trough regions may mainly reflect differences in Hb aggregation and bound water, respectively, between two subfractions.

[はじめに] 水と高分子の相互作用を高分子の f_2 照射部位より水への分子間交差緩和時間 ($T_{IS}(H_2O)$, 以下の文中では単に T_{IS} と略す) を用いて研究を進めてきた。最近, 各種の親水性合成高分子ゲル(ソフトコンのタクト・レンズ)の $1/T_{IS}$ vs Dry Weight (W(%)) に於いて, $20 \text{ ppm} < f_2 < -20 \text{ ppm}$ のとき, モノマー組成に関係なく $1/T_{IS}$ vs W(%) は, ほぼ直線になるが, $20 \text{ ppm} > f_2 > -20 \text{ ppm}$ ではモノマー組成に依存し, 即ちOH基数が多いほど同じW(%)でも $1/T_{IS}$ が大きくなることを見出した(恵良ら(1))。この結果を用い, -100~100 ppm を f_2 照射し, 正常及び異常ヘモグロビン(Hb Yokohama (Hb-Y), Hb Koeln (Hb-K))赤血球内・水性状を T_{IS} を用いて研究した。

キーワード: 異常ヘモグロビン, 分子間交差緩和, 結合水, 分子集合状態

うえさか のぶひろ, そがみ まさる, えら せいいち, かとう かずお, ながい なおき

[実験材料と方法] ヘマトクリット管にパックした正常赤血球 (Normal RBC), 異常ヘモグロビン赤血球 (RBC (Hb-Y), RBC (Hb-K))及びPercoll不連続密度勾配法を用いてRBC (Hb-Y), RBC (Hb-K)をlight, middle, high density fraction (L-fr., M-fr., D-fr.)に分画した試料及びラット肝組織, Hela細胞等を測定した. また, ウシ血漿アルブミン(BPA)溶液, BPAゲル(BPA*gel)をモデル系(5 mm ϕ)として用いた. T_{IS} はAkasakaの方法(2)を用い, Bruker社AM 500を用いて測定した. S, I 2スピン系を仮定し, S スピン系プロトンラジオ波で f_2 照射し, Iスピン系の磁化変化を観測すると, [1],[2]式のように変化する(飽和移動法).

$$dl/dt = -(I - I_0)/T_1 - I/T_{IS} \quad [1]$$

$$I = I_{\infty} + (I_0 - I_{\infty}) \exp(-\tau/T_1^*) \quad [2]$$

I_0, I_{∞} は長時間 f_2 照射する前, 後のI スピン系の磁化, $1/T_1^* = 1/T_1 + 1/T_{IS}$ である. また, I_{∞}/I_0 は[3]式のようになる.

$$I_{\infty}/I_0 = T_1^*/T_1 \quad [3]$$

[3]式を用い飽和移動の作用スペクトル, $[1 - (I_{\infty}/I_0)]$ vs f_2 (ppm) (Action Spectra)及び交差緩和スペクトル, $1/T_{IS}$ vs f_2 (ppm) (Cross-relaxation Spectra)を-100~100 ppmにわたって, $\gamma H_2/2\pi \sim 250$ 又は 350 Hzの f_2 照射を用いて測定した.

[結果と考察] BPA溶液, BPA*gelの作用スペクトル, 交差緩和スペクトルを, それぞれ図1A, 1Bに示した(f_2 照射: $\gamma H_2/2\pi \sim 350$ Hz). 図1Aの作用スペクトル, $[1 - (I_{\infty}/I_0)]$ vs f_2 (ppm)はBPA溶液(\diamond)とBPA*gel(\bullet, \circ)の間に大きな差を示したが, 4.83%(\bullet), 12.39%(\circ)のBPA*gel間にはあまり差が無かった. 然しながら, 交差緩和スペクトル, $1/T_{IS}$ vs f_2 (ppm)は図1Bに示すように4.83%(\bullet), 12.39%(\circ)BPA*gel及び12.0%BPA溶液(\diamond)の何れの間にも大きな差が観測された. BPA*gel交差緩和スペクトルのブロード成分は, ゲル内の高分子集合体(凝集体)の寄与により, 0~10 ppmに於ける急峻なピークはタンパク質の周囲の結合水又は構造化した水によるのだろう(恵良ら(1, 3)). 中性領域, 8.23 M尿素中では観測されなかったが, 卵白アルブミン(OVA; 1.50%, 5.32 M尿素, pD 3.64; α ヘリックス $\sim 0\%$)に於いて, 0~10 ppmに於ける急峻な, しかも, 12.39%BPA*gel(図1B)より大きな $1/T_{IS}$ ピークが報告されている(3).

$1/T_{IS}$ 又は T_{IS} vs f_2 (ppm)の何れを用いても T_{IS} 値全プロファイルを比較し, 高分子集合体の寄与(図1Bのブロード成分)と0~10 ppmの結合水の寄与を同時に区別して表示することが困難なため図1B(Δ ; f_2 照射, 350 Hz)に示すように, T_{IS} 値の比 vs f_2 (ppm)プロットを試みた. T_{IS} (4.83% BPA*gel)/ T_{IS} (12.39% BPA*gel) vs f_2 (ppm)(図1B, Δ)は, ほぼ横軸に平行になり, ゲル性状, 即ち高分子集合状態及び結合水の類似性を示唆した. 図2A(f_2 照射, 250 Hz)に, S期(\circ), M期(\bullet), 無処置(Δ)Hela細胞の $1/T_{IS}$ vs f_2 (ppm)及び $T_{IS}(\bullet)/T_{IS}(\circ)$ vs f_2 (ppm) (\square), $T_{IS}(\Delta)/T_{IS}(\circ)$ vs f_2 (ppm) (\diamond)を示した. Hela細胞各期の T_{IS} 値比は横軸に平行になり, 互いに性状の類似していることを示唆している(東海大・短期大学部・福崎 稔らとの共同研究). 図2B(f_2 照射, 250 Hz)に, RBC(Hb-Y)のD-fr. (\diamond), 正常RBC (N#1(Δ), N#2(\circ), N#3(\blacktriangle))の交差緩和スペクトル及び T_{IS} (N#1)/ T_{IS} (N#3) vs f_2 (ppm) (\square)を示した. T_{IS} (N#1)/ T_{IS} (N#3)もHela細胞の結果と同様にほぼ横軸に平行であった.

RBC(Hb-Y)のL-fr. (∇), M-fr. (\blacktriangle), D-fr. (\triangle)の交差緩和スペクトル及び T_{1s} 値比, $T_{1s}(L)/T_{1s}(D)$ (\diamond), $T_{1s}(M)/T_{1s}(D)$ (\circ)を図3A(f_2 照射, 250 Hz)に示した. 序文に述べたソフトコンタクト・レンズ(1)の高分子サイズの寄与の大きい $20 \text{ ppm} < f_2 < -20 \text{ ppm}$ では T_{1s} 値比は, ほぼ横軸に平行になり, 例えば $T_{1s}(M)/T_{1s}(D) \sim 2.5$ (\circ)となり, RBC(Hb-Y)のD-fr.内には, T_{1s} を短縮する大きなHb集合体の存在を示唆した(2). ソフトコンタクト・レンズのモノマー組成, 即ちOH基数の寄与の大きい $20 \text{ ppm} > f_2 > -20 \text{ ppm}$ では, 図3Aに示すような谷になった. この領域の f_2 照射では, RBC内水性状(結合水量)の変化が少ないことを示唆している. RBC(Hb-K)のL-fr. (∇), M-fr. (\blacktriangle)及び未分画RBC(\diamond)の交差緩和スペクトル及び T_{1s} 値の比, $T_{1s}(\nabla)/T_{1s}(\blacktriangle)$ (\circ), $T_{1s}(\diamond)/T_{1s}(\blacktriangle)$ (\square)を図3B(f_2 照射, 250 Hz)に示した. 未分画RBC(Hb-K)とそのM-fr.の T_{1s} 値比(\square)は ~ 1 で, ほぼ横軸に平行になり, 図2A, 2Bに類似しており, RBC(Hb-K)の $T_{1s}(\nabla)/T_{1s}(\blacktriangle)$ プロット(\circ)はRBC(Hb-Y)の対応したプロットに良く似ていた.

前述アンダーラインの実験結果(1)を用い, 赤血球内に於ける水への磁化(飽和)移動において, $-100 \sim 100 \text{ ppm}$ の f_2 照射を用いて高分子サイズの寄与及び結合水量の寄与のグローバルな分離を試みた.

[文献] (1) 恵良聖一, 曾我美 勝, 紀ノ定保臣 等, 第36回NMR討論会ポスター#50 (2) K. Akasaka (1981) J. Magn. Reson. 45, 337-343; K. Akasaka (1983) ibid. 51, 14-25; K. Akasaka, R. Ishima, S. Shibata (1990) Physica B 164, 163-179 (3) M. Sogami, S. Era (1997) Int. J. Peptide Res. (in press)

[図説明]

Figs. 1A & 1B Action spectra (1A) and cross-relaxation spectra (1B) for BPA solution (14.39%, 0.10 M NaCl, pD 7.1; \diamond) and BPA*gel (0.10 M NaCl, pD 4.0; \circ , 14.39%; \bullet , 4.83%), obtained by f_2 -irradiation at $\gamma H_2/2\pi \sim 350 \text{ Hz}$ at 25 °C. (\triangle) shown in Fig. 1B(r-ordinate scale), $T_{1s}(4.83\% \text{ gel})/T_{1s}(14.39\% \text{ gel})$.

Fig. 2A Cross-relaxation spectra (l-ordinate scale) and ratios of T_{1s} values (r-ordinate scale) for S(\circ), M(\bullet) and random (\blacktriangle) phases, obtained by f_2 -irradiation at $\gamma H_2/2\pi \sim 250 \text{ Hz}$ at 25 °C. (\square), $T_{1s}(\bullet)/T_{1s}(\circ)$; (\diamond), $T_{1s}(\blacktriangle)/T_{1s}(\circ)$.

Fig. 2B Cross-relaxation spectra (l-ordinate scale) for normal RBC(\triangle , N #1; \circ , N #2; \blacktriangle , N #3) and D-fr. of RBC(Hb-Y) (\diamond), and ratios of T_{1s} values (r-ordinate scale) for normal RBC (\square , $T_{1s}(N \#1)/T_{1s}(N \#3)$), obtained by f_2 -irradiation at $\gamma H_2/2\pi \sim 250 \text{ Hz}$ at 25 °C.

Fig. 3A Cross-relaxation spectra (l-ordinate scale) for L(∇), M(\blacktriangle) and D(\triangle) fr. of RBC (Hb-Y), and ratios of T_{1s} values (r-ordinate scale; \diamond , $T_{1s}(L\text{-fr.})/T_{1s}(D\text{-fr.})$; \circ , $T_{1s}(M\text{-fr.})/T_{1s}(D\text{-fr.})$), obtained by f_2 -irradiation at $\gamma H_2/2\pi \sim 250 \text{ Hz}$ at 25 °C.

Fig. 3B Cross-relaxation spectra (l-ordinate scale) for L(∇), M(\blacktriangle) and unfractionated (\diamond) RBC(Hb-K), and ratios of T_{1s} values (r-ordinate scale; \circ , $T_{1s}(L\text{-fr.})/T_{1s}(M\text{-fr.})$; \square , $T_{1s}(\text{unfr.})/T_{1s}(M\text{-fr.})$), obtained by f_2 -irradiation at $\gamma H_2/2\pi \sim 250 \text{ Hz}$ at 25 °C.

Fig. 1A

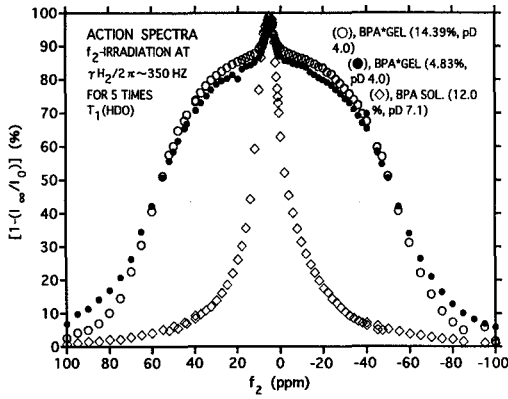


Fig. 1B

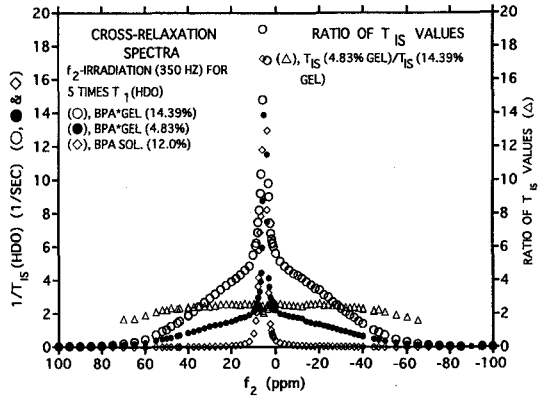


Fig. 2A

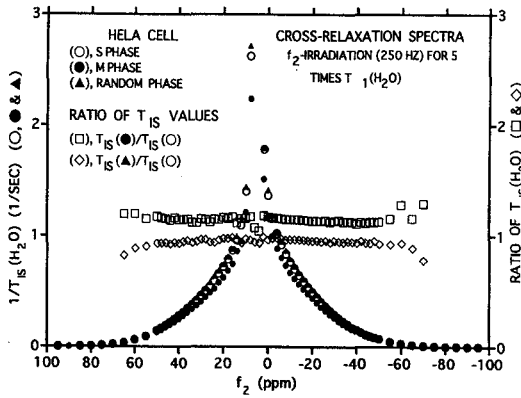


Fig. 2B

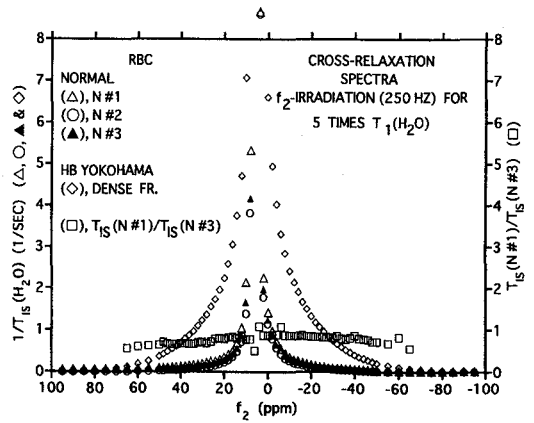


Fig. 3A

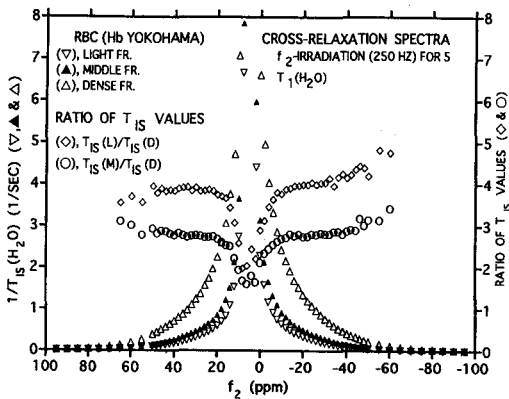
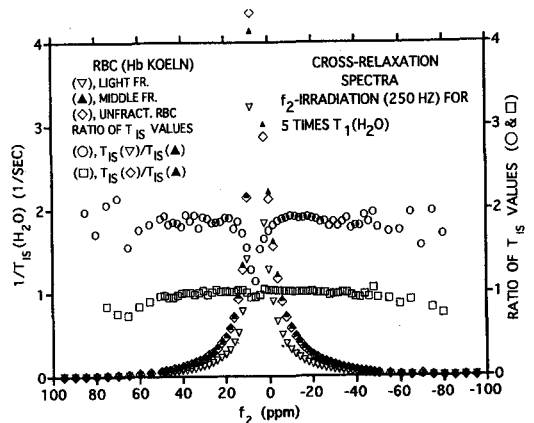


Fig. 3B



ヒト好中球 NADPH オキシダーゼ p47 PB2 domain の NMR 解析

(生物分子工学研究所¹、九州大学医学部²、東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンター³) ○廣明秀一¹、住本英樹²、伊藤隆司³、神田大輔¹

NMR study of PB2 domain of human neutrophilic lymphocyte NADPH oxidase, p47^{phox}.

(Dept. of Structural Biology, Biomolecular Engineering Research Institute¹; Dept. of Biochemistry, Kyushu University, School of Medicine²; Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo³) Hidekazu HIROAKI¹, Hideki SUMIMOTO², Takashi ITO³, and Daisuke KOHDA¹

NMR study of PB2 domain (phox and Bem homology 2) of p47^{phox} NADPH oxidase is ongoing. PB2, also called PX domain, is newly found homologous sequence of unknown function, which is widely spread in p47^{phox}, p40^{phox}, Yeast Bem1p, and many other proteins. In NADPH oxidase, PB2 is important for regulation of its enzymatic activity. NMR analysis of ¹³C/¹⁵N labelled p47-PB2 and its structure determination will lead us to understand the biological role and mechanism of action of PB2 domains.

[序論]

PB2 (phox and Bem homology 2) ドメインは、近年新たに発見されたドメインである。PB2 ドメインは、ヒト好中球の捕食作用に関わる NADPH オキシダーゼの可溶性サブユニット p47^{phox}、p40^{phox} 及び、酵母の出芽部位と細胞極性決定の制御因子 BEM1 で配列上相同性のある領域として知られていた(1)。これはその後、PX ドメインとして Type III PI3 キナーゼを始めとする様々な蛋白質に、種を超えて出現するモジュールとして報告され(2)、その保存されているプロリンに富む領域が SH3 ドメインの結合部位ではないかと推測されているが、構造を含め未知の点が多い。p47^{phox} PB2 ドメインは、NADPH オキシダーゼの活性の制御に重要であるが(3)、その具体的な機能はまだ明らかにされていない。今回、我々は、NMR による解析と溶液中の PB2 ドメインの構造が、その未知の機能の解明に有力な手がかりを与えることを期待して、種々の実験を行った。

[実験]

1. 大量発現系の検討

NMR 実験に適した PB2 ドメインを調製するため、ヒト p47^{phox}、p40^{phox} および *S. cerevisiae* Bem1 の PB2 ドメインについて、GST 融合タンパク発現系と His タグ発現系について発現、可溶化および精製条件を検討した。また p47^{phox} については N 末端 17 残基を欠失したものについても検討した。

キーワード：PB2 ドメイン、多次元 NMR、分子認識、SH3 ドメイン

ふりがな：ひろあきひでかず、すみもとひでき、いとうたかし、こうだだいすけ

2. 溶液中の会合状態の検討と NMR 測定条件の至適化

動的光散乱装置 DynaPro 801TC (Protein Solutions) を利用して、溶液中の見かけの分子量を測定し、塩濃度と pH について検討した。また、CD によりサンプルの熱安定性についても検討した。それに基づいて、多核 NMR 実験を行う条件を決定した。

3. NMR 測定

NMR 測定は、Bruker DMX600 および DMX750 を用いて行った。 ^1H - ^{15}N HSQC, ^{15}N edited TOCSY, ^{15}N edited NOESY, HNCA, HNC0, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, ^{13}C -CT-HSQC をそれぞれ測定した。

[結果と考察]

我々は p47-PB2 (130 アミノ酸, MW 15kDa) を、GST 融合発現系を用いて大腸菌から約 4mg/l の平均収量でサンプルを調製する系を確立した。他の PB2 ドメインの発現系は、いずれも蛋白質が不溶性となり、大量発現は困難であった。以後の実験は p47-PB2 について行うことにし、定法により非標識、 ^{15}N 標識および $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 二重標識したサンプルを得た。

p47-PB2 は CD で α - β 蛋白のパターンを示し、50°C まで安定な構造を保っていることがわかった。pH 6.5 で ^1H - ^{15}N HSQC を測定したところ、分離のよい良好なスペクトルを得たが、同じ条件で ^1H - ^{13}C constant time (26ms) HSQC を測定したところ S/N の悪いスペクトルしか得られなかった。このことから p47-PB2 は溶液中で多量体を形成していて、 ^{13}C および ^{15}N の緩和時間が短いことが予想された。ゲルろ過による実験では p47-PB2 は単量体の位置で溶出されていたため、この現象は NMR 測定条件のような濃厚溶液(0.5~1.0 mM)で特徴的であると予想された。動的光散乱により、p47-PB2 の見かけの分子量が、20K から 45K まで濃度依存的に増加することが確認された。また同様の分子量増加は温度を 20°C から 45°C まで上昇させることでも見られた。このことから、p47-PB2 は濃厚溶液中で非特異的に自分自身で弱く会合して、アグリゲーションを形成していることがわかった。またその会合は疎水的な相互作用によるものである。

動的光散乱を用いたスクリーニングを行った結果、50mM リン酸緩衝液(pH 5.5)、5~10% グリセロール存在下で、見かけの分子量が 18K まで小さくなることがわかった。この条件での NMR を測定したところ、 ^1H - ^{15}N HSQC のシグナルの位置はほとんど変化しないものの HNCA スペクトルの感度に著しい改善を見た。

[文献]

- (1) Sumimoto, H., et al., *International Symposium Membrane Proteins, Structure, Function and Expression Control*, Kyushu University Press (Japan), 1997, p235-244.
- (2) Ponting, C. P., *Protein Science*, 5 (1996) 2353-2357
- (3) 第 70 回 日本生化学会大会(1997,金沢)

大腸菌 Ada 蛋白質 N 端 16K 部分の構造と DNA 認識
(生物工研) ○秋友由子、神田大輔、廣明秀一、武藤隆則、森川
耿右

Structure and DNA recognition of *E. coli* Ada protein
N-terminal 16K fragment
(Biomolecular Engineering Research Institute)

○Yoshiko Akitomo, Daisuke Kohda, Hidekazu Hiroaki, Takanori Muto, Kosuke
Morikawa

The *Escherichia coli* Ada protein repairs methylated DNA by direct methyl transfer from DNA to its Cys69. After the Cys69 methylation, Ada binds the promoter regions of *ada* and *alkA* genes with high affinity. We have been examining the structure and DNA-recognition of N-terminal 16kDa fragment (N-Ada16K) and its Cys69 methylated form (Me-Ada16K) by NMR spectroscopy. The ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -NOE measurements and comparison of the ^{15}N -SQC spectra showed two-domain structure of N-Ada16K. By analysing the NMR spectra of the complex of Me-Ada16K and 18mer-DNA containing the *ada* promoter sequence, we concluded that Me-Ada16K bound to the *ada* promoter with a HTH motif in the C-terminal domain irrespective of Cys69 methylation and the second DNA-binding site around Cys69 in the N-terminal domain in Cys69 methylation dependant manner.

大腸菌 Ada 蛋白質(39kDa)は、メチル化損傷を受けた DNA からメチル基を自身の Cys 残基に転移して DNA を修復する機能と、DNA 修復酵素の遺伝子(*ada*,*alkA* 他)の転写を活性化する機能を持つ。DNA 修復では、Cys321 は O⁶メチルグアニンから、Cys69 は Sp メチルリン酸トリエステルからメチル基を受け取る。また、DNA(*ada*,*alkA*プロモータ領域)への結合は、Ada の N 端 20kDa ドメイン(M1~K178)で起こる。Cys69 がメチル化されると、この結合の特異性が大幅に強まり、Ada 自身をはじめとする DNA 修復酵素の遺伝子の転写が促進される。Ada は一個の亜鉛原子を持ち、Cys69 と Cys38、Cys42、Cys72 が配位している。N 端 10kDa(Met1~Arg92、N-Ada10K)はメチル基受容活性のみ持ち DNA には結合しないが、Myers らにより立体構造が決定されている。我々は、DNA に結合できる最小フラグメントである Ada の N 端 16kDa(Met1~Lys146、N-Ada16K)部分と、その Cys69 をメチル化した Me-Ada16K の構造と DNA 認識の機構を調べている。

我々は、大腸菌大量発現系を用いて、 ^{15}N and/or/ ^{13}C ラベルした N-Ada16K と N-

Ada 蛋白質、DNA 認識、メチル基転移

あきともよしこ、こうだだいすけ、ひろあきひでかず、むとうたかのり、もりかわこうすけ

Ada10K、更にこれらを酵素化学的な手法で Cys69 のみ 100%メチル化した Me-Ada16K と Me-Ada16K を調製した²⁾。種々の NMR 測定を用いて、N-Ada16K と Me-Ada16K の主鎖原子の帰属を完了した。

N-Ada16K の Gln81~Lys146 部分は、構造についての情報が殆ど得られていなかったが、今回の帰属をもとに二次構造を調べ、四本のヘリックス(Asp85~Arg92、Leu102~Val109、Pro113~Thr124、Arg136~Glu142)で構成される事を見い出した。

次に、¹⁵N-¹H}-NOE 測定を行い、N-Ada16K と Me-Ada16K の主鎖の運動性を見ると、共に Asn78~Gln80 の NOE が 0.4~0.5 と、運動性が高いことがわかった (fig1)。N-Ada16K と Me-Ada16K の ¹⁵N-SQC スペクトルを比べると、ピークの化学シフトの変化は Phe29~Glu75 の範囲、特に亜鉛に配位している Cys38、Cys42、Cys69、Cys72 近傍に集中し、Asn78 以降はまったく変化がなかった。N-Ada10K と N-Ada16K、又 Me-Ada10K と Me-Ada16K の比較では、N 末端から Gln80 まで変化しない。これらの結果は、N-Ada16K、Me-Ada16K が、Asn78~Gln80 をヒンジとして繋がった、独立した二つのドメイン、Met1~Ala77、Gln81~Lys146、で構成されていると解釈される。

次に我々は、Ada の DNA 認識の機構を調べるため、Ada が結合する ada プロモータ領域配列の 18merDNA と N-Ada16K 又は Me-Ada16K 複合体を調製、主鎖アミドプロトンの NMR シグナルの帰属をほぼ完了することが出来た。これに基づき、DNA との相互作用による ¹⁵N-SQC スペクトルの化学シフトの変化を調べた。まず、N-Ada16K-DNA 複合体で、Leu102~Val109、Pro113~Thr124 の二本のヘリックス上のアミノ酸のピークが大きくシフト変化した。ada プロモータ領域と無関係な配列の 18merDNA を加えても変化はない。これは Leu102~Thr124 がヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) 配列特異的 DNA 結合モチーフであることを示す。Cys69 をメチル化していない Ada でも、ある程度配列特異的に DNA に結合することが報告されており、この HTH モチーフによると考えられる。Lys86~Pro128 は、原核生物の転写因子である AraC ファミリーモチーフに合致するところで、Ada の Leu102~Thr124 および他の AraC ファミリー蛋白質でこれに相当する部分は、HTH モチーフと予想されていた。今回の結果は、AraC ファミリーの蛋白質として初めてこの HTH モチーフを実証した。認識ヘリックスの N 端には、Phe114、His115 があり、特にピークの変化が大きく、これらが DNA 塩基を認識していると思われる。

Me-Ada16K-DNA 複合体では、HTH 部分で同様の変化が見られたのに加えて、上記の Cys69 メチル化で変化した領域と、Cys42~Leu48 間のループ部分のピークに顕著なシフト変化が見られた (fig2)。この部分は、N-Ada16K-DNA 複合体ではわずかしき変化しない。つまり、Cys69 のメチル化により Cys69 を中心とした領域に、ada プロモータを認識するための構造が誘起され、Me-Ada16K では、これと先の HTH モチーフの二つのサイトで ada プロモータ領域に、強い配列特異性で結合する。また、Me-Ada16K-DNA 複合体では、Asn78~Gln80 のヒンジ部分のピークも大きく変化していた。現在、DNA 結合におけるこのヒンジ部分の役割を調べるため、Asn78~Gln80 を削った N-Ada16K と、Asn78~Gln80 を三つの Gly に置き換えた

N-Ada16K、更に N-Ada16K の後半ドメイン(Ala77~Lys146)の大量発現系を構築して、NMR スペクトルを調べている。In vivo でこれらの転写活性を調べる方法も検討中である。

Cys69 のメチル化により誘起される DNA 認識の構造が後半ドメインとは独立だったので、我々は Ada の N 端 10kDa のフラグメントで、この構造変化を詳細に調べている。 ^{13}C でユニフォームにラベルし Cys69 に付いたメチル基のみ ^{12}C である Me-Ada10K の、3D ^{13}C -filtered NOESY スペクトル³⁾から、Phe29、Val31、Ile36、Ala44 の側鎖が Cys69 についたメチル基に近づくような構造変化が起こることがわかった。現在、Me-Ada10K と N-Ada10K の立体構造解析を進めている。

- 1) Myers, C.D., *et al. Biochemistry*, **31**, 4541-4547 (1993)
- 2) Sakashita, H., *et al FEBS Let.t*, **323**, 252-256 (1993)
- 3) Ogura, K., *et al. J.Magn.Reson.*, **B112**, 63-68 (1996)

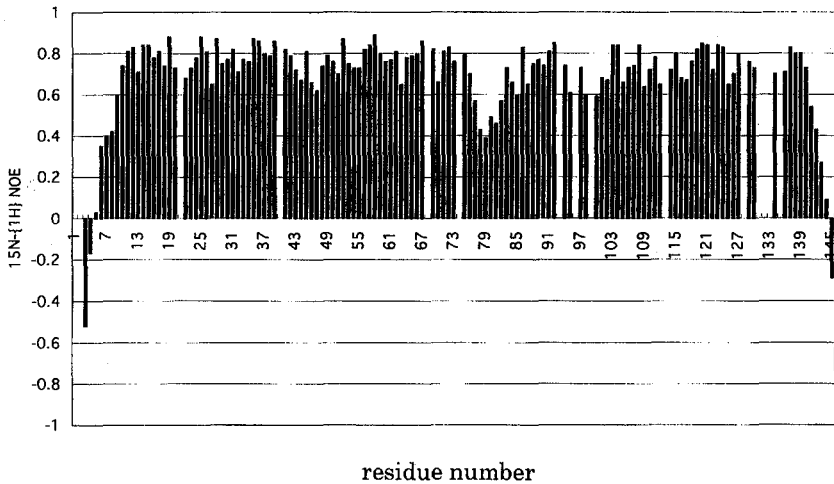


Fig1. distribution of ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -NOE values over the sequence of Me-Ada-16K

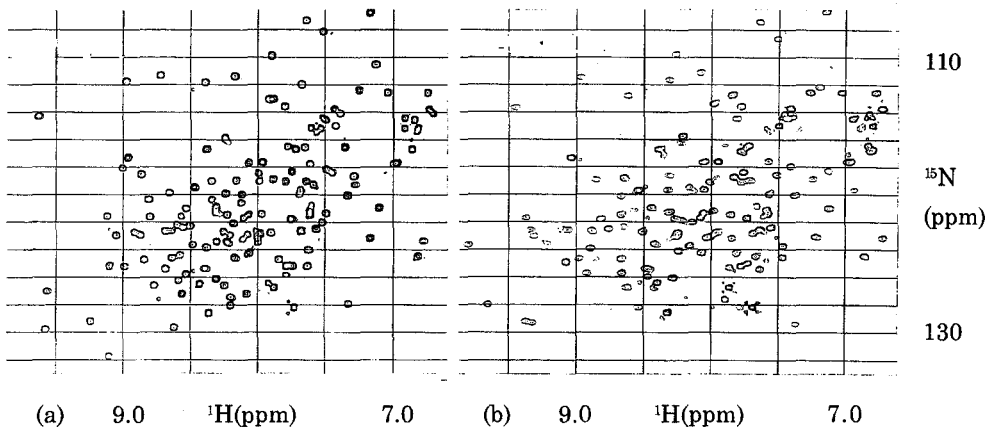


Fig2. ^{15}N -SQC spectra of Me-Ada16K (a) and Me-Ada16K-DNA complex(b)

P28

原がん遺伝子産物 c-Myb と DNA との複合体の動的構造
(横浜市大・院総合理¹, 横浜市大・医², KAST³, 都臨床研⁴, 理研・筑波
LS⁵) ○佐々木元子¹, 緒方一博^{2,3}, 畠中秀樹⁴, 皿井明倫²,
石井俊輔⁵, 西村善文¹

Backbone Dynamics of Myb-DNA Complex

(¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, ²Department of Structural Biology, Yokohama City University School of Medicine, ³Kanagawa Academy of Science and Technology, ⁴Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ⁵Tukuba Life Science Center, Institute of Physical and Chemical Research) ○Motoko Sasaki¹, Kazuhiro Ogata^{2,3}, Hideki Hatanaka⁴, Akinori Sarai⁵, Shunsuke Ishii⁵, 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。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⁾。立体構造解析の結果から、この構造的な揺らぎは、R2 の疎水性コア内に存在する

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, はたなか ひでき, さらい あきのり, いしい
しゅんすけ, にしむら よしふみ

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、R2 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 R2 の構造を比較することにより、野生型の R2 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インド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、R2 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 310K、pH6.8、サンプル濃度 2.3mM とし、 T_1 、 T_2 、 $T_{1\rho}$ 、NOE の測定を行った。

[結果・考察]

タンパク質単体で見られた N 端部分の速い揺らぎは、DNA との結合によるタンパク質 DNA リン酸骨格との相互作用によって、抑えられていた。また、タンパク質単体では個々のリピートをつないでいるループ部分にも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も DNA のリン酸骨格と結合し、速い揺らぎが抑えられていた。

マイクロ秒からミリ秒程度の遅い揺らぎに関しては、単体の R2 ではリピート全体 (特に第 3 ヘルックス部分) にわたって認められたが、複合体では R2 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、R2 の疎水性コアのパッキングが密になることにより、キャビティが埋まることによる構造的安定化が R2 の揺らぎの減少に寄与していると考えられることができる。

[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).

P29

芳香環シグナルをプローブとした
H⁺-ATP合成酵素βサブユニットの研究
(横浜国大・工、¹東工大・資源研)

○八木宏昌、久松久美子、戸澤加江子、吉田賢右¹、阿久津秀雄

A NMR study on the H⁺-ATP synthase β subunit as probed by the aromatic signals

Department of Bioengineering, Yokohama National University. ¹Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology.

○Hiromasa Yagi, Kumiko Hisamatsu, Kaeko Tozawa, Masasuke Yoshida¹, and Hideo Akutsu

The H⁺-translocating ATP synthase β subunit is a large protein and the molecular size is 52kDa. It has a nucleotide binding site. A conformational change in the β subunit on binding of nucleotide was observed by monitoring the NMR signals of Tyr and His residues. The spectrum of Tyr residues in the aromatic region was simplified by the selective deuteration. A significant narrowing of the Tyr resonances was also achieved by the elimination of the dipole-dipole interaction between the vicinal protons in the ring. Some of the C2 proton resonances of imidazole rings of His residues can be observed separately because of the sharpness of the signals. The results on the substrate titrations of these signals are discussed in connection with the conformational change of the β subunit.

【緒言】

H⁺-ATP合成酵素は分子量50数万の巨大な膜酵素で、触媒部位を持つ膜表在性のF₁部分と、H⁺チャンネルを形成する膜内在性のF₀部分で構成されている。F₁は分子量の異なる5種のサブユニットからなり、その組成は、α₃β₃γδεであり、触媒部位はαとβの境界面のβサブユニット側にある。J. P. Abrahamsらによって報告されたウシ心臓ミトコンドリアF₁のX線結晶構造解析は、基質結合によってβサブユニットの構造が変化することを示している。また吉田、木下のグループによりATPの分解に伴いF₁が回転することが明らかにされた。つまり、回転とβサブユニットの構造変化は密接な関係があると考えられる。そこで我々はTF₁-ATPaseβサブユニットに注目し、単離βサブユニットにおける基質結合と構造変化の関係を明らかにしていくことを目指している。βサ

key words: H⁺-ATP合成酵素、βサブユニット、選択的重水素化、Tyr、His

○やぎ ひろまさ、ひさまつ くみこ、とざわ かえこ、よしだ まさすけ、あくつ ひでお

βユニットは分子量が5万と大きいため、Tyr、Hisの芳香環シグナルをプローブとして用いた。両者とも一次配列上に12個づつ、ほぼ均等に分布し、構造変化のプローブとして用いることが可能である。Tyrについては、選択的重水素によりプロトン間の双極子相互作用をおさえシグナルをシャープにした。Hisについてはシグナルが低磁場側に分離して現れることを利用した。

【実験】

1) 選択的重水素化TF₁βサブユニットの発現

¹H-NMR スペクトルの芳香環領域を単純化しTyrシグナルの解析を容易にするため、大腸菌による大量発現系を利用して芳香環プロトンを重水素化したPhe、His、2,6位のプロトンが重水素化されたTyrをβサブユニットに取り込ませた。

2) 部位特異的突然変異を用いたアミノ酸置換

部位特異的突然変異によってβサブユニット中に存在する12個のTyr残基をPheに、また12個のHis残基をGlnにそれぞれ置換し、変異体βサブユニットを24個全て作製した。このときTyr→Phe変異体は選択的重水素化を行った。

3) ¹H-NMR 測定

(1) Tyr残基について

選択的に重水素化されたβサブユニットにMg-ATP、ATP、Mg-ADP、Mg-AMP、アデノシンを順次加えて測定を行った。変異体βサブユニットをそれぞれ40℃で測定し、野生型βと比較しTyr残基のシグナルの帰属を行った。

(2) His残基について

野生型βサブユニットにMg-ATP、Mg-AMP-PNPを順次加えて測定を行った。シグナルの帰属はTyrと同様に野生型と比較して行ったが、HisシグナルはpHの変化で大きな影響を受けるため様々なpHで帰属を行った。

なお、全ての測定はBruker AM400, DRX400を用いた。

【結果および考察】

(1) 選択的重水素化によるスペクトルの単純化

Fig.1に芳香族領域の¹H-NMRスペクトルを示した。分子量が大きいため普通の試料ではHis由来のシグナル以外では分離したシグナルが観測されない。しかし、選択的重水素化によってTyrのみのシグナルに単純化され、40℃において10本のシグナルが観測された。また、プロトン間の双極子相互作用も抑えられているため、そのシグナルはシャープなものとなった。

(2) 基質滴定によるシグナルの変化

Fig.2にMg-ATPの滴定スペクトルを示した。これから化学シフト値を変化させるシグナルが3本観測された。それらは、Tyr-148, 199, 341のシグナルと帰属された。このうちTyr-341のシグナルは特に変化が大きかった。結晶構造との比較から、Tyr-341は基質のアデニン環近傍にあり実際に基質と結合していると考えられている。よって、この化学シフトの解析から解離定数を求めることが出来る。滴定を行った基質について

解析を進めている。Tyr-148, 199は基質結合により構造変化を起こす領域にあることが確認された。従ってF₁の結晶で見られる基質結合による構造変化はβサブユニット単体でも起こることが明らかになった。さらに、ATP、Mg-ADPの滴定によってもMg-ATPでシフトした3本のシグナルが同様な変化を見せた。しかしMg-AMP、アデノシンではこの変化は起きなかった。つまりAMPとADPの間に構造変化を引き起こす要因があることが解った。またMgの存在下でシフトするシグナルも観測された。このことはMgの存在が基質の結合様式に変化を与えていることを示すものであった。

Mg-ATP、Mg-AMP-PNPを滴定した結果、His-179, His-200, His-324のシグナルの化学シフト値が変化した。これらの残基はTyr-148, 199と同様に基質結合により構造変化を起こす領域にある。以上の結果は単体でも基質結合によって結晶構造と似たような構造変化が起こっていることを示す。

(3) まとめ

本研究により分子量5万のタンパク質においても選択的重水素化の手法を取り入れることにより、構造変化の様子を¹H-NMRで観測できることが明らかとなった。

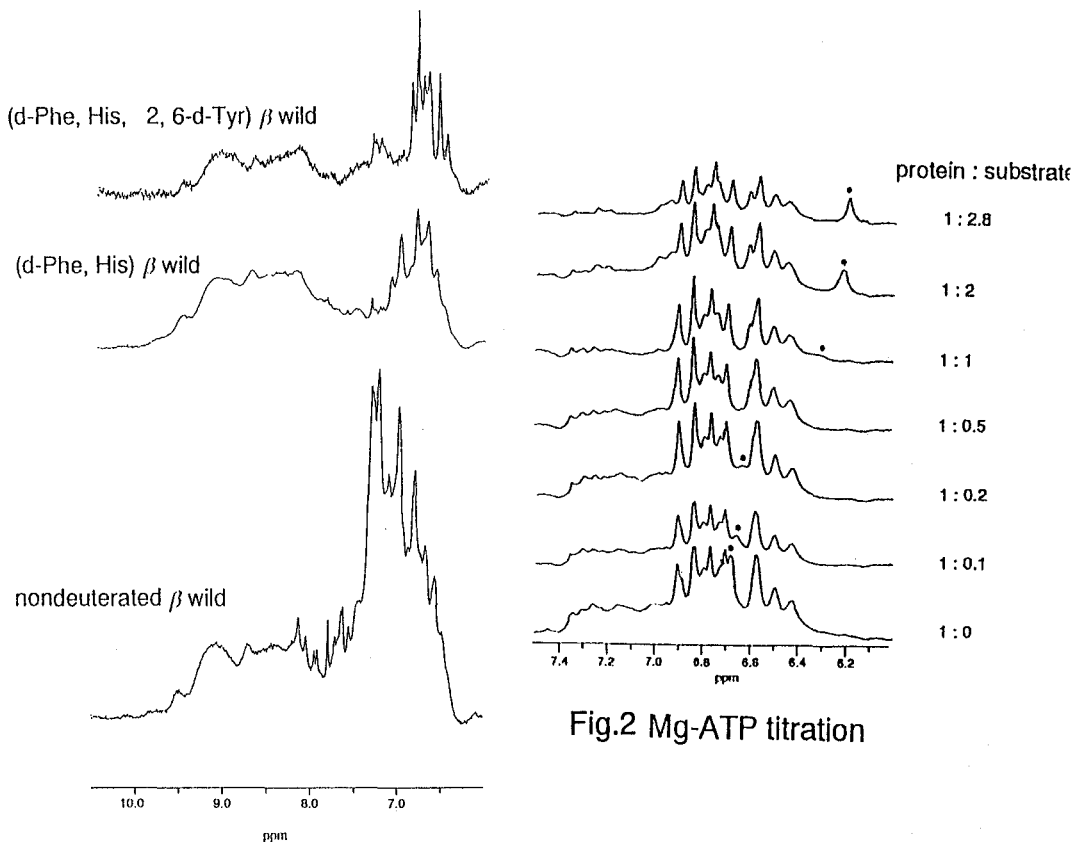


Fig.1 Simplification of ¹H-NMR spectra in the aromatic region

神戸大学大学院自然科学研究科¹、神戸大学理学部²○李 華¹、山田 博昭²、赤坂 一之¹

Structural Changes in BPTI Induced by High Pressure

○Hua Li, Hiroaki Yamada and Kazuyuki Akasaka

The Graduate School of Science and Technology¹ and Faculty of Science², Kobe University

By performing two-dimensional ¹H-NMR measurements at 750MHz at varying hydrostatic pressure (1 ~ 2000 bar) in aqueous environment (90%¹H₂O/10%²H₂O), we found that the chemical shifts of the amino protons of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) change sensitively with pressure within the folded manifold. The strong tendency for low field shifts observed for the amino protons suggests the compression of both internal hydrogen bonds for amino protons with carbonyls and external ones for those with solvent water. For amino groups forming internal hydrogen bonds with carbonyls, pressure-induced shortenings are estimated for individual hydrogen bond based on an empirical shift-distance correlation.

はじめに) 圧力は、温度、変性剤、溶媒などの外部因子と違って、直接原子間の距離を変えることにより、タンパク質の構造を変化させると思われる。本研究では、圧力によるタンパク質BPTIのフォールドした状態での構造変化を調べた。

実験) 高圧装置は、オンライン石英製高圧セルシステムと高感度、高分解能のBruker DMX750と組み合わせ、2000barまでの任意の圧力で測定することが可能である。この装置を用いて、我々は36°Cで、さまざまな圧力で、軽水中(90%¹H₂O/10%²H₂O)でタンパク質BPTIの1Dと2Dの¹H-NMR測定を行った。試料溶液は、10mMBPTIを200mM酢酸緩衝液に溶かして、pH4.6に調整した。

結果と考察) 2次元HOHAHAとNOESY(Fig. 1)スペクトルから、個々のアミノプロトンとC α プロトンの圧力によるケミカルシフト変化を追究した。その結果、52個のほとんどのアミノプロトンのケミカルシフトは圧力に対してリニアに低磁場にシフトすることが明らかになった(Fig. 2)。このことから、タンパク質分子内の水素結合だけでなく、タンパク質分子とその周辺の溶媒としての水との水素結合も圧力によって、強くなる、すなわち距離が短縮されたと考えられる。分子内の水素結合については、圧力による水素結合距離の短縮の程度を推定した(Fig. 3)。

キーワード: 圧力、タンパク質構造、水素結合

り か、やまだ ひろあき、あかさか かずゆき

その結果、短縮された距離は0~0.11Åの間に収まり、平均値0.02Åで、ほぼ水素結合距離の1%に達することがわかった。また、溶媒水と水素結合しているアミノプロトンのケミカルシフトは圧力によってもっと敏感に変化する。それゆえ、圧力はタンパク質と溶媒水とのミクロな相互作用を研究する間接的なプローブとなることが期待される。

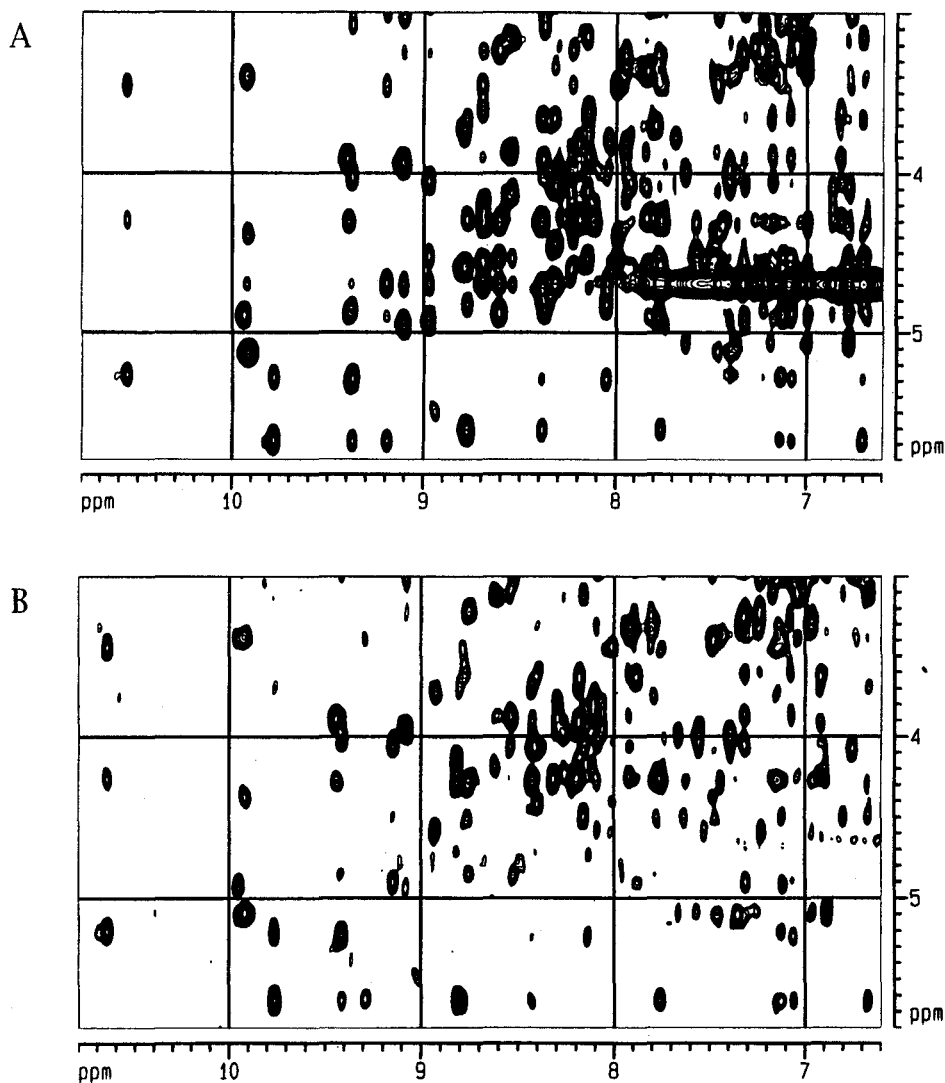


Fig. 1 The finger print regions of the NOESY spectra of BPTI, measured at 36°C, at 1bar (A) and 2000bar (B). The solvent peak was suppressed by watergate at 1bar (A) or by presaturation at 2000bar (B).

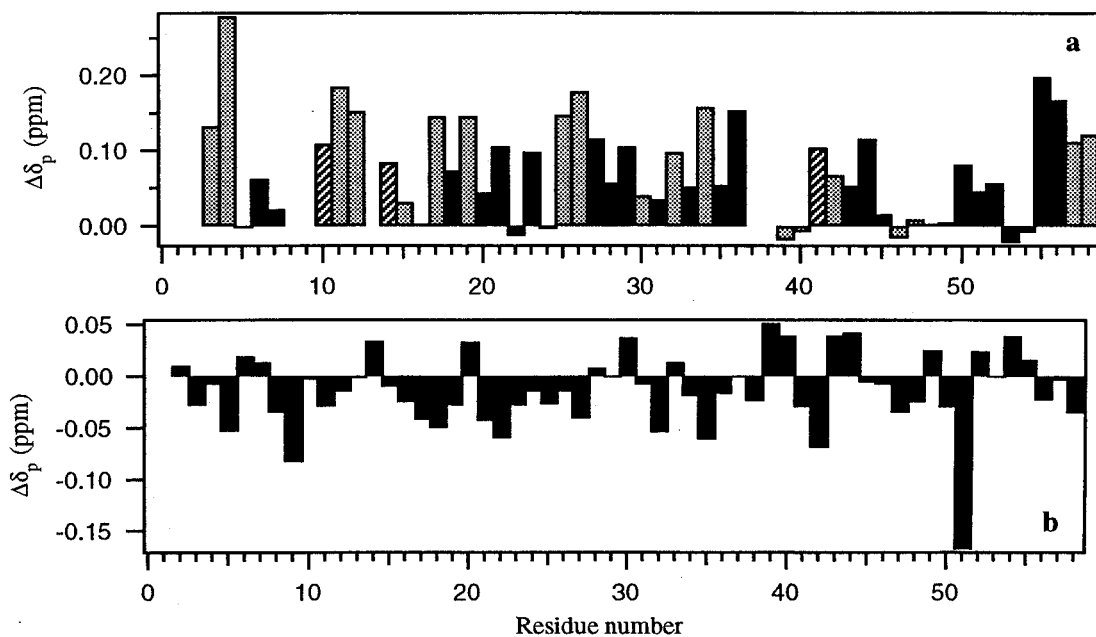


Fig. 2 Histograms of pressure-induced chemical shifts for individual NH(a) and alpha(b) protons. In (a), The solid columns are for the 28 NH protons H-bonded to carbonyls, the hatched columns are for the 4 ones H-bonded to internal water and point-filled columns are for the 20 ones H-bonded to solvent water.

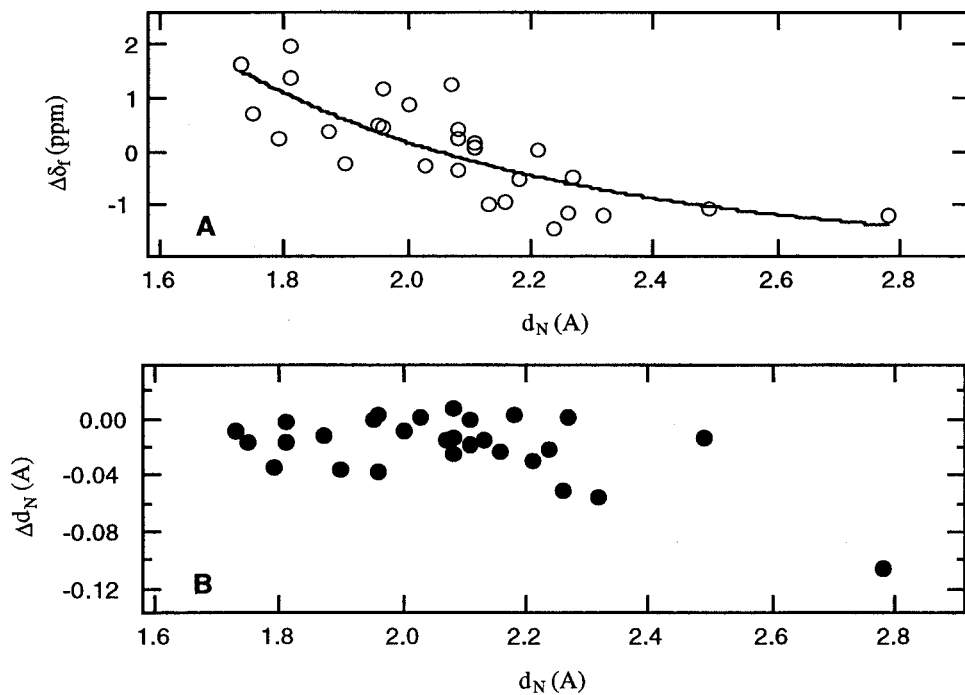


Fig. 3 (A) Plot of the folding shift against the H---O distance of the NH---O=C H-bond in BPTI. (B) Plot of the estimated pressure-induced shortening of the H---O distance against the H---O distance of the H-bond in BPTI.

ヒトMBF1のNMRによる構造解析

○三島正規¹ 尾崎淳¹ 竹丸憲一² 池上貴久¹ 上田均²
 広瀬進² 半田宏³ 白川昌宏¹
¹奈良先端科学技術大学院大学 ²国立遺伝学研究所
³東京工業大学

NMR study of the human MBF1

○M.Mishima¹, J.Ozaki¹, K.Takemaru², T.Ikegami¹, H.Ueda², S.Hirose²,
 H.Handa³, M.Shirakawa¹
¹Nara Institute of Science and Tecnology ²National Institute of Genetics
³Tokyo Institute of Tecnology

The human MBF1 (multi protein bridging factor 1) is a transcriptional mediator, which binds to both transcriptional activator ATF1 and basic transcription factor TBP, and is necessary for transcriptional activation of several genes. In order to understand the mechanism of transcriptional regulation in the term of structural biology, we have analyzed the three dimensional structure of the core domain of human MBF1 by means of NMR. We performed 3D/4D heteronuclear resonance experiments, and have made assignments of the most of the signals in the structured part of the protein. Based on medium range NOEs and chemical shift index (CSI), the secondary structure of human MBF1 has been determined, and it was found that the domain is consisted of 4 helices. The structure determination of the tertiary structure is under the way, and will be discussed together with its interaction with TBP and ATF1.

目的

最近、真核生物の転写調節研究においてメディエーターと呼ばれる因子の働きが注目されてきている。メディエーターは、シスエレメントに結合する転写調節因子と、基本転写因子の両者に結合してその橋渡しをする因子である。MBF1はカイコ転写調節因子BmFTZ-F1による転写活性化に必要なメディエーターとして¹同定された。酵母からヒトにいたるまで真核生物で広く保存されており、BmFTZ-F1のDNA結合ドメイン内にあるFTZ-F1boxと呼ばれるアミノ酸配列に直接結合しFTZ-F1のDNAへの結合を促進すること、TBPと結合することが明らかになっている。FTZ-F1boxとよく似た配列はATF転写調節因子ファミリーやGCN4のDNA結合ドメインにも存在する。転写調節因子のDNA結合ドメインと結合するメディエーターは他にほとんど知られていない。

ヒトMBF1コアダメインはAキナーゼによって活性が制御されるATF1と基本転写因子TBPの双方と相互作用することが確かめられている。今回我々は、ヒトMBF1のコアダメインの立体構造と、他の蛋白質との相互作用を調べ、転写調節のメカニズムを構造学的な立場から解明するために異種核多次元NMRによる構造解析を行った。

実験

ATF1、TBPとの結合活性を有する57番以降の92残基を大腸菌を用いてM9最小培地で大量発現させ、精製した。この方法で¹⁵Nラベル、¹⁵N,¹³CラベルされたヒトMBF1を効率よく得ることができた。

mediator ATF1 TBP 転写調節 異種核多次元NMR

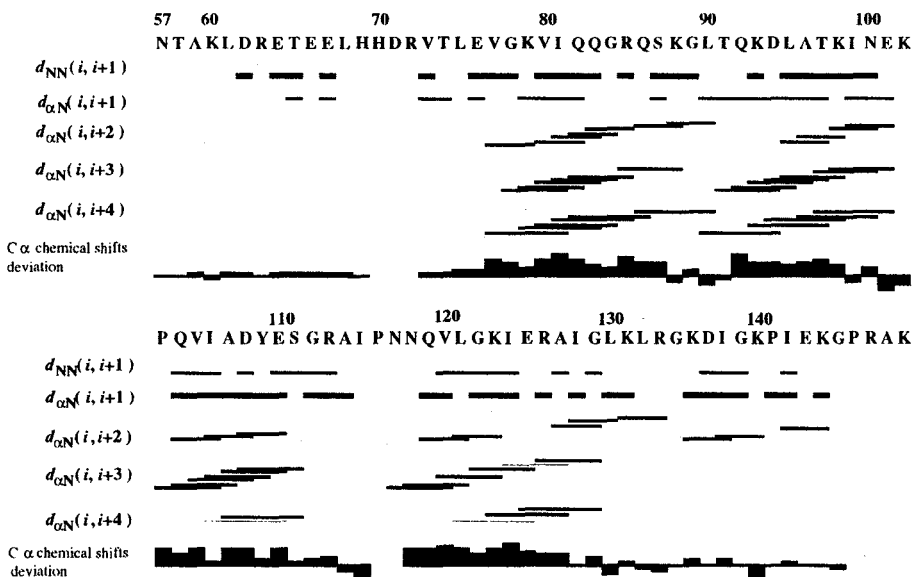
みしままさき、おざきじゅん、たけまるけんいち、いけがみたかひさ、うえだひとし、ひろせすむ、はんだひろし、しらかわまさひろ

測定はBruker社のDMX500、DRX500、DRX800を使用し、50mM KCl、10% D2Oを含むpH 6.5の50mM リン酸緩衝溶液中で310 Kで行った。CBCANH、CBCA(CO)NH、HNCACO、HNCOから主鎖の帰属、CCONH、H(CCO)NH、¹⁵N-TOCSY-HSQC、3D-HCCH-TOCSYから側鎖の帰属を行った。NOEの収集は¹⁵N-NOESY-HSQC、4D-¹³C/¹³C,HMQC-NOESY-HSQC、4D-¹³C/¹⁵N,HMQC-NOESY-HSQCから行った。またHMQC-Jスペクトルから2面角情報の収集を行った。

結果および考察

安定な立体構造を取っていないと思われるN末端部分以外の主鎖、側鎖の¹H、¹⁵N、¹³C核のシグナルのほぼ全ての帰属をすることができた。帰属を基に近・中距離NOEの解析と化学シフトインデックスの結果からN末約20残基のフレキシブルな部分と4本の α -helixからなる二次構造を持つ事が分かった。このフレキシブルなN末端はATF1と相互作用すると考えられている部位に対応している。これはヒトMBF1のコアドメインが当研究室で決定されたカイコMBF1と相同の立体構造を持つことを示唆する。現在さらにNOEを収集し構造解析を進めつつある。またヒトMBF1のコアドメインの立体構造と、ATF1、TBPとの蛋白質-蛋白質相互作用も議論したい。

Fig.1 Sequential NOEs and Chemical shifts deviation of human MBF1-core



文献

1) Li, F.-Q., Ueda, H., Hirose, S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 3023-3021

^1H および ^{13}C NMR 化学シフト評価による ペプチド・タンパク質の構造解析

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

Structure Analyses of Peptides and Proteins
using ^1H and ^{13}C NMR Chemical Shift Evaluation Method

Mitsuo Iwadate¹, 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 can be used to determine the structures of peptides and proteins along with the NMR parameters such as Nuclear Overhauser Effect. In this study, the ^1H NMR chemical shift calculation was applied to study change in the intermolecular arrangements of aggregated amphipathic peptide, melittin molecules with increasing temperature. Secondary, the ^{13}C NMR chemical shift contour maps were prepared as a function of torsion angles, Φ and Ψ based on the chemical shift values and PDB data of 40 proteins. These maps were used for determination of protein structures on the basis of the ^{13}C chemical shifts

これまで当研究グループは、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、原子座標に基づく ^1H NMR 化学シフトの評価式を提案してきた⁽¹⁾。又、タンパク質の ^{13}C 化学シフトについては、内部回転角 (ϕ 、 ψ) と化学シフトを定量的に関連づける等高線図を報告し、タンパク質やペプチドの構造解析に等高線図を用いることができることを示してきた⁽²⁾。

本研究では、 ^1H NMR 化学シフト評価式 (特に環電流効果の式) を、温度上昇に伴う凝集メリチンの分子間会合の破壊に伴う分子間配置の変化を検討するために用いた。すなわち、会合状態 (四量体) でのメリチンの ^1H NMR スペクトルの帰属を DQF-COSY, NOESY 等により行った後、温度上昇に伴う高磁場域のピークの化学シフト変化を測定した。その化学シフト変化を、 ^1H NMR 化学シフトの評価式を用い、分子間の距離の関数として定量的に評価すると共に、分子間 NOE を採取することによって、分子間の空間配置を定量的に検討した。

さらに、 ^{13}C NMR 化学シフトの定量的利用に関しては、(ϕ 、 ψ) の関数としての化学シフトのデータベースを増やし、精度の高い化学シフトの等高線図を作成すると共に、その利用について検討した。

参考文献

- (1) M.P. Williamson and T. Asakura, "3. Protein Chemical Shift" Methods in Molecular Biology, **60**, 53-69 ; Protein NMR Techniques Edited by : D. G. Reid Humana Press Inc. Totowa, NJ 1997.
- (2) T. Asakura, M. Demura, T. Date, N. Miyashita, K. Ogawa and M. P. Williamson, Biopolymers (1997), **41**, 193.

キーワード : ^{13}C 化学シフトマップ ペプチド タンパク質 構造解析

いわだてみつお でむらまこと あさくらてつお M P Williamson

(横浜市大大学院総合理¹、大阪大微生物病研²)○岡村英保¹、花岡慎悟¹、長土居有隆¹、牧野耕三²、西村善文¹Structural analysis of DNA-binding domain of
Escherichia coli transcriptional factor PhoB○Hideyasu Okamura¹, Shingo Hanaoka¹, Aritaka Nagadoi¹,
Kozo Makino², Yoshihumi Nishimura¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University¹Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University²

PhoB is a bacterial transcriptional activator that regulates the transcription of over 30 genes which are responsible for transport and assimilation of phosphate and phosphorous compound. PhoB protein contains a DNA-binding domain, consisting of 104 amino acids, which binds specifically to a DNA sequence, named pho box. Here, we have examined the structure of the PhoB DNA-binding domain by using two and three dimensional NMR spectroscopy in its bound and unbound states with a specific DNA.

<序論>

大腸菌では培地中のリン酸が不足すると少ないリン酸を有効に利用するために少なくとも 31 個ものリン酸レギュロンと呼ばれる遺伝子群が発現される。これらの遺伝子群の発現は転写因子 PhoB により調節されており、プロモーター領域にはリン酸ボックスと呼ばれる 18 塩基対からなる共通配列が存在している。リン酸欠乏下では大腸菌はまず内膜に存在している PhoR タンパク質が ATP により自己リン酸化し、PhoB に対してキナーゼとして働き PhoB をリン酸化し、リン酸化された PhoB はリン酸ボックスに対しての結合能が上昇し、 $\sigma 70$ サブ

NMR、PhoB、DNA 結合ドメイン、二次構造、立体構造

おかむら ひでやす、はなおか しんご、ながどい ありたか、まきの こうぞう、
にしむら よしふみ

ユニットを含む RNA ポリメラーゼ・ホロ酵素による転写誘導が起こる。原核生物の刺激応答系では PhoR/PhoB のようなタンパク質ペアは、多数見つかっており、これらは総称して 2 成分制御系と呼ばれている。PhoB (229 残基) は、N 末端側にリン酸受容ドメイン、C 末端側に DNA 結合/転写活性化ドメインの 2 つのドメインから構成されている。そこで我々は PhoB の DNA 結合/転写活性化ドメインを含む C 末端側 104 残基 (126-229) について、NMR による溶液中の立体構造解析を行っている。また、PhoB の DNA 結合ドメインと DNA の複合体についても NMR 測定を行っている。

<実験>

^{15}N , ^{13}C 安定同位体ラベルされたサンプルは大腸菌大量発現系を用いて、窒素及び炭素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -glucose を含む M9 培地で産生した。超音波処理により菌体破碎後、各種クロマトグラフィーにより精製した。NMR サンプルとして 1-2mM のサンプルを得た。NMR 測定については、主鎖の連鎖帰属を HNCACB、CBCA (CO)NH を用いて行い、側鎖の帰属を 3D HCCH-TOCSY、HBHA (CO)NH、2D TOCSY、2D NOESY 測定を用いて行った。距離制限については、2D NOESY、3D ^{15}N -NOESY-HSQC、4D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY-HMQC 測定、 ϕ 角度制限については HNHA 測定から得た。水素結合の同定にはバッファー中の H_2O を $^2\text{H}_2\text{O}$ へ交換後の ^{15}N -HSQC 測定により行った。 ^{15}N -PhoB の DNA 結合ドメインと DNA の複合体については ^{15}N -HSQC 測定を行った。

<結果>

得られた情報により、隣接残基間 NOE, ^{13}C 化学シフトインデックス法, 重水素交換測定などから、2 次構造を決定した。さらに詳細な立体構造に向けて、距離制限、角度制限の収集を行ない、ディスタンスジオメトリー計算による構造精密化を進めている。得られた構造は、同じ 2 成分制御系に属する大腸菌転写因子 OmpR の DNA 結合ドメインの X 線結晶構造と同様に、3 本の α ヘリックスと 2 つの逆平行 β シートから成っていることが分かった。また、 ^{15}N -PhoB の DNA 結合ドメインに特異的な DNA を加えて ^{15}N -HSQC 測定を行った結果、シグナルの変化が見られた。

P34 ヒトテロメア結合タンパク質TRF1の立体構造解析

(横浜市大 総合理¹、大阪大 蛋白研²)○西川 忠輝¹、長土居 有隆¹、吉村 祥子²、相本 三郎²、西村 善文¹

Solution structure of DNA-binding domain from a telomeric protein, TRF1

○Tadateru Nishikawa¹, Aritaka Nagadoi¹, Shoko Yoshimura², Saburo Aimoto²
and Yoshifumi Nishimura¹

1. Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University
2. Protein Research Institute, Osaka University

TRF1 is a mammalian telomeric protein that, as a dimer, binds to the duplex of TTAGGG repeats at chromosomal ends. Recently, it has been found that the telomeric protein, like TRF1, binds to telomeric DNA and control the telomere length by regulating the function of telomerase, telomeric elongation enzyme. Here, we have examined the solution structure of the DNA-binding domain from human TRF1, hTRF1 by NMR.

hTRF1 DNA-binding domain consists of 53 amino acids whose sequence is very homologous to that of each Myb binding repeat. It contains three helices which are maintained by a hydrophobic core formed by three tryptophans, corresponding to the Myb conserved tryptophans. And also the architecture of three helices is very similar to that of each repeat in the Myb DNA-binding domain.

<はじめに>

真核生物の染色体末端には、特徴的な数塩基対の配列が数十～数百個繰り返し並んでおり、そこに相互作用するタンパク質とともに複合体を形成しテロメアを構成している。近年の研究からテロメアの長さが、染色体の完全な複製のためや染色体の安定に重要であることがわかってきた。

このテロメアDNAの伸長反応はテロメラーゼという酵素が担っているが、その酵素テロメラーゼの活性がテロメア結合タンパク質であるTRF1などにより調節されているという事が最近報告され、TRF1のテロメア長の調節への関与が指摘され注目されている。

ヒトテロメア結合タンパク質hTRF1はヒト染色体末端TTAGGGリピート領域に

< キーワード > TRF1、DNA結合ドメイン、テロメアタンパク質、立体構造

にしかわただてる、ながどいありたか、よしむらしょうこ、あいもとさぶろう、にしむらよしふみ

2量体で結合するタンパク質である。全長で439残基からなりN末端側より酸性アミノ酸残基に富む領域、TRF特異的ドメイン、そしてC末端側にDNA結合ドメインをもつ。このTRF1のDNA認識機構を詳しく調べるために、今回私たちはhTRF1C末端、53アミノ酸残基からなるDNA結合ドメインの立体構造を2次元NMR法により決定した。

< 実験 >

化学合成により約1.6 mMのTRF1 DNA結合ドメイン(53 a.a.) 試料を得た。Bruker社製DMX-600およびAMX-500を用いて、2D NOESY、2D TOCSY、2D COSYなどの測定を行った。次にスペクトルの解析から距離制限、角度制限を得て、EMBOSSにより構造計算を行った。

< 結果と考察 >

hTRF1 DNA結合ドメインはヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを含む3本の α ヘリックスからなり、それらは3つのTrpと1つのPheがつくる疎水的コアにより安定化されていた。アミノ酸配列上相同性がある転写因子MybのDNA結合ドメイン各リピート構造と立体構造的に大変よく似ていた。またその際、よく保存されていて疎水的コアを形成しているTrp残基の配向もほぼ同じであった。ただし第2ヘリックスと第3ヘリックスを結ぶループは7つのアミノ酸残基からなりMyb及び通常のヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフよりも長いループをつくっている。

一方、酵母のテロメア結合タンパク質であるRap1は2つのヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフがタンデムにつながったDNA結合ドメインを持つ。そしてそれぞれはアミノ酸配列上の相同性がないにもかかわらずMyb DNA結合ドメインと立体構造上高い類似性がある事が分かっている。そこで、今回得られた結果とあわせると、酵母と高等生物の間のテロメア結合タンパク質では配列上相同性は無いものの、構造上同じモチーフを用いてテロメアDNAに結合するということがわかった。ただし、TRFは2量体で、Rap1はタンデムにつながったヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ2つを用いてDNAに結合することから、全体のDNA結合様式は違うものになると考えられ興味深い。

(筑波大化学系、東北大院理*)

○越川城大、山本泰彦、松岡有樹*、四釜慶治*

Active Site Structure in a Monomeric Hemoglobin from a Midge Larva (*Tokunagayusurika akamusi*)

K. Koshikawa, Y. Yamamoto, A. Matsuoka* and K. Shikama*

Department of Chemistry, University of Tsukuba

*Biological Institute, Graduate School of Science, Tohoku University

NMR study of met-cyano form of monomeric hemoglobin from *Tokunagayusurika akamusi* has revealed that the correlation time for internal motion of heme 2-vinyl group is relatively large ($\tau_c = 5.2$ ns) and that the 2-vinyl plane is oriented almost orthogonal to the heme plane. These results strongly suggest the presence of a large steric hindrance between the vinyl group and the surrounding amino acid residues. The analysis of heme methyl proton shifts indicated the bonding interaction between heme iron and axial ligands in this protein is relatively strong. The formation of a strong Fe-His bond demands the proximal His imidazole plane with its orientation intersected between the two N-Fe-N axes of the heme and such a imidazole orientation is consistent with small in-plane asymmetry of heme electronic structure in this protein, as reflected in the span of heme methyl proton signals.

【序論】

節足動物のアカムシユスリカ (*Tokunagayusurika akamusi*) の四齢幼虫に存在する単量体ヘモグロビン (Hb) 成分の一つであるHbコンポーネントV (TAHb V) は、アミノ酸残基152個から成る酸素結合ヘムタンパク質である。その一次構造は、哺乳類のミオグロビン(Mb)のものとは、ヘム鉄の第五配位子である近位His (HisF8) と、これまでに報告されているあらゆる酸素結合ヘムタンパク質で保存されているPheCD1以外は全く異なっている。このHbの機能に関しては酸素親和性は哺乳類Mb等とほぼ同じであり、それがpHに依存するというBohr効果を示すこと(四釜ら、未発表データ)などがわかっている。一方、このタンパク質の構造に関しては、一次構造以外にはヘリックス含量がMbよりもかなり少ないことがわかっているだけである。私どもはTAHb Vの比較的高い酸素親和性とBohr効果の分子機構を解明するために、NMRによりこのタンパク質の活性部位の構造解析を進めている。一般的に、NMRによりヘムタンパク質の活性部位の構造を解析する場合、ヘム鉄の対電子に起因するヘム側鎖及びヘム近傍のアミノ酸残基に由来するシグナルの常磁性シフトや常磁性緩和を活性部位の分子構造や電子構造についての知見を得るための有効なプローブとして用いることができる。本研究では、鉄三価低スピン状態であるメトシアノ体でのTAHb Vのヘム鉄の配位構造、ヘムの電子構造及びヘム側鎖のコンフォメーションと内部運動を常磁性シフトや、NOEの照射時間依存性の観測から得られる交差緩和速度の解析から決定した。その結果、TAHb Vでのヘムの2-ビニル基とコンタクトしているタンパク質部分との間に比較的大きな立体障害が存在することが明らかになった。

アカムシユスリカ、単量体ヘモグロビン、ヘム、常磁性シフト、NOE

こしかわくにひろ、やまもとやすひこ、まつおかありき、しかまけいじ

【実験】

アカムシユスリカの四齢幼虫から分離精製されたTAHb Vを限外ろ過によりタンパク質濃度1~3mMに濃縮後、溶媒をD₂Oに交換してから、外部配位子として10当量のCN⁻を加え、メトシアノ体を調製した。NMR測定はBruker社製AC-400Pで行った。シグナル帰属にはCOSY、NOESY及び一次元NOEを用いた。

【結果と考察】

¹H NMRスペクトル:メトシアノTAHb Vの¹H NMRスペクトルをマッコウクジラMbのものと比較してFig.1にシグナル帰属(帰属の詳細については、ポスターで報告予定)とともに示す。TAHb Vのスペクトルの特徴は、(1) ヘム側鎖メチルプロトンシグナルの常磁性シフトが小さい、(2) ヘムメチルプロトンのシフトパターンがクジラMbのものとは大きく異なる、(3) 最も低磁場にシフトしているシグナルと最も高磁場にシフトしているシグナルが、ともに同じヘム側鎖ビニル基のプロトンに由来する、などがある。ヘムメチルプロトンシグナルの常磁性シフトでは、メチル基が直接共有結合するピロール環炭素原子のp_z軌道に存在する不対電子が超共役により、メチルプロトンのs軌道にしみ出すことにより生じるコンタクトシフトが支配的である。それぞれのピロール環の炭素原子のp_z軌道に存在する不対電子は、ヘム鉄からポルフィリン環のπ共役系にしみ出る不対電子密度に依存するため、(1)の結果は、メトシアノTAHb Vではヘム鉄からポルフィリン環平面方向への不対電子のしみ出しは少ないことを示してしている。軸方向の配位子とヘム鉄との結合が強くなればなるほどポルフィリン環への不対電子のしみ出しが抑制されることが予想され、TAHb Vではヘム鉄と軸配位子との結合がクジラMbのものより強いことが考えられる。また、ヘムメチルプロトンのシフトパターンは、軸配位子の一つである近位Hisのイミダゾール環平面のヘムに対する配向(Fig.2 参照)と密接な関係があることがわかっている。立方対称場中の3d軌道は、エネルギーに関して2つの軌道群に分かれる。そのうちよりエネルギーが低い軌道群はd_{xy}、d_{yz}、d_{xz}から成り、メトシアノ体での不対電子は、これらの3つの軌道の中で最もエネルギーが高い軌道に入る。d_{xy}とd_{xz}のエネルギー準位はヘム鉄に直接配位するイミダゾール環の窒素原子のp_z軌道との相互作用により高められるが、その程度はイミダゾール環のヘムに対する配向に依存する。TAHb Vの場合、ヘムメチルプロトンシグナルの広がり約10ppmであり、クジラMbの約22ppmよりかなり小さく、ポルフィリン環の電子構造の対称性が高いことがわかる。したがって、Fig.2の角度φはTAHb Vでは±45°に近いものと推測される。このタンパク質ではProがF7に存在するためHisF8付近のヘリックスの構造がひずんでいると予想され、そのことがφに影響を及ぼしているものと考えられる。

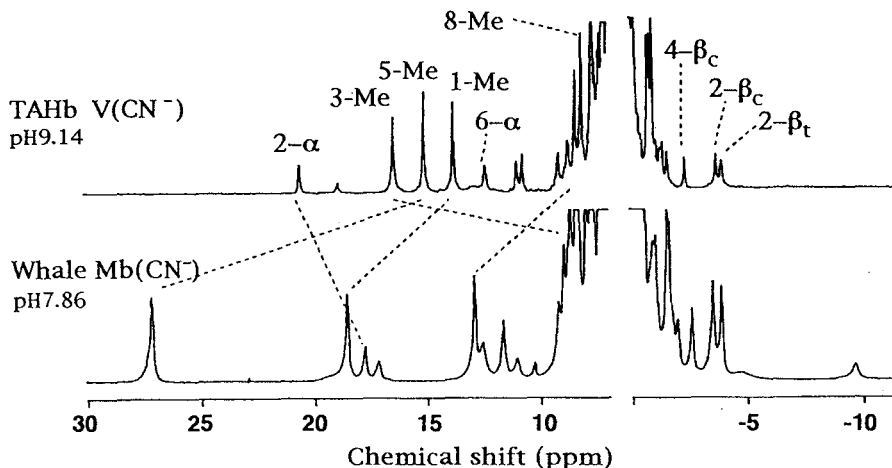


Fig.1 400MHz ¹H NMR spectra (in D₂O at 25°C)

ヘム側鎖の内部運動：双極子相互作用する¹H核の緩和は、次式で示される。

$$\dot{M}_z = R \Delta M_z \quad (1)$$

ここで、 ΔM_z は M_z の熱平衡状態からのずれ、 R は緩和行列である。 R の対角要素 (ρ_{ii}) 及び非対角要素 (σ_{ij}) は、それぞれ対応する核固有のスピン-格子緩和速度 (intrinsic spin-lattice relaxation rate) 及び i - j 核間の交差緩和速度 (cross-relaxation rate) であり、エネルギー準位間の遷移確率に関して次のように表現される。

$$\rho_{ii} = \sum_{I \neq j} (W_0^{ij} + 3W_1^{ij} + 6W_2^{ij}) + \rho^* \quad (2)$$

$$\sigma_{ij} = 6W_2^{ij} - W_0^{ij} \quad (3)$$

$$W_n^{ij} = \{h^2 \gamma_H^4 / (2\pi)^2 10r_{ij}^6\} \cdot J(n\omega) \quad (4)$$

$$J(n\omega) = \tau_c / \{1 + (n\omega \tau_c)^2\} \quad (5)$$

ρ^* は、双極子相互作用以外の緩和機構からの寄与を示す。注目しているシグナルの ρ は、そのシグナルに対して選択的にスピン-格子緩和時間を求めることにより得られる。2スピン近似により、time-dependent NOEは次式のように表現できる。

$$NOE_i = (\sigma_{ij} / \rho_{ii}) \{1 - \exp(-\rho_{ii} T_{IRR})\} \quad (6)$$

T_{IRR} はスピンを照射している時間を示す。式(6)より、 T_{IRR} を変化させてNOEを測定することにより、 σ 、 ρ を同時に決定することができる (ρ は独立した実験からも決定可能)。 σ を求めれば式(3)~(5)より、 τ_c を計算することができる。

2-β_cプロトンに照射して2-αプロトンにNOEを観測した結果をFig.3に示す。β_cプロ

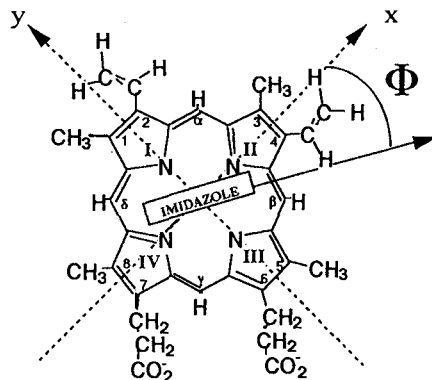


Fig.2 Molecular structure of heme. Φ is defined as the angle between the projection of the HisF8 imidazole plane onto the heme plane and the N11-Fe-N14 axis.

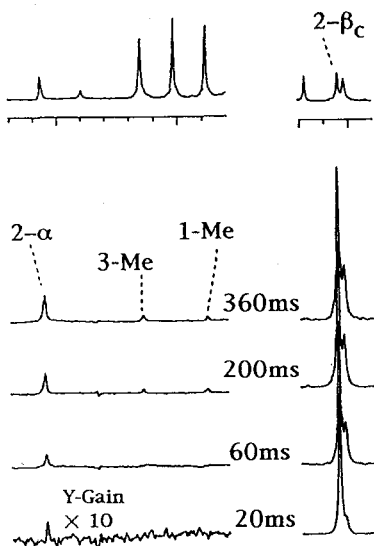


Table I
Result of NOE study for the selected proton pairs of TAHb V, pH9.14 at 25°C

	ρ (s ⁻¹)	NOE (%)	σ (s ⁻¹)	τ_c (ns)
2-β _c - 2-α	11.0	-17.3	-1.9	5.2
4-β _c - 4-β _t	11.6	-49.0	-5.7	3.2
2-α - 2-α'	15.6	-61.0	-9.5	5.5

Fig.3 NOE difference spectra recorded with saturation of 2-β_c for the indicated time. NOE observed for 1-Me and 3-Me signals are secondary.

トンの緩和速度 (ρ) は 11.0s^{-1} であり、定常状態NOEから $2-\beta_c$ - $2-\alpha$ 間の交差緩和速度 (σ) は、 -1.9s^{-1} と求められ、この核間ベクトルの相関時間 (τ_c) は 5.2ns と求められた。同様にして4-ビニル基の $4-\beta_c$ - $4-\beta_t$ 、6プロピオン酸基の $6-\alpha$ - $6-\alpha'$ の τ_c を求めた (Table I)。これらの側鎖の内部運動の τ_c が、タンパク質全体の運動の τ_c (約 10ns) より小さいことは、これらの側鎖がタンパク質に固定されているのではなくそれぞれ動的にゆらいでいることがわかる。ただし、2-ビニル基の τ_c はこれまでに報告されているMbでのものより大きく、ビニル基とタンパク質とのコンタクトの立体的障害により、ビニル基の運動が抑えられているものと考えられる。また、6-プロピオン酸基の α - CH_2 基の τ_c は、このプロピオン酸基のカルボキシル基はタンパク質部分のアミノ酸残基と salt bridge を形成していないことを示している。

ヘム側鎖のコンフォメーション：2-ビニル基 $2-\alpha$ シグナルと $2-\beta_c$ あるいは $2-\beta_t$ シグナルのシフト差は、TAHb Vでは約 24ppm であり、クジラMbの約 20ppm より 20% 程度大きい。両タンパク質での $2-\beta_c$ 、 $2-\beta_t$ シグナルのシフト値にそれほど差はなく、TAHb Vでの $2-\alpha$ シグナルの低磁場シフトがクジラMbのものより顕著である。 $2-\alpha$ シグナルでは、メチルプロトンと同様にピロール環の炭素原子の p_z 軌道からの不對電子のしみ出しによる正のコンタクトシフト (δ) が生じるが、その大きさは Fig. 4A で定義される角度 θ と $\delta_c \propto \cos^2 \theta$ の関係がある。 $2-\beta$ シグナルと同一ピロール環に結合している $1-\text{Me}$ のシフト値は TAHb V、クジラMb でそれぞれ、 13.76 、 18.62ppm であり、このピロール環にしみ出している不對電子密度は TAHb V の方が小さいことになる。したがって、 $2-\alpha$ シグナルの常磁性シフトで TAHb V の方が大きいのは θ が小さい (つまりビニル平面とヘム平面がお互いに直交に近い配向をとる) からであると解釈できる。ただし、 $1-\text{Me}$ シグナルは $2-\alpha$ シグナルとより大きなNOEを示すことから、 $2-\alpha$ プロトンがわずかに $1-\text{Me}$ の方に向いていると推測される。このようなビニル基のコンフォメーションと、この側鎖の内部運動の τ_c が比較的大きいことを考え合わせると、TAHb V の $2-\beta$ シグナルとタンパク質部分とのコンタクトには、哺乳類のMbなどには無い大きな立体障害が存在するものと推測される。

4-ビニル基 $4-\beta_t$ シグナルは $3-\text{Me}$ シグナルと強いNOE相関を示すことから、このビニル基のヘム平面に対する配向は Fig. 4B のようになっていることがわかる。この配向は、クジラMbなどの結晶構造で見られるものと本質的に同じである。

6-プロピオン酸基 $5-\text{Me}$ シグナルの照射により、 $6-\alpha$ シグナル (12.43ppm) よりも $6-\alpha'$ シグナル (8.77ppm) により大きなNOEが観測される。プロピオン酸基の α プロトンシグナル間のシフト値の違いは、両シグナルのコンタクトシフトの差に由来すると考えられるので、コンタクトシフトの解釈と $5-\text{Me}$ シグナルとのNOE相関から、6-プロピオン酸基の α -メチレン基のヘム平面に対する配向は Fig. 4C の様になっているものと推測される。

pHの影響 : pHによる酸素親和性の変化には、タンパク質の三次構造変化が伴うと考えられている。酸素親和性が大きく変わるpH6からpH9までの間でヘム側鎖のシフト値に大きな変化は見られなかった。このタンパク質では、三次構造の変化がヘム側鎖のシフト値に及ぼす影響は小さいことがわかった。

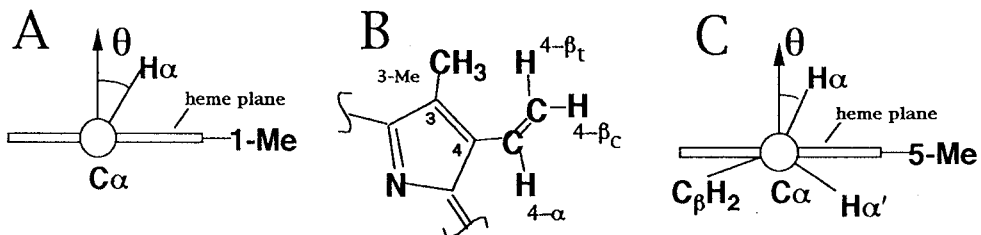


Fig. 4 (A) The angle θ is defined as the dihedral angle between the CH vector and the normal to the heme plane. Orientation of the 4-vinyl (B) and 6-propionate α - CH_2 (C) group with respect to heme in TAHb V.

Arthromyces ramosus Peroxidase の I⁻ および第 2 基質
結合部位の解析

細谷東一郎¹、○高橋征三²、福山恵一³、板倉寛之³、佐藤康一⁴
(1 東理大基礎工、2 日女大理、3 阪大理、4 熊大医)

Studies of the Binding Site of Iodide and Second Substrates to *Arthromyces ramosus* Peroxidase.

T. Hosoya¹, S. Takahashi², K. Fukuyama³, H. Itakura³, and K. Sato⁴

1. Fac. Ind. Sci & Tech., Science Univ. Tokyo
2. Fac. Sci., Japan Women's Univ.
3. Fac. Sci., Osaka Univ.
4. Sch. Med., Kumamoto Univ.

The site and characteristics of iodide and aromatic donors to *Arthromyces ramosus* peroxidase were examined by x-ray crystallographic analysis, ¹H and ¹²⁷I NMR, and kinetic studies. It was found that iodide ion located at the distal side of the heme and lies between the two peptide segments. The distance from peripheral methyl groups were more than 10Å. The aromatic donors are also located at the same side and oriented parallel to the heme. The distance between iodide ion and aromatic donors were found more than 10Å apart. These results suggested that the electron transfer mechanism in peroxidase.

ペルオキシダーゼは過酸化水素を基質とし種々の化合物を酸化する酵素である。有機化合物の酸化反応は Compound I や Compound II と呼ばれる中間状態をともなう 2 段階の電子移動反応が関与するが、よう素のような無機化合物の酸化反応は 1 段階で進行することが知られている。しかしその反応の詳細は知られていない。これらの反応の詳細を明らかにするために、ペルオキシダーゼの中の結合位置を確定し、相互作用する残基を同定することを試みた。

[実験] ARP は天知博士より恵与された粉末を使用した。A₄₀₃/A₂₈₀=2.63 である。その他の試薬は市販品を用いた。X-線結晶解析は ARP 結晶に KI または BHA を soak し差フーリエ法で解析した。¹H および ¹²⁷I-NMR は Bruker AMX-400WB を用い 5mm の HX-プローブを用いた。¹²⁷I-NMR は 41.6 kHz のバンド幅で 200,000-800,000 回積算した。¹H の化学シフトは HDO の共鳴位置を 4.82ppm として求めた。反応速度は日立 UV-3000 を用い差スペクトルの変化を用い非線形最小自乗法で解析した。

キーワード：ペルオキシダーゼ，ARP，X-線結晶解析，NMR，差スペクトル

ほそや とういちろう、たかはし せいぞう、ふくやま けいいち、いたくら ひろゆき、さとう こういち

[結果] X-線結晶解析の結果、よう素イオンはヘムの distal side に位置し2本のペプチド鎖 Phe⁹⁰-Pro⁹¹-Ala⁹² と Ser¹⁵¹-Leu¹⁵²-Ile¹⁵³ の近傍にあり、ヘム鉄から 12.8Å 離れて存在することが分かった。この結果は hyperfine region のスペクトル変化が他のペルオキシダーゼと比べてきわめて小さいことから支持された。また hyperfine region の ¹H-NMR による滴定実験から pH=5.5 で Kd=50mM であることが分かった。これは他のペルオキシダーゼと比べてかなり結合が弱い。また ¹²⁷I-NMR による滴定実験と反応速度の解析から pKa=5.3 付近の残基が結合に強く関与することが分かった。これらの結果を総合すると、よう素イオンから distal histidine への電子移動が最初ののステップとして起こることが示唆される。しかし、よう素イオンは 8Å 程度 His⁵⁶ から離れた位置にあり、ペプチド鎖で隔てられている。したがって直接結合するのではなく、長距離の電子移動が起こっているものと考えられる。

ペルオキシダーゼは、多種類のフェノール誘導体と結合し反応することが知られている。しかしその結合位置は NMR による実験から 8位の peripheral methyl 残基の近傍にあるという以外あまりよく分かってなかった。今回、X-線結晶解析により、BHA は図に示すようにヘム面に平行かつ 8-メチル近傍に位置することが分かった。差スペクトルの研究から ARP は種々の芳香族基質に対して結合力

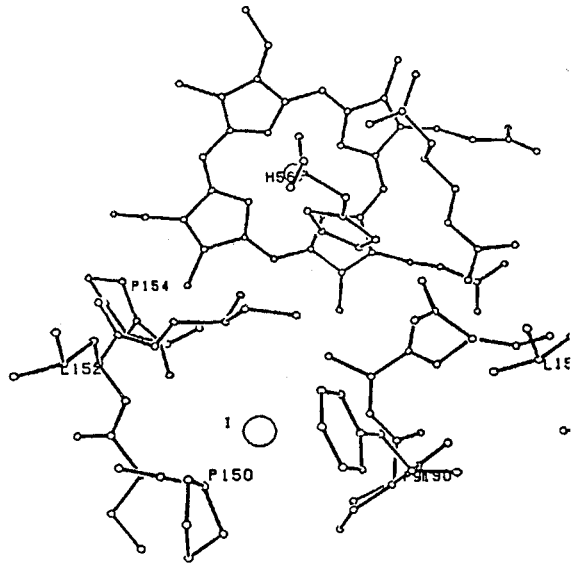


Fig. 1 The vicinity of iodide binding site to ARP. The peptides, Phe⁹⁰-Pro⁹¹-Ala⁹² and Ser¹⁵¹-Leu¹⁵²-Ile¹⁵³, are shown. The interatomic distances to the iodide are: F90 Cβ; 3.8Å, P91 Cδ 3.8Å, S151 N; 4.0Å.

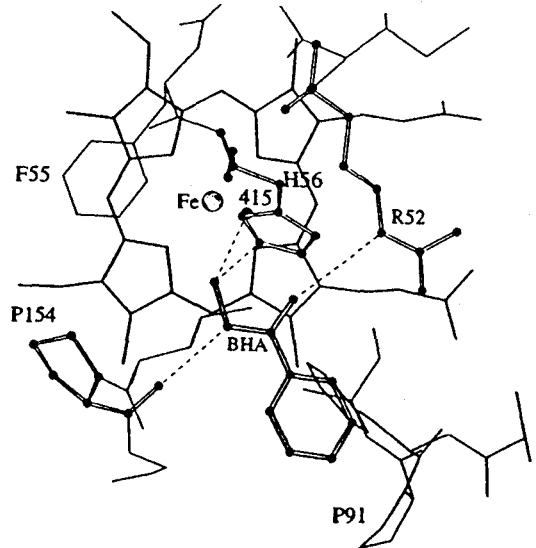


Fig. 2 Environment of BHA molecule. Hydrogen bonds are shown by broken lines. The lower side of the figure is the surface of ARP molecule. The distance between BHA C1 and heme methyl C18 is 3.9Å, and between Fe and O8 is 4.4Å.

がきわめて弱いことが分かった。したがって BHA 以外の化合物については X-線結晶解析で結合位置を求めることはできなかった。しかし NMR や差スペクトルの結果から、ほぼ同じ位置に結合することが示唆された。

以上の結果から、よう素イオンと芳香族化合物の結合位置は離れていることが明らかになった。差スペクトルの解析から、よう素イオンの存在は種々の芳香族化合物の結合に影響を及ぼさないという知見と一致する。結晶解析から示唆された水素結合のネットワークが基質結合の駆動力として一般的に成り立つかどうかはまだ明らかでない。p-cresol などのモデルを同じ位置に挿入してみると、かなり無理があるように思われる。一般的には distal Histidine と直接水素結合するとは限らないのではなかろうか。つまり芳香族化合物の過酸化水素による酸化は、よう素イオンの場合と同様、distal Histidine を介して電荷リレーが起こるが、直接でなく長距離の電荷リレーが関与している可能性が高い。

分子動力学の計算から X-線結晶解析は芳香族化合物の結合位置がややヘムに近い位置に評価される傾向があることが示唆された。また ARP はヘムポケットの構造がやや固く、それが結合力の違いとなっている可能性が計算から示唆された。NMR の緩和時間の解析から、ヘム鉄と芳香族化合物との間の距離を見積もることができるが、X-線結晶解析の結果と比べて 2Å 近く距離が遠く評価された。この結果は分子動力学の計算結果とも矛盾する。反磁性たんぱく質との結合による基質の緩和速度の増大を補正すると距離の違いはさらに大きくなった。この距離の食い違いは従来の常磁性たんぱく質についての緩和の解析に、何か本質的な因子が抜けている可能性がある。詳細は本討論会で討論したい。

P37

無細胞タンパク質合成系による部位特異的安定同位体標識
タンパク質の大量合成法の開発(理研・細胞情報伝達¹, 東大・院理²)○矢吹 孝^{1,2}, 木川隆則¹, 横山茂之^{1,2}**Site-directed stable-isotope labeling of a protein by cell-free protein synthesis**Takashi Yabuki^{1,2}, Takanori Kigawa¹, Shigeyuki Yokoyama^{1,2}¹Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),²Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo

We have established a method for producing a milligram quantity of site-specifically stable-isotope labeled protein by highly efficient cell-free protein synthesis involving amber suppression. The *Escherichia coli* amber suppressor tRNA^{Tyr}_{CUA} (25 mg) prepared by in vitro transcription with T7 RNA polymerase was aminoacylated with purified *E. coli* tyrosyl-tRNA synthetase, using 2 mg of L-[¹⁵N]tyrosine. In the gene encoding the human c-Ha-Ras protein, the codon for Tyr³² was changed to an amber codon (TAG). This template DNA and the [¹⁵N]Tyr-tRNA^{Tyr}_{CUA} were reacted in a coupled transcription-translation system containing T7 RNA polymerase and *E. coli* cell extract. The subsequent purification yielded 2.2 mg of [¹⁵N]Tyr³²-Ras protein. In the ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of the labeled Ras protein, only one cross peak was observed, which was unambiguously assigned to Tyr³².

[序]

分子量30kDaを越えるタンパク質のNMRによる解析は、激しいシグナルのオーバーラップのために困難となる。このような系において部位特異的に安定同位体標識を導入したタンパク質を用いれば大幅なスペクトルの簡素化が可能となり、標識部位近傍の構造情報を選択的に得ることができる。

部位特異的に安定同位体標識されたタンパク質の調製法として固相化学合成法があげられるが、分子量の大きなタンパク質への適用は困難であった。また、無細胞タンパク質合成系とサプレッサー-tRNAを組み合わせた系を用いた方法が報告されている¹⁾。しかし、この方法ではタンパク質合成量が少なく、NMR測定で必要とされるmgオーダーの標識タンパク質を得ることは困難であった。今回、高効率の大腸菌由来無細胞タンパク質合成系²⁾を用いてNMR測定が可能となる量の部位特異的標識されたRasタンパク質を生化学的に合成し¹⁵N-¹H HSQCスペクトルを測定することに成功したので報告する。

キーワード： 安定同位体標識, 部位特異的標識, Ras, 無細胞タンパク質合成系

やぶき たかし, きがわ たかのり, よこやま しげゆき

[方法]

T7 RNA polymerase を用いた *in vitro* transcription により大腸菌 tyrosine amber suppressor tRNA^{Tyr_{CUA}} を合成した。これに大腸菌 tyrosyl-tRNA synthetase を用いて L-[¹⁵N]tyrosine をプレチャージすることにより [¹⁵N]Tyr-tRNA^{Tyr_{CUA}} を得た。 [¹⁵N]Tyr-tRNA^{Tyr_{CUA}} を加えた無細胞タンパク質合成系にて、Ras の Tyr³² のコドンが amber (TAG) に変更されたテンプレート DNA を用いて合成反応を行うことにより、Tyr³² のみが選択的に ¹⁵N 標識された Ras タンパク質を得た。

[結果・考察]

Tyrosine amber suppressor tRNA (25 mg), L-[¹⁵N]tyrosine (2 mg) および無細胞タンパク質合成系 (反応スケール 30 ml) を用いて反応を行い 2.2 mg の [¹⁵N]Tyr³²-Ras タンパク質精製標品を得た。¹⁵N-¹H HSQC スペクトルにより Tyr³² のみが選択的に標識されていること、Tyr³² 以外の Tyr 残基ならびに他のアミノ酸残基への標識の漏れが見られないことを確認した。

この標識法は分子量の大きなタンパク質およびタンパク質間相互作用の解析など、分子量の大きな系の解析に有効である。

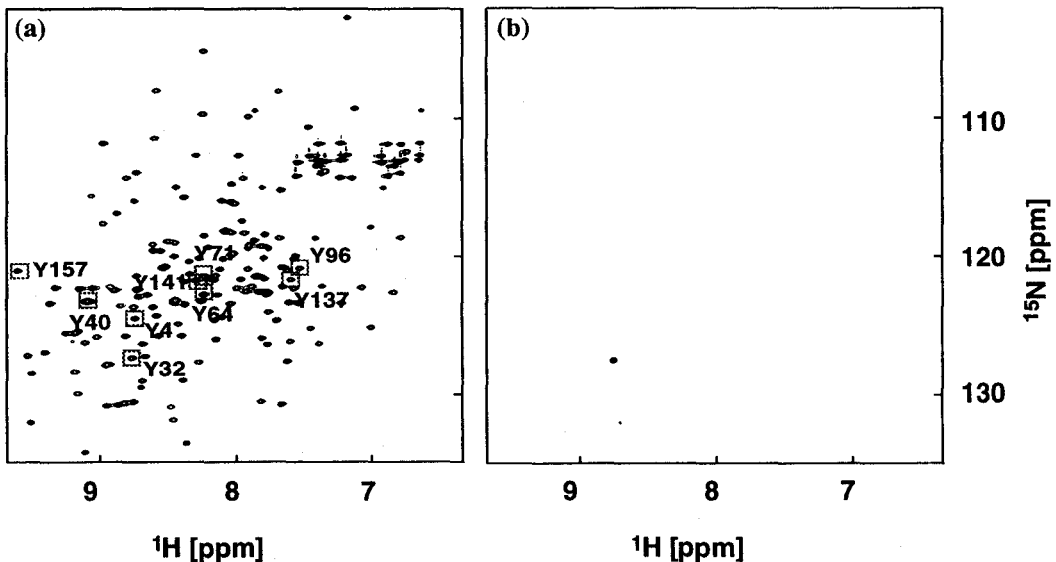


Fig. 1. ¹H-¹⁵N HSQC spectra of (a) uniform [¹⁵N]Ras•GDP and (b) [¹⁵N]Tyr³²-Ras•GDP

- 1) Sonar, S., Lee, C.P., Coleman, M., Patel, N., Liu, X., Marti, T., Khorana, H.G., RajBhandary, U.L. and Rothschild, K.J. (1994) *Nat. Struct. Biol.*, 1, 512-517.
- 2) Kigawa, T., Muto, Y. and Yokoyama, S. (1995) *J. Biomol. NMR*, 6, 129-134.

○森田哲史^{1,4}, 寺田透^{1,3,4}, 伊藤隆², 山崎和彦⁴, 白水美香子¹, 木川隆則¹, 横山茂之^{1,4}

(理研・細胞情報伝達¹, 理研・遺伝生化学², 理研・生体分子解析³, 東大・院理⁴)

NMR structural analysis of GTP-bound form of mutant Ras (P34G)

○Tetsuhito Morita^{1,4}, Tohru Terada^{1,3,4}, Yutaka Ito², Kazuhiko Yamasaki⁴, Mikako Shirouzu¹, Takanori Kigawa¹ and Shigeyuki Yokoyama^{1,4}

¹Cellular Signaling Laboratory, ²Laboratory of Cellular and Molecular Biology, ³Division of Biomolecular Characterization, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), ⁴Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo

The wild type Ras bound with GMPPNP showed the "regional polysterism", which was observed as extreme line broadening of ¹H-¹⁵N correlation peaks, for biologically important loop regions (L1, L2 and L4). A mutant of Ras, Ras(P34G), showed however no polysteric phenomena though it still has the activity to bind to Raf-1, which is one of the downstream targets of Ras.

We presented here the backbone and sidechain assignments of Ras(P34G).GMPPNP, obtained from triple-resonance NMR experiments with deuterium decoupling on 50%-²H/¹³C/¹⁵N-labelled sample. The solution structure of Ras(P34G).GMPPNP has also been calculated from NOE and dihedral angle restraints.

野生型 Ras は活性型である GTP 結合型において、下流のターゲットの活性化や GAP との結合に重要なループ L1, L2, L4 に"局所的構造多形性"が存在し、この領域では主鎖アミド基由来のピークに著しいブロードニングが観測される¹⁾。これに対し、L2 の変異体 Ras(P34G)では"局所的構造多形性"が見られないことから、NMR によって構造決定を行うことが可能であると思われる。Ras(P34G)は下流のターゲットのひとつである Raf と結合する活性を保持していることから、Ras(P34G).GMPPNP の高次構造を決定することで、Raf との相互作用が可能な構造を同定し、さらには Ras の機能発現のメカニズムの理解につながる事が期待される。

Ras(P34G), コンフォメーションの多形性, 主鎖の帰属, 側鎖の帰属, 立体構造決定

もりた てつひと, てらだ とおる, いとう ゆたか, やまさき かずひこ, しろうず みかこ, きがわ たかのり, よこやま しげゆき.

【方法】

Nietlispach らの研究により, HBHACBCA(CO)NNH や(H)CC(CO)NNH のように, 側鎖のプロトンを励起し, アミドプロトンに磁化を移動するタイプの実験では 50%の割合でランダムに ^2H を導入したときに感度が最も上昇することが示されている²⁾. $\sim 50\%^2\text{H}$, $\sim 100\%^{13}\text{C}$, ^{15}N 標識した c-Ha-Ras (P34G) · GMPPNP (1-171) を調製し, 3D HNCACB, 3D HBHA(CBCACO)NNH, 3D HCC(CO)NNH, 3D HCCH TOCSY を測定し, 主鎖, 側鎖の帰属を行った. このサンプルを重水溶媒に置換し, 3D ^{13}C -Separated NOESY-HSQC, 3D ^{13}C -aromatic ^{13}C -aliphatic NOESY を測定した. さらに ^{15}N 標識のサンプルを調製し, ^{15}N -Separated NOESY-HSQC, 2D HMQC-J を測定した. NMR の測定は Bruker DRX600 を用いた. 現在, これらのスペクトルを解析し構造解析を進めている.

【結果・考察】

3D HNCACB によって全ての残基の配列特異的な帰属を行うことができた (Fig.a). 3D HBHA(CBCACO)NNH, 3D (H)CC(CO)NNH, 3D HCCH TOCSY の解析によって主鎖, 側鎖の帰属を行った (Fig.b,c). 芳香環のプロトンの化学シフトについては 3D ^{13}C -Separated NOESY-HSQC の解析から帰属した. 全ての残基について ^1H - ^{15}N のクロスピークが観測されたが, L2 に属する G34, T35 については線形が著しくブロードになっていた. また, L2 の残基にはロングレンジの NOE がほとんど観測されなかった. そこで L2 の運動性が他の領域と異なっているかどうか調べるために, ^{15}N の緩和パラメーターを測定し, 検討を行っている.

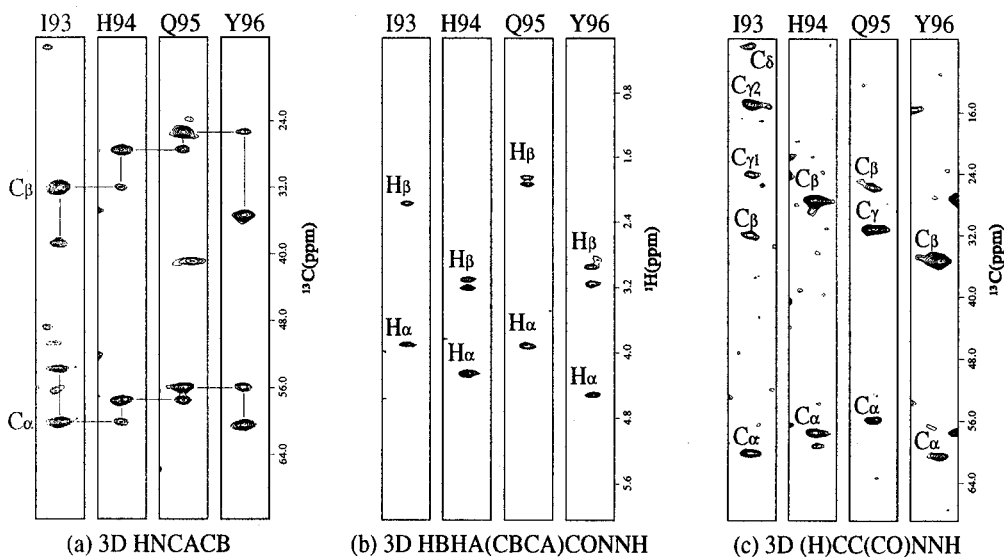


Fig. slices from 3D HNCACB, 3D HBHA(CBCA)CONNH and 3D HCC(CO)NNH spectrum

1. Ito Y *et al.* (1997) *Biochemistry* 36,9109-9119
2. Nietlispach D *et al.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 407-415

コリシンE6のRNaseドメインとインヒビターImmE6の タンパク質間相互作用の解析

(東大応生工¹、理研遺伝生化²、東大院理生化³、理研生体分子解析⁴、理研細胞情報伝達⁵)○大野光宏¹、伊藤 隆²、寺田 透^{3,4}、武藤 裕³、岩原淳二^{3,5}、木川隆則⁵、柴田武彦²、横山茂之^{3,5}、正木春彦¹、魚住武司¹

NMR study of the protein-protein interaction between colicin E6 and ImmE6

(¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, ²Laboratory of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), ³Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, The University of Tokyo, ⁴Division of Biomolecular Characterization, ⁵Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN))

¹Mitsuhiko Ohno, ²Yutaka Ito, ^{3,4}Tohru Terada, ³Yutaka Muto, ^{3,5}Jyunji Iwahara, ⁵Takanori Kigawa, ²Takehiko Shibata, ^{3,5}Shigeyuki Yokoyama, ¹Haruhiko Masaki, ¹Takeshi Uozumi

Abstract

Colicin E6 and its cognate inhibitor ImmE6 form a tightly bound complex. We have found that C-terminal ribonuclease domain of colicin E6, E6-CRD, is the binding interface to ImmE6, and have determined solution structures of E6-CRD and ImmE6 by NMR spectroscopy.

In the present study we reconstructed the small complex, E6-CRD/ImmE6, and investigated the recognition mechanism of the protein-protein interaction system. We prepared a hetero-labeled complex, ¹³C, ¹⁵N-E6-CRD/¹⁵N-ImmE6, and measured a ¹³C-filtered/¹⁵N-separated 3D HMQC-NOE-HSQC spectrum aiming at observing intermolecular NOEs. Relatively strong intermolecular NOEs were found only from backbone amide and sidechain ε-protons of W47 (ImmE6) to E6-CRD, suggesting an important role of W47 in the E6-CRD/ImmE6 recognition.

【緒言】

コリシンE6は感受性大腸菌に殺菌活性を示すタンパク質性毒素である。コリシン生産菌はRNaseドメインに強く結合するインヒビターを共発現して、自殺を免れている。コリシンE6とコリシンE3はアミノ酸の相同性が98%と非常に高いが、それぞれのインヒビターは他方のコリシン活性を阻害する事は出来ない。特定のアミノ酸残基をもう一方のコリシンタイプに変換した時に阻害活性を示す残基を特異性決定基と呼んでいるが、この特異性決定基はコリシン、インヒビターともに高々2残基程度である。我々はこうした特異性を分子レベルで解明するために、コリシンE6のRNaseドメイン(E6-CRD)と

コリシン、タンパク質間相互作用、分子間NOE

おおのみつひろ、いとうゆたか、でらだとおる、むとうゆたか、いわはらじゅんじ、きがわたかのり、しばたけひこ、よこやましげゆき、まさきはるひこ、うおずみたけし

ImmE6の共発現系を構築し、E6-CRD、ImmE6それぞれのサブユニット、及びコンプレックスの立体構造の解析を行っている。E6-CRDにはE6とE3とで異なるアミノ酸を全て含むが、それでも相同性は87%と非常に高い。

それぞれのサブユニットについては、立体構造がほぼ解明できたため、それぞれの分子の接触部分を分子間NOEにより直接観測する事を試みた。ケミカルシフト変化により間接的な情報は得られていたが、直接観測には今回初めて成功し、興味深い知見を得る事ができたので報告する。

【方法と結果】

E6-CRD/ImmE6コンプレックスは、非常に強固なコンプレックスを形成するため、サブユニットに解離するには尿素変性を行っている。こうして尿素変性を経た後リフォールディングさせたサブユニットから再構成したコンプレックスが、ネイティブなコンプレックスとまったく同じ構造をとることは我々がNMRにより既に明らかにしている。この構造の可逆性を利用して、分子間NOEを測定するために、 ^{13}C , ^{15}N -E6-CRD/ImmE6コンプレックスから ^{13}C , ^{15}N -E6-CRDを、 ^{15}N -E6-CRD/ImmE6コンプレックスから ^{15}N -ImmE6を調製し、 ^{13}C , ^{15}N -E6-CRD/ ^{15}N -ImmE6を再構成した。この試料について、 ^{13}C -filtered/ ^{15}N -separated 3D HMQC-NOE-HSQCスペクトルを測定することにより、 ^{13}C , ^{15}N -E6-CRDの分子内NOEに加えて、 ^{15}N -ImmE6の ^{15}N に結合したプロトンから ^{13}C , ^{15}N -E6-CRDの ^{13}C に結合したプロトンへの分子間NOEを直接観測することを試みた。

結果はインヒビターの特異性決定基として最重要と同定されていたW47のアミドプロトンと側鎖の ϵ NHからのみ強い分子間NOEが観測された。このことから、特異性決定基が相互作用面の構造の安定化といった二次的な効果ではなく、直接的な接触により、相互作用の調節に大きく関与している事が初めて明らかになった。コンプレックスの形成前後でケミカルシフトが動いていた他の残基や、もう一方の特異性決定基については、側鎖間の分子間の接触についてまだ解析が及んでいないため、直接的な接触の有無について明言は出来ない。が、今回の様な様々な組み合わせの再構成コンプレックスの利用により近々解析できるものと期待される。

○大木 出¹、池上 貴久¹、秋山 徹²、白川 昌宏¹

¹奈良先端科学技術大学院大学、²大阪大学

NMR Study of the hDLG PDZ2 Domain and the APC C-terminal Peptide Complex

○I. Ohki¹、T. Ikegami¹、T. Akiyama²、M. Shirakawa¹

¹Nara Institute of Science and Technology、²Osaka University

PDZ domains are repeated structure motifs, each of which is comprised of about 100 amino acid residues, found in a number of cytosolic signal transduction proteins localized near cell membrane. PDZ domains recognize a consensus carboxy-terminal sequence, and mediate protein-protein interaction. Human homolog of *Drosophila* tumor suppressor protein, hDLG, has three PDZ domains, and the second one (PDZ2) binds to the C-terminal peptide of APC, which is coded by the causative gene of genetic disease, Familial adenomatous polyposis (FAP). Thereby, hDLG may play a role in the Wnt signal transduction, which is organized by β catenine, APC, Tcf/Lef. In order to understand the molecular mechanism, we have analyzed the three dimensional structure of the complex formed by hDLG PDZ2 and the C-terminal peptide of APC by means of NMR. We found that hDLG PDZ2 consists of 6 beta-strands and 2 sheets. The tertiary structure of the complex, and the mechanism of the molecular recognition will be discussed.

(はじめに)

発生分化や、細胞周期の制御には、隣接細胞からのシグナル伝達が非常に重要である。カドヘリンや Wnt/Wnt レセプターからの隣接細胞間シグナルは細胞内で β カテニンに収束し核に伝えられるが、この伝達経路は癌抑制タンパク質 APC が β カテニンと結合することによって抑制的に調節されている。最近、阪大の秋山らにより ショウジョウバエの癌抑制タンパク質 Dlg (Discs Large) のヒトホモログである hDLG が APC と結合することが示された¹⁾。hDLG は、この APC との結合を介してこの伝達系のシグナル因子としても働いている可能性がある。

hDLG は分子内に PDZ と呼ばれる、100 残基ほどのドメインを 3 つ持っており、このうちの二番目の PDZ ドメイン (PDZ2) が、APC の C 末部分と結合する。PDZ ドメインは細胞膜周辺に見つかるシグナル伝達因子に多く見られ、シナプスで NMDAR レセプターと結合している PSD-95、タイトジャンクションを構成している ZO-1、ZO-2、アポトーシスに関与する FAS レセプターに結合する FAP-1 などに存在している。そこで本研究では、このシグナル伝達の分子メカニズムを解明するため、NMR を用いて hDLG PDZ2 ドメインと APC C 末 7 残基分のペプチドとの複合体の溶液中での立体構造解析を行なった。

Key words: Heteronuclear NMR、Three-Dimensional Structure、hDLG、PDZ Domain、APC、Complex

おおいずる、いけがみたかひさ、あきやまとおる、しらかわまさひろ

(測定試料)

hDLG PDZ2 は、大腸菌内で GST 融合タンパク質として発現させ、精製後 Factor Xa でhDLGのみを切り出し、 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 、 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 、 $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ラベル体を作成した。APC C 末ペプチドは、化学合成により調製した。NMR 測定は hDLG PDZ2 に 3 倍モル量の APC ペプチドを加え、透析で余分なペプチドを除いたものを使用した。

(方法)

試料は 1.5 mM に調整し、KCl 25mM、90% H₂O/10% D₂O、pH 7.0、温度 310 K の条件で測定を行なった。主鎖、側鎖の帰属のために一連の 3 次元 NMR スペクトル (CBCA(CO)HN、CBCANH、HNCO、HN(CA)CO、TOCSY-HSQC、H(CCO)NH、CONH、HCCH-TOCSY) を測定した。また、構造情報を得るため 3 次元、4 次元の NOESY スペクトル (3D NOESY-HSQC、4D CC HMQC-NOESY-HSQC、4D CN HMQC-NOESY-HSQC) の測定、 ^{15}N HSQC による H-D 交換実験を行った。なお NMR スペクトルの測定には、Bruker 社 DRX500、DMX500 および DRX800 を用いて行なった。

構造決定には DYANA および X-PLOR を使い、simulated annealing 法による distance geometry 計算を行なって条件を満たす構造を求めた。

(結果)

hDLG PDZ2 のほとんどの主鎖、側鎖の帰属を完了し、それを元に NOESY スペクトルを解析し、493 個の NOE (隣接残基間 184、中距離 108、遠距離 243) を得た。また、H-D 交換実験も合わせて解析し 21 個の水素結合ペアを推測した。これらの構造情報を元に Dyana で構造計算を行なった。500 個のランダムな初期構造より始め、最終的に得られた構造のうち、最も目的関数の値の小さな構造を 10 個、重ね合わせたものが Fig. 1 である。得られた構造は、6 つの β シートと、2 本のヘリックスを持ち、 $\beta 1$ - $\beta 2$ 、 $\beta 2$ - $\beta 3$ の間のループ部分を除いて比較的良く収束している。ループ部分を除く平均構造に対する r.m.s.d. は主鎖重原子で 1.55 Å であった。現在さらに精密化を進めており、複合体全体の構造とペプチド-タンパク質相互作用について議論する予定である。

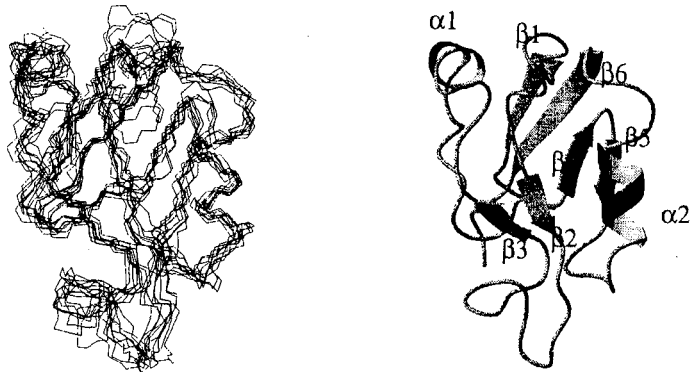


Fig. 1 Superposition of the 10 calculated structures and ribbon diagram of hDLG PDZ2

1) A. Matsumine, K. Toyoshima, T. Akiyama, et al., SCIENCE, 272, p1020-1023, 1996

酸化型および還元型フェレドキシンの構造

(広大・総合科学¹、農水省生物研²、金沢大・理³)○手島圭三¹、加藤悦子²、山崎俊正²、和田敬四郎³、赤堀興造¹Structures of the Oxidized and Reduced *E. arvense* ferredoxins(Hiroshima Univ.¹, NIAR², Kanazawa Univ.³)Keizo Teshima¹, Etsuko Kato², Toshimasa Yamazaki², Keishiro Wada³,Kozo Akabori¹

The solution structures of the oxidized and reduced *E. arvense* ferredoxins were elucidated by two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy. The ¹H-chemical shifts and the secondary structures of the reduced ferredoxin were very similar to those of the oxidized one. However, the chemical shifts of amide or α -protons of D25, E29, K49, D64, H89, E92, E93 and L94 in the reduced state were differed more than 0.1 ppm from those in the oxidized state. These amino acid residues were almost consistent with those which were suggested to be involved in the interactions of the ferredoxin with the Photosystem I complex or ferredoxin-NADP⁺ reductase. It was very interesting that the amino acid residues away from the redox-center showed large chemical shift differences in the oxidized and reduced states.

【序論】 高等植物やラン藻の電子伝達タンパク質、フェレドキシンは、光合成電子伝達系の光化学系 I 複合体から電子を受け取り、フェレドキシンNADP⁺還元酵素 (FNR) 等の還元酵素に電子を渡す働きをしている。このような生体内電子伝達反応は高い反応効率と特異性をもっている。その要因として酸化還元中心の電位が重要であることは言うまでもないが、それだけでなく、反応に関与するタンパク質間の相互作用が重要であると考えられる。光化学系 I 複合体の複合体モデルの研究¹⁾、化学修飾や化学架橋剤による研究²⁻⁴⁾、遺伝子操作による改変体を用いた研究⁵⁻⁶⁾から、フェレドキシンと光化学系 I 複合体およびFNRとの相互作用において、フェレドキシンの酸性アミノ酸残基の重要性が指摘されている。また、フェレドキシンとFNRの解離定数が酸化還元に伴って変動するという興味ある報告がなされている⁷⁾。フェレドキシンの電子伝達反応機構をより詳細に明らかにするためには酸化型と還元型フェレドキシンの構造の比較が必要である。酸化型フェレドキシンの構造は結晶解析により明らかにされているが⁸⁻⁹⁾、酸化還元電位が低いために還元状態での結晶化が困難である。しかし、NMR法を用いれば試料を密封する事によって還元型の構造解析が比較的容易である。そこで、我々は、スギナ (*E. arvense*) フェレドキシンの酸化型と還元型構造の比較をNMR法を用いて行い、タンパク質との相互作用部位の構造変化について考察した。

キーワード：フェレドキシン、電子伝達タンパク質

てしま けいぞう、かとう えつこ、やまざき としまさ、わだ けいしろう、
あかぼり こうぞう

【実験】 酸化型フェレドキシンの¹H-NMR測定は2mMフェレドキシン、75mMリン酸緩衝溶液 (pH8.0) を用いて25℃で行った。HOHAHAおよびNOESY測定の混合時間は、それぞれ、60~85msecと50~150msecである。¹Hシグナルの帰属は二次元NMRデータを用いて定法通りに行った。

還元型フェレドキシンの調製は次のように行った。アルゴンガスで置換した密封セル内で、脱気水で調製した300mMジチオナイト溶液をフェレドキシンの2倍モル量加え、試料を還元し、ステンレス管とアルゴンガスを用いて、空気に触れさせることなくNMR試料管に還元型試料を封入した。二次元NMR測定は酸化型の場合と同様の条件で行った。NMR装置は日本電子 α-400 と Bruker DMX-750 を用いた。NOEの距離情報に基づく構造計算はX-PLOR3.1を用いて行った。

【結果と考察】 スギナフェレドキシンの95個のアミノ酸残基のうち、80個の残基について、¹Hシグナルの帰属を酸化型および還元型で行った。ただし、鉄-硫黄クラスター近傍のS37~G48、L75~I77の¹Hシグナルは酸化型、還元型のどちらの場合でも鉄の常磁性効果により検出できなかった。酸化型フェレドキシンについて約500点のNOE情報からジスタンスジオメトリーとsimulated annealing法で立体構造を構築した。その結果は結晶解析の結果⁹⁾とほとんど同じであった。二次構造は、α-ヘリックスがI23~A30、D64~E70、E91~L94の部分であり、β構造がY2~T8、G11~V17、K49~S52、D83~E87の部分である。還元型の二次構造も酸化型と同様であった。

次に、還元型と酸化型フェレドキシンの化学シフトの差をアミド、αおよびβプロトンについてそれぞれ調べた。アミドとαプロトンの結果をFig. 1と2に示す。

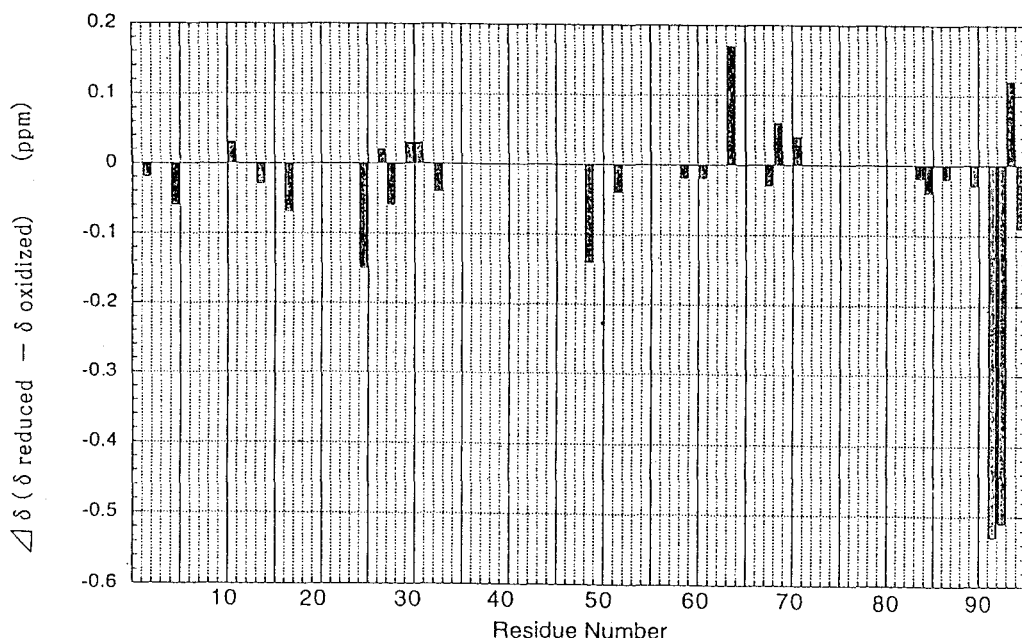


Fig. 1. Differences in the chemical shifts of the amide protons of the *E. arvensis* ferredoxin between the oxidized and the reduced states.

