

第 37 回 N M R 討 論 会

講 演 要 旨 集

日時 1998年11月17日(火)～19日(木)

会場 横浜市開港記念会館

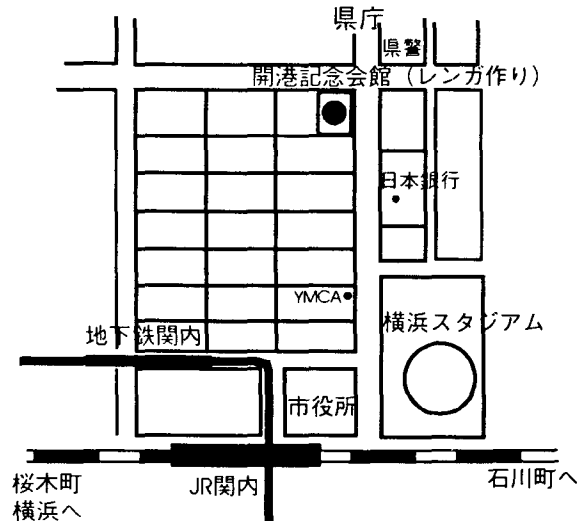
共催 日本化学会、日本薬学会、日本生物物理学会、日本生化学会、日本農芸化学会、日本分析化学会、高分子学会、日本物理学会、日本磁気共鳴医学会

第 37 回 NMR 討論会 会場案内

横浜市開港記念会館

(横浜市中区本町1-6)

◇ 会場案内図



◇ 交通

JR京浜東北・根岸線 関内駅(南口)より徒歩10分
横浜市営地下鉄 関内駅(出口1)より徒歩10分

◇ 連絡先

横浜国立大学 工学部 物質工学科
〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5
阿久津 秀雄
TEL: 045-339-4232
FAX: 045-339-4251
E-mail: nmr37@bio.bsk.ynu.ac.jp

◇ 当日連絡先

TEL: 050-303-9709

第37回NMR討論会プログラム 「NMRの方法論の応用と新展開」

第1日 11月17日 (火)

10:00~10:05)

開会の挨拶

10:05~11:25)

議長 嶋田一夫

L1 立体特異的同位体標識を用いた蛋白質内部の二面角解析 …… 1
(都立大理¹、東海大開発工²) ○楯 真一¹、寺内 勉¹、土屋征司¹、松井 裕¹、西山幸三郎²、甲斐荘正恒¹

L2 芳香族アミノ酸側鎖シグナル帰属のためのパルスシーケンスの開発 …… 5
(理研遺伝生化学¹、ケンブリッジ大生化学²、東大応用生命工学³) ○伊藤 隆¹、D. Nietlispach²、大野光宏³、
正木春彦³、E. D. Laue²、柴田武彦¹

議長 斉藤 肇

L3 ¹H、⁷Li および¹⁹F-NMRスピナーエコー磁場勾配法で測定した有機電解液の全構成成分の自己拡散係数とイオン伝導度・溶媒和とイオン対形成 …… 9
(物質研¹、ユアサコーポレーション²) ○早水紀久子¹、相原雄一²、新井盛勝²、Cirilo Garcia-Martinez¹

L4 MAS-Multiconformational液晶NMR法による環状エンケファリンの構造解析 …… 13
(阪大医) 木村敦臣、月城聖一、藤原英明

-休憩-

11:45~12:25)

議長 堀井文敬

L5 固体重水素NMRによるポリ(γ-ベンジル-L-グルタマート)の配向挙動と主鎖ダイナミクスの検討 …… 17
(北大院工) ○堤 耀広、窪田俊介、泉川大輔、平沖敏文

L6 Stray Field Imaging法による固体高分子材料解析 …… 20
(新日鐵(株)先端研¹、サリー大理²) ○齋藤公児¹、B. Newling²、P. J. McDonald²

-昼食-

4:00~16:00)

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)

議長 早水紀久子

L7 木材中の水分挙動と各種NMRスペクトル …… 24
(日本女子大¹、理研²) ○南澤明子¹、鶴沢 洵²、柴田俊之

L8 ランタノイド元素ドーブY₂O₂Sの⁸⁹Y-MAS NMR …… 28
(三菱化学横浜総研¹、東京水産大²) ○原園としえ¹、下村康夫¹、渡辺徳子²

議長 三森文行

L9 ²H NMRによるzeolite KL 細孔内のベンゼン及びシクロヘキサンの運動 …… 32
(筑波大物質工¹、物質研²) ○佐藤孝幸¹、国森公夫¹、林 繁信²

L10 家兔アキレス腱の*in vivo* H-1 DQF Imaging …… 35
(京都府立医大一生理¹・整形²、テルアビブ大化学³、生理研分子生理⁴) ○瀬尾芳輝¹、生駒和也²、高宮尚武²、
L. Tsoref³、H. Shinar³、G. Navon³、村上政隆⁴

-休憩-

17:40~18:20)

議長 恵良聖一

L11 NMRイメージングによるLECラット肝病変の1年間にわたる経時観察 …… 39
(国立環境研¹、筑波大医²、筑波メディカルセンター³) ○三森文行¹、吉岡 大^{1,2}、女屋博昭^{1,2}、板井悠二²、
土井幹雄³

- 1L12 新しいアプローチによるMR microscopeの開発(I)―臨床用マグネットと独立したMRIを用いたMR microscopeの開発― … 42
 (筑波大理工¹、筑波大臨床医²) ○巨瀬 勝美¹、拝師 智之¹、安立直剛¹、吉岡 大²、阿武 泉²

第2日 11月18日 (水)

(9:20~11:20)

特別講演 1

座長 稲垣冬彦

- 2L1 NMR of Very Weakly Aligned Macromolecules … 46
 (National Institutes of Health, USA) Ad Bax

特別講演 2

座長 寺尾武彦

- 2L2 Solid State NMR and Optically Pumped NMR for Biological Purposes … 47
 (National Institutes of Health, USA) Robert Tycko

―休憩―

(11:40~12:40)

特別講演 3

座長 阿久津秀雄

- 2L3 Generating and Exploiting Intermolecular Multiple-Quantum Coherences in Solution NMR and MRI … 48
 (Department of Chemistry, Princeton University) Warren S. Warren

―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)

(16:00~18:00)

特別講演 4

座長 堤 耀広

- 2L4 高分子のNMR … 51
 (北大理) 引地邦男

特別講演 5

座長 荒田洋治

- 2L5 NMRによる蛋白質、核酸の構造と相互作用の研究 … 52
 (阪大蛋白質研) 京極好正

(18:30~20:30)

懇親会 重慶飯店別館 (電話 045-641-8386)

第3日 11月19日 (木)

(9:20~10:40)

座長 安藤 勲

- 3L1 液体窒素蒸発量の少ないNMR超電導マグネット … 56
 (神戸製鋼開発推進センター¹、ジャパンマグネットテクノロジー²) 伊藤 聡¹、○斎藤一功¹、林 征治¹、西澤 節¹、井上康彦²

- 3L2 ゼロ量子¹³C MAS法による常磁性固体の固体高分解能NMR … 59
 (京大理¹、マインツ大²) ○久保 厚¹、T.P.Spaniol²、寺尾武彦¹

座長 鷗澤 洵

- 3L3 ¹⁰⁹Ag-¹⁰⁷Ag二重共鳴NMR測定法の開発及びその測定結果 … 63
 (無機材研、UBC化学科カナダ) 丹所正孝、和田弘昭、Colin A. Fyfe、Hiltrud Grondey、Tom Markus

3L4	家蚕および野蚕絹フィブロインの主鎖構造に関する角度依存固体 ¹⁵ Nおよび ¹³ C NMRによる研究 (東京農工大工) ○朝倉哲郎、亀田恒徳、出村 誠	… 65
－休憩－		
(11:00～12:00)		
座長 赤坂一之		
3L5	磁場配向リン脂質二重膜中生理活性ペプチドの立体構造解析 (姫路工大理) ○内藤 晶、木村成輝、永尾 隆、則定和志、辻 暁、斉藤 肇	… 68
3L6	天然物化学におけるLC-NMRの応用測定とその実際 (日本ロシユ研 ¹ 、東大院農 ² 、東大分生研 ³) ○射手園佳子 ¹ 、河原郁子 ¹ 、唐澤 薫 ¹ 、青木雅弘 ¹ 、中山 登 ¹ 、 降旗一夫 ² 、瀬戸治男 ³	… 72
座長 白川昌宏		
3L7	機能性RNAの構造及びタンパク質との相互作用の解析 (横浜国大工 ¹ 、工技院生命研 ² 、工技院産融研 ³ 、筑波大応用生化 ⁴) ○片平正人 ¹ 、小林伸一郎 ¹ 、上杉晴一 ¹ 、 山本利香 ^{2,3,4} 、多比良和誠 ^{2,3,4} 、西川 諭 ² 、P. K. R. Kumar ^{2,3}	… 76
(12:10～13:00)		
特別講演6		
座長 甲斐荘正恒		
3L8	NMR in Structural Biology – Before and After NMR Structural Determination (Eidgenössische Technische Hochschule, Switzerland) Kurt Wüthrich	… 78
－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)		
(16:00～17:40)		
座長 白川昌宏		
3L9	無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の安定同位体標識法 (理研細胞情報伝達 ¹ 、東大院理 ²) ○木川隆則 ¹ 、矢吹 孝 ¹ 、山口絵未 ¹ 、横山茂之 ^{1,2}	… 79
座長 西村善文		
3L10	温度ジャンプNMR法によるタンパク質フォールディングの研究 (神戸大自然科学 ¹ 、神戸大理 ²) ○川上 勝 ¹ 、赤坂一之 ^{1,2}	… 83
3L11	植物ホルモン応答に関連する転写因子のDNA結合ドメインと標的DNAの複合体の立体構造 (生命工研構造生物 ¹ 、生命工研植物分子生物 ²) ○山崎和彦 ¹ 、Mark D. Allen ¹ 、高木 優 ² 、舘野 賢 ¹ 、鈴木 理 ¹	… 85
座長 横山茂之		
3L12	転写因子の蛋白質間相互作用 — 立体構造、安定性と運動性 (奈良先端大バイオ) ○白川昌宏、池上貴久、佐藤滋夫、山口秀幸、尾崎順、三島正規、岡田輝政	… 87
3L13	抗体による紫外線損傷DNA認識機構のNMR解析 (東大院薬 ¹ 、北大院薬 ² 、金沢大薬 ³ 、機能水研 ⁴) ○嶋田一夫 ¹ 、加藤晃一 ¹ 、鳥澤拓也 ¹ 、山本展裕 ¹ 、丸木理世 ¹ 、 森岡弘志 ² 、小松康雄 ² 、二階堂修 ³ 、大塚栄子 ² 、荒田洋治 ⁴	… 89

ポスターセッション演題		
【溶液測定法の開発】		
P1	Pulse-Gradient Spin-Echo NMR Studies of Protein Solution Behaviour (機能水研) ○William S. Price, Fuminiko Tsuchiya and Yoji Arata	… 91
P2	蛋白質溶液多核測定における3軸PFGを用いた溶媒信号消去 (バリアンジャパン) ○根本暢明、串田克彦	… 93
P3	PFG ¹ H-NMRによる分子内運動の解析 (サントリー生有研) ○菅瀬謙治、岩下 孝	… 97

P4	インテインを利用した蛋白質の部分標識 (阪大蛋白研 ¹ 、大阪工業技術研 ² 、生体分子工研 ³) ○山崎俊夫 ¹ 、大友崇紀 ¹ 、京極好正 ¹ 、上垣浩一 ² 、伊藤暢聡 ³ 、中村春木 ³	... 99
P5	HMBC法の新しい応用測定—J分解-HMBC法について (東大院農 ¹ 、東大分生研 ²) ○降旗一夫 ¹ 、瀬戸治男 ²	... 100
P6	四級炭素の遠隔 ¹ H- ¹³ Cスピン結合定数の符号の決定 (北大理) ○熊本康裕、引地邦男	... 104
P7	gs-PASS-TOCSYとその応用 (北大農) ○福士江里、川端 潤	... 108
【溶液応用(蛋白質、ペプチド)】		
P8	小脳形成に関する蛋白質V1の立体構造決定 (都立大理) ○大野綾子、楯 真一、田岡万悟、久保田英俊、松井 裕、磯辺俊明、甲斐荘正恒	... 112
P9	hDLG PDZ2-APC C末ペプチド複合体の構造解析 (奈良先端大 ¹ 、阪大 ²) ○大木 出 ¹ 、池上貴久 ¹ 、秋山 徹 ² 、白川昌宏 ¹	... 114
P10	Grb2 C末端SH3ドメインと基質ペプチドの複合体の溶液構造 (都臨床研 ¹ 、学習院大 ² 、ニューヨーク大 ³) ○川崎政人 ¹ 、小椋賢治 ¹ 、寺沢宏明 ¹ 、湯沢 聡 ^{1,2} 、畠中秀樹 ¹ 、V. Mandiyan ³ 、J. Schlessinger ³ 、稲垣冬彦 ¹	... 116
P11	cre結合蛋白質CRE-BP1/ATF2の転写活性化ドメインの溶液構造 (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	... 117
P12	ミトコンドリア膜透過装置 rat Tom20pのcytoplasmic domainの溶液構造 (生物分子工研 ¹ 、名古屋大理 ²) ○阿部義人 ¹ 、小代俊浩 ² 、遠藤斗志也 ² 、神田大輔 ¹	... 119
P13	イネのシステインプロテイナーゼ阻害剤、オリザシスタチン-IのNMRによる構造解析 (東大生物生産工研センター ¹ 、東大院農 ²) ○永田宏次 ¹ 、工藤紀雄 ¹ 、阿部啓子 ² 、荒井綜一 ² 、田之倉 優 ¹	... 121
P14	RalBP1結合タンパク質POB1のEHドメインの構造解析 (理研細胞情報伝達 ¹ 、東大理 ² 、広島大医 ³) ○小柴生造 ^{1,2} 、木川隆則 ¹ 、岩原淳二 ¹ 、菊池章 ³ 、横山茂之 ^{1,2}	... 123
P15	出芽酵母Zinc-finger蛋白質Rme1pのDNA結合ドメインの構造解析 (東京薬大薬 ¹ 、コロンビア大 ² 、明星大理工 ³) ○神藤平三郎 ¹ 、村瀬敦司 ¹ 、A. Mitchell ² 、清水光弘 ³	... 125
P16	NMR Studies of a 35kDa Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1)-Ubiquitin Complex (理研遺伝生化学 ¹ 、東京医歯大歯 ² 、三菱化学生命研 ³ 、北里大理 ⁴) ○Sundaresan Rajesh ^{1,2} 、伊藤 隆 ¹ 、坂本泰一 ³ 、岩本真理子 ³ 、小寺義男 ^{3,4} 、土田信夫 ² 、柴田武彦 ¹ 、河野俊之 ³	... 127
P17	Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 による Ubiquitin の認識機構の NMR 解析 (三菱化学生命研 ¹ 、理研分子遺伝 ² 、東京医歯大歯 ³ 、北里大理 ⁴) ○坂本泰一 ¹ 、伊藤 隆 ² 、Rajesh Sundaresan ^{2,3} 、岩本真理子 ¹ 、小寺義男 ^{1,4} 、坂本泰一、河野俊之 ¹	... 130
P18	大腸菌嫌気性センサーキナーゼArcBのC末端リン酸転移ドメインの構造解析 (奈良先端大 ¹ 、名大 ²) ○岡田輝政 ¹ 、平山順也 ¹ 、池上貴久 ¹ 、水野 猛 ² 、白川昌宏 ¹	... 132
P19	ヒトNADPHオキシダーゼp47 PB2 domain のNMRによる立体構造解析 (生物分子工研 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	... 134
P20	ヒトテロメア結合タンパクhTRF1のDNA結合ドメインの立体構造 (横浜市大院総合理 ¹ 、阪大蛋白研 ² 、UCSF ³) ○西川忠輝 ¹ 、長土居有隆 ¹ 、吉村祥子 ² 、相本三郎 ² 、Peter Konig ³ 、西村善文 ¹	... 136
P21	局所的な構造変化を誘起したcystatin Aの構造解析 (都立大理 ¹ 、青学大理工 ²) ○須田真輔 ¹ 、楯 真一 ¹ 、大野綾子 ¹ 、梶 裕之 ¹ 、松井 裕 ¹ 、鮫島達也 ² 、甲斐荘正恒 ¹	... 138
P22	翻訳開始因子eIF4Eの構造と運動性 (Harvard Medical School, Dept. of BCMP) ○松尾 浩、A. M. McGuire、G. Wagner	... 141
P23	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	... 142
P24	VavのN末端側SH3ドメインのNMRによる立体構造解析 (都臨床研) ○小椋賢治、永田宏次、戎井悦子、畠中秀樹、稲垣冬彦	... 145

P25	ナトリウムチャンネルの不活性化ゲートペプチドとペンタペプチドKIFMKとの相互作用 (京大薬) 黒田義弘、○前田能崇、宮本和英、田中一三、大高 章、藤井信孝、中川照眞	… 146
P26	発育阻害ペプチドgrowth-blocking peptide (GBP)の立体構造解析 (北大理 ¹ 、北大低温研 ² 、富山医薬大薬 ³) ○相沢智康 ¹ 、藤谷直樹 ¹ 、早川洋一 ² 、河野敬一 ³ 、引地邦男 ¹ 、新田勝利 ¹	… 150
P27	HIV-2ヌクレオキャプシドタンパク質 C 端側部分ペプチドの立体構造解析 (北里大理 ¹ 、三菱化学生命研 ²) 小寺義男 ^{1,2} 、前田忠計 ¹ 、佐藤一紀 ² 、河野俊之 ²	… 153
P28	ω -conotoxin TXVIIの立体構造解析 (三菱化学生命研) ○小林邦子、佐々木 亨、佐藤一紀、河野俊之	… 155
P29	δ コノトキシンTxVIAの立体構造解析 (三菱化学生命研) ○河野俊之、佐々木 亨、佐藤一紀	… 157
P30	アミド基を側鎖にもつアミノ酸残基によるミオグロビンの機能調節の分子機構 (筑波大化学 ¹ 、慶応大医 ²) ○山本泰彦 ¹ 、栗原徳正 ¹ 、江川 毅 ² 、島田秀夫 ² 、石村 巽 ²	… 159
P31	チトクロム c_3 ヘム軸配位子イミダゾールNHプロトンの交差緩和 (横浜国大工 ¹ 、三菱重工基盤研 ² 、千葉工大 ³ 、東大院工 ⁴) ○原田英里砂 ¹ 、大村友章 ² 、藤原敏道 ¹ 、河合剛太 ³ 、渡辺公綱 ⁴ 、阿久津秀雄 ¹	… 163
P32	ペプチドと蛋白質の相互作用のTRNOE解析 (三菱化学生命研 ¹ 、群大工 ²) ○楠 英樹 ^{1,2} 、若松 馨 ² 、平野利好 ² 、田中剛史 ¹ 、中島勝弥 ² 、立木あゆ美 ² 、佐藤一紀 ¹ 、河野俊之 ¹	… 166
P33	β ラクトグロブリンの $\alpha \rightarrow \beta$ 転移の研究 (岐阜大医 ¹ 、阪大たんぱく研 ² 、コーネル大学 ³) ○桑田一夫 ¹ 、星野 大 ² 、後藤祐児 ² 、恵良聖一 ¹ 、CarA.Batt ³	… 167
P34	¹ H-NMRによるヒト血清アルブミン構造転移及び尿素変性の研究 (岐阜大医生理 ¹ 、岐阜大 ²) 恵良聖一 ¹ 、○曾我美 勝 ² 、中村浩二 ¹	… 169
P35	NMR化学シフト計算と化学シフトマップに基づくペプチド、タンパク質の構造解析 (東京農工大工 ¹ 、University of Sheffield ²) ○岩館満雄 ¹ 、朝倉哲郎 ¹ 、M. P. Williamson ²	… 173
P36	エラスチンタンパク質のコアセルベーション現象における自己拡散 (名工大工) ○吉水広明、早川喜子、藤原美穂、辻田義治、木下隆利	… 176
【溶液応用(蛋白質、ペプチド以外)】		
P37	GNRA tetraloopの ³¹ Pスピン緩和による内部運動解析 (都立大理) ○小野 晶、宮下 新、小野 明、楯 真一、甲斐荘正恒	… 179
P38	大腸菌 4.5S RNA のタンパク質結合部位の構造解析 (千葉工大工 ¹ 、筑波大生物科学 ²) 坂本泰一 ¹ 、鈴間 聡 ² 、山崎高生 ² 、中村幸治 ² 、山根國男 ² 、○河合剛太 ¹	… 180
P39	分岐シクロデキストリン類の溶液における立体構造 (工技院生命研 ¹ 、日本電子データム ²) ○石塚靖子 ¹ 、根本 直 ¹ 、藤原正子 ² 、藤田憲一 ² 、中西洋志 ¹	… 182
P40	Pyridine環上置換基の ¹⁵ Nと α 及び β ¹ H longrange coupling constantへの影響 (雪印乳業、日本電子、千葉大) ○佐藤陽子、内海博明、関 宏子、徳永達裕、中越雅道	… 186
P41	拡散係数測定に基づくハイドロゲル高分子と医薬品の相互作用の評価 (国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄	… 190
P42	二本鎖型界面活性剤の反応に及ぼすミセル表面電荷の効果 (名工大工) ○駒田陽三、吉野明広、岡林博文	… 193
P43	多核NMR法による水溶液中におけるイオン間相互作用の研究 (横浜国大機器分析センター ¹ 、横浜国大工 ²) 末澤裕子 ¹ 、廣田 穰 ²	… 197
P44	ポリプロピレンの ¹³ C-NMRにおけるサイクリング・サイドバンド他の問題点 (三菱化学横浜総研) ○森 輝雄	… 201
P45	コンビナトリアル・ケミストリーにおける構造決定の新技术「SR-MAS法」 (日本電子 ¹ 、東大院薬 ² 、東京理科大理 ²) ○津野久幸 ¹ 、樋岡克哉 ¹ 、小林 修 ²	… 205
【液晶、膜、不均一系】		
P46	[1- ¹³ C]Val標識バクテリオロドプシン：固体高分解能 ¹³ C NMRによる水素結合ネットワークの探索 (姫路工大理 ¹ 、ウェイン州立大 ² 、カリフォルニア大 ³) ○谷生道一 ¹ 、井上さゆり ¹ 、辻 暁 ¹ 、横田恭宣 ¹ 、Richard Needleman ² 、Janos K. Lanyi ³ 、内藤 晶 ¹ 、斉藤 肇 ¹	… 207

P47	磁場配向膜における膜貫通 α -ヘリックスの構造 (姫路工大) ○木村成輝、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇	… 211
P48	リン脂質膜中のマストバラン配向構造に関する ^{31}P 、 ^{15}N 固体NMR解析 (東京農工大 ¹ 、長崎工大 ²) ○出村 誠 ¹ 、堀由美子 ¹ 、朝倉哲郎 ¹ 、新留琢郎 ² 、青柳東彦 ²	… 215
P49	膜蛋白質における金属イオン結合の解析 (姫路工大 ¹ 、ウェイン州立大 ² 、カリフォルニア大 ³) ○辻 暁 ¹ 、山口 悟 ¹ 、谷生道一 ¹ 、小西英正 ¹ 、井上さゆり ¹ 、内藤 晶 ¹ 、Richard Needleman ² 、Janos K. Lanyi ³ 、斉藤 肇 ¹	… 217
P50	固体高分解能NMRによる磁場配向二重膜中アラメシチンの膜に対する配向の決定 (姫路工大) ○永尾 隆、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇	… 221
P51	Liquid-Crystal NMR Study of 2-Vinylxopyridine (阪大医) A. V. Vashchenko, A. Kimura, A. V. Afonin and H. Fujiwara.	… 225
P52	高分解能MAS溶液プローブを用いたリン脂質膜に結合したペプチドの構造解析 (東レリサーチセンター) ○川口 謙、木村一雄	… 228
P53	リオトロピック液晶中での硫酸キニジンのコンホメーション —溶液構造と比較して— (神戸薬大 ¹ 、阪大医 ²) ○杉浦真喜子 ¹ 、木村敦臣 ² 、藤原英明 ²	… 229
【計算、シミュレーション、データ処理】		
P54	分子動力学計算による $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}$ の緩和時間シミュレーション (金沢大理、岩手大工 ²) ○井田朋智 ¹ 、平井篤樹 ¹ 、木村潤子 ¹ 、西館数芽 ² 、水野元博 ¹ 、遠藤一央 ¹ 、須原正彦 ¹	… 233
P55	計算機支援に基づくパルス系列の開発の効率化 (都臨床研 ¹ 、明大理工 ²) ○横地政志 ¹ 、楠 正美 ² 、稲垣冬彦 ¹	… 237
P56	NMR化学シフトにおける相対性効果 (北見工大) ○馬場雄久、福井洋之	… 238
P57	C^{13} -NMR、Vamp及びMOPACによるCre及びCmの変換機構の解明とその応用 (味の素中央研) ○大竹亮子、島 圭吾、海老沢計慶、高橋三雄、鈴木榮一郎、井澤邦輔	… 240
【医用/ <i>in vivo</i> NMRとイメージング】		
P58	合成高分子ゲルによる磁化移動コントラスト法の基礎的検討 (岐阜大医生理 ¹ 、岐阜大 ² 、京都府立医大放射線医学 ³ 、愛知県がんセンター放射線治療 ⁴ 、藤田保衛大衛生 ⁵) ○恵良聖一 ¹ 、曾我美 勝 ² 、紀ノ定保臣 ³ 、松島 秀 ⁴ 、内山幸男 ⁴ 、加藤和夫 ⁵ 、永井直樹 ¹	… 242
P59	誘電共振の画像信号に及ぼす影響 (東大医) ○湯川泰宏、入口紀男、上野照剛	… 246
P60	リアルタイム3D-MRIシステムの開発 (筑波大理工) ○拝師智之、巨瀬勝美	… 250
P61	新しいアプローチによるMR microscopeの開発(II) —3D画像の処理法と表示法の開発— (筑波大理工 ¹ 、筑波大臨床医 ²) ○拝師智之 ¹ 、安立直剛 ¹ 、巨瀬勝美 ¹ 、吉岡 大 ² 、阿武 泉 ²	… 254
P62	3D-MR画像からの泡多面体の自動抽出法の開発 (筑波大理工工学系) ○安立直剛、拝師智之、巨瀬勝美	… 258
P63	回転座標系イメージング法による ^{13}C の空間分布計測 (電総研) ○服部峰之、清水秀明、守谷哲郎	… 262
P64	NMRマイクロイメージングによる植物組織の凍結制御機構の解析 (機能水研 ¹ 、生物資源研 ²) ○井出博之 ¹ 、石川雅也 ² 、William S. Price ¹ 、荒田洋治 ¹	… 264
P65	拡散測定によるインゲンの生育に伴う組織構造の変化の解析 (食品総合研 ¹ 、日本電子データム ² 、農業生物資源研 ³) ○石田信昭 ¹ 、小川秀次郎 ² 、小泉美香 ³ 、狩野広美 ³	… 267
P66	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 第二報 (東芝研究開発センター ¹ 、創価大生命科学研究 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 、金松知幸 ² 、塚田裕三 ²	… 271
P67	マウス脳内高エネルギーリン酸化合物の化学交換MRI (九大薬) ○栗林秀人、金沢洋子	… 275
P68	光学活性シフト試薬による脳内代謝物質の分析 (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	… 279

P69	リポソーム造影剤の ¹⁹ F-NMRイメージングへの応用 (阪大医 ¹ 、九大薬 ²) ○月城聖一 ¹ 、木村敦臣 ¹ 、金沢洋子 ² 、藤原英明 ¹	… 282
【固体測定法の開発】		
P70	隣接分子の相対配置決定のための多スピンREDOR解析 (姫路工大) ○西村勝之、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇	… 286
P71	¹⁷ O高磁場固体高分解能NMR法を用いたペプチドおよびポリペプチドの構造解析 (日本ブッカー ¹ 、東工大工 ² 、群馬大工 ³) ○山内一夫 ^{1,2} 、黒木重樹 ² 、安藤 勲 ² 、荘司 顯 ³ 、尾崎拓男 ³	… 290
P72	固体 ¹³ C- ² H 2次元相関MASNMR法による常磁性物質の分解能向上 (京大理) 伊藤俊樹、久保 厚、寺尾武彦	… 293
P73	MAS下での ¹³ C- ¹ H双極子粉末パターンの復活法の開発とその応用 (京大理) ○竹腰清乃理、寺尾武彦	… 297
P74	回転試料中の同種核2スピン系に対するスピンエコーパルス系列の効果 (分子研 ¹ 、筑波大理工 ²) ○桑原大介 ¹ 、中井利仁 ² 、宮島清一 ¹	… 299
P75	重水素核の1次元交換NMR法の開発 (京大理) ○水野 敬、竹腰清乃理、寺尾武彦	… 300
P76	¹ H CRAMPS NMR による α -アミノ酸の結晶構造の研究 (群馬大工 ¹ 、日本電子 ² 、味の素 ³) ○木村英昭 ¹ 、中村かおり ¹ 、江口暁子 ¹ 、杉沢寿志 ² 、出口健三 ² 、海老澤計慶 ³ 、鈴木榮一郎 ³ 、荘司 顯 ¹	… 303
P77	同位体標識生体高分子の構造解析のための多次元固体高分解能NMR法の開発 (横浜国大工) ○佐々健太郎、藤原敏道、阿久津秀雄	… 307
P78	固体NMRによるアデノシン二面角の決定法の開発 (横浜国大工) ○鈴木栄一、藤原敏道、阿久津秀雄	… 311
P79	光励起三重項状態を用いた動的核偏極NMRの応用をめざして (京大理) ○武田和行、今泉孝幸、溝上潤、竹腰清乃理、寺尾武彦	… 315
【固体物性、高分子、固体イメージング】		
P80	棒状分子のゾルゲル転移 (北大院工) 平沖敏文、磯田由美、谷 知広、武川雅英、堤 耀広	… 318
P81	¹ H CRAMPS法による高分子の水素結合に関する構造解析 (京大化研) ○増田憲二、梶 弘典、堀井文敬	… 319
P82	固体二次元スピンエコーMAS法によるポリ-L-アラニン α ・ β 炭素の化学シフトテンソルと二次構造 (東工大生命理工) 浅川直紀、竹野入正利、櫻井 実、井上義夫	… 322
P83	固体2次元交換 ¹³ C-NMR法によるPMAAの脱水反応過程 (防大化) ○浅野敦志、黒津卓三	… 324
P84	高圧固体高分解能NMR法によるXeガス存在下における高分子混合体の分子運動の研究 (京大院理) ○三好利一、清水弘之、竹腰清之理、寺尾武彦	… 326
P85	高分子の過冷却液晶状態の構造とダイナミクスに関する固体NMR解析 (京大化研) ○石田宏之、森本英敏、堀井文敬	… 329
P86	固体 ¹³ C、 ¹⁵ N-NMR化学シフトを用いた芳香族イミド化合物のコンホメーション解析 (東工大工) ○石井張愛、安藤 勲、安藤慎治	… 332
P87	¹³ CNMR化学シフトを用いたビフェニル化合物の結晶中のコンホメーション解析 (東工大工) ○廣中俊也、黒子弘道、安藤 勲、安藤慎治	… 336
P88	固体2次元 ¹³ Cスピン拡散NMRによる絹フィブロインの構造解析 (東京農工大工 ¹ 、Natick RD&E Center ²) ○亀田恒徳 ¹ 、出村 誠 ¹ 、朝倉哲郎 ¹ 、F.A.Fossey ²	… 340
P89	高分子へのXe吸着挙動と ¹²⁹ Xe NMR化学シフト (名工大工) ○宮内 実、鈴木智幸、吉水広明、辻田義治、木下隆利	… 342
P90	拘束した超延伸ポリエチレン繊維の結晶転移およびダイナミクスに関する固体 ¹³ C NMR解析 (京大化研) ○桑原和弘、梶 弘典、堀井文敬	… 345
P91	固体高分解能 ¹³ CNMRによる凍結乾燥製剤中のタンパク質および高分子添加剤の分子運動性の測定 (国立衛研 ¹ 、横浜国大工 ²) ○吉岡澄江 ¹ 、阿曾幸男 ¹ 、小嶋茂雄 ¹ 、櫻井智司 ² 、藤原敏道 ² 、阿久津秀雄 ²	… 349

P92	高分子の結晶化過程の <i>in situ</i> 固体 ¹³ C NMR解析 (京大化研 ¹ 、龍谷大理工 ²) ○大平康正 ¹ 、堀井文敬 ¹ 、中沖隆彦 ²	… 352
P93	高分子中に吸着されたXenonの動的挙動と高分子鎖の分子運動 (阪大院理 ¹ 、帝人構造解析センター ² 、神戸薬大 ³) ○永阪文物 ^{1,2} 、上田貴洋 ¹ 、中山尋量 ³ 、江口太郎 ¹ 、中村巨男 ¹	… 355
P94	¹⁹ Fおよび ¹³ C固体NMRによるバクテリオロドプシンの構造解析 (サントリー生有研) ○岩下 孝、関谷紀子、金 鍾文、吉原和雄、石黒正路	… 358
P95	縮合多環化合物と鎖状炭化水素の混合物の固体NMR (電通大 ¹ 、工学院大工 ²) ○小林信昭 ¹ 、安達久彰 ¹ 、仁木國雄 ¹ 、鈴木 冲 ¹ 、矢ヶ崎隆義 ²	… 361
P96	イミダゾール結晶中における水素結合の ¹⁵ N固体NMRによる研究 (阪大院理 ¹ 、分子研 ²) ○上田貴洋 ¹ 、増井大二 ¹ 、長友重紀 ² 、中村巨男 ¹	… 365
P97	アルカリ-水素-C ₆₀ 三元系化合物のNMR (II) (分子研) ○緒方啓典、宮島清一	… 367
P98	V ₂ O ₅ 層間に取り込まれたD ₂ Oの動的挙動の固体 ² H-NMRによる研究 (群馬大工 ¹ 、阪大院理 ² 、岡山大理 ³) ○武田 定 ¹ 、後藤裕子 ¹ 、丸田悟朗 ² 、高原周一 ³ 、橋高茂治 ³	… 370
P99	[Cu(H ₂ O) ₆][PtCl ₆]結晶における構造相転移と水素結合 (金沢大理) ○水野元博、飯島隆広、折井謙吾、須原正彦	… 371
P100	優先富化現象を示す化合物の固体NMR (理研分子構造解析室 ¹ 、京大院人間環境学 ²) ○仲村高志、高橋弘樹、田村 類、鷺澤 洵	… 373
P101	水素結合型有機強磁性体HQNNの極低温固体 ² H-NMRによる研究 (群馬大工 ¹ 、阪大院理 ² 、東大院総合 ³ 、都立大院工 ⁴) ○丸田悟朗 ² 、武田 定 ¹ 、松下未知雄 ⁴ 、泉岡 明 ³ 、菅原 正 ³ 、山口 兆 ²	… 377
P102	高速スイッチング磁場勾配系を用いないマジックエコー固体イメージング (筑波大理工) ○野中正幸、松井 茂、中井利仁、井上多門	… 378
【固体化学におけるNMR】		
P103	水に溶ける新規チタンエン酸錯体の ¹³ C-NMRおよび機能性チタン複合酸化物合成への展開 (東工大応セラ研 ¹ 、東工大資源研 ²) ○多田 大 ¹ 、垣花真人 ¹ 、中村義之 ²	… 382
P104	¹ H- ³¹ P SEDOR NMR法による12タングストリン酸無水物 (H ₃ PW ₁₂ O ₄₀) のプロトンサイトの研究 (阪大院理) ○上田貴洋、辰巳奉正、中村巨男	… 386
P105	ニトロアニリン類の ¹³ C CP/MAS NMRスペクトルにおけるNに結合したCのシグナルのパターンについての検討 (物質研) ○林 繁信	… 388
P106	⁷ Li NMRによるイオン伝導性ガラスのイオンダイナミクスの検討 (大工研 ¹ 、分子研 ²) ○赤井智子 ¹ 、大石 修 ² 、宮島清一 ²	… 391
P107	Spin-Lattice Relaxations and Dynamics in Kaolinite Intercalation Compounds (物質研) ○Xiulan Xie、林 繁信	… 393
P108	Ag _x Cu _{1-x} I (0 ≤ x ≤ 0.5)の ⁶³ CuNMR及びX線回折 (金沢大理) ○木村潤子、水野元博、遠藤一央、須原正彦	… 397
P109	¹ H NMR Studies of Hydrogen Sites and Mobility in V-H-D Alloys (物質研) ○B. Bandyopadhyay、林 繁信	… 400
P110	固体NMR法によるいくつかの複素環π共役系高分子の固体構造に関する研究 (東工大生命理工 ¹ 、東工大資源化学研 ²) 浅川直紀 ¹ 、櫻井 実 ¹ 、井上義夫 ¹ 、山本隆一 ²	… 404
P111	多次元相関NMR法による包接ゲスト分子の配列の研究 (京大院) ○中村新治、竹腰清乃理、今城文雄、寺尾武彦	… 406
P112	固体高分解能NMRによるヒトカルシトニン繊維形成機構の解明 (姫路工大 ¹ 、日本チバガイギ国際研 ²) ○上平美弥 ¹ 、内藤 晶 ¹ 、大城由紀 ¹ 、辻 暁 ¹ 、野坂篤子 ² 、斉藤 肇 ¹	… 408
P113	固体 ² DNMRによるペプチドおよびポリペプチドの水素結合の研究 (東工大工) ○小野真之介、黒木重樹、安藤 勲	… 412

【ハードウェア】

- P114 化学種特異的³¹P-NMRイメージング装置の開発 …… 414
(日立基礎研) ○田村 充、尾藤良孝
- P115 高磁場高圧高分解能NMR測定装置の開発とシクロファン¹のNMRスペクトルに対する圧力効果 …… 417
(神戸大理¹、神戸大院自然²) ○山田博昭¹、西川和義¹、室 文人¹、渡邊愛子¹、西中清寿子¹、赤坂一之²
- P116 固体NMR用高速デジタル任意波形発生装置の試作 …… 421
(京大理) ○久保 厚、高岡一馬、寺尾武彦
- P117 ¹³C用高感度前置増幅器の開発 …… 425
(日本電子) ○末松浩人、栗原範明
- P118 硝酸鉛の²⁰⁷Pb MAS NMR測定による高温VTMASの温度較正 …… 427
(ジャパンエネルギー分析センター¹、日本電子²、東工大工³) ○高橋俊朗¹、杉沢寿志²、馬場俊秀³

【その他】

- P119 光ポンピングによるスピン偏極Xeガス発生法の最適化 …… 430
(電総研) ○服部峰之、平賀 隆、守谷哲郎
- P120 NMR Prediction Software and Tubeless NMR - an Analytical Tool for Screening of Combinatorial Libraries …… 432
(Advanced Chemistry Development) ○Antony Williams、Dmitry Mityushev、Vladimir Shilay、Sergey Bakulin
- P121 NMR分光法によるアルカリプロマイド水溶液中における水分子のD核および¹⁷O核のスピン-格子緩和速度におよぼす圧力効果 …… 433
(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

【付録】

- キーワード索引 …… 435
- 著者索引 …… 441
- 参加者名簿 …… 447

第 1 日 (11 月 17 日 火曜日)

講演要旨

1L1

立体特異的同位体標識を用いた蛋白質の二面角解析

(都立大・理1、東海大開発工2) ○楯 真一¹、寺内 勉¹、土屋征司¹、松井裕¹、
西山幸三郎²、甲斐莊正恒¹

Application of the stereoselective deuteration to elucidate the accurate torsion angles in a protein

**Shin-ichi Tate, Tsutomu Terauchi, Seiji Tsuchiya, Yutaka Matsui, Kouzaburo Nishiyama,
and Masatsune Kainosho**
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo Metropolitan University
Tokai University

Abstract : The 'accurate' measurement of spin coupling constants is not trivial even with the recently devised NMR techniques. The spin coupling constants involving the protons in CH₂ moieties intrinsically suffer from the interference caused by the spin relaxation of the coupled spins, leading to the systematic under estimation of the J-values. In the past a few years, we have been focusing on the experimental strategies to overcome this problems in measuring spin coupling constants from the sample preparation and NMR experimental sides. In this presentation, we will report our recent extended applications of the stereoselective deuteration to refine the NMR derived torsion angle information in a protein.

Introduction : The CH₂ moieties in a protein are preferable to give us a set of 120° shifted vicinal spin couplings enabling us to uniquely determine torsion angles. However, the large dipolar interaction among these spatially neighboring protons limits the accuracy of the observed J-coupling constants. We have shown the stereoselective deuteration at Cβ site can much improve the accuracy of the experimentally derived J-coupling constants and based on those values we analyzed the rotameric state of χ₁ side chain in a protein. The deuteration at Cβ site can not only eliminate the dipolar interference effect on the observed ¹H-¹H homonuclear coupling constants, but also can expand the lowest observable J-values in the heteronuclear spin echo difference spectroscopy due to the reduction of the transverse spin relaxation rate of the protons at Cβ sites. As extended application of the above strategy, we will show you the torsion angle analysis of χ₁ using much extensive deuteration and also φ torsion angle analysis on Gly residues with the stereoselective deuteration on ¹³Cα site.

Keywords: stable isotope labeling, deuteration, torsion angle analysis, spin coupling constants

たて しんいち、てらうちつとむ、つちやせいじ、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

χ_1 torsion angle analysis using the stereoselectively deuterated Phe with perdeuteration at ring

In the previous application we have shown, ^2H was introduced only on the $\text{C}\beta$ site. In considering the long range home- and heteronuclear scalar couplings and also ^1H - ^1H dipolar interaction between $\text{H}\beta$ protons and ring protons in Phe residue, we can recognize those would contribute to the systematic errors in the measured couplings. To make clear this contribution, we labeled a protein with the Phe stereoselectively deuterated at $\text{C}\beta$ site and also simultaneously perdeuterated at ring portion. In this Phe, the all spins essentially used for the χ_1 analysis can be treated as isolated spin system from the neighboring protons in the same residue, giving us the ideal situation for the accurate J-analysis. We applied this labeling to a protein, cystatin A (11kDa).

As shown in Fig 1, two types of stereoselectively deuterated Phe, (2R, 3S)-Phe and (2S, 3S)-Phe, were directly incorporated into a protein using standard culture of *E.coli*. Cystatin A has overall rotational correlation time of 4.7 ns evaluated on the ^{15}N spin relaxation analysis. In this size of protein, we did not measure any significant differences in J-couplings between the results obtained with Phe with perdeuterated and non-deuterated at ring. Table 1.

Table 1. Comparison of the observed $J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}$ coupling constants in cystatin A

	perdeuterated	non-deuterated
F70	11.1 ± 0.3 Hz	12.0 ± 1.0 Hz
F98	5.6 ± 0.7 Hz	5.5 ± 0.7 Hz

The listed couplings around χ_1 were measured according to the previously reported experiments, Table 2. And the rotameric state of each χ_1 side chain torsion was analyzed based on the simple motion models we used in the previous analysis as shown in Table 3.

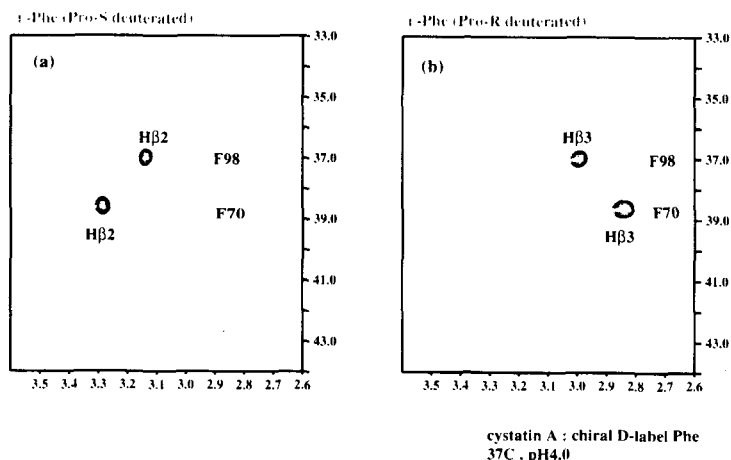


Fig. 1 : Stereoselective deuteration at $\text{C}\beta$ site of Phe residues in cystatin A

Table 2 : The collected spin coupling constants in Phe residues in cystatin A (pH 4.0, 37°C)

residue		$J_{\alpha\beta}$	$J_{n\beta}$	$J_{c\beta}$ [Hz]	appr. χ^1
F70	H β 2	6.1 ± 0.2	< -1.2	9.1 ± 0.1	180°
	H β 3	11.1 ± 0.3	-1.5 ± 0.3	2.2 ± 0.8	
F98	H β 2	5.0 ± 0.2	-4.0 ± 0.2	2.0 ± 1.1	60°
	H β 3	5.6 ± 0.7	< -1.3	8.9 ± 0.2	

Table 3 : Results of χ^1 -torsion angles with different motional models. Cystatin A (pH 4.0, 37°C)

residue	model	result	r.m.s.d.	Q
F70	Rigid rotamer	$\chi^1=161.5$	0.87	69.5%
	Staggered conformation	$\chi^1 (60^\circ)$ 0.0 % $\chi^1 (180^\circ)$ 86.1 % $\chi^1 (-60^\circ)$ 13.9 %	0.75	72.8 %
	Two site jump model	$\chi^1 (162.1^\circ)$ 98.2 % $\chi^1 (-121.9^\circ)$ 1.8 %	0.82	33.4 %
	Gaussian angle distribution	$\chi^1 = 162.2 \pm 7.1^\circ$	0.82	67.4 %
F98	Rigid rotamer	$\chi^1=72.3^\circ$	1.60	50.1 %
	Staggered conformation	$\chi^1 (60^\circ)$ 85.8 % $\chi^1 (180^\circ)$ 0.0 % $\chi^1 (-60^\circ)$ 14.2 %	1.02	75.4 %
	Two site jump model	$\chi^1 (68.5^\circ)$ 85.7 % $\chi^1 (-6.0^\circ)$ 14.3 %	0.98	47.2 %
	Gaussian angle distribution	$\chi^1 = 67.2 \pm 22.1^\circ$	0.97	78.3 %

ϕ -torsion angle of Gly residues using the stereoselective deuteration on C α site

The same problems in J analysis is encountered in J (HN, H α) of Gly residues. We have shown a metabolic way of stereoselective deuteration on C α site in Gly, a couple of years ago. By applying this labeling, we can obtain the proteins labeled with [R- 2 H]Gly or [S- 2 H]Gly. Using these stereoselectively deuterated proteins, we can accurately measure both 3 J(NH, H α) and 3 J(NH, H $^{\delta}$ α), giving the unique determination of ϕ -torsion angles of these glycines. Table 4 summarize the collected J-values and the evaluated ϕ -torsion angles of Gly residues in cystatin A.

Table 4: The collected spin coupling constants, J(HN, H α), in glycine residues in cystatin A (pH 4.0, 37°C)

residue	3 J _{NH,Hα} [Hz]	3 J _{NH,H$^{\delta}$$\alpha$} [Hz]	ϕ -torsion [deg.]
G4	5.1 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	-176.1
G5	5.2 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	60.2
G36	6.1 \pm 0.1	4.2 \pm 0.4	-86.3
G50	2.0 \pm 1.0	7.5 \pm 0.1	153.0
G60	4.4 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	176.2
G75	4.9 \pm 0.1	5.6 \pm 0.1	71.0
G84	3.1 \pm 0.4	2.7 \pm 0.4	4.4
G97	3.1 \pm 0.5	4.5 \pm 0.2	-31.5

In the accurate ϕ -torsion analysis, the collected two experimental input are not enough. To collect further complementary structure information, we are currently working on the torsion angle analyses using the dipole-dipole cross-correlated relaxation by ZQ/DQ spectroscopy using this sample, Fig. 2. The details of the experiments will be shown in our presentation.

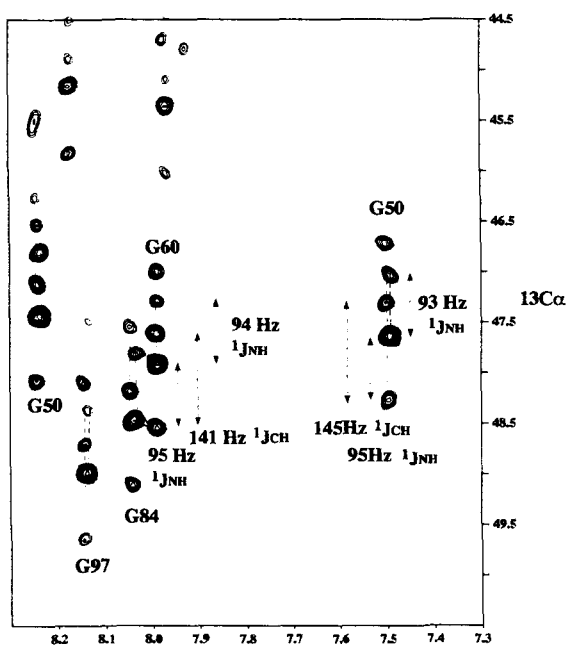


Fig. 2 : ZQ/DQ spectrum for the DD cross correlated relaxation analysis.

芳香族アミノ酸側鎖シグナル帰属のためのパルスシーケンスの開発
(理研遺伝生化学¹, ケンブリッジ大生化学², 東大応用生命工学³)

〇伊藤 隆¹, D. Nietlispach², 大野光宏^{1,3}, 正木春彦³, E. D. Laue², 柴田武彦¹

Novel pulse sequences for the resonance assignment of aromatic side-chains in conjunction with α/β -selective deuteration

Yutaka Ito¹, Daniel Nietlispach², Mitsuhiro Ohno^{1,3}, Haruhiko Masaki³, Ernest D. Laue² and Takehiko Shibata¹

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

²Cambridge Centre for Molecular Recognition, Department of Biochemistry, University of Cambridge, U.K.;

³Department of Biotechnology, The University of Tokyo, JAPAN

A combination of simulation and experiment is used to demonstrate novel triple-resonance NMR experiments, $H_8(C_8C_\gamma C_\beta C_\alpha CO)NNH$ and $H_\epsilon/H_\delta(C_\epsilon/C_\delta C_\gamma C_\beta C_\alpha CO)NNH$. These experiments correlate the amide 1H and ^{15}N resonances of one residue with aromatic 1H and ^{13}C resonances of its preceding residue. By incorporating $^{13}C/^{15}N$ -labelled phenylalanine in which α/β -positions are selectively deuterated into uniformly $^2H/^{15}N$ -labelled proteins, the sensitivity of these experiments is significantly improved. These experiments provide an efficient approach for the unambiguous assignment of aromatic side-chains.

Introduction

Distance restraints around aliphatic and aromatic amino acid residues are important for the global fold determination, since hydrophobic interactions of these residues construct the protein core. In recent years, amino acid selective labelling of aliphatic side-chains in a completely deuterated background has been reported as an approach for the global fold determination (1,2,3). For the assignment of methyl groups of these aliphatic residues, a couple of pulse sequences have been proposed in which the methyl proton magnetization is finally transferred to backbone amide protons by using one-bond homonuclear/heteronuclear J couplings, thus providing unambiguous assignments (4,5). In contrast, for the aromatic side-chains, intraresidue NOEs are usually used for the assignment of 1H and ^{13}C resonances. This NOE-based approach may cause ambiguity in assignments, in particular for the regions of aromatic clusters. Some pulse sequences have been proposed aiming at unambiguous assignments of aromatic 1H and ^{13}C resonances by correlating the chemical shifts of C_β and of aromatic protons via J couplings (6,7,8). However, these pulse sequences still cause ambiguity when the chemical shifts of C_β overlap each other, especially, in larger proteins.

In this study we present two new pulse sequences, $H_8(C_8C_\gamma C_\beta C_\alpha CO)NNH$ and $H_\epsilon/H_\delta(C_\epsilon/C_\delta C_\gamma C_\beta C_\alpha CO)NNH$, for the assignment of side-chain 1H and ^{13}C resonances of aromatic residues by a combination of triple-resonance NMR and selective $^1H/^{2}H/^{13}C/^{15}N$ -labelling for aromatic residues. These pulse sequences correlate the side-chain $^1H/^{13}C$ resonances of one aromatic residue with amide 1H and ^{15}N resonances of the following residue, thus providing unambiguous assignment due to well-separated ^{15}N chemical shifts.

Experimental Methods

To demonstrate the pulse sequences and the contribution of regio-selective α/β -deuteration, *E. coli* ImmE6 protein (84 residues) was produced in an *E. coli* expression system at 37 °C in M9 minimal media containing α/β -deuterated and uniformly $^{13}C/^{15}N$ -labelled phenylalanine (α/β - $^2H/^{13}C/^{15}N$ -Phe) with D-glucose- 2H_6 and $^{15}NH_4Cl$ as the sole carbon and nitrogen sources, respectively. This Phe-selectively labelled protein will be described as α/β - $^2H/^{13}C/^{15}N$ -Phe-(bg- $^2H/^{15}N$)-ImmE6 henceforth. Completely protonated and uniformly $^{13}C/^{15}N$ -labelled ImmE6 ($^{13}C/^{15}N$ -ImmE6) was also prepared.

タンパク質, 位置特異的重水素化, 芳香族アミノ酸, triple-resonance NMR

いとうゆたか, Nietlispach D., おおのみつひろ, まさきはるひこ, Laue E. D., しばたたけひこ

The method described by Tenenbaum *et al.* (9), and LeMaster and Richards (10) was applied to prepare α/β - $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Phe starting from $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled phenylalanine. The deuteration efficiency was checked by measuring ^1H -NMR of the final product and found to be more than 95%.

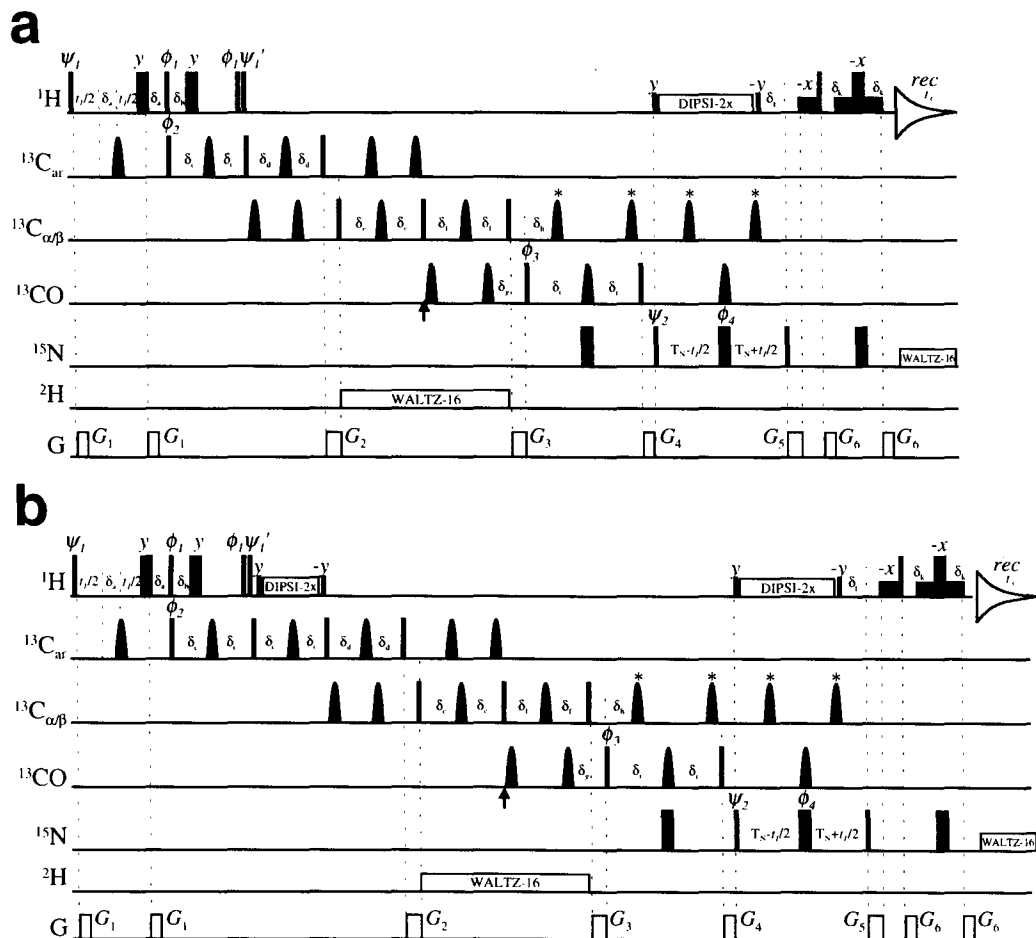


Figure 1. Pulse schemes for the (a) $\text{H}_\delta(\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ and (b) $\text{H}_e/\text{H}_\delta(\text{C}_e/\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$. All narrow and wide pulses have flip angles of 90° and 180° , respectively, and unless indicated otherwise are applied along the x axis. Half height filled boxes represent water selective 90° ^1H pulses. The ^1H , ^2H , $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$, and ^{15}N carriers are centered at 4.7 (water), 4.7, 44.9, and 118.2 ppm, respectively. Pulses for aromatic and carbonyl carbons are applied from one channel by switching the carrier from 130.9 to 176.3 ppm at the points indicated by arrowheads. Field strengths for all ^{13}C 90° rectangular pulses are set avoiding excitation of other unwanted ^{13}C magnetizations. Q3 180° pulses are applied for α/β , aromatic and carbonyl carbons with durations of 320, 427 and 427 μs , respectively. Four phase-shifted rSNOB pulses (367 μs) are applied for α carbons (indicated by *). Typical values for the delays are $\delta_1=1.5\text{ms}$, $\delta_2=1.55\text{ms}$, $\delta_3=2.1\text{ms}$, $\delta_4=2.1\text{ms}$, $\delta_5=6.2\text{ms}$, $\delta_6=6.9\text{ms}$, $\delta_7=4.5\text{ms}$, $\delta_8=4.4\text{ms}$, $\delta_9=12.4\text{ms}$, $\delta_{10}=5.4\text{ms}$, $\delta_{11}=2.25\text{ms}$, $T_{\text{relax}}=12.0\text{ms}$. The following phase cycling is employed: $\psi_1=x$; $\psi_2=x$; $\psi_3=4x$, $4(-x)$; $\phi_1=y$; $\phi_2=8x$, $8(-x)$; $\phi_3=2x$, $2(-x)$; $\phi_4=8x$, $8(-x)$; $\text{rec}=x$, $2(-x)$, x , $-x$, $2x$, $2(-x)$, $2x$, $-x$, x , $2(-x)$, x . Gradient pulses are applied with durations and strengths as follows: $G_1=0.4\text{ms}$ (10.0Gcm^{-1}); $G_2=0.6\text{ms}$ (6.1Gcm^{-1}); $G_3=0.8\text{ms}$ (6.1Gcm^{-1}); $G_4=1.3\text{ms}$ (6.1Gcm^{-1}); $G_5=2.3\text{ms}$ (9.2Gcm^{-1}); and $G_6=0.4\text{ms}$ (18.3Gcm^{-1}).

Figures 1a and 1b illustrate the pulse sequences that have been developed to provide $^1\text{H}_\delta/^{13}\text{C}_\delta - ^1\text{H}_\text{N}$ and $^1\text{H}_e/^{13}\text{C}_e - ^1\text{H}_\text{N}$ correlations for proteins in which α/β -position of aromatic residues are deuterated, respectively. For completely protonated samples, "no ^2H -decoupling

versions" of the pulse sequences 1a and 1b were performed with additional ^1H CPD and optimised delays. The basic "architecture" of these pulse sequences is CBCA(CO)NNH pulse sequence following the $^1\text{H}(\text{aromatic})\text{-}^{13}\text{C}(\text{aromatic})$ INEPT, one/two step(s) $^{13}\text{C}\text{-}^{13}\text{C}$ COSY and $^{13}\text{C}_\gamma(\text{aromatic})\text{-}^{13}\text{C}_\beta$ INEPT transfers.

The ^2H -decoupling versions of $\text{H}_\delta\text{C}_\delta(\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ and $\text{H}_\epsilon\text{C}_\epsilon\text{H}_\delta\text{C}_\delta(\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ experiments were recorded in the 2D ($^1\text{H}\text{-}^1\text{H}_\text{N}$ or $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}_\text{N}$) mode on a 0.8mM sample of the $\alpha/\beta\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-Phe}\text{-}(\text{bg}\text{-}^2\text{H}/^{15}\text{N})\text{-ImmE6}$ in 90% $^1\text{H}_2\text{O}$ / 10% $^2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Na-phosphate (pH 6.0) and with the probe temperature of 30 $^\circ\text{C}$. The "no ^2H -decoupling version" experiments were recorded in a similar manner on a 0.8mM sample of the $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-ImmE6}$ in the same NMR buffer and at the same probe temperature. All the experiments were performed on a Bruker DRX 600.

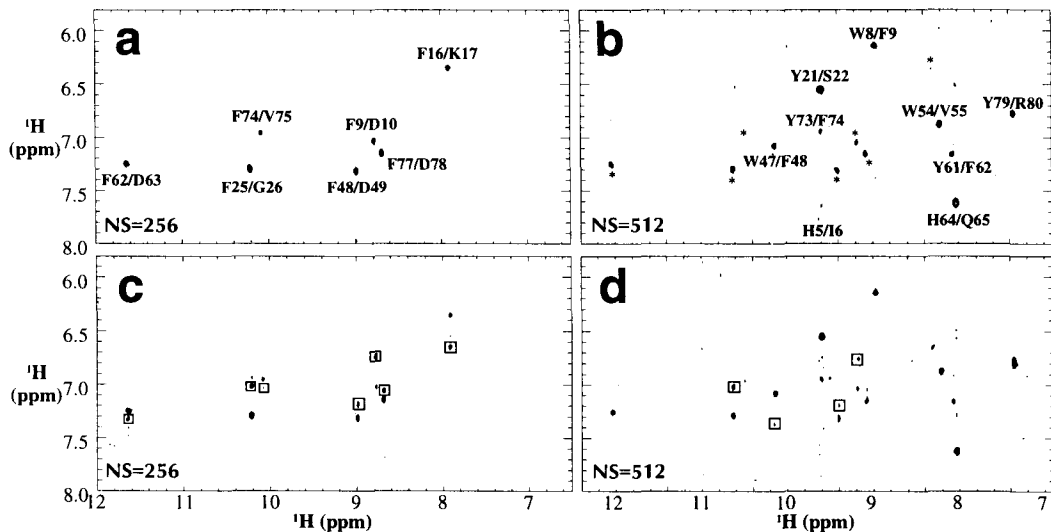


Figure 2. Two dimensional ($^1\text{H}\text{-}^1\text{H}_\text{N}$) spectra recorded using the $\text{H}_\delta(\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ (a and b) and $\text{H}_\epsilon/\text{H}_\delta(\text{C}_\epsilon/\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ (c and d) pulse sequences. Two spectra on the left were measured on $\alpha/\beta\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-Phe}\text{-}(\text{bg}\text{-}^2\text{H}/^{15}\text{N})\text{-ImmE6}$. Two spectra on the right were measured on $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-ImmE6}$. All of the spectra were recorded on a Bruker DRX600 spectrometer using samples of ~ 0.9 mM concentration and at the probe temperature of 303K. Each 2D data set was recorded with a total of 32×1024 complex points and maximum acquisition times of 24.2 and 102.5ms in $t_1(^1\text{H})$ and $t_1(^1\text{H}_\text{N})$, respectively, and processed using Azara software (Boucher, unpublished) applying the 1D maximum entropy method for t_1 dimension. All possible cross peaks due to seven Phe residues were observed in the $\text{H}_\delta(\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ spectrum of $\alpha/\beta\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-Phe}\text{-}(\text{bg}\text{-}^2\text{H}/^{15}\text{N})\text{-ImmE6}$, while some of the peaks were missing for $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-ImmE6}$. Assignments are indicated in the $\text{H}_\delta(\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ spectra. Additional cross peaks corresponding to $\text{H}_\epsilon \rightarrow \text{H}_\text{N}$ transfer are indicated by boxes in the $\text{H}_\epsilon/\text{H}_\delta(\text{C}_\epsilon/\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ spectra.

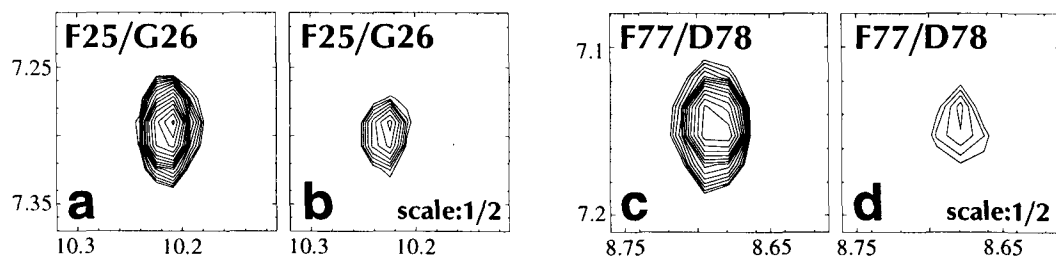


Figure 3. Two small regions in the two dimensional ($^1\text{H}\text{-}^1\text{H}_\text{N}$) $\text{H}_\delta(\text{C}_\delta\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ spectra of (a and c) $\alpha/\beta\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-Phe}\text{-}(\text{bg}\text{-}^2\text{H}/^{15}\text{N})\text{-ImmE6}$ and (b and d) $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\text{-ImmE6}$. Cross peaks corresponding to the $\text{H}_\delta(\text{F25}) \rightarrow \text{H}_\text{N}(\text{G26})$ and $\text{H}_\delta(\text{F77}) \rightarrow \text{H}_\text{N}(\text{D78})$ transfers are shown. Intensity of cross peaks were scaled according to the number of scan for each spectrum.

Figure 2 shows the spectra of the 2D ($^1\text{H}\text{-}^1\text{H}_\text{N}$) versions of $\text{H}_\delta\text{C}_\delta(\text{C}_\gamma\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{CO})\text{NNH}$ and

$H_{\epsilon}C_{\epsilon}H_{\delta}C_{\delta}(C_{\gamma}C_{\beta}C_{\alpha}CO)NNH$ measured on $\alpha/\beta\text{-}^2H/^{13}C/^{15}N\text{-Phe-(bg-}^2H/^{15}N)\text{-ImmE6}$ (Figures 2a and 2c) and $^{13}C/^{15}N\text{-ImmE6}$ (Figures 2b and 2d). In Figure 2a, all of possible cross peaks corresponding to six phenylalanine residues in ImmE6 were clearly observed. Additional six cross peaks corresponding to $^1H_{\epsilon} - ^1H_N$ correlations were observed for the $H_{\epsilon}C_{\epsilon}H_{\delta}C_{\delta}(C_{\gamma}C_{\beta}C_{\alpha}CO)NNH$ spectrum (Figure 2c).

The sensitivity enhancement in the $H_{\delta}(C_{\delta}C_{\gamma}C_{\beta}C_{\alpha}CO)NNH$ experiment due to the α/β -selective deuteration of Phe residues was estimated to be ~6 to 7 fold by comparing the intensity of cross peaks in the spectra measured for $\alpha/\beta\text{-}^2H/^{13}C/^{15}N\text{-Phe-(bg-}^2H/^{15}N)\text{-ImmE6}$ and $^{13}C/^{15}N\text{-ImmE6}$ (Figure 3).

Results and Discussion

The results show that these new experiments should provide a useful means for assigning the 1H and ^{13}C resonances of aromatic side-chains unambiguously. In addition, regio-selective deuteration at α/β positions of aromatic residues provides significant improvements in sensitivity of these experiments (the sensitivity enhancement observed in this study might be partially due to the longer transverse relaxation time of 1H_N in $\alpha/\beta\text{-}^2H/^{13}C/^{15}N\text{-Phe-(bg-}^2H/^{15}N)\text{-ImmE6}$). The procedure we used for the preparation of $\alpha/\beta\text{-}^2H/^{13}C/^{15}N\text{-Phe}$ can be applied to ten amino acids including most of aliphatic and aromatic ones (10), thus this approach can be also available for other aromatic residues. In this study, we demonstrated the above approach using a small protein. For larger proteins, the contribution of α/β -deuteration to the sensitivity might be much more significant, since the rapid relaxation of protonated $^{13}C_{\beta}$ and $^{13}C_{\alpha}$ nuclei should reduce the sensitivity drastically.

We also tried different versions of the pulse sequences that have $^{13}C\text{-TOCSY}$ periods instead of the COSY-type transfers within aromatic carbons, which has not been so much successful so far. Further improvement in sensitivity might be possible by applying, e.g., heteronuclear cross polarization techniques into $C_{\gamma}\rightarrow C_{\beta}$, $C_{\alpha}\rightarrow CO$, and $CO\rightarrow N$ transfer steps.

In our previous study (2), we showed that a reasonable structure model of a relatively larger protein can be determined from limited NOE restraints, even though the assignments of aromatic side-chains are ambiguous. The unambiguous assignments of aromatic side-chains obtained by the approach presented here should be very useful for accelerating the process of global fold determination and improving the resolution of the structure models.

References

1. Metzler, W. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6800 (1996)
2. Smith, B. O. et al., *J. Biomol. NMR* **8**, 360 (1996)
3. Gardner, K. H. et al., *Biochemistry* **36**, 1389 (1997)
4. Nietlispach, D. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 407 (1996)
5. Gardner, K. H. et al., *J. Biomol. NMR* **8**, 351 (1996)
6. Yamazaki, T. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11054 (1993)
7. Grzesiek, S. & Bax, A., *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6527 (1995)
8. Lözhr, F. & Rüterjans, H., *J. Magn. Reson. Ser B* **112**, 259 (1996)
9. Tenenbaum, S. W. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **362**, 308 (1974)
10. LeMaster, D. M. & Richards, F. M., *J. Labelled Compounds Radiopharmaceuticals* **19**, 639 (1982)

1L3

^1H 、 ^7Li および ^{19}F -NMR スピナーエコー磁場勾配法
で測定した有機電解液の全構成成分の自己拡散係数
とイオン伝導度・溶媒和とイオン対形成

(物質研) ○早水紀久子、Cirilo Garcia-Martinez
(ユアサコーポレーション) 相原雄一、新井盛勝

**PGSE ^7Li , ^{19}F and ^1H Diffusion Measurements for Organic Electrolytes
including $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$**

K. Hayamizu, C. Garcia Martinez, Y. Aihara¹, and S. Arai¹
National Institute of Materials and Chemical Research and ¹Yuasa Corporation

The self diffusion coefficients (D) of the Li, anion, and solvent in $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ solvent systems were measured by the pulse-gradient spin-echo (PGSE) NMR method. Fourteen different organic solvents that are commonly used as electrolytes in lithium batteries were studied. The D of the corresponding pure solvents were also measured. Since a good correlation between the D of the pure solvents and the inverse of the viscosity was obtained, the results are discussed in terms of the Stokes-Einstein equation. Comparisons of the D of the solvent, the Li and the anion illustrate the solvation behavior for each solvent. The relationship of the ionic conductivity between the sum of the D of the lithium ion and the anion gives the degree of ion-pair formation and enables the roles of the solvents in the electrolytes to be clearly explained.

自己拡散係数は物質移動と付随する機能を研究するうえで、基本的かつ重要な物理量である。パルス磁場勾配スピナーエコー法が開発され自己拡散係数の測定が精度よく測定できるようになった。無侵擾な測定法で、NMR核種を含む成分が個別に観測できることが大きな利点である。我々はリチウム塩を含む14種の有機電解液のカチオン、アニオン、溶媒の自己拡散係数を全て測定し、溶媒和について明確な結果を得た。またイオン伝導度と比較することによりイオン対の形成を明らかにした。また純溶媒の自己拡散係数と粘度との間の関係を実験的に明確にした。

はじめに

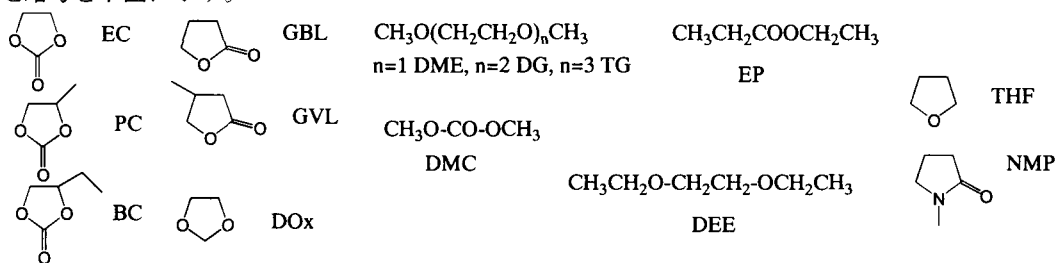
電解溶液の研究には長い歴史があり、イオンと溶媒の相互作用(溶媒和)、イオン間の相互作用(イオン対形成)を中心に、様々な理論式に基づいて、パラメータが導出されている。電解液は電池やコンデンサーなど実用的に重要であるために電気化学的な視点の種々の研究が既に報告されている。しかし理論式の適用はイオン濃度の小さい領域であることが望ましく、実用的な濃度領域での研究では経験的なパラメーターの導入が必要である。電解液での重要な現象であるイオン

PGSE NMR、自己拡散係数、リチウムイオン、溶媒和、イオン対形成

はやみずきくこ、あいはらゆういち、あらいしげまさ、Garcia-Martinez Cirilo

伝導度はカチオンとアニオンの自己拡散係数と深く相関していると考えられる。

パルス磁場勾配法スピナーエコーNMR(PGSE-NMR)による自己拡散係数 (D) の測定は既に提案されてから時間がたっているが、最近では装置的に改良されて、実用的にデータの取得ができるようになってきている。我々はこの方法をリチウム電池の電解液として重要な14種類の純粋な有機溶媒およびリチウム塩 ($\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$, LiTFSI と省略) を含む有機電解液の D の測定に適用した。電解液構成成分は全て NMR の対象になる核種を含むので、液 (^1H)、リチウムイオン (^7Li)、アニオン (^{19}F) で個別に D を測定すると同時にイオン伝導度を測定した。その結果従来の電気化学や溶液論では得られなかったイオンの挙動を明確に記述できたので発表する。ここで用いた有機溶媒の化学構造と略号を下図に示す。



拡散現象の理論式は古典的な Stokes-Einstein の式が重要であり、粘性 η の媒体中を半径 r_s の剛体が拡散するときには

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s} \quad D = \frac{kT}{c\pi\eta r_s}$$

で表される。ここでは6の代わりに実験パラメータ c を導入する。またカチオンとアニオンの拡散係数 (D_+ と D_-) とイオン伝導度 σ との関連式 Nernst-Einstein の式にイオンの会合度 ξ を導入した式は次の通りである。

$$\sigma_D = \frac{Ne^2}{kT} (D_+ + D_-)(1 - \xi)$$

実験

14種類の有機溶媒ではバッテリー用(水分含量の少ないもの)の試薬を用いた。塩は十分乾燥し、溶媒と塩のモル比が20:1になるように調製し、5mmφのNMRサンプル管に高さ5mmに入れて測定した。一般的な測定温度は30°Cである。イオン伝導度は30°Cで交流インピーダンス法で測定した。ECの融点は39°Cであるので、全ての測定を40°Cで行った。

結果

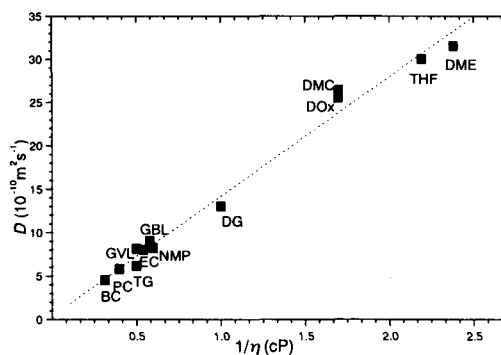


Figure 1. The self diffusion coefficients at 30 °C are plotted versus the inverse of the viscosity at 25 °C for the pure liquids, except for ethylene carbonate for which data was obtained at 40 °C.

1. 純液体の D と粘度 η との相関

純液体の自己拡散係数は密度、粘度などと同様に物理定数であるので、今回測定し14種の溶媒の中で、粘度の文献値が見つかった12種について D と η との関係を図1にプロットした。図1から(1)式が広範囲の有機溶媒に対して成立することが分かる。ここでGBLとPCについて提案されたファンデルワールス半径 0.268 と 0.276nm を代入すると c はそれぞれ 3.2 と 3.3 になる。四塩化炭素とベンゼンに対して提案されている c の値は 3.6 と 3.8 であるので、実験パラメーター c を導入すれば Stokes-Einstein の式は自己拡散現象を十分に説明しているといえる。

2. 電解液における D_{Li} , D_{anion} および $D_{solvent}$

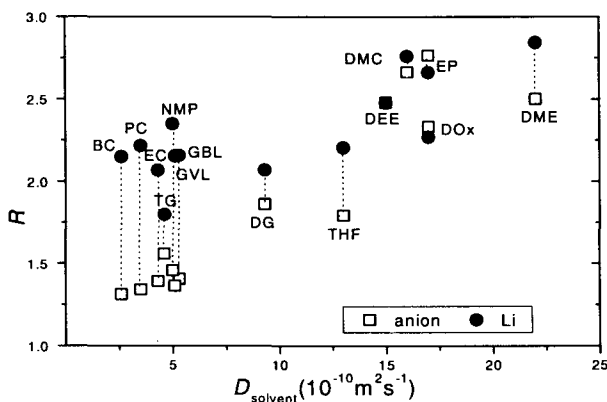


Figure 3. The experimental ratios of the Stokes radius of the lithium, R_{Li} and the anion R_{TFSI} relative to the solvent are plotted against the self diffusion coefficient of the solvent. The R values were calculated as the ratio of the diffusion coefficient of the solvent relative to that of the ions, i.e., $R_{Li} = D_{solvent}/D_{Li}$ (solid circle) and $R_{TFSI} = D_{solvent}/D_{TFSI}$ (open square). The dotted lines are guides for the eyes.

リチウムイオンそのものはアニオンよりも半径は明らかに小さいので、リチウムイオンは溶媒和した状態が拡散半径として計算されたといえる。BC, GBL などでは平均して2分子が溶媒和し、DMC, EC では溶媒和よりもイオン対形成効果の方が大きい。NMR の時間尺度からいえば、溶媒和しているのか、バルクの溶媒の中にいるかを見分けることはできず、 $D_{solvent}$ も両者の交換平均の値である。

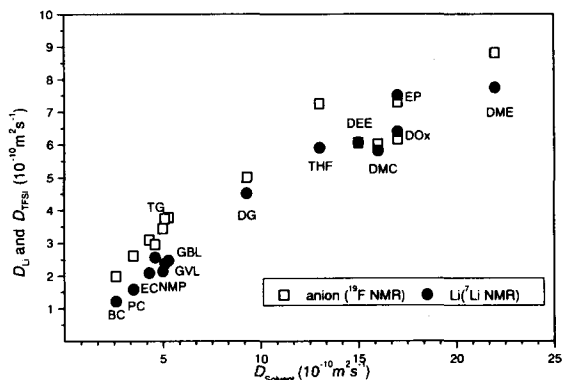


Figure 2. A plot of the self diffusion coefficients of the lithium ion and the anion (TFSI) versus the self diffusion coefficient of the solvent. The solid circles and open squares indicate the self diffusion coefficients of lithium and TFSI, respectively.

電解液において測定した D_{Li} と D_{anion} の値を $D_{solvent}$ でプロットした結果を図2に示す。イオンの拡散は溶媒の拡散によって支配されていることが明瞭に示されている。多くの場合にアニオンの拡散の方がリチウムより速く拡散していることがわかる。Stokes-Einstein の式の有効性が示されているので、 $R = D_{solvent}/D_{ion}$ は溶媒の拡散半径とイオンの拡散半径の比になると仮定してよい。このように計算したリチウムとアニオンの R の値を $D_{solvent}$ に対してプロットしたのが図3である。溶媒の種類によって相違はあるが、リチウムの拡散半径の方がアニオンの拡散半径より大きくなる。

3. イオン伝導度

イオン伝導度をアニオンとリチウムの自己拡散係数の和でプロットして図4に示す。一見イオン伝導度とイオンの拡散速度には相関がないように見えるが、溶媒の種類に着目して補助的な線を引いてみると図に示したような関係が成立する。バッテリー用電解溶液の経験から溶媒は主溶媒(環状炭酸エーテル EC, PC, BC と環状エステル GBL,GVL)と副溶媒に分けて考えられている。またグライム系(TG,DG,DME)溶媒での相関をプロットすると両者が分類できる。同族列で

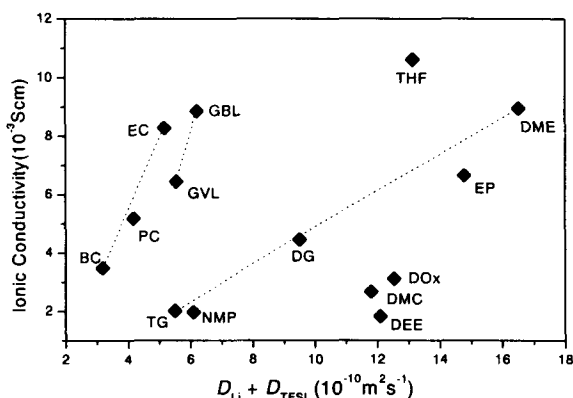


Figure 4. A plot of the ionic conductivity versus the sum of the diffusion coefficients of the lithium (D_{Li}) and the TFSI (D_{TFSI}).

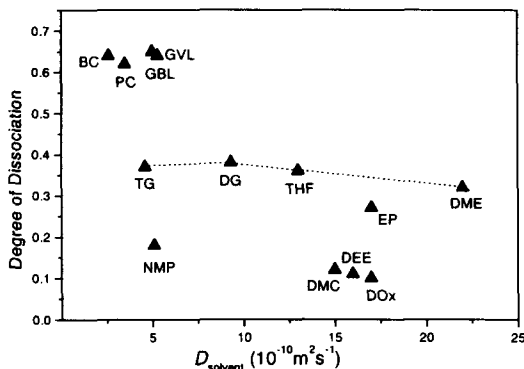


Figure 5. A plot of the degree of the dissociation versus the self diffusion coefficient of the solvent.

文献

1. K. Hayamizu, Yuichi Aihara, Shigemasa Arai, and William S. Price, *Solid State Ionics*, 107, 1-12 (1998)
2. K. Hayamizu, Y. Aihara, S. Arai and C. Garcia Martinez, contributed
3. M. Ue, *J. Electrochem. Soc.* 141,3336 (1994).

プロットすれば、イオン伝導度とイオンの自己拡散係数との間には良好な相関がみられる。グライム系の溶媒は高分子電解質で最も重要なポリエチレンオキサイト (PEO) のモデルとしての研究対象になっている。ここで Nernst-Einstein の関係式を適用してみる。実験パラメータ ξ はイオン対の形成に関連する。イオン伝導度とリチウムイオンとカチオンの拡散係数の和とから実験的に求まる ξ をもちいて、イオンの解離度 $\alpha = 1 - \xi$ を $D_{solvent}$ に対してプロットして図5に示した。主溶媒と言われる PC や GBL では解離度が大きく 0.65 付近の値を示している。またグライム系列では解離度は分子の大きさに関係なく 0.3~0.35 の値をとることがわかる。溶媒におけるリチウムの溶媒との相互作用を考察する上で重要である。また副溶媒として使われている DMC, DEE などではイオンの解離能は低いと溶媒自身の拡散が大きいために混合して用いれば、イオン伝導度に寄与することを明確に示唆している。

1L4 MAS-Multiconformational液晶NMR法による環状エンケファリンの構造解析 (阪大・医) ○木村敦臣、月城聖一、藤原英明

Conformational Diversity of $[D-Pen^2, D-Pen^5]$ enkephalin as Studied by Magic-Angle Spinning Liquid-crystal NMR spectroscopy and Multiconformational Analysis

Atsuomi Kimura , Sei-ichi Tukishiro and Hideaki Fujiwara

School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University, 1-7 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

The conformation of biologically active $[D-Pen^2, D-Pen^5]$ enkephalin (DPDPE) has been studied by liquid-crystal NMR spectroscopy employing magic-angle spinning (MAS) two-dimensional methodology and by computer-assisted multiconformational analysis. The NMR structural parameters of DPDPE were obtained in a CsPFO (cesium perfluorooctanoate) liquid-crystal. The NMR structural information was acquired in the anisotropic environment basing upon the vicinal coupling constant of $^3J(HNC_{\alpha}H)$ and the $^1H-^1H$ ROE factors obtained under the MAS condition. These data were submitted to multiconformational analysis based on the ECEPP/2 potential energy function and the Metropolis Monte Carlo simulation. As a result of the energy calculation, 4 conformers are obtained for DPDPE which are considered to exist in the anisotropic environment. The major contribution is determined among these probable conformers in the liquid-crystal medium. Moreover, it is suggested from the NMR multiconformational analysis that the D-Pen⁵ residue, the C-terminal "address" segment, is responsible for the conformation of the "message" segment (N-terminal tetrapeptide sequence). The conformational flexibility is discussed for the spatial arrangement of the Tyr¹ and Phe⁴ aromatic rings in the message segment of the bioactive conformation in relation to the activity of DPDPE.

【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はMulticonformation解析を導入したMAS-Multiconformational液晶NMR法の開発を行ってきた。2)

(キーワード)MAS/NMAS液晶NMR、環状エンケファリン、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

そこで本研究では、環状エンケファリン (Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen: DPDPE)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)を用いて、DPDPEを1.5wt.%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。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。

$$\frac{\left| \sum_{i=1}^N w_i \langle A^{\text{calc}} \rangle_{ik} - \langle A^{\text{exp}} \rangle_k \right|}{\left(\sum_{i=1}^N (w_i D_{ik}^{\text{calc}})^2 + (D_k^{\text{exp}})^2 \right)^{1/2}} < t_k \quad (1)$$

ここで、iは各々のコンホマーを指し、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∑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DPDPEのROESY/MASスペクトルより求めた構造パラメーターとその標準偏差をTable 1に示す。Table 1においてROE_{upp}=<ROE>_{exp}+D_{exp}、及びROE_{low}=<ROE>_{exp}-D_{exp}と仮定することにより、<ROE>_{exp}、及びD_{exp}を求めた。

また、D-Pen⁵NH-D-Pen⁵C_αHにおいて観測された3J(HNC_αH)値(6.8±0.5)Hzより、

Table 1. NMR data for DPDPE Observed in the CsPFO Liquid Crystal

vector	ROE
Tyr ¹ αH — Tyr ¹ βH _{proS}	+
Tyr ¹ αH — Tyr ¹ ArH _{2,6}	+++
Tyr ¹ αH — D-Pen ² NH	+++
D-Pen ² γH _{proS} — D-Pen ² NH	+
Gly ³ αH _{proS} — Gly ³ NH	+++
Gly ³ αH _{proR} — Gly ³ NH	++
Gly ³ αH _{proS} — Phe ⁴ NH	++
Phe ⁴ αH — Phe ⁴ βH _{proS}	++
Phe ⁴ αH — Phe ⁴ ArH _{2,6}	+++
Phe ⁴ βH _{proR} — Phe ⁴ NH	++
Phe ⁴ αH — D-Pen ⁵ NH	+
Phe ⁴ NH — D-Pen ⁵ NH	++
D-Pen ⁵ αH — D-Pen ⁵ NH	+
D-Pen ⁵ γH — D-Pen ⁵ NH	++

Note. Qualitative evaluation; Strong(+++), 2.0-2.7Å; Medium(++), 2.0-3.3Å; Weak(+), 2.0-4.0Å

$\langle J \rangle_{exp}$ 、及びその D_{exp} を求め、Multiconformation解析に際してKarplus式を用いて $\langle J \rangle_{calc}$ 、及び D_{calc} を算出した。

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³⁾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、溶媒和を考慮したECCEP/2力場⁴⁾を用いて1500stepのMonte Carlo Minimization(MCM)計算⁵⁾を行ったところ、4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.1及びTable 2に示す。

Multiconformation解析 上述の4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NMRパラメータ($\langle A_{calc} \rangle_{ik}$)および標準偏差の計算値($D_{calc,ik}$)を決定した。次に、重み $\{w_i\}$ ($i=1\sim 4$)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。

4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

Table 2. Dihedral Angles for the Four Energy-Minimized Conformers

		model			
		1	2	3	4
Tyr ¹	ψ	138	164	143	143
	ω	-178	179	-178	-178
	χ^1	178	58	179	179
	χ^2	-105	-94	-103	-105
D-Pen ²	χ^6	180	180	180	-179
	ϕ	88	83	79	80
	ψ	20	33	31	29
	ω	170	168	165	175
	χ^1	-65	-62	-61	-63
Gly ³	$\chi^{2.1}$	46	45	42	41
	$\chi^{2.2}$	79	71	72	70
	ϕ	-42	-66	-63	-67
	ψ	-69	-115	-115	-102
	ω	-175	-173	-171	-171
Phe ⁴	ϕ	-114	-103	-103	-105
	ψ	-60	4	0	-5
	ω	177	177	179	-177
D-Pen ⁵	χ^1	168	58	-175	-57
	χ^2	-120	-99	-100	-81
	ϕ	66	138	139	137
	χ^1	-56	-85	-83	-85
	$\chi^{2.1}$	22	67	70	67
	$\chi^{2.2}$	77	59	60	60
	$\angle CSSC$	96	116	115	116
	energy, (kcal/mol)	-6.3	-9.5	-10.3	-12.5

Table 3. Energies and Statistical Weights for the Conformers 1-4 Obtained from the Multiconformational Analysis

i	E_i (kcal) ^{a)}	E_i^{ave} (kcal) ^{b)}	w_i^{low}	w_i^{upp}	w_i^{ave}
1	-6.32	1.03	0.26	0.71	0.40
2	-9.46	0.52	0.00	0.43	0.15
3	-10.33	2.80	0.00	0.62	0.19
4	-12.42	-1.82	0.00	0.70	0.26

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DPDPEは最安定構造である4、あるいは準安定構造2~3としては殆ど存在せず、seed構造の中で最も不安定な構造である1として主に存在することが明らかとなった。

ここで、構造1と4を比較すると、Table 2よりその差異は主にD-Pen⁵φに基づく事が分かる。また、モンテカルロシミュレーションにおいても、D-Pen⁵φはフレキシブルなランダムコイル構造を示すことが明らかとなった。現在、エンケファリンのN末端4残基が活性を示すのに必要なmessage部位であり、C末端残基はaddress部位と呼ばれ、message部位のコンホメーションを安定化すると考えられている。したがってDPDPEの構造変化はC末端address部位の構造変化に起因するものと考えられる。

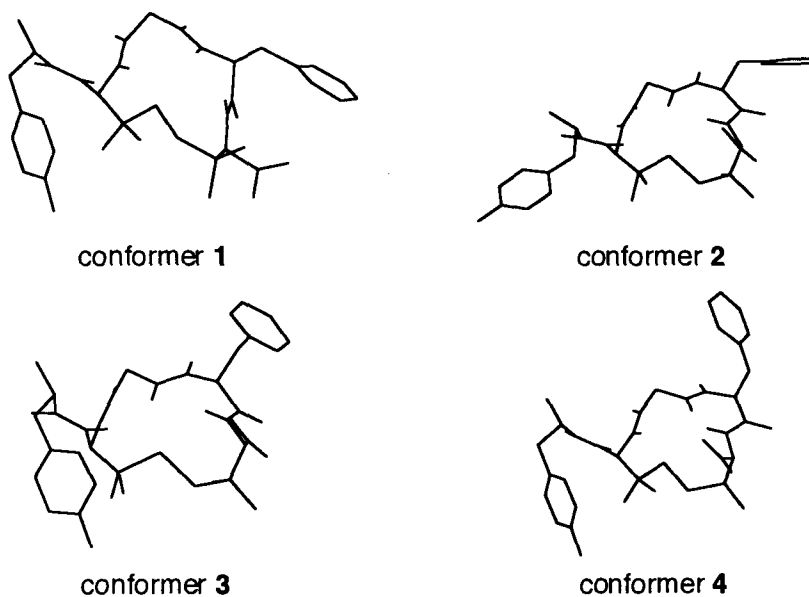


Figure 1. Four seed conformers of DPDPE.

〈参考文献〉

- 1) Kimura, A.; Kuni, N.; Fujiwara, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4719.
- 2) Kimura, A.; Takamoto, K.; Fujiwara, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, in Press.
- 3) Nikiforovitch, G. V.; Prakash, O.; Gehrig, C. A.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3399.
- 4) Meirovitch, H.; Meirovitch, E. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5123.
- 5) Li, Z.; Scheraga, H. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6611.

1L5 固体重水素 NMR による Poly(γ -benzyl L-glutamate) の配向挙動と主鎖ダイナミクスの検討

(北大院工) ○堤耀広・窪田俊介・泉川大輔・平冲敏文

Main Chain Orientation and Dynamics of Poly(γ -benzyl L-glutamate)
Studied by Solid State ^2H -NMR

*Graduate School of Engineering, Department of Applied Physics,
Hokkaido University, Sapporo 060-8628, Japan*
A.Tsutsumi, S.Kubota, T.Izumikawa and T.Hiraoki

Solid state ^2H -NMR measurements were made on films of poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG) cast from the chloroform solution in order to investigate the molecular orientation and the local motion of backbone. Spectra were found to considerably depend on alignment angles. Spectral simulations were performed fairly well assuming essentially the planar orientation of the α -helical backbones in the film. Temperature dependence of quadrupole splittings indicated that the peptide plane undergoes a small amplitude libration around the axis connecting neighboring C^α atoms. This motional model well explained the T_1 anisotropy.

1) 序論

Poly (γ -benzyl L-glutamate) (以下 PBLG) はクロロフォルムなどの α -helix 溶媒の溶液からキャストした膜中で α -helix 構造をとり、分子軸は膜面と平行な面配向状態をとることが知られている。 α -helix は主鎖内ペプチド間の水素結合によって保持されており、N-H 結合の向きは分子軸 (helix 軸) とほぼ平行である。N-H 基を選択的に重水素化した PBLG (PBLG-Nd) の場合も同様のことが期待され、重水素 NMR スペクトルから、helix 軸配向に関する情報が得られると考えられる。本研究では、この方法により PBLG 膜中での配向状態を評価すると共に、四重極分裂幅、スピン-格子緩和時間の温度変化から、主鎖内の微小揺ら

キーワード: Poly(γ -benzyl L-glutamate), 面配向膜, 主鎖ダイナミクス, 重水素 NMR

○つつみあきひろ、くぼたしゅんすけ、いずみかわたいすけ、
ひらおきとしふみ

ぎについても詳細な検討を行った。

2) 実験

PBLG をクロロフォルムと三フッ化酢酸 (TFA- d_1) との混合溶媒中 (7 : 3wt. %) に溶かし、室温で約 3 時間攪拌後、エタノールで沈澱させ PBLG-Nd を得た。重水素化率は IR スペクトルより 83% と見積もられた。PBLG-Nd のクロロフォルム溶液から、ガラス板上で 2 種類の配向膜を作製した。1 つはガラス板状にキャストし乾燥させた面配向膜であり、もう 1 つはガラス板上で溶液を乾燥するまで一方向にストロークして配向させた 2 重配向膜である。これらの配向膜を短冊形に切り、2 重配向膜ではストローク方向を揃え、約 100 枚重ねて直径 5mm の NMR サンプル管に封入した。重水素 NMR スペクトルは、Bruker MSL-200 を用い 30.7MHz で測定した。また、膜面に垂直な面内で、膜面あるいはストローク方向と外部磁場との傾斜角 θ を 15 度おきに 0 から 90 度まで変化させた。測定温度は -50°C から 90°C である。

3) 結果と考察

2 つの配向膜に対する ^2H -NMR スペクトルは、傾斜角 θ と共に線形が大きく変化した。Fig. 1-(a) に 343K での 2 重配向膜に対する結果を示す。 $\theta = 0$ 度では $\nu = \pm 140\text{kHz}$, $\pm 60\text{kHz}$ に合計 4 本のピークが観測された。このうち外側ピーク (ν_{zz}) の強度は θ の変化と共に次第に減少し、 $\theta = 90$ 度では内側ピーク (ν_{xx}) のみとなる。また、 $\nu = \pm 80\text{kHz}$ には明瞭な肩 (ν_{yy}) が観測される。これらのピーク位置は、ペプチド基における電場勾配テンソルの主値に良く対応している ($Z \parallel \text{N-D}$, $X \parallel$ ペプチド面, $Y \perp$ ペプチド面)。スペクトルの角度依存から配向状態を評価するために、

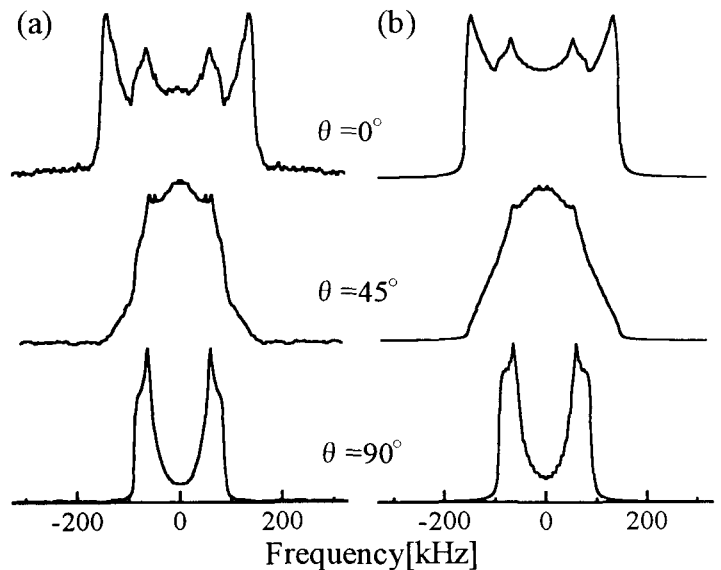


Fig.1 (a) ^2H -NMR spectra (343K)
(b)simulated spectra($\sigma_{\alpha} = 48^{\circ}$, $\sigma_{\beta} = 15^{\circ}$)

helix 軸配向に分布を考慮した計算機シミュレーションを行った。helix 軸は、面配向膜では、面内での等方分布と膜面に対して垂直方向へのガウス分布（分布幅 σ_β ）、2重配向膜では、更にストローク方向周りの膜面内ガウス分布（分布幅 σ_α ）を仮定した。即ち、配向状態はガウス分布幅（ σ_α , σ_β ）を用いて評価した。その結果、2重配向膜では $\sigma_\alpha=48$ 度、 $\sigma_\beta=15$ 度の配向状態であると見積もられ、この配向状態は実験スペクトルの角度依存性をよく再現する (Fig. 1-(b))。また、面配向膜では $\sigma_\alpha=\infty$ 、 $\sigma_\beta=15$ 度となった。

それぞれの角度のスペクトル線形はほとんど温度変化しないが、ピーク分裂幅は特徴的な変化を示した (Fig. 2)。電場勾配主軸系の y , z 成分 ($\Delta\nu_{yy}$, $\Delta\nu_{zz}$) は温度と共に直線的に変化するのに対し、 x 成分 $\Delta\nu_{xx}$ は一定であった。これは、 $C^\alpha-C^\alpha$ ボンドにはほぼ平行な軸周りにペプチド面が高速の微小振幅振動を行っていることを示唆する。このモデルに基づくと、振動の振幅角 χ は、363K で 14 度、ねじれの力の定数は 8.8×10^{-13} (erg) と算出された。

x 成分 ($\pm 60\text{kHz}$) と z 成分 ($\pm 140\text{kHz}$) のスピン-格子緩和時間 (T_1) の温度変化を Fig. 3 に示す。 T_1 は温度と共に減少するが、常に z 成分の方が長く、その比は約 1.4 であった。上述の高速微小振動モデルによる計算値は 2.5 となり、いくらか大きい T_1 の異方性の傾向を説明することができる。

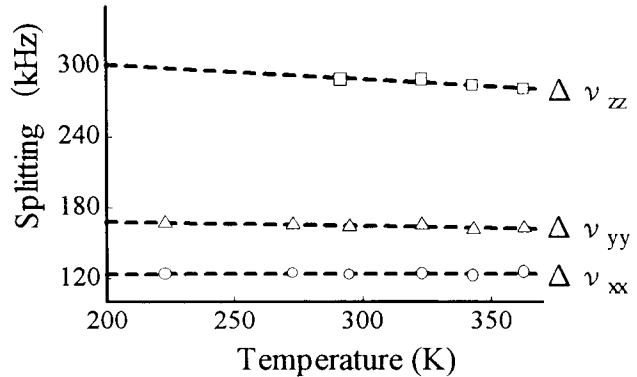


Fig.2 Temperature dependence of quadrupolar splittings.

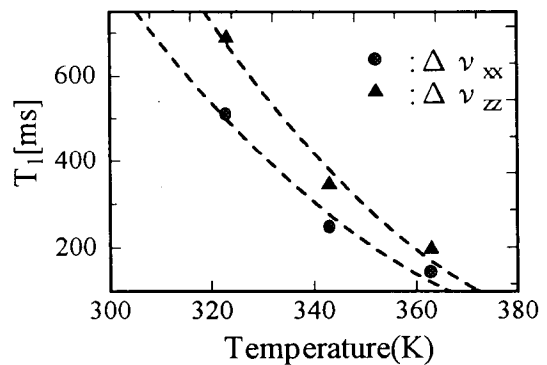


Fig.3 Temperature dependence of spin-lattice relaxation time T_1 .

Structural Analysis of Solid State Materials Using Stray Field Imaging

Nippon Steel Corporation Advanced Technology Research Laboratories 1), University of Surrey 2)

○ Koji Saito 1), B.Newling 2), P.J.McDonald 2)

Stray field Imaging exploits the very large magnetic field gradient outside the central field region of a large super conducting magnet. This gradient, typically 50 T/m for 89 mm, 9.4T magnet, is orders of magnitude than obtainable from the small current windings used in conventional gradients sets. We have demonstrated that structural analysis of real solid materials, PVC, Polyester and Coals, which are used widely are studied using this Stray field imaging technique. PVC and Polyester samples were irradiated by UV radiation from just surface side and Coals were treated with rapid or slow heating at 380 °C. The results of PVC and Polyester samples shows that the degradation from the surface occurred and there is significant difference about the degradation degree among these samples. And the effects of heating treatment in coals, which have very short T2, are clarified. Stray field imaging is undoubtedly a powerful tool with many potential applications to solid state materials.

1. はじめに

NMR イメージングは非破壊測定であるため、材料解析への応用にも期待されているが、実材料に応用する場合、試料の線幅が重要な問題となる。それは以下に示すような式で勾配磁場と分解能の関係が表されるからである¹⁾。

$$\delta = \Delta f_s / \gamma G$$

δ ; spatial resolution Δf_s ; natural line width of sample γ ; gyromagnetic ratio G ; applied gradient
例えば石炭を材料として取り上げた場合、 $\Delta f_s=50\text{kHz}$ 程度で、目標分解能を $100 \mu\text{m}$ としても必要な $G=12\text{T/m}$ 以上となり、せいぜい磁場勾配量が 5T/m 程度の市販NMRイメージング装置では有益な情報を得ることは困難である。この問題点を克服するアプローチとして、マジックエコー法²⁾、Single-Point-Imaging 法³⁾等が提案されているとともに、大きな磁場勾配を持つSCMの漏洩磁場を利用する STRAFI (STRAY Field Imaging) 法が1988年に Samoilenko らから提唱されている⁴⁾。STRAFI 法では9.4Tの89mmボア径のSCMで約50T/m程度の磁場勾配が得られるため、線幅の非常に広い試料に対しても有効である⁵⁾。今回、STRAFI 法を実材料に応用し、いくつか興味深い結果を得たので報告する^{6,7)}。

2. 実験

(1) 試料の調整

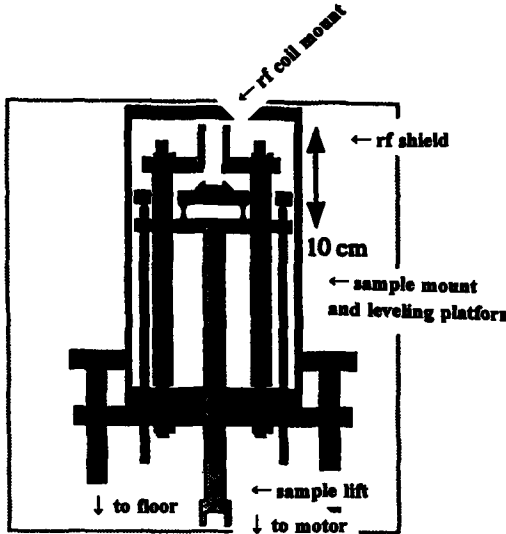
PVCは約 $500 \mu\text{m}$ の厚さの一般鉄線材被覆に使用されているもので、外側から人工気象劣化促進試験のひとつである SWOM (Sunshine Weather Of Meter; 片面処理時間48分・紫外線照射(280~450nm, 370W/m²) + 12分・降雨=計1時間処理)を0,100,200,300,500,1000,2000,3000 hours 実施した試験材から線材を取り除き、1cm*1cm程度にカットしたものを測定試料とした。またポリエステル系樹脂は住宅建材用塗膜材、屋外家電塗膜材として使用されているもので、モ

Stray field Imaging、NMRイメージング、固体高分子

さいとうこうじ、Newling Ben, McDonald J.Peter

デル的に $500 \mu\text{m}$ 厚に調整し、PVC の場合と同様の劣化試験を 0,100,200,300,500,1000,2000,3000 hours 処理した試験材から、 $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 程度にカットしたものを測定試料とした。石炭は鉄鋼業に広く用いられている約 3mm 程度の大きさの Wittbank 炭を選び、次世代コークス開発プロジェクト装置にて、急速加熱処理 (380°C まで $10000^\circ\text{C}/\text{min}$ で急速昇温)、低速加熱処理 (380°C まで $100^\circ\text{C}/\text{min}$ で低速昇温)、無処理された石炭をそれぞれ測定試料とした。

(2) 実験



● The University of Surrey
Department of Physics

測定は 9.4T の SCM で $58\text{T}/\text{m}$ の磁場勾配下で、Chemagnetic (VARIAN) CMX-400 Infinity 及び自製のプローブ (Figure 1) で行われた。1 次元のイメージング測定を共鳴周波数は 236.82 MHz 、パルスシーケンスは quadrature echo sequence を使用し、 τ 時間は $25 \sim 60 \mu\text{sec}$ で実施した。代表的な積算回数は 400 回程度であった。磁場勾配量が一定であるため、試料を機械的に動かす事で位置情報を得た。このプローブでは、rf コイルと独立にサンプル設置面が動くように設計されている。また B_1 に水平に於かれたサドル型コイルを使用している。

Figure 1

A schematic diagram of a one dimensional stray field profiling probe

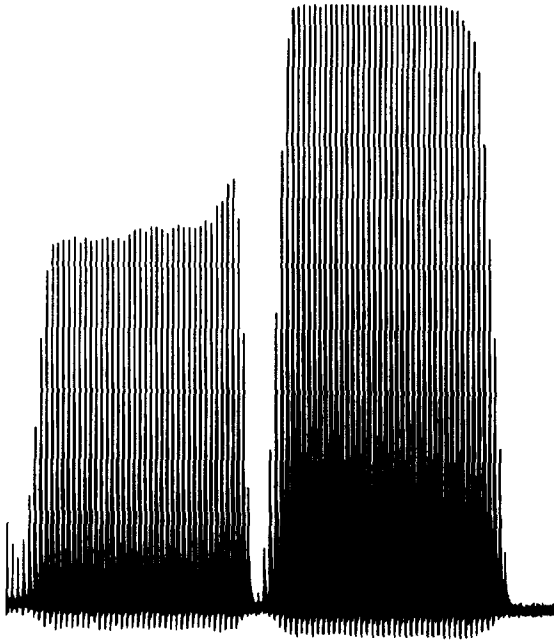


Figure 2 に典型的な STRAFI の測定結果を示す。2 つの試料の測定結果を併記してある。ひと固まりの測定結果の中には FID 信号の集団であることが容易にわかり、それぞれが測定に際して試料位置を動かした結果に対応しており、横軸は位置情報を反映している。この各 FID 信号に double-exponential 曲線を fit させ、 T_2 の long 成分と short 成分を得て、各位置における T_2 値や成分比をつなぎあわせる事でイメージング profile を作り出すことができる。

Figure 2

The echo profile of two PVC films $500 \mu\text{m}$ thick sandwiched between cover slips and separated by a $100 \mu\text{m}$ glass spacer. At each location a train of 40 echoes is shown acquired a pulse length of $6 \mu\text{sec}$. There are 25 steps covering $500 \mu\text{m}$ so that the spatial step is $20 \mu\text{m}$. 400 averages were acquired.

3. 結果

(1) PVC系について

Figure 3にPVCでの long 成分の profile を測定の際の τ 時間が 25 及び 60 μ sec の場合について示す。

τ 時間が 25 及び 60 μ sec の結果とも、SWOM 処理時間が長くなるにつれて、 T_2 が短くなり、それが SWOM 処理を受けた表面側から生じていることが明らかになる。

SWOM 処理が 0 時間の試料でも表面側で若干 T_2 が低下しているが、これは自然劣化のためと思われる。3000 時間の処理では、ほとんど表面側と裏側で T_2 の差がなくなっており、ほぼ全面的な劣化となっていることが推定でき、実際の試料でも変色し固くなっていた。PVC が SWOM 処理での劣化によって T_2 が低下している理由としては、紫外線照射に伴うラジカル濃度の増加、2重結合の増加、揮発分の減少に伴う mobility の低下等が考えられる。quadrature echo sequences での τ 時間が長い場合には、 T_2 の long 成分のみが強調される傾向にあり、対して τ 時間を短くするとスピロックのシーケンスに近くなる。よって T_2 よりもむしろ T_1 での信号減衰となると考えられており、測定条件を変えることで、異なるコントラストを得ることができる。今回の PVC の場合、 $\tau=25 \mu$ sec では SWOM 処理時間が 1000 時間を超えた試料で profile 変化が $\tau=60 \mu$ sec の場合と異なることから、両者の結果を比較することは、PVC の SWOM 処理による劣化メカニズムを考える上で興味深い。

(ポリエステル系の結果については、紙面の都合上発表当日に示す)

(2) 石炭について

Figure 4 に急速加熱、低速加熱処理した石炭の測定結果を無処理炭の結果と併せて示す。石炭は一般に mobile 成分と immobile 成分が存在しており、特に immobile 成分の T_2 は 50 μ sec 以下のため、イメージングすることはできなかった。しかし STRAFI 法はこのような T_2 の短い材料

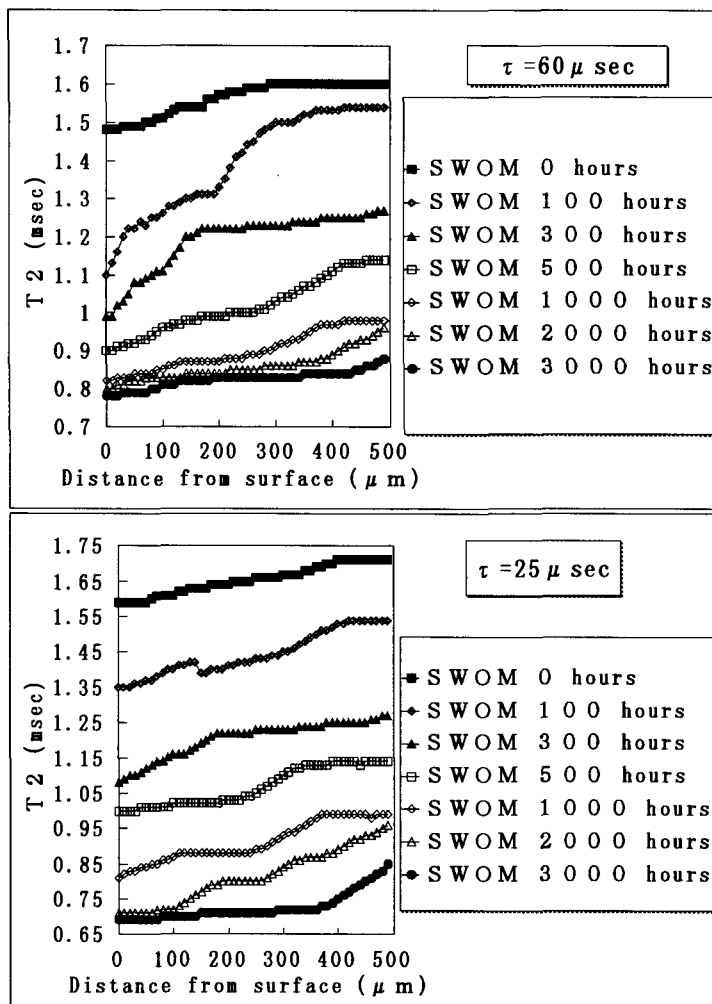


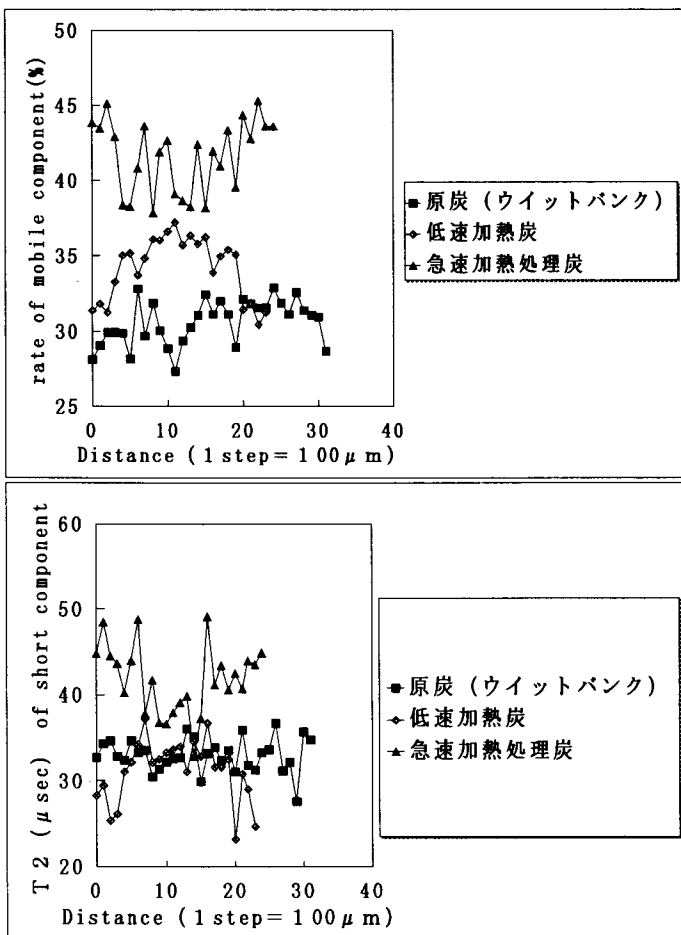
Figure 3

Profiles of PVC films from surface to bottom
(quadrature echo sequences ; $90^\circ \tau$ ($90^\circ \tau$ echo τ) n
 $\tau=60 \mu$ sec or 25μ sec and $n=40$)

にも非常に有効で、加熱による石炭の構造変化を検出できていることがわかる。本結果から、急速加熱することにより、石炭中の分子間相互作用を弱める構造緩和が生じて、その結果 mobile 成分の増加が確認でき、その現象は粒子周辺ほど顕著なことがわかる。また T_2 も上昇しており、運動性も増加している。対して、低速加熱では mobile 成分の多少の増加は見られるものの、 T_2 では周辺部で逆に減少していることから、構造緩和とともに再熱反応が起きているのではないかと推定できた。

Figure 4

The profiles of the rate of mobile component and T_2 of short component in three kinds of coal (rapid-treatment, slow treatment, no-treatment)



4. まとめ

STRAFI 法は従来法ではイメージングできなかった T_2 の $50 \mu \text{ sec}$ 以下の固体高分子材料の解析にも有効であることがわかった。得られる情報としては、一次元 Projection の場合が多いので、それに合わせた試料作成が必要であるが、現在では 2 次元や 3 次元測定のためのプローブが開発中である。STRAFI 法では多核のイメージングも可能なことから、今後 STRAFI 法は材料解析を行う上で広く活用される可能性が高い。

参考文献

- 1) I.Ando and T.Asakura Ed. 「Solid State NMR of Polymer」 Elseiver, 1998
- 2) S.Mtsui , Chem.Phys.Lett. 179, (1991) 187
- 3) D.G.Cory , Ann Reports of NMR Spectr. , 24 (1992) 114
- 4) A.A.Samolienko et al. , JETP Lett., 47 (1988) 348
- 5) P.J.McDonald , Progress in NMR Spectroscopy , 30 (1997) 69
- 6) K.Saito et al. , J.Mater.Science, 1998 (in press)
- 7) K.Saito et al. , ICSTI-98 , (1998) 145
K.Saito et al. , Tetsu to Hagane, submitted

(日本女子大¹、理研²)○南澤 明子¹、鶴澤 洵²、小沢あつみ¹、柴田 俊之²

NMR Study on the Dynamic Behaviour of Water in Wood

Faculty of Science, Japan Woomen's University¹The Institute of physical and Chemical Research²Akiko Minamisawa¹, Jun Uzawa², Atumi Ozawa¹, Toshiyuki Shibata²

We have hitherto studied the dynamical behaviour of water contained in woods, particularly about the relation between water contents and the wood direction and about the water transfer during a hydration or dehydration process. In the course of our previous studies we were able to determine the fiber saturation point definitely from the relation between ultrasonic velocities and water contents. In the present study we performed an experiment to determine the fiber saturation point using a more microscopic method, i.e., wide-Line NMR and deuterium NMR, and found it certainly possible. Hydrogen in firmly tied water molecules or in hydroxyl groups of cellulose could be replaced with deuterium by repeating the process of D₂O adsorption after complete dehydration of woods. Also, a difference in molecular motions between D₂O molecules in the central and the peripheral parts of woods was detected using deuterium NMR for wood specimens.

1. 緒言

我々は従来、木材の含水率と方向性の関係、吸湿脱湿過程における水分移動といった面から、木材中水分の動的挙動に関する研究を進めてきた。これらの研究の過程で超音波の音速と含水率の関係から繊維飽和点を明確に決定できた。我々は今回、広幅NMRと重水素NMRにより、分子レベルでこの繊維飽和点を決定できないか実験を試みた結果、それが十分に可能であることが実証された。NMRの結果から理解されることは、木材中の結合水には三つの状態がある。完全な乾燥をしてから重水を吸着させるという過程を繰り返すことによって、固く結合した結合水やセルロース自身の水酸基についても水素と重水素が交換される。また、3種類の溶媒を吸着させた重水素NMRにより、木材の心材部と辺材部における水の運動状態の違いが検出された。

木材は、大は住宅などの建築物、中は箆筒などの家具、小は木彫とか小物入れに至るまで、特に私達日本人にとって身近で重宝な材料として使用されてきた。これからも木材に対する私達の愛着は衰えることがないように思われる。我々はこのように人間の生

[キーワード] 木材、水、繊維飽和点、広幅NMR、重水素NMR、

[著者] みなみさわ あきこ¹、うざわ じゅん²、おざわ あつみ¹、しばた としゆき²

活と密接な関係にある木材について、その構造と物理的性質の関係を調べるために、長年に渡り研究を続けてきた。金属やセラミックスなどの無機材料と比較するとき、木材の大きな特徴として、構造があまり機密でなく、多孔質 (porous) であって、そのため内部に多量の気体や水分を蓄えうることが挙げられる。乾燥状態の木材に水分が取り込まれていくと、最初は繊維部分 (cellulose) に吸着して運動を抑制されてしまうが、ある程度以上に浸入してきた水分は、もはや束縛されず比較的自由的な状態にあると考えられる。この境界値を示すために繊維飽和点 (fiber saturation point) という量が用いられる。我々は過去の研究において、木材中の超音波の音速と木材の含水率の関係を調べ、木材の繊維飽和点で急激な音速変化が生じることを見出した。一般に含水率が低くなるほど音速は増加する (木材が硬くなる) 傾向にあるが¹⁾、含水率がかなり低いところで、逆に急に音速が減少する。(木材が急に軟らかくなる) と考えられるところがあることがわかった。

この繊維飽和点と含水率0%付近の状態変化に着目し、分子構造レベルでの木材と水の関係性を調べるためNMRによる実験を試みた。広幅NMR、プロトンのFT-NMR、重水素NMR、さらに固体高分解能 (CP/MAS) NMRの測定によって、結合水と自由水の関係、ヒノキ木材の心材・辺材部の相違など、ヒノキ木材と水の関係性を明らかにすることが本研究の直接の目的である。

2. 実験方法

2.1 NMR装置 NMR装置としては、広幅NMRはJ M310(1964年)型電磁石と自作検出器およびJ NMα400T型 FT-NMR装置に溶液用プローブまたはCP/MASユニットを付属させて測定した。

2.2 木材試料 試料は木曽産のヒノキを用い、長さ30 mmで8 mm Φ (広幅) と長さ40 mmで3 mm Φと4 mm Φ (広幅 ²H) の3種類をそれぞれ用いた。Fig. 1に試料の切削状況を示す。その他に粉体試料 (広幅: CP/MAS) も用いた。

2.3 試料含水率の決定法

木材試料の含水率はU [%]は、

$$U_{mass} = \{ (m_h - m_o) / m_o \} \times 100 \quad (1)$$
 で与えられる。測定する試料を m_h [g] とし、デシケータ中で乾燥した試料を105°Cの乾燥器に入れて乾燥し重量に変化のなくなった時点を完全乾燥 (絶乾状態) と定義する。今回は、試料を真空乾燥器を用いてほぼ含水率を0%の状態にし、軽水中または、重水を入れたデシケータ中に放置し、吸収時間を変化させ含水率を調整した。試料はNMR試験管に速やかに封入して、それぞれ用いた。また、試料管の底に一定量の D₂O などを入れ、試料木片と接触させてからの²H-NMRスペクトルの経時変化を測定した。

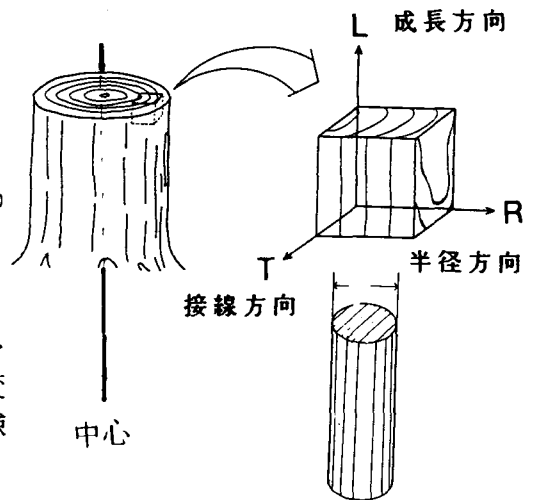


Fig.1. Shapes of wood specimen.

3. 実験結果

2.1 超音波測定

パルスオーバーラップ法による超音波の音速と含水率の測定結果の中の一例をFig.2 に示す。(1)の屈曲点は、繊維飽和点であり、②は、低含水率側の屈曲点である。試料は軽水中に放置し、その試料を空气中でゆっくり自然乾燥させていく。乾燥に伴い試料の質量は徐々に減少していくため、時間間隔をおいて質量を測り、並行して超音波速度の測定を行う。最後に(1)により含水率を求めた結果である。

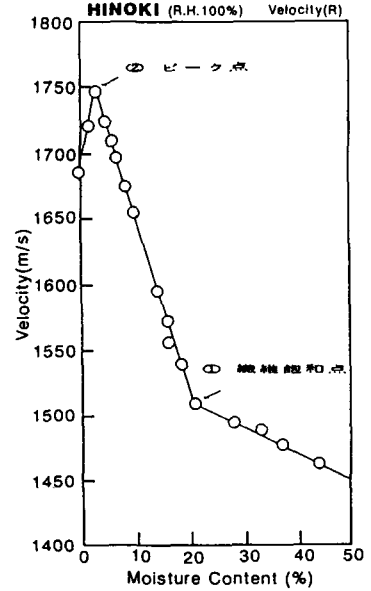


Fig. 2. Relationships between ultrasonic velocities and moisture contents.

3.2 各種NMRスペクトル

Fig. 3 に二次モーメントと含水率の関係を示す。 H_2O および D_2O を含ませた場合、低含水率域においてピーク点が現れること、および含水率 20% から 25% 付近で繊維飽和点③、④があることを認めることができた。

Fig. 4 に絶乾質量から求めた含水率の関係 U_{mass} と、重水素NMRの面積強度比から求めた自由水の割合 U_f の関係を示した。 U_{mass} 30% 付近に繊維飽和点があることが認められ、この結果からも音速から求めた結果と一致することが理解された。

Fig. 5 に広幅NMRのスペクトル曲線を示す。重水置換と乾燥を3回繰り返した試料のスペクトルを重ね合わせた結果は、明瞭に広幅成分が減少している。

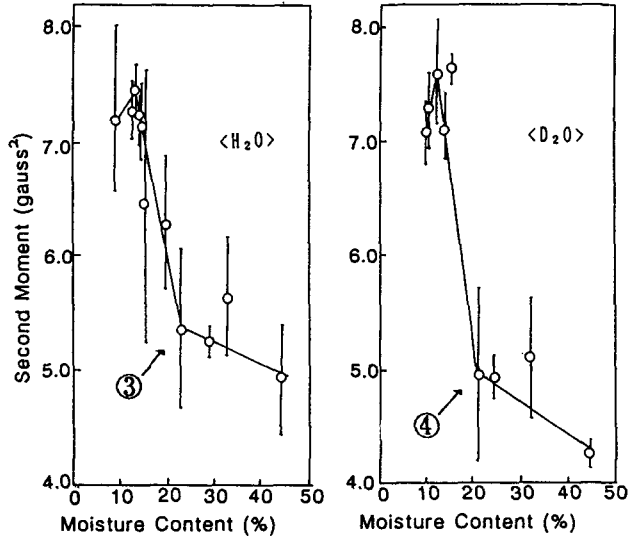


Fig. 3 Comparison between secondary moments and moisture contents (for H_2O and D_2O).

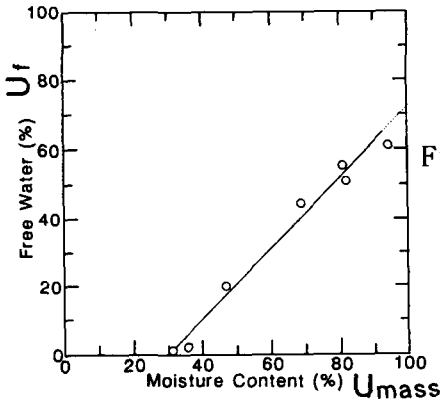


Fig. 4 Free water percentage for various moisture contents.

これは固く結合した水およびセルロース自身の水酸基の水素まで重水と交換したものと考えられる。Fig. 6 に、木材の中心から 1 cm おきに、7 cm まで切り出した試料の 2H -NMR スペクトルを示す。木材の中心から 1 cm の心材部分の試料では、束縛された等方的運動をしている自由な状態の水が多く含まれており、7 cm の位置の辺材部分の試料では束縛された非

等方的な運動をしている結合状態の水が多く含まれていることを示している。また、内側の心材から外側の辺材にかけて、自由な状態の水から結合状態の水に変化し、結合状態の水が増えていることがわかる。これは心材よりも辺材の方が木材の構造が密に成っているためだと考えられるが、構成成分の違いによることも考えられる。同一試料を $^1\text{H-NMR}$ も用いて測定を行ったが、心材と辺材の違いは得られなかった。木材の心材と辺材で $^2\text{H-NMR}$ スペクトルが違う理由を明確にするため、心材と辺材をそれぞれ粉末にし、CP/MASで ^{13}C スペクトルを測定した。その結果、Fig.7 に示す通り心材と辺材に大きな違いがみられない。従って、構造の違いと考えられる。

4. 考察とまとめ

広幅NMRとFT-NMR（重水素NMR）の両方の測定方法ともに繊維飽和点を認めることができた。その値約20~30%は超音波測定値と一致している。超音波による音速測定の場合は、含水率を変えて音速を測定することになるが、重水素NMRでは吸収曲線から繊維飽和点を特定することができる。したがって、NMRを使用することは木材の繊維飽和点を測定するうえで、有効な測定方法であることが理解された。木材の中心部分心材と辺材の違いは、 $^2\text{H-NMR}$ から判別することができることがわかった。重水以外にも重シクロヘキサンや重メタノールについて実験を行ない、心材と辺材の違いを見ることができた。木材中には結合水と自由水の2種類あることがすでに知られているが、NMR実験の結果からその中間の状態の水が存在することが示唆される。今回用いた木材はヒノキであったが、広葉樹材についても興味ある課題である。

文献：1) 南澤明子、小沢あつみ：木材学会誌40 (10)、1052-1058(1994)

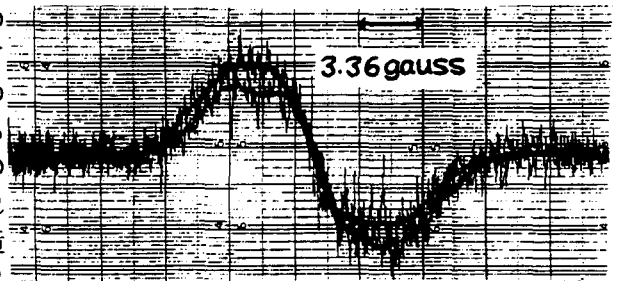


Fig.5. Wide range NMR Spectra representing intensity changes caused by repeating, dehydration and D-substitution.

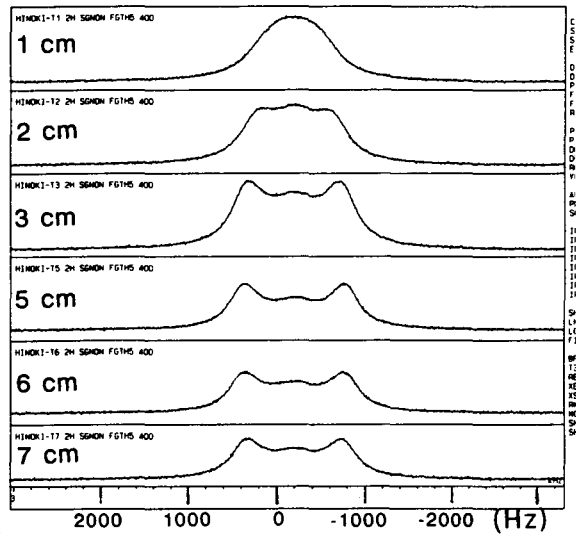


Fig.6. Spectrum pattern obtained by $^2\text{H-NMR}$

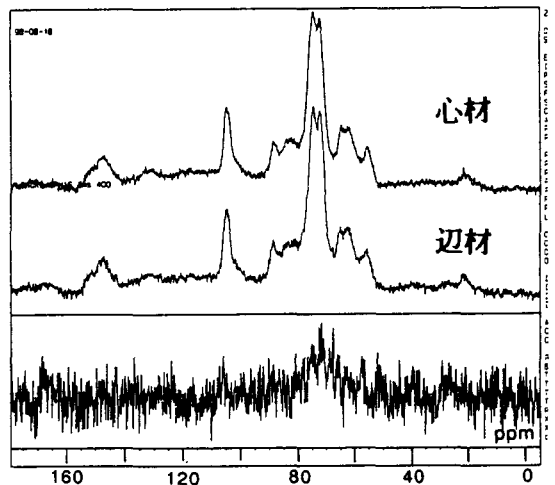


Fig.7. Difference between hearts and sapwoods as detected by CP/MAS.

ランタノイド元素ドーブ Y_2O_2S の ^{89}Y -MAS NMR
 (三菱化学横浜総研¹・東京水産大²)○原園としえ¹・下村康夫¹・渡部徳子²

^{89}Y -MAS NMR of Lanthanoid Ion-Doped Y_2O_2S

(Mitsubishi Chemical Co., Ltd¹, Tokyo University of Fisheries²)

○Toshie Harazono¹, Yasuo Shimomura¹, Tokuko Watanabe²

$^{89}Y(I=1/2)$ -MAS NMR of various lanthanoid ion-doped Y_2O_2S with 4 mol% content of Ln/Y have been studied. Besides the main peak at 292 ppm of pure Y_2O_2S , another several peaks appeared for Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Yb, Tm-doped samples. For Gd, Tb, Dy, Ho, Er-doped samples, only a main peak with broader linewidth observed. The spectrum patterns were affected by the z component of the lanthanoid electron spin, a relative pseudocontact term, and ion radius of the ion. $^{139}La(I=7/2)$ -MAS and -static NMR spectra also measured for La- Y_2O_2S .

著者らは、ランタノイド元素をドーブした一連の蛍光体の物性を、イットリウム-89をプローブとした固体NMRを用いて調べており、これまでに、赤色蛍光体Eu- Y_2O_3 ¹⁾、緑色蛍光体Tb- $Y_3Al_5O_{12}$ ²⁾、赤色蛍光体Eu- Y_2O_2S ³⁾について報告した。 ^{89}Y は天然存在比100%、核スピ、 $I = 1/2$ 、であるにもかかわらず、共鳴周波数が4.9 MHz (H:100MHz)、¹Hに対する相対感度が 1.18×10^{-4} と低感度、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の研究例は少ない。著者らは昨年のNMR討論会で、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ドーブ Y_2O_2S の ^{89}Y -MAS NMRについて報告した。³⁾ Eu- Y_2O_2S の物性をさらに詳細に検討するため、今回、14種類のランタノイド元素をドーブした Y_2O_2S を合成し、 ^{89}Y 、 ^{139}La 、及び、 ^{175}Lu 固体NMRを測定し、 ^{89}Y シグナルの線幅やシフト、及び、ランタノイド元素の分布について新たな知見を得たので報告する。

試料及び測定方法：本研究で用いた試料 (lanthanoid ion /Y=4 mol%)は従来の方法で作成した。⁴⁾ 不純物濃度はSeiko-SPS-1200A ICP とRigaku 3370 蛍光X線で定量したが、すべて100ppm以下であった。固体NMRの測定はBruker社製MSL-300固体NMR装置に低周波数用CP-MASプローブを装着して行なった。測定条件は以下の通りである。 ^{89}Y の共鳴周波数：14.706MHz、90°パルス：11 μ s (MAS)、回転数：5000 rps、0 ppm：1.5M $Y(NO_3)_3$ 水溶液、デットタイム：150 μ s、くり返し時間：100 - 3200 s。積算回数：22 - 553。 ^{139}La の共鳴周

^{89}Y -MAS NMR、 ^{139}La -MAS NMR、ランタノイド元素、 Y_2O_2S

○はらぞの としえ・しもむら やすお・わたなべ とくこ

波数：42.436MHz、I：7/2、0 ppm：1M LaCl₃水溶液、90°パルス：7μs (LaCl₃水溶液)、4.5 μs (La-Y₂O₇S)、測定パルス幅：1.5-4.5 μs、回転数：5000 rps、デッドタイム：50 μs、エコータイム：200 μs (MAS)、30 μs (static)、くり返し時間：1-5 s。積算回数：3万 - 10万。
¹⁷⁵Luの共鳴周波数：34.236MHz、I：7/2。

結果、及び、考察：

Y₂O₇Sは図1に示したような六方晶系の結晶構造をしており、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。ランタノイド元素はYサイトを置換する。

⁸⁹Y：ランタノイド元素をドープしたサンプルの⁸⁹Y-MAS NMR スペクトルを図2に示した。⁸⁹Y-MASシグナルは、いずれも292 ppm にメインピークが現れた。

①：Euをドープした時に現れる4本のシグナルは、Y (Y')のT₁値とリートベルト法によるY-Eu距離との関係、及び、シグナルの面積の定量測定から、低磁場側よりEu(-0-, -0-)Y', Eu(-0-, -S-)Y', Eu(-S-, -S-)Y', 及び、Eu-S-Y'に帰属された。³⁾ Y'はEuから見て0、または、Sを経由して第1近接に存在するYである。Eu(-0-, -0-)Y', Eu(-0-, -S-)Y', Eu(-S-, -S-)Y'のY'のシフトは主に擬コンタクト項で、Eu-S-Y'のY'のシフトは主にコンタクト項で説明できた。³⁾

②：S_z (電子スピンのz方向の成分) と relative PCS (理論から求められた相対的な擬コンタクトシフト値) の符号がEuと反対であるNd-Y₂O₇SのY'のピークはメインピークをはきんでEu-Y₂O₇Sの場合と高磁場側と低磁場側が反転している。

③：PrとCe-Y₂O₇SのY'のピークは、メインピークの低磁場側に2、3本現われる。Pr-Y₂O₇SのY'のシフトはCeドープ-Y₂O₇SのY'のシフトに比べて約2倍大きいのが、これは、Prのrel. PCSがCeの1.7倍であることから説明できる。S_zに関しては、Pr/Ce=3であるが、両者のメインピークの線幅はほぼ同じ位である。これは、Ceのイオン半径がPrに比べて大きいので、Ce-Y₂O₇Sの結晶構造が歪み、これがY'シグナルの線幅の増加に反映されているものと思われる。4本のピークが現れない理由については考察中である。

④：SmはS_zとrel. PCSの値が小さいため、Sm-Y₂O₇SのY'のシグナルのシフトと線幅は小さい。

⑤：GdはS_zが0であるので、シフト試薬としては働かず緩和試薬として働くといわれている。

⑥：TbからTmまでは、S_z、及び、rel. PCS共に大きいのでメインピークの線幅が広がり、またシフトしたピークも観測されない。(Tmでは、数本の小さいピークが観測された。)

⑦：Ybのrel. PCSは大きいのが、メインピークのすそに4本のピークが現れる。シフトの大きさがrel. PCSと対応しないので、これについては考察中である。一方、メインピークの線幅はS_zに比例している。

⑧：LaとLuは反磁性であるためシグナルは1本である。線幅はLu-Y₂O₇Sの方が小さいのが、これは、Luのイオン半径がYに近く、結晶構造の歪みが少ないからであると考えられる。

以上のようにLn-Y₂O₇Sの⁸⁹Y-MAS NMR シグナルは、S_zとrel. PCSの他にLnのイオン半径の違いに基づく結晶構造の歪みに大きく依存していることが明らかになった。

¹³⁹La：図3はLa-Y₂O₇Sの¹³⁹La-static (a)と-MAS (b) NMR スペクトルである。staticシグナル

には、ブロードなピークと四極子核特有の線形を持ったピークが観測された。MASシグナルには0.37 sと1.3 sの2種類のスピン-格子緩和時間を持つメインピークが920 ppmに現れた。
 ^{175}Lu : Lu-Y₂O₂Sの ^{175}Lu NMRシグナルは、 ^{175}Lu が大きな四極子モーメント ($5.7 \times 10^{-24}\text{cm}^2$)を持つため検出されなかった。

Table 1. The calculated relative magnitudes of the contact and pseudocontact terms, and effective ion radii with coordination number 7 for the lanthanoid ions.

Ln ³⁺	Ec ^{a)}	Sz ^{b)5)}	Rel PCS ^{c)6)}	Effective ion radii / Å
La ³⁺	4f ⁰	0.000	0.0	1.24
Ce ³⁺	4f ¹	0.979	-6.3	1.21
Pr ³⁺	4f ²	2.972	-11.0	1.20
Nd ³⁺	4f ³	4.487	-4.2	1.19
Pm ³⁺	4f ⁴	4.014	2.0	1.17
Sm ³⁺	4f ⁵	-0.063	-0.7	1.16
Eu ³⁺	4f ⁶	-10.682	4.0	1.15
Gd ³⁺	4f ⁷	-31.500	0.0	1.14
Tb ³⁺	4f ⁸	-31.818	-86.0	1.12
Dy ³⁺	4f ⁹	-28.545	-100.0	1.11
Ho ³⁺	4f ¹⁰	-22.629	-39.0	1.10
Er ³⁺	4f ¹¹	-15.374	33.0	1.09
Tm ³⁺	4f ¹²	-8.208	53.0	1.08
Yb ³⁺	4f ¹³	-2.587	22.0	1.07
Lu ³⁺	4f ¹⁴	0.000	0.0	1.06
Y ³⁺				1.10

a) Electronic configuration

b) The average z component of the lanthanoid ion spin.

c) The calculated relative pseudocontact shift.

- sign indicates downfield.

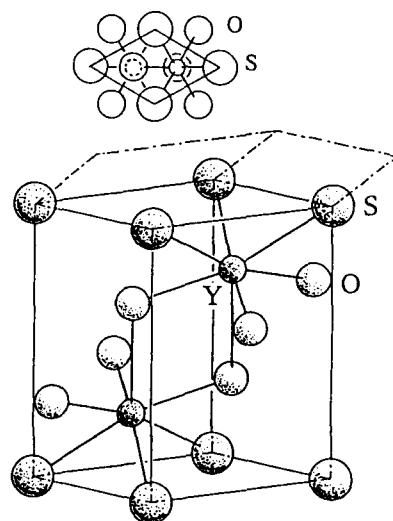


Fig. 1 Crystal structure of Y₂O₂S.

Reference

- 1) T.Harazono, E.Yokota, H.Uchida, and T.Watanabe, Bull. Chem. Soc. Jpn., 71, 825(1998).
- 2) T.Harazono, E.Yokota, H.Uchida, and T.Watanabe, Bull. Chem. Soc. Jpn., in press.
- 3) 原園、安達、渡部、第36回NMR討論会要旨集、p. 67(1997).
- 4) 蛍光体ハンドブック、p.171、蛍光体同学会編、オーム社、1987.
- 5) M. Goldling and M. P. Halton, Aust. J. Chem., 25, 2577(1972).
- 6) B. Bleaney et.al., J. C. S. Chem. Comm., 791(1972).
- 7) J. E. Huheey, "Inorganic Chemistry, principles of structure and reactivity", p. 71, coordination number 7, Harper & Row, Publishers, New York, 1978.

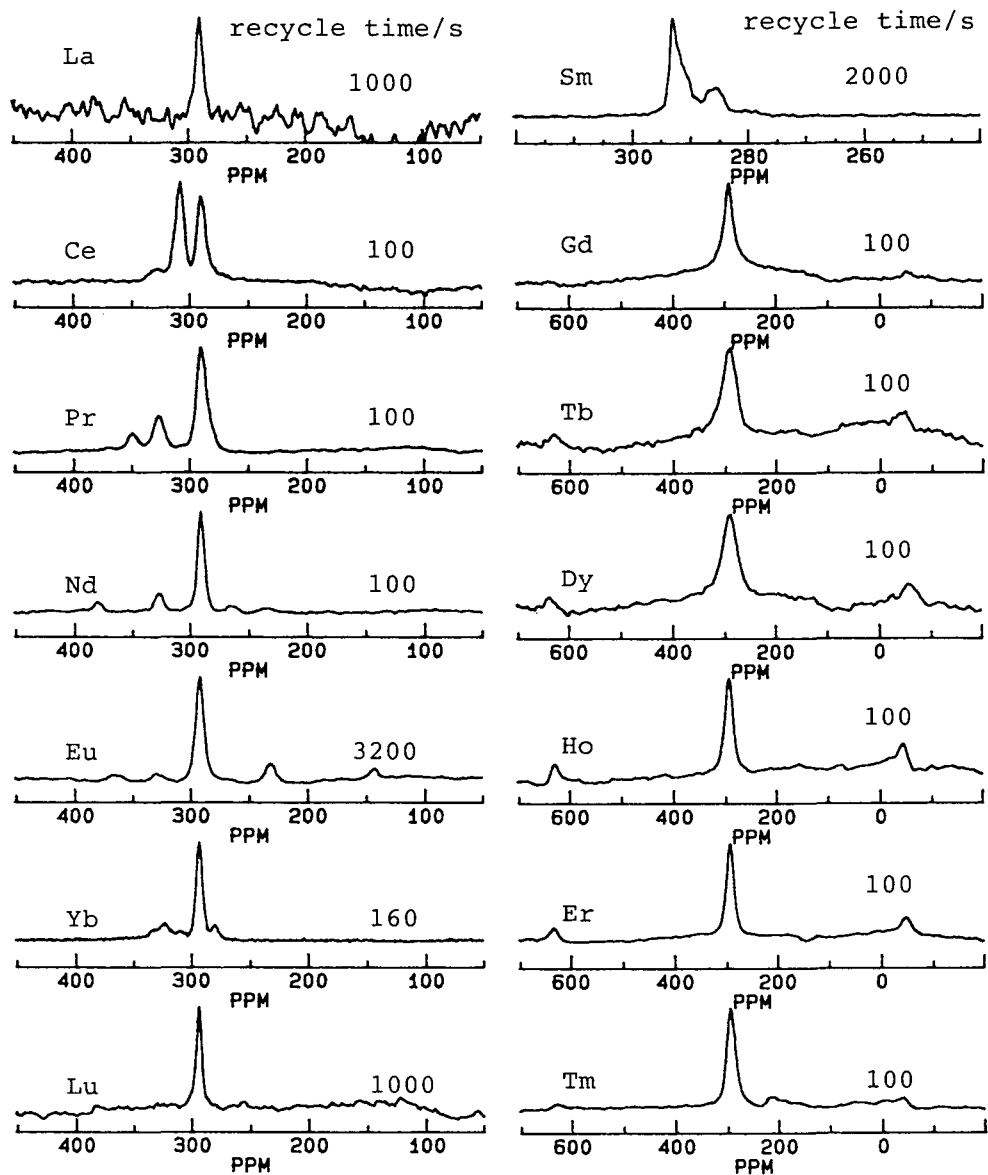


Fig. 2 ^{89}Y -MAS NMR spectra for $\text{Ln-Y}_2\text{O}_2\text{S}$ with 4 mol% content of Ln/Y .

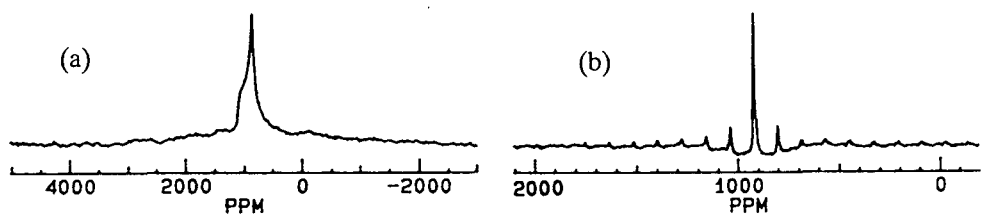


Fig. 3 ^{139}La -static(a) and -MAS(b) NMR spectra for $\text{La-Y}_2\text{O}_2\text{S}$.

**^2H NMR による zeolite KL 細孔内の
ベンゼンおよびシクロヘキサンの運動**
〔筑波大物質工¹、物質研²〕○佐藤孝幸¹、国森公夫¹、林 繁信²

**Molecular Motions of Benzene and Cyclohexane in Zeolite KL
Studied by Deuterium NMR**

(Tsukuba univ.¹, National Institute of Materials and Chemical Research²) ○Takayuki Sato¹,
Kimio Kunimori¹, and Shigenobu Hayashi²

Molecular motions of perdeuterated benzene and cyclohexane sorbed at loading levels of 1 molecule per channel lobe in zeolite KL have been examined by ^2H NMR in the temperature range from 123K to 373K. For the analysis of the motions, the spectrum simulation has been done by using MXET1 program. The motion of benzene is jumping around the six equivalent potassium cation sites on the walls of the zeolite channel combined with ring rotation. From the temperature dependence of the residence time, we infer an activation energy of 8.1kcal/mol. The cyclohexane spectra consist of two types of signals, axial deuterium and equatorial one. The motion of cyclohexane is similar to that of benzene, whose activation energies are 1.9 and 10.7kcal/mol at low and high temperatures, respectively.

1.緒言

^2H NMR は運動によりスペクトル形状が変化することや、広い周波数範囲の運動を解析できるという点で分子運動を解析する強力な手段となる。今回我々はホストにゼオライト KL、ゲストに重水素化したベンゼン、シクロヘキサンを用い、ホスト内でのゲスト分子の運動について ^2H NMR を用いて解析を行った。ホストへのゲスト分子導入量はゼオライト KL 単位格子当たり一分子とした。実測の NMR スペクトルパターンから得られた情報をもとにシミュレーションすることで運動モードを決定し、その運動サイトに滞在する時間から活性化エネルギーを求めた。今回の解析ではゲスト分子が運動サイト間をジャンプするのに要する時間も考慮してシミュレーションを行った。

2.実験方法

・ ^2H NMR 測定

ホストとしてゼオライト KL(単位格子組成： $\text{Na}_{0.31}\text{K}_{9.24}\text{Al}_{9.55}\text{Si}_{26.45}\text{O}_{72}$)、ゲストとしてベンゼン- d_6 (99.6atom%D)、シクロヘキサン- d_{12} (99.6atom%D)を用いた。真空脱気処理を施し細孔内の水を完全に除去したゼオライト KL を N_2 条件下でバイアル瓶に移した後、単位格子当たり一分子の計算量のゲスト分子をマイクロシリンジでバイアル瓶に注入し 100°C で 24 時間保持した。導入量はベンゼン： $35\mu\text{l/g}$ 、シクロヘ

^2H NMR、ゼオライト KL、ベンゼン、シクロヘキサン

さとうたかゆき、くにもりきみお、はやししげのぶ

キサソ：43 $\mu\text{l/g}$ である。サンプルはその後常温に戻し、 N_2 条件下で Pyrex 製のガラスチューブに詰め低温減圧下で封じ切った。 ^2H NMR 測定は BRUKER MSL 400(61.4MHz)を用い、124K~373K の温度範囲にて行った。

・スペクトルシミュレーション

IBM SP2 上で MXET1 プログラム¹⁾を用いてシミュレーションを行い、得られたスペクトルを実測のスペクトルと比較することで運動の解析を行った。実測のスペクトルから得られた核四極結合定数と非対称定数を用い、運動サイト、運動頻度などを変化させることでシミュレーションを行った。シクロヘキサソにおいてはアキシヤルとエクアトリアルな重水素の運動を別々にシミュレーションし、それらを合成することで実測との比較を行った。

3.結果と考察

・ベンゼソ

Fig.1 に今回の実験から考えられる細孔内でのベンゼソの運動モデルを示す。細孔内の等価な6つの K^+ サイトとベンゼソの π 電子雲の相互作用により、ベンゼソは C_6 軸回りの運動を行いながら K^+ サイトをジャンプしているということが考えられる。また Fig.2 に実測の NMR スペクトルとシミュレーションの比較を示す。240K までの低温領域では Fig.1 の K^+ サイトにて C_6 軸回りの運動を行っていることを示すスペクトル形状が見られた。そこでこの温度領域では C_6 軸回りの運動を6つのサイトで行っている場合のパラメータでシミュレーションした結果、実測と程よい一致が見られた。しかし 273K 以上の温度領域においてこの運動モードでのシミュレーションでは実測と一致せず、シミュレーションパラメータにジャンプに要する時間の寄与も加えた。結果、滞在時間とジャンプに要する時間の割合を4:1にしたとき実測との一致が見られた。この温度領域におけるスペクトル形状はサイトでの運動とジャンプ中の運動(細孔空間での等方的な運動)の平均値を示すパターンとなった。

また実測のスペクトルとシミュレーションのスペクトルとの比較により決定した運動の速度の温度依存性から活性化エネルギーは 8.1kcal/mol であることが分った。

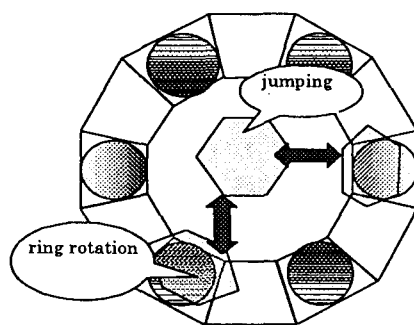


Fig.1 The motion of benzene in zeolite KL.

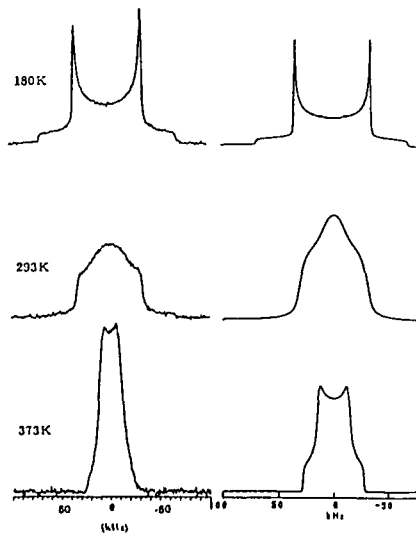


Fig.2 ^2H NMR spectra of benzene- d_6 in zeolite KL and simulated spectra.

・シクロヘキサン

Fig.3 にシクロヘキサンの ^2H NMR スペクトルを示す。シクロヘキサンには環の炭素と同一面上にあるエクアトリアル水素と環の C_3 軸に平行なアキシアル水素があり、スペクトルもこれら二種類の水素の運動を足し合わせたようなスペクトル形状を示した。低温のスペクトルからアキシアル水素の $\text{QCC} = 173.3\text{kHz}$ 、エクアトリアル水素の $\text{QCC} = 53.3\text{kHz}$ と見積もられ、シクロヘキサン環が C_3 軸回りで早い回転をしていることが分った。シクロヘキサンの低温側のスペクトルにおいてもベンゼン同様ゼオライト細孔壁の K^+ サイトをジャンプする運動を行っているスペクトル形状が見られた。しかし温度を上昇するに伴い、細孔空間での等方的な運動をする時間が長くなっていることを示すスペクトル形状が現れた。これはベンゼンと異なり π 電子雲と K^+ の静電的な相互作用が無いいため、ベンゼンに比べてシクロヘキサンのサイト滞在時間が短いことを表している。シミュレーションから 260K 以下の温度領域ではサイト滞在時間の方が細孔空間滞在時間より長いが 280K 付近ではほぼ同一となり、それより高温領域においては細孔空間滞在時間の方が長くなることが分った。 373K ではサイト滞在時間と細孔空間滞在時間の比は $3 : 11$ であった。

Fig.4 に温度に対する K^+ サイト滞在時間のアレニウスプロットを示す。 260K 付近で傾きが変わり、活性化エネルギーが変化することが分る。高温領域における活性化エネルギーは 10.7kcal/mol 、低温領域においては 1.9kcal/mol であった。これは先に示したサイト滞在時間と細孔空間滞在時間がほぼ等しくなるときの温度とほぼ一致しており、この温度付近において運動モードに何らかの変化が起きたと考えられる。

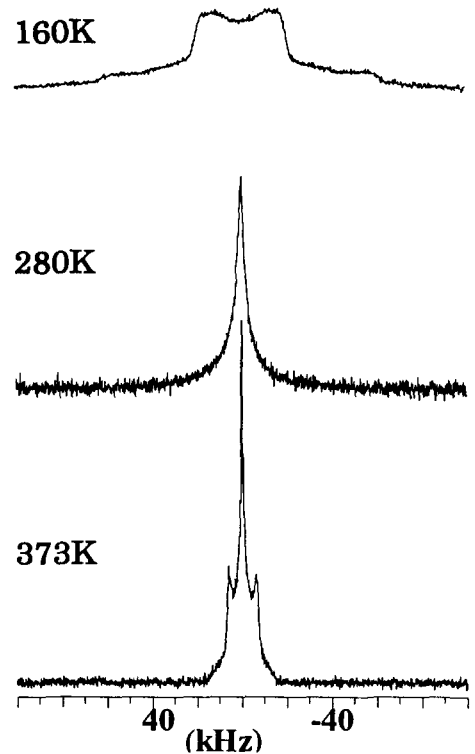


Fig.3 ^2H NMR spectra of cyclohexane- d_{12} in zeolite KL.

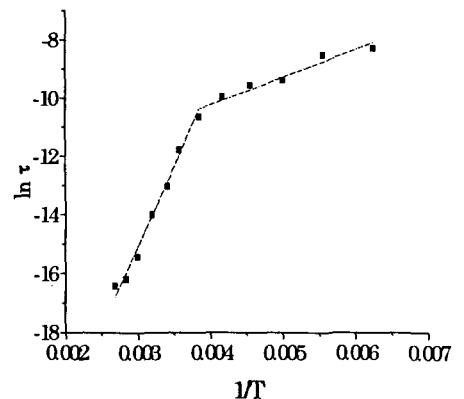


Fig.4 Temperature dependence of the residence time of cyclohexane- d_{12} in zeolite KL.

¹⁾M.S.Greenfield et al., J.Mag.Reson. 72.89(1987)

家兎アキレス腱のin vivo H-1 DQF Imaging

京都府立医大・一生理¹・整形²、テルアビブ大・化学³、生理研・分子生理⁴○瀬尾芳輝¹、生駒和也²、高宮尚武²、Liat Tsoref³、Haddash Shinar³、
Gil Navon³、村上政隆⁴

In vivo H-1 DQF Imaging of Rabbit Achilles Tendon

Departments of Physiology¹ and Orthopaedic Surgery², Kyoto Prefectural University of
Medicine; School of Chemistry, Tel Aviv University³; and Department of Molecular
Physiology, National Institute for Physiological Sciences⁴° Y. Seo¹, K. Ikoma², H. Takamiya², L. Tsoref³, H. Shinar³, G. Navon³, M. Murakami⁴

In order to image water molecules interacting with ordered structures, in vivo ¹H double quantum filtered (DQF) NMR imaging was applied to the rabbit Achilles tendon. The collagen fibers in the tendon are well oriented in the longitudinal direction of the tendon. The water molecules in tendon interact with collagen fibers. This interaction was observed as the residual dipolar splitting of ¹H₂O using DQF NMR. In in vivo experiments, a rabbit was anesthetized and the right lower limb was inserted in a 35 mm ¹H RF coil. Then, the rabbit was set in an NMR spectrometer (ABX-4.7/40) at 4.7 T, and was measured by the DQF imaging sequence, 90°-tau-90°-t₁-90°-(acquisition), where tau is the double quantum creation time. The phase and frequency encoding gradients for imaging were applied during the acquisition time. The Achilles tendon as well as other tendons were depicted as areas as highlighted intensity at the creation time of 0.5 ms. In preliminary experiments, we found that ¹H DQF images change dramatically during healing processes of injured Achilles tendon. Therefore, ¹H DQF imaging is very promising technique for examining structural disorders of tendon in vivo.

【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、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ている。我々は、重水置換したアキレス腱組織について、重水素核NMRスペクトルの四極子分裂 (vq) の大きさが、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・修復過程に著しく変化する事を示した。さらに、これらの変化の解剖的分布を二量子フィルター化学シフト画像 (DQF SI) により画像化できることを報告してきた。

最近、生体組織においても、巨大分子に配向した水分子内のH-1核間の双極子相互作用により、軽水素核 (H-1) 二量子フィルター-NMRスペクトルを測定できることが明らかになった。軽水素核においては、その緩和機構は重水素に比べて著しく複雑

キーワード：水分子、二量子フィルター、in vivo MRI、アキレス腱

せおよして、いこまかずや、たかみやひさたけ、Tsoref, L., Shinar H., Navon G.

であるが、生体中にもっとも多量に存在する核であり、in vivoでの画像計測が行えれば、従来のNMR画像法では殆どタッチできなかった「構造化した水」を調べることができる。今回、家兎アキレス腱のin vivo計測を試みるとともに、アキレス腱断裂修復モデルを用い、病態解析への可能性を検討した。

【方法】 in vivo測定は、麻酔下の家兎（日本白色種）右下腿部を35 mm H-1 RFコイル内に固定し、アキレス腱の長軸を静磁場と平行とし、ABX 4.7/40 NMR分光計（4.7 T）にBGA260自己シールド型磁場勾配コイルを用い、室温(24℃)で行った。in vitro計測は、麻酔下にアキレス腱、又は下腿部を一塊に摘出し、直径10 mm又は25mm NMR試料管内に腱の長軸を静磁場と平行に固定し、AMX-300wb NMR分光計(7.05 T)に、直径10 mm又は25mm H-1 RF コイル、Micro2.5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】 アキレス腱の一量子NMRでは、図1 aに示すように幅広い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- τ /2-180- τ /2-90-t1-90-t2 (acq)] により、水分子の軽水素核間の双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に示すような逆位相のローレンツ型吸収線が重なった形のスペクトルが測定された。重水素核では四極子分裂として測定できたが、軽水素核では緩和時間の差として測定されている。図2に、アキレス腱・皮膚組織・皮下組織・骨皮質・骨格筋の二量子フィルターNMR信号強度の展開時間依存性を示す。軽水素核では縦緩和時間が長いので、化学交換による緩和の平均化が大きく寄与し、緩和機構の解析は複雑である。二量子フィルターNMR信号強度が最大になる展開時間 (τ_{max}) を、便宜的なパラメーターとした。

図3に二量子フィルター画像 (DQF Imaging) の代表的なパルス系列を示す。最初の90°パルスを周波数選択パルスとしスライス選択磁場勾配パルスとともに与える。位相エンコード勾配パルスと周波数エンコード勾配パルスは最後の90°パルス後に与えた。16ステップのRFパルスの位相で積算を行い、 T_{21} のコヒーレンスを選択的に測定した。図4に、アキレス腱部のa) H-1磁場反転エコー(GE)画像、b) c) H-1 DQF画像

Fig. 1 H-1 SQ (a) and DQF (b) spectra of rabbit Achilles tendon at 7.05 T.

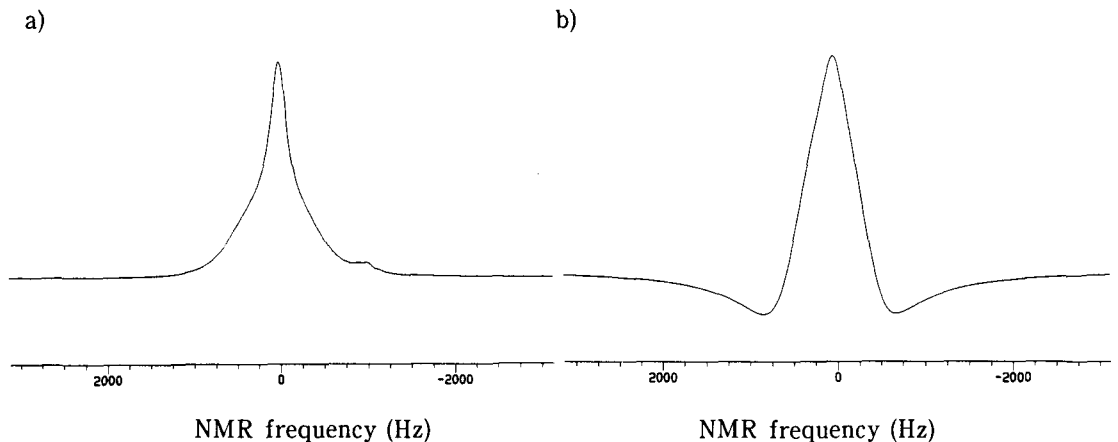


Fig. 2 Creation time dependencies of H-1 DQF signal of Achilles tendon, skin, subcutaneous tissue, bone and skeletal muscle at 7.05 T.

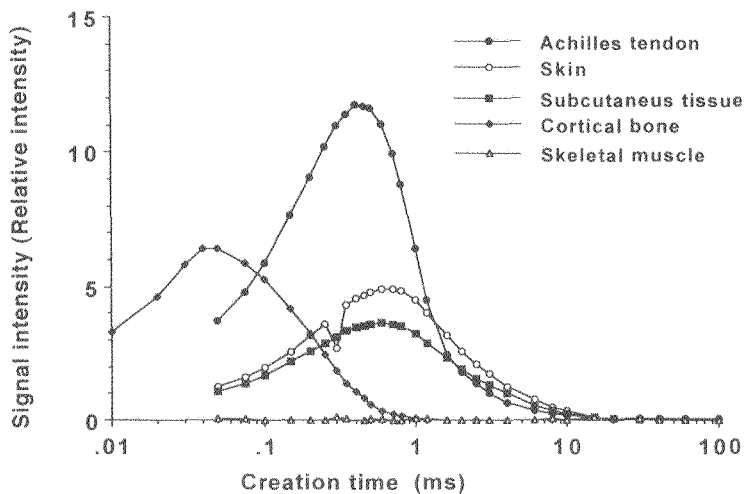


Fig. 3 Pulse sequence of H-1 DQF imaging

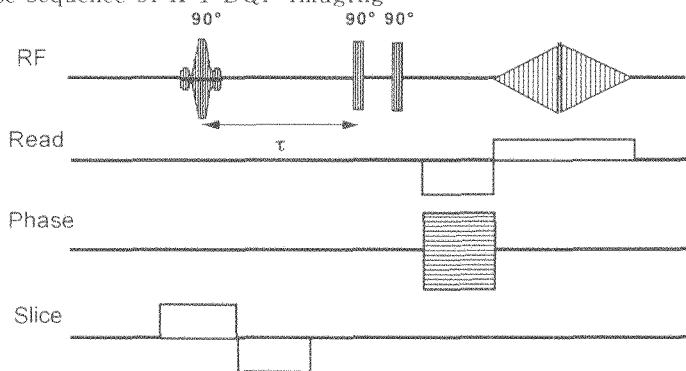


Fig. 4 H-1 DQF images of rabbit Achilles tendon at 7.05 T

a) H-1 Gradient-Echo Imaging b) H-1 DQF Image($\tau= 0.4$ ms) c) ($\tau= 1$ ms)

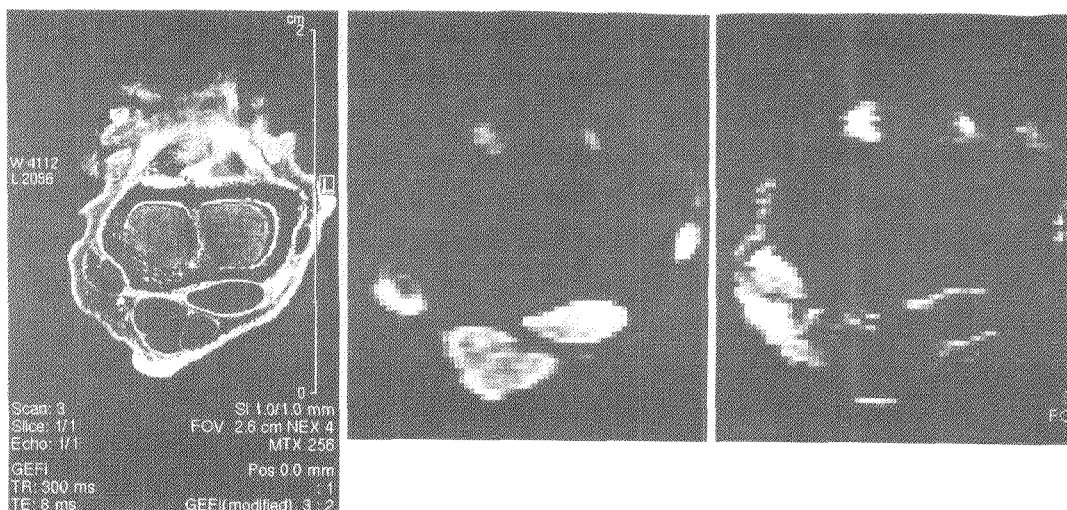
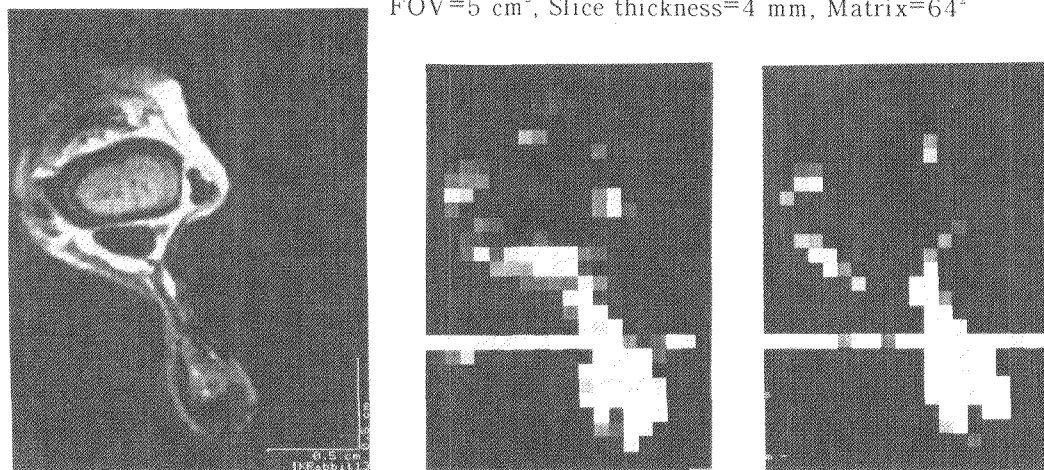


Fig. 5 in vivo H-1 DQF images of rabbit Achilles tendon at 8 weeks after resection.

a) H-1 Gradient-Echo Imaging b) H-1 DQF imaging ($\tau=0.5$ ms) c) ($\tau=1$ ms)

FOV=5 cm², Slice thickness=4 mm, Matrix=64²



を示す。GE画像では、皮膚・皮下組織・骨格筋・骨髄内部が高信号領域として描出されている。アキレス腱・足底筋腱等の腱組織と骨皮質は殆ど無信号領域で、周囲の軟部組織の高信号領域との対比によって可視化されており、腱の T_2 緩和時間が短いことを示している。一方、腱組織中の水分子の検出に最適な展開時間0.4 msに設定したDQF画像（図4b）では、腱に対応した領域が高信号に描出されている画像を得ることができた。皮下組織に対応した領域もわずかな信号強度を示しているが、皮膚・骨格筋・骨皮質・骨髄内部に対応する領域は、殆ど無信号となった。また、皮膚および皮下組織中の水分子の検出に最適な展開時間1 msに設定したDQF画像（図4c）では、腱組織実質は殆ど無信号領域となり、皮膚・皮下組織・腱周囲の軟部組織がはっきりと描出されている。

アキレス腱断裂後8週めのアキレス腱部のin vivo H-1 GE画像を図5aに示す。並行して走る足底筋腱は殆ど無信号であるが、修復中のアキレス腱は中程度の信号強度を示しており、皮下組織との弁別は不可能である。一方、展開時間0.5 msのDQF画像（図5b）では、正常の腱組織と同様に、修復中のアキレス腱は高信号領域として描出され、皮下組織とはっきり弁別できた。また、展開時間1 msに設定したDQF画像（図5c）では、修復中のアキレス腱は、皮膚・皮下組織と同様に高信号領域として描出され、正常腱組織（足底筋腱）との差異を示した。アキレス腱断裂後の修復過程では、二量子フィルターNMR信号強度が最大になる展開時間（ τ_{max} ）が、時間とともに短縮し、また展開時間依存性がシャープになりつつ、正常アキレス腱の値に漸次近づいていく。腱断裂後8週めでは、 τ_{max} は約1 msであり、正常腱の二倍強である。DQF画像の信号強度および画像コントラストは信号強度の展開時間依存性を反映するものであり、腱組織の病態解析に有用であると考えられる。

【まとめ】 in vivo H-1二量子フィルター画像法により、腱組織中の「結合水」の解剖学的分布を画像化することに成功した。今後、アキレス腱断裂後の修復過程を適確に画像化できる画像パラメータの検討とともに、重水素NMRを併用し組織修復過程における水分子の動態について検討していく予定である。

NMR イメージングによるLECラット肝病變の
1年間にわたる経時観察

○三森文行¹、吉岡 大^{1,2}、女屋博昭^{1,2}、板井悠二²、土井幹雄³
(¹国立環境研究所、²筑波大医、³筑波メディカルセンター)

Longitudinal study of hepatic lesions developed in LEC rats for one year
by NMR imaging

E. Mitsumori¹, H. Yoshioka^{1,2}, H. Onaya^{1,2}, Y. Itai², M. Doy³

(¹National Institute for Environmental Studies, ²Tsukuba Univ., ³Tsukuba Medical
Center)

The Long-Evans Cinnamon (LEC) rat is a new mutant strain which abnormally accumulates copper in the liver and spontaneously develops hepatic lesions including hepatocellular carcinoma (HCC). Therefore, it could be a good model animal for hepatic lesions. In order to observe the developmental process of hepatic lesions in LEC rats we repeatedly measure NMR images of the same 12 rats at 60, 75, 90 and 100 weeks old. The result demonstrates that either cancerous or non-cancerous lesion in LEC rats kept its imaging characteristics from the early stage to 100 weeks old. Growth rate of individual lesions was evaluated from the repeated observation in the same rats.

【はじめに】 LECラットはATPaseの異常から肝に多量の銅を蓄積し、このため肝細胞癌をはじめとする肝疾患を自然に発症する肝疾患モデル動物である。我々はこれまでLECラット肝のNMRイメージングと病理診断の対応から、LECラット肝の多彩な病變がNMR画像上で識別できることを示した(1)。今回、これらの病變、特に肝細胞癌(HCC)が如何に発症、成長してくるかを明らかにするために、NMRイメージング法の無侵襲性を生かして同一の動物の肝イメージを1年間にわたって繰り返し測定し、疾患の経時変化を明らかにした。

【方法】 当研究所で繁殖をしたLECラット12匹を対象として、同一動物を60、75、90、100週齢で繰り返しイメージ測定を行った。ラット肝イメージの測定には、自作の内径85mmのsineコイルを用いたNMR信号検出器を用いた。この信号検出器を口径30cmの水平ボア磁石を有するBruker Biospec24/30 NMR分光計に接続して測定を行った。磁場勾配コイルはMagnex社の自己シールド型 AGRAD 255/178を用いた。上記測定システムを用いて、T₁強調画像(TR/TE=306/13ms, データ256×128)、T₂強調画像(CPMG法, 6エコー, TR/TE=2082ms/15-90ms)を測定した。FOVは8cm、スライス厚は3mm。60、75、90週

NMRイメージング、造影剤、LECラット、肝臓、肝細胞癌

みつもりふみゆき, よしおかひろし, おなやひろあき, いたいゆうじ, どいみきお

齢では腹腔内に置いた留置針よりGd(DTPA)を0.6mmol/kg体重投与し、造影後T₁強調画像を測定した。100週齢の測定では下腿静脈よりGd(DTPA)を0.3mmole/kg体重投与し、スピンエコー法(TR/TE=156/13 ms, データ256×64)を用いて、造影初期の動的過程をGd(DTPA)静注後22秒より310秒まで5画像にわたって追跡した(ダイナミックスタディ)。またこの後、造影後のT₁強調画像を測定した。100週齢での測定後に動物を屠殺し、肝をhematoxylin-eosin (HE)染色、periodic-acid methenamine silver (PAM)染色し、病理診断を行った。また、12匹中2匹は60週齢測定後、1匹は77週齢で死亡したので、この時点で病理診断を実施した。

【結果と考察】 画像と病理診断の対応から、12匹のLECラットで肝細胞癌(HCC)1例、異形成結節(dysplastic nodule)3例(この2病変を合わせて、neoplastic/dysplastic noduleと呼ぶ)、肝紫斑症(peliosis hepatis)24例、胆管線維症(cholangiofibrosis)7例、胆管拡張(bile duct dilatation)4例、嚢胞腺腫(cystadenoma)3例を同定した。HCCは前癌状態ともいえるdysplastic noduleを合わせても4例とこれまでに報告されたよりも発症率が小さかった。これに対して、肝紫斑症がきわめて多く、LECラットの代表的肝病変と言える。

60-100週齢の画像上ではこれらの病変の位置や、画像特性はよく保たれており、各病変の経時的な対応付けは比較的容易であった。図1にneoplastic/dysplastic noduleの75-100週のT₂強調画像の推移を示す。画像より、各病変のT₂緩和時間、T₁強調画像における肝筋または病変部位/正常肝の信号強度比を定量的に評価した。また、画像上の病変の長径、短径の積より病変体積を算出し、その成長速度について考察した。この結果、嚢胞腺腫のT₂緩和時間が病変の増大に伴って延長する他は、各病変の画像特性は発症から100週齢まで良く維持されることがわかった。たとえば、neoplastic/dysplastic noduleはやや長めのT₂緩和時間、T₁強調画像において肝実質に比べわずかに低いか同程度の病変/肝の信号強度比を示し、Gd(DTPA)投与10分後のT₁強調画像ではほとんど信号強度の増強はみられなかった(図2)。これに対して、肝紫斑症ではT₂緩和時間の延長はさらに大きく、T₁強調画像では低い病変/正常肝の信号強度比を示す。造影後T₁強調画像では大きな信号の増強がみられた(図2)。この結果はLECラット肝に発症する癌、非癌病変はいずれも発症当初より特異的な画像特性を示し、病変相互の関連は認められないことを意味する。また、病変体積の経時変化(図3)より、単一指数関数を仮定して求めた病変のダブリングタイム(T_D)はneoplastic/dysplastic noduleでは4.1週と最も短かく、肝紫斑症5.8週、胆管拡張8.7週、嚢胞腺腫4.6週、胆管線維症では20.3週と最長であった。このような個々の病変の特徴的な成長速度はNMRイメージング法の無侵襲性を生かしてはじめて得られたものである。

【文献】

(1) H. Yoshioka, Y. Itai, H. Onaya, M. Doy, F. Mitsumori, Magn. Reson. Imaging, 14, 429 (1996).

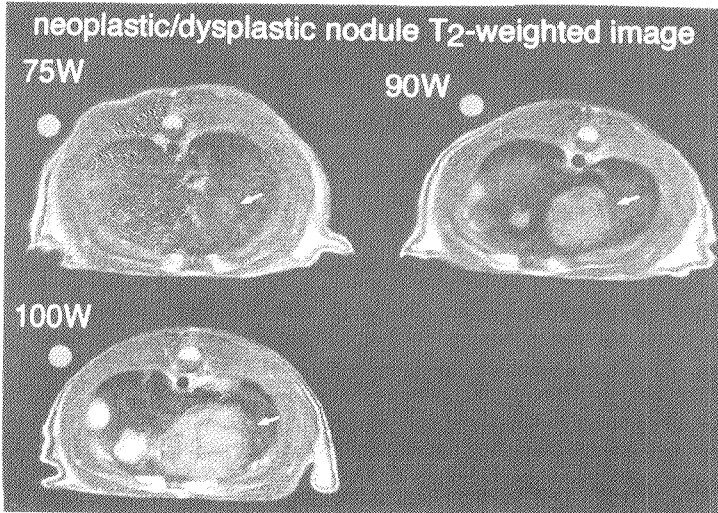


Fig.1 T2 weighted images (TR/TE = 2082/60ms) of neoplastic/dysplastic nodule in the same LEC rat at 75, 90, 100 weeks old (arrow).

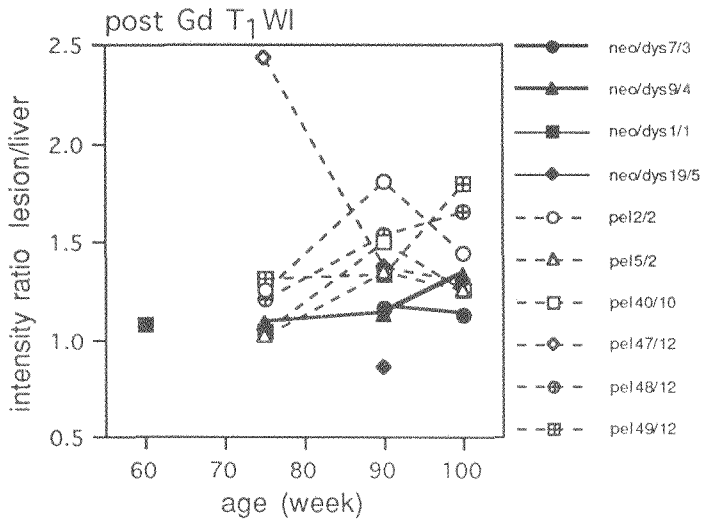


Fig. 2 Time course changes in the signal intensity ratio of lesion to normal liver parenchyma in the post Gd T1 weighted image. Closed symbol with solid line shows neoplastic and dysplastic nodules. Open symbol with broken line shows peliosis hepatis.

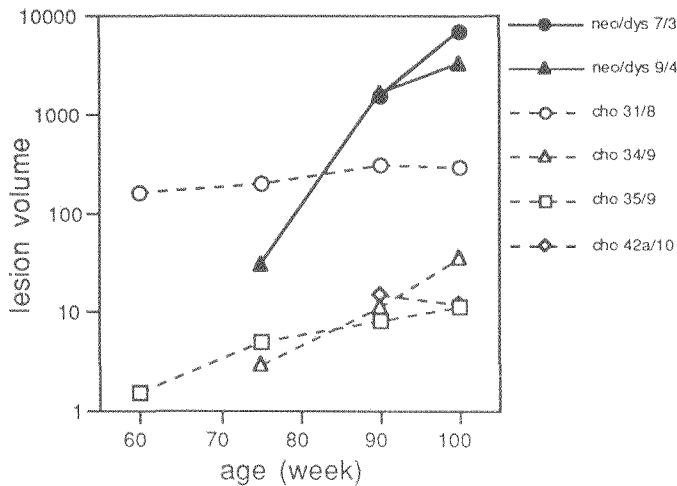


Fig. 3 Time course changes in the lesion volume in neoplastic and dysplastic nodules (closed symbol) and cholangiofibrosis (open symbol).

1L12

新しいアプローチによる MR microscope の開発(I)

—臨床用マグネットと独立した MRI を用いた MR microscope の開発—

○巨瀬勝美, 拝師智之, 安立直剛 (筑波大物工), 吉岡 大, 阿武 泉 (筑波臨医)

A Novel Approach to the MR Microscope (I)

-MR Microscope using a Whole Body Magnet and an Independent MRI System-

A novel approach to the MR microscope is proposed to overcome several disadvantages of existing MR microscopes. The proposed system uses a clinical whole body magnet and an independent NMR imaging system. The experiment using a 1.5 T clinical whole body magnet has presented clear 2D images at the $(50 \mu\text{m})^2$ pixel size and a 3D image at the $(150 \mu\text{m})^3$ voxel size. It is thus concluded that the proposed system can be a useful add-on MRI system to existing or future clinical MRI scanners, because neither electrical connection to the scanners nor initial and running cost for the magnet is required.

1. はじめに

既存の NMR microscope(MRM)では, ほとんどの場合, 高磁場を発生する超伝導磁石(7-14T)を使用している. ところが, このような超伝導磁石は高価であり, しかも広い設置スペースと, 維持のための多大なコストを必要とする. また, 静磁場強度は, 臨床用 MRI の静磁場(0.3~1.5T)と大きく異なるため, 画像間のコントラストの直接的な比較が困難であるという問題も存在する. 本研究では, 従来の MRM における以上の問題点を解決するために, 「臨床用 MRI の静磁場を利用し, 独立した撮像システムを持つ NMR microscope」を提案し, その開発と実験の結果を報告する.

