

第18回 NMR 討論会

講演要旨集

1979年11月4日(日), 5日(月), 6日(火)
大 阪 大 学 工 学 部

共 催

日本化学会・日本分析化学会
日本薬学会・日本農芸化学会

第 18 回 NMR 討論会

共 催 日本化学会, 日本分析化学会
日本薬学会, 日本農芸化学会

日 時 1979年11月4日(日), 5日(月), 6日(火)

場 所 大阪大学工学部U-3共同講義棟(吹田市山田上)

第 1 日 11月4日(日)(9:45~10:35)

- | | | |
|-----|--|------|
| 101 | ^{13}C 化学シフトにおける溶媒効果 | PAGE |
| | (神女薬大)○杉浦真喜子(神大教養)上地真一 | 1 |
| 102 | ^{13}C 化学シフトにおけるASIS効果 | |
| | (神大教養)○上地真一(神女薬大)杉浦真喜子 | 5 |
| | (10:45~12:00) | |
| 103 | 零粘度緩和時間(3)メチル基の陽子スピン格子緩和時間 | |
| | (名工大)○吉野明宏, 上野 昇, 高橋憲助 | 9 |
| 104 | ピコリル型カルバニオンのNMR(V)ピコリル型イオン対の ^{13}C 及び ^7Li NMRスペクトル | |
| | (三重工技セ)○小西和頼(名工大)吉野明宏, 加藤守松, 高橋憲助 | 13 |
| | (分子研)川田勇三, 菅原 正, 岩村 秀 | |
| 105 | 分子内硫黄原子によって安定化された炭素陽イオン(7) ^{13}C NMRによる研究 | |
| | (神大工)北条 卓, ○市 忠顕 | 17 |
| | (13:00~14:15) | |
| 106 | 有機スズ化合物とルイス塩基の溶液内錯体形成II ジメチルスズジクロライドとピコリン塩基の会合についての熱力学的検討 | |
| | (阪大薬)藤原英明, ○酒井文彦, 佐々木喜男 | 21 |
| 107 | 有機スズ化合物とルイス塩基の溶液内錯体形成III 液晶溶媒中での観察 | |
| | (阪大薬)○藤原英明, 佐々木喜男 | 25 |
| 108 | 光学活性物添加ネマティック液晶のNMRスペクトル (日立, 日立研)○亀沢範正 | 29 |
| | (14:25~16:05) | |
| 109 | 高温, 高分解能NMRによる熔融高分子の動的性質 | |

- (北大工)○下川繁三, 宮沢邦夫, 横野哲朗, 山田英二, 真田雄三 33
- 110 バナジウム水素化物中の水素の拡散
(化技研)○林 繁信, 早水紀久子, 山本 修, 小野修一郎 37
- 111 スラッジ中の水の状態に関する研究
(荏原インフィルコ)○佐藤広昭, 鈴木英友(東北大非水研)池上恒男 41
- 112 ゲル中の水結機構; 温度依存性に及ぼすゲル濃度の効果について
(静岡薬大)○片山誠二(東大理)藤原鎮男 45
(16:15~17:55)
- 113 固体高分解能NMR法を用いた高分子における結晶質と非晶質の分離測定
(京大理)○前田史郎, 寺尾武彦, 雑賀亜帆 49
- 114 Magic Angle Spinning (MAS) 法による固体高分子の緩和時間測定
(日本電子)○藤戸輝昭(京大理)寺尾武彦 53
- 115 高圧, 高分解能NMR 核置換N, N-dimethylbenzamideの分子内回転に対する圧力効果
(神大理)山田博昭, ○中塚正勝, 子谷一実, 世良 明 57
- 116 220-MHz, 高圧, 高分解能NMR ヘム蛋白質のヘム近傍の構造に及ぼす圧力効果
(京大工)○森島 績, 小川 諭(神大理)山田博昭 61

第2日 11月5日(月)(9:20~10:35)

- 201 プロトン間スピン結合定数における π 電子伝達機構と結合次数
(北大理)○吉田克彦 65
- 202 MRT法と π 電子伝達機構 (北大理)○吉田克彦 69
- 203 アセチレン-白金(0)錯体の ^{195}Pt NMR定数の検討
(東大生産研)○鯉江泰行, 篠田純雄, 斎藤泰和 73
(10:45~12:00)
- 204 二配位酸素化合物の ^{17}O NMRと化学構造
(分子研)岩村 秀, 菅原 正, 川田勇三(名工大)○加藤守松, 高橋憲助 77
- 205 ^{13}C NMRの化学シフトの加成性と構造解析への応用
(宇部興産中研)○斎藤啓治, 石田嘉明, 大島時生 81
- 206 高分解能 ^1H NMRデータのファイル化方式の検討
(化技研)○山本 修, 柳沢 勝 85

(13 : 00 ~ 14 : 40)

- 207 ビシクロ型ピウレタンのステレオダイナミックス
(東大教養) 野村祐次郎, ○竹内敬人 89
- 208 ベンジルアニリンにおける水素結合と NMR スペクトル
(電通大) ○小宮 誠, 藍原有敬 93
- 209 4-アミノアゾベンゼンの ^{15}N 及び ^{13}C NMR スペクトルへのプロトン付加の影響
(京大薬) ○黒田義弘 (名市大薬) 桑江彰夫 97
- 210 ^{15}N NMR 分光法 I アミドと ^{15}N NMR スペクトル
(化技研) ○中西洋志 (C. I. T.) J. D. Roberts 101

(14 : 50 ~ 16 : 30)

- 211 ^{15}N NMR 分光法 II ^{15}N NMR スペクトルによるプリン及びアデニン誘導体のプロトン付加の研究
(化技研) ○中西洋志 (C. I. T.) J. D. Roberts 105
- 212 ^{15}N 核酸関連物質の構造化学への応用 (味の素中研) ○甲斐荘正恒, 小倉博子 109
- 213 ^{15}N NMR による核酸塩基の相互作用の検出
(阪大蛋白研) ○京極好正, 渡辺まゆみ, 樋口直樹, 岩橋秀夫
菅田 宏 (三菱生命研) 大島泰郎 (味の素中研) 甲斐荘正恒 113
- 214 フラビンおよびフラビン蛋白の NMR (第 7 報)
(名大医) ○河野敬一, 鈴木彰子, 大石誠子, 八木国夫 (阪大蛋白研) 京極好正 117

第 3 日 11 月 6 日 (火) (9 : 20 ~ 10 : 35)

- 301 各種パルス系列の応用
(日本電子) ○細野政美, 大内宗城, 松下和弘, 中川恵策, 今成 司 121
- 302 相関 NMR とその応用 VIII データ処理の高速化とデータ処理精度の検討
(東大計セ) ○小沢 宏 (東大理) 荒田洋治, 藤原鎮男 125
- 303 相関 NMR の生体系への応用 II 大腸菌の嫌氣的醗酵過程における代謝制御および膜透過
(東大理) 荻野孝史, ○荒田洋治, 藤原鎮男 129

(10 : 45 ~ 12 : 00)

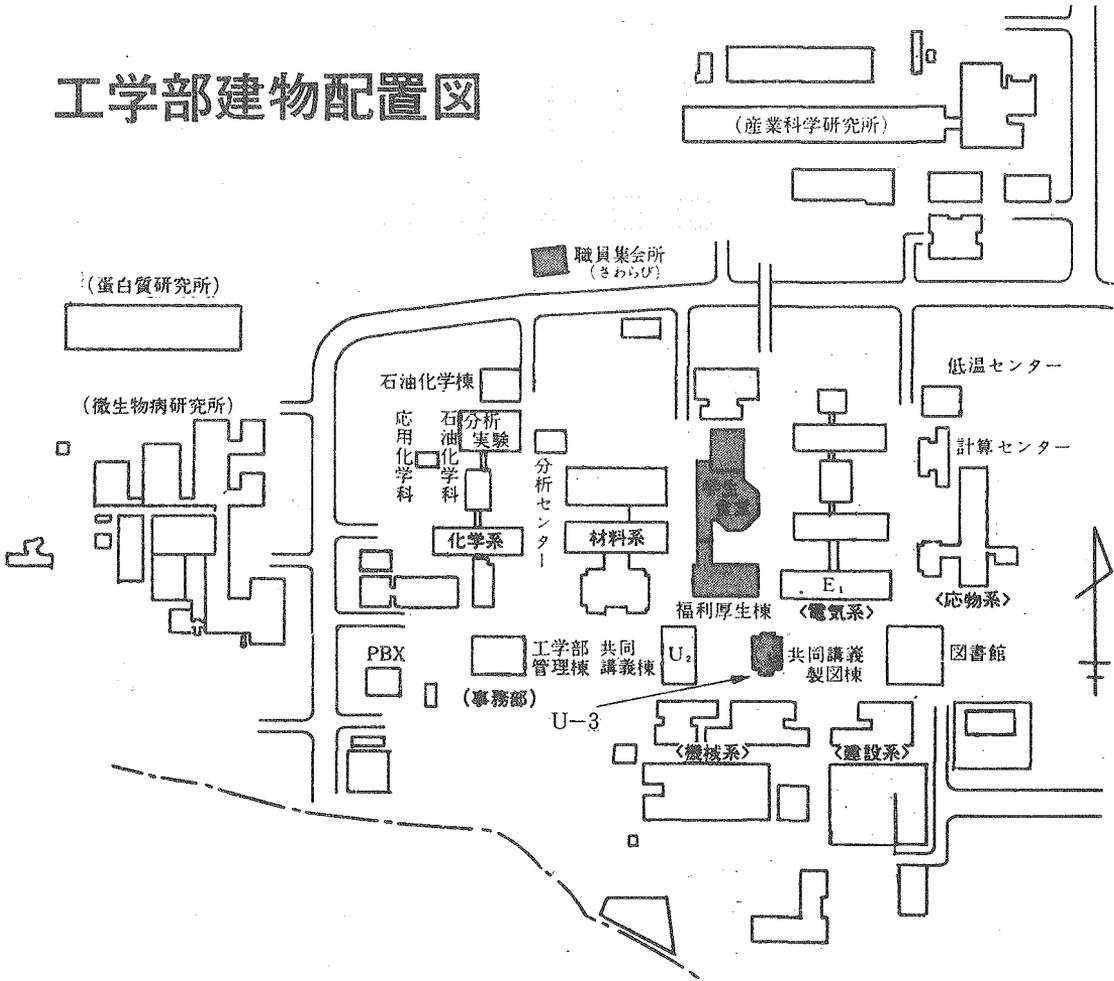
- 304 NMR による病態解析 (徳大教養) ○吉川研一 (予研) 逢坂 昭 133
- 305 選択的水飽和法による生体組織の ^1H 高分解能スペクトル

- (京府医大)○吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭(生理研) 巨 弘 137
- 306 生体高分子系におけるスピンドラフ (京大理)○赤坂一之 141
(13:00~14:15)
- 307 生体膜極性基部位と陽イオンの相互作用
(京府医大)○西川弘恭, 安里会人, 吉崎和男, 森本武利(生理研) 巨 弘 145
- 308 ^{31}P , ^{14}N NMRによるリン脂質とイオン, 麻酔剤の相互作用
(理研)○柴田俊之, 鶴沢 洵, 杉浦嘉彦(群大医) 林 浩平 149
- 309 レシチン多重膜におけるポリエチレンマクロライド, サポニンとコレステロールの相互作用
用 ^2H NMRによる研究
(国立がんセ研)○斎藤 肇, 稲荷昌司(東大薬) 秋山敏行, 高木重和, 三川 潮 153
(14:25~15:40)
- 310 ランタニドイオンの存在下におけるウロン酸の ^{13}C NMRスペクトル
(京工織大)○泉 邦彦 157
- 311 2'-Fluoro-2'-deoxyadenosine を含むジヌクレオシドモノホスフェートのコンホ
ーメーションのNMRによる研究
(阪大薬)○上杉晴一, 高塚陽子, 池原森男 161
(Johns Hopkins大) D. M. Cheng, L. S. Kan, P. O. P. Tsó
- 312 非ヘム鉄酸素添加酵素プロトカテキニン酸-3,4-ジオキシゲナーゼの活性中心構造
と基質の結合
(京大工)○小川 諭, 森島 績, 米沢貞次郎, 遠藤一央(滋賀医大) 佐伯行一,
岩城正佳, 野崎光洋 165
(15:50~17:30)
- 313 ^1H NMRによるコプロトキシンの水溶液中の構造の研究
(東大理, 京大薬*)○遠藤斗志也, 稲垣冬彦, 林 恭三,* 宮沢辰雄 169
- 314 ウシ膵臓トリプシンインヒビターのメチルシグナルに関する研究
(東大理)○柴田康行, 稲垣冬彦, 宮沢辰雄 173
- 315 スピンドラフ化したアセテートキナーゼと基質との特異的相互作用
(埼玉大工)○飯田武揚, 西尾正敏, 荒川陽一, 三田村 孝 177
- 316 ^{13}C NMRによるクロマチンゲルのヒストン-DNAの相互作用の研究
(国立がんセ研) 斎藤 肇, ○大杉義彰, 児玉晶彦, 永田親義 181

インフォーマルミーティング 11月5日(月)16:40~17:40 超伝導NMRについて

懇親会 11月5日(月)18:00 ~ 職員集会所「さわらび」にて行ないます。

工学部建物配置図



交通 阪急千里線北千里下車徒歩15分、タクシー5分

北大阪急行千里中央下車タクシー10分

第 1 日

11 月 4 日 (日)

<はじめに>

^1H 化学シフトにおける溶媒効果については、これまで多くの議論がなされてきているが、 ^{13}C 化学シフトの場合の議論はあまりなされていない。それは、 ^{13}C 化学シフトが ^1H に比べてシフト幅が大きく、実際の化学シフトを議論する際に特別な場合をのぞいては溶媒効果があまり問題にならないと言われてきている為と思われる。しかし実際には、特別な相互作用の考えられる場合は勿論、Buckinghamら²⁾によって物理的因子といわれているものに相当する溶媒効果も結構大きく、扱い方によっては決して無視出来ないものと思われる。最近、Tiffonら³⁾は、一連の ^{13}C 化学シフトの溶媒効果について検討し、特にVan der Waals相互作用について議論している。

通常溶媒効果を検討する場合、外部基準を用い、体積磁化率の補正を行なって化学シフトを求めるのが常法である。しかし演者らは、応用ということ、又有機化学者の多くが内部基準法を用いて測定していることを考慮し、実際にTMSを内部基準として化学シフトを測定する際に出てくる可能性のある溶媒効果を議論することを目的として本研究に着手した。すなわち特別な相互作用をしない系を取り上げ、その際の溶媒効果の評価の仕方、一般的取扱い方、又さらに見い出された溶媒効果か、主として溶媒、溶質のどのような性質に由来しているか、などを検討した。

<実験>

^{13}C 化学シフトの測定は、日電バリオンNV-21型スペクトロメーター(22.6MHz)を用い、スペクトル幅は特別な場合を除いて4kHz(基準として用いた*o*-Bu.cyclohexaneについては2.5kHz)、使用データ頁8192で行った。測定濃度は10mole%、8mm管を用い、D溶媒以外はロック用に D_2O のセラリーを用いた。通常TMSを内部基準に用いたが、*o*-Bu.cyclohexaneについてはTMSを、又TMSについてはcyclohexaneをそれぞれ外部基準に用いて、外部基準法でも測定を行った。

<結果と考察>

o-Bu.cyclohexaneを一連の溶媒中(内部基準法)で測定すると、 ^{13}C 化学シフトは、一番大きく変化するC-1で、 CCl_4 から C_6F_6 に溶媒を変えると2.5ppm以上シフトする。しかしその変化の仕方は各炭素によってかなりの違いが見られる。

今、それぞれの溶媒におけるC-1の化学シフトを横軸に、それに対応する溶媒での別の炭素の化学シフトをたて軸にとると(化学シフト比較法)どの炭素についても、よい直線関係が得られ、各炭素におけるその直線の"slope"の大きさはそれぞれFig. 1に示したようになる。このように、各炭素

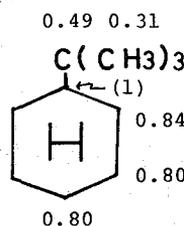


Fig.1 *o*-Bu.cyclohexaneにおけるC-1を基準にした相対シフト("slope")

すぎうらまきこ うえじしんいち

間でその溶媒シフトにより直線関係がなり立つということは、使用した溶媒中では、特殊な相互作用がなく、各炭素すべてが相対的に同じ種類の溶媒効果を受けていることを示している。一方 Fig. 1 に示されるような "slope" の大きさの違いは、それら溶媒効果の受けやすさを示す溶質の因子とみなすことが出来る。

次に、さらに溶媒効果に対する溶質の因子を広く調べる目的で、*t*-Bu.cyclohexane の C-1 の化学シフトを基準にして、種々の溶質の化学シフトを同様にプロットすると、それぞれよい直線関係が得られ、それぞれの溶質の各炭素についての "slope" を求めることが出来る。

溶媒シフトに寄与する因子

iso-octane に対して上記のようにして得られた "slope" は、Fig. 2 で示されるように、Tiffon らが $S^{i(3b)}$ と名づけている値と比較的よい相関にある。

Tiffon らの S^i は体積分極率に関するパラメータ $(\frac{n^2-1}{2n^2+1})^2$ に対して化学シフトをプロットして得られた勾配であり、それは Van der Waals 相互作用に起因している。従って我々のこの溶媒シフトに寄与しているのも、主として Van der Waals 相互作用であると考えられる。そこで基準に用いた *t*-Bu.cyclohexane の C-1 の化学シフトを $(\frac{n^2-1}{2n^2+1})^2$ に対してプロットしてみた。Fig. 3 に示すように、無極性の脂肪族炭

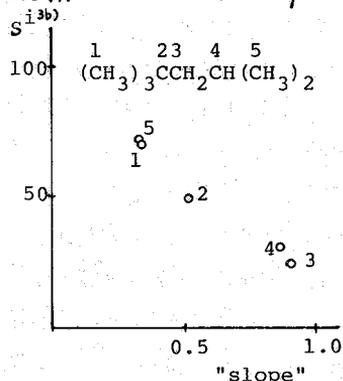


Fig. 2 "slope" と $S^{i(3b)}$ との相関

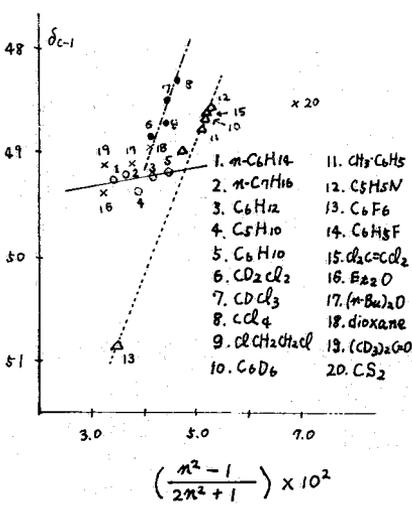


Fig. 3 δ_{C-1} (*t*-Bu.cyclohexane の C-1 の化学シフト) の溶媒シフト

化水素溶媒、ハロゲン化炭化水素溶媒、そして sp^2 炭素を持つ溶媒と、3つの別々の相関が得られる。二硫化炭素、アセトン、エーテル類などの直線からのずれは、これら溶媒では Van der Waals 相互作用以外の溶媒効果が寄与している可能性を示唆している。

このように、ここで我々が扱っている溶媒シフトは、主として Van der Waals 相互作用に由来するものであると考えられるが、ここで注意しなければならぬのは、Fig. 3 の直線関係が、本来の Van der Waals 相互作用で考えられるのとは逆の相関関係にあること、又 Fig. 2 での S^i と "slope" が逆相関になっていることである。これは、ここで取扱っている溶媒シフトが、内部基準の TMS を使っている為と考えられる。すなわち、内部基準の TMS も同じよ

うな溶媒シフトを受けており、さらにその TMS の方が各溶質より大きな溶媒シフトを受ける為、観測しているそれぞれの炭素の溶媒シフトは、TMS の溶媒シフトと、それぞれの実際の溶媒シフトの差としてあらわれていることになる。このことを確かめる目的で、外部基準を用いて測定した *t*-Bu.cyclohexane の化学シフトを、 $(\frac{n^2-1}{2n^2+1})^2$ に対してプロットすると、Fig. 3 とは逆相関のそらもつと勾配の小

さな直線を示すことが解る。又さらに外部基準を使って測定したTMS自体の化学シフトも $(\frac{n^2-1}{2n^2+1})^2$ に対してプロットすると、同じような直線関係を示し、その勾配は *o*-Bu.cyclohexane のどの炭素よりも大きくなっている。

以上のことから、*o*-Bu.cyclohexane の C-1 の化学シフトに対して相関の得られる溶媒シフトは (*o*-Bu.cyclohexane 自身も含めて)、主としてそれぞれの溶質と溶媒との Van der Waals 相互作用に起因しているとすることが出来、又その大きさは、TMS に対する溶媒シフトとそれぞれの溶媒シフトの差である為、その "slope" が小さい程溶媒の効果を強く受けているとすることが出来る。

"slope" の大きさ (溶質の因子) に関する考察

種々の溶媒中で測定した化学シフトを、対応する *o*-Bu.cyclohexane の C-1 の化学シフトとプロットして得られる直線の "slope" は個々の分子、炭素によって差違があり、それは上で述べたように、"slope" の小さい程、溶媒に対する感度が大きいとすることが出来る。この "slope" の大小は溶質に関する因子であるが、そこで次に、この "slope" の大小の差が何に由来するか考えてみたい。

Vander Waals 相互作用によるシフトは、分子同志の接近により電子雲に引き起される歪みの為であると言われている。そこで、ここでの "slope" の差、すなわち溶媒に対する感度の違いは、各分子、各炭素に対して、①溶媒分子が接近する度合の差違と、さらに②溶媒分子が接近した時の電子雲の歪みの受けやすさの差違の、2つの因子が考えられる。

Fig. 1 で解るように、"slope" の大きさは同一分子内でもその炭素の種類によって異なり、それは Tiffon らが $S_{CH_3}^{\delta} > S_{C-1}^{\delta} > S_{C-2}^{\delta} > S_{C-4}^{\delta}$ の序列と対応している。又異なる分子間でも同じ種類の炭素では比較的近い値をとっており、このことは、むしろ上記の②が原因となっていると考えられる。すなわち

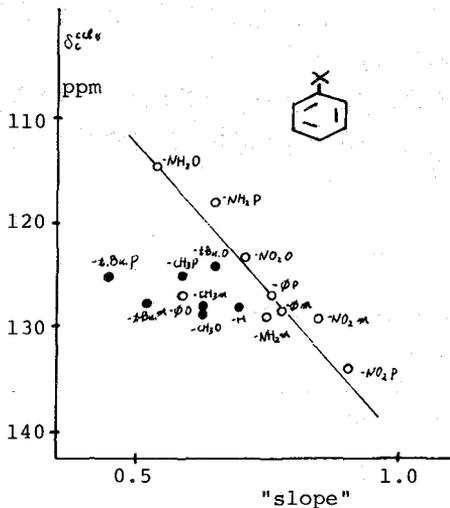


Fig. 4 - 置換ベンゼンにおける "slope" と ^{13}C 化学シフトの相関

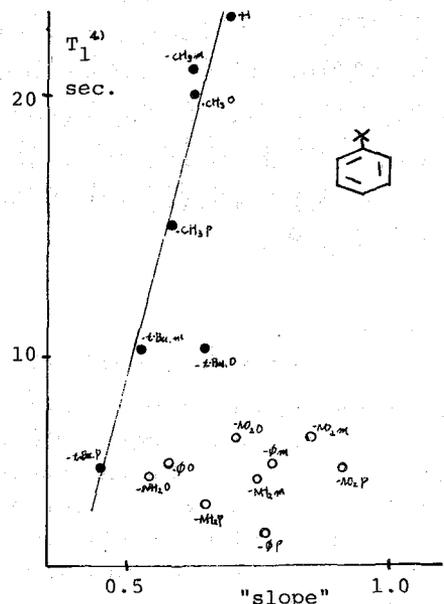


Fig. 5 - 置換ベンゼンにおける "slope" と T_1 の相関

ち溶媒の接近によって引き起される C-H 又は C-C 結合における電子雲の分極の違いが、その溶媒シフトの差によってあらわれるものと考えられる。このように、②については、観測している炭素における結合状態の性質が関係してくるので、その炭素の電子的性質と "slope" が何らかの相関を示すことが予想される。Fig. 4 に、一置換ベンゼンにおける各炭素の化学シフトを "slope" に対してプロットしてみたが、上記の予想通り、置換基効果の比較的大きい置換ベンゼンのつけ根以外の炭素について、比較的良好な相関がみられる。

一方①の因子については、溶質分子の運動状態が関係していると考えられ、いわゆる相関時間が指標になり得るのではないかと考えられる。そこで、dipole-dipole 機構で緩和している炭素については、ついている水素の数が等しければ T_1 は T_2 に反比例するので、先の一置換ベンゼンについて、その T_1 と "slope" の相関を見た。Fig. 5 で解るように、主に Fig. 4 で直線からずれたものがよく T_1 と相関している。予想されるように、 T_1 が小さいものすなわち相関時間の大きいもの程、"slope" が小さく溶媒に対する感度が大きくなっていることが解る。

さらに borneol, isoborneol 及び β -ionone などにおいても、その "slope" は対応する炭素の T_1 と比較的良好な相関を与えている。

以上のことより、Van der Waals 相互作用による溶媒効果において、溶質に関係する因子、すなわち溶媒効果に対する感度は、個々の分子における各炭素の結合状態と、さらにそれら分子、炭素の相関時間に関係していることが明らかになった。

〈まとめ〉

- 1) 内部基準法によっても、適当な炭素（この場合 *tert*-Bu.cyclohexane の C-1）の溶媒シフトを基準に用いて、それとの相関を得ること（化学シフト比較法）により、Van der Waals 相互作用などの溶媒効果を取り出すことが可能である。
- 2) そこで得られる溶質因子 ("slope") は Tiffon らの $S_{\text{rel}}^{(3)}$ に相当するものであるが、値の小さい程、溶媒に対する感度が大いことを示している。これは内部基準の TMS が大きい溶媒効果を受けている為である。
- 3) Van der Waals 相互作用は、溶質の個々の炭素の結合状態の性質と、それら分子及び各炭素の運動状態に関する性質とに関係し、後者は相関時間と対応させることが出来る。

〈文献〉

- 1) 例えば 中川直哉; 化学の領域, 15, 598 (1961) などの総説
- 2) A.D.Buckingham, et al.; J.Chem.Phys., 32, 1227 (1960)
- 3) a) B.Tiffon and J.P.Doucet; Can.J.Chem., 54, 2045 (1976)
b) D.Cans, et al.; Tetrahedron Letters, 2078 (1976)
c) B.Tiffon and D.Cans; J.Magn.Reson. 27, 147 (1977)
d) B.Tiffon and J.E.Dubois; Org.Magn.Res., 11, 295 (1978)
- 4) G.C.Levy, et al., J.Am.Chem.Soc., 95, 1527 (1973)

(神戸大教養・神戸女薬大) O上地真一, 杉浦真喜子

<はじめに>

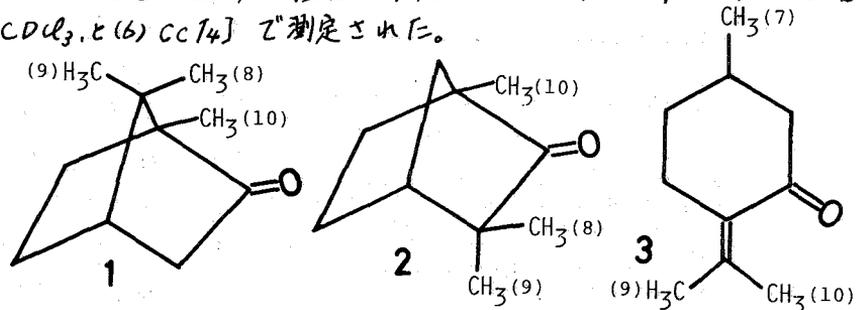
^1H NMRにおける aromatic solvent-induced shifts (ASIS) 効果についてはよく知られており有機化学の分野において立体配座の解析などに用いられ、その有用性は広く認められている¹⁾。特にカルボニル基を含む化合物については、よく調べられている。それは、見い出された ^1H ASIS効果は、経験則であるカルボニル平面則による、ある程度定性的に説明できるからである。ごく最近、dipole 平面則が提出されると同時に、ASIS効果における新しい理論的解釈が与えられている²⁾。しかしながら、 ^{13}C NMRにおけるASIS効果は、その有機化学的応用が期待されるにもかかわらず、今も知られていない。 ^1H ASIS効果との比較において、 ^{13}C ASIS効果の予想される特色としては、(1)スペクトル分離がよいため、すべての炭素についてのASIS効果が容易に得られる。(2)プロトニエ持たない炭素骨格への適用の可能性が有ることなどを上げることができよう。 ^{13}C ASIS効果が今まで注目されなかった一つの要因は、 ^{13}C 化学シフトは、 ^1H の場合に比較して、そのシフト幅がはるかに広く、観測される溶媒シフトに対する異方性項の相対的重要性が小さくなることである。(そのため、後述するように、 ^{13}C ASIS効果の規則性は、従来 ^1H ASIS効果の評価のために用いられてきた、単なる溶媒シフト差において、明確に見い出すことが困難である。)しかし、溶媒と溶質との特殊な相互作用が考えられる場合は、 ^{13}C 溶媒シフトに及ぼす溶媒の異方性シフト効果を無視することはできない³⁾。今回、我々は、*t*-butylcyclohexaneのC-1を基準化学シフトとして用い、一連の溶媒中における化学シフト比較法によって、 ^{13}C ASIS効果の規則性を見い出した。そして、得られた ^{13}C ASIS効果を ^1H ASIS効果と比較し、その有用性を調べてみた。

<実験>

測定条件は、講義番号(101)の場合とほぼ同じである。(ただし、スペクトル幅は5.5 KHzである。) TMSを内部基準に用い、溶質濃度は、約15 mol%である。

<結果と考察>

Camphor **1**, fenchone **2**, と pulegone **3** の ^{13}C 化学シフトは、Benzene- d_6 と Hexafluorobenzene を含む一連の無極性溶媒中[(1) Hexane, (2) Heptane, (3) CD_2Cl_2 , (4) $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, (5) CDCl_3 , と (6) CCl_4] で測定された。



○うえじしんいち
すぎうらまきニ

今更で、 ^1H A S I S 効果と評価する方法として、溶媒シフト差を見る方法が用いられてきた。すなわち、A S I S 効果 $\Delta\delta(\text{ppm}) = \delta(\text{aromatic solvent}) - \delta(\text{CCl}_4 \text{ or } \text{CDCl}_3)$ の方法を α - β のメケル基の ^{13}C 溶媒シフトに適用してみると明らかになるように、信頼できる ^{13}C A S I S 効果を反映してはいるように思えない。例えば、問題とは、 α のメケル基炭素とカルボニル基(カルボニル dipole)との幾何因子に無関係に、 C_6F_6 溶媒中では、常に大きい値(磁場シフト($\Delta\delta$ の値から評価される))が得られる。[1 に対しては、 $\Delta\delta$ Ref: CCl_4 (ppm): +0.89 (8 Me), +0.83 (9 Me), +0.58 (10 Me), 2 に対しては、+0.75 (8 Me), +0.91 (9 Me), +0.49 (10 Me), 3 に対しては、+0.89 (7 Me), +0.45 (9 Me), +0.27 (10 Me)] この事実は、 C_6D_6 と C_6F_6 溶媒の異方性効果に基づく寄与が、 ^{13}C 溶媒シフトにおける主因子ではなくて、小さいことを示していると考えられる。

そこで、 α - β のメケル基の ^{13}C 化学シフトを対応する溶媒中での *t*-butylcyclohexane の C-1 の化学シフトに対してプロットすると (1)~(6) の無極性溶媒に限って、非常に相関のよい直線が得られた。(Camphor の場合を Figure 1 に示す) この直線関係において、 C_6D_6 と C_6F_6 溶媒の異方性に基づく因子以外の因子(例えば、van der Waals 因子)は、相殺されるであろう。そして、solvent sensitivity は、その直線の slope に吸収される。したがって、ここで最も注目すべきことは、 C_6D_6 と C_6F_6 溶媒に見られる明確な直線からのずれであり、これらのずれの方向と大きさは、そのうち C_6D_6 と C_6F_6 の異方性に基づくシフト、すなわち、 ^{13}C A S I S 効果と見なすことができよう。このような方法で得られたメケル基に対する ^{13}C A S I S 効果の妥当性を調べる目的で、 ^1H A S I S 効果との比較を行った。(Table 1)

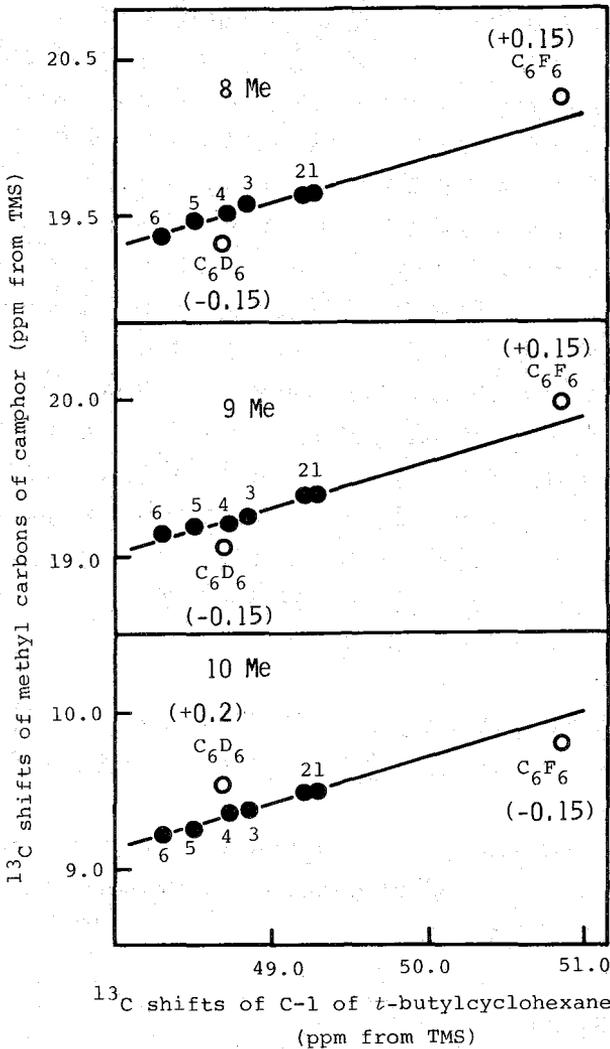


Figure 1. ^{13}C shifts of the methyl carbons of camphor plotted against ^{13}C shifts of the C-1 of *t*-butylcyclohexane in corresponding solvents. Numbers refer to solvents as designated in the text. The values (ppm) in parentheses indicate the magnitude of deviations.

Table 1. ^{13}C ASIS and ^1H ASIS effects (ppm)^{a)} observed for the methyl carbons of camphor, fenchone, and pulegone

	C_6D_6		C_6F_6	
	^{13}C ASIS	^1H ASIS	^{13}C ASIS	^1H ASIS
Camphor				
8 Me	-0.15	-0.21 ^{b)}	+0.15	+0.07 ^{b)}
9 Me	-0.15	-0.28 ^{b)}	+0.15	+0.16 ^{b)}
10 Me	+0.20	+0.07 ^{b)}	-0.15	-0.06 ^{b)}
Fenchone				
8 Me	≈ 0	-0.08 ^{c)}	≈ 0	-0.01
9 Me	≈ 0	-0.10 ^{c)}	≈ 0	-0.01
10 Me	+0.20	+0.02 ^{c)}	-0.15	-0.07
Pulegone				
7 Me	-0.10	-0.24 ^{c)}	≈ 0	+0.09
9 Me	-0.20	-0.28 ^{c)}	≈ 0	+0.01
10 Me	+0.15	+0.15 ^{c)}	-0.20	-0.09

a) The plus and minus signs mean the downfield and up-field shifts, respectively. b) K. Nikki and N. Nakagawa, *Chem. Lett.*, 699(1974). c) J. D. Connolly and R. McCrindle, *J. Chem. Soc. (C)*, 1613(1966).