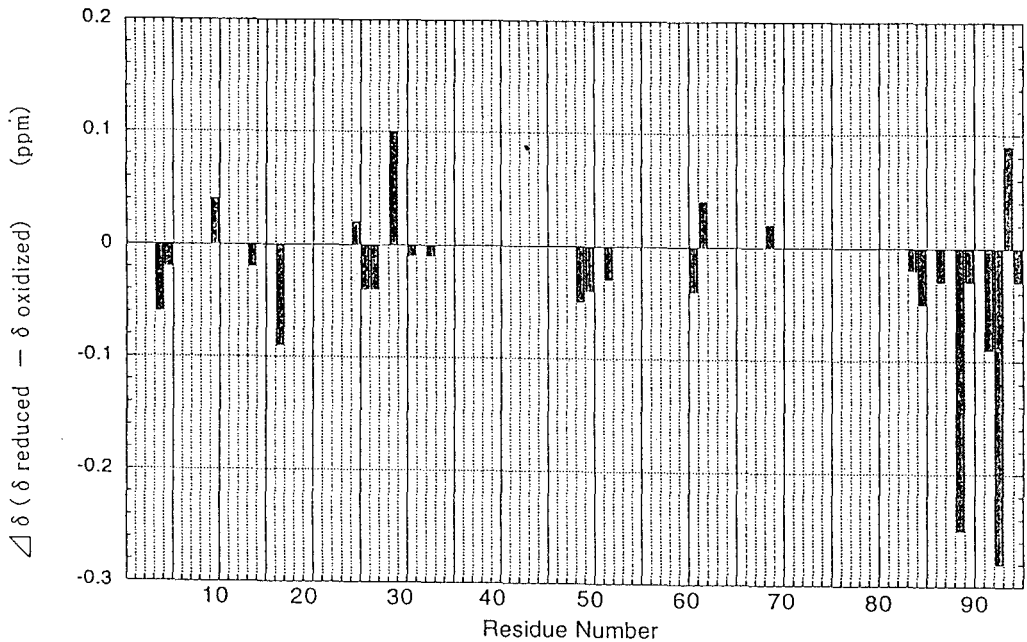


Fig. 2. Differences in the chemical shifts of the α -protons of the *E. arvensis* ferredoxin between the oxidized and the reduced states.

還元型フェレドキシンの¹Hの化学シフトの値はほとんど酸化型と同じであったが、D25、E29、K49、D64、H89、E92、E93およびL94のアミドまたは α プロトンの化学シフトは、還元されることによって0.1ppm以上の変化を示した。 β プロトンについても同様の傾向が見られた。変化を示したアミノ酸残基はすべて種を越えて一次構造上高く保存されていることがわかった。また、これらの残基は、FNRまたは光化学系I複合体と相互作用することが示唆されているアミノ酸残基(D25、E28、E29、D33、D64、D65、E91、E92、E93、残基番号はスギナの一次構造に合わせた)と一致することがわかった。

化学シフト変化の大きいアミノ酸残基の立体構造上の位置関係をNMR法から構築した酸化型主鎖構造の模式図に示したのがFig. 3である。一電子還元される鉄-硫黄クラスターから離れたところにあるアミノ酸残基のプロトンの化学シフトが特異的に変動を受けることは大変興味深い。C末端側にある α -ヘリックス上にE92とE93がある。NH-NHのNOEパターンの比較から、酸化型と還元型でC末端ポリペプチドは同様のヘリックス構造をとっていると思われる。E92、E93、L94の大きな化学シフトの変動から、このヘリックスと他のループ間との相対的位置関係の変化が示唆される。また、H89はそのヘリックスのN末端側にあり、K49は立体構造上そのヘリックスの近くに存在するので、E92、E93、L94の化学シフトの変動にH89とK49が深く関わっていることが示唆される。

今後は、酸化還元に関連した、フェレドキシンと電子の授受を行うタンパク質との相互作用の変化の仕組みを、フェレドキシンの局所構造の運動性と構造変化に基づいて具体的に明らかにしていきたいと思っている。

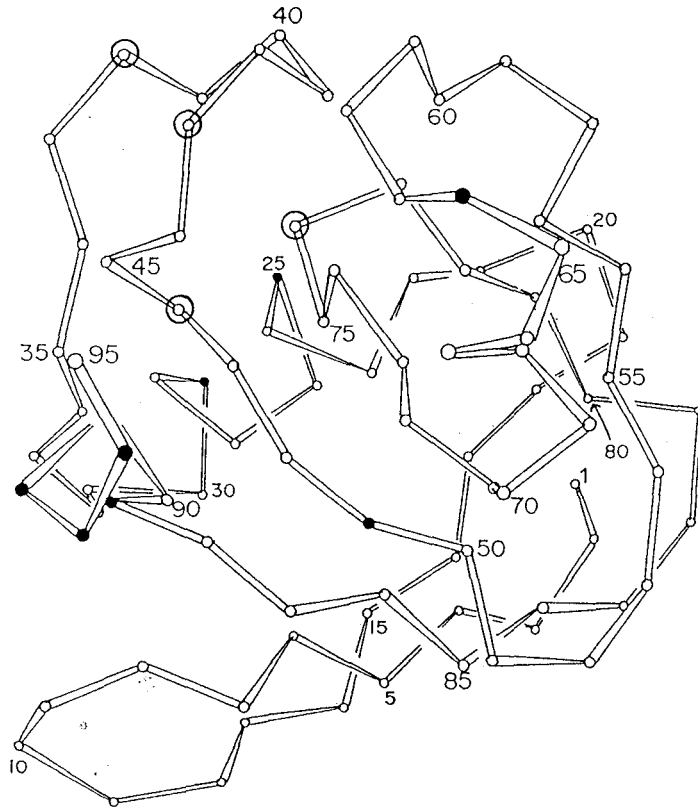


Fig. 3. Schematic representation of the conformation of the oxidized *E. arvensis* ferredoxin. The closed circles show the amino acid residues of which the chemical shifts of amide or α -protons in the reduced state were differed more than 0.1 ppm from the oxidized state. The double circles show C38, C43, C46 and C76 which form the iron-sulfur cluster.

【参考文献】

- 1) J.H. Golbeck, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **43**, 293-324 (1992)
- 2) B. Vieira, K.K. Colvert, D.J. Davis, Biochim. Biophys. Acta, **851**, 109-122 (1986)
- 3) G. Zanetti, D. Morelli, S. Ronchi, A. Aliverti, B. Curti, Biochemistry, **27**, 3753-3759 (1988)
- 4) A.R. De Pascalis, I. Jelesarov, F. Ackermann, W.H. Koppenol, M. Hirasawa, D.B. Knaff, H.R. Bossard, Protein Science, **2**, 1126-1135 (1993)
- 5) A. Bhattacharyya, T.E. Meyer, G. Tollin, Biochemistry, **25**, 4655-4661 (1986)
- 6) J.K. Hurley, Z. Salamon, T.E. Meyer, J.C. Fitch, M.A. Cusanovich, J.L. Markley, H. Cheng, B. Xia, Y.K. Chae, M. Medina, C. Gomez-Moreno, G. Tollin, Biochemistry, **32**, 9346-9354 (1993)
- 7) C.J. Batie, H. Kamin, J. Biol. Chem., **256**, 7756-7763 (1981)
- 8) T. Tsukihara, K. Fukuyama, M. Nakamura, Y. Katsube, N. Tanaka, M. Kakudo, K. Wada, T. Hase, H. Matsubara, J. Biochem., **90**, 1763-1773 (1981)
- 9) S. Ikemizu, M. Bando, T. Sato, Y. Morimoto, T. Tsukihara, K. Fukuyama, Acta Cryst **D50**, 167-174 (1994)

P42

大腸菌RecAタンパク質に結合した単鎖DNAのtransferred NOE解析

○西中太郎^{1,3}、伊藤 隆¹、横山茂之^{2,3}、柴田武彦¹

(理化学研究所・¹遺伝生化学,²細胞情報伝達,³東大・院・理)

Transferred NOE analysis of single-stranded DNA Bound to *Escherichia coli* RecA Protein

○Taro Nishinaka^{1,3}, Yutaka Ito¹, Shigeyuki Yokoyama^{2,3}, Takehiko Shibata¹

¹Cellular & Molecular Biology Laboratory, ²Cell Signaling Laboratory,
The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako-City, Saitama 351-01, Japan
³Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science,
The University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

NMR studies of the DNA oligonucleotides in the presence of *Escherichia coli* RecA Protein have been carried out in order to characterize the conformation of DNA bound to RecA protein. Transferred NOE analysis for RecA-bound DNA oligomers indicated that this structure includes novel deoxyribose-to-base stacking interaction. This structure agrees with the 1.5-fold extension of DNA strands in RecA filaments, previously observed by electron microscopic studies. Moreover, the extended structure includes little steric hindrance between adjacent residues, suggesting that RecA-bound DNA has the advantage of the free motion of the bases that should be required during the process of the base pair switching. A molecular model of the triplex DNA structure for the mechanism of homology search and strand exchange will be presented.

大腸菌recA遺伝子産物 (RecA) は、相同組換えにおいて中心的役割を果たすタンパク質であり、そのホモログは広く哺乳類まで存在している。ホモログ間のアミノ酸配列相同性は20-30%と低いにも関わらず、それらが形成するフィラメント状のDNA複合体の構造は互いに非常に類似している。複合体フィラメント内のDNAは通常のDNAに比して1.5倍に引き延ばされ、18.6 bp/turnに巻き戻されて観察されるが、原子配置レベルでの知見は未だ得られていなかった。

我々は、RecAタンパク質に結合したDNAの構造について解析する目的でRecAタンパク質に結合したDNAオリゴヌクレオチドのtransferred NOE (TRNOE) 測定を行った。DNAオリゴヌクレオチド (3-6 bases) とATP非加水分解アナログATP γ Sを含む

transferred NOE、RecA、DNA、相同組換え

にしなか たろう、いとう ゆたか、よこやま しげゆき、しばた たけひこ

溶液にRecAタンパク質を加えると1D NOE差スペクトル上にTRNOE由来のシグナルが観察された。このシグナルはATP γ SをADPに置換することにより顕著に減少した。また、DNAオリゴヌクレオチドを塩基の配列がそれに対応するRNAオリゴヌクレオチドに置換することによってもシグナルが顕著に減少した。

また、 $T_{1\rho}$ 値のスピロックパワー依存性を測定することにより、DNAオリゴヌクレオチドのRecAタンパク質からの解離速度を求めた。その結果、DNAオリゴヌクレオチドd(TGACAT)においては30°Cで40000 (\pm 4000)s⁻¹、DNAオリゴヌクレオチドd(TAG)においては30°Cで54000 (\pm 5000)s⁻¹、との値を得た。

得られたTRNOEデータを用い、simulated annealingによる構造計算を施し、良く収束した構造を得た。我々は3merから6merまでのDNAオリゴヌクレオチドを用い、同様の実験を行ったが、得られたTRNOEスペクトルのパターンはほとんど全ての残基について同様であった。従って我々は、今回得られた構造は、RecAに結合したDNAについて共通に観察されるものであると結論した。

得られた構造の最も顕著な特徴はそのスタッキング様式にある。典型的なDNA構造では塩基間がファン・デル・ワールス接触しているのに対し、RecA結合型ではデオキシリボースのC2', H2', H2''部位が次に続く残基の塩基部位の上方に位置する。塩基間の距離は約5.1Åに離されており、これはB型DNAの1.5倍に相当する。さらに、この構造は隣り合う残基間での立体障害が少なく、塩基対の交換時に要求される塩基の自由な運動に有利であるという利点がある。

得られた構造はTRNOEデータを定性的に良く説明しているが、シュガーのパッカリングの型は純粋なN-typeでもS-typeでもなく、その中間の型を示している (Fig. 1)。これは残基内H3'-H8/H6 NOEおよび残基内H1'-H8/H6 NOEの強度は、残基内H2'-H8/H6 NOEの強度に比して期待されるよりも強いことが原因である。このことは、RecAタンパク質に結合したDNAが実際に中途半端なシュガーパッカリングを取っている可能性を示しているが、RecAタンパク質がN-typeとS-typeのシュガーパッカリングの平衡状態にあるという可能性を否定できない。このN-typeからS-typeあるいはS-typeからN-typeへのシュガーパッカリングの変換によって、DNA分子の塩基部分がほぼ水平に、顕著な立体障害無く回転する。実際、我々は緩和行列解析により、得られたTRNOEがN-typeとS-typeのシュガーパッカリングの混合状態であるとしても矛盾無く解釈できることを確認した。

このNMR解析の結果得られた構造の特徴および生化学的、生物物理学的な実験により今まで得られている知見に基づき、RecAフィラメント内の二重鎖DNAの分子構造モデルを構築した。その結果、2つの型のDNA分子構造を得た (Fig. 2)。その一つ

はN-type のシュガーパッカリングを持つ構造で, RecAタンパク質のATP型フィラメントに対応する約95Å (18.6 bp/turn) のらせんピッチを持っている. もう一つはS-type のシュガーパッカリングを持つ構造で, RecAタンパク質のADP型フィラメントに対応する約64Å (12.5 bp/turn) のらせんピッチを持っている.

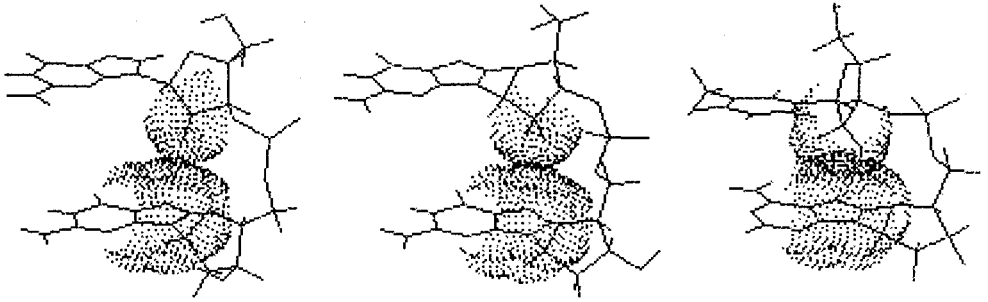


Fig. 1. Side view of the S-type (left) and the N-type (center) structure of RecA-bound DNA. Calculated structure determined by NMR is shown in right.

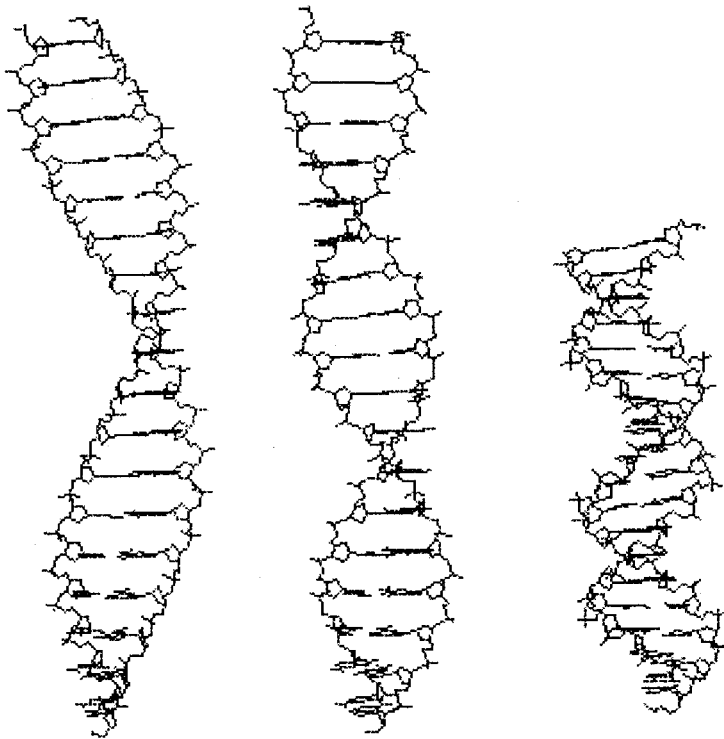
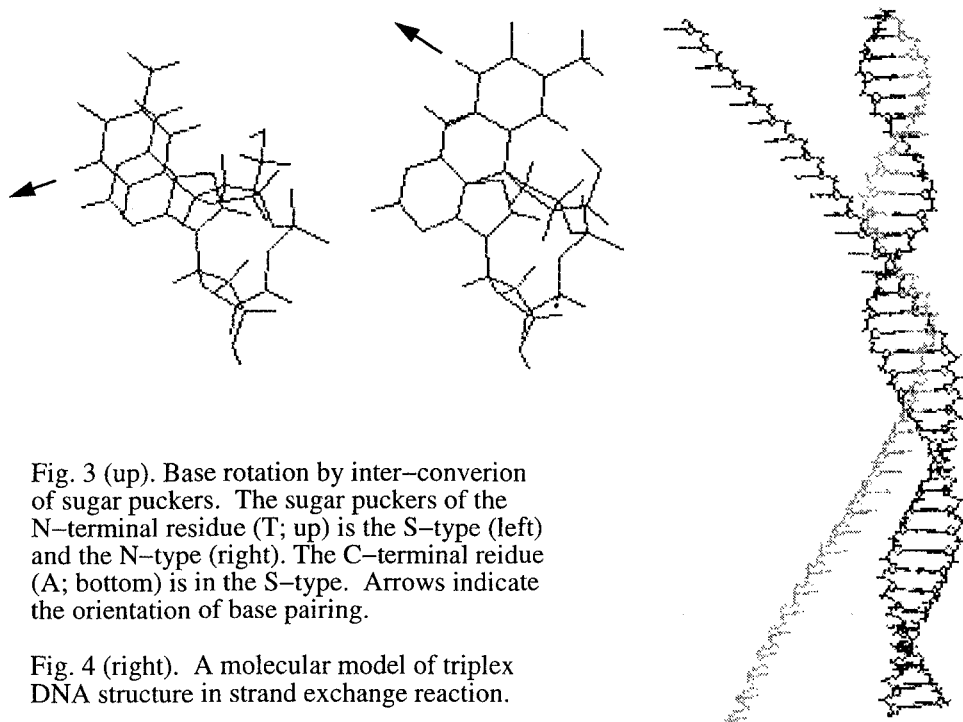


Fig.2. Molecular models of DNA within RecA filaments. The N-type structure (left), the S-type structure (center). B-form DNA is shown in right.

以上、今回のNMR解析により、RecAタンパク質に結合したDNAの特異な構造上の特徴 (deoxyribose-base stacking) が明らかになった。また、それが非常に柔軟性に富む構造である可能性が示唆された。この柔軟に運動しやすい性質が単鎖DNAと二重鎖DNAとの間の塩基対を交換するという動的な反応を可能にさせる要因となっていると想定される。我々は、シュガーパッカリングのN-typeとS-typeとの間のコンフォメーション変化が、塩基配列の相同性の探索およびDNA鎖交換反応の際に必要な塩基の回転に深い関連があると考えている。我々は今回、このシュガーパッカリングの相互変換による相同探索、鎖交換反応の三重鎖DNA分子構造模型を提出する。



REFERENCE: T. Nishinaka *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 6623-6628 (1997).

P43

ミトコンドリア膜透過装置 rat Tom20p の cytoplasmic domain の NMR 解析

(生物分子工学研究所¹、名古屋大学理学部²) ○阿部義人¹、小代俊浩²、
遠藤斗志也²、神田大輔¹

NMR study of cytoplasmic domain of rat Tom20p in mitochondria outer membrane translocation system.

(Biomolecular Engineering Research Institute¹; Faculty of Science, Nagoya University²)

Yoshito ABE¹, Toshihiro SHODAI², Toshiya ENDO², Daisuke KOHDA¹

Tom20p is an outer mitochondrial membrane protein and functions as a component of the import receptor complex for the cytoplasmically synthesized mitochondrial precursor proteins. We overexpressed the cytoplasmic domain of rat Tom20p in *E. coli* cells, and analyzed it using NMR spectroscopy and limited proteolysis. The results suggested that N-terminal 27 residues of the cytoplasmic domain were flexible. Upon addition of mitochondrial presequence, the cross peaks of ¹H-¹⁵N HSQC moved, suggesting that Tom20p is a primary binding site of mitochondrial presequences. The analysis of the cytoplasmic domain of Tom20p will give us the more information on membrane translocation system in mitochondria.

[序論]

ミトコンドリアを構成する多くのタンパク質は核の DNA にコードされており、それらはミトコンドリア中に送られ、機能を発揮する、その時に必要な膜透過装置は Tom (transmembrane outer membrane) - Tim (translocation inner membrane) complex と呼ばれる約 10 種類の膜タンパク質により構成されている。その中で Tom20p-Tom22p complex はシグナル配列認識レセプターとしての機能を持っており膜透過装置の中でプレタンパク質のシグナル配列を最初に認識し、ミトコンドリア内への輸送を開始すると考えられている。今回我々は、ラット Tom20p の細胞内ドメインの大腸菌による大量発現系を構築し、NMR 及びプロテアーゼによる限定分解を用いて解析を行った。これらの解析はミトコンドリアの膜透過装置の解明に有力な情報を与えると期待される。

キーワード：ミトコンドリア、Tom20p、多次元 NMR、

ふりがな：あべよしと、しょうだいとしひろ、えんどうとしや、こうだだいすけ

[実験]

1、ラット Tom20p 細胞外ドメインの調製

全長 145 残基のラット Tom20p から膜貫通部分の N 末端 24 残基を欠失させた細胞外ドメイン (Tom20p Δ (1-24)) は大腸菌により、pET プラスミドを用いて発現させ、精製した。また、プロテアーゼによる限定分解を行い、さらに N 末端から 27 残基を削除したもの (Tom20p Δ (1-51)) を調製した。¹H-¹⁵NNOE 実験をもちいて得られた各コンストラクトの動的挙動を解析した。

2、プレ配列ペプチドとの相互作用の解析

プレ配列 pALDH (rat liver aldehyde dehydrogenase のプレ配列 20 残基) と OTC38 (ornithine transcarbamylase プレ配列 38 残基) をペプチド合成し、¹⁵N ラベルした Tom20p の細胞外ドメインとの相互作用を ¹H-¹⁵NHSQC のスペクトルを比較することにより調べた。さらに、Tom20p とプレ配列との相互作用をプロテアーゼ分解を用いて調べた。

[結果と考察]

我々は Tom20p Δ (1-24) を大腸菌を用いて、約 10mg/L の平均収量で発現させた。得られた Tom20p Δ (1-24) を V8 プロテアーゼ (5000:1 w/w) 及びトリプシン (10000:1 w/w) によりプロテアーゼによる限定分解を行うとさらに N 末端から 27 残基及び 28 残基が優先的に分解を受けることが確認された。また、Tom20p Δ (1-24) の ¹H-¹⁵NNOE 測定を行うと、¹H の化学シフトにおいて 7.9ppm~8.4ppm、¹⁵N の化学シフトにおいて 120ppm~125ppm の部分に非常に運動性の高い部分 (¹H-¹⁵N NOE<0.5) が存在していた。しかし、プロテアーゼによる限定分解を用いて N 末端 27 残基を削除した Tom20p Δ (1-51) においては、これらの大部分が消失する事がわかった。このことから、Tom20p Δ (1-24) の N 末端部分には非常に flexible な部位が存在していることが判明した。

プレ配列ペプチド pALDH と OTC38 をそれぞれ Tom20p Δ (1-24) に添加し、¹H-¹⁵NHSQC のスペクトルの変化を調べた。双方のペプチドで共通のシグナルが変化しており、これは Tom20p の上にプレ配列の認識ポケットの存在を示しているものと考えている。また、化学シフトの変化量は OTC38 の方が大きく、2つのペプチドの結合力に差異があるものと考えられる。更に Tom20p Δ (1-51) に OTC38 を添加したところ、Tom20p Δ (1-24) と同様の部位のシグナルが変化していることを見いだした。このことは、Tom20p の 52-145 残基にプレ配列の認識ポケットが存在していることを示す。

また、Tom20p Δ (1-24) の V8 プロテアーゼによるプロテアーゼ分解をペプチド存在下及び非存在下でおこなった。N 末端 27 残基の切断速度はペプチド存在下及び非存在下では同じであった。しかし、長時間の反応の結果、ペプチド存在下での Tom20p Δ (1-51) の更なる分解がペプチド非存在下に比べて遅くなっている事が見いだされた。さらにマスペクトルによる解析をおこなうと、Tom20p Δ (1-51) の 73 番目のグルタミン酸の C 末端側の分解がペプチドにより抑制されていた。このことから、Tom20p の細胞外ドメインはミトコンドリアのプレ配列と 73 番目付近の部分と部位特異的に相互作用をしているのではないかと予想している。さらにこれらの結果を確かめるため、現在 Tom20p の細胞外ドメインの帰属を行っている。

(都臨床研¹, 慶大理工², 学習院大³, ニューヨーク大⁴)○小椋賢治¹, 土屋滋夫^{1, 2}, 寺沢宏明¹, 湯沢 聡^{1, 3}, 畠中秀樹¹,
V. Mandiyan⁴, J. Schlessinger⁴, 稲垣冬彦¹**Solution Structure of the Grb2 SH2 Domain Complexed with the Phosphotyrosine Containing Peptide Derived from Shc**Kenji Ogura¹, Shigeo Tsuchiya^{1, 2}, Hiroaki Terasawa¹, Satoru Yuzawa^{1, 3}, Hideki Hatanaka¹, Valsan Mandiyan⁴, Joseph Schlessinger⁴, and Fuyuhiko Inagaki¹¹Department of Molecular Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. ²Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University. ³Institute for Biomolecular Science, Gakushuin University. ⁴Department of Pharmacology, New York University Medical Center.

Src homology 2 (SH2) domains are protein modules found within a wide variety of cytoplasmic signaling molecules that bind with high affinity to phosphotyrosine (pTyr)-containing protein sequences. The solution structure of Growth Factor Receptor-Bound protein 2 (Grb2) SH2 domain complexed with Shc-derived pTyr-containing peptide was determined by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonances of the SH2 domain of Grb2 were assigned by analysis of multi-dimensional, double- and triple-resonance NMR experiments. Twenty structures of the Grb2 SH2 domain were calculated using with X-PLOR on the basis of 1649 experimentally derived conformational restraints containing 89 intermolecular NOEs. The structures converged to a root-mean-squared distance deviation (rmsd) of 0.66 and 1.11 Å for the backbone atoms and for the non-hydrogen heavy atoms, respectively. The pTyr binding site of the Grb2 SH2 domain was similar to that of other SH2 domains. The C-terminal region following to pTyr did not form an extended structure due to blocking by a bulky sidechain of Trp-121 of the Grb2 SH2 domain. As a result, the peptide formed a turn-structure on the surface of the Grb2 SH2 domain. Asparagine residue at pTyr +2 position of the bound peptide, which is the specific residue for protein-binding from peptide library screening experiments, interacted with Lys-109 and Leu-120 of the Grb2 SH2 domain. In comparison with the peptide-free structure of the Grb2 SH2 domain, the conformation of BC loop changes upon peptide binding. This suggest that, like the *lck* and *blk* SH2 domains, the BC loop may have a gated phosphotyrosine binding site.

Grb2, SH2, Shc

おぐらけんじ, つちやしげお, てらさわひろあき, ゆざわさとる,
はたなかひでき, Mandiyan, V., Schlessinger, J., いながきふゆひこ

コアクティベータCBPのCREB結合ドメイン(KIX)の
3核3次元NMR法による立体構造解析
(1 東京都臨床研、113東京都文京区本駒込3-18-22、
2 理研筑波ライフサイエンス、茨城県つくば市高野台)
○永田宏次1、小椋賢治1、畠中秀樹1、高橋知巳2、
秋丸裕司2、戎井悦子1、石井俊輔2、稲垣冬彦1

Three-dimensional structure analysis of the CREB-binding domain (KIX) of the transcription coactivator CBP by triple-resonance three-dimensional NMR

(1 The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan, 2 RIKEN Tsukuba Life Science Research Center, Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, Japan)

Koji Nagata1, Kenji Ogura1, Hideki Hatanaka1, Tomomi Takahashi2, Hiroshi Akimaru2, Etsuko Ebisui1, Shunsuke Ishii2, Fuyuhiko Inagaki1

The transactivation by the transcription factor CREB depends on the phosphorylation of its Ser (position 133 in mouse; 202 in *Drosophila*), because only the phosphorylated CREB associates with the coactivator CBP. CBP bridges between CREB and a component of basal transcription machinery TFIIB. In order to investigate the structural basis of the phosphorylation-dependent interaction of CREB and CBP, we have determined the three-dimensional structure of the CREB-binding domain of *Drosophila* CBP (KIX) based on the NOE data. KIX consists of three α -helices. The formation of KIX-KID complex induced chemical shift perturbations of some main-chain atoms of KIX, indicating that these atoms are located at or near the intermolecular interaction surface. Assignment of intermolecular NOEs is now in progress.

転写活性化因子CREBはふだんからDNAに結合しているがそれだけでは転写活性化能はない。Aキナーゼ等によりCREBのSer残基(マウスの場合113位、ショウジョウバエ202位)がリン酸化されることで、CREBはコアクティベータCBPに結合し、CBPを介して基本転写因子群に作用し転写を活性化する。このSerのリン酸化に依存するCREB-CBP複合体形成の分子機構を明らかにするために、まずCBPのCREB結合ドメイン(KIX、85残基)の立体構造をNMRにより解析した。¹³C,¹⁵N均一標識体の調製、各種3核3次元NMRの測定・帰属、3次構造決定をおこなった。KIXは3つの α ヘリックスを有していた。次にCREB由来のリン酸化Ser含有ペプチド(KID)添加による化学シフト変化からKIXのKID結合残基を特定した。現在、KIX-KID複合体について分子間NOEの帰属を進めており、相互作用の詳細な解析をおこなう予定である。

コアクティベータ、転写因子、CBP、CREB、立体構造

ながたこうじ、おぐらけんじ、はたなかひでき、たかはしともみ、
あきまるひろし、えびすいえつこ、いしいしゅんすけ、いながきふゆひこ

P47

ヘパリン結合性成長因子ミッドカインのヘパリン結合様式

(都臨床研 1、ペプチド研 2、名大医 3、生化学工業 4、東大理 5)

○岩崎わかな 1, 5、永田宏次 1、畠中秀樹 1、乾達也 2、木村皓俊 2、村松喬 3、吉田圭一 4、田隅三生 5、稲垣冬彦 1

The Structural Model for Heparin-Binding of Midkine, a New Heparin-Binding Growth Factor.

(Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science 1, Peptide Institute Inc. 2, Nagoya University School of Medicine 3, Seikagaku Corporation 4, University of Tokyo 5)

Wakana Iwasaki 1, 5, Koji Nagata 1, Hideki Hatanaka 1, Tatsuya Inui 2, Terutoshi Kimura 2, Takashi Muramatsu 3, Keiichi Yoshida 4, Mitsuo Tasumi 5, Fuyuhiko Inagaki 1

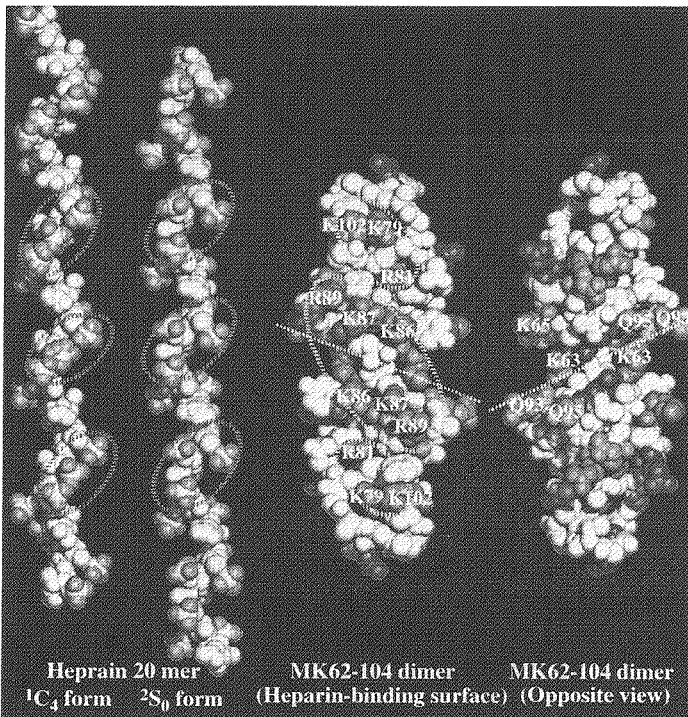
Midkine (MK) is a 13kDa new heparin-binding growth factor. MK is structurally divided into two domains and most of the biological activities are located on the C-terminal domain. The solution structures of the two domains were determined by NMR. Both domains consist of three antiparallel β -strands but the C-terminal domain has a long flexible hairpin loop where heparin-binding consensus sequence is located. The heparin-binding affinity was enhanced upon formation of a MK dimer. This is due to a new heparin binding site formed at the interface of the head-to-head dimer interface of the C-terminal domain. The head-to-head dimer model is consistent with the results of cross-linking experiments by transglutaminase. The MK dimer on heparan sulfate may be presented to the receptor to induce receptor dimerization.

【序】ミッドカイン(MK)は、アミノ酸 121 残基からなるヘパリン結合性の成長因子で、神経突起伸長、神経細胞生存維持、プラスミノーゲン活性化酵素の活性促進などの働きを示す。その一次構造は既知の成長因子とは相同性が認められず、新しいファミリーを形成しており、高次構造に興味を持たれていた。MK による神経突起伸長作用は、細胞外の MK と神経細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用によって開始されると考えられている。本研究では、NMR により MK の立体構造を決定するとともに、ヘパラン硫酸のモデルとしてヘパリンを用い、ヘパリンとの結合様式について明らかにすることを目的とした。なお、ヘパリン結合を始めとする MK の機能は、主に C 末端側 (62-104) によって担われている。

【方法・結果】固相法により合成した MK1-59, MK62-104 について、NMR 測定・分子動力学計算により立体構造を決定した。NOESY スペクトルの比較から、これらドメインの構造は、MK 全長においてもほぼ完全に保たれていることが確認された。MK1-59, MK62-104 共に 3 本の β 鎖からなる逆平行 β シート構造を持つ。しかし、2 本目と 3 本目の β 鎖を結ぶループが、MK62-104 では顕著に長いのが特徴的であった。この長いループ上には、ヘパリン結合コンセンサス配列が存在しており、

ループが柔軟に動くことによって、ヘパリンに対するより精密な結合部位が形成されると考えられる。さらに、このコンセンサス配列と同じ側に塩基性残基からなるクラスターが存在しており、これら2箇所によってヘパリンと結合すると考えられる。実際、ヘパリン12糖の共存・非共存下におけるMK62-104のNMRスペクトルを比較したところ、側鎖プロトンの化学シフトの変化が観測された残基は全て、塩基性クラスターの存在する面上に局在し、裏面上には全く存在していなかった。

MKのヘパリン結合活性は、MK2量体の形成によって促進されることが知られている。これは、MKのC末端ドメインがhead-to-head状の2量体を形成すると、2量体界面上に新たな塩基性クラスターが形成されるためだと考えられる(下図)。このhead-to-head2量体モデルは、小島らによるトランスグルタミナーゼによる架橋実験の結果を説明することができる。head-to-head2量体上では、アミンアクセプターであるGln95は、もう1つのMK分子のLys63と近い位置に露出されているからである。MKは、ヘパリン硫酸上で2量体の形でMK受容体に提示され、さらにMK受容体の2量化を介してシグナルが伝達されると考えられる。



The Model for the heparin-binding structure
(Dotted circles indicate acidic or basic clusters)

成長因子

いわさきわかな、ながたこうじ、はたなかひでき、いぬいたつや、きむらてるとし、むらまつたかし、よしだけいいち、たすみみつお、いながきふゆひこ

GlcNAc (N-アセチルグルコサミン) 基を含む糖質分子で 観測された糖の構造異性体

(工技院生命研) ○石塚靖子、M. M. Billah、中西洋志

Stereoisomers Observed in Saccharide Molecules Containing N-acetylglucosamine Group
(AIST, National Institute of Bioscience and Human-Technology.)

○Yasuko ISHIZUKA, Mohammad M. BILLAH, and Hiroshi NAKANISHI

In the analysis of 750 MHz ^1H NMR spectra of oligosaccharides with N-acetylglucosamine group(LNT, LNnT and LNH), the separate two peaks for the anomeric proton signal in the N-acetylglucosamine group were observed at room temperature. At higher temperature, the peaks fused into one signal. The same phenomena were also found in the signal of the N-methyl protons of the N-acetylglucosamine group. These results strongly indicate the existence of the conformers around the N-acetylglucosamine in the special oligosaccharides.

序：β-D-グルコースは水溶液においてピラノース環の2つのいす形のうち $^4\text{C}_1$ 構造（略してC1）をとると考えられ、アノメリック水素は7-8 Hzの分裂をしたダブルレットとして観測される。この分裂は $^3\text{J}_{1,2}$ によるもので、1位の水素と2位の水素の2面角はほぼ180度である。β-D-グルコースが糖鎖の中に組み込まれている場合でもアノメリック水素の分裂は変わらず、殆どの場合、それ以外の2-6位の水素に比べて低磁場に遊離して観測されるために、糖鎖のシグナル帰属の基礎となっている。

アノメリック水素が単純なダブルレットではなく、ダブルダブルレットになる場合があることが知られている。ラクトースの場合、非還元糖であるガラクトースのアノメリック水素はダブルダブルレットである。これはラクトースのα-アノマーとβ-アノマーでは化学シフトが0.002 ppmだけ異なるために起こる。500 MHzの分光器ではこの化学シフトの違いは1 Hzで、 $^3\text{J}_{1,2}$ に因る分裂に比べ小さいため、α-アノマーとβ-アノマーの存在比に依存した強度のダブルダブルレットとなる。ラクトースではガラクトースのアノメリック水素のみならず、2位、3位、5位もα-アノマーとβ-アノマーの違いが見られた。本研究ではこのようなα-アノマーとβ-アノマーの化学シフトの違いによらない他のダブルダブルレットの例を示し、その原因がN-アセチルアミノ

キーワード：GlcNAc (N-アセチルグルコサミン)、糖、 ^1H NMR

いしづかやすこ、もはめど・びらー、なかにしひろし

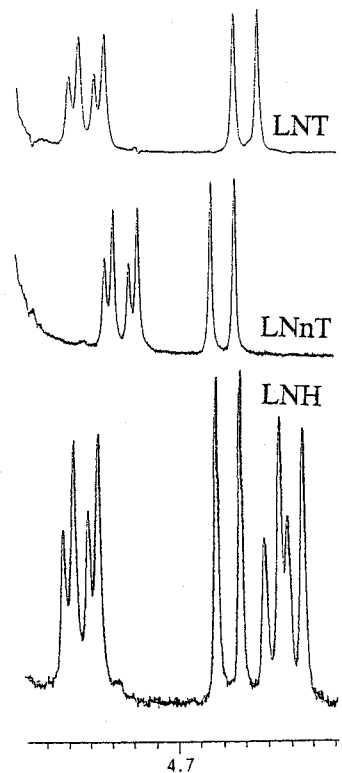


Fig. 1. Anomeric proton of N-Acetylglucosamines, each includes one of β-D-glucose.

基に由来する構造異性であることを突き止めたので、その結果を報告する。

実験：糖鎖として市販（生化学工業）のラクト-N-テトラオース（Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc：LNT）、ラクト-N-neo-テトラオース（Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc：LNnT）、ラクト-N-ヘキサオース（Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc：LNH）を主に用いた。糖鎖1-5mgを重水溶液0.4mlに溶かし、DMX750(Bruker製)を用いてNMRスペクトルを測定した。

結果：Fig. 1に298KにおけるLNT, LNnT,及びLNHのN-アセチルグルコサミンのアノメリック水素のシグナルを示す。この分裂はN-アセチルグルコサミンが還元末端から3糖目であることから、還元末端のα-アノマーとβ-アノマーの違いによるものとは考えられない。また分裂はTableに示すように数Hz程度の小さなものであった。TableにはN-アセチルのメチル水素の分裂も示したが、N-アセチルグルコサミンのアノメリック水素とN-アセチルのメチル水素に明らかな分裂が見られた。N-アセチルグルコサミンの2位から6位の水素核の分裂は残念ながら、確認されていない。これらN-アセチルグルコサミンのアノメリック水素とN-アセチルのメチル水素は昇温すると融合してそれぞれ1つのシグナルになる。Fig. 2にLNHのN-アセチルグルコサミン基のアノメリック水素のスペクトルの温度変化を示す。このスペクトルでは還元末端糖がα-アノマーのアノメリック水素の298Kにおけるシグナルを化学シフトの基準として用いている。LNHの298Kにおける¹³C NMRスペクトルではN-アセチルグルコサミン基のアノメリック炭素が他の炭素シグナルに比べ、ブロードになっており、2つのN-アセチルのメチル炭素の内の1つは明らかに分裂が見られた。これらの結果から、N-アセチルグルコサミンのアノメリック水素とN-アセチルのメチル水素の分裂はN-アセチルアミノ基が関与した構造異性体の存在を示唆する。

このようなアノメリック水素の分裂は還元末端にGlcNAcを含む、N-アセチルラクトサミンや還元糖であるN-アセチルガラクトサミンやN-アセチルグルコサミンでは観測されていない。このような小さな分裂は高磁場の分光器によって初めて明らかになったものであるが、わずかなエネルギー差の異性体が糖鎖に存在し、生体の微妙な分子認識に寄与しているのではないかと考えられる。

Table Signal Splittings observed in GlcNAc of oligosaccharides at 298K.

	Signal Splitting (Hz)	
	anomeric proton	methyl proton
LNT	3.28	0.91
LNnT	2.83	0.85
LNH	3.50, 4.95	0.86 1.75

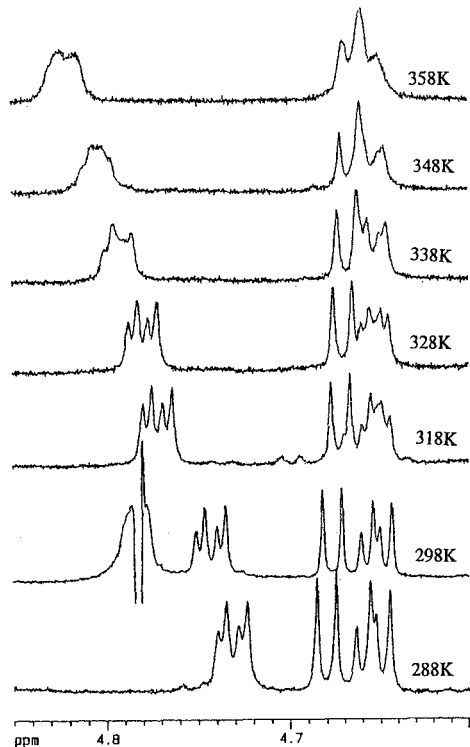


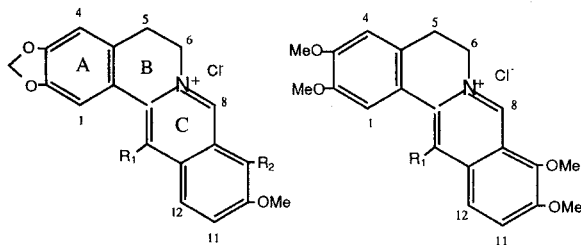
Fig. 2 Anomeric protons of GlcNAc C and E in Lacto-N-hexaose

Stereochemical Considerations of Protoberberine Type Alkaloids using the Selective Relaxation Methods

Makiko Sugiura, Tourei Sai, Kinuko Iwasa
Kobe Pharmaceutical University

The modified selective relaxation method in which the selective non-inversion relaxation times (T_1^{SNI}) and non-selective relaxation times (T_1^{NS}) are measured has been applied to several berberine (I - V) and palmatine derivatives (VI - VIII). On this method, cross relaxation values (σ_{ij}) and inter-proton distances (r_{ij}) have been estimated for several pairs of protons for these alkaloids. The conformations of these alkaloids are discussed using the r_{ij} values concerning with those bioactivities.

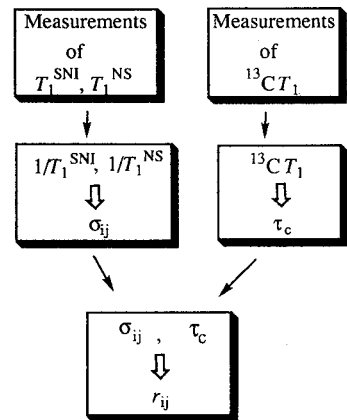
【はじめに】 Berberine, Palmatine など Protoberberine 型アルカロイドには、抗菌活性、抗腫瘍活性などの生物活性をもつものも多く、またその活性は、置換基の有無、種類等によっても微妙に差が出てくる。¹⁾ それらの活性の差は、置換基そのものの種類・大きさの変化と共に、その置換基の差によって引き起こされる作用部位におけるわずかなコンホメーションの変化にも依存している可能性が考えられる。そのことを考慮に入れた上で、Berberine, Palmatine およびそれらのいくつかの誘導体について、改良選択的緩和法を適用し、得られた水素間距離からコンホメーションの変化について考察を試みた。



	R ₁	R ₂
I	-H	-OMe
II	-Me	-OMe
III	-Pr ⁿ	-OMe
IV	-Bu ⁿ	-OMe
V	-H	-OH

	R ₁
VI	-H
VII	-Me
VIII	-Pr ⁿ

Flow Chart of the Modified Selective Relaxation Method



今回用いたのは上に示すような 5 種の Berberine 誘導体および 3 種の Palmatine

キーワード：選択的緩和法 Berberine Palmatine 交差緩和 立体化学

すぎうら まきこ さい とうれい いわさ きぬこ

誘導体である。これらにより、主に 13 位置換基の有無・種類によるコンホメーションの変化と 2, 3 位の置換基の違いによるコンホメーションの変化について考察を加える。

選択的緩和法は、上記フローチャートのように、Selective Non-inversion T_1 (T_1^{SNI}) と通常の Non-selective T_1 (T_1^{NS}) の測定から交差緩和 (σ_{ij}) を、さらにそれから水素間距離 (r_{ij}) を得る方法である。

【実験】各アルカロイドを重メタノールに溶解し、それぞれ脱ガス、溶封して測定サンプルとした。

それぞれのサンプルについて上記フローチャートに従い、 T_1^{NS} 、 T_1^{SNI} 、 ^{13}C T_1 の測定を行った。NMR の測定は Varian VXR-500 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125MHz) を用い、 T_1^{NS} 及び ^{13}C T_1 の測定は通常の IR 法を、 T_1^{SNI} の測定はあらかじめ Gaussian-shaped パルスで選択的に特定の信号を反転させた後 $180^\circ - \tau - 90^\circ$ となるパルスシーケンス²⁾を用いて行った。

【結果と考察】Table 1 にそれぞれのアルカロイドの T_1^{NS} の値を、Table 2 に ^{13}C T_1 の値をそれぞれまとめた。また Table 3, 4 に I および VIII を例として、議論の対象となる水素の T_1^{NS} および T_1^{SNI} の測定値を示した。(他のアルカロイドについても同様にそれぞれの値が得られている。)

Table 1. T_1^{NS} values (s) for alkaloids I~VIII.

	R_1																
	H1	H4	H5	H6	H8	H11	H12	H13	H1'	H2'	H3'	H4'	OCH ₃ O	2OMe	3OMe	9OMe	10OMe
I	1.662	4.348	0.660	0.618	1.443	1.650	1.629	1.171					1.684			3.807	1.745
II	3.138	4.895	0.730	0.746	1.700	1.627	1.627		0.679				1.846			4.434	1.883
III	1.338	4.118	0.604		1.361	1.650	0.960		0.438	0.603	1.118		1.499			3.715	1.648
IV	1.253	4.177	0.589		1.583	1.618	0.963		0.422	0.538	1.058	1.609	1.407			3.768	1.622
V	1.463	3.697	0.583		1.569	1.545	1.661	1.097					1.454				1.523
VI	0.838	1.435	0.519	0.444	0.949	1.433	1.093	0.797						1.176	1.157	2.874	1.540
VII	1.470	1.594	0.589		1.264	1.378	1.351		0.588					1.515	1.257	3.518	1.610
VIII	0.817	1.563	0.561		1.475	1.281	1.002		0.391	0.482	1.026			1.427	1.190	3.754	1.540

これら T_1^{NS} および T_1^{SNI} の測定値より、フローチャートに従って特定の水素間の σ_{ij} 値を求め Table 5 に示した。さらにその σ_{ij} 値と Table 2 の ^{13}C T_1 値から得られる τ_c の値と r_{ij} を求め、その値を Table 6 にまとめた。

Table 5 の σ_{ij} 値と Table 6 の r_{ij} の値を各アルカロイド間で比較すると、13 位置換基が入ることにより、A 環と C 環との立体反発がむしろ緩和されるということが分かる。また Berberine 誘導体と Palmatine 誘導体とでは、4 位と 5 位の水素間距離がわずかながら異なっていることが分かる。このことは 2, 3 位の置換基の違いにより B 環のコンホメーションに微妙な差が生じることを示唆する結果である。

以上の結果を考慮しつつ、13 位置換基の効果と活性の関係、Berberine 誘導体と

Palmatine 誘導体の活性の違いなどについて議論したい。

Table 2. ^{13}C T_1 values (s) for alkaloids I~VIII.

	C1	C4	C5	C6	C8	C11	C12	C13	C1'	C2'	C3'	C4'
I	1.220	1.228	0.687	0.672	1.088	1.108	1.228	1.179				
II	1.220	1.265	0.716	0.694	1.150	1.083	1.222		0.938			
III	1.019	0.997	0.526	0.466	0.990	0.996	0.994		0.473	0.693	1.540	
IV	0.972	0.949	0.503	0.492	0.910	0.849	0.888		0.484	0.709	1.278	2.174
V	0.968	1.018	0.533	0.482	0.926	0.839	0.927	0.913				
VI	0.881	0.916	0.529	0.505	0.819	0.822	0.906	0.898				
VII	0.920	0.899	0.512	0.552	1.088	0.909	0.940		0.754			
VIII	0.834	0.812	0.455	0.401	0.828	0.735	0.771		0.413	0.528	1.489	

Table 3.
Observed T_1^{NS} and T_1^{SNI}
values for I.

observed(i)	H1	H4	H8	H11	H12	H13
T_1^{NS}/s	1.662	4.348	1.443	1.650	1.629	1.171
selected(j)						
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H1		4.415	1.441	1.641	1.617	1.438
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H4	1.657		1.440	1.645	1.631	1.171
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H5	1.649	4.792	1.437	1.630	1.620	1.162
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H6	1.651	4.298	1.626	1.645	1.629	1.168
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H8	1.646	4.405		1.635	1.621	1.165
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H11	1.640	4.297	1.431		1.764	1.173
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H12	1.655	4.394	1.449	1.704		1.250
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H13	2.105	4.283	1.437	1.637	1.771	
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ 9OMe	1.657	4.348	1.460	1.667	1.626	1.169
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ 10OMe	1.650	4.310	1.441	1.857	1.629	1.163

Table 4.
Observed T_1^{NS} and T_1^{SNI}
values for VIII.

observed(i)	H1	H4	H8	H12	H11
T_1^{NS}/s	0.817	1.563	1.475	1.002	1.281
selected(j)					
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H1		1.563	1.464	0.998	1.257
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H4	0.813		1.468	1.005	1.253
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H5	0.817	1.694	1.464	0.998	1.270
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H6	0.817	1.581	1.731	1.006	1.266
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H8	0.806	1.562		0.994	1.258
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H11/12	0.802	1.555	1.458		
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H1'	0.871	1.565	1.475	1.067	1.283
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H2'	0.883	1.566	1.463	1.037	1.286
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ H3'	0.822	1.562	1.477	1.012	1.267
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ 2OMe	0.889	1.787	1.464	1.002	1.264
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ 3OMe	0.873	1.825	1.458	0.995	1.264
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ 9OMe	0.812	1.567	1.490	1.006	1.296
$T_1^{\text{SNI}}/\text{s}$ 10OMe	0.816	1.563	1.468	1.034	1.389

Table 5. The estimated σ_{ij} values of several pairs of protons for alkaloids I~VIII.

H		I		II	III	IV	V		VI		VII	VIII
i	j	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$	$\sigma_{ij} \times 10^{-3}$
H1	H13	126.8	158.6				149.2	183.3	158.3	146.0		
H1	H1'			12.6	48.4	61.9					25.4	75.6
H1	H2'				59.2	68.1						91.5
H1	2OMe								25.1		27.2	32.8
H4	H5	21.3		21.1	21.7	26.4	23.0		34.2		44.2	49.2
H4	3OMe								26.4		28.4	30.6
H8	H6	78.0		78.8	81.4	81.9	74.3		89.6		83.3	100.1
H11	H12	19.0	47.2				82.7	62.9				
H11	10OMe	22.5		15.5	18.9	22.3	27.7		22.1		16.2	20.2
H12	H13	49.2	53.7				56.1	81.5	44.9	35.7		
H12	H1'			12.6	69.2	78.6					16.8	60.5
H12	H2'				36.9	45.1						33.2

Table 6. The estimated r_{ij} values (Å) of several pairs of protons for alkaloids I~VIII.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
H1 - H13	2.01 - 2.08				2.03 - 2.09	2.09 - 2.12		
H1 - H1'		3.05	2.50	2.42			2.82	2.38
H1 - H2'			2.42	2.38				2.31
H12 - H13	2.41 - 2.43				2.33 - 2.47	2.57 - 2.68		
H12 - H1'		3.10	2.36	2.35			3.02	2.50
H12 - H2'			2.63	2.58				2.76
H4 - H5	2.79	2.79	2.87	2.79	2.83	2.69	2.58	2.57
H6 - H8	2.29	2.27	2.30	2.33	2.36	2.32	2.26	2.28
H11 - H12	2.45				2.35 - 2.43			
2OMe - H1						2.84	2.79	2.74
3OMe - H4						2.81	2.78	2.78
10OMe - H11	2.81	3.00	2.94	2.91	2.82	2.93	3.05	3.01

- 1) K.Iwasa et.al., *Eur.J.Med.Chem.* **31**, 469 (1995); K.Iwasa et.al., *Planta Medica* **63**, 196 (1997)
- 2) 杉浦ら, 「第 35 回 NMR 討論会要旨集」 p20

(¹岐阜大・医・生理, ²岐阜大, ³京都府立医大・放射線医学, ⁴藤田保衛大・衛生, ⁵愛知がんセンター・放射線治療部) ○恵良聖¹, 曾我美勝², 紀ノ定保臣³, 加藤一夫⁴, 松島 秀⁵, 内山幸男⁵, 永井直樹¹

Magnetization Transfer Characteristics in Polymer Gels

(¹Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., ²Gifu Univ., ³Dept. of Radiol., Kyoto Prefect. Univ. of Med., ⁴Sch. of Health Sci., Fujita Health Univ., ⁵Dept. of Rad. Oncol., Aichi Cancer Center Hosp.) S. Era¹, M. Sogami², Y. Kinoshita³, K. Kato⁴, S. Matsushima⁵, Y. Uchiyama⁵, N. Nagai¹

Water-protein or -polymer interactions were studied using intermolecular cross-relaxation times ($T_{IS}(H_2O)$, $T_{IS}(HDO)$) from irradiated protein or polymer protons (f_2 -irradiation from -100 to 100 ppm at $\gamma H_2/2\pi$ of 69~350 Hz) to observed water protons. The obtained results on protein gel (BPA*gel) and hydrophilic soft contact lenses (SCLs) were as follows: (1) Plots of $1/T_{IS}(HDO)$ vs $\gamma H_2/2\pi$ (Hz) for BPA*gel were approximately linear except f_2 -irradiation of -10~0.9 and 8.6~14 ppm (Figs. 1A & 1B). Those for SCLs were also linear except f_2 -irradiation of -10~2 and 10~16 ppm (Figs. 2A & 2B). The detailed mechanism on this phenomenon will not be clear until more information is available. (2) Plots of $1/T_{IS}(H_2O)$ vs Dry Weight (W(%)) for SCLs were nearly linear for f_2 -irradiation of 20 ppm < f_2 < -20 ppm and were independent of monomer composition. However, those for f_2 -irradiation of 20 ppm > f_2 > -20 ppm were strongly depend on monomer composition, that is, $1/T_{IS}(H_2O)$ values increased with increasing number of OH group (Figs. 3A, 3B & 3C).

[はじめに] ウシ血漿アルブミン(BPA)溶液, ゲル(BPA*gel)及び各種の親水性合成高分子ゲル(soft contact lenses(SCLs); 含水量, 23~83%)を用いて, f_2 照射部位より水への飽和移動(磁化移動)の機序について研究した。

[実験材料と方法] BPA溶液, BPA*gel(D_2O , 0.10 M NaCl)はEraら(1)の方法により作製した。含水量変化域の異なるSCLs (HEMA, GMA), SCLs (HEMA, N-VP), SCLs (GMA, MMA, N-VP), SCLs (MMA, N-VP)を用いた。HEMA, GMA, MMA, N-VPは, それぞれhydroxyethyl methacrylate, glyceryl methacrylate, methyl methacrylate, N-vinyl-2-pyrrolidoneの略で, SCLsの主たるモノマーである。

キーワード: 高分子ゲル, 水性状, 磁化移動, 分子間交差緩和

えら せいいち, そがみ まさる, きのさだ やすとみ, かとう かずお, まつしま しげる, うちやま ゆきお, ながい なおき

分子間交差緩和時間 ($T_{1S}(H_2O)$, $T_{1S}(HDO)$; 以下の式では単に T_{1S} と略す)は Akasakaの方法 (2) を用い, Bruker AM 500を用いて測定した. S, I 2スピン系を仮定し, S スピン系プロトンラジオ波で f_2 照射し, I スピン系の磁化変化を観測すると, [1], [2]式ようになる(飽和移動法).

$$dI/dt = -(I - I_0)/T_1 - I/T_{1S} \quad [1]$$

$$I = I_\infty + (I_0 - I_\infty) \exp(-\tau/T_1^*) \quad [2]$$

I_0 , I_∞ は長時間 f_2 照射する前, 後のI スピン系の磁化, T_1 はスピン格子緩和時間, $1/T_1^* = 1/T_1 + 1/T_{1S}$ である. また, $I_\infty/I_0 = T_1^*/T_1$ となり, この関係式を用い, 飽和移動・作用スペクトル, $[1 - (I_\infty/I_0)]$ vs f_2 (ppm) (Action Spectra)及び交差緩和スペクトル, $1/T_{1S}$ vs f_2 (ppm) (Cross-relaxation Spectra)を $-100 \sim 100$ ppmにわたって測定した. f_2 照射は $69 \sim 350$ Hz ($\gamma H_2/2\pi$ 単位)を使用した.

[結果と考察] BPA*gel(12.39%, 4.83%; pD 4.0, 0.10 M NaCl)及びBPA溶液(12.0%; pD 7.1, 0.10 M NaCl)の $-100 \sim 100$ ppmにわたる飽和移動・作用スペクトル, 交差緩和スペクトルを $69, 107, 150, 200, 250, 350$ Hz($\gamma H_2/2\pi$ 単位)の f_2 照射を用いて求めた(参照: ポスター#25, 図1A, 1B). $1/T_{1S}(HDO)$ vs f_2 照射強度($\gamma H_2/2\pi$ (Hz))プロットに於いて, 図1Aの -10.00 (◆), -2.00 (□), 0.90 ppm (■), 図1Bの 8.65 (●), 14.00 ppm (▲)に於ける f_2 照射を除いて, $20 \text{ ppm} < f_2 < -20 \text{ ppm}$ 及び $2.98, 7.23$ ppmの f_2 照射では, ほぼ直線であった. これらの結果は, タンパク質の ϵ CH₂, 芳香族プロトン等を f_2 照射する場合と $20 \text{ ppm} < f_2 < -20 \text{ ppm}$ を f_2 照射(オフ・レゾナンス照射)する場合は, 水への磁化移動の機序に差のあることを示唆する結果であろう. 全く同様の結果がSCLs (GMA, MMA, N-VP; 含水量, 45.0%)の $1/T_{1S}(H_2O)$ vs $\gamma H_2/2\pi$ (Hz)プロットに於いても観測された. 図2Aの -10.00 (◆), 0.00 ppm (□), 図2Bの 2.00 (○), 10.00 (▲), 16.00 ppm (◆)に於ける f_2 照射を除いて, $20 \text{ ppm} < f_2 < -20 \text{ ppm}$ 及び 6.00 ppmの f_2 照射では, ほぼ $1/T_{1S}(H_2O)$ vs $\gamma H_2/2\pi$ (Hz)プロットは直線であった. これらの結果は, SCLsに於ける水への磁化移動もBPA*gelと全く同一の機序によることを示唆している.

前述のように, SCLs (GMA, MMA, N-VP; 含水量, 45.0%)の $1/T_{1S}(H_2O)$ vs $\gamma H_2/2\pi$ (Hz)プロットに於ける ± 20 ppmを境にした興味ある事実を見出した. また, 材料で述べた全てのSCLsを用い, $7.13, -4.00$ 及び -8.79 ppmを $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hzで f_2 照射し, $1/T_{1S}(H_2O)$ vs 乾燥重量(%)を求めると, 7.13 ppmではSCLsの種類に依る顕著な差が観測されたが, -8.79 ppmの f_2 照射ではその差が減少することを見出した. このため, 材料で述べた殆ど全てのSCLsについて $\gamma H_2/2\pi \sim 250$ 又は 350 Hzの f_2 照射を用い, $-100 \sim 100$ ppmにわたる交差緩和スペクトルを測定し, ついで $1/T_{1S}(H_2O)$ vs 乾燥重量(%)を求めた. $20 \text{ ppm} < f_2 < -20 \text{ ppm}$ の f_2 照射では, 図3A, 3Cに示すようにモノマー組成による差は, 殆ど観測されなかったが, $20 \text{ ppm} > f_2 > -20 \text{ ppm}$, 例えば $2.00, 6.00, 8.00$ ppmの f_2 照射では, 図3Bに示すように, モノマー組成の差, 即ちOH基の個数の差が顕著に観測された. 図3A, 3B, 3Cの結果も ± 20 ppmを境にして, f_2 照射プロトンより水への磁化移動機序の異なることを示唆している. $20 \text{ ppm} > f_2 > -20 \text{ ppm}$ の f_2 照射では, おそらく結合水の量の寄与が大きいことを示唆しているのだろう.

[文献] (1) M. Sogami, S. Nagaoka, S. Era et al (1986) Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130-140; S. Era, M. Sogami, K. Kuwata et al (1989) *ibid.* 33, 214-222 (2) K. Akasaka (1981) J. Magn. Reson. 45, 337-343; K. Akasaka (1983) *ibid.* 51, 14-25; K. Akasaka, R. Ishima, S. Shibata (1990) Physica B 164, 163-179 (3) 上坂伸宏, 曾我美勝, 恵良聖一等, 第36回NMR討論会ポスター#25

[図説明] Figs. 1A & 1B $1/T_{IS}(\text{HDO})$ values, obtained by the saturation transfer method of Akasaka (2) with f_2 -irradiation at desired frequency (ppm) at 25 °C, as a function of f_2 -power ($\gamma H_2/2\pi$ (Hz)) for BPA*gel (14.39%, pD 4.0, 0.10 M NaCl).

Figs. 2A & 2B $1/T_{IS}(\text{H}_2\text{O})$ values, obtained by the saturation transfer method of Akasaka (2) with f_2 -irradiation at desired frequency (ppm) at 25 °C, as a function of f_2 -power ($\gamma H_2/2\pi$ (Hz)) for SCLs (GMA, MMA & N-VP; water content, 45.0%).

Figs. 3A, 3B & 3C $1/T_{IS}(\text{H}_2\text{O})$ values, obtained by the saturation transfer method of Akasaka (2) with f_2 -irradiation at desired frequency (ppm) and $\gamma H_2/2\pi \sim 350$ Hz at 25 °C, as a function of dry weight (%) for SCLs (GMA, MMA & N-VP), SCLs (HEMA & N-VP) and SCLs (GMA & HEMA). Except f_2 -irradiation at 2.00, 6.00 or 8.00 ppm (Fig. 3B), plots of $1/T_{IS}(\text{H}_2\text{O})$ values, obtained by f_2 -irradiation of $20 \text{ ppm} < f_2 < -20 \text{ ppm}$, were nearly lineal function of dry weight (%).

Fig. 1A

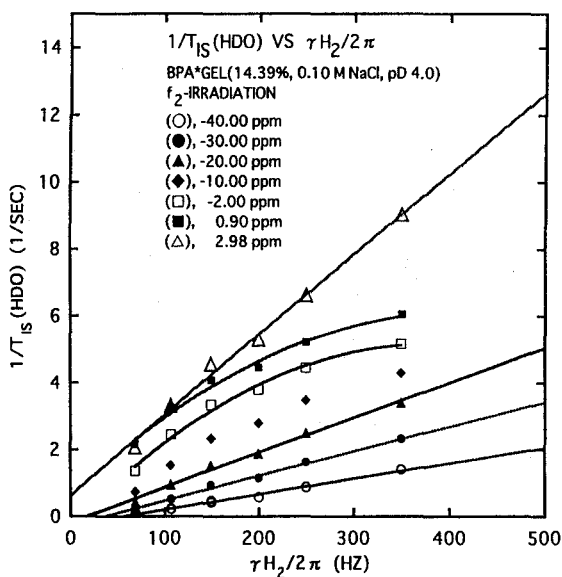


Fig. 1B

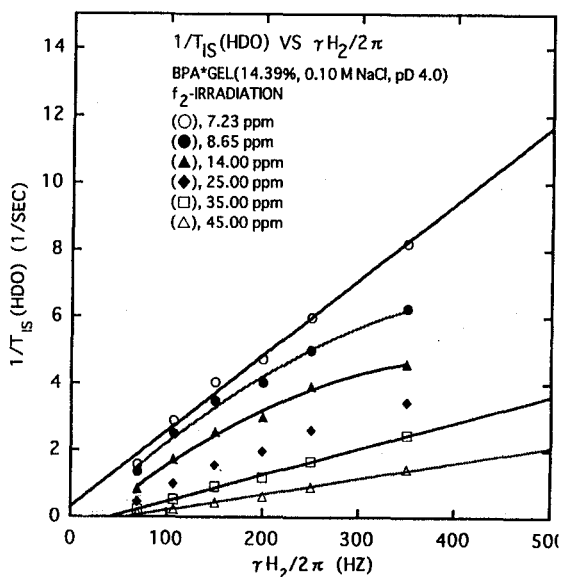


Fig. 2A

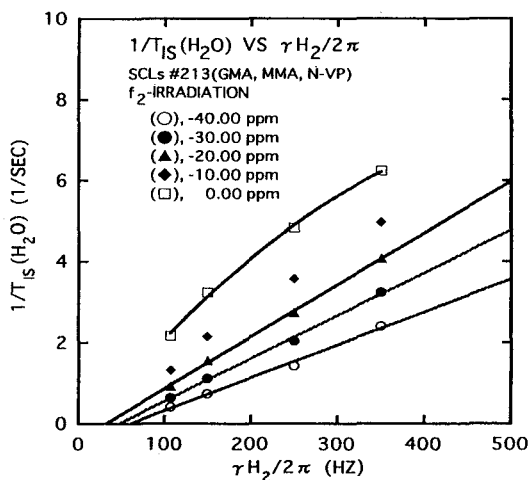


Fig. 2B

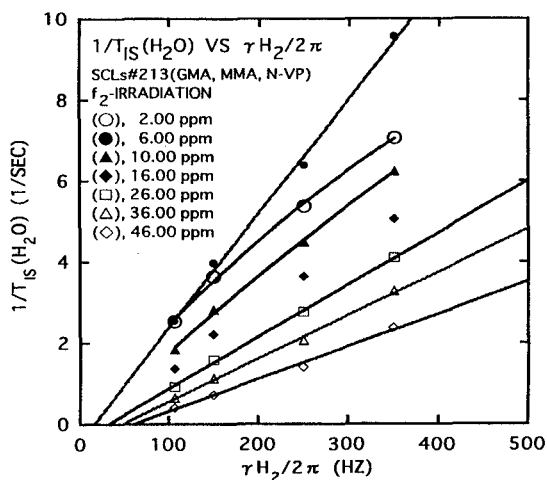


Fig. 3A

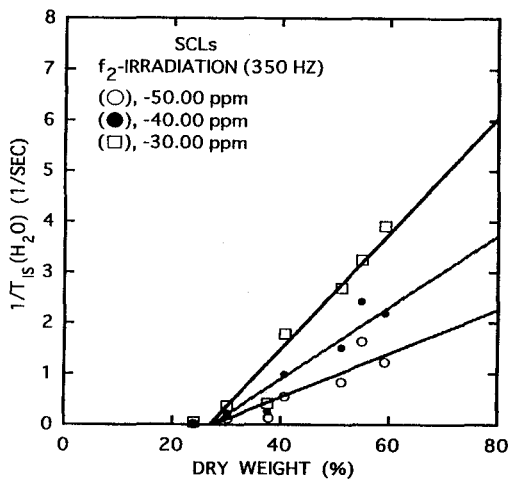


Fig. 3B

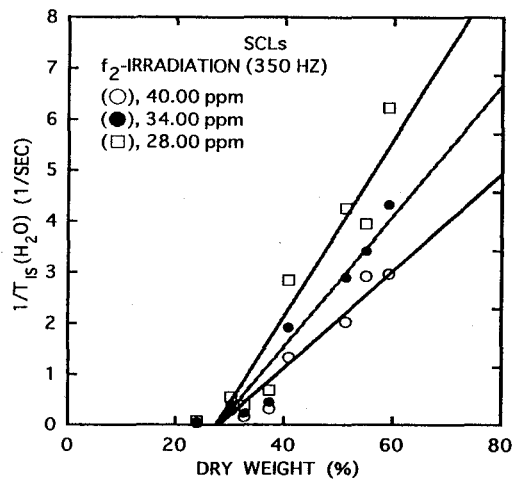
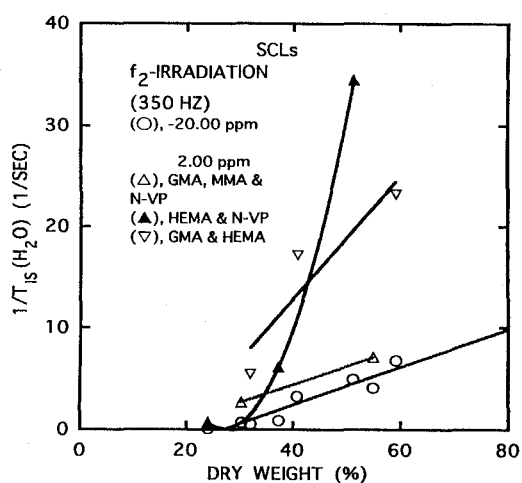


Fig. 3C

^1H NMR と ^{13}C NMR スペクトルデータベースの
インターネットにおける公開
(物質研) ○早水紀久子 柳沢 勝

^1H and ^{13}C NMR Spectral Databases on Web

Kikuko Hayamizu and Masaru Yanagisawa

National Institute of Materials and Chemical Research, E-mail: hayamizu@nimc.go.jp

Recently we have opened the home page of our ^1H and ^{13}C NMR spectral databases of organic compounds, SDBS-NMR, which can be accessed freely on the Web. At present, about 10,100 ^1H and 9,700 ^{13}C NMR spectra can be accessed. Each NMR spectrum consists of a spectral pattern, one or two chemical structures with the spectra assignments (two structures for the chemical equilibrium such as keto-enol tautomers), chemical shifts and peak data (for ^1H NMR) and peak data for (for ^{13}C NMR). The ^1H NMR database is made from two files, one is spectral patterns measured at 90 and 400 MHz, and another is parameters where the chemical shifts, coupling constants and the line width (if necessary of broad peaks such as OH, NH or NH_2) are included. The spectral patterns at any resonance frequency can be generated from the NMR parameters, and we set it at 300 MHz on the Web, because the most popular NMR spectrometers are 200 to 300 MHz for the ^1H resonance. The spectral patterns and the chemical structures are converted to image format so that the functions of the expansion of the ^1H spectral patterns or peak picking are not included. But the digital data of the peak position and the relative intensities are included, therefore the users can extract the couplings.

After we opened SDBS-NMR on the Web and asked about ten NMR sites to introduce our NMR spectral database and to make the link to our home page at the middle of May 1997, about 1,000 accesses per day on average have been obtained. The domestic accesses are about 30 % , about 30% US Educational (total access from US was 38% during June and July), and the remaining is from the whole world. Probably the number of the access depending on the country is roughly proportional to the number of the NMR spectrometers.

Our home page address is the following. <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/>

^1H NMR ^{13}C NMR Database Internet Home page

はやみず きくこ、やなぎわさ まさる

Structure transformation mechanism of an alanine derivative as revealed by NMR

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

○Ryoko Ohtake, Keigo Shima, Kunisuke Izawa and Ei-ichiro Suzuki

The solution structures of an alanine derivative (*N*-(1-methyl-4-hydroxy-3-imidazolin-2,2-ylidene) alanine; shortened as MEHIYA) were found out by NMR to be *syn-anti* and D, L-racemic isomers. Consequently, under different conditions of solvent and temperature, we measured the structure transformation rates (Fig. 1; the remarkable increase in 80%MeOD at the higher temperature >303K) and the thermodynamical parameters ($\Delta G = -6.2$ kJ/mol, -8.9 kJ/mol, and 14.2 kJ/mol, in aq. soln, salted aq. soln, and 80%MeOD, respectively) between *syn* and *anti* forms in MEHIYA. The methine proton disappeared with H-D exchange, suggesting interconversion between the racemic isomers. Additionally, the mechanism of structure transformation in MEHIYA was investigated.

【序】

我々は、各種アミノ酸誘導体の合成とその構造研究を行う中から、本研究で取り上げるアラニンの誘導体 (*N*-(1-メチル4ヒドロキシ-3-イミダゾリン-2,2-イリデン)アラニン：略して MEHIYA とする) が、溶液中で、*syn-anti*の異性体として、しかも、それぞれがD,L-ラセミ体として、交換しながら存在する事を見つけた。更に、このNMR研究の対象としての好材料を用いて、溶媒、温度条件を変化させた速度論的及び熱力学的解析を行ったので、その結果を含めここに報告する。

【結果と考察】

(1) *syn-anti* 変換の熱力学的パラメーター

まず、NOESYにより、*anti*体：*syn*体が約3：2の量比で存在する（水溶媒系；298K, D₂O）事を確認した後、これらの関係が平衡か否かを調べる為に、¹H-NMRによる温度可変測定(D₂O)を行い、Arrheniusプロットを作成した。その結果、温度の変化に伴い*anti*/*syn*の比率が変化しており、これらの異性体は平衡関係にあることが判明した。更に、食塩を添加した水溶媒系や80%MeOD溶媒系についても同様に調べた結果、以下の事が分かった。

水溶媒系では、塩の添加の有無に拘わらず、278~293K付近を境に、それ以下の温度では*anti*/*syn*の比率がほぼ不変であるのに対し、温度が上昇すると*anti*体が増加する。これは、温度の上昇に伴い、平衡がエネルギーのより高い*anti*体へと移行する為と考えられる。一方、80%MeOD溶媒系では、水溶媒系とは逆に、温度が上昇するに従って*syn*体が増加する事が分かった。更に、全体を通じて水溶媒系と比べて*anti*/*syn*の値は小さい。この事から、80%MeOD溶媒系では、水溶媒系とは異なる環境下にあり、分子内水素結合などにより*syn*体の安定化が図られていると考

えられる。なお、水溶媒系、塩添加系、及び80% MeOD溶媒系での ΔG 値は、各々、 -6.2 kJ/mol (293~328K)、 -8.9 kJ/mol (298~328K)、 14.2 kJ/mol である。

(2) *syn-anti* 変換の速度論的解析

次に、MEHIYA の各官能基の環境を調べる為に、前述した各溶媒系における温度可変条件下での各官能基別のT1測定を行った。そして、更に、*syn*と*anti*が完全に独立して観測できるN-CH₃基について、文献*¹に記載されている交換速度の式を基に、¹H-NMR (照射の有無による) の差スペクトルとT1値を用いて、*anti* ⇌ *syn*変換速度 (k) を求め、その温度と変換速度との関係をグラフにすると図1のようになった。

-NCH₃基に注目して変換速度を溶媒別に捉えると、80%MeOD溶媒系の方が水溶媒系よりも303 Kを境に速度が急激に増大、即ち、*syn* ⇌ *anti*変換が非常に盛んになるということが分かった。このことから、80%MeOD溶媒系と水溶媒系ではMEHIYA の環境が非常に異なっていることが示唆される。

(3) D,L 相互変換

また、HPLCの結果と重水素交換に着目した実験により、溶液構造はラセミ体として存在し、容易に相互変換している様子を捉える事に成功した。即ち、D₂Oに溶解、経時したサンプルについて、¹H-NMRを測定した結果、他のシグナルには全く変化が見られなかったが、メチン基由来のシグナルのみが消失していることが判明した。更に、¹³C-NMRを測定した結果、他の官能基については¹H-NMRと同様に全く変化が見られなかったが、-CH基はトリプレット (t) に分裂して非常に弱く観測された。このことから、水溶媒中では、メチンプロトンが周囲の水

(D₂O) のDと交換している事が分かった。なお、メチンプロトンが周囲の水の水素と容易に交換することは、*syn*体と*anti*体の変換機構を考える上で重要な知見である。

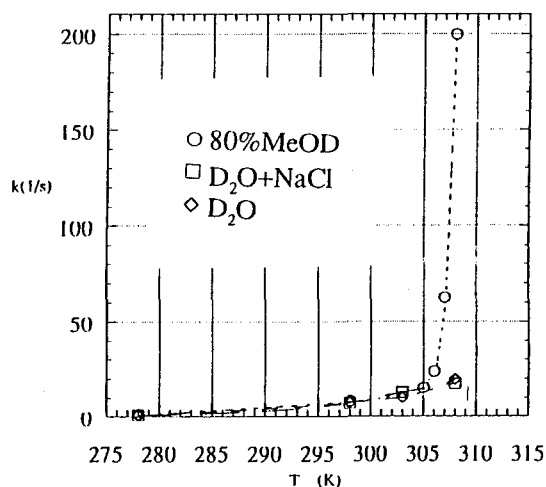


Fig.1: The structure transformation rates between *syn* and *anti* forms in MEHIYA, under different conditions of solvent and temperature

参考文献*1: 泰地,横山,宮澤.(1982) 第9回生体分子の構造に関する討論会講演要旨集, p.4-5

キーワード: アラニン、*syn-anti*異性体、緩和時間

○おたけりょうこ、しまけいご、いざわくにすけ、すずきえいいちろう

Molecular Structure of Polymer Alloy: Structure Determination of Reaction Product of PPE and Compatibilizer using ^{13}C labeling

(Sumitomo Chemical Co. Ltd.) ○ Akihiko Okada, Emiko Fukuyo-Yokota, Takeshi Fujii
and Kazutoshi Ohashi

Molecular structure of compatibilizer derivatives of PPE(polyphenylene ether)/PA(polyamide) alloy which are bound to the PPE polymer chain was determined by the use of high field nuclear magnetic resonance and ^{13}C labeling technique. PPE samples reacted with maleic anhydride in extruder(1), in stainless reaction tube under high temperature and pressure(2) were prepared for structure analysis. TOCSY, HMQC and HMBC spectra were measured with eliminating peaks of polymer main chain. Two PPE - acid adduct structures were determined in Sample (2) and identical structures were identified in Sample (1). ^{13}C labeled PPE- acid adduct structures were obtained by the use of ^{13}C labeled maleic anhydride. This confirmed that these adduct structures determined in the present study were produced exactly from maleic anhydride.

【はじめに】 ポリフェニレンエーテル (PPE) とポリアミド (PA) とは非相溶であるが、この系に無水マレイン酸などの不飽和カルボン酸を添加して熔融混練することにより、対衝撃性の優れたポリマーアロイの得られることはよく知られている。本研究の目的は、ポリマーアロイ生成の機構を調べるため、まず PPE と相溶化剤である無水マレイン酸 (MAH) が反応してどのような化合物を生成するか、有機化合物の構造解析の手法を用いて実験的に明らかにすることである。

PPE と PA が混練機内で不飽和カルボン酸とどのような反応を起こして、どのように変化するか実験した報告はまだほとんどない。Akkapeddi[1]らは、 ^{13}C 化した無水マレイン酸を用い PPE とアロイ化剤の結合反応を NMR で解析したが、PPE 側の情報が得られなかったため、無水マレイン酸が PPE にどのような形で結合しているか詳細に明らかにすることはできなかった。

そこで本研究では、 ^1H - ^1H や ^{13}C - ^1H のスピン結合の情報から MAH (誘導体) と PPE との結合に関する情報を得ることができないか検討した。 ^1H - ^1H や ^{13}C - ^1H のスピン結合の情報を得る手段としては、高磁場による 2 次元 NMR (TOCSY[2]、HMQC、HMBC[3]) を用いた
キーワード: 二次元 NMR、 ^{13}C ラベル、合成高分子、ポリマーアロイ

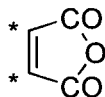
○おかだあきひこ、よこたえみこ、ふじいたけし、おおはしかずとし

が、ポリマーに極少量 (PPE に対して約 0.x %) 結合した MAH 由来の NMR ピークを感度よく取り込むために、次の検討を行った。

1. NMR 測定手法の改良

2. ^{13}C 化 MAH の導入

【実験】 PPE は日本ポリエーテル (株) より入手し、MAH は和光純薬より購入した。また ^{13}C ラベル化 MAH については、 α -($^{13}\text{C}_2$)-MAH (>99% ^{13}C)、すなわち、



を ISOTEC Inc. (US) より購入した。

PPE と MAH の結合体 (PPE-MAH Adduct) の試料としては、PPE と MAH を二軸混練機により混練した試料 (PPE-

MAH Adduct[1])、PPE と MAH を混合し SUS 管に封入し N_2 で 40 kg/cm^2 に加圧し 270°C で 1 hr 加熱した試料 (PPE-MAH

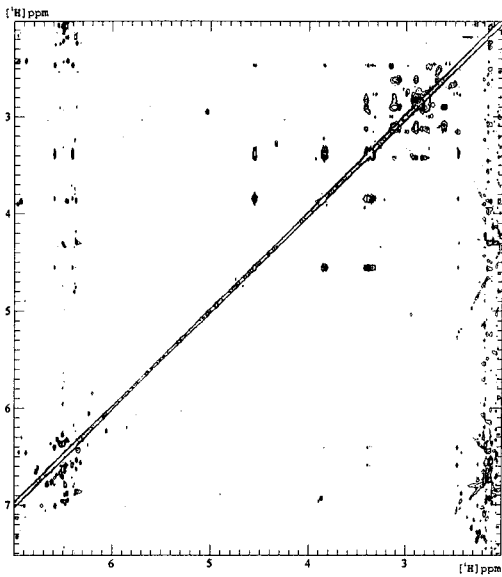
Sample	Constituents (PHR)	
	PPE	MAH
PPE-MAH Adduct[1]	100	2.2
PPE-MAH Adduct[2]	100	10
PPE-(^{13}C)MAH Adduct[3]	100	10

figure 1. Samples prepared in this study.

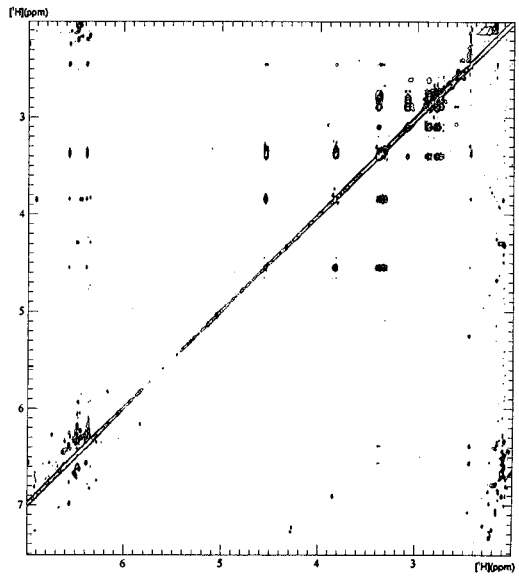
Adduct[2])、PPE-MAH Adduct[2] と同一の条件で ^{13}C 化した MAH を用いて調製した試料 (PPE-MAH Adduct[3]) の 3 つを用いた。組成、反応条件を figure 1 に示す。

NMR 測定は、Bruker 製 AMX-600 spectrometer (^1H : 600 MHz) を用い、重クロロホルム溶液、313 K で行った。TOCSY、HMQC、HMBC の測定においては、2 本あるポリマー主鎖のピークを電磁波により照射して消去する手法を用いた。ピークの消去は、観測中心を 2 本のピークの中点におき、照射する電磁波の位相をすばやく切り替えることにより行った。一方、 ^{13}C 化 MAH を用いた実験では、 ^{13}C のデカップルを行いながら測定し、パルスシーケンスの中で ^{13}C デカップルの on/off のタイミングを変えることにより、F2/F1 軸両方、F2 軸のみ ^{13}C デカップルされたスペクトルを得た。また、HMQC のかわりにパルス磁場勾配法を用いて HSQC[4] スペクトルを測定した。

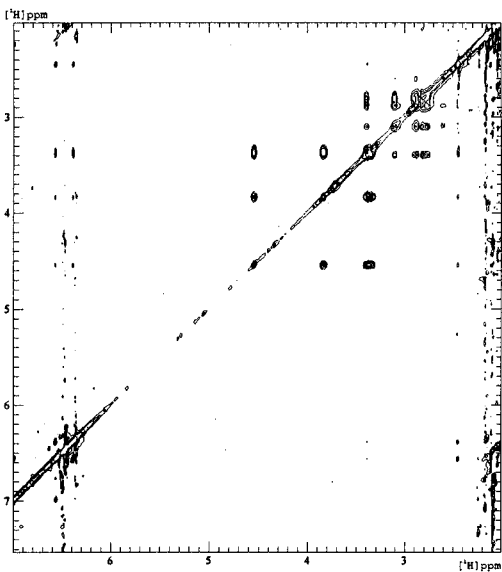
【結果と考察】 figure 2 に PPE-MAH Adduct[1]、[2]、[3] の TOCSY スペクトルを比較した。PPE-MAH Adduct[3] については、F1/F2 軸を ^{13}C デカップルしたもの(C)に加えて F2 軸のみを ^{13}C デカップルしたものも(D)比較した。figure 2(A)、(B)、(C) のスペクトルが一致したことで、加圧下での SUS 反応容器による加熱と、混練機での熔融混練とで、PPE と MAH との間にかかる反応は同じことが確認された。



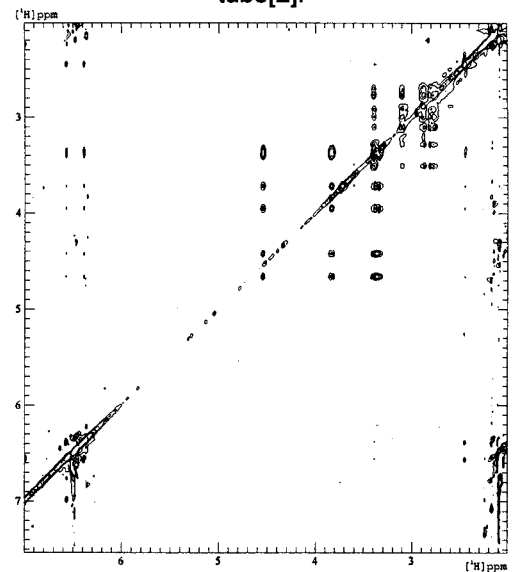
(A) PPE-MAH Adduct made by extruder[1].



(B) PPE-MAH Adduct made by reaction tube[2].



(C) F1/F2-decoupled TOCSY of PPE-(¹³C)MAH Adduct[3].



(D) F2-decoupled TOCSY of PPE-(¹³C)MAH Adduct[3].

figure 2. TOCSY spectra of PPE-MAH Adducts.

MAH 由来のピークの同定

figure 2の(C)と(D)の比較によって、¹Hのうち、¹³Cによる分裂を示すものがあり、これによりfigure 2に見られるピークのいくつかはMAH由来であることが確認された。またこれらTOCSYの結果とHMQC、HMBC、HSQCなどの結果を総合することにより、PPEに結合したMAHの構造として、figure 3のような2つの構造"A"および"B"が解析された。MAHは二重

結合が PPE 部分と反応し、酸無水物の不部は変化せずそのまま残っていることがわかった。構造”B”は以前から PPE と MAH の反応生成物として予想されていて、文献 1 でもモデル化合物との比較から解析がなされていたが、構造”A”については、構造を詳細に決定したのは本研究がはじめてである。

【まとめ】 本研究で、我々は高磁場による 2 次元 NMR と安定同位体標識の導入が、ポリマー末端の微少な構造変化を明らかにする上で非常に有効であることを示した。このような手法は、他のポリマーの末端の改質や、加工による構造変化に広く応用されることが期待される。ただ、安定同位体標識の導入を行う上で重要なのは、実際に熔融混練機などで起こっている反応をいかに小スケールで再現できるかである。本研究において用いた加圧下における SUS 反応管を用いた加熱反応は、熔融混練機内の化学反応をよくシミュレーションしていることが示された。このような実験室系での加圧・加熱によるポリマーのキャラクタリゼーションは、他のポリマーの熔融混練による変化の追跡にも一般に応用できる可能性がある。

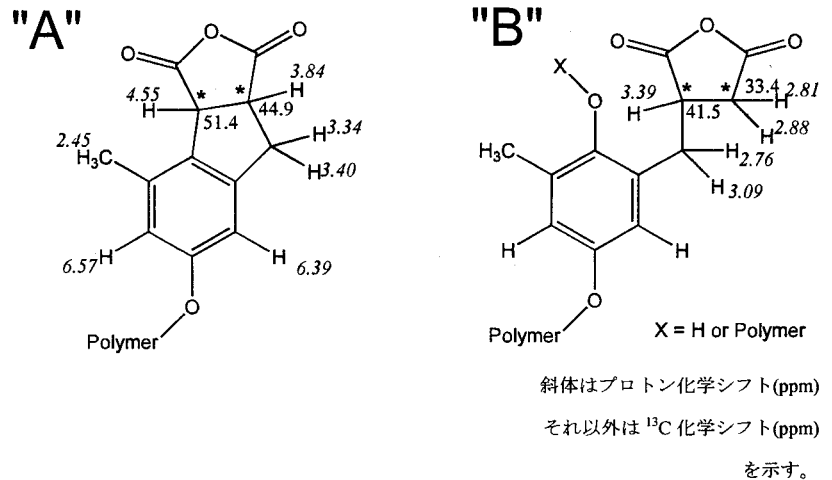


figure 3. PPE-MAH adduct Structure determined by NMR.

- 1 J. H. Glans and M. K. Akkapeddi, *Macromolecules*, **24**, 383 (1991).
- 2 TOCSY: Ad Bax and D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, **65**, 393(1985).
- 3 HMQC and HMBC: M. F. Summers and Ad Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093(1986).
- 4 HSQC: G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.*, **69**, 185(1980).

キシロースイソメラーゼ(EC5.3.1.5)による[2-²H]-D-グルコースの分子内重水素転移反応の解析について
(農水省・食総研¹, 日本ブルカー(株)²)
○小野裕嗣¹, 佐藤 一², 春見隆文¹

**Analysis of Intramolecular Deuterium Transfer in [2-²D]-D-glucose
Catalyzed by Xylose Isomerase (EC5.3.1.5)**

(National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries¹
Bruker Japan Co., Ltd.²)

○Hiroshi Ono¹, Hajime Sato², Takafumi Kasumi¹

The isomerization reaction between D-glucose and D-fructose catalyzed by xylose isomerase (D-Xylose ketol-isomerase EC 5.3.1.5) was studied with NMR by employing deuterium labeled [2-²D]-D-glucose as a substrate. When the reaction was carried out in D₂O, D-glucose isomerized to D-fructose without introduction of deuterium from the solvent. The same reaction using [2-²D]-D-glucose in H₂O afforded [1-²D]-D-fructose as a single diastereomer. The NOESY spectrum with 1,2:5,6-di-O-isopropylidene acetal derived from the [1-²D]-D-fructose revealed the absolute configuration of C-1 as *R*. These results showed that the H-2 of D-glucose transferred to the neighboring carbonyl carbon from the *re* plane side. From the above, we conclude that the intermediate in this enzyme reaction should have a specific conformation during the 1,2-hydride transfer, in which the two oxygen atoms at the 1 and 2-positions are oriented in the *syn* conformation.

【緒論】キシロースイソメラーゼ(D-Xylose ketol-isomerase EC 5.3.1.5)によるD-グルコースのD-フルクトースへの異性化反応は酵素反応の中でも最も単純な部類に属し、開環型グルコースの2位ヒドロキシメチレンがカルボニル基へ、1位アルデヒド基がヒドロキシメチル基に変換される。すなわち本反応では生成したD-フルクトースの1位ヒドロキシメチル基上に新たな水素が導入されるが、その由来と導入時の立体化学は十分に明らかにされていない。この問題の解決に当たっては、同一炭素上のジアステレオトピックな水素を区別する必要がある、NMRが最も有力な手段である。

【実験】基質としてD-グルコース数mgを5mMのMg²⁺をむリン酸緩衝溶液(50mM, pH 7.5)に溶解し、キシロースイソメラーゼ(*Streptomyces griseofuscus* S-41由来)を加えて60℃で反応を行った。反応は5mm径のNMR試料管内で行い、必要に応じて¹H NMRスペクトルで追跡した。測定には、Bruker社製AVANCE DRX-600、インバース四重共鳴5mm QXI (¹H-¹³C/¹⁵N/³¹P) XYZ-gradientプローブを用いた。

【結果】D-フルクトースの¹H NMRスペクトルをFigure 1(c)に示した。水溶液中、D-フル

【キーワード】キシロースイソメラーゼ、ヒドリド転移、[2-²H]-D-グルコース

おのひろし, さとうはじめ, かすみ たかふみ

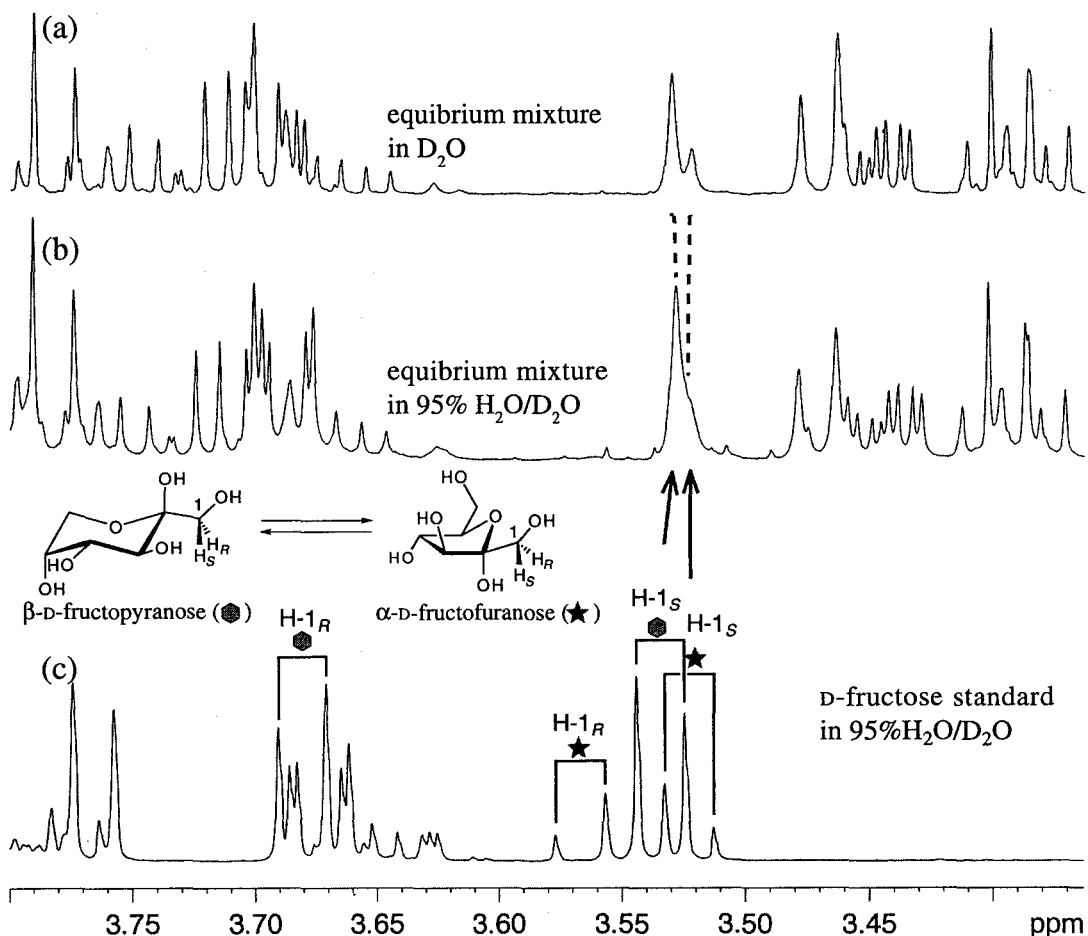


Figure 1 ¹H NMR spectra of the equilibrium mixture. (a) [2-²H]-D-glucose and [1-²H]-D-fructose in the presence of xylose isomerase in D₂O at 333K. The H-1_S signals of both [1-²H]-D-fructose anomers were assigned as broad singlets due to deuterium coupling while the H-1_R signals were not observed. (b) The same equilibrium mixture in 95% H₂O/D₂O at 303K. Two H-1_S signals overlapped. (c) D-fructose standard solution at 303 K in 95 %H₂O/D₂O. H-1_R and H-1_S of the two anomers β-D-fructopyranose and α-D-fructofuranose were assigned as two pairs of doublets.

クトースは6員環構造のα-D-fructopyranoseと5員環構造のβ-D-fructofuranoseを主な成分とする平衡混合物になることが知られており、これら両アノマーのジアステレオトピックな2つの1位水素(H-1_R, H-1_S)のそれぞれが区別して観測されている。重水中で非重水素標識のD-グルコースを異性化させたところ、生じたD-フルクトースは非重水素標識体D-フルクトースと同一のスペクトルパターンを示し、溶媒から基質への重水素の移動は観測されなかった。一方、同じ条件で[2-²D]-D-グルコースを異性化したところ、1位水素のH-1_Rが消失し、H-1_Sが重水素とのJ-カップリングによると見られるブロードな一重線として観測された(Figure 1(a))。軽水中でも同様の結果が得られ(Figure

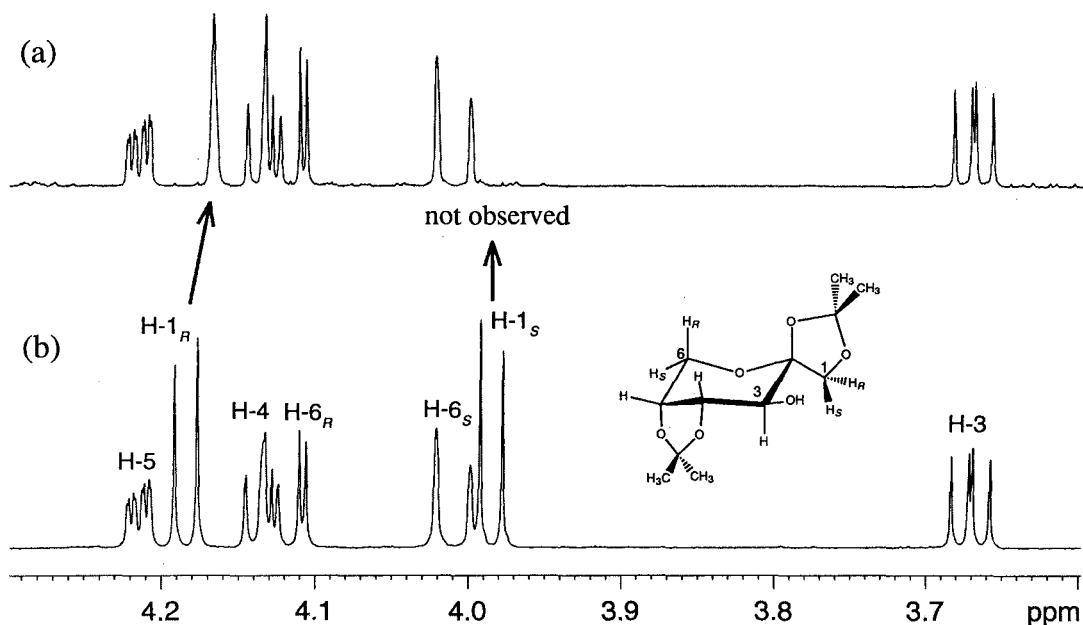


Figure 2 ^1H NMR spectra of diacetal derivatives. (a) *IR*-1-deuterio-1,2:4,5-di-*O*-isopropylidene- β -D-fructopyranose in CDCl_3 . The H-1_S signal was assigned as a broad singlet due to deuterium coupling while the H-1_R signal was not observed. (b) 1,2:4,5-di-*O*-isopropylidene- β -D-fructopyranose (standard) in CDCl_3 . Both H-1_R and H-1_S were assigned.

1(b)), *IR*-[1- ^2D]-D-フルクトースの生成が確認された。なお、 H-1_R と H-1_S それぞれの帰属は、[1- ^2D]-D-フルクトースをdi-*O*-isopropylidene誘導体へと導いて決定した。すなわち、異性化反応混合物を凍結乾燥し、硫酸存在下、アセトンと縮合させ、HPLCで精製して純粋な*IR*-1-deuterio-1,2:4,5-di-*O*-isopropylidene- β -D-fructopyranoseを得た。このものの ^1H NMRスペクトル(Figure 2(a))を、標品として合成した非重水素標識体のもの(Figure 2(b))と比較すると1位以外は同一のスペクトルを与えた。NOESYスペクトルの結果から1位の絶対配置を図示したように*R*と決定した(Figure 3)。

【考察】溶媒(軽水または重水)を変えた基質(D-glucose, [2- ^2D]-D-glucose)の実験では、生成するD-フルクトースへ溶媒からの(重)水素の移動は認められなかった。また基質中の2位の重水素が生成したフルクトースの1位に移動したことが明らかとなり、キシロースイソメラーゼによるグルコースの異性化が、分子内1,2-水素移動によって起こることが実験的に

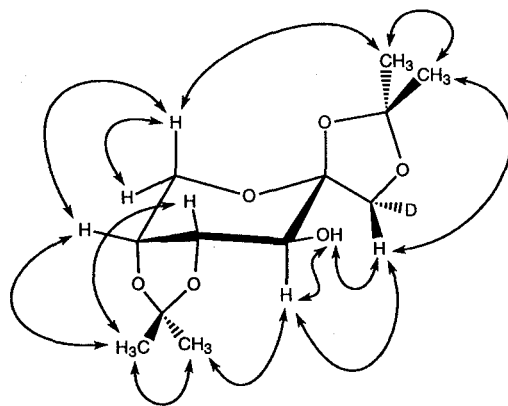


Figure 3 Molecular structure of *IR*-1-deuterio-1,2:4,5-di-*O*-isopropylidene- β -D-fructopyranose. The arrows represent NOEs observed in NOESY experiment.

証明された。

フルクトースのH-1_RとH-1_Sが異なる化学シフトをもつことから、本異性化反応で一方のジアステレオマーのみが選択的に生成したことは直ちに明らかになった。しかし1位ヒドロキシメチル基は自由回転が可能のため、フルクトース自身のスペクトルによる帰属には曖昧さが避けられない。そこで、コンホメーションを固定したジ-Oイソプロピリデン誘導体へと導き、NOE実験から1位の立体化学を決定した。その結果、生成したフルクトースのH-1_Rが転移水素であることが明らかとなった(Figure 4)。

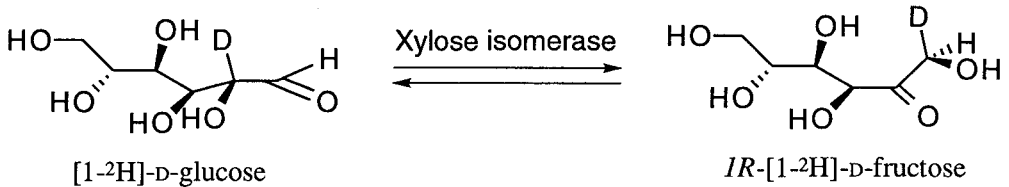


Figure 4 Deuterium correlation *via* enzymatic isomerization. [1-²D]-D-glucose and *IR*-[1-²D]-D-fructose are represented by an open-ring structure. The deuterium atom in *IR*-[1-²D]-D-fructose occupies the H-1_R position of non-labeled D-fructose.

起源の異なるキシロースイソメラーゼの阻害剤共存下におけるX線結晶解析の結果等から、本タイプの酵素反応機構として開環型グルコースを経由した1,2-ヒドリド転移が示唆されている。本実験結果を説明するためには、2位のヒドリドがプロキラルな隣接アルデヒド基の*re*面へ転移する必要がある。従って、酵素の活性中心における基質分子の反応部位のコンホメーションは、開環型グルコース分子の2位水酸基と1位アルデヒドの酸素原子が同一方向へ*syn*配向しているものと考えられる(Figure 5)。

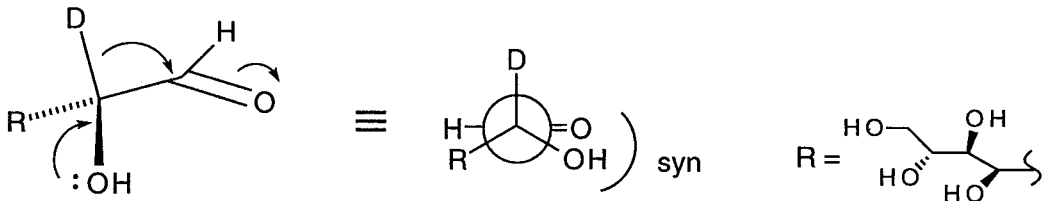


Figure 5 Proposed conformation of [2-²D]-D-glucose during the 1,2-hydride (deuteride) transfer catalyzed by xylose isomerase.

【結論】キシロースイソメラーゼ(EC5.3.1.5)によるD-グルコースからD-フルクトースへの異性化反応機構を、同位体ラベルされたグルコースを基質としたNMR実験から検討した。酵素による本異性化反応は、D-グルコースの2位の水素が1位のカルボニル炭素の*re*面へ転移して起こり、重水素が転移して生成した[1-²D]-D-フルクトースの1位がRの絶対配置であることが明らかとなった。本異性化の反応機構として、活性中心において基質分子の1,2-位の酸素原子が*syn*配向した分子内1,2-ヒドリド転移が強く示唆された。現在、²D-NMRによる直接的な解析を検討中である。

【謝辞】キシロースイソメラーゼを御供与くださいました合同酒精(株)に感謝いたします。

【参考文献】C. A. Collyer and D. M. Blow (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1362-1366.

○福原忠雄、小松一男、阪本興彦、高松翼
(資生堂 安全性・分析センター)

Application of semimicro LC/¹H-NMR experiment using PFG to structural analysis
Tadao Fukuhara, Kazuo Komatu, Okihiko Sakamoto, and Tasuku Takamatu
(Safety & Analytical Research Center, SHISEIDO Co., Ltd.)

An on-line combination system of semimicro liquid chromatography (LC) and ¹H-NMR with a micro LC/NMR probe (3mm i.d.) was constructed. As LC condition, an ODS semimicro column, CAPCELL PAK C₁₈ (1.5mm i.d.×250mm) and the mobile phase consisting of deuterium oxide (D₂O)/acetonitrile-d₃ (CD₃CN)=25:75 (v/v) and a flow rate of 100 μl/min were used. This system required only 6ml/hr of expensive deuterated solvents, and showed significantly improved cost-efficiency. By the use of a deuterated organic solvent, residual solvent signals could be easily minimized and the detectable windows for NMR signals of sample were further expanded. Application of the system to structural analysis by PFG 2D-spectra measurement was described.

【はじめに】

液体クロマトグラフィー (LC) と NMR のオンライン結合は古くから検討されているが、汎用的な測定装置としては定着していない。その理由としては、NMR の感度が、紫外・可視分光光度計はもとより質量分析計などの他の検出機器に比較して極端に低いということもあるが、移動相溶媒に高価な重水素化溶媒を大量に用いる必要があるというコスト面の問題も大きい。感度面の問題は、磁石の高磁場化やプローブの改良などにより改善されつつあるが、移動相については、LC で汎用される逆相モードを用いた場合、水とアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒の混液を、毎分 0.5~1ml の流量で用いる必要があり、測定に多量の重水素化溶媒を必要とするという制約がある。最近、上市された LC/¹H-NMR 装置の例では、比較的安価な重水をロック溶媒とし、有機溶媒には軽溶媒を使用して、WET 法¹⁾ などの特殊なパルステクニックで巨大な溶媒信号を消去する方法が用いられている。しかしながら、この方法では、巨大な溶媒信号の近傍のシグナルは全く観測することができず、構造解析に用いる試料の信号の観測領域が狭くなるし、溶媒信号の消去に高度な技術を要する。我々は、本技術の汎用性の向上を目的とし、LC の移動相流量を通常の約 1/10 で操作し得るセミマイクロ LC を用いることにより、1 時間当たりの溶媒使用量が 6ml 程度であるコストパフォーマンスに優れたセミマイクロ LC/¹H-NMR 装置を組み立て、種々の検討を行ってきたが²⁾ ³⁾、水・有機溶媒ともに重水素化溶媒を用いることで、溶媒信号の消去が容易で、かつ、試料の信号の観測可能領域を広くすることができ、コスト面においても汎用性のある手法になり得ることを確認した。本報では、構造解析への応用として、PFG を使った種々の 2 次元スペクトル測定の検討結果を報告する。

【装置】

セミマイクロ LC 装置には、資生堂製 NANOSPACE SI-1 を使い、逆相モードのセミマイクロラムには資生堂製 CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (内径 1.5mm, 長さ 250mm, 粒径 5 μm) を用いた。NMR 装置には、日本電子製 Lambda-400 に内径 3mm の LC/NMR 用プローブ NM-N40H3X/FGLC を組み込んで用いた。LC と NMR は内径 0.13mm、長さ 1.8m の PEEK チューブで接続した。NMR スペクトル測定のタイミングは、NMR の直前に接続した紫外検出器を

LC/¹H-NMR, PFG, セミマイクロ LC

ふくはらただお、こまつかずお、さかもとおきひこ、たかまつたすく

モニタリングすることにより調節した。移動相には Isotec 製の重水 (99.9atom%D) と Aldrich 製の重アセトニトリル (95+atom%D) の混液を 100 μ l/min (6ml/hr) の流量で用いた。測定方法としては、移動相を流したまま連続してスペクトルを測定する on-flow 法と、2次元 NMR などのために、試料が検出部に到達した時点で移動相を停止して順次スペクトルを測定する stop-flow 法の 2 種類を使い分けて行った。

【実験及び結果】

LC などでの単離が難しい異性体の例として、ケト-エノール互変異性体の存在が知られている、4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BMDBM) を試料として、LC/¹H-NMR の測定を行った。BMDBM の構造式を Fig-1 に示す。

(a) LC 条件

移動相に、D₂O:CD₃CN=25:75 (1%りん酸)を用い、カラム温度を 40℃とした。紫外検出器の検出波長を 280nm、注入量を 1mg とした時の UV クロマトグラムを Fig-2 に示した。ケト体またはエノール体に由来すると思われる主ピークが、保持時間約 15 分に検出され、互変異体のもう一方に由来するピークが保持時間約 7 分に出現した。因みにその直後に溶出するピークは 4,4'-dimethoxydibenzoylmethane (DMDBM) によるものであることが既に確認されている。

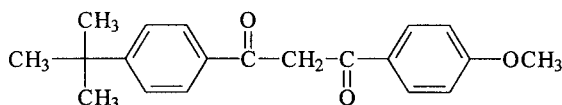


Fig-1 The structure of BMDBM

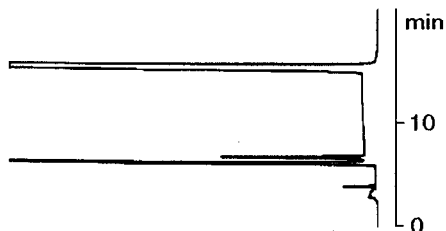


Fig-2 UV chromatogram of BMDBM

(b) on-flow スペクトルの測定

on-flow スペクトルは、観測幅 4000Hz、データポイント 4K で、45° パルスを用いて、くり返し時間 1.25 秒で、1 回の積算回数を 16 回 (1つのスペクトルの測定時間を 20 秒) とし、約 30 分間連続測定した。アセトニトリルの信号は、プレサチュレーションをせず、HDO 信号は、DANTE パルスでプレサチュレーションした。上記 LC 条件で注入量を 1mg とした時の on-flow スペクトルを Fig-3a に、その contour plot を Fig-3b に示したが、Fig-2 のクロマトグラムと同様に、2 種類の成分のスペクトルが確認できた。成分 B 直後の DMDBM のシグ

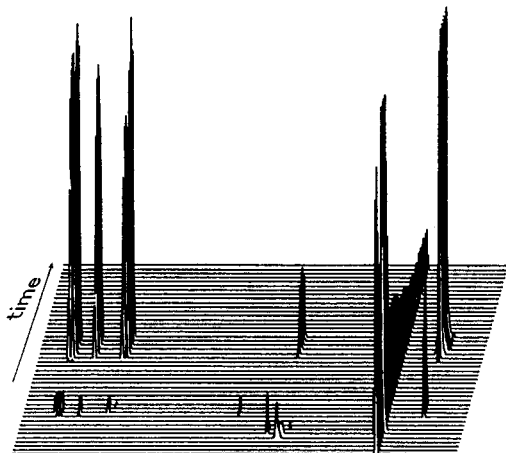


Fig-3a Stacking plot of on-flow spectrum

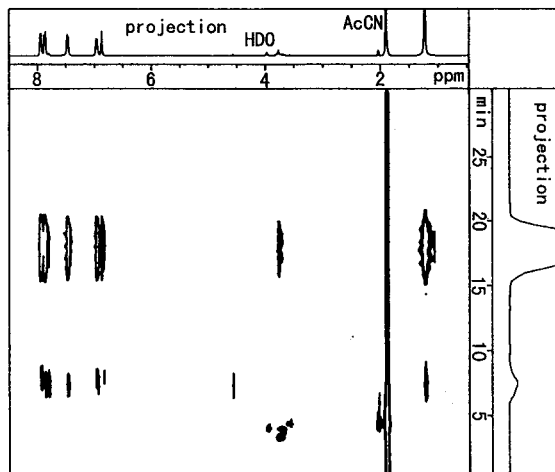


Fig-3b Contour plot of on-flow spectrum

ナルも分離良く観測された。約 17 分 (成分 A) と 7.5 分 (成分 B) におけるスペクトルを取り出し (スライスし) Fig-4 に示した。成分 A のスペクトルには約 6.8ppm に鍵となるシグナルが認められたのに対し、成分 B では約 4.5ppm にシグナルが認められた。

(C) stop-flow によるスペクトルの測定

試料を 5mg 注入して、約 17 分後に移動相を停止し、PFG-DQFCOSY (積算時間; 約 1 時間), PFG-HMQC (積算時間; 約 1 時間), PFG-HMBC (積算時間; 約 5 時間) を測定した。スペクトル解析の結果、成分 A は Fig-5 に示した構造のうちエノール体であることが支持された。Fig-6,7 には PFG-HMQC, HMBC スペクトルを示したが、約 6.8ppm のシグナルはエノール体由来のメチンシグナルであることが確認された。このこと及び Fig-4(B) のスペクトルから、残りの成分 B はケト体であり、ケト体由来のシグナルは約 4.5ppm のものであると予測されたが、量的に約 1% と少ないことと、速やかにエノール型へと変化し、また、その平衡がエノール型に偏っていることから解析可能な 2 次元 NMR スペクトルは得られなかった。そこで、約 7.5 分後に移動相を停止し、成分 B を検出部に閉じ込めたまま、on-flow スペクトルと同様の測定法により横軸が時間軸となる ¹H-NMR スペクトルを測定した。スペクトルは、観測幅 5500Hz、データポイント 4K で、45° パルスを用いて、くり返し時

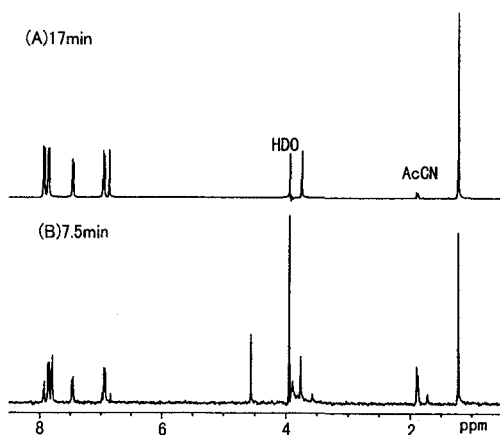


Fig-4 On-flow slice spectra of BMDBM

(A) Slice spectrum of 17min.

(B) Slice spectrum of 7.5min.

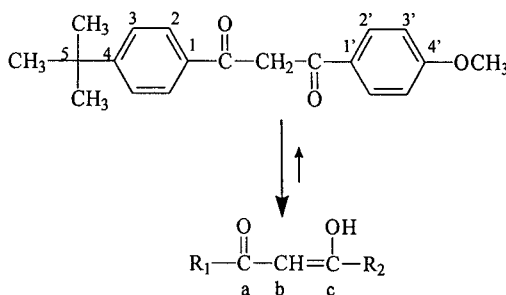


Fig-5 Keto-enol tautomer of BMDBM

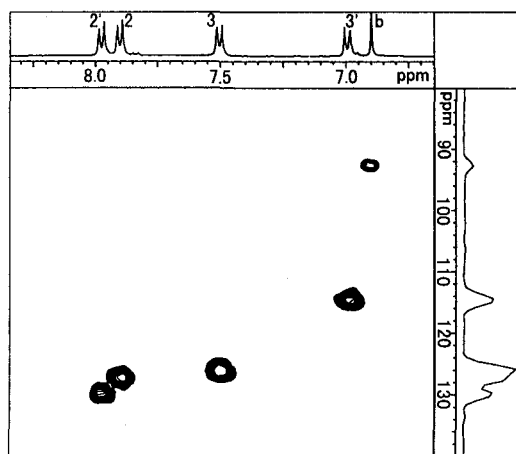


Fig.6 Expanded PFG-HMQC spectrum; mobile phase stopped at 17 min.

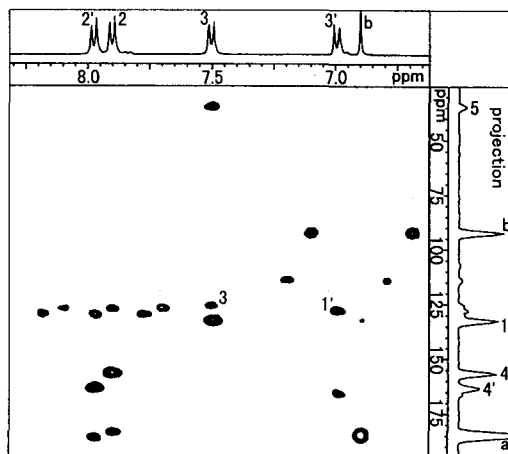


Fig.7 Expanded PFG-HMBC spectrum; mobile phase stopped at 17 min.

間6秒で、1回の積算回数を128回（1つのスペクトルの測定時間を約13分）とし、約4時間連続測定した。その contour plot の拡大図を Fig-8 に示したが、約 4.5ppm のケト体由来のシグナルの減少に伴い、約 6.8ppm のエノール体由来のシグナルが増大していることが確認できた。そして、約3時間後にはほぼエノール体に変化し、エノール体のスペクトルと一致することが確認できた。Fig-9 には、約 6.8ppm と約 4.5ppm のシグナルの F1 方向（時間軸）でのスライススペクトルを並べて示したが、ケト型由来のシグナルの減少と、エノール型由来のシグナルの増大する様子がよく示された。成分 B は、量的に少なく 2D-スペクトルが測定できなかったが、各種の stop-flow 法によりケト体を確認できた。

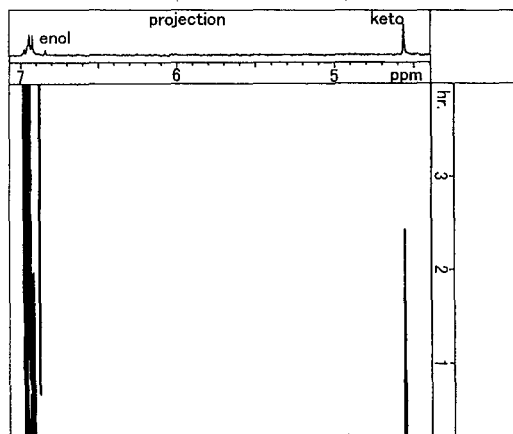


Fig-8 Spectrum of keto-enol tautomerism vs. time.

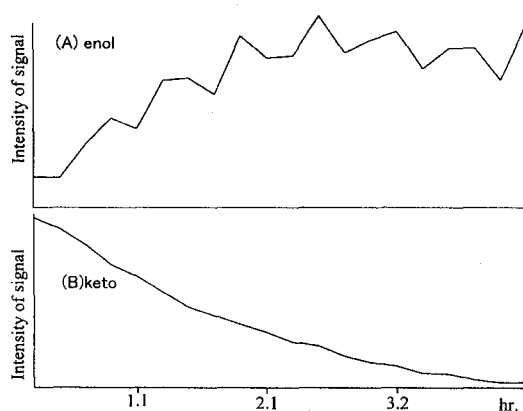


Fig-9 Time-course spectra of component B (A) F1 slice spectrum of ca. 6.8ppm. (B) F1 slice spectrum of ca. 4.5ppm.

【まとめ】

セミマイクロ LC/¹H-NMR を用いて、PFG を用いた 2 次元 NMR スペクトルを測定し、構造解析への応用の可能性を示すことができた。また、通常の分取によっては捕らえることができないケト-エノール互変異性体の NMR スペクトル測定と、その変化の様子を観測することができ、セミマイクロ LC/¹H-NMR の有用性が示された。

【文献】

- 1) P., Harold and H., Wolf, *Macromolecules*, 29, 6556-6559 (1996)
- 2) 福原忠雄ら Separation Sciences '94 講演要旨集 105 頁
- 3) T. Fukuhara et al *BUNSEKI KAGAKU*, 45, 421-426 (1996)

The study of micellar structure in Bis(quaternary ammonium bromide) surfactants

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

Norikatsu Hattori, ○Akihiro Yoshino, Hirofumi Okabayashi

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 the 1H -NMR spectra and discuss about the 1H chemical shifts and signal pattern depending on concentration. The aggregation numbers in micellar solution are analysed by the mass action law using raw and corrected data. They are related to the conformational structures of the molecular aggregation. We discuss about the validity of correction and the effect of the spacer concerning micellar aggregation in the gemini type surfactant molecule.