2. システムの構成

Fig. 1 に開発したシステムを示す. このシステムに, 3軸の勾配コイルと RF コイルが一体となったプローブとプリアンプが接続され, これによって, 磁石を除くすべての MR マイクロスコープが構成されている. プローブとプリアンプを除く全重量は約 80 kg であり, キャスターがついているので移動は容易である. このシステムは, 4つのユニットから構成され, 上段より, パルスプログラマーと AD コンバータを内蔵した PC, シンセサイザー(DDS)を内蔵した高周波変調・検波系, パワーオペアンプを用いた勾配磁場電源($\pm 15\text{V}$, $\pm 5\text{A}$), 送信機(50 W)となっている.

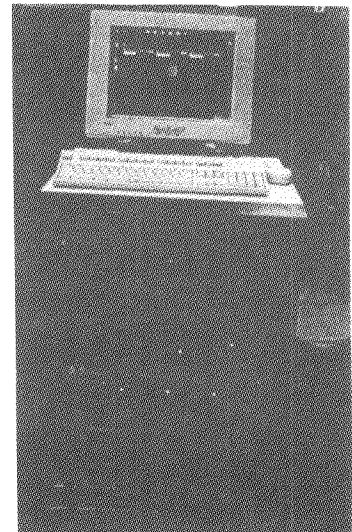


Fig. 1. System overview. Weight: 80 kg. Size: 54 cm(W) x 77 cm (H) x 60 cm (D).

こせかつみ, はいしともゆき, あだちなおたか, よしおかひろし, あんのいずみ

3. 実験の方法

Fig. 1 に示したシステムを、筑波大学物理工学系の実験室から、筑波大学病院の MR 撮像室へ運搬し、1.5 T の静磁場強度を持つ臨床用 MRI 装置(GYROSCAN ACS II, Philips 社製)を利用して撮像実験を行った。この装置の磁石は、局所的な磁気シールドを持っており、磁石の開口から横に約 2 m 離れた場所でも漏洩磁場強度は 20 G~30G であったので、この位置にシステムを設置した。なお、この漏洩磁場は、装置の動作には全く問題がなかった。

撮像対象としては、水ファントム、植物の茎、アーモンドの実、手術により摘出されたヒトの虫垂、大腿骨頭を使用した。アーモンド以外は、外径 10.0 mm、内径 9.0 mm の NMR 用試験管の中に挿入して測定した。そして、摘出試料は、乾燥などを避けるため生理食塩水に浸した。これらの試料を RF コイルの中に鉛直に挿入し、プローブを寝台の上に固定して、プローブを、寝台の移動機構を利用して、磁石の中央部へと移動させた後、撮像を行った。

4. 二次元画像の撮像とその評価

二次元画像の撮像に用いたパルスシーケンスは、標準的なスピン・エコー撮像シーケンスである。いずれも 12.8 mm×12.8mm の画像視野で撮像を行い、スライス厚さは、2 mm(ファントムと虫垂)および 4 mm(植物の茎)、画素数は 256×256(ファントムと植物の茎)および 128×128(虫垂)とした。ファントムと植物の茎では TE は 12 ms、TR は 200 ms (ファントム)と 1000 ms (植物の茎)を使用した。なお、虫垂に関しては、臨床画像で使用されている標準的な TR と TE (密度強調画像 : TR/TE=2000/15, T1 強調画像 : TR/TE=500/15, T2 強調画像 : TR/TE=2000/80)を使用した。ファントムと植物の茎の画像を Fig. 2 に、虫垂の画像を Fig. 3 に示す。

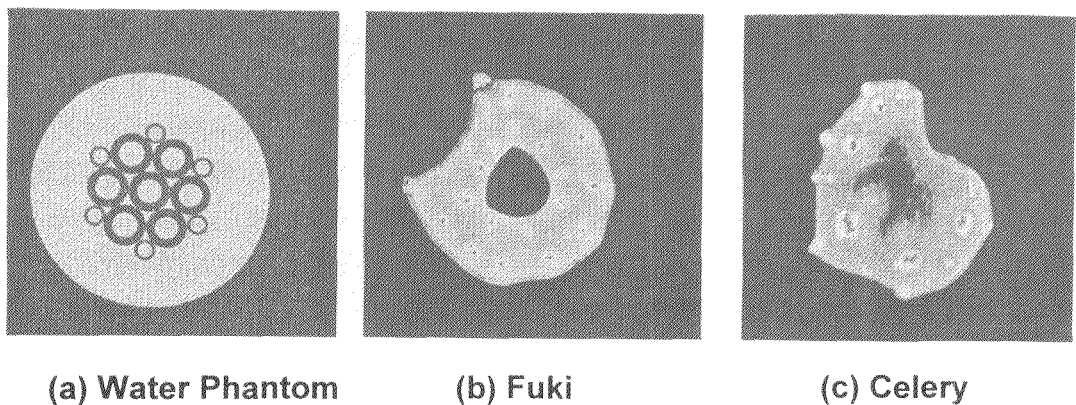
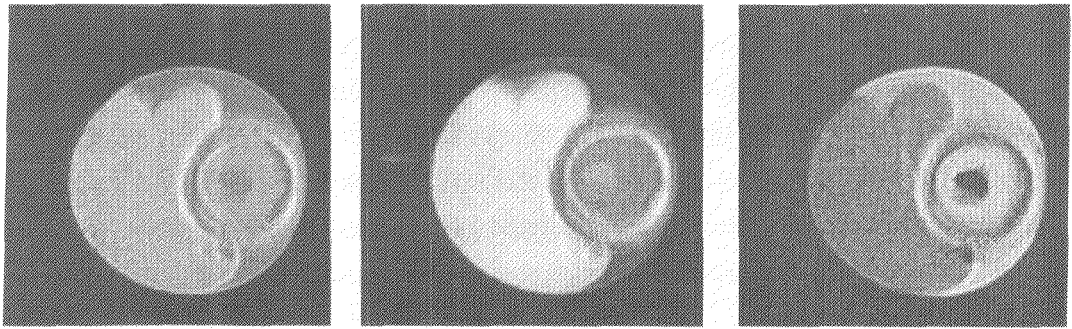


Fig.2. Cross-sectional images of a water phantom (a), plant stems (fuki (b) and celery (c)). Slice thickness: 2 mm (phantom), 4 mm(plant stems), FOV: 12.8 mm×12.8 mm, number of matrix: 256×256, pixel size: 50 μm×50 μm. Number of signal accumulation: 4.



(d) TR/TE = 2000/15

(e) TR/TE = 500/15

(f) TR/TE = 2000/80

Fig.3. Cross-sectional images of a human appendix. Slice thickness: 2 mm, FOV: 12.8 mm × 12.8 mm, number of matrix: 128 × 128, pixel size: 100 μm × 100 μm. Number of accumulation (measurement time) : (d) 6 (25.6 min.), (e) 10 (10.6 min.), (f) 10 (42.7 min.).

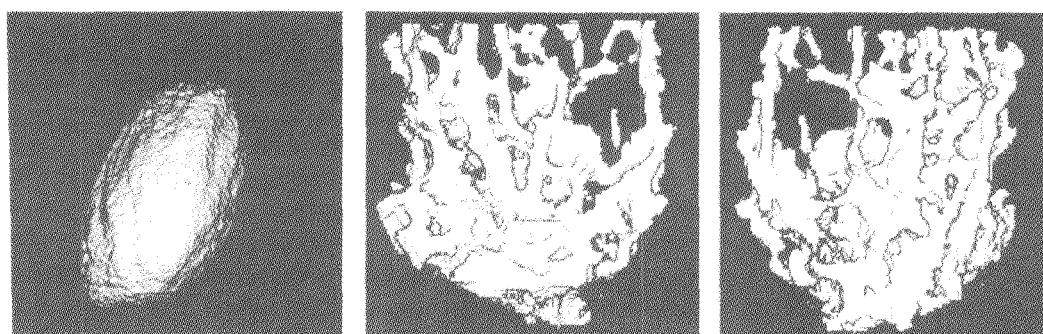
Fig. 2 に示すように、ファントムや植物では、4 回程度の信号加算で、面内で 50 μm 程度の空間分解能を実現することができた。いっぽう、Fig.3 に示すように、ヒトの虫垂は、TR と TE の変化によって、大きく異なる画像コントラストが得られた。画像の中央部より左側の T1 強調画像で high intensity, T2 強調画像で low intensity に描出されている部位は、虫垂に付随した脂肪組織であり、画像の中央部より右側辺縁部の、T1 強調画像で low intensity, T2 強調画像で high intensity に描出されている部分は、生理食塩水である。そして、虫垂の本体は、右側の環状の組織として描出されているが、画像コントラストの異なる三層の組織から形成されていることが観察される。

5. 三次元画像の撮像とその評価

前節に示すように、二次元画像によってかなりの情報が得られる試料も存在するが、MR マイクロイメージングにおいては、三次元的構造の計測が不可欠な場合も多い。そこで、三次元画像によるシステムの評価を行うために、アーモンドの実とヒトの大腿骨頭の一部を撮像した。アーモンドの実は、TR/TE=200/8 のスピン・エコー法を用い、(19.2 mm)³ の画像視野において、画素数 128³、信号積算回数 1 回(計測時間約 55 分)で撮像した。いっぽう、大腿骨頭は、TR/TE/flip=100/5/30° の勾配エコー法を用い、(12.8 mm)³ の画像視野において、画素数 64³、信号積算回数 96 回(計測時間約 11 時間 : overnight signal accumulation)で撮像した。Fig. 4 に、取得された画像データを用いて 3D の可視化を行った結果を示す。

アーモンドの実の画像データは、128³ の画素数を持ち、構造が単純であったので、標準的なサーフェイスレンダリングソフトウェア(NMR-3Dview)を用いて可視化を行った。しかしながら、大腿骨頭の画像データは、画素数が 64³ と少なく、しかも、骨梁の構造が、low intensity として描出されているため、以下のようにしてレンダリング画像を作成した。まず、

64³画素の画像データを Fourier 内挿し、128³画素の画像データとした。そして、骨梁の3次元構造を可視化するため、まず、骨の全体を FOV の中から抽出し、骨梁の部分が低い画素強度を持つように画素強度を反転して、その画像データに対してサーフェスレンダリングを行った。この結果が、Fig. 4(b),(c)に示すものである。このように、あたかも、マイクロ X 線 CT で撮像したかのような trabecular structure の 3D 画像を取得することができた。なお、Fig. 4 に示す画像データは、約 11 時間の信号積算によって得られた画像であるが、計測は、64³画素の画像を信号加算なしで連続的に計測・画像再構成し、計測後に画像データ間で加算を行うという方法を用いたため、計測後に、任意の回数の信号積算による画像を得ることが可能であった。そこで、どの程度の時間で trabecular structure が可視化できるかということ調べたところ、2 時間程度の計測時間でも、3D 構造の可視化は可能であった。



(a) almond nut (b) Trabecular (front) (c) Trabecular (back)

Fig. 4. (a) Volume rendered surface image of an almond nut. FOV: (19.2 mm)³, number of matrix: 128³, pixel size: (150 μm)³. (b), (c) Trabecular structure of a piece of a human femur. FOV: (12.8 mm)³, number of matrix: 64³, pixel size: (200 μm)³.

6. むすび

臨床用の MRI の静磁場のみを利用し、独立した撮像システムを持つ MR マイクロスコープを開発し、人体の摘出試料に対し、その有効性を、二次元画像と三次元画像を用いて評価した。その結果、二次元画像に関しては、スライス厚 2 mm、面内分解能 100 μm の画像を実用的な時間で取得できることを示した。また、三次元画像に関しては、200 μm 立方程度の画素での計測が実用的な時間で可能であり、画像処理手法を活用することにより、三次元構造の可視化も有効であることを示した。本システムは、臨床の現場における MR マイクロスコープを、本体装置の変更や更新を全く必要とせずに、最小のコストで実現するものであり、医療現場における MR マイクロスコープの普及を促進するものと期待される。 ■

第2日 (11月18日 水曜日)

講演要旨

2L1

NMR of weakly aligned macromolecules.

Ad Bax, Marcel Ottiger, John Marquardt, Gabriel Cornilescu, Ben Ramirez and Frank Delaglio

Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, NIH, Bethesda, Maryland 20892, USA

Biomolecular structure determination by NMR to date has been based almost exclusively on very local parameters such as NOEs and J couplings. In contrast, dipolar couplings for macromolecules weakly aligned with the magnetic field provide information on individual bond vectors relative to the molecular alignment tensor and therefore have an intrinsic long-range character. They therefore constrain the relative orientation of parts of a structure that are not connected by NOEs.

In order to retain the simplicity of the high-resolution NMR spectrum it is essential that the degree of alignment is sufficiently weak ($\leq 10^{-3}$). At higher degrees of alignment broadening caused by ^1H - ^1H dipolar couplings make the spectra generally intractable. Such weak degrees of alignment can be obtained either as a result of the macromolecules magnetic susceptibility anisotropy, or by using a very dilute liquid crystalline phase consisting of large, disc-shaped phospholipid particles, commonly referred to as bicelles. Modified bicelles permit measurement of dipolar couplings over a wide range of pH, from 1 to 12, and temperatures (20-50 °C).

It will be shown that both the magnitude and orientation of the alignment tensor are under experimental control. Measurement of dipolar couplings for two different orientations of the solute relative to the liquid crystal director yields unique orientations of the corresponding internuclear vector relative to the molecular frame. Dipolar couplings obtained in this manner are shown to contain highly precise information on the macromolecular structure and also carry information on its dynamic properties. Furthermore, such measurements yield the relative magnitudes of the various types of dipolar and chemical shift anisotropy interactions..

Solid State NMR Methods for Structural Investigations of Peptides and Proteins

Robert Tycko, David P. Weliky¹, Andrew E. Bennett², Oleg N. Antzutkin³,
Carl A. Michal, Francisco Blanco, and Yoshitaka Ishii

Laboratory of Chemical Physics, NIDDK
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892-0520, USA

¹current address: Department of Chemistry, Michigan State University

²current address: Harvard Medical School

³on leave from: Division of Inorganic Chemistry, Lulea University of Technology, Lulea, Sweden

Over the past several years, we have developed several new solid state NMR techniques for determining certain aspects of the conformations of peptides and proteins, in particular the backbone conformations, in environments such as frozen solutions, membrane-bound forms, noncrystalline solids, and fibers. The techniques include two-dimensional magic-angle-spinning (2D MAS) exchange spectroscopy¹, constant-time double-quantum-filtered dipolar evolution (CTDQFDE) measurements², and high-order ¹³C multiple quantum (HOMQ) NMR³. The techniques will be described, along with our approach to analyzing the NMR data in terms of backbone conformations. The utility of these solid state NMR measurements will be illustrated by experimental results on a number of systems that are of current interest, including an HIV-1 gp120 V3 loop peptide/antibody complex⁴ and a synthetic helix-forming peptide [MB(i+4)EK] that serves as model for the role of ₃₁₀-helices in helix-coil transitions⁵. Results on these systems demonstrate the unique contributions to biophysical chemistry and structural biology that can be made by solid state NMR measurements of *local* structural features. Other topics that may be covered include new approaches to *global* structure determination⁶ by solid state NMR and efforts to adapt optical pumping methods⁷ to biomolecular solid state NMR.

1. D.P. Weliky and R. Tycko, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8487 (1996); R. Tycko, D.P. Weliky, and A.E. Berger, *J. Chem. Phys.* **105**, 7915 (1996).
2. A.E. Bennett, D.P. Weliky, and R. Tycko, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4897 (1998).
3. O.N. Antzutkin and R. Tycko, submitted for publication.
4. D.P. Weliky, A.E. Bennett, A. Zvi, J. Anglister, P.J. Steinbach, and R. Tycko, submitted for publication.
5. H.W. Long and R. Tycko, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7039 (1998).
6. R. Tycko, *J. Biomolec. NMR* **8**, 239 (1996).
7. R. Tycko, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **11**, 1 (1998).; R. Tycko and J.A. Reimer, *J. Phys. Chem.* **100**, 13240 (1996); C.A. Michal and R. Tycko, *Phys. Rev. Lett.*, in press.

2L3 GENERATING AND EXPLOITING INTERMOLECULAR MULTIPLE-QUANTUM COHERENCES IN SOLUTION NMR AND IN VIVO MRI

Warren S. Warren, Princeton University, Princeton, NJ 08544

In the last few years we have discovered (much to our surprise) that samples with at least one concentrated component can grossly violate the predictions of conventional NMR theory in a wide variety of solution NMR experiments[1~10]. Slightly modified conventional sequences, which should give absolutely no signal, instead give strong intermolecular cross-peaks (with amplitudes typically as large as 10-15% of the full magnetization) and new transitions in the indirectly detected dimension. For example, the n-quantum CRAZED sequence ($\pi/2-t_1$ -{gradient, length T }- $\pi/2$ -{gradient, length nT }- t_2) [1] generates resonances in the indirectly detected dimension with all of the experimental properties of intermolecular multiple-quantum coherences (iMQCs). Demonstrated applications include improving contrast in magnetic resonance imaging [2,7,8], and removing inhomogeneities without removing chemical shifts [3,4]. I will discuss these applications, and present a wide range of new results from our laboratory.

The theoretical picture of these effects shows that the additional peaks come from dipolar interactions between distant spins in solution. The dipolar interaction between nuclei is proportional to $(3 \cos^2 \theta - 1)/r^3$ where θ is the angle between the internuclear vectors and the applied magnetic field and r is the separation between the spins. In a solid, each nucleus interacts with all other nuclei, giving a highly broadened line. In a liquid, Bloembergen pointed out in 1948 that diffusion averages the value of θ on an NMR time scale (milliseconds), and since $\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle = 0$ the couplings are expected to disappear. In fact, however, this argument is only valid for couplings between pairs of spins which diffuse significantly more than their separation before spin evolution occurs (in water, this means $r \ll 10 \mu\text{m}$). This might seem quite sufficient, since the dipolar interaction falls as r^{-3} ; but the number of spins at a distance r is proportional to $r^2 dr$. Thus, the net magnetic field at any site from all the spins at a distance r only falls as $1/r$, and the integral diverges—the spins between 1

and 3 mm from any given molecule are just as important as the ones between 1 and 3 Å! The real reason these couplings are not usually observed is more subtle: if the sample is nearly spherical and the magnetization points in the same direction everywhere, the sum of all of the couplings vanishes. By breaking the uniform direction of the magnetization (usually gradient pulses) we reintroduce effects of the dipole-dipole coupling. The magnitude of the reintroduced couplings is comparable to a J coupling (2-3 Hertz), hence is large enough to dramatically alter two-dimensional spectra, but not so large as to degrade resolution.

Intermolecular dipole-dipole interactions can be handled in two superficially vastly different ways. The first approach we used employed Bloch equations modified to include the dipolar demagnetizing field [11]—a framework originally developed to explain the observation of multiple echoes (at times $n\tau$) after the sequence 90- τ -90. The dipolar demagnetizing field $\mathbf{B}_d(\mathbf{r})$ at each position is the overall sum of the local fields generated by all the spins in the sample, which is then used to modify the normal form of the Bloch equations, giving an additional contribution ($\mathbf{M} \times \gamma\mathbf{B}_d(\mathbf{r})$) to $d\mathbf{M}/dt$. Unfortunately these modified Bloch equations are inherently nonlinear, so many of the properties normally associated with the theoretical framework of two-dimension NMR (for example, evolution in the indirectly detected dimension reflecting energy differences between eigenstates) no longer hold. In addition, this approach cannot be applied to a spin system which has purely quantum mechanical effects such as J-couplings. We later developed a full quantum treatment using density matrix theory, which retains the individual intermolecular dipolar couplings and discards the high temperature approximation. In this treatment the peaks come from iMQCs which are created from multiple-spin terms in the equilibrium density matrix ρ_{eq} and are detected by dipolar couplings during the final time interval t_2 [1,12]. In practice, the classical and quantum pictures virtually always give the same predictions. The classical picture is much better for numerical simulations; the quantum approach gives a better understanding of the physical origin of dipolar effect, and provides better intuition for pulse sequences design.

Both methods will be used in this presentation. We have recently developed, for the first time, the ability to calculate evolution in systems with both dipolar and J

couplings, and the ability to handle three-dimensional structure (tissues with tumors; inhomogeneous broadening in very high field magnets). I will show how intermolecular zero-quantum coherences (simultaneously flipping spins separated by 10 μ m-10 mm in opposite directions) permits contrast enhancement for *in vivo* magnetic resonance imaging. In addition, I will discuss work beginning at the National High Magnetic Field Laboratory using such coherences to produce sharp spectra in highly inhomogeneous and drifting electromagnets.

References

1. W. S. Warren, W. Richter, A. H. Andreotti and B. T. Farmer, "*Generation of impossible correlation peaks between bulk water and biomolecules in solution NMR*," Science 262, 2005 (1993)
2. Wolfgang Richter, Sanghyuk Lee, Warren S. Warren, and Qihong He, "*Imaging with Intermolecular Multiple-Quantum Coherences in Solution NMR*", Science 267, 654(1995)
3. S. Vathyam, S. Lee and W. S. Warren, "*Homogeneous NMR Spectra in Inhomogeneous Fields*", Science 272, 5258 (1996)
4. Sangdoo Ahn, Natalia Lisitza and Warren S. Warren, "*Intermolecular Zero-Quantum Coherences of Multi-Component Spin Systems in Solution NMR*," J. Mag. Reson. 133, 266(1998).
5. Sangdoo Ahn and Warren S. Warren, "*Effects of intermolecular dipolar couplings in solution NMR in separated time intervals: the competition for coherence transfer pathways*", Chem. Phys. Lett. 291, 121 (1998)
6. Sangdoo Ahn, Sanghyuk Lee, and Warren S. Warren, "*The competition between intramolecular J couplings and intermolecular dipolar couplings in two-dimensional solution NMR*," Molecular Physics (invited paper, Ernst commemorative issue; in press)
7. R. R. Rizi, S. Ahn, J. Hopkins, J. S. Leigh, W. S. Warren, "*Contrast Enhancement Based on Intermolecular Zero Quantum Coherences for Magnetic Resonance Imaging and Microscopy*", in Magnetic Resonance Microscopy (P. Blumler, B. Blumich, E. Fukushima, editors; VCH publishing, 1998) in press
8. Warren S. Warren, Sangdoo Ahn, Rahim R. Rizi, Jeff Hopkins, John S. Leigh, Marlene Mescher, Wolfgang Richter, Michael Garwood, and Kamil Ugurbil, "*MR Imaging Contrast Based on Intermolecular Zero-Quantum Coherences*," Science 281, 247 (1998)
9. Sangdoo Ahn, Warren S. Warren and Sanghyuk Lee, "*Quantum treatment of intermolecular multiple-quantum coherences with intramolecular J-coupling in solution NMR*", Journal of Magnetic Resonance 128, 114 (1997)
10. Warren S. Warren and Sangdoo Ahn, "*The boundary between liquid-like and solid-like behavior in magnetic resonance*," J. Chem. Phys. 108, 1313 (1998).
11. Q. He, W. Richter, S. Vathyam and W. S. Warren, "*Intermolecular multiple-quantum coherences and cross-correlation in solution*", J. Chem. Phys. 98, 6779(1993).
12. S. Lee, W. Richter, S. Vathyam and W. S. Warren, "*Quantum treatment of the effects of dipole-dipole interactions in liquid NMR*", Journal of Chemical Physics 102, 874 (1996).

2L4

高分子のNMR

北大理 引地 邦男

NMR of Polymers

Hokkaido University, Kunio Hikichi

I will talk about application of NMR to polymers, in particular, NMR methods to study motional and structural aspects of polymers.

1950年代から60年代にかけては、いわゆるブロードラインNMRが中心であって、高分解能NMRがやっと出始めたころである。そのブロードラインNMRで高分子固体の分子運動を調べたのが私のNMRの始まりである。その時の周波数は12 MHzであった。現在はその60倍以上にもなっている。数量的な変化ばかりではない。測定の方法も変化した。現在は、パルスフーリエ変換によって吸収曲線が観測されるが、当時は吸収曲線を微分したものが観測された。

つい最近、ブロードラインNMRのお世話になることになった。振り出しに戻ったことになるが、この間のNMRとの関わりについてお話したい。

高分子、分子運動、相互作用、構造

ひきち くにお

2L5

NMRによる蛋白質、核酸の構造と相互作用の研究
(阪大蛋白研) 京 極 好 正

NMR Studies on the Structure and Interaction of Proteins and Nucleic Acids (Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871) Yoshimasa Kyogoku

Since 1970 I have been involved in the NMR works on proteins and nucleic acids. Especially I paid attention to solve the mechanism of the molecular recognition of nucleic acids and proteins. To pursuit the aim, I introduced and applied several NMR techniques, i.e., the use of the resonances of stable isotope nuclei, photochemically induced dynamic nuclear polarization, distance geometry algorithm for structure determination and heteronuclear multidimensional NMR. Starting from the work on the base pairing of nucleic acid base derivatives, recently we could determine the solution structure of a nucleic acid-protein complex of MW 25 K.

1970年来NMRを用いた蛋白質、核酸の構造研究に従事してきた。それ以前は赤外、ラマン分光法によって核酸の研究を行っており、特に塩基対形成の機構、構造変換の要因を探っていた。さらに遺伝情報発現の段階で、蛋白質と核酸がどのようにかかわっているかを原子レベルで見ることに興味を抱いており、そのような研究を行うのには振動分光に比べてNMRは次のような利点があると思えた。1. 原子レベルの分解能が高い、2. 水溶液が対象に出来る、3. 量的、時間的変動が追跡しやすい。こういった特徴を生かし、上記の目的を達成するためには以下の手法を積極的に導入、適用してきた。

1. 安定同位体利用NMR法による分子認識部位の同定

生体高分子のNMR情報は膨大であり、今でこそそれらをすべて利用できる方向にきているが、研究開始当初は何らかの方法で特定の部位に関する情報を選別する必要があった。また相互作用の研究ではプロトンのアクセプターである原子団の情報も欲しい。そこで積極的に天然存在比および特定部位を特異的に標識した化合物の ^{13}C 、 ^{15}N のシグナルを利用した。その結果懸案であった溶液中での核酸、塩基対の構造分布(Watson Crick型とHoogsteen型の比)を明らかにし¹、tRNAにおけるアンチコドン-コドンの塩基対形成の証明等²が行えた。蛋白質や補酵素関係はヒスチジン側鎖の水素原子解離は π (δ 1)位のNからか τ (ϵ 2)位のNからかを明らかにしたことがこの種の研究の最初で³、これは最近のカーボニックアンヒドラーゼの12個のヒスチジンの解離の挙動をすべて明らかにしたことに連なる⁴。酸化還元系ではポルフィリン環中の ^1H がN核の間を動きまわる様子⁵、フラビンの酸化、還元状態の構造比較等⁶が安定同位体標識を生かして行えた。これらの標識化合物はまた並行して行っていた振動分光解析にも利用できるという利点もあった⁷。安定同位体標識化合物の利用は甲斐荘氏ら高い合成技術を持つ研究室の協力があってこそ可能になったことである。

安定同位体標識NMR、光CIDNP法、ディスタンスジオメトリー、異核種多次元NMR

きょうごく よしまさ

2. 光CIDNP法による分子認識部位の検出

巨大な分子量を持つ生体高分子の中で機能的に重要な部分の構造や認識の情報を得る手段を持つことの意味は大きい。Kapteinらがフラビン色素を用いた光CIDNP法によって酵素蛋白質の活性中心への研究に用いていることを知り、この手法を研究室でも使えるようにした。それを用いて核酸-蛋白質相互作用系に用い、Cro リプレッサーの認識ヘリックスが、DNAと直接相互作用をしていることを示した⁸。その後この手法は抗体の抗原認識表面の状態⁹や巨大蛋白質の表面露出度の検出¹⁰に用いられた。また核酸のCIDNPの測定にも初めて成功し、DNAのA、B、Z型の同定、薬物の結合部位の検出に用いられた¹¹。

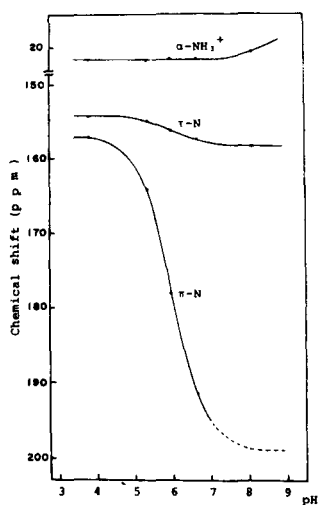


Fig. 1. pH dependence of ^{15}N chemical shift of histidine³

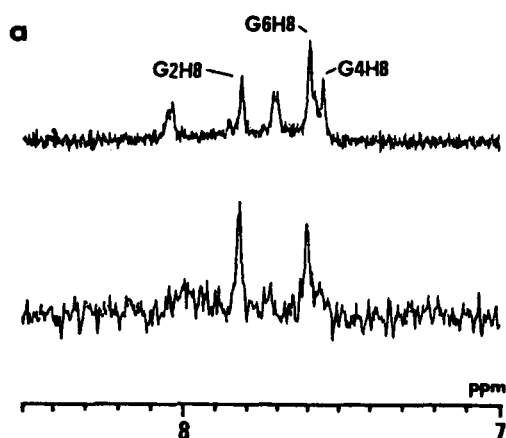


Fig. 2. One-dimensional (upper) and photo-CIDNP difference (lower) spectra of $r(\text{CGCGCG})_2$ in A form¹¹

3. Distance geometry 法の導入と小蛋白質の構造決定

Wüthrichらが2次元NMRを蛋白質や核酸に適用できるようにし、さらに得られた核間距離情報とディスタンスジオメトリー法とを組み合わせることで生理活性ペプチドや小さい蛋白質の溶液中の立体構造を決定できるようにしたという情報は、NMRでX線解析法に対抗するように溶液中の立体構造が決められないかを考えていた者にとっては衝撃的であった。2次元NMRの手法を導入するとともに、またディスタンスジオメトリーのプログラムを開発していた郷、ブラウン氏の協力で、我が国で初めて生理活性ペプチドコノトキシンG Iの溶液構造が小林らによって決定された¹²。

4. 核酸塩基対、鎖のダイナミクス-生体膜構造研究とのつながり

装置、技術が進んでくるとNMRの技術を生かした研究も可能になってくる。従来手がけてきた塩基対の研究でも、飽和移動法による塩基間の直接的なプロトン移動¹³、17塩基対を持つDNAオリゴマーでの各イミノプロトンの交換速度から2重らせん開裂のダイナミクス¹⁴、蛋白質の相互作用によって誘起される曲りの検出¹⁵、Aトラクトを持つDNA鎖の曲がった構造¹⁶、 ^1H 濃度の低い

核酸構造の精密な決定法¹⁷等の研究が行われた。

りん酸ジエステル結合を持つ核酸の骨格構造はりん脂質の骨格にも通じる。りん脂質の構造変換¹⁸、りん脂質 2 重鎖の相転移¹⁹の研究が行われたが、それは阿久津らによる生体系の固体NMRの研究へと発展する。

5. 異核種多次元NMR法の導入と大きな蛋白質、その複合体への適用

¹H核の2次元NMRとそれを用いた構造決定は分子量1万くらいのものまでは適用可能であるが、帰属等にはシグナルの重なりからくる困難さも多い。また適用したいと思う転写因子やその核酸との複合体には、測定の実験条件、シグナルの複雑さから適用不可能であった。それを可能にしてくれたのがHSQC法と、それを組み込んだ異核種多次元NMR法の開発である。ただ異核種の測定には安定同位体を導入した蛋白質の合成が必要であり、それには遺伝子操作を用いた大腸菌による大量生産系の構築が必須である。白川氏らの努力により、研究室にその体制をとることが出来たことはその後の研究の展開に画期的な影響を与えた。その系を用いて初めて酵母の転写因子 Gal4 のDNA結合ドメインの構造が出され²⁰、その後POUのホメオドメイン²¹、Cro リプレッサー 2量体²²、RNAポリメラーゼの α サブユニットのC末端ドメイン²³、IRF-2のDNA結合ドメイン²⁴の溶液構造が決まり、最近Cro-O_R3の複合体の溶液構造²⁵も求められた。

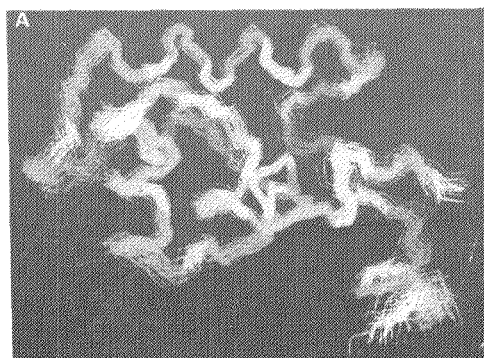


Fig. 3 Peptide backbone traces of 50 simulated annealing structures of RNA polymerase α CTD²³

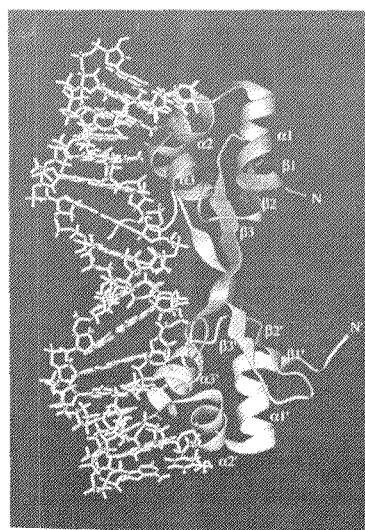


Fig. 4 Solution structure of the Cro-O_R3 complex²⁵

研究室ではさらに分子量の大きなものへの適用に向けて、山崎らにより重水素化法、インテインを利用したドメインの標識化²⁶等の研究が行われている。溶液構造決定の研究は今後は巨大な分子の構造決定法の開発に向かうであろう。ただ構造を決めるという目的であれば、結晶化の努力をしてX線解析を行う方が有利だという場合もあるだろう。しかしNMRは局所の精密な構造、相互作用の強さの定量化、種々の時間スケールの動的挙動の情報が得られる。これらの特色を生かして、生物学的機能に密接したソフトな構造の研究に用いられるべきと考える。さらに、こういったことはNMRで解決できないか、そのためにはどうすればよいかと工夫することが新しい技術発展に連なる。生体

系の核磁気共鳴法はそういった要求に答えながら発展をしてきた。

参考文献

- 1) H. Iwahashi and Y. Kyogoku; *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 7761-7765 (1977), M. Watanabe, H. Sugeta, H. Iwahashi, Y. Kyogoku and M. Kainosho; *Eur. J. Biochem.*, **117**, 553-558 (1981)
- 2) M. Amano and Y. Kyogoku; *Eur. J. Biochem.*, **217**, 131-136 (1993)
- 3) K. Kawano and Y. Kyogoku; *Chem. Letters*, 1305-1308 (1975)
- 4) H. Shimahara; PhD Thesis, Osaka University, 1997
- 5) K. Kawano, Y. Ozaki and Y. Kyogoku; *J. C. S. Chem. Comm.*, 226-227 (1977)
- 6) K. Kawano, N. Ohishi, A. Takai-Suzuki, Y. Kyogoku and K. Yagi; *Biochemistry*, **17**, 3854-3859 (1978)
- 7) M. Abe, T. Kitagawa and Y. Kyogoku; *J. Chem. Phys.*, **69**, 4526-4534 (1978)
- 8) M. Shirakawa, S. J. Lee, H. Akutsu, Y. Kyogoku, K. Kitano, M. Shin, E. Ohtsuka and M. Ikehara; *FEBS Letters*, **181**, 286-290 (1985)
- 9) F. Hayashi, S. Endo, Y. Arata, A. Shimizu and Y. Kyogoku; *Biochemistry*, **28**, 3976-3981 (1989)
- 10) B. J. Lee, H. Aiba and Y. Kyogoku; *Biochemistry*, **30**, 9047-9054 (1991)
- 11) K. Katahira, R. Sakaguchi-Katahira, F. Hayashi, S. Uesugi and Y. Kyogoku; *J. Amer. Chem. Soc.*, **113**, 8647-8651 (1991)
- 12) Y. Kobayashi, T. Ohkubo, Y. Kyogoku, Y. Nishiuchi, S. Sakakibara, W. Braun and N. Go; *Biochemistry*, **28**, 4853-4860 (1989)
- 13) H. Iwahashi and Y. Kyogoku; *Nature*, **271**, 277-278 (1978)
- 14) S. L. Lee, H. Akutsu, Y. Kyogoku, K. Kitano, Z. Tozuka, A. Ohta, E. Ohtsuka and M. Ikehara; *J. Biochem.*, **98**, 1463-1472 (1985)
- 15) M. Katahira, H. Sugeta, Y. Kyogoku and S. Fujii; *Biochemistry*, **29**, 7214-7222 (1990)
- 16) S. J. Lee, M. Shirakawa, H. Akutsu, Y. Kyogoku, M. Shiraishi, K. Kitano, M. Shin, E. Ohtsuka and M. Ikehara; *EMBO J.*, **6**, 1129-1135 (1987)
- 17) C. Kojima; PhD Thesis, Osaka University, 1996
- 18) H. Akutsu, M. Ikematsu and Y. Kyogoku; *Chem. Phys. Lipids*, **28**, 149-158 (1981)
- 19) W. Yoshikawa, H. Akutsu and Y. Kyogoku; *Biochim. Biophys. Acta*, **735**, 397-406 (1983)
- 20) M. Shirakawa, W. J. Fairbrother, Y. Serikawa, T. Ohkubo, Y. Kyogoku and P. E. Wright; *Biochemistry*, **32**, 2144-2153 (1983)
- 21) E. H. Morita, M. Shirakawa, F. Hayashi, M. Imagawa and Y. Kyogoku; *Protein Science*, **4**, 729-739 (1995)
- 22) H. Matsuo, M. Shirakawa and Y. Kyogoku; *J. Mol. Biol.*, **254**, 668-680 (1995)
- 23) Y. H. Jeon, T. Negishi, M. Shirakawa, T. Yamazaki, N. Fujita, A. Ishihama and Y. Kyogoku; *Science*, **270**, 1495-1497 (1995)
- 24) J. Furui, K. Uegaki, T. Yamazaki, M. Shirakawa, M. B. Swindells, H. Harada, T. Taniguchi and Y. Kyogoku; *Structure*, **6**, 491-500 (1998)
- 25) H. Tochio, H. Matsuo, C. Kojima, T. Yamazaki and Y. Kyogoku; *Eur. J. Biochem.*, submitted
- 26) T. Yamazaki, T. Otomo, N. Oda, Y. Kyogoku, K. Uegaki, N. Ito, Y. Ishino and H. Nakamura; *J. Amer. Chem. Soc.*, **120**, 5591-5592 (1998)

第3日 (11月19日 木曜日)

講演要旨

3L1

液体窒素蒸発量の少ない NMR 超電導マグネット
(神戸製鋼所) ○斉藤一功、伊藤 聡、林 征治、西澤 節
(ジャパンマグネットテクノロジー) 井上康彦

A low liquid nitrogen consumption superconducting magnet for NMR

K. Saito¹, S. Ito¹, S. Hayashi¹, T. Nishizawa¹ and Y. Inoue²

¹Kobe Steel, LTD, ²Japan Magnet Technology Inc.

NMR system has high noise sensitivity, i.e. mechanical and magnetic vibration, making it difficult to apply a cryocooler to reduce boil off of cryogen. However a low vibration cryocooler, i.e. a pulse tube cryocooler (PTC), has recently become available. The PTC was tested on a superconducting magnet for NMR as a liquid nitrogen shield cooler, and the spectra of standard sample - $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ - were acquired on PTC operating and non-operating condition. No special peak on the spectrum was observed, and liquid nitrogen boil off rate was reduced from 150cc/h to 15cc/h - a 90% reduction.

背景

現在、高分解能 NMR 装置には超電導マグネットが用いられている。このタイプの超電導マグネットは、真空容器の中に液体ヘリウムに浸された超電導コイルが入れられ、その周囲を液体窒素で取り囲んだ構造になっている。液体窒素の主な役割は、室温から液体ヘリウムへの輻射熱をカットすることにある。液体窒素槽には多くの輻射熱が侵入し、液体窒素を蒸発させている。現在使用されている NMR 用超電導マグネットでは、1 週間から 10 日に一度の割合で液体窒素の補充を必要とするものが多い。装置の使用者にとって、この作業は NMR 測定の中断を余儀なくされるだけでなく煩雑でもある。

このため液体窒素を自動的に供給する装置も存在するが、コストがかさむ欠点がある。また、別の方法として、最近の MRI 用超電導マグネットと同様に、GM 冷凍機を搭載する事も考えられるが、GM 冷凍機の振動により NMR 測定にノイズが入るといった問題がある。

パルスチューブ冷凍機

パルスチューブ冷凍機は、近年その性能が飛躍的に向上している冷凍機であり、低温部に可動部が無いという特長がある。低温部では冷媒ガス(ヘリウムガス)が振動しており、このガスの振動によって熱の輸送が起こっている。このため他の方式の冷凍機とは異なり振動が極

キーワード : マグネット、蒸発量、冷凍機、ノイズ、パルスチューブ

さいとうかずよし、いとうさとし、はやしせいじ、にしざわたかし、いのうえやすひこ

めて小さく、NMR用超電導マグネットの冷却に適している。

実験方法

パルスチューブ冷凍機の有効性を確認するため、パルスチューブ冷凍機をNMR用超電導マグネットに装着し、窒素蒸発量および標準試料のNMRスペクトルの観察を行った。

実験ではNMR用超電導マグネット(発生磁場 11.7T; JMT 製)を改造し、冷凍機先端が超電導マグネットの窒素槽に接触するようにパルスチューブ冷凍機を取り付けた。冷凍機の効果を調べるためパルスチューブ冷凍機を取り付ける前後で液体窒素の蒸発量を測定した。

NMR信号の観測は、超電導マグネットにパルスチューブ冷凍機を取り付けた後に行い、高分解能NMR分光計(日本電子製)および溶液用プローブ(日本電子製)を用いた。スペクトル観察の試料には $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ を用い、測定対象核はプロトンとした。測定はパルスチューブ冷凍機を動かしている状態と、一時的に停止させた状態とで行い、それぞれのNMR信号を取得した。

結果

Fig.1 にパルスチューブ冷凍機を取り付ける前後での液体窒素の蒸発量の変化を示す。パルスチューブ冷凍機の効果によって液体窒素の蒸発量が1/10に減っていることが分かる。これは液体窒素槽へ侵入した熱をパルスチューブ冷凍機で吸収していることを示している。パルスチューブ冷凍機による蒸発量の低減で、改造した超電導マグネットの液体窒素の補充間隔は従来より10倍延びて90日となった。

Fig.2は得られた $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ の ^1H スペクトルである。Fig.2(A)は冷凍機の動作中に得られたもの、Fig.2(B)は冷凍機を停止させた状態で得られたものである。これらと比べるとほとんど違いが無く、パルスチューブ冷凍機がNMR測定に悪影響を与えていないことが分かる。

パルスチューブ冷凍機は現在も発展中の冷凍機であり、今後の技術開発によって更なる性能向上が期待できる。

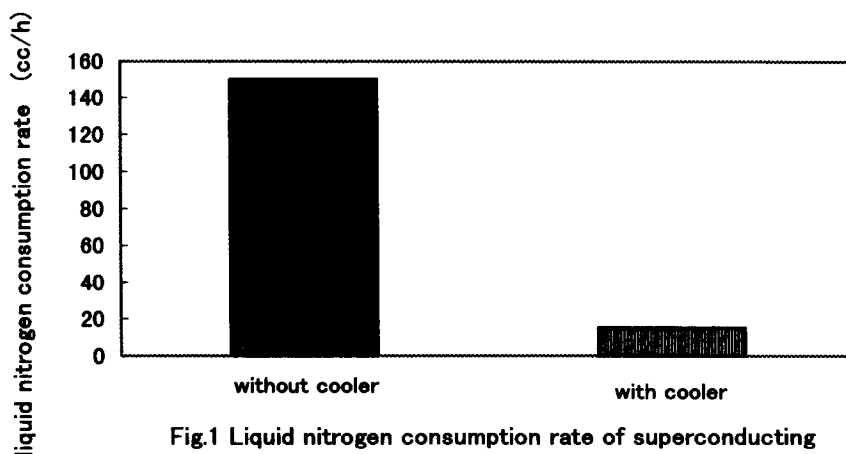


Fig.1 Liquid nitrogen consumption rate of superconducting magnet with and without pulse tube cryocooler

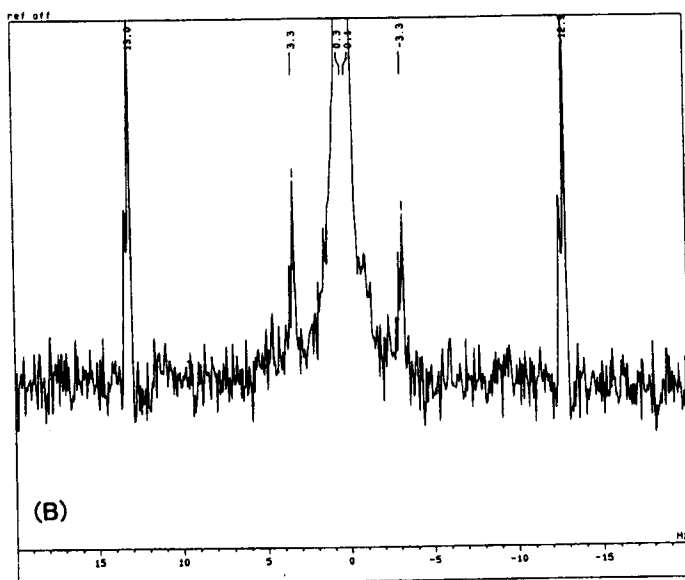
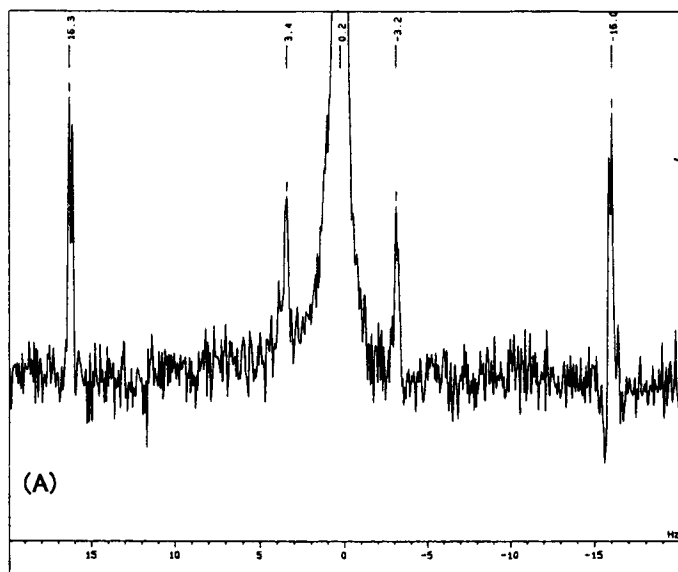


Fig.2 500MHz ^1H spectra of $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ obtained during the cryocooler operating (A) and the cryocooler off (B)

3L2

ゼロ量子 ^{13}C MAS 法による常磁性固体の高分解能 NMR (京大理 1、マインツ大 2)

○久保 厚 1、Thomas P. Spaniol 2、寺尾武彦 1

Resolution Enhancement of Magic-Angle Spinning NMR spectra for Paramagnetic Solids by Zero-Quantum NMR.

Kyoto University 1, University of Mainz 2,

Atsushi Kubo 1, Thomas P. Spaniol 2, and Takehiko Terao 1

^{13}C zero-quantum (ZQ) magic-angle spinning (MAS) NMR spectroscopy for paramagnetic solids is proposed to obtain both highly resolved isotropic peaks and accurate values of shift anisotropies by removing line broadening due to bulk magnetic susceptibility (BMS) shift. Several pulse sequences for ZQ NMR experiments under fast MAS are presented which are based on homonuclear J couplings between a ^{13}C pair. These pulse sequences were applied on $\text{Pr}(^{13}\text{CD}_3^{13}\text{COO})_3\cdot\text{D}_2\text{O}$. The line width along the ZQ dimension was much smaller (120Hz) than that of a 1 D spectrum (1 kHz). For determining paramagnetic shift anisotropies, a ZQ spinning sideband (ssb) pattern was observed by inserting a 180° pulse during t_1 period to enhance the ssb intensities. Two spin order which disturb the observation of ZQ coherence can be removed either by a selective excitation scheme or by a spin-locking pulse.

<序論>

粉末試料の NMR スペクトルを測定すると微結晶の表面で磁化率が不連続に変化するために試料内に磁場の分布が生ずる。常磁性固体ではこの効果は大きく、結晶の磁化率に異方性がある場合には MAS NMR スペクトルの等方値に分布をもたらし分解能を悪くしてしまう。また磁化率異方性の有無に関係なく、粉末スペクトルまたは ssb パターンはこの効果でゆがめられてしまうので、スペクトルより正確に常磁性シフトの異方値を決定するのは困難である。[1,2] この様な問題は spin pair に対してゼロ量子 NMR スペクトルを測定することにより回避できる。ゼロ量子遷移は二つのスピンのシフトの差が観測される。磁化率による不均一磁場は原子間距離のスケールでは一定なので、ゼロ量子遷移を観測すればうまくキャンセルされ取り除ける。ここでは試料として $\text{Pr}(^{13}\text{CD}_3^{13}\text{COO})_3\cdot\text{D}_2\text{O}$ を使い、幾つかのパルス・シーケンスで測定がうまく行えるかを検討した。

<実験>

CMX300 と Doty 社製 3 重共鳴プローブを用い、 ^{13}C および ^2H の共鳴周波数 75.5 および 46.1MHz、スピニング周波数 15.6kHz で実験を行った。 ^{13}C および ^2H の強度はそれぞれ 67 および 56kHz であった。また待ち時間 3 秒で積算をした。

<結果>

図 1 に phase-sensitive mode のゼロ量子 NMR の測定に用いたパルス・シーケンスとその coherence pathway を示した。P1 と D1 は溶液のゼロ量子 NMR の測定でも使用されているシーケンスである。 ^{13}C 間の J coupling のみを考慮した場合、パルスの間隔が $\tau = 1/(2J)$ を満足する条件で、P1 は $I_{iz} + I_{jz}$ を $(ZQC)_x^y - 2I_{iz}I_{jz}$ に D1 は $(ZQC)_y^z$ を

常磁性、固体、 ^{13}C 、MAS、ゼロ量子遷移

くぼ あつし、Thomas Paul Spaniol、てらお たけひこ

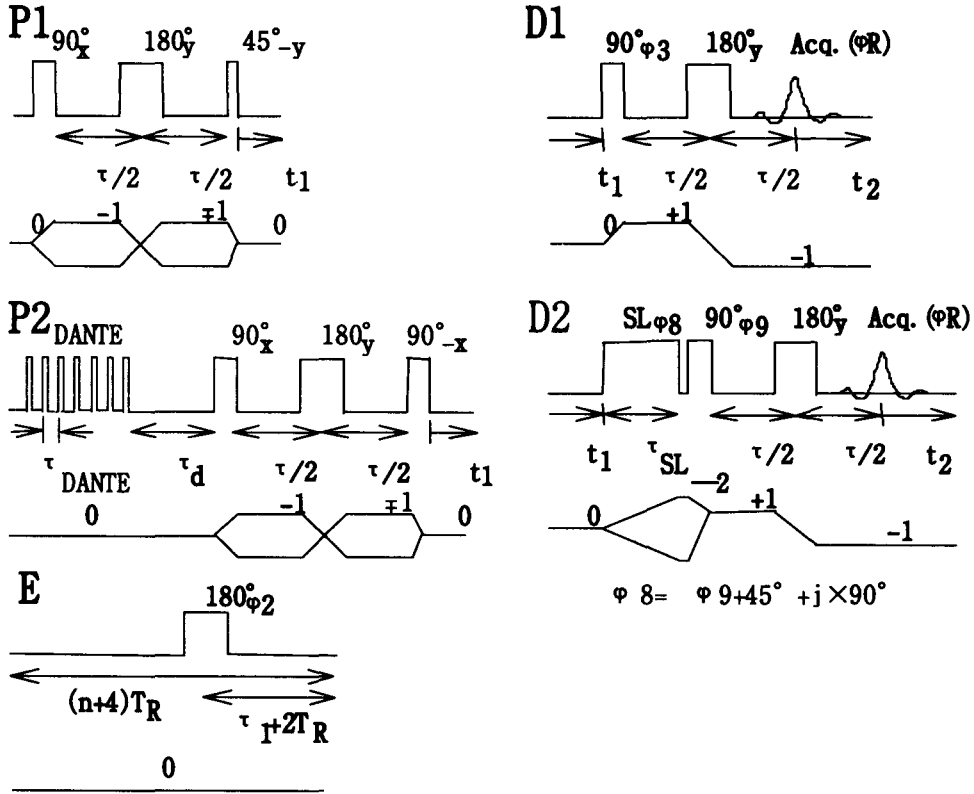


Figure 1. Pulse sequences and coherence transfer pathways for ZQ MAS NMR experiments. P1 and P2 are employed for the preparation of ZQ coherences $(ZQC)_x^y = \frac{1}{2}(2I_{ix}I_{jx} + 2I_{iy}I_{jy})$ and $(ZQC)_y^y = \frac{1}{2}(2I_{iy}I_{jx} - 2I_{iy}I_{jy})$, respectively. D1 and D2 are employed to convert $(ZQC)_x^y$ and $(ZQC)_y^y$ to observable transverse magnetizations $\frac{1}{2}(I_{iz} - I_{jz})$ and $\frac{1}{4}(I_{iz} + I_{jz})$, respectively. Sequence E is employed during the t_1 period for the observation of ZQ spinning sidebands. The parameters n and τ_1 are set to $k - 2\text{int}(k/N)$ and $T_R(k \bmod N)/N$, respectively, in the k -th t_1 experiment.

$\frac{1}{2}(I_{iz} - I_{jz})$ にそれぞれ変換することが期待される。P1- t_1 -D1 というシーケンスで $t_1=T_R$ という条件で $\tau/2$ を T_R の整数倍になるようにしながら変化させた。 $(T_R$ は回転周期で $64.1\mu\text{s}$ 、このシーケンスは sine 信号を生じるので $t_1=T_R$ で信号が極大となった。) 信号は $\tau=8\text{ms}$ 付近で最大となり、酢酸の ^{13}C 間の J coupling の値約 50Hz でうまく説明できた。スピニング周波数が 15.6kHz と rotational resonance の条件よりかなり高いので ^{13}C 間の磁気双極子相互作用は平均化されていると考えられる。ここでは分解能をあげることもおよびシフトの異方性を正確に測定することが目的であるから、MAS で磁気双極子相互作用を消して方向依存性のない J coupling のみを残しておくほうが都合が良い。ただし常磁性電子の影響で T_2 が短い時はより短時間で磁化移動が可能な磁気双極子相互作用を使ったほうが有利かもしれない。

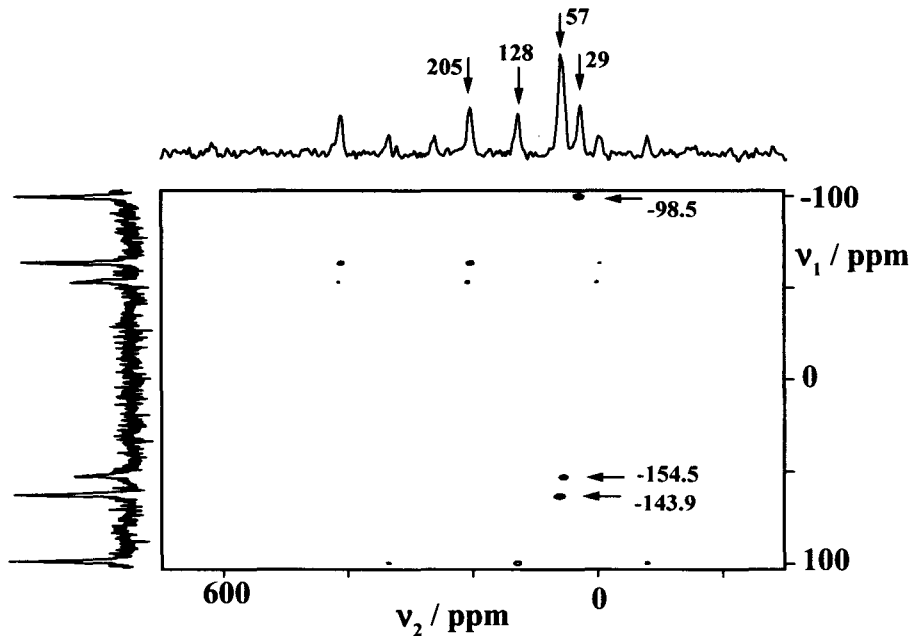


Figure 2 ^{13}C Zero-quantum MAS NMR spectrum of $\text{Pr}(\text{}^{13}\text{CD}_3\text{}^{13}\text{COO})_3\cdot\text{D}_2\text{O}$. The sine and the cosine pulse sequences $\text{P1-t}_1\text{-}\{\text{D1, D2}\}$ were employed. The period t_1 was incremented from $0.2\mu\text{s}$ to 26.7 ms by a rotor period T_R . 32 and 16 transients were accumulated for the cosine and the sine experiments.

P2 と D2 は今回新たに考案した。まず P2 は DANTE180°パルスで選択反転させ $I_{iz} - I_{jz}$ という状態を生成し D1 の逆の経路で $2(\text{ZQC})_y^y$ に変換する。 τ_d は DANTE パルスの不完全性より生じた横磁化を消去するために挿入した。DANTE パルスが完全であれば P1 の 2 倍の信号が得られる。また D2 は $(\text{ZQC})_x^y$ を $\frac{1}{4}(I_{iz} + I_{jz})$ に変換する。D1 に比べ変換の効率は 1/2 である。2 スピンオーダー $2I_{iz}I_{jz}$ を取り除くためにスピロックパルスを加えた。スピロックパルスを加えると静磁場およびラジオ波磁場の不均一性により有効磁場に垂直な成分が dephase することがわかっている。[3] 今のサンプルでは $\text{P1-t}_1\text{-D2}$ のシーケンスで実験を行ったところ τ_{SL} を $5T_R$ 以上にしてやると信号の大きさがほぼ一定になった。 τ_{SL} が正確に T_R の整数倍とならないでも信号強度の減衰が起きないことがわかった。例えば 180° パルスを使用したパルスシーケンスではパルスのタイミングと試料回転のより厳密な同期が必要なる。

次に $\text{P1-t}_1\text{-D1}$ 及び $\text{P1-t}_1\text{-D2}$ をそれぞれ sine と cosine のシーケンスとして使い、phase sensitive mode の 2 次元ゼロ量子 MAS NMR スペクトルを測定した。(図 2) v_1 方向の線幅は 120Hz で v_2 方向の線幅 1kHz に比べ 1/8 程度になっている。このため 1 次元スペクトルでは重なっていた 57ppm のメチルのピークと 205ppm のカルボニルのピークが 2 本に分かれた。結晶中に非等価な酢酸基は 3 つあるのでこのすべての信号が分離できたことになる。 v_1 方向の線幅の原因としては ^{13}C 間の磁気双極子相互作用

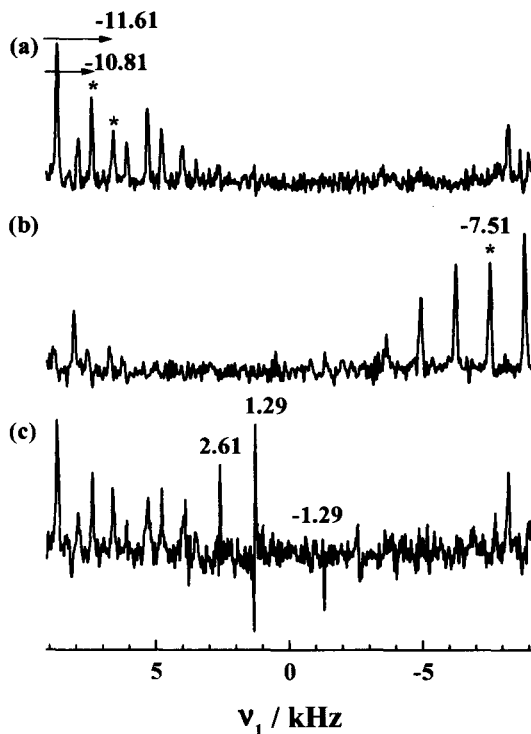


Figure 3 ZQ spinning sidebands observed by sequences P2-E-{D2, D1} (a,b) and by P1-E-{D1, D2} (c). The seven pulse DANTE sequence inverts a carbonyl signal at 205 ppm (a) or 128 ppm (b), respectively. t_d and t_{SL} were $8T_R$ and $10T_R$. A total 252 t_1 data were obtained by using $\tau_1 = (k \bmod 14)T_R/14$ and $n = k - \text{int}(k/14)$ for $k=0,1,\dots,252$. 64 and 128 transients were accumulated for the cosine and the sine experiments of (a,b) and for the sine and the cosine experiments of (c). In the sequence E 180° pulses were applied to both the ^{13}C and the D channels. * shows center band positions. Note that two center bands of (a) are folded from the lower frequency side. In spectrum (c) the spinning sidebands arising from two spin order appears at integer multiples of a virtual spinning frequency (1.3kHz).

よりもサンプル内の温度分布や2次元実験中の温度の変動がきいていると考えられる。

次にEのシーケンスを t_1 period で使用し、ゼロ量子シフトの異方性の決定を試みた。P1をPreparationシーケンスとして用いた場合、中心周波数からスピニング周波数(計算値1.3kHz)の整数倍離れた位置に非常に鋭いピークが現れた。(図3(c))これは2スピンオーダーの一部が 180° パルスの不完全性のためにゼロ量子コヒーレンスに変換されたことにより生じたと考えられる。2スピンオーダーは時間依存しない。 180° パルスの後のゼロ量子コヒーレンスの時間依存性のみを考えると $\nu_1=0$ の両側に鋭いスピニング・サイドバンドを生ずることが予測できる。P2のパルスシーケンスを用いると2スピンオーダーは生成されないで測定したいゼロ量子コヒーレンスのサイドバンドのみを含む信号が得られた。(図3(a,b))またS/Nも(c)に比べ2倍となった。スピニング・サイドバンドは図2及び簡単な計算で予測される位置に現れた。同じ57ppmのメチル基に属する信号で(図3(a))サイドバンドパターンは大きく異なっている。信号の帰属に有用な情報を与えると考えられる。

[1] T. P. Spaniol, A. Kubo, and T. Terao, *J. Chem. Phys.* **106**, 5393 (1997).

[2] A. Kubo, T. P. Spaniol, and T. Terao, *J. Magn. Reson.* **133**, in press.

[3] A. L. Davis, G. Estcourt, J. Keeler, E. D. Laue, and J. J. Titman, *J. Magn. Reson. A* **105**, 167 (1993).

3L3

$^{109}\text{Ag}-^{107}\text{Ag}$ 二重共鳴 NMR 測定法の開発及びその測定結果
無機材研¹、UBC 化学科(カナダ)²

○丹所正孝^{1,2}、和田弘昭¹、C. A. Fyfe²、H. Grondey²、T. Markus²

First Observation of $^{109}\text{Ag}-^{107}\text{Ag}$ Double Resonance of a Silver Ion Conductor
by Dipolar-Dephasing Difference NMR Experiment on Ag_9GaSe_6

Masataka Tansho^{1,2}, Hiroaki Wada¹, Colin A. Fyfe², Hiltrud Grondey² and Tom Markus²

1. National Institute for Research in Inorganic Materials (NIRIM),
1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan
2. Department of Chemistry, University of British Columbia,
2036 Main Mall, Vancouver, B. C., V6T 1Z1, Canada

$^{109}\text{Ag}-^{107}\text{Ag}$ double resonance of a silver compound has been measured for the first time. It is known that because of the quite small gyromagnetic ratios of silver nuclei, usually quite long T_1 values of the order of 1000s are expected for silver compounds. However, in many silver ion conductors, the T_1 minimum was actually found to be of the order of 100ms, and a large scalar coupling between silver nuclei has been suggested for the relaxation mechanism in these systems. To detect interactions between neighbored silver nuclei, we have carried out a $^{109}\text{Ag}-^{107}\text{Ag}$ double resonance measurement. Using the dipolar-dephasing difference NMR method, the signal from $^{109}\text{Ag}-^{107}\text{Ag}$ resonance is observed for Ag_9GaSe_6 .

【緒言】多くの銀イオン導電体において測定される Ag の T_1 は、双極子相互作用から予測される 1000s 程度の値よりはるかに短く、その極小において 200ms 程度の値になる場合もあることが知られている。Brinkmann らは、高温極限において緩和速度 (T_1^{-1}) が磁場の二乗に比例することから、この緩和メカニズムをケミカルシフトの異方で説明した。しかしながら、その一方で Chung らの実験は緩和速度の磁場依存性がゼロに近いことを示していた。近年無機材研でも同様の実験を行ったところ、緩和速度は磁場依存性を示さなかった。そこで、我々は、この緩和は Ag 核間のスカラー結合の揺らぎ(第 1 種スカラー緩和)によるとして説明した^{1), 2)}。 T_1 極小から推定されるスカラー結合の値が非常に大きい¹⁾ ことから、この相互作用の観測を期待して、 $^{109}\text{Ag}-^{107}\text{Ag}$ 二重共鳴 NMR 法による測定を試みた。測定対象として、 Ag_9GaSe_6 の室温相を選んだ。

二重共鳴、Ag NMR、イオン導電体

たんしょ まさたか、わだ ひろあき、C. A. Fyfe、H. Grondey、T. Markus

【装置】市販の Bruker 社 MSL-400(9.4 T)にX核用の高出力アンプをもう一台付け足し、X核用のチャンネルをひとつ多くしたものをを用いた。プローブは低磁場用の MAS Probe を用いた。 ^{109}Ag (18.6MHz)及び ^{107}Ag (16.2MHz)の共鳴周波数は15%しか差がないことを考慮して、Fig. 1 の様な装置を組んだ。要点として、以下の2点があげられる。[1]両周波数で共に Matching 及び Tuning をとれる様にした。[2]High Pass Filter と Low Pass Filter により、他の共鳴周波数によるノイズを減らした。

【パルス系列】二重共鳴法に用いたパルス系列は、van Eck らが SEDOR 法を元にして作った Dipolar Dephasing 法にさらに改良を加えた Dipolar Dephasing Difference 法である³⁾。この測定の特徴として、以下の二点があげられる。[1]off-resonance の long pulse を用いた場合と on-resonance の long pulse を用いた場合の差スペクトルを測ることにより、二種の核間の正味の相関を測定できる。[2]ふたつの long pulse を共に off-resonance にした場合に、シグナルが消えることが確認できれば、ふたつの照射周波数の分離がうまくいっていることを確認できる。

【結果】 ^{109}Ag - ^{107}Ag 二重共鳴スペクトルが初めて銀イオン導電体について観測された。 Ag_9GaSe_6 の室温相について得られたシグナルを、Fig. 2 に示す。

【考察】イオンの並進運動がきわめて速い銀イオン導電体($\sigma \sim 0.1 \text{ S}^{-1}$)においても二種の銀核間の相互作用が消えないで残っていることが明らかになった。

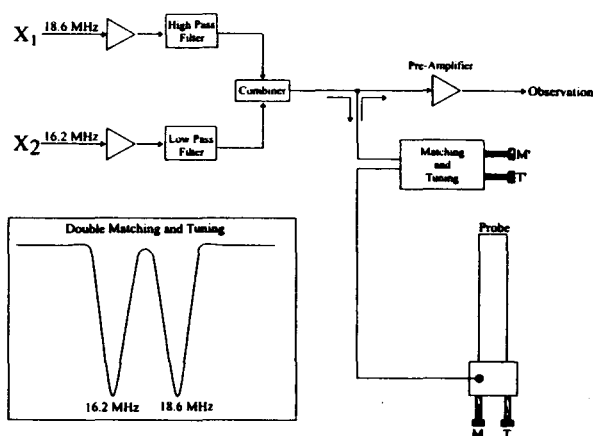


Fig. 1 Setting of ^{109}Ag - ^{107}Ag double resonance NMR measurement

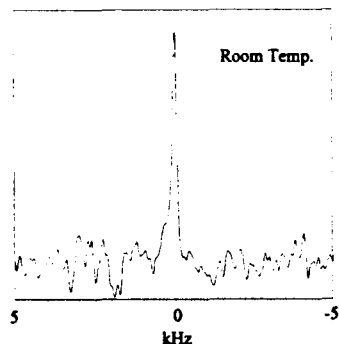


Fig. 2 ^{109}Ag - ^{107}Ag double resonance spectrum on Ag_9GaSe_6 by 2kHz spinning

Reference

- 1) M. Tansho, H. Wada, M. Ishii, and Y. Onoda, *Solid State Ionics* **86-88**, 155 (1996).
- 2) M. Tansho, H. Wada, M. Ishii, and Y. Onoda, *J. Phys. Chem. B* **102**, 5047 (1998).
- 3) C. A. Fyfe, K. T. Mueller, H. Grondey, and K. C. Wong-Moon, *J. Phys. Chem.* **97**, 13484 (1993).

3L4

家蚕および野蚕絹フィブロインの主鎖構造に関する 角度依存固体 ^{15}N および ^{13}C NMR による研究

東京農工大工学部 [○]朝倉 哲郎、亀田 恒徳、出村 誠

Angular Dependent Solid-State ^{15}N and ^{13}C NMR Analyses of Backborn Structures of
Bombyx mori and *Samia cynthia ricini* Silk Fibroins

Tetsuo Asakura, Tsunenori Kameda and Makoto Demura
Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

The solid state ^{15}N NMR spectra of ^{15}N Ala and ^{15}N Gly *Samia cynthia ricini* silk fibroin fibers were observed as a function of the angle between the oriented axis of the block silk sample and the magnetic field. 75% of the Ala residue and 40% of the Gly residues take β -sheet structure and other fraction of these amino acids random coil structure. The difference in the stress-strain curves of *Bombyx mori* and *S.c.ricini* was interpreted with the difference in the amounts of β -sheet and non-crystalline domains between two silk fibers.

1) 緒言

シルク研究の歴史は長い。その研究の流れの中で、シルク研究から得られた情報は、絶えず、合成高分子の開発にフィードバックされてきた。例えば、近年、繊維の分野で新たに開発され、一世を風靡してきた新合繊は、もともとシルクの不均一形状を模倣したポリエステル素材の開発が出发点となってきた。現在、さらに、着心地や快適さ等を追求した新しい観点からの合繊の開発が望まれているが、新たな観点からのシルクを含む天然繊維の研究は、その開発にあたって、大きなヒントを与えることになろう¹⁾。また、シルクは、常温、常圧下、しかも水溶液から得られる。その優れた物性は、高次構造や配列制御の妙に基づいており、原子レベルでのそれらの解明は、自然に優しい繊維を分子設計するための基礎となりうる。

本研究では、繊維特性の大きく異なる家蚕と野蚕の一種のエリ蚕（インド原産種）の絹繊維について、その構造の詳細を固体NMRの手法を用いて得、各々、比較した。尚、家蚕絹の構造解析結果については、既に報告済み^{2,3)}であるので、実験は、エリ蚕絹について行った。

2) 実験

エリ蚕絹の配向試料の作成は、以下のように行った。

^{15}N ラベルアラニンならびにグリシンをエリ蚕5齢期に各々、経口投与後、絹が蓄積された絹糸腺を取り出し、延伸をさせながら、繊維状に巻きとった。その繊維の軸方向を揃えながら、接着剤を用いて平板状とし、それを積層して、配向ブロック試料とした^{2,3)}。

^{15}N 固体NMR測定は、JEOL EX-400およびCMX-400NMR装置を用い、スピニングをさせずに、配向軸と静磁場の角度を任意に変えて行った。

絹フィブロイン、結晶・非晶構造、安定同位体ラベル、化学シフト異方性、固体NMR

あさくらてつお、かめだつねのり、でむらまこと

3) 結果と考察

1. エリ蚕絹配向試料の ^{15}N NMR スペクトル

エリ蚕絹フィブロインの48.4%をしめるアラニン残基の75%は、アラニン連鎖を形成しており、蚕絹糸腺中では、NMR タイムスケールで見ると、 α -ヘリックスとランダムコイルの早い交換状態として存在する^{4,5)}。一方、残りの25%は、孤立しており、ランダムコイルとして存在する。

Fig.1 に、 ^{15}N Ala および ^{15}N Gly エリ蚕絹の一軸配向ブロック試料の角度依存固体 ^{15}N NMR スペクトルを示した。一連の配向軸と磁場との角度を変えた配向試料のアラニンラベル絹のスペクトルから、アラニン連鎖部分が β 構造をとっており、パウダーパターンを、25%含むことがわかる。これは、その ^{13}C CP/MAS NMR において、Ala C $^{\beta}$ ピークの解析⁶⁾から得られた結果とも一致する。すなわち、水溶液からの繊維化の過程において、アラニン連鎖からなるヘリックス部分が、定量的に、すべて β 構造にか変わったことを意味する。しかしながら、一口に β 構造といっても、構造のとりうる領域は広く、さらに、アラニン連鎖部分の内部回転角(ϕ , ψ)を決定するために、配向系のNMR解析をすすめた。

一方、エリ蚕絹フィブロインの33.2%をしめるグリシン残基は、ランダムコイルとして存在し、例えば、アラニン連鎖部分が、ヘリックス \rightarrow コイル転移をおこしても、その溶液の ^{13}C NMR スペクトルにおいて、グリシンピークは、変化しない^{4,5)}。しかしながら、 ^{15}N Gly エリ蚕絹の一軸配向ブロック試料の角度依存固体 ^{15}N NMR スペクトルは、予想されるように、パウダーパターン成分が多いものの、角度に依存してスペクトルパターンは変化し、一部、 β 構造が生じていることがわかる。これは、配向処理によってアラニン連鎖部分が β 構造を形成するに伴い、アラニン連鎖近傍に存在する一部のグリシン残基が、巻き込まれたものと推察される。その割合は、グリシン残基の40%であり、巻き込まれたグリシン残基の構造解析をさらに進めた。

2. エリ蚕絹配向構造の解析

粉末試料のパウダーパターンから、 ^{15}N Ala および ^{15}N Gly 部位の化学シフトテンソル値を決定するとともに、配向系のスペクトル解析から繊維軸の分布を考慮したシミュレーションによって、主軸座標系(PAS)を繊維軸座標系(FAS)へ変換する時のオイラー角を各サイト毎に決定できる^{2,3)}。さらに、主軸座標系(PAS)を分子軸座標系(MAS)へ変換する時のオイラー角の値は、既に、モデル化合物について報告済みのものを用いた⁷⁾。

Fig.1 において、パウダーパターンとの差スペクトルから得られた ^{15}N NMR 配向成分の解析から、繊維軸に対する N-H 方向のなす角度は、Ala 86 $^{\circ}$, Gly 83 $^{\circ}$ 、繊維軸に対する N-C $^{\prime}$ 方向のなす角

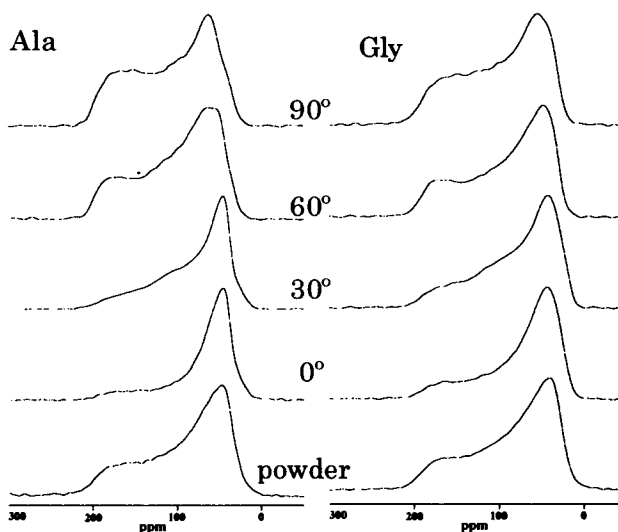


Fig.1 Angular dependent ^{15}N solid state NMR spectra of ^{15}N Gly and ^{15}N Ala labeled *S.c. ricini* silk fibroins as a function of the angle between the oriented axis of silk fiber and magnetic field.

度は、Ala 40°, Gly 34°と決定した。今後、カルボニル部位を ^{13}C ラベルしたエリ蚕絹の角度依存固体 ^{13}C NMR スペクトルの解析結果を加えて、アラニンおよびグリシンの配向部位について、内部回転角(ϕ , φ)を決定する予定である。

Fig.2に示したように、二種類の絹繊維の応力-ひずみ曲線 (Stress-Strain Curve) は、著しく異なる⁸⁾。家蚕絹の場合は、立ち上がりが急で、比較的直線的に変化するが、エリ蚕絹の場合は、按部を有する、よりなだらかな曲線となる。家蚕絹フィブロインでは、90%以上を占める Gly, Ala, Ser, Tyr, Val 残基が、殆ど、繰り返し領域に存在し、発達した β 構造領域を形成している⁹⁾。したがって、NMRでみた非晶領域は、少ない。一方、エリ蚕絹の場合、 β 構造は、アラニンの75%を占めるアラニン連鎖部分が、主であり、グリシン残基の約40%が、 β 構造に寄与するものの、圧倒的に非晶構造が多いことがわかる。これが、二種類の絹繊維間の Stress-Strain curve の違。今後、さらに非晶領域のアミノ酸を同位体ラベルし、アミノ酸残基レベルでの構造-物性相関を説明していく予定である。

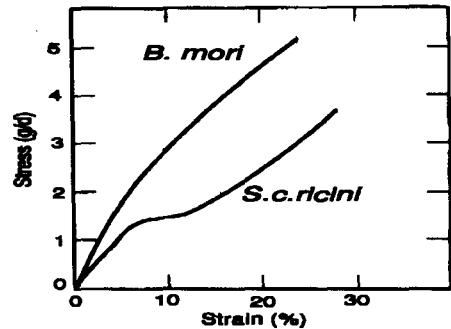


Fig.2 Stress-Strain curves of *B.mori* and *S.c.ricini* silk fibroin fibers.

本研究は一部、生研機構基礎技術推進事業により行われた。

参考文献

- 1) 繊維基礎講座 I 要旨集,1998, 繊維学会
- 2) T.Asakura, M.Minami, R.Shimada, M.Demura, M.Osanai, T.Fujito, M.Imanari and A.S.Ulrich, *Macromolecules*, **30**, 2429 (1997).
- 3) M.Demura, M.Minami, T.Asakura and T.A.Cross, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1300 (1998).
- 4) T.Asakura and T.Murakami, *Macromolecules*, **18**, 2614 (1985).
- 5) T.Asakura, H.Kashiba and H.Yoshimizu, *Macromolecules*, **21**, 644 (1988).
- 6) M.Ishida, T.Asakura, M.Yokoi and H.Saito, *Macromolecules*, **23**, 88 (1990).
- 7) T.Asakura, Y.Yamazaki, K.W.Seng and M.Demura, *J.Mol.Struct.*, **446**, 179 (1998).
- 8) E. Iizuka and H. Itoh, *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, (1998). in press.
- 9) T.Asakura et al. Manuscript in preparation.

3L5

磁場配向リン脂質二重膜中生理活性ペプチドの 立体構造解析

(姫路工大理) ○内藤 晶、木村成輝、永尾 隆、則定和志、
辻 暁、斉藤 肇

Structural elucidation of biologically active peptides in the magnetically oriented lipid bilayers

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology,
Akira Naito, Shigeki Kimura, Takashi Nagao, Kazushi Norisada,
Satoru Tuzi, and Hazime Saitô

Magnetically oriented lipid bilayer systems have attracted much attention as a powerful means to provide detailed information on the structure and dynamics of membrane bound peptides utilizing solid state NMR spectroscopy. We demonstrate here that dynorphin and melittin incorporated into model membranes exhibit a new class of magnetic ordering of lipid bilayers which form a elongated liposome. We also show that these magnetically oriented lipid bilayers can be used to investigate the secondary structure and the orientation of the peptides bound to membranes in view of the ^{13}C NMR spectra. As an example, it turned out that the N- and C-terminals of the α -helices of melittin are located in the surface of the magnetically oriented lipid bilayers, whereas the central part such as Gly¹² is inserted into the hydrophobic region of lipid bilayers.

【序】配向二重膜に生体分子が結合した系では異方的相互作用が観測できるので、膜生体分子の構造に関する詳細な情報を与える。昨年メリチンやダイノルフィン等の両親媒性生理活性ペプチドを含むリン脂質二重膜は ^{31}P NMR スペクトルの解析から、脂質二重膜面を磁場に平行に向けて自発的に磁場配向することを報告した¹⁾。自発的に磁場配向を示す二重膜として bicelle²⁾が報告されているが、本研究で示す磁場配向二重膜は楕円形のリポソームを形成することで大きな磁気異方性を示す新しいタイプの磁場配向二重膜であることが判明した。この様な磁場配向膜に取り込まれた生理活性ペプチドの構造情報を得るため、磁場配向膜に取り込まれたカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフト値を解析した。この結果、膜ペプチドがヘリックス軸にそって大きな振幅運動を持つ場合、ペプチドの配向に関する詳細な情報を与えることを見いだした。本講演では磁場配向二重膜を用いた膜結合ペプチドの構造を決定する新しい方法の基礎と応用について報告する。

リン脂質二重膜、磁場配向、メリチン、ダイノルフィン、 ^{13}C 化学シフト値

ないとう あきら、きむら しげき、ながお たかし、のりさだ かずし、つじ さ
とる、さいとう はじめ

【実験】メリチンあるいはダイノルフィンとリン脂質(DMPC)を 1:10 のモル比でメタノールに溶かし、完全に溶媒を取り除いてから、pH7.4 トリス緩衝液を用いて水和した。さらに凍結融解を繰り返して、脂質二重膜を調製した。この脂質二重膜が小胞体を形成しているかどうかを検証するため、カリウムイオンを小胞体に取り込み、小胞体外部のカリウム濃度変化をカリウムイオン選択性電極を用いて測定した。 ^{31}P および ^{13}C NMR 測定はすべて DD-NMR(one pulse excitation with proton decoupling)法によって測定した。磁場配向状態の化学シフト値(δ_{obs})は静止状態で測定し、等方化学シフト値(δ_{iso})は MAS 条件下で測定した。また磁場配向試料の異方的化学シフト値($\delta_{\parallel} - \delta_{\perp}$)は 110Hz の Slow-MAS 条件下で測定した。

【結果と考察】

磁場配向二重膜の性質 図 1 にメリチン/DMPC 二重膜の ^{31}P NMR スペクトルの温度変化を示す。40℃に保って磁場中に試料を挿入した場合は粉末パターンを示しているが、温度を 10℃まで下げることによって、等方化学シフト値に 1 本線の信号が現れた。この結果は比較的大きな小胞体を液晶-ゲル転移点(T_m)以上では形成しているが、 T_m 以下では二重膜の分断が起こっていることを示している。さらに 10℃から温度を上昇させた場合には、20℃付近で一旦粉末線形を示したが、さらに温度を上昇させると -13ppm の位置に 1 本線が現れた。この

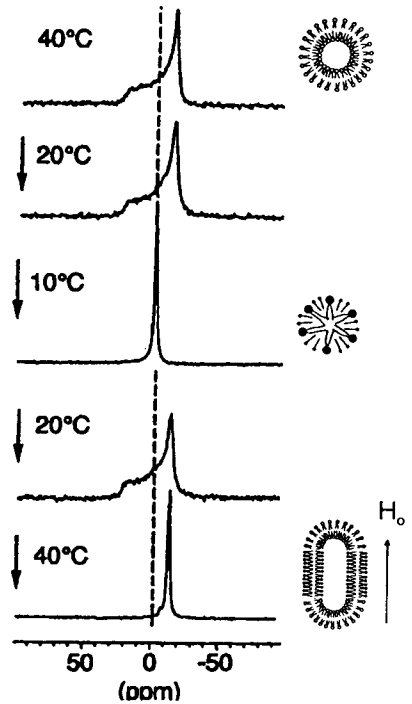


Fig.1. Temperature variation of ^{31}P NMR spectra of DMPC/melittin(10/1) bilayers.

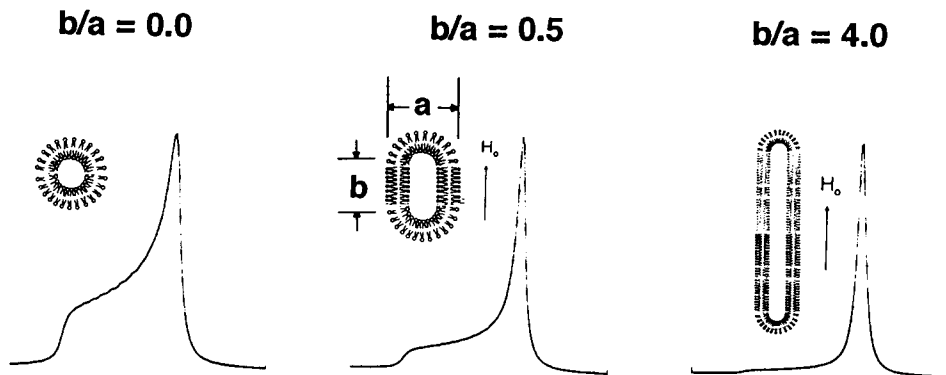


Fig. 2. ^{31}P NMR lineshape of elongated liposome.

結果は温度を T_m 以上に上昇させることによって、膜融合が起こり再び大きな小胞体を形成すると同時に磁場に対して二重膜面を平行に配向したことを示している。この磁場配向状態の二重膜が小胞体を形成していることを確かめるため、カリウムイオンを小胞体に取り込み、界面活性剤の triton-X を添加して小胞体を分断し、放出されるカリウムイオンをカリウムイオン選択性電極によって、測定した。この結果、 40°C ではカリウムイオンの放出が観測されたことから、小胞体の形成が明らかとなった。このような小胞体が自発的に磁場配向を起こすためには小胞体は楕円体を形成していると考え、 ^{31}P NMR スペクトルの解析を行った。この結果、図 2 に示すように、磁場に配向しているとき長軸が短軸に対して 5 倍以上長い楕円形リポソームを形成していることが判明した。

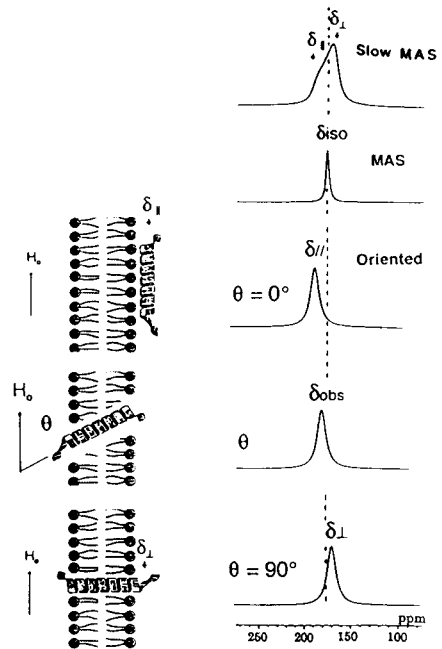


Fig. 3. Relation between orientation of helix and ^{13}C chemical shifts in magnetically oriented lipid bilayers.

生理活性ペプチドの膜中での構造決定 楕円形小胞体に結合した両親媒性生理活性ペプチドであるメリチンの膜中の構造を決定するため、カルボニル炭素の ^{13}C 化学シフト値に注目した。 α -ヘリックスでは $\text{C}=\text{O}$ 軸がヘリックス軸にほぼ平行であり、ヘリックスは軸の周りを大きな振幅で運動していることを考慮すると、図 3 に示すように磁場配向が起こらない場合は、ヘリックス軸に軸対称な粉末パターンを示すが、磁場に平行に配向した場合は、等方化学シフト値から低磁場にシフトし、磁場に垂直に配向した場合は高磁場にシフトする。さらに、ヘリックス軸が静磁場に対して θ 傾いているときの磁場配向試料の化学シフト値 (δ_{obs}) は (1) 式で表される。

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{iso}} + (1/3)(3\cos^2 \theta - 1)(\delta_{\parallel} - \delta_{\perp}) \quad (1)$$

ここで δ_{obs} 、 δ_{iso} 、 δ_{\parallel} 、 δ_{\perp} はそれぞれ実験によって決定することができるので、それらの値を用いて θ を決定することができる。実際メリチン/DMPC 磁場配向膜において $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^3$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}^5$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{12}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}^{16}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Ile}^{20}$ を標識したメリチンの化学シフト値の測定結果を図 4 および表 1 に示す。図 4 で得られた値を式 (1) に代入して Val^5 近傍のヘリックス軸が膜面となす角を 35° と決定した。同様に各標識部位付近のヘリックス軸の膜面に対する角度が決定できた。この結果、図 5 に示すように膜に結合したメリチンは N 端と C 端が膜表面近傍に存在し、ヘリックス軸は N 端から 35°

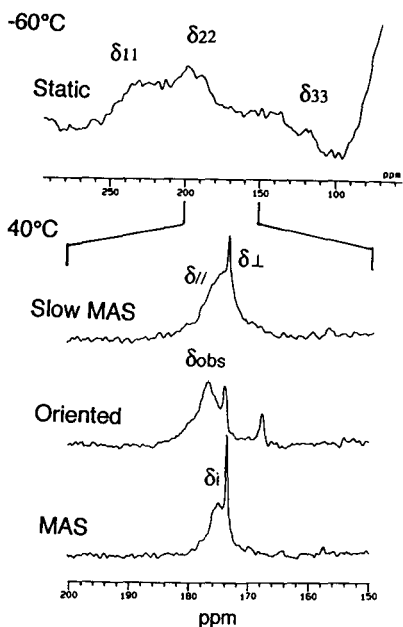


Fig. 4. ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}^5$ -melittin in magnetically oriented lipid bilayers.

の角度で膜内に挿入され、N 端からは 72° の角度で膜面に挿入されていることが分かった。さらにヘリックスの折れ曲がり角は 73° であり、膜に挿入された中央部分は異方性が小さいことから、運動性が非常に高いことが判明した。

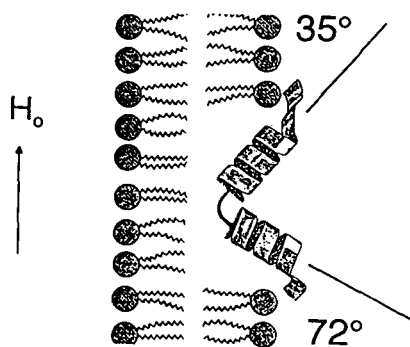


Fig. 5. Orientation of melittin in magnetically oriented lipid bilayers.

【まとめ】 メリチンやダイノルフィン等の両親媒性生理活性ペプチドがリン脂質二重膜に作用する結果、elongated liposome が形成され、この長軸が自発的に磁場に平行に配向する性質のあることが分かった。この磁場配向膜に結合したペプチドの ^{13}C 化学シフト値は膜に対するペプチドの配向に関する詳細な情報を与えることから、膜ペプチドや膜蛋白質の構造決定に自発的磁場配向膜は有効であると考えられる。

Table1. ^{13}C chemical shifts, structure and orientation of melittin in magnetically oriented lipid bilayers

	δ_{obs}	δ_{iso}	$\delta_{//} - \delta_{\perp}$	Structure	θ
$[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^3$	179.8ppm	171.8 ppm	20.7 ppm	α -helix	$32^\circ \pm 10^\circ$
$[1-^{13}\text{C}]\text{Val}^5$	177.0ppm	175.2 ppm	5.4 ppm	α -helix	$35^\circ \pm 5^\circ$
$[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{12}$	170.9ppm	171.6 ppm	0 ppm	α -helix	-
$[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{15}$	15.9ppm	16.1 ppm		α -helix	-
$[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}^{16}$	177.2ppm	175.6 ppm	8.0 ppm	α -helix	$43^\circ \pm 5^\circ$
$[1-^{13}\text{C}]\text{Ile}^{20}$	170.2ppm	174.7 ppm	15.1 ppm	α -helix	$72^\circ \pm 5^\circ$

【文献】

- 1) 内藤 晶、等 第36回 NMR 討論会要旨集 p.16-19 (1997).
- 2) C.R. Sanders II and J.H. Prestegard, Biophys. J. 58, 447-460 (1990); C.R. Sanders II and J.P. Schwonek, Biochemistry, 31, 8898-8905 (1992).

3L6

天然物化学におけるLC-NMRの応用とその実際

○射手園佳子、河原郁子、唐沢 薫、青木雅弘、中山 登、*降旗一夫、**瀬戸治男
(日本ロシュ研、*東大院農・応生化、**東大・分生研)

Application of LC-NMR in Natural Products Screening

In order to avoid isolating known substances during natural product screening (dereplication), we investigated the use of LC-NMR for identification or structural elucidation of microbial metabolites contained in fermentation broths or in crude extracts. The sensitivity of our LC-NMR instrument equipped with a flow cell (3mm diameter) was sufficient to identify the target compound without purification or after a simple solvent extraction procedure. In addition, the WET pulse sequence enabled satisfactory suppression of multiple signals due to mixed non-deuterated solvents, which were used for gradient elution. Thus LC-NMR experiments can be done without using costly deuterated NMR solvents and with rather high sensitivity, and this technique is expected to increase the productivity in natural product screening.

Y. Itezono, F. Kawahara, K. Karasawa, M. Aoki, N. Nakayama, K. Furihata* and H. Seto**

Nippon Roche Research Center

*Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo

**Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo

はじめに

近年コンビナトリアルケミストリーを利用した生理活性物質のスクリーニングが活発に行われているが、微生物を主体とする天然物は依然として重要な生理活性物質のソースである。しかしながら、種々様々なスクリーニング方法が用いられているにも拘わらず、ヒットする活性化合物の大部分は既知物質であり、新規化合物の発見を効率良く行うには、早期の段階で(できれば培養液、あるいは簡単な精製操作後)、活性物質本体を同定し、既知物質を排除する(dereplication)ことが重要である。この目的には、情報量の多いLC-NMRが最適と考えられる。しかしLC-NMRは開発されてから久しくなるが、従来まであまり有効に使われてきたとは言い難い。その理由は数mg程度のサンプル量を必要とするという感度の悪さと、重水素化溶媒を使用することに伴う経済的な問題があったためである。しかしながら、最近のNMR技術の進歩により感度が大幅に改善され、更に溶媒除去を確実にこなせるWET^{1),2)}が開発されたことにより、この二点の問題が解決され幅広い応用が期待されるようになってきた。そこで、dereplicationの手段としてLC-NMRの応用を検討したところ、極めて迅速に結論が得られるのみならず、構造未知の化合物の場合にも種々の2D測定による構造決定が可能であることが判明した。本報告ではこれらの結果について報告する。

キーワード LC-NMR, WET

いてその よしこ、かわはら ふみこ、からさわ かおる、あおき まさひろ、なかやま、のぼる、ふりはた かずお、せと はるお

装置

LCにはバリアンモデル9012 HPLCポンプと9065DAD検出器を用い、NMRはバリアン INOVA500 (500MHz)と内径3mmのフロープローブ(アクティブボリューム= 60 μ l)を使用した。カラムはSenshu pak PEGASIL ODS (column-1)或いはDevelosil ODS-HG-3 (column-2)のセミマイクロカラム(内径 2 ϕ , 長さ150mm)を用いた。移動層には0.01% TFAを含む CH_3CN と D_2O の混液を用い、250 μ l/minの流速で展開した。

実験と結果

1) オンフロー測定条件検討と検出限界

効率的な実験を行なうにはオンフローにての測定が望ましいが、感度の問題があるため、まず測定可能限界を検討した。測定には90度パルスを用い、繰り返し時間2秒とし、1スペクトルは16回積算した。試料として2mg/mlの純品indomethacinの溶液を調製し、その5 μ lをカラムに注入したところ(10 μ g)、解析可能な良好なスペクトルが得られた。しかしその2分の1量では、ピークの存在がわかる程度であり、オンフロー測定での検出限界は5-10 μ gであると判断した。

2) 培養液に含まれる化合物のオンフロー測定

微生物の培養液中には様々な培地成分や代謝産物が混在している。この状態、或いは培養液を粗精製した段階でサンプル中の既知化合物を検出できるか否かを、モデルサンプルとして純品のchloroflavinin (CLF)を用いて検討した。活性化合物が水溶性の場合と脂溶性の場合を想定し、CLF非生産菌の培養液を凍結乾燥後、メタノールにて抽出したA溶液と、培養液を直接酢酸エチルにて抽出したB溶液でCLFを溶解し(A,Bサンプル 1mg/ml)その10 μ lをカラムに注入しオンフロー測定を行なった。水溶性の画分となるAサンプルでは、3~4 ppm付近に糖由来と思われる大きなピークが観測されたためメキシ基の存在は確認できなかったが、芳香族プロトン領域には不純物に由来する顕著なピークは存在せず、CLFのクロモフォア由来のピークを容易に識別することができた (Fig. 1)。一方脂溶性の画分となるBサンプルでは、Aサンプルに存在していた3~4 ppm付近の大きなピークは消失し、芳香族プロトン領域に多数のピークが認められる (Fig. 2)。A、Bサンプル

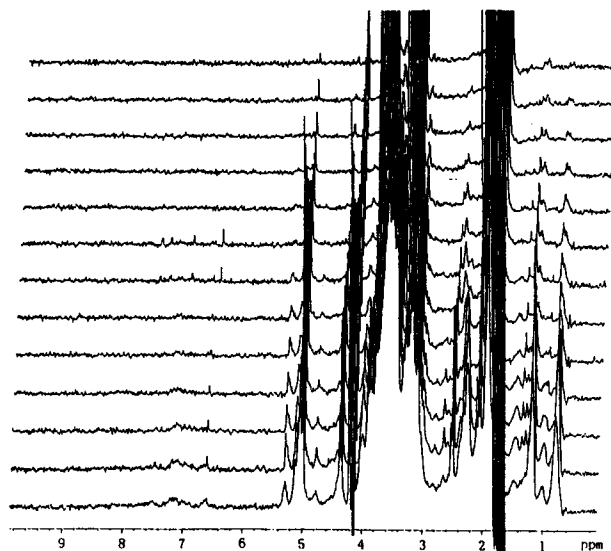
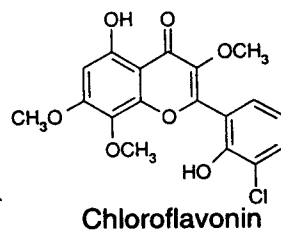


Fig.1 on flow experiment of CLF in solution A
(column-1, 45% CH_3CN)

ルともに、CLFと一致するUV吸収を示すLCの画分でスライスすると(図の矢印)、同定目的に十分使用し得るスペクトルが得られた。

dereplicationに際しては、まずUV吸収スペクトルの比較による既知化合物の検索を行なうが、特徴的なUV吸収を示さない場合、あるいは莢雑物の影響で既知化合物のUV吸収に一致しない場合には、LC-NMRが有効であることが判明した。

3) ストップフロー測定

LC-NMRで感度を上げる最も簡単な方法は、ストップフロー測定であるが、測定時間としては30分から1時間程度が実用的な範囲と考えられる。CLFのDMSO溶液(200 $\mu\text{g/ml}$)を10 μl インジェクトしてオンフロー測定した場合、メトキシ基のみが辛うじて観測出来たに過ぎなかったが(16回積算)、ストップフローで15分測定した場合(400回)、極めて良好なスペクトルを得ることができた。また培養液に含まれる化合物を想定し、A溶液でCLFを溶解し(400 $\mu\text{g/ml}$)、その10 μl をストップフロー測定にて1時間積算を行なった結果、CLFを容易に同定し得るスペクトルが得られた。

4) scout scan²⁾

天然物の分析において、gradient溶出がしばしば用いられる。しかしgradient条件下では溶媒ピークがシフトするため、LC-NMR測定に際しては溶媒除去が困難となる。この場合、信号取得前に1回測定して溶媒の位置を決定し、溶媒ピークを照射しながら

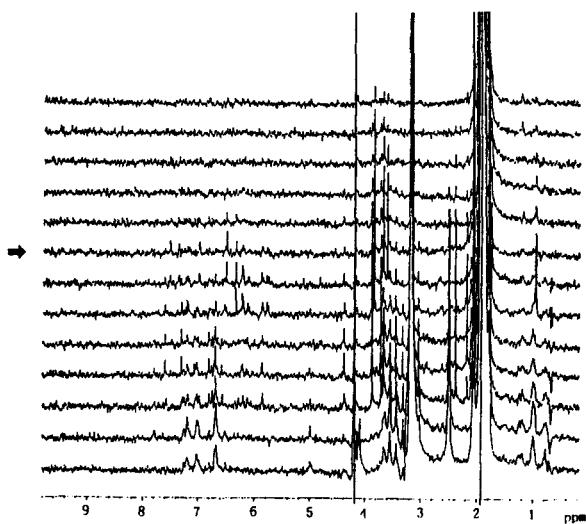


Fig.2 on flow experiment of CLF in solution B
(column-2, 45% CH_3CN)

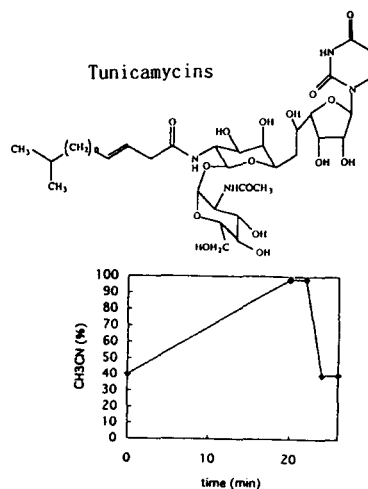
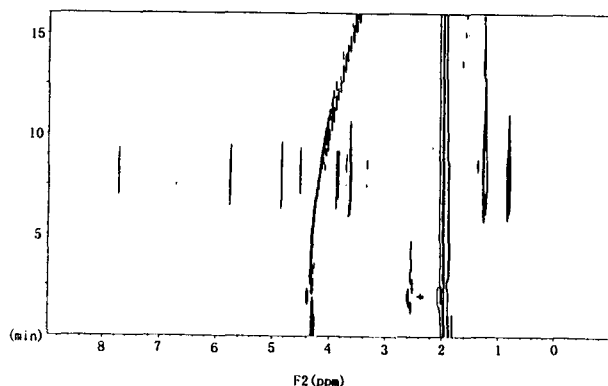


Fig.3 Scout scan experiment (column-2)

らスペクトルを測定する scout scan が有効である。テスト試料として市販の tunicamycins (TNMS) 混合物を用いた。isocratic 条件下での TNMS の UV クロマトグラムは、ピークがブロードとなり良い分離が得られなかった。一方 gradient の採用によりピークがシャープになることによって感度が上昇したため、LC の保持時間の異なる 3 つの画分に同一クロモフォア由来のピークがオンフロー測定により観測できた。この結果本サンプルが同族体の混合物であることが確認できた (Fig. 3)。また溶出時間と共にシフトする溶媒ピークが消去されており、scout scan が溶媒消去に威力を発揮することが判明した。本方法を使用すれば、複数の溶媒からなる LC 展開液の使用も可能である。

5) 検出器としての NMR

UV 吸収のない化合物を LC によって分離する場合、NMR を検出手段とすることによって効率的な実験を行なうことが可能である。我々が単離を試みたある化合物の場合、かなり精製の進んだ段階においても UV 吸収を示していたが、このサンプルをオンフローにて測定したところ、シグナルは UV 吸収のある画分 (Fig. 4, * で示す) の直前に観測された (矢印で示す)。

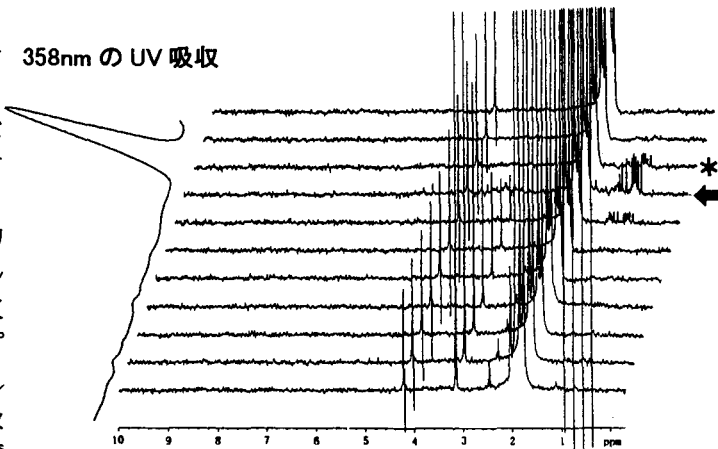


Fig.4 on flow experiment of AF3836 (column-1, 40% CH₃CN)

このデータをもとに化合物の単離精製を行なったところ、この NMR シグナルを示す部分が目的とする活性部分であることが確認された。

まとめ

天然物のスクリーニングの効率化を目指して、早い段階での dereplication を行うために LC-NMR の使用を検討した。その結果、crude な段階でのサンプルの分析に極めて威力を発揮し、実験の迅速化、時間短縮、労力の大幅な削減が可能になることが判明した。LC-NMR による試料の検出限界は μg オーダーであり、dereplication には極めて有効な方法であると考えられる。更に、ストップフロー測定を使用すると、種々の測定が可能であり、単離すると不安定な化合物の構造決定に有効な手段であると考えられる。

謝辞

本研究を行なうにあたり、技術面でのご協力をいただきましたバリアン社の串田克彦氏にお礼申し上げます。

References

- 1) R. J. Ogg, P. B. Kingsley, J. S. Taylor, *J. Magn. Reson. B* 104, 1 (1994)
- 2) S. H. Smallcombe, S. L. Patt, P. A. Keifer, *J. Magn. Reson.* 117, 295 (1995)

3L7

機能的 RNA の構造及び蛋白質との相互作用の解析

(横浜国大・工¹、工技院生命研²、工技院融合研³、筑波大応用生化⁴)

○片平正人¹、小林伸一郎¹、上杉晴一¹、山本利香^{2,3,4}、
多比良和誠^{2,3,4}、西川諭²、P.K.R. Kumar^{2,3}

Structure and interaction with peptides of an RNA aptamer

○Masato Katahira¹, Shin-ichiro Kobayashi¹, Seiichi Uesugi¹, Rika Yamamoto^{2,3,4}, Kazunari Taira^{2,3,4}, Satoshi Nishikawa², and P.K.R. Kumar^{2,3}, ¹Faculty of Engineering, Yokohama National University, ²National Institute of Bioscience and Human Technology and ³National Institute for Advanced Interdisciplinary Research, MITI, and ⁴Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba

The interaction with a Tat peptide of an RNA aptamer having two TAR motifs has been investigated. The aptamer was bound to by two peptide molecules. The formation of two U:A:U base-triples in the aptamer was strongly suggested upon binding of the peptides. Model building implies that peptide-peptide interaction performed may facilitate strong binding of the peptide to the aptamer.

(序) HIV の Tat(trans-activation)蛋白質は、ウィルスの mRNA の転写開始直後に形成される TAR(trans-activation region)と呼ばれるバルジを含むステム＝ループ構造の RNA (図 1(a)) に結合し、転写の伸長を促進する。我々は SELEX 法により、Tat 蛋白質に対し高い親和性を有する RNA アプタマー (図 1(b)) を得た¹⁾。このアプタマーは TAR に比べ 50-100 倍強く Tat 蛋白質に結合し、デコイ法への応用が期待されている。アプタマーは TAR 様のモチーフを 2 個有している。今回 Tat 蛋白質の TAR 結合領域に対応する 36 残基の Tat ペプチドとアプタマーの相互作用を解析した。

(方法) ¹³C, ¹⁵N 2 重標識した RNA アプタマーは、T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写系により合成し、ゲルにより精製した。Tat ペプチドはペプチド合成機により合成し、精製した。各種 NMR スペクトルは Bruker DRX600 を用いて測定した。

(結果と考察) RNA アプタマーと Tat ペプチドの複合体形成を、イミノプロトン領域のスペクトルを用いてモニターした。Tat ペプチドの添加に伴い、13.8 ppm 付近に新たなピークが出現してきた (図 2)。このピークはアプタマー : ペプチド = 1 : 2 まで増大し続けるが、それ以上ペプチドを加えてもほとんど変化しなかった。これより、RNA アプタマー 1 分子当たり、Tat ペプチドは 2 分子結合する事

Tat, TAR, HIV, アプタマー, RNA

かたひらまさと、こばやししんいちろう、うえすぎせいいち、やまもとりか、たいらかずなり、にしかわさとし、P.K.R.クマール

がわかった。

HSQC スペクトルより、13.8ppm 付近には実際には 2 本のシグナルがあり、 ^1H 及び ^{15}N のケミカルシフト値から、水素結合に関与した U 残基のイミノプロトンのシグナルである事がわかった。

イミノプロトン領域のピークの帰属を NOESY に基づき行った。NOE による連結を図 3(a)に示してある。Tat ペプチドの添加によって新たに出現したピークは、U6 と U22 のシグナルである事がわかった。さらに観測された他の NOE も合わせて考えると、Tat ペプチドの結合に伴い RNA アプタマーには構造変化が生じ、2 つのベーストリプル U6:A9:U26 及び U10:A25:U22 が形成される事が強く示唆された。ベーストリプルの形成は Tat ペプチドが TAR に結合した時にも見られ²⁾、これにより A 型 RNA 構造においては元来狭い主溝が広げられ、塩基へのペプチドのアクセスを可能にしていた。

RNA アプタマーは、2 つの TAR モチーフを軸対称の配置で有している。そこで TAR-Tat ペプチド複合体の構造に基づき RNA アプタマー-ペプチド複合体のモデルを構築した。モデルにおいて 2 つのペプチド分子はペプチド間の相互作用が可能な距離に近接して存在していた。この相互作用で 2 つのペプチド分子が RNA に協同的に結合する事によって、高い親和性もたらされている可能性がある。

ペプチドの代わりにアルギニンアミドを用いた複合体の解析もあわせて行い、アルギニンによる RNA 塩基の認識に関する解析を進行させている。

1) Yamamoto, R., Murakami, K., Taira, K., and Kumar, P.K.R. *Gene Ther. Mol. Biol.* 1 451-466 (1998)

2) Puglisi, J.D., Chen, L., Blanchard, S., and Frankel, A.D., *Science*, 270, 1200-1203.

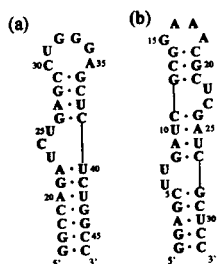


Figure 1. RNA sequences of TAR (a) and an aptamer (b).

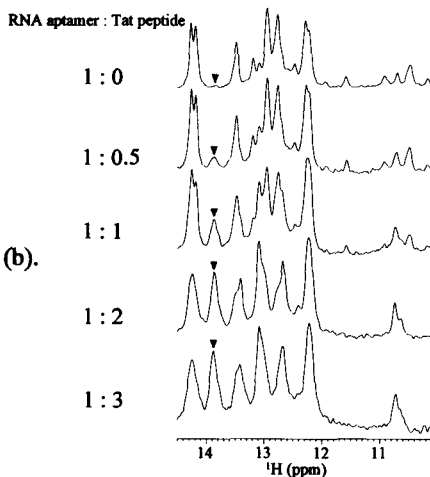


Figure 2. Tat peptide-titration to the aptamer.

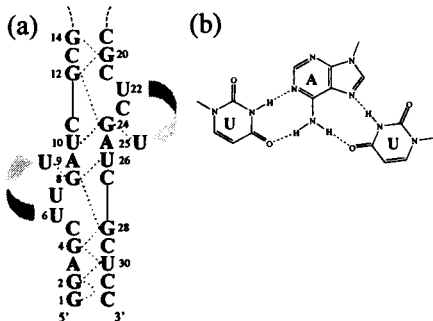


Figure 3. Observed NOE connectivities (a) and U:A:U base-triple (b).

NMR in Structural Biology – Before and After NMR Structure Determination

Kurt Wüthrich, Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule Hönggerberg, CH-8093 Zürich, Switzerland

For my scientific life the 5-year period 1980–84 had a very special impact. During this period, 2D NOESY of proteins was introduced (1), soon followed by the sequential assignment method for proteins (2) and the complete NMR structure determination of a globular protein (3). In this lecture I shall focus on spectroscopy aspects of biomolecular NMR before (4) and after (5,6) the advent of NMR structure determination of proteins, and conclude with some comments on solution NMR with very big molecular sizes using TROSY (7,8).

References

- (1) Anil-Kumar, Ernst, R.R. and Wüthrich, K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **95**, 1–6: A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton–proton cross-relaxation networks in biological macromolecules.
- (2) Wagner, G. and Wüthrich, K. (1982) *J. Mol. Biol.* **155**, 347–366: Sequential resonance assignments in protein ^1H nuclear magnetic resonance spectra: basic pancreatic trypsin inhibitor.
- (3) Williamson, M.P., Havel, T.F. and Wüthrich, K. (1985) *J. Mol. Biol.* **182**, 295–315: Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ^1H nuclear magnetic resonance and distance geometry.
- (4) Wüthrich, K. (1976) *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*. North Holland, Amsterdam. (Japanese Translation: Tokyo, 1979).
生体物質のNMR—ペプチド・タンパク質を中心に (荒田・甲斐荘訳) 東京化学同人(1979)
- (5) Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York. (Japanese translation: Kagaku Dozin, Tokyo, 1991)
タンパク質と核酸のNMR—二次元NMRによる構造解析— (京極・小林訳) 東京化学同人(1991)
- (6) Wüthrich, K. (1995) *NMR in Structural Biology*, World Scientific, Singapore.
- (7) Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. and Wüthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 12366–12371: Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole–dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution.
- (8) Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. and Wüthrich, K. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6394–6400: Transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) for NMR studies of aromatic spin systems in ^{13}C -labeled proteins.

3L9

無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の安定同位体標識法

(¹理化学研究所・細胞情報伝達研究室, ²東京大学大学院・理学系研究科)

○木川隆則¹, 矢吹 孝¹, 山口絵未¹, 横山茂之^{1,2}

Stable-isotope labeling of proteins by the cell-free protein synthesis

Takanori Kigawa¹, Takashi Yabuki¹, Emi Yamaguchi¹, and Shigeyuki Yokoyama^{1,2}

¹*Cellular Signaling Laboratory, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),*

Saitama 351-0198, and ²Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

We developed methods for stable-isotope labeling of proteins using the cell-free protein synthesis. First, an improved cell-free system, which could produce about 0.5 mg of proteins per 1 ml reaction mixture, was used for amino acid selective stable-isotope labeling of the Ras protein. We have succeeded in six types (Asp, Phe, Pro, Ser, Thr, and Tyr-selective) of selective labeling with no isotope scrambling problem. Second, we have established a method for producing a milligram quantity of site-specifically stable-isotope labeled protein by cell-free system involving amber suppression. This method was used for specific labeling at Tyr32 of the Ras protein. In addition, we recently developed a dialysis cell-free system, which could produce about 6 mg of protein per 1 ml reaction mixture. This method is suitable for uniform labeling of proteins.

1. 序

無細胞タンパク質合成系は、生細胞の発現系においてしばしば問題となる生体維持機構の制約を受けにくく、さらに、系を人為的に改変することが容易であることから、タンパク質の発現手法として有望であると期待されてきた。従来の無細胞系では合成量の低さが最大の欠点であったが、我々は、大腸菌抽出液を用いた系に関して系の改良や反応条件の最適化をおこない、1mlの反応液当たり0.5mg程度の目的タンパク質を得られるようにした(1-3)。これにより、タンパク質の構造解析をおこなうために必要なmgオーダーのタンパク質を、無細胞系を用いて調製することが可能になった。そこで我々は、無細胞系を利用した安定同位体標識タンパク質調製法を開発・応用してきた。

キーワード：安定同位体，アミノ酸選択的標識，部位特異的標識，多次元NMR，無細胞タンパク質合成系

きがわたかのり，やぶきたかし，やまぐちえみ，よこやましげゆき。

II. アミノ酸選択的安定同位体標識への応用

生細胞による発現系を用いてアミノ酸選択的な安定同位体標識をおこなう場合、標識アミノ酸が代謝されてしまうため、目的アミノ酸の標識効率が低くなり、しかも他のアミノ酸へも標識が及んでしまう。無細胞系においてはアミノ酸代謝系が機能している必要はなく、積極的に代謝系を抑制することが可能であることから、この種の標識に特に有効であると期待された。

我々はまず、生細胞による発現系では極めて困難な、アスパラギン酸選択的な安定同位体標識を試みた(1)。標識の対象としてはRasタンパク質を選んだ。反応は15mlスケールでおこない、その際用いた $[^{15}\text{N}]$ -アスパラギン酸は1mgと極めて少量であった。無細胞系を用いてアスパラギン酸選択的に標識したRasタンパク質のHSQCスペクトルが図1aである。大腸菌による発現系を用いて $[^{15}\text{N}]$ アスパラギン酸により標識したRasタンパク質のスペクトル(図1b)と比較すると明らかなように、無細胞系を用いると、アスパラギン酸のみが選択的に標識されており、アスパラギン等の他のアミノ酸への標識の漏れは全く検出されなかった。

現在までに我々は、上述の例も含めて6種類(Asp, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr)のアミノ酸選択的標識を無細胞系を用いておこなっており、いずれの場合にも他のアミノ酸への標識の漏れは検出されず、標識アミノ酸の使用量も極めて少ない(一試料あたり数mg)。このように、アミノ酸選択的な安定同位体標識への無細胞系の利用は極めて有効であると考えられる。

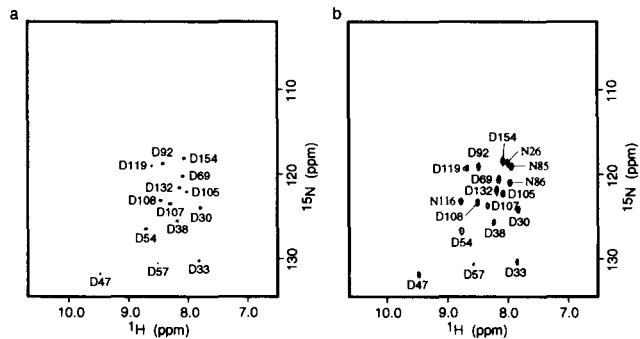


図1. ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル。(a) $[^{15}\text{N}]$ -アスパラギン酸を用いて無細胞系により調製したRasタンパク質。(b) $[^{15}\text{N}]$ -アスパラギン酸を用いて大腸菌により調製したRasタンパク質。

III. 部位特異的安定同位体標識法の開発

無細胞系では、コドンとtRNAの対応関係を巧妙に利用することにより、タンパク質上の特定の残基のみに任意のアミノ酸を導入することが可能である。大きなタンパク質分子(分子量50kDa以上)の動的な性質をNMRにより解析する場合に、ユニフォームな安定同位体標識をおこなうと、シグナルの重なりが激しく帰属は難しいが、この方法でタンパク質の特定残基のみを安定同位体標識することができれば、シグナルの帰属が容易となり、目的部位の構造情報を迅速に引き出すことが可能となるため、NMR構造生物学においては画期的な手法になることが期待される。

しかし、従来この手法で得られるタンパク質量は極めて少量であり(μg オーダー)、タンパク質の構造解析に必要なmgオーダーのタンパク質を得るのは困難であ

と考えられていた。前述の様に、我々の改良してきた無細胞系ではmgオーダーのタンパク質を調製することが可能であることから、我々の系とtRNAの*in vitro*大量調製技術を組み合わせることにより、mgオーダーの部位特異的安定同位体標識タンパク質を調製することが可能になると考えられた。

実際には、Rasタンパク質の32位チロシン残基のみに安定同位体標識(^{15}N)を導入することを試みた(3)。図2に実験のスキームを示す。Rasタンパク質の鑄型プラスミド上の32位チロシン残基のコドンアンバーコドン(TAG)に置換し、*in vitro*転写系を用いて調製したチロシンのアンバーサプレッサー-tRNA(10mlスケールにより25mg得られた)に、大量発現したチロシンtRNA合成酵素を用いて ^{15}N チロシンをチャージした(^{15}N Tyr-tRNA^{Tyr}_{CUA})。この鑄型プラスミドと ^{15}N Tyr-tRNA^{Tyr}_{CUA}を用いて無細胞反応をおこなった。mRNA上のアンバーコドンは ^{15}N Tyr-tRNA^{Tyr}_{CUA}により認識されて、 ^{15}N チロシンは特異的にRasタンパク質の32位に導入される。しかし実際には、アンバーコドンは翻訳終結因子1(RF1)にも競合的に認識されるため、翻訳が32位で終結したRasタンパク質断片も生成されてしまう。このような、目的タンパク質以外のタンパク質生成を極力抑えるために、詳細な条件検討が必要であった。反応は30mlスケールでおこない、最終的に約2mgの精製されたタンパク質が得られた。32位チロシン残基への ^{15}N 標識の導入率は、質量分析を用いて解析した結果、50%以上であることがわかった。HSQCスペクトルを測定した結果、32位チロシン残基のピークのみが観測され、他のピークは全く観測されず、32位チロシン残基に特異的に ^{15}N 標識が導入されていることが確認された(図3)。

同様の手法を用いることにより、すでに特異的なアンバーサプレッサー-tRNAが報告されている14種類(Ala, Arg, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr)のアミノ酸残基に関しては、部位特異的に安定同位体標識が可能であると考えられる。それに対して、他の6種類のアミノ酸残基に関しては、現在まで特異的なアンバーサプレッサー-tRNAの存在は報告されておらず、これらアミノ酸残基の部位特異的な標識を可能にするためには、tRNAや酵素の特異性の人為的な改変が必要となると思われる。

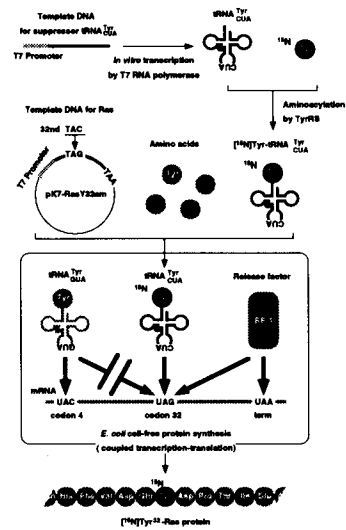


図2. 無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の部位特異的安定同位体標識方法

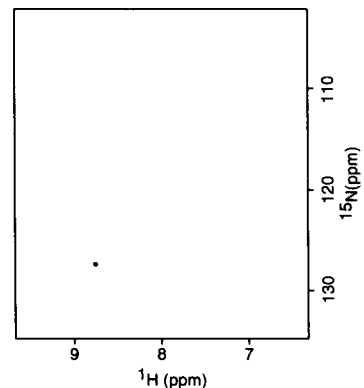


図3. ^{15}N Tyr³²-Rasの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル。Tyr³²のシグナルのみが観測されている。

IV. 透析を用いた大量合成系の開発と応用

無細胞のタンパク質合成反応は、通常はエッペンドルフチューブやファルコンチューブのような試験管内でおこなわれる（バッチ法）が、簡便な市販の使い捨て透析ユニットを用いて、タンパク質合成の基質となる低分子成分（ATP等の核酸やアミノ酸）を含む溶液（基質液）に対して反応液を透析すること（透析法）により、合成量が飛躍的に増えることがわかってきた。我々の反応系を用いて透析法をおこなうと、確かに、タンパク質合成は6時間以上持続して、CATタンパク質の場合には、1mlの反応液を用いて3mg程度のタンパク質が得られた（図4）。更に、反応開始6時間後に基質液を新しい物と交換すると、タンパク質合成は20時間程度持続して、最終的には6mg程度のタンパク質が得られることがわかった。そこで、この透析法を用いて、均一標識したタンパク質の調製を試みた。その際、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識したAlgaeの加水分解物から調製したアミノ酸混合物を主な標識源として利用し、不足するアミノ酸については、二重標識された単離アミノ酸を補うことにした。図5に透析法を用いて調製した ^{13}C 、 ^{15}N 均一標識Rasタンパク質のHSQCスペクトルを示す。タンパク質を調製した時点で二重標識された物が無かったため、非標識の物を用いたAsn, Cys, Gln以外の残基が標識されていることが確認された。

以上のように、我々の開発・改良してきた無細胞タンパク質合成系は、様々な種類の安定同位体標識に有効である。

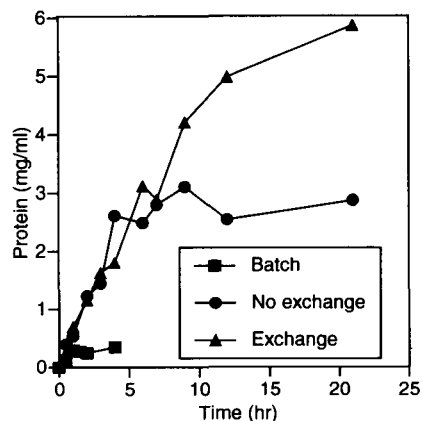


図4. CATの合成. ■; 通常法（バッチ法）, ●; 透析法, ▲; 基質液交換をおこなった透析法。

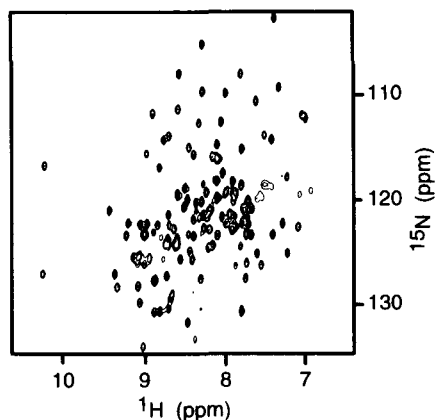


図5. 透析法を用いて調製した $[\text{u-}^{13}\text{C}$, $^{15}\text{N}]$ -Rasの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル。

参考文献

1. Kigawa, T., Muto, Y., and Yokoyama, S. (1995), *J. Biomol. NMR* **6**, 129-34.
2. Kim, D.-M., Kigawa, T., Choi, C.-Y., and Yokoyama, S. (1996), *Eur. J. Biochem.* **239**, 881-886.
3. Yabuki, T., Kigawa, T., Dohmae, N., Takio, K., Terada, T., Ito, Y., Laue, E. D., Cooper, J. A., Kainosho, M., and Yokoyama, S. (1998), *J. Biomol. NMR* **11**, 295-306.

温度ジャンプNMR法による タンパク質フォールディングの研究

(神戸大自然科学) ○川上 勝、赤坂一之

Protein Folding Studied by Temperature-jump NMR

Masaru Kawakami and Kazuyuki Akasaka
Graduate School of Science and Technology, Kobe University

A microwave Temperature-jump NMR technique was developed and applied to the unfolding study of ribonuclease A, lysozyme and alpha-lactalbumin in millisecond to second range. Nearly complete signal assignments of the aromatic protons of the unfolded species that appear upon the temperature jump were performed by State-Correlated Two-Dimensional NMR spectroscopy. Unusual deviations of chemical shifts of some aromatic protons from random coil values indicated residual structures in the unfolding species. A transient unfolding species was detected for ribonuclease A, in which the Tyr92-Pro93 peptide bond existed in the cis conformer.

われわれは、マイクロ波をNMRプローブ内において水溶液試料に照射し、20ミリ秒以内に20℃程度の温度ジャンプを起こす事が可能な「温度ジャンプNMR装置」の開発に成功した。

(Kawakami & Akasaka, *Rev. Sci. Instrum.* **69**, 9 (1998) in press)

この開発により、温度ジャンプに伴うタンパク質の構造転移の過程をNMRによって直接観測することが初めて可能となった。これまでにいくつかのタンパク質に対して「温度ジャンプ1次元NMR」「状態相関2次元NMR」の測定を行った結果、タンパク質のアンフォールディング過程に関して、以下に述べるいくつかの興味ある知見を得た。

(1) リゾチームのアンフォールディング過程と水和

ニワトリ卵白リゾチームでは、pH 2, 50℃から20℃の温度ジャンプに伴う1次元NMRを測定し、残基ごとの天然状態由来のシグナルの消失速度を測定することに成功した。さらに「状態相関2次元NMR法」によってジャンプ後100ミリ秒での変性状態のほぼ全ての芳香環プロトン信号の帰属に成功した。それらの化学シフトの値は、ジャンプ後100ミリ秒以内に、タンパク質の鎖が既に水和を完了していることを示唆している。

タンパク質、フォールディング、温度ジャンプNMR、状態相関2次元NMR

かわかみまさる、あかさかかずゆき

(2) ラクトアルブミンの変性状態における残存構造

ラクトアルブミンにおいては、pH 7, 40°Cから20°Cの温度ジャンプ直後のスペクトルは、すでに熱平衡状態における変性スペクトルと一致していた。しかし、Tyr 103、His 107の信号が著しく高磁場シフトしており、熱変性状態でこの部分に残存構造が存在する事を示している。

(3) モルテングロビュール構造におけるプロトン信号の分離

タンパク質の変性状態の一つであるモルテングロビュール状態では、一般にプロトン信号は幅広く重なり合い、これまで個々のプロトンの信号を、直接分離して観測されたことはない。ラクトアルブミンにおいて、モルテングロビュール状態と熱変性状態間での「状態相関2次元スペクトル」の測定によって、モルテングロビュール状態の個々のプロトン信号の分離観測に成功した。この分離された各信号の線幅は、モルテングロビュール状態における個々の環境のゆらぎに関する知見を与える。

(4) リボヌクレアーゼAのアンフォールディングに伴う過渡的分子種の検出

pH 3.5, 50°Cから20°Cの温度ジャンプに伴うリボヌクレアーゼAの状態相関スペクトルの解析の結果、ジャンプ直後にその高次構造はほぼ崩壊しているが、Tyr 92-Pro 93のペプチド結合が天然状態と同じシス配位を保っている事がわかった。これは、状態相関2次元NMRによって、タンパク質のアンフォールディングの過渡的分子種の検出に成功したことを意味している。

3L11

植物ホルモン応答に関与する転写因子のDNA結合ドメインと標的DNAの複合体立体構造の決定と三鎖βシートによる塩基配列認識
○山崎和彦^{1,2}、Mark D. Allen^{1,2}、高木優³、館野賢^{1,2}、鈴木理^{1,2,4}

¹生命工学工業技術研究所・構造生物学研究施設、²科学技術振興事業団・戦略的基礎研究、³生命工学工業技術研究所・植物分子生物学、⁴東大・総合文化研究科

A new DNA recognition mode by a three-stranded β-sheet revealed by the solution structure of the DNA-binding domain of a transcription factor of plant origin in the complex with the target DNA
Kazuhiko Yamasaki^{1,2}, Mark D. Allen^{1,2}, Masaru Ohme-Takagi³, Masaru Tateno^{1,2},
and Masashi Suzuki^{1,2,4}

¹AIST-NIBHT CREST Centre of Structural Biology, ²Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) Project, JST, ³AIST-NIBHT Plant Molecular Biology Laboratory, ⁴Graduate School of Human and Environmental Sciences, University of Tokyo

The 3D solution structure of the GCC-box binding domain (GBD) of a transcription factor from *Arabidopsis thaliana* in the complex with its target DNA fragment has been determined by heteronuclear multidimensional NMR in combination with simulated annealing and restrained molecular dynamic calculation. The GBD domain consists of a three-stranded anti-parallel β-sheet and an α-helix packed approximately parallel to the β-sheet. Arginine and tryptophan residues in the β-sheet are identified to contact eight of the nine consecutive basepairs in the major groove, and at the same time bind to the sugar-phosphate backbones. The target DNA bends slightly at the central CG step thereby allowing the DNA to follow the curvature of the β-sheet.

【はじめに】 ストレス応答性植物ホルモン、エチレンにより、キチナーゼやグルカナーゼなどの生体防御遺伝子の発現が誘導される。シロイヌナズナ由来AtERF1は、その転写を制御する特異的転写因子である。昨年度はAtERF1のDNA結合ドメイン（GCCボックス結合ドメイン、GBD）の立体構造をNMR分光法により決定し、αヘリックスと三鎖逆平行βシートからなることを発表した（第2回構造生物学シンポジウム）。今回、GBDとその認識配列であるGCCボックスを含むDNA分子の複合体の立体構造決定を行い、これに基づき蛋白質によるβシートを用いた新しいDNA認識機構を報告する。

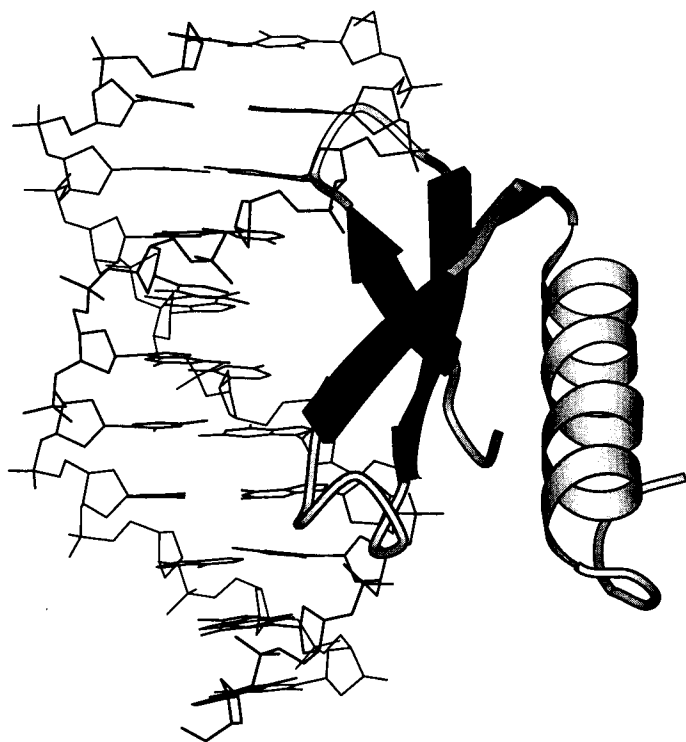
【方法】 GBDと13塩基対DNA（5'GCTAGCCGCCAGC3'/5'GCTGGCGGCTAGC3'、GCCボックス配列に下線）の複合体の同種核および異種核多次元NMRスペクトルを、Bruker社DMX750およびDMX500の装置を用いて測定した。得られた¹H核間の距離制

キーワード：蛋白質-DNA複合体、多次元NMR、分子動力学、転写因子、植物ホルモン応答

やまさきかずひこ、マークアッレン、たかぎまさる、たてのまさる、すずきまさし

約を用いてX-PLOR3.1による徐冷法計算およびAMBER4.1による水分子を含めた分子動力学計算を行い、複合体の立体構造を決定した。

【結果および考察】GBD単量体は、三鎖からなる β シートを介してDNAの主溝（7塩基対のGCCボックス配列全体を含む9塩基対）に結合する（図）。GBDの12アミノ酸残基とDNAの12ヌクレオチドは水素結合、疎水性結合、静電的結合などにより接触する。4つのアルギニン残基がGCCボックスの5つのグアニン塩基と水素結合し、配列特異的認識において重要である。そのうち3残基は、DNAのピリミジン塩基との疎水性結合、さらに、リン酸基との静電的結合を同時に行っていてドメインのDNAへの結合の角度をも決定する。2つのトリプトファン残基は、塩基と疎水性結合を行うと同時にリン酸基と水素結合を形成していた。DNAのらせん軸はGBDの β シートにより良く沿うために、中央のCGステップにおいて約20度屈曲していた。



蛋白質の β シートがDNAの主溝に結合する例としてMetJやArcRなどの報告があるが、いずれも二量体の会合面上に形成された β シートの二鎖は等価で、標的DNA6塩基対もほぼ対称である。これに対して、GBD三鎖 β シートは転写方向の下流（図中下方）でこれに近い様式を用い、HUやIHFに見られる副溝への β シート結合様式に近い形で上流へとさらに延長しており、認識するDNAの長さが延びている。以上の点で新規なDNA認識を明らかにするものである。

図 GBD-DNA 複合体の立体構造： β シート中下方やや濃く表示された領域がMetJやArcRに近い認識モード、黒く表示された領域はHUやIHFに近い認識モード。

【参考文献】 Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M., & Suzuki, M. (1998) EMBO J., in press.

3L12

転写因子の蛋白質間相互作用 — 立体構造、安定性と運動性
(奈良先端大・バイオ,¹阪大・蛋白研) ○白川昌宏、池上貴久、岡田輝政、佐藤滋夫、山口秀幸、尾崎順、三島正規、¹京極好正

Structures and dynamics of transcription factors

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,¹Institute for Protein Research, Osaka University)

Masahiro Shirakawa, Takahisa Ikegami, Terumasa Okada, Shigeo Sato, Hideyuki Yamaguchi, Jun Ozaki, Masaki Mishima, ¹Yoshimasa Kyogoku

Gene transcription in eukaryotes are achieved and regulated by so-called transcription factors, which are general transcription factors and regulatory factors. Responding to the intracellular signals, the action of the transcription factors are regulated by other protein factors, by chemical modifications, physical interactions, regulation of their transportation, etc. In addition, transcription is often coupled with other cellular events in nuclei, i.e. replication, gene repair and recombination. This phenomenon is recently named as "transaction".

The solution structure of different classes of proteins which regulate the action of transcription factors will be presented. They includes the transcriptional co-activator MBF1 from *Bombyx mori* and human, the *E. Coli* sensor kinase ArcB and the Val55 -> Cys mutant of λ -phage Cro protein. In addition to the solution structures, their interactions with other proteins and their dynamic properties will also be discussed.

遺伝子転写は細胞内シグナル伝達に関わる蛋白質を含む様々な蛋白質間相互作用、蛋白質-DNA相互作用によって精密に制御されている。それらはDNA鎖上の制御配列に結合するDNA結合蛋白質、DNA結合蛋白質と基本転写因子にDNA鎖上で相互作用して転写活性化を仲介する転写メディエーター、そしてこれらの蛋白質をリン酸化する蛋白質などが含まれる。また核内では”DNAトランスアクション”と呼ばれる、遺伝子の複製・修復と転写とのカップリングが見られ、転写制御の一要素となっている。

大腸菌ArcBc, ヒトMBF1、カイコMBF1の溶液中での立体構造を決定したので報告する。大腸菌ArcBは外界の嫌気的条件を検出し細胞内へシグナルを伝えるセンサー蛋白質であり、原核生物に多く見られる2-コンポーネントシステムの一つである。そのC末端ドメイン (ArcBc)は外界からのシグナルに应答してキナーゼドメインから受け取ったリン酸基を、DNA結合性の転写調節因子へと受け渡すトランスミッターとして機能する。解析の結果ArcBcは溶液中で5本のヘリックスからなる α

遺伝子転写、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質の動的構造、緩和時間、立体構造決定

しらかわ まさひろ、いけがみ たかひさ、おかだ てるまさ、さとう しげお、
やまぐち ひでゆき、おざき じゅん、みしま まさき、きょうごく よしまさ

ドメイン構造を持ち、リン酸基転移に必要な活性ヒスチジンは蛋白表面に位置するヘリックスの上に位置し、溶媒に露出していることが判った。

ヒト及びカイコMBF1はFTZ-F1, ATF-1などのDNA結合性の転写因子と基本転写因子TBPの双方とDNA上で結合することにより転写活性化を行う150残基程度の転写メディエーターである。酵母からヒトまで広く真核生物に保存されていることからその重要性が指摘されている。ヒト及びカイコMBF1ともDNA結合性の転写制御因子であるFTZ-F1, ATF-1などと結合する部分は溶液中で安定な構造を取らず、TBP結合ドメインは安定な共通したフォールディングを持つ事が判った。また両者は共通して特徴的な正に荷電した Ω 状のループ構造を持つ。

λ ファージCro蛋白質は2量体で特定の回文配列を持つDNAに特異的に結合するリプレッサー蛋白質である。その野生型の溶液構造は以前の本会で発表したのが、今回そのVal55 \rightarrow Cys変異体(CroV55C)の立体構造を決定した。CroV55Cでは水溶液中で自発的に2量体中のサブユニット間でジスルフィド結合が形成され、野生型に比べて著しく熱安定性が向上している。興味深いことにNMRで決定されたCroV55Cの溶液中での立体構造は野生型のそれと殆ど同じであった。サブユニット間の相対的な配向も似通っている。にもかかわらずCroV55Cの特異的DNA結合能は野生型の数分の一程度に減少している。

これらの蛋白質は蛋白質-蛋白質相互作用、蛋白質-DNA相互作用を介して機能する。複合体のNMR測定による化学シフト・パートバージョン法、変異体を用いた解析、立体構造を基にした結合モデルなどにより相互作用部位の解析を行った。またこういった生体高分子間の相互作用には蛋白質の動的構造が大きな役割を果たす。蛋白質については、 ^{15}N 核緩和時間等をもとにしたモデルフリー・フォーマリズムによる解析やスペクトル密度マッピングによるピコ秒-ナノ秒の時間領域の解析、見かけのJ(0)解析によるマイクロ秒-ミリ秒領域の解析、さらに遅い時間領域の解析としてアミドプロトン交換速度の精密な測定によるProtection factorの算出により、広い時間領域の運動性の解析を行うことが出来る。

CroV55Cは立体構造が野生型Croと同一であるのみならず、モデルフリー法による解析によりピコ秒-ナノ秒の時間領域での運動性も似通っている。しかしアミドプロトン交換速度測定によるProtection factorは両者で顕著な相違をしめした。これは遅い時間領域での運動性、或いは安定性に重要な差異が見られることをしめす。また5本のヘリックスを持つ α 構造ドメインタンパク質であるArcBcにおいても、ピコ秒-ナノ秒の時間領域での運動性は個々のヘリックス間で系統的な差異が見いだされないが、アミドプロトン交換速度の精密な測定によるProtection factorの解析はリン酸転移を行う活性ヒスチジンを持つヘリックスのみが有意に低い安定性を示した。これは活性ヒスチジンのリン酸化、脱リン酸化といった機能を説明すると考えられる。これらの蛋白質の動的構造解析を見かけのJ(0)解析によるマイクロ秒-ミリ秒領域の運動性を含めて議論する。

こういった動的構造解析はタンパク質の内部運動のみならず回転拡散の異方性といった外部運動に関する知見をも与える。また外部運動解析によるタンパク質立体構造決定における精密化の手法も考案されている。タンパク質外部運動の解析と構造精密化についても議論する。

3L13

抗体による紫外線損傷DNA認識機構のNMR解析

○嶋田 一夫¹ 加藤 晃一¹, 鳥澤 拓也¹, 山本 展裕¹, 丸木 理世¹, 森岡 弘志², 小松康雄², 二階堂 修³, 大塚 栄子², 荒田 洋治⁴, (東大・院薬系¹, 北大, 院薬², 金沢大, 薬³, 機能水研⁴)

DNA damage, which is caused by ultraviolet light (UV), leads to cell killing, mutation, and neoplastic transformation. At adjacent pyrimidine sites, two major types of photoproducts, i.e., cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts, are formed. Monoclonal antibodies that bind to (6-4) pyrimidine dimers specifically (64M-3, 64M-5) have been established. These monoclonal antibodies have been widely utilized for detection and quantitation of the DNA lesions and proved to be powerful tools for investigating cellular repair systems. A detailed understanding of the mechanisms of antigen recognition of these monoclonal antibodies is required for their further applications, especially as targets for antibody engineering aimed to improve their affinities and specificities and to endow them with catalytic activities as DNA repair. Here we report multinuclear NMR study of interactions between the UV-induced damaged DNA and the Fab fragments of the antibodies against them.

1. 序

紫外線の照射によって生じるDNA損傷は、細胞死、突然変異、形質転換を引き起こす。代表的なDNAの紫外線損傷としては、隣接するピリミジン部位で形成されるcyclobutane pyrimidine dimerおよび(6-4)photoproductが挙げられる。これらの損傷DNAに対するマウスモノクローナル抗体が樹立され、現在では損傷DNAの検出試薬として用いられている。これらの抗体と紫外線損傷DNAの相互作用を高次構造の観点から解明し、それに基づいて抗体の改変を行えば、より親和性、特異性の高い抗体を作製することが可能であり、更にはDNA修復機能を備えた触媒抗体を創製することへと発展することが期待される。本研究では(6-4)photoproductと、それに特異的に結合するマウスモノクローナル抗体64M-5を対象とし、NMRを用いて抗体の紫外線損傷DNA認識メカニズムを解析した。

2. 結果および考察

(6-4)photoproductの高次構造に関して現在までに盛んに研究が行われてきたがデオキシリボースリン酸骨格のコンフォメーションに関する知見は乏しい。そこで、(6-4)photoproductのデオキシリボースリン酸の³¹Pシグナルを指標として、64M-5との相互作用解析を行った。そのために、損傷部位のみから形成されるd(T[6-4]T)と、その両端にヌクレオチドを付加したd(GTAT[6-4]TATG)の³¹P-NMR測定を行った。d(GTAT[6-4]TATG)由来の7個の³¹Pシグナルの帰属はDQF-COSY, TOCSY, ROESY, ¹H-³¹P HSQC および ¹H-³¹P HMQC 測定により行った。その結果、d(T[6-4]T)由来の³¹Pシグナルと、d(GTAT[6-4]TATG)の損傷部位由来の³¹Pシグナルは異なる化学シフトを示すことが明らかとなった。³¹Pの化学シフトはデオキシリボースリン酸骨格の構造を敏感に反映することが知られている。このことから、損傷部位のリン酸骨格のコンフォメーションは、隣接するヌクレオチドの存在によって変化することが判明した。次に(6-4)photoproductと64M-5との相互作用を検討した。64M-5 Fabに結合したd(T[6-4]T)に由来する³¹Pシグナ

損傷DNA, 抗原認識機構, 抗体

しまだいちお, かとうこういち, とりさわたくや, やまもとのぶひろ, まるきりよ, もりおかひろし, こまつやすお, にかいどうおさむ, おおつかえいこ, あらたようじ

ルは-2.97ppmに観測されたが、d(GTAT[6-4]TATG)と64M-5 Fabの複合体のスペクトル中の対応する位置にはP4由来のシグナルは観測されなかった。この結果から、64M-5と結合した状態においてもd(T[6-4]T)とd(GTAT[6-4]TATG)との間で損傷部位のリン酸骨格のコンフォメーションが異なっていることが判明した。したがって64M-5の抗原結合部位はリン酸骨格が異なる(6-4)photoproductに対して異なった様式で適合していることが明らかとなった。

さらに、64M-5との結合状態においては、d(GTAT[6-4]TATG)のP1とP7以外の³¹Pシグナルが化学シフト変化と広幅化を示した。これは5', 3'末端を除くヌクレオチド全体が、64M-5との結合に関与していることを示している。表面プラズモン共鳴法により、損傷部位を含む鎖長の異なるオリゴデオキシヌクレオチドと64M-5 Fabとの解離速度定数(k_{off})を求めたところ、d2merからd6merまではk_{off}が順次小さくなり、d6merとd8merでは変化がなかった。この結果は先の³¹P-NMRの結果と良く一致する。また、d8merと64M-5との結合定数のNaCl濃度依存性を調べた結果、低イオン強度条件下では結合定数が有意に高くなることが分かった。この結果から、64M-5の(6-4)photoproductの認識には、DNAのリン酸基と64M-5の塩基性アミノ酸残基の側鎖との静電相互作用が寄与していることが示唆された。

次に、これらの相互作用における64M-5側の構造情報を得るために、64M-5上の抗原結合部位を決定し、その認識機構の解析を行った。アミノ酸選択的に主鎖アミド基を¹⁵N標識したIgGを調製し、パパイン消化によりFabフラグメントを得た。こうした試料を用いて残基タイプ別に¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定し、ダブルラベル法と、標識Fabと非標識Fabとの間でL鎖とH鎖を組み換えることによって個々のシグナルを位置特異的に帰属した。化学シフト摂動実験の結果、L1, L3, H1およびH3ループがd(GTAT[6-4]TATG)との結合に関与していることが明らかとなった。こうして同定した結合部位の近傍には、顕著なLys残基クラスターが存在しており、これらが先に述べたDNAのリン酸基と静電相互作用していると考えた。

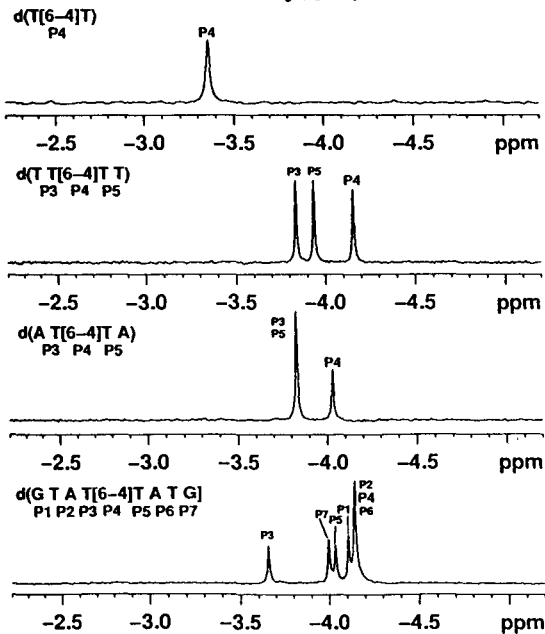


Fig. 1 ³¹P-NMR spectra of DNA containing (6-4) photoproduct

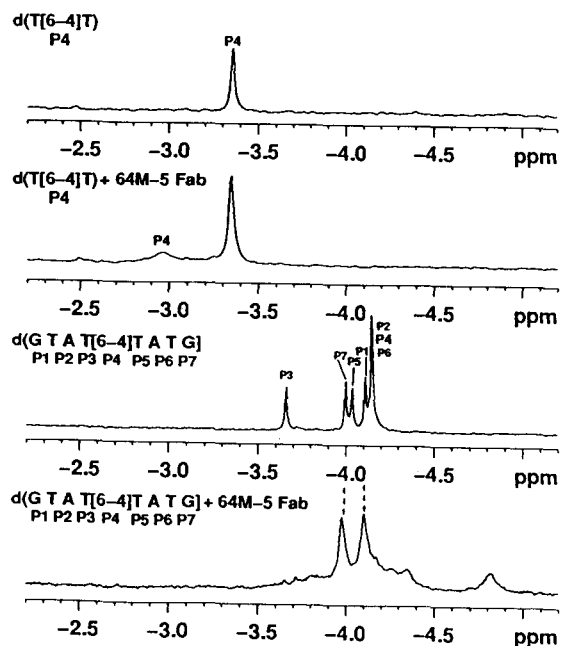


Fig.2 ³¹P-NMR spectra of DNA containing (6-4)photoproduct in the absence and presence of antibody 64M-5 Fab fragment

ポスター発表要旨

P1

Pulse-Gradient Spin-Echo NMR Studies of Protein Solution Behaviour

William S. Price, Fumihiko Tsuchiya and Yoji Arata

Water Research Institute
Sengen 2-1-6
Tsukuba, Ibaraki 305-0047
Japan

Pulse-gradient spin-echo (PGSE) NMR diffusion measurements (1; 2) are becoming a popular means of studying the aggregation behaviour of proteins (e.g., (3; 4)). In interpreting the diffusion data it is often, albeit simplistically, assumed that the proteins are hard spheres and the diffusion coefficient is related to the effective hydrodynamic radius, R_D , via the Stokes-Einstein equation,

$$D = \frac{kT}{f} \quad (1)$$

where k is the Boltzmann coefficient, T is temperature and the friction coefficient, f , is given by

$$f = 6\pi R_D \eta \quad (2)$$

Typically R_D is larger than the molecular radius and the concept of a hydration layer is often invoked to account for this discrepancy. In Eq. (1) it is implicitly assumed that the diffusing species are present at infinite dilution, that is apart from interacting with the solvent, they do not interact with each other. This assumption is not strictly true in concentrated protein solutions since the mean square displacement of the protein molecules in the time scale of the PGSE NMR experiment is larger than the average separation between protein molecules. Another complicating factor is that proteins are charged species and thus have colloidal properties.

In the present study we have probed the aggregation behaviour of two similarly sized proteins, lysozyme and a salt-mediated killer toxin (SMKT), under various conditions (e.g., pH, salt) using PGSE NMR diffusion measurements. In its native state lysozyme is a monomer with a molecular weight of 14320, whereas as SMKT is a heterodimer which under neutral or basic conditions easily separates into its two subunits, α (MW: 6344) and β (MW: 7874), with the α -subunit precipitating and the β -subunit remaining in solution. At low pH these two proteins exhibit quite similar diffusion behaviour but at higher pH their behaviour differs dramatically. The lysozyme diffusion was sensitive to both the salt concentration and pH. As the pH increased the observed diffusion coefficient decreased indicating aggregation. However, the killer toxin had completely different diffusion

Keywords: Aggregation, Crowding, Diffusion, Electrostatic Interactions, Protein

behaviour and the diffusion of the β -subunit was insensitive to the pH (see Fig. 1). The behaviour of the two proteins is contrasted and attempts are made to explain the differences in behaviour between the two proteins.

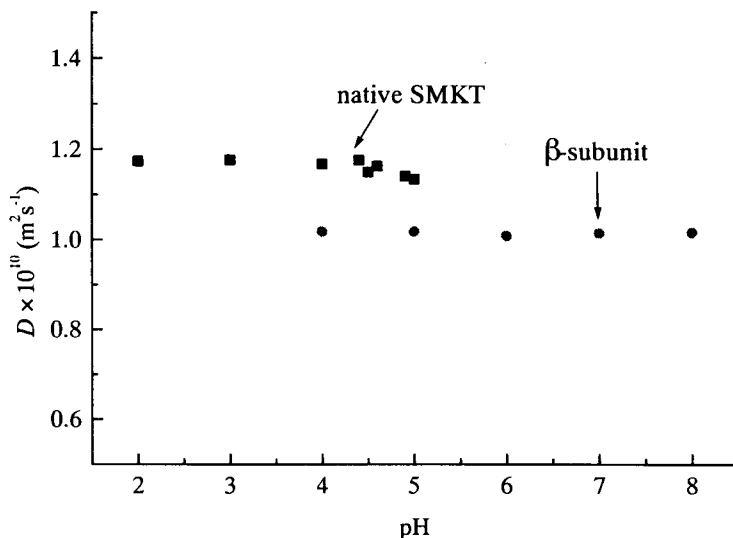


Figure 1. Diffusion coefficient versus pH for the intact SMKT (■) and β -subunit (●). In both cases the samples were dissolved in 2 mM phosphate buffer to give a final concentration of 1 mM. The diffusion coefficient of the SMKT could not be measured above pH 5 due to dissociation of the heterodimer. The very small scatter of the data in the pH ranges where there was no structural change shows the high reproducibility of the diffusion measurements.

References:

1. Price, W.S. 1997. Pulsed Field Gradient NMR as a Tool for Studying Translational Diffusion, Part 1. Basic Theory. *Concepts Magn.Reson.* 9:299-336.
2. Price, W.S. 1998. Pulsed Field Gradient NMR as a Tool for Studying Translational Diffusion, Part 2. Experimental Aspects. *Concepts Magn.Reson.* 10:197-237.
3. Krishnan, V.V. 1997. Determination of Oligomeric State of Proteins in Solution from Pulsed-Field-Gradient Self-Diffusion Coefficient Measurements. A Comparison of Experimental, Theoretical, and Hard-Sphere Approximated Values. *J.Magn.Reson.* 124:468-473.
4. Price, W.S., M. Nara, and Y. Arata. 1997. A Pulsed Field Gradient NMR Study of the Aggregation and Hydration of Parvalbumin. *Biophys.Chem.* 65:179-187.

P2

蛋白質溶液多核測定における3軸PFGを用いた溶媒信号消去
バリアンジャパン(株)NMR応用部 根本暢明○、串田克彦

Solvent Signal Suppression in Multinuclear Solution NMR
Experiments of Proteins Accomplished by Triple Axis PFG

Nobuaki Nemoto and Katsuhiko Kushida
(Application Laboratory, Varian Japan K.K., Tokyo, Japan)

Abstract

We used a triple axis PFG unit and measured several multinuclear NMR spectra of uniformly isotope-labeled proteins in solution distributing PFG axis. In the most pulse sequences we tested such as ^{15}N - ^1H HSQC, ^{15}N edited NOESY or HCCH-TOCSY, the distributed PFG experiments showed better solvent signal suppression than those by conventional Z single axis PFG. This method takes an advantage especially in the experiments that directly-observe $\text{H}\alpha$ protons that is closed to the water resonance. In addition, we discuss another example of solvent signal suppression accomplished by WET-1D with triple axis PFG.

Introduction

In the past years, it is getting popular to equip a triple axis PFG unit with a NMR spectrometer designated to solution NMR experiments. Roughly speaking, spectrometers equipped with triple axes PFG with some waveform generators is equivalent to MRI or MRS spectrometer, therefore, one can use the triple axis PFG unit for the sake of imaging shimming. Actually, such a spectrometer for solution NMR equipped with triple axis PFG retains perfect compatibility to the pulse sequence designed for Z single axis PFG and does not have any serious spectroscopic disadvantages. In other words, it rather may often sound that the imaging shimming would be the most important usage of triple axis PFG unit for paying some extra costs for the three channel D.C. amplifier and the probe. On the other hand, Mattiello et al. showed that triple axis PFG effectively suppresses intermolecular multi quantum (MQ) coherence in MQ filtered COSY (MQF-COSY) experiments¹. In their article¹, they wrote that there was little progress in water suppression in the pulse sequences except for MQF-COSY experiments. We here report applications of triple axis PFG technique to multinuclear experiments, distributing the axis for PFG applied. There are some improvement in solvent signal suppression.

Results and Discussion

We modified following triple resonance pulse sequences designed to isotopic labeled proteins; ^{15}N - ^1H HSQC, ^{13}C - ^1H HSQC; HNCQ, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, C(CO)NH, HC(CO)NH, ^{15}N edited NOESY (NOESY - HSQC) and HCCH-TOCSY with and without COS-FT technique (not all the pulse sequences are shown here) in addition to WET-1D. We used Varian's UNITY INOVA 500 spectrometers with triple resonance (^1H , ^{13}C and ^{15}N) triple axis PFG probe. For the labeled test proteins, we used ubiquitin and calmodulin complex. The original pulse sequences for Z-axis PFG are taken from ProteinPack user-library that is available from the Internet worldwide web page of Varian, <http://www.nmr.varian.com>. In the Figure 1., the pulse sequence of ^{15}N - ^1H HSQC is shown.

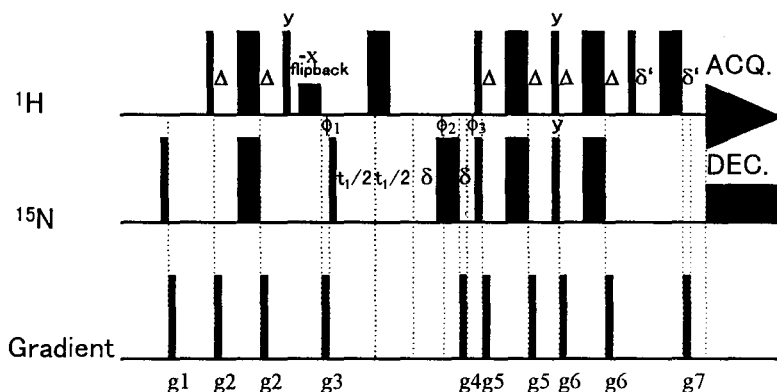


Figure 1. Pulse sequence for ^{15}N - ^1H heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectroscopy. All narrow pulses have a flip angle of 90 degree, while wider pulses have an angle of 180 degree. Pulses for which the phases are not indicated are applied along the x axis. The field strengths employed are as follows; all ^1H pulses = 21.0kHz; ^{15}N rectangular pulses = 6.76kHz; ^{15}N garp decoupling 3.6kHz. To suppress the water signal, 1.7ms of sinc shaped flipback pulse is applied. The delays used are $\Delta = 2.47\text{ms}$, $\delta = 2.5\text{ms}$ and $\delta' = 250\mu\text{s}$. The duration and strengths of the gradients are $g1 = (500\mu\text{s}, 15.9\text{G/cm})$, $g2 = (1\text{ms}, 21.8\text{G/cm})$, $g3 = (1\text{ms}, 15.9\text{G/cm})$, $g4 = (2.5\text{ms}, 25.8\text{G/cm})$, $g5 = (500\mu\text{s}, 4.0\text{G/cm})$, $g6 = (500\mu\text{s}, 6.0\text{G/cm})$ and $g7 = (250\mu\text{s}, 25.8\text{G/cm})$. All gradients are rectangular shape. For a triple axis PFG experiment, gradients are applied along with Z($g1, g4$ and $g7$), X($g6$), Y($g2$ and $g5$) and magic angle ($g3$), respectively. The phase cycle is $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 2x, 2y, 2(-x), 2(-y)$; $\phi_3 = x$; receiver = $x, 2(-x), x$. Quadrature in t_1 is obtained by States - TPPI of ϕ_3 .

Almost all the parameters are same to the original sequence except for the direction of PFG that we applied. In the ^{15}N - ^1H HSQC experiment, the water magnetization is to be aligned by Z axis through the sequence accomplished by the flip back pulse (1.7ms of sinc-pulse) in the middle of the sequence. As shown in Figure 2, there is very little improvement in the ^{15}N - ^1H HSQC, however, on the other hand, in ^{15}N edited NOESY (NOESY - HSQC) experiments, there was a significant difference probably due to the signals from the solute is weaker than those in the HSQC spectrum (cf. Figure 3).

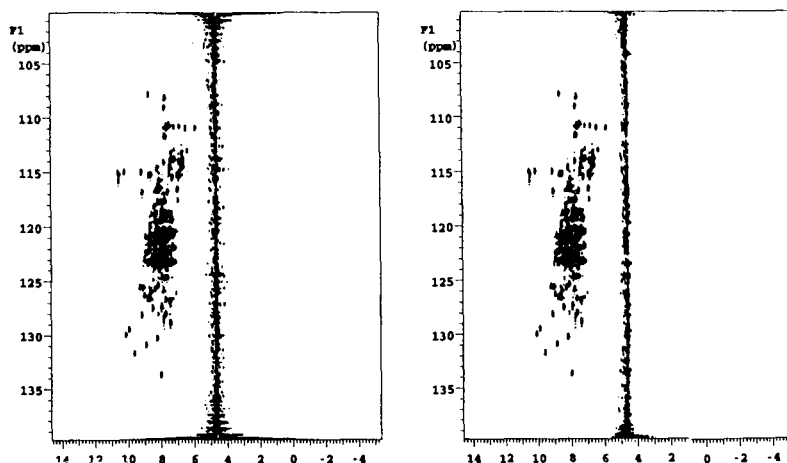


Figure 2. ^{15}N - ^1H HSQC spectra of calmodulin complex. The spectrum measured with Z single axis PFG is shown in the left, whereas that measured with triple axis PFG is shown in the right.

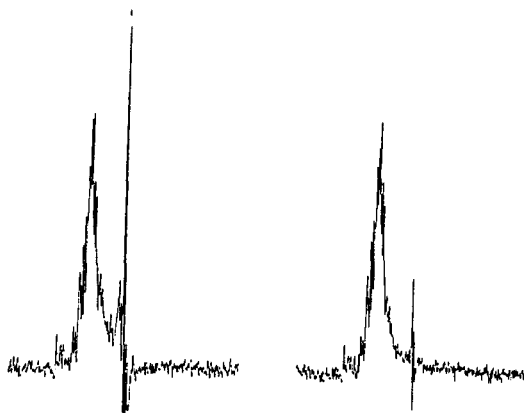


Figure 3. One dimensional spectra of ^{15}N edited NOESY (NOESY - HSQC) of calmodulin complex. The spectrum measured with Z single PFG is shown in the left, whereas that measured with triple axis PFG is shown in the right.

In Figure 4, two dimensional (^1H - ^1H) version of HCCH-TOCSY with COS-FT (doubly enhanced) technique is shown. Although we did not use any shaped pulse for water resonance, water signal was clearly suppressed by an application of triple axis PFG. As shown in Figure 2 or Figure 3, for the sequences that directly-observe amide protons, this technique is not so useful, however, this method takes an advantage especially in the experiments that directly-observe $\text{H}\alpha$ protons that is closed to the water resonance.

In Figure 6, WET-1D spectra are shown. Changes gradient type from Z single axis PFG to triple axis PFG causes almost 40% reduction of the residual water signal.

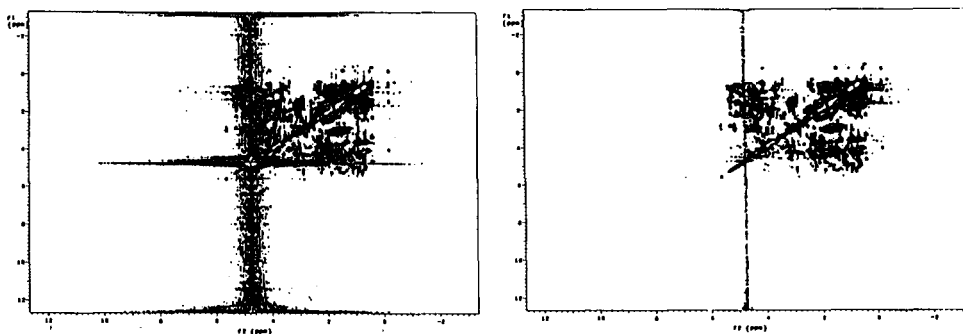


Figure 4. Two dimensional version (^1H - ^1H) of HCCH-TOCSY of ubiquitin. The spectrum measured with Z single PFG is shown in the left, whereas that measured with triple axis PFG is shown in the right.

Summary

As shown here, distributing PFG axis on not only multinuclear experiments but one dimensional experiments like WET-1D may cause some improvement in solvent signal suppression. This method takes an advantage especially in the experiments that directly-observe $\text{H}\alpha$ protons that is closed to the water resonance.

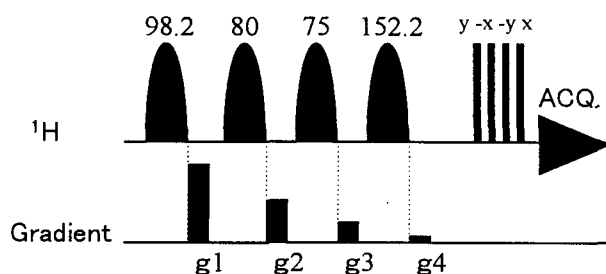


Figure 5. Pulse sequence WET-1D. All narrow pulses have a flip angle of 90 degree, while water selective pulses are shown in half-sine shape with the power in degree. The field strengths employed are as follows; rectangular ^1H pulses = 21.0kHz. For water selective pulses, seduce-1 shaped pulse with 8ms duration are used. The duration and strengths of the gradients are $g_1 = (2\text{ms}, 15.9\text{G/cm})$, $g_2 = (2\text{ms}, 7.9\text{G/cm})$, $g_3 = (2\text{ms}, 3.9\text{G/cm})$ and $g_4 = (2\text{ms}, 1.9\text{G/cm})$. All gradients are rectangular shape. For the triple axis PFG experiment, gradients are applied along with Z(g_1 and g_4), X(g_3) and Y(g_2), respectively.

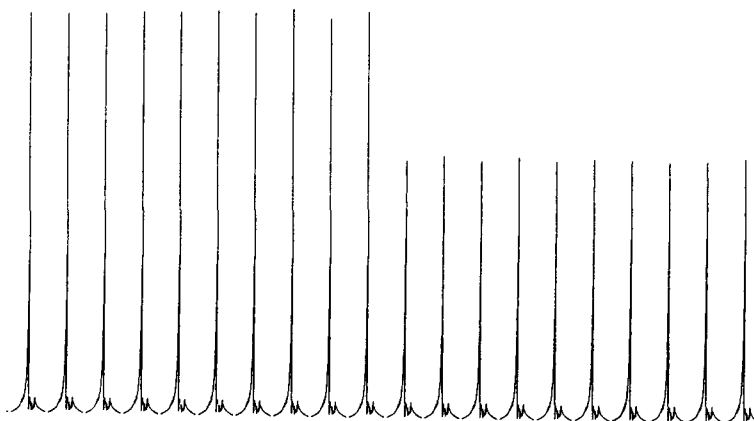


Figure 6. WET 1D spectra. Ten spectrum measured with Z single PFG is shown in the left half, whereas those measured with triple axis PFG is shown in the right half. These spectra were measured by the absorption mode.

Reference

1. Mattiello, D.L. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, pp3253-3261

Acknowledgement

We appreciate Toshiyuki Tanaka (TARA center, Tsukuba Univ., Tsukuba, Japan) who kindly offered experimental time and the use of calmodulin complex.

Keywords

3 軸 PFG (triple axes PFG)、溶媒消去 (solvent signal suppression)、多核実験 (multi nuclear experiment)

ねもとのぶあき、くしだかつひこ

PFG ¹H-NMRによる分子内運動の解析
(サントリー生有研) ○菅瀬謙治、岩下 孝

Local mobility analysis by PFG ¹H-NMR

○Kenji Sugase, Takashi Iwashita
SUNTORY Institute for Bioorganic Research

The determination of diffusion coefficients by means of the pulsed field-gradient (PFG) NMR is a very versatile type of experiment. Diffusion coefficients have been used to monitor molecular transport in biological systems, to study molecular interactions such as ion exchange and drug-protein binding, and to simplify the complex NMR spectra of biofluids. Diffusion coefficients are regarded to be the same magnitude anywhere with in the sample. Here we applied PFG ¹H-NMR to hen egg white lysozyme (HEWL) and found that all of the diffusion coefficients obtained from HEWL weren't the same, which suggests that PFG ¹H-NMR can analyze the local mobility in a sample.

【緒言】

PFG ¹H-NMRは、分子の動的情報を得ることのできる極めて有力な手法である。PFG ¹H-NMRにより得られる拡散係数は、直接的な動的情報であるので、モデルを組み立てる必要のある緩和時間よりも解釈が容易である。また、複数の物質を含む混合溶液では、個々の物質の拡散定数を測定することができるうえに、拡散定数の違いを利用することによりシグナルの分離を行うこともできる。すなわち、生体から抽出した溶液を分離・精製することなしに、生体内に非常に近い条件で測定を行うことが可能である。これまで拡散係数は、1つの物質であればどのシグナルから求めても同じ値になると考えられてきた。しかし、今回、我々はニワトリ卵白リゾチームにPFG ¹H-NMRを適用し、拡散係数が局所的に異なることを明らかにした。

【実験】

拡散係数を測定するために用いたパルスプログラム(Fig.1b)は、BPP-STE (Bipolar Pulse Pair STimulated Echo) にWATERGATEを組み込んだものである。BPP-STEはSTE (Fig.1a) におけるパルス磁場勾配1回照射分を、 π パルスを挟んだ+,-のパルス磁場勾配のペアに置き換えたものである。BPP-STEでは、初めの+,-のペアにより磁化の位相を乱してコヒーレンスを消去し、 Δ だけ分子を拡散させた後、次の+,-のペアで再

PFG ¹H-NMR、拡散係数、分子内運動

すがせけんじ、いわしたたかし

びコヒーレンスを復活させる。パルス磁場勾配を+,に照射するのは、パルス磁場勾配照射により発生する渦電流を、互いに打ち消しあうようにするためである。また、 π パルスを入れることにより、スピンエコーを形成して化学シフトの展開も消去される。

測定は、Bruker DMX-750を用いて308°Kで行った。各種待ち時間は $\delta=1\text{ms}$, $\tau=520\mu\text{s}$, $\Delta'=50.52\text{ms}$ とした。測定試料のニワトリ卵白リゾチームは、400 μl (90% H_2O /10% D_2O) で濃度が7.0mM, pH3.8の溶液を用いた¹⁾。

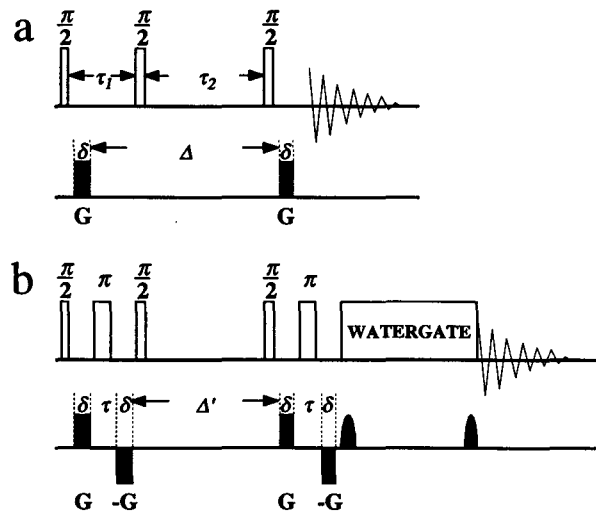


Fig.1 Pulse sequence for the measurement of diffusion coefficients: (a) STE and (b) BPP-STE incorporated with WATERGATE

【結果および考察】

Fig.2 (黒色, G=100%; 灰色, G=1%) は、ニワトリ卵白リゾチームのBPP-STEスペクトルの拡大図である。1%のスペクトルを0.385倍すると、2つのスペクトルが0.4~0.6ppm付近ではちょうど重なり合う。Fig.2以外の領域でも易動性のシグナル以外はほぼ重なる。しかし、0.8~1.3ppm付近 (Leu, Thr, Ile, Valの CH_3 シグナルなど¹⁾) では明らかに異なっている。ニワトリ卵白リゾチームの拡散係数が分子全体で一定であれば、スペクトルは完全に重なり合うはずである。しかし、このような違いが現れたのは、分子内の運動性の違いが拡散係数の違いとしてスペクトル上に現れたものと考えられる。現在、より詳細を明らかにするために解析中である。

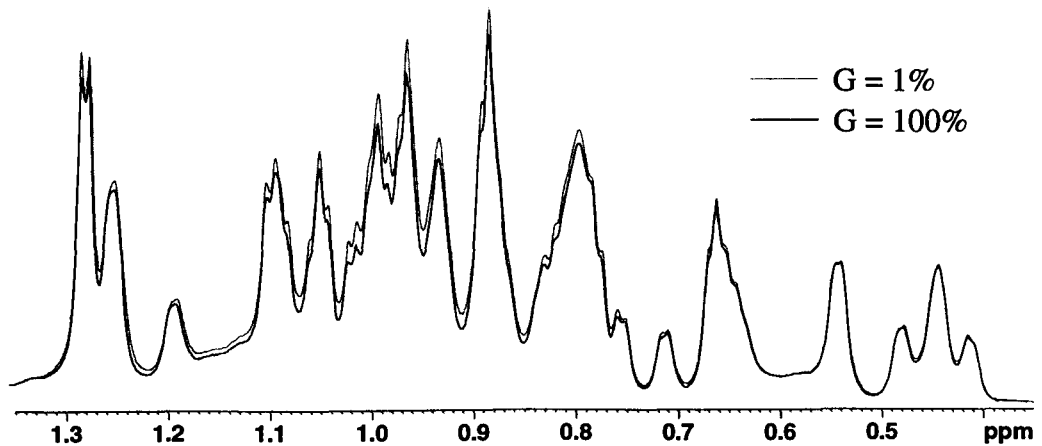


Fig.2 Expansion of BPP-STE spectra obtained from HEWL

1) Christina Redfield and Christopher M. Dobson, *Biochemistry*, 1988, 27, 122-136

P4

インテインを利用した蛋白質の部分標識

(阪大蛋白研¹、大阪工業技術研²、生体分子工研³)

○山崎俊夫¹、大友崇紀¹、京極好正¹、上垣浩一²、伊藤暢聡³、中村春木³

Segmental Labeling of Protein using Intein (Institute for Protein Research, Osaka University¹, Osaka National Research Institute², Biomolecular Engineering Research Institute³) Toshio Yamazaki¹, Takanori Otomo¹, Yoshimasa Kyogoku¹, Koichi Uegaki², Nobutoshi Ito³, Haruki Nakamura³

Partial isotope labeling of protein is achieved by ligation of labeled and unlabeled peptide segments. Intein, which naturally causes self-splicing of peptide, was divided into two fragments and mixed in vitro. After refolding, the two-piece intein recovered its activity. The preceding (the N-terminal half of the target protein) and succeeding (the C-terminal half of the target protein) peptide fragments were ligated by the splicing reaction. We applied this technique to a small protein consisting of 90 amino acids and a large protein consisting of 370 amino acids and successfully obtained segmentally labeled protein samples. Because continuous residues are labeled, all kinds of triple resonance spectroscopies for assignment of resonances and NOE spectroscopies for structure determination can be applied without heavy signal overlapping.

蛋白質のペプチド鎖にそった区分の標識法を開発した。標識した部分ペプチドと無標識の残りのペプチドをペプチド結合でつないだ。このライゲーションには、インテインと呼ばれる自己スプライシングを行う蛋白質を用いた。スプライシングの結果、インテインより N 端側のペプチド鎖と C 端側のペプチド鎖がつながる。また、インテインを途中で2つに分け別々に発現し、試験管内で混ぜることによってスプライシング機能が回復することができた。インテインの両端に目的蛋白質の部分ペプチドを遺伝子上で組み入れ、独立に発現して、試験管内で目的蛋白質の前半ペプチドと後半ペプチドをつなぐことに成功した。発現時に前半(後半)のみを標識すると前半(後半)が標識された蛋白質ができる。90 アミノ酸からなる *E. coli* RNA polymerase α subunit の C 末端ドメインと、370 アミノ酸からなる maltose binding protein で部分標識に成功した。現時点での技術では、接続部は突き出たループであることと、Gly-Thr の余分なアミノ酸が挿入されることが必要条件であるようだ。この部分標識法は、ペプチド鎖上連続した部分が標識されているので、3 重共鳴法による帰属などがそのまま適用できる。また重なりが最も深刻な NOESY に用いれば、蛋白質の構造を部分的に求めながら全体を組み立てることができる。

インテイン、ペプチドスプライシング、ペプチドライゲーション

やまざき としお、おおとも たかのり、きょうごく よしまさ、うえがき こういち、いとう のぶとし、なかむら はるき

P5

東大院農・応生化、*東大・分生研
○降旗一夫、*瀬戸治男

We present a new HMBC technique named J-resolved HMBC which enables to measure easily the long-range C-H J couplings. In the conventional HMBC spectra, the HMBC cross peaks contain information on the long-range C-H J splittings and/or H-H J splittings. However, due to the poor resolution in the F_2 or F_1 dimension, it is difficult to measure directly the long-range C-H J couplings from HMBC cross peaks.

In order to solve this problem, we have incorporated the J-scaling method into HMBC and developed a new technique, J-resolved-HMBC. This modification enables to detect long range C-H J couplings of complicated compounds. Advantages of this method are simple operation, high sensitivity and general applicability. This technique does not require any requirements on the character of the particular NMR spectrum.