(講演では、すべての炭素についての ^{13}C ASIS効果と議論する予定)

対応する ^1H と ^{13}C ASIS効果の比較は、次の理由に基づいている。すなわち、異方性項が、化学シフトを測定している核と異方性を持つ原子団との間の空間的配向因子のみによるもので、対象となる核(例えば、 ^{13}C や ^1H)のいかにかわれず一定の値となるからである。

Table 1から明らかのように、Camphor分子の8,9.Me基に

対して観測される ^{13}C ASIS効果の方向は、10.Meに對する ^{13}C ASIS効果の方向とは、逆である。これら3種のメチル基の示す ^{13}C ASIS効果の方向は、 ^1H ASIS効果の方向と一致している。又、fenchoneとpulegoneの両分子において、顕著な ^{13}C ASIS効果は見られない場合もあるが、その他の ^{13}C ASIS効果の方向については、 ^1H ASIS効果の場合と一致が認められる。これらの事実から、 ^{13}C ASIS効果の方向を定性的に説明するために、 ^1H ASIS効果の場合と同様に、カルボニル平面則(dipole 平面則)が、そのまゝ適用できると示していると思われる。又、最近、 ^1H NMRで、 C_6D_6 と C_6F_6 溶媒中では、逆のASIS効果を示すことが見出されているが、 ^{13}C ASIS効果においても、その傾向が明らかに見られ、ここで得られた ^{13}C ASIS効果の有用性を支持している。しかしながら、 ^{13}C ASIS効果の示す大きさは、 ^1H ASIS効果のものとは、多少異なり、このことからは、この差異は、恐らく(1) ^1H と ^{13}C ASIS効果の評価方法に基いた違い(2)メチル基における ^1H と ^{13}C 核に對するカルボニル基(溶媒和した C_6D_6 や C_6F_6 分子)との幾何因子における小さい違いによるものと思われる。

fenchone分子において、10.Meは、Camphor分子の10.Meとほぼ同じ幾何因子を持つと考えられるので、 ^{13}C ASISに對しても同程度の効果が期待される。事実、方向及び大きさとともに、同じであることがわかった。一方、8,9.Me基においては、顕著な ^{13}C ASIS効果を見出すことができた。(一つの可能な説明は、

8,9 Me 基が、 ^{13}C A β 1 β 効果の符号の反転する基準線上にあるという仮定である。その場合、8,9 Me 基の炭素を通り、カルボニル基に対して垂直な基準線を考えたとすると、Camphor と pulegone の両分子 10 Me 炭素は、明らかにこの基準線よりも前方に位置してあり、又 Camphor 分子の 8,9 Me 炭素は、その後方に位置することに成り、 ^{13}C A β 1 β 効果の方向がうまく説明されるように思われる。しかし、fenchone の 8,9 Me の ^{13}C A β 1 β 効果 (C_6D_6) が、ある程度の大きさを示していることを考えると、更に検討を要することである。

Pulegone 分子において、一つの応用として、 ^{13}C A β 1 β 効果に基づく Me 基のシグナルの帰属を行った。この分子で問題となる、2つの帰属は、9,10位 Me 基の区別である。Jautelat らは、⁴⁾ カルボニル基に近いメチル基が、その立体障害のために高磁場シフトするという仮定に基づいて、高磁場側のシグナルを 10位 Me 基に帰属した。今、従来のカルボニル平面則を適用して考えれば、10 Me は、基準線の前方に位置し、 C_6D_6 中で低磁場、 C_6F_6 中で高磁場シフトを受け、一方 9 Me は、後方に位置するため C_6D_6 中で高磁場、 C_6F_6 中で低磁場シフトを受けることが予想される。Table 1 に示された 9,10 Me 基の ^{13}C A β 1 β 効果の方向から、高磁場側のシグナルは、明らかに 9 位 Me 基に帰属することが出来る。この結果は Jautelat らの帰属とは逆である。又、7 Me は、基準線の後方に位置するため、 ^{13}C A β 1 β 効果の方向も妥当なものである。

以上、化学シフト比較法による ^{13}C A β 1 β 効果の評価について述べてきたが、我々は、帰属ほどの有機化学的応用ということを考えて、 ^{13}C A β 1 β 効果の簡便評価法についても報告する。

さらに当然のことであるが、カルボニル炭素も、A β 1 β 効果を受けているはずである。一連の溶媒中における C=O 化学シフトは、上記の *t*-butylcyclohexane の C-1 の化学シフトとまったく相関は見られない。これは、カルボニル基が、大きな dipole を有するため、Van der Waals 相互作用以外の特殊な溶質-溶媒との相互作用(例えば、H-bond や dipolar association)が大きく化学シフトに影響したためと考えられる。そのため我々は、以前に報告したように、³⁾ 極性溶媒パラメーター G 値⁵⁾ を用いて $^{13}\text{C}=\text{O}$ に対して直線的相関を得ることに成った。この直線からのずれと溶媒の異性効果との関連についても報告する予定である。

<文献>

- 1) reviews として: P. Laszlo, *Progr. NMR Spectrosc.*, **3**, 231 (1967); J. Ronayne and H. Williams, *Annu. Rev. NMR Spectrosc.*, **2**, 83 (1967).
最近の有機化学分野への応用例として: I. Horibe, H. Shigemoto, and K. Tori, *Tetrahedron Lett.*, 2849 (1975).
- 2) K. Nikki and N. Nakagawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 3267 (1978).
- 3) S. Ueji and M. Nakamura, *Tetrahedron Lett.*, 2549 (1976).
- 4) J. Jautelat, J. B. Grutzner, and J. D. Roberts, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **65**, 288 (1970).
- 5) A. Allerhand and P. v. R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 374 (1963).

103 零粘度緩和時間 (3)

メチル基の陽子スピン格子緩和時間

(名工大) ○吉野明広, 上野 昇, 高橋寛助

1. はじめに スピン格子緩和時間は、分子運動についての有用な情報源となる。ここに、溶液における研究の一手段である陽子スピン格子緩和時間（以下Tとする）では、孤立した一本の吸収線を示すような分子を研究対象とし、その分子の重水素置換体を溶媒に用いて希釈実験を行うことによって分子内の相互作用による寄与と、分子間の相互作用による寄与を分離する研究がなされてきた。^{1), 2)} 即ち、この種の実験においては、主として分子間の双極子-双極子相互作用による寄与が希釈によって消失し、分子内の寄与のみが残るとし、さらに測定温度を変化させることにより四極子緩和やスピン回転緩和の寄与を実験的に求め、分子内寄与から差し引き、最後に残りを分子内双極子-双極子相互作用による寄与として分離している。^{2), 3)} しかし、重水素が陽子の同位体元素であるとはいえ、その原子量は二倍であり、溶液物性の変化は否定できない。したがって重水素置換体とそうでないものの分子運動状態が全く同一なまま磁気的環境変化だけが起っているとは断定しがたい。

本研究では、以上述べた磁気的環境以外の環境変化、特に粘度変化がないまま磁気的環境変化のみが起こっている場合のTの挙動を考え、実験的に、対象分子の分子内の相互作用の緩和への寄与と、分子間の相互作用の緩和への寄与を正確に分離することを試みる。

2. 理論 一般に、緩和機構は次のように分離される。^{6), 7)}

$$(1/T_1)_{exp} = (R_i)_{exp} = (R_i)_{D-D} + (R_i)_{quad} + (R_i)_{sc} + (R_i)_{ca} + (R_i)_{sr} \dots \dots (1)$$

$(R_i)_{D-D}$ …… 双極子-双極子緩和

$(R_i)_{quad}$ …… 四極子緩和

$(R_i)_{sc}$ …… スカラ-緩和

$(R_i)_{ca}$ …… 化学シフトの異方性による緩和

$(R_i)_{sr}$ …… スピン-回転緩和

ここで、測定核を陽子とし、対象分子を炭化水素あるいは、そのハロゲン置換体を用い、測定温度、測定周波数を一定とすれば、四極子緩和はスピンの1/2であるから存在しない。スカラ-緩和は、陽子-陽子の結合がなければ無視でき、化学シフトの異方性による緩和は、陽子では例が少なく上に、14 KG 程度の磁場なら無視してよい。またスピン-回転緩和は、測定温度に依存しており、一定と考えられる。したがって、(1)式は次のようになる。

$$(R_i)_{exp} = \{R_i\}_{inter} + \{R_i\}_{intra} \\ = \{R_{D-D}\}_{inter} + \{(R_{D-D})_{intra} + (R_i)_{other}\} \dots \dots (2)$$

ここで、添字、inter及びintraは、それぞれ、分子間及び分子内の相互作用による緩和

よしの あきひろ、うえの のぼる、たかはし けんすけ

和機構による寄与を表わし、添字 *other* は、他の緩和機構による寄与を表わす。さて、双極子-双極子相互作用は、分子内相互作用(回転運動)と分子間相互作用(並進運動)があり、同種の核のみ存在する場合には次の式で与えられる。^(6,7)

$$(R_{i-o})_{intra} = \frac{3}{2} \hbar^2 \gamma^4 \sum_{\alpha} \frac{\tau_2}{r_{\alpha}^6} = \frac{3\hbar^2 \gamma^4 \eta}{2kT} \sum_{\alpha} \frac{V}{r_{\alpha}^6} \dots (3)$$

\hbar : $\frac{1}{2\pi} \times$ (プランク定数)
 γ : 磁気回転比

$$(R_{i-o})_{inter} = \frac{6\pi^2 \hbar^2 \gamma^4 \eta}{5kT} \left(\frac{n \rho N_0}{M} \right) \dots (4)$$

k : ボルツマン定数
 τ_2 : 回転の相関時間

(3)式における V は、六角最密充填を仮定して、 $V = 0.74 M / N_0 \rho$ とする。また(4)式における括弧の中は、スピン密度 ($\frac{\text{スピンの数}}{\text{cm}^3}$) V : 分子容積を表わしている。ここで、重水素や塩素が分子中に含まれているとすれば、陽子-陽子間の距離と陽子-重水素、陽子-塩素の距離が等しいという仮定のもとに、(4)式に与える寄与は、陽子-陽子の場合に比べてそれぞれ 0.042, 0.038 となり、これよりそれらの寄与は無視しうるものと考えられる。(4)式は、分子間の双極子-双極子相互作用を表わしているため、溶質-溶質間の相互作用だけでなく、溶質-溶媒間の相互作用にも適用できる。これより(2)式は次のようになる。

$$(R_i)_{exp} = \{ (R_{i-o})_{solite-solite} + (R_{i-o})_{solite-solvent} \}_{intra} + \{ (R_{i-o}) + (R_i)_{other} \}_{intra} \dots (5)$$

希釈実験により、(5)式の第一項 $(R_{i-o})_{solite-solite}$ は消失し、続いて、(4)式により第二項 $(R_{i-o})_{solite-solvent}$ を計算して差し引けば、第三項以後の分子内の寄与のみが残ることになる。もし、重水素置換体で希釈実験したならば、 $(R_{i-o})_{solite-solvent}$ は無視できるので、粘度変化による R_i の変化分と $(R_{i-o})_{solite-solite}$ を加えたものが消失することになり、粘度変化による R_i の変化分だけの誤差が生ずる。また、対象分子の重水素置換体が入りできない場合には、このような分離は不可能となってしまふ。したがって、重水素置換体を必要としない分離法を実験的に考察する。

3. 実験 試薬はすべて市販のものを使用した。測定試料は、真空系 10^{-5} Torr にて凍結-脱気-融解を五回以上繰返し、蒸留後密封したのものを使用した。相対粘度は、真空中で測定し、水を密度 1 g/cm^3 , 粘度 1 cP として校正した。密度は、相対粘度及び下の測定後、同一試料について測定し、水の密度で補正した。

緩和時間の測定は、日立製 R-20 B (60 MHz) を使用し、NMR 信号を、一旦日立製信号平均化解析装置 A-1600A に記憶させたのを記録した。測定方法は、速い断熱通過による磁化の反転回復の方法を用い、その磁化回復曲線は、最小二乗法にて解析した。またその測定方法の妥当性は、ベンゼンの測定結果を他の文献と比較することにより確認した。

以上の測定における相対誤差は、それぞれ、相対粘度 $\pm 2\%$ 以下、密度 $\pm 1\%$ 以下、緩和時間 $\pm 10\%$ 以下であり、測定温度はすべて $31.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ であった。

4. 実験結果と考察 ベンゼン, アニソール, アセトニトリル, 1,1,1-三塩化エタンの四種の対象分子について、二硫化炭素, 四塩化炭素, 四塩化エチレン, 五塩化エタン及び重水素置換体を主として溶媒とし、希釈実験を行った。ベンゼンに

ついて、 $(1/\tau_i)$ 即ち R_i とモル分率との関係を表わせば、図1のようになる。図より明らかなる如く、 R_i とモル分率の間には、ほぼ直線関係が認められ、会合、錯形成等の溶質分子そのものの変化はないものと考えられる。したがって、図1において低濃度領域を直線近似して求めた切片は、溶質分子の無限希釈時の値として十分に意味を持つものと考えられる。しかし、これらの切片には、(5)式に示すように、溶質-溶媒間の相互作用をも含んでおり、これを差し引く必要がある。これらを(4)式より計算し、その実験値より差し引くと、表1のようになる。表1より明らかなる如く、これらの切片は、溶媒によって異なっており、溶質固有の切片というより、むしろ溶媒の物性による影響が関与していると考えられる。表1より、切片は溶媒分子の分子量や粘性係数が大きくなるほど増加しており、(3)式における $(R_{i=0})_{intra}$ が粘度に比例していることと考えあわせると、定性的に正しい。さらにこれを証明するため、この切片、即ち、表1で補正した切片を粘性係数に対してプロットした結果を示せば、(図2) 前述の如く切片と粘性係数の間には直線関係が認められる。さらに、注目すべき点は、ベンゼンとその重水素置換体であるベンゼン- d_6 で希釈した場合の切片もこの直線上にあることである。したがって、(3)式によれば、この直線は、 $\{R_i\}_{intra}$ の粘性係数による変化を表わしており、少なくとも溶媒に使用した物質の粘度範囲においては、この直線関係は成立しているといえよう。したがって、この直線を利用して、純溶液の粘度における $\{R_i\}_{intra}$ を決定すれば、純溶液中の分子運動における分子内の寄与と分子間の寄与が分離されるはずであり、また、希釈過程における粘度変化による実験値の変化の推定及び緩和機構の分離が可能をはずである。したがって、これによって、ベンゼンの分子内の寄与と、分子間の寄与を分離した値を、表2に示し、(3)、(4)式による計算値と比較すれば、(4)式による結果は非常に一致を示すが、(3)式による結果は大きく異なる。アニリン、1,1-三塩化エタンに関して同様な希釈実験を行うと、図3、4に示すような結果が得られる。これ

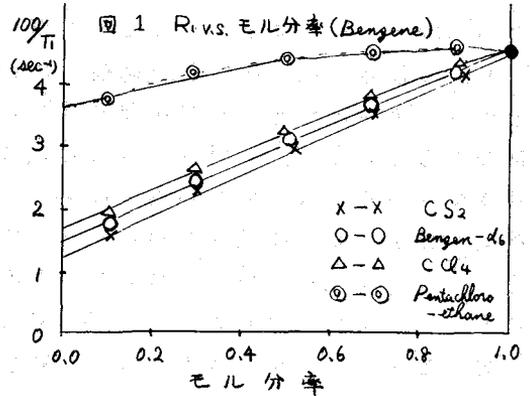


表1 分子間相互作用 (X/100)

溶媒	補正值	切片	i_{intra}
二酸化炭素	0.00	1.38	1.38
ベンゼン- d_6	0.00	1.43	1.43
四塩化炭素	0.00	1.66	1.66
五塩化エタン	1.59	3.70	2.11

図2 R_i vs. 粘性係数 (Benzene)

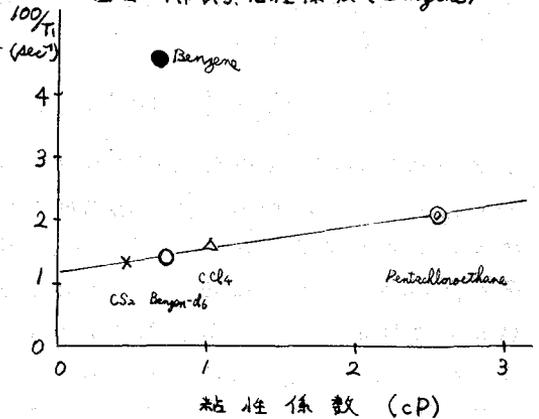


表2 実験値と計算値の比較

	i_{inter}	i_{intra}
実験値	3.16	1.47
計算値	3.55	1.64

らの二物質においても、ベンゼンと同じく R_i と粘性係数の間には、直線関係が成立し、やはり、分子内の寄与と分子間の寄与に分離できる。(表3)しかし、図2と図3、4を比べると、ベンゼンの場合に比べて、他の二物質ではその傾きも切片もかなり大きく、零とはしがたい。このことは、(3)式において、粘度が零となっても $(R_i)_{c=0}$ 又は $(R_i)_{c=0, \eta=0}$ が零とならないことを示す。即ち、粘度零において、無限に小さくなるはずの τ_2 が、ある有限の値よりは小さくならず、回転速度が一定値以上とならないと考えられる。あるいは、(5)式における $\{R_i\}_{\text{rot}}$ として考えるスピン回転緩和による寄与が残っている場合が考えられるであろう。いずれにせよ、メチル基に対しては、零粘度における緩和時間 $[R_i]_{c=0, \eta=0}$ が存在し、式で表現すれば、次のようになる。

$$\{R_i\}_{\text{intra}} = C_{\text{rot}} \times \eta + [R_i]_{c=0, \eta=0} \dots (6)$$

(6)式での C_{rot} は、粘性係数によるプロットの直線の傾きを表わし、 $\{R_i\}_{\text{intra}}$ の粘度依存性を表現する定数であり、 $[R_i]_{c=0, \eta=0}$ は、零粘度の極限における粘度に無関係な運動による緩和への寄与と考えられる。図3, 4より $[R_i]_{c=0, \eta=0}$ はほぼ一致し、 C_{rot} はアニソールのほうが大きい。このことは、アニソールのメチル基のほうが、純溶液中でより大きく束縛されていることを表わし、定性的に一致する。よって C_{rot} 及び $[R_i]_{c=0, \eta=0}$ は、分子運動に対して有用な情報を与えると考えられる。

図3 R_i vs. 粘性係数 (Anisole)

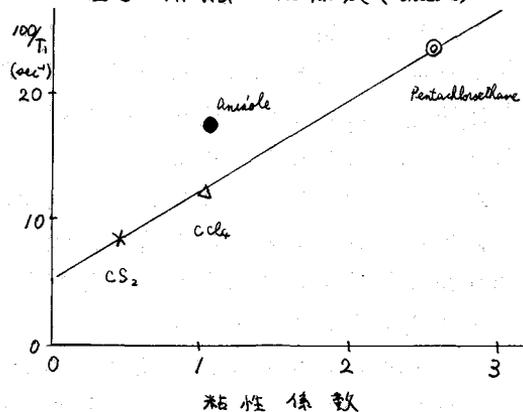


図4 R_i vs. 粘性係数 (1,1,1-Trichloroethane)

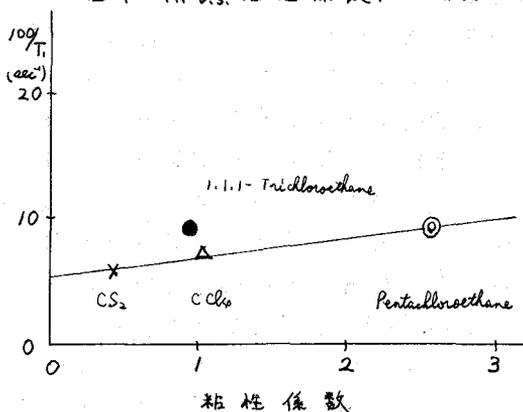


表3 分子間と分子内の寄与

		分子間	分子内
アニソール	実験値	4.97	13.30
	計算値	5.71	120.03
1,1,1-三塩化エチレン	実験値	2.45	7.24
	計算値	2.02	112.97

文献

- 1) E. Bock, J. Czubryt and E. Tomchuk, Can. Jour. Chem. 48, 2814 (1970)
- 2) H. S. Sandhu, J. Mag. Resonance 29, 563, (1978)
- 3) H. S. Sandhu, J. Mag. Resonance 34, 141, (1979)
- 4) R. W. Mitchell and M. Eisner, J. Chem. Phys. 33, 86 (1960)
- 5) R. W. Mitchell and M. Eisner, J. Chem. Phys. 34, 651 (1961)
- 6) A. Abragam, "The Principles of Nuclear Magnetism" Chapter VIII Oxford Univ. Press, London and New York (1961)
- 7) T. C. Farrar and E. D. Becker "Pulse and Fourier Transform NMR" Academic Press, (1971)

104 ピコリル型カルバニオンのNMR²⁾

ピコリルイオン対のC-13及びLi-7 NMRスペクトル
(三重工技セ)の小西和頼(名工大) 吉野明広、加藤守松、
高橋憲助(分子研) 川田勇三、菅原 正、岩村 秀

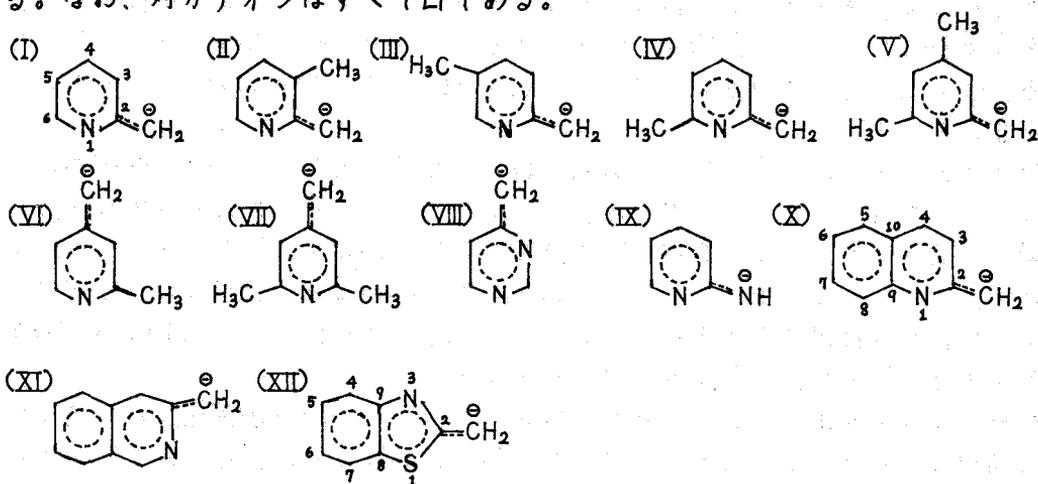
1.はじめに

これまでの一連のピコリル型カルバニオンに関する報告において、H-1およびC-13 NMRにより極性溶媒中の α -ピコリルリチウム(I)に対する次の二つの問題点を明らかにすることができた。

(1) 活性 α -炭素とその周囲の構造

(2) 分子内電荷分布

そこで、お三番目の問題点である対カチオンとの間の結合状態を調べるために、その有効な手段の一つとしてLi-7共鳴を用いた。それにより得られに知見と共に、関連するピコリル型アニオン(II)-(XII)のNMRスペクトルの観測結果についても報告する。なお、対カチオンはすべてLi⁺である。



2.実験

アニオンの合成方法は、すべて既報に準じた。出発物質はすべて市販品を用い、常法により完全脱水精製した後、それらとn-BuLiを高真空中で反応させ上記のアニオンを合成した。

C-13およびLi-7 NMRスペクトルは、バリアンFT 80A(分子研)の装置を使用し、C-13に対する共鳴周波数 20.000 MHz、およびLi-7 30.913 MHzで、FT法により測定された。また、測定温度は、37°Cである。サンプルの濃度は、一部を除いて0.8 ~ 1.3 mol/lである。C-13化学シフトは、使用した溶媒のピークを内部標準として計算された。そしてその溶媒の基準ピークの化学シフトは、TMSからEt₂Oに対して17.1、THF 26.4、HMPA 37.0、DME 58.8および

こにし かずより、よしの あまひろ、かとう もりまつ、たかはし けんすけ
かわだ ゆうぞう、すがわら ただし、いわむら ひいす

TG (テトラグライム) 58.6 ppm であるとした。また、Li-7 化学シフトについては、D₂O 中の LiCl (0.5 mol/l) のピークを外部標準として計算した。

α-ピコリルおよびγ-ピコリルアニオンに対する PPP と CNDO/2 MO 計算は、Okita C-4300C (三重工技社) として Hitachi-8450 (名工大) 計算機システムにより行なった。アニオンの骨格の座標は、ピリジンのそれ²⁾と同様であるとして、また、α-と2-炭素間およびγ-と4-炭素間の結合距離は、1.39 Å であるとして計算した。

3. 結果と考察

アニオンに対する C-13 および Li-7 化学シフトを表1と表2に示す。また、図1にMO計算の結果得られたπ-電子密度とC-13化学シフトの関係を示す。

(A) アニオンの NMR スペクトル

C-13 スペクトルについて、シグナルの帰属には、H-1 スペクトルとの比較、出発物質のスペクトルからの推定、off resonance decoupling による四級炭素の確認等種々の方法を用いた。その結果、前記の12個のアニオンの生成を確認した。特に、メチル置換ピリジンを出発物質とするアニオンについては、スペクトルパターンの相違により(I)に代表されるα-ピコリル型(I)-(V)とγ-型(VI)-(XII)に区別することができる。

Li-7 スペクトルについて、本研究において合成したアニオンは、既述のごとくすべてリチウムカチオンとイオン対をなしている。そこで、これらのスペクトルを観察した結果、アニオン、溶媒、測定温度等の違いにより、化学シフトや吸収中に変化を生じた。たとえば、α-ピコリルリチウム(I)の場合、通常の測定条件で、溶媒を THF から HMPA に変えることにより化学シフトにおいて 0.24 ppm、吸収中に至っては、約 6.5 倍も広がるといった変化を示す。

N-14 スペクトルについて、出発物質あるいはピリジンの塩酸塩、N の位置に結合を持つγ-ピコリン-N-オキサイドといった関連する化合物のスペクトルは、比較的容易に観測することができたのに反し、アニオンのスペクトルの観測は非常に困難で、その吸収を確認することができないまま現在に至っている。

(B) α-ピコリルアニオン(I)とその対カチオンとの間の結合状態

(I)-(XII) に対する Li-7 共鳴スペクトルにおいて、環内に窒素原子を1個多く含む(XIII)、α-原子が窒素である(IX)そして五員環にイオウ原子を持つ(XIV)等を除くアニオンのシグナルは、すべて基準に対して高磁場側に現われており、それらの化学シフトの値は、すべて 0 ~ -1.0 ppm 内で、THF 中のベンジルあるいは1-フェニルアリルと類似しているもののシクロペンタジエニル(-8.37 ppm) あるいはインデニル(-6.12 ppm) アニオンとは大きく異なっている^{3,4)}。

そこで、(I)-(XII)のうち(I)を代表に取り上げ、その対カチオンに対する溶媒、濃度、測定温度等の影響について得られた観測事実を述べる。まず、表2に示す種々の溶媒における Li-7 化学シフトの値から、次の点を指摘することができる。用いられた溶媒の中で最も極性が強い HMPA において、シグナルが最も低磁場に現われ、その値が -0.05 ppm と非常に小さい。また、わずかながらあるがシフトに反ぼす溶媒の

影響もわかれる。一方、まったく同じ試料により測定されたアニオンのC-13およびH-1化学シフトをみると、Li-7の場合に比べて顕著な溶媒効果を示している。Et₂O中における5-および3-位の炭素に対しTHF中のそれらは、4.7および2.7ppm、さらにHMPAに至っては9.8および5.2ppmも高磁場シフトする。次に、濃度効果について、THF中、0.5~2.0mol/lの範囲で、シフト差は0.02ppmとほとんど無視できる反面、吸収の半値中は2~8Hzと大きく変化する。また、DME中の(I)、THF中の(IV)および(V)等の場合も0.8~1.2mol/lの範囲で、シフト差は0.02~0.05ppmと小さい。最後に、溶液内に過剰の出発物質が混在する場合のスペクトルを観測した結果、表2に示す様にα-ピコリンの比率が増加する程、低磁場シフトし吸収中も広がる。さらに、測定温度を-76°Cまで下げると、α-ピコリンが過剰に混在する場合にピークが二つに分裂するといった変わった変化が起きる。

以上の事実から、(I)に対する対カチオンの平均的な位置は、ピリジン環の環電流効果によりシャヘイが増える領域、つまり、環上のπ-電子雲の影響を強く受けるところではなく、最初にメタル-プロトン交換反応が起きる活性α-炭素と強い電荷的影響を持つ環内の窒素原子の二つの影響を受ける付近にあり、溶媒の極性の強さによりこれらからの遠ざかり方が異なる。また、THF、DME中におけるα-ピコリルリチウム(I)の会合問題については、Li-7化学シフトに及ぼす濃度効果からみて、本研究の濃度範囲では、会合状態が大きく変ってはいないかあるいは会合の影響は重要ではないと考えられる。従って、これらのことから、THF中、室温でα-ピコリルリチウム(I)は、主として、溶媒分子により周縁部から全体を取り巻かれた形で溶媒和されているtight型のion pairとして存在している。

Table 1. The carbon chemical shifts of the anions, in ppm^{a)}

Anion	Solv.	Assignment		4-C	5-C	6-C	7-C	8-C	9-C	10-C	CH ₂	CH ₃
		2-C	3-C									
(I)	Et ₂ O	165.5	118.8	134.7	102.0	149.8					57.5	
	THF	164.2	116.1	131.6	97.3	148.7					57.0	
	DME	165.5	115.7	131.3	96.2	148.8					58.0	
	EG	161.9	114.8	130.5	94.1	149.0					61.5	
	HMPA	161.3	113.6	129.8	92.2	149.8					62.6	
(II)	THF	163.2	119.4	130.7	97.2	146.7					56.2	21.0
(III)	THF	164.1	116.6	134.2	104.6	147.1					54.2	18.1
(IV)	THF	166.0	112.7	132.6	97.3	155.7					54.1	24.6
(V)	Et ₂ O	169.1	114.2	144.7	104.7	156.8					52.9	22.6 25.5
(VI)	THF	149.7	107.9	150.0	107.9	143.7					64.9	24.4
(VII)	THF	150.2	106.4	151.9	106.4	150.2					62.2	24.3
(VIII)	THF	159.4	---	144.2	55.4	95.2					42.9	
(IX)	THF	174.2	115.3	136.3	104.7	148.1					--	
(X)	THF	159.0	111.8	128.6	126.3 ^{b)}	117.7	128.2 ^{b)}	126.0 ^{b)}	155.8	122.7	70.2	
(XI)	THF	125.5	157.6	63.2	116.0 ^{b)}	125.2 ^{b)}	85.5 ^{b)}	117.2 ^{b)}	126.2	141.2	29.5	
(XII)	THF	157.6	---	116.2 ^{b)}	120.3 ^{b)}	88.8 ^{b)}	119.5 ^{b)}	131.4	145.2		c)	

a) Errors are estimated to be within ± 0.3 ppm. b) Assignment uncertain. c) The chemical shift is not available because of overlapping of the large solvent peak.

Table 2. ^{13}C Chemical shifts for various anions, in ppm^{a)}

Anion	Solv.	Shift (ppm)	Anion	Solv.	Shift (ppm)
(I)	THF	-0.52	(IV)	THF	-0.30
	THF	-0.29	(V) ^{c)}	Et_2O	-0.10
	THF	-0.62	(VI)	THF	-0.22
	THF	-0.26	(VII)	THF	-0.03
	THF	-0.05	(VIII)	THF	0.29
(I') ^{b)}	THF	-0.01	(IX)	THF	1.12
(I'') ^{b)}	THF	-0.26	(X)	THF	-0.08
(I''') ^{b)}	THF	-0.40	(XI)	THF	-0.35
(II)	THF	-0.24	(XII)	THF	1.01
(III)	THF	-0.34			

a) Errors are estimated to be within ± 0.03 ppm.

b) In proportions of starting materials, α -picoline:n-BuLi = 1.77:1, 1.31:1, and 0.53:1 for (I'), (I''), and (I'''), respectively.

c) Contaminated with a small amount of (VII).

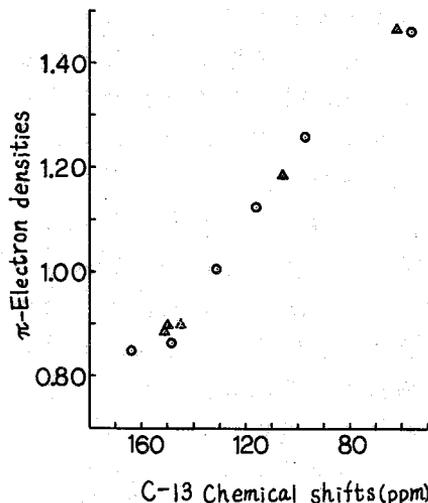


Fig. 1. π -E.D. (PPP method) vs. ^{13}C C.S., O (I) in THF and Δ (VII) in THF.

(C) α -および γ -ピコリル型アニオンの化学シフトと電子密度

α -ピコリルアニオン(I)の ^{13}C 化学シフトは、PPPあるいはCND0/2法により計算される π -電子密度と良い相関を示すことについては、前報で述べた通りであるが、さらに、(II)-(V)の α -型および(IV)-(VII)の γ -型のアニオンについても同様であることがわかった。図1に示す様に、(I)、(VII)の両者の π -電子密度を同じ尺度でもって ^{13}C 化学シフトから見積ることが出来る。このことは、両者が、それらのスペクトルパターンは大きく違うものの、類似のアニオンであることを意味している。しかしながら、H-1スペクトルから、 γ -型のアニオン(IV)-(VII)は、THF中で共に α -型を経た後すべて γ -型に変化し、この変化がより安定な状態への異性化でしかも一次反発的に進むことについてはすでに明らかになっている。そこで、これら5個の α -型と2個の γ -型のアニオンに対するLi-7化学シフトを比較すると、その差が最も大きいものでも0.3 ppmときわだった違いをみせない。従って、もし、これら γ -型のアニオンとそれらの対カチオンとの間の結合状態に関して、 α -型のそれを通して推定できるとするならば、 γ -型アニオンのリチウム塩(IV)-(VII)は、THF中、室温で、主として、対カチオンと環内の窒素原子の間がより緊密になった形のtight型のion pairとしてかあるいは、対カチオンが活性 γ -炭素原子に配位した形のイオン対として存在していると考えられる。

4. References

- 1) Part IV in this series: H. Konishi and K. Takahashi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 50, 2512(1977).
- 2) E. Pak, L. Hansen-Nygaard, and J. Rastrup-Anderson, J. Mol. Spectrosc., 2, 361(1958).
- 3) R. Waack, H. A. Poran, L. B. Baker, and G. A. Olah, J. Am. Chem. Soc., 88, 1272(1966).
- 4) P. F. Cox and H. L. Terry, Jr., J. Magn. Resonance, 14, 317(1974).