【はじめに】

我々はこれまで界面活性分子の分子構造とその物性に関する研究を行い、表題化合物の無水物および水和物における固体構造[1]、溶液構造[2]について検討を行ってきた。特に昨年の本討論会ではビシナル結合定数 $^3J_{HH}$ と $^3J_{CH}$ から、ミセル化に伴う分子内の構造変化を明らかにした。アルキル鎖は伸びているコンホメーションが優位に存在していること、ミセル化にともないベンゼン環はアルキル鎖に対する立体配置が変化することを明らかにした。今回は 1H -NMR および ^{13}C -NMR を用いて、化学シフトとシグナルパターンの濃度依存性から、水溶液中における単量体-ミセル平衡過程について会合数とベンゼン環の異方性効果の検討を行った。ジェミニ型界面活性剤の会合数と会合体構造に及ぼす spacer の効果について報告する。また、会合数を求めるために用いる化学シフトの値は、体積磁化率を考慮して補正を行った。補正の効果についても報告する。

【実験】

合成---化合物は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い

1H -NMR、ミセル、会合数、ジェミニ型界面活性剤の spacer の効果、体積磁化率はとりのりかつ、よしのあきひろ、おかばやしひろふみ

3種の spacer をもつ分子を合成した(Fig. 1)。オクチル鎖の水素はN原子に近い方から H1, H2 と記号をつけ、N原子に結合しているメチル基の水素は N-CH₃、ベンゼン環とN原子間のメチレン水素は Hsp、ベンゼン環部分の水素は Hph とする。

測定---重水溶液中における ¹H-NMR 測定の試料管には体積磁化率の補正を行うため SHIGEMI 社製 2重管(SC0010)を用いた。外部標準には DSS(0.2M)を用いた。測定は日立製作所製 R-90 (永久磁石：磁場は試料管の長軸に対して垂直方向) 及び Varian 社製 400 Unity plus (超伝導磁石：磁場は試料管長軸に対して水平方向) を用いてそれぞれ測定温度 30 °C で行った。¹³C-NMR 測定は Varian 社製 400 Unity plus を測定温度 30 °C で用いた。

【結果と考察】

会合数の推定--- Fig. 2 に oxy8 の永久磁石および超伝導磁石を用いた ¹H-NMR スペクトルを示す。

ミセル溶液中において、モノマー *S* と会合数 *n* の会合体 *S_n* には式 (1)、式 (2) で表される平衡が成り立っていると仮定し、質量作用の法則を用いて、直線近似で線形的にミセルの会合数、平衡定数を推算した[4]。また、式 (3) と式 (4) から、はじめに *n*、*K* を仮定して、最適な δ_M を決定し δ の計算値

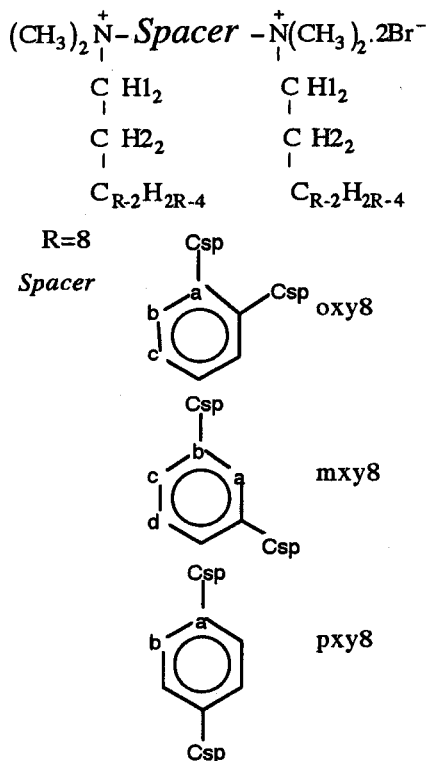


Fig.1 Gemini surfactants

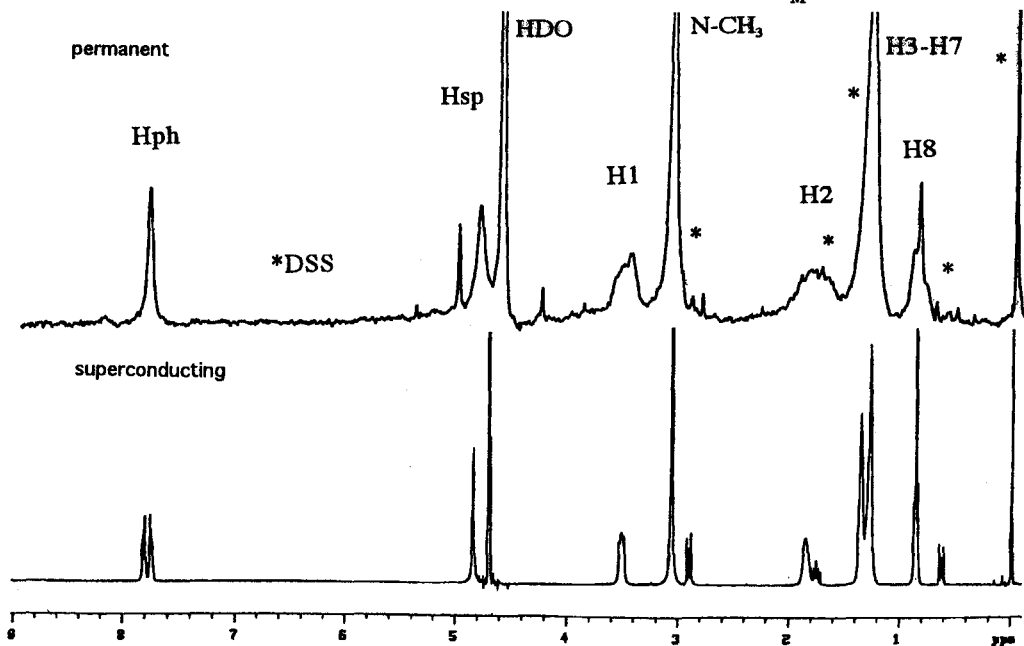


Fig. 2 ¹H-NMR spectra for oxy8 at 6wt% using permanent and superconducting magnet.

$$nS \rightleftharpoons S_n \quad (1)$$

$$K = [S_n]/[S]^n \quad (2)$$

$$[S] = C_D(\delta_m - \delta)/(\delta_M - \delta_m) \quad (3)$$

$$\log(C_D - [S]) = \log nK + n \log [S] \quad (4)$$

K : Kinetic Constant δ_m , δ_M : Chemical shift of monomer and micelle C_D : Concentration

をもとめ式 (5) の δ_{err} が最小のものを (Fig.3) 直接探索法により非線形的に求め [5], 線形的に求めた値と比較検討した。

$$\delta_{err} = \sum \frac{(\delta_{obs} - \delta_{calc})^2}{(\delta_{obs})^2} \quad (5)$$

体積磁化率の補正—体積磁化率の補正は試料管長軸方向に対して磁場を垂直 (永久磁石) および水平方向 (超伝導磁石) にかけて測定をして行った。真の化学シフト δ_0 は式 (6) から算出した [4]。

$$\delta_0 = \frac{1}{3}(\delta^S + 2\delta^P) \quad (6)$$

ここで δ^P , δ^S は永久磁石、超伝導磁石を用いた場合の観測された化学シフトである。補正值はミセル溶液濃度に対して単調な増減とならなかった (Fig.4)。化学シフトはミセル形成前では超伝導磁石の方が低磁場に観測されたが、ミセル形成と共に逆転した。したがって、各測定濃度で補正を行う必要が生じた。Table 1 に示したように磁化率を補正した場合 n, K の値は永久

Table 1 n, K values for oxy8/N-CH₃ part

	liner				nonliner	
	n	K	n*	K*	n*	K*
p	21	7.6×10^{25}	6	9.0×10^5	6	8.3×10^4
s	50	8.3×10^{65}	8	3.8×10^9	26	4.2×10^{32}
c	26	3.9×10^{32}	7	2.0×10^7	7	5.5×10^6

p: permanent s: superconducting c: correction data

* considering solvent effect

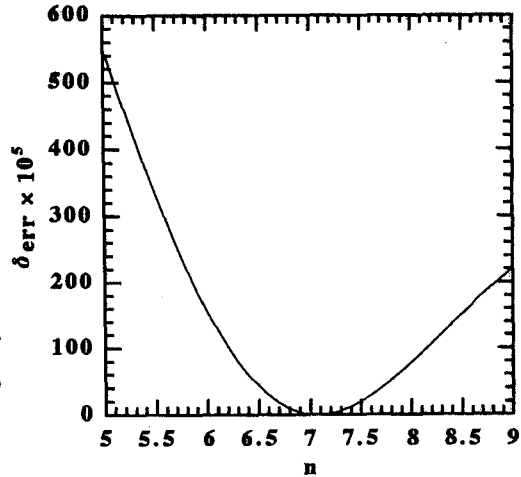


Fig. 3 The err for oxy8 at N-CH₃ part vs. aggregation number

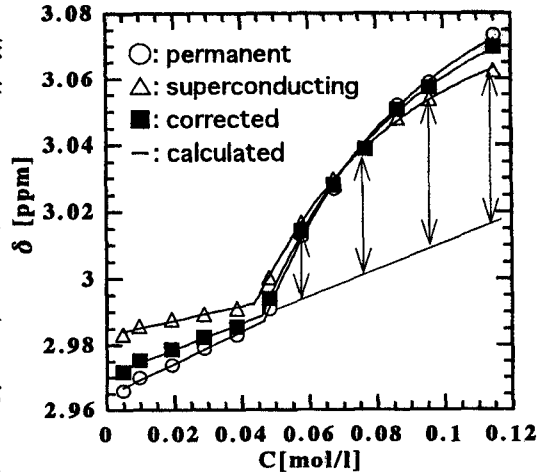


Fig. 4 The plot of δ vs. concentration for oxy8/N-CH₃ part

磁石を用いたものと超伝導磁石のそのの間となった。

溶媒効果の補正—溶媒効果がない場合、臨界ミセル濃度以下では化学シフト値は一定値をとると考えられるが、実際の化学シフトの測定値は濃度に対し一定の傾きを持った直線となっ

た(Fig. 4)。そこで、この効果を補正するために CMC 以下の濃度領域に対して近似直線を引き、Fig. 4 の矢印部分の化学シフトとした。oxy8 では溶媒効果は Hsp>N-CH₃>Hph>H8 となっている(順に 0.71, 0.49, 0.19, 0.05 [ppm mol⁻¹])。これはこの順に強い相互作用を受けていることを示す。ところで H8 ではミセル形成によって水素結合が弱まることにより説明されるが他の部分は H8 よりはるかに大きな値をとり、むしろ分子間におけるベンゼン環の環電流効果が支配的である。Hph に着目すると溶媒効果は mxy8>pxy8>oxy8 となっている。mxy8 と pxy8 では濃度増加に対し高磁場シフトしており、一方 oxy8 では低磁場シフトをしているため、ベンゼン環の異方性効果が逆に作用していると考えられる。

会合体構造--- oxy8 では補正を行った値に対して会合数 n の値はそれぞれの値が一致しなかった (Hph>N-CH₃≈Hsp>H8)。これはミセル会合したときの分子間相互作用を反映している。つまり、Hph の部分がスタックしている会合構造が考えられる。Fig.5 に Hph の濃度変化を示す。このスペクトルパターンは Cb、Cc が ¹³C-NMR で区別されて観測されているので、濃度増加に伴い 2 種の水素の化学シフト差が大きくなっていくものと説明される。oxy8 のベンゼン環の炭素は CMC 前後で (1wt%→5wt%) 濃度が高くなるにつれて、すべて低磁場シフトしており、Cb>Ca>Cc (化学シフト差の差は順に 0.212, 0.137, 0.061 [ppm]) となった。³J_{CH}の結果とあわせて、会合体構造はベンゼン環が 2 本の平行なアルキル鎖の側に向いている構造と示唆された。

【結論】

ミセル溶液では体積磁化率が単調変化せず、各濃度ごとに補正が必要である。oxy8 では会合数が mxy8 と pxy8 に比べて大きく、より大きなミセルを作る。一方 mxy8 と pxy8 は小さな会合体しか形成しない。会合数 n、溶媒効果の値は分子の各部位に対して異なり、分子間相互作用による会合構造を反映したものとなった。また、この不一致は構造推定する上で重要なプローブとなり得る。

【参考文献】

- [1] 服部、吉野、岡林、第 3 4 回 NMR 討論会講演要旨集,101,(1995).
- [2] 服部、吉野、岡林、第 3 5 回 NMR 討論会講演要旨集,155,(1996).
- [3] 実験化学講座 続 12, pp298-301(1967).
- [4] J. H. Fendler, E. J Fendler, R. T. Medary, O. A. El Seoud, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **69**,280,(1973).
- [5] O. Söderman, P. Guering, *Colloid & Polymer Sci* , **265**, 76, (1987).

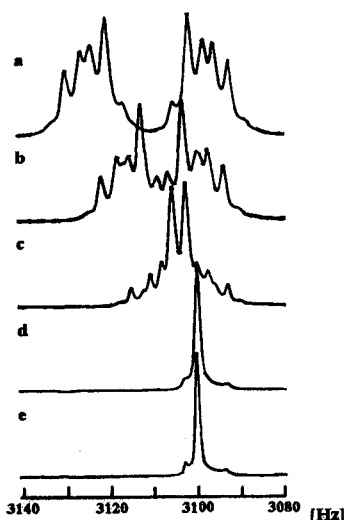


Fig.5 ¹H-NMR Spectra for oxy8-D₂O system at 30°C (a=5.0wt%; b=4.0wt%, c=3.0wt%, d=2.0wt%, e=1.0wt%).

Conformational change of *n*-octylphosphoethanolamine hydrochloride in aqueous solution
studied by NMR Spectroscopy

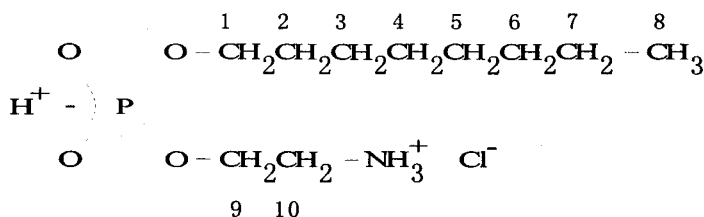
Akihiro Yoshino, ○Tomohiro Iwasaki, Norikatsu Hattori, Keijirou Taga and Hirofumi Okabayashi

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

The title surfactant is synthesized for mimetic studies of phospholipids. The conformations of several sites of the title surfactant are determined. The critical micelle concentration (CMC) for concentrated solutions (more than 12 wt%) is obtained by means of electrical conductivity. For higher concentrations, the concentration dependence of NMR shift data can not be used to extract micellar aggregation number since the solvent effects and volume magnetic susceptibility do not cancel each other and the law of mass action can not be applied at these concentrations. The ability of ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts to determine CMC and micellar structure has been investigated.

【緒言】

従来、界面活性分子の水溶液ミセルの会合数は、NMR 化学シフトから求められてきた^{1,2)}。しかしながら、臨界ミセル濃度(以下 CMC とする)の高い化合物に対しては溶媒効果や体積磁化率の補正など薄い濃度では無視された要因が会合数を小さくすることが報告されている³⁾。一方、我々は表題化合物を合成して電気伝導度および NMR 化学シフトから CMC を求めたところ、12wt%以上の高濃度を観測した⁴⁾。本研究では、このような高濃度での化学シフト変化に対する溶媒効果と体積磁化率の効果について検討を試みた。また、ミセル化による化学シフト差の違いから水溶液中の立体構造についても検討する。Scheme 1 に OPEA・HCl の分子構造を示す。



Scheme 1 Structure and Numbering of OPEA・HCl

キーワード: ^1H NMR、 ^{13}C NMR、ミセル、ビシナル結合定数、コンホメーション変化

よしのあきひろ、○いわさきともひろ、はつとりりかつ、たがけいじろう、おかばやしひろふみ

【実験】

OPEA は塩化ホスホリルに *n*-オクチルアルコールを反応させ、次いで2-アミノエタノールを作用させた後、酢酸で加水分解することにより合成した。OPEA・HCl は OPEA に等モルの塩酸を加えて反応させ、再結晶により精製したものをを用いた。

オクチル鎖の炭素は、P 原子に近い方から C₁, C₂ というように記号を付け、エチル鎖の炭素は、P 原子に近い方から C₉, C₁₀ と記号を付けることにする。重水素中における ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルは、Varian UNITY 400 plus 分光計(400MHz), R-90 分光計(90MHz)を用いて、30°Cで測定した。また、電気伝導度の測定器には東亜電波工業 MODEL CM-2A を使用し、臨界ミセル濃度(CMC)を求めた。

【結果と考察】

(1)コンホメーションの決定

OPEA・HCl の P 原子寄りの1, 2, 9, 10位の ¹H, ¹³C-NMR 吸収線に ³¹P との結合定数による分裂がみられたので、それぞれの位置でのコンホメーションを解析した。また、デカップリングを行うことにより PO-C₁H, PO-C₉H, HC₂-C₃H 軸まわりのコンホメーションも解析した。

NMR スペクトルで観測される三結合間の結合定数は二面体角に依存しており、Karplus の関係式に従い trans, gauche, gauche'型の各々の ³J の荷重平均、 ${}^3J = P_t \cdot {}^3J_t + P_g \cdot {}^3J_g + P_{g'} \cdot {}^3J_{g'}$ で表される。ここで、P_t, P_g, P_{g'} はそれぞれ trans, gauche, gauche'型の比率、³J_t, ³J_g, ³J_{g'} は trans, gauche, gauche'型の回轉異性体の三結合間の結合定数である。OPEA・HCl は gauche と gauche'が同じ形態であるので、次のように表される。

$${}^3J = P_t \cdot {}^3J_t + (1 - P_t) \cdot {}^3J_g$$

それぞれの結合定数 ³J_t, ³J_g は、PO-CH 軸回轉では ³J_t = 30.6Hz, ³J_g = 1.5Hz, PO-CC 軸回轉では ³J_t = 8Hz, ³J_g = 2Hz を使用した。しかし、H₂ 水素は H₁ をデカップルしたところ4本観測された。そこで、観測したスペクトルを AA'XX'系と近似し、trans, gauche, gauche'型の比率を次のように表した。J_{ax} = P_g · ³J_g + P_{g'} · ³J_g + P_t · ³J_t, J_{bx} = P_g · ³J_g + P_{g'} · ³J_t + P_t · ³J_g, P_t + P_g + P_{g'} = 1 ところで、OPEA・HCl は gauche と gauche'が同じ形態であるので、次のように表される。

$$J_{ax} = 2 P_g \cdot {}^3J_g + P_t \cdot {}^3J_t$$
$$J_{bx} = P_g ({}^3J_g + {}^3J_t) + P_t \cdot {}^3J_g, \quad P_t + 2P_g = 1$$

これをもとに、それぞれの回轉異性体の割合を求めた。各々の炭素に対するスペクトルの帰属は、¹H-¹H および ¹H-¹³C COSY スペクトルにより行った。

結合定数と骨格炭素についてのトランス配座の割合(*t*)との関係を Table 1 に示す。これから、それぞれオクチル鎖とエチル鎖の根元の PO-CH と PO-CC の *t* は、どれもほぼ同じ値であり、コンホメーションに差がなく二つの O-C まわりはトランスの比率が大きいことが分かる。一方、HC₁-C₂H と HC₉-C₁₀H の ³J はオクチル鎖とエチル鎖で異なる。すなわち、コンホメーションに違いがあり、オクチル鎖の方がエチル鎖より束縛回轉している。一方、HC₂-C₃H と HC₁-C₂H を比較すると HC₂-C₃H の二種類の水素が区別されていることからトランスの比率が大きく、束縛回轉していることが分かった。

Table 1 Coupling constant (3J , Hz) and trans conformation ratio (t) against backbone carbon

bond	12wt%(0.5M)		15.5wt%(0.7M)		bond	$^3J_{ax}$	$^3J_{bx}$	t
	3J	t	3J	t				
PO-C ₁ H	6.77	64	6.77	64	HC ₂ -C ₃ H	8.50	5.90	10
PO-C ₉ H	6.59	65	6.59	65				
PO-C ₁ C ₂	7.10	85	7.25	88				
PO-C ₉ C ₁₀	6.94	82	7.24	87				
HC ₁ -C ₂ H	6.59	—	6.68	—				
HC ₉ -C ₁₀ H	5.31	—	5.4	—				

(2) ^{13}C Chemical shift

CMC 以下の化学シフトが一定値であるとして溶媒効果は直線近似で差し引いた。主鎖の C₃-C₈ での溶媒効果は 10^{-12} ppm/mol 以下であった。一方、C₁, C₂, C₉ ではそれぞれ 0.3138, -0.0583, 0.3564 ppm/mol であり、C₁₀ は補正できなかった。しかしながら、全体的に溶媒効果は少ない。

Fig.1に溶媒効果補正後の ^{13}C 化学シフトの濃度依存性を示す。どの部位でも同じ濃度で変化がみられ、すべての部位で単量体領域に比べて高磁場シフトしている。これはミセル形成による疎水場での立体圧縮効果である。C₉ での化学シフト変化が最も大きく、それ以外の部位においてはほぼ同一である。図からも分かるように測定の誤差が大きいので、会合数の決定は行わなかった。

電気伝導度の測定から求めた CMC は、0.535[mol/l]であり、NMR と比較すると電気伝導度の方が CMC 濃度が低く鋭敏であった。

(3) ^1H Chemical shift

溶媒効果は(2)と同じく直線近似で差し引いた。主鎖の H₂-H₈ での溶媒効果は -0.0634 - -0.0524 ppm/mol であった。一方、H₁, H₁₀ は 0.001 程度と小さく H₉ では 0.0217 ppm/mol であった。

Fig.2に補正後の 400MHz での ^1H 化学シフトの濃度依存性を示す。 ^{13}C -NMR とは異なり、測定の部位によって単量体領域に比べ

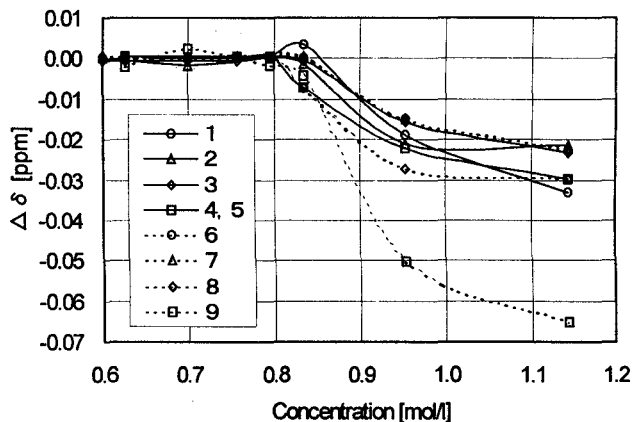


Fig.1 Corrected ^{13}C chemical shift against concentration

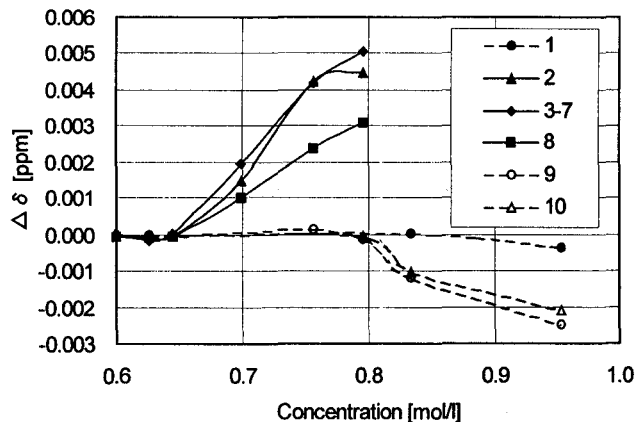


Fig.2 Corrected ^1H chemical shift against concentration

て高磁場や低磁場にシフトしている。すなわち、 H_1 , H_9 , H_{10} は高磁場シフトしているが、主鎖の H_2 - H_8 では低磁場シフトしている。このシフト変化のうち前者は電荷移動で説明され、後者は溶媒の水との水素結合で説明される。単量体領域では水との水素結合のため高磁場シフトしているが、ミセルを形成すると主鎖の部分から水が排除されて低磁場シフトする。主な化学シフト変化は主鎖で見られることから、この変化はミセル形成に直接関連している。また、ミセル形成における変化も部位により異なり、 H_1 , H_9 , H_{10} では ^{13}C とほぼ等しく、 H_2 - H_8 ではそれより鋭敏であった。これは、水素が分子骨格である炭素より外側にあるためと考えられる。

(4) 体積磁化率の補正

体積磁化率は外部における二重管基準法で 400MHz と 90MHz の ^1H -NMR スペクトルの比較から補正を行った。補正式は、 $\delta_0 = (\delta^s + 2\delta^p)/3$ のように表される。ここで、 δ_0 は体積磁化率が補正された真の化学シフト、 δ^s は超伝導磁石装置(400MHz)により観測される化学シフト、 δ^p は永久磁石装置(90MHz)により観測される化学シフトである。

Fig.3に 400MHz と 90MHz の ^1H -NMR スペクトルから体積磁化率の補正を行った結果を示す。上から順に 90MHz の測定値(IR)、磁化率の補正值(VM)、400MHz の測定値(SC)である。400MHz の化学シフトに変化がみられず解析が困難であるが、体積磁化率の補正後の値では滑らかである。また、90MHz の化学シフトには変化がみられるが、高濃度において単調増加でないためこのことから体積磁化率の補正が必要である。

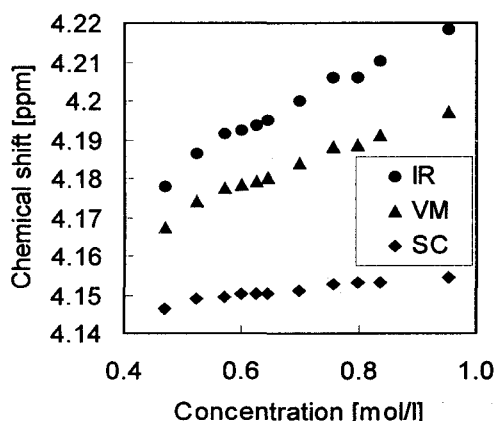


Fig.3 ^1H NMR chemical shifts and corrected chemical shifts for H_9 against concentration

(5) 会合数と生成定数

δ_0 に対して質量作用則^{1,2)}を適用して会合数を求めた。まず、 $1/C$ から平衡ミセルシフト δ_M を求め、ミセル濃度 $[S]=C(\delta_M - \delta_0) / \delta_M$ を計算し $\log(C-[S])$ をプロットして傾きから会合数 n 、切片から $\log nK$ (K は平衡定数) を算出した。 H_9 の結果が最も誤差が少なく計算され、 $n=39$ 、 $K=4.9 \times 10^6$ を得た。

【結論】

結合定数からオクチル鎖とエチル鎖では、ミセル形成時のコンホメーションが異なり、オクチル鎖の方が束縛回転していることが分かった。また、化学シフトの濃度変化から CMC に対する鋭敏さは、 ^{13}C よりも ^1H の方が鋭敏であり、特に主鎖が鋭敏であった。 ^1H -NMR の 400MHz と 90MHz で磁化率の補正を行なうことにより真の値が得られることが分かった。

- 1) J. H. Fendler, E. J. Fendler, R. T. Medary and O. A. El Seoud, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **69** 280 (1973)
- 2) UH Henriksson, Lars Üdbbeg, *J. Colloid. Interface Sci.*, **46** 212 (1974)
- 3) O. Söderman and P. Guering, *Colloid & Polymer Sci.*, **265** 76-82 (1987)
- 4) 岩崎智浩, 服部憲和, 吉野明広, 多賀圭次郎, 岡林博文, 第50回コロイドおよび界面化学討論会 P029 (1997)

(理化学研究研) ○李 俊、鷗沢 洵、土肥義治

Conformational Analysis of Oligomers of (R)-3-Hydroxybutanoic Acid
in Solutions by NMR Spectroscopy

Jun Li, Jun Uzawa, and Yoshiharu Doi

The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Horosawa 2-1, Wako, Saitama 351-01

As model compounds of poly[(R)-3-hydroxybutanoate] [P(3HB)], oligomers of (R)-3-hydroxybutanoic acid (3HB) were studied in terms of their conformational behavior in solutions by means of ^1H NMR spectroscopy. The NMR assignments of the oligomers were made by using two-dimensional pulsed field gradient ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^{13}C HMBC (heteronuclear multiple-bond correlation) spectroscopy. The conformational behaviors of 3HB oligomers generated by rotation about the CH_2 - CH bonds were investigated in various solvents by analysis of vicinal coupling in the 500-MHz ^1H NMR spectra. The effects of the polarity of solvents and temperature on the conformational structures were discussed.

【はじめに】

ポリ(R)-3-ヒドロキシブタン酸[P(3HB)]は多くの微生物が作る立体規則性のバイオポリエステルであり、その生分解性と生体適合性に多くの関心が寄せられ、いろいろと研究されてきた。そこで、完全に均一な化学構造と分子量をもつ(R)-3-ヒドロキシブタン酸(3HB)のオリゴマーを化学合成し、P(3HB)のモデル化合物としてその性質を調べ、より詳細な情報を得ることは重要な課題である。

先に、私たちはP(3HB)のOH末端のモデル化合物として3HBのダイマーのメチルエステルである methyl (3R)-3-[[[(3'R)-3'-hydroxybutanoyl]oxy]butanoate [M(3HB)2]を合成し、その CDCl_3 と D_2O 中のコンフォーメーション構造につい

て報告した¹⁾。今回、さらに3HBのトリマーのメチルエステル[M(3HB)3]及び3HBのダイマー[A(3HB)3]を加え、NMRによりこれらのオリゴマーのコンフォーメーションについて、溶媒や温度効果を検討したので報告する。Chart 1にはP(3HB)及び3HBのオリゴマーの化学構造を示す。

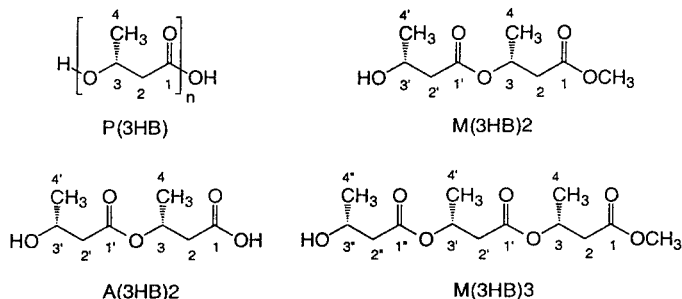


Chart 1. Structures of P(3HB) and 3HB oligomers.

【方法】

(R)-3-ヒドロキシブタン酸(3HB)のオリゴマーはmethyl (R)-3-hydroxybutanoateから合成し、NMR、MASS、及び元素分析などによって同定した。3HBのオリゴマーのNMR帰属は磁場勾配パルス法(PFG)を用いた二次元HMBC及びCOSYスペクトルによって行った。種々の温度と溶媒中での ^1H -NMRスペクトルを測定し、メチレンプロトンのカップリング定数を求め、そのカップリング定数から CH_2 - CH 結合に関してそれぞれのモノマーユニットの各コンフォーメーションの分率を見積もった。

【結果と考察】

まず、磁場勾配パルス法を用いた二次元HMBC及びCOSYスペクトルによって3HBのオリゴマーのNMR帰属を行った。Figure 1にM(3HB)2の ^1H - ^{13}C PFG-HMBCスペクトルを示す。二つのcarbonyl炭素

(C1, C1')のうち、メトキシ基の¹Hとlong-range相関を示したのはC1であることがわかった。したがって、メチレンプロトン(H2, H2')の帰属はC1及びC1'との相関から決めることができた。更にM(3HB)2の¹H-¹H PFG-COSYスペクトルを測定した。H3とH2, H3とH4, そしてH3'とH2', H3'とH4'の相関ピークが見られた。

Figure 2 に3HBモノマーユニットのCH₂-CH結合に関して可能な3つのコンフォーマー、即ちtrans (T), gauche (G), 及びanother gauche (Ḡ)を示す。二つのメチレンプロトン(CH₂)とメチンプロトン(CH)はABXカップリング系を形成し、スペクトル上で現れるみかけのカップリング定数J_{AX}とJ_{BX}はそれぞれのコンフォーマーのビシナルカップリング定数とそれらの分率から決める。Gaucheとtransのビシナルカップリング定数はそれぞれ約2.1 Hzと11.0 Hzとして、J_{AX}とJ_{BX}からCH₂-CH結合に関してそれぞれのモノマーユニットの各コンフォーマーの分率を見積もることができる。

Table 1 にCDCl₃中での3HBオリゴマーの各モノマーユニットのメチレンプロトンのカップリング定数とCH₂-CH結合に関してのコンフォーマーの分布を示す。三つのオリゴマーに対して、いずれの場合にもOH末端と隣接していない3HBユニットのCH₂-CH結合に関しては主にtrans conformerであり、次はgauche conformerであり、another gauche conformerは3%以内に止る。このコンフォーマーメーション構造はP(3HB)の骨格のものと同様である。一方、OH末端と隣接する3HBユニットのCH₂-CH結合に関してはかなり違ったコンフォーマーメーション構造を示す。この場合、メインがgauche conformerになり、trans conformerと並びanother gauche conformerも10%程度を示す。それはFig. 3に示すように、gaucheとanother gauche conformersにはOHと-C=Oが分子内水素結合を形成できるためと考えられる。これらの分子内水素結合の形成によってgaucheとanother gauche conformersが安定化されたため、この二つのコンフォーマーの分率が上がったのである。

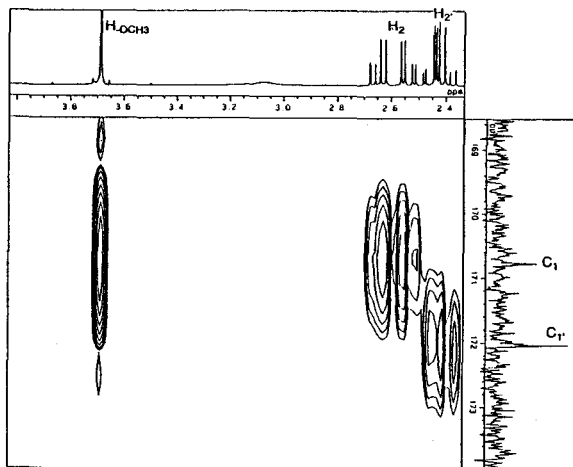


Fig. 1. Expansion of ¹H-¹³C PFG-HMBC spectrum of M(3HB)2 in CDCl₃ at 25 °C.

Table 1. Coupling Constants of Methylene Protons and Conformer Distributions of CH₂-CH Bonds in Oligomers of (R)-3Hydroxybutanoic Acid in CDCl₃ at 27 °C.

Oligomer	Bond	Probe H	Coupling constant / Hz		Conformer fraction		
			J _{AX}	J _{BX}	P _T	P _G	P _{Ḡ}
A(3HB)2	C2-C3	H2	8.2	4.9	0.68	0.31	0.01
	C2'-C3'	H2'	5.2	7.3	0.34	0.58	0.08
M(3HB)2	C2-C3	H2	7.6	5.2	0.63	0.35	0.02
	C2'-C3'	H2'	3.7	8.5	0.18	0.73	0.09
M(3HB)3	C2-C3	H2	7.6	5.5	0.61	0.38	0.01
	C2'-C3'	H2'	7.8	5.2	0.63	0.34	0.03
	C2''-C3''	H2''	3.7	8.7	0.17	0.73	0.10

Table 2 にD₂O中での3HBオリゴマーの各モノマーユニットのメチレンプロトンのカップリング定数とCH₂-CH結合に関してのコンフォーマーの分布を示す。OH末端と隣接していない3HBユニットのCH₂-CH結合に関しては、主に transと gauche conformersであり、another gauche conformerはほとんどない。このコンフォーメーション分布はCDCl₃中でのものと少々異なり、それは溶媒の極性の影響だと考えられる。また、OH末端と隣接する3HBユニットのCH₂-CH結合に関しては、gauche conformerの分率は依然 trans conformerのものより高く、D₂O中でも gauche conformerにはOHと-C=Oが分子内水素結合を形成できると考えられる。しかし、この水素結合はCDCl₃中でのものより弱いと思われる。

Table 3 に種々の非極性溶媒と極性溶媒中でのM(3HB)₂の各モノマーユニットのメチレンプロトンのカップリング定数とCH₂-CH結合に関してのコンフォーマーの分布を示す。まず、dichloromethane, cyclohexane, 及び*n*-hexaneなどの非極性溶媒中において、どの3HBユニットについてもCH₂-CH結合に関してのコンフォーマーの分布はCDCl₃中でのものとよく似ている。OH末端と隣接する3HBユニットのCH₂-CH結合に関してgaucheとanother gauche conformersにはOHと-C=Oが分子内水素結合を形成している。一方、THF, acetone, 及びDMFなどの極性溶媒中において、二つの3HBユニットのCH₂-CH結合に関してのコンフォーマーの分布は非極性溶媒中でのものとかかなり異なっている。この場合、二つの3HBユニットのコンフォーマー分布は近い値になり、gaucheとanother gauche conformersにはOHと-C=Oが分子内水素結合を形成できないと考えられる。

Table 2. Coupling Constants of Methylene Protons and Conformer Distributions of CH₂-CH Bonds in Oligomers of (*R*)-3-Hydroxybutanoic Acid in D₂O at 27 °C.

Oligomer	Bond	Probe H	Coupling constant / Hz		Conformer fraction		
			<i>J</i> _{AX}	<i>J</i> _{BX}	<i>P</i> _T	<i>P</i> _G	<i>P</i> _{Ḡ}
A(3HB) ₂	C2-C3	H2	6.7	6.7	0.50	0.50	0.00
	C2'-C3'	H2'	5.5	7.3	0.38	0.58	0.00
M(3HB) ₂	C2-C3	H2	6.4	6.4	0.49	0.49	0.02
	C2'-C3'	H2'	5.2	7.8	0.35	0.64	0.00
M(3HB) ₃	C2-C3	H2	—	—	—	—	—
	C2'-C3'	H2'	—	—	—	—	—
	C2"-C3"	H2"	5.2	7.9	0.34	0.65	0.01

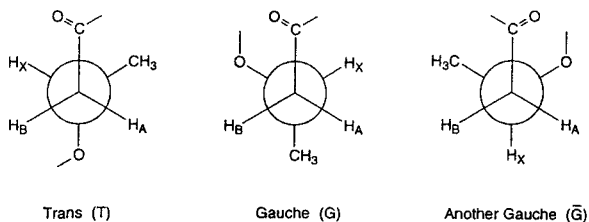


Fig. 2. Newman projections of possible conformers of a 3HB monomer unit about CH₂-CH bond.

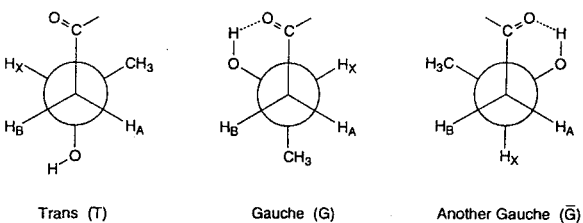


Fig. 3. Conformational structures about CH₂-CH bond of 3HB unit adjacent to OH terminal in 3HB oligomers. In both gauche and another gauche conformers the hydroxy and carbonyl groups form an intramolecular hydrogen bond.

Table 3. Coupling Constants of Methylene Protons and Conformer Distributions of CH₂-CH Bonds in M(3HB)₂ in Various Organic Solvents at 27 °C.

Solvent	Bond	Probe H	Coupling constant / Hz		Conformer fraction		
			J_{AX}	J_{BX}	P_T	P_G	$P_{\bar{G}}$
CD ₂ Cl ₂	C2-C3	H2	7.8	5.4	0.64	0.37	0.00
	C2'-C3'	H2'	3.4	8.5	0.14	0.72	0.14
C ₆ D ₁₂	C2-C3	H2	7.2	5.8	0.57	0.41	0.02
	C2'-C3'	H2'	3.2	8.6	0.10	0.72	0.18
C ₆ D ₁₄	C2-C3	H2	7.3	5.8	0.58	0.41	0.01
	C2'-C3'	H2'	3.0	8.8	0.11	0.75	0.14
THF- <i>d</i> ₈	C2-C3	H2	7.3	6.1	0.57	0.43	0.00
	C2'-C3'	H2'	7.3	5.8	0.58	0.41	0.01
Acetone- <i>d</i> ₆	C2-C3	H2	7.6	5.5	0.61	0.38	0.01
	C2'-C3'	H2'	7.3	5.8	0.58	0.41	0.01
DMF- <i>d</i> ₇	C2-C3	H2	6.6	6.6	0.50	0.50	0.00
	C2'-C3'	H2'	7.0	6.1	0.55	0.44	0.01

さらに、温度による3HBオリゴマーのコンフォーマーメーション分布の影響について検討した。Fig. 4にCDCl₃中の温度によるM(3HB)₂の二つの3HBユニットのコンフォーマーメーション分布の影響を示す。C2-C3結合に関しては温度の上昇につれて、三つのコンフォーマーの分率が徐々に平均化される。一方、C2'-C3'結合に関しては温度の上昇につれて、三つのコンフォーマーの分率の変化はかなり異なり、gaucheとanother gauche conformersの分率は徐々に下がると共に、trans conformerの分率は上がる。これは高温において、gaucheとanother gauche conformersの水素結合が弱くなるためと考えられる。特に温度が低い時、another gauche conformerがtrans conformerより高い分率を示すことがわかった。これは温度が低い場合、その水素結合はより効果的に形成でき、gauche conformerだけでなくanother gauche conformerのエネルギーをも大きく下げたことを示唆する。

今後、更に(S)体の3HBのオリゴマーや(R)と(S)体3HBユニット両方を含むオリゴマーのコンフォーマーメーション構造について検討し、それらのコンフォーマーメーション構造と酵素分解性との関連を調べる予定である。

【Reference】 1) J. Li, J. Uzawa, and Y. Doi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 1887 (1997).

キーワード： 3-ヒドロキシブタン酸のオリゴマー、PFG, HMBC, コンフォーマーメーション, 水素結合

著者ふりがな： り しゅん, うざわ じゅん, どい よしはる

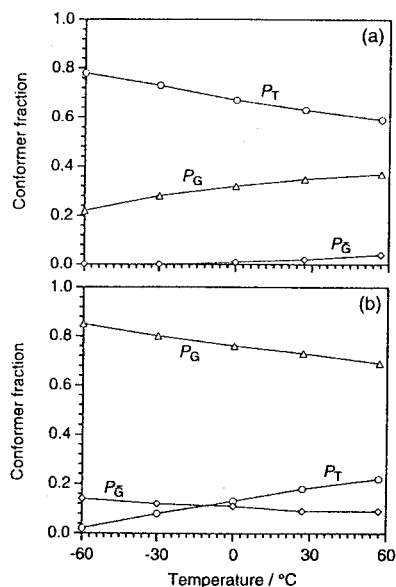


Fig. 4. Conformer fractions for the C2-C3 bond (a) and the C2'-C3' bond (b) of M(3HB)₂ as a function of temperature in CDCl₃.

Two component obstruction model of water diffusion in food macrostructure
(Tokyo university of fisheries) ○Mika Fukuoka, Yu-Ichiro Gomi, Hisahiko Watanabe

The diffusion properties of water in beads suspensions have been studied using pulsed field gradient nuclear magnetic resonance(PFG-NMR). The diffusion decays tend to be non-exponential. A model which considered two physically distinguishable water phases, namely bulk and hydrated shell water has been used to fit the data. The diffusion rates has been measured at diffusion time varying. The results clearly showed diffusion time dependent. In this work two dimensional random walk simulation of transient obstruction effect on moisture diffusion which consist of two phases water was conducted via numerical calculation.

Introduction

本研究の目的は単純な系例えばガラスビーズを充填した際にできる間隙における水分子の拡散挙動をモデル化することにより、より複雑な構造を有する食品素材や生体組織中の水の拡散挙動への適応を検討することである。溶液の分子自己拡散係数をパルス磁場勾配 (PFG) NMR法で測定する手法は1965年にTannerにより提出されて以来有力な方法となっている。PFG-NMR法では拡散時間を数十ミリ秒から数秒まで変化させることが可能であり、拡散時間を適切に選べば、分子は拡散している周りの構造の影響を受け、その結果が拡散係数の値に現れる。このようなrestricted diffusionを解析して生体組織や食品の構造に関する情報を得ることも可能である。しかしながら適切なモデルを設定し、境界条件を与えて拡散方程式を解いて解析解を得ることは難しい。

近年我々は、transientな拡散係数の時間依存性を示すrestricted diffusionについてランダムウォークシミュレーションによる解析をおこなった。モデルでは2次元の座標上に多数の粒子を配列したcellを設定した。粒子が自由に拡散できる部分と壁により制限される部分を作り、開孔比で表した。開孔比を変化させるとinfiniteな拡散係数値が異なることがわかった。この結果を実際の食品素材に適用させるとともに、構造がしっかりわかったモデルサンプルで検証する必要がある。そこで我々はモデルサンプルとしてガラスビーズを充填させて水はその間隙を拡散するような系を設定し、解析を試みた。

NMR measurements of water diffusion in beads suspension

ガラスビーズはBaO・TiO₂・SiO₂系ガラス、粒径80μmを用いた。これを蒸留水に懸濁させ、直径5mmのNMR試験管に充填した。その後懸濁液上部の上澄み液を取り除きNMR測定試料とした。

PFG-NMR法はstimulated echo パルスシーケンスで行なった。磁場勾配の大きさ $g=6\sim 37.5\text{gauss/cm}$ 、duration time $\delta=2\text{ms}$ 、拡散時間 $\Delta=19\sim 209\text{ms}$ 、測定温度：20℃で実験した。測定パラメータに対するエコーシグナルの減衰は、doped waterの場合は直線性を示し、傾きから計算した拡散係数値は $2\times 10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$ となった。これに対しガラスビーズを充填した場合は直線性は示さない。また傾きもdoped waterの場合に比べかなり減少していることがわかった。拡散係数を $2\times 10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$ とすると拡散時間が109msにおける拡散距離は約20μmとなる。粒径80μmのビーズを充填し、その間隙の水を観測しているとすれば、この拡散距離ではビーズによるobstruction effectを受けていると考えられる。拡散時間が十分短い19ms

PFG-NMR, water diffusion, Obstruction effect

ふくおかみか、ごみゆういちろう、わたなべひさひこ

においてはほぼ直線性を示した。拡散時間の増大とともに傾きが小さくなり直線性も示さなくなる transient な挙動を示した。

Simulation of water diffusion in beads suspension

PFM-NMRの測定結果を解析するために次のような仮定をたてた。1) ピーズ間隙に存在する水に、拡散係数の異なる2成分があるとする。ピーズ表面に吸着している水分子と、その水とさらに弱く結合し、動きにくくなっている水が形成する層をAとする。拡散係数を D_A とする。このA層より外の連続相をBとする。B相はバルクな溶液からなり、この場合は蒸留水の拡散係数値に等しい拡散係数 D_B を有する。A層にある水のpopulationを P_a とすると、バルクな水のpopulation, P_b は $P_b=1-P_a$ となる。

2) 拡散時間を長くしていくとB相の水はピーズとA層からなる部分に衝突し自由な拡散が制限されると考える。その結果B相の水の見かけの拡散係数 D_B は拡散時間が大きくなるとともに減少していき最終的にはある一定値に収束すると予想される。これに対し D_A はほとんど変化しないとする。population, P_a と P_b は拡散時間が変化しても一定であるとする。仮定1), 2)に基づき、PFM-NMRのエコーシグナル強度の減衰は以下のように表せる。

$$A/A_0 = P_a \exp(-D_A x) + (1 - P_a) \exp(-D_B x) \quad (*) \text{ただし } x = \gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3)$$

上式を測定値にfitさせた。A層の水の拡散係数値 D_A はKimmich et al. (1993)^{*)}による値を採用した。拡散時間 Δ の変化に対して D_A は常に一定、populationも一定、バルクの水の拡散係数値 D_B のみ変化させて Δ が19msから259msまでのNMRの測定値をシュミレーションすることができた。拡散時間が19msの場合においては、シュミレーションに用いたパラメータは $D_A=1.2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$, $D_B=2.2 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$, $P_a=0.26$ である。拡散時間が209msの場合には用いたパラメータは $D_A=1.2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$, $D_B=7.3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$, $P_a=0.26$ である。

シュミレーションの結果得られた D_B の時間変化についてobstruction modelによる解析をおこなった。obstruction modelのRandom walk simulationによる解析の詳細は別報によった²⁾。本報ではそのうち二つの結果を用いた。一つは拡散係数値の時間依存性のマスターカーブである。もう一つはobstruction modelにおける開孔比 g と、解析解としてもとめた拡散時間が十分長いところにおけるinfiniteな拡散係数値(定常値)との関係である。マスターカーブにfittingさせた結果obstacleのcellサイズは25.6 μm , freeな拡散係数値は $2.0 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$, infiniteな拡散係数値は $4.3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$ となった。

infiniteな拡散係数値はfreeな拡散係数値の約0.22になった。この結果よりobstruction modelにおける開孔比は $g=0.21$ となった。

Water diffusion in small beads suspension

粒径16 μm のガラスビーズを充填した試験管内の水について同様の実験を試みた粒径80 μm の場合と明らかに異なる結果を示した。拡散時間は19msから209msまで変化させたが、拡散時間の変化に対するエコーシグナルの減衰は、ほぼ一つの曲線を示した。この結果を粒径80 μm の場合と同様に2成分系obstruction modelで解釈してみると粒径16 μm のビーズを用いた場合はバルクな水のtransientなobstruction effectはほとんど観測されなかったことになる。すなわち本実験の拡散時間内でバルクの水の拡散に対するビーズによるobstruction effectが定常状態に達していると考えられる。ビーズと相互作用するB層の厚みは粒径によらず一定と考えられるのでA層の水の拡散係数値は粒径80 μm のビーズを用いた場合と等しい。一方粒径が小さい方が大きい方に比べ粒子表面積が大きくなるのでA層の水のpopulation(体積分率)が大きくなると考えられる。以上の仮定を踏まえてシュミレーションを行った結果、得られたパラメータは $D_A=1.2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$, $D_B=1.1 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$, $p_a=0.40$ であった。

*) R. Kimmich et al. Appl. Magn. Reson. 4, 425-440(1993).

2) Y. Gomi, T. Mihori, I. Terashima and H. Watanabe, *Engineering & Food at ICEF7*(R. Jowitt, ed), A53(1997).

Relativistic Effects on Nuclear Magnetic Shieldings.

Kitami Institute of Technology

○T. Baba, H.Fukui

A Schrödinger-Pauli type two-component perturbation theory has been presented for the relativistic effect calculation of nuclear magnetic shieldings. The expression for the relativistic nuclear magnetic shieldings are derived from the use of Douglas-Kroll transformation of the no-pair equation for a molecule which bears a nuclear magnetic dipolar moment, and which is placed in an external magnetic field. The exact form of the relativistic kinetic energy is included in the eigenvalue equation which is solved variationally. We calculated the relativistic mass correction effect on the nuclear magnetic shieldings in the four hydrogen halide molecules, HF, HCl, HBr, and HI, at the coupled Hartree-Fock (CHF) level. It was shown that the mass correction effect increases the nuclear magnetic shieldings of the halogen nuclei. The increments in the shielding are proportional to about third power of the atomic numbers. This increase in the shielding means that the mass correction effect tends to concentrate the electrons in a molecule to the vicinity of the heavy nuclei.

The results for our relativistic and nonrelativistic calculations for the magnetic shielding constants are presented in Table I and Figure 1.

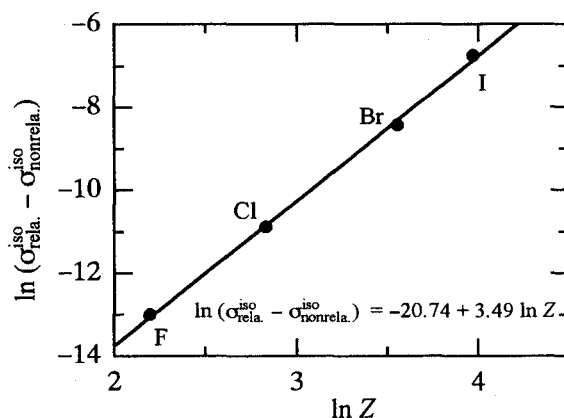


Figure 1. Linear plotting of $\ln(\sigma_{rela}^{iso} - \sigma_{nonrela}^{iso})$ vs. $\ln Z$ for the isotropic shielding constants of the halogen nuclei in hydrogen halides. Z is the atomic number of the halogen atom. Gauge origins are placed at the halogen nuclei.

Keyword: Relativistic effect, Chemical Shift, Coupled Hartree-Fock

○ばば たけひさ, ふくい ひろゆき

TABLE I. Relativistic and nonrelativistic nuclear magnetic shieldings (in ppm) in hydrogen halides.

Molecule	Basis set	Gauge Origin		Nonrela.	Rela.	Rela. - Nonrela.
HF	(13s8p3d/7s2p)	F	σ_{\perp}^d	482.4	485.9	3.5
			σ_{\perp}^p	-106.5	-108.4	-1.9
			σ_{\perp}	375.9	377.5	1.6
			σ_{\parallel}	481.9	485.5	3.5
			σ_{iso}	411.3	413.5	2.3
		H	σ_{\perp}^d	467.1	470.6	3.5
			σ_{\perp}^p	-77.7	-79.4	-1.7
			σ_{\perp}	389.4	391.2	1.8
			σ_{\parallel}	481.9	485.5	3.5
			σ_{iso}	420.3	422.6	2.4
HCl	(15s12p6d/7s2p)	Cl	σ_{\perp}^d	1151.4	1179.5	28.1
			σ_{\perp}^p	-307.5	-321.4	-14.0
			σ_{\perp}	843.9	858.0	14.1
			σ_{\parallel}	1149.1	1177.2	28.1
			σ_{iso}	945.6	964.4	18.8
		H	σ_{\perp}^d	1140.4	1168.5	28.2
			σ_{\perp}^p	-279.2	-292.2	-12.9
			σ_{\perp}	861.1	876.4	15.2
			σ_{\parallel}	1149.1	1177.2	28.1
			σ_{iso}	957.1	976.6	19.5
HBr	(17s13p8d4f/7s2p)	Br	σ_{\perp}^d	3129.2	3465.2	336.0
			σ_{\perp}^p	-765.8	-943.7	-178.0
			σ_{\perp}	2363.5	2521.5	158.0
			σ_{\parallel}	3126.2	3462.3	336.1
			σ_{iso}	2617.7	2835.1	217.4
		H	σ_{\perp}^d	3119.3	3456.0	336.7
			σ_{\perp}^p	-687.2	-864.7	-177.5
			σ_{\perp}	2432.2	2591.4	159.2
			σ_{\parallel}	3126.2	3462.3	336.1
			σ_{iso}	2663.5	2881.7	218.2
HI	(19s15p10d6f/7s2p)	I	σ_{\perp}^d	5508.0	7478.0	1969.9
			σ_{\perp}^p	-1469.5	-2674.2	-1204.7
			σ_{\perp}	4038.5	4803.8	765.3
			σ_{\parallel}	5504.6	7474.9	1970.3
			σ_{iso}	4527.2	5694.1	1166.9
		H	σ_{\perp}^d	5499.3	7471.8	1972.4
			σ_{\perp}^p	-1438.7	-2613.0	-1174.3
			σ_{\perp}	4060.6	4858.8	798.1
			σ_{\parallel}	5504.6	7474.9	1970.3
			σ_{iso}	4542.0	5730.8	1188.8

2次元NMRによるDNA - C-1027 クロモフォア複合体 の構造解析

(京大化研) ○奥野恭史、杉浦幸雄

(サントリー生有研) 岩下 孝

(大鵬薬品製薬セ) 大谷敏夫

Interaction of C-1027 Chromophore with d(TGCCATC)/d(GATGGCA): A Binding Model Based on NMR Experiments

Yasushi Okuno,† Takashi Iwashita,* Toshio Otani,§ and Yukio Sugiura*†

†Institute for Chemical Research, Kyoto University

*Suntory Institute for Bioorganic Research

§Tokushima Research Center, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

C-1027, a new macromolecular antitumor antibiotic, is believed to exert its biological actions through the induction of cellular DNA cleavage. The identified C-1027 chromophore comprises 9-membered enediyne, benzoxazolate, macrocyclic 16-membered ring, and aminosugar moieties. The chromophore of C-1027 also induces sequence-specific double-strand DNA cleavage. Here, interaction between its cycloaromatized analog (Chr) and DNA oligomer d(T1G2C3C4A5T6C7)/d(G8A9T10G11G12C13A14) has been determined by 2D-NMR experiments. The NMR evidences clearly indicate intercalative and minor-groove bindings of benzoxazolate and aminosugar moieties, respectively. The intermolecular NOE cross peaks also predict that Chr-H6 is closely situated in A5-H5'. The above-mentioned study presents the structural insight into the basis of C-1027 chromophore binding to DNA oligomer.

(序) C-1027は放線菌 *Streptomyces globisporus* C-1027の培養濾液より単離された薬物で、グラム陽性菌に対して抗菌活性があり、癌細胞に対して強力な細胞毒性がみられる抗腫瘍性抗生物質である。その構造は、分子量約1万のアポタンパクとクロモフォアと呼ばれるエンジン型低分子化合物から構成され、このクロモフォアによるDNA切断が抗腫瘍作用に大きな役割をはたしていることが知られている。

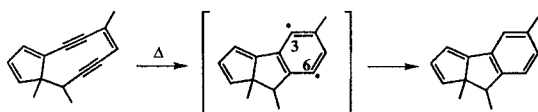
C-1027クロモフォアの作用機構は、他のエンジン系抗生物質同様、エンジン環のバーグマン反応により発生した1,4-デヒドロベンゼンピラジカルが、DNAの水素を引き抜き切断するというものである(Fig.1)。ここで特筆すべき点は、ネオカルチノスタチンなどの従来のエンジン系化合物のDNA切断には還元剤が必要であるのに対し、C-1027では還元剤非存在下においてもDNA切断が起こることである。

(キーワード) C-1027、エンジン、DNA、2次元NMR、分子認識

おくのやすし、すぎうらゆきお、いわしたたかし、おおたとしお

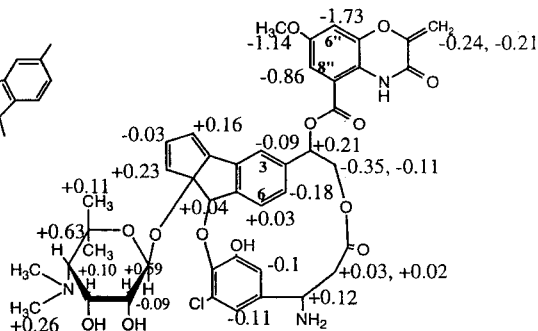
そこで今回演者らは、2次元NMR法に基づいて、C-1027クロモフォアとDNAとの相互作用を解析し、クロモフォアによるDNA切断の分子レベルでの解明を行った。

(実験) NMR実験は、Bruker DMX-750および、JEOL Lambda-600を用いて測定した。測定試料として、C-1027クロモフォアは還元剤非存在下でもバグマン反応が進み不安定であるので、芳香環化されたクロモフォア(Fig.2)を使用し、DNAオリゴマーには d(TGCCATC)/d(GATGGCA) を用いた(Fig.3)。1 : 1 DNA - クロモフォア複合体の形成は、1次元定量測定を行うことにより、DNA-イミノプロトンの化学シフト変化から確認し、この複合体試料、1.5mM溶液 (H₂O及びD₂O、pH7.0)を、288 - 298Kで測定した。2次元測定には、¹H-NOESY、DQF-COSY、およびTOCSYを用い、得られた種々の2次元チャートからDNA-クロモフォア複合体の¹H-スペクトル帰属を行った。そしてNOESYスペクトルのDNA-クロモフォア分子間NOEsピークから、2分子間の相互作用を解析した。



(Fig.1) Activation Mechanism of C-1027 Chromophore

5' - T₁ G₂ C₃ C₄ A₅ T₆ C₇ - 3'
 3' - A₁₄C₁₃G₁₂G₁₁T₁₀A₉ G₈ - 5'
 (Fig. 3) DNA Oligomer



(Fig.2) Structure and Chemical Shift Changes ($\delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$) of C-1027 Chromophore

(結果及び考察) C-1027クロモフォアのベンゾキサジン環部分のH8", H6" およびOMeと、G12のH1', 2", 3', およびG11のH1', 2"との間の分子間NOEピークがみられたこと、さらに、G11, G12のイミノプロトンやクロモフォアのベンゾキサジン環部分の¹Hが複合体形成により、高磁場シフトしたこと(Fig. 3) から、C-1027クロモフォアのベンゾキサジン環部分はDNAの(C3 · G12)-(C4 · G11)間でインターカレートしていることが明らかとなった。また、アミノ糖部分はDNA糖鎖の1', 2", 4'の¹HとのNOEsが見られたため、マイナーグループ側からDNAに結合していることが明らかになった。さらに、C-1027クロモフォアの6位の¹HとDNAの¹HとのNOEsピークの存在によって、クロモフォア-6位のラジカルはDNAのA5-5'位から、水素を引き抜いていることが示唆され、これはゲル電気泳動法を用いたDNA切断実験の結果と一致した。一方、クロモフォア-3位の¹HとDNAとの分子間NOEsは観測されなかったが、これについては、モデリングの際に予測する予定である。

現在は、DNA - クロモフォア複合体の分子内NOEsや分子間NOEsのピーク強度から距離情報を得て、それに基づく、立体構造の計算に着手している。

(参考) Y.Okuno, T.Iwashita, T.Otani and Y.Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 4729.

Structural Peculiarity of Compounds With Intramolecular Hydrogen Bonding

(阪大・薬) O Alexander Vashchenko, (阪大・遺伝情報) 高木達也,
(阪大・医) Andrei Afonin, 藤原英明

Structural Peculiarity of Compounds With Intramolecular Hydrogen Bonding

O Alexander Vashchenko,¹ Tatsuya Takagi,² Andrei Afonin,³ and
Hideaki Fujiwara³

Faculty of Pharmaceutical Sciences,¹ Genome Information Research Center,² Faculty of
Medicine,³ Osaka University, Yamadaoka, Suita 565.

Abstract: An *ab initio* DFT calculation of 2-vinyloxy- and 2-vinylthiopyridine is presented. The calculation of NMR shielding tensors was carried out by Gauge Independent Atomic Orbital (GIAO) method. Some theoretical evidence of intramolecular hydrogen bonding in these compounds is discussed.

1. Introduction.

Modern multipulse NMR spectroscopy has proven to be a powerful technique for solution of many types of problems in chemistry and biochemistry. However, the problem of correct signal assignment as well as the understanding of the relationship between the chemical shift and molecular structure can be quite difficult. *Ab initio* calculations are now becoming affordable and accurate enough to be useful in the solution of many problems. To obtain insight into all kinds of molecular properties for which experimental data are not amenable the methods of quantum chemistry is most suitable. A comparison of the experimental and theoretical data can be very useful in making correct assignments and understanding the basic chemical shift - structure relationships.

Calculations of magnetic shielding tensors have been performed by different methods and at various theoretical levels. Semiempirical methods¹ provide a correct qualitative understanding but are not accurate quantitatively. Almost all *ab initio* results are at the SCF level, and are based on the coupled Hartree-Fock perturbation theory.² A common difficulty in the calculation of magnetic properties is that the usual wave functions do not guarantee gauge invariance,³ i.e. the results may depend on position of the atoms in the Cartesian frame. Ditchfield was the first who implemented gauge invariant atomic orbital (GIAO) method for magnetic shielding calculation.⁴ Following Ditchfield's work, the GIAO method has been also implemented by Ribas Prado et al.⁵ and by Fukui et al.⁶ Friedrich et al.⁷ were the first to combine the GIAO method with density functional theory (DFT). We chose the GIAO method since it is known to yield very accurate results.⁸

2. Results and Discussion.

It has been established by spectral and crystallographic data that polar C-H groups can

Keywords: *ab initio* calculation, density functional theory, hydrogen bonds, chemical shift calculation

Oアレキサンダー ヴァシェンコ、たかぎ たつや、アンドレイ エイホニン、ふじわら ひであき

form the weak hydrogen bonds with heteroatom. The nonbonded interaction of this type between different parts of the same molecule is ordinary cited as intramolecular hydrogen bonding interaction. There were investigated some of pyridine molecules with anomalous chemical shift of H_X proton. Possible explanation of this phenomena is presented.

There are three possible conformations of the 2-vinyloxy- (2-VOP) and 2-vinylthio pyridine (2-VTP) as shown in Figure 1. The A and B forms of these molecules are planar. Structure C is non-planar. The angle ϕ takes values 23° and 18° , and ϕ takes 25° and 36° in 2-VOP and 2-VTP, respectively. In planar conformations short distance between nitrogen atom and hydrogen atom of vinyl group is observed. In A form the distance $N \dots H_X$ is 2.29\AA (2-VOP) and 2.31\AA (2-VTP) and $N \dots H_B$ distance in form B is 2.32\AA (2-VOP) and 2.31\AA (2-VTP). In all these cases the distance between nitrogen and hydrogen atoms is smaller than the sum of their van der Waals radii ($\approx 2.5\text{\AA}$). Also the low field chemical shift is observed for H_X proton in conformer A when calculations are compared between the three conformers A, B, and C. This is also the case for H_B proton in conformer B when calculations are compared between three conformers. Therefore, that the short distances calculated between N and H atoms are indicative of the presence of intramolecular hydrogen bonding. The calculation of this nitrogen chemical shift is also very characteristic of the hydrogen bonding. That is, the calculated shift changes from low field to high field in the order of $C < B < A$ in Tables 2 and 3. Also the amount of change is smaller for 2-VTP than that for 2-VOP. All these tendencies are interpreted to show that nitrogen chemical shift changes to high field when it is engaged in stronger hydrogen bonding. This high field change was observed experimentally in our previous report.⁹

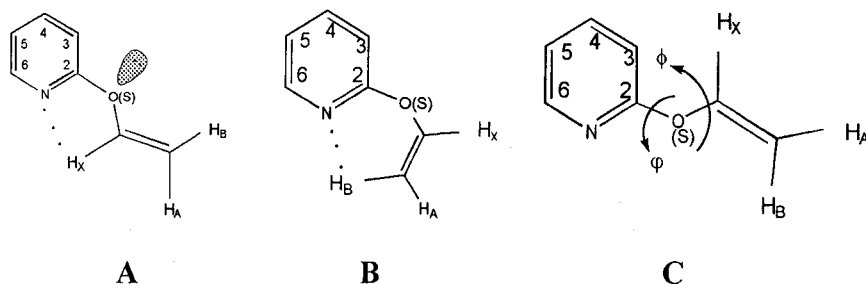


Figure 1. Three possible conformations of 2-vinyloxy- and 2-vinylthiopyridines.

The experimental NMR data of 2-vinyloxy- and 2-vinylthiopyridine are presented in Table 1 together with those of their 3-substituent analogues. The chemical shift of H_X proton in

Table 1. The ^1H and ^{13}C NMR Parameters of Pyridines Obtained from Experiment

Compounds	δ / ppm					J / Hz		
	H_A	H_B	H_X	C_α	C_β	$^1J_{C\beta H_A}$	$^1J_{C\beta H_B}$	$^1J_{C\alpha H_X}$
2-VOP	4.49	4.87	7.55	144.17	95.21	162.1	157.9	188.3
3-VOP	4.51	4.81	6.62	147.48	96.72	162.5	158.5	184.1
2-VTP	5.49	5.56	7.11	128.17	116.33	162.3	159.1	178.7
3-VTP	5.43	5.37	6.50	130.42	117.07	162.2	159.6	174.9

2-VOP and 2-VTP is shifted to lower field compared to the corresponding 3-substituted pyridines. The indirect coupling constant $^1J_{C\alpha H X}$ in these compounds is increased considerably, compared to that in the 3-analogue.

To look deeper into the nature of these anomaly from the theoretical view point we provided investigation of quantum chemical characteristics of these compounds. An *ab initio* calculation were carried out by GAUSSIAN 94 in D95++(D,P) basis set at B3LYP level of density functional theory (DFT). The calculation of magnetic shielding tensors (MST) was performed by GIAO method. In the Tables 2 and 3 the quantum chemical characteristics of 2-VOP and 2-VTP, respectively, are presented.

Table 2. Charge distributions and GIAO Magnetic Shielding Tensors in 2-VOP.

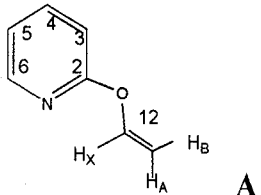
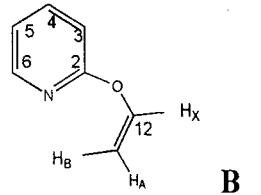
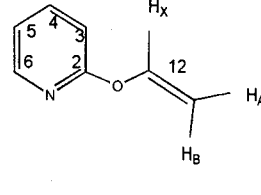
 A			 B			 C		
	Charge	MST/ppm	Charge	MST/ppm	Charge	MST/ppm		
N	-0.196513	-25.9458	-0.177092	-38.0022	-0.192752	-50.5568		
C ₂	-0.291796	22.4828	-0.247670	19.3162	-0.043446	19.9580		
C ₃	0.612949	75.2430	0.500694	73.3967	-0.293805	80.0438		
C ₄	-0.424618	49.3446	-0.506834	50.5678	0.159297	49.3536		
C ₅	0.010803	70.5542	0.058705	70.6628	-0.355308	69.9094		
C ₆	-0.286212	38.6000	-0.290648	38.5881	-0.028975	35.9520		
O	-0.276260	131.2765	-0.228737	136.0866	-0.162784	120.3567		
C ₁₂	0.002177	42.1650	-0.030960	40.2745	-0.079965	39.3044		
C ₁₃	-0.511270	94.3620	-0.422230	87.3652	-0.298886	90.7679		
H _X	0.240272	22.7020	0.176192	24.7604	0.174915	24.7571		
H _B	0.181409	26.5278	0.237050	24.7128	0.196842	26.2600		
H _A	0.166965	27.0540	0.170891	26.7661	0.165283	26.8970		

Table 3. Charge distributions and GIAO Magnetic Shielding Tensors in 2-VTP.

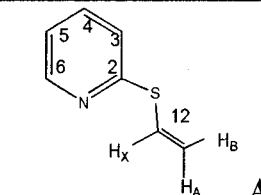
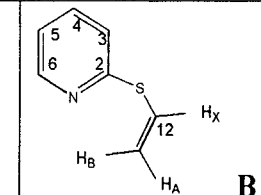
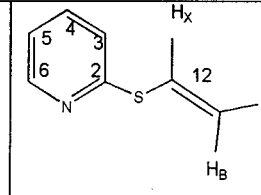





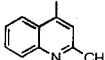

 A			 B			 C		
	Charge	MST/ppm	Charge	MST/ppm	Charge	MST/ppm		
N	0.023533	-57.0607	-0.012187	-65.1778	0.019395	-73.5413		
C ₂	-0.059621	21.8927	0.145502	16.3006	0.122435	16.5687		
C ₃	0.006347	65.9743	-0.436959	65.5428	-0.451540	68.4456		
C ₄	-0.291315	52.7675	-0.088334	54.0215	-0.124957	52.5621		
C ₅	0.066273	69.5322	-0.108154	69.4906	-0.183963	69.5256		
C ₆	-0.171469	35.9862	-0.001957	38.3876	-0.008035	36.1650		

Table 3 (continued). Charge distributions and GIAO Magnetic Shielding Tensors in 2-VTP.

	Charge	MST/ppm	Charge	MST/ppm	Charge	MST/ppm
S	-0.481145	378.9448	-0.534361	391.8559	-0.299137	367.1601
C ₁₂	0.081627	51.9992	0.046179	56.3385	0.010095	50.2380
C ₁₃	-0.595396	79.4191	-0.354897	71.2620	-0.452603	68.8086
H _X	0.306128	23.1003	0.192839	25.2034	0.233540	24.6710
H _B	0.185781	26.0073	0.228676	23.7428	0.219587	25.5717
H _A	0.184052	26.0925	0.171290	25.7803	0.176199	25.8919

In both cases of 2-VOP (Table 2) and 2-VTP (Table 3) nitrogen atom chemical shift of A moved to the high field and H_X proton chemical shift to the low field when compared with those of B and C. In NMR experiments H_X proton of 2-VOP is observed at the lower field compared to that of 2-VTP. The calculation of shielding tensors gave the result agreeable to this observation. The interaction between atoms has attractive character, which predominate over the repulsive forces which occurs owing to nucleus-nucleus interaction. Attractive nature of the intramolecular hydrogen bonding stabilizes planar conformation of the 2-pyridines. The lower field shift of H_X proton in 2-VOP compared to 2-VTP is possibly explained by redistribution of the charges in the ring. In 2-VTP nucleus-nucleus interaction has repulsive character because of the positive charges on atoms N and H_X (0.0235 and 0.3061, respectively) whereas in 2-VOP it is attractive (-0.1965 and 0.2403).

Table 4. NMR ¹⁵N Chemical shifts⁹ of R-O-CH=CH₂

δN/ppm	267.7	251.1	312.2	304.1	247.0	291.9	237.7
R							

Experimental NMR data of ¹⁵N chemical shift are in a good agreement with calculated one. In all compounds (Table 4) where vinyloxy group is close to the nitrogen atom and hydrogen bonding is realized the high field shift of nitrogen atom is observed. The calculation by GIAO method gave increasing magnetic shielding tensor of 2-VOP and 2-VTP (Tables 2 and 3), i.e. the chemical shift of nitrogen atom shifts to the high field in A form compared to B and C form, suggesting a decreasing of strength of the hydrogen bonding in this order.

References:

- ¹ Fukui H., *Magn.Reson.Rev.*, 11, 205 (1987).
- ² Stevens R.M., Pitzer R.M., and Lipscomb W.N., *J.Chem.Phys.*, 38, 550 (1963).
- ³ Hameka H.F., *Advanced Quantum Chemistry*, Addison-Wesley: New York, 1963, p.162.
- ⁴ Ditchfield R., *Mol.Phys.*, 27, 789 (1974).
- ⁵ Ribas Prado F., Giessner-Prettre C., Daudey J.-P., Pullman A., Young F., Hinton J., and Harpool D.J., *J.Magn.Reson.*, 37, 431 (1980).
- ⁶ Fukui H., Miura K., and Nosaka T., *J.Chem.Phys.*, 82, 1410 (1985).
- ⁷ Friedrich K., Seifert G., and Grossmann G.Z., *Z.Phys.D.*, 17, 45 (1990).
- ⁸ Wolinski K., Hinton J.F., and Pulay P., *J.Am.Chem.Soc.*, 112, 8251 (1990).
- ⁹ Afonin A.V., Vashchenko A.V., and Fujiwara H., *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, 69, 933 (1996).

NMR分光法によるアルカリ金属臭化物水溶液中における水分子の
 スピン-格子緩和速度におよぼす濃度・温度効果
 (立命館大理工¹・創価大工²) ○文野 浩一¹、清水 昭夫²、谷口 吉弘¹

Concentration and Temperature Effects on the Spin-Lattice Relaxation Rates of D₂O Molecule in Alkali Bromide Aqueous Solutions Studied by NMR Spectroscopy

¹Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga 525-77

²Faculty of Engineering, Soka University, Hachioji, Tokyo 192

Koichi, Fumino¹; Akio Shimizu²; Yoshihiro Taniguchi¹

The spin-lattice relaxation times (T_1) of D and ¹⁷O nuclei of heavy water (D₂O) molecules for Li⁺, Na⁺, K⁺ and Cs⁺ in alkali bromide dilute aqueous solutions were measured in the range of 5-50°C by means of NMR. The spin-lattice relaxation rates ($R_1=1/T_1$) varied linearly with the concentration up to 1 molkg⁻¹ at a given temperature.

The D and ¹⁷O rotational correlation times of coordinated D₂O molecules for these cations were determined. The ratio of rotational correlation times was practically independent of temperature, and the rotational anisotropies of the coordinated D₂O molecules were almost temperature-independent.

1. はじめに 最近のNMR分光法の発展によって、溶液中のイオンまたは水分子の回転運動に関して 1molkg⁻¹ 以下の低濃度領域において精度のよい測定が可能になり、この濃度領域における研究は、一連のアニオンおよび水分子について行われている。我々は25°Cにおいてアルカリ金属臭化物水溶液中における水分子のD核と¹⁷O核のスピン-格子緩和速度 (R_1) を測定し、アルカリ金属イオンに配位される水分子の回転運動に異方性が生じることを見いだした¹⁾。水の構造は温度によって顕著に変化するので、この水分子の回転運動の温度依存性を研究することによって、電解質水溶液の構造とイオン-水間相互作用による水和に関する知見が得られ、水和の動的構造が解明されるものと思われる。本研究においては、アルカリ金属臭化物水溶液中における水分子のD核と¹⁷O核の R_1 を5~50°Cの温度範囲で測定し、アルカリ金属イオンに配位した水分子の動的挙動について考察する。

2. 実験方法 測定は JEOL JNM-GX 270 FT-NMR (基準磁場: 6.34 T、基準振動数 D: 41.5 MHz、¹⁷O: 36.6 MHz) を用いて行われた。スピン-格子緩和時間 (T_1) は Inversion-Recovery (180°- τ -90°) 法によって測定した。測定温度はエアコンプレッサーおよび液体窒素によって、5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 (± 0.1) °Cに保たれた。 T_1 の測定精度は $\pm 1\%$ であった。測定振動数は、D: 2701.2 Hz、¹⁷O: 30120.5 MHzであった。またDおよび¹⁷O核の測定においては optical-lock 方式を用いた。

3. 結果および考察 Fig. 1 に臭化リチウム水溶液中におけるD₂O分子の¹⁷O核の R_1/R_1° (R_1° は純水における R_1) と溶液濃度 m との関係を示す。 R_1/R_1° は m と直線関係にあり、

NMR分光法, アルカリ金属臭化物水溶液, スピン-格子緩和速度, 回転相関時間

ふみのこういち, しみずあきお, たにぐちよしひろ

(1)式によって与えられる。(この傾向はD核についてもまた他のアルカリ金属臭化物水溶液の場合も同様であった。)

$$R_1/R_1^0 = 1 + B_x \cdot m \quad (x: D, ^{17}O) \quad (1)$$

B_x の値は個々のイオンからの寄与に分けることができるので、(2)式が成立する。

$$B_x = B_{x^+} + B_{x^-} \quad (2)$$

(2)式で得られた B_{x^+} から、 $|B_{D^+}| > |B_{O^+}|$ であるので、 Li^+ および Na^+ の構造形成効果および K^+ および Cs^+ の構造破壊効果は、D核の回転運動に一層反映されるものと思われる。

また、 R_1 の値は(3)式として表される。

$$R_1 = (1 - x^+ - x^-) R_1^0 + x^+ R_{1^+} + x^- R_{1^-} \quad (3)$$

ここで、 R_{1^+} および R_{1^-} はカチオンおよびアニオンに配位した水分子の R_1 、 $x^+ = n^+ \cdot m / 50.0$ 、 n^+ はイオンの配位数である。(3)式および $B_{x^+}(K^+) = B_{x^-}(Cl^-)$ により、(4)式が得られる。

$$B_{x^+} = \left\{ \frac{(R_1^+)_x}{(R_1^0)_x} - 1 \right\} \cdot \frac{n^+}{50.0} \quad (4)$$

D核および ^{17}O 核は四極子相互作用によって緩和されるので、極度尖鋭化条件下では(5)式が成立する。

$$R_1 = \frac{3}{40} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \cdot \left(\frac{e q Q}{h} \right)^2 \cdot \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \tau \quad (5)$$

(5)式から得られたアルカリ金属イオンに配位した D_2O 分子の ^{17}O 核の回転相関時間 τ と温度との関係を Fig. 2 に示す。これによると、一般に各温度において以下の関係が認められた。

$$Li^+ > Na^+ > D_2O > K^+ > Cs^+$$

この傾向はD核についても同様であった。

さらに、D核と ^{17}O 核の回転相関時間の比の値は各温度においてほとんど一定で、アルカリ金属イオンに依存しており、以下の関係が認められた。

$$Li^+ > Na^+ > D_2O > K^+ > Cs^+$$

参考文献

- 1) A. Shimizu and Y. Taniguchi, Bull. Chem. Soc. Jpn., **63**, 1572 (1990).

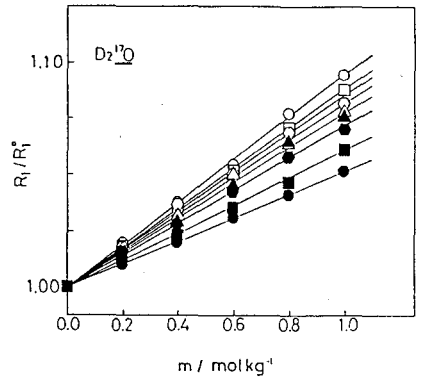


Fig. 1 Plots of the relative ^{17}O relaxation rates R_1/R_1^0 of a D_2O molecule in $LiBr$ solutions.

○: 50°C, □: 40°C, ○: 30°C, △: 25°C,
▲: 20°C, ●: 15°C, ■: 10°C, ●: 5°C

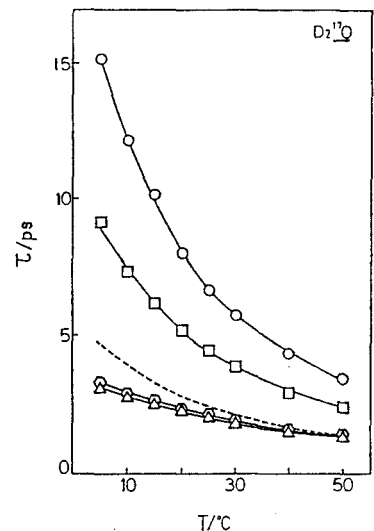


Fig. 2 Temperature dependences of the $\tau(^{17}O)$ values of the coordinated D_2O molecules at infinite dilution and pure D_2O .

○: Li^+ , □: Na^+ , ○: K^+ , △: Cs^+ , ---: pure D_2O .

ナトリウムチャンネルブロッカージブカインとナトリウム
チャンネルの不活性化ゲートペプチドとの相互作用
(京大 薬) ○黒田義弘、石川順也、田中陽子、田中一二三、
大高 章、藤井信孝、中川照眞

Interactions between Na⁺-channel blocker dibucaine and Na⁺-channel
inactivation gate peptides as studied by ¹H-NMR spectroscopy
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, 606-01
○Yoshihiro Kuroda, Junya Ishikawa, Yoko Tanaka, Kazufumi Tanaka,
Akira Otaka, Nobutaka Fujii, Terumichi Nakagawa

Three hydrophobic amino acid residues (isoleucine-phenylalanine-methionine, IFM) in the intracellular linker between domains III and IV of the Na⁺-channel α -subunit are known to work as inactivation particles for occluding the intracellular mouth of the channel pore in the fast inactivation process. The Na⁺-channel blocker dibucaine prolongs the inactivated state and thus is expected, more or less, to interact with the intracellular linker. Presently, we have synthesized the fragment peptide which includes the IFM residues (GGQDIFMTEEQK) and some related peptides which are mutated at the acidic amino acid residues (D, E) into the corresponding neutral amino acid residues (N, Q) and investigated the interactions with dibucaine in sonicated phosphatidylserine (PS) liposome solutions by ¹H-NMR spectroscopy.

【緒言】

Na⁺チャンネル α サブユニットのドメイン III のセグメント 6(III S6) とドメイン IV のセグメント 1(IV S1) を結ぶリンカー部分 (III-IV linker) は、不活性化ゲートとして機能することが知られている。III-IV linker 中の三つの疎水性アミノ酸 IFM (Ile, Phe, Met) は、疎水性相互作用により Na⁺チャンネルのイオン透過孔を塞いで Na⁺イオンの細胞内への流入を抑制し、特に Phe がその重要な役割を担う。本研究では IFM を含むペプチド MP-1A (Fig. 1, rat brain IIA, Gly1484-Lys1495) を合成し、疎水性環境を模倣する系として TFE 中での二次構造および Na⁺チャンネルブロッカージブカイン (Fig. 2) との相互作用を ¹H-NMR を用いて検討した。また、Phe-1489 を Gln に置換したペプチド MP-2A (F1489Q) および、約 50 残基からなる III-IV linker の中で IFM の前後にしか酸性アミノ酸が存在しないことに着目し、置換ペプチド MP-1QEA (E1492Q), MP-1EQA (E1493Q), MP-1QQA (E1492Q)

ナトリウムチャンネル、不活性化ゲート、ジブカイン、静電相互作用、NMR

○くろだよしひろ、いしかわじゅんや、たなかようこ、たなかかずふみ、
おおたかあきら、ふじいのぶたか、なかがわてるみち

-1493QQ), MP-1NA(D1487N), MP-1NQQA(D1487N, EE1492-1493QQ)を合成して (Fig. 1) リン酸緩衝液中およびPSリポソーム溶液中におけるジブカインとの相互作用を $^1\text{H-NMR}$ を用いて検討した。

【実験】

(1) III-IV linker 中の IFM を含む各種のペプチド (Fig. 1) は F-moc 固相法にて合成し、ODS カラム逆相 HPLC にて精製し、大気圧イオン化法マスペクトルにて分子量の確認を行った。

(2) TFE($\text{CF}_3\text{-CD}_2\text{-OH}$)に 3mM の MP-1A および 15mM のジブカインを溶解させ、1次元、2次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定を Bruker AM-600 にて行った。

(3) 310mOsm リン酸緩衝液(pH=7.0, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}=9/1$)あるいは重水中で超音波処理した 15mM PS(Phosphatidylserine) リポソーム溶液に 3mM ジブカインおよびペプチド 3mM を溶解させ、1次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定を Bruker AM-600 にて行った。

Fig. 1) Amino acid sequences of the synthesized peptides

MP-1A

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-NH₂

MP-2A

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-NH₂

MP-1QEA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Gln-Glu-Gln-Lys-NH₂

MP-1EQA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Glu-Gln-Gln-Lys-NH₂

MP-1QQA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Gln-Gln-Gln-Lys-NH₂

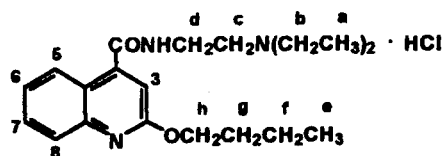
MP-1NA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asn-Ile-Phe-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-NH₂

MP-1NQQA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asn-Ile-Phe-Met-Thr-Gln-Gln-Gln-Lys-NH₂

Fig. 2) Chemical structure of dibucaine



【結果と考察】

TFE 中での MP-1A の 2次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの解析より、疎水性環境下での MP-1A はジブカインの有無に関わらず大部分が α ヘリックス構造をとることが分かった。CD スペクトルからもこれを支持する結果を得た。さらに、MP-1A 中に存在する 3つの酸性アミノ酸それぞれについて、側鎖末端のカルボキシル基に最も近い CH_2 プロトンの化学シフトのジブカイン添加による変化を見ると、Glu1492 の γ CH_2 が際だって高磁場シフトした (Fig. 3) ことから、この残基のカルボキシル基とジブカインの三級アミンが静電相互作用していると考えられる。

リン酸緩衝液において、MP-1A および MP-2A は共にジブカインのキノリン環のプロトンを高磁場シフトさせるが、MP-1A を添加した場合のキノリン環プロトンのシフトがより高磁場側に変化した。この結果は、MP-1A の Phe のベンゼン環とジブカインのキノリン環が π - π スタッキング相互作用をすることによる環電流効果の影響によるものと考えられる。PS リポソーム溶液中のジブカインにペプチドを加えた場合、ジブカインのキノリン環は MP-1A の場合は高磁場側に、MP-2A の場

合は低磁場側に変化した (Fig. 4)。シフト変化の度合いは、リン酸緩衝液中の場合に比べ 5~10 倍程度大きい。この結果はジブカインが PS 膜の極性基部分に結合することにより膜表面に近寄ったペプチドの Phe1489 との π - π スタッキング相互作用が増強していることを示している。MP-1EQA と MP-1QEA について同様のシフト変化を見ると、MP-1EQA は MP-1A の場合よりも 2 倍程度より大きくキノリン環プロトンを高磁場シフトさせ、MP-1QEA は MP-1A と同程度に高磁場シフトさせた。このことは、Glu1492 が Glu1493 よりもジブカインの三級アミンと相互作用しやすい事を示しており、先の TFE での結果を支持している。

【結論】

ジブカインは、Na⁺チャンネルの III-IV linker における Phe1489 と π - π スタッキング相互作用をし、三級アミン部分は Glu1492 の持つ負電荷と静電相互作用をして Na⁺チャンネルの不活性化状態を安定化させていると考えられる (Fig. 5)。

Fig. 3) Changes in chemical shifts of MP-1A as a result of the interaction with dibucaine

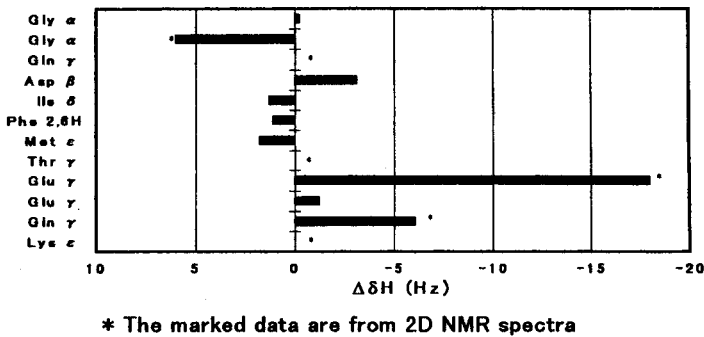


Fig. 4) Changes in chemical shifts of dibucaine as a result of the interaction with MP-1A and MP-2A

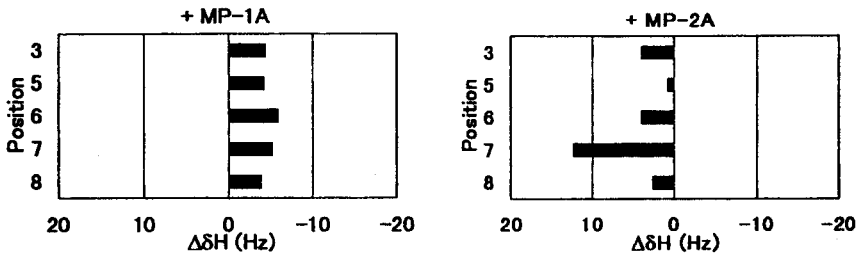
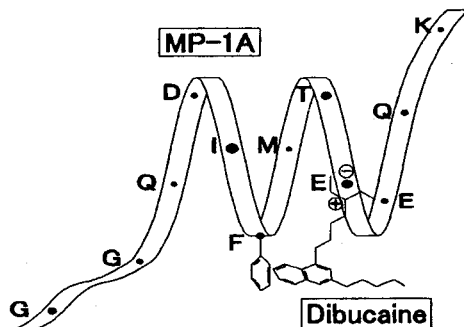


Fig. 5) Schematic representation of the interaction between MP-1A and dibucaine



ナトリウムチャンネル不活性化ゲートペプチドの溶液構造
および局所麻酔薬ジブカインとの相互作用

(京大薬) 黒田義弘、○松本 大、守田理恵、那須裕郷、
藤井信孝、中川照眞

Solution structures of the inactivation gate peptide of sodium channel
and interaction between the peptide and local anesthetic dibucaine

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Yoshihiro Kuroda, ○Masaru Matsumoto, Rie Morita, Hirosato Nasu,
Nobutaka Fujii and Terumichi Nakagawa

Sodium ion (Na^+) channels, which initiate the action potentials in electrically excitable cells, are the molecular targets of local anesthetic drugs. Inactivation of sodium channels terminates the sodium channel current responsible for initiation of action potentials. The local anesthetic drugs stabilize the inactivated state and block the inward sodium current.

Also, it has been reported that a hydrophobic sequence (Ile-Phe-Met), located in the inactivation gate segment connecting homologous domains III and IV of the sodium channel (III-IV linker), is required for fast inactivation. Taking this critical report into consideration, we synthesized peptides which correspond to the region of the III-IV linker of the channel. The purpose of this study is to explore the secondary structure of this region and the structural binding site of local anesthetic drugs.

【序論】

電氣的興奮性細胞において活動電位を引き起こす Na^+ チャンネルは、局所麻酔薬分子のターゲットとされている。現在のところ、不活性化状態にある Na^+ チャンネルに対して細胞の内側から局所麻酔薬が作用し Na^+ イオンの流入を抑制することにより、伝導を阻害すると考えられているが、その分子レベルでの作用機序については未だ明らかにされていない。

電位依存性 Na^+ チャンネルは、活動電位発生時、脱分極を引き起こし、その際の Na^+ イオンの流入は不活性化によって終了する。 Na^+ チャンネルの不活性化機

キーワード：ナトリウムチャンネル、不活性化ゲート、ジブカイン、
溶液構造、NMR

くろだよしひろ、○まつもとまさる、もりたりえ、なすひろさと、
ふじいのぶたか、なかがわたるみち

構に関して、 α サブユニットのドメインⅢとドメインⅣの間のリンカー部分（Ⅲ-Ⅳリンカー）が不活性化ゲートとして機能し、その中の疎水性アミノ酸 Ile-Phe-Met が Na^+ イオンの通過する孔をブロックすることにより、ゲートが閉じて不活性化が起こると報告されている（1992年）。また Tang らは、この不活性化状態において、ドメインⅣのセグメント4（S4）とセグメント5（S5）の間のリンカー部分が、不活性化ゲートであるⅢ-Ⅳリンカーのレセプターの一部となりうると報告した（1996年）。彼らは、この結合において、疎水性相互作用が重要な役割を果たしていると考えている。

これらの背景をもとに、我々はⅢ-Ⅳリンカー領域に対応するペプチドを Fmoc 固相法により合成し、その溶液構造について検討した。今回はその溶媒として、Phosphate buffer、Trifluoroethanol- d_2 、Sodium dodecyl sulfate- d_{25} solution を用いた。また、それぞれの溶液において、局所麻酔薬ジブカインとの相互作用についても検討した。

【方法】

・ Na^+ チャンネル不活性化ゲート領域の配列をもつ以下に示す2種類のペプチドを Fmoc 固相法で合成し、逆相 HPLC（ODSカラム）にて精製した。得られたペプチドを大気圧イオン化マススペクトルにより、分子量の確認を行った。

Fig.1) Amino acid sequences of the synthesized peptides

MP-3A : Ac-Lys-Lys-Lys-Phe-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-Lys-NH₂

MP-4A : Ac-Lys-Lys-Lys-Phe-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-Lys-NH₂

・ MP-3A、MP-4A を Phosphate buffer、Trifluoroethanol- d_2 Sodium dodecyl sulfate- d_{25} solution にそれぞれ 3 mM となるように溶解し、Bruker AM-600 にて 1D、COSY、NOESY、TOCSY を測定した。その後、Silicon Graphics Indigo において NIH NMRpipe で conversion および processing を行った。

・ MP-3A、MP-4A を Phosphate buffer、Trifluoroethanol- d_2 、Sodium dodecyl sulfate- d_{25} solution にそれぞれ 50 μM となるように溶解し、日本分光 J-720 円二色性分散計により CD スペクトルを測定した。

【結果・考察】

1. Phosphate buffer 中の溶液構造

測定温度 293 K、pH 4.5 にて行った。全体的に残基間 NOE があまり観測されず、運動性が高く不安定な構造をもつことが示唆された。また、CD スペクトルからもランダム構造を示す波形が得られた。

2. Trifluoroethanol-d₂ 中の溶液構造

測定温度 300 K にて行った。疎水性アミノ酸 Ile-Phe-Met を中心として、 $\alpha N(i, i+3)$ 、 $\alpha N(i, i+4)$ 、 $\alpha \beta(i, i+3)$ などの残基間NOEが観測され、 α -helix が形成されていることが示された。また、CDスペクトルもこれを支持する結果となった。

3. Sodium dodecyl sulfate-d₂₅ solution 中の溶液構造

測定温度 293 K、pH 4.5、SDSの濃度 200 mM として測定した。現在、2次元スペクトルを解析中であるが、多くの残基間NOEが観測されている。また、CDスペクトルは TFE中での波形に類似した α -helix を示す波形が得られている。

4. 各溶媒における局所麻酔薬ジブカインとの相互作用

上記の3種類の異なる溶液において、それぞれペプチドの有無によるジブカインの化学シフトの変化を調べた。いずれも化学シフトの変化は 10 Hz 未満となり、相互作用はあまり大きくないことが示唆された。

【参考文献】

- J.W.West *et al.* / Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.89 10910-10914 (1992)
L.Tang *et al.* / J.Gen.Physiol. Vol.108 89-104 (1996)
G.D.Henry *et al.* / Methods In Enzymology Vol.239 515-535 (1994)
Y.Kuroda *et al.* / Biophysical Journal Vol.71 1191-1207 (1996)

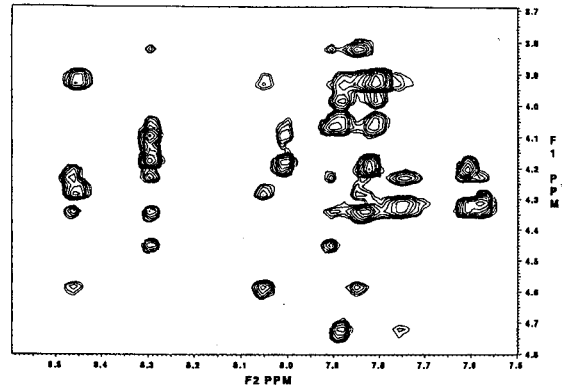


Fig.2) The fingerprint region of 600 ms mixing time NOESY spectrum of MP-3A in TFE-d₂ at 300 K recorded at 600 MHz

Design of Opioid Receptor Selective Agonist Based on MAS/NMAS and Multiconformational NMR Spectroscopy

Atsuomi Kimura, Kenji Takamoto, Seichi Tukishiro and Hideaki Fujiwara†

School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University, 1-7 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

The preferred conformation of a neuropeptide, kyotorphin(H-Tyr¹-Arg²-OH), has been studied by the MAS/NMAS liquid-crystal and the multiconformational NMR spectroscopy. The ¹H-¹H ROE factors and the corresponding interproton distances obtained by the ROESY/MAS experiment are elucidated by a weighted sum of multiconformation. Among 5 seed conformers obtained by Monte Carlo minimization-method, we could find that the 3 conformers are existing significantly in the liquid crystal. Especially, the conformer, which has the highest population, is similar to the bioactive conformation of the pharmacophore of enkephalin. Therefore, it is possible to relate the obtained conformation to the δ/μ receptor selectivity.

【序】 これまでに我々は、マジック角試料回転(MAS)法を利用したMAS/NMAS液晶二次元NMR法を開発し、一連のエンケファリンの液晶中における構造と配向を決定することによって構造-活性に関する検討を行ってきた。1) この手法はMAS条件下で得られるROEからの距離情報、およびNMAS条件下で得られる直接結合定数という配向情報を利用することにもとづくものである。このため、これまでは構造多形(Diversity)を考慮せず、分子の平均の構造および配向を決定していた。しかし、Molecular Diversityは医薬品設計においても重要な概念であるため、これを考察するために我々の開発した手法にNMRパラメーターを利用したMulticonformation解析²⁾を導入することとした。そこで本研究において、オピオイド受容体選択的鎮痛薬の設計を目的に、エンケファリンと同様に鎮痛作用を有するkyotorphin(H-Tyr¹-Arg²-OH)を対象溶質として、液晶中における構造のDiversityの解析を行った。

【実験】 溶媒はリオトロピック液晶であるCsPFO液晶(CsPFO:H₂O:D₂O=40:48:12)を用い、Kyotorphin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 VXR-200固体プローブを用いて行った。

(キーワード)MAS/NMAS液晶NMR、Kyotorphin、ROESY/MAS、
Multiconformation解析

○きむらあつおみ、たかもとけんじ、つきしろせいいち、ふじわらひであき

また、構造計算、Monte Carlo Simulation及びMulticonformation解析は全て自作のFortranプログラムにより行った。

【方法】 Multiconformation解析は、NMRパラメーターと力場計算の組み合わせによって行うことができる。3) 力場計算から得られる数個の局所安定構造をもとにMonte Carlo Simulationを行うことによって、様々な局所構造からNMRパラメーターの平均値(A_{calc})およびその標準偏差(D_{calc})を計算し、それらの計算値の加重平均値と実験値(A_{exp} 及び D_{exp})とが次の条件を満たすならば、各々のコンホーマーの重み(即ち、モル分率)を採択する。

$$\frac{\left| \sum_{i=1}^N w_i \langle A^{calc} \rangle_{ik} - \langle A^{exp} \rangle_k \right|}{\left(\sum_{i=1}^N (w_i D_{ik}^{calc})^2 + (D_{ik}^{exp})^2 \right)^{1/2}} < t_k \quad (1)$$

ここで、 i は各々のコンホーマーを指し、 k はNMRパラメーターのインデックスである。 t_k はstudentの t 値であり、本研究では $t_k=1.96$ とした。また、重み w_i は $\sum w_i=1$ 及び $w_i>0$ を常に満たす。

【結果と考察】

ROESY/MAS実験による距離情報の導出

液晶中に溶解したkyotorphinのROESY/MASスペクトルをFig. 1に、このスペクトルより得た'仮想'核間距離とその標準偏差をTable 1に示す。

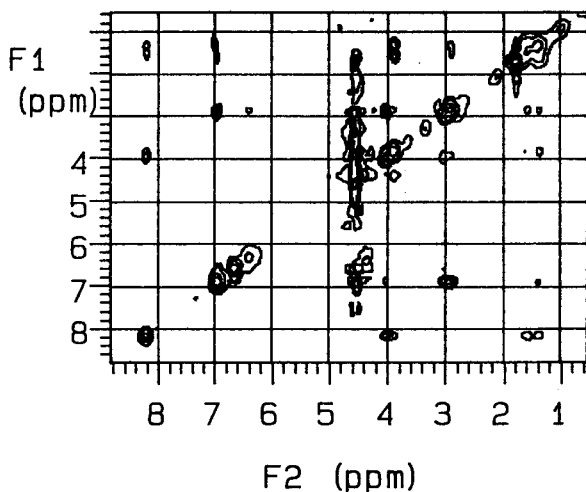


Table 1: NMR data of kyotorphin in the CsPFO liquid crystal

vector	interproton distance
Tyr ¹ αH - Tyr ¹ βH	2.34(0.67)
Tyr ¹ αH - Tyr ¹ ArH _{2,6}	3.24(0.44)
Tyr ¹ αH - Arg ² NH	2.83(0.77)
Tyr ¹ ArH _{3,5} - Arg ² εH	4.14(0.59)
Arg ² NH - Arg ² αH	2.23(0.57)
Arg ² NH - Arg ² βH	2.68(0.12)
Arg ² NH - Arg ² δH	2.85(0.75)
Arg ² αH - Arg ² βH	2.61(0.78)
Arg ² αH - Arg ² γH	2.38(0.42)
Arg ² αH - Arg ² δH	2.65(0.85)
Arg ² δH - Arg ² εH	2.84(0.75)

Figure 1. ROESY/MAS spectrum of kyotorphin dissolved in the CsPFO liquid crystal

tm=100ms; spinning speed=2.5kHz.

Conformational Search NMR情報からConformational Diversity解析を行うに当たって、Nikiforovichらの開発したMetropolis Monte Carlo Sampling法を応用することとしたが、そのためにはseedとなる構造を探索する必要がある。

そこで温度300Kにおいて、ECCEP/2力場を用いて1500 stepのMonte Carlo Minimization(MCM)計算⁴⁾を行ったところ、5個のseed構造を首尾良く決定することができた。各々のseed構造およびパラメーターをそれぞれFig.2及びTable 2に示す。

Multiconformation解析 上述の5個のseed構造に対して各々40000 stepのMetropolis MC Samplingを行って得た統計サンプルから、それぞれの核間距離($\langle A_{calc} \rangle_{ik}$)および標準偏差の計算値($D_{calc,ik}$)を決定した。次に、重み $\{w_i\}$ ($i=1\sim 5$)をランダムに発生させ、(1)式を満たす100000組の $\{w_i\}$ を決定した。それらから求めた $\{w_i\}$ の平均値、最小値および最大値を Table 3に示す。

5個のseed構造はいずれも単独ではTable 1に示した距離条件の全てを満たすことはできなかったのに対して、Multiconformation解析によって全ての距離条件を満たす結果を得ることができた。したがって、Table 3に示した結果から、液晶中においてkyotorphinは最安定構造である

1、あるいはseed構造の中で最も不安定な構造である5としては殆ど存在せず、準安定構造2~4として主に存在することが明らかとなった。

Table 2: Dihedral angles for the five seed conformers

	No. (energy)				
	1 (6.2kcal)	2 (6.6kcal)	3 (7.3kcal)	4 (8.0kcal)	5 (9.3kcal)
ψ_1	-22.6	-12.5	-24.4	-23.2	33.5
ω_1	-178.8	179.4	-178.0	-177.0	179.4
χ_1^1	176.7	64.7	174.1	174.7	-55.4
χ_1^2	-101.7	-85.1	73.0	-103.4	99.8
χ_1^6	180.0	179.6	179.5	179.7	-179.9
ϕ_2	-143.6	-143.7	-145.1	-141.8	-143.0
χ_2^1	-165.3	-166.7	-166.3	-159.8	-165.7
χ_2^2	177.8	177.2	173.9	82.0	178.5
χ_2^3	179.1	179.0	65.3	174.2	179.0
χ_2^4	-80.4	-80.2	73.6	-81.5	-80.5
χ_2^5	179.2	179.2	-177.3	179.4	179.4
$\chi_2^{6,1}$	-179.7	-179.7	179.0	179.8	-180.0
$\chi_2^{6,2}$	179.7	179.7	-179.8	180.0	179.5

Table 3: Statistical weight values for seed conformers 1~5

	1	2	3	4	5
\bar{w}	0.05	0.28	0.17	0.49	0.01
w_{min}	0.00	0.00	0.00	0.27	0.00
w_{max}	0.21	0.69	0.45	0.92	0.04

特に存在割合が高いと考えられる4の構造は、当研究室において決定したエンケファリンのオピオイドレセプター選択性に関する3次元レセプターマップ⁵⁾と最も良くfitするためkyotorphinの活性構造と推定される。

今後、この3次元レセプターマップを用いて構造活性相関解析を行い、kyotorphinのオピオイドレセプター選択性に関する考察を加える予定である。

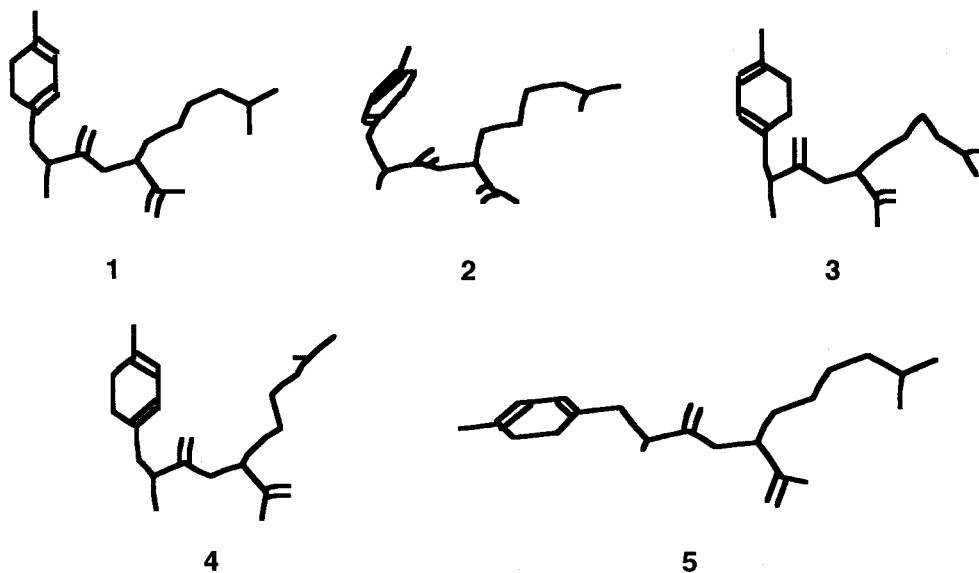


Figure 2. The five seed conformers of kyotorphin obtained by the MCM method.

〈参考文献〉

- 1) Kimura, A.; Kuni, N.; Fujiwara, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4719.
- 2) Vasquez, M.; Nemethy, G.; Scheraga, H. A. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2183.
- 3) Nikiforovitch, G. V.; Prakash, O.; Gehrig, C. A.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3399.
- 4) Li, Z.; Scheraga, H. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6611.
- 5) Kimura *et al.* submitted.

Heteronuclear 2D-NMR of Swollen Synthetic Polymers using Pulsed Field Gradient and HRMAS method

(¹ Bruker Japan, ² Sumitomo Chemical Co. Ltd.) ○ Hajime Sato¹, Kazuo Yamauchi¹ and Akihiko Okada²

We demonstrate the use of high resolution magic angle sample spinning (HRMAS) spectroscopy for applying two-dimensional high resolution solution NMR experiments to synthetic polymers which are only swollen but not soluble. Combination of magic angle spinning and ²H lock enabled us to obtain ¹³C-NMR spectra of D₂O-swollen synthetic polymer gel with ²H lock. Resolution of ¹H-NMR spectra was increased and artificial peaks were disappeared by the use of HRMAS probehead and spherical spacer which are specially designed for HRMAS experiments. We also showed that well resolved [¹³C-¹H]HSQC spectrum of D₂O-swollen synthetic polymer gel can be obtained by the incorporation of pulsed field gradient to MAS condition.

【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ぬか検討した。前回は、一般的な CP-MAS プロブヘッドを用いて MAS により分解能が劇的に向上することを示したが、今回はトリプルチューン (¹H,²H,¹³C) コイルを持つ HRMAS 専用プロブを用いて異核種 2次元 NMR を測定する検討を行ったので報告する。

【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)の吸水性感ゲルを用いた。高分子は室温で重水(99.75%)に膨潤させた。また、測定は 1次元 NMR については室温、2次元 NMR については 40°Cで行った。

すべての NMR スペクトルは Bruker DRX-400 上で 4 mm HRMAS(¹H/¹³C/²H)プロブを用いて測定した。サンプルは、内部の形状が球形のスペーサを入れた HRMAS 専用ローターに詰めた。サンプルの回転数は 1.9 kHz に設定した。

HRMAS-Z プロブヘッドについて

最近開発された HRMAS 用プロブは ¹H/²H/¹³C にトリプルチューン可能なコイルを用
キーワード: HRMAS、合成高分子、膨潤状態、重水素ロック、2次元 NMR

○さとう はじめ、やまうち かずお、おかだ あきひこ

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 プローブに比べて高分解能化・低ノイズ化がはかられている。さらにこの HRMAS プローブには一軸グラジェントが導入されている。一般の溶液プローブとは異なり、HRMAS プローブは Z_0 磁場の方向とサンプル回転軸 (=マジックアングル) の方向は平行でない。このプローブでは、磁場勾配の勾配ベクトルはサンプル回転軸に平行となるように設計されている。すなわち、磁場勾配コイルにより誘起される磁場は、サンプルの回転軸に直交する平面では均一となり、サンプル回転軸に沿って増減する¹。

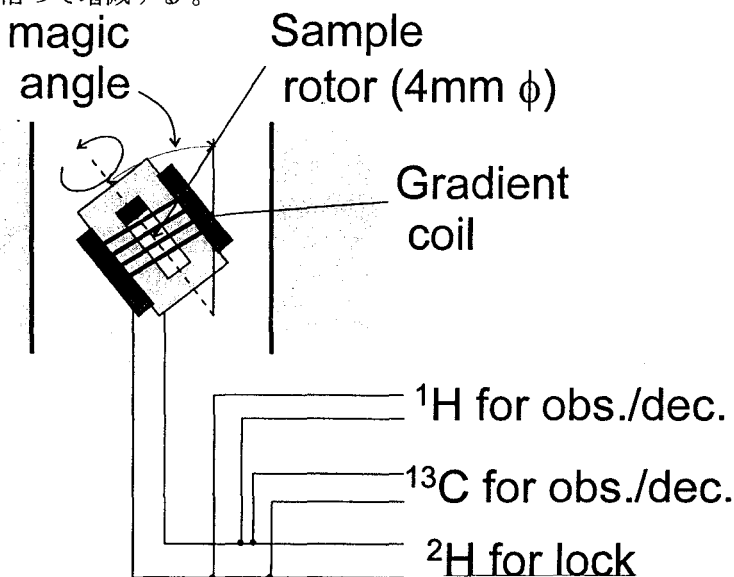


figure 1. Schematic representation of HRMAS probehead.

【結果と考察】1. HRMAS 専用プローブ/ローターの効果 前回の CP-MAS プローブを流用した測定では、試料のロータへの詰めかたによっては HDO のピークの高磁場側にアーティファクトのピークが見られる場合があった (figure 2B の「*」)。しかし、今回 HRMAS 専用プローブと球形のスペーサをいれた専用のローターを用いた測定では、そのようなアーティファクトは全く見られず、非常に良好な線形が得られた (figure 2)。

2. ^{13}C -NMR 測定 前回は分解能調整を行ったあとにロックをはずして ^{13}C -NMR の測定を行ったが、今回は ^2H をロックしたまま ^{13}C -NMR の測定を行った。通常の溶液の測定と同様の容易さでスペクトルが測定できた。今回用いた吸水性ゲルでは、ロックをかけた測定とはずした測定ではスペクトルの質に目立った差は見られなかった。

3. 異核種 2 次元測定 前回は 1D $^1\text{H-NMR}$ と 2D HOHAHA (TOCSY) スペクトルを報告したが、今回は、GRASP システムを用いた HSQC 測定を試みた。まず、 $1/4J_{\text{CH}}$ を直接結合した C-H の値に合わせて測定を行った。パルスプログラムは、States-TPPI 法で位相補正可能なシーケンスを用いた (figure 3)。良好な HSQC スペクトルが得られたが、 ^1H の線幅がブロードなため、 $1/4J_{\text{CH}}$ としては、実際の値より少し小さい 1.3 ms 程度が有効であることがわかった。

【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。なかでも、GRASP システムの併用により、HSQC 等、異核種 2 次元 NMR が良好に得られることから、通常 NMR による構造解析で用いる標準的な手法が MAS 条件でも利用可能なことが確かめられた。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

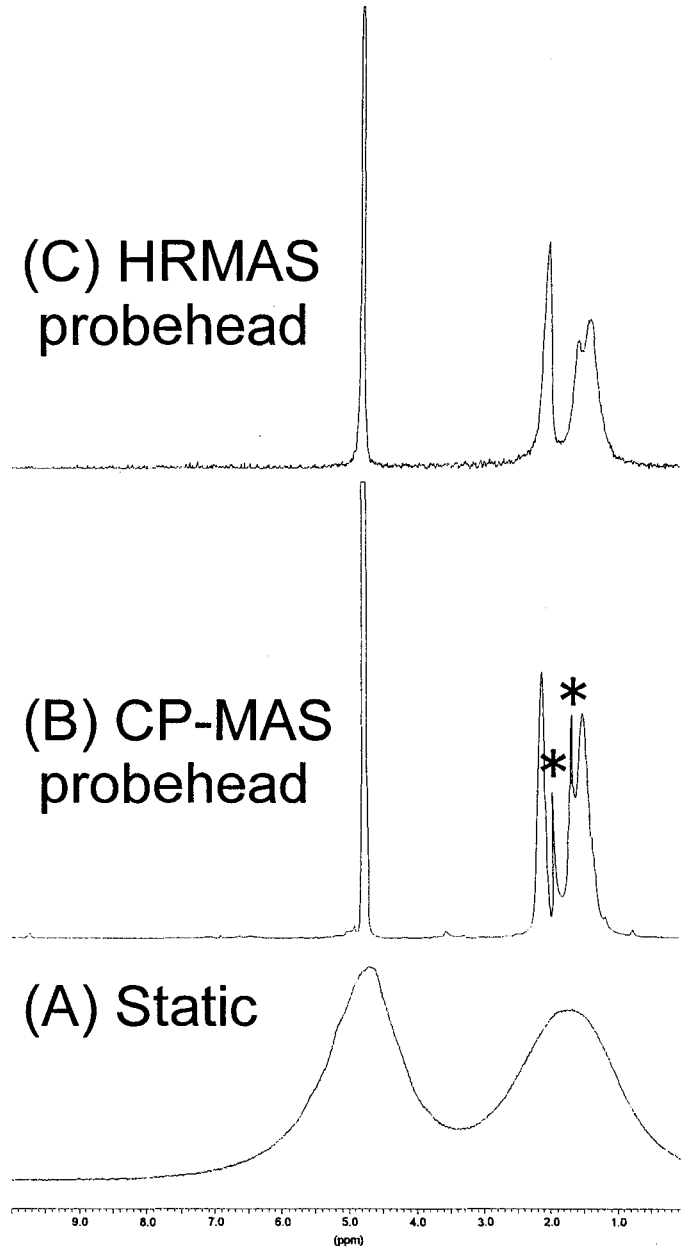


figure 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra of swollen polymer with and without MAS

"*" indicates an artifact peak. Sample volume was 50 μl in (B) and 20 μl in (C).

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。

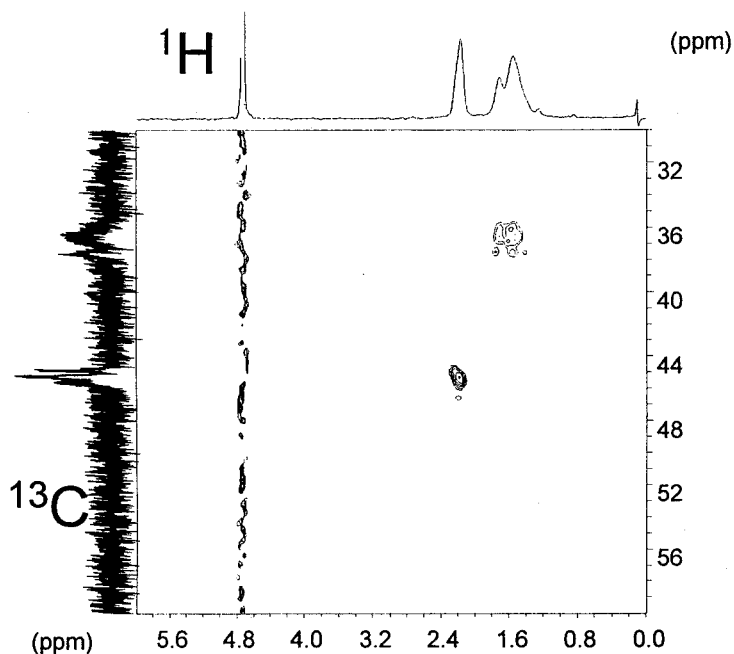


figure 3. GRASP-HSQC spectrum of swollen polymer with MAS.

Sinusoidal-shaped pulsed field gradient was applied. The duration of gradient pulse and recovery delay were set to 800 μ s and 30 μ s, respectively.

¹ W., E., Maars, F., H., Laukin & D., G., Cory, (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 13085.

東京農工大学工学部 菊地 淳、鶴田千夏、朝倉 哲郎
 農水省生物研 山崎俊正
 都立大学理学部 嶋田 敬三
 Northwestern University P.A Loach, P.S Parkes-Loach
 University of Sheffield C.N Hunter, M.J Conroy, M.P Williamson

Structural Analysis of a Light-harvesting Antenna Complex by Both Solution and Solid State NMR Spectroscopy

Jun Kikuchi¹, Chinatsu Tsuruta¹, Tetsuo Asakura¹, Toshimasa Yamazaki², Keizo Shimada³, P.A. Loach⁴, P.S.Parkes-Loach⁴, C.N Hunter⁵, M.J. Conroy⁵ and M.P Williamson⁵

1. Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184.
2. National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305
3. Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo 191
4. Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, USA
5. Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK

The photosynthetic apparatus of purple bacteria contains two different kinds of antenna complexes (LH1 and LH2), which consist of two small integral membrane proteins α and β , each of approximately 6 kDa, and bacteriochlorophyll and carotenoid pigments. We have purified the antenna polypeptide LH1 β from *Rhodospira rubra*, and have recorded circular dichroism (CD) spectra and a series of 2D-NMR spectra. An analysis of the amide proton chemical shifts of the residues surrounding the histidine chlorophyll ligand suggests that the local structure is well ordered even in the absence of protein-lipid and protein-pigment interactions. In order to investigate the dynamical feature of the complex state, we have performed isotope labeling of deuterium amino acids into photosynthetic membrane. Analysis of the ²H-solid state NMR spectral pattern of amino acid side chains has discussed.

<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, β 鎖:約 6kDa) と色素分子(BChl)とから構成される光捕獲アンテナ複合体 (LH1, LH2) によって、光エネルギー捕獲を行う (Fig.1)。近年、2 種類の紅色光合成細菌の LH2 の結晶構造が決定されたものの^{1,2)}、膜タンパク質複合体の結晶化の難しさから、LH1 に関しては低分解能の 2 次元電子線回析像が得られているに過ぎない³⁾。

本研究では、まず、溶液多次元 NMR 法によりアンテナタンパク単体(LH1 β 鎖)の構造情報を、さらに固体 ²H-NMR にて光合成内膜における複合体のダイナミクスを検討し、幾つかの知見を得たので報告する。



Figure 1 Model structure of an LH1 $\alpha\beta$ minimum structural subunit.

キーワード：光捕獲アンテナ複合体、安定同位体ラベリング、多次元 NMR 法、固体重水素 NMR 法

きくちじゅん、あさくらてつお、つるたちなつ、しまだけいぞう P.A Loach, P.S Parkes-Loach, C.N Hunter, M.J. Conroy, M.P Williamson

<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 ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) 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、 $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ 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。重水素安定同位体ラベリングについては、LH1 のみを有する変異株(PUC705BA)、ならびに LH1, LH2 を有する野生株(2.4.1)をアミノ酸も含んだ培地組成で光合成条件下で培養することにより行った。これらの菌体から超音波処理、超遠心処理により内膜小胞を作成し、固体 NMR 測定サンプルとした。固体重水素 NMR スペクトルは、四極子エコー法により JEOL EX-400 を用いて得た。

<結果および考察>

まず有機溶媒(TFE)、界面活性剤(SDS, OG)中に可溶化した LH1 β 鎖の CD スペクトルを比較すると、いずれの条件下同様な α -helix に特徴的なパターンが得られた。二次構造の類似性については $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ 下、ならびに $^2\text{H}_5$ -SDS 下での ^1H -NMR スペクトルパターンからも支持された。さらに詳細な構造解析を進めていくと、C 末端膜貫通領域については特にアミドプロトンの化学シフトの分離が良く、 α -helix に特徴的な高磁場シフトばかりでなく、低磁場側にも多くの残基が観測されていることがわかった。これらの中には、色素分子とのリガンドである His 残基に隣接した Ala34 等が含まれていた。

ここで、種々の紅色光合成細菌の光捕獲アンテナタンパクについて配列比較を行うと、特徴的な二次シフトを示すアミノ酸残基に種間の保存度が高いことから、アンテナタンパクは色素分子との配位のために α -helix 構造を歪めており、これが単離された有機溶媒中でも保存されていると考えた⁴⁾。今後さらに詳細な構造情報を得るために、 ^{15}N 均一ラベルした LH1 β 鎖を用いた 3D-NOESY-HMQC 等により連鎖帰属を行う予定としている。

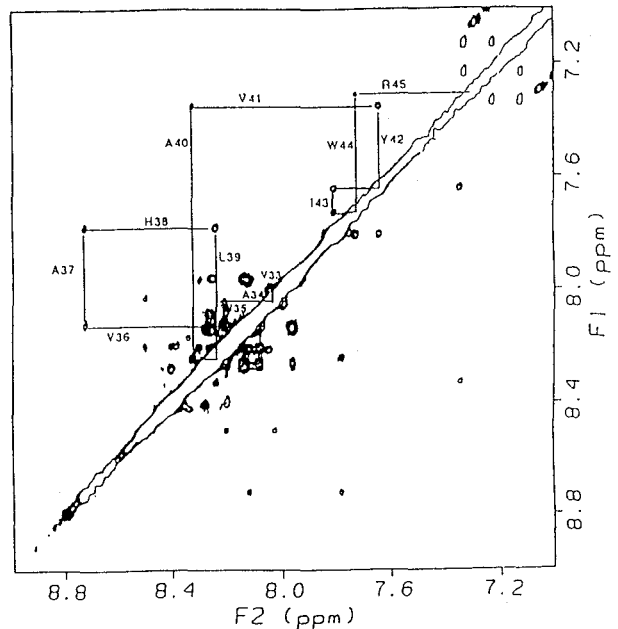


Figure 2 NOESY spectrum of LH1 β . Low-field region of the NOESY spectrum in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$. Sequential d_{NN} NOEs are indicated the transmembrane region.

次に、色素分子やリン脂質との複合体についての構造ならびにダイナミクス情報を得るために、固体重水素 NMR 測定を行った。Fig. 3 は $^2\text{H}_3$ -methyl-Ala, $^2\text{H}_4$ -ring-Tyr ラベルした内膜小胞についての固体重水素 NMR スペクトルである。これらのアミノ酸については、菌体内でのアミノ基転移反応が起こらず、アミノ鎖特異的にラベルする条件を見出すことができた。また得られたスペクトルは各アミノ酸側鎖の運動モードに特異的なシグナルであり、Ala については 2 成分、Tyr については 3 成分に分離することができた。

さらに、 $^2\text{H}_3$ -methyl-Met のラベリングにより、菌体内での代謝を利用して Met、ならびにバクテリオクロフィル(BChl)のメチル部位両方を同時に観測することができた。菌体や内膜小胞が示すスペクトルパターンは、アミノ酸自身のそれと大きく異なり、等方運動成分が圧倒的に多いことがわかった (Fig.4)。同じ内膜小胞で比較しても、内膜における LH の含量が高い野生株についてはさらに等方運動成分が多い (Fig.4(a), (b))。この内膜小胞から、有機溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OAc}$) を用いて LH タンパクを選択的に可溶化し、さらに色素やリン脂質等をゲルろ過により分離すると、極めてシャープなシグナルが得られた (Fig.4(d))。一方で他の膜タンパク等が存在する不溶画分については、異方性の成分がより多く観測された (Fig.4(c))。このことから LH 複合体については Met サイトならびに Bchl のメチルサイトいずれも等方的な運動をしているものと考えた。

参考文献

- 1) Mc Dermott et al., *Nature* (1995) **374**, 517-521
- 2) Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schultze, K., & Michel, H. *Structure* (1996) **4**, 581-597
- 3) Karrasch, S., Bollough, P. & Ghosh, R. *EMBO J.* (1995) **14**, 631-638
- 4) Kikuchi, J., Asakura, T., Loach, P.A., Parkes-Loach, P.A., Shimada, K., Hunter, C.N., Connors, M.J. & Williamson, M.P. *Biochem. J.* submitted.