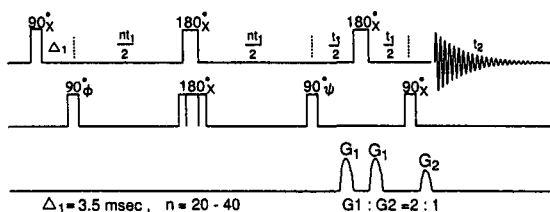
天然有機化合物の構造解析において、long-range J_{CH} を如何にして効率良く測定するかが重要な課題の一つである。HMBC法は、long-range J_{CH} を利用した相関ピークを検出するために、広範に利用されている測定法であるが、そのクロスピークから直接long range J_{CH} を読みとることは困難である。この問題を解決するため、inverse法によるlong range J_{CH} の測定法が多数提案されているが、条件設定が困難、観測領域が制限される、あるいは解析が困難である等の欠点を有している。

HMBC法では、 f_2 軸方向には J_{HH} や J_{CH} のスピン結合によるJ-分裂が観測されるが、実際の測定では、 f_2 軸方向のJ-分裂クロスピークから直接スピン結合定数を検出することは困難である。この問題を解決する一つの方法として、J-scaling法^{1)~3)}を応用し、 f_1 方向の見かけ上の分解能を高めて J_{CH} を測定する、J-resolved-HMBC法を検討し良好な結果を得ることができたので報告する。

パルス系列

図1にパルス系列J-resolved-HMBC-1, -2を示す。HMBC法の磁化は、炭素の化学シフトと、プロトン-プロトンのスピン結合で展開するが、プロトンと炭素のスピン結合では時間展開していない。しかも、 Δt_1 は短く設定されるため、 f_1 方向において、プロトンのスピン結合が検出できるほどには t_1, max を展開していない。スピン結合定数が測定できるまで分解能をあげるためには、 t_1, max が300msから500ms位までになるよう時間展開する必要があるが、実際にはこのような大きな値になるまで展開することは現実的ではない。そ

J-resolved-HMBC-1



J-resolved-HMBC-2

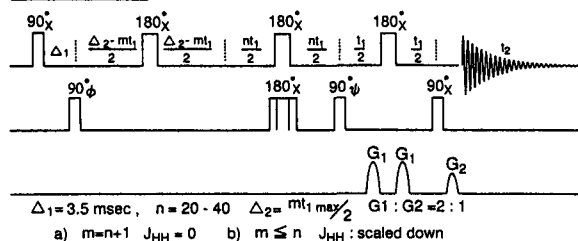


図1. パルス系列

(a) J-resolved-HMBC-1 (b) J-resolved-HMBC-2

キーワード J-resolved-HMBC
ふりはた かずお、せと はるお

ここで、スピン結合に対しては、 $t_{1,max}$ が300~500msまで時間展開し、なおかつ、プロトン-炭素のスピン結合も検出できるように、スピン展開時間 (Δ_2) のところをJ-scalingパルス ($-nt_1/2-180(H,C)-nt_1/2-$)で置き換える (図1)。その結果、HMBC磁化は化学シフトに対しては t_1 、プロトン-プロトンのスピン結合は $(n+1)t_1$ 、そして、炭素とのスピン結合に対しては nt_1 で時間展開し、 f_1 方向において、 J_{CH} 、 J_{HH} のスピン結合を検出する。

2D-J-分解法の t_1 の時間展開の設定においては、 $t_{1,max}$ は観測するスピン結合定数 $1/J$ のオーダーを越えるように設定しなければならない。このオーダーよりも小さな値で測定した場合はスペクトルのサンプリング定理が満たされず、スピン結合定数は観測できない。例えば、 $J=2\text{Hz}$ を観測するためにはdigital resolutionが2Hz以下、 $t_{1,max}$ が500msec以上になるように設定する。J-resolved-HMBC法においても、J分解スペクトルの時間展開パラメーターと同様に $nt_{1,max}$ がスピン結合定数 $1/J$ のオーダーを越えるようにscaling factor (n)を設定する。その結果、スピン結合定数は実際の値よりも J_{CH} においてn倍、 J_{HH} においてn+1倍の値として観測される。

J-resolved-HMBC スペクトル

図2 はJ-resolved-HMBCのスペクトル(左)とクロスピーク(右)の模式図である。

J-resolved-HMBC-1スペクトルでは、 J_{CH} のJ-分裂が J_{HH} とともにscale upされて観測される。そのクロスピークは、J-分解スペクトルにおけるクロスピークのパターンと同じであり、プロトン-プロトンのJ-分解クロスピークとプロトン-炭素のJ-分解クロスピークの二種類が同時に検出される。一つのプロトンに対する f_1 方向のクロスピークはn倍の J_{CH} と(n+1)倍の J_{HH} に分裂して観測され、しかも、プロトンの J_{HH} -分裂は、すべて同じパターンを与える。この nJ_{CH} と $(n+1)J_{HH}$ から、long range J_{CH} と J_{HH} の値を算出することができる。J-reso-HMBC-2において、 $m=n+1$ に設定した場合は、プロトン-プロトン間のJ-modulationの効果が一定に保持されるために(constant time method)、プロトン-プロトンの J_{HH} はデカップルされる。そのためシグナルはn倍の J_{CH} のみの分裂となり、解析は非常に簡単になる。し

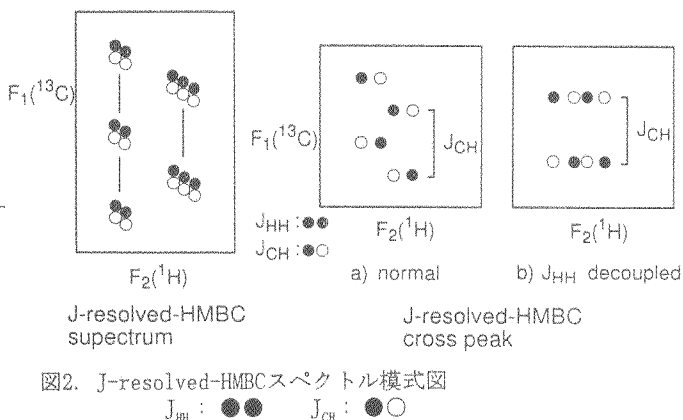


図2. J-resolved-HMBCスペクトル模式図

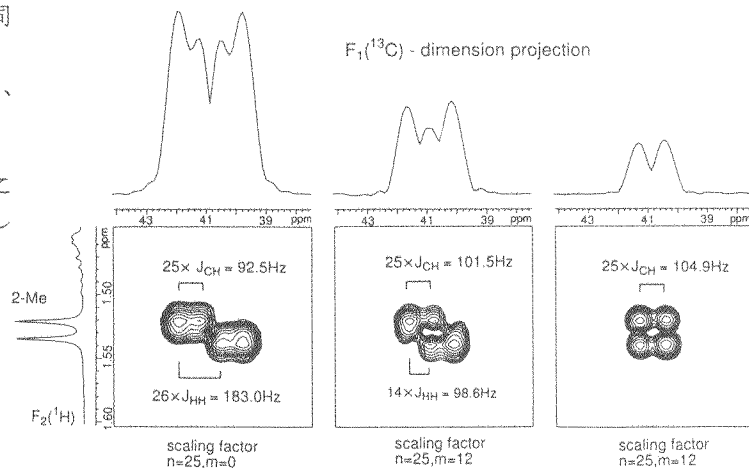


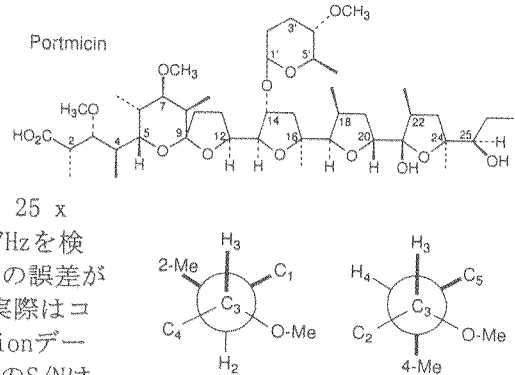
図3. portmicinのJ-resolved-HMBC スペクトル

- a) パルス1、n=25 b) パルス2、n=25、m=12
 - c) パルス2、n=25、m=26
- $f_1 \times f_2 = 14000 \times 2250 \text{ Hz}$, point=230 x 1024
 $nt_{1,max} = 410\text{ms}$, scans = 64

かし、constant time method を使用しているためスペクトルのS/Nは大きく低下する。 $m \leq n$ の時は、 J_{CH} の値はn倍で観測されるのに対して、プロトン-プロトンの J_{HH} の値は $n+1-m$ 倍にscale downする。従って $m=n+1$ に設定した場合に比べ Δ_2 を短く設定できるため、スペクトルのS/Nは僅かに改善される。複雑なクロスピークを解析する場合には、 J_{HH} のscale downをはかり、 J_{CH} の値を読みやすくすることも重要である。

ポートミシンのJ-resolved-HMBCスペクトル

図3はポートミシンのJ-resolved-HMBCスペクトルであり、2位のメチルプロトンから、2位の炭素とのクロスピークである。a)では $26 \times J_{HH}=183.0 \text{ Hz}$ 、 $25 \times J_{CH}=92.5 \text{ Hz}$ を、b)では $25 \times J_{CH}=101.5 \text{ Hz}$ と $14 \times J_{HH}=98.6 \text{ Hz}$ を観測している。c)では J_{HH} はdecoupleされ、 $25 \times J_{CH}=104.9 \text{ Hz}$ のみが観測され、 $J_{CH} \approx 4 \text{ Hz}$ 、 $J_{HH} \approx 7 \text{ Hz}$ を検出した。scale upした J_{CH} の値において数10 Hzの誤差が生じているが、誤差自体もscale upされる。実際はコンマ数Hzの誤差であった。 f_1 軸方向のprojectionデータは、スペクトルのS/Nを示す。クロスピークのS/Nはa)→b)→c)の順に低下している。



c)の実験のように、 J_{HH} をdecoupleするためにconstant time法を導入した場合は、S/Nの低下は避けられない。そのため、分子量の大きな複雑な化合物への応用は困難である。

図4はポートミシンの3位のプロトンからのクロスピークを示す。3位と4位のプロトンはスピン結合定数1.5Hzで、gaucheの関係にある。この場合C4に結合した4-MeとC5が、3位のプロトンに対してどちらがantiで、どちらがgaucheなのか、プロトンのスピン結合定数からは判別出来ない。このようなとき、long range J_{CH} を利用することによりこの関係が証明出来る。

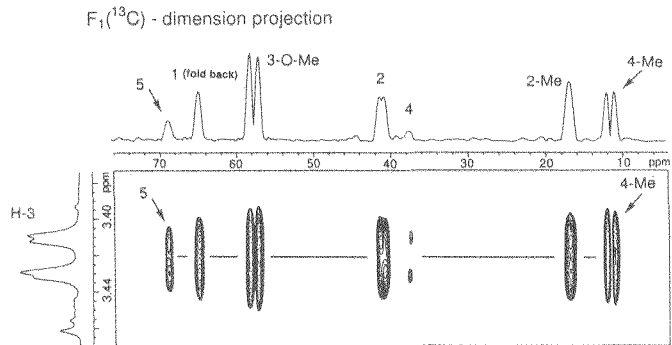


図4. portmicinのJ-resolved-HMBC-2 スペクトル
 $f_1, f_2=14000 \times 2250 \text{ Hz}$, point=230 x 1024
 scaling factor(n)=25, $nt_1, \text{max} = 410 \text{ ms}$, scans = 64

スペクトルからH3と4-Meとの間で $25 \times J_{CH}=129.7 \text{ Hz}$ が観測されたことより、 J_{CH} を5.2Hzと決定した。その結果、3位のプロトンに対して、4-Meがanti、C5がgaucheの関係にあることが容易に判明した。また、2位と3位のプロトンのスピン結合定数9.7Hzであることから、C1と2-Meは、ともにgaucheの関係にあることが予想され、そのlong-range J_{CH} は3Hz以下であった。

モノゾマイシンへの応用

図5. にJ-resolved-HMBC-1のスペクトルを示す。モノゾマイシンのような複雑な構造を有する化合物では T_2 が短いため、J-resolved-HMBC-1を使用した。scaling factor (n)=25、データポイント $t_1, x t_2=512 \times 1024$ 、測定幅 $f_1 \times f_2=23000 \times 2900 \text{ (Hz)}$ 、 $nt_1, \text{max}=555 \text{ ms}$ 、scan数128回のデータである。window関数としては、 f_1 軸、 f_2 軸とも、sine bellを使用した。H47とH48は3Hzでスピン結合し、gaucheの関係にあるが、48-MeとC49は、H47に対してどちらがantiで、どちらがgaucheで

あるかを判別することは出来ない。しかし、スペクトルから、H47とC49の間で $25 \times J=135\text{Hz}$ が観測され、long-range J_{CH} が5.5Hzと決定されたことから、H47とC49はantiの関係にあることが容易に判明した。また、48-Me、46-Me、C45の間のスピン結合定数は3Hz以下であることから、H47位のプロトンに対してgaucheの相対配置をとっていることが判明した。

J-resolved-HMBC法は、観測するスピン結合定数の大きさに応じて、 nt_{max} を250msec (4Hz)から500msec (2Hz)ぐらいまで時間展開しなければならない。そのため、通常のHMBC法に比べて、かなりスペクトルのS/Nが低下する。実際の測定に当たっては、このS/Nの低下を考慮して積算時間を設定することが重要である。

まとめ

天然有機化合物のantiであるかgaucheであるかの相対立体配置の決定において、HETLOC法を使用した方法が報告されているが、HETLOC法では、プロトン-プロトンがgaucheの関係をとっている場合は、スペクトルのS/Nが低く、long range J_{CH} を観測することが困難となる。これに対して、J-resolved-HMBC法では、プロトン-プロトンがgaucheの関係をとっている場合、anti配位の炭素シグナルの J_{CH} の観測は非常に容易である。また、4級炭素で切断されたスピン系に対しても応用が可能であり、antiであるかgaucheであるかの相対立体配置の決定が容易に行うことが出来ることが判明した。

J-resolved HMBC法は通常のHMBC法よりはS/Nは劣る。また、pure absorption modeでの測定ができないという欠点も有している。しかし、HMBCと同様、測定は容易であり、しかも、複雑な化合物にも適用が可能であり、実用的には他の方法にひけをとらないと考えられる。

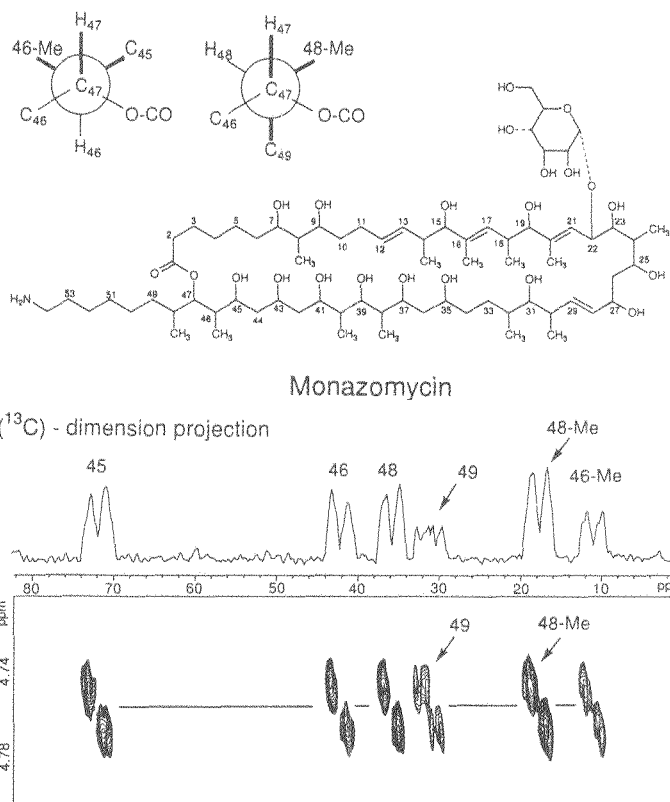


図5. monazomicin J-resolved-HMBC-1スペクトル
 $f_1, f_2 = 23000 \times 2900\text{Hz}$, point=512x1024,
 scaling factor(n)=25, $nt_{\text{max}}=555\text{msec}$, scan=128

- 1) R. V. Hosur, M. Ravikumar, and A. Sheth, J. Magn. Reson. 65, 375 (1985).
- 2) V. V. Krishnamurthy, J. Magn. Reson. B 113, 46 (1996).
- 3) V. V. Krishnamurthy, J. Magn. Reson. A 121, 33 (1996).

(北大・理) ○熊木康裕 引地邦男

Determination of sign of long-range ^1H - ^{13}C scalar coupling constant for non-protonated carbon

○Yasuhiro Kumaki* and Kunio Hikichi**

High-Resolution NMR Laboratory* and Division of Biological Sciences**,
Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo

The sign of scalar coupling between carbonyl carbon and α proton ($J_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$) relative to those between amide proton and α proton ($^3J_{\text{HNH}\alpha}$) are determined by an E.COSY-type HSQC experiment for cyclic dipeptide cyclo(Leu-Gly). The pulse sequence used in this experiment gives cross-peaks of amide protons and carbonyl carbons which show E.COSY-type tilt due to α protons. The determination of the sign of $J_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$ makes it possible to distinguish between two-bond (intra-residue) and three-bond (inter-residue) $J_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$. We assign carbonyl carbons of cyclic dipeptide cyclo(Leu-Gly) by this sign information.

<序論>

HMBC 法は四級炭素の帰属を行う上で有力な手法であるが、この手法では 2 つの共有結合を隔てた ^1H - ^{13}C スピン結合 ($^2J_{\text{CH}}$) による相関と 3 つの共有結合を隔てた ^1H - ^{13}C スピン結合 ($^3J_{\text{CH}}$) による相関を区別することが困難であるという問題点がある。一般に $^2J_{\text{CH}}$ と $^3J_{\text{CH}}$ の絶対値に大きな差がないことがその原因である。しかしながら一般に $^2J_{\text{CH}}$ 及び $^3J_{\text{CH}}$ の符号はそれぞれ負、正であることが知られており⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾、符号を決定することによってこれらを区別することが可能である。

水素原子と結合している炭素に関しては、 ^1H - ^{13}C 遠隔スピン結合 ($^nJ_{\text{CH}}$) の符号は HETLOC(X-half-filtered TOCSY) 法で知ることが可能であるが、1 つの共有結合を隔てた ^1H - ^{13}C スピン結合 ($^1J_{\text{CH}}$) を持たない四級炭素に関してはこの方法は利用できない。Otting らは ^1H - ^{13}C 遠隔スピン結合の ^1H 同種核スピン結合に対する相対符号を決定するいくつかの方法を提案した⁽⁴⁾。これらの方法は ^{13}C とスカラー結合している ^1H が他の ^1H とスカラー結合している場合に適応可能である。

ここではこれらの手法のうち HSQC を基本とした E.COSY 法を環状ヘフチド cyclo(Leu-Gly) に応用した例を報告する。このヘフチドの 2 つのアミドプロトン (H_N) は 2 つのカルボニル炭素 (C') と 2 つ (残基間) ないしは 3 つ (残基内) の結合を隔てており、 H_N - C' の相関のみでこれらを区別することは困難である。HSQC を基本とした E.COSY 法で得られる H_N - C' の交差信号は、 C' と α プロトン (H_α) 間のスピン結合 ($^nJ_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$) の H_α - H_N 間のビシナルスピン結合 ($^3J_{\text{HNH}\alpha}$) に対する相対符号の情報を与える。2 つの結合を隔てた $J_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$ ($^2J_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$) と 3 つの結合を隔てた $J_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$ ($^3J_{\text{C}^{\text{H}_\alpha}}$) の符号の違いに注目することで、 H_N - C' の交差信号が残基内、及び残基間のどちらの連結に由来しているのかを決定した。

<パルスシーケンス>

本研究で使用したパルスシーケンスを図 1 に示す。最後の選択的 $\pi/2$ パルスで励起された ^1H は最終的に相関信号として観測されるが、この相関信号は最後の選択的 $\pi/2$ パルスによって励起されない他の ^1H との受動スピン結合によって E.COSY タイプに分裂する。このパルスシーケンスの展開時間は、 F_1 軸において符号の決定に関係のない不要な $^nJ_{\text{CH}}$ を選択的 ^1H ハルスによって消去し、それ以外の ^1H とのスピン結合を ^{13}C の化学シフトに対してスケールリングするように設計されている。これによって F_1 軸方向の微細構造は簡略化され、また F_1 軸方向のデジタル分解能が遠隔 ^1H - ^{13}C スピン結合定数と同程度の場合においても E.COSY タイプの微細構造を観測することが可能となる。

四級炭素、スピン結合定数の符号

○くまき やすひろ、ひきち くにお

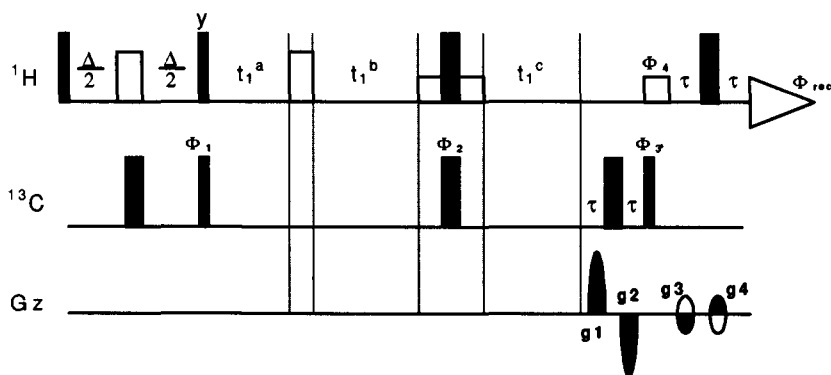


Fig.1. Pulse sequence for sign determination of long-range ^1H - ^{13}C scalar coupling constant for non-protonated carbon. Filled thick bar and thin one represent $\pi/2$ and π pulses, respectively. Open long bar and short one represent, respectively, π and $\pi/2$ pulses, which are applied to selective protons. Δ is the duration of evolution of long-range ^1H - ^{13}C coupling. Durations of pulsed field gradient and subsequent recovery time are τ . Quadrature detection in t_1 is obtained by Rance method, in which signs of g_3 and g_4 are reversed. The amplitude ratio of gradients g_1 , g_2 , g_3 , and g_4 is given by $\gamma_{\text{H}}:-\gamma_{\text{H}}:\gamma_{\text{C}}:-\gamma_{\text{C}}$. Phases are cycled as follows: $\Phi_1 :x,-x$; $\Phi_2 :8x,8y,8(-x),8(-y)$; $\Phi_3 :2x,2(-x)$; $\Phi_4 :4x,4(-x)$; $\Phi_{\text{rec}} :x,2(-x),x,2(-x),2x,-x$, $x,2(-x),x$. The evolution time is as follows: $t_1^a = \frac{1}{2}t_1$, $t_1^b = \frac{\lambda}{2}t_1$, $t_1^c = \frac{\lambda-1}{2}t_1$. λ is a scaling factor of passive coupling splitting evolution ($\lambda > 1$).

< 試料と方法 >

試料として 92mM の環状ジヘフチド cyclo(Gly-Leu) の DMSO- d_6 に溶液を使用した

測定温度は 32°C である。使用した装置は日本電子製 ALPHA600 とナロラック製 HCN 三重共鳴磁場勾配プローブである。 ^1H の選択及び非選択パルス及び ^{13}C の RF パルスのキャリア周波数はそれぞれ選択パルスの照射中心はそれぞれ 2 つの H_N 及び C' 信号の中間領域とした。 ^1H 選択的 $\pi/2$ パルス及び π パルスとして磁場強度がそれぞれ 0.68kHz、及び 1.5kHz の矩形波パルスを使用した。 Δ は 74.6msec、スケール因子は 3、積算回数は 64 回とした。

スペクトルは F_2 軸に関して純分散、 F_1 軸に関して純吸収波形となるように位相補正を行い、正の信号のみを等高線表示させた。

< 結果 >

図 1 のパルスシーケンスで測定された cyclo(Leu-Gly) のスペクトルの H_N - C' 領域を図 2a に示す。それぞれの H_N は 1 つの C' のみと相関を示しており、このことはこれらの相関が残基間あるいは残基内のどちらか一方のみの連結によるものであることが分かる。図 3a、3b はそれぞれ $\text{H}_\text{N}(\text{Leu})$ - C'_B 、 $\text{H}_\text{N}(\text{Gly})$ - C'_A の相関信号の拡大図である。それぞれの相関信号は受動スピン結合によって生じた微細構造を示している。

DQF-COSY 及び HMBC の結果から $\text{H}_\text{N}(\text{Leu})$ と C'_B の両方と、及び $\text{H}_\text{N}(\text{Gly})$ と C'_A の両方とスピン結合をしている ^1H はそれぞれ $\text{H}_\alpha(\text{Leu})$ 及び $\text{H}_{\alpha 1}(\text{Gly})$ 、 $\text{H}_{\alpha 2}(\text{Gly})$ であることが確かめられた。よって図 3a、3b の微細構造に含まれている E-COSY タイプの分裂を与える受動スピン結合はそれぞれ $\text{H}_\alpha(\text{Leu})$ 及び $\text{H}_\alpha(\text{Gly})$ との受動分裂によるものである。

図 3a 及び 3b において F_1 軸方向に E-COSY タイプの分裂を与えている 3 つの J_{CH} ($J_{\text{C}'(\text{B})\text{H}_\alpha(\text{Leu})}$, $J_{\text{C}'(\text{A})\text{H}_\alpha 1(\text{Gly})}$, $J_{\text{C}'(\text{A})\text{H}_\alpha 2(\text{Gly})}$) の絶対値は 5~7Hz の範囲にあることが long-range HSQC 実験⁽⁵⁾ によりわかっており、この場合これらが ^2J であれば負⁽²⁾、 ^3J であれば正⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ となる。また Karplus の関係式により $^3\text{J}_{\text{H}_\text{NH}_\alpha}$ の符号は正⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ であるから、図 2 の 2 つの H_N - C' の相関が残基間の連結によるものであれば、E-COSY タイプの分裂は正の傾き(図 4)、残基内の連結によるものであれば負の傾き(図 5)を

示すことになる。なお図 4、5 の模式スペクトルに現れている全ての受動スピン結合による分裂は、DQF-COSY 及び long-range HSQC 実験の結果に基づいている。図 3 の実測スペクトルと図 4、5 の模式図と比較により、2 つの H_N-C' の相関は残基内の連結によることが明らかとなった。

<参考文献>

- (1) Atta-ur-Rahman, "Nuclear Magnetic Resonance", Springer-Verlag, New York, 1986.
- (2) V.F.Bystrov, Prog.NMR Spectrosc. **10**, 41 (1976).
- (3) J.Kowalewski, Prog.NMR Spectrosc. **11**, 1 (1977).
- (4) G.Otting, B.A.Messerle, and L.P.Soller, J.Am.Chem.Soc. **119**, 5425 (1997)
- (5) L.Poppe, H. van Halbeck, J.Magn.Reson. **92**, 636 (1991)
- (6) V.F.Bystrov, Yu.D.Avrilov, and V.N.Solkan, J. Magn.Reson. **A110**, 118 (1994).
- (7) V.N.Solkan and V.F.Bystrov, Bull.Acad.Sci.USSR **23**, 1232 (1974).
- (8) L.F.Kao and M.Barfield, J.Am.Chem.Soc. **107**, 2323 (1985).
- (9) V.F.Bystrov, S.L.Portnova, V.I.Tsetlin, V.T.Ivanov, and Yu.A.Ovchinnikov, Tetrahedron **25**, 493 (1969).
- (10) V.F.Bystrov, V.T.Ivanov, S.L.Portnova, T.A.Balashova and Yu.A.Ovchinnikov, Tetrahedron **29**, 873 (1973).
- (11) A.Pardi, M.Billeter, and K.Wuthrich. J.Mol.Biol. **180**, 741 (1984).

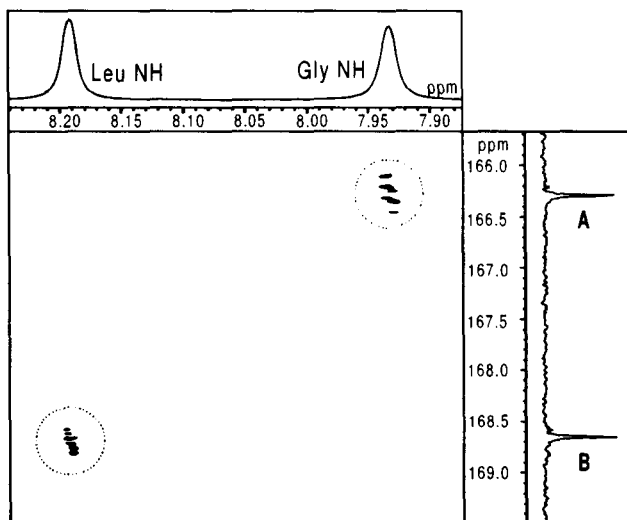
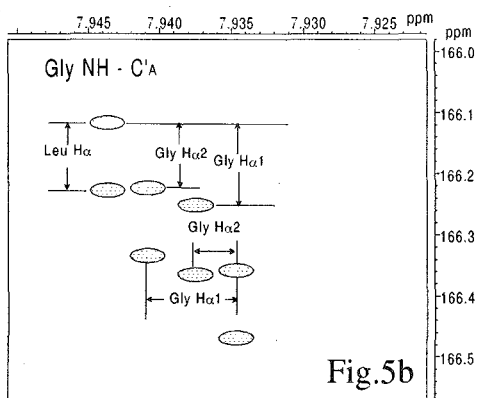
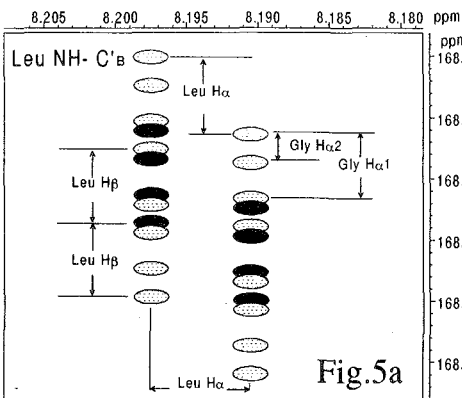
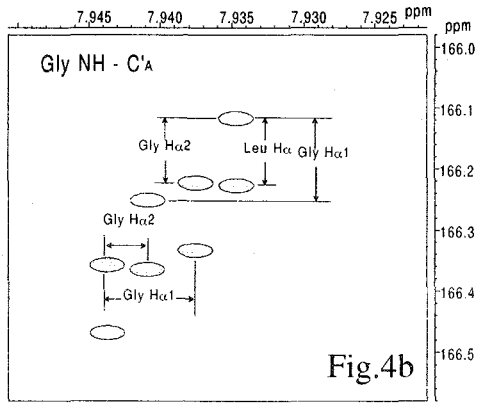
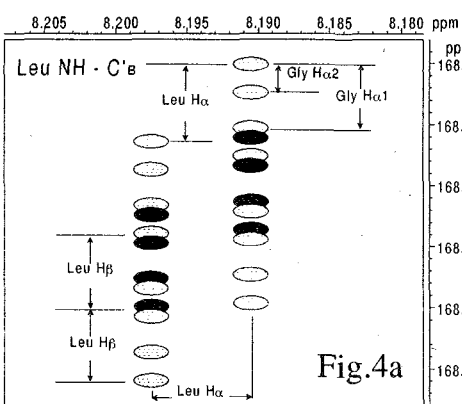
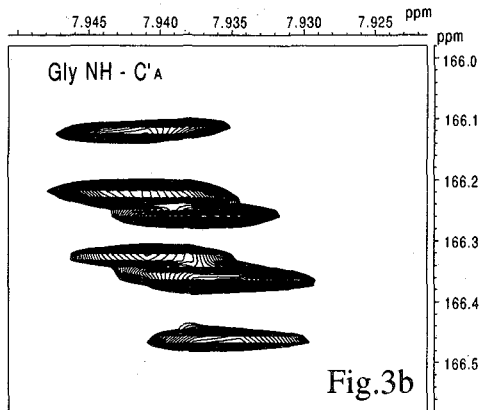
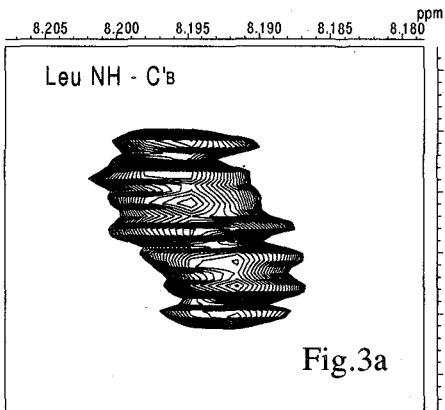


Fig.2 : The H_N-C' region of 2D spectrum of cyclo(Leu-Gly) measured by the pulse sequence shown in Fig.1.

Fig.3 (upper in next page): Enlarged spectrum of the cross-peak shown in Fig.2. Fig.3a corresponds to the cross-peak of $H_N(\text{Leu})$ and carbonyl carbon B(C'_B). Fig.3b to that of $H_N(\text{Gly})$ and carbonyl carbon A(C'_A)

Fig.4 (middle in next page): Schematic spectra in cases where active couplings are inter-residue ones.

Fig.5 (lower in next page): Schematic spectra in cases where active couplings are intra-residue ones.



gs-PASS-TOCSY and its application

(Fac. Agric. Hokkaido Univ.) Eri Fukushi and Jun Kawabata

A resolution enhanced and time-saving 1D version of HETLOC spectrum; PASS (Paired satellite selection)-TOCSY was improved to gs-PASS-TOCSY using coherence selection by pulsed field gradient. The gs-PASS-TOCSY can eliminate unwanted coherence signals more effectively than normal PASS-TOCSY and thus results in better quality spectra in a reasonable measuring time.

1. はじめに

天然有機化合物の立体構造解析には NOE 法が一般的に用いられるが、最近鎖状分子の立体構造解析に ^1H - ^1H (J_{HH}) および遠隔 ^{13}C - ^1H スピン結合定数 ($^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$) を併用した解析が行われるようになり[1]今後広範な応用が期待されている。この $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ の測定には簡便で感度の良い HETLOC 法 (determination of heteronuclear long-range couplings; w1-hetero half-filtered TOCSY)[2] が主に用いられている。HETLOC スペクトルは $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY スペクトルと似ているが、 F_1 方向に ^{13}C に直接結合した ^1H シグナルのみが選択されており、相関ピークは F_1 方向に J_{CH} で大きく分裂し、 F_2 方向に $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ だけずれて現れる (Fig.1a)。

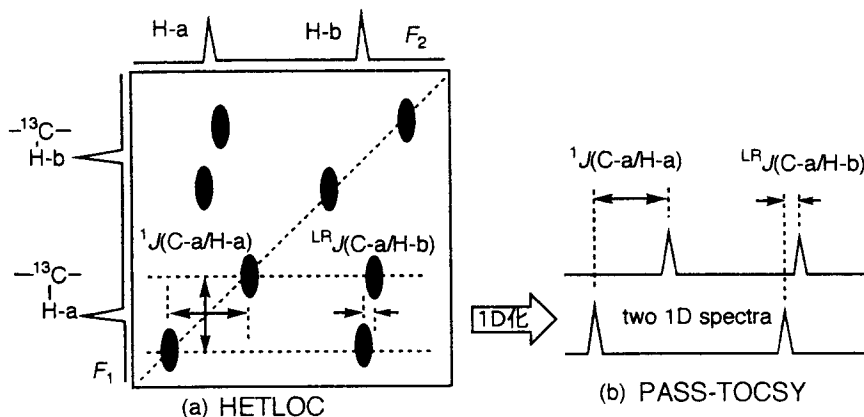


Fig.1 Schematic drawing of 2D HETLOC and 1D PASS-TOCSY spectra.

私たちは HETLOC 法をより簡便に測定し応用範囲をさらに広げるためすでに 1D 化を検討し、HETLOC スペクトルから $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ を求めるときに必要な 2 本の F_2 スライスに相当する 2 つの一次元スペクトルだけを測定する PASS-TOCSY 法 (Fig.1b) を提案している[3]。この方法は、アンチフェイズで J 値を観測する 1D 法で問題となるシグナルの相殺がおきず、また $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ を時間展開していないので J_{HH} 展開とシグナル減衰が少ないという利点がある。今回は本法にグラジエントパルスによるコヒーレンス選択を用いる gs-PASS-TOCSY 法 (Fig.2b) を作成したので報告する。これにより BIRD パルスを用いずに非ラベル化合物でもより良質な PASS-TOCSY スペクトルを得ることができた。

Key words: HETLOC, PASS-TOCSY, E-HETLOC, gs-PASS-TOCSY, $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$

ふくし えり、かわばた じゅん

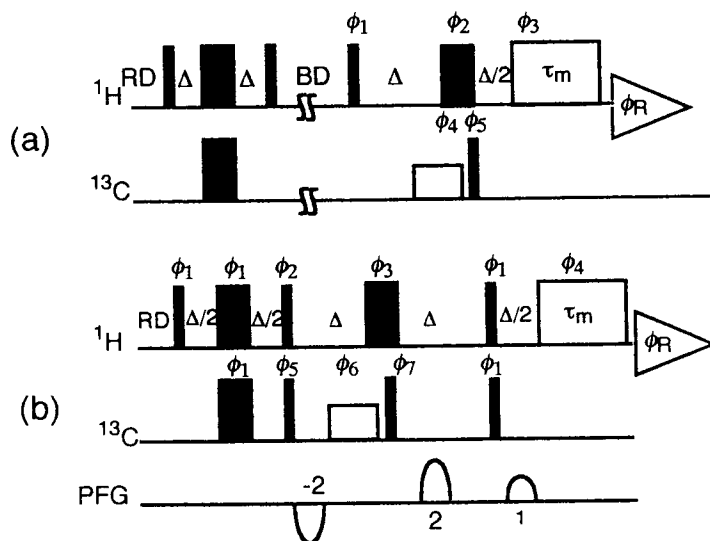


Fig.2 Pulse sequences of PASS-TOCSY(a) and gs-PASS-TOCSY(b). Narrow, wide and open bars represent $\pi/2$, π , and selective $\pi/2$ pulses, respectively. The delays RD, Δ , BD, and τ_m represent a repetition delay, $1/2J_{\text{CH}}$, a BIRD delay for eliminating ^{13}C -bonded proton signals, and a mixing time for TOCSY, respectively. ^1H pulse offset should be positioned at each satellite signal or $\pm 2nJ_{\text{CH}}$ ($n=1,2,3 \dots$). Phase cycling used were (a) $\phi_1 = x$, $\phi_2 = -y$, $\phi_3 = x^4$, $-x^4$, $\phi_4 = x$, $-x$, $\phi_5 = x^2$, $-x^2$, $\phi_R = x$, $-x$, $-x$, x , (b) $\phi_1 = x$, $\phi_2 = y$, $\phi_3 = x^2$, $-x^2$, $\phi_4 = y^2$, $-y^2$, $\phi_5 = y^4$, $-y^4$, $\phi_6 = -y$, $\phi_7 = y$, $-y$, $\phi_R = x$, $-x$, x , $-x$, $-x$, x , $-x$, x

2. PASS 法による HETLOC の 1D 化

HETLOC スペクトルで ^{13}C を求めるときに必要な 2 本の F_2 スライスの一つのシグナルが F_1 方向に J_{CH} により分裂したダブルレット(サテライト)のそれぞれ由来である。通常 2D 法の 1D 化は選択パルスを使用して $t_1=0$ に固定しておこなうが、HETLOC 法の場合はこの手順では 2つのスライスの重ねあわせに相当する 1D HMQC-TOCSY スペクトルが得られるだけである。PASS 法ではこの 1D HMQC-TOCSY 法の refocusing delay を $1/4J_{\text{CH}}$ と設定し (Fig.2a) さらに ^1H の周波数中心 ν を ^1H サテライトシグナルの一方に置くことにより、そのサテライトを通るスライスに相当するサブスペクトルを得る[2]。モデル化合物として 1-butanol (1, 60 mg/0.5ml DMSO- d_6) を用い C-1 を選択励起し ν を H-1 の高磁場側のサテライトシグナルに置いた PASS-TOCSY スペクトルを Fig.3b に示す。

3. gs-PASS 法

元の PASS 法には ^{13}C 核の反位相磁化が展開する待ち時間が無く、このままでは ^{13}C 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はできない。そこで、全体の磁化移動を E-HSQC タイプにした E-HETLOC[4]から同様の手順で PASS 法を作成した (Fig.2b)。Fig.3b と同じ条件で測定した 1 の gs-PASS-TOCSY スペクトルを Fig.3d に、 ν を H-1 の低磁場側のサテライトシグナルに置いて得たスペクトルを Fig.3c に示す。グラジエントパルスによるコヒーレンス選択を用いることで ^{13}C に結合したプロトンの残存ピークが少なくなりスペクトルの質が向上していることがわかる。

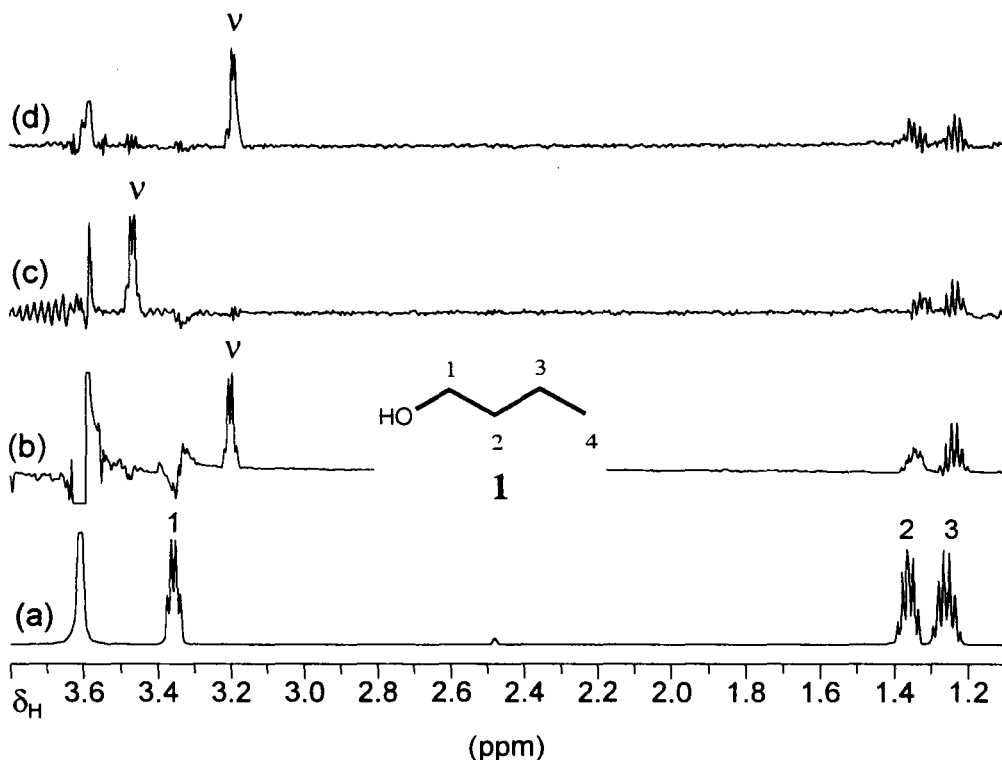


Fig.3 Comparison of PASS-TOCSY and gs-PASS-TOCSY spectra of 1-butanol (1, 60 mg/0.5ml DMSO- d_6). Normal ^1H spectrum (a), PASS-TOCSY spectrum (b), and gs-PASS-TOCSY spectra (c and d). Sequences used are Fig.2a and 2b for (b) and (c and d), respectively. Delays RD, Δ , BD, and τ_m are 2.0 s, 3.6 ms, 1.2 s, and 108 ms. ^1H pulse offset (v) was set on higher (b and d) or lower (c) field signal of ^{13}C satellite of C-1. Each spectrum was accumulated using 32 transients. The total measuring times were 135 and 95 sec for (b) and (c and d), respectively.

4.応用

cholesterol (2, 65mg/0.5ml chloroform- d) の 1 位および 2 位の非等価メチレンの低磁場側のプロトン(H- 2_α 、H- 1_β) のケミカルシフトはほぼ同じであるため、2D HETLOC では $^2\text{J}(\text{C}-3/\text{H}-2_\alpha)$ と $^2\text{J}(\text{C}-3/\text{H}-1_\beta)$ を区別して得ることはできなかった。TOCSY のミキシングタイム(τ_m)を徐々に長くして測定すれば初めはH- 2_α への相関ピークが主で、後にH- 1_β への相関ピークが大きくなることが予想されたので、C-3 を選択励起した gs-PASS-TOCSY スペクトルを τ_m を変化させて測定した。その結果、vをH-3の低磁場側のサテライトシグナルにおいて得たスペクトル (Fig.4b, d)において、 $\tau_m=57\text{ms}$ (b)よりも $\tau_m=186\text{ms}$ (d) において大きくなるピークがH- 1_β 、 $\tau_m=57\text{ms}$ にも認められるピークがH- 2_α と帰属した。vをH-3の高磁場側のサテライトシグナルに置いて得たスペクトル (c, e) では τ_m を変化させてもシグナルの形に変化が見られないが、HSQC のデータから $\delta_{\text{H}-1_\beta}$ は $\delta_{\text{H}-2_\alpha}$ よりやや低磁場側に位置することと予想される $^1\text{J}_{\text{CH}}$ の符号から c, e では H- 1_β 、H- 2_α がほぼ同じ位置に現れているためと考えられた。以上の結果 $^2\text{J}(\text{C}-3/\text{H}-2_\alpha)=-5\text{Hz}$, $^2\text{J}(\text{C}-3/\text{H}-1_\beta)=+8\text{Hz}$ のそれぞれを求めることができた。

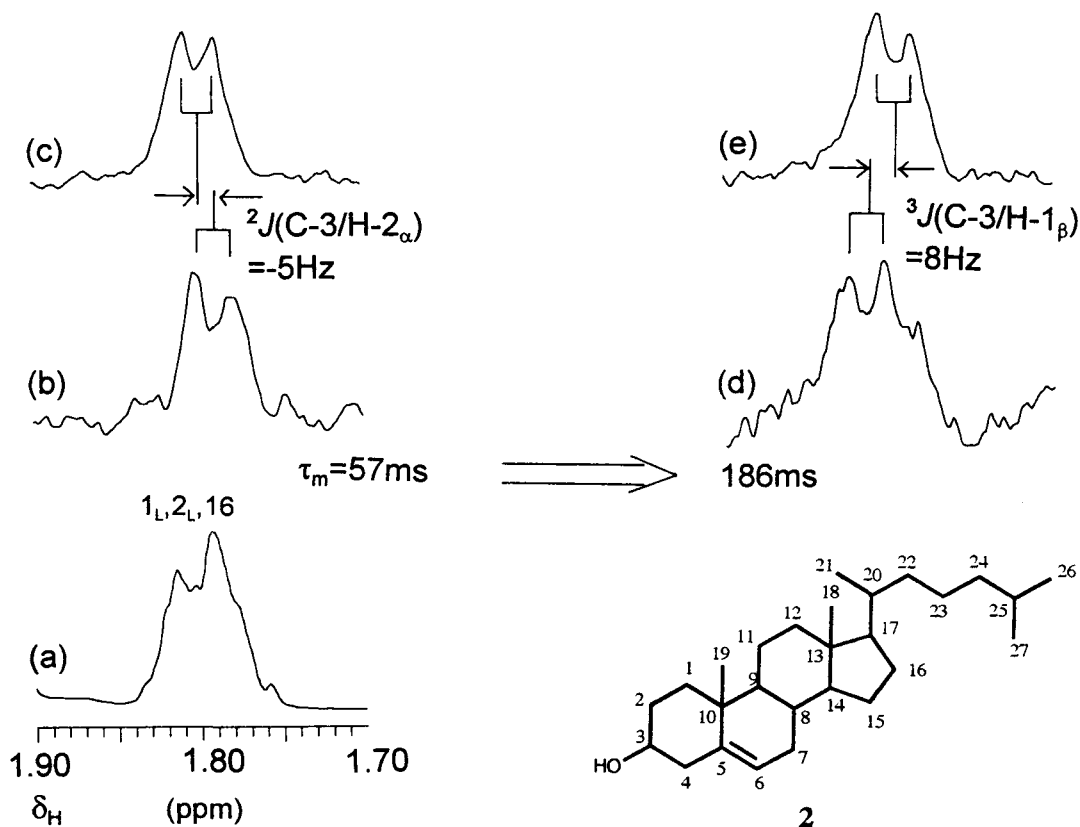


Fig.4 gs-PASS-TOCSY spectra of cholesterol (2, 65mg/0.5ml chloroform-*d*). Normal ^1H spectrum (a) and gs-PASS-TOCSY spectra (b - e). Sequences used are Fig.2b for (b - e). Delays RD and Δ are 1.5 s and 3.52 ms, respectively, whereas τ_m are 57 ms and 186 ms for (b and c) and (d and e), respectively. ^1H pulse offset (ν) was set on lower (b and d) or higher (c and e) field signal of ^{13}C satellite of C-3. Each spectrum was accumulated using 512 transients. The total measuring time was ca. 21 min for each satellite selection.

5. おわりに

今回ミキシングタイムを変化させて複数の gs-PASS-TOCSY スペクトルを測定することで、ほぼ同じ位置に重なっている相関ピークを区別して帰属できた。二次元スペクトルを複数測定することはディスクスペースと測定時間の点から効率的ではないばかりか、今回のような解析には高分解能が必要であり一次元スペクトルで測定することで始めて可能になったものである。またグラジエントパルスによるコヒーレンス選択を用いることで BIRD パルスを用いずに非ラベル化合物で良質なスペクトルを測定できるようになった。

References

- [1] 村田道夫, 松森信明, 化学と工業, **51**, 1083-1087 (1998)およびその引用文献
- [2] M. Kurtz, 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(1997), 講演要旨集 p.86

(都立大・理) ○大野綾子、楯 真一、田岡万悟、久保田英俊、松井裕、
磯辺俊明、甲斐荘正恒

Structure analysis of a newly found cerebellar protein, V1, by heteronuclear NMR spectroscopy

**Ayako Ohno, Shin-ichi Tate, Masato Taoka, Hidetoshi Kubota, Yutaka Matsui,
Toshiaki, Isobe, and Masatsune Kainosho**
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo Metropolitan University

Abstract: The V1 protein was identified as a transiently expressed protein in the early stage of cerebellar morphogenesis. The V1 protein consists 118 amino acid residues, 12.8 kDa, and it shows 2.5 times repeat of the similar sequence. This found repeating unit is the ankylin motif which is frequently found in the protein-protein interaction site in some proteins involved signal transduction. The ankylin repeat motif is commonly found as a part of a large protein, but the V1 protein consists of only 2.5 time repeats of this motif as its notable feature. We solved the V1 protein structure with the conventional heteronuclear multi-dimensional NMR methods. Currently, the backbone r.m.s.d. of the temporally obtained 10 final structure is 0.6 Å, based on around 1,800 NMR derived restraints with no distance and angle violations greater than 0.5 Å and 5 degrees. The obtained structure shows that each ankylin repeat consists one 3_{10} -helix – loop – two α -helices and 2.5 time repeats of this structural unit were also found in the spatial structure. Comparing with the known ankylin motif structures, the presently found structure uniquely has 3_{10} helix.

小脳形成期に特異的に発現する細胞質蛋白質として田岡、磯辺らによって単離・同定された V1 蛋白質は、118 残基からなる 13kDa の蛋白質である。アミノ酸配列から V1 にはアンキリンリピートという特徴的なモチーフが、2.5 回繰り返されることがわかっている。アンキリンリピートは、33 アミノ酸からなり、細胞の分化や細胞周期に関わる一連の蛋白質中に多く見つかっており蛋白質間の相互作用に直接関与する部位であることがわかってきている。既に、最近の X 線結晶構造解析の結果から、p53 binding protein や cyclin dependent kinase inhibitor p19 の溶液構造により、アンキリンモチーフの立体構造は、V 字型の配置をもつ 2 本の α -helix と β -hairpin 構造を持っていることがわかってきている。本研究では、このようなアンキリンモチーフのみからなっている蛋白質 V1 の立体構造を決定し、これまで見つかったアンキリンモチーフ構造との構造上の比較を行うことを目的とした。

Key words: solution structure, NMR, ankylin motif, anisotropic reorientation

おおのあやこ、たて しんいち、たおか まさと、くぼたひでとし、まついゆたか、いそべ としあき、かいのしょうまさつね

安定同位体核利用 NMR を用いることで、定法に基づいて V1 の立体構造解析を行った。現在は、さらに立体構造の精密化を進めている段階であるが、約 1700 個の NMR 構造定法に基づいて、10 個の最終構造の主鎖の重なりが 0.6 Å となるまでに構造決定が完了している。得られた V1 の立体構造は、アミノ酸配列から示唆されたように 2.5 回のモチーフ構造の繰り返しを持っていた。興味深い点は、配列上は 0.5 ユニットとして同定されていた部分が、立体構造上も確かにモチーフ構造の半分の立体構造を持っている点である。今回の解析の結果明らかとされた V1 蛋白質の 2 次構造の模式図を図 1 に示す。図に示すように、各モチーフは、 3_{10} helix - loop - α -helix - α -helix という構造をもっている。これまでに見つかっているアンキリンモチーフの構造単位には、最初のループ部に短い逆平行 β -sheet を持つという例が知られているが 3_{10} -helix を持つという構造は、今回の V1 の構造解析で初めて見つかった特徴的な構造である。図 2 には、NMR で決定された V1 の最終構造のうちの 1 つを示すが、図に示すように、既に知られている他のアンキリンリピート部の構造と同様に、V1 でも繰り返すリピート構造はお互い同士横並びとなり、全体では楕円状の立体構造を形成している。

現在は、V1 の持つ長球状の構造から期待される、分子運動の異方性の解析や、さらに磁気的異方性を利用した、立体構造の精密化を行いつつある。

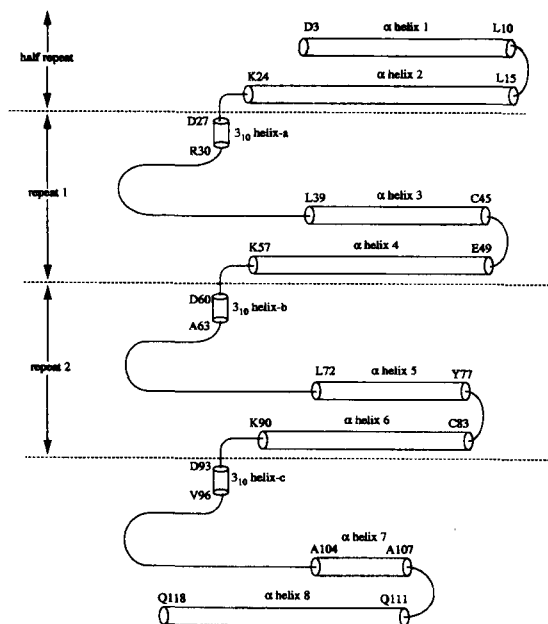


図 1. V1 の 2 次構造

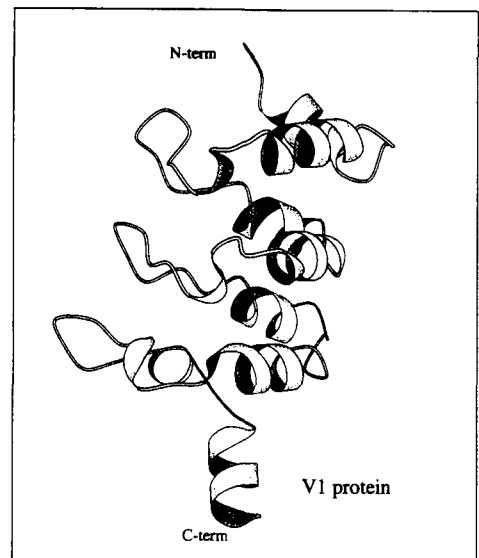


図 2. V1 の立体構造

P9

hDLG PDZ2ドメイン-APC C末ペプチド複合体の構造解析

○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

Human homolog of *Drosophila* tumor suppressor protein, hDLG has 3 PDZ domains and the second domain (PDZ2) binds to the C-terminal sequence of APC, which is coded by the causative gene of familial adenomatous polyposis (FAP). hDLG may play a role in the cell cycling signal transduction, which is organized by APC, cyclin/Cdk and so on. In order to understand the molecular mechanism of the signal transduction, we have analyzed the 3D structure of the complex, hDLG PDZ2 domain - APC C-term. peptide by means of NMR. We found that hDLG PDZ2 domain consists of six β -strands and two helices. APC C-terminal peptide binds in a groove between the second helix and the second β -strand and forms an antiparallel β -sheet with β -B. The binding site on the hDLG PDZ2 has a large hydrophobic pocket which the peptide valine and threonine side chain is inserted and the upper region with positive potential near the GLGF loop may recognize peptide C-terminal carboxylate.

(序論)

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る100残基ほどの機能ドメインであり、タンパク質のC末の特異的な配列を認識して結合してタンパク質同士の相互作用を取り持つ。最近、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 は分子内に三つの PDZドメインを持ち、このうちの二番目の PDZドメイン (PDZ2) のみが、癌抑制タンパク質 APC のC末部分と結合することが阪大の秋山らによって示された¹⁾。hDLGとAPCの複合体形成は、細胞周期抑制のシグナル伝達に重要な役割を果たしており、このシグナル伝達の分子メカニズムとPDZドメインの特異的な分子認識機構を解明することを目的として、NMRを用いてhDLG PDZ2ドメインとAPC C末ペプチド複合体の溶液中での立体構造解析を行なった。

Keywords: PDZドメイン、hDLG、APC、複合体、多次元NMR

おおき 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

(方法)

hDLG PDZ2ドメイン (316-404) は大腸菌内で発現を行い、化学合成したAPCのC末ペプチド (hDLGとの結合に必要な十分なC末7残基分) との複合体を調製した。hDLG PDZ2の ^{15}N 、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ラベル体作成には、窒素源及び炭素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (0.5 g/L)、 ^{13}C -glucose (1 g/L) を含むM9培地を用いた。NMR測定サンプルは、20 mM リン酸バッファー、25 mM KCl、5 mM DTTに調製し、310 KでNMRスペクトルの測定を行った。距離情報の収集は分子内NOEについては主に4D ^{13}C HMQC-NOESY- ^{13}C HSQC、4D ^{13}C HMQC-NOESY- ^{15}N HSQCを用いて、分子間NOEについては3D ^{13}C F1-filtered F3-edited NOESY-HSQCを用いて測定した。構造計算にはDyana 1.4を用い、simulated annealing 法によるdistance geometry計算を行って条件を満たす構造を求めた。また、より詳細な分子間情報を得るためAPCペプチドの同位体ラベルも試みている。

(結果)

多次元NMR法により得た分子内NOE 948個、分子間NOE 20個および二面角、水素結合情報をもとに構造計算を行い、PDZ2ドメイン-APCペプチド複合体の立体構造を主鎖原子のr.m.s.dで0.56 Åの収束度 (distance geometry 計算により得られた30個の構造の平均構造に対するr.m.s.d) で決定した。これにより、APCペプチドはPDZ2ドメインの βB と αB 間の溝に結合して βB と逆平行 β シートを形成していることが判明した。PDZ2ドメインとAPCペプチドの結合は、主にPDZ2ドメインGLGFループ付近の正電荷とペプチドC末のカルボキシル基との静電相互作用、及びPDZ2ドメイン βB - αB 間の溝の疎水基とペプチド疎水基の疎水的相互作用によるものであると考えられる。分子間相互作用の詳細は本検討会で議論する予定である。



The superimposed 30 calculated structures and ribbon diagram of hDLG PDZ2 Domain with the APC peptide

P10

Grb2 C末端SH3ドメインと基質ペプチドの複合体の溶液構造

(¹都臨床研、²学習院大、³ニューヨーク大)

○川崎政人¹、小椋賢治¹、寺沢宏明¹、湯沢聡^{1,2}、畠中秀樹¹、

V. Mandiyan³、J. Schlessinger³、稲垣冬彦¹

Solution structure of the carboxy-terminal SH3 domain of Grb2 complexed with the ligand peptide

(¹Tokyo Met. Inst. of Med. Sci., ²Gakushuin Univ., ³New York Univ.)

○Masato Kawasaki¹, Kenji Ogura¹, Hiroaki Terasawa¹, Satoru Yuzawa^{1,2},

Hideki Hatanaka¹, V. Mandiyan³, J. Schlessinger³, Fuyuhiko Inagaki¹

Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) is an adapter protein with a domain structure of SH3-SH2-SH3. We have determined the solution structure of the complex between the carboxy-terminal SH3 domain of Grb2 and the peptide (RHYRPLPPLP) by NMR. The bound peptide adopts a left-handed polyproline type II helix. The orientation of the bound peptide is found to be opposite to that of the peptide (VPPPVPPIRRR) bound to the amino-terminal SH3 domain of Grb2.

Grb2は、SH3-SH2-SH3のドメインからなり、シグナル伝達経路におけるアダプター蛋白質の中で、最もよく研究されているものの一つである。しかしこれまで、Grb2のC末端側SH3ドメイン (Grb2 cSH3) と強く結合するアミノ酸配列は報告されておらず、cSH3のリガンド結合様式は不明であった。今回、cSH3と特異的に結合することが見つかったペプチド (RHYRPLPPLP) を用いて、cSH3との複合体の立体構造を、NMRにより解析した。¹⁵Nラベルおよび¹³C¹⁵NダブルラベルしたGrb2 cSH3を用い、ペプチドとの複合体についての各種多次元NMRの測定を行った。cSH3ドメインとの間にNOEを生じるペプチドのアミノ酸残基は、Y3、R4、L6、P7、L9、P10であった。Simulated annealingによる構造計算の結果、ペプチドは、これまで立体構造が報告されているSH3ドメインのリガンドと同様に、ポリプロリンII型ヘリックス様の構造を取っていた。ペプチドの結合の向きは、Grb2 N末端SH3ドメインと基質ペプチド (VPPPVPPIRRR) の結合の場合とは反対方向であった。今回用いたペプチドの配列 (RHYRPLPPLP) の中で、RPLPPLPの部分はSrc SH3ドメインのコンセンサス配列としてよく知られているものである。RPLPPLP配列だけではGrb2との強い結合は見られないという報告とも考え合わせると、N末端側のY3残基が、Grb2 cSH3との結合親和性を高めるのに寄与している可能性が考えられる。

Grb2、SH3ドメイン

かわさきまさと、おぐらけんじ、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

P11

cre 結合蛋白質 CRE-BP1/ATF2 の転写活性化ドメインの溶液構造
(横浜市大院総合理¹、理研筑波 LS²)

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

STRUCTURAL ANALYSIS OF TRANSACTIVATION DOMAIN OF CRE-BP1/ATF-2

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

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

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

Activating transcription factor-2 (ATF-2) (also designated CRE-BP1) is a transcription factor that binds to cAMP response element (CRE). ATF-2 contains two functional domains, an N-terminal transactivation domain and C-terminal DNA-binding domain. The DNA-binding domain consists of two subdomains: an N-terminal half (N-subdomain) which shows amino acids sequence homology to the TF III A type zinc finger motif found in DNA-binding domains of many transcription factors, and a C-terminal half (C-subdomain) which contains two threonine residues that the stress-activated protein kinases phosphorylate. Here, we have examined the structure of the transactivation domain to understand the mechanism of the transcriptional activation of ATF-2.

【序論】

CRE-BP1/ATF2 は細胞内 cAMP の増加に応答する遺伝子 *cre* (cAMP response element) 配列に結合し、転写調節を行う蛋白質の1つとして同定された。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 欠損マウスによる研究が報告され、CRE-BP1 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 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 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 Zn²⁺ イオンが必要であり、そのドメインの N 末側約半分 (N-subdomain) 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 (C-subdomain) には、JNK (c-Jun N-terminal kinase) でリン酸化される 2 つのスレオニンがある。

【キーワード】

cre 結合蛋白質、ATF-2、転写活性化ドメイン、NMR、立体構造解析

○ながどい ありたか、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

さらに、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 の転写制御の詳細を調べるために、CRE-BP1 の N 末端側の転写活性化ドメイン (88 アミノ酸残基: CRE-BP1N88) の立体構造を解析した。現在、転写活性化ドメインがリン酸化された合成ペプチドを作製し、その構造解析を行っている。さらに、非リン酸化転写活性化ドメインと DNA 結合ドメインとの分子内相互作用についても言及する。

【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。各種イオン交換クロマトグラフィーで精製後、2.0~5.0mM の NMR サンプルを得た。NMR 測定は Bruker DMX-600 を使用し、Buffer 条件は 20mM リン酸緩衝液 pH6.3, 200mM NaCl, 5mM d-DTT, $30\mu\text{M}$ ZnCl_2 , 0.4mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で、温度 300K で行った。 ^{15}N でラベルしたサンプルに関して、HSQC, $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE, TOCSY-HSQC ($\tau=100\text{ms}$), NOESY-HSQC ($\tau=50, 100, 150\text{ms}$) 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 などの測定を行い、NMR スペクトルを帰属した。構造計算は EMBOSS を使用し、4D-SA 法で計算した。

【結果と考察】

構造計算ディスタンス・ジオメトリーの結果、CRE-BP1N88 の N-subdomain の構造は他の転写調節因子の DNA 結合ドメイン中に見出された C2H2 型の Zn フィンガー構造とほとんど同じであった (FIG. 1)。それは機能に関係なく、Zn フィンガーモチーフは DNA の認識に特有な構造でないことが示された。しかし、DNA のリン酸骨格と相互作用するアミノ酸が CRE-BP1N88 では系統的に他のアミノ酸に置換されていた。一方、リン酸化部位を有する C-subdomain の構造は明らかな 2 次構造エレメントは見られず、変性した構造となっていた (FIG. 2)。この領域はリン酸化部位を機能的にマスクするために DNA 結合ドメインと分子内相互作用することで構造変化の可能性が考えられる。

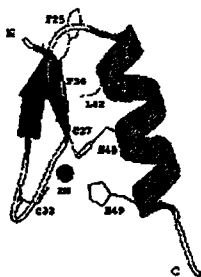


FIG.1
Diagrammatic representation of the N-subdomain from CRE-BP1N88.

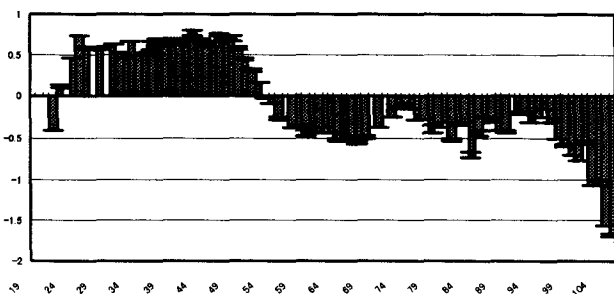


FIG.2
Histogram of the $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE data shows the backbone flexibility of the CRE-BP1N88.

P12

ミトコンドリア膜透過装置 rat Tom20p cytoplasmic domain の溶液構造

(生物分子工研究所・構造解析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

Solution structure 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 that functions as a component of the import receptor complex for mitochondrial precursor proteins synthesized in cytoplasm. It is unknown how the receptor complex recognizes precursor proteins. We determined the solution structure of the cytoplasmic domain of rat Tom20p (95 residues). The Tom20p protein consists of four α -helices with a long flexible C-terminal tail. We identified the specific site in this domain which binds to the signal peptide using intermolecular NOEs, chemical shift perturbation and spin-labeling technique.

[序論]

ミトコンドリアを構成する多くの蛋白質は核の DNA にコードされており、それらはミトコンドリア中におくりこまれ、その機能を発揮する。その時に必要な膜透過装置は Tom (translocation outer membrane)-Tim (translocation inner membrane) complex とよばれる約 15 種類の膜蛋白質によって構成されている。そのなかで、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蛋白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。今回われわれは、ratTom20p の cytoplasmic domain の溶液中の立体構造を決定した。また、シグナル配列ペプチドを合成し、ratTom20p の cytoplasmic domain との相互作用を化学シフト変化、およびスピラベル法を用いて調べた。これらの結果は、ratTom20p がシグナル配列ペプチドを特異的に認識していることを示している。

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. ratTom20p の cytoplasmic domain の立体構造決定

ratTom20p の cytoplasmic domain は全長 145 残基の膜貫通部分の N 末端 1~24 残基を欠失させたものを大腸菌から発現させ、さらに flexible な部位の N 末端 25~50 残基を V8 プロテアーゼにより限定分解したものをを用いた。測定時の溶液条件は Dynamic light scattering を用いて最適化し、その条件下で構造決定に必要な種々の NMR 測定を行った。NMR 測定終了後、ほぼすべてのシグナルの帰属を完了した。そして 2047 個の NOE、127 個の二面角情報、また H-D 交換実験から得られた水素結合情報を用いて構造計算を行った。立体構造計算は DYANA ver 1.4 (ETH)を用いて行った。

2.シグナル配列ペプチドとの相互作用

シグナル配列ペプチド sALDH(rat liver aldehyde dehydrogenase のシグナル配列 22 残基)、sOTC(rat ornithine transcarbamylase のシグナル配列 38 残基)、sCOX4 (cytochrome oxidase subunit4 のシグナル配列 25 残基) はペプチド合成及び gene10 との fusion protein として大腸菌に発現させることにより得た。シグナル配列ペプチドとの相互作用は 1) シグナル配列ペプチド添加前後の ^{15}N ラベルした Tom20p の cytoplasmic domain の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを比較すること、2) N 末端に特異的にスピンラベル試薬を結合させた sALDH を化学修飾で作製し、その添加前後の NMR スペクトルの変化を比較することにより解析した。

[結果・考察]

NMR により決定した Tom20p の cytoplasmic domain の構造は、5 つの α -ヘリックスからなる構造であり、C 末端に長い flexible な部分があった。Tom20p の 69~103 番目の残基はその一次構造上の情報から TPR (Tetratricopeptide Repeat)モチーフであると考えられていた。最近、X 線結晶解析により protein phosphatase5 に含まれる 3 つの TPR モチーフの立体構造が解かれた(1)。今回得られた Tom20p の TPR モチーフと protein phosphatase5 の TPR モチーフの構造を比較すると主鎖だけでなく側鎖の向きも非常によく似ており、TPR モチーフは構造的によく保存されたモチーフであると考えている。シグナル配列ペプチド添加前後の ^{15}N ラベルした Tom20p の cytoplasmic domain の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを比較すると、3 種類のペプチドともに共通のシグナルが変化し、これは Tom20p にシグナル配列認識ポケットが存在していることを示している。また、N 末端に特異的にスピンラベル試薬を結合させた sALDH を添加したところ、特定の部位のシグナルがブロードニングし、シグナル配列ペプチドはある一定の向きでのみ、Tom20p と結合することがわかった。

Reference

- 1) Das AK *et al.* *EMBO J* 1998 Mar 2;17(5):1192-1199

P13

イネのシステインプロテアーゼ阻害剤、オリザシスタチン-IのNMRによる構造解析

(¹東京大学・生物生産工学研究センター、²東京大学・農生科・応生化)
○永田宏次¹、工藤紀雄¹、阿部啓子²、荒井綜一²、田之倉優^{1,2}

NMR structural studies of a rice cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin-I (¹Biotechnology Research Center and ²Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo)

Koji Nagata¹, Norio Kudo¹, Keiko Abe², Soichi Arai², Masaru Tanokura^{1,2}

Cystatins are a group of proteins which bind to cysteine proteinases and inhibit their activities. Oryzacystatin-I (OC-I, 11 kDa) is a phytocystatin from seeds of a rice *Oryza sativa*, which has potential resistance in rice and for cancer therapeutics. Unlike other cystatins, it is reported that OC-I does not require the N-terminal part for the inhibitory activity. To understand the structural basis of the inhibitory activity of OC-I, we have determined the solution structure of OC-I with several 2D and 3D homo- and heteronuclear NMR experiments and torsion angle dynamics (TAD) calculations, and identified putative papain binding site with chemical shift perturbation data.

[序論]

シスタチンは、パパイン群のシステインプロテアーゼを特異的に阻害するタンパク質の総称である。アミノ酸配列の類似性やジスルフィド結合の有無により、4群に区分される。植物シスタチンは、立体構造既知の動物シスタチン3群とは異なる4つめの群を構成しており、その殺虫活性(害虫は、植物シスタチンを摂食することにより消化不良を起こし、成長が阻害され、死にいたる)を利用して、安全な耐虫性穀物の開発が進められている。

本研究は、イネのシスタチン、オリザシスタチン-I(OC-I、分子量11k)の立体構造を決定し、植物シスタチンのシステインプロテアーゼ阻害剤としての活性発現機構を立体構造に基づいて明らかにすることを目的とした。

[方法]

¹⁵N 標識 OC-I は ¹⁵N 標識 NH₄Cl とアミノ酸混合物(昭光通商)を含む M9 最小培地中で大腸菌 BL21(DE3) を宿主として T7 プロモータ制御下に発現させた後、カラムクロマトグラフィで精製した。NMR 測定試料は、OC-I 濃度 2-3 mM、溶媒 50 mM Na phosphate/100 mM NaCl/0.02% NaN₃, pH 6.8。パパインは Sigma から購入した。

NMR 測定は Varian Unity INOVA 500 分光計と z 軸 PFG プローブ (Varian, Nalorac) を用いた。3D ¹H-¹⁵N TOCSY-HSQC (49 ms τ_m)、NOESY-HSQC (150 ms τ_m)、および 2D DQF-COSY、TOCSY (45 ms τ_m)、NOESY (150 ms τ_m) を NMR シグナルの帰属に用いた。3D ¹H-¹⁵N NOESY-HSQC (75 ms τ_m) および 2D NOESY (75 ms τ_m) の交差ピーク強度から ¹H 間距離制限を得た。3D HNHA、¹H-¹⁵N TOCSY-HSQC (33 ms τ_m)、NOESY-HSQC (75 ms τ_m)、2D ¹H-¹H NOESY (75 ms τ_m) のデータに基づいて ϕ 、 χ_1 角の二面角制限を得た。¹H-²H 交換実験の結果から水素結合制限を得た。

構造計算は DYANA ver. 1.4 を用いて torsion angle dynamics (TAD) により行った。

植物シスタチン、システインプロテアーゼ阻害剤、タンパク質立体構造解析

ながた こうじ、くどう のりお、あべ けいこ、あらい そういち、たのくら まさる

[結果・考察]

立体構造の決定

大腸菌を宿主として発現、精製した OC-I の ^1H - ^1H 2D NMR (DQF-COSY, TOCSY, NOESY) および ^{15}N で標識した OC-I の ^1H - ^{15}N 3D NMR (TOCSY-HSQC, NOESY-HSQC) を測定し、 ^1H および ^{15}N の NMR シグナルの帰属を完了した。1111 個の ^1H 間距離制限、85 個の二面角制限に基づき、TAD による構造計算を行い、OC-I の溶液構造を得た。収束度が悪い N、C 末端部を除いて (残基番号 20-95)、RMSD は主鎖原子について $0.69 \pm 0.16 \text{ \AA}$ 、全重原子について $1.39 \pm 0.16 \text{ \AA}$ であった。OC-I は基本的に他群のシスタチンと同様に 1 本の α ヘリックスと 1 枚の逆平行 β シート (4 本の β ストランドを含む) からなる二次構造を有するが、他のシスタチンに見られる N 末端部の β ストランドを欠失していた (図 1)。DALI データベース検索から、OC-I の立体構造は、他のシスタチン分子のほか、植物由来の甘味タンパク質モネリンにもよく似ていることが明らかになった。現在、両分子の構造と機能の関係を調べている。

分子内運動の解析

$\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE スペクトルを測定した結果、OC-I の N 末端 13 残基目までは負のシグナルを持つことが示され、15 残基目のシグナルは NOE 存在下で消失した。C 末端は 5 残基 (残基番号 98-102) が負のシグナルを有した。この結果から、N 末端部 15 残基と C 末端部 5 残基がきわめて大きな内部運動をしていることが明らかになった。立体構造解析の結果、N 末端部約 20 残基には長距離 NOE が観測されなかったが、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE スペクトルを用いた分子内運動の解析結果は OC-I の N 末端部少なくとも 15 残基が rigid な特定の立体構造をとらないことを裏付けている。

化学シフト変化によるパパイン結合部位の特定

^{15}N 標識 OC-I と非標識パパインの複合体 (各 0.1 mM) の ^1H - ^{15}N HSQC を測定し、パパイン添加による ^1H 、 ^{15}N の化学シフト変化量を調べた。その結果、N 末端部 Val 8 - His 22 および中央部 Val 50 - Val 55 に顕著な化学シフト変化が生じた。これらの残基はすべて OC-I の 1 つの分子表面に集中しており、この部位がパパイン結合部位であると強く示唆された。また同時に、rigid な立体構造をとらない N 末端部もパパイン認識に関与していると示唆された。



図 1. OC-I の NMR 構造。(左) 主鎖原子の重ね合わせ。(右) リボン表示。MOLMOL を使って表示した。

P14

RalBP1結合タンパク質POB1のEHドメインの構造解析

(理研細胞情報伝達¹、東大理²、広島大医³)

○小柴生造^{1, 2}、木川隆則¹、岩原淳二¹、菊池章³、横山茂之^{1, 2}

Solution structure of the Eps15 homology domain of a Human RalBP1-interacting protein.

Seizo Koshiba^{1,2}, Takanori Kigawa¹, Junji Iwahara¹, Akira Kikuchi³, and Shigeyuki Yokoyama^{1,2}

¹Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN);

²Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo; ³Department of Biochemistry, Hiroshima University School of Medicine, Japan

The Eps15 homology (EH) domain is a motif found in many proteins and has been reported to bind to proteins involved in sorting within the cell. This domain consists of about 100 amino acid residues and has sequence similarity with EF-hand calcium-binding domains, but the structural relationship of the EH domain with the EF-hand domains has not been investigated. In this report, we have determined the structure of the EH domain of human RalBP1-interacting protein (POB1) by multidimensional NMR spectroscopy. POB1 contains one EH domain and two proline-rich motifs, and interacts with RalBP1, a putative effector protein of a low-molecular weight GTP-binding protein, Ral. We found that the POB1 EH domain binds calcium ion and the structure consists of a pair of EF-hand motifs. These results indicate that the EH domain is one of the EF-hand domains.

<序論>

EH (Eps15 homology) ドメインは、EGFレセプターの基質であるEps15の分子内相同配列として同定されたもので、これまでに真核生物の多くの細胞内タンパク質に存在することが報告されている。このドメインを含むタンパク質は主にエンドサイトーシスに関係し、Asn-Pro-Phe (NPF) 配列を含むタンパク質と分子間相互作用することが報告されている。このドメインはアミノ酸約100残基からなり、カルシウム結合ドメインであるEFハンドと一次配列上の相同性が存在するが、高次構造上の関係はこれまで調べられていなかった。本研究で我々はRalBP1結合タンパク質であるPOB1 (partner of RalBP1) タンパク質のEHドメインの高次構造を多次元NMR法を用いて決定した。POB1タンパク質は、1つのEHドメインと2つのPro-rich配列、そしてC末端

多次元NMR、構造解析、タンパク質、カルシウム

こしばせいぞう、きがわたかのり、いわはらじゅんじ、きくちあきら、よこやましげゆき

にコイルドコイル領域をもち、この領域で低分子量Gタンパク質Ralに結合するRalBP1タンパク質と相互作用することが報告されている。

<方法>

human POB1のEHドメイン(103残基)を、GST融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製する系を確立した。次に、安定同位体標識した試料を用いて、各種多次元NMRスペクトルを測定した。測定試料は、約2 mMのPOB1 EHを使用し、バッファは20 mM Tris-HClバッファ(pH 7.5), 50 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM DTT, 0.1 % アジ化ナトリウムを用いた。測定はBruker社のDRX600を用いて、30 °Cで行った。データの処理はNMRPipeを用い、解析はNMRViewを用いた。主鎖の帰属は、3D HNCA, HN(CO)CA, HNC(O), HCACO, CBCANH, CBCA(CO)NH, ¹⁵N-edited NOESY及び¹⁵N-edited TOCSYスペクトルを用いて行い、側鎖の帰属は、主に3D HCCH-TOCSY, HCCH-COSY及び¹⁵N-edited TOCSYスペクトルを用いた。距離情報は、3D ¹⁵N- 及び ¹³C- edited NOESYスペクトルから得た。構造計算はX-PLOR Ver. 3.1を用い、simulated annealing法で計算した。またカルシウムイオンの結合の有無を調べるために、EDTAの添加に伴うEHドメインの主鎖アミドプロトンの化学シフトの変化を調べた。

<結果及び考察>

POB1のEHドメインは4本の α ヘリックスが、EFハンド構造に特徴的な1対のヘリックスループヘリックス(HLH)構造を形成し、隣り合った2つのHLH構造のループ間が短い β シートを構成する。N端側のHLHはC端側のそれに比較してヘリックス間の角度が開いており、1番目のヘリックスは残りの3本のヘリックスに比較して直角に近い向きにある。2番目と4番目のヘリックスは平行に近い向きを取り、3番目のヘリックスはそれに対してやや傾いた向きで結合し、中心に疎水性のコアを形成するヘリックスバンドル構造を取っている。EHドメインの構造を他のEFハンドドメインと比較すると、カルシウム依存的に構造が変化するカルモジュリン等より、カルビンディンにより類似しているが、カルビンディンに比べて、4番目のヘリックスが2, 3番目のヘリックスにより近接している。一方EDTAの添加に伴う¹⁵N-HSQCスペクトルの変化を調べたところ、ほとんどのピークが消滅した。このことはPOB1のEHドメインがカルシウムイオンを強固に結合し、他の幾つかのEFハンドタンパク質のように活性の制御のためではなく、カルシウムイオンが構造上の安定性に必要であることを示唆している。1次配列の比較から2番目のEFハンドにカルシウムイオンの結合に必要な残基が保存されていることが分かっており、このことからEHドメインは2番目のEFハンドで1個のカルシウムイオンを結合していると考えられる。これらの結果はEHドメインがEFハンドタンパク質ファミリーの中で、独立した1グループを形成していることを示している。

P15

出芽酵母Zinc finger 蛋白質 Rme1p のDNA結合ドメインの構造解析

(東京薬大¹, 明星大², コロンビア大³, 農林省資源研⁴) ○神藤平三郎¹, 村瀬敦司¹, 清水光弘², A. P. Mitchell³, 加藤悦子⁴, 山崎俊正⁴

Structural Study of the DNA Binding Domain of Zinc-finger Protein Rme1p from *Saccharomyces cerevisiae*

(Tokyo Univ. of Pharmacy & Life Science¹, Meisei Univ.², Columbia Univ.³, NIAR⁴),
H. Shindo¹, A. Murase¹, M. Shimizu², A. P. Mitchell³, E. Katoh⁴, T. Yamazaki⁴

Rme1p acts as a negative regulator of meiosis which blocks the transcription of *IME1*. Rme1p (300 a.a.) is Zn-finger protein which consists of three regions similar to C₂-H₂ Zn-finger motif. Notably, none of the putative Rme1p Zn-finger matched with the consensus sequence of C₂-H₂ motif. Thus, Rme1p may provide new insight to mechanisms of diversity of DNA recognition by Zn-finger proteins. Herein, we constructed, purified a series of deletion- and point-mutants of Rme1p, and characterized interaction of DNA with Rme1p mutants by gel retardation assay. The DNA binding domain was found to consist of the C-terminal region (16 a.a.) as well as all three Zn-fingers. The structural study by NMR is underway and will be presented in the poster.

Rme1p蛋白質は出芽酵母の減数分裂を開始するマスター遺伝子*IME1*(inducer meiosis)の転写を抑制する。Rme1pは300アミノ酸残基からなるZn-finger蛋白質であり、3つのC₂-H₂型Zn-fingerモチーフを持つ。しかし、いずれのモチーフも典型的なC₂-H₂型Zn-fingerに共通した配列とマッチしていない。したがって、Rme1pはZn-fingerによるDNAの認識機構の多様性に関して新しい知見を提供するものと期待される。

今回、われわれは、一連のRme1pの欠失変異体ならびに点変異体のマルトース結合蛋白質融合体の発現系を構築し、Rme1pのDNA結合ドメインをゲルシフト法を用いて決定した。NMR測定に供するために、His-tagまたはnon His-tag融合体を作成し、それらの溶解性について検討し、NMRによる予備的実験を行った。

[試料と方法]

Rme1p遺伝子およびその欠失体とmaltose結合蛋白質(MBP)との融合体をpMAL-c2(New England Biolabs)にクローンし、一連のMBP-Rme1p蛋白質を発現させ、アミロ

Keywords: Rme1p, DNA結合ドメイン, Zinc Finger, NMR

しんどう へいさぶろう, むらせ あつし, しみず みつひろ, アーロン ミッチェル, かとう えつこ, やまざき としまさ

ーズ樹脂クロマトグラフィーを用いて精製した。これらの融合蛋白質のDNA結合能を調べるために、2つのRme1p結合部位を含むDNA断片(404 bp)を用いてゲルシフトアッセイを行った (Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1.5 mM DDT, 8% glycerol, 0.25 mg/mL BSA)。

NMR測定用試料を得るために、同様の Rme1p 欠失変異体を pET-21a (non His-tag) および pET-21b (His-tag) にクローンし、後者については Nickel column を用いて精製した。

[結果および考察] われわれは最近、Rme1p がゲノム中の *IME1* 遺伝子上流 -2030 と -1950 に2つの結合部位を持つことを *in vivo* footprinting 法により実証した^{1,2)}。この結合部位は13塩基対、5'-G(A/T)ACCTCAAAA(G/C)G-3'、からなる共通配列を有することが分かった。これらの部位を含む404 bp のDNA断片を調製し、一連のRme1p変異体に対してゲルシフトアッセイを行った結果、Rme1pの結合には3つのZn-fingerとC末端領域の16残基が必須であることを見出した (図1を参照)。このC末端領域にある残基の点変異の実験から K190,R191がDNA結合に必須であることがわかった。もしこのC末残基が α -helix であるとする、 α -helix は anphoteric な性質を示すことが示唆され、Zn-finger モチーフの安定性にも寄与しているものと推察された。したがって、Rme1pのDNA結合ドメインはC末端領域を含む3つのZn-finger であることが結論できる。それゆえ、Rme1p 蛋白質は新規のDNA結合モチーフを提供すると期待される。

マルトース融合蛋白質はその大きな分子サイズのためにNMR測定には不適切であるので、Rme1pの non His-tag およびHis-tag 付き断片を調製した。しかし、不運にも上述のDNA結合ドメインはいずれの調製法においても不溶性であった。そこで、溶解性の高いものを得る目的で、種々の欠質変異体を調製した結果、C末端領域を含む2つのZn-finger 変異体 (ZF2/ZF3/C-TR)が比較的高い溶解度を与えることがわかった (約 0.5 mM 濃度)。現在、NMR測定中であり、予備的なNMR測定結果をポスターにおいて発表できるであろう。



図1 Rme1p のDNA結合ドメイン

文献：

- 1) M. Shimizu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 790-795 (1997).
- 2) M. Shimizu et al., *Nucl. Acids Res.*, 26, 2329-2336 (1998).

P16

NMR Studies of a 35kDa Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1) - Ubiquitin Complex

(理研遺伝生化学¹, 東京医科歯科大歯², 三菱化学生命研³, 北里大理⁴)

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

NMR Studies of a 35kDa Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1) - Ubiquitin Complex

○Sundaresan Rajesh,^{1,2} Yutaka Ito,¹ Taiichi Sakamoto,³ Mariko Iwamoto,³ Yoshio Kodera,^{3,4}
Nobuo Tsuchida,² Takehiko Shibata,¹ and Toshiyuki Kohno³

¹Laboratory of Cell. & Mol. Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

²Laboratory of Mol. & Cellular Oncology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

³Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, ⁴Department of Physics, Kitasato University

ABSTRACT

Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1, 27kDa) is involved in the processing of Ubiquitin (Ub) precursors and Ub-protein fusions. Partial backbone assignments were obtained for YUH-Ub complex. The Ub binding interface was mapped onto the secondary structure of free YUH1 and extrapolated onto the crystal structure of UCHL3 (human homologue of YUH1). Further results from a chemically coupled YUH-Ub will be presented.

INTRODUCTION

Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1, 236 residues), is a member of the Ubiquitin C-terminal Hydrolase family of deubiquitinating enzymes. It functions to maintain the free Ub pool in cells, through hydrolysis of Ub C-terminal extensions, cleaving both α -NH and ϵ -NH linked peptide bonds (extensions of up to 72 residues can be cleaved). YUH1 exhibits high specificity for the C-terminal residues of Ub and a narrow P site (Gly76 of Ub) specificity. YUH1 shares 30% sequence identity with its human homologue UCHL3. However at secondary structure level the NMR structure differs slightly from the crystal structure of UCHL3. The reaction mechanism is conserved and involves the formation of a thio-ester intermediate with the C-terminal -COOH of Ub. Ub binds with micromolar binding constant and Ub-aldehyde maybe a tightly bound inhibitor. We have undertaken heteronuclear 3D NMR studies to delineate the structural basis for such a high specificity towards Ub and to identify the Ub binding interface on YUH1.

タンパク質タンパク質相互作用, 重水素化, triple-resonance NMR

Rajesh S., いうゆたか, さかもとたいいち, いわもとまりこ, こでらよしお, つちだのぶお,
しばたけひこ, こうのとしゆき

EXPERIMENTAL METHODS

Multipoint titrations were performed using $u\text{-}^{15}\text{N}$ -labelled YUH1 and unlabelled Ub in molar ratios of 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:1.5 and 1:2. A series of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of YUH1 were obtained for each of the steps mentioned above.

A 1:3 mixture of $\sim 80\%$ $^2\text{H}, u\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -labelled YUH1 and unlabelled Ub, respectively was used for the backbone resonance assignment of Ub bound YUH1. The following triple resonance experiments, HNCA, HN(CO)CA, HN(COCA)CB were used to assign the backbone $^1\text{H}_\text{N}$, $^{15}\text{N}_\text{H}$, $^{13}\text{C}_\alpha$ and $^{13}\text{C}_\beta$ resonances.

The 35kDa YUH1-Ub covalent complex was prepared by treatment of a 1:5 mixture of $^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -labelled YUH1 and unlabelled Ub respectively, with NaBH_4 and purifying the complex by ion exchange column chromatography. 3D HNCA, HN(CO)CA, HN(COCA)CB spectra were recorded to assign the backbone resonances of YUH1 in the YUH1-Ub covalent complex.

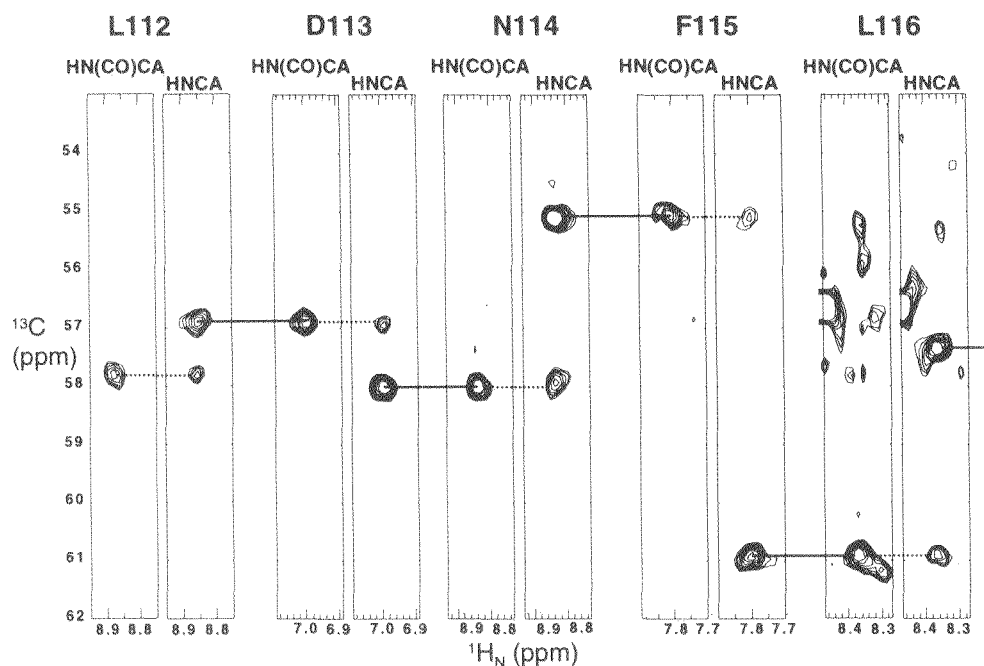


Figure 1: Backbone resonance assignment of YUH1-Ub mixture. $^1\text{H}_\text{N}(F_3)\text{-}^{13}\text{C}(F_2)$ cross-sections corresponding to the ^{15}N frequencies (F_1) of residues L112 - L116, in the 3D HN(CO)CA and HNCA spectra of a 1:3 molar mixture of $\sim 80\%$ $^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -labelled YUH1 and unlabelled Ub respectively. Bold lines indicate inter-residue connectivities while by dotted lines indicate intra-residue connectivities.

RESULTS AND DISCUSSION

Titration experiments monitored YUH1 during formation of transient YUH1-Ub complex. Around 40% of ^1H , ^{15}N correlations disappeared due to exchange broadening. Of the remaining residues, some displayed considerable chemical shift changes while the rest were least affected. This indicated an intermediate exchange behaviour for Ub bound YUH1. Backbone resonance

assignment, as shown in Figure 1, was performed on a 1:3, YUH1-Ub mixture to get further information on the binding interface. Though the sensitivity was enhanced due to deuteration yet the intermediate exchange resulted in ~60 missing ^1H - ^{15}N correlations. These residues, lacking ^1H - ^{15}N correlations may be involved in direct or indirect interaction with Ub and might constitute the binding interface for Ub. This information when mapped onto the secondary structure of YUH1, shows an extensive area of contact for Ub on YUH1. Missing residues include those around active site regions, few acidic and hydrophobic patches.

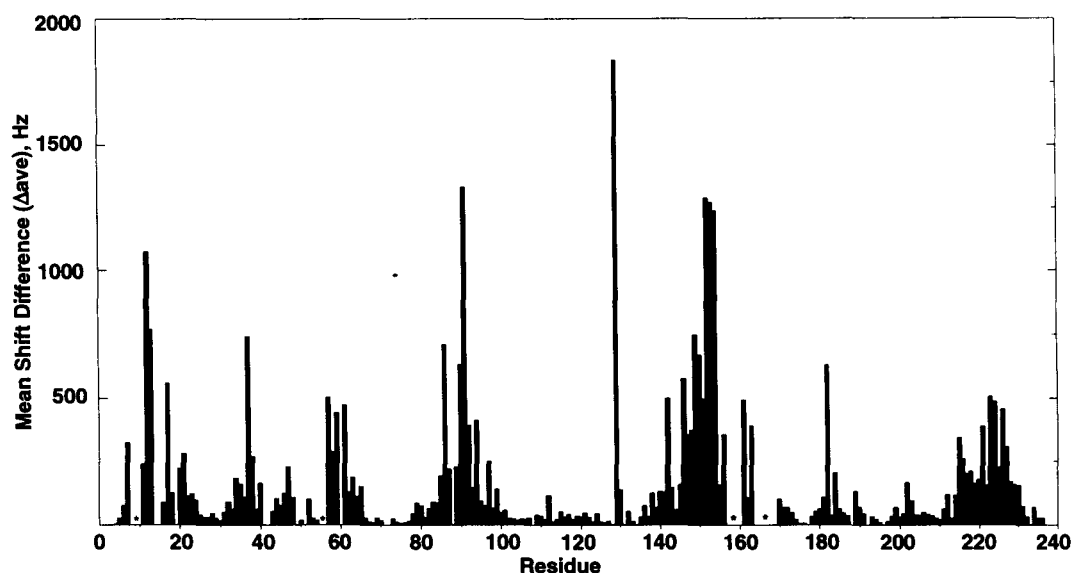


Figure 2: Chemical shift difference for backbone $^1\text{H}_\text{N}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$ between free YUH1 and YUH1-Ub covalent complex. Unassigned residues due to missing connectivities are indicated by asterisk. Mean shift difference, $\Delta_{\text{ave}} = [(\Delta^1\text{H}_\text{N})^2 + (\Delta^{15}\text{N})^2 + (\Delta^{13}\text{C}_\alpha)^2]^{1/2}$, where $\Delta^1\text{H}_\text{N}$, $\Delta^{15}\text{N}$, $\Delta^{13}\text{C}_\alpha$ are the chemical shift differences (Hz) between YUH1 and YUH1-Ub covalent complex.

In order to obtain more precise information on the binding interface we performed a similar set of experiments as explained above on an equimolar ~80% ^2H , ^{13}C , ^{15}N -labelled YUH1 - unlabelled Ub covalent complex. Almost 92% of backbone ^1H , ^{15}N resonances could be assigned for this complex. Backbone ^1H , ^{15}N $^{13}\text{C}_\alpha$ correlations could not be assigned for 20 residues due to lack of connectivities in the ^{13}C dimension, though we could observe corresponding crosspeaks in the ^1H - ^{15}N HSQC spectrum. Chemical shift perturbation of residues in YUH1-Ub complex from that of free YUH1, shown in fig., 2, identified the Ub interacting domains in YUH1, consistent with our earlier observations for the 1:3 mixture. These results when mapped onto the X-ray structure of YUH1 homologue, UCHL3 favour a lateral binding for Ub on UCH family enzymes involving both electrostatic and hydrophobic interactions. A hypothetical model for UCHL3 Ub binding could be envisaged on the basis of the above results.

P17

**Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 による Ubiquitin の
認識機構の NMR 解析**

(三菱化学生命研¹, 理研・分子遺伝², 東京医科歯科大・歯³,
北里大・理⁴) ○坂本泰一¹, 伊藤隆², Rajesh Sundaresan^{2,3},
岩本真理子¹, 小寺義男^{1,4}, 河野俊之¹

An NMR analysis of the recognition of ubiquitin by ubiquitin hydrolase 1
Taiichi Sakamoto¹, Yutaka Ito², Sundaresan Rajesh^{2,3}, Mariko Iwamoto¹, Yoshio Kodera^{1,4},
and Toshiyuki Kohno¹

¹Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, ²Laboratory of Cellular and Molecular Biology,
The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), ³Faculty of Dentistry, Tokyo
Medical and Dental University, and ⁴Department of Physics, School of Science, Kitasato
University

Yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) is a cysteine protease, which catalyzes the removal of adducts from the C-terminus of ubiquitin and is important for the generation of monomeric ubiquitin. Heteronuclear NMR spectroscopy has been utilized to map the binding surface on ubiquitin for YUH1. With titrating YUH1 to ubiquitin, the amide resonances of the basic residues were highly perturbed. The positively charged basic residues are possibly involved in direct interaction with negatively charged acidic residues on YUH1. In addition to electrostatic surface, hydrophobic surfaces on ubiquitin and YUH1 also likely contribute to the binding interaction. These large changes were observed for residues located extensively on the five-stranded β -sheet and C-terminus in ubiquitin, suggesting that YUH1 recognizes a wide area of ubiquitin.

[序] yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH1, アミノ酸 236 残基) は, ubiquitin (76 残基) の C 末端の Gly 残基の後ろでペプチド結合を特異的に切断するシステインプロテアーゼであり, ubiquitin 前駆体のプロセッシングを行っている. また, YUH1 は polyubiquitin 化したポリペプチドからポリペプチド断片を切り放す活性を持つ. polyubiquitin 化したタンパク質が 26S プロテアソームにより分解された後に, YUH1 は 26S プロテアソーム上に polyubiquitin 化したポリペプチドが蓄積するのを防ぎ, ubiquitin をリサイクルしていると考えられている. 我々は, YUH1 による ubiquitin の認識機構を明らかにすることを目的とし, NMR による解析を行った.

Keywords: ubiquitin, yeast ubiquitin hydrolase 1, chemical shift perturbation

さかもと たいいち, いとう ゆたか, Sundaresan Rajesh, いわもと まりこ,
こでら よしお, こうの としゆき

[方法] ^{15}N 標識した ubiquitin, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ubiquitin および 50%-D/ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ubiquitin を大腸菌を用いた系により大量調製した. ubiquitin のアミドシグナルの帰属のため, ^{15}N 標識 ubiquitin を用いて 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC, 3D ^{15}N -edited TOCSY-HSQC, 3D ^{15}N -edited NOESY-HSQC の測定および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 ubiquitin を用いて 3D CBCACONH, 3D HNCACB の測定を行った. 次に, ^{15}N 標識 ubiquitin を YUH1 で滴定しながら 2D HSQC の測定をすることにより, アミドシグナルの変化を調べた. YUH1 と複合体を形成した 50%-D/ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 ubiquitin のアミドシグナルの帰属のため, 3D HNCA, 3D HN(CO)CA を測定した.

[結果および考察] ^{15}N 標識した ubiquitin を YUH1 で滴定したところ, YUH1 との結合により, ubiquitin の主鎖のアミドシグナルの約半分が大きく変化した (Figure 1). 特に, 塩基性のアミノ酸残基 (Arg42, Lys48, Arg72, Lys74) のシグナルが大きく変化していた. よって, 正電荷を帯びた ubiquitin の塩基性残基が負電荷を帯びた YUH1 の酸性残基と相互作用している可能性が示唆された. さらに, ubiquitin の疎水性残基 (Leu8, Ile44, Phe45, Val70, Leu71, Leu73) のシグナルが変化したことから, これらの残基が YUH1 と疎水的な相互作用をしていることが示唆された. シグナルが大きく変化した残基を ubiquitin の立体構造上でマッピングすると, 変化した残基は5つの strand からなる β -sheet 表面およびC末端の広範囲に分布することがわかった. よって, YUH1 は ubiquitin の非常に広い範囲を認識しており, このことが YUH1 の基質特異性の高さに寄与していることが示唆された.

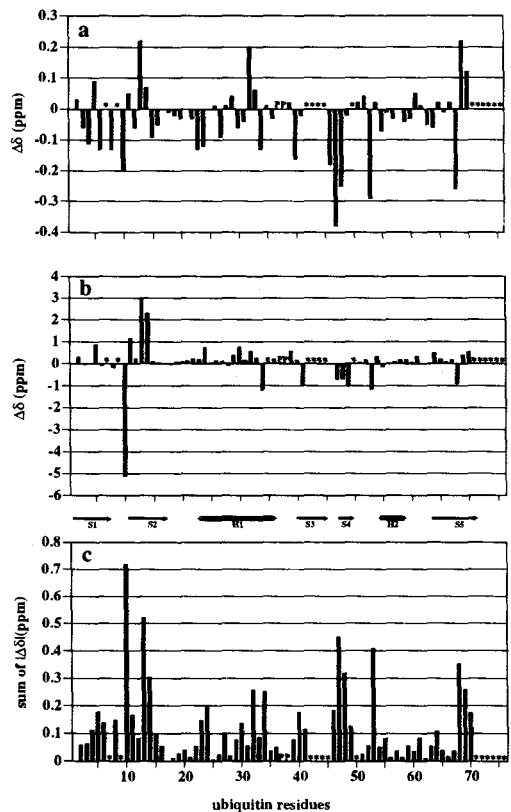


Figure 1. Chemical shift perturbations of backbone amide protons (a) and nitrogens (b) caused by binding of YUH1. The weighted sum of the total chemical shift perturbations for both nuclei (c). The complexation-induced chemical shift changes for residues indicated by asterisk could not be determined because of the disappearance of the signals.

P18

大腸菌嫌気性センサーキナーゼArcBのC末端リン酸転移ドメインの構造解析

(¹奈良先端科学技術大学院大学、²名古屋大学)

○岡田輝政¹、平山順也¹、池上貴久¹、水野猛²、白川昌宏¹

NMR study of the C-terminal phosphotransfer domain of ArcB

(¹Nara Institute of Science and Technology, ²Nagoya University)

○Terumasa Okada¹, Junya Hirayama¹, Takahisa Ikegami¹, Takeshi Mizuno², Masahiro Shirakawa¹

Two-component systems are widespread signaling functions not only in bacteria but also in some eukaryotes like yeasts and plants. The phosphotransfer reactions are carried out by characteristic transmitter and receiver domains of signaling proteins. An anaerobic sensor kinase ArcB of *Escherichia coli* was identified as a new module of two-component systems. We have determined the solution structure of a C-terminal phosphotransfer domain of ArcB (ArcB^c, 125 a.a.). ArcB^c contains five helices arranged in an anti-parallel manner. The flexibility of ArcB^c was shown by the result of the analysis of the hydrogen exchange rate and the result of the model-free analysis of the relaxation data. The relaxation data showed the presence of an axially symmetric rotational diffusion character. The pK_a value for the active His717 was determined.

細菌は2成分系(His-Aspホスホリレー)と呼ばれる情報伝達系を持ち、環境情報を感知するセンサー蛋白質から遺伝子発現を制御するレギュレーター蛋白質へのリン酸転移反応によって情報伝達を行っている。環境変化が検知されると、センサー蛋白質のトランスミッター領域のヒスチジン残基が自己リン酸化され、このリン酸基がレギュレーター蛋白質のレシーバー領域のアスパラギン酸残基に転移されることによってレギュレーター蛋白質が活性化され、転写調節等によって環境に適応する。このような情報伝達機構は、酵母や植物などの真核生物でも発見されている。

ArcBは大腸菌のセンサー蛋白質のひとつであり、嫌気的環境をセンサーとして感知し、レギュレーター蛋白質ArcAにリン酸基を転移する。ArcBは2つのトランスミッター領域と1つのレシーバー領域を持ち、リン酸基はN末端トランスミッター領域から中央のレシーバー領域、C末端トランスミッター領域へと分子内を移動し、さらにArcAのレシーバー領域へと転移される。

His-Aspホスホリレー、ArcB、多次元NMR、緩和解析、活性ヒスチジン

おかだてるまさ、ひらやまじゅんや、いけがみたかひさ、みずのたけし、しらかわまさひろ

本研究では、ArcBのC末端にある125残基からなるトランスミッター領域ArcBcのリン酸転移のメカニズムを原子レベルで理解するために、NMRを用いてArcBcの溶液中での立体構造解析を行い、動的構造を明らかにすることを目的とした。

安定同位体ラベルしたArcBcを用いた多次元NMR測定により、ほとんどの主鎖、側鎖の帰属を完了した。そしてそれをもとに距離情報、角度情報、水素結合の情報を集め、プログラムDYANAを用いたsimulated annealing法により立体構造計算を行い、ArcBcの構造を決定した。ArcBcは5本のヘリックスからなるソラマメに似た α ドメイン構造をしている。

そして、緩和時間の測定とアミドプロトンの交換速度の測定による運動性の解析を行った。緩和データのmodel-free analysisと、アミドプロトンの交換速度から得られるprotection factorから、ArcBcは全体的にしっかりした構造を持ち、活性残基を含む3本目のヘリックスは、他のヘリックスに比べて特徴のある動的構造を持つことがわかった。また、緩和データはaxially symmetric rotational diffusion tensorの存在を示した。さらにヒスチジン側鎖の化学シフトのpH依存性を調べ、リン酸化を受ける活性ヒスチジン側鎖などのpKaの値を求めた。



Fig1. Superposition of the 10 calculated structures and ribbon diagram of ArcBc

P19

ヒト NADPH オキシダーゼ p47 PB2 domain の NMR による立体構造解析

(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

Solution structure of PB2 domain of human 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

Solution structure of PB2 domain (phox and Bem homology 2) of p47^{phox} NADPH oxidase has been determined by NMR. 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. p47-PB2 comprises one three-stranded β -sheet followed by 4 α -helices with a long flexible loop. This loop contains a PXPXXP sequence, which is putative binding site of the C-terminal SH3 domain of p47^{phox}.

[序論]

PB2 (phox and Bem homology 2) ドメインは、近年発見された、120 アミノ酸前後のドメインである。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、酵母の出芽部位決定制御因子 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た(2)。p47^{phox} の PB2 ドメインは、その保存されているプロリンに富む領域と SH3 ドメインの相互作用が、NADPH オキシダーゼの活性の制御に重要であると予想されているが、その具体的な機構には不明な点が多い。我々は、NMR を用いて溶液中の PB2 ドメインの構造を明らかにすることが、生理的機能の解明につながることを期待している。

[実験]

1. NMR 測定と帰属

NMR 試料は、ヒト p47^{phox} の 1~128 番目の残基を、GST 融合タンパク発現系を用いて、大腸菌より発現、精製して得た。¹⁵N, ¹³C, ¹³C/¹⁵N 標識 p47-PB2 を定法に従いそれぞれ調製した。また、主鎖の帰属の確認のために、^{[14}N]-Arg または^{[14}N]-Lys を ¹⁵N 培地中に添加して培養した Arg /Lys - inverse label 体を併用した。

キーワード：PB2 ドメイン、多次元 NMR、分子認識、溶液構造

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

バリン、ロイシンのメチル基の立体特異的帰属には、 ^{13}C -fractionally label 体を 14% $^{13}\text{C}_6$ -glucose-86% $^{12}\text{C}_6$ -glucose を含む培地から調製して、実験に用いた。主鎖の帰属は、HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH を用いて定法に従って行った。また側鎖のプロトンは、HC(C)H-TOCSY, (H)CCH-TOCSY, HC(C)H-COSY を組み合わせて行った。aromatic 領域の帰属は ct-TROSY- ^{13}C , ^1H -COSY と ^{13}C -NOESY-HSQC を組み合わせて行った。HD 交換実験より、約 40 個の溶媒との交換が遅いアミドプロトンを同定した。

2. 立体構造計算

p47-PB2 の立体構造は、DYANA ver 1.5 (ETH) を用いて SGI ワークステーション上で、二面角空間での simulated annealing 法により計算した。計算には、約 1800 個の NOE 情報、約 100 個の二面角情報、及び 34 個の水素結合情報を用いた。

[結果と考察]

p47-PB2 (130 アミノ酸、MW 15kD) は、動的光散乱による解析から、0.1~0.5mM の濃度範囲で、見かけの分子量が 17kD から 45kD まで濃度に依存して増加する傾向を示した。これは、p47-PB2 が溶液中で自己会合して、アグリゲーションを形成しているためである。我々はタンパク質濃度 0.6~0.8mM で、3D-NMR の測定を行い、全体の約 90%の帰属を完了した。

NMRにより決定した p47-PB2 の構造は、N 末端側に 3 本の strand からなる β -sheet と、片面に 4 本の α -helix が集まった、特徴的な扁平な形状をしている。2 本の α -helix の間にある長いループは、構造計算の収束が悪いが、 ^1H , ^{15}N heteronuclear-NOE の結果からこの領域が他よりも flexible であることが示された。SH3 の結合配列ではないかと予想されているプロリン残基に富んだ配列 (PxPxxP) はちょうどこのループに位置しており、PB2 ドメインの機能を考察する上で非常に興味深い。

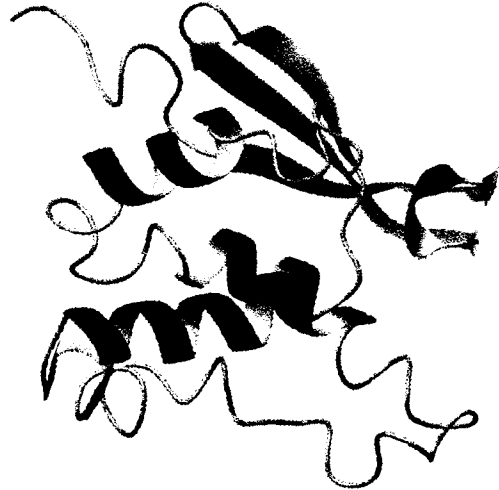


Figure 1. A ribbon diagram of p47-PB2.

[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

ヒテロメア結合タンパク質 hTRF1 DNA 結合ドメインの 立体構造解析

(¹横浜市大・院・総合理、²阪大・蛋白研、³UCSF)

°西川忠輝¹、長土居有隆¹、吉村祥子²、相本三朗²、KONIG, Peter³、西村善文¹

Solution structure of the DNA-binding domain of human telomeric protein,
hTRF1

¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Yokohama, Japan

²Protein Research Institute, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

³Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine, University of California
San Francisco, San Francisco, California, USA

°Tadateru Nishikawa¹, Aritaka Nagadoi¹, Shoko Yoshimura², Saburo Aimoto²,
Peter König³ and Yoshifumi Nishimura¹

The human TRF1 (telomere repeat binding factor 1) is a main component on human telomere as well as hTRF2, which binds to double strand TTAGGG repeats as a dimer and should be one of the key factor of telomere length regulation. hTRF1 consists of 439 amino acids, containing three presumed functional domains, an acidic domain at the N-terminus, TRF specific/dimerization domain at the central and DNA-binding domain (DBD) which has sequential homology to each of the three repeats of c-Myb DBD at the C-terminus. In order to gain structural information about human telomere, we had determined the solution structure of hTRF1 DBD which consisted of three helices and second and third helices form a helix-turn-helix valiant motif. The architecture of the 3 helices was very close to Myb repeats and Rap1 subdomains.

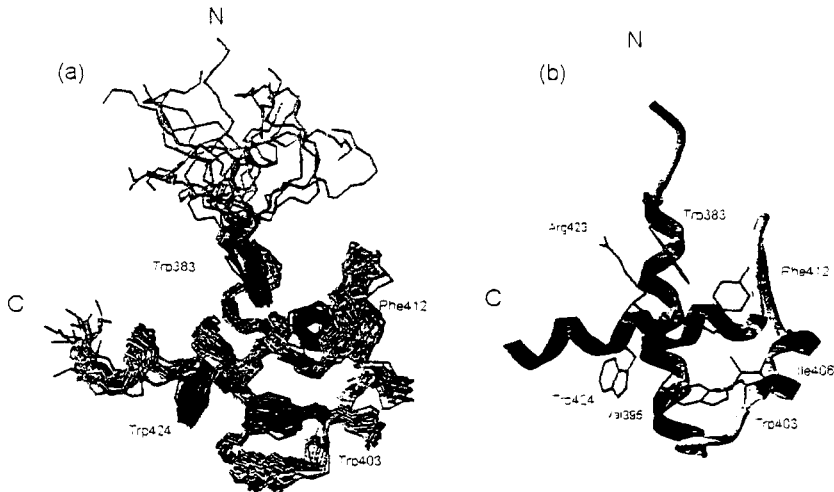
hTRF1 は hTRF2 と並んでヒトの染色体末端二本鎖テロメア DNA に結合するタンパク質であり、テロメアの構成因子となるほか、テロメラーゼの負の調節因子としても働くことが知られている。全長で 439 アミノ酸残基からなるこのタンパク質は、N 末端より酸性アミノ酸残基に富む領域、中央に TRF 特異的/二量化ドメイン、そして C 末端に転写因子 Myb タンパク質の DNA 結合ドメイン各リピートと配列相同性を

テロメア、TRF, DNA 結合ドメイン、

にしかわただてる、ながどいありたか、よしむらしょうこ、
ピーター コーニック、 にしむら よしふみ

持つDNA結合ドメインを持っている。このMyb様配列は、hTRF1をはじめ、その他多くのテロメア結合タンパク質でも確認されていることから、テロメアDNAの認識にはMyb様の構造が重要だと考えられている。私達はこのDNA結合ドメインの立体構造を決定し、それに基づいてテロメアにおけるタンパク質-DNAの分子認識機構を明らかにしたいと考えている。

化学合成によってhTRF1のDNA結合ドメイン(53 a. a.)のペプチドフラグメントを得、それに対し二次元NMRの測定、スペクトルの解析、3次元構造の決定を行った。hTRF1 DNA結合ドメインは3つの α ヘリックスからなる構造を有しており、それらの相対配置は、Mybの各リピートや酵母のテロメア結合タンパク質Rap1のDNA結合ドメイン中に含まれる2個のサブドメインの各々に良く似ていた。テロメアにおけるさらなる構造情報を得るため、現在TRF1-DNA複合体での構造解析を進めている。



Solution structure of hTRF1 DNA-binding domain (TRF Myb homology region, 53 a. a.) (a) Best-fit superposition of the 18 structures. (b) Refined average structure derived from the 18 structures. Residues which form the hydrophobic core are indicated in both.

P21

局所的な構造変化を誘起した cystatin A の構造解析

(都立大・理¹、青学大・理工²) ○須田真輔¹、楯 真一¹、大野綾子¹、
梶 裕之¹、松井裕¹、鮫島達也²、甲斐荘正恒¹

NMR structural analysis of the heat induced topoisomer of cystatin A

**Shinsuke Suda, Shin-ichi Tate, Ayako Ohno, Hiroyuki Kaji, Yutaka Matsui,
Tatsuya Samejima, and Masatsune Kainosho**

**Department of Chemistry, Faculty of Science
Tokyo Metropolitan University
Aoyama Gakuin University**

Abstract : Cystatin A is a kind of thiol proteinase inhibitor. Cystatin A does not have any S-S bridges but its structure is highly stable against the temperature. Its heat denaturing point is 93°C and its structure can be reversibly re-fold after cooling down. During several purification of cystatin A, we sometimes found unexpected fraction in DEAE chromatography. After the several analysis of the fraction, we found the involved protein is also cystatin A in the partly denatured state. The spectral comparison of the ¹H-¹⁵N HSQC of the native cystatin A and that of the protein in this fraction shows only the limited part of the cross peaks have changed their locations. To characterize this partly denatured cystatin A, we started to explore the generation mechanisms of this protein. Several sorts of denaturing processes were applied to get, but finally we found out that heat denaturing process can induce this partly denatured state. In this presentation, we show the character this partly denatured cystatin A with this production process and this structural features analyzed by NMR spectroscopy.

Cystatin A はチオール プロテアーゼ阻害蛋白質の 1 つであり、極めて熱に安定な構造を持つことが知られている。その熱変成温度は 93 度であり、熱変性後も冷却することで元の構造に戻ることがわかっている。我々は、これまでに何度も cystatin A の精製を繰り返すうちに、時々 DEAE の溶出に通常では現れないフラクション(B-fraction)が出ることに気がついていた。この、フラクションの蛋白質を単離して NMR スペクトルを調べてみると、その蛋白質は cystatin A そのものであり、しかも NMR スペクトルから見る限り完全に変成したものではなく、極めて局所的な構造変化のみを持つものであることがわかった。図 1 には、¹H-¹⁵N HSQC の比較を示す。

Key words: protein folding, heat denaturing, NMR, protein structure

すだしんすけ、たて しんいち、おおのあやこ、かじひろゆき、まついゆたか、さめじまたつや、
かいのしょうまさつね

(a) native cystatin A, (b) B-フラクションから単離された cystatin A。このスペクトルの比較からわかるように、両者には極一部にシグナル変化が見られているのみで、全体的には極めて良く似たスペクトルを与えていることがわかる。

この B-フラクション cystatin A の性質を詳しく調べるために、様々な変成条件を用いて B-フラクション cystatin A の生成条件を検討した。その結果、100 度で蛋白質を変成させその後、序冷することで、B-フラクション cystatin A を作り出すことが可能であることを見出した。図 2 には、陰イオン交換 HPLC の溶出パターンを示すが、native cystatin A をこのような熱処理をすることで、native 蛋白質よりも溶出の遅れる B-fraction に相当する cystatin A が生成することを示している。また、逆に精製した B-fraction の cystatin A を同様の熱処理にかけると、今度は逆に native cystatin A を生成することが可能である、図 3。このことは、cystatin A が熱による変成過程を経て行き来する 2 つの安定な構造状態を持つことを示唆している。

現在我々は、同位体利用 NMR 法を用いて B-fraction の cystatin A の立体構造解析を行っているが、発表では、構造解析の結果を基にして cystatin A の持つもう一つの安定な立体構造の性質とその生成の機構に関して議論する予定である。

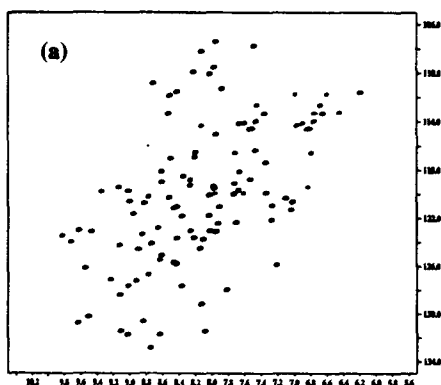
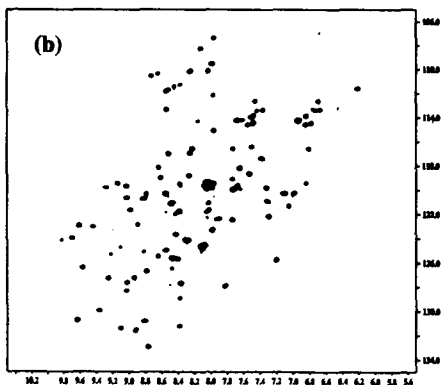
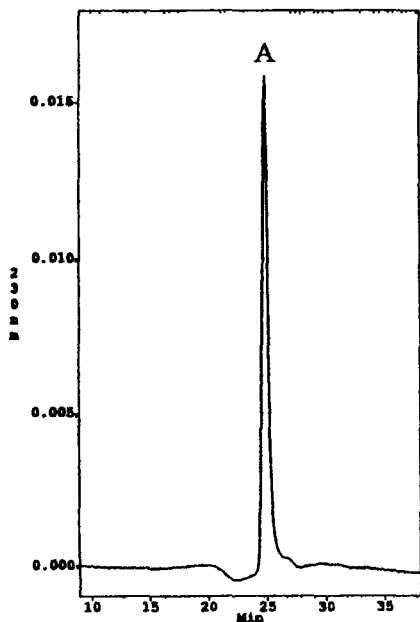


図 1. Native cystatin A(a)と B-fraction から単離された cystatin A(b)の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの比較





Elution profile of Anion Exchange Chromatography
 Column: POLOS Q/M 4.60mmD/50mmL
 Solvent: 10mM Tris-HCl pH8.0
 Gradient: 0-300mM NaCl /30min
 Flow rate: 1.00ml/min

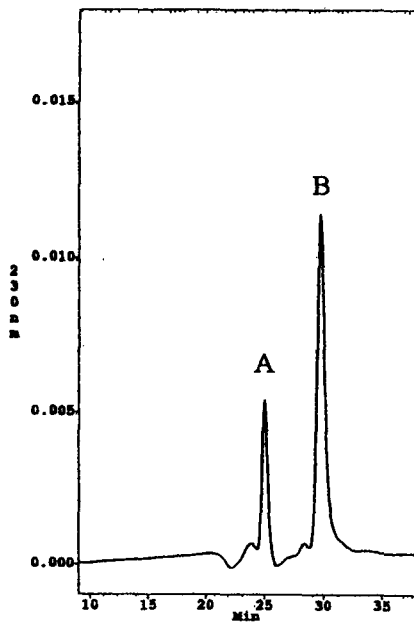
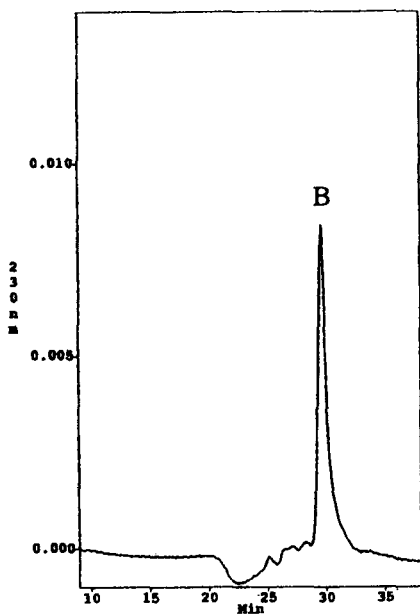


図2. Native cystatin A の HPLC 溶出パターン(a)と、熱処理後に得られる溶出パターン(b)。部分変性した蛋白質を含む B-fraction が生成している。



Elution profile of Anion Exchange Chromatography
 Column: POLOS Q/M 4.60mmD/50mmL
 Solvent: 10mM Tris-HCl pH8.0
 Gradient: 0-300mM NaCl /30min
 Flow rate: 1.00ml/min

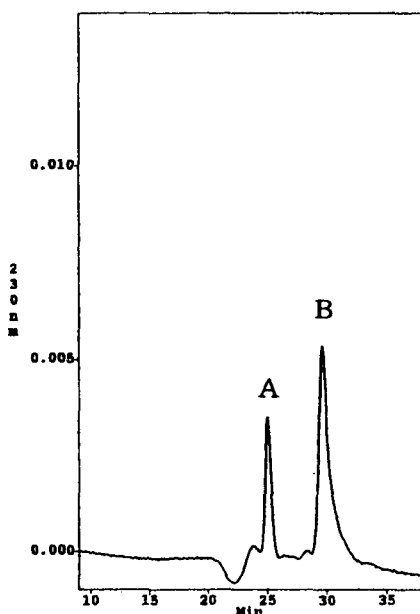


図3. B-fraction 蛋白質を熱処理した時の HPLC 溶出パターンの変化。

翻訳開始因子 eIF4E の構造と運動性

[§]Harvard Medical School, Dept. of BCMP. [†]大阪大学蛋白質研究所
o Matsuo Hiroshi^{§*}, A. M. McGuire[§], G. Wagner[§].

Structure and Dynamics of translation Initiation Factor: eIF4E

[§]Harvard Medical School, Dept. of BCMP. [†]Institute for protein research, Osaka univ.
o Matsuo Hiroshi^{§*}, A. M. McGuire[§], G. Wagner[§].

The mRNA cap-binding protein is the limiting factor in the eIF4F translation initiation complex, which mediates the binding of 40S ribosomal subunit to the mRNA. ¹⁵N relaxation studies have been used to characterize the back bone dynamics of deuterated eIF4E in a CHAPS micelle for the apoprotein, the m⁷Gpp bound form, and the m⁷GpppA bound for, as well as for CHAPS-free eIF4E. Large differences in overall correlation time between the CHAPS (15.9 ~19.4 ns) and CHAPS-free (11.8 ns) forms indicates that eIF4E is embedded in a large micelle in the presence of CHAPS, with a total molecular weight in the range of 40-60 kD. The concentration of CHAPS has a large effect on the overall correlation time of eIF4E within the CHAPS micelle. CHAPS seems to restrict the mobility of two loop regions thought to be embedded in the micelle. Amide hydrogen exchange data indicates the presence of slowly exchanging amides protected by the CHAPS micelle. No significant changes in overall mobility were seen between the m⁷Gpp-bound form, the m⁷GpppA-bound form, and the apoprotein.

mRNA の CAP 構造に結合する翻訳開始因子 eIF4E は eIF4F 複合体を構成する蛋白質の 1 部として mRNA を ribosome に結合させる役割を担う翻訳開始に不可欠な分子である。我々は eIF4E 蛋白質と CAP 構造のアナログである m⁷Gpp との複合体の構造を決定した。資料の溶解度と安定性をあげるために両性イオンをもつ非変性デタージェント CHAPS を 25mM 用いた。アポ蛋白質、m⁷Gpp 複合体 m⁷GpppA 複合体、CHAPS フリーの eIF4E 蛋白質について主査のアミド窒素核の緩和測定を行い運動性を比較した。CHAPS のミセルに取り込まれた eIF4E の等方的な回転運動の相関時間は 15.9~19.4ns であり、CHAPS を含まないサンプルでは 11.8ns であった。これは eIF4E 蛋白質が CHAPS のミセルに取り込まれ全体の分子量が 40-60 kD になっていることを示している。また CHAPS の ミセルに取り込まれることで溶媒との交換から保護されたアミド窒素核が重水素交換実験で観測された。

翻訳開始因子、CHAPS、¹⁵N 緩和測定

まつお ひろし

P23

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 *E.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 that are responsible for transport and assimilation of phosphate and phosphorous compound. The DNA-binding domains of PhoB at least have two functions, DNA-binding and interaction with RNA polymerase. PhoB-like proteins consist of a large family of transcriptional factor in bacterial species. The crystal structure of DNA-binding domain of OmpR, one of PhoB-like proteins, already has been determined. PhoB and OmpR directly interact with RNA polymerase, but interact with different subunit of RNA polymerase; the σ -subunit for PhoB and the α -subunit for OmpR. Here, We have determined the solution structure of PhoB DNA-binding domain and compared it with the crystal structure of OmpR DNA-binding domain. The structures of RNA polymerase contact site represent significant differences between PhoB and OmpR.

<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 30 個以上のリン酸レギュロンと呼ばれる遺伝子群が発現され、単一の転写因子 PhoB により調節されている。リン酸欠乏下では内膜に存在している PhoR が ATP により自己リン酸化され、PhoB に対してキナーゼとして働き PhoB をリン酸化する。リン酸化された PhoB はリン酸レギュロン遺伝子群のプロモーター領域に共通に存在する phobox と呼ばれる共通配列への結合能が上昇し、RNA ポリメラーゼによる転写が誘導される。PhoB は分子量 26 k Da, 229 残基からなる蛋白質であり、N 末端側にリン酸受容ドメイン、C 末端側に DNA 結合ドメインの二つのドメインから構成されている。C 末端側の DNA 結合ドメインは DNA 結合と転写活性化の 2 つの機能を持つと考えられて

NMR、PhoB、OmpR、DNA 結合ドメイン、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

いる。PhoB 様の転写因子は原核生物において、大きなファミリーを形成しており、C 末端側の DNA 結合ドメインについて、OmpR 蛋白質で、X 線結晶構造解析が行われており、その構造はヘリックスターンヘリックス変異モチーフである Winged ヘリックスターンモチーフに属するものであった。さらに、転写活性化の際に RNA ポリメラーゼとの相互作用すると考えられる部位はヘリックスターンヘリックスモチーフのいわゆるターン領域に当たり、ここは、11 残基という非常に長いループを形成していた。また、PhoB の RNA ポリメラーゼ相互作用部位も OmpR の構造上でループ部分に当たっていた。しかし、OmpR と PhoB は、転写活性化の際に、OmpR は α サブユニットと PhoB は $\sigma 70$ サブユニットとそれぞれ相互作用をするなどの機能の違いが存在し、また、このループ部分の相同性も低いものであった。そこで、これらの機能の違いを理解するために、われわれは、PhoB の DNA 結合ドメインを NMR により溶液中の構造を決定し、OmpR の X 線結晶構造との比較を行った。さらに、PhoB の転写活性化のメカニズムを明らかにするために、DNA との複合体の構造解析についても行っている。

<実験>

PhoB の DNA 結合ドメインは大腸菌大量発現系により、 ^{15}N , ^{13}C 安定同位体ラベルについて、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{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 測定は 50mM リン酸緩衝液、500mM NaCl 中で、温度 300K で行った。主鎖の帰属には CBCA(CO)NH, CBCANH、側鎖の帰属には HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, HNHB, NOESY, TOCSY を用いた。距離制限は 2D NOESY, 3D ^{15}N -edited NOESY, 3D ^{13}C -edited NOESY, 4D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -edited NOESY、角度制限は HNHA から得た。これらの制限を使い、構造計算を行った。また、PhoB と DNA フラグメントとの複合体についても NMR 測定を行った。

<結果と考察>

構造計算の結果から得た 20 個の構造のその平均構造からの主鎖 rmsd は N 末 C 末を除いた全体で $0.63 \pm 0.08 \text{ \AA}$ 、二次構造要素で $0.39 \pm 0.05 \text{ \AA}$ であった。得られた構造は、N 末から 4 つの β ス



Fig1. Left: Backbone superposition of the 20 NMR-derived structures
Right: Ribbon representation of the average structure

トランドからなる β シート、3本のヘリックス、C末に β ヘアピンというものであった。これらの二次構造はOmpRのDNA結合ドメインと一致するものであり、特に3本のヘリックスとC末の β ヘアピンの配向は非常によく重なるものであった。しかしながら、DNAとの複合体のNMR測定から認識ヘリックスと考えられる3本目のヘリックスの長さがPhoBの方がOmpRに比べて長くなっており、さらに、それに伴いRNAポリメラーゼの相互作用部位と考えられる2本目と3本目のヘリックスの間のループの構造は大きく異なっていた。これらの構造の違いにはPhoB、OmpRそれぞれでループ中に存在している変異によりRNAポリメラーゼとの相互作用が失われるという報告がなされている疎水性残基が大きな役割をしていることが明らかになった。また、これらの構造の違いはPhoBとOmpRの相互作用するRNAポリメラーゼのサブユニットの違いを表しているのかもしれない。



Fig2. Left: PhoB DNA-binding domain. Right: OmpR DNA-binding domain.

P24 VavのN末端側SH3ドメインのNMRによる立体構造解析 (都臨床研) ○小椋賢治, 永田宏次, 戎井悦子, 畠中秀樹, 稲垣冬彦

Structural study of the N-terminal SH3 domain of Vav

Kenji Ogura, Koji Nagata, Etsuko Ebisui, Hideki Hatanaka, and Fuyuhiko Inagaki
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

The N-terminal SH3 domain of Vav (Vav/nSH3) has a proline-rich region, which is known to be a ligand to the C-terminal SH3 domain of Grb2 protein.

Uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - and ^{15}N -labeled Vav/nSH3 (78 residues) samples were prepared by overexpression system using *E.coli*. The solution structure of Vav/nSH3 was determined using a series of the triple resonance multi-dimensional NMR experiments and simulated annealing calculations.

Although an overall folding of Vav/nSH3 was similar to other SH3 domains, the proline-rich region was inserted in the RT-src loop. Further structural details will be discussed

Vavは血球系細胞に発現する845アミノ酸からなるタンパク質であり、シグナル伝達系因子に特徴的なドメインを多く含んでいる。そのなかにはSrc homology-3 (SH3) ドメインが2個存在する。そのうちN末端側のSH3ドメイン (Vav/nSH3) は以下の2点の特徴を有する。(1)他のSH3ドメインとアミノ酸相同性が低い。(2)自分自身にプロリンに富む領域 (proline-rich region; PRR) を持ち、このPRR領域がGrb2タンパク質のC末端側SH3ドメイン (Grb2/cSH3) と結合できる。このことはVav/nSH3においてのみ見られる特徴である。今回われわれは、SH3同士の間を介したVav-Grb2間の相互作用様式を解明するための第一段階として、Vav/nSH3単独でのNMRによる立体構造解析をおこなったので報告する。

ノンラベル-, ^{15}N 均一ラベル-, $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ 均一ラベル-Vav/nSH3ドメイン (78残基) は大腸菌の大量発現系により生産した。得られたタンパク質を90% H_2O /10% D_2O または D_2O に濃度1mMにて溶解し、NMR測定試料とした。Varian UNITYplus600またはUNITY INOVA500分光計を使用し、各種の多次元NMRスペクトルを測定した。NMRデータ処理には、NMRPipe, Felix95.0および自家製ピークピック/相関検出プログラムを使用した。立体構造計算にはXPLOR3.1を使用した。

Vav/nSH3は、他のSH3ドメインとアミノ酸相同性が低いにもかかわらず、SH3ドメインとしての立体構造上の特徴を保持していた。また、PRR領域はRT-loop部位に存在していることがわかった。

Vav, SH3ドメイン

おぐらけんじ, ながたこうじ, えびすいえつこ, はたなかひでき, いながきふゆひこ

ナトリウムチャンネルの不活性化ゲートペプチドと
 ペンタペプチド KIFMK との相互作用

(京大薬) 黒田義弘、○前田能崇、宮本和英、田中一二三、
 大高 章、藤井信孝、中川照眞

Interactions between the sodium channel inactivation gate peptides and
 the pentapeptide KIFMK as studied by ¹H-NMR spectroscopy

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Yoshihiro Kuroda, ○Yoshitaka Maeda, Kazuhide Miyamoto,

Kazufumi Tanaka, Akira Otaka, Nobutaka Fujii, and Terumichi Nakagawa

The pentapeptide, KIFMK, which contains three clustered hydrophobic amino acid residues of isoleucine, phenylalanine, and methionine (IFM) in the sodium channel inactivation gate on the cytoplasmic linker between domains III and IV, is known to restore the fast inactivation and to block open sodium channels. In order to investigate the docking site of this pentapeptide to the sodium channel and the resulting molecular mechanisms of the action of the pentapeptide on the sodium channel fast inactivation process, we have studied the interactions between the pentapeptide and the fragment peptide which includes the IFM residues (GGQDIFMTEEQK; MP-1A (1484-1495)) by ¹H-NMR spectroscopy. Some related peptides which are mutated at the acidic amino acid residues (D, E) into the corresponding neutral amino acid residues (N, Q) in MP-1A and also the pentapeptide synthesized by using *d*-Lys instead of *l*-Lys, *d*-KIFM*d*-K, have also been studied. It was concluded that both D1487 and E1492, but not E1493, are situated in a favorable position for the electrostatic binding to the lysine residues of KIFMK.

【緒言】

ナトリウムチャンネルは、電氣的興奮性細胞において活動電位を生じるナトリウムイオンの急速な流入を媒介している。電位依存性ナトリウムチャンネルは、活動電位発生時、脱分極を引き起こし、その際のナトリウムイオンの流入は不活性化によって終了する。ナトリウムチャンネルの不活性化機構に関して、αサブユニットのドメインⅢのセグメント6とドメインⅣのセグメント1とを

ナトリウムチャンネル、不活性化ゲート、KIFMK、静電相互作用、NMR

くろだよしひろ、○まえだよしたか、みやもとかずひで、たなかかずふみ、
 おおたかあきら、ふじいのぶたか、なかがわたるみち

細胞質側で結ぶⅢ-Ⅳ linker 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残基 IFM(Ile1488, Phe1489, Met1490)がナトリウムイオンの通過する孔を閉塞することにより、ゲートが閉じて不活性化が起こると報告されている(1992)。また、疎水性アミノ酸 IFM を含むペプチド KIFMK が薬物や変異によって不活性化の阻害されたナトリウムチャンネルに作用して不活性化を回復し、正常なナトリウムチャンネルに対しては不活性化を速めるという報告がある(1994)。

これらの報告から、我々はナトリウムチャンネルの不活性化ゲートに KIFMK が重要な影響を及ぼしていると考え、Ⅲ-Ⅳ linker 領域に対応する IFM を含むペプチド MP-1A(Fig.1, rat brain II A, Gly1484-Lys1495)を合成し、疎水性環境を模倣する系として TFE(CF₃CD₂OH):H₂O=80:20 中での KIFMK との相互作用を ¹H-NMR を用いて検討した。また、約 50 残基からなるⅢ-Ⅳ-linker 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て、置換ペプチド MP-1NA(D1487N)、MP-1QEA(E1492Q)、MP-1EQA(E1493Q)を合成し、KIFMK との相互作用を調べた。また、MP-1A と KIFMK との相互作用に対して KIFMK の両端の *l*-Lys を *d* 体に置き換えることによる影響を、80% TFE 中で ¹H-NMR を用いて検討した。

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-1NA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asn-Ile-Phe-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-NH₂

MP-1EQA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Glu-Gln-Gln-Lys-NH₂

MP-1QEA

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Gln-Glu-Gln-Lys-NH₂

KIFMK

Ac-Lys-Ile-Phe-Met-Lys-NH₂

d-KIFM*d*-K

Ac-*d*-Lys-Ile-Phe-Met-*d*-Lys-NH₂

【実験】

- (1)Ⅲ-Ⅳ linker 中の IFM を含む各種ペプチドは F-moc 固相法によって合成し、ODS カラムを用いる逆相 HPLC によって精製し、大気圧イオン化法マスペクトルによって分子量を確認した。
- (2)溶媒(TFE:H₂O=80:20)にモデルペプチド(50 μ M)を溶解させ、pH 7.0 に調整して、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。
- (3)溶媒(TFE:H₂O=80:20)に 12 残基のペプチド(3 mM)、5 残基のペプチド(3 mM)、及びその両方を溶解させ、pH 7.0 に調整して、300 K で bruker AM-

600(600 MHz)を用いて 1D-NMR、COSY、TOCSY(90 ms)、ROESY(200 ms)の測定を行った。その後、Silicon Graphics Indigo において NMRpipe で Conversion 及び Processing を行った。

(4)得られた 2D-NMR スペクトルから連鎖帰属法に従い、各プロトンの帰属を行った(Fig.2)。

【結果と考察】

80% TFE 中のペプチドの構造については、CD スペクトルから MP-1A、MP-1NA、MP-1EQA、MP-1QEA の全てが α ヘリックス構造をとり、KIFMK も不完全ながら α ヘリックス構造をとっていることが分かった。しかしながら、*d*-KIFM*d*-K の CD スペクトルは明瞭な二次構造を示さなかった。

80% TFE 中における MP-1A の側鎖末端のメチレンまたはメチルの各プロトンの化学シフトは KIFMK の添加により Lys12 を除いて全て低磁場シフトして観測された(Fig.3)。MP-1EQA の場合は Lys12 を含めた全てのプロトンについて低磁場シフトがみられた。一方 MP-1NA および MP-1QEA の場合、反対に Lys12 を除いて高磁場シフトが観測されたが、それらの化学シフト変化の絶対量は MP-1A および MP-1EQA の場合に比べて少なかった。さらに MP-1A に *d*-KIFM*d*-K を作用させた場合には、Lys12 を除いて MP-1NA および MP-1QEA の場合よりも大きな高磁場シフトが観測された。ここで、80% TFE 中に存在するペプチドの化学シフトは主にペプチドと溶媒との水素結合、ペプチド間の水素結合および、それらの二次構造に依存していると考えられる。さらにペプチドと溶媒との水素結合はペプチド間の相互作用により影響を受ける。MP-1A および MP-1EQA と KIFMK との相互作用においては KIFMK の両端の塩基性アミノ酸 Lys と 12 残基中の酸性アミノ酸 Asp4 および Glu9 とがそれぞれ静電相互作用をすることにより、ペプチド単独で溶媒中に存在するときの溶媒との水素結合よりも強い水素結合がペプチド間に形成されるため、低磁場シフトして観測されたと考えられる。逆に、MP-1NA および MP-1QEA と KIFMK との相互作用の場合や、MP-1A と *d*-KIFM*d*-K との相互作用ではペプチド間の相互作用は弱くペプチド間に強い水素結合は形成されない。さらにペプチドと溶媒との水素結合はペプチドが単独で溶媒中に存在する場合よりも弱まるので高磁場シフトして観測されたと考えられる。

【結論】

疎水性環境下で、KIFMK は、その両端の塩基性アミノ酸 Lys がナトリウムチャンネルの III-IV linker における酸性アミノ酸 Asp1487 および Glu1492 と静電相互作用により結合した状態で、III-IV linker 中の IFM-の疎水性レセプターに結合することによりナトリウム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.2 The fingerprint regions of (a)COSY, (b)TOCSY (90 ms mixing time), and (c)ROESY (200 ms mixing time) spectra of MP-1A in 80% TFE at 300 K recorded at 600 MHz

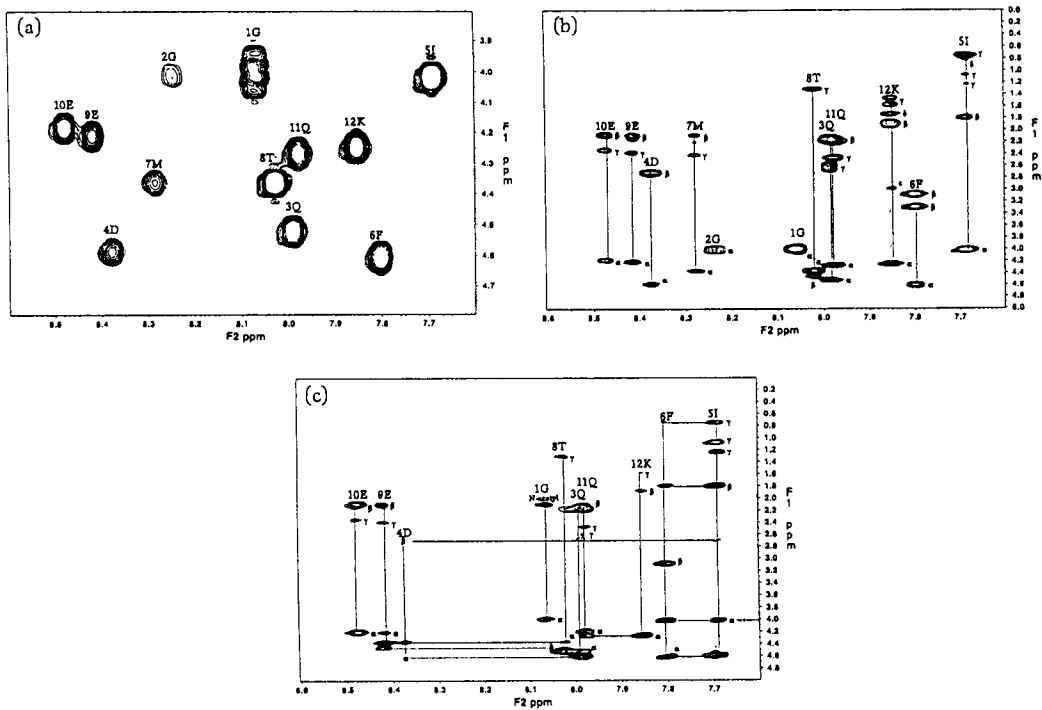
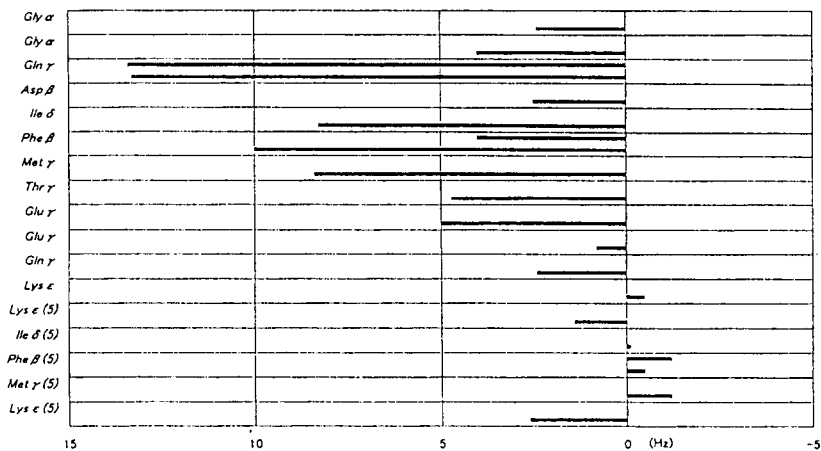


Fig.3 Changes in chemical shifts of MP-1A as a result of the interaction with KIFMK



【参考文献】

J.W.West *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89, 10910-10914 (1992).
 G.Eaholtz *et al.*, Neuron, 12, 1041-1048 (1994).

発育阻害ペプチド growth-blocking peptide(GBP) の 立体構造解析

(北大・理¹、北大・低温研²、富山医薬大・薬³)

○相沢智康¹、藤谷直樹¹、早川洋一²、河野敬一³、引地邦男¹、
新田勝利¹

Three-dimensional structural analysis of growth-blocking peptide (GBP)

○Tomoyasu Aizawa¹, Naoki Fujitani¹, Yoichi Hayakawa², Keiichi Kawano³, Kunio Hikichi¹,
Katsutoshi Nitta¹

¹Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, ²Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Growth-blocking peptide (GBP) is an insect growth factor consisting of 25 amino acid residues that retards the development of lepidopteran larvae at high concentration, while it stimulates larval growth at low concentration. In this study, we determined the solution structure of GBP by two-dimensional ¹H NMR spectroscopy. The structure contains a short segment of double-stranded β -sheet involving residues 11-13 and 19-21 and a type-II β -turn in the loop region (8-11), while the N-terminus and C-terminus are disordered. The well-defined region of GBP was found to share similarity with that of the C-terminal domain of the epidermal growth factor (EGF).

【序】 宿主体内に卵を産みつけ寄生する内部寄生バチは、寄生後、その宿主の発育を制御し、自らの生育に適した環境を整えることが知られている。growth-blocking peptide (GBP)は、寄生バチであるカリヤコマユバチの宿主であるアワヨトウ幼虫から単離された25残基から成るペプチドであり、寄生された宿主幼虫体内でその濃度が上昇し、成長、蛹化を妨げる活性を持つことが知られている。最近の研究から、このGBPは、未寄生の幼虫内でも発現している幼虫の遺伝子由来の産物で、低濃度では昆虫の培養細胞の増殖を促進し、高濃度で阻害する、成長因子であることが明らかになった。GBPは、昆虫において初めて同定された成長因子であり、その構造、機能の解明は重要な意義を持つ。また、数多くの研究例のある、哺乳類由来の成長因子との比較も興味深い。我々は、このGBPの溶液構造をNMRにより決定した。

キーワード： 2次元¹H-NMR、growth-blocking peptide (GBP)、上皮成長因子 (EGF)

あいざわともやす、ふじたになおき、はやかわよういち、かわのけいいち、
ひきちくにお、にったかつとし

【方法】 試料のGBPは、ペプチド合成機を用いてBoc法により化学合成し、2個のシステイン残基間 (Cys7, Cys19) をジスルフィド結合で架橋した。精製した試料を、重水及び軽水中に1.5-3.0mMの濃度で溶解し、pHを4.4に調整して、2次元 ^1H NMR測定をおこなった。装置は、日本電子社製 JNM- α 600 分光計を用い、DQF-COSY、TOCSY (mixing time, 50-100ms)、NOESY (mixing time, 100-500ms) スペクトルを数点の温度 (4°C、10°C、30°C) で測定し、NMRシグナルの帰属を行った。また、凍結乾燥後の試料を重水に溶解することで、アミド交換速度の遅い残基を同定した。

構造計算に必要な距離制限情報は、NOESY (mixing time 300ms) スペクトルから、二面体角情報はDQF-COSYスペクトルから求め、立体構造計算は、X-PLOR 3.1を用いて行った。

【結果と考察】 N末端2残基を除くほとんどすべての残基について、そのNMRシグナルの帰属を完了した (図1)。また、これらの情報に基づいて、同定した二次構造を図2に示す。2本鎖逆平行 β シート (Tyr11-Arg13, Cys19-Pro21) および、Type II β ターン (Val8-Tyr11) が同定され、25残基とかなり分子量の小さい成長因子でありながら、二次構造を有していることが判明した。

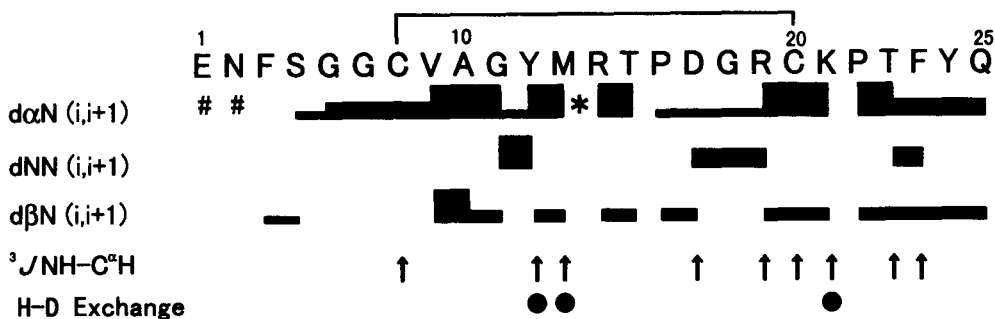


Fig.1. Diagram of NOE connectivities between protons of neighboring ($d\alpha\text{N}$, $d\beta\text{N}$, $d\text{NN}$) J -coupling constants ($^3J_{\text{HN-H}\alpha}$) and slowly exchanging amide protons in D_2O . The strength of the observed NOE is represented by the thickness of bars. Residues with $^3J_{\text{HN-H}\alpha} > 8$ Hz are indicated by arrows. The backbone amide protons, which exchange slowly with D_2O , are indicated by circles. The $d\alpha\text{N}$ of Met12 is not identified because the alpha proton of Met12 is not assigned (*). Glu1 and Asn2 are not assigned (#). The disulfide connectivity is shown by a solid line.

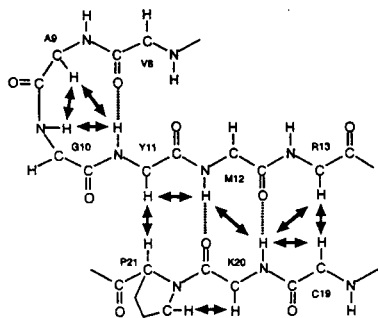


Fig. 2. Identification of the antiparallel β -sheet and the type II β -turn. The NOE connectivities are indicated by arrows. The broken line indicates hydrogen bonds for which slowed amide-proton exchange was observed.

X-PLORでの構造計算は、NOESYスペクトルに基づく117個の距離制限情報、同定された3個の水素結合に基づく距離制限情報、7個の二面体角情報を用いて行われた。合計100個の計算結果から、エネルギー値が最少で、距離情報に対するバイオレーションが0.1 Å以下の20個を選択した(図3)。N末端及びC末端の残基(Glu1-Gly6, Phe23-Gln25)は、距離制限情報が少なく、構造が収束しなかった。これらの領域を除いた部分の、平均構造に対する20個の構造のRMSDは、主鎖のN,C α ,C核に対して0.89 Å、すべての重原子に対して1.72 Åであった。

最近の我々の研究から、GBPは、昆虫由来の培養細胞(SF-9)に対してだけでなく、ヒト上皮由来培養細胞に対しても増殖促進活性を持ち、その活性の強さは、ヒト上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)と同程度であることが明らかになった。また、興味深いことにEGFのC末端ドメインに対して、GBPは一次構造上の弱い相同性を持つ。図4は、GBPとマウスEGFの立体構造の比較であり、立体構造上も相同性を持つことが明らかになった。高い相同性を持つ β シートおよび β ターン領域の、GBPとEGFの主鎖間のRMSDは、1.98 Åであった。

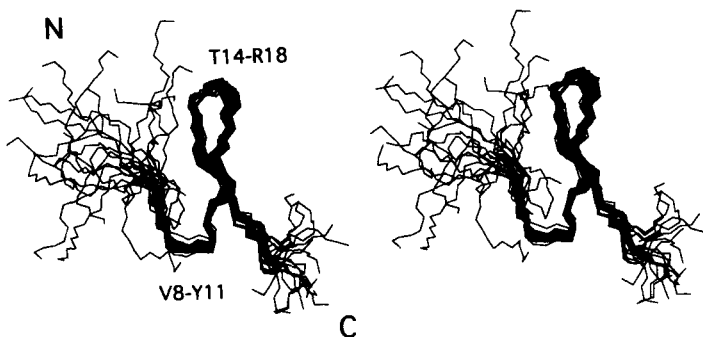


Fig. 3. Stereo view of the ensemble of 20 NMR structures of GBP superimposed for best fit over the backbone atoms of residues 7-22 of the mean coordinate structure.

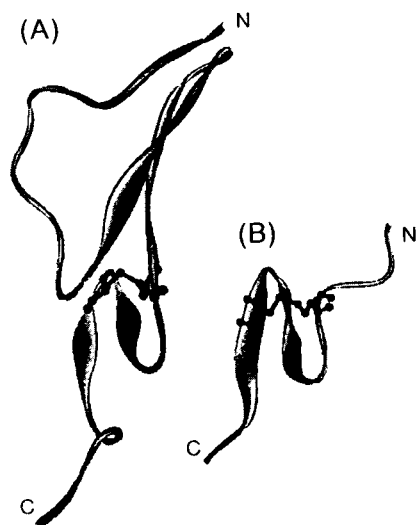


Fig. 4. Comparison of the 3-D structures of (A) mouse EGF and (B) GBP. The disulfide bonds, Cys33-Cys42 in EGF and Cys7-Cys19 in GBP, are shown with balls and sticks.

基からなる zinc finger motif (ZFM) を 2 つ含み, N 端側の ZFM と C 端側の ZFM は塩基性アミノ酸に富む 7 残基のアミノ酸 (linker 領域) でつながれている. この linker 領域は NC タンパク質の機能発現にとって重要であることが様々な生化学的な研究によって明らかにされている [1]. NCp7 およびその部分ペプチドの立体構造は既に NMR によって決定されて, 今までに約 10 件の論文で構造機能相関について議論されている [2,3]. にもかかわらず, NCp8 の立体構造と機能の関係はほとんど研究されていない. 当研究では, NCp8 の立体構造を決定し, HIV の NC 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.

昨年度, 我々は NCp8 の N 端側の ZFM と linker 領域を含む 29 アミノ酸残基の部分ペプチド (NCp8-f1: ウイルス RNA を認識する最小の構造単位) の立体構造を決定した. 本年度はこれに引き続き, linker 領域と C 端側の ZFM を含む 27 アミノ酸残基のペプチド (NCp8-f2) の構造を決定した. 討論会では, NCp8-f2 の立体構造と NCp8-f1 および他のレトロウイルスの NC タンパク質の立体構造を比較して NC タンパク質の構造機能相関について議論する.

- [1] Darlix, J. L., Lapadat-Tapolsky, M., De Rocquigny, H. & Roques, B. P. (1995). *J. Mol. Biol.* **254**, 523-537.
- [2] Summers, M. F., South, T. L., Kim, B. & Hare, D. R. (1990). *Biochemistry* **29**, 329-340.
- [3] De Guzman, R. N., Wu, Z. R., Stalling, C. C., Pappalardo, L., Borer, P. N. & Summers, M. F. (1998). *Science* **279**, 384-388.

P28

ω -conotoxin TxVIIの立体構造解析

(三菱化学生命科学研究所)

○小林邦子、佐々木亨、佐藤一紀、河野俊之

Three-dimensional structure of ω -conotoxin TxVII

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

Kuniko Kobayashi, Toru Sasaki, Kazuki Sato, and Toshiyuki Kohno

The three-dimensional structure of ω -conotoxin TxVII (ω -CTX TxVII) in aqueous solution has been analysed by ^1H NMR. This peptide is a calcium ion channel blocker derived from a venom of the molluscivorous snail *Conus textile*. It has 26 amino acids residues including six cysteine residues which form three disulfide bonds. This cystine framework is as same as those of other calcium ion channel blockers, ω -CTX MVIIA and ω -Aga IVA.

We have found that ω -CTX TxVII has a triple-stranded β -sheet. Its three-dimensional structure is under calculation.

[序]

ω -conotoxin TxVII (ω -CTX TxVII) はイモガイの毒液由来のペプチドであり、カルシウムイオンチャンネルを阻害することがわかっている。 ω -CTX TxVII は 26 アミノ酸残基から成り、分子内で 3 本のジスルフィド結合を形成している。このジスルフィド結合を構成するシステイン残基の配置は、以前に我々が構造決定したカルシウムイオンチャンネル阻害剤である ω -CTX MVIIA や ω -Aga IVA と同様である。しかし、 ω -CTX TxVII が L 型のカルシウムイオンチャンネルを阻害するのに対し、

キーワード： ω -CTX TxVII、イオンチャンネル、ペプチド、立体構造、
ジスルフィド結合

○こばやしくにこ、ささきとおる、さとうかずき、こうのとしゆき

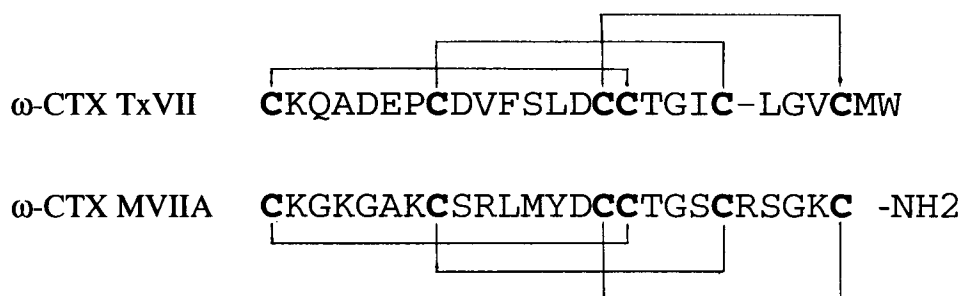
ω -CTX MVIIA はN型、 ω -Aga IVA はP型で、ターゲットのチャンネルサブタイプが互いに異なっている。また、 ω -CTX TxVII は分子全体としては負に帯電しており、疎水性残基に富んでいるのが特徴である。これらのことをふまえ、NMRを用いて溶液中の ω -CTX TxVII の立体構造解析を行った。

[実験]

ペプチドを化学合成し、5 mM、pH 5.5 でサンプル調製した。NMR測定にはBruker 製 AMX-500 を使用した。軽水および重水中での2次元NMR測定(DQF-COSY、TOCSY、NOESY、P. E. -COSY)を3種の温度(288 K、298 K、310 K)で行った。288 K においては、重水素交換測定も行った。得られた情報から、まず2次構造を決定した。現在さらに、X-PLORを用いた3次構造解析を進めている。

[結果]

現在までの解析の結果、 ω -CTX TxVII は3本の β ストランドから成る β シート構造をとることがわかった。この構造は ω -CTX MVIIA や ω -Aga IVA にも共通に存在している。



Primary structure of ω -CTX TxVII and ω -CTX MVIIA.

(三菱化学生命研)

○河野俊之、佐々木 亨、佐藤一紀

Three-dimensional Structure of δ -conotoxin TxVIA

○Toshiyuki Kohno, Toru Sasaki, and Kazuki Sato

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

The three-dimensional solution structure of ω -conotoxin TxVIA (ω -CTX TxVIA) has been determined by ^1H NMR. This peptide is a sodium ion channel blocker derived from a venom of the molluscivorous snail *Conus textile*. It has 27 amino acids residues including six cysteine residues which form three disulfide bonds. This cysteine framework is as same as those of other calcium ion channel blockers, ω -CTX MVIIA and ω -Aga IVA.

We have found that ω -CTX TxVIA has a triple-stranded β -sheet. The three-dimensional structure and structure-function relationships of ω -CTX TxVIA will be discussed.

[序]

δ コノトキシン TxVIA (δ -CTX TxVIA) はイモ貝から単離されたトキシンであり、アミノ酸 27 残基からなり、他のコノトキシンと同様に 3 本の SS 結合を持っている。しかし、他のコノトキシンがカルシウムチャンネルを阻害することが多いのに対し、 δ -CTX TxVIA はナトリウムチャンネルを阻害する。また、 δ -CTX TxVIA は、他のコノトキシンとは異なり疎水性残基と酸性残基に富んでいる。本研究では、この δ -CTX TxVIA について NMR を用いた立体構造解析を行った。

[実験]

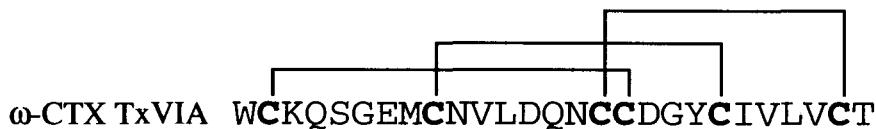
δ -CTX TxVIA は化学合成したものを、4 mM、pH 7.0 でサンプル調製した。NMR 測定には Bruker AMX-500 を用いた。軽水および重水中での 2 次元 NMR 測定 (DQF-COSY, TOCSY, NOESY, P.E.-COSY) を 3 種の温度 (288 K, 298 K, 310 K) で行った。さらに、重水素交換測定を 288 K で行った。常法にしたがって、シグナルの帰属を行い、得られた情報から、まず 2 次構造を決定した。さらに、X-PLOR を用いた 3 次構造計算を行い、100 個の初期構造から 20 個の最終構造を決定した。

プロトン NMR、コノトキシン、イオンチャンネル阻害、SS 結合、立体構造

こうのとしゆき、ささきとおる、さとうかずき

[結果]

計算の結果得られた 20 個の最終構造の RMSD は、主鎖 (C α , C, N) で 0.52 ± 0.11 Å、全重原子で 1.19 ± 0.10 Å であった。また、 ω -CTX TxVIA は 3 本の β ストランドから成る β シート構造を基本構造に持つことがわかった。この基本構造は、我々が以前に立体構造決定した ω -CTX MVIIA や ω -Aga IVA にも共通に存在している。



Primary structure of ω -CTX TxVIA



Stereopairs of backbone heavy atoms for the 20 converged structures of ω -CTX TxVIA

P30

アミド基を側鎖にもつアミノ酸残基によるミオグロビンの機能調節の分子機構

(筑波大化学¹、慶應大医²) ○山本泰彦¹、栗原徳正¹、江川 毅²、
島田秀夫²、石村 巽²

Hydrogen Bonding Interaction of an Amide Group of Asn and Gln at Distal E7 of Bovine Myoglobin with Bound-Ligand and Its Functional Consequences

Y. Yamamoto¹, N. Kurihara¹, T. Egawa², H. Shimada², and Y. Ishimura²

¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, Tsukuba 305-8571

²Dept. of Biochem., School of Med., Keio Univ., Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582

Asp and Gln were substituted for distal HisE7 of bovine myoglobin and hydrogen-bonding interaction of E7 side-chain with Fe-bound ligand in mutants has been characterized by paramagnetic NMR. From the analysis of observed paramagnetic shifts for non-coordinated amino acid proton signals, the orientation of the principal magnetic axes with respect to heme in met-cyano form of proteins has been calculated using the least square search method. The tilt of the z axis relative to the heme normal was found to be similar among bovine native and mutant Mbs. But the azimuthal angle for the z axis in the mutants is different from that in the native Mb. Since the z axis is expected to align along the Fe-CN⁻ coordination, the present results dictate that E7 residue does not contribute to the ligand tilt but largely influences the direction of the tilt.

【はじめに】筋肉中に存在する酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン (Mb) の機能調節において、ヘム鉄の外部配位子結合部位近傍に存在するヒスチジン (HisE7, またはHis64) が大きな役割を担っている。ヘム鉄に結合した配位子はHisE7側鎖と水素結合を形成することにより、その配位状態が安定化される。水素結合がMbの配位子親和性に与える影響を解析するために、HisE7が他のアミノ酸残基に置換された一連の部位特異的変異体が調製され、それらについて水素結合と親和性との関係が研究されている。ただし、ここで考慮しなければならないことは、この水素結合以外に、活性部位の構造、E7残基の極性や側鎖の高さ、活性部位における静電的相互作用なども、Mbの配位子親和性に影響を及ぼすということである。したがって、E7残基の置換に伴い、複数の構造化学的因子が同時に変化する場合、個々の因子の機能への寄与を評価することは困難である。部位特異的変異体を利用してある

常磁性NMR、水素結合、水素交換反応速度、電子構造、ミオグロビン

やまもと やすひこ、くりはら のりまさ、えがわ つよし、しまだ ひでお、
いしむら ゆずる

特定の構造化学的因子のタンパク質の機能への寄与を解析する場合には、そのアミノ酸残基の置換が他の因子に与える影響ができるだけ少ないことが望ましい。本研究では、His側鎖のイミダゾールと同様に、水素結合形成に関してプロトンのドナー、アクセプターのどちらとしても作用することができるアミド基を側鎖にもつGlnとAsnに置換し、これらE7側鎖のアミド基がヘム鉄に結合した配位子との水素結合形成とMbの機能に与える影響を解析した。

〔実験方法〕 ウシMbは、標準的な方法により心筋から分離精製した。H64Q、H64Nの遺伝子は、化学合成されたウシMbのDNA配列を基にして調製した。得られた組み換えDNAをプラスミド（PUC19）に組み込んだ後、大腸菌（JM109）に導入し、目的タンパク質を発現させた。分離精製されたMbにフェリシアン化カリウムを加え酸化し、配位子として約5当量のKCNを加え、メトシアノ体を調製した。限外ろ過によりMb濃度を約0.1mMに濃縮後、溶媒をD₂O置換または10%D₂OにしてNMR測定試料とした。NMR測定は、Bruker社製AC-400Pにより行った。シグナル帰属は、二次元NMRスペクトル、一次元NOE差スペクトル、緩和時間などの測定により行った。磁化率テンソルの主軸は、帰属されたアミノ酸残基のプロトンに由来するシフト値の解析により決定したが、計算には、ウシMbのX線結晶構造は報告例がないため原子座標としてマッコウクジラMbの結晶構造を、また反磁性シフト値としてマッコウクジラMbのCO体での値を用いた。

〔結果・考察〕 マッコウクジラMbのX線結晶構造の原子座標を基に、HisE7をGln、Asnに置換して側鎖のコンフォメーションを変化させることにより、それぞれの側鎖NHプロトンがヘム鉄に配位したCN⁻と水素結合できる距離に近づけるかどうかを評価した。モデル計算からは、H64Q、H64NでのGlnE7、AsnE7はともにマッコウクジラMbでのHisE7同様、ヘム鉄に結合した配位子と水素結合形成が可能であることが示され、E7側鎖のヘムに対する配向の一例をそれぞれFig.1に示す。

三つのMbのメトシアノ体の¹H NMRスペクトルをFig.2に示す。Figs.2B & 2Cの拡大されたスペクトルの比較からわかるように、天然Mbと変異体での対応するシグナルのシフト差は比較的大きいが、H64QとH64Nとの間にはあまり差が無い。また、天然Mbと変異体のスペクトルの差は、ヘム側鎖プロトンだけではなくヘム鉄からの不対電子の非極在化によるコンタクトシフトの寄与が無視できるアミノ酸残基のプロトンシグナルにまで及んでいる。ヘム近傍のいくつかのアミノ酸残基のプロトン

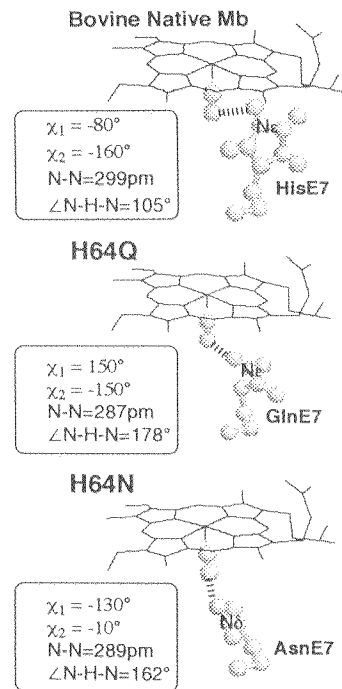


Fig. 1. Possible side-chain conformations of HisE7, GlnE7, and AsnE7.

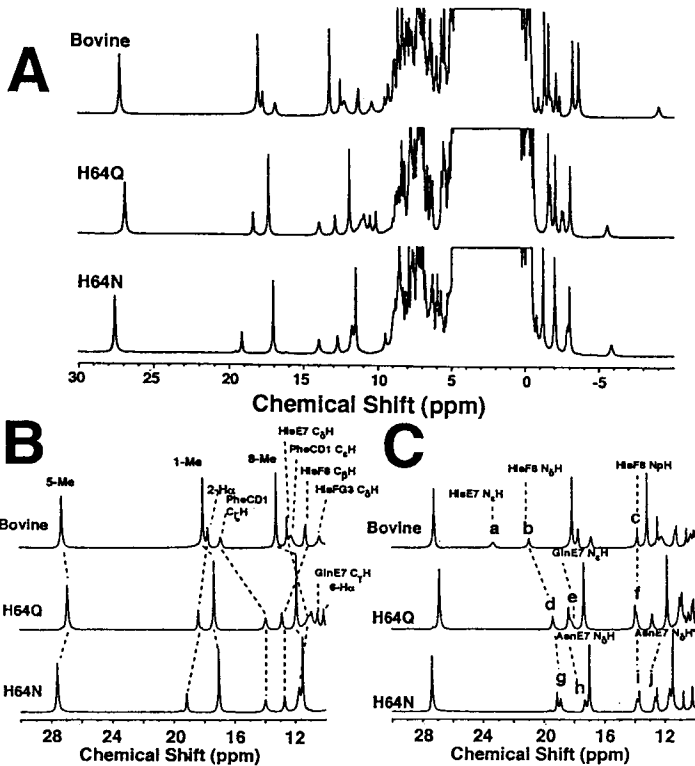


Fig. 2. (A) 400 MHz ^1H NMR spectra of bovine native (upper), H64Q (middle), and H64N (lower) Mb(CN $^-$)s in $^2\text{H}_2\text{O}$, p ^2H 7.00, at 25°C. (B) in $^2\text{H}_2\text{O}$. (C) in 90% $^2\text{H}_2\text{O}$ /10% $^1\text{H}_2\text{O}$. Signal assignments are given with the traces and the corresponding signals are connected by broken lines. Exchangeable proton signals, peaks a - j, are assigned as indicated.

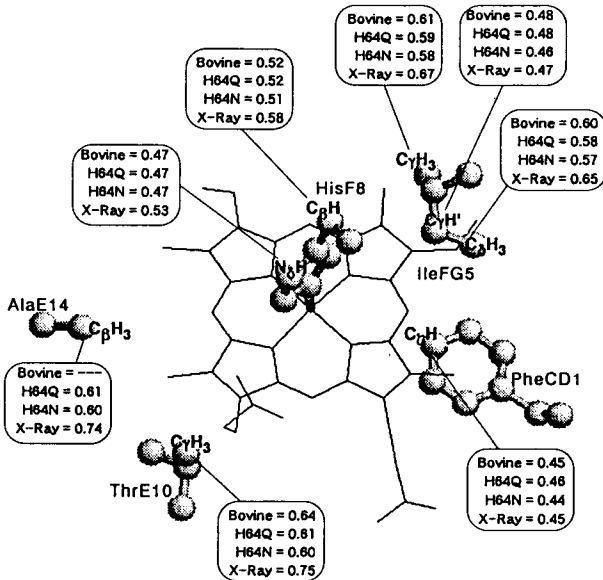


Fig. 3. Iron-proton distances (R_{Fe}) for selected amino acid protons, determined from the analysis of paramagnetic relaxation rate.

のヘム鉄からの距離を緩和時間の解析より求め、三つのMbで比較した結果を Fig.3 に示す。Fig.3 からわかるように、ヘム鉄からの距離に関する限り、アミノ酸置換の活性部位の構造への影響はまったく無いと言える。したがって、三つのMbでの対応するシグナルのシフト値の違いは、構造変化に由来するものではないことがわかる。メトシアノ体は、鉄三価低スピン錯体であるため、磁氣的異方性が大きく、擬コンタクトシフトによりヘム鉄近傍のアミノ酸残基のプロトンに由来するシグナルに比較的大きな常磁性シフトが生じる。磁化率テンソルの主軸の分子軸に対する配向は、アミノ酸残基のプロトンシグナルで観測されるシフト値から求めることが可能である。天然Mbで行った計算の結果を Fig.4 に示す。変異体でも同様な計算を行った結果、主軸のz軸とヘム平面の法線とのなす角は三つのMbでほとんど差が無く約17°であった。一方、天然Mbと変異体とはz軸の傾く方向が異なる (Fig.4 の角度 α)

Analysis of paramagnetic shift

	$\delta pc(obs)$	$\delta pc,ax(calc)$	$\delta pc,rh(calc)$	$\delta pc(calc)$
PheCD1C _z H	12.18	13.60	-1.33	12.27
ThrE10C _β H	-1.03	-0.88	-0.71	-1.59
C _γ H ₂	-2.97	-2.41	-0.81	-3.23
AlaE14C _α H	-1.20	-0.92	-0.26	-1.18
C _β H	-2.65	-2.20	-0.61	-2.81
IleFG5C _α H	-1.81	-1.43	-0.55	-1.98
C _β H	-1.07	-0.26	-0.80	-1.06
C _γ H	-2.65	-1.52	-0.94	-2.46
C _γ H'	-8.72	-6.12	-2.88	-9.01
C _γ H ₂	-4.58	-2.72	-1.03	-3.74
C _δ H ₂	-5.10	-3.82	-1.04	-4.86

$\delta pc(obs)$: Observed pseudo-contact shift. (Shift in ppm)

$\delta pc,ax(calc)$: Calculated axial pseudo-contact shift.

$\delta pc,rh(calc)$: Calculated rhombic pseudo-contact shift.

$\delta pc(calc)$: Calculated pseudo-contact shift.

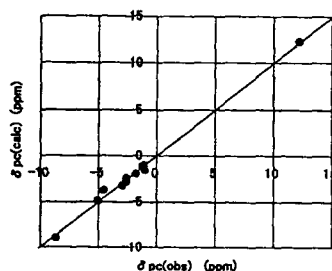
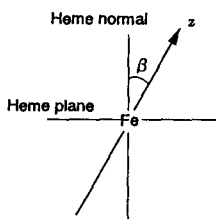
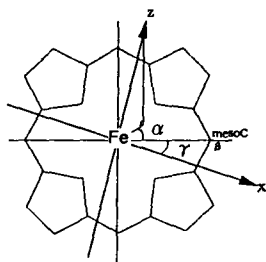


Fig. 4. Calculation of the principal magnetic axes from the analysis of non-coordinated amino acid proton shifts. Since the X-ray structure of bovine Mb is not available, the atomic coordinates reported for crystal structure of sperm whale Mb were used. In addition, the proton shifts reported for sperm whale carbonmonoxy Mb were used as diamagnetic reference shifts.

Orientation of the Axes with respect to Heme

	HisE7	GlnE7	AsnE7
α	8.2°	35.6°	34.7°
β	17.0°	16.5°	16.4°
γ	25.0°	24.2°	18.4°



飽和移動法により水素交換速度を決定した結果、H64NでのAsnE7 N_δH プロトンの交換反応速度は、H64QでのGlnE7 N_εHのものより少なくとも100倍以上大きいことがわかった。モデル化合物でのAsnE7 N_δH とGlnE7 N_εHの水素交換速度は同じであるので、変異体での交換速度の差は両者での水素結合強度の差を反映していると考えることができる。したがって、H64NのCN⁻解離反応速度がH64Qのものより50倍以上大きいことは、両者での水素結合強度の差に関して解釈することができる。また、Asn側鎖がGln側鎖よりメチレン基の数が一つ少なく、外部配位子の侵入経路の立体障害の程度に両者の間で差があることは、H64NのCN⁻結合反応速度がH64Qの約2倍になっていることに反映されている。このように、H64QとH64Nの活性部位の構造とCN⁻結合反応の動力学的パラメータの関係から、E7残基の側鎖と配位子との水素結合とE7側鎖の高さはそれぞれ解離反応速度、結合反応速度を通してMbのCN⁻親和性を調節することが明らかとなった。

変化することに対応する) ことがわかった。z軸はFe-CN⁻配位結合に沿うと考えられることから、得られた結果はヘム平面の法線に対するCN⁻の傾きはこれらのMbで同じであるが、傾きの方向が異なることを示している。変異体での角度αは、GlnE7、AsnE7のプロトンドナーである側鎖アミドNHプロトンのヘム鉄への接近する方向とよく一致している。

P31

チトクロム c_3 のヘム軸配位子 NH プロトンの交差緩和
(横浜国大・工¹, 三菱重工基盤研², 千葉工大・工³, 東大・院工⁴)
○原田 英里砂¹, 大村友章², 藤原敏道¹, 河合剛太³, 渡辺公剛⁴,
阿久津秀雄¹

Interference contribution to the transverse relaxation of imido protons of the heme coordinated imidazoles in the cytochrome c_3

¹Faculty of Engineering, Yokohama National University, ²Advanced Technology Research Center, Mitsubishi Heavy Industries, LTD, ³Department of Industrial Chemistry, Chiba Institute of Technology, ⁴Graduate School of Engineering, University of Tokyo
¹E. Harada, ²T. Ohmura, ³T. Fujiwara, ²G. Kawai, ³K. Watanabe, ¹H. Akutsu

We have succeeded in obtaining ¹⁵N labeled cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. In the HSQC spectrum, the relative linewidths of the doublet peaks of the ¹⁵N-coupled imido protons of the coordinated imidazole group were reversed on the oxidation. This inversion is explained by the interference between the relaxation processes due to the electron-proton dipolar and ¹⁵N-¹H dipolar interactions. In the reduced state, all these protons could be assigned. The CSA of these protons are larger than those of peptide protons. It suggests the existence of the hydrogen bonds involving imido protons of the coordinated imidazole group.

【緒言】硫酸還元菌 Miyazaki F 株のチトクロム c_3 は 1 分子中に 4 つのヘムを持つ、分子量約 14000 の c 型ヘムタンパク質であり、全てのヘムは低スピン状態である。この蛋白質は酸化還元電位が -270mV と非常に低いという特徴を示す。我々は、この蛋白質の酸化還元に関わる構造的要因を解明するために、溶液 NMR で構造解析を行っている。

【実験】通常の培地成分に N 源として ¹⁵NH₄Cl を用い培養を行い、この菌体を既に確立されている方法で精製し、¹⁵N 標識チトクロム c_3 を得た。500MHz, 600MHz の分光器を用い、¹H-¹⁵N HSQC, NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC を測定し、連鎖帰属法により主鎖のアミドプロトンの帰属を行った。その後、ヘム軸配位子イミダゾール NH プロトンの帰属を行った。また、還元型において、M. Tessari らによる方法で化学シフト異方性の測定を行った。

チトクロム c_3 、常磁性、化学シフト異方性

はらだえりさ, おおむらともあき, ふじわらとしみち, かわいごうた, わたなべきみつな, あくつひでお

以上の測定は全て軽水中 (90% H_2O /10% D_2O), pH7, 303Kで行い、還元型では水素雰囲気中で硫酸還元菌 Miyazaki F 株ヒドロゲナーゼによりサンプルを還元させた。ただし、酸化型においては全てのイミダゾールNHプロトンを観測するため、pH5で行った。

【結果及び考察】HSQC スペクトルにおいて、酸化型・還元型共にN末・Proを除く観測可能な主鎖のアミドプロトン全てを帰属できた。ただし、Gly 73のアミドプロトンが酸化型では観測出来なかった。これはX線結晶構造から蛋白質の外側に位置していることが分かっているため、溶液中においても非常に交換が早いからと考えられる。また、ヘム軸配位子イミダゾールNHプロトンについて、還元型では8個の全てが帰属でき、酸化型では3個の帰属が出来た。(Fig.1) このとき、酸化型では緩和が早いので600MHzで測定すると全てのイミダゾールNHプロトンが観測できないので、500MHzで測定したスペクトルを(A)に載せる。

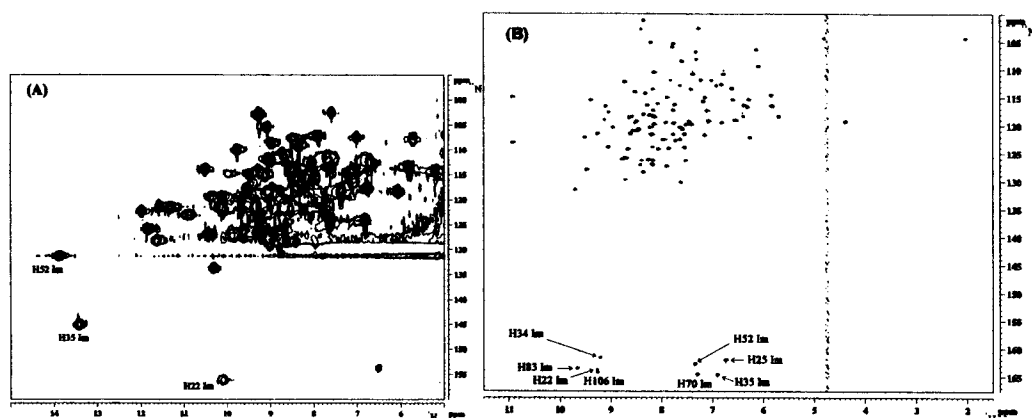


Fig 1 (A):HSQC spectrum of uniformly ^{15}N -labeled cytochrome c_3 (fully oxidized state) (500MHz), (B):HSQC spectrum of uniformly ^{15}N -labeled cytochrome c_3 (fully reduced state) (600MHz)

また、それらの ^{15}N によって分裂した2本のピークの線幅が、還元型では低磁場側が高磁場側よりも広がっているが、酸化型では高磁場側の方が広がっており、酸化型と還元型において逆転することが見出された。(Fig. 2) これは共に500MHzで測定したスペクトルである。

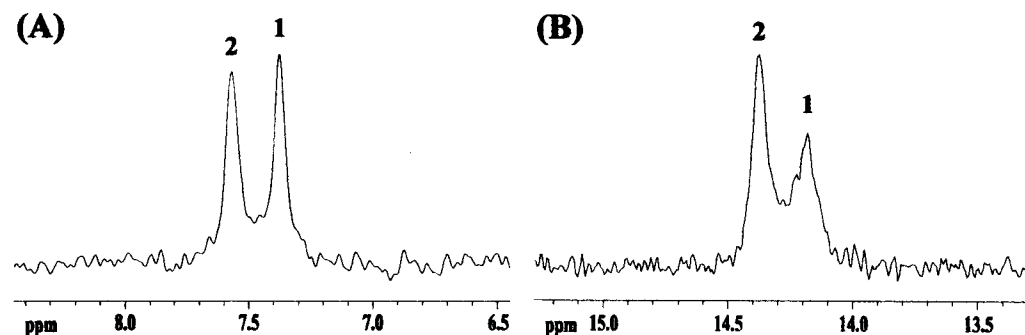


Fig 2 Proton NMR spectra of imidazole protons of His 52 of uniformly ^{15}N -labeled cytochrome c_3 . (A):fully reduced state, (B):fully oxidized state (500MHz)

Goldmanによると、 ^{15}N - ^1H のスピンのにおいて、分裂した2本のシグナルの線幅は、化学シフト異方性 CSA(^1H)と双極子-双極子相互作用 DD(^{15}N - ^1H)の寄与で $J < 0$ のとき、以下のように与えられる。

$$R_2^{(1)} (= \frac{1}{T_2^{(1)}}) = \lambda + \eta$$

$$R_2^{(2)} (= \frac{1}{T_2^{(2)}}) = \lambda - \eta$$

ここで、 λ が ^{15}N - ^1H の双極子緩和で、 η が ^1H のCSAと ^{15}N - ^1H の双極子相互作用の交差緩和である。

しかしながら、酸化型においては、CSAと双極子相互作用の交差緩和に鉄とプロトンとの常磁性の交差緩和が加わり、ハミルトニアンは以下のように表される。

$$\mathcal{H} = \mathcal{H} (^{15}\text{N}-^1\text{H dipole}) + \mathcal{H} (^1\text{H CSA}) + \mathcal{H} (\text{Fe}-^1\text{H dipole})$$

ここでFe- ^1H の項はpseudo contact shift テンソルなので、 ^1H CSAと足し合わせ、新たにCSA'と定義する。第2項のプロトンのCSAの符号と第3項のCSAの符号は逆転しており、後者の方がはるかに大きいので、酸化型のCSAの符号は還元型の場合に比べて逆転する。

また、還元型における化学シフト異方性の測定から、イミダゾールNHプロトンはタンパク質の主鎖のアミドプロトンと違って、15~32ppmといった比較的大きな化学シフト異方性の値をもつことが分かった。M. TessariらやN. Tjandraらにより、化学シフト異方性はNHプロトンの水素結合に依存していて、その距離が短くなるほど大きな値になるということが報告されている。このことから判断すると、イミダゾールNHプロトンが明らかにタンパク質の主鎖のアミドプロトンに比べて、強い水素結合をしていることを示している。

【参考文献】

- ¹⁾ M. Tessari, H. Vis, R. Boelens, R. Kaptein and G. W. Vuister, (1997), Quantitative measurement of relaxation interference effects between $^1\text{H}_\text{N}$ CSA and ^1H - ^{15}N dipolar interaction: Correlation with secondary structure., *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8985-8990
- ²⁾ N. Tjandra and A. Bax, (1997), Solution NMR measurement of amide protein chemical shift anisotropy in ^{15}N -enriched proteins. Correlation with hydrogen bond length., *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8076-8082
- ³⁾ M. Tessari, F. A. A. Mulder, R. Boelens and G. W. Vuister, (1997), Determination of amide protein CSA in ^{15}N -labeled proteins using ^1H CSA / ^{15}N - ^1H dipolar and ^{15}N CSA / ^{15}N - ^1H dipolar cross-correlation rates., *J. Magn. Reson.* 127, 128-133
- ⁴⁾ M. Goldman, (1984), Interference effects in the relaxation of a pair or unlike spin-1/2 nuclei., *J. Magn. Reson.* 60 437-452
- ⁵⁾ T. Ohmura, E. Harada, T. Fujiwara, G. Kawai, K. Watanabe and H. Akutsu, (1998), Paramagnetic inversion of the sign of the interference contribution to the transverse relaxation of the imido protons of the coordinated imidazoles in the uniformly ^{15}N labeled cytochrome c_3 ., *J. Magn. Reson.* 131, 367-372.