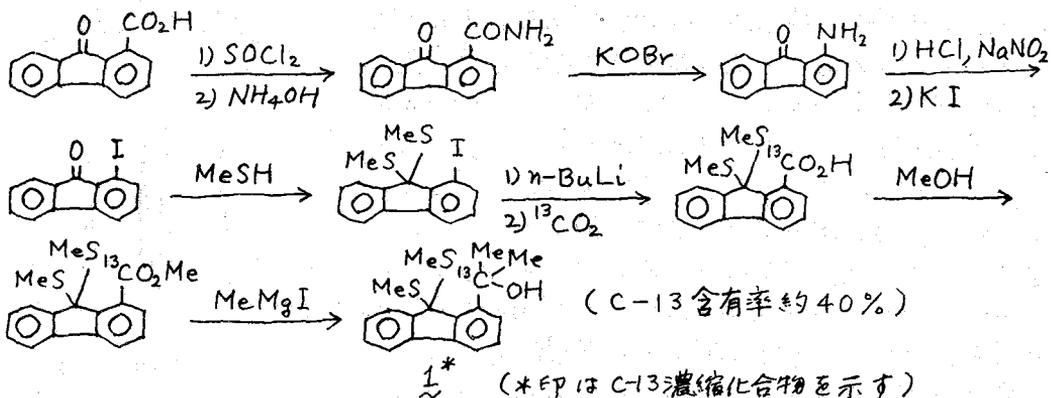
105 分子内硫黄原子によって安定化された炭素陽イオン(7)

C-13 NMRによる研究
(神戸大工) 北條 卓, 〇市 忠顕

1. はじめに 三価の炭素陽イオンに対しさらに2個の硫黄原子を配位させ、五価の炭素種を合成しようとする試みが種々なされて来たがそれらは不成功におわつた。¹⁻³⁾ 近年我々は基本骨格としてフルオレンを用いることにより、この試みに成功した。⁴⁾ またこのイオンの反応性についても検討し興味ある結果を得た。⁵⁾ 今回はこのイオンの構造について¹³C-NMRを中心に検討する。

2. 化合物の合成

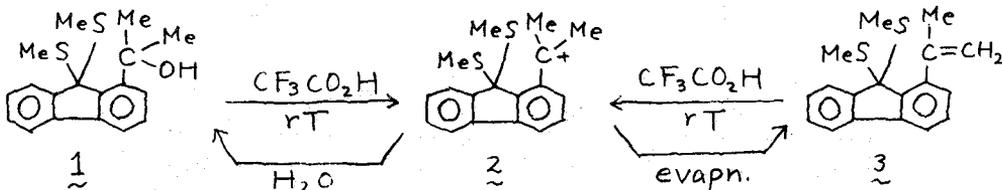
C-13濃縮化合物の合成は下記の経路にしたがって合成した。ただし、炭酸ガス



によるC-13導入に際し、C-13含有率90%の炭酸バリウムに天然の炭酸バリウムを混合して用いたため、アルコール1のC-13含有率は約40%(C-13 NMRより計算)となった(図3参照)。

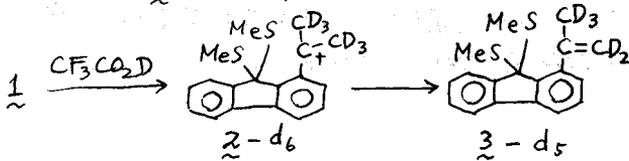
3. イオン2の生成および¹H-NMR

アルコール1を0~30°Cでトリフルオロ酢酸(TFA)に溶かすと、ただちにイオン2が生成する。イオン2は氷水にあげるとアルコール1を再生し、TFAを除去するとオレフィン3が生成する。オレフィン3もTFA中でイオン2となる。イオン2は紫外・可視スペクトルにおいて長波長側に吸収を有する。329nm(ε7,300), 387(8,300), 448(6,300)。イオン2は¹H-NMRにおいて35°C以上でメ



(ほうじょう) まさる, いちただあき

チル領域に3本の吸収を示す。それぞれ δ 2.70 (S, 3H, C⁺-Me), 2.31 (S, 6H, S-Me) 1.95 (S, 3H, C⁺-Me) である。シグナルの帰属は次のようになされた。アルコール 1 を TFA の代りに CF₃CO₂D に溶かすと δ 2.70 及び 1.95 の吸収がなくなり、この溶液から TFA-d₁ を留去するとオレフィン 3-d₅ が得られる。



したがって 2本の S-Me は等価であり、2本の C-Me は大きく非等価 (差 0.75 ppm) である。また 0°C においては 2本の S-Me は非等価となるがその差は小さい (約 0.1 ppm)。しかしながら C-Me の方は全く変化しない。イオン 2 の構造として 2a, 2b, 2c および 2c と 2d の速い平衡が考えられるが、この内 2b は 2本の C-Me が非等価であることより否定される。2c であれば 2本の C-Me より 2本の S-Me の方が非等価性が大きいはずであるからこれも否定される。2c と 2d の速い平衡と考えると、温度を上げた場合 2c に 1本となるのは 2c 又は 2d においてケミカルシフト差の小さい方であるから C-Me 方が 2c に 1本化しなければならない。しかるに実際は S-Me の方が 2c に 1本化するわけであるからこれも否定される。構造 2a では 2本の C-Me は大きく非等価で 2本の S-Me が等価であり、実験事実をよく説明している。

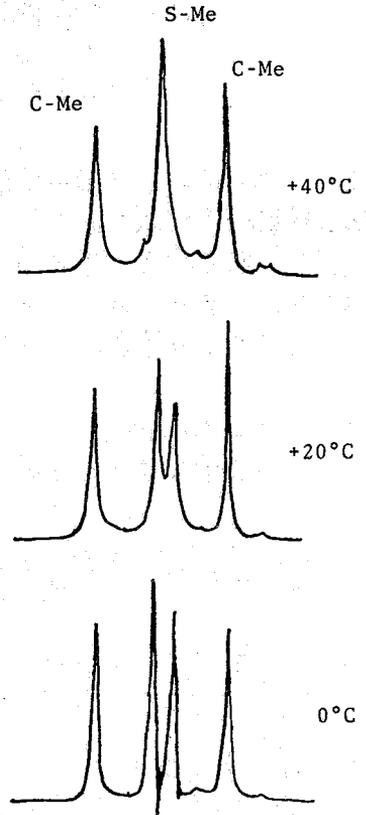
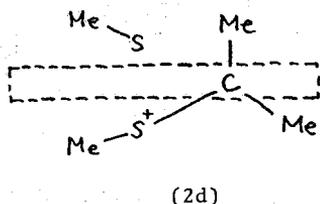
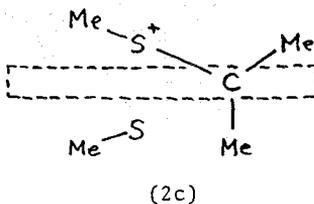
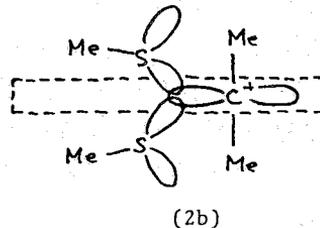
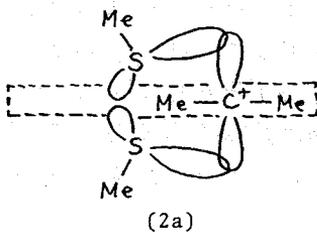


Fig. 1. Methyl region of ¹H-NMR of Ion (2)



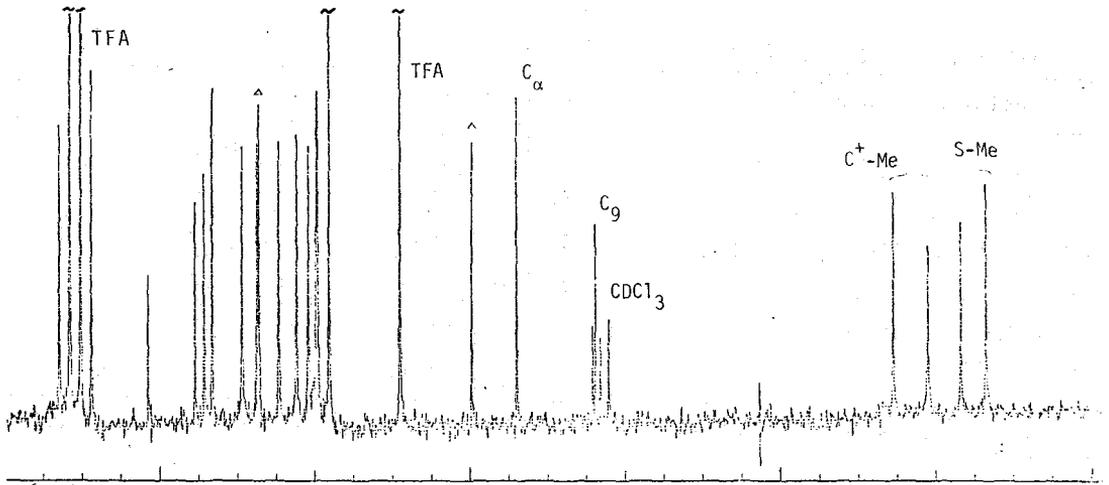


Fig. 2. $C-13$ NMR of Ion 2 in CF_3CO_2H at $-20^\circ C$

4. $C-13$ NMRによる検討

イオン2は室温ではやや不安定であるので $^{13}C-NMR$ は $-20^\circ C$ で測定した。日本電子PFT-100型フーリエ変換NMR装置を用い、 8ϕ 試料管中でアルコールをTFA- $CDCl_3$ (4:1)混合溶媒に溶かしイオン2を発生させた。濃度は約20%とし、内部基準としてTMSを用いた。45 μ パルスを用い、パルスくりかえし時間は2~3秒、積算回数は500~1000回とした。内部ロックは $CDCl_3$ のDシグナルによる。観測周波数は25.03MHz、プロトンデカップリングはノイズデカップリングによる。 J_{CH} の測定はゲートデカップリングで行い、パルス繰り返し

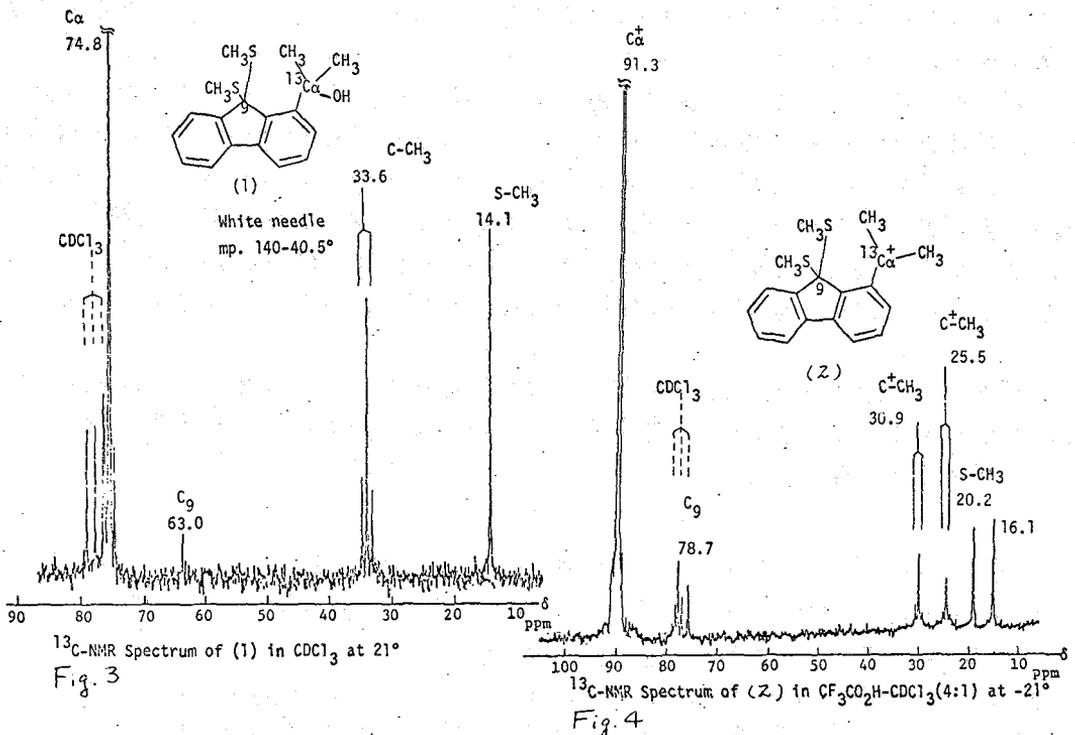


Table 1. C-13 NMR Data^{a, b}

Position	Alcohol(CDCl ₃)	Ion(TFA, -20°C)	$\Delta\delta^c$
C _α	74.8	91.3	16.5
C _β	63.1	78.7	15.6
C _α -Me	33.7 (J _{CC} =40.0Hz)	30.9* (J _{CC} =34.2)	-2.8
		25.5* (J _{CC} =30.5)	-8.2
S-Me	14.1	20.2 (J _{CH} =146.5)	6.1
		16.1 (J _{CH} =141.6)	2.0

a) δ_C , ppm from TMS. b) J, Hz. c) $\Delta\delta = \delta(\text{ion}) - \delta(\text{alcohol})$. *) J_{CH}=128-133 Hz

時間10秒で1700回積算した。J_{CC}の測定には先に合成した40%¹³C濃縮試料を用いた。結果を図2~4及び表1に示す。図2は非濃縮アルコール_±から発生させたイオン_±のスペクトルを示す。TFAとCDCl₃の吸収線を除くと、残るのは18本の吸収線であって、これはイオン_±の18個の炭素に対応しており、平衡混合物でないことを示している。イオンのC_α炭素の化学シフトは91.3ppmでOlahらの報告しているジメチルベンジルカチオンの値255.7に比べると160ppm以上高磁場であり、かなりの陽電荷が硫黄原子に流れていることを示している。又C_βを見るとアルコールに比べ15ppm低磁場移動しており、C_β位へも電荷が分布していることがうかがわれる。S-Meは2本になっておりこれは¹H-NMRにおける低温のパターンと対応している。アルコールに比べそれぞれ2ppmと6ppm低磁場シフトしておりC⁺→Sの陽電荷の流れを反映していると考えられる。またJ_{CH}も異なり電荷のかたよりを示しているようだ。しかしながら2本のS-Meのシフト差は4.1ppmで2本のC-Meのシフト差5.4ppmよりも小さい。もしこのイオン種がスルホニウムであれば2本のS-Meのシフト差はもっと大きく(約10ppm)なければならぬし、スルホニウムでない方(2本の内の)のS-MeのJ_{CH}はもっと小さい(138Hz)はずである。Olahらはt-BuカチオンのJ_{CC}が25.1Hzであると報告している。イオン_±のJ_{CC}は30.5と34.2でありアルコール_±の値40Hzに比べかなり小さな値となっており、かなりの陽電荷が炭素に残っていることを示している。

5. 結論 以上の¹H-および¹³C-NMRの検討によりイオン_±が古典的なスルホニウムイオンや古典的な炭素陽イオンではなく、新しい型の炭素陽イオンであることが明らかとなった。

- 1) M. Hojo, T. Ichi, Z. Yoshida, Y. Tamaru, J. Am. Chem. Soc., **91**, 5170 (1969).
- 2) R. Breslow, L. Kaplan, D. LaFollette, J. Am. Chem. Soc., **90**, 4056 (1968).
- 3) J.C. Martin, R. J. Basalay, J. Am. Chem. Soc., **95**, 2572 (1973).
- 4) M. Hojo, T. Ichi, T. Nakanishi, N. Takaba, Tetrahedron Lett., 2159 (1977).
- 5) 北條, 市, 佐藤, 柴藤, 第29回有機反応機構討論会(1978)

序論

我々は、昨年の討論会で、 Me_2SnCl_2 とピコリン塩基が溶液内で1:1錯体と1:2錯体を同時に形成することを示した。^{1,2)}今回は、ルイス塩基として、 α, β, γ -ピコリンを取り上げ、その生成定数(K_1, K_2)、錯体シフト($\delta_{AB}, \delta_{AB_2}$)及び、生成定数の温度依存性より熱力学的パラメーター($\Delta H_1, \Delta H_2, \Delta S_1, \Delta S_2$)を求め、その安定化学種を検討した。今回用いたピコリン塩基は、 Me_2SnCl_2 のMeプロトンをも3本に分裂させることからピコリン塩基の濃度依存性について計算を行なった。又、溶媒は、化学的に安定で溶解度が比較的良好な PhNO_2 を用いた。

実験

$^1\text{H-NMR}$ の測定には、CWモードの場合日立R-22(90MHz)を、FTモードの場合は日立R-900M(90MHz)装置を用いた。CWモードではTMS内部基準により、内部ロック方式で測定を行なった。化学シフトの精度は $\pm 0.1\text{Hz}$ である。FTモードの場合は、溶媒の信号が強すぎるため、溶媒除去のパルス系列で測定した。その結果、溶媒信号は通常の $1/20$ 以下に減少させることができた(図1参照)。パルス系列の代表的な条件は、(180°パルス-5sec-90°パルス-データ収集-20sec)である。温度可変実験の際のプロブ温度測定は、較正済みの $^{\circ}\text{C}$ 熱電対により行なった。温度の安定性は $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 以下であった。 Me_2SnCl_2 は市販品を減圧昇華精製、ピコリン塩基は市販品を BaO で乾燥後蒸留した。 PhNO_2 は市販品に CaH_2 を加え加熱還流し、脱水後、減圧蒸留を行なった。試料調製、蒸留等の操作は、全てドライボックス中で行なった。

塩基のシフトの濃度依存性の平衡式によるシミュレーション

実験シフトと計算シフトの根平均二乗偏差

$$\text{rmsd} = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (\delta_{\text{obsd}, i} - \delta_{\text{calcd}, i})^2}{n} \right]^{1/2}$$

が最小となるように生成定数及び、錯体シフトを計算により決定することが必要である。計算には、偏微係数を利用して関数の極小化を行う、ガブルーチン・プログラムD A V I D³⁾を引用した。ここで必要となる計算は、各平衡式のもとで、(1)式を最小とすることである。

$$F = (\delta_{\text{obsd}} - \delta_{\text{calcd}})^2 \dots\dots (1)$$

1:1錯体と1:2錯体が共存すると仮定した場合; $A + B \xrightleftharpoons{K_1} AB, AB + B \xrightleftharpoons{K_2} AB_2$.

$$\left. \begin{aligned} K_1 &= C_{AB} / (C_A \cdot C_B) \\ K_2 &= C_{AB_2} / (C_{AB} \cdot C_B) \end{aligned} \right\} \dots\dots (2) \quad \left. \begin{aligned} C_A^0 &= C_A + C_{AB} + C_{AB_2} \\ C_B^0 &= C_B + C_{AB} + 2C_{AB_2} \end{aligned} \right\} \dots\dots (3)$$

(2), (3)式を C_B について解くと C_B の3次式

$$K_1 K_2 C_B^3 + K_1 \{1 + K_2 (2C_A^0 - C_B^0)\} C_B^2 + \{1 + K_1 (C_A^0 - C_B^0)\} C_B - C_B^0 = 0 \dots\dots (4)$$

が得られ、これを解いて(2), (3)式より各々の化学種の生成濃度を計算することができる。計算シフトは、

ふじわらんであき、さかいふみんこ、ささきよしお

$$\delta_{\text{calcd}} = \frac{C_B \delta_B + C_{AB} \delta_{AB} + 2C_{AB_2} \delta_{AB_2}}{C_B^0} = \delta_B + \frac{C_{AB}}{C_B^0} (\delta_{AB} - \delta_B) + 2 \frac{C_{AB_2}}{C_B^0} (\delta_{AB_2} - \delta_B) \dots (5)$$

となり、 $K_1, K_2, \hat{C}_{AB}, \hat{C}_{AB_2}$ の4種がパラメータとみなされる。よって必要な微係数は、

$$\frac{\partial F}{\partial K_1} = -2\Sigma(\delta_{\text{obsd}} - \delta_{\text{calcd}}) \frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial K_1}, \quad \frac{\partial F}{\partial \delta_{AB}} = -2\Sigma(\delta_{\text{obsd}} - \delta_{\text{calcd}}) \frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial \delta_{AB}}$$

$$\frac{\partial F}{\partial K_2} = -2\Sigma(\delta_{\text{obsd}} - \delta_{\text{calcd}}) \frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial K_2}, \quad \frac{\partial F}{\partial \delta_{AB_2}} = -2\Sigma(\delta_{\text{obsd}} - \delta_{\text{calcd}}) \frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial \delta_{AB_2}}$$

ここで(5)式より

$$\frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial K_1} = \frac{(\delta_{AB} - \delta_B)}{C_B^0} \cdot \frac{\partial C_{AB}}{\partial K_1} + 2 \frac{(\delta_{AB_2} - \delta_B)}{C_B^0} \cdot \frac{\partial C_{AB_2}}{\partial K_1}, \quad \frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial \delta_{AB}} = \frac{C_{AB}}{C_B^0}$$

$$\frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial K_2} = \frac{(\delta_{AB} - \delta_B)}{C_B^0} \cdot \frac{\partial C_{AB}}{\partial K_2} + 2 \frac{(\delta_{AB_2} - \delta_B)}{C_B^0} \cdot \frac{\partial C_{AB_2}}{\partial K_2}, \quad \frac{\partial \delta_{\text{calcd}}}{\partial \delta_{AB_2}} = \frac{C_{AB_2}}{C_B^0}$$

さらに(2)、(3)式より

$$\frac{\partial C_{AB}}{\partial K_1} = \frac{C_A C_B + K_1 (C_A + 1/2 C_B) (\partial C_B / \partial K_1)}{1 + 1/2 K_1 C_B}, \quad \frac{\partial C_{AB_2}}{\partial K_1} = K_2 C_B \frac{\partial C_{AB}}{\partial K_1} + K_2 C_{AB} \frac{\partial C_B}{\partial K_1}$$

$$\frac{\partial C_{AB}}{\partial K_2} = \frac{K_1 (C_A + 1/2 C_B)}{1 + 1/2 K_1 C_B} \frac{\partial C_B}{\partial K_2}, \quad \frac{\partial C_{AB_2}}{\partial K_2} = C_B C_{AB} + K_2 C_{AB} \frac{\partial C_B}{\partial K_2} + K_2 C_B \frac{\partial C_{AB}}{\partial K_2}$$

最後に(4)式を微分して

$$\frac{\partial C_B}{\partial K_1} = \frac{C_B - C_B^0}{K_1 R}, \quad \frac{\partial C_B}{\partial K_2} = \frac{K_1 C_B^2 (C_B + 2C_A^0 - C_B^0)}{R}$$

ただし

$$R = 3K_1 K_2 C_B^2 + 2K_1 [1 + K_2 (2C_A^0 - C_B^0)] C_B + K_1 (C_A^0 - C_B^0) + 1$$

結果と考察

溶存化学種について： $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{O}_2)$ とピコリン塩基の錯形成については、これまで γ -ピコリンヒの1:2錯体が単離されその構造が推定されているのみであり、1:1錯体に関する報告はない。このような単核錯体の溶液中での相互作用を調べる場合は、考えられるすべての化学種が生成されると仮定して計算を行なう必要がある。ピコリン側で観察したJobプロットは溶液中での1:1錯体の生成を示唆した

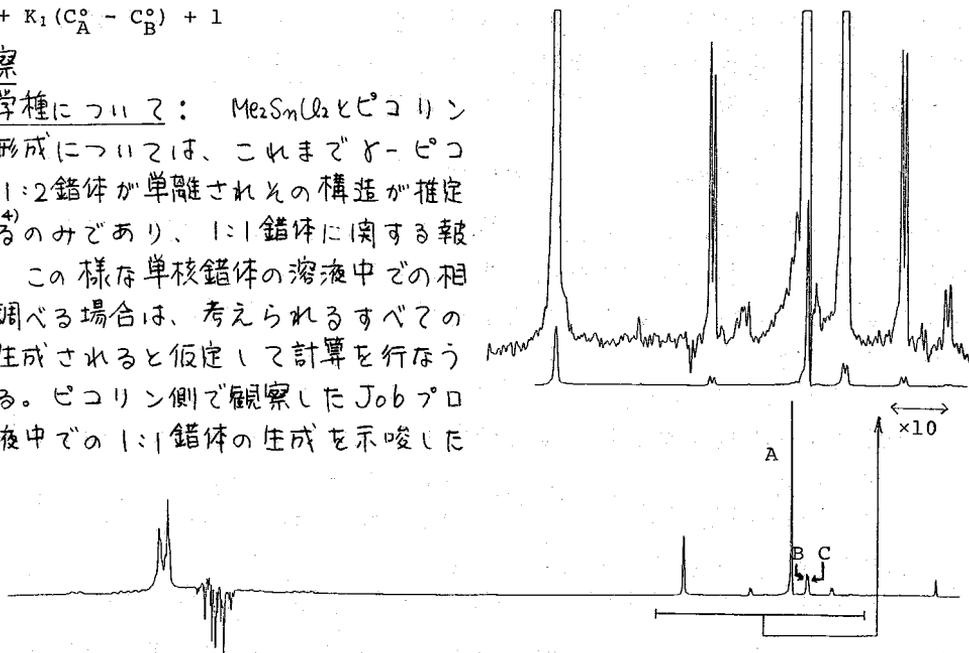


Fig. 1 ^1H -FT nmr spectra of Me_2SnCl_2 in nitrobenzene, containing 0.034M α -picoline. ($C_{\text{sn}}=0.066\text{M}$).

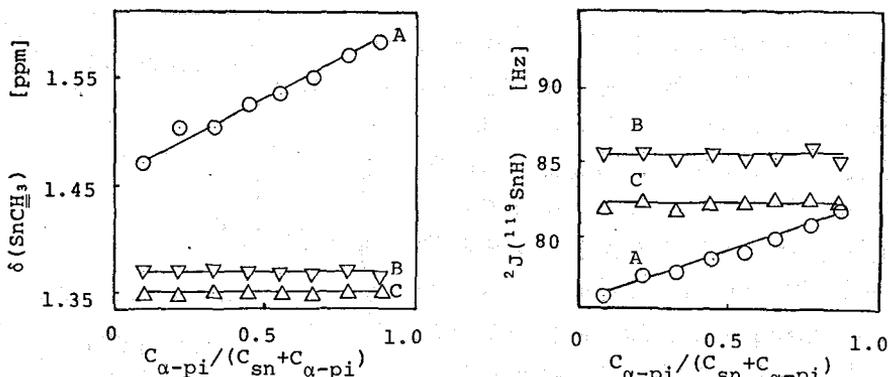


Fig. 2 Concentration dependence of the ^1H shift and coupling constant for the α -picoline + Me_2SnCl_2 system

in nitrobenzene (total conc.=0.1M).

が、 Me_2SnCl_2 のMeプロトンが3本に分裂することが、 CH_2CH_2 中での測定¹⁾と同様に、 PhNO_2 中に於ても観察された。その例を図1に示す。ピークA、B、C各々について Sn 核とのカップリングが観察された。これら3つのピークの化学シフト及び、結合定数の濃度依存性を図2に示す。この図に於てB、Cの化学シフト及び、結合定数は濃度依存性を全く示さない。またピークAに対するB、Cの強度比は Me_2SnCl_2 の濃度が増すに従って減少した。これらのことから、ピークB、Cは単一の化学種であると推定され、これらの $^2J(^{119}\text{Sn}-\text{H})$ 値がそれぞれ85.5Hz及び、82.5Hzでありその値が6配位と4配位の場合の $^2J(^{119}\text{Sn}-\text{H})$ 値のほぼ中間にあることから5配位の1:1錯体とするのが妥当であろう。以上の事実より、溶液中での錯形成は1:1錯体と1:2錯体が混在しているものと推定される。

濃度依存性のシミュレーションについて

ピコリン塩基の濃度を約0.02Mに一定とし、 Me_2SnCl_2 の濃度を0~0.1M程度まで変化させて得られるピコリンのMe基の濃度シフト曲線をプロットしたのが図3である。このデータを従来より1:1錯体の平衡定数の決定に用いられてきた Kete la arの式に基づきプロットすると図4となる。この図から直線に乗る部分とそれからはずれる部分とがあることが解る。従って直線に乗

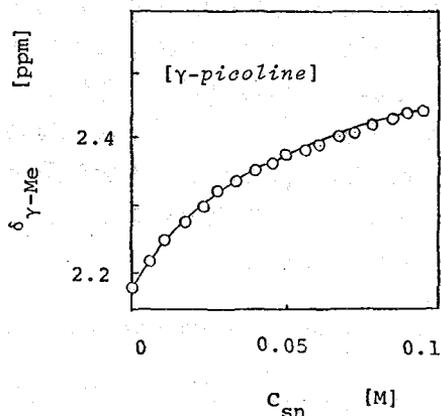


Fig. 3 Concentration dependence of ^1H nmr shifts for the picoline + Me_2SnCl_2 system ($\text{pi}=0.02\text{M}$).

Table I: Parameters determined by analysis of the nmr concentration dependence for the picoline + Me_2SnCl_2 system in nitrobenzene at 34.1°C.

base	$K_1 [\text{M}^{-1}]$	$K_2 [\text{M}^{-1}]$	$\delta_B [\text{ppm}]$	$\delta_{AB} [\text{ppm}]$	$\delta_{AB_2} [\text{ppm}]$	rmsd [Hz]
α -picoline	6.4	6.0	2.502	3.491	2.927	0.19
β -picoline	18.6	14.1	2.248	2.566	2.433	0.10
γ -picoline	22.0	17.9	2.258	2.616	2.470	0.18

る部分から $A + B \stackrel{K_1}{\rightleftharpoons} AB$ 型の計算方法で K_1 及び δ_{AB} を求めることができる。次にその値を用い、全域のデータについて、 $A + B \stackrel{K_1}{\rightleftharpoons} AB$ 、 $AB + B \stackrel{K_2}{\rightleftharpoons} AB_2$ 型の計算を行い K_2 及び δ_{AB_2} を求めた。計算結果を表 I に示す。 α 、 β 、 γ -ピコリンのどれもが $K_2 > 1$ であることから安定度は 1:2 錯体の方が高いといえる。 r_{msd} が 0.2 Hz 以下と実験値を良く再現している。又、 K_1 と δ_{AB} の決定に際し、直線に乗る部分のデータを用いた時のみ最小の r_{msd} が得られた。なお、最初からパラメータを 4 種とし $A + B \rightleftharpoons AB$ 、 $AB + B \rightleftharpoons AB_2$ 型の計算方法を適用した場合、1 つのデータについてそれぞれ 4 種のパラメータを同時に決定することはできたが、くり返し実験の結果、その値が再現性に乏しく、前回と同様、4 種のパラメータを同時に決定することは困難と結論された。

熱力学的検討

濃度シフト曲線の温度依存性を図 5 に、又これらより求めた熱力学的パラメータを表 II に示す。 ΔH は一般的な水素結合程度の大きさである。 ΔS に関しては予想通り、 α -ピコリンのメチル基による大きな立体障害が示唆された。これらより等平衡温度を計算すると α -ピコリン = 94°C 、 β -ピコリン = 477°C 、 γ -ピコリン = 573°C となり、 α -ピコリンはその立体障害のため 1:2 錯体が著しく生成し難いことを示している。

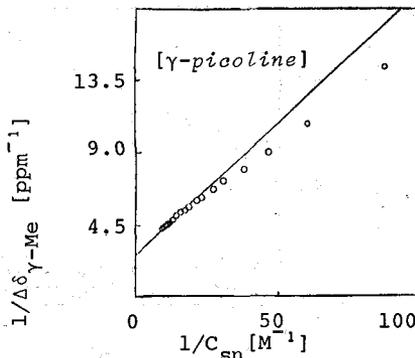


Fig.4 Ketelaar plots for the picoline + Me_2SnCl_2 system in nitrobenzene.

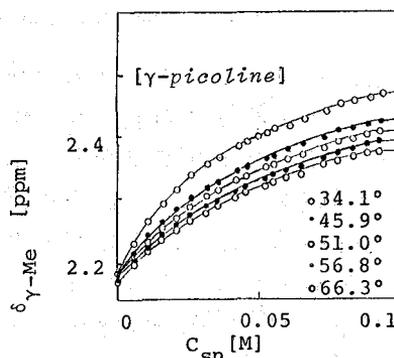


Fig.5 Concentration dependence of ^1H nmr shifts for the picoline + Me_2SnCl_2 system ($\text{pi}=0.02\text{M}$).

Table II: Thermodynamic data for the picoline + Me_2SnCl_2 in nitrobenzene.