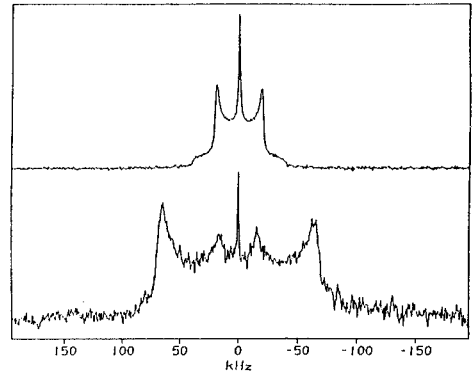


Figure 3. ^2H quadrupole echo solid state NMR spectra of the photosynthetic membrane of *Rb.sphaeroides* PUC705BA. Top: $^2\text{H}_3$ -methyl Ala labeled sample, Bottom: $^2\text{H}_4$ -ring-Tyr labeled sample.

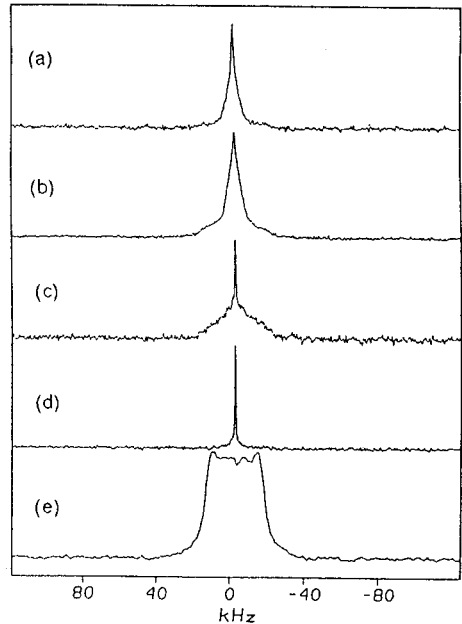


Figure 4. Comparison of the various ^2H -NMR spectra of $^2\text{H}_3$ -methyl Met labeled samples: (a) *Rb.sphaeroides* 2.4.1 membrane, (b) *Rb.sphaeroides* PUC705BA membrane, (c) $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ insoluble fraction, (d) Antenna proteins, (e) Met.

Natural Abundance ^2H NMR for Liquid Crystal Studies. Application to Microscopic Orders of 4OCB/6OCB Mixtures.

Kazuteru TABAYASHI¹, Kazuyuki AKASAKA² Division of Material Science¹, and Division of Molecular Science², The graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokko-Dai tyo, Nada-ku, Kobe 657, Japan

Information on the microscopic ordering of molecules in liquid crystalline mixtures is important from both academic and practical viewpoints. By natural abundance deuterium NMR, we could determine microscopic orders of each constituent in the liquid crystalline mixture of 4OCB and 6OCB.

1 はじめに。通常、液晶材料は数種類の単体材料を混合して用いられる。このことにより、目的とする物性、例えば液晶相の安定化、自発分極、誘電率異方性の増大、粘性の低下、キラルピッチの制御等の物性向上を行っている。しかし、混合液晶中での各成分分子のマイクロな挙動までは良く解っておらず、混合中での配向秩序の変化は興味のあるところである。液晶分子のマイクロな配向秩序を求める為に、古くから重水素NMRが一般的な手法として用いられてきた。しかしながら、重水素は自然界での存在比が低く、測定対象は化学的な重水素標識をされた試料に限られていた。我々は、最近、液体仕様の高感度NMR装置を用いることによって、重水素標識をすることなく、天然存在比のままでの重水素NMR測定に成功した。この手法により、高額の重水素化試料を用いる事無く、分子内各サイトでのマイクロ配向度を得ることができたことを昨年発表した(1)。本研究ではさらなる応用を目指し、一般的な液晶であるシアノビフェニル液晶の中から、4'-butyloxy-4-cyanobiphenyl (4OCB)と4'-hexyloxy-4-cyanobiphenyl (6OCB)の2種を混合し、混合による、各分子のマイクロ配向度の変化を天然存在比での重水素NMRで追跡した。

2 実験。混合する液晶はメルク製6OCBと4OCBの二種類を用いた。特に精製は行わなかった。試料は、加熱融解して均一に混合し、その混合比はそれぞれ、1:2と1:4混合の4種類の混合液晶を作成した。それぞれの混合液晶についてDSCを用いて相転移温度を測定した。NMR測定はブルカー社DMX-750(重水素共鳴周波数115MHz)を用いた。試料は等方相温度まで加熱して、液体相で分解能を調整した後、測定温度まで冷却した。

3 結果。プロトンデカップリングして約20,000回の積算で天然存在比の重水素N

液晶、天然存在 ^2H -NMR

たばやし かずてる・あかさか かずゆき

MRシグナルが観測された。混合液晶の場合、少ない成分を十分なS/Nで検出するためにはさらに積算回数を増やす必要があり、約8~10万回の積算を要した。各単体液晶のシグナル同定は各々の四極子分裂の中心が化学シフト値に対応していることを利用することにより、容易にできる。この方法についての詳細は以前の発表内容に記す(1,2)。

混合比に対応するシグナル強度比から、混合液晶中でも6OCBと4OCBのそれぞれの同定は簡単にできた。しかし、各単体液晶間で四極子分裂に差が無い場合、主成分液晶の信号の影に隠れてしまう（特に芳香環コア部）為の観測できないが、側鎖の大部分はそれぞれ分離しており、全ての混合比において観測できた（Figure 1）。

液晶/等方相転移温度は4OCB,6OCBとも殆ど同じであり、両者の混合を行っても、転移温度は殆ど変化しなかった。にもかかわらず、配向度は混合比によって大きく変化した。混合による四極子分裂の変化は6OCBと4OCBとも、1:2と2:1の混合比のときが、1:4と4:1の混合比の時よりも四極子分裂の減少が大きくなっていた。しかも、6OCBの場合は、1:4と4:1の混合ではむしろ、純粋な6OCBよりも四極子分裂が大きくなっている場合があった。全ての混合比で完全に分離して観測できる6OCBの γ 、 δ 、 ε メチレンとメチル基、4OCBの β 、 δ メチレンとメチル基の配向度の変化を純粋な6OCB、4OCBを基準にとって比べてみた。両者とも、1:2混合比が最も配向度が小さくなった。特に6OCBの場合、1:4混合比において、純粋な6OCBよりも配向度が向上する結果が得られた（Figure 2）。

4OCBでモニタすると、6OCBが20%の時、4OCBは「不純物」である6OCBの影響で配向が乱されると考えられる。33%まで6OCBを増やすとより配向が乱れてくる。さらに増やして66%や80%にすると、主成分は6OCBとなり、6OCBの配向の影響で配向秩序度が回復していると考えられる。

それに対して、6OCBでモニタすると、比較的配向秩序のたかい4OCBの影響で、全体的に、純粋な時よりも配向が高くなっている。ただし、66%まで6OCBの比率を減らすと配向が大きく乱れてくる。逆に、6OCBが20%では4OCBが主成分となり、4OCBの配向の影響を受けて配向が向上していると考えられる。

結果的には6OCBにとって、4OCBは配向向上剤として働いていると考えられるが、これが機能するには、混合割合が、一方の成分に偏っているときであり、等量に近いと逆に配向を乱してしまった。

液晶を混合したときの物性変化はマイクロ配向の変化と密接な関係があるはずであり、液晶混合の重要な指針を与えるものと期待される。本研究は今後、これらの研究に有用な手法であると考えられる。

参考文献

- 1 田林, 赤坂, 第35回NMR討論会予稿集, 48, (1996)
- 2 K. Tabayashi and K. Akasaka, J. Phys. Chem., 101(26), 5108(1997)

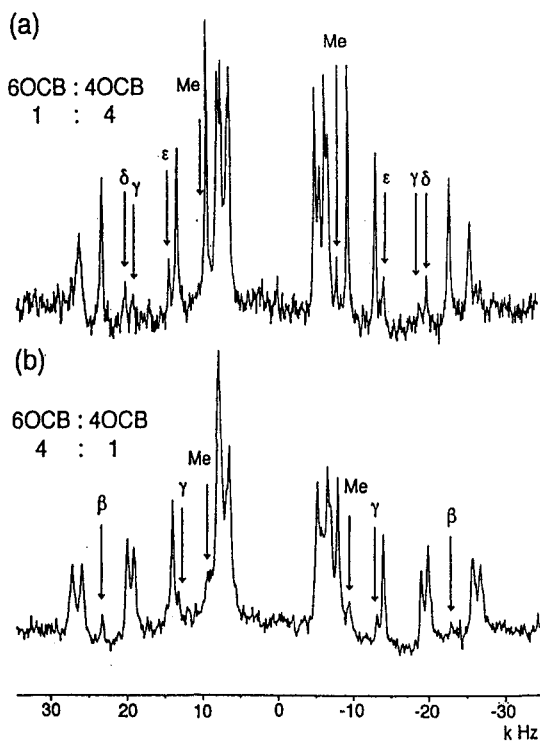


Figure 1. Natural abundance ^2H NMR spectra of mixture of 4OCB and 6OCB mixture. The both spectra of the mixture of accumulation was 100,000 scans for 10 hr with proton decoupling. (a) 4OCB : 6OCB = 4:1, The marks γ , δ , ϵ and Me correspond to γ -, δ -, ϵ -methylene and methyl deuteron signals of 6OCB in the mixture, respectively. (b) 4OCB : 6OCB = 1:4, The marks β , γ and Me correspond to β -, γ -methylene and methyl deuteron signals of 4OCB in the mixture, respectively.

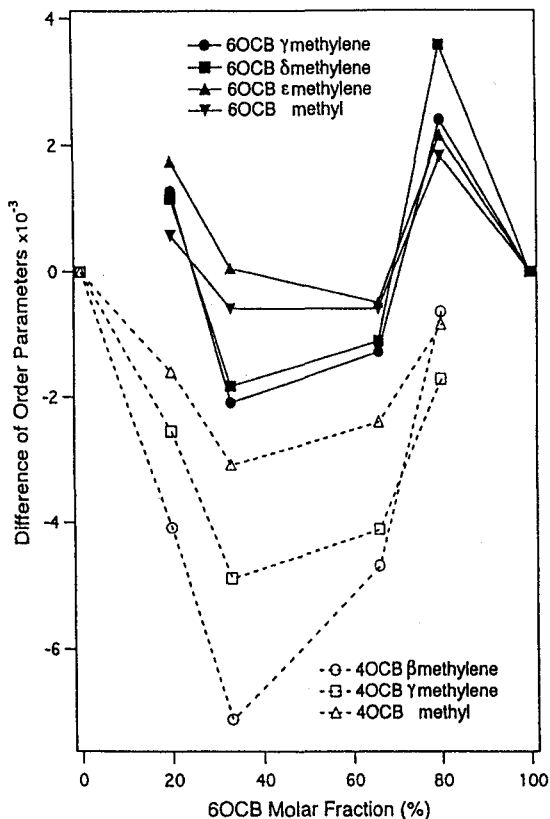


Figure 2. Plots of differential order parameters of the C- ^2H bonds of 4OCB and 6OCB against varying mixing ratio. The values are obtained after subtraction of orders in the pure material. The temperature was 63 °C ($T_c - 12$ °C). Where the order parameters of β -, γ -methylene and methyl in the pure 4OCB were 0.166, 0.094, and 0.067, respectively, and the order parameters of γ -, δ -, ϵ -methylene and methyl in the pure 6OCB were 0.132, 0.139, 0.096, 0.054, respectively.

P70 汎用DSPボードを用いたMRI用パルスプログラムの開発

(筑波大学物理工学系) ○巨瀬 勝美, 拝師 智之

Development of a Flexible Pulse Programmer for MRI Using a Commercial Digital Signal Processor Board

Katsumi KOSE and Tomoyuki HAISHI

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

A flexible pulse programmer for NMR imaging experiments has been developed using a commercial DSP (digital signal processor) board. The DSP is the 32-bit word floating-point DSP (TMS320C31, Texas Instruments) running at the 40 MHz clock frequency with the instruction cycle of 50 ns. The DSP program for the pulse sequences is developed using the interrupt function of the internal timer with the 100 ns clock cycle. As a result, the time resolution of 100 ns and minimum time interval of 2.7 μ s are achieved without any additional hardware devices.

<はじめに>

最近の撮像手法の高速化・高機能化に伴って、ますます複雑なパルスシーケンスが使用されてきている。このようなパルスシーケンスを開発したり、実行するためには、RF系や勾配磁場系の性能は言うまでもなく、それらを制御するパルスプログラマに高い性能が要求される。ところが、MRIでは、3チャンネルの勾配磁場を、高い精度で高速に制御する必要があるため、たとえ簡単なパルスシーケンスを実行する場合でも、市販のパルス発生器などで対応することは難しい。このように、パルスプログラマは、MRI装置を自作する場合においても、最も大きな障害となっている。そこで、我々は、高速で、しかも正確な時間制御が可能な市販のDSP (Digital Signal Processor) ボードを用いて、MRI用の高性能なパルスプログラマを開発した。

<なぜDSPボードか？>

Table.1に、MRI用のパルスプログラマ(観測核種は1種類のみ)に要求される出力の仕様の例を示す。このように、MRIにおいては、80~128ビット程度の語長で、時間的に正確な制御が要求される。これを実現する方法として、たとえば語長+時刻データ+制御コードを並列に保存したメモリ(128~160ビット)と、32ビット幅程度のタイマー、そしてコンパレータ回路を利用し、ハードロジックで実現する手法がある。しかしながら、多次元のMRI計測では、何重もの時間ループを必要とするため、回路構成も複雑となり、また、配線の規模も膨大なものとなる。

そこで、古くから知られているように、ある種のコンピュータを利用することが考えられる。しかしながら、パーソナルコンピュータはもちろん、多くのボードコ

キーワード: MRI, NMRイメージング, パルスプログラマ, DSP, 高速イメージング
こせかつみ, はいしともゆき

outputs	word length (bits)
gradients (x,y,z)	48
RF phase	12
RF shape, trigger	12
RF amplitude	8
RF frequency offset	12
signal sampling	4
total	96

Table.1 Word lengths for outputs required for an MRI pulse programmer (only for one channel RF). RF shape means a selection of a waveform stored in some external memory (ROM or RAM).

コンピュータにおいては、D-RAMのリフレッシュ回路や、システム内の様々な割り込みにより、正確な時間パルス列を発生することができず、また、外部タイマーによる割り込みを使用したとしても、その割り込み処理において、正確な時間が再現できるという保証はない。いっぽう、時間的にcriticalな制御を目的として製作されたDSPボードは、このような目的には最適である。すなわち、メモリにはすべてS-RAMが使用されており、また、ほとんどの場合、システムクロックに同期したタイマーがDSPに内蔵されている。しかも、アーキテクチャは、1命令1固定語長と非常にシンプルな構造をしており、通常のマイクロプロセッサに比べ、プログラミングが遥かに容易で、しかも高速な処理が可能である。

以上のようなDSPボードとして、ロボットや精密機械(ステッパなど)の制御に利用されるものが、最近、安価に供給されるようになってきた。しかも、そのようなボードは、複数のチャンネルのDAコンバータやADコンバータを備えているので、そのまま、MRI用のパルスプログラマとして利用できる可能性を持っている。

<ハードウェアの構成と機能>

DSPボードとして、mtt社のDSP6031を使用した。このボードは、Texas Instruments社のDSP (TMS320C31, クロック周波数40 MHz), 128Kword (32 bit word)のS-RAM, 4チャンネルの12ビットAD変換器, 4チャンネルの12ビットDA変換器, 8ビットのデジタルI/Oを、フルサイズのISAバスカード1枚に実装したものである。また、拡張バスによって、32ビットのデジタル出力ポートを接続した。

TMS320C31は、1語長が32ビットの浮動小数点DSPであり、40 MHzのクロックでは、命令サイクルが50ns, 浮動小数点演算のピーク速度は40 MFLOPS(同時2命令実行)である。また、CPUクロックに同期した内蔵タイマーのクロックサイクルは100 nsであり、このタイマーの割り込みを利用することにより、100 nsの時間分解能のパルスの発生が可能である。このDSPボードと1枚の拡張モジュールを、パーソ

ナルコンピュータ (IBM-PC互換機, CPU: Pentium133, DOS6.2とWindows95の共存インストール)のATバスに実装した。

<プログラムの構成と動作>

プログラム開発は、Windows3.1/DOS6.2上のPC用Cコンパイラ (Visual C++1.5) と、DOS Extender上のDSP用Cコンパイラとアセンブラを使用して行った。

パルサーのプログラムの動作の概要を、Fig.1に示す。すなわち、まず、パルス発生タイムテーブルをPC上のテキストエディタで作成する。このファイルには、パルス(イベント)の発生時刻(100 ns分解能)、イベント(勾配磁場, RFなど)名、そしてその大きさ(種類など)が、時刻の順に並べて書かれてある。

パルサーを駆動するためのPC上のプログラムは、そのファイルを読み込み、時刻データを、イベント間の時間差から一定のオーバーヘッドを差し引いた時間に書き換え、また、イベント名とその強度データを、その動作を実現するための、DSPボード上の出力のアドレスと、出力データに変換する。このプログラムは、このデータテーブルと、このデータに従ってパルサーを動作させるDSPプログラムを、DSPボード上にのメモリに直接転送し、そのプログラムを起動する。

DSP上で起動したプログラムは、データテーブルから時間データを読み込んで、DSPに内蔵のタイマー(100 nsクロック)に書き込み、それがカウントされてゼロになって割り込みが発生するまで待機する。そして割り込みが発生したら、データテーブルに保持されている出力アドレスと出力データに従って、パルスなどを出力する。このような操作を、すべてのイベントが終了するまで繰り返すことによって、1つのパルスシーケンス発生する。このように、連続するパルスの間には、データを出力するためのオーバーヘッドが存在するが、本プログラムでは2.7 μ sであった。

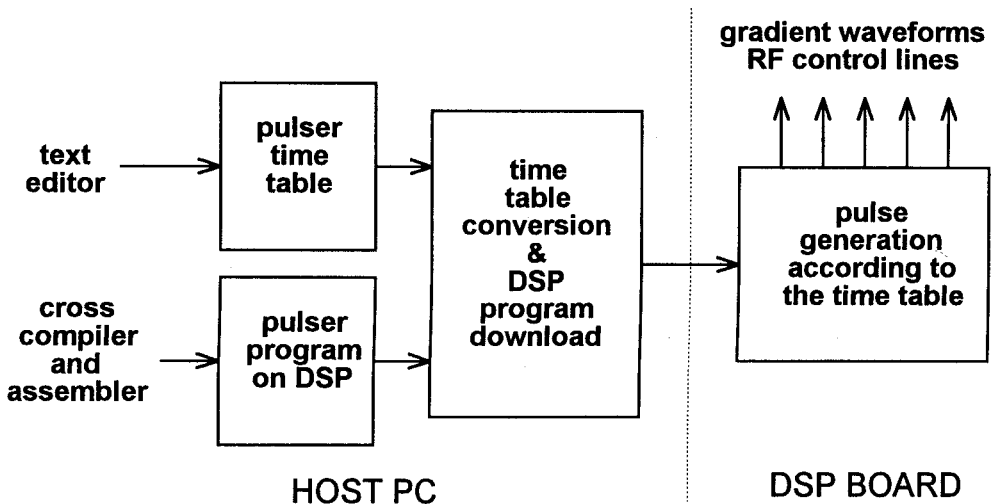


Fig.1. Overview of the program.

<結果と考察>

Fig.2に、繰り返し時間が0.4ms(!)のFLASHシーケンスの勾配磁場の波形を示す。実際には、勾配コイルや電源の能力などから実施は不可能に近いが、波形としては、100 nsの精度で、パルスジッタもなく、設定通りに発生できることが確認された。

本パルスプログラムでは、ビット幅の制約(最大32ビット)から、同時に多項目の出力を制御することは不可能である。ただし、勾配磁場同士であれば、ラッチが共通であるため、同時に変化させることは可能である。しかしながら、勾配磁場同士以外の項目を同時刻に変化させなければならない応用は、実際には非常に少ないと思われる。なお、勾配磁場の大きさをステップ毎に変化させながら計測する、二次元や三次元の撮像シーケンスも、DSPのプログラムを書き換えることによって、容易に作成することができる。

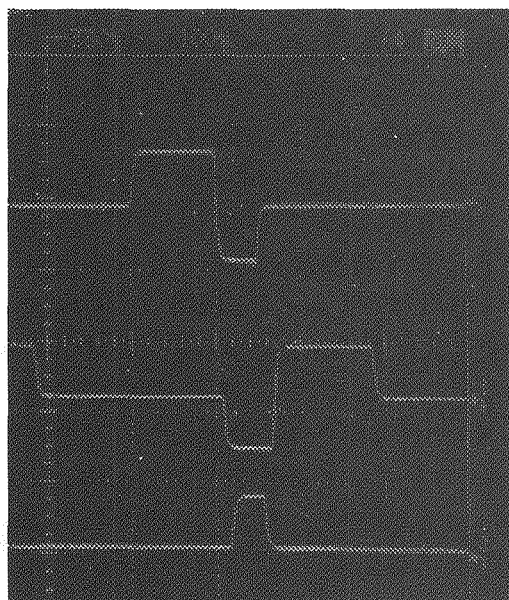


Fig.2. Gradient waveforms in a FLASH sequence (TR=0.4 ms). The switching speed of the signals is determined by the DA converters' conversion time (about 10 μ s). The horizontal axis is 100 μ s/div.

<むすび>

汎用のDSPボードを使用し、プログラムを開発するだけで、MRI用のパルスプログラムを開発することに成功した。このプログラムは、100 nsの時間設定精度をもち、しかも非常に汎用性に富むため、MRIにおける将来の先端的なパルスシーケンスにも充分に対応できるものと思われる。また、本DSPボードは、パルスシーケンスの繰り返しの間に、データテーブルをホストCPUからダイナミックに受け取ることも可能であるため、リアルタイム画像再構成装置と組み合わせることにより、real-time & interactive MRIシステムを構築することも可能と思われる。■

P71 MR 画像における並進運動する物体の偽像の研究

筑波大学物理工学系 ○安立直剛, 拝師智之, 巨瀬勝美

Study of motion artifacts observed in MR images of objects undergoing a translational motion

Naotaka ADACHI, Tomoyuki HAISHI, Katsumi KOSE

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

Moving objects produce various artifacts in their MR images. For the first step to understand their properties, we performed computer simulations and experiments for two systems. The first is a particle sinking at a constant velocity in a stationary liquid. The second is a water phantom translating at a constant velocity. The computer simulations reproduced the experimental results very well; the pattern of the motion artifacts were understood by the superposition of stripe spin distribution with various length along the moving direction.

<はじめに>

液体中に多数の固体粒子が分散した系(固液混相系)は、自然界にも工学的応用においても広く存在し、その流れの性質の解明や制御は、大きな課題となっている。また、このような系は、その応用的側面ばかりでなく、多数の固体粒子が流体を介して相互作用する、自由度の大きな複雑な力学系として、物理学的にも大変興味のある系である。

本研究では、固液混相系の流動特性を明らかにする第1歩として、FLASHにおける「静止流体中を沈降する1個の球体」、および multi-shot EPI における「一定速度で並進移動するリング状ファントム」が発生する偽像(アーチファクト)を、計算機シミュレーションと実験によって研究した。

<方法>

○計算機シミュレーションの方法

NMR 画像を計算機シミュレーションで再現するためには、その撮像シーケンスにおける核磁化の運動をすべて追跡する必要がある。しかしながら、そのためには、流体の流速分布が既知でなければならず、しかも膨大な計算時間が必要である。そこで、本研究では、流体は静止し、球体のみが移動するというモデルを使用した。すなわち、流れによる位相変化は無視できるものと仮定した。このため、NMR 信号は、断層面の核磁化分布の2次元フーリエ変換で表わすことができる。

本研究で行った計算機シミュレーションの方法は、実空間で画像データを作成し、それを2次元フーリエ変換してk空間でスキャンするという作業を、球体を沈降させながら行うというものである。撮像シーケンス全体の時間(実験では 616.96ms)に比べて、1本のラインをスキャンする時間(2.56ms)は短いので、球体は1本のラインをスキャンしている間は静止していると仮定した。スキャンして取得したデータはフーリエ空間のデ

キーワード : NMR イメージング, 偽像, アーチファクト, ダイナミック MR
あだちなおたか, はいしともゆき, こせかつみ

ータであり、そのデータを2次元逆フーリエ変換して絶対値を計算することにより、再構成画像を得た。実験では物体の移動方向を信号の読み取り方向にとっており、FLASHではシーケンシャルオーダーでデータを収集している。そこで、FLASHについては、実験に対応した場合のほか、信号の読み取り方向を変えた場合とセントリックオーダーを用いた場合のシミュレーションも行った。また、multi-shot EPIについては4shotで行い、こちらも1本のラインをスキャンする間の球体の移動は無視した。

○実験方法

この研究では静止流体中を落下する球体の実験と、一定速度で並進運動するリング状ファントムの実験の2つの実験を行った。

球体の実験では、鉛直においた円管内の静止流体を球体が沈降する系を用いた。円管はアクリル製で底部はふさがれており、内径は16mm、外径は20mm、全長は約600mmである。作業流体としては、スクロース(砂糖)を硫酸銅水溶液に溶かしたものをを用いた。なお、以下のNMR計測において作業流体の温度は、ほぼ25℃に保持した。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19.2mm×19.2mmの領域を128×128の画像サイズで撮像した。よって、1画素は0.15mm四方となる。ナイロン球を、この試料ガイドの中に、10～20秒の間隔で静かに投入し、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4mm)において撮像を行った。また今回の実験ではスクロース濃度の異なる3種類の流体を用いた(Table 1)。

リング状ファントムによる実験では、内部を硫酸銅水溶液で満たし、内径10mm外径14mm高さ10mmの円管を直径3mm高さ100mmの円柱で貫いたリング状ファントムを入れたアクリルパイプを、変速機付きモーターで一定速度で移動させながら撮像を行った。移動速度としては、0.4, 0.8, 1.6, 2.4(cm/s)の4通りで実験を行った。

working fluids	A	B	C
sucrose density(Mol/l)	1.1	1.0	0.9
sinking speed of a sphere (cm/s)	1.35	2.63	3.40
moved distance of a sphere during imaging time (pixel)	58.5	113.75	149.5

Table 1 Working fluids used in the experiment.(25℃)

<結果>

Fig.1 に示すものが実験によって得た画像(a)～(c)とそれに対応したシミュレーションによる画像(d)～(f)である。流体はそれぞれTable 1で示したものである。Fig.2は読み取り方向を球体の落下方向に垂直に取った場合のシミュレーション画像である。撮像時間中の球体の移動距離を画素数でそれぞれ示した。Fig.3はスキャンのラインの取り方をセントリックオーダーにした場合のシミュレーション画像である。また、流れによる位相変化を調べるために実験データから作成した位相画像をFig.4に示す。位相のずれはほとんど見られない。従ってシミュレーションの仮定が有効であることが確認された。Fig.5はmulti-shot EPIによる並進運動するリング状ファントムの実験画像およびシミュレーション画像である。ゴーストが読み取り方向と位相エンコード方向に現れている。

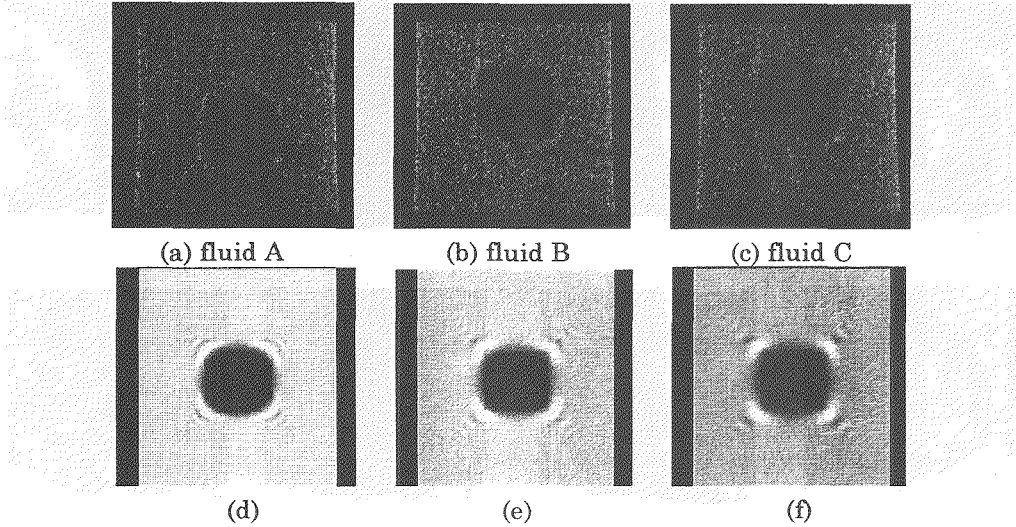


Fig.1 Experimental images(upper) and simulated images(lower) of a sinking sphere. (FLASH)

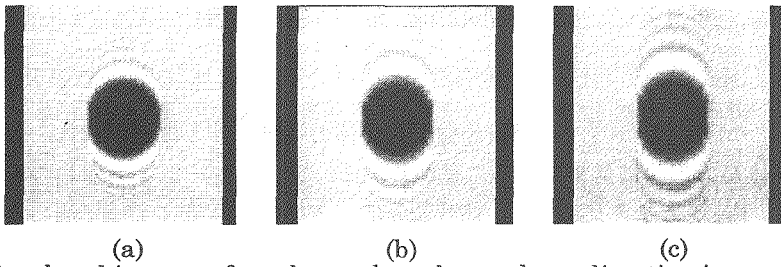


Fig.2 Simulated images of a sphere when the read-out direction is perpendicular to the sinking direction

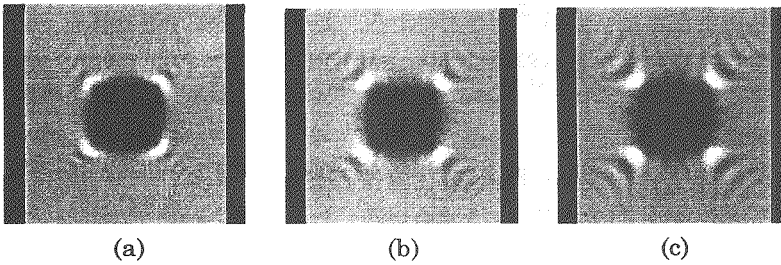


Fig.3 Simulated images of a sphere using centric-order phase encoding.

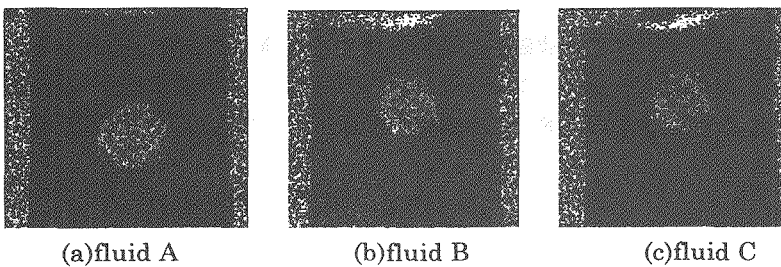


Fig. 4 Phase images of experimental data.

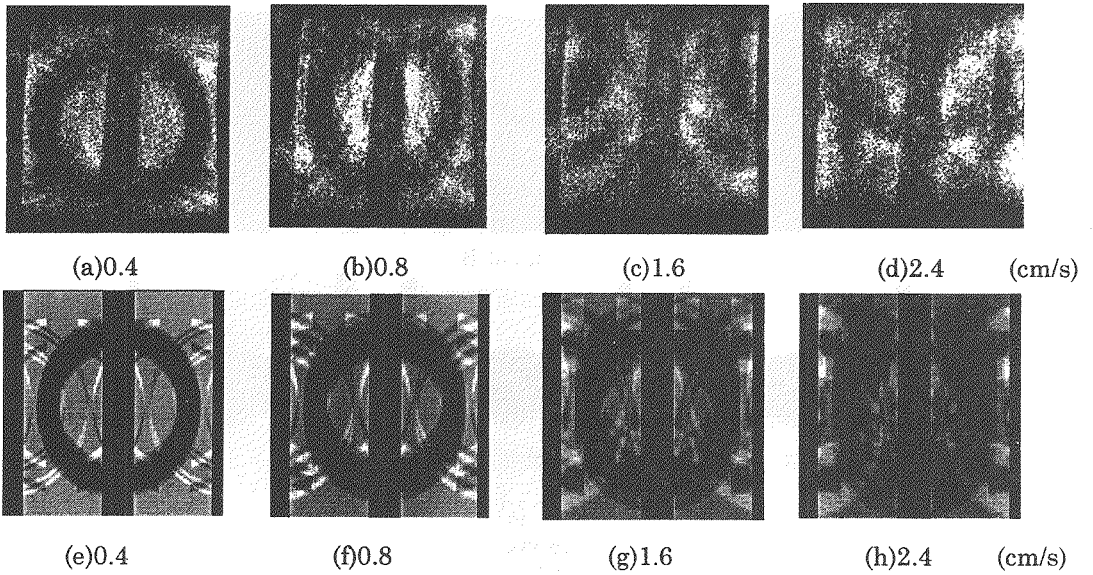


Fig.5 Experimental images(upper) and simulated images(lower) of the ring shaped water phantom. (multi-shot EPI)

<考察>

FLASHについては、Fig.1の実験画像から球体の移動に伴う偽像が球体の斜め方向に強く現れ、球体が方形状に見えることがわかる。シミュレーションはこの現象をよく再現している。Fig.1と2の比較から、信号読み取り方向の取り方によって明らかにアーチファクトの形状が異なることがわかる。また、Fig.3の画像とFig.1のシミュレーション画像を比較すると、それほど大きな違いは見られなかった。

multi-shot EPIについては、物体の移動速度が遅くてもゴーストが著しく現れるため、移動する物体の計測には不相当であるといえる。よって、移動する物体をEPIで計測する場合は、画素数は少なくなるもののsingle-shot EPIを使用すべきであると思われる。

<むすび>

静止流体中を落下する球体をFLASHで撮像した場合、および並進運動するリング状ファントムをmulti-shot EPIで撮像した場合に現われる偽像について実験及び計算機シミュレーションを行い、実験画像に現れる偽像をシミュレーションによって再現することに成功した。その結果から、並進運動する物体を撮像する場合に、どのようなシーケンスをどのように使うかについていくつかの知見が得られた。

今後の課題としてすべての核磁化の挙動と流速を考慮したシミュレーションと、他のパルスシーケンスを用いたシミュレーションを行うこと、アーチファクト発生のメカニズムの解明、偽像のより小さい計測方法の開発などがあげられる。

References

Qing-San Xiang,R.Mark Henkelman : K-Space Description for MR Imaging of Dynamic Objects,Magn.Reson.Med.29,422-428(1993)

(1東大大院 医 医用生体工学, 2東大 医科研)

○亀井裕孟¹, 伊良皆啓治¹, 吉川宏起², 上野照剛¹Magnetic Resonance Imaging of the Neuronal Active Currents
in the Human BrainHirotake Kamei¹, Keiji Iramina¹, Koki Yoshikawa² and Shoogo Ueno¹¹Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Medicine,²Institute of Medical Science, University of Tokyo)

A new functional magnetic resonance imaging technique to visualize the distribution of neuronal active currents in the human brain was developed. This technique was used to obtain the maps of the human brain activity by using motor stimulus paradigms.

1. はじめに

NMRを利用した脳機能計測法のうち差分NMR法, fMRI (機能MRI) 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うことができる. 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の信号が得難く, 高い空間および時間分解能が得られない難点がある. 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. しかし, MEGには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.

磁場源 (電流双極子) の空間分布が確かな位置情報の得られるMRIによって画像化できれば, より直接的に脳機能計測を行うことができる. われわれは, 既に, ファントムを用いた予備実験でMEGで観測されているのと同程度の大きさの電流双極子を空間分解能の高いMR イメージング法によって画像化できることを示した(1).

今回はこの手法をヒトの脳機能イメージングに適用し, 脳活動電流分布を検出することができたので, その結果について報告する.

2. 方法

長さ $2l$ の直線導体上を電流 I が流れているとき, $2l$ の中心 O から垂直方向に距離 r の点における磁束密度 $B(r)$ は $B(r) = \mu_0 I / 2 \pi r (r^2 + l^2)^{1/2}$ で与えられる.

脳機能イメージング, 活動電流, fMRI, MEG

かめいひろたけ, いらみなけいじ, よしかわこうき, うえのしょうごう

いま、Oを原点とするr方向の線形磁場勾配 G_r を加えると、実効的な磁場勾配は $G(r) = G_r r + \mu_0 I / (2 \pi r (r^2 + R^2)^{1/2})$ となる。

均質な物質の中に電気伝導度以外の物理的性質が周囲の物質と同じ直線の導体があると仮定する。導体に電流を流し、MR像を撮像すると、導体を含む面のMR像は導体を中心に対称的な信号強度変化を示す。しかし、導体と周囲の物質との間に磁化率の違いがあつたりすると、信号強度変化の対称性は失われる。何らかの方法で非対称的信号強度変化をもたらす原因を見かけ上取り除くことができれば、現実の測定対象においても微弱電流の変化をMR像として観測することが可能である。ここでは測定条件の異なる4種の画像を処理することによって非対称的信号強度変化をもたらす原因を取り除いた。また、電流on, offによって得られた画像の差分画像からは電流の大きさを知ることにも可能である。測定にはGE社のSignaを使用し、EPIを適用した。マトリックスサイズ:256×256, TR:4000, TE:40msである。

3. 結果と考察

右手のfinger tappingを行ったときの活動電流MR像をFig.1に示す。通常のfMRIと同様な手法で電流源を表示したもので、活動部位が良く描出されている。差分画像における活動部位のprofileをFig.2に示す。電流源を中心に対称的に信号強度が変化するprofileが得られている。

fMRIでBOLD効果を検出するためには出来るだけ高い磁場での測定が望ましいが、活動電流MRIではS/Nが許す限り低磁場を用いた方がよいという利点がある。

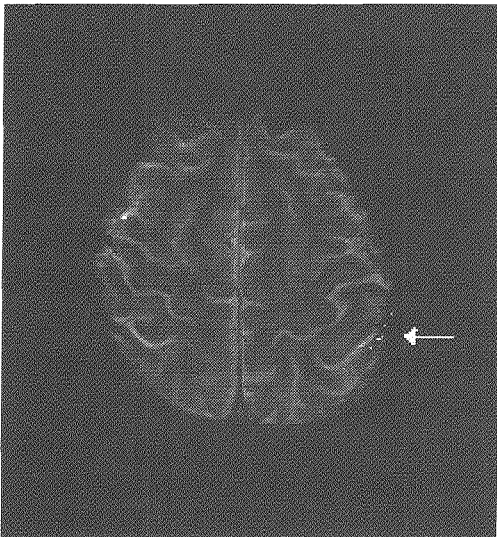


Fig.1. MRI mapping of the neuronal active currents during right hand finger tapping.

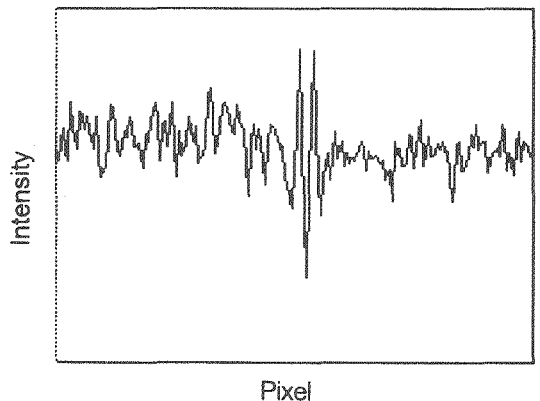


Fig.2. Profile of the subtraction image at the level of the current source.

(1)亀井裕孟他：第35回NMR討論会、講演要旨集、p176(京都、1996)。

NMRイメージングにおけるRF磁場不均一性補償法

○三原 啓明、入口 紀男*、佐々木 康人、上野 照剛
 東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻
 シーメンス旭メディテック (株) *

A Method for RF Inhomogeneity Correction in MR Imaging

Hiroaki Mihara, Norio Iriguchi*, Yasuhito Sasaki, Shoogo Ueno

University of Tokyo, Graduate School of Medicine

*Siemens-Asahi Medical Technologies Ltd. **

Abstract: A method for RF inhomogeneity correction in MR imaging is proposed. First, two images with different flip-angles and one image with a very small flip-angle are obtained. Then, spatial distribution maps of functions, flip-angle θ and $\sin \theta$, are produced by employing those images. Finally, the correction is achieved by dividing one original image by those maps of functions.

目的：MR画像は、RFコイルのデザインに起因するRF磁場の不均一性、及び、被検査体内部組織の導電率の分布に起因する励起の不均一性等によって、信号強度は、不均一なものであることが多く、特にサーフェイスコイル等を用いた撮像においては、RF磁場の不均一性は画像への深刻な影響が避けられない。本研究は、 θ 画像及び $\sin \theta$ 画像を作成することによって、RF磁場の不均一性を原理的に補正することを目的とするものである。

原理：一般にMRイメージング信号は、測定対象物質がスピン密度、 T_1 、 T_2 等の緩和時間について均一な物質であっても、RF磁場の不均一性が原因となり、測定対象内の位置により、磁化の倒されるフリップ角度 (θ) が様々に異なるため、 $\sin \theta$ の項が含まれる信号強度は、構成する物質の情報以外に、位置の情報が含まれたものになってしまう。この不均一性は、外部から与えられるRF磁場の不均一性及び測定対象自体の磁気遮蔽効果が主な原因であると考えられる。この影響のため、例えば、フィールドエコーにより磁化ベクトルの発する信号強度 I_0 は、次のような式で表される。

$$I_0 = \rho \sin \theta (1 - e^{-T_r/T_1}) e^{-T_e/T_2^*}$$

キーワード：MRI, RF磁場、不均一性補償

みはらひろあき、いりぐちのりお、ささきやすひと、うえのしょうごう

更に同一のサーフェスコイル等によって励起と検出が行われる場合には、信号の検出の際にも、検出される信号強度 I は、位置によって減衰の大きさが異なる[1]ため、次のように表される。

$$I = \rho\theta^* \sin\theta(1 - e^{-Tr/T1})e^{-Te/T2^*}$$

ここで、 θ^* は、励起の際のフリップ角度 θ と比例関係にある ($\theta^* \propto \theta$)。また、 θ と θ^* は、場所の関数になっている。

そこで、ある小さなフリップ角度 θ_1 で得られた画像のピクセル強度 $\text{pic1}(\theta_1)$ は、

$$\begin{aligned} \text{pic1}(\theta_1) &= k\theta^* \sin\theta_1 \cdot X \\ (X &= (1 - e^{-Tr/T1})e^{-Te/T2^*}) \end{aligned}$$

任意のフリップ角度 θ で得られた $\text{pic2}(\theta)$ は、

$$\text{pic2}(\theta) = k\theta^* \sin\theta \cdot X$$

フリップ角度 2θ で得られた $\text{pic3}(\theta_1)$ は、

$$\text{pic3}(2\theta) = k\theta^* \sin 2\theta \cdot X = 2k\theta^* \sin\theta \cos\theta \cdot X$$

ここで、 $\theta_1 = m\theta$ $m \cong 0$, $\theta^* = n\theta$ とおくと、

$$\begin{aligned} \text{pic1}(\theta) &= nk\theta \sin m\theta \cdot X \cong mnk\theta^2 \cdot X \\ \text{pic2}(\theta) &= nk\theta \sin\theta \cdot X \\ \text{pic3}(\theta) &= 2nk\theta \sin\theta \cos\theta \cdot X \end{aligned}$$

したがって、 $\sin\theta$ 分布画像、 θ 分布画像は次式で与えられる。

$$\sin\theta = \sqrt{1 - \left(\frac{\text{pic3}(\theta)}{2 \cdot \text{pic2}(\theta)} \right)^2} \quad (1)$$

$$\theta = \frac{1}{m} \cdot \frac{\text{pic1}(\theta)}{\text{pic2}(\theta)} \cdot \sqrt{1 - \left(\frac{\text{pic3}(\theta)}{2 \cdot \text{pic2}(\theta)} \right)^2} \quad (2)$$

更に、原画像 ($\text{pic2}(\theta)$ 画像) は、次式によって補正画像となる。

$$X = \frac{m}{nk} \cdot \frac{(\text{pic2}(\theta))^2}{\text{pic1}(\theta) \left(1 - \left(\frac{\text{pic3}(\theta)}{2 \cdot \text{pic2}(\theta)} \right)^2 \right)} \quad (3)$$

フリップ角が $m\theta$ ($m \cong 0$)、 θ 、 2θ となる3枚の画像を撮る (例えば、RFパルスを与える時間を $m t$ 、 t 、 $2 t$ とする)。この時、他の撮像パラメータは、すべて等しくする。

この操作により得られた θ 分布画像、及び $\sin \theta$ 分布画像で、フリップ角 θ の画像を割り算すれば、RF 磁場の不均一を原理的にキャンセルした画像が得られる。また、スピンエコー法においては、検出される信号強度 I は、

$$I_{SE} = \rho \theta^* \sin \theta \sin^2 \frac{\theta_2}{2} \cdot (1 - e^{-Tr/T1}) e^{-Te/T2}$$

となり [2]、 $\theta_2 = 4\theta$ とすることにより、フィールドエコー法の場合と同様の手法によって、 θ 分布画像、 $\sin \theta$ 分布画像、補正画像を求めることができる。

実験方法、材料：直径 3.5cm の球形ファントム ($T1=300ms$) を直径 2.4cm の単巻円形コイルに載せ、磁界密度 7.0T、口径 18.3cm の MRI 装置にて測定を行った。フリップ角 $10^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ の画像を $Tr=1600ms, Te=5ms$ のフィールドエコー (FE) 法にて取得した。

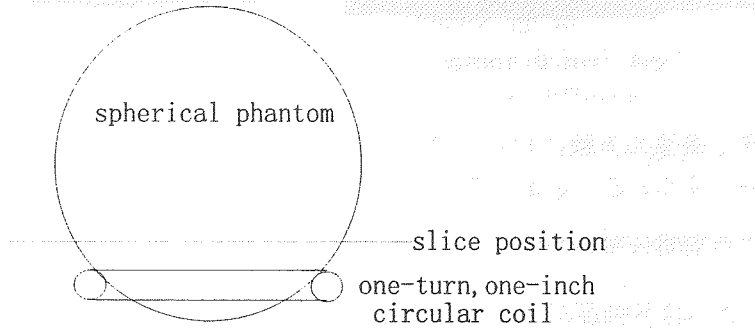


Fig.1 Positioning of the phantom

実験結果：原画像を Fig.2 に示す (フリップ角 45°)。また、フリップ角 θ の空間的な分布画像を Fig.3 に $\sin \theta$ の空間的な分布画像を Fig.4 に示す。また、原画像を θ および $\sin \theta$ で除した補正画像を Fig.5 に示す。

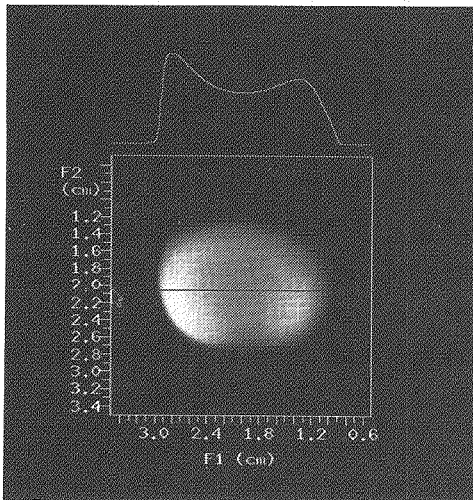


Fig.2 Original image

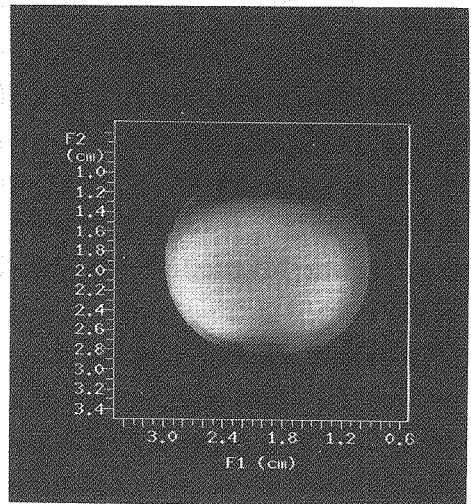


Fig.3 θ image

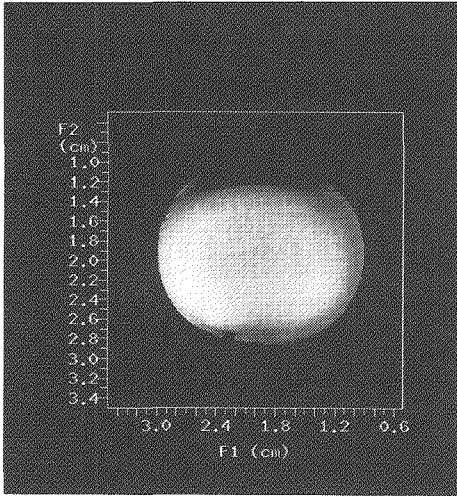


Fig.4 $\sin \theta$ image

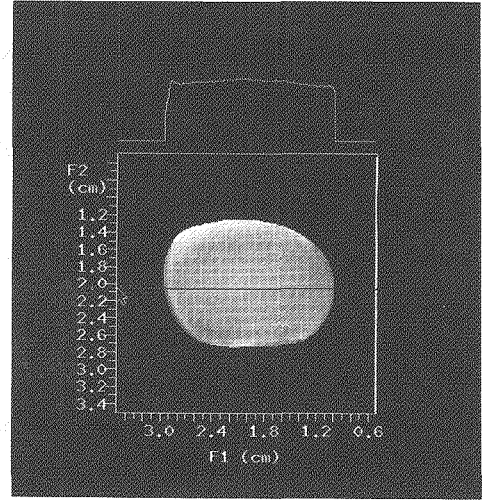


Fig.5 Corrected image

考察：撮像の実験においてはT1緩和による影響を最小限とするため、T_rを十分に長くとることが必要であった。

θ の空間分布画像は、 $\cos^{-1}\left(\frac{\text{pic3}(\theta)}{2 \cdot \text{pic2}(\theta)}\right)$ によって、より正確に求められる。

また、信号強度が極めて小さい(≈ 0)ピクセル間の除算には、誤差を伴うことがある。しかし、本研究は、MRイメージングにおいて、外部から与えたRF磁場の不均一性及び、RFコイルによって信号を検出する上での空間的不均一性を原理的に補償するものである。これによりMRI画像の信号強度の定量的な扱いが可能となるものと考えられる。

結論：本研究によってRF磁場の不均一を原理的に補正することが可能となった。また、フリップ角 θ 及び $\sin \theta$ の空間的分布も画像として可視化された。本研究は、更に、臨床用MRイメージング[3]、マイクロイメージング等における広い分野での応用が期待される。

参考文献：[1] D.I.Hoult and R.E.Richards, "The Signal-to-Noise Ratio of the Nuclear Magnetic Resonance Experiment." *J. of Magn. Reson.* 24,71-86,(1976)

[2] Willam H. Perman, Matt A. Bernstein, and John C. Sandstrom, "A method for Correctly Setting the rf Flip Angle." *Magnetic Resonance in Medicine* 9,16-24,(1988)

[3] Scott W. Atlas, *Magnetic Resonance Imaging of the Brain and Spine.* Lippincott-Raven, (1996)

(国立環境研究所) ○三森文行、山根一祐

Anisotropic diffusion of water molecule in the cortex of rat brain

E. Mitsumori, K. Yamane

(National Institute for Environmental Studies)

We measured the anisotropic diffusion of water molecule in the cortex of rat brain by a diffusion-weighted imaging method. The apparent diffusion coefficient (ADC) for the diffusion parallel to the column structure of the cortex was significantly larger than that for perpendicular to the column. This anisotropy was dissolved in the brain intoxicated with methyl mercury, suggesting the effect of methyl mercury to the integrity of the column structure. With higher b-factor up to $7.21 \times 10^9 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ the signal intensity at the cortex was biexponentially attenuated, demonstrating the presence of two water components which are different in the diffusion rate.

【はじめに】 磁場勾配パルスを用いる拡散強調イメージング法は水の運動を通じて、生体の機能に関する情報を与える可能性がある。すでに、脳の白質において水分子の拡散が異方性を有し、これから神経線維の走行方向に関する情報を得ることができていることが知られている。しかし、主として細胞体よりなる皮質での拡散異方性を観測した例はあまり報告されていない。我々はラット大脳皮質において、皮質の機能単位とされるカラムの方向と関連した拡散異方性を観測した。また、メチル水銀中毒ラットの脳皮質においてはこの異方性が解消する方向に拡散速度が変化していることを見いだした。さらに、拡散強調のb値をあげると、もはや信号強度の変化は単一の指数曲線で近似することは不可能となり、2成分に分離されることがわかった。これらの事実より、脳で観測される水分子の拡散の意味について論じたい。

【方法】 ラット脳のイメージ測定のために内径50mm、長さ52mmの変形 Alderman-Grant型のNMR信号検出器を作製した。またこの信号検出器に適合するラット頭部の固定器具をアクリル樹脂を用いて作製した。上記の信号検出器を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。拡散強調画像は頭部冠状断において G_R 方向にdiffusion磁場勾配パルスを加えたstimulated echo法により、主として $\delta = 3\text{ms}$ 、 $\Delta = 56\text{ms}$ 、 $G_D = 0 \sim 80\text{mT/m}$ で勾配パルス強度を8段階に変えて測定した。FOV=5cm, スライス厚3mm, TR/TE=1000/20.24ms

拡散、異方性、NMRイメージング、ラット、大脳皮質

みつもりふみゆき、やまね かずすけ

である。 G_R を考慮した b 値は $0.272 \sim 4.11 \times 10^8 \text{m}^2\text{s}$ である。 b 値を変えて測定した拡散強調画像での信号強度の減衰過程より見かけの拡散係数(ADC)を算出した。より大きな信号減衰を得るためには、 $\delta = 11 \text{ms}$, $\Delta = 112 \text{ms}$ とし、最大 b 値 $=7.2 \times 10^9 \text{m}^2\text{s}$ まで測定を行った。メチル水銀中毒ラットは12週齢の雄Wistarラットに 5mg Hg/kg 体重の塩化メチル水銀を12日間毎日経口投与することにより作製した。給餌量を投与動物の摂食量と合わせたラットを対照群とした。ラットは1%halothane (50% $\text{O}_2/50\% \text{N}_2\text{O}$) 麻酔下においてNMR測定を行った。

【結果と考察】 ラット大脳の冠状断で、直交する2方向の拡散強調画像を測定すると脳梁や海馬采等の白質部分では神経線維の走行方向に沿った明らかな異方的拡散が認められる。主として神経細胞体よりなる皮質部位においても、白質ほど明確ではないもののカラムの方向と相関した異方的拡散が認められることがわかった(図1)。 b 値が比較的小さな $4.11 \times 10^8 \text{m}^2\text{s}$ までの測定では b 値の増大に伴う信号強度の減衰は単一指数関数に従い、頭頂部皮質のカラム方向に平行方向の拡散のADCは $0.78 \pm 0.10 \times 10^9 \text{m}^2\text{s}^{-1}$ ($n=5$)と、直交方向のADC $0.63 \pm 0.06 \times 10^9 \text{m}^2\text{s}^{-1}$ ($n=5$)に比べて有意に大きい(図2)。

ところが、メチル水銀中毒ラットを対照群と比較すると、カラムに平行する方向のADCに変化はないものの、直交方向のADCが有意に延長し、上記の拡散の異方性が解消される方向に変化した(図3)。この傾向は頭頂部、側頭部の皮質で共通に認められたが、視床部位や小脳皮質、三叉神経束等では認められなかった。大脳皮質での変化はメチル水銀によるカラム構造の何らかの傷害を反映するものと考えられる。

正常ラットの測定において拡散強調を増大し最大 b 値を $7.21 \times 10^9 \text{m}^2\text{s}$ とすると、もはや大脳各部位の拡散強調画像の信号強度の減衰は単一の指数曲線で近似することは困難となった。bipexponentialでのフィッティングを行うと良い近似が得られ、大脳皮質のカラムに平行な拡散のADCは速い拡散 $D_f = 0.87 \times 10^9 \text{m}^2\text{s}^{-1}$ を示す成分(相対強度 $f_f = 0.85$)と遅い拡散 $D_s = 0.14 \times 10^9 \text{m}^2\text{s}^{-1}$ を示す成分(相対強度 $f_s = 0.15$)の2成分に分離された(図4)。さらに、カラムに直交する方向の拡散では、速い成分の D_f が減少する傾向を示した。この結果は、大脳皮質における水分子の拡散異方性は速い成分に由来することを示唆する。

上記の結果は、これまで信じられてきた、神経細胞内外の水分子が速い交換状態にあるという仮説と相反する。ここで得られた結果から細胞内外の水の遅い交換を仮定できるとすれば、 D_f 、 D_s はそれぞれ細胞外、細胞内の拡散に対応すると考えられる。したがって、脳皮質で認められた異方性は細胞外の水分子のカラム構造まわりでのtortuosityの違いに由来すると解釈できる。しかし、観測された遅い成分と速い成分の比率(0.15:0.85)は、脳において0.8:0.2とされる細胞内外の比率とは逆転しているため、これらを直ちに細胞内外のコンパートメントに帰属できるか否かは更なる検討を要する。

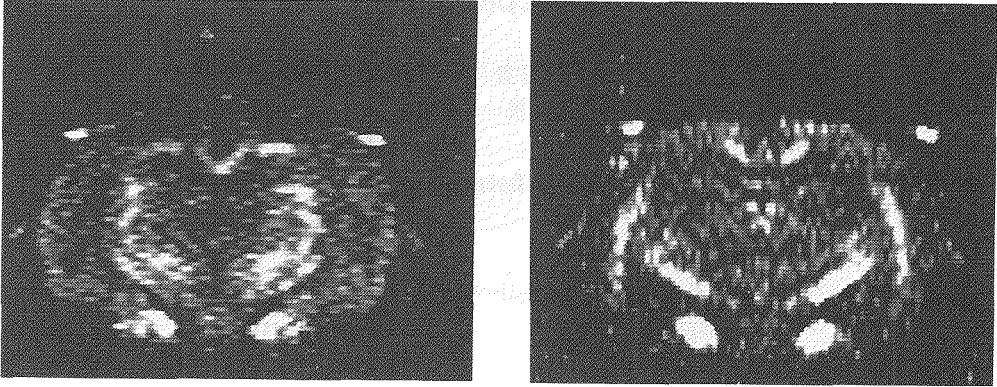


Fig.1. Diffusion weighted images of a rat brain (coronal slice). The diffusion gradient was applied along Y axis (vertical) in the left image, and along X axis (horizontal) in the right one. b-factor was $2.90 \times 10^9 \text{ m}^2\text{s}$ ($G_D=58.47\text{mT/m}$, $\delta = 9\text{ms}$, $\Delta = 112\text{ms}$).

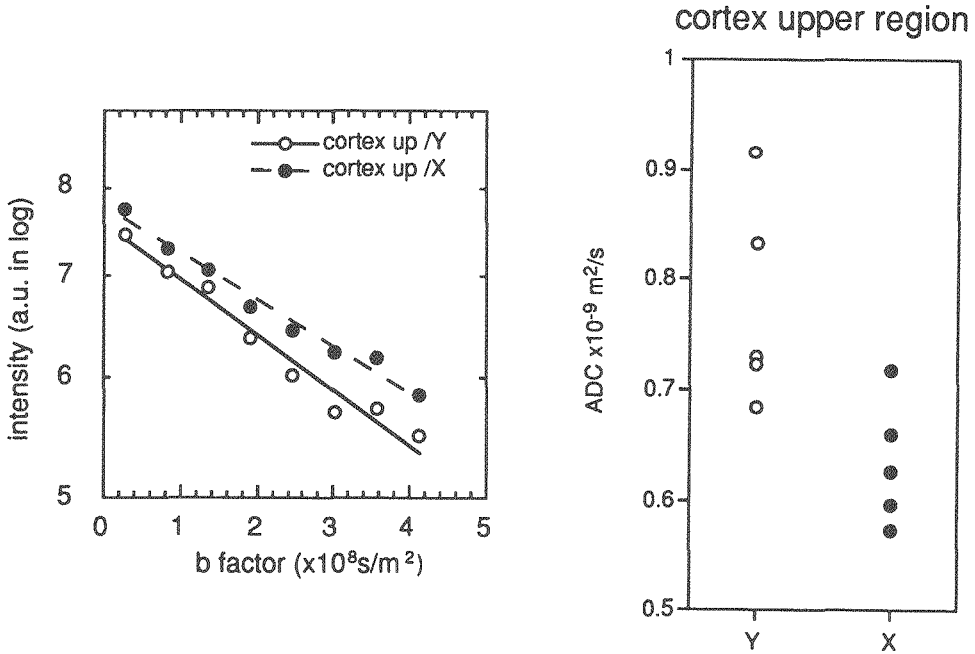


Fig.2(left). Signal attenuation at the upper region of the cortex of a rat brain obtained in the diffusion-weighted stimulated echo images with the b-factor up to $4.11 \times 10^8 \text{ m}^2\text{s}$. Diffusion gradient applied along Y direction (○) is parallel, and along X (●) is perpendicular to the column of the cortex. A solid and a broken line show the regression line assuming a monoexponential attenuation.

Fig.2(right). ADC values at the upper region of the cortex of 5 normal rats calculated by a monoexponential fitting to the data obtained from diffusion-weighted images with the diffusion gradient along Y or X direction.

cortex upper region

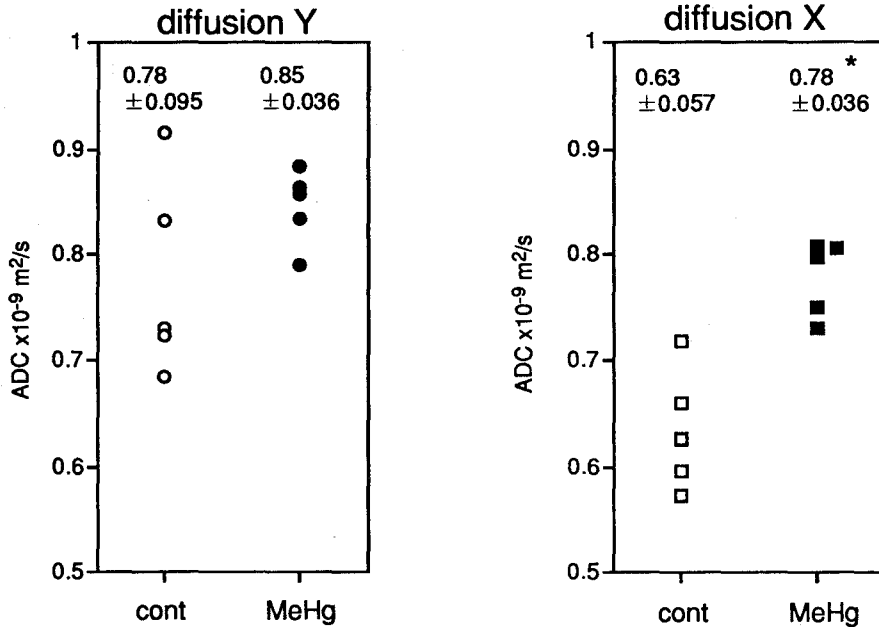


Fig. 3. ADC values at the upper region of the cortex of the brain of 5 normal or 5 methylmercury-intoxicated rats. The left frame shows results obtained with the Y-diffusion gradient (parallel to the column), and the right shows those with X gradient (perpendicular to the column).

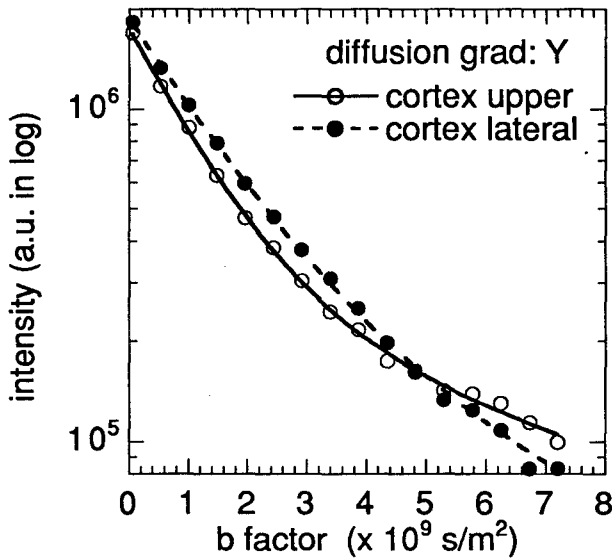


Fig. 4. Signal attenuation at the upper or lateral region of the cortex of a rat brain with the b-factor up to $7.21 \times 10^9 \text{ m}^2 \text{ s}$. A solid and a broken line show the regression line assuming a biexponential attenuation.

(¹生物研・²農工研・³食総研・⁴Baylor College) ○小泉美香¹・
狩野広美¹・五十部誠一郎²・石田信昭³・C.F. Hazlewood⁴

Restricted Diffusion of Cell-associated Water in Germinating Morning Glory Seeds Exposed to Electric Field

Mika KOIZUMI¹, Hiromi KANO¹, Seiichiro ISOBE², Nobuaki ISHIDA³ & Carlton F. HAZLEWOOD⁴

¹National Institute of Agrobiological Resources, ²National Research Institute of Agricultural Engineering, ³National Food Research Institute, Tsukuba Science City, Ibaraki 305, Japan & ⁴Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA

Morning glory seeds in dry condition were exposed to electric field. Effects of the treatment on physical states of cell-associated water in the germinating seeds were observed by ¹H-NMR imaging and restricted diffusion measurements.

Diffusion-weighted images of both treated and untreated seeds were measured by the pulse gradient stimulated-echo method. Water movement is considered to occur through partly permeable cell membrane in untreated seeds. Maximum of water transport rate in the seed reached that of pure water. The treatment is considered to perturb membrane systems and cell functions.

私たちを取り巻く環境には電場が溢れている。この電場は生体に様々な影響を与えると考えられ、診断や治療など医療の場にも用いられているが、その作用の実態については明らかとは言えない。これは電場が生体に与える影響が多岐にわたるとともに、通常の状態ではその変化が微小で検出し難いことが一因であると思われる。一方、生体において細胞中の自由水は、生命活動を支える各種の反応に必要な物質や熱を移動させるための媒体であると同時に、細胞膜やその他の細胞構成物質によってその動きを規制されている。このことから、自由水の状態は、細胞の生理状態をよく反映していると考えられる。

本研究では、乾燥状態で電場処理を行うと発芽率が低下することが知られているアサガオ種子を材料として、その吸水、発芽過程における制限拡散測定により細胞中の水の動態を調べ、乾燥種子に与えられた電場処理の影響を検討した。

<材料及び方法>

アサガオの乾燥種子に、発芽率が50%に低下する強さの電場処理(15 kV/3 cm, 60 min)を施した。これを湿ったろ紙上にまき、25℃で48時間培養し、サンプルとした。

キーワード: アサガオ、電場、水、制限拡散、¹H-NMR イメージング

こいずみみか、かのひろみ、いそべせいいちろう、いしだのぶあき、Hazlewood C.F.

測定は 270 MHz 超伝導 NMR スペクトロメーター (JEOL GSX-270WB) に装着可能なマイクロイメージング装置と自作の磁場勾配発生装置を用いて行った。¹H-NMR イメージは 2D-FT 法により、拡散イメージは Pulse gradient spin-echo 法 (磁場勾配の強度は 278 mT/m で 3 ms、拡散時間は 12 ms) により測定した。

制限拡散は、Pulse gradient stimulated-echo 法により拡散時間を変えて測定した。更に、Y 軸に 89 mT/m の磁場勾配を与えて選択励起を行い、画像の Y 軸中央部の X 軸に平行な線に沿った巾 1 mm の部位における制限拡散の一次元プロファイルを測定した。このデータをマイクロコンピューターに転送し、Tanner のモデル (1978) を Meerwall & Ferguson (1981) が変形した式に非線形最小自乗法を用いて当てはめ、水の移動速度 (Do)、コンパートメントサイズ (a) 及び膜透過性 (D/Do) を求めた。

<結果及び考察>

拡散時間を 13, 61, 111 ms と変えて測定した電場処理 (左) および未処理 (右) のアサガオ種子の ¹H-NMR イメージ (上)、Pulse gradient stimulated-echo 法で測定した拡散イメージ (中)、そして Stejskal & Tanner の式により計算した拡散係数イメージ (下) を Fig. 1 に示す。¹H-NMR イメージを見ると、未処理の種子

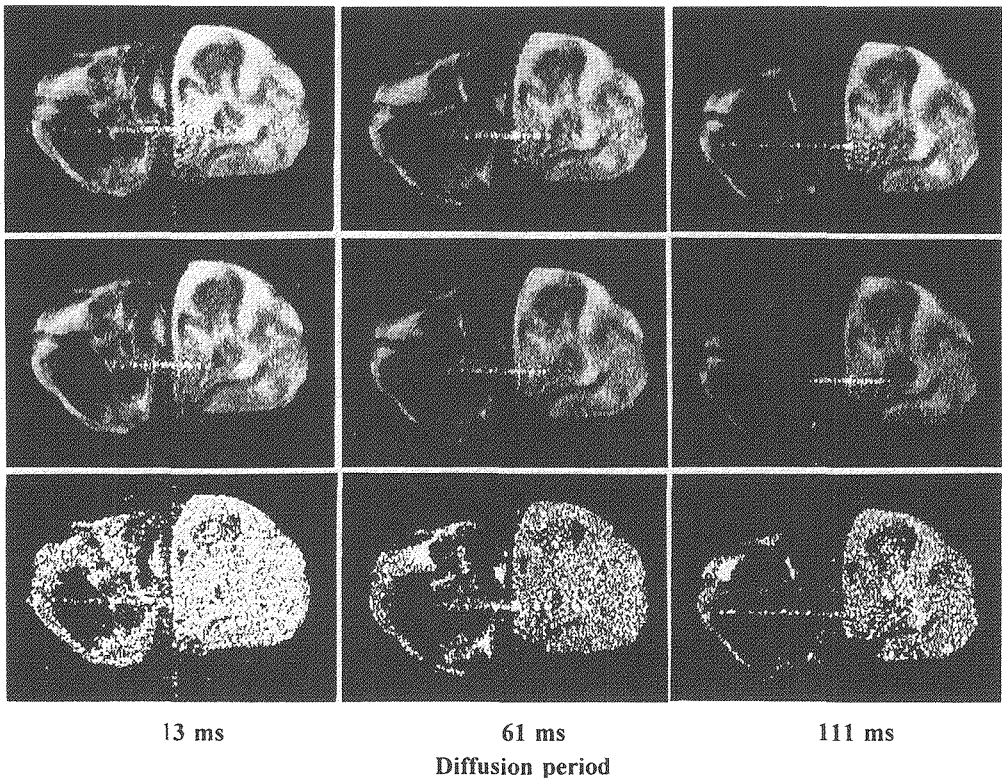


Fig. 1 ¹H-NMR images (top), diffusion-weighted images (middle) and diffusion coefficient images (bottom) of the germinating morning glory seeds measured by the pulse gradient stimulated-echo method with diffusion times of 13, 61 and 111 ms. The left seed of each image is treated with the electric field of 15 kV/3 cm for 60 min and the right one is untreated.

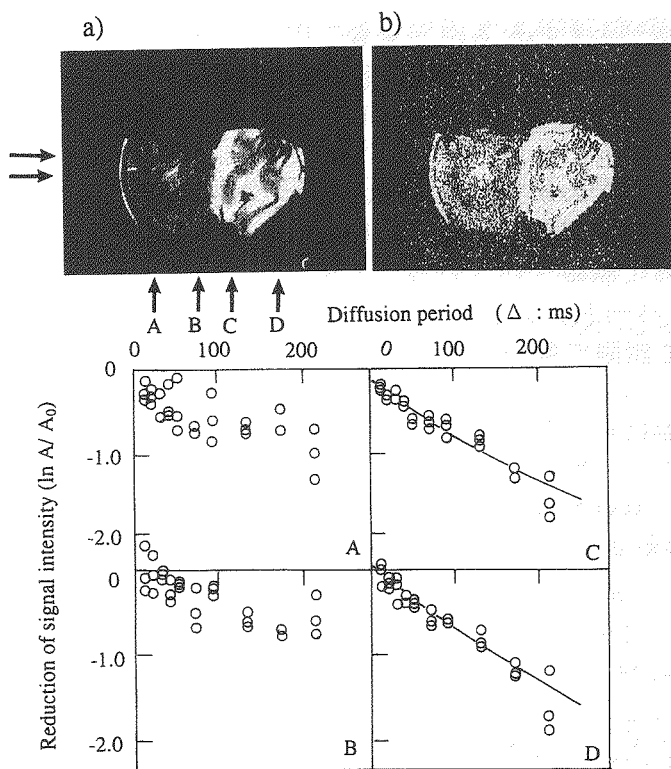


Fig. 2 An $^1\text{H-NMR}$ image (a) and a diffusion coefficient image (b) of the treated (left) and untreated (right) seeds measured by the pulse gradient spin-echo method (top), and curve fitting analysis of one-dimensional profiles at positions indicated by arrows A, B, C and D on the $^1\text{H-NMR}$ image (bottom). Restricted diffusion measurement was carried out by the pulse gradient stimulated-echo method combined with selective excitation using various diffusion times. The horizontal narrow area between the arrows (left side of images) was selectively excited.

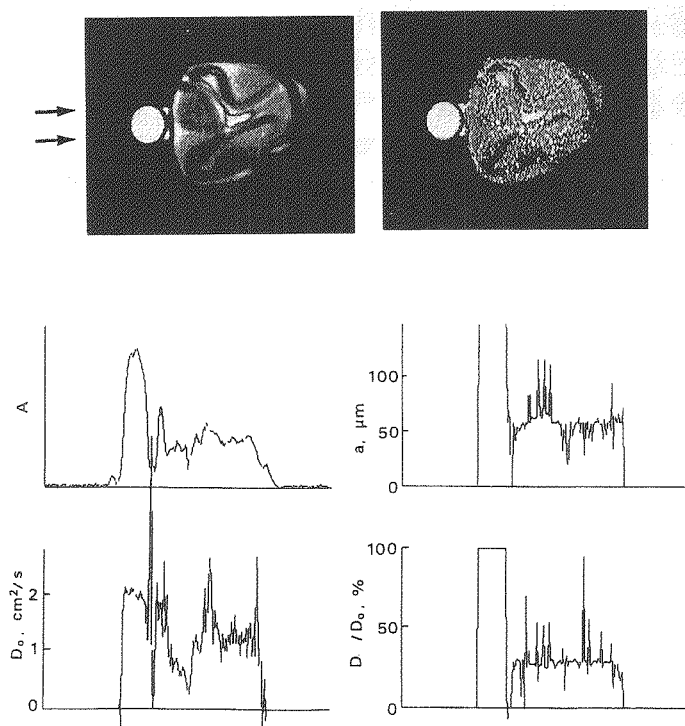


Fig. 3 An $^1\text{H-NMR}$ image (left) and a diffusion coefficient image (right) of an untreated seed with distilled water in a capillary tube (top), and one-dimensional profiles of amount of water (A), transport rate of water (D_0), compartment size (a) and membrane permeability (D/D_0) (bottom). The measurements were carried out by the same method as Fig. 2.

では子葉が折り畳まれている構造がよくわかるが、電場処理した種子では全体にシグナル強度が弱く、部分的に子葉や葉脈が見える程度であった。どちらの発芽種子も含水率は73%と同じであるので、電場処理した種子では水の存在状態が変化し、自由水が減少しているものと思われる。

拡散係数イメージを見ると、どちらのサンプルにおいても拡散時間13 msの時にイメージ強度が最も強く、拡散時間が長くなるに従って低下した。このことは、水の動きが細胞構造によって制限されていることを示している。そこで膜構造によって仕切られたコンパートメントのサイズと膜透過率を知るために、拡散時間を16段階に変えて制限拡散の一次元プロファイルの測定を行った。

$^1\text{H-NMR}$ イメージ (Fig. 2a) の左に示す矢印の間を選択励起し、Pulse gradient stimulated-echo 法で拡散時間を変えて測定した時のシグナル減衰 $\ln(A/A_0)$ を拡散時間に対してプロットすると、未処理種子では緩くカーブした曲線 (Fig. 2C, D) となり部分的透過性を持つ膜を通して細胞の水が移動していることを示した。一方、電場処理した種子ではプロットがばらつき、Meerwall & Ferguson の式にフィッティングする事が出来なかった (Fig. 2A, B)。未処理種子と同じ水分含量であるにもかかわらず $^1\text{H-NMR}$ イメージで局所的にしかシグナルが出ないことを考え合わせると、以下のように考えることが出来る。健全な種子では膜構造の存在によって一定秩序のもとで吸水が進むが、電場処理されると部分的に膜が壊され、そこに侵入した水が露出した貯蔵物質にランダムに吸着し貯蔵物質の膨張をまねく。このため大部分の水は吸着水となり、イメージ強度は低下する。また、貯蔵物質の膨張により更に膜の破壊が拡大され、組織の構造がヘテロになる。こうして磁場が不均一となり、制限拡散測定においてシグナル減衰が著しく変動するようになるのではないかと思われる。

次に、未処理種子の制限拡散を純水を入れたキャピラリーとともに測定し、水の移動速度 (D_0)、コンパートメントサイズ (a) 及び細胞膜の透過性 (D/D_0) を求めた (Fig. 3)。コンパートメントサイズはおよそ $50 \mu\text{m}$ 前後、膜の透過性は35%程度で、組織による大きな変動は見られなかった。水の移動速度は $0.3 \sim 2.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ と場所により大きく変動し、特に主脈や表皮の部分では純水と同程度の高い移動速度を示した。高濃度の溶質を含む細胞内においてこのように高い移動速度を示すのは、代謝によって生じた熱や、膜などの運動によって水の動きが高められているためと思われる。

<文献>

Tanner J.E. (1978) *J. Chem. Phys.* **69**: 1748-1754.

Meerwall E. & Ferguson R.D. (1981) *J. Chem. Phys.* **74**: 6956-6959.

検出位相を掃引する回転座標系イメージング法

電子技術総合研究所 超分子部 生体核磁気計測ラボ

○服部峰之、清水秀明、守谷哲郎

Rotating-frame imaging method with phase-sweep detection

Mineyuki Hattori, Hideaki Shimizu, and Tetsuo Moriya
Electrotechnical Laboratory, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN

A new faster rotating-frame imaging method with sweeping a phase of the reference signal during the detection period is proposed. The schematic and theoretical descriptions of this method are presented. The spectrometer system including the probe with a saddle coil and a surface coil and the variable phase synthesizer was constructed.

〈序論〉 回転座標系イメージング実験においては、表面コイルからの距離(x_1, x_2)に依存した、ラジオ波磁場強度の勾配を位置情報のエンコードに利用する。Houltによる回転座標系ズーグマトグラフィ[1]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た二次元イメージングであるが、ラジオ波磁場勾配パルスの長さを段階的に変えた、多数回の励起を繰り返している。この振幅変調を基本とした、高速型の回転座標系イメージング法は、繰り返し待ち時間をとらないで断続的にラジオ波磁場勾配パルスを印加し、nutaton信号を擬FIDとして得る実験として、提案されている[2,3,4]。位相変調回転座標系イメージングは、一軸方向に勾配をもった x' 軸 θ 度パルスにより $y'-z$ 軸上にフリップ角分布として展開した後、 y 軸90度パルスにより $x'-y$ 面上に倒し(位相変調)、 θ を段階的に変えた一連のこのシーケンスを行い、一次元の化学シフト分布を得ている[4,5]。この従来法では、検出器の位相が、固定されているため、複数回の励起を繰り返さざるを得なかったわけである。ここでは、検出器の位相を連続的に掃引しながら、この位相エンコードされた信号を一回の励起で高速に取り出す方法を検討し、検出位相が掃引できる分光計を製作した。Fig. 1にこの方法における、磁化の運動を模式図で表す。

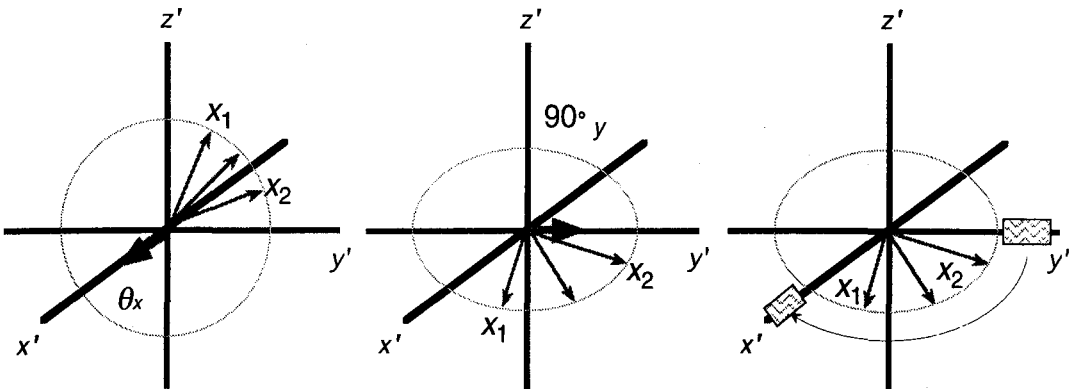


Fig. 1 検出位相を掃引する回転座標系イメージング法の概略図

<装置> Fig. 2 に分光計の概要を示す。プローブは、日本電子のプロトン・ ^{13}C 二重共鳴用 (W/B,5mm径用) を、均一ラジオ波磁場照射用・検出用の鞍型コイルとし、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も一回巻き表面コイルを、プロトン用照射・検出コイルと直交配置になるように配置した。表面コイルと鞍型コイルの2チャンネルと位相検波用の1チャンネルのRFを発生するため、発振器(アンリツMG3633A,~2.7GHz)からのRFを分配器で3系統に分け、それぞれに位相可変のシンセサイザ(Wavetek650, ~2MHz, 4ch.)からのRFを混合した。1, 2ch. の位相を固定しておいて、第3ch.の信号をJEOL分光計からのデータ取り込み開始トリガーと同期して、掃引させた。x軸方向の位置エンコード(x_1, x_2)に位相変調を採用したシーケンスをFig. 3に示す。

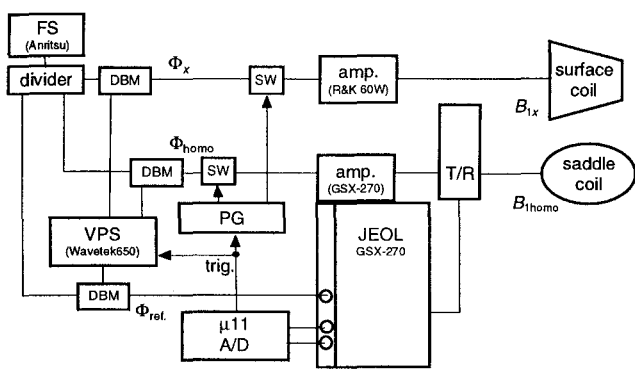


Fig. 2 検出位相を掃引する回転座標系イメージング用分光計のブロック図

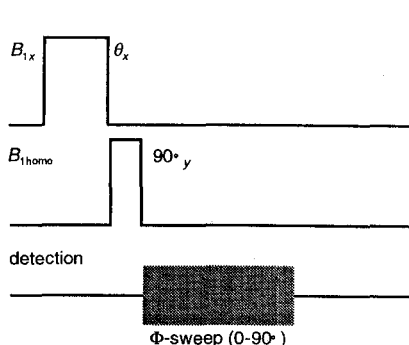


Fig. 3 実験に用いたパルスシーケンス

<結言> ラジオ波磁場勾配は、静磁場勾配に比べると、立ち上がり、立ち下がりに要する時間が格段に短いという特徴がある。ラジオ波磁場勾配を生体のような不均一な対象中に、系統だって発生することができれば、静磁場勾配の利用を基盤としている現状の高速イメージング法を越える高速な方法へ発展し得る。

<参考文献>

[1] D. I. Hoult, J. Magn. Reson. **33**, 183 (1979).
 [2] P. Maffei, P. Mutzenhardt, A. Retournard, B. Diter, R. Raulet, J. Brondeau, and D. Canet, J. Magn. Reson. **A107**, 40 (1994).
 [3] K. R. Metz, J. P. Boehmer, J. L. Bowers, and J. R. Moore, J. Magn. Reson. **B103**, 152 (1994).
 [4] R. Raulet, D. Grandclaude, F. Humbert, and D. Canet, J. Magn. Reson. **127**, 259 (1997).
 [5] 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).
 [6] P. Styles, M. B. Smith, R. W. Briggs, and G. K. Radda, J. Magn. Reson. **62**, 397 (1985).

P77

マルチスライス HSQC 法を用いた高感度 *In Vivo* ^{13}C 代謝物イメージング

○渡邊英宏¹, 梅田匡朗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

High Sensitive *In Vivo* ^{13}C Metabolite Imaging Using Multislice HSQC

H. Watanabe¹, M. Umeda¹, Y. Ishihara¹, K. Okamoto¹,

M. Oda², K. Oshio², T. Kanamatsu², Y. Tsukada²

¹Toshiba R&D Center, ²Institute of Life Science, Soka University

Multislice HSQC sequence is proposed. This sequence is a multivoxel ^1H detected ^{13}C spectroscopy sequence with good peak separation and no increase of the scan time. A human volunteer brain ^{13}C spectra with proton sensitivity were obtained, using this method. After drinking glucose C-1, glutamate C-3,4 could be detected. Glutamate C-4 appeared, the appearance of Glutamate C-3 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。この ^{13}C -MRS シーケンスには、高 S/N、局所励起、良好な代謝物ピークの分離が必要であり、今年の NMR 討論会にて、我々は、これらを満足するシーケンスとして局所励起 HSQC シーケンスを発表した (1, 2)。このシーケンスの特長は、準備期の ^{13}C 反転パルスの印加時刻の工夫により、準備期の ^1H パルスを選択励起パルスとすることが可能となる点にあり、これにより局所励起が可能となる。

本研究では、上記特長に加えて、スキャン時間を増加させること無く、複数の領域の HSQC 信号を取得することが可能な、マルチスライス HSQC シーケンスを提案した。そして、ファントム実験によりその基本性能を確認し、人ボランティア試験により本方法の有用性を実証した。

2. 理論

マルチスライス HSQC シーケンス

マルチスライス HSQC シーケンスには2つの特長がある (Fig. 1)。第1の特長は、局所励起 HSQC シーケンスと同様、準備期にあり、第2の特長は、検出期にある。

準備期の特長は、 ^{13}C 反転パルスを ^1H エコー時刻および第3の ^1H パルスの 1/(4J)前に印加す

ることにより、 $1/(2J)$ よりも長い任意の ^1H のエコー時間でも、分極移動を生起させることが可能となることである。 ^1H のエコー時間TEを $(\tau+1/4J)$ とした時、すなわち $90^\circ (^1\text{H})-\tau+1/(4J)-180^\circ (^1\text{H})-\tau-180^\circ (^{13}\text{C})-1/(4J)-90^\circ (^1\text{H})$ のシーケンスにおけるIS系(^1H , ^{13}C の2スピン系)の直積演算子展開は以下の様になる。

$$\begin{aligned}
 I_z &\xrightarrow{90^\circ x(^1\text{H})} -I_y \\
 &\xrightarrow{\tau+\frac{1}{4J}} \xrightarrow{180^\circ (^1\text{H})} \xrightarrow{\tau} \frac{1}{\sqrt{2}} I_y + \frac{1}{\sqrt{2}} 2I_x S_z \xrightarrow{180^\circ (^{13}\text{C})} \frac{1}{\sqrt{2}} I_y - \frac{1}{\sqrt{2}} 2I_x S_z \\
 &\xrightarrow{\frac{1}{4J}} \xrightarrow{-2I_x S_z} \xrightarrow{90^\circ y(^1\text{H})} 2I_z S_z
 \end{aligned} \tag{1}$$

すなわち、Fig. 1のシーケンスでは、準備期にてx, yの空間2次元で局所励起化された領域内で $2I_z S_z$ のコヒーレンスが生成される。続いて印加される ^{13}C パルスにより ^{13}C の1量子コヒーレンスが生起され、 ^{13}C 化学シフトが展開する。引き続き ^{13}C パルス、 ^1H パルスを印加して ^1H に分極を戻して ^1H 感度で観測を行う。

第2の特長は、検出期のマルチスライスである。展開期後の ^{13}C パルス印加により、空間2次元局所領域内で $2I_z S_z$ のコヒーレンスが生成される。これは、 ^1H 、 ^{13}C 共に縦磁化の状態であるため、緩和時間が長く観測不可の状態である。すなわち、マルチスライスが可能となる。まず、検出期の第1の ^1H 選択励起パルスの印加により、第1の局所領域V1からのHSQC信号が観測される。この信号をディフェーズした後、第2の ^1H 選択励起パルスを印加して第2の局所領域V2からのHSQC信号が観測される (Fig. 1)。

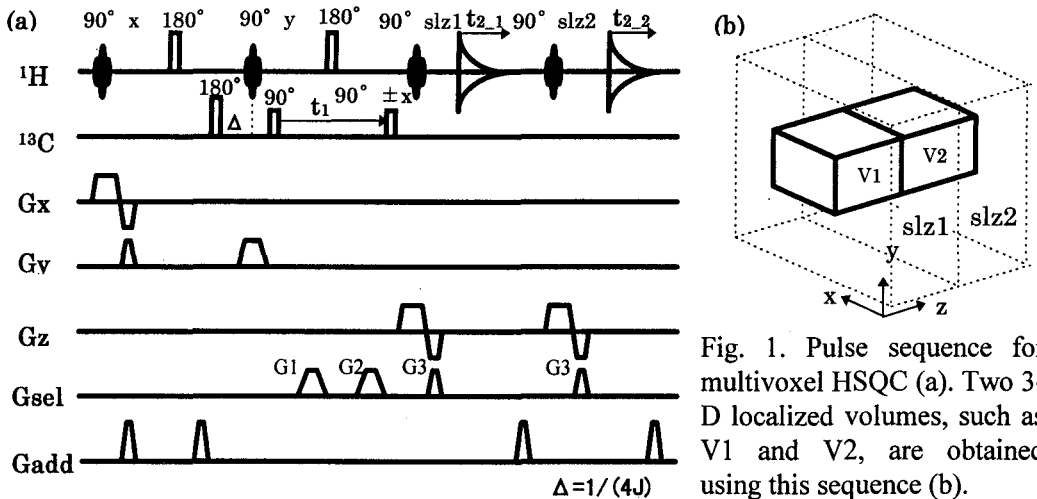


Fig. 1. Pulse sequence for multivoxel HSQC (a). Two 3-D localized volumes, such as V1 and V2, are obtained using this sequence (b).

3. 方法

ファントム実験および人ボランティア実験は、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。

ファントム実験

RF コイルには、それぞれ 85 MHz (^1H) と 21 MHz (^{13}C) に同調をとった 2 つの直交配置した鞍型コイル (直径 140 mm) を用いた。この RF コイル内に、 $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸 (1 g) と $[1-^{13}\text{C}]$ エタノール (1 g) を Z 方向に並べて配置した。 $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸および $[1-^{13}\text{C}]$ エタノールはそれぞれ Fig. 1 で示した V1、V2 領域内に配置した。

マルチスライス HSQC シーケンスの条件は、 $128 \times 128 \times 2$ ($F1 \times F2 \times \text{Slice}$)、TR 500 ms とした。

人ボランティア試験

本試験は創価大学生命科学研究所倫理委員会の承認を得て実施した。対象は健康成人ボランティアで、試験について文書にて同意を得た。本試験に先立ち事前検査として、問診、血圧検査、血液検査、尿検査、糖負荷試験、心電図計測、MRI 撮像を実施し、糖尿病などの異常がないことを確認した後、1ヶ月以内に本試験を実施した。また、本試験後1ヶ月以内に事後検査として、MRI 撮像を除いて事前検査と同様の検査を実施し、異常が無いことを確認した。

本試験で用いた試薬は、市販の $[1-^{13}\text{C}]$ D グルコース (アイソテック社製) を体重 1 kg 当たり 1 g 溶かした 30 % 水溶液で、経口にて服用してもらい、その後後頭部領域からのマルチスライス HSQC 信号の取得を行った。

RF コイルには、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 (^1H : 直径 300 mm、 ^{13}C : 直径 250 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 (直径 100 mm) を用いた。

マルチスライス HSQC シーケンス条件は、局所領域サイズが $35 \times 30 \times 35 \text{ mm}^3$ 、観測時間 15 分、TR 0.9 s とした。空間 2 次元の分布を求めるため、1 方向にエンコード勾配磁場パルスを加え、マトリックスサイズを $128 \times 128 \times 4 \times 2$ ($t1 \times t2 \times kx \times \text{slice}$) とした。データ収集後、F1、F2 方向に 0 フィリングを行い、 $256 \times 256 \times 4 \times 2$ とした。コヒーレンス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、勾配磁場強度は 0.85 G/cm、 G_2 印加時間は 20 ms とした。

4. 結果

ファントム実験

V1 スペクトルには $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸 (1 g) のピークが、V2 スペクトルには $[1-^{13}\text{C}]$ エタノールのみのピークが得られた (Fig. 2)。この結果、マルチスライス HSQC シーケンスにより、複数領域の ^1H - ^{13}C 相関スペクトルが得られることが確認できた。

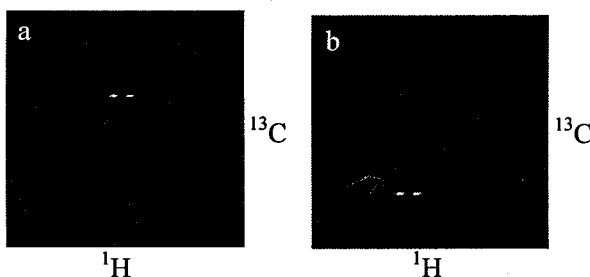


Fig. 2. Multislice HSQC spectra. Only Acet-2 peaks were shown in the V1 spectrum (a) and only Eth-1 peaks were shown in the V2 spectrum (b).

人ボランティア試験

人後頭部の4領域からのHSQCスペクトルを得ることができた。グルコース投与後、まず4位のグルタミン酸が増加した。これに続き、3位のグルタミン酸のピークが認められた (Fig.3)。この結果、マルチスライス HSQC シーケンスにより人脳内のグルコース代謝の観測が可能であることが実証できた。

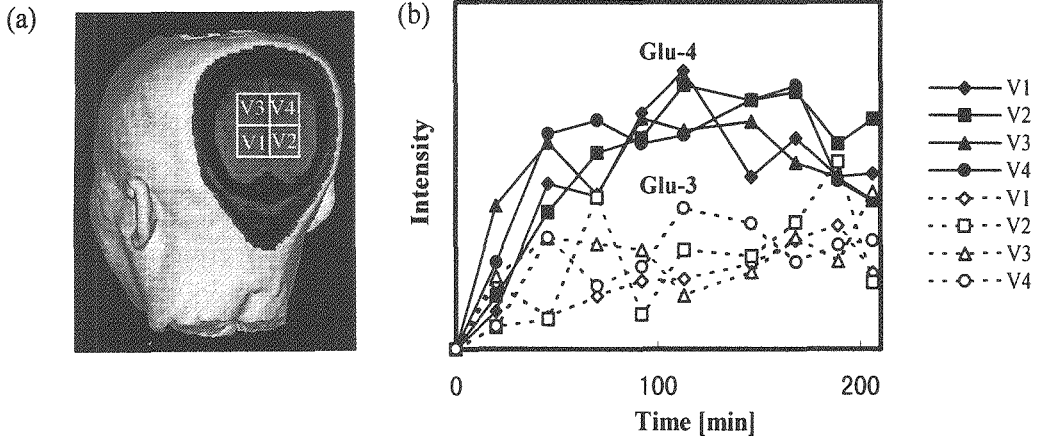


Fig. 3. The human volunteer 3-D image (a) and Glutamate C-3,4 labeling timecourses (b).

5. 結論

マルチスライス HSQC シーケンスは、スキャン時間を増加すること無くマルチボクセル ^{13}C スペクトロスコピーが可能な方法であり、高感度、良好な代謝物ピークの分離という特長を有する。本方法は、*in vivo* ^{13}C スペクトロスコピーの有力な方法となり得る。

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. H. Watanabe, et al., 4th Annual Meeting, ISMRM, 1220, 1996
2. 渡邊英宏 他, 第35回NMR 討論会要旨集, 377, 1996

in vivo, ^{13}C -MRS&I, HSQC, マルチスライス, ^1H 観測法

わたなべひろ, うめだまさあき, 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, つかだやすぞう

A Search for an Optimal Pulse Sequence of Chemical Shift Imaging
for Weak Signals in Biological Systems at High FieldHideto Kuribayashi, Yoko Kanazawa
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

We have improved the method of chemical shift imaging and compared the sensitivity and quality of images acquired from spin echo(SE), fast spin echo(FSE), gradient echo(FLASH) and spectroscopic imaging(PRESS). Experiment with the phantom and 5-FU administered mice has shown that FSE is the most high sensitive method.

<はじめに>

小動物体内に存在する低濃度薬品や標識化合物の動態をモニタするために、高磁場(9.4T)装置による化学シフト画像を試みてきた。高磁場であることにより、シグナルの分離による化学シフト選択が容易になり、測定の高感度化が可能であるため測定の時間的分解能が期待できる。しかし、磁化率アーティファクトの問題が深刻になる。また、高い共鳴周波数によるRF出力は、測定対象物の発熱をまねく可能性もある。化学シフト画像を薬物代謝の研究に応用するならば、代謝過程を追跡できる時間分解能が特に要求される。また、実験動物は個体差を少なからず持つために、一検体につき代謝物全ての情報を経時的に得ることが実験誤差の低減につながる。本研究ではフッ素化合物化学シフト測定法の比較検討を、高磁場装置で測定可能なマウスの5-FU代謝追跡を用いて行った。

<実験方法>

0.025M トリフルオロアセトアミドを生理食塩水とn-プロパノール(混合比6:4)の混合溶媒に加えた16mlの溶液ファントムを用いて、測定条件の最適化を行った。溶媒と混合比は生体組織の水分の比率より決定した。

臓器ファントムとしては、5-フルオロウラシル(5-FU)投与マウスの摘出臓器を用いた。内径28mmのプラスチックチューブに上記の混合溶媒をいれ、その中に内径9mmのプラスチックチューブに入れた臓器を固定した(F- β -アラニン(FBAL) 6mmol/kg)。

*In Vivo*測定としては、MH134腫瘍細胞を右脇下に移植した9~10週齢のメスC3Hマウスに4時間の絶食後、0.5% CMC溶液に懸濁させた2mmol/kg 5-FUを経口投与した。エーテル麻酔下NMRプローブ内にマウスを固定し、測定中は0.5% Halothaneで麻酔を維持した。¹H SE法でプロトン形態画像を得、¹⁹Fスペクトルにより化学シフトを決定した後、¹⁹F画像測定を行った。測定後直ちに腫瘍あるいは臓器を摘出し、加熱により酵素失活させ、¹⁹Fスペクトルを用いて摘出臓器中の¹⁹F化合物の定量を行った。また、測定後の臓器は画像の臓器

化学シフト画像、マウス、磁化率、フッ素化合物

くりばやし ひでと、かなざわ ようこ

ファントムとして使用した。

NMR測定には、Varian社製UNITY INOVA400と縦型で9.4Tボア径89mmの超電導磁石を用いた。画像測定には外径40mm高さ35mmの $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ tunable volume coilと自己遮蔽型勾配コイルを使用した。

<パルス系列>

画像測定の基本的なパルス系列はスピンエコー法とグラジエントエコー法に大別されるが、化学シフト選択画像には、それらに加えて磁場勾配を利用した局所スペクトルから画像を構成する方法が用いられている。生体内の微量化合物を対象として、高速測定の可能なfast spin echo法およびFLASH法と、短い T_2 シグナル用に工夫したPRESS法を用いた。また、spin echo法を画質の比較のため用いた。画像測定でのスライス選択は、低濃度化合物を対象としているために行わなかった。

1. Fast Spin Echo法(FSE)

最初の 90° パルスで化学シフト選択を行い、パルスサイクルごとに選択周波数を変え、4つの化学シフトに対応する画像(FU,FUPA+FBAL,Fnuc,Halothane)の同時計測の能力を上げた。実働パルス系列でのTRは0.25sであるが、特定の周波数でのTRは1.0sである。位相エンコードステップは、k-spaceの中心から外側へ磁場勾配の符号を交互に変えたものである。esp=6ms。データ64x16。スライスなし。etl=16。

2. Gradient Echo法(FLASH)

ファントム実験では通常のFLASH法でパルス幅2.5msのgaussianパルスを用い化学シフト選択を行った。プレサチュレーションパルスで不要シグナルを飽和させ、その縦磁化が回復しない間に短いTR(=15ms)で位相エンコードステップを全てサンプリングする方法も試みた。この場合、励起されたシグナルの縦磁化が回復するまで $3T_1$ かかると見積り、選択周波数の切り替えは4sごとに行い、その順番は化学シフト位置の関係でシグナルが飽和される必要のないFUPA+FBALとHalothaneをひとつおきにはさみ飽和されたシグナルの縦磁化の回復を図った。TE=1.5ms。フリップ角 15° 。データ64x16。

3. 局所スペクトル法(PRESS)

磁場勾配を利用した局所スペクトルの中で、PRESSは比較的長い T_2 をもつシグナルを対象とした測定法として知られている。しかし上記のパルス系列と測定条件をそろえるならば三次元スライスは必要でないため、 90° – 180° の単純なスピンエコーを使用し、TEを3.2msまで短縮できた(パルス幅1ms)。一方、STEAM法は3つの 90° パルスを必要とするためにTEは4.5ms以上となる(パルス幅1ms)。その結果、ファントム実験でSTEAM法に比べ高感度測定が可能になった。 ^{19}F NMRの化学シフト分布領域は ^1H や ^{31}P のそれよりも大きく(^{19}F :800ppm, ^1H :20ppm)、今回の系においては5000Hz以上離れた信号が存在するために1msのsincパルス(選択幅6000Hz)では観測が困難であり、中心周波数を変える方法を必要とした。動物実験では ^{19}F 薬物の全身分布を得るために、5mmx5mm, 5x9 voxelのサンプリングを行った。サンプリングの順番はマルチスライス法で用いられるスライス面をひとつおきにサンプリングする方法を二次元に応用し、一つのvoxel毎に中心周波数を変えて行った。実働パルス系列でのTRは0.17sである。

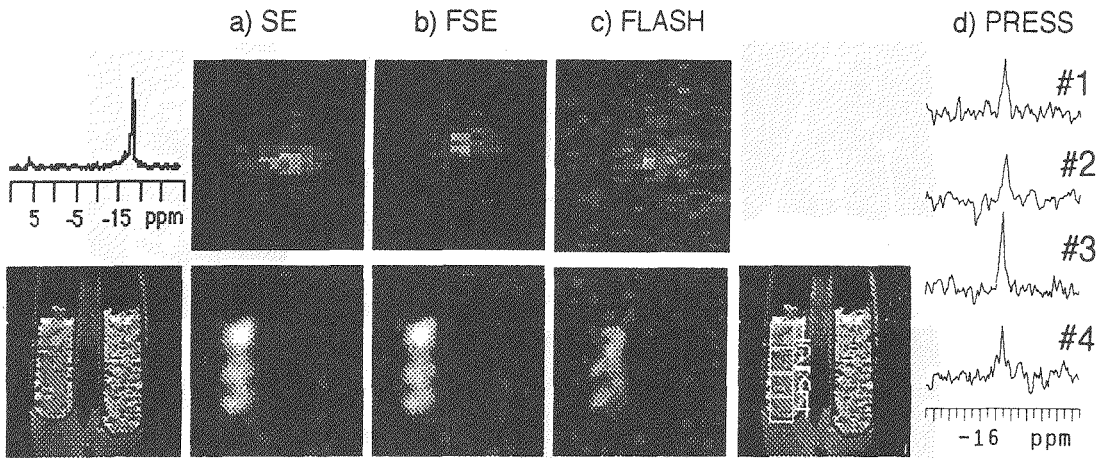


Fig.1 ^1H image ^9F spectrum and ^{19}F k-spaces and images with a) SE, b) FSE, c) FLASH and d) PRESS

<結果と考察>

臓器ファントムの結果を Fig.1 に示す。肝臓の臓器ファントム (Fig.1 2本の 10mm 管の左) で各パルス系列により得られる画像の質を比較した。SE 法 (Fig.1a) と FSE 法 (Fig.1b) は同じ積算回数であり、FSE 法の積算時間 (3min) は SE 法の 16 分の 1 である。データの k 空間表示を比較すると、FSE 法の位相エンコード軸のエコーは T_2 減衰が認められ、また FSE 画像では若干 S/N が SE 法に比べ劣るが、画質に差はみられなかった。なお SE 法においても ^{19}F 画像に濃度分布があるのは、この臓器は摘出後そのままサンプル管に入れたため、臓器内で FBAL の分布があるものと考えられる。FLASH 法 (Fig.1c) は SE 法と同じ積算時間 (45min) である。FLASH 画像は SE 法に比べて明らかに S/N が劣っている。4つの voxel の PRESS 法も SE 法と同じ積算時間 (45min) である。4点での PRESS 法では十分な S/N が得られているが、Fig.1 の PRESS スペクトルの S/N は 6 であり SE 画像の S/N が 15 であるので、SE 画像のほうが高感度である。また動物測定では、薬物の全身分布を見るために 5×9 voxel のサンプリングを行うため、同じ S/N 比を得るためには約 10 倍の時間が必要である。Fig.1d の PRESS スペクトルの S/N は 6 以下であり、45 分で 5×9 voxel サンプリングでは S/N が 3 以下になりシグナルの識別が困難となる。

動物実験の結果を Fig.2,3 に示す。投与後 17 分より 10 分間 FSE 法で ^{19}F 画像測定を行い、胃の位置に FU、肝臓の位置に FUPA または FBAL の画像が (Fig.2c)、Halothane の信号は体のほぼ全領域から得られた。その後 FLASH 法で 12 分積算した。FUPA+FBAL は画像測定前後のスペクトルからみて濃度が上昇しているが、FLASH 画像の S/N は FSE 画像のものより低く、臓器ファントムの結果と一致する。

投与後 55 分より 62 分間 PRESS 法で ^{19}F スペクトル測定を行い、FU 領域では信号とみなせるものではなく、FBAL 領域では Fig.3b に示した 3 領域においてシグナルが得られ、肝臓の位置に FBAL が存在することを確認できた。しかしその S/N は低く (S/N=3)、シグナルの識別が困難であった。

FSE 法が化学シフト画像法に適していることが示された。特に小動物体内における薬物代謝追跡のような時間分解能を要求する測定に有用であり、その応用が期待される。

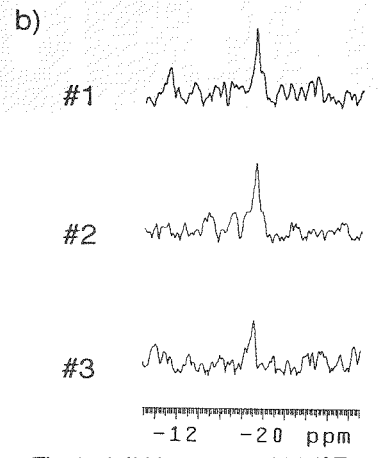
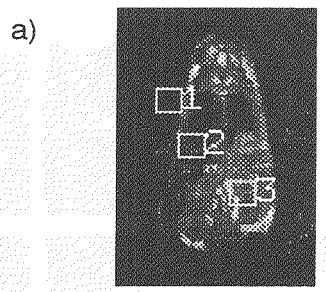
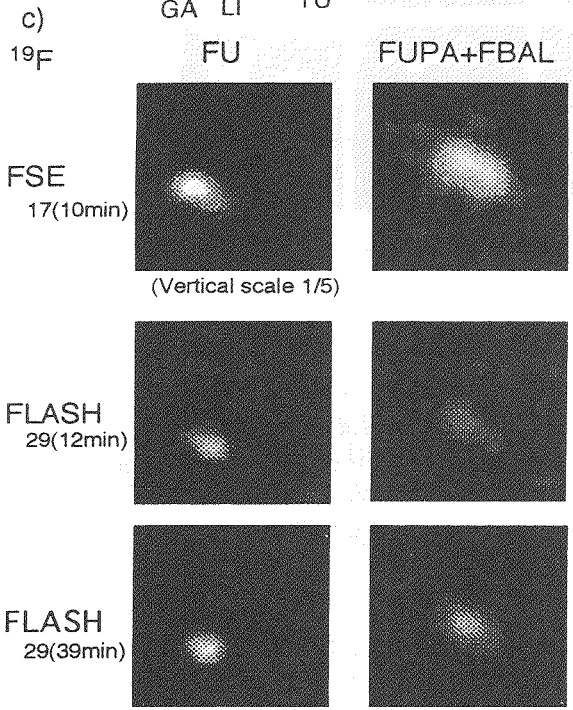
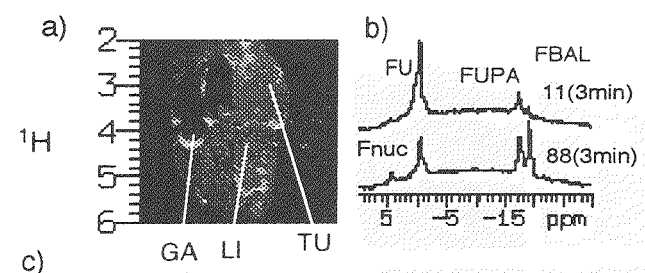


Fig.2 a) ^1H image, b) ^{19}F spectra and c) ^{19}F images from the same mouse. Starting time (data accumulation time) are shown.

Fig.3 a) ^1H image and b) ^{19}F spectra of FBAL by PRESS sequence.

NMR顕微鏡による発芽大麦における糖の消長の追跡

○石田信昭（食総研）、小川秀次郎（日本電子データム）、
小泉美香、狩野広美（生物研）

Location of sugars in barley seeds during germination by NMR microscopy.

Nobuaki Ishida¹, Hidejiro Ogawa², Mika Koizumi³ and Hiromi Kano³

¹National Food Research Institute, Tsukuba Science City, Ibaraki 305, Japan

²JEOL Datum Co. Ltd., Akishima, Tokyo 196, Japan. ³National Institute of

Agrobiological Resources, Tsukuba Science City, Ibaraki 305, Japan

¹H-NMR localized spectral imaging method combined with ¹H-NMR imaging and ¹³C-NMR spectroscopy was attempted to use as a means for tracing the distribution and fluctuation of sugars in germinating barley seeds, malts. This is important for cultivation of the crop and on the use of major material of beers and spirits. Maltose, sucrose, fructose and oils were detected in imbibed seeds by ¹³C-NMR spectra. During the first 6 day of germination, the maltose content increased. Sugars were located by ¹H-NMR images and ¹H-NMR localized spectral images in the vascular bundle of the seeds as well as in the solubilized endosperm. They were also detected in the vascular bundles but not in the mesophyll cells of the coleoptile in the shoots. The sugars were present in the basal part of the shoot, but not above 7 mm from scutellum. The data suggest that the sugars are primarily transported through the vascular bundles and, at the same time, rapidly incorporated into mesophyll cells in the leaves.

NMR顕微鏡は光学顕微鏡等が組織の光透過性や散乱といった固体の構造を基に画像を作るのに対し、組織中の溶液の分布をイメージ化するという特徴がある。また、シグナルは本質的にスペクトル情報をもっているため、単に溶液のシグナル強度によるイメージだけでなく、スペクトル情報に由来する溶媒や溶質といった化学物質の分布のイメージ（化学シフトイメージ）を得ることもできる。選択励起による化学シフトイメージは、化合物の化学シフト差を利用して単一の物質の情報を得るため、生体中の糖のように大きな水のシグナルの近くにある弱いシグナルをイメージ化することは難しく、3D-FT法による方法も測定時間が長くなる上、試料の不均一性による影響もあり利用が限られてくる。ここではもう一つの方法として、イメージ上のX軸の中央における狭い領域をY軸に沿って選択的に励起し、切り出したラインに沿ってスペクトルをとる局所スペクトル法を取り上げた。

キーワード：発芽大麦、糖、NMRイメージング、局所スペクトル、転流

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

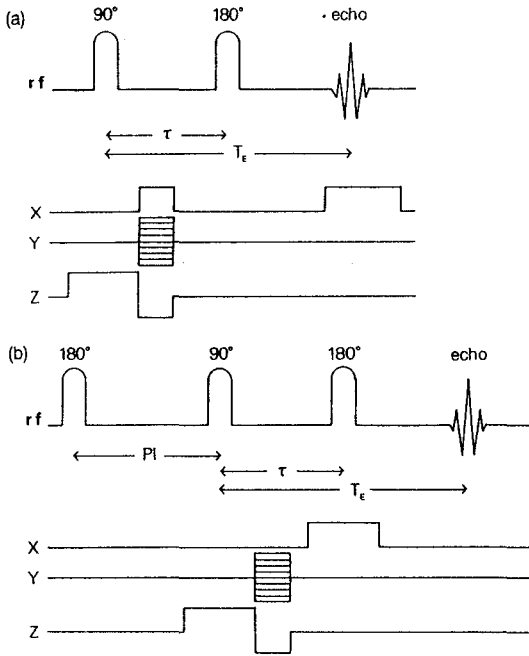


Fig. 1 Pulse sequences used for measurement of (a) ^1H -NMR images and (b) ^1H -NMR localized spectral image.

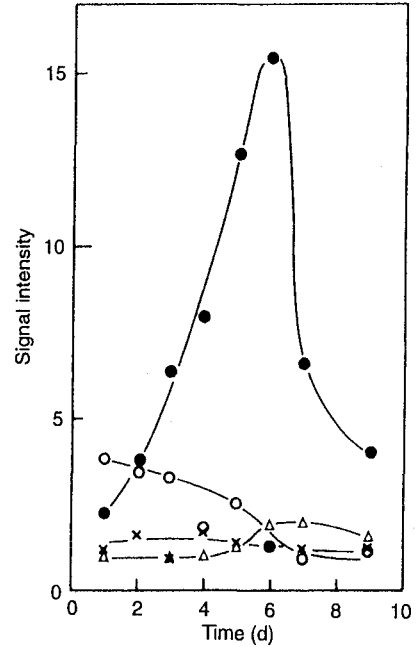


Fig. 2 Changes of sucrose, maltose, fructose and oils during the germination of barley seeds. ● maltose, X sucrose, △ fructose, ○ oils

発芽大麦では貯蔵されていたデンプンがアミラーゼにより分解されて糖が生成し、これが発育初期の根や幼芽の生長に利用される。また、発芽大麦は食品においては「モルト」として酒の発酵原料として古くより利用され、そのデンプンの分解状況は品質に重要な影響を与える。この大麦の発芽過程における、デンプンの分解と糖の生成及び分布をNMRイメージとそれに対応した局所スペクトルイメージにより追跡した。

【材料及び方法】

発芽大麦： 大麦種子(ニューゴールドデン)を湿らせたろ紙の上で発芽させ、吸水後経日的に測定を行った。

NMR測定： 270MHz超伝導NMRスペクトロメーター(JEOL GSX-270WB)に装着可能なマイクロイメージング装置と自作の磁場勾配発生装置を用いて測定を行った。 ^1H -NMRイメージは2D-FT法(Fig. 1a)によって、局所スペクトルイメージはイメージング用2D-FT法のシーケンスにおいて 180° パルスと同時にX軸に磁場勾配を与えY軸に沿ってX軸中央部1mmの範囲を選択励起するとともに、シグナル取り込み時のX軸磁場勾配を取り除いてシグナルを取り込み、一連のデータを2次元フーリエ変換する事により求めた。また、大きな水のシグナルを抑制するため 90° パルスの前に 180° パルスを入れたシーケンス(Fig. 1b)により測定を行った。 90° 及び 180° ソフトパルスは3msのsincパルスを用い、エコー時間(T_E)21ms、繰り返し時間(T_R)5s、128エンコードにより4回積算で、256 x 256マトリックスで画像を再構成した。 ^{13}C -NMRは同じNMRスペクトロメーターを用い径5mmの試料管により測定した。

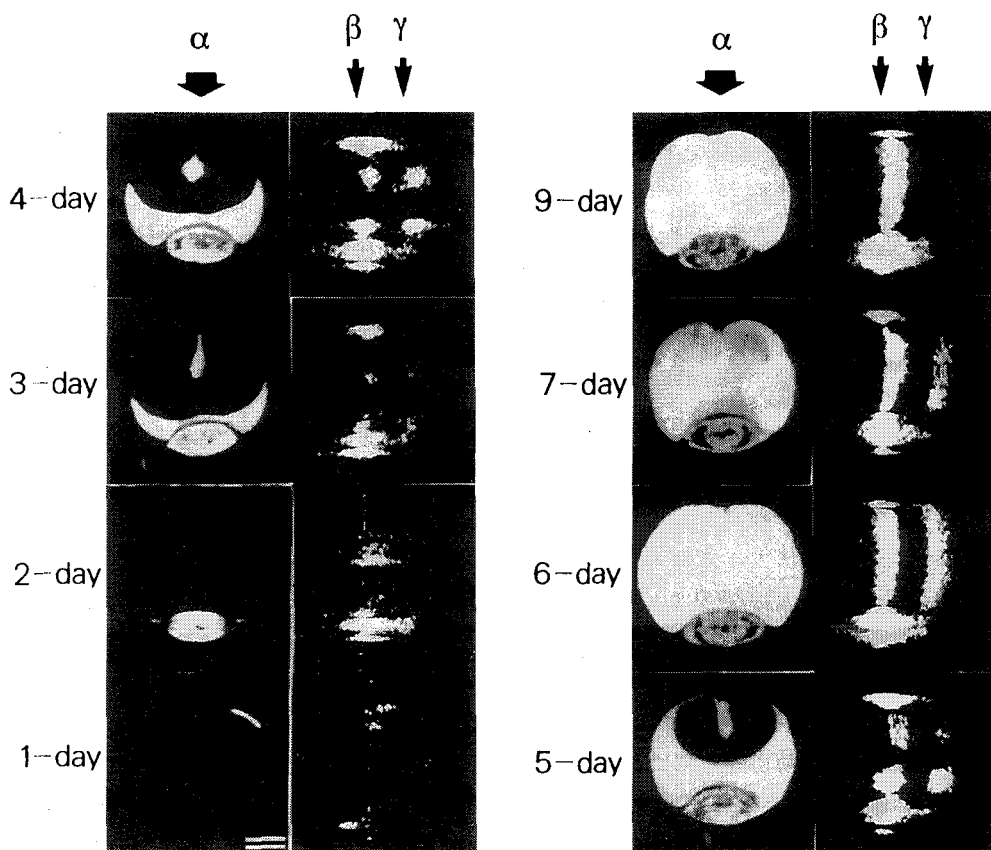


Fig. 3 Changes of (a) the ^1H -NMR and (b) the ^1H -NMR localized spectral images of barley seedlings with growth stages. The centre of the ^1H -NMR images (a) was selectively excited with a width of 1.0 mm (indicated by arrow α) for measurement of the ^1H -NMR localized spectra (b). Arrow β indicates water signals and γ sugar signals. The scale bar indicates 1 mm.

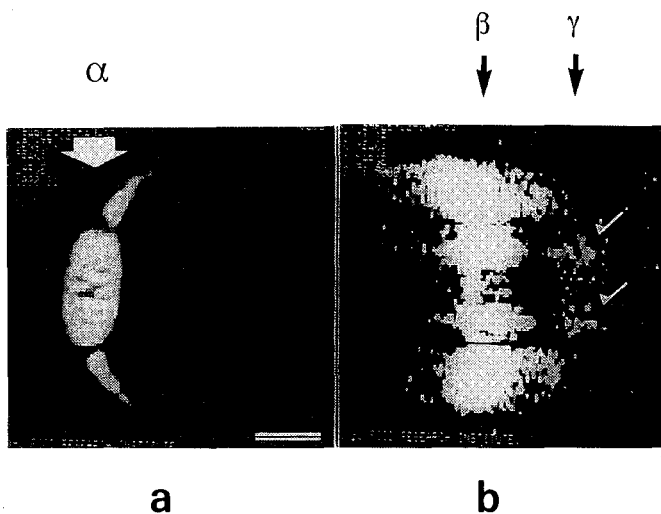


Fig. 4 (a) An ^1H -NMR image and (b) an ^1H -NMR localized spectral image produced by selectively exciting the area, indicated by arrow α , passing through the vascular bundles of the coleoptile. Arrows β and γ are the same as in Fig. 3. The scale bar indicates 1 mm.

【結果及び考察】

発芽大麦においては ^{13}C -NMRによりマルトース、シュークロース、フラクトースと油脂のシグナルが観察された。NMRシグナル強度を基にそれぞれの化合物の量の変化を示したのがFig. 2である。主要な糖であるマルトースは吸水後急激に増加し、6日後に最大に達した後、急激に減少した。

発芽過程における大麦の ^1H -NMRイメージ(a)と局所スペクトルイメージ(b)の変化をFig. 3に示した。局所スペクトルイメージは ^1H -NMRイメージ上の矢印 α に沿って1mmの範囲について測定したもので、縦軸が対応するイメージのY軸位置、横軸が化学シフトとなっている。また、イメージ強度はシグナルの強度を表す。局所スペクトルイメージ上の β は水、 γ は糖のシグナルである。

吸水2日後で幼芽のイメージが観察され、同時に幼芽の第1葉に糖のシグナルが観測された。3日後になると胚乳が溶けて胚乳部のNMRイメージが観測されるようになり、そこに糖の強いシグナルが観測されるようになった。6日目には胚乳はほとんど溶けて強いNMRイメージと胚乳全体に大きな糖のシグナルが観測された。この時点で胚乳の大部分が可溶化され糖の生成も最大になった。さらにステージが進むとNMRイメージに大きな変化は認められないが、局所スペクトルイメージの糖のシグナルは急激に少なくなり、9日後には胚乳部にはほとんど糖が認められなくなった。

Fig. 3では幼芽の糖は第1葉で観測され、子葉鞘からは観測されなかった。糖は葉や茎の中を水とともに移動すると考えられる。局所スペクトルイメージのY軸のスライス幅は1mmのため、種子の中心を測定したFig. 3では子葉鞘の左右に分かれて存在する維管束が測定にかからなかったことが考えられた。そこで、子葉鞘の維管束を通る方向の測定を行い、糖の分布と転流の様子を調べた(Fig. 4)。その結果、子葉鞘では維管束の部分からのみ糖のシグナルが観測された。

このような生きたままの生体試料を扱う場合、生理的状态を保ちながら測定するため、測定時間の短縮は非常に重要な要素となる。本報告で述べた選択励起法を利用した局所スペクトル法は、選択幅1mmと化学シフトイメージに比べX軸方向の分解能は良くないが、測定時間は短縮でき実用的に有効な方法と考えられる。

【文献】

- N. Ishida et al. (1994) Abstract of the second international conference on applications of magnetic resonance in food science. P. 34.
N. Ishida et al. (1996) *Plant Cell Environ.*, **19**, 1415–1422.

○岡本和也、梅田匡朗、石原康利、渡邊英宏、
小田正記*、金松知幸*、塚田裕三*

(株)東芝研究開発センター、*創価大学生命科学研究所

^{13}C - MRS & I of Human Brain by Oral Administration of [^{13}C] Glucose

Kazuya Okamoto, Masaaki Umeda, Yasutoshi Ishihara, Hidehiro Watanabe,

Masanori Oda*, Tomoyuki Knamatsu*, Yasuzo Tsukada*

Research and Development Center, TOSHIBA

*Institute of Life Science, Soka University

We report a primitive study of brain metabolism measurements by human brain ^{13}C -MRS following to oral administration of [^{13}C] Glc. The study protocol was reviewed and approved by the Ethical Board Committee of Institute of Life Science, Soka University. Healthy volunteers were chosen and gave their written consent after being informed about the procedure and the potential risks of the study. The study was performed using a 2T whole body MRS research system equipped by ^{13}C -direct/ ^1H -indirect observation pulse sequences and RF probes specialized for each sequence. Volunteers lay across the bed of the system and put their back of the head on the surface coil after oral administration of 99% enriched [^{13}C] Glc (g/kg) in a 30% weight /volume water solution. We could observed ^{13}C spectra in both cases of direct/indirect observations and obtained time courses of the signals of [^{13}C] Glc, [^{13}C] Glu, and etc.