P32

ペプチドと蛋白質の相互作用の TRNOE 解析

(三菱化学生命研¹, 群大工²)

○楠 英樹^{1,2}, 若松 馨², 平野利好², 田中剛史^{1,2},
中島勝弥², 立木あゆ美², 佐藤一紀¹, 河野俊之¹

TRNOE Analyses of Peptide-Protein Interactions

○Hideki Kusunoki^{1,2}, Kaori Wakamatsu², Rikou Hirano², Takeshi Tanaka^{1,2}, Katsuya Nakajima², Ayumi Tachiki², Kazuki Sato¹ and Toshiyuki Kohno¹ (Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences¹ and Faculty of Engineering, Gunma University²)

Transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE) has been used to analyze conformations of peptides bound to large proteins. This method, however, has a few drawbacks: (i) Peptide proton resonances are poorly dispersed and (ii) Indirect NOEs relayed via protein protons may be observed between remote peptide protons. To solve these problems, we uniformly enriched peptides and proteins with ¹³C/¹⁵N and ²H, respectively. As an example, analyses of mastoparan-X (MP-X) bound to Gi1 α are presented.

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。しかしこの方法を用いた場合、以下に示すような問題が生じる可能性がある： (i) 観測されるペプチドシグナルの分離が悪い。 (ii) 蛋白質のプロトンを介した間接的な NOE が生じる。本研究ではこれらの問題を解決するため、(i) 安定同位体標識したペプチドと、(ii) 重水素化した蛋白質をそれぞれ調製した。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。その結果、(i) 安定同位体標識したペプチドの多核多次元 TRNOE 解析を行うことによって、マストパランX の TRNOE クロスピークの分離は大いに向上し、その構造を詳細に決定することができた。また、(ii) 重水素化した蛋白質を用いることによって、蛋白質のプロトンを介した間接的な NOE を除去することができた。これらのことから、ペプチドの安定同位体標識と蛋白質の重水素化はペプチドと蛋白質の相互作用を解析するのに大変有用であることが示された。

安定同位体標識ペプチド, 多核多次元 TRNOE 法, 重水素化蛋白質, 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, ひらのりこう, たなかたけし, なかじまかつや, たちきあゆみ, さとうかずき, こうのとしゆき

βラクトグロブリンのα→β転移の研究

(¹岐阜大医学部第二生理, ²阪大たんぱく研, ³コーネル大学)
 ○桑田一夫¹, 星野 大², 後藤祐児², 恵良聖一¹, Carl A. Batt³

α→β transition in β-Lactoglobulin A

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

¹Dept. of Physiology, School of Medicine, Gifu University, ²Institute for Protein Research, Osaka University, ³Dept. of Food Science, Cornell University

Abstract: Whereas bovine β-lactoglobulin is a predominantly β-sheet protein, it has a marked α-helical preference, and can be considered to be a useful model of the α→β transition, a key issue for understanding the folding and biological function of a number of proteins. In order to understand the mechanism of the α→β transition, the backbone structures of the recombinant bovine β-lactoglobulin A in the native state and in the highly helical state induced by 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) were characterized by ¹H, ¹³C, and ¹⁵N multidimensional NMR spectroscopy. Overall secondary structures in the native state were similar to those of the crystal structure. On the other hand, β-lactoglobulin in the TFE state was composed of many α-helical segments, but order parameters were significantly reduced, indicating the enhanced internal mobility. The presence of the persistent α-helices in the helical state and the core β-sheet in the native state suggested that, during folding, native-like core β-sheet and several non-native helices are formed first and, subsequently, remaining β-sheet is 'induced' through interaction with the preexisting β-sheet.

近年、プリオン病やアルツハイマー病を総称した 'Conformational Disease' という疾病概念が提案されている。その特徴は、蛋白質の立体構造が一旦は正常に形成されるが、何らかの環境要因により、立体構造が徐々に壊れてゆく、特にその過程に、蛋白質内部或いは蛋白質間のα→β転移が、多かれ少なかれ関与していることである。その中核を形成する神経変性疾患においては、不溶性の蛋白質集合体の沈着が見られる。

βラクトグロブリンは、立体構造形成過程で、αヘリックスの多い中間体を形成し、分子内でα→β転移を行って天然構造に到達することが知られている。我々は、α→β転移のメカニズムを、βラクトグロブリンのフォールディング過程をモデルとして、原子レベルで明らかにするため、多次元多核NMRを用い、ウシβラクトグロブリンAの天然立体構造形成過程を研究している。

βラクトグロブリン, フォールディング, NMR

くわたかずお、ほしのまさる、ごとうゆうじ、えらせいいち、かあるばつと

我々はまず、 ^{15}N 、 ^{13}C で均一に二重ラベルした β ラクトグロブリンを、*Pichia Pastoris* (酵母)を用いて大量発現し、種々の溶媒環境下における3次元NMRスペクトルを測定した。天然状態における2次構造、3次元立体構造、及び溶液中におけるダイナミクス ($p \sim n$ 秒)を求めた。NMR測定では酸性 (pH 2.0) で単量体、X線解析では中性で二量体という違いにも拘わらず、両者の二次構造は、 β シートの端で数残基異なるものの、かなり良く一致していた。ダイナミクス解析からは、N端半分に存在する β シートは相対的に不安定で、C端半分に存在する β シートは安定であることが示され、これは疎水性プロフィールと比較的良好に対応していた。オフ・レゾナンス・スピン・ロックを用いた3次元緩和スペクトルから、ゆっくりした (msecオーダー) 構造の揺らぎについて、現在、観測を行っているので、その結果についても発表する予定である。

更に、TFE 50%中における β ラクトグロブリンの二次構造、及びダイナミクス ($p \sim n$ 秒)を求めた。TFE 50%中では、61%の残基がヘリックス構造をとっていた。これと、二次構造予測の結果とを比較した結果、実際にヘリックスを形成し易い領域を特徴づける事が出来、 β ラクトグロブリンのフォールディング中間体でも、その部分が一時的にヘリックス構造を取っているのではないかと考えられた。また実際、その領域のヘリックス含量は38%と、ストップドフローCD測定による中間体のヘリックス含量、37%、と極めて近い値を示した。ヘリックス構造をとりやすい領域は、N端側のA~Dシート領域及びC端側の α ヘリックス領域に存在した。逆に、C端側のE~Hシートは安定で、中間体においても疎水性のコアを形成しているのではないかと考えられた。

この仮説を検証するために、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移の midpoint である TFE15%中でのスペクトルを詳細に観測した結果、N端側のA~Dシートはかなり壊れているが、C端側のE~Hシートは安定であることが分かった。以上の実験事実から、 β ラクトグロブリンの中間状態では、N端側のA~Dシート領域がヘリックス、C端側のE~Hシート領域は β シート構造をとっており、天然構造は、N端側のヘリックスがC端側の β シートと相互作用することにより、 β シートへと誘導されることにより出来上がる可能性が高い事が分かった。これは、分子内部で起こる $\alpha \rightarrow \beta$ 転移であるが、プリオン等に見られる $\alpha \rightarrow \beta$ 転移のメカニズムと類似している。この点から、ウシ β ラクトグロブリンAの天然立体構造形成過程が、‘Conformational Disease’のよいモデルになるのではないかと考えられる。 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移の原子レベルでの機構を解明することが、‘Conformational Disease’の治療につながる可能性もあるだろう。

参考文献

- 1) Tae-Rak Kim, Yuji Goto, Nami Hirota, Kazuo Kuwata, Helen Denton, Su-Ying Wu, Lidsay Sawyer and Carl A. Batt, High-level expression of bovine β -lactoglobulin in *Pichia pastoris* and characterization of its physical properties, *Protein Eng.* 10, 1339-1345 (1997)
- 2) Kazuo Kuwata, Masaru Hoshino, Yuji Goto, Seiichi Era and Carl A. Batt, $\alpha \rightarrow \beta$ transition of β -lactoglobulin as evidenced by the heteronuclear NMR, *J. Mol. Biol.* in press

P34

¹H-NMRによるヒト血清アルブミン構造転移及び尿素変性の研究

(¹岐阜大・医・生理, ²岐阜大) 恵良聖一¹, [○]曾我美 勝², 中村浩二

1

¹H-NMR and CD studies on the structural transition of serum albumin in the acidic region (¹Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., ²Gifu Univ.) S. Era¹, M. Sogami², K. Nakamura¹

(1) Human serum albumin (HSA) showed the characteristic two-step transition, one corresponding to the N→F (pH 4.6→3.4) and the other to the F→E transitions (below pH 3.0). (2) ¹H-NMR spectra and cross-relaxation times (T_{1s}) from irradiated to observed protein protons, which reflect the structural fluctuation in proteins, were measured on the N-, F-, E-forms of HSA and the N*-form (8.23 M urea, neutral pH) of iodoacetamide-blocked HSA (IA-HSA). ¹H-NMR spectra and elongations of T_{1s} values for the F- and E-forms of HSA were quite similar to those for the N*-form of IA-HSA, indicating the liberation of the intramolecular motion in the F- and E-forms. (3) The reported data on hydrodynamic radii and D-H exchange reaction in the N→F transition, and the results obtained might indicate that the F-form of HSA has a native-like globule form with highly helical state and with fluctuating tertiary structure. All of the present findings on the F-form seem to be in accord with the structural features of the F-form suggested by Foster's group (1961-1965) and the molten globule state recently depicted by Dolgikh et al (1981) and Ohgushi et al (1983).

ヒト血清アルブミン(HSA), ウシ血清アルブミン(BSA), ウシ・メルカプトアルブミン(BMA)は酸性側において, N→F, F→E転移と呼ばれる2段階構造転移を示す. このN→F転移に於ける物理化学的性状変化(1,2), 即ち, 固有粘度, 分子直径, Trp蛍光変化, Trp回転緩和時間, ESRによるSH基(Cys 34)にラベルしたスピンプローブの回転緩和時間, 疎水性蛍光色素(ANS)との相互作用, D-H交換反応, 二次構造変化, レーザーラマン分光, solvent perturbation difference spectra, ¹H-NMR等による研究が系統的に進められている. N→F転移について, Foster グループは, 「N→F転移では, 分子容の増加は殆ど観測されず, α ヘリックス含量の若干の減少, 大きな三次構造(tertiary structure)変化及びペプチド鎖の「ゆらぎ」(D-H交換反応)がN→F転移に於いて増加する」と報告した(1). 最近, HSA結晶の立体構

キーワード: 交差緩和時間, ヒト血清アルブミン, Molten Globule State, 二次構造, 三次構造

えら せいいち, そがみ まさる, なかむら こうじ

造がCarterらにより報告された(1992, 1994). 著者らはHSA, BMAを用い, N→F, F→E転移に於ける二次構造, 「ゆらぎ」変化を尿素変性(Urea Unfolding)と比較研究した.

[材料と方法] 活性炭脱脂したHSA, BSA, BMA(脱脂BSAよりSE-Sephadexを用いて精製)を使用した. 尿素変性実験では, SH基をiodoacetamideを用いてブロックしたIA-HSA, IA-BSAを用いた. $^1\text{H-NMR}$ 測定は D_2O 中で行った.

CD測定はJasco J-40 円二色計, $^1\text{H-NMR}$ 測定はBruker社AM 500型スペクトロメータを使用した(25°C).

Cross-relaxation time (T_{1s} , 交差緩和時間): Akasaka(3)のInversion Recovery法を用いた. ところが, 「 α CHは, その近傍にある緩和の遅いHDOシグナルが重なり, 正確に T_1 , T_{1s} を測定することが困難であった」. AkasakaのInversion Recovery法の 180° pulseの代わりに 90° pulseを用い, T_2 (spin-spin relaxation time)の5倍後よりacquisitionを開始した. 著者らはこの方法をHalf-inversion Recovery法と名付けた(4). HDO (4.75 ppm)より離れた CH_3 , CH_2 , εCH_2 , 芳香族プロトン, His(C2H)の T_{1s} は何れの方法によっても同じであった(4).

[結果と考察] HSAの二次構造変化: Fig. 1に示すように, HSA N型(0.10 M NaCl)の f_α , f_β はそれぞれ0.69~0.70, 0.14 で, f_α 値はCarter等のX線結晶解析より求めた~0.67に近い値であった. これらの構造転移に於ける二次構造変化は下記のとうりであった: (N→F), f_α , 0.70→0.55; f_β , 0.15→0.23; (F→E), f_α , 0.55→0.53; f_β , 0.23→0.25. BMAの二次構造変化pH-profileはHSAよりも急峻であった. これは, ミクロ不均一性の指標となるheterogeneity constant (h , 等電点に於ける電気泳動移動度の標準偏差)が, BMA, HSAで, それぞれ, 0.45×10^{-5} , $1.25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{sec}^{-1}$ (1)であるため, pH-profileに顕著な差が観測されるのだろう.

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル---Fig. 2に, 0.10 M Clに於けるN型 (pD 5.02), F型 (pD 3.74), E型(pD 2.97)及び尿素変性状態(N*型, pD 7.93)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した. 分子量の小さいネイティブ状態のタンパク質, 例えば, cytochrome c (11.7 kDa), ovalbumin (45 kDa)等は良く分散した, 多数のシャープな吸収線を示すが, N型の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは, Fig. 2に示すように, ブロードで少数の吸収線を示すのみであった. N→F転移に於いて顕著なスペクトル変化が観測され, F→E転移では殆ど変化が無かった. しかもF型, E型のスペクトルはN*型(IA-HSAの尿素変性状態, pD 7.93)(★, urea中の不純物)のスペクトルと, ureaによる吸収線のわずかな低磁場シフトを除いて殆ど差が無かった. これらの結果は, HSAのF, E型構造では, 主鎖, 側鎖の可動性(mobility)が増加していることを示唆している.

交差緩和時間(T_{1s} , cross-relaxation time): 主鎖(αCH), 側鎖(εCH_2 , CH_3 など)の可動性の定量的指標となる交差緩和時間(T_{1s})を, -2.45, 0.40, 7.13, 8.65 ppmを39~107 Hz ($\gamma\text{H}_2/2\pi$ 単位)で f_2 照射して求めた. Fig. 3A, 3Bに8.65 ppm (~107 Hz) f_2 照射時のN, F, E型の主鎖, 側鎖の T_{1s} vs chemical shift (ppm)を示した. また, Fig. 4に-2.45 ppm(~107 Hz) f_2 照射時のN, F型及びN*型(8.23 M urea, pD 7.93)の T_{1s} vs chemical shift (ppm)を示した.

N→F転移で T_{1s} 値は~2倍以上延長し, 対応したN*型(8.23 M urea, pD 7.93)と

ほぼ同じであった。 T_{1s} 値も、N→F転移に於いてF型の主鎖、側鎖の可動性が大幅に増加していることを示唆している。 E型の T_{1s} 値もF型と同様に大幅に延長していた。 BMAのN→F転移も、ほぼHSAと同じであった。

上述の結果は、演者等も含めたFosterグループ(1957~1965)が、『N→F転移に於いて、F型分子容の大きな増加はなく、ヘリクッス量の若干の減少、主として三次構造変化で、分子の「ゆらぎ」(D-H交換反応)が増加する』と言う報告の再確認である。 然も、約20年後に報告された α -lactalbumin (Dolgikh et al, 1981(5)), cytochrome c (Ohgush et al, 1983 (6))の酸性溶液に於ける Molten Globule State と全く同等の状態であろう。

[文献]: (1) J. F. Foster (1975) in Albumin, Structure, Functions and Uses (V. M. Rosenoer, M. Oratz, M. A. Rothschild eds.), pp. 58-84, Pergamon Press, Oxford (2) T. Peters, Jr. (1996). All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, pp. 1-75. Academic Press, New York (3) K. Akasaka (1981) J. Magn. Reson. 45, 337-343; K. Akasaka (1983) ibid. 51, 14-25; K. Akasaka, R. Ishima and S. Shibata (1990) Physica B 164, 163-179 (4) M. Sogami, S. Era, T. Koseki et al (1997) J. Peptide Res. 50, 465-474 (5) D. A. Dolgikh, R.I. Gilamanshin, E. V. Brazhnikov et al (1981) FEBS Lett. 136, 311-315 (6) M. Ohgush and A. Wada (1983) FEBS Lett. 164, 21-24

[図説明] : Fig. 1 pH-profile of f_{α} (○, l-ordinate scale), f_{β} (●, r-ordinate scale) and f_R (◐, r-ordinate scale) of HSA in 0.10 M NaCl at 25 °C. N-F and EXPANSION indicate the N→F and F→E transitions, respectively.

Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of the N- (pD 5.02), F- (pD 3.74), E-forms (pD 2.97) of HSA (4.84%) and IA-HSA (8.23 M urea, pD 7.93, 1.50%) in 0.10 M Cl⁻ at 25 °C. ★-marked signals indicate impurities in deuterated urea and protons due to excess iodoacetamide.

Figs. 3A and 3B Plots of T_{1s} values for each spectral line (main and side chains protons) of the N- (○, pD 5.02), F- (◇, pD 3.74) and E-forms (●, pD 2.97) of HSA (4.84%) in 0.10 M Cl⁻ at 25 °C, obtained by the inversion recovery and/or half-inversion recovery methods with f_2 -irradiation at 8.65 ppm and $\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hz, versus chemical shift of each spectral line (ppm).

Abscissa scales : A, 0.5 ~ 5.0 ppm; B, 6.5 ~ 7.5 ppm.

Fig. 4 Plots of T_{1s} values for each spectral line (main and side chains protons) of the N- (○, pD 5.02), F- (◇, pD 3.74) of HSA (4.84%) and N*-forms (◆, 8.23 M urea, pD 7.93) of IA-HSA (1.50%) in 0.10 M Cl⁻ at 25 °C, obtained by the inversion and/or half-inversion recovery methods with f_2 -irradiation at -2.45 ppm and $\gamma H_2/2\pi \sim 107$ Hz, versus chemical shift of each line (ppm).

(J. Peptide Res., in press (1998))

Fig. 1

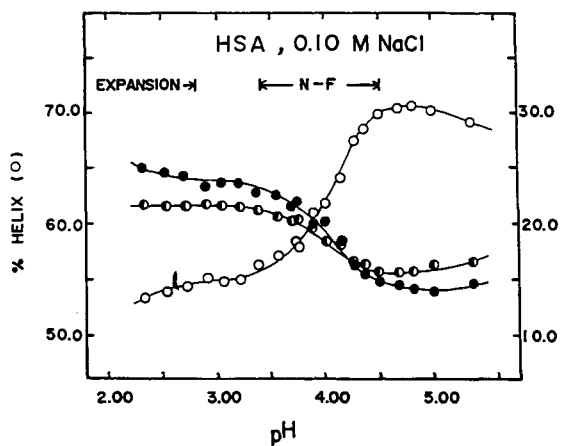


Fig. 2

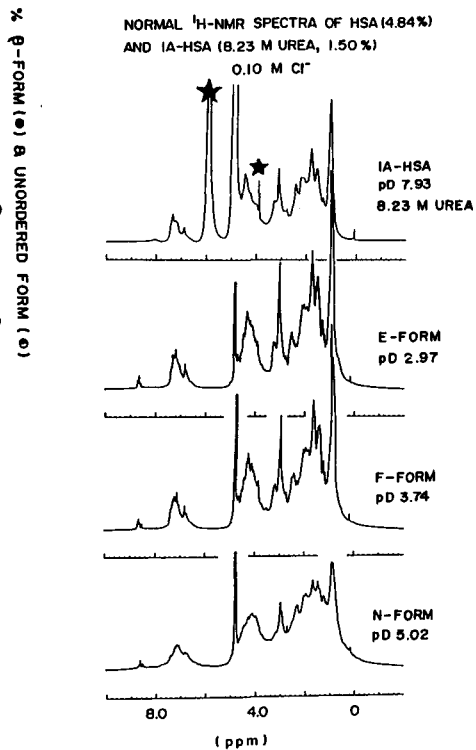


Fig. 3A

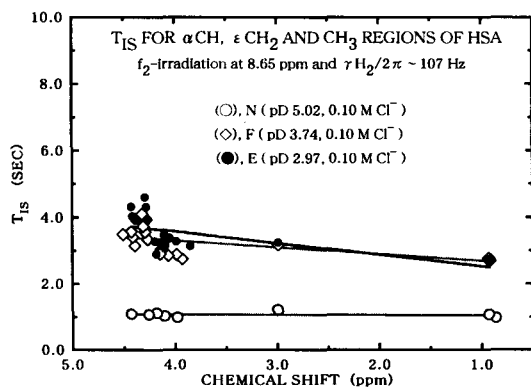


Fig. 4

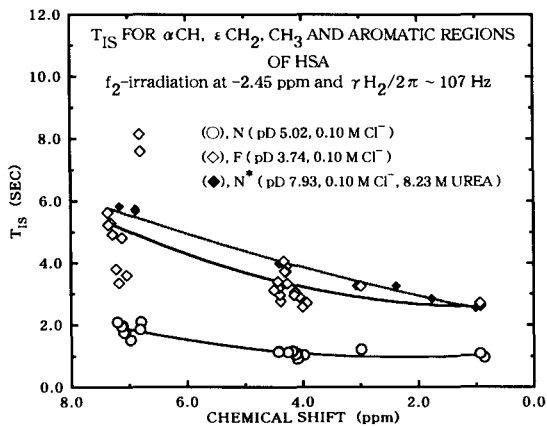
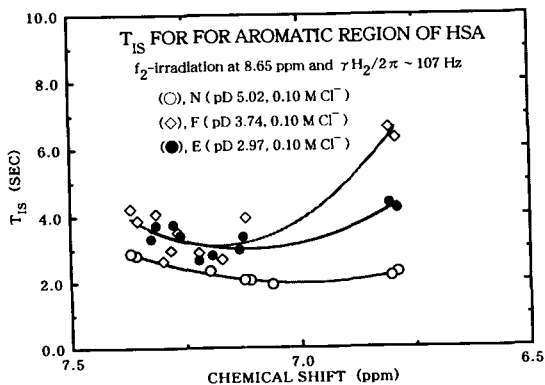


Fig. 3B



東京農工大工学部
University of Sheffield○岩館満雄、朝倉哲郎
M.P. Williamson

Structure Analyses of Peptides and Proteins

Based on NMR Chemical Shift Calculation and Chemical Shift Contour Plots

Mitsuo Iwadate¹, Tetsuo Asakura¹ and M.P. Williamson²1. Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
Koganei, Tokyo2. Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology,
University of Sheffield, Sheffield, UK

The NMR chemical shifts involve a lots of structural information and can be used as a key parameter in determinations of peptide and protein structures as well as the parameters such as NOE. In this study, ¹H NMR chemical shift calculation was applied to evaluate the pressure-induced shifts of BPTI and melittin. And the ¹³C NMR chemical shift contour maps are prepared as a function of torsion angles, Φ and Ψ based on the chemical shift values and PDB data of 40 proteins. The relationship between secondary structure and the secondary shifts of the C α and C β carbones was analyzed using Fourier series treatment of these data.

緒言 これまで当研究グループでは、タンパク質やペプチドの α 、 β ならびにNHプロトンについて、その原子座標に基づく¹H NMR化学シフトの定量的評価法を提案してきており⁽¹⁾、その評価法を様々な系に適用することを試みてきた⁽²⁾⁽³⁾。一方¹³C NMR化学シフトに関しては、タンパク質の¹³C NMR化学シフトの実測データとPDB構造データを組み合わせて化学シフトの(ϕ , ψ)等高線マップを作成し、構造解析への化学シフトの利用について検討してきた。

本研究では¹H NMR化学シフトに関して提案してきた評価法をより多くの系に利用すると共に、¹³C NMR化学シフトマップについてはより使いやすい形にすると共に、各アミノ酸残基毎の(ϕ , ψ)等高線マップを定量的に比較できるようにした。すなわち、圧力変化に伴うBasic Pancreas Trypsin Inhibitor (BPTI) および melittin について、その¹H NMR化学シフトの変化に基づいて、構造の変化を検討すること、環状ペプチド vasopressin のジスルフィド結合間にメチレンを導入した誘導体ペプチドについて導入前後の構造変化を化学シフト評価に基づいて検討すること、¹³C NMR化学シフトの(ϕ , ψ)等高線マップについて、そのサーフェスをFourier級数解析等である。

方法と結果

1 ¹H NMR化学シフト計算による圧力変化の解析

圧力変化に伴うBPTI及びmelittinの¹H NMR化学シフトは神戸大学赤坂研究室で測定されたデータで赤坂先生との共同研究の一環である。 α -helix構造を有するmelittinについてNH及び α プロト

キーワード：¹H NMR化学シフト計算、¹³C NMR化学シフトマップ、BPTI、melittin、vasopressin
いわだてみつお あさくらてつお M P Williamson

ンの化学シフト変化の量とシフト方向を再現するように、内部回転角を変化させて検討した。

2000bar の圧力がかかることによって生ずる化学シフトの変化量は、各残基で一様に内部回転角が変化すると仮定すると内部回転角の平均の変化量として、2~5%に相当し、シフト変化の方向を満足する内部回転角の変化は、圧力変化に伴い ϕ が増加、 ψ が減少となった。さらに圧力変化に伴うこのような微小な¹H NMR 化学シフト変化を、主に磁気異方性効果の変化としてとらえ詳細に解析するとともに化学シフト計算を導入したX-PLORでの解析を進めつつある。

2 vasopressinの構造変化の解析

本研究は東京理科大学植木研究室との共同研究であり、脳下垂体から分泌される下垂体後葉ホルモン[Arg⁸] vasopressin(9残基の環状ペプチド)のジスルフィド結合にメチレンを導入したagonistの構造解析を¹H NMR 化学シフトとNOEを組み合わせて解析した。導入前の化合物である[Arg⁸] vasopressinの溶液構造はSchmidt等⁽⁴⁾によって報告されている。¹H NMR測定はBruker AMX500を用いNOESY, DQF-COSYを測定し各プロトンについて立体特異帰属を行った。メチレン基の導入によって¹H NMR 化学シフト値およびNOEが大きく異なっている部位を中心に化学シフト計算を導入した構造解析を進めている。

3 ¹³C NMR化学シフトの(ϕ, ψ)等高線マップサーフェスのFourier級数解析

40個のタンパク質のデータベースからアミノ酸毎に作成した(ϕ, ψ)等高線マップを作成した。基本的にBax等⁽⁵⁾の方法に従いランダムコイルシフト値との差から二次シフト値を算出、補正を行ったあとその二次シフト値が内部回転角、水素結合の影響をその程度受けているか定量化した。また各アミノ酸毎に内部回転角依存性を定量化し、18種のアミノ酸残基を五つのカテゴリーに分けた。

これまでアミノ酸残基毎に内部回転角依存性を等高線マップ表示してもその特徴を定量的に捕らえることは困難であった。そこで各カテゴリー毎にFourier級数解析を行うことにより内部回転角依存性を三角関数による周期関数を用いて特徴付けを行った。主鎖の内部回転角に依存するシフト $\delta(\phi, \psi)$ はFourier級数 $b_{n,m}(n=1\sim 2N+1, m=1\sim 2N+1)$ で以下のように表される。

$$\delta(\phi, \psi) = a_0(\psi)/2 + \sum_{n=1}^N a_{2n}(\psi) \cos(n\phi) + \sum_{n=1}^N a_{2n+1}(\psi) \sin(n\phi)$$

$$a_n(\psi) = b_{n,0}/2 + \sum_{m=1}^N b_{n,2m} \cos(m\psi) + \sum_{m=1}^N b_{n,2m+1} \sin(m\psi)$$

各cluster毎にN=5(第5調波まで)としてFourier級数を計算した。その結果、 $\delta(\phi, \psi)$ は、 ϕ, ψ の正弦及び余弦の $(2N+1)^2=121$ 項の多項式から再現された。そして、Fourier級数の余弦成分 $b_{1,2m}(m=1\sim 5)$ にcluster毎に以下のような特徴が見られた(Figure1)。

- clust1(芳香族アミノ酸、Leu, Met残基)及びclust5(Gly残基)では第一調波($m=1$)の強度が他のclusterに比べて特に低くなっているのが見られた。第一調波は α -helix構造の低磁場シフトおよび β -sheet構造の高磁場シフトを示す成分であり、Gly残基のC α 化学シフトは二次構造の依存性が小さいことを示している。
- 水溶性残基が多数を占めるclust2では第二調波($m=2$)の絶対値が他に比べて有為の低く、ほぼ第一調波のみで説明される。
- clust3(β 位がCHの残基、Pro)とclust4(Ala, Ser)は第一から第四調波($m=1\sim 4$)に全体的に大きな強度があり、起伏の激しい内部回転角依存性となっている。
- いずれのclusterにおいても ϕ 及び ψ 側両次元において第五以上の調波($m>4$)は正弦項、余弦項

の両方で有意な強度は見られず N=5 で内部回転角依存性は記述される。

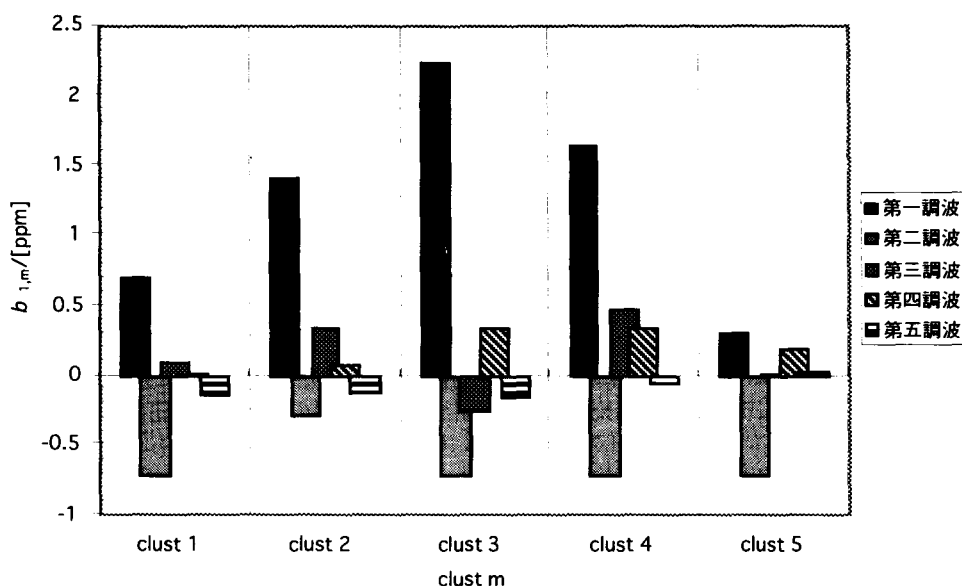


Figure 1 The Fourier series of $^{13}\text{C}\alpha$ Chemical Shift Surface in Ψ dimension, clustered into clusters of amino acid types with similar surfaces. (clust 1 Trp, Leu, Met, Phe, Tyr) (clust 2 Glu, Gln, Lys, Arg, Asp, Asn) (clust 3 Val, Ile, Thr, Pro) (clust 4 Ala, Ser) (clust 5 Gly).

最終的に PDB座標から α 位と β 位の ^{13}C NMR化学シフトを計算するプログラムを作成⁽⁶⁾し web上に公開した(<http://www.tuat.ac.jp/~asakura/research/13C/>)。また、 ^{15}N NMR化学シフトについても内部回転角及び水素結合の依存性について検討しつつある。

謝辞

本研究は一部、生研機構基礎技術推進事業により行われた。また、NMR構造計算の一部は、MSI (サンジェゴ) のソフトを用いて行われた。

参考文献

- (1) T. Asakura, K. Taoka, M. Demura and M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR* (1995), **6**, 227.
- (2) M. Iwadate, T. Asakura and M. P. Williamson, *J. Eur. Biochem.* (1998), *in press*.
- (3) T. Asakura, M. Iwadate, T. Date, M. Demura and K. Nokihara, *Peptide Chemistry* (1996), C. Kitada (Ed.), 345.
- (4) J. M. Schmidt, O. Ohlenschläger, H. Rüterjans, Z. Grzonka, E. Kojro, I. Pavo and F. Fahrenholz, *Eur. J. Biochem.* (1991), **201**, 355.
- (5) S. Spera and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* (1991), **113**, 5490.
- (6) M. Iwadate, T. Asakura and M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR*, *submitted*.

(名工大・工) ○吉水広明、早川喜子、藤原美穂、辻田義治、木下隆利

Self-diffusion and the Coacervation Properties of Elastin Protein in Aqueous Solution

○Hiroaki Yoshimizu, Yoshiko Hayakawa, Miho Fujiwara, Yoshiharu Tsujita, and Takatoshi Kinoshita
Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology

We discussed the partial molecular mobility and the self-diffusion of water and elastin protein in aqueous solution in order to clarify the coacervation phenomenon which is one of the important role on the formation of elastin fiber in native systems. The spin-lattice relaxation time (T_1) for the methyl protons of the Val in elastin and water increased with the temperature, and the increase became especially remarkable above 40~45 °C the coacervation comes about. On the other hand, the self-diffusion coefficients (D) for elastin and water were the same results as T_1 , and the diffusion of water in elastin was close to that of pure water at high temperature. From the facts that the coacervation was endothermic and in that process the turbidity of the solution increased, the result in this study was due to the formation of dense and dilute phase of elastin in aqueous solution.

1.はじめに

高等生物において弾性力を求められる組織（大動脈、靭帯、肺など）に広く分布している構造蛋白質エラスチンは、アミノ酸組成¹⁾ (Table 1) の80%以上がAla、Val、Pro、Glyであり、側鎖の性質を見る限り疎水性であるが、組織から分離抽出する過程で、水溶性の画分が容易に得られる。エラスチンにはテトラ(Val-Pro-Gly-Gly)、ペント(Val-Pro-Gly-Val-Gly)、ヘキサ(Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val)アミノ酸配列の繰り返しが多く見られ²⁾、 β -ターンの繰り返し構造の形成が考えられている³⁾。エラスチンの高次構造モデルはFig. 1に示したようにランダムコイル構造の中に部分的に α -ヘリックスや β -ターンの繰り返し構造が点在するような構造と提案される⁴⁾。本研究ではエラスチン水溶液中における熱的挙動（コアセルベーション：低温においては透明な均一溶液であるが、加熱すると白濁し二相に分離する）を、エラスチン及び水の両分子に着目し、温度可変によるそれらの局所的分子運動性および自己拡散性について¹H NMR法を用い議論した。

2.実験

試料は牛の頸部靭帯より中性抽出した不溶性エラスチンを熱シュウ酸処理し、水溶性断片とした可溶化エラスチンをエラスチンプロダクツ社より購入し、そのまま用いた。NMR測定は Varian社製 Unity 400 plus NMR分光計を用いた。¹Hのスピン-格子緩和時

Table 1
Amino acid composition of elastin

Amino acid		Amino acid	
Gly	30.6	Phe	3.3
Ala	23.0	Tyr	0.9
Val	14.8	Glu	1.6
Pro	12.5	Asp	0.5
Hyp	1.1	Ser	0.8
Leu	6.5	Thr	0.8
Ile	2.6	Lys	0.4
		Arg	0.5

Values are number of residues per 100 residues of the protein.

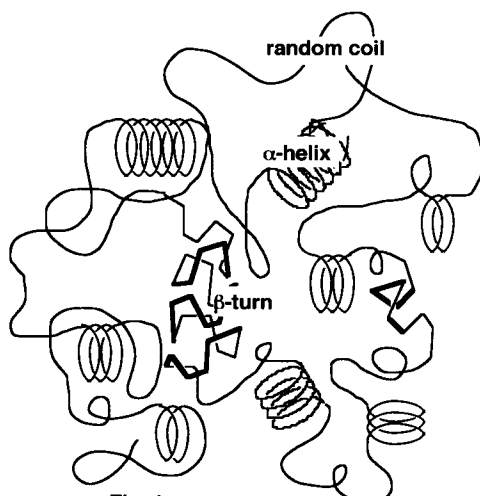


Fig. 1
Schematic model of elastin.

Key Words: エラスチン、コアセルベーション、自己拡散係数、PFG NMR、液-液相分離
よしみずひろあき、はやかわよしこ、ふじわらみほ、つじたよしはる、きのしたたかとし

間 (T_1^H) 測定には反復回転法を用いた。測定温度範囲は15~60℃であった。パルス磁場勾配 (PFG) ^1H NMR法を用いて自己拡散係数 (D) を算出した。

3. 結果と考察: エラスチン水溶液の熱的挙動を検討するため、DSC及び濁度測定を行った。Fig. 2に濁度の結果を示す。20℃付近より増加し始め、50℃以降変化が見られない。これは可逆的であった。濁度が増加する温度範囲はDSC測定で観測された吸熱ピークにほぼ一致した。35~50℃にかけて観測される吸熱ピークはエラスチンの水溶液にのみ見られ、含水系を含むエラスチン固体では観測されなかった。これはコアセルベーションがエラスチン分子同士の規則的配列というよりはむしろ水和していたエラスチン分子と水が解離することを示唆している。

次にコアセルベーションの過程における二次構造の変化について確認するため、CD及び ^{13}C NMR測定を行った。得られたCDスペクトルは197nmに負のピークを有し、主コンホメーションはランダム構造であるが、222nmのモル楕円率より見積もられる α -ヘリックス含率は17.5%であり、完全に無秩序ではなく部分的に秩序構造を有していることがわかった。各温度において得られた α -ヘリックス含率は、ほぼ一定であったことから、コアセルベーションの過程における二次構造の変化はほとんどないといえる。 ^{13}C NMRスペクトルの温度変化もほとんど見られないこと、また基準物質のピーク強度に対する各ピーク強度の比も温度に依らずほぼ一定であることから、コアセルベーション前後でエラスチンの活発な分子運動性が極端に低下するとは考えられず、かつそのコンホメーションの量も保持されていると考えられる。温度によってゾル-ゲル転移を示すポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)においてその ^{13}C NMRスペクトルは著しい線幅の広がりやピークの消失が報告されている⁵⁾。従って、仮にコアセルベーションによりミセル様のものが形成されるとすればスペクトルはブロードになるはずである。本研究において60℃まで温度を上昇させたが、各ピークの線幅はむしろ狭くなる傾向であったことから、コアセルベーションによって緻密な凝集構造が形成されているとは考えにくい。

水溶液状態におけるエラスチンの局所分子運動の温度依存性についてより詳細に検討するため、 T_1^H 測定を行った。Fig. 3にエラスチンD2O溶液中のValのメチルプロトン由来のピークから求めた T_1^H の温度依存性を示す。温度上昇とともに T_1^H は長くなるが、40~45℃付近を境にその増加が顕著になった。これはコアセルベーションを反映していると考え

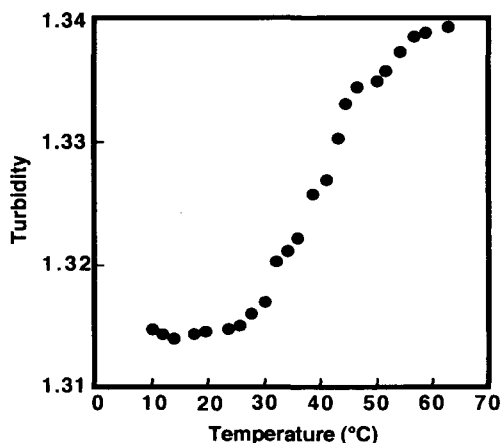


Fig. 2 Temperature dependence of the turbidity at 400nm for elastin aqueous solution (0.4mg/ml).

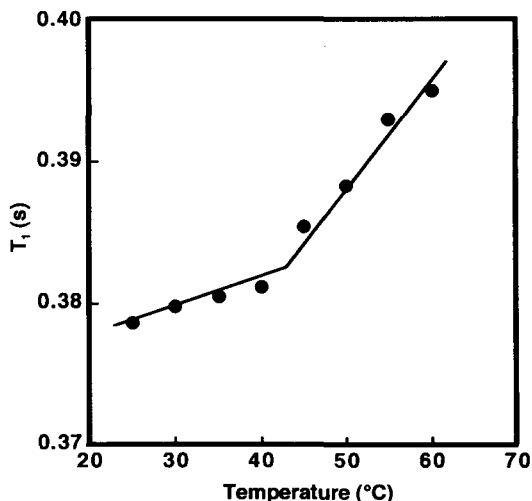


Fig. 3 Temperature dependence of T_1^H for the methyl protons of Val in elastin.

られ、その過程でエラスチンの局所分子運動性の向上はより大きくなることが明らかとなった。水分子すなわちDHOのピークに関して同様の検討を行った。比較のためにエラスチンの存在しないDHO即ちバルクのD₂Oについても測定した。DHOの T_1^H はエラスチン存在下の方が、そうでないものに比べ短くなった。これはエラスチンの存在により水の運動性が束縛されているためと思われる。また、温度依存性に関してエラスチンの有無で顕著な差が現れた。いずれの場合も温度上昇とともにDHOの T_1^H は長くなるが、バルクは単調増加であるのに対し、エラスチン存在下では40~45℃を境に増え方が顕著になった。従って、コアセルベーションによって共存している水分子の運動性もより高まると言える。

次にコアセルベーション前後におけるエラスチンおよび水の両分子の拡散性について磁場勾配パルス (PFG) ¹H NMR法を用いて検討した。エラスチンのValメチルプロトン由来のピークから求めた自己拡散係数 (D) の温度依存性をFig. 4に示す。温度上昇とともに拡散性は高くなり、特に40℃からその変化は顕著になった。さらにDHO由来のピークにも着目し、同様の検討を行った。結果をFig. 5に示す。エラスチン存在下での値が小さいのは、水の動きがエラスチンにより抑制されているためである。一方、エラスチンの有無に関わらず水の拡散係数は温度とともに大きくなるが、エラスチン存在下における水の拡散係数は、徐々にバルクのそれに近づいていく。これはコアセルベーションの結果、水溶液中でエラスチン同士および水同士が多く存在する場ができたためと考えられる。ここで“エラスチン同士が多く存在する場”とは凝集構造のような緻密な構造を意味するのではなく、単にエラスチン濃度の高い部分と捕らえるべきであろう。

以上、水の拡散性を検討することによってコアセルベーションが液-液二相分離であることが明らかとなった。

文献

1. D. W. Urry and B. Starcher, *Nature*, 222, 795 (1969).
2. K. Raju and R. A. Anwar, *J. Biol. Chem.*, 262, 5755 (1987).
3. W. R. Gray, L. B. Sandberg, and J. A. Foster, *Nature*, 246, 461 (1973).
4. 早川喜子, 吉水広明, 辻田義治, 木下隆利, 第35回高分子と水に関する討論会講演要旨集, 29 (1997), 藤川誠二, 早川喜子, 吉水広明, 木下隆利, 辻田義治, 繊維学会予稿集, G-67 (1998).
5. Fang Zeng, Zhen Tong, and Hanquiao Feng, *Polymer*, 38, 5539 (1997).

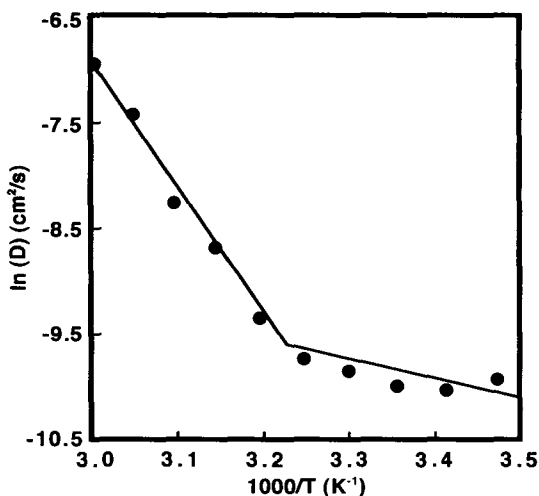


Fig. 4 Arrhenius plot of self-diffusion coefficient of elastin in D₂O.

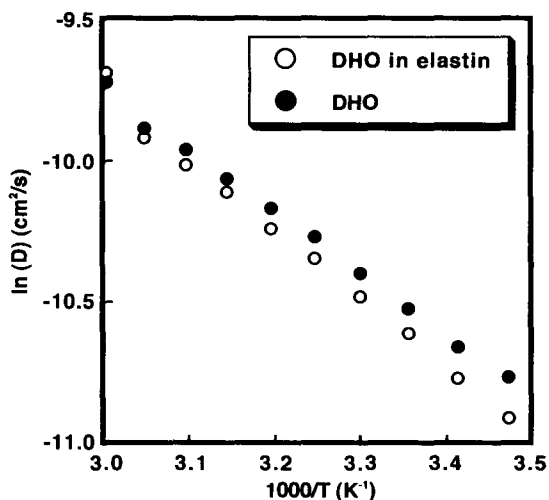


Fig. 5 Arrhenius plots of self-diffusion coefficient for two kinds of DHO.

(東京都立大学理学研究科¹、CREST²)○小野 晶¹、宮下新¹、小野 明²、楯 真一¹、甲斐荘正恒¹The analysis of the local conformational dynamics in the GNRA tetraloop
by the ^{31}P NMR relaxation rates.○ Akira Ono¹, Shin Miyashita¹, Akira (Mei) Ono², Shin-ichi Tate¹, Masatsune Kainosho¹

The local motion of the sugar-phosphate backbone of a GNRA tetraloop, 5'-(GGCGAAGCC)-3', has been investigated by the ^{31}P NMR relaxation rates. The anomalous T_1/T_2 ratios found for the loop region, consisting of the C3, G4, A5, indicated that the conformational fluctuation was localized in this region.

[序] GNRA型tetra loopは天然のRNA構造に頻出する安定なsmall loop構造の一つであり、NMR法¹やX-線結晶構造解析法²により三次元立体構造が解析されている。我々はGNRA型tetra loopを形成するRNAデカマー、5'-(GGCGAAGCC)-3' (Fig. 1)、の各ヌクレオシド残基を一つ一つ選択的に ^{13}C / ^{15}N で標識

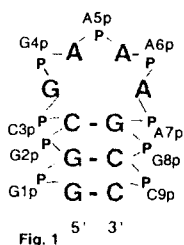


Fig. 1

した10種のisotopomersを化学合成し、NMR測定に用いることにより、 ^1H , ^{13}C , ^{31}P の全てのシグナルの帰属を完了したが、A6残基の5'位メチレンプロトンの内の $proS$ -プロトンに帰属されるシグナルだけがブロードである、という特異な現象が観測された³。測定温度や測定磁場強度を変化させて解析を行った結果、ループ部位に内部運動が存在することが推測された。本報告では、 ^{31}P NMR緩和実験を行うことによりループ部位の内部運動性に関してより詳細な解析を行ったので報告する。

[結果] Table 1に ^{31}P NMRの緩和解析の結果、 T_1 、 T_2 、及び T_1/T_2 比を示した。内部運動は T_1/T_2 比において顕著に示された。G4p (5'から4番目のホスホジエステル結合)の T_1/T_2 比が明らかにステム部位のホスホジエステル結合の T_1/T_2 比に比較して大きな値を示した。これは、G4残基とA5残基周辺に内部運動が存在することを示唆するものである。報告では、本結果に関して三次元構造^{1,2}やA6残基の5'位メチレンプロトンシグナルの挙動³との関連から更に詳細に議論したい。

residue	T_1 [s]			T_2 [ms]			T_1/T_2		
	283K	293K	303K	283K	293K	303K	283K	293K	303K
G1p	1.58 ± 0.04	0.915 ± 0.010	N.D.	37.9 ± 0.3	65.8 ± 3.8	N.D.	41.8	13.9	
G2p	1.48 ± 0.09	0.863 ± 0.007	N.D.	38.6 ± 2.0	62.5 ± 2.6	N.D.	38.3	13.8	
C3p	1.55 ± 0.09	0.835 ± 0.002	0.608 ± 0.009	24.1 ± 3.5	37.4 ± 0.8	62.8 ± 0.1	64.6	22.3	9.69
G4p	2.07 ± 1.23	1.02 ± 0.05	0.745 ± 0.069	15.1 ± 5.6	13.6 ± 4.0	30.2 ± 1.3	138	74.5	24.6
A5p	0.99 ± 0.06	0.670 ± 0.018	0.516 ± 0.001	19.0 ± 2.0	29.4 ± 2.3	53.2 ± 3.0	52	22.8	9.71
A6p	1.38 ± 0.24	0.808 ± 0.018	N.D.	35.6 ± 0.9	55.0 ± 2.8	N.D.	38.7	14.7	
A7p	1.25 ± 0.16	0.868 ± 0.030	0.694 ± 0.052	39.8 ± 1.5	53.7 ± 3.7	79.1 ± 4.3	31.4	16.2	8.77
G8p	1.54 ± 0.21	0.871 ± 0.030	N.D.	46.3 ± 4.1	68.5 ± 3.9	N.D.	33.2	12.7	
C9p	1.64 ± 0.06	0.915 ± 0.010	N.D.	41.3 ± 0.0	65.8 ± 3.8	N.D.	39.7	13.9	

Table 1. ^{31}P relaxation parameters, T_1 , T_2 , and T_1/T_2 , measured at 202.5 MHz, at 283, 293, and 303K. N.D. = Not determined due to signal overlap.

References

- 1) Jucker *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 968.
- 2) Pley *et al.*, (1994) *Nature*, **372**, 111.
- 3) Kataoka *et al.*, (1996) *Nucleic Acids Symp. Ser.* **35**, 93.

キーワード：GNRA tetraloop、動的構造、安定同位体、RNA structure、緩和時間
おの あきら、みやした しん、おの あきら、たて しんいち、かいのしょう まさつね

P38

大腸菌 4.5S RNA のタンパク質結合部位の構造解析

(千葉工大・工¹, 筑波大・生物科学²) 坂本泰一¹, 鈴間 聡², 山崎高生²,
中村幸治², 山根國男², ○河合剛太¹

Structural analysis of protein binding region of *E. coli* 4.5S RNA.

Taiichi Sakamoto¹, Satoshi Suzuma², Takao Yamazaki², Kouji Nakamura², Kunio Yamane²,
○Gota Kawai¹

¹Department of Industrial Chemistry, Chiba Institute of Technology,

²Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

E. coli signal recognition particle (SRP) is a ribonucleoprotein which consists of 4.5S RNA (144 nt) and Ffh protein, and mediates the protein translocation across the membrane. 4.5S RNA also binds to Elongation factor G (EF-G) and is supposed to promote the release of EF-G-GDP from ribosome. These two proteins bind to the same region of 4.5S RNA but with different manner; some mutation decrease affinity for only EF-G. To investigate the interaction of 4.5S RNA with Ffh and EF-G, the protein binding region (SRP49, 49nt) of 4.5S RNA and two mutants of SRP49 are studied by using NMR. One of the mutants binds to Ffh but not to EF-G (M17, A17→U) and another one do not bind to both Ffh and EF-G (M30, A30→C). By the analysis of imino proton signals of SRP49 and its mutants suggests that the manner of base pairings is different between these three RNAs.

【序】 大腸菌 4.5S RNA (114 残基) はシグナル認識粒子 (SRP) のもう一つの構成要素である Ffh タンパク質と複合体を形成し、タンパク質の膜透過過程に関与している。一方 4.5S RNA はタンパク質伸長因子 (EF-G) とも結合し、GDP 結合型 EF-G がリボソーム上から解離する過程に関与することが予想されている。変異体の解析により Ffh および EF-G はいずれも 4.5S RNA のほぼ同一の領域に結合するが、結合様式には違いが見られる。Figure 1 に、49 残基からなるタンパク質結合部位 (SRP49) を示したが、例えば 17 番目の A を U に置換した変異体 (M17) は Ffh および EF-G との結合活性が非常に低く、30 番目の A を C に置換した変異体 (M30) は Ffh と結合するが EF-G との結合活性は非常に低い (中村ら unpublished data)。4.5S RNA の NMR 解析については、すでに報告されているが、その構造およびタンパク質との複合体の構造は明らかになっていない (1)。本研究では、4.5S RNA と二種類のタンパク質との結合様式について明らかにすることを目的とし、SRP49 およびその変異体について NMR による解析を行っている。

キーワード：シグナル認識粒子，安定同位体標識，タンパク質-RNA 相互作用

さかもとたいいち，すずまさとる，やまざきたかお，なかむらこうじ，やまねくにお，
かわいごうた

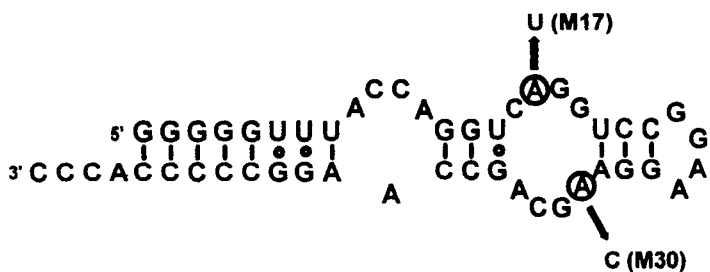


Figure 1. Secondary structure of SRP49.

【実験】 T7 RNA polymerase を用いた転写系により SRP49 を調製した。¹⁵N 標識した SRP49 も同様に調製した。SRP49 の変異体 M17 および M30 については、RNA 合成機を用いて調製した。NMR については Bruker DRX-500 を用いて 298K の温度で測定した。軽水中において NOESY および HMQC の実験により、SRP49 のイミノプロトンのシグナルを帰属した。SRP49 と M17 および M30 のイミノプロトンシグナルを比較した。以上の測定には jump-and-return 法を用いた。

【結果および考察】 SRP49 および M17 のイミノプロトンシグナルを比較すると、A17 を U に置換することにより G(34):U(15)塩基対由来のシグナル (▼) が減少し、新たに3つのシグナル (●) が観測された (Figure 2)。M17 では、U(15)が bulge out し、新たに G(34):C(16)、A(33):U(17) および G(18):C(32)の塩基対が形成されていると考えられる。また、SRP49 および M30 のイミノプロトンシグナルを比較すると、A30 を C に置換することにより新たに2つのシグナル (★) が観測された (Figure 2)。M30 では、G(19):C(30)塩基対が新たに形成されることにより、A(29):U(20)塩基対が安定化していると考えられる。これらの変異導入により、内部ループおよびその近傍の塩基対の形成様式が変わったことによって、M17 および M30 はタンパク質と相互作用できなくなった可能性が示唆された。

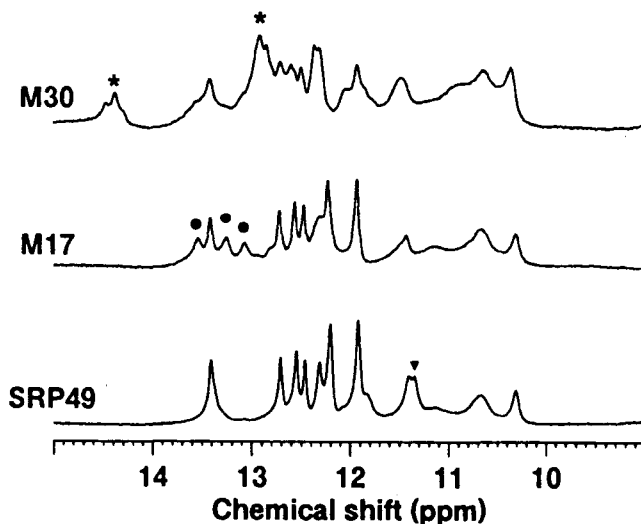


Figure 2. Imino proton signals of SRP49 and the mutants.

参考文献 1. Schmitz, U. *et al.* (1996) *RNA*, 2, 1213-1277.

P39

分岐シクロデキストリン類の溶液における立体構造
(工技院・生命研¹、日本電子データム²) ○石塚靖子¹、根本直¹、
藤原正子²、藤田憲一²、中西洋志¹

Three Dimensional Structure of Branched α -Cyclodextrins in Solution

(AIST・NIBH, JEOL DATUM*) ○Yasuko ISHIZUKA, Tadashi NEMOTO, Masako FUJIWARA,* Ken-ichi FUJITA,* and Hiroshi NAKANISHI

¹H NMR spectra of glucosyl- α -CD, maltosyl- α -CD, maltotriosyl- α -CD and panosyl- α -CD were observed and NOE correlations were analyzed. Three dimensional structures of these substituted cyclodextrins were effectively simulated using DADAS method with distance constraints estimated by the strength of NOE correlational peaks.

「序」

水溶液における溶解度改善のために、シクロデキストリン(CD)に代わって分岐 CD が用いられることが多い。この場合、分岐部分の糖鎖は CD を構成する 1 つの glucose 残基の 6 位の水酸基に結合しているが、分岐部分の糖鎖が CD に対してどのような配置をとるかは非常に興味をもたれる。

そこで、glucosyl- α -CD¹、maltosyl- α -CD¹、maltotriosyl- α -CD¹ および panosyl- α -CD の 4 つの分岐 CD の水溶液における立体構造を明らかにするために、NMR スペクトルを解析し、さらに NOE を検出し、その強度から、NOE を示す水素核間距離を推定し、立体構造の可視化を行ったのでその結果を報告する。用いた分岐 CD はすべて α -D-glucose から成り、NMR シグナル帰属のために、各 glucose 残基を分岐部分ではシクロデキストリンに近い方から、A, B, C と名付け、シクロデキストリン部分では分岐のついた残基を 1D とし、1D の 4 位に結合する glucose 残基を 2D、という方向で順に 6D まで名付けた。

「実験」

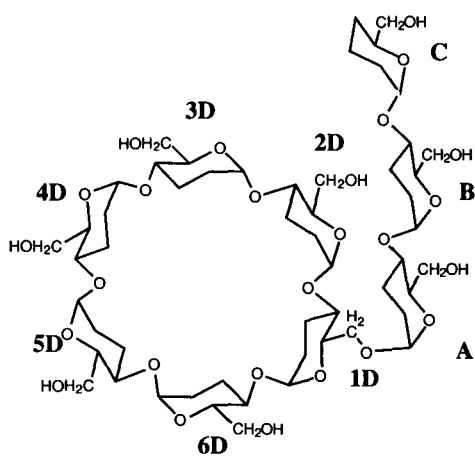
NMR スペクトルの測定は水溶液で、Bruker 社製 DMX750 及び DMX500 を用いて、298K で行った。外部基準として、sodium-2,2-dimethyl-2-silapentionate-d₄ (DMSP) を用いた。

「結果と考察」

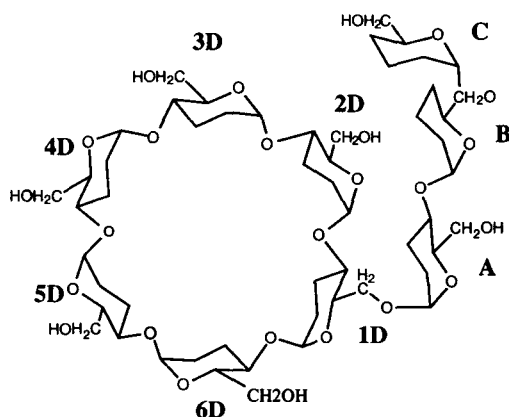
glucosyl- α -CD の 1 位のシグナルは分岐 A と CD の化学シフトが大きく異なり、それ

キーワード: 分岐シクロデキストリン・立体構造・panosyl- α -CD・maltotriosyl- α -CD

いしづかやすこ、ねもとただし、ふじわらまさこ、ふじたけんいち、なかにしひろし



Maltotriosyl- α -CD



Panosyl- α -CD

それぞれ 4.95 ppm と 5.07 ppm 付近に現われる。CD の 5.07 ppm 付近のシグナルはさらに 3 つのダブルレットピークに分けることができ、最も低磁場側 5.072 ppm に 1 個、5.067 ppm に 1 個、そしてさらに 5.057 ppm に 4 個の水素に対応した強度を持つ。分岐のない CD では 1 位のシグナルは幾分幅広くなったダブルレットとして観測されるが、分岐がつくことで、CD を構成する 6 個の glucose 残基の等価性が崩れ、3 つのピークに分裂したと考えられる。一方、分岐部分をもつ 1D 残基の 6 位の水素 (1D6) は水酸基が置換しているため、シグナルは低磁場シフトし、分岐を持たない残基 (2D-6D) の 6 位のシグナルと明確に区別できる。1 位シグナルと 6 位の水素の相関スペクトル (TOCSY) から、5.067 ppm のシグナルが分岐を持つ残基の 1 位の水素 (1D1) のシグナルに相当することがわかった。分岐による影響は 6D よりも 2D の方が大きいと考えられることから、5.072 ppm に現われた CD の 1 位のシグナルは 2D1 と帰属される。

このような CD の 1 位の分裂は他の 3 つの分岐 CD でも同じように観測され、glucosyl- α -CD と同じように帰属を行った。このように帰属した 1 位のシグナルとの相関スペクトル (1D HOHAHA, 並びに 2D TOCSY) から 4 つの分岐 CD の ^1H シグナルの帰属を行った。 maltotriosyl- α -CD についての結果を Table 1 に示す。

4 つの分岐 CD の NOE を混合時間およびスピロックの条件を変えた合計 6 種類の条件での 2D NOESY 及び ROESY スペクトルで検出した。得られた NOE を Table 2 にまとめた。すべての O-グリコシル結合位の水素間に NOE が観測され、特に強い NOE が D1 と D4 の間にみられ、また D1 と D6 の間にも比較的強い NOE が観測された。また maltotriosyl- α -CD では A1 と 1D6 の間に、panosyl- α -CD では D1 と B6 の間に強い NOE が観測された。

Table 2 に示した NOE の内、太字で示した NOE を用い、立体構造の可視化を DADAS90 プログラム²を用いて行った。強い (s) NOE、及び比較的強い (m) NOE を示す水素核間距離をそれぞれ 3.0-3.5 Å、及び 4.0-4.5 Å として、弱い (w) について

Table 1 Chemical Shifts of Maltotriosyl- α -CD (ppm from DMSP)

	C	B	A	1D	2D	3D -6D
1	5.375	5.305	4.904	5.048	5.059	5.043, 5.054
2	3.573	3.614	3.578	3.658	3.616	3.625
3	3.681	3.941	3.996	4.008	3.989	3.982
4	3.405	3.649	3.644	3.610	3.553	3.584
5	3.706	3.848	3.852	3.832	3.852	3.832
6	3.752	3.795	3.798	3.905-3.950	3.905-3.960	3.905-3.970
6	3.812	3.850	3.870	4.015	3.810-3.866	3.810-3.867

Table 2. Detected Interresidual NOEs

	Maltotriosyl- α -CD	Panosyl- α -CD	Maltosyl- α -CD	Glucosyl- α -CD
C1 - B6	-	<u>s</u>		
C1 - B4	<u>s</u>	-		
C1 - B5	<u>m</u>	-		
C1 - B3	<u>w</u>	-		
C1 - D6	<i>w (C1 - 2D6)</i>	-		
B1 - A4	<u>s</u>	<u>s</u>	<u>s</u>	
B1 - A3	<u>m</u>	<u>m</u>	<u>w</u>	
B1 - A5	<u>w</u>	<u>w</u>	<u>w</u>	
B1 - D6	<i>vw*</i>	<i>vw*</i>	-	
B6 - D1		<i>m (B6 - 2D1,6D1)</i>	-	
A1 - 1D6	<u>s</u>	<u>s</u>	<u>s</u>	<u>s</u>
A1 - D6	<i>m* (1A1 -1D6)</i>	-	-	<u>w</u>
A1 - 1D4	<u>vw</u>	-	-	-
A1 - 1D2	-	-	-	<i>w*</i>
A1 - D4	-	-	-	<u>vw</u>
A5 - 2D1	-	-	-	<u>m</u>
A3 - D1	-	-	<i>w (A3 - 2D1)</i>	<i>vw*</i>
D1 - D4	<u>s</u>	<u>s</u>	<u>s</u>	<u>s</u>
D1 - D6	<u>m</u>	<u>m</u>	<u>m</u>	<u>m</u>

bold : used as distance constraint

italic : checked the possibility of every cases

underline : reasonable in the results after simulations

* : unchecked

s: strong, m: medium strong, w: weak, vw: very weak

-: not detected

は 4.5 Å とした。

CD のシグナルについて、完全に 6 つの glucose 残基の区別ができていないので、NOE についても glucose 残基を特定できない場合があった。maltotriosyl- α -CD では C1-D6 について、panosyl- α -CD では B6-D1 について、maltosyl- α -CD では A3-D1 が特定できなかった。これらについては 1D から 6D までのそれぞれの場合について、計算を行い、整合性のある構造を結果として出すことのできる場合を調べた。得られた整合性のある場合を Table 2 のそれぞれの欄に括弧をつけて示した。

panosyl- α -CD の場合、2 つの可能性があり、B6-D1 は B6-2D1 の場合と B6-6D1 の場合が整合性がある。B6-2D1 の場合の立体構造の結果を Fig.1 に示した。この Fig.1 に示した場合も、もう 1 つの B6-6D1 の場合も panosyl- α -CD では分岐の糖鎖は CD 環の外側にあり、包接のための入り口を閉ざす位置にはないことがわかった。一方、maltosyl- α -CD では C1-D6 の NOE は C1-2D6 の場合にのみ、整合性のある立体構造が結果として、計算された。得られた構造は分岐部分が CD 環の狭い入り口付近に存在するような構造であった。

panosyl- α -CD と maltosyl- α -CD の構造は分岐部分の O-グリコシル結合の一つが異なるのみで、他に違いはない。このようなわずかな違いが大きな立体構造の違いを生じることは非常に興味深い。また、分岐部分の CD に対する配置から、panosyl- α -CD の方が包接を起こしやすいことが示唆される。

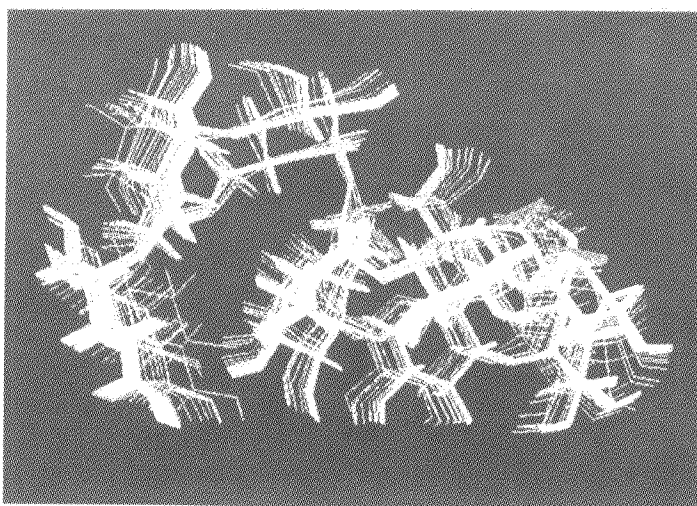


Fig. 1 Simulated structures of Panosyl- α -CD by DADAS90

References

- [1] Y. Ishizuka, H. Nakanishi, T. Shiraishi, Y. Kogure and S. Kobayashi, J. Carbohydr. Chem. 10, 583-592 (1991).
- [2] DADAS90 was in Molscope software package developed using DADAS method. About DADAS method, W. Braun and N. Go, J. Mol. Biol., 186, 611-626, (1985).

P40

Pyridine 環上置換基の ^{15}N - ^1H longrange coupling constant への影響

○佐藤陽子¹⁾, 徳永達裕²⁾, 関 宏子²⁾, 内海博明³⁾,
中越雅道¹⁾

1) 雪印乳業(株)生科研, 2) 千葉大学分析センター, 3) 日本電子(株)応研

Effect of the functional group on ^{15}N - ^1H longrange scalar coupling constant of pyridine skeltone.

Yoko Satoh¹⁾, Tatsuhiro Tokunaga²⁾, Hiroko Seki²⁾, Hiroaki Utsumi³⁾,
Masamichi Nakakoshi¹⁾

1) Snow Brand Milk Product, 2) Chiba Univ., 3) JEOL

Recently, heteronuclear longrange scalar coupling constants are available for structural elucidation of organic compounds. In order to study the effect of the functional groups to ^{15}N - ^1H longrange scalar coupling constant, we were measured ^{15}N - ^1H longrange scalar coupling constants of the several pyridine compounds with natural abundance ^{15}N nuclear by J-HMBC method. ^{15}N - ^1H longrange scalar coupling constant was effected by the substituted functional groups on pyridine. We present the functional group effects to the ^{15}N - ^1H longrange scalar coupling constants of the several pyridine derivatives.

1) はじめに

異種核間の longrange scalar coupling constant (以下ロングレンジ J と略す) は、有機化合物の立体構造解析に古くから応用されてきた。特に最近 2D による ^{13}C - ^1H のロングレンジ J を求める方法として、 ^{13}C 観測の測定法が提案されている¹⁾。しかしながら、解析する化合物の分子量が大

Keyword : longrange scalar coupling constant、磁場勾配、 ^{15}N 核

著者ふりがな: さとうようこ, とくながたつひろ, せきひろこ,
うつみひろあき, なかこしまさみち

きくなるにつれて ^1H のスペクトルが複雑となるうえ、特に微量サンプルの測定は、 ^{13}C 観測による測定では十分な感度が得られない。そこで近年、 ^1H 観測による HMBC 測定を応用した J-HMBC-2D 及び HETELOC 測定等でロングレンジ J が測定されており、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖並びにオリゴペプチドの構造解析に応用されている^{2),3),4)}。一方、 ^{15}N 核はその天然存在比が 0.37% であり、測定が困難なことから現在まで天然存在比でのロングレンジ J の測定は行なわれていない。しかし、 ^{15}N エンリッチピリジン類での ^{15}N - ^1H ロングレンジ J は、Lichter ら⁵⁾により、置換基が ^{15}N - ^1H ロングレンジ J に与える影響について電気陰性度が高い隣接基関与により $^2J_{\text{NH}}$ が増大することが報告されており、また Witanowski ら⁶⁾は構造解析への応用を報告している。しかし、様々な置換基を有するピリジン環での測定は未だ不十分であり、また全てのサンプルで ^{15}N エンリッチ化合物を得ることは極めて困難である。近年磁場勾配パルスを応用することにより天然存在比での ^{15}N - ^1H ロングレンジ J の測定が可能となった。更に、化合物の薬理活性や代謝において重要である N 核周辺の化学構造の情報を得る事は意味があると考え、天然存在比の ^{15}N - ^1H のロングレンジ J を測定することにし、まず数種の置換基をもつピリジン誘導体を測定し、その置換基の影響を調べることにした。

2. 測定方法

測定は 5mm のサンプルチューブを用い、DMSO- d_6 にサンプル 50-100mg を溶解し、装置は JEOL ECP500、Alpha500 及び Lambda600 で測定した。測定は J-HMBC-2D 法 (Fig.)、 $T=120\text{msec}$ 、 $\Delta=20-110\text{msec}$ 、 $\text{AQMTM}=0.45-0.55\text{sec}$ 、温度は 30°C で測定した。なお、J 値の算出については Δ に関する信号強度変化に対して $A \sin(\pi J \Delta)$ を Microsoft Excel のソルバー機能を用いて最小二乗法で適合し求めた。また、J 値の計算は説明分散相関係数 $R^2=0.65$ 以上を採用した。2,3,4 位に各置換基を有するピリジン誘導体、ピリジン及びピリジン塩酸塩のロングレンジ J を測定し、その結果を表に示した (Table 1, 2)。

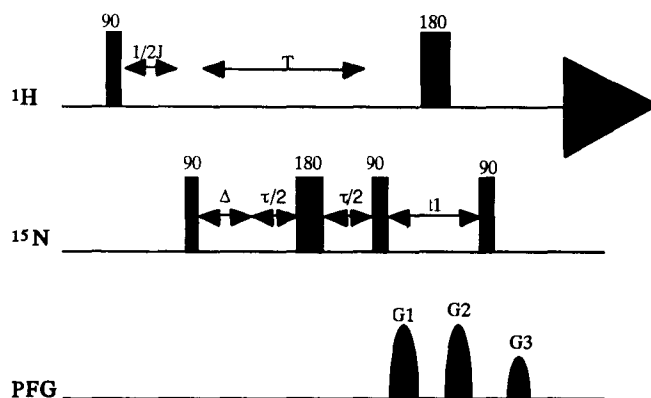


Fig. PFG-J-HMBC-2D

3. 結果及び考察

ピリジン及びその誘導体の測定において $T=200, 160, 120\text{msec}$ で検討した結果、 $T=200\text{msec}$ と 160msec での測定では ^1H - ^1H J モジュレーションの影響によりクロスピークの S/N が低下すると共に緩和の影響も受け、クロスピークのすそが広がるためピーク強度にばらつきが見られ、精度の高い J 値が算出されなかった。 $T=120\text{msec}$ の場合 ^1H - ^1H J モジュレーションが小さく、十分なピーク強度が得られた。このことから $T=120\text{msec}$ として測定を実施した。更にパルスの繰り返し時間をを約 2sec にし、緩和の影響も少なくする事とした。

J 値が小さい場合にはそのシグナル強度が低いために正確な値は求められないと判断されたが、 0.5Hz 程度のカップリングでも比較的精度の高い値が測定された。この事から天然存在比での ^{15}N 核と ^1H のロングレンジ J は、本方法で測定可能であると共に ^{15}N 核の化学構造についての情報が得られることも判明した。N 核に直接結合した電子吸引基、すなわち O 核が結合した N-oxide では、孤立電子対が O 核の結合により消失した結果、 α -1H と N 核のカップリング定数が減少した (Table 1.)。

Table 1. ^{15}N - ^1H longrange scalar coupling constants of non-substituted pyridines.

position	H	HCl	N-oxide
2,6 (R^2)	10.691 (0.998)	0.597 (0.975)	<0.5Hz
3,5 (R^2)	3.875 (0.946)	0.596 (0.988)	4.192 (0.990)

種々のピリジン誘導体を測定した結果、電子吸引基並びに電子供与基の間における J 値は N 核の α 、 β 位の H で差があることが判明した。このことからロングレンジ J 値は N 核の孤立電子対と置換基の影響を受けて変化するものと確認された(Table 2)。

これらの結果より、PFG-J-HMBC-2D 法により、 ^{15}N - ^1H ロングレンジ J 値を測定することが可能であると判断されるとともに、ある程度のサンプル量が確保できれば構造決定に有用な情報を与えると推察された。

尚、他の誘導体についても測定を進めている。

Table 2. ^{15}N - ^1H longrange scalar coupling constants of 3-substituted pyridines.

position	3-Cl	3-COOH	3-OH
2	10.63	11.44	9.18
R^2	(0.99)	(0.88)	(0.96)
5	0.79	3.36	6.29
R^2	(1.00)	(0.91)	(0.92)
6	11.38	11.36	11.06
R^2	(0.96)	(0.67)	(0.93)

- 文献：1) K. E. Kover *et al.*, *J.Magnetic Resonance*, **130**, 155-161(1998)
 2) A. Bax *et al.*, *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 8370(1994)
 3) A. Bax *et al.*, *J.Magnetic Resonance*, series A, **110**, 257 (1994)
 4) D. Leibfritz *et al.*, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **33**, 632-638(1995)
 5) R. L. Lichter *et al.*, *J.Am.Chem.Soc.* **93**, 5218(1971)
 6) J. Witanowski *et al.*, *Prog. NMR Spectrosc.*, **7**, 117(1977)

P41

拡散係数測定に基づくハイドロゲル高分子と医薬品の相互作用の評価
(国立医薬品食品衛生研究所) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄

Determination of the Diffusion Coefficient of 5-Fluorouracil in Amphiphilic Hydrogels
Prepared by Different Initiation Method by ^{19}F -NMR
Yukio. Aso, Sumie. Yoshioka and Shigeo. Kojima
National Institute of Health Sciences

Amphiphilic hydrogels were prepared by redox initiation using ammonium persulfate (chemical gel) and by γ irradiation initiation (γ irradiation gel). The release of 5-fluorouracil (5-FU) from the chemical gel was faster than that the γ irradiation gel. Spin-lattice relaxation time and the diffusion coefficient of 5-FU measured by ^{19}F -NMR suggest that swelling of γ irradiation gel proceeds gradually from surface, whereas the swelling of chemical gels seems to take place homogeneously. The difference in drug release rates may be ascribed to this different swelling behavior of the gels, as well as the different swelling rate.

はじめに

ゲルネットワーク内に親水性のアクリル酸残基と疎水性のドデシルアクリルアミド残基を有する両親媒性ハイドロゲルは親水性および疎水性の薬物の放出制御製剤に適用できる汎用性の高い素材である。我々は重合反応を開始する方法を変えることにより、モノマー組成が同一であるにもかかわらず、薬物放出速度が異なる両親媒性ハイドロゲルが得られることを明らかにした。このゲルからの薬物放出速度はゲルの膨潤速度に大きく依存するが、薬物放出速度の差は膨潤速度の差のみでは説明することはできず、ゲル高分子と薬物の相互作用がゲルの調製法で異なる可能性が考えられた。ゲル高分子と薬物の相互作用は薬物の運動性に影響を与え、薬物の拡散係数(D)やスピン-格子緩和時間(T_1)に影響すると考えられる。そこで、5-フルオロウラシル(5-FU)をモデル薬物とし ^{19}F -NMR を用い、放出過程における薬物の D や T_1 を測定し、薬物の運動性の変化を明らかにし、両親媒性ハイドロゲルの放出速度に影響を及ぼす因子について考察した。

実験

両親媒性ハイドロゲルの調製

モノマーおよび架橋剤 (イソプロピルアクリルアミド(91.5 mol%)、ドデシルアクリルアミド(2 mol%)、アクリル酸(5 mol%)、ビスメチレンアクリルアミド(2.5 mol%)、全量 2g)お

キーワード：拡散係数、パルス磁場勾配、ハイドロゲル
あそゆきお、よしおかすみえ、こじましげお

び 5-フルオロウラシル(5-FU)を 4ml のエタノールに溶解した。化学重合法の場合は 0.5ml の過硫酸アンモニウム水溶液を加え、窒素を通気して溶存酸素を除去した後、0.125ml のテトラメチルエチレンジアミンを加え攪拌した後、厚さ 2mm のシリコンゴムスペーサーで隔てられたシリル化したガラス容器に移し、室温で 4 時間反応させた。γ 線照射法の場合はモノマーと 5-FU のエタノール溶液に水 0.625ml を加え除酸素した後、ガラス容器に移し、5 kGy の γ 線を照射した。ゲルは直径 9mm の円板に切り、減圧乾燥した。

膨潤率、薬物放出プロファイル

pH7.4 のリン酸緩衝液を用い、37°Cにおいてゲルの膨潤率および薬物放出量の時間変化を測定した。膨潤率 S はゲルの重量を測定し、次式に従い算出した。

$$S=(W_t-W_0)/W_0$$

W_0 および W_t はそれぞれキセロゲルの重量、pH 7.4 の緩衝液で膨潤させたゲルの重量を表す。緩衝液中に放出された 5-FU を高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

NMR

^{19}F を観測核とし、膨潤率の異なるゲル中の 5-FU のスピン-格子緩和時間(T_1)および拡散係数(D)を測定した。 T_1 の測定は inversion-recovery 法により行った。 D の測定は stimulated spin-echo 法により行った。拡散時間は 0.4 秒、磁場勾配パルス幅は 1.5ms とし、磁場勾配強度を 3~30 Gauss/cm の範囲で変化させ、エコー強度の測定を行った。ゲルの膨潤には pH 7.4 のリン酸緩衝液(5mg/ml の 5-FU を含む)を凍結乾燥し重水に再溶解した溶液を用いた。

結果および考察

化学重合法および γ 線照射法によって調製した両親媒性ハイドロゲルからの 5-FU の放出曲線を Fig. 1 に示す。モノマー組成が同一であるにもかかわらず、化学重合法で調製したゲルは γ 線照射法によって調製したゲルに比べ速やかな薬物放出を示し(Fig.1 A)、膨潤率も大きかった(Fig.1 B)。両者のゲルの放出速度は 2 倍の差がみられたが、膨潤速度は 1.3 倍の差であった。薬物放出速度はゲルの膨潤速度に大きく依存するが、膨潤速度の他に薬物放出速度に影響する因子が存在することを示唆する。Fig. 2 に放出過程におけるゲル中の 5-FU の T_1 および D の変化を示す。5-FU の T_1 および D は時間とともに増加し、膨潤することにより 5-FU の動きが良くなっていることがわかる。 T_1 は重合法によって差が見られず、 D の値は放出の遅い γ 線照射ゲルの方が大きい傾向を示したことから、合成法によってゲル高分子と 5-FU の相互作用に大きな差はないことが示された。

化学重合ゲルではゲル全体がほぼ均一に膨潤するのに対し、γ 線照射ゲルの場合には膨潤がゲルの表面から徐々に進行し、膨潤が不均一に起きていることが示された。すなわち、3 時間膨潤させた γ 線照射ゲルの円板の円周部分を試料とした場合は拡散係数の測定が可能であったが、ゲル円板の中央部分ではシングルパルスでシグナルが観測されたにもかかわらず、stimulated-echo 法ではまったくシグナルが消失してしまった。これはゲルの中央部分に存在する 5-FU の動きが円周部分に比べ非常に遅いためと思われる。化学重合

ゲルでは均一に膨潤するため薬物がゲル全体から放出されるのに対し、 γ 線照射ゲルにおいては膨潤した部分と膨潤していない部分があり、薬物は膨潤した部分から放出されるため、膨潤率から予測されるより放出速度が小さいものと考えられる。化学重合法と γ 線照射法の開始ラジカルの生成速度に差があるため、高分子の構造の異なるゲルネットワークが形成され、その結果、膨潤の仕方の違うゲルが形成されたものと考えられる。

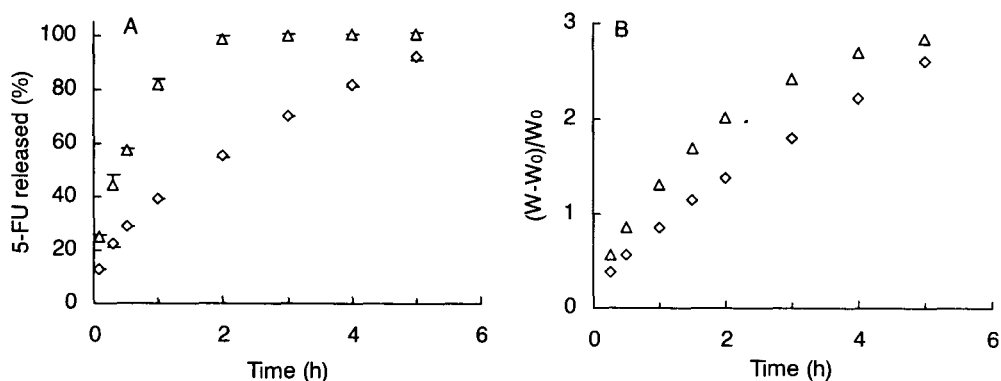


Fig. 1 Drug release profiles from amphiphilic hydrogels (A) and swelling kinetics (B) Δ , chemical initiation; \diamond , γ irradiation initiation

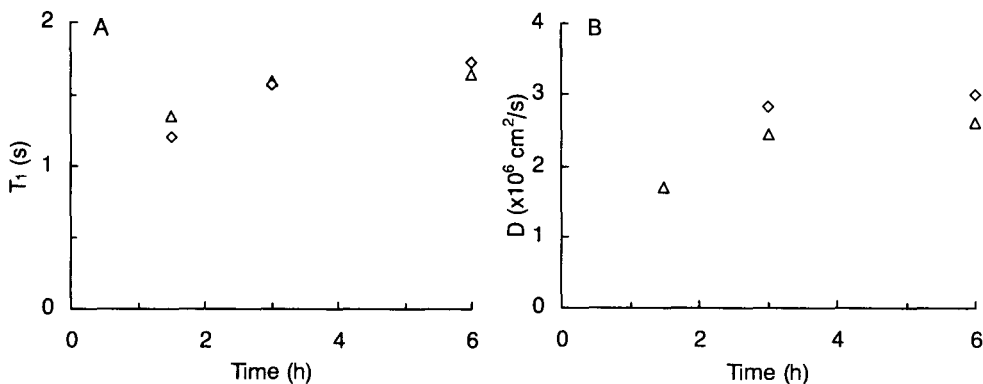


Fig. 2 ^{19}F spin-lattice relaxation time (A) and diffusion coefficient (B) of 5-FU in amphiphilic hydrogels Δ , chemical initiation; \diamond , γ irradiation initiation

まとめ

stimulated spin-echo 法による拡散係数測定の結果から、異なる合成法で調製したゲル高分子と 5-FU の相互作用に差が無いことが明らかとなった。stimulated spin-echo 法によって得られるエコー強度は動きが速く T_2 の大きな分子のシグナルが強調されたため、不均一な試料に適用する場合、注意が必要と考えられる。

P42

二本鎖型界面活性剤の反応に及ぼすミセル表面電荷の効果 (名工大工) ○駒田陽三、吉野明広、岡林博文

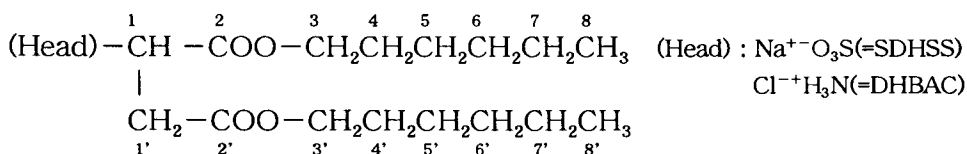
The hydrolysis and the exchange reaction of the bi-tailed surfactants in the aqueous micellar state and their hindrance by phase-boundary potential effect

○Yoza Komada, Akihiro Yoshino, and Hirofumi Okabayashi

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Sodium dihexylsulfosuccinate and 1,4-Dihexyloxy-1,4-oxo-2-butanammonium chloride were synthesized to offer the cationic and anionic micellar solutions. The base-concentration dependence of the ^{13}C NMR spectrum for these surfactant- D_2O systems has been investigated in the surfactant-concentration range 10-100mM. In particular, the ^{13}C chemical shift variation of carbon atoms close to the hydrophilic region has been examined, and the interaction between the OD^- anions and charges formed at the interface has been discussed for anionic micellar solution. The base-catalyzed H-D exchange reaction between the surfactant proton and D_2O deuterium has also been investigated in the temperature range 333K-353K. It has been found that the hydrolysis and the H-D exchange reaction were hindered by the phase-boundary potential. However, for the anionic micellar solution, addition of 4-methylphenol promoted the H-D exchange reaction compared with the reaction system without 4-methylphenol.

【緒言】 本研究の二本鎖型界面活性剤は、重水素交換可能な反応部位が疎水基と親水基の結合部にある点で非常に興味深い。これまで我々は、逆ミセル系での水素-重水素交換反応から界面反応と可溶化水の相互作用について明らかにしてきた¹⁾。また、塩基触媒では OD^- が反応試薬となるためにアニオン性界面活性剤の水溶性ミセル表面でのイオンバリアーによる電荷反発の存在を明らかにした²⁾。今回用いた極性の異なるミセルの物性は cmc、会合数、及びミセル半径がほぼ等しいものと確認されているので²⁾、これ等の結果を利用してミセル表面電荷の極性のみの効果を求めることができる。本研究ではこれらの二種の水溶性ミセルを用いて、界面付近でのエステル加水分解反応及び水素-重水素交換反応の反応機構を明らかにすることを目的とした。



【実験】 今回用いた Sodium dihexyl sulfosuccinate(SDHSS)と 1,4-Dihexyloxy-1,4-oxo-2-butanammonium chloride(DHBAC)は、既報に従い合成した²⁾。試料は NaOH 濃度を変化させた SDHSS 及び DHBAC 重水溶液を手製パイレックス製アンプル管に封かんし、精密恒温器 DF-42 中で 60~80℃で塩基触媒 H-D 交換反応を行ったものを開封し、5 mm NMR 管につめて調整した。また、触媒として *p*-クレゾールを用いた場合についても同様に行った。 ^{13}C -NMR 及び ^1H -NMR スペクトルは Varian UNITY 400 plus(400MHz)と GEMINI2000(300MHz)を用いて室温(25℃)で操作した。

ミセル構造、塩基触媒水素-重水素交換反応、反応速度、熱力学的パラメータ、化学シフト変化

こまだようぞう、よしのあきひろ、おかばやしひろふみ

【結果と考察】

エステル加水分解反応に及ぼすミセル化効果

塩基触媒が作用する反応部位には電荷移動による¹³C化学シフトの変化が期待される。Table 1に極性基付近での塩基効果を示す。C1,C1'とC2,C2'を比較するとC2,C2'の変化が優勢である。この事実からH-D交換反応の反応部位はC1であるので、C1の水素が引き抜かれる確率は少ないものと考えられる。C2,C2'はエステル加水分解の反応機構での電荷移動の影響を受けるので、この変化は加水分解のメカニズムに関連している。アニオン性のSDHSSにおいてはcmc前(10mM)はNaOHの添加によってC2,C2'が低磁場シフトする。そして、塩基濃度が高いほど低磁場シフト量大きい。しかしながら、cmc後の40、70、100mMにおいては塩基濃度に影響されない。一方、カチオン性のDHBACではcmc後でも低磁場シフトしている。従って、C2,C2'の化学シフトに及ぼすミセル化効果は、アニオン性のSDHSSに特有であるといえる。このメカニズムはOD⁻がC2,C2'を攻撃すると、電気陰性度の高い酸素原子が二分子結合するため、C2C2'の電子密度が減少しこれが低磁場シフトの原因となると考えられる。このように、SDHSSにおけるミセル化によるエステル加水分解反応の抑制がうまく説明できる。従って、アニオン性ミセルの界面付近の環境はOD⁻にとって近づきにくいと考えられる。

塩基触媒 H-D 交換反応速度式の決定

H1'水素のシグナルは3.1ppm付近に表れる。H1'水素がDに交換されると、H1'水素のシグナルはABXパターンからABパターンへと変化する。Fig.1にSDHSSのスペクトルを示す。ABXパターンによって8つに分裂したピークはABパターンの4つの分裂へと徐々に変化しながら両者

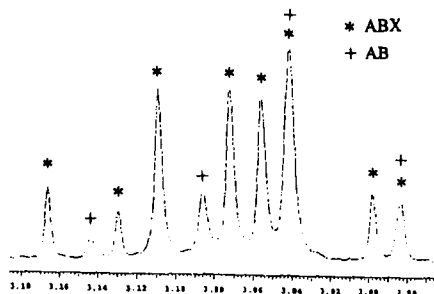


Fig.1 ¹H-NMR spectra for H1' proton of SDHSS

Table 1 OD⁻ anion effect for C-1,1',2,2' on the ¹³C chemical shifts for SDHSS micellar solution

	NaOH 0mM			5mM			10mM		
10mM	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$
C1	64.58	-0.04	-0.06	64.52	0.01	0.06	64.49	0.00	0.01
C1'	36.08	-0.08	-0.09	36.06	0.00	0.01	36.04	-0.01	0.00
C2	171.81	0.89	3.37	171.43	-0.01	-0.01	171.3	0.00	-0.04
C2'	175.25	0.00	1.82	174.55	-0.02	-0.03	174.3	0.00	-0.04
40mM	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$
C1	64.52	0.01	0.06	64.5	-0.02	0.00	64.5	-0.02	0.00
C1'	36.06	0.00	0.01	36.04	-0.02	0.02	36.04	-0.02	0.02
C2	171.43	-0.01	-0.01	171.34	-0.03	-0.03	171.34	-0.03	-0.03
C2'	174.55	-0.02	-0.03	174.37	-0.03	-0.01	174.37	-0.03	-0.01
70mM	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$
C1	64.52	0.01	0.06	64.5	-0.02	0.00	64.5	-0.02	0.00
C1'	36.06	0.00	0.01	36.04	-0.02	0.02	36.04	-0.02	0.02
C2	171.43	-0.01	-0.01	171.34	-0.03	-0.03	171.34	-0.03	-0.03
C2'	174.55	-0.02	-0.03	174.37	-0.03	-0.01	174.37	-0.03	-0.01
100mM	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$	δ	$\Delta \delta$	$\Delta \delta$
C1	64.49	0.00	0.01	64.49	0.00	0.01	64.49	0.00	0.01
C1'	36.04	-0.01	0.00	36.04	-0.01	0.00	36.04	-0.01	0.00
C2	171.3	0.00	-0.04	171.3	0.00	-0.04	171.3	0.00	-0.04
C2'	174.3	0.00	-0.04	174.3	0.00	-0.04	174.3	0.00	-0.04

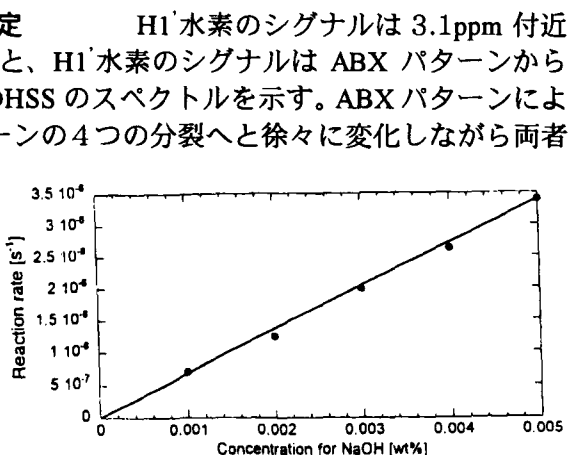


Fig.2 Linear relationship between the base concentration and the observed reaction rates for SDHSS micellar solution

が重なって現れる。この積分強度の経時変化をもとに反応速度を求めた。また、Fig.2にSDHSS 10mMにおいてNaOH濃度を変化させたときのH-D交換反応速度を示す。反応速度は触媒濃度に対して直線関係を示している。これより反応速度は触媒濃度に対して一次であることが分かった。ここで、界面活性剤濃度は触媒濃度に対して20倍の濃度であるため、事実上一定とみなすことができる。このため反応速度式は $v = k [\text{OD}^-]$ で表すことができる。H-D交換反応においては正逆両方の反応速度定数があるため $k/2$ を反応速度定数 k_D とした。

熱力学的パラメータと反応機構

H-D交換反応について熱力学的に解釈するため、温度依存性について検討した。アレニウスの式は速度定数の温度依存性を表す実験式であり、次式で表される。

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A \quad (1)$$

E_a は活性化エネルギー、 $\ln A$ は頻度因子であり、それぞれ反応障壁の高さ、反応物の衝突頻度を示す。一方、活性錯体理論よりアイリングの式が導かれる。これは、次式で表される。

$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln \frac{k_B}{h} \quad (2)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 h はプランク定数である。よって $1/T$ に対し、 $\ln k$ 、及び $\ln(k/T)$ をプロットすれば、各熱力学的パラメータが求められる。Fig.3にアイリングプロットのみを示す。全て直線関係が成り立っている。しかしながら、cmc後のSDHSS(40mM)のみがその他の直線から大きく外れている。また、求めた熱力学的パラメータをTable 2に示す。アニオン性のSDHSSでは、活性化エネルギー(E_a)及び活

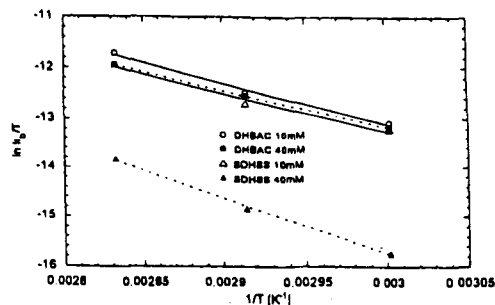


Fig.3 Eyring plots for the exchange reaction rate constant

Table 2 Thermodynamic parameters for the H-D exchange reaction rate constants

	E_a kJmol ⁻¹	log A dm ⁻³ mol ⁻¹ s ⁻¹	ΔH^\ddagger kJmol ⁻¹	ΔS^\ddagger JK ⁻¹ mol ⁻¹
SDHSS 10mM	65.2	6.99	62.3	-121
SDHSS 40mM	96.2	10.76	93.3	-48.5
DHBAC 10mM	69.2	7.68	66.3	-107
DHBAC 40mM	62.9	6.68	60.1	-127

性化エンタルピー(ΔH^\ddagger)がcmc後においてそれぞれ31kJmol⁻¹増加しているのに対し、カチオン性のDHBACではそれほど変化していない。これはSDHSSでは、ミセル形成によりH-D交換反応も抑制されていることを示す。また、エントロピー変化(ΔS^\ddagger)が全て負であることから、H-D交換反応機構は活性錯体を形成しているものと推察される¹⁾。ところで、カチオン性のDHBACではミセル化により ΔS^\ddagger が減少しているのに対し、アニオン性のSDHSSでは大きく増加している。先に示したようにアニオン性ミセルの界面付近はOD⁻が近づきにくくなっている。そのため反応後に生じるOH⁻を反応に必要なOD⁻にするためには電荷反発を受けないD₂Oがミセル界面で移動する必要がある。この過程があるため ΔS^\ddagger が大きくなると推察される。一方、

カチオン性ミセルでは電荷反発がないため OD⁻ はミセル内に取り込まれやすく、ミセル化による界面凝集効果¹⁾によって ΔS^\ddagger がより減少すると思われる。このことは ΔH^\ddagger にも反映されている。

反応試薬の構造因子の決定

ミセル界面における反応試薬の構造因子の決定のために、界面活性剤濃度に対して 1/15 モルの *p*-クレゾールを加え、70℃において H-D 交換反応を行った。フェノール類は、塩基触媒の共存下でフェノキシドイオンになり、反応試薬としては中性のジエノン中間体を形成する³⁾。このため立体効果、中性効果(反応試薬が中性ジエノン中間体である)、疎水性効果が考えられる。得られた反応速度定数を Table 3 に示す。これによると、ミセル形成によって速度定数は小さくなっている。また、クレゾールを加えた場合は NaOH のみのときより速度定数は大きくなる。この傾向

は DHBAC において約 1.4 倍であるのに対し、SDHSS においては約 3 倍になっており SDHSS の方が著しい。このため、立体効果は反応に影響せず、反応促進は中性効果と疎水性効果の相乗作用に起因すると思われる。

¹H-NMR により、反応試薬の存在領域について調べた。クレゾールは 7ppm 付近に 4 本のピークが現れる。これらの化学シフト δ_A 、 δ_B を Table 4 に示した。クレゾールは疎水的環境におかれると高磁場シフトする。 δ_A 、 δ_B はいずれも高磁場シフトしているが、メチル基に近い δ_A が約 3 倍変化している。すなわちクレゾールはメチル基をミセル中心に向けた配置をとっている。これより上記の疎水性効果が確認された。

	10mM (below cmc)	40mM (above cmc)
SDHSS	1.07×10^{-1}	3.13×10^{-3}
SDHSS (cresol)	1.17×10^{-1}	9.76×10^{-3}
DHBAC	1.32×10^{-1}	3.11×10^{-2}
DHBAC (cresol)	9.04×10^{-2}	4.26×10^{-2}

Table 4 ¹H NMR chemical shift for *p*-Cresol

	δ_A	δ_B
SDHSS 10mM	6.269	5.950
SDHSS 40mM	6.206	5.922
DHBAC 10mM	6.272	5.951
DHBAC 40mM	6.200	5.924

【結論】

エステル加水分解において、アニオン性ミセルの界面付近は OD⁻ に対しミセル表面電荷の効果が表れる。塩基触媒 H-D 交換反応は触媒濃度に対して一次反応であり、活性錯体を形成する反応機構をとる。ミセル表面電荷はアニオン性ミセルと OD⁻ の組み合わせで H-D 交換反応を 1/3 に抑制する。ミセル界面の反応では立体効果よりもミセル表面電荷に影響しない中性試薬を用いることと疎水性効果の相乗作用によって反応が促進される。この効果は主に界面付近への反応試薬の濃縮効果で説明される。このような効果は環境ホルモン等の微量物質の生体内への濃縮作用に対応している。

- 1) A. Yoshino, H. Okabayashi, T. Uchida, T. Ogasawara, T. Yoshida, *J. Phys. Chem.*, **100**, 8418 (1996)
- 2) 駒田陽三, 堀田英偉, 吉野明広, 岡林博文, 上原敏之, 第 51 回コロイド及び界面化学討論会 2P62, 251(1998)
- 3) 吉野, 中島, 高橋, 日本化学会誌, (6), 921(1989)

(横浜国大・機分セ、横浜国大・工) ○末澤裕子・廣田 穰

Multinuclear NMR Spectroscopic Studies on Ionic Interactions in Aqueous Solutions.

(Instrumental Analysis Center ; Fac. of Engn., Yokohama Natl.Univ.) ○ Hiroko Suezawa, Minoru Hirota

The NMR line width of ^{14}N nuclei in cations and ^{35}Cl , ^{81}Br nuclei of halide ions of mono- and dibasic azabenzenes and azanaphthalene were measured in aqueous solutions. In the W , defined by $W = \Delta\nu_{1/2} \cdot T / \eta$, vs. concentration plots, a characteristic plateau was observed in the concentration range from 1.5m to 3.0m. The height of the plateau could be correlated with the volume (a^3) of the cations of these bases, except for the cases of diazanaphthalenes. These findings suggest the presence of contact ion pairs in this concentration range. The factors of contact ion formation are the pKa value and the size (volume) of the cations.

<序>

1、2価のアニリニウム、ピリジニウム系のハロゲン化物の水溶液においてカチオン側を ^{14}N 、 ^{15}N 核、アニオン側をハロゲン核(^{35}Cl 、 ^{81}Br)のNMRを用いてイオン間相互作用について研究してきた。1価の塩基においては接触イオン対を形成している濃度領域では有機カチオンの大きさが対イオンの線幅を決めることを見出した。この方法を、多酸塩基(2価塩基)の塩におけるイオン間相互作用にも応用し検討した。また、2種類の塩基共存下でのイオン対形成における競争反応を行い、塩基のpKaとカチオン分子の大きさの影響について詳しく検討した。

四極子核($I > 1/2$)のNMRスペクトルの線幅は次のように表される。

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{\pi}{10k} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right)^2 \left(1 + \frac{e^2}{3} \right) a^3 \frac{T}{\eta} \quad W = \Delta\nu_{1/2} \frac{T}{\eta}$$

この値を粘度(η)と温度(T)で補正した値を補正線幅(W)と定義した。 W 値から測定核を含むイオン近傍の体積(a^3)と測定核上の電場勾配($e q Q$)の情報が得られる。一連の研究では主にこのハロゲン核の W 値を用いて水溶液中におけるイオン間相互作用を検討した。また、競争反応の検討には ^{15}N 核の化学シフトも用いた。

<実験>

試料溶液の調製：濃度0.5 - 4.0 m (mol/kg) (H_2O 、20% D_2O 添加)

測定温度：30 - 80 °C

測定機器：JEOL-FX90Q NMR、粘度測定：ウペローデ粘度計

<結果と考察>

1価、2価の含窒素芳香族系陽イオンのハロゲン化物の水溶液中におけるイオン間相互作用について主にハロゲン核の線幅を用いて研究してきた。測定した核の補正線幅(W)を濃度に対してプロットすると、ほとんどの塩で濃度が1.5 - 3.0 mの

多核NMR、イオン間相互作用、補正線幅、接触イオン対、pKa

すえざわ ひろこ、ひろた みのる

濃度範囲でW値が一定となり、ここでは一定組成の会合体である接触イオン対が生成していると考えられる(図1.a、b)。この領域では陽イオンの体積と電場勾配の情報に対イオンであるハロゲンイオンに伝わると考えられる。従ってハロゲン核の補正線幅を決める因子としてはイオンの体積(V)と核上の電場勾配とがあるが、イオンの体積が主因であると考えられる。実際ハロゲン核のW値と陽イオンの体積とは良い相関があった(表1)。置換ピリジニウム臭化水素酸塩の例を示す(図2)。ピリジニウム系より大きい分子であるキノリン、キノキサリン、ピピリジル、フェナントレンでもその体積と対イオンのW値とは良い相関がみられた。しかし、ジアザナフタレン系はプロットからはずれる結果となった(図3)。

ジアザナフタレン系(キノキサリン、フタラジン、ナフチリジン)では分子の大きさが同じと考えられるキノリン、イソキノリンよりW値は小さい。これらは弱い塩基でありイオン対形成が完全に行われないと考えられる。水和しているアニオン上の電場勾配はイオン対を生成しているアニオンに比べてちいさくなり、そのW値は平均的に小さくなっていると推測される。ここで、これらの塩基のpKaとアニオン側のW値とはある程度相関があった(表2)。

ジアジン(ピラジン、ピリミジン、ピリダジン)はいずれも弱い塩基であり、ジアザナフタレンに関する理論的考察からするとイオン対を形成している確立は少なく、アニオン側のW値も小さくなるはずである。しかし、三種の塩基ともピリジンとほぼ等しいW値となり接触イオン対は形成されていると考えられる。これはカチオン分子の大きさに関係があると思われる。pKaが同じように小さいピラジンとキノキサリンを比べた場合、キノキサリンは分子がかなり大きくイオン間距離が長くなりイオン間相互作用が弱くなりイオン対の形成が困難になると考えられる。これに対してジアジンは分子が小さいためイオン対の形成が容易になり、水溶液中では接触イオン対や多イオン会合体として存在していると考えられる。分子を少し大きくしたメチルジアジンはW/Vプロットからは少し外れるものの分子が大きくなった分W値も大きくなっており、この程度の大きさの分子でもイオン対の形成は十分可能と思われる。アミノピリジンでは比較的大きなpKa値であり水溶液中では完全にイオン対を形成していると考えられる。

多種類の塩基を含む系でのイオン間相互作用および選択的イオン対の生成について検討した。多価塩基とハロゲン化物イオンとの競争反応の結果、イオン対の生成のしやすさの順序はトリアジン>ピリジン>>キノキン>ピピリジル、フェナントレン>ジアジン、ジアザナフタレンとなった。イオン対の形成はイオンの電荷が大きいほど、イオンの体積が小さいほど容易になることがわかっている。イオンの電荷とは塩基の塩基性(pKa)と相関があり、カチオンになり易さと関係している。2種類の塩基の共存溶液では、塩基過剰の場合、ピリリジン、アニリン、キノリンなどの塩基性の強い塩基同士ではアニオンは一方のカチオンとのみ選択的にイオン対を形成するのではなく、両塩基がアニオンに配位した状態である。塩基性に差がある場合にはアニオンはより強い方の塩基と選択的にイオン対を形成する。また、弱い塩基同士では塩基の分子大きさが関与する。いずれの場合の共存状態でもアニオンとカチオンが等モルの水溶液中ではアニオンはそれぞれのカチオンと個別に接触イオン対を形成していることが¹⁵N化学シフトを用いた方法で明らかになった。

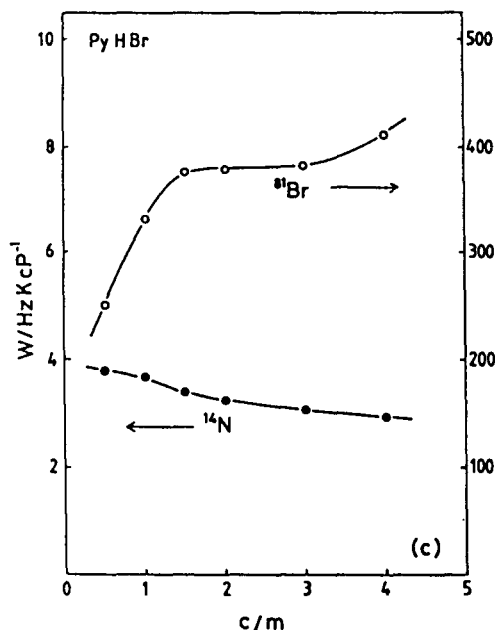


Fig 1.(a) Concentration dependence of the ^{14}N and ^{81}Br NMR line widths (W) of pyridinium bromides.

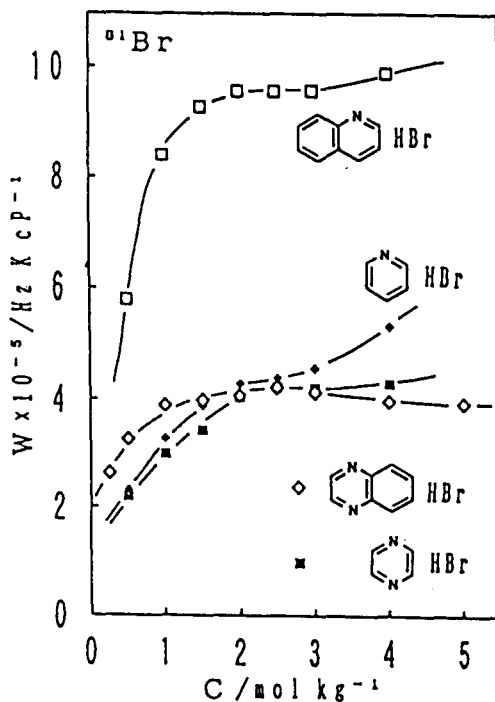


Fig 1.(b) Concentration dependence of the ^{81}Br NMR line width (W) of halide of pyridine, pyrazine, quinoline, and quinoxaline.

TABLE 1: The Calibrated Line Widths (W Values) at the Plateau Region of Pyridinium Halides

nitrogen cation (^{14}N)	V_{calc} , \AA^3	$W(^{14}\text{N})$, Hz K cP $^{-1}$	anion	$W(\text{Hal})$, Hz K cP $^{-1}$	$W(^{17}\text{O})$, Hz K cP $^{-1}$
(a) Pyridinium Chlorides					
H	20.4	2.93	^{35}Cl	7.47	12.4
2-Me	30.0	7.73		13.1	14.3
3-Me	30.0	4.41		8.77	10.7
4-Me	30.0	4.01		9.23	13.6
2-Et	34.8	8.45		14.8	12.5
4-Et	34.8	5.78		10.6	12.4
2-Pr	42.8	10.9		17.0	13.5
4-Pr	42.8	8.15		15.7	14.1
4-Bu 1	53.6	9.21		17.5	-
2-Ph	-	27.6		24.2	-
4-Ph	-	23.0		19.4	11.1
(c) Pyridinium Bromides					
H	20.4	3.22	^{81}Br	378	15.4
2-Me	30.0	8.15		551	-
4-Me	30.0	4.70		573	18.4
4-Et	34.8	5.79		676	-
4-Pr	42.8	8.31		837	18.5
4-Bu 1	53.6	10.1		1117	13.5
(e) Pyridinium Iodides					
H	20.4	3.15	^{127}I	1683	16.1
2-Me	30.0	7.31		2115	13.4
4-Me	30.0	4.53		2488	16.0
2,6-Me $_2$	-	12.3		2790	14.8
2-Pr	42.8	10.9		3830	11.3

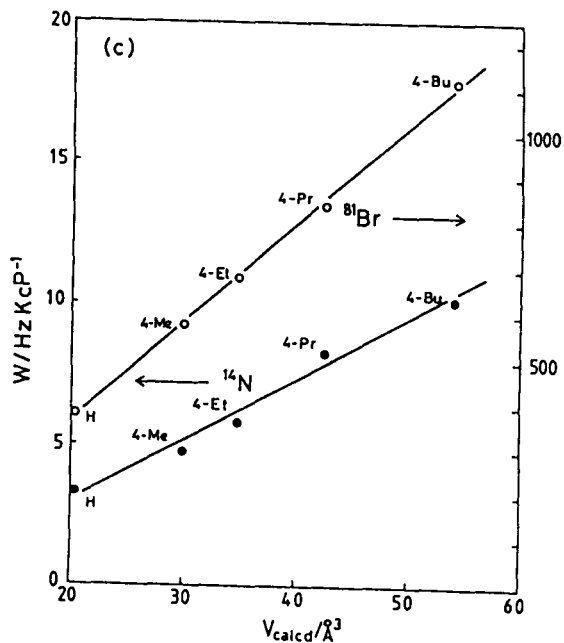


Fig 2. The W vs. V_{calc} plots for the series of 4-alkylpyridinium.

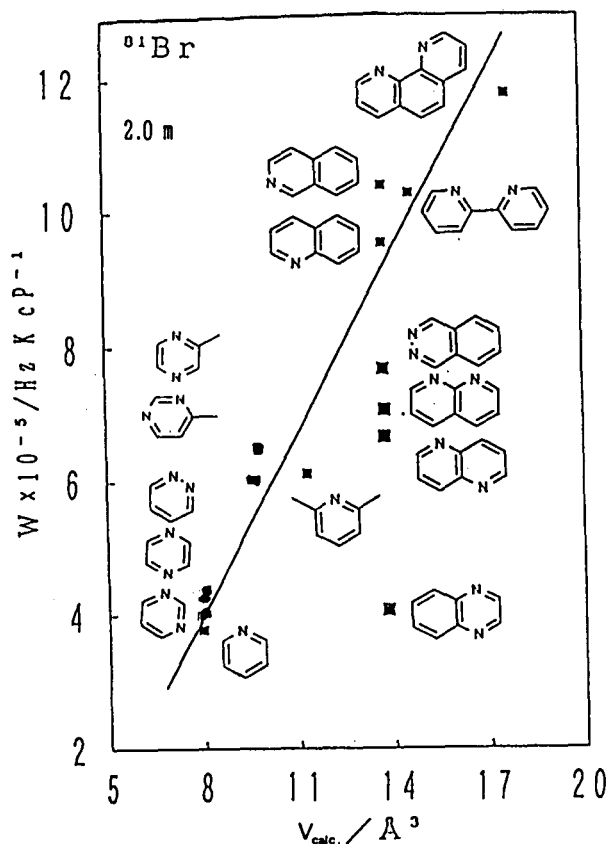


Fig 3. The W vs. V_{calc} plots for the series of mono- and dibasic azabenzenes and diazaphthalenes.

TABLE 2.
 $W(^{81}\text{Br})$ and P_{Ka} values of bromide of diazabenzene and diazaphthalenes in aqueous solution

Zm	$W(^{81}\text{Br})$	P_{Ka}
pyridine	448.5	5.23
pyrazine	430.7	0.6
pyridazine	439.3	2.33
pyrimidine	401.4	1.30
2-Methylpyrazine	639.0	1.5
3-Methylpyridazine	747.6	—
4-Methylpyrimidine	589.9	2.0
Quinoxaline	406.7	0.72
1.5-Naphthyridine	674.8	2.91
1.8-Naphthyridine	707.1	3.39
phthalazine	739.5	3.47
Quinoline	956.4	4.94
Isoquinoline	1044	5.14

$W \times 10^{-3} / \text{HzKcP}^{-1}$

TABLE 3(a) p_{Ka} , V , $W(^{35}\text{Cl})$, and $\delta(^{15}\text{N})$ of chlorides of bases in aqueous solution

Base	p_{Ka}	V/A^3	$W(^{35}\text{Cl})$	$\delta(^{15}\text{N})/\text{ppm}$	$\Delta \delta^*(^{15}\text{N})/\text{ppm}$
Aniline(A)	4.7	95.38	9.98	52.7	-7.0
Pyridine(P)	5.2	79.23	11.06	205.0	-112.3
Pyrazine(R)	0.7	74.47	9.99	298.5	-68.2
Pyridazine(D)	2.3	74.69	10.00	303.6	-76.8
Quinoline(Q)	4.9	123.38	21.62	195.4	-120.8

$$\Delta \delta^* = \delta(\text{ion pair}) - \delta(\text{base/aq.})$$

TABLE 3(b) $\Delta \delta(^{15}\text{N})$ and $W(^{35}\text{Cl})$ of chlorides of mixed 2 different bases in aqueous solution

Ratio of mixture	base 1 : base 2 : HCl/aq. [mol/Kg]					
	1.5 : 1.5 : 1.5		1.5 : 1.5 : 2.3		1.5 : 1.5 : 3.0	
Base	$\Delta \delta(^{15}\text{N})/\text{ppm}$	$W(^{35}\text{Cl})$	$\Delta \delta(^{15}\text{N})/\text{ppm}$	$W(^{35}\text{Cl})$	$\Delta \delta(^{15}\text{N})/\text{ppm}$	$W(^{35}\text{Cl})$
P/A	-75.1/23.5	27.74	-101.7/+1.2	19.78	-112.4/-7.2	16.43
P/R	-112.2/----	19.73	-112.2/-59.0	18.89	-112.4/-68.3	14.38
D/R	-69.4/----	21.58	-71.7/-63.1	-19.87	-78.2/-69.5	16.13
P/Q	61.7/-84.1	25.76	-96.1/-104.9	24.72	-112.4/-121.1	23.92

$W(^{35}\text{Cl})/\text{kHz} \cdot \text{K} \cdot \text{cP}^{-1}$

Cycling side bands and other problems on ^{13}C -NMR of polypropyrene
Teruo Mori
Analytical Sciences Laboratory, Yokohama Research Center,
Mitsubishi Chemical Co.

In the recent high field NMR instruments over 500MHz, composite pulses are used to decouple protons. These decoupling sequences can decouple wider frequency range, but some cycling side bands became serious problem to observe ^{13}C -NMR of synthetic polymers with small signals adjacent to main signals. We report these problems in the ^{13}C -NMR of polypropyrene.

【序論】 ポリプロピレン (PP) を始めとするポリオレフィンの分子構造解析には ^{13}C -NMRが有力な手段である。剛性の高いポリプロピレンの解析では、微量の立体欠陥や異種構造や末端の解析を行うために高感度測定が必要であり高磁場装置が必要とされる。だがその測定には、実験上のいくつかの困難がある。すなわちプロトンデカップリングに伴うサイクリング・サイドバンド (CSB)、 ^{13}C -サテライト、スピニングサイドバンド (SSB) というあらゆる高分子の微量構造解析に共通の問題がある。また高分子量ポリオレフィンでは100℃以上の溶液でも粘度が高く分解能が低下し勝ちだが、いかに均一で低粘度の溶液を作るかという問題がある。最後にシム調整の問題がある。

【実験】 NMR測定はバリアン社製Inova500を使った。デカップリング系列はメーカー作成のWALTZ16とGARP、MLEV16、および自作のWaughを使った。各デカップリング系列の実験的比較は、バリアン社作成のASTM(dioxane/benzene-d6=40/60)を使用した。ポリオレフィンのNMR測定用試料は次のように調製した。NMR用10mm径試料管中にポリマー100~200mgを取り、高沸点非極性のオルトジクロロベンゼンとロック用の重ベンゼン0.2~0.3mLを混合し、溶液高を50mm(全容積約3.0mL)とした。窒素雰囲気下130℃で攪拌溶解し均一化した後0℃に急冷し、バーナーで封管した。

【サイクリング・サイドバンド】 ^{13}C -NMR測定ではH核とのスピン結合による信号の分裂をうち消してスペクトルを簡単にするために、H核を照射して完全デカップリングを行う。近年の装置の高磁場化に伴い、より広範囲の周波数をより低出力でデカップルするために、照射周波数を疑ランダムに変調するノイズデカップリングに替わって各種コンポジットパルスによる照射が主流となっている¹⁻⁸⁾。例えば、Waugh^{3), 4)}、WALTZ^{5), 6)}、GARP⁷⁾、MPF5⁸⁾などである。

これらのコンポジットパルスによる照射で生じるCSBは^{9), 10)}、高分子の微量構造解析のように巨大信号と共存する微小信号を観測する場合は妨害となりうるので、GARP、WALTZ16、MLEV16、Waughによるデカップルスペクトルを実験的に比較した(図1、2、3)。GARPは同一出力で最も広範囲をデカップルできるがCSBは最も大きい。MLEV16は照射範囲が狭い点でもCSBが大きい点でもWALTZ16に劣る。Waughは全くと言えるほどにCSBがないが、照射中心がずれたときの強度変化が大きく、水素核周波数範囲が広い時は信号間の定量性が悪い恐れがある。強度変化しても積分値は変化しないはずだが、キニンで測定すると照射中心による変化が観測された(図4)。線幅の広がり度で積分範囲が不適切となることやS/N低下が原因と推定される。結論として高分子の微量構造解析のための ^{13}C -NMR測定ではWALTZ16の使用が良いが、それでも中心信号の0.1%程度のCSBは観測されるので観測したい信号との重なりを避ける必要がある。

ポリプロピレン、 ^{13}C -NMR、サイクリング・サイドバンド、高分子微量構造

もり てるお

C S B 中心信号からのシフト周波数はコンポジットパルスシーケンス中の周期で決まるが、これは周期の最小単位である照射 90 度パルス幅とシーケンス中のその組み合わせにより決まる。正確にはシミュレーションで計算できるが^{8), 10)}、実験的には照射 90 度パルス幅の n 倍 (n はある倍数) の逆数がシフト周波数となることが多い。WALTZ16 では、 $n = 16, 19.5, 32, 48$ などとなり、照射 90 度パルス幅の設定により観測したい信号との重なりを避けることができる。図 5 にポリプロピレンの ^{13}C -NMR スペクトルを示すが、C S B はかなり広範囲に観測されるのでその帰属は解析上重要である。ポリオレフィンの NMR 測定は、パルス幅の長くなりがちな太いプローブを用いた 100 °C 以上での測定なので、5 mm 径プローブを用いた室温測定よりも C S B が出やすい。またデカップラーオフセットの効果も大きい。

【 ^{13}C -サテライトとスピニングサイドバンド】前者は J_{CH} の値から後者はスピニング速度から帰属する。スピニングしなければ S S B は抑制できるが、ポリオレフィンでは不均一化しやすい高粘度溶液の 100 °C 以上での測定なのでスピニングによる均一化が必要である。

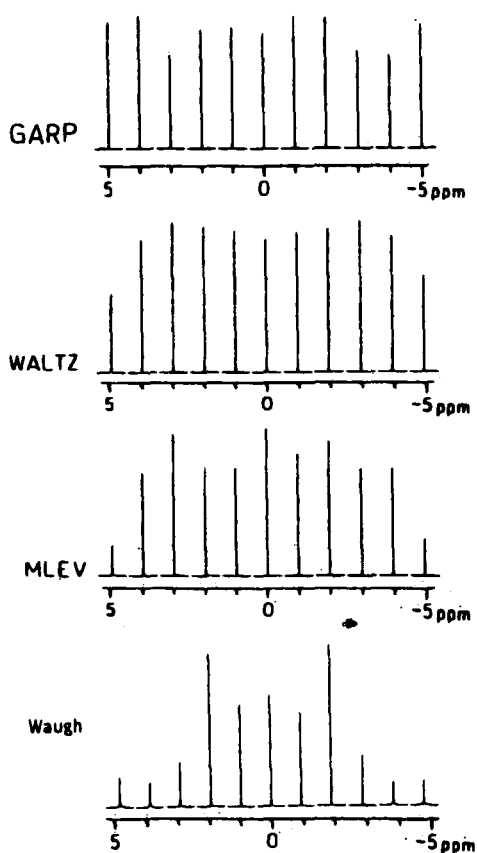


Fig. 1. Experimental decoupling range of composite pulses.
 Sample: 1,3-dioxane/benzene- d_6 (4/6), Made by Varian
 Probe: 5mbb Temp: 25 °C Spectral range: 500 Hz
 Pulse width: 7 μs (45 deg.) scans: 48 dpwr: 45
 Acquisition time: 2.048 s delay: 1.000 s dmf: 9182 Hz
 X-axis: decoupler offset from H-signal of the sample.

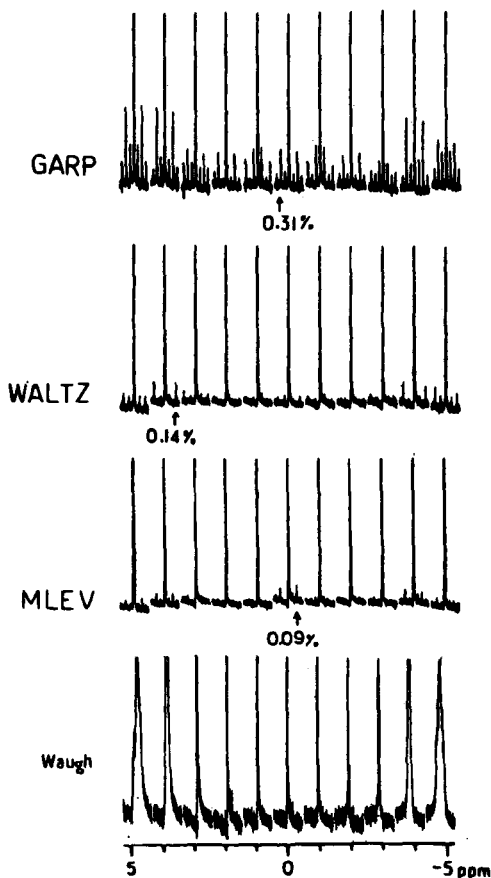
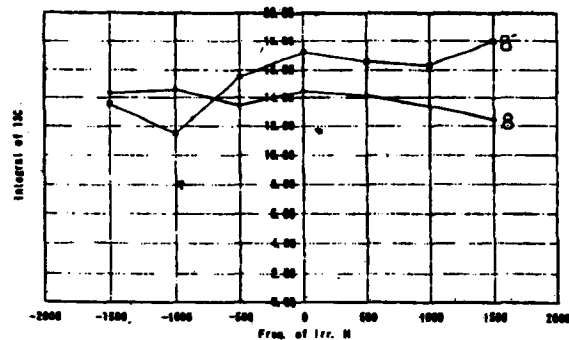
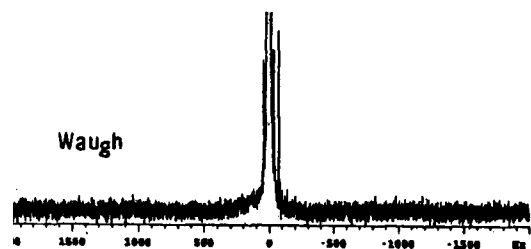
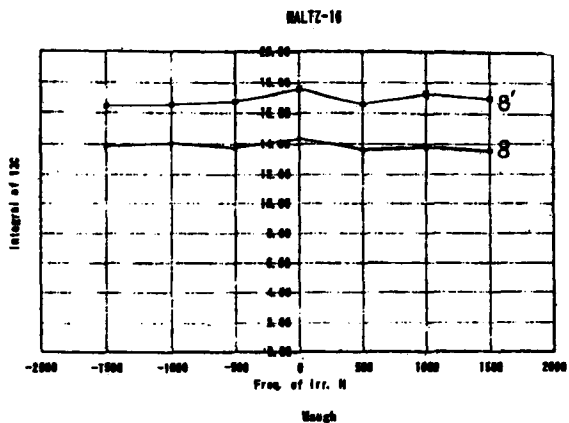
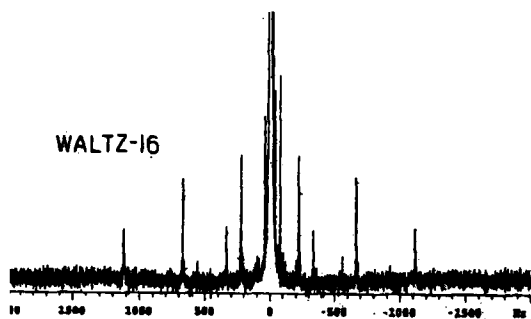


Fig. 2. Experimental cycling side bands of composite pulses.
 Same spectra as Fig. 1. The Y-axis are expanded 100 times.



3. Experimental cycling side bands of WALTZ-16 and Waugh
 No condition as Fig. 1 except following parameters.
 Spectral range: 4000 Hz scans: 4000 dpwr: 46 dmf: 10722 Hz

Fig. 4. The integral of signals of ^{13}C -NMR of quinone as the function of decoupler offset
 Signal 8 : ^{13}C 27.40ppm 1H-offset -1606Hz
 Signal 8' : ^{13}C 131.17ppm 1H-offset +1400Hz
 Probe: 5mbb Temp: 25 °C Spectral range: 20110.6 Hz
 Pulse width: 16.8 μs (90 deg.) scans: 512 dpwr: 46 dmf: 10426 Hz
 Acquisition time: 1.200 s delay: 6.800 s

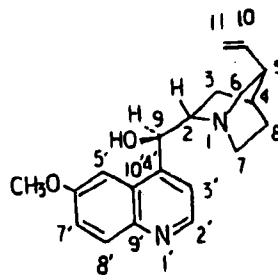
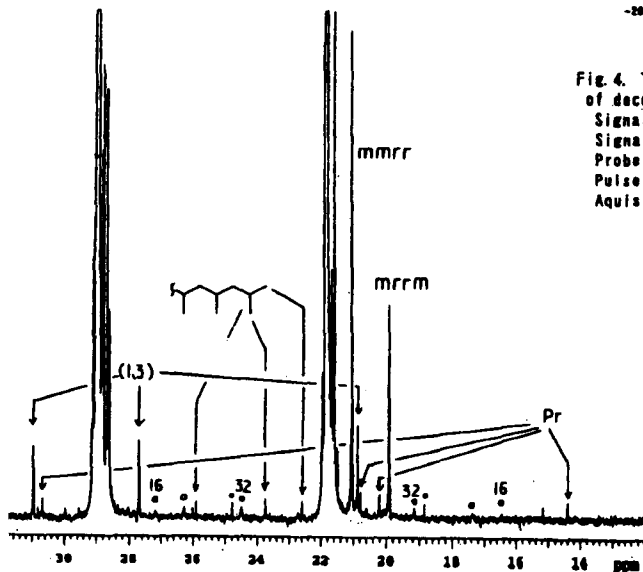


Fig. 6. ^{13}C -NMR spectrum of polypropylene
 Sample: Synthesized by dimethylsilane-bis(3-methyl-1-phenyl-4-indenyl)
 titanium chloride catalysis. Solvent: o-dichlorobenzene/benzene-d6 (20/2)
 Probe: 10mbb Temp: 130°C decoupling frequency: 10744 Hz (1/93.1 μs)
 Pulse width: 8.8 μs (45 deg.) scans: 14464 dpwr: 52 dmf: 10744 Hz
 Acquisition time: 2.000 s delay: 3.000 s Spectral range: 20110.6 Hz

Fig. 5. Structure of quinone

【測定試料調製】 高分子量のポリマーは溶液粘度を低くするために試料濃度を低くしてはならない。メルトインデックス (MI) < 10 のPPでは約100~150mg、MI < 1 のPPでは100mg以下の試料量でないと線幅が広がる。MI = 0.02のPPで8Hzの線幅であり解析に耐えられた。溶液からできるだけ酸素を除き封管すれば、測定中の酸化や溶媒組成変化が避けられる。重ベンゼンの沸点は80℃だが10%以下ならば130℃でも沸騰はせず、封管すれば蒸発もしない。高温で溶解後に放冷するとポリマーが析出する時点で粘性が低いいため比重差で分離し不均一となる。急冷により全体がゲル化し均一となる。

【シム調整、チューニング】 プローブ温度を130℃にした直後はチューニングが経時変化するので、1~2時間放置してからチューニングするのが良い。シム調整はZ方向の7軸自動シムで約10分で良好になるが、積算開始直前に行うのが良い。

【結論】 CSB、試料調製、シム調整、チューニングなどに適切な注意を払うことにより、500MHz装置によるポリプロピレンの良質な¹³C-NMRスペクトルを得ることができる。特にCSBについては、磁場が高くなるほど広範囲のデカップルが必要となるために注意を払う必要がある。

文献

- 1) Freeman, R. (訳:坂口潮;嶋田一夫)「NMRハンドブック」共立出版(1992)
"A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance" Longman Gr. UK ltd. (1988)
- 2) Waugh, J. S. J. Magn. Reson. 50(1982) 30-49
- 3) 日本電子「ユ-ザ-ズ'ミ-ティング'資料 NM08-NMR分光計の構成と機能の概要-」(1983)
- 4) Waugh, J. S. J. Magn. Reson. 49(1982) 517-521
- 5) Shaka, A. J.; Keeler, J.; Frenkiel, T.; Freeman, R. J. Magn. Reson. 52(1983) 335-338
- 6) Shaka, A. J.; Keeler, J.; Freeman, R. J. Magn. Reson. 53(1983) 313-340
- 7) Shaka, A. J.; Barker, P. B.; Freeman, R. J. Magn. Reson. 64(1985) 547
- 8) Fujiwara, T.; Nagayama, K. J. Magn. Reson. 77(1988) 53-63
- 9) Shaka, A. J.; Barker, P. B.; Bauer, C. J.; Freeman, R. J. Magn. Reson. 67(1986) 396-401
- 10) Fujiwara, T.; Nagayama, K. J. Magn. Reson. 81(1989) 245-54

(日本電子) ○津野久幸、樋岡克哉

(東京大学大学院薬学系研究科) 小林修

‘SR-MAS Method’ as a New Technology for the Structure Determination in Combinatorial Chemistry

JEOL Ltd. ○Hisayuki Tsuno, Katsuya Hioka

The University of Tokyo Shu Kobayashi

It was shown that the SR-MAS(Swollen-Resin Magic Angle Spinning) method enabled us to determine the structure of solid-phase organic products without cleavage from solid supports. Consequently, characterization of resins containing products was successfully carried out in very short time compared with the conventional methods such as IR or MS. Usefulness of the ^{13}C SR-MAS spectrum has been demonstrated throughout the useful carbon-carbon bond-forming reactions on the solid-phase.

1. はじめに

固相反応の開発において、Swollen-Resin Magic Angle Spinning (SR-MAS)法が、生成物を含む樹脂の直接的な構造決定に極めて有用であることがわかった。固相有機合成においては、生成物の構造決定はしばしば困難であり、液相有機合成で用いられる通常の NMR 法は多くの場合適用することはできない。その結果、構造決定は、IR,MS などの NMR 以外の分光学的手法を用いるか、あるいは固相から切り出した後、液相有機合成の通常の分析法 (NMR,IR,MS など) をもって行われているが、これには非常な手間と時間を必要としている。我々は、固相から切り出さずに溶媒で膨潤させて MAS-NMR 法で特殊サンプル管を用い ^{13}C -NMR 測定をすることにより、短時間で構造決定が可能であることを明らかにした。

2. 実験

実験は日本電子製 JNM-LA400 分光計に SR-MAS プローブを装着して行った。サンプル管には外径 6 Φ 、容量 166 μl のものを用いた。高速で回転させてもサンプルが漏れないようにサンプルキャップにはダイフロン製の密着タイプのものを用いている。サンプリング手順はサンプルを 10mg 程度直接サンプル管に入れて、溶媒を注入し膨潤することを確認後、キャップを締めるというごく簡単な手法で行っている。

3. 結果

Fig.1(a),(b),(c)に一連の固相合成の過程の樹脂の ^{13}C -NMR スペクトルを示す。測定シーケンスにはパルスサチュレーションシングルパルスを用い、MAS 回転速度は 4kHz である。膨潤溶媒として(a),(c)のサンプルには CDCl_3 、(b)のサンプルには Py-d_5 と CDCl_3 の混合溶媒を用いた。膨潤溶媒に関して特筆すべきこととして、例えば(b)のサンプルでは、 CDCl_3 、DMSO、dioxane を使

キーワード SR-MAS 法、固相合成、コンビナトリアル・ケミストリー

つのひさゆき、ひおかかつや、こばやししゅう

用した場合は ^{13}C -NMR の信号が出にくかったという経緯があり、サンプルと溶媒の間に相性があることがわかっている。(b)では 167.5ppm にカルボキシル基の ^{13}C -NMR のピークが明瞭に観測されており、(a)のサンプルから合成が原料の残存や副生物を伴うことなく行われたことが明らかである。さらに(c)には 51.7ppm にメチルエステル基の ^{13}C -NMR のピークが明瞭に観測されており、(b)のサンプルから合成が正確に行われたことが明らかである。

(a)



(b)



(c)

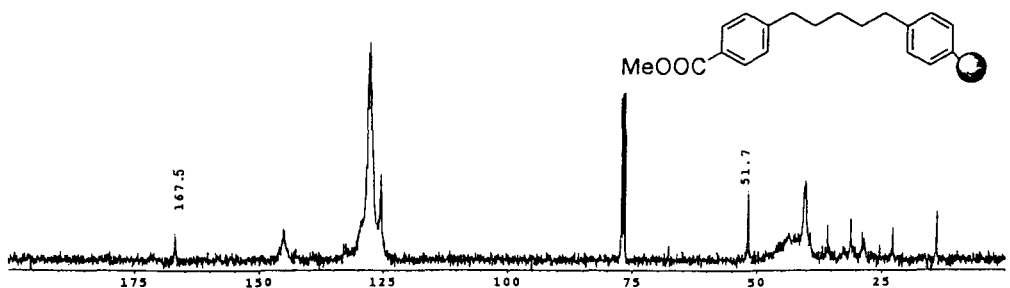


Fig.1 ^{13}C SR-MAS NMR Spectra

4. 考察

一般に合成のスキームを最終的に確立するまでには、それぞれのステップでの反応条件の最適化が必要とされる。SR-MAS法を用いれば、通常の液相反応と同様に一つ一つの反応を直接NMRを用いて解析することができる。従って各ステップの最適化に要する時間が大幅に短縮されるわけであり、最終的なスキームの確立に要する手間と時間も大幅に短縮されることがわかる。ただし、結果でも触れたように、サンプルと溶媒の間には信号の出やすさに関して相性があることがわかっているが、これが何に起因するのかは特定できていない。今後はさらに実験を重ねてこの点を明らかにしていく必要がある。

参考文献

S. Kobayashi, et al. *Molecules Online*, 1998, 2, 35-39.

P46

[1-¹³C]Val標識バクテリオロドプシン：固体高分解能
¹³C NMRによる水素結合ネットワークの探索

(姫路工大・理、ウェイン州立大¹、カリフォルニア大²) ○谷生道一、
井上さゆり、辻 暁、横田恭宣、Richard Needleman¹、Janos K.
Lanyi²、内藤 晶、斉藤 肇

[1-¹³C]Val-labeled bacteriorhodopsin :
A study of hydrogen-bonded network by ¹³C solid-state NMR

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

¹*Department of Biochemistry, Wayne State University*

²*Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine*

○Michikazu Tanio, Sayuri Inoue, Satoru Tuzi, Kiyonobu Yokota, Richard Needleman¹,
Janos K. Lanyi², Akira Naito, Hazime Saito

We have recorded ¹³C NMR spectra of [1-¹³C]Val-labeled bacteriorhodopsin and its mutants by solid-state NMR methods. The ¹³C signal of Val49 was shifted downfield by Thr46→Val substitution, suggesting that Thr46 hydroxyl group is hydrogen bonded with Val49. In Asp96→Asn mutant, however, such a displacement of Val49 peak did not occur, although its dynamic feature was changed. Interestingly, the replacement of Asp85 with Asn induced substantial conformational changes in protein backbone including Val49 and Val199. These results suggest that there is a chain of interacting residues between Asp96 and extracellular surface in bR.

【序論】

高度好塩菌、*Halobacterium Salinarium*の紫膜に存在するバクテリオロドプシン (bR) は光駆動プロトンポンプとして働く膜蛋白質で、248残基のアミノ酸とLys216にシッフ塩基結合したレチナルから構成される。bRは光を照射されるとレチナルが異性化を起こし、シッフ塩基のプロトンがbR細胞外側に位置するプロトンaccepterのAsp85に移動し、このAsp85の電荷の消失が細胞外側膜表面部位のGlu204またはその近傍の水分子からプロトンが放出されると考えられておる。その後、シッフ塩基はプロトンdonorのAsp96からプロトンを受け取るが、シッフ塩基とAsp96の空間的な距離は離れているため[1]、何らかの手段でAsp85のプロトン化の情報をAsp96まで伝えられなくてはならない。Maedaらは、Asp85-Val49-Thr46-Asp96間に水分子を介した水素結合ネットワークが存在することを示唆している[2]。そこで我々は、[1-¹³C]Val標識bRにおいてこの領域に存在するVal49、お

固体高分解能NMR、膜蛋白質、プロトンポンプ、バクテリオロドプシン、コンフォメーション

たにお みちかず、いのうえ さゆり、つじ さとる、よこた きよのぶ、Richard Needleman、
Janos K. Lanyi、ないとう あきら、さいとう はじめ

よび細胞外側膜表面部位に位置するVal199の主鎖カルボニルの帰属を行い、特にVal49の信号が、Thr46、Asp85および96の側鎖の変化によってどのように影響されるかを固体高分解能NMRを用いて解析した。

【実験】

[1-¹³C]Val標識野生株 (WT) および変異株bRは、非標識Valを[1-¹³C]Valに置換した合成培地で各高度好塩菌を培養することで得た。精製した標識bRを含む紫膜は、5 mM HEPES、10 mM NaCl、0.025 % (w/v) NaN₃、pH 7の緩衝液に懸濁し、NMR測定試料とした。

100.6 MHz ¹³C NMR測定は、交差分極マジック各回転法 (CP-MAS/TOSS) を用いた。測定条件は、MAS回転数；2600-4000 Hz、接触時間；1 ms、取り込み時間；25 msまたは50 ms、繰り返し時間；4 s、¹Hおよび¹³Cのπ/2パルス；5-6 μs、積算回数；3000-10000回、測定温度は20 °Cで遮光状態で行った。

【結果と考察】

Fig. 1 に、[1-¹³C]Val標識WT、Val49→Ala (V49A) およびVal199→Ala (V199A) 変異株bRのCP-MASスペクトルを示す。Fig. 1 からWTと各変異株bRでは、得られた化学シフト値に大きな変化はなく、Val49および199のAlaへの置換はbR主鎖構造を大きく変えないことがわかる。各変異株をWTと比較することで、Val49は172.1 ppm、Val199は171.1 ppmであることがわかる。これらの残基は、C-端側にProがあるため置換基効果により、最大2.5 ppmの高磁場シフトが予想される。それらを考慮すると、コンフォメーション依存化学シフトより、Val49はα-ヘリックスにVal199はループに帰属され、X線[1] および電子顕微鏡[3]によるbR構造モデ

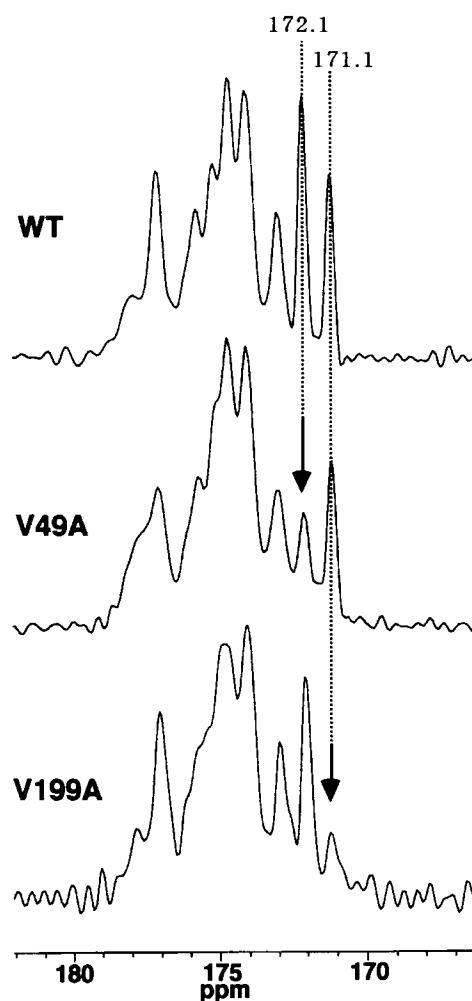


Fig.1 ¹³C CP-MAS/TOSS NMR spectra of [1-¹³C]Val labeled WT, V49A and V199A.

ルとも一致する。

Fig. 2に[1-¹³C]Val標識WT、Thr46→Val (T46V) 変異株およびAsp96→Asn (D96N) 変異株のCP-MASスペクトルを示す。これらの変異株においても得られた信号の化学シフト値には著しい変化はなく、Thr46とAsp85の側鎖の変化はbR二次構造に著しい変化を起こないことがわかった。しかしVal49の信号がT46Vではやや低磁場側にシフトしているのに対し、D96Nではそのような変化は見られない。これはThr46の方がAsp96よりもVal49の主鎖構造への寄与が大きいこと、またThr46の側鎖OH基とVal49との間に水素結合を介した相互作用があることを示している。

Asp96とThr46は、FT-IR[2]およびX線構造解析[1]から、側鎖間で相互作用があることが示唆されている。したがってAsp96の側鎖の変化はThr46を介してVal49に影響することが予想され、高次構造に影響しないのであれば、その運動性を変えている可能性がある。そこでWTと各変異株bRの交差緩和時間 (T_{CH}) を測定した (Table 1)。その結果WTではVal49の T_{CH} の値は他の信号のそれとほとんど変わらなかったのに対し、D96NではVal49の T_{CH} が大きいことがわかった。これはAsp96の側鎖の変化がVal49の主鎖構造を変えないが、その揺らぎを大きくすることを示している。このようにD96NにおいてVal49の化学シフト値が変化しない

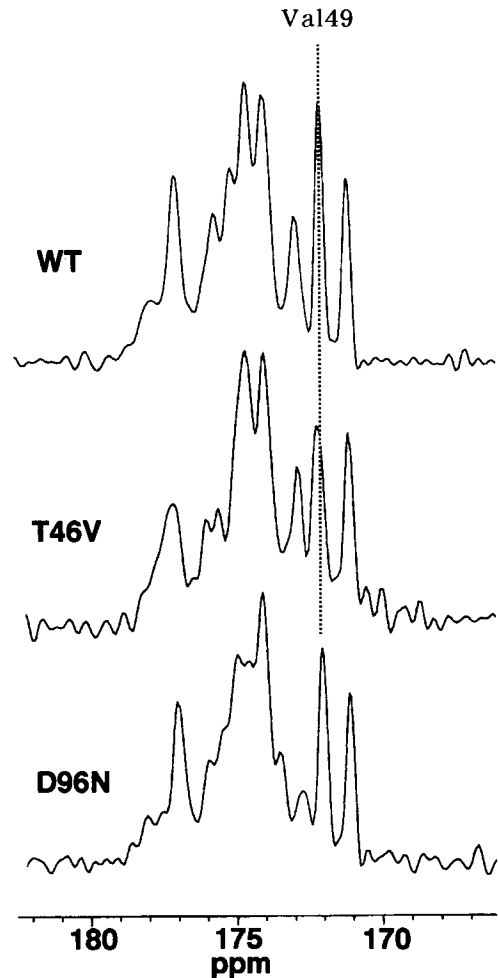


Fig.2 ¹³C CP-MAS/TOSS NMR spectra of [1-¹³C]Val labeled WT, T46V and D96N.

Table 1. T_{CH} of [1-¹³C]Val labeled WT, T46V and D96N (ms).

	171.1	172.1	173.0	174.0	174.6
WT	0.42	0.49	0.38	0.33	0.34
T46V	0.34	0.28	0.29	0.30	0.34
D96N	0.29	<u>0.84</u>	0.30	0.41	0.35

のはAsnの側鎖も水素結合が可能であるためと考えられる。

Fig. 3に[1-¹³C]Val標識WT、Asp85→Asn変異株 (D85N) およびGlu204→Gln変異株 (E204Q) のCP-MASスペクトルを示す。D96Nと異なり、D85Nではスペクトル線形に大きな違いがある。これはAsp96が中性においてプロトン化しているのに対し、Asp85はイオン化しているためと考えられ、Asp85の電荷の消失はbRの主鎖構造を大きく変えることを示している。興味深いことに、D85NではVal49の構造変化のみならず、細胞外側膜表面部位のVal199の化学シフト値も変化している。このVal199の変化はE204Qにおいても観測され、D85NにおけるVal199主鎖構造の変化はAsp85とGlu204間の相互作用の変化によるものであることが示唆される。またE204QでもVal49の信号が高磁場シフトしていることから、Glu204の側鎖の変化もVal49の主鎖構造を変化させることを示唆した。

これらの結果は、Glu204-Asp85-Val49-Thr46-Asp96間で、水素結合および電荷依存の相互作用が存在していることを示しており、光サイクルにおいてAsp85のプロトン化がこの相互作用を介してGlu204の側鎖環境の変化（細胞外へのプロトン放出）およびAsp96の側鎖環境の変化（Asp96の脱プロトン化の促進）を誘起すると考えられる。

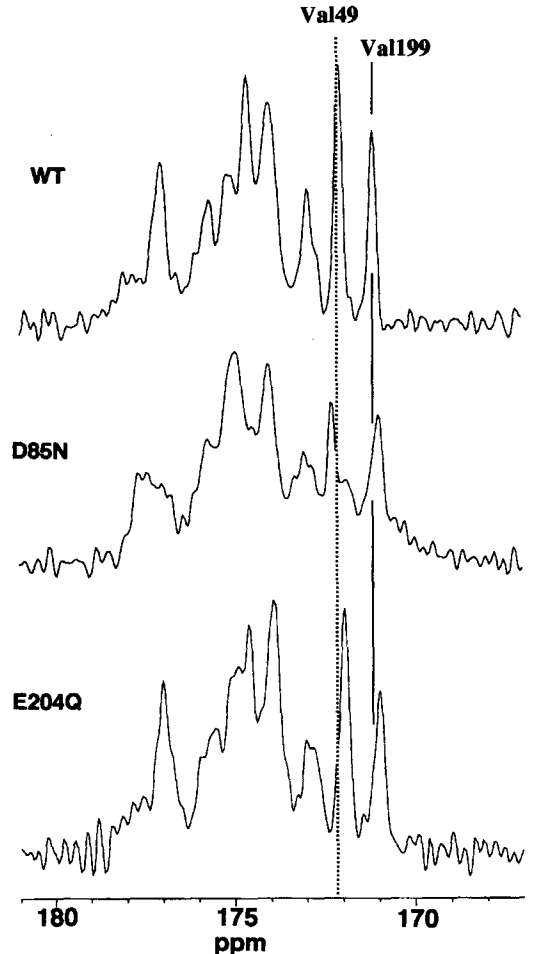


Fig.3. ¹³C CP-MAS/TOSS NMR spectra of [1-¹³C]Val labeled WT, D85N and E204Q.

REFERENCES

- [1] Luecke et al., *Science* 280 (1998) 1934-1937.
- [2] Maeda et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 121(1997) 399-406.
- [3] Grigorieff et al., *J. Mol. Biol.* 259 (1996) 393-421.

Conformation of transmembrane α -helical fragments
 in magnetically oriented lipid bilayers

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology
 S. Kimura, A. Naito, S. Tuzi and H. Saito[^]

Transmembrane α -helical fragments containing the sequence of the C-helix of integral membrane protein bacteriorhodopsin(bR) were incorporated into bilayered discoidal mixed micelles (bicelles) composed of DMPC and DHPC. The change of orientation in the magnetically oriented bicelles was observed as a substantial displacement of the ^{13}C chemical shifts in the specifically [1- ^{13}C]-labeled fragments of bR-C(72-107) between pH6.0 and pH7.4.

【序論】

7本の膜貫通ヘリックスから構成されるバクテリオロドプシン(bR)のN末端側から3番目のヘリックス(bR-C)は、プロトンポンプ機能に重要な Asp85 および Asp96 を含んでいる。Huntらは、化学合成したフラグメント bR-C をリン脂質二重膜に再構成させ、その挙動を蛍光、CD および偏向FTIR スペクトルにより観測したり。その結果、フラグメント bR-C は、pH6 以下で膜貫通型であるのに対し、pH6 以上では膜表面に結合あるいは遊離の型で存在することが示された。そこで我々は、リン脂質二重膜に対するフラグメント bR-C のより詳しい情報を得るために、選択的に安定同位体標識したフラグメント bR-C を磁場配向膜として知られるバイセル膜²⁾へ再構成させ、脂質平面に対する相対方向ならびにその構造を固体高分解能 NMR の手法を用いて解析したので報告する。

【実験】

図1に示した[1- ^{13}C]Ala⁸⁴, [15N]Phe⁸⁸, [3- ^{13}C]Ala⁹⁸を三重標識したペプチドフラグメント bR-C(72-107)を Fmoc 固相法で合成した。フラグメント bR-C と dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC) を共に有機溶媒に溶解し、その溶媒を減

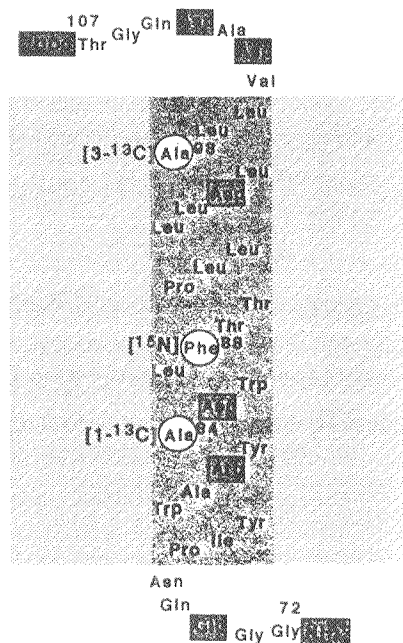


Fig. 1 Schematic diagram of the synthetic fragment bR-C.

固体高分解能 NMR ・ α -ヘリックス ・ リン脂質二重膜 ・ REDOR ・ 磁場配向膜

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

圧除去した後、dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC)を加え、水和させたバイセル膜試料を調製した。bR-C : DMPC : DHPC=1 : 50 : 15 (molar ratio)の試料と 1 : 200 : 60 の試料の2種類について、水和量が 25%w/v になるようにバイセル膜試料を調製し、0.5N HClあるいはNaOHにより、pH 5.0あるいは7.4に調製した。これらの試料を試料管に詰め、Chemagnetics社製CMX-400 NMR分光器により³¹Pおよび¹³C NMRスペクトルを測定した。

【結果と考察】

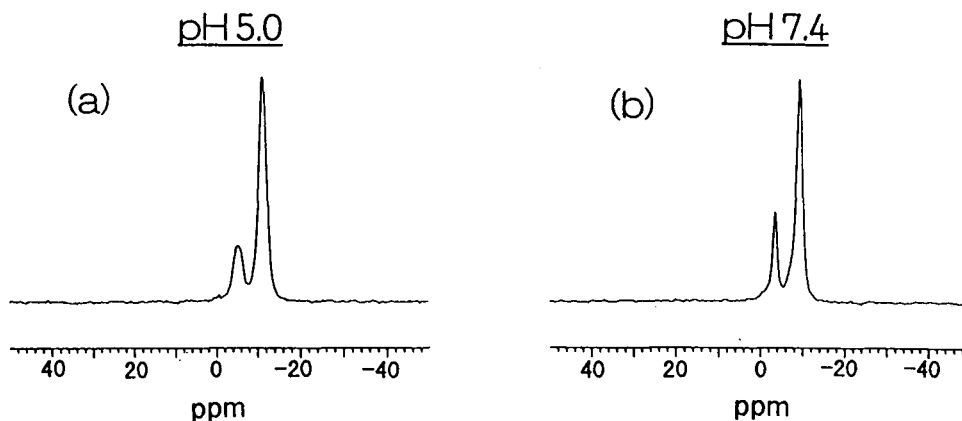


Fig. 2 ³¹P NMR spectra of fragment bR-C incorporated into bicelles, recorded at 30°C (a)pH5.0 and (b)pH7.4.

図2にフラグメントbR-Cをバイセル膜に再構成させた試料の30°Cにおける静止状態での³¹P NMRスペクトルを示す。(a)pH5.0、(b)pH7.4ともにリン脂質二重膜の膜面が磁場に対し平行に配向した結果、³¹Pの化学シフトテンソルの δ_{\perp} の成分のみが観測されていることが分かる³⁾。このことより、フラグメントbR-Cが存在しても、リン脂質二重膜は磁場に配向していることが確認された。

図3に、安定同位体標識したフラグメントbR-Cをバイセル膜に再構成させた試料の30°Cにおける静止状態での¹³C DD-Static NMRスペクトルと、試料をMAS角で高速回転させた¹³C DD-MAS NMRスペクトルを示す。(c) pH5.0と(d) pH7.4のスペクトルは、bR-C : DMPC : DHPC=1 : 200 : 60(molar ratio)の試料であることから、[1-¹³C]Ala⁸⁴の信号は、ほとんど観測されずDMPC/DHPCのカルボニル炭素の信号が主に観測されている。それに対し、bR-C : DMPC : DHPC=1 : 50 : 15の試料である(a) pH5.0と(b) pH7.4のスペクトルでは、(a) 172 ppm付近と、(b) 174 ppm付近に[1-¹³C]Ala⁸⁴由来のNMR信号が観測されていることが分かる。より詳細に[1-¹³C]Ala⁸⁴の化学シフト値を調べるために、pH5.0とpH7.4についてそれぞれ、(e)=(a)-(c)および(f)=(b)-(d)を実行し差スペクトルを求めた。その結果、[1-¹³C]Ala⁸⁴の信号が、(e) pH 5.0では171.9 ppmに、(f) pH 7.4では173.9 ppmに現れていることが明らかになった。また、DMPC/DHPCのカルボニル炭素の信号が(e) pH 5.0で167.0 ppm、173.5 ppm付近に、(f) pH 7.4で168.0 ppm付近に互いに180°位相のずれた分散形として現れている。DMPC/DHPCに対しフラグメントbR-Cの割合が多い試料の方が、(a) pH 5.0では膜全体の配向が良くなり、(b) pH 7.4では

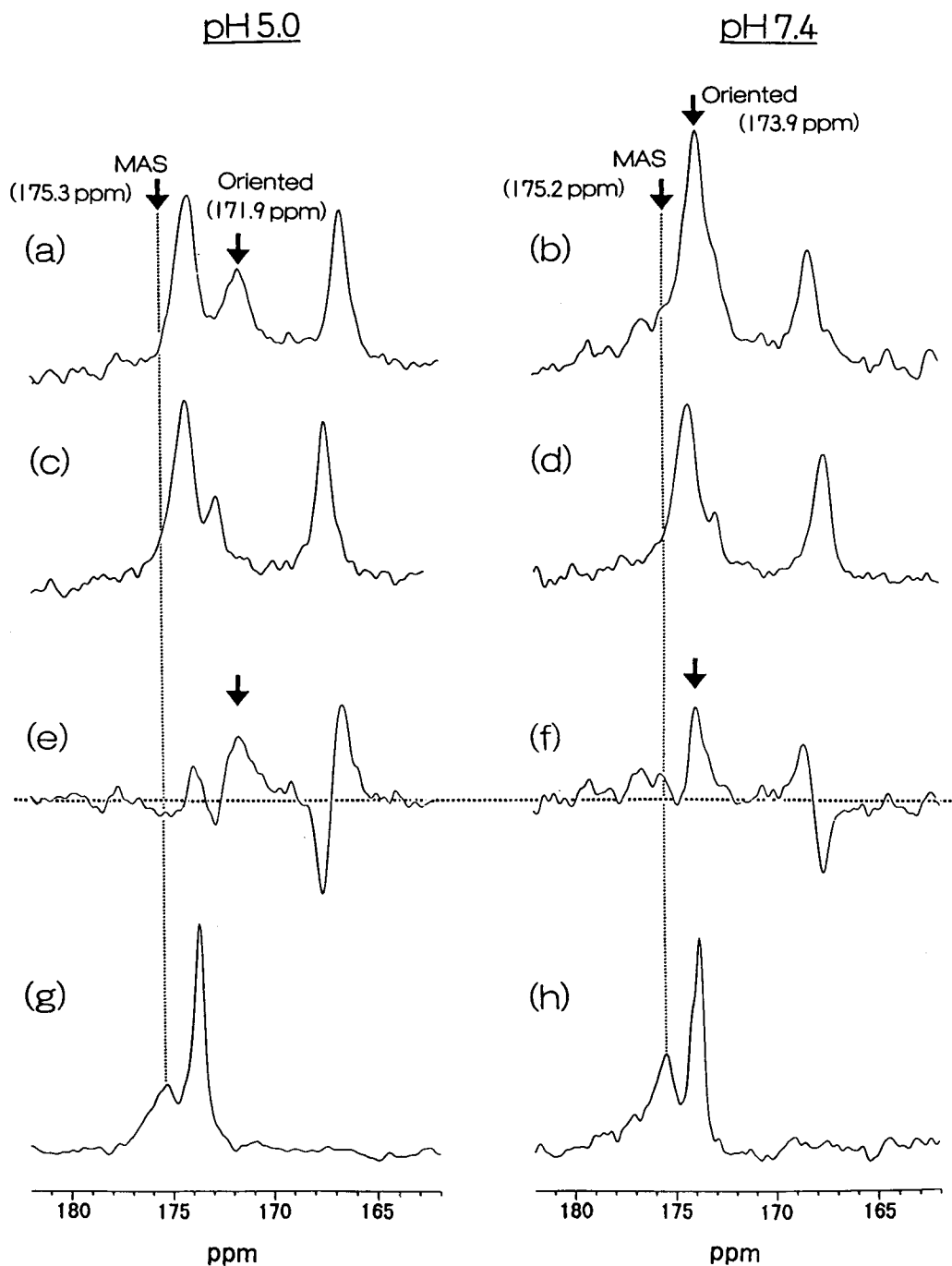


Fig. 3 ^{13}C DD-Static [(a)~(d)] and DD-MAS [(g),(h)] spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{84}$ labeled fragment bR-C incorporated into bicelles. (a),(b),(g),(h); bR-C : DMPC : DHPC = 1 : 50 : 15 (molar ratio). (c),(d); bR-C : DMPC : DHPC = 1 : 200 : 60 (molar ratio). (e) = (a)-(c), (f) = (b)-(d) are difference spectra. ^{13}C DD-MAS spectra were measured at 45°C . The chemical shift values at 45°C were the same as those at 30°C .

その逆の傾向にあることが分かった。

次に、 ^{13}C DD-MAS NMR スペクトルの $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{84}$ の化学シフト値が (g) pH 5.0 で 175.3 ppm、(h) pH 7.4 で 175.2 ppm であることから、 Ala^{84} 付近ではともに α -ヘリックスを形成していることが分かった⁴⁾。 ^{13}C DD-MAS NMR スペクトルの $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{84}$ の化学シフト値が pH 5.0 と pH 7.4 でほとんど変化しなかったことから、 ^{13}C DD-Static NMR スペクトルの pH 変化に伴う約 2.0 ppm の化学シフトとのずれは、二次構造の変化ではなく、リン脂質二重膜に対する相対方向の変化により生じたものと考えられる。pH5.0 の磁場配向した試料では、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{84}$ の信号は等方化学シフト値から低磁場側に 3.4 ppm シフトしているのに対して、pH7.4 では、等方化学シフト値に 1.3 ppm まで近くなっている。この結果から、pH5.0 のフラグメント bR-C が pH7.4 に比べてより膜貫通型になっていることが示された⁵⁾。主鎖カルボニル炭素よりも化学シフト異方性が小さい Ala の側鎖メチル炭素でも同様の変化が見られた(表 1)。 Ala^{98} 付近でも構造変化の伴わない、リン脂質平面膜に対する相対方向の変化が観測された。

Table 1 The chemical shift values of $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{84}$ and $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{98}$ in ^{13}C DD-Static and ^{13}C DD-MAS NMR spectra (ppm from TMS)

	$[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{84}$		$[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^{98}$	
	pH5.0	pH7.4	pH5.0	pH7.4
Static	171.9	173.9	15.2	16.2
MAS	175.3	175.2	15.9	16.1

【まとめ】

フラグメント bR-C をバイセル膜に再構成させた pH 5.0 と pH 7.4 の試料は、リン脂質二重膜の膜面を外部磁場と平行になるようにして配向していることが ^{31}P NMR スペクトルから分かった。磁場配向したリン脂質二重膜でフラグメント bR-C の Ala^{84} と Ala^{98} 付近は、二次構造の変化はなく、脂質平面に対する相対方向の変化が、化学シフト値の変化として観測された。すなわち、pH 5.0 のときの方が pH 7.4 のときよりも、よりリン脂質二重膜に垂直にフラグメント bR-C が挿入されていることが明らかになった。このような pH 依存膜挿入は、このフラグメントに多数存在する Asp の電離状態に関わると考えられる。このように、バイセル膜を用いた研究は、pH に依存して変化するペプチドのリン脂質二重膜の膜面に対する方向と構造の情報を得ることができる有効な手法であることを示した。

参考文献

- 1) J. F. Hunt, P. Rath, K. J. Rothschild and D. M. Engelman, *Biochemistry*, **36**, 15177 - 15192 (1997)
- 2) C. R. Sanders, II, and G. C. Landis, *Biochemistry*, **34**, 4030 - 4040 (1995)
- 3) 内藤晶, 岡本真名武, 水野敬, 永尾隆, 新藤由利子, 辻暁, 斉藤肇, 第 36 回 NMR 討論会講演要旨集, 16-19 (1997)
- 4) H. Saito and I. Ando, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, **21**, 209-290 (1989)
- 5) 木村成輝, 内藤晶, 辻暁, 斉藤肇, 第 36 回 NMR 討論会講演要旨集, 330-333 (1997)

(東京農工大¹、長崎大²) ○ 出村 誠¹、堀 由美子¹、朝倉 哲郎¹、
新留 琢郎²、青柳東彦²

^{31}P and ^{15}N Solid State NMR Analyses of Molecular Orientation of Mastoparan in Phospholipids Bilayers

Makoto Demura¹, Yumiko Hori¹, Tetsuo Asakura¹, Takuro Niidome² and Haruhiko Aoyagi²

¹ Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

² Department of Applied Chemistry, Nagasaki University, Bunkyo-machi,
Nagasaki 852-8521, Japan

Solid state ^{31}P and ^{15}N NMR spectroscopies were used to study orientational behavior of mastoparan (MP), 14-residues toxin from wasp venom, in multi-lamellar vesicles and oriented bilayers of phospholipid. The solid state ^{31}P chemical shift anisotropy data show MP molecules interact with dimyristoyl-phosphatidylglycerol (DMPC) strongly. The solid state ^{31}P spectra of MP - phospholipid mixture oriented between glass plates were observed as a function of the angle between bilayer normal and magnetic field. The several components which depend on the angles were detected in the spectra, indicating the presence of several kinds of oriented phospholipids perturbed by MP molecules. In addition, the MP molecules which were introduced in the DMPC/DMPG system were found to be in two orientational states from ^{15}N angular-dependent solid state NMR spectra of [^{15}N]-Ala¹⁰ labeled MP in the presence of lipid bilayer.

【緒言】 14残基のペプチドからなるスズメバチ毒、マストパランは、生体膜中でいくつかの生理活性を有することが報告されている。これまでにマストパランの有無による色素の透過速度の変化¹⁾、脂質存在下での CD、 ^1H NMR 測定から、マストパランは両親媒性ヘリックス構造を形成していることが分かっている²⁾ が、膜結合や膜貫通中間状態の配向構造については分かっていない。

本研究では、二種類のマストパラン含有脂質膜を作製し、配向構造に敏感な角度依存固体 NMR 法を用い、リン脂質および含有されたマストパランの配向構造に関する知見を得ることを目的とした。リン脂質膜の配向については固体 ^{31}P NMR 測定、また、リン脂質膜中に存在するペプチドの配向は固体 ^{15}N NMR 測定を行い、マストパランの脂質膜への吸着、浸入、透過のメカニズムについて考察した。

【実験】 【マストパランの合成】 マストパラン(MP)及びその [^{15}N]Ala¹⁰ ラベル物は固相法により合成し、HPLC により精製した。【NMR 試料作製】 ①多重リポソーム系：MP とジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)、及び MP, DMPC, ジミリスチルホスファチジルグリセロール(DMPG)混合物を Tris/HCl バッファーに溶かし、25%w/v に調整したものを多重リポソーム系試料とした。②配向脂質二重層系：MP と DMPC、及び MP, DMPC, DMPG 混合物をガラスプレート上に展開し、水和率 60% に調整したものを配向脂質二重層系試料とした。

【固体 NMR 測定】 脂質極性部分の配向構造の検出には固体 ^{31}P NMR を用い、ペプチドの構造解析は固体 ^{15}N NMR を用いて行った (JEOL EX400NMR 装置 角度可変固体 NMR ユニット付き)。

マストパラン、リン脂質膜、安定同位体ラベル、化学シフト異方性、配向構造

でむらまこと、ほりゆみこ、あさくらてつお、にいどめたくろう、あおやぎはるひこ

[結果と考察]

多重リポソーム系の固体 ^{31}P NMR 測定から、MP は DMPC のみより DMPG を含むリポソームとより強く相互作用することが分かった。一方、DMPG を含む配向脂質二重層系の角度依存固体 ^{31}P NMR 測定の結果は、複数のピークが観測された(Fig. 1)。脂質配向方向と磁場方向とのなす角度 θ を変えて測定した結果、各々のピークは角度に依存して、その位置が変化しており、脂質極性部は複数の配向成分からなることが分かった。これは MP が脂質二重層の配向変化を伴って、膜貫通状態を形成していることを示唆する。

MP の 10 残基目の Ala を ^{15}N ラベルした試料を用い、同様にガラスプレート間に配向させた試料の固体 ^{15}N NMR スペクトルを測定した。ガラスプレートを磁場に平行と垂直に設置した場合、 ^{15}N NMR スペクトルは角度に依存して線形が変化した。ガラスプレートを磁場に垂直に設置した場合(Fig. 2)、162 ppm にマイナーピーク(A)、68 ppm にメインピーク(B)が観測された。これらのピークは、化学シフト異方性によるスペクトルシミュレーションから、成分比 A/B=1/9、ヘリックス軸の平均の配向方向とその分布幅は A: 膜貫通方向 $\pm 10^\circ$ 、B: 膜表面方向 $\pm 30^\circ$ と得られた。

以上の結果をまとめると、

(1) MP とリン脂質極性頭部との相互作用は DMPC のみより DMPG を共存させた方が強い。

(2) DMPC/DMPG リン脂質膜の極性頭部の配向秩序は MP によって大きく影響を受ける。また、リン脂質膜の極性頭部の配向方向は 3 状態を示す。

(3) MP はリン脂質膜中でヘリックス配向軸が膜貫通方向と膜表面方向の 2 状態をとる。ただしその配向分布は膜表面方向が広く、膜貫通方向では狭い。

発表では、これらの結果に基づいた MP のリン脂質膜への結合モデルを提案する。

文献

- 1) K. Matsuzaki, S. Yoneyama, O. Murase, K. Miyajima, *Biochemistry*, **35**, 8450, 1996
- 2) Regitze R. Vold, R. Scott Prosser and Alan J. Deese, *Journal of Biomolecular NMR.*, **9**, 329, 1997

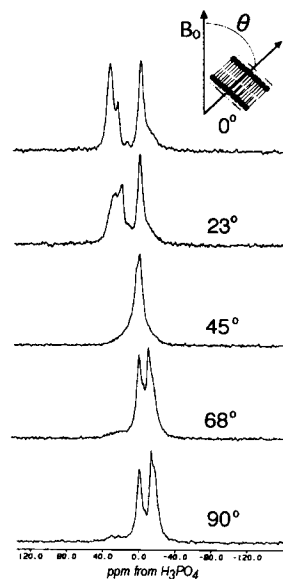


Fig. 1 Angular dependent ^{31}P solid state NMR spectra of MP / DMPC / DMPG oriented bilayer which was prepared between glass plates.

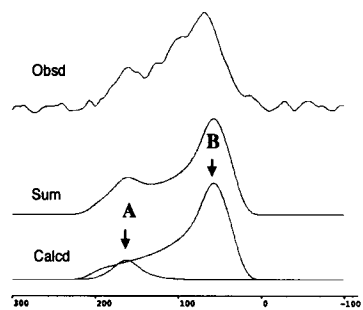


Fig. 2 Angular dependent ^{15}N solid state NMR spectra of ^{15}N -Ala¹⁰ labeled MP / DMPC / DMPG oriented bilayer which was prepared between glass plates (bilayer normal was parallel to B_0).

P49

膜蛋白質における金属イオン結合の解析

(姫工大・理¹、ウェイン州立大²、カリフォルニア大³) ○辻 暁¹、
山口 悟¹、谷生道一¹、小西英正¹、井上さゆり¹、内藤 晶¹、
Richard Needleman²、Janos K. Lanyi³、斉藤 肇¹

Analysis of Metal Ion Binding to Membrane Protein (Himeji Institute of Technology¹, Wayne State University², University of California³)
○Satoru Tuzi¹, Satoru Yamaguchi¹, Michikazu Tanio¹, Hidemasa Konishi¹,
Sayuri Inoue¹, Akira Naito¹, Richard Needleman², Janos K. Lanyi³, Hazime Saito¹

High affinity cation binding sites of bacteriorhodopsin, one of the typical intrinsic membrane proteins, were examined with solid-state ¹³C NMR using samples labeled with [3-¹³C]Ala and [1-¹³C]Val. As a result, high-affinity cation binding sites in bacteriorhodopsin were observed by solid-state ¹³C NMR, and one of the preferred cation binding sites was located at the loop between helix F and G near Ala196, in view of the 3D structure of bacteriorhodopsin from X-ray diffraction. The cation binding was found to induce conformational alteration of the F-G loop structure. A rather rapid exchange of bound cations among the cation binding sites with lifetime shorter than 3 ms was also observed.

[はじめに]

これまでに本研究室では生合成的に膜蛋白質中の特定の種類のアミノ酸を¹³C標識し、固体高分解能¹³C NMRを用いて観測することで、生体膜懸濁液中における膜蛋白質の構造情報を得ることができることを示してきた¹⁻³⁾。ここでは高度好塩菌の細胞膜に存在する光プロトンポンプ蛋白質であるバクテリオロドプシン(bR)を対象として、膜蛋白質と金属イオンの相互作用に注目し、金属イオン結合の膜蛋白質立体構造への寄与、蛋白質中の金属イオン結合部位、膜蛋白質を含む生体膜上での金属イオンの動的挙動などの情報を固体NMRにより解析した。バクテリオロドプシンは生理的条件下で1分子あたり2個以上の二価カチオン(カルシウムイオンまたはマグネシウムイオン)を結合していると考えられており、脱イオンにより活性部位に結合したレチナルの吸収波長の変化(568 nm→603 nm)、活性の喪失などの変化が起きる。しかしながら、蛋白質中でのカチオン結合サイトは特定されておらず、蛋白質立体構造に対するカチオンの寄与は明らかになっていない。今回、固体NMR

固体高分解能NMR、膜蛋白質、金属イオン、バクテリオロドプシン、コンフォメーション

つじさとる、やまぐちさとる、たにおみちかず、こにしひでまさ、いのうえさゆり、ないとうあきら、Needleman Richard、Lanyi Janos K.、さいとうはじめ

により、カチオン結合サイトの一つを特定し、その構造モデルを与えることができた。また、結合サイト間の交換を含む結合イオンの動的な挙動、カチオンの結合により誘起される蛋白質の立体構造変化を見出した。バクテリオロドプシンに関して得られる膜蛋白質-金属イオン間の相互作用の特徴は、膜蛋白質一般における金属イオンとの相互作用のモデルを与えられられる。

[実験]

試料： [3-¹³C]Ala-および[1-¹³C]Val-標識バクテリオロドプシンは[3-¹³C]alanineまたは[1-¹³C]valineを対応する非標識アミノ酸と置換した完全合成培地中で培養した*Halobacterium salinarium*から紫膜として調製した。菌株として野生型 (S9)、部位特異的アミノ酸変異株：Ala126→Gly (A126G), Ala196→Gly (A196G), Val199→Ala (V199A)を使用した。紫膜を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8)により処理することで脱イオン膜 (青膜)を調製し、NaOH、CaCl₂、MnCl₂を添加することで結合カチオンの置換をおこなった。

測定： Chemagnetics CMX-400スペクトロメーター (¹H: 400 MHz)を用い、CPMASおよびDDMAS (single-pulse excitation dipolar-decoupled MAS)により測定をおこなった。測定試料として、紫膜または青膜を緩衝液 (5 mM HEPES pH7.0, 10 mM NaCl, 0.025 % NaN₃)または純水中に懸濁し、濃縮した懸濁液をジルコニア製サンプルローターに導入後、樹脂により密閉したものを使用した。

[結果と考察]

[3-¹³C]Ala標識バクテリオロドプシンのアラニンC_β炭素のスペクトルはFig.1のように主にアミノ酸残基の二面角に依存して12本の分離したピークを与える。蛋白質の二次構造と信号の対応をFig.1上部に示した。これらの信号のうち、15.39 ppmおよび17.78 ppmのピークは各々A126GおよびA196G変異体で消えることからAla126およびAla196の個々の残基に帰属できた。

紫膜中のカチオンを除去した場合、Fig.2のように主に陽イオン除去に由来する生体膜の表面pH低下によりバクテリオロドプシンの立体構造が大きく変化することがスペクトル線形の変化から観測される。このとき、蛋白質の可視領域における吸収波長変化、活性の喪失が起こり、

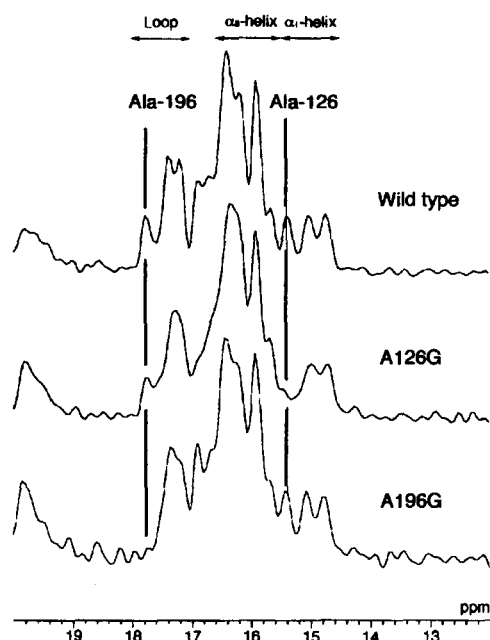


Fig. 1 ¹³C CP-MAS NMR spectra of [3-¹³C]Ala labeled wild type bR and its mutants.

蛋白質がnativeな構造をとっていないことがわかる。脱イオンしたバクテリオロドプシン懸濁液 (pH 4) のpHをNaOH (終濃度400-650 μ M) でpH 7.0とすると、Fig.3のようにnativeなバクテリオロドプシンに近いスペクトルが回復し、蛋白質の大部分がnativeな立体構造を再生することがわかるが、intactのバクテリオロドプシンと比較すると、ループおよびヘリックス構造に矢印で示す4個所のスペクトル変化が残る。これらは本来蛋白質に結合していた二価カチオンをNa⁺イオンにより置換したことによって生じた変化と考えられ、金属イオン結合が複数のサイトで膜蛋白質の局所的な立体構造に影響を与えることを示している。特にAla196に帰属された17.78 ppmの信号の低磁場側へのシフトはこの残基近傍の蛋白質構造 (膜の細胞外側に位置するループ部位) がカチオン結合により影響されることを示し、残基近傍へのカチオン結合を示唆している。

[1-¹³C] Val標識バクテリオロドプシンのスペクトルではPro残基のイミド窒素に隣接するVal49、Val69およびVal199の信号は高磁場側に分離して観測される。V199A変異体によって帰属された199位バリンに対応する171.11 ppmの信号は上述のような二価カチオンのNa⁺イオンによる置換で影響を受けないことが見出され、196位近傍のカチオンによる立体構造への影響は非常に局所的であることが示された。

脱イオンの後Na⁺によって再生したバクテリオロドプシンにCa²⁺、Mn²⁺を加えることで、蛋白質に結合したNa⁺をこれらの二価カチオンに置換することができる。Mn²⁺の結合による[3-¹³C]Ala信号の広幅化から、カチオン結合部位近傍の残基を直接に特定した。Fig.4に示すように、少量のMn²⁺ (蛋白質に対し、1/10モル当量)

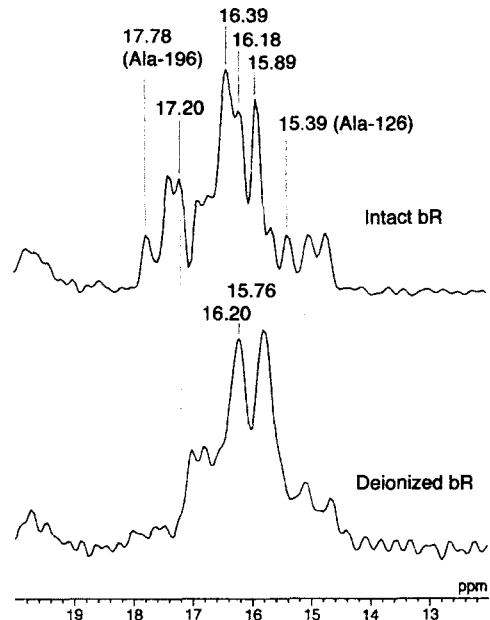


Fig. 2 ¹³C-CPMAS NMR spectra of intact and deionized bR.

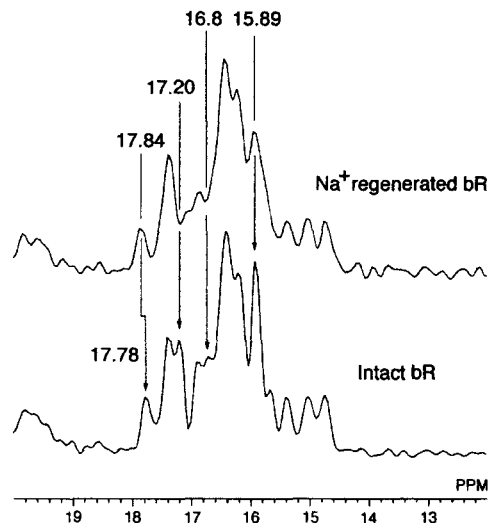


Fig. 3 ¹³C-CPMAS NMR spectra of intact and Na⁺ regenerated bR.

の添加によりヘリックスおよびループ部位の5個所の信号(矢印)に相対的に大きい信号強度の減少が見られる。これらは2個所以上の結合サイトへの Mn^{2+} 結合による影響を示しており、特にAla196に対応するピークには強い影響が観測される。この結果から、Ala196を含むバクテリオロドプシンの膜貫通ヘリックスFのC-末端と細胞外側のループ部位の境界部分にカチオン結合サイトの一つがあると結論し、X線構造解析による立体構造⁴⁾を考慮し結合部位のモデルを提案した (Fig. 5)。

また、蛋白質に対し非常に少ないモル比(1/10モル当量)の Mn^{2+} により複数のサイトに対応すると考えられる信号の高さに減少が見られ、さらにAla196に対応する17.80 ppmの信号の70%以上が広幅化により見かけ上消滅している点を考慮すると、 Mn^{2+} は3 ms以下の寿命で結合サイト間、および蛋白質間を移動していると考えられる。このことから、バクテリオロドプシンとカチオンの結合は親水的表面近傍で起きており、結合はサイト間の交換を含む動的な性質を持っていることがわかった。

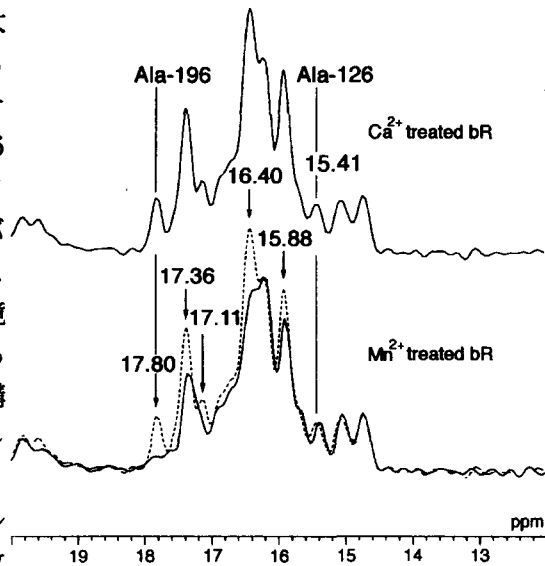


Fig. 4 ^{13}C -CPMAS NMR spectra of $[3-^{13}C]$ Ala-labeled deionized bR treated with Ca^{2+} (top and dotted line of bottom) and Mn^{2+} (solid line of bottom)

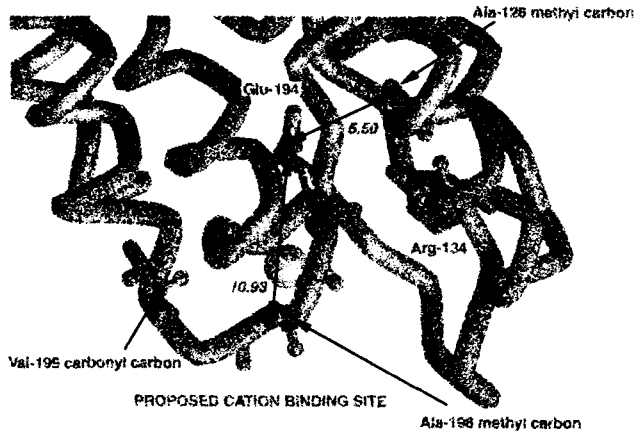


Fig. 5 A proposed cation binding site at the F-G loop of bR.