	$-\Delta H_1$ [Kcal/mol]	$-\Delta H_2$ [Kcal/mol]	$-\Delta S_1$ [e.u.]	$-\Delta S_2$ [e.u.]
α -picoline	12.3	6.6	36.2	18.0
β -picoline	3.4	3.3	5.4	4.4
γ -picoline	4.1	3.3	4.9	3.9

References

- 1) 第17回NMR討論会要旨集p-53. (1978) 藤原、酒井、佐々木、他
- 2) H.Fujiwara, F.Sakai and Y.Sasaki J.P.C., 83, 2400 (1979)
- 3) R.Fletcher and M.J.D.Powell Computer J., 6, 163 (1963)
- 4) Hendriker, D.G., Inorg.Nucl.Chem.Lett., 5, 115 (1969)

107 有機スズ化合物のルイス塩基の溶液内錯体形成 Ⅲ. 液晶溶媒中での観察

(阪大薬) ○藤原英明・佐々木喜男

序 液晶中に配向した分子のNMRスペクトルを解析することにより、特に対称性の良い分子について、その構造(geometry)に関する詳細な情報が得られることが分かっている。この方法によれば錯体形成による分子の変形を定量的に議論できると期待される。しかし、これまで2,3のイオンの構造が決定され、¹⁾ 塩基性と酸性液晶中で結合角のわずかな変化が見られる²⁾ 他に詳しい研究はなく、ピリジンとシフト試薬Eu(DPM)₃との錯体形成についても顕著な構造の変化は認められていない。³⁾ 我々は、錯体形成による分子の構造変化を詳細に調べる目的で、トリメチルスズクロライド(以下Me₃SnClと略記)とピリジンの系を液晶中で測定した。その結果大過剰のピリジンの添加によりMe₃SnClの結合角の大きな変化が観察された。

実験 液晶としてNP1008(メルク製、安息香酸エステル誘導体の二成分混合物)を用いた。Me₃SnClはメルク製を昇華により精製した。ピリジンは乾燥後蒸留し、モレキュラーシーブ4A上に保存した。ピリジン-d₅はメルク製(D含量99%以上)を用いた。NP1008とピリジン-d₅は特に精製せず、デシゲーター中に保存した。

¹H NMR測定は日立R-900 M FT NMR装置(90 MHz, 34°C)により5中管にマスピニングせずに測定した。取り込み幅は試料により異なるが、最大50 ppmであり、記憶点数は通常16K点であるが取り込み幅の小さい場合は8K点である。パルス角度は約40°(90°パルスが18 μsec)であり、待ち時間は2 sec、試料の濃度に応じて十分なSN比が得られるまでFIDの積算を行った(0.01 Mの試料で約1000回である)。液晶溶媒によるバックグラウンド信号がベースラインのうねりとして現われるので"Baseline Correction"を数回行った。ピーク位置はコンピューターより書き出す表から読みとった。

試料はNMR管の中で加熱混合し、NMR管をプローブ内に15分以上放置し、温度が十分一定になった後測定を開始した。ピークの半値幅は~10 Hzである。

スペクトルの解析 配向したMe₃SnCl分子のNMRスペクトルは(A₃)₃系となるので、LAO300N 3Aプログラムを以下の点で修正して解析を行った、即ち、1) 常法通り⁴⁾ 直接結合定数D_{ij}を考慮に入れ、2) クスピンまでの制限を9スピンの拡張する。その他、スピン系の対称性が良いため適切な変数が多数現われるのでその条件が入力できるようにし、4) 同じ周波数のピークが強度の総和をとり出力されるようにし、5) 簡単のため磁気テープをコンピューターメモリに置き換えた。修正プログラムは3-メチルプロピンの文献値を再現することで試験した。

ふじわら ひであき, ささき よしお

結果と考察

Me₃SnCl のスペクトルと構造

NP1008 中に配向した Me₃SnCl のスペクトルは図

1b) のようであり、シミュレーションによる計算スペクトルは a) である。約 50 本のピークによる計算で根平均二乗偏差は 1 Hz 以下であり両者の一致は良好である。計算に用いた変数は、¹H のシフト、同一メチル基内の H-H 直接結合定数 (D₁₂ とする) および異なるメチル基間の H-H 直接結合定数 (D₁₄) の二つである。直接結合定数 D₁₄ は文献値が無いため、その値が 0.5 Hz 程度と予想されることから、今回の計算ではゼロとした。実質的な変数は D₁₂ と D₁₄ の二つであるので、いくつかの試行計算により実際のスペクトルの D₁₂ と D₁₄ のおおよその値を決めることは容易であった。計算結果は表 1 のとおりである。

D₁₂, D₁₄ は次の式で表わされる:

$$D_{12} = -\frac{h}{4\pi^2} \gamma_H^2 \frac{1}{2} \left\langle \frac{3\cos^2\theta_{12} - 1}{r_{12}^3} \right\rangle, \quad D_{14} = -\frac{h}{4\pi^2} \gamma_H^2 \frac{1}{2} \left\langle \frac{3\cos^2\theta_{14} - 1}{r_{14}^3} \right\rangle$$

ここで、 γ_H は ¹H 核の回転磁気比、 γ_{12} , θ_{12} , および γ_{14} , θ_{14} はある瞬間の ¹H 核 1 と 2 および 1 と 4 の距離およびそれらを結ぶ直線が z 軸となす角度である。

SnC₃ を C_{3v} 対称軸の配向度とすると、 γ_{12} が一定であることを考えて、

$$D_{12} = -\frac{h}{4\pi^2} \gamma_H^2 \frac{1}{2} S_{C3} \left\langle \frac{3\cos^2\alpha_{12} - 1}{r_{12}^3} \right\rangle \quad \text{----- (1)}$$

$$D_{14} = -\frac{h}{4\pi^2} \gamma_H^2 \frac{1}{2} S_{C3} \left\langle \frac{3\cos^2\alpha_{14} - 1}{r_{14}^3} \right\rangle \quad \text{----- (2)}$$

となる。ここで α_{12} , α_{14} は ¹H 核 1 と 2 および 1 と 4 を結ぶ直線が C_{3v} 対称軸となす角度である。

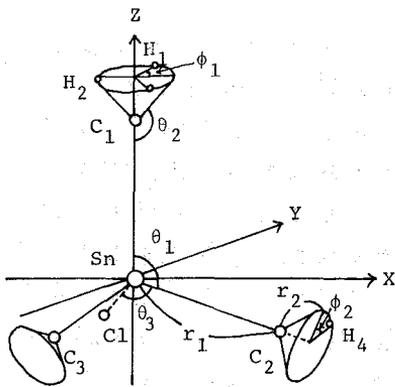


Fig. 2 Structure of Me₃SnCl

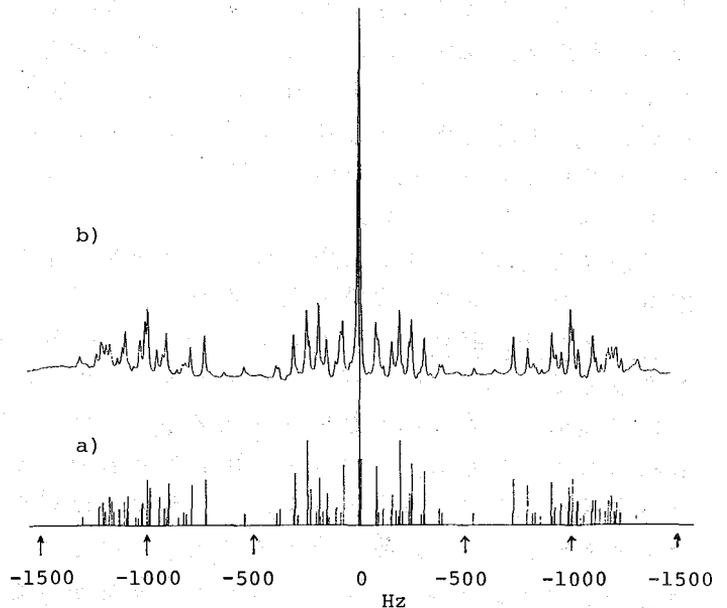


Fig. 1 Observed and simulated ¹H nmr spectra of Me₃SnCl in NP1008 (0.1M).

メチル基が自由回転であるとして(1)と(2)を計算すると次のようになる。

$$D_{12} = -\frac{1}{8\pi^2} \gamma_H^2 \cdot S_{C3} \frac{1}{3\sqrt{3} \sin^3 \theta_2 \cdot r_2^3} \frac{3 \int (3 \cos^2 \alpha_{12} - 1) d\phi_1}{d\phi_1}$$

$$D_{14} = -\frac{1}{8\pi^2} \gamma_H^2 \cdot S_{C3} \frac{\iint \{(3 \cos^2 \alpha_{14} - 1) / r_{14}^3\} d\phi_1 d\phi_2}{\iint d\phi_1 d\phi_2}$$

ただし、積分の範囲は $0 \sim 2\pi$ であり、 θ_2 は S_n-C-H の角度、 θ_1 と θ_2 は自由回転の角度である(図2参照)。したがって D_{14}/D_{12} は上式中の定積分を計算することにより求められる。⁵⁾ Me_3SnCl の構造は電子線回折により決定されており⁶⁾、 $r_1 = 2.106 \pm 0.006 \text{ \AA}$ 、 $r_2 = 1.125 \pm 0.015 \text{ \AA}$ 、 $\theta_1 = 114.9 \pm 1.6^\circ$ 、 $\theta_2 = 113.4 \pm 1.4^\circ$ 、 $\theta_3 = 103.2 \pm 0.6^\circ$ である。ただし、 θ_1 および θ_3 はそれぞれ $C-Sn-C$ および $Cl-Sn-C$ の角度である(図2参照)。 γ と r_2 をこの値に固定し、 θ_1 を 110° から 120° まで変化させた場合、 D_{14}/D_{12} の計算値は図3a)のように変化する。この時 D_{14}/D_{12} と θ_3 の関係は図3b)となる。

Me_3SnCl の D_{14}/D_{12} は表1より 0.1528 であり、これより図3を利用して、 θ_1 と θ_3 を決定できる。この際、 $\theta_2 = 113.4^\circ$ とすると $\theta_3 = 104.9^\circ$ となり上の文献値の誤差範囲外となるが、 $\theta_2 = 112.0^\circ$ とすれば $\theta_1 = 113.6^\circ$ 、 $\theta_3 = 103.7^\circ$ となり文献値と矛盾しない値が得られる。これより、NP1008 中での Me_3SnCl の構造は気体状と殆んど同じと結論できる。

ピリジン添加の影響

液晶中に配向した Me_3SnCl のスペクトルは図4a)であり、大きく分けてA、B、Cの三部分より成る。 $0.1M$ の Me_3SnCl にピリジンを $0.06M$ 、 $0.1M$ 、 $0.13M$ と順次添加すると、全体のスペクトルはb)~d)のように変化する。これらを図では、A、B、Cは Me_3SnCl のピークであり、その他はピリジンのピークである。これより次の二点が結論できる。

- 1) ピリジンのスペクトルは顕著な変化を示さないが、 Me_3SnCl の場合はそれが見られる。
- 2) Me_3SnCl とピリジンが液晶中で強固な錯体を形成した場合には、両成分分子のH向の結合

Table 1

System	D_{12}	D_{14}	D_{14}/D_{12}
Me_3SnCl 0.1M	$\pm 333.1\text{Hz}$	$\mp 51.0\text{Hz}$	-0.1531
Me_3SnCl 0.01M	$\pm 384.5\text{Hz}$	$\mp 58.6\text{Hz}$	-0.1524
$Me_3SnCl + \text{Pyridine}$ 0.1M/0.01M	$\pm 286.9\text{Hz}$	$\mp 32.0\text{Hz}$	-0.1115

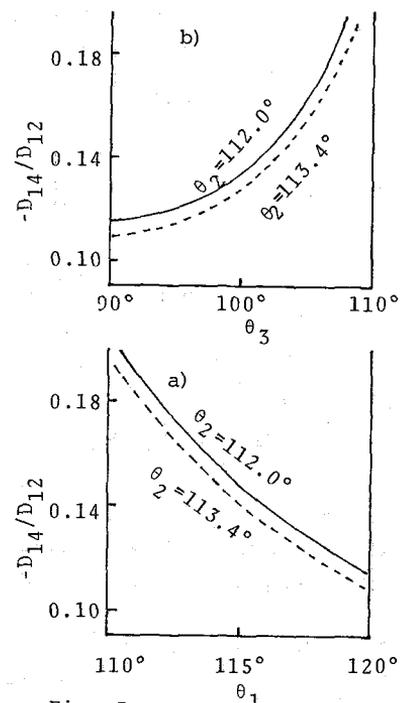


Fig. 3

定数が観察されるはずであり、実際はそうでないことから、錯体形成は液晶中でも通常の溶液中と同様 (NMR の time scale に比較して) 早い動的平衡にある。

上の 2) は Armitage ³⁾ が液晶 EBBA 中においてピリジンと $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ について得た結論と一致する。これらの結果を考慮し、ピリジンを含まない場合と、大過剰のピリジン-d₅ を含む場合の Me_3SnCl のスペクトルを測定し、 Me_3SnCl の構造の相違を検討した。この際、 Me_3SnCl の濃度は 0.01 M とした。ピリジン-d₅ を 10 倍量含む場合、表 1 のように D_{14} , D_{12} とともに絶対値が小さくなり、 D_{14}/D_{12} の値も小さくなる。この時の D_{14}/D_{12} の比より図 3 を利用して θ_1 と θ_3 を求めると $\theta_1 \approx 120^\circ$, $\theta_3 \approx 90^\circ$ である。この値は結晶として単離した錯体の X 線構造解析の結果と一致する。

以上の結果から、液晶溶媒中での Me_3SnCl およびそのピリジン錯体の構造は、気体および固体における場合と同様であり、通常の溶液中でも同様であると推論される。液晶中での錯体形成の特徴をさらに明確にするためには、詳細な濃度依存性の検討および、種々のルイス塩基を用いた観察等が必要であり、これらは錯体形成による構造変化あるいはその様式の定量的議論に有益な情報をもたらすであろう。

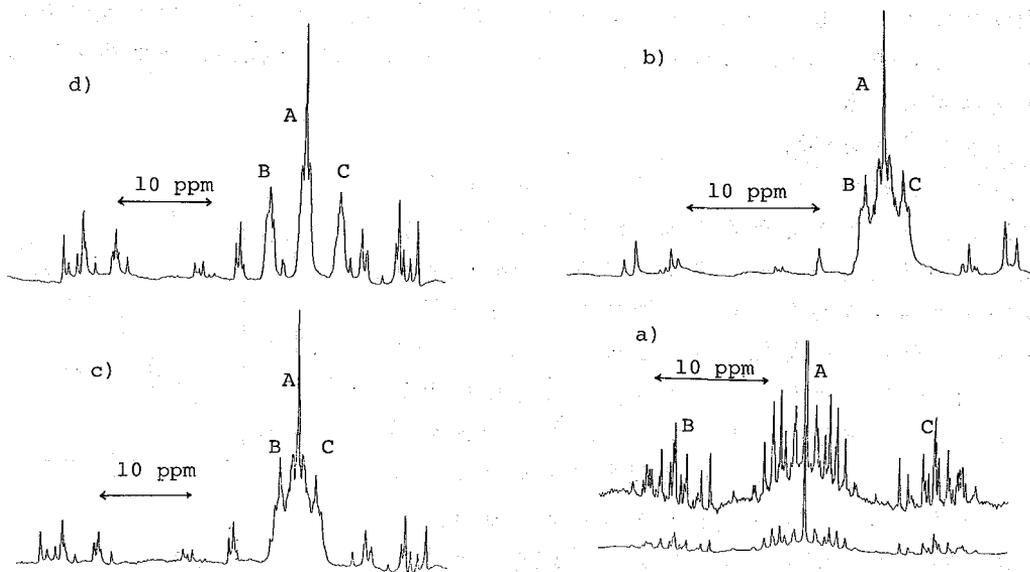


Fig. 4 ^1H NMR spectra of the Me_3SnCl + pyridine system in NP1008.

文献

- 1) Y. Lee and L.W. Reeves, *Can. J. Chem.*, **53**, 161 (1975).
- 2) A. Saupe, G. Englert, and A. Povh, in "Ordered Fluids and Liquid Crystals", *Adv. Chem. Ser.*, **63**, 51 (1967).
- 3) I. M. Armitage, E. E. Burnell, M. B. Dunn, L. D. Hall, and R. B. Malcolm, *J. Magn. Resonance*, **13**, 167 (1974).
- 4) P. Diehl, C. L. Khetrupal, and H. P. Kellerhals, *Mol. Phys.*, **15**, 333 (1968).
- 5) 定積分の計算には阪大計算センターライブラリープログラム TINTMR を利用した。
- 6) B. Beagley, K. McAloon, and J. M. Freeman, *Acta Cryst.*, **B30**, 444 (1974).

108 光学活性物添加ネマティック液晶のNMRスペクトル。

(日立・日立研) 亀澤 範正

1. 序

液晶状態におけるプロトンのNMRスペクトル、なすびにパルスモータを用いた試料回転機構を併用することによる液晶のツイスト粘性の測定を可能にしたことについては、昨年¹⁾の討論会で報告した。ネマティック液晶に光学活性物を混合すると、液晶はマクロ的にネジれた構造(ラ旋構造)になるといわれている。昨年²⁾発表したスペクトロメータを用いることにより、このネジれた構造に対してどのような知見が得られるかを調べるため、各種のネマティック液晶と光学活性物とを組合せ、濃度、温度、回転角度、回転速度等の条件を変えてスペクトルを測定してみることにした。

2. 実写

測定に用いた液晶と光学活性物を表に示しておいた。ネマティック液晶NP-5, ZLI-1083, ZLI-1167はメルクから、TN-101はホフマン・ラ・ロッシュから入手した。光学活性物 *d*-carvone と CB-15 は夫々東京化成, BDH から入手した。NP-5の組成はガスクロマトグラフのピーク面積比を利用して求めた。TN-101とZLI-1083の組成々分および組成比はメーカーから公表されている。^{1,2)} ZLI-1167については組成々分のみが公表されている。³⁾

プロトンのNMRスペクトルは昨年⁴⁾報告したスペクトロメータによって測定した。試料の回転スピードはパルスモータ駆動用のパルス周波数によってコントロールした。

3. 測定結果

NP-5のスペクトルを図1に示した。これは末端アルキル基の鎖長が短いため、シグナル面積比を用いて比較的容易にシグナルの帰属が可能である。両wingのシグナルはベンゼン環のオルトプロトン向の双極子相互作用による分裂である。ただし、シグナル面積比からみて、両wingのシグナルにはベンゼン環に隣接したメチレン基のシグナルも含まれている。これに対し、ZLI-1083のdoublet(図2A)には、ベンゼン環プロトンの他にシクロヘキサン環内のメチレン基をはじめ、相当数のメチレン基のシグナルが重なっていると考えざるを得ない。一方、ZLI-1167のスペクトル(図2B)における両wingのシグナル(shoulderになっている)の間隔はZLI-1083の場合の約1/2になっている。両wingのシグナル間隔 $\Delta\nu$ は $\Delta\nu \propto (3\cos^2\alpha - 1)/2$ (α : 磁場とdirectorのなす角度)であるから、ZLI-1167の場合は $\alpha \cong \pi/2$ であると考えられる。一般に、ベンゼン環を含むネマ

表. 液晶および光学活性物

略称	組成々分	モル比
NP-5	<chem>CCOC(=O)c1ccc(cc1)N#Nc2ccc(cc2)CC</chem>	2
	<chem>CCOC(=O)c1ccc(cc1)N#Nc2ccc(cc2)C4H9</chem>	3
TN-101	<chem>CCCCC(=O)Oc1ccc(cc1)C#N</chem>	1
	<chem>CCCCC(=O)Oc1ccc(cc1)C#N</chem>	1
	<chem>CCCCC(=O)Oc1ccc(cc1)C#N</chem>	1
	<chem>CCCCC(=O)Oc1ccc(cc1)C#N</chem>	1
ZLI-1083	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C#N</chem>	2.1
	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C#N</chem>	1.6
	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C#N</chem>	1.0
	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C#N</chem>	
	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C#N</chem>	
ZLI-1167	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C#N</chem>	unknown
	<chem>CCCCc1ccc(cc1)C#N</chem>	
<i>d</i> -carvone	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C)C(=O)C</chem>	
CB-15	<chem>CCCCC(=O)Oc1ccc(cc1)C#N</chem>	

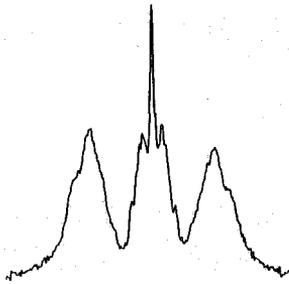


図1. NP-5の¹Hスペクトル。(35°C)

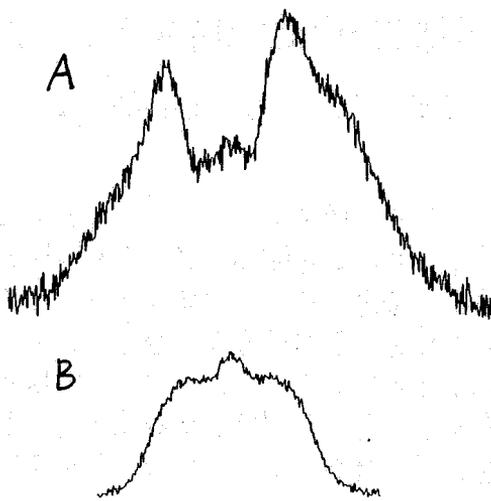


図2. ZLI-1083とZLI-1167の¹Hスペクトル。(35°C).
A: ZLI-1083, B: ZLI-1167

ネック液晶の磁気異方性は正であるから、磁場中に静止させると $\alpha=0$ となる。一方、ZLI-1167の磁気異方性は負である³⁾。従って、磁場中では $\alpha=\pi/2$ になるはずである。図2の結果はこのこととよく対応している。ZLI-1167のdirectorはネマティック状態では磁場と直交しているのだから、光学活性物を混合することによって、もしも理想的なラ旋構造になったとしてもdirectorは磁場と直交する面内で方向が変わるだけだから依然としてdirectorの方向は磁場と直交しているはずである。従って、そのスペクトルは光学活性物を混合しない場合と同じだと予想される。しかし、ZLI-1167にCB-15を5% (重量) 混合したスペクトル (図3) はsharpなsingletに変化している。このことは、ラ旋軸が磁場方向に平行にはなっていないことを示している。

磁場に対するdirectorの配列が完全なランダム状態のときに、スペクトルが如何に変るかをみるために、最も粘度の高いTN-101を用いて次のような実験を行なってみた。まず高温にして一たんisotropic状態にした後、長時間室温に放置 (TN-101は室温で液晶) した。その後、素速くNMRプローブ内に試料をセットし、セット直後のスペクトルを測定して図4Bに示した。directorが完全に磁場方向に配列した状態の図4Aとは著しく異なり、図4Bはsharpなsingletを呈している。図3が図4Bと酷似していることは、ZLI-1167に光学活性物を混合すると、directorの磁場に対する配列が全くランダムになることを示している。仮にラ旋構造になりにしても、ラ旋軸の方向が全くランダムであると考えられる。なお、ZLI-1167を用いて図4と同じ測定を行な、たが、スペクトルは図2Bと同じであった。恐らく、これはZLI-1167の粘度が低いことによるものと考えられる。

次に最もシグナルの帰属の確実なNP-5を用い、これにd-carvoneを1.7mole%混合したもののスペクトルの温度変化 (図5) を測定してみた。温度の低下に伴って、両wingのシグナルの相対強度は減少してゆくが、シグナルの形状ならびに

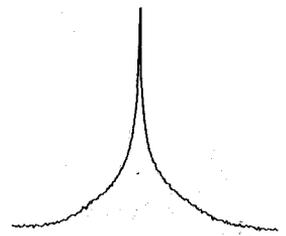


図3. 光学活性物添加によるZLI-1167のスペクトル変化。CB-15濃度: 5wt%

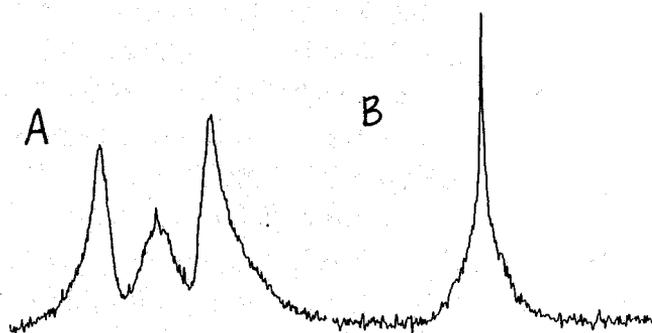


図4. directorの配列状態によるスペクトルの変化。
A: director 磁場と平行, B: ランダム配列

両 wing のシグナル間隔 $\Delta\nu$ はほとんど変らない。なお、この温度範囲では液晶の order parameter はほとんど変らない。もしも、温度の低下に伴って理想的に液晶がネジレた構造に変化してゆくならば、directorの磁場に対する角度の種々異なったものの混合物のスペクトルになるはずである。その場合、 $\Delta\nu \propto (3\cos^2\alpha - 1)/2$ の関係から考え、両 wing のシグナル形状ならびに $\Delta\nu$ が大幅に変ること容易に予想されることである。実測結果の $\Delta\nu$ の温度変化が極めて小さいことは、低温においても依然として磁場方向に平行な director の数が他の方向に向いたもの数よりも相当に多いことを物語っている。つまり、director の数は角度 α に依存して分布はするが、その分布のピークは $\alpha \cong 0$ (即ち磁場方向) に近いと考えられる。

以上述べてきた図1~5の結果を総合すると次のようなことが言えよう。ネマティック状態においては液晶のもつ磁気異方性の正、負によって夫々 director が磁場に平行、直交して配列する。光学活性物を混合すると director の配列状態は確かに変化する。しかし、その変化に際し(特に NP-5 や ZLI-1167 のような低粘度液晶の場合)、理想的なラ旋構造になるのではなく、director の磁場に対する配列はランダムになる。ただし、ランダムの程度は温度に依存する。director は磁場に対する角度に依存して分布し、その分布曲線のピークは磁場方向に近く、かつ温度の低下に伴って分布曲線は broad になる。もちろん、これ迄の結果だけでは部分的にラ旋構造になっていることは否定できないが、仮にラ旋構造をとったとしても、そのラ旋軸の方向はまた磁場に対してランダムであると考えられる。

終りに、2,3の補足的な測定結果について述べる。TN-101 に d-carvone を 3 mole %, CB-15 を 1 mole % 混合したもののスペクトルを夫々図6A, 6B に示した。これらは完全なランダム配列の場合の図4Bと異なり、中央のシグナルの両サイドに夫々2ヶの shoulder をもっている。こうした shoulder は、他の3種のネマティック

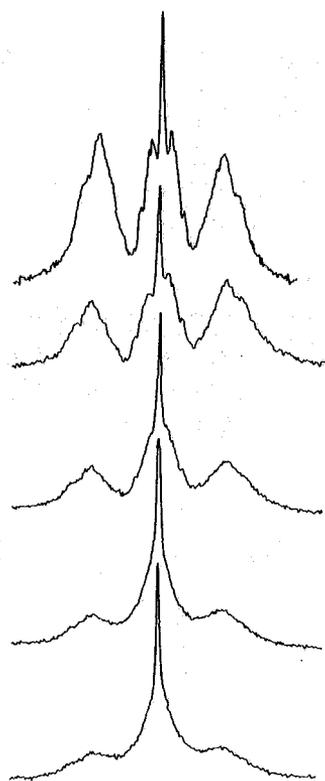


図5. NP-5 と d-carvone の混合系のスペクトル温度変化
d-carvone 濃度: 1.7 mole %
測定温度は上から 35, 10, 7.5, -1°C。

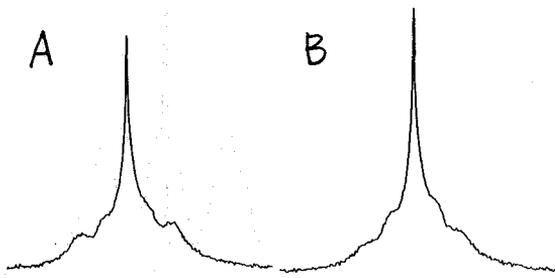


図6. 光学活性物添加によるTN-101のスペクトル変化。(35°C)
A: d-carvone 濃度3 mole%, B: CB-15 濃度1 mole%

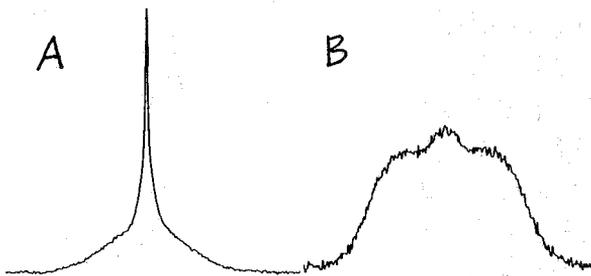


図7. 試料の回転によるスペクトルの変化。
回転速度: 2 Hz
A: NP-5, B: ZLI-1167

は著しく変化している。TN-101, ZLI-1083の場合も同様な結果を示した。これは、液晶のもつ正の磁気異方性による磁場方向への復帰トルクと回転によるトルクとの相対関係が頂度 director の向きをマジック・アングルにしたためであろう。このことは磁気異方性の負な ZLI-1167 に対しても同様であることは容易に予想される。それにもかかわらず図7Bは静止時のスペクトル図2Bと全く変らない。恐らくこれは ZLI-1167 の粘度が小さいために、回転させても director の向きが変らない結果と思われる。

ック液晶と光学活性物との混合系ではみられなかつた。理想的なラ旋構造、即ちラ旋軸が総べて磁場に垂直である場合、このような shoulder が現われる可能性がある。これについては以前に報告した。図6A, 6B は、一見理想的なラ旋の結果のように思われる。しかし、試料を種々の角度回転させると、shoulder の形が変り、場合によっては shoulder の認められない場合もあった。このことから、図6A, 6B は理想的なラ旋構造の結果とは考之にくい。むしろ、director の向が変ったために、頂度プロトン向ベクトルが磁場方向に平行になるようなメチレン基やメチル基が生じた結果と考之た方が妥当だと考之られる。

NP-5ならびに ZLI-1167 を 2 Hz の速度で回転させながら測定した結果を図7A, 7B に示した。静止時のスペクトル図1と比較すると図7A

- 1) M. Schadt, J. Chem. Phys., 63, 4379 (1975)
- 2) L. Pohl et al, Phys. Letters, 60A, 421 (1977)
- 3) L. Pohl et al, Phys. Letters, 65A, 169 (1978)
- 4) 亀澤, 第17回NMR討論会講演要旨集, 61 (1978)
- 5) N. Kamezawa, J. Magn. Resonance, 21, 211 (1976)

(北大工) 下川 繁三, 宮沢 邦夫, 横野 植朗, 山田 英二, 真田 雄三

〔序〕 合成高分子や天然高分子の中には高温(400°C前後)で熔融し、液相状態を経過して炭化するものがある。この温度域では熱分解、解重合、環化、重縮合等の諸反応が競合する疑似的平衡状態が出現する。そうして時間や温度の経過と共に液相内構造に秩序が形成される。これらは磁場の中では特に顕著で光学的異方性の液晶(メソフェーズ)が生成していることが認められている¹⁾。合成高分子の塩化ビニル(PVC)の熱分解(TD)残渣、天然物ではピッチ類等がこの熱経過を通して炭化する。しかしながら分光学的に高温で直接それを検知する方法はなかった。NMRは液体の性質を調べる上で特に優れており、この様な高温液体での秩序構造の形成過程を調べる上で最も適した方法といえよう。本研究では上述の目的に合致する高温用、高分解能NMRのシステム化とこれを用いてPVCの熱分解熔融物の直接観測、またエチレンタールピッチに応用して高温、高分解能NMRのこの方面への有効性について言及する。

〔実験装置について〕 周知の様に高温で高分解能を得るには従来の電磁石の改良で行なわれる。広幅用の磁石に磁極間隙60mmのポールピースを取りつけ、これに2次の項定調節できるシム板を装着した。全シム電流は1.2Aで、空冷されたハリポットで補正磁場を作る。静磁場の強さは8.8kGであり、フラックススタビライザーにより安定化した。良好な磁場を得るためにおおよそ1年を費やした。分光器は既設のパルスFT用を用いたが、両者間の電源の相違によるノイズ等に注意を払った。周波数はプロトンで36.4MHzである。高温用プローブは定温冷水によって冷却されている。図1には改造した電磁石によって得られる磁場の分解能を調べた例を示す。(a)は試料管を回転しなるときの水の周波数スペクトルで半値幅は20Hzである。(b)は回転した場合の水のそれで半値幅は2.5Hzと得た。試料管は10mmφを用い室温で測定した。高分子液体は一般に個々のスペクトルの重なりが多く、幅広い吸収線を与える。したがって、試料の回転を行なわずともよい場合がある。

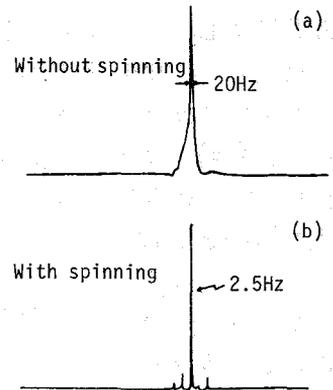


Fig.1 Fourier spectra of water without spinning and with spinning

〔PVC熱分解熔融物への応用〕 PVCを熱分解すると、約330°Cで完全に炭素化し、残渣は昇温と共に次第に軟化して液状を呈する²⁾。このTD-PVC残渣はホリ

しもかわしげやう、みやぎわくにお、よこのてつろう、やまだえいじ、さなだゆうぞう

エン型の構造をもち、また同時に末端からの環化や環の縮合が始まる。図2は336°Cより420°C迄の温度を2°C・min⁻¹の昇温速度で観測したスペクトルである。明らかに分解能のよい磁場で観測すると、化学シフトが出現する。これは芳香族および脂肪族のプロトンであることが判った。シフトの幅は200Hzで5.5 ppmである。この温度域では昇温と共に順次環化が進行し、420°Cでは信号強度は逆転している。この様に高温液体中の構造の変化を容易に調べられる。図3には室温より430°C迄の昇温過程での核スピン-格子緩和(T₁)を示す。TD-PVCはおよそ300°Cで固化する。これは脱塩化水素反応によって生じたポリエン型分子のランダムな架橋と考えられる。300°C以上では再び軟化し、400°C付近ではT₁の値は約100msと短くなり、かつ液相を呈する。液体でT₁が短くなるには(1)粘性が高いか(2)常磁性不純物によるかの何れかであろう。液体状態ではポリエン型分子の側鎖炭素数は~12と判っている²⁾。また400°C程度の温度であることから(1)の理由ではなく、熱分解による脱塩化水素反応で生じた対電子スピンによることが理解される。この温度域ではESRの2尺モーメント、信号強度はほぼ一定であり、対電子スピン濃度は~10¹⁸ spins・g⁻¹であった²⁾。次にTD-PVCのPR-FTスペクトルを観測してみた。図4がそれで、測定温度は410°Cである。芳香族および脂肪族プロトンのT₁はほぼ等しく、106ms、111msと得られた。このことは分子全体にわたって緩和機構が同じく、対電子の非局在化によって生じていると考えられる。TD-PVCを430°C以上に昇温して行くと、液相内の疑似平衡がやぶれて、ポリエンの環化、環の縮合が進行する。よく知られている様に重合した芳香環は磁場の方向に対してある角度で配列する。図5は450°Cの温度で観測した液相成分の残渣である。掃引幅は24kHzである。中

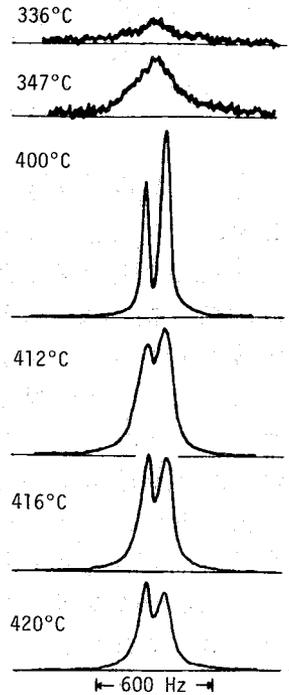


Fig.2 Temperature dependence of the spectra of TD-PVC at 36.4MHz under nitrogen atmosphere

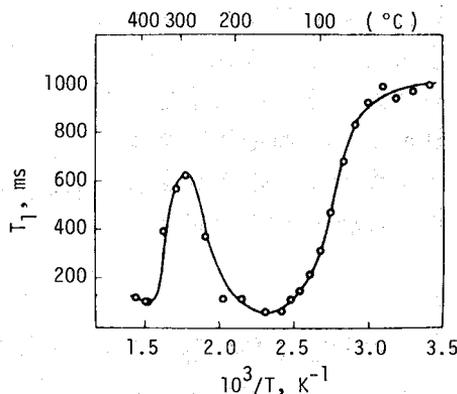


Fig.3 Temperature dependence of proton spin-lattice relaxation time of TD-PVC at 36.4MHz under nitrogen atmosphere

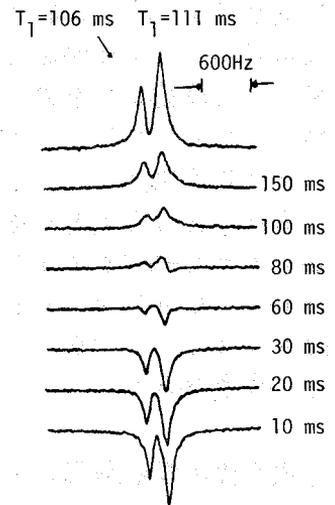


Fig.4 Partially relaxed FT spectra of TD-PVC in the molten state at 410°C

央の比較的幅の狭い成分とスペクトル全域にわたるブロードな成分の存在が認められる。このスペクトルを入力としてフーリエ変換して得られた自由誘導減衰信号からこれに含まれる成分を分離して3つの T_2 成分を得た。各成分の T_2 は $30\mu\text{s}$ (20%), $70\mu\text{s}$ (15%) および $600\mu\text{s}$ (15%) である。2つのローレンツ曲線と1つのガウス曲線を重ねた形状関数を作り、best fit で得たのが下のシミュレーションの図である。固体的な T_2 $30\mu\text{s}$ の成分は磁場の中での環化の進行で成長した液晶部分と推定される。また液体的な T_2 $600\mu\text{s}$ の成分はこの温度でまだ重合していない芳香環によるものと考えられ、中間の T_2 $70\mu\text{s}$ の成分は非晶部分に由来すると考えられる。以上の結果は熱処理後の同一試料の室温での光学的観察から判明した。