【背景および目的】

^{13}C -MRSでは、生体で重要な働きをする代謝基質を ^{13}C 標識化合物として投与し、その代謝産物の信号を動的・経時的に観測することにより、直接生体内物質代謝の様子を調べることができる。 ^{13}C -MRSの生体応用は、培養細胞、摘出臓器から始まり、1980年はじめに Alger¹⁾らにより動物およびヒトの初めての in vivo スペクトル (natural abundance) が得られた後、Yale 大や Basel 大等を中心として動物および人で in vivo ^{13}C -MRSを用いた種々の代謝研究が進められ、1991年には Beckman²⁾ら、1992年には Gruetter³⁾らにより、[^{13}C]グルコースを投与したヒト脳からスペクトルが得られるまでになった。しかし、 ^{13}C -MRSを用いた in vivo 特にヒトでの代謝研究・臨床応用は、(1)検出感度が低い、(2)局所化が困難、(3)試薬が高価、という問題のため、十分行われてきているとは言えない。

我々は上記問題の解決のため、局所励起可能な高感度検出法⁴⁾やデカップリングパルス印加時のMRI温度計測法⁵⁾の開発を進め、カンクイサル等の動物を用いてそれらの技術評価や ^{13}C -MRSによる脳代謝データの計測を行ってきた。今回、[^{13}C]グルコースを用いて健康人ボランティアの頭部 ^{13}C -MRSデータを取得する機会を得ることができ、今まで開発してきた技術の評価およびヒト脳内グルコース代謝に関するデータ取得を行ったので報告する。

【方法】

本試験は創価大学生命科学研究所倫理委員会の承認を得て実施した。対象は健康成人ボランティアで、試験について文書にて同意を得た。本試験に先立ち事前検査として、問診、血圧検査、血液検査、尿検査、糖負荷試験、心電図計測、MRI撮像を実施し、糖尿病などの異常がないことを確認した後、1ヶ月以内に本試験を実施した。また、本試験後1ヶ月以内に事後検査として、MRI撮像を除いて事前検査と同様の検査を実施し、異常がないことを確認した。本試験で用いたシステムは、東芝製2T¹³Cスペクトロスコピー研究用システムで、¹³C直接観測法(¹Hデカップリング¹³C-MRS、局所励起INEPT¹³C-MRS)/局所励起¹H観測法(マルチスライスHSQC¹³C-MRS)の各シーケンスと、¹³C直接観測用コイル系(¹H(150mm円形)&¹³C(100mm円形)送受信兼用表面コイル)/¹H観測用コイル系(¹H&¹³C送信用鞍型コイルと¹H受信用表面コイル(100mm円形))を組み込んだ。¹³C観測法で印加する¹Hデカップリングパルスは頭部全体及び局所SARを越えないように設定し、さらに被検者頭表および脳内で温度上昇がないことを、コイルに最も近接した頭表に設置した光ファイバー温度計と位相法によるMRI温度計測法より確認できるようにした。本試験で用いた試薬は、市販の[1-¹³C]グルコース(アイソテック社製)を体重1kg当たり0.25g~1g溶かした30%水溶液で、経口にて服用してもらった。服用後2時間~3.5時間の間、¹³C直接観測法または¹H観測法での計測を実施すると共に、服用前・30分・60分・120分・240分の時点で採血をして、血糖値・インシュリン量・血中グルコースの[¹²C/¹³C比](fraction)を求めた。得られたスペクトルについては[1-¹³C]グルコース、[4-¹³C]グルタミン酸、[3-¹³C]グルタミン酸、[2-¹³C]グルタミン酸等のピークを同定し、それらの時間変化をグラフ化した。

【結果】

被検者は全12例(男性9例・女性3例、年齢20歳~75歳)で事前・事後検査で異常は見られなかった。データ収集は¹³C直接観測法で5例、¹H観測法で7例行い、以下にその結果をまとめる。

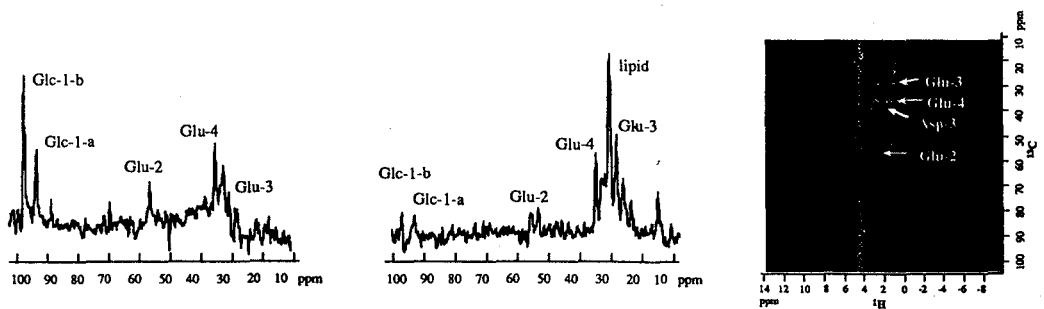


図1 ¹Hデカップリング¹³Cスペクトル 図2 局所励起INEPT¹³Cスペクトル 図3 マルチスライスHSQC¹H-¹³C相関スペクトル

(1)各パルスシーケンスで得られたスペクトル

スペクトルを図1～3に示す。 ^1H デカップリング ^{13}C -MRS では、頭皮や骨髄部の脂肪信号を除くため、試薬服用前に予め脂肪バックグラウンド信号を取得して服用後得られたスペクトルから引き算することにより、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース代謝物の信号を観測するが、被検者の動きの影響を受けやすく、うまく脂肪信号を除去できなかった。しかし、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース、 $[4-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸、 $[3-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸、 $[2-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸等のピークは5分積算のスペクトルで十分観測できた。局所励起分極移動法では、脳内 150 ml ($7\text{cm}\times 3\text{cm}\times 7\text{cm}$)の領域を選択励起することにより、引き算処理無しに脂肪信号をかなり抑えたスペクトルを得ることができた。但し、高周波の送信を表面コイルから行っているため、有効な観測容積が小さく分極移動によるS/N向上効果は見られていない。上記2つのシーケンスでは、 ^1H デカップリングパルスを使用していたが、印加による温度上昇は光ファイバー温度計でもMRIによる温度計測法でも確認されず、安全に検査できたことを確認できた。マルチスライス HSQC 法では、16分で4ボクセル($1\text{ボクセル } 37\text{ ml}$ ($35\times 30\times 35\text{mm}$))からそれぞれ $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 2次元スペクトルを取得でき、 $[4-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸、 $[3-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸、 $[2-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸等のピークを同定できた。これにより、本法の高感度特性、局所化能(画像化の可能性)、高い化合物判別能を評価できた。

(2)血糖値・fraction 値とスペクトル

1g/体重 1kg 投与の場合、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースの服用後、血糖値が最大 $120\sim 240\text{ mg/dl}$ 、インシュリン値が最大 $30\sim 80\ \mu\text{U/ml}$ になりかなり個人差があったが、それに連れて上昇する血中グルコースの ^{13}C fraction は $70\sim 90\%$ の範囲に収まった。これは、スペクトルにおいては、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースピークの最大値が人によりかなり差が大きかったのに対し、 $[4-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸ピークの最大値にあまり差がなかったことと対応しており、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースピークは[血糖値 \times ^{13}C fraction] を、 $[4-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸ピークは ^{13}C fraction を反映していると考えられる。

(3)投与量とスペクトル

$[1-^{13}\text{C}]$ グルコース投与量を $[0.25\text{g}/\text{体重 } 1\text{kg}]$ 、 $[0.5\text{g}/\text{体重 } 1\text{kg}]$ 、 $[1\text{g}/\text{体重 } 1\text{kg}]$ とした場合、各々

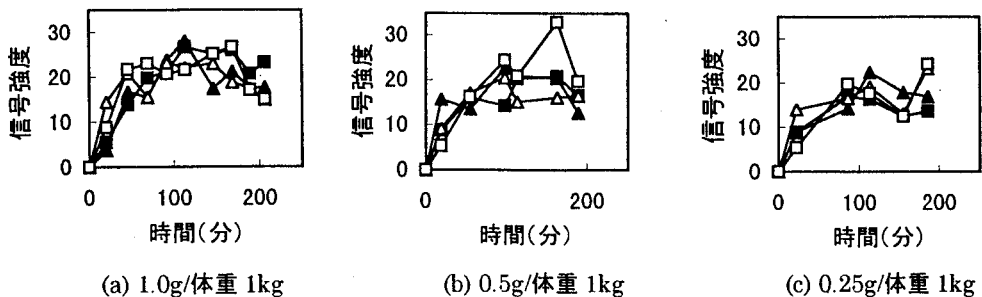


図4 経口投与量と $[4-^{13}\text{C}]$ グルタミン酸信号強度の時間変化
(後頭部4カ所からの信号を表示)

HSQC スペクトルから計測した[4-¹³C]グルタミン酸ピーク(図4)を比較すると、[0.25g/体重1kg]投与でも[1g/体重1kg]投与の場合に比べ信号強度の劣化は30%程度であり、[0.5g/体重1kg]投与では殆ど差がなかった。¹³C fraction のデータもこれを裏付ける同様の变化を示した。これは、経口投与の場合、従来考えられていた投与量(1g/体重1kg)の半分以下の投与量で良いことを示しており、また低濃縮(65%程度)試薬の利用可能性をも示唆するものであった。

【まとめ】

本臨床試験により、(1)¹H観測法の一つであるマルチスライス HSQC 法、MRI 温度計測法の有用性を評価でき、一方、(2) グルコースの脳内代謝に関する豊富なデータを収集すると共に、[1-¹³C]グルコース投与量を大幅に削減(1/2以下)できる見通しを得た。今後、代謝モデルを構築し代謝パラメータの算出法を検討すると共に、更に高感度化・高分解能化の検討を進めていく。

【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) Alger, J.R., et al., Science 214:660,1981
- (2) Bechmann, N., et al., Biochemistry 30:6362,1991
- (3) Gruetter, R., et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:1109,1992
- (4) Watanabe,H., et al., 4th Annual Meeting, ISMRM, 1220, 1996
- (5) Ishihara,Y., et al., 3th Annual Meeting, SMR, 1935, 1995

MRスペクトロスコピー、¹³C、[1-¹³C]グルコース、ボランティア、HSQC

おかもとかずや、うめだまさあき、いしはらやすとし、わたなべひでひろ、おだまきのり、かなまつともゆき、つかだやすぞう

P81

ラット脳内代謝変化の2次元NMR測定

○高橋征三¹, 荻野孝史²

(1 日本女子大理学部, 2 国立精神神経センター神経研究所)

Chase of Metabolites in Rat Brain Tissue by 2D-NMR

S. Takahashi¹ and T. Ogino²

(1 Fac. Sci., Japan Women's Univ., 2 National Institute of Neuroscience, NCNP)

Rapid measurement method for 2D-NMR was devised for rat brain tissues. Rat brain was dissected and packed in 5mm NMR tube to allow measurement. Major metabolites were successfully picked up by super COSY, setting the delay time to 70ms. Sensitivity in a given time was dramatically improved by rapid repetition, minimum saturation of water resonance, and limit the size of F1 to 28 points. Total time for spectral measurement became ca. 5 min for each spectra. The time course of metabolites were chased for major components at the interval of 7.5 min. It was found that the present method detects over 15% change which is still to be improved.

In vivo NMRは画像診断法として広く普及しているが、スペクトル分析による応用はまだ一般的でない。1次元NMRを使っているために、信号の分離が困難で、定量分析に使えるピークが少ないからである。ピークの分離には2次元NMRが有利なことは自明だが、一般的には測定時間がかかり実用的でないとされている。そこで2次元NMRの測定時間を短縮する方法を検討した。

生体組織は不均一構造であり種々の分子量の代謝物が混在している。したがって T_1 は長いが T_2^* は極端に短いという特徴がある。また昨年度の本討論会で報告したように、ほとんどすべての代謝分子は、水の信号を飽和すると磁気飽和移動により信号強度が低下する。この2つの特徴を利用して単位時間あたりの感度を最大にする条件を求めた。

[実験] 装置は Bruker AMX-400WB を用い 300K で測定した。試料は 7 週齢の Wistar Rat の脳を摘出し、5mm 試料管に詰め、ロック用に重水素化生理食塩水を微量添加した。

キーワード：2次元NMR，ラット，脳，代謝物質，時間変化

たかはし せいそう, おぎの たかし

[結果] super COSYは COSYに delay を入れ、対角信号を抑制し非対角信号を増大する方法である。ピークごとに delay 時間の影響は異なる。この方法は taurin や NAA(N-Acetyl Aspartate)などの対角項の近くに出る信号を検出するのに適する。今回は delay time を 70ms に固定して測定した。この条件は Glutamate, GABA, NAA など、脳内に存在する主要神経伝達物質の検出にもっとも有利な条件である。図 1 に示す S/N 比を得るには一般に 3-4 時間の測定時間がかかる。これをいかに短縮するかが本研究の課題である。

F2 領域のデータサイズは、スペクトル幅を 10ppm にしたとき、512 点より大きくしてもピークの分離は改善されなかった。256 点では明らかに分離が劣化した。T₂*が短いためデータ点数は少ないほど S/N の点では有利であった。図 1 から、信号の折り返しを許し、ピークの重なりが許容できる F1 の最小のスペクトル幅は 2 ppm 前後であると判断された。そしてピークの分離能を損なわない最小のデータサイズは 28 点前後であることがわかった。また offset を変えて F2 のスペクトル幅を 5ppm にしても感度は上昇しなかった。

昨年度、水を飽和すると磁気飽和移動により、ほとんどすべての代謝物質の信号強度が減少することが分かった。しかし飽和しないと receiver の残留ノイズのために感度が低下することが分かった。その妥協点として 100ms 照射時間で最小限のパワーを探った。

その結果得られたスペクトルを図 2 に示す。積算時間は約 30 分である。図 1 の結果を参照すれば、信号の折り返しがあってもピークの帰属の曖昧さは全くない。また

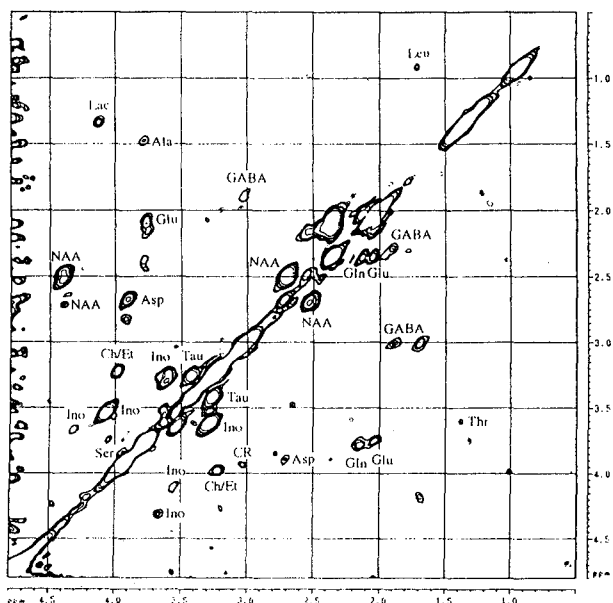


Fig. 1 sCOSY Spectrum of Rat Brain Tissue

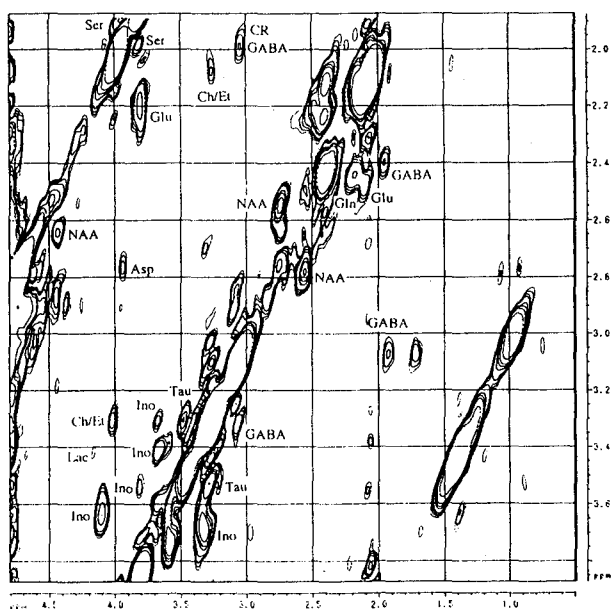


Fig. 2 Optimized sCOSY spectrum.

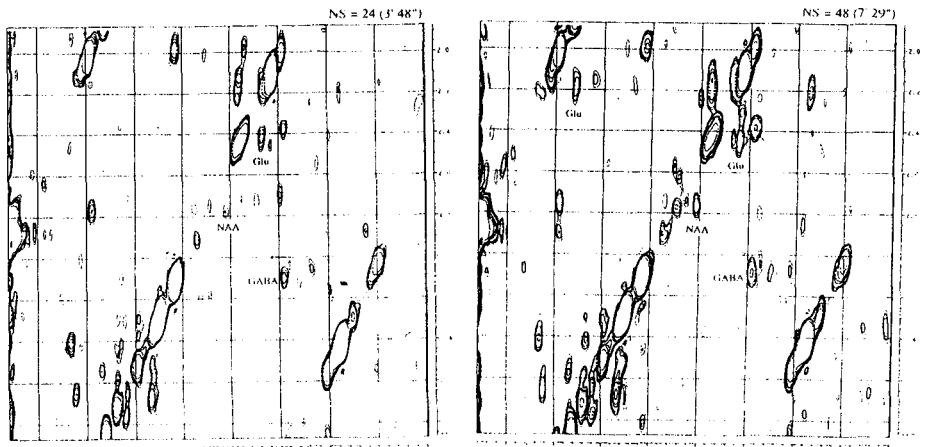


Fig. 3 Effect of Acquisition Time on S/N Ratios.

Left. NS=24 (total 3'48")

Right NS=48 (total 7'29")

ピークの重なりは1つを除けば、ほとんど無視できた。

この条件下で目的の感度を得るために、どの程度の積算時間が必要かを図3に示した。左が3分48秒の結果で右は7分29秒の結果である。この結果から5分程度の積

このようにして得られたスペクトルの再現性を求めるために、時間変化を追跡しどの程度の変化を検出できるか調べた。強度はもっとも単純な体積強度を使った。その結果を図4に示す。現時点で約15%以上の変化を捉えられることが分かった。

現時点では解析に何等工夫をしていない。フィルターを工夫し最小自乗法による peak fitting を導入すれば見掛けの S/N 比は2倍以上の向上が見込める。

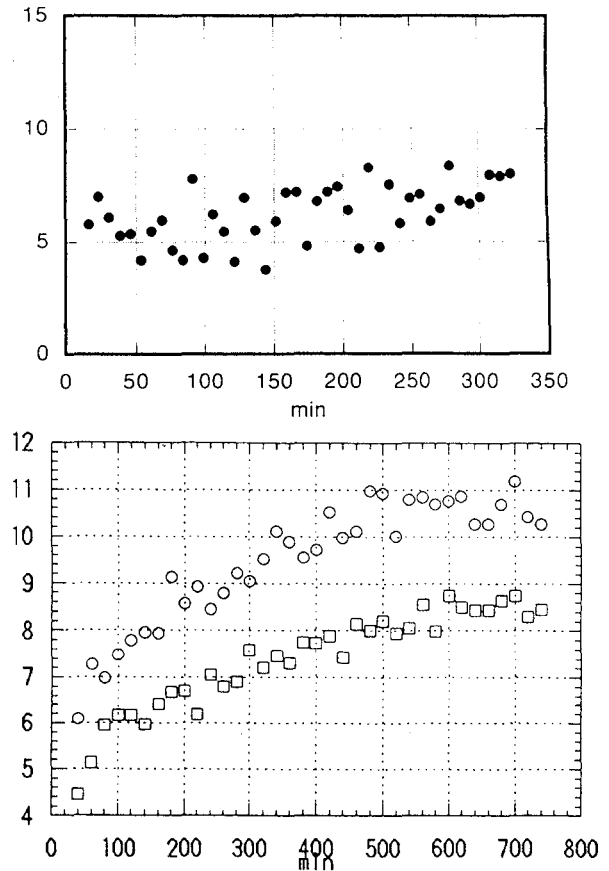


Fig. 4 Time Course of the Change of Metabolites after Dissection. Upper: Aspartate Lower: GABA

Determination of Small Chemical Shift Anisotropy by Adiabatic Ramped Spin-locking NMR

Naoki Asakawa[†], Boqin Sun, and Robert G. Griffin*Francis Bitter National Magnet Laboratory and Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139 U.S.A.*[†] *Department of Biomolecular Engineering, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa 226 Japan*

A novel method for accurate determination of small chemical shielding anisotropy(CSA) of the solid state nuclear magnetic resonance(NMR) is described. The method is based on the adiabatic ramped spin-locking of transverse magnetization. The equation for the time evolution of the spin dynamics for a system on the presence of chemical shielding and the ramped spin-locking rf field is analogous to that for the case of homonuclear magnetic dipolar coupling. The time course of signal intensity with respect to the ramped spin-locking time is sensitive to magnitude of CSA(span: Ω). The asymmetrical parameter(skew: κ) modulates the intensity profile a little. By carrying out the experiments under the on-resonance condition, the (Ω , κ) values were determined for the L-alanine C_{β} -carbon.

I. INTRODUCTION

It is known that chemical shift obtained by the solid state NMR has information about the local electronic state round a nucleus.¹ The principal values of chemical shift tensor(CST) are particularly an interesting fingerprint for studies of the three dimensional electronic structure, as well as isotropic chemical shift obtained by the cross-polarization and the magic-angle sample spinning(CP-MAS) NMR.²

In this presentation, we propose a novel methodology for determination of the anisotropic (span: Ω) and the asymmetrical parameter(skew: κ) of chemical shift tensor, which is based on the adiabatic process in the rotating frame of rf spin-locking.

II. THEORY

In a frame rotating at near the resonance frequency, the Hamiltonian for a system involving both chemical shielding and the spin-locking rf field is presented as the following,

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_{\Delta} + \mathcal{H}_1, \quad (1)$$

where \mathcal{H}_{Δ} and \mathcal{H}_1 are the Zeeman and the rf field Hamiltonian, respectively. In order to comprehend the dynamics of the spin system, one has to solve the following equation derived from Liouville-von Neumann equation for the density matrix,³

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = \mathcal{W}(t)\rho(t) \quad (2)$$

$$\mathcal{W}(t) = \begin{pmatrix} -r_1 & -\omega_{\Delta}(t) & 0 \\ \omega_{\Delta}(t) & -r_2 & -\omega_1(t) \\ 0 & \omega_1(t) & 0 \end{pmatrix}, \quad (3)$$

where r_1 is the longitudinal relaxation rate in the rotating frame of the ramped spin-locking field($r_1 = T_{1\rho}^{-1}$) and r_2 is the transverse relaxation rate($r_2 = T_2^{-1}$). Eqs. 2 and 3 are exactly the same as the

equation of motion for the case of homonuclear dipolar coupling described by Levitt et al,⁴ except for taking account of both $T_{1\rho}$ and T_2 .

$$\mathcal{W}(t) = \begin{pmatrix} -r_2^{zq} & -\omega_\Delta(t) & 0 \\ \omega_\Delta(t) & -r_2^{zq} & -\omega_B(t) \\ 0 & \omega_B(t) & 0 \end{pmatrix}, \quad (4)$$

where r_2^{zq} and $\omega_B(t)$ are the same meanings described in the literature.⁴ For the case of homonuclear dipolar coupling, one needs to consider only one transverse relaxation time in the $\{|2\rangle, |3\rangle\}$ subspace, on the other hand, for the case of CSA recoupling, both $T_{1\rho}$ and T_2 should be considered.

The formal solution for Eq.2 is,

$$\rho(t) = \mathcal{L}(t, 0)\rho(0) \quad (5)$$

with

$$\mathcal{L}(t, 0) = \hat{T} \exp \int_0^t \mathcal{W}(t) dt, \quad (6)$$

where \hat{T} is the Dyson's time ordering parameter. One needs to calculate the time course of $\rho(t)$ during the entire ramped spin-locking time. In order to perform the spectrum simulation, we divide spin-locking time duration to many small time steps, and then build $\mathcal{W}(t)$ matrix for each time step. For the sake of saving the computation time, the diagonalization of $\mathcal{L}(t, 0)$ matrix was performed only once, instead of performing many diagonalization procedures for each $\mathcal{W}(t_n)$. $\mathcal{L}(t, 0)$ is expressed as the follows,

$$\mathcal{L}(t, 0) = \mathcal{W}(t - \Delta t)\mathcal{W}(t - 2\Delta t) \cdots \mathcal{W}(\Delta t)\mathcal{W}(0). \quad (7)$$

Then, $\rho(t)$ can be easily calculated by Eq. 5. Signal intensity profile simulated as a function of the spin-locking time indicates the oscillatory character if the simulation is performed without the consideration of rf inhomogeneity. This is because the adiabatic condition during the ramped spin-locking is not strictly valid.

III. SPECTRUM SIMULATION

Figs.1 and 2 show the spin-locking time dependence of a magnetization intensity with respect to chemical shift anisotropy parameter :span(Ω) and with respect to the asymmetrical parameter:skew(κ), respectively. We found that the magnetization intensity profile is dominated by Ω value, and slightly modulated by the κ value.

The longitudinal relaxation time($T_{1\rho}$) in the rotating frame of rf field and the transverse relaxation time(T_2) would affect the signal intensity profiles, which is to damp the signal to the zero. For simplicity, we assumed $T_{1\rho} = T_2$. For the case of a large chemical shift anisotropy such as $\Omega = 6.8 \text{ kHz}$, the effect of the relaxation times cannot be ignored for larger spin-locking time than 2 msec. On the contrary, the $T_{1\rho}$ and T_2 for the small anisotropies do not largely modify the intensity profile over the range of the relaxation rate, 10-30 Hz. This means that, although it is still difficult to experimentally determine the $T_{1\rho}$ in the rotating frame with the ramped rf field, this novel ramped spin-locking experiment provides one to determine small CSA parameters under the high-resolution MAS condition.

IV. EXPERIMENTAL

A. Sample

For all the experiments performed in this study, we used 100% ^{13}C methyl-carbon labelled L-alanine($[3-^{13}\text{C}]\text{L-alanine}$). The sample was recrystallized by slow evaporation of the L-alanine aqueous solution.⁵

B. Solid State NMR measurements

The pulse sequence for the ramped spin-locking experiment developed here is shown in Fig.3. In order to establish the ^{13}C magnetization, the ramped cross-polarization(RCP) from ^1H to ^{13}C was employed, which is a specific version of variable amplitude CP(VACP) and which sweeps over the range including the matched Hartmann-Hahn cross-polarization(HHCP) condition.⁵ The rf intensity during the RCP was set at 35 kHz for ^1H (constant) and the ramping range, 28 ~ 39 kHz for ^{13}C channel. The RCP contact time was 2 msec. By applying the high-speed digital attenuation of the rf intensity, the ramping was carried out with 100 steps; each time step has 20 μ sec time duration and the shape of the rf intensity curve was STANH-5. The RCP is followed by the ramped spin-locking of the ^{13}C channel. The spin-locking rf field was ramped over the range of intensities, 20 ~ 12kHz so that the ramping range should correspond to the range from $5/2\nu_r$ to $3/2\nu_r$ (ν_r ;MAS speed). The ramping was carried out with 200 steps; for each steps, the rf intensity was set as constant. The MAS speed was set at about 8.00 ± 0.03 kHz. The ramping technique eliminates the necessity of precise control of MAS speed. During acquisition, the two pulse phase modulation(TPPM) decoupling⁷ was carried out in order to improve resolution and sensitivity.

V. RESULTS AND DISCUSSION

Fig.4 shows the signal intensity profiles of 100% ^{13}C methyl-carbon labelled L-alanine($[3-^{13}\text{C}]$ L-alanine) under the various offset conditions as a function of the spin-locking time and the spectrum simulations with the assumption of adiabatic process and with 10% rf inhomogeneity during the ramped spin-locking. From Fig.4, we can pronounce that at the condition of on-resonance, the spin system precesses adiabatically in the rotating frame of the spin-locking. At the presence of offset, the experimental results were deviated from the simulations; that means, the adiabatic condition is no longer valid. By carrying out the on-resonance experiments and the spectrum simulation, we were able to determine the accurate chemical shift anisotropy(span: Ω) for L-alanine powder sample, $\Omega = 1.1$ kHz. Fig.5 demonstrates that the accuracy of the Ω determined by this method is estimated as 0.1 kHz. Although the intensity profile is much less dependent on κ than on Ω , the iterative fitting between the experimental and the simulated, provides rough estimation of κ . The κ for the C_β -carbon was determined as 0.2. However, at this moment, we have to wait for further improvements on the method in order to obtain the accurate κ value.

The κ value is responsible for the position of the midfield principal component of chemical shift tensor(δ_{22}) in a whole spectral range of the chemical shift powder pattern. Unfortunately, we could not obtain the sign of κ , because intensity profiles for $+\kappa$ and $-\kappa$ are the same each other.

¹ H.Saito and I.Ando, *Annu. Rept. NMR Spectroscopy.*, **21**, 209(1989).

² E.O.Stejskal, J.Schaefer, and J.S.Waugh, *J.Magn.Reson.*, **28**, 105(1977).

³ B.C.Gerstein and C.R.Dybowski, "*Transient Techniques in NMR of Solids*", Academic Press, London(1985).

⁴ M.H.Levitt, D.P.Raleigh, F.Creuzet, and R.G.Griffin, *J.Chem.Phys.*, **92**, 6347(1990).

⁵ M.S.Lehmann, T.F.Koetzle, W.C.Hamilton, *J.Am.Chem.Soc.*, **94**, 2657(1972).

⁶ S.R.Hartmann and E.L.Hahn, *Phys.Rev.*, **128**, 2042(1962).

⁷ A.E.Bennett, C.M.Rienstra, M.Auger, K.V.Lakshmi, and R.G.Griffin, *J.Chem.Phys.*, **103**, 6951(1995).

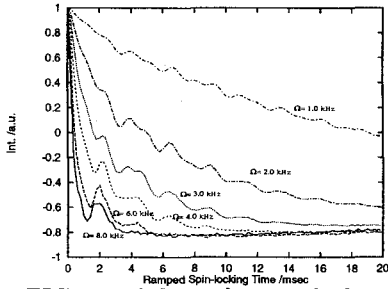


FIG. 1. δ -dependence of the simulated signal intensity as a function of the ramped spin-locking time. κ value was 0.0 and $T_{1\rho}^{-1}, T_2^{-1} = 10$ Hz. 10 % rf inhomogeneity was incorporated in the simulations.

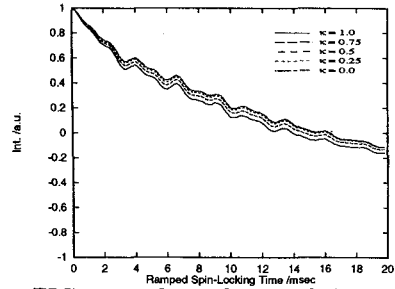


FIG. 2. κ -dependence of the simulated intensity as a function of the ramped spin-locking time. $\Omega = 1.1$ kHz.

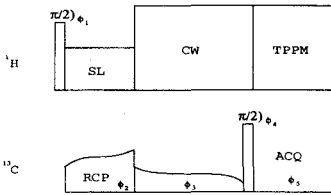


FIG. 3. The pulse sequence of the adiabatic ramped spin-locking experiment. The phase cycling used is the following; $\phi_1 = \{ xxx \bar{x}\bar{x}\bar{x} \bar{x}\bar{x}\bar{x} xxx \}$, $\phi_2 = \{ xy\bar{x}\bar{y} xy\bar{x}\bar{y} \bar{x}\bar{y}xy \bar{x}\bar{y}xy \}$, $\phi_3 = \{ xy\bar{x}\bar{y} xy\bar{x}\bar{y} \bar{x}\bar{y}xy \bar{x}\bar{y}xy \}$, $\phi_4 = \{ xy\bar{x}\bar{y} xy\bar{x}\bar{y} \bar{x}\bar{y}xy \bar{x}\bar{y}xy \}$, and $\phi_5 = \{ xy\bar{x}\bar{y} \bar{x}\bar{y}xy \bar{x}\bar{y}xy xy\bar{x}\bar{y} \}$.

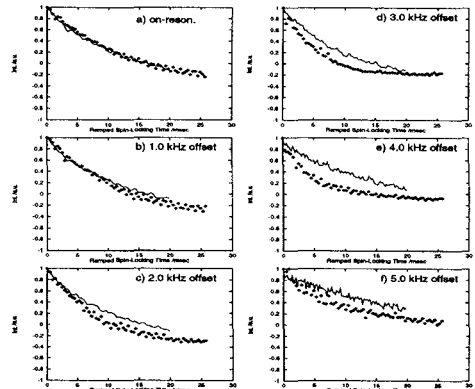


FIG. 4. The experimental offset effect on the signal intensity of [100%, $3\text{-}^{13}\text{C}$]L-alanine amino acid. The simulations are expressed by the solid lines.

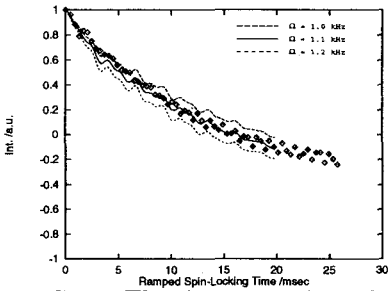


FIG. 5. The demonstration of accuracy of Ω value. The accuracy was estimated as ± 0.1 kHz.

P83 固体³¹P および¹³C NMR 化学シフトを用いた生体膜モデルと塩基性ホモポリペプチドとの相互作用に関する研究

(東工大・生命理工)○浅川直紀, 佐藤大輔, 櫻井実, 井上義夫

A Structural Study of Acidic Phospholipid-Basic Homopolypeptide Complex by ³¹P and ¹³C Solid State NMR Chemical Shifts

Naoki Asakawa, Daisuke Sato, Minoru Sakurai, and Yoshio Inoue

(Department of Biomolecular Engineering, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa 226 Japan)

A simple mean to detect the complex formation of biomembrane with basic polypeptides on powder sample is presented. Cross polarization magic angle spinning (CP/MAS) experiments by solid-state NMR on rotating powders produce 'chemical shift' information correlated with structures. The correlation of 'structure' and 'chemical shift', which is called S/C correlation, was examined on poly(L-lysine)/dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA) complex and poly(L-arginine)/DPPA complex by ³¹P CP/MAS experiments. These examinations suggest that the least shielded component of a chemical shift tensor, δ_{11} , is shifted toward about 10ppm lower frequencies when the membrane-polypeptide complex is produced. The secondary structures of poly(L-lysine) and poly(L-arginine) in the presence of DPPA, which would be difficult to determine by X-ray diffraction, were also determined by ¹³C CP/MAS experiments.

I. INTRODUCTION

The interactions of membrane with proteins play an important role in living cells. Particularly, since some membrane proteins require specific phospholipid in order to activate themselves [1-3], we need to understand the function of the membrane-protein interaction as well as that of a protein. As one of the typical model systems to examine this interaction, a system composed of acidic phospholipid and basic polypeptide has been used. Poly(L-lysine) and poly(L-arginine) are representative basic polypeptides, and each residue of these polypeptides has a positive charge in their sidechains at physiological pH. Therefore, these polypeptides are expected to bind electrostatically to negatively charged phospholipid. Currently, it is confirmed that such a binding affects to a change of the thermotropic property of the membrane [4,5], a change of the itself secondary structure. According to the result, additions of poly(L-lysine) and poly(L-arginine) to dipalmitoylphosphatidic acid(DPPA) cause the phase transition temperature from gel to liquid crystal to move to about 9°C higher temperatures and about 18°C lower temperatures, respectively, than the transition temperature of DPPA without these polypeptides, 50°C, where, however, we must note that these temperatures vary with depending on the amount and molecular weight of polypeptide, and pH. [6] The thermotropic behavior in the case of the poly(L-lysine)/DPPA complex has been interpreted by X-ray diffraction and been concluded that this is due to the fact that poly(L-lysine) adopt a β -sheet conformation on the surface of the DPPA bilayers and strengthen the packing structure of the membrane [7], whereas the phenomenon in the case of the poly(L-arginine)/DPPA complex has never been interpreted in terms of the structure for this complex, which would be difficult to determine by X-ray diffraction.

In this presentation, we shall correlate chemical shift obtained by ³¹P cross polarization magic angle spinning (CP/MAS) NMR experiments [8-10] with the membrane-polypeptide complex formation. Further, the secondary structures of poly(L-lysine) and poly(L-arginine) in the presence of DPPA will be also determined by ¹³C CP/MAS experiments. These results will give an explanation on the changes of the phase transition temperature caused by addition of polypeptides.

キーワード: ³¹P, ¹³C, CSA, ポリペプチド, 生体膜
あさかわなおき, さとうだいすけ, さくらいみのる, いのうえよしお

II. MATERIALS AND METHODS

Materials

Desired amount of DPPA was dispersed in a 200mM HEPES buffer (pH 7.3) containing 5mM EDTA. This dispersion was prepared so that the lipid concentration should be $\frac{1}{50}$ wt%. The dispersion after incubated at 80°C for 2hours was sonicated for 20min to form a unilamellar structure, using an ultrasonic disruptor (UR-200P, TOMY SEIKO Co., Tokyo, Japan). Apart from the dispersion, poly(L-lysine) hydrochloride was dissolved in HEPES buffer, the amount of which was as much as that of HEPES buffer in the dispersion of the DPPA vesicles. The solution was prepared so that the ratio of amino acid residues/DPPA molecules should be 2:1, and added to the dispersion so that the lipid concentration should be $\frac{1}{100}$ wt%. Next, the dispersion was incubated at 90°C for 10 min and then cooled down to room temperature. This cycle of heating and cooling was repeated three times to get homogeneous samples. The produced precipitate of the DPPA/poly(L-lysine) complex was collected by centrifugation at 9000×g for 15min. The precipitates thus obtained were stored at 4°C for 4 days and then lyophilized. The exactly same procedure was employed for the complex of DPPA with poly(L-arginine). A non-complex sample of DPPA was prepared as follows. A desired amount of DPPA was dispersed in water so that the lipid concentration should be $\frac{1}{100}$ wt%. The dispersion was incubated at 80°C for 2hrs and then cooled down to room temperature. The sample thus obtained was stored at 4°C for 4days and then lyophilized.

Experimental

The experiments were performed on a JEOL GSX270 FT NMR spectrometer equipped with the MAS accessory at a proton frequency of 270MHz. The typical ^1H , ^{31}P and ^{13}C 90° pulse widths were 5.0 μs , 4.7 μs and 5.3 μs , respectively. A CP contact time was 2.0ms. The principal values of chemical shift tensors were obtained by the method by D. Fenzke et. al. [11], which is an extension of Herzfeld and Berger analysis [12].

III. RESULTS AND DISCUSSION

The spectra obtained from ^{31}P CP/MAS experiments of dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA), the poly(L-lysine)/DPPA complex, and the poly(L-arginine)/DPPA complex are shown in Fig.1(a)-(c), respectively. Here, we must note that since lyophilized sample forms rigid lattice at room temperature, the averaging of chemical shift anisotropy caused by flexibility of phospholipid is not observed on these spectra. These spectra show apparent differences in each spinning sideband pattern. Therefore, it is expected that a comparison of principal values of chemical shift tensors allow us to obtain the information about complex formation. On these samples, the principal values were determined by Herzfeld-Berger analysis [12], and are shown in Table I, where the isotropic chemical shift of DPPA is defined as 0ppm. Comparison of the principal values obtained from these samples suggests that the membrane-polypeptide complex formation causes δ_{11} , which is the least shielded component of the principal values, to be shifted toward about 10ppm lower frequencies. In addition to this, we found that the isotropic chemical shifts were also shifted toward 2~3ppm lower frequencies when the membrane-polypeptide complex was produced. If we attempt to correlate these principal values with structure, one has to make the assumption that the orientation of the chemical shift tensor be the same as that of the phosphodiester model shown in Fig.2 [13], since no information about the orientation of the chemical shift with respect to the molecular frame of the phosphate group is obtained from powder sample. As for this, it was reported that the chemical shift of a phosphorus nucleus on a phosphorylated compound depends on the geometry of the phosphate group moiety [14,15]. In other words, the change in the principal values means that in the geometry. Therefore, This δ_{11} shift seems to be due to the fact that the membrane-polypeptide complex formation causes the oxygen nuclei bound to a phosphorus nucleus to move to a direction facing to δ_{11} , resulting in the increasing of a shielding effect in the direction of δ_{11} . Hereafter, the analysis with δ_{11} as the probe will permit a simple detection of the membrane-polypeptide complex formation on powder sample. Further, the differences between the principal values of poly(L-lysine) and poly(L-arginine), that is, differences of δ_{22} and that of δ_{33} may suggest that poly(L-lysine) and poly(L-arginine) make a difference in the manner of binding to DPPA. As far as this case is concerned, we must note,

however, that the principal values were determined from inhomogeneous broadening peaks, which will lead to principal values averaged by superposition of various homogeneous signals. In order to accurately evaluate the effect due to binding of polypeptide, we need to separate homogeneous peaks derived from DPPA with polypeptide by selective excitation such as DANTE pulse train and SELDOM pulse train.

Next we will describe the results obtained from ^{13}C CP/MAS experiments. The spectrum obtained from DPPA is shown in Fig.3(a). Fig.3(b) shows the structure of DPPA with numbers corresponding to subscript at the signals in Fig.3(a), where the signals at 15.2ppm, 25.3ppm, 33.8ppm, 64.5ppm, 72.3ppm and 173.3ppm in Fig.3(a) correspond to the isotropic chemical shifts, whereas ones at -27.6ppm and 95.2ppm correspond to the sideband signals, respectively. On the other hand, the spectra obtained from the poly(L-lysine)/DPPA complex and the poly(L-arginine)/DPPA complex are shown in Fig.4(a) and (b), respectively. These spectra make a difference from the spectrum for DPPA at 50 ~ 60ppm, where only signals of the C_α carbon derived from the polypeptides appear.

We can elucidate the structure/chemical shift correlation (S/C correlation) [16,17] for the C_α carbon in polypeptide, and can make determination of the secondary structure of polypeptide since chemical shift of the C_α carbon is very sensitive to secondary structure of polypeptide, and the chemical shift does not overlap any signals from the lipid as described above. In addition to this advantage, the S/C correlation of poly(L-lysine) and poly(L-arginine) in solid state have been already reported by A. Shoji et al. [18] and H.R. Kricheldorf et. al. [19] From these results, the isotropic chemical shift of the C_α carbon for poly(L-lysine) is 51.4ppm for β -sheet structure, and is 58.2ppm for α -helix structure, and that for poly(L-arginine) is 58.0ppm for α -helix structure. The β -sheet structure for poly(L-arginine) in the solid state have never been found out. In order to determine the secondary structure of these polypeptides, we identified signals which emerged at the chemical shift region for C_α carbon by this S/C correlation. As a result, for the poly(L-lysine)/DPPA complex, we found the specific peaks for β -sheet structure at 52.1ppm and α -helix structure at 58.3ppm and an unidentified peak at 54.8ppm, respectively(Fig.4(a)). This suggests that not only the existence of a β -sheet region, but also an α -helix region is confirmed, where the former has been found out by the X-ray diffraction and circular dichroism (CD) measurement while the latter has never been found out. The existence of short α -helix regions seems to have prevented the X-ray diffraction and CD measurement from finding out this α -helix region, since NMR measurement makes use of chemical shift for the C_α carbon which significantly depends on dihedral angle ϕ and ψ , whereas the X-ray diffraction and CD measurement require substantial degree of geometrical repetition.

On the other hand, the poly(L-arginine)/DPPA complex gave an inhomogeneous broad signal for the C_α carbon over the range of chemical shift of 50~60ppm(Fig.4(b)). This suggests that the main-chain of poly(L-arginine) in the poly(L-arginine)/DPPA complex forms an irregular conformation. This irregular conformation might cause the relaxation of the packing structure of the membrane, resulting in the decrease of the phase transition temperature from gel to liquid crystal.

-
- (1) Sandermann, H.; McIntyre, J. O.; Fleischer, S. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 6201.
 - (2) Nishizuka, Y. *Nature* **1984**, 308, 693.
 - (3) Bell, R. M. *Cell* **1986**, 45, 631.
 - (4) Ohki, K. et. al., personal communication.
 - (5) Takahashi, H. et. al., personal communication.
 - (6) Takahashi, H.; Yasue, T.; Ohki, K.; Hatta, I. *Molecular Membrane Biology* **1996**, 13, 233.
 - (7) Takahashi, H.; Matuoka, S.; Kato, S.; Ohki, K.; Hatta, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1069, 229.
 - (8) Schaefer, J.; Stejskal, E. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 98, 1031.
 - (9) Stejskal, E. O.; Schaefer, J.; Waugh, J. S. *J. Magn. Reson.* **1977**, 28, 105.
 - (10) Stejskal, E. O.; Memory, J. D. *High Resolution NMR in the Solid State: Fundamentals of CP/MAS* Oxford Univ. Press: New York 1994.
 - (11) Fenzke, D.; Maeß, B.; Pfeifer, H. *J. Magn. Reson.* **1990**, 88, 172.
 - (12) Herzfeld, J.; Berger, A. E. *J. Chem. Phys.* **1980**, 73, 6021.
 - (13) Kohler, S. J.; Klein, M. P. *Biochemistry* **1976**, 15, 967.
 - (14) Olivieri, A. *J. Magn. Reson.* **1990**, 88, 1.
 - (15) Turner, G. L.; Smith, K. A.; Kirkpatrick, R. J.; Oldfield, E. *J. Magn. Reson.* **1986**, 70, 408.
 - (16) Saito, H.; Ando, I. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **1989**, 21, 209.

- (17) Kurosu, H.; Ando, S.; Yoshimizu, H.; Ando, I. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **1994**, 28, 189.
 (18) Shoji, A.; Ozaki, T.; Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I. *Macromolecules* **1984**, 17, 1472.
 (19) Kricheldorf, H. R.; Muller, D. *Macromolecules* **1983**, 16, 615.

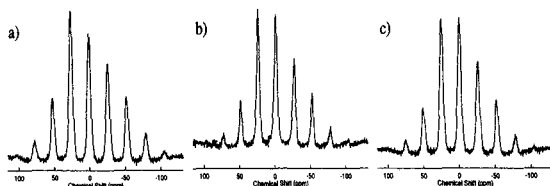


FIG. 1. (a) The ^{31}P CPMAS spectrum of dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA). The spinning speed was $\omega_r/2\pi = 2.885\text{kHz}$. (b) The ^{31}P CPMAS spectrum of the poly(L-lysine)/DPPA complex. The spinning speed was $\omega_r/2\pi = 2.794\text{kHz}$. (c) The ^{31}P CPMAS spectrum of the poly(L-arginine)/DPPA complex. The spinning speed was $\omega_r/2\pi = 2.922\text{kHz}$. The principal values of the chemical shift tensors derived from each spectrum is shown in Table I.

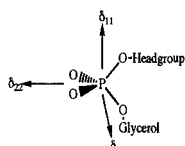


FIG. 2. The expected orientation of ^{31}P chemical shift tensor with respect to the molecular frame of the phosphate group. The least shielded component of a chemical shift tensor, δ_{11} , is perpendicular to the membrane surface, and δ_{22} and δ_{33} are paralleled to one, as is shown in this figure.

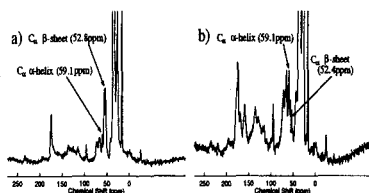


FIG. 4. (a) The ^{13}C CPMAS spectrum of the poly(L-lysine)/DPPA complex. The spinning speed was $\omega_r/2\pi = 4.223\text{kHz}$. (b) The ^{13}C CPMAS spectrum of the poly(L-arginine)/DPPA complex. The spinning speed was $\omega_r/2\pi = 4.329\text{kHz}$. The poly(L-arginine)/DPPA complex gave a broad peak for the C_α carbon. These spectra make a difference from the spectrum for DPPA at $50 \sim 60\text{ppm}$ region, where the peaks of the C_α carbon derived from polypeptides appear.

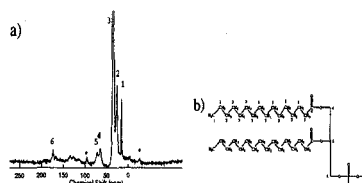


FIG. 3. (a) The ^{13}C CPMAS spectrum of dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA). The spinning speed was $\omega_r/2\pi = 4.170\text{kHz}$. (b) The structure of dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA) with numbers corresponding to subscript at the peaks in (a). The isotropic chemical shifts correspond to methyl carbon at 15.2ppm , to methylene carbon with γ effect at 25.3ppm , to methylene carbon without γ effect at 33.8ppm , to $\text{H}_2\text{-C-O}$ carbon at 64.5ppm , to H-C-O carbon at 72.3ppm and to carbonyl carbon at 173.3ppm , respectively.

TABLE I. The principal values of the ^{31}P chemical shift tensor by parts per million(ppm). The isotropic chemical shift of DPPA is defined as 0ppm .

Compound	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}
DPPA	0.0	66.7	12.6	-79.3
poly(L-Lys)/DPPA	-2.7	57.3	9.5	-74.9
poly(L-Arg)/DPPA	-2.4	56.3	13.5	-77.0

The measurement of heteronuclear dipole-dipole interactions using Tycko's pulse sequence

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

Daisuke Kuwahara, Seiichi Miyajima, Toshihito Nakai

We showed a new two-dimensional(2D) NMR method to measure heteronuclear dipole-dipole interactions under magic-angle sample spinning(MAS); the present method utilizes Tycko's pulse sequence originally exploited to obtain chemical-shift powder spectra. The present method makes it possible to get the powder patterns for the dipole-dipole interactions between ^{13}C and quadrupolar nuclei having $I=1$.

<目的>マジック角試料回転(MAS)は ^{13}C 、 ^{31}P などのスピン1/2の核種に対して高分解能NMRスペクトルを与えるが、一方で分子構造に関する情報をもたらす重要な相互作用を消去してしまう。失われた相互作用を復活させるためにいろいろな手法が開発されたが、中でもREDOR、TEDORは蛋白質中のペプチド結合距離(CN間距離)を測定するために幅広く用いられている。

近年マジック角試料回転のもとで化学シフト粉末スペクトルを測定できるパルス系列が開発され (Tycko et al. [1])、それを使用して ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用粉末スペクトルを1次元NMRで測定すること[2]が行われた。本研究では上記パルス系列をあえて2次元NMRの枠組みのなかで利用することにより、様々な異種核間双極子相互作用の粉末スペクトルを測定することを試みた。本研究で提案する手法は、Tyckoのパルス系列を観測する核種(^{13}C)にのみ照射するために、 ^{13}C - ^{15}N スピン系だけでなく ^{13}C - $\{^1\text{H}\}_n$ スピン系に対しても使うことができる。さらに、これまであまり行われてこなかった ^{13}C と四極子核との双極子相互作用を観測する実験に道をひらくことになる。

キーワード：異種核間双極子相互作用、マジック角試料回転、2次元NMR

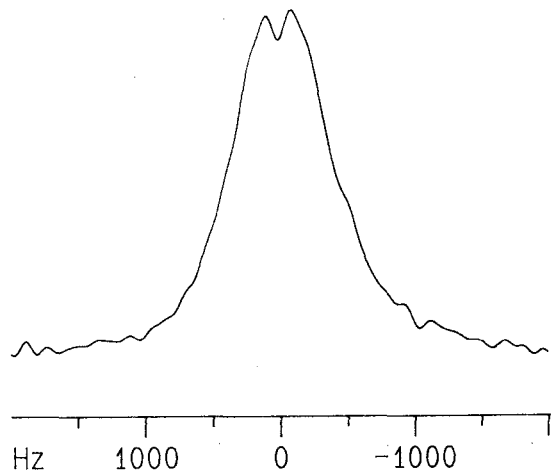
著者ふりがな：くわはらだいすけ、みやじませいいち、なかいとしひと

<方法>最初に ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用粉末スペクトルを測定する方法を述べる。

Tyckoの手法は、2次元NMRの t_1 時間を試料回転周期でインクリメントし、1回転周期に4つの π パルスを ^{13}C にかけることにより、 ^{13}C 化学シフト異方性を復活させるものである。本研究では、2倍の試料回転周期を単位として t_1 時間をインクリメントする。そして、 t_1 時間の中間に ^{13}C π パルスを照射する。 t_1 時間の前半では ^1H デカップリングのみを行い、後半は ^1H デカップリングと ^{15}N デカップリングを同時に行う。このようにすると t_1 時間の終わりには ^{13}C 化学シフト異方性はrefocusするが、 ^{13}C 磁化は前半部分で ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用により時間推進されているため、 ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用に関する情報が t_1 時間の終わりに ^{13}C 磁化の推進位相中に残る。 t_2 時間は ^1H デカップリングのもとで ^{13}C 磁化のFIDを観測し、得られたFIDを2次元フーリエ変換すれば、 F_1 軸上には ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用粉末パターンが現れる。

また、 t_1 時間の前半で ^1H - ^1H デカップリングを行い後半の ^{15}N デカップリングをやめると、 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用粉末スペクトルを測定するためのパルス系列となる。

<実験および考察>右図は、全ての ^{13}C と ^{15}N をラベルしたL-alanineに、本研究の手法を適用して得られた2次元スペクトル上で、 α 炭素に対して F_1 軸方向summationを行った結果である。 ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用による分裂がはっきりと現れている。しかし構造的には、はっきりしたPake doublets粉末パターンが見られない。これは分子内の ^{13}C - ^{13}C 双極子相互作用が原因と考えられる。会場では ^{15}N と α 炭素のみラベルした試料の実験結果および ^{13}C - ^1H 双極子相互作用粉末スペクトルを発表するとともに、本手法がその他の異種核間双極子相互作用測定に応用できることについて議論したい。



<参考文献> [1] J. Magn. Reson., 85 (1989) 265

[2] 第35回NMR討論会講演要旨集1P6

P85 REDORによるLeu-enkephalin結晶多形の識別と立体構造構築法の開発

(姫路工大 理、慈恵会医大[‡]、国立がんセンター[§])

○西村 勝之、内藤 晶、橋元親夫[‡]、相田美砂子[§]、辻 暁、斉藤 肇

Three Dimensional Structure of Leu-enkephalin in Different Crystalline Polymorph Based on Accurate Interatomic Distances by REDOR

○Katsuyuki Nishimura, Akira Naito, Chikao Hashimoto[‡], Misako Aida[§], Satoru Tuzi, and Hazime Saitô

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, Harima Science Garden City, Kamigori, Hyogo 678-12, Japan,

‡Department of Chemistry, The Jikei University School of Medicine, Kokuryo-cho, Chofu-shi, Tokyo 182, Japan, and

§Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute, Tukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

Conformational transitions of Leu-enkephalin crystals grown from both MeOH/H₂O and H₂O were observed at characteristic temperature. Interatomic distances for the ¹³C, ¹⁵N doubly labeled Leu-enkephalins (Tyr-[1-¹³C]Gly-Gly-[¹⁵N]Phe-Leu) crystallized from MeOH/H₂O and H₂O were measured by means of REDOR. It turned out that three-dimensional structures of Leu-enkephalin were altered together with these phase transitions based on the interatomic distances thus obtained. It is emphasized that distinguishment of crystalline polymorphs is also feasible as viewed from interatomic distances.

序論

我々はこれまで、REDOR法を系統的に¹³C、¹⁵Nで二重標識したLeu-enkephalinに適用し、C-N原子間距離を±0.1Åの精度で決定できることを示した^{1,2)}。さらに精密原子間距離を満たす二面角の領域を求め、次にこの中から¹³C化学シフト値の二次構造情報³⁾に基づき可能な二面角を選択し、主鎖の立体構造を一義的に決定した。その過程でLeu-enkephalin結晶における温度依存性構造転移現象を観測した⁴⁾。今回Leu-enkephalin (MeOH/H₂O)および(H₂O)結晶の双方で最も構造変化に敏感な部位を¹³Cおよび¹⁵Nで二重標識した試料の原子間距離測定を構造転移前後の各温度で行い、各相でのLeu-enkephalinの構造をREDORによって決定することを試みた。

実験

[1-¹³C]Gly、[¹⁵N]Pheを標識したFmocアミノ酸をFmoc-OSuから合成し、これらを用いて¹³C、¹⁵N二重標識試料Tyr-[1-¹³C]Gly-Gly-[¹⁵N]Phe-LeuをABI社ペプチド合成機
固体高分解能NMR、原子間距離測定、Enkephalin、3次元構造決定法、結晶多形

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

により固相法で合成し、逆相 HPLC で精製した。非標識試料を用いて標準率 30% に希釈した試料も調製した。最終的に MeOH/H₂O および H₂O により結晶化を行い、各々微結晶を得た。

¹³C-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, ¹³C, ¹⁵N の共鳴周波数はそれぞれ 400.16 MHz, 100.64 MHz, 40.55 MHz であった。¹⁵N 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 ¹³C, ¹⁵N 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 30 mg を内径 5 mm φ のジルコニア製試料管中央部 6 mm の幅に詰め¹⁾。試料管の回転は回転周波数コントローラーにより 4000 ± 3 Hz に調節して行った。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 (Full echo - REDOR) / REDOR = ΔS/S₀ として REDOR 効果を回転周期の整数倍 (NcTr) を変化させて求め、理論曲線との比較から原子間距離を解析した。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。

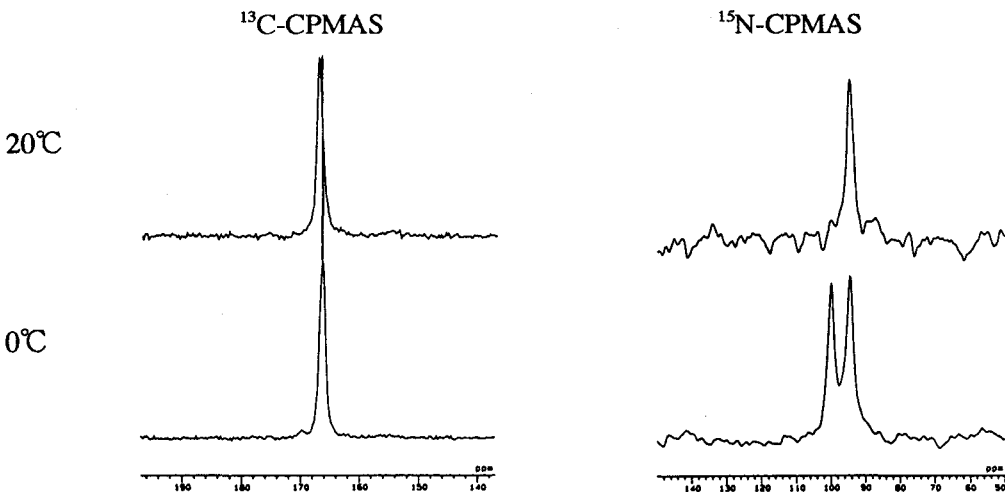


Figure 1 ¹³C-, ¹⁵N-CPMAS spectra of Tyr-[1-¹³C]Gly-Gly-[¹⁵N]Phe-Leu(H₂O) at 20 and 0 °C.

結果と考察

等方的化学シフト値の一致から、100%、30% 標識試料が同一のコンホメーションをとっていることを確認した²⁾。図1に Leu-enkephalin(H₂O) 結晶の 0°C、20°C の各温度での ¹³C, ¹⁵N-CPMAS スペクトルを示す。また表 1 に各温度で Leu-enkephalin (MeOH/H₂O) および (H₂O) 結晶の Gly₃C=O と PheN の化学シフト値を示す。

図1から Leu-enkephalin(H₂O) 結晶では室温から温度を下げていくと化学シフト値の異なる信号が、新たに生じることが分かる。20°C で観測された化学シフト値は、0°C で観測された二つの化学シフト値の間ではないため、この変化は 2 種類の異なる分子間の化学交換速度の低下に起因する信号変化ではないことが結論できた。

転移点は10°C付近にあることがCPMASスペクトルの温度変化から示唆された。また、一方の¹⁵N化学シフト値は20°Cの値に近いが、もう一方の値は大きく異なることから、この標識¹⁵N核の周辺は少なくとも立体構造に変化が生じていることが分かった。すなわち20°Cではほぼ2つの等価な構造が、0°Cでは非等価な二つの構造に転移していることが分かった。さらに原子間距離を測定することにより、明確にその違いが確認できた。この構造変化は温度に依存するが、可逆的な変化であり、溶媒分子であるH₂Oとの水素結合状態や数が増減することが原因であると考えられる。

図2にNcTr=16msでのLeu-enkephalin(H₂O)結晶の¹³C-REDORとFull echoスペクトルを示す。同位体二重標識試料の微結晶環境に起因する、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を、同位体標識率100%、30%の試料実験値を外挿することにより削除し、精密な原子間距離を求めた^{1,2)}。表2に決定した原子間距離を示す。

Table 1 ¹³C and ¹⁵N chemical shift values of Tyr-[1-¹³C]Gly-Gly-[¹⁵N]Phe-Leu(MeOH/H₂O) and (H₂O) crystals.

temperature	H ₂ O		MeOH/H ₂ O	
	¹³ C	¹⁵ N	¹³ C	¹⁵ N
20°C	167.3	94.7	170.7	92.8, 94.2
0°	166.3	94.7, 100.2	*	*

* Not determined

Table 2 ¹³C-¹⁵N interatomic distances of Tyr-[1-¹³C]Gly-Gly-[¹⁵N]Phe-Leu(MeOH/H₂O) and (H₂O) crystals.

temperature	interatomic distance	
	H ₂ O	MeOH/H ₂ O
20°C	4.35 Å	3.79 Å
-5°C	4.10 Å	*

*Not determined

表2の原子間距離測定結果から、Leu-enkephalin(H₂O)においては構造転移後の立体構造は転移前の構造に比べより曲がった構造になっていることがわかった。またこの立体構造はLeu-enkephalin(MeOH/H₂O)に比べると、より伸びた構造であることも判明した。またLeu-enkephalin(H₂O)結晶はX線回折法によりその立体構造が報告されているが⁹⁾、標識位置の原子間距離を比較する限り、1Å以上異なるため、本研究で測定した結晶はこの報告されている結晶とは立体構造の異なる別の多形構造であることが示唆された。この構造転移の潜熱を定量的に観測するため、DSC

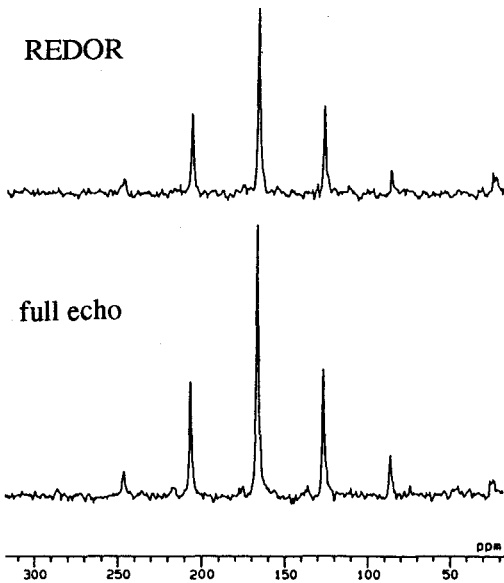


Figure 2 ^{13}C -REDOR and full echo spectra of 100% doubly labeled Tyr-[1- ^{13}C]Gly-Gly-[^{15}N]Phe-Leu(H_2O) at $\text{NcTr} = 16\text{ms}$.

測定を行っている。

一方 Leu-enkephalin ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) 結晶では上述の Leu-enkephalin (H_2O) 結晶とは異なり、構造転移は温度変化に対して不可逆的であった。すなわちこの結晶においても室温から温度を下げていくと新たに ^{13}C および ^{15}N -CPMAS 信号が生じてくるが、一度低温まで温度を下げてしまうと温度を上げ直しても元の状態には戻らなかった。また DSC 測定からも、不可逆的な構造転移を生じることが確認でき、転移点は $5\sim 5^\circ\text{C}$ の間にあることが分かった。これは結晶水の凍結に基づくペプチド骨格の変化を直接観測しており、タンパク質モデルとしても極めて興味深い。Leu-enkephalin の X 線回折において、データの再現性に関する問題が指摘されているが、今回観測した構造転移現象がこの X 線回折データの解析を困難にしている原因であると考えられる。

転移前の Leu-Enkephalin ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) は、系統的な精密原子間距離に基づいて求めた結果、主鎖の立体構造は、C、N 末端ともに完全に伸び切った構造であるのに対して、Gly₃ 周辺ではわずかに曲がった構造をしていることをすでに報告した⁹⁾。構造転移後の原子間距離が決定できれば、より明確に違いを示すことができる。この試料は現在測定中である。

このように効果的な原子間距離を測定することによっても、各結晶多形中の enkephalin 分子の立体構造の違いを有意に決定できることが示された。

また昨年報告した Leu-Enkephalin($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) 結晶主鎖の三次元構造の構築法の精密化の結果とともに最終報告についても示す。

- 1) A. Naito, K. Nishimura, S. Kimura, S. Tuzi, N. Yasuoka, M. Aida, H. Saito., *J. Phys. Chem.*, **100**, 14995 (1996).
- 2) A. Naito, K. Nishimura, S. Tuzi, H. Saito., *Chem. Phys. Letters*, **229**, 506 (1994).
- 3) H. Saito and I. Ando, *Ann. Rep. NMR Spectroscopy*, **21**, 209 (1989).
- 4) R. Wiest, V. Pichon-Pesme, M. Benard, and C. Lecomte, *J. Phys. Chem.*, **98**, 1351 (1994).
- 5) K. Nishimura, A. Naito, T. Hashimoto, M. Aida, S. Tuzi, and H. Saito, *Proceeding of 35rd NMR symposium Kyoto 1996*.

Structural Analysis of a Glassy Crystal by Deuterium Quadrupole-Order Exchange NMR

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

○Shinji Ichikawa, Atsushi Kubo, Fumio Imashiro, and Takehiko Terao

Abstract: Deuterium selective quadrupole-order exchange NMR experiments were performed on a glassy crystal pentachlorotoluene $C_6Cl_5CD_3$ using a homemade magic-angle hopping probe, which enables us to switch the single crystal orientation during a mixing time. The quadrupole-order exchange takes place selectively between the two doublets the quadrupole splittings of which coincide with each other during the mixing time. The cross-peak evolutions during the mixing time were measured.

[序論]

ペンタクロロトルエン分子は、結晶中で室温においてベンゼン環の擬六回軸の周りに回転再配向運動を行っている。150 K 以下においてはこの運動が凍結し、メチル基の配向が乱れたまま、系はガラス結晶状態へ移行する[1]。メチル基のそれぞれの配向の占有率は、重水素化したペンタクロロトルエンの重水素 NMR スペクトルにおいて観測されるダブルットの面積強度から決定された。本研究では、着目しているメチル基の配向とその近傍にある他のメチル基の配向が、相関を持つのか調べることを目的として、単結晶重水素NMRのスピンドiffusionの実験を行った。低温において、配向の乱れに対応して異なる四重極分裂を示す信号のうちの一つを選択的に励起し、交換時間の前にサンプルを回転させて、相関を観測したいサイトの四極子分裂を交換時間の間のみ一致させて選択的にスピンドiffusionを行い、元の位置に戻して観測した。

[理論]

スピン $I=1$ である 2 スピン系のハミルトニアン H が、
 $H = H_{Q1} + H_{Q2} + H_d$

$$H_Q = \frac{\omega_Q}{3}(3I_z^2 - \mathbf{I} \cdot \mathbf{I}) \quad H_d = \frac{\omega_d}{2}(3I_{1z} \cdot I_{2z} - \mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2)$$

重水素NMR、マジックアングルホッピング、スピンドiffusion

いちかわ しんじ、くぼ あつし、いましてろ ふみお、てらお たけひこ

と表されるとき、四極子オーダーを $Q_z = 3I_z^2 - \mathbf{I} \cdot \mathbf{I}$ と表すと、
四極子オーダー Q_z の交換は、

$$\langle Q_{1z}(t) \rangle - \langle Q_{2z}(t) \rangle = \frac{\Delta\omega_Q^2}{\Delta\omega_Q^2 + \omega_d^2} + \left(\frac{\omega_d^2}{\Delta\omega_Q^2 + \omega_d^2} \right) \cos\left(\sqrt{\Delta\omega_Q^2 + \omega_d^2} \cdot t\right) \quad (1)$$

$$\Delta\omega_Q = \omega_{Q1} - \omega_{Q2}$$

と表せる。 $\Delta\omega_Q = 0$ のとき、 $\langle Q_{1z}(t) \rangle - \langle Q_{2z}(t) \rangle = \cos(\omega_d t)$ となり 2 スピン間で交換が起こることがわかる。

[実験]

試料として、メチル基を重水素化した pentachlorotoluene $C_6Cl_5CD_3$ の単結晶を用いた。試料は単結晶の b 軸が、自作した magic angle hopping プローブの goniometer の回転軸と一致するようにとりつけた。goniometer の回転軸は静磁場と 54.7° の角度をなすようにセットした。goniometer を回転させるために取り付けられたプーリーはステッピングモーターに取り付けたプーリーと糸でつなぎ、ステッピングモーターをパルスシーケンスと同期して制御することにより、パルスシーケンスに応じて、試料の配向を変えられるようにした[2]。サンプルを 11° 回転させたときは、糸のあそびに対応して始め 3 ms のブランクタイムがありその後 9 ms で回転し、移動を始めてから完全に静止するまで、ブランクタイムを含めて回転に要する時間として、15 ms を必要とした。スピン拡散の測定は、Chemagnetics Infinity 300 スペクトロメーターを用い、46 MHz の共鳴周波数で 138 K において行った。図 1 に示すパルスシーケンスを使って測定した。選択励起ソフトパルスとして幅が $400 \mu s$ のガウシアンソフトパルスを用いた。表 1 に示す phase and frequency cycles を用いると、四極子オーダーのみを位相のゆがみなく観測することができた。

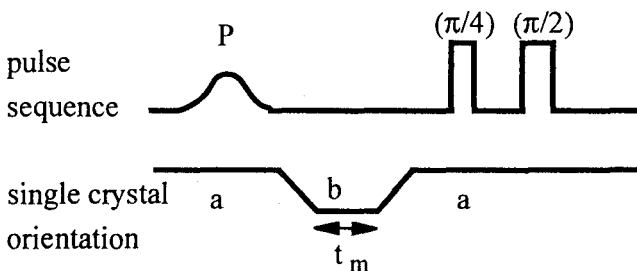


Fig.1 Pulse sequence for a selective quadrupole-order exchange experiment (SEQURE). P is a Gaussian π pulse applied at one peak of a selected doublet with an offset frequency f . Phase and frequency cycles are shown in

table. A stepping motor switches the single crystal orientation from a to b between the preparation and the mixing (t_m) times and from b to a between the mixing (t_m) and the detection times, respectively.

frequency of selective pulse	phase		receiver
	$(\pi/4)$	$(\pi/2)$	
f	x	x	x
f	x	-x	x
-f	-x	-x	x
-f	-x	x	x

Table 1 Phase and frequency cycles for the pulse sequence shown in fig.1. These cycles are further increased by a factor of four by changing the phases of the $(\pi/4)$ and $(\pi/2)$ pulses and the receiver phase simultaneously by 90° , 180° , and 270° , respectively.

[結果及び考察]

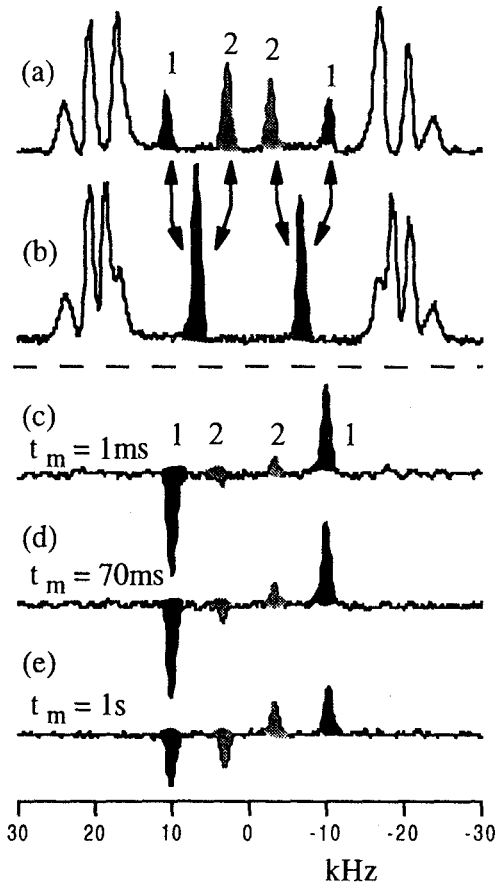


図1の検出時間と交換時間の結晶の配向で測定した四極子エコースペクトルをそれぞれ図2の(a)、(b)に示した。(c)、(d)、(e)は、選択励起交換スペクトルであり、交換時間(t_m)の増加に従い、ダブレット1の四極子オーダーが、ダブレット2に移動しているのが観測されている。ダブレット1、2の面積強度を I_1 , I_2 とし、その交換時間(t_m)による変化をプロットしたものを図3に示す。図4において、ダブレット1と2の四極子分裂の大きさの差に対する面積強度の変化を示した。ここで、 $\Delta\nu_Q = \nu_{Q1} - \nu_{Q2}$ である。ピークの半値幅が、約500 Hz あるので、ピークの重なる範囲においてのみ、交換が起こっていることがわかる。

Fig.2 The mixing time dependence of SEQUIRE spectra (c - e). (a) and (b) are

quadrupole echo spectra recorded at the orientations during the detection and the mixing times of SEQUIRE experiments (c - e), respectively.

Fig.3

The mixing time (t_m) dependences of I_1 and I_2 , which are the area intensities of the doublet 1 and 2, respectively. (ii) shows the short part of the mixing time(t_m) in (i).

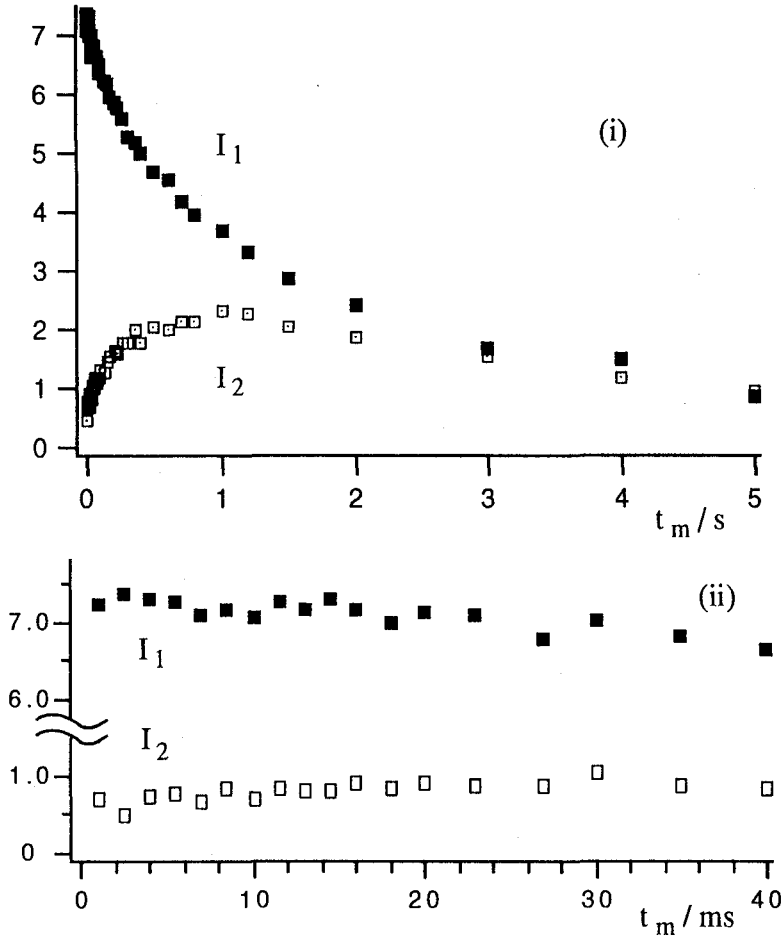
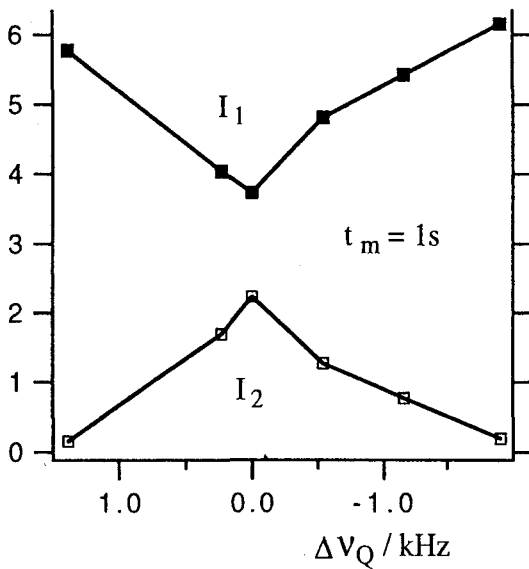


Fig.4 The dependence of I_1 and I_2 on the difference of the quadrupole splitting between doublets 1 and 2. $\Delta v_Q = v_{Q1} - v_{Q2}$

[参考文献]

- [1] A. Kubo, A. Yogo, F. Imashiro, and T. Terao, J. Phys. Chem., **100**, 39, (1996)
 [2] J. Z. Hu, A. M. Orendt, D. W. Alderman, C. Ye, R. J. Pugmire, and D. M. Grant, Solid State Nucl. Magn. Reson., **2**, 235-243, (1993)



**Structural Analysis of the ^{13}C , ^{15}N multiple labeled powder peptide sample
by Solid State NMR Experiments**

Kaoru Nomura, K. Takegoshi, and T. Terao

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

Abstract : Several solid state NMR techniques including the R2TR [1] and the Rotational Resonance [2] methods and their 2D variants have been applied to obtain the tertiary structure of the ^{13}C , ^{15}N multiple labeled powder peptide sample. We examine the limitation and the applicability of the solid-state NMR approach to determine the structure of a peptide.

我々はこれまでに、多スピン系において、特定の同種核スピン間の双極子相互作用のみをMAS下で選択的に復活させる方法（R2TR法）を開発し核間距離の測定を行った。また、この方法を固体多次元相関NMR法に応用することにより、結合角や二面角を測定する手法などを開発した。本研究では、既存の測定手法や上記の手法を用いて、 ^{13}C , ^{15}N で均一に多重ラベルしたペプチドの粉末試料の立体構造の決定を試み、これまでの手法の適応限界や難点などについて検討した。モデルサンプルとしては、1分子中に ^{13}C を8個、 ^{15}N を2個含むグリシルイソロイシン ($\text{C}_8\text{N}_2\text{H}_{16}\text{O}_3$) を選んだ。

行った解析のプロセスは以下の通りである。まず、 ^{13}C - ^{13}C 同種核COSY法により、 ^{13}C -NMRスペクトルの帰属を行った。次に、 ^{13}C - ^{15}N 双極子相関2次元NMR法により、 ^{13}C - ^{15}N 核スピン間の距離を求めた。さらに、R2TR法またはR2法により、いろいろなペアの核間距離を求めた。最後に、R2TR法を用いた固体多次元相関NMR法により得られた双極子/双極子相互作用相関NMR粉末パターンにより、二面角などを決定した。

Reference

1. K. Takegoshi, K. Nomura, and T. Terao, Chem. Phys. Lett. **232**, 424 (1995).
2. E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, and V. T. Wynn, Phys. Lett. **4**, 99 (1963).

多次元固体NMR法 / R2TR法 / 多重ラベル / 固体粉末試料 / 立体構造解析

のむらかおる、たけごしきよのり、てらおたけひこ

P88 半整数スピン核の固体高分解能NMRを得るための 二つの測定法(DOR、MQ-MAS)の比較

(日本電子) ○杉沢寿志・樋岡克哉

The comparison between MQ-MAS and DOR NMR spectroscopy for half integer quadrupolar nuclei

○Hisashi Sugisawa, Katsuya Hioka

Analytical Instrument Division, JEOL Ltd.

After the discovery of Multiple-Quantum Magic-Angle Spinning(MQ-MAS) method by L. Frydman and J. S. Harwood in 1995, the half integer quadrupolar nucleus are becoming to the target of material researchers. In this research area, the DOR and DAS techniques are commonly used. But both method demand special probes and have serious mechanical limitations. The MQ-MAS method demands the MAS-probe only. Therefore the MQ-MAS is promising method. We compared between the DOR and MQ-MAS spectroscopy on the ability of site resolution.

はじめに

固体高分解能 NMR 法が高分子材料/触媒等の固体材料のキャラクタリゼーション、分子レベルでの構造解析に有用な情報を与えることは、これまでの研究成果によって実証されている。さらに近年、多様なプローブの開発と測定法の開発/発見によって、その可能性が大幅に広がってきたように見える。しかし、その多くの手法の中から、現実の材料解析に有効な手法を選び出し、実際に適用し、真に有用な情報を引き出すことは、必ずしも容易ではない。我々は、各種測定法における解析能力を示す最も重要な指標は、サイトの分離能力であると考えている。現実の材料は、未知の複雑な成分/サイトを持っており、このような材料を解析するには、それらのサイトが十分に信頼できるだけ、スペクトル上で分離されなくてはならないからである。このような観点から見た場合、ハイパワー¹H デカップリングを併用したスピン 1/2 の希スピン系の MAS 法(いわゆる CP/MAS 法)が、幅広い応用分野を持つに至ったことは当然であったと言える。この方法は、化学シフト以外の全ての相互作用を取り除くことができ、その結果、信頼性の高いサイト情報が得られるからである。

一方、同じスピン 1/2 の核でありながら、¹H 核および ¹⁹F 核は、強い同種核双極子相互作用による線幅の広がりを抑えることが技術的に困難であったため、適用分野が限られていた。とはいえ、安定した ¹H-CRAMPS スペクトルが得られる分光計とその測定手順の確立、あるいは、高感度 ¹H-MAS 測定技術の確立による希薄 ¹H 系への適用のような有用な系の探索により、¹H 観測の固体 NMR も一定の応用分野を獲得しつつある。¹⁹F 核に関しては、高速 MAS プローブが開発されるにつれ¹⁾、適用分野が広がりつつある。

キーワード: 固体 NMR、半整数スピン核、DOR、MQ-MAS,

すぎさわひさし、ひおかかつや

このような流れに立って考えると、次なる目標は、スピンの $1/2$ 以外の核の詳細なサイト情報を得ることである。スピン $1/2$ 以外の核のうち、スピン数が $3/2$ 、 $5/2$ のような半整数スピン核の中央遷移に相当するピークは、1次の核四極子相互作用を受けないため、MASによってある程度先鋭化される。しかも残された2次の相互作用は、磁場強度に反比例するため、高磁場になるほど、線幅の広がりが抑えられ、サイトの分離能力が高まる。高磁場 NMR を用いることで、 ^{27}Al のような核であっても、ある程度のサイト分離が可能となり、限られた試料系ながら、材料解析の道具たり得たのである。しかしながら、残余の2次の核四極子相互作用による線幅の広がりは、多くの試料に対して、サイトの分離を妨げてきた。

この相互作用を取り除き、詳細なサイト情報を得る手法として、DOR(Double Rotation)法および DAS(Dynamic Angle Spinning)法が提案されている。これらの手法は、機械的に特殊なプローブを利用するため、現実の材料に適用することは容易ではなかった。1995年に Frydman によって MQ-MAS 法²⁾が提案された。これは、MAS プローブという確立され普及した技術を用い、半整数スピン核の高分解能化を達成できるので、広範な応用を持つと期待された。Frydman によって提案された最初の方法の問題点は、感度の損失が激しいことと、純粋吸収スペクトルが得られないことにあった。その後、多量子コヒーレンスの励起効率を上げるためのパルス列の工夫と純粋吸収スペクトルを得るための位相回しの提案によって、実用的な時間で、高分解能スペクトルが得られるようになってきた。本報告では、現在確立されつつある MQ-MAS 法とようやく安定して稼動するようになってきた DOR 法の長短を比較し、現実の試料系における実用性を検討する。

実験

使用した分光計は、Chemagnetics CMX-Infinity 型である。DOR プローブは、Chemagnetics 14mm DOR プローブを使用した。90度パルス幅は、7~8 μ 秒。Outer Rotor の回転速度は 700Hz 程度、Inner Rotor の回転速度は 5kHz 程度であった。静磁場強度は、300MHz または 400MHz であった。

MQ-MAS の測定には、4mm Φ APEX 型 CP/MAS プローブを使用した。典型的な MAS 速度は 15kHz 程度である。90度パルス幅は 1.5 μ 秒~2 μ 秒であった。パルスの繰り返しによる干渉を避けるために、飽和回復法により T_1 緩和時間を測定し、パルス繰り返し時間はその3倍以上に設定した。MQ-MAS 法は、D. Massiot³⁾の提案したパルスシーケンスを用いた。スピニングサイドバンドを減らし、S/N を向上させるために、回転同期サンプリングを行っている。3量子励起パルスとその検出パルスの幅は、得られるスペクトルの感度とアーティファクト信号に影響する。1量子遷移の影響を極力抑えるために、これらのパルス幅は実試料で測定した 2π または、 4π パルス幅に設定した。等方シフト軸に関しては、shearing 変換を用いて、通常の2次元表示を行えるようにした。

適用例($\text{AlPO}_4\text{-11}$)

^{27}Al 核は、 T_1 緩和時間が短い(数十ミリ秒程度)ため、DAS 法の適用が困難であった。したがって、MQ-MAS 法以前は、この核の固体高分解能 NMR スペクトルを得るには DOR 法を用いる必要があった。そこで、DOR 法と MQ-MAS 法の適用性を検討するための試料として、アルミノフォスフェート系モレキュラーシーブの ^{27}Al スペクトルを比較することにした。以下、 $\text{AlPO}_4\text{-11}$ の MAS、DOR、MQ-MAS スペクトルを比較する。 $\text{AlPO}_4\text{-11}$ は焼成等の処理を施していない。リファレンスとして、1規定の AlCl_3 水溶液を 0ppm とした。

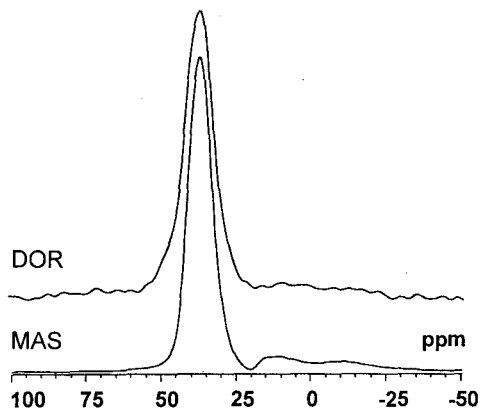


Fig.1 ^{27}Al -DOR and MAS spectra of $\text{AlPO}_4\text{-11}$
at 400MHz SCM

MAS speed is 10kHz. Outer Rotor speed is 600Hz.
Flip Angle = $\pi/4$. Exp. time for DOR is 1min.

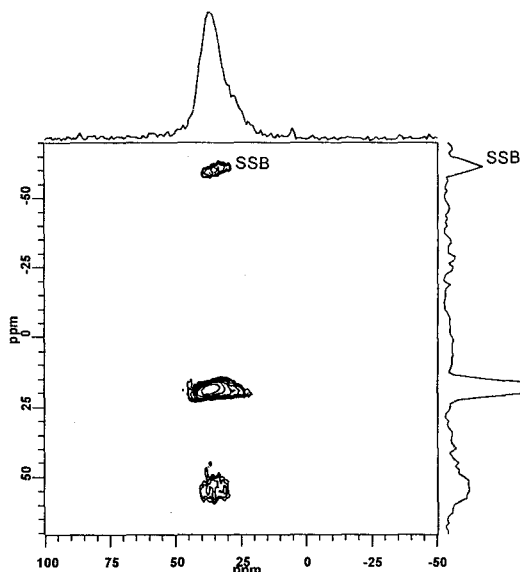


Fig.2 ^{27}Al -MQ-MAS spectrum of $\text{AlPO}_4\text{-11}$
at 300MHz SCM

MAS speed is 16kHz. PW1=9.8usec, PW2=5.0usec,
Pulse Delay=0.3sec, Scan#=128, Exp.
Time=42min

この試料の場合、MAS スペクトルと DOR
スペクトルでは、4 配位ピーク (37ppm)
の線形にほとんど変化が見られない。それに

対して、MQ-MAS 法では、18ppm を頂点と
する鋭い等方ピークと、55ppm 付近のブ
ロードな等方ピークの二つのピークが観測さ
れた。実験の都合上、今のところ、DOR ス
ペクトルが 400MHz での、MQ-MAS スペク
トルが 300MHz での測定となっている。当
日は、両スペクトルの磁場依存性に基づき、
サイト分離能についてより詳細な議論をす
る。

まとめ

DOR 法は、Outer Rotor の回転速度の限界
(600Hz~1kHz)により、サイトの分離が不十分
となるケースがある。この点、MQ-MAS 法の方
が、サイト分離能力が高いケースが多いと考え
られる。今回の $\text{AlPO}_4\text{-11}$ がその例の一つとな
る。しかし、MQ-MAS 法は、多量子コヒーレン
スの励起効率の悪さと、2 次元展開が必要なこ
とから、測定時間が長いという欠点を持つ。さら
に、多量子コヒーレンスの励起効率とその1量子遷
移への移動効率が、四極子パラメータに依存
するため、定量性に問題がある。

MQ-MAS 法、DOR 法とも、未だ適用例が少
ないため、それらを特徴づけるには至ってい
ない。ポスター発表当日、多くの方との議論
の中でより理解を深めてゆきたい。

謝辞

試料をご提供いただいた東工大工 馬場俊
秀先生に感謝いたします。

参考文献

- 1) 馬場俊秀 他、第35回NMR討論会予稿集、
99(1996)
- 2) 杉沢寿志 他、第35回NMR討論会予稿
集、52(1996)
- 3) L. Frydman and J. S. Harwood, J. Am. Chem.
Soc., 117, 5367(1995)
- 4) D. Massiot et. al., Solid State NMR, 6,
73(1996)

^1H NMR (CRAMPS) による ポリペプチドの固体構造解析 (6)

(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

Structural Analysis of Solid Polypeptides by ^1H NMR (CRAMPS) (6)

(¹Dept. Biological Sciences, Gunma University, and ²NMR Application Lab., JEOL Ltd.)

Hideaki Kimura¹, Takuo Ozaki¹, Hisashi Sugisawa²,
Kenzo Deguchi² and Akira Shoji¹

Abstract: A relation between the amide proton chemical shift and the conformation of homopolypeptides in the solid state has been studied using the ^1H CRAMPS NMR method. The amide proton signals are considerably broad and poor due to the dipolar couplings by quadrupolar interaction. In order to eliminate the quadrupolar interaction, we have synthesized some fully ^{15}N -labeled homopolypeptides and measured their ^1H CRAMPS NMR spectra, however, the signal of the amide proton in the ^{15}N -labeled polypeptides was not very sharp and rich, suggesting that the cause of NH signal broadening and poorness is not only by the quadrupolar interaction but also mainly the heteronuclear dipolar interaction. Thus, the amide proton chemical shifts of homopolypeptides have been successfully determined (α -helix; 8.0-8.1 ppm, β -sheet; 8.6-9.1 ppm) by fast sample spinning (3.5 kHz).

1. 緒言

^{13}C , ^{15}N CP-MAS NMR は、ポリペプチドやタンパク質の固体構造解析に有用であることは良く知られている。それに加え、最近、我々は、 ^1H CRAMPS 法をポリペプチドやタンパク質の固体構造解析に適用し、主鎖のメチンプロトン (H_α) 化学シフト値が主鎖のコンホメーション解析に有効であることを見出した¹⁻³⁾。 H_α 化学シフトが主鎖のコンホメーションに依存することを利用して、 ^1H CRAMPS 法をポリペプチドやタンパク質のコンホメーション解析に応用できることは、画期的な発見であったが、アミドプロトン (NH) シグナルが、四極子核 (^{14}N) との双極子相互作用のせいでブロードになり、その化学シフト値を決定できなかった。

今回、我々は、アミドプロトン (NH) シグナルのブロードニングの原因を明らかにし、どのように、シャープな NH シグナルを得られるかを調べた。そこで、四極子相互作用を消去するために、 ^{15}N 完全標識ポリ (L-アラニン)、ポリ (L-ロイシン) を合成し、測定した。しかし、四極子相互作用の NH シグナルのブロードニングに対する寄与はそれほど大きくはなかった。さらに、NH シグナルのブロードニ

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

グの原因を明らかにするために、QD-CRAMPS 法により、スピニング・サイド・バンド (SSB) の観測を行った。通常のCRAMPS 測定では、ピークの折り返しがあるので、SSB の観測はできないが、QD-CRAMPS 法ではそれが可能になる。

その結果、四極子相互作用よりは、むしろ、N-H 間の双極子相互作用が NH シグナルのブロードニング及び低強度の主な原因であることが分かった。このことから、¹⁵N 完全標識ポリペプチドを高速 (3.5 kHz) でマジック角回転したところ、¹⁵N-H 双極子相互作用が平均化され、NH 化学シフトを得ることができた。

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。シリコンゴム(δ 0.12 ppm)を内部基準とした。

パルス列としてBR-24を用いた場合、90度パルス幅：1.3 μ s、 τ ：3 μ s、回転周波数：2.0 kHz、待ち時間：10s とし、スケーリングファクターは0.40を用いた。MREV-8を用いた場合、90度パルス幅：1.1 μ s、 τ ：2.4 μ s、回転周波数：2.0-3.5 kHz、待ち時間：10s とし、スケーリングファクターは0.51を用いた。

3. 結果及び考察

Fig.1 に固体状態のポリ (L-アラニン) (α -helix , β -sheet) の¹H CRAMPS スペクトルを示す。驚くべきことに、四極子相互作用を消去したはずの¹⁵NH シグナルでさえ、それほど先鋭化されず、強度も低い。それでも、半値幅を比較すると、¹⁴NH シグナルよりは¹⁵NH シグナルの方がやや先鋭化されているので、四極子相互作用もNH シグナルのブロードニングに寄与している。しかしながら、NH シグナルのブロードニング及び低強度の原因は、四極子相互作用だけではないことがわかる。

NH シグナルのブロードニング及び低強度の主要な原因を明らかにするために、¹⁵N 完全標識ポリ (L-アラニン) (α -helix) の¹H QD-CRAMPS を測定し、NH シグナルのSSB を観測した (Fig.2)。NH シグナルのSSB が、 H_{α} 、 H_{β} シグナルのそれに比べ、強い強度で広い範囲に存在しているのが分かる。これは、N-H 間の双極子相互作用が非常に大きいことを意味している。このことから、NH シグナルのブロードニング及び低強度の原因は、四極子相互作用より、むしろ、N-H 間の双極子相互作用が主な原因になっていると考えられる。

四極子相互作用とN-H 間の双極子相互作用が NH シグナルのブロードニングの原因ならば、¹⁵N 完全標識ポリペプチド・サンプルを高速回転させれば、NH 化学シフト値が得られるはずである。Fig.3 に¹⁵N 完全標識ポリ (L-アラニン) の¹H CRAMPS (高速回転) スペクトルを示す。¹⁵N 完全標識ポリペプチド・サンプルを高速回転することにより、NH 化学シフト値、8.0 ppm が得られる。BR-24 パルス列では、2.0kHz 以下の回転に抑えなければならないので、高速回転 (3.5 kHz) では、よりサイクル時間の短い MREV-8 パルス列を用いた。異なるスケーリング・

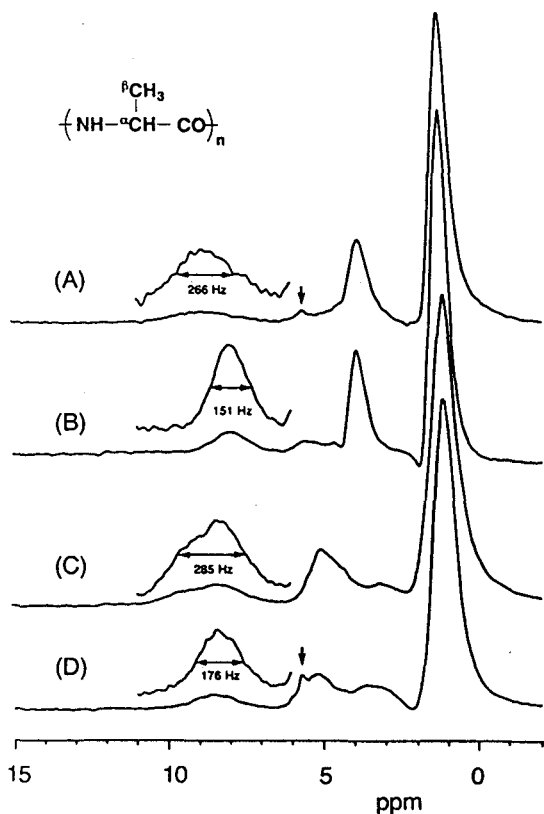


Figure 1. 300 MHz ^1H CRAMPS NMR spectra of α -helical and β -sheet poly(L-alanines) at 2.0 kHz; (A) $[\text{Ala}]_n$ -5 (α -helix; averaged degree of polymerization ($\overline{\text{DP}}_n$) = 65; natural abundance of ^{15}N), (B) fully ^{15}N -labeled $[\text{Ala}^*]_n$ -2 (α -helix; 99 atom% purity of ^{15}N , assumed weight average degree of polymerization ($A/I=100$)), (C) H- $[\text{Ala}]_5$ -NHBu (β -sheet; natural abundance of ^{15}N), and (D) fully ^{15}N -labeled $[\text{Ala}^*]_n$ -1 (β -sheet; 99 atom% purity of ^{15}N ; $A/I=4$). Peak assignment: NH, 8.5-8.0 ppm; H_α , 5.1 ppm (β -sheet); 3.9 ppm (α -helix), H_β , 1.2 ppm. Note: $-\text{CH}_2-$ peak (3.2-3.5 ppm) of *n*-butylamide group in spectra (C), (D) and artifact (\downarrow sign) (5.7 ppm) in spectra (A), (D).

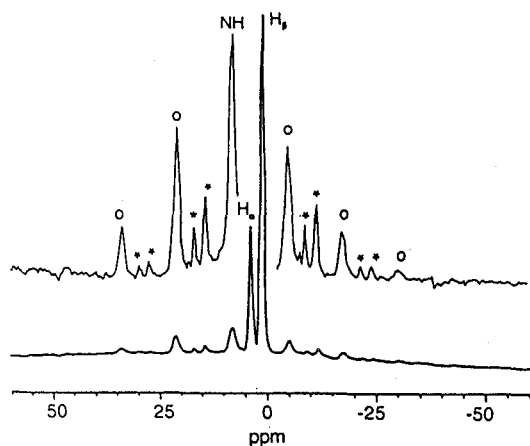


Figure 2. 300 MHz ^1H QD-CRAMPS NMR spectra of fully ^{15}N -labeled $[\text{Ala}^*]_n$ -2 in the solid state.

The sign(o) indicates spinning side bands (SSB) of NH signal and sign(*) indicates SSB of H_α and H_β signals.

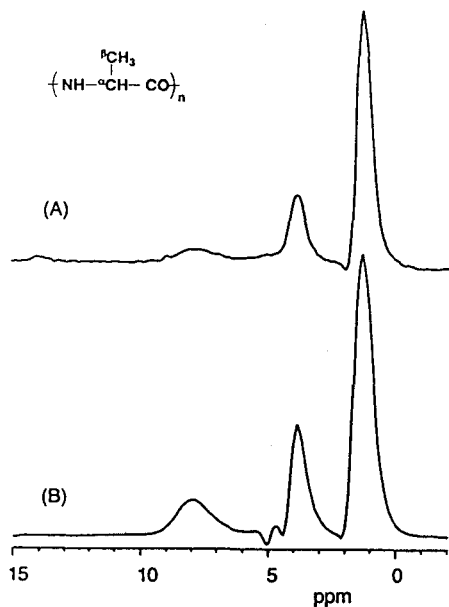


Figure 3. 300 MHz ^1H CRAMPS NMR spectra of fully ^{15}N -labeled $[\text{Ala}^*]_n$ -2 in the solid state; (A) pulse sequence, BR-24; spinning frequency (SP) 1.5 kHz, (B) pulse sequence, MREV-8; SP 3.5 kHz. Peak assignment: NH; 8.0 ppm, H_α ; 3.9 ppm, H_β ; 1.4 ppm.

ファクターを用いているが、化学シフト値はよく一致している。
 このようにして得た、NH 化学シフト値を Table1 にまとめた。

Table 1. Synthetic condition and their characteristics of homopolypeptide samples .

Sample	A/I ^a	Conformation ^b	H _β , H _γ , H _δ ^c	H _α ^d	NH ^e
H-[Ala] ₅ -NHBU	—	β-sheet	1.2	5.0	8.4
[Ala] _n -5	65	α-helix	1.4	3.9	8.2
[Ala*] _n -1	4	β-sheet	1.2	5.2	8.6
[Ala*] _n -2	100	α-helix	1.4	4.0	8.0
[Leu] _n -1	5	β-sheet ^f	0.9, 1.5	5.5	—
[Leu] _n -2	100	α-helix	0.8, 1.7	4.0	8.2
[Leu*] _n -1	5	α-helix+β-sheet ^g	0.9, 1.6	5.4(4.0)	(9.1,8.2)
[Leu*] _n -2	100	α-helix	0.8, 1.6	4.0	8.1

Abbreviations: Ala, L-alanine; Leu, L-leucine; Ala*, ¹⁵N fully labeled L-alanine; Leu*, ¹⁵N fully labeled L-leucine; NHBU, n-butyl amide; α-helix, right handed α-helix; β-sheet, anti-parallel β-sheet. ^aThe molar ratio of the monomer (A) to the initiator (I), which corresponds to the theoretical number-averaged degree of polymerization (\overline{DP}_n). ^bConformations of these samples were determined by the ¹³C and/or ¹⁵N CP-MAS NMR, IR and far-IR spectroscopic methods. ^cChemical shift values of side chain proton signals (ppm) at 2.0 kHz. ^dChemical shift value of methyne proton signal (ppm) at 2.0 kHz. ^eChemical shift value of amide proton signal (ppm) at 3.5 kHz. ^fcontaining only a little amounts of α-helix. ^gcontaining small amounts of α-helix.

4. 結論

我々は、¹⁵N 完全標識ポリペプチド・サンプルを高速回転することにより、NH 化学シフト値 (α-helix; 8.0-8.1 ppm, β-sheet; 8.6-9.1 ppm)を得た。これらの値は、溶液の ¹H NMR により得られたそれらの値と非常に興味深い対応を示し、水素結合距離とNH 化学シフト値との関係にも矛盾がないことがわかった。

5. 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) 木村英昭、尾崎拓男、杉沢寿志、出口健三、莊司顯、第35回NMR 討論会講演要旨集、13-15頁、1996.
- (3) Shoji, A.; Kimura, H.; Ozaki, T.; Sugisawa, H.; Deguchi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, *118*, 7604-7607.

バクテリオロドプシンのヘリックスフラグメントの脂質二重層中での構造：REDORによる解析
 (姫路工大 理) ○木村 成輝、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇

Conformational study on helical fragments of bacteriorhodopsin in lipid bilayers based on REDOR measurements

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology
 S. Kimura, A. Naito, S. Tuzi and H. Saitô

^{13}C , ^{15}N -labeled three kinds of fragments of bacteriorhodopsin were chemically synthesized to gain insight into relative orientation, conformation and dynamics of these fragments incorporated into lipid bilayers. The $^{13}\text{C}\cdots^{15}\text{N}$ interatomic distances between four amino acid residues were also measured by REDOR experiments and the result indicates that α -helix is, indeed, formed at the labeled site.

【序】バクテリオロドプシン(bR)は高度高塩菌の紫膜中に存在する膜タンパク質であり、光駆動型プロトンポンプとしての機能を有する。このタンパク質の7本の膜貫通ヘリックスは膜面に対して垂直に並び補欠分子族としてのレチナールを囲んでいる。我々はこれまで[3- ^{13}C]Alaを標識したbRの固体高分解能 ^{13}C NMRによる研究から、bR中のヘリックスには α_{H} ヘリックスと帰属した通常のヘリックスと性質の異なるヘリックスの存在を報告した。しかしこの α_{H} ヘリックスの帰属は測定手段により異なり、その性質を明らかにする必要がある。本研究では、bRの膜貫通ヘリックスを化学合成し、リン脂質二重層に再構成させた系を用いてbRの膜貫通ヘリックスの構造と運動性について詳細な情報を得ることを試みた。ヘリックスの運動性については主鎖カルボニル炭素の化学シフト異方性を解析することで情報を得た。ヘリックス構造は水素結合を形成する位置の $^{13}\text{C}\cdots^{15}\text{N}$ 原子間距離をREDOR法を用いて決定した。さらに、膜中のヘリックスの配向に関する情報を得るため、オピオイドペプチドの存在による磁場配向膜に再構成することにより、膜中でのbRヘリックスの配向についての知見も得た。

【実験】7本鎖(A~G)の膜貫通ヘリックスからなるbRのA鎖(シーケンス6~42) bR-A (long)と、それよりC端が7残基短い(6~35) bR-A (short)、さらにB鎖(36~71)をFmoc固相法で合成した。これらのフラグメントをそれぞれDMPCと共にメタノール/クロロホルム混合溶媒に溶解後、ロータリーエバポレーターにより溶媒を減圧除去した。さらに、真空ポンプを用いて完全に溶媒を取り除いた脂質フィルムに過剰の水を加え、凍結融解を繰返し膜への再構成試料を調製した。これらの試料を5mmφのジルコニア製ロータリーに詰め、接着剤を用いて完全に密封した後、Chemagetics社製CMX-400 NMR分光器により測定した。

【結果と考察】

1) MAS/静止/配向条件下における主鎖カルボニル炭素の異方性

図1に、[1- ^{13}C]Ala¹⁴標識bR-A (short)のMAS、静止状態、さらにダイノルフィンを加えた磁場配向脂質二重層における ^{13}C NMRスペクトルとそのシミュレーションを示す。静止条件下の ^{13}C NMRスペクトルにおいて、DMPCが液晶相である温度(40°C)では、フラグメントがヘリックス軸周りの速い回転運動をするためにゲル相(0°C)では現れていた化学

固体高分解能 NMR ・ 膜タンパク質 ・ REDOR ・ 構造解析 ・ 脂質二重層

きむら しげき ・ ないとう あきら ・ つじ さとる ・ さいとう はじめ

Liquid crystalline phase

Gel phase

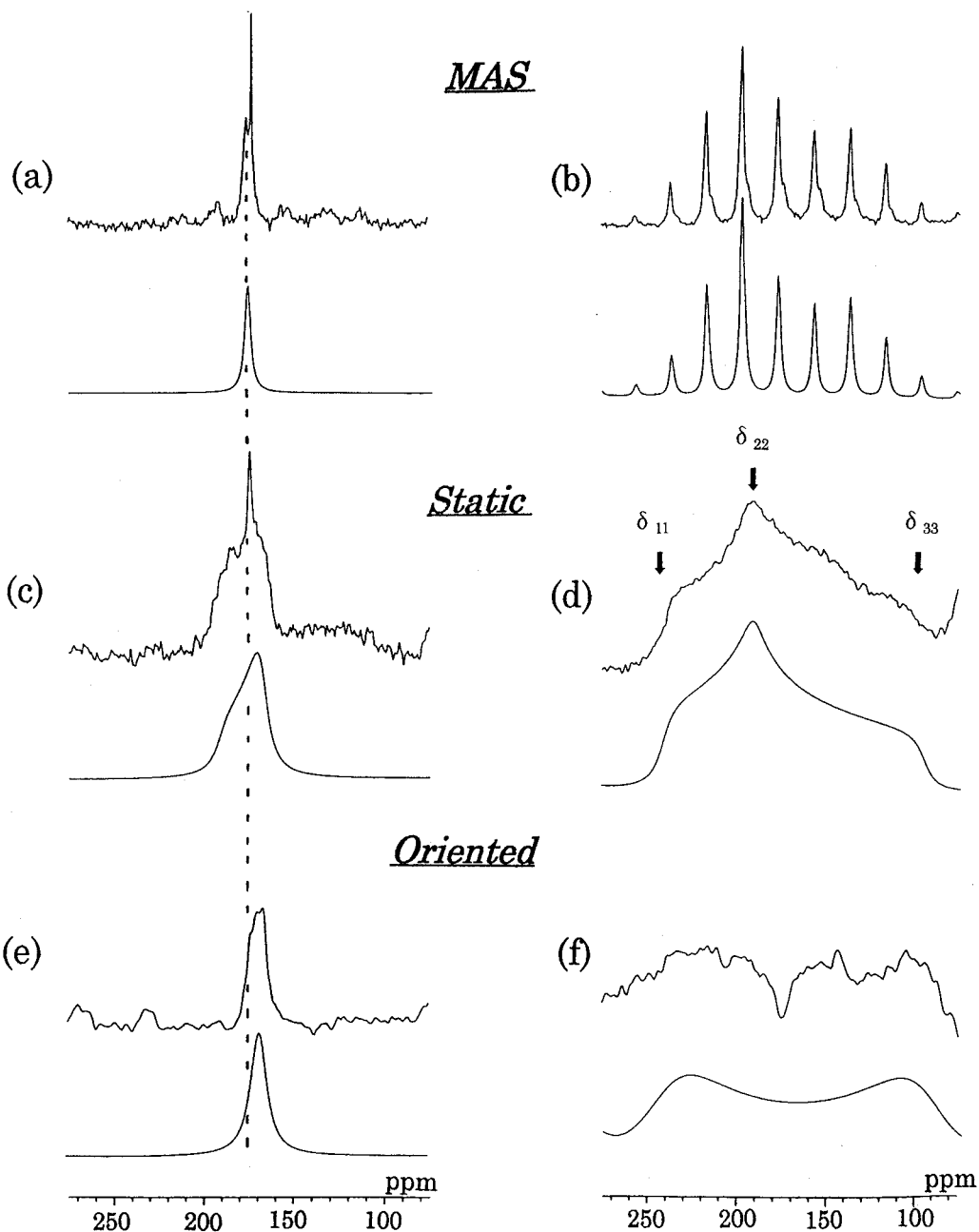


Fig.1 ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ bR-A (short) incorporated in DMPC bilayers at liquid crystalline phase (left panel) and gel phase (right panel) under MAS[(a),(b)],static[(c),(d)] and magnetically oriented[(e),(f)] conditions. Simulated spectra were also accompanied under the experimental ones.

シフトの主値である δ_{11} と δ_{33} が平均化され、ゲル相(0°C)のスペクトル(d)よりも異方性の小さいパウダーパターン(c)が得られた。また、液晶相における配向スペクトル(e)では、MAS スペクトル(a)の等方値よりも高磁場の共鳴線が観測された。これは、静磁場に対してヘリックス軸が垂直でかつヘリックス軸周りの速い回転運動が存在するときのシミュレーションの結果と一致した。 ^{31}P の NMR 信号から、脂質平面は静磁場に平行に配向していることが分かっているので、このフラグメントは脂質平面に垂直に挿入され、液晶温度ではヘリックス軸周りで回転運動をしていることが分かった。ゲル相(f)では、ヘリックス軸周りの回転が止まることから δ_{11} と δ_{33} の平均化が起こらず異方性の広がり観測されたが、 δ_{22} のピークが現れなかったことから、ヘリックスはこの温度でも磁場に配向していることが分かった。

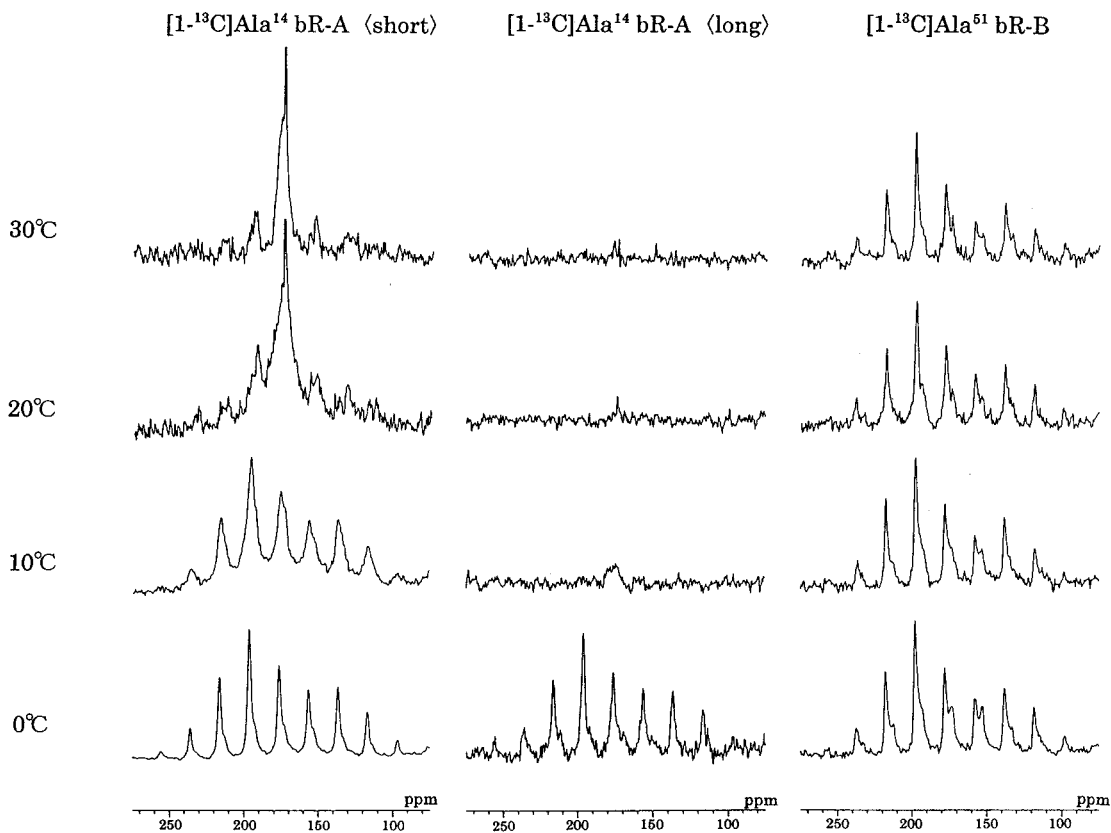


Fig.2 Temperature-variations of ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ bR-A (short) and (long) fragments incorporated in DMPC bilayers.

2) フラグメントの運動性

図2に、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ 標識 bR-A の (short) と (long)、さらに $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{51}$ 標識 bR-B の3つのフラグメントについての ^{13}C CP-MAS スペクトルの温度可変を示す。脂質が液晶の温度で bR-A (short) は、ヘリックス軸周りの速い回転運動のために異方性が減少している。それに対し bR-A (long) では、10°C以上の温度で信号が観測されなかった。bR-A (long) は、bR-A (short) より C 端に極性アミノ酸が多いために、その部位が脂質の親水部と相互

作用し、ヘリックス軸周りの回転が制限されると同時に、 $^{13}\text{C}=\text{O}$ の化学シフト異方性の程度、すなわち 100K Hz 程度の別の運動成分を持つことになり、化学シフト相互作用との干渉により信号が消失しているものと考えられる。また、B 鎖では、ヘリックス軸周りの回転が止まっているために、 30°C においても大きな異方性を示すスペクトルが得られた。

3) REDOR による $^{13}\text{C}\cdots^{15}\text{N}$ 原子間距離測定

十分に運動が止まっていると考えられる -30°C において、膜再構成フラグメントの分子内水素結合を形成する C-N の原子間距離を REDOR 法を用いて測定した(図3)。REDOR 法では、速い分子運動が存在すると双極子相互作用が部分平均を受けて弱められ、実際よりも長い距離が得られる。bR-A (long) フラグメントは bR-A (short) に比べて C 端部位の極性アミノ酸が多いためにリン脂質の極性基と強く相互作用し、ヘリックス軸周りの回転運動が制限されていることが分かったので、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ 、 $[^{15}\text{N}]\text{Ala}^{18}$ 二重標識 bR-A (long) フラグメントを膜に再構成させ、その C-N 原子間距離を測定した。その結果、その 4 アミノ酸残基離れた C-N 原子間距離を $4.5 \pm 0.1 \text{ \AA}$ と決定できた。この結果は、 Ala^{14} の $^{13}\text{C}=\text{O}$ と Ala^{18} の $^{15}\text{N}-\text{H}$ 間で水素結合を形成して α -ヘリックス構造をとる場合の距離と一致する。このように比較的長いフラグメントを用いることにより、運動による双極子相互作用の平均化を受けることなく、高い精度で膜中フラグメントの原子間距離を測定できることが判明した。

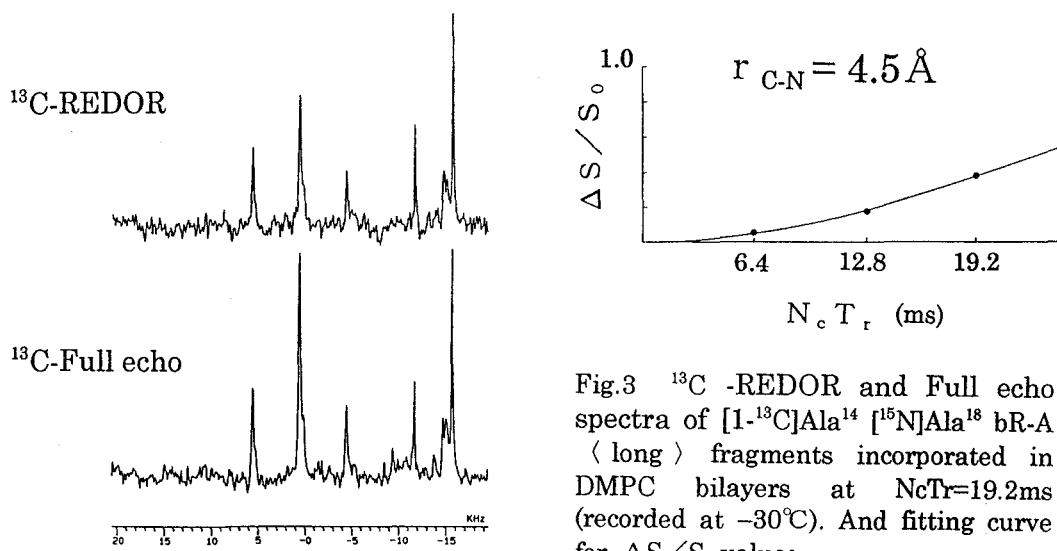


Fig.3 ^{13}C -REDOR and Full echo spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{14}$ $[^{15}\text{N}]\text{Ala}^{18}$ bR-A (long) fragments incorporated in DMPC bilayers at $N_c\text{Tr}=19.2\text{ms}$ (recorded at -30°C). And fitting curve for $\Delta S/S_0$ values.

【まとめ】ペプチドの主鎖カルボニル炭素の信号を解析することによって膜貫通ヘリックスの構造および運動性に関する情報が得られた。膜貫通フラグメントにおいて、膜外部分のアミノ酸残基の数が増えることで、ヘリックスの運動性が大きく制限されることが判明した。また、アミノ酸配列の違いがヘリックスの運動性に影響を与えていることも判明した。このようにヘリックスの運動性を下げることができたことにより、REDOR 法を用いて高い精度で原子間距離を測定することが可能になった。従来、膜ペプチドの原子間距離の決定には運動による補正を考慮しなければならなかったが、本研究でその必要のないことを示すことができた。本研究で示したように、磁場配向膜を調製することが可能になったことから、膜貫通フラグメントが膜面に対して垂直に配向している直接の情報を得ることができた。これらの方法は、膜タンパク質の運動性と構造を調べる上で重要な情報を与えることが分かった。

(Kyoto Univ.) K. Takegoshi, D. Reichert, T. Terao

The dependence of the ^1H -driven ^{13}C -spin diffusion on ^1H decoupling during the spin-diffusion time was examined under MAS. We show that there is a maximum spin-diffusion rate at a finite decoupling strength and discuss the result qualitatively using existing theories.

γ-バロラクトン (Valerolactone (V a 1)) のR体とS体を見分けて包接化合物を作ることが知られている。その構造は今城らにより固体NMR法を用いて研究され [1]、包接されたR体とS体の比率はR : S = 2 : 3であることが示されている。我々はR体とS体がどのように空間的に並んでいるかに興味を持った。果たしてR体とS体は各々で集合してドメインを形成しているのか？R体とS体は混ざって存在しているのか？それならばその分布はどうなっているのか？このような固体中の不均一構造を研究するアプローチとして ^{13}C - ^{13}C 間のスピン拡散に注目した。実際に、今城らはMAS下でS体とR体のメチル基 (99% ^{13}C 化) 間のスピン拡散を観測している。つまり、ドメインの形成は否定されている。

さて、 ^{13}C - ^{13}C 間のスピン拡散を隣のV a 1からさらに隣のV a 1へとつなげていく必要がある。スピン拡散速度は速ければ速いほど T_1 以内に伝えることの出来る範囲が広がって、より詳細な分布を得ることが可能になる。従って、最高のスピン拡散速度を得るための方法・条件を、まず検討した。

MAS下で ^{13}C 間のスピン拡散を生じさせる機構として、rotational resonance法 [2] が考えられるが、V a 1のR体とS体のメチル基の化学シフト差はわずか70 Hz (7 T) であるので、この系には適用出来ない。 ^{13}C にCWラジオ波を照射するR2TR法 [3] は、 H_1 下でのスピン格子緩和時間が短くなるために、スピン拡散速度の増大のメリットが打ち消されてしまう場合があり、この系に適用することは難しい。他のパルス法も同様の難点がある。そこで、 ^1H 駆動 (^1H -driven) と呼ばれる手法を採用した。今回は ^1H 駆動機構のスピン拡散における ^1H のデカップルの最適条件について発表する。

[1] F. Imashiro, D. Kuwahara, and T. Terao, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1759 (1993).

[2] E.R. Andrew, A. Bradbury, R.G. Eades, and V.T. Wynn, *Phys. Lett.* 4, 99 (1963).

[3] K. Takegoshi, K. Nomura, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* 232 424 (1995).

Key Words: 固体NMR、スピン拡散

たけごし きよのり、でとれふ らいへると、てらお たけひこ

固体高分解能 ^{13}C NMRによるバクテリオロドプシンの
脂質および界面活性剤との相互作用の解析

(姫路工大) ○谷生 道一、辻 暁、内藤 晶、斉藤 肇

A High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR Study on Lipid-Protein and Detergent-Protein interactions in Purple Membrane

○Mchikazu Tanio, Tuzi Satoru, Akira Naito and Hazime Saitô
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We measured ^{13}C NMR spectra of partially delipidated or solubilized $[3-^{13}\text{C}]$ Ala labeled bacteriorhodopsin by solid-state NMR methods. In partial delipidation without disruption of trimeric structure, we found that local conformational change was induced from α_{II} -helix (16.4 ppm) to α_{I} -helix (14.5 ppm) together with increased flexibility of loops regions. It was also demonstrated that disrupted trimeric structure of bR to monomer by Triton X-100 resulted in additional peaks at 18.1, 15.5 and 14.5 ppm for loops, transmembrane α_{II} -, α_{I} -helices, respectively. In addition, appreciably increased helical peaks were associated with solubilization by SDS and ascribed to a conversion from the peak resonated at the position of random coil to α -helical chains arising from Ala residues at the interface of membrane surface.