- 1) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô (1994) *Biochemistry*, **33**, 15046-15052.
- 2) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô (1996) *Eur. J. Biochem.*, **239**, 294-301.
- 3) S. Yamaguchi, S. Tuzi, T. Seki, M. Tanio, R. Needleman, J. K. Lanyi, A. Naito and H. Saitô (1998) *J. Biochem. (Tokyo)*, **123**, 78-86.
- 4) H. Luecke, H. T. Richter and J. K. Lanyi (1998) *Science*, **280**, 1934-1937.

P50

固体高分解能NMRによる磁場配向二重膜中アラメシチンの膜に
対する配向の決定

(姫路工大・理) ○永尾 隆、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇

Orientation of Alamethicin in Magnetically Oriented Lipid Bilayers by High-Resolution Solid-State NMR Spectroscopy

Department of life Science, Himeji Institute of Technology
○Takashi Nagao, Akira Naito, Satoru Tuzi and Hazime Saito

Alamethicin is an antibiotic peptide consisting of 20 amino acid residues and exhibits voltage-dependent ion channel gating in lipid bilayers. The structure and dynamics of membranes bound alamethicin were investigated using magnetically oriented lipid bilayer systems.

^{13}C chemical shifts of carbonyl carbon in the magnetically oriented system exhibit the orientation of alamethicin to be normal to the surface of lipid bilayers. Further, ^{13}C isotropic chemical shift values indicate that the backbone near Ala⁴, Gly¹¹ and Val¹⁵ residues of alamethicin form α -helix structure. These results indicate that alamethicin has entirely α -helix structure in the lipid bilayers and is inserted into membranes in the absence of membrane potential.

アラメシチンは菌類である *Trichoderma viride* から得られる抗生物質で、20アミノ酸残基から成る生理活性ペプチドである。アラメシチンは生体膜中で6から11量体を形成し、電位依存性イオンチャンネル機構を示すことが知られている。アラメシチンは膜タンパク質の電位依存性構造変化や脂質膜との相互作用を研究する上で重要なモデルとして、その活性は電気生理学的手法等でよく研究されている。またX線回折¹⁾や溶液NMR分光法²⁾により結晶構造や溶液中での構造が報告されている。しかしアラメシチンの脂質二重膜中での立体構造や脂質膜表面との相対配向に関してはまだ不明な点が多い。

本研究では磁場配向脂質二重膜 (パイセル)³⁾中に部位特異的に ^{13}C 標識したアラメシチン類似体を再構成し、固体高分解能NMR分光法を用いてアラメシチンの膜中での配向を決定することを試みた。特にカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトテンソルに注目して、その解析からアラメシチンの脂質二重膜に対する相対配向を決定することに成功した。同時にその等方化学シフト値から脂質膜中でのアラメシチンの二次構造を決定したので報告する。

固体高分解能NMR、アラメシチン、磁場配向膜、安定同位体標識、イオンチャンネル

○ながお たかし、ないとう あきら、つじ さとる、さいとう はじめ

[実験]

アラメシチン、および $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^4$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{11}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}^{15}$ -アラメシチンは、活性化試薬HATUを用いてABIペプチド合成機により固相法で合成し、その後HPLCにより精製した。これらの試料はDMPC単独成分のマルチラメラベシクル、およびDMPC/DHPC混合成分から成るバイセル膜中にそれぞれ再構成させて固体高分解能NMR測定を行った。アラメシチンに含まれる $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^4$ の信号の帰属のため、 α -ヘリックスおよび 3_{10} -ヘリックス構造のモデル化合物も同様に合成し、凍結乾燥状態でNMR測定を行った。測定はChemagnetics社製CMX400 NMR分光器を用い、CP-MAS法、DD-MAS法、DD法によりNMRスペクトルを得た。試料はジルコニア製5 Φ ローターに詰め、アラルダイトで完全に密封した状態で測定した。NMR測定において繰り返し時間は4sec、 ^{13}C の接触時間は1msecに設定し、測定温度は10~45 $^{\circ}\text{C}$ の間で変化させた。

[結果と考察]

脂質膜中アラメシチンの二次構造

脂質膜中でのアラメシチンの ^{13}C DD-MAS NMR測定の結果、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{11}$ および $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}^{15}$ の信号はそれぞれ172.5ppm、175.3ppmの位置に観測され、これらの部位が α -ヘリックス構造をとっていることを示した。 $[3-$

$^{13}\text{C}]\text{Ala}^4$ はAib残基に挟まれた特殊な環境にあり、その信号は16.6ppmと通常の α -ヘリックス構造のものより1ppm以上低磁場側に観測された。そこでAib残基に挟まれたAla残基を含むモデル化合物との信号の比較を行った結果、Ala 4 においても α -ヘリックス構造をとっていることが分かった。以上の結果より、アラメシチンが脂質二重膜環境で分子全体にわたって α -ヘリックス構造をとることが分かった。

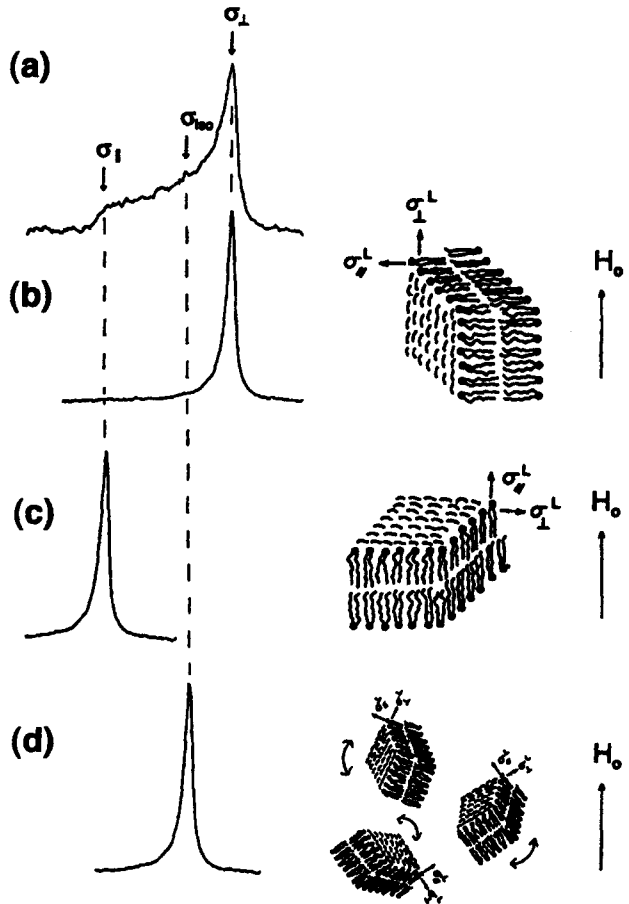


Fig.1 ^{31}P NMR spectra of magnetically oriented lipid bilayer

アラメシチンを含むバイセルの磁場配向挙動

バイセルを用いた磁場配向膜の測定において、まず ^{31}P NMRにより脂質二重膜の配向を確かめた。DD法によりリン脂質二重膜を観測した場合、もし脂質が等方運動をしていればFig.1 (d)の様に化学シフトの等方値の位置に信号が観測される。一方大きなリポソームを形成している場合や、脂質膜間相互作用が存在することで運動が制限されるとFig.1 (a)の様なパウダーパターンを生じる。リン脂質は二重膜を形成しながら脂質分子軸周りの速い回転運動を持つので、そのパウダーパターンは典型的な軸対称パターンを示し、その化学シフトテンソルの主値は σ_{\perp} と σ_{\parallel} で表わされる。このため脂質膜表面が静磁場に対して平行に配向した場合、その信号はFig.1 (b)の様に化学シフトの等方値より高磁場側の σ_{\perp} の位置に現われる。逆に膜表面が静磁場に対して垂直に配向した場合、その信号はFig.1 (c)の様に化学シフトの等方値より低磁場側の σ_{\parallel} の位置に現われる。アラメシチンを再構成したバイセル膜の ^{31}P NMRスペクトルをFig.2に示す。45°CでDMPCとDHPCの ^{31}P NMR信号が σ_{\perp} の位置に現われたことからバイセル膜が膜表面を静磁場に対して平行に向けて配向していることが分かった。

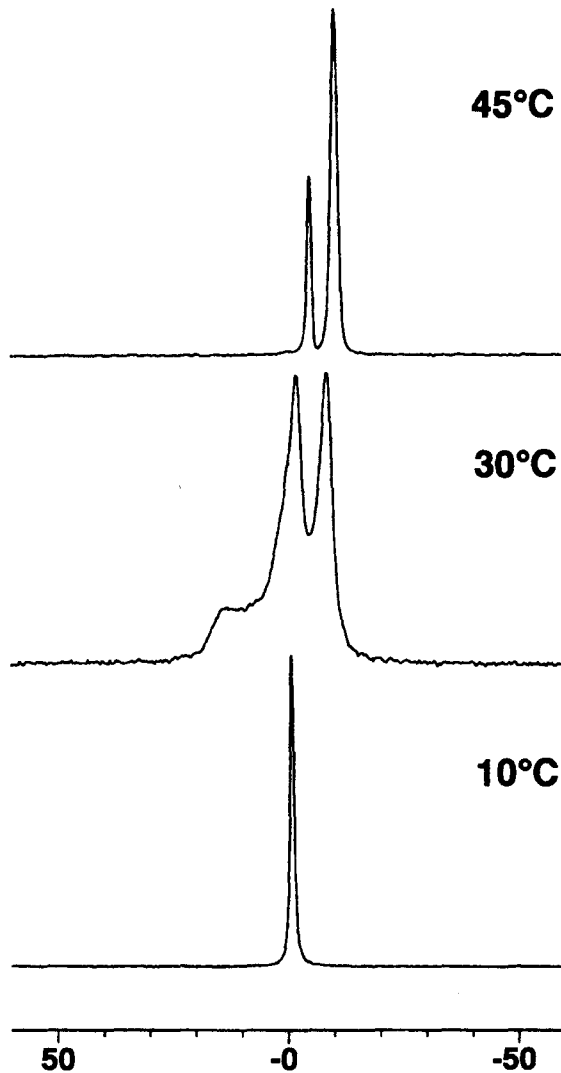


Fig.2 ^{31}P DD NMR spectra of bicelles containing alamethicin

バイセルに再構成したアラメシチンの配向

次に磁場配向した試料の ^{13}C NMRスペクトルをFig.3に示す。 α -ヘリックス構造をとったペプチド中のカルボニル炭素のC=O軸は、それぞれ4残基離れたアミドプロトンと水素結合を形成するためヘリックス軸に平行にそろう。アラメシチンは膜中

でヘリックス構造をとるので、そのカルボニル炭素もヘリックス軸に平行にそろっている。またアラメシチンが脂質二重膜中で速い一軸回転運動を持つならば、異方性の小さな軸対称パウダーパターンを示す。このパウダーパターンにおいてヘリックス軸に垂直な方向を向く σ_{\perp} は等方値より高磁場側に、平行な方向を向く σ_{\parallel} は等方値より低磁場側に現われる。このためリン脂質膜と同様な解析が可能となり、その配向化学シフト値から静磁場に対するアラメシチンヘリックスのなす角度が決定できる。Fig.3 (b)の配向スペクトルとFig.3 (c)のMASスペクトルとの比較から、配向に従って $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{11}$ で9.2ppm、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}^{15}$ で5.8ppmと信号が大きく高磁場シフトすることがわかった。この結果より Gly^{11} 、 Val^{15} 部位ではヘリックス軸が静磁場に対してほぼ垂直に配向していることがわかった。

[まとめ]

磁場配向バイセル膜に再構成したアラメシチンのカルボニル炭素の化学シフト値を解析した結果、アラメシチンは α -ヘリックス構造をとり、そのヘリックス軸は脂質膜表面にほぼ垂直に挿入されていることが判明した。この結果はアラメシチンがイオンチャンネルゲートが閉じた状態においても α -ヘリックス軸は膜表面に横たわるのではなくて膜に垂直に配向することを示唆している。

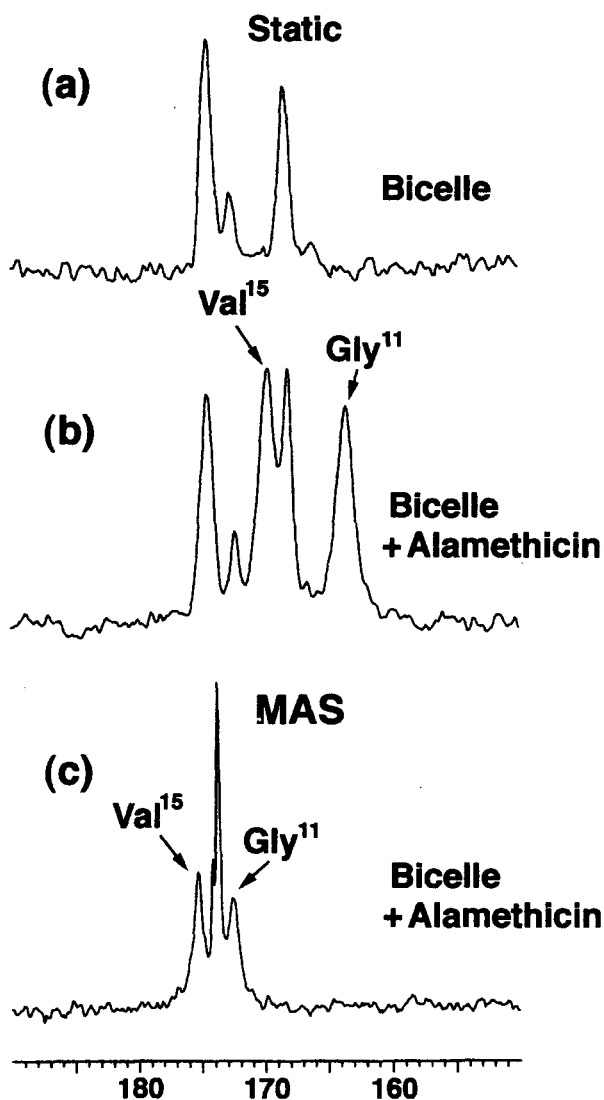


Fig.3 ^{13}C DD NMR spectra
 (a) bicelles (b) bicelles containing alamethicin
 (c) bicelles containing alamethicin taken with MAS condition

- 1) Robert O. Fox Jr., Frederic M. Richards, Nature, (1982), 300, 325-330
- 2) Adelinda A. Yee, Randal Babiuk, Joe D. J. O'Neil, Biopolymers, (1995), 36, 781-792
- 3) Charles R. Sanders, II, Geoffrey C. Landis, Biochemistry, (1995), 34, 4030-4040

Liquid -Crystal NMR Study of 2-Vinyloxy pyridine.

(阪大・薬¹ 阪大・医²) ○ Alexander V.Vashchenko¹, Atsuomi Kimura²,
Andrei A.Afonin², and Hideaki Fujiwara².

Abstract: NMR spectrum of the title compound has been measured in nematic phase ZLI1167 and analyzed to obtain the direct couplings. The purpose of this investigation is to advocatively conclude the presence of intramolecular hydrogen bonding between the olefinic CH proton and pyridine nitrogen, which we have suggested according to the discussion of NMR chemical shift and quantum chemical calculation.

Introduction.

We have measured ¹H NMR spectra of 2-vinyloxy pyridine in nematic liquid crystal ZLI1167. High resolution spectra were obtained. The spectra were analyzed with the use of established programs SHAPE and LAOCOON modified in some respects in our laboratory. The compound makes up a 7-spin system with seven different chemical shifts, but the ground state conformation is already obtained as a planar one in our previous calculation based on *ab initio* method. Therefore, the order parameters to be determined independently are three. Almost good fit is obtained just now between the calculated and observed spectra.

Experimental.

2-Vinyloxy pyridine was dissolved in nematic solvent ZLI1167 by 2.6 wt %. ¹H NMR spectrum was measured on Varian VXR-200 NMR spectrometer operating at 200 MHz. The temperature of measurements was 26°C. Normal solution spectrum of 2-vinyloxy pyridine in CDCl₃ was taken on the same spectrometer at the same temperature.

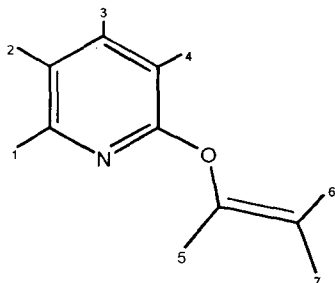
Keywords: liquid crystal, direct couplings, 2-vinyloxy pyridine, conformation, order parameter.

アレキサンダーヴァシェンコ、きむらあつおみ、アンドレイエイホニン、ふじわらひであき

Analysis of NMR spectra obtained in the nematic phase was made by the program LAO3D9D. This is a modified version of LAOCN3 applicable in double precision mode with a damping route as reported by the authors [1]. The resulting direct couplings were analyzed by the program SHAPE [2] to obtain structural and order parameters. All calculations were made on a work station Fujitsu S4-IP.

Results.

2-Vinyloxy pyridine exhibits spectra of 7 spin system. It includes seven chemical shifts (δ_1 - δ_7) and twenty one direct couplings (D_{12} , D_{13} , D_{14} , D_{15} , D_{16} , D_{17} , D_{23} , D_{24} , D_{25} , D_{26} , D_{27} , D_{34} , D_{35} , D_{36} , D_{37} , D_{45} , D_{46} , D_{47} , D_{56} , D_{57} , D_{67}) besides twenty one indirect couplings J_{ij} as independent variables. Indirect couplings were fixed at the values observed in isotropic medium as usually done [3] when the indirect couplings show no discernible solvent dependency. The values used amount: $J_{12}=5.79$ Hz, $J_{13}=2.04$ Hz, $J_{14}=0.77$ Hz, $J_{23}=6.93$ Hz, $J_{24}=1.07$ Hz, $J_{34}=8.76$ Hz, $J_{45}=0.21$ Hz, $J_{56}=13.83$ Hz, $J_{57}=6.24$ Hz, and $J_{67}=-1.84$ Hz, other indirect couplings being small and negligible.



Scheme 1.

Table 1. NMR Parameters of 2-Vinyloxy pyridine
Dissolved in Nematic Phase ZLI1167.

Direct couplings / Hz:

$D_{12}=571.1$, $D_{13}=-24.45$, $D_{14}=334.8$, $D_{15}=174.8$,
 $D_{16}=193.1$, $D_{17}=42.5$, $D_{23}=849.63$, $D_{24}=152.55$,
 $D_{25}=107.28$, $D_{26}=32.31$, $D_{27}=-19.80$, $D_{34}=1070.94$,
 $D_{35}=94.14$, $D_{36}=-22.11$, $D_{37}=5.25$, $D_{45}=90.51$,
 $D_{46}=126.67$, $D_{47}=211.42$, $D_{56}=276.89$, $D_{57}=1430.90$,
 $D_{67}=1113.31$

Relative Chemical shifts / Hz at 200 MHz:

$\nu_1=415.58$, $\nu_2=100.61$, $\nu_3=452.42$, $\nu_4=159.30$,
 $\nu_5=563.69$, $\nu_6=-417.60$, $\nu_7=-337.82$

All the chemical shifts are different from each other, and also all the direct couplings are different from each other. And hence totally 28 parameters are regarded to be independent variables. Therefore, it is very much interested if the spectrum is solved fully and conformation is determined. The LAOCOON iteration calculation has now

given RMS error of 15.8 Hz for the sixty nine observed and simulated transition frequencies. The simulated and observed spectra are shown in Fig.1. This calculation has to be improved more so that the final RMS error reduces as small as a few Hz. The spin system includes 28 independent parameters and this makes the final solution very intricate to be reached. Further efforts are underway to establish the final solution. In the Poster Session overall discussion is applied to the molecule 2-vinyloxy-pyridine to give proofs to its planar structure and intramolecular specific interaction from the experimental point of view.

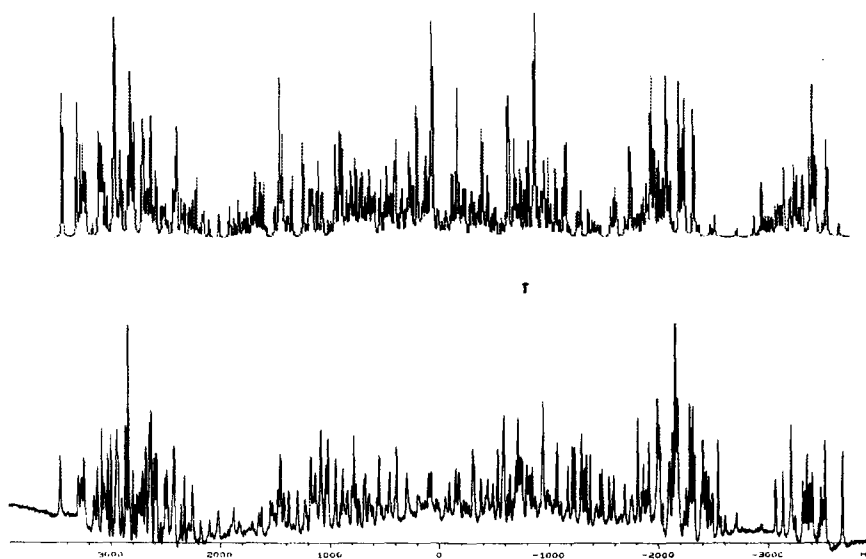


Fig. 1. Simulated (upper) and experimental (lower) ^1H NMR spectra of 2-vinyloxy-pyridine dissolved in nematic solvent ZLI1167.

References:

- [1] H.Fujiwara, I.Yamanaka, and Y.Sasaki, *Nippon Kagaku Kaishi*, 1566 (1986).
- [2] P.Diehl, P.M.Henrichs, and W.Niederberger, *Mol.Phys.*, **20**, 139 (1971).
- [3] H.Fujiwara and Y.Sasaki, *J.Chem.Soc., Chem.Commun.*, 35 (1981).

P52 高分解能 MAS 溶液プローブを用いたリン脂質膜に結合したペプチドの構造解析
(東レリサーチセンター) ○川口 謙、木村一雄

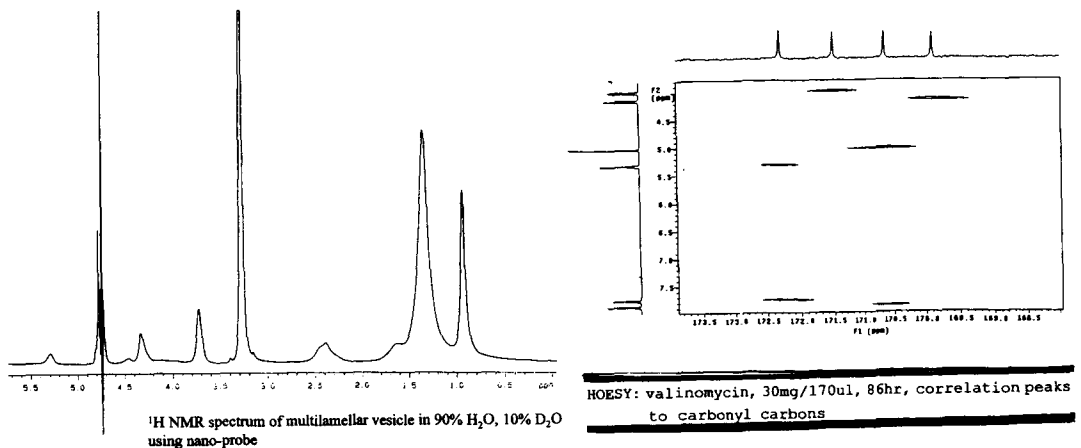
Structural Analysis of Peptide bound to Phospholipid Membrane using High-Resolution Liquid MAS Probe

Toray Research Center, Inc., Ken Kawaguchi, Kazuo Kimura

High-Resolution Liquid MAS Probe, which is called nanoprobe, is used for small amount compounds in liquid state normally, but we have used the probe for phospholipid membrane because the probe has magic angle spinning ability. We tried to measure ^1H NMR of peptide bound to liposome. We also tried to make more sensitive pulse sequence of HOESY due to structural analysis of peptide.

高分解能 MAS 溶液プローブ (ナノプローブ) は本来、微量溶液試料用に開発されたプローブであるが、マジック角回転を用いているため、生体膜のような不均一系でも比較的、高分解能スペクトルが測定できる。このことを利用して、水溶液中のリン脂質膜 (リポソーム) に結合したペプチドを直接に NMR 観測することを試みた。下図左はジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) のリポソーム (マルチラメラベシクル:MLV) にバリノマイシンを取り込ませた状態の ^1H NMR スペクトルである。90% H_2O 、10% D_2O で測定している。MLV の状態にあるにもかかわらず、NMR シグナルが比較的高分解能で観測できる。また、ペプチド (バリノマイシン) のシグナルも一部観測できている。現在 NOESY の解析と、重水素化 DMPC を用いた測定を検討している。

また、ペプチドの立体構造を解析する目的で H-C NOESY (HOESY) の改良を試みた。HOESY は感度の低い測定法であるが、Inverse Mode、Phase Sensitive Mode にするなど改良し、30mg のバリノマイシンで HOESY を観測できるようにした (下図右)。今後、水素結合の観測に適用していきたい。



リン脂質膜、ペプチド、水溶液、HOESY、高分解能 MAS 溶液プローブ

かわぐち けん、きむら かずお

リオトロピック液晶中での硫酸キニジンの コンホメーション - 溶液構造と比較して -

(神戸薬大¹⁾, 阪大・医²⁾) ○杉浦眞喜子¹⁾, 木村敦臣²⁾, 藤原英明²⁾

Conformation of Quinidine Sulfate Dissolved in a Lyotropic Liquid Crystal - Comparing with that in solution -

Makiko Sugiura¹⁾, Atsuomi Kimura²⁾, Hideaki Fujiwara²⁾

1 Kobe Pharmaceutical University, 2 School of Allied Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University

The conformation of a quinidine sulfate, antiarrhythmic agent, has been determined in a lyotropic liquid crystal by means of magic angle spinning (MAS) and ROESY experiment. The information of H-H distance extracted from ROESY/MAS spectra was analyzed according to the distance geometry algorithm. The resulting conformation of quinidine sulfate has been compared with those in a organic solution and for crystal.

【はじめに】リオトロピック液晶を用いた液晶 NMR は、生体膜中での配向した分子の構造を知る上で有用な方法である。特に MAS 条件下での ROESY スペクトル (ROESY/MAS) と組み合わせた方法は、スピン数の多い複雑な化合物にも応用出来、薬物と生体膜との相互作用、生体膜中での薬物のコンホメーション等を知る手がかりを得ることが出来る。¹⁾今回ここでは、硫酸キニジン (I) にこの方法を適用した。

硫酸キニジン (I) は、抗不整脈薬として常用されており、その作用機序については、細胞膜リポプロテインとの結合によって、金属イオンの膜透過性を変化させることなどが知られている。その作用機序に関するより詳細な情報を得ることを期待して、このリオトロピック液晶中でのコンホメーション解析を行った。さらに以前に我々が選択的緩和法を用いて決定したキニジン塩基の重クロロホルム中でのコンホメーション²⁾との違いも併せて検討することを目的とした。

【実験】パーフルオロオクタン酸セシウム塩 (CsPFO) は常法により調製し、重水にとかして (40:60 by wt%) リオトロピック液晶とした。その CsPFO 液晶に I を溶解し (0.5 wt%)、測定サンプルとした。液晶の確認は、²D NMR によって行った。

ROESY /MAS スペクトルの測定は、Varian VXR-500 (¹H: 500MHz) により、ナノプローブを用いて行った。

【結果と考察】I を CsPFO 液晶に溶解した液晶溶液は、²DNMR により、27~39℃ で、異方性の液晶状態を、40℃ 以上で、等方性のミセル状態をとることが分かった (Fig.2, 3)。液晶状態 (33℃)、ミセル状態 (42℃) それぞれについて、MAS 条件下で ROESY スペクトルを測定した。液晶状態で 32 個、ミセル状態で 28 個の ROE ピークを得た。Fig.4 に液晶状態での ROESY スペクトルを、

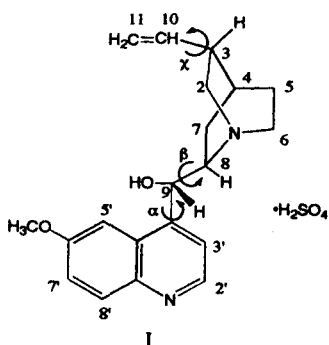


Fig. 1

キーワード : 硫酸キニジン, リオトロピック液晶, ROESY/MAS, コンホメーション

すぎうら まきこ きむら あつおみ ふじわら ひであき

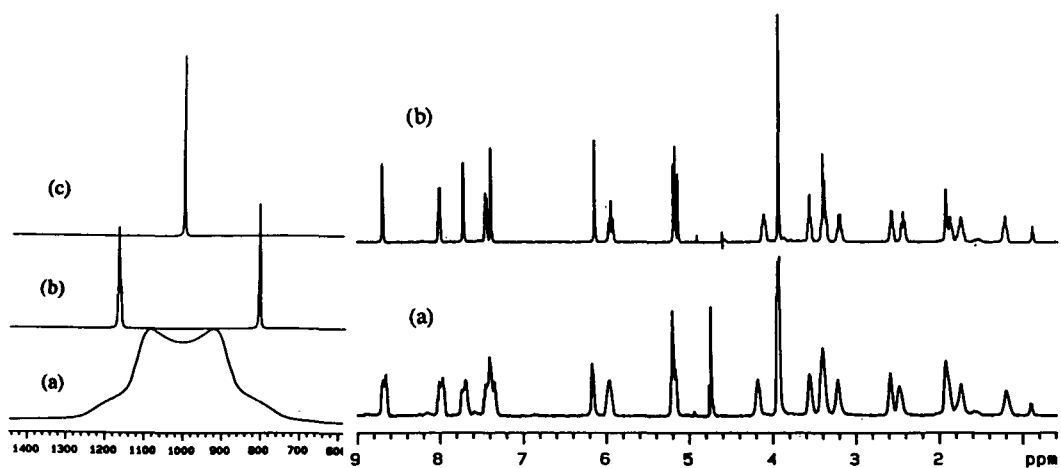


Fig. 2 ²D Spectra of the solution of I dissolved in the CsPFO/D₂O, (a) at RT, (b) at 33°C, and (c) at 42°C.

Fig.3 500 MHz ¹H NMR spectra measured under MAS of I dissolved in the CsPFO solvent, (a) at 33°C in the liquid-crystal state, and (b) at 42°C in the micellar state.

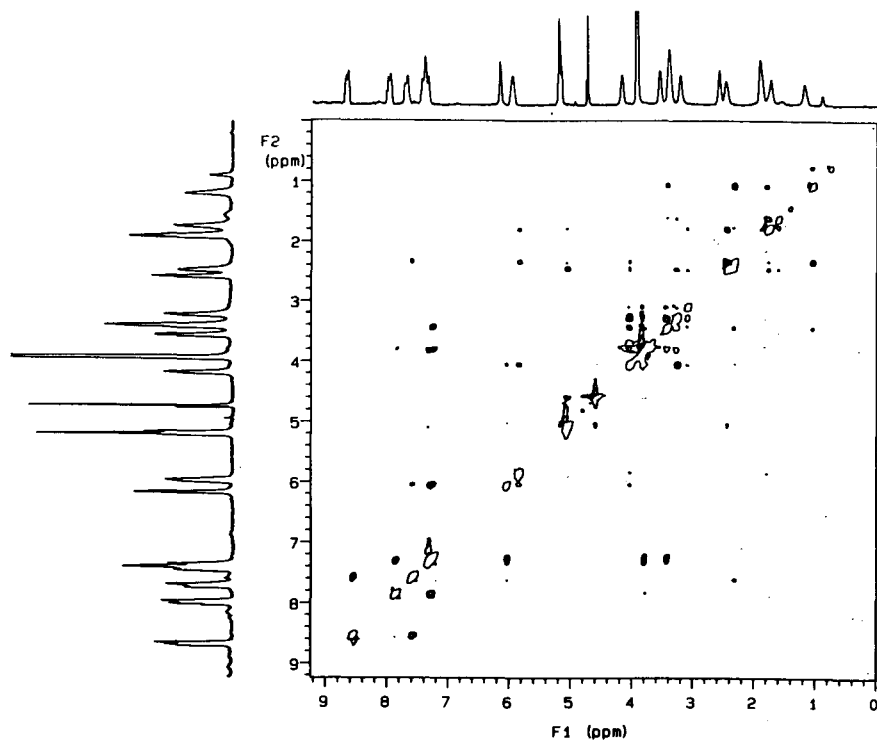


Fig. 4 ROESY/MAS spectrum of I dissolved in the CsPFO Liquid-crystal.

Table 1 にそれぞれの ROE の結果をまとめた。ミセル状態と液晶状態の ROE ピークを見比べると、キノリン環部分とキヌクリジン環部分の間に関係する ROE の値にはほとんど大きな差は見られないが、ピニル基部分とキヌクリジン環部分のプロトン間では、いくらか ROE の強さに差が見られる。

キニジンのコンホメーションを議論する場合、主に Fig.1 に示すような 3 つの結合周りの回転が問題になる。これらの 3 つの結合の回転を可変にして、Table 1 の距離情報を満足するようなコンホメーションをディスタンス・ジオメトリー法で計算した。

それぞれ得られたコンホメーションを Fig. 5 に、また 3 つの二面角の値を Table 2 に示した。この Table 2 には、以前に我々が行った有機溶媒中でのキニジン塩基での結果²⁾と、X 線結晶解析による結晶構造からの結果³⁾も併せて示した。

これらの結果を見比べると、 α , β については、いずれの状態でもあまり大きな差は見られない。これは、これらのコンホメーションを決定する因子が、主に分子内の水素同士の反発によっていることに起因する。すなわちキノリン環部分の水素とキヌクリジン環部分の水素、それにそれらに挟まれた 9 位の水素同士の立体反発が一番小さくなるようなコンホメーションをとるものと思われる。

一方ピニル基のコンホメーション (χ) については、それぞれに差が見られ、特に液晶中では、他と大きく異なっている。この液晶中のコンホメーションは、他のものに比べ、わずかではあるが、より長く伸びた構造になっており、液晶中では、溶液状態、あるいは、結晶状態よりも、より長く伸びた構造で安定に存在していることが分かった。

Table 1 ROE Effects of I

Hi	Hj	Liquid-crystal	Micellar	Hi	Hj	Liquid-crystal	Micellar
2a	2b	+++	+++	6b	8	+	+
2a	7a	+	+	7a	7b	+++	+++
2a	9	+	++	7a	10	+	+
2a	10	+	++	7a	3'	++	++
2b	3	++	++	7a	5'	+	+
3	4/5a	+++	+++	7b	8	+	++
3	6b	+	+	8	9	++	++
3	10	+	+	8	3'	+	+
3	11	+	++	8	5'	+++	+++
4	7a	+	+	9	3'	+	+
4	7b	++	+	9	5'	+++	+++
4	10	+	++	10	11	++	++
5a	5b	+++	+	2'	3'	+++	+++
5a	6b	++	+	5'	OMe	+++	+++
5b	6a	++	+	7'	8'	+++	+++
5b	7b	+	+	7'	OMe	+++	+++

Table 2. Dihedral angles (°) for the conformations of some states

for Quinidine or its salts

		Liquid crystal	Micellar	in CDCl ₃	Crystal
α	<C9'-C4'-C9-C8	79	79	70	79
β	<C4'-C9-C8-C7	89	52	50	72
χ	<C11-C10-C3-C4	-77	-144	150	-130

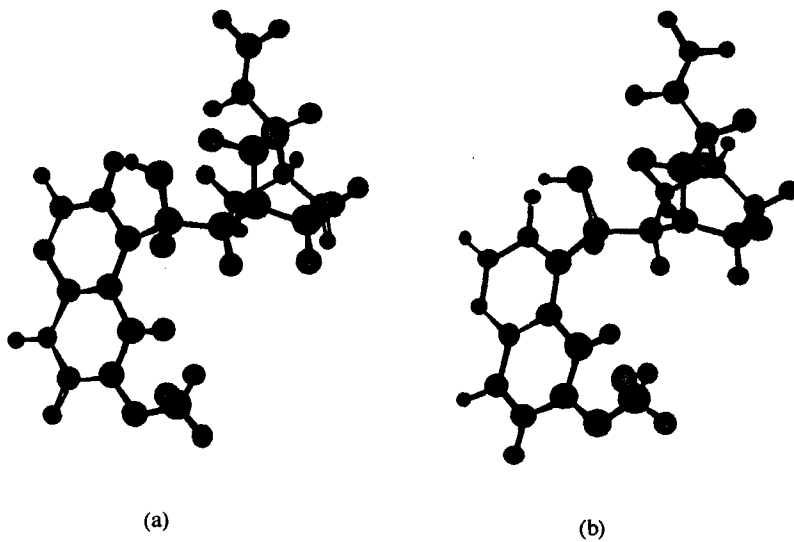


Fig. 5 Proposed conformations for (I), (a) in the micellar state, and (b) in the liquid-crystal state.

【参考文献】

- 1) A. Kimura, et al., *J. Magn. Res.* **B**, 112, 44 (1996)
木村, 他, 第 36 回 NMR 討論会講演要旨集 P 247 (1997)
- 2) T. Sai, et al., *Magn. Resn. Chem.* **30**, 1041 (1992)
- 3) S. Kashino, et al., *Acta Crystallogr., Sect.C* **39**, 310 (1983)

分子動力学計算による $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ の 緩和時間シミュレーション

○井田朋智¹、平井篤樹¹、木村潤子¹、西館数芽²、水野元博¹、遠藤一央¹、須原正彦¹
(金沢大学・理¹、岩手大学・工²)

Relaxation Time Simulation of $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ from Molecular Dynamics Calculation

○T.Ida¹, A.Hirai¹, J.Kimura¹, K.Nishidate², M.Mizuno¹, K.Endo¹, M.Suhara¹
(Faculty of Science, Kanazawa University¹ and Faculty of Engineering, Iwate University²)

The nature of ionic motions in $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ has been studied with the calculation of the molecular dynamics using a soft-core potential function. By considering that a mobile ion (Ag^+ or doped Cu^+) hops among octahedral lattices, The activation energy in α phase was estimated as 8.3kJ/mol, which was a good agreement with the value obtained from the ^{63}Cu - NMR measurement (about 7kJ/mol).

【序】

超イオン導電体 (SuperIonic Conductor、以下 SIC) は、融点より遙かに低温で高いイオン伝導率を示す物質である。近年、工業的にも SIC を用いたバッテリーやセンサーが重要視されており、実験的に、また理論的に様々なアプローチが試みられている。

代表的な SIC には AgI や CuI があり、以前から分子動力学計算による取り扱いが盛んに行われている。AgI については京大の上田ら⁽¹⁾によって数多くなされておられ、SIC 相転移機構や転移前後の構造的変化が理論的に研究されている。

Ag と Cu の混晶について X 線構造解析⁽²⁾ から、図 1 に示すような相図が報告されている。AgI は 420K に SIC 相転移点があり、閃亜鉛鉱型結晶構造を持つ γ 相から 1 次転移後、SIC 相において不動イオンである I^- が、平均構造として体心立方構造を示す α 相へ転移する。

SIC 相においては、この I^- 格子内を移動イオンである Ag^+ が、固体内で拡散することによって高いイオン伝導率を示す。さらに高温側にある融点は 828K である。

CuI は γ 相から不動イオンが面心立方構造を示す α' 相 (SIC 相) に 1 次転移する。融点は 878K である。Ag と Cu の混晶にはそれぞれの構造が混合状態にある $\gamma + \alpha$ 、 α' や $\alpha + \alpha'$ 相の存在が混晶の電気伝導率⁽³⁾等の平均的物性面、言い換えれば、静的な構造から研究されている。

最近になって我々は $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ の ^{63}Cu - NMR によるスピン-格子緩和時間測定を行っており (Fig.2 参照)、混晶におけるローカルサイトの動的な構造についても明らかになりつつある。そこで、本研究の目的は、分子動力学計算を AgI と CuI の混晶にまで発展させ、イオンの運動をシミュレートすることにより、NMR より得られた結果を理論的に解析することである。

分子動力学計算、緩和時間、シミュレーション、超イオン導電体、相転移

いだともりの、ひらいあつき、きむらじゅんこ、にしだてかずめ、みずのもとひろ、えんどうかづな、すはらまさひこ

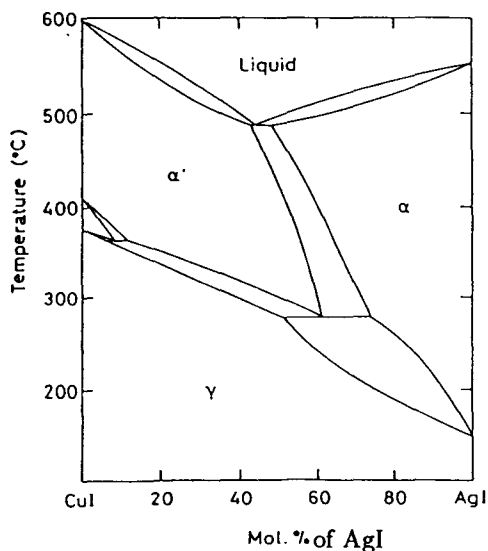


Fig.1 Phase diagram of Tde AgI-CuI system. (2)

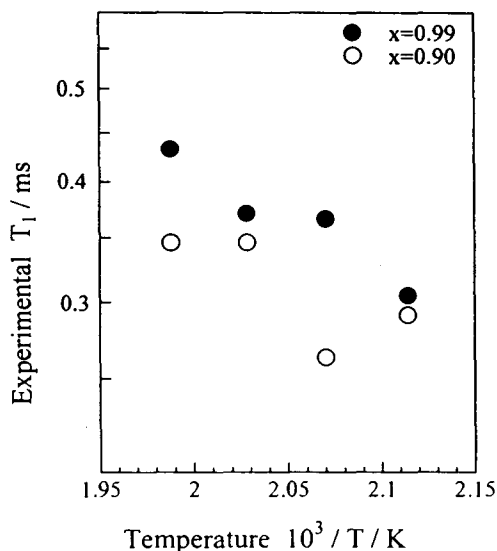


Fig.2 Temperature dependence of Tde ^{63}Cu - NMR relaxation time, for $x = 0.99$ and 0.90 in $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$.

【分子動力学計算】

今回用いた分子動力学計算 (以下 MD 計算) には速度ベルレアルゴリズムを採用した。ポテンシャルはソフトコアポテンシャル (4) を基礎として、

$$\Phi_{ij}(r) = \epsilon \left(\frac{\sigma_i + \sigma_j}{r} \right)^n + \frac{Z_i Z_j (fe)^2}{r} \quad (1)$$

を用いた。ここで、 ϵ はソフトコアの寄与の大きさを 0.05 とした。 $\sigma_{i,j}$ は各イオンのソフトコア半径で、各々 $\sigma_I = 2.2$ 、 $\sigma_{Ag} = 0.63$ 、 $\sigma_{Cu} = 0.50$ とした。 Z はイオンの電荷で、 f は共有結合性を考慮した有効電荷係数であり 0.6 とした。初期設定として、格子定数は AgI α 相の 5.08 \AA とし、単位セル当たり 4 イオンを $5 \times 5 \times 5 = 125$ セル、計 500 粒子を設定し、周期的境界条件でつないだ。計算は 1 step を 9.28 fsec として 10 万 step 行い、各 step ごとに注目粒子の位置を決定した。

【Tetrahedral(Td) 格子間ホッピングモデル】

Fig.3 に X 線構造解析より得られた AgI の α 相における結晶構造を模式的に示す。

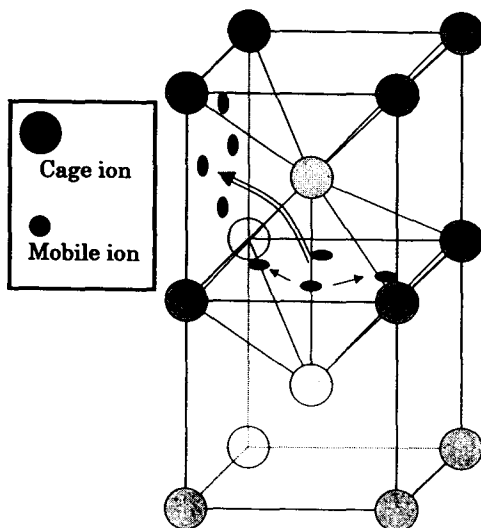


Fig.3 Hopping model among Td or Oh lattices.

不動イオン (I^-) が bcc 構造を成し、移動イオン (Ag^+ またはドーブされた Cu^+) が bcc 面上の 4 点に安定位置を占めており、この内の

いずれかに存在している。この存在位置はどこも不動イオンが作る4面体の中心にあり、高温になると隣接する4面体格子(Td格子)間を跳び移ることで拡散していると考えられている。

ここで、移動イオンが拡散する途中においてTd格子内に滞在している間エネルギーのやり取りを行い緩和していくモデルを仮定する。よって、各移動イオンのTd格子内滞在時間を相関時間に相当するとして、MD計算結果から相関時間を見積もった。

Fig.4に500KにおけるAg⁺イオンの相関時間(Td格子内滞在時間)の分布を示す。相関時間は単一の値に集中するわけではなく、ある程度の範囲を持って緩やかに分布していることが分かる。このことから通常単一相関時間から得られるB.P.P.の式にはあてはまらず、相関時間分布を持つ多相関時間による緩和時間シミュレーションが必要となる。

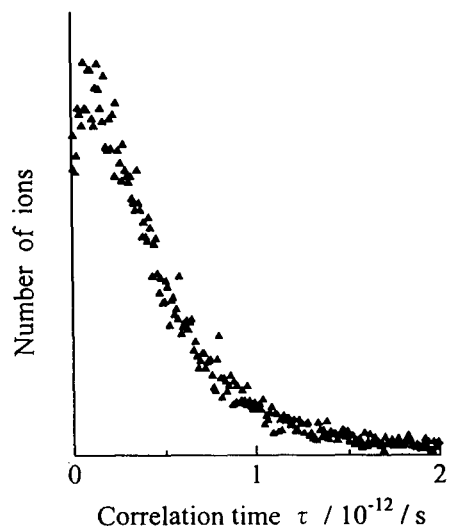


Fig.4 Distribution of a calculated correlation time at 500K from Td lattice hopping model.

【多相関時間による緩和時間】

移動イオンはTd格子内の中心から十分速い速度で隣接するTd格子に跳び移るとし、また、スピンは格子内でランダムに配向しているとすると、相関関数は配向部分と時間部分が平均化

され相関時間のみの関数になる。従って、相関関数 $f(\tau)$ を以下のように表すことが出来る。

$$f(\tau) = \overline{Rm(\tau, t)} G(\tau) \quad (2)$$

ここで、 $\overline{Rm(\tau, t)}$ は配向・時間部分の平均で $G(\tau)$ は相関時間部分である。

多相関時間の場合においても個々の粒子が感じる相関は指数関数によって特徴付けられると考えると、

$$G(\tau) = \int d\tau_i g(\tau_i) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_i}\right) \quad (3)$$

となる。ここで、 $g(\tau)$ は相関時間の分布関数であり、単一相関時間 τ_c の場合、 $g(\tau) = \delta(\tau - \tau_c)$ となり、通常の相関関数と等しくなる。

緩和時間の逆数は相関関数のフーリエ変換に比例するので、

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &\propto \int d\tau f(\tau) \exp(-i\omega\tau) \\ &= \int d\tau \overline{Rm} \int d\tau_i g(\tau_i) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_i}\right) \exp(-i\omega\tau) \\ &= \overline{Rm} \int d\tau_i g(\tau_i) \frac{2\tau_i}{1 + (\omega\tau_i)^2} \end{aligned} \quad (4)$$

と表すことが出来る。この関係を用いてMD計算より得た相関関数の分布から緩和時間をシミュレートした。

【Td格子モデルによる計算結果】

多相関時間の緩和時間シミュレーションから得られた緩和時間の温度変化をFig.5に示す。この図より計算による緩和時間には温度変化がないことが分かる。しかし、Fig.2に示したように、NMRの緩和時間の温度変化はアレニウスの活性化プロセスとして理解でき、約7kJ/molと得られており計算結果とは一致しない。この結果について移動イオンの平均二乗変位から考察すると、 α 相における隣接Td格子間距離がすでに格子振動的範囲に入っており、相内の格子振動と拡散の寄与が分離できていないためだと考えられる。

以上のような結果より、隣接するTd格子中心間の距離が短いために、バックグラウンドとしてある格子振動の寄与が分離できないので、より大きな格子間の跳び移りモデルを考える必要がある。

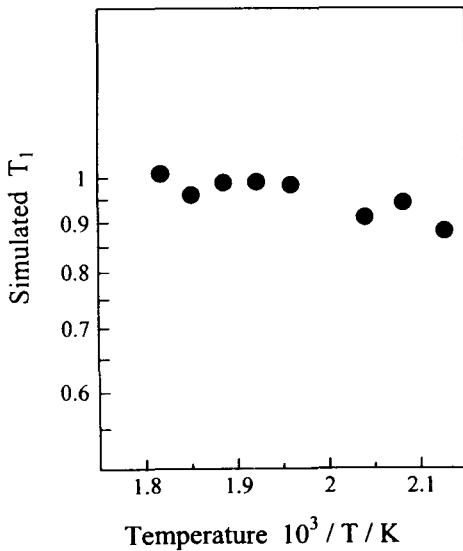


Fig.5 Temperature dependence of a simulated relaxation time by Td lattice model, without considering $\overline{Rm}(r, t)$.

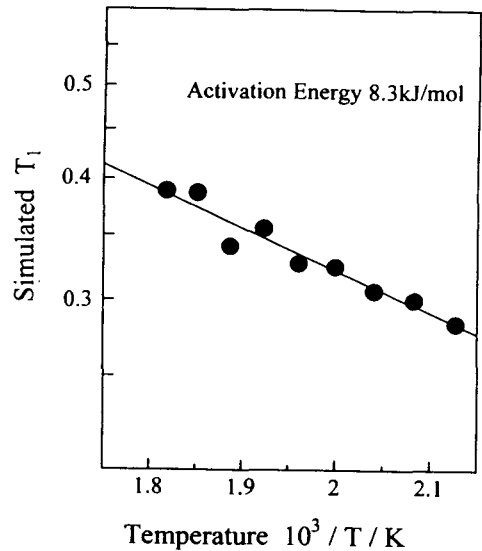


Fig.6 Temperature dependence of a simulated relaxation time by Oh lattice model, without $\overline{Rm}(r, t)$.

【Octahedral(Oh) 格子間ホッピングモデル】

4つの隣接するTd格子中心はいずれも等価なサイトであるため、格子振動的規模により十分速い跳び移りの存在が拡散との差を見せないことが分かった。従って、この4サイトを平均化して一つの格子と見なすことによって、拡散の寄与を見いだせるのではないかと考えた。そこで、Fig.3に戻ってみると、移動イオンは4つのサイト跳び移りから他の4サイトへジャンプするモデル、つまり、4つのTd格子が作るOh格子間を跳び移っているモデルを仮定する。

計算方法はTd格子間のときと同様に行い、相関時間の分布を見積もり、緩和時間をシミュレートした。

結果をFig.6に示す。図より、緩和時間の温度変化を活性化エネルギーとして見積もると、8.3kJ/molとなった。これは実験結果と良く一致しており、緩和時間の熱的挙動を十分うまく再現できていると考えられる。

【考察】

Td格子間ホッピングモデルでは相内でバックグラウンドとして存在する格子振動と、緩和時間の温度変化に寄与している拡散が十分に分離できないことが分かった。そこで、Oh格子間ホッピングモデルを導入することで、 α 相における $Ag_xCu_{1-x}I$ の緩和時間がうまくシミュレートできた。この結果から α 相における緩和時間は、Td格子間の跳び移りをベースとして、より離れたサイトへの跳び移りが多くなることで温度変化を示すことが分かる。

モデルとしてNMR測定が困難な Ag^+ の緩和を、濃度1%の混晶中の Cu^+ を通じて考察したが、同様な計算方法を用いてより高濃度の Cu^+ をドーブした系についても計算を行った。

【参考文献】

- (1) 上田顕、金子豊 日本物理学会誌 **40** (1985) 866
- (2) J.Nölting: Ber.Bunsenges. Phys. Chem. **68** (1964) 932.
- (3) M.Kusakabe, Y.Shirakawa, S.Tamaki and Y.Ito. J. Phys. Soc. Jpn. **64** (1995) 170
- (4) P.Vashishta and A.Rahman. Fast Ion Transport in Solids (1979) 527

SIMnD : A pulse sequence simulation system for education and development of NMR
 Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science¹, Department of Physics, Meiji Univ.²
Masashi Yokochi¹, Masami Kusunoki², Fuyuhiko Inagaki¹

Abstract

The SIMnD is a software library written in C language which allows to calculate time evolution of the density matrix according to a pulse sequence written by user. The pulse sequence program is composed of functions which are provided by the library. The user is free from actual preparation of calculation and just code a desired pulse sequence, which is then linked to the SIMnD library. The system includes complex relaxation processes such as TROSY and cross-correlation effect as well as ordinary NMR pulse techniques of phase cycling and pulse field gradient. The SIMnD system is a helpful tool for beginner's education, occasional trouble shooting of a pulse sequence and efficient design of new experiments of NMR.

Methods

私たちはSIMnDと呼ばれるパルス系列を模擬するシステムを開発した。このシステムの特徴はパルス系列と煩雑な密度演算子の計算の準備及び実行領域を完全に分けたことにある。パルス系列はライブラリの用意する関数で組み立てられるため、実際の分光器のパルス系列によく似ている。パルス系列プログラムは単純な構造をもちながら、ライブラリの選択により様々な計算に対応できる。

現在SIMnDは、2,3,4スピン系にそれぞれ対応している。システムの用意する計算は1D,2D,3DのFIDを取得するための時間領域(Time-Domain)実験とパルス系列の励起プロファイルを取得するための周波数領域(Frequency-Domain)実験である。またパルス系列の任意の時刻における密度行列をCartesian, Multi-Quantum, Polarizationのそれぞれの基底に分けて表示することが出来る。

用意されるライブラリ関数は基本的なパルス技術である位相回し、磁場勾配パルスに対応している。ハミルトニアンは自由に設定できるためJ結合の強弱を問わない。また緩和行列を生成して緩和現象を扱えるようにした。得られたFID及びFFT処理データ、励起プロファイルデータはシステムの提供するviewerプログラムで表示可能である。(Xlib及びOpenLook[*]を使用する)

プログラムの公開予定はポスター会場にて掲示する。

[*] XlibはX端末上で、OpenLookはSunのワークステーション上で表示可能

[Available calculation in the SIMnD system]

- Spin System 2, 3, 4 spin system (Hetero, Homo)
- Output Form Time Domain 1D/2D/3D FID
- Frequency Domain 1D/2D/3D exciting profile

[Basic profile of the SIMnD system]

- Base of Operator ✓ Cartesian, ✓ Multi-Quantum, ✓ Polarization
- Phase Cycling ✓ Pulse Phase, ✓ Quadrature Detection
- J-coupling ✓ weak, ✓ strong
- PFGz ✓ selection, ✓ elimination
- Relaxation ✓ Dipolar Coupling, ✓ Chemical Shift Anisotropy, ✓ cross-correlation between interactions

key word : density matrix

ふりがな : よこちまさし、くすのきまさみ、いながきふゆひこ

Gauge-origin Independent Relativistic Effects on Nuclear Magnetic Shieldings

Kitami Institute of Technology

○ T. Baba, H. Fukui

The gauge-origin independent expression for the relativistic nuclear magnetic shieldings was derived from the Douglas-Kroll transformation of the no-pair equation and the use of the gauge including atomic orbitals (GIAOs) proposed by London. Using our expression the relativistic spin free effect on the nuclear magnetic shieldings was evaluated for the four hydrogen halide molecules, HF, HCl, HBr, and HI, with uncontracted Cartesian Gaussian-type basis sets at the coupled Hartree-Fock (CHF) level. It was found that the GIAO-CHF results are very similar to the shielding values calculated with the fixed gauge origins at the halogen nuclei. The calculated results showed that the spin independent relativistic effect produces high-field shifts in the hydrogen halide protons. However, the computed spin free effect was too small to interpret the very large upshield shifts observed in HBr and HI molecules.

The results of our relativistic and nonrelativistic calculations for the nuclear magnetic shielding constants are presented in Tables I and II.

TABLE II. The proton chemical shifts (in ppm) of hydrogen halides relative to the HF proton shielding constant. The positive sign of the chemical shifts indicates a high-field shift.

	HCl	HBr	HI
Nonrela. calc.	2.08	2.39	2.62
Rela. calc.	2.17	3.06	4.95
Observed ^a	2.95	6.85	15.75

^a Reference [2].

References

- [1] H. Fukui and T. Baba, *J. Chem. Phys.* **108**, 3854 (1998).
- [2] W. G. Schneider, H. J. Bernstein, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **28**, 601 (1958).

Keyword: nuclear magnetic resonance, chemical shift, relativistic effects, gauge-origin independence, GIAO

○ばば たけひさ, ふくい ひろゆき

TABLE I. Relativistic and nonrelativistic nuclear magnetic shieldings (in ppm) in the four hydrogen halides of HF, HCl, HBr, and HI.

Molecule ^a	Basis set ^b	Nucleus		Nonrela.	Rela.	Rela. – Nonrela.
HF	(13s8p3d/7s2p)	F	σ_{\perp}^d	461.1	464.5	3.4
			σ_{\perp}^p	-81.7	-83.5	-1.7
			σ_{\perp}	379.3	381.0	1.7
			σ_{\parallel}	481.9	485.5	3.5
			σ_{iso}	413.5	415.8	2.3
		H	σ_{\perp}^d	18.94	18.97	0.02
			σ_{\perp}^p	1.96	2.06	0.10
			σ_{\perp}	20.91	21.03	0.13
			σ_{\parallel}	44.08	44.08	0.00
			σ_{iso}	28.63	28.72	0.08
HCl	(15s12p6d/7s2p)	Cl	σ_{\perp}^d	1144.2	1172.3	28.1
			σ_{\perp}^p	-293.6	-307.2	-13.7
			σ_{\perp}	850.6	865.0	14.4
			σ_{\parallel}	1149.1	1177.2	28.1
			σ_{iso}	950.1	969.1	19.0
		H	σ_{\perp}^d	22.28	22.32	0.04
			σ_{\perp}^p	1.01	1.23	0.22
			σ_{\perp}	23.30	23.56	0.26
			σ_{\parallel}	45.56	45.53	-0.02
			σ_{iso}	30.72	30.88	0.17
HBr	(17s13p8d4f/7s2p)	Br	σ_{\perp}^d	3119.5	3455.1	335.6
			σ_{\perp}^p	-717.7	-890.6	-172.9
			σ_{\perp}	2401.8	2564.5	162.7
			σ_{\parallel}	3126.2	3462.3	336.1
			σ_{iso}	2643.2	2863.8	220.5
		H	σ_{\perp}^d	18.03	18.20	0.17
			σ_{\perp}^p	3.83	4.87	1.04
			σ_{\perp}	21.86	23.07	1.21
			σ_{\parallel}	49.36	49.20	-0.16
			σ_{iso}	31.03	31.78	0.75
HI	(19s15p12d8f/7s2p)	I	σ_{\perp}^d	5502.2	7479.0	1976.7
			σ_{\perp}^p	-1447.3	-2648.6	-1201.3
			σ_{\perp}	4055.0	4830.4	775.5
			σ_{\parallel}	5504.6	7481.8	1977.1
			σ_{iso}	4538.2	5714.2	1176.0
		H	σ_{\perp}^d	16.68	17.09	0.41
			σ_{\perp}^p	4.13	7.43	3.30
			σ_{\perp}	20.81	24.53	3.71
			σ_{\parallel}	52.14	51.94	-0.19
			σ_{iso}	31.25	33.66	2.41

^a Used bond lengths are given in Ref. [1].

^b Uncontracted bases are used. The Gaussian exponents are presented in Ref. [1].

C13-NMR、Vamp、MOPACによるCre、Crn 及び関連化合物の変換機構の解明

(味の素(株)中央研究所) ○大竹亮子、島圭吾、海老沢計慶、高橋三雄、
鈴木榮一郎、井澤邦輔

C13-NMR study on Structure transformation mechanism between Cre and Crn with theoretical calcs.(Vamp&MOPAC), and its application to their derivatives

R. Ohtake, K. Shima, K. Ebisawa, M. Takahashi, E. Suzuki*, and K. Izawa

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

It is well known that there exists equilibrium between Cre and Crn in aq.soln. and the ratio of [Cre] to [Crn] is influenced by pH. However, the further explanation can not be found. In this study, the mechanism of the structure transformation between Cre and Crn was investigated. Additionally, on the basis of this investigation, it was found that MEHIYA, in aq.soln., is less stable than MOIMYS. The details are described as follows; 1) It was clearly found that the equilibrium of Cre-Crn was influenced not only by pH, but also by temperature. 2) During the pH titration under room temperature, the C13-NMR chemical shift of the Cre N-CH₃ signal (ca.39ppm) was constantly different from that of Crn (ca.32ppm). This finding was useful for structure discrimination of MOIMYS or MEHIYA. 3) By using Vamp and MOPAC, the calculated values were obtained, which well correspond to the experimental results, except for quaternary carbons.

【序】

クレアチンとクレアチニンは、共に自然界に存在する良く知られたアミノ酸類である。理化学辞典*¹における記載では、両者は互いに平衡関係にあり、存在比は、主として、酸性下ではCrnに、そして、アルカリ性下ではCreに偏ると記されているが、その詳細については触れられていない。そこで、今回、1) Cre,Crnの相互変換の仕組みをより詳細に解明し、2) その結果を同種の骨格を有する MOIMYS、MEHIYAの構造変換機構の解明に役立てる事ができた。更に、これら一連の化合物群に関し、C13-NMR化学シフト値予測プログラム (Vamp) やエネルギー計算 (MOPAC) を用いて実測値の傾向を考察したので、その結果を含め、ここに報告する。

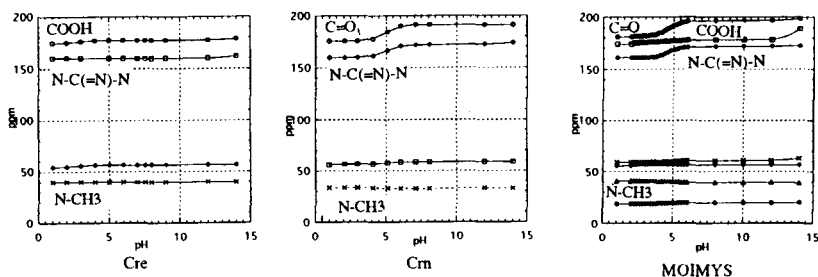
【方法】

1. Cre及びCrnのC13-NMRを、pHを変えた種々の条件下で測定する。
2. Vampにより、Cre、Crn及びMOIMYS、MEHIYAのC13-NMR化学シフト値を計算し、各々の実測値と比較評価する。
3. MOPACにより、エネルギー計算を行い、実測値の ΔH 値と比較検討する。

【結果と考察】

1.pH 滴定実験、加熱実験

Cre及びCrmについて、pH滴定実験、加熱実験を行ったところ、25℃では広いpH領域において安定、且つ、60℃以上で相互変換を生じる事が分かった。また、25℃でpHを変えたC13-NMR測定を行った結果、互いに異なる特徴的な滴定曲線を示す事が分かった。更に、これらの結果に基づき、MOIMYS、MEHIYAに関するC13-NMRによるpH滴定曲線の特徴を説明する事ができ、更に、それにより2つの異性体の構造を確認する事が出来た。



The pH titration of Cre, Crm and MOIMYS by C13-NMR

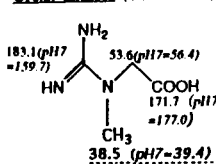
2.C13-NMR 化学シフト値予測 プログラム：Vampによる化学シフト計算

これら一連の化合物について、C13-NMR化学シフト値予測を行った結果、四級炭素を除き、大略、各々の実測値の傾向をよく説明出来た。

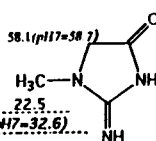
3.MOPACによるエネルギー極小化計算

MOIMYS、MEHIYAの各種コンフォーマーについて、エネルギー極小化計算を行い、各々の実測結果をよく説明する事が出来た。更に、それにより、NMR上、MOIMYSでは2種類 (*syn-anti*) の、そして、MEHIYAでは1種類のみコンフォーメーションが観測されるという実験事実を説明する事ができた。

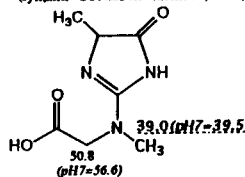
Cre(2) extended (non-extended)



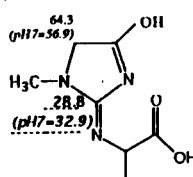
Crm(2) keto (enol)



MOIMYS(4) anti- CONH- extended (syn,anti- CONH,NH- extended, non-)



MEHIYA(6) syn- enol- extended (syn,anti- keto, enol- extended, non-)



The comparison of the experimental results (pH7) with the calculated values by using Vamp

* () shows the experimental results

注 (略語表)

MOIMYS : N- (4- methyl- 5- oxo- 1- imidazolin- 2- yl) sarcosine

MEHIYA : N- (1- methyl- 4- hydroxy- 3- imidazolin- 2, 2- ylidene) alanine

参考文献 *1 : p372, 理化学辞典 (第3版増補版), 岩波書店

キーワード：クレアチニン、クレアチン、エネルギー計算、化学シフト値予測、化学平衡

〇おたけりょうこ、しまけいご、えびさわかずよし、たかはしみつお、すずきえいいちろう、いざわくにすけ

合成高分子ゲルによる磁化移動コントラスト法の基礎的研究

(¹岐阜大・医・生理, ²岐阜大, ³京都府立医大・放射線医学, ⁴愛知県ガンセンター・放射線治療部, ⁵藤田保衛大・衛生)

○恵良聖一¹, 曾我美勝², 紀ノ定保臣³, 松島秀⁴, 内山幸男⁴, 加藤一夫⁵, 永井直樹¹

Magnetization Transfer Characteristics in Synthetic Copolymer Gels

(¹Dept. of Physiol., Gifu Univ. Sch. of Med., ²Gifu Univ., ³Dept. of Radiol., Kyoto Prefect. Univ. of Med., ⁴Dept. of Radiation Oncol., Aichi Cancer Center Hosp., ⁵Dept. of Health Sci., Fujita Health Univ.)

OS. Era¹, M. Sogami², Y. Kinosada³, S. Matsushima⁴, Y. Uchiyama⁴, K. Kato⁵, N. Nagai¹

We have found that the cross-relaxation times ($T_{1S}(H_2O)$) from irradiated protein to observed water protons are greatly reduced on protein solution→gel transition. To study the effects of bound water on $T_{1S}(H_2O)$ values, we measured $T_{1S}(H_2O)$ values for synthetic copolymer gels (soft contact lenses, SCLs), such as SCL(HEMA, GMA), SCL(HEMA, N-VP), SCL(GMA, N-VP, MMA) and SCL(N-VP, MMA), where HEMA, GMA, N-VP and MMA are hydroxyethyl methacrylate, glyceryl methacrylate, *N*-vinyl-2-pyrrolidone and methyl methacrylate, respectively.

Plots of $1/T_{1S}(H_2O)$ values vs. dry weight (W(%)) for SCL(HEMA, GMA) (●), SCL(HEMA, N-VP) (◐), SCL(GMA, N-VP, MMA) (□) and SCL(N-VP, MMA) (○), shown in Fig. 2A (f_2 , 2.40 ppm), indicated significant differences in the steepness among them compared with small differences shown in Fig. 2C (f_2 , -13.52 ppm). It is worth to note that the order of the steepness in plots of $1/T_{1S}(H_2O)$ vs. W(%) is SCL(HEMA, GMA) = SCL(HEMA, N-VP) > SCL(GMA, N-VP, MMA) > SCL(N-VP, MMA). The above evidences may suggest that the results in Figs. 2A and C are probably attributed to the underlying magnetization transfer mechanism, that is, bound water-weighted and molecular size-weighted magnetization transfer phenomena, respectively.

キーワード ; 高分子ゲル, 水性状, 磁化移動, 分子間交差緩和

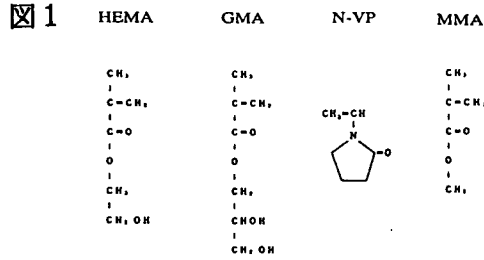
えら せいいち, そがみ まさる, きのさだ やすとみ, まつしま しげる, うちやま ゆきお, かとう かずお, ながい なおき

【はじめに】 hydroxyethyl methacrylate (HEMA), glyceryl methacrylate (GMA), *N*-vinyl-2-pyrrolidone (N-VP), methyl methacrylate (MMA) などのモノマーは通常ソフトコンタクトレンズ (SCL) を製造する際の素材として使われている。これらモノマーのブロックコポリマーで、モノマー組成及び含水率の異なった4種類の合成高分子ゲル、即ち SCL(HEMA, GMA), SCL(HEMA, N-VP), SCL(GMA, N-VP, MMA), SCL(N-VP, MMA)を用いて、それらゲル内の水分子の $T_1(H_2O)$ 及び分子間交差緩和時間($T_{IS}(H_2O)$) [1]を測定し、種々の f_2 照射部位より水分子への飽和移動 (磁化移動) の機序について研究した(500 MHz 1H -NMR)。さらに、それら合成高分子ゲルの磁化移動比(magnetization transfer ratio, MTR)による MR 画像を 1.5 T の MRI 装置 (GE 社製, Signa Advantage) によって撮像し、上述の NMR による結果と比較検討した。

【材料と方法】 今回の研究に使用した合成高分子ゲル(SCLs) (日本メニコン社より供与) を構成するモノマーの構造式を図 1 に、また合成した各種高分子ゲルのモノマー組成および含水率を表 1 に示す。これらの SCLs を円柱状に加工し、内径 1.1 mm の NMR 用ガラス細管に入れ、ロック用溶媒として DMSO- d_6 を入れた 5 mm ϕ の NMR 試料管に挿入し、測定に供した。 1H -NMR は Bruker 社製 AM 500 1H -NMR スペクトトメーターを用い、それぞれの試料の $T_1(H_2O)$, $T_{IS}(H_2O)$ を測定した。 $T_{IS}(H_2O)$ は水シグナルより 2.40, -8.73, -13.52 ppm を $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz で f_2 照射し, inversion recovery 法により測定した [1]。一方 MTR による MR 画像の撮像には、直径約 15 mm の円柱状に加工した各種 SCLs(それぞれの SCLs の組成および含水率を図 3 A に示す)を用い、マトリックス = 256 x 192, 積算回数 = 2, MT 計測用 SPGR として MT パルス = 18 msec, offset = -94.0 ~ 94.0 ppm の撮像条件にて行った。

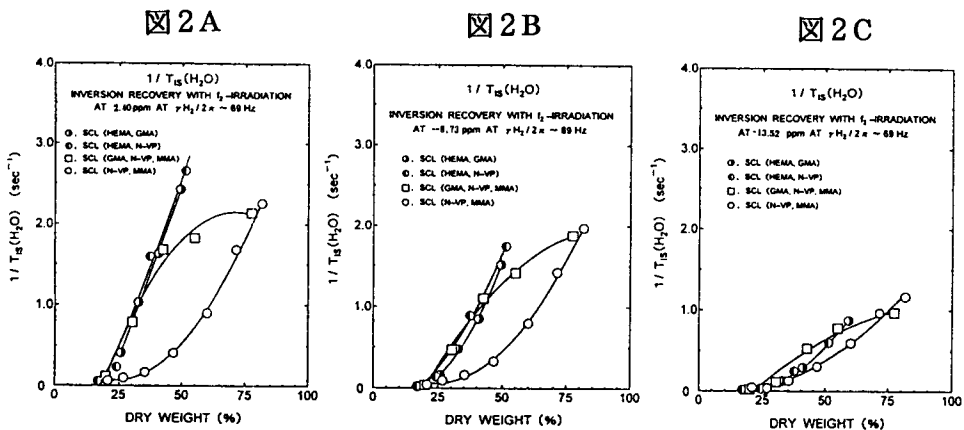
Table 1
weight percents of monomers and water content (%) in synthetic block copolymer gels

	HEMA	GMA	N-VP	MMA	Water content(%)
SCL(HEMA, GMA)	23.7	75.9	-	-	74.2
	45.3	54.4	-	-	67.2
	65.0	34.7	-	-	59.2
	83.1	16.6	-	-	50.6
	99.7	-	-	-	40.8
SCL(HEMA, N-VP)	19.9	-	79.8	-	83.1
	39.9	-	59.8	-	76.0
	59.8	-	39.9	-	62.7
	79.8	-	19.9	-	48.7
SCL(GMA, N-VP, MMA)	-	41.7	52.3	5.5	80.1
	-	37.0	48.3	16.3	69.7
	-	32.3	40.4	26.9	57.5
	-	27.7	34.6	37.3	45.0
	-	21.0	26.2	52.5	22.6
SCL(N-VP, MMA)	-	-	87.9	4.1	79.2
	-	-	78.9	13.1	73.2
	-	-	69.9	22.1	64.7
	-	-	60.9	31.1	53.3
	-	-	51.9	40.1	40.0
	-	-	42.9	49.1	28.5
	-	-	33.9	58.1	18.4



【結果と考察】 それぞれの SCL の含水率は、モノマー組成の組み合わせとその比率を変えることによって変化させ得る（表 1）が、その結果個々の SCL 内の高分子と水分子との相互作用も種々異なることが容易に予想される。図 1 の構造式からも明らかのように、SCL の素材のモノマーである HEMA, GMA は分子内に OH 基を有し、また N-VP は溶液中で開環し、OH 基が生じる。従って SCL(HEMA, GMA)や SCL(HEMA, N-VP)は親水性コポリマーゲルであり、ゲル内の水分子との相互作用も他の SCL より強い。一方 MMA の分子内に OH 基は存在せず、疎水性の $-\text{CH}_3$ 基が多数存在している。従って SCL(N-VP, MMA)は疎水性コポリマーゲルの性質を有し、SCL(GMA, N-VP, MMA)はそれらの中間であろうと考えられる。

交差緩和時間測定、即ち $1/T_{1S}(\text{H}_2\text{O})$ vs. 乾燥重量 (W%) プロットでは、比較的水シグナルに近い 2.40 ppm を f_2 照射した場合、図 2A に示すように、 $1/T_{1S}(\text{H}_2\text{O})$ 値のプロットは SCL の種類によって大きく異なった挙動を示す結果が得られた。即ち含水率が同じゲルでも、SCL の種類によってその $1/T_{1S}(\text{H}_2\text{O})$ 値には大きな相違があり、2.40 ppm を f_2 照射して得られた $1/T_{1S}(\text{H}_2\text{O})$ 値は、親水性コポリマーゲルと疎水性コポリマーゲルとの相違、即ち両ゲル内の水分子の挙動の相違を大きく反映していると考えられる。ところがこのような傾向は、 f_2 照射部位が -8.73 ppm (図 2B)、 -13.52 ppm (図 2C) というように、水シグナルから遠ざかるにしたがって小さくなり、約 -20 ppm 以降は SCL のモノマー組成の相違によらず、同一直線上にのるようになった (図は示さず)。



また図3に示すように、1.5 T の MRI 装置による MTR-MR 画像でも、組成は異なるが含水率がほぼ同様の4種類のSCL (SCL(HEMA, GMA) (含水率, 58.0%); SCL(HEMA, N-VP) (61.0%); SCL(GMA, N-VP, MMA) (59.0%); SCL(N-VP, MMA) (55.0%); 図中の黒枠のSCL)の場合、水シグナルより4.70 ppmでの f_2 照射(図3B)では、含水率がほぼ同様であるにもかかわらず、それぞれのSCLの画像コントラストには明らかな差がみられるが、水シグナルよりかなり離れた47.0 ppmでの f_2 照射(図3C)による画像コントラストにはほとんど差が認められなかった。

以上のようなNMR及びMRIの結果から、水シグナルに比較的近い部位での f_2 照射による飽和移動は主に結合水の寄与を反映し、一方それよりかなり離れた部位での f_2 照射による飽和移動は主に高分子などの分子サイズの寄与を反映した磁化移動機序であることが示唆された。

図3A モノマー組成と含水量 (%)

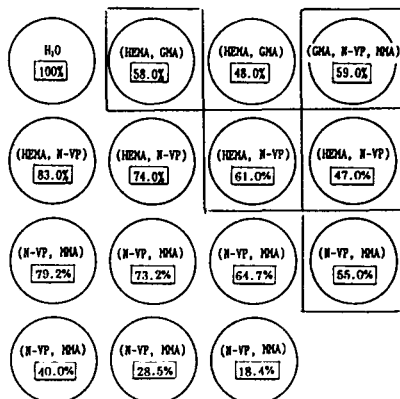


図3B

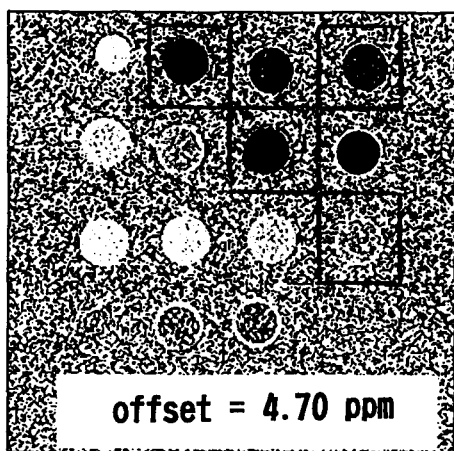
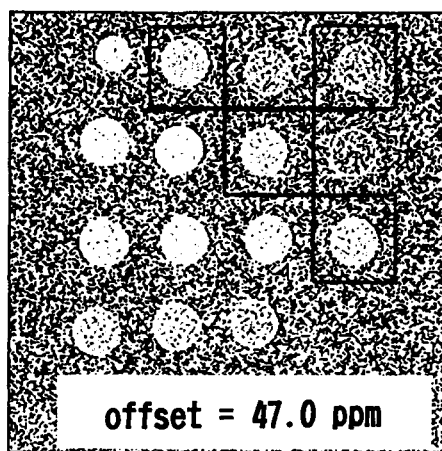


図3C



参考文献

- [1] Akasaka, K. (1981) J. Magn. Reson. 45, 337-343; Akasaka, K. (1983) ibid. 51, 14-25;
Akasaka, K., Ishima, R. and Shibata, S. (1990) Physica B 164, 163-179

誘電共振の画像信号に及ぼす影響

○湯川 泰宏、入口 紀男、上野 照剛

東京大学大学院 医学系研究科 医用生体工学講座

The effects of dielectric resonance on signal intensities
in Magnetic Resonance ImagingYasuhiro Yukawa, Norio Iriguchi, and Shogo Ueno
University of Tokyo, Graduate School of Medicine

Abstract: Dielectric resonance causes specific inhomogeneities in magnetic resonance imaging (MRI). It has been considered that the characteristics of dielectric resonance are directly linked to the permittivity ϵ_r of the object. However, we assume that the effects of dielectric resonance on image signal intensities appear to be related to the rotatability of electrical dipoles rather than to the permittivity ϵ_r . Using spherical phantoms of distilled water, saline solution, glycerin, and mineral oil, we carried out experiments with a 7.05-T, 18.3-cm system. Water exhibits dielectric resonance inhomogeneities. Glycerin and mineral oil doesn't exhibit inhomogeneities.

1 : はじめに

磁気共鳴イメージング (MRI) において、画像の不均一は重要な問題の一つである。信号強度の不均一の主な原因としては、静磁場 (B_0 磁場) の不均一性、RF (Radio Frequency) 磁場 (B_1 磁場) の不均一性、被検査体の磁化率 (susceptibility) の分布によるアーチファクトなど種々存在する。特に高磁場においては、誘電共振 (dielectric resonance) を原因とする画像の不均一性が見られる^{[1],[2]}。誘電共振は、被検査体の寸法が RF パルスの波長の 1/4 に近づくとときに生じると考えられ、volume resonance と呼ばれていた。物質内の波長は誘電率 ϵ の平方根に反比例する。生体を構成する重要な物質である水は比誘電率が大きく (約 80)、生体を対象とする MRI において誘電共振を原因とする画像の不均一は無視できない。そこで我々は、比誘電率の異なる水、食塩水、グリセリン、およびミネラルオイルについて、7.05-T、口径 18.3-cm の装置を用いて実験を行い、誘電共振を原因とする画像の不均一性について検討した。

キーワード: MRI, dielectric resonance, electrical dipole

ゆかわやすひろ、いりぐちのりお、うえのしょうごう

2：誘電共振を原因とする画像の不均一性

被検査体を均一な B_1 磁場が貫くとき、被検査体内には誘導電界 E が発生する。たとえば、球形の被検査体では、電界 E は B_1 磁場に対して垂直かつ同心円状に発生し、被検査体の中心部でゼロ、周縁部で最大の大きさをもつ。また、電界 E は、 B_1 磁場と同じ、ラーモア (Larmor) 周波数に近い周波数をもつ高周波振動電界である。水分子は、正と負の微小な電荷をもつ電気双極子 (electrical dipole) であるので、この振動電界 E によって電氣的に回転・振動する。水分子の振動電界 E による回転・振動は、被検査体の中心部では磁気スピン (^1H) に対して励起エネルギーとなり、周縁部では水分子の回転・振動エネルギーとなるために、励起の不均一が同心円状に生じることになり、画像の不均一性となって現れるものと考えられる。

3：実験方法

7-T・18.3cm MRI システムを用いて、純水、食塩水 (5.0%、20%)、グリセリン、ミネラルオイルの球形ファントム (直径各 36mm) の撮像を行った。撮像シーケンスは、スピンエコー法 ($T_r=6000\text{ms}$ 、 $T_e=6\text{ms}$) を用いた。撮像断面は、RF パルスに対して垂直方向とした。

4：実験結果

図 1 は純水の MRI 画像である。中心部に比べて周縁部の信号強度が低いことがわかる。

図 2 は、純水の MRI 画像である。RF パルス強度を左上から右下方向に、順次大きくして撮像したものである。励起角 α が 180° であるとき画像は低信号となる。図 2 では、 180° を超えて順次大きな励起角を与えたものである。周縁部においては、中心部よりも常に励起角が小さく、誘電共振によるエネルギーロスが起きているものと考えられる。

20%食塩水では、 B_1 磁場に対して導電性による遮蔽効果がみられ、誘電共振による周縁部の励起抑制と導電性による中心部の励起抑制とは、球形ファントムのこの寸法 ($\phi=36\text{mm}$) では、食塩濃度としておよそ 5.0% で平衡した^[3]。

グリセリンおよびミネラルオイルでは、誘電共振による画像の不均一は見られなかった (図 3)。

図 4 はエネルギーの損失を示すものである^[4]。図 5 は誘導電界 E の分布を表すものである。誘電共振によるエネルギー損失は中心からの距離の 2 乗に比例するものと考えられる。

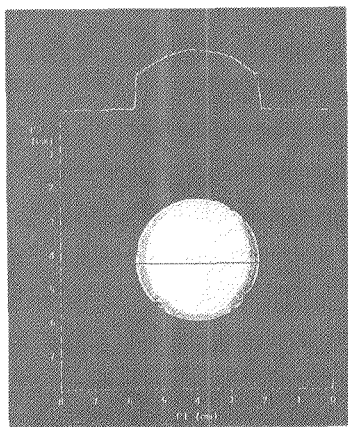


Fig. 1 : Pure water image($\alpha = 90^\circ$)

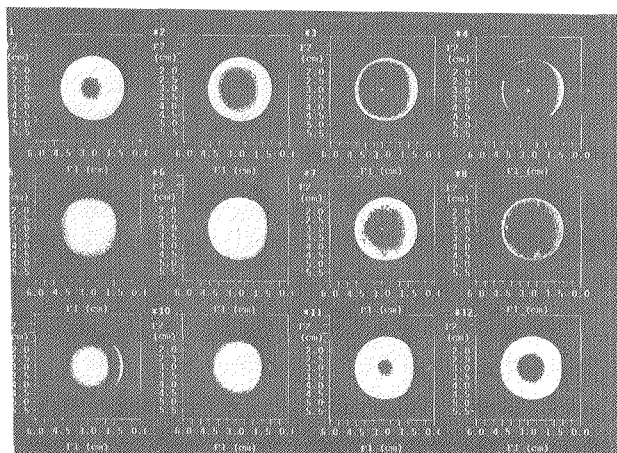


Fig.2 : Pure water images obtained with RF excitation power increased stepwise

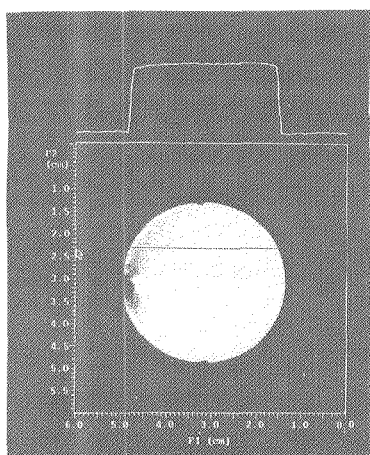


Fig.3 : Glycerin image

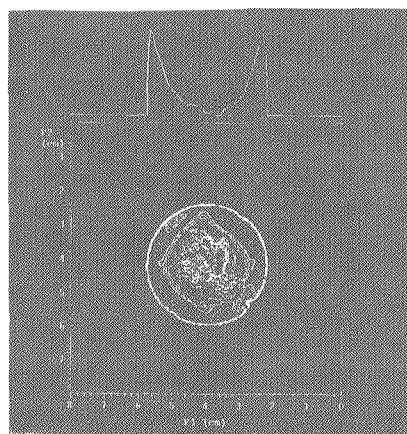


Fig.4 : Map of energy loss

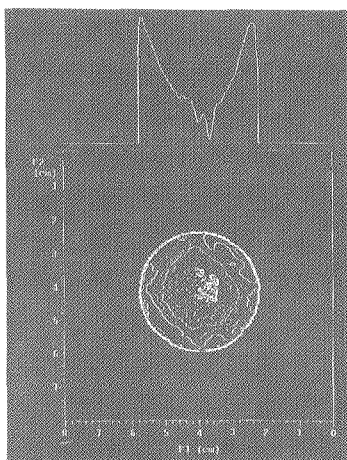


Fig.5 : Map of electrical field

5: 考察

誘電共振による画像の不均一に関しては、分子レベルでの物質の動態が、非常に重要な役割を果たすと考えられる。双極子モーメントをもっている物質（生体高分子や水）に外部電界を作用すると、双極子は電界の方向に配列し分極が起こる。外部電界が振動していれば、その周波数に応じて分子は回転・振動する。分極の大きさは、誘電率の実数部と虚数部によって決定され、この誘電率は外部電界の周波数に依存する。

B_1 磁場が均一であるとき、球状被検査体内に誘導される電界 E は、 B_1 磁場に対して垂直かつ同心円状に生じ、中心からの距離に比例し大きくなる。この振動電界 E によって極性をもつ水分子は電氣的に回転し、RF パルスのエネルギーは最終的に熱になると考えられる。その結果、フリップ角が減少すると考えられる。また、極性分子の回転運動によって、巨視的には大きな誘導電流 (dielectric currents) が流れると考えられる^[6]。誘電率が高く、電氣的極性をもつ水分子は、回転振動をおこしやすいと考えられる。一方、ミネラルオイルは誘電率が低く ($\epsilon < 3$)、また、グリセリンは低周波において誘電率が高いが、本実験においては 300MHz において誘導共振による不均一を示さなかった。この理由として、分子量が大きい (分子半径 r が大きい) ことと、分子レベルでの粘度 η が大きいことにより、誘電緩和時間 τ が長いために、双極子の回転が 300MHz の振動電界 E の変化に十分応答できなかったことが考えられる^[6]。

参考文献

- [1]:D. G. Gardian and F. N. H. Robinson, "Radiofrequency Losses in NMR Experiments on Electrically Conductive Samples", J.Magn.Reson, 34:449-455, 1979
- [2]:H. Bomsdorf, T. Helzel, D. Kunz, P. Roeschmann, O. Tschendel and J. Wieland, "Spectroscopy and Imaging with a 4 Tesla Whole-body MR System", NMR in Biomedicine, 1:151-158, 1988
- [3]:Y. Yukawa, N. Iriguchi, H. Mihara, and S. Ueno, "Shielding Effects of Conductive Samples in Magnetic Resonance", Book of Abstracts, 18th Meeting of ICMRBS, Tokyo, 1998
- [4]:H. Mihara, N. Iriguchi, Y. Yukawa, and S. Ueno, "Mapping of the Dielectric Resonance Distribution", Transaction of ISMRM Meeting, Sydney, 1998
- [5]:K. C. Ong, H. Wen, A. S. Chesnick, S. Duewell, F. A. Jaffer and R. S. Balaban, "Radiofrequency Shielding of Surface Coils at 4.0 T", JMRI, 5:773-777, 1995
- [6]: 上平恒・逢坂昭, 「生体系の水」 pp80-83, 講談社サイエンティフィク, 1989

P60 リアルタイム 3D-MRI 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 3D NMR Imaging System

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

Tomoyuki HAISHI, Katsumi KOSE

A real-time 3D NMR image reconstruction system was developed using two personal computers connected each other via 10 BASE-T ether-net. One is a reconstructor having a Pentium CPU (clock frequency 166 MHz) and the other is a image-processor with a Pentium II CPU (clock frequency 300 MHz). NMR imaging experiments were performed using this system with a 3D gradient echo sequence. The obtained results demonstrated a great promise of the real-time 3D-MRI system.

〈はじめに〉

これまで、データ収集と並行して画像再構成・表示する、いわゆる「リアルタイム MRI」は、いくつも報告されている⁽¹⁻⁴⁾。しかし、それらは、二次元断層面の撮像に限られており、三次元構造の実時間計測を達成したシステムは報告されていない。その原因は、3D データの収集時間の短縮が難しいこと、3D 画像処理専用システムの計測システムへの接続法および高速なボリューム可視化法が、確立されていない事などによるものと考えられる。以上の状況をふまえて、ピア・ツー・ピア・ネットワーク方式による相互接続が容易な、Windows95 搭載の PC を 2 台用いて、撮像および画像再構成と並行してボリューム・レンダリング法による表示を分散処理で行う、リアルタイム 3D-MRI 画像再構成・表示装置の構築を試みた。

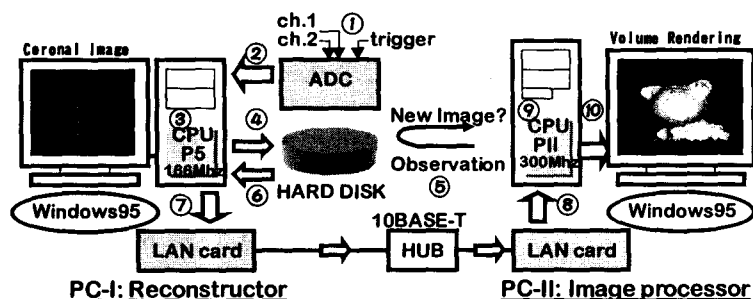


Fig.1. Real-time 3D-MRI system and its data flow

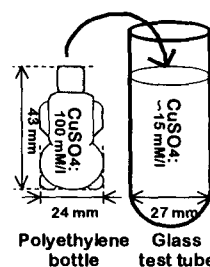


Fig.2. Water phantom

リアルタイム、3D、PC、レンダリング

はいしともゆき, こせかつみ

<リアルタイム 3D 画像再構成・表示装置>

Fig.1 に、開発したリアルタイム 3D 画像再構成・表示装置のブロック図とデータの流れを示す。システムは、ネットワーク・カードを搭載した 2 台の PC (PC-I: Pentium 166MHz 搭載, PC-II: Pentium II 300MHz 搭載)によって構成され、それぞれは、ピア・ツー・ピア方式で接続されている。10BASE-T ハブを介したデータ転送レートは、最大約 1 MByte/秒であり、PC-I のハードディスクを、PC-II から高速にアクセスすることが可能である。また、PC-I に搭載された AD 変換ボード(DATEL: PC-414G, 32 Kword FIFO)は、同時に 2 チャンネルの信号を、最高 1MHz のサンプリングレートで 14bit のデジタル化が可能である。

このシステムのソフトウェアの開発は、Windows95 上で、C/C++コンパイラ(Microsoft: VisualC++4.0)を使用して行った。また、コンパイルの際には、Pentium コード生成と処理速度を優先する最適化オプションを選択した。

PC-I 上で動作するプログラムは、Fig.1 の①~④に相当し、NMR 信号の収集、画像再構成、表示、共有ハードディスクへの保存を行う。①トリガー信号に同期して AD 変換ボードでサンプリングされた NMR 信号は、② ISA バスを介して PC-I のメイン・メモリに読み込まれる。③ 3D データは直ちに画像再構成され、④ 1 画素あたり 16 bit で 512 KByte の絶対値画像として共有ハードディスクに保存される。また、計測中のデータ確認のために、直前に再構成された 3D 画像の 64 枚の断面像を、CRT へ順次表示した。

PC-II に搭載されたプログラムは、Fig.1 の⑤~⑩であり、ハードディスクからのデータ読込、3D 画像作成・表示を繰り返して行う。起動後は、⑤ PC-I 上の指定された保存ファイルを監視する。この際に、新たな再構成画像の保存が確認されれば、⑥⑦⑧ ネットワーク経由でデータを読み込む。そして、⑨ ボリュームレンダリング法での画像作成を行ない、⑩ 直ちに表示する。また、計測データが更新されるまでの間、2 軸の座標変換による 3D 画像を作成・表示する事が可能である。

<撮像実験>

水ファントム、装置およびパルスシーケンス

被写体に用いた水ファントムは、Fig.2 に示すように、ガラス製試験管(I.D. 27 mm)に約 15 mM/l の硫酸銅水溶液を満たし、その底部付近に、100 mM/l の硫酸銅水溶液を充填したポリエチレン製容器を挿入したものである。そして、手動で移動・回転する被写体の撮像を行った。実験は、静磁場強度 4.74T の鉛直な開口をもつ超伝導磁石(室温開口径 89 mm)と、アクティブ・シールド型グラディエント・プローブ (Doty: I.D. 40 mm)を備えた、自作の MRI システムを用いた。パルス・プログラマーは DPS ボード使用しており⁶⁾、100 ns の時間分解

能で動作する。パルス・シーケンスには、TR/TE/flip = 1.5ms/0.7 ms/10 deg, 画像視野が(32.0 mm)³, 画素数 64³, 信号積算 1 回, データ収集時間 6.24 秒, そしてサンプリング・レートは 10 μs の, 3D gradient echo 法を用いた。

ボリューム・レンダリング法のパラメタ決定⁷⁾

撮像に用いた被写体の, ポリエチレン製容器の表面と試験管内部の水の輪郭を同時に 3D 表示をするために, 不透明度(opacity)と色情報(color)のパラメタを以下のように決定した。まず, 前処理として画像全体を平滑化し, 画素値のヒストグラムを用いたクラスタリングを行う。Fig.3 は, 上述の水ファントム撮像実験で得られた, 画素値のヒストグラムの概略図であり, (A) 100 mM/l の硫酸銅水溶液, (B) 15 mM/l の硫酸銅水溶液, そして(C)ホワイト・ノイズの, 3 つのグループにクラスタリングされる。これらのしきい値により, 不透明度と色情報は Table 1 に示すように与えた。

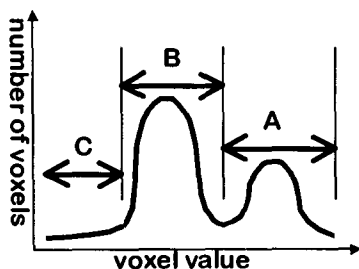


Fig.3. Histogram of the phantom

Group of voxels	Color (user defined)	Opacity (user defined)
A: Water (CuSO ₄ : 100 mM/l)	□ white	High (100%)
B: Water (CuSO ₄ : ~15 mM/l)	■ gray	Low (5%)
C: Noise	transparent	Clear(0%)

Table 1. Parameters for Volume Rendering

<結果>

ソフトウェアの処理時間

以下に, 2 つのソフトウェアの処理時間を, それぞれストップ・ウォッチで測定した値を示す。PC-I 搭載のプログラムの処理時間は, データ収集 6.24 秒, 3D 画像再構成・保存 1.8 秒であり, 繰り返し時間は 8.04 秒であった。PC-II のプログラムの場合は, PC-PC 間のデータ転送 0.5 秒, 2 軸回転を含めた 3D 画像の作成・表示 1.6 秒, 総処理時間は 2.1 秒であった。また, 実際に 2 台の PC を連動させた場合の繰り返し時間は 8.04 秒であった。

実験画像

Fig.4 は, 手動で下降・回転する水ファントムを, 8.04 秒間隔でリアルタイムに撮像・更新した, 4 枚の連続した 3D-MRI 画像である。これらは, 被写体の三次元的形状と動きを十分に捉えている。また, volume rendering 法より, ポリエチレン製容器に充填された水の表面と試験管内の水の輪郭が, 同時に可視化されている。

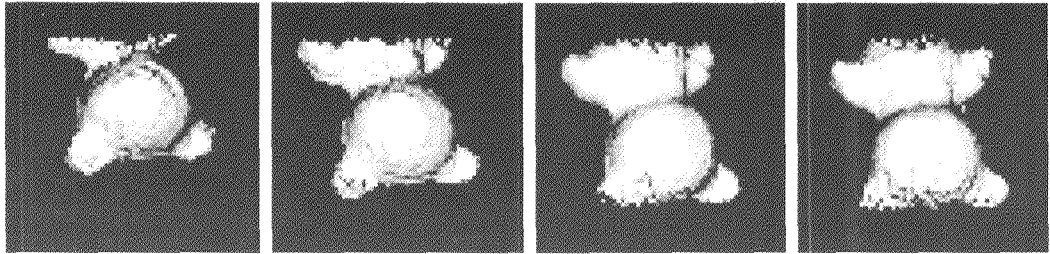


Fig.4. Four consecutive volume rendering images of the water phantom. The time intervals between images were 8.04 s. The water in a grass test cube shows an out line of the water phantom. The surface of polyethylene bottle is clearly visualized.

<考察>

実験の結果、画像更新時間は約 8.0 秒であったが、これは PC-I の処理時間とほぼ同一であり、並行に動作する PC-II が十分に高速である事から、PC-I によって決定されている事になる。しかもそれは、約 6 秒を必要とする 3D 勾配エコーの撮像によるものである。よって、画像更新時間のさらなる更新を試みる場合は、より高速な撮像法を用いることが最も重要である。例えば、TR の短縮、 k 空間における球殻内での信号サンプリング、half Fourier 法などがあげられる。また今回の実験で、高速撮像の繰り返しによって勾配コイルが加熱し、試料の上昇温度が確認された。このため、長時間に渡る撮像のときは、実験系管理および装置保守の観点から、勾配コイルを十分に冷却する必要がある。

<むすび>

ネットワーク接続した 2 台の PC と AD 変換ボードを組み合わせ、分散処理によるリアルタイム 3D-MRI 画像再構成・表示装置の開発を行った。3D gradient echo 法を用いて水ファントムの撮像を行った結果、 64^3 画素の画像を 8.04 秒毎に更新した。被写体の可視化にボリューム・レンダリング法を用いることにより、内部構造と輪郭を効果的かつリアルタイムに表示するができた。今後、撮像とソフトウェア処理をさらに高速化し、流体計測の実験を行なう予定である。

<参考文献>

- 1) R. C. Wright, S. J. Reiderer, F. Fazaneh, P. J. Rossman, and Y. Liu: Mgn. Reson. Med. 12, 407 (1989)
- 2) 市川修, 巨瀬勝美, 瀬尾秀輝: 日本磁気共鳴医学会雑誌, 第 15 巻, 216 (1995)
- 3) A. F. Gmitro, A. R. Ehsani, T. A. Berchem, and R. J. Snell: Magn. Reson. Med. 33, 230 (1996)
- 4) K. Kose, T. Haishi, A. Caprihan, and E. Fukushima: J. Magn. Reson. 124, 35 (1997)
- 5) M. Levoy: IEEE Comput. Graph. & Appl., 8, 3, pp. 29-37 (1988)
- 6) 巨瀬勝美, 拝師智之: 第 36 回 NMR 討論会講演要旨集, pp. 261-264 (1997)
- 7) 中嶋正之: 3 次元 CG, オーム社, pp. 49-63 (1994)

P61 新しいアプローチによる NMR microscope の開発 (II)

- 3D 画像の処理法と表示法の開発 -

○ 拝師智之¹, 安立直剛¹, 巨瀬勝美¹, 吉岡大², 阿武泉², 筑波大学物理工学系¹, 臨床医学系²

A Novel Approach to the MR Microscope (II)

- Development of 3D image processing and display methods -

Institute of ¹Applied Physics, ²Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8573 Japan

Tomoyuki HAISHI¹, Naotaka ADACHI¹, Katsumi KOSE¹, Hiroshi YOSHIOKA², Izumi ANNO²

Image processing and display methods for 3D data obtained with an MR microscope using a 1.5 Tesla whole body magnet (*MRMICS*) have been developed. The sample used in this study is a piece of a human femur inserted into a glass test tube (I.D. 9 mm). The 3D image data were obtained with a 3D gradient echo sequence (TR / TE / flip = 100 ms / 5 ms / 60 deg, FOV : (12.8 mm)³, Matrix : 64³). The trabecular structure of the human femur was clearly detected as a set of low intensity signals surrounded by fat tissue (bone marrow). The surface rendered volume images of the trabecular structure visualized the spatial structure.

<はじめに>

*MRMICS*¹⁾ (MR microscope with an independent console system) は、臨床 MRI 装置の超伝導磁石に発生する均一な静磁場空間を利用し、可搬型の MRI 専用コンソールを用いて、NMR マイクロスコプを実現する手法である。本研究では、*MRMICS* を用いて 1.5T の臨床用 MRI の静磁場で撮像された、高空間分解能の三次元画像の有効性を確立するため、その処理法および表示法の開発を行った。

<装置>

撮像に用いた装置は、超伝導磁石、イメージング・システム、そしてプローブ・ヘッドの3つの部分で構成される。Fig.1 に示すように、磁石は、1.5T の静磁場強度を持つ臨床 MRI 装置 (Gyroscan ACS II: Philips) のホールボディ・マグネットであり、イメージング・システムは、PC をデジタル処理系の中心とした自作の可搬型 MRI (総重量 79.5 kg) である。また、寝台に設置されたプローブ・ヘッドは RF プローブ (ソレノイド・コイル) と 3 軸勾配コイル (Anderson 型²⁾) が一体となった自作のものである。

MRMICS、三次元、骨、trabecular

はいしともゆき、あだちなおたか、こせかつみ、よしおかひろし、あんのいずみ

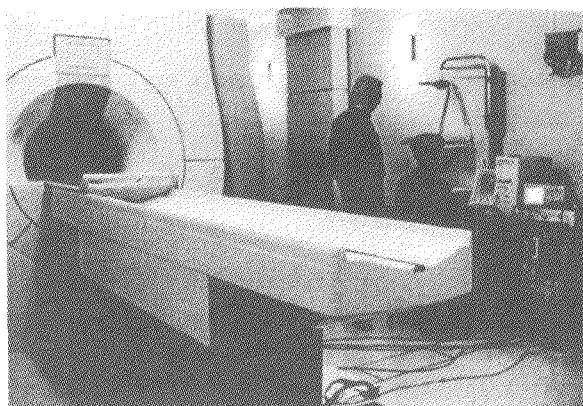


Fig.1. A novel type NMR microscope: a portable MRI console, a whole body magnet, and a gradient probe.

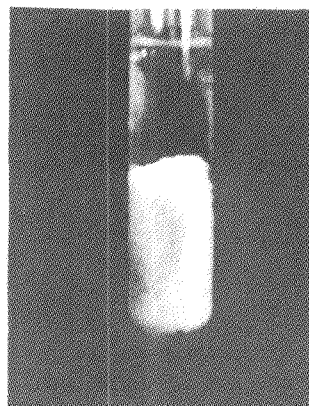


Fig.2. A piece of human femur in a glass test tube (I.D. 9 mm).

<被写体と撮像法>

Fig.2 に示す被写体は、生理食塩水が入った内径 9 mm の試験管に、摘出したヒト大腿骨頭の一部 (直径約 8 mm, 全長約 2 cm) を挿入したものである。三次元的に広がるカルシウムの骨梁構造 (trabecular structure) と、そのまわりの脂肪に大別されるのが特徴である。また比較のため、ヒト虫垂 (直径約 6 mm, 全長約 5 cm) についても同様に用意した。虫垂は片側が塞がった管状の構造をしており、まわりに脂肪分が付帯しているのが特徴である。

撮像は、TR/TE/flip = 100 ms (大腿骨頭) and 200 ms (虫垂) / 5 ms / 60 deg, 信号加算 1 回, 撮像視野(12.8 mm)³, 画素数 64³, 画素サイズ(200 μm)³ の 3D 勾配エコー法で行った。また、計測後の画像加算を目的として、ヒト大腿骨頭については連続 96 枚, ヒト虫垂は連続 20 枚, それぞれ撮像を行った。NMR 信号データからの画像再構成・保存は、計測中に画像毎に自動で行った。画像データは絶対値化されて、1 画素あたり 16bit 階調で画像 1 枚あたり 512 Kbyte のバイナリデータとして、ハード・ディスクに順次保存された。

<3D データの処理法>

撮像後の 64³ 画素の画像データに対する基本処理を以下に示す。まず、保存されたハードディスク上の 96 枚(ヒト大腿骨頭)もしくは 20 枚(ヒト虫垂)の画像データを PC のメイン・メモリに読み込み、加算平均化を行って 1 枚の画像データとする。次に、Fourier 内挿による補間を行ない、128³ 画素へと変換する。

また、ヒト大腿骨頭の 3D 表面表示に関しては、128³ 画素の画像データに対して画素値反転を行なった後、三次元的な Region Growing 法による画像抽出をおこない、ノイズおよび生理食塩水の信号を除去した。なお、C/C++コンパイラには VisualC++4.0 を用いた。

〈結果〉

断層像表示による 3D 画像の評価

Fig.3 は、(a)(b)96 回の加算により平均化されたヒト大腿骨頭のデータ、および、(c)(d)加算回数 20 回のヒト虫垂のデータである。それぞれ共に、画素数 128×128、画素サイズ(100 μm)³であり、(a)(c)垂直断層像および(b)(d)水平断層像である。

まず、ヒト大腿骨頭に関して、(a)(b)に共通して高い画素強度をもつ部分が、試料の脂肪成分であり、その内部を網目状に低い画素値として描出されているのが、カルシウムを主成分とする骨梁構造である。次にヒト虫垂のサンプルに関して、(c)は試験管の底部付近であり、図上方で尖形構造をしているのが虫垂の先端である。試験管の内壁に密着している高輝度の部分は虫垂に付着した脂肪である。また(d)より、高い画素強度を持つ脂肪が、虫垂の内部に環状に存在しているのがわかる。

骨梁構造の 3D 表示

Fig.4 は前述のヒト大腿骨頭の 3D データより、骨全体を抽出し、画素値を反転して表面表示を行ったものであり、右図は左図の後方から見た表面を表示したものである。これより、断層像表示では不十分であった三次元的な trabecular 構造の可視化が、明瞭になされていることがわかる。

〈考察〉

計測時間と画像 S/N

ヒト大腿骨頭の撮像実験では、S/N が非常に乏しい状況であったため、加算によってこれを補う必要があった。3D 画像一枚の計測時間は約 7 分/枚であり、96 枚の連続した計測の所要時間は約 8 時間であった。いっぽう、実験後、実用的な計測時間を算出するために、少ない加算回数の画像に現れる変化に注目した。その結果、ハードディスクに保存された連続した 16 枚の画像データ、つまり実際の計測時間が 2 時間程のものからでも、骨梁構造をほぼ構築できる事を確認した。

画像抽出の必要性

大腿骨頭のサンプルに関して、しきい値選択のみによる骨梁構造の表面表示は不可能であった。つまり、関心領域である骨梁と、非関心領域であるノイズおよび生理食塩水の画素強度がほぼ同一であったためである。しかし、画像上で、Region Growing 法を用いて骨全体の抽出を前処理としておこなった結果、Fig.5 のような attractive な画像が得られた。ただし、抽出の精度向上をさらに高めていくためには、今後、様々なサンプルでの実験を重ねる必要がある。他方、新たな抽出法を開拓していくことも重要である。

<むすび>

本研究では、1.5T の静磁場において、*MRMICS* によって取得された 3D 画像の有効性を確立するため、その処理法と表示法の開発を行った。被写体は、内径 9 mm の試験管に入れたヒト大腿骨頭の一部であり、 64^3 画素の三次元画像データを、画素サイズ($200\mu\text{m}$)³ の 3D 勾配エコー法で取得した。Fourier 内挿で 128^3 画素に拡大された画素サイズ($100\mu\text{m}$)³ の画像データの断層面には、骨の trabecular 構造が低い画素強度としてはっきりと描出された。また、骨の全体を抽出し、画素値を反転して表面表示を行った結果、三次元的な trabecular 構造が明瞭に可視化された。以上より、1.5T の静磁場を用いた *MRMICS* の 3D マイクロイメージング画像は、非常に有望であり、今後さらに普及していくもの期待される。

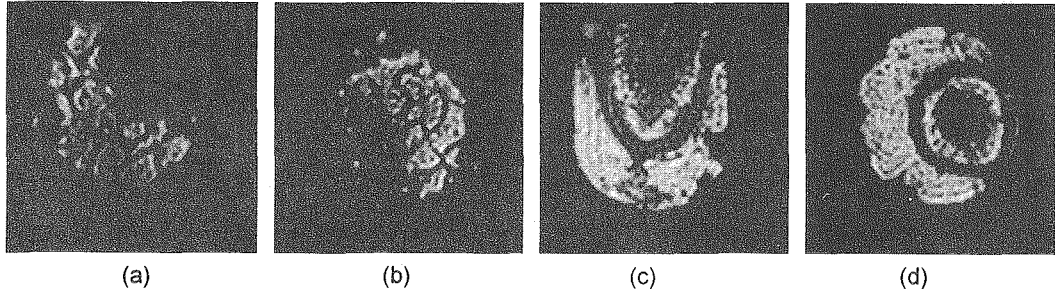


Fig.4. Cross sectional images of two samples in grass test tubes (I.D. 9 mm). (a)(b) a piece of human femur and (c)(d) a human appendix surrounded with fat. These images are obtained with 3D gradient echo sequences (TR / TE / flip = 100 ms^{(a)(b)} and 200 ms^{(c)(d)} / 5 ms / 60 deg, FOV : (12.8 mm)³, Matrix : 64^3), and expanded to 128^3 voxels with Fourier interpolation.

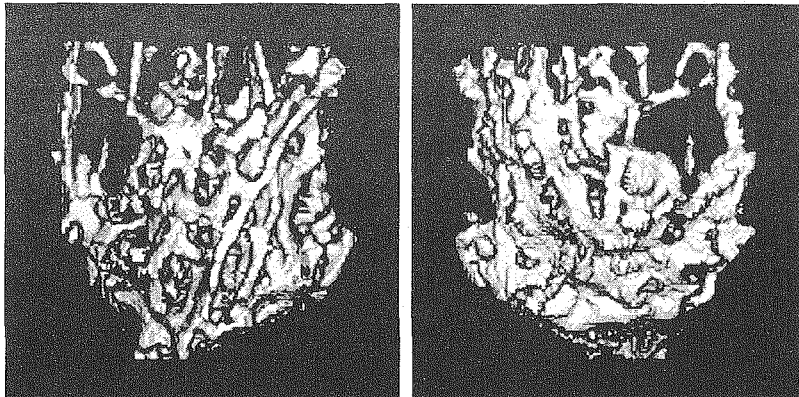


Fig.5. Surface rendered volume images of the trabecular structure created from a piece of human femur

<参考文献>

- 1) 巨瀬勝美 他:第 37 回 NMR 討論会講演要旨集, 1L12 (1998)
- 2) W. A. Anderson, Rev. Sci. Instrum. 32, 241-250 (1961)

3D-MR 画像からの泡多面体の自動抽出法の開発

筑波大学 物理工学系
○安立直剛, 拝師智之, 巨瀬勝美

The development of bubble polyhedra auto-extracting algorithm from 3D-MR image data

Naotaka ADACHI, Tomoyuki HAISHI, Katsumi KOSE
Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

To obtain geometrical information of characteristic structure of bubble polyhedra, we need to develop a polyhedra auto-extracting algorithm from 3D-MR image data. For the first step, we have developed a method using smoothing process and gradient calculation of 3D-image data to extract vertices of polyhedra. For the second step, we have developed a method using integral value on the line connecting two vertices to extract edges. As a result, we have partly succeeded in extracting polygons automatically from the 3D data.

<はじめに>

二つの異なった物質が混合した系の一つの代表例である泡構造は、極めて特徴的な空間的構造を持っており、その構造の計測は非常に大きな関心を集めている。すなわち、工業的にはポリウレタンフォームを始めとした発泡体の力学的性質と製造プロセスの関連において、また、学問的には Kelvin 問題(三次元空間を同じ体積に分割する時に、境界面の面積が最小となるのはどのような分割であるか?)との関連において、泡構造の計測が大きな注目を集めている。

そこで、本研究の元となったプロジェクトは、NMR イメージングを用いて泡の三次元構造を計測し、その三次元的形態がどのようなメカニズムで決定されているかを、実験的に検証(考察)することを目標として始められた。

<実験と撮像結果>

試料として、ポリウレタンフォームを試験管(内径 30 mm)に入れ、硫酸銅水溶液を注入したものを用いた。この試料の三次元 NMR 画像(画像視野: 32 mm×32 mm×32 mm, 画素数: 128×128×128, 画素サイズ: (250 μm)³)を、静磁場強度 4.74T の超伝導磁石を用いた NMR イメージング装置で取得した。パルスシーケンスとしては、繰り返し時間(TR) 25 ms, エコー時間(TE) 3 ms の三次元グラディエント・エコーシーケン

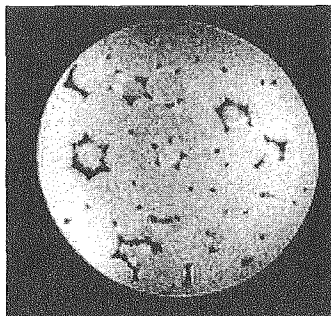


Fig.1 slice image

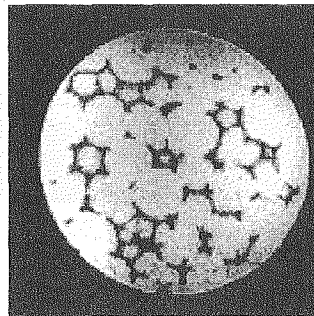


Fig.2 MIP image (n=8)

キーワード: 多面体, 自動抽出, 3D, イメージング
あだちなおたか, はいしともゆき, こせかつみ

スを使用した。

この画像では、硫酸銅水溶液の水のプロトンが高い画素濃度で描出され(Fig.1), 泡多面体の稜(辺)は、低画素濃度で描出される。

<三次元画像データからの泡多面体の抽出方法>

これまでの研究によって、泡多面体群を構成する辺のデータから、泡多面体を構築する方法が開発されている。この方法は、まず、二つの方向への最小値投影画像を用いて、多面体の辺を無作為に抽出していく(Fig.3)。

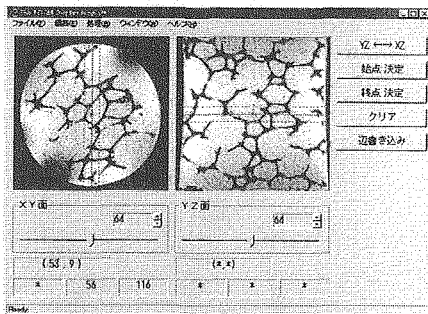


Fig.3 edge extracting program

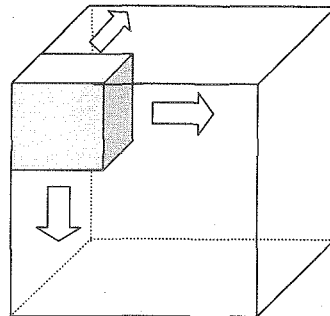


Fig.4 partial volume sweeping

次に、これらの辺の集合から、多面体の面を辺の組み合わせとして計算機で検索し、さらに多面体を面の組み合わせとして計算機で検索する。検索のアルゴリズムとしては、単純な組み合わせによる方法を用いているが、検索領域を制限し、その領域を三次元画像内で少しずつ動かしていくことにより(Fig.4)、実用的な時間で抽出を行うことを可能としている。以上より、辺が自動抽出されれば多面体の自動抽出が完成される。

辺の自動抽出を行うために、まず多面体の頂点を抽出する方法を考えた。頂点の位置を限定するために、三次元的に平滑処理を行い、ある閾値より画素値の低い点を取り出すことで、頂点のおおよその位置を求めることができる。

そして、平滑処理を行った画像の画素勾配の絶対値を取り、その値がある閾値より小さい部分(画素分布が極大、極小、鞍点となる部分)を取りだし、先に求めた座標との論理積を取ることで、さらに頂点の位置を絞り込んだ。

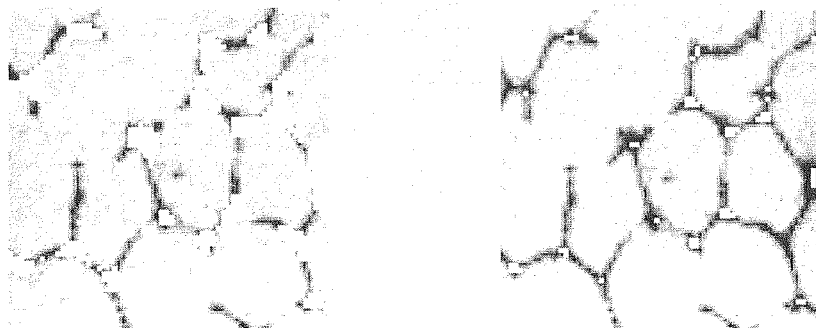
このようにして、ある程度頂点の位置を絞り込んだ後、次に、その頂点どうしを結んで辺の構築を行う。任意に取り出した二つの頂点を結んだ直線上で、画素値の線積分を求め、その値から、その直線が多面体の辺であるかどうかを判断する。線積分は直線上のすべての点で行う方法と、直線の中点付近のみで行う方法を検討した。しかし、頂点が一つに定まっていないため、実際は1本であるはずの辺が複数の辺として抽出される。その対処法として、辺どうしの中点の距離・内積・辺の長さから同一の辺であると判断できれば、それらをまとめて1本にする処理を行い、ある領域内の頂点は1つにまとめるアルゴリズムを導入した。

<結果>

Fig.5 に、三次元的平滑処理と画素勾配によって限定された頂点を示した画像を示す。閾値を変えることにより、限定される頂点の領域が増減する。

Fig.6 に抽出された頂点を結んで線積分した値から求めた辺の画像を示す。こちらも、閾値を変えることにより、辺が構築される場合とされない場合が生じる。また、閾値が高すぎると、辺のないところでも辺を構築してしまう(Fig6-C)。

Fig.7 は複数の辺を一つにまとめる処理を行った結果である。

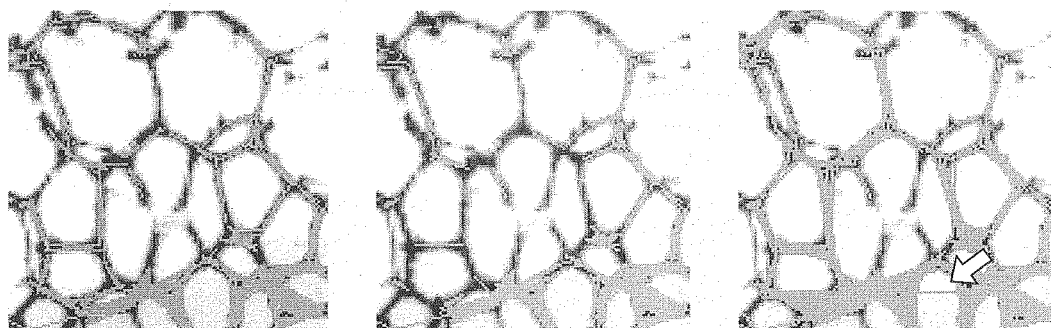


(A) smoothing processed thresholding

(B) gradient value thresholding

Fig.5 limited position of vertexes

from smoothing process and gradient value thresholding



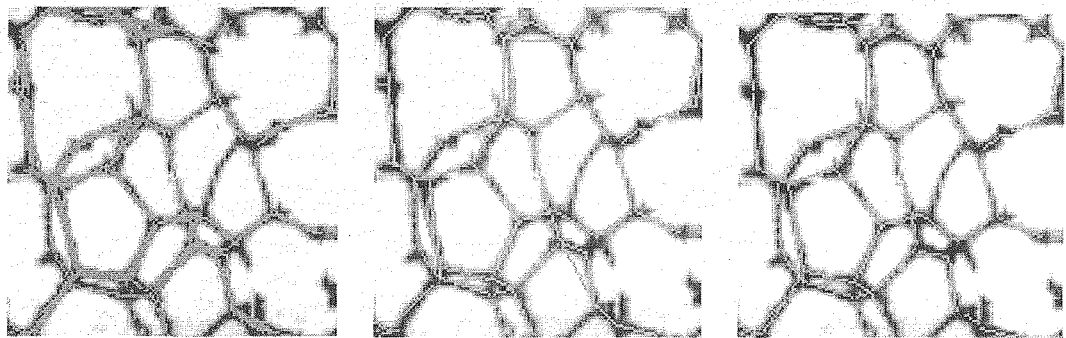
(A)

(B)

(C)

Fig.6 polyhedra's edges obtained from line-integral value

(threshold : $A < B < C$)



(A) original data

(B)

(C)

Fig.7 results from getting edges extracted as plural together

(threshold : $B > C$)

<考察>

磁場の不均一性や RF コイルとのカップリングによって、画素値が局所的に不均一であるため、平滑処理画像から頂点座標を限定する際に頂点をすべて検出できるように閾値を設定すると、辺の中ほどの点までが検出されてしまったり、同様に、辺の抽出においても、実際には辺がないところに辺を構築してしまうことが起こった。これらの問題は、画像の補正により、均一性を上げることや局所的に閾値を設定したりすることで改善でき、余分な辺は、面の構築・多面体の構築の過程で取り除くことができるものと考えられる。線積分を行う領域の違いについては、どちらもほぼ同じような結果が得られたので、中点付近だけで線積分を行う方が計算時間などの点で有利である。

また、複数の辺を一本の辺にまとめ、離れた辺をつなげるアルゴリズムは、複数のパラメータ(中点の距離・内積・辺の長さ・頂点の位置)を用いて処理を行っているので最適化が難しく、うまくいっている領域といていない領域があった。こちらのパラメータも局所的に決定することで改善しなければならない。

<むすび>

泡多面体の三次元画像から、多面体の辺を抽出する方法について検討した。まず、多面体の頂点を抽出し、その頂点同士を結んで辺を構築する方法を考えたが、まだまだたくさん問題が残っており、更なる改良が必要である。

いずれにしても、三次元画像データからの三次元の幾何学的オブジェクトの抽出に関しては、これまでほとんど研究例がないため、確立された手法は存在せず、さまざまなアイデアを試して見る必要がある。

P63

回転座標系イメージング法による ^{13}C の空間分布計測

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

Measurements of the spatial distribution of ^{13}C nucleus by Phase-encoded rotating-frame imaging method with incremented phase detection

Mineyuki Hattori, Hideaki Shimizu, and Tetsuo Moriya

Electrotechnical Laboratory, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, JAPAN

Phase-encoded rotating-frame imaging method with incrementing a phase of the reference signal during the detection period is applied to the measurements of the spatial distribution of ^{13}C nucleus. The schematic and theoretical descriptions of the measurements are presented. The spectrometer system including the probe with a saddle coil and a surface coil and the additional synthesizer were constructed. Demonstration experiments using a phantom sample of containing ^{13}C nucleus are performed.

【序論】 ^{13}C は、生体内の糖などの代謝過程を研究する上で重要なNMR核種である[1,2,3]。従来のMRI計測においては、位置情報を得るために静磁場勾配を利用している。しかし、静磁場勾配の反転時に導体に生ずる渦電流は、高速に計測を行おうとすればするほど、激しさを増して行く。例えば、脳の機能を高速に測ろうとすればするほど、導体である神経回路網に激しい渦電流を誘導することになってしまふ。磁場強度が変動するときに発生する渦電流は、ラジオ波磁場の方が静磁場に比べ、測定対象に与えるの影響が少ないと考えられ、位置情報を得る方法として、高周波磁場強度の勾配を利用することが、この問題を解決する手段の一つである[4,5,6]。回転座標系イメージング法による ^{13}C の空間分布計測は、脳内の神経の活動と代謝の関連性を問うというレベルでの、高次脳機能計測法としての発展が期待される。

【課題】位相変調回転座標系イメージング法では、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° 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]。我々は、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た[6]。この高速な実験を行うには、サンプリング速度を早くしなければならず、分析用装置で運動性の低い T_2^* の短い試料では難しい。ここでは、フリップ角(θ)を固定して、検出器の位相を順次変化させて複数回の励起で収集したデータから、 ^1H 間接検出法により ^{13}C 空間分布を得る方法を検討した。

回転座標系、イメージング、高周波磁場勾配、 ^{13}C

はっとりみねゆき、しみずひであき、もりやてつお

【装置】 Fig.1に分光計の概要を示す。プローブは、日本電子の ^1H - ^{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。分光計は、日本電子GSX-270を基本とし、位相検波器への参照信号 (314.55MHz) を外部の移相器で調整できるようにした。一系統の高周波cw信号を、分光計本体のパルス発生器と同期したパルス発生器で制御し、 θ パルスを増幅して表面コイルへと送った。x軸方向の位置エンコードに位相変調を採用したシーケンスをFig.2に示す。これは、[5]のものと類似しているが、検出位相を変化させている点が異なっている。

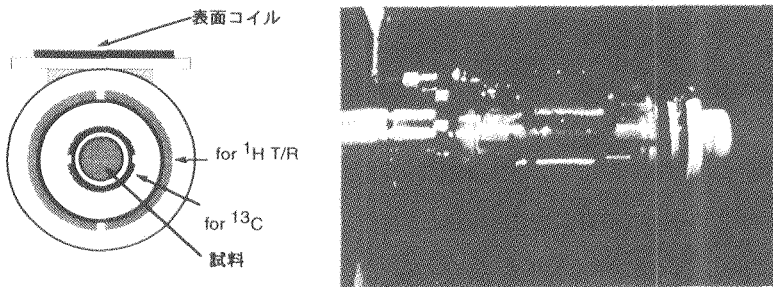


Fig.1 製作した回転座標系イメージング用二重共鳴プローブ

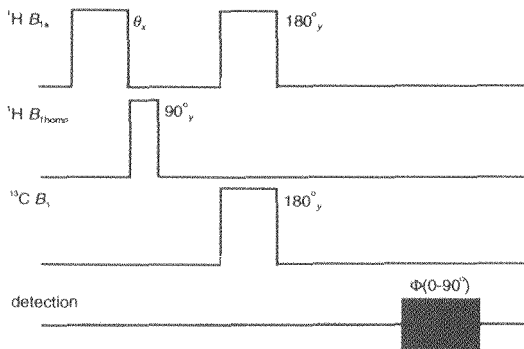


Fig.2 実験に用いたパルスシーケンス

【まとめ】 ^1H - ^{13}C 二重共鳴用プローブに表面コイルを付加して、一軸方向の高周波磁場勾配を発生させられるようにしたプローブを製作し、検出位相可変の位相変調回転座標系イメージング法による ^1H 間接検出 ^{13}C の空間分布計測に適用した。

【参考文献】

- [1] T. Inubushi, S. Morikawa, K. Kito, and T. Arai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 866 (1993).
- [2] 渡邊英宏ら、第36回NMR討論会講演要旨集、P77, 285 (1997).
- [3] A. Knüttel, K.-H. Spohn, and R. Kimmich, *J. Magn. Reson.*, **86**, 542 (1990).
- [4] 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).
- [5] F. Mitsumori and N. M. Bolas, *J. Magn. Reson.*, **97**, 282 (1992).
- [6] M. Hattori, H. Shimizu, and T. Moriya, *Proc. 29 AMPERE & 13 ISMAR*, 563 (1998).

NMR マイクロイメージングによる植物組織の凍結制御機構の解析
 ((株) 機能水研究所¹、農水省生物資源研究所²)

○井出博之¹、石川雅也²、ウィリアム シドニー プライス¹、荒田洋治¹

Visualization of Freezing Behaviors in Wintering Flower Buds by Magnetic Resonance Imaging

(Water Research Institute¹, Sengen 2-1-6 Tsukuba Ibaraki 305-0047, Japan and National Institute of Agrobiological Resources², Kannondai 2-1-2, Tsukuba Ibaraki 305-0856, Japan)

Hiroyuki Ide¹, Masaya Ishikawa², William S. Price¹ and Yoji Arata¹

Most temperate perennial plants form flower and leaf buds during the summer and autumn in order to survive the subfreezing temperatures of winter. Flower buds are made of complex tissues and their freezing behaviors are species specific. Generally flower buds are more sensitive to cold compared to other organs (eg., stem, leaf bud, root etc.), however, little is known about their freezing behaviors. So far most studies of freezing injury have been performed by measuring exotherms with differential thermal analysis (DTA). With magnetic resonance imaging (MRI) it is possible to non-invasively observe tissue structures and to distinguish whether the (water in the) tissues are frozen or supercooled. ¹H NMR images of wintering flower buds of azalea, full moon maple and conifers were acquired at differing subfreezing temperatures and the results were compared with DTA results.

Introduction

Wintering tissues of temperate woody plant species are known to display diverse freezing behaviours under subfreezing temperatures, such as extracellular freezing (e.g. bark), deep supercooling (e.g. xylem ray parenchyma) and extra-organ freezing (e.g. flower buds and leaf buds). These freezing behaviours are species and tissue specific and are important determinants of cold hardiness; they are sometimes referred to as 'freezing strategies'. Traditionally, the freezing behaviours of tissues have been determined using differential thermal analysis (DTA) and visual observation of bulk frozen tissue, NMR spectroscopy, freeze fracture electron microscopy and scanning electron microscopy of small frozen tissue specimens. However, none of these methods allows the organized freezing behaviours of various tissues in a single sample to be followed at differing temperatures. In the present work, ¹H NMR images of some buds were taken at differing subfreezing temperatures. From the images it was possible to visualize the organized freezing behaviours of various tissues in the buds. These freezing behaviours were compared with that extrapolated from conventional DTA data. From the results obtained, it can be seen that NMR microscopy is a powerful tool for locating freezing events and supercooling in complex tissues.

マイクロイメージング、凍結、¹H、植物

いで ひろゆき、いしかわ まさや、ういりあむ しどにー ぷらいす、あらた ようじ

Materials and Methods

Materials

Buds attached to twigs were collected in Tochigi Prefecture (azalea), the Tsukuba Experimental Botanical Garden (maple) and the Botanical Garden of Hokkaido University (conifer) and stored at 5 °C before use.

NMR micro-imaging

¹H Nuclear magnetic resonance micro-imaging was conducted on a Bruker DRX-300 NMR spectrometer operating at 300 MHz. For the freezing studies, cold nitrogen gas was used for cooling and a cooling rate of 5 °C/h was used between the temperatures at which the buds were imaged. Normally a field of view (FOV) of 10 mm by 10 mm digitized into 128 pixels in each direction (i.e. the in-plane resolution was typically 78 μm and slice thickness of 500 μm was used. Typical image acquisition parameters were a recycle delay of 1.2 s, an echo time of 7 ms and the number of averages set to 8.

Differential thermal analysis (DTA)

Excised buds on twigs with a length of about 1 cm were cooled at 5 °C/h from 20 to -40 °C in a programmable freezer (Model FPR-1200S, Fujikawa Sangyo Co. Ltd., Tsukuba, Japan). Exothermic events were detected with a copper-constantan thermocouple.

Results and Discussion

NMR microscopy can be used to visualize freezing behaviors in plant tissues. Basically the contrast in a density image taken at a subfreezing temperature reveals the localization of unfrozen water in the sample. By comparing NMR images taken at various subfreezing temperatures, we could visualize contrasting freezing behaviors in various tissues (Fig. 1). Whilst the source of HTE or tissues in which ice spontaneously nucleates at high subfreezing temperatures (most probably extracellular freezing process) and LTE or tissues which deep supercool can be identified by comparing images taken at various subfreezing temperatures (Fig. 2). Tissues which are either dehydrated or partially frozen are also identifiable with this method. It is expected that NMR microscopy may elucidate the relationship between freezing behaviors and buds morphology and also the localization of barriers against ice propagation. In contradistinction to traditional methods, it may also allow the units of deep supercooling in the xylem and other tissues of cold-hardy woody plants to be identified. Exotherms from tissues not otherwise identifiable can be determined with NMR microscopy.

References

1. Price, W. S., Ide, H., Arata, Y., and Ishikawa, M. (1997) Visualization of freezing behaviours in flower bud tissues of cold hardy *Rhododendron japonicum* by nuclear magnetic resonance micro-imaging. *Aust. J. Plant Physiol.* 24, 599-605.
2. Ishikawa, M., Price, W. S., Ide, H., and Arata, Y. (1997) Visualization of freezing behaviors in leaf and flower buds of *Acer japonicum* by nuclear magnetic resonance microscopy. *Plant Physiol.* 115,1515-1524.
3. Ide, H., Price, W. S., Arata, Y., and Ishikawa, M. (1998) Freezing behaviors in leaf buds of cold-hardy conifers visualized by NMR microscopy *Tree Physiol.* 18, 451-458.

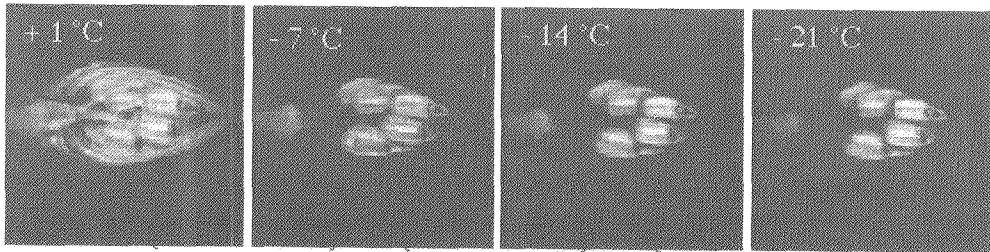


Fig. 1 A typical transverse NMR image taken at differing subfreezing temperatures of an azalea flower bud.

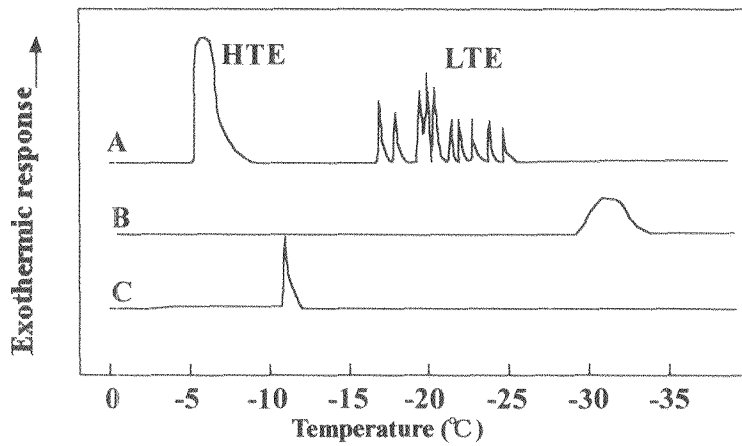


Fig. 2 A typical DTA profile of an azalea flower bud with a 1 cm twig.

P65

拡散測定によるインゲンの生育に伴う組織構造の変化の解析

○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）

Changes of textural organizations in growing kidney beans studied by diffusion measurements of cell-associated water using an NMR microscope.

Nobuaki Ishida¹, Hidejiro Ogawa², Mika Koizumi³ and Hiromi Kano³

¹National Food Research Institute, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8642, Japan

²JEOL Datum Co. Ltd., Akishima, Tokyo 196, Japan.

³National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8602, Japan

Diffusion of cell-associated water in growing kidney beans were studied. Diffusion coefficient images show different contrast of tissue organizations from that of ¹H-NMR images. Two types of barrier spacing were detected in kidney beans, one has 50 μ m spacing and constant permeability, and another has 25 μ m spacing and widely ranging permeability. Number of the smaller spacing increased with the growth of the seed and reduced with maturation.

ビタミン、ミネラル、繊維等栄養価に富んだ初夏の野菜であるインゲンの食味（口触り）と強い関係のある組織構造の、生育に伴う変化を調べることを目的として、拡散強調イメージ、及び制限拡散強調イメージを測定した。それらのデータを基に、各組織毎の細胞の水の運動性（拡散係数）の変化、細胞を構成しているコンパートメントの大きさの変化、水の存在するコンパートメントを作っているしきりの透過性の生育ステージの伴う変化を解析した。

キーワード：インゲン、NMRイメージング、拡散イメージ、パルスグラディエントスピ
ンエコー法、パルスグラディエントスティミュレイテッドエコー法

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

【材料及び方法】

インゲン： インゲン(*Phaseolus vulgaris*)は自然光の温室において、ポットで土耕栽培した。

NMRイメージング測定：超伝導NMRスペクトロメーター(270MHz, JEOL GSX-270WB)及びマイクロイメージング装置を用いて測定を行った。

〈パルスグラディエントスピンエコー(PGSE)法〉 エコー時間(T_E)27ms、拡散時間(Δ)12ms、拡散用パルス幅(δ)3ms、拡散測定用パルス磁場勾配(G)278mT/m、エンコード128回

〈パルスグラディエントスティミュレイテッドエコー(PGSTE)法〉 エコー時間(T_E)27ms、拡散時間(Δ)variable、拡散用パルス幅(δ)3ms、拡散測定用パルス磁場勾配(G)68mT/m、エンコード32回

【結果及び考察】

1) $^1\text{H-NMR}$ によれば生育の初期stage4までは莢に多量の水が認められた。種子の形成後は種子にも多量の水が認められた。その後のstageでは種子には水のシグナルは認められず、生育に伴って莢の水も消失した。最後のstageではそれまで水の少なかった莢の外側に水のシグナルが認められた。食べ頃のインゲンはstage3~stage4と思われる。

2) Fig. 1に $^1\text{H-NMR}$ イメージ及びPGSE法による拡散強調イメージとそれを基にStejskal & Tannerの式により求めた拡散係数イメージを示す。PGSE法による拡散強調イメージ(Fig. 1中段)ではすべての組織でシグナルが弱くなり、 $^1\text{H-NMR}$ イメージを越える情報を得ることはできなかった。拡散係数イメージ(Fig. 1下段)は通常の $^1\text{H-NMR}$ イメージ(Fig. 1上段)とは異なったコントラストを与えた。すなわち、水の少ない組織についても明瞭な形態的イメージを与えた。

3) PGSTE法による制限拡散強調イメージを解析して得られた、コンパートメントの大きさ(a)のイメージとヒストグラムをFig. 2に、コンパートメントのしきりの透過性(D/D。)のイメージとヒストグラムをFig. 3に示す。インゲンの中に二つの異なったサイズのコンパートメントが存在した。一方は50 μm 程度、もう一つは25 μm 程度の大きさであった。サイズの小さなコンパートメントはstage4まで増加し、その後stageが進むとともに減少した。サイズの大きなコンパートメントはstage4まで増加し、その後一定の数を保っていた。サイズの小さなコンパートメントは莢の内側の組織に当たると考えられる。その部分ではstage4以降、貯蔵物質がたまり、水のコンパートメントが少なくなると思われる。

4) D/D。イメージにおいても透過性の異なった二種類のしきりに囲まれたコンパートメントが存在することが明らかとなった。一つは25%程度の透過性を持ち、もう一つはきわめて広い透過性の変化を示すコンパートメントであった。ヒストグラム変化を対応させてみると、小さなサイズのコンパートメントが広い範囲の透過性を持つコンパートメントに対応すると推定される。

これらのパラメータイメージによって、 $^1\text{H-NMR}$ イメージでは得られない組織毎の水のコンパートメントのしきりに関する情報が得られる。

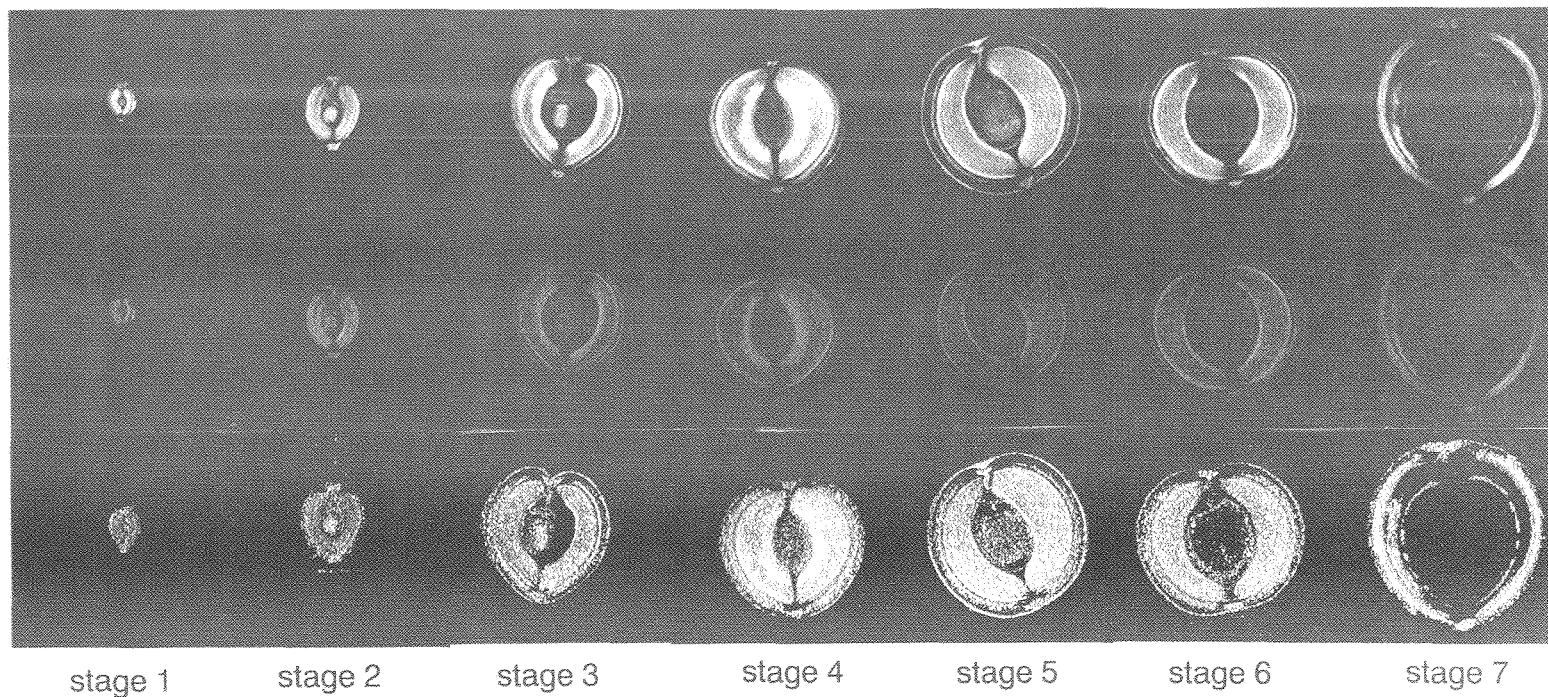


Fig.1 $^1\text{H-NMR}$ images (top), diffusion-weighted images (middle) and diffusion-coefficient images (bottom) by pulse gradient spin-echo method. Diffusion-coefficient was calculated by the formula of Stejskal & Tanner. T_e is 27 ms and Δ 12 ms. The magnitude of pulse gradients was 278 mT/m.

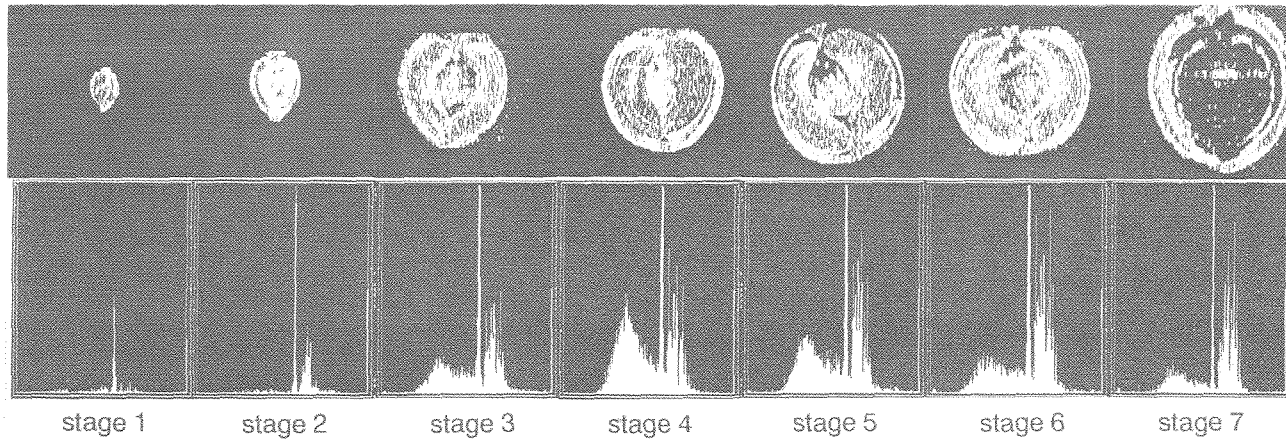


Fig.2 Images (top) and histograms (bottom) of the water spacing (a) calculated by the Meerwall & Ferguson's modification of the model of Tanner.

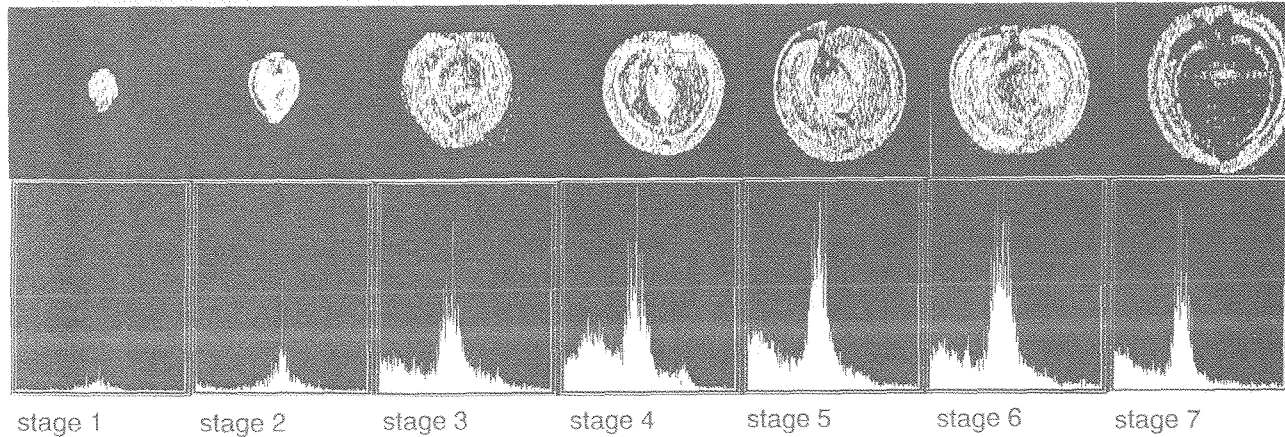


Fig.3 Images (top) and histograms (bottom) of the permeability of the barrier (D/D_0) calculated by the Meerwall & Ferguson's modification of the model of Tanner.

P66

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 第二報

○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, 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, T. Kanamatsu², Y. Tsukada²

¹Toshiba R&D Center, ²Institute of Life Science, Soka University

In the multislice HSQC sequence, the relaxation during the preparation and evolution periods causes sensitivity loss. Using a gradient system with greater gradient amplitude and faster slew rate, these periods can be shortened and SNR improves. In the glutamate phantom experiment, the SNR improvement was verified. $J_{\text{C-H}}$ coupling is the other source of sensitivity loss. In this sequence, ^{13}C decoupling pulse is not applied during the detection period to prevent body heating. Curve fitting using the 2D Lorentzian model can improve accuracy of quantitation. After a 2D HSQC spectrum of a human brain was curve-fitted, the residual value became almost equal to noise value.

1. はじめに

^{13}C 標識グルコースを用いた ^{13}C Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging (MRSI)では、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非侵襲に追うことが可能であるため、 ^{13}C MRSIは有力な代謝測定法として期待されている。我々は、この ^{13}C MRSIの高感度シーケンスとして、これまでに ^1H 感度、マルチボクセルスペクトロスコピー、代謝物の高分離が可能なマルチボクセル HSQC 法を提案し、人ボランティア試験にて、2T 全身用 MRI 装置を用いて観測時間 16 分で 37 ml の後頭部領域から、2D ^1H - ^{13}C 相関 HSQC スペクトルを取得できることを報告してきた (1, 2)。

本研究では、 ^{13}C MRSI をさらに高分解能化するため、勾配磁場系の強化による緩和の影響低減、およびスペクトル処理による定量精度向上について検討した。

キーワード：*in vivo*、 ^{13}C -MRSI、HSQC、緩和、スペクトル処理

わたなべひでひろ、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、かなまつともゆき、つかだやすぞう

2. 方法

図1にマルチスライス HSQC シーケンスを示す。本シーケンスでは、準備期の長さが任意に設定可能であり、これにより ^1H パルスを用いた 3D 局所励起が可能となっている。このシーケンスにおける信号劣化原因として、緩和による信号減衰（準備期、展開期）および $J_{\text{C-H}}$ カップリングによるスペクトル分裂が挙げられる。前者は、臨床用 MRI 機の勾配磁場系の性能に依存する。ボランティア試験は、通常の臨床機と同等の仕様である最大勾配磁場強度 10 mT/m、立ち上がり時間 1 ms の勾配磁場系を用いて行い、準備期、最小の展開期の長さをそれぞれ 20 ms、47 ms とする必要がある。これに対し、今回、S/N 向上のため、勾配磁場系の強化（最大勾配磁場強度 30 mT/m、立ち上がり時間 200 μs ）を行った。この結果、準備期、最小の展開期の長さをそれぞれ 12 ms、15 ms とすることが可能となり、S/N 評価として以下の実験を行った。実験には、2 T ^{13}C スペクトロスコピー研究用全身用 MRI（東芝製）を用いた。まず、 ^{13}C 2mM 相当のグルタミン酸の緩和時間（準備期、展開期）を測定し、勾配磁場系の強化による S/N 向上効果について検討した。次に、ボランティア試験時と今回のシーケンス条件でそれぞれ HSQC スペクトルを取得し、S/N を比較した。

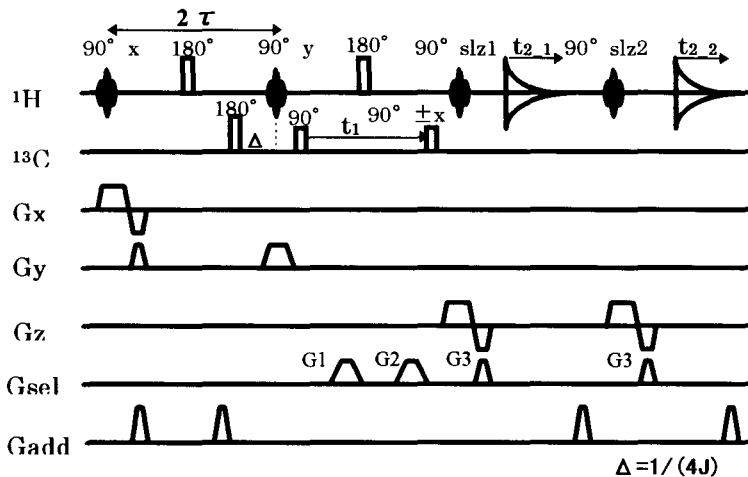


Fig. 1. Multislice HSQC sequence.

後者に関しては、本シーケンスでは生体の発熱の影響を避けるために ^{13}C デカップリングパルス（検出期）が非印加であり、この結果スペクトル分裂が生ずる。分裂したスペクトルの解析法として、2D ローレンチアンをモデル式とした非線型最小二乗法によるカーブフィッティングツールを作成した。このモデル式 F は位相を ϕ 、 ^{13}C 、 ^1H の吸収、分散、位相をそれぞれ A_1 、 A_2 、 D_1 、 D_2 とした時、以下の様に記述できる。

$$F = \exp(i\phi)[A_1 + iD_1][A_2 + iD_2] \quad [1]$$

非線型最小二乗法には、修正 Marquardt 法 (3) を用いた。また、推定精度を求めるため、誤差

伝播式を用いて誤差解析を行った。誤差伝播式は、ヤコビアン行列を A 、スペクトルデータの誤差を σ_y 、推定パラメータの誤差を σ_{x_i} とした時、以下の様に記述できる (3)。

$$\sigma_{x_i} = \sqrt{(\tilde{A}A)_{ii}^{-1}} \sigma_y \quad [2]$$

3. 結果

グルタミン酸 2 位、3 位、4 位の緩和時間計測結果を図 2 に示す。2 位、3 位、4 位の準備期の緩和時間は 53 ms、31 ms、33 ms、展開期の緩和時間は 100 ms、130 ms、150 ms であった。この結果、勾配磁場系の強化に伴い、準備期を 20 ms から 12 ms に、展開期の最小時間を 47 ms から 15 ms にすることにより、約 1.6 倍の感度向上が期待できることがわかった。実際に上記条件にて HSQC スペクトルを取得し S/N 比較を行った結果、約 1.5 倍の S/N 向上が認められた (図 3)。

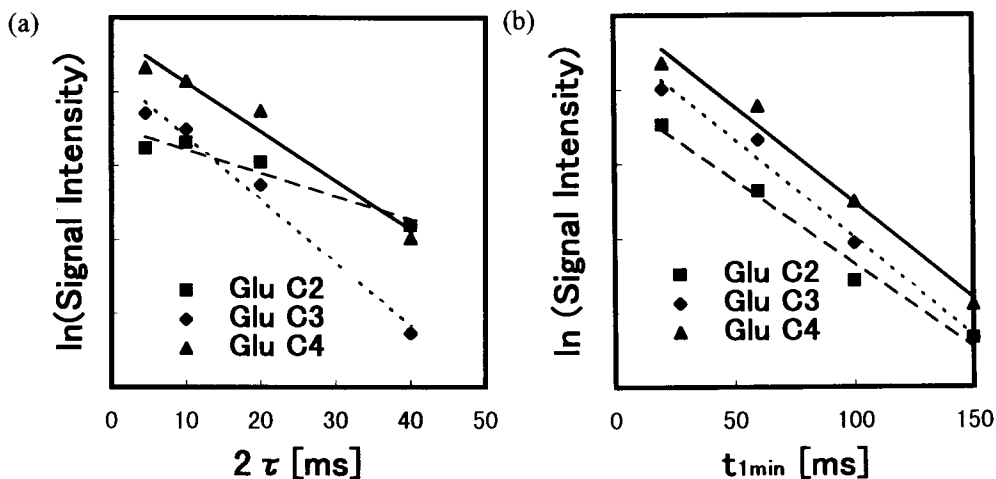


Fig. 2. Signal attenuation during the preparation period (a) and the evolution period.

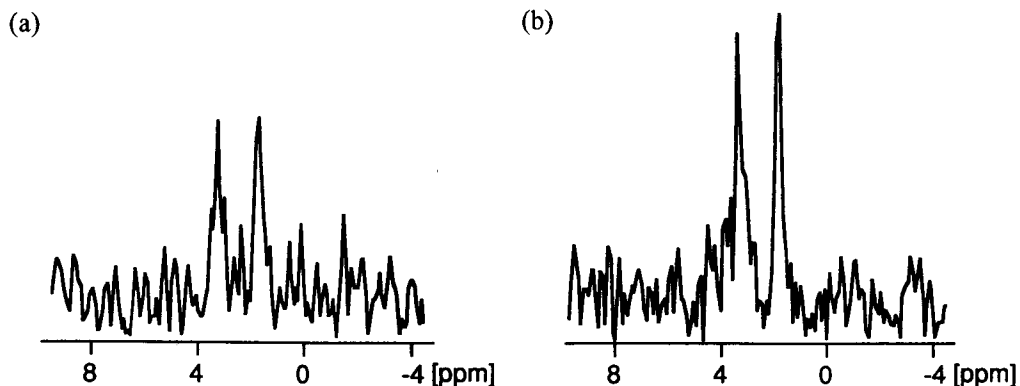


Fig. 3. HSQC spectra of glutamate phantom using the conventional gradient system (a) and the new gradient system (b).

カーブフィッティングに関しては、誤差伝播式を用いた誤差解析の結果、ボランティア試験時のスペクトル条件である $S/N = 4$ 、 ^{13}C 半値幅 = 8 Hz、 ^1H 半値幅 = 16 Hz、 $J_{\text{C-H}} = 127$ Hz において、ピーク体積は $\pm 7\%$ (p-p) の精度で推定可能であることがわかった。ピーク強度測定の場合には上記 S/N では $\pm 12.5\%$ (p-p) の精度であり、約 1.7 倍の精度向上が期待できることがわかった。次に、本カーブフィッティングを用いて人脳 HSQC スペクトルを解析した結果、残差はノイズレベルとなり、良好にフィット可能であることが確認できた。

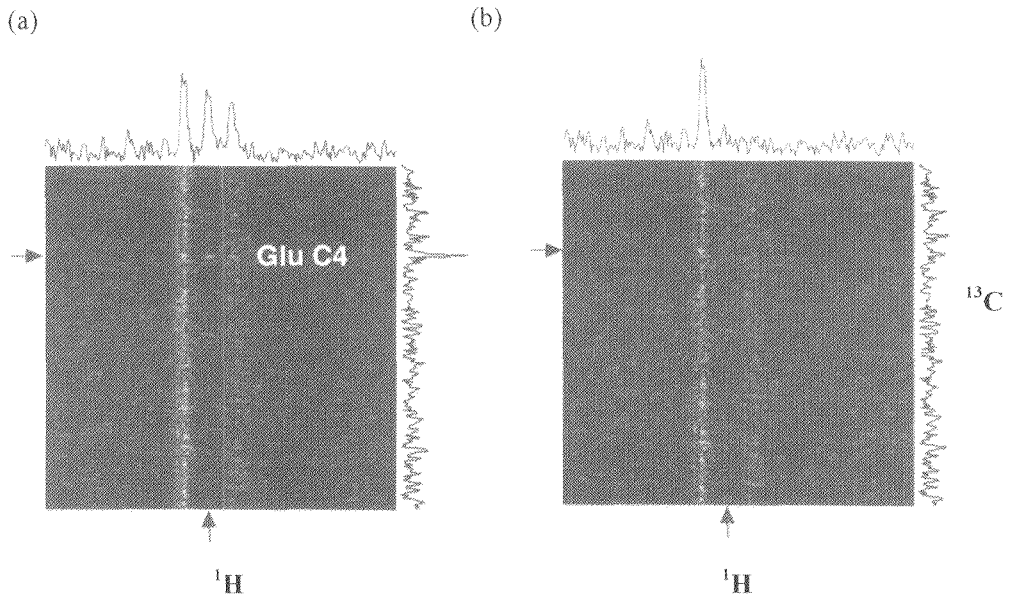


Fig. 3. HSQC spectrum of a volunteer brain (a) and residual spectrum after curve fitting (b).

4. 結論

勾配磁場系の強化および 2D スペクトル処理により、マルチスライス HSQC 法の感度および定量精度を向上させることが可能である。

謝辞

本研究開発は、医療福祉機器技術研究開発制度の一環として、新エネルギー・産業技術開発機構(NEDO)からの委託により実施したものである。

参考文献

1. H. Watanabe, et al., 5th Annual Meeting, ISMRM, 360, 1998
2. 渡邊英宏 他, 第 36 回 NMR 討論会要旨集, P.285, 1997
3. 中川徹, 小柳義夫著, 最小二乗法による実験データ解析, 東大出版会, 1989

Chemical exchange MRI and its application to the creatine kinase study

Hidetō Kuribayashi and Yoko Kanazawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

In vivo chemical exchange MRI with 2D chemical shift imaging(CSI) sequence and saturation transfer method was proposed for the purpose of construction of saturation transfer ratio map to evaluate the chemical exchange rate constant. This technique was applied to ^{31}P NMR for the creatine kinase study in the mouse brain using surface coil and 9.4T system.

<はじめに>

in vivo ^{31}P NMR は生体内における高エネルギーリン酸化合物の代謝情報を無侵襲で追跡する方法として、医学・薬学の分野で活用されている。また、化学交換 NMR を利用することにより、定常状態の酵素活性を反応速度定数として示すことも行われている。従来の化学交換 *in vivo* ^{31}P NMR においては、臓器特異性を持たせる目的で表皮の切除や心臓の灌流といったような外科的手術を必要とし、無侵襲測定とは言えなかった。特定の領域における交換速度情報を得るための化学交換画像も試みられているが、交換速度定数を得るまでには至っておらず(1,2)、その後の報告も見当たらない。

本研究ではマウス脳でのクレアチンリン酸(PCr)から ATP へのクレアチンキナーゼを介した交換反応を測定対象とし、二次元の位置情報を持たせた化学シフト画像(CSI法)に飽和移動法を組み合わせた化学交換画像から交換速度の算出を試みた。

<方法>

^{31}P NMR 測定にはすべて Doty 社製 16mm single turn $^1\text{H}/^{31}\text{P}/^{13}\text{C}$ サーフェスコイルを用いた。測定条件はヘキサメチルホスホリクトリアミド(HMPA)を生理食塩水と n-プロパノール(混合比 6:4, v/v)の混合溶媒に加えた溶液ファントムを用いて求めた。画像測定には内径 37mm の $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ プローブと自己遮蔽型勾配コイルを用いた。すべての NMR 測定には、Varian 社製 UNITY INOVA400 と縦型で 9.4T ポア径 89mm の超電導磁石を用いた。

雄性 ddY マウスの頭部の毛を刈り、自家製の固定具を用いてサーフェスコイルを頭部に装着し、磁石中に設定した。実験中はペントバルビタールで麻酔を維持した。磁石中での位置設定とシミングの後、 ^{31}P 化学交換測定(n=3)または PCr の T_1 測定(n=3)を行った。終了後、サーフェスコイルを外して ^1H 形態画像を撮像した。

化学交換、化学シフト画像、飽和移動、マウス、クレアチンキナーゼ

くりばやしひでと、かなざわようこ

化学交換測定には飽和移動法を用いた。γ-ATP シグナルは、約 100Hz の半値幅を持つために、その飽和には共鳴周波数と±50Hz の 3 箇所を順に CW パルスで励起した。飽和時間は測定時間短縮のため、予想される PCr の T₁ の 2 倍(=6s)とした(3)。また、PCr シグナルを中心に低磁場側でγ-ATP シグナルと対称となる位置を照射し、参照スペクトルとした。

化学交換 MRI 測定は飽和移動法と二次元の位置情報を持たせた CSI 法を組み合わせで行った(スライスなし)。FOV=2cm×2cm のコロナル画像。位置情報の取得には、2×2 回の位相エンコードで測定し、フーリエ変換は 4×4 点で行った。CSI データ処理は Varian 社製 CSItool 上で行った。

PCr の T₁ 測定は反転回復法を用いた。反転パルスには sech を使い、サーフェスコイルから深さ 5mm の位置にある磁化を反転しうる最小のパワー設定にした。待ち時間中は化学交換測定同様にγ-ATP シグナルを飽和した。

クレアチンリン酸から ATP への交換速度定数(k)は、化学交換測定において得られたγ-ATP シグナル飽和 PCr スペクトル強度(Ms)、参照スペクトル強度(Mo)、γ-ATP シグナル飽和下の PCr の T₁ を[1]式(4)に代入し求めた。

$$k=(1/T_1)(1-Ms/Mo)/(Ms/Mo) \quad [1]$$

スペクトル強度には、ピーク面積を使用した。

<結果と考察>

図 1 に位置情報を持たない化学交換 ³¹P MRS(Fig.1a,b)と二次元の位置情報を持たせた CSI 法を用いた化学交換 ³¹P MRI(Fig1.d,e)を示す。MRS と MRI どちらにおいても、γ-ATP シグナルを飽和させた PCr シグナル強度は参照スペクトルにくらべて減少しており、化学交換 ³¹P MRI においても化学交換過程を追跡することが可能であった。MRS と MRI より得られた強度比(Ms/Mo)と交換速度定数(k)を表 1 と 2 に示した。PCr の T₁ 値は、1.8±0.9s であり、この値を計算に用いた。MRS からの k は既報のデータ(0.32 : サル脳(5)、0.53 : ウサギ脳(5)、0.22 : ラット脳(6)など)と比較して高い値を示した。MRI からの k は、MRS の値とは必ずしも良い一致とは言えず、voxel 間によって値に幅が見られた。

今回は k を求める目的で、定常状態達成のために飽和時間を PCr の T₁ の 3 倍以上に設定した。MRS・MRI どちらもγ-ATP シグナルが除去できていることと、k が高い値を示したことから飽和移動の定常状態にほぼ達していたと言える。MRS と MRI の結果の違いは、計算に全て同じ T₁ を用いていることから、MRI スペクトルの質によるものと思われる。MRS が 20 分の積算で得られたのに対し、MRI 測定には 65 分必要であった。位相エンコード数の小ささによる voxel 内シグナル強度の定量性と信号積算効率の悪さに関して今後の検討が必要である。

9.4T の装置を使用して、測定感度が上がり、PCr の T₁ 値が低磁場装置に比べ短くなったため(3)、繰り返し時間の点で化学交換測定と T₁ 測定共に有利であった。シグナルの分離もよく(PCr とγ-ATP の周波数差、約 400Hz)、化学交換とは無関係のオフレゾナンス照射による観測シグナル強度の減少を抑えることができた。しかし現段階では、測定時間の関係から位置情報を持たない T₁ 値を化学交換 MRI での k の計算に使用せざるを得なかった。

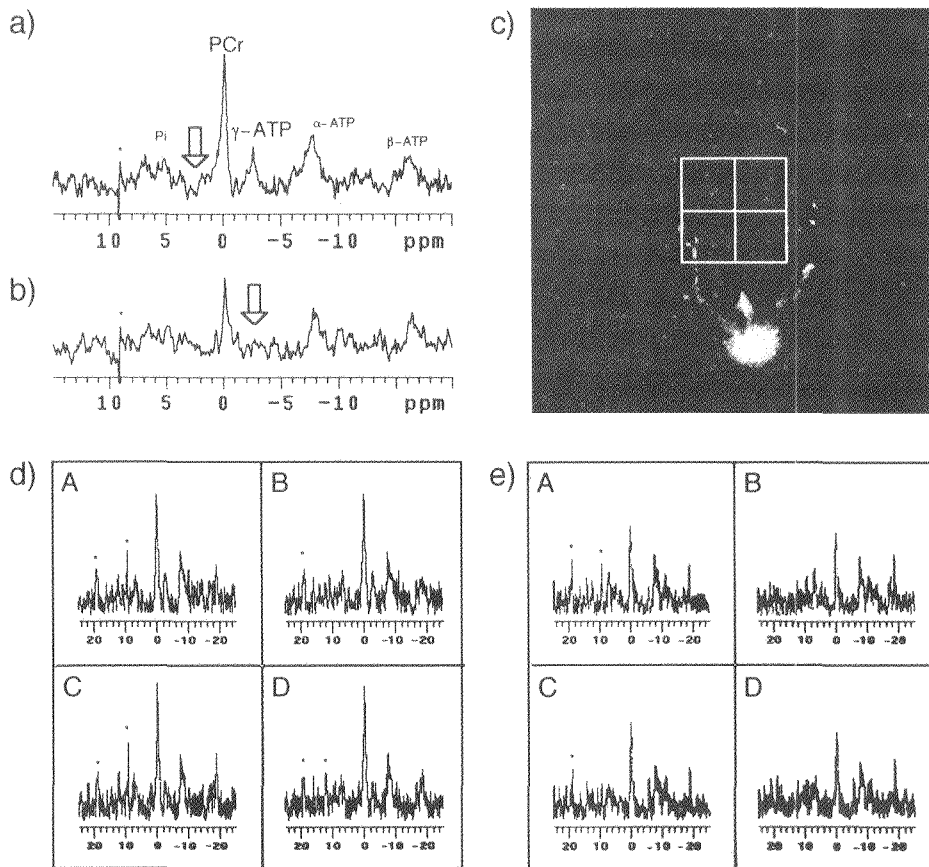


Fig.1. Chemical exchange ^{31}P MRS with control(a) and γ -ATP(b) irradiation. The location of saturating irradiation is shown by the arrows. ^1H coronal image of the mouse brain(4cm \times 4cm,c). Chemical exchange ^{31}P MRI with control(d) and γ -ATP(e) irradiation from the box(1cm \times 1cm) drawn on the ^1H image. *:noise

kの値は T_1 に大きく左右されるので “ T_1 map” が必要であり、検出器の感度の向上などが必要となる。

化学交換の位置情報を得るための CSI 法は、既に報告されているスピンエコー法を用いた化学交換画像(1,2)と比較すると、 γ -ATPシグナルが飽和されていることが常にスペクトルより確認でき、その他のシグナルの情報も同時に得られるといった利点があった。またこの方法は高エネルギーリン酸系以外の研究で、近接したシグナルの交換情報が必要な場合や、化学交換により T_2 が短い系において有利であろう。

二次元の位置情報を持たせた CSI法を用いた化学交換 ^{31}P MRIにより、飽和移動の現象を追跡できた。今後、交換速度定数の精度向上のために、測定の高感度化や空間分解能の向上によるスペクトル強度の定量性の検討が必要である。

Table.1 Results of chemical exchange MRS using saturation transfer. The T_1 value of 1.8 s for PCr was used.

mouse	Ms/Mo	k (s ⁻¹)
1	0.45	0.7
2	0.47	0.6
3	0.67	0.2

Table.2 Results of chemical exchange MRI using 2D CSI and saturation transfer. The T_1 value of 1.8 s for PCr was used.

mouse		Ms/Mo	k (s ⁻¹)
1	voxel A B	0.56	0.44
	voxel C D	0.52	0.47
2	voxel A B	0.69	0.56
	voxel C D	0.62	0.59
3	voxel A B	0.44	0.52
	voxel C D	0.52	0.56

参考文献

1. Hsieh, P.S., Balaban, R.S., (1987) *J. Magn. Reson.* 74, 574-579
2. Mora, B., Narasimhan, P.T., Ross, B.D., Allman, J., Barker, P.B., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8372-8376
3. Clarke, G.D., Rehr, R.B., (1990) *Magn. Reson. Med.* 14, 522-529
4. Mann, B.E., (1977) *J. Magn. Reson.* 25, 91-94
5. Mora, B.N., Narasimhan, P.T., Ross, B.D., (1992) *Magn. Reson. Med.* 26, 100-115
6. Holtzman, D., Meyers, R., Khait, I., Jensen, F., (1997) *Epilepsy Res.* 27, 7-11

光学活性シフト試薬による脳内代謝物質の分析

○高橋征三¹、荻野孝史²(日本女子大理¹、国立精神神経センター神経研²)

Studies of Metabolites in Brain by a Chiral NMR Shift Reagent

(Fac. Sci., Japan Women's Univ.¹, Institute of Neurosciences, NCNP²)

Chiral NMR shift reagents europium(III)-N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-(R)- and (S)-propylenediamine were synthesized. They were stable at neutral pH in aqueous media. They resolved the enantiomer signals of D,L-valine and D,L-serine. However, the signals not only overlap to those of reagent but become broadened by addition of shift reagent. Further studies are under progress to apply to the extracts from rat brain tissues.

高等動物の生体中では、アミノ酸は、グリシンを除いて、L-体しか存在しないとされてきたが、近年ヒトの脳内にD-アミノ酸がかなり多量に存在することが発見された。そして加齢とともにD-アミノ酸の含量が増大することが分かってきた。しかし脳内におけるD-アミノ酸の代謝経路や生理的な意義はほとんど不明で、現在さかんに研究されている。

現在D-アミノ酸の研究は、脳組織から目的成分を抽出して、光学活性樹脂を担体にした液体クロマトグラフィーで分離するという方法がとられている。この生化学的方法は、破壊分析であり、操作の複雑性のために定量的再現性に乏しいという問題がある。本研究は、その生化学的方法の限界を克服するために、NMRを用いて、スペクトル的にD,L-アミノ酸の光学分離を試みた。

[実験] (S)-(-)-または(R)-(+)-1,2-propanediamine hydrochloride と 2-(chloromethyl)-pyridine hydrochloride を Mandelらの方法にしたがってカップリングし、N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-(R)-および(S)-1,2-propanediamine (tpn) を合成した¹⁾。光学活性ランタノイドシフト試薬の合成は Hazamaらの方法にしたがい、tpn と EuCl₃ を等モル混ぜ、メタノール中で還流して得た²⁾。NMR の測定は Bruker AMX-400WB を用い 298K で測定した。

[結果] tpn は、ほとんどの溶媒にたいして溶解度などの挙動が反応副生物と一致するため、完全な精製はできなかった。したがって得られたスペクトルはまだ微量の不純物によるものを含んでいると思われる。

キーワード：光学活性、シフト試薬、アミノ酸、代謝物、脳

たかはし せいぞう、おぎの たかし

シフト試薬のランタノイドイオンの種類としては、シフト能に比べて **broadening** が強いので Eu 以外は実用的でないことがわかった。シフト試薬 Eu(tppn)は中性水溶液で安定に溶解し、Eu 錯体添加によって系の pH は有意の変化を示さなかった。

シフト試薬の構造は図 1 に示す通りである。Eu³⁺は 8 配位構造をしていて、pyridine 環の N 原子 4 個とイミノ基の N 原子 2 個ならびに Cl 原子 2 個と配位している。図のように比較的複雑な構造をしているので、配位子を押しつけてアミノ酸がこのシフト試薬に配位する能力はそれほど大きくないだろうと想像される。事実、シフト能はきわめて小さく、

アミノ酸とシフト試薬の量比を変えて、シフトの大きさをしらべた滴定実験の結果からは、測定条件下でシフト試薬はおよそ 1/1000 しかアミノ酸に結合していないと見積もれた。そして少なくとも量比が 12 倍になるまでは、誘起シフトの大きさは量比にほぼ比例することが分かった。

以上の知見のもとに D,L-バリンでテストした結果、量比 4 : 1 で、 γ 位のメチル基プロトンに明瞭に D-, L-に分離できた。**broadening** が激しいので γ 位のメチル基ほど明瞭ではないが α 位も D-, L-分離して観測された。他方 β 位置は **broadening** のために分離できなかった。

D,L-セリンの場合は、**broadening** のために α -位は分離できなかったが、モル比 1 : 1.2 ~ 1.5 で β -位のプロトンを分離できた。またシフト試薬を入れた状態で 24 時間安定に系が存在し得ることが分かった。しかしシフト試薬からの信号の重なるのために、このままの条件では実用に適さないことが分かった。tppn はメチル基やメチレン基を持っていて、Eu(tppn)からの信号はセリンの β -プロトンの信号と重なる。とくに free の tppn が系に混在するとかなりシャープなピークが重なる。さらに、シフト試薬の一部がこわれて、ランタノイドイオンが露出して直接アミノ酸に配位すると思われる現象が見られた。これが **broadening** の大きな原因になっていると思われる。したがってシフト試薬をより安定に存在させる条件を検討する必要があることが分かった。

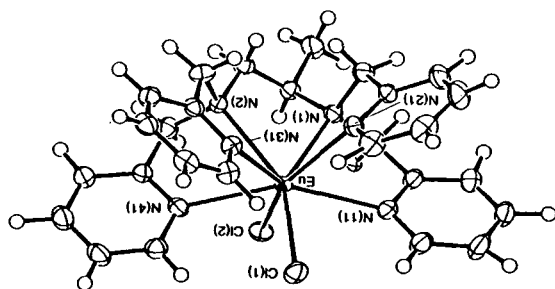


Fig. 1 The structure of NMR shift reagent Eu (tppn). Four nitrogen atoms from pyridine are co-planer to one another.

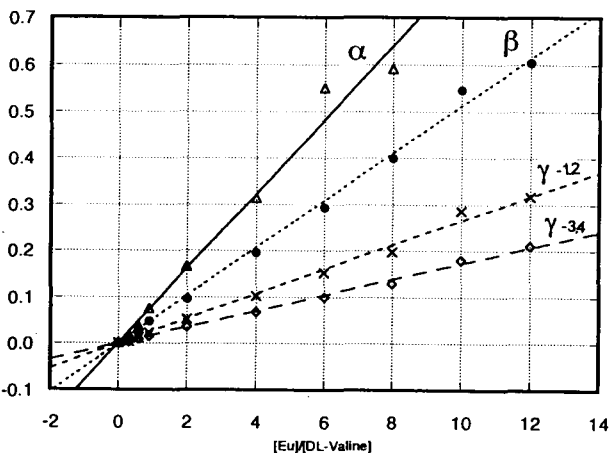


Fig. 2 Induced chemical shift vs. molar ratio of Eu (tppn) / Valine

シフト試薬とアミノ酸のピークの重なりの問題については、J-resolve 2次元 NMR を導入すれば解決できる見通しがある。しかし、いまの測定条件ではシフト試薬が不安定なためにおこるとされるピークのブロードニングがあるので、アミノ酸の種類によってシフト試薬の最適モル比が異なる。したがって直ちに組織抽出液へ適用することは極めて難しい。シフト試薬のもっと安定な測定条件や別の構造の配位子については今後の検討課題であり、詳細については本討論会で報告する予定である。

- 1) J. B. Mandel, C. Maricondi and B. E. Douglas, *Inorg. Chem.*, (1998), 27, 2990
- 2) R. Hirayama et. al., *Chem. Commun.*, (1996), 15

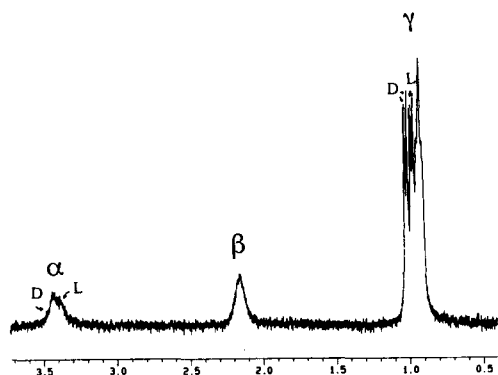


Fig. 3 ^1H NMR spectrum of D,L-valine.
Molar ratio of Eu(tppn) against valine
is 4:1.

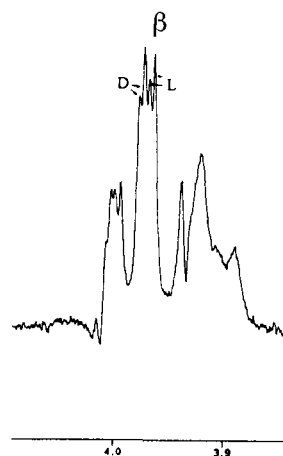


Fig. 4 β -proton region of
D,L-serine. Molar ratio
is 1.4 : 1.

P69

リポソーム造影剤の¹⁹F-NMR イメージングへの応用

(¹阪大・医、²九大・薬)

○¹月城聖一、¹木村敦臣、²金沢洋子、²楢崎美智子、¹藤原英明

Application of liposome as a contrast agent in ¹⁹F-NMR imaging

¹Sei-ichi Tsukishiro, ¹Atsuomi Kimura, ²Yoko Kanazawa, ²Michiko Narazaki, ¹Hideaki Fujiwara

¹School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University, 1-7 Ymadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

¹⁹F containing liposome has been tested as a novel MRI contrast agent to improve the contrast of images and to target specific organs. The ¹⁹F-NMR imaging using the ¹⁹F containing liposome will be able to enhance the contrast of images and the ability of diagnosis, since ¹⁹F is not an element organizing a living body. We chose PFOA (PerFluoroOctanoic Acid) as a compound of ¹⁹F. The PFOA containing liposome is shown to be useful for the study of distribution and metabolism *in vivo*. But it is also recognized that T₁ and T₂ values of the ¹⁹F signal in liposome are short and spatial resolution is not high enough when compared with the results of ¹H imaging.