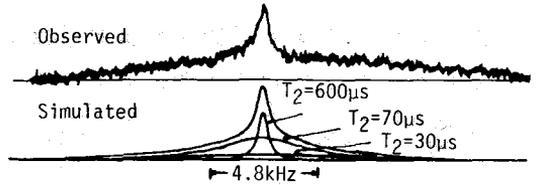


Fig.5 FT spectrum of TD-PVC at 450°C with sweep width of 24kHz

以上の結果は熱処理後の同一試料の室温での光学的観察から判明した。

【エチレンタールピッチの炭化初期過程の研究への応用】

図6 および図7に高温におけるエチレンタールピッチのプロトンNMRスペクトルを示す。約357 Kでブロードな構造のなリスペクトルが現われ、396 K付近から芳香族水素ならがに脂肪族水素に対応する2本の共鳴線に分裂する。481 Kになると、分子運動が活発となり、共鳴線は非常にシャープになる。しかし、芳香環に対して α , β , γ 位の炭素についでいる水素の個々の微細構造は観測されなかつた。明らかに481 K以下では

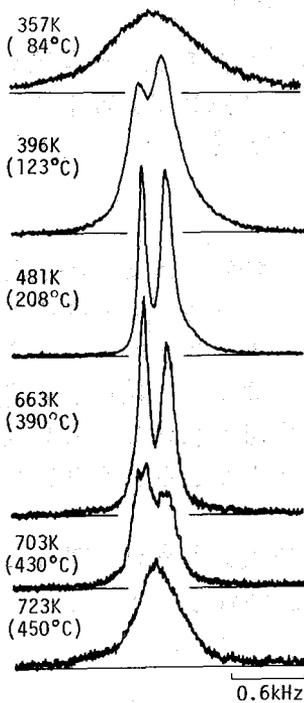


Fig.6 Proton n.m.r. spectra of ethylene tar pitch at high temperatures (Heating rate is $1\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$)

脂肪族水素の強度が芳香族水素のそれより大きいが、その後逆転する。703 Kになると、スペクトルはブロードニングを起し始め、723 Kでは再び構造のなリシグナルが観測される様になる。743 Kになると、更にブロードニングが進行し、図7に示す様な高土の1/8の線幅($\Delta H_{1/8}$)と半値幅($\Delta H_{1/2}$)の比($\Delta H_{1/8}/\Delta H_{1/2}$)が7.0である裾幅の広い共鳴線となる。光学偏光顕微鏡観察により703 Kでメソフェーズ小球体が出現し、743 Kではバルクメソフェーズとなっていることが明らかとなった。したがって、ここでもスペクトルのブロードニングはメソフェーズの生成と関係していると考えられる。

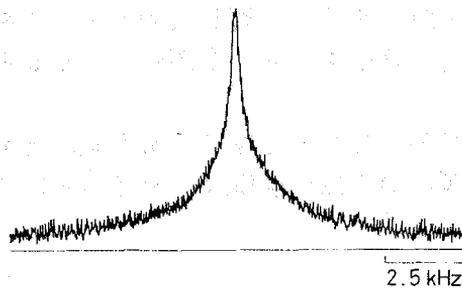


Fig.7 Proton n.m.r. spectrum of ethylene tar pitch at 743K (Heating rate is $1\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$)

時間依存の脂肪族水素分率(CHAL)を図8に示す。今、反応が脂肪族水素分率に関して1次

であると仮定すると、物質収支は速度定数を k として (1) 式で表わされる。

$$-\frac{dC_{\text{HAL}}}{dt} = kC_{\text{HAL}} \quad \text{---- (1)}$$

$t=0$ のとき $C_{\text{HAL}} = C_{\text{HAL}0}$ の初期条件で (1) 式を積分すると、

$$C_{\text{HAL}} = C_{\text{HAL}0} \cdot \exp\{-kt\} \quad \text{---- (2)}$$

となる。したがって、(2) 式の左辺を時間に対して片対数プロットし、直線が得られれば k が求められる。図 8 から明らかになるように、時間が長い領域では直線が得られているが、短い領域では離れている。そこで、見掛けの反応性から 2 つの反応種よりなると考え、

$$C_{\text{HAL}} = C_{\text{HAL}1} + C_{\text{HAL}2} = C_{\text{HAL}10} \cdot \exp\{-k_1 t\} + C_{\text{HAL}20} \cdot \exp\{-k_2 t\} \quad \text{---- (3)}$$

により表わされるとすると、各温度での k_1 、 k_2 が求まり、アレニウスプロットに

よりそれぞれの活性化エネルギーは $152 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $279 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ と求まる。各温度における時間依存スペクトルの測定終了後の試料にはメソフェーズ球体が発現していた。したがって、これらの反応は何らかの形でメソフェーズ生成に関連していると考えられるが、詳細については目下検討中である。

[結論] 以上の如く高温での NMR を分解能のよい磁場で観測すると、今迄得られていない熱反応過程の動的構造変化を容易に追跡できることが判り、高分解能 NMR と広幅 NMR の中間に存在する新しい領域を開拓することが可能となった。今後の課題として高温での試料の回転と高温測定時の磁場ロックが重要と思われるが、しかしながら現在の処、高温での観測スペクトルが電子の影響下にあることを考慮すると、我々の試料の回転をしない分解能でも十分役立つものと考えられる。

謝辞：本研究の実施に当たって電磁石の改良、その他で多大の御協力を頂いた北大理学部液体化学講座の下地光雄教授、中村義男助教授に感謝致します。

References

- 1) J.D.Brooks and G.H.Taylor, Carbon 3, 185(1965)
- 2) 下川 繁三 et al., 日化誌 2016 - 2020(1973)

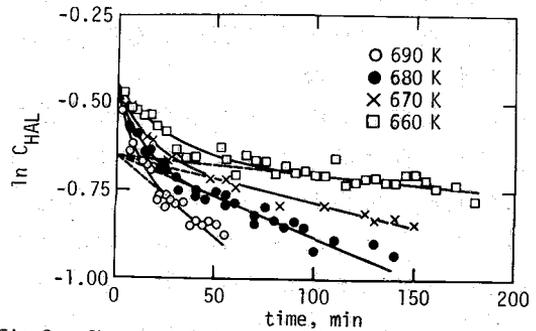


Fig.8 Changes of C_{HAL} of ethylene tar pitch with time

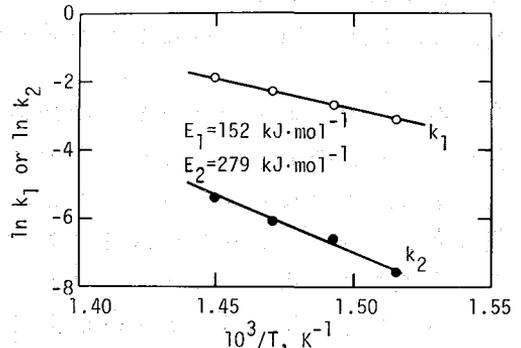


Fig.9 Arrhenius plots of rate constants for ethylene tar pitch

(化技研) ○ 林 繁信, 早水紀久子, 山本 修, 小野修一郎

最近、エネルギー問題が大きくクローズアップされ、水素エネルギーの研究がその一環として進められている。金属水素化物は、水素の輸送・貯蔵手段として有用なものであり、金属水素化物における水素の挙動を知ることは重要である。NMRは、水素の自己拡散を調べるのに有効な手段の一つであり、従来より多くの報告がなされているが、いまだに水素の挙動については確立していない部分が多い。なかでもバナジウム水素化物については報告も少なく不明な点が多い。

本研究では、バナジウム水素化物のβ相におけるプロトンのスピン-格子緩和時間を測定し、バナジウム格子中の水素の拡散について考察した。

<実験> (1) 試料の合成 バナジウム金属 (>99.7%) を耐圧容器に入れ、500°Cで真空排気した後、水素を50~100 atm 導入し、室温まで徐冷、再び500°Cに加熱し真空排気した。この操作を5回以上くり返してバナジウム金属を活性化する。VH_{0.90}は、活性化したバナジウム金属に100 atmのH₂を導入して水素化した後、50°C、1 atmに5~6時間保って合成した。VH_{0.59}は、活性化したバナジウム金属に必要量のH₂を導入して合成した。H量は、水素化に伴う重量増加によって決めた。H量の誤差は±0.05以内と考えられる。合成したバナジウム水素化物は、He気流下において200 mesh以下に粉碎した後、Pyrexガラス製アンプルに真空封入し、T₁測定用試料とした。粉末X線回折パターン解析から、VH_{0.90}、VH_{0.59}いずれも金属格子はbody-centered tetragonalであり、VH_{0.90}では $a = 3.04 \text{ \AA}$ 、 $c = 3.41 \text{ \AA}$ 、VH_{0.59}では $a = 3.02 \text{ \AA}$ 、 $c = 3.33 \text{ \AA}$ であることがわかった。

(2) T₁の測定 スピン-格子緩和時間の測定は通常の180°-τ-90°パルス法によって行なった。測定に用いた装置はNMR speciality社製のPS-60 RWで、測定周波数は55.0172 MHz、90°パルスは約5.5 μsであった。シグナルはBiomation 1010 Transient Memoryに記録した後、FACOM F-PDT8 マイクロコンピュータを用いて4~20回積算した。温度を設定してから30分以上待ち、T₁の変動のない状態で測定を行なった。

<結果及び考察>

図1, 2に、220 KにおけるVH_{0.90}及び190 KにおけるVH_{0.59}の緩和曲線を示した。VH_{0.90}、VH_{0.59}のいずれにおいても緩和曲線は単一の指数関数的減衰を

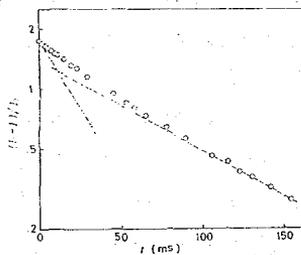


図1. VH_{0.90}, 220 Kにおける¹Hの緩和曲線

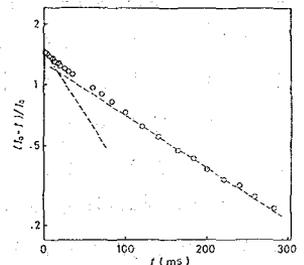


図2. VH_{0.59}, 190 Kにおける¹Hの緩和曲線

はやし しげのぶ, はやみず きくこ, やまもと おさむ, おの しゅういちろう

示さず、二種類以上の T_i の存在を示唆している。77~420 Kの範囲で温度変化させて測定したが、同じような傾向がどの温度でも見られた。

$VH_{0.90}$, $VH_{0.59}$ のバナジウム原子の格子は、body-centered tetragonalであり、body-centered cubicの c 軸が伸びた形になっている。X線回折の結果より、金属格子は β 相の1相のみであり、 α 相(bcc)、 γ 相(fcc)の混在の無いことが確認されている。水素原子は金属格子のすきまにはいっており、Octahedral siteとTetrahedral siteとが考えられる。バナジウム原子と水素間の相互作用を考えると、図3に示す O_z siteが最も安定で、次に T_x 及び T_y siteが安定であると考えられる。水素が O_z 及び T_x (T_y) siteにある比率で分布し、各々の T_i の値を示していると考えられる。

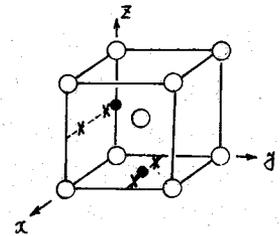


図3. VH_x の interstitial site. ○: Vanadium, ●: O_z site, x: T_x site.

水素が一種類の site のみに分布しているとする、拡散による緩和時間 T_d は、

$$1/T_d = A_{HH} \cdot R_{HH} \cdot F_{HH}(\tau/2) + A_{HM} \cdot R_{HM} \cdot F_{HM}(\tau) \quad (1)$$

と表わされる。ここで、

$$A_{HH} = (2/5) \rho_H^4 \rho_V^2 I(I+1) \quad (2)$$

$$A_{HM} = (2/15) \rho_H^2 \rho_M^2 \rho_V^2 S(S+1) \quad (3)$$

$$F_{HH}(\tau) = \frac{\tau}{1 + \omega_H^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega_H^2 \tau^2} \quad (4)$$

$$F_{HM}(\tau) = \frac{\tau}{1 + (\omega_H - \omega_M)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_H^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_H + \omega_M)^2 \tau^2} \quad (5)$$

であり、

$$R_{HH} = \sum_i (r_{iHH})^{-6}, \quad R_{HM} = \sum_j (r_{jHM})^{-6} \quad (6)$$

である。 \sum_i は、ある水素を中心とし、周囲のすべての水素原子についての和であり、 \sum_j は周囲のすべてのバナジウム原子についての和であることを示す。

水素が O_z siteのみを占めると仮定すると、 T_d の最小値の理論値は約6 msとなり、 T_x (T_y) siteのみを占めると仮定すると約2 msとなる。(1)式の第2項のH-V相互作用による緩和の項のみを考えると、 O_z siteで7 ms, T_x (T_y) siteで6 msとなる。実測した緩和曲線をどのような比率で分離しても理論値に合う T_d の最小値の組は出てこなく、 O_z site, T_x (T_y) siteの一方、もしくは双方の T_d の最小値が、理論値に比べはるかに大きくなってしまふ。

TiH_x などのようにH-H相互作用のみを考慮すればよい系では実測値と理論値が良い一致を示し、 VH_x , NbH_x , TaH_x のようにH-M相互作用が大きく寄与する系では理論値が実測値より小さくなってしまふことが報告されている。そこで、(1)式の第2項のみに補正係数Bをかけることにする。

水素が2種類の site を占める場合、異なった site にある水素間の相互作用をも考慮に入れなければならない。しかも、各 site への水素の分布の比率が不明なため、緩和曲線を、次式：

$$\frac{M_0 - M}{M_0} = b_0 \exp\left(-\frac{t}{T_0}\right) + b_T \exp\left(-\frac{t}{T_T}\right) \quad (b_0 + b_T = 2) \quad (7)$$

を用いて最小二乗法で分離すると、 T_0 、 T_T の誤差が大きくなりすぎる。そのため、 b_0 、 b_T を先に決めておく必要がある。異なった siteにある水素間の相互作用を考慮すると、(7)式は次のように改められる。

$$\frac{1}{T_{id}} = A_{HH} \cdot R_{ii}(x_i) \cdot F_{HH}\left(\frac{\tau_i}{2}\right) + B \cdot A_{HM} \cdot R_{iM} \cdot F_{HM}(\tau_i) + A_{HH} \cdot R_{ij}(x_j) \cdot F_{HH}(\tau') \quad (8)$$

(i, j は 0 又は T で、 $i \neq j$)

ここで、 x_i は i siteの水素濃度を示し、

$$x_0 + x_T = x \quad (x: \text{全水素濃度}) \quad (9)$$

$$x_T/x_0 = b_T/b_0 = \exp(-\Delta E/RT) \quad (10)$$

という関係にあり、

$$\tau^{-1} = \tau_0^{-1} + \tau_T^{-1} \quad (11)$$

である。 $R_{ii}(x_i)$ 、 $R_{ij}(x_j)$ は、 i siteにある水素を中心とし、周囲の i 、もしくは j siteにあるすべての水素原子についての和をとった値であり、 i, j siteへの分布の仕方、すなわち温度の関数となっている。

$x_0(x_T)$ を決めると(7)式より T_0, T_T の実験値が出てきて、 T_0, T_T の最小値の実験値が求まる。今、伝導電子との相互作用による緩和時間を T_{ie} とすると、

$$1/T_i = 1/T_{id} + 1/T_{ie} \quad (12)$$

の関係があるが、 T_{id} の最小値付近では $1/T_{ie}$ は無視できるとすると、 $T_i \approx T_{id}$ となる。さらに、 O_2 siteと T_x siteで T_{id} が最小値をとる温度が 20Kほどしか違わないので、 $\tau_0 = \tau_T$ と仮定すると、(8)式より、 $x_0(x_T)$ 、 B の関数として、 T_0, T_T の最小値の理論値が求まる。実験値と理論値が合うように、 $x_0(x_T)$ 、 B を決めると、 $VH_{0.90}$ では $x_0 = 0.62$ 、 $x_T = 0.28$ 、 $B = 0.344$ (320 K)、 $VH_{0.59}$ では $x_0 = 0.44$ 、 $x_T = 0.15$ 、 $B = 0.352$ (345 K)となった。 T_{id} が最小値をとる温度の違いを無視すると、(10)式から ΔE は $VH_{0.90}$ で 490 cal/mol、 $VH_{0.59}$ で 750 cal/molとなる。H-V相互作用の補正係数は $VH_{0.90}$ 、 $VH_{0.59}$ 共に 0.35という一致した値を示しており、何らかの物理的意味があると考えられる。

上記の ΔE の値から、

O_2 、 T_x siteに分布する水素の成分比を測定温度ごとに求め、(7)式を用いて緩和曲線から最小二乗法により T_0, T_T を求めると、図4~5のようになる。 T_i の最小値は、 $VH_{0.90}$ では、

$$T_0 = 14.5 \text{ ms (330 K)},$$

$$T_T = 6.5 \text{ ms (310 K)},$$

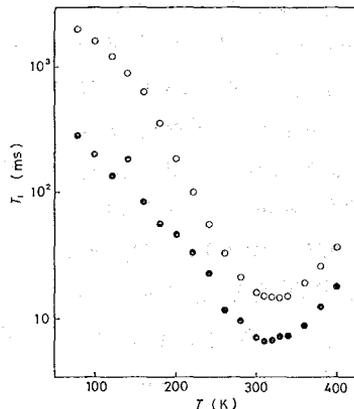


図4. $VH_{0.90}$ の緩和時間。

○: O_2 site, ●: T_x site.

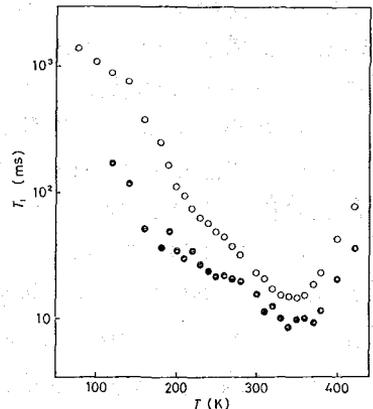


図5. $VH_{0.59}$ の緩和時間。

○: O_2 site, ●: T_x site.

VH_{0.59}では、 $T_0 = 14.9 \text{ ms}$ (350 K), $T_T = 8.6 \text{ ms}$ (340 K)であった。 $T_x \text{ site}$ の方が $O_2 \text{ site}$ より、最小値をとる温度がわずかに低く、水素拡散が速い傾向を示している。

液体窒素温度付近では、拡散による緩和の寄与が小さくなるので、低温における T_i から伝導電子との相互作用による緩和の大きさを求めることができる。 $K = T_i \cdot T$ の値は、 $O_2 \text{ site}$ は VH_{0.90}で $160 \text{ s} \cdot \text{K}$, VH_{0.59}で $110 \text{ s} \cdot \text{K}$ となった。 $T_x \text{ site}$ の方は、低温でも拡散の寄与が無視できず、VH_{0.90}で $K > 22 \text{ s} \cdot \text{K}$, VH_{0.59}で $> 21 \text{ s} \cdot \text{K}$ となった。

実測した T_i から、(12)式を用いて、伝導電子との相互作用による緩和の寄与を差し引き、水素拡散による緩和時間 T_{id} を求める。

T_{id} を(8)式に入れ、 τ_0 , τ_T を未知数として各測定温度において連立方程式を解くと、図6~7のようになる。但し、 $T_x \text{ site}$ における伝導電子との相互作用による緩和を無視した場合である。この相互作用を考慮しても、 E_a の値には大きな影響を与えない。 $1/T$ ~ T のグラフは直線にならず、水素の拡散の機構が温度によって変化していることがわかった。グラフの傾きから、拡散の見かけの活性化エネルギー E_a は表1に示すようになる。いずれの場合でも、高温側の方が低温側より E_a が大きくなっている。高温側においては、 $O_2 \text{ site}$ と $T_x \text{ site}$ で E_a が一致しているが、低温になると、 $T_x \text{ site}$ の方が $O_2 \text{ site}$ より E_a が小さくなり、拡散は $T_x \text{ site}$ の方が速くなる。さらに、VH_{0.59}の $O_2 \text{ site}$ では、220~310 Kにおいて特異な挙動を示す。図6~7の折れ曲がりの点において、 $O_2 \text{ site}$ では VH_{0.90}で $x_0 = 2/3$ (250 K), VH_{0.59}で $x_0 = 1/2$ (220 K)という非常に単純な値をとっている。 $T_x \text{ site}$ でも VH_{0.90}で $x_T = 1/4$ (250 K), VH_{0.59}で $x_T = 1/8$ (300 K)となる。これらの結果から、水素拡散が、水素の配列と密着に関連し合っていることが示唆される。

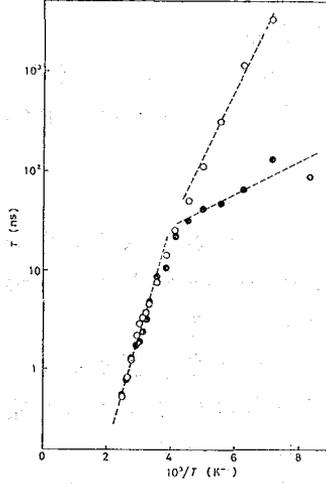


図6. VH_{0.90}における、¹Hの mean jump time.
○: $O_2 \text{ site}$, ●: $T_x \text{ site}$.

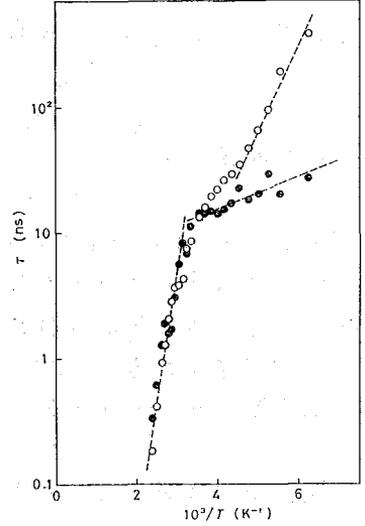


図7. VH_{0.59}における、¹Hの mean jump time.
○: $O_2 \text{ site}$, ●: $T_x \text{ site}$.

表1. 水素の拡散の活性化エネルギー。

	site	E_a [kcal/mol]	T [K]
VH _{0.90}	O_2	3.0	120~250
		5.3	250~400
	T_x	0.8	120~250
		5.3	250~400
VH _{0.59}	O_2	2.9	160~220
		8.8	310~420
	T_x	0.5	160~300
		8.8	300~420

111 スラッジ中の水の状態に関する研究

(荏原インフィルコ) ○佐藤広昭, 鈴木英友

(東北大非水研) 池上恒男

[はじめに]

廃水処理プロセスで発生するスラッジは、通常フィルタープレス、ロールプレスあるいは遠心分離機などの機械脱水装置によって脱水される。これらの脱水装置によって得られた脱水ケーキは乾燥焼却される場合が多いが、乾燥焼却には多くのエネルギーを必要とする。また機械的な脱水方法による水分の除去には限度があり、この限度が大きな問題となっている。機械脱水において限度が生じる原因としては、2つのことが考えられる。一つは、スラッジを機械的に高圧で加圧してもスラッジ中の固体粒子同士が十分に接近しないため(摩擦、角の引っ掛かり等)、固体粒子が密に充填せず水が占める空隙が一定比率で残ること。他方は、水と粒子との相互作用が脱水を阻害することである。しかし、スラッジ中の水の状態についての報告はほとんど見当らず、解明されていないため、脱水ケーキの水分がある一定限度以下に低下しない原因は明らかにされていない。著者等は、スラッジ中の水の状態についての知見を得るため、活性スラッジおよび水酸化アルミニウムを試料として、試料の含水率、温度等を変化させてNMRスペクトルを測定した。

[実験]

活性スラッジは、合成下水を回分式に処理したものを使用した。水酸化アルミニウムは、硫酸アルミニウム水溶液に水酸化ナトリウム水溶液を加えて生成したものを純水で十分に洗浄して使用した。シリカ粒子は、日本アエロジル株式会社製のシリカ粒子(商品名: AEROSIL OX 50, AEROSIL 130およびAEROSIL 300)に水に懸濁させて使用した。上記の試料を真空ろ過し、生成したケーキを常温に放置して試料中の水分を蒸発させた。蒸発水分量を調節(時間経過)することによって含水率の異なる試料を得た。試料の含水率は、試料を105~110°Cで十分乾燥後計量して求めた。

試料を直接測定用試験管に充填するのは極めて難しいのと、もし充填しても高温での測定において水がサンプル管の上部に凝縮するなど測定上の支障も多いので、図-1に示すようなセルを作り、このセルに試料を充填後、セルを測定用試験管に押入して測定した。

このセルは、図-1に示すように両端開放のガラス管(日本精密科学株式会社製)に両側からゴム栓を押込み、さらに接着剤(信越化学

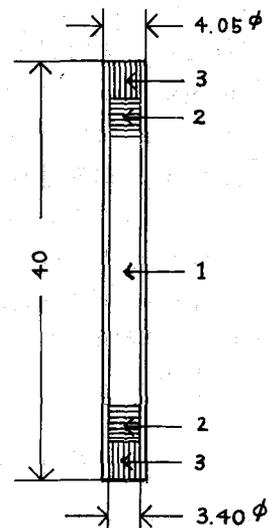


図-1 測定用セル

1: 試料, 2: ゴム栓, 3: 接着剤

製シーラントKE42)を充填して止めたものである。両端開放としたのは、試料が泥状でも入れやすい事、ゴム栓を押込む際試料の量を容易に加減できるためセル内の空間をほとんど零にする事ができる等の利点からである。栓材、接着剤および構造が適当でない、加熱中に栓が押出されたり、セルが破壊したりしやすい。図-1に示したセルは約150°Cの加熱に耐える強度を持つ。

スペクトロメーターは、日本電子株式会社製PS-100で、温度変化は付属の温度可変装置を使用した。温度誤差は±10°C以内、温度再現性および温度分布はこれより良いと思われるが不明である。

〔実験結果〕

当然のことながら試料の含水率、温度の変化に対して最も敏感なのは線幅である¹⁾。化学シフトの変化も認められるが、精度良く測定できずとりあげることができなかった。図-2に含水率と線幅の関係を示す。線幅はピークの半分の高さでの全幅をとった。この関係で特徴的なのは含水率に対して負の傾斜を持つ線幅が含水率のある値を境にして著しく急傾斜を示し、あたかも折れた2つの直線のような挙動を示すことである。この折点より下の領域での水は、固体粒子と相互作用を持ち束縛を受けてい

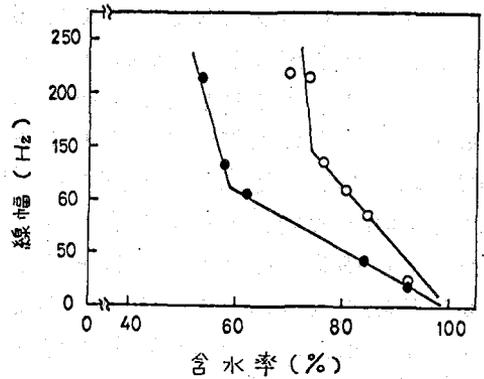


図-2 含水率と線幅の関係

○: 活性スラッジ, ●: 水酸化アルミニウム

るとすれば一応の説明がつく。他の物理測定でこの境界を示す水分を表-1に示す。TG-DTA法²⁾は、TGの微分曲線(DTG)の変曲点から分別して測定した値。膨張計法³⁾は、膨張計を使用して-10°Cにおいても膨張しない水の量を測定した値。また熱量法は、比熱計を使用して0°Cにおいても発熱しない水の量を測定した値である。表-1に示すように、試料中には自由水と異なる物性を持つ水が存在し、熱量法による測定値以外の測定値はNMR法による測定値にかなり近い値を示した。NMR法、TG-DTA法および膨張計法で測定したときの束縛水量(自由水と異なった物性を持つ水)は、活性スラッジで2.1~3.0 g-水/g-乾物量、水酸化アルミニウムで1.0~1.4 g-水/g-乾物量の範囲内に存在する。通常活性スラッジや水酸化アルミニウムを機械的な固液分離法で上記の水分の範囲内に入るまで脱水することができない事実からも、上記の水の量を固体と相互作用を持つ束縛水と考えてよい

表-1 種々の方法で測定した束縛水量

	NMR法	TG-DTA法	膨張計法	比熱法
活性スラッジ	3.0 (75)	2.14 (68.1)	2.50 (71.4)	0.32 (24.2)
水酸化アルミニウム	1.4 (58)	1.08 (51.9)	1.16 (53.7)	

単位: g-水/g-乾物量, ()内はwt%

のではなからうか。

NM法での折点の意味を確かめるため、粒径の異なるシリカ粒子（平均粒径 $8\text{ m}\mu$ 、 $20\text{ m}\mu$ および $52\text{ m}\mu$ ）に水分を含ませた試料で測定した含水率と線幅の関係を図-3に示す。図-3より、同一含水率で比較すると、粒径が小さいほど線幅は広い。また折点から測定した束縛水量も粒径が小さいほど大きな値になる。この結果は、シリカ粒子の表面積が折点の含水率を支配していることを示しており、表面から一定の距離までの水が束縛を受けているとすれば前の

説明を支持する方向の結果といえる。シリカ粒子を均一の球形の粒子と仮定して、水分子がシリカ粒子の周りに均一の厚みで束縛されているとシリカ粒子表面からの束縛の距離は、 $8\text{ m}\mu$ 、 $20\text{ m}\mu$ および $52\text{ m}\mu$ の粒子で、それぞれ 42 \AA 、 86 \AA 、 140 \AA ということになる。

温度変化（高温測）に対して線幅は、水酸化アルミニウム系でも活性スラッジ系でも負の傾斜を示す。図-4にその例を示す。活性スラッジ系について含水率に対する線幅を温度を変えて求めた例を図-5に示す。温度が上がると線幅が減少するとともに傾斜も緩やかになるが、折点の含水率はほとんど変わらない。水酸化アルミニウム系についてはいまだ測定を行っていないので何ともいえないが興味ある

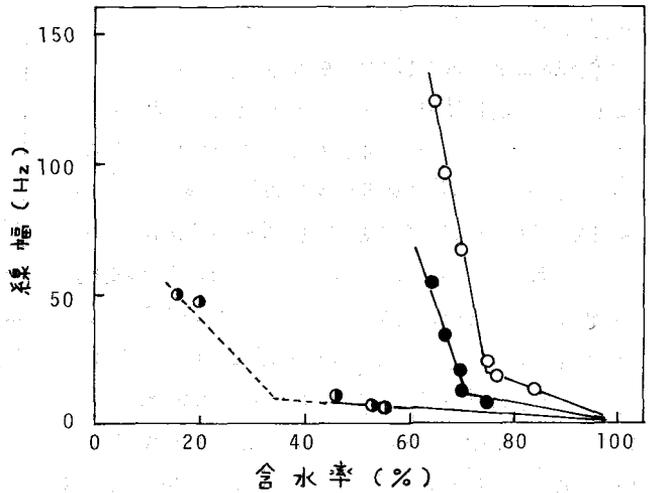


図-3 粒径の異なるシリカ粒子の含水率と線幅の関係

○: $8\text{ m}\mu$, ●: $20\text{ m}\mu$, ◐: $52\text{ m}\mu$

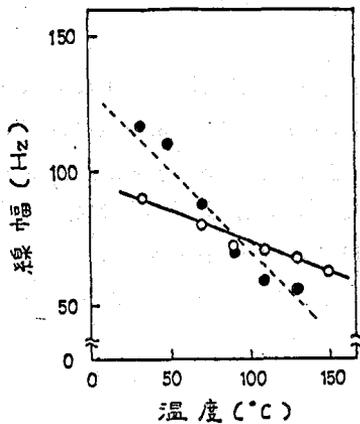


図-4 温度と線幅の関係

○: 活性スラッジ(含水率 87.0%)
●: 水酸化アルミニウム(含水率 82.7%)

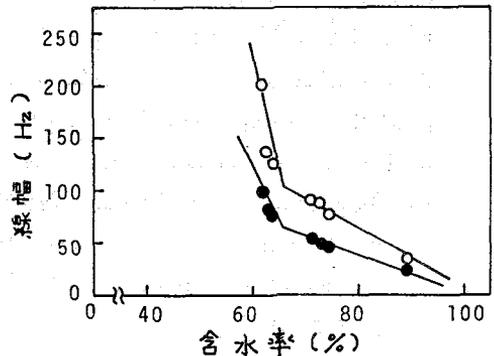


図-5 加熱時における含水率と線幅の関係

○: 33°C , ●: 130°C

事実である。

凍結融解、加熱放冷等の温度サイクルに対し、不可逆変化やヒステリシスを示す例は多い。その点、活性スラッジのような生物については減少の期待があったが、 $-50 \sim 150^{\circ}\text{C}$ の間でほとんど変化がなかった。これに対し、水酸化アルミニウム系は凍結融解により線幅の縮小を示し(図-6)、凍結温度 -20°C と -50°C の比較では、後者のほうが線幅縮小が著しいという結果となった。これは氷結によって水酸化アルミニウムの構造が壊れることおよび -20°C と -50°C では氷結しないで残っている水の量が後者のほうが少ないことを仮定すればつじつまがあう。また水酸化アルミニウム系は加熱によっても同様の現象を示すが、 90°C 、30分間という条件でさえも起きる点については説明が難しい。

[結論]

以上から、結論としていえるのは、このような固液分散系において、ある含水率以下の水は、通常の水では無く、ある程度の束縛を受けている事である。他の物理測定も同様の傾向を示すものがあり、NMRの測定結果はこれと矛盾しない。

水の線幅がある含水率を境として急激に変化する事、またこの境が温度によってはほとんど変化せず固体の性質状態に支配される事などは、今後の問題として面白い。

機械脱水の限界は上記の含水率と対応すると見てよいだろうが、詳しくは今後の問題となる。

[文献]

- 1) 日本水産学会編, “食品の水—水分活性と水の挙動—(水産学シリーズ3)” 恒星社厚生閣(1973) p. 25.
- 2) A. Ohsaka and M. Momota: The use of differential thermal analysis and thermogravimetry to study free and bound water in foodstuffs and animal tissues. In “Proceeding of the 2nd International Symposium on Properties of Water in Relation to Food Quality and Stability” (L. B. Rockland, ed.), Academic Press, 1979, in press.
- 3) H. Heukelekian and E. Weisberg, Sewage and Industrial Wastes, 28, 4 (1956).