【序論】

膜蛋白質は周囲を脂質で囲まれた環境で機能している。膜蛋白質は疎水性であるため精製や結晶化は界面活性剤を用いた可溶化によって行われるが、可溶化処理により多くの脂質は蛋白質との相互作用を失う。したがって、脂質の膜蛋白質の構造と機能に対する影響についての知識を得ることは、膜蛋白質一般の研究においても重要である。高度好塩菌の紫膜 (PM) に含まれるバクテリオロドプシン (bR; 分子量 26000) は、PM中で三量体を形成し、光駆動プロトンポンプとして働く膜蛋白質である。bRは界面活性剤を用いずに脂質と複合体を形成した膜断片 (PM) として精製可能であり、また固体高分解能NMRを用いることで、膜の状態で、常温での構造とダイナミクスの情報を得ることができる。特に $[3-^{13}\text{C}]$ Ala標識bRの ^{13}C NMRスペクトルは、Fig. 1, 2に示すように、コンホメーション依存化学シフトにより α_{I} -ヘリックス、 α_{II} -ヘリックス、ループ部位、ランダムコイル構造の各二次構造に帰属された^{1)~4)}。我々はこれらの帰属をもとに、脂質を部分的除去したbR (三量体) および可溶化したbR (単量体) の高次構造とダイナミクスを、PM中のbRと比較、検討した。またbRでは、

固体高分解能NMR、バクテリオロドプシン、脂質-蛋白質間相互作用、蛋白質-蛋白質間相互作用、界面活性剤-蛋白質間相互作用

たにおみちかず、つじさとる、ないとうあきら、さいとうはじめ

NMR, IR, CDなどにより、通常の α -ヘリックスとは異なるヘリックス、 α_{II} -ヘリックスの存在が確認されているが、低温電子顕微鏡により得られた立体構造モデルでは確認されていない。今回の結果から α_{II} -ヘリックスに関する新しい知見も得ることが出来た。

【実験】

[3-¹³C]アラニン標識bRを含むPMは、[3-¹³C]アラニンを含む合成培地で培養した高度好塩菌より遠心分離により精製した。

脱脂処理は界面活性剤CHAPS、ドデシルマルトシド (DM)、デオキシコール酸 (DOC) を用いて行った。可溶化はTritonX-100 (TX100)、TritonN-101 (TN101)、DM、SDSを用いて行った。bRはこれらの脱脂処理では三量体、可溶化処理では単量体であることが分かっている。

NMR測定は、脱脂試料は遠心沈澱させたものを、可溶化試料は限外濾過により濃縮したものを試料とし、20℃、遮光状態で行った。測定方法はCP-MAS法、DD-MAS (双極子デカップルドMAS) 法を用いた。

【結果と考察】

1) 脱脂PM (三量体)

Fig. 1にintact PMとCHAPS/DM脱脂[3-¹³C]Ala標識PMのDD-MASスペクトル (a-b) とそのデコンボリューションスペクトル (c-d)、Fig. 2にintact PM、DOC、CHAPS、CHAPS/DM脱脂処理[3-¹³C]Ala標識PMのCP-MASスペクトル(a-d) とそのデコンボリューションスペクトル (e-h) を示す。各脱脂PMはDD-MAS、CP-MASスペクトルともに、PMと類似した線形を示

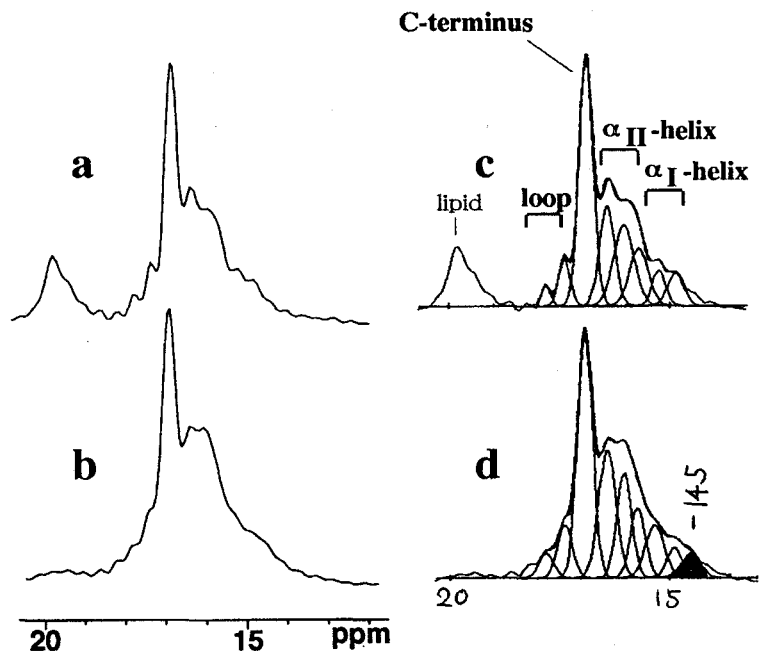


Fig.1 ¹³C DD-MAS spectra of intact(a) and CHAPS/DM treated [3-¹³C]Ala-PM(b), and (c) and (d) are obtained by deconvolution of (a) and (b), respectively.

した。これは、これらの脱脂処理がbRの二次構造に著しい変化を与えないことを示しており、特にDOC処理PMは低温電子顕微鏡によるデータと一致する⁵⁾。ただし、DD-MASスペクトルでは、各脱脂処理PMに共通して α_1 -ヘリックスに帰属される14.5 ppmに新たな信号が観測された

(Fig. 1)。さらにCP-MASスペクトルでは α_{II} -ヘリックスに帰属される16.4 ppmの信号強度の減少と14.5 ppm付近の信号の出現、およびループ部位の信号強度の減少が観測された (Fig. 2)。これはbRが脂質の除去により、 α_{II} -ヘリックス (16.4 ppm) から α_1 -ヘリックス (14.5 ppm) への構造変化とループ部位に揺らぎによる交差分極 (CP) 効率の減少が起こることを示しており、脂質がbRの膜貫通ヘリックスの構造とループ部位の運動性に影響を与えていることが分かった。

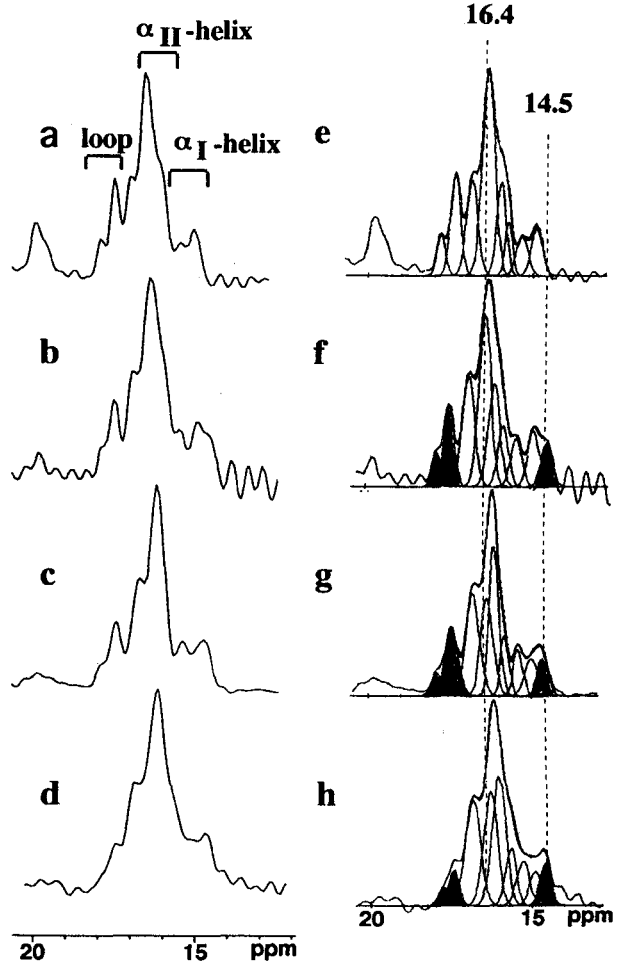


Fig.2 ^{13}C CP-MAS spectra of intact(a), DOC-treated(b), CHAPS-treated(c) and CHAPS/DM-treated [3- ^{13}C]Ala-PM(d), and (e)-(h) are obtained by deconvolution of (a)-(d), respectively.

2) 可溶性bR (単量体)

Fig. 3にTriton X-100 (TX100 ; a)、TritonN-101 (TN101 ; b)、DM可溶性(c) [3- ^{13}C]Ala標識bR (UV吸収極大波長はそれぞれ550 nm) のDD-MASスペクトルを示す。Fig. 3より、各可溶性bRのDD-MASスペクトルはPMと類似した線形であるが、PMに比べ共通して、15.5 ppm付近の信号強度がやや上昇している。これは、界面活性剤の種類によらない変化であることから、可溶性によって単量体に変化したことによる共通の変化と考えられる。界面活性剤と信号の重複がないTX100可溶性bRでは (Fig. 3 a)、14.5 ppm (α_1 -ヘリックス)、18.1 ppm (ループ部位) に

新たに信号が生じていることが分かる。これはTX100による可溶性化により、bRの二次構造に著しい変化はないが、ヘリックスおよびループ部位が一部変化していることを示している。

Fig. 4にSDS可溶性化[3-¹³C]Ala標識bR (UV吸収極大波長437 nm) のDD-MASスペクトル (a) とそのデコンボリューションスペクトル (b) を示す。これよりSDS可溶性化bRでは16.0-16.4 ppm付近の α_{II} -ヘリックス領域の信号強度が上昇しており、PMに比べ、著しくヘリックス含量が増えていることが分かった。この変化は、パバイン処理によるC-末端切除の実験から、16.9 ppmのヘリックス末端部位に帰属される信号が、 α_{II} -ヘリックスへと安定化するためであることが分かった。これは、 α_{II} -ヘリックス構造が通常の α -ヘリックスよりも安定であることを示唆している。

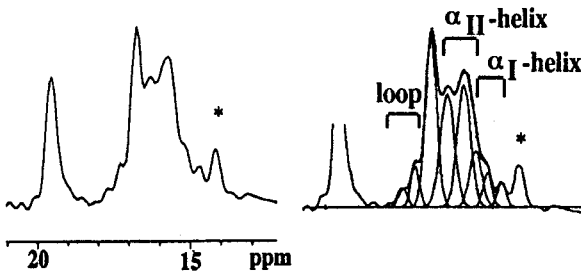


Fig.4 ¹³C DD-MAS spectrum of SDS solubilized [3-¹³C]Ala-bR(a) and the deconvoluted spectrum (b).

* detergent

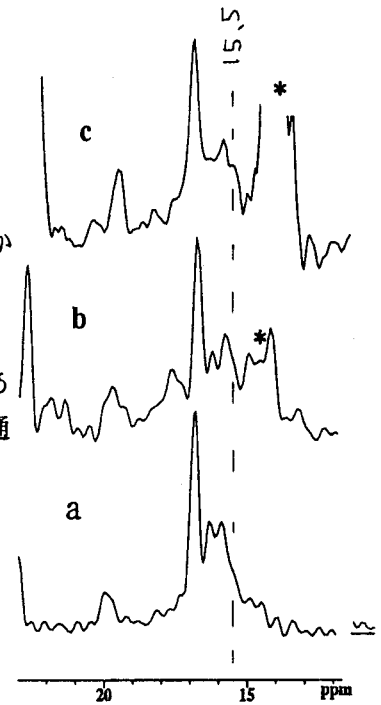


Fig.3 ¹³C DD-MAS spectra of TX100 (a), TN101 (b) and DM(c) solubilized [3-¹³C]Ala-bR.

- 1) Tuzi, S., Naito, A., & Saitô, H. (1996) Eur. J. Biochem. 239, 294-301.
- 2) Tuzi, S., Yamaguchi, S., Naito, A., Needleman, R., Lanyi, J.K., & Saitô, H. (1996) Biochemistry, 35, 7520-7527.
- 3) Tuzi, S., Naito, A., & Saitô, H. (1994) Biochemistry, 33, 15046-15052.
- 4) Tuzi, S., Naito, A., & Saitô, H. (1993) Eur. J. Biochem. 218, 837-844.
- 5) Grigorieff, N., Beckmann, E., & Zemlin, F. (1995) J. Mol. Biol. 254, 404-415.

固体高分解能 ^{113}Cd -NMRによるバクテリオロドプシン中の
金属結合部位の構造解析

(姫工大・理) ○山口 悟、辻 暁、内藤 晶、斉藤 肇

A High-resolution Solid-State ^{113}Cd -NMR Study of the
Structure of Metal Binding Site of Bacteriorhodopsin

○Satoru Yamaguchi, Satoru Tuzi, Akira Naito and Hazime Saitō
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology,
Harima Science Garden City, Kamigori, Hyogo, Japan 678-12

We have recorded ^{113}Cd -NMR spectra of ^{113}Cd -reconstituted bacteriorhodopsin (^{113}Cd -bR) in order to clarify the manner of metal binding. ^{113}Cd signal was visible by DD-MAS but not visible by CP-MAS NMR. DD-MAS spectra of the five times equivalents reconstituted bR gave broad signals at high field. This means that rapid chemical exchange among $^{113}\text{Cd}^{2+}$, lipid, bR and water is dominant and no strong specific binding site is identified.

【1 序論】

バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌 (*Halobacterium Salinarium*) の紫膜に内在する光プロトンポンプ蛋白質で、中央に発色団であるレチナールが存在する。またCaやMgなどの2価の陽イオンが蛋白質中に存在し、これらを除去すると、吸収最大波長が568nmから604nmにシフトし、プロトンポンプ機能を持たない青膜となる。2価カチオンは蛋白質中で構造と機能に関与していることが示唆されているが、明確な結合位置や周辺構造の情報は与えられていない。

本研究はバクテリオロドプシンの全ての二価カチオンを ^{113}Cd に置換し、 ^{113}Cd NMRの観測により、bRの2価カチオン結合部位の構造情報を得ることを目的とする。

【2 実験】

高度好塩菌 (*Halobacterium Salinarium*) を天然培地で培養し、遠心分離器で精製することにより紫膜を得た。この紫膜をイオン交換樹脂(Dowex-50w-X8)で処理し、陽イオンを除去することで青膜を作成した。金属状の ^{113}Cd から CdCl_2 を作成し、青膜に対して1倍当量、2倍当量、5倍当量の CdCl_2 を加えて ^{113}Cd -bR再構成試料を作成した。凍結乾燥試料については再構成試料を少なくとも15時間凍結乾燥させた後、相対湿度0%、100%の試料についてはそれぞれグローブバッグ中の相対湿度を0%、100%に保ち、その条件下でサンプルチューブに封入した。NMR測定はCMX-400スペクトルメーターを用いて、基準物質として $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ を用い、20°C、遮光条件下でCP-MAS法、DD-MAS (single pulse excitation with Dipolar Decoupled-MAS)法を用いた。

【3 結果、考察】

図1に2倍当量の Cd^{2+} を加えた0%水和、100%水和、ペレットの各々の試料と5倍当量の Cd^{2+} のDD-MASスペクトルを示す。100%水和、ペレットの試料について

固体高分解能NMR、バクテリオロドプシン、化学交換、運動性

○やまぐちさとる、つじさとる、ないとうあきら、さいとうはじめ

は-175ppm付近に信号が観測されるが、0%水和試料では信号が観測されなかった。5倍当量加えると、-178ppmから-191ppm付近に広幅の信号が観測された。5倍当量加えた場合、信号は全体的にやや高磁場にシフトし、線幅のプロード化が観測された。仮に強い結合部位が存在するならば分離された信号が観測されるはずである。この結果はNMRのタイムスケールからは Cd^{2+} はバクテリオロドプシンと強く結合しているのではないことを示している。1M CdCl_2 水溶液の信号はCd-bRの信号よりさらに約800ppm高磁場側に観測されることから、水溶液中 ⇄ 脂質の極性頭部 ⇄ タンパク質表面 ⇄ タンパク質内部の速い化学交換をしており、 $10^2 \sim 10^3$ Hz程度の交換速度を持っていると考えられる。我々は昨年の本討論会でバクテリオロドプシンから二価カチオンを除去すると、タンパク質表面近傍のループ部位、ランダムコイルに主な高次構造変化が起こっているとすでに報告しており(1)、結合部位が膜表面部位にも存在することを示している。また、CP-MAS法からは信号は観測することはできなかったことも Cd^{2+} はbR中ではCP-MASで観測されるほど強い結合を作っているのではないことを示している。

現在までXAFSのデータなどからバクテリオロドプシンと金属イオンの結合に関する研究よりHigh affinity binding site の存在が示唆されているが、本研究結果はこの強い結合部位の存在を否定する結果であり、bR中に二価陽イオンの結合部位が存在はするが、二価陽イオンは化学交換していることを示している。

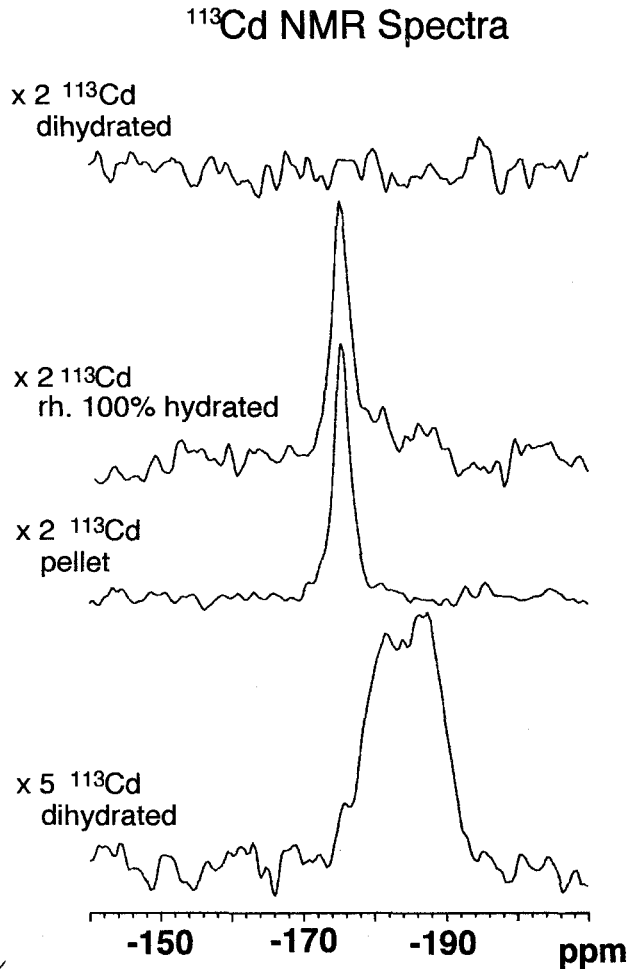


図1 2倍当量の $^{113}\text{Cd}^{2+}$ を加えた0%水和、100%水和、ペレットの各々の試料と5倍当量の $^{113}\text{Cd}^{2+}$ を加えたペレットの試料の ^{113}Cd DD-MAS NMR スペクトル

- 1) P. D. Ellis, *The Mutinuclear Approach to NMR Spectroscopy*, Chapter 22, NATO Scientific Affairs Division, 1983.
- 2) 辻暁, 内藤晶, 斉藤肇, 第35回NMR討論会講演要旨集423-426 (1996), 京都

**^{15}N NMR Chemical Shifts and Hydrogen Bonding
in Imidazole derivatives in the Solid State**

Takahiro Ueda¹, Shigenobu Hayashi¹, Shigenori Nagatomo², Hirotsugu Masui², and
Nobuo Nakamura²

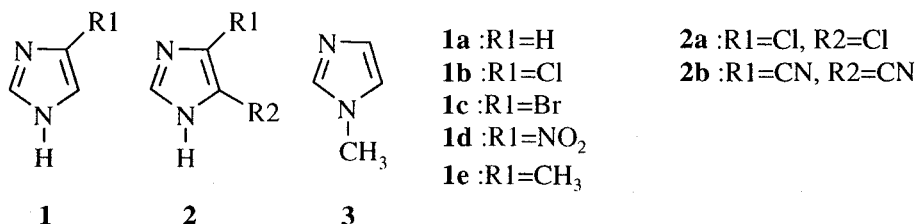
¹ National Institute of Materials and Chemical Research, Tsukuba, Ibaraki 305

² Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,
Toyonaka, Osaka 560

Abstract Intermolecular hydrogen bonds (N-H...N) in the crystals of imidazole and its derivatives (4-substituted and 4,5-substituted imidazoles) were studied by 1D and 2D ^{15}N CP/MAS NMR as well as by an *ab initio* molecular orbital (MO) calculations. The difference of ^{15}N chemical shift values between amino and imino nitrogen atoms is linearly related to the hydrogen bond distance. According to the *ab initio* MO calculations it was found that the hydrogen bond influences ^{15}N chemical shift much dominantly than the electronic state of the substituents. In 2D ^{15}N exchange NMR spectrum of imidazole crystal, the cross peaks were observed when the mixing period is longer than 100 ms, indicating that very slow motion of proton in the hydrogen bond takes place in the compound.

Introduction

Imidazole constitutes a functional group of biologically active molecules such as histamine and histidine, and plays an important role in the biologically active processes, *viz.* a proton donor and/or acceptor in those substances. Imidazole and its derivatives have been known to form intermolecular N-H...N hydrogen bond, and to construct one-dimensional hydrogen-bonded molecular networks in the crystals [1-3]. The ability of imidazole to act as a proton donor and/or proton acceptor is closely related to the structure and the dynamics of the hydrogen bonds. However, the structure and the properties of the hydrogen bonds in imidazole and



Scheme

キーワード：イミダゾール誘導体、 ^{15}N CP/MAS NMR、 ^{15}N 化学シフト、水素結合、分子軌道計算

うえだたかひろ、はやししげのぶ、ながともしげのり、ますいひろつぐ、なかむらのぶお

its derivatives in the solid state have rarely been studied so far. In the present work imidazole and its six 4-substituted derivatives (see Scheme) have been investigated by 1D and 2D ^{15}N CP/MAS NMR spectra as well as by an *ab initio* molecular orbital calculations.

Experimental

4-Chloroimidazole (**1b**) and 4-bromoimidazole (**1c**) were synthesized and purified according to the literatures [4]. The other substances (commercial grade reagents) were purified by recrystallization and/or vacuum sublimation. The 1D and 2D ^{15}N CP/MAS NMR spectra were measured at room temperature by Bruker MSL200, DSX300, and MSL400 NMR spectrometers operating at the Larmor frequencies of 20.3, 30.4, and 40.6 MHz, respectively. Powdered samples of ^{15}N -glycine (-347.5 ppm from nitromethane) and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (-341.2 ppm) were used as the external standards for the ^{15}N chemical shift [5]. The principal values of ^{15}N chemical shift tensor σ were calculated by using GAUSSIAN94 MO calculation program [6] package with the 6-311G(df, p) basis set under the GIAO condition [7]. Each computation was carried out on the molecular geometry which was determined by the structural analysis. The values of the calculated chemical shifts δ were referred to that of the isolated nitromethane molecule.

Results and discussion

^{15}N CP/MAS NMR spectra and chemical shift values of Imidazoles

Figure 1 shows ^{15}N CP/MAS NMR spectra of 4-substituted imidazole derivatives at room temperature. Two peaks due to the amino and imino nitrogen atoms are observed at *ca.* -200 and *ca.* -135 ppm, respectively. The isotropic ^{15}N chemical shift values δ determined from the spectra together with the hydrogen bonded intermolecular N...N distances $R_{\text{N}\dots\text{N}}$ are listed in Table 1. The absolute values of δ in 4-substituted derivatives ($0.2834 \leq R_{\text{N}\dots\text{N}} \leq 0.2882$ nm) depend on the substituents. However, the observed variations in δ to those of imidazole were less than 5.7 ppm for -NH- and 6.6 ppm for =N-, except for **1d**, in which the large shifts (7.047 ppm for -NH- and 7.1 ppm for =N-) were observed. On the other hand, the effect of the hydrogen bond on the ^{15}N δ values was elucidated by referring to the value of δ in 1-methyl-imidazole

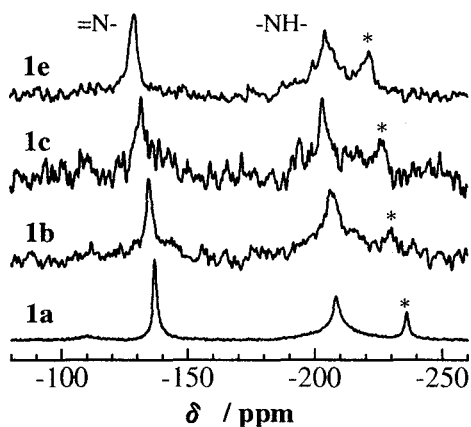


Fig. 1 ^{15}N CP/MAS NMR spectra of 4-substituted imidazoles at room temperature. Asterisk indicate the spinning side band.

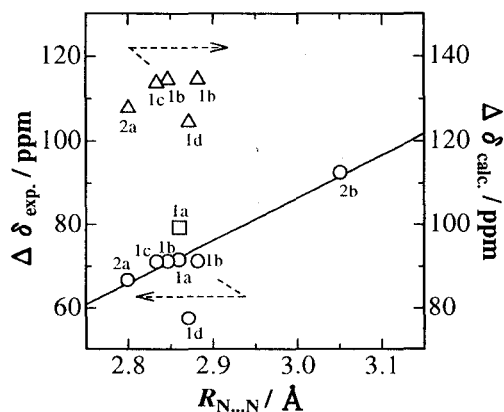


Fig. 2 ^{15}N chemical-shift difference between -NH- and =N- vs. hydrogen bond distance; experimental (○) and calculated values (△:dimer, □:trimer).

(3), in which the formation of the hydrogen bond is inhibited. Fig. 2 shows the plot of the ^{15}N chemical-shift difference $\Delta\delta$ between the amino and imino nitrogens against $R_{\text{N}\dots\text{N}}$, indicating that the experimental $\Delta\delta$ varies almost linearly with $R_{\text{N}\dots\text{N}}$, except for **1d**. As $R_{\text{N}\dots\text{N}}$ decreases, the shielding for amino nitrogen decreases while that for imino nitrogen increases. This fact implies that the formation of the hydrogen bond between two molecules causes to mix or to resonate the two extreme electronic structures, $-\text{NH}-$ and $=\text{N}-$. The extent of the mixing depends on the strength of the hydrogen bond. Large shifts of δ for each nitrogen in **1d** from that of the imidazole may be originated from a strong electron-attractive property of the NO_2 group.

^{15}N NMR chemical shifts and *ab initio* MO calculations

^{15}N chemical shifts in the present substances are also examined by *ab initio* MO calculations. The effect of the hydrogen bond on the molecular electronic state is extracted by comparing the ^{15}N chemical-shift in the hydrogen-bonded molecular dimer(or trimer) with that in the free molecule. The calculated isotropic values of ^{15}N chemical shifts are listed in Table 1. When the hydrogen bonds are formed the shielding of the amino nitrogen decreases and that of the imino nitrogen increases, resulting in the decrease in $\Delta\delta$. This trend holds in all the compounds for which the computation was performed. Among them, $\Delta\delta$ in imidazole shows the most remarkable effect: the calculation for the trimer results in the decrease in $\Delta\delta$ from 148 ppm in the free molecule to 99 ppm (changed by 49 ppm). The calculated $\Delta\delta$ are plotted in Fig. 2 against $R_{\text{N}\dots\text{N}}$. Although the absolute experimental $\Delta\delta$ values do not agree with the theoretical

Table 1. ^{15}N chemical shifts for amino and imino nitrogens and the hydrogen bonded distances in the crystals of substituted imidazoles.

Substance	Type	δ (Exp.) / p.p.m.	δ (Calc.) / p.p.m.		$R_{\text{N}\dots\text{N}}$ / nm
			Free	H. B. ^{a)}	
Imidazole (1a)	-NH-	-207.167	-344.57	-323.39 ^{b)}	0.286 ^{c)}
	=N-	-135.64	-196.66	-224.06 ^{b)}	
4-Chloro- (1b)	-NH-	-204.55	-358.74	-343.44	0.2847, 0.2882 ^{d)}
	=N-	-133.44	-186.67	-208.97	
4-Bromo- (1c)	-NH-	-201.54	-353.37	-335.41	0.2834 ^{d)}
	=N-	-130.50	-182.78	-201.74	
4-Nitro- (1d)	-NH-	-200.12	-351.62	-337.38	0.2871 ^{e)}
	=N-	-142.74	-191.97	-213.07	
4-Methyl- (1e)	-NH-	-204.17	-----	-----	-----
	=N-	-129.05	-----	-----	
4,5-Dichloro- (2a)	-NH-	-200.02	-352.96	-339.11	0.2800 ^{f)}
	=N-	-133.34	-189.52	-211.34	
4,5-Dicyano- (2b)	-NH-	-210.5	-342.31	-----	0.3051 ^{f)}
	=N-	-118.0	-189.60	-----	
1-Methyl - (3)	-NH-	-219.2	-----	-----	-----
	=N-	-119.1	-----	-----	

a) H.B. means hydrogen bonded molecules.

b) This value is calculated for the trimer.

c) Ref. [1].

d) S. Nagatomo, unpublished result.

e) Ref. [2].

f) Ref. [3].

ones, the trend of the variation of $\Delta\delta$ with $R_{N,N}$ is similar to each other. This result implies that the experimental $\Delta\delta$ values for ^{15}N are mainly governed by the intermolecular hydrogen bond but much insensitive to the sort of the substituent. MO calculations did not interpret the large shifts observed in **1d**.

Proton dynamics in imidazole crystal

In ^{15}N 2D exchange NMR [8] spectrum of imidazole, the cross peaks between two main diagonal peaks corresponding to amino and imino nitrogens are observed at room temperature with long mixing times (> 100 ms), indicating that a some kind of a slow dynamic process takes place in the imidazole crystal. It is noted that a simple instantaneous proton jump from $-\text{NH}-$ to $=\text{N}-$ does not cause the complete chemical exchange between the imino and the amino nitrogens; the appearance of the cross peaks in the 2D exchange spectrum is hence interpreted by a "collective" excitation of the hydrogen-transfer in the 1D hydrogen-bonded molecular network which is accompanied by an effective chemical exchange of imidazole molecule, *i.e.*,



The most probable one of such a collective excitation may be realized by dynamic soliton mechanism in 1D molecular chain [9].

References

- [1] G. Will, *Nature (London)*, **198**, 575 (1963); *Z. Kristallogr.*, **129**, 211(1969); S. Martinez-Carrera, *Acta Crystallogr.*, **20**, 783(1966); B. M. Craven, R. K. McMullan, J. D. Bell, and H. C. Freeman, *Acta Crystallogr., Sect. B*, **B33**, 2585(1979).
- [2] I. Sógalas, J. Poitras, and A. L. Beauchamp, *Acta Crystallogr., Sect. C*, **C48**, 295(1992); H. L. De Bondt, E. Ragia, N. M. Blaton, O. M. Peeters, and C. J. DeRanter, *ibid.*, **C49**, 693(1993).
- [3] S. Dou, A. Weiss, *Z. Natureforsch., A*, **47A**, 177(1992); S. Nagatomo, S. Takeda, H. Tamura, and N. Nakamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 2783(1995).
- [4] I.E. Balaban and F.L. Pyman, *J. Chem. Soc.*, **121**, 947 (1922).
- [5] S. Hayashi and K. Hayamizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**,688(1991).
- [6] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. A. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzalez, and J. A. Pople, GAUSSIAN 94, Revision D. 1, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1995.
- [7] K. Wolinski, J. F. Hilton and P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 8251(1990).
- [8] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **71**, 4546(1979).
- [9] J. L. Skinner and P. G. Wolynes, *J. Chem. Phys.*, **73**, 4015(1980).

Relationship between ^{13}C NMR Chemical Shifts and Conformations of Biphenyl Derivatives in the Crystalline State

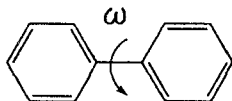
Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

Toshiya Hironaka, Shinji Ando, Hiromichi Kurosu, Isao Ando

We measured ^{13}C NMR spectra of biphenyl derivatives and estimated a relationship between the chemical shifts and the dihedral angles at biphenyl linkage in the crystalline state. The tendency of the measured chemical shifts toward the dihedral angles agreed with that of the calculated shielding constants.

はじめに

高分子化合物（とりわけ液晶性高分子）にはビフェニル構造を有するものが数多く存在する。フェニル環同士のなす二面角 ω （下図）に規定されるコンホメーション



は分子間パッキングと密接な関係があり、その決定は分子構造と物性の関係を明らかにする上で必要不可欠である。しかしながら従来のX線回折法では単結晶を得にくいため高分子化合物の結晶構造を解析するのは難しく、時間もかかってしまうという欠点もある。一方、固体高分解能NMRでは近距離の情報が得られるので局所的なコンホメーションを見積もることが可能となる。そこで今回は固体高分解能 ^{13}C NMRを用いて結晶中の二面角を決定する手始めとして、 ^{13}C NMR化学シフトとビフェニル構造の二面角の関係について検討を行った。

測定

固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルは日本電子製GSX-270NMR分光器（67.8MHz）を用い、化学シフトの基準はアダマンタン（29.5PPM from TMS）を外部基準とし、パルスシーケンスはflipback法（コンタクトタイム5ms、繰り返し時間5~100s）で行い、また帰属のためにdipolar dephasing法（コンタクトタイム5ms、待ち時間20 μs ）を併用した。

ビフェニル、二面角、 ^{13}C NMR化学シフト

ひろなかとしや、あんどうしんじ、くろすひろみち、あんどういさお

サンプル

X線回折法により既に結晶構造が分かっている以下の低分子のビフェニルモデル化合物を用い、二面角が満遍なく分布するように選定した。

- (1) ビフェニル ($\omega=0^\circ$ ¹⁾)
- (2) 4-4'-ジヒドロキシビフェニル ($\omega=0.3^\circ$ ²⁾)
- (3) 4-フェニルフェノール (2つの異なる結晶形態有り、 $\omega=1.6^\circ$ ³⁾)
- (4) 4-フェニルフェノール (2つの異なる結晶形態有り、 $\omega=2.2^\circ$ ³⁾)
- (5) 4-4'-ビフェニルジカルボン酸ジエチルエステル (以下2BP2) ($\omega=26.0^\circ$ ⁴⁾)
- (6) o-トリジン ($\omega=40.8^\circ$ ^{5,6)})
- (7) 2-フェニルフェノール ($\omega=56.6^\circ$ ⁷⁾)
- (8) 2-2'-ジニトロビフェニル ($\omega=61.8^\circ$ ⁸⁾)
- (9) m-トリジン ($\omega=84.4^\circ$ ⁹⁾)

ビフェニルの遮蔽定数計算

化学シフトと二面角の相関を計算と実測を比較するべく、ビフェニルの遮蔽定数計算を行った。

計算方法：Gaussian 94

HF-GIAO-CHFにより全エネルギー及び遮蔽定数を計算

計算機：Cray C90 (東京工業大)

基底関数：6-31G

結果はFig.1の通りになり、C1とC2の遮蔽定数が二面角の増加に対し低磁場ヘシフトする傾向を示している。

結果と考察

サンプルの測定結果はTable 1の様になり、化学シフトにおける置換基の効果¹⁰を除去した値 ($C1_{\text{off}}$ と $C6_{\text{off}}$)と二面角において、C1炭素について ($C1_{\text{off}}$)は計算結果の傾向とは一致しなかったが、C6炭素の化学シフト ($C6_{\text{off}}$)が二面角の増大に伴い低磁場シフトする傾向が見られる (Fig. 2)。これはサンプルにはC4の位置に置換基がついている物が多く、C1に炭素に対しての置換基の効果 (パラ位) が大きいことによるものと考えられる。

また、二面角が小さいところでの化学シフトの大きな変化については置換基の問題

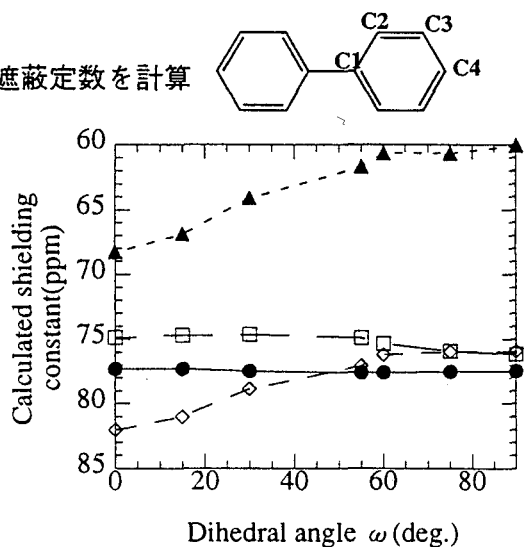


Fig. 1 Calculated shielding Constants of single biphenyl depend on dihedral angles ω : C1(▲), C2(◇), C3(□), C4(●).

かパッキングの問題が現在検討中である。

Table 1 Measured the C1, C6 chemical shifts, and the $C1_{\text{eff}}$, $C6_{\text{eff}}$ excepted the substituent effects from C1, C6.

	C1(ppm)	$C1_{\text{eff}}$ (ppm)	C6(ppm)	$C6_{\text{eff}}$ (ppm)
(1)biphenyl($\omega=0^\circ$)	138.4	138.4	127.5	127.5
(2)4-4' dihydroxy biphenyl($\omega=0.3^\circ$)	132.3	139.6	127.6	126.2
(3)4-phenyl phenol($\omega=1.6^\circ$)	131.3	138.6	127.8	126.4
(4)4-phenyl phenol($\omega=2.2^\circ$)	131.2	138.5	127.4	126.0
(5)2BP2($\omega=26.0^\circ$)	142.9	139.0	127.4	127.9
(6)o-tolidine($\omega=40.8^\circ$)	133.1	143.0	125.9	127.9
(7)2-phenyl phenol($\omega=56.6^\circ$)	129.8	142.5	132.4	131.0
(8)2-2'-dinitrobiphenyl($\omega=61.8^\circ$)	133.8	138.6	131.6	130.7
(9)m-tolidine($\omega=84.4^\circ$)	131.6	140.7	131.6	130.8

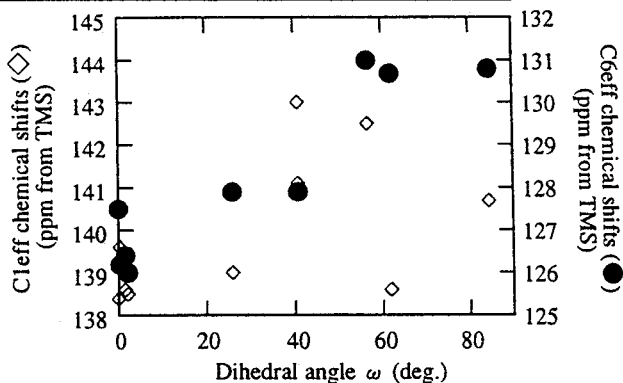
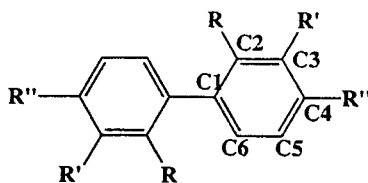


Fig. 2 Relationships between dihedral angles ω and $C1_{\text{eff}}$ (◇) and $C6_{\text{eff}}$ (●) (from TMS).

Reference

- 1 G-P. Charbonneau and Y. Delugeard, *Acta Cryst.*, **B33**,1586(1977)
- 2 M. A. Jackisch, F. R. Fronczek, C. C. Geiger, P. S. Hale, W. H. Daly and L. G. Butler, *Acta Cryst.*, **C46**, 919(1990)
- 3 C. P. Brock and K. L. Haller, *J. Phys. Chem.*, **88**, 3570(1984)
- 4 X. Li and F. Brisse, *Macromolecules*, **27**,2276(1994)
- 5 S. A. Chawdhury, A. Hargreaves and R. A. L. Sullivan, *Acta Cryst.*, **B24**,1222(1968)
- 6 V. K. Bel'skii, L. A. Chtkina and V. A. Shuvaeva, *Z. Strukt. Khim.*, **28**,184(1987)
- 7 M. Perrin, K. Bekkouch and A. Thozet, *Acta Cryst.*, **C43**, 980(1987)
- 8 A. Sekine, Y. Ohashi, K. Yoshimura, M. Yagi and J. Higuchi, *Acta Cryst.*, **C50**, 1101(1994)
- 9 F. Fowweather, *Acta Cryst.*, **5**, 820(1952)
- 10 G. C. Levy, R. L. Lichter and G. L. Nelson, *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2nd Ed., A Wiley-Interscience Publication(1980)

¹³C CP/MAS NMR study on dehydration of PHEMA/PMAA blends

Atsushi Asano, Masaru Eguchi, and Takuzo Kurotu

Department of Chemistry, National Defense Academy, Yokosuka 239, Japan.

Miscibility and dehydration of poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/poly(methacrylic acid) (PHEMA/PMAA) blends were studied by ¹³C CP/MAS NMR. ¹H-*T*₁ and -*T*_{1ρ}, which were observed indirectly through resolved ¹³C signals, and dynamic DSC measurements revealed the miscibility of the PHEMA/PMAA blends. The values of ¹H-*T*₁ of PHEMA in the PHEMA/PMAA blends gradually increase with PHEMA composition increases. Furthermore, the single *T*_g is observed in each PHEMA/PMAA blend, and the changing of the value depends on the composition. These results indicate that the PHEMA/PMAA blends are homogeneous on a scale of 20-50nm.

TGA and ¹³C CP/MAS NMR measurements show that PMAA is dehydrated and becomes intramolecular cyclic anhydrides in a few tens minutes at around 523K. On the other hand, PHEMA, which has OH in side-chain end as well as PMAA, does not undergo such dehydration even at 573K, but undergoes decomposition from around 573K. In the PHEMA/PMAA blends, however, ¹³C CP/MAS NMR spectra indicate that PHEMA is dehydrated and forms intermolecular anhydrides with PMAA. 2D-WISE spectra and ¹³C-*T*₁ measurements show the molecular motion of the heat-treated blends becomes slower.

[緒言] ポリマーブレンドの物理的性質は、相溶性やポリマー間の相互作用などに依存する。熱処理した際に化学反応がともなう場合においては、その構造変化を知ることは材料設計・開発に重要である。われわれは ¹³C NMR シグナルに観測される化学シフト変化や ¹H 緩和時間からポリマーブレンドの相溶性と脱水反応について検討した。ここでは熱処理すると脱水反応を起こすことが知られている PMAA と側鎖末端に水酸基(OH)をもつ PHEMA とのブレンドについて検討した。

Key Words: ¹³C CP/MAS NMR, poly(2-hydroxyethyl methacrylate), poly(methacrylic acid), polymer blend, dehydration

あさのあつし、えぐちまさる、くろつたくぞう

[実験] ^{13}C CP/MAS NMR は Bruker DMX 500 分光計を用いて測定された。ダイナミック DSC と TGA は Perkin-Elmer 7 series を用いて測定した。

[結果と考察] Fig.1(a)に ^{13}C CP/MAS NMR の C=O ピークの拡大図を示した。PMAA のカルボキシル基(HOC=O)がブレンドしたことにより低磁場シフトする。これは、PMAA の HOC=O 基と PHEMA の側鎖末端にある OH 基が分子間水素結合を形成したためである。 ^1H 緩和時間とダイナミック DSC から 20nm で均一にブレンドされていることが示唆された。Fig1(b)に 573K で 10 分間熱処理したブレンドの PHEMA の側鎖 CH_2 基の NMR スペクトルを示した。熱処理する前のブレンドと PHEMA だけを熱処理したスペクトルには化学シフト変化は観測されない。しかしブレンドを熱処理すると PHEMA の側鎖 CH_2 基に化学シフト変化が観測された。この変化は PMAA と PHEMA が分子間脱水反応を起こしたと考えることにより説明される。 ^{13}C - T_1 と 2D-WISE スペクトルを測定して運動性について考察した。Fig.2 に C=O 領域の 2D-WISE スペクトルの F_1 軸をプロットした。熱処理した後の方が半値幅が広く、分子運動が遅くなったことを示している。

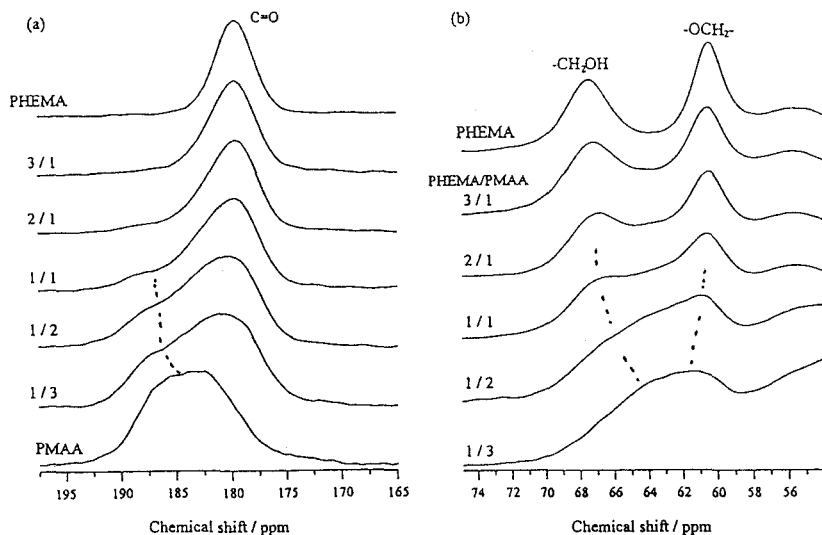


Fig.1 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of PHEMA/PMAA blends. (a):CO region before heating; (b): PHEMA CH_2 region after heating.

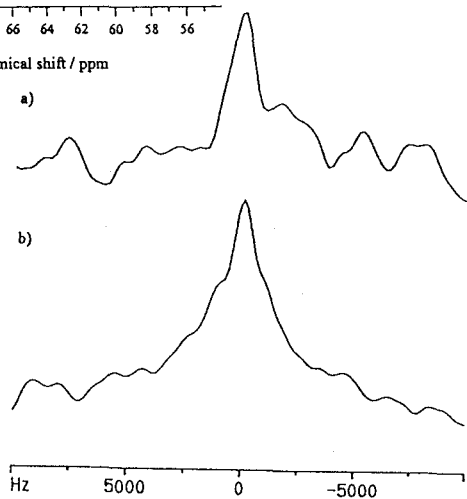


Fig.2 2D-WISE ^{13}C spectra in the F_1 dimension. a) before heat-treatment, b) after heat-treatment at 573K for 10min.

固体NMR法によるエチレン・ビニールアルコール共重合体のゲル状態の
構造とダイナミックスの研究

東工大工 ○兼清 真人・小林 将俊・安藤 勲
奈良女生環 黒子 弘道
クラレ物性研 石井 孝浩・網屋 繁俊

Structural and Dynamical Studies of (Ethylene-Vinyl Alcohol) Copolymer Gels by Solid State NMR Spectroscopy

M. Kanekiyo, M. Kobayashi, I. Ando (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152)

H. Kurosu (Department of Human Life and Environment, Nara Women's University, Kita-Uoya Nishimachi, Nara 630)

T. Ishii, S. Amiya (Material Science Research Laboratory, Kuraray Co., Ltd., Kurashiki, Okayama 710)

The structure and dynamics of (ethylene-vinyl alcohol) copolymer gel prepared by the freezing-thawing method have been studied by high-resolution solid-state ^{13}C NMR and ^1H pulse NMR. From these experimental results, it was found that the gel is mainly composed of three different components in molecular motion. These components were assigned to the crosslinked region, the non-crosslinked region and the intermediate region.

緒言

我々は既にPVAゲルの構造とダイナミックスについて研究し、そのゲルが3つの運動性の異なった領域から構成されていることを報告した。本研究の対象である反復凍結融解法によって調整したエチレン・ビニールアルコール(EVA)共重合体ゲルはPVAゲルと同様に分子間相互作用によって形成される高分子ゲルであり、鎖間での水素結合がゲルの生成機構に大きく関係している。一方でEVA共重合体のエチレン鎖部分では水素結合による架橋は存在しないという特徴を持っている。

このため、本研究において、EVA共重合体ゲルの作成を試み、分子レベルでの構造と運動の情報が得られる固体高分解能 ^{13}C NMR法、 ^1H パルスNMR法測定を行なうことによりゲルの構造と運動性の相関関係について検討を行ない、EVAゲルの生成、構造、ダイナミックスを解明することを目的とする。

エチレン・ビニールアルコール、ゲル、固体 NMR、水素結合、ダイナミックス

かねきよまさひと、こばやしまさとし、あんどういさお、くろすひろみち、いしいたかひろ、あみやしげとし

実験

重合度及びエチレン含有率の異なったEVAをジメチルスルホオキシド(DMSO)に溶解させた。これを凍結融解を繰り返し(-20~20°C)、ゲルを生成させた。固体 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルおよび ^{13}C PST/MAS NMRスペクトルは、日本電子製GSX-270 NMR分光器(測定周波数67.8MHz)で測定した。測定中にゲル中の溶媒の蒸発を防ぐために0-リング付きローターを使用した。また、BRUKER社製のMinispec PC20パルスNMR(測定周波数20.0MHz)を用いて、CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)法及びソリッドエコー法により、 ^1H T_2 の測定を行なった。

結果

図1は ^1H T_2 測定をソリッドエコー法により行なった結果であり、EVAゲルには運動性の異なるポリマーの3つの成分が存在することがわかった。これらの3つの成分は、架橋領域($T_2 = 17 \mu\text{s}$, 成分比 = 7%) 架橋領域によって運動が束縛された領域($T_2 = 123 \mu\text{s}$, 成分比 = 21%) 及び運動が束縛されていない領域($T_2 = 325 \mu\text{s}$, 成分比 = 72%)と帰属される。図2は固体状態におけるEVAにおけるCP/MAS法を用いた固体高分解能 ^{13}C NMR測定によるCH炭素のピーク強度比であり(Peak I, II, III各々78, 71, 64ppm)、EVAエチレン含量が増えるにつれてPeak Iが増加していくことがわかった。

これらの結果を基に、エチレン分率の異なるサンプルの信号の比較から帰属を行い、EVAゲルの構造とダイナミクスに及ぼすエチレン鎖の影響について考察する予定である。

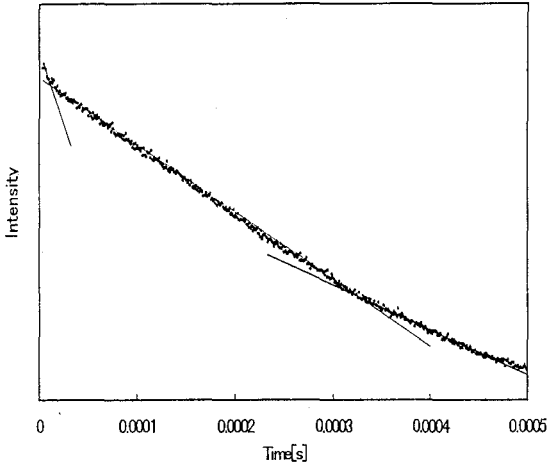


Fig. 1. ^1H pulse NMR signal decay of EVA in the gel state observed by solid echo method

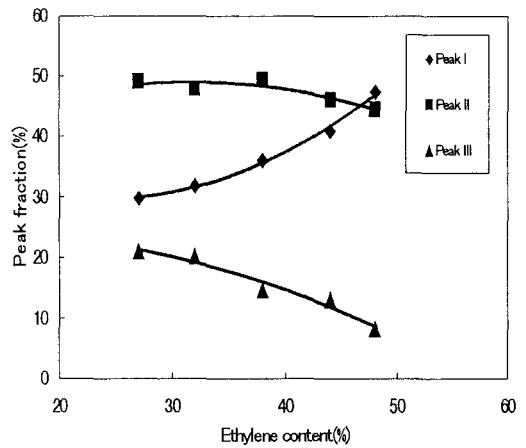


Fig. 2. Fraction for the components I, II and III in solid state EVA at various ethylene content determined by ^{13}C CP/MAS NMR.

Molecular Mobility of Lyophilized Protein Formulations as Measured by NMR, Related to Glass Transition Temperature

National Institute of Health Sciences, S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima

We investigated the usefulness of the spin-spin relaxation time of protein or excipient protons as a probe for evaluating the molecular mobility of lyophilized protein formulations. A critical temperature at which a Lorentzian relaxation process due to liquid polymer protons appears, T_{mc} , was determined for protein formulations containing dextran and poly(vinyl alcohol), and compared with the glass transition temperature of the formulations determined by differential scanning calorimetry. Bovine serum γ -globulin and albumin were used as model proteins. Protein denaturation was enhanced in a microscopically liquidized state at temperatures above T_{mc} that is lower than T_g .

【目的】タンパク質凍結乾燥製剤の品質評価法の一つとして、製剤の安定性に密接に関係する物理的状態の変化を、プロトンのスピン-スピン緩和時間(T_2)を指標として検出する方法を確立することを目的とする。デキストランやポリビニルアルコール(PVA)などの高分子を添加剤として含有するタンパク質凍結乾燥製剤について、温度変化に伴うタンパク質プロトンおよび添加剤プロトンの T_2 の変化から、分子の運動性の限界温度(T_{mc})を測定し、熱分析によって測定されるガラス転移温度(T_g)と比較することによって、製剤の物理的状態の変化を表すパラメータとしての T_{mc} の有用性を検討した。さらに、分子の運動性と製剤の安定性との関係についても考察した。

【実験】牛血清アルブミン(BSA)および γ -グロブリン(BGG)の凍結乾燥品について、タンパク質プロトンの T_2 を10~90℃において solid echo 法で測定した(JNM-MU25, JEOL)。デキストラン(40k)およびPVA(18k および120k)を添加剤とする BGG 凍結乾燥製剤についても同様に添加剤プロトンの T_2 を測定した。同時にタンパク質の経時的な変性をサイズ排除クロ

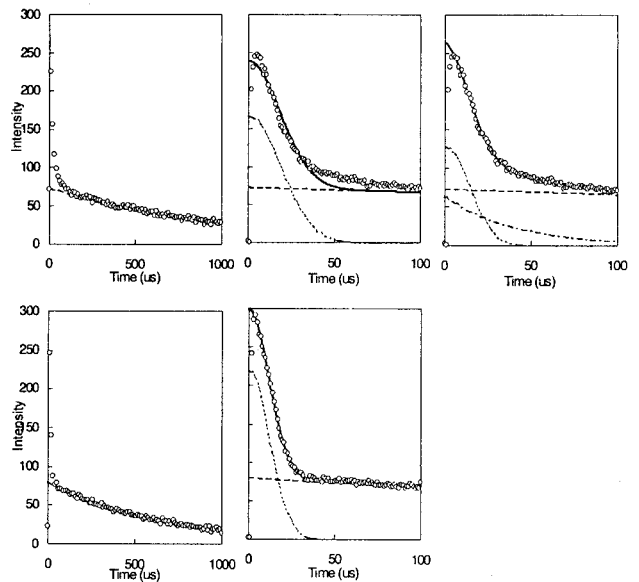


Fig.1. FID Signals Obtained from Lyophilized BGG
[H₂O]: 0.212 g/g solid

マトグラフィー(SEC)で測定した。DSC は 10°C/min の昇温速度で測定した。

【結果および考察】

タンパク質プロトンの T_2 を指標として測定した凍結乾燥品の運動性

BSA および BGG の凍結乾燥品は、水分子のプロトンおよびタンパク質分子のプロトンによる自由誘導衰減シグナル (FID シグナル) を示した。Fig.1 に示す BGG 凍結乾燥品の FID シグナルから明らかのように、水分子プロトンはロレンツ型減衰を示すのに対して (Fig.1-A, D)、タンパク質分子プロトンは 10°C では一つのガウス型減衰 (Fig.1-E)、90°C ではガウス型とロレンツ型の二相性の減衰 (Fig.1-B, C) を示した。すなわち、凍結乾燥品中のタンパク質プロトンは、低温領域では運動性の低い固

体状態での緩和過程を示すのに対して、高温では低い運動性に起因する緩和過程に加えて、一部液体プロトンのような高い運動性に起因する緩和過程を示すことが明らかになった。

高い運動性に起因する緩和過程が現れる温度は、製剤中の分子の運動性が大きく変化する温度であることから、NMR の緩和過程からみた分子の運動性の限界温度 (T_{mc}) と定義した。Fig.2 に、高い運動性に起因する緩和過程を示すタンパク質プロトンの比率 (P_{hm}) を示す。BGG および BSA のいずれの凍結乾燥品についても、高い運動性に起因する緩和過程が現れる温度は水分含量に依存し、水分含量が高くなるにしたがって低い温度で観察された。

BSA および BGG 凍結乾燥品は高温保存によって変性および凝集することが知られている。Fig.3 に示すように、タンパク質の変性量は温度に大きく依存した。温度が T_{mc} 以上になると変性が急激に起こりはじめることが明らかになった。すなわち、BSA および BGG いずれの凍結乾燥品についても、水分含量が約 0.3 および 0.2g/g solid ではそれぞれ T_{mc} は 30°C および 40°C であるが (Fig.2)、変性はその温度付近から有意に観察された。これらの結果から、 T_{mc} 以上で微視的な液体化が起こり、分子の運動性が急激に増大するとタンパク質の安定性が著しく低下すること、また水分含量の上昇は T_{mc} を低下させ、 P_{hm} を上昇させるために、安定性の低下につながるということが明らかになった。

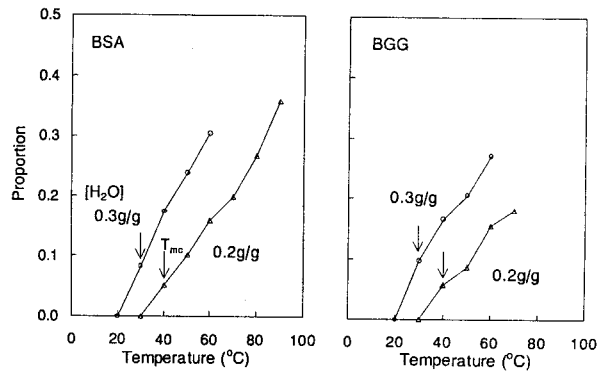


Fig.2. Proportion of High Mobility Relaxation Process
 T_{mc} : critical temperature of molecular mobility

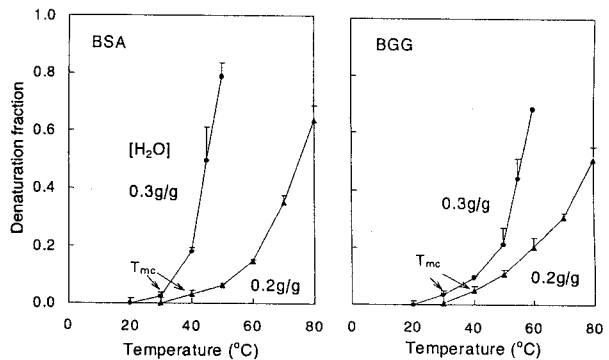


Fig.3. Critical Temperature of Molecular Mobility (T_{mc}) and Protein Stability

これらの凍結乾燥品の T_g は、ガラス転移による比熱の変化が DSC のチャートにおいて明瞭に示されず検出できなかった。NMR によって測定される T_{mc} は、 T_g が測定できない凍結乾燥品について、物理的状態変化に関する情報を与える重要なパラメータであると考えられる。

デキストランを添加剤とするタンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性

デキストランを含有する BGG 凍結乾燥製剤は、低温領域では水分子プロトンによるロレンツ型減衰とデキストランプロトンによるガウス型(Abragam 式)減衰を示したが、高温領域ではデキストランプロトンによるガウス型減衰に加えてロレンツ型減衰も示し、NMR の緩和過程からみた分子の運動性の限界温度(T_{mc}) が存在することが分かった (Fig.4)。

10℃ 間隔の測定によって求めた T_{mc} は、Fig.5 に示すように、分子量 40k および 510k のデキストランの製剤ともに、40℃であったが、ロレンツ型緩和過程を示すプロトンの比率は、40k のデキストラン製剤の方が高く、デキストランの分子量が低いほどデキストラン分子の運動性が大きくなることが分かった。

一方、デキストランプロトンの低い運動性に起因するガウス型緩和の T_2 は、デキストランの分子量による差が見られず、 T_{mc} 以下の温度領域では、分子の運動性が著しく小さく、その差は NMR の時間軸では観察できないものと考えられる。

デキストランを含有する BGG 凍結乾燥製剤の安定性は、デキストランの分子量に大きく依存した。Fig.6 に示すように、分子量 40k のデキストラン製剤は 510k の製剤より高い変性量を示した。いずれの製剤も変性速度のアレニウスプロットは高温側と低温側で断線がみられ、その温度は NMR から求めた T_{mc} とほぼ一致することが分かった。すなわち、 T_{mc} を境に製剤の物理的状態が変化し、タンパク質の変性は、 T_{mc} 以下では運動性の低いリジッドな固体状態で起こるのに対し、 T_{mc} 以上では微視的に液体化した状態で起こると考えられる。

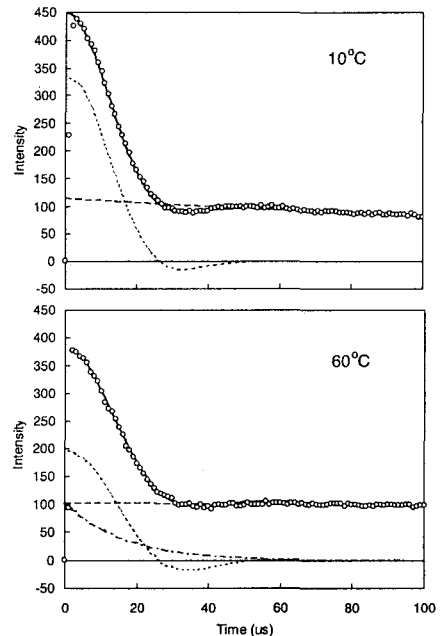


Fig. 4. Free Induction Decay of Dextran Protons in Lyophilized Formulation (DRN 10k, [H₂O]:0.17g/g solid)

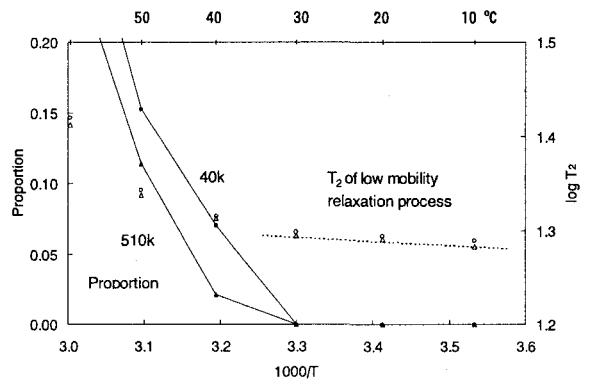


Fig. 5. T_2 of Low Mobility Relaxation Process and Proportion of High Mobility Relaxation Process of DRN Protons

デキストランを含有する製剤の T_g は、NMR から求めた T_{mc} より高温側で観察された。分子量 40k のデキストラン製剤は、 35°C の T_{mc} に対し、 T_g は 58°C であった。これらの結果から、製剤中の分子は T_g よりもかなり低い温度領域においてすでに運動性が有意に上昇し、一部が液体化していることが明らかになった。すなわち、 T_g 以下のガラス状態においても、製剤のフレキシビリティが高まり、タンパク質の不安定化に繋がると考えることができる。

PVA を添加剤とするタンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性

PVA を含有する BGG 凍結乾燥製剤は、デキストラン製剤と同様に PVA プロトンによるガウス型とロレンツ型の緩和を示すが、そのロレンツ型緩和は水分子プロトンのロレンツ型緩和の T_2 に近い値の T_2 を示すため、 H_2O 存在下では PVA プロトンと水分子プロトンの T_2 の分離測定は不可能であった (Fig.7)。重水を用いて調製した凍結乾燥製剤について、PVA プロトンのガウス型とロレンツ型の緩和の T_2 を測定した結果、PVA 製剤はデキストラン製剤に比較して低い T_{mc} を示し、製剤中の分子の運動性が高いことが分かった。また、高い分子の運動性から予測されるように、BGG 変性の度合はデキストラン製剤に比較して高いことが明らかになった。

まとめ

タンパク質の凍結乾燥製剤について測定した、タンパク質プロトンおよび添加剤プロトンの T_2 の変化に基づく分子運動性の限界温度 (T_{mc}) は、 T_g よりも低い温度領域で起こる物理的状态変化を的確に表すパラメータであることが明らかになった。

タンパク質、凍結乾燥製剤、ガラス転移温度

よしおかすみえ、あそゆきお、こじましげお

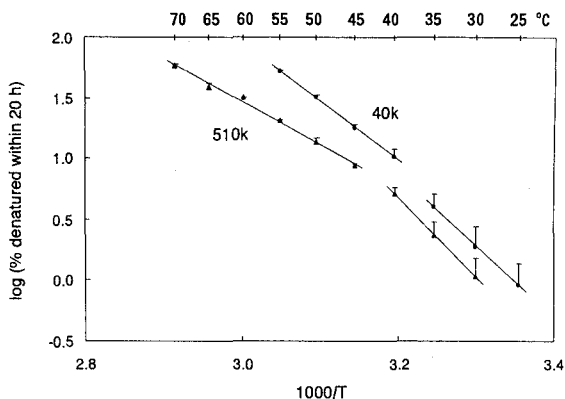


Fig.6. Arrhenius Plots for BGG Denaturation in Lyophilized Formulation Containing Dextran

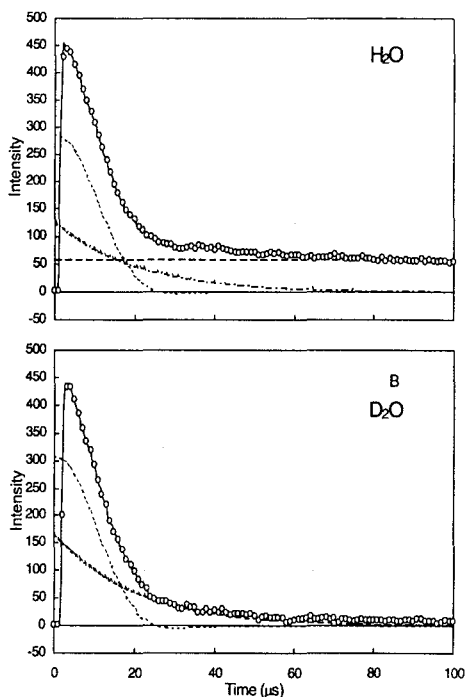


Fig.7. Free Induction Decay of PVA Protons in Lyophilized Formulation (PVA18k, $[\text{H}_2\text{O}]:0.098\text{g/g solid}$)

Determination of insulin diffusivity in dextran hydrogels by pulsed-field-gradient NMR
(National Institute of Health Sciences) ○Yukio Aso, Sumie Yoshioka, Shigeo Kojima

The diffusion coefficient of insulin in dextran hydrogels was determined by pulsed-field-gradient NMR. Aromatic proton signals were separated from dextran proton signals and utilized to extract insulin diffusivity. The degree of cross-linking of the hydrogels had no effect on the diffusion coefficient of insulin. The release rate of insulin from the hydrogels was not affected by the degree of cross-linking. These results suggest that the mesh size of the hydrogels is much larger than insulin molecule size. Pulsed-field-gradient NMR is useful to evaluate drug release characteristics of hydrogels containing polypeptide.

はじめに

ハイドロゲルはタンパク質、ペプチドなどの高分子医薬品の放出制御製剤の基剤として注目されており、そのようなハイドロゲル製剤の薬物放出特性を評価するための指標が望まれている。低分子量の医薬品についてはゲル形成性高分子製剤からの薬物放出速度をパルス磁場勾配 NMR によって得られる自己拡散係数から予測する試みが行われており、パルス磁場勾配 NMR によって得られる薬物の自己拡散係数は、ハイドロゲル製剤の放出特性を評価するための指標として有用と考えられる。そこでパルス磁場勾配 NMR がハイドロゲル製剤中での高分子医薬品の自己拡散係数測定にどの程度適用可能なのかを検討することを目的として、インスリンをモデル医薬品としてハイドロゲル中の自己拡散係数の測定を行い、薬物放出実験から得られるインスリンの拡散係数との比較を行った。

実験

デキストランハイドロゲルの調製

メタクリル酸グリシジル(GMA、和光純薬)を修飾したデキストラン(分子量 40,000、和光純薬)とインスリン(牛膵臓由来、和光純薬)を2%の重水素化酢酸(99%、Aldrich)を含む重水(99.75%、和光純薬)に溶解した。この溶液を5 mmのNMR試料管に入れ、1kGyの γ 線を照射し、NMR測定用のゲルを得た。また、この溶液をシリル化処理した2枚のガラス板(76×52 mm)と厚さ2mmのシリコンゴムスペーサーを用いて作った容器に入れ、1kGyの γ 線を照射し、インスリンの放出実験用のゲルを得た。ゲルの調製に用いたデキストランはGMAの修飾率(100個のグルコースモノマーあたりのGMA分子の数)が7、17、21%のものを用いた。

キーワード：分子拡散、ハイドロゲル、インスリン、タンパク質

あそゆきお、よしおかすみえ、こじましげお

拡散係数の測定

拡散係数の測定は Stimulated echo 法により行った。図 1 にパルスシーケンスを示す。90°パルス 9 μ s、磁場勾配パルス巾 δ 4~9 ms、拡散時間 Δ 10~300 ms、磁場勾配強度 3~30 Gauss/cm、繰り返し時間 5 s、積算回数 4~32 回で行った。測定は 37°C で行った。

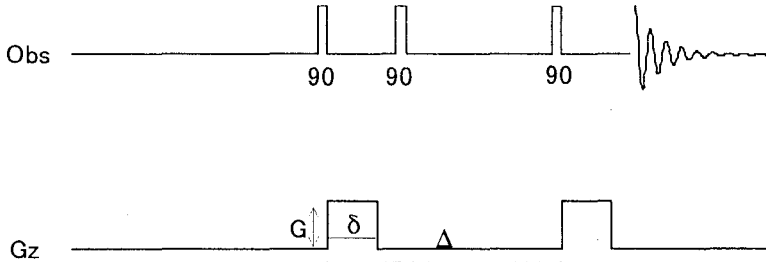


Fig.1 Stimulated spin-echo pulse sequence

インスリンの放出実験

γ 線照射して得られたゲルを切り、直径 10 mm、厚さ 2 mm のディスクを得た。このディスクを 10 ml の 2% 酢酸水溶液に入れ、37°C で振とうし、放出されたインスリンの量を経時的に高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

結果および考察

拡散係数の測定は Stimulated echo 法により行った。エコー強度と拡散係数 D の関係は 1 式で表される。

$$\ln(A/A_0) = -(\gamma\delta G)^2(\Delta - \delta/3)D \quad (1)$$

ここで A および A_0 はそれぞれ磁場勾配の強度が G および 0 の時のエコー強度を表す。 g 、 δ 、 Δ はそれぞれプロトン核の磁気回転比、磁場勾配パルスの持続時間、拡散時間を表す。図 2 に 2% 酢酸水溶液中で測定したインスリンの芳香環水素のエコー強度の磁場勾配強度依存性を示す。磁場勾配強度の 2 乗とエコー強度の対数との間には直線関係が得られ、直線の勾配は拡散時間が大きいほど大きかった。芳香環水素の

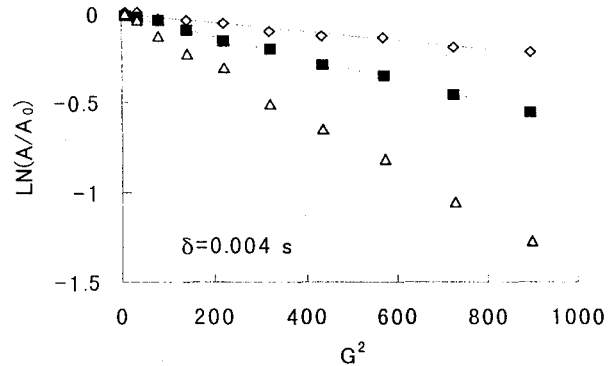


Fig. 2 Spin echo decay of 2% Insulin at 37 °C as a function of intensity of field gradient

$\diamond \Delta=0.01$ $\blacksquare \Delta=0.025$ $\triangle \Delta=0.05$

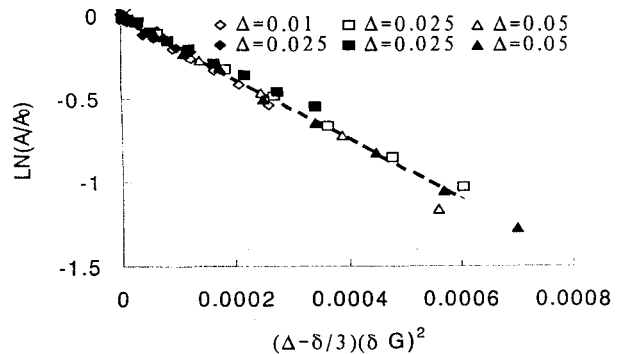


Fig. 3 Spin echo decay of 2% Insulin at 37 °C as a function of $(\Delta - \delta/3)(\delta G)^2$
open symbol: $\delta=0.006$ s,
closed symbol: $\delta=0.004$ s

シグナルはデキストランのプロトンシグナルとの分離が良好であったことから、インスリンの拡散係数の測定に用いるシグナルとして適当と考えられた。拡散時間、磁場勾配パルスの持続時間および磁場勾配強度を変えて測定したときのエコー強度と $(\delta G)^2$ ($\Delta\delta/3$) の関係は図3に示されるように一つの直線であらわされた。インスリンの拡散係数に及ぼすインスリン濃度およびデキストランの濃度の影響を検討したところ、0.5~3%の濃度範囲ではインスリン濃度が高いほど拡散係数は小さくなる傾向がみられたが、変化は小さかった。それに対し、デキストランはインスリンの拡散係数を大きく減少させ、図4に示すように20%のデキストラン存在下では拡散係数は約10分の1に減少した。デキストラン共存下においてもインスリンの拡散係数の測定が Stimulated echo 法により可能であることが示された。

図5はインスリン2%を含有するデキストランハイドロゲル(デキストラン濃度20%)中のインスリンの拡散係数におよぼすゲル架橋度の影響を示す。架橋度とインスリンの拡散係数との間には明確な傾向がみられなかった。これは今回検討したデキストランゲルの架橋度低いため、ゲルの網目がインスリンに比べ大きく、インスリンの拡散に影響しないためと考えられる。このことはインスリンの放出実験のデータからも裏付けられ、図6に示すようにデキストランゲルからのインスリンの放出速度は架橋度の影響がほとんど見られなかった。

デキストランゲルからのインスリンの放出率と時間の平方根の間には直線関係が得られ、インスリンの放出が拡散律速であることが示された。ゲルからの薬物放出が拡散によって支配される場合、薬物の初期放出率 (M_t/M_0) と時間 (t) の関係は2式で表さ

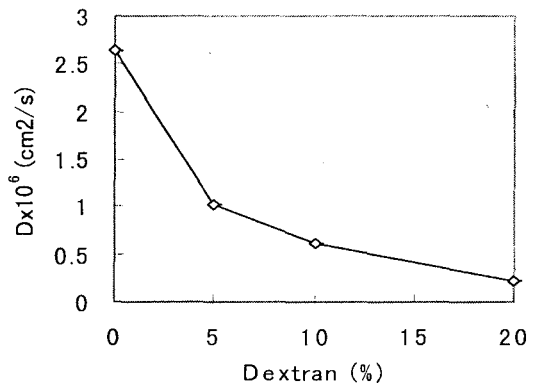


Fig. 4 Effect of dextran on the diffusion coefficient of insulin in solution

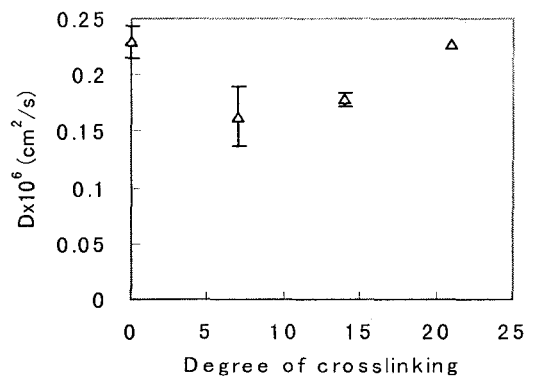


Fig. 5 Effect of the degree of crosslinking on the diffusion coefficient of insulin in dextran hydrogels

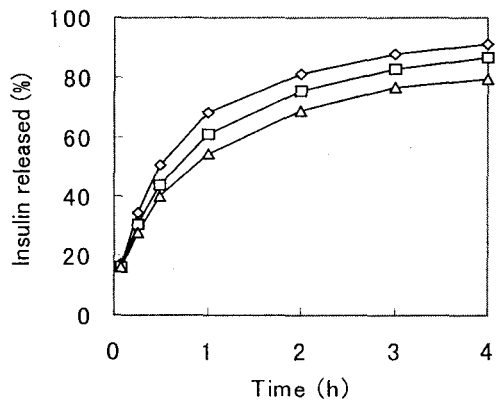


Fig. 6 Insulin release from dextran hydrogels degree of crosslinking: ◇, 7; ◻, 11; △, 21%

れる²⁾。

$$M_t/M_0=4(Dt/\pi l^2)^{1/2} \quad (2)$$

ここで D は拡散係数、 t は時間、 l はゲルディスクの厚さを表す。図 6 に示した放出実験のデータをもとに 2 式に従いインスリンの拡散係数を算出したところ $4.8 \times 10^7 \sim 5.9 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{s}$ であり、Stimulated echo 法により得られた拡散係数 $1.6 \times 10^7 \sim 2.3 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{s}$ より大きな値が得られた。この違いが何によるのかは不明であるが、NMR の実験に用いたゲルと放出実験に用いたゲルの γ 線照射条件の違いが原因の一つと考えられる。

まとめ

ゲル高分子プロトンと良く分離したインスリンの芳香環水素のシグナルを測定することにより、デキストランゲル中のインスリンの拡散係数が測定できた。インスリンなどの分子量数千のポリペプチドであれば、パルス磁場勾配 NMR によりハイドロゲル中の拡散係数の測定ができると考えられる。高分子医薬品を含有するハイドロゲル製剤の薬物放出特性を評価するうえで、パルス磁場勾配 NMR によって測定される拡散係数は有用な指標であると考えられる。

参考文献

1. P. Gao, P. R. Nixon and J. W. Skoug, *Pharm. Res.*, **12**, 965 (1995).
2. P. L. Ritger and N. A. Peppas, *J. Controlled Release*, **5**, 23 (1987).

(名工大・工) ○宮内 実、竹川 政克、吉水 広明、
辻田 義治、木下 隆利

Xe Sorption Properties and ^{129}Xe NMR of the Polymers

Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology

Minoru Miyauchi, Masakatsu Takekawa, Hiroaki Yoshimizu,
Yoshiharu Tsujita, Takatoshi Kinoshita

In this study, to clarify the relationships between the ^{129}Xe NMR parameters and Xe sorption properties of the polymers, the ^{129}Xe NMR spectra of the ^{129}Xe in polyphenyleneoxide, PPO, polycarbonate, PC, and polystyrene, PS. The Xe sorption isotherms of these polymers were measured by the quartz crystal microbalance at 25 °C. The good relationship between the amount of Xe into the polymer and the ^{129}Xe NMR chemical shift was obtained as well as the case of the Langmuir sorption capacity which was determined by the dual-mode sorption model from the isotherm. Furthermore, the CO_2 -pressure treatment (the sample conditioned with CO_2 at 60 atm and r.t.) was carried out for PPO and PC, ^{129}Xe NMR chemical shifts of these conditioned samples showed up-field shift and their peak widths became narrow. On the other hand, there was no obvious relationship between the peak widths and Xe sorption properties. These findings suggest that the ^{129}Xe NMR chemical shift and peak width are corresponding to the size of the microvoid and its distribution, respectively.

[緒言] ^{129}Xe はスピン量子数 1/2、天然存在比 26.4%で、その磁気回転比は ^{13}C の約 1.1 倍であるので、数気圧程度でも比較的容易に NMR スペクトルが得られる。 ^{129}Xe の化学シフトは $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{E}) + \delta(\text{Xe})$ と分解することができる。ここで $\delta(\text{S})$ は Xe 原子と高分子鎖との衝突による項であり間隙が小さいほど大きくなる。 $\delta(\text{E})$ は電場による分極あるいは Xe 原子からの電荷移動によって引き起こされる項である。又、 $\delta(\text{Xe})$ は Xe 原子同士の衝突による項で、Xe 密度が上がるにしたがって増加する。本研究では、種々の高分子に溶解や収着した ^{129}Xe の NMR スペクトルを観測し、化学シフト値や線幅の変化と高分子の構造の関連性を検討した。

keyword : ^{129}Xe NMR、気体収着特性、マイクロポイド

みやうちみのる、たけかわまさかつ、よしみずひろあき、つじたよしはる、きのしたたかとし

[実験] Xe は名古屋興産(株)社製のものを用いた。各種高分子試料を、テフロン製バルブの付いた NMR 管(Wilmad 社製)に約 2g 充填した後、十分乾燥してから所定圧力に相当する Xe を導入した。 ^{129}Xe NMR スペクトルは、日本電子(株)製の GX400NMR 分光計を用い、観測周波数は 110.5MHz にてシングルパルス法で測定した。又、積算は十分な S/N 比が得られるまで(概ね 500~2000 回)行い、待ち時間は 10 秒にした。 ^{129}Xe NMR 化学シフト値はあらかじめ気体 ^{129}Xe について化学シフトの圧力依存性を調べておき、同時に観測される気体 ^{129}Xe のピークを内部基準として補正した(圧力 0 の時を 0ppm とする)。 ^{129}Xe NMR 測定は Xe 導入後室温で少なくとも 16 時間放置後に行った。Xe 吸着等温曲線は Quartz Crystal Microbalance (QCM)法により水晶発振子の発振周波数変化から重量変化を算出することにより得た。

[結果と考察] Fig. 1 にガラス状高分子試料(PPO 及び PC, PS)の 25°C における Xe 吸着等温曲線を示す。Xe の吸着量は PPO>PC>PS の順で多いが、これは他の気体における結果と一致する。これらの等温曲線に二元吸着モデルを適用して解析した結果を Table 1 に示す。Langmuir サイトの飽和定数 C_H' 及び Henry 則に従う溶解度係数 k_D ともに吸着量の多少に寄与していることがわかる。これらの結果を踏まえ、以下に ^{129}Xe NMR パラメーターとの相間を議論する。

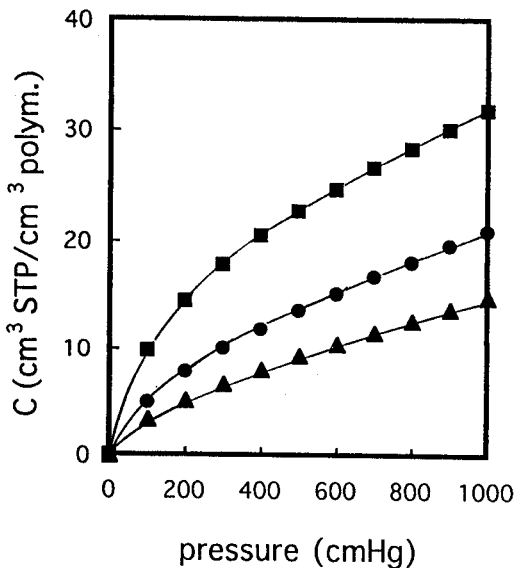


Fig.1 Xe sorption isotherms at 25°C.

Table1 Dual-mode sorption parameters of Xe for PPO, PC, and PS

sample	C_H'	$k_D \times 10^2$	$b \times 10^3$
PPO	19.1	1.5	7.5
PC	9.0	1.3	6.8
PS	4.9	1.1	8.6

C_H' : $\ln \text{cm}^3 \text{STP}/\text{cm}^3 \text{polym.}$

k_D : $\ln \text{cm}^3 \text{STP}/\text{cm}^3 \text{polym. cmHg}$

b : $\ln \text{cmHg}^{-1}$

PPO 及び PC、PS について Xe 圧力が約 10 気圧の下、室温における ^{129}Xe NMR のスペクトルを観測した。各試料に溶解や吸着した ^{129}Xe の NMR ピークは何れも対称性の良い単一ピークであったことから、Langmuir 吸着及び Henry 則に従う溶解サイトそれぞれのサイト間での交換は速いと思われる。得られた ^{129}Xe NMR 化学シフト値(ピークトップの値)を各試料の Xe 吸着量(10 気圧下)に対しプロットした(Fig. 2)が、これには強い相関(吸着量の増加と共に高磁場シフトする)が見られる。また、ガラス状高分子のマイクロボイドの量と対応づけられる C_H' との間にも同様な良い相関が見られた(Fig. 3)。同じ試料(PC)で Xe 圧力を変化させた場合、試料中の Xe 密度を反映して低磁場シフトが観察されたが、このシフト量に比べ、異なる試料間でのシフト差の方が大きい。これらの結果は各試料の分子鎖間隙或いはマイクロボイドのサイズや量の差から生じる現象と考察される。一方、ピーク線幅は $\text{PC} > \text{PPO} > \text{PS}$ の順で狭くなり、吸着量との間に明確な相関があるとはいえない。また、同じ試料でありながら、異なるガラス状態を作り出す方法の一つとして、PC と PPO に対し CO_2 圧処理(60 気圧の CO_2 に 12 時間さらした後に解放した)を行い、 ^{129}Xe NMR スペクトルを観測したところ、各々の徐冷試料に比べ、高磁場シフトし線幅は細くなった。以上の結果より、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値が高分子鎖間隙或いはマイクロボイドのサイズ及びその分布を知るプローブと成り得ることが示された。

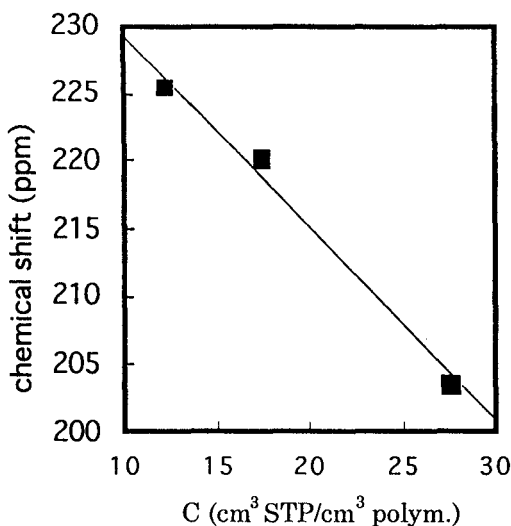


Fig.2 The plot of ^{129}Xe NMR chemical shift vs. amount of Xe sorption for the polymers at 760 cmHg.

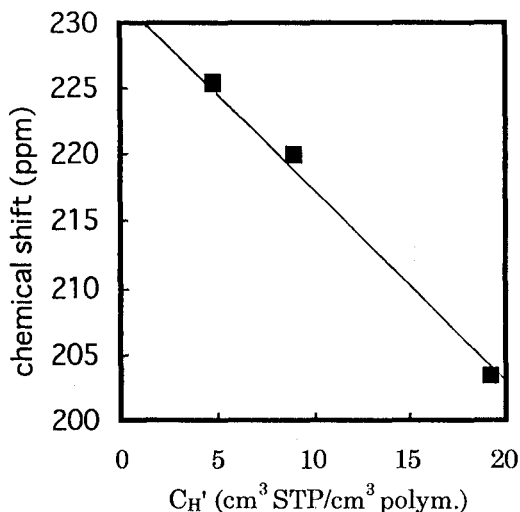


Fig.3 The plot of ^{129}Xe NMR chemical shift vs. Langmuir sorption capacity of Xe for the polymers at 760 cmHg.

高圧¹HパルスNMR法によるPVA／水系の
分子運動に関する研究

東京工業大学工学部高分子工学科 ○小林将俊・兼清真人・安藤 勲

A Study of Molecular Motion of PVA / Water System
by High-Pressure ¹H Pulse-NMR Method

Masatoshi KOBAYASHI, Masahito KANEKIYO and Isao ANDO

It is known that poly(vinyl alcohol) (PVA) in aqueous solution forms a gel by undergoing freeze-thaw cycles. The formation of hydrogen bonds between PVA chains plays an important role. From this, it can be expected that gel formation is greatly influenced by the application of pressure. From such a situation, we aim to elucidate the effect of pressure on the gel formation by high pressure ¹H pulse-NMR where pressure is changed from 1 to 500 kg/cm².

The ¹H spin-spin relaxation times (T_2) of aqueous PVA solution and PVA gel were obtained by CPMG and solid-echo methods. From these experiments, it was found that the T_2 signal is composed of some components which are assigned to the mobile, immobile and intermediate regions.

[目的]

圧力は温度とならんで自然現象を支配する重要なパラメーターである。圧力を加えることは巨視的には体積減少をもたらす、微視的には分子間距離を減少させる。これにともない分子の集合状態や分子間相互作用の強さが変化する。高分子ゲル、特に物理架橋ゲルのゲル化過程において圧力を加えると分子間相互作用の強さが変化し、ゲルの生成過程に大きな影響をもたらすことが期待される。当研究室では既に¹HパルスNMR法を用いてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)水溶液のゲル化は圧力を加えることにより抑制されると報告した¹⁾。本研究ではポリビニルアルコール(PVA)水溶液が凍結融解を繰り返すと分子間水素結合の形成によりゲル化することに着目し、PVA水溶液中での分子間水素結合の形成におよぼす圧力効果を¹HパルスNMR法により明らかにすること、さらにこれをもとにPVAゲルの生成機構を明らかにすることを目的とする。

[実験]

用いた試料は重合度300および1700のアタクチックPVAである。この試料を重水に溶解、沈殿を3回繰り返し、PVAの水酸基の¹Hを重水素置換したPVA(PVOD)を作成した。これを重水に溶解させ(濃度10wt%)、耐圧NMRサンプル管に封入した(Fig. 1)。高圧パルスNMR測定に用いた加圧装置はハンドポンプ、圧力計、耐圧ステンレス管、ステンレスジョイントで構成され(Fig. 1)、圧力媒体には油を使用した。測定可能な圧力は最大500kg/cm²程度で

PVA / パルス NMR / ¹H T_2 / 高圧 NMR / ゲル

こばやしまさとし、かねきよまさひと、あんどういさお

ある。NMR 装置は Bruker minispec PC-20 (^1H 共鳴周波数 20MHz) パルス NMR 分光器を用い、 ^1H スピン-スピン緩和時間 (T_2) を CPMG 法およびソリッドエコー法により求めた。

※圧力単位の換算 $1\text{kg}/\text{cm}^2 \cong 1\text{atm} \cong 10^5\text{Pa}$

[結果・考察]

Fig. 2 に示したのは 50atm, 30°Cにおける CPMG 法による PVA 重水溶液の高分子鎖の ^1H シグナルである。この減衰曲線より 2 成分の $^1\text{H } T_2$ を求めた。 T_2 の短い成分は溶液中で高分子鎖の凝集が起こり、これにより分子運動の束縛された成分、 T_2 の長い成分は運動性の良い高分子鎖の成分であると帰属した。Fig. 3 にこの 2 成分の $^1\text{H } T_2$ の圧力に対する変化を示した。分子運動の束縛された成分の T_2 は 1-500 kg/cm^2 の範囲で 20-40ms 程度でほぼ一定である。一方、運動性の良い成分の T_2 は 1-100 kg/cm^2 では 600-700ms であるのに対し、200 kg/cm^2 以上の高圧を印加すると T_2 値は 100ms 程度に減少する。

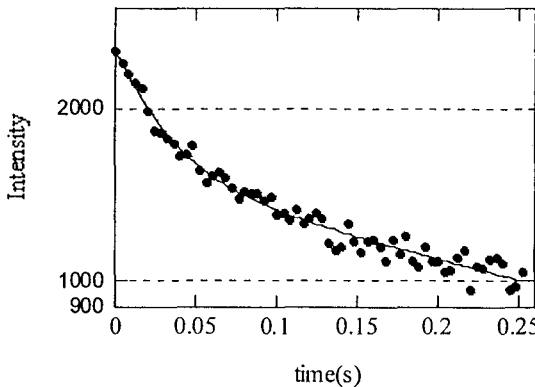


Fig.2
 ^1H signal of PVOD/ D_2O solution
by ^1H NMR CPMG method at 50 kg/cm^2 .

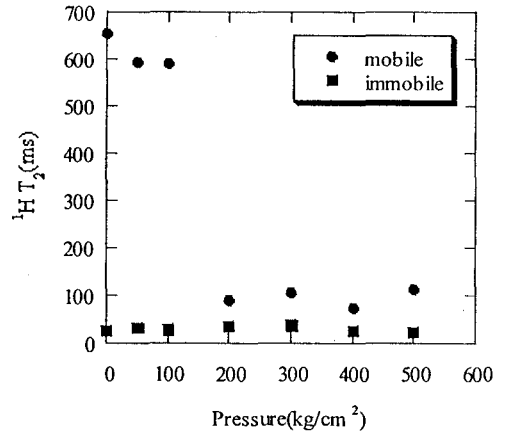
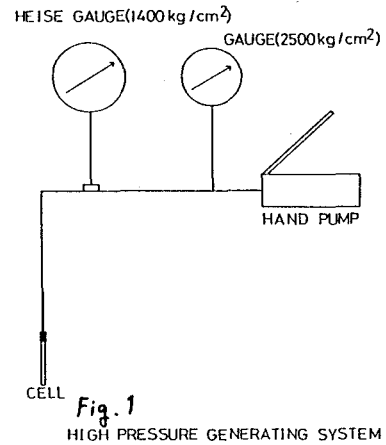


Fig. 3
The plot of $^1\text{H } T_2$ of PVA/ D_2O solution against pressure obtained by ^1H NMR CPMG method.

これは PVA 水溶液中の凝集部分の運動性は圧力を印加しても変化しないのに対し、自由に運動している高分子鎖の分子運動性は 200 kg/cm^2 以上の高圧下で束縛を受けることを示している。

次に、ソリッドエコー法により NMR プロブ内で凍結融解を繰り返しゲル化させたサンプルの FID 信号と $^1\text{H } T_2$ の圧力依存性の結果を Fig. 4, 5 に示した。一般にソリッドエコー

法は固体状態のような分子運動が大きく束縛されている系 (T_2 値が 1ms 程度以下) の FID 信号を精度良く求めることができる。ここで示された T_2 はゲル状態における高分子鎖の信号であり、運動性の異なる3つの領域 (架橋領域・非架橋領域・中間領域) が存在することを示している。Fig. 5 に示したように得られた T_2 値は圧力に対してあまり変化は見られずほぼ一定である。

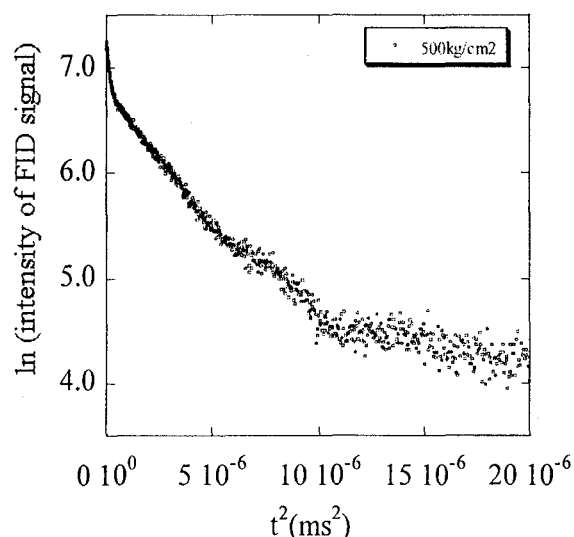


Fig.4

The ^1H FID signal of PVA gel at 500 kg/cm^2 by solid echo pulse sequence.

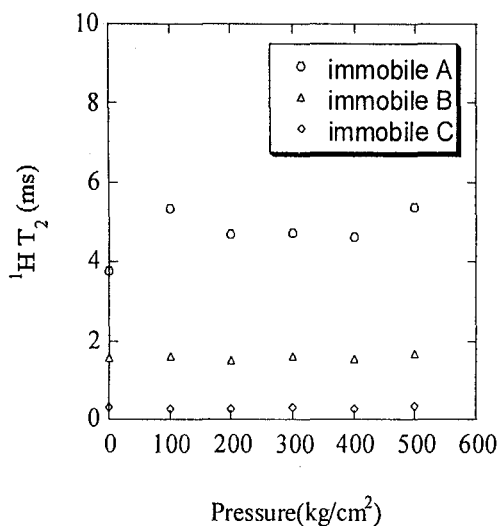


Fig.5

The plot of ^1H T_2 of PVA/ D_2O gel against pressure obtained by ^1H NMR solid echo pulse sequence.

以上の結果より、PVA 水溶液中の高分子鎖の分子運動は溶液状態においては圧力を印加することにより大きく束縛される。これに対し凍結融解を繰り返し高分子鎖が3次元網目を形成すると、圧力を印加しても分子運動はそれほど大きな影響を受けないことがわかった。また PVA 水溶液の2成分の信号の成分比は圧力変化に対してはほぼ一定であった。さらに圧力印加状態下での経時変化の実験から、圧力印加により水溶液中で PVA 鎖の凝集が進むかどうかについて検討を行う予定である。

このように高圧 ^1H パルス NMR 法により高分子鎖間の相互作用の変化を明らかにすることができる。これらからゲルの生成に及ぼす分子間相互作用について、発表当日述べる予定である。

- 1) H. Ohta, I. Ando, S. Fujishige, K. Kubota, J. Polym. Science: Part B: Polymer Physics, Vol. 29, 963 (1991)

Dynamic Properties of Tetramethylammonium in Synthetic Clay Mineral

Department of Chemistry, University of Tsukuba

Shin'ichi Ishimaru, Miho Yamauchi, Ryuichi Ikeda

Dynamics of Tetramethylammonium(TMA) cation in the interlayer-space of saponite was investigated by ^1H and ^2H NMR spectra and spin-lattice relaxation time(T_1) measurements. Four deuterated specimens: D_2O saturated TMA-saponite, anhydrous TMA-saponite, H_2O saturated TMA- d_{12} -saponite, and anhydrous TMA- d_{12} -saponite, were prepared for the measurements. Both ^1H and ^2H spectra of the H_2O saturated TMA- d_{12} -saponite and the anhydrous TMA- d_{12} -saponite showed sharp and structureless line-shapes at *c.a.* 250 K suggesting the cationic isotropic reorientation. The ^1H T_1 of D_2O saturated TMA-saponite showed a large distribution of the correlation time of the cationic motion.

(序)

スメクタイトや雲母などの層状粘土鉱物は負電荷を帯びたケイ酸層と層間に存在する陽イオンから構成される。層間の陽イオンは容易にイオン交換される性質を持つ。また、粘土層間には陽イオンとの相互作用により、様々な分子が吸収され、層間化合物を形成する。粘土層間に束縛された陽イオンや極性分子はバルクの液体や固体とは異なる性質を示すと予測され興味深い。本研究では層状粘土鉱物の一種であるサポナイトの陽イオンをテトラメチルアンモニウムに交換し、層間水の有無による陽イオンの動的挙動の変化を ^1H のスピン-格子緩和時間(T_1)および ^2H スペクトル測定により調べた。

(実験)

合成 Na-サポナイト (日本粘土学会参考試料 JCSS-3501 クニミネ工業) を出発物質として塩化テトラメチルアンモニウム水溶液によるイオン交換を行いテトラメチルアンモニウム-サポナイト (TMA-サポナイト) を得た。得られた TMA-サポナイトを2本のガラス製試料管に入れ、一旦、両者を真空脱水した後、一方はそのまま少量のヘリウムガスとともに封じ、もう一方は飽和水蒸気圧の D_2O 蒸気に終日晒した後同様にヘリウムガスとともに封じた。塩化テトラメチルアンモニウム- d_{12} を用い、同様な手順により H_2O 飽和 TMA- d_{12} -サポナイト、無水 TMA- d_{12} -サポナイトを作製し計4種類の試料用意した。

D_2O 飽和 TMA-サポナイトについては 200°C で恒量とし、室温からの減量より水和量をカチオンあたり 14.0 ± 0.5 分子と決定した。また同じ試料について示差熱分析(DTA)を行い、相転

キーワード： サポナイト、層間化合物、粘土鉱物

著者ふりがな：いしまる しんいち・やまうち みほ・いけだ りゅういち

移の有無を調べた。

^1H T_1 測定は当研究室自作のパルス NMR により、スペクトル測定は Bruker MSL-300 システムにより行った。

(結果および考察)

DTA 測定により D_2O 飽和 TMA-サポナイトが 217 K, 241 K, 292 K で相転移を起こすことを見出した。また、310 K 付近から D_2O の脱離によるものと思われる大きな吸熱を観測した。

D_2O 飽和 TMA-サポナイトの ^1H NMR スペクトルは 250 K 付近まで線幅がほぼ 1 kHz の鋭い吸収線を示し、それ以下の温度では冷却に伴って徐々に線幅が増大した。また、 H_2O 飽和 TMA- d_{12} -サポナイトおよび無水 TMA- d_{12} -サポナイトの ^2H NMR スペクトルはいずれも 120 K 付近で構造のない幅の狭い吸収線形を示しており、カチオンの全体回転がこの温度で既に活性化されていることを示している。図 1 は両化合物の吸収線の半値全幅の温度変化である。図中に示した破線は DTA 測定により観測された相転移温度を示している。どちらの化合物も 200 K 付近で線幅が減少しており、さらに別の運動が活性化されている様子が窺える。

図 2 は D_2O 飽和 TMA-サポナイトの ^1H T_1 温度変化および周波数変化測定の結果である。最低温相で観測された T_1 極小はカチオンの運動の活性化によるものであるが、極小より低温側での T_1 の周波数依存性は通常の熱活性化過程である BPP 理論式から予想される $T_1 \propto \omega^2$ よりかなり小さい。これは粘土層格子中の電荷分布によるカチオン環境の不均一によるものと考えられる。そこで、カチオンの運動の相関時間に Cole-Davidson 型の分布を導入した理論式を用いて最適化を行った結果、実験結果をよく再現することができた。各運動の詳細については現在検討中である。

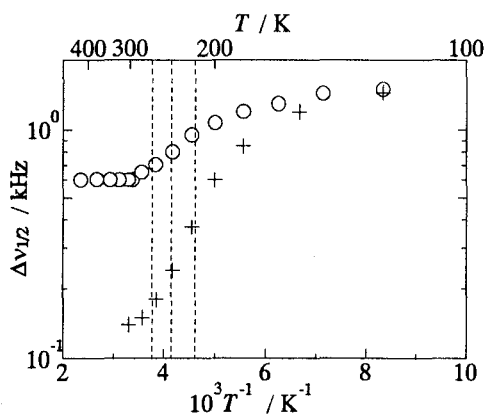


Fig.1 Temperature dependence of ^2H NMR FWHM of anhydrous TMA- d_{12} -saponite (○) and H_2O saturated TMA- d_{12} -saponite(+)

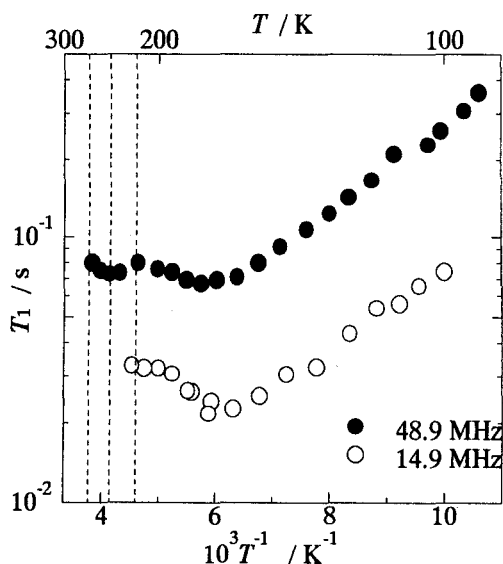


Fig.2 Temperature and frequency dependence of ^1H T_1 of D_2O saturated TMA-saponite

The Application of High Resolution Solid State NMR for the Application of Rubber Aging Process

S. Inoue¹, ○T. Sugie¹, T. Kamada², M. Ushio² and H. Okamoto¹
 (Aichi Institute of Technology¹, Toyo Rubber Co., Ltd.²)

ABST : The application of high resolution solid state NMR for rubber aging process has never reported. Therefore, we measured T_{2c} using CP/MAS method and appliciated aging process from layer structure. There are interesting correlations between T_{2c} and physical properties. The results indicated that the application of rubber aging process at molecular level is possible.

緒言

これまで熱、振動、オゾンおよび紫外線などの外部の影響によるゴムの劣化挙動に対する評価としては、硬さ試験、引張試験、伸び試験、架橋密度などの物理的な試験が行われてきた。最近ではパルス NMR を用いた評価も報告されるようになったが、高分解能固体 NMR を用いた評価はほとんど報告されていないのが現状である。

そこで今回は、物質の結晶状態あるいは層構造など分子レベルでの知見が得られることから注目されている高分解能固体 NMR を用いて T_{2c} を測定することにより、任意の温度および時間で熟劣化したゴムサンプルの劣化挙動に対する応用について検討を行った。

実験

実験は東洋ゴム工業(株)から提供された 80, 100 および 120°C の各温度にて 70~960 時間加熱したゴムサンプルを Varian 社製 300MHz NMR UNITY plus を用いて T_{2c} の測定を行った。

結果

結果は加熱時間が長くなるにつれて 80, 100, 120°C の順に T_{2c} は減少し (Fig. 1)、パルス法に相当する T_{2h} についても同様の傾向を示した。

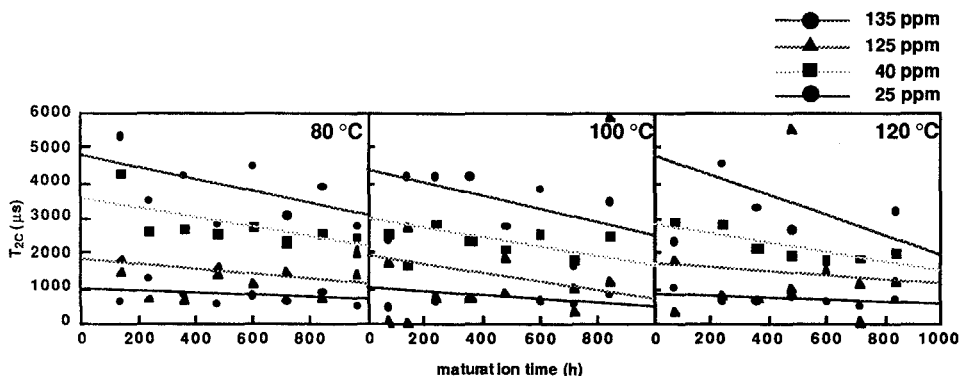


Fig. 1 The spin-spin relaxation times(T_{2c}) of rubber samples

キーワード：固体高分解能NMR、劣化挙動、 T_{2c} 、スピン拡散、層構造

いのうえ しんいち・すぎえ たかのり・かまだ つねお・うしお まさひろ・おかもと ひろし

また従来通りの物理的な試験法についても検討を行ったところ、硬さの増大、引張強度の低下、伸び率の減少および架橋密度の増大といった一連のゴムの劣化を示す傾向がみられた (Fig. 2)。

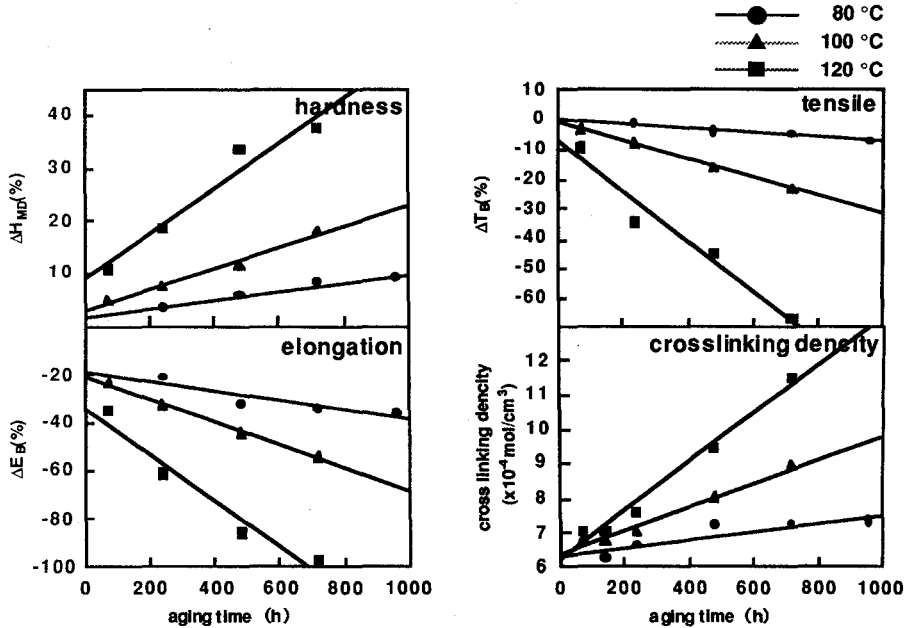


Fig. 2 The physical properties of rubber samples

結論

加熱温度および加熱時間の増大に伴う T_{2c} の減少は、サンプル中の分子が二次元的な網目構造を形成することにより、隣接する炭素-炭素間でのスピン拡散が生じているためと考えられる。このことは物性値における架橋密度の増大と一致する。この二次元的な網目構造が層をなすことにより、層と層との間ですべりが生じ一連の物性値の低下を招いていると考えられる (Fig. 3)。

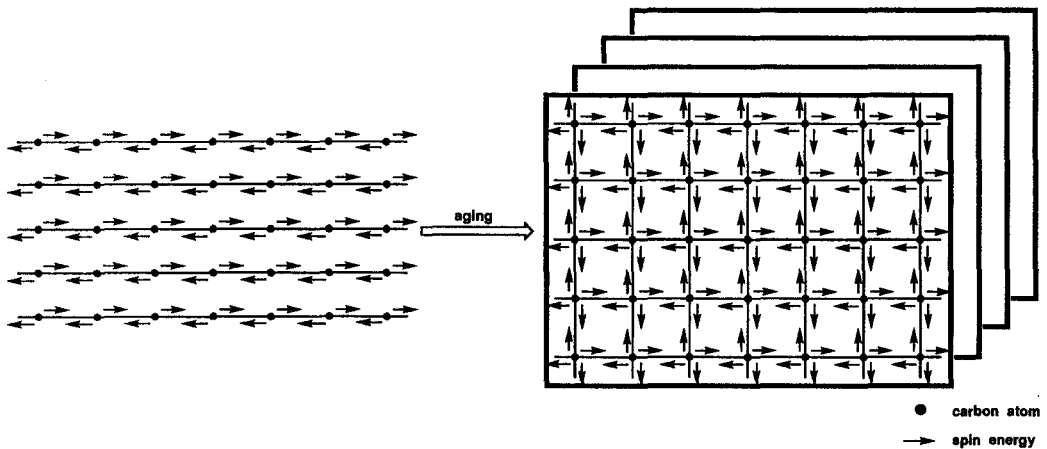


Fig. 3 The transformation of rubber layer structure by aging

また、現在同様の測定方法を用いて実際に工業的に利用されているゴムパーツについても検討を行っており、実際の使用により生じた劣化の実験室レベルでの再現、工業用ゴム製品 (例えば自動車用部品など) の寿命の予測などに対して極めて有用であると考えられる。

Proton tunneling in NHO hydrogen bonds in solid. ^1H -NMR and ultra-low temperature ^{15}N -CP/MAS NMR

Sadamu Takeda

*Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma 376 and
Institute for Molecular Science, Myodaiji, Okazaki 444, Japan*

C. Benedict, U. Langer, and H.H. Limbach

*Institut für Organische Chemie Freie Universität Berlin, Fachbereich Chemie, Takustrasse 3,
D-14195 Berlin, Germany*

Proton-transfer quantum tunneling in NHO hydrogen bonds of N,N'-di(2-hydroxy-1-naphthylidene)-p-phenylenediamine (abbreviated by DNP) was investigated by ^1H -NMR relaxation and ^{15}N -CP/MAS NMR spectrum which was measured down to 26 K for ^{15}N -enriched DNP. DNP has two NHO hydrogen bonds and combination of two possible forms, OH and NH forms, may lead to four tautomeric forms. Temperature variation of ^{15}N chemical shift indicates fast exchange between -NH- and =N- even at 26 K. T_1 of ^1H and ^{15}N chemical shift were analyzed by four-site exchange model with tunneling effects. The result suggests that the form of one hydrogen bond, OH or NH form, affects the potential energy function hindering the proton transfer motion in the other hydrogen bond of DNP molecule.

水素結合中の量子効果によるプロトントランスファートンネリングの研究は化学反応や生体系での様々なプロセスを理解する上で重要と思われる。特に複数の水素結合が相互作用しあうような系でのプロトントランスファードायナミクスは、分子骨格を通じた情報伝達などにとって重要と思われる。

N, N'-di(2-hydroxy-1-naphthylidene)-p-phenylenediamine (略号: DNP) は1分子中に2つのNHO水素結合を持ち、各々の水素結合でOH型とNH型が可能あり、これらの組み合わせにより、4種類の互変異性体が存在しうる。これら4種類の互変異性体、[OH, OH], [OH, NH], [NH, OH], [NH, NH]、のうち[OH, NH]と[NH, OH]は結晶中でも分子の中心に対称心があることから等価なエネルギー状態にあると思われる。

^1H の緩和速度は約25Kと200Kに極大を示す。 ^{15}N の信号は1本だけ観測され、その化学シフトは NH_4Cl の ^{15}N を基準(0ppm)として338Kで180.6ppmであり、温度降下とともに次第に大きくなり26Kでは233.1ppmとなる。室温以下での ^{15}N -CP/MAS-NMRの測定にはDoty社のPenguin Probeを用いたが、前回報告したこのPenguin Probeによるシフト効果(439.9/T ppm)は補正している。

^1H の緩和速度と ^{15}N 化学シフト両者の温度依存性を、4サイト交換モデルを用いて解析した。その結果、[OH, OH]と[OH, NH] ([NH, OH])とのエネルギー差が0.75kJ/mol、[OH, NH] ([NH, OH])と[NH, NH]のエネルギー差が1.55kJ/molで、 ^1H の緩和速度と ^{15}N 化学シフト両者の温度依存性をほぼ再現できた。もし、DNP分子中の2つの水素結合が独立であれば、これらの値は等しいはずである。この値の違いは2つの水素結合間の相互作用の現れと考えられる。また活性化エネルギーやトンネリングの速さも、[OH, NH] \leftrightarrow [OH, NH] ([NH, OH])と[OH, NH] ([NH, OH]) \leftrightarrow [NH, NH]で異なることも、2つの水素結合間の相互作用を示唆している。

プロトントンネリング、極低温 ^{15}N -CP/MAS-NMR、 ^1H -NMR、NHO水素結合
ただただ、C. べねでいと、U. らんがー、H. H. りんばっは

筑波大学理工学系

○野中正幸、松井茂、中井利仁、井上多門

IMAGING OF THE SECOND-MOMENT II
 Institute of Applied Physics, University of Tsukuba
 M.Nonaka, S.Matsui, T.Nakai and T.Inouye

Approaches are discussed to imaging of the second moment of proton NMR dipolar spectra. Two methods are proposed using the peak shapes of the magic echo trains for evaluation of the second moment: One is a quasi-multidimensional FT approach where the peak shapes of the magic echoes are spatially resolved, and the other is the fast version of the former approach, collecting the same data in a much shorter measurement time. Preliminary results of spatially 1D and 2D experiments are reported.

【はじめに】

固体材料の NMR イメージングを行う上で、分解能の向上とともに重要な研究課題の一つに、イメージコントラストをより多彩にすることがあげられる。特に、NMR スペクトロスコーピーの情報をコントラストに取り込むことは、NMR イメージング法の有用性を高める上で必要不可欠である。前回、我々は、新たな分子運動性のコントラストとして 2 次モーメントを取り上げ、マジックエコートレインを用いたイメージング方式を提案した[1]。今回は、この空間 1 次元の実験を改良した結果、さらに空間 2 次元に拡張した実験結果について発表する。

【 M_2 イメージング】

n 次モーメント (M_n) は、通常、スペクトルの線形 $f(\omega)$ により、次式のように定義される。

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{\infty} f(\omega) d\omega} \quad (\omega_0: \text{共鳴周波数}) \quad (1)$$

M_2 イメージング法としてまず考えられるのは、スペクトルの測定とイメージング法を多次元 FT 法により結び付け[2]、空間的に分解されたスペクトルから (1) 式により M_2 の空間分布を求める方法である。しかし、この方法には一般的な多次元 FT 法のように測定時間が長いという欠点がある。

これに対して、我々は時間領域の信号である FID あるいはエコー信号を直接利用する方法を考案した。FID 信号 $S(t)$ は、Van Vleck の moment を用いて次式のように展開することができる。

$$S(t) = 1 - \frac{M_2}{2!} t^2 + \frac{M_4}{4!} t^4 - \frac{M_6}{6!} t^6 + \dots \quad (2)$$

この式より、 $t=0$ 近傍の FID の形に対して curve fitting を行なうことによって M_2 を求めることができる[3]。よって、例えば Fig.1a に示すような空間 1 次元のマジックエコー[4,5]イメージングシーケンス[6,7]により、 t_1 を数回インクリメントして測定し、マジックエコーの peak 付近の形を計測することにより、 M_2 イメージングが可能となる(quasi-2D FT approach)。この方法では、数回で

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、まついしげる、なかいとしひと、いのうえたもん

測定が完了するので、上で述べた通常の 2D-FT 法に比べてかなり測定時間を短くすることができる。

さらに、我々は空間 1 次元の実験の場合には、1 回の測定のみで計測が完了する高速な方法(fast approach)も考案した(Fig.1b)。この方法では、quasi-2D FT approach(Fig.1a)に比べ t_1 のインクリメントの必要がなく、多重エコーが一度に測定される。得られた多重エコーは、適切なデータ処理によって quasi-2D FT approach 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。

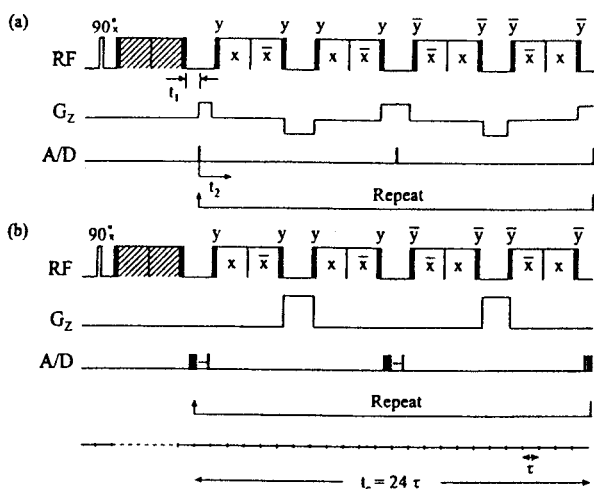


Fig.1 Pulse sequences for spatially 1D second moment imaging using the magic echo technique. The hatched magic-sandwich RF irradiation represents a pulse cycle consisting of four magic-sandwich irradiations.

(a) **Quasi-2D FT approach** where t_1 is incremented several times and then during t_2 the echo peaks are sampled once for an echo in the presence of the pulsed gradient G_z for imaging. Fourier transformation is made along t_2 only, producing z resolution.

(b) **Fast approach** where the magic echoes are sampled several times for an echo in the absence of the pulsed gradient G_z .

【実験条件】

すべての実験は、 ^1H 共鳴周波数 60MHz の自作の装置を用いて行った。RF 磁場の強度は 100kHz、magic echo sequence の時間間隔 τ は $50 \mu\text{s}$ (Fig.1)、磁場勾配の強度 G_z は Fig.1a の場合 16mT/m で、Fig.1b の場合は、Fig.1a と同一の視野幅(9mm)を得るため、32mT/m とした。

空間 1 次元の実験において、quasi-2D FT approach (Fig.1a) では 128 の magic echo を発生させ、偶数番のエコーが測定された。 t_1 のインクリメントは $10 \mu\text{s}$ 間隔で 6 回おこなった。fast approach では、各エコーを $10 \mu\text{s}$ 間隔で 7 点サンプリングした(Fig.1b)。 M_2 を求めるための curve fitting には、(2)式を t に関する 4 次関数としたものを用いた。

また、fast approach では、この方法の高速性を生かして空間 2 次元に拡張した実験も行なった。2 次元画像は、テストサンプルを 1.8° きざみで回転することによって得られた 100 projection から再構成した。S/N を向上させるために積算を 8 回行い、測定時間は約 50 min.であった。

【結果と考察】

quasi-2D FT approach による空間 1 次元の実験結果を Fig.2 に示す。テストサンプルは 2 本の試験管(内径 3mm)にそれぞれ adamantane、hexamethylbenzene を入れたものである。得られた 2 次元データは t_2 に関してのみ FT され、 t_1 方向には magic echo の形が、 z 軸方向には projection が示されている(Fig.2a)。(2)式に基づく t_1 方向の curve fitting により、 M_2 の空間分布が得られた(Fig.2b)。fast approach による実験結果(Fig.3)も Fig.2 と同様の結果が得られ、本方法の有用性が示された。 M_2 の値は、スペクトル実験より求めた M_2 値(adamantane 0.94 G^2 , hexamethylbenzene 2.01 G^2)に良く一致している。

fast approach により測定された、テストサンプルの 2 次モーメントの空間 2 次元分布を Fig.4b に示す。これは、Fig.4a に示される 7 枚の 2 次元画像について curve fitting することによって得られた。テストサンプルは、adamantane、hexamethylbenzene 粉末を内径 7mm の試験管に入れたもので、粉末は厚さ 1mm のテフロンシートにより分けられている。各粉末の M_2 値が精度良く得られている。FID が $1/e$ に減衰するところを T_2 と仮定すると、両試料の T_2 は共に $50 \mu s$ 程度であり、 M_2 は、 T_2 よりも分子運動性に対してより感度のよいパラメータであることが確認できる。固体の NMR イメージングにおいて、このような Echo Planar 法に類似の原理に基づく高速法が実現されたのは本実験が初めてである。

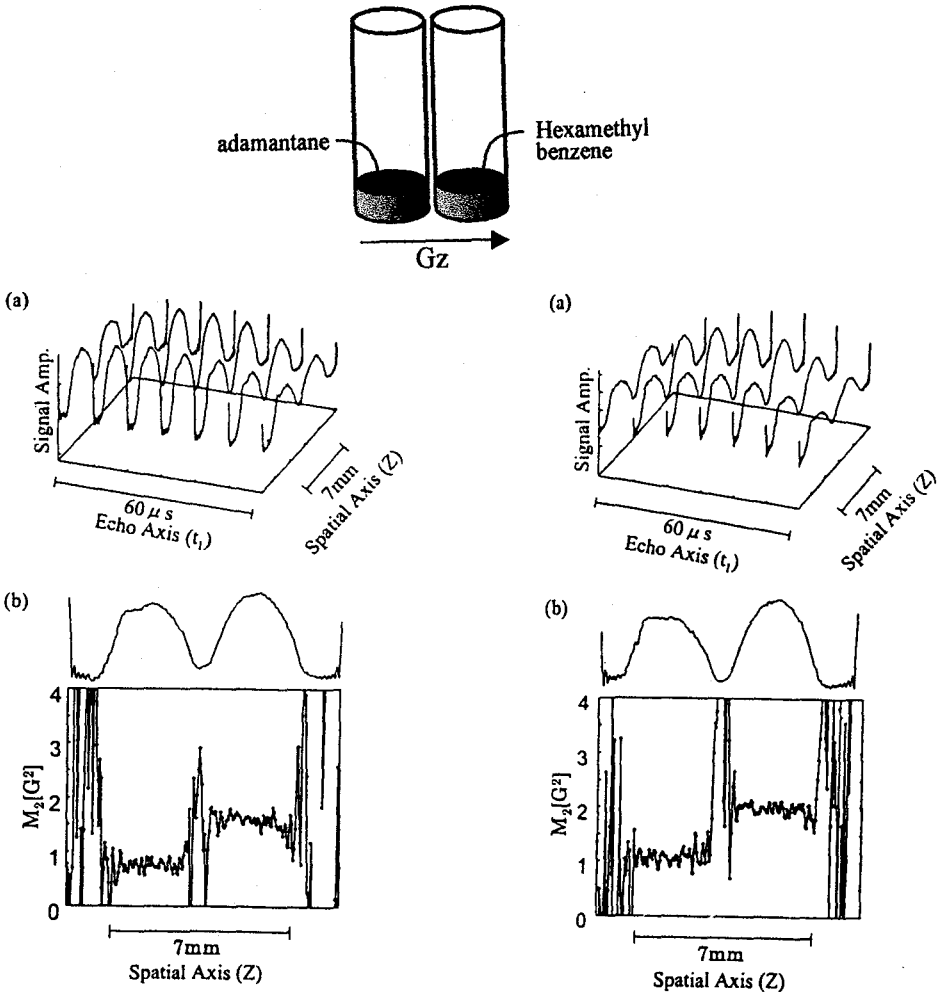


Fig.2 Spatially 1D experimental results obtained by the quasi-2D FT approach shown Fig.1a. Seven measurements(16 accumulations for each measurement to improve the S/N) with different t_1 were made and corresponding seven projections were recorded (a). Curve fittings along the t_1 axis produce the localized values of the second moment as shown in(b).

Fig.3 Spatially 1D experimental results obtained by the fast approach shown in Fig.1b. Only a single measurement(16 accumulations for S/N improvement) was made with seven points sampling for each echo. The corresponding seven projections are shown in (a). Curve fittings along the t_1 axis produce the localized values of the second moment as shown in(b).