【序】 MRI 診断において重要な画像のコントラストを高めるために、現在、Gd³⁺や Fe³⁺などの金属イオンやそれらのキレート錯体が造影剤として用いられているが、特定の疾患あるいは機能を担う部位に集積するような造影剤が次世代型として望まれている。そこで薬物キャリアーとしての応用が期待されているリポソームに注目し、そのような造影剤の開発を試みることにした。リポソームは、脂質二重層からなる閉鎖小胞である。リポソームは、生体膜モデルとして基礎的な研究に用いられ、また薬剤カプセルなどとして応用的な研究に用いられてきた¹⁾。一方、MRI は¹H、¹³C、³¹P などの生体構成成分を画像化しているが、生体構成成分ではない元素である ¹⁹F を含んだフッ素化合物を用いることにより ¹⁹F の集積部分のみを画像化し、コントラストを効果的に高める事が期待される。

¹⁹F は磁気回転比γが¹H に次いで大きく、スピナー個当たりの MRI の検出感度は¹H と匹敵するくらいに高く、¹H に比べ化学シフトの分布領域は広いがピークの線幅は特に広くはないという利点を備えており、物質識別に適した核である²⁾。そこで筆者らはリポソームにフッ素化合物を導入したフッ素化リポソーム造影剤の開発を試みることにした。

キーワード：リポソーム、¹⁹F-NMR イメージング、MRI、PFOA

○つきしろせいいち、きむらあつおみ、かなざわようこ、ならぎきみちこ、ふじわらひであき

【実験方法】

使用するフッ素化合物には、リポソームへの取り込まれやすさや含まれるフッ素原子の数が多いたほうが S/N 比の上で有利であることを考慮し、パーフルオロオクタン酸 (Perfluorooctanoic Acid : PFOA) を選んだ。

1. in vitro の実験

PFOA を溶解させた卵黄レシチンからなる SUV (Small Unilamellar Vesicle) リポソーム(以下 PFOA リポソーム)を常法により作製した(レシチン濃度 65mM、PFOA 濃度 10mM)。PFOA リポソームのフッ素の緩和時間 T_1 、 T_2 をそれぞれ、Inversion Recovery 法、CPMG 法を用いて、pH2、7、12 のもとで ^{19}F -NMR (188MHz Varian VXR-200) により測定した。

2. in vivo の実験

上記で作製した試料を凍結乾燥して、必要に応じて通常水で溶液に戻し使用した。試料を体重約 30g のマウスに 1.5ml 経口投与し、Varian Unity 400 WB NMR 分光計により、マウスの ^{19}F -NMR イメージングを測定した (376MHz)。使用したパルス系列は高速撮像法³⁾である。また、投与 2.5 時間後にマウスの肝・胃・腎・腸を摘出し、それぞれの臓器でのフッ素の定量を行った。この定量には、 ^{19}F -NMR を利用した。

【結果と考察】

1. in vitro における PFOA リポソームのフッ素の緩和時間 T_1 、 T_2 の測定結果を Table 1 に、PFOA の構造とそのフッ素のスペクトルを Figure 1 に示した。これをみると、 T_2 は T_1 の 1/100 の程度で非常に短いことが分かる。ある物質がリポソームに封入されるとその物質の運動性が束縛され、 T_1 に比べて T_2 が短くなることが知られており、この実験結果から PFOA はリポソーム内に効率的に封入されていることが分かる。

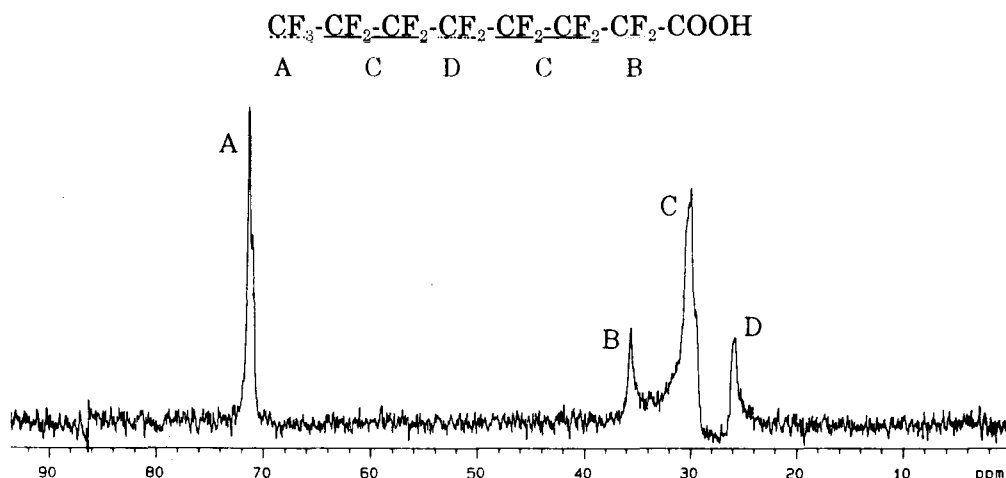


Figure 1. Structure of PFOA and ^{19}F -NMR spectrum of PFOA liposome (in vitro)

Table 1. T_1 and T_2 values of ^{19}F in PFOA liposome(a): T_1 values

Signal	pH2	pH7	pH12
A	370(23)	381(25)	790(71)
B	330(28)	280(37)	680(49)
C	320(5)	302(8)	650(14)
D	360(20)	347(19)	710(3)

(b): T_2 values

Signal	pH2	pH7	pH12
A	2.60(0.28)	3.20(0.37)	2.80(0.20)
B	1.50(0.40)	1.60(0.29)	2.20(0.32)
C	1.00(0.06)	1.30(0.16)	1.20(0.33)
D	2.90(0.71)	3.80(0.72)	3.50(0.65)

Standard deviations are given in the parenthesis

2. PFOA リポソームをマウスに経口投与し、ファーストスピンエコー法で ^1H のイメージと ^{19}F のイメージングを行った結果を Figure 2 に示した。 ^{19}F イメージングの経時変化より投与直後は胃に見られたフッ素の集積が、経時的に肝臓へ移動している様子が認められる。投与 2.5 時間後の臓器の PFOA リポソームのフッ素量について相対的な割合を示すと Table 2 の通りである。この Table で、DPPC-chol リポソーム (コレステロールを含有する DPPC リポソーム) の値は [^3H] Ara-C を封入させたリポソームを用い、マウスに静注し、1 時間後の各臓器中の分布を放射性薬品を用いた実験から求めたものである³⁾。両者を比較するとオーダーの違いはあるが各臓器中におけるリポソームの分布の割合は同様の傾向となっていることが分かる。

今まで経口投与後のリポソームの体内動態はよく知られていなかったが、この結果から体内動態が明らかとなり、今後リポソームの体内動態の研究に ^{19}F イメージングが有効となることが示唆された。

Table 2. Ratio of liposome in organs

liposome	liver	stomach	kidney	intestine
PFOA SUV liposome	41.2%	49.8%	4.8%	5.0%
DPPC-chol(1:1) REV liposome ^{a)}	4.82%		0.68%	0.25%

a) These values are cited from reference 4)

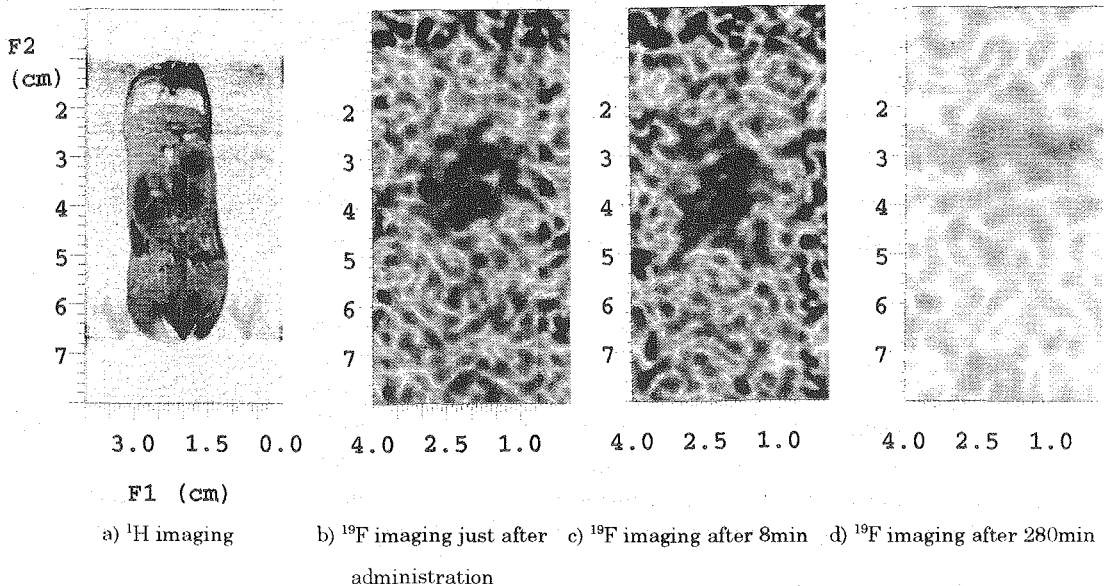


Figure 2. ^{19}F and ^1H imaging of a mouse after oral administration of PFOA liposome.
(F1 and F2 express physical dimensions inside the probe coil)

【結論】

PFOA を含有したリポソームを用いての ^{19}F 及び ^1H -NMR イメージングを測定し、リポソーム研究における ^{19}F -NMR の特徴や有用性を調べた。マウスを用いた実験では、PFOA は顕著な代謝を受けないこと、及びリポソームの体内動態を調べる上で ^{19}F イメージングは貴重なデータを提供できることが確かめられた。しかし、 ^{19}F イメージングは ^1H イメージングに比べ空間分解能がかなり低下することが認められ、その原因は短い T_2 によることが分かった。

(引用文献)

- 1) 奥直人、「リポソームの作成と実験法」、廣川書店。(1994)
- 2) 日本磁気共鳴医学会編、「NMR 医学」、丸善株式会社。(1991)
- 3) 栗林秀人、金沢洋子. 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. 第 36 回 NMR 討論会要旨集. p 289-292 (1997)
- 4) Mayhew, E., Papahadjopoulos, D. "Therapeutic Applications of Liposomes" *in* Liposomes, The Liposome company, Princeton, NJ (1983)

隣接分子の相対配置決定のための多スピン REDOR 解析
 (姫路工大 理) ○西村 勝之、内藤晶、辻暁、斉藤肇

I-S_n Multispin Analysis of REDOR Experiments for the Determination of Relative Configuration of Neighboring Molecules.

○ Katsuyuki Nishimura, Akira Naito, Satoru Tuzi, and Hazime Saito
 Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

In order to obtain accurate intramolecular interatomic distances by means of solid state NMR REDOR method, intermolecular dipolar interactions should be removed by extrapolation of REDOR factor to infinite dilution of labeled samples. However, we found that the slope of the extrapolated line thus obtained reflected the manner of intermolecular dipolar coupling¹⁻³⁾. These results suggest that geometrical arrangement of the nearest neighbor molecule can be obtained from the REDOR data. Here, we attempted to estimate the intermolecular contribution from the adjacent molecules in the crystal on the basis of the REDOR factors, analyzed for I-S₂ 3 spin system¹⁾ of N-Acetyl-Pro-Gly-Phe.

<概要> 同位体二重標識試料では、分子内の原子間距離測定において、隣接分子中の標識同位体からの磁気双極子相互作用が目的とする分子内磁気双極子相互作用を変調することをすでに報告している¹⁾。本研究ではこれまで分子内原子間距離測定のために削除してきた分子間磁気双極子相互作用を解析することにより、隣接分子間の幾何情報を得ることを試みた。まず X 線回折結果のある N-Acetyl-Pro-Gly-Phe²⁾において、I-S₂ 3 スピン系による分子間磁気双極子相互作用の解析を行い、分子間二重標識同位体間距離および分子内、分子間距離ベクトルのなす角度を決定し、得られた変数の確度と精度を検討した。

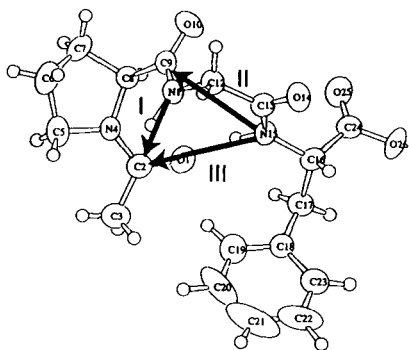


Fig. 1 ¹³C-¹⁵N interatomic distances of ¹³C-¹⁵N interatomic doubly labeled N-Acetyl-Pro-Gly-Phe molecules measured by REDOR method

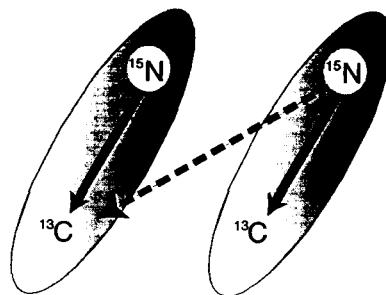


Fig. 2 Schematic representation of dipolar contributions included from those of from the neighboring molecules.

キーワード：多スピン REDOR、原子間距離、相対配置決定、分子間双極子相互作用、オピオイドペプチド、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

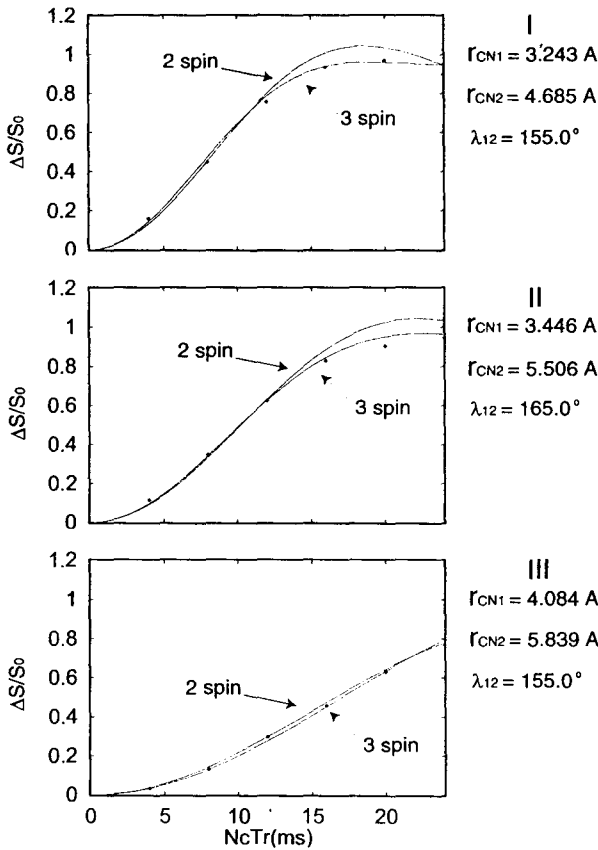


Fig. 3 Plot of $\Delta S/S_0$ values against NcTr from I to III

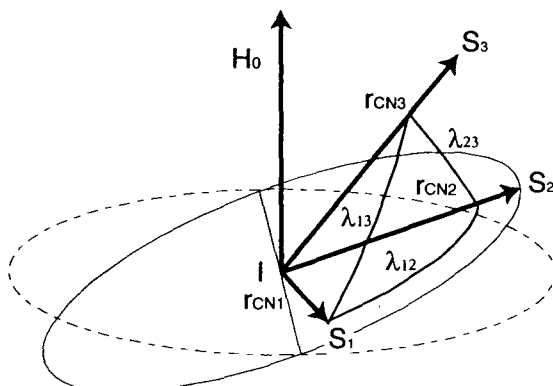


Fig. 4 Orientation of interatomic distance vectors and the mutual angles between them

<結果> 図 1 に REDOR 法で測定した原子間距離を示す。図 2 に示すように同位体二重標識試料では、隣接分子からの分子間磁気双極子相互作用が存在し、観測している分子内磁気双極子相互作用は変調される。この現象の S_1 -I- S_2 の 3 スピン系で解析法はすでに報告しており、観測される磁気双極子相互作用は分子内、分子間磁気双極子相互作用とそれらベクトルのなす角度の 3 つの変数に依存する。分子内の磁気双極子相互作用（原子間距離）を決定するには、まず系統的に希釈した試料の REDOR 実験値を外挿し、無限希釈した $\Delta S/S_0$ 値を得る。この値に対して I-S 2 スピン系の理論曲線をフィッティングして分子内原子間距離を決定する。得られた分子内原子間距離を代入し、残りの 2 つの変数、分子間磁気双極子相互作用および 2 つの原子間ベクトルのなす角度の可能な組み合わせを決定する。

図 3 に各試料の実験値に対する I-S 2 スピン、 S_1 -I- S_2 3 スピン系の理論曲線を示す。得られた分子間同位体二重標識原子間距離および双極子ベクトルのなす角度を、X 線回折実験から得られた値とともに表 1 に示す。各変数の定義を図 4 に示す。

Table 1 Geometrical parameters for N-Acetyl-Pro-Gly-Phe in the orthorhombic crystal obtained by X-ray diffraction and REDOR.

		Interatomic distances and angles		
		I	II	III
Distance(A)				
r_{CN1}	X-ray	3.193	3.346	3.984
	REDOR	*(3.243) **(3.259)	*(3.446) **(3.397)	*(4.084) **(4.029)
r_{CN2}		4.685	5.506	5.839
r_{CN3}		5.474	6.830	6.495
Angle(deg)				
λ_{12}	X-ray	141.44	138.38	139.09
	REDOR	*(155.0)	*(165.0)	*(155.0)
λ_{13}		70.37	104.21	102.27
λ_{23}		128.98	115.48	74.13

*Obtained by performing theoretical curve fitting to REDOR data using S_1 - I_1 - S_2 3spin system.

**Corrected values based on the equation $\langle r \rangle_{REDOR} = r_0 + \{ \langle u \rangle^2 + \langle v \rangle^2 - 4\langle w \rangle^2 \}$

用を直接観測している。NMR で得られる原子間距離は $\langle r \rangle_{REDOR} = \langle 1/r \rangle^{-1} = r_0 + (1/2r_0) \{ \langle u \rangle^2 + \langle v \rangle^2 - 4\langle w \rangle^2 \}$ で表わされる²⁾。 $\langle u \rangle$ 、 $\langle v \rangle$ および $\langle w \rangle$ は各々距離ベクトルに垂直な成分と平行な微小振幅成分で、 r_0 は X 線から得られる原子間距離である。この熱振動テンソルに基づく補正を行った値は、表 1 に示したように X 線回折で得られた値はよく一致していることが分かる。

さらに角度のずれは、原子間距離ベクトルの相対配向にのみ依存するため、3 スピン目以上の磁気双極子相互作用の寄与が存在していることを示している。実際表 1 に示したように、この試料は 4 スピン目の寄与が無視できないことが分かる。このずれが 4 つ目のスピンの影響であることを証明するために S_1 - I - S_2 、 $-S_3$ 4 スピン系の理論曲線を計算した。

さらに S_1 - I - S_2 、3 スピン系理論曲線のフィッティングにより得られた分子間幾何変数の精度を定量的に評価するために、各 NcTr での 3 スピン系理論曲線の $\Delta S/S_0$ 3spin を D_2/D_1 および λ_{12} を軸とした等高線マップを計算した。 D_1 、 D_2 は各々分子内、分子間磁気双極子相互作用、 λ_{12} はこれら原子間ベクトルのなす角度である。

<考察> 表 1 から、得られた分子内原子間距離のは X 線回折実験から得られた値より長いことが分かる。また角度も 15° 程度大きいことが分かる。このずれの原因を 2 つの要素に分解して考察した。

まず分子内原子間距離の長化は、X 線回折実験で得られた熱振動テンソルで表わされる微小振幅の分子運動が存在することが原因であると考えられる。X 線回折法では電子の密度を観測するのに対し、NMR では原子間距離の 3 乗分の 1 に比例する磁気双極子相互作用

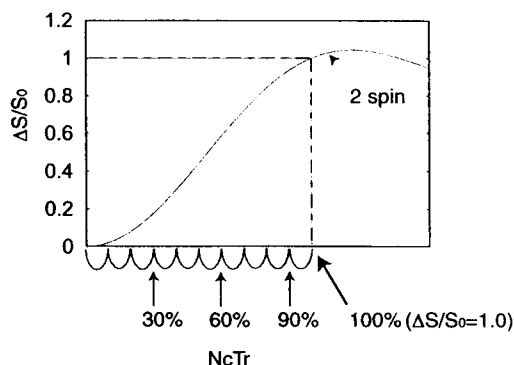


Fig. 5 Definition of $NcTr_{(\Delta S/S_0=1.0)}$

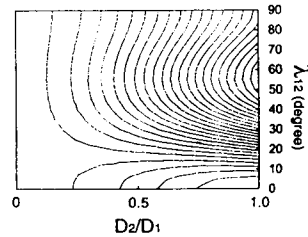
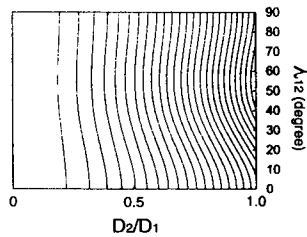
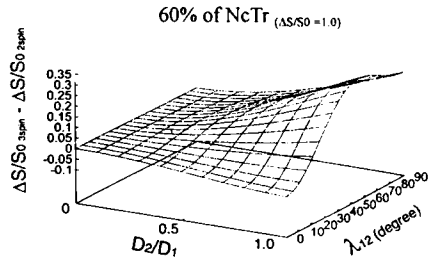
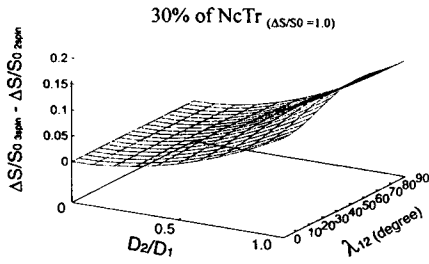


図5に示すように、いかなる実験にも適用可能であるような一般性のある NcTr 値を以下のように定義した。NcTr_(AS/S₀=1.0)は2スピン系理論曲線でΔS/S₀値が1.0を与えるNcTrとし、10%-100%まで10の時間領域に分割し、各10個のNcTrに対して上述の等高線マップを計算した。図6には各NcTrでの3スピン系理論曲線のΔS/S₀_{3spin} - ΔS/S₀_{2spin}の等高線マップを示す。図6から分かるようにΔS/S₀_{3spin} - ΔS/S₀_{2spin}の変数に対する依存性が各NcTrによって異なる。実験の精度に基づいて、可能な変数の領域を決定し、10個すべての等高線マップを重ねると可能な変数領域を求めることができる。得られた領域は試料Ⅰにおいて最高でD₂はD₁の5%、角度λ₁₂は±2.5°の精度であることが分かった。

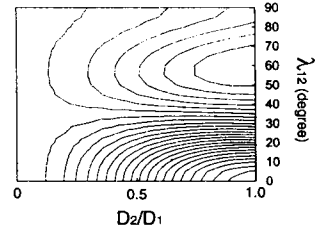
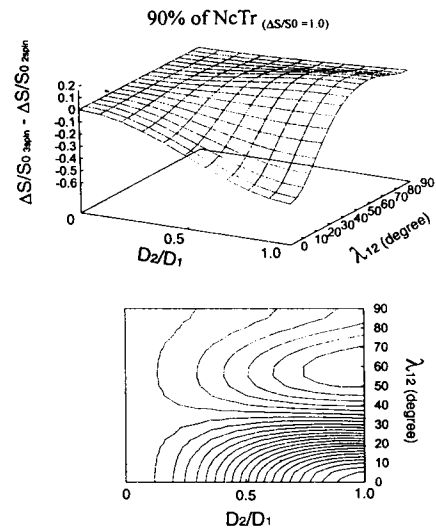


Fig. 6 Contour plot of $\Delta S/S_{0\ 3spin} - \Delta S/S_{0\ 2spin}$ in various NcTr.

さらにオピオイドペプチド Leu-enkephalin の(MeOH/H₂O)結晶における、隣接分子の相対配置決定についても発表する予定である。

- 1) A.Naito, K.Nishimura, S. Tuzi, and H. Saito. Chem. Phys. Letters, **229**, 506 (1994)
- 2) A.Naito, K.Nishimura, S.Kimura, M. Aida, N. Yasuoka, S. Tuzi, and H. Saito. J. Phys. Chem. **100**, 14995 (1996)
- 3) K.Nishimura, A.Naito, C. Hashimoto, S. Tuzi, and H. Saito. J. Phys. Chem. in press (1998)

P71

¹⁷O 高磁場固体高分解能 NMR 法を用いた
ペプチドおよびポリペプチドの構造解析

○山内一夫¹、黒木重樹²、安藤勲²、荘司顯³、尾崎拓男³
日本ブーカー¹、東工大・工²、群馬大・工³

Structural Analysis of Peptides and Polypeptides
Using High-Field High-Resolution Solid State ¹⁷O NMR

Kazuo Yamauchi¹, Shigeki Kuroki², Isao Ando², Akira Shoji³, Takuo Ozaki³
Bruker Japan¹,

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology²,
Department of Biological Sciences, Gunma University³

The ¹⁷O NMR spectra of peptides in the solid state were successfully measured at high field (9.4T, 11.7T, and 18.8T) and high speed MAS (25KHz). Three kinds of NMR parameters such as chemical shift, quadrupolar coupling constant and asymmetric parameters are obtained by theoretical simulation of these spectra. The relationship between three NMR parameters and the hydrogen-bonding structure was discussed.

緒言

酸素原子はペプチドおよびポリペプチド中で水素結合を形成するために重要な役割を果たしている。しかしながら、固体状態でのペプチド中での ¹⁷O の測定は簡単ではなかった [1]。これまでにポリペプチドの ¹⁷O スペクトルは粉末試料を静止状態で比較的低磁場下で行ってきた。このような状態で測定したスペクトルは NMR パラメータである核四極子結合定数(e^2qQ/h)、電場勾配の非対称パラメータ(η)、化学シフトテンソル(δ_{11} , δ_{22} , δ_{33})、二つの相互作用間のオイラー角(α, β, γ)という情報が得られる。しかしながら実際には核四極子相互作用が数 MHz あり化学シフトの異方性も大きいためスペクトル幅が 1000ppm 以上となりこのようなスペクトルでは正確な解析は難しかった。そこで、今回の測定では高速のマジック角で回転させ高磁場で測定を行った。十分高速なマジック角回転をすれば化学シフトの異方性と1次の核四極子相互作用を消去でき等方的化学シフト(δ_{iso})、核四極子結合定数(e^2qQ/h)、電場勾配の非対称パラメータ(η)の三つのパラメータが決定できる単純な線形になる。更に核四極子相互作用による線幅は共鳴周波数に反比例するので高磁場での測定により線幅を狭くさせることを行った。この二つの組み合わせによりスペクトルの主ピークとスピニングサイドバンドを完全に分離することができた。このスペクトルから等方的化学シフト(δ_{iso})、核四極子結合定数(e^2qQ/h)、電場勾配の非対称パラメータ(η)が得られ、構造の違うポリペプチドについて NMR のパラメータの違いが構造の違いに起因していることがわかった。

¹⁷O、固体高分解能 NMR、固体高磁場 NMR、ペプチド、化学シフト

やまうちかずお、くろきしげき、あんどういさお、しょうじあきら、おざきたくお

実験

^{17}O NMR スペクトルの測定は Bruker 社製 Avance400 (磁場強度 9.4T, ^1H 共鳴周波数 400MHz), Avance500 (磁場強度 11.7T, ^1H 共鳴周波数 500MHz), Avance800 (磁場強度 18.8T, ^1H 共鳴周波数 800MHz)分光器を用い それぞれ ^{17}O の周波数 54.2MHz, 67.8MHz, 108.5MHz で測定を行った。ポリペプチドのサンプルとして α -helix を形成している(L-Ala) $_n$ [A/I=100]と β -sheet を形成している(L-Ala) $_n$ [A/I=5]をもちいた。NMR スペクトルは 54.2MHz, 67.8MHz では 15KHz のマジック角回転、では 25KHz のマジック角回転下で測定を行った。いずれの場合もゲートつきデカップリング法を用いた。スペクトルの解析には Bruker 社製 WINFIT を用い等方的化学シフト(δ_{iso}), 核四極子結合定数(e^2qQ/h), 電場勾配の非対称パラメータ(η)を求めた。

結果・考察

Figure 1 に(L-Ala) $_n$ [A/I=100] の 54.2MHz, 67.8MHz でのスペクトル、Figure 2 に(L-Ala) $_n$ [A/I=5]の 54.2MHz, 67.8MHz でのスペクトルを示す。この程度の磁場及び回転数でサンプルの信号は観測されているがスピニングサイドバンドが主ピークと重なり特に主ピークのベースライン近辺の正確な線形を解析するには十分でないことがわかる。Figure 3 に 108.5MHz での二つのサンプルのスペクトルを示す。高磁場中で高速回転を行うことによってスピニングサイドバンドとの重なりもなく十分解析できる線形をえることができた。このことからシミュレーションにより正確な等方的化学シフト、核四極子結合定数、電場勾配の非対称パラメータを求めるために高磁場(67.8MHz)での測定と高速回転(25KHz)での MAS を行うことが有効な手段であることがわかった。

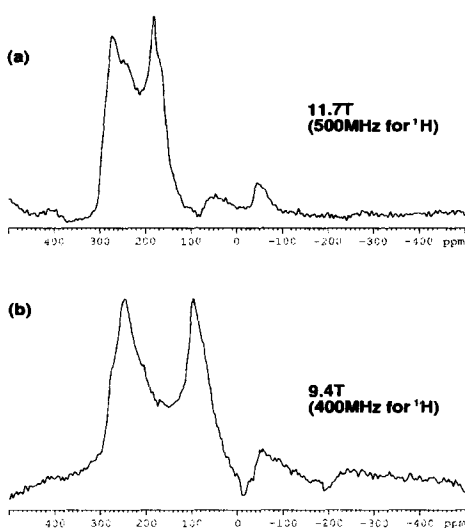


Figure 1 ^{17}O MAS NMR spectra of solid (L-Ala) $_n$ [A/I=100] with an α -helix form at 67.8MHz(a) and 54.2MHz(b) spun at 15KHz.

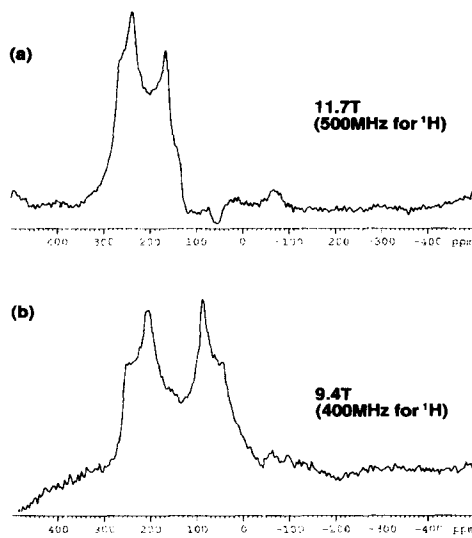


Figure 2 ^{17}O MAS NMR spectra of solid (L-Ala) $_n$ [A/I=5] with a β -sheet form at 67.8MHz(a) and 54.2MHz(b) spun at 15KHz.

この 108.5MHz で測定を行ったスペクトルを基に NMR のパラメータ(等方的化学シフト、核四極子結合定数、電場勾配の非対称パラメータ)をシミュレーションにより得ることができた(Table 1)。静止試料に対して行った以前の研究より水素結合距離が短くなると核四極子結合定数は減少し化学シフトは高磁場シフトするということがわかっている [1]。今回の結果もそれらの傾向と一致し高磁場、高速回転下でより信頼性の高い値実験結果を得ることに成功した。

さらに発表においては構造による NMR パラメータの変化と水素結合距離についての知見を理論計算結果と合わせて紹介する[2]。

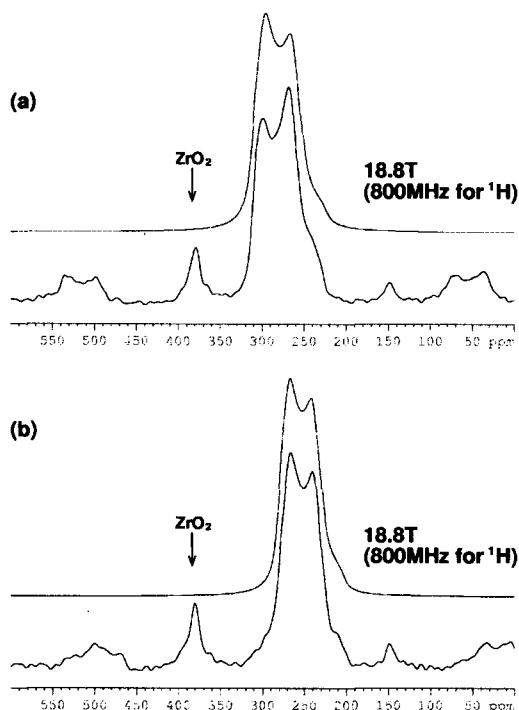


Figure 3
 ^{17}O MAS NMR spectra spun at 25KHz of solid $(\text{L-Ala})_n$ [A/I=100] with an α -helix form(a), and solid $(\text{L-Ala})_n$ [A/I=5] with a β -sheet form(b) at 108.6MHz with theoretically simulated spectra.

Table 1 The determined NMR parameters of $(\text{L-Ala})_n$

	α -helix	β -sheet
e^2qQ/h (MHz)	8.59	8.04
η	0.28	0.28
δ_{iso} (ppm)	319	286
$R_{N...O}$ (Å)	2.87	2.83

References

- [1] S. Kuroki, A. Takahashi, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki, *J.Mol.Struct.* **323** (1994) 197
 [2] S. Kuroki, K. Yamauchi, H. Kurosu, S. Ando, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki, *ACS Series* (1999) to be submitted.

謝辞

AVANCE500 NMR 分光計を使用しての高速 MAS 測定は防衛大学の浅野敦志博士、AVANCE800 NMR 分光計を使用しての高速 MAS 測定は Bruker Analytik GmbH の Dr. Stefan Steuernagel に多大な協力を得たことを感謝いたします。

Resolution Improvement of Magic-Angle Spinning
NMR Spectra in Solid Paramagnetic Compounds
Using Two-Dimensional ¹³C-D Transferred-Echo Double Resonance
Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University,
Kyoto 606-8502, Japan

○Toshiki Itoh, Atsushi Kubo, and Takehiko Terao

Abstract: In powder samples of paramagnetic compounds, the discontinuous change of bulk magnetic susceptibility at the crystallite surfaces causes broadening in one-dimensional magic-angle spinning (MAS) NMR spectra and often yields splittings due to small chemical or paramagnetic shift differences unobservable. Here, we performed two-dimensional ¹³C-D transferred-echo double resonance (TEDOR) NMR experiments on Pr(¹³CD₃¹³COO)₃ · D₂O.

【序論】 常磁性物質の粉末試料は試料中にBMS (bulk magnetic susceptibility) による反磁場が生じるためMAS NMRシグナルの線幅が広くなり、化学シフトによるピークの分裂が観測されない。そこで結晶学的に非等価な3つの酢酸基をもつ酢酸プラセオジウム1水和物Pr(¹³CD₃¹³COO)₃ · D₂Oを試料として、2次元TEDOR法および2次元異種核間多量子NMR法にて¹³CまたはDのシグナルを観測した。

【理論】 (Fig.1) のようなパルス系列を用いてメチル基の重水素のNMRスペクトルを観測する。*t_r*時間はTr (rotor period) の整数倍にとった。メチル基 (C-D₃) のハミルトニアンは、(Fig.1) の *t_r* 時間と acquisition period では [1] 式で与えられ、mixing period では [2] 式で与えられる。

$$H_z = \omega_I \sum_{\alpha} I_z^{\alpha} + \omega_S S_z \quad [1]$$

$$H_D = 2\bar{\omega}_D \sum_{\alpha} I_z^{\alpha} S_z \quad \alpha = 1, 2, 3 \quad [2]$$

ただし、 $\bar{\omega}_D$ (average dipolar frequency) は次式で与えられる。

$$\bar{\omega}_D = \pm D \left\{ 2\sqrt{2} \sin 2\beta \sin \left(\alpha + \omega_r \frac{\text{Tr}}{4} \right) \right\} \quad [3]$$

ω_r : スピニングスピード (rad/s) ($\omega_r \text{Tr} = 2\pi$)

α, β : ローター軸に対する I-S 核間ベクトルの方位角、極角の初期値 (rad)

D: 双極子結合定数 (Hz)

このパルス系列の cosine の実験における I_3 -S 系の直積演算子展開は以下のようになる。(観測される信号に関連する項のみを示した。)

$$S_z \xrightarrow{\left(\frac{\pi}{2}\right)_y} S_x \xrightarrow{H_z \times t_1} S_x \cos \omega_S t_1$$

$$\xrightarrow{H_D \times 2m\text{Tr}} 2 \cos \omega_S t_1 \cdot \sin 2\bar{\omega}_D m\text{Tr} \cdot \cos^2 2\bar{\omega}_D m\text{Tr} \cdot \sum_{\alpha} I_z^{\alpha} S_y$$

$$\xrightarrow{\left(\frac{\pi}{2}\right)_x} 2 \cos \omega_S t_1 \cdot \sin 2\bar{\omega}_D m\text{Tr} \cdot \cos^2 2\bar{\omega}_D m\text{Tr} \cdot \sum_{\alpha} I_z^{\alpha} S_z$$

Keywords: 固体¹³C-D 2次元相関MAS NMR法、常磁性物質、2次元TEDOR法

いとう としき、くぼ あつし、てらお たけひこ

$$\begin{aligned} \left(\frac{\pi}{2}\right)_x^I &\rightarrow -2 \cos \omega_s t_1 \cdot \sin 2\bar{\omega}_D m \text{Tr} \cdot \cos^2 2\bar{\omega}_D m \text{Tr} \cdot \sum_{\alpha} I_y^{\alpha} S_z \\ \xrightarrow{H_D \times 2n \text{Tr}} &\cos \omega_s t_1 \cdot \sin 2\bar{\omega}_D m \text{Tr} \cdot \cos^2 2\bar{\omega}_D m \text{Tr} \cdot \sin 2\bar{\omega}_D n \text{Tr} \cdot \sum_{\alpha} I_x^{\alpha} \end{aligned} \quad [4]$$

[4] 式の係数がある配向(α, β)にたいするシグナルの大きさを意味する。

$$S(m \text{Tr}, n \text{Tr}, \alpha, \beta) = \sin 2\bar{\omega}_D m \text{Tr} \cdot \cos^2 2\bar{\omega}_D m \text{Tr} \cdot \sin 2\bar{\omega}_D n \text{Tr} \quad [5]$$

とおけば、粉末試料でのシグナルの大きさは α, β についての平均で与えられる。

$$\langle S(m \text{Tr}, n \text{Tr}) \rangle = \int_{\alpha=0}^{2\pi} \int_{\beta=0}^{\pi} S(m \text{Tr}, n \text{Tr}, \alpha, \beta) \sin \beta d\beta d\alpha \quad [6]$$

シグナルの大きさは m, n に依存するので、2次元の実験を最適化するためにシグナルが最大となるような(m, n)を理論的にもとめる。

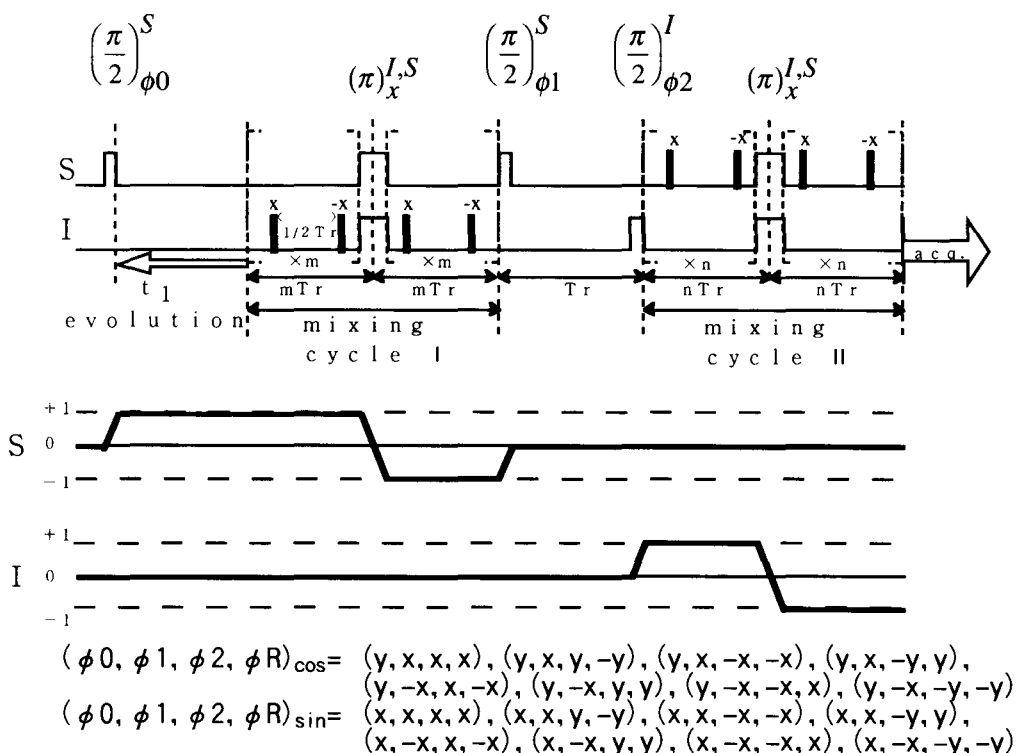


Fig.1 A pulse sequence, coherence pathways, and phase cycling for the two-dimensional TEDOR NMR experiment

The black squares denote π pulses which are inserted in each rotor period (Tr) of the mixing periods I and II. The first π pulse of the rotor period is applied at a time $\text{Tr}/4$ from the beginning of the rotor period, and the interval between the first π pulse and the second one is a half rotor period.

【実験】 試料として ^{13}C およびDで標識した酢酸プラセオジウム1水和物の粉末試料を用い、Chemagnetics社製CMX400NMR分光器とDoty社製3重共鳴プローブ(5mmφローター)を用いて、スピニング周波数10000Hz(ローター周期100 μs)で実験を行った。共鳴周波数 ^{13}C :100MHz、D:61MHzであった。 ^{13}C の基準にはアダマンタン(29.5ppm)、Dの基準にはTKS(tetrakis silane)((CH_3) $_3\text{Si}$) $_4\text{Si}$ (0.27ppm)を用いた。

【結果及び考察】 [6]式をコンピューターシミュレーションにより計算した結果が(Fig.2)である。mの増加にたいしてシグナルはほぼ単調減少するが、nについてはシグナルはn=3で最大値をとる。したがって、(m,n)=(1,3)でシグナルが最大になるはずである。しかし実験により確認したところ、シグナルが最大になるのは(m,n)=(1,4)のときであったのでこの値を用いて2次元スペクトルを観測した。

1次元NMR法では重なって見えなかった3つのメチル基のピークがはっきりと分離、観測できた。(Fig.3) 2次元スペクトルはケミカルシフトを軸にとると、周波数の単位では傾き1の方向にのびており、この試料の ^{13}C およびDのMASNMRシグナルのブロードニングがBMSによる不均一幅によることを示している。カルボニル基のピークは観測されなかったことにより、カルボニル基の ^{13}C とメチル基のDとの双極子結合はきわめて弱いことがわかる。(Fig.3)のピークの中心の位置から、酢酸プラセオジウムの3つのメチル基の ^{13}C およびDのケミカルシフトを、

$$(\sigma(^{13}\text{C}), \sigma(\text{D})) = (13.63\text{ppm}, 94.73\text{ppm}), (8.86\text{ppm}, 79.23\text{ppm}), (-8.63\text{ppm}, 30.15\text{ppm})$$

と決定した。

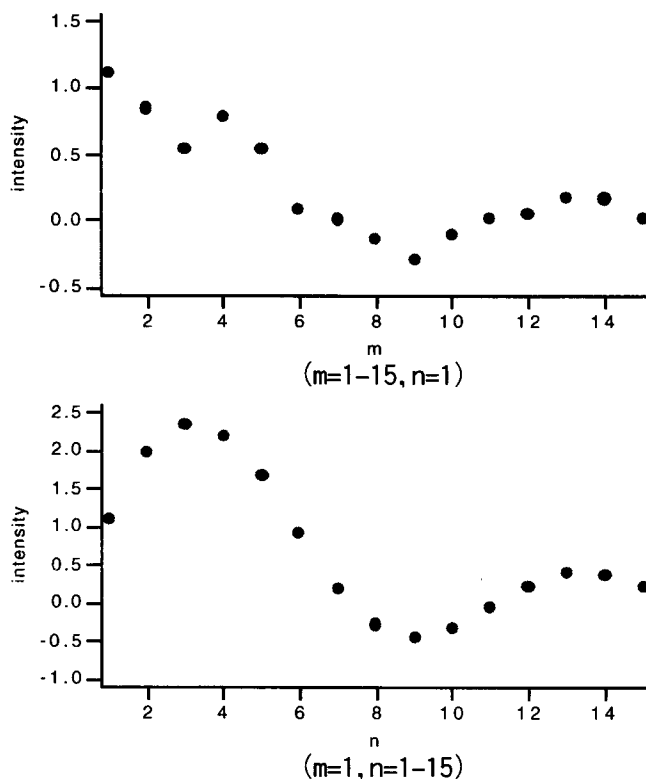


Fig.2 Result of the computer simulations of eq.[6]

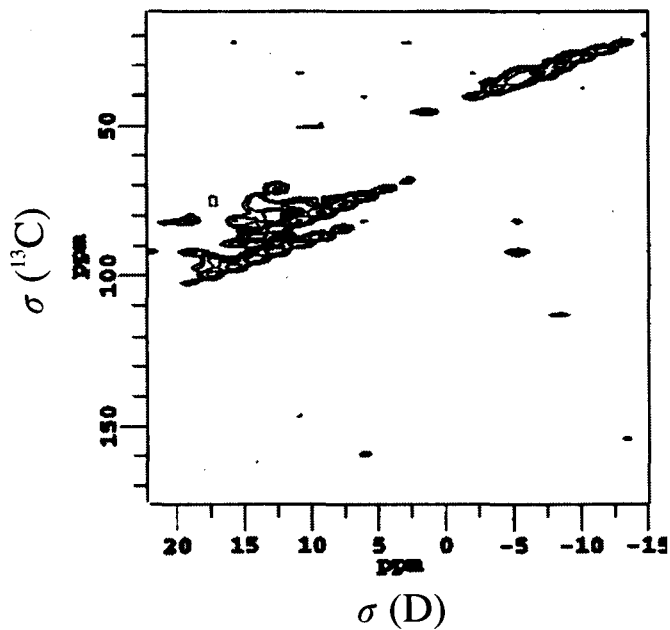


Fig.3 Two-dimensional TEDOR spectrum of $\text{Pr}(\text{}^{13}\text{CD}_3\text{}^{13}\text{COO})_3 \cdot \text{D}_2\text{O}$
 64 free induction decays were accumulated. A total of 60 t_1 data with 4096 points were collected.

[参考文献]

- (1) Andrew W. Hing, Shimon Vega, and Jacob Schaefer
J. Magn. Reson. A103, 151–162 (1993)
- (2) Thomas P. Spaniol, Atsushi Kubo, and Takehiko Terao
J. Phys. Chem. 1997, 106, 5393–5405
- (3) John V. Muntean and Leon M. Stock
J. Magn. Reson. 76, 540–542 (1988)

Recoupling of ^{13}C - ^1H heteronuclear dipolar interactions under magic angle spinning based on frequency-switched Lee-Goldburg sequences

(Kyoto Univ.) K. Takegoshi and T. Terao

(Abstract) We propose a new ^{13}C - ^1H recoupling method under MAS based on rotor-synchronized frequency switched Lee-Goldburg irradiation, which is designed to work even at a very high spinning speed upto 30kHz.

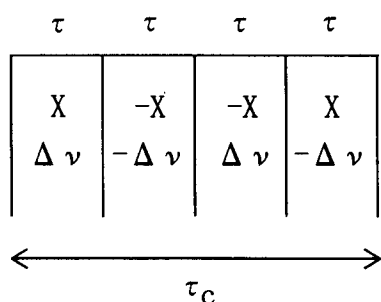


Figure 1. The proposed pulse sequence for ^{13}C - ^1H recoupling under MAS.

Fig.1 shows the proposed recoupling pulse cycle applied to ^1H . The intensity and the duration time for all four pulses are ν_1 and τ , respectively, and the total cycle time τ_c is 4τ . The phase and the frequency for the four pulses are given as (phase, offset frequency) = $(X, \Delta\nu)$, $(-X, -\Delta\nu)$, $(-X, -\Delta\nu)$, and $(X, -\Delta\nu)$, respectively. The offset and the intensity for each pulse are chosen to satisfy the Lee-Goldburg (LG) conditions[1] as $\sqrt{2}\Delta\nu = \nu_1$, and the duration time as $\tau = \sqrt{2/3}/\nu_1$. Apparently, the first two LG pulses are the pulse cycle called FSLG-2 (frequency-switched Lee-Goldburg)

[2], which is designed to remove homonuclear dipolar couplings among ^1H spins at the zeroth and all odd orders of the average Hamiltonians. The proposed sequence, hence, consists of two FSLG-2 cycles whose effective fields lie either along $(X,0,Z)$ or $(-X,0,Z)$ in the rotating frame, and we shall call this sequence as FSLG-2 $\bar{2}$.

The modulation of the spatial part caused by MAS can be interfered by the modulation of the spin part caused by FSLG-2 $\bar{2}$ when the following condition $\tau_c^{-1} = \nu_c = n\nu_1$ ($n = 1$ or 2) is satisfied. The recoupled heteronuclear dipolar interaction at the zeroth-order approximation may be given as

$$\overline{\mathcal{H}_D^{(0)}} = -\frac{2d}{\pi} \sin \theta_{\text{MA}} \cos \theta_{\text{MA}} G_n \sin(n\gamma) I_X S_Z \quad (1)$$

To achieve sufficient homonuclear decoupling, ν_1 larger than 50kHz may be required. Practically, therefore, the modulation frequency ν_c for ν_1 of 50 ~ 100kHz is ca. 15 ~ 30kHz. Therefore, the spinning speed, which satisfies the recoupling condition, is ranging

Key Words: 固体NMR、MAS、双極子相互作用、FSLG

たけごしきよりの、てらおたけひこ

from ca. 15 ~ 30kHz for the $n = 1$ condition, and ca. 7.5 ~ 15kHz for the $n = 2$ condition. The $n = 1$ condition for a spinning speed of less than 15kHz can also be realized by doubling the cycle time of the basic FSLG- $2\bar{2}$ sequence by either using 4π LG pulses instead of 2π LG pulses or using a new 8-pulse sequence defined as $(X, \Delta\nu)$, $(-X, -\Delta\nu)$, $(X, \Delta\nu)$, $(-X, -\Delta\nu)$, $(-X, \Delta\nu)$, $(X, -\Delta\nu)$, $(-X, \Delta\nu)$, and $(X, -\Delta\nu)$. We refer the latter sequence to FSLG- $4\bar{4}$. Similarly one can further extend the cycle time to find recoupling conditions for slower spinning conditions. In general, the sequence may be represented as FSLG- $m\bar{m}$ with $m = 2, 4, 6, \dots$

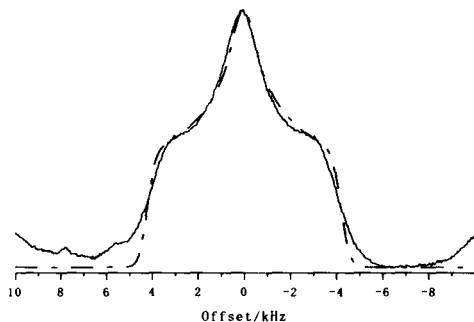


Figure 2. The experimental (solid) and simulated (dash-dotted) FSLG- $4\bar{4}$ spectra for the $C_{\alpha}H$ carbon of *l*-Valine.

Figure 2 shows the experimental (the solid line) and the simulated (the dashed line) lineshapes for the CH carbon of [2- ^{13}C , ^{15}N]-labeled *l*-valine ($^{13}C \sim 99\%$), which was kindly provided by Prof. M. Kainosho at Tokyo Metropolitan University. The rf intensity ν_1 for the LG pulse was 70.88kHz, and its corresponding τ is $11.5\mu s$. With $1\mu s$ for frequency/phase jump, τ_c becomes $50\mu s$. The $n = 1$ condition was fulfilled by using the FSLG- $4\bar{4}$ sequence with the MAS spinning speed of 10.00kHz, which was stabilized to within $\pm 10Hz$.

Since the intensities of unlabeled carbons are small, the FID under FSLG- $4\bar{4}$ decoupling were collected directly in one dimension. Further, sampling was done without synchronization to the spinning. This produces spinning side-bands at $\pm 10kHz$. However, since a maximum breadth of a directly bonded ^{13}C - 1H pair is normally in the range of 6-8kHz, the side-bands appear at the out-side of the dipolar powder pattern. The simulated lineshape (Fig.2; the dash-dotted line) obtained from Eq.(1) ($\tau=0.115nm$) with 15Hz Gaussian broadening is compared favorably with the experimental lineshape (Fig.2; the solid line). Several applications of the FSLG- $m\bar{m}$ sequence are envisaged, for example, correlation of two dipolar vectors to determine angles, and will be presented.

Reference

- [1] M. Lee and W.I. Goldberg, *Phys. Rev. A* **140**, 1261 (1965).
- [2] A. Bielecki, A.C. Kolbert, and M.H. Levitt, *Chem. Phys. Lett.* **155**, 341 (1989);
A. Bielecki, A.C. Kolbert, H.J.M. de Groot, R.G. Griffin, and M.H. Levitt, *Adv. Magn. Reson.* **14**, 111 (1990).

P74

回転試料中の同種核 2 スピン系に対するスピンエコーパルス系列の効果

(分子研1、筑波大・物理工2)○桑原大介1、中井利仁2、宮島清一1

Spin-echo experiments for homonuclear coupled spins under magic-angle sample spinning

Additional resonance lines emerged along the F_1 axis on a two-dimensional (2D) NMR spectrum when the 2D spin-echo pulse sequence was applied to a ^{13}C - ^{13}C spin system under magic-angle sample spinning. We found that the intensities of the additional lines are closely related to the homonuclear dipolar interaction and that the positions of the lines are determined by a sample spinning frequency and the difference of the isotropic chemical shifts.

マジック角で回転している 2,3- ^{13}C -L-alanine の ^{13}C - ^{13}C 2 スピン系に 2 次元スピンエコーパルス系列を適用すると、 F_1 軸上のスペクトルは $F_1 = 0\text{Hz}$ の中心線のみならず、何らかの付加的な共鳴線を示すことが実験的に明らかになった。過去には、マジック角で回転している ^{31}P - ^{31}P 2 スピン系に同じパルス系列を使った実験がいくつかのグループで行われている^{1,2,3}。それらの実験結果に現れた付加的な共鳴線はすべて J -coupling によるものであった。

本研究では、参考文献 1 に示された 2 次元 FID の表式を利用して、 ^{13}C - ^{13}C 2 スピン系に対して生じた付加的な共鳴線の由来を明らかにすることを試みた。その結果、それらの共鳴線の強度は ^{13}C - ^{13}C 双極子相互作用を大きく反映していることがわかった。また共鳴線の位置は、試料の回転周波数と ^{13}C - ^{13}C の化学シフト等方値の差で決まることを見いだした。さらに Floquet 理論を基にしたシミュレーションプログラムと multiple-time-step 法を使ったプログラムを作成した。そして実験的に得られたスペクトルを計算機シミュレーションにより再現することを行った。

会場では、シミュレーションスペクトルと実験結果を比較することで系の相互作用に関する情報を求めることについて議論したい。

〈参考文献〉

1. J. Chem. Phys. 92, 7156 (1990)
2. J. Chem. Phys. 94, 7038 (1991)
3. J. Chem. Phys. 98, 6138 (1993)

キーワード：同種核 2 スピン系、マジック角試料回転、スピンエコー、Floquet 理論

くわはらだいすけ、なかいとしひと、みやじませいいち

(京大院理、マルチン・ルター大¹) ○水野 敬、D. Reichert¹、竹腰清乃理、寺尾武彦

Deuteron One-Dimensional Exchange NMR in Solids

(Kyoto Univ., Martin Luther Univ.¹) T. Mizuno, D. Reichert¹, K. Takegoshi, T. Terao

Abstract

A 1D spin-exchange method for obtaining structural information in selectively deuterated organic solids is proposed on the basis of a recently developed 2D-experiment. It utilizes $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{D}$ cross polarization, a narrowband excitation of the ^2D -powder pattern as well as polarization transfer (spin diffusion) between deuterons stimulated by sample turning during the mixing time. The method was demonstrated for the determination of bond angles in α -Glycine-[2,2-d₂].

近年、我々は、スピン拡散により生じた2つの重水素間の2次元交換パターンを解析することで、結合間角度を測定できることを示した[1]。一般に2つの異なる重水素間の2次元交換スペクトルは、Fig.1に見られるようなリサージュ型のリッジを示す。我々は、このリサージュのある ω_1 周波数における1次元スペクトルには2次元と全く同じ情報が含まれていることに着目し、選択励起を用いることにより、重水素1次元交換NMR法を開発した。

実験は、以下の手順で行った。パルス系列はFig.2に示されている。

1) 選択励起：二次元スペクトルにおける ω_1 軸の周波数を一意的に選択する目的で選択励起を行う。まず、 $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{D}$ の交差分極(CP)により、 ^2D のon-resonance付近の横磁化を選択的に分極する。励起幅は ^2D のRF強度によるために、CPを保ちつつRF強度を下げることで選択性を上げることが出来る。我々はCP-TAPF法[2]により、 ^1H (照射周波数: 300.455359MHz)に60kHzのRFを、 ^2D (照射周波数: 46.1216MHz)に10kHz以下の弱いRFパルスを照射して線幅 $\sim \pm 7\text{kHz}$ 程度の選択性を得た。さらにCPで生じた横磁化をZ方向に戻す際に、単一の強い90°パルスの代わりに、DANTEパルス[3]を用いることで、さらなる選択を行い $\pm 2\text{kHz}$ の選択励起を実現できた。

2) スピン拡散：混合時間における磁化交換はスピン拡散により行われる。ところが、 ^2D の場合、四極子による共鳴周波数の差の方が $^2\text{D} - ^2\text{D}$ 双極子相互作用よりも大きい

Key Words: スピン拡散、選択励起

みずのたかし、でとれふらいへると、たけごしきよのり、てらおたけひこ

め、そのままではスピン拡散が遅い、または起こらない。そこでスピン拡散を促進するため、磁場に垂直な軸廻りの試料回転を行った。試料回転下の四極子相互作用 ω_{Qi} は

$$\omega_{Qi} = \frac{3}{8}\chi \left\{ -\frac{1}{2}(3\cos^2\beta_i - 1) + \frac{3}{2}\sin^2\beta_i \cos[2\Psi(\tau) + 2\gamma_i] \right\} \quad (i=1,2)$$

と表される。ここで、 $(0, \beta_i, \gamma_i)$ は、四極子結合テンソルの主軸系から試料回転系へのオイラー角で、 $\Psi(\tau)$ は混合時間中の試料の回転角である。 $i=1,2$ 間のスピン拡散は、 $\omega_{Q1} = \omega_{Q2}$ のとき生じる。今回の実験では、混合時間中に $+180^\circ$ 、 -180° 半回転を1回づつ行った。

3) 観測： ^2D のFIDを四極子エコーで観測した。エコーの条件は 90° パルス幅が $2\mu\text{s}$ 、パルス間隔が $20\mu\text{s}$ である。

試料として、 α グリシンのメチレン基を重水素化した、 α -Glycine-[2,2- d_2] ($\text{NH}_2\text{CD}_2\text{COOH}$)を用いた。

得られた1次元交換スペクトルをFig.3に示す。混合時間は500msである。我々は先に測定した2次元スペクトルより、CD間の結合間角度 108.6° と求めた。これに対応する1次元交換スペクトルにおける磁化交換によるピークは、

$$\begin{aligned} &\pm 69\text{kHz}, \pm 63\text{kHz}, \pm 58\text{kHz}, \\ &\pm 3\text{kHz}, \pm 105\text{kHz}, \pm 111\text{kHz} \end{aligned}$$

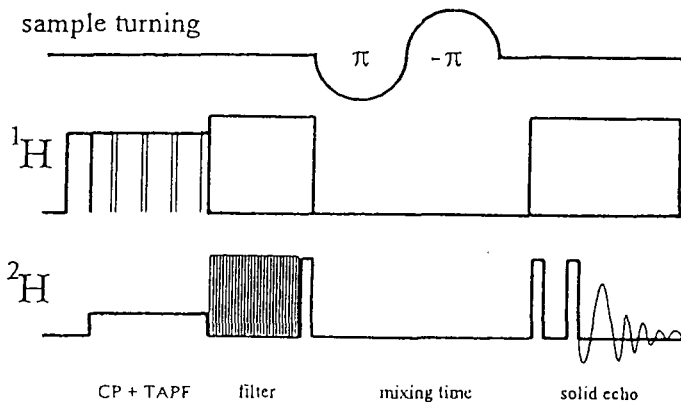
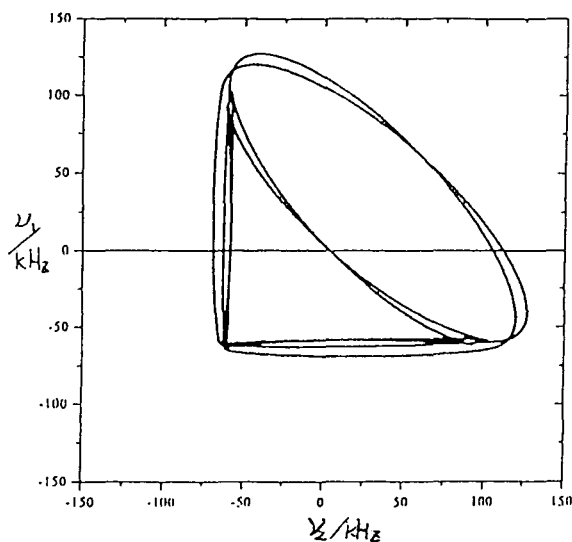


Figure 1: Deuteron 2D-exchange NMR spectrum (ridge plot). The horizontal line denotes an irradiate frequency of the experiment.

Figure 2: Pulse sequence of deuteron 1D-exchange NMR experiment.

に現れると計算された。測定で得られた $\pm 57.2\text{kHz}$ 、 $\pm 62.0\text{kHz}$ 、 $\pm 67.9\text{kHz}$ 、 $\pm 103.0\text{kHz}$ 、 $\pm 109.8\text{kHz}$ のピークはそれぞれ計算値とよい一致を示している。ところが実験で得られた $\pm 46\text{kHz}$ のピークは分子内では説明できず、これは結晶のデータ [4,5] より、重水素間の距離 2.75Å 、二つの C-D 間の角度 69.6° の分子間の磁化交換によるものであると思われる。このピークが分子間の磁化交換によるものであることは、混合時間を 200ms にした 1 次元交換スペクトル (Fig.4) をとった時に、このピークの強度が減少したことから示される。

2 次元交換スペクトルでは、この $\pm 46\text{kHz}$ のピークは他の信号に埋もれて判別出来なかったが、1 次元交換スペクトルをとることによって初めて判別することが出来た。また、今回の実験では混合時間 500ms で距離約 3Å のスピン拡散を達成することが出来たが、 ^2D は一般に T_1 が長いものが多いためもっと混合時間を長く設定できるために、さらに遠い ^2D 間のスピン拡散を観測する (つまり 10Å 程度の遠い所にある C-D 間の角度を測定する) ことも可能である。

Figure 4: (a) Deuteron 1D-exchange NMR spectrum (mixing time 500 msec), (b) Deuteron 1D-exchange NMR spectrum (mixing time 200 msec), where without a selective pulse of excitation by DANTE.

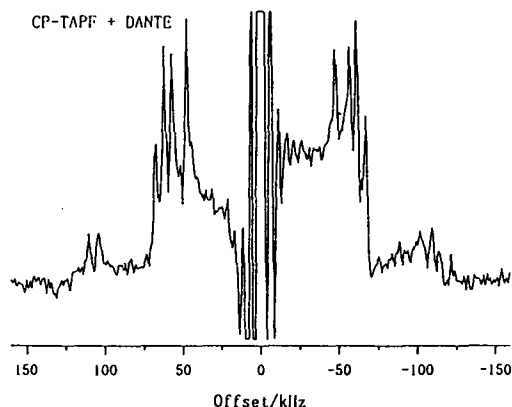
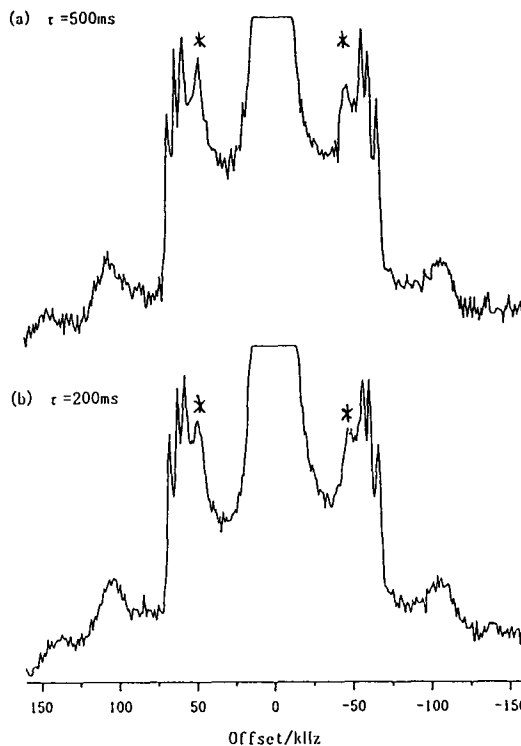


Figure 3: Deuteron 1D-Exchange NMR spectrum (mixing time 500 msec).



References

- [1] K.Takegoshi, M.Ito, T.Terao, Chem.Phys.Lett. 260(1996),159
- [2] K.Takegoshi, C.A.McDowell, J.Magn.Reson. 67(1986),356
- [3] G.Bodenhausen, R.Freeman, G.A.Morris, J.Magn.Reson. 23(1976)171
- [4] P.G.Jönsson, A.Kvick, Acta.Cryst.B 28(1972)1827
- [5] L.F.Power, K.E.Turner, F.H.Moore, Avta.Cryst.B 32(1976)11

P76

^1H NMR (CRAMPS) による ポリペプチドの固体構造解析 (7)

(群馬大工¹、日本電子²、味の素³) ○木村英昭¹、杉沢寿志²、出口健三²、
海老沢計慶³、鈴木榮一郎³、莊司顯¹

Structural Study of α -Amino-Acid Crystals by ^1H NMR (CRAMPS) (7)

(¹Dept. Biological Sciences, Gunma University, ²NMR Application Lab., JEOL Ltd.,

and ³Central Research Laboratories, Ajinomoto Company, Inc.)

Hideaki Kimura¹, Hisashi Sugisawa², Kenzo Deguchi²,

Kazuyoshi Ebisawa³, Ei-ichiro Suzuki³ and Akira Shoji¹

Abstract: ^1H CRAMPS NMR method was applied to structural analysis of polymorphic forms of α -amino acid crystals, in order to test the power of ^1H CRAMPS NMR compared with the ^{13}C and ^{15}N methods. We have studied two different stages of α -amino acid crystals: α -glycine and γ -glycine, and A-histidine and B-histidine. As a result, it was found that the α -methylene proton (H^α) signal of α -glycine splits into two peaks (4.4 and 3.4 ppm), but that of γ -glycine gives a singlet peak (3.3 ppm), which was reasonably explained by the ^1H electrostatic potential (ESP) charge calculation for this glycine system. Furthermore, it was found that the ^1H chemical shift difference between H^2 and H^5 peaks from the imidazole ring of A-histidine (0.4 ppm) could easily be distinguished from that of B-histidine (0.9 ppm). Thus, the ^1H chemical shifts of α -amino acids are very sensitive to a slight difference in magnetic surroundings of protons as well as to difference of the hydrogen bond network. Therefore, the ^1H CRAMPS NMR spectra are very useful for the structural analysis of α -amino acid crystals.

1. 緒言

これまで我々は、 ^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) 化学シフト値及びアミドプロトン (NH) 化学シフト値が主鎖のコンホメーション解析や水素結合の研究に有効であることを見出した¹⁻²⁾。今後 ^1H CRAMPS 法はポリペプチドの固体構造解析に強力な武器となるであろう。

キーワード： ^1H CRAMPS NMR、化学シフト、結晶構造、グリシン、L-ヒスチジン

○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
えびさわ かずよし、すずき えいいちろう、しょうじ あきら

今回我々は、 ^1H CRAMPS 法を α -アミノ酸結晶構造解析に応用した³⁾。アミノ酸には結晶多形を持つものがあり、その結晶形態を決定する要因はアミノ基とカルボキシル基間の水素結合が分子間を作るネットワークであると考えられている。それなら、 ^1H 核は水素結合に直接関与しているので、 ^1H 化学シフトは ^{13}C や ^{15}N 化学シフト以上にその結晶構造の違いを敏感に反映すると予想される。そこで本研究では、分子のコンホメーションはほぼ同じく、水素結合様式が異なる結晶多形として知られるグリシンの α 形と γ 形、ヒスチジンのA形とB形について、結晶構造の違いと ^1H , ^{13}C , ^{15}N 化学シフト値との相関を調べた。NMR 法はこれらのアミノ酸の結晶構造解析、すなわち、異なる結晶多形をNMR スペクトルで識別できるかどうか、について議論する。特に、グリシンは固体高分解能 ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR の標準物質として用いられており、結晶構造の違いによりそれらのスペクトルに重大な違いが生じるのであれば、グリシンを標準物質として用いるには注意が必要であることを喚起しなければならない。

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) を内部基準とした。パルス列として BR-24 を使用し、90度パルス幅: 1.3 μs 、 τ : 3 μs 、回転周波数: 1.5–2.0 kHz、待ち時間: 10 s とし、スケールリングファクターは 0.40 を用いた。

3. 結果及び考察

Figure 1 にグリシンの 75 MHz ^{13}C CP-MAS NMR スペクトル: (A) グリシン α 形、(B) グリシン γ 形を示す。これらのスペクトルでは、ピークが 2 つの領域 (C=O, CH_2) に現れ、それぞれの ^{13}C 化学シフトは、C=O ピーク (α : 176.4 ppm; γ : 174.6 ppm)、 CH_2 ピーク (α : 44.0 ppm, 43.6 ppm ; γ : 42.9 ppm, 42.5 ppm) で、両結晶形の違いにより 1 ppm より大きい差が観測される。したがって ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルからこれらの結晶多形を識別することが可能である。一方、 ^{15}N 化学シフト値は、Figure 2 に示すように両者は非常に近い値 (α : 11.6 ppm ; γ : 12.3 ppm) をとるので、 ^{15}N 化学シフトの誤差が ± 0.3 ppm 程度であることを考えると、 ^{15}N CP-MAS NMR スペクトルからグリシン α 形と γ 形を識別することは困難である。

Figure 3 にグリシンの 300 MHz ^1H CRAMPS NMR スペクトル: (A) グリシン α 形、(B) グリシン γ 形を示す。これらのスペクトルは 2 つの領域 (低磁場から NH, CH_2) に分かれる。注目すべきは、メチレンプロトン (H_α) シグナルが α 形ではダブルレット

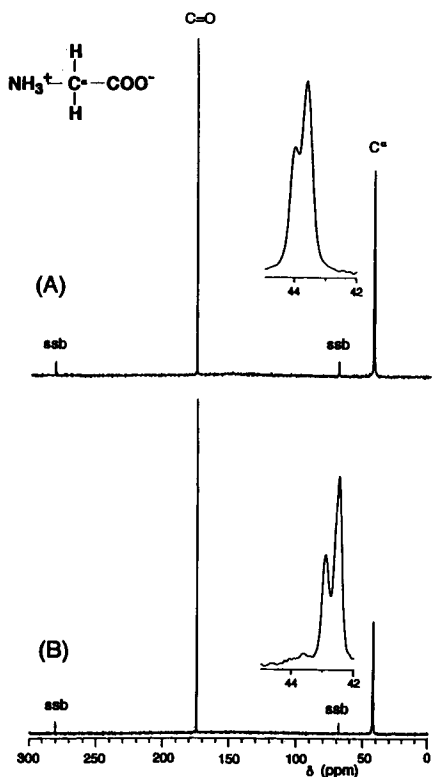


Figure 1. 75.49 MHz ^{13}C CP-MAS NMR spectra of glycine crystals; (A) α -glycine, (B) γ -glycine.

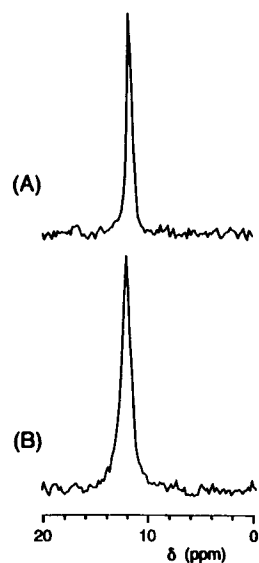


Figure 2. 27.25 MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectra of glycine crystals; (A) α -glycine, (B) γ -glycine.

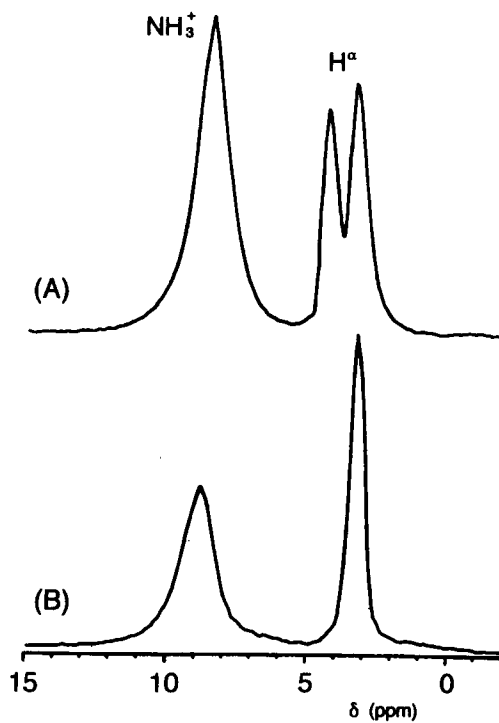


Figure 3. 300 MHz ^1H CRAMPS NMR spectra of glycine crystals; (A) α -glycine, (B) γ -glycine.

(4.4, 3.4 ppm) なのに対して、 γ 形ではシングレット (3.3 ppm) になっていることである。このグリシンにおける H^{α} シグナルの本数は、この両形を識別する上で大きな特徴となる。この H^{α} シグナルの本数の違いは、結晶形態の違いによって H^{α} が置かれる磁気的環境が異なるために生ずるもので、 α 形では H^{α} が非等価な 2 本にわかれ、 γ 形では等価な 1 本になることを示している。これは、ESP (electrostatic potential) 電荷計算によっても定性的に確認することができる。これまで、グリシンは 1H CRAMPS NMR スペクトルを得るデモンストレーションの物質として使用されてきたが、 H^{α} シグナルが 2 本に分裂する α 形を使用した物が全てであり、 γ 形グリシンの 1H CRAMPS NMR スペクトルを示したのは本研究が初めてである。

4. 結論

我々は、 ^{13}C , ^{15}N CP-MAS NMR 及び 1H CRAMPS NMR 法により α -アミノ酸結晶構造の違いと 1H , ^{13}C , ^{15}N 化学シフト値との相関を調べた。その結果、 α -アミノ酸の結晶構造は ^{13}C や ^{15}N 化学シフトよりもむしろ、 1H 化学シフト値から明確に識別できることが分かった。また、グリシンはしばしば、固体高分解能 1H , ^{13}C , ^{15}N NMR 測定の標準物質として用いられるが、化学シフトの基準として用いる場合には、注意を払わなければならない。

5. 参考文献

- (1) Shoji, A.; Kimura, H.; Ozaki, T.; Sugisawa, H.; Deguchi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, *118*, 7604-7607.
- (2) Kimura, H.; Ozaki, T.; Sugisawa, H.; Deguchi, K.; Shoji, A., *Macromolecules*, in press.
- (3) Kimura, H.; Ozaki, T.; Sugisawa, H.; Deguchi, K.; Ebisawa, K.; Suzuki, E.; Shoji, A., *J. Mol. Struct.* 1998, *447(3)*, 247-255.

同位体標識生体高分子の構造解析のための 多次元固体高分解能 NMR 法の開発

(横浜国大 工) ○佐々健太郎、藤原敏道、阿久津秀雄

Multidimensional Solid-State NMR for the Structural Analysis of Isotope-Labeled Biomacromolecules

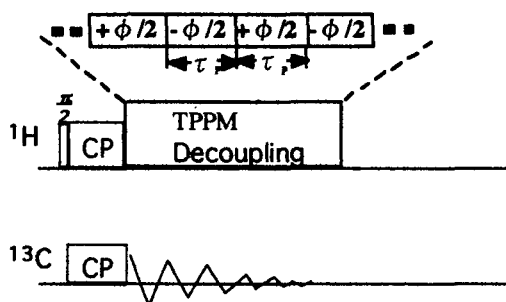
○ K. Sasa, T. Fujiwara, H. Akutsu
Faculty of Engineering, Yokohama National University

We are developing solid-state NMR methods which provide more structural information about isotope labeled biomacromolecules. In this study we have designed 2D NMR pulse sequences for sequential assignment of peptides on the basis of ^{13}C - ^{13}C dipolar couplings connectivity. In solid-state NMR for fully labeled sample, high resolution and sensitivity are required to separate the signals by isotropic chemical shifts. In these pulse sequences, the resolution is enhanced by decoupling homonuclear ^{13}C J couplings with a selective pulse and decoupling ^{13}C - ^1H heteronuclear dipolar couplings with the TPPM method.

私達は、安定同位体標識と多次元 NMR を組み合わせることにより、固体状態の生体高分子の構造情報を一度に多く得ることのできる測定法の開発を試みている。本研究において、私達は、 ^{13}C - ^{13}C 双極子結合からペプチドの連鎖帰属を行うための 2 次元パルス系列を開発した。完全標識した試料の固体 NMR での測定においてはその ^{13}C - ^{13}C 結合により分解能と感度が悪くなることが応用研究への障害となっている。これらパルス系列では、選択パルスによる同種核 ^{13}C J 結合のデカップリングと TPPM 法による ^{13}C - ^1H 異種核双極子結合のデカップリングにより、分解能が改善された。

異種核間デカップリングの改良

本研究では TPPM デカップリングを用いることで異種核間デカップリングの改良を行った。TPPM 法ではデカップリングの際、デカップリングする側の位相を交互に一定の時間ごとに変えていく。こうすることでデカップリングの位相が平均化し、MAS 実験法による不十分なプロトンデカップリングから生じた部分に相当する線幅を大きく減少させることができる。パルス幅と位相を最適化することで高磁場に



ϕ : Phase Modulation Angle
 τ_P : Pulse Flip Angle
CP: Cross Polarization
TPPM: Two Pulse Phase Modulation
Fig. 1. Pulse sequence for CPMAS experiment with the TPPM decoupling

固体 NMR、多次元 NMR、立体構造決定、マジック角試料回転、安定同位体標識

ささけんたろう、ふじわらとしみち、あくつひでお

において、広い範囲の回転速度での分解能と感度が向上する。

パルス系列は図1に示した。実験は ^{13}C フルラベルグリシンを用いて行った。回転速度は5kHz、 ^1H のTPPMデカップリング強度は63kHzにした。

図2は線幅の、フリップ角(τ_p に相当)と位相角(ϕ)に対する依存性を示している。線幅が最も狭くなるのは位相角が $10\sim 15^\circ$ 、フリップ角が $165\sim 185^\circ$ のときであった。また、 ^{13}C 、 ^{15}N フルラベルバリンにおいても、ほぼ同じ結果が得られた。

図3は従来のCWデカップリングとTPPMデカップリングを比べた図である。 ^{13}C フルラベルグリシンの C^α シグナルを示している。TPPMデカップリングでは図2で示した最適な位相角とフリップ角を用いた。線幅は約12Hz改善された。

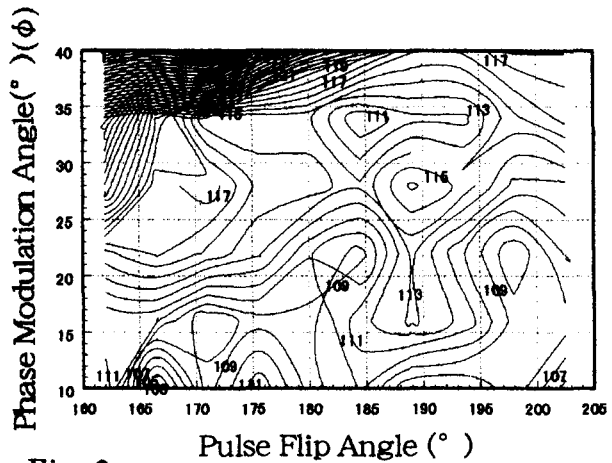


Fig. 2. Contour plot of the line width of the $^{13}\text{C}^\alpha$ signal of the fully ^{13}C labeled glycine

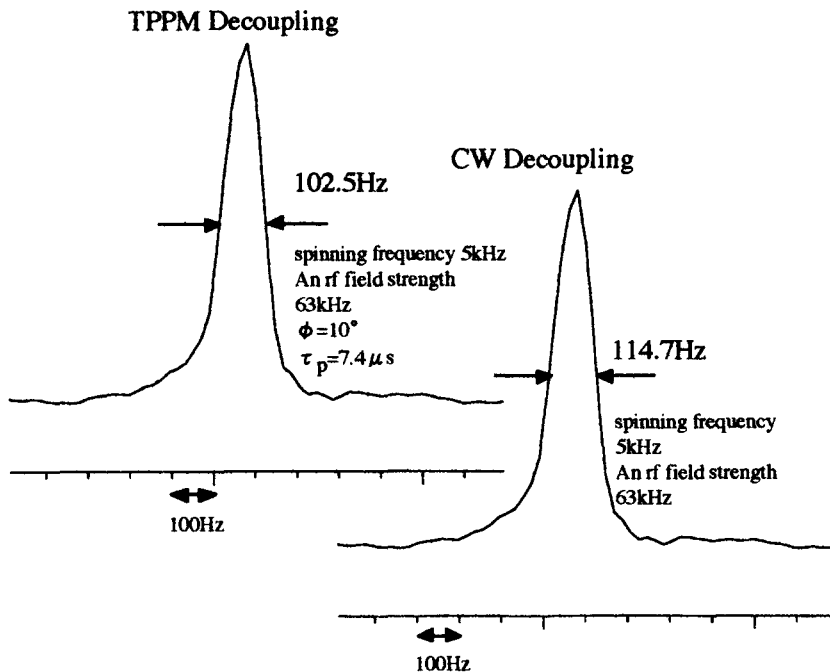


Fig. 3. The $^{13}\text{C}^\alpha$ signal of the fully labeled glycine

2) 同種核間デカップリングの改良

2次元の実験において、バンド選択的な π パルス(gaussianパルス)を展開期(t_1)の中央に打つ(選択励起)ことで、その前後において、選択された核と他の核との間の同種核間のJ値の符号が反転する。

こうすることで同種核間J結合を取り除くことができる。アミノ酸においてはJ $^{13}\text{C} \alpha\text{-}^{13}\text{C} \beta$

結合は約50Hz、他の脂肪族 ^{13}C - ^{13}C 結合は30-40kHzの線幅に相当する。よってその線幅の分、分解能が向上する。

パルス系列は図4に示した。実験は50% ^{13}C , ^{15}N フルラベルバリン(フルラベルバリン: ノンラベルバリン=1:1)を用いて行った。回転速度は9kHzで行った。

図5, 6, 7でその結果を示した。図5は従来のRFDRを使用したときの実験結果で、図6と図7は選択励起を含むパルス系列での実験結果である。図6ではカルボニル ^{13}C

を選択励起し、カルボニル ^{13}C から C^α に移った磁化のシグナル(クロスピーク)についてS/N比と線幅を記した。同様に図7では C^α を選択励起し C^β に移った磁化のシグナル(クロスピーク)について記した。

t_1 方向は $\text{CO} \rightarrow \text{C}^\alpha$ 約50Hz、 $\text{C}^\alpha \rightarrow \text{C}^\beta$ で約40Hz改善した。S/N比は $\text{CO} \rightarrow \text{C}^\alpha$ で0.72倍に、 $\text{C}^\alpha \rightarrow \text{C}^\beta$ で0.42倍と、悪くなった。これは選択パルスの幅が長く横磁化が緩和したためである。選択パルスの幅は $\text{CO} \rightarrow \text{C}^\alpha$ では0.17ms、 $\text{C}^\alpha \rightarrow \text{C}^\beta$ で3.2msとした。特に C^α は C^β と共鳴周波数が近いので、 C^α を選択励起するパルスの幅は長くなった。その結果S/N比も悪くなった。

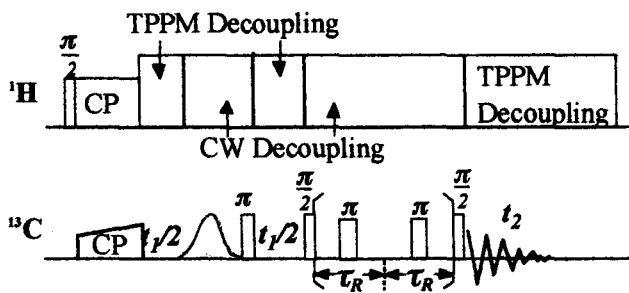


Fig. 4. Pulse sequence for ^{13}C J decoupling with a selective pulse

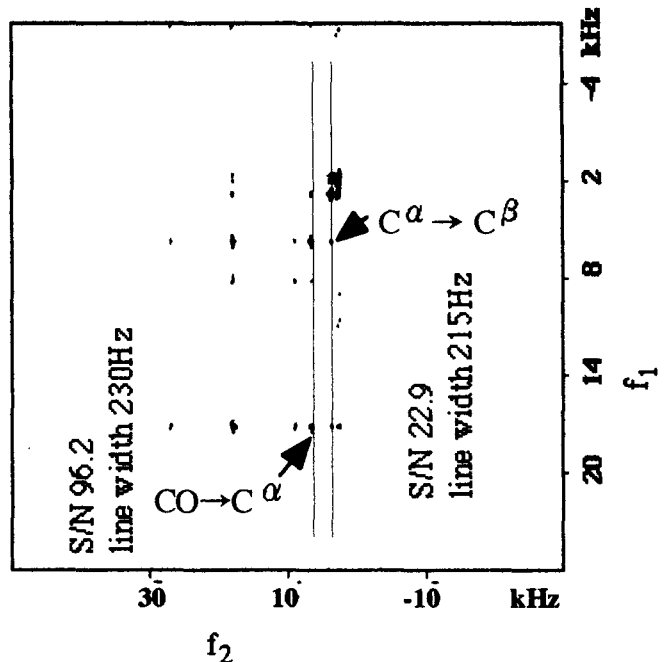


Fig. 5. 2D ^{13}C RFDR spectrum of 50% fully ^{13}C , ^{15}N labeled valine

図 6 のパルス系列は十分な S/N 比が得られる条件について適用できる。また ^{13}C の緩和速度の違い試料ほど、S/N 比が悪くならないので、図 6 のパルス系列が有効である。

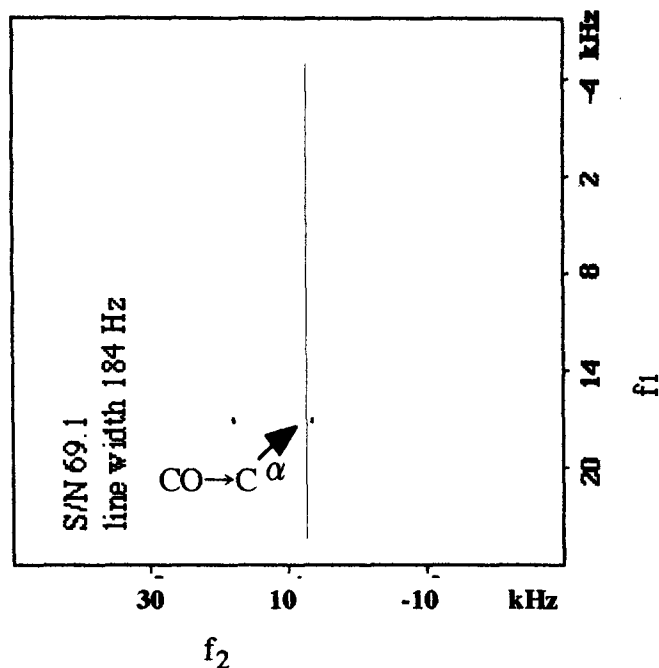


Fig. 6.
2D spectrum of 50% fully ^{13}C , ^{15}N labeled valine obtained with the pulse sequence shown in Fig. 6. The cross peak from carbonyl ^{13}C to α - ^{13}C is indicated by an arrow.

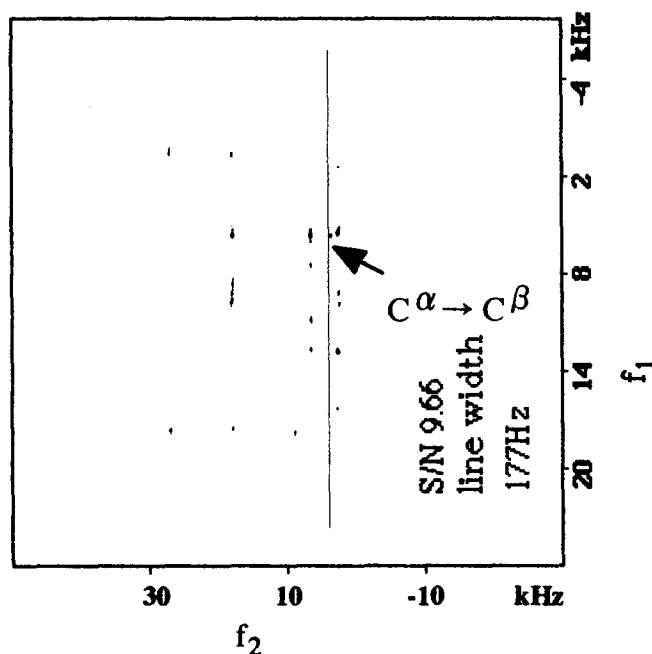


Fig. 7.
2D spectrum of 50% fully ^{13}C , ^{15}N labeled valine obtained with the pulse sequence shown in Fig. 6. The cross peak from α - ^{13}C to β - ^{13}C is indicated by an arrow.

参考文献

- 1) Andrew E. Bennett, Chad M. Rienstra, Michele Auger, K. V. Lakshmi and Robert G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **103**, 6951-6957 (1995).
- 2) Suzana K. Straus, Tobias Bremi

and Richard R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **262**, 709-715 (1996).

固体NMRによる

アデノシン二面角の決定法の開発

(横浜国大・工) ○鈴木栄一、藤原敏道、阿久津秀雄

Multidimensional solid-state NMR for determining the dihedral angle for the N9-C1' bond in adenosine

Department of Chemistry and Biotechnology, Yokohama National University
○Eiichi Suzuki, Toshimichi Fujiwara, Hideo Akutsu

A method to determine the dihedral angle for the N9-C1' bond in powdered adenosine labeled with ^{13}C and ^{15}N nuclei is developed. 2D spectra for the correlation between the chemical shift anisotropy and the dipolar interaction was investigated using numerical calculations. The correlation between C1'-H dipolar interaction and N9 chemical shift anisotropy can be obtained from multidimensional solid-state NMR under magic-angle spinning conditions. As the results of the simulation, the correlation spectrum was sensitive to the dihedral angle. To determine the dihedral angle, N9 chemical shift anisotropy was measured by ^{15}N solid-state NMR.

[緒言]

核酸などの全体構造を知るためには、核間距離や二面角を求める必要がある。最近、固体高分解能NMRでは、同位体標識した粉末試料についての核間距離を決められるようになってきた。勿論、X線回折や溶液NMRによっても、二面角を決定することができる。しかし、X線回折を用いた場合、測定試料が単結晶である必要があるため、限られた試料でしか測定を行うことが出来ない。また、自然界には適当な溶媒がないために、ほとんど溶解しない化合物

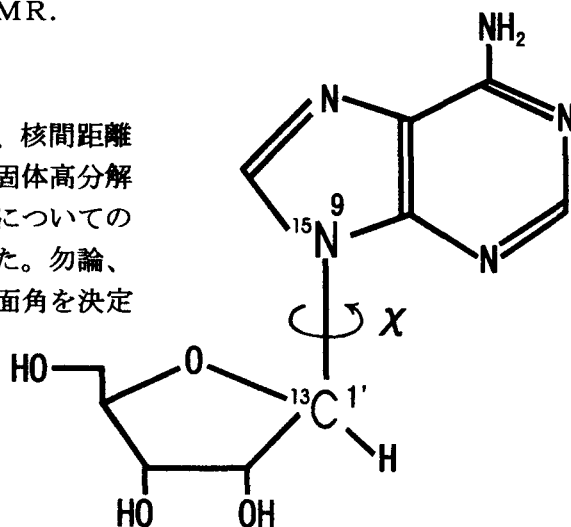


Fig 1 Dihedral Angle α of Adenosine

固体高分解能NMR、アデノシン、二面角、化学シフト異方性、双極子相互作用

○すずき えいいち、ふじわら としみち、あくつ ひでお

が多く存在し、このような物質を溶液NMRで測定するのは非常に困難である。一方、固体NMRでは、試料は多結晶でも良く、これにより構造や運動性など溶液状態では得られない固体状態の情報を得ることが出来る。当研究室では、既にいくつかの二面角決定法を報告してきたが、今回は固体NMRによるアデノシン二面角の決定法の開発について報告する。

本研究では二面角の決定に、CH双極子相互作用と化学シフト異方性、という相互作用を用いる。これらの相互作用を高分解能スペクトルが得られるマジック角試料回転のもとで求める。そして、ある核の化学シフト異方性の主軸と別の核が関与する双極子相互作用との相対的な向きを相関させ、二面角を決定する⁽¹⁾⁽²⁾。今回の二面角決定法の開発の試料としては、アデノシンを用いた(Fig. 1)。この二面角の決定にあたって、本研究では、化学シフト異方性とCH双極子相互作用の相関スペクトルによる二面角決定法を計算機シミュレーションで検討した。また、¹⁵N 9の化学シフト異方性についての測定も行った。

[実験]

すべての固体NMR測定には、静磁場強度 9.4 Tで Chemagnetics CMX400 核磁気共鳴装置を使用した。また、NMRの計算機シミュレーションは、予備的研究として、以前ペプチドに適用したパラメーターに基づいて行った。検討した2次元NMRパルス系列は、第1次元が化学シフト異方性による展開期で、第2次元はCH双極子相互作用による展開期である。第1次元では位相敏感法を用いている。

[結果と考察]

・シミュレーション

本研究でのシミュレーションの目的は、アデノシンのN 9化学シフト異方性とCH双極子相互作用の相関スペクトルによる二面角決定法の検討にあるわけだが、現在の段階ではアデノシンのN 9化学シフト異方性のパラメーターが報告されていないので、アデノシンではシミュレーションが行えない。そこで、今回は、アデノシンN 9の代わりに、核のまわりの面の対称性が似ていて、すでに化学シフト異方性のパラメーターの報告のあるペプチドのカルボニル炭素についてシミュレーションを行うことにした(Fig 2)。そのシミュレ

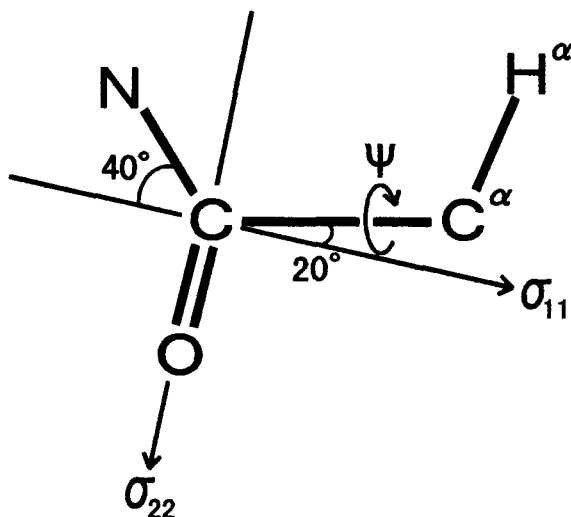


Fig 2 Principal axes of a chemical shift tensor for carbonyl carbon

ーションの二面角とは、カルボニルC-C^αを軸として、C^α-H結合をまわした時の回転角Ψである。

このシミュレーションでは、二面角の変化がC^α-H双極子相互作用とカルボニル炭素の化学シフト異方性の相関スペクトルに鋭敏に反映するかどうかを調べた。そのために、シミュレーションはオフレゾナンスなどのない理想的な条件から、徐々に現実の測定環境に近づくように数種類行った。その一例をFig 3に示す。この場合、C_βについての化学シフト異方性の影響をなくし、マジック角試料回転数を5 kHzとした。この条件では、二面角Ψの変化に対してスペクトルは大きく変化した。

Fig 3のスペクトル間の違いを定量的に評価するためにスペクトル間のRMSD (root mean square deviation)を計算し、Ψ₁、Ψ₂の二次元上にマップした(Fig 4)。この図で、RMSDの最小は、Ψが0° から180°の範囲でΨ₁=Ψ₂の場合しかないことから二面角がその範囲で一義的に求められるということがわかる。

・ NMR測定

アデノシンについてのシミュレーションを行うためには、N9の化学シフトテンソルの主値を求める必要がある。このために、固体¹⁵N-NMRを測定し、得られたスペクトルのメインピークの強度とサイドバンドの強度の比から化学シフトテンソルの主値を算出した。今回はマジック角試料回転数を3.2kHzと1.5kHzという低速の条件で、サイドバンドが出やすいようにして測定を行った。¹³C、¹⁵Nフルラベルアデノシンの¹⁵N9の化学シフトテンソルの主値は、

$$(\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}) = (104, 174, 239) \text{ ppm}$$

天然存在比アデノシンの化学シフトテンソルの主値は、

$$(\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}) = (102, 180, 235) \text{ ppm}$$

となった。これらの値は、Grantらの報告している窒素複素環における¹⁵Nの化学シフトテンソルの主値とほぼ一致した⁽³⁾。

ここで、¹³C、¹⁵Nフルラベルアデノシンの化学シフトテンソルの主値には、¹³C¹⁵N双極子相互作用の影響が含まれてしまう。

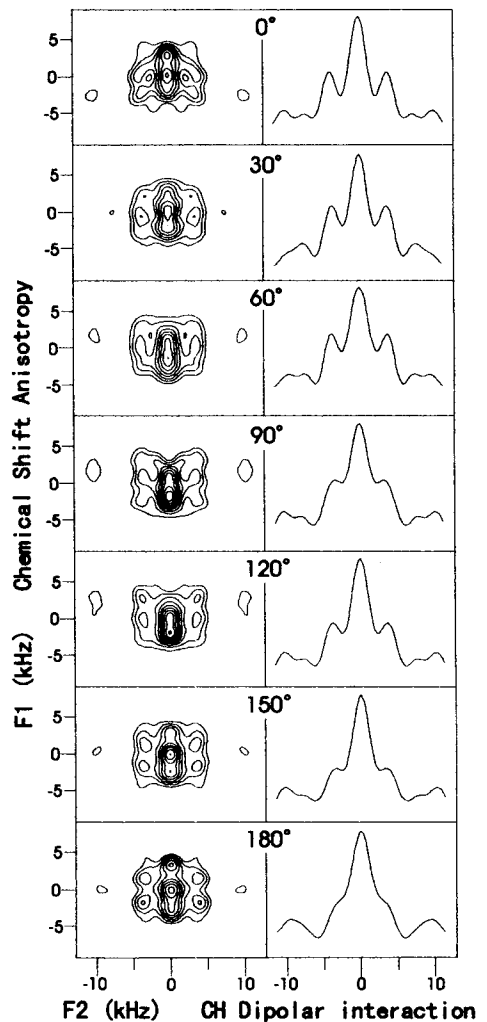


Fig3 2D spectra for the correlation between the ¹³C chemical shift anisotropy and the C^α-H^α dipolar coupling for glycine

ところが、上の結果を見る限りでは、両者の値のずれは誤差の範囲内であるので、 ^{13}C ^{15}N 双極子相互作用の影響は小さいと考えられる。

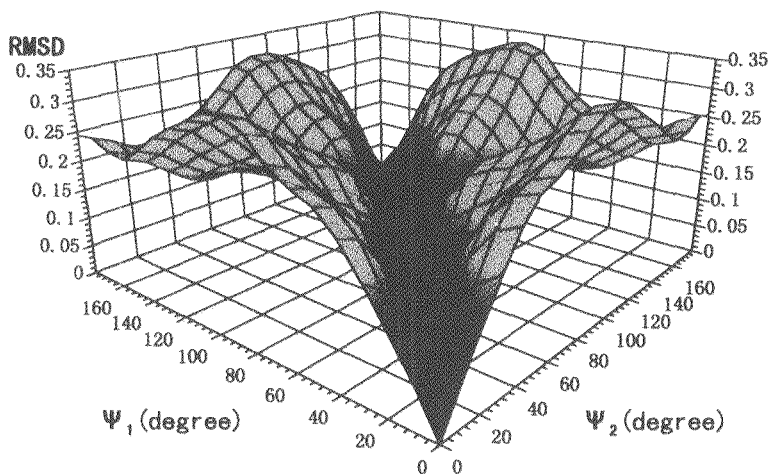


Fig 4 RMSD between spectra at dihedral angles $\Psi = \Psi_1$ and Ψ_2

[まとめ]

^{13}C 同種核に関するシミュレーションでは、化学シフト異方性と CH 双極子相互作用相関のスペクトルが二面角 Ψ に敏感であることがわかった。今後は、よりアデノシンの二面角 χ に近い条件でのシミュレーションを行っていく予定である。このために、 ^{15}N 9 の化学シフトテンソルの主値がわかったので、その主軸の方向を決定する。

そうして得られたシミュレーションの結果に基づき、測定方法を検討して、実際の測定によりアデノシン二面角 χ を実験的に決定していく予定である。

[参考文献]

- (1) Toshimichi Fujiwara, Taiji Shimomura, Yasunori Ohigashi, and Hideo Akutsu, J. Chem. Phys. **109**, 2380 (1998)
- (2) Toshimichi Fujiwara, Taiji Shimomura, and Hideo Akutsu, J. Magn. Reson. **124**, 147 (1997)
- (3) Mark S. Solum, Karen L. Altmann, Mark Strohmeier, David A. Berges, Yulei Zhang, Julio C. Facelli, Ronald J. Pugmire, and David M. Grant, J. Am. Chem. Soc. **119**, 9804 (1997)

[謝辞]

^{13}C 、 ^{15}N 完全標識アデノシンを提供して下さった、東京都立大学理学部の甲斐荘正恒博士、小野晶博士、小野明博士に感謝致します。

P79 光励起三重項状態を用いた動的核偏極NMRの応用をめざして
(京大院理) ○武田和行、今泉孝幸、溝上潤、竹腰清乃理、寺尾武彦

Towards the application of dynamic nuclear polarization of a photoexcited triplet state

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University
○ Kazuyuki Takeda, Takayuki Imaizumi, Jun Mizokami,
K. Takegoshi, and Takehiko Terao

Abstract

In order to perform dynamic nuclear polarization(DNP) of a photoexcited triplet state, a probe has been developed which can carry out ^1H - ^{13}C double resonance experiments together with laser irradiation, microwave irradiation, and magnetic field sweep. The ^{13}C magnetization of p-terphenyl has been enhanced at 0.32 Tesla by transferring the spin polarization from photoexcited triplet pentacene via protons by the combination of the integrated solid effect(ISE) and the cross polarization(CP) techniques.

Introduction

To overcome the low sensitivity in NMR due to the small magnetic moment of nuclear spins, dynamic nuclear polarization(DNP) has been used to transfer the polarization of electron spins to nuclear spins. Two types of electron spins in a matter may be invoked; (1) a free radical, (2) a photoexcited triplet state. The latter has certain advantages, such as

- Some triplet states can realize much higher electron spin polarization as compared to free radicals.
- After the DNP process, the triplet state decays to the ground state, which may otherwise disturb the NMR observation.

Up to present, $\sim 10^5$ enhancement of ^1H spin polarization can be achieved at liquid nitrogen temperature by means of DNP of a photoexcited triplet state[1]. We are stimulated to exploit the high spin polarization for NMR of chemically and/or biologically interesting systems.

Key words: 光励起三重項状態、動的核偏極 (DNP)、超低磁場NMR
○たけだ かずゆき、いまいずみ たかゆき、みぞかみ じゅん、
たけごし きよのり、てらお たけひこ

Experimental setup

Among several DNP techniques, the integrated solid effect(ISE) efficiently builds up proton magnetization[1-3]. This requests microwave irradiation of a few Gauss at the electron Larmor frequency of the triplet state together with magnetic field sweep of $\sim \pm 15$ Gauss. The enhanced proton magnetization may further be transferred to dilute spins such as ^{13}C by the conventional cross polarization(CP) technique.

In order to carry out ISE and CP succeedingly, we have developed a probe(Fig.1), which consists of a TE_{102} mode X-band microwave cavity, field-sweep rods, and a NMR coil. The resonance frequency of the cavity is ~ 9.6 GHz and the Q-factor is ~ 500 . We found that the power of a few hundreds milliwatts is sufficient to produce a few Gauss microwave field inside the cavity. The field sweep current is driven by a power operational amplifier(Apex microtechnology, PA-05) with ± 30 A, which can realize ± 20 Gauss sweep. The NMR coil is wound with 0.5ϕ enamelled copper wire with 5mm diameter and 20mm length, and its inductance is $\sim 0.8\mu\text{H}$. The coil is doubly-tuned at ~ 13.5 and ~ 3.4 MHz, which correspond to ^1H and ^{13}C resonances at ~ 0.32 Tesla.

Results

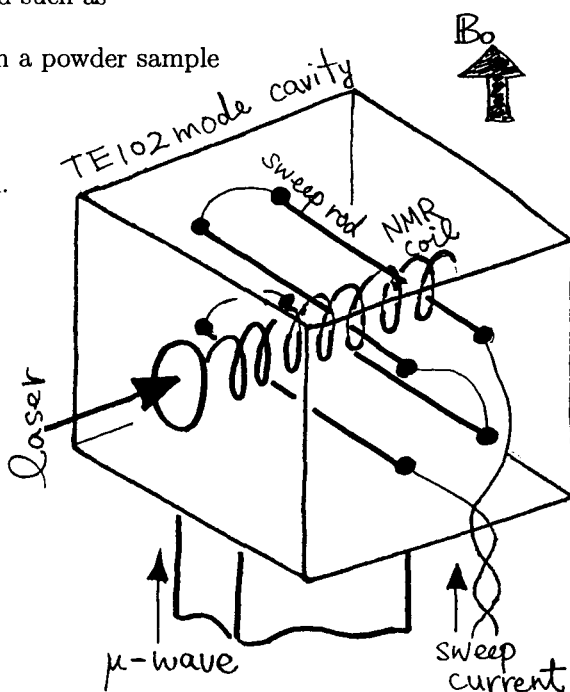
The pulse sequence shown in Fig.2 is employed to transfer the polarization from a photoexcited triplet state to ^{13}C spins via proton spins. Fig.3 shows the enhanced ^{13}C spectrum of a single crystal p-terphenyl in which $\sim 0.1\text{mol}\%$ pentacene is dissolved as the triplet polarization source. In the conventional CP spectrum of the same sample, the ^{13}C signal was too weak to appreciate.

Further applications of this method such as

- nuclear magnetization buildup in a powder sample
- low field NMR(at ~ 0.05 Tesla)

will be presented at the poster session.

Fig.1. The schematic of a probe-head for DNP of a photoexcited triplet state. The cavity and the sweep rods have been gold-plated.



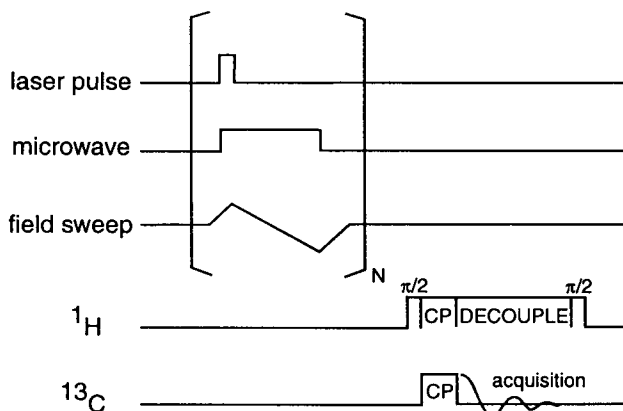
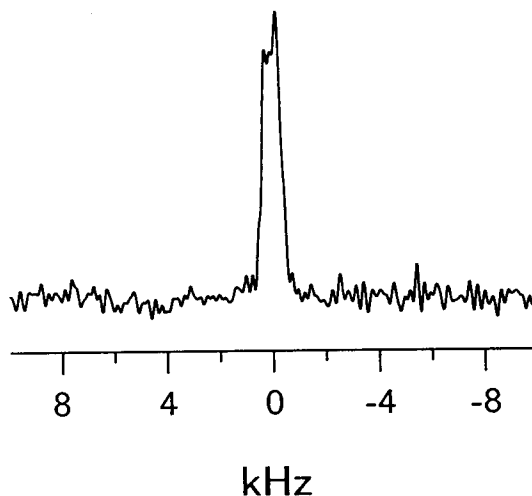


Fig.2. Pulse sequence to enhance ^{13}C magnetization by the combination of ISE and CP. Successive repetition of ISE builds up ^1H magnetization, which is then transferred to ^{13}C by CP. After the acquisition, transverse ^1H magnetization is flip-backed by a $\pi/2$ pulse for the next scan.

Fig.3. The enhanced ^{13}C spectrum of a single crystal p-terphenyl doped with pentacene at 0.319Tesla, accumulated over 225 times by the pulse sequence in Fig.2. The ^{13}C resonance frequency was 3.415MHz. ISE have been carried out in 30sec with the repetition rate of 50Hz, and the CP contact time was 5msec.



References

- [1] M. Iinuma, I. Shaké, R. Takizawa, M. Daigo, H.M. Shimizu, Y. Takahashi, A. Masaike, and T. Yabuzaki, *Phys. Lett. A* 208 (1995) 251
- [2] A. Henstra, P. Dirksen, and W.Th. Wenckebach, *Phys. Lett. A* 134 (1988) 134
- [3] A. Henstra, T.-S. Lin, J. Schmidt, and W.Th. Wenckebach, *Chem. Phys. Lett.* 165 (1990) 6

(北大院工) °平沖敏文、磯田由美、谷 知広、武川雅英、堤 耀廣

Sol-Gel Transition of rod-like molecule

T. Hiraoki, Y. Isoda, T. Tani, M. Takekawa, and A. Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060-8628

An α -helical rigid-rod poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) forms the thermoreversible gel in benzyl alcohol (BzOH). ^2H -NMR relaxation times of BzOH were measured to investigate the dynamics of BzOH in the PBLG solution. T_2 of BzOH decreases with PBLG concentration in the gel. As increasing the temperature, T_2 increases, rises steeply from 40 to 50°C, and approaching the solvent value, showing the gel-to-sol transition. And T_2 indicates the hysteresis at the transition temperature region. Two phase model of BzOH in the gel will be discussed.

poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG)はベンジルアルコール (BzOH)中で α -ヘリックスのコンフォメーションをとり、低温ではこの棒状分子が互いに物理的に架橋して、熱可逆性ゲルを形成する。ゲルからゾルへの転移点は約 50°C である。本研究では、PBLG-BzOH 溶液の BzOH のダイナミクスを通して、ゾルーゲル転移を調べるため、溶媒の ^2H の緩和時間を測定した。PBLG 濃度は 0.5~9.3%(v/v)で、準稀薄等方溶液である。

ゲル状態では、BzOH の T_2 は PBLG 濃度に依存して減少し、しかも T_1 よりもかなり小さいので、ゲル中の溶媒には遅い運動状態が存在する。温度上昇に伴い、40~50°C で T_2 は急に増加し、溶媒のみの値に接近し、この温度以上でゾルになり、溶媒の T_2 がゲル-ゾル転移を反映する事を示している。一方、ゾルからゲルへの転移温度は 35~27°C であり、転移はヒステリシスを示す。

溶媒が PBLG に bound した状態と free な状態の間で化学交換する二相モデルを仮定して、溶媒のダイナミクスを求めた。20°C のゲル状態では、PBLG に bound した BzOH の相関時間は $\sim 10^{-8}\text{s}$ であり、free な場合の $7 \times 10^{-10}\text{s}$ と較べて、著しく遅い。これは、ゲルでは架橋のため PBLG 分子の回転運動が抑えられるためである。bound した溶媒の相関時間は、PBLG の側鎖末端のフェニル基のそれに近く、PBLG 分子表面のダイナミクスを反映することを示唆している。化学交換時間は 1 ms 以下である。高温のゾル状態では、架橋がはずれ PBLG 分子自身の運動も速くなるため、溶媒の T_2 には PBLG の存否による明確な差が表れない。発表時には PBLG 自身のダイナミクスについても議論する。

poly(γ -benzyl L-glutamate) ベンジルアルコール ゾルーゲル転移 重水素 NMR

ひらおき としふみ、いそだ ゆみ、たに ともひろ、たけかわ まさひで、つつみ あきひろ

The characterization of different types of OH groups has been performed for poly(vinyl alcohol) (PVA) films with different tacticities by ¹H combined rotation and multiple pulse spectroscopy (CRAMPS). ¹H CRAMPS spectra of different PVA films can be well resolved into 5 constituent lines by the least squares method by assuming the three OH resonance lines; these OH lines has been attributed to the intramolecular hydrogen bonded OH proton, intermolecular hydrogen bonded hydrogen boned OH proton, and free OH proton, respectively. ¹H CRAMPS measurements have also been made for main-chain deuterated atactic PVA films at different temperatures. It is found that another resonance line for OH groups appears at 4.3 ppm above about 80 °C. This OH line should be assigned to OH groups that undergo the enhanced molecular motion in the noncrystalline region above T_g . On the basis of these results, it is concluded that four types of OH groups can be characterized by ¹H CRAMPS measurements; intramolecular hydrogen-bonded OH groups, intermolecular hydrogen-bonded OH groups, OH groups free from hydrogen bonding, which preferentially exist in the crystalline region, and highly mobile OH groups in the noncrystalline region observed above T_g .

[緒言] これまで我々は、ポリビニルアルコール(PVA)の種々の状態における水素結合に関して固体 ¹³C NMR 法により解析を行ってきた¹⁻³⁾。その結果、結晶、非晶および凍結溶液状態における PVA の分子内水素結合およびコンホメーションを明らかにした。本研究では、ポリビニルアルコール (PVA) フィルムにおける OH 基の水素結合状態に関して、水素結合を形成する OH、NH プロトンなどを固体状態において直接観測できることから水素結合の解析に有効であると考えられる ¹H combined rotation and multiple pulse spectroscopy (CRAMPS)^{4,5)}法により解析を行った。

[実験] クラレ(株)から提供された 5 種類の立体規則性の異なる PVA を用いた。表 1 に立体規則性および重合度を示す。PVA フィルムは水溶液から casting 法により製膜した。¹H CRAMPS 測定は、Chemagnetics CMX-400 分光計により、9.4T の静磁場下で行った。多重パルスとして BR-24⁶⁾を用い、90° パルス幅およびパルス間隔はそれぞれ 1.3、3.0ms とした。MAS の回転数は 1.5kHz とした。¹H

Table 1. Degree of Polymerization (DP) and Tacticities for Different PVA Samples

Sample	DP	Triad tacticity			Dyad tacticity ^a	
		<i>mm</i>	<i>mr</i>	<i>rr</i>	<i>m</i>	<i>r</i>
S-PVA	1590	0.19	0.48	0.33	0.43	0.57
A-PVA	1700	0.23	0.50	0.27	0.48	0.52
LI-PVA	b	0.50	0.39	0.11	0.70	0.30
MI-PVA	1130	0.66	0.28	0.06	0.81	0.19
HI-PVA	9100	0.79	0.19	0.02	0.88	0.12

^a Calculated by the least-squares method assuming Bernoullian statics ^b not measured

¹H CRAMPS, 水素結合、ポリビニルアルコール

ますだ けんじ、かじ ひろのり、ほりい ふみたか

化学シフトは、poly(dimethylsiloxane)の CH₃ 炭素のピーク(0 ppm)を内部基準として決定した。

[結果及び考察] 図1に、A-PVA および側鎖の OH 基を重水素化した A-PVA-d₁ フィルムの室温における ¹H CRAMPS スペクトルを示す。図1(a), (b)において CH および CH₂ 共鳴線は明瞭に現れている。一方、A-PVA と A-PVA-d₁ フィルムの共鳴線を比較すると、OH 基の重水素化により、図1(b)において約 8ppm から 2ppm の広範囲にわたって共鳴線の強度の減少が観測される。ここで、より詳細に OH 共鳴線の形状を検討するため、図(a)より図(b)の共鳴線を差し引き、図1(c)に表された OH プロトンに帰属される共鳴線を得た。OH 共鳴線は、8~2ppm にわたって広く分布している、これは OH 基による水素結合に分布があるためと考えられる。

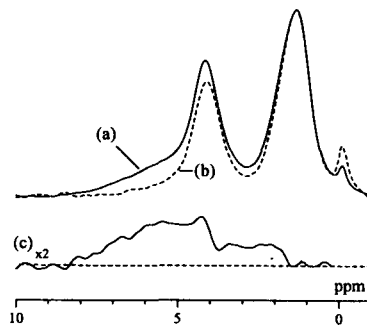


Fig. 1. ¹H CRAMPS spectra: (a) A-PVA films, A-PVA-d₁ films, (c) subtracted((a)-(b)).

図2に、立体規則性の異なる PVA の室温における ¹H CRAMPS スペクトルを示す。各共鳴線に関して波形解析を行った。ここで、低磁場側から分子内および分子間水素結合を形成したプロトンに帰属される OH_n 共鳴線、水素結合フリーのプロトンに帰属される OH_f 共鳴線を仮定した。この解析に基づいた種々の温度における研究⁷⁻⁹⁾より、OH_f基は結晶領域中に存在することを明らかにした。しかし、図2の波形解析より得られた OH_f基の分率は 0.11-0.27 と非常に大きい値となった。この結果は、上記波形解析のように OH_n および OH_f 共鳴線の導入を仮定した解析では十分でないことを示している。そこで、これまでの固体 ¹³C NMR 解析¹⁾により明らかにされたように HI-PVA では分子内水素結合が、S-PVA では分子間水素結合が主として形成されることに着目する。特に、HI-PVA における OH_n 共鳴線は、分子内水素結合に帰属される OH プロトンをほぼ反映していると考えられる。したがって、この共鳴線の形状をもとに、5.7ppm 付近に分子内水素結合に帰属される共鳴線 OH_{intra} を導入する。また、図2の場合と同様に、2.9ppm 付近に水素結合フリーの OH_f 共鳴線を導入する。さらに、分子間水素結合に帰属される OH_{inter} 共鳴線をこれらの中間に導入する。このような考えを基に、図2に示した各スペクトルを、3種類の OH 共鳴線により解析した結果を図3に示す。いずれの試料でも実験曲線と合成曲線の一致はかなり良いことがわかる。この結果によれば、OH_{inter} 共鳴線の線幅はかなり広いが、このことは、分子間水素結合の多様性を表していると考えられる。図4に、図3の波形解析の結果得られた、OH_{intra}、OH_{inter}、OH_f 基のモル分率を *mm* 分率に対してプロットした。*mm* 分率の減少とともに、OH_{intra} 基のモル分率が減少し、OH_{inter} 基のモル分率が増大する。固体 ¹³C NMR 解析からも、*mm* 分率の増加に伴う分子内水素結合を形成した OH 基の増加および分子間水素結合を形成した OH 基

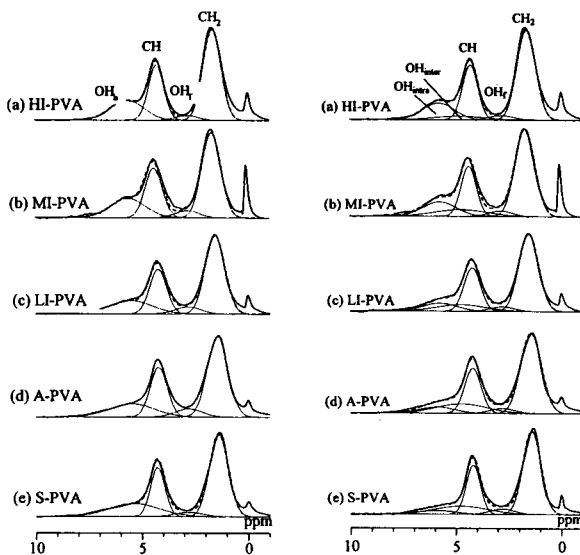


Fig. 2. 400 MHz ¹H CRAMPS spectra of A-PVA with different tacticities, measured at room temperature. Line shape analysis has been made by assuming the two different OH lines.

Fig. 3. 400 MHz ¹H CRAMPS spectra of A-PVA with different tacticities, measured at room temperature. Line shape analysis has been made by assuming the three different OH lines.

の減少が、共鳴線に関する統計計算の結果明らかになっている¹⁰⁾。このように、¹H CRAMPS 解析の結果は、固体 ¹³C NMR 解析より得られた結果と一致する。一方、OH_f 基の分率は立体規則性によらず一定であることも明らかになった。

図5に種々の温度で

測定した、主鎖を重水素化した A-PVA-*d*₃ フィルムの ¹H CRAMPS スペクトルを示す。図3と同様な波形解析の結果、*T*_g (80℃付近) 以上では、新たに OH_f 共鳴線を導入する必要がある。ここで、OH_f 共鳴線の化学シフト(δ = 4.38 ppm)は、溶液 ¹H NMR における OH 共鳴線の平均の化学シフトと良く一致する。このことより、OH_f 共鳴線を、*T*_g 以上において分子運動性が增大することにより水素結合が高速で交換する OH 基に帰属する。

図6には、図5の波形解析の結果得られた各 OH 基のモル分率を温度に対してプロットした。*T*_g 付近では、OH_{intra} および OH_{inter} 基のモル分率が大きく減少し、OH_f 基のモル分率が増大する。しかし、140℃以上では、OH_{intra}、OH_{inter}、OH_f 基のモル分率はほとんど変化しない。これより、*T*_g 以上での OH_f 共鳴線は非晶領域に、OH_{intra} および OH_{inter} 共鳴線は結晶領域に存在する OH 基と考えられる。一方、OH_f 基のモル分率は温度によらずほぼ一定である。OH_f 基が非晶領域に存在するならば、温度の上昇に伴い OH_f 基のモル分率の減少が見られるはずである。これより、水素結合を形成していない OH 基は結晶領域に存在することがわかる。以上の結果より、140℃以上における OH_{intra}、OH_{inter}、OH_f 共鳴線の分率の和は結晶化度を表わしていることが明らかになった。

NH 基を有するナイロンに関する ¹H CRAMPS 解析の結果についても報告する予定である。

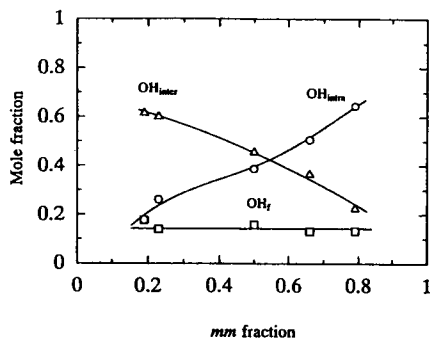


Fig. 4. Plots of the mole fractions of different OH groups for PVA films with different tacticities as a function of the *mm* fraction.

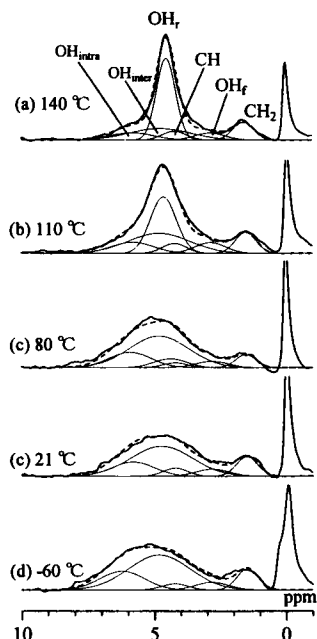


Fig. 5. 400 MHz ¹H CRAMPS spectra of A-PVA-*d*₃ films, measured at different temperature.

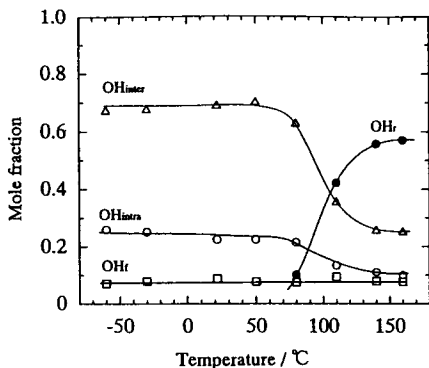


Fig. 6. Plots of the mole fractions of different OH groups for A-PVA-*d*₃ films as a function of temperature.

- (1) Horii, F.; Hu, S.; Ito, T.; Odani, H.; Matsuzawa, S.; Yamaura, K. *Polymer* **1992**, *33*, 2299.
- (2) Masuda, K.; Kaji, H.; Horii, F. *Macromolecules*, **1997**, *30*, 2519.
- (3) Masuda, K.; Horii, F. *Macromolecules*, **1998**, *31*, 5810.
- (4) Gerstein, B. C.; Chou, C.; Pembleton, R.G.; Wilson, R.C. *J. Phys. Chem.* **1997**, *81*, 565.
- (5) Des, S. F.; Bronnimann, C. E.; Wind, R. A.; Maciel, G. E. *J. Magn. Reson.* **1989**, *82*, 454.
- (6) Burum, D. P.; Rhim, W. K. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 944.
- (7) Horii, F.; Hu, S.; Deguchi, K.; Sugisawa, H.; Ohgi, H.; Sato, T. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3330.
- (8) Masuda, K.; Kaji, H.; Horii, F. *Polym. Prep.* **1998**, *47*, 992.
- (9) Masuda, K.; Kaji, H.; Horii, F. Submitted to *Polymer Journal*.
- (10) Hu, S.; Horii, F.; Odani, H. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **1991**, *69*, 165.

固体二次元スピネコー法によるポリ-L-アラニン α ・ β 炭素の化学シフトテンソルと二次構造

P82

東工大.生命理工 ○浅川直紀, 竹野入正利, 櫻井 実, 井上義夫

^{13}C Chemical Shift Tensors and Secondary Structure of Poly-L-alanine by Solid-state Two dimensional Spin-echo NMR and Ab initio Chemical Shielding Calculation

Naoki Asakawa¹, Masatoshi Takenoiri, Minoru Sakurai, Yoshio Inoue, Takakazu Yamamoto
Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology
4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan
phone:045-924-5796, FAX:045-924-5827, email.nasakawa@bio.titech.ac.jp

Abstract: Analyses of ^{13}C chemical shielding tensor for α -helix rich poly-L-alanine(pALA) and the powdered sample of mechanically stretched β -sheet pALA were performed by solid-state two dimensional spin-echo(2DSE) nuclear magnetic resonance(NMR) spectroscopy. From the iterative fitting of 2DSE spectra with spectrum simulations, we were able to obtain the information about principal values of chemical shift tensors(CST) for nuclei with small chemical shift anisotropy(CSA) such as CH- and CH_3 -carbons. The experimental results show that the lowest shielding component, δ_{11} , of L-alanine(ALA) residue α - and β -carbons are sensitive to the conformational changes and responsible for behavior of the conformational dependent isotropic chemical shift. Ab initio gauge-invariant atomic orbital(GIAO) chemical shielding calculations were carried out in order to understand the correlation between the CST and the polypeptide conformation.

I. 緒言

化学シフトテンソルの観測を通して分子の立体構造に関する情報を得る試みが近年なされてきている。しかし、ポリペプチドやタンパク質中の α 炭素や側鎖の CH_2 ・ CH_3 炭素はもともと化学シフト異方性が小さいために、化学シフトテンソル主値の決定が困難であった。そこで我々は二次元スピネコー法¹により、ポリ-L-アラニンの二次構造と化学シフトテンソル主値との関係を明らかにし、化学シフトテンソルに影響を与える要因を明らかにすることを目的として研究を行った。

II. 実験と理論計算

SIGMA 社 (St.Louis,U.S.A.) 製のポリ-L-アラニンをジクロロ酢酸に溶解し、水で抽出した後、室温でプレス乾燥しフィルムを得た(α -helix リッチサンプル(I))。さらにフィルムを80~90°Cの水中で延伸し、ジクロロ酢酸に溶解させ、残渣を洗浄乾燥させることにより β -sheet サンプル(II)を得た。固体二次元NMR測定は Varian UNITY+400 および JEOL JNM-GSX270 を用いて行った。化学シフトテンソル主値の決定は、2Dスピネコー法のスペクトルシミュレーションプログラムを作成し、SGI Indigo²にて行った。

III. 結果・考察

Fig.a,b に二種類のサンプル中のL-アラニン残基 β 炭素の2Dスピネコー法によるスペクトルを示す。スペクトルシミュレーションの結果と比較することにより、各々の化学シフトテンソル主値を $\delta^{\alpha h}=(25.3, 19.5, 0.6\text{ppm})$ 、 $\delta^{\beta s}=(37.7, 16.1, 5.3\text{ppm})$ と決定し、 δ_{11} に大きな差が生じていることがわかった。*ab initio* MO法による磁気遮蔽定数の計算から $R_{\alpha-\beta}$ の距離の効果を見積もったが³、 $R_{\alpha-\beta}$ の影響は小さく、主鎖の二面角の違いによるステリックな効果が支配的であることが明らかとなった。² 詳細はポスターにて述べる。

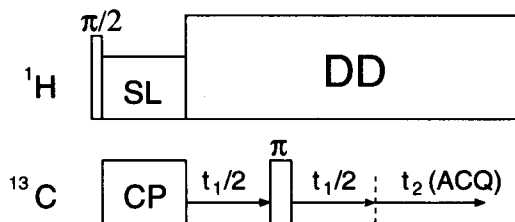


FIG. 1. The pulse sequence for two dimensional spin-echo NMR.

¹二次元スピネコー法、ポリペプチド、化学シフトテンソル、固体NMR
あさかわなおき、たけのいりまさとし、さくらいみのる、いのうえよしお

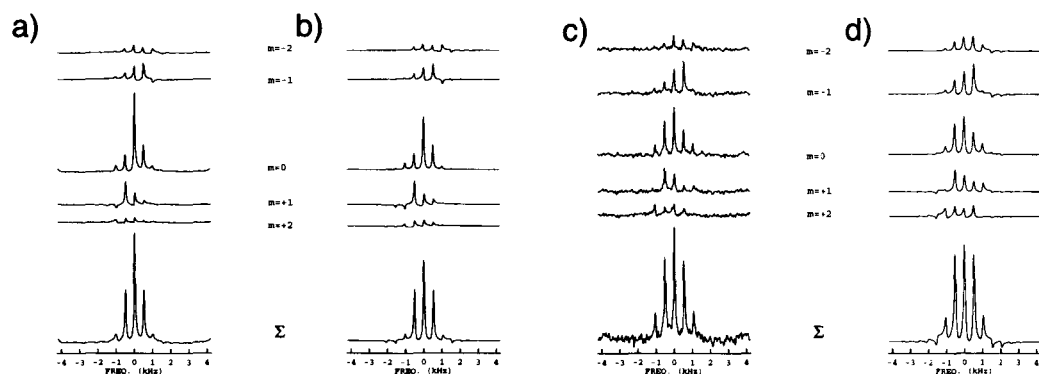


FIG. 2. 100.579 MHz ^{13}C 2D spin-echo NMR spectra for poly-L-alanine β -carbon with α -helix form in sample I(a), with β -sheet form in sample II(c). Parts b) and d) are the best fitted simulations for a) and c), respectively. The spinning rate was set at $\omega_r/2\pi = 1.025$ kHz for both a) and c). 128 t_1 values were collected, with 640 acquisitions per t_1 value for a) and with 1600 acquisitions for c). Time increment in the t_1 -dimension was 119.0 μs .

TABLE I. Principal values of experimental chemical shift tensors and theoretical chemical shielding tensors for L-alanine residue carbonyl-, α -, and β -carbons in poly-L-alanine by solid state two dimensional spin-echo NMR and *ab initio* CHF-GIAO method

sample	structure	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}
carbonyl-carbon					
I	α_R	177.8	247.1	192.5	93.8
II	β_A	171.3	245.4	173.2	95.3
α -carbon					
I	α_R	52.7	72.1	54.3	31.7
I	β_A	48.6	59.7	54.6	31.6
II	β_A	48.1	57.1	54.1	33.1
β -carbon					
I	α_R	15.1	25.3	19.5	0.6
II	β_A	19.7	37.7	16.1	5.3
basis set	structure	σ_{iso}	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}
carbonyl-carbon					
6-31G*	$\alpha_R + \text{HB}$	34.43	-41.07	24.42	119.95
6-31G*	$\beta_A + \text{HB}$	32.81	-41.37	17.54	122.27
6-31G*	α_R	36.45	-48.49	38.52	119.31
6-31G*	β_A	33.55	-48.57	27.23	121.99
α -carbon					
6-31G*	$\alpha_R + \text{HB}$	155.69	138.40	159.16	169.52
6-31G*	$\beta_A + \text{HB}$	156.58	143.68	152.33	173.73
6-31G*	α_R	155.73	138.03	160.14	169.03
6-31G*	β_A	156.84	143.88	152.79	173.86
β -carbon					
6-31G*	$\alpha_R + \text{HB}$	184.35	173.43	178.52	201.09
6-31G*	$\beta_A + \text{HB}$	181.16	164.31	178.59	200.57
6-31G*	α_R	184.12	173.09	178.34	200.93
6-31G*	β_A	181.04	164.18	178.54	200.41

¹A.C.Kolbert et al., *J.Chem.Phys.*, **90**, 679(1987).

²N.Asakawa et al., *Magn.Reson.Chem.*, in press.

P83 固体2次元交換¹³C-NMR法によるPMAAの脱水反応過程

(防大化学) ○浅野敦志、黒津卓三

Solid-State 2D Exchange ¹³C-NMR study on dehydration of PMAA

○Atsushi Asano and Takuzo Kurotu

Department of Chemistry, National Defense Academy, Yokosuka 239, Japan.

Dehydration of poly(methacrylic acid) (PMAA) was studied by solid-state 1D CP/MAS and 2D exchange ¹³C-NMR. We observed three apparent ¹³C resonances at 172, 178, and 186ppm for a heat-treated PMAA at 423K for 20hr. The peak at 172ppm has been attributed to intramolecular six-membered cyclic anhydrides. The peak is observed in the ¹³C NMR spectra of further heat-treated film at 513K after heat-treatment at 423K/20hr, and the other peaks are disappeared. This implies that the two peaks at 178 and 186ppm is not ascribed to any anhydrides. To assign the two peaks, we observed 2D-exchange ¹³C-NMR at various temperatures. We attributed the two peaks at 172 and 178ppm to free carboxyl carbons and hydrogen-bonded acid dimers, respectively.

【緒言】 PMAA は 250–300°C において側鎖のカルボキシル基同士が脱水反応をおこし、分子内 6 員環構造を有する無水物を形成することが知られている¹。脱水反応過程を ¹³C CP/MAS NMR と 2 次元交換 NMR を用いて考察した。

【実験】 ¹³C CP/MAS NMR の測定は Bruker DMX 500 分光計を用いて行った。2D-Exchange NMR 測定は ¹H 側の CP に Ramp パルス²を用い、デカップリングには TPPM 法³を用いた。用いたパルス系列を図 1 に示す。

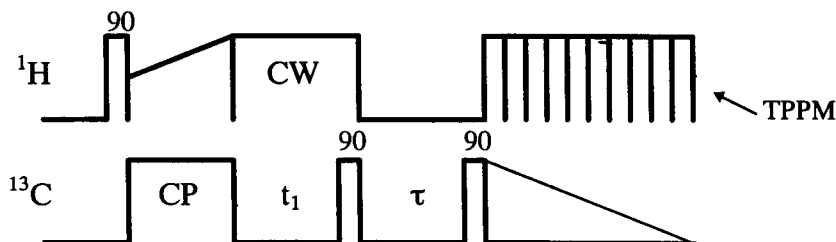


Figure 1. Pulse sequence for solid-state 2D-Exchange ¹³C NMR. Ramped-Amplitude CP method² and a two pulse phase modulation (TPPM) ¹H decoupling³ are used. Two π pulses of 0° and 15° phases are used for TPPM. τ represents a mixing time.

Key Words: 2D Exchange ¹³C-NMR, poly(methacrylic acid), dehydration

あさのあつし、くろつたくぞう

[結果と考察]

PMAA を 300℃ で 10 分間熱処理したフィルムの ¹³C CP/MAS NMR スペクトルは、PMAA 無水物由来のスペクトルを示し、特にカルボキシル基のピークの線幅ならびに化学シフト変化に現れる。熱処理する前のカルボキシル基は 183ppm にブロードなピーク(1200Hz)として観測されるが、無水物になったカルボニル基は 172ppm にシフトして、よりシャープなピーク(600Hz)として観測される¹。

PMAA を 150℃ で長時間ゆっくり脱水させたフィルムのカルボキシル領域のピークは、見た目上 186、178、172ppm の 3 つのピークに分裂して観測された。このスペクトルは 4 つのガウス波形によって最小二乗フィットでき、その化学シフトは 187、183、178、172ppm である。このうち、183 と 172ppm のピークはそれぞれ熱処理する前と後のピークと一致する。187 と 178ppm のピークを帰属するため固体 2 次元交換 NMR を測定した。図 2 に 27℃(A)と 0.7℃(B) で測定した固体 2 次元交換 NMR スペクトルを示す。図 2A に 187 と 178ppm のピーク間に交差ピークが観測された。温度を 0.7℃ にするとこの交差ピークが消えていることがわかる。また、-14℃、62℃ で測定すると、弱い交差ピークが観測された。このことは、この交差ピークが距離的に近いために観測されているわけではなく、化学交換によるものであることを示している。187ppm は PMAA/PEO コンプレックスにおいて観測された PMAA の酸二量体の化学シフト値と一致している⁴。このことから、178ppm のピークは水素結合していないフリーな PMAA 分子由来であると考えられる。

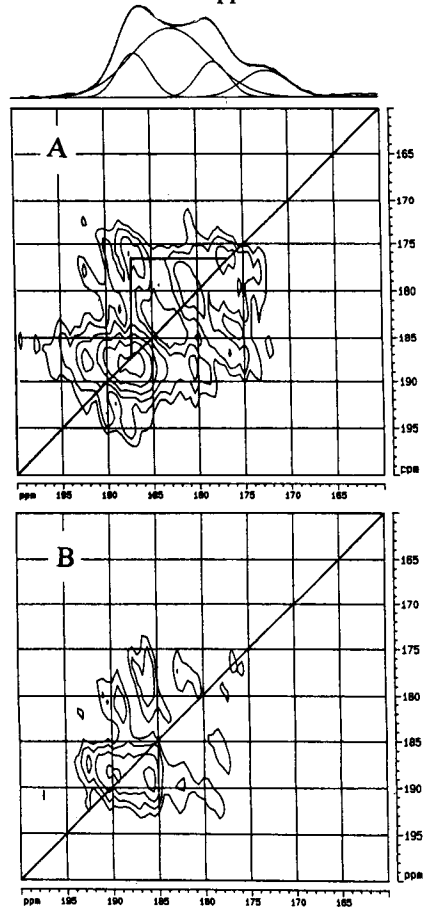


Figure 2. 2D-Exchange ¹³C NMR spectra of PMAA after heat-treatment at 300℃ for 10min: A; observed at 27℃ and B: at 0.7℃.

References

1. (a) C.A. Fyfe and M.S. McKinnon, *Macromolecules*, **19** (1986) 1909. (b) B.-C. Ho, Y.-D. Lee and W.-K. Chin, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **30** (1992) 2389.
2. G. Metz, X. Wu, and S.O. Smith, *J. Magn. Reson. A* **110** (1994) 219.
3. A.E. Bennett, C.M. Rienstra, M. Auger, K.V. Lakshmi, and R.G. Griffin, *J. Chem. Phys.*, **103** (1995) 6951.
4. T. Miyoshi, K. Takegoshi, and K. Hikichi, *Polymer*, **37** (1996) 11.

P84

高圧固体高分解能 NMR 法による Xe ガス存在下における
高分子混合体の分子運動の研究
京大院理 ○三好利一、清水弘之、竹腰清乃理、寺尾武彦

**Molecular motion in a polymer blend
under high Xe gas pressures:
¹³C high-pressure MAS and ¹²⁹Xe NMR study of
polystyrene/poly(vinyl methyl ether)**

Toshikazu Miyoshi, Hiroyuki Shimizu, K. Takegoshi, and Takehiko Terao
Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University,

So far, a great interest has been attracted in gas-polymer interactions because of the industrial and scientific importance¹. Permeation, dilation, and sorption measurements have been used to study the translation of gas molecules, the volume of a polymer dilated by gas, and the amount of sorbed gas molecules, respectively. The obtained data have been interpreted by the dual-mode model. This model assumes the existence of two gas binding sites which have different affinities with gas molecules independent of gas pressure. Under high gas pressures, however, this model becomes inadequate, because the polymer structure is affected by dissolved gas molecules; they swell the polymer to increase the interchain distance (the plasticization effect), leading to enhancement of the mobility of polymer. The enhancement of motion by the plasticization effect has been detected as decrease of glass transition temperature (T_g) for several glassy polymers.

Magic angle spinning (MAS) NMR is a widely used and very powerful means for studies of static and dynamic structures of solid materials². Recently, we have developed a simple method for high-pressure MAS(HPMAS) NMR³, and applied to study molecular motion of poly(styrene) (PS) under high CO₂ gas pressures of 7MPa.⁴ The obtained results showed that the dissolved CO₂ molecules expand the interchain distance both in the densely and loosely packing regions homogeneously, and enhance mobility of the PS chain in both regions simultaneously. This result was explained by fast diffusion of the dissolved CO₂ molecules in PS.

PS forms a single phase mixture with poly(vinyl methyl ether)(PVME). So far, the dynamic and static microstructures of this blend has been investigated by various solid-state NMR methods⁵. We are interested how dissolved gas molecules affect dynamic and structure of each polymer in the

(**Keywords**) High pressure, MAS, Xe gas, plasticization, polymer blend
みよしとしかず、しみずひろゆき、たけごしきよのり、てらおたけひこ

thermodynamically homogeneous PS/PVME blend. We used Xe gas as a pressure medium, because ^{129}Xe NMR of the dissolved Xe molecules can not only be used to probe the microstructure of polymer, but also be used as internal pressure reference⁶.

Fig. 1 shows that ^{129}Xe MAS NMR spectra of Xe dissolved in the PS/PVME (50/50 wt ratio) blend under two typical Xe gas pressures studied (0.8 and 4.0 MPa). We observed two peaks for the blend in these pressure ranges. The low- (220 ppm) and high-field (4~20 ppm) side peaks are assigned to ones of ^{129}Xe dissolved in the blend and ^{129}Xe gas, respectively. The single resonance for ^{129}Xe dissolved in the blend indicates that PS and PVME are well mixed in the pressure range of 0.8~4.0 MPa. The linewidth for ^{129}Xe peak decreases with increasing Xe gas pressures. This is explained by fast diffusion of Xe molecules. The diffusion of Xe molecules highly depends on the main chain motion of polymer at temperature above T_g . Therefore, the observed line-narrowing for ^{129}Xe in the blend shows that the molecular motions of PS and PVME are enhanced by Xe molecules dissolved in the blend (the plasticization effect).

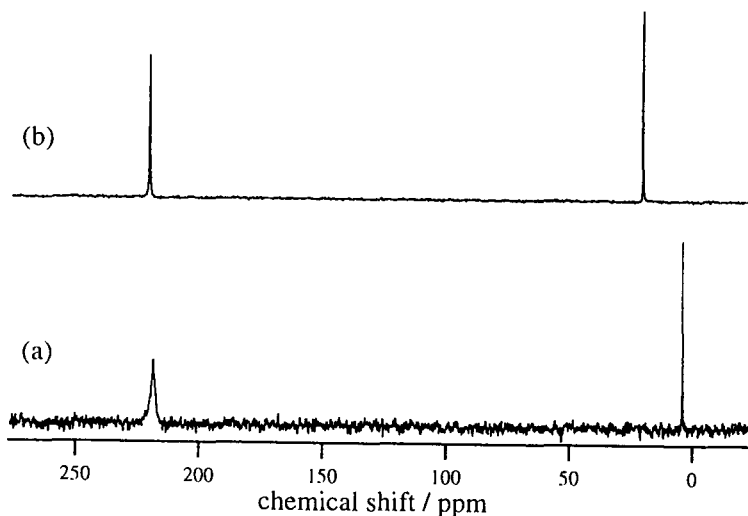


Fig. 1 ^{129}Xe MAS NMR spectra of the PS/PVME(50/ 50 wt ratio) at room temperatures under Xe gas pressures of (a) 0.8MPa and (b)4.0MPa . Chemical shifts were referenced to the resonance of a free ^{129}Xe gas which is extrapolated to 0.0MPa.

To investigate the molecular dynamics of each polymer in the blend under high Xe gas pressures, we have measured ^{13}C HPMAS NMR spectra of the blend. Fig. 2 shows that ^{13}C HPMAS NMR spectra of the PS/PVME (50/50 wt ratio) blend under (a) atmospheric and (b) Xe gas pressure of 4MPa. The different linewidths of PS and PVME found in Fig. 2(a) have been explained by considering the motional heterogeneity between PS and PVME in the miscible

blend⁷. With increasing Xe gas pressure, it was observed that ¹³C signals for PS is broadened, while the signals of PVME get narrower (Fig. 2(b)). This result shows that molecular motion of both polymers is affected by the dissolved Xe molecules. Further details will be discussed in our presentation.

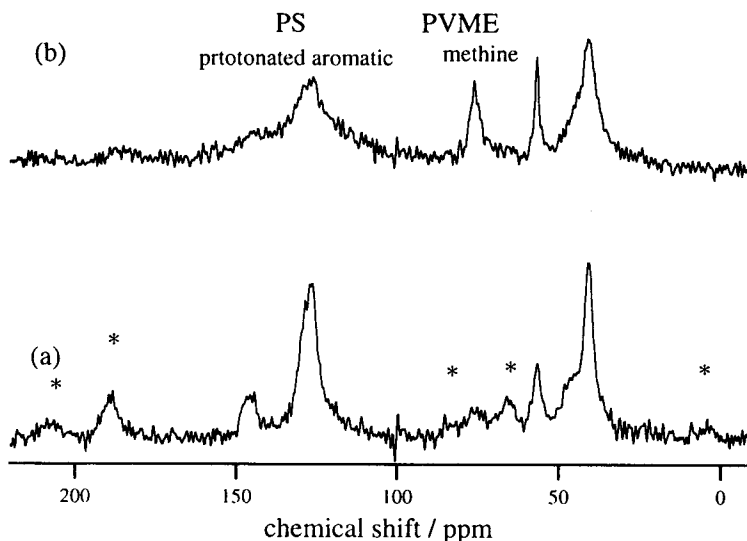


Fig 2. ¹³C HPMAS NMR spectra of the PS/PVME blend (50/50 wt) under (a) atmospheric pressure and (b) Xe gas pressure of 4MPa. * denotes the spinning sidebands of the aromatic carbons of PS. MAS frequency was set to 4.5kHz.

References

- [1] for example, D. M. Sefcic, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, 1986, **24**, 935.
- [2] R. A. Komoroski *High resolution NMR spectroscopy of synthetic polymers in Bulk*; VCH: Deerfield Beach, FL, 1986.
- [3] T. Miyoshi, K. Takegoshi, and T. Terao. *J. Magn., Reson.*, 1997, **125**, 383.
- [4] T. Miyoshi, K. Takegoshi, and T. Terao *Macromolecules* 1997, **30**, 6582.
- [5] K. Takegoshi, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 1995, **30**, 97.
- [6] T. Miyoshi, K. Takegoshi, and T. Terao *Polymer*, 1997, **38**, 5475.
- [7] K. Takegoshi and K. Hikichi, *J. Chem. Phys.*, 1991, **94**, 3200.

Solid-state NMR Analyses of the Structure and Dynamics of the Supercooled Liquid
Crystalline State of Polymers

Hiroyuki Ishida, Hidetoshi Morimoto, and Fumitaka Horii

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

The structure and molecular motion of the supercooled liquid crystalline component included in liquid crystalline polyurethane (PDBDM) have been investigated by CP/MAS ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopies. PDBD- m with different methylene numbers (m) were prepared by polymerizing 3,3'-dimethyl-4,4'-biphenyldiyl diisocyanate, α,ω -alkanediols with various numbers m of carbons, and 1-hexanol. Polarizing optical microscopy has confirmed that the liquid crystallization occurs in all the domains for each sample on cooling, while subsequent crystallization does not proceed in some domains. The latter domains should contribute to the supercooled liquid crystalline component. Moreover, ^1H spin-lattice relaxation measurements have revealed that a large amount of the supercooled liquid crystalline component also exists in the crystallized domains in the microphase-separated state of the order of 20 – 30 nm. ^{13}C spin-lattice relaxation decay analyses have confirmed the existence of three components with different T_1 values, crystalline, medium, and supercooled liquid crystalline component, suggesting prominent differences in their molecular mobilities. The evaluation of their ^{13}C chemical shifts has concluded that the spacer methylene sequence has a characteristic conformation described by $ttx(tx),tt$ ($\ell = m/2 - 3$) for the supercooled liquid crystalline component, whereas the corresponding conformation is the planar zigzag for crystalline and medium components. Further characterization of molecular motion of the mesogen group and hydrogen bonding of the isocyanate bond is in progress.

1. 緒言

最近、我々はサーモトロピック液晶性ポリウレタンを等方相からネマチック液晶相を経て結晶化させた場合、かなり大量の非晶成分が生成することを見出した。偏光顕微鏡で観察する限り、冷却に伴って系全体が液晶化するが、結晶化は必ずしも系全体にわたって起こるようには見えない。従って、この系の非晶成分は過冷却液晶成分とみなすことができるが、この成分がどのように系内に分布しているのかについては明らかでない。そこで本報告では、過冷却液晶成分の存在状態をはじめ、構造およびダイナミクスについて固体 NMR 法により検討した結果を述べる。

2. 実験

液晶性ポリウレタン PDBD- m は、炭素数 m が異なる種々の α,ω -alkanediol と 3,3'-dimethyl-4,4'-biphenyldiyl diisocyanate、および 1-hexanol を重合することにより得た。そして等方相より液晶相を経て $1^\circ\text{C}/\text{min}$ で冷却して結晶化させた試料を作製した。 ^{13}C および ^{15}N NMR 測定は、それぞれ JEOL JNM-GSX200 および Chemagnetics CMX-400 分光計により行った。

液晶性高分子、過冷却液晶状態、固体高分解能 NMR、固体構造、分子運動

いしだひろゆき、もりもとひでとし、ほりいふみたか

3. 結果と考察

3.1 固体 ^{13}C NMR 測定と ^{13}C スピナー格子緩和過程解析

図1に等方相より $1^\circ\text{C}/\text{min}$ で徐冷した PDBD-8 の室温で測定した CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを示す。得られた共鳴線の帰属は溶液測定の結果に基づいて行った。分子運動性の違いにより試料の結晶-非晶構造を明らかにし、そして各成分の存在分率を決定するため、飽和回復法による ^{13}C スピナー格子緩和過程を室温で測定した。図2には、C9 炭素の結果を示す。最小二乗法による解析の結果、 T_{1c} の異なる三つの成分が存在することが明らかになり、 T_{1c} の短い成分から順に、過冷却液晶、中間および結晶成分に帰属した。この結果に基づけば、過冷却液晶成分のモル分率は0.62であり、かなり高いことが注目される。一方、カルボニル炭素やフェニレン炭素についても同様の解析を行った結果、 T_{1c} が12-24s と150-250sの二成分のみが観測された。このような成分数の違いの原因は明らかではないが、過冷却液晶成分に帰属できる T_{1c} の短い成分の存在分率は約0.4である。

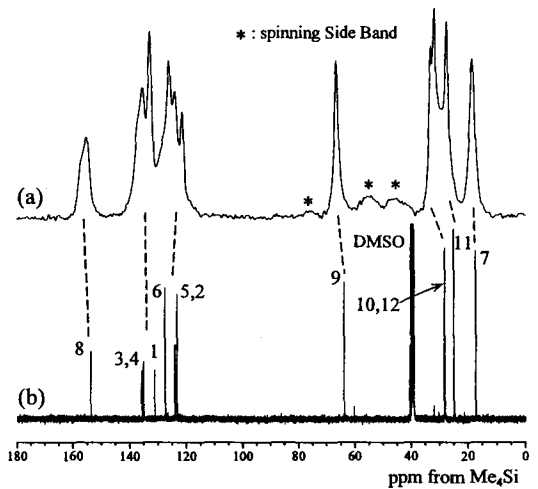
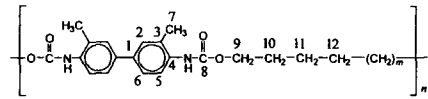


Figure 1. ^{13}C NMR spectrum of PDBD-8: (a) in the solid state at room temperature; (b) in the solution state at 100°C .

3.2 過冷却液晶成分の存在状態

偏光顕微鏡により PDBD-*m* の粉末を熔融状態から冷却する過程を観察したところ、液晶化は特定の部分から始まり、それらの部分から液晶領域が広がっていくことが分かった。そして結晶化も主として液晶化が始った部分から開始し、液晶化の後を追うように進行するが、通常の条件下では全体には広がらないで停止する。したがって、結晶化しない領域が過冷却液晶成分に相当する。次に、過冷却液晶成分が結晶化しない領域のみに存在するのか、結晶化した領域にも存在するのかを明らかにするために、結晶成分と ^1H スピナーを交換する成分の有無を ^1H スピナー格子緩和時間(T_{1H})測定により検討した。図3には $1^\circ\text{C}/\text{min}$ で冷却した PDBD-8 について反転回復法と CP/MAS 法を結合したパルス系列により室温で測定した ^1H スピナー格子緩和過程を示す。 T_{1H} の異なる二成分が存在しており、上述の T_{1c} 測定の結果のように過冷却液晶成分のモル分率がかなり高

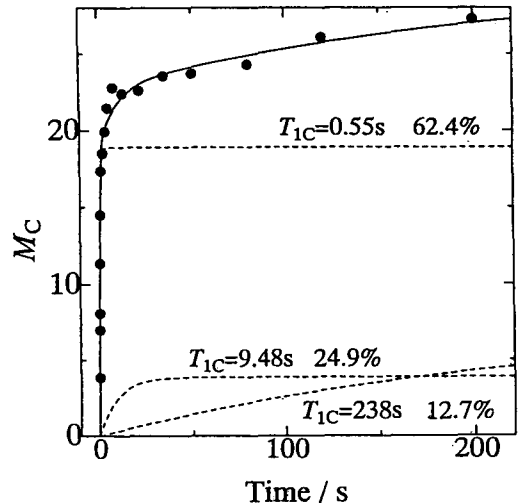


Figure 2. ^{13}C T_1 relaxation process measured for PDBD-8 by the saturation recovery method.

いことを考え合わせると、過冷却液晶のみのドメイン($T_{1H}=1.7\text{ms}$)および結晶と過冷却液晶が共存するドメイン($T_{1H}=1.29\text{s}$)が存在すること、後者のドメインでは結晶領域と過冷却液晶領域が20–30nm以下のオーダーでマイクロ相分離状態にあることなどが結論できる。

3.3 コンホメーションとダイナミクス

スペーサーのメチレン炭素の化学シフトについて γ -gauche効果を考慮して解析した結果、結晶および中間成分のスペーサーは平面ジグザグ構造をとるが、過冷却液晶成分は、trans-gauche間的高速遷移を起こしている結合(x)とtransの結合(t)が交互に入るttx(tx),tt($\ell=m/2-3$)で表される特異なコンホメーションをもつことが明らかになった。図4に一例としてPDBD-8の各成分のコンホメーションを示す。先述したように、過冷却液晶成分のメチレン炭素の T_{1C} は数100msであるので、trans-gauche間の遷移は室温で 10^8Hz 程度であると推定される。一方、メソゲン炭素の T_{1C} は12–24sと長く、分子運動はかなり拘束されている。メソゲンの詳細な分子運動状態を明らかにするために ^{13}C 化学シフトの異方性を解析する予定である。

図5に示すように室温で測定したCP/MAS ^{15}N NMRスペクトルには59ppm付近に単一の共鳴線が現われる。従って、過冷却液晶成分と結晶成分の水素結合状態に著しい差異はないと考えられる。しかし、 ^{15}N スピン-格子緩和過程をCPT1パルス系列により測定したところ、少なくとも二成分が存在することから、過冷却液晶成分の水素結合はかなり運動性の高い状態にあると考えられる。

参考文献

- 1) Ishida, H.; Kaji, H.; Horii, F. *Macromolecules*, **30**, 5799 (1997).
- 1) Ishida, H.; Kaji, H.; Horii, F. *Polym. Prepr.*, **30**, 991 (1993).

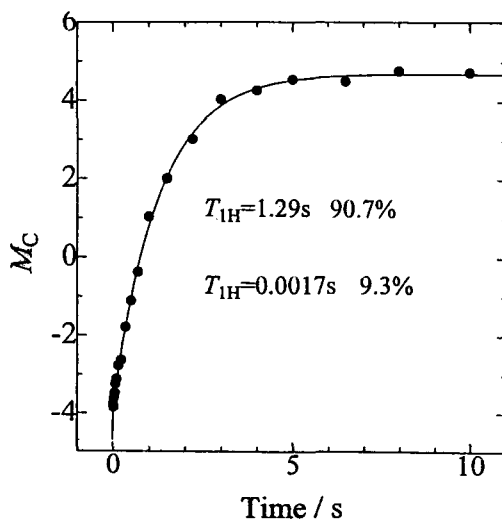


Figure 3. ^1H spin-lattice relaxation process measured at room temperature for PDBD-8.

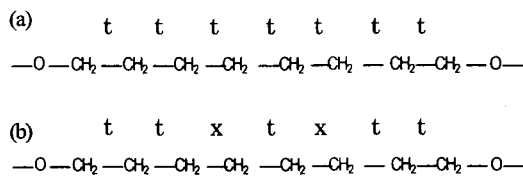


Figure 4. Conformation of the methylene sequence of PDBD-8: (a) the crystalline and medium components; (b) the supercooled component.

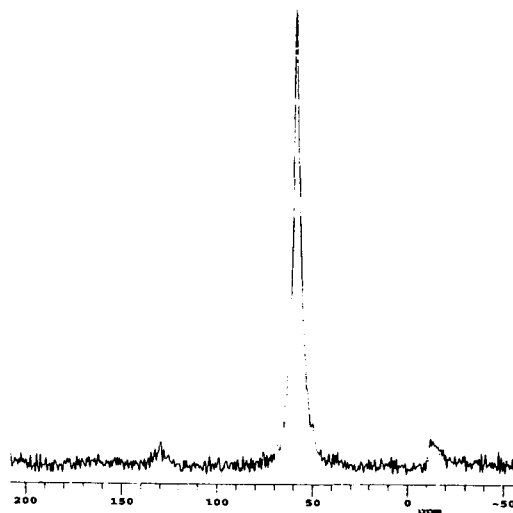


Figure 5. CP/MAS ^{15}N NMR spectrum of PDBD-8.

Conformational Analysis of Polyimides in the Solid State
 by Solid State ¹³C and ¹⁵N NMR

¹Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

²Department of Chemistry and Material Science, Tokyo Institute of Technology

 ○Haruchika Ishii¹, Isao Ando² and Shinji Ando¹

The dihedral angles (ω) between the imide ring and the N-substituted phenyl ring in several kinds of solid polyimides were analyzed through the observation of ¹³C NMR chemical shifts in ortho-position of the carbon, in order to elucidate their structure-property relationships. This method is based on the relationship between ω s and ¹³C NMR chemical shift, as obtained in low weight aromatic imides previously. From the experimental results, it was found that the dihedral angles ω s of Pyromellitic Dianhydride/*p*-Phenylenediamine imide, Pyromellitic Dianhydride/4,4'-Diaminodiphenyl Ether imide, 4,4'-Bipthalic Dianhydride/*p*-Phenylenediamine imide and Bipthalic Dianhydride/4,4'-Diaminodiphenyl Ether imide are obtained to be 80~90°, 60~70°, 50~60° and 50~60°, respectively. On the basis of these dihedral angles, the relationship between the ω s and glass transition temperatures T_gs was discussed.

1. 緒言

ポリイミドは非常に高い耐熱性を持つ高分子化合物である。そのため、現在では大変広範囲に利用されている。しかし、その分子構造を高い精度で明らかにした研究例は多くない。今後、ポリイミドを改良して新しい機能を持たせ、性質に変化を加える上で、ポリイミドの分子構造は非常に有用な情報になると思われる。しかしながらX線による高分子量ポリイミドの分子構造解析は、その単結晶の作りにくさから比較的困難である。そこで我々はNMR化学シフトを用いて、芳香族ポリイミドのイミド環とフェニル環の間の二面角 ω を比較的容易に解析する手法を開発した。

前回行った研究発表では、二面角 ω がX線構造解析で知られている低分子芳香族イミド化合物を用いて、二面角 ω と特定位置(Fig.1の*C)の¹³C NMR化学シフト値の間の相関関係を見出し、¹³C NMR化学シフト値を利用して二面角 ω の決定ができることを示した。

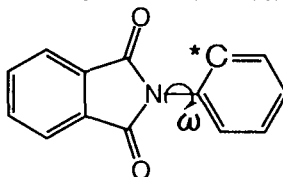


Figure 1 Structure of aromatic imide as model compound of aromatic imide, where the dihedral angle ω is defined.

The ¹³C NMR chemical shift of the *C carbon is concerned in this work.

キーワード：ポリイミド、化学シフト、コンホメーション

いしいはるちか、あんどういさお、あんどうしんじ

以上のことから本研究では、前回示した固体 ^{13}C NMR化学シフト値と二面角 ω の関係をを用いて、X線構造解析では決定することが困難な芳香族ポリイミドの二面角 ω の解析をした。また、その二面角 ω とポリイミドのガラス転移温度の関係を議論した。

2.実験

2.1.試料の合成

ポリイミドの原料には酸無水物二種（Pyromellitic Dianhydride[PMDA]、4,4'-Bipthalic Dianhydride[BPDA]）とジアミン二種（*p*-Phenylenediamine[PDA]、4,4'-Diaminodiphenyl Ether[ODA]）を用い、4種のポリイミド試料を合成した（Fig. 2）。

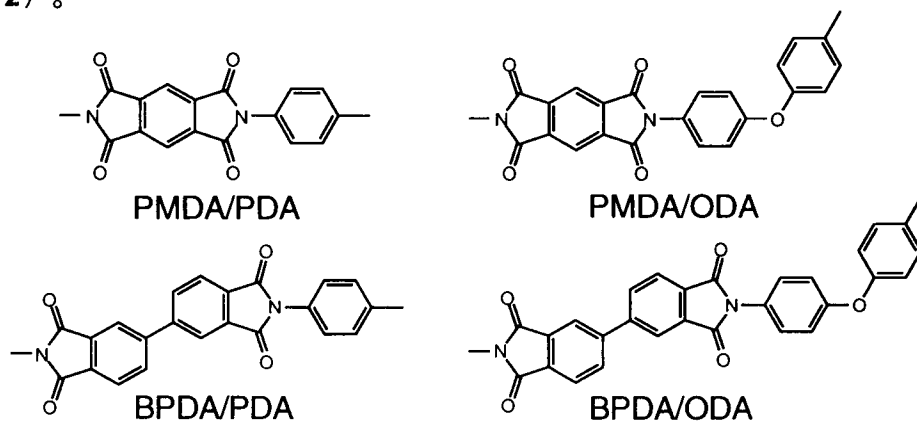


Figure 2 The structure of aromatic polyimides prepared in this work.

高結晶性のポリイミドを得るために以下の合成法を用いた⁽¹⁾。

脱水N-methyl-2-pyrrolidinone (NMP)を溶媒として N_2 下でサンプル濃度が10%になるようにジアミン、酸無水物の順で投入し、一日攪拌しポリアミド酸を作成した。その後、NMPを足して2%までサンプル濃度を低下させたのち、 N_2 下にて 180°C で5時間ほど加熱し、そこから析出したポリイミドを遠心分離器にて取り出した。この試料をアセトンと水で数回洗浄を繰り返して、測定試料とした。

2.2.NMR測定

合成した固体サンプルの測定にはJEOL社GSX-270NMR分光器（67MHz）を用いて、CP-MAS法に加えてTOSS法、Dipolar dephasing法を使用して固体 ^{13}C NMRスペクトルを観測した。 ^{13}C NMR化学シフトはアダマンタン（29.5ppm）を基準とした。

3.結果・考察

Fig. 3,4 に示すように非常に分解の良いNMRスペクトルが得られたため、帰属は比較的容易だった。

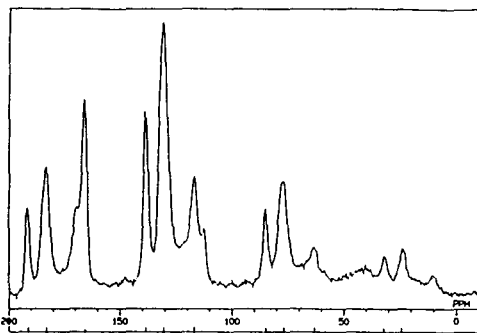


Figure 3 ^{13}C -CP/MAS spectrum of PMDA/PDA imide

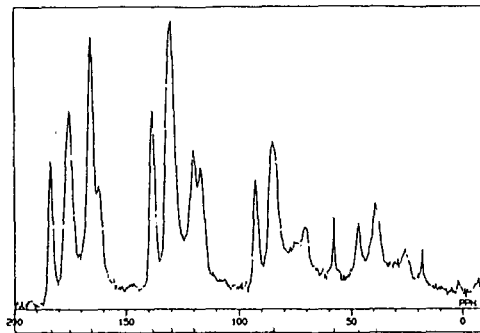


Figure 4 ^{13}C -CP/MAS+DDph spectrum of PMDA/PDA imide

二面角 ω と固体 ^{13}C NMR 化学シフト (δ) の相関を明確にするには、置換基の効果を化学シフトから取り除く必要があることが、前回の低分子芳香族イミド化合物の研究によって明らかになっている。そこで前回と同様に、置換基効果を取り除くために加成則⁽²⁾を使って予想される化学シフト (δ_s) を計算し、固体 ^{13}C NMR 化学シフトとこの計算値の差 ($\delta - \delta_s$) を使って、二面角 ω を決定した。モデル化合物の研究によって得られた化学シフトと二面角 ω の相関を **Fig.5** に示す⁽³⁾。

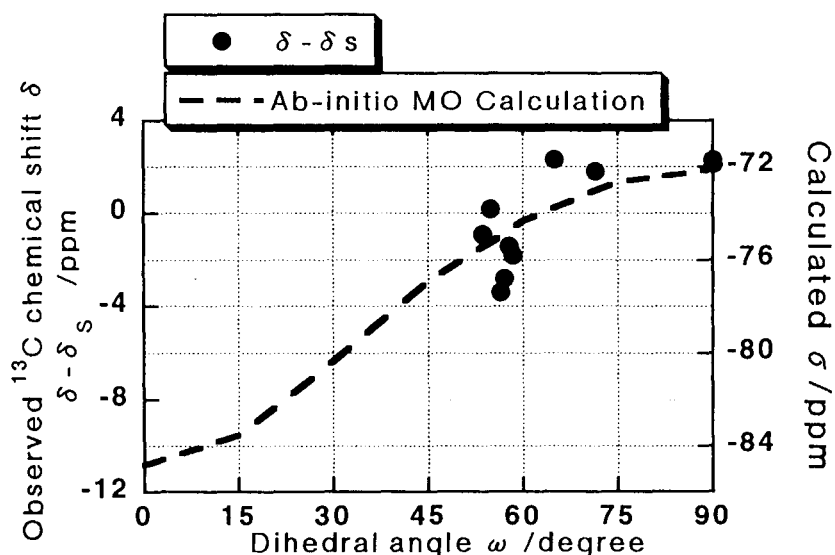


Figure 5 ^{13}C -chemical shift difference ($\delta - \delta_s$) vs dihedral angle ω in model compounds

以上の相関を用いて得られた各ポリマーの二面角 ω を **Table** に示す。同時に各ポリイミドのガラス転移温度も載せた。ただし、PMDA/PDA の T_g は、観測する前に分解が先に起こってしまい、観測ができない。このために予想される計算値を示した^(4,5)。

Table Observed ^{13}C chemical shifts, and Dihedral angles ω of PMDA/PDA, PMDA/ODA, BPDA/PDA and BPDA/ODA as predicted from each NMR chemical shifts and their Tgs.

Sample	Chemical shift (solid), δ /ppm	Chemical shift (substituent effect), δ s/ppm	$\delta-\delta_s$ /ppm	Dihedral angle ω / degree	Tg / $^{\circ}\text{C}$ (4.5)
PMDA/PDA	130.2	127.2	+3	80~90	(702)
PMDA/ODA	126.7	126.3	+0.4	60~70	410~377
BPDA/PDA	126.1	127.2	-1.1	50~60	355
BPDA/ODA	125.5	126.3	-0.8	50~60	285

低分子芳香族イミド化合物では、二面角 ω が 50° 以下のものがほとんど見つかっておらず、大多数が $50\sim 70^{\circ}$ であった。今回用いた4種のポリイミド試料の結果も低分子芳香族イミド化合物とほぼ同様の結果が得られた。

またTgと二面角 ω を比較すると、二面角 ω の値が大きくなればなるほど、Tgが高くなっていることがわかった。これについての詳しい分子論的な考察に関しては、現在検討中である。

4. 結論

低分子芳香族イミド化合物によって得られたイミド環-フェニル環間の二面角 ω と、固体 ^{13}C 化学シフトから置換基の効果を取り除いた値の相関を用いて、芳香族ポリイミドの二面角 ω を求めた。その結果、PMDA/PDA、PMDA/ODA、BPDA/PDA、BPDA/ODAの二面角 ω はそれぞれ $80\sim 90^{\circ}$ 、 $60\sim 70^{\circ}$ 、 $50\sim 60^{\circ}$ 、 $50\sim 60^{\circ}$ と決定した。また、その二面角 ω とポリイミドのガラス転移温度の関係を議論した。

References

1. Y. Nagata, Y. Ohnishi, T. Kajiyama, *Polym. J.*, 28, 11, 980 (1996)
2. D. F. Ewing, *Organic Magnetic Resonance*, 12, 9, 499 (1979)
3. H. Ishii, S. Ando, I. Ando, 第36回NMR討論会講演要旨集, 375 (1997)
4. C. Feger, M. M. Khojasteh, M. S. Htoo, *Advances in Polyimide Science and Technology*
5. T. Katayama et al, エンジニアリングプラスチック, 高分子素材 One Point-1

^{13}C NMR化学シフトを用いたビフェニル化合物の結晶中のコンホメーション解析

(東工大) ○廣中俊也、黒子弘道、安藤勲、安藤慎治

Conformational Analysis of Biphenyl Derivatives in the Crystalline State by ^{13}C NMR Chemical Shifts

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

Toshiya Hironaka, Hiromichi Kurosu, Isao Ando, Shinji Ando

Dihedral angles between two benzene-rings at biphenyl linkages were analyzed using ^{13}C NMR chemical shifts in the crystalline state for several compounds and polymers whose crystal structures have not been analyzed. 4-Methoxybiphenyl has a coplanar structure, and 4-cyanobiphenyl has a twisted structure. All the biphenyl linkages in main-chain liquid crystalline polymers (P7MB, PDTEB and PTEB) analyzed in this study have coplanar structures.

1. はじめに

われわれは ^{13}C NMR 化学シフトと結晶中におけるビフェニル構造のベンゼン環同士のなす二面角 ω (Fig.1) の相関を見いだした¹。それは二面角の増加とともに $C_{6,eff}$ ($C_{n,eff}$ は C_n 炭素の化学シフトを置換基補正した値) が低磁場にシフトするというものであった。そこで今回は、測定試料数を増やすとともに、磁気遮蔽定数の計算をより詳細に行い、結晶構造が未知の化合物 (高分子化合物、低分子化合物) にその結果を適用して、結晶中のビフェニル構造の二面角の推定を試みた。

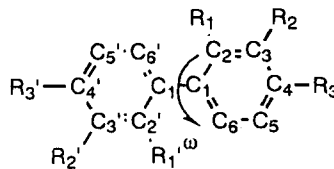


Fig.1 A chemical structure of biphenyl derivative.

2. 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)を用いて測定を行った。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(ct) 5ms、繰り返し時間 5s) で、帰属のために dipolar dephasing 法 (ct=5ms、dephasing 時間 20 μ s) を併用した。溶液の ^{13}C NMR スペクトルは日本電子製 GSX-500NMR 分光器(125.7MHz)を用い、化学シフトの基準 TMS を基準とし、溶媒は重クロロホルムに統一した。

^{13}C NMR 化学シフト、ビフェニル、コンホメーション

ひろなかとしや、くろすひろみち、あんどういさお、あんどうしんじ

3. サンプル

今回解析に用いた低分子化合物は 4-メトキシビフェニルと 4-シアノビフェニル、高分子化合物は高分子液晶を形成する P7MB, PDTEB 及び PTEB (Fig.2)である。4-メトキシビフェニルはアセトン溶液から、4-シアノビフェニルはクロロホルム溶液からそれぞれ溶媒を蒸発させることにより結晶試料を調製し、粉碎して測定に用いた。3種の高分子化合物については文献^{2,3}の固体NMRデータを参考にして二面角の解析を行った。

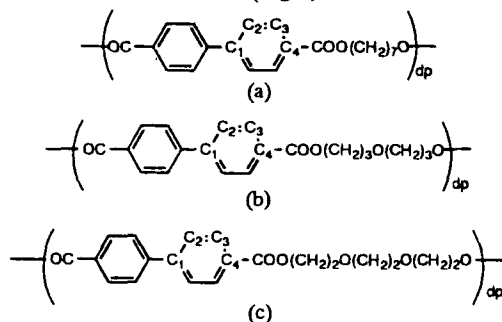


Fig.2 Chemical structures of (a) P7MB (b)PDTEB (c)PTEB.

4. 結果

4.1 ¹³C NMR 化学シフトと二面角の関係

前回より試料数を増やし、磁気遮蔽定数計算を詳細に行った結果、C1_{eff}、C2_{eff}、C6_{eff}に2面角との相関が見られ、またC1・C2・C6炭素の固体と溶液の化学シフトの差(ΔC_n)にも相関が見られた(Fig.3)。中でもC6_{eff}は計算結果と良い一致を示している。2位(Fig.1)に置換基がついていない化合物については、二面角の増加とともに化学シフトが低磁場側にシフトしていた。しかしながら、C1_{eff}は二面角が0°のところでバラツキが大きく、2位に置換基がついていない化合物についてはC2とC6の化学シフトが同じであることから、結果としてコンホメーション解析に使用できるパラメータはC6_{eff}、ΔC1、ΔC2となる。

4.2 ¹³C NMR 化学シフトを用いたコンホメーション解析

3で述べた化合物のC6_{eff}、ΔC1、ΔC2をTable 1に示した。その結果、4-メトキシビフェニルはベンゼン環同士の二面角が0°の共平面構造であると推定される。一方、4-シアノビフェニルはΔC1とC6_{eff}・ΔC2で得られる結果に違いが生じたが、共平面ではなく捻れた構造であると推定される。また、3種の高分子化合物ではいずれもビフェニル構造が共平面構造であると推定される。

5. まとめ

今回解析を行った化合物はいずれも溶媒に可溶であり、置換基がビフェニル構造の4位のみ結合している。このためC6_{eff}、ΔC1、ΔC2のいずれでもコンホメーションの推定が可能となった。一般にビフェニル構造の2位に置換基を有しない化合物の二面角は50°以下であることが結晶構造解析から知られている。したがって、これらの化合物においては、ビフェニル構造が共平面構造であるか(0°)それとも20°~40°にねじれているのかを知ることが重要である。われわれの方法はこの両者を見分けるのに有効である。一方、溶媒に不要なものや2位に置換基が存在するものは、

$\Delta C1$ と $\Delta C2$ が解析に利用できず、特に 2 位に置換基を有する化合物の二面角はほとんどの場合 50° 以上であり、 ^{13}C NMR 化学シフトに差が生じないことから解析は容易でない。

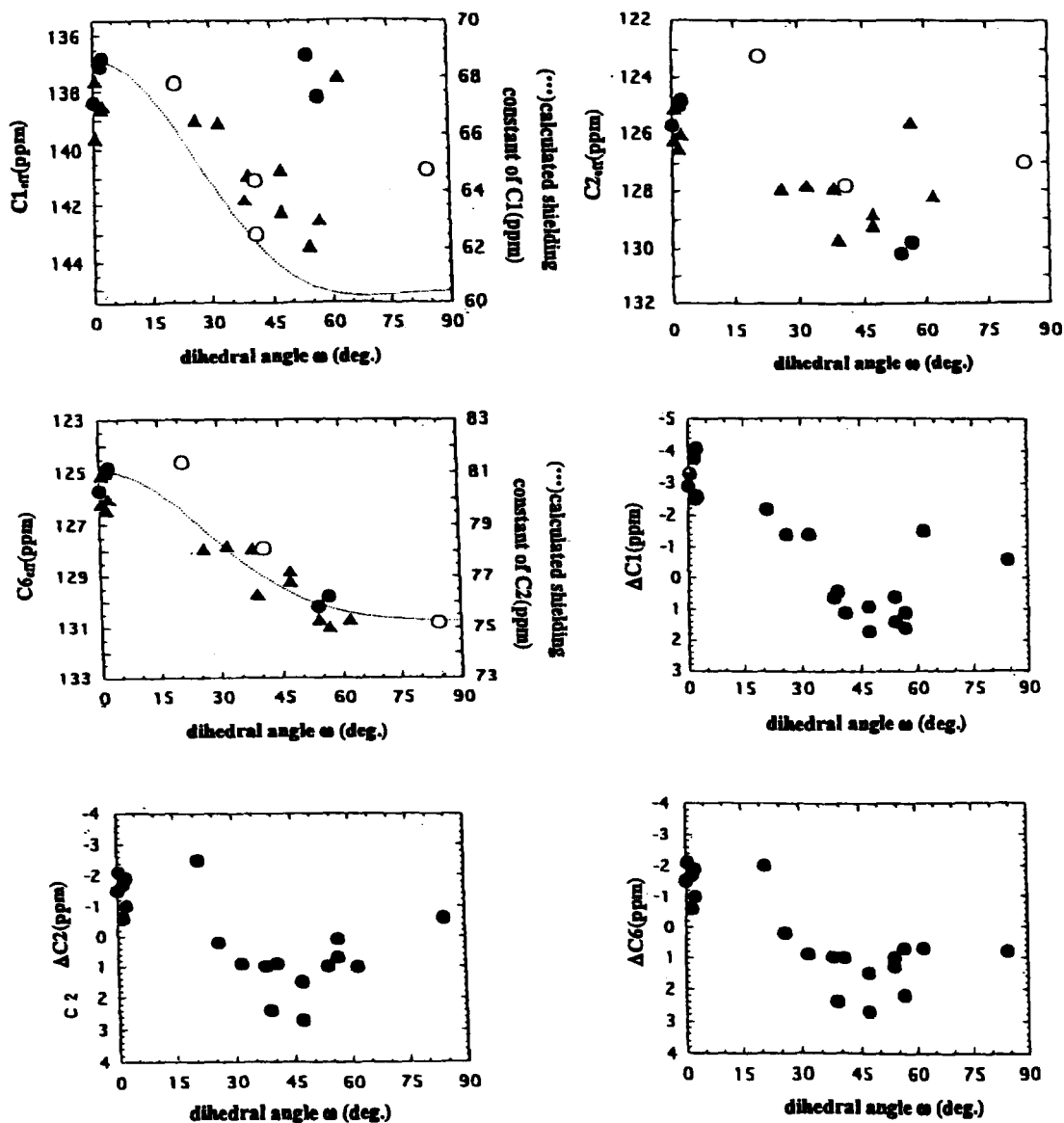


Fig.3 Relationships between the dihedral angles and the ^{13}C chemical shift parameters.

Table 1 ^{13}C chemical shift parameters of biphenyl derivatives.

	$\text{C6}_{\text{eff}}(\text{ppm})$	$\text{C6}'_{\text{eff}}(\text{ppm})$	$\Delta\text{C1}(\text{ppm})$	$\Delta\text{C1}'(\text{ppm})$	$\Delta\text{C2}(\text{ppm})$	$\Delta\text{C2}'(\text{ppm})$
4-methoxybiphenyl	125.7	124.9	-4.1	-3.0	-1.5	-1.9
4-cyanobiphenyl	126.9	127.5	-0.7	-0.3	-0.3	0.2
P7MB	125.5		-4.3		-2.2	
PDTEB	125.8		-4.2		-1.9	
PTEB	125.7		-4.1		-2.0	

参考文献

1. 廣中俊也, 安藤慎治, 黒子弘道, 安藤勲, 第 36 回 NMR 討論会講演要旨集, 345(1997)
2. E. Perez, M. M. Marugan and D. L. VanderHart, *Macromolecules*, **26**, 5852 (1993)
3. E. Perez, R. Benavente, A. Bello, J. M. Perena and D. L. VanderHart, *Macromolecules*, **28**, 6211 (1995)

農工大工 ○亀田恒徳、出村誠、朝倉哲郎 Natick RD&E Center S.A.Fossey

Structural Analysis of Silk Fibroin Fiber by ¹³C Solid State Two-Dimensional Spin Diffusion NMR

Tsunenori Kameda[†], Makoto Demura[†], Tetsuo Asakura[†] and S.A.Fossey[‡]

[†]Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan, [‡]Natick RD&E Center, Natick, Massachusetts, USA

The spacial ¹³C spin distribution of silk fibroins obtained from *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* silkworms has been investigated. For the purpose, ¹³C-labeled model polypeptides; [1-¹³C]Ala labeled (AG)_n and [1-¹³C]Gly labeled (AG)_n, and ¹³C-enriched *S. c. ricini* silk fibroin were prepared and observed using ¹³C solid state two-dimensional spin diffusion NMR technique. The 2D spin diffusion spectra of ¹³C labeled (AG)_n with silk I form (the form before spinning) were clearly changed between before and after dilution with non-labeled (AG)_n, indicating the information on the intermolecular structure arrangement. In addition, the structure of α-helical form of *S. c. ricini* silk before spinning has been calculated from the Solid State 2D-spin diffusion NMR spectral simulation.