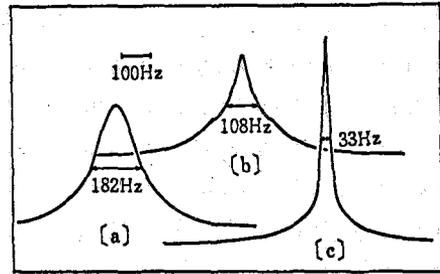


図-6 凍結融解による水酸化アルミニウムのNMRスペクトルの変化
含水率: 81.8%, 凍結時間: 30分
[a]: 凍結前
[b]: -20°C で凍結後
[c]: -50°C で凍結後

112 ゲル中の水の氷結機構； 温度依存性に及ぼすゲル濃度の効果について

(静岡薬大) 〇片山 誠ニ, (東大.理) 藤原 鎮男

ゲル相中に含まれる水には、自由水と結合水 (= 水和水) の存在がよく知られている。自由水は0°Cで氷結するのに対し結合水は氷結せず、氷点よりはるかに低い温度に冷却した時はじめてブロードな不凍水成分の水としてNMRにより検出される。¹⁾ 生体高分子に水和した水和水量は、この不凍水成分を検出することによって求められるが、しかしこの不凍水量は著しく温度依存性を示すため、不凍水と水和水との対応は必ずしも定量的に明確なものではない。従って不凍水をもって水和水を研究するうえで、不凍水そのものの状態分析をしておく必要がある。又、一方、ゲルのような高分子網目構造からなるマトリックス中に含まれる水の氷結融解機構はどのようなものなのか興味ある問題である。なぜならこれらは生体系の氷結融解機構と極めて類似しているように考えられるからである。

演者らは既にポリアクリルアミドゲル(PAA)を用いて、ゲル中の水の相対量、核磁気緩和時間 T_1 、シグナルの半値中の各々についての温度依存性を調べ、ゲル中の水の低温域における状態分析を行なってきた。²⁾ その結果、各々の温度範囲に対応して、四つの熱平衡状態 {A) 自由水-結合水 ($\sim 10^\circ\text{C}$), B) 自由水-不凍水-氷 ($0^\circ\text{C} \sim -10^\circ\text{C}$), C) 不凍水-氷 ($-10^\circ\text{C} \sim -70^\circ\text{C}$), D) 氷 ($-70^\circ\text{C} \sim$)} (図1) の存在を示唆して来た。今回さらに、種々の濃度のゲルサンプルについて同様の実験を行ない、ゲル濃度の温度履歴現象や四つの熱平衡状態に及ぼす影響について調べ、ゲル中の水 (H_2O^{17}) の O^{17} 共鳴線の温度依存性の結果とも併せ、ゲル中の水の氷結融解機構について論じた。

(実験) 各濃度のPAAゲル(5%, 10%, 20%, 30%)は常法により、アクリルアミド水溶液に微量の過硫酸アンモニウムを添加し、光重合にて調製された。NMR測定は、 ^1H 共鳴として日本電子製FX-100を、 O^{17} 共鳴にはバリアン社製FT80スペクトルメーターを用いた。温度制御はいずれも付属の温度可変装置を用いた。なお直接温度計をプローブに挿入し、測定温度をチェックし、 $\pm 1^\circ\text{C}$ の範囲内の精度で実験を行なった。 T_1 測定は、 $180^\circ\text{T}-90^\circ$ パルス系列によるInversion Recoveryを観測して求め、ブロードな不凍水の T_1 は磁化 $M=0$ までの時間 T_{null} ($T_{null} = T_1/1.44$)を用いて算出した。不凍水量は LiCl , Mn^{2+} を含む90%

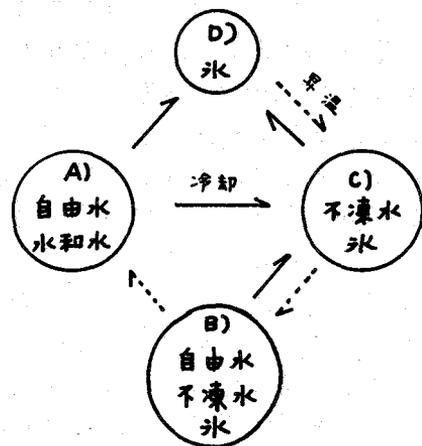


図1 ポリアクリルアミドゲル中の水の低温域における各熱平衡状態とその向の相変化機構

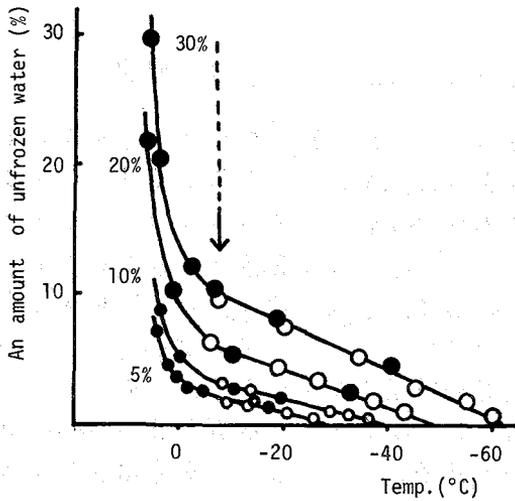


図2 ホリアクリルアミドゲル(5%, 10%, 20%, 30%)中に含まれる水の含量の温度依存性。 ○—冷却過程 ●—昇温過程

(結果及び考察) 図2はPAAゲル中の水の含量の温度依存性を調べたものである。冷却していくと、ゲル中の水の含量は -10°C で急激に減少する。この時、ゲル中の自由水は氷結し、同時に結合水に由来するブロードな不凍水成分が現われる。この相変化を起こした -10°C の臨界温度からさらに冷却していくと、この不凍水成分の量はリニアに減少し遂に消失してしまう。逆に低温側から昇温していくと不凍水量は -10°C までは冷却過程と同じpathを通して増加し、さらに -10°C の臨界点を経過し連続的に急増加し元の水の量に復帰する。このPAAゲル中の水の量はPAAゲル濃度に関係なくほぼ同じ傾向の履歴現象を示した。

図3は、PAAゲル中の水のスピン格子緩和時間 T_1 の温度依存性を調べたものである。冷却していくと、 T_1 は -10°C までリニアに減少してくるが、 -10°C で急激に小さく($\approx 30\text{ms}$)なる。以後の冷却に対して T_1 はほとんど変化しないか及至は若干の減少傾向にある。逆に低温側から昇温していくと、冷却過程と同じpathを通して元の状態に復帰していくが、 -10°C から 0°C の間の T_1 の挙動は冷却過程のものとは異なり、連続的に増加し元の冷却過程に到達する。このゲル中の水の T_1 は、PAAゲルの濃度に関係なくほぼ同じ傾向の履歴現象を示した。

図4は、ゲル中の水の線中(半値中)の温度依存性を示したものである。冷却していくと、線中は -10°C までほぼ一定の小さな値($< 1\text{Hz}$)を示しているが、 -10°C で急激に $\approx 300\text{Hz}$ 程度のブロードな不凍水成分に変わる。以後この不凍水の線中はほぼリニアに増加し、 $\approx 1000\text{Hz}$ 以上にも達し消失する。逆に低温側から昇温していくと、不凍水の線中は冷却過程と同じpathを通して減少し、元の状態に復

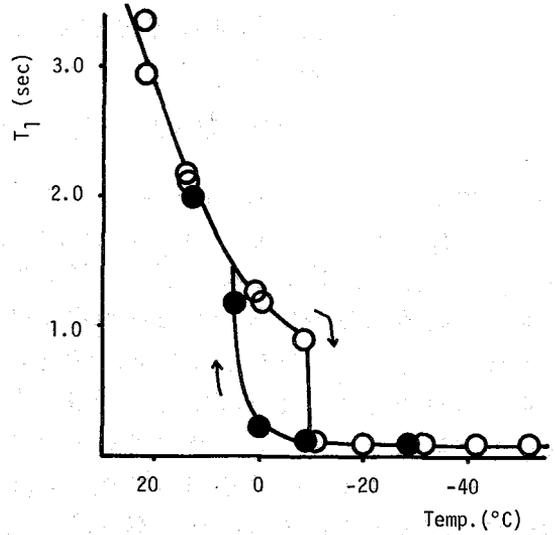


図3 ポリアクリルアミドゲル(20%)中の水のスピン格子緩和時間 T_1 の温度依存性

D_2O 水溶液を基準にして面積から求めた。なお、各温度における測定は十分に熱平衡に達するまでの時間をおいた後に行なった。

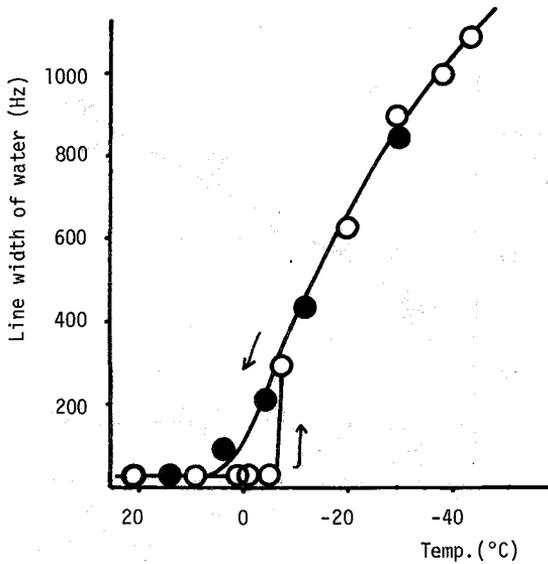


図4 ポリアクリルアミドゲル(20%)中の水の半値中の温度依存性

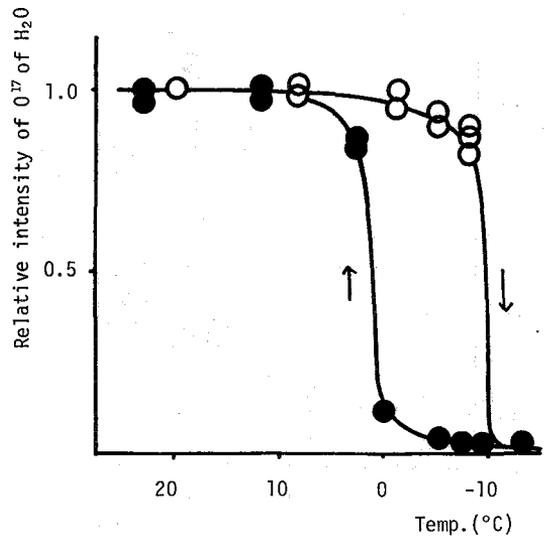


図5 PAAゲル(30%)中に含まれる水(H₂O¹⁷)の相対量の温度依存性

帰していくが、 -10°C から 3°C の間の線中の挙動は冷却過程のものとは異なり、連続的かつ緩慢に減少し元の冷却過程に到達する。このゲル中の水の線中の挙動はPAAゲルの濃度に関係なくほぼ同じ傾向の履歴現象を示した。

図5は、30% PAAゲル中の水(H₂O¹⁷)の 0^{17} シグナルの相対強度の温度依存性を調べたものである。冷却していくと、水の相対量は -10°C まではほぼ一定であるが、 -10°C 付近で急激に減少し消失する。逆に昇温していくと、水の相対量は冷却過程と異なり、 -5°C 付近から現われ始め、以後急速に増加し元の相対量に復帰する。

図6は、同じく 0^{17} の線中(半値中)の温度依存性を調べたものである。室温付近にて $\approx 80\text{ Hz}$ の線中を示す 0^{17} の共鳴線は、温度降下とともにリニアに広がっていき、 -10°C 付近では 200 Hz 以上にも達し消失する。逆に低温側から昇温していくと、 -5°C 付近で線中 $\approx 420\text{ Hz}$ の微弱信号が検出され始め、 $\approx 3^{\circ}\text{C}$ で冷却過程の値に復帰した。 0^{17} 共鳴ではプロトンでみられたような -10°C 以下の不凍水成分はみられなかった。これは不凍水の 0^{17} は液体状態であるもののかかなり運動束縛されているため、 0^{17} の四極子緩和が顕著にきいてブロードニングし、検知できなくなったものと考えられる。

以上の結果から、四つの熱平衡状態が無理なく説明されるだけでなく、これらの四つの状態間の相変化に対して以下にのべるような現象論的な氷結融解機構が考えられた。冷却過程において、状態A)はC), D)へと相変化していくが、B)状態は現出しない。状態A)の水は -10°C まで氷結しないが、これは過冷却状態のためであり、この過冷却の原因即ち氷点降下を起す原因はClapeyron-Clausiusの式より内部圧にその原因を求めることができるが詳細についてはここでは言及しない。 -10°C に至りゲルマトリックス内に氷晶核が形成され、それが急成長しゲルは失透する。これはゲル中の自由水が急激に氷結したことに対応している。一方この時、水和

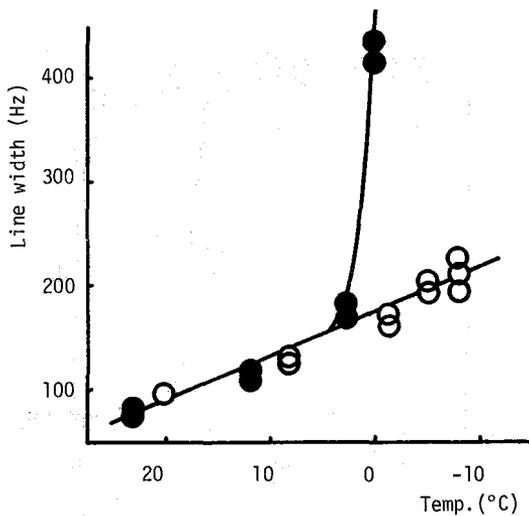


図6 PAAゲル(30%)中に含まれる水(H₂O)の0.7兆ヘルツ線の半値中の温度依存性

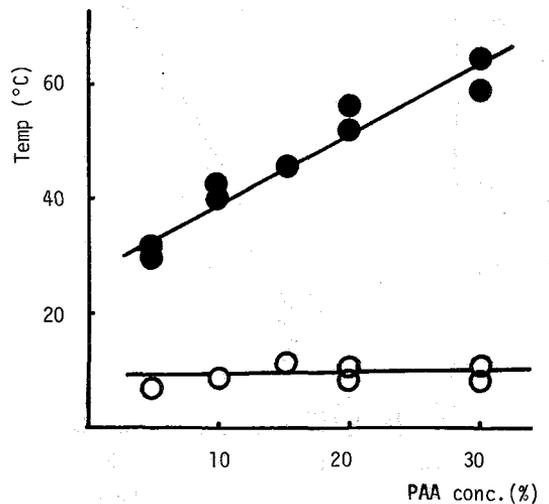


図7 PAAゲル中の不凍水の存在する温度範囲

水成分は自由水の氷結により主たる交換相手を失ない、より運動束縛されたブロードな不凍水成分に変化する。この不凍水成分は各温度において熱平衡にあり、冷却及至昇温により、運動束縛のゆるい成分から氷結していき、逆に運動束縛の強い成分から融解していく。即ちここで不凍水は τ_c に分布を持つが未だ溶液状態であるため不凍水分子間のプロトン交換が可能であり、このため単一モードの不凍水成分として検出されるものと考えられる。³⁾ 一方、昇温過程において、氷状態D)は、C)、B)、A)の順に相変化する。ここで -10°C 以上において、自由水に由来する氷が融解しB)状態を現出する。このB)状態は昇温過程のみに現われ、hysteresis loopの原因となっており、大きな融解の潜熱に由来する。

ゲル濃度は高分子網目の間隙即ち空間の大きさによって特徴づけられるが⁴⁾このマトリックスサイズの効果は、不凍水の存在範囲に著しく影響を及ぼすことがわかる。図7より、自由水が氷結する温度(-10°C)はこのゲルマトリックスサイズの影響を受けずほぼ一定であるが、不凍水の存在する下限の温度(不凍水 \rightarrow 氷)はゲルマトリックスのサイズが小さくなるに従って、より低温側に移行することがわかる。これは生体系の自由水が少なく、結合水が多い組織ほど不凍水を低温まで($\sim -70^\circ\text{C}$)有することができるが、みずみずしい組織即ち結合水が少なく自由水の多い組織ほど、不凍水の存在範囲は狭まることと対応している興味深い。

⁰測定には、一方ならぬ御助力をいただきました分子科学研究所の岩村秀教授に感謝いたします。

1) I. D. Kuntz, Jr., T. S. Brassfield, G. D. Law, and G. D. Purcell, *Science*, **163**, 1329 (1969)

2) 第17回 NMR 討論会要旨集 1974 東京

3) D. E. Woessner, B. S. Snowden, Jr., and Y. C. Chiu, *J. Coll. Inter. Sci.*, **34**, 283 (1970)

4) S. Katayama and S. Fujiwara, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4485 (1979)

113 固体高分解能NMR法を用いた高分子における結晶質と非晶質の分離測定

京大 理 ○前田史郎, 寺尾武彦, 糺賀亜帆

〔序〕 結晶性高分子は結晶相, 非晶相などのいくつかの相からなり, 各相の成分比, 運動性, 非晶構造などが巨視的な性質と深い関連性を持っていることがよく知られている。高分子における, このような静的動的構造の研究に¹³C固体高分解能NMRは一つの有効な手段を手えるものと思われる。¹ そこで我々は各相のスペクトルの分離, 各相各吸収線のT₁測定, 各相の成分比の測定などを行なう目的でアインタクチック・ポリプロピレン(PP)および繊維状ポリエチレン(PE)における¹³C固体高分解能NMR測定を行なっているが、その予備的な結果をここに報告する。

〔実験〕 proton-decoupled ¹³C NMRスペクトルは単に90°パルスを用いる方法(図1b, 90°パルス法)と¹³C-¹H間 cross-polarizationを利用するproton-enhanced NMR^{2,3}(図1a, CP法)を用いて自作の装置で測定した。共鳴周波数は¹H, ¹³Cに対してそれぞれ59.53MHz, 14.97MHzであり, H₁の大きさはそれぞれ15G, 60Gである。測定には市販のPE繊維およびiti-PPを用いた。PP試料は添加剤も重合体含まないものである。PE試料は90°Cで, PP試料は140°Cで約20分間アニールしてから測定に用いた。

〔各相のT₁の分離測定法〕 ¹³CのT₁測定に用いたパルス系列を図2に示す。はじめにパルス系列のくり返し時間の中に生じる¹³Cスピン系の磁化を90°パルスで消滅させる。次に¹³C-¹H間 cross-polarizationを利用して¹³Cスピン系の磁化を生じさせ, 90°パルスを加えて静磁場方向(図2a)又はその逆の方向(図2b)に向かせる。そして, 時間tの後に¹Hスピン系をdecouplingしながら, ¹³Cスピン系に90°パルスを加えてFIDを記録しこれをフーリエ変換して高分解能スペクトルを得る。解析を容易にするため, 時間tの間¹Hスピン系を飽和させてtransient NOE効果を取除き¹³Cスピン系のスピン-格子緩和を単一指数関数型にする。このとき測定1(図2a), 測定2(図2b)で得られるある相のある吸収線に対する¹³Cスピン系の磁化S₁(t), S₂(t)はcross-polarizationおよびNOEで得られる磁化の大きさをそれぞれS_{cp}およびS_{eg}とすると次式を手えられる。

$$S_1(t) = S_{cp} e^{-t/T_1} + S_{eg} (1 - e^{-t/T_1}) \quad (1)$$

$$S_2(t) = -S_{cp} e^{-t/T_1} + S_{eg} (1 - e^{-t/T_1}) \quad (2)$$

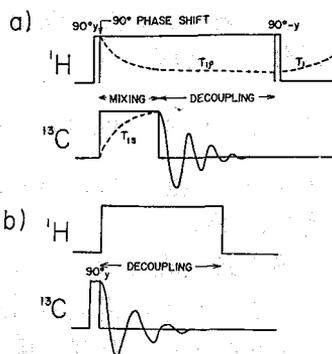


図1 a) CP法ならびに b) 90°パルス法のパルス系列

まえだ しろう, てらお たけひこ, さいか あほろ

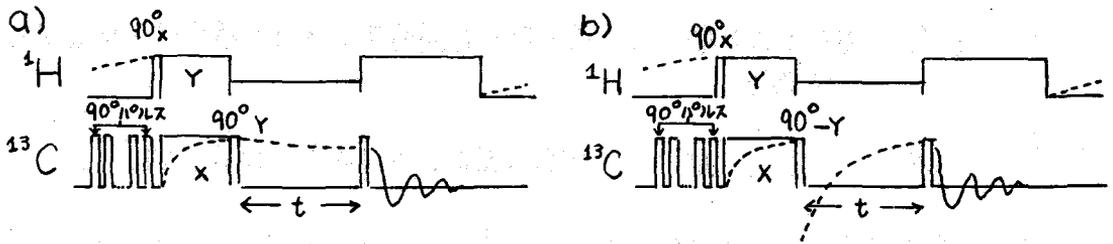


図2. ^{13}C T_1 測定のパルス系列 a) 測定1 b) 測定2

ここで (1) と (2) の差をすれば

$$S_-(t) \equiv S_1(t) - S_2(t) = 2S_0 p e^{-t/T_1} \quad (3)$$

となり, cross-polarization によって信号が得られる相, すなわち後述のようにま
として rigid な相の場合に T_1 値を定めることができる。これに併して (1) と (2)
の和をすれば

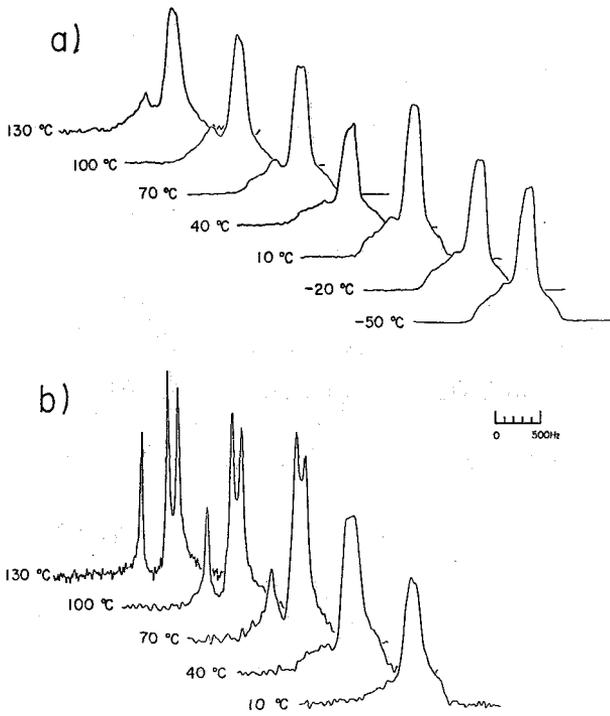
$$S_+(t) \equiv S_1(t) + S_2(t) = 2S_0 q (1 - e^{-t/T_1}) \quad (4)$$

となり, saturation recovery 法の場合の式に一致し, どの相の場合にも T_1 値が
得られる。

ある吸収線に対して (4) の半対数プロットを行なえば, 各相の緩和過程が重なっ
て観測されるために直線とはならず, 解析が困難となるが, (3) のプロットも併わ
せて行なえば, 各 T_1 値を分離するのに有用であるだけでなく分離された各 T_1 値
を各相に帰属するためにも有効である。

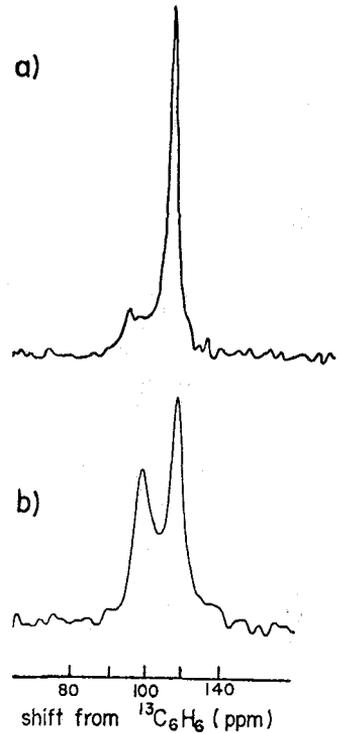
しかし, cross-polarization および NOE どちらの enhancement factor も種々の
パラメーターに依存するため, 各相の成分比を定量性のある各相のスペクトルを得
るためには上記の方法は使えない。この場合には saturation recovery 法に transient
NOE の効果を消去する工夫を付け加えることによって, 定量性を与え得ることを
討論会で報告する予定である。

〔結果と議論〕 図3a, 3b はそれぞれ CP 法, 90° パルス法で得られたバルク
な it-PP の proton-decoupled ^{13}C 粉末スペクトルである。CP 法の場合, ミキ
シング時間は 3ms, 90° パルス法の場合くり返し時間は 5秒である。3a と 3b と
で大きな違いがみられている。3a では温度の上昇に伴う大きな変化はみられない。
他方, 3b では 40°C では 3a とほぼ同じスペクトルであるが, 温度の上昇とともに
線幅の大きな減少が認められる。特に 130°C においては各吸収線がはっきり分
離し, それらの位置は低磁場側から順に液体ベンゼンに併して 81.5, 99.5, 106.6
ppm (誤差 2ppm) であり, 溶液で得られている等方平均シフト値 81.8, 99.8, 106.8
ppm⁴ にほとんど一致し, この温度ではランダムな運動状態にあることを示してい
る。しかし, 3a の 130°C におけるスペクトルはガラス転移点以下のものとほとん
ど変化はみられず, おおむね静的な状態にあることを示している。このような一見
相反する結果は次のように説明することかできる。CP 法では ^{13}C - ^1H 間の双極子



Proton-decoupled ^{13}C spectra of it-polypropylene

図3. a) CP法, b) 90° パルス法による it-PP のスペクトル



Proton-decoupled ^{13}C spectra of oriented polyethylene. The draw direction is parallel to the magnetic field.

図4. a) CP法, b) 90° パルス法による PE のスペクトル

相互作用が強くないと交叉緩和が速やかに行なわれず、非常に長いミキシング時間も必要とする。従って有限のミキシング時間では運動が激しいほど信号は弱くなりここで用いられた3msというミキシング時間では双極子相互作用の強い immobile な部分、すなわち結晶相と immobile な非晶相のみが観測にかかると考えられる。一方 90° パルス法ではパルスのくり返し時間を十分長くすれば、全ての部分からの信号が得られる。図3bにおける線幅の減少は非晶相の化学シフト異方性がマイクロブラウン運動により減少したことによる。我々の知る限りでは、結晶性高分子において化学シフト異方性の減少によりマイクロブラウン運動もとらえたのははじめてである。

図4a, 4bはPE繊維の配向試料においてそれぞれCP法および 90° パルス法を用いて得られた proton-decoupled ^{13}C スペクトルである。繊維軸は静磁場と平行で温度は 80°C であり、 90° パルスのくり返し時間は 2.0s である。4aの高い吸収線(ベンゼンから117ppm)は主として配向した結晶相によるものであり VanderHart の ultraoriented PE の位置⁵と一致する。4bでは、117ppmの鋭い吸収線と98ppmを中心とする幅の広い吸収線とが分離されている。低磁場側の吸収線は溶液における等方平均値98.8ppm⁶にほぼ一致しており主として mobile な非晶相によるものである。高磁場側の吸収線は主として結晶相によるもので、化学シフト異方性により、等方平均値から約18ppmシフトしている。このように配向試料を用いて同じス

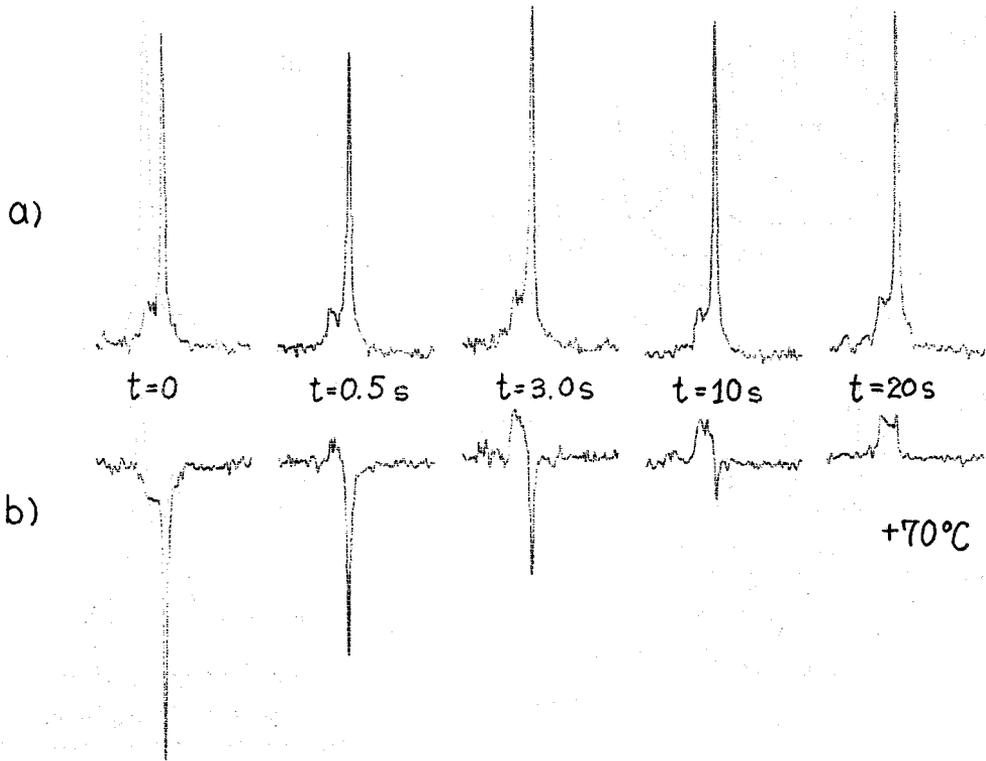


図5. PEの T_1 測定 a) 測定1によるスペクトル b) 測定2によるスペクトル

スペクトル中に両相のスペクトルを分離観測することができた。

前に述べた T_1 測定法をPE試料に適用して得られたスペクトルを図5に示す。S/N比が悪く予備的な結果ではあるが T_1 値を求めてみると次のようになった。B点の $S_-(t)$ の半対数プロットをとるとB点は2成分系であることが分かり T_1 値は長い成分で約40秒、短い成分で1秒程度となった。A点の $2\text{Seg-}S_+(t)$ の半対数プロットをとると約250msとなった。この結果A点の $S_+(t)$ プロットから得られる成分は運動性の激しい非晶相であり、B点の $S_-(t)$ プロットから得られる T_1 の長い成分は運動性の乏しい結晶相、 T_1 の短い成分はこれらの中間相であると考えられる。PPについても同様の結果を得ている。今後、各相の運動性を調べるために、 T_1 の温度依存性の測定も行なう予定である。

〔文献〕

1. 寺尾武彦；高分子 28,510(1979)
2. 寺尾武彦；化学の領域 32,686(1978)
3. M.Mehring; 'High Resolution NMR Spectroscopy in Solids', 'NMR Basic Principles and Progress' ed. P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld, Springer-Verlag, Berlin(1976), Vol. 11
4. L.F. Johnson, F. Heatley, and F.A. Bovey; Macromolecules 3, 175(1970)
5. D.L. VanderHart; J. Magn. Resonance 24, 467(1976)
6. T. Hama, T. Suzuki, and K. Kosaka; Kobunshi Ronbunshu 32, 91(1975)

114 Magic Angle Spinning (MAS) 法による

固体高分子の緩和時間測定

(日本電子) 藤戸輝昭, (京大理) 寺尾武彦

1. はじめに

我々はこれまで、Magic Angle Spinning 法を使用して、数種の柔粘性結晶の固体サンプルで、分子内の各カーボンをすべて分離した状態で緩和時間を測定し、固体状態での分子運動について研究してきた¹⁾。しかし、これまでの MAS 法では、使用したスピナーが、cylindrical type²⁾で、これを Low-angle design²⁾ で回転させたため、回転時にノイズが発生し、高速度には使用上の限界があった。また、このデザインのスピナーでは、小さく作りにくいので、15cm のクロスコイル回路を使用せざるを得なかったため、プロトシデカツコイルパワーをあまり大きくすると、放熱するところが多かった。これらの難点を克服するため、スピナーを式は既述のタイプのままで、良好な結果を得た。今回は、これを用いて、固体高分子の緩和時間測定をこころす。その緩和機構及び分子運動についての私見を得たので、併せて報告する。

2. 実験

装置は、JEO. FX-100 FT-NMR を使用し、下述のようなタイプのスピナーをもった MAS フローブを用いて実験を行った。周波数は C-13 が 25 MHz、プロトン照射が 100 MHz である。

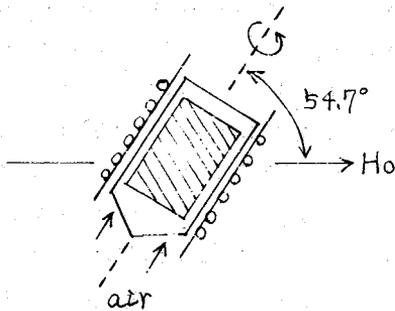


図 1. MAS スピナー

と同様に、容易に行える。ただ、このタイプのスピナーは、コマ形のスピナーにくらぶと、原理的にバラエスがとりにくいから、ステーター及び、コイルボビンにかなり力くふうを必要とした。このスピナーで、1.5 K₂/cm², 502/min のエアを使用した場合、2.5 kHz の回転数が得られる。(空気圧を上げるとさらに高速が得られる。)

スピナー

スピナーには、図 1 のような鉛筆型のカプセルを採用し、磁場に対して magic angle 即ち、54.7° だけ傾けて回転させ、いわゆる Beam-design で使用する²⁾。このタイプのスピナーを採用したのは、次の理由からである。

① コイルをカプセルの近くに巻けるので、filling factor が良い。

② サンプルの出し入れが通常のフローブ

ふじと てるあき, てらお たけこ

フローブ回路

フローブの回路は、Single coil-Double tune 方式をとり、 $\gamma/4$ 回路を使って、観測系へのプロトと照射用 RF のみれを阻止している。³⁾ 使用したコイルポジンの外径は 12 ϕ 、カポコレルの外径は 10 ϕ である。プロト上の照射パルサーは、10 μ sec のパルス幅を使用し、200 μ sec である。この回路では、プロト上照射パルサーを大きくとれるという特徴がある。

T₁測定法

MAS での測定には、通常 cross polarization (C.P.) 法と呼ばれる = 重共鳴法が使われるが、我々は、C.P. 法の使用は避け、図 2 のような T₁ 測定法を用いた。これは、¹³C の T₁ 測定には通常の Inversion Recovery 法 ($\pi - t - \pi/2$) のパルス系

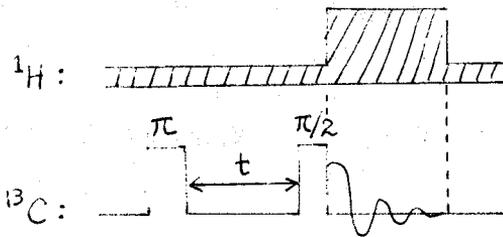


図 2. MAS. T₁ 測定法

を用い、¹H 照射は、FID サンプリング時のみ high power decouple を行い、その他の時間は、low power 照射するもので、フローブの発熱を避け、しかも NOE enhancement 効果を残そうとする方法である。この方法の利点は次の点である。

① Cross polarization 法での T₁ 測定には、複雑なパルス系列が必要であり、また Hartmann-Hahn 条件を満たすため

に、Carbon 系と proton 系の RF power level 比が正確に一定でないといけないが、本法ではその必要がない。② 通常、サンプルによって Cross polarization のための Contact time の最適条件が異なる。また一つのサンプル内でも、分子内の各カーボンでの最適 Contact time は異なる。さらに、同一ピークを示すものでも、結晶質と非晶質のように二種以上の成分が含まれている場合には、いずれの成分にも最適化することは不可能であり、このため、C.P. 法では正確なスケールが得られないことがある。本法によれば、このような心配はない。ただ、この方法では、cross polarization 法に比べ、理論的に S/N が 3/4 程度に落ちるといふ欠点はあるが、実用上はそれほど支障とはならない。

3. 測定結果

装置の分解能は、アダマント粉末でチェックしたところ、5 Hz 以下であった。(フローブそのものの分解能は 1 Hz 以下である。) このフローブを用いて、前回には、回転数及び decouple power 不足のため測定出来なかったヘキサメチルベンゼン及び PMMA の ¹³C の T₁ を測定した。なお測定はいずれも室温で行った。

ヘキサメチルベンゼン

表 1 に、溶液及び固体でのヘキサメチルベンゼンの T₁ 測定値を示す。

	Solution (CDCl ₃)	Solid (MAS)
-CH ₃	8. sec	0.66 sec
	13.	3.0

表1. ヘキサメチルベンゼンの¹³C-T₁

このサンプルは、固体状態でも、室温では、フェニル面に垂直なC₆軸のまわりの回転だけでなく、面内の軸のまわりにも回転を行っている。⁵⁾ しかし、MASを行わない場合には、フェニルカーボンは、かなり大きい (~150 ppm) ケミカルシフトの異方性を示すが、これは運動が、等方的になるほど速くはないことを示している。一方、メチルカーボンは、固体状態では、プロトンとの双極子相互作用を平均化するほど回転が速くはないため、0.66 sec という短いT₁を示すのであろう。固体状態でフェニル基のT₁に寄与するのは、分子内及び分子間のメチルプロトンとの双極子相互作用で、サンプル回転をしない場合、T₁は異方性を示すが、MASでは平均化された値となり、液体よりは、かなり短い。