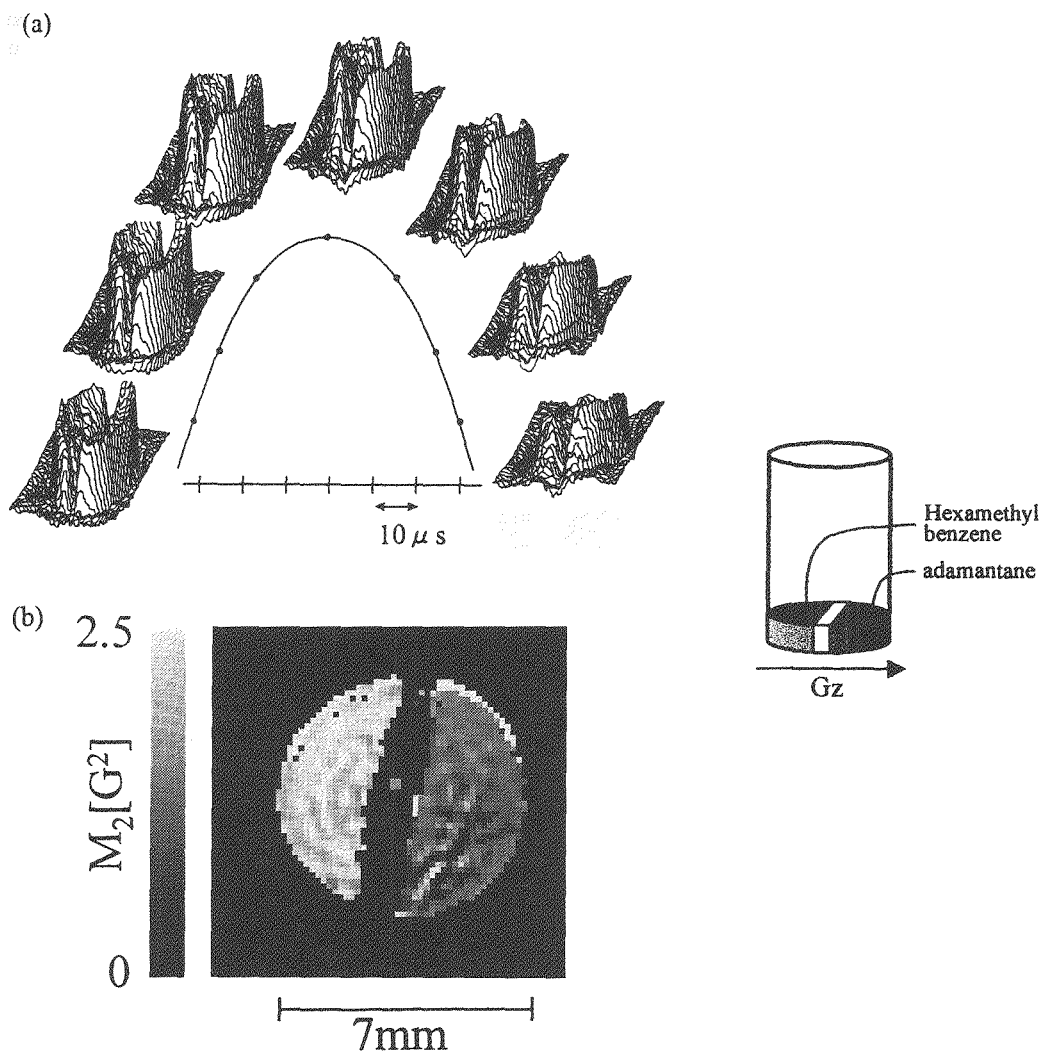


Fig.4 Spatially 2D experimental results obtained by the fast approach shown in Fig.1b. One hundred measurements (8 accumulation for S/N improvement) were made to record 100 projections by stepwise sample rotation. Each echo was sampled by seven points and the corresponding seven 2D images obtained by filtered back projection are shown in (a). Each 2D image is displayed on a 64x64 matrix. Curve fittings at the resolved 2D locations produce the 2D distribution of M_2 values as shown in (b).

References

- [1] 野中正幸,福永康弘,中井利仁,松井茂,井上多門 “2次モーメントのイメージング” 第35回NMR 討論会要旨 3P41 (1996)
- [2] S.Matsui, *J.Magn.Reson.*, 95(1991)149.
- [3] J.G.Powles and J.H.Strange, *Proc.Phys.Soc.*, 82(1963)6.
- [4] W.-K.Rhim, A.Pine and J.S.Waugh, *Phys.Rev.*, B3(1971)684
- [5] K.Takegoshi and C.A.McDowell, *Chem.Phys.Lett.*, 116(1985)100.
- [6] S.Matsui, *Chem.Phys.Lett.*, 179(1991)187.
- [7] S.Matsui, A.Uraoka, T.Inouye, *J.Magn.Reson.*, A 120(1996)11.

東工大工：○石井張愛、安藤慎治、安藤勲

Solid State ¹³C、¹⁵N-NMR Studies on Polyimide Conformation in Solid

Polyimide is an excellent thermostable polymer. However we do not have sufficient information about the relation between their conformation and property, because Polyimides are difficult to be analyzed by X-ray diffraction because it needs a single crystal and polymer has a lot of amorphous region.

Then we made an attempt to develop a new structural investigation method by using solid state ¹³C、¹⁵N-NMR chemical shift.

We synthesized several kinds of substituted aromatic imides which have different dihedral angles(ω) between imide ring and phenyl ring. And we recorded high-resolution solid-state and solution ¹³C、¹⁵N-NMR spectra. We found a relation between their chemical shifts and dihedral angles.

○Haruchika Ishii, Shinji Ando and Isao Ando

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

1.序論及び目的

機能性高分子材料研究の始まった1940年代から現在までに芳香族ポリアミドや芳香族ポリイミドなど様々な耐熱性高分子の研究がなされており、またこれまで実用化され、多種多様な用途に用いられている。しかしながらその機能と構造の関係が未だ明らかになっていない例も数多い。

このような機能性高分子の中でも耐熱性をはじめとする多くの有用な性質（例としては難燃性、高い機械強度など）を持つ芳香族ポリイミドの、固体中での芳香環とイミド環の間の二面角 ω に注目した。本研究では、現在広く行われているようなX線回折を用いた構造決定法を行うには難しい高分子量のポリイミドのコンホメーションを、固体¹³C、¹⁵N-NMR化学シフトを用いて決定する方法を開発することを目的とする。

キーワード (コンホメーション、ポリイミド)

いしいはるか、あんどうしんじ、あんどういさお

2. 実験

X線によって構造解析がなされている低分子量の芳香族イミド化合物を5種合成を行った。これらのサンプルは置換基と結晶系の違いによってそれぞれのイミド環と芳香環の間の二面角 ω は変化している。これらの固体CP/MAS及びDipolar Dephasing ^{13}C 、 ^{15}N -NMR、溶液 ^{13}C 、 ^{15}N -NMR スペクトルをそれぞれ観測し、各核の化学シフトと二面角 ω との相関を調べた。

2.1. NMRの測定条件について

2.1.1. 溶液NMRについて

溶液 ^{13}C -NMRスペクトルはいずれも日本電子製GSX-500NMRスペクトロメーター（観測周波数125.7MHz₂、基準にはTMS）を用い、溶媒には CDCl_3 を使用し、また溶液 ^{15}N -NMRスペクトルにはBruker社製MSL-400NMRスペクトロメーター（観測周波数40.5MHz₂、基準には CH_3NO_2 を使ったが NH_4NO_3 基準に補正）を用い、溶媒は CDCl_3 を用いた。

2.1.2. 固体NMRについて

固体NMR測定にはすべてBruker社製DSX-300スペクトロメーターを用い、 ^{13}C （観測周波数75.5MHz₂基準はTMS）、 ^{15}N （観測周波数30.4MHz₂、基準にはグリシンを用いたが NH_4NO_3 基準に補正）のスペクトルを固体 ^{13}C CP/MAS及び固体 ^{13}C CP/MAS+Dipolar Dephasing（コンタクトタイムは40 μsec ）、 ^{15}N CP/MAS法で観測した（スペクトル例、Figure 2、3）。

3. 結果・考察

3.1. 固体 ^{13}C -NMR 化学シフトについて

観測された化学シフトには置換基の効果が含まれているため、それが障害となって二面角の違いによる化学シフトの有為な変化を見るが出来なかった。そこで置換基の効果をとり除く方法として、溶液中ではこの結合回りに自由回転が起こっていると仮定し、固体 ^{13}C -NMR 化学シフトから同じ核の溶液 ^{13}C -NMR 化学シフトを引くことを考えた。この方法で算出した値と二面角 ω をプロットしたところ、C2部（Figure 1参照）の化学シフトの差に二面角との相関が得られた（Figure 4）。またその他の位置の ^{13}C -NMR 化学シフトに関しては有為な相関はえられなかった。C2位置の ^{13}C -NMR 化学シフトに二面角の影響がでるのは、イミド環のカルボニル基との距離の変化によるものと思われる。

3.2. 固体 ^{15}N -NMR化学シフトについて

上記の3.1. 固体 ^{13}C -NMR 化学シフトと同様に置換基の化学シフトに対する効果を排除するため、溶液 ^{15}N -NMR化学シフトを引いた値と二面角 ω との相関を調べた（Figure 5）。しかしながら、二面角 ω との間に相関は見られなかった。

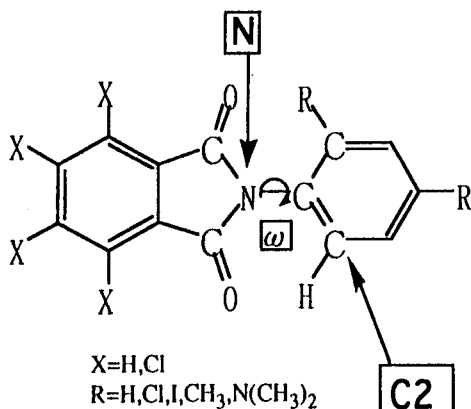


Figure 1 Dihedral angle ω and C2、N atoms.

① N-(o-tolyl)phthalimide	
$\omega=70.7$	
② N-(4-iodo-phenyl)-phthalimide	
$\omega=56^\circ$	
③ N-(p-tolyl)tetra-chlorophthalimide recrystallized from DMF and EtOH (α 型)	
$\omega=90^\circ$	
④ N-(4-dimethylaminophenyl)-phthalimide	
$\omega=64.5^\circ$	

Table 1 Structure of sample and their ω s.

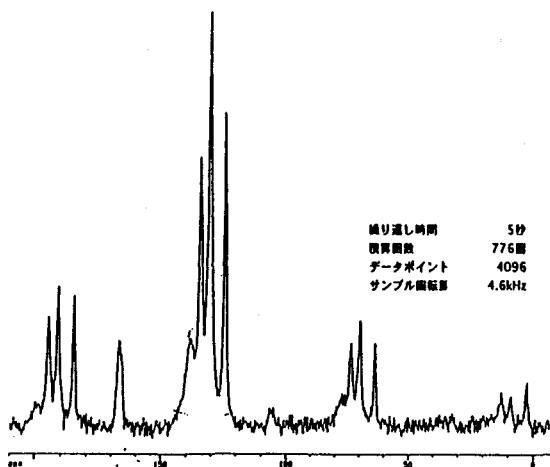


Figure 2 ¹³C-CP/MAS Spectrum of N-(4-iodo-phenyl)-phthalimide

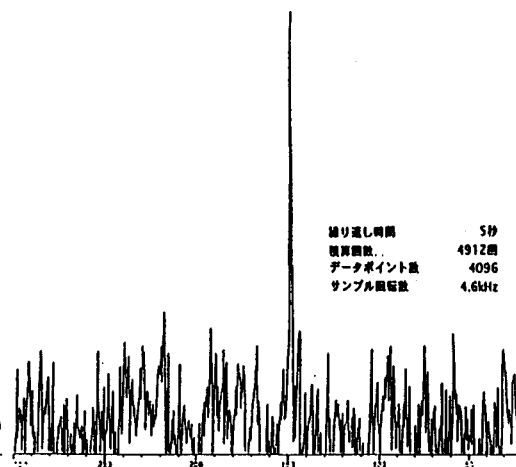


Figure 3 ¹⁵N-CP/MAS Spectrum of N-(4-iodo-phenyl)-phthalimide

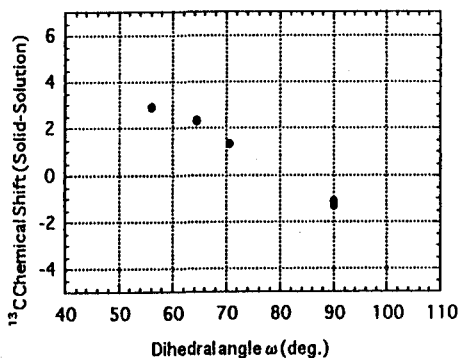


Figure 4 ¹³C-chemical shift difference (Solid-Solution) vs dihedral angle ω

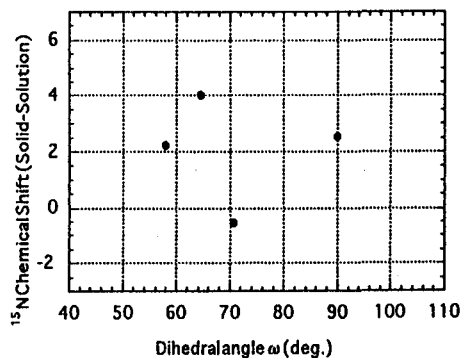


Figure 5 ¹⁵N-chemical shift difference (Solid-Solution) vs dihedral angle ω

Correlation between ^{13}C NMR Chemical Shift Tensor Components
and Conformation of Polypeptides in the Solid State (2)

Y. Matsuzawa¹, M. Ashikawa¹, T. Ozaki¹, I. Ando² and A. Shoji¹

¹Department of Biological Sciences, Gunma University, and ²Department of
Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

The conformations of some polypeptides and oligopeptides containing (1- ^{13}C)-labeled L-amino acid residue in the solid state has been studied by ^{13}C NMR method in order to clarify conformational effects on the ^{13}C chemical shift tensor components (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) of (1- ^{13}C) labeled L-amino acid residue adopting right-handed α -helix (α -helix), left-handed α -helix (α_L -helix), and anti-parallel β -sheet forms. It was found that the ^{13}C chemical shift tensor components of C=O, δ_{22} , depends mainly on conformation. In addition, it was found that the δ_{22} depends on the nature of the amino acid residues in copolypeptides.

1 緒言

カルボニル炭素の ^{13}C 等方性化学シフト (δ_{iso}) は、ポリペプチドの固体コンホメーションに依存して変化し、固体構造解析の有効な手段として確立されている^{1,2}。一方、 ^{13}C 化学シフトテンソル主値 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) は、より詳細な情報を含むことが期待されており、オリゴペプチドについて水素結合との相関が報告されている³⁻⁶。しかしながら、ポリペプチドの ^{13}C 化学シフトテンソルに関する研究は殆ど行われていない。

そこで本研究では、1- ^{13}C 標識アミノ酸残基を含む種々のポリペプチド及びオリゴペプチドを合成し、カルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトテンソル主値とコンホメーション・アミノ酸組成 (アミノ酸配列) との関係について調べた。

2 実験

1- ^{13}C 標識アミノ酸を含むポリペプチド ($[\text{Ala}^*, \text{X}]_n$, $[\text{Leu}^*, \text{X}]_n$, $[\text{Val}^*, \text{X}]_n$) は、N-カルボキシアミノ酸無水物(NCA)法により合成した。ヘプタ (7量体) ペプチド ($\text{H}-[\text{Ala}]_3-\text{Ala}^*-\text{[Ala]}_3-\text{OH}$, $\text{H}-[\text{Leu}]_3-\text{Leu}^*-\text{[Leu]}_3-\text{OH}$) は、Fmoc-法により固相合成した。 ^{13}C CP-MASおよびCP-Static スペクトルは、JEOL EX-270WB NMR分光計により67.8 MHzで測定した。 ^{13}C 化学シフトテンソル主値は、 ^{13}C CP-Static スペクトルより決定した。

キーワード： ^{13}C 化学シフトテンソル、ポリペプチド、コンホメーション

まつざわよしはる, あしかわみぎや, おざきたくお, しょうじあきら, あんどういさお

3 結果・考察

1) 試料のコンホメーション解析

各試料のコンホメーションは、 ^{13}C 等方性化学シフトデータに基づいて決定した (Table 1)。

2) ホモポリペプチドの δ_{22} とコンホメーションとの相関

α -ヘリックスホモポリペプチドの δ_{22} (Ala*; 191.4、Leu*; 193.0 ppm) は、 β -シート δ_{22} (Ala*; 180.2、Leu*; 177.7 ppm) に比べ10-15 ppm低磁場側に観測された。また、 α_L -ヘリックスの δ_{22} (Ala*; 182.5 ppm、Leu*; 180.7 ppm) は β -シートの δ_{22} よりわずかに低磁場側に観測された。以上のことから、 δ_{22} はコンホメーションに大きく依存し、各コンホメーション間のシフト差は等方性化学シフトの場合よりも大きいことが確認された。さらに、同じコンホメーションでのアミノ酸残基の種類によるシフト差は最大で3 ppm観測され、 δ_{22} がアミノ酸残基の種類を敏感に反映することも明らかになった。

3) コポリペプチドの δ_{22} とコンホメーション・アミノ酸組成との相関

アミノ酸組成の変化に伴うシフト差は、[Ala*,Leu] $_n$ 、[Leu*,Ala] $_n$ で2 ppm以内であり、アミノ酸組成の影響が小さいことが示唆された。また、[Ala*,Val] $_n$ 、[Val*,Ala] $_n$ では、 α -ヘリックスと β -シート間のシフト差が5~10 ppm程度で、 δ_{22} はコンホメーションの違いにより大きく変化し、わずかにアミノ酸残基の組成・配列の影響を反映することが明らかになった。このようなアミノ酸組成によるシフト差は等方性化学シフトではほとんど観測されていないことから、この結果は δ_{22} がコンホメーション解析だけでなくアミノ酸配列の解析に利用できる可能性を示唆するものであるといえる。

4 結論

- 1) ポリペプチドのカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトテンソル主値 δ_{22} は、低磁場側から α -ヘリックス (188-194 ppm)、 α_L -ヘリックス (180-183 ppm)、 β -シート (177-184 ppm) となり、コンホメーション依存化学シフト値が得られた。
- 2) 同一コンホメーションをとる各試料間の δ_{22} のシフト差を調べると、 α -ヘリックスで6 ppm、 β -シートで7 ppmと大きい。このことから、 δ_{22} からアミノ酸の種類および配列に関する情報が得られることがわかった。

文献

- 1) H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, *Macromolecules*, 1983, 16, 1050-1057.
- 2) A. Shoji, T. Ozaki, H. Saito, R. Tabeta, I. Ando, *Macromolecules*, 1984, 17, 1472-1479.
- 3) S. Ando, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 3380-3386.
- 4) N. Asakawa, H. Kurosu, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki, *J. Mol. Struct.*, 1994, 317, 119-129.
- 5) Zhengtian Gu, R. Zambraro, A. McDermott, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 6368-6372.
- 6) T. Kameda, N. Takeda, S. Kuroki, H. Kurosu, S. Ando, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki, *J. Mol. Struct.*, 1996, 348, 17-23.

Table 1 Observed ^{13}C chemical shift values (δ_{iso} , δ_{22}) of some $1-^{13}\text{C}$ labeled peptides.

sample	composition	conformation	^{13}C chemical shifts (ppm from TMS)	
			δ_{iso}	δ_{22}
[Ala*] ₁₀₀	100	α -helix	176.7	191.4
H-[Ala] ₃ -[Ala*]-[Ala] ₃ -OH	-	β -sheet	172.4	180.2
[Ala*, D-Ala] ₁₀₀	20 : 80	α_{L} -helix	173.4	182.5
[Ala*, Leu] ₁₀₀	25 : 75	α -helix	176.7	192.4
[Ala*, Leu] ₁₀₀	50 : 50	α -helix	176.7	192.5
[Ala*, Leu] ₁₀₀	75 : 25	α -helix	176.7	191.9
[Ala*, Val] ₁₀₀	20 : 80	β -sheet	173.0	181.2
[Ala*, Val] ₁₀₀	30 : 70	β -sheet(+ α)	173.1 (176.6)	183.5
[Ala*, Val] ₁₀₀	40 : 60	α -helix (+ β)	176.6 (172.1)	188.2
[Leu*, Leu] ₁₀₀	100	α -helix	176.3	193.0
H-[Leu] ₃ -[Leu*]-[Leu] ₃ -OH	-	β -sheet	171.5	177.7
[Leu*, D-Leu] ₁₀₀	20 : 80	α_{L} -helix	173.5	180.7
[Leu*, Ala] ₁₀₀	25 : 75	α -helix	176.2	192.1
[Leu*, Ala] ₁₀₀	50 : 50	α -helix	176.1	193.7
[Leu*, Ala] ₁₀₀	75 : 25	α -helix	176.2	193.7
[Val*] ₁₀₀	100	β -sheet	172.3	177.9
[Val*, Ala] ₁₀₀	80 : 20	β -sheet	172.2	181.2
[Val*, Ala] ₁₀₀	70 : 30	β -sheet(+ α)	172.3 (174.9)	181.0
[Val*, Ala] ₁₀₀	60 : 40	α -helix(+ β)	174.9 (172.3)	189.2

Preparation and Solid State NMR Evaluation of One-dimensional Superlattice of Platinum Dionedioximates

(National Institute of Material and Chemical Research,¹ School of Science, Univ. of Tokyo²)○Mitsuhiro Kanakubo,¹ Kaoru Yamamoto,² Hirobumi Ushijima,¹ Takahiro Ueda,¹ Toshihide Kamata,¹ Fujio Mizukami,¹ and Toshiaki Ohta²

A Mixed crystal of bis(dimethylglyoximato)platinum(II) (Pt(dmg)₂) and bis(diethylglyoximato)platinum(II) (Pt(deg)₂) was prepared by coevaporation. ¹³C CP MAS NMR spectra of Pt(dmg)₂, Pt(deg)₂, the mixture, and the coevaporated film have been measured. The peaks observed for the coevaporated film are relatively broad. This fact suggests the one-dimensional structure where the two complexes are randomly stacked.

【序】*d*⁸金属イオンのジオンジオキシム錯体は平面四配位型の構造をもち、固体結晶中では中心金属が直線上に連なった一次元分子カラムを形成することが知られている。それらの物質は、その一次元金属鎖構造により、電気伝導性、三次非線形光学特性など種々の興味深い物性を示すことが分かっている。そこで我々は、その金属鎖構造に注目し、一次元電子系の人工的制御を試みてきた。その過程で、異なる金属間距離をもつ二種類の白金ジオンジオキシム錯体 (Fig. 1) が分子線蒸着法により混晶化でき、一次元超格子を作製しうることを見出した。これまで、混晶の構造評価については可視-紫外吸収スペクトルならびにX線回折により行ってきた。本研究では、分子線蒸着法により作製した混晶の構造評価に固体 NMR 法を適用し、より分子論的な描象を得ることを目的とした。

【実験】混晶は分子線蒸着装置 (ULVAC) を使い、 $2 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-7}$ torr の真空下で、Pt(dmg)₂, Pt(deg)₂ をそれぞれ 380°C, 150°C で加熱し (蒸着速度=約 0.3 nm s⁻¹)、スライドガラスに共蒸着させることにより作製した。共蒸着膜の厚さが 0.2 μm 以下で可視部の最

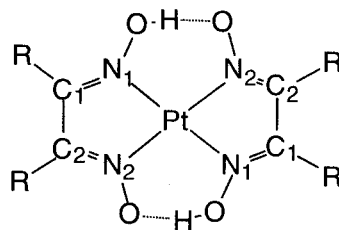


Fig. 1 Structure of Pt(dmg)₂ (R = CH₃) and Pt(deg)₂ (R = C₂H₅)

一次元超格子・白金ジオンジオキシム錯体・分子線蒸着・混晶・固体 NMR

かなくぼみつひろ・やまもとかおる・うしじまひろぶみ・うえだたかひろ・かまたとしひで・みずかみふじお・おたとしあき

大吸収波長が 500~600 nm の範囲のもの (Fig. 2) をスライドガラスからはがしとり固体 NMR の試料とした。 ^{13}C CPMAS NMR は、Bruker AMX-500 を用い、298 K、接触時間 4 ms、遅延時間 4 s の条件で測定した。

【結果】 $\text{Pt}(\text{dmg})_2$ および $\text{Pt}(\text{deg})_2$ の ^{13}C CPMAS NMR の測定結果を Fig.3 a, b に示す。10~20 ppm にアルキル基のピークが、150~160 ppm に 5 員環を形成している炭素 (C_1 および C_2) のピークが観測された。後者のピークは $\text{Pt}(\text{dmg})_2$ で 4.3 ppm、 $\text{Pt}(\text{deg})_2$ で 0.8 ppm 分裂した。この分裂は錯体分子の構造が C_2 対称であることに起因している。分裂の程度が $\text{Pt}(\text{deg})_2$ で小さかったのは、より C_4 対称に近かったためと推測される ($\text{Pt}(\text{dmg})_2$ ¹⁾ では $\text{Pt}-\text{N}_1=197(2)$ pm, $\text{Pt}-\text{N}_2=195(2)$ pm、 $\text{Pt}(\text{deg})_2$ では $\text{Pt}-\text{N}_1=197(1)$ pm, $\text{Pt}-\text{N}_2=196(1)$ pm)。

上記二種類の錯体を乳鉢を用いて物理的に混合した試料のスペクトルを Fig.3 c に示す。混合物のスペクトルは非常に鋭い吸収線を与え、Fig.3 a と b の単なる重ね合わせであることが分かる。一方、共蒸着により作製した混晶のスペクトル (Fig. 3 d) は、非常にブロードな吸収線を与えることが分かった。これは、二種類の錯体が混晶化し、隣接した分子の影響を受けたためと考えられる。すなわち、二種類の錯体がランダムにスタックして一次元白金鎖を形成したための効果が現れたものと考えられる。

1) M.S.Hussain, B.E.V.Salinas, and E.O.Schlemper, *Acta Cryst.* **B35**, 633 (1979).

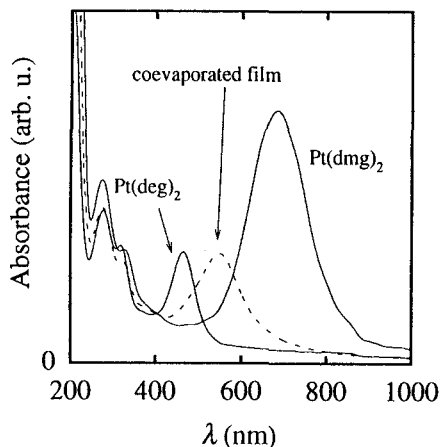


Fig. 2 UV-vis spectra

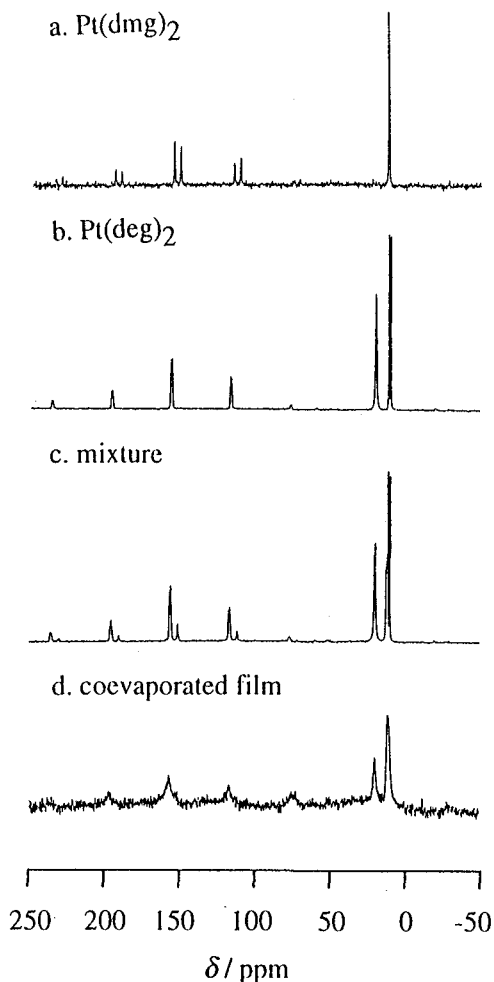


Fig. 3 ^{13}C CPMAS NMR spectra

²H-MAS-NMR による
有機磁性結晶における電子スピン密度分布の研究
(群馬大工¹、阪大院理²、電通大電子物性³)
武田 定¹、丸田悟朗²、山口 兆²、井街 論³、石田尚行³、野上 隆³

²H-MAS-NMR study of electron spin density distribution in organic magnetic crystals

Goro Maruta and Kizashi Yamaguchi

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560, Japan

Sadamu Takeda

Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma 376 and

Institute for Molecular Science, Myodaiji, Okazaki 444, Japan

Ron Imachi, Takayuki Ishida and Takashi Nogami

Department of Applied Physics and Chemistry, The University of Electro-Communications, Chofu,

Tokyo 182, Japan

Electron spin densities on hydrogen atoms of 4-(hydroxyimino)-TEMPO, which has been recently found to be a molecular ferromagnet at low temperature, were determined in the crystal phase from the temperature dependence of the Fermi contact shift measured by ²H-MAS-NMR. Large negative hyperfine coupling constant, A_D ($A_D = -0.55\text{MHz}$), observed for the NOD group implies that spin polarization mechanism works via intermolecular hydrogen bond. Positive hyperfine coupling constant ($A_D = +0.12\text{MHz}$) for axial CD_3 groups indicates that single occupied MO spreads out toward the direction of axial methyl groups by hyperconjugation, while the equatorial methyl groups show negative coupling constant ($A_D = -0.24\text{MHz}$). MAS heating problem and the calibration of the thermometer which we employed are also presented.

ニトロキシド基をスピン源とする有機磁性結晶における分子間磁気相互作用は、ラジカルサイト間の直接の相互作用と、C原子やH原子を介する間接的な相互作用に大別される。前者は不対電子軌道(SOMO)の形状と配向、後者は隣接分子のラジカルサイトと接する水素原子上の電子スピン密度が重要である。

4-hydroxyimino-TEMPOは、低温($T_c \sim 0.25\text{K}$)で強磁性相に転移する有機磁性結晶であり、ニトロキシド基は隣接する分子のヒドロキシイミノ基と分子間水素結合を形成している。本研究では、選択的に重水素置換を行った試料について、高速マジック角回転法を用いたD-NMRスペクトルを室温から170Kの温度領域で測定し、コンタクトシフトの温度変化から結晶中における水素原子のスピン密度を実験的に決定した。

NOD基の重水素核スピン-電子スピン結合定数 A_D ($A_D = -0.55\text{MHz}$)が大きな負の値であることから、分子間水素結合を介したスピン分極機構が働いていることがわかる。 CD_3 基の結合定数は、エクアトリアル位で負 ($A_D = -0.24\text{MHz}$)、アキシャル位で正 ($A_D = +0.12\text{MHz}$)である。これは、超共役によりSOMOがアキシャルメチル基の方向に広がっていることを意味しており、分子軌道計算の結果もこれを支持している。

MAS測定では、高速回転による試料温度の上昇が起こるため温度校正が必要である。今回、硝酸鉛(II)の²⁰⁷Pb化学シフトの温度依存性と柔粘性結晶の転移点を用いて温度校正を行ったので、あわせて報告する。

²H-MAS-NMR、有機強磁性体、水素結合、コンタクトシフト、温度校正

ただだ さだむ、まるた ごろう、やまぐち きざし、いまち ろん、いしだ たかゆき、のがみ たかし

A Study of Neighboring Amino-acid Sequence Effect of α -helical
Oligopeptides Containing ¹⁵N Labeled Residues in SolutionKen-ichi Hatano, Hideyuki Kiguchi, Kaori Wakamatsu, and Akira Shoji
Faculty of Engineering, Gunma University

Recently, we reported the correlation between the solid-state ¹⁵N chemical shifts of the labeled residue and the neighboring amino-acid sequence in selectively isotope-labeled α -helical octadeca peptides. In that report, it revealed that δ_{iso} in the polypeptides depends mainly on the preceding residue of labeled residues and sequence effects at other positions are small. In this study, the ¹⁵N chemical shifts in the same α -helical peptides have been measured using two-dimensional heteronuclear multi-quantum coherence experiments. As a result, backbone peptide ¹⁵N chemical shifts for a given residue type are strongly affected by the neighboring residue types in the sequence. Thus, in solution state as well as in the solid state, the ¹⁵N chemical shifts are very sensitive to sequence-effects of the preceding residue as well as conformational effects and residue type.

1. はじめに

固体状態における多分散系ポリペプチドの主鎖カルボニル炭素の等方性化学シフトはアミノ酸残基の種類にはあまり依存せず、主にコンホメーションに大きく依存することがわかっている。また主鎖アミド窒素の等方性化学シフトはコンホメーション依存性、アミノ酸残基の種類、そして隣接アミノ酸残基の効果による影響を受けるということがわかっている。本研究室でのこれまでの研究によって、単分散系ポリペプチドを用いこれらのことを確認した¹⁾。

溶液状態においては、ランダムコイル状態でのアミド窒素の化学シフトの隣接アミノ酸残基効果の研究が行なわれている²⁾。本研究では、固体状態と同じ規則的二次構造をとったポリペプチドを溶液状態で測定し、¹⁵N化学シフトに対するアミノ酸配列効果が果たして固体状態と同様に観測されるかどうかを調べ議論していきたい。

キーワード：¹⁵N-NMR、ポリペプチド、化学シフト、コンホメーション
はたのけんいち、きぐちひでゆき、わかまつかおり、しょうじあきら

2. 実験

実験試料は、Phe, Leu, Ala から構成された 18 量体のポリペプチドで、N 末端から 8 位のカルボニル炭素を ^{13}C で、12 位のアミド窒素を ^{15}N でラベル化したものである。そのアミノ酸配列を図 1 に示す。以下、本試料を FLA シリーズと略す。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18												
FLA1	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Ala	-	Phe	-	Leu	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA2	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Ala	-	Phe	-	Ala	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA3	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Ala	-	Phe	-	Phe	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA4	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Ala	-	Leu	-	Leu	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA5	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Ala	-	Ala	-	Leu	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA6	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Leu	-	Phe	-	Leu	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA7	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Phe	-	Phe	-	Leu	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA8	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Ala ^C	-	Ala	-	Phe	-	Leu	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA9	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Phe ^C	-	Ala	-	Phe	-	Leu	-	Ala ^N	-	Phe	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA10	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Ala	-	Phe	-	Leu	-	Ala ^N	-	Leu	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A
FLA11	:	F	-	L	-	A	-	F	-	Leu ^C	-	Ala	-	Phe	-	Leu	-	Ala ^N	-	Ala	-	L	-	A	-	F	-	L	-	A

Figure 1. Amino acid sequences of α -helical octadeca-peptides containing Ala^N (12th) and Leu^C, Ala^C, Phe^C (8th) residue.

FLA シリーズの各試料が溶液中で α ヘリックスをとる溶媒系を様々な溶媒からスクリーニングして見いだした。 α ヘリックス形の確認には旋光分散 (ORD) の測定 (日本分光製 ORD/CD J-20A 型: 波長は 300 から 400nm) で行った³⁾。

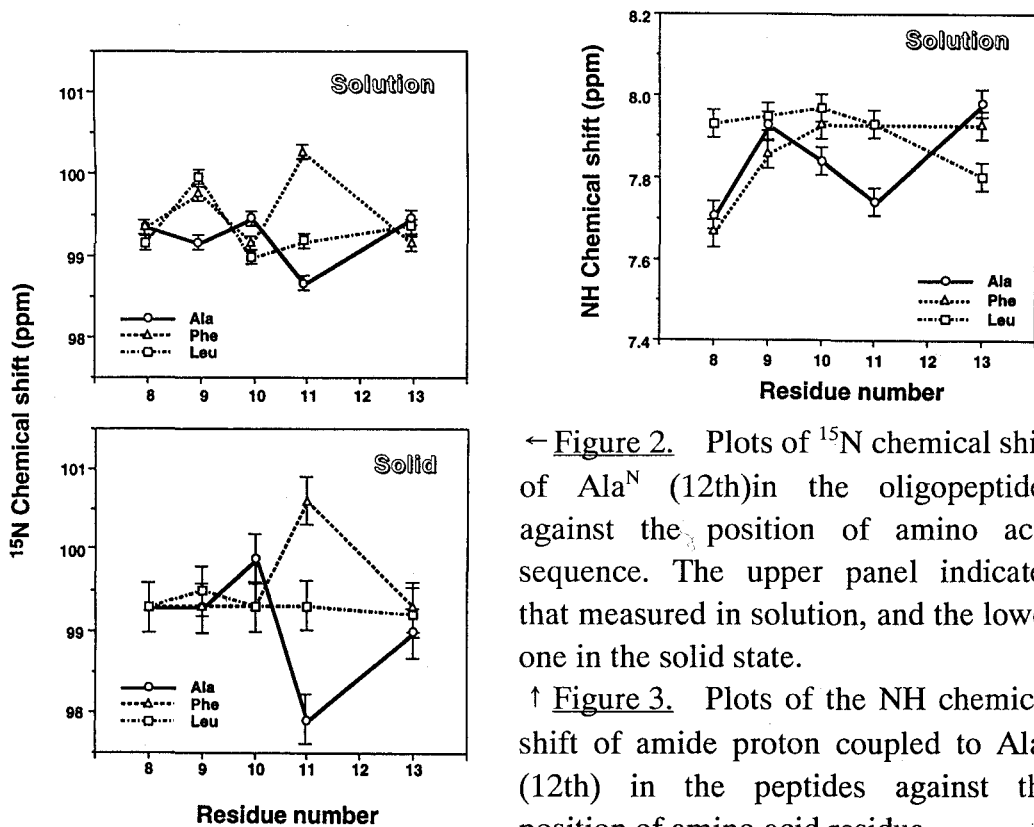
溶液 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N -NMR 化学シフトの測定は、Bruker 社製 ARX400 で行った。 ^{13}C 標識したカルボニル炭素は一次元法、 ^{15}N 標識したアミド窒素とそこに結合したアミドプロトンは HMQC 法で測定し、 ^1H 化学シフトはテトラメチルシランを基準とし ^{13}C と ^{15}N 化学シフトにおいては ^1H の化学シフト値から補正した^{4),5)}。

3. 結果および考察

ORD 測定の結果より、 α ヘリックス形の含量が高くかつよく溶ける溶媒は、トリフルオロエタノール:ヘキサフルオロイソプロパノール (3:7) 混合溶媒であることがわかった。このときの α ヘリックス含量は 59% と見積ることができた。この結果は、NMR の化学シフト値からも支持

され、 α ヘリックス形をとっていることが確認できた⁶⁾。

図2に、溶液中での各試料の12位の¹⁵N標識アラニン残基の¹⁵N化学シフトを示す。比較のため、固体で得られた¹⁵N化学シフトも図2に示してある。また、図3には溶液中の12位のアミドプロトンの化学シフトを示した。



← Figure 2. Plots of ¹⁵N chemical shift of Ala^N (12th) in the oligopeptides against the position of amino acid sequence. The upper panel indicates that measured in solution, and the lower one in the solid state.

↑ Figure 3. Plots of the NH chemical shift of amide proton coupled to Ala^N (12th) in the peptides against the position of amino acid residue.

主鎖アミド窒素：図2の¹⁵N化学シフトをみると、11位のアミノ酸残基の影響が他の残基に比べて大きく12位の¹⁵N標識アラニン残基の化学シフトに反映されていることがわかる。このことから、¹⁵N化学シフトは、隣接した11位の残基によって大きく影響を受けるということが結論できた。以上の結果は固体状態の結果とほぼ同様な傾向を示すことから、溶液中でも隣接アミノ酸残基効果が存在しているという事が明らかになった。また、Ala, Pheにおける化学シフトの挙動は、固体NMRでの化学シフトテンソル σ_{22} のそれと大変よく似ている事がわかった¹⁾。

主鎖アミドプロトン：図3に示すように各試料での¹H化学シフトをみると、8位にAla残基またはPhe残基、そして11位がAla残基のとき高

磁場側へ大きくシフトしている。この原因としては、8位の残基のカルボニル炭素は12位の残基のアミドプロトンと水素結合を形成することによって8位の残基の影響を受けているものだと考えられる。11位の残基については、アミド窒素同様に隣接アミノ酸残基効果の影響を最も受けているためだと考えられる。また図2と図3を比較してみると、12位の ^{15}N 化学シフトは8位の残基の影響を殆ど受けないのに対し、 ^1H 化学シフトがかなり影響を受けている理由としては、アミド窒素よりもアミドプロトンの方が8位の残基の側鎖により近いいためその影響を受けやすい事が考えられる。

主鎖カルボニル炭素：FLA1, 2, 3の ^{13}C 化学シフト値は、これらの3つの試料が溶媒に非常に溶けにくいサンプルであったため積算回数を重ねても観測できなかった。その他のサンプルについても、FLA9以外は隣接アミノ酸残基効果の影響をあまり受けていないという結果が得られた。FLA9だけが他のアミノ酸残基と異なり大きく高磁場側へシフトしているが、これは固体状態の場合と同様、Phe残基側鎖の環電流シフト効果によるものだと考えられる。

4. 参考文献

- 1) 莊司顯, 小川一輝; 第35回NMR討論会講演要旨集, p.282 (1996)
- 2) Daniel Braun, Gerhard Wider, Kurt Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8466-8469, 1994
- 3) 浜口浩三, 武貞啓子, 蛋白質の旋光性: ORDとCD, 東京大学出版会, 1971
- 4) David S. Wishart, Colin G. Bigam, Arne Holm, Robert S. Hodges, Brian D. Sykes, *Journal of Biomolecular NMR*, ESCOM, **5**, 67-81, 1995
- 5) George C. Levy, Robert L. Lichter, *NITROGEN-15 NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY*, A Wiley-Interscience Publication, p32, 1979
- 6) David S. Wishart, Brian D. Sykes, *METHODS in ENZYMOLOGY.*, **239**, 363-392, 1994

分子内水素結合を有する9-ヒドロキシフェナレノン類結晶
 における水素/重水素秩序の解析

(東邦大理¹・分子研²・東大院総合³)

○持田智行^{1,2}・桑原大介²・宮島清一²・菅原 正³

Phase Transitions and Hydrogen/Deuterium Ordering in 9-Hydroxyphenalenone Derivatives in the Solid State.

Tomoyuki MOCHIDA^{1,2}, Daisuke KUWAHARA², Seiichi MIYAJIMA² and Tadashi SUGAWARA³
 (Toho University¹, Institute for Molecular Science², The University of Tokyo³)

Phase transitions and hydrogen/deuterium dynamics in 9-hydroxyphenalenone derivatives are investigated by means of ²H NMR spectroscopy. Temperature dependence of the spectra for 5-methyl derivative shows that the phase transition at $T_c = 44$ K is shown to accompany an antiferroelectric deuteron ordering. In the case of 5-Bromo derivative, which shows *deuterium-induced* phase transitions, ²H NMR spectra show that the deuteriums are antiferroelectrically ordered below $T_1 = 34$ K. The incommensurate feature between $T_1 = 34$ K and $T_c = 22$ K probably originates from an incommensurate tilting of the molecules. In the commensurate phase, the ²H spectrum consists of four distinguishable deuteriums having different quadrupole coupling constants.

1. 緒言

われわれは水素結合系分子の結晶内互変異性に基づく誘電性発現に着目し、9-ヒドロキシフェナレノン誘導体(図1)における相転移挙動について検討を行ってきた[1]。この系の誘電応答の起源は、プロトン移動と連動した互変異性に伴って分極反転が生じる点にある。また、分子内で閉じた孤立水素結合系とみなせることから、水素結合型誘電体の本質を探るのに格好の系と考えられる[1]。ここで取り上げる5-メチル体(1)、および5-ブロモ体(2)はほぼ同形結晶であるが、それぞれ以下のような相転移系列を持つ[1、2]。メチル体(1)は41Kに、その重水素置換体(1-d)は44Kに相転移を有する。一方、ブロモ体(2)においては、重水素誘起相転移が観測される。すなわち、軽水素体(2)は低温まで相転移を示さないものの、重水素置換体(2-d)では36Kおよび22Kに逐次相転移が出現する。X線回折[3]、および比熱[4]の測定から、前者は整合-不整合相転移(2次転移)、一方後者はb軸方向に倍周期が生じるロックイン転移(1次転移)であることが判明している。

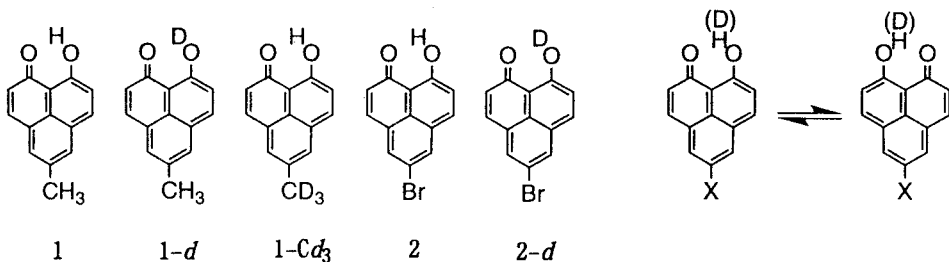


図1 9-ヒドロキシフェナレノン誘導体とその互変異性

ヒドロキシフェナレノン誘導体、重水素誘起相転移、整合-不整合相転移、重水素NMR
 もちだともゆき、くわはらだいすけ、みやじませいいち、すがわらただし

我々は、この重水素誘起相転移の起源を、プロトンのトンネル運動により抑えられていた双極子相互作用の復活に帰せられると考えている。今回、これらの相転移と水素結合系の秩序構造との関連を明らかにする目的で、重水素化試料 (1-*d*、1- Cd_3 、2-*d*) に対して固体 2H NMR測定を行った。

2. 実験

試料 (1、2) の合成は文献に従って行った[1]。重水素化メチル体 (1- Cd_3) の合成は、重よう化メチルを出発原料に用いて合成した。ヒドロキシル水素の重水素置換体 (1-*d*、2-*d*) は、封管中で重水を少量加えた1または2のベンゼン熱飽和溶液の徐冷法により作成した。測定にはこうして得られた単結晶試料 (典型的なサイズ: 約0.3 x 0.3 x 4.0 mm³) を用いた。重水素NMR測定は、Bruker DSX-400にBruker社製極低温プローブを装着し、室温から5 Kの温度範囲で行った (測定周波数61.25MHz)。測定の際は、重水素系の秩序化に伴う e^2Qq 変化を検出するため、分子長軸を磁場に対して適当に傾けて固定した。

3. 結果と考察

1) メチル体 (1-*d*) における水素結合系の動的挙動

メチル体 (1-*d*) 単結晶の重水素スペクトルの温度依存性を図2に示す。室温相においては、一対の共鳴線が認められた。これは、互変異性による動的平均化によって、結晶学的に独立な分子数が1個となっていることに対応している。 $T_C = 4.4$ K以下の低温相では、これらが2組に分裂するのが認められた。これは低温相で重水素に関する秩序化が起これ、2種類の互変異性体が区別されて観測されていることを示す。これより、低温相が重水素に関する反強誘電的秩序相であることが明確に結論できる。

一方、メチル基の運動が相転移に及ぼす影響を調べる目的で、メチル基の部分のみを重水素化した試料 (1- Cd_3) の重水素粉末スペクトルを測定した。その結果、メチル基は低温まで速い回転を起こしており ($e^2Qq/h = 52$ kHz, $\eta = 0$)、相転移前後でその線形が変化しないことが判明した。これより、相転移がメチル基の運動とは相関を持たない事がわかる。

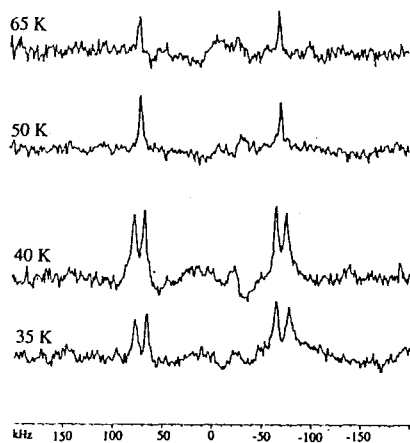


図2 メチル体 (1-*d*) の単結晶 2H スペクトルの温度変化

2) プロモ体 (2-*d*) における水素結合系の動的挙動

プロモ体 (2-*d*) における重水素単結晶スペクトルの温度変化を図3に示す。メチル体 (1-*d*) と同様に、室温相では一組の共鳴線が観測されるが、 T_I で、2組に分裂しはじめる。四極子分裂の温度依存性を図4に示す。 T_I 以下での分裂の様子が秩序パラメーター的に振る舞っていることより、この相転移は、本質的には重水素の反強誘電的秩序化に基づく相転移と考えられる。すなわち、互変異性系の双極子相互作用が相転移の起源と考えられる。この相の不整合性について以下に考察する。

T_I 以下での共鳴線の様子を詳しく見てみると、不整合相 ($T_I > T > T_C$) では、温度低下とともに線幅に広がり認められる。さらに整合相 (T_C 以下) に入ると、それぞれの共鳴線がわずかに分裂する。



図3 プロモ体 (2-d) 単結晶における重水素スペクトルの温度変化

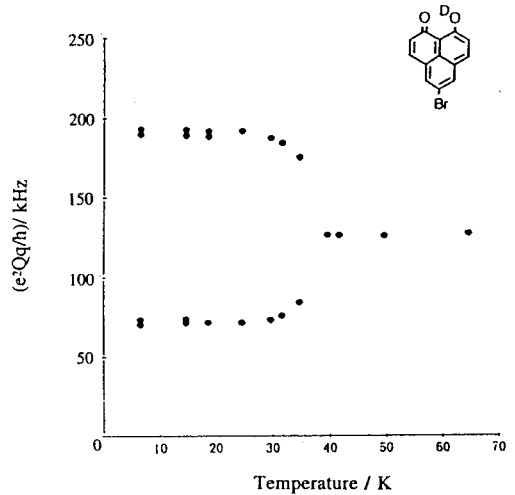


図4 プロモ体 (2-d) の重水素スペクトルにおける四極子分裂の温度依存性

X線回折の実験から、不整合性はb軸方向に生じ、その波数 q は降温に伴い0.6—0.5と変化し、 T_C 以下で2倍周期 ($q = 0.5$) となることがわかっている[3]。しかし、この不整合性の実態、特に重水素の反強誘電的秩序化との関係は明らかでなかった。我々の ^2H NMRの実験において、 T_I 以下での共鳴線の広がり及び T_C で生じる2次的な分裂が小さいことから、不整合性の起源はかなり鮮明になった。それは重水素の秩序化に関するものではなく、他の自由度、おそらく分子配向の自由度に関するものだというのである。

実験結果(図3)から、整合相では結晶学的に独立な4個の分子が存在し、その分裂の様子から、これは反強誘電的に秩序化した2種類の分子が、各々2通りのわずかに異なる配向を持つことにより生じたものと推定できる。従って、整合相と室温相の間に現れる不整合相の起源は、分子配向の不整合性に帰せられる。不整合相で生じる共鳴線幅の広がり、分子配向の不整合性、およびその配向変位が低温ほど大きくなる傾向を反映したものである。

これよりさらに、 T_I 以下で生じる重水素系の反強誘電的秩序に関しては、その基本格子は(2bではなく)周期bであると帰結できる。なお結晶学的にも、室温の単位格子においてすでにb軸方向に2分子が存在し($Z = 4$)、反強誘電的秩序化に際し重水素系が倍格子を形成する必然性はない。

以上、プロモ体で見出されている重水素誘起相転移は、整合—不整合相転移の性格を持つものの、本質的には重水素系の誘電的秩序化に基づくことが示された。ここで、重水素誘起相転移の起源に対する我々の予想、すなわち、“水素体ではトンネル運動が双極子相互作用に打ち勝って相転移が消失しているのに対し、重水素化によってトンネリングが抑えられ、隠れていた双極子相互作用が相転移を引き起こす”、というシナリオが裏付けられたこととなる。

4. 文献

- 1) T. Mochida, A. Izuoka, T. Sugawara, Y. Moritomo and Y. Tokura, *J. Chem. Phys.*, **101**(9), 7971 (1994).
- 2) Y. Moritomo, Y. Tokura, T. Mochida, A. Izuoka and T. Sugawara, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **64**, 1892 (1995).
- 3) Y. Noda, I. Tamura, Y. Kuroiwa, T. Mochida and T. Sugawara, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **63**, 4286 (1994).
- 4) M. Ichikawa and T. Matsuo, *J. Mol. Struct.* (1996).

NMR Study in alkali-Hydrogen-C₆₀ Ternary Compounds.*Inst. for Mol. Sci.* : ○H. Ogata, S. Miyajima, K. Imaeda, H. Inokuchi

²³Na, ¹H and ¹³C NMR studies have been carried out for the Na-H-C₆₀ superconductor (T_c=15K). The peak position of the ²³Na spectrum exhibits discontinuous upfield shift of about 30 ppm at about 260 K, which is indicating a first order phase transition. From the line shape of the ²³Na spectrum obtained at 23 K, the quadrupole coupling constant tensor is evaluated to be $e^2Qq/h=3.7\text{MHz}$ with the asymmetry parameter $\eta=0.95$. The ¹H NMR spectrum obtained at room temperature suggests anionic hydrogen state. Temperature dependence of ¹³C spin-lattice relaxation time below about 150K shows the Korringa-like behavior ($T_1 \times T = 280(\text{sec} \cdot \text{K})$). A slightly less value of $(T_1 \times T)^{-0.5}$ for this system compared with K₃C₆₀ and Rb₃C₆₀ suggest that H1s and/or Na3s orbital contribute to the electronic state on the Fermi surface.

I. はじめに

種々のアルカリ-C₆₀化合物は、水素吸蔵を起こし、Fermi 面近傍の電子物性に影響を及ぼすことが次第に明らかになりつつある。アルカリ-C₆₀化合物中における水素の存在状態、インターカレートの構造および電子状態、特に水素が Fermi 面近傍の電子状態に及ぼす影響を系統的に理解することは新物質開発の点においても大変興味深い。Na-H-C₆₀三元系化合物は T_c=15K の超伝導相を持つ事が知られている¹⁾。Fig. 1 に粉末 X 線回折データの Rietveld 解析により求めたこの系の室温における分子配列 (fcc, 空間群 $Fm\bar{3}m$, $a=14.356(\text{\AA})$) を示す²⁾。Na イオンは C₆₀ 分子が作る 2 種類の隙間 (Octahedral-site, Tetrahedral-site) の中心からずれた安定位置に分布した平均構造をとっていることがわかっている。今回我々は、Na-H-C₆₀超伝導体におけるインターカレートの存在状態、構造および系の電子状態を明らかにすることを目的として ²³Na, ¹H, ¹³C NMR のスペクトルおよび T₁ の温度依存性の測定を行った。

II. 実験

一連の測定に用いた試料は市販の NaH と昇華精製した C₆₀ を化学量論比 4:1 で混合したものを加熱 (350℃, 100 時間) することによって得た。¹³C (測定周波数 100MHz), ²³Na (105MHz) および ¹H NMR (400MHz) の測定は、Bruker 社製 DSX400 を用いた。

キーワード: C₆₀、超伝導、水素

○おがたひろのり、みやじませいいち、いまえだけんいち、いのくちひろお

III. 結果および考察

^{23}Na NMR

Fig. 2 に ^{23}Na NMR スペクトルの温度依存性を示す。室温付近のスペクトルの線幅 (約 10kHz) は、 T_1 は約 100 $\mu\text{sec.}$ であることから、主に不確定性幅に起因するものと考えられる。室温におけるスペクトルの中心位置は 1.0M NaCl 水溶液を基準として約 80ppm で、結晶中で Na は陽イオンに近い形で存在している事が分かるが、このシフトの原因としては化学シフトの他に、Knight shift が考えられる。NMR スペクトルの中心位置は約 260K を境に低温側にかけて 30ppm ほど高磁場シフトし、この温度での一次相転移を示している。又、約 200K 以下の温度で粉末パターンが観測される。このことは 200K 以上の温度領域では C_{60} 分子、水素および Na イオンの運動により Na 核周りの電場勾配テンソルの異方性が平均化されているためと考えられる。化学シフトの異方性が無視できるほどに小さいと仮定すると、23K におけるスペクトルの線形から、Na 核周りの電場勾配テンソルの大きさは、 $e^2Qq/h=3.7\text{MHz}$, $\eta=0.95$ と見積もることができる。第一原理に基づく局所密度汎関数法によるこの系の電場勾配の計算結果³⁾からは、Octahedral-site には Na イオン 2 個、H イオン 1 個、Tetrahedral-site に Na イオン 1 個存在するとき低温のスペクトルをほぼ再現することが分かった。このことからこの超伝導を示す相の化学組成は $\text{Na}_4\text{HC}_{60}$ であることが示唆される。

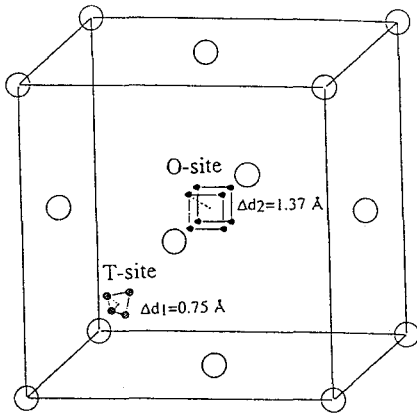


Figure 1. Possible positions for Na^+ ions in $\text{Na}_x\text{H}_y\text{C}_{60}$ crystal structure at room temperature. Open circles show C_{60} molecules, full circles Na^+ ions in Octahedral-site and slashed-marked circles in Tetrahedral-site.

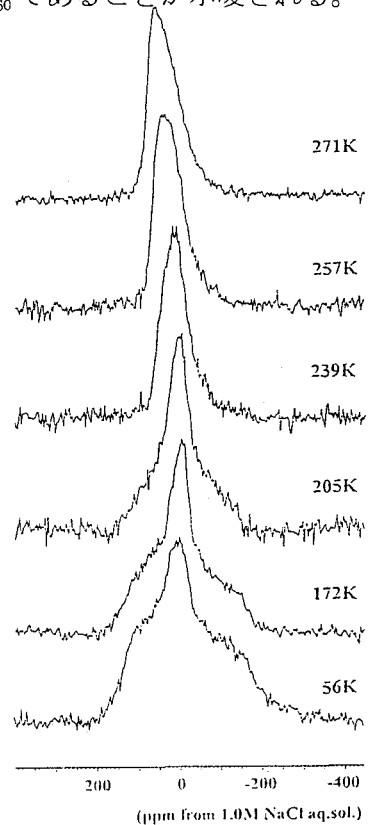


Figure 2. Temperature dependence of ^{23}Na NMR spectra (105MHz) in $\text{Na}_x\text{H}_y\text{C}_{60}$ superconductor.

^1H NMR

室温における ^1H NMR スペクトルは、TMS から見た中心のシフト値約 -3.5ppm 、二次モーメント約 5.5kHz^2 の線幅をもつ単一成分からなるように見える。このシフトの要因としては、化学シフト、主に C_{60} 分子上の常磁性スピンによる常磁性シフト、そして Knight shift が考えられる。これらの寄与を考慮してもシフト値がマイナスであることから水素は結晶中で $\text{H}^{-\delta}$ 的に存在していることを示している。Fig. 3 に ^1H NMR 二次モーメントの温度依存性を示す。低温に行くにつれ、スペクトルは広がる。このことは、室温付近では C_{60} が作る隙間中で Na イオンおよび (又は) $\text{H}^{-\delta}$ が運動していることを示している。

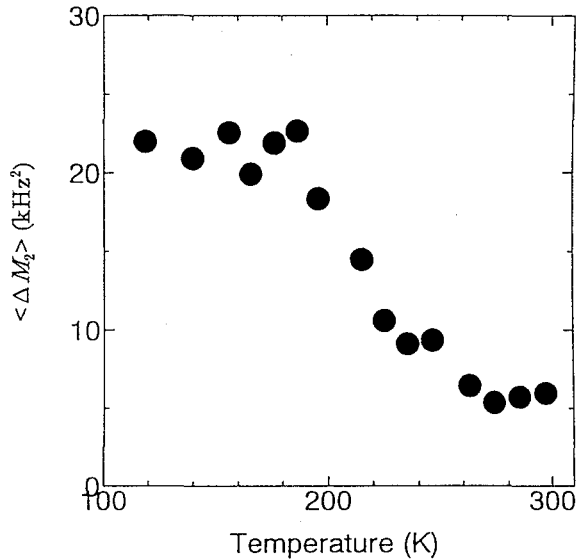


Figure 3. Temperature dependence of second moment of ^1H NMR spectra (400MHz) in $\text{Na}_x\text{HyC}_{60}$ superconductor.

^{13}C NMR

室温における ^{13}C NMR スペクトルは、TMS を基準にして 184ppm に C_{60} 分子の回転運動により先鋭化された sharp なシグナルが観測される。低温にゆくにつれて、 C_{60} 分子の運動が化学シフトテンソルおよび Knight シフトテンソルの異方性の大きさに比べて遅くなるにつれて粉末パターンが現れてくる。Fig. 4 に飽和回復法によって測定したスピン-格子緩和率 ($1/T_1$) の温度依存性を示す。測定を行った全温度領域で磁化回復曲線は単一指数関数で fit することができる。約 150K 以下の温度で、得られた $1/T_1$ は Korringa 則を満足するような温度依存性を示す ($T_1 \times T = 280 \text{ (sec. K)}$)。Fig. 5 にこの $(T_1 \times T)^{-0.5}$ の値 (炭素原子上の局所状態密度 $N(E_f)$ carbon に比例する値) を K_3C_{60} , Rb_3C_{60} について報告されている値⁴⁾とともに T_c の値に対してプロットした結果を示す。点線は K_3C_{60} , Rb_3C_{60} の値を用いて弱結合 BCS 理論から外挿した予測される値である。この結果は、 Na-H-C_{60} 超伝導体の T_c の値を説明するに足りるほとんどの状態密度は炭素上にあるものの、若干不足していることを示しており、水素の $1s$ 軌道

あるいは Na の 3s 軌道 (あるいはその両方) が Fermi 準位近傍のバンド形成に寄与していることを強く示唆している。約 260K で $1/T_1$ の大きな跳びが観測される。この跳びはこの温度における C_{60} 分子の回転状態の変化に伴う一次相転移によってこの温度以上で Fermi 準位近傍の状態密度 ($N(E_f)$) が増加することに起因している。ESR による spin 磁化率が 260K を境にそれ以下の温度で半減していることから 260K 以上の温度で期待される Korring 則の寄与は $T_1 \times T = 70$ (sec. K) となる (Fig. 4 中の点線)。観測された $1/T_1$ のデータには Korringa 項の他に付加的な $1/T_1$ の寄与が存在することが分かる。200K 近傍にピークをもつ $1/T_1$ は C_{60} 分子の運動によって生じる shift の異方性の揺らぎに起因する緩和、310K 近傍にピークをもつものは H^δ および C_{60} の運動による 1H - ^{13}C 双極子相互作用の揺らぎに起因する緩和と考えることができる。

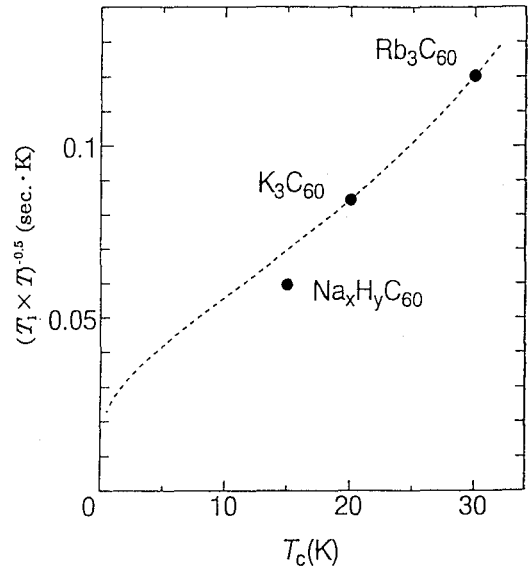
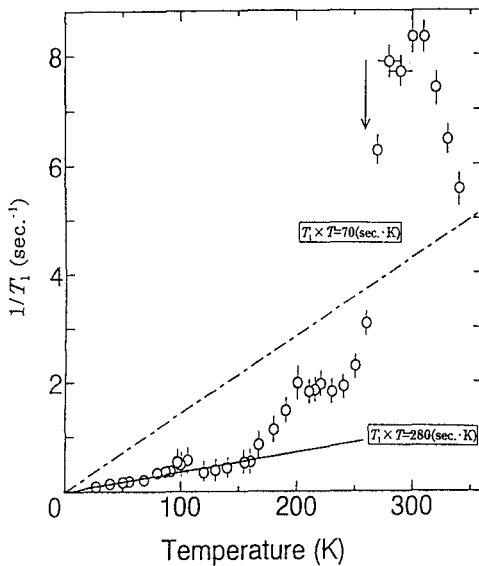


Figure 4. Temperature dependence of ^{13}C spin-lattice relaxation rates ($1/T_1$) in $Na_xH_yC_{60}$ superconductor. Figure 5. Relationship between $(T_1 \times T)^{-0.5}$ and T_c for K_3C_{60} , Rb_3C_{60} and $Na_xH_yC_{60}$ superconductors.

Reference:

- 1) K. Imaeda *et al.*, *Synth. Metals* 85 (1997) 1575.
- 2) C. Nakano *et al.*, *Chem. Lett.* (1997) 343.
- 3) S. Suzuki, *private communication*.
- 4) R. Tycko *et al.*, *J. Phys. Chem.*, 95 (1991) 518.

P113

Si(OEt)₄-RSi(OEt)₃系から得られる有機修飾セ

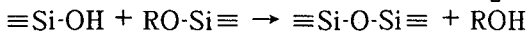
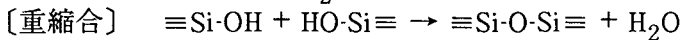
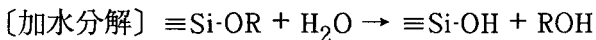
ラミックスの構造に与える官能基Rの影響

(早大理工¹, 物質研²) 菅原義之¹, 中島 寛¹, 〇林 繁信²,
黒田一幸¹

Effect of R Groups on the Structures of Organically-modified Ceramics Prepared from Si(OEt)₄-RSi(OEt)₃ Systems, Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University,¹ National Institute of Materials and Chemical Research,² Yoshiyuki Sugahara,¹ Hiroshi Nakashima,¹ OShigenobu Hayashi,² and Kazuyuki Kuroda.¹

【Abstract】 The structures and dynamics of organically-modified ceramics prepared by co-hydrolysis of tetraethoxysilane (Si(OC₂H₅)₄)-organotriethoxysilane (RSi(OC₂H₅)₃, R=CH₃, C₅H₁₁, C₈H₁₇) mixtures were studied based on relaxation time ($T_{1\rho}^H$ and T_{SiH}) measurements of ²⁹Si CP/MAS NMR. The values of $T_{1\rho}^H$ for all ²⁹Si sites were decreased as the organic groups introduced in the matrix became more flexible, indicating the siloxane network structures became more mobile. With an increase in the amount of water in the sol-gel reaction, the apparent values of T_{SiH} for Q⁴ units in TEOS-C₅H₁₁-Si(OEt)₃ and TEOS-C₈H₁₇-Si(OEt)₃ systems were increased, indicating both the T units (derived from (RSi(OC₂H₅)₃)) and Q units (derived from TEOS) in these systems tended to be aggregated in the matrix.

【緒言】ゾルゲル法とは、アルコキシドの加水分解とそれに引き続いて起こる縮重合によって低温でネットワーク形成を行って酸化物を合成する手法である。代表的アルコキシドであるアルコキシシランの反応は以下の通りである。



近年、無機-有機複合材料に対する関心が高まり、有機基が直接結合したオルガノアルコキシシラン (RSi(OR')₃; R₂Si(OR')₂) を用いたゾル-ゲル法により得られる有機修飾セラミックスが注目を集めている。この材料の物性は、最終的な生成物の構造に依存するため、望ましい物性・機能を有する材料設計を行う上でゲルの構造を解明することが重要な課題である。そこで本研究では、テトラエトキシシラン (TEOS) と様々な有機基を有する三官能性オルガノアルコキシシラン (RSi(OEt)₃) を用い共加水分解・重縮合反応を行った。得られたゲルについて固体²⁹Si CP/MAS NMRでの緩和時間測定を行い、TEOSから得られるユニット (Si(OH)_{4-y}(OSi)_y: Q^yユニット) とRSi(OEt)₃から得られるユニット (RSi(OH)_{3-2z}(OSi)_z: T^zユニット) の分散状態に着目して、ゲルの原子レベルでの内部骨格構造及び運動性の変化について検討した。

有機修飾セラミックス, ゾル-ゲル反応, ²⁹Si CP/MAS NMR, クロスポーラリゼーション, 固体NMR

すがはらよしゆき・なかしまひろし・はやししげのぶ・くろだかずゆき

【実験方法】ゲルの作製は、アルコキシシラン-エタノール-水-硝酸系で行った。出発溶液の組成は $\text{Si}(\text{OEt})_4:\text{RSi}(\text{OR})_3:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HNO}_3=1:1:10:x:0.3$ (mol比)とした。 $\text{RSi}(\text{OR})_3$ にはメチルトリエトキシシラン、ペンチルトリエトキシシラン、オクチルトリエトキシシラン(以下それぞれMTES, C_5TES , C_8TES と略す)を用い、マトリックス内に導入する有機基を変化させた。さらにゾル-ゲル反応時に添加する水の量(x)を $x=2, 5, 10, 20$ と変化させた。まずアルコキシシランとEtOHを混合した後、 H_2O と HNO_3 を滴下し室温で24時間攪拌した。その後密閉して 60°C に保ち、ゲル化熟成後、溶媒を取り除いて引き続き 60°C で3日間乾燥させた。さらに生成したキセロゲルの減圧乾燥を行った後、粉碎して固体NMRの試料とした。測定は固体 ^{29}Si CP/MAS NMRを用いて 79.5MHz で行い、繰り返し時間 5s としてコンタクト時間を $0.1\sim 50\text{ms}$ の範囲で変化させて行った。

【結果と考察】四官能性アルコキシシラン (TEOS) 及び三官能性オルガノアルコキシシラン ($\text{RSi}(\text{OR})_3$) の共加水分解・重縮合反応により得られたキセロゲルの代表的固体 ^{29}Si CP/MAS NMスペクトルをFig.1 (TEOS-MTES) 及びFig.2 (TEOS- C_5TES) に示し、シグナル強度のコンタクト時間依存性 ($x=2, 20$) をFig.3 (TEOS-MTES) 及びFig.4 (TEOS- C_5TES) に示す。ゲル骨格中に導入するTユニットの有機基を比較的小さな CH_3 基からバルキーな C_5H_{11} 基や C_8H_{17} 基へ変化させると、全ての ^{29}Si サイト(T^2 , T^3 , Q^3 , Q^4 ユニット)のカーブフィットから得られる回転系での ^1H スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}^{\text{H}}$)の値が減少した。これは導入する有機基の構造が柔軟になると共に、シロキサン骨格自体の運動性もかなり大きくなることと対応すると考えられる。また同一試料における各サイトの値を比較すると、 Q^4 ユニットの値が他に比べ大きい傾向が認められた。

一方同様に算出される ^{29}Si - ^1H スピン間の交差緩和時間(T_{SiH})に関しては、ゾル-ゲル反応時に添加する水の量(x)を $x=2, 5, 10, 20$ と増加した場合、TEOS- C_5TES 及びTEOS- C_8TES 系において Q^4 ユニットの値が増加する傾向が見られた。 Q^4 ユニット ($\text{Si}(\text{OSi})_4$) は ^1H を持たないので、検出された Q^4 ユニットは Q^3 ユニットあるいはTユニットの ^1H とカップリングする必要がある。 Q^3 ユニットの相対量がTユニットに比べて少ないこと (Figs. 1&2) を考慮に入れると、この結果はTユニットの ^1H と容易に双極子カップリングをする位置に存在する Q^4 ユニットの数が減少し、Tユニットと距離が離れたところに存在する Q^4 ユニット (これらはより大きな T_{SiH} を示す) の数が増加したことを示唆していると考えられる。このことから、TEOS- C_5TES 及びTEOS- C_8TES 系では、水の量(x)を増加させるにつれ、有機基の疎水性相互作用により加水分解・重縮合反応の初期段階でTユニットがより集合したオリゴマーを生成するようになり、その結果として最終的なゲル骨格中でもTユニット、Qユニットが各々でより凝集した構造を形成していることが考えられる。

上述の凝集状態を想定すると、 T_{SiH} の値は分布を持つものと考えられ、従って Q^4 ユニットの $T_{1\rho}^{\text{H}}$ の値は、 T_{SiH} の大きな成分のためにみかけ上大きくなったものと考えられる。そこで、 Q^4 ユニットの $T_{1\rho}^{\text{H}}$ の値が他のサイトと同じであると仮定し、 T_{SiH} の値の分布を変化させることで Q^4 ユニットのシグナル強度のコンタクト時間依存性をシミュレーションすることを試みている。シミュレーションの結果の詳細については、当日報告する。

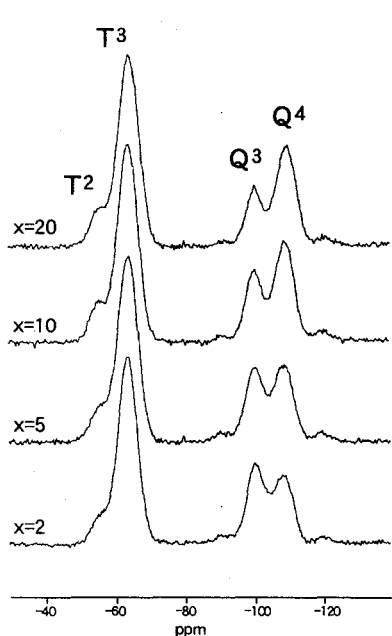


Fig.1 ^{29}Si CP/MAS NMR spectra of TEOS-MTES gels for various $x=\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$ ratios. (CP contact time; 8.0ms)

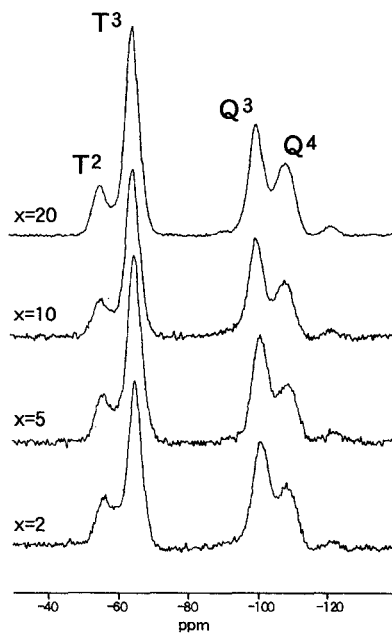


Fig.2 ^{29}Si CP/MAS NMR spectra of TEOS- C_5TES gels for various $x=\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$ ratios. (CP contact time; 8.0ms)

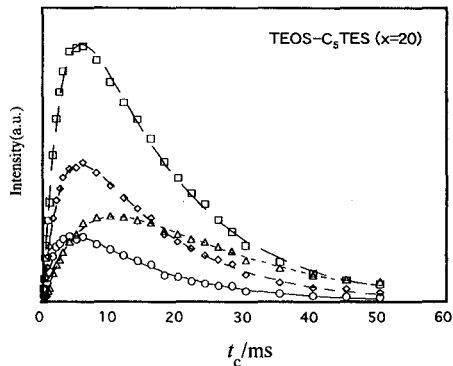
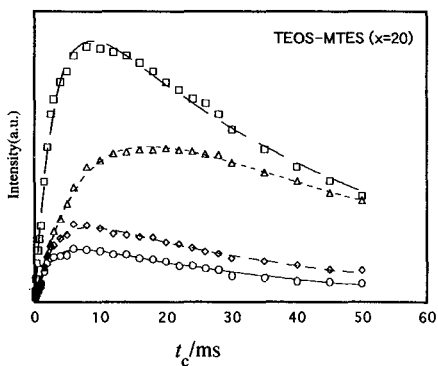
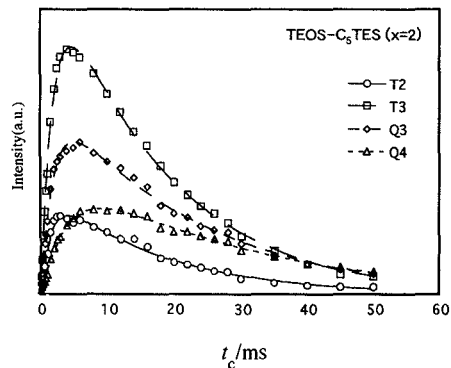
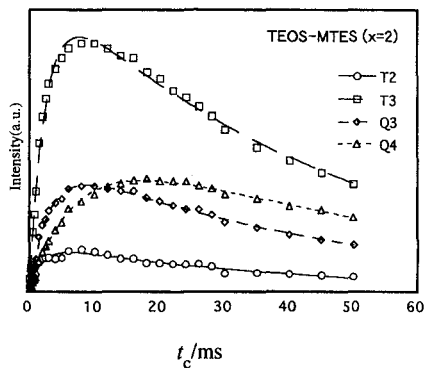


Fig.3 Plots of ^{29}Si CP/MAS intensity as a function of contact time (t_c) for NMR spectra of TEOS-MTES gels.

Fig.4 Plots of ^{29}Si CP/MAS intensity as a function of contact time (t_c) for NMR spectra of TEOS- C_5TES gels.

東京農工大工 ○大川陽平、出村 誠、朝倉哲郎
北大工 平沖敏文、堤 耀広

^2H labeling of side chain of silk fibroin and dynamics analysis studied on ^2H solid state NMR

Youhei Ohkawa¹, Makoto Demura¹ and Tetsuo Asakura¹ Toshifumi Hiraoki²
and Akihiro Tsutsumi²

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan

²Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

Bombyx mori silk fibroin with a higher deuterium-labeling ratio was obtained by oral administration of [3,3- $^2\text{H}_2$]Ser with natural abundance Gly than by the simple administration. The powder samples having silk I and silk II structures and the uniaxially oriented fiber samples were prepared from the ^2H labeled silk fibroin and analyzed by solid-state ^2H -NMR. From the spectra of both powder samples, the side chain of Ser residue was found to be composed of two motional fractions. By assuming a 3-fold jump motion, one motional fraction would be slow component of 10^4 Hz and the other would be fast component of 10^6 Hz. However, the silk I and silk II samples have different characters, namely the libration angle and contents of these motional fractions. Based on the quadrupole splitting of the oriented sample, the χ_1 angle of Ser side chain was determined.

[緒言]

我々は、これまで絹繊維の構造とダイナミクスを詳細に解明することを目的とし、カイコ(*Bombyx mori*) 絹フィブロインの合わせて92%を占めるアミノ酸組成を占める Gly, Ala, Ser, Tyr, Val 残基について、同位体ラベル法と ^{15}N , ^{13}C , ^2H 固体 NMR を用いて研究を進めてきた[1-4]。

本研究では、絹フィブロイン繊維の結晶部に主に存在する Ser 残基について、カイコ絹フィブロインの Ser 側鎖のメチレン基について、 ^2H ラベルを行い、二つの結晶形、Silk I と Silk II の試料について、固体 ^2H -NMR を用いてダイナミクス解析を行うことを目的とした。合わせて、Ser 側鎖の $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ 軸まわりの内部回転角 χ_1 についても検討した。

[実験]

カイコ(*B. mori*)の五令三日目から四日間、[3,3- $^2\text{H}_2$]Ser を人工飼料と共に経口投与することによって、[3,3- $^2\text{H}_2$]Ser ラベル絹試料を得た。固体 ^2H NMR 測定は、四極子エコー法を用い、重水素ラベル試料のパウダースペクトルと繊維軸を揃えた配向試料の角度依存スペクトルを測定した。NMR 装置は JEOL EX 400 スペクトロメータを用いた。ダイナミクスの解析には Vold らのプログラム、MXQET を用いた。

絹フィブロイン、固体 ^2H NMR、セリン、ダイナミクス、逆平行 β シート構造

おおかわようへい、でむらまこと、あさくらてつお、ひらおきとしふみ、つつみあきひろ

[結果と考察]

Fig.1に、[3,3-²H₂]Ser ラベル絹フィブロインの Silk I と Silk II のパウダー試料の固体²H NMR スペクトルを示す。絹フィブロインの[3,3,3-²H₃]Ala の場合、単一の速い 3 site jump の運動様式でそのダイナミクスが説明できたが、Ser 側鎖の場合、単一の 3 site jump 運動様式では再現されなかった。しかし、2種類の運動様式を仮定することによって、Silk I と Silk II 共にほぼ、スペクトルパターンが再現されることがわかった。すなわち、3 site jump の運動様式では、10⁴ Hz の遅い運動（成分1）と 10⁶ Hz のより速い運動（成分2）である。最終的な運動パラメータを Table 1 に、シミュレーションを Fig.2 に示す。Silk II において遅い運動に対応する成分1の割合は75.5%、速い運動に対応する成分2は22.6%であり、中央の HDO 由来のピークは1.9%であった。絹フィブロイン中の Ser 残基の一次構造上の分布と、固体 NMR から決定された Ser 側鎖の運動成分の割合を比較した結果、Silk II 型を形成する一次シークエンス (AlaGlyAlaGlySerGly) (75%) とそれ以外(25%)の比率とほぼ一致していた。従って、成分1は結晶領域由来、成分2は非晶領域由来であると結論した。Silk I では遅い運動に対応する成分1の割合が80.0%であり、速い成分に対応する成分2の割合が16.6%であり、HDO 由来のピークは3.4%となった。Silk I の方が外側の運動の遅い成分の割合が増え、しかも HDO 由来であると思われるピークの割合も増加している。このことは、Ser 側鎖が Silk I 構造の安定化に寄与しているものと予想される。

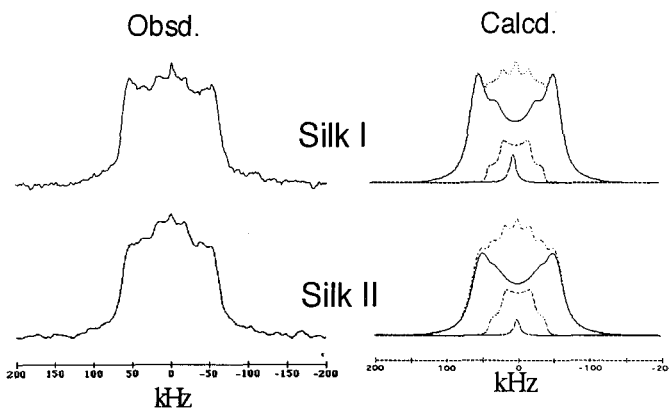


Fig. 1 Observed and Calculated ²H solid state NMR spectra of [3,3-²H₂]Ser labeled silk fibroins, silk I and silk II.

Table 1 Parameters for the dynamics simulation of [3,3-²H₂]Ser labeled silk fibroins, silk I and silk II.

Silk I	Fraction-1	Fraction-2	HDO
Content (%)	80.0	16.6	3.4
Frequency of rotation (Hz)	10 ⁴	10 ⁶	
Frequency of libration (Hz)	10 ⁴	10 ⁶	
Amplitude of libration (deg)	18	10	

Silk II	Fraction-1	Fraction-2	HDO
Content (%)	75.5	22.6	1.9
Frequency of rotation (Hz)	10 ⁴	10 ⁶	
Frequency of libration (Hz)	10 ⁴	10 ⁶	
Amplitude of libration (deg)	20	10	

繊維軸をそろえた配向ブロック試料の固体²H NMR スペクトルを測定した結果、スペクトルパターンは繊維軸と磁場とのなす角度に依存してスペクトルパターンが若干変化することがわかった。このような角度依存性は運動の比較的遅い成分由来と推察される。配向ブロック試料の固体²H NMR スペクトルの四極子分裂幅から得られる β-sheet 構造(silk II) 中の Ser 側鎖の配向角 χ₁ についても発表する。

文献

1. M. Demura et al., J. Molecure Structure, in press.
2. T. Asakura et al., Annual Reports on NMR Spectroscopy, 34, 301-346, 1997.
3. T. Asakura et al., Biopolymers, 41, 193-203, 1997.
4. T. Asakura et al., Macromolecules, 30, 2429-2435, 1997.

P115 NMR法を用いたジェランの2重螺旋構造のダイナミックスに関する研究
(東水大) ○松川真吾・渡部徳子 (東工大) 安藤勲

A Study on Dynamics of Double Helix Structure of Gellan Using ^1H NMR Method

Shingo Matsukawa¹, Tokuko Watanabe¹ and Isao Ando²

¹Dept. of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato-ku, Tokyo 108

²Dept. of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152

We have measured the T_2 values of gellan molecule and self-diffusion coefficients of water (D_w) in 4% solution of gellan, which is known to have a double-helix structure and to form a gel by aggregation of helices under the existence of cations. It was found that the component of T_2 shorter than 8 ms increases with decreasing temperature and that D_w in gellan solution was almost same in whole temperature range with that in neat water. From these results, it was suggested that double-helix structures of gellan molecules increase with decreasing temperature and that the mobility of solvent is not restrained by gellan molecules.

(緒言)

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、多糖などの天然由来の高分子は特異的な高分子-高分子間相互作用を示し、生命現象において重要な役割を担っている。すなわち、水素結合、疎水結合、イオン結合などに基づく構造形成が、DNA、酵素、糖タンパク質などの生体高分子の機能の発現機構を支配している。NMR法は、このような高分子-高分子間の相互作用による構造形成に伴う運動性の変化を検討する上で有力な手段である。緩和時間測定では、セグメントスケールの分子運動に関する知見が得られ、磁場勾配を用いる実験では、分子全体の拡散係数が得られる。

本研究では、D-グルコース、D-グルクロン酸、D-グルコース、L-ラムノースを繰り返し単位とする多糖類であるジェランの2重螺旋構造形成を取り上げ、NMR法により構造形成のダイナミックスを詳細に研究する。ジェランは、水素結合による2分子間の相互作用によって2重螺旋を形成し、さらに、カリウムなどのイオンの存在下では、この2重螺旋同士の相互作用によってゲル構造を形成する。したがって、このゲル化機構を分子レベルで理解するためには、2重螺旋形成過程を詳細に研究するこ

キーワード ; 拡散係数、緩和時間、2重螺旋構造、ジェランゲル、高分子間相互作用

まつかわしんご わたなべとくこ あんどういさお

とが有効である。そこで、2重螺旋形成のダイナミックスをNMR法によって測定し、糖鎖間の相互作用について考察するとともに、ジェランのゲル化機構解明のための基礎的知見を得ることを目的とする。

(実験)

試料調製 重水に0.4wt%のナトリウム型ジェラン(Kelco社)を溶解し、80℃で12時間攪拌した後、凍結乾燥した。この試料に重水を加え、90℃に12時間加熱して完全に溶解し、4wt%のジェラン溶液を調製した。

NMR測定 90℃で溶解した試料を70℃に1時間保った後、10分に1℃の割合で温度を下げながらNMR測定を行った。自己拡散係数は、試作した高磁場勾配発生装置を接続したGSX270 NMR分光器(270MHz,日本電子製)を用い、65℃-25℃において、パルス磁場勾配スピンエコー¹H-NMR法により、磁場勾配を13.4Tm⁻¹、磁場勾配パルスの間隔を10ms、磁場勾配パルスの幅を0.001ms-0.9msまで変えて測定した。¹HT₂緩和時間はCPMG法によりτ=2ms、エコー観測時間t=8ms-72msにて測定した。

(結果と考察)

gellanの運動性 Fig.1に各温度においてCPMG法により測定したt=8msにおけるエコー信号から得られたスペクトルを示した。1.5ppmにL-ラムノースのメチル基、4.7ppmにHDO、3.8-4.9ppm及び5.5ppmに糖鎖環上のプロトンに基づくピークが見られる。

温度が低くなるとHDOのピークに比べ、gellanのピークが小さくなる。このことは8msの間にT₂緩和によって減衰する成分が増えることを示している。測定した試料は25℃においても流動性のある溶液状態であり、ゲル化は見られなかったため、この短いT₂を持つ成分は2重螺旋形成によって生じたと考えられる。HDOのピークに対するメチル基のピーク強度比の温度依存性をFig.2(a)に示した。この図より、2重螺旋形成によって生じる短いT₂を持つ成分は40℃まで徐々に増え、40℃以下ではほぼ一定となると考えられる。この時、t>8msにおいて観測されるエコー信号強度より求めたT₂はFig.2(b)に示したように、ほとんど変化しない。t>8msにおいて観測されるのは、2重螺旋形成に関与していない成分であると考えられるが、温度低下にともない、この成分の運動性はほとんど変わらずに、成分比が減少していくと考えられる。

溶媒の運動性 Fig.3にHDOの拡散係数の温度依存性を示した。HDOは重水中に微量含まれるものであるが、D₂Oと物理的性質がほぼ同じなので、この拡散係数より溶媒の拡散挙動を議論できる。gellan溶液中のHDOに対するプロットは測定温度範囲において直線となり、また、重水中HDOの値とほぼ同じである。4wt%溶液中においては、gellanの高分子鎖による抑制を受けず、また、gellanの2重螺旋構造形成の影響も受けないと考えられる。

Reference

- 1) 松川真吾、安藤勲、高分子討論会要旨集, 45 (12), (1996), 3268.
- 2) H.Grasdalen, O.Smidsrod, *Carbohydr. Polym.*, 7, (1987), 371.

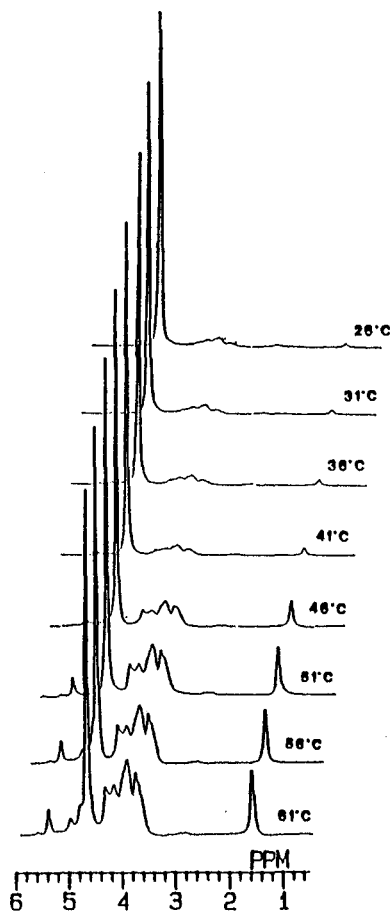


Fig. 1 Spin-echo ¹H NMR spectra of gellan solution of gellan at echo time t=8ms at various temperature.

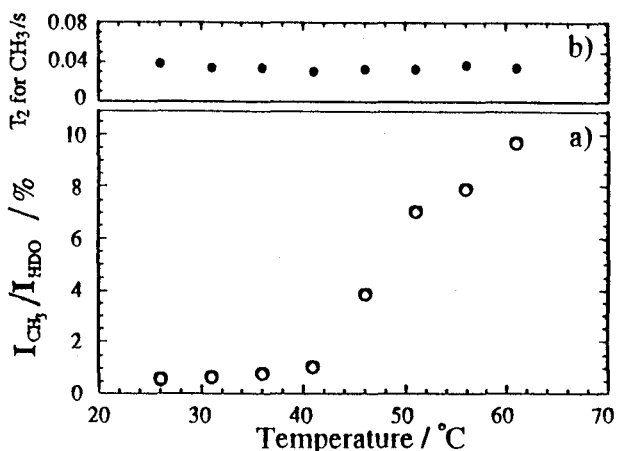


Fig. 2 Temperature dependence of (a) the ratio of the intensity of methyl group of gellan(I_{CH_3}) to the intensity of HDO(I_{HDO}) and (b) T_2 values for methyl group of gellan.

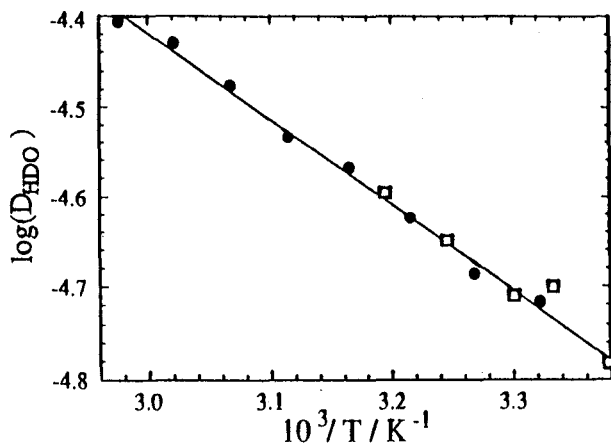


Fig.3 Temperature dependence of the diffusion coefficients of water molecules(D_{HDO}) in gellan solution(●) and in neat D₂O(□).

農水省生物研：○加藤悦子・山崎俊正
東海大工：大島明博・田畑米穂

日本電子応研：杉沢寿志
原研高崎：瀬口忠男

Structures of Radiation Crosslinked Polytetrafluoroethylene as Studied by High-Resolution Solid-State ^{19}F MAS NMR

E. Katoh, T. Yamazaki (Natl. Inst. of Agrobiological Resources), H. Sugisawa (JEOL), A. Oshima, Y. Tabata (Tokai Univ.), T. Seguchi (JAERI Takasaki)

The irradiation effect on chemical structures of radiation crosslinked polytetrafluoroethylene (PTFE) was studied by high-resolution solid-state ^{19}F magic angle spinning (MAS) NMR at high temperature. It was demonstrated that high speed MAS ^{19}F NMR measurement at high temperature was a powerful tool to analyze structures of insoluble fluorine compounds. For the electron beam irradiated PTFE, NMR signals corresponding to CF_3 , CF_2 , CF and internal double-bond group were newly observed, and their intensities increased with an increase of irradiation dose. The existence of CF signals strongly indicated that network with the crosslinking of PTFE was formed by the irradiation in the molten state.

1. 緒言

高分子材料へ電子線を照射すると、分子構造に架橋（架橋型）や分子鎖解裂（分解型）などの変化が生じ、物性が変化することが知られている。ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) は電子線照射により分子鎖の切断が生じ、強度等が低下してしまう分解型の高分子である。このため、優れた物性を持つにも関わらず、原子力施設や宇宙環境等の放射線場での使用が著しく制限されてきた。近年、酸素非存在下融点近傍の高温で PTFE に電子線照射を行うと力学特性等の物性が向上する事から、照射により PTFE が架橋する可能性が強く示唆されている。しかし、PTFE は溶媒に不溶であり、溶液 NMR による構造解析が不可能であること、またフッ素原子の強い双極子相互作用により通常の固体高分解能 NMR 法では構造情報が得られないため、架橋構造を直接支持する結果は報告されていない。我々は、高速 MAS ^{19}F NMR 法が含ふつ素高分子の構造解析に有効な手法であることを報告してきた(1)。本研究では、 ^{19}F 固体高分解能 NMR により、特に従来の高速 MAS 法に加え高温での測定を行うことにより、スペクトルの先鋭化を実現し、PTFE の放射線架橋による構造変化を詳細に検討した。

2. 実験

サンプル：PTFE($M_n \sim 8.7 \times 10^6$)を酸素非存在下 340°C（熔融状態）に加熱し電子線照

キーワード PTFE・電子線照射・固体 NMR・ ^{19}F MAS NMR・crosslinking

かとうえつこ やまざきとしまさ すぎさわひさし たばたよねほ おおしまあきひろ
せぐちただお

射を行った。照射の線量は 100kGy, 2MGy, 5MGy, 10MGy とした。

室温高速 MAS ^{19}F NMR 測定：日本電子製 α -400 装置に、Doty 社製 Ultrasonic CP/MAS[®]プローブと ^{19}F 用パリアンプ[®]を装着し、室温にて行った。約 20mg のサンプルをシリコンナイトライド製のローターに詰めて測定に用いた。スペクトル幅、デューティおよび積算回数は各々 100kHz、4k および 48 回とした。 ^{19}F 化学シフトは、外部基準として n-perfluoroicosane の内部 CF_2 シグナル-123.7ppm (対 Freon-11 0ppm) を用いた。温度可変高速 MAS ^{19}F NMR 測定：Chemagnetics 社製 CMX300-Infinity に APEX 型 F/H 二重共鳴[®]プローブ (4mm ϕ)を装着し測定を行った。スペクトル幅、デューティおよび積算回数は各々 200kHz、8k および 32 回とした。

3. 結果と考察

a: 室温における高速 MAS ^{19}F NMR 測定結果

スピニングサイドバンド(SSB: Fig 中では*で示す)のシグナルは測定の回転数によりシフトするが、真のシグナルはシフトしない。そこで、本研究では正確な情報を得るために、12kHz と 15kHz の回転数で測定を行った。照射線量の異なる PTFE の ^{19}F MAS NMR の測定結果を Fig. 1 (回転数 12kHz) および Fig. 2 (回転数 15kHz) に示した。

Fig.2 には -40~-80ppm の拡大スペクトルと -100~-130ppm の波形解析結果を合わせて示した。放射線の線量が増大するにつれ新たなシグナルが 9 種類現れ、その強度が増加することがわかった。

それぞれのシグナルはトリフルオロメチル基(CF_3)、フルオロメチル基(CF_2)そしてフルオロメチン基(CF)に帰属することができた (Fig. 3)。

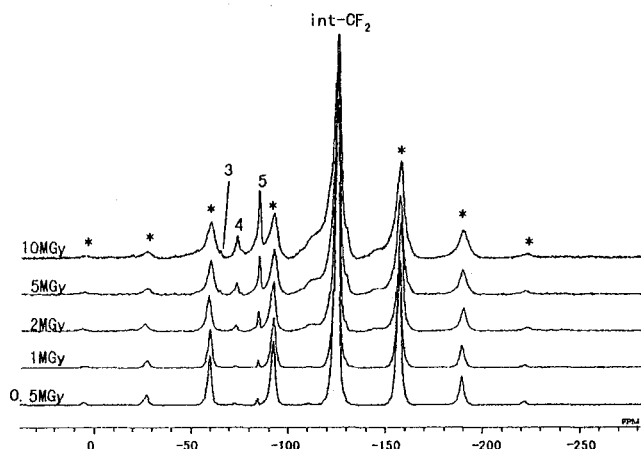


Fig. 1 High-Resolution Solid-State ^{19}F MAS NMR Spectra of Five Kinds of Irradiated PTFE Samples Prepared with Different Irradiation Dose Measured at a Spinning Rate of 12 kHz.

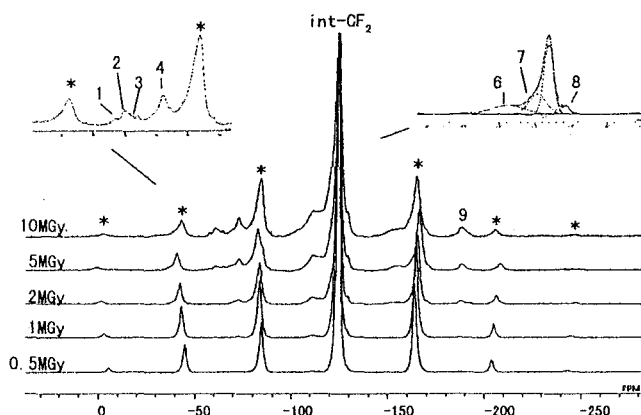


Fig. 2 High-Resolution Solid-State ^{19}F MAS NMR Spectra of Five Kinds of Irradiated PTFE Samples Prepared with Different Irradiation Dose Measured at a Spinning Rate of 15 kHz.

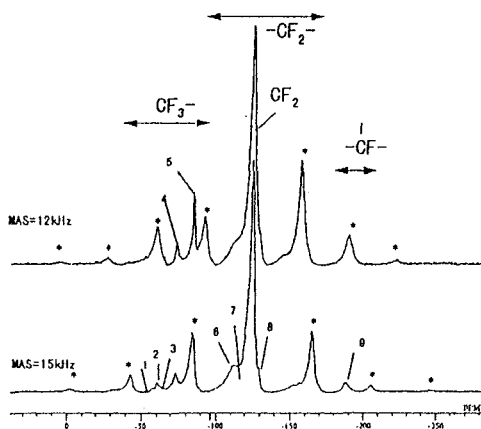


Fig. 3 High-Resolution Solid-State ^{19}F MAS NMR Spectra of 10MGy Irradiated PTFE

CF_3 、 CF_2 は数種類のシグナルが観測されたことから、分岐鎖長や化学環境の異なる CF_3 、 CF_2 が共存していることが分かった。室温での測定では、化学構造の変化があること、特に CF の存在が明らかになったことから電子線照射により架橋構造が生成することが分かった。しかし、より詳細な構造解析を行うためには、スペクトルの先鋭化と SSB の消去が必要である。

b: 温度可変高速 MAS ^{19}F NMR による測定結果

Fig.4 に 10MGy 照射による PTFE の温度可変高速 MAS ^{19}F NMR の測定結果を示す。温度が上昇するにつれ、スペクトルは先鋭化し、さらに SSB の強度が低下していくことが分かった。これは、温度が上昇することにより、PTFE の運動性が向上し、高速回転によっても取り除けずに残っている化学シフトの異方性や双極子相互作用が弱くなるためと考えられる。10MGy 照射による PTFE の場合 150°C で高速 MAS の速度 15kHz で測定することにより、完全に SSB がなくなり解析可能なスペクトルが得られた。その結果、室温測定での結果に加えて、多くの種類の CF_3 基、 CF_2 基が生成していることが分かった。10MGy 照射 PTFE の 150°C における高速 MAS(15kHz) ^{19}F NMR スペクトルと帰属結果を Fig.5 に示す。

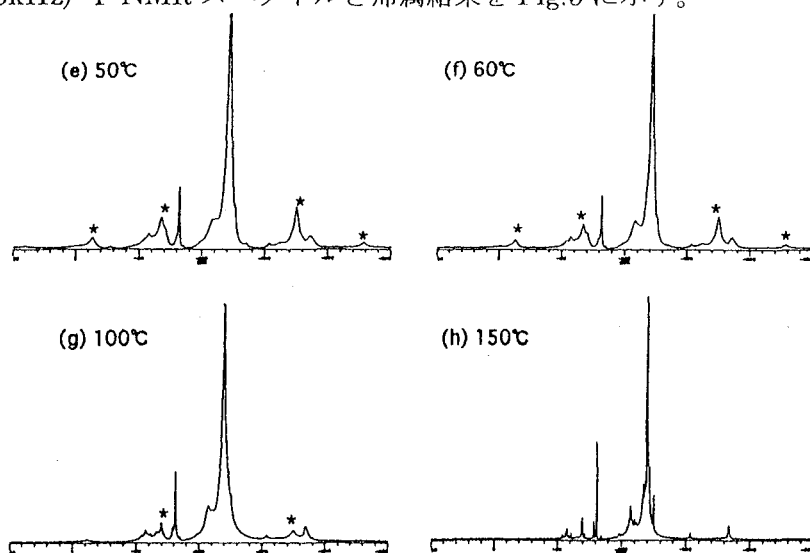


Fig. 4 Solid-State ^{19}F NMR Spectra of 10MGy Irradiated PTFE at Various Temperature

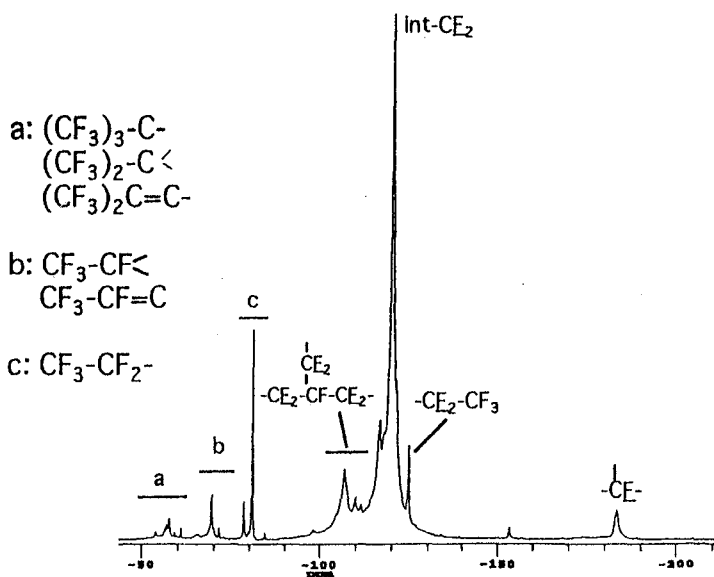


Fig. 5 High Resolution Solid-State ^{19}F MAS NMR Spectrum of 10MGy Irradiated PTFE at 150 °C and a Spinning Rate of 15 kHz.

帰属は、種々の含ふッ素化合物の溶液 ^{19}F NMR のデータを参考にして行った。 CF_3 基は Fig.5 に示すように、a,b,c で示す3領域にシグナルが分かれて現れることが分かった。それぞれの領域は a:4級炭素に結合した CF_3 、b:3級炭素に結合した CF_3 、c:2級炭素に結合した CF_3 である。 CF_2 は架橋点に隣接する CF_2 および CF_3 に隣接する $\text{CF}_2(\alpha\text{-CF}_2)$ に帰属できた。フルオロアルキル鎖が短く運動性の良い場合には $\alpha\text{-CF}_2$ が観測できることから、電子線照射 PTFE には分子鎖長の短い枝分かれが存在していることが示唆される。

一般に架橋が起きたときには、T-type と H-type が生成することが知られている。つまり、 CF は架橋点の構造を反映すると考えられ、このシグナル強度が架橋の密度に相当すると仮定できる。このことから、10MGy の電子線照射で架橋した場合の架橋数は約 24CF_2 ユニットあたり1個と算出できた。

4. 結言

高温における高速 MAS 法は固体状態における ^{19}F NMR シグナルを先鋭化する事が可能であり、従来化学構造を解析することが難しいとされてきた溶媒に不溶な含ふッ素化合物の構造解析に非常に有効な手法であることが分かった。固体高分解能 ^{19}F NMR による電子線照射 PTFE の構造解析の結果から、融点付近の温度で PTFE に電子線照射を行うことにより架橋反応が起こっており、分岐鎖には化学環境の異なる種々の鎖長が存在することを明らかにした。また、 CF シグナルの定量値から架橋密度を算出し、架橋密度と電子線照射量の相関を解明した。

(阪大院理 1, 帝人(株)構造解析センター 2, 神戸薬科大 3, 物質研 4)

○永阪文惣^{1,2}、中山尋量^{1,3}、上田貴洋⁴、江口太郎¹、中村亘男¹ **^{129}Xe - and ^2H -NMR Studies of the Dynamics of Molecules and Micropores in Polycarbonate.**Bunsow Nagasaka^{1,2}, Hirokazu Nakayama^{1,3}, Takahiro Ueda⁴, Taro Eguchi¹, and Nobuo Nakamura¹¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560²Material Analysis Research Center, Teijin Ltd., Hino, Tokyo 191³Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Hyogo 658⁴National Institute of Materials and Chemical Research, Tsukuba, Ibaraki 305

Abstract Dynamics of molecules and micropores in amorphous polycarbonate (PC) has been investigated by ^{129}Xe - and ^2H -NMR spectra. The NMR signal of ^{129}Xe adsorbed in PC broadens out inhomogeneously with decreasing temperature from 298 to 200 K. The line broadening implies that Xe molecules are distributed over rooms or micropores with different sizes formed in the polymer. From ^2H -NMR spectrum of partially deuterated PC in which xenon was dissolved, it was indicated that the phenyl-ring 180° flip motion became slow drastically in the similar temperature region to the case of the broadening of the ^{129}Xe resonance.

Introduction.

In addition to the success of ^{129}Xe -NMR spectroscopy as a probe for the study of the void space in microporous solids such as zeolites and clathrates[1], its applications to the characterization of amorphous phase of polymer has recently been an increasingly interested subject[2]. The xenon dissolved in polymers gives us the microstructural and dynamical information associated with the "free volume" of such micropores occupied by xenon.

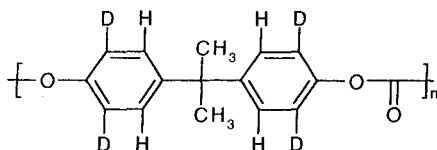


Fig. 1 Repeat unit of partially deuterated polycarbonate.

 Keywords: ^{129}Xe -NMR, ^2H -NMR, ダイナミクス, ポリカーボネート

ながさかぶんそう、なかやまひろかず、うえだたかひろ、えぐちたろう、なかむらのおお

There have been reported, for example, some studies of the heterogeneous structure in a blend polymer[3], and of the probable dynamical correlation between the polymer motion and the mobility of xenon distributed over various micropores with different sizes near the glass transition temperature[4, 5].

In the present study, we investigated the dynamic behavior of xenon in micropores and of the phenyl-ring in polycarbonate below room temperature by ^{129}Xe - and ^2H -NMR spectra to understand the whole nature of polymer, *i.e.*, containing molecular segments and empty space.

Experimental.

Amorphous bisphenol-A polycarbonate, PC (Mw=28000) and phenylene-deuterated(97%) PC-d₁ [Fig. 1] (Mw=49300) were used in the present NMR experiments. Each polymer / Xe gas system was prepared by sealing off the pyrex NMR tube which contains the polymer and the appropriate amount of Xe gas at liq. N₂ temperature. The xenon pressures at room temperature were ca. 10 and ca. 14 atm for PC and PC-d₁, respectively.

^{129}Xe -DD/MAS NMR spectrum was measured by a Bruker DSX200 spectrometer at 55.3 MHz with the magic angle spinning at 3.0 kHz between 298 and 200 K. The signal of free xenon gas in the sample tube at room temperature was used as the reference for the ^{129}Xe -NMR chemical shift. For ^2H -NMR spectra, the measurements were carried out using a Bruker DSX300 spectrometer, operating at the Larmor frequency of 46.0 MHz.

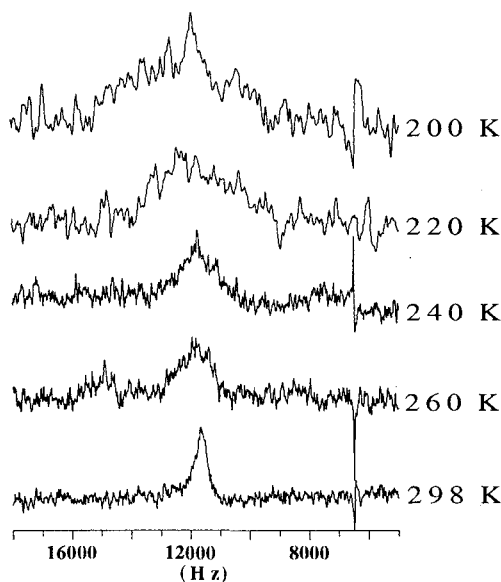


Fig. 2 Temperature dependence of ^{129}Xe -DD/MAS NMR spectrum of xenon in PC at 4.7 T.

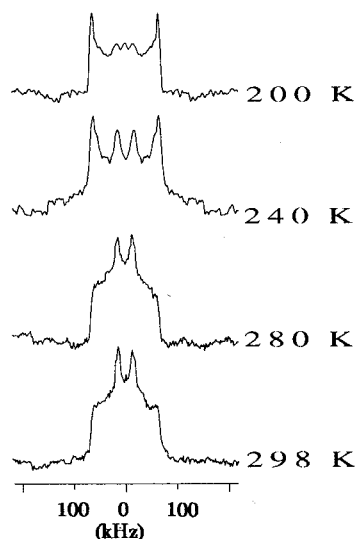


Fig. 3 ^2H -NMR spectra at 7.0 T of the phenyl deuteriums of xenon-dissolved PC.

Results and discussion.

As can be seen in Fig. 2, the ^{129}Xe resonance peak of xenon adsorbed in PC broadens out inhomogeneously with decreasing temperature from 298 to 200 K. Under the condition of the MAS and the proton dipolar decoupling, the fact that the line is asymmetric at low temperature suggests that Xe molecules are distributed over rooms with different sizes and / or shapes which exist randomly in the bulk polymer. The line-narrowing on heating may be brought about by the interpore exchange of Xe molecules.

According to ^2H -NMR spectrum of partially deuterated PC in which xenon was dissolved, shown in Fig. 3, it was indicated that the rate of the 180° flip of the phenyl ring becomes low drastically on cooling in the similar temperature region to the case of ^{129}Xe NMR. In comparison with the data at 1 atm[6], this result suggests that the xenon adsorbed in PC does not affect phenyl-ring motion significantly at the pressures less than 15 atm. We are planning to clarify whether any correlation between the broadening of the ^{129}Xe resonance and the phenyl-ring motion in PC exists or not.

Acknowledgment.

The authors thank Dr. K. Yamauchi for his assistance in the measurement of ^2H -NMR spectra on a Bruker DSX300 equipped at Bruker Japan Co., Ltd.

References

1. P.J. Barrie and J. Klinowski, *Progr. NMR Spectr.* **24**, 91 (1992).
2. D. Raftery and B.F. Chmelka, *NMR Basic Principles and Progr.* **30**, 110 (1994).
3. M. Tomaselli, B.H. Meier, P. Robyr, U.W. Suter, and R.R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **205**, 145 (1993).
4. T.R. Stengle and K.L. Williamson, *Macromolecules* **20**, 1430 (1987).
5. A.P.M. Kentgens, H.A. vanBoxtel, R.-J. Verweel, and W.S. Veeman, *Macromolecules* **24**, 3712 (1991).
6. M. Werle, G.P. Hellmann and H.W. Spiess, *Colloid & Polymer Sci.* **265**, 815 (1987).

京大化研 ○田井利弘・梶弘典・堀井文敬

2D SASS and 2D MAT NMR Analyses of Molecular Motion of
Phenoxy Resins in the Glassy State

Toshihiro Tai, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii

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

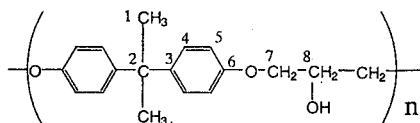
The phenylene ring motion of phenoxy resins has been characterized by analyzing ^{13}C chemical shift anisotropy(CSA). The CSA spectra have been obtained by 2D switching angle sample spinning (2D SASS) and 2D magic angle turning (2D MAT). The CSA spectra of the phenylene ring CH carbons are found to be almost axially symmetric, suggesting the enhanced 180° jump motion of the phenylene group at room temperature. The CSA spectra of quaternary carbons in the phenylene ring show almost rigid lineshapes below 80°C and become narrower at 100°C . This narrowing may indicate the onset of the fluctuation of the phenylene ring axis with the order of 10^4 Hz.

[緒言]

高分子のガラス状態における耐衝撃性、気体透過性などの巨視的な性質は、 $10^4\sim 10^5\text{Hz}$ の分子運動に関係していると考えられ、その解析は極めて重要である。 ^{13}C 化学シフト異方性(CSA)の解析は、この周波数領域の分子運動を解明するのに有用な方法である。これまで我々は、ビスフェノール A ポリカーボネート、ポリアリレートなどのビスフェノール A 残基を含むガラス状高分子について、そのフェニレン環の分子運動を明らかにしてきた¹⁾。本研究では、ビスフェノール A 残基を含むフェノキシ樹脂の CSA スペクトルを二次元 Switching Angle Sample Spinning(2D SASS)法²⁾、二次元 Magic Angle Turning(2D MAT)法³⁾により測定し分子運動解析を行った。

[実験]

試料はフェノキシ樹脂(ユニオンカーバイド社製)を 160°C で融解し液体窒素中で急冷したものである。DSC 測定による T_g は 87°C であった。NMR 測定は Chemagnetics CMX-400 分光計(9.4T) および JEOL JNM-GSX200 分光計(4.7T)により行った。二次元 SASS 測定には Doty Scientific 製 SASS プローブを用いた。二次元 SASS 測定は室温、 80°C 、 100°C で、二次元 MAT 測定は室温で行った。



キーワード：フェノキシ樹脂、高分子のガラス状態、 ^{13}C 化学シフト異方性、固体構造

たい としひろ、かじ ひろのり、ほりい ふみたか

[結果および考察]

1) 2D SASS 測定

室温で C4, C5 炭素の CSA は σ_{11} , σ_{22} の平均化した軸対称スペクトルであった。これより、室温で既にフェニレン環が結合軸周りのジャンプ運動を起こしていることがわかった。100°Cでの測定ではこれらの CSA スペクトルは高磁場側のシヨルダーが減少し、スペクトル全体も狭幅化した。高磁場側のシヨルダーは σ_{33} に対応しており、 σ_{11} , σ_{22} にくわえて σ_{33} が平均化していることからフェニレン環のジャンプ運動に加えフェニレン環軸の揺動運動が開始したことが示された。フェニレン環の軸炭素 C3, C6 の 80°C のスペクトル形状は室温とほぼ同一であった。しかし、100°C の形状は C3, C6 ともに狭幅化しており、 $T_g+10^\circ\text{C}$ でフェニレン環軸の振幅の大きい揺動運動が始まっていることが示された。

2) 2D MAT 測定

CSA 共鳴線のシミュレーション解析を行うためには剛直状態における各炭素の CSA を測定し化学シフトテンソルの主値を決定することが必要である。しかし、SASS プローブは測定温度範囲が狭い。そこでより広い温度範囲の測定が可能な CP/MAS プローブで 2D MAT 測定を行った。図 1 に室温の 2D MAT スペクトルを示す。2D MAT 法は CSA の形状に影響を及ぼさない超低速(今回 57Hz)で Magic Angle で回転させ F_2 軸にはそれによって得られた CSA スペクトルを、 F_1 軸では 1/3 回転ずつ時間展開

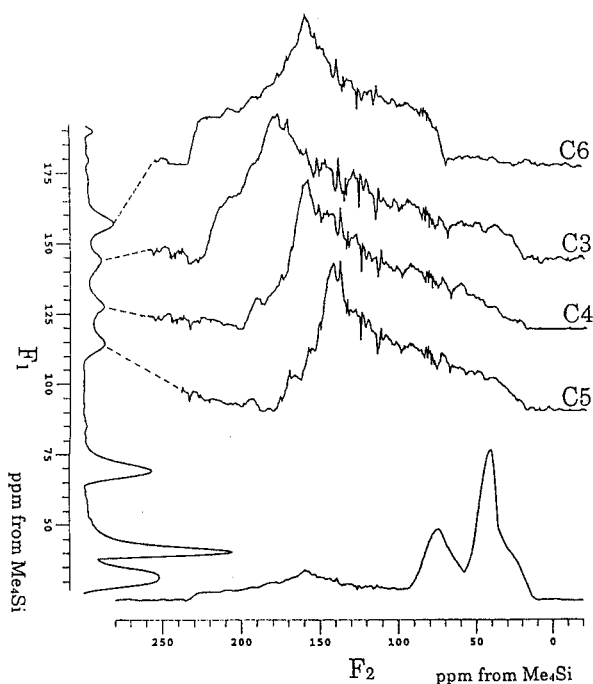


Fig. 1. 100MHz 2D MAT ^{13}C spectra for phenoxy resins at room temperature.

させることにより高分解能スペクトルを得て CSA を分離する方法である。図に示されるように各 CSA が分離して測定できていることがわかる。今後は低温測定をおこなって主値を決定し、フェニレン環の運動の周波数、および振幅を定量的に解析する予定である。

References

- 1) F. Horii, T. Beppu, N. Takaesu, and M. Ishida, *Magn. Reson. Chem.*, **32**, S30 (1994)
- 2) A. Bax, N. M. Szeverenyi, G. E. Maciel, *J. Magn. Reson.*, **55**, 494 (1983)
- 3) Z. Gan, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8307 (1992)

京大化研 ○増田 憲二・梶 弘典・堀井 文敬

Frozen-State CP/MAS ^{13}C NMR Analyses of the Polymer solutions
—Analyses of the Hydrogen bond and the Conformation—

K. Masuda, H. Kaji, and F. Horii

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

CP/MAS ^{13}C NMR measurements and analyses have been performed for the frozen DMSO- d_6 and aqueous solutions of poly(vinyl alcohol)(PVA) samples with different tacticities. Each PVA solution was packed into a MAS rotor with an O-ring seal and frozen in the rotating state at a rate of 1kHz in a CP/MAS probe by cooling down to -50°C . As a result, it is found that the CH resonance lines of the frozen PVA solutions, which are quite different in line splitting from those of PVA films, significantly depend on the solvents and the tacticities. These difference in CH resonance lines are well explained by evaluating the upfield shifts due to the so-called γ -*gauche* effect and the downfield shifts induced by the formation of the intramolecular hydrogen bond. In addition, the measurements and analyses about the quenched frozen PVA solutions are in progress and the results will be reported at the symposium.

1. 緒言

固体ポリビニルアルコール(PVA)の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルの CH 共鳴線は分子内水素結合の形成に基づいて 3 本(共鳴線 I、II、III)に分裂する。すなわち、共鳴線 I、II、III は分子内水素結合をそれぞれ 2、1、0 個形成した OH 基に結合した CH 炭素に帰属される。そして、これらの CH 共鳴線の強度は、立体規則性、温度、含水率、製膜溶媒、熱処理などにより、分子内および分子間水素結合の違いを反映して著しく変化することなどが明らかとなっている¹⁾。このように、PVA の分子内および分子間水素結合に関する情報を得るのに固体 ^{13}C NMR 解析は非常に有効である。しかし、固体状態での水素結合の形成は前段階である溶液状態に大きく依存していると考えられ、溶液状態における水素結合の解析法を開発することは重要である。ここで、溶液では分子運動性が高いため、水素結合、コンホメーションなどが高速で平均化されるため、溶液状態での NMR 解析は必ずしも有効ではない。

そこで、本研究では、種々の PVA 溶液について、これらを凍結することにより CP/MAS ^{13}C NMR 測定並びに解析する方法を考案した²⁾。その結果、CH 共鳴線が溶媒および立体規則性の違いにより大きく変化し、このような CH 共鳴線の変化は γ -*gauche* 効果に基づく高磁場シフトおよび分子内水素結合の形成による低磁場シフトを考慮することで説明できることを明らかにした。また、*mm* 分率の増加に伴い凍結溶液中である特定のコンホメーションが優先的に生成することなどを見出した。

キーワード：ポリビニルアルコール、水素結合、凍結状態 ^{13}C NMR、 γ -*gauche* 効果、冷却速度

ますだ けんじ、 かし ひろのり、 ほりい ふみたか

2. 実験

試料: 立体規則性の異なる 4 種の PVA を用いた。分率比 *mm:mr:rr* はそれぞれ A-PVA(0.23:0.50:0.27), LI-PVA(0.50:0.39:0.10), MI-PVA(0.66:0.28:0.06), HI-PVA(0.79:0.19:0.02)である。3wt%の PVA 水溶液または DMSO-*d*₆ 溶液を O-リング付き MAS ロータに充填し、約 1kHz の低速で回転させながら -50℃ まで冷却することにより凍結させた。

固体 ¹³C NMR 測定: 測定は JEOL JNM-GSX200 分光計により、4.7T の静磁場下で行った。固体高分解能スペクトルは CP/MAS 法により、¹³C スピン-格子緩和時間 *T*_{1c} は CPT1 パルス系列により測定した。測定温度は -50℃ である。

3. 結果および考察

凍結 PVA 溶液の CP/MAS ¹³C NMR スペクトル

図 1 に、種々の立体規則性 PVA の凍結 DMSO-*d*₆ 溶液の CP/MAS ¹³C NMR スペクトルを示す。ここで、reference として水から製膜した A-PVA フィルムのスペクトルを図 1(e)に示した。図 1(a)では、CH 共鳴線は固体 PVA の共鳴線 II、III に相当する 2 本のピークに分裂する。しかし、*mm* 分率が増大するにつれ、共鳴線 III に対応する共鳴線は強度の減少とともに低磁場側にシフトする。(c)、(d)では、固体の共鳴線 II、III の中間の化学シフトに単一のピークを示す。図 2 に凍結 PVA 水溶液の CP/MAS ¹³C NMR スペクトルを示す。reference として DMSO から製膜した A-PVA フィルムのスペクトルを図 2(e)に示した。凍結 PVA 水溶液の CH 共鳴線の形状はフィルムの場合と大きく異なる。また、凍結 DMSO-*d*₆ 溶液の場合と同様に *mm* 分率の増大とともに CH 共鳴線は低磁場側にシフトする。

このように凍結 PVA 溶液の CH 共鳴線が立体規則性、溶媒の違いに大きく依存することは、従来の分子内水素結合の形成による低磁場シフトだけではなく、*gauche* コンホメーションによる高磁場シフト(*γ-gauche* 効果)についても考慮する必要があることを示している。

分子内水素結合および *γ-gauche* 効果に基づく統計計算

種々の凍結溶液での CH 共鳴線の分裂の違いを説明するため、分子内水素結合の形成による低磁場シフトと *γ-gauche* 効果に基づく高磁場シフトを考慮した統計計算を行った。

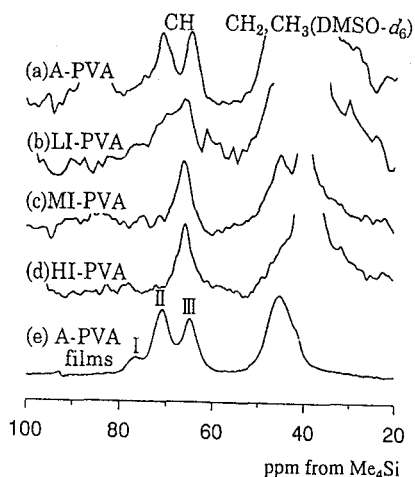


Fig. 1 CP/MAS ¹³C NMR spectra of frozen DMSO-*d*₆ solutions of PVA samples with different tacticities, measured at -50℃

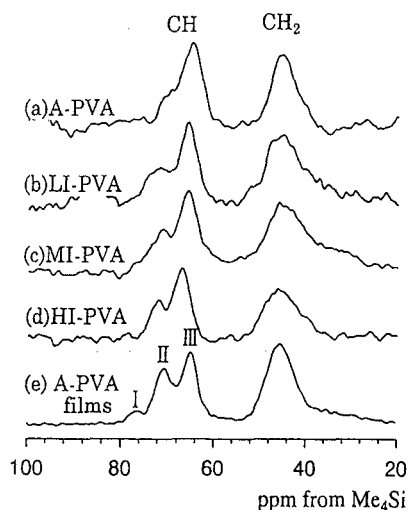


Fig. 2 CP/MAS ¹³C NMR spectra of frozen aqueous solutions of PVA samples with different tacticities, measured at -50℃

凍結溶液では個々の分子鎖についてあらゆるコンホメーションをとることから、分子内水素結合だけでなくコンホメーションの変化による CH 共鳴線への影響についても考慮する必要がある。ここで、分子内水素結合の形成による低磁場シフトを+5.9ppm、また γ 位の OH 基または CH₂ 基が *gauche* 位の場合の高磁場シフト(γ -*gauche* 効果)をそれぞれ-7.2ppm,-5.9ppm と仮定した。その結果、CH 炭素については分子内水素結合の形成およびコンホメーションの違いにより 9 つの化学シフトの異なる状態が可能であることが明らかになった。

この 9 つの状態に相当する化学シフトを用いて、それぞれの試料の CH 共鳴線について波形解析を行った。図 3 に凍結 A-PVA 溶液についての波形解析の結果を示す。実測スペクトルと合成スペクトル(破線)はよい一致を示した。その他の凍結溶液についても同様な波形解析が可能であった。したがって、上記の水素結合およびコンホメーションに関する仮定は妥当なものと考えられる。

次に、解析から得られた CH 共鳴線の相対強度を説明するために、C-C 結合の *trans* の確率を f_t および隣接 OH 基と分子内水素結合を形成する確率を f_a とし、上記の 9 つの状態に対応する存在確率の式を導いた。この式を用いて、上記解析の結果得られた相対強度と一致する計算強度を最小 2 乗法により求めた。図 4 に凍結 A-PVA 溶液に関する波形解析および統計計算より得られた共鳴線の相対強度を示す。ここで、黒い縦棒は波形解析、中空の縦棒は計算による分率を示している。ここで、計算値と実測値は非常に良い一致を示す f_t および f_a 値を求めることができた。よって、統計的取り扱いが妥当であり、凍結溶液中での分子内水素結合およびコンホメーションの解析方法として非常に有効であることを明らかにした。

イソタクチック PVA の凍結 DMSO-*d*₆ 溶液および凍結水溶液に関して同様に解析を行った。LI-PVA に関しては計算値と実測値はある程度の一致を示した。しかし、*mm* 分率の高い MI-PVA、HI-PVA に関して両凍結溶液について良い一致は得られなかった。凍結 DMSO-*d*₆ 溶液の場合、共鳴線 5,6 の強度が HI-PVA、MI-PVA で著しく大きく、凍結水溶液の場合には共鳴線 2,3,4,5 の強度が強くなり HI-PVA で現われた。これより、凍結溶液中で上記の共鳴線に対応するコンホメーションが優先的に形成されるためと考えられる。したがって、統計的取り扱いが適用できない系と推測される。

また発表では、急冷凍結 PVA 溶液に関する測定および解析結果についても報告する予定である。

参考文献

- 1) Horii, F., Hu, S., Ito, T., Odani, H., Kitamaru, R., Matsuzawa, S. and Yamamura, K., *Polymer* 1992, 33, 2299
- 2) Horii, F., Masuda, K. and Kaji, H., *Macromolecules* 1996, 30, 2519

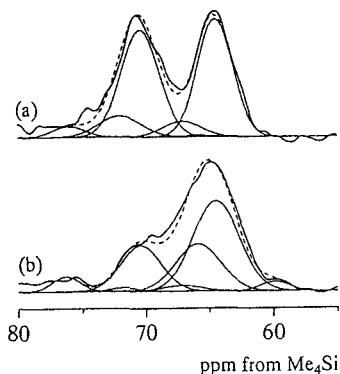


Figure 3 Lineshape analysis of the CH lines of frozen A-PVA solutions (a) DMSO-*d*₆ and (b) H₂O. The broken line indicates the composite curve of all lines shown by solid lines

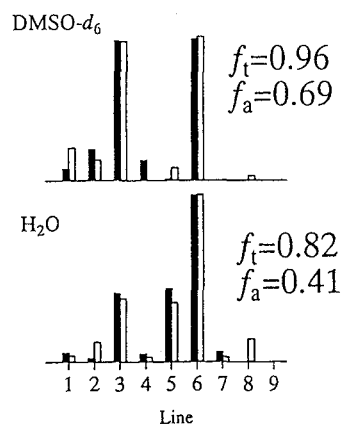


Fig. 4 The histograms for the observed and calculated mass fractions for CH resonance lines in the frozen A-PVA solutions

^{14}N effects on ^{13}C CP/MAS NMR spectra of nitroanilines
(National Institute of Materials and Chemical Research) Shigenobu Hayashi

The signal of ^{13}C adjacent to amino and nitro groups is splitted into two peaks with an intensity ratio of 1:2 theoretically. However, the apparent signal intensities of 1:1 were often observed. The signal patterns were simulated successfully, assuming different line shapes and widths for the two peaks.