緒言

カイコ(*Bombyx mori*)絹フィブロインはAla-Glyが交互に繰り返されるシークエンスをもち、その構造は逆平行βシート構造(Silk II型構造)である。一方、絹フィブロインの繊維化は、繊維化以前のSilk I型からSilk II型への構造転移を意味するが、Silk I型構造については未だ決定的な構造が明らかにされていない。

固体NMR構造解析手法の一つである¹³C固体2次元スピン拡散NMR法は空間的な¹³C核間の磁氣的相互作用を検出する。特に化学シフト異方性の大きいカルボニル¹³Cでは、カルボニル基同士の配向角度によってその異方性相互作用パターンが大きく変化する。そのため、原子座標レベルの構造解析には欠かせない分子内、分子間の局所的なカルボニル基の配置とその配向角度が得られる利点がある。

本研究では、絹フィブロインの繊維化に伴う構造転移に着目し、繊維化前後の安定構造の原子座標レベルの構築を目的とし、¹³Cラベル絹およびそのラベル化合物を用いた固体2次元スピン拡散NMRによるカイコ絹フィブロインのsilk II型およびsilk I型構造の解明を行った。

実験

家蚕およびエリ蚕絹繊維試料は、[1-¹³C]Gly, [1-¹³C]Alaのエリ蚕への経口投与により得られた。¹³Cラベル家蚕絹フィブロインモデルペプチド ([1-¹³C]Ala-Gly)_n, (Ala-[1-¹³C]Gly)_nは信州大学の英先生により活性エステル法で合成された。これらの化合物を透析によってsilk I型に調製した。¹³C 2Dスピン拡散NMR測定は、JEOL

絹フィブロイン、結晶・非晶構造、安定同位体ラベル、化学シフト異方性、¹³Cスピン拡散

かめだつねのり でむらまこと あさくらてつお ステファン・フォッセー

EX 400 NMR およびCMX-400でstatic測定用プローブを用いて行った。ミキシング時間は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2を、分子動力学計算には、Insight II 950/Discover (MSI)を用い、力場にはcvff2.3を用いた

結果と考察

^{13}C ラベル家蚕絹フィブロインモデル化合物の透析により得られた試料の ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルからsilk I型と同定した。この試料の2Dスピン拡散NMR測定を行ったところ、ラベル率の高い ^{13}C ラベル($[1-^{13}\text{C}]\text{Ala-Gly}$) $_n$ 試料(A)と、ノンラベル(Ala-Gly) $_n$ で希釈した低濃度 ^{13}C ラベルPoly($[1-^{13}\text{C}]\text{Ala-Gly}$) $_n$ 試料(A*)では異なるスペクトルパターンとなることが観測された(Fig. 1)。このパターンの変化はFosseyらが考えているSilk I型モデルの原子座標に基づくシミュレーション(Fig.2)と概ね一致していることがわかる。また同時に、Silk II型およびエリ蚕フィブロインのコンフォメーションに関する検討も2Dスピン拡散NMRスペクトルとそのシミュレーションを用いて行っている。

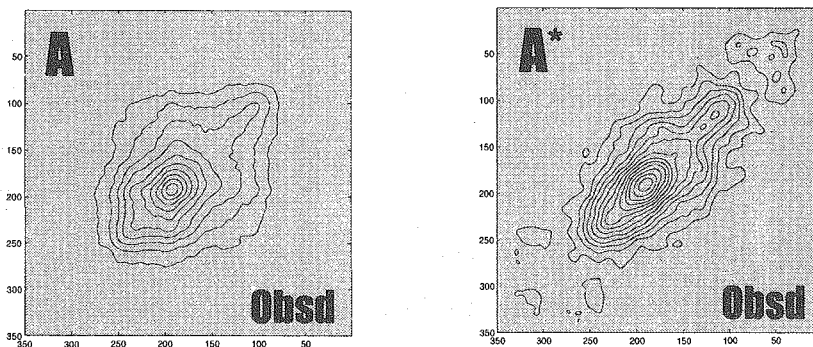


Fig. 1 ^{13}C Solid State 2D-spin diffusion NMR spectra of ($[1-^{13}\text{C}]\text{Ala-Gly}$) $_n$ (A) and the diluted (A*; 20 % dilution by non-labeled sample) samples .

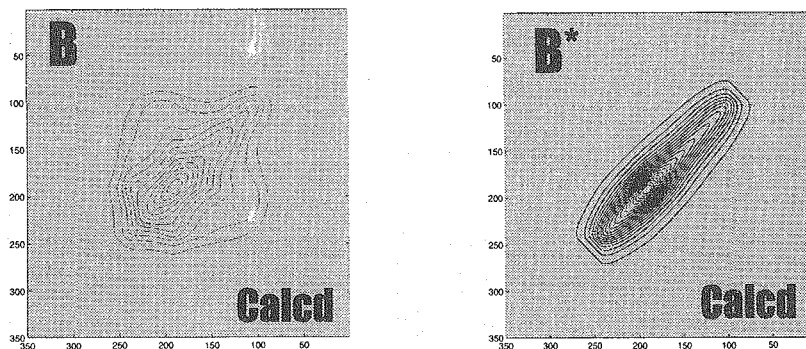


Fig. 2 Inter -sheet (B) and intra-sheet (B*) 2D-spin diffusion pattern simulation for Ala site of (Ala-Gly) $_n$.

なお、本研究は一部、生研機構基礎技術推進事業により行われた。また、NMR構造計算の一部は、MSI(サンジエゴ)のソフトを用いて行われた。

P89 高分子への Xe 収着挙動と ^{129}Xe NMR 化学シフト

(名工大・工) ○宮内 実・鈴木 智幸・吉水 広明
辻田 義治・木下 隆利

Xe sorption behavior and ^{129}Xe NMR chemical shift

Minoru Miyauchi, Tomoyuki Suzuki, Hiroaki Yoshimizu,
Yoshiharu Tsujita and Takatoshi Kinoshita

Department of Material Science and Technology, Nagoya Institute of Technology

In this study, to clarify the relationships between the ^{129}Xe NMR parameters and Xe sorption properties of the glassy polymers, the ^{129}Xe NMR spectra of the ^{129}Xe in polyphenyleneoxide, PPO, tetramethylpolycarbonate, TMPC, and polystyrene, PS. The Xe sorption isotherms of these polymers were measured by the quartz crystal microbalance at 25 °C. For example, the ^{129}Xe NMR chemical shift of Xe in PS shifted to low field with increasing the sorption amount of Xe. Since the isotherm of Xe for PS showed the dual mode sorption type, we can calculate the dual mode sorption parameters. The good linear relationship between the ^{129}Xe NMR chemical shift and the Xe sorption into Langmuir site of PS calculated using the dual mode sorption parameters was obtained. The similar results for TMPC and PPO were obtained. These findings suggest that the ^{129}Xe NMR spectroscopy is a good method for characterizing the microvoid of glassy polymers.

[緒言] ^{129}Xe は数気圧程度でも比較的容易に NMR スペクトルが得られるので、高分子に収着や溶解した ^{129}Xe の NMR スペクトルもまた観測可能である。一方、ガラス状高分子への気体の収着特性をその未緩和体積（またはミクロボイド）と関連付ける試みが多くの研究者によってなされている。ここでは、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値とガラス状高分子のミクロボイドとの関連性を検討した。

keyword : ^{129}Xe NMR、気体収着挙動、ミクロボイド
みやうちみのる、すずきともゆき、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] 本研究で用いた高分子キャスト膜試料はポリフェニレンオキシド(PPO)、テトラメチルポリカーボネート(TMPC)、ポリスチレン(PS)である。各高分子膜試料を、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)。Xe 収着等温曲線は Quartz Crystal Microbalance (QCM)法により得た。

[結果と考察] Fig. 1 に各試料の 25°Cにおける Xe 収着等温曲線を示す。Xe の収着量は PPO>TMPC>PS の順で多く、他の気体における結果と符号する。これらの等温線はガラス状高分子に典型的な曲線であり、二元収着モデルを適用して解析可能である。非線形最小二乗法により決定した二元収着パラメーターを 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 ともに収着量の多少に寄与している。

各試料について種々の Xe 圧力の下、室温における ^{129}Xe NMR のスペクトルを観測した。各試料中の ^{129}Xe の NMR ピークは何れも対称性の良い単一ピークを示したことから、Langmuir 収着及び 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(もし両サイトにある各々の Xe の NMR 化学シフト値が異なり、且つ両サイト間の交換速度が NMR スペクトル観測のタイムスケールより遅ければ、各々のサイトにある Xe の量に対応した強度をもつ 2 本のピークが観測される)。何れの試料膜においても高圧、すなわち収着量が増加するとともに ^{129}Xe NMR 化学シフト値は低磁場シフトした(Fig. 2)。この低磁場シフトの原因として高分子中の Xe 密度の増加が挙げられるが、バルクの Xe ではその NMR 化学シフト値が圧力とともに線形に低磁場

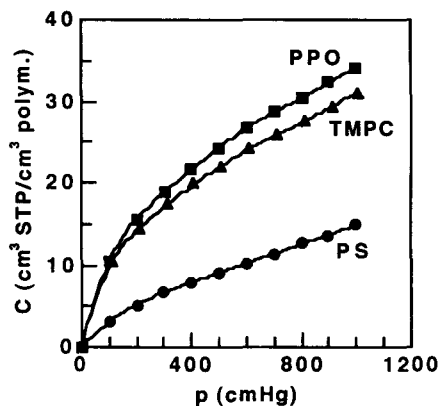


Fig. 1 Xe sorption isotherms at 25 °C.

Table 1 Dual-mode sorption parameters and glass transition temperature

sample	C_H'	$k_D \times 10^2$	$b \times 10^3$	T_g
PPO	19.1	1.5	7.5	219
TMPC	17.4	1.5	8.8	196
PS	4.9	1.1	8.6	100

C_H' : in $\text{cm}^3\text{STP}/\text{cm}^3\text{polym.}$
 k_D : in $\text{cm}^3\text{STP}/\text{cm}^3\text{polym. cmHg}$
 b : in cmHg^{-1} T_g : in °C.

シフトすることを考慮すると、高分子中の Xe の NMR 化学シフト値は収着量に対し線形に変化すると期待される。Fig. 3 は Table 1 の値を使って各圧力における Langmuir サイトの収着量(C_H)を算出し、これに対して ^{129}Xe NMR 化学シフト値をプロットし直したものである。Fig. 2 より Fig. 3 の方が良好な直線関係となっていることから、ここでみている ^{129}Xe NMR 化学シフト値は Langmuir 収着サイトに偏った情報を提供しているとみるべきである。すなわち、透過データに部分不動化モデルを適用して Langmuir 収着及び Henry 則に従う溶解サイトそれぞれの拡散係数を求めると、Langmuir 収着サイトの方が約一桁小さいので、 ^{129}Xe NMR 化学シフトの実測値が両サイトの拡散係数を反映した重み平均値を意味するとすれば、Langmuir 収着サイトに偏っている事実はうまく説明できる。

一方、Fig. 3 のプロットを $C_H = 0$ に外挿した値は高分子と Xe との相互作用のみがある場合の NMR 化学シフト値であり、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' との間に良好な直線関係が見られた(Fig. 4)。これらの結果は高分子の未緩和体積或いはマイクロボイド、分子鎖間隙等を評価する上で、 ^{129}Xe NMR 法が有効な手法であることを示している。

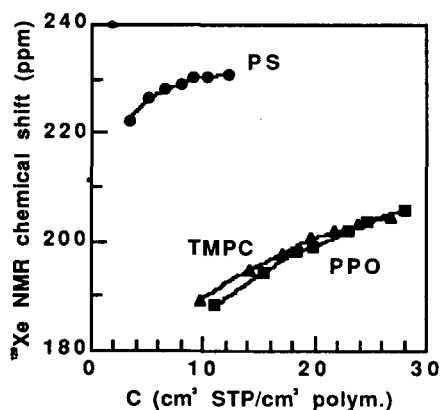


Fig. 2

The plot of ^{129}Xe NMR chemical shift vs. amount of Xe sorption at various pressures.

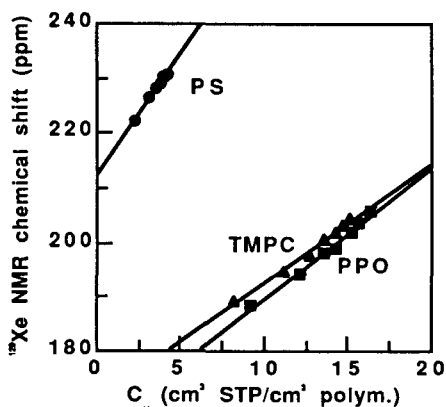


Fig. 3

The plot of ^{129}Xe NMR chemical shift vs. amount of Xe into Langmuir site at various pressures.

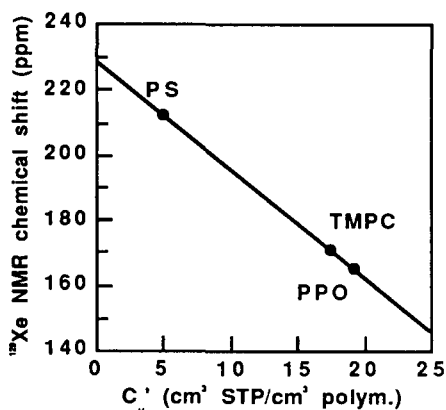


Fig. 4

The plot of ^{129}Xe NMR chemical shift vs. Langmuir sorption capacity of Xe for the polymers.

拘束した超延伸ポリエチレン繊維の
結晶転移およびダイナミクスに関する固体 ^{13}C NMR 解析

京大化研 ○桑原 和弘・梶 弘典・堀井 文敬

Solid-State ^{13}C NMR Analyses of the Crystalline Phase Transition and
Molecular Motion for Constrained Ultradrawn Polyethylene Fibers

Kazuhiro Kuwabara, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, JAPAN

The orthorhombic-to-hexagonal phase transition for constrained polyethylene fibers has been investigated by solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. In accord with the endothermic peak at 151 °C due to the phase transition in DSC, a new ^{13}C resonance line assignable to the CH_2 carbons appears in the hexagonal phase in the CP/MAS ^{13}C NMR spectra. The calculation of the ^{13}C chemical shift has revealed that 7 % gauche defects are included in the hexagonal phase of constrained polyethylene fibers. In the CP/DD ^{13}C NMR spectra obtained by setting the orientation axis of fibers perpendicular to the static magnetic field B_0 , two resonance lines assignable to σ_{11} and σ_{22} for the crystalline methylene carbons are remarkably observed at temperatures from 120 to 145 °C. In contrast, these two lines merge to a single resonance at 152 °C. On the other hand, no remarkable change in chemical shift even in the hexagonal phase are observed for a single resonance line appearing at σ_{33} for the crystalline methylene carbons, when the CP/DD ^{13}C spectra are measured by setting the orientation axis of fibers parallel to B_0 . These experimental results suggest that gauche defects may rapidly migrate along the molecular chain axis, holding the overall chain axis unchanged, to fulfill the cylindrical symmetry in the hexagonal phase.

1. 緒言

拘束下のポリエチレン繊維では、大気圧においても、融点よりやや低い温度で斜方晶から六方晶への転移が出現することが知られている。固体 NMR 法は、このよう相転移現象における動的な情報を得る上で有効であると考えられるが、これまで研究はなされていなかった。本研究では、固体 ^{13}C NMR 法により、拘束下のポリエチレン繊維における結晶転移、および

キーワード：固体 ^{13}C NMR、ポリエチレン繊維、相転移、ゴーシュコンホメーション、
分子運動

くわばら かずひろ、かじ ひろのり、ほりい ふみたか

六方晶の構造と分子運動について解析を行った。

2. 実験

試料のポリエチレン繊維、Dyneema は東洋紡（株）に提供して頂いた。各測定において、繊維はホルダーに堅く巻付け、両端を束縛、固定した。DSC 測定は TA Instruments DSC 2920 により、1°C/min の昇温速度で行った。CP/MAS ^{13}C NMR 測定は、Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4 T の静磁場下で行った。繊維の延伸方向を静磁場に平行、あるいは垂直にセットした状態での CP/dipolar decoupling (DD) ^{13}C NMR 測定は、JEOL JNM-GSX 200 分光計により 4.7 T の静磁場下で行った。

3. 結果と考察

DSC 測定の結果、145°C 近傍から始まり、約 151°C にピークトップをもつ斜方晶-六方晶転移に帰属される吸熱が認められた。図 1 には、CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを示す。145°C までは、斜方晶に帰属される 32.9 ppm の共鳴線のみが見られるが、145°C 以上で、斜方晶の共鳴線よりも高磁場側に、より線幅の狭い六方晶の共鳴線が出現することが分かる。*n*-アルカンの六方晶¹⁾のように、斜方晶より低磁場側に共鳴線が現れないのは、ポリエチレン繊維の六方晶では *gauche* コンホメーションが含まれ、各メチレン鎖において高速の *trans-gauche* 遷移が起こっていることを示す。 γ -*gauche* 効果に基づいて化学シフト値から算出した *gauche* 分率は約 7% である。したがって、約 14 CH_2 あたり一個の *gauche* が含まれていることになる。

図 2 には、繊維の延伸方向を静磁場に垂直にセットして得られた CP/DD ^{13}C NMR スペクトルの温度変化を示す。38.8 ppm のピークおよび 49.0 ppm のショルダーはそれぞれ結晶成分の CH_2 炭素の σ_{22} および σ_{11} に対応する。室温から 145°C までは結晶成分の共鳴線の形状に大きな変化は見られない。これに対して、斜方晶-六方晶転移領域の 147~151°C では、 σ_{11} のショルダーが小さくなり、 σ_{22} のピークが低磁場シフトする、すなわ

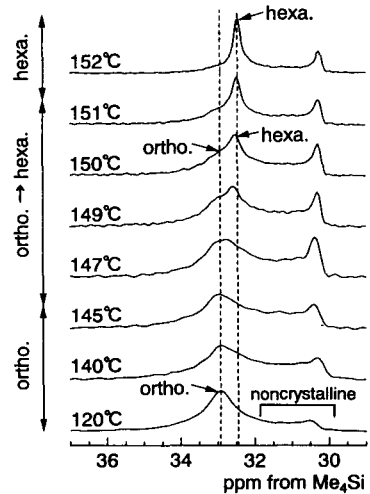


Fig. 1. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of constrained polyethylene fibers.

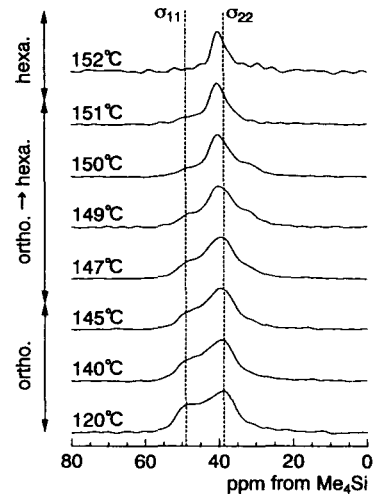


Fig. 2. CP/DD ^{13}C NMR spectra of constrained polyethylene fibers obtained by setting the orientation axis perpendicular to B_0 .

ち σ_{11} と σ_{22} の平均化が起こっていることが分かる。152°Cにおいては、40.2 ppm に単一の共鳴線が認められる。 σ_{22} と σ_{11} に対応する 2 本の共鳴線が単一になるという結果は、*n*-アルカンの六方晶においても認められ、分子鎖軸回りのランダムな回転運動が起こると結論されている¹⁾。図 2 に示した 150°C における結晶成分の単一の共鳴線の化学シフトは、室温における剛直状態での σ_{11} と σ_{22} の平均値 43.9 ppm と比較して、高磁場シフトしている。拘束状態のポリエチレンの六方晶においては *gauche* コンホメーションが存在して分子鎖方向に高速で並進運動するため、平均の γ -*gauche* 効果により高磁場シフトしているものと考えられる。

図 3 には、繊維の配向方向を静磁場に平行にセットして得られた CP/DD ^{13}C NMR スペクトルを示す。結晶成分の CH_2 炭素の σ_{33} の共鳴線が温度上昇に伴ってわずかながら低磁場シフトしている。この場合も *gauche* コンホメーションが存在して高速で並進運動することにより、化学シフトの値が変化したものと考えられるが、 γ -*gauche* 効果は σ_{33} についてはかなり小さいと考えられる。

以上より考えられる、拘束下のポリエチレン繊維における六方晶の分子運動のモデル図を、*n*-アルカンの六方晶と比較して図 4 に示す。*n*-アルカンの六方晶では、結晶中のメチレン鎖が短いため、平面ジグザグ構造をもつ分子鎖全体が分子鎖軸回りにランダムな回転運動をしている¹⁾。一方、拘束下のポリエチレン繊維の六方晶では、7%程度の *gauche* コンホメーションが含まれ、これらが分子鎖方向に高速で並進運動することにより円筒対称が成立していると考えられる。

次に、斜方晶と六方晶の分子運動性を、 ^{13}C スピナー-格子緩和 ($T_{1\rho}$) 挙動により比較した。図 5 には、斜方晶と六方晶が共存する温度、150°C における MAS 状態での部分 $T_{1\rho}$ 緩和スペクトルを示す。斜方晶と六方晶の磁化の減衰は同程度である。すなわち、 $T_{1\rho}$ に反映される、数メチレン単位が関与するポテンシャルミニマムの速い揺動運動に関しては、斜方晶と六方晶の分子運動性は大差がないと考えられる。

分子鎖軸回りの分子運動の比較については、高分解能 ^{13}C スペクトルの線幅により検討した。図 6 には、斜方晶-六方晶転移が顕著には起こっていない 145°C における CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを、24°C におけるスペクトルと共に示す。145°C での斜方晶の線幅は、24°C

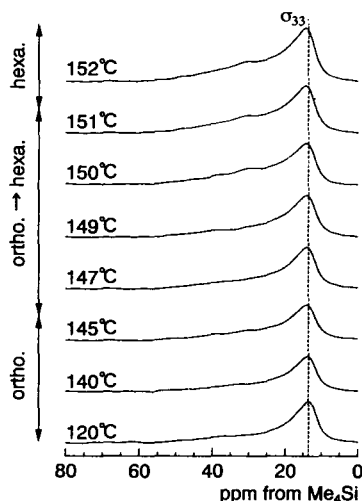


Fig. 3. CP/DD ^{13}C NMR spectra of constrained polyethylene fibers obtained by setting the orientation axis parallel to B_0 .

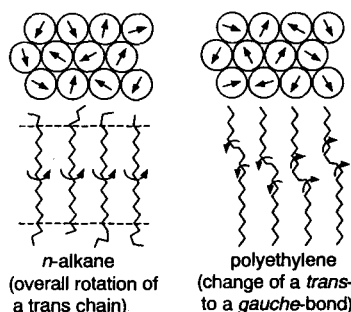


Fig. 4. Molecular motions around the molecular chain axis.

の斜方晶と比較して明らかに増大している。線幅の増大は 10^5 Hz 程度の分子運動が起こっていることを示すが、運動モードは分子鎖軸回りの 2-サイト交換の 180° ジャンプ運動と考えられる。その根拠は、ポリエチレン単結晶と線状低密度ポリエチレンについても温度上昇に伴い線幅が増大したこと、およびその温度範囲で ^{13}C CSA スペクトルに変化が見られなかったことより明らかにされている²⁾。一方、図 1 において六方晶の線幅が温度上昇に伴い小さくなっているのは、 10^5 Hz と比較して十分速い分子運動が起こっていることを示す。

以上より考えられる、斜方晶-六方晶転移近傍での、斜方晶と六方晶の分子運動のモデル図を図 7 に示す。斜方晶においては分子鎖軸回りの 180° ジャンプ運動が 10^5 Hz 程度で起こっている。一方、六方晶では gauche コンホメーションが分子鎖軸方向に並進運動することにより円筒対称が保たれるような分子運動が 10^5 Hz より十分速くで起こっている。 T_{1c} に反映されるポテンシャルミニマムの揺動運動に関しては、斜方晶と六方晶とで大差はない。

- 1) Kitamaru, R.; Horii, F.; Nakagawa, M.; Takamizawa, K.; Urabe, Y.; Ogawa, Y. *J. Mol. Struct.* **1995**, 355, 95.
- 2) Kuwabara, K.; Kaji, H.; Horii, F. *Polym. Prep. Jpn.* **1997**, 46, 3565.

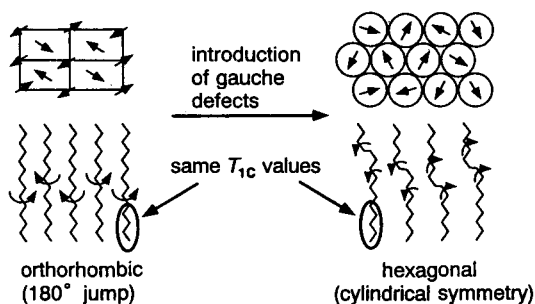


Fig. 7. Illustrated molecular motions of the orthorhombic and hexagonal phases of polyethylenes.

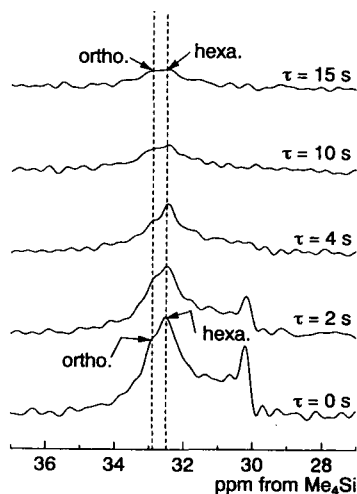


Fig. 5. Partially relaxed MAS ^{13}C NMR spectra of constrained polyethylene fibers at 150°C .

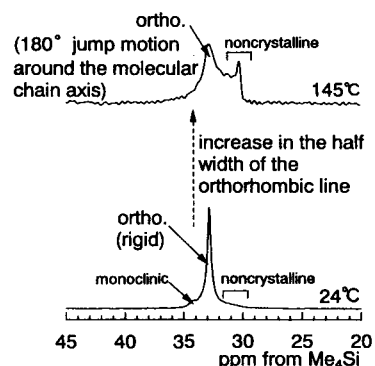


Fig. 6. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of constrained polyethylene fibers at 24°C and 145°C .

P91

固体高分解能 ^{13}C -NMR による凍結乾燥製剤中のタンパク質および高分子添加剤の分子運動性の測定

(国立衛研¹、横浜国大工²) ○吉岡澄江¹、阿曾幸男¹、小嶋茂雄¹、櫻井智司²、藤原敏道²、阿久津秀雄²

Determination of Molecular Mobility of Protein and Excipients in Lyophilized Formulations Using ^{13}C Solid-State NMR

S. Yoshioka¹, Y. Aso¹, S. Kojima¹, S. Sakurai², T. Fujiwara², H. Akutsu²
National Institute of Health Sciences¹, Yokohama National University²

The molecular mobility of lyophilized formulations was determined by solid state high resolution ^{13}C -NMR and discussed in relation to protein stability in the formulations. The spin-lattice relaxation time (T_1) of carbonyl carbon of bovine serum γ -globulin (BGG), a model protein, was determined as well as the T_1 of methin carbon of dextran, a model polymer excipient. The correlation time, τ_c , of each carbon was calculated from the observed T_1 . The temperature dependence of the τ_c calculated for BGG carbonyl carbon was nonlinear and consistent with that for dextran methin carbon. The results suggest that the molecular mobility of dextran affected the molecular mobility of protein, and consequently protein stability.

【目的】前回、タンパク質凍結乾燥製剤の安定性が、高分子添加剤プロトンのスピン-スピン緩和時間(T_2)の変化から測定される分子運動性の限界温度(T_{mc})によって支配されることを明らかにした。今回、凍結乾燥製剤中のタンパク質の安定性と分子運動性の関係をさらに詳細に検討することを目的として、固体広幅 NMR にかえて固体高分解能 ^{13}C -NMR を用い、タンパク質および高分子添加剤の運動性を分離して測定し、それぞれの分子運動性の温度依存性を明らかにした。同時に、製剤中のタンパク質の保存安定性を測定し、その温度依存性を分子運動性の温度依存性と比較することによって両者の関係を考察した。モデルタンパク質として牛血清 γ -グロブリン(BGG)、モデル添加剤としてデキストランを用いた。

【実験】タンパク質凍結乾燥製剤はデキストラン(40k)および BGG の混合溶液 (1:1) から凍結乾燥して調製した。製剤中のデキストランのメチン炭素および BGG のカルボニル炭素のそれぞれについて、固体高分解能 ^{13}C -NMR (Varian) を用いてスピン-格子緩和時間(T_1)を測定した。測定には Torchia のパルス系列を用いた。同様に、デキストラン単独の凍結乾燥製剤および BGG 単独の凍結乾燥製剤についても T_1 の測定を行った。さらに、タンパク質を

タンパク質、凍結乾燥製剤、分子運動性

よしおかすみえ、あそゆきお、こじまげお、さくらいさとし、ふじわらとしみち、あくつひでお

含有する凍結乾燥製剤を一定温度(20℃~45℃)に55時間保存後、サイズ排除クロマトグラフィーによってBGGの経時的な凝集量を測定し、製剤の保存安定性を検討した。

【結果および考察】

デキストランのメチン炭素の運動性

BGG凍結乾燥製剤中のデキストラン炭素について測定した T_1 は、Fig.1Aに示すような温度依存性を示した。相関関数が一つの相関時間 τ_c で減衰していると仮定し、またその緩和機構において炭素と水素の双極子-双極子相互作用が支配的であると仮定して、デキストラン炭素の τ_c を T_1 の観測値から(1)式に従って算出した(Fig.1A)。同様に、BGGを含有しないデキストラン単独の凍結乾燥製剤について測定したデキストラン炭素の T_1 および τ_c の計算値をFig.1Bに示す。

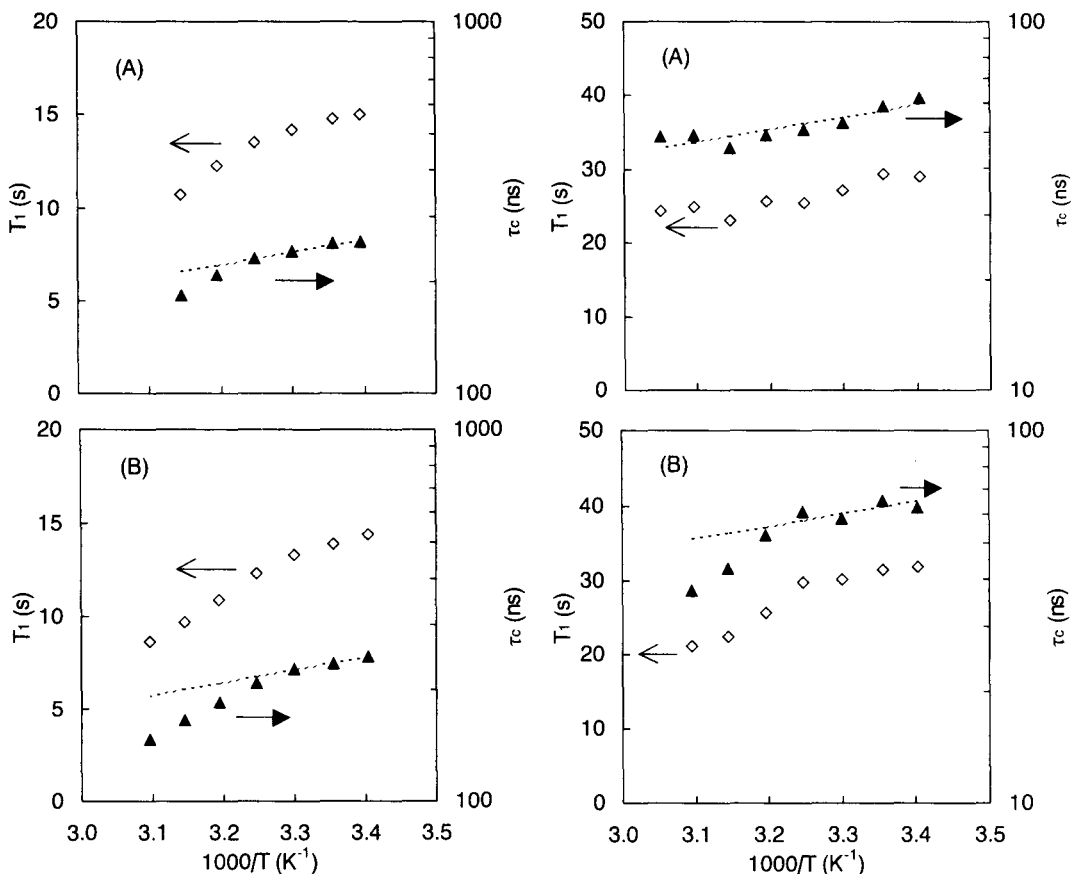


Fig.1. Observed T_1 (◇) and Calculated τ_c (▲) of Dextran Carbon in Dextran Formulation (A) and Dextran-BGG Formulation (B)

Fig.2. Observed T_1 (◇) and Calculated τ_c (▲) of BGG Carbon in BGG Formulation (A) and Dextran-BGG Formulation (B)

$$1/T_1 = (1/10) \gamma_C^2 \gamma_H^2 h^2 (2\pi)^{-2} r_{C-H}^{-6} [1 / (\omega_C - \omega_H)^2 + 3/\omega_C^2 + 6 / (\omega_C + \omega_H)^2] / \tau_c \quad (1)$$

デキストラン単独の凍結乾燥製剤および BGG とデキストランを含有した凍結乾燥製剤のいずれの場合も、デキストラン炭素の τ_c は非線形の温度依存性を示し、35°C 付近で温度依存性が変化した。また、いずれの製剤も 20°C 付近では 200~300ns の τ_c が得られた。

BGG のカルボニル炭素の運動性

BGG 凍結乾燥製剤中の BGG のカルボニル炭素は、Fig.2 に示すような T_1 の温度依存性を示した。BGG のカルボニル炭素の τ_c は、相関関数が一つの相関時間 τ_c で減衰していると仮定し、また化学シフトの異方性による緩和機構が支配的であると仮定して T_1 の観測値から (2) 式を用いて算出した。ここで、 $(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2$ はアミノ酸について報告されている値 (1.43×10^{-8}) を用いた。

$$1/T_1 = (1/15) \gamma^2 H_0^2 (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 (2/\omega_0^2 \tau_c) \quad (2)$$

デキストランを含有しない BGG 単独の凍結乾燥製剤においては、BGG のカルボニル炭素の τ_c は温度依存性が小さく、ほとんど直線的であるのに対して (Fig.2A)、デキストランを含有した BGG 凍結乾燥製剤においては、35°C 付近で温度依存性が不連続になり、高温領域では温度依存性が大きくなった (Fig.2B)。デキストランを含有した BGG 凍結乾燥製剤では、BGG カルボニル炭素の τ_c はデキストランメチン炭素の τ_c と同様のパターンの温度依存性を示すことが分かった。以上の結果から、デキストランが存在する BGG 凍結乾燥製剤中では、BGG はデキストランの動きに連動し、35°C 付近を境に高温領域で運動性が急激に高まることが明らかになった。

凍結乾燥製剤中の BGG の安定性

BGG の凝集速度の温度依存性は、32°C を基準温度とした Williams-Landel-Ferry 式によって表すことができた。すなわち、凝集速度は 32°C でその温度依存性が変化するが、その温度はデキストランおよび BGG の T_1 の温度依存性が不連続となる温度とほぼ一致した。なお、今回観察された T_1 の温度依存性が不連続となる点は、前報でデキストランプロトンのスピン-スピン緩和時間 (T_2) の変化から測定された分子運動性の限界温度 (T_{mc}) とほぼ一致することが分かった。

まとめ

BGG 凍結乾燥製剤中の BGG のカルボニル炭素の T_1 、および添加剤であるデキストランのメチン炭素の T_1 を、固体高分解能 ^{13}C -NMR を用いて測定することによって、タンパク質の安定性を密接に反映するタンパク質および高分子添加剤の運動性を測定できることが明らかになった。

P92 高分子の結晶化過程の *in situ* 固体 ^{13}C NMR 解析

京大化研 ○大平康正, 堀井文敬, 龍谷大理工 中沖隆彦

In situ analyses of solid-state ^{13}C NMR for the crystallization process in polymer

Y. Ohira, F. Horii and T. Nakaoki[†]

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

[†]Department of Materials Chemistry, Ryukoku University, Seta, Otsu 520-2194, Japan

The spontaneous crystallization process of the planar zigzag form (Form III) for highly syndiotactic polypropylene (sPP) has been investigated at 0 °C mainly by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy and wide angle X-ray diffractometry. In the line shape analysis of the fully relaxed dipolar decoupling (DD) / MAS ^{13}C NMR spectrum, the CH_3 resonance line has clearly been resolved into two Lorentzian curves, lines I and II, centered at 21.7 and 18.9 ppm, respectively. It has been found that the integrated fraction of line II is remarkably increased within about 10 h and then further increased slowly. The ^{13}C spin-lattice relaxation time ($T_{1\rho}$) analysis for the CH line has revealed that the $T_{1\rho}$ values ascribed to the crystalline component is also increased within about 10 h, indicating the growth of the Form III crystallites. The wide angle X - ray diffraction profile has also confirmed the change from the amorphous pattern to the profile identified with Form III at 0 °C within about 10 h. Accordingly, it is concluded that the spontaneous crystallization of Form III really proceeds mainly as a result of the crystalline growth of the Form III crystallites. The existence of Form III in samples kept at 0 °C has also been confirmed by the observation of an endothermic peak at around 38 °C due to the phase transition from Form III to another crystal form with *ttgg* conformation.

緒言 シンジオタクチックポリプロピレン (sPP) の全トランス連鎖結晶 (Form III) は試料を延伸した場合に生成することが知られている¹⁾。しかし、最近我々はこの Form III が、メルトから 0 °C 近傍に急冷・保持することで自発的に結晶化することを見出した²⁾。

本研究では、結晶化に対し動力学的な知見を得ること、結晶のサイズや完全性について解析を行うため、固体高分解能 ^{13}C NMR、広角 X 線回折、および熱分析により Form III の 0 °C における自発的な結晶化過程を詳細に検討した。

実験 試料は住友化学より提供された sPP ($\pi = 0.96$, $M_z = 820,000$) を 170 °C で融解後、0 °C 近傍で急冷・保持し作製した。固体高分解能 ^{13}C NMR の測定は、JEOL JNM-GSX200 分光計により磁場強度 4.7 T で行い、MAS 周波数は 3.0 kHz とした。試料を急冷状態で測定するため、sPP をメルトからガラス転移点 (約 -10 °C) 以下の温度に急冷し、この状態に保ちながら小片として、MAS ローターに充填した。このローターを約 -20 °C に保ったプローブにすばやくセットした後、0 °C に昇温して NMR 測定を行った。広角 X 線回折測定についても、ほぼ同様な取り扱いにより、RIGAKU 自動回折計により行った。

キーワード ; シンジオタクチックポリプロピレン、結晶化、全トランス連鎖結晶

おおひらやすまさ、ほりいふみたか、なかおきたかひこ

結果と考察) 図 1 には、0 °C に保持した試料の、0 °C での Dipolar Decoupling (DD) / MAS ^{13}C NMR スペクトルの経時変化を示す。ここで、パルス繰り返し時間を、 CH_3 の最長の ^{13}C スピン-格子緩和時間 T_{1c} の 5 倍 (5 s) にセットしたため、 CH_3 については熱平衡状態のスペクトルとなっている。図には CH, CH_3 の波形解析結果も示した。 CH_3 は 18.9 および 21.7 ppm の 2 つの Lorentz 曲線により波形解析が可能である。時間の経過とともに、Form III の化学シフトと一致する 18.9 ppm の共鳴線の強度が明瞭に増加する。この共鳴線の積分分率の時間変化を図 2 に示した。時間の経過とともにこの分率は急激に増加するが、約 10 h を境にして、その後は緩やかに増加するようになる。このような時間変化は Form III の結晶化を表すと考えられ、同一条件下で T_{1c} の測定も行った。図 3 には CH の T_{1c} の時間変化を示す。尚、いずれの時間においても CH の T_{1c} には 2 成分存在したが、ここでは結晶成分に帰属される最長の T_{1c} を示した。時間の経過とともに、 T_{1c} は約 10 h までは直線的に増加し、その後ほぼ一定となる。この T_{1c} の増大は結晶サイズの増大によると考えられる。したがって、0 °C への急冷によって結晶核がすばやく生成し、これらが約 10 h までは成長するが、その後は T_{1c} に影響するほどのサイズの増大が起こらないといえる。この急冷直後の試料中の構造については現在検討中である。

図 4 には、同一条件で測定した広角 X 線回折図の時間変化を示す。図中の実線は Form III に特有の回折角を示す。また、鋭い回折ピークは 0 °C における測定中に生成する氷によるものである。

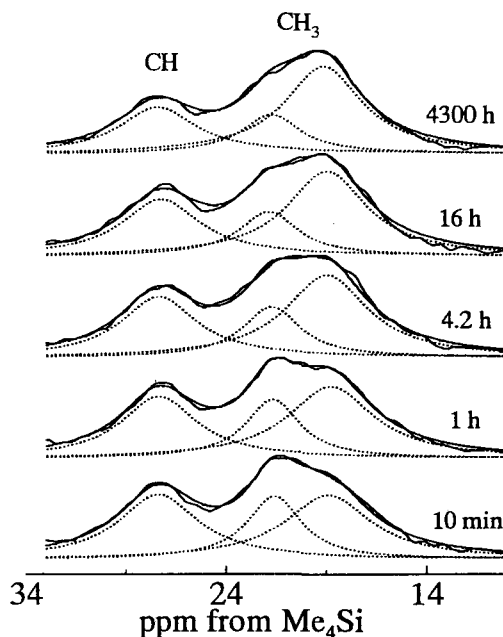


Figure 1. Time change of fully relaxed DD / MAS ^{13}C NMR spectra at 0 °C for sPP samples quenched from the melt to 0 °C.

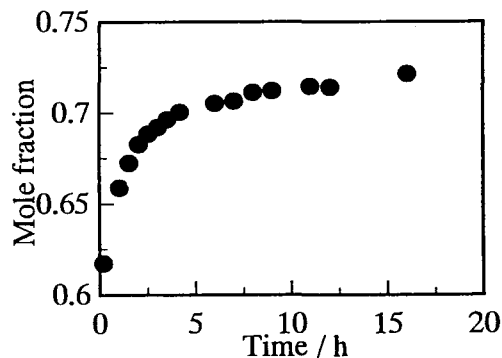


Figure 2. The relation between holding times and the mole fraction of the line at 18.9 ppm obtained by line shape analysis for CH_3 resonance in Figure 1.

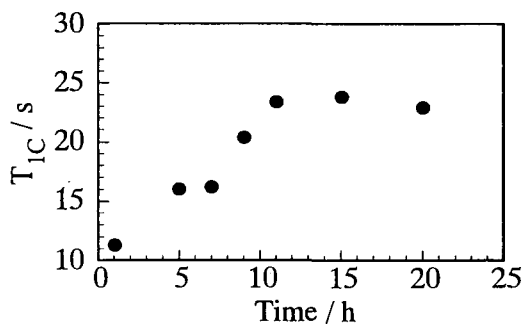


Figure 3. The relation between holding time and the ^{13}C spin-lattice relaxation time of the CH resonance line at 27.3 ppm.

急冷直後では、メルトが示す形状と類似することから、ほぼ非晶状態にあると考えられる。時間の経過とともに、最初約 16.3° に認められたメインピークは次第に広角側へシフトし、数時間以内に Form III の回折角である 17° 付近にピークをもつ特有の形状が認められるようになる。さらに時間が経過すると、回折は僅かにシャープとなるが、約 10 h 以降ではほとんど変化は認められなくなる。メインピークの回折角の時間変化を図 5 に示す。約 10 h までは回折角は著しく増加するが、その後は Form III の回折角である 17° 付近で一定となる。以上の結果より、 0° 近傍において Form III の結晶化がほぼ急冷直後から約 10 h までの間に起こること、この結晶化は主として結晶の成長に基づくことなどが結論される。

Form III の形成をさらに確認するため、 0° で保持した試料の DSC 測定を行った。図 6 は 0° に 1500 h 保持した試料の DSC 曲線である。矢印で示した 38° 付近にブロードな吸熱ピークが観測される。Form III は 50° 付近で *ttgg* 連鎖の結晶 (Form I) に相転移することが明らかにされている³⁾。したがって、このピークは Form III \rightarrow I の結晶相転移に基づくといえ、試料中に Form III が形成されていると結論できる。この結果を基に、この試料を転移点直下の 32° で 1200 h 熱処理した結果、転移点は 45° まで上昇することを確認した。しかし、転移ピークや X 線回折図の形状にはほとんど変化が認められなかった。これらの原因については現在検討中である。

参考文献)

- 1) G. Natta, M. Peraldo, G. Allegra, *Makromol. Chem.* **1964**, 75, 215.
- 2) T. Nakaoki, Y. Ohira, H. Hayashi, F. Horii, *Macromolecules* **1998**, 31, 2705.
- 3) P. Sozzani, R. Simonutti, A. Comotti, *Magn. Reson. Chem.* **1994**, 32, 45.

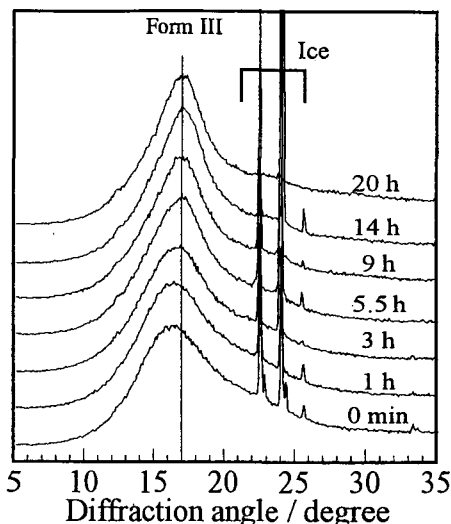


Figure 4. Time change of wide angle X-ray diffraction profiles at 0°C for sPP samples quenched from the melt to 0°C .

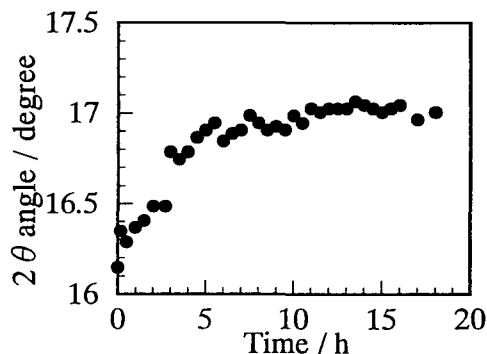


Figure 5. Time change of 2θ angle for the main peak obtained from Figure 4.

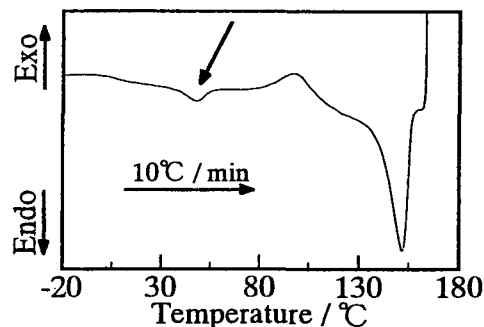


Figure 6. DSC curve of the sPP sample held at 0°C for 1500 h.

P93**高分子中に吸着された Xenon の動的挙動と高分子鎖の分子運動**

(阪大院理 1, 帝人(株)構造解析センター 2, 神戸薬科大 3)

○永阪文惣^{1,2}、上田貴洋¹、中山尋量³、江口太郎¹、中村亘男¹**Dynamic Behavior of Adsorbed Xenon and Molecular Motion of Polymer as Studied by Solid State NMR****Bunsow Nagasaka^{1,2}, Takahiro Ueda¹, Hirokazu Nakayama³, Taro Eguchi¹, and Nobuo Nakamura¹**¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043²Material Analysis Research Center, Teijin Ltd., Hino, Tokyo 191-8512³Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Hyogo 658-0003

Abstract Dynamic behavior of the adsorbed xenon and molecular motion in polycarbonate, PC have been studied by ¹²⁹Xe-, ¹³C-, and ²H-NMR spectra. It was found that the efficiency of the polarization transfer from ¹H to ¹³C of phenyl ring of PC is decreased in several months after the sample preparation, suggesting that the phenyl-ring 180° flip motion is prevented probably due to the adsorbed xenon. The favorable micropores for xenon to be trapped is discussed in detail.

The application of ¹²⁹Xe-NMR to characterize the structure of amorphous polymer in which so-called, "free volume" exists, has been one of the recent attractive subjects. In our last report, the inhomogeneous broadening of the NMR signal of ¹²⁹Xe adsorbed in polycarbonate, PC with decreasing temperature suggested that the dissolved xenon guests exchange among different micropores in the polymer at room temperature[1]. This mechanism is confirmed by the observation of a nearly round contour plot in 2D exchange

NMR experiment (fig.1).

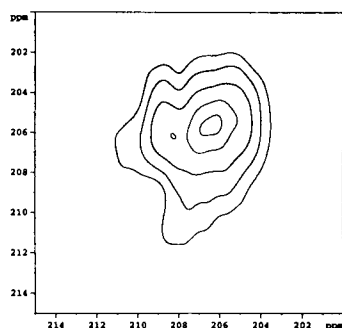


Fig.1 2D-Exchange NMR spectrum of ¹²⁹Xe in PC at room temperature. Mixing time is 1 s.

Here we present some more results from the investigation on the dynamic behavior of the adsorbed xenon in long time scale and molecular motion of PC. As can be seen in ¹³C-CP/MAS NMR spectra of PC/Xe (fig.2), after several months from the adsorption of Xe into PC, the intensities of the phenyl ring peaks (120, 128 ppm) are reduced. According to its contact time dependence as shown in fig.3, this phenomenon can be ascribed to the decrease of the efficiency of the polarization transfer from ¹H to ¹³C of the phenyl

Keywords: ¹²⁹Xe-NMR, 高分子, ダイナミクス, ミクロポアー

ながさかぶんそう、うえだたかひろ、なかやまひろかず、えぐちたろう、なかむらのおお

ring of PC due to both the steric hindrance effect of the adsorbed Xe and probable polarization transfer between ^{13}C and nearby ^{129}Xe . Thus it is suggested that during such a long time, some of xenon atoms occupied all kind of micropores would move to a part of micropores which have a favorable environment, *e.g.*, radius for the xenon to be trapped in[2], resulting in approaching to the phenyl ring of PC.

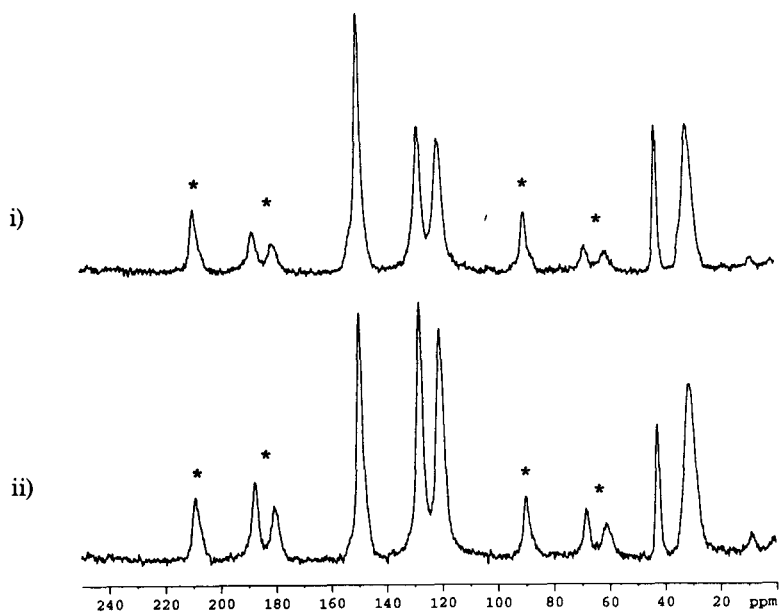


Fig. 2 ^{13}C -CP/MAS NMR spectra of i) the xenon dissolved PC after the passage of several months and ii) PC without xenon, at room temperature. Spinning side bands are indicated by asterisk.

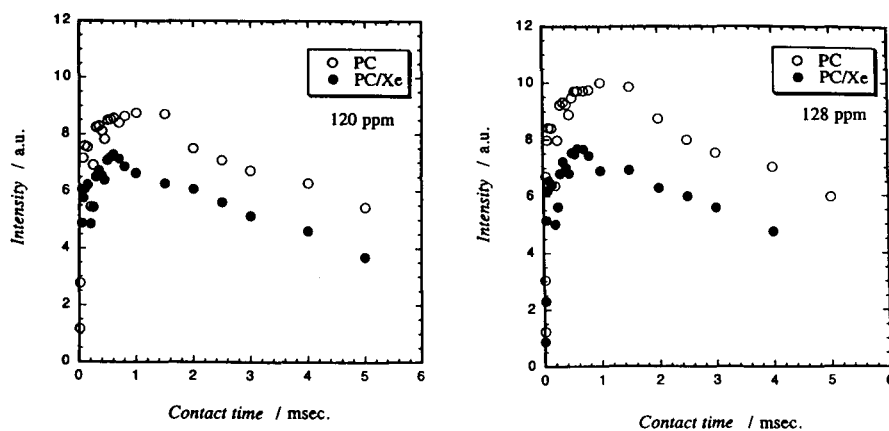


Fig. 3 Contact time dependence of the phenyl ring peak (120, 128 ppm) intensity in ^{13}C -CP/MAS NMR spectra of PC and PC/Xe at room temperature.

In addition to the above remarkable effect of the adsorbed xenon on ^{13}C CP intensity, fig.4 shows that 180° flip motion of the phenyl ring of PC is also suppressed in the aged sample.

The correlation between the dynamic behavior of xenon in micropores and the phenyl ring motion of PC will be discussed in a quantitative manner based on the result of 2D- ^{129}Xe exchange experiment.

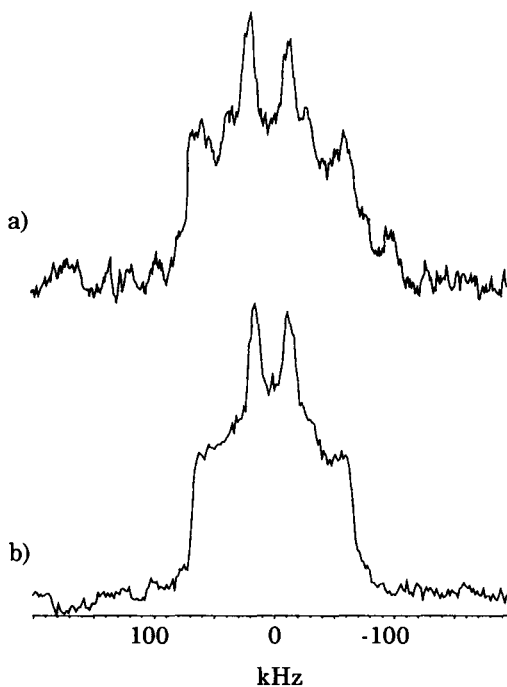


Fig. 4 ^2H -NMR spectra for the phenyl groups of the partially deuterated PC in which xenon dissolved. a) after several months, b) freshly prepared sample.

References

1. B. Nagasaka et al., to be published.
2. J.A. Ripmeester and C.I. Ratcliffe, *J. Phys. Chem.* **94**, 7652 (1990).

^{19}F および ^{13}C 固体NMRによるバクテリオロドプシンの構造解析

(財)サントリー生有研) ○岩下 孝、関谷紀子、金鍾文、吉原和雄、石黒正路

Structure Analysis of Bacteriorhodopsin using ^{19}F and ^{13}C Solid-State NMR

○Takashi Iwashita, Noriko Sekiya, Jong Moon Kim, Kazuo Yoshihara, Masaji Ishiguro
Suntory Institute for Bioorganic Research

Membrane proteins like receptors which contain α -helices play an important role in the biological system. Bacteriorhodopsin is a kind of photoreceptors which has 7 α -helices and it is thought to be the model of GTP-binding protein coupled receptors. Tryptophan residues of bacteriorhodopsin were labeled by ^{19}F or ^{13}C on their imidazole ring to obtain structural informations using the solid-state NMR. Synthetic chromophore which had an aromatic ring was incorporated to the labeled bacteriorhodopsin. The upper field shift was observed on a part of ^{13}C signal from tryptophans in the opsin part, which was thought to be an aromatic ring effect.

【緒言】

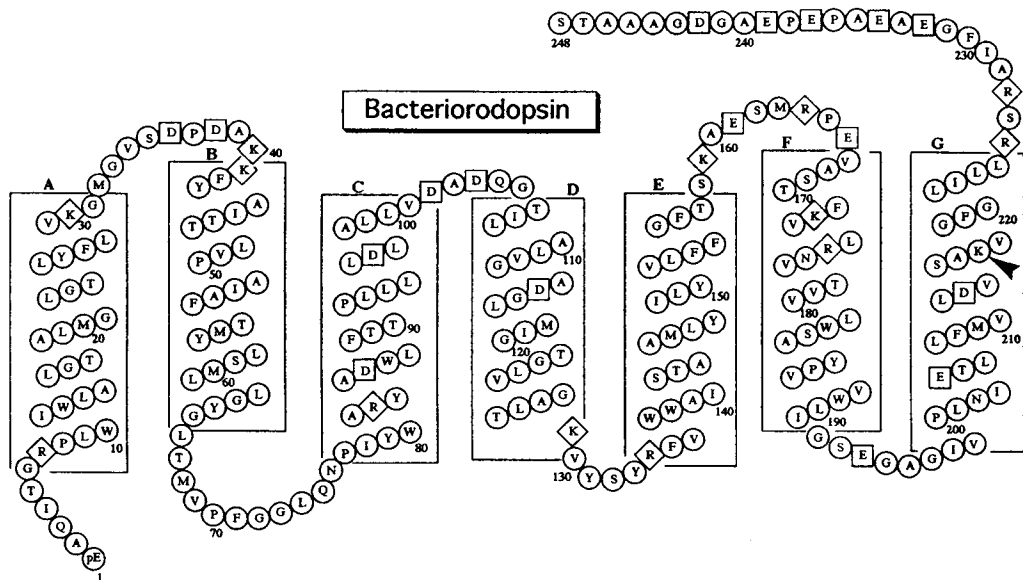
生物活動において重要な役割を担っている様々な受容体の中でもGタンパクを介し情報伝達を行っているGPCR (G-protein coupled receptor)は α -ヘリックスが膜を何回も貫通した構造を持つ膜蛋白質である。バクテリオロドプシンは情報伝達ではなくプロトンポンプ活性という生理機能を有し α -ヘリックスが7回膜を貫通した構造を持っているGPCRと類似の蛋白である。この蛋白はバクテリアの培養が容易であり、試料の大量調製が出来ることと構造の類似性から、GPCR構造研究のモデルとなりうる。また、バクテリオロドプシンはその分子中にシッフ塩基により結合しているクロモフォア (レチナール) を持っており、このクロモフォアは化学的に外してバクテリオロドプシンとすることが出来る。バクテリオロドプシンは合成クロモフォアとの再構成により合成バクテリオロドプシンの生成が可能である。このことは様々なラベル化合物の導入が可能であることを意味しており、固体NMRによる研究もいくつか報告されている。今回、バクテリオロドプシン部分とクロモフォアの両者に標識原子 (^{19}F または ^{13}C) を導入してその間の距離を見積もることを目標に実験を行った。

【実験】

合成培地に4-F、5-F、6-F、4- ^{13}C -トリプトファンを加えてバクテリアを培養し、膜画分をシヨ糖勾配遠心法を用いて精製してラベル化バクテリオロドプシンを得た。

キーワード： ^{19}F 固体NMR、 ^{13}C 固体NMR、膜タンパク質、バクテリオロドプシン、安定同位体標識

いわした たかし、せきや のりこ、きむ じょんむん、よしはら かずお、いしぐるまさじ



Ⓜ : 4 or 5 or 6F-Tryptophan, 4-¹³C-Tryptophan

▲ : Natural or synthetic chromophores bind here to make Schiff base.

Fig.-1 Bacteriorhodopsin amino acid sequence

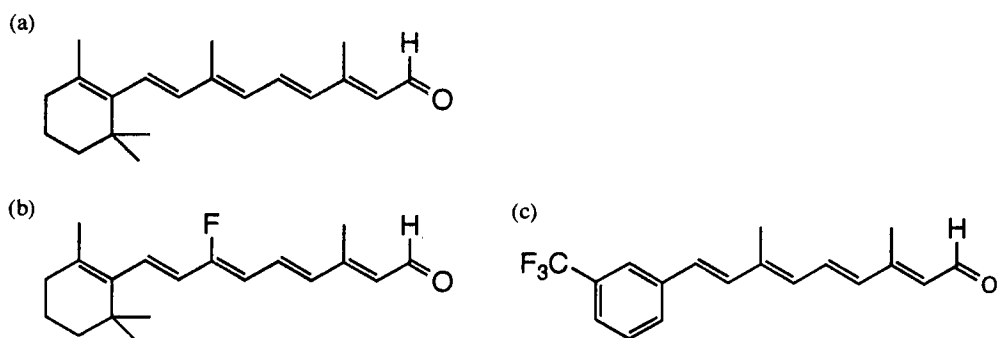


Fig.-2 (a) Natural chromophore; (b)&(c) Synthetic fluorinated chromophores

ラベル化バクテリオロドプシンはヒドロキシアンモニウム存在下、光照射によってバクテリオオプシンとした。Fig.-2に示すようなクロモフォアを化学合成し、バクテリオオプシンと再構成して合成バクテリオロドプシンを得た。 ^{19}F および ^{13}C 固体NMRはCMX-300 Infinityを用い、それぞれ282MHz, 75MHzで測定した。

【結果および考察】

Fig.-1に示すようにバクテリオロドプシンには8個のトリプトファンが含まれており ^{13}C 固体NMRでは115-125ppmの間に重なって見える。このうち低磁場側のピークはシクロヘキセン環の代わりにベンゼン環とした人工クロモフォアを入れるとFig.-3に示すように高磁場側へシフトすることが分かった。他のシクロヘキセン環を持つ人工クロモフォアとの再構成ではこのようなシフトは観測されないことからベンゼン環による影響と考えられる。原子間距離についてはREDORおよびRFDRタイプの実験について検討中である。

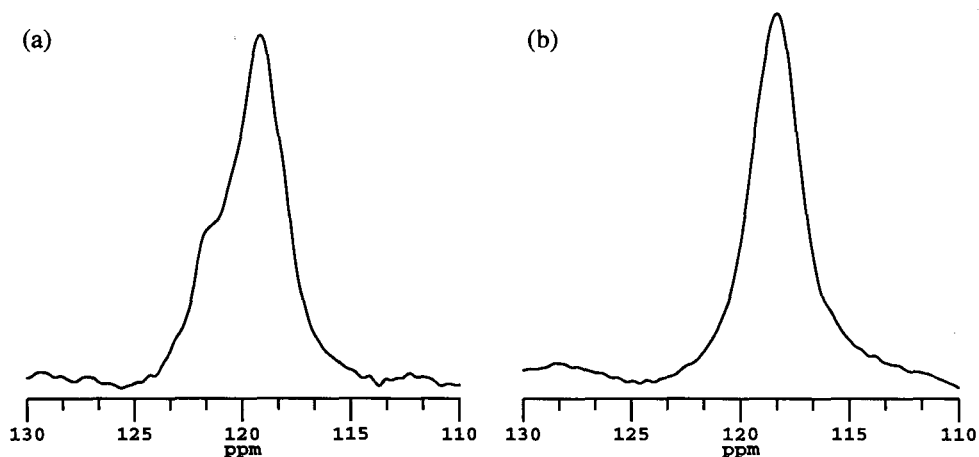


Fig.-3 CP-MAS Spectra of Bacteriorhodopsin containing 4- ^{13}C labeled tryptophanes. The chromophore is (a) wild type; (b) the synthetic one which had an aromatic ring.

P95 縮合多環芳香族化合物と鎖状炭化水素の混合物の固体 NMR
(電通大¹、工学院大²)

○小林信昭¹、安達久彰¹、仁木國雄¹、鈴木 冲¹、矢ヶ崎隆義²

Solid State NMR of n-Alkanes in the Mixture of the n-Alkanes
and Condensed Polycyclic Aromatic Compounds

○Nobuaki Kobayashi¹, Hisaaki Adachi¹, Kunio Nikki¹,
Noboru Suzuki¹ and Takayoshi Yagasaki²

(The University of Electro-Communications¹, Kogakuin University²)

¹³C CP/MAS solid state NMR chemical shifts of long-chain n-alkanes (C_nH_{2n+2}, n=19~24) in the mixture of the n-alkanes and condensed polycyclic aromatic compounds (ring numbers are 2~7) were obtained and those spin lattice relaxation times (T₁) were determined. The spectra of the mixture of n-alkanes and carbon fiber (PAN) were also discussed.

1. はじめに

直鎖アルカンの ¹³C CP/MAS 固体 NMR スペクトルは、その炭素数により化学シフト値が少し異なることが知られている。¹⁾そして、アルカンの結晶構造は炭素数が 20~24 では偶数個の場合に三斜晶で、奇数個のときに斜方晶であることがわかっている。したがって化学シフト値と結晶構造の間には密接な関係がありそうであるが、化学シフトの偶奇性のメカニズムはまだ明らかにされていない。一方、スピナー格子緩和時間 (T₁) についても、炭素数が偶数個の場合に奇数個の場合に比べて長いことが報告されている。²⁾これは偶数個のカーボン数のアルカンの結晶構造が奇数個の場合に比べてタイトであることによる、と説明されている。

今回は、C19~C24 の n-アルカンベンゼン環の数が 2~7 の何種類かの縮合多環化合物 (1) および PAN 系のカーボン・ファイバー (2) に混合して、¹³C CP/MAS 固体 NMR の化学シフトやスピナー格子緩和時間、あるいは線幅の検討を行った。

Key words: ¹³C CP/MAS 固体 NMR、n-アルカン、
縮合多環芳香族化合物、カーボン・ファイバー

こばやしのぶあき、あだちひさあき、につきくにお、すずきのほる、
やがさきたかよし

2. 実験

測定試料は 140°C に加熱したパラフィンに、縮合多環芳香族化合物およびカーボン・ファイバーを投入し、1 時間程度攪拌後冷却し乳鉢で粉末にして測定した。カーボン・ファイバーの場合はさらに KCl で希釈して測定した。

¹³C CP/MAS 固体 NMR スペクトルは、周波数 75MHz で、90 度パルス幅 5.2 μs、コンタクトタイム 500 μs、待ち時間 3s、MAS3000Hz の条件で、Unity 300 型分光計 (Varian 社製、プローブは Doty 社製) を用いて測定した。

3. 結果と考察

(1) n-アルカンを縮合多環芳香族化合物と混合した場合

Fig.1 に直鎖アルカン (C19、20、21) を、種々の芳香族化合物 (Np : Naphthalene, An : Anthracene, Py : Pyrene, Bp : Benzophenanthrene, Nc : Naphthacene, Co : Coronene) に重量比 1:1 で溶融した系のアルカンの化学シフトを示す。また、単体での化学シフトについて、

C19 は ———、C20 -----、C21 ----- で示す。

この場合、全てのメチル基、メチレン基の化学シフトは、アルカン単体の場合に比べて、低磁場シフトを示す。また、メチル基に注目すると、芳香環の環数の増加に伴い、低磁場シフトを示す傾向があることがわかった。

次に Fig.2 は、Fig.1 と同様の系における T₁ をあらわす。C20 のメチレン基については、芳香族との溶融により、ピレンの場合を除いて T₁ が長くなり、C21 の場合はベンゾフェナントレンとの溶融を除き、T₁ が短くなった。

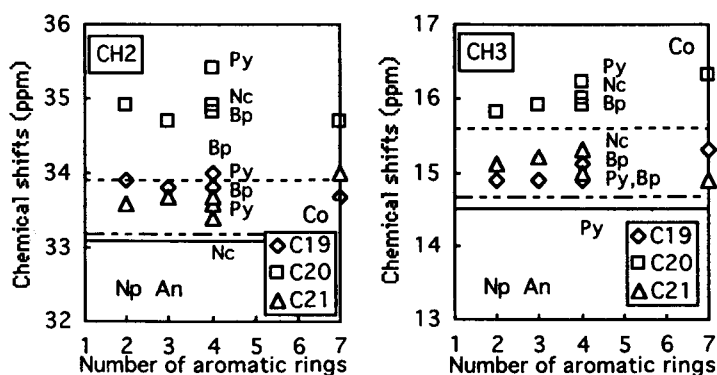


Fig.1 Chemical shifts of n-alkane (C19,20,21) soaked in condensed polycyclic aromatic compounds (Cx : aromatic compounds = 1 : 1)

また、アルカン単体の場合と同様に、化学シフトにも T₁ にもアルカンの炭素数の偶奇性があらわれていることから、芳香族化合物との混合状態は、分子レベルで十分であるとは言えないと思われる。ただし、T₁ には混合による変化が見られることから、混合による分子運動性あるいは、混合状態の情報が見られると考えて検討中である。

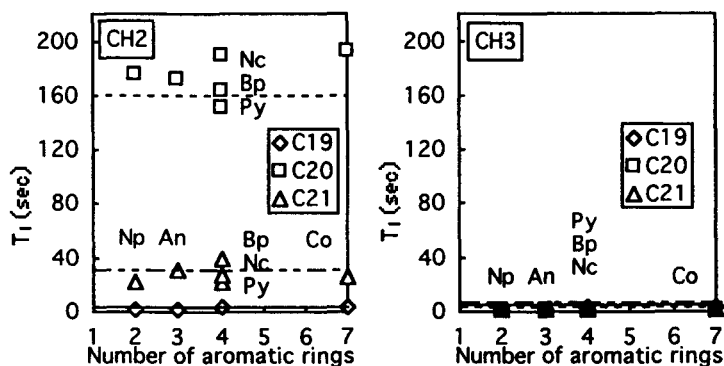


Fig.2 T₁ for n-alkanes (C19,20,21) soaked in condensed polycyclic aromatic compounds
 (C_x : aromatic compounds = 1 : 1)

(2) n-アルカンをカーボンファイバーと混合した場合

Fig.3 に (C19、20) を PAN 系カーボンファイバー (CF) に溶融したときの、メチレン基の半値幅を示す。この試料については得られる S/N 比が十分でなく、T₁ 測定が困難なため、線幅の比較を行った。C19 について、CF との混合比によらずメチレン基の線幅に大きな変化は見られない。一方 C20 については混合比が 1:1 付近で、極大となり顕著な変化が見られた。以上の結果より C20 について、メチレン基の周りのスピンがより不均一な状態にあることを示すと考えられる。つまり、CF との相互作用が C19 の場合より大きいと考えた。

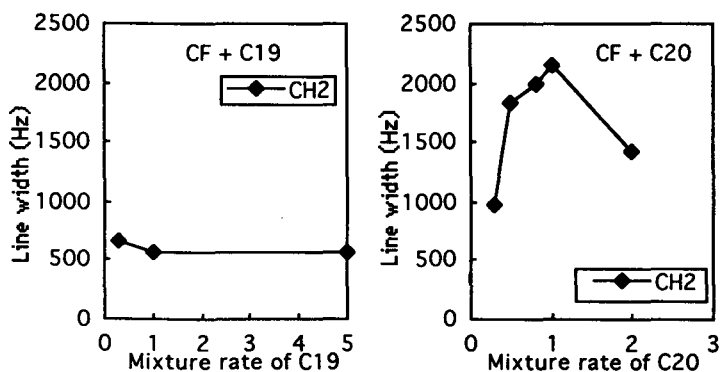


Fig.3 Half height line width of n-alkanes (C19,20) soaked in carbon fiber (CF)
 (CF : C_x : KCl = 1 : x : 2)

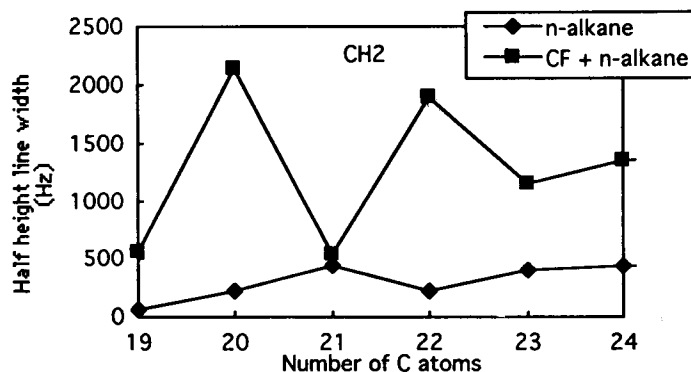


Fig.4 Half height line width of n-alkanes soaked in carbon fiber (CF)
(CF : Cx : KCl = 1 : 1 : 2)

Fig.4 は CF に導入した、一連のアルカンメチレン基の半値幅をあらわす。共通した傾向は、アルカンを CF に溶融することにより、線幅の拡がりが見られることである。また、アルカンの炭素数の偶奇により、線幅の変化量が異なる。また、偶奇による線幅の変化を比較すると、偶数アルカンにおけるメチレン基の半値幅の変化量がより大きくなった。

参考文献

1. 安藤勲編、高分子の固体 NMR、講談社サイエンティフィック、(1994)
2. M. Okazaki and K. Toriyama, *J. Phys. Chem.*, 93,2883 (1989)

イミダゾール結晶中における水素結合の¹⁵N 固体 NMR による研究

(阪大院・理¹、分子研²)

○上田貴洋¹、増井大二¹、長友重紀²、中村亘男¹

¹⁵N Solid State NMR study of hydrogen bonding in the Imidazole crystal
Takahiro Ueda¹, Hirotsugu Masui¹, Shigenori Nagatomo², and Nobuo Nakamura¹

¹ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,

Toyonaka, Osaka 560-0043

² Institute for Molecular Science, Myodaiji, Okazaki 444-0867

The intermolecular hydrogen bond of the type N-H...N in imidazole crystal was studied by static ¹⁵N NMR spectrum, 1D and 2D exchange CP/MAS NMR spectra, and *ab initio* molecular orbital calculation. The observed ¹⁵N chemical shift anisotropies for =N= and -NH- were consistent with the calculated ones. The *ab initio* MO calculation for some of imidazole derivatives predicted that the magnitude of the ¹⁵N chemical shift anisotropy of -NH- is related linearly to the hydrogen bond distance. The 2D exchange CP/MAS NMR spectrum showed that the exchange of the spins between the =N= and -NH- takes place. The spin exchange rate was determined to be 1.4 Hz at room temperature by the measurement of 1D exchange CP/MAS NMR spectrum.

N-H...N 型の分子間水素結合は生理活性や情報伝達機能をつかさどる相互作用として生体中において特に重要である。イミダゾール分子は結晶中においてこのタイプの 1 次元分子間水素結合鎖を形成することが知られている。この化合物における分子間水素結合の構造とダイナミクスについての詳しい研究は、生体における種々の機能発現を分子レベルで理解する上で重要な情報を提供してくれる。昨年の本討論会では、イミダゾール環の 4 位の位置に置換基を導入したいくつかの化合物について実験と量子化学計算の両面から ¹⁵N 化学シフト値と水素結合との関係を調べた[1]。その結果、=N-と-NH-の ¹⁵N 化学シフト値の差と水素結合距離との間に相関があることを見出した。本研究では、化学シフトの異方性と水素結合距離との関係に注目し、粉末スペクトルの測定と *ab initio* 分子軌道計算を行った。また、水素結合のダイナミクスを詳細に調べるために 1 次元及び 2 次元 ¹⁵N CP/MAS exchange NMR の測定を行った。

¹⁵N をエンリッチした試料について静止状態での粉末スペクトルを測定したところ、Fig.1 に示すような化学シフトの異方性による特徴的なパターンが得られた。このスペクトルでは=N-と-NH-の 2 つの窒素原子の信号が重なっている。そこで、シミュレーションにより、これらの分離を行って各窒素原子の化学シフトテンソルの主値、

キーワード：交換 NMR・水素結合・化学シフト異方性・イミダゾール

うえだ たかひろ・ますい ひろつぐ・ながとも しげのり・なかむら のおお

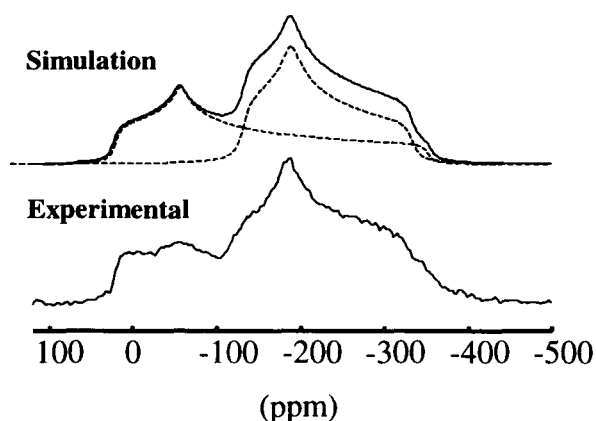


Fig. 1 ^{15}N powder spectrum for ^{15}N -enriched imidazole crystal; the simulation (above) and the experimental (below).

異方性及び非対称パラメータを得た。その結果を Table 1 にまとめた。*ab initio* MO 計算で得られた化学シフトの異方性は実験値と非常に良い一致を示す。イミダゾール環の 4 位に置換基を持つ化合物について同様の計算を行ったところ、-NH-の窒素の化学シフトの異方性と分子間水素結合距離との間に良い直線関係が成り立つことがわかった。これより、水素結合を評価する指標として化学シフトの異方性が有効であるといえる。

分子間水素結合の動的な側面については、水素のダイナミクスを調べるために 2 次元 ^{15}N CP/MAS exchange NMR スペクトルの測定を行った。その結果、=N-と-NH-の信号にクロスピークが観測され、2 つの窒素原子の間で磁化の交換が起きていることがわかった。この磁化交換の機構を明らかにするために、1 次元 CP/MAS exchange スペクトル測定を行ったところ、室温における交換速度として 1.4Hz を得た。磁化の交換が ^1H - ^{15}N 双極子相互作用によるスピン拡散で起こる場合、最近接の ^1H - ^{15}N 双極子相互作用を考慮して交換速度を見積もると 0.1Hz 程度となる。これは実測値に比べはるかに小さく、磁化の交換がスピン拡散による可能性は極めて低いことがわかった。さらに詳細に調べるために、交換速度の温度依存性、交差緩和時間やスピン-格子緩和時間の測定も行ったので合わせて報告する。

Table 1. Principal values, the anisotropies, and the isotropic values of ^{15}N chemical shift tensor for =N- and -NH- in imidazole crystal.

Atom	^{15}N chemical shift tensor and anisotropy / ppm from CH_3NO_2						
	Experimental					Calculated*	
	$\delta_{iso.}$	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	$ \Delta $	$\delta_{iso.}$	$ \Delta $
=N-	-130.2	22.96	-57.91	-355.5	338.1	-224.1	397.1
-NH-	-218.6	-132.3	-189.8	-333.6	172.5	-323.4	175.5

* The calculation is carried out for the trimer molecule by the use of GAUSSIAN94 program package with the basis set 6-31G(d, p).

[1] 上田貴洋、林 繁信、長友重紀、増井大二、中村亘男、第 36 回 NMR 討論会講演要旨集, p.341-344, (1997), 東京

NMR Study in Alkali-Hydrogen-C₆₀ Ternary Compounds (II)
Insti. for Mole. Sci. OH. OGATA and S. MIYAJIMA

The effect of hydrogen absorption on the structural and electronic properties of K₃C₆₀ superconductor was investigated by means of powder X-ray diffraction, magnetic susceptibility, and solid state NMR. No lattice expansion as well as no structural change were observed in powder X-ray diffraction by hydrogen absorption. Superconductivity was preserved and the T_c was not affected by hydrogen absorption. Peak position and line shape of ¹³C NMR spectrum did not change by hydrogen absorption. Peak position of ¹H NMR spectra suggested that hydrogen was almost neutral in the crystal. ²³Na NMR spectra suggest that absorbed hydrogen does not occupy octahedral or tetrahedral sites in the host f.c.c. lattice. Nuclear Curie-like behavior was observed in the temperature dependence of the ¹H NMR intensity. An attempt at detecting and controlling the reaction process of potassium hydride with C₆₀ by *in-situ* ¹H NMR measurements is also reported.

はじめに

アルカリ-炭素化合物は、様々な条件下で水素を吸蔵(物理、化学吸着)することが知られている。特に水素が化学吸着した場合、水素はアクセプターとして働き、新たなキャリア数制御、新しい電子状態形成の可能性を与える。我々は、アルカリ-C₆₀化合物中に取り込まれた水素の存在状態、インターカレートの間所構造、水素の電子状態を系統的に理解することを目的として研究を行っている。K₃C₆₀超伝導体の水素ガス吸蔵効果については、いくつかの報告例がある¹⁾⁻³⁾が、水素を取り込んだ化合物形成の有無、水素の存在状態、構造と電子状態の相関に関する明確な知見が得られていない。今回我々は、この系の構造および電子状態の相関を明らかにすることを目的として、(1)いくつかの条件で K₃C₆₀超伝導体に水素ガスを吸蔵させた試料を合成し、SQUID 磁束計を用いた静磁化率測定による超伝導特性の評価、及び ³⁹K、¹³C、¹H NMR の測定を行った。また、(2)K₃C₆₀への水素吸蔵試料の作成法として、水素化カリウムと C₆₀の直接反応法を取り上げ、*in-situ* ¹H NMRにより反応過程の観察及び制御を行い、この方法による水素吸蔵の可能性についても検討した。

実験及び結果

(1)出発試料となる K₃C₆₀超伝導体は、昇華精製した C₆₀粉末を原料として固相拡散により得た K₃C₆₀と、等量の C₆₀との混合物を反応させるいわゆる希釈法により得た。得られた試

水素吸蔵、C₆₀、*in-situ* NMR

おがた ひろのり、みやじま せいいち

料は粉末 X 線回折および ^{13}C 固体高分解能 NMR により単相の K_3C_{60} であることを確認した。静磁化率測定(2K, zero field cooling)により、この試料の超伝導体積分率は 60–65%と見積もることができた。目的試料は、この試料に水素ガスを反応させて得た。表 1 に作成した試料の水素ガス反応条件、超伝導体積分率および組成を示す。水素の組成は ^1H NMR スペクトルの積分強度により求めた。いずれの試料においても超伝導転移温度の変化は認められなかった。高温で長時間反応させた試料ほど吸蔵した水素量が多いものの、水素量と超伝導体積分率との間には、有意な相関を見出すことができなかった。Figure 1 に試料 No.5($\text{K}_3\text{C}_{60}\text{H}_{0.56}$)の室温における ^1H NMR スペクトル(測定周波数 400.1MHz)を示す。TMS から約 3.2ppm 低磁場側にピークをもつシグナルが観測された。このことは、水素はハイドライドではなく、中性水素であることを示している。又、 ^1H NMR スペクトル強度の温度依存性は、30 K まで Curie 則に従い、オルト-パラ水素転換によって生じる様な異常は観測されなかった。Figure 2(b)に同じ試料の ^{13}C NMR スペクトル(100.6MHz)を示す。比較のために、出発試料である K_3C_{60} の ^{13}C NMR スペクトルを(a)に示す。水素吸蔵により、スペクトルの位置及び線幅に顕著な変化は認められない。このことは、水素吸蔵に伴い Fermi 準位近傍の電子状態に変化を与えるような反応は起こっていないことを示唆している。これは、静磁化率の結果とも一致する。Figure 3 に室温における(a) K_3C_{60} 及び(b) 試料 No.5($\text{K}_3\text{C}_{60}\text{H}_{0.56}$)の ^{39}K NMR スペクトル(18.7MHz)を示す。室温から 200 K の温度領域で、両者のスペクトルに有意な差異は認められなかった。このことは、水素は Octahedral, Tetrahedral 両サイト共に占有していないことを示唆している。以上の結果は、水素は結晶粒界の C_{60} 分子に共有結合していることを示唆している。

(2)モル比 3:1 の割合で、水素化カリウムと C_{60} 粉末の混合物を減圧下でパイレックス管中に封管し、NMR プロブ中で加熱し、その反応過程を *in-situ* ^1H NMR により観察した。Figure 4 に 457 K に加熱した試料の ^1H NMR スペクトルの時間依存性を示す。反応開始後、約8時間で、-6ppm 付近に分解したハイドライドイオンと考えられるシグナルが現れ始める。このピーク強度が最大に達した直後に、反応を止める為に試料を室温まで急冷した。急冷後、シグナルのピーク位置は徐々に低磁場シフトし、水素の状態は、アニオンから中性に変化していくのが確認された。粉末X線回折により、最終生成物の結晶構造は K_3C_{60} と同じであることが確認された。

以上の結果は、 K_3C_{60} の格子中では、水素はハイドライドイオンとしては安定に存在しにくいことを示唆している。

Reference

- 1) T.Enoki *et al.*, *Syn.Met.* **64**(1994)329-333.
- 2) 薩摩林他、1996 年分子構造総合討論会 講演要旨集 p.138.
- 3) 米原由華子、熊本大学理学研究科修士論文(1996).
- 4) H.Ogata and S.Miyajima, *Syn.Met.* *in press*.
- 5) H.Ogata and S.Miyajima, *Syn.Met.* *to be published*.

Table 1. The conditions of H₂ gas reaction, chemical compositions, the superconducting transition temperatures(T_c) and shielding fractions (V_{sc}(%)) of hydrogen absorbed K₃C₆₀.

Sample No.	H ₂ gas pressure(Torr)	reaction temperature(°C)	reaction time(hrs)	chemical composition	T _c	V _{sc} (%)
1	650 ~ 690	25	24			
		200	24	K ₃ C ₆₀ H _{0.11}	19.4	40
2	700	220	30	K ₃ C ₆₀ H _{0.11}	19.4	49
3	700	210	110	K ₃ C ₆₀ H _{0.33}	19.4	50
4	760	250 ~ 300	70	K ₃ C ₆₀ H _{0.36}	19.4	56
5	720	250	230	K ₃ C ₆₀ H _{0.56}	19.4	37

Figure 1. ¹H NMR spectrum of K₃C₆₀H_{0.56} at room temperature.

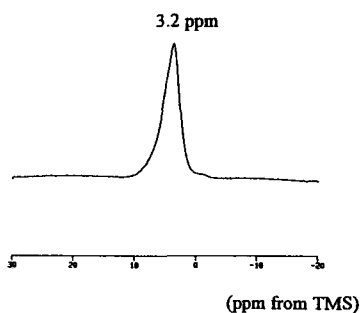


Figure 3. ³⁹K NMR spectra of (a)K₃C₆₀ and (b)K₃C₆₀H_{0.56} at room temperature.

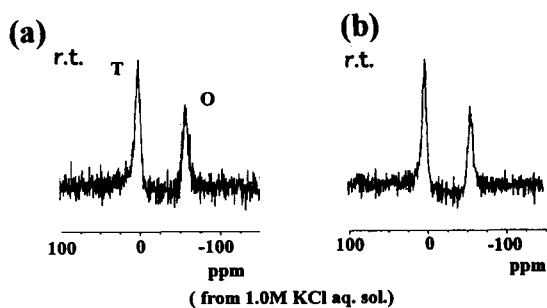


Figure 2. ¹³C NMR spectra of (a)K₃C₆₀ and (b)K₃C₆₀H_{0.56} at room temperature.

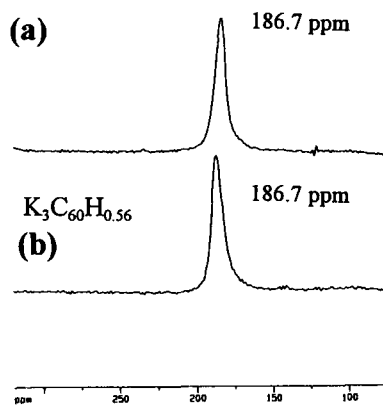
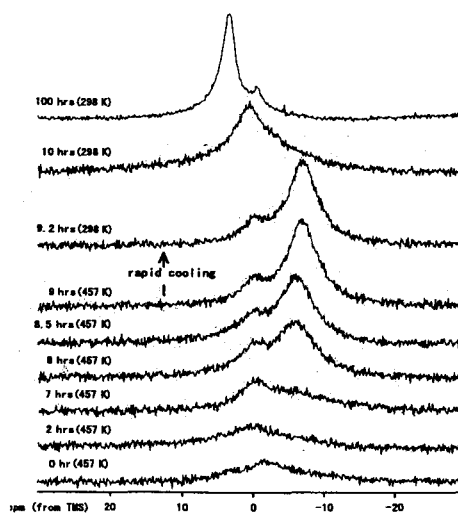


Figure 4. Time dependence of *in-situ* ¹H NMR spectra in the mixture of KH and C₆₀.



V_2O_5 層間に取り込まれた D_2O の動的挙動の
固体 2H -NMR による研究

(群馬大工¹、阪大院理²、岡山大理³)

後藤裕子¹、丸田悟朗²、○武田 定¹、高原周一³、橘高茂治³

Solid state 2H -NMR study of dynamic property of D_2O intercalated in V_2O_5 layer

Yūko Gotō¹, Goro Maruta², Sadamu Takeda¹, Shuichi Takahara³, Sigeharu Kittaka³

¹Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma 376, Japan,

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560, Japan,

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridaicho, Okayama 700, Japan

Vanadium pentoxide exhibits a layered structure. Water molecules can be intercalated between the V_2O_5 layers and the intercalation is accompanied with increasing of an interlayer distance: 11.4Å for monolayer and 14.7 Å for bilayer adsorption of water molecules. In this paper, dynamic property of the intercalated heavy water molecules was investigated by solid state deuterium NMR spectrum for different amount of intercalated D_2O molecules corresponding to the monolayer and bilayer structure. Spectral simulation revealed two motional modes: 180° flipping around a two fold axis of the molecule and a rotation about the axis that lies on the molecular plane and makes an angle θ with the two fold axis. The angle θ apparently depends on the amount of adsorption.

五酸化バナジウム V_2O_5 は層状構造を持ち、 V_2O_5 層の層間に水分子が取り込まれる。この水の吸着状態はその蒸気圧により変化し、水分子 1 層の状態から 2 層の状態まで可能である。このとき層状構造の繰り返し周期は水分子 1 層では 11.4Å で、水 2 層では 14.7Å となり、層間隔の増大を伴って水分子が取り込まれていることがわかっている。この吸着水の動的挙動およびその吸着量依存性を重水素核固体 NMR スペクトルの温度依存性から調べた。

$V_2O_5(D_2O)_x$ について、吸着量の異なる $x=1.3, 1.4, 1.6, 2.2$ の試料について 130 K から 360 K の温度範囲で、Bruker DSX300 を用いて四極子エコー法により NMR スペクトルの測定をおこなった。この吸着量は、水分子が 1 層の状態から 2 層の状態までをカバーしている。観測されたスペクトルは 150 K から 230 K の間で顕著な温度変化を示した。

スペクトル線形のシミュレーションによる解析から、いずれの吸着量でも、水分子は二つの軸の周りに回転運動をしていると考えることにより、スペクトルの温度依存性を説明できることがわかった。一つは、水分子の 2 回軸周りの 180 度フリップ（フリップ運動）で、もう一つはこの 2 回軸と角度 θ をなし水分子を含む平面内にある軸周りの回転（回転運動）である。フリップ運動の活性化エネルギーはほぼ 28 kJ/mol で、この値の吸着量依存性は顕著ではない。回転運動の活性化エネルギーは誤差は大きいですが、35 ~ 40 kJ/mol と僅かに吸着量に依存するように見える。明確に吸着量に依存するのは、二つの回転軸のなす角度 θ であり、吸着量が増すに連れてこの角度は 30 度から 18 度へと減少していくことがわかった。また、360 K でも水分子の運動は等方的にはならない。

2H -NMR、 V_2O_5 層間化合物、吸着水、分子運動

(金沢大理) ○ 水野元博・飯島隆広・折井謙吾・須原正彦

Structural Phase Transition and Hydrogen bond in [Cu(H₂O)₆][PtCl₆]

Motohiro Mizuno, Takahiro Iijima, Kengo Orii and Masahiko Suhara

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa, 920-1192

For the phase transition of [Cu(H₂O)₆][PtCl₆] caused by the cooperative Jahn-Teller effect, it is known that the transition temperature shifts from 135 K to 129 K on deuteration. This phenomenon is considered to be related closely to the local structure around H site. To obtain the information about the environment of the H site and the motion of the water molecule, ²D NMR investigations on the single crystal [Cu(H₂O)₆][PtCl₆] were carried out. From the angular dependence of the quadrupole splitting for ²D NMR, the principal values and the direction cosine of the nuclear quadrupole interaction were obtained at 293 and 133 K. The direction of H₂O was determined and the Cl···H hydrogen bond was discussed. The simulation of the spectra for the direction of H₀ // [111] was performed and the rate of the 180° flip (*k*) for H₂O was estimated.

【序】 [Cu(H₂O)₆][PtCl₆] は $T_c=135$ K で協同的 Jahn-Teller 効果による構造相転移を起こす。転移温度は重水素化にともない 6 K 低温にシフトする。この低温シフトは重水素化による質量変化では説明できず、水分子の局所構造と密接な関係があると考えられる。本研究では単結晶 ²D NMR の角度変化の測定を行い、室温と相転移付近での水分子の環境を調べた。また、スペクトルの温度変化から水分子の 180° フリップの速さを見積もった。これらの結果をもとに、相転移と水素結合の関係を考察した。

【実験】 ²D NMR の測定は CMX-300 スペクトロメーターを用い、共鳴周波数 45.825 MHz で行った。パルス系列には核四極相互作用と常磁性シフトによる横磁化の減衰をリフォーカスさせる $90_x^\circ - \tau - 180_y^\circ - \tau - 90_y^\circ - \tau - 180_y^\circ - \tau - \text{acq}$ パルス系列を用いた。

【結果と考察】 Fig.1 に H₀//[111] における ²D NMR の四極子分裂 ($2\Delta\nu$) の温度変化を示す。高温相では [Cu(H₂O)₆][PtCl₆] の空間群は $R\bar{3}$ で、H₀//[111] のとき 6 つの水分子は等価である。140 K 以下では水分子

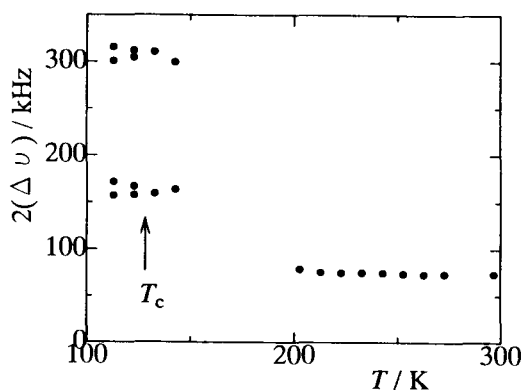


Fig.1 Temperature dependence of ²D quadrupole splitting of [Cu(H₂O)₆][PtCl₆] for H₀//[111].

キーワード: ²D NMR, 核四極相互作用

みずのもとひろ, いいじま たかひろ, おりい けんご, すはら まさひこ

の非等価な D により 2 つの $2\Delta\nu$ が観測されたが、200 K 以上では、水分子の速い 180° フリップに伴う平均化により、1 つの $2\Delta\nu$ となった。相転移温度 ($T_c=129$ K) 以下では 4 つの $2\Delta\nu$ が観測され、低温相では結晶の 3 回対称性が失われ水分子が非等価になったことがわかる。 ^2D NMR の $2\Delta\nu$ の角度変化の測定から、核四極相互作用定数 e^2Qq/h と非対称パラメーター η を見積もった。293K では $e^2Qq/h=132$ kHz, $\eta=0.72$, 133K では水分子の 2 つの D に対してそれぞれ $D1(e^2Qq/h=245$ kHz, $\eta=0.06)$, $D2(e^2Qq/h=236$ kHz, $\eta=0.10)$ となった。Fig.2 に $H_0//[111]$ における ^2D NMR スペクトルの温度変化及び水分子の 180° フリップを仮定したシミュレーションを示す。シミュレーションによって得られた水分子の 180° フリップの速さ k の温度変化を Fig.3 に示す。フィッティングから水分子の 180° フリップの活性化エネルギー $E_a = 24\text{kJmol}^{-1}$ 頻度因子 $k_0 = 1.4 \times 10^{13}\text{s}^{-1}$ が得られた。 $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンは高温相では Jahn-Teller 効果による三つの等価な歪みの方向を熱励起により飛び移っている。我々がこれまでに行ってきた ^{195}Pt NMR のスピン格子緩和時間の結果から、Jahn-Teller 状態間の飛び移りの速さは相転移温度で 10^9s^{-1} のオーダーであると考えられる。これに対し、相転移温度での水分子の 180° フリップの速さは 10^3s^{-1} のオーダーであり、Jahn-Teller 状態間の飛び移りは、水分子の 180° フリップに比べ、非常に速く起こっていることがわかる。この結果は、Jahn-Teller 状態間の飛び移りに D-Cl 間の水素結合が影響していることを示唆しており、重水素化に伴う相転移の低温シフトは重水素化によって水素結合が弱まり、より低温まで Jahn-Teller 状態間の飛び移りが起こるためと考えられる。

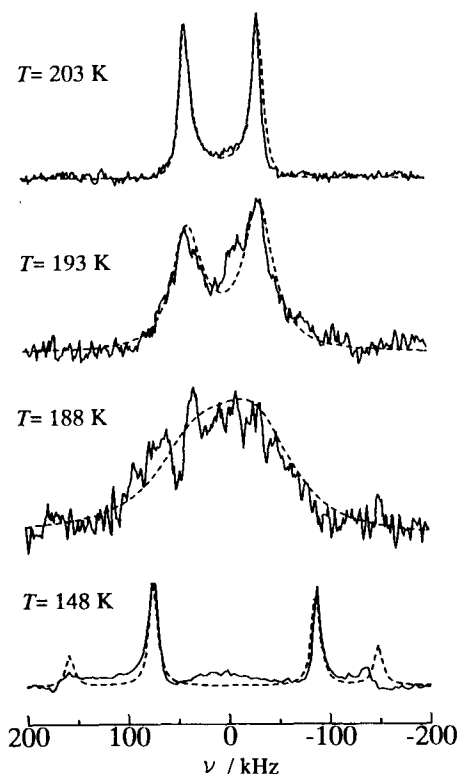


Fig.2 Temperature dependence of the observed and the simulated ^2D NMR spectra for $H_0//[111]$.

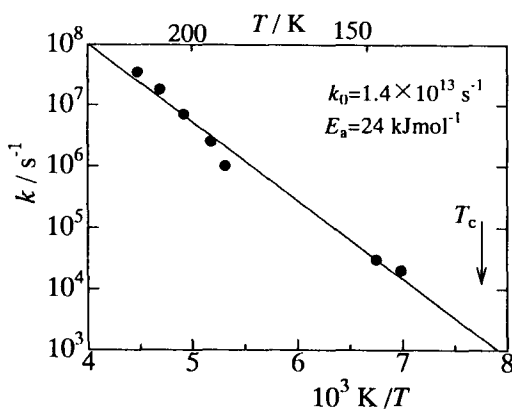


Fig.3 Temperature dependence of the jumping rate (k) for the 180° flip of H_2O .

優先富化現象を示す化合物の 固体NMR

(¹理研 分子構造解析室、²京大・院人間環境学)
○仲村 高志¹、高橋 弘樹¹、田村 類²、鷗澤 洵¹

Solid state NMR of the compounds showing *Preferential Enrichment*.

○Takashi Nakamura¹, Hiroki Takahashi¹, Rui Tamura² and Jun Uzawa¹
The Institute of Physical & Chemical Research (RIKEN), Division of Molecular Characterization;
Graduate School of Human & Environmental Studies, Kyoto University

Recently we have found the first case of accomplishment of an enantiomeric resolution by simple recrystallization of a racemic compound. We designate this new enantiomeric resolution phenomenon as *Preferential Enrichment*. Here we report the intermolecular interactions of enantiomers in racemates and enantiomers, which undergo *Preferential Enrichment* in the solid state by means of X-ray crystallographic analysis and ¹³C and ¹⁵N CP/MAS NMR, respectively.

1. はじめに

ラセミ体の再結晶による光学分割は、ラセミ混合物[一つの結晶は(+)または(-)分子から構成される不斉結晶の混合物]の優先晶出法に限られ、ラセミ化合物結晶[一つの結晶は(+)分子と(-)分子が対をなす結晶]は再結晶による光学分割は不可能であると考えられていた。しかし、この例外

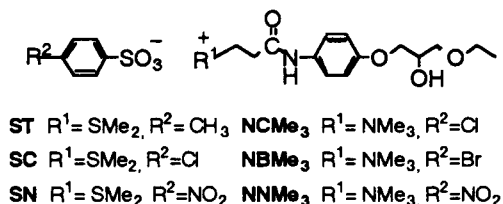


Fig. 1

として、ある一群の2級アルコール(Fig.1)のラセミ結晶[(±)結晶]の単純な再結晶を行うことにより、母液中で一方のエナンチオマーが大きく光学富化(最高100% ee)する現象を見出し、優先富化(Preferential Enrichment)と命名した。¹⁻³ 本現象ではさらに、析出する低光学純度の結晶の再結晶を行うと、母液は結晶と同じキラリティーに光学富化し、新たに析出する結晶のキラリティーは、再結晶前とは逆になる(析出結晶におけるキラリティーの逆転現象)ことも見出した。

キーワード：優先富化、ラセミ化合物結晶、光学異性体、固体NMR

○なかむらたかし、たかはしひろき、たむらるい、うざわじゅん

この現象を利用して、ラセミ体を高光学純度で光学分割する方法を確立した。すなわち、ラセミ体結晶と析出結晶の再結晶を順次繰り返して、同じキラリティーを持つ母液を回収することにより、両エナンチオマーを高光学純度で分割することができる光学分割法である(Fig.2)。

優先富化現象を示す化合物の光学活性体は一般に単結晶が得られ難い。そのため、ラセミ体と光学活性体の固体高分解

能NMRの測定を行った。今回、NCMe₃とNBMe₃の光学活性体の単結晶が得られX線結晶構造解析を行い、ラセミ体と光学活性体の結晶構造の比較を行った。単結晶が得られない化合物のラセミ体結晶と光学活性体結晶の結晶構造の相関関係を検討するため、固体高分解能NMRスペクトルとX線結晶構造解析の結果を比較した。

2. ラセミ体と光学活性体の結晶構造

優先富化を起こしたNCMe₃とNBMe₃のラセミ体と光学活性体のX線結晶構造解析の結果、両者ともに、ほぼ同じ格子定数を持つことが判明した (Table 1)。ラセミ体では対称心を持つ空間群 ($P\bar{1}$) であり、一方、光学活性体は、反転対称を持たない空間群 ($P1$) であった。

Table 1 Space group and Lattice parameter

	Space Group	Z	a(Å)	b(Å)	c(Å)	$\alpha(^{\circ})$	$\beta(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$	V(Å ³)	R	Rw
(±)NCMe ₃	$P\bar{1}$	2	9.848	14.823	9.147	97.81	92.69	105.92	1267	0.056	0.097
(S)NCMe ₃	$P1$	2	9.890	14.969	9.142	97.46	92.37	106.78	1285	0.124	0.119
(±)NBMe ₃	$P\bar{1}$	2	9.907	15.034	9.137	97.41	92.69	106.78	1287	0.135	0.168
(S)NBMe ₃	$P1$	2	9.918	15.060	9.188	97.34	92.45	106.58	1299	0.055	0.039

ラセミ体では、*R*と*S*エナンチオマー間の水酸基と末端エトキシ酸素間で分子間水素結合による環状二量化構造が見られた (Fig3. a) [O⋯HO: NCMe₃ 2.82Å, NBMe₃ 2.89Å]。光学活性体結晶では、ラセミ体にみられる水素結合は存在せず、一方の水酸基とアミドカルボニル酸素間に水素結合が見られた[OH⋯O=C:NCMe₃, 2.64Å; NBMe₃, 2.77Å] (Fig3. b)。

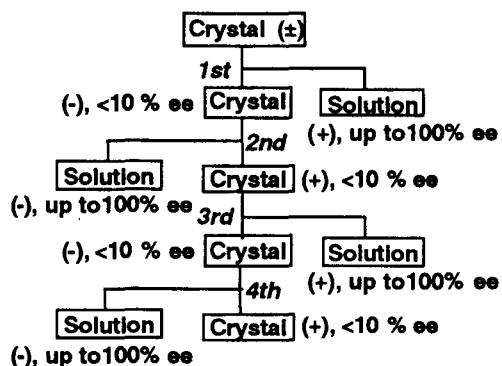


Fig. 2

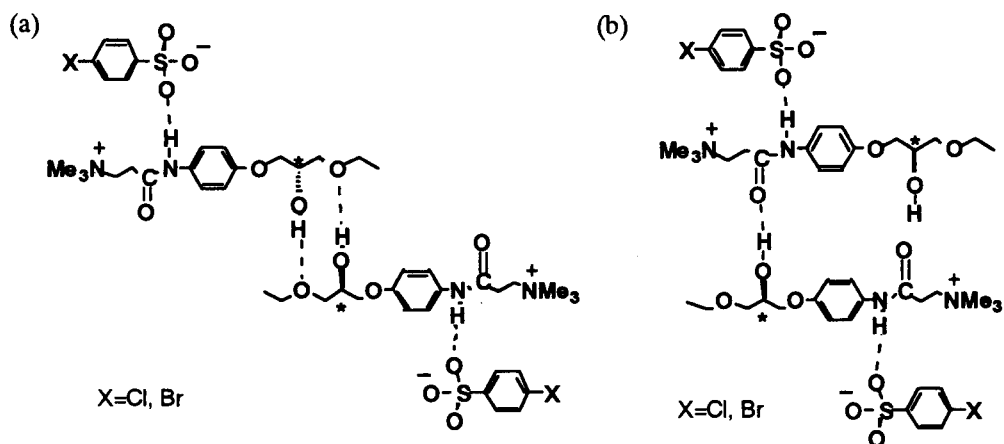


Fig.3 Intermolecular Hydrogen bonds of (a) Racemic compound crystals and (b) Enantiomer crystals.

ラセミ体と光学活性体に共通して、スルホニウム酸素の一つとアミド窒素間に水素結合が見られた [S-O \cdots H-N: (\pm)-NMe $_3$, 2.91Å; (S)-NMe $_3$, 2.90, 2.94; (\pm)-NBMe $_3$, 2.91Å; (S)-NBMe $_3$, 2.91, 2.92Å]。

3. 固体NMRの測定

固体NMRはCP/MAS法を用い、 ^{13}C と ^{15}N について測定を行った。 ^{13}C のスペクトルを比較するとNMe $_3$ とNBMe $_3$ 両者ともに、ラセミ体ではカルボニルのシグナルが1本 (NMe $_3$, 166.0ppm; NBMe $_3$, 165.7ppm) であるのに対し(Fig. 4b, 5b)、光学活性体では、2本 (NMe $_3$, 165.2ppm, 167.7ppm; NBMe $_3$, 165.2ppm, 167.9ppm) であった(Fig. 4a, 5a)。この結果は、X線結晶構造解析の結果と一致する。また、NBMe $_3$ については、非ラセミ体 (ca. 3% ee) の結晶についても固体NMRを測定したところ、ラセミ体と光学活性体の中間のシグナルが得られた (Fig. 5c)。

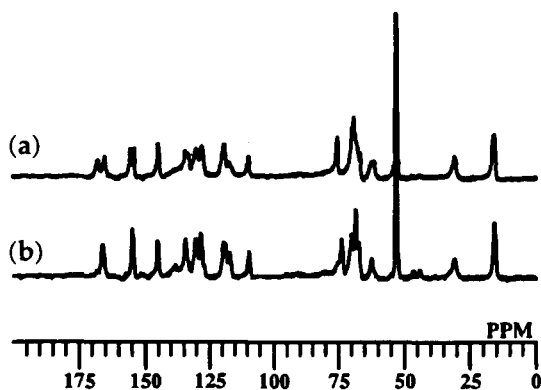


Fig. 4 ^{13}C -CP/MAS spectrum of (a) (S)-NMe $_3$ and (b) (\pm)-NMe $_3$.

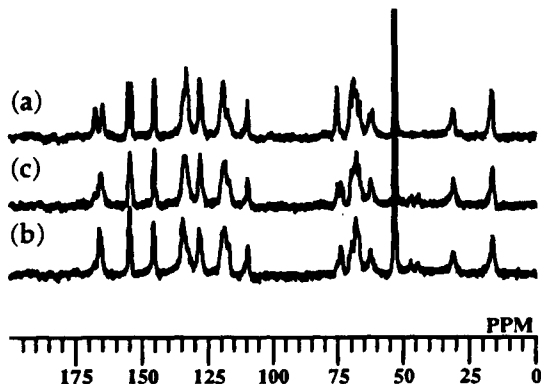


Fig. 5 ^{13}C -CP/MAS spectrum of (a) (S)-NBMe₃, (b) (±)-NBMe₃ and (c) non-racemate (ca. 3% ee).

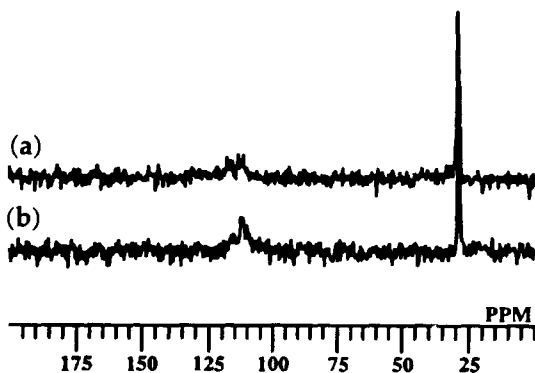


Fig. 6 ^{15}N -CP/MAS spectrum of (a) (S)-NBMe₃ and (b) (±)-NBMe₃.

NBMe₃の ^{15}N のスペクトルでは、低磁場（ラセミ体、111-116ppm; 光学活性体、111-117ppm）のシグナル（アミド窒素）が、ラセミ体と光学活性体で異なっていた（Fig. 6）。この結果もX線結晶構造解析の結果を支持している。

4. まとめ

優先富化現象を示す化合物のラセミ体と光学活性体の固体NMRをX線結晶構造解析の結果と比較を行った。固体NMRでも、ラセミ体と光学活性体の結晶の違いが明らかとなった。また構造の異なる官能基も同定することができた。このことから、単結晶が得られない他の化合物の光学活性体についても固体NMRを用いることにより、ラセミ体との結晶構造の比較が可能であることが判明した。

参考文献

- 1) R. Tamura *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2372-2374.
- 2) R. Tamura *et al.* *Enantiomer* **1997**, *2*, 277-280.
- 3) R. Tamura *et al.* *Chirality* **1997**, *9*, 220-224.

P101

水素結合型有機強磁性体 HQNN の極低温固体 $^2\text{H-NMR}$ による研究

(群馬大工¹、阪大院理²、東大院総合³、都立大院工⁴)

○丸田悟朗²、武田定¹、松下未知雄⁴、泉岡明³、菅原正³、山口兆²

Very low temperature solid state $^2\text{H-NMR}$ of hydrogen-bonded organic ferromagnet HQNN

Goro Maruta², Sadamu Takeda¹, Michio M. Matsushita⁴, Akira Izuoka³, Tadashi Sugawara³, Kizashi Yamaguchi²

¹Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gunma University

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

³Department of Basic Science, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

⁴Department of Industrial Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo Metropolitan University

Solid state $^2\text{H-NMR}$ spectra were measured for polycrystalline samples of organic magnetic crystals with deuterated hydrogen-bonds, α -HQNN, β -HQNN and RSNN between 290K and 2K. The electron spin density at the radical sites and the hydrogen atoms in the crystalline phase were found from the electron-nuclear dipolar and hyperfine coupling constants. Relationship between the microscopic and macroscopic susceptibilities was discussed.

【序】HQNN の α 型結晶、 β 型結晶およびこの分子の異性体である RSNN の分子結晶は、いずれも分子間水素結合をもつ有機磁性結晶であり、 α -HQNN は $T_c \sim 0.5\text{K}$ で強磁性相に転移し、他は低温で反強磁性的である。これらの結晶内では、スピン源となる NO 基が隣接分子と水素結合しているため、水素結合が強磁性発現に重要な寄与をしていると考えられている。これまでに我々は、選択的に水素結合を重水素化した試料について、高速マジック角回転(MAS)法を用いた固体高分解能 $^2\text{H-NMR}$ スペクトルに現れる等方性シフトを測定することにより、これらの水素結合中の水素原子上の電子スピン密度を明らかにし、分子間の磁氣的相互作用のメカニズムを議論してきている。本研究では、磁気相転移温度に近付いたときに有機磁性結晶内に発達する磁気秩序を、原子レベルで局所的に観測することを目的として、固体広幅 $^2\text{H-NMR}$ スペクトルの測定を極低温で行った。

【実験】水素結合を重水素化した、 α -HQNN、 β -HQNN および RSNN の粉末試料について、Bruker 社の DSX-300 固体 NMR 測定装置に自作の NMR プロブを組み合わせて、室温 \sim 2K の温度領域で $^2\text{H-NMR}$ スペクトルをソリッドエコー法を用いて測定した。測定磁場は 7T である。低温領域では、スペクトルの線幅は極めて広いが、共鳴周波数を 50 \sim 200KHz きざみで変化させることで、全体のスペクトルをえた。

【結果】スペクトルのシミュレーションを行い、スペクトルの形状および中心の位置から、それぞれ磁気双極子相互作用 ν_D およびフェルミ接触相互作用 ν_F を各温度において求めた。詳しい解析は現在進行中であるが、 ν_D からはラジカルサイトにおける電子スピンの分布の様子、 ν_F からは水素原子の位置における電子スピン密度がわかる。また、 ν_D 、 ν_F の温度依存性から決定した磁化率は、いわば局所的な磁化率であり、これを巨視的測定により求められている磁化率と比較検討する。

固体 $^2\text{H-NMR}$ 、有機強磁性体、水素結合、電子スピン密度、核スピン-電子スピン相互作用

まるたごろう、たけださだむ、まつしたみちお、いずおかあきら、すがわらただし、やまぐちきざし

Magic Echo Solid-State NMR Imaging without a Rapidly Switchable Field Gradient

M. Nonaka, S. Matsui, T. Nakai, and T. Inouye
Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8573

To relax the high-speed requirement imposed on the gradient system used in solid-state proton imaging, we propose two simple modifications of the magic echo imaging sequence, TREV-16TS: In the first modification, the applied gradient is inverted in the middle of the RF irradiation and the second modification utilizes a sinusoidal gradient synchronized with the RF sequence. It is estimated by experiments that as far as the RF amplitude is at least about ten times stronger than the resonance offset induced by the gradient, the spatial resolution is not degraded significantly by the line narrowing deterioration due to the gradient applied during the on-resonance RF irradiation. The modifications allow commercially available standard gradients to be used for the magic echo imaging of solids.

INTRODUCTION

Solid-state NMR imaging generally requires hardware of high performance (1,2). In particular, for the imaging methods employing the line narrowing techniques, the requirements imposed on the field gradient system are so stringent that they can hamper the widespread use. In the multiple pulse imaging experiments (3), for instance, the gradient must be switched faster than one microsecond. This is because the multiple pulse line narrowing is based on the solid echo and therefore the length of the RF-free windows for pulsed application of the gradient must be much shorter than the transverse relaxation time of the solid sample. This requirement can be relaxed to some extent by the use of multiple magic echoes for line narrowing (4-7), where the RF-free windows can be made as long as the transverse relaxation time (Fig. 1a). Nevertheless, standard gradient switching times commercially available are currently about the same as the transverse relaxation time unless any specially designed gradient driver and/or specially wound gradient coils with a small inductance (a few microHenry) are used.

In this paper, to relax this requirement of fast gradient switching, we modify the gradient portion of the magic echo imaging sequence. We assume to employ a standard gradient system which is commercially available for liquid-state imaging and can achieve a switching time of about 30 μ s. In the modified sequences, the gradient is inverted during the RF irradiation or alternatively a sinusoidal gradient is employed instead of the pulsed one. Experimental results are presented which indicate what conditions are necessary to be satisfied to obtain high-resolution images with the gradient-modified magic echo sequences.

MODIFICATION OF THE GRADIENT SEQUENCE

When the gradient is unswitchable rapidly, we must resort to a continuous gradient combined with the original magic echo sequence, TREV-8 (8). The sequence TREV-8 refocuses the homonuclear (proton-proton) dipolar interaction only and scales down inhomogeneous interactions like chemical shifts and heteronuclear dipolar interactions, exhibiting a relatively limited degree of line narrowing. Since the spatial resolution is proportional to the line narrowing efficiency, better resolutions can be obtained by using the sequence, TREV-16TS, modified for improved line narrowing (4,5). Consequently, we have tried to devise imaging sequences using the TREV-16TS as shown in Fig. 1.

Figure 1a shows the ideal gradient pulse sequence we proposed previously (4). Here, the gradient pulses are applied only during the RF-free windows for avoiding gradient interference with the RF line

Key Words : 固体イメージング、マジックエコー、高速スイッチング磁場勾配、正弦的磁場勾配

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

narrowing. The polarity of the gradient is inverted in synchronism with the RF pulse sequence. This is because spins are inverted successively by 180° pulses virtually inserted in the TREV-16TS sequence for additional refocusing of inhomogeneous interactions. The gradient switchings must be made rapidly enough to assure that gradient pulses can achieve maximal frequency encoding.

For attaining the same frequency encoding by using a relatively slow gradient with a switching time of about $30 \mu\text{s}$, which is equal to the time interval τ (Fig. 1), firstly conceivable is the use of gradient sequence shown as Fig. 1b, where the gradient inversion is made at each center of the RF irradiation sandwiched by the 90° y pulses. This modification is useful when a gradient switching time is equal to or shorter than the time interval 2τ of the TREV-16TS sequence. Generally, as far as the RF field is strong compared to the gradient-induced resonance offset, the resonance offset can be neglected during the RF irradiation. The resonance offset is averaged out by the fast nutation about the RF field direction. Thus, the gradient sequence modified as Fig. 1b has the same effect as that of Fig. 1a. However, to what extent the RF field should be stronger for avoiding the possible interference between the gradient and the RF irradiation remains to be examined.

Another point to be noted in considering such interference is the gradient effect on the sandwiching 90° y pulses applied for the interconversion between the rotating (R) and tilted rotating (TR) frames (8). The gradient effect on the frame interconversion complicates the theoretical description of the interference effects, because the resultant spin flipping around the effective field deviates from the ideal 90° flipping about the y axis, not only in the flip angle but also in the flip axis direction. If the flip axis deviation can be ignored, the flip angle deviation remains, resulting in a spatial distribution of the tilted angle of the TR frame along the gradient direction. Although the tilted angle distribution matches with the distribution of the nutation axis during the sandwiched RF irradiation under the presence of the gradient, the spatial distribution leads to incomplete refocusing of the homonuclear dipolar interaction. This is because for complete refocusing, the tilted angle must be 90° uniformly in space. The time intervals in the TREV-16TS sequence are set by assuming that the homonuclear dipolar interaction is scaled uniformly by the factor of $-1/2$ in the TR frame.

The use of the sinusoidal gradient waveform, shown in Fig. 1c avoids this distribution effect on the frame interconversion, being expected to provide a better resolution. The gradient-induced resonance offset will again be averaged out by the fast RF nutation. The sinusoidal time dependence of the gradient can be neglected as far as its frequency is much slower than the RF nutation frequency.

For the RF nutation averaging of the gradient-induced resonance offset, the average Hamiltonian (AH) theory (9) tells us that due to the symmetry of the TREV-16TS sequence, all the odd-order AH's are zero in addition to the zero-th order AH. Thus, the first non-zero term is the second-order AH. This suggests that the RF amplitude can be somewhat smaller than anticipated in both modifications.

An additional technical advantage in the use of sinusoidal gradient is that while the frequency components of the rectangular gradient pulses spread over a wide bandwidth including much higher frequency components than the frequency determined by the pulse width, the highest frequency component of the sinusoidal gradient waveform is simply the oscillation frequency. This significantly relaxes the high-speed requirement on the gradient system.

EXPERIMENTAL

Experiments were carried out on a home-built NMR imager and a Chemagnetics CMX300 Infinity, operating for protons at 60 and 300 MHz, respectively. The RF amplitude was variable between 100 and 21 kHz, depending on the experiment. The time interval τ of the magic echo pulse sequence (Fig. 1) was fixed at $30 \mu\text{s}$. Suitably shaped adamantane powders, which exhibit a linewidth of about 14 kHz, were the test sample for all the experiments.

The gradient system in the home-built imager comprises a small coil with an inductance of a few microHenry and a high-speed driver with a bandwidth of about 1 MHz, achieving a high efficiency of 4.5 G/cm/A and a switching speed as fast as $3 \mu\text{s}$. On the other hand, the inductance of the active-shielded gradient coils in the CMX300 was about $40 \mu\text{H}$ and the efficiency of the coils was c.a. 1 G/cm/A. The bandwidth of the driver, Techron 7570, was 20 kHz. The sinusoidal waveforms were obtained by simply inserting a phase-linear Bessel low-pass filter (24dB/oct) prior to the final driver. By setting the filter cut-off frequency to the inversion rate, $1/4\tau$ (Fig. 1), successively inverting rectangular waveforms were converted to corresponding sinusoidal waves.

RESULTS AND DISCUSSION

Experiments with a rapid gradient system

To examine the gradient interference effects on the TREV-16TS line narrowing efficiency, it is necessary to vary the gradient amplitude relative to the RF amplitude. Since the imaging parameters are changed if the gradient is varied, we chose in the following experiments to vary the RF amplitude while keeping the gradient amplitude constant. Using the sequences shown in Figs. 1a, 1b, and 1c, we have measured projections of the one-dimensional test sample which was aligned precisely to about $\pm 1^\circ$ using a stepping motor. The results obtained by running the sequences on the home-built imager are shown in Figs. 2, 3, and 4.

Projections obtained at an RF amplitude of 100 kHz are shown in Fig. 2, where projections 2a, 2b, and 2c were measured by employing the ideally pulsed, nonideally pulsed, and sinusoidal gradients as shown in Figs. 1a, 1b, and 1c, respectively. It can be seen immediately that a high resolution of 100 μm or a better is achieved and no significant difference is observed in resolution among the three projections. This is reasonable because the RF amplitude of 100 kHz was much stronger than the maximum resonance offset ± 4.2 kHz at both ends of the projections, as calculated by the applied gradient of about 4.4 G/cm. The RF nutation averaging of the gradient-induced resonance offset and the interconversion between the R and TR frames are almost perfect in this experimental condition.

Figure 3 shows projections measured in the same manner as in Fig. 2; the RF amplitude was however reduced to 51 kHz. Overall resolution is deteriorated by the somehow reduced line narrowing efficiency as a result of the weaker RF amplitude. This can be confirmed by the experimental results shown in Fig. 5, where the line narrowing efficiency is plotted as a function of the RF amplitude. Only slight or essentially no difference is observable in resolution among the three projections in Fig. 3. However, the difference becomes much more pronounced in the similarly obtained projections shown in Fig. 4, where the RF amplitude was reduced even more to 36 kHz and the overall resolution becomes worse due to the lowered narrowing efficiency (Fig. 5). In particular, while the highest resolution is obtained in projection 4a, projection 4b exhibits the lowest resolution. Qualitatively, the difference between projections 4a and 4b can be ascribed to the two gradient interference effects mentioned above. On the other hand, the difference between projections 4b and 4c may be due to the gradient effect on the frame interconversion.

These experimental results indicate that for avoiding the resolution loss due to the gradient effects, the RF amplitude should be at least about ten times stronger than the gradient-induced resonance offset and that the second modification of using the sinusoidal gradient is more tolerable to such resolution loss as expected.

Experiments with a slow gradient system have been conducted using the CMX300 Infinity. The results will be reported in the presentation.

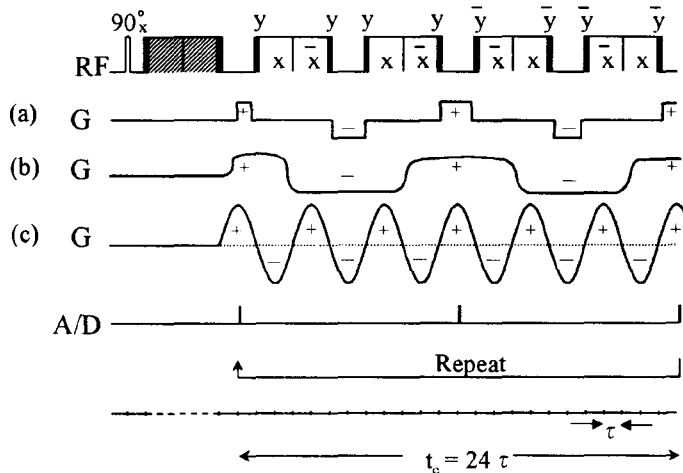


FIG. 1 : Magic echo sequence, TREV-16TS, for solid-state imaging combined with ideally pulsed (a), nonideally pulsed (b), and sinusoidal (c) field gradients. On resonance RF irradiations along x and $-x$ are sandwiched by 90° y pulses. This is called the magic sandwich. The hatched magic sandwich represents four magic sandwiches.

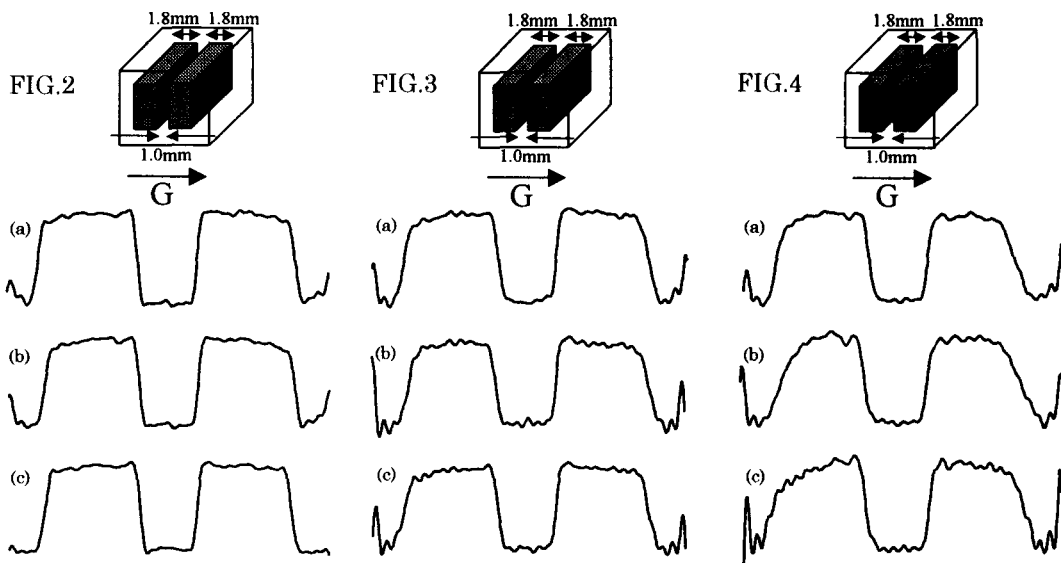


FIG. 2,3,4 : Projections of the one-dimensional test sample obtained with the TREV-16TS sequence ($\tau = 30 \mu\text{s}$) combined with ideally pulsed (a), nonideally pulsed (b), and sinusoidal (c) gradients illustrated in Fig. 1. The RF amplitude was set at 100 kHz in Fig.2, 51kHz in Fig.3 and 36kHz in Fig.4. One-dimensional test sample of adamantane powder was measured on the home-built imager.

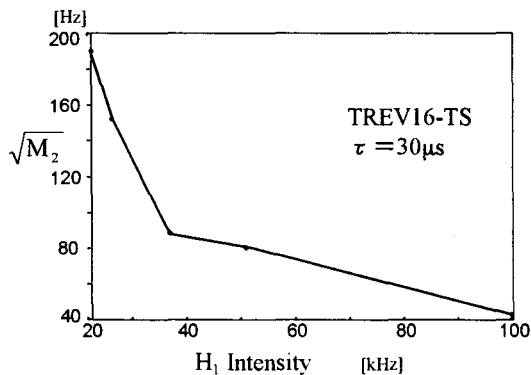


FIG 5 : TREV-16TS line narrowing efficiency plotted as a function of the RF amplitude. The square root of the second moment $\sqrt{M_2}$ of the narrowed proton line of the adamantane test sample was measured on the home-built imager. It can be seen that the line narrowing is quite effective when the RF field is stronger than about 36 kHz while if weaker it is deteriorated rather rapidly.

REFERENCES

1. D. G. Cory, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **24**, 87-180 (1992).
2. P. Blümmler and B. Blümich, "NMR – Basic Principles and Progress," **30**, pp.209-277 Springer-Verlag, Berlin, (1993).
3. D. G. Cory, J. B. Miller, and A. N. Garroway, *J. Magn. Reson.* **90**, 205-213 (1990).
4. S. Matsui, *Chem. Phys. Lett.* **179**, 187-190 (1991);
S. Matsui, *J. Magn. Reson.* **95**, 149-153 (1991);
S. Matsui, *J. Magn. Reson.* **98**, 618-621 (1992);
S. Matsui, Y. Ogasawara, and T. Inouye, *J. Magn. Reson. A* **105**, 215-218 (1993);
S. Matsui, M. Nonaka, T. Nakai, and T. Inouye, *Solid State NMR* **10**, 39-44 (1997).
5. S. Matsui, A. Uraoka, and T. Inouye, *J. Magn. Reson. A* **120**, 11-17 (1996).
6. F. Weigand, D. E. Demco, B. Blümich, and H. W. Spiess, *Solid State NMR* **6**, 357-365 (1996).
7. M. A. Hepp and J. B. Miller *J. Magn. Reson. A* **111**, 62-69 (1994).
8. K. Takedoshi and C. A. McDowell, *Chem. Phys. Lett.* **116**, 100-104, (1985).
9. U. Haeblerlen. "High Resolution NMR in Solids", Academic Press, New York, (1976).

P103

水に溶ける新規チタンクエン酸錯体の ^{13}C -NMR および 機能性チタン複合酸化物合成への展開

(東工大・応セラ研) ○多田大、垣花真人

(東工大・資源研) 中村義之

^{13}C -NMR of a novel water-soluble titanium citric acid complex and its application towards the synthesis of functional multi-component titanium oxides

(Materials and Structures Laboratory, Tokyo Institute of Technology)

○Masaru TADA and Masato KAKIHANA

(Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology)

Yoshiyuki NAKAMURA

A novel water-soluble Ti citric acid (CA) complex, which was found to be highly resistant to water, was successfully prepared. The ^{13}C -NMR spectra of solids precipitated from "Ti/CA/H₂O" mixtures with various ratios of Ti/CA indicated formation of a Ti-CA complex with a stoichiometry close to Ti:CA = 1:1. The solid-state ^{13}C -NMR spectrum of the 1:1 complex evidenced that the alcohol OH in CA was fully deprotonated to form an alkoxide oxygen atom with a strong nucleophilic nature. This alkoxide oxygen atom together with the two terminal -COOH groups played a major role in stabilizing the Ti-CA complex, in which a fused 6-membered chelate ring may exist. The Ti-CA complex was utilized for the synthesis of SrTiO₃ as an example. Heating and condensing of a H₂O solution of Ti- and Sr-CA complexes produced a yellowish puff-like solid mass, which after pyrolysis at 200 °C was converted to a precursor for SrTiO₃. The formation of pure SrTiO₃ occurred when the precursor was heat treated in air at 500 °C for 12 h.

(1) はじめに

BaTiO₃ や PbTiO₃ に代表されるチタンを含む複合酸化物は、強誘電性など電気的性質において種々の特性をもつ重要な工業材料として知られる。優れた電気的特性を得るためには、組織や組成を分子レベルで制御しなければならないので、近年いわゆるゾルゲル法に代表される化学的プロセスを重視した溶液法の発展が目覚ましい。例えば、最も先進的とされるゾルゲル法で BaTiO₃ を作製する場合には、バリウムおよびチタンのアルコキシドをアルコールなど非水系溶媒に溶解し、ここに適当量の水を添加しアルコキシドの加水分解を促進させて得られるゲルを

キーワード：チタンクエン酸錯体、 ^{13}C NMR、水溶性錯体、機能性チタン複合酸化物

ただまさる、かきはなまさと、なかむらよしゆき

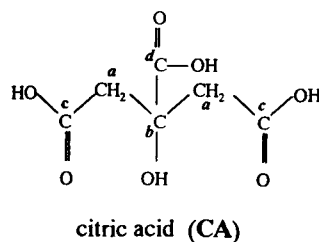
600 から 700 °C で熱処理することにより単相の BaTiO₃ を得ることが可能である [1]。しかしながら、金属アルコキッドを出発原料とするプロセスでは、(1) 金属アルコキッドは不安定であり、空気中の水と容易に反応して加水分解する、このため、(2) 使用に際してはすべての操作を窒素または二酸化炭素気流中で行わなければならない、また保存に際しては空気との接触を避けねばならない、さらに (3) 値段が非常に高いなど、実用的に難点があり工業化への展開を妨げている。最近、我々は水に対して高い溶解度を持ち、かつ加水分解に対して安定である新しいチタンクエン酸錯体の開発に成功した [2]。チタンに対してクエン酸がどのように配位しているかを調べることは、この特異な錯体がなぜ水に対して安定であるかを知る上で極めて重要である。そこで本研究では、チタンとクエン酸の比率の異なる種々の固体析出物の ¹³C-NMR の測定を実施し、クエン酸の配位数および配位様式を推定したので、その結果を報告する。また、この水に安定な新しいチタンクエン酸錯体を用いて、我々は水を酸素と水素とに分解する BaTi₄O₉ 型光触媒の作製にすでに成功している [3]。そこで本研究では、コンデンサーや光触媒に用いられている SrTiO₃ の合成にこの水溶性チタンクエン酸錯体を適用したので、その結果についても報告する [2]。

(2) 実験

金属チタン粉末を過酸化水素水のアルカリ性溶液に溶解させ、ここに Ti:CA=1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:3, 1:5 となるように無水クエン酸 (CA) を添加した。この溶液を 80 °C で乾燥し、溶媒を除去して得られた残渣の固体 ¹³C-NMR の測定は、日本電子株式会社製超伝導 FT-NMR 分光光度計 (NMR-GSX-270) を用いて ¹³C 周波数 67.9MHz で交差分極マジック角回転 (Cross Polarization - Magic Angle Spinning : CP-MAS) 法により行った。ケミカルシフトは、外部標準としてアダマンタン (C₁₀H₁₆) を用い、最も高磁場のピークを TMS 標準換算で 29.5 ppm として決定した。チタン酸ストロンチウム (SrTiO₃) を作製する手順は以下の通りである。まず上述のように金属チタンを溶解させた後、CA をチタンに対して 15 倍モル量添加し、ここに必要量の炭酸ストロンチウムを加え完全に溶解させた。この溶液をホットプレート上 200 °C で加熱し、溶媒を除去して得られた残渣をチタン酸ストロンチウム (SrTiO₃) の前駆体とした。この前駆体を 250 °C から 650 °C で熱処理して得られた粉体の X線回折スペクトルを測定し、生成物の同定を行った。

(3) 結果

図 1 に色々な Ti:CA 比で単離した固体析出物の固体 ¹³C-NMR の結果を示す。参照スペクトルとしてチタンを含まない無水クエン酸 (CA) の固体 ¹³C-NMR を図 1 (a) に合わせて示した。CA の NMR で観測されている *a*, *b*, *c*, *d* のピークは、次の図でマークした炭素にそれぞれ帰属される。Ti に対して CA を大過剰に含む Ti:CA=1:5 および 1:3 の固体の NMR には (図 1 (b), (c))、金属に配位していないと考えられるフリーの CA に対応する 75 ppm ピーク (*b*) が観測されている。この 75 ppm ピーク (*b*) の強度は CA 量の減少と共に弱くなり、Ti:CA=1:1 のときに消失した。これはチタンクエン酸錯体の Ti と CA モル比が



1:1であることを示唆している。Tiを含む固体のNMRには、75 ppm ピーク (*b*) と対の形で、クエン酸のアルコール性 OH 基のプロトンが解離し、一種のクエン酸アルコキシドの形で金属に強く配位した錯体種に固有の共鳴ピーク (*b'*: 85 ppm) が観測されている。この *b* ピークの相対強度は CA の減少と共に大きくなり、Ti:CA=1:1 以下の濃度で相対強度はほぼ一定となっている。Ti に対して CA が不足している Ti:CA=1:0.5 および 1:0.1 の固体析出物は、1:1 型 Ti-CA 錯体と無機チタン化合物 (水酸化物など) の混合物であると考えられる。低磁場側 190 ppm 付近に観測されている *d* ピークは、*b* ピークと同様の挙動を示すことから、1:1 型 Ti-CA 錯体に固有とみなすことができ、したがって *b* カarbonに直接結合している -COOH 基に帰属される。1:1 型 Ti-CA 錯体において、*b* カarbonに結合しているアルコキシド酸素はクエン酸の両端の -COOH 基の酸素と協同的にチタンに配位し、安定な縮合 6 員環を形成しているものと考えられる。

図 2 に SrTiO₃ 用前駆体 (Ti-CA、Sr-CA および大過剰 CA) を種々の温度で熱処理して得られた粉体の X 線回折図形を示す。400 °C までは、ピークは観測されず試料がアモルファスであることがわかる。結晶化は 450 °C から始まり、500 °C で単相の SrTiO₃ が得られた。従来からのゾルゲル法 [4, 5] や共沈法 [6, 7] で単相の SrTiO₃ を得るためには、700 °C から 900 °C の熱処理が必要であったのに比べ、本法では安価な原料を用い、しかも湿気を遮断するためのグローブボックスなど特別な設備を使うことなくより低温で高純度の SrTiO₃ が合成できた。

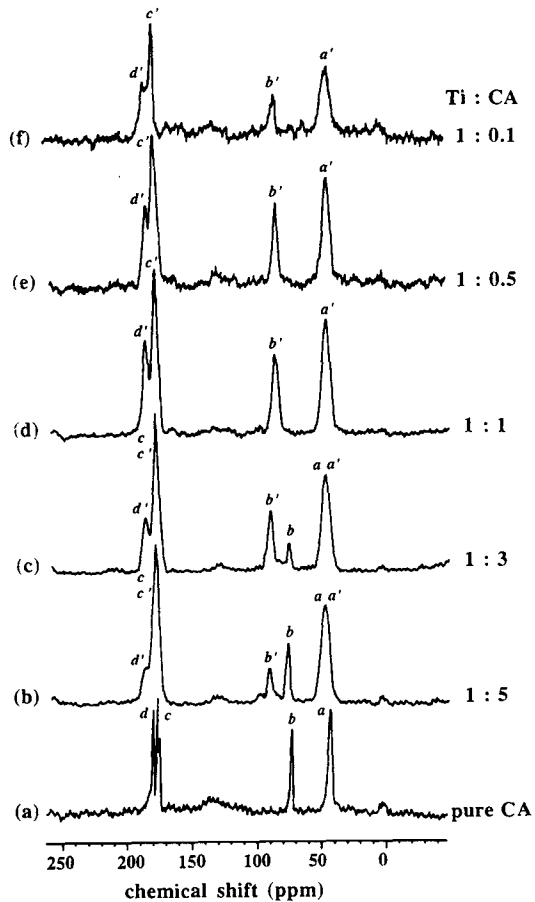


Fig.1 Solid-state ¹³C-NMR spectra of (a) anhydrous citric acid (CA) and solids precipitated from "Ti/CA/H₂O" mixtures with Ti:CA = (b) 1:5, (c) 1:3, (d) 1:1, (e) 1:0.5 and (f) 1:0.1.

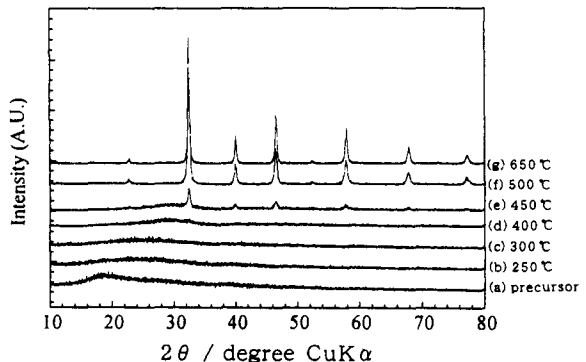


Fig.2 XRD patterns of (a) precursor derived from a "Sr/Ti/CA/H₂O" mixture with Sr:Ti:CA=1:1:15 and of the calcined powders in air for 12 h at (b) 250 °C, (c) 300 °C, (d) 400 °C, (e) 450 °C, (f) 500 °C, and for 2 h (g) at 650 °C.

参考文献

- [1] P.P.Phule and S.H.Risbud, *J. Mater. Sci.* **25** (1990) 1169.
- [2] M.Kakihana, M.Tada and Y.Nakamura, submitted to *Chem. Mater.*
- [3] M.Tada, M.Kakihana, Y.Yamashita and K.Yoshida, submitted to *J. Alloys and Compounds.*
- [4] J. S. Smith, R. D. Dolloff and K. S. Mazdiyanni, *J. Am. Ceram. Soc.*, **53** (1970) 91.
- [5] H. K. Varma, P. Krishna Pillai, T. Veetil Mani, K. G. K. Warriar and A. D. Damodaran, *J. Am. Ceram. Soc.*, **77** (1994) 129.
- [6] W. Fam and L. Niinisto, *Mater. Res. Bull.*, **29** (1994) 451 .
- [7] S. Bhattacharjee, M. K. Paria and H. S. Maiti, *Ceram. Int.*, **18** (1995) 295 .

P104

^1H - ^{31}P SEDOR NMR 法による 12 タングストリン酸無水物 ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) のプロトンサイトの研究

(阪大院・理) ○上田貴洋、辰巳奉正、中村亘男

Proton position in Dodecatungstophosphoric Acid Anhydrous, $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ as studied by ^1H - ^{31}P SEDOR NMR

Takahiro Ueda, Tomomasa Tatsumi, and Nobuo Nakamura

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043

Proton position in dodecatungstophosphoric acid anhydrous, $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$, which was prepared by evacuation at temperature above 488 K, was studied by means of ^1H - ^{31}P spin echo double resonance (SEDOR) NMR. A remarkable decay of SEDOR signal was observed due to the protons strongly bound to the heteropolyanion, $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$. In order to assign the proton position, the intensity of SEDOR signal was simulated for possible proton sites, *i.e.*, positions attached to corner-shared, edge-shared, and terminal oxygen atoms of WO_6 unit in $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$. The model structure in which the proton is bound to the edge-shared oxygen atom reproduce satisfactorily the observed decay.

近年、固体 NMR による核間距離の定量的な測定は、たんぱく質やアミノ酸などの生体分子において盛んにおこなわれている。しかしながら、無機材料や触媒化学の分野においては強力な研究手段になり得るにもかかわらず、その応用はまだほとんどなされていない。本研究では、固体酸触媒として知られる $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ 無水物中のプロトンに対して核間距離測定法の 1 つである Spin Echo Double Resonance (SEDOR) 法を応用し、プロトンサイトの同定を試みた。

この化合物の触媒反応では、プロトンサイトは酸点として働き触媒機構を理解する上で非常に重要な要素となる。Fig. 1 に Keggin 構造と呼ばれるこの化合物のポリアニオンの構造を示す。ポリアニオン上のプロトンは、 WO_6 八面体の 3 種類の酸素原子

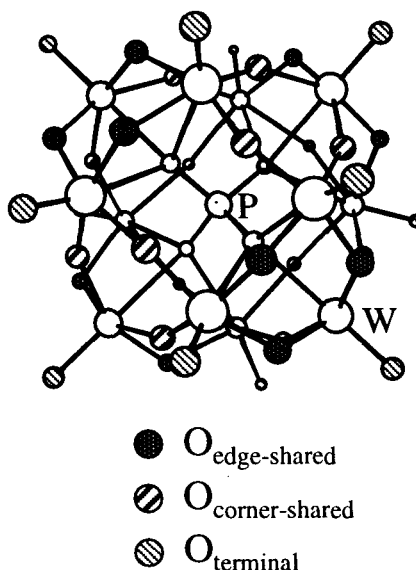


Fig.1 Keggin structure of heteropolyanion, $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$

キーワード：SEDOR・ ^1H - ^{31}P 双極子相互作用・ヘテロポリ酸・distance geometry

うえだ たかひろ・たつみ ともまさ・なかむら のぶお

(O_{terminal} 、 $O_{\text{corner-shared}}$ 、 $O_{\text{edge-shared}}$)のどれかに結合して存在すると考えられる。IR による研究では、W-O-W 伸縮振動に対する H/D の同位体シフトから稜共有酸素 ($O_{\text{edge-shared}}$) がプロトンサイトとして有力であることが示唆されている[1]。しかし、これ以外にプロトンサイトについての定量的な研究はこれまでほとんどなされていない。そこで、SEDOR 法を用いて $H_3PW_{12}O_{40}$ 無水物のプロトンサイトの同定と P-H 核間距離の精密測定を行った。

1H - ^{31}P SEDOR の測定には Fig.2 に示すパルスシーケンスを用いた。 ^{31}P の 90° パルス照射から t_1 後に 1H 側に 180° パルスを照射する。エコー強度の減衰を t_1 を変化させて観測することにより 1H - ^{31}P 異種核双極子相互作用を精密に測定できる。

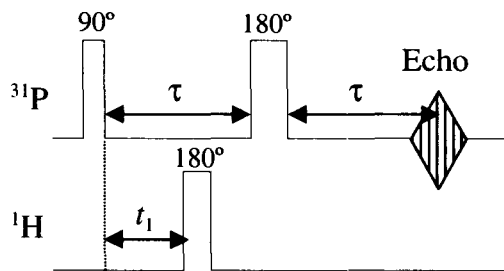


Fig. 2 Pulse sequence of 1H - ^{31}P SEDOR

無水物と自由水を大量に含む 29 水和物について、 1H - ^{31}P SEDOR を測定した結果を Fig. 3 に示す。無水物では、 ^{31}P のエコー強度は $t_1 \sim 500 \mu\text{sec}$ で $t_1=0$ のときに比べ、約 80% まで減衰した。一方、29 水和物ではエコー強度の減衰は観測されなかった。これから、無水物ではプロトンがポリアニオンの表面に強く結合しており、拡散のような運動は起こっていないことがわかる。

Fig.1 の構造をもとにポリアニオン表面上の 3 つの可能なサイトのそれぞれにプロトンがある時の 1H - ^{31}P 異種核双極子相互作用の大きさを概算し、SEDOR によるエコー強度の減衰をシミュレートした。その結果を Fig.3 に破線で示す。実験値とシミュレーションの結果を比べると、3 つの酸素原子のうち $O_{\text{edge-shared}}$ にプロトンが結合した場合に両者の一致が最も良かった。これから、 $H_3PW_{12}O_{40}$ 無水物では IR の実験で予想されたようにプロトンは $O_{\text{edge-shared}}$ に結合しているといえる。また、この場合の P-H 核間距離は 0.50nm となる。講演では重水素置換した試料の結果もあわせて報告する。

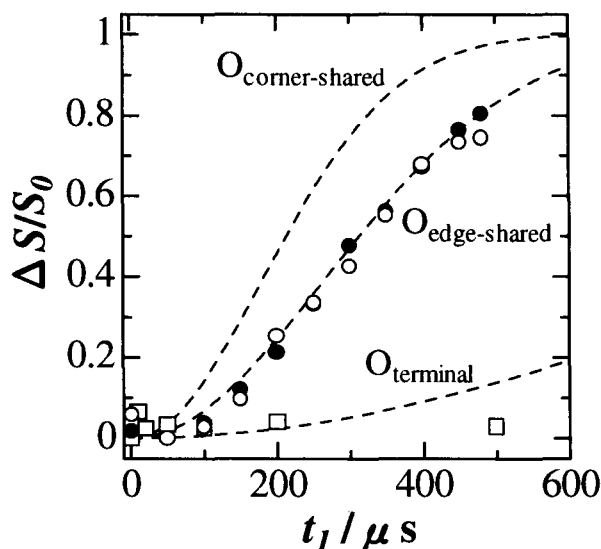


Fig. 3 The decay of 1H - ^{31}P SEDOR signal for $H_3PW_{12}O_{40}$ evacuated at 623 K (●) and 488 K (○), and for $H_3PW_{12}O_{40} \cdot 29H_2O$ (□). The broken lines are the calculated decays when protons are located at the specified site on $PW_{12}O_{40}^{3-}$.

[1] K. Y. Lee, N. Mizuno, T. Okuhara, M. Misono, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 1731(1989).

Differential broadening between the signals splitted by the residual dipolar interaction with ^{14}N in ^{13}C CP/MAS NMR spectra of nitroanilines
 (National Institute of Materials and Chemical Research) Shigenobu Hayashi

^{13}C CP/MAS NMR spectra of various nitroanilines have been measured, and the origin of the differential broadening observed between the signals splitted by the residual dipolar interaction with ^{14}N has been clarified experimentally. The dipolar interaction between ^1H and ^{14}N is responsible for the ^{13}C differential broadening, while the direct dipolar interaction with ^1H is neglected. A kind of motion can eliminate the differential broadening, which is presumably the 180° flip of the NH_2 group around the C-N axis. Therefore, the differential broadening is highly correlated to the molecular motion and the hydrogen bonding.

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の強度比を持つ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 スペクトルの中に見かけ上1:1の強度比のようなパターンを示すものがあり、そのパターンが2つのピークの線幅の違いに起因することを前回までに報告した^{1,2)}。今回は、線幅の違いの原因を実験的に明らかにした。また、この現象の化合物による違いや温度による変化から、分子運動や水素結合の状態との関連について検討した。

実験 試料は市販のものを用いた。 ^{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。クロスポーラリゼーションには通常の矩形パルスを用い、 ^1H デカップリングには CW 及び TPPM デカップリングを用いた。

結果及び考察 Fig. 1 に、50.32 MHz、室温で測定した2-メチル-4-ニトロアニリンの C-NH₂ のシグナルを示した。 ^1H デカップリングを強くすると理論的な1:2のパターンに近づくことがわかった。 ^1H CW デカップリングを40 kHzより弱くすると2つのピークとも線幅が広がり始める。50 kHzより強い場合、高周波数側のピーク ($m_s=0$) の線幅はそれ以上変化しないが、低周波数側のピーク ($m_s=\pm 1$) は ^1H デカップリングを強くするにつれて線幅が減少する。見か

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

け上 1 : 1 の強度比のパターンは、Fig. 1B や 1C のように、 $m_s = 0$ のピークは充分デカップリングされているが、 $m_s = \pm 1$ のピークのデカップリングが不完全な状態で観測された。

もし、 ^{13}C - ^1H 間の双極子相互作用で線幅が広がるとすると、2つのピークとも同じように広がると考えられる。また、 ^1H スペクトルが ^{14}N との双極子相互作用によって広がっているため、デカップリングに用いる ^1H 周波数からの off-resonance 効果によって線幅の違いが生じた可能性もある。そこで、 ^1H 周波数を変えて測定を行ったが、スペクトルのパターンは変化しなかった。このことは、 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用が原因ではないことを示している。即ち、 ^{14}N - ^1H 双極子相互作用が間接的に ^{13}C のスペクトルに影響を及ぼしていることを示している。

前回、2-メチル-4-ニトロアニリンでは温度を上げると 1 : 2 パターンになることを報告した。このことは、分子運動が線幅の違いを解消させることを示している。この化合物は、アミノ基とニトロ基がパラ位にあり、分子間水素結合を形成している。温度を上げることによりアミノ基の 180° 回転運動が起こり、この運動が線幅の違いを解消していると考えられる。

Fig. 2 に、アミノ基とニトロ基がオルト位にある、2-メチル-6-ニトロアニリンの C-NH₂ シグナルを示した。通常の CW デカップリングで測定すると Fig. 2B に示したように $m_s = \pm 1$ のピークの方が低くなるようなスペクトルが得られ、パラ化合物より大きな線幅の違いが観測された。TPPM デカップリングをすることにより、1 : 2 パターンに近いシグナルが得られた (Fig. 2A)。この化合物では、融点近くまで温度を上げてシグナルパターンはほとんど変化しなかった。オルト化合物ではアミノ基とニトロ基が分子内で水素結合を作っており、アミノ基の 180° 回転運動が起こるよりも分子全体の運動が起きてしまうのかもしれない。

アミノ基とニトロ基がメタ位にある化合物、6-ニトロ-2-アミノトルエンでは、C-NH₂ シグナルは通常の CW デカップリングで理論的な強度比 1 : 2 に近いパターンを示した。TPPM デカップリングを用いてもパターンは変化しなかった。オルト及びパラ化合物ではアミノ基とニトロ基がベンゼン環と共鳴効果を示しアミノ基の 180° 回転運動が起こりにくいが、メタ化合物では共鳴

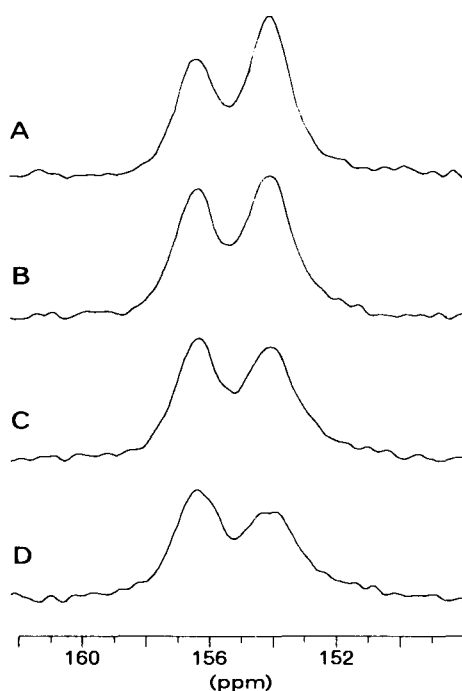


Fig. 1. ^1H decoupling field dependence of the C-NH₂ signal in ^{13}C CP/MAS NMR spectra of 2-methyl-4-nitroaniline, measured at 50.32 MHz and 298K. The spinning rates were 4.00 kHz. ^1H decouplings were (A) TPPM and (B-D) CW, whose fields were (A) 51 kHz, (B) 67, (C) 51 and (D) 40 kHz. Intensities are normalized.

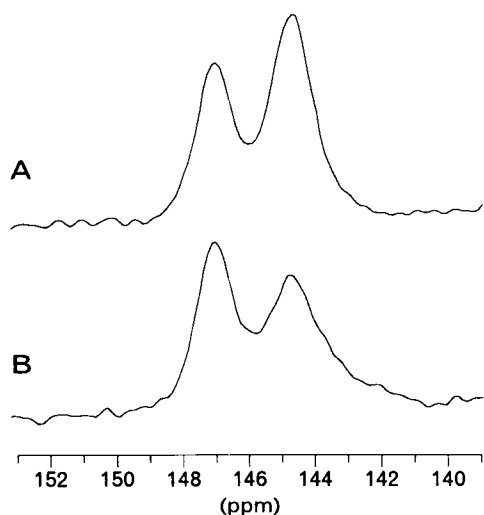


Fig. 2. ^1H decoupling dependence of the C-NH_2 signal in ^{13}C CP/MAS NMR spectra of 2-methyl-6-nitroaniline, measured at 50.32 MHz and 298K. The spinning rates were 4.00 kHz. ^1H decouplings were (A) TPPM and (B) CW, in which the fields were 51 kHz. Intensities are normalized.

効果がないためアミノ基の 180° 回転運動が起こりやすいと考えられる。

パラ化合物でも、アミノ基の H をメチル基で置換していくと線幅の違いが解消された (Fig. 3)。メチル基の置換によって、1つ目は $^1\text{H}\cdot^{14}\text{N}$ 間の双極子相互作用が弱くなること、2つ目は分子間水素結合がなくなりアミノ基の 180° 回転運動が起こりやすくなることのためと考えられる。

- 文献： 1) 林、分子構造総合討論会要旨集 (1996) p. 558.
2) 林、第36回NMR討論会要旨集 (1997) p.415.

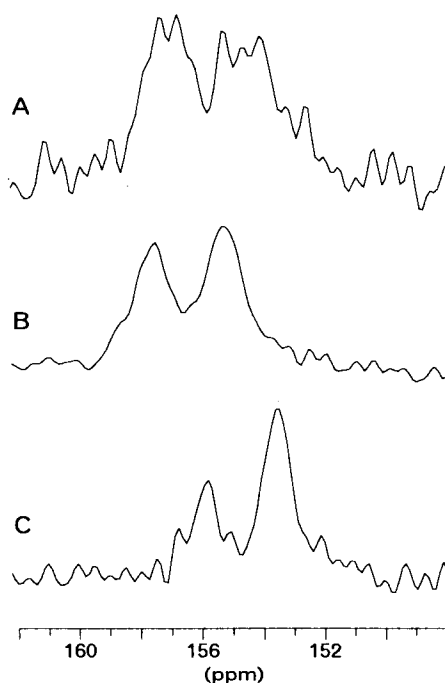


Fig. 3. The C-NH_2 signal in ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (A) *p*-nitroaniline, (B) *N*-methyl-*p*-nitroaniline and (C) *N,N*-dimethyl-*p*-nitroaniline, measured at 50.32 MHz and 298K. The spinning rates were (A) 4.00 kHz and (B,C) 7.00 kHz. ^1H decoupling was CW with a field of 68 kHz.

P106 ^7Li NMRによるイオン伝導性ガラスのイオン ダイナミクスの検討

(大阪工業技術研究所) ○赤井智子
(分子科学研究所) 大石修・宮島清一

Investigation of lithium-ion dynamics in ion conducting glasses by ^7Li NMR
(Osaka National Research Institute, Institute of Molecular Science)

○ Tomoko Akai, Osamu Ohishi and Seiichi Miyajima

Dynamics of lithium ions in lithium-thioborate glass is investigated by using ^7Li NMR. To determine the rate of local hopping of ions, temperature dependence of spin-lattice relaxation time and line width are measured and analyzed by using Kohlrauch-Williams-Watt (KWW) function. Diffusion coefficient of lithium is measured by pulsed-field gradient spin echo method. Based on these results, diffusion mechanism in these glasses is discussed.

【緒言】

リチウムを多量に含む硫化物系のガラスは室温で 10^{-3}Scm^{-1} 程度の高い導電率を示し¹⁾ 固体電解質材料としての応用が期待されており、そのイオンのダイナミクスをNMRを用いて検討する試みが行われつつある²⁾。非晶質のイオン伝導体においては、構造分布やイオン間相互作用に起因する複雑なイオンの挙動が電気伝導特性を支配しているため、様々なNMRパラメーターを測定しイオンの挙動を多面的にとらえる必要がある。各種の緩和時間からイオンの局所ホッピング速度を求め、パルス磁場勾配法(PFG法)により測定した拡散係数と比較することは一つの良い方法である。 T_2 の長い高分子系の電解質材料についてはかなりPFGによる拡散係数の測定が行われているが、無機系の材料は一般的に T_2 が数ms以下と短い場合報告例は非常に少ない。

本研究では $\text{Li}_2\text{S}-\text{B}_2\text{S}_3$ 系のガラスを合成し緩和時間の測定を行い、非デバイ型関数(KWW式)を用いた解析を行うことによりイオンの局所ホッピング速度を求めた。また、最近開発されたPFG-NMR装置³⁾を用いて拡散係数を観測した。それらの結果からイオンの拡散挙動について考察を行った。

【実験】

試料のガラスは Li_2S と B_2S_3 の原料粉末をグローブボックス中で混合し、内面にカーボンコーティングした石英管に封入した後、 1000°C で熔融し、その後石英管ごと水中に投入することによって急冷しガラスを作製した。

スピン格子緩和時間と線幅の測定は、Chemagnetics CMX-200を用いて共鳴周波数 78MHz で測定を行った。またPFG-NMRによる拡散係数の測定は共鳴周波数 20MHz 、磁場勾配 4.3T/m で 180°C で測定を行った。

あかいともこ おおいしおさむ みやじませいいち

キーワード： ^7Li NMR、イオンダイナミクス、パルス磁場勾配法、緩和時間

【結果及び考察】

Fig. 1に70Li₂S-30B₂S₃ガラスの⁷LiのT₁の温度依存性を示す。図からわかるようにT₁の温度依存性は非常に小さい。類似の現象がAgイオン超イオン伝導体³⁾の場合に観察されており、非晶質に特有の非デバイ型緩和が原因であると考えられる。このような非デバイ型の緩和を表す関数としてKWW関数 $\exp(-(t/\tau_0)^\beta)$ ($0 < \beta < 1$) が一般によく用いられる。相関関数がKWW関数になる場合のT₁の相関時間依存性は厳密には解くことが不可能であるが、

$$\exp(-(t/\tau_0)^\beta) = \sum C_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1)$$

のように和の形に近似展開することで⁵⁾、

$$T_1^{-1} = \sum C_i [\tau_i / (1 + \omega_0^2 \tau_i^2) + 4\tau_i / (1 + 4\omega_0^2 \tau_i^2)] \quad (2)$$

で計算することができる。τ₀はτ₀exp(E_a/RT)のアレーニウスの活性化過程に従うと考え、E_aが伝導度の活性化エネルギー、38kJ/molにほぼ等しいと仮定して(2)式によってT₁の温度依存性を計算した。τ₀=4×10⁻¹⁵s, β=0.26として計算した結果を図中実線で示す。

また、同じ試料の線幅の温度変化をFig. 2に示す。現在まで非晶質伝導体においては、線幅の温度変化はあまり定量的に取り扱われてこなかったが、今回、KWW式を用いて数値計算を行った結果(図中実線で示す)、T₁と同じ活性化パラメータで実験値を説明することができた。

このガラスについて、PFG-NMR法により180℃での拡散係数の測定に成功した。その値は5.5×10⁻¹¹m²/sであった。当日はこれらの結果をもとにイオンのホッピングと拡散、電気緩和、電気伝導との関連について詳しく報告する予定である。

【参考文献】

- 1) A. Pradel and M. Ribes, *Mat. Chem. Phys.*, 23, 121 (1989)
- 2) I. Svare *et al.*, *Phys. Rev. B*, 48, 9336 (1993).
- 3) O. Ohishi and S. Miyajima, *J. Magn. Reson.*, 123A, 64 (1996)
- 4) S. H. Chung *et al.*, *Phys. Rev. B.*, 41, 6154 (1990)
- 5) C. T. Moynihan *et al.*, *Phys. Chem. Glasses.*, 14, 122 (1973)

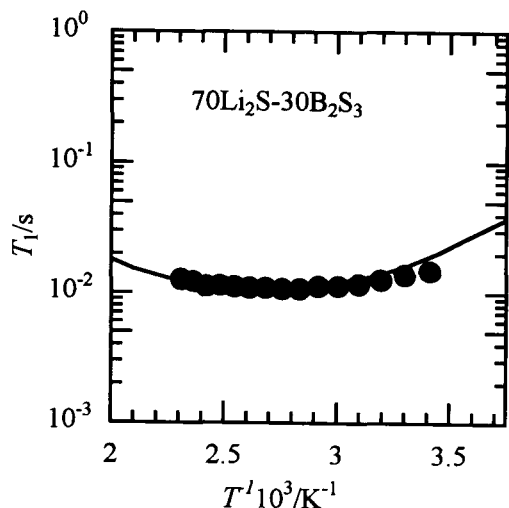


Fig. 1 Temperature dependence of ⁷Li NMR spin-lattice relaxation time in 70Li₂S-30B₂S₃

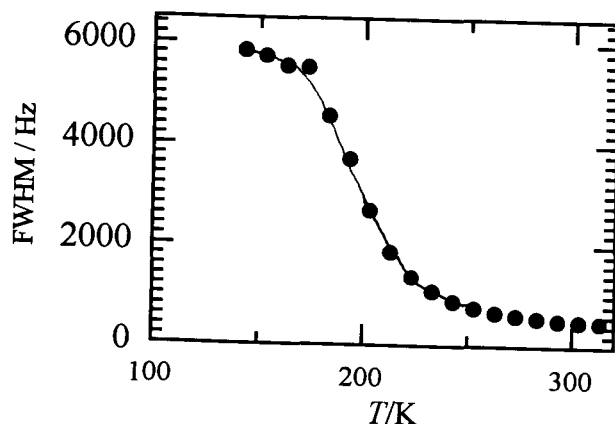


Fig. 2 Temperature dependence of ⁷Li NMR line width in 70Li₂S30B₂S₃

P107

Spin-Lattice Relaxations and Dynamics in Kaolinite

Intercalation Compounds

(物質研) ○Xiulan Xie, 林 繁信

Xiulan Xie and Shigenobu Hayashi

(National Institute of Materials and Chemical Research)

Abstract ^2H NMR spectra of kaolinite/formamide- N,N - d_2 (FA- d_2) were recorded in 200–350 K: a narrow central component corresponds to the outer-surface molecules; a resolved Pake doublet RD_1 for host O-D formed by H-D exchange between host hydroxyl and deuterated amide of the guest molecules during synthesis; and a distribution of Pake doublets for interlayer molecules. Temperature dependence of quadrupole coupling constant revealed librational motions of the host O-D groups and the interlayer guest molecules. ^2H spins relax through combination of paramagnetic impurities and fluctuation of the quadrupole interaction caused by librational motion. ^{13}C spins in kaolinite/FA relax through dipole-dipole (dd) interaction with either proton or ^{14}N by librational motion of the molecules. ^{29}Si spins of kaolinite and the intercalates relax through direct dd interaction with electron spins on paramagnetic impurities, while relaxation of ^1H spins caused by paramagnetic impurities is limited by spin diffusion.

Introduction

In our previous study,¹ we investigated local structures and orientations of the guest molecules in kaolinite intercalation compounds with formamide (FA) and its derivatives, formamide- N,N - d_2 (FA- d_2), N -methylformamide (NMF), and N,N -dimethylformamide (DMF) mainly through ^1H , ^{13}C and ^{29}Si NMR spectra: Guest molecules are regularly arranged in the interlayer space with a molecular guest/host ratio of 1.0, i.e. one guest molecule per each $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ unit; ^{13}C and ^1H NMR spectra indicates that the guest/host interaction are in the order of FA > NMF > DMF, and also suggests that the mobility of the guest molecules are in the inverse order.

In the present work, we have investigated dynamics of the guest molecules in these samples mainly through ^2H and ^{13}C NMR studies. Spin-lattice relaxation times T_1 and spectra were measured under variable temperature conditions. The obtained results demonstrate the interlayer guest molecules undergoing fast librational motions with small amplitude. ^{29}Si and ^1H relaxation studies are also presented.

Experimental

Spin-Lattice Relaxation, Kaolinite Intercalation, Paramagnetic Impurities, Dynamics

シー シューラン、はやし しげのぶ

The kaolinite (named sample I) used was Georgia kaolinite KGa-1 with a content of paramagnetic impurities of about 0.46 wt %. Kaolinite/FA was obtained by a two-step displacement method with kaolinite/NMF as intermediate, kaolinite/FA- d_2 and kaolinite/NMF by a vaporizing method, and kaolinite/DMF by the two-step displacement method with kaolinite/NMF as intermediate as well, and they are referred to as samples II, III, IV, and V, respectively.

The NMR measurements were carried out by Bruker MSL400, ASX200, and ASX400 spectrometers with static magnetic field strengths of 9.4, 4.7 and 9.4 T, respectively. ^2H static spectra were recorded with the quadrupole echo pulse sequence. ^2H T_1 was measured with the saturation recovery method combined with the quadrupole echo pulse sequence for signal detection. ^{13}C spin-lattice relaxation time T_1 was measured with the inversion recovery method and Torchia's method,² ^{29}Si T_1 with Torchia's method, and ^1H T_1 with the inversion recovery method.

Results and Discussion

^2H NMR Spectra

Line shape of ^2H NMR spectra reveals motions in the molecules. ^2H NMR spectra of kaolinite/FA- d_2 were recorded in 200 ~ 350 K, as shown in Figure 1. The pattern is comprised of a narrow central (NC) peak, a resolved doublet (RD_1), and a distribution of Pake doublets. Although the resolved doublet indicates a rigid state of the guest molecules, a distribution of Pake doublets already shows amount of molecules which experience some kind of motion. Figure 2 shows temperature dependence of contribution ratio of the components, and temperature dependence of quadrupole coupling constant (QCC) is depicted in Figure 3. RD_1 has QCC value of 259 ~ 248 kHz in the temperature range of 200 ~ 350 K, while for the distributed doublets the weighted average value is 232 ~ 174 kHz in the same temperature range. The distributed doublets have QCC values reasonable for a ND_2 group, whereas the value for RD_1 suggests the formation of OD group: during synthesis H-D exchange between guest ND_2 and the surface OH groups of the host took place, and component RD_1 is therefore due to host O-D groups. NC component is due to outer-surface guest molecules. Three lines parallel to the temperature axis within experimental error as shown in Figure 2 indicate constant contribution of each component throughout the temperature range. RD_1 has a contribution of 30 ± 2 %; and NC and distributed doublets have contributions of 25% and 45%, respectively. Fraction of intercalation of the guest molecules is estimated to be 0.64, which is comparable to ^{13}C NMR results where the value was deduced to be 0.57. The resolved doublet RD_1 has weak temperature dependence of QCC which can be fitted into a linear regression: $QCC = 266.1 - 0.05T$, where QCC is in kHz and T stands for temperature in K. Librational motion of the O-D groups, where D moved randomly on the bottom surface of a cone, causes the QCC temperature dependence with an asymmetry factor of 0.0. The circles with error bars stand for weighted average QCC values of the distributed Pake doublets which obey a linear regression: $QCC = 312.8 - 0.41T$. Librational motions with small amplitude in the

molecules resulted in the temperature dependence of the line shape. Distribution in the motional amplitude causes the distributed doublet pattern. Temperature dependence of QCC reflects mobility of the molecules.

²H Relaxation

Figure 4 shows ²H relaxation curves of kaolinite/FA- d_2 . Distribution of the relaxation time as revealed by the nonexponentiality suggests that the relaxation is caused by paramagnetic impurities and fluctuation of the quadrupole interaction due to librational motion of the molecules.

¹³C Relaxation

Figure 5 shows magnetization recovery curves for FA (sample II) at different temperatures. The temperature dependence suggests that the relaxation mechanism is of motional origin, and the nonexponentiality means a distribution of the relaxation time. The time in which the magnetization becomes $1/e$ of its initial value, $T_{1\text{est}}$, is accordingly chosen to be a representative value for T_1 . In the temperature range studied $T_{1\text{est}}$ decreases with increasing temperature for all the intercalates. $T_{1\text{est}}$ increases at the higher magnetic field in the order FA (sample II) > FA- d_2 (sample III) > NMF (sample IV), with DMF (sample V) almost field independent. Fast librational motions with small amplitude of the guest molecules contribute to the relaxation in ¹³C spins. For librational motion, activation energy is nearly zero; correlation time is almost temperature independent; and the temperature dependence in relaxation rate results from change in libration amplitude with temperature.

²⁹Si and ¹H Relaxations

²⁹Si magnetization recovery curves were plotted as a function of square root of time. All the curves are linear, which means direct relaxation through the dipole-dipole interaction with electron spins on paramagnetic impurities. The relaxation rate decreases upon expansion of the interlayer distance by intercalation. The relaxation time and the basal spacing d show the following relation: $T_1 = 31.22 + 57.47d^2$ with T_1 in second and d in nanometer. The relation is consistent with the relaxation model applied where T_1 is in inverse proportion to N_p^2 . N_p is inversely proportional to the basal spacing.

Proton relaxation curves of kaolinite and kaolinite/FA- d_2 are depicted in Figure 6. Relaxation of protons in hydroxyl groups of the host kaolinite and the guest molecules are both due to paramagnetic impurities under diffusion-limited case.

1. Xiulan Xie, Shigenobu Hayashi, 分子構造総合討論会 (松山, 1998), 4A01.
2. D. A. Torchia, *J. Magn. Reson.* **1978**, *30*, 613.

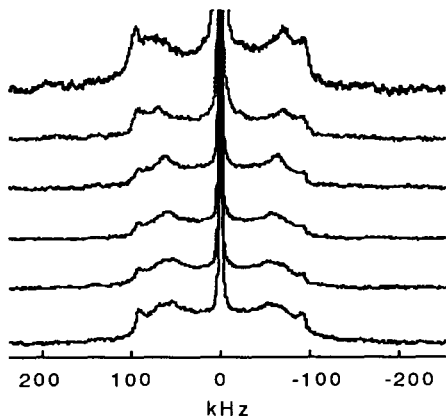


Fig. 1. Variable temperature ^2H spectra of kaolinite/FA- d_2 (61.42 MHz).

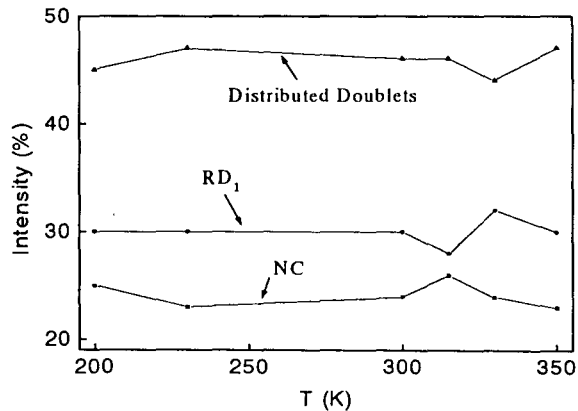


Fig. 2. Component fraction in ^2H spectra of kaolinite/FA- d_2 (61.42 MHz).

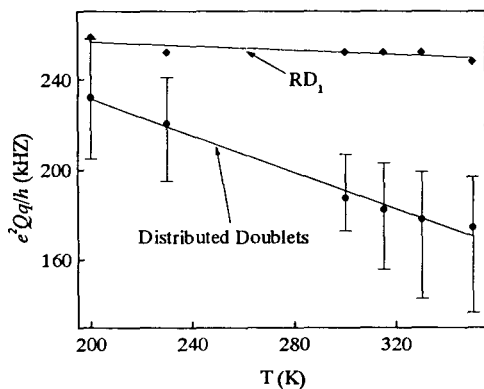


Fig. 3. Quadrupole coupling constant of kaolinite/FA- d_2 (61.42 MHz).

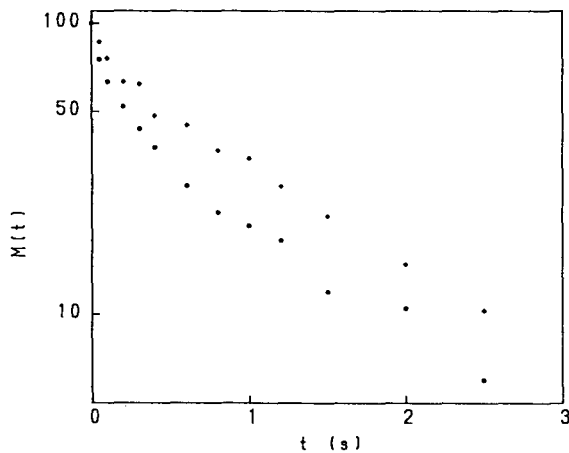


Fig. 4. ^2H relaxation curves of kaolinite/FA- d_2 (61.42 MHz, 294 K): RD $_1$ (\bullet), RD $_2$ of distributed doublets (\blacklozenge).

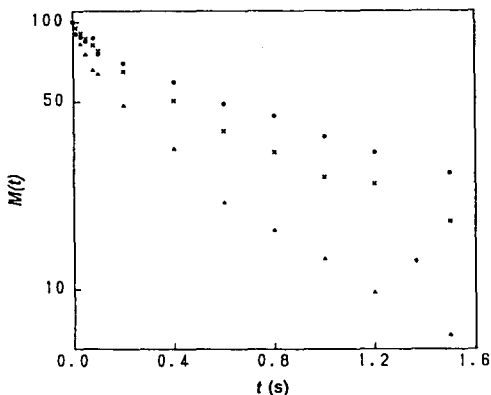


Fig. 5. ^{13}C relaxation curves of kaolinite/FA; 300 K(\bullet), 315 K(\times), 330 K(\blacktriangle). $\nu_L=100.61$ MHz, MAS rate 4.0 kHz.

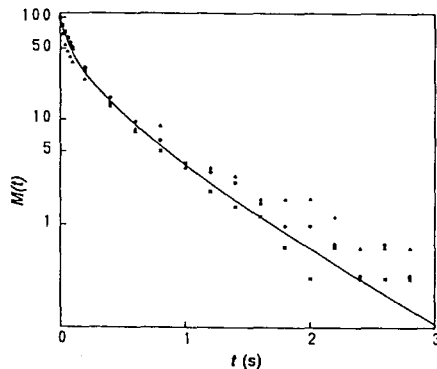


Fig. 6. ^1H relaxation curves of kaolinite (\times), and Kaolinite/FA- d_2 : OH (\bullet), HCO (\blacktriangle) $\nu_L=400.14$ MHz, MAS rate 12.0 kHz.

P108

$Ag_xCu_{1-x}I$ ($0 \leq x \leq 0.5$) の ^{63}Cu NMR 及び X 線回折

金沢大 理○木村潤子、水野元博、遠藤一央、須原正彦

Structural Analysis of $Ag_xCu_{1-x}I$ ($0 \leq x \leq 0.5$) by ^{63}Cu NMR and X-ray Diffraction Methods

Junko Kimura, Motohiro Mizuno, Kazunaka Endo, and Masahiko Suhara

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University

Abstract

^{63}Cu NMR and X-ray diffraction have been used to perform a structural analysis of mixed crystal $Ag_xCu_{1-x}I$ ($0 \leq x \leq 0.5$). The lattice constants of $Ag_xCu_{1-x}I$ have been analyzed as a function of temperature by X-ray diffraction. We, thus, observed that lattice constants change discontinuously in the temperature range of phase transition. On the other hand, we examined the temperature dependence of ^{63}Cu chemical shifts and spin-lattice relaxation time of $Ag_xCu_{1-x}I$ from ^{63}Cu NMR measurements. The chemical shifts of these mixed crystals were seen to have different temperature dependences in a border line around about $50^\circ C$: The shift changes linear in the low temperature, while it shows curve lines in the high temperature range. In the case of nuclear relaxation, the spin-lattice relaxation rates depend on the lattice vibrations in the lower temperature. On the other hand the rates in the high temperature are governed with the diffusion of the cation Cu^+ . The results of the shifts seems to correspond to those of the relaxation rates.

序

前回 $Ag_xCu_{1-x}I$ ($0.99 \leq x \leq 0.75$) のイオン伝導相から超イオン伝導相転移について NMR 及び X 線回折の研究から報告した^[1]。この相転移領域における2つの NMR スペクトルはイオン伝導相と超イオン伝導相の構造に対応していた。今回は $Ag_xCu_{1-x}I$ ($0 \leq x \leq 0.5$) の相転移について構造の変化を X 線回折から解析する。また、 γ 相での電子構造及び分子運動について ^{63}Cu NMR ケミカルシフト及びスピン格子緩和時間から考察する。

実験

①試料の作成

AgI と CuI をそれぞれ規定 ($0 \leq x \leq 0.5$) のモル比で混合し、電気炉により $650^\circ C$ 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。

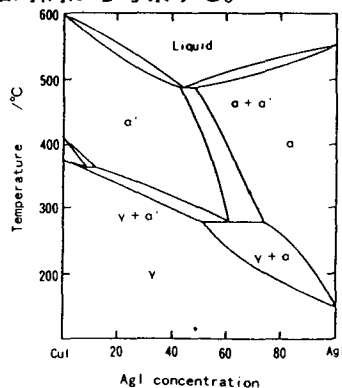


Fig.1 Phase diagram of AgI-CuI system.

完全固溶体、ケミカルシフト、結晶構造、 $Ag_xCu_{1-x}I$ 、拡散

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

② 粉末 X 線回折

理学 RINT 1200 を用い、窒素雰囲気下で室温から 450°C の温度範囲で行った。

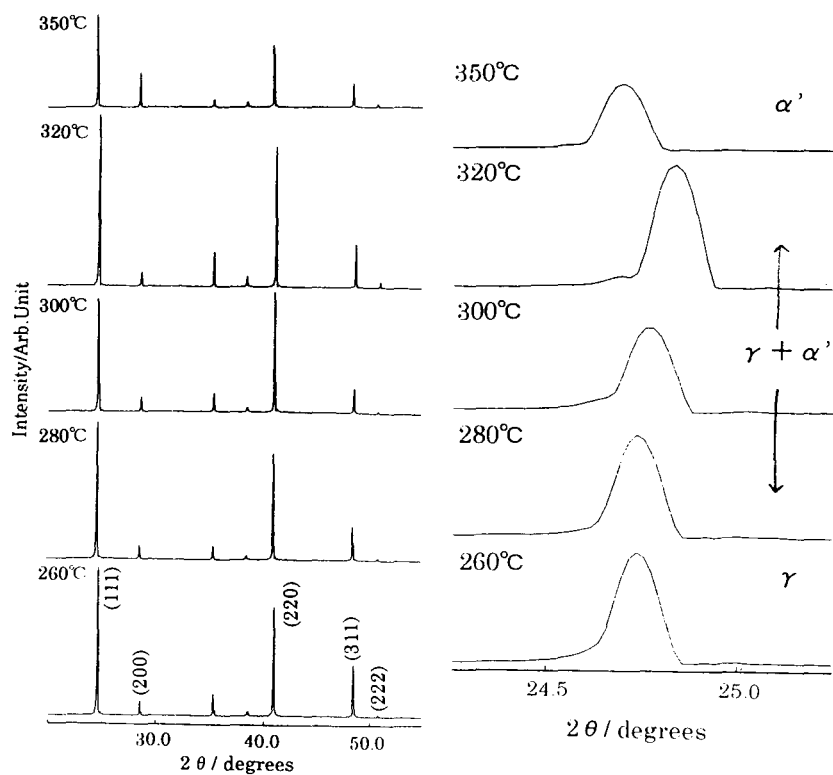
③ ^{63}Cu -NMR

Chemagnetics 社製 CMX-300 スペクトロメータを用い、観測周波数 79.12MHz、-100°C から 250°C の温度範囲で測定した。なお、ケミカルシフトは CuI を基準とした。

結果および考察

① 粉末 X 線回折

Fig.2 に $\text{Ag}_{0.3}\text{Cu}_{0.7}\text{I}$ の粉末 X 線回折パターンの γ 相から α' 相の温度変化を示す。これらの回折パターンは $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}\text{I}$ ($0.75 \leq x \leq 0.99$) で観測された相転移領域での結果と異なる。260°C の回折強度の結果は閃亜鉛鉱構造を示し、350°C 以上では、ピーク強度が急激に小さくなっている。つまり 350°C 以上で 200 面のピークが相対的に大きくなり、これは Cu、Ag の熱振動が I と比較して大きくなることと考えられる。



(a) 2θ : 20.00 – 55.00 degree

(b) 2θ : 23.00 – 25.25 degree

Fig.2 X-ray diffraction patterns of $\text{Ag}_{0.3}\text{Cu}_{0.7}\text{I}$.

これらの回折パターンから求めた格子定数の温度依存性を Fig.3 に示す。低温、高温で格子の膨張している温度領域をそれぞれ γ 、 α' 相とし、格子の縮小している温度領域を $\gamma + \alpha'$ 相と帰属した。これは Nolting の比熱により求められた相図^[3](Fig.1)とよく対応しており、Fig.2 の α' 相の温度領域における各ピークの強度も、日下部らの報告^[2]による α' 相とよく一致した。

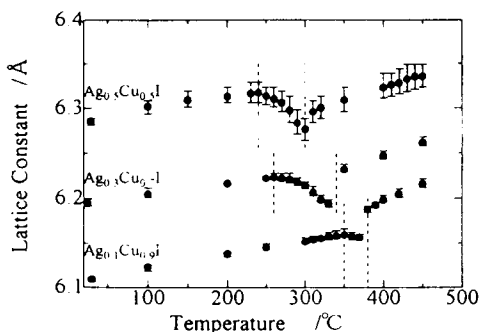


Fig.3 Temperature dependence of lattice constants of $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}$ ($0 \leq x \leq 0.5$).