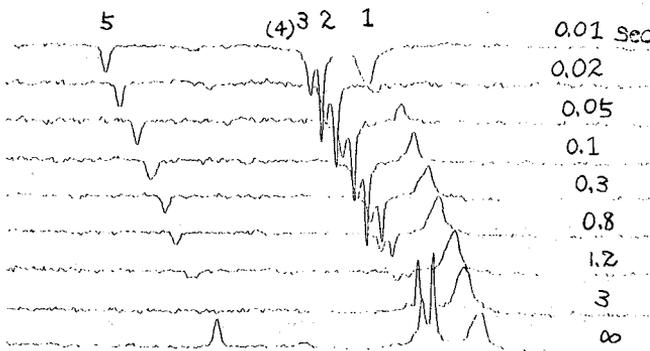


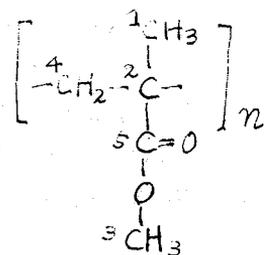
図3. PMMAの¹³C-T₁スペクトル(MAS)

	T ₁ Solution (CDCl ₃)	T ₁ (MAS)	T _{1g} (MAS)
1	58ms (42)	0.05 sec	5 ms
2	540 (581)	2.9	4.3
3	400 (448)	3.8	11
4	50 (46)	—	—
5	1500 (1100)	3.4	11

表2. PMMAの¹³C-T_{1g}値

PMMA

図3にMASで測定したPMMA固体の¹³C-T₁スペクトルを示す。これから得られたT₁値を表に示す。(メチレンのピーク(4)は、強度が小さくて測定出来なかった。) なお、表のsolution欄のカッコの内の値はLyeraらのデータ⁶⁾で、M_w ≈ 6000のサンプルで溶媒はトリメチンである。またT_{1g}(MAS)と



書いてあるのは、Schaeferら⁷⁾のデータから推定したものである。これらのデータから次のことかいてるであろう。PMMAの主鎖はセグメント運動 (torsional motion) をしている、その程度は、溶液中でも固体中でもあまり変わらない。それは、主鎖のメチルカーボンのT₁が、溶液でも、固体でも、同程度 (~50ms) に短いことによつ

7で示されている。一方、側鎖の $-OCH_3$ は固体状態でも、かなり速い回転を行つてゐることが、プロトンのスピノエコーデータより示されている。⁸⁾ この回転のために、 $-OCH_3$ の T_1 は、主鎖のメチルの T_1 よりはずっと長くなつてゐるのであろう。しかし側鎖のエステル全体としては、非常に速い運動しかしてゐない。それは、MASを行なつた状態では、カルボニル基は大きなケミカルシフトの異方性を示すことから分る。奇妙なのは、固体状態では、4級炭素がプロトンと直接ついてゐないにもかかわらず、 $-OCH_3$ より短い T_1 値を示すことである。(T_1 のデータも同じ傾向を示している。) これは、4級炭素が隣隣の+隣のメチルプロトンと双極子相互作用しやすくなるような位置関係になるよう主鎖がゆがみ、ゆがみしした torsional motion をしてゐるためであると考へられる。この周波数が、 10^6 Hz 付近であるため、4級炭素の T_1 値が短くなつたと、Schaeferらは説明してゐる。⁷⁾ この点を明らかにするため、現在詳細について検討中である。

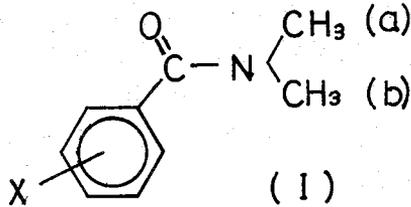
参考文献

- 1) 藤戸、今原; *14回 NMR 討論会要旨集, p5 (1978)
- 2) J. Schaefer and E.O. Stejskal; "Topics in ^{13}C NMR spectroscopy" vol. 3. Chap 4. (1977)
- 3) V. R. Cross, R. K. Hester and J. S. Waugh; Rev. Sci. Instr. 42 1486 (1970)
- 4) W. L. Earl and D. L. Vanderhart; Macromolecules 12 702 (1979)
- 5) R. Van Steenwinkel; Z. Naturforsch. 24a 526 (1969)
- 6) J. R. Lyerla Jr, T. T. Horikawa and D. E. Johnson; J. A. C. S. 99 2403 (1977)
- 7) J. Schaefer, E. O. Stejskal and R. Buchdahl; Macromolecules 10 385 (1977)
- 8) T. M. Connor; Br. Polymer J. 1 110 (1959)

115 高圧高分解能NMR, 核置換 *N,N*-dimethylbenzamide の分子内回転
に対する圧力効果

(神大 理) 山田博昭, 中塚正勝 子谷一実 世良明

私たちは先に高圧高分解能NMR(HPHR-NMR)の測定を行なうための極めて簡単な方法を開発し報告した。この方法によれば、高圧下での試料スピニングが可能のため、分解能を飛躍的に向上させることができる。今回は、この方法に若干の改良を加え、核置換 *N,N*-dimethylbenzamide (I) を測定試料とし、C(=O)-N結合の回りの回転速度に対する圧力効果を、希薄溶液中で測定することに成功したので報告する。



[実験]

● 熱膨張高圧セル²⁾

Fig 1(a) に示すように、ガラス製の耐圧セル内に試料溶液及びフェニルアセチレンを低温下に満たし、両端を熔封した後、スピニング可能な安全ジャケット内に入れて、温度制御されたプローブ内に置いた。熔封直前における内部の液体の冷却程度を削減することによりセル内の圧力を調節した。セル内の発生圧力はフェニルアセチレンのC≡CH化学シフトの圧力依存性を利用し決定した。また試料溶液とフェニルアセチレンとを仕切るのに水銀だけでなく、ピストンFig 1(b)の挿入により両液が混じり合うのを防ぐことができた。上記のセルを用い、CH₂Cl₂を測定した際の結果をFig 2に示す。スピニング条件下では0.5~0.6Hzの分解能が比較的容易に得られた。

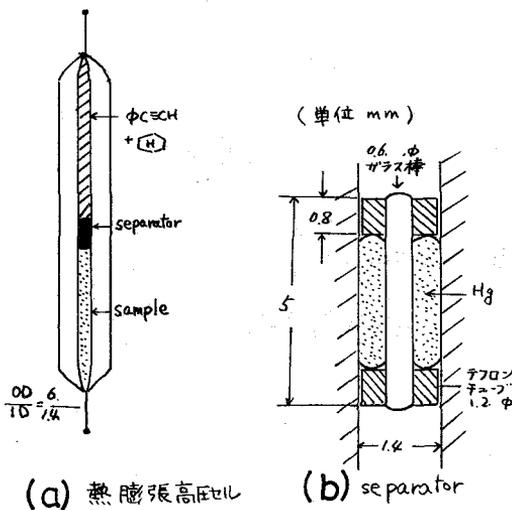
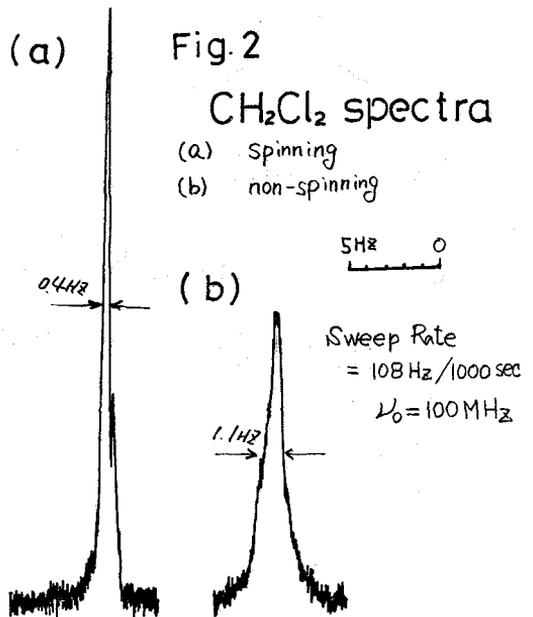


Fig.1



やまだひろあき なかつがまさかつ こたにかずみ せらあきら

● 測定

置換バフズアミド 5 mol%, シクロヘキサン 1 mol%, クロロホルム 94 mol% より成る溶液について、Jeol-PS-100 スペクトロメーター ($\nu_0 = 100\text{MHz}$) を用い、 35°C で高圧下の測定を行なった。また分子内回転が充分遅い場合の $\text{CH}_3(a) \sim \text{CH}_3(b)$ 間の化学シフトの差 $\Delta\nu_{\infty}$ を決定するために、低温測定を行ない $\Delta\nu_{\infty}$ を求めた。また低温高圧化での $\Delta\nu_{\infty}$ 測定により $\Delta\nu_{\infty}$ の圧力依存性を求めた。(Table 1)

[結果]

置換バフズアミドの CH_3 スペクトルの波形の圧力変化より各々の圧力下での lifetime τ における波形を常法⁴⁾により計算(各圧力下での $\Delta\nu_{\infty}$ を用いた。)し観測波形と一番よくマッチする計算波形を選び、各圧力下における回転速度定数 k を求めた。一例としてバフズアミド ($X=H$) の CH_3 スペクトルの圧力変化を Fig. 3 に示す。圧力の増大と共に波形は広がりを見せ、 $C(=O) - N$ 結合の回りの回転が遅くなっていることが明白である。

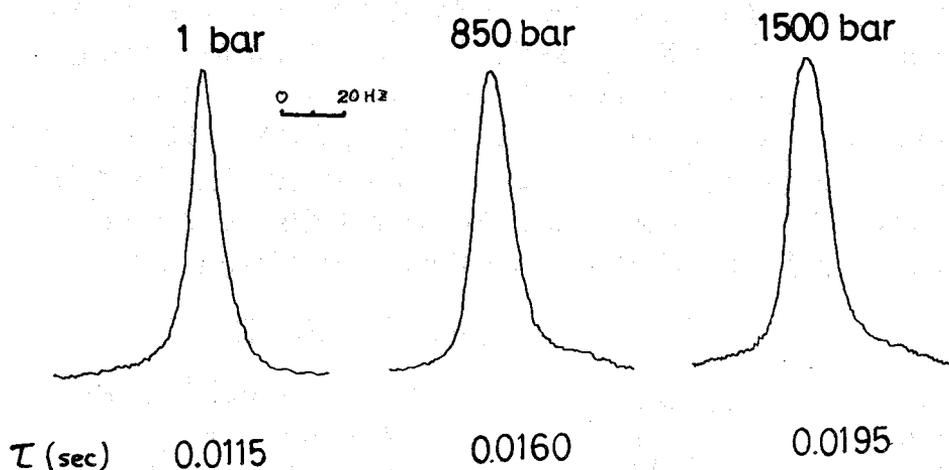


Fig. 3 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ signal ($X=H$)
in CHCl_3 at 35°C $\nu_0 = 100\text{MHz}$

Table 1 (inCHCl₃ 35°C ν₀ = 100MHz)

X	p-Me	H	m-Br	p-NO ₂	p-(CH ₃) ₂ NCO	m-(CH ₃) ₂ NCO	35-di(CH ₃) ₂ NCO
ρ) _∞ 1 bar	10.6 Hz	13.7	12.3	16.2	15.0	13.0	9.7
Δ) _∞ 1500 bar	8.9 Hz	11.3	10.4	14.4	12.9	10.7	8.4
ΔV [‡] cm ³ /mol	+10.2	+9.5	+8.8	+3.1	+10.0	+8.7	+9.4

このようにして、それぞれの圧力下での回転速度定数を求めたが、 ρ に対する圧力Pの効果は次のように、活性化体積、 ΔV^{\ddagger} により表わされる。

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial P}\right)_T = -\frac{\Delta V^{\ddagger}}{RT}$$

これより ΔV^{\ddagger} を求め、Table 1に示した。 ΔV^{\ddagger} は遷移状態の部分モル体積と原系の部分モル体積との差を表わす。我々の得た ΔV^{\ddagger} はすべて正の値を示し、遷移状態の部分モル体積が原系に比べて増加していることがわかる。またX=H, p-Me, p-NO₂, m-Brの四種については、 ΔV^{\ddagger} に対する置換基の極性効果が明白に表われていると言える。(なお、p-(CH₃)₂NCO以下三種は極性効果から予想されるよりも大きな ΔV^{\ddagger} を与えている。これらに対して、我々は現在のところ妥当な説明を見出していない。少なくとも、①置換基の立体配座とその極性とのがかり合い、②置換基がかさ高く、しかもその形状が球形より大きく偏差していることなどへの配慮が必要で、今後、慎重に検討されるべき課題であろう。)

[考察]

活性化体積は一般に、溶媒和項 $\Delta V^{\ddagger}_{\text{solution}}$ 、と構造項 $\Delta V^{\ddagger}_{\text{structure}}$ とに分けて考えら

$$\Delta V^{\ddagger} = \Delta V^{\ddagger}_{\text{structure}} + \Delta V^{\ddagger}_{\text{solution}}$$

るが、この場合、構造項は非常に小さい(| $\Delta V^{\ddagger}_{\text{structure}}$ | < 1 cm³/mol) ので部分モル体積の差は、主に原系と遷移状態との溶媒和の強弱により支配されていると見なせる。したがって溶媒和に対する極性効果、立体効果に注目しつつ考察を行なう。

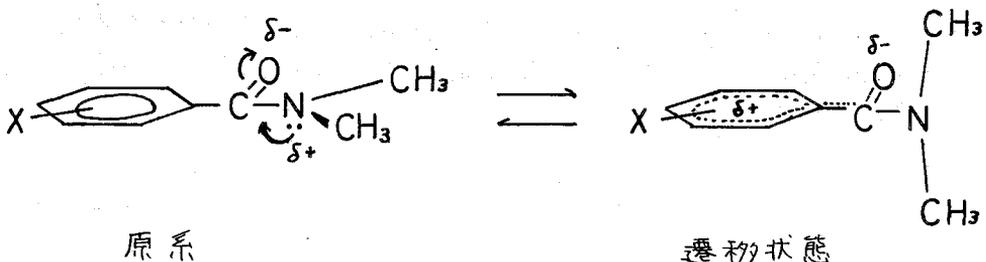


Fig. 4

まず原系では $\chi=0$ と $N(4p_2)$ との共役により強い電荷が生じている。一方遷移状態では、この共役は切断され、 $\chi=0$ は π -ニル基と共役に入る。(Fig. 4)
このため、電荷の非局在化の範囲が大きく広がり、溶媒分子との相互作用が原系に比べて弱まる。すなわち部分モル体積は、遷移状態で増大するわけである。

次に考慮すべきは、溶質分子の立体配座と、溶質-溶媒分子の充填との関係であるが、これは溶質分子が平面構造をとった時、充填は密になると考えるのが妥当であろう。Fig. 4から明らかのように遷移状態では、原系に比べ、分子の平面性は失われ、充填はゆるくなるはずであって、極性効果と同様、遷移状態における体積増大を生むと考えられる。

今回得られた重要な成果の一つは、 ΔV^\ddagger に対する置換基効果を見出したことである。最近 Ludemann⁵⁾ は、dimethylbenzamide の HPHR-NMR を誘電率の異なる種々の溶媒で測定(濃度 20% ν)し、分子内回転の ΔV^\ddagger は溶媒効果を受けない ($\Delta V^\ddagger = \text{const.} = 9 \text{ cm}^3/\text{mol}$) と結論し、単純な幾何学モデルにより、活性化体積 $\approx \text{const.}$ なることを説明している。しかし今回の結果は ΔV^\ddagger に対する置換基の極性効果の存在を示唆しており、Ludemann の言うような単純な分子モデルによる説明は困難である。

先に述べたように、遷移状態では $\chi=0$ とベンゼン環との共役の結果、電荷の非局在化が行なわれる。ところで、その度合いは、置換基の極性効果を受けるはずであり、例えば、電子供与性置換基は非局在化を助長し、その結果、溶媒和は弱まって遷移状態での部分モル体積の増大をもたらす。今ひとつの可能性は、原系における $\chi=0$ 面とベンゼン環面の同一平面性に対する置換基効果の存在である。すなわち電子供与性置換基は同一平面性を助けるが、吸引性置換基の場合は、同一平面性がいくぶんこなわれており、原系での部分モル体積が比較的大きくなる可能性がある。 ΔV^\ddagger に対する置換基効果については以上のような説明が可能であろうが、現段階では明確な結論を得るに到りていない。

- 1) H. Yamada, K. Fujino, M. Nakatsuka and A. Sera., Chem. Lett., 1979, 217
- 2) 山田, 西谷, 世良, 才16回 NMR 討論会 (1977) 要旨集 p 5
- 3) 山田, 西谷, 藤野, 世良, 才16回 NMR 討論会 (1977) 要旨集 p 144
- 4) H.S. Gutowsky and C.H. Holm., J. Chem. Phys., 25, 1228 (1956)
- 5) R. Raushschwalbe, G. Völkel, E. Lang and H-D. Lüdemann., J. Chem. Research (M), 1978, 5325

[序] 高圧下における溶液の高分解能 NMR の測定は, 山田らの耐圧セルの方法が成功して以来,¹⁾ 一般に行われるようになった。²⁾ 小川の研究は主として高圧下における低分子の挙動を扱ったもので,³⁾ 生体高分子に適用しはじめられた。本研究では, 高圧下におけるミオグロビン (Mb), γ globin (Hb), パルオキミジン等 γ 蛋白質の α プロトン NMR を 220 MHz にて耐圧セルおよび安全シヤケットを用いて測定し, γ 近傍の構造に及ぼす圧力効果を追究した。⁴⁾

[方法] 超伝導 NMR (220 MHz) のプローブに適用される高圧 NMR セルを 3 びに安全シヤケットを作成し, 1-2500 atm. の種々の圧力下で, γ 蛋白質の ^1H NMR スペクトルを 220 MHz PFT 法を用いて測定した。

耐圧セルは通常のカラスキャピラリー (3.3 mm O.D., 1.3 mm I.D.) を用い, 圧力指示溶液 (フェニルセクレン 95%, ミクロキサン 5%), 水銀, 試料溶液を含む。高圧発生は, 圧力指示溶液の熱膨張により, また内圧測定は, フェニルセクレン α エチルプロトンシフトの圧力依存性を利用する。²⁾

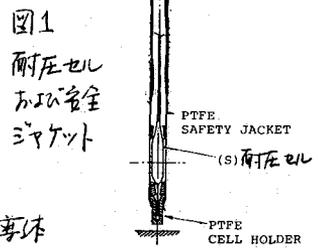
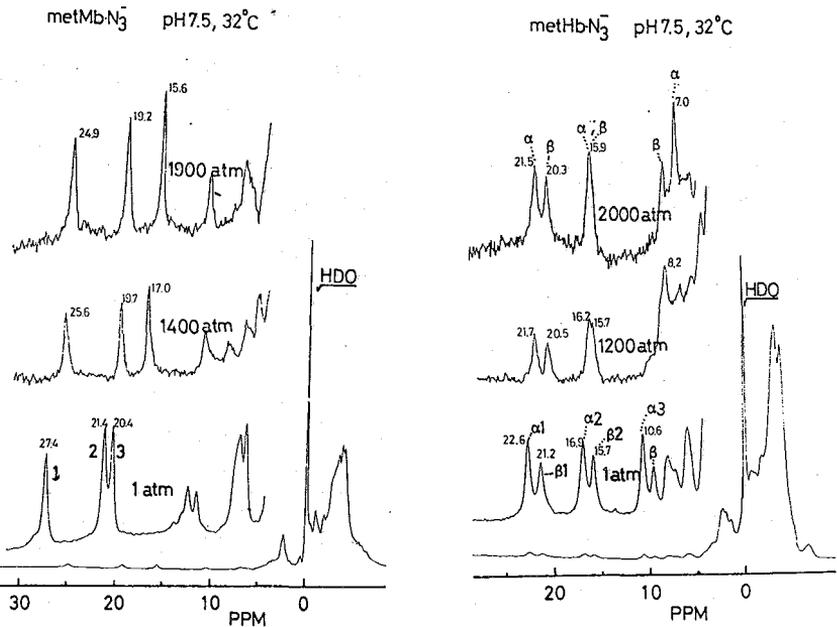
[結果および考察]

(A) γ 鉄の高スピン-低スピン平衡に及ぼす圧力効果.

Mb, Hb のアゾ²⁻錯体の ^1H NMR スペクトルに及ぼす効果を図 2 に示す。1 atm 下において高強場側に距離を測る γ 側鎖 $\times 4$ ルシグナル (3 種) は昇圧とともに高強場側にシフトしている。また図 3 に示すように, Mb の α シグナル, β シグナル

においては, 同様の圧力効果が認められる。一方 Mb CW, Hb CW では, 図 4 に示すように顕著な変化はみられなかった。すなわち γ 鉄 (III) の高スピン-低スピン平衡系にある MbN₃⁻, HbN₃⁻

図 2. MbN₃⁻, HbN₃⁻ の α プロトン常磁化シグナル (γ 側鎖 $\times 4$ 基) に及ぼす圧力効果.



Mb-Im, Mb-pyrazole において
このメチル基によるシフト
が観測された。これは
圧力下において蛋白質構
造に変化が生じ、鉄
への配位状態の変化を
通じて、スピ平衡が
低スピ側へずれたも
つと解釈される。同標
の圧力効果もUVスペク
トルによっても追えられ、
540, 580 nm (Mb-N₃ 222)

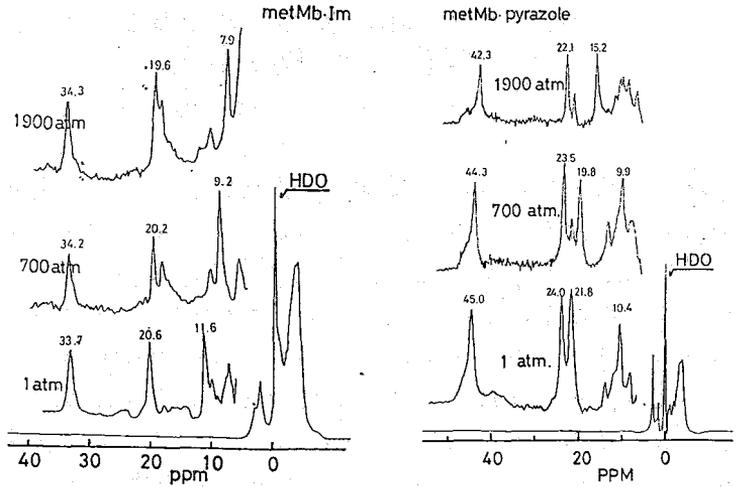


図3. Mbのイミダゾール、ピラゾール鉄体のHスペクトル
に及ぼす圧力効果。

表1.

Hyperfine Shifts (ppm from HDO signal) of the Heme Methyl Proton Signals in Purely Low and High Spin States for the Azide Complexes of Metmyoglobin (metMb-N₃⁻) and Methemoglobin (metHb-N₃⁺) at 33 °C¹

	Low-Spin form	High-Spin form
metMb N ₃ ⁻	3	13.1
	2	18.7
	1	22.7
metHb N ₃ ⁺	β3	6.1
	α3	4.1
	β2	14.0
	α2	14.2
	β1	19.0
	α1	19.3

¹ Taken from Iizuka and Morishima (1974) Biochim. Biophys. Acta. 371, 1., and Morishima et al. (1978) Biochim. Biophys. Acta. 534, 307.

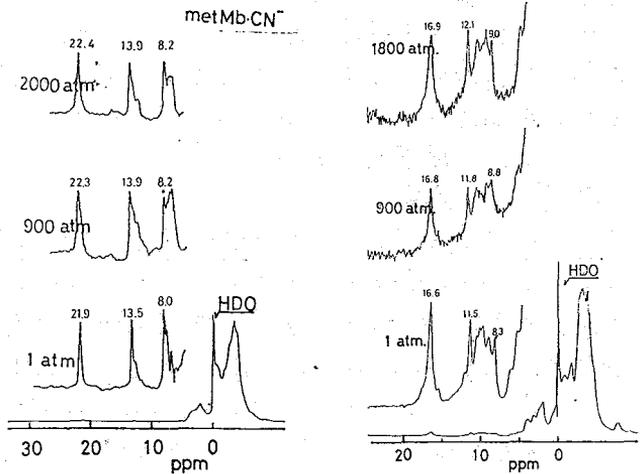


図4. Mb, HbのCN 誘導体(低スピ)のHスペクトル

表2.

Low Spin and High Spin Contents, and Observed and Simulated Hyperfine Shifts (ppm) of the heme methyl signals for azide complexes of metmyoglobin (metMb-N₃⁻) and Methemoglobin (metHb-N₃⁺) at 1 atm and high pressures at 32 °C.

	Pressure (atm)	Spin Content (%)		Observed Chemical Shift (ppm)					Simulated Chemical Shift (ppm)				
		Low spin	High spin	1			3		1			3	
				α1	β1	α2	β2	α3	α1	β1	α2	β2	α3
metMb-N ₃ ⁻	1	80	20	27.4	21.4	20.4			27.3	22.4	20.6		
	2000	93	7	24.9	19.2	15.6			24.3	19.9	15.7		
metHb-N ₃ ⁺	1	82	18	22.6	21.2	16.9	15.7	10.6	22.5	21.0	16.7	15.7	10.3
	1900	86	14	21.5	20.3	15.9	15.9	7.0	21.7	20.5	16.1	15.3	8.8

¹ Calculated with the use of the relation; (Shift)_{spin Equilibrium} = (low spin limiting shift) x (low spin content) + (high spin limiting shift) x (high spin content)

に認められる低スピンの吸収帯の吸収強さの増加を認めた。このNMRスペクトルの圧力効果も定量的に論ずるために、すでに当研究著らにより得られた $Mb \cdot N_3^-$, $Hb \cdot N_3^-$ の高スピン状態におけるNMR常磁性シフト、低スピン状態におけるシフト(表1, スピン平衡系のNMR常磁性シフトの解析より得られたもの)を用いて、高圧下における常磁性シフトを最も良く再現するように高スピン、低スピン含量を算出した。すなわち、スピン平衡における γ -鉄鎖×4の平均常磁性シフトは

$$(\text{常磁性シフト})_{\text{スピン平衡}} = (\text{低スピン状態におけるシフト}) \times (\text{低スピン含量}) + (\text{高スピン状態におけるシフト}) \times (\text{高スピン含量})$$

より、高圧下におけるスピン含量は上式を用い、観測された高圧下におけるシフトをシミュレーションすることにより得られ、結果を表2に示す。たとえば $Mb \cdot N_3^-$ においては、1atmでは γ -鉄鎖80%低スピン、20%高スピンを示すが

2000 atmでは93%低スピンとなり、低スピン含量が相当量増加している。この変化はUVスペクトルの圧力効果から得られた結果とも一致する。一方 $Hb \cdot N_3^-$ においては、 $Mb \cdot N_3^-$ にくらび圧力によるスピン含量の変化は小さく、かつ圧力による平均シフト変化が、 $Hb \cdot N_3^-$ の方が小さいに起因するものと思われる。

THE EFFECT OF HIGH PRESSURE ON THE HIGH SPIN-LOW SPIN EQUILIBRIUM

HEMOPROTEIN	PRESSURE (ATM)	LOW SPIN CONTENT (%)	HIGH SPIN CONTENT (%)	ΔV (ML/MOL) AT 32°C
$Mb \cdot N_3^-$	1	80	20	-15
	2000	93	7	
$Hb \cdot N_3^-$	1	82	18	-5
	1900	86	14	

またスピン平衡の圧力による変化に伴う体積変化 ΔV は、次式により与えられる

$$(\partial \ln K) / \partial p = -\Delta V / RT$$

ここで K は高スピン($s=5/2$)-低スピン($s=3/2$)平衡定数、 p は圧力、 R , T はそれぞれ気体定数、温度(°K)である。この圧力変化は表2のスピン含量の値から算出され、従って ΔV は表2の如く得られた。この ΔV の符号がマイナスに付くのは高圧下で蛋白質が contraction を起こすことである。Ogumola は⁵⁾UVスペクトルの圧力変化より $Mb \cdot H_2O$ (高スピン) + $N_3^- \rightleftharpoons Mb \cdot N_3^-$ (低スピン) 配位子交換に伴う $\Delta V = -11$ ml/mol と得たが、本研究におけるスピン平衡に伴う $\Delta V = -15$ ml/mol とよく対応を示す。高スピン-低スピン変化が γ -鉄鎖の構造変化のみに起因するのではなく、高スピン(γ -鉄鎖の平均値)から低スピン(鉄鎖平均内にある)への変化に伴う体積変化は $10 \sim 15$ ml/mol と見積もられ、従ってこの値は $\Delta V = -15$ ml/mol は、これはくわしく、スピン変化が蛋白質全体の構造変化に伴うものである。

(B) メトヘモグロビン、メトマイグロビン、ペルオキシダーゼの γ -鉄鎖における圧力効果

酸化型高スピン状態を示す aquomet Mb, aquomet Hb の NMR スペクトルに対する圧力効果を図5に示す。met Mb. ではスピン平衡系にあることを示す

第 2 日

11 月 5 日 (月)

北大理

吉田克彦

<序> 液体状態のNMRスペクトラム解析より得られる核スピン結合定数は、その結合が分子内電子を媒介として起こるので、分子の結合状態を反映する。プロトン間スピン結合は、主として *contact term* に帰因することから、注目している核に局所的に導入されたスピン密度の他の核への伝播として考えることができる。その伝播機構を、スピン結合している核間を隔てる *bond (coupling path)* の性格で表現することが、多く行われてきた(1)、平面共役系におけるスピン結合定数の導い、この電子伝達機構と π 電子伝達機構と分離し、それぞれの特徴を通じて理解する方法はその一つである。

π 電子によるスピン密度の伝達機構は、*coupling path* を構成しているおのおのの原子が系に供与する π 電子数によって、二つに大別される。(1) *coupling path* が系に π 電子を1ヶずつ与える原子から成る場合、 π スピン密度は隔てる *bond* 数にともない符号交代しながら、 π 電子の非局在性を反映してその大きさをゆっくりと減弱する。(2) *coupling path* が系に2ヶの π 電子を供与する原子を含む場合、 π スピン密度はその原子を含む *bond* を通じて急速にその大きさを減じ、又符号交代を必要としない。*Coupling path* を通じる π スピン密度の減衰の度合は二重結合性との関連で、議論されてきている。MO formalism で、McConnell は、 π 電子伝達機構による結合定数 J^{π} は、スピン結合しているプロトンに直接結合している原子間の結合次数の二乗に比例することを示した(2)。

$$J^{\pi} = \frac{B^2 Q^2 \gamma_{NH}^2}{h \Delta E}$$

ここで、 ΔE (一重項状態と三重項状態間の平均エネルギー) は本質的に正であるから、この表式は必ず正符号を与える。この表式は、*coupling path* によっての符号交代を説明することはできない。又、*bond* 数の増大に伴う π 電子スピン密度の減少の度合も数しあきる。例えば、ベンゼンにおける $^3J^{\pi}$ は、 $^2J^{\pi}$ とはほぼ同程度の大きさを持つが、この表式では、 $^3J^{\pi} \gg ^2J^{\pi}$ を与える。

SOS-VB法によって計算された J^{π} と*coupling path*の*bond*数、*bond*の二重結合性の関係は、Bartfieldによって報告された(1)。

$$^n J^{\pi} = -1.7 (-1)^r (0.56)^s$$

ここで、 r は*coupling path*の炭素間二重結合の数、 s は一重結合の数である。この表式は、 π スピン密度は炭素間二重結合を通じてほぼ同様に減衰せず、一重結合を通じてやく44%減衰することを示している。しかし、SOS-VB法によって計算された $^3J^{\pi}$ は、*coupling path*の二重結合性を反映していないように見える。シクロペンタジエンで、二重結合に関して $^3J^{\pi} = 2.29 \text{ Hz}$ 、一重結合に関して、 $^3J^{\pi} = 0.86 \text{ Hz}$ 、他方ベンゼンに対して $^3J^{\pi} = 0.76 \text{ Hz}$ を与える。

実験的にπ電子伝達機構の大きさや符号を得ることのできるMRT法(メチル置換法)は、少くとも $J_{HH'}$ に関してπ-bondの結合次数の二乗依存性を与える(3)。

これらの報告は、π電子伝達機構とそのcoupling path、二重結合性に関する点について、一貫したデータがないことを示している。INDO-FPT法によって計算されたπ電子伝達機構 $J_{HH'}$ は、炭化水素ばかりでなく、hetero原子を含む系に対しての long-range coupling を十分に説明した。又 $J_{HH'}$ が結合次数の二乗に比例することも示した(4)。coupling path が2つあるいは3つの炭素間π結合を含む場合について、π電子伝達機構 $J_{HH'}$ の二重結合依存性を調べたので報告する。又 hetero原子を含むπ結合の二重結合性と、π電子伝達機構 $J_{HH'}$ についても、報告する。

<計算方法> プロトン間スピン結合定数に対するπ電子伝達機構 $J_{HH'}$ 、π電子スピン密度、結合次数等は、INDO近似の finite perturbation theory によって計算された(5)。π電子伝達機構 $J_{HH'}$ は次の様に計算される。contact term に基づく振動ポテンシャル $h_{HH'}$ を含んだ形で、SCF計算から必要な精度まで解かれる。この時、分子の各場所にスピン密度が生じる。 $J_{HH'}^{total}$ は、次式で与えられる。

$$J_{HH'}^{total} = A \rho_{H'}(h_{HH'}) \quad [\rho_{H'}: \text{水素H'のスピン密度}]$$

同様にして、π系にスピン密度が生じない条件下のもとで解かれ、π電子伝達機構 $J_{HH'}^{\pi}$ が得られる。π電子伝達機構 $J_{HH'}^{\pi}$ は、次式で定義される。

$$J_{HH'}^{\pi} = J_{HH'}^{total} - J_{HH'}^{\sigma}$$

π電子伝達機構 $J_{HH'}^{\pi}$ は、SCF計算から同時に得られる核H'が結合している原子N上のπ電子スピン密度 ρ_N^{π} より、次式で良く再現することができる(6)。

$$J_{HH'}^{\pi} = A_{N-H'} \rho_N^{\pi}(h_{HH'})$$

このことは、π電子伝達機構 $J_{HH'}^{\pi}$ が coupling path のπ電子スピン密度によって、伝播の様子を表現できる訳で、一般にH'の結合していない原子を通じてのスピン密度の伝播の様子も知ることができる。

<結果> 計算された分子は、エチレン誘導体、ブタジエン誘導体、五員環、六員環、五員環のベンゼン誘導体、インドリジン等である。図1に示された様に $J_{HH'}$ は、プロトンH、H'がそれぞれ結合している炭素-炭素間の結合次数の二乗に比例する。この結果は、McConnell によって表られた関係、およびMRT法の結果と一致する。

次に、coupling path が2つあるいは3つのπ結合を含む場合について、みてみよう。Barfield によって与えられたように、coupling path のbondの二重結合性に注目しながら伝播の様子を、ブタジエンを例として調べてみる(図5)。本計算結果は、SOS-VB法の結果とよく分照している。πスピン密度は、炭素4の方が炭素3よりも、その強さにおいて大きくなっている。この結果は、Barfieldによ