ニトロアニリン類の ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを測定すると、アミノ基およびニトロ基の根元の炭素のシグナルが2つに分裂することはよく知られている。これは、 ^{14}N が四極核であるため ^{13}C - ^{14}N 間の双極子相互作用がマジック角回転によって完全には平均化されないためである。理論的には、相手核が $I=1$ の場合1:2の強度を持つ2つのピークに分裂する。ところが、種々のニトロアニリン類の ^{13}C スペクトルの中に、1:2の強度では説明できないようなパターンがあることを前回報告した¹⁾。前回は、置換基の種類や温度によってパターンが変化することを報告したが、今回は、パターンのシミュレーションを行い、何が原因となっているのかについて考察を加えた。

実験 ^{13}C CP/MAS NMR測定には、ブルカーASX200 (測定周波数 50.32 MHz)を用いた。スペクトルパターンのシミュレーションは、自作のプログラムを用いてNEC PC9801パソコンで行った。

結果及び考察 Fig. 1の左半分に、50.32 MHzで測定した2-メチル-4-ニトロアニリンのスペクトルのアミノ基のシグナルを示した。 $I=1$ の核種と結合した ^{13}C のシグナルが2つに分裂するのは、 $m_s=0$ と ± 1 との2つに分裂するためであり、理論強度比は1:2となるはずである。ところが、図に示したように、室温以下では見かけ上ほぼ1:1の強度比を持つ2つのピークに分裂している。室温以上では、しだいに1:2の理論強度比を持つパターンへと変化していった。

シグナル強度のコンタクト時間依存性及び ^{13}C スピナー格子緩和時間の測定を行ったが、分裂した各成分において、CPの効率や T_1 に違いは見られなかった。

スペクトルパターンを詳細に検討すると、2つの成分の線幅に違いがあることがわかる。そこ

ニトロアニリン、 ^{13}C CP/MAS NMR、核四極相互作用、固体NMR

はやし しげのぶ

で、各成分に別々のブロードニングファクターを設定してスペクトルシミュレーションを行った。ブロードニングファクターとしては、ガウス型とローレンツ型を仮定した。ところが、単一の線形では実測スペクトルを再現することができず、ガウス型とローレンツ型を混在させ、各成分に異なった混在率と線幅を与えることによって実測スペクトルを再現できた。なお、 $m_s = +1$ と -1 については同じ線形と線幅を持つと仮定した。シミュレーションスペクトルをFig. 1の右半分に示した。1:1の強度比を持つように見えるスペクトルでも、本当は1:2の強度比を持っており、線幅や線形が異なるために見かけ上1:1になっていることがわかった。

Fig. 2に、各成分の線幅の温度依存性を示した。 ^{14}N の状態、ひいてはアミノ基の運動に関係した温度依存性だと考えられる。

アミノ基ほど顕著ではないが、ニトロ基の根元の炭素も各成分の線形や線幅が異なっていた。

当日は他のニトロアニリン類についてもシミュレーション結果を報告する予定である。

文献：1) 林、1996年分子構造総合討論会予稿集

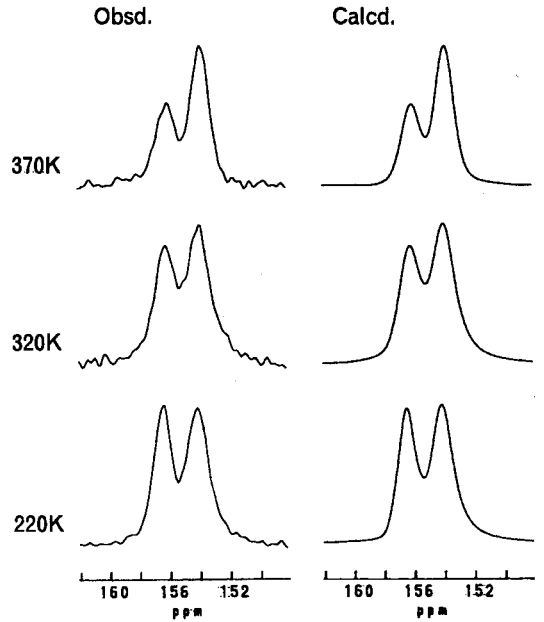


Fig. 1. ^{13}C CPMAS NMR spectra of 2-methyl-4-nitroaniline at 50.32 MHz and their simulated spectra.

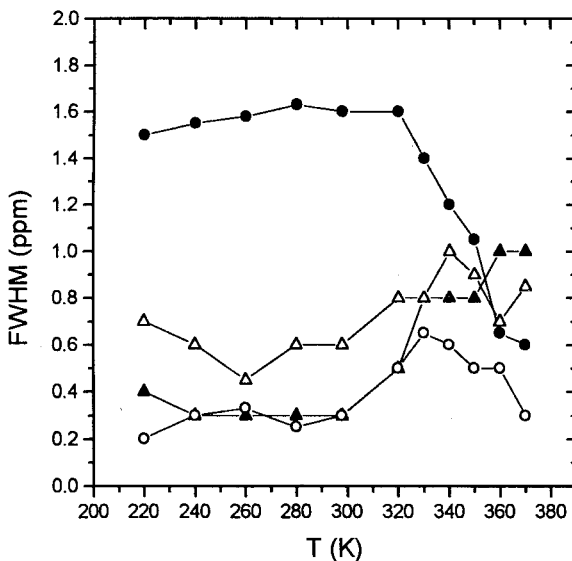


Fig. 2. Full widths at half maximum used in the simulation.

●: Lorentzian and ▲: Gaussian components in $m_s = \pm 1$.
○: Lorentzian and △: Gaussian components in $m_s = 0$.

(神奈川大工1、愛媛大理2) ○高山 俊夫1、田村 将銘2、梶川 裕治2、東 長尾2

A Dynamic Study of Diamido-Rigand (ppda)-Containing Pd and Ni complexes by Solid State NMR

○Toshio Takayama 1, Masana Tamura 2, Yuji Kajikawa 2, and Nagao Azuma 2

(1 Department of Applied Chemistry, Kanagawa University, Yokohama; 2 Department of Material Chemistry, Ehime University, Matuyama)

The solid state NMR experiments have successfully provided very useful information about structure and dynamics of metallic complexes. In this work, we study structural and dynamic analyses of Diamido-Rigand (ppda)-Containing Pd and Ni Complexes in the solid state by means of ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. $[\text{Pd}(\text{ppda})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Ni}(\text{ppda})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ consist of square planar forms. The molecular-motional rate of the bridged propylene ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) carbones for $[\text{Pd}(\text{ppda})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ at 25°C is about 10^{-8}s where can be decided from the theory describing the line broadening introduced when the rate of molecular motion is equal to the proton decoupling field strength, but $[\text{Ni}(\text{ppda})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ does not display the line broadening at same temperature.

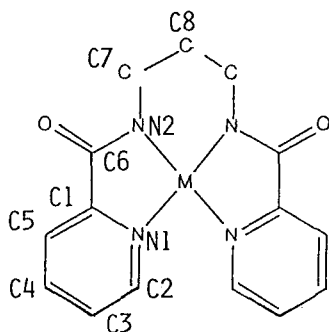
1) 緒論

$[\text{Pd}(\text{ppda})](\text{ppda}: \text{N}, \text{N}'\text{-bis}(\text{picolinoyl})\text{-1,3-propandiamine})$ 錯体 (Fig.1) は平面性の高い PdN_4 型構造をとっているが、架橋プロパン鎖の中央の炭素原子はデイスオ-ダ-していることが単結晶のX線構造解析の結果から分かった。このデイスオ-ダ-がどの温度範囲で示すのかを解明することは大変興味深い。また、同じ d_8 電子配置を有し $\text{Pd}(\text{II})$ よりイオン半径の小さい $\text{Ni}(\text{II})$ からなる $[\text{Ni}(\text{ppda})]$ 錯体との比較も興味深い。しかし、広い温度範囲での単結晶X線測定は多大なる困難を伴う。そこで、本錯体のダイナミックスを固体NMR法を用いて明らかにすることは大変有用であると考えられる。

2) 実験

2-1 錯体合成: $[\text{Pd}(\text{ppda})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ は H_2ppda と PdCl_2 の水溶液から風解性の細い針状結晶として得られた。溶液のpHを0.5から13まで変化させても同じ錯体を得られた。 $[\text{Ni}(\text{ppda})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ も NiCl_2 から同様に合成した。

2-2 固体高分解能NMR測定: JEOL EX270 装置を用いて ^{13}C , ^{15}N (natural) 核観測周波数 67.8, 27.25 MHz, 基準物質として TMS, NH_4NO_3 ($\delta = 0.0$) を用いた。



$[\text{Pd}(\text{ppda})]\text{H}_2\text{O}$: $M = \text{Pd}$; $[\text{Ni}(\text{ppda})]\text{H}_2\text{O}$: $M = \text{Ni}$
Fig.1 Schematic structure of $[\text{M}(\text{ppda})]$
($M = \text{Pd}, \text{Ni}$) complex.

ジアミド配位子、金属錯体、固体NMR、ダイナミックス

○たかやまとしお、たむらまさな、かじかわゆうじ、あずまながお

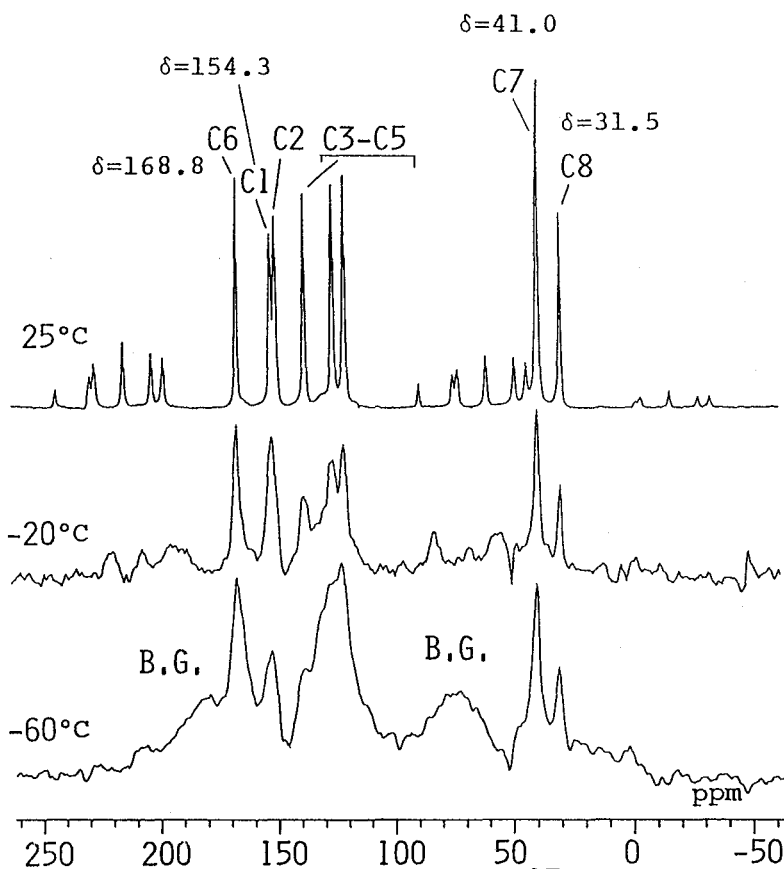


Fig.2 Temperature dependence ^{13}C CP/MAS NMR spectra of $[\text{Ni}(\text{ppda})]\cdot\text{H}_2\text{O}$.

3) 結果と考察

$[\text{Ni}(\text{ppda})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ の温度可変 ^{13}C /CPMAS NMRスペクトルを Fig.2 に示す。ピークの帰属(一部)とその化学シフト値を25°Cのスペクトルに記した。-60°Cではプロブからのバックグラウンド(B.G.)が大きくなったが、ピークは確認された。低い温度での線幅の増大を除けば25~-60°Cの温度範囲でシグナルの化学シフトに変化がなかった。このことは $[\text{Ni}(\text{ppda})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ はこの温度範囲で反磁性体で構造に変化がないことを示している。また、 ^{15}N 化学シフト (25°C)はN1 $\delta = 101.3$, N2 $\delta = 196.0$ であった。

次に、 $[\text{Pd}(\text{ppda})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ について述べる。 ^{15}N 化学シフト (100°C) はN1 $\delta = 109.7$, N2 $\delta = 199.1$ であった。この値は温度の違いを考慮しても $[\text{Ni}(\text{ppda})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ とほぼ同じであり、同じ配位構造をしていることを示している。次に、温度可変 ^{13}C /CPMAS NMR スペクトル(25°C ^{13}C without CP 共)をFig.3に示す。ピークの帰属(一部)と化学シフト値を100°Cと25°C(without CP)のスペクトルに記した。その結果、25°C(without CP)と $[\text{Ni}(\text{ppda})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ 25°Cの化学シフトの値はほぼ同じであった。これはNi(II)とPd(II)のイオン半径の違いによる配位子炭素の化学シフトに相違がないことを示している。また、ピリジン環部分C2~C5炭素の化学シフトが $[\text{Ni}(\text{ppda})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ とは異なっていた。

これは各錯体のピリジン環の結合距離や角度が異なっていることを示している。次に、100°Cでは[Pd(ppda)]・H₂OのC1,C6,C7,C8炭素の化学シフトが低磁場シフトした。これは熱振動によって結合距離や角度が変わったことが起因していると思われる。50と25°CのCP/MASスペクトルに注目すると、プロパン鎖のC7,C8炭素のスペクトルのS/Nが極端に悪くなっている。これは、①¹³C without CP 25°C NMRスペクトルが明瞭なピークを示したこと、②25°C CP/MASスペクトルで不明瞭であったプロパン鎖のピークが再び0°CのCP/MASスペクトルでは明瞭になったことから、プロパン鎖C7,C8炭素の分子運動によるC-H双極子-双極子相互作用の変調速度(約10⁻⁸s)が¹Hデカップリング磁場強度と同じ程度になったことを示している。このことはX線回折法による架橋プロパン鎖の中央の炭素原子がデイスオダ構造(Fig.4)を取っていることを暗示していると思われる。

[Pd(ppda)]・H₂Oのプロパン鎖が室温近くで約10⁻⁸sの運動をしているのに対し[Ni(ppda)]・H₂Oの室温でのプロパン鎖は同じ運動速度を示さなかった。これはNi(II)とPd(II)の特性の違い、即ち(1)電子拡大系列によればNi(II)はPd(II)よりd殻の広がり小さく共有結合性が弱まっている、(2)HSAB(Hard and Soft Acids and Bases)からはPd-Nは結合性が弱いのにに対してNi-Nは結合性が強い等の理由からM-N-C-C-C-N 6員環の結合角や距離に違いを生じさせていることによると思われる。

詳しくは緩和時間(T₁)測定を行なって明らかにする。

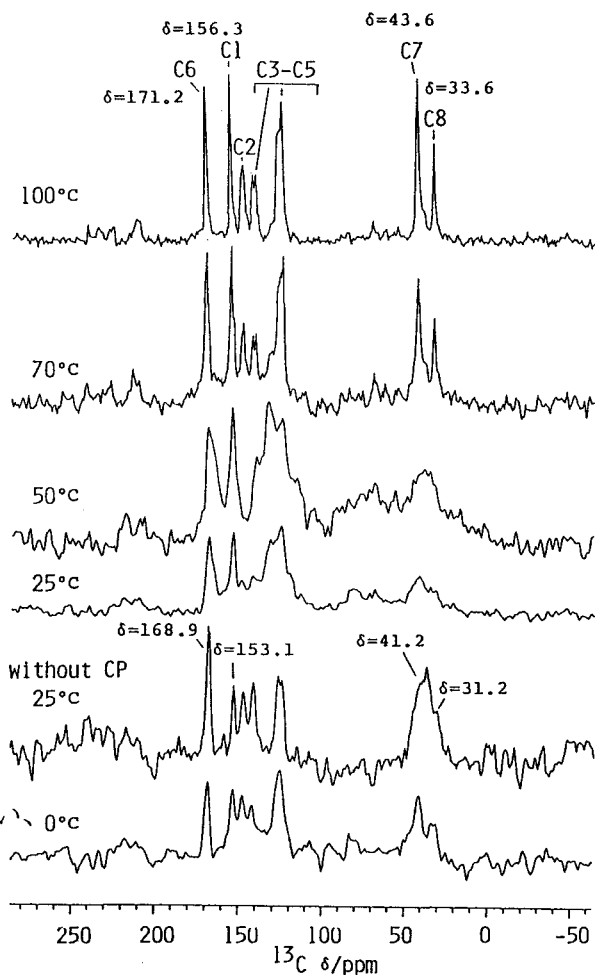


Fig.3 Temperature dependence ¹³C CP/MAS NMR spectra of [Pd(ppda)]H₂O(with ¹³C without CP spectrum at 25°C.

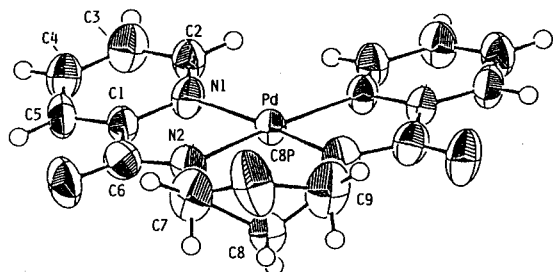


Fig.4 Perspective view of [Pd(ppda)]H₂O including the atom-numbering scheme.

Crystal Data	
Crystal system : Monoclinic	
Space group <i>PT</i>	
<i>a</i>	= 10.757(3) Å
<i>b</i>	= 10.958(5) Å
<i>c</i>	= 7.156(1) Å
α	= 100.78(2)°
β	= 97.52(2)°
γ	= 115.33(2)°
<i>Z</i>	= 2
<i>R</i>	= 0.058

[Pd(ppda)]・H₂O

P122

Ag_xCu_{1-x}I のイオン伝導相および超イオン伝導相における Cu 核の固体 NMR

金沢大 理 ○木村潤子、水野元博、遠藤一央、須原正彦
東工大 工 黒木重樹

Ionic and Superionic Conduct Phases of Ag_xCu_{1-x}I by Solid Cu NMR

Junko Kimura¹, Motohiro Mizuno¹, Kazunaka Endo¹, Masahiko Suhara¹ and Shigeki Kuroki²

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University and

²Tokyo Institute of Technology

Abstract

⁶³Cu NMR and X-ray diffraction have been used to perform a structure analysis of mixed crystal Ag_xCu_{1-x}I in the temperature range of -100 to 250°C. We observed two sites of signals of ⁶³Cu nuclei which correspond to the tetrahedral and octahedral centers in the temperature range of γ-to-α phase transition.

序

AgI は室温で閃亜鉛鉱構造の γ 相であり、146°C 以上で体心立方構造の超イオン伝導状態 α 相に相転移することが知られているが、Ag 核の固体 NMR は低感度で緩和時間が長いので観測されていない。そこで、我々は CuI と AgI の完全固溶体を作製し、結晶相の相転移を ⁶³Cu 核の NMR 観測から試みた。室温における Ag_xCu_{1-x}I の構造は、正四面体の中心に Cu または Ag が存在し、4 個の I が頂点に存在する(4 配位)。これに対し超イオン伝導状態では、立方体の中心に Cu または Ag が存在し、各側面の中心に I が 6 個配位した(6 配位) α 相に転移する。この相転移による構造の変化を NMR で分離する事ができた。また X 線回折より、Ag_xCu_{1-x}I の格子定数とケミカルシフトの関係を考察した。

完全固溶体、ケミカルシフト、相転移、結晶構造、Ag_xCu_{1-x}I

きむらじゅんこ、みずのもとひろ、えんどうかつなか、すはらまさひこ、くろき しげき

実験

①試料の作成

AgI と CuI をそれぞれ規定($x=0.75\sim 0.99$)のモル比で混合し、電気炉により 650°C で加熱した。生成した試料を乳鉢ですりつぶし、パウダー状にした。

② ^{63}Cu -NMR

Chemagnetics 社製 CMX-300 スペクトロメータを用い、観測周波数 79.12MHz で測定した。

ケミカルシフトは CuI を基準とした。

③ 粉末 X 線回折

理学 RINT 1200 を用いた。

結果および考察

① 粉末 X 線回折

Fig.1 に室温における $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ ($x=0.75, 0.85, 0.99$) の粉末 X 線回折パターンを示す。これらのパターンは試料の構造が閃亜鉛鉱構造であることを示している^[1]。これらの回折パターンから求めた格子定数と AgI 濃度に対するプロットを Fig.2 に示す。格子定数が AgI 濃度に対し Vegard 則に従っていることから、これらの試料が完全固溶体であるといえる^[2]。

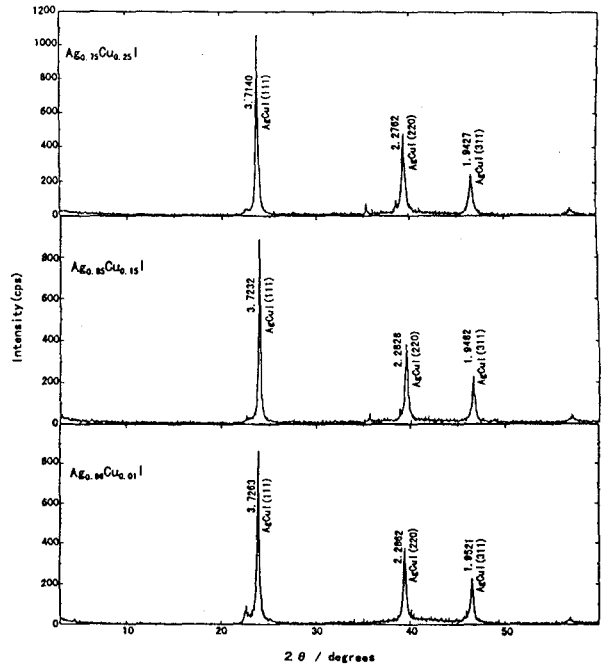


Fig.1 X-ray diffraction patterns of $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ ($x=0.75, 0.85, 0.99$).

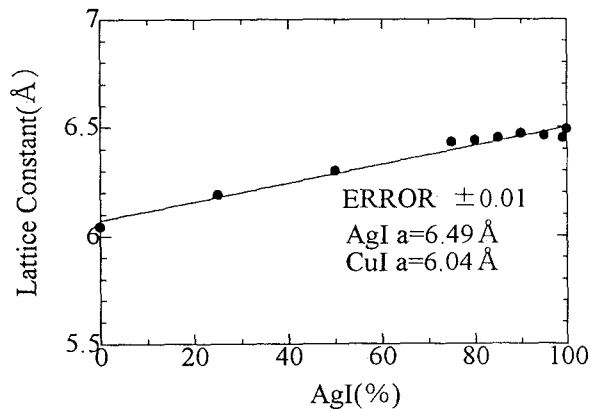


Fig.2 The unit cell dimension of $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ vs. Ag/Cu ratios.

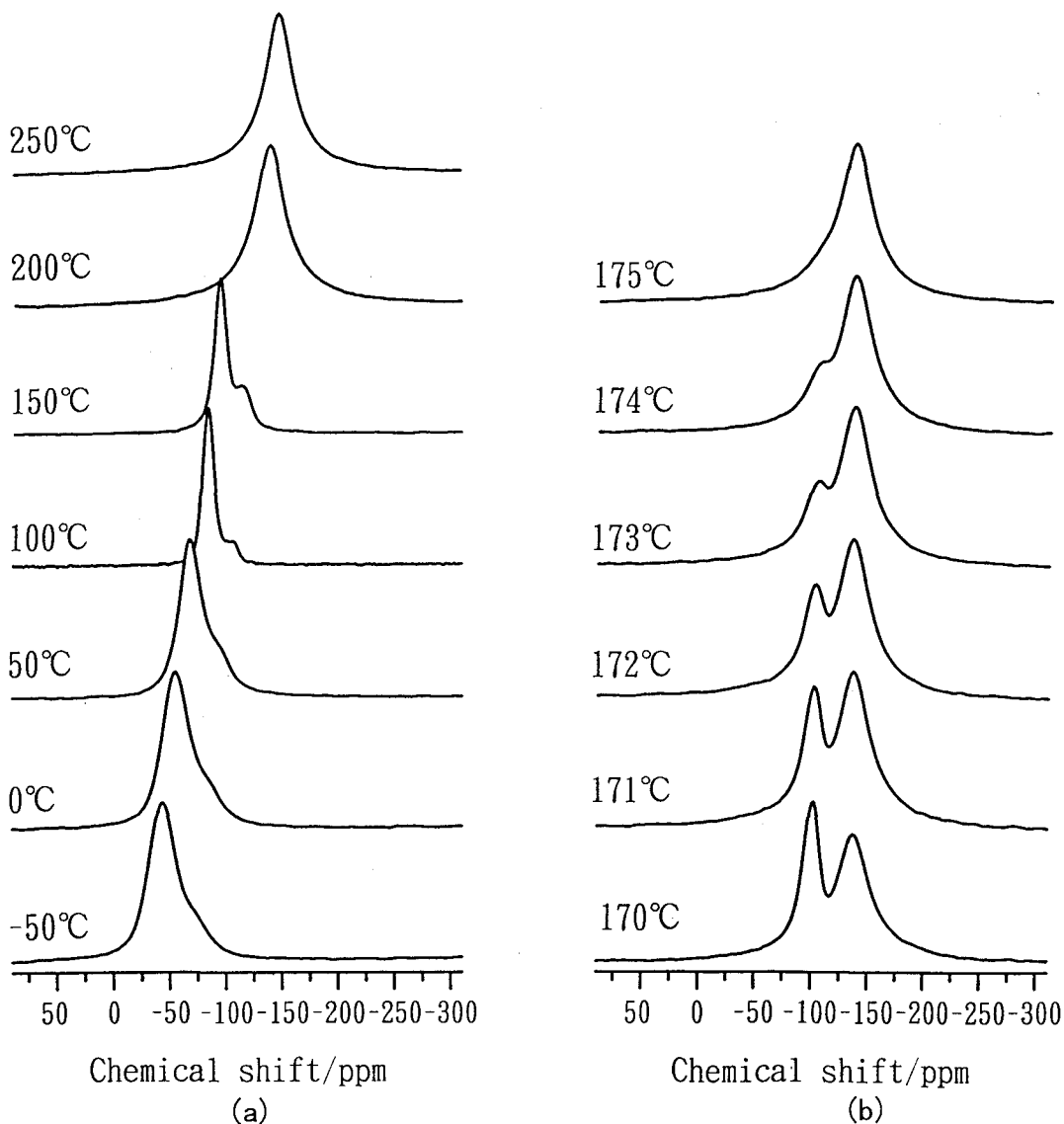


Fig.3 ^{63}Cu NMR spectra of $\text{Ag}_{0.95}\text{Cu}_{0.05}\text{I}$.

② ^{63}Cu -NMR スペクトル

Fig.3に $\text{Ag}_{0.95}\text{Cu}_{0.05}\text{I}$ の ^{63}Cu NMRスペクトルの測定温度 (a)-50~250°C および (b)170~175°C を示した。Fig.3 (a)のスペクトルは温度の上昇と共に高磁場側にシフトしている。この結果は、Olsenらによる $(\text{AgI})_{0.6}(\text{AgPO}_3)_{0.4}$ における ^{109}Ag NMRの-85~50°Cで観測された高磁場シフトに対応している^[3]。Fig.3 (b)では、相転移温度における2種のシグナルを観測できた。低磁場側のシグナルは T_d の中心に存在するCu核に対応するもので、温度170~175°Cの変化に対し、ピーク強度が極端に小さくなることがわかる。これに対し高磁場側のシグナルは O_h の中心にあるCu核に対応し、同じ温度範囲で強度が増大する結果が得

られた。この結果は $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ の導電率の研究^[4]から得られた γ 相から α 相に相転移する構造と対応するもので、 ^{63}Cu NMR では 2 種の構造を明確に観測できたわけである。 $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ ($0.75 \leq x < 1.00$) の超イオン伝導体の α 相における ^{63}Cu のシグナル[Fig.3 (a)の 200 および 250°C のスペクトル]は線形解析の結果 Lorentz 型が支配的であった。これは超イオン伝導体では、Cu サイトが液体状態に近い挙動をしていると考えられ、緩和時間の解析からも T_1 および T_2 が等しいことを確かめた。Fig.4 に ^{63}Cu のケミカルシフト測定から得た $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ ($0.75 \leq x < 1.00$) の相図を示した。これは Nolting による X 線回折から得られた相図とかなりよく一致している^[5]。

③ ^{63}Cu -NMR ケミカルシフト

Fig.5 に、 $x = 0.95$ 及び $x = 0.75$ 試料の ^{63}Cu -NMR スペクトルにおけるケミカルシフトの温度依存性を示す。どの試料も温度上昇に従い、ケミカルシフトは高磁場側にシフトすることがわかった。このケミカルシフトの原因として、I の 5p 軌道から Cu の 4s と 4p の空軌道に電子の寄与があり、それに対して Cu の 3d 軌道から I の 5p 軌道にバックドネーションが生ずる。このために Cu の 3d 軌道に hole ができる^[6]。これが高磁場シフトの主たる原因である。

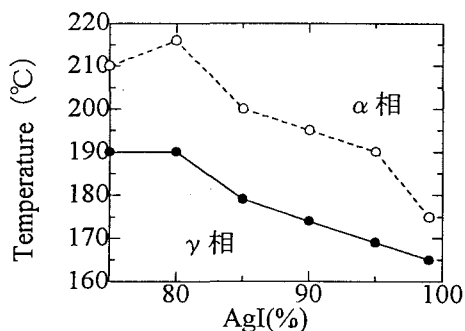


Fig.4 Phase diagram of $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ ($0.75 \leq x < 1.00$).

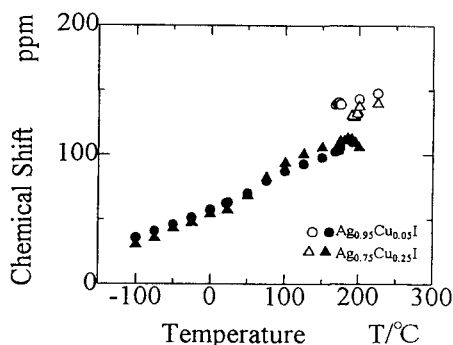


Fig.5 Temperature dependence of ^{63}Cu NMR chemical shift in $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ ($x = 0.75, 0.95$).

参考文献

- [1] K. Endo and T. Fujito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1860(1990).
- [2] L. Vegard and G. Skoftealand, *Arch. Math. Naturv.*, **45**, 163(1942).
- [3] K. K. Olsen and J. W. Zwanziger, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **5**, 123(1995).
- [4] M. Kusakabe, Y. Shirakawa, S. Tamaki and Y. Ito, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **64**, 170(1995).
- [5] J. Nolting, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **68**, 932(1964).
- [6] H. Nakatsuji, K. Kanda, K. Endo and T. Yonezawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4653(1984).

固体¹⁹F-MAS-NMRを用いた 含フッ素芳香族化合物の解析

(東工大) ○中村邦彦・安藤慎治・安藤勲
(日本電子) 杉沢寿志

Analysis of Fluoroaromatic Compounds by ¹⁹F MAS NMR in Solid

○Kunihiko Nakamura¹⁾, Shinji Ando¹⁾, Isao Ando¹⁾, Hisashi Sugisawa²⁾

¹⁾Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology. ²⁾JEOL

¹⁹F MAS NMR measurements were carried out for the polycrystalline samples of octafluoronaphthalene and tetrafluoro-1,4-benzoquinone. Octafluoronaphthalene showed four different peaks. It indicated that there are two different molecules in a unit lattice. Variable temperature measurements were also carried out and the principal values of ¹⁹F chemical shift tensor were determined using the method of Herzfeld and Berger. Molecular motion was discussed from the behavior of the chemical shift tensor.

【緒言】

ポリテトラフルオロエチレン (テフロン[-CF₂-CF₂-]_n) に代表されるように、含フッ素高分子は、低吸水性・低誘電率・撥水撥油性・化学的安定性・熱的安定性・難燃性などの優れた特性を示す。また、耐熱性高分子であるポリイミドにフッ素を導入したフッ素化ポリイミドは、既存のポリイミドに比べて、可視領域における透明性や非晶性が高く、耐熱性工学材料として優れた特性を示す。含フッ素高分子は、きわめて有用な高分子にも関わらず、一部のものを除いて不溶不融であるため、高温での分子構造の変化や固体状態におけるコンホメーション、及び、その電子状態については未だに明らかになっていない。

本研究では、上記の含フッ素高分子の立体構造解析への掛け橋として、含フッ素芳香族化合物を高速回転固体¹⁹F-MAS-NMRを用いて測定し、そのスピニングサイドバンド解析により、このフッ素核の化学シフトテンソルの値を正確に決定し、ここから、含フッ素化芳香族化合物の分子運動の解明を行うことを目的とする。

¹⁹F-NMR/MAS/固体/フッ素

なかむらくにひこ・あんどうしんじ・あんどういさお・すぎさわひさし

【実験】

本研究では、含フッ素芳香族化合物として、Aldrich社製のオクタフルオロナフタレン・テトラフルオロ-1,4-ベンゾキノンを、昇華精製して用いた。測定は、Chemagnetics社製のCNM-CMX 300MHzを用い、170K~370Kの範囲で温度を変えて行った。外部基準として、ヘキサフルオロベンゼン (-164.9ppm) を用い、 CFCl_3 (0ppm) に換算した。得られたスペクトルからの化学シフトテンソルの主値の算出には、HerzfeldとBergerによって発表された方法⁽¹⁾を用いた。

【結果】

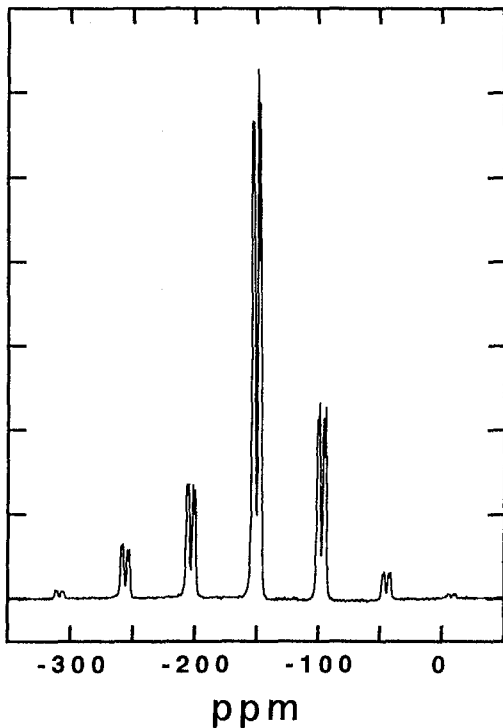


Figure 1. ^{19}F MAS NMR spectra of Octafluoronaphthalene (Spinning speed 15kHz, 300K)

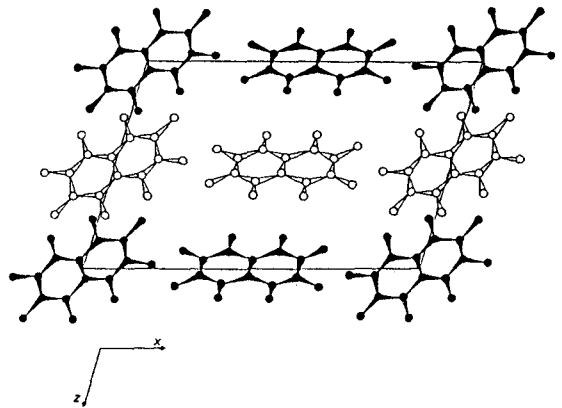


Figure 2. Projection of the low phase structure on to the (010) plane. Molecules drawn with open circles are displaced by $1/2b$ towards the observe (Ref. 4)

オクタフルオロナフタレンは、溶液のNMRでは2本のピークが見られるが、固体のNMRではピークが4本見られる。これは、結晶格子中に環境の異なる2つの分子が存在するためである。(Figure.1, Figure.2)

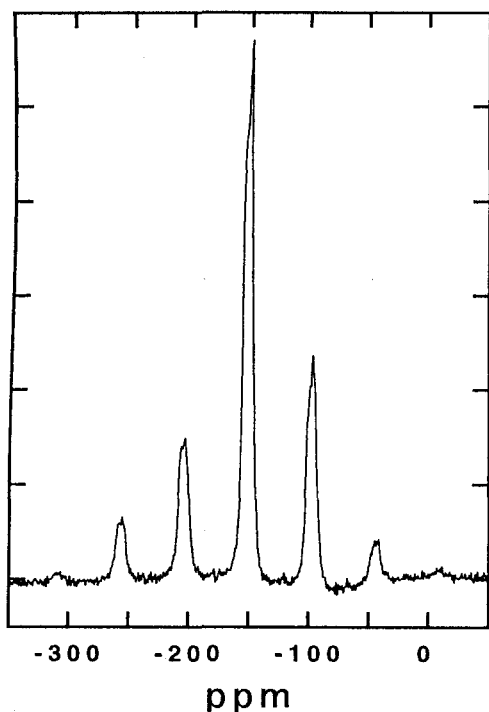


Figure 3. ^{19}F MAS NMR spectra of
Octafluoronaphthalene
(Spinning speed 15kHz, 200K)

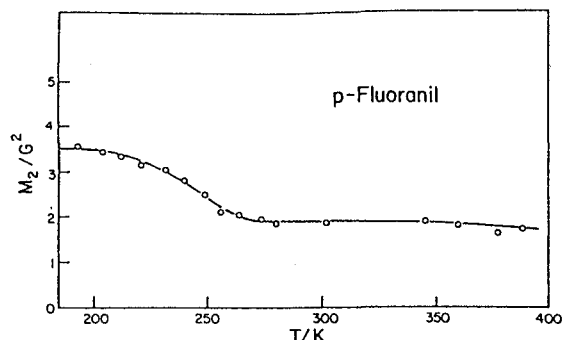


Figure 4. ^{19}F second moments as a function of
temperature for Tetrafluorobenzoquinone
(Ref.7)

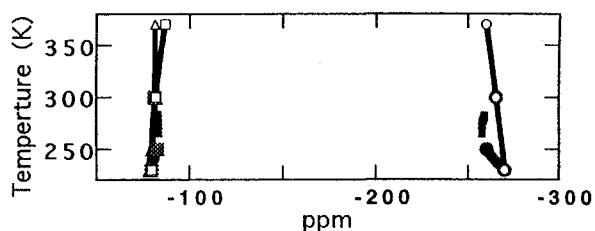


Figure 5. ^{19}F chemical shift tensor as a function of
temperature for Tetrafluorobenzoquinone

温度を変えて、オクタフルオロナフタレン・テトラフルオロベンゾキノンを測定したところ、オクタフルオロナフタレンは200K付近でスペクトルが急激に変化 (Figure 3) し、テトラフルオロベンゾキノンの化学シフトテンソルは、以前に測られた2次モーメント (Figure 4) から予想される振る舞いと異なった振る舞いを示した。 (Figure 5)

また、当日は、オクタフルオロナフタレン・テトラフルオロベンゾキノンの運動性についても発表する予定である。

【文献】

- (1) J.Herzfeld and A.E.Berger, *The Journal of Chemical Physics*, **1980**, No.73,6021
- (2) A.Del.Pra, *Acta. Cryst.*, **1972**, Vol.B28,3438-3439
- (3) G.S.Pawley,;O.W.Dietrich, *J.Phys.*, **1975**, Vol.8,2549-2558
- (4) G.A.Mackenzie,;J.W.Arthur,;G.S.Pawley, *J.Phys.*, **1977**, Vol.10,1133-1149
- (5) M.Mehring, R.G.Griffin, and J.S.Waugh, *J.Chem.Phys.*, **1971**, 55, 746
- (6) Robin.K.Harris,;P.Jackson,;G.J.Nesbitt, *Journal of Magnetic Resonance*, **1989**, Vol.85,294-302
- (7), J.A.Ripmeester, R.K.Boyd, *J.Chem.Phys.*, **1979**, 71 (12), 5167-5170

Solid-state Photodimerization of 9-Methylanthracene
As Studied by Solid-State ^{13}C NMR

Shinji Nakamura, Kiyonori Takegoshi, Takehiko Terao

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

To specify the locus of reaction in the solid-state photodimerization, a microscopic domain structure of solid 9-methylanthracene(9-MA) and its photodimerized product is studied by solid-state NMR. The photodimerization of 9-MA has been expected to occur randomly at its crystal lattice, however, the spin-diffusion data shows that 9-MA dimer forms a domain structure on the order of 100nm.

1.はじめに

反応が溶液で起きる場合と固体で起きる場合とでは反応生成物が異なる場合があることが知られている。それは、溶液反応の場合、分子はランダムに衝突して、反応生成物は反応分子自身の静電的性質により決めるのに対して、固体反応では格子構造中の分子の相対配向により反応生成物が決るからと説明されている。そのような例として、ジアセチレン置換体における結晶相重合反応がX線回折法を用いて研究されている。それによると反応する二重結合が0.4 nm以内にあり、結合が平行に近い場合に高重合性となることが示され、結晶格子中の配向が反応の大きな要因であることが示された。ジアセチレン置換体の重合反応は結晶構造を保ったまま進むためにX線回折法が適用できたが、他の多くの固相反応においては、反応途中で結晶構造が破壊されるためにX線回折法の適用は難しい。

結晶には理想的な繰り返しを持つ構造ばかりでなく、結晶表面、格子欠陥、反応物生成による結晶の歪みなどがある。光による二量化反応の場合に、これらの部位は吸収した光エネルギーのトラップとして働く可能性があるので、反応がこれらの場所で起きれば単量体の配列から予想された生成物とは違うものができることもある。従来は、反応生成物が結晶構造からの予想したものと一致しない場合には格子欠陥で反応が進むと説明されてきた。しかし、反応生成物が予想されたものと一致したとしても、もちろん、格子欠陥で反応が起こったのではない、ということにはならない。反応生成物の予想/制御という立場から考えると、反応の場所が(1)結晶の特異点、

キーワード：9-メチルアントラセン・光化学反応・二量化・スピン拡散・ ^{13}C NMR

なかむら しんじ・たけごし きよのり・てらお たけひこ

例えば、格子欠陥で起こるのか、(2)光を吸収したランダムな部位で起こるのかを明らかにすることは重要である。

そこで上記の問題を解明することを目的として、9-メチルアントラセン(9-MA)の二量化反応(図1)における二量体の微視的分布構造を、固体NMRを用いて研究した。9-MAは結晶の単量体の配向から予想される二量体の構造と実際の生成物が一致している上に、分子間の距離が0.4 nm以内にあり、単量体の配向も二量体の構造に近いために、反応は結晶中のランダムな部位で起きていると思われていた。しかしながら、はっきりした分光学的な根拠はない。そこで¹Hのスピンの拡散を測定して二量体のドメイン構造を調べた。

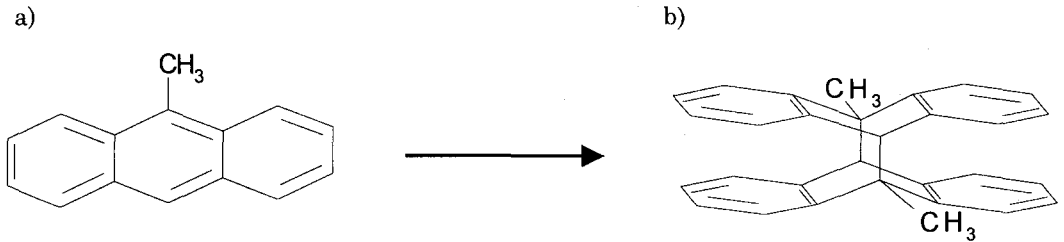


Fig. 1 Structure of a) monomer(M) and b) trans-dimer(D)

2.実験

9-MAの固相反応はヘキサンから再結晶化したものを乳鉢で粉末にして、水に懸濁させて激しく攪拌しながら高圧水銀ランプの光を照射して行った。

NMR測定はChemagnetics社製CMX300分光計により行った。 T_1 はinversion recovery法(IR法)で測定した。

3.結果と考察

図2は下から照射時間が a)0、b)30分、c)240分の9-MAの¹³Cスペクトルを示す。a)は純粋な単量体のスペクトル。b)では単量体と二量体が半々位の混合物になっている。二量体のピークとして25.5ppm、51.2ppm、64.9ppmにメチル基、四級炭素、メチン基が観測された。メチル基の線幅はかなり広いがこれは水素橋頭位により回転運動が束縛されているためと考えられる。c)ではほぼ100%二量体になっていると思われる。

図3にIR法により得られた磁化の減衰を示す。異なる分子間のスピンの拡散を考慮にいたれた T_1 曲線の計算を行うのにいろいろなモデルがあるが、ここでは最も単純な二相モデルを採用した。単量体をM、二量体をDとしたときの各々の¹H磁化のIR法下での緩和曲線は

$$\begin{aligned} A(t) &= a_+ e^{r_+ t} + a_- e^{r_- t} \\ B(t) &= b_+ e^{r_+ t} + b_- e^{r_- t} \end{aligned} \quad (1)$$

と、得られる。

ここで、

$$\begin{aligned} r_{\pm} &= 1/2[-(K_D + K_M + k_c) \pm R] \\ a_{\pm} &= A_0 [1 \pm R^{-1}(K_M + k_c - K_D)] \end{aligned}$$

$$b_{\pm} = B_0[1 \pm R^{-1}(K_D + k_c - K_M)]$$

$$R = \{[(K_D - K_M) + (f_D - f_M)k_c]^2 + 4f_D f_M k_c^2\}^{1/2} \quad (2)$$

A_0 、 B_0 は $t=0$ における信号強度。 K_D 、 K_M と f_D 、 f_M はそれぞれ成分 D、M の緩和速度、スピン濃度分率、そして k_c は交差緩和速度である。 K_D 、 K_M は単量体および 240 分照射した二量体より測定したもの($K_D=0.09036 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_M=0.00655 \text{ s}^{-1}$)を用いた。

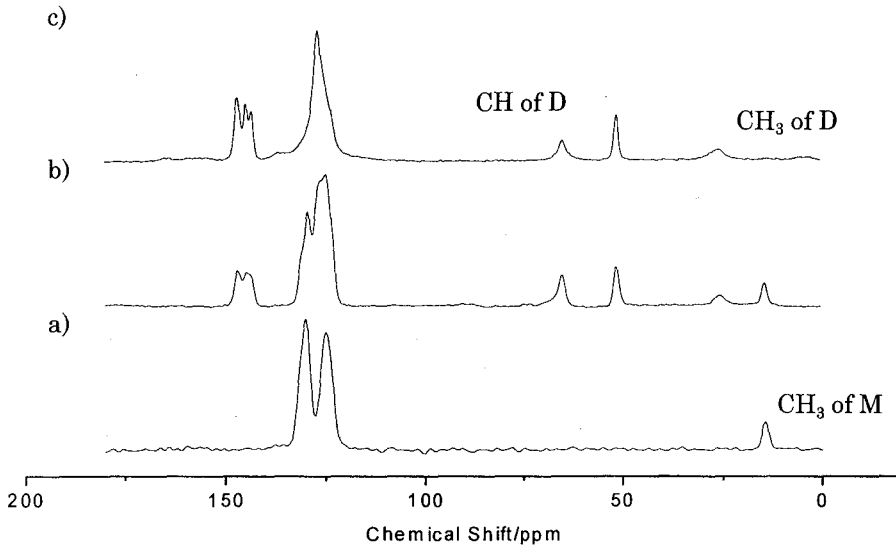


Fig. 2 ^{13}C solid-state NMR spectra for 9-MA. a) pure monomer, b) 9-MA irradiated for 30 minutes, c) 9-MA for 4 hour. M and D written in the Fig. stand for monomer and dimer, respectively.

図 3 の直線は反応前の単量体の緩和曲線を、点線および破線は 10 分、240 分照射のときに、 k_c 、 f_D 、 f_M を変数として式(1)でフィットした曲線をあらわしている。観測値と計算値は良い一致をしている。

10 分照射した後の D の緩和曲線では、約 15 秒で曲線の傾きが変わっており、二量体ドメインの存在を示している。拡散定数を $D=8 \times 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$ と仮定してドメインサイズを見積もると、約 100nm であった。さらに、いろいろな照射時間での緩和曲線の解析からドメインが大きくなっていく様子が観測された。これは二量化反応が結晶の格子欠陥部位で起こり、さらに二量体生成に伴って形成された周辺の格子欠陥部位で反応が起こり、ドメインが成長していることを示している。9-MA において固体の二量化反応における上記の準経験則が「一見」成立しているようにみえるのは、単にトランス型がシス型よりも安定だからであるからと考えられ、固体反応において結晶構造により反応生成物の構造を制御/予想することは難しいことが示された。

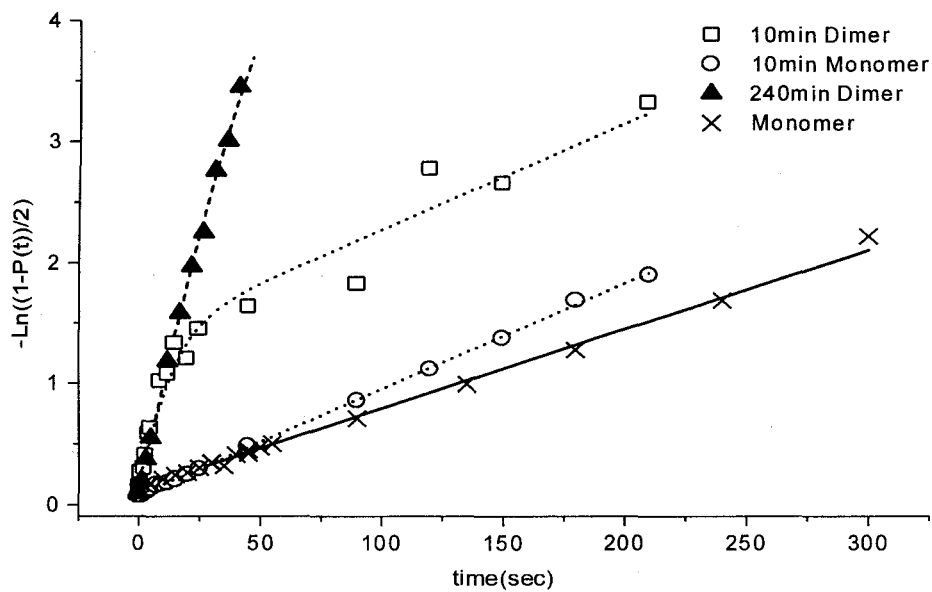


Fig. 3 The ^1H T_1 Relaxation curve for 9-MA(M) and the photodimerized 9-MA(D). $P(t)$ denotes the normalized intensity. The solid line, the dotted lines and the broken line represent the best-fit curve using eqs.(1) and (2) for pure 9-MA, the photo-irradiated solid for 10 minutes and those for 4 fours, respectively,

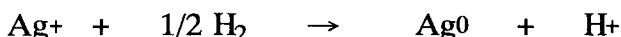
Dynamic and Catalytic Property of protons in Ag-Y Zeolite,
(Tokyo Institute of Technology) Toshihide Baba, Norito Komatsu, Yuki Morikawa and Yoshio Ono, (JEOL) Hisashi Sugisawa, (Japan Energy) Toshiro Takahashi.

A temperature dependent line-shape of protons in Ag-Y and $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ was examined at a temperature range between 25 and 200°C. Ag-Y generated two kinds of protons when Ag-Y was reduced with hydrogen. The line widths of the two kinds of protons broadened and the peak approached each other upon raising temperature. They merged into one peak around 180°C. These result show that a proton exchange reaction proceeds between two kinds of protons.

$\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ also generated two kinds of protons by reducing it with hydrogen. The proton exchange reaction between two kinds of protons proceeded as well as Ag-Y, while temperature dependence of the line width was not observed for parent acid $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$.

1) 緒言

講演者らはプロトン交換ZSM-5ゼオライトのプロトンの運動性が触媒活性に影響を及ぼすことを既に報告している。プロトン交換 ZSM-5 ゼオライトばかりでなく H-Yゼオライトや $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ の固体酸性は酸性 OH 基に帰因する。これらの触媒は n-ヘキサンをはじめ種々の反応に固体酸触媒として高い活性を示す。一方、 H^+ が Ag^+ イオンである Ag-Y ゼオライトや $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ の酸性は、 Ag^+ イオンが水素で還元されることによって発現する。



このとき、触媒活性は水素が共存することによって飛躍的に増大し、H-Yゼオライトや $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ の活性よりも高い活性を示す。そこで本研究ではこれらの固体酸中のプロトンの性質、特にプロトンの運動性を温度可変 $^1\text{H MAS NMR}$ によって調べた。

2) 実験

Ag-Y ゼオライトはNa-Yゼオライトを AgNO_3 溶液を用いて、イオン交換法によって調製した。 $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ は $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ と Ag_2CO_3 との中和反応によって調製した。

$^1\text{H MAS NMR}$ 測定は、Chemagnetics CMX-Infinity を用い、試料をガラスアンプル中に封管することによって行った。測定温度は室温から100°Cまたは200°Cである。

3) 実験結果

Ag-Yのプロトンの性質

Ag-Yを水素で還元した後、水素共存下で $^1\text{H MAS NMR}$ を測定した。室温では酸性プロトンに帰因したプロトンが4.6 ppm と4.0 ppmに観測される(図1)。前者は図2に示したソーダライトケージに、後者はスーパーケージに存在するプロトンである。こうしたプロトンのケミカルシフトは、H-Y型ゼオライトのプロトンも同じケミカルシフトを示す為、殆ど区別がつかない。水素共存下で測定温度を上げて測定したところ、室温付近で観測されていた2本のピークは180°C付近では1本のピークに変化した。このことは二種類のプロトン間で交換を起こしていることを示している。こうした現象に対して、H-Y型ゼオライトの酸性プロ

ゼオライト、 $^1\text{H MAS NMR}$ 、運動性、水素還元

ばばとしひで、こまつのりと、もりかわゆき、おのよしお、すぎさわひさし、たかはしとしろう

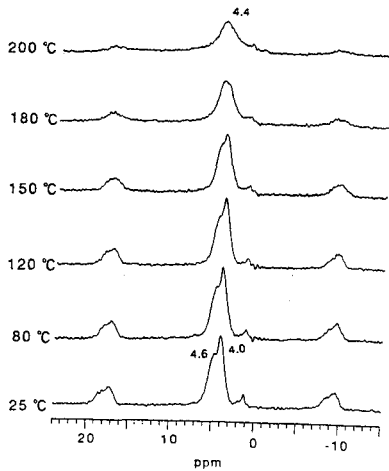


図1 ^1H MAS NMR spectra of Ag-Y reduced with hydrogen

トンに帰因するピークの線形には、温度を変化させても大きな変化が観測されない。従って、Ag-Yに発現したプロトンはH-Yのプロトンの性質と異なることを示している。先に述べたH-ZSM-5の結果を考えると、Ag-Yに発現したプロトンはおそらく運動性が高く、容易に交換反応をおこすものと思われる。

部分的に還元した $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ のプロトンの性質

$\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ のプロトンもAg-Yゼオライトの場合と同じ様に、銀イオンが水素によって還元されることによって発現する。 ^1H MAS NMRで測定すると、発現したプロトンのピークが9.2ppmと6.4ppmに観測される。ここで6.4ppmに観測されるプロトンは水素が共存するときにだけ観測され、その量は水素の圧力の変化によって可逆的に変化する。言い換えると、水素が共存すると6.4ppmのプロトンが観測される。測定温度を上げて ^1H MAS NMRを測定したときのスペクトル変化を図3に示した。水素共存下で昇温すると2種類のプロトンの間で交換がおこる。

一方水素が共存しない場合には、9.2ppmのプロトンだけが観測される。この時、温度を高くして ^1H MAS NMRを測定してもそのピークの線形は殆ど変化しない。これはプロトン同士の交換が起こるときには、6.4ppmのプロトンが9.2ppmのプロトンの所に移動することによって交換を起こしていることを示している。

$\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ のプロトンのケミカルシフトは9.0ppmであった。このピークの線形は、温度を上げて測定しても線形は100°Cでは室温と同じであった。これは $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ のプロトンの運動性は $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ のそれに比べ低いことを示している。

水素で還元した $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ を用いて、ヘキサンの異性化反応には9.2ppmのプロトンは触媒活性を示さず、6.4ppmのプロトンだけが活性を示す。 $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ 自身の活性よりも水素で還元した $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ の活性は高いものであった。こうした触媒系においても運動性の高いプロトンは高い活性を示している。

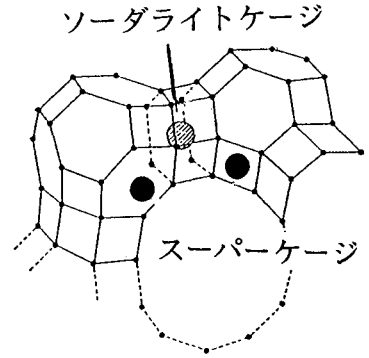


図2 Structure of Y-zeolite

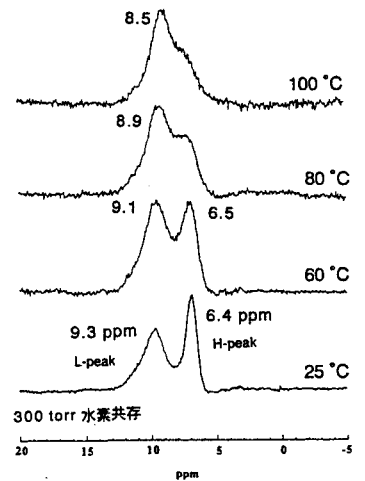


図3 ^1H MAS NMR spectra of $\text{Ag}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ reduced with hydrogen

岡田明彦	P67	鴨 修	P6	小泉美香	P79
緒方一博	P28	川上 勝	P1	神田大輔	P26
緒方啓典	P112	川口 謙	P24	神田大輔	P27
岡林博文	P56	河野敬一	1L6	神田大輔	P43
岡林博文	P57	川端 潤	P3	河野俊之	1L8
岡村英保	P33	川畑俊一郎	1L6	河野俊之	P15
岡本和也	P77			河野俊之	P16
岡本和也	P80		(き)	河野俊之	P20
岡本 弘	P103	木川隆則	1L11	河野俊之	P22
岡本真名武	1L5	木川隆則	P37	河野俊之	P23
小川秀次郎	P79	木川隆則	P38	越川城大	P35
荻野孝史	P81	木川隆則	P39	小嶋茂雄	P98
奥野恭史	P61	菊池 章	1L11	小嶋茂雄	P99
奥村 康	1L12	菊地 淳	P68	巨瀬勝美	3L11
小椋賢治	1L12	木口英幸	P110	巨瀬勝美	P70
小椋賢治	P45	北川 進	3L8	巨瀬勝美	P71
小椋賢治	P46	紀ノ定保臣	P50	小寺義男	P16
尾崎 淳	P31	木下隆利	P100	小寺義男	P23
尾崎拓男	P107	金 載一	P16	後藤祐児	1L3
尾崎拓男	P89	金 載一	P20	小林邦子	P20
押尾晃一	P77	金 美希	1L8	小林将俊	P101
小田耕平	P13	木村敦臣	P66	小林将俊	P97
小田正記	P77	木村一雄	P24	小松一男	P55
小田正記	P80	木村成輝	P90	小松法仁	P125
落合誠二郎	3L7	木村潤子	P122	小松博義	P16
小野裕嗣	P54	木村皓俊	P47	五味雄一郎	P59
小野嘉夫	P125	木村英昭	P89	近藤 満	3L8
		京極好正	1L10		
		京極好正	1L9		
		京極好正	P11	齐田 理	3L4
		京極好正	P12	齋藤公児	3L10
				齐藤 肇	1L5
			(く)	齐藤 肇	P85
		楠 英樹	P15	齐藤 肇	P90
		楠 英樹	P22	齐藤 肇	P92
		楠 正美	P10	齐藤 肇	P93
		久保 厚	P86	蔡 東玲	P49
		栗林秀人	P78	佐伯純一	1L8
		栗原範明	P4	坂倉正義	1L7
		栗原靖之	1L8	阪本興彦	P55
		黒木重樹	3L5	坂本泰一	P23
		黒木重樹	P122	櫻井 実	P83
		黒子弘道	P95	佐々木元子	P28
		黒子弘道	P97	佐々木康人	P73
		黒田一幸	P113	笹平理朗	3L4
		黒田義弘	P64	佐藤一紀	P15
		黒田義弘	P65	佐藤一紀	P16
		黒津卓三	P96	佐藤一紀	P20
		桑田一夫	1L3	佐藤康一	P36
		桑原大介	P111	佐藤大輔	P83
		桑原大介	P84	佐藤 一	P54
				佐藤 一	P67
			(こ)	皿井明倫	P28
		小泉美香	P75		

(か)

(さ)

	(し)		多賀圭次郎	P57	手島圭三	P41
四釜慶治	P35		高橋征三	P36	手塚智子	1L1
柴田武彦	P23		高橋征三	P81	出村 誠	3L4
柴田武彦	P39		高橋俊朗	P125	出村 誠	P114
柴田武彦	P42		高橋知巳	P46	出村 誠	P32
島 圭吾	P52		高橋栄夫	1L7	寺内 勉	1L4
嶋田一夫	1L7		高松 翼	P55	寺尾武彦	P86
嶋田敬三	P68		高宮尚武	3L12	寺尾武彦	3L1
嶋田陽子	3L8		高本研二	P66	寺尾武彦	P124
清水昭夫	P63		高山俊夫	P121	寺尾武彦	P87
清水秀明	P76		竹川政克	P100	寺尾武彦	P91
莊司 顯	3L3		竹腰清乃理	P124	寺沢宏明	P21
莊司 顯	P107		竹腰清乃理	P87	寺沢宏明	P45
莊司 顯	P110		竹腰清乃理	P91	寺田 透	P38
莊司 顯	P89		武田 定	P104	寺田 透	P39
小代俊浩	P43		武田 定	P109	照屋健太	1L9
白川昌宏	1L10		竹丸憲一	P31		
白川昌宏	P31		田隅三生	P47		
白川昌宏	P40		楯 真一	1L4	土肥義治	(と) P58
白水美香子	1L11		楯 真一	P13	戸澤加江子	P29
白水美香子	P38		田中一二三	P64	戸澤秀樹	P16
新藤由利子	1L5		田中亀代次	1L10	朽尾豪人	P12
榛葉伸久	1L7		田中剛史	P22	友森チエリ	P14
			田中俊之	P14		
	(す)		田中富士枝	1L7		(な)
末武徹也	1L6		田中陽子	P64	内藤 晶	1L5
末松浩人	P4		田中良二	P5	内藤 晶	P85
末松浩人	P5		谷生道一	P92	内藤 晶	P90
菅原義之	P113		谷口吉弘	P63	内藤 晶	P92
菅原 正	P111		田畑米穂	P116	内藤 晶	P93
杉浦眞喜子	P49		田林一晃	P69	永井直樹	P25
杉浦幸雄	P61		田村将銘	P121	永井直樹	P50
杉江隆徳	P103		田村 充	P2	中井利仁	P105
杉沢寿志	P125				中井利仁	P84
杉沢寿志	P116			(つ)	長岡正司	1L8
杉沢寿志	P123		塚田裕三	P77	永尾 隆	1L5
杉沢寿志	P88		塚田裕三	P80	中川照眞	P64
杉沢寿志	P89		塚原智典	P16	中川照眞	P65
鈴木榮一郎	P52		月城聖一	P66	永阪文惣	P117
須原正彦	P122		辻 暁	1L5	中沢賢一	P18
住本英樹	P26		辻 暁	P85	中島 寛	P113
			辻 暁	P90	永田宏次	P46
	(せ)		辻 暁	P92	永田宏次	P47
瀬尾芳輝	3L12		辻 暁	P93	永田 崇	1L8
瀬口忠男	P116		辻田義治	P100	長土居有隆	P18
瀬戸治男	P7		津田 栄	1L6	長土居有隆	P33
			土田信夫	P23	長土居有隆	P34
	(そ)		土屋滋夫	P45	長友重紀	P94
曾我美 勝	P25		土屋文彦	1L2	中西洋志	P48
曾我美 勝	P50		堤 耀広	P114	中村邦彦	P123
			鶴田千夏	P68	中村新治	P124
	(た)				中村亘男	P117
田井利弘	P118			(て)	中村亘男	P94
高木達也	P62		出口健三	P89	中村春木	P21

中山尋量	P117	久松久美子	P29	三森文行	P74
那須裕郷	P65	平沖敏文	P114	三原啓明	P73
		平賀和三	P13	宮内 実	P100
(に)		平賀 隆	P9	宮島清一	P111
西川忠輝	P34	平野利好	P22	宮島清一	P112
錦戸條二	P17	廣明秀一	P26	宮島清一	P8
西中太郎	P42	廣明秀一	P27	宮島清一	P84
西村勝之	P85	広瀬 進	P31	(む)	
西村善文	P18	廣中俊也	P95	武藤隆則	P27
西村善文	P28	(ふ)		武藤 裕	P19
西村善文	P33	福井洋之	P60	武藤 裕	P39
西村善文	P34	福岡美香	P59	村上克彦	1L9
西山幸三郎	1L4	福士江里	P3	村上勝彦	P11
新田勝利	1L6	福原忠雄	P55	村上正志	3L5
		福山恵一	P36	村松 喬	P47
(の)		藤井郁雄	1L7	(も)	
野上 隆	P109	藤井文志	P53	持田智行	P111
野中正幸	P105	藤井信孝	P64	森川耿右	1L10
野村 薫	P87	藤井信孝	P65	森川耿右	P27
		藤原敏道	3L2	森川有紀	P125
(は)		藤原英明	P62	森田哲史	1L11
拝師智之	3L11	藤原英明	P66	森田哲史	P38
拝師智之	P70	文野浩一	P63	守田理恵	P65
拝師智之	P71	降旗一夫	P7	守谷哲郎	P76
橋元 親夫	P85	(ほ)		守谷哲郎	P9
橋本康博	P17	星野 大	1L3	(や)	
長谷川憲一	P5	細谷東一郎	P36	八木宏昌	P29
島中秀樹	1L12	堀井文敬	3L6	安野和浩	P12
島中秀樹	P28	堀井文敬	P118	柳沢 勝	P51
島中秀樹	P45	堀井文敬	P119	柳田保子	1L8
島中秀樹	P46	(ま)		矢吹 孝	P37
島中秀樹	P47	前川利男	P18	山内一夫	P67
秦野賢一	P110	前田忠計	P16	山内美穂	P102
服部憲和	P56	牧野耕三	P33	山口 兆	P109
服部憲和	P57	正木春彦	P39	山口 悟	P93
服部峰之	P76	増井大二	P94	山腰良晃	P5
服部峰之	P9	増田憲二	P119	山崎和彦	P38
花岡慎悟	P33	松井 茂	P105	山崎俊夫	1L9
羽田勝二	P17	松井 裕	1L4	山崎俊夫	P11
馬場雄久	P60	松岡有樹	P35	山崎俊夫	P12
馬場俊秀	P125	松川真吾	P115	山崎俊正	P68
林 繁信	P113	松坂裕之	3L8	山崎俊正	P116
林 繁信	P120	松澤義治	P107	山崎俊正	P14
林 繁信	P94	松島 秀	P50	山崎俊正	P41
林 宗市	3L1	松本 大	P65	山田博昭	1L1
早水紀久子	3L7	丸田悟朗	P109	山田博昭	P30
早水紀久子	P51	(み)		山根一祐	P74
原園としえ	3L9	三島正規	P31	山本 薫	P108
半田 宏	P31	水上富士夫	P108	山本敬三	P17
(ひ)		水野 敬	1L5	山本泰彦	P35
樋岡克哉	P88	水野元博	P122	(ゆ)	
引地邦男	1L6				
肥後順一	P21				

結城敏文	1L12	Liu D.	P14
湯沢 聡	P45	Loach P.A.	P68
		Mandiyar V.	P45
	(よ)	Meier B. H.	3L4
横田絵美子	P53	Navon G.	3L12
横地政志	P10	Opella S.	P17
横山茂之	1L11	Parkes-Loach P.S.	P68
横山茂之	P19	Price W. S.	3L7
横山茂之	P37	Price W. S.	1L2
横山茂之	P38	Rajesh S.	P23
横山茂之	P39	Reichert D.	P91
横山茂之	P42	Seeram S. S.	P13
吉岡澄江	P98	Schlessinger J.	P45
吉岡澄江	P99	Sharf Y.	3L12
吉川宏起	P72	Shinar H.	3L12
吉田圭一	P47	Sun B.-Q.	P82
吉田賢右	P29	Tong K.	P14
吉野明広	P56	Valentine K.	P17
吉野明広	P57	Vashchenko A.	P62
吉水広明	P100	Williamson M.P.	P32
吉村祥子	P34	Williamson M.P.	P68

	(わ)		
若松 馨	P110		
若松 馨	P15		
若松 馨	P22		
和田敬四郎	P41		
渡部徳子	3L9		
渡部徳子	P115		
渡辺尚彦	P59		
渡邊英宏	P77		
渡邊英宏	P80		

	(A~Z)		
Afonin A.	P62		
Batt C.A.	1L3		
Benedict C.	P104		
Billah M.M.	P48		
Bluemich B.	3L10		
Bluemler P.	3L10		
Conroy M.J.	P68		
Dubovskii P.	1L1		
Griffin R.G.	P82		
Hazlewood C.F.	P75		
Heger A.	P21		
Hunter C.N.	P68		
田 栄浩	P12		
Kalbitzer H.R.	1L1		
Langer U.	P104		
李 奉振	1L9		
李 俊	P58		
李 華	1L1		
李 華	P30		
Limbach H. H.	P104		

	(R)		X線構造解析	3L8
R 2 T R 法		P87		
Ras		1L11		(Y)
Ras		P37	⁸⁹ Y-MAS	3L9
Ras(P34G)		P38	Y ₂ O ₂ S	3L9
RecA		P42		
REDOR		P90		(あ)
Relativistic effect		P60	アーチファクト	P71
RF磁場		P73	アカムシユスリカ	P35
RGL		1L11	アキレス腱	3L12
RNA Polymerase		P12	アサガオ	P75
RNA polymerase		1L9	アトピー性疾患	1L12
RNAポリメラーゼ		P11	アミドプロトン	P10
RNA結合蛋白質		1L8	アラニン	P52
RNAbinding domain		P19	アルカリ金属臭化物水溶液	P63
ROESY/MAS		P66	圧力	1L1
			圧力	P30
	(S)		安定同位体	1L4
²⁹ S i C P / M A S N M R		P113	安定同位体ラベリング	P68
29SINMR		3L5	安定同位体間	P13
S4		P24	安定同位体標識	3L2
SELF-DIFFUSION-COEFFICIENT		P8	安定同位体標識	P37
SH2		P45	安定同位体標識ペプチド	P15
SH3		P21		
SH3ドメイン		P26		(い)
Shc		P45	イミダゾール誘導体	P94
simulated annealing		P21	イメージング	P76
spin-lock		P82	インスリン	P99
Splicing		P19	異種核間双極子相互作用	P84
Syn-anti異性体		P52	異種核多次元NMR	P31
			異常ヘモグロビン	P25
	(T)		異方性	P74
T2c		P103	遺伝子修復	1L10
TBP		P31	一次元超格子	P108
Three-Dimensional Structure	P40			
Tom20p		P43		(う)
transferred NOE		P42	ウナギカルシトニン	P17
T R F 1		P34	運動性	P125
triple resonance spectroscopy		1L9	運動性	P93
triple-resonance NMR		P23		
TRNOE法		P22		(え)
Tyr		P29	エチレン・ビニールアルコール	P97
			エンジン	P61
	(W)		液晶	P69
water diffusion		P59		
	(X)			(お)
¹²⁹ Xe		P9	オフレゾナンス照射	1L3
¹²⁹ Xe NMR		P100	温度ジャンプNMR	P1
¹²⁹ Xe-NMR		P117	温度校正	P109
X-線結晶解析		P36		(か)

ガラス転移温度	P98	ゲル	P97
化学シフト	P110	結合水	P25
化学シフト	P89	結晶構造	P122
化学シフト異方性	3L4	結晶多形	P85
化学シフト異方性	3L6	原がん遺伝子産物	P28
化学シフト画像	3L12	原子間距離測定	P85
化学シフト画像	P78		
化学交換	P93	(こ)	
化合物半導体	P4	コアクティベータ	P46
画像再構成	3L11	コリシン	P39
会合数	P56	コンタクトシフト	P109
回転座標系	P76	コンフォーメーション	P58
回転相関時間	P63	コンフォーメーションの多形性	P38
回転偏光	P9	コンホメーション	3L3
界面活性剤	P11	コンホメーション	P106
界面活性剤-蛋白質間相互作用	P92	コンホメーション	P107
拡散	P74	コンホメーション	P110
拡散係数	P115	コンホメーション	P89
核四極相互作用	P120	コンホメーション変化	P57
核双極子相互作用	3L2	固体	P123
活動電流	P72	固体 ¹⁰⁹ Ag NMR	3L8
完全固溶体	P122	固体 ³ H NMR	P114
感度	P4	固体2次元NMR	3L4
緩和時間	3L10	固体NMR	3L2
緩和時間	P115	固体NMR	P108
緩和時間	P13	固体NMR	P113
緩和時間	P52	固体NMR	P116
		固体NMR	P120
(き)		固体NMR	P121
キシロースイソメラーゼ	P54	固体NMR	P88
希ガス	P9	固体NMR	P91
気体収着特性	P100	固体NMR	P97
偽像	P71	固体イメージング	P105
逆平行βシート構造	3L4	固体構造	P118
逆平行βシート構造	P114	固体高分解能 ¹ H NMR	P89
距離測定	3L1	固体高分解能NMR	P103
局所スペクトル	P79	固体高分解能NMR	P85
極低温 ¹⁵ N-CP/MAS NMR	P104	固体高分解能NMR	P90
金属錯体	P121	固体高分解能NMR	P92
銀(I)錯体	3L8	固体高分解能NMR	P93
絹フィブロイン	3L4	固体重水素NMR法	P68
絹フィブロイン	P114	固体粉末試料	P87
		交差緩和	P49
(く)		光化学反応	P124
グラウンド	P5	抗菌活性	1L6
グラウンド・インピーダンス	P5	抗原認識部位	1L7
クロスポーラリゼーション	P113	構造	P20
		構造解析	1L6
(け)		構造解析	P32
ケミカルシフト	P122	構造解析	P90
ゲル	P101	構造決定	P15

高圧NMR	P101	水性状	P50
高次構造	1L11	水素	P112
高磁界プローブ	P5	水素還元	P125
高速イメージング	P70	水素結合	1L1
高分子ゲル	P50	水素結合	P109
高分子のガラス状態	P118	水素結合	P119
高分子間相互作用	P115	水素結合	P30
合成高分子	P53	水素結合	P58
合成高分子	P67	水素結合	P94
混晶	P108	水素結合	P97

(さ)

サポナイト	P102
差スペクトル	P36
三重共鳴三次元NMR	1L12
酸素17	P2

(し)

ジアミド配位子	P121
ジェミニ界面活性剤のspacer効果	P56
ジェランゲル	P115
ジスルフィド結合	1L6
ジスルフィド結合	P20
ジブカイン	P64
ジブカイン	P65
脂質-蛋白質間相互作用	P92
脂質二重層	P90
時間変化	P81
磁化移動	P50
磁化率	P78
磁場配向	1L5
主鎖の帰属	P38
重水素NMR	P111
重水素NMR	P86
重水素ロック	P67
重水素化	P11
重水素化蛋白質	P22
重水素交換	P17
重水素誘起相転移	P111
常磁性シフト	P35
状態相関2次元法	P1
触媒抗体	1L7

(す)

スピン-格子緩和速度	P63
スピン拡散	3L4
スピン拡散	P103
スピン拡散	P124
スピン拡散	P86
スピン拡散	P91
スピン結合定数	1L4

(せ)

ゼオライト	P125
セミマイクロLC	P55
セリン	P114
制限拡散	P75
成長因子	P47
整合-不整合相転移	P111
生体膜	P83
生理活性ペプチド	1L5
静電相互作用	P64
赤色蛍光体	3L9
選択的プロトン標識	P23
選択的緩和法	P49
選択的重水素化	P29
前置増幅器	P4

(そ)

ゾルーゲル反応	P113
疎水コア	1L1
双極子相互作用	3L1
層間化合物	P102
層構造	P103
相転移	P122
相同組換え	P42
側鎖の帰属	P38

(た)

ダイナミクス	1L3
ダイナミクス	P114
ダイナミクス	P117
ダイナミックMR	P71
ダイナミックス	3L5
ダイナミックス	P121
ダイナミックス	P97
ダニアレルゲン	1L12
タンパク質	1L11
タンパク質	P32
タンパク質	P98
タンパク質	P99
タンパク質-タンパク質相互作用	1L10

タンパク質間相互作用	1L11		(に)	
タンパク質間相互作用	P39	ニトロアニリン		P120
タンパク質構造	1L1	二次元NMR		P53
タンパク質構造	P30	二次元交換スペクトル		3L6
多核多次元TRNOE法	P15	二次構造		P33
多次元NMR	P14	二面角		3L2
多次元NMR	P18	二面角		P95
多次元NMR	P26	二量化		P124
多次元NMR	P43	二量子フィルター		3L12
多次元NMR法	P68			
多次元固体NMR法	P87		(ぬ)	
多重ラベル	P87	ヌクレオキャプシドタンパク質		P16
多重共鳴多次元NMR	1L10	ヌクレオチド除去修復		1L10
体積磁化率	P56			
代謝物質	P81		(ね)	
大脳皮質	P74	粘土鉱物		P102
単量体ヘモグロビン	P35			
蛋白質-蛋白質間相互作用	P92		(の)	
蛋白質構造	1L4	脳		P81
蛋白質構造	P13	脳機能イメージング		P72
蛋白質小分子相互作用	P15			
蛋白質小分子相互作用	P22		(は)	
		ハイドロゲル		P99
(ち)		バクテリオロドプシン		P92
超伝導	P112	バクテリオロドプシン		P93
		パルスNMR		P101
(て)		パルスプログラマ		P70
テロメアタンパク質	P34	パルス幅		P5
天然存在 ² H-NMR	P69	白金ジオンジオキシム錯体		P108
転写因子	P46	発芽大麦		P79
転写活性化ドメイン	P18	半整数スピン核		P88
転写調節	P31			
転流	P79		(ひ)	
電子線照射	P116	ビシナル結合定数		P57
電子伝達タンパク質	P41	ヒスチジンキナーゼ		P14
電場	P75	ヒドリド転移		P54
		ヒドロキシフェナレノン誘導体		P111
(と)		ビフェニル		P95
凍結乾燥製剤	P98	光ポンピング		P9
凍結状態 ¹³ CNMR	P119	光捕獲アンテナ複合体		P68
糖	P48	非晶構造		3L6
糖	P79	表面情報		3L10
動的構造	P28			
動的立体構造解析	1L7		(ふ)	
同位体フィルター	P10	フェノキシ樹脂		P118
		フェレドキシン		P41
(な)		フッ素		P123
ナトリウムチャンネル	P24	フッ素化合物		P78
ナトリウムチャンネル	P64	プローブ		P1
ナトリウムチャンネル	P65	プロテアーゼインヒビター		P13
		プロトントンネリング		P104

不活性化ゲート	P64	膜タンパク質	P90
不活性化ゲート	P65	膜分断	1L5
不均一性補償	P73	膜融合	1L5
部位特異的標識	P37		
複合体	1L8		(み)
複合体	P28	マイクロボイド	P100
分極移動	P2	ミセル	P24
分子運動	3L1	ミセル	P56
分子拡散	P99	ミセル	P57
分子間NOE	P39	ミトコンドリア	P43
分子間交差緩和	P25	水	P75
分子間交差緩和	P50	水分子	3L12
分子軌道計算	P94		
分子構造	3L5		(む)
分子集合状態	P25	無細胞タンパク質合成系	P37
分子線蒸着	P108		
分子認識	P26		(め)
分子認識	P61	メチル基転移	P27
	(へ)		(ゆ)
ペプチド	P20	有機強磁性体	P109
ペプチド	P24	有機修飾セラミックス	P113
ペプチド	P32		
ヘム	P35		(よ)
ヘリックス	P24	溶液構造	P65
ペルオキシダーゼ	P36		
並進拡散	P11		(ら)
	(ほ)	ラジオ波磁場勾配	P76
		ラット	P74
		ラット	P81
		ランダム重水素標識	P23
			(り)
ボランティア	P80	リアルタイム	3L11
ポリイミド	P106	リン31	P2
ポリエチレンテレフタレート	3L6	リン脂質二重膜	1L5
ポリカーボネート	P117	立体化学	P49
ポリシルメチレン	3L5	立体構造	1L12
ポリビニルアルコール	P119	立体構造	1L3
ポリペプチド	3L3	立体構造	1L8
ポリペプチド	P107	立体構造	P33
ポリペプチド	P110	立体構造	P34
ポリペプチド	P83	立体構造	P46
ポリペプチド	P89	立体構造解析	P18
ポリマーアロイ	P53	立体構造解析	P87
膨潤状態	P67	立体構造決定	P38
	(ま)	隣接アミノ酸配列効果	3L3
マイクロ波	P1		(れ)
マウス	P78	冷却速度	P119
マジックアングルホッピング	P86	劣化挙動	P103
マジックエコートレイン	P105		
マジック角試料回転	3L2		
マジック角試料回転	P84		
マルチスライス	P77		

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
Bandoyopadh yay Bilwadal	物質工学工業技術研究所基礎部固体NMRグループ 〒305 茨城県つくば市東1-1	bilwa@nimc.go.jp	0298-54-4515	0298-54-4524
Billah M. M.	生命工学工業技術研究所生物物質部 〒305 つくば市 東1-1	billah@nibh.go.jp	0298-54-6125	0298-54-6135
Farmer II Bennett	Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute 〒 P.P. Box 4000 Princeton, NJ 08543-4000 USA	sanly@atlas.brms.com	609-252-3485	609-252-6012
胡 梅	生命工学工業技術研究所生物物質部 〒305 つくば市 東1-1	hu@nibh.go.jp	0298-54-6136	0298-54-6135
Griesinger Christian	Institut für Organische Chemie Universität Frankfurt 〒 Marie-Curie-Str.11, D-60439 Frankfurt, Germany	cigr@krypton.org.chemie.uni-frankfurt.de	69-5800-9130	69-5800-9128
Kupce Eriks	Varian NMR Instruments 〒 28 Manor Road Walton-on-Thames Surrey KT12 2QF UK	Eriks.Kupce@nmr.varian.com	44-1932-898000	44-1865-200579
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@kobe-u.ac.jp	078-803-0145	078-803-0145
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2-1	lijun@postman.riken.go.jp	048-462-1111	048-462-4667
Montelione Gaetano T.	CABM-Rutgers Univ. 〒 679 Hoes Lane Piscataway NJ 08854, USA	guy@nmrlab.cabm.rutgers.edu	908-235-5321	908-235-4850
Price W. P.	機能水研究所 〒305 つくば市千現2-1-6	wprice@wri.co.jp	0298-58-6186	0298-58-6144
Vashchenko Alexander V.	大阪大学医学部保健学科医用工学講座 〒565 大阪府吹田市山田丘1-7	sasha@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-879-2577	06-879-2577
Waelchli Markus	日本ブルカー株式会社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	0298-58-0322
Xiulan Xie	物質工学工業技術研究所基礎部固体NMRグループ 〒305 茨城県つくば市東1-1	xiulan@nimc.go.jp	0298-54-4515	0298-54-4524
秋友由子	生物学研究所構造解析部門 〒565 大阪府吹田市古江台6-2-3	akitomo@beri.co	06-872-8218	06-872-8219
阿久津秀雄	横浜国立大学工学部 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	akutsu@bio.bsk.ynu.ac.jp	045-339-4232	045-339-4251
浅川直紀	東京工業大学生命理工学部生体分子工学科 〒226 神奈川県横浜市緑区長津田町4259	nasakawa@bio.titech.ac.jp	045-924-5796	045-924-5827
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	0423-83-7733	0423-83-7733
浅野敦志	防衛大学校化学教室 〒239 横須賀市走水1-10-20	asanoa@cc.nda.ac.jp	0468-41-3810	0468-44-5901
芦川幹也	群馬大学工学部生物化学工学科荘司研究室 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1	d4b010@edu.cc.gunma-u.ac.jp	0277-30-1443	0277-30-1443

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
芦田 淳	バリアンジャパン 〒108 東京都港区芝浦4-16-36住友芝浦ビル	jun.ashida@jp.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
阿曾幸男	国立医薬品食品衛生研究所 〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1	aso@nihs.go.jp	03-3700-1141	03-3707-6950
安立直剛	筑波大学理工工学系巨瀬研究室 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1	adachi@fourier.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5214	無
阿部義人	(株)生物分子工学研究所一構造解析研究部門 〒565 大阪府吹田市古江台 6-2-3	abe@beri.co.jp	06-872-8218	06-872-8219
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	okuno@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3219	0774-32-3038
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	okuno@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3219	0774-32-3038
安藤 勲	東京工業大学工学部 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	iando@polymer.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 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	sando@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2137	03-5734-2889
池田 博	東京工業大学生命理工学部生物工学科 〒226 横浜市緑区長津田町 4259	hikeda@bio.titech.ac.jp	045-924-5758	045-923-0374
石井張愛	東京工業大学工学部高分子工学科安藤慎治研究室 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	hishiix@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
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 〒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
石田信昭	食品総合研究所 〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2	nobu@nfri.affrc.go.jp	0298-38-8057	0298-38-7996
石塚靖子	生命工学工業技術研究所生体物質部 〒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
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 京都府京都市左京区北白川追分町	ichi@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4014	075-751-2085
射手園佳子	日本ロシュ研究所 〒247 神奈川県鎌倉市梶原200	yoshiko.itezono@roche.com	0467-47-2209	0467-45-6815
伊藤俊樹	京都大学大学院理学研究科化学教室分子構造化学研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	tottsu@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
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	03-3823-1247
井上匡子	神戸大学大学院自然科学研究科分子集合科学専攻 〒657 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1	kyokoino@kobe-u.ac.jp	078-803-0145	078-803-0145
井上眞一	愛知工業大学応用化学科 〒470-03 愛知県豊田市八草町八千草1247	sh-inoue@ac.aitech.ac.jp	0565-48-8121	0565-48-0076

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
井ノ岡 博	武田薬品工業(株)開拓第一研究所 〒300-42 つくば市和台10	Inooka_Hiroshi@takeda.co.jp	0298-64-5025	0298-64-5000
猪原武男	小野薬品工業(株)水無瀬総合研究所構造解析室 〒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
今泉孝幸	京都大学理学部化学系 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	tak@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	無
井町美佐子	日本ブルカー株式会社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	0298-58-0322
岩崎智浩	名古屋工業大学応用科学科 〒466 名古屋市昭和区御器所町	r02ach05@edsys.center.nitech.ac.jp	052-732-2111	無
岩崎わかな	東京大学生物生産工学研究センター生物構造工学研究室 〒113 東京都文京区弥生1-1-1	ss67172@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5449-5422
岩下 孝	(財) サントリー生物有機科学研究所 〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1	takashi@minase.suntory.co.jp	075-962-3742	075-962-2115
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	iwase@psat.fukuoka-u.ac.jp	092-871-6631	092-863-0389
岩館満男	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	0423-83-7733
植木定雄	日本ブルカー株式会社マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	ueki@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
上田貴洋	大阪大学大学院理学研究科化学専攻構造物理化学研究室 〒560 大阪府豊中市待兼山町1-16	ueda@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-850-5779	06-850-5785
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@rikennmr.riken.go.jp	048-467-9361	048-462-4627
江口太郎	大阪大学大学院理学研究科化学専攻(北ブロック) 〒560 豊中市待兼山町1-16	eguchi@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-850-5778	06-850-5785
海老沢計慶	味の素中央研究所分析研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	lm_ebisawa@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-7609
戎井悦子	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	無	03-3823-2101	03-3823-1247
恵良聖一	岐阜大学医学部第二生理学教室 〒500 岐阜市司町40	era@cc.gifu-u.ac.jp	058-267-2225	058-267-2962
遠藤一央	金沢大学理学部化学科 〒920-11 石川県金沢市角間町	endo@wriron1.s.kanazawa-u.ac.jp	072-264-5924	072-264-5742
大川陽平	東京農工大学工学部 〒184 東京都小金井市中町2-24-16	ohkawa@cc.tuat.ac.jp	0423-88-7025	0423-83-7733
大木 出	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 〒630-01 奈良県生駒市高山町 8916-5	i-ooki@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5576	0743-72-5579
大島曜子	東邦大学薬学部中央機器室NMR 〒274 千葉県船橋市三山2-2-1	sakamoto@phar.toho-u.ac.jp	0474-72-1282	0747-72-1282

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
大竹亮子	味の素中央研究所分析研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	lm_ootake@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-7609
大津直子	味の素中央研究所分析研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	lm_ootu@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-7609
大友崇紀	大阪大学蛋白質研究所物性部門 〒565 大阪府吹田市山田丘3-2	otomo@protein.osaka-u.ac.jp	06-879-8598	06-879-8599
大野 靖	日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所 〒569-11 大阪府高槻市紫町1-1	ohno@isrl.jti.co.jp	0726-81-9700	0726-81-9725
岡田明彦	住友化学(株)筑波研究所 〒300-32 茨城県つくば市北原6番	okadak@tuc.sumitomo-chem.co.jp	0298-64-4182	0298-64-4746
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	a9086781@ut.asahi-kasei.co.jp	0558-76-7085	0558-76-2947
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	okuno@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3219	0774-32-3038
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	okuno@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3219	0774-32-3038
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
小野裕嗣	農林水産省食品総合研究所 〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2	ono@nfri.affrc.go.jp	0298-38-7148	0298-38-7996
帯田孝之	九州大学大学院薬学研究科免疫薬品学講座 〒812 福岡市東区馬出3-1-1	obita@imm1.phar.kyushu-u.ac.jp	092-642-6664	無
甲斐荘正恒	東京都立大学理学部化学科 〒192-03 東京都八王子市南大沢1-1	kainosho@raphael.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2544	0426-77-2525
垣田信吾	協和醱酵工業株式会社東京研究所 〒194 東京都町田市旭町3-6-6	skakita@kyowa.co.jp	0427-25-2555	0427-26-8330
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	0774-38-3152	0774-33-1164
片岡 弘	財団法人地球環境産業技術研究機構環境触媒研究室 〒619-02 京都府相楽郡木津町木津川台9-2	orb@rite.or.jp	0774-75-2305	0774-75-2318
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79-5	katahira@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	045-339-4264	045-339-4264
片平律子	協和醱酵工業株式会社東京研究所 〒194 東京都町田市旭町3-6-6	rkatahira@kyowa.co.jp	0427-25-2555	無
加藤悦子	農水省農業生物資源研究所生物工学部染色体操作研究室 〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2	ekatoh@abr.affrc.go.jp	0298-38-8399	0298-38-8399
加藤晃一	東京大学大学院薬学系研究科 〒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

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
加藤 肇	富士写真フイルム富士宮研究所 〒418 富士宮市中大里2-0-0	kato@tomiken.fujifilm.co.jp	0544-26-7643	0544-26-7691
金久保光央	物質工学工業技術研究所基礎部 〒305 茨城県つくば市東1-1	kanakubo@nimc.go.jp	0298-54-4536	0298-54-4487
金沢洋子	九州大学薬学部 〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1	kanazawa@pch.phar.kyushu-u.ac.jp	092-642-6622	092-642-6545
兼清真人	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丁目12番1号	mkanekiy@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
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	0298-38-7408
亀井裕孟	東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	kamei@medes.m.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5689-7215
川口 謙	(株)東レリサーチセンター有機構造化学研究部 〒248 鎌倉市手広1111	kimura@blab.toray.co.jp	0467-32-9974	0467-32-0414
川口哲朗	日本ブルカー株式会社大阪営業所 〒564 大阪府吹田市豊津町17-5	kawaguchi@bruker.co.jp	06-339-7008	06-339-7010
川崎政人	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	mkawasak@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
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	011-716-0879
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	0467-45-6815
木川隆則	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	tkigawa@postman.riken.go.jp	048-467-9428	048-462-4675
菊地 淳	東京農工大学工学部 〒184 東京都小金井市中町2-24-16	kikuchij@cc.tuat.ac.jp	0423-88-7025	0423-83-7733
菊池純子	塩野義製薬株式会社創薬第一研究所物理化学研究部門 〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4	junko.kikuchi@shionogi.co.jp	06-458-5861	06-458-0987
北川 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
北村健司	武田薬品医薬開発部分析代謝研究所 〒532 大阪市淀川区十三本町2-17-85	Kitamura_Kenji@takeda.co.jp	06-300-6002	06-300-6086
木村敦臣	大阪大学医学部保健学科医用工学講座 〒565 大阪府吹田市山田丘1-7	kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-879-2577	06-879-2577
木村一雄	(株)東レリサーチセンター有機構造化学研究部 〒248 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	shigeki@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0182	07915-8-0182
木村潤子	金沢大学大学院自然科学研究科物質科学専攻 〒920-11 石川県金沢市角間町	kimura@wrion1.s.kanazawa-u.ac.jp	072-264-5686	072-264-5742

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
木村英昭	群馬大学工学部生物化学工学科荘司研究室 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1		0277-30-1443	0277-30-1443
		d5b012@pop.edu.cc.gunma-u.ac.jp		
木村雅晴	住友化学工業株式会社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3-1-98		06-466-5172	06-466-5459
		kimuram@sumitomo-chem.co.jp		
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		0474-65-7362	0474-65-7362
		EZH02437@niftyserve.or.jp		
串田克彦	バリアンジャパン 〒108 東京都港区芝浦4-16-36住友芝浦ビル		03-5232-1238	03-5232-1264
		katsuhiko.kushida@jp.varian.com		
楠 英樹	群馬大学工学部生物化学工学科生物機能第三研究室 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1		0277-30-1439	0277-30-1439
		kusunoki@libra.ls.m-kagaku.co.jp		
久保 厚	京都大学大学院理学研究科化学教室 〒606- 京都市左京区北白川追分町		075-753-4014	無
		a.kubo@kuchem.kyoto-u.ac.jp		
熊沢茂則	静岡県立大学食品栄養科学部 〒442 静岡市谷田52-1		054-264-5525	054-264-5522
		kumazawa@fns1.u-shizuoka-ken.ac.jp		
栗林秀人	九州大学薬学部 〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1		092-642-6624	無
		kurihide@pch.phar.kyushu-u.ac.jp		
黒木重樹	東京工業大学工学部高分子工学科 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1		03-3726-1111	03-5734-2889
		skuroki@polymer.titech.ac.jp		
黒子弘道	奈良女子大学生活環境学部生活環境学科 〒630 奈良県奈良市北魚屋西町		0742-20-3461	0742-20-3461
		kurosu@cc.nara-wu.ac.jp		
黒田幸夫	日本ブルカー株式会社技術サービス部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5		0298-52-1236	0298-58-0322
		kuroda@bruker.co.jp		
黒田義弘	京都大学大学院薬学研究科製剤機能解析学分野 〒606-01 京都市左京区吉田下阿達町		075-753-4530	075-753-4578
		yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp		
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		03-3474-6662	03-3474-6650
		無		
桑原大介	分子科学研究所 〒444 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38		0564-55-7471	無
		kuwahara@ims1.ims.ac.jp		
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		0298-38-7014	0298-38-7408
		無		
神田大輔	(株) 生物分子工学研究所一構造解析研究部門 〒565 大阪府吹田市市古江台 6-2-3		06-872-8218	06-872-8219
		kohda@beri.co.jp		
河野俊之	三菱化学生命科学研究所 構造解析研究室 〒194 東京都町田市市南大谷11号		0427-24-6285	0427-24-6317
		tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp		
越川城大	筑波大学化学系 〒305 つくば市天王台1-1-1		0298-53-6925	0298-53-6925
		無		
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		048-462-1111	048-462-4627
		koshino@postman.riken.go.jp		
巨瀬勝美	筑波大学物理工学系 〒305 つくば市天王台1-1-1		0298-53-5335	0298-53-5205
		kose@bukko.bk.tsukuba.ac.jp		

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
小林邦子	(株)三菱化学生命科学研究所構造解析研究室 〒194 東京都町田市南大谷11	kuniko@libra.ls.m-kagaku.co.jp	0427-24-6285	0427-24-6317
小林信昭	電気通信大学化学教室 〒182 東京都調布市調布ヶ丘1-5-1	nkoba@dust.pc.uec.ac.jp	0424-83-2161	無
小林将俊	東京工業大学工学部高分子工学科安藤勲研究室 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	mkobayas@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
小松一男	資生堂安全性・分析センター分析研究グループ 〒223 神奈川県横浜市港北区新羽町1050	kazuo_komatsu@po.shiseido.co.jp	045-542-5296	045-545-2811
斉田 理	東京農工大学工学部 〒184 東京都小金井市中町2-24-16	saita@cc.tuat.ac.jp	0423-88-7025	0423-83-7733
斉藤 肇	姫路工業大学理学部生命科 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479-1	saito@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0181	07915-8-0182
斉藤彰良	東亜合成株式会社つくば研究所応用研究部 〒300-26 茨城県つくば市大久保2番	saitoh@tsukuba.toagosei.co.jp	0298-65-2605	0298-65-2610
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3-35-1	saito@lab1.nsc.co.jp	044-777-4111	044-752-6341
斎藤茂治	筑波大学先端学際領域研究センターリサーチアソシエイト 〒305 つくば市天王台1-1-1	shige@tara.tsukuba.ac.jp	0298-53-6045	0298-53-6065
坂本泰一	三菱化学生命科学研究所構造解析研究室 〒194 東京都町田市南大谷11号	taichi@libra.ls.m-kagaku.co.jp	0427-24-6285	0427-24-6317
佐々木雅人	日本ブルカー株式会社マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	sas@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
佐藤 一	日本ブルカー株式会社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	0298-58-0322
沢辺紀子	東京理科大学薬学部 〒162 東京都新宿区市ヶ谷船河原町12	無	03-3260-4272	03-3268-3045
嶋田一夫	東京大学大学院薬学系研究科 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	shimada@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-3815-6540
島田光伸	三菱化学株式会社鹿島事業所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	1600450@cc.m-kagaku.co.jp	0479-46-4621	0479-46-6113
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	yshimada@comp.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	無
清水直樹	三菱化学株式会社筑波研究所 〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町中央8-3-1	3806935@cc.m-kagaku.co.jp	0298-87-0946	0298-87-3257
下川繁三	テクノサイエンスラボ 〒069 北海道江別市大麻中町22-18	無	011-386-4855	011-386-4855
莊司 顯	群馬大学工学部生物化学工学科 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1	shoji@bce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1443	0277-30-1443
白石美紀	資生堂安全性・分析センター分析研究グループ 〒223 神奈川県横浜市港北区新羽町1050	shiraishi_miki@po.shiseido.co.jp	045-542-5296	045-545-2811

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
白川昌宏	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 〒630-01 奈良県生駒市高山町8916-5	shira@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5571	0743-72-5579
榛葉信久	東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	shimba@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-3815-6540
菅瀬謙治	(財) サントリー生物有機科学研究所 〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1	sugase@minase.suntory.co.jp	075-962-3742	075-962-2115
杉浦眞喜子	神戸薬科大学中央分析室 〒658 神戸市東灘区本山北町4-19-1	makiko-s@kobepharma-u.ac.jp	078-441-7591	078-441-7592
杉江隆徳	愛知工業大学応用化学科 〒470-03 愛知県豊田市八草町八千草1247	無	0565-48-8121	0565-48-0076
杉江隆徳	愛知工業大学応用化学科 〒470-03 愛知県豊田市八草町八千草1247	無	0565-48-8121	0565-48-0076
鈴木榮一郎	味の素中央研究所分析研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	LM_suzuki@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-7609
鈴木浩崇	(株) ブリヂストン研究部分析研究ユニット 〒187 東京都小平市小川東町3-1-1	suzuki-h@bridgestone.co.jp	0423-42-6252	0423-41-9252
須原正彦	金沢大学理学部化学科 〒920-11 石川県金沢市角間町	suhara@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	072-264-5688	072-264-5742
瀬尾芳輝	京都府立医科大学第一生理学教室 〒602 京都市上京区河原町広小路上ル梶井町465	yseo@phys.kpu-m.ac.jp	075-251-5311	075-251-0295
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	seki@crystal.cac.chiba-u.ac.jp	043-290-3810	043-290-3813
曾我美 勝	岐阜大学医学部生理学教室 〒500 岐阜市司町40	無	058-267-2227	058-267-2962
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	0774-38-3152	0774-33-1164
高津敏夫	三共株式会社バイオメディカル研究所 〒140 東京都品川区広町1-2-58	無	03-3492-3131	03-5436-8565
高橋憲助	〒465 名古屋市名東区植園町1丁目50番地(自宅)	無	052-782-7273	052-782-7273
高橋栄夫	東京大学大学院薬学系研究科 〒113 東京都文京区本郷7-3-1	hid@mol.f.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-3815-6540
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
高山陽子	塩野義製薬株式会社創薬第一研究所物理化学研究部門 〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4	yohko.takayama@shionogi.co.jp	06-458-5861	06-458-0987
滝野 博	(株) シーアイエルジャパン 〒157 世田谷区砧8-33-1	無	03-3416-8200	03-3416-8200
竹腰清乃理	京都大学大学院理学研究科化学 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
武貞啓子	味の素中央研究所分析研究所 〒210 川崎市川崎区鈴木町1-1	lm_takesada@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7145	044-211-7609
武田和行	京都大学大学院理学研究科化学教室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	075-753-4000
武田 定	群馬大学工学部材料工学科材料設計化学講座第4研究室 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1	stakeda@chem.gunma-u.ac.jp	0277-30-1382	0277-30-1380
田中 鍛	帝人(株)東京研究センター構造解析センター 〒191 東京都日野市旭が丘4-3-2	tnk53379@token1.teijin.co.jp	0425-86-8121	0425-86-8123
田中俊之	筑波大学先端学際領域研究センター 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1	ttanaka@tara.tsukuba.ac.jp	0298-53-6065	0298-53-6065
田中彬嗣	九州大学薬学部 〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1	無	092-642-6551	092-642-6545
谷生道一	姫路工業大学理学部生体物質構造学II講座 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479番地1	tanio@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0182	07915-8-0182
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@kobe-u.ac.jp	078-881-1212	078-803-0839
田村友美	日本ブルカー株式会社大阪営業所 〒564 大阪府吹田市豊津町17-5	tot@bruker.co.jp	06-339-7008	06-339-7010
田村泰盛	農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 生産技術部製糸技術研究チーム 〒394 長野県岡谷市郷田1-4-8	yasumori@nises-ok.affrc.go.jp	0266-22-3664	0266-22-3094
忠田吉弘	農林水産省 食品総合研究所 状態分析研究室 〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2	Chuda@nfri.affrc.go.jp	0298-38-8033	0298-38-8033
手島圭三	広島大学総合科学部物質生命科学コース 〒739 広島市鏡山1-7-1	teshi@ipc.hiroshima-u.ac.jp	0824-24-6529	0824-24-0757
手塚亮典	バリアンジャパン 〒108 東京都港区芝浦4-16-36住友芝浦ビル	akinori.tezuka@jp.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
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	0423-88-7188	0423-88-2041
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	terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4011	075-753-4000
寺沢宏明	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	terasawa@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
寺田秀夫	日本ブルカー株式会社大阪営業所 〒564 大阪府吹田市豊津町17-5	ht@bruker.co.jp	06-339-7008	06-339-7010
照井彬弘	塩野義製薬株式会社創薬第一研究所物理化学研究部門 〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4	無	06-458-5861	06-458-0987
堂本竹雄	日本ブルカー株式会社マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	td@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
土江松美	大阪市立大学理学部分析室&生物化学研究室 〒558 大阪市住吉区杉本3-3-138	matsumi@cubane.sci.osaka-cu.ac.jp	06-605-2597	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1-1-1TARAセンター共同研究棟A306	ctomomor@tara.tsukuba.ac.jp	0298-53-6045	0298-53-6065
内藤 晶	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	naito@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0180	07915-8-0182
永尾 隆	姫路工業大学理学部生体物質構造学II講座 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479番地1	takashi@sci.himeji-tech.ac.jp	07915-8-0182	07915-8-0182
永阪文惣	大阪大学大学院理学研究科中村(亘)研 〒560 大阪府豊中市待兼山町1-16	bunsow@pochi.ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-850-5779	06-850-5785
中島 茂	萬有製薬(株)創薬研究所 〒300-26 茨城県つくば市大久保3番地	strcchem@banyu.co.jp	0298-77-2000	0298-77-2029
中島善人	地質調査所地殻物理部 〒305 茨城県つくば市東1-1-3	yoshito@gsj.go.jp	0298-54-3615	0298-54-3618
永田宏次	東京大学生物生産工学研究センター生物構造工学研究室 〒113 東京都文京区弥生1-1-1	unagata@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-3812-2111	03-5689-7225
永田 崇	横浜国立大学工学部物質工学科生物工学大講座上杉-片平研究室 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	nagata@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	045-339-4271	045-339-4264
永田親清	芝浦工業大学工学部工業化学科 〒113 東京都港区芝浦3-9-14	nagata@sic, shibaura-it.ac.jp	03-5476-2432	03-5476-3162
中西洋志	生命工学工業技術研究所生体物質部 〒305 つくば市 東1-1	nakanisi@nibh.go.jp	0298-54-6136	0298-54-6135
中村邦彦	東京工業大学工学部高分子工学科安藤慎治研究室 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	knakamur@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
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 京都市左京区北白河追分町	nakashin@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
中村春木	生物分子工学研究所情報解析研究部門 〒565 大阪府吹田市古江台6-2-3	nakamura@beri.co.jp	06-872-8212	06-872-8219
中村美希子	近畿大学理工学部化学科分析化学研究室 〒557 大阪府東大阪市小若江3-4-1	me95c01@cced.kindai.ac.jp	06-730-5880	無
中村好邦	大正製薬(株)創薬研究所分子科学研究室 〒330 埼玉県大宮市吉野町1-403	s13219@ccm.taisho.co.jp	048-663-1111	048-652-7254
中村義之	東京工業大学資源化学研究所NMR, ESR室 〒226 横浜市緑区長津田町4 2 5 9	ynakamur@res.titech.ac.jp	045-924-5110	045-924-5109
中山 登	日本ロシュ研究所 〒247 神奈川県鎌倉市梶原200	noboru.nakayama@roche.com	0467-47-2209	0467-45-6815
中山尋量	神戸薬科大学一般化学研究室 〒658 神戸市東灘区本山北町4-1-9-1	hiro@kobepharmaceuticals.co.jp	078-441-7552	078-441-7553
名川吉信	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	0298-54-6135

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
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生命科学科生体物質構造学II講座 〒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
西村重徳	大阪府立大学農学部食品素材化学研究室 〒591 大阪府堺市学園町1-1	tigers@biochem.osakafu-u.ac.jp	0722-52-1161	0722-52-0341
西山裕介	京都大学大学院理学研究科化学教室分子構造化学講座 〒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	電気通信大学化学教室 〒182 東京都調布市調布ヶ丘1-5-1	nikki@e-one.uec.ac.jp	0424-83-2161	無
丹羽 浩	東ソー株式会社四日市研究所 〒510 三重県四日市市霞1-8	niwa@tosoh.co.jp	0593-63-1622	0593-65-5205
根本暢明	バリアンジャパン 〒108 東京都港区芝浦4-16-36住友芝浦ビル	nobuaki.nemoto@jp.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
野口 滋	第一製薬株式会社製薬技術研究所 〒134 東京都江戸川区北葛西1-16-13	無	03-3680-0151	03-5696-8339
野中正幸	筑波大学物理学系 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1	nonaka@ctlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5421	0298-53-5048
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	075-753-4000
野呂優規美	ファルマシア・アップジョン株式会社 筑波総合研究所 化学・製剤研究部 〒300-42 茨城県つくば市和台23	yukimi.noro@ap.pnu.com	0298-64-5815	0298-64-3833
拝師智之	筑波大学理工学研究科 〒305 つくば市天王台1-1-1	haishi@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5214	0298-53-5205
長谷川憲一	日本電子株式会社基礎研究部9596プロジェクト 〒196 東京都昭島市武蔵野3-1-2	hasegawa@jeol.co.jp	0425-42-2244	0425-46-8068
畠中秀樹	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	hatanaka@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
秦野賢一	群馬大学工学部生物化学工学科 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1	hatano@bce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1437	0277-30-1437
服部憲和	名古屋工業大学応用化学科岡林研究室 〒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 生体核磁気計測ラボ 〒305 茨城県つくば市梅園1-1-4	mhattori@etl.go.jp	0298-54-5537	0298-54-5540
馬場雄久	北見工業大学 〒090 北海道北見市公園町165	take@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-26-9414	0157-26-0862
濱島 斉	三和化学研究所創薬研究所 〒511-04 三重県員弁郡北勢町塩崎363番地	skkddr@mkn.ilc.or.jp	0594-72-6221	0594-82-0072
林 繁信	物質工学工業技術研究所基礎部固体NMRグループ 〒305 茨城県つくば市東1-1	hayashi@nimc.go.jp	0298-54-4515	0298-54-4524

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
林 文晶	塩野義製薬株式会社創業第一研究所物理化学研究部門 〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4	fumiaki.hayashi@shionogi.co.jp	06-458-5861	06-458-0987
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
原園としえ	三菱化学(株) 横浜総合研究所分析物性研究所 〒227 横浜市青葉区鶴志田町1000	harazono@rc.m-kagaku.co.jp	045-963-3130	045-963-4261
原田治幸	京都大学大学院工学研究科分子工学専攻分子設計学講座 〒606-01 京都府京都市左京区吉田本町	haruyuki@mds.moleng.kyoto-u.ac.jp	075-753-5937	075-751-7611
久留正雄	東京理科大学薬学部 〒162 東京都新宿区市ヶ谷船河原町12	hisatome@ps.kagu.sut.ac.jp	03-3260-4272	03-3268-3045
尾藤良孝	日立製作所基礎研究所バイオモレキュラー研究プログラム 〒350-03 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520	bito@harl.hitachi.co.jp	0492-96-6111	0492-96-6006
楡山行雄	ファルマシア・アップジョン株式会社 筑波総合研究所 化学・製剤研究部 〒300-42 茨城県つくば市和台23	yukio.hiyama@ap.pnu.com	0298-64-3815	0298-64-3833
平沖敏文	北海道大学大学院工学研究科量子物理工学研究科 〒060 札幌市北区北13条西8丁目	hiraoki@sun2.huap.hokudai.ac.jp	011-706-6640	011-716-6175
平野利好	群馬大学工学部生物化学工学科生物機能第3研究室 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1	m6b337@edu.cc.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439	0277-30-1439
平松宗一郎	東京工業大学工学部高分子工学科安藤慎治研究室 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	shiramat@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
廣明秀一	(株) 生物分子工学研究所一構造解析研究部門 〒565 大阪府吹田市古江台 6-2-3	hiroakih@beri.co.jp	06-872-8218	06-872-8219
広田豊彦	第一製薬株式会社試験研究センター 〒134 東京都江戸川区北葛西1-16-13	無	03-3680-0151	03-5696-8347
廣中俊也	東京工業大学工学部高分子工学科安藤慎治研究室 〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1	thironak@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889	03-5734-2889
福岡美香	東京水産大学食品生産学科 〒108 東京都港区港南4-5-7	fukuoka@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0624	03-5463-0497
福士江里	北海道大学農学部GC-MS&NMR室 〒060 札幌市北区北9条西9丁目	JAH02422@niftyserve.or.jp	011-706-4134	011-716-0879
福原忠雄	資生堂安全性・分析センター分析研究グループ 〒223 神奈川県横浜市港北区新羽町1050	fukuhara_tadao@po.shiseido.co.jp	045-542-5296	045-545-2811
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	0720-50-0733
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	06-304-1192
藤倉一繁	バリアンジャパン 〒108 東京都港区芝浦4-16-36住友芝浦ビル	kazushige.fujikura@jp.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
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	fujita@sbchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-5643	無

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
藤森裕基	日本大学文理学部化学科 〒156 東京都世田谷区桜上水3-25-40	fujimori@chs.nihon-u.ac.jp	03-3329-1151	03-5317-9433
藤原英明	大阪大学医学部保健学科医用工学講座 〒565 大阪府吹田市山田丘1-7	fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-879-2573	06-879-2573
藤原敏道	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79-5	g00888@sinet.ad.jp	045-339-4224	045-339-4251
藤原正子	日本電子データム(株)AM技術部 〒196 東京都昭島市武蔵野3-1-2	masako@jeol.co.jp	0425-42-1182	0425-42-4059
藤原靖弘	京都薬科大学NMR室 〒607 京都市山科区御陵中内町5	無	075-595-4637	075-595-4766
文野浩一	立命館大学理工学部化学科分子物性化学研究室 〒525-77 滋賀県草津市野路東1-1-1	無	0775-66-1111	0775-61-2659
降旗一夫	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
古井淳一	大阪大学蛋白質研究所物性部門 〒565 吹田市山田丘3-2	furui@protein.osaka-u.ac.jp	06-879-8598	06-879-8599
古田浩祐	杏林製菓株式会社中央研所 〒329-01 栃木県下都賀郡野木町御手洗2399-1	fvbb0981@mb.infoweb.or.jp	0280-56-2201	0280-57-1293
逸見 光	農林水産省食品総合研究所応用微生物部 〒305 つくば市観音台2-1-2	hemmi@nfri.affrc.go.jp	0298-38-8096	0298-38-7996
星野鉄哉	日立化成工業(株) 〒300-42 茨城県つくば市和台48	HCN00727@niftyserve.or.jp	0298-64-4000	0298-64-4008
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@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3150	0774-33-1164
堀内正隆	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	horiuchi@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
増田憲二	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	masuda@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3152	0774-33-1164
松川真吾	東京水産大学食品生産学科生物資源化学講座渡部研究室 〒108 東京都港区港南4-5-7	matsukaw@cc.tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0403	03-5463-0403
松田弘喜	北見工業大学 〒090 北海道北見市公園町165	hiro@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-26-0862	0157-26-0862
松田裕生	帝人(株)東京研究センター 構造解析センター 〒191 東京都日野市旭が丘4-3-2	mtd30217@token1.teijin.co.jp	0425-86-8121	0425-86-8123
松林久一	第一製薬株式会社試験研究センター 〒134 東京都江戸川区北葛西1-16-13	無	03-3680-0151	03-5696-8347
松原康史	三菱化学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	3709437@cc.m-kagaku.co.jp	0298-87-0946	0298-87-3257
松村志保	ゼリア新薬工業株式会社中央研究所研究技術部 〒360-01 埼玉県大里郡江南町大字押切2512-1	無	0485-36-3456	0485-39-1072

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
松本 大	京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学分野 〒606 京都市左京区吉田下阿達町	masaru@pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4530	075-753-4578
丸田悟朗	群馬大学工学部材料工学科材料設計化学講座第4研究室 〒376 群馬県桐生市天神町1-5-1	stakeda@chem.gunma-u.ac.jp	0277-30-1382	0277-30-1380
三浦宏一	北見工業大学 〒090 北海道北見市公園町165	miura@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-26-0862	0157-26-0862
三島正規	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 〒630-01 奈良県生駒市高山町 8916-5	m-misima@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5576	0743-72-5579
水越利巳	生物分子工学研究所機能創製プロジェクト部門 〒565 大阪府吹田市古江台6-2-3	toshimi@beri.co.jp	06-872-8203	06-872-8219
水野 敬	京都大学理学研究科化学専攻分子構造化学研究室 〒606 京都市左京区白川追分町	mizuno@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
水野元博	金沢大学理学部化学科 〒920-11 石川県金沢市角間町	mizuno@wrron1.s.kanazawa-u.ac.jp	072-264-5686	072-264-5742
溝上 潤	京都大学理学部化学系 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	mizokami@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	無
三森文行	国立環境研究所環境健康部 〒305 茨城県つくば市小野川16-2	mitumori@nies.go.jp	0298-50-2532	0298-50-2574
水戸 潤	千葉大学分析センター 〒263 千葉市稲毛区弥生町1-33	mito@pchem2.s.chiba-u.ac.jp	043-290-3810	043-290-3813
宮内康次	(株)UBE科学分析センター高分子分析第一研究室 〒290 千葉県市原市五井南海岸8-1	29687u@ube-ind.co.jp	0436-23-5997	0436-23-5449
三宅洋子	東京都立大学理学部化学科有機化学第一研究室 〒192-03 東京都八王子市南大沢1-1	ymiyake@comp.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-2525
宮島清一	分子科学研究所分子集団系 〒444 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38	miyajima@ims.ac.jp	0564-55-7423	0564-54-2254
三好利一	京都大学大学院理学研究科化学教室分子構造化学講座 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	miyoshi@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-751-205
武藤隆則	(株)生物分子工学研究所一構造解析研究部門 〒565 大阪府吹田市古江台 6-2-3	tmuto@beri.co.jp	06-872-8218	06-872-8219
村林秀樹	株式会社武田分析研究所試験第2部 〒532 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85	himura@sun-inet.or.jp	06-300-6537	無
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	tmorita@postman.riken.go.jp	048-462-1111	048-462-4627
森田哲史	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	morita@jota.riken.go.jp	048-467-9428	048-462-4675
八木宏昌	横浜国立大学工学部 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	yagi@bio.bsk.ynu.ac.jp	045-339-4231	045-339-4251
八島秀仁	日本ブーカー株式会社マーケティング部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	yas@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
安野和浩	大阪大学蛋白質研究所物性部門 〒565 大阪府吹田市山田丘3-2	kazu@protein.osaka-u.ac.jp	06-879-8598	06-879-8599
矢吹 孝	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	yabuki@jota.riken.go.jp	048-467-9428	048-462-4675
山内一夫	日本ブルカー株式会社アプリケーション部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	yam@bruker.co.jp	0298-52-1235	0298-58-0322
山口 悟	姫路工業大学理学部生体物質構造学II講座 〒678-12 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479番地1	無	07915-8-0182	07915-8-0182
山口 徹	塩野義製薬株式会社創薬第一研究所物理化学研究部門 〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4	tohru.yamaguchi@shionogi.co.jp	06-458-5861	06-458-0987
山本昭彦	日本ブルカー株式会社技術サービス部 〒305 茨城県つくば市二の宮3-21-5	ay@bruker.co.jp	0298-52-1236	0298-58-0322
山本博幸	富山化学工業株式会社総合研究所開発第一研究部 〒930 富山県富山市下奥井2-4-1	無	0764-31-8269	0764-31-8208
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
山本至臣	富山化学工業株式会社総合研究所開発第一研究部 〒930 富山県富山市下奥井2-4-1	yamamotoy@labo.toyama-	0764-31-8269	0764-31-8208
湯澤 聰	東京都臨床医学総合研究所生体活性物質研究部門 〒113 東京都文京区本駒込3-18-22	yuzawa@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
余川 隆	バリアンジャパン 〒108 東京都港区芝浦4-16-36住友芝浦ビル	takashi.yokawa@jp.varian.com	03-5232-1238	03-5232-1264
横田信三	宇都宮大学農学部森林科学科 〒321 宇都宮市峰町350	yokotas@cc.utsunomiya-u.ac.jp	028-649-5538	028-649-5545
横地政志	東京都臨床医学総合研究所生体活性物質研究部門 〒113 東京都文京区本駒込3-18-22	yokochi@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
吉岡澄江	国立医薬品食品衛生研究所 〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1	yoshioka@nihs.go.jp	03-3700-1141	03-3707-6950
好田真由美	協和醗酵工業株式会社東京研究所 〒194 東京都町田市旭町3-6-6	myoshida@kyowa.co.jp	0427-25-2555	0427-26-8330
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
吉水広明	名古屋工業大学工学部材料工学科有機材料コース辻田研究室 〒466 名古屋市昭和区御器所町	yosimizu@mse.nitech.ac.jp	052-735-5272	052-735-5294
若松 馨	群馬大学工学部生物化学工学科 〒376 桐生市天神町1-5-1	wakamats@bce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439	0277-30-1439
渡辺 剛	メニコン総合研究所研究開発部材料開発室 〒487 愛知県春日井市高森台5-1-10	XLH05136@niftyserve.or.jp	0568-95-3349	0568-95-3318
渡部徳子	東京水産大学食品生産学科生物資源化学講座 〒108 東京都港区港南4-5-7	tokuko@s4201.tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643	03-5463-0643

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
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

JMB 233 127(93)

DALI

第36回 NMR 討論会講演要旨集

発行日 1997年10月9日

発行者 第36回 NMR 討論会
世話人 稲垣 冬彦
財団法人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
TEL : 03-3823-2101 (内線5261)
FAX : 03-3823-1247
E-mail: inagaki@rinshoken.or.jp

印刷 株式会社 日出島
代表 日出島 清司
〒113 東京都文京区本郷2-16-8
TEL : 03-3818-5581
FAX : 03-3818-5587