②⁶³Cu-NMR

Fig.4 に $\text{Ag}_{0.1}\text{Cu}_{0.9}$ における ⁶³Cu スピン-格子緩和時間(T_1)の温度依存性を示す。室温以下の低温領域では、格子緩和速度は T^2 に比例するので、その緩和は格子振動に依存すると考えられる。室温からは徐々に T_1 が T^{-2} からずれ、150°C 以上で T_1 が急に短くなる。この緩和は Cu^+ の拡散によるものと考えられ、その活性化エネルギーは 40 kJ/mol と概算した。また 100°C 付近で minimum が観測された。

Fig.5 に $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}$ ($0 \leq x \leq 0.5$) の ⁶³Cu-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。各試料は温度上昇に伴い、ケミカルシフトが高磁場側にシフトすることがわかった。これは、温度上昇とともに格子振動あるいは格子の膨張が原因である。これについては Becker らの model^[4] とともに、筆者らの考え方によって解析する。また、室温付近から約 125°C の温度範囲でのケミカルシフトの急激な増加は、⁶³Cu の緩和機構の変化(線幅の減少、スピン格子緩和速度の温度依存性の違い)に対応している。

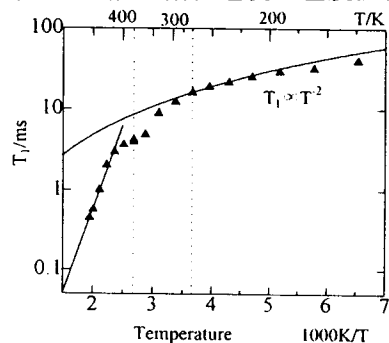


Fig.4 Temperature dependence of ⁶³Cu NMR T_1 in $\text{Ag}_{0.1}\text{Cu}_{0.9}$.

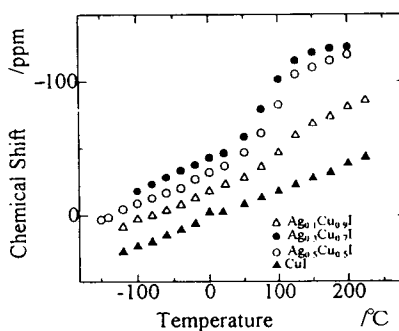


Fig.5 Temperature dependence of ⁶³Cu NMR chemical shift in $\text{Ag}_x\text{Cu}_{1-x}$ ($0 \leq x \leq 0.5$).

参考文献

- [1] 木村、水野、遠藤、須原、第 36 回 NMR 討論会要旨集、420(1997).
- [2] M. Kusakabe, Y. Ito, and S. Tamaki, *J. Phys. Soc. Jpn.* 65, 3220(1996).
- [3] J. Nolting: *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 68, 932(1964).
- [4] K. D. Becker, *J. Chem. Phys.* 68, 3785(1978).

(National Institute of Materials and Chemical Research)

O.B. Bandyopadhyay and S. Hayashi

Abstract: Vanadium-hydrogen-deuterium (V-H-D) alloys $\text{VH}_{0.6}\text{D}_{0.2}$ and $\text{VH}_{0.2}\text{D}_{0.6}$ have been prepared from the hydride $\text{VH}_{0.8}$ and the deuteride $\text{VD}_{0.8}$. ^1H spin-lattice relaxation time (T_1) measurements reveal that H atoms occupy only the octahedral sites in $\text{VH}_{0.8}$, both the octahedral and tetrahedral sites in $\text{VH}_{0.6}\text{D}_{0.2}$, and predominantly the tetrahedral sites in $\text{VH}_{0.2}\text{D}_{0.6}$. The temperature and frequency dependences of proton T_1 can be described by a modified form of BPP equation. The results suggest that in vanadium, H atoms undergo some kind of correlated motion. The mean residence times (τ_0) and the activation energies (E_a) of H diffusion under different host lattice conditions have been determined.

Introduction: Vanadium hydrides and vanadium deuterides have been extensively studied in the past [1]. It is known that hydrogen and deuterium occupy different sites in vanadium, leading to different phase diagrams. When the concentration of solute atoms is very low, hydrogen in vanadium diffuses faster than deuterium. Fukai and Kazama [2] studied hydrogen diffusion in β -VHx samples by NMR. The observed anomalous temperature dependence of ^1H spin-lattice relaxation time (T_1) was explained as a consequence of temperature dependent activation energy (E_a) of hydrogen diffusion. The diffusion of interstitial atoms depends on the condition of the host metal lattice which in case of vanadium can be modified in various ways by the presence of H and D atoms at different concentrations. Presently, we have been investigating V-H-D alloys by ^1H and ^2H NMR in order to know how hydrogen and deuterium affect each other in regard to their site occupancy and mobility in vanadium. Here we report mostly the results of ^1H NMR measurements.

Sample preparation and characterisation: Vanadium pure hydride ($\text{VH}_{0.8}$) and pure deuteride ($\text{VD}_{0.8}$) were mixed at different ratios and homogenised at an elevated temperature to obtain the VH_xD_y alloys as $\text{VH}_{0.6}\text{D}_{0.2}$ (hydrogen-rich), $\text{VH}_{0.2}\text{D}_{0.6}$ (deuterium-rich), and $\text{VH}_{0.4}\text{D}_{0.4}$ (equal amounts of hydrogen and deuterium). In the temperature range of our interest, $\text{VH}_{0.8}$ has a *bct* structure with hydrogen occupying the octahedral (O) sites, while $\text{VD}_{0.8}$ has a *bcc* structure in which deuterium mostly occupy the tetrahedral (T) sites. In the deuteride, below about 240 K, the interstitial D atoms form an ordered orthorhombic sublattice [1]. The x-ray powder diffraction studies on the VH_xD_y alloys show that at room temperature the hydrogen-rich alloy is *bct* as the pure hydride, and the

Keywords: Metal hydride, hydrogen, spin-lattice relaxation time, isotope effect, diffusion

deuterium-rich alloy is *bcc* as the pure deuteride. $\text{VH}_{0.4}\text{D}_{0.4}$ contains both *bct* and *bcc* phases and we will not discuss the results of this sample.

^1H NMR measurements: ^1H NMR measurements have been performed in V-H-D and $\text{VH}_{0.8}$ alloys at 30 MHz and 60 MHz in between 120-420 K. For a nucleus with spin $I = 1/2$, the spin-lattice relaxation rate can be expressed as,

$$(T_1)^{-1} = (T_{1d})_{II}^{-1} + (T_{1d})_{IS}^{-1} + (T_{1e})^{-1} \quad (1)$$

where $(T_{1d})_{II}^{-1}$ and $(T_{1d})_{IS}^{-1}$ are the contributions from the modulation of nuclear dipolar interactions between like spins (I-I) and unlike spins (I-S), respectively, and $(T_{1e})^{-1}$ arises from the fluctuation of hyperfine interaction between spin I and conduction electrons. At low temperatures where diffusion is sufficiently slowed down, only $(T_{1e})^{-1}$ is significant. We have determined T_{1e} at 77 K and made use of the Korringa relation, $T_{1e}T = \text{constant}$, in Eq. (1) to separate out the dipolar contribution,

$$(T_{1d})^{-1} = (T_{1d})_{II}^{-1} + (T_{1d})_{IS}^{-1} \quad (2)$$

The BPP equations which is often used to describe H diffusion in metal hydrides, is of the form,

$$(T_{1d})^{-1} \propto \tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2) \quad (3)$$

τ_c being the correlation time. For a thermally activated H diffusion process, τ_c follows the Arrhenius' relation, $\tau_c = \tau_0 \exp(E_a / kT)$, where τ_0 is known as the mean residence time at infinite temperature and E_a is the activation energy. The BPP equations predict that the plot of T_{1d} versus inverse of temperature will have a minimum where $\omega \tau_c \approx 1$, and will be symmetric over the minimum. Moreover, these equations also predict ω^2 dependence of T_{1d} at low temperatures where $\omega \tau_c \gg 1$.

Fig. 1 shows the observed proton T_1 at 30 MHz in $\text{VH}_{0.8}$ and V-H-D samples. It is readily observed that T_1 behaviour and therefore the hydrogen motion in deuterium-rich $\text{VH}_{0.2}\text{D}_{0.6}$ is different from that in $\text{VH}_{0.8}$ in which H atoms occupy O sites. In hydrogen-rich $\text{VH}_{0.6}\text{D}_{0.2}$, below about 200 K the decay of ^1H magnetisation can be expressed as a sum of two components showing the presence of H atoms in two types of environments. It would be justified to suggest that in $\text{VH}_{0.2}\text{D}_{0.6}$, which is *bcc*, H atoms occupy mainly the tetrahedral (T) sites as do the D atoms. In $\text{VH}_{0.6}\text{D}_{0.2}$, H atoms occupy octahedral (O) sites mainly, but below 200 K, a small fraction of H atoms occupy T sites where their mobility gives rise to the short component of T_1 .

However, it is readily observed that in no case, T_1 curves are symmetric over the minimum, and also in every case there is a pronounced deviation from the low temperature ω^2 proportionality. In order to describe our T_1 data, we have rewritten the BPP equations by modifying the spectral density function as [3],

$$J(\omega) \propto \tau_c / (1 + \omega \tau_c)^{1+\alpha} \quad (4)$$

The equation for $(T_{1d})^{-1}$ then becomes,

$$\begin{aligned} (T_{1d})^{-1} &= (T_{1d})_{HH}^{-1} + (T_{1d})_{HV}^{-1} \\ &= C\gamma_i^2 \left[\frac{2}{3} M_{HH} \left[\frac{0.5\tau_c}{1 + (0.5\omega\tau_c)^{1+\alpha}} + \frac{2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^{1+\alpha}} \right] \right. \\ &\quad \left. + M_{HV} \left[\frac{0.5\tau_c}{1 + \{(1 - \gamma_s / \gamma_l)\omega\tau_c\}^{1+\alpha}} + \frac{1.5\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^{1+\alpha}} + \frac{3\tau_c}{1 + \{(1 + \gamma_s / \gamma_l)\omega\tau_c\}^{1+\alpha}} \right] \right] \end{aligned} \quad (5)$$

Since only ^1H spins are mobile, we have put $\tau_{HV} = \tau_c$, so that $\tau_{HH} = 0.5\tau_c$. M_{HH} and M_{HV} are the second moment contributions from ^1H - ^1H and ^{51}V - ^{51}V interaction respectively.

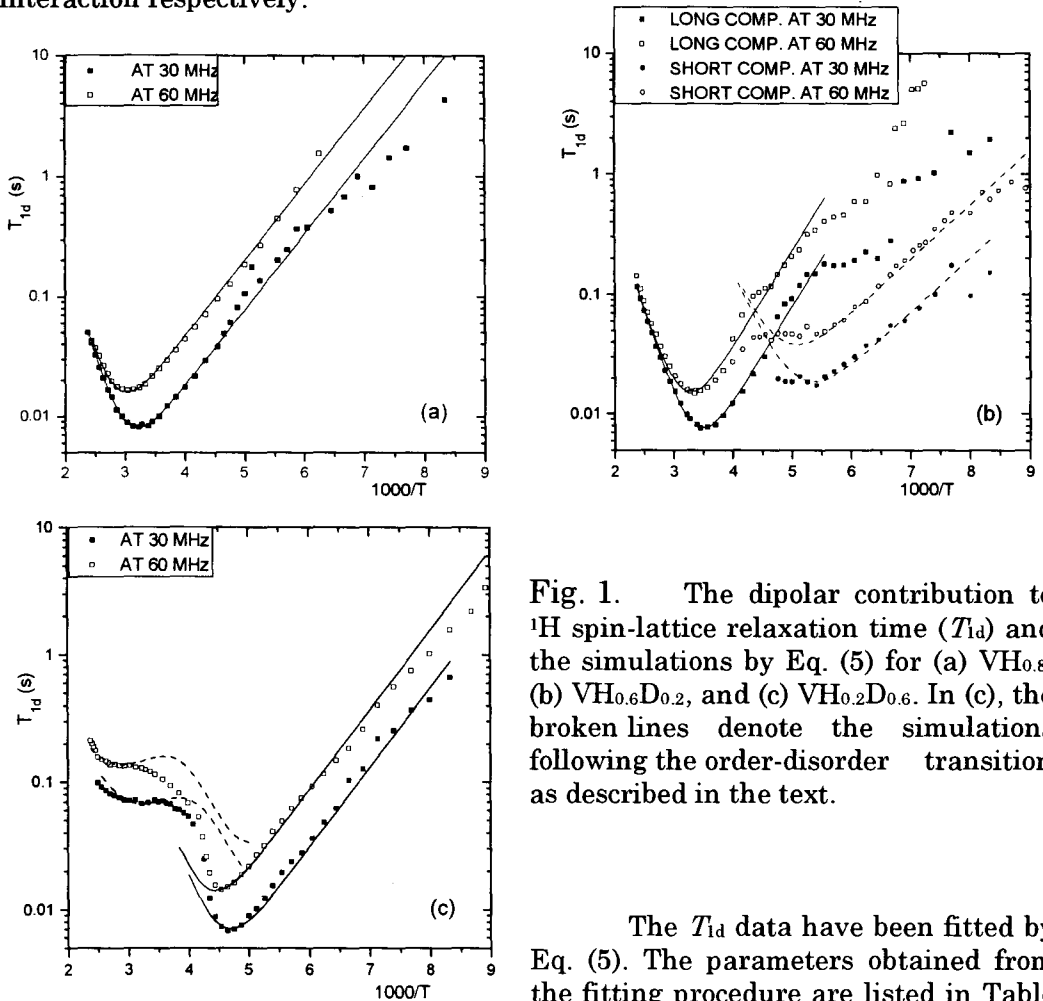


Fig. 1. The dipolar contribution to ^1H spin-lattice relaxation time (T_{1d}) and the simulations by Eq. (5) for (a) $\text{VH}_{0.8}$, (b) $\text{VH}_{0.6}\text{D}_{0.2}$, and (c) $\text{VH}_{0.2}\text{D}_{0.6}$. In (c), the broken lines denote the simulations following the order-disorder transition as described in the text.

The T_{1d} data have been fitted by Eq. (5). The parameters obtained from the fitting procedure are listed in Table 1. The factor C which can be seen as a multiplication factor to the theoretical second moment was adjusted in order to make the minimum of the simulated curve coincide with the experimental T_{1d} minimum. Thus, the value of C in a particular simulation might signify the

fraction of total H atoms participating in the corresponding motion at any instant. C is between 0.35 to 0.45 for the motion in octahedral (O) sites. But in case of the short component of T_1 in $VH_{0.6}D_{0.2}$, C is only 0.15, indicating that only a small fraction of H atoms occupy the tetrahedral (T) sites. The values of α , between 0.38 and 0.55, indicate a significant departure from isotropic diffusion. Alternatively, a kind of correlated motion, in which a jump of one H atom is simultaneous with a jump of another neighbouring H atom, may be envisaged. The activation energy (E_a) for $VH_{0.8}$ is 0.33eV and τ_0 is 5×10^{-14} s. These values may be compared with 0.29 eV and 5×10^{-14} s for E_a and τ_0 respectively, found in $VH_{0.736}$ by Fukai and Kazama [2], though they adopted a treatment very different from the present one to analyse their data. For the H motion in T sites at low temperature, both E_a and τ_0 yield smaller values than those in O sites.

In $VH_{0.2}D_{0.6}$, the H motion underwent a drastic change following the order-disorder transition of orthorhombic D sublattice. The qualitative behaviour of the motion that arose in this situation was simulated by assuming that following the transition, τ_0 of the existing motion was reduced to only about 20 % of its original value, and a new motion with a much longer τ_0 and smaller E_a was superimposed on it. The observed relaxation rate was the weighted sum of the relaxation rates caused by these two motions.

Table 1. Parameters of H atom diffusion in the specified sites in $VH_{0.8}$ and V-H-D alloys obtained by fitting T_{1d} with the Eq. (5). Also given are the values of Korringa constant ($T_{1e}T$) measured at 77 K.

Sample	H site	$T_{1e}T$ (sK)	τ_0 (s)	E_a (eV/atom)	α	C
$VH_{0.8}$	Oct.	150	5×10^{-14}	0.33	0.38	0.35
$VH_{0.6}D_{0.2}$	Oct.	174	6×10^{-14}	0.29	0.55	0.4
	Tetr.		2×10^{-14}	0.21	0.43	0.15
$VH_{0.2}D_{0.6}$	Tetr.	192	10^{-14}	0.25	0.5	0.45
	Tetr.		10^{-11} ^a	0.18 ^a	0.5 ^a	0.45 ^a

^a parameters of the newly appearing H motion which at high temperature is superimposed on the existing one, as described in the text.

We have also performed 2H NMR measurements on the same V-H-D samples and on $VD_{0.8}$ to study deuteron site occupancy and mobility. A detail description will be published later.

References:

- [1] Topics in Applied Physics, Vol. 28 and 29, ed. G. Alefeld and J. Volkl, Springer-verlag 1978.
- [2] Y. Fukai and S. Kazama, Acta Metallurgica 25 (1977) 59.
- [3] Cl. Ritter and W. Muller-Warmuth, J. Chem. Phys 83 (1985) 6130.

東工大・生命理工 ○浅川直紀, 櫻井 実, 井上義夫, 東工大・資源研 山本隆一

Solid State NMR study of Regio-regulated π -Conjugated Polymers

Naoki Asakawa¹, Minoru Sakurai, Yoshio Inoue, Takakazu Yamamoto
 Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology
 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan
 phone:045-924-5796, FAX:045-924-5827, email:naasakawa@bio.titech.ac.jp

Abstract: ¹³C solid state NMR measurements of π -conjugated polymers, regio-regulated poly(3-alkylthiophene-2,5-diyl)(P3RTh) and poly(4-alkylthiazole-2,5-diyl)(P4RTz) were performed. It was found that the powdered poly(4-methylthiazole-2,5-diyl)(P4MeTz) film involves two electronically distinct methyl-groups while the x-ray crystallographic study indicates that there exists only one conformer in the unit cell. The two compositions would be attributable to the signal from the crystalline phase and disordered phase, respectively. Chemical shift anisotropy parameters and molecular mobility of the methyl-groups in P3MeTh and P4MeTz were investigated as well, by the two dimensional spin-echo (2DSE) technique.

I. はじめに

π 共役系高分子は機能性高分子材料として、また擬一次元金属を扱う物性物理学の分野において注目されており、実験的または理論的研究が行われてきている。さらに、 π 共役系高分子はレドックス挙動や導電性のみならず、フォトルミネセンス(PL)や三次高調波の非線形光感受率($\chi^{(3)}$)の測定から興味深い光学的性質をもつことが近年わかってきており、高速オプトエレクトロニクス材料としても期待されている。しかし、電子的・光学的物性の物理化学的あるいは電子構造学的解明は不十分であり、機能発現機構の解明が望まれている。Su-Schrieffer-Heeger がポリアセチレンのソリトンモデル(SSHモデル)を発表して以来、 π 共役系の物性理論は急速に発展し、poly(p-phenylene)(PPP)やpoly(pyrrole)(PPr)やpoly(thiophene)(PTh)のようなキノイド構造を形成することができる物質ではドーピングによりポーラロン・バイポーラロンを形成することが明らかになっている。さらに最近では、 π 共役系高分子の非線形光学的性質が明らかになるにつれて $\chi^{(3)}$ の理論計算の試みもなされつつある。特に、Abe と Su ら¹、Harigaya ら²のソリトン・ポーラロン・バイポーロン格子状態におけるエキシトン(励起電子とホールの対)の概念の導入による光吸収スペクトルの解釈は興味深い。その理論計算によると、ポリ(p-フェニレンビニレン)(PPV)において、共役系高分子の鎖長とソリトン濃度が非線形光学応答特性を決める重要な因子であるとしている。

山本らは、有機金属錯体モノマーを用いた脱ハロゲン化重縮合法により、regio-regularityを制御したいくつかの複素環を有する π 共役系ポリマーの合成を行ってきた。ポリ(3-アルキルチオフェン-2,5-ジイル)(P3RTh)やポリ(4-アルキルチアゾール-2,5-ジイル)(P4RTz)(Fig.1参照)はUV-vis-PL- $\chi^{(3)}$ 測定から分子間 π - π 相互作用が光学的物性を決定している重要な要因であると考えられる実験結果が得られている。³このように、共役系高分子の鎖長やソリトン濃度のみでなく、分子間相互作用も重要な因子であることが明らかになりつつある。

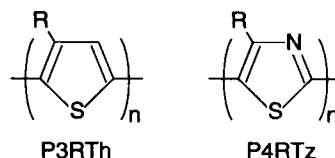


FIG. 1. Molecular structures of poly(3-alkyl thiophene -2,5-diyl) and poly(4-alkylthiazole -2,5-diyl).

P3RTh と P4RTz は結晶状態において、主鎖は s-trans 構造を形成し、アルキル鎖が分子間で end-to-end パッキングすることにより、複素環同士の face-to-face π スタッキングが形成されていることがオリゴマーの単結晶を用いた X 線回折からわかっている。高分子量のものにおいても face-to-face π スタッキングをしていることが示唆されている。しかし、側鎖のアルキル基がメチル基の場合、すなわち P3MeTh の場合には、結晶格子は Face-Centered Lattice となり、 π スタッキングは staggered 構造をとることが示されてきている。この staggered 構造は HT-P3MeTh-*rand*-P3MeTh 共に形成されていると考えられている。

分子間 π - π 相互作用の強さは固体中における高分子鎖間のパッキングと密接な関係にあり、高分子固体薄膜の電子状態に関する情報が物性解明には必要不可欠である。固体 NMR 法はこのような分子間相互作用を調べる上で有用な知見を与える可能性をもっている。そこで、regio-regularity (HH:head to head, HT:Head to tail, *rand*:random)を制御した P3RTh や P4RTz などの π 共役系高分子の電子構造や分子構造を固体 NMR により調べ、分子間相互作用に関する知見を得ることを目的として研究を行っている。

II. 実験と理論計算

固体¹³C CPMAS NMR 測定は二重共鳴 MAS プローブを装着した JEOL JNM-GSX270 にて行った。rf 強度は¹H-¹³C チャンネル共に 50kHz であった。

¹ π 共役系高分子、ポリ(3-アルキルチオフェン)、ポリ(4-アルキルチアゾール)、固体 NMR あさかわなおき、さくらいみのる、いのうえよしお、やまもとたかかず

MAS 回転は 3.0kHz で行った。磁気遮蔽定数計算は GIAO(gauge invariant atomic orbital)-CHF(coupled Hartree Fock) 法により行った。計算には分子研の NEC SX-3 上で *Gaussian 94* を用いた。

III. 結果と考察

FIG. III に HH-P4MeTz、HT-P3MeTh、*rand*-P3MeTh の ^{13}C CPMAS NMR スペクトルを示す。スペクトルよりメチル炭素の等方平均化学シフトがそれぞれ、20.1ppm(肩ピーク 17ppm), 15.0ppm, 15.0ppm であることがわかった。X 線回折の結果より、HH-P4MeTz の単位胞には単一の構造をもつモノマーユニットのみが存在していることが示唆されていたが、今回我々は固体 NMR 測定により電子環境の異なる二種類のメチル炭素が存在していることを見出した。今回新たに観測された構造は X 線回折でははっきりとした回折パターンを示していないことから非晶成分である可能性が高い。P4MeTz などの π 共役系高分子は主鎖構造が *s-trans* となり剛直な平面構造を形成した高分子が層状秩序構造を形成する傾向があることが知られているが、非晶成分は平面構造からねじれた構造となり、乱れた層状構造を形成している可能性がある。複素環同士のコンホメーションのねじれ角は近傍の複素環同士の立体障害のポテンシャルとの競合によって決まってくるので、サーモクロミック効果が観測されると考えられる。この点については現在検討中である。

HT-および *rand*-P3MeTh は ^{13}C CPMAS スペクトルからそれぞれメチル炭素がそれぞれ一種の化学シフト値をもつことがわかる。しかし信号の半値幅から、*rand* 体は HT 体に比べ半値幅が大きく Chemical Shift Dispersion(CSD) がより大きいことがわかる (*rand* 体:264Hz(FWHM), HT 体:106Hz)。

当初、P4MeTz と P3MeTh のメチル炭素の化学シフト差 (約 5ppm) はメチル炭素と複素環との結晶中での相対的な配置の違いから生じる反磁性電流の効果のためであると考えた。しかし、P4MeTz と類似の *face-to-face* π スタッキングを形成するポリ(3-ヘキシル-チオフェン-2,5-ジイル)(P3HexTh) の ^{13}C CPMAS 測定から側鎖の α 炭素 (メチレン炭素) の化学シフトが他のメチレン炭素のものとは比べ低磁場側へ大きくはシフトしていない (約 2ppm) ことから、メチル炭素の化学シフトを環電流の効果のみによって説明することは難しいのではないかと考えられる。この 5ppm のシフト差の原因を解明するためには化学シフトテンソル主値の決定し、三次元的な結晶場と関連付けて考える必

要がある。そこで、 ^{13}C CP-static 測定や二次元スピンエコー測定⁴を行った。その結果から、HH-P4MeTz の方が HT-P3MeTh や *rand*-P3MeTh よりもメチル炭素の CSA が小さくなった。現段階では、メチル基の回転運動が凍結しているかどうかはわからないが、これまでの他の系での研究から判断すると室温条件下でメチル基回転運動が凍結しているとは考え難い。しかし、回転拡散の場合に起こる化学シフトテンソルの平均化による軸対称化がみられなかったため、この系のメチル基の回転は 3 サイトジャンプのようなホッピング運動である可能性が高い。この現象は、ポリ(L-アラニン)の粉末サンプルにおいて、 CH_3 基の ^{13}C 化学シフトテンソルが C_{3v} 軸に関する 3 サイトジャンプ運動を行っているにもかかわらず、化学シフトテンソルが平均化されないという我々の結果⁵に似ている。

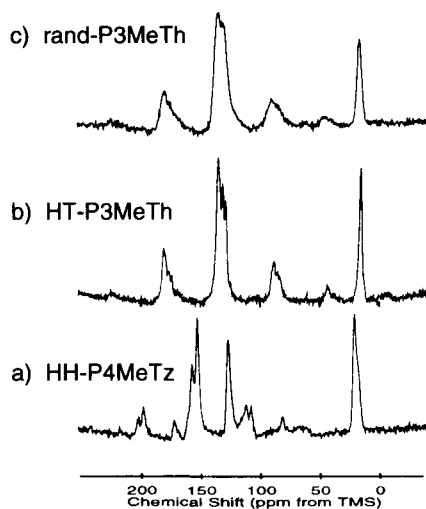


FIG. 2. 67.94MHz ^{13}C CPMAS NMR Spectra for HH-Poly(4-methyl-thiazole-2,5-diyl) [HH-P4MeTz] (a), HT-Poly(3-methyl-thiophene-2,5-diyl) [HT-P3MeTh] (b), and *rand*-P3MeTh, respectively.

¹ S.Abe et al., *Phys.Rev.*, **45**, 9432(1992) など。

² K.Harigaya, *J.Phys.:Condens. Matter*, **7**, 7529(1995) など。

³ T.Yamamoto et al., *J.Am.Chem.Soc.*, **120**, 2047(1998)。

⁴ Kolbert et al., *J.Chem.Phys.*, **90**, 679(1987)。

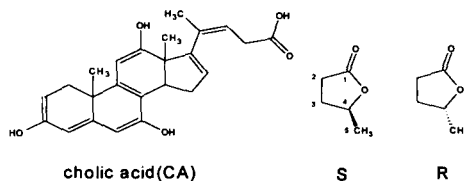
⁵ N.Asakawa et al., *Magn.Reson.Chem.*, in press.

Multi-dimensional correlation NMR study of molecular sequential alignment of γ -valerolactone enantiomers enclathrated in the cholic acid host

(Kyoto Univ.) S. Nakamura, K. Takegoshi, F. Imashiro, T. Terao

The alignment of guest molecules in solid one-dimensional inclusion compounds of the cholic acid/ γ -valerolactone was studied by ^{13}C solid-state NMR methods. A high-resolution solid-state ^{13}C CPMAS NMR spectrum exhibits four $^{13}\text{CH}_3$ peaks of γ -valerolactone. By examining ^{13}C 2D exchange NMR spectra, we assigned these to four enantiomers, R-axial, R-equatorial, S-axial and S-equatorial, enclathrated in the host. Further, these enantiomers coexisted microscopically in the cholic acid channels. The sequential alignment of four enantiomers in host channel was performed by ^{13}C multidimensional spin diffusion experiments.

コール酸 (CA) は γ -バレロラクトン (γ -Val) の R 体と S 体を見分けて包接化合物 (CA/ γ -Val) を作り、包接された R 体と S 体の比率は R : S = 2 : 1 であることが示されている。また、今城ら^[1]は CA/ γ -Val の固体高分解能 ^{13}C -NMR スペク



トルを測定し、2 : 1 の面積比を持つ二本のメチルピークを得た。彼らは SASS 法を用いて二つのメチル基の化学シフト異方性は異なっている、つまり、コンフォメーションに違いがあることを示した。さらに、ab initio GIAO 法による計算を行い、この化学シフト異方性の違いは axial と equatorial のコンフォメーションに由来するものであり、axial のコンフォメーションの方がより安定で、equatorial よりも高磁場の化学シフト等方値を持つことを示した。したがって、2本のメチルピークの内、高磁場側の面積の大きい方が R-axial で、低磁場側の小さいピークは S-equatorial と帰属された。この結果は γ -Val の光学分割は R と S のコンフォメーションの違いによって起こっていることを示唆している。

CA/ γ -Val は CA チャンネル中に一次的に並んでいることが分かっている。我々は、R 体と S 体の一次的配列を分子間の ^{13}C - ^{13}C スピン拡散を用いて決定できるのではないかと考えた。図 1 に 400MHz 磁場中で測定した CPMAS スペクトルを示した。以前は二本に見えていたピークが実際には 4 本あることが示された。これらのピークを帰属するために ^{13}C - ^{13}C 双極子相関二次元 NMR スペクトルを測定したところ、すべてのピーク間でスピン拡散によるクロスピークが観測された。この

key word: 多次元相関 NMR 法、光学分割、スピン拡散、配列、包接化合物

なかむら しんじ、たけごし きよのり、いましてろ ふみお、てらお たけひこ

ことはこれらのメチル基ピークが包接された γ -Val に属していること示している。そこで、我々は新たに観測された二本のピークを包接されないと思われていたS-axial とR-equatorial であると考えた。同じコンフォメーションの化学シフトが僅かに違っているのはS体とR体ではホスト CA との相互作用が異なり、構造が異なっているためではないかと考えている。また、4種類の γ -Val 間で生じたクロスピーク強度はそれぞれ異なる交換時間依存性を持っていることが分かった。このことは4種類の γ -val の一次元的な配列がランダムではないことを示唆していると思われたので、スピン拡散実験を行った。結果を図2, 3に示す。図2のような初期磁化を作り、ある交換時間だけ待った後に観測されたそれぞれのピークの面積をプロットしたのが図3である。交換速度を見積もるために単一指数関数でフィットしたところ高磁場側から速度として、 0.37 s^{-1} , 0.47 s^{-1} , 0.56 s^{-1} , 0.72 s^{-1} と得られ、それぞれが異なる交換速度を持っており、この結果もランダムな配列を否定している。これらのデータのさらに具体的な配列モデルに基づいた解析は当日報告する。また、一次元的な配列は時間次元を区切った ^{13}C 多次元交換NMR法により測定可能であると考えられ、現在測定を行い、一次元実験の結果と合せて検討を行っている。

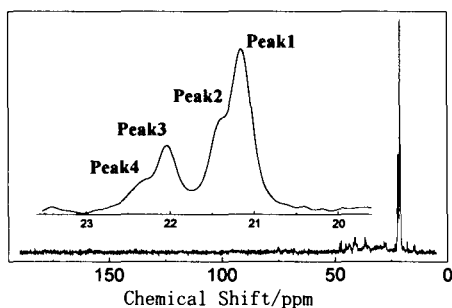


Fig.1 A ^{13}C CPMAS srectrum of cholic acid/[5- ^{13}C] γ -valerolactone inclusion compounds. The inset is an expanded methyl region.

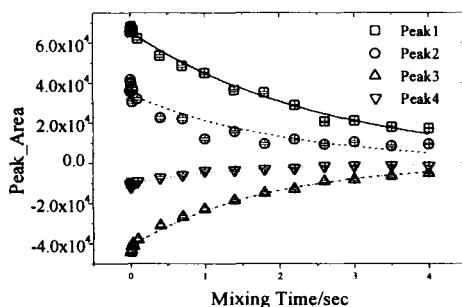
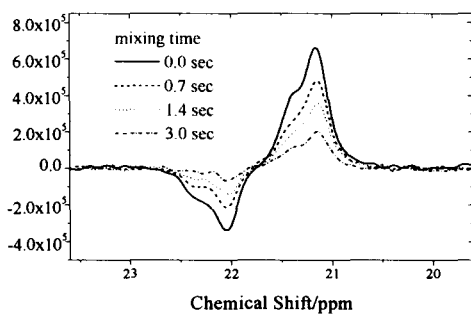


Fig.2 (Left)Observed 1D-exchange spectra for $^{13}\text{CH}_3$ of γ -valerolactone enclathrated in cholic acid. Spectra at different mixing times are are shown. (Right)Plots of the spin diffusion data. Each symbol, \square , \circ , \triangle or ∇ , represents peak area of respective peak in Fig.1. Each the line through the data points is the "best fit" curve to a single exponetial function.

reference

1. F. Imashiro, D. Kuwahara and T. Terao, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1993)

P112

固体高分解能NMRによるヒトカルシトニン繊維形成機構の解明

(¹姫路工大理、²日本チバガイギ国際研究所)

○上平 美弥¹・内藤 晶¹・大城 由紀¹・辻 暁¹・
野坂 篤子²・斉藤 肇¹

Mechanism of Fibrillation Process of Human Calcitonin by High Resolution Solid State NMR

¹Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

²International Research Laboratories, Ciba-Geigy Japan Ltd.

○Miya Kamihira¹, Akira Naito¹, Yuki Oshiro¹, Satoru Tuzi¹, Atsuko Nosaka² and Hazime Saitô¹

Conformational changes during fibril formation were investigated by ¹³C high resolution solid state NMR spectroscopy. In the fibril formation, a conformational change from α -helix to β -sheet was observed at the vicinity of Gly¹⁰ in acetic acid solution (pH3.3) as viewed from ¹³C chemical shift of the carbonyl carbons in the DD- and CP-MAS spectra. At the same time, the conformational changes from random coil to β -sheet were observed at Phe²², Ala²⁶ and Ala³¹, respectively. The conformation of the fibril prepared at pH7.5 exhibited β -sheet at the central region and random coil at the C-terminus region. It was suggested that not only the hydrophobic interaction but also an electrostatic one plays an important role to cause the association of hCT molecules.

序

カルシトニン(CT)は、32残基からなるペプチドホルモンで、Cys¹-Cys⁷間のS-S結合と、C端のアミド構造をもつ(図1)。生体中では主に、ミネラルの骨細胞からの流出を防ぐ働きをもつ。しかし、ヒトカルシトニン(hCT)は水溶液中で容易にフィブリルを形成し沈殿するために、臨床上の欠点となる。こうしたフィブリル形成による沈殿現象は、アルツハイマー病におけるアミロイド斑にもみられることから、hCTのフィブリル化機構を明らかにすることにより、アミロイド化の解明に対しても知見を与えると考えられる。本実験では、部位特異的に¹³C標識したhCTを合成し、酢酸水溶液中(pH3.3)、および酢酸ナトリウム水溶液中(pH7.5)での繊維形成にともなう局所的な2次構造変化を解析し、pHの違いによるフィブリル形成機構、および構造の違いを明らかにした。

ヒトカルシトニン、アミロイド化、構造転移、固体高分解能NMR

かみひら みや、ないとう あきら、おおしろ ゆき、つじ さとる、のさか
あつこ、さいとう はじめ

れ高磁場側に1.9, 1.3ppm
ずつシフトし、 β -シート構
造へ構造変化したことが明
らかになった (図 2B)。
Ala²⁶、Ala³¹のメチル信号
については、溶液中に近い
ランダムコイルの状態と、
 β -シート構造の両方が共存
することが明らかになった。
¹³C化学シフト値とその帰
属を表 1 にまとめる。

¹³C CP-MASスペクトル
で観測された信号強度の変

化を時間に対してプロットすると、2段階反応の様式を示した (図 3)。その
反応は、一段階目の均一な分子反応による核形成過程 (A→B) と、自己触媒
反応である第二段階 (A+B→2B) からなる。ここで、DD-MASスペクトルで
観測されたモノマーのhCTの信号を“A”、CP-MASスペクトルで観測されたフィ
ブリン化hCTの信号を、“B”と帰属し反応速度の解析を行った。この結果、
Gly¹⁰、Phe²²の二種類のカルボニル信号強度の変化から求めた第一段階(k_1)、
および第二段階(k_2)の反応速度は、最小二乗フィッティングにより、それぞれ
 $k_1=2.71 \times 10^{-8}$, 3.28×10^{-6} , $k_2=1.05 \times 10^{-3}$, $2.04 \times 10^{-3}/s^{-1}$ と求められた。溶液がゲ
ル化しはじめCP-MASスペクトルが観測されるまでに要した時間 (k_1 に依存)
は、それぞれの標識試料で大きく異なったが、核形成後のフィブリン化過程で
は反応速度はほぼ同じであることが判明した。

Table 1: ¹³C chemical shifts (ppm from TMS) and the assignments.

	pH 3.3		pH 7.5
	solution	fibril	fibril
Gly ¹⁰ C=O	171.8 α -helix	169.9 β -sheet	169.1 β -sheet
Phe ²² C=O	171.4 random coil	170.1 β -sheet	168.8 β -sheet 171.5* random coil
Ala ²⁶ CH ₃	16.9 random coil	16.9 random coil 19.3 β -sheet 21.3 β -sheet	18.7 β -sheet
Ala ³¹ CH ₃	17.2 random coil	17.3 random coil 19.7 β -sheet	17.0 random coil 18.8* β -sheet

*: minor peaks

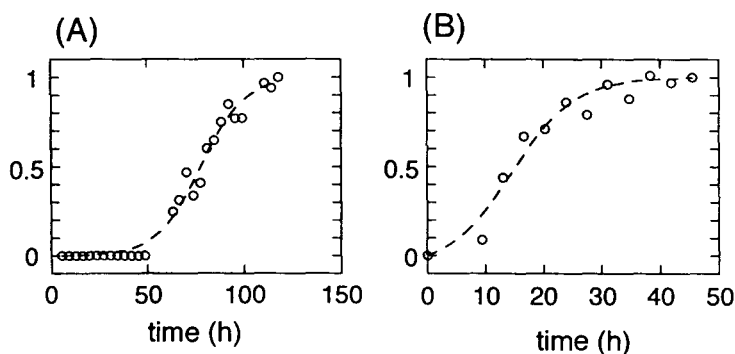


Fig. 3 Plots of (A) [1-¹³C]Gly¹⁰, (B) [1-¹³C] Phe²² peaks in the ¹³C CP-MAS spectra. The vertical line indicates fraction of formed fibril after normalizing the respective intensities observed at 118h and 45.5h after dissolution.

2. pH7.5で生成したフィブリルの観測

酢酸ナトリウム水溶液(pH7.5)中で生成したフィブリルの沈殿について、¹³C CP-MASスペクトル測定を行ったところ、Gly¹⁰、Phe²²のカルボニル信号が169.1、168.8 ppm、Ala²⁶、Ala³¹のメチル信号についてはそれぞれ18.7、17.0 ppmに得られた(図2C、表1)。Gly¹⁰、Phe²²についてはβ-シート構造に帰属されるが、Ala²⁶、Ala³¹についてはランダムコイルとβ-シート構造の中間の値を示した。これらの¹³C化学シフト値は、pH3.3で生成したフィブリルで観測された値と大きく異なり、またPhe²²以外の共鳴線の線形が先鋭であることから、いづれの位置においてもフィブリルの二次構造がpH3.3で生成したものと大きく異なることが明らかになった。

3. hCTのフィブリル化機構

水溶液中ではhCT中央部がα-ヘリックスを形成し²⁾、それが両親媒性となることが報告されている³⁾。また、pH7.5ではpH3.3よりフィブリルの形成速度が速いことが報告されている⁴⁾。以上の報告、および本研究の結果をもとにhCTのフィブリル化機構について考察する。pH7.5では、Asp¹⁵側鎖が負に、Lys¹⁸側鎖が正に荷電するので、hCTは中央ヘリックス部位の分子間静電相互作用により引き合い、その後中央部がα-ヘリックス→β-シート転移を起こすことで逆平行β-シートが成長してフィブリルが形成される。一方pH3.3では、Lys¹⁸、His²⁰が正に荷電するので、静電相互作用はむしろ斥力として働き、中央部の両親媒性ヘリックスの疎水性部分どうしが疎水的相互作用で会合することでα-ヘリックス→β-シート転移が起こりフィブリルが形成されると考えられる。このため、pH7.5ではpH3.3よりフィブリル形成速度が大きく、また得られたフィブリルの構造が均一となるため先鋭なNMR信号を与えることが考えられる。

1) Saitô, H. and Ando, I. (1989) *Annu. Rev. NMR Spectrosc.* 21, 209-290.

2) Jeon, Y.H., Kanaori, K., Takashima, H., Kosiba, T. and Nosaka, Y.A. 第18回 ICMRBS 講演予稿集 pp.61 (1998) 東京

3) Epand, R. M., Epand, R. F., Orłowski, R., Schlueter, R. J., Boni, L. T. and Hui, S.W. (1983) *Biochemistry* 22, 5074-5084.

4) Kanaori, K. and Nosaka, Y. A. (1995) *Biochemistry* 34, 12138-12143.

P113 固体 ^2D NMR によるペプチドおよびポリペプチドの水素結合の研究
(東工大) ○小野真之介、黒木重樹、安藤勲

Solid State ^2D NMR Study on Hydrogen-Bonding of Peptides and Polypeptides.

(Department of material science, Tokyo Institute of Technology)

S. Ono, S. Kuroki, and I. Ando

Static Solid State ^2D NMR spectra of glycine residue containing peptides were measured. By computer simulations of these spectra, the NMR parameters such as quadrupole coupling constant (e^2qQ/h) and electric field gradient asymmetry parameter (η) were determined. From these results, it was found that an increase in the N-H bond length leads to a linear decrease of nuclear quadrupole coupling constant. This result implies that the quadrupole coupling constant (e^2qQ/h) values gives useful information about the N-H bond length in the hydrogen bond of peptides and polypeptides.

1. 緒言

これまでに、私共は NMR 化学シフトを通して固体状態のペプチドおよびポリペプチドの水素結合周りの構造が理解できることを示してきた。例えば、カルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトおよびアミド窒素の ^{15}N 化学シフトと $\text{N}\cdots\text{O}$ 水素結合距離の間に相関関係があることがわかった。また、カルボニル酸素の ^{17}O NMR スペクトルから得られる核四極子結合定数(e^2qQ/h)が水素結合距離と相関関係があることがわかった。

本研究では、アミド水素を重水素置換したグリシン残基を含んだペプチドを調製し、その固体粉末 ^2D NMR スペクトルを測定した。そのスペクトルをコンピューターシミュレーションすることにより、核四極子結合定数(e^2qQ/h)および電場勾配の非対称パラメータ(η)を求め、水素結合周りの構造との相関関係を調べた。

2. 実験

固体 ^2D NMR スペクトルの測定は、Bruker 社製 DSX-300 分光器を用い、46.1MHz、室温で行った。繰り返し時間は 20sec、データポイントは 8K、スペクトル幅は 1052kHz である。積算回数は 40~200 回である。パルスシーケンスは、solid echo 法を用いた。

3. 結果と考察

Fig.1 に重水素化した GlyGly、AlaGly、GlyGly·HCl、GlyGly·HNO₃ の固体 ^2D NMR スペクトルを示す。これらのスペクトルをそれぞれスペクトルシミュレーションを行い、核四極子結合定数を求めた。核四極子結合定数(e^2qQ/h)は、GlyGly では 30.7kHz、AlaGly では 32.0kHz、GlyGlyHCl では 33.8kHz、GlyGlyHNO₃ では 35.0kHz と求めら

固体 ^2D NMR、四極子核、ペプチド、水素結合

おのしんのすけ、くろきしげき、あんどういさお

れた。この核四極子結合定数を N-H 結合距離に対してプロットしたものを Fig.2 に示す。 Fig.2 に示されるように、 N-H 結合距離が増加するにつれて核四極子結合定数 (e^2qQ/h) は、直線的に減少した。なお、グリシン残基を含んだポリペプチドに関しては、現在、実験が進行中であり講演で紹介する。

は、現在、実験が進行中であり講演で紹介する。

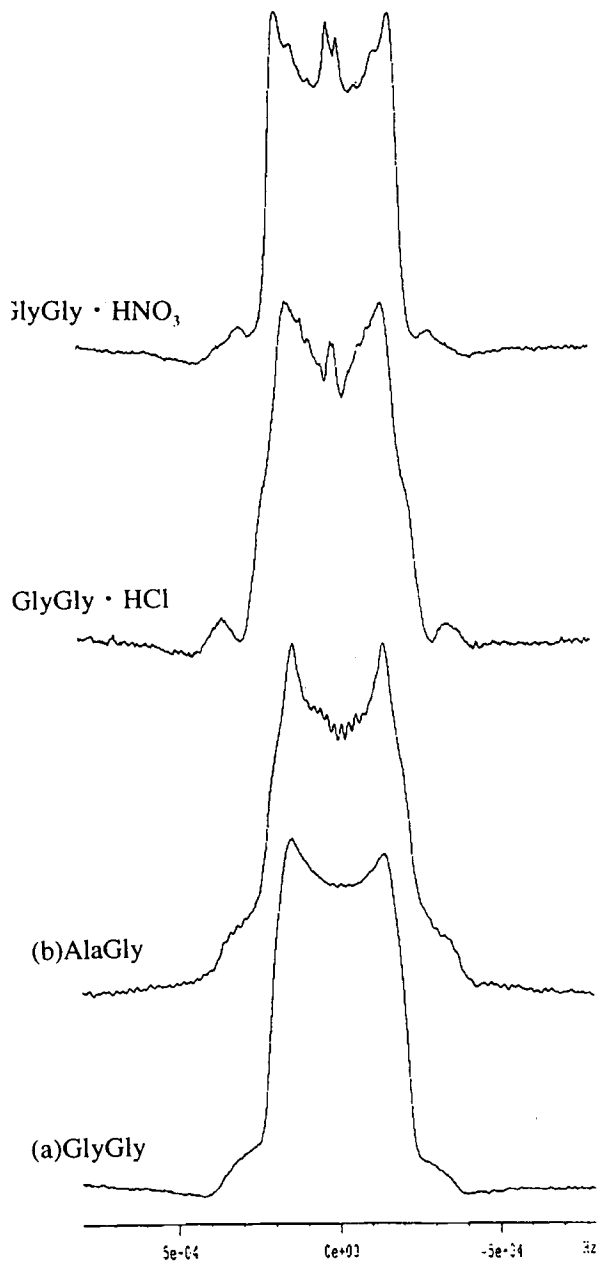


Fig.1 Deuterium spectra of GlyGly (a) , AlaGly (b) GlyGly · Hcl (c) , GlyGly · HNO₃ (d)

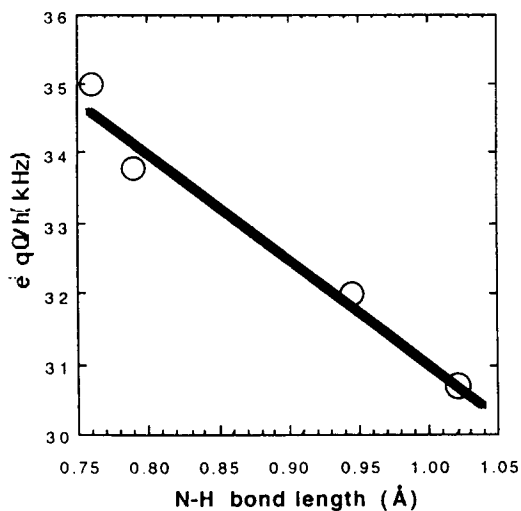


Fig.2 Plots of e^2qQ/h for amide N-D of peptides against N-H bond length.

化学種特異的 ^{31}P -NMR イメージング装置の開発

P114

(日立基礎研) ○田村 充、尾藤 良孝

An apparatus for Chemically Specific ^{31}P -NMR Imaging
M.Tamura and Y.Bito, Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

ABSTRACT: An apparatus for chemically specific ^{31}P -NMR imaging was developed. ^{17}O -decoupled ^{31}P gradient-echo signals showed imaging of ^{17}O -labeled phosphoric acid was feasible under conditions of (1) approximately 3ms TE and (2) a read-out gradient of 0.029 T/m for 1mm spatial resolution.

1.目的

生理条件での化学種特異的 ^{31}P -NMR 観測が可能になれば、代謝物濃度が定常状態にある生体エネルギー代謝系において特定化学種リン酸化合物の経時変化を選択観測することで、代謝機能や情報伝達に関わる生体情報を計測できる可能性がある。

そこで、我々は化学種特異的 ^{31}P -NMR 観測およびイメージングを目的として、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⁴⁾、モデル溶液試料を測定対象とする選択的 ^{31}P -NMR 観測を開始し⁵⁾、Z 軸傾斜磁場コイル内蔵の高分解能 ^{31}P - ^{17}O プロープ(Nalorac G-500B 特注品)を使用して ^{17}O 標識 ^{31}P -NMR イメージングに着手した。

今回は ^{17}O 標識リン酸化合物を測定対象として ^{31}P -NMR イメージングが実験可能であることを確認したので報告する。

2.方法

ブルカー社 AMX-500 の観測側 X-ch を ^{31}P 観測に、照射側 Y-ch を ^{17}O 励起に使用し、ASPECT 3000 から外部トリガを取り出して任意波形発生器(HP 33120A)で傾斜磁場パルス波形を発生し、定電流増幅器(NF 4510, DC~20kHz, $\pm 7.5\text{A}$)で増幅してプロープ内 Z 軸傾斜磁場コイルに印加した。傾斜磁場波形はあらかじめパソコンで定義して転送した。傾斜磁場発生の評価には、5%v/v 25.7atom% $\text{H}_3\text{P}^{17}\text{O}_4/\text{H}_2^{17}\text{O}$ (Isotec, Inc.)を対称形マイクロ試料管(シゲミ BMS-005)に充填した試料を用いた。試料管の内管を移動して溶液の Z 軸方向の厚さを 10mm または 1mm に調節した。Fig.1 に試料管の断面図を、Fig.2(1)に信号観測に用いたグラジエントエコー法のパルス系列を示す。

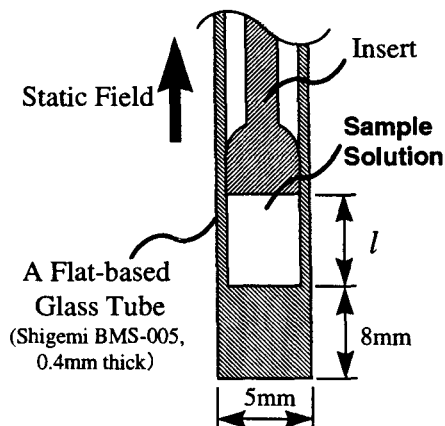


Fig.1 Cross section of the Sample Specimen

$l=10$ [mm] for experiments shown in Fig.2 and Fig.3, $l=1$ [mm] in Fig.4, respectively.

リン 31、酸素 17、イメージング

たむら みつる、 びとう よしたか

3.結果

試料厚さを 10mm に設定し、傾斜磁 G_1, G_2 をいずれもゼロとして FID を観測した後、 $G_1=+0.046$ [T/m], $G_2=-0.023$ [T/m] ($G_1:G_2=+2:(-1)$) に設定してグラジエントエコーを観測した。 $H_3P^{17}O_4$ の FID およびエコーの時間領域信号を Fig.2(2)(3) に示す。 G_2 を可変して取り込んだエコーの絶対値スペクトルを Fig.3 に示す。

次に試料厚さを 1mm に設定し、磁石中心に対して試料管を Z 軸方向に -1, 0, +1mm だけ移動してグラジエントエコーを観測した。周波数スペクトルを Fig.4 に示す。スペクトルの「すそ」の立ち上がりから周波数分解能は 500Hz 程度と見積もられ、Fig.3(3)における ^{17}O 標識 ^{31}P -NMR イメージングの空間分解能は約 0.25mm だった。再結像時間 $TE=3ms$ の条件で、空間分解能 1mm 相当の read-out 傾斜磁場強度は 0.029T/m であり、0.05T/m 程度の傾斜磁場を発生可能な 1H -NMR マイクロイメージング用傾斜磁場コイルを用いて、1mm オーダーの $\{^{17}O\}$ - ^{31}P NMR イメージングが可能であることが分かった。

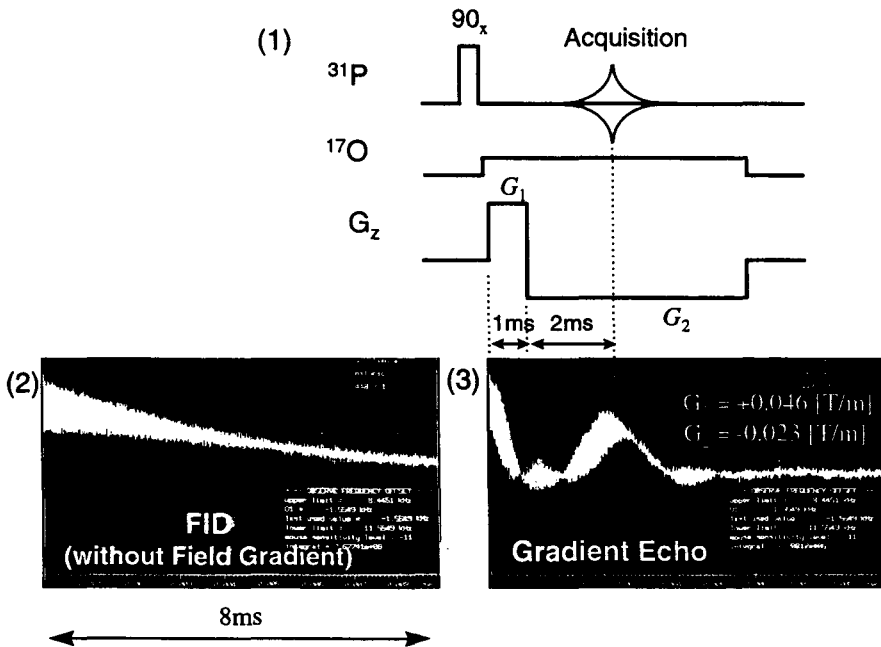


Fig.2 ^{31}P Gradient Echo experiments

(1) Pulse sequence (2) FID (3) Gradient-echo

Sample : 5%v/v 25.7atom% $H_3P^{17}O_4/H_2^{17}O$

References

- 1) 田村, 原田, 第 33 回 NMR 討論会要旨(1994)
- 2) 田村, 原田, 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, 第 35 回 NMR 討論会要旨(1996)
- 5) 田村, 第 36 回 NMR 討論会要旨(1997)

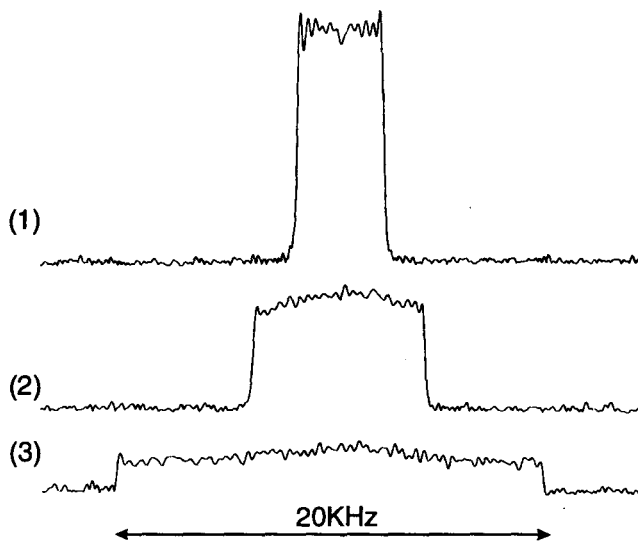


Fig.3 G_2 -dependence

(1) $G_2=0.02328$ [T/m] (2) $G_2=0.04656$ [T/m] (3) $G_2=0.1164$ [T/m]

Sample : 5%v/v 25.7atom% $H_3P^{17}O_4/H_2^{17}O$

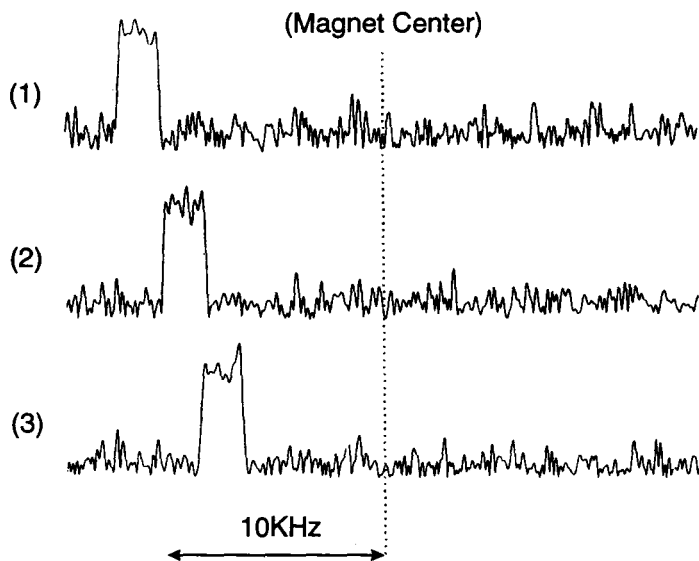


Fig.4 Gradient Field Profiles along Z-axis

$G_2=0.1164$ [T/m], $l = 1$ [mm]. The Sample tube was traveled at
 (1) -1mm (2) 0mm (3) +1mm, respectively, along z-axis.

P115

高磁場高圧高分解能NMR測定装置の開発と
シクロファンのNMRスペクトルに対する圧力効果

(神戸大理、神戸大院自然科学*) ○山田博昭、西川和義、室 文人、
渡邊愛子、西中満寿子、赤坂一之*

High Pressure High Resolution NMR at Very High Magnetic Field.

Effect of High Pressure on NMR Spectra of Paracyclophane.

Fac. Sci., Kobe University, The Graduate School of Sci. and Technol.,
Kobe University*.

Hiroaki Yamada, Kazuyoshi Nishikawa, Fumihito Muro,

Aiko Watanabe, Masuko Nishinaka, Kazuyuki Akasaka*.

We report here an improved version of the high pressure quartz cell assembly which has been designed for the experiments under very high magnetic fields (400 - 750 MHz spectrometers). An explosion test (a proof test) at 600 MPa (ca. 6000 atm) has been done for a typically made quartz cell settled in a PTFE safety jacket. The jacket proved to withstand the explosion. Employing this high pressure technique, the pressure dependence of cis-1,12-dimethoxy[12]paracyclophane spectra has been studied up to 450 MPa.

1. 高圧NMR装置¹(Fig. 1 参照のこと)

合成石英が極めて高い引っ張り強度($>210 \text{ kg mm}^{-2}$)を有することに注目し、従来のパイレックスガラス(強度 = $30\sim40 \text{ kg mm}^{-2}$)にかわる高圧セルの新材料として用いることを試みた。まず o. d. / i. d. (外径/内径) = 15 mm / 10 mm の合成石英管から酸水素炎を用いて o. d. / i. d. = 3.5 mm / 1 mm のセル管体(13)をつくる。この本体から引きのばした毛細管(10)をSUS-316ノズル(9)にエポキシ((8), Araldite AT-1)接着し、ノズルをベリリウム銅製セパレーター(6)に接続する。セパレーター内部にはテフロン(PTFE)製の試料チューブ(5)があり、このチューブは上端近くに二つのフリーピストン(2)を持ち下端はPTFEコネクタ(7)を介して石英毛細管(10)に結合している。実際上はこれらのフリーピストンが試料溶液(4)と灯油((1)、圧伝達媒)の混合を防ぐセパレーターの役をはたしている。漏れを防ぐために二つのフリーピストンの間にパーフルオロポリエーテル(3)をいれる。ベリリウム銅セパレーター(6)は常法により、高圧バルブ、圧力計、増圧機、オイルポンプよりなる昇圧装置に結合する。

キーワード：高圧NMR、高圧セル、石英高圧セル、シクロファン

やまだひろあき、にしかわかずよし、むろふみひと、わたなべあいこ、にしなかますこ、
あかさかかずゆき

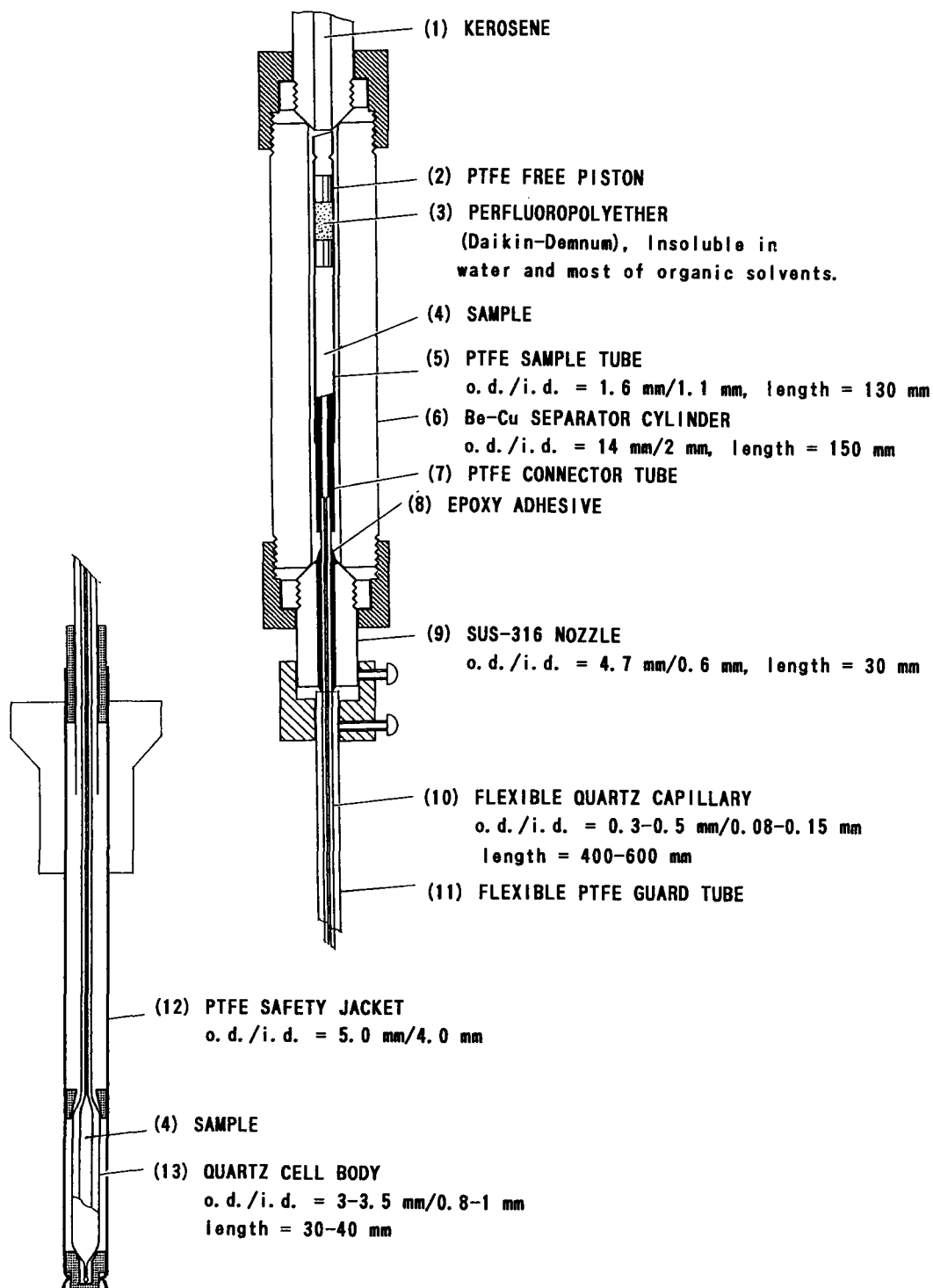


Fig. 1. Schematic drawing of the high pressure cell assembly for high resolution NMR measurements at very high magnetic field.
Resolution is better than 3×10^{-9} (up to 200 MPa, Bruker DMX-750 spectrometer).

2. 試料の導入・セルの洗浄

セルを不活性ガスで満たした後、試料の入ったガスタイト注射器(Hamilton Gastight Syringe)をPTFEコネクタ(7)に結合し、10~30 atm に加圧すると試料がセル内に入って行く。セル内にあった不活性ガスは小さい気泡に圧縮されて浮上、ピストンをひくと外部に排出される。適当な溶媒を同様の方法又はSUS製小型ポンプ^{1b}を使ってセルに圧入することにより内部を洗浄し、くり返し使用することができる。200 MPaまでの実験で18回目をむかえたものもある。試料液の必要量は約200 μ lである。

3. 使用最高圧力・分解能

合成石英の引っ張り強度から見てセル自体の耐圧強度は相当高いところにあると推定される(弾性円筒近似による計算からは10000 atm 以上になるのだが!!)。今回は、セルが破裂したときにPTFEジャケット(12)がこれに耐えうるかどうかを見るテストをおこなった。セルをPTFEジャケットに入れ、610 MPa(約 6000 atm)まで加圧したが破裂しなかったので外部からセル本体に傷をつけることによって強制的に破壊した。その結果PTFEジャケットに損傷は見られなかった。現在のところ、この高圧NMR装置を使い、6000 atm までの実験は安全に行い得るだろうと考えている。分解能は 3×10^{-9} (Bruker DMX-750、 ~ 200 MPa、TMS in viscous CD_3OH soln.)よりも良好である。^{1c}

4. パラシクロファンの圧力挙動²の測定

シス-1, 12-ジメトキシ[12]パラシクロファン($\text{CDCl}_2\text{CDCl}_2$ 溶液)の環プロトン波形を90 MHz、Tc付近(133 °C)、において400 MPaまで追跡測定した。各圧力における波形をAA' BB' の4-スピン系としてQCPE-DNMR5 プログラムにより解析し、ベンゼン環の内部回転速度を求めた。解析に必要な各圧力での化学シフト差はNMRタイムスケール上、環の回転をほぼ止めてみることのできる400 MHz 高圧NMRの測定による波形から求めた。加圧によって回転速度は増加するが(このことは負の活性化体積により説明される²)高圧になるにしたがいその増加率は減少し、 $\ln k$ vs. p プロットは上にややふくらんだ右上がりのカーブを描く。

なお、400 MHz NMRによりメチレンブリッジの化学シフトを450 MPaまで測定したところブリッジ頂上のメチレンプロトンの高磁場圧力シフトが顕著であることが分かった。Johnson-Bovey のベンゼン環磁気異方性contourを利用して計算すると、450 MPa までの加圧によってメチレンブリッジは約0.5 Åベンゼン環面の方向に縮むと推定される。上述の高圧領域における回転速度増加率の減少は、一般に加圧による溶媒粘度の増加、負の活性化圧縮率($\Delta\beta^* < 0$)等により説明されるが、ブリッジの縮小によってシクロファン分子はメチレン数12個から、たとえばメチレン数11.5個を有する分子に圧力変形しているのであり、それによって内部ポテンシャルが変化する為に回転の圧力加速が少し阻害されると考えることもできる。

- 1a). H. Yamada, In *High-Pressure NMR*; (ed. by J. Jonas) "Glass Cell Method for High-Pressure, High-Resolution NMR Measurements. Application to the Studies of Pressure Effects on Molecular Conformation and Structure" Springer-Verlag: Berlin (1991).
- b). H. Yamada, K. Kubo, I. Kakiyama, and A. Sera, In *Current Japanese Materials Research*; Vol. 13, "High Pressure Liquid and Solution" (The Society of Materials Science, Jpn; ed. by T. Taniguchi, M. Senoo, and K. Hara) Elsevier Science Publishers :UK. (1994) p 49.
- c). H. Yamada, K. Nishikawa, M. Sugiura, and K. Akasaka, *International Conference on High-Pressure Science and Technology*, (1997) Abstracts, p 413, The Japan Society of High Pressure Science and Technology, Kyoto.
2. H. Yamada, K. Mukuno, M. Umeda, T. Maeda, and A. Sera, *Chem. Lett.*, 437 (1996).

P116 固体 NMR 用高速デジタル任意波形発生装置の試作

(京大理) ○久保 厚、高岡 一馬、寺尾 武彦

Fast Digital Wave-Form Generator for Solid State NMR

Department of Chemistry, Kyoto University

Atsushi Kubo, Kazuma Takaoka, and Takehiko Terao

A design of a digital wave-form generator is presented.

溶液の NMR では断熱パルスを利用することにより広帯域のデカップリング行ったり、また帯域選択励起を行っている。[1] 固体でもパルス振幅および位相をより高速に変調できれば、このような実験が可能である。断熱パルスのラジオ波強度 $\nu_1(\max)$ 、周波数掃引の幅 ΔF 、掃引時間 T の間には、 $\Delta F \leq 2\pi T \{\nu_1(\max)\}^2$ の関係があるから $\nu_1(\max) = 100\text{kHz}$ 、 $T = 0.1\text{ms}$ の断熱パルスを用いれば $0.5\Delta F \approx 3\text{MHz}$ の帯域を反転させることが可能である。常磁性固体や核四極子相互作用を持つ系では不均一幅が非常に大きくこのように広帯域でスピンを反転させるパルスが利用できると便利である。

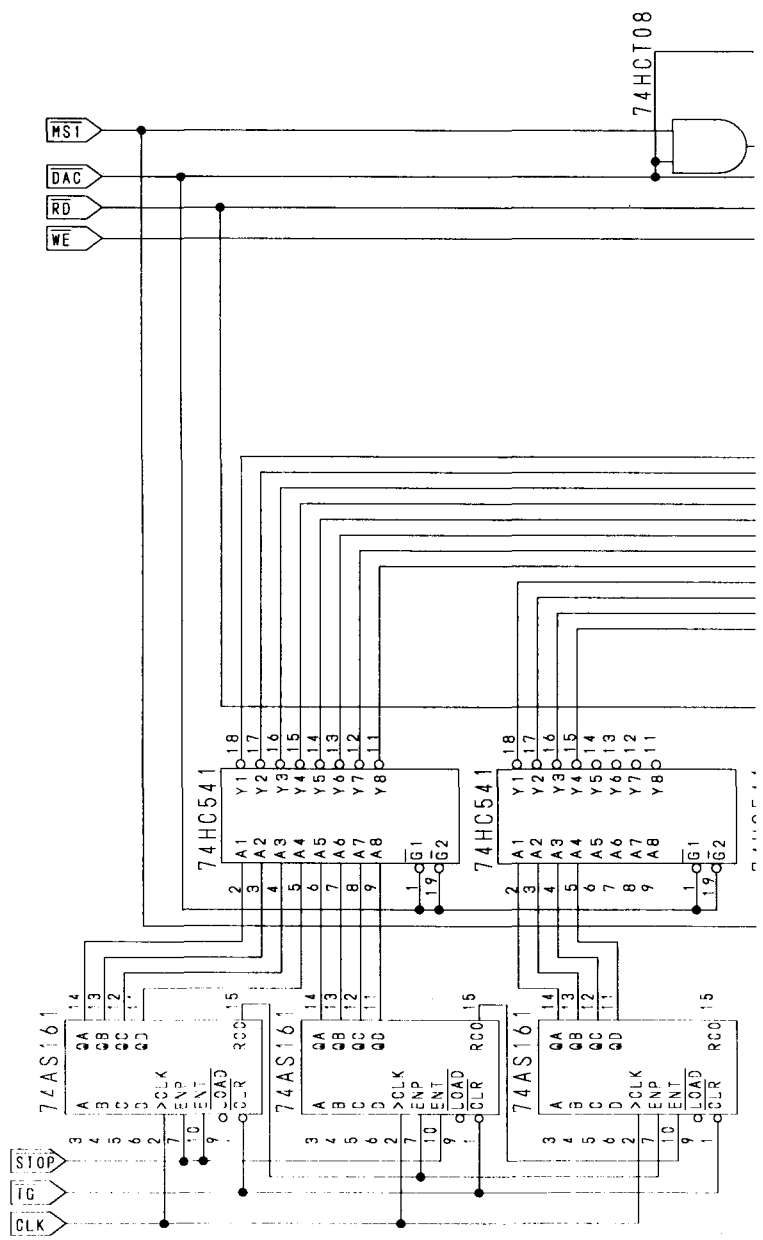
図に任意波形発生装置の3つのブロックを示した。(a) は cypress 社の高速 SRAM (15ns read cycle time) を使用したメモリー・ボード・ユニットである。出力モードでは左上のカウンタ(AS161)を使用しクロック信号(CLK)に同期してメモリーのアドレスを一定量ずつ変化させ、メモリーの内容を右下のバッファ(HC541)に出力する。一方入力モードではパソコンのインターフェース・ボード[2]からアドレス(PA0~PA11)を指定し、データ(PB0~PB7)を読み書きする。A ポートにアドレスを出力してから B ポートにデータを入出力すればよい。

(b) はモード選択ユニットである。スイッチ(SW)でメモリーから DA 変換器に信号を出力するモード及びメモリーを読み書きするモードを切り替える。またインターフェース・ボードの A ポートの信号(PA13~PA15) を用いてデータを読み込み/書込みと2つのメモリー・ボードの選択ができるようになっている。

(c) はパルスのタイミング・コントロール・ユニットである。外部からクロック信号(例えばシンセサイザーの出力)を入れ、ひとつのメモリー・アドレスの実行時間を決定する。また NMR スペクトロメーターのコンソールより \overline{TG} と \overline{CWG} のパルスを入力する。 $\overline{TG} = L \rightarrow H$ でパルスの出力が開始し $\overline{CWG} = L \rightarrow H$ となったのちメモリー・アドレスより最後のデータが出力された時点でパルスの照射を終了する。

任意波形発生装置、固体 NMR

くぼ あつし、たかおか かずま、てらお たけひこ



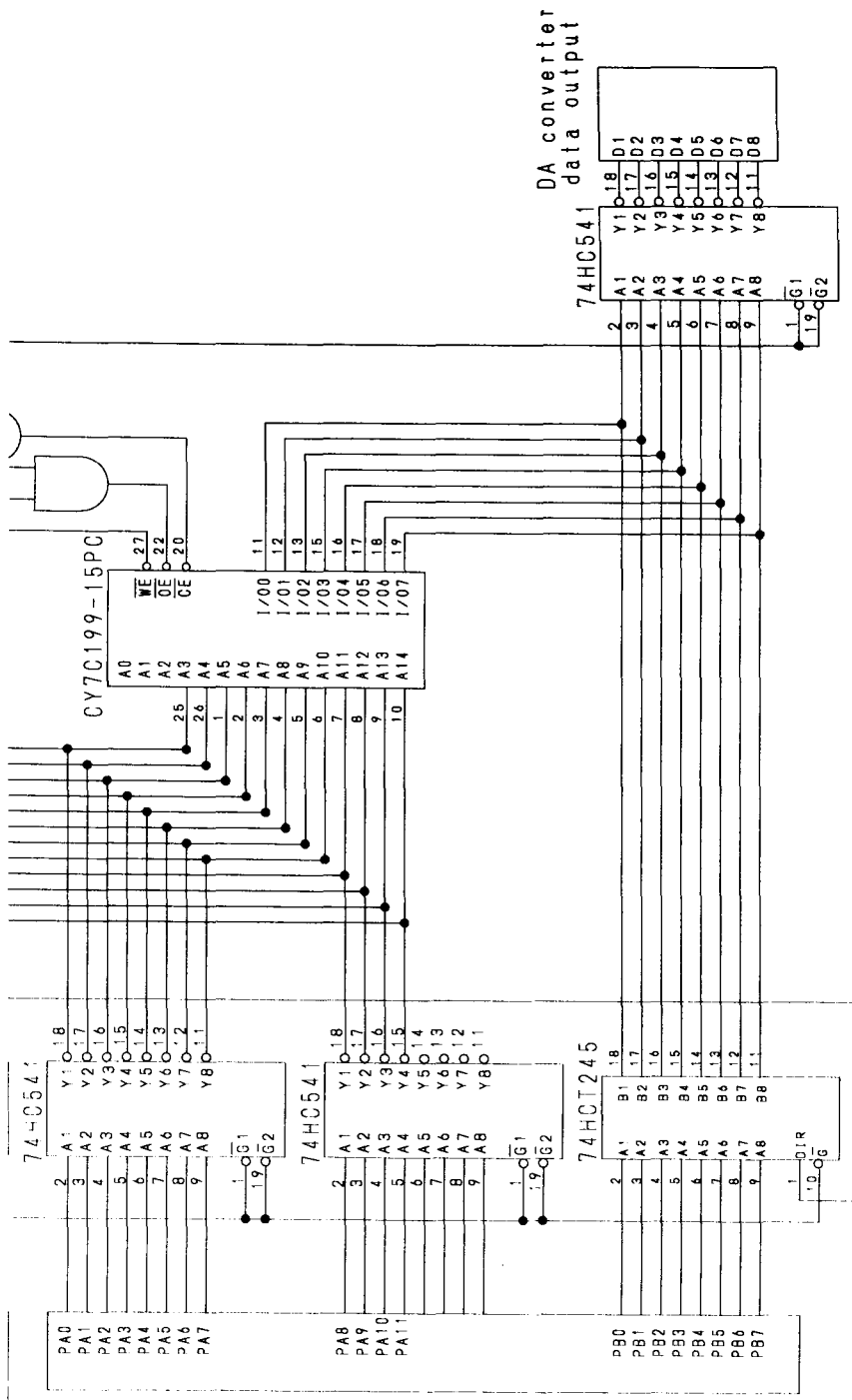
(a) Memory Board (no. 1)

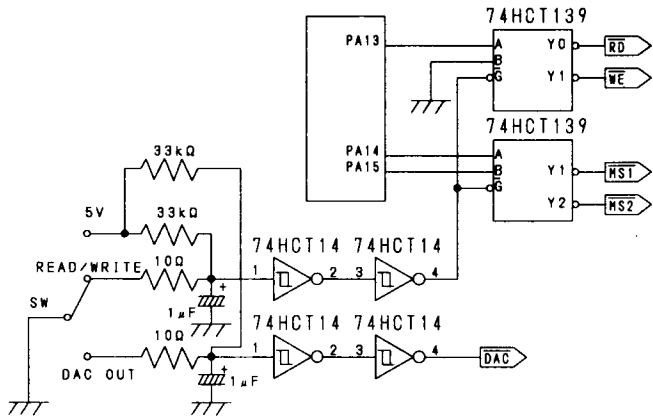
またDIPスイッチで照射終了時のカウント数を $n \times 2^8 \sim n \times 2^{12}$ に設定できるようにした。メモリーには $2^8 \sim 2^{12}$ 周期で同じデータを書き込んでおく。

参考文献

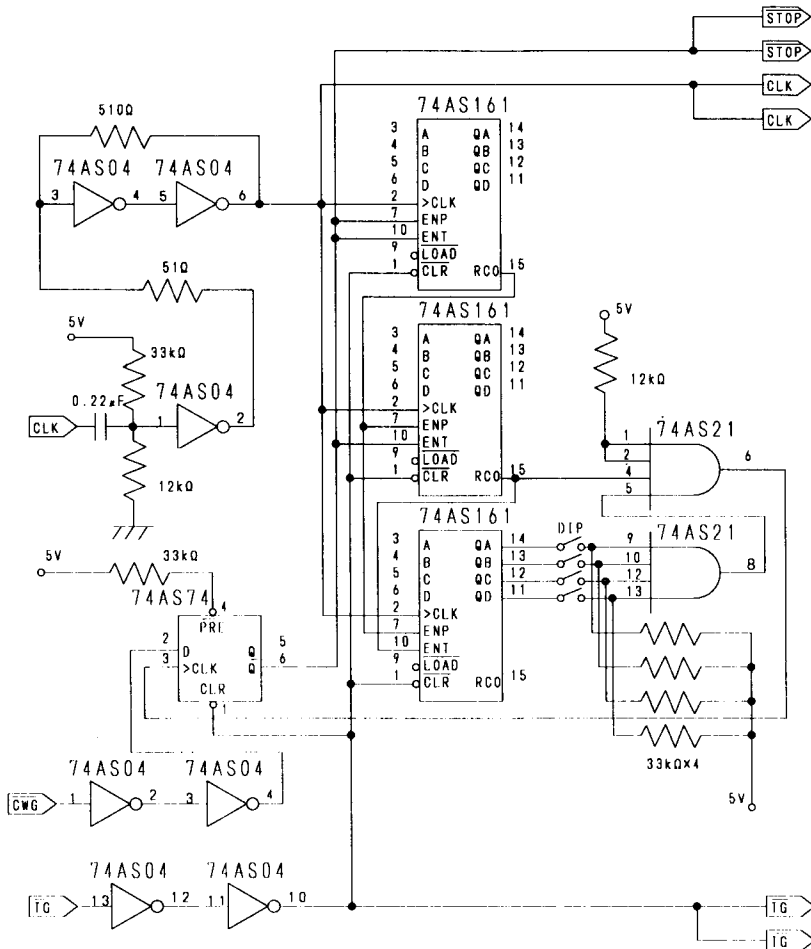
- [1] E. Kupče and R. Freeman, J. Magn. Reson., A117, 246 (1995).
- [2] 横山直隆、パソコン機械制御と製作実習入門、技術評論社(1990)。

emory Board (no.2)





(b) Mode Selection Unit



(c) Pulse Timing Control Unit

P117

13C 用高感度前置増幅器の開発
(日本電子)○末松浩人、栗原範明

Ultra Low Noise Preamplifiers for the detection of 13C
(JEOL LTD.)○Hiroto Suematsu, Noriaki Kurihara

Ultra-low noise preamplifiers using GaAs HEMT technology have been developed to observe 13C NMR signals for spectrometers from 300MHz to 800MHz.

Use of this type of preamplifier in NMR ,especially for the detection of 1H,has been reported previously(1)(2)(3).

We obtained a noise figure of 0.17dB at 150MHz (noise temperature 12K), for example. These preamplifiers add very little noise to the noise from probe coil(about 300K, if not cooled).

In practice, the new GaAs HEMT preamplifiers result in a 13C sensitivity improvement of around 20% compared with earlier designs.

300MHz から 800MHz までの NMR 装置にて ¹³C 信号を感度良く観測するため、化合物半導体(GaAs High Electron Mobility Transistor)を使用した高感度前置増幅器を開発した。

この種の前置増幅器の ¹H 信号観測への利用は既に報告されているが¹⁾²⁾³⁾、今回はその技術を ¹³C 信号観測に拡張した。

前置増幅器自体の雑音指数は常温にて 0.2dB 前後に改善された。

例として 150MHz 用(600MHz 装置 ¹³C 観測用)前置増幅器単体の雑音指数を[Fig.1]に示す。

本前置増幅器を使用することにより、従来に比べ ¹³C 感度は 600MHz 装置において 20%以上改善された。

600MHz 装置における ¹³C 感度(ASTM)の改善結果を[Fig.2]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。

参考文献

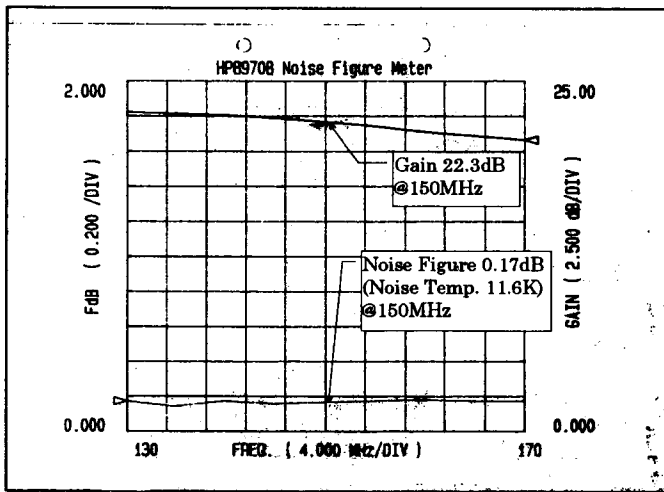
(1) Fuks et.al.,38th ENC,1997

(2) Koscielniak et.al.38th ENC,1997

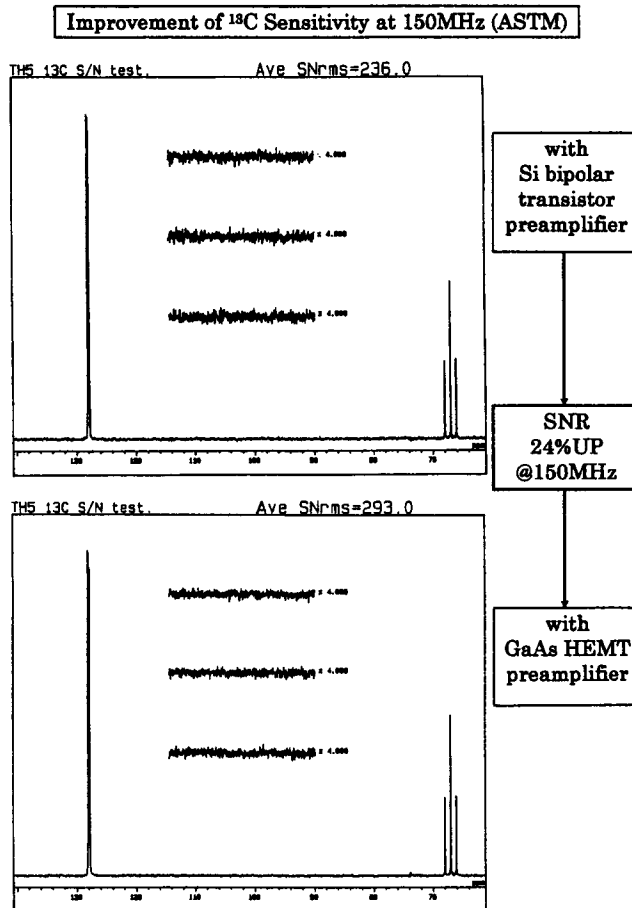
(3)末松,栗原,"化合物半導体を使用した超高感度前置増幅器",第 36 回 NMR 討論会要旨(1997)

13C、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 150MHz Preamplifier



[Fig.2]Improvement of ¹³C sensitivity at 150MHz

P118

硝酸鉛の²⁰⁷Pb MAS NMR測定による 高温 MASの温度較正

(ジャパンエナジー分析センター 1, 日本電子 2, 東工大 3)

○高橋俊朗 1, 川島弘江 1, 杉沢寿志 2, 馬場俊秀 3

Temperature calibration using ²⁰⁷Pb MAS NMR of lead nitrate for high temperature

○Toshiro Takahashi^a, Hiroe Kawashima^a, Hisashi Sugisawa^b, Toshihide Baba^c

^aJapan Energy Analytical Research Center Co., Ltd.

^bAnalytical Instrument Division, JEOL Ltd.

^cDepartment of Chemical Engineering, Tokyo Institute of Technology

We report a method for high temperature calibration of magic-angle spinning NMR spectroscopy. The method is an extension of that developed by Anthony Bielecki and Douglas P. Buram, and consists of measuring the chemical shift in ²⁰⁷Pb MAS NMR spectrum of lead nitrate. ²⁰⁷Pb chemical shift was extremely sensitive to temperature and the temperature dependence was observed from 30 to 410°C. These results indicate ²⁰⁷Pb MAS NMR spectrum of lead nitrate would be a thermometer for high temperature.

はじめに

固体高分解能 NMR 法における温度可変測定は、温度変化にともなう固体材料の構造、物性、分子運動に関する有用な情報が得られる測定手法であり、多分野で利用されている。固体高分解能 NMR 法では、試料管を高速回転させるという特異的な機械システムを利用するため、試料管内の温度を直接測定することは困難である。通常、測定時のドライブ及びベアリング温度が試料温度として検出される。しかし、この温度は種々の原因により実際の試料温度とは異なることから、正確に温度を把握するために様々な温度較正法が提案されている。今まで報告されている温度較正法が適用できる温度範囲は、-130~150°C程度であり、それより高温での温度較正は行われていない。500°C以上の MAS 測定が可能になった現在、150°C以上の高温でも正確に温度較正を行うことは、測定データを解析する上で必要不可欠である。

そこで Bielecki¹⁾らによって提案されている硝酸鉛を用いた温度較正法 (~150°C) を拡張し、高温での温度較正が可能か検討を行った。

実験

プローブの温度較正

硝酸鉛の化学シフト値と温度の関係を正確に求めるため、Table1 に示した化合物の相転移温度及び融点から、プローブの温度較正を行った。相転移温度及び融点は熱分析測定により

キーワード：温度較正、硝酸鉛、VTMAS

たかはしとしろう、かわしまひろえ、すぎさわひさし、ばばとしひで

求めた。下記に示した硝酸鉛の測定と同じ分光計、プローブ、試料管回転速度にて NMR 測定を行った。

Table 1 Samples to calibrate temperature

Sample	Melting point or Phase transition temperature* (°C)
4-cyano-4'-7-alkoxybiphenyls	55*
	75
4-cyano-4''-5-alky-p-terphenyls	130*
Citric acid	148
NaNO ₃	305
LiI	461

硝酸鉛の ²⁰⁷Pb MAS NMR

硝酸鉛は Aldrich 社製 5N を使用し、分光計は JNM-CMX400、プローブには Doty 社製 High Temperature MAS Probe を用いた。90 度パルス幅 6.5 μs、試料管回転速度 2500 ± 50Hz、待ち時間は 10s、積算回数 40 回の条件でシングルパルスにより測定を行った。試料は材質が窒化ホウ素である高温測定用試料管に入れ、測定温度において平衡状態に達するように 10 分以上放置した後、測定を行った。

結果及び考察

Fig.1 には NMR 測定で観測された上記試料の融解、相転移時のコントローラー表示温度と実際の相転移温度及び融点の関係を示した。NMR の測定結果から、80°C 以下では試料温度が表示温度より高いが、約 80°C を境に低くなり、試料温度が 461°C では表示温度は 475°C を示し温度差が 14°C あることが分かった。プローブの温度較正を行うためコントローラー表示温度と試料温度の関係式を Fig.1 から求めた。式は 1~3 次について検討し AIC²⁾ を考慮したうえで 2 次式に決定した。その結果、(1) 式を得た。

$$T = 1.3 \times 10^{-4} T_D^2 + 0.9 T_D + 7.3 \quad (1)$$

ここで T は試料温度、T_D は温度コントローラーの表示温度を示している。

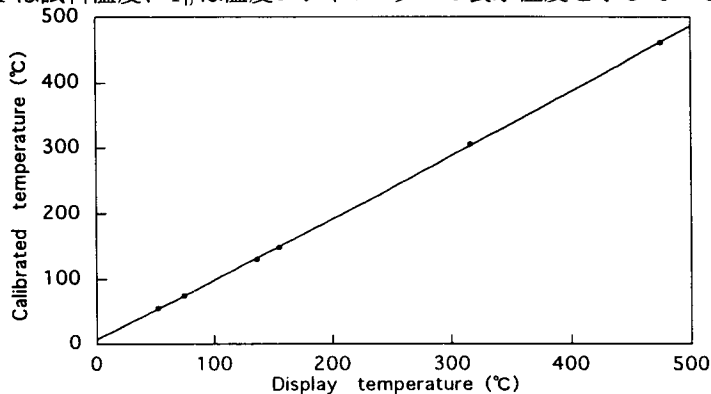


Fig.1 Plot of Calibrated temperature (based on melting point and phase transition temperature) vs Display temperature.

硝酸鉛の熱分析測定から分解開始温度は 450℃であり、390℃で 3 時間ホールドした実験では 4wt%以下の重量減少しか確認されず、硝酸鉛は 400℃付近でかなり安定であることが分かった。よって NMR 測定は約 410℃まで行った。Fig.2 には 386℃での ^{207}Pb MAS NMR スペクトルを、Fig.3 には測定結果から得られた化学シフト値と温度の関係を示した。温度は(1)式で補正した値を用いた。化学シフト値基準にテトラエチル鉛を用いると観測周波数が広くなりすぎるため、便宜上 30℃での化学シフト値を 0ppm に設定した。

Fig.2 に示した 386℃でのスペクトルは S/N=35 であり高温でも高感度であった。また、Fig.3 に示すように 200℃以上の高温においても温度上昇に伴い化学シフト値は低磁場シフトした。このように硝酸鉛の ^{207}Pb MAS NMR は高感度で、その化学シフト値は低磁場シフトする温度依存性が見られたことから、400℃程度の高温まで温度較正に用いることが可能であることが分かった。Bielecki らは試料温度と化学シフト値の関係は-130~150℃の温度範囲では 1 次式で表すことができると報告している。しかし、Fig.3 からわかるように 150℃以下に比べ 200℃以上の高温では、化学シフト値あたりの温度変化が小さくなっているため 200℃以上に Bielecki らの式を用いると誤差が大きくなる。そこで Fig.3 から試料温度と化学シフト値の関係を求めた。フィッティングに用いる式は 1~4 次式について検討し AIC を考慮して(2)に示す 2 次式を得た。

$$T = -5.1 \times 10^{-4} \delta^2 + 1.29 \delta + 31.0 \quad (2)$$

ここで T は試料温度、 δ は化学シフト値を示している。この式を用いることで比較的容易に 3℃以内の誤差範囲で 400℃程度の高温まで温度較正を行えることが分かった。また(2)式を用い Fig2. のピーク半値幅から 386℃での試料管内の温度分布を見積もったところ 1℃以内と推測された。今後、適切な化学シフト値基準になる化合物を見つけることができれば、より容易に-130℃~400℃の幅広い温度範囲での温度較正が可能になる。

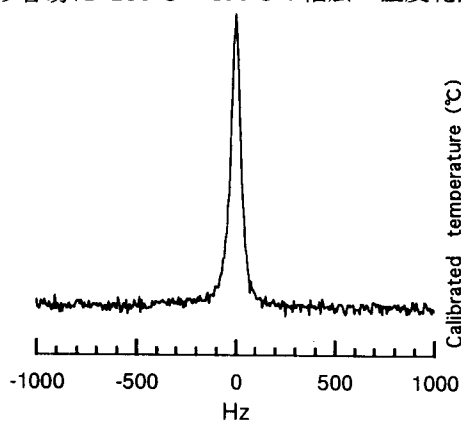


Fig.2 ^{207}Pb MAS NMR spectrum of lead nitrate at 386℃.

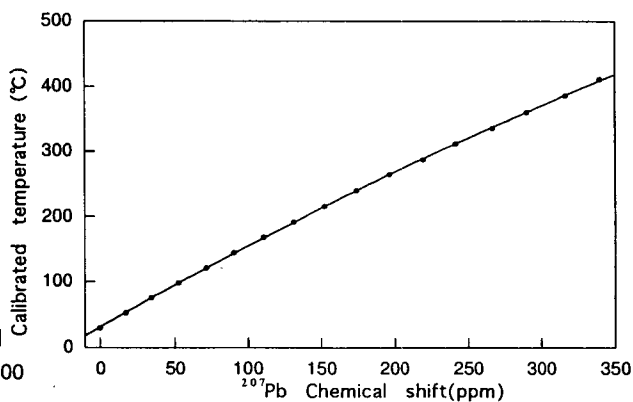


Fig.3 Plot of ^{207}Pb chemical shift VS Calibrated temperature.

参考文献

- 1) Antony Bielecki and Douglas P. Burum, J. Magn. Reson. A 116, 215 (1995)
- 2) 鈴木義一郎著 情報量基準による統計解析入門

P119

光ポンピングによるスピン偏極Xeガス発生法の最適化
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

Optimization of the efficiency of nuclear spin polarization processes
for Xe gas by optical pumping

Mineyuki Hattori, Takashi Hiraga, and Tetsuo Moriya

Electrotechnical Laboratory, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, JAPAN

The flow-through type apparatus for the polarization of noble gas nuclear spins using high-power diode laser arrays (794.7nm, 12W) was constructed[1]. The performance for the polarization of natural abundant Xe gas was evaluated. In order to optimize the pumping condition, the shape of pumping cell, flow rate and temperature of the cell was varied.

【原理】核スピンの偏極した希ガスは、 ^{129}Xe 、 ^3He 等のスピン量子数1/2の核スピンを有する単原子分子を含む希ガスおよびRb、Cs等のアルカリ金属蒸気を混合した気体に、円偏光された励起光を照射することによって、Rb等の基底状態準位にある電子が光吸収により励起されて励起状態準位を経由した後に基底状態準位に戻るときに、外部から印加された磁場によって磁氣的に縮退が解かれた基底状態準位の内の電子準位の一方の準位に高い確率で遷移させ、Rb分子等の電子スピン偏極度が高い状態を作成し、この偏極状態のRb等がXe等の希ガス分子と衝突して、この過程でRb等の偏極状態がXe等の希ガスの核スピン系に移動することによって得られる[2]。この過程は、一般に光ポンピングと呼ばれている。[図1参照]

【課題】これまでの円筒状ガラス容器を採用した偏極装置[3,4]では、励起光強度は入射方向の入射面からの距離に依存して指数関数で減少する。円筒状ガラス容器内のRb等の濃度は、励起光が強い部位に最適化して決定するため、入射面からの距離が離れた励起光強度が弱い部分がかかなりの体積を占めることになる。こうした励起効率の低い部位での偏極率の低下は、Xe等分子が拡散によって効率の高い部位に移動することにより解消されるが、全体の励起効率を低下させている原因となっている（実際に偏極された ^{129}Xe の量は5%程度）。我々は、フローセルを用いて常圧付近で安全にガスを流しながら偏極希ガスを製造し、後方に核磁気共鳴装置を配置することで連続的に偏極希ガスを発生させた後、偏極率を減少させずに短時間でNMR測定を行える偏極装置を報告した[1]。ここでは、この装置のセル形状を改良することで、安全にガスを流しながら、偏極率をさらに向上させた偏極希ガスの発生方法を最適化することを目的としている。

希ガス、 ^{129}Xe 、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

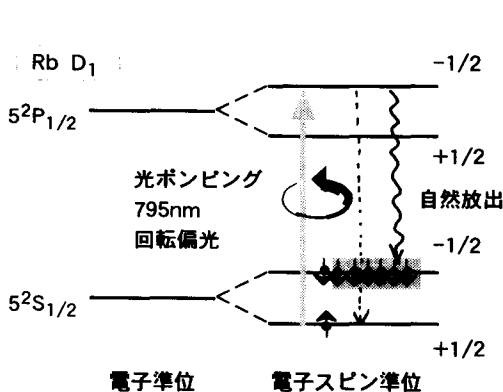


図1. 光ポンピングの原理

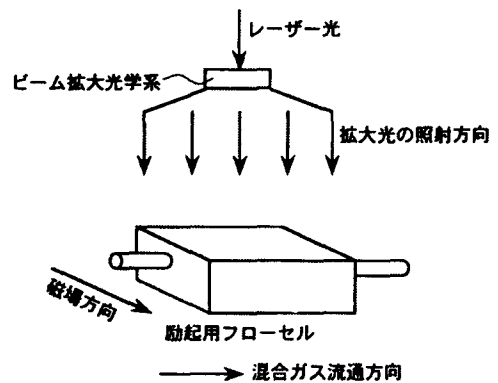


図2. 偏極希ガス製造装置のフローセルと励起光と磁力線の配置図

【方法】フローセル内に低圧の希ガスと光ポンピング用触媒さらにクエンチャーガスの混合気体を一方向に流通させ、フローセル内には励起光を照射し、かつ磁場を印加することで、連続的に偏極希ガスを安全に製造することが可能である。そして、フローセルの励起光照射面に垂直に磁力線が通過するように磁石を配置し、フローセルに励起光を拡大して照射面全面に平行に照射させ、フローセル内の気体の流通方向に垂直に励起光を照射する[図2参照]ことで、偏極率を飛躍的に向上が期待される。また、偏極希ガス製造装置を核磁気共鳴検出装置の前方に配置することで、連続的に発生した偏極希ガスを、別容器への移送による偏極率の減少を起こさずに短時間で核磁気共鳴検出装置に導入し核磁気共鳴測定することが可能となる。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。励起光強度が高い条件では、Rb濃度を高めて、Xe核との衝突回数を増大し、Xe-Xe間の衝突によるスピン系の緩和が偏極率の低下に効かない条件下で、偏極効率を効果的に上昇させられる。このときのセルの形状としては、受光面を広くし光路長を短くするとともに効率が高上げられると考えられる。

受光面5cm×5cm、光路長1mmと10mmのセルを製作し、高出力ダイオードレーザーアレイ(794.7nm, 12W)を励起源に用いてRbの光ポンピングを行い、¹²⁹Xeの核スピンを偏極させるフロー型の光ポンピング装置において、フロー速度、Rb濃度(セルの温度)を変化させ、NMR測定を行って偏極率を評価した。

【参考文献】

- [1] 服部峰之、平賀隆、守谷哲郎、第36回NMR討論会講演要旨集、P9, 103 (1997).
- [2] W. Happer, E. Miron, S. Schaefer, D. Schreiber, W. A. van Wijngaarden, and X. Zeng, Phys. Rev. A **29**, 3092 (1984).
- [3] B. Driehuys, G. D. Cates, E. Miron, K. Sauer, and W. Happer, Appl. Phys. Lett. **69**, 1668 (1996).
- [4] M. Haake, A. Pines, J. A. Reimer, and R. Seydoux, J. Am. Chem. Soc. **119**, 11711 (1997).

P120

NMR Prediction Software and Tubeless NMR – an Analytical Tool for Screening of Combinatorial Libraries

Antony Williams, Dmitry Mityushev, Vladimir Shilay and Sergey Bakulin

Advanced Chemistry Development, 133 Richmond Street West, Suite 605, Toronto, Ontario, M5H 2L5, Canada.

Tubeless NMR is quickly becoming the method of choice for the application of the Nuclear Magnetic Resonance technique to the analysis of combinatorial libraries. Coupling automation with flow NMR technology now allows NMR spectra to be acquired on materials populating a combinatorial plate in only a few hours. This routine acquisition of large amounts of spectral data can indeed increase the rate of throughput for such analyses but the technology can lead to an inordinate amount of data with no appropriate manner to track and database the information in a facile manner. Since the chemist can often offer suggestions for the structures expected for each vial on the plate it would be appropriate to attempt to relate the experimental spectra to those predicted for the structure. The development of software to allow the databasing of NMR spectral curves associated with molecular structures, and the application of NMR prediction algorithms to allow comparison of experimental and predicted spectra has been attempted. Software is now available which allows the user to access and process NMR data directly from the spectrometer and display in a 96 well plate format. The spectral curves generated can be stored directly in a database and associated with chemical structures and user definable textual data fields. H1 NMR prediction algorithms allow predicted spectra to be generated for each of the suggested structures and displayed on screen for direct visual comparison with the experimental spectra. An analysis for matching experimental and predicted spectra can be performed based on the differences in shifts between the spectra. The obtained values are then displayed using color coding to display ranges for the match factors.

NMR分光法によるアルカリブロマイド水溶液中における水分子の
D核および¹⁷O核のスピン-格子緩和速度におよぼす圧力効果
(立命館大理工・創価大工*)○文野浩一・清水昭夫*・谷口吉弘

Pressure Effects on the Spin-lattice Relaxation Rates of D and ¹⁷O Nuclei in D₂O
Molecule in Alkali Bromide Aqueous Solutions by NMR Spectroscopy

Koichi, FUMINO; Akio, SHIMIZU*; Yoshihiro, TANIGUCHI

Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga, 525-8577

*Faculty of Engineering, Soka University, Hachioji, Tokyo, 192-0003

The spin-lattice relaxation rates (R_1) of D and ¹⁷O nuclei of heavy water (D₂O) molecule in alkali bromide (LiBr, NaBr, KBr, CsBr) aqueous solutions were measured in the range of 0.1-300 MPa at 1.0 molkg⁻¹ and 30°C by NMR. The R_1 value decreases with increasing pressure. The rotational correlation times (τ) obtained by the R_1 value decreases with increasing pressure and τ is in this order: Li⁺ > Na⁺ > pure D₂O > K⁺ > Cs⁺. This implies that the interaction between D₂O molecules becomes weaker with increasing pressure and that the D₂O molecules rotate more remarkably.

1.はじめに 電解質水溶液中における水分子の再配向運動に関する研究は、イオンの水合を理解する上で基本的かつ重要な問題である。これまで実験は 1.0 molkg⁻¹ 以上の高濃度領域において行われてきたが、近年のNMR分光法の発展により、水分子のD核と¹⁷O核のスピン-格子緩和速度(R_1)が 1.0 molkg⁻¹ 以下の低濃度領域において精度よく測定できるようになった。アルカリブロマイド(LiBr, NaBr, KBr, CsBr)水溶液中における水分子のD核および¹⁷O核の R_1 を 25°Cにおいて測定したところ、 R_1 は溶液濃度 m と(1)式の関係にあることが認められた¹⁾。

$$R_1/R_1^0 = 1 + B \cdot m \quad (1)$$

ここで、 R_1^0 は純水における測定核の R_1 、 B はイオン-溶媒間相互作用に関するパラメーターである。また、これらの核の R_1 を 5-50°Cにおいて測定したところ、アルカリ金属イオンに配位する水分子の回転運動は水の構造的にも依存することが明らかになった²⁻⁴⁾。水の構造は圧力によっても顕著に変化するので、水分子の回転運動におよぼす圧力効果の研究から、高圧力下におけるイオン-水間相互作用による水合に関する知見が得られるものと思われる。ところでこの濃度領域における水分子の回転運動に関する圧力効果の研究は Ueno らによって t -ブチルアルコール水溶液および尿素水溶液について行われているのみである⁵⁾。そこで、アルカリブロマイド(LiBr, NaBr, KBr, CsBr)水溶液中における水分子のD核および¹⁷O核の R_1 を 30°C、1.0 molkg⁻¹、0.1-300 MPaにおいて測定した。

2. 実験方法 アルカリブロマイド(LiBr, NaBr, KBr, CsBr)は、予め P₂O₅ 入りのデシケーター中にて 7 日間以上減圧乾燥させた。ロック溶媒には D₂O(CEA 製、重水素化率 99.8%以上)を用いた。試料中の溶存酸素を除去するために、試料溶液を測定直前に窒素ガスを用いて 10 分間バブリングし、試料溶液をガラス管とテフロン製チューブに入れて両者をつなぎ合わせて測定試料とした。 R_1 の測定は JEOL JNM GX-270 FT-NMR(基準磁場: 6.34 T、基準 NMR、アルカリブロマイド水溶液、水分子、スピン-格子緩和時間、圧力

ふみの こういち、しみず あきお、たにぐち よしひろ

振動数 D:41.5 MHz、 ^{17}O :36.6 MHz)を用いて Inversion-recovery 法($180^\circ - \tau - 90^\circ$ パルス法)によって行い、測定誤差は $\pm 2\%$ であった。測定圧力は株式会社高圧機器製 KP-5-A 型圧力ポンプを用いて、0.1, 50 ± 1 , 100 ± 1 , 150 ± 1 , 200 ± 1 , 250 ± 1 , 300 ± 2 MPa とした。積算回数は D 核および ^{17}O 核についてそれぞれ 8 および 1600 回とした。測定温度は JEOL MVT/HT 温度ユニットを用いて $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保たれた。溶液の濃度は 1.0 mol kg^{-1} であった。

3. 結果および考察 アルカリプロマイド水溶液中における水分子の D 核と ^{17}O 核の R_1 の値は圧力の増加とともに減少した。(1)式の B はカチオンとアニオンからの寄与に分割できるので、(2)式が成立する。

$$B = B^+ + B^- \quad (2)$$

また、 R_1 の値は、二状態モデルにより (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^- はそれぞれカチオンおよびアニオンに配位する水分子の R_1 、 $x^+ = n^+ \cdot m / 50.0$ 、 50.0 は重水 1000 g 中に含まれる D_2O のモル数、 n^+ はイオンの配位数である。(3)式および $B^+(K^+) = B^-(\text{Cl}^-)$ を仮定して (4)式が得られる。

$$B^+ = \{(R_1^+ / R_1^0) - 1\} \cdot (n^+ / 50.0) \quad (4)$$

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⁶⁾。

$$R_1 = (3/40) \{(2I+3)/I^2(2I-1)\} (e^2qQ/\hbar)^2 \{1 + (\eta^2/3)\} \tau \quad (5)$$

ここで I はスピン量子数、 e^2qQ/\hbar は四極子結合定数、 η は非対称性パラメーター、 τ は測定核の回転相関時間である。これよりアルカリ金属イオンに配位する水分子の D 核および ^{17}O 核の τ が得られ、 ^{17}O 核について Fig. 1 に示す。 τ の値は各圧力において、 $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{pure D}_2\text{O} > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ の順になることが認められた。また、 τ の値は圧力の増加とともに減少することが認められ、圧力の増加とともに水分子間の水素結合が弱くなり、水分子が一層速く回転することによるものと思われる。

4. 参考文献

- 1) A. Shimizu and Y. Taniguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1572 (1990).
- 2) K. Fumino, A. Shimizu and Y. Taniguchi, *DENKI KAGAKU*, **63**, 54 (1995).
- 3) K. Fumino, A. Shimizu and Y. Taniguchi, *Mat. Sci. Res. Intl.*, **2**, 54 (1996).
- 4) K. Fumino, A. Shimizu and Y. Taniguchi, *Mat. Sci. Res. Intl.*, **2**, 229 (1996).
- 5) K. Yoshida, K. Ibuki and M. Ueno, *J. Chem. Phys.*, **108**, 1360 (1998).
- 6) A. Abraham, "The Principles of Nuclear Magnetism," Oxford University, Oxford (1967).

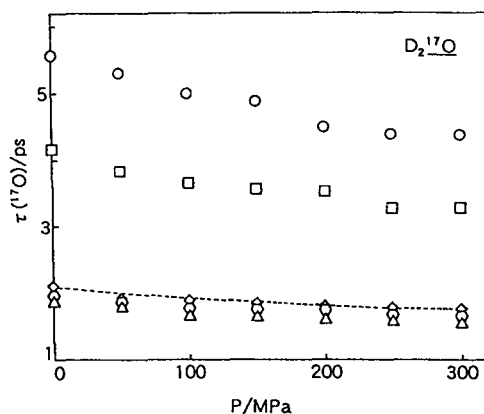


Fig. 1 Pressure dependences of the $\tau(^{17}\text{O})$ values of the coordinated D_2O molecules at infinite dilution and pure D_2O .
○: Li^+ , □: Na^+ , ○: K^+ , △: Cs^+ , ◇: pure D_2O .

索引と名簿

キーワード索引		⁷ Li	P106	HSQC	P66
		⁸⁹ Y-MAS NMR	1L8	hydrogen	P109
(数字・アルファベット)		Ag NMR	3L3	<i>in vivo</i>	P66
¹²⁹ Xe	P119	aggregation	P1	isotope effect	P109
¹²⁹ Xe-NMR	P93	Ag _x Cu _{1-x} I	P108	J reso-HMBC	P5
¹³⁹ La MAS NMR	1L8	alpha-アミノ酸	P76	Kaolinite	
¹³ C	P117	APC	P9	Intercalation	P107
13-C	P63	ArcB	P18	KIFMK	P25
¹³ C CP/MAS NMR	P105	ATF2	P11	LC-NMR	3L6
¹³ C-MRSI	P66	CHAPS	P22	LEC ラット	1L11
¹³ C-NMR	P44	chemical shift		Liquid crystal	P51
¹³ C-NMR	P103	perturbation	P17	lon grange coupling	
¹³ CNMR 化学シフト	P87	C H 双極子相互作用	P73	constant	P40
¹³ C 化学シフト	P42	conformation	P51	L-ヒスチジン	P76
¹³ C 固体 NMR	P94	cre 結合蛋白質	P11	maltosyl-a-CD	P39
¹³ C スピン拡散 NMR	P88	diffusion	P1	maltotriosyl-a-CD	P39
¹⁵ N	P40	diffusion	P109	MAS 液晶 NMR	1L4
¹⁵ N 緩和測定	P22	direct coupling	P51	Metal hydride	P109
¹⁷ O	P71	DNA 結合ドメイン	P15	Molten Globule State	P34
¹⁹ F - NMR イメージング	P69	DNA 結合ドメイン	P20	MR microscope	1L12
¹⁹ F 固体 NMR	P94	DNA 結合ドメイン	P23	MRI	1L12
¹ H CRAMPS NMR	P76	DNA 複合体	P23	MRMICS	P61
¹ H CRAMPS 法	P81	Dynamics	P107	Multiconformation 解析	1L4
¹ H- ³¹ P 双極子相互作用	P104	E. COSY	P6	Myb リピート	P20
¹ H-NMR	P3	Floquet 理論	P74	NMR	P11
1次元交換 NMR	P75	glucosyl-a-CD	P39	NMR	P15
² D NMR	P99	GNRA tetraloop	P37	NMR	P23
² H NMR	1L9	Grb2	P10	NMR	P25
2-Vinyloxyppyridine	P51	growth-blocking		NMR	P121
2次元 ¹ H-NMR	P26	peptide (GBP)	P26	NMR イメージング	1L11
2次元 TEDOR 法	P72	hDLG	P 9	NMR 構造決定	P8
2面角情報	1L1	H-D 交換	3L12	order parameter	P51
³¹ P NMR	3L13	HETLOC	P7	panosyl-a-CD	P39
3D	P61	His-Asp ホスホリレー	P18	Paramagnetic	
3D	P62	HIV	3L7	Impurities	P107
3軸 PFG	P2	HIV-2	P27	PASS	P7

PB2 ドメイン	P19	Vav	P24	安定同位体標識	3L13
PC	P61	VTMAS	P118	安定同位体標識	P4
PDZ ドメイン	P9	WET	3L6	安定同位体標識	P38
PFOA	P69	Xe	P84	安定同位体標識	P50
PGSE NMR	1L3	Y ₂ O ₂ S	1L8	安定同位体標識	P77
PhoB	P23	yeast ubiquitin		安定同位体標識	P94
planarity	P51	hydrolase 1	P17	安定同位体標識	
PMAA	P83	Zinc finger	P15	ペプチド	P32
protein	P1	zinc finger motif	P27	安定同位体ラベル	3L4
pulse-gradient		$\alpha \rightarrow \beta$ 転移	P33	安定同位体ラベル	P48
spin-echo	P1	α -ヘリックス	P47	安定同位体ラベル	P88
REDOR	P47	β ラクトグロブリン	P33	アンフォールディング	3L10
ribonucleaseA	3L10	π 共役系高分子	P110	イオンダイナミクス	P106
Rm1P	P15	ω_1 -hetero half-		イオンチャンネル	P28
RNA	3L7	filtered TOCSY	P 7	イオンチャンネル	P50
ROESY/MAS	P53	ω -CTX TxVII	P28	イオンチャンネル阻害	P61
SEDOR	P104	(あ行)		イオン間相互作用	P43
SH3 ドメイン	P10			イオン対	1L3
SH3 ドメイン	P24	アキレス腱	1L10	イオン導電体	3L3
Spin-Lattice		圧力	P121	異種核間多量子 NMR 法	P72
Relaxation	P107	アデノシン	P78	位置特異的重水素化	1L2
spin-lattice		アニオン	P43	イミダゾール	P96
relaxation time	P109	アプタマー	3L7	イメージング	P62
SR-MAS 法	P45	アミド水素	P113	イメージング	P63
SS 結合	P61	アミノ酸選択的標識	3L9	イメージング	P114
Stray Field Imaging 法	L6	アミロイド化	P112	インゲン	P65
T ₁	P 3	アラメシチン	P50	インテイン	P 4
tar	3L7	アルカリ-水素-C ₆₀		液晶性高分子	P85
tat	3L7	三元系化合物	P97	エネルギー計算	P57
TFE	P33	アルカリプロマイド		オピオイドペプチド	P70
Tom20P	P12	水溶液	P121	オリザシスタチン	P13
trabecular	P61	安定同位体	3L9	温度較正	P118
TRF	P20	安定同位体核	1L1	温度ジャンプNMR	3L10
triple-resonance NMR	1L2	安定同位体核	P8		
triple-resonance NMR	P16	安定同位体核	P21	(か行)	
ubiquitin	P17	安定同位体核	P37	回転座標系	P63

回転偏光	P119	肝臓	1L11	交換 NMR	P96
化学シフト	P56	感度	P117	交差緩和時間	P34
化学シフト	P71	緩和	P66	構造解析	P14
化学シフト	P86	緩和解析	P18	構造解析	P35
化学シフト異方性	3L4	緩和時間	P54	構造決定	P32
化学シフト異方性	P31	緩和時間	P80	構造多形性	3L13
化学シフト異方性	P48	緩和時間	P106	構造転移	P112
化学シフト異方性	P78	緩和時間の異方性	1L5	高速スイッチング	
化学シフト異方性	P88	過冷却	P64	磁場勾配	P102
化学シフト異方性	P96	過冷却液晶状態	P85	高分解能 MAS 溶液	
化学シフト画像	1L10	希ガス	P119	プローブ	P52
化学シフト画像	P67	絹フィブロイン	3L4	高分解能スペクトル	P52
化学シフト計算	P35	絹フィブロイン	P88	高分子	P93
化学シフト値予測	P57	機能性チタン複合		高分子ゲル	P58
化学シフトテンソル	3L5	酸化物	P103	高分子混合体	P84
化学シフトテンソル	P82	金属イオン	P49	高分子微量構造	P44
化学シフトテンソル	P110	グラジエントエコー	P3	光励起三重項状態	P79
化学シフトマップ	P35	グリシン	P76	ゴーシュ	
化学交換	P67	クレアチニン	P57	コンホメーション	P90
化学平衡	P57	クレアチン	P57	固相合成	P45
拡散	P108	クレアチンキナーゼ	P67	固体 ^{13}C NMR	P90
拡散係数	P41	傾斜磁場	P114	固体 ^{13}C - ^2H 2 次元	
拡散測定	P65	ケギン構造	P104	相関 MASNMR 法	P72
拡散定数	P3	結晶化	P92	固体 ^2D NMR	P113
核スピン-電子スピン		結晶構造	P108	固体 ^2H -NMR	P98
相互作用	P101	結晶構造	P76	固体 ^2H -NMR	P101
角度依存重水素 NMR	1L5	結晶・非晶構造	3L4	固体 2 次元交換	
核四極相互作用	P99	結晶・非晶構造	P88	^{13}C -NMR	P83
核四極相互作用	P105	ケミカルシフト	P108	固体 NMR	3L4
化合物半導体	P117	原子間距離	P70	固体 NMR	P73
カチオン	P43	高圧	P84	固体 NMR	P77
活性ヒスチジン	P18	高圧 NMR	P115	固体 NMR	P100
カルシウム	P14	高圧セル	P115	固体 NMR	P105
肝細胞癌	1L11	光学異性体	P100	固体 NMR	P110
環状エンケファリン	1L4	光学活性	P68	固体 NMR	P116
完全固溶体	P108	光学分割	P111	固体 NMR	P95

固体イメージング	1L6	四極子核	P113	水素-重水素	
固体イメージング	P102	シグナル認識粒子	P38	交換反応機構	P42
固体高磁場 NMR	P71	シクロファン	P115	水分挙動	1L7
固体高分解能 NMR	P46	シクロヘキサン	1L9	水溶液	P52
固体高分解能 NMR	P47	自己拡散係数	1L3	水溶性錯体	P103
固体高分解能 NMR	P49	システイン		スピンエコー	P74
固体高分解能 NMR	P50	プロテイナーゼ阻害剤	P13	スピンエコー	P82
固体高分解能 NMR	P71	ジスルフィド結合	P28	スピン拡散	P111
固体高分解能 NMR	P78	自動抽出	P62	スピン結合定数の符号	P6
固体高分解能 NMR	P84	磁場配向膜	3L5	スピン-格子緩和速度	P121
固体高分解能 NMR	P85	磁場配向膜	P47	スペクトル処理	P66
固体高分解能 NMR	P112	磁場配向膜	P50	正弦的磁場勾配	P102
固体構造	P85	磁場勾配パルス	P40	静電相互作用	P25
コノトキシソ	P61	シフト試薬	P68	生理活性ペプチド	3L5
コヒーレンス	P55	シミュレーション	P54	ゼオライト KL	1L9
コンビナトリアル		重水素 NMR	1L7	石英高圧セル	P115
ケミストー	P45	重水素化	P16	接触イオン対	P43
コンフォメーション	P46	重水素化蛋白質	P32	ゼロ量子 NMR	3L2
コンフォメーション	P49	縮合多環化合物	P95	選択励起	P75
コンホメーション	P53	主鎖微小揺らぎ	1L5	前置増幅器	P117
コンホメーション	P86	硝酸鉛	P118	全トランス連鎖結晶	P92
コンホメーション	P87	常磁性	P31	造影剤	1L11
(さ行)		常磁性 NMR	P30	双極子相互作用	P78
サイクリング		常磁性物質	P72	層状化合物 V_2O_5	P98
サイドバンド	P44	蒸発量	3L1	相対性効果	P56
細胞の水	P65	上皮成長因子 EGF	P26	相対配置決定	P70
鎖状炭化水素	P95	植物	P64	相転移	P54
三次元	P61	植物ホルモン応答	3L11	相転移	P90
三次構造	P34	シンジオタクチック		ゾル-ゲル転移	P80
酸素 17	P114	ポリプロピレ	P92	(た行)	
紫外線損傷 DNA	3L13	水素結合	P30	代謝物質	P68
磁化移動		水素結合	P81	ダイナミクス	P33
コントラスト法	P58	水素結合	P96	ダイナミクス	P93
磁気異方性	3L5	水素結合	P101	多核 NMR	P43
磁気緩和	3L12	水素結合	P113	多核多次元 TRNOE 法	P32
		水素交換反応速度	P30		

多核実験	P2	転写因子	3L11	ステイミュレイテッド	
多次元 NMR	3L9	転写因子	3L12	エコー法	P65
多次元 NMR	3L11	転写活性化ドメイン	P11	パルスグラディエント	
多次元 NMR	P9	凍結	P64	スピンエコー法	P65
多次元 NMR	P12	凍結乾燥製剤	P91	パルスチューブ	3L1
多次元 NMR	P14	同種核 2 スピン系	P74	パルス磁場勾配	P41
多次元 NMR	P18	動的核偏極	P79	パルス磁場勾配法	P106
多次元 NMR	P19	動的構造	1L1	光ポンピング	P119
多次元 NMR	P77	動的構造	P37	ヒトカルシトニン	P112
多次元固体 NMR	3L2			ヒト血清アルブミン	P34
多次元相関 NMR 法	P111	(な行)		ビフェニル	P87
多スピン REDOR	P70	ナトリウムチャンネル	P25	広幅 NMR	1L7
脱水反応	P83	二次元固体 NMR	P82	部位特異的標識	3L9
多面体	P62	二次構造	P34	不活性化ゲート	P25
タンパク質	1L2	二重共鳴	3L3	複合体	P9
タンパク質	P14	二相モデル	P80	物性	1L7
タンパク質	P35	ニトロアニリン	P105	プロトン NMR	P61
タンパク質	P91	二本鎖型界面活性剤	P42	プロトンポンプ	P46
蛋白質-DNA 複合体	3L11	二面角	P78	分岐シクロ	
タンパク質-RNA		二量子フィルター	1L10	デキストリン	P39
相互作用	P38	ヌクレオキャプシド		分子運動	P85
蛋白質間相互作用	3L12	タンパク質	P27	分子運動	P90
蛋白質構造	3L12	熱力学的パラメータ	P42	分子運動性	P91
蛋白質小分子相互作用	P32	ノイズ	3L1	分子間交差緩和	P58
タンパク質		脳	P68	分子間双極子相互作用	P70
タンパク質相互作用	P16	脳内蛋白質	P8	分子動力学	3L11
蛋白質変性	P21			分子動力学計算	P54
チタンクエン酸錯	P103	(は行)		分子内運動	P3
チトクロム c_3	P31	配向構造	P48	分子認識	P19
超イオン導電体	P54	配向分布	1L5	分析	P68
超低磁場 NMR	P79	ハイドロゲル	P41	ヘテロポリ酸	P104
デジタル任意波形		配列	P111	ペプチド	P35
発生装置	P116	バクテリオロドプシン	P46	ペプチド	P71
テロメア	P20	バクテリオロドプシン	P49	ペプチド	P82
電子構造	P30	バクテリオロドプシン	P94	ペプチド	P113
電子スピン密度	P101	パルスグラディエント		ペプチド	P28

ペプチド	P52	ミトコンドリア	P12	立体構造解析	P11
ベンゼン	1L9	無細胞タンパク質		立体構造解析	P13
芳香族アミノ酸	1L2	合成系	3L9	立体構造決定	P77
包接化合物	P111	木材	1L7	リボソーム	P69
飽和移動	P67	モノクローナル抗体	3L13	硫酸キニジン	P53
ポータブル MRI	1L12			リン 31	P114
骨	P61	(や行)		リン脂質二重膜	3L5
ポリイミド	P86	有機強磁性体	P101	リン脂質二重膜	P47
ポリエチレン繊維	P90	優先富化	P100	リン脂質膜	P48
ポリビニルアルコール	P81	誘電共振	P59	リン脂質膜	P52
ポリプロピレン	P44	誘電損失	P59	冷凍機	3L1
ポリペプチド	1L5	誘電率	P59	レンダリング	P60
ポリペプチド	P80	溶液構造	P19		
翻訳開始因子	P22	溶媒消去	P2		
		溶媒のダイナミックス	P80		
(ま行)		溶媒和	1L3		
マイクロイメージング	P64	四級炭素	P6		
マウス	P67				
膜蛋白質	P46	(ら行)			
膜蛋白質	P49	ラクトアルブミン	3L10		
膜タンパク質	P94	ラジオ波磁場勾配	P63		
マグネット	3L1	ラセミ化合物結晶	P100		
マジックエコー	P102	ランタノイド	1L8		
マジック角回転	3L2	リアルタイム	P61		
マジック角試料回転	P73	リオトロピック液晶	P53		
マジック角試料回転	P74	リゾチーム	3L10		
マジック角試料回転	P77	リチウム	P106		
マジック角試料回転	P82	リチウムイオン	1L3		
マジック角試料回転	P110	立体構造	1L1		
マストバラン	P48	立体構造	P21		
ミオグロビン	P30	立体構造	P23		
マイクロポアー	P93	立体構造	P27		
水の運動	P98	立体構造	P28		
水分子	1L10	立体構造	P29		
水分子	P121	立体構造の			
ミセル表面電荷	P42	シミュレーション	P39		

著者索引

(アルファベット)

A. V. Afonin	P51	H. Shinar	1L10	安立直剛	P62
Mark D. Allen	3L11	T. P. Spaniol	3L2	安立直剛	1L12
Sergey Bakulin	P120	Rajesh Sundaresan	P17	安立直剛	P61
B. Bandyopadhyay	P109	L. Tsoref	1L10	安達久彰	P95
Car A. Batt	P33	Robert Tycko	2L2	阿部啓子	P13
Ad Bax	2L1	A. V. Vashchenko	P51	阿部義人	P12
F. A. Fossey	P88	G. Wagner	P22	荒井綜一	P13
Colin A. Fyfe	3L3	Warren S. Warren	2L3	新井盛勝	1L3
Cirilo	1L3	Antony William	P120	荒田洋治	3L13
Garcia-Martinez		M. P. Williamson	P35	荒田洋治	P64
Hiltrud Grondey	3L3	Kurt Wüthrich	3L8	Yoji Arata	P1
Peter Konig	P20	Xiulan Xie	P107	安藤 勲	P113
P. K. R. Kumar	3L7	(あ行)		安藤 勲	P86
Janos K. Lanyi	P49	相沢智康	P26	安藤慎治	P86
Janos K. Lanyi	P46	相原雄一	1L3	安藤慎治	P87
E. D. Laue	1L2	相本三郎	P20	阿武 泉	1L12
V. Mandiyan	P10	青木雅弘	3L6	阿武 泉	P61
Tom Markus	3L3	青柳東彦	P48	飯島隆広	P99
P. J. McDonald	1L6	赤井智子	P106	池上貴久	P18
A. M. McGuire	P22	赤坂一之	3L10	池上貴久	P9
A. Mitchell	P15	赤坂一之	P115	池上貴久	3L12
Dmitry Mityushev	P120	秋山 徹	P9	生駒和也	1L10
G. Navon	1L10	阿久津秀雄	P31	井澤邦輔	P57
Richard Needleman	P49	阿久津秀雄	P78	石井俊輔	P11
Richard Needleman	P46	阿久津秀雄	P77	石井張愛	P86
B. Newling	1L6	阿久津秀雄	P91	石川雅也	P64
D. Nietlispach	1L2	浅川直紀	P82	石黒正路	P94
William S. Price	P1	浅川直紀	P110	石田信昭	P65
William S. Price	P64	朝倉哲郎	P35	石田宏之	P85
Sundaresan Rajesh	P16	朝倉哲郎	3L4	石塚靖子	P39
Detlef Reichert	P75	朝倉哲郎	P88	石原康利	P66
J. Schlessinger	P10	朝倉哲郎	P48	石村 巽	P30
Vladimir Shilay	P120	浅野敦志	P83	泉岡 明	P101
		阿曾幸男	P41	泉川大輔	1L5
		阿曾幸男	P91	磯田由美	P80

磯辺俊明	P8	鶴澤 洵	P100	小川秀次郎	P65
板井悠二	1L11	鶴沢 洵	1L7	小椋賢治	P24
井田朋智	P54	宇田広子	P11	小椋賢治	P10
射手園佳子	3L6	内山幸男	P58	尾崎拓男	P71
井出博之	P64	内海博明	P40	尾崎 順	3L12
伊藤 聡	3L1	梅田匡朗	P66	小田正記	P66
伊藤隆司	P19	江川 毅	P30	女屋博昭	1L11
伊藤俊樹	P72	江口暁子	P76	小野 晶	P37
伊藤暢聡	P4	江口太郎	P93	小野 明	P37
伊藤 隆	P16	海老澤計慶	P76	小野真之介	P113
伊藤 隆	P17	海老沢計慶	P57	折井謙吾	P99
伊藤 隆	1L2	戎井悦子	P24		
稲垣冬彦	P55	恵良聖一	P34	(か行)	
稲垣冬彦	P24	恵良聖一	P58	甲斐莊正恒	P37
稲垣冬彦	P10	恵良聖一	P33	甲斐莊正恒	1L1
井上さゆり	P49	遠藤一央	P108	甲斐莊正恒	P21
井上さゆり	P46	遠藤一央	P54	甲斐莊正恒	P8
井上多門	P102	遠藤斗志也	P12	垣花真人	P103
井上康彦	3L1	大石 修	P106	梶 弘典	P81
井上義夫	P82	大木 出	P9	梶 弘典	P90
井上義夫	P110	大城由紀	P112	梶 裕之	P21
今泉孝幸	P79	大高 章	P25	片平正人	3L7
今城文雄	P111	大竹亮子	P57	加藤和夫	P58
入口紀男	P59	大塚栄子	3L13	加藤晃一	3L13
岩下 孝	P94	大友崇紀	P4	金沢洋子	P67
岩下 孝	P3	大野綾子	P21	金沢洋子	P69
岩館満雄	P35	大野綾子	P8	金松知幸	P66
岩原淳二	P14	大野光宏	1L2	狩野広美	P65
岩本真理子	P16	大平康正	P92	上平美弥	P112
岩本真理子	P17	大村友章	P31	亀田恒徳	3L4
上垣浩一	P4	岡田輝政	P18	亀田恒徳	P88
上杉晴一	3L7	岡田輝政	3L12	唐澤 薫	3L6
上田貴洋	P93	緒方啓典	P97	河合剛太	P31
上田貴洋	P96	岡林博文	P42	河合剛太	P38
上田貴洋	P104	岡村英保	P23	川上 勝	3L10
上野照剛	P59	岡本和也	P66	川口 謙	P52

川崎政人	P10	栗林秀人	P67	駒田陽三	P42
河野敬一	P26	栗原範明	P117	小松康雄	3L13
川端 潤	P7	栗原徳正	P30		
河原郁子	3L6	黒木重樹	P113	(さ行)	
木川隆則	3L9	黒子弘道	P87	斉藤一功	3L1
木川隆則	P14	黒田義弘	P25	齋藤公児	1L6
菊池 章	P14	黒津卓三	P83	斉藤 肇	P49
橘高茂治	P98	桑田一夫	P33	斉藤 肇	P46
紀ノ定保臣	P58	桑原和弘	P90	斉藤 肇	3L5
木下隆利	P36	桑原大介	P74	斉藤 肇	P70
木下隆利	P89	小泉美香	P65	斉藤 肇	P50
金 鍾文	P94	神田大輔	P19	斉藤 肇	P112
A. Kimura	P51	神田大輔	P12	斉藤 肇	P47
木村敦臣	P69	河野俊之	P32	坂本泰一	P16
木村敦臣	P53	河野俊之	P16	坂本泰一	P17
木村敦臣	1L4	河野俊之	P17	坂本泰一	P38
木村一雄	P52	河野俊之	P28	櫻井智司	P91
木村成輝	3L5	河野俊之	P27	櫻井 実	P82
木村成輝	P47	河野俊之	P29	櫻井 実	P110
木村潤子	P108	小柴生造	P14	佐々木 亨	P28
水野元博	P108	小嶋茂雄	P41	佐々木 亨	P29
木村潤子	P54	小嶋茂雄	P91	佐々健太郎	P77
木村英昭	P76	巨瀬勝美	P62	佐藤一紀	P32
京極好正	2L5	巨瀬勝美	1L12	佐藤一紀	P28
京極好正	P4	巨瀬勝美	P60	佐藤一紀	P27
串田克彦	P2	巨瀬勝美	P61	佐藤一紀	P29
楠 英樹	P32	小寺義男	P16	佐藤滋夫	3L12
楠 正美	P55	小寺義男	P17	佐藤孝幸	1L9
工藤紀雄	P13	小寺義男	P27	佐藤陽子	P40
国森公夫	1L9	後藤裕子	P98	鮫島達也	P21
久保 厚	P116	後藤祐児	P33	柴田武彦	P16
久保 厚	3L2	小西英正	P49	柴田武彦	1L2
久保 厚	P72	小林邦子	P28	島 圭吾	P57
窪田俊介	1L5	小林 修	P45	嶋田一夫	3L13
久保田英俊	P8	小林伸一郎	3L7	島田秀夫	P30
熊木康裕	P6	小林信昭	P95	清水昭夫	P121

清水光弘	P15			多比良和誠	3L7
清水秀明	P63	(た行)		田村 充	P114
清水弘之	P84	田岡万悟	P8	田村 類	P100
下村康夫	1L8	高岡一馬	P116	丹所正孝	3L3
莊司 顯	P76	高木 優	3L11	塚田裕三	P66
小代俊浩	P12	高橋征三	P68	月城聖一	P69
白川昌宏	P18	高橋俊朗	P118	月城聖一	1L4
白川昌宏	P9	高橋弘樹	P100	辻 暁	P49
白川昌宏	3L12	高橋三雄	P57	辻 暁	P46
神藤平三郎	P15	高原周一	P98	辻 暁	3L5
末澤裕子	P43	高宮尚武	1L10	辻 暁	P70
末松浩人	P117	武川雅英	P80	辻 暁	P50
菅瀬謙治	P3	竹腰清乃理	P79	辻 暁	P112
菅原 正	P101	竹腰清之理	P84	辻 暁	P47
杉浦眞喜子	P53	竹腰清乃理	P111	辻田義治	P36
杉沢寿志	P76	竹腰清乃理	P75	辻田義治	P89
杉沢寿志	P118	竹腰清乃理	P73	土田信夫	P16
鈴木栄一	P78	武田和行	P79	土屋征司	1L1
鈴木栄一郎	P76	武田 定	P101	Fumihiko Tsuchiya	P1
鈴木栄一郎	P57	武田 定	P98	堤 耀広	P80
鈴木智幸	P89	竹野入正利	P82	堤 耀広	1L5
鈴木 冲	P95	多田 大	P103	津野久幸	P45
鈴木 理	3L11	立木あゆ美	P32	出口健三	P76
鈴間 聡	P38	辰巳奉正	P104	出村 誠	3L4
須田真輔	P21	楯 真一	P37	出村 誠	P88
須原正彦	P99	楯 真一	1L1	出村 誠	P48
須原正彦	P108	楯 真一	P21	寺内 勉	1L1
須原正彦	P54	楯 真一	P8	寺尾武彦	P79
住本英樹	P19	舘野賢	3L11	寺尾武彦	P84
瀬尾芳輝	1L10	田中一二三	P25	寺尾武彦	P111
関 宏子	P40	田中剛史	P32	寺尾武彦	P116
関谷紀子	P94	谷生道一	P49	寺尾武彦	3L2
瀬戸治男	P5	谷生道一	P46	寺尾武彦	P72
瀬戸治男	3L6	谷口吉弘	P121	寺尾武彦	P75
曾我美 勝	P34	谷 知広	P80	寺尾武彦	P73
曾我美 勝	P58	田之倉 優	P13	寺沢宏明	P10

土井幹雄	1L11	中村亘男	P96	花岡慎悟	P23
徳永達裕	P40	中村亘男	P104	馬場雄久	P56
鳥澤拓也	3L13	中村春木	P4	馬場俊秀	P118
		中村義之	P103	早川洋一	P26
(な行)		中山 登	3L6	早川喜子	P36
内藤 晶	P49	中山尋量	P93	林 繁信	P109
内藤 晶	P46	新留琢郎	P48	林 繁信	P107
内藤 晶	3L5	二階堂 修	3L13	林 繁信	1L9
内藤 晶	P70	西川忠輝	P20	林 繁信	P105
内藤 晶	P50	西川和義	P115	林 征治	3L1
内藤 晶	P112	西川 諭	3L7	早水紀久子	1L3
内藤 晶	P47	西澤 節	3L1	原園としえ	1L8
中井利仁	P102	西館数芽	P54	原田英里砂	P31
中井利仁	P74	酉中清寿子	P115	樋岡克哉	P45
永井直樹	P58	西村善文	P20	引地邦男	2L4
中沖隆彦	P92	西村勝之	P70	引地邦男	P26
永尾 隆	3L5	西村善文	P11	引地邦男	P6
永尾 隆	P50	西村善文	P23	尾藤良孝	P114
中川照眞	P25	西山幸三郎	1L1	柴田俊之	1L7
中越雅道	P40	仁木國雄	P95	平井篤樹	P54
永阪文惣	P93	新田勝利	P26	平沖敏文	P80
中沢賢一	P11	根本 直	P39	平沖敏文	1L5
中島勝弥	P32	根本暢明	P2	平賀隆	P119
永田宏次	P13	野坂篤子	P112	平野利好	P32
永田宏次	P24	野中正幸	P102	平山順也	P18
長土居有隆	P20	則定和志	3L5	廣明秀一	P19
長土居有隆	P11			廣田 穰	P43
長土居有隆	P23	(は行)		廣中俊也	P87
長友重紀	P96	拝師智之	P62	福井洋之	P56
中西洋志	P39	拝師智之	1L12	福士江里	P7
中村かおり	P76	拝師智之	P60	藤井信孝	P25
中村浩二	P34	拝師智之	P61	藤田憲一	P39
中村幸治	P38	畠中秀樹	P24	藤谷直樹	P26
中村新治	P111	畠中秀樹	P10	藤原敏道	P31
仲村高志	P100	服部峰之	P63	藤原敏道	P78
中村亘男	P93	服部峰之	P119	藤原敏道	P77

藤原敏道	P91	水野 敬	P75	山本展裕	3L13
H. Fujiwara	P51	水野 猛	P18	山本泰彦	P30
藤原英明	P69	水野元博	P99	山本利香	3L7
藤原英明	P53	水野元博	P54	湯川泰宏	P59
藤原英明	1L4	溝上 潤	P79	湯沢 聡	P10
藤原正子	P39	三森文行	1L11	横田恭宣	P46
藤原美穂	P36	南澤明子	1L7	横地政志	P55
文野浩一	P121	宮内 実	P89	横山茂之	3L9
降旗一夫	P5	宮下 新	P37	横山茂之	P14
降旗一夫	3L6	宮島清一	P97	吉岡澄江	P41
星野 大	P33	宮島清一	P106	吉岡澄江	P91
堀井文敬	P85	宮島清一	P74	吉岡 大	1L11
堀井文敬	P92	宮本和英	P25	吉岡 大	1L12
堀井文敬	P81	三好利一	P84	吉岡 大	P61
堀井文敬	P90	村上政隆	1L10	吉野明広	P42
堀由美子	P48	村瀬敦司	P15	吉原和雄	P94
		室 文人	P115	吉水広明	P36
(ま行)		森岡弘志	3L13	吉水広明	P89
前川利男	P11	森 輝雄	P44	吉村祥子	P20
前田忠計	P27	森本英敏	P85		
前田能崇	P25	守谷哲郎	P63	(わ行)	
牧野耕三	P23	守谷哲郎	P119	若松 馨	P32
正木春彦	1L2			渡漫愛子	P115
増井大二	P96	(や行)		渡辺公綱	P31
増田憲二	P81	矢ヶ崎隆義	P95	渡辺徳子	1L8
松井 茂	P102	矢吹 孝	3L9	渡邊英宏	P66
松井 裕	1L1	山口絵未	3L9	和田弘昭	3L3
松井 裕	P21	山口 兆	P101		
松井 裕	P8	山口 悟	P49		
松尾 浩	P22	山口秀幸	3L12		
松下未知雄	P101	山崎和彦	3L11		
松島 秀	P58	山崎高生	P38		
丸木理世	3L13	山崎俊夫	P4		
丸田悟朗	P101	山田博昭	P115		
丸田悟朗	P98	山根國男	P38		
三島正規	3L12	山本隆一	P110		

参加者名簿

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
Bilwadal Bandyopadhyay	物質工学工業技術研究所基礎部固体NMRグループ 305-8565 茨城県つくば市東 1-1	0298-54-4515 bilwa@nimc.go.jp	直通	0298-54-4524
Ad Bax	Lab. of Chem. Phys., NIDDK, NIH 20892-05 Bethesda, MD, USA	1-301-496-2848 bax@speck.nidk.gov	直通	1-301-402-0907
William. S. Price	機能水研究所 305-0047 つくば市千現 2-1-6	0298-58-6186 wprice@wri.co.jp	直通	0298-58-6144
Robert Tycko	Lab. of Chem. Phys., NIDDK, NIH 20892-05 Bethesda, MD, USA	tycko@helix.nih.gov	直通	
Alexander Vashchenko	大阪大学医学部保健学科 565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-7	06-879-2577 sasha@sahs.med.osaka-u.ac.jp	直通	06-879-2577
Markus Waelchli	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1235 mrw@bruker.co.jp	24	0298-58-0322
Warren S. Warren	Department of Chemistry, Princeton University 08544-10 Princeton, NJ, USA	1-609-258-3910 WWARREN@Princeton.edu	直通	1-609-258-6746
Kurt Wuthrich	Molekularbiologie und Biophysik, ETH Honggerberg CH-8093 Zurich, Switzerland	41-1-633-2473	直通	41-1-633-1151
Xiulan Xie	物質工学工業技術研究所基礎部固体NMRグループ 305-8565 茨城県つくば市東 1-1	0298-54-4515 xiulan@nimc.go.jp	直通	0298-54-4524
相沢智康	北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻 060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-2771 aizawa@polymer.sci.hokudai.ac.jp	直通	011-706-2771
赤井智子	大阪工業技術研究所 563-8577 池田市緑ヶ丘 1-8-31	0727-51-9543 akai@onri.go.jp	直通	0727-51-9627
赤路眞佐子	京都大学薬学部NMR室 606-01 京都市左京区吉田下阿達町 46-29	075-753-4516 makaji@pharm.kyoto-u.ac.jp.	直通	無
阿久津秀雄	横浜国立大学工学部物質工学科 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4232 akutsu@ynu.ac.jp	直通	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 226-8501 横浜市緑区長津田町4259	045-924-5796 nasakawa@bio.titech.ac.jp	直通	045-924-5827
朝倉克夫	千葉大学理学部化学科 263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33	043-290-2888 asakura@scichem.c.chiba-u.ac.jp	直通	043-290-2791
朝倉哲郎	東京農工大学工学部 184-8588 小金井市中町 2-24-16	042-388-7733 asakura@cc.tuat.ac.jp	直通	042-383-7733
浅野敦志	防衛大学校化学教室 239-8686 横須賀市走水 1-10-20	0468-41-3810 asanoa@cc.nda.ac.jp	3596	0468-44-5901
浅野敦志	防衛大学校化学教室 239-8686 横須賀市走水 1-10-20	0468-41-3810 asanoa@cc.nda.ac.jp	3596	0468-44-5901
芦田 淳	バリアンジャパン 108-0023 東京都港区芝浦 4-16-36住友芝浦ビル	03-5232-1238 jun.ashida@jp.varian.com	直通	03-5232-1264

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
阿曾幸男	国立医薬品食品衛生研究所 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1	03-3700-1141 aso@nihs.go.jp	227	03-3707-6950
足立恭子	海洋バイオテクノロジー研究所 424-0037 清水市袖師町 1900	0543-66-9213 kadachi@shimizu.mbio.co.jp	直通	0543-66-9255
安立直剛	筑波大学物理工学系巨瀬研究室 305-8573 つくば市天王台 1-1-1	0298-53-5214 adachi@fourier.bk.tsukuba.ac.jp	直通	0298-53-5205
穴井孝弘	日本電子株式会社分析器機技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 anai@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
阿部真之	協和発酵工業(株)医薬研究所開発研究所 411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188	0559-89-2020 無	直通	0559-86-7430
荒田洋治	機能水研究所 305-0047 つくば市千現 2-1-6	0298-58-6183 arata@wri.co.jp	直通	0298-58-6166
安藤勲	東京工業大学大学院理工学研究科物質科学専攻 152-8552 目黒区大岡山 2-12-1	03-5734-2139 iando@polymer.titech.ac.jp		
安中雅彦	千葉大学工学部物質工学科高分子化学講座 263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33	043-290-3409 annaka@planet.tc.chiba-u.ac.jp	直通	043-290-3401
飯島隆広	金沢大学理学部化学科 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 ijima@wrron1.s.kanazawa-u.ac.jp	直通	076-264-5742
池田龍一	筑波大学化学系 305-8571 つくば市天王台 1-1-1	0298-53-4250 ikeda@staff.chem.tsukuba.ac.jp	直通	0298-53-6503
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 152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1	03-3726-1111 hishiix@polymer.titech.ac.jp	4250	03-5734-2889
石田信昭	食品総合研究所分析評価部品質情報解析研究室 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-2	0298-38-8057 nobu@nfri.affrc.go.jp	直通	0298-38-7996
石田宏之	京都大学化学研究所材料物性基礎III 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 hiro@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	直通	0774-38-3148
石塚靖子	生命工学工業技術研究所 305-8566 つくば市東 1-1	0298-54-6125 ishizuka@nibh.go.jp	直通	0298-54-6135
井田朋智	金沢大学理学部化学科 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 ida_t@wrron1.s.kanazawa-u.ac.jp	直通	076-264-5742
射手園佳子	日本ロシュ研究所機器分析グループ 247-8530 鎌倉市梶原 200	0467-47-2209 yoshiko.itezono@roche.com	直通	0467-45-6815
井出博之	(株)機能水研究所 305-0047 つくば市千現 2-1-6 研究支援センター内	0298-58-6186 ide@wri.co.jp	直通	0298-58-6144
稲垣冬彦	東京都臨床医学総合研究所生体活性物質研究部門 113-8613 東京都文京区本駒込 3-18-22	03-3823-1309 inagaki@rinshoken.or.jp	直通	03-3823-1247
猪原武男	小野薬品工業(株)水無瀬総合研究所 618-8585 大阪府三島郡島本町桜井 3-1-1	075-961-1151 inohara@magical.egg.or.jp	5607	075-962-9314

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
今泉幸幸	京都大学大学院理学研究科化学専攻 606 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 tak@kuchem.kyoto-u.ac.jp	直通	無
今城文雄	京都大学大学院理学研究科 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4033 imashiro@kuchem.kyoto-u.ac.jp	直通	075-753-4033
井町美佐子	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1235 mi@bruker.co.jp	20	0298-58-0322
岩下 孝	(財)サントリー生物有機科学研究所 618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1	075-962-3742 iwashita@sunbor.or.jp	直通	075-962-2115
岩瀬由紀子	福岡大学薬学部 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1	092-871-6631 iwase@psat.fukuoka-u.ac.jp	6651	092-863-0389
岩館満雄	東京農工大学工学研究科物質生物工学専攻 184-8588 小金井市中町 2-24-16	042-388-7025 iwadate@cc.tuat.ac.jp	直通	042-383-7733
植木定雄	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1234 su@bruker.co.jp	43	0298-58-0322
上杉晴一	横浜国立大学工学部物質工学科 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4265 uesugi@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	直通	045-339-4265
上田貴洋	大阪大学大学院理学研究科化学専攻 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-16	06-850-5779 ueda@ch.wani.osaka-u.ac.jp	直通	06-850-5785
上埜正夫	出光石油化学株式会社樹脂研究所 299-0193 市原市姉崎海岸 1-1	0436-60-1837 BXS03466@nifty.ne.jp	直通	0436-60-1033
内田さやか	東京大学工学系研究科応用化学専攻御園生研究室 113-8696 東京都文京区本郷 7-3-1	03-3812-2111 tt76700@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	7273	03-5802-2949
内田宗吉	日本電子株式会社分析器機技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 uchida@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
内海博明	日本電子株式会社分析器機技術本部応用研究センターNM芯用研究グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2241 utumi@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
梅本公子	国際基督教大学理学科 181-8585 三鷹市大沢 3-10-2	0422-33-3256 umemoto@icu.ac.jp	直通	0422-33-1449
江口太郎	大阪大学大学院理学研究科 560-0043 豊中市待兼山町 1-16	06-850-5778 eguchi@ch.wani.osaka-u.ac.jp	直通	06-850-5785
海老沢計慶	味の素中央研究所分析研究部 210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-244-7145 clm_ebisawa@te10.ajinomoto.co.jp	直通	044-211-7604
恵良聖一	岐阜大学医学部生理学教室 500-8705 岐阜市司町 40	058-267-2225 era@cc.gifu-u.ac.jp	直通	058-267-2962
遠藤一央	金沢大学理学部化学科 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 endo@wrron1.s.kanazawa-u.ac.jp	直通	076-264-5742
大胡雄	東京都立大学理学研究科化学 192-0397 八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111 cog@raphael.chem.metro-u.ac.jp	3527	0426-77-2525

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線 FAX
大島(坂本)曜子	東邦大学薬学部中央機器室NMR 274-8510 船橋市三山 2-2-1	0474-72-1282 sakamoto@phar.toho-u.ac.jp	直通 0474-72-1282
大竹亮子	味の素(株)中央研究所 210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-244-7145 clm_ootake@te10.ajinomoto.co.jp	直通 044-211-7609
大津直子	味の素(株)中央研究所 210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-244-7145 clm_ootu@te10.ajinomoto.co.jp	直通 044-211-7609
大平康正	京都大学化学研究所材料物性基礎3 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-31-3154 ohira@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	3154 0774-33-3148
緒方一博	横浜市大医学部構造生物学, KAST緒方プロジェクト 236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9	045-781-6761 ogata@med.yokohama-cu.ac.jp	直通 045-781-6763
岡本和也	㈱東芝研究開発センター情報・通信システム研究所研究第6担当 210-8582 川崎市幸区小向東芝町 1	044-549-2289 kazuya@eel.rdc.toshiba.co.jp	直通 044-520-1308
小川 潔	旭化成工業(株)創薬研究所 410-2321 静岡県田方郡大仁町三福 632-1	0558-76-7085 a9086781@ut.asahi-kasei.co.jp	直通 0558-76-2947
荻野孝史	国立精神神経センター神経研究所 187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	042-341-2711 ogino@ncnp.go.jp	5254 042-342-7521
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 113-8613 東京都文京区本駒込 3-18-22	03-3823-2101 kogura@rinshoken.or.jp	5264 03-3823-1247
小野晶	東京都立大学理学研究科化学 192-0397 八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111 akira@raphael.chem.metro-u.ac.jp	3538 0426-77-2525
小野真之介	東京工業大学大学院物質科学専攻 152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1	03-3726-1111 sono@titpoly-1.polymer.titech.ac.jp	4250 03-5734-2889
甲斐荘正恒	東京都立大学理学研究科化学 192-0397 八王子市南大沢 1-1	0426-77-2544 kainosho@raphael.chem.metro-u.ac.jp	直通 0426-77-2525
垣田信吾	協和発酵工業 東京研究所 194-8533 町田市旭町 3-6-6	0427-25-2555 skakita@kyowa.co.jp	2220 0427-26-8330
笠原文子	武田薬品工業(株)創薬研究本部医薬品化学研究所 532-8686 大阪市淀川区十三本町2丁目 17-85	06-300-6618 Kasahara_Fumiko@takoda.co.jp	直通 06-300-6306
片岡 弘	(財)地球環境産業技術研究機構環境触媒研究室 619-0292 京都府相楽郡木津町木津川台 9-2	0774-75-2305 orb@rite.or.jp	直通 0774-75-2318
片平律子	協和発酵工業株式会社東京研究所 194-0023 町田市旭町 3-6-6	0427-25-2555 rkatahira@kyowa.co.jp	2220 0427-26-8330
加藤晃一	東京大学大学院薬学系研究科 113-0033 文京区本郷 7-3-1	03-3812-2111 kkato@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	4812 03-3815-6540
加藤有介	東京大学院農学生命科学研究科応用生命化学食品工学(田之倉研) 113-8657 文京区弥生 1-1-1	03-3812-2111 ss77183@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	3072 03-5802-3326
狩野広美	農業生物資源研究所 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2	0298-38-8378 無	直通 0298-38-7408

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線 FAX
上平美弥	姫路工業大学理学部生命科学科 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町金出地 1479-1	07915-8-0182 kamihira@sci.himeji-tech.ac.jp	直通 07915-8-0182
鴨 修	日本電子顕微鏡分析機器技術本部応用研究センター-NM応用研究グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2241 kamo@jeol.co.jp	直通 042-546-8068
川口哲朗	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	06-339-7008 twk@bruker.co.jp	直通 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 113-8613 東京都文京区本駒込 3-18-22	03-3823-2101 mkawasak@rinshoken.or.jp	5263 03-3823-1247
川島裕之	資源環境技術総合研究所エネルギー資源部 305-8569 つくば市小野川 16-3	0298-58-8413 hk@nire.go.jp	直通 0298-58-8408
河野敬一	富山医科薬科大学薬学部 930-0194 富山市杉谷 2630	0764-34-5061 kawano@ms.toyama-mpu.ac.jp	直通 0764-34-5061
川端 潤	北海道大学農学部生物機能化学科 060-8589 札幌市北区北9条西9丁目	011-706-4140 junk@chem.agr.hokuai.ac.jp	直通 011-706-2496
木田 惇	日本電子(株)分析機器技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 kida@jeol.co.jp	直通 042-542-8068
氣田佳喜	日本電子顕微鏡設計技術本部第三設計部電気技術グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2240 ykida@jeol.co.jp	042-546-8760
絹巻明生	田辺製薬株式会社 創薬研究所 335-8505 戸田市川岸 2-2-50	048-433-2631 a-kinmki@tanabe.co.jp	直通 048-433-2610
木村敦臣	大阪大学医学部保健学科 565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-7	06-879-2577 Kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp	直通 06-879-2577
木村成輝	姫路工業大学理学研究科生命科学専攻生体物質構造学講座 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町金出地 1475-2	07915-8-0182 shigeki@sci.himeji-tech.ac.jp	直通 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 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 kimura@wron1.s.kanazawa-u.ac.jp	直通 076-264-5742
木村雅晴	住友化学工業(株)生物環境科学研究所 554-0022 大阪市此花区春日出中 3-1-98	06-466-5172 kimuram@sumitomo-chem.co.jp	直通 06-466-5459
木村由美子	日本大学薬学部分析センター 274-8555 船橋市習志野台 7-7-1	0474-65-7362 EZH02437@ne.jp	直通 0474-65-7362
木山泰範	日本新薬株式会社薬剂研究部 601-8550 京都市南区西大路通り八条下がる	075-321-9101 ykiyama@mb.infoweb.ne.jp	直通 075-321-9038
京極好正	大阪大学蛋白質研究所 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2	06-879-8597 kyogoku@protein.osaka-u.ac.jp	直通 06-879-8599
串田克彦	バリアンジャパン 108-0084 東京都港区芝浦 4-16-36住友芝浦ビル	03-5232-1238 katsuhiko.kushida@jp.varian.com	直通 03-5232-1264
楠 英樹	三菱化学生命科学研究所構造解析研究室 194-0031 町田市南大谷 11	0427-24-6285 kusunoki@libra.ls.m-kagaku.co.jp	直通 0427-24-6296

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
久保厚	京都大学理学部化学教室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4014 a.kubo@kuchem.kyoto-u.ac.jp	直通	075-753-4000
久保田高明	北海道大学大学院薬学研究科 060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	011-706-3922 無	直通	011-706-4989
熊沢茂則	静岡県立大学食品栄養科学部食品学科 422-8526 静岡市谷田 52-1	054-264-5525 kumazawa@smail.u-shizuoka-ken.ac.jp	直通	054-264-5551
栗林秀人	九州大学薬学部 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1	092-642-6624 kurihide@pch.phar.kyushu-u.ac.jp	直通	092-642-6545
栗原範明	日本電子(株)分析器機技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 kurihara@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
黒木重樹	東京工業大学大学院物質科学専攻 152-8552 目黒区大岡山 2-12-1	03-5734-2889 skuroki@polymer.titech.ac.jp	直通	03-5734-2889
黒子弘道	奈良女子大学生活環境学部アパレル科学講座 630-8506 奈良市北魚屋西町	0742-20-3461 kurosuo@cc.nara-wu.ac.jp	直通	0742-20-3461
黒田幸夫	日本ブルー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1236 yk@bruker.co.jp	33	0298-58-0322
黒田義弘	京都大学薬学研究科 606-8501 京都市左京区吉田下阿達町	075-753-4530 yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp	直通	075-753-4578
桑野晴光	(株)科学技術研究所分析部 140-0001 品川区北品川 3-10-2	03-3474-6662 無	513	03-3474-6650
桑原 和弘	京都大学化学研究所材料物性基礎研究部門III 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 kuwaba@modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp	直通	0774-38-3148
小泉美香	農業生物資源研究所 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2	0298-38-7014 無	直通	0298-38-7408
河野俊之	三菱化学生命科学研究所構造解析研究室 194-8511 町田市南大谷11号	0427-24-6285 tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp	直通	0427-24-6296
小島登貴子	埼玉県工業技術センター北部研究所 360-0031 熊谷市末広 2-133	0485-21-9172 tkojima@tech-lab.pref.saitama.jp	直通	0485-25-6052
小寺義男	北里大学理学部物理学科 228-8555 相模原市北里 1-15-1	0427-78-9540 kodera@medcc.kitasato-u.ac.jp	直通	0427-78-9953
小林邦子	(株)三菱化学生命科学研究所 構造解析研究室 194-8511 東京都町田市南大谷11号	0427-24-6285 kuniko@libra.ls.m-kagaku.co.jp	直通	0427-24-6296
小林好真	東京大学大学院理学系研究科化学専攻天然物化学 133-0033 東京都文京区本郷 7-3-1	03-3812-2111 sohta@chem.s.u-tokyo.ac.jp	4358	03-5800-6898
駒田陽三	名古屋工業大学工学部応用化学科 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町	052-732-2111 r03ach08@edsys.center.nitech.ac.jp	5904	052-735-5247
齋藤公児	新日本製鐵(株)先端技術研究所 211-0035 川崎市中原区井田 3-35-1	044-797-1274 saito@lab1.nsc.co.jp	直通	044-752-6341

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
蔡 東玲	神戸薬科大学中央分析室 658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1	078-441-7591 t-sai@kobepharma-u.ac.jp	直通	078-441-7592
坂本泰一	千葉工業大学工学部工業化学科河合研究室 275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1	0474-78-0425 taichi@ic.it-chiba.ac.jp	直通	0474-78-0425
櫻井智司	日本電子株式会社分析機器技術本部応用研究センターNM応用研究グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2241 sasakura@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
佐々木元子	横浜市大医学部構造生物学, KAST緒方プロジェクト 236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9	045-781-6761 motoko@yokohama-cu.ac.jp	直通	045-781-6763
佐々健太郎	横浜国立大学工学部物質工学科 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4224 sasa@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	直通	045-339-4251
佐藤浩三	日本電子(株)分析機器技術本部 5501P 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	0425-42-2236 sato@jeol.co.jp		0425-46-8068
佐藤孝幸	物質工学工業技術研究所基礎部固体NMRG 305-8565 つくば市東 1-1	0298-54-4515 t.sato@nimg.go.jp	直通	0298-54-4524
佐藤一	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1235 one@bruker.co.jp	11	0298-58-0322
沢辺紀子	東京理科大学薬学部 106-0826 東京都新宿区市ヶ谷船河原町 12	03-3260-4272 無	5050	03-3268-3045
志野英雄	日本電子(株)設計技術本部第三設計部電気技術グループ 196-8558 昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2240 shino@jeol.co.jp		042-546-8760
島 一嘉	三協化学株式会社合成化学研究所 254-0016 神奈川県平塚市八幡 5-2-3	0463-21-1560 k_shima@qa2.so-net.ne.jp	455	無
嶋田一夫	東京大学大学院薬学系研究科 113-0033 文京区本郷 7-3-1	03-3815-6540 shimada@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	直通	03-3815-6540
嶋田計雄	日本電子(株)分析機器技術本部応用研究センター 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2242 shimada@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
下川繁三	069-0854 江別市大麻中町 22-18	011-386-4855 sigebo@ma4.seikyuu.ne.jp		011-386-4855
神藤平三郎	東京薬科大学薬学部 192-0392 八王子市堀之内 1432-1	0426-76-4542 shindo@ps.toyaku.ac.jp	直通	0426-76-4542
榎葉信久	味の素(株)中央研究所 210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-244-7145 clm_sinba@te10.ajinomoto.co.jp	直通	044-211-7609
末澤裕子	横浜国立大学機器分析センター 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4401 suezawa@ynu.ac.jp	直通	045-339-4401
末松浩人	日本電子(株)分析器機技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 suematsu@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
菅瀬謙治	(財)サントリー生物有機化学研究所 618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1	075-962-3742 .sugase@sunbor.or.jp	直通	075-962-2115

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
杉浦眞喜子	神戸薬科大学中央分析 658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1	078-441-7591 makiko-s@kobepharmaceuticals.co.jp	直通	078-441-7592
杉沢寿志	日本電子顕微鏡分析機器技術本部応用研究センター-NM応用研究グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2241 sugisawa@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
杉本恭子	物質工学工業技術研究所 305-8565 つくば市東 1-1	0298-54-4525 ksugimoto@nimc.go.jp	直通	0298-54-4525
鈴木栄一	横浜国立大学工学部物質工学科 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4224 suzuki@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	直通	045-339-4251
鈴木榮一郎	味の素(株)中央研究所 210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-244-7145 clm_suzuki@te10.ajinomoto.co.jp	直通	044-211-7609
須原正彦	金沢大学理学部化学科 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 suhara@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	直通	076-264-5742
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	075-251-5311 yseo@phys.kpu-m.ac.jp	直通	075-251-0295
関 宏子	千葉大学分析センター 263-8522 千葉県稲毛区弥生町 1-33	043-290-3810 seki@crystal.cac.chiba-u.ac.jp	直通	043-290-3813
曾我美勝	岐阜大学医学部生理学教室 500-8705 岐阜市司町 40	058-267-2227 無	直通	058-267-2962
高橋健一	千葉工業大学工学部工業化学科 275-858 千葉県習志野市津田沼 2-17-1	0474-78-0425 takahas@ic.it-chiba.ac.jp	直通	0474-78-0425
高橋憲助	465-0077 名古屋市名東区植園町 1-50			
高橋俊朗	ジャパンエナジー分析センター 335-8503 戸田市新菅南 3-17-35	048-433-2143 t.takaha@lab.j-energy.co.jp	直通	048-433-2150
高橋栄夫	東京大学大学院薬学系研究科 113-0033 文京区本郷 7-3-1	03-3812-2111 hid@mol.f.u-tokyo.ac.jp	4814	03-3815-6540
高橋弘樹	理化学研究所分子構造解析室 351-0198 和光市広沢 2-1	048-467-9363 tah@postman.riken.go.jp		048-462-4627
高橋光政	日本たばこ産業(株)医薬総合研究所品質管理センター 569-1125 大阪府高槻市紫町 1-1	0726-81-9700 無	1534	0726-81-9731
高山俊夫	神奈川大学工学部応用化学科 221-8686 横浜市神奈川区六角橋 3-27-1	045-481-5661 takayama@cc.kanagawa-u.ac.jp	3206	045-413-9770
高山知子	三共株式会社分析代謝研究所 140-8710 品川区広町 1-2-58	03-0492-3131 tytomo@shina.sankyo.co.jp	4110	03-5436-8567
高山陽子	塩野義製薬株式会社創薬研究所物理化学研究部門 553-0002 大阪府福島区鷺洲5-12-4	06-458-5861 yohko.takayama@shionogi.co.jp	278	06-458-0987
武田 定	群馬大学工学部材料工学科 376-8518 桐生市天神町 1-5-1	0277-30-1382 stakeda@chem.gunma-u.ac.jp	直通	0277-30-1380

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
田中 鍛	帝人(株)構造解析センター 191-8512 東京都日野市旭が丘 4-3-2	042-586-8121 tnk53379@token1.teijin.co.jp	直通	042-586-8123
田中俊之	筑波大学先端学際領域研究センター 305-8577 つくば市天王台 1-1-1	0298-53-6065 ttanaka@tara.tsukuba.ac.jp	直通	0298-53-6065
田中彬嗣	九州大学薬学部 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1	092-642-6551 無	直通	092-642-6551
谷生道一	姫路工業大学理学部生命科学科 678-1297 赤穂郡上郡町金出地 1475-2	07915-8-0182 tanio@sci.himeji-tech.ac.jp	直通	07915-8-0182
田之倉 優	東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1	03-3812-2111 utanok@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	3074	03-5689-7225
田村友美	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	06-339-7008 tot@bruker.co.jp	直通	06-339-7010
丹所正孝	科学技術庁無機材質研究所 305-0044 茨城県つくば市並木 1-1	0298-51-3218 mtansho@chem.ubc.ca	直通	0298-52-7449
月城聖一	大阪大学医学部保健学科 565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-7	06-879-2577 tukisiro@sahs.med.osaka-u.ac.jp	直通	06-879-2577
辻 暁	姫路工業大学理学部生命科学科 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町金出地 1479-1	07915-8-0182 tuzi@sci.himeji-tech.ac.jp	直通	07915-8-0182
薦川 宰	武田薬品工業(株)製薬研究所 532-0024 大阪市淀川区十三本町 2-17-85	06-300-6539 Tsutagawa_Osamu@takeda.co.jp	直通	06-300-6251
土屋文彦	機能水研究所 305-0047 つくば市千現 2-1-6 筑波研究支援センター内 D-5	0298-58-6186 tsuchiya@wri.co.jp	直通	0298-58-6144
堤 耀広	北海道大学大学院工学研究科量子物理工学専攻 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6639 atsutsu@eng.hokudai.ac.jp		
津野慎治	富士写真フイルム(株)富士宮研究所 418-8666 静岡県富士宮市大中里 200	0544-26-7642 tuno@tomiken.fujifilm.co.jp	直通	0544-26-7691
津野久幸	日本電子株式会社分析機器技術本部応用研究センターNM応用研究グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2241 htsuno@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
手塚亮典	バリアンジャパン 108-0084 東京都港区芝浦 4-16-36住友芝浦ビル	03-5232-1238 akinori.tezuka@jp.varian.com	直通	03-5232-1264
寺尾武彦	京都大学大学院理学研究科化学教室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4011 terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	直通	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 113-8613 東京都文京区本駒込 3-18-22	03-3823-1309 terasawa@rinshoken.or.jp	直通	03-3823-1247
堂本竹雄	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1234 td@bruker.co.jp	42	0298-58-0322
土江松美	大阪市立大学理学部化学科生物化学研究室 558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138	06-605-2564 matsumi@sci.osaka-cu.ac.jp	直通	06-605-2522

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
内藤晶	姫路工業大学理学部生命科学科 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1475-2	07915-8-0180 naito@sci.himeji-tech.ac.jp	直通	07915-8-0182
中井利仁	筑波大学物理工学系 305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1	0298-53-5048 nakai@bukko.bk.tsukuba.ac.jp	直通	0298-53-5048
永井美佐	北里大学理学部物理学科 228-8555 神奈川県相模原市北里 1-15-1	0427-78-9541 mngai@walrus.sci.kitasato-u.ac.jp	直通	0427-78-9953
永尾 隆	姫路工業大学理学部生命科学科 678-1297 赤穂郡上郡町金出地 1475-2	07915-8-0182 takashi@sci.himeji-tech.ac.jp	直通	07915-8-0182
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 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1	03-3812-2111 unagata@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	3072	03-5689-7225
中田真一	千代田化工建設(株)総合研究所 221-0022 横浜市神奈川区守屋町 3-13	045-441-1288 snakata@yhk.chiyoda.co.jp	直通	045-441-1281
永田親清	芝浦工業大学工学部工業化学科 108-8548 東京都港区芝浦 3-9-14	03-5476-2432 nagata@sic.shibaura-it.ac.jp	直通	03-5476-3162
長縄 博	微生物化学研究所化学部 141-0021 東京都品川区上大崎 3-14-23	03-3441-4173 naganawah@bikaken.or.jp		03-3441-7589
中村昭正	協和発酵工業(株)医薬研究所開発研究所 411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188	0559-89-2020 無	直通	0559-86-7430
仲村高志	理化学研究所分子構造解析室 351-0198 和光市広沢 2-1	048-467-9362 nakamura@rikennmr.riken.go.jp	直通	048-462-4627
中村亘男	大阪大学大学院理学研究科 560-0043 豊中市待兼山町1番16号	06-850-5791 nobuo@ch.wani.osaka-u.ac.jp	直通	06-850-5785
中村好邦	大正製薬株式会社創薬研究所分子科学研究室 330-8530 埼玉県大宮市吉野町 1-403	048-663-1111 s13219@ccm.taisho.co.jp	3139	048-652-7254
中山 登	日本ロシュ研究所機器分析グループ 247-8530 鎌倉市梶原 200	0467-47-2209 noboru.nakayama@roche.com	直通	0467-45-6815
新村奈美	山之内製薬(株)化学研究所構造解析研究室 305-8585 つくば市御幸が丘 21	0298-54-1623 niimura@yamanouchi.co.jp	直通	0298-52-9585
西川紀恵	明治製薬(株)薬品総合研究所創薬研究所薬物設計G 222-8567 横浜市港北区師岡町 760	045-545-3125 無	直通	045-545-3199
西山裕介	京都大学理学部化学教室分子構造化学講座 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4014 nishi@kuchem.kyoto-u.ac.jp	直通	075-753-4000
根本暢明	バリアンジャパン 108-0084 東京都港区芝浦 4-16-36住友芝浦ビル	03-5232-1238 nobuaki.nemoto@jp.varian.com	直通	03-5232-1264
野口 滋	第一製薬株式会社製薬技術研究所 134-8630 東京都江戸川区北葛西 1-16-13	03-3680-0151 noguczow@daichipharm.co.jp	3423	03-5696-8339
野口 朋	三菱化学㈱鹿島事業所医薬開発研究所物性分析Aグループ 314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山 14	0479-46-4621 2000301@cc.m-kagaku.co.jp	直通	0479-46-6113

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線 FAX
野中正幸	筑波大学物理学系 305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-5421 nonaka@ctlab.bk.tsukuba.ac.jp	直通 0298-53-5048
野間弘昭	九州工業技術研究所ファイン素材部 841-0052 佐賀県鳥栖市宿町 807-1	0942-82-5161 noma@kniri.go.jp	262 0942-83-0850
拝師智之	筑波大学物理学系巨瀬研究室 305-8573 つくば市天王台 1-1-1	0298-53-5214 haishi@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	直通 0298-53-5205
服部峰之	工業技術院電子技術総合研究所超分子部 305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-4	0298-54-5537 mhattori@etl.go.jp	直通 0298-54-3364
濱島 斉	三和化学研究所創薬研究所 511-0406 三重県員弁郡北勢町塩崎363番地	0594-72-6221 skkddr@mkn.ilc.or.jp	370 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 305-8565 茨城県つくば市東 1-1	0298-54-4515 hayashi@nimc.go.jp	直通 0298-54-4524
早水紀久子	物質工学工業技術研究所 305-8565 つくば市東 1-1	0298-54-4525 hayamizu@nimc.go.jp	直通 0298-54-4525
原園としえ	三菱化学(株)横浜総研分析研 227-8502 横浜市青葉区鶴志田町 1000	045-963-3167 2309373@cc.m-kagaku.co.jp	直通 045-963-4261
原田英里砂	横浜国立大学工学部物質工学科 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4224 harada@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	直通 045-339-4251
原田治幸	京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5937 haruyuki@mds.moleng.kyoto-u.ac.jp	直通 075-751-7611
原 雄一	製剤技術研究所 171-8545 東京都豊島区高田 3-41-8	03-3987-2096 harayui@chugai-pharm.co.jp	直通 03-3987-3477
春山英幸	三共分析代謝研究所 140-8710 品川区広町 1-2-58	03-3492-3131 haru@shina.sankyo.co.jp	4110 03-5436-8567
引地邦男	北海道大学大学院理学研究科 060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-2770 hikichi@gogh.sci.hokudai.ac.jp	直通 011-706-4993
百名一男	日本電子株式会社システム技術本部2G 196 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	0425-42-2235 hyakuna@jeol.co.jp	直通 042-546-7225
平冲敏文	北海道大学工学研究科量子物理学専攻 060-8628 札幌市北区北13西8	011-706-6640 hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	直通 060-716-6175
廣田 洋	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター 351-0198 和光市広沢 2-1	048-469-3184 hirota@cytologic.riken.go.jp	直通 048-469-3184
廣中俊也	株式会社東レリサーチセンター構造化学研究部 520-8567 大津市園山 3-3-7	077-533-8609 Toshiya_Hironaka@trc.toray.co.jp	直通 077-533-8696
福沢世傑	科学技術振興事業団横山情報分子プロジェクト 351-0198 和光市広沢 2-1 理化学研究所内	048-469-3184 seketsuf@cytologic.riken.go.jp	直通 048-469-3184
福士江里	北海道大学農学部GC-MS&NMR室 060-8589 札幌市北9西9	011-706-4134 feria@cen.agr.hokudai.ac.jp	直通 011-716-0879

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
福島裕	日本電子株式会社分析器機技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 yfukusim@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
藤井直之	日本電子分析機器技術本部応用研究センターNM応用研究グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2241 nfujii@jeol.co.jp	直通	042-546-8068
藤川昭彦	藤沢薬品工業(株)基盤技術研究室 532-8514 大阪市淀川区加島 2-1-6	06-390-1326 akihiko_fujikawa@po.fujisawa.co.jp	直通	06-304-1192
藤倉一繁	バリアンジャパン 108-0084 東京都港区芝浦 4-16-36住友芝浦ビル	03-5232-1238 kazushige.fujikura@jp.varian.com	直通	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 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5643 fujita@sbchem.kyoto-u.ac.jp	直通	075-753-5917
藤戸輝昭	日本電子データム分析機器技術部 196-0022 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-1182 fujito@jeol.co.jp	直通	042-542-4059
藤原敏道	横浜国立大学工学部物質工学科 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4224 tfjwr@ynu.ac.jp	直通	045-339-4251
藤原正子	日本電子データム株式会社AI技術部 196-0022 東京都昭島市中神町1156番地	042-542-1182 masako@jeol.co.jp	直通	042-542-4059
藤原靖弘	京都薬科大学構造有機化学教室 607-8414 京都市山科区御陵中内町 5	075-595-4637 fujiwara@mb.kyoto-phu.ac.jp	直通	075-595-4766
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	03-3812-2111 furihata@mcb1.iam.u-tokyo.ac.jp	5460	03-3816-0453
古井淳一	大阪大学蛋白質研究所 565-0871 吹田市山田丘 3-2	06-879-8598 furai@protein.osaka-u.ac.jp	直通	06-879-8599
古木隆生	神奈川県産業技術総合研究所基盤技術部 243-0435 海老名市下今泉 705-1	0462-36-1500 無	3106	0462-36-1525
古田浩祐	杏林製薬株式会社中央研究所創薬研究一部 329-0114 栃木県下都賀郡野木町御手洗 2399-1	0280-56-2201 fvbb0981@mb.infoweb.or.jp	303	0280-57-1293
星野鉄哉	日立化成工業株式会社筑波開発研究所 300-4247 茨城県つくば市和台 48	0298-64-4000 HCN00727@niftyserve.or.jp	609	0298-64-4008
堀井文敬	京都大学化学研究所 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3148 horii@modycb.kuicr.kyoto-u.ac.jp	直通	0774-38-3148
堀 由美子	東京農工大学工学研究科物質生物学専攻 184-8588 小金井市中町 2-24-16	042-388-7025 yhorii@cc.tuat.ac.jp	直通	042-383-7733
前田史郎	福井大学工学部生物化学工学科 910-8507 福井市文京 3-9-1	0776-27-8635 maeda@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	直通	0776-27-8747
前田能崇	京都大学薬学部製剤機能解析学分野 606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29	075-753-4530 無	直通	075-753-4578
増田憲二	京都大学化学研究所 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-32-1611 masuda@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	直通	0774-38-3148

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線	FAX
松尾浩	大阪大学蛋白質研究所物性部門 565-0871 大阪府吹田市山田丘3の2	06-879-8598 hmatsuo@protein.osaka-u.ac.jp	直通	06-879-8599
松田裕生	帝人(株)構造解析センター 191-8512 東京都日野市旭が丘 4-3-2	042-586-8121 mtd30217@token1.teijin.co.jp	直通	042-586-8123
松村志保	ゼリア新薬工業(株)中央研究所研究技術部 360-0111 埼玉県大里郡江南町大字押切 2512-1	0485-36-3456 無	2405	0485-39-1072
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四研究室 376-8518 桐生市天神町 1-5-1	0277-30-1382 maruta@chem.sci.osaka-u.ac.jp	直通	0277-30-1380
水口千代子	(株)帝人システムテクノロジー サイエンシステム事業部 113-0033 東京都文京区本郷 2-38-16本郷TSビル	03-3818-3170 mizukuchi@tjnsys.co.jp	直通	03-3818-3234
水野元博	金沢大学理学部化学科 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 mizuno@wron1.s.kanazawa-u.ac.jp	直通	076-264-5742
溝上 潤	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 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 mizokami@kuchem.kyoto-u.ac.jp	直通	無
三森文行	国立環境研究所環境健康部 305-0053 つくば市小野川 16-2	0298-50-2532 mitumori@nies.go.jp	直通	0298-50-2574
南園邦夫	帝人(株)構造解析センター 191-8512 東京都日野市旭が丘 4-3-2	042-586-8121 mnm31194@token1.teijin.co.jp	直通	042-586-8123
三原知浩	武田薬品工業株式会社医薬開発本部分析代謝研究所第1部 532-8686 大阪市淀川区十三本町 2-17-85	06-300-6632 Mihara_Tomohiro@takeda.co.jp	直通	06-300-6086
三宅洋子	東京都立大学理学研究科化学 192-0397 八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111 ymiyake@comp.metro-u.ac.jp	3526	0426-77-2525
村瀬敦司	東京薬科大学薬学部 192-0392 八王子市堀之内 1432-1	0426-76-4542 shindo@ps.toyaku.ac.jp	直通	0426-76-4542
飯塚舜介	鳥取大学医学部医学科医療システム学 683-8503 米子市西町 86	0859-34-8286 mesh@grape.med.tottori-u.ac.jp	直通	0859-34-8285
森 輝雄	三菱化学(株)横浜総合研究所分析物性研究所 227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地	045-963-3167 3707337@cc.m-kagaku.co.jp	直通	045-963-4261
八島秀仁	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1234 yas@bruker.co.jp	49	0298-58-0322
山内一夫	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1235 yam@bruker.co.jp	21	0298-58-0322
山口芳樹	東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1	03-3812-2111 yyoshiki@mol.f.u-tokyo.ac.jp	4814	03-3815-6540
山崎和彦	生命工学工業技術研究所 305-8566 つくば市東 1-1	0298-54-6536 kyamasak@nibh.go.jp	直通	
山本昭彦	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-12-5	0298-52-1236 ay@bruker.co.jp	38	0298-58-0322

氏名	所属 郵便番号 住所	電話 E-Mail	内線 FAX
山本泰彦	筑波大学化学系 305-8571 つくば市天王台 1-1-1	0298-53-7369 yash@sakura.cc.tsukuba.ac.jp	直通 0298-53-7369
禅 知明	横浜国立大学工学部物質工学科 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-3965 T-YUZURI@synchem.bsk.ynu.ac.jp	直通 045-339-3965
湯本史明	東京大学生物生産工学研究センター田之倉研究室 113-8657 文京区弥生 1-1-1	03-3812-2111 aa86231@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp	3072 03-5802-3326
横井 貴子	山之内製薬㈱化学研究所構造解析研究室 305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 21	0298-52-5111 yokoit@yamanouchi.co.jp	2907 0298-52-9585
好田真由美	協和発酵工業株式会社東京研究所 194-0023 東京都町田市旭町 3-6-6	0427-25-2555 myoshida@kyowa.co.jp	2220 0427-26-8330
吉野明広	名古屋工業大学工学部応用化学科 466-8555 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5241 yoshino@ach.nitech.ac.jp	直通 052-735-5247
和田武	日本ブルカー株式会社 305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	0298-52-1234 wad@bruker.co.jp	48 0298-58-0322
渡部徳子	東京水産大学水産学部食品生産学科 108-8477 東京都港区港南 4-5-7	03-5463-0643 tokuko@ttokyo-u-fish.ac.jp	直通 03-5463-0643
渡邊英宏	㈱東芝研究開発センター情報・通信システム研究所研究第6担当 210-8582 川崎市幸区小向東芝町 1	044-549-2289 hidehiro1.watanabe@toshiba.co.jp	直通 044-520-1308