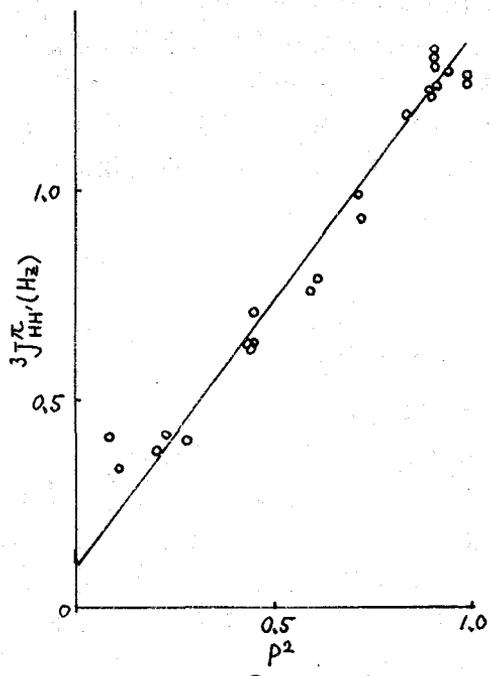


图 1

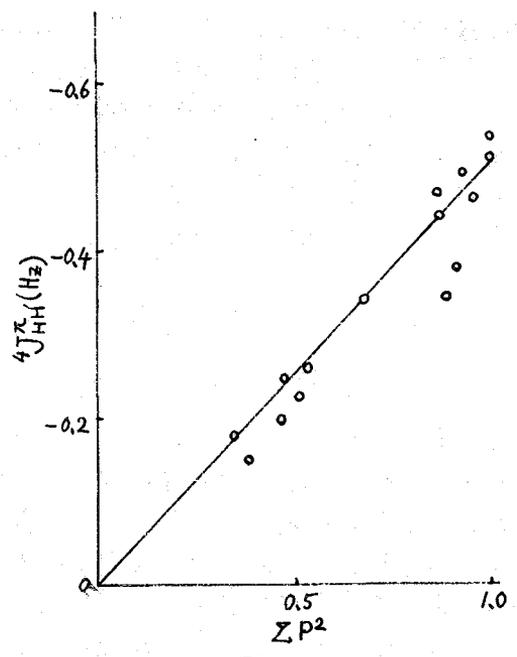


图 2

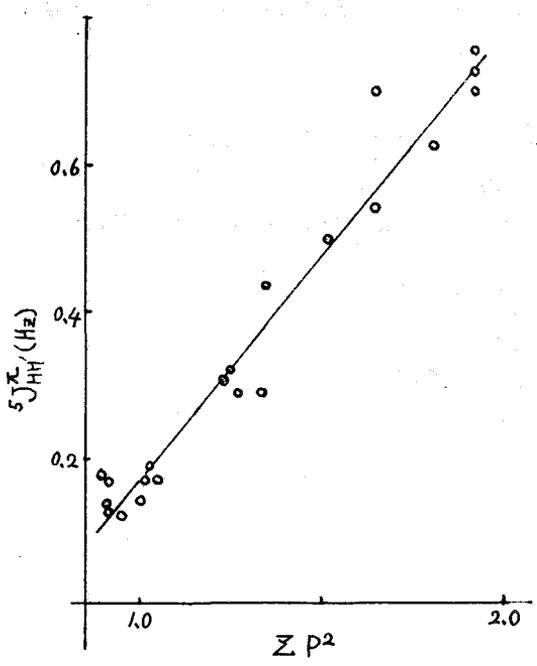


图 3

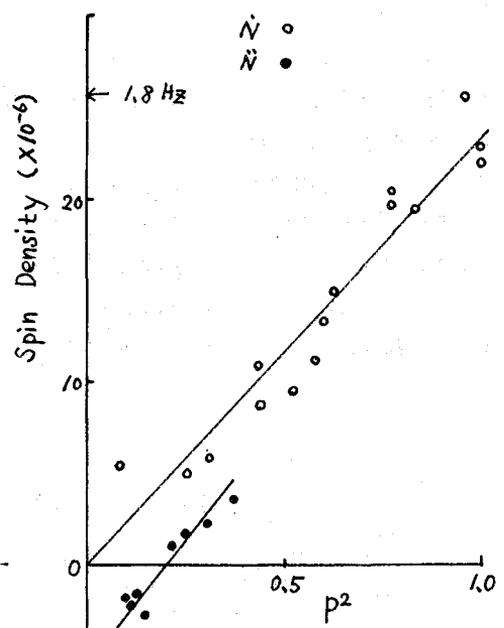


图 4

与えられた様な簡単な関係は得にくいことを意味する。それ故、 ${}^3J^{\pi}$ と ${}^4J^{\pi}$ とを別々の式に表すことを考える。1つの π -bond を含む coupling path の場合に結合次数に依存性があるから、一般に個々の π bond の結合次数の関数と仮定して、できるだけ簡単な表式をさがしてみた。結果は、図2、図3に示した。 ${}^3J^{\pi}$ 、 ${}^4J^{\pi}$ とも、その coupling path の個々の bond の結合次数の二乗の和に近似的に比例する。これらの結果は、少くとも、coupling path の bond の二重結合を反映していることを示している。

$${}^3J^{\pi} = 1.25 P_{N_1N_2}^2 + 0.10$$

$${}^4J^{\pi} = -0.50 P_{N_1N_2}^2 \quad P_{N_1N_2}^2 = P_{N_1N_2'}^2 + P_{N_1N_2''}^2$$

$${}^5J^{\pi} = 0.60 P_{N_1N_2N_3}^2 - 0.42 \quad P_{N_1N_2N_3}^2 = P_{N_1N_2N_3'}^2 + P_{N_1N_2N_3''}^2 + P_{N_1N_2N_3'''}^2$$

これらの式の、特に ${}^4J^{\pi}$ と ${}^5J^{\pi}$ についての物理的背景は明らかではない。

次に、coupling path に窒素分子を含む場合について見てみよう。窒素は炭に1つの π 電子を与える場合と2ヶ与える場合がある。1つの π bond を含む場合について、結果を図4に示した。N原子が炭に1つの π 電子を与える場合、その窒素原子に通常水素原子は結合していないので、縦軸はN原子上の π 電子スピンの密度をとった。contact term による摂動は炭素原子に結合している水素に加えられた。N原子が炭に1つの π 電子を供与する場合、炭素-炭素 π bond の場合と同様であるが、N原子が炭に2つの π 電子を与える場合、結合次数のある値を境にして、その符号が異なる結果が得られた。いずれの場合も、結合次数への依存性が見いだされた。

Reference

- 1) M. Barfield and B. Chakrabarti, Chem Rev, 69, 757 (1969)
- 2) H.M. McConnell, J. Mol Spectroscopy, 1, 11 (1957)
- 3) R.E. Wasylshen, J.B. Rowboham, and T. Scaesfer, Can. J. Chem. 51, 953 (1973)
- 4) K. Yoshida 74年分子構造討論会予講集
- 5) K. Yoshida Chem Phys. 21, 317 (1977)
- 6) K. Yoshida 74年 NMR 討論会予講集

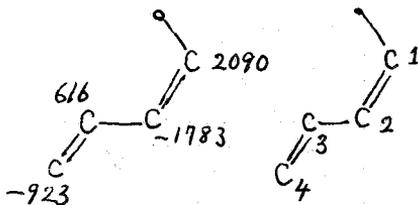


図5 π スピン密度 ($\times 10^8$) C ナンバー

北大理
吉田克彦

〈序〉 MRT法 (*methyl Replacement Technique*) は、プロトン間スピン結合定数に対するπ電子伝達機構を実験的に見積る方法である。この方法に対する実験的な背景は、ESRの超微細結合定数である。πラジカルのプロトン超微細結合定数と、そのメチル誘導体のメチル基のプロトン超微細結合定数との関係に依拠している。理論的には、メチル基の超共役として考えられた(1)。同様のスピン密度の伝達機構が予測されることから、NMRのプロトン間スピン結合定数に対するπ電子伝達機構を見積るのにしばしば適用された。特に、π電子伝達機構は理論的に計算上の理由から、炭化水素のみ報告されたが、MRT法は *ketene* 原子を含む系のπ電子伝達機構の大きさ、符号、異性を知る等に多くの分子に適用された(2)。MRT法によって見積られるプロトン間スピン結合定数に対するπ電子伝達機構は、そのメチル誘導体のメチルプロトン-プロトン間スピン結合定数 $J_{\text{CH}_3-\text{H}}$ から、次の様に定義される。

$${}^n J_{\text{HH}'}^{\pi} = \frac{(\alpha_{\text{H}'})}{J_{\text{CH}_3-\text{H}}}$$

ここでαの符号は、メチル基によって置換された炭素とに比較して *coupling path* の bond が1つ増したためによる。MRT法による結果と、INDO近似の *finite perturbation theory* (INDO-FPT) によって計算されたπ電子伝達機構は、多くの点で良い一致を示したが、いく分異なる結果も与えた。この点を調べる為に、INDO-FPT法によって、 $J_{\text{CH}_3-\text{H}}$ に対するπ電子伝達機構とπ電子伝達機構を計算し、メチル基のコンフォメーションに関して、何点か計算を行った。

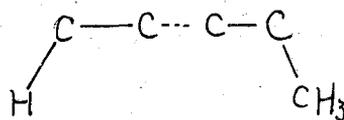
〈計算方法〉 メチルプロトン-プロトン間スピン結合定数 $J_{\text{CH}_3-\text{H}}$ は、INDO-FPT法により計算された。メチル基のいろいろなコンフォメーションに関しての電子とπ電子を分離することが困難であるので、π電子伝達機構は、メチルプロトンに *contact term* の振動ポラリザビリティを加えた時、他のプロトンが結合している炭素原子のπ軌道に生ずるπ電子スピン密度から、次式で求められる。

$$J_{\text{CH}_3-\text{H}}^{\pi} = A_{\text{C-H}} \rho^{\pi}(\text{CCH}_3)$$

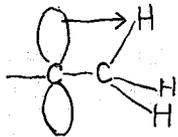
ここで、 $A_{\text{C-H}}$ は、ほぼ bond C-H に関係する量で、メチル基のコンフォメーションに依らず存在しないと考えられる。 $\rho^{\pi}(\text{CCH}_3)$ は、C-H bond の炭素原子上のπ電子スピン密度である。π電子伝達機構は、この時

$$J_{\text{CH}_3-\text{H}}^{\alpha} \equiv J_{\text{CH}_3-\text{H}}^{\text{total}} - J_{\text{CH}_3-\text{H}}^{\pi}$$

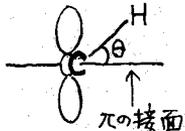
として定義する。メチル基は、単一の為自由回転しているものと仮定する。自由回



転していなければ、主要なコンフォメーションについて平均化すればよい。メチル基の水素は、メチル基が結合している炭素のπ軌道から直接スピン密度の伝達を受ける。水素とπ軌道との混合は $\sin\theta$ 依存性を示すので、水素に誘起されるスピン密度は $\sin^2\theta$ 依存性を示す。水素がπ系の持面にある時 ($\theta=0^\circ$) でもスピン密度の伝達はあるが、非常に小さいとすれば、次式の関係が期待される。



$$\pi J_{CH_3-H} = A \sin^2 \theta + B$$



自由回転を仮定して平均をとると、

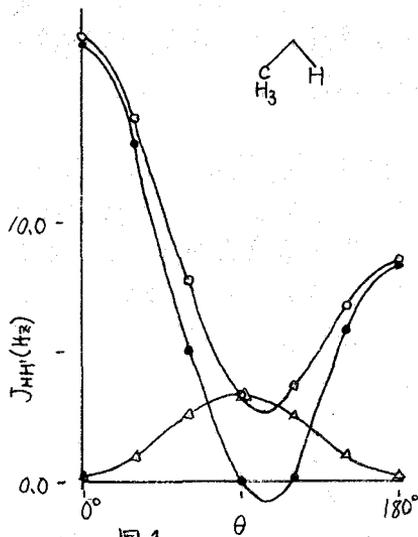
$$\pi J_{CH_3-H} = \frac{A}{2} + B$$

<結果> 表1に、ベンゼンの各 coupling のπ電子伝達機構について、INDO-FPT法とMRT法およびそのσ電子伝達機構とπ電子伝達機構を示した。ベンゼンの

表1. ベンゼン

	INDO-FPT	Exp.	MRT ($-J_{CH_3-H}$)	π	σ
J_{ortho}	0.61	0.75	0.88	0.78	0.1
J_{meta}	-0.44	-0.36	-0.50	-0.48	-0.2
J_{para}	0.52	0.62	0.65	0.65	0.0

計算結果より、 J_{meta} はσ電子伝達機構がいく分残っているが、おおむねMRT法の正当性を保証している。図1はブタジエン分子の geminal coupling に対する J_{CH_3-H} の結果である。σ伝達機構が大半にのこっている。図2は、ブタジエンの



- Total
- △ π電子伝達機構
- σ電子伝達機構

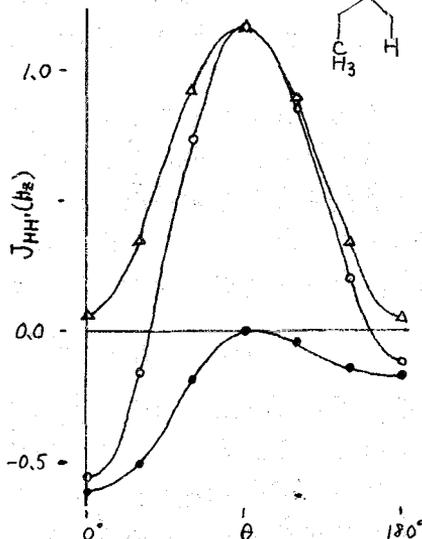


図2

hold型のJの結果で、メチル基とプロトンの空間的接近のため、σ機構が残って、π機構と打消可傾向を示す。keto 原子を含む他の種々の場合についての結果を報告する予定である。

Reference 1) R.A. Hoffman, Mol. Phys., 1, 326 (1958)

2) T. Schaefer and J.M. Rowbotham, Can. J. Chem., 52, 489 (1974)

(東大・生研) ○ 鯉江泰行, 篠田純雄, 有藤泰和

1. はじめに.

白金は核スピン $1/2$ を持つため、錯体の NMR スペクトルから核スピン結合定数と化学シフトの知見をもとに、配位子との結合性格を検討することができる。すでに、白金(II)-オレフィン、または、カルボニル錯体¹⁾ および、 β -メトキシアルキル水銀²⁾ では中心金属-炭素核スピン結合定数は Pople, Santry の理論³⁾ に基づく相互分極率 $\pi(\text{MC})$ で理解され、かつ、M-C 結合の結合性をよく反映することを報告した。本研究では、2つの磁気的に非等価なホスフィン配位子をもち、ほぼ平面正方形で結合論的に取り扱える $[\text{Pt}(\text{R}=\text{CR})_2(\text{PPh}_3)_2]$ 、さらに、一連のアセチレン-白金(II)錯体 $[\text{Pt}(\text{R}=\text{CR})(\text{PPh}_3)_2]$ の JAP 値について EHM O 計算を通して検討し、さらに、アセチレン錯体における ^{195}Pt の化学シフトが、アセチレンの違いなどの様上反映しているかについて計算を通して明らかにしようとして試みた。

2. 実験と計算

一連の $[\text{Pt}(\text{R}=\text{CR})(\text{PPh}_3)_2]$ ($\text{R}=\text{Et}, \text{Me}, \text{H}, \text{Ph}, \text{COOR}, \text{CN}, \text{CF}_3$) は、既知の方法で合成した。 ^{195}Pt NMR の測定は、日本電子製 FX-100 (印度プロブ) (21.28 MHz)、 ^{31}P NMR は FX-60 (24.15 MHz) 分光計で行った。NMR 試料は、0.2 M CH_2Cl_2 溶液とした。

量子化学的計算は、振張ヒュッケル法による。Slater 関数の指数係数と未分方程式の対角要素 (σ - π 積分) は、配位原子については Burns⁴⁾ と Basch⁵⁾ の値を採用し、白金原子は、Cotton⁶⁾ の提案に従った。共鳴積分は、Wolfsberg-Helmholtz 式により評価した。 σ - π 積分の電荷感度因子を各原子につき、単位荷電当り 20 eV とし、Mulliken population analysis により求めた電荷が自己無撞着となるまでくり返し行なった。 $[\text{Pt}(\text{R}=\text{CR})_2(\text{PPh}_3)_2]$ の結合角および距離は、X 線構造解析で報告されている値を用い、Pt-H 距離 ($\text{X}=\text{H}$) は、160.7 とした。 $[\text{Pt}(\text{R}=\text{CR})(\text{PPh}_3)_2]$ については、報告されている $[\text{Pt}(\text{Ph}=\text{CPh})(\text{PPh}_3)_2]$ の値¹⁰⁾ で $\text{R}=\text{C}_2$ 部分と同定し、アセチレンの置換基のみを置き代えた、 $\text{R}=\text{C}_2$ 部分は平面とした。また、簡単のため、ホスフィン配位子は PH_3 に代えて計算を行なった。

3. 結果と考察

Pople, Santry の理論³⁾ によると、核スピン結合定数は次式で与えられ、結合 (couple) している原子 AB 間の s 性格は、原子 A, B 間の原子価 s 軌道相互分極率 $\pi(\text{AB})$ と関係づけられる。

$$J(\text{AB}) = (16\hbar^2 \mu_B \beta^2 / 4) [S_A(0)]^2 [S_B(0)]^2 \pi(\text{AB})$$

$$\pi(\text{AB}) = -4 \sum_{\mu}^{\text{occ}} \sum_{\nu}^{\text{occ}} (E_{\nu} - E_{\mu})^{-1} C_{\mu A} S_{\mu B} C_{\nu A} C_{\nu B}$$

$[\text{Pt}(\text{H}_3(\text{PMe}_2)(\text{CF}_3)_3)(\text{PF}_6)]^{8)}$ および、 $[\text{Pt}(\text{H}(\text{PEt}_3)_3)(\text{CF}_3\text{CO}_2)_2\text{H}]^{11)}$ の JAP 値と、 $[\text{Pt}(\text{PPh}_3)_3]$

こいえ やすゆき しのだ すみお さいとう やすかず

(X=CH₃, H)の両錯体について算出した相互分極率 $\pi(PtP)$ を表1に示した。 $[Pt(CH_3)(PPh_3)]^+$ の2つの磁気的に非等価なリン原子と白金との相互分極率の値は、メチル基に cis 位のリンと白金との値 $\pi(PtP^c)$ が、メチル基に trans 位の値 $\pi(PtP^t)$ より大きく、その比 ($\pi(PtP^c)/\pi(PtP^t)$) は、ほぼ1.5となっており、核スピン結合定数の比 ($J(PtP^c)/J(PtP^t)$) の値によく見合っている。同様に、 $[PtH(PPh_3)_3]^+$ の $\pi(PtP^c)/\pi(PtP^t)$ は約1.2と、 $J(PtP)$ 値の比にほぼ一致した。磁気的に非等価な2つのホスフィンは、いずれも同一の白金に結合しているのど、Fermi 接触項に寄与する $[S_{Pt}(0)]^2$ (白金の s 電子密度) は、両錯体定数にと、2

Table 1 Coupling constant and mutual polarizability of $[PtX(PH_3)_3]^+$

X	$J(PtP^c)^*$	$J(PtP^t)$	$J(PtP^c)/J(PtP^t)$	$\pi(PtP^c) \times 10^{-2}$	$\pi(PtP^t) \times 10^{-2}$	$\pi(PtP^c)/\pi(PtP^t)$
CH ₃	2822	1865	1.51	0.192	0.130	1.48
H	2515	2037	1.24	0.208	0.166	1.25

* Units in Hz. ** Units in eV⁻¹.

共通である。また、算出されたリンの s 電子密度 $[S_{Pt}(0)]^2$ は、メチル錯体の Pt^c 1.406、Pt^t 1.403、ヒドリド錯体の Pt^c 1.402、Pt^t 1.379 とほぼ等しい。ゆえに、 $J(PtP^c)/J(PtP^t)$ では、 $[S_{Pt}(0)]^2$ と $[S_{Pt}(0)]^2$ の項は相殺されることとなるから、 $\pi(PtP^c)/\pi(PtP^t)$ が核スピン結合定数の比によく見合っているのはまことに合理的である。また、メチル錯体の Pt^c の d 軌道と Pt の 6s 軌道の overlap population は 0.18 と、Pt^t の値 0.15 より大きく、 $\pi(PtP)$ の傾向とよく見合っている。ヒドリド錯体においても、同様の傾向が認められた。population 解析からは、Pt の 6p、5d 軌道の Pt-P 結合に対する寄与は重要ではないことがわかった。したがって、 $J(PtP)$ は、Pt-P 結合における結合成分の強さを反映するものと考えられる。

Table 2 ¹⁹⁵Pt and ³¹P resonance data of $[Pt(RC \equiv CR)(PPh_3)_2]$

	RC≡CR'	δ_{Pt}/ppm	δ_P/ppm	$J(PtP)/Hz$
1	PhC≡CPh	-208.4	27.1	3452
2	PhC≡CMe	-194.2	29.5 28.2	3377 3454
3	PhC≡CCOOMe	-176.6	26.3 24.5	3403 3741
4	PhC≡CH	-156.5	31.0 27.1	3464 3547
5	EtC≡CEt	-156.0	30.4	3425
6	MeC≡CMe	-141.2	31.2	3420
7	HC≡CH	-124.8	29.1	3626
8	EtOCOC≡CCOEt	-122.4	24.5	3722
9	MeOCOC≡CCOOMe	-119.7	23.8	3722
10	CF ₃ C≡CCF ₃	-112.2	21.0	3595
11	CF ₃ CH ₂ OCOC≡CCOOC ₂ H ₅	-92.5	23.8	3726
12	CNC≡CH	-40.3	26.5 25.7	3434 3887
13	CNC≡CCN	53.4	21.3	3696

表2には、 $[Pt(RC \equiv CR')(PPh_3)_2]$ の ¹⁹⁵Pt, ³¹P NMR 定数の測定値をまとめて示した。¹⁹⁵Pt 化学シフトは、Gogginらの提案に従い、21.4 MHz を基準として磁場側を正とした。³¹P 化学シフトは、85% H₃PO₄ からの値を示した。図1には、Ptセチレン-

Goggin, Goodfellowら¹²⁾は、白金(II)錯体 $[Pt(X)_2L]$ ($X=Cl, Br, I, L=NMe_3, PMe_3, AsMe_3, SbMe_3$ 等)の白金シフトが、中心金属と配位するLとの共有結合性を補正した励起エネルギー項で理解できることを報告した。図3には、一種の $[Pt(RC=CR')(PPh_3)_2]$ の白金化学シフトと、 $[Pt(RC=CR')(PPh_3)_2]$ をモデルとする計算で得られた励起エネルギーの逆数 (ΔE^{-1}) とをプロットした。励起エネルギーとしては、HOMO である白金の軌道から、LUMO または、LUMO 近傍にある白金の σ 軌道とアセチレン π^* とから成る分子軌道準位へのエネルギー差を選んだ。図から明らかになるように、白金化学シフトと ΔE^{-1} との間には正の相関関係がみられた。白金の充満軌道のエネルギー準位はどの錯体でもほとんど差がない。一方、励起エネルギーの値は主に空いたアセチレンの π^* エネルギー準位で決まるので、電子吸引性の置換基をもつアセチレンほど π^* 軌道がはいから、その錯体の白金シフトはより負の値にみられることになる。

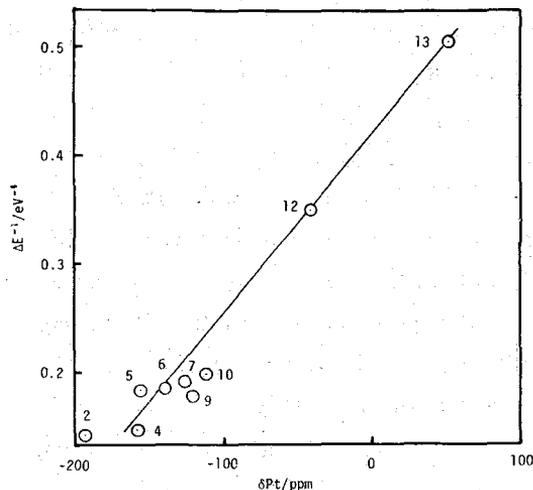


Fig 3
Correlation of observed ^{195}Pt chemical shift with calculated reciprocal transition energy for $[Pt(RC=CR')(PPh_3)_2]$

¹³⁾ P 化学シフトは多くの試みにもかわらず、まだよく理解されるに至っていない。アセチレン白金(II)錯体について測定された δP シフトは、白金シフトとは逆方向にシフトする傾向が認められたが、白金シフトと同様に取扱った δE^{-1} とは関連がなかった。リン原子の電子密度単独では、リンシフトと関連性がみられない。リンと白金との結合次数も含めた複数の項が寄与してはいるのではないかと考えられる。

- 1) T. Iwayanagi and Y. Saito, Chem. Lett., 1193 (1976)
- 2) T. Iwayanagi, T. Ibusuki and Y. Saito, J. Organometal. Chem., 128, 145 (1977)
- 3) J. A. Pople and D. P. Santry, Mol. Phys., 8, 1 (1964)
- 4) G. Burns, J. Chem. Phys., 41, 1521 (1964)
- 5) H. Basch, A. Viste and H. R. Gray, Theoret. Chim. Acta, 3, 458 (1965)
- 6) F. A. Cotton and C. B. Harris, Inorg. Chem., 6, 369 (1967)
- 7) M. Wolfsberg and L. Helmholz, J. Chem. Phys., 20, 837 (1952)
- 8) L. Manojlovic-muir, K. W. Muir, T. Solomon, D. W. Meek and J. L. Peterson, J. Organometal. Chem., 146, C26 (1978)
- 9) R. E. Caputo, D. K. Mark, R. D. Willett, S. G. N. Roundhill and D. M. Roundhill, Acta Cryst., B33, 215 (1977)
- 10) J. O. Glanville, J. M. Stewart and S. O. Grim, J. Organometal. Chem., 7, p9 (1967)
- 11) T. W. Dingle and K. R. Dixon, Inorg. Chem., 13, 846 (1974)
- 12) P. L. Goggin, R. J. Goodfellow, S. R. Haddock, B. F. Taylor and I. R. H. Marshall, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 459 (1976)
- 13) S. S. Dharmatti and C. R. Kanakan, J. Chem. Phys., 31, 1436 (1960)
- 14) N. F. Ramsey, Phys. Rev., 78, 699 (1950)
- 15) J. D. Kennedy, W. Mcfarlane, R. J. Puddephatt and P. J. Thompson, J. Chem. Soc., Dalton, 874 (1976)
- 16) P. S. Pregosin and R. W. Kunz, " ^{31}P and ^{13}C NMR of Transition Metal Phosphine Complexes", Springer-Verlag Berlin 1979

(分子研・石工大) 岩村 秀・菅原 正・川田勇三・加藤守
松・高橋憲助

§ 1. はじめに

近年の FT-NMR の技術的進歩により、連続可変の周波数発振器と、広範囲の周波数に同調がとれるプローブを組み合わせた機種が市販されるようになり、天然同位体存在比核種 (^{17}O , ^{29}Si , ^{77}Se など) の NMR 測定がルーチンなものになりつつある。我々は、有機化合物における酸素原子の重要性に鑑み、種々の含酸素化合物の ^{17}O NMR (天然存在比 0.037%, $I = -\frac{5}{2}$, 四極子能率 $-2.6 \times 10^{-26} \text{ cm}^2$) の測定を行ない、1) 酸素を含む官能基の同定に、極めて有用であること、2) 分子構造、特に酸素を含む分子内相互作用の研究に有効な手段となりうることなどを明らかにしてきた。²⁾ 一般に、酸素を含む有機化合物は、一配位酸素化合物 ($X = \text{O}$, カルボニル酸素など) と、二配位酸素化合物 ($R-O-X$, エーテル, アルコール酸素など) に大別される。このうち、一配位酸素化合物に関しては、従来化学シフトを赤外の基準振動数や紫外スペクトルの $n-\pi^*$ の極大吸収波長と相関させた報告が³⁾ 二、三みられるが、二配位酸素化合物の化学シフトを系統的に整理しようという試みはまだ十分とはいえない。そこで、今回二配位酸素化合物に着目し、これらの化学シフトを検討し、より包括的に理解する為により有用ないくつかの経験則を見出した。又、酸素原子上の電荷密度と、化学シフトとの相関をより定量的に検討したいと考え、その目的にかたう糸として、一連の m -、 p -置換アニソール類を選び、 ^{17}O 化学シフトの測定を行った。その結果、 p 位の置換基の σ^- 定数と、 ^{17}O 化学シフトとの間に良好な直線関係が成立することが明らかになった。

§ 2. 実験法

^{17}O NMR の測定には、Varian 社の FT-80A を使用した。共鳴周波数 10.782 MHz。天然同位体存在比試料の 25~50% 重クロロホルム溶液を 10 mm サンプル管に詰め、内部ロック法により測定した。スペクトル幅 (SW) 8000 Hz, フーリエ変換点 (FN) 16384。共鳴線の半値幅が広く (通常 100 Hz 前後) 緩和は極めて速いと考えられるので、90°パルスを用い、サンプリング時間 (AT) は 0.02 秒、従ってデータポイント数 ($DP = 2 \cdot AT \cdot SW$) 320 とした。低周波数領域でのパルスの切れの悪さからくるベースラインのうねりをとけるため、待ち時間としては 800~1000 μ 秒を設定した。化学シフトは、発振器の周波数から吸収極大の周波数を読みとり、同一条件下での同軸細管中の中性の水の酸素からの相対シフトに換算した。装置からの精度は $SW/FN = 8000 \text{ Hz} / 16384 = 0.5 \text{ Hz}$ であるが、共鳴線の半値幅が広い為、極大位置の読みとり誤差が大きく、精度としては、 \pm / ppm ($\pm 10 \text{ Hz}$) が妥当と考えられる。

§ 3. ^{17}O NMR の一般的性質及び特徴

いわむら いいず・すがわら ハダシ・かわだ ゆうぞう・おかとう もりまつ・バカハシ けんすけ

1. 測定感度

^{17}O の同位体存在比は、0.037%。一定の磁場における核1個当りの検出感度は 2.91×10^{-3} であるから ^1H の 10^{-5} のオーダー又 ^{13}C の $1/10$ である。

2. 化学シフト

^{17}O の化学シフトの範囲は 8000 Hz に及ぶ、 ^1H 、 ^{13}C と比べて著しく広い。しかし半値巾が通常 100 Hz 前後と広い為、情報量を過大許容することは危険であろう。 ^{17}O の化学シフトは ^{13}C の場合と同様常磁性遮蔽項が支配的であり、Pople の近似式に従えば式(1)のように表わされる。

$$\sigma_p = \frac{-e^2 \kappa^2 \langle r^{-3} \rangle}{2m c^2 \langle \Delta E \rangle} (Q_{AA} + \sum_{AB} Q_{AB}) \quad (1)$$

Q_{AA} ... 原子A上の電荷密度の関数
 Q_{AB} ... AB間の結合次数の関数

$\langle r^{-3} \rangle$... 2p電子軌道半径の-3乗の平均値
 $\langle \Delta E \rangle$... 平均励起エネルギー

即ち、化学シフトを決める要因としては、 $\langle r^{-3} \rangle$ で代表される電荷密度及び平均励起エネルギーが挙げられる。

3. 半値巾

一般に四極子緩和をもつ核は四極子緩和が支配的TF為、共鳴線の半値巾は四極子緩和時間の逆数で表わされる。即ち、測定条件としては粘度の小さな溶液を比較

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{T_1} \approx \frac{1}{T_1} = \frac{3}{125} \left(1 + \frac{\eta}{3}\right) \left(\frac{e^2 Q q}{h}\right)^2 \tau_c \quad (2)$$

$$\tau_c = 4\pi\eta \frac{a^3}{3kT} \quad (3)$$

η ... 異方性パラメーター

$e^2 Q q/h$... 四極子結合定数

τ_c ... 分子全体の回転運動の相関時間

的高温で測定することが半値巾を小さくすることに有効であることを教えている。

§4. 二配位酸素化合物の化学シフトにおける二、三の経験則

1. α 効果 (酸素原子に直結する原子の効果)

種々の原子に直結した二配位酸素化合物の化学シフトを比較すると、水の酸素は最も高磁場側に、又、オゾンの中央の酸素は最も低磁場側にあることがわかる。³⁾ 即ち、 α 位の原子の電気陰性度が増大する程、低磁場へシフトする傾向が認められる。 ^{17}O 化学シフトを、隣接原子の電気陰性度の対プロットすると図1のように、1電気陰性度当り 270 ppm の傾きをもつ直線が得られた。これは、 ^{13}C 化学シフトの同様のプロットから得られる直線の傾きの約6倍に相当する。

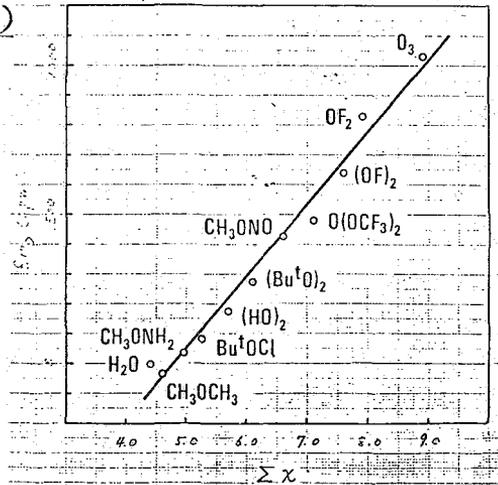


図1 $\delta^{17}\text{O}$ vs 電気陰性度

2. β 効果 (α 炭素上の置換基効果)

ジメチルエーテルの水素原子を順次メチル基で置換したジエチルジイソプロピル、ジブチルエーテルの ^{17}O 化学シフトは夫々、 δ -42, 16, 64, 90 ppmと段階的に低磁場に移行する。即ち、置換基の電子供与性が增大する程低磁場シフトしており(1)式の電荷密度の関係する $\langle \delta^2 \rangle$ や

Q_{AA} の部分では説明できず、平均励起エネルギー $\langle \Delta E \rangle$ の部分が大きき寄与しているものと推定される。第1次近似として、これらのシフトをイオン化電位の逆数とプロットすると、図2の良好な直線が得られ、この推論が裏付けられた。鎖状エーテルのかわりに環状エーテルもこの直線にのるが、オキシランは予想されるよりも遙かに低磁場に及ぶ点をもつ。²⁾又、アルコール類も同様の直線を与えている。

メチルプロピルエーテル(δ -18)の β メチレン基を酸素で置換したジメトキシエタン(δ 10)では28 ppmの低磁場シフトが認められた。又、ジプロピルエーテルの両側の β メチレン基と酸素で置換したビスメトキシメチルエーテル(δ 65)では、丁度2倍の56 ppmの低磁場シフトが観測され、加則性が成立する。

3. α 効果(炭素上の置換基効果)

^{17}O 化学シフトにおいても、 ^{13}C 化学シフトの場合と同様の α 効果が指摘されている。即ち、エチルメチルエーテルの α 水素を順次メチル基で置換すると、夫々6.5, 2.5 ppmの高磁場シフトが観測されている。ところで、ブチルメチルエーテル(δ -18)の α 炭素を酸素に置き換えた1,2-ジメトキシエタン(δ -23)では5 ppmの高磁場シフトが認められた。同様の高磁場シフトはジエチルグリコールジメチルエーテル(ジブチルエーテルより6.5 ppm高磁場)、 β -ジオキサン(テトラヒドロピランより11 ppm高磁場)にも観測されており、酸素原子の α 効果が炭素原子より大きいことを示している。その他同様の効果はハロゲン原子にも認められた。

3.5. 芳香環を介した置換基の効果 — アニソール類の ^{17}O 化学シフト —

芳香環を介した置換基の影響を検討する為、16種の m -, p -置換アニソール類の ^{17}O NMRの測定を行った。この系は、置換基の電子的効果のみをとり出して議論する場合、従来屢々、用いられてきたものであり、 ^{17}O 化学シフトと酸素原子上の電荷密度との関連を定量的に理解することができると期待される。アニソール類の ^{17}O の共鳴線は室温で1.7 μ 著しく幅が広く、測定が困難な為、80 $^{\circ}\text{C}$ で測定をおこなった。分子軸方向に細長いアニソール類の分子では、回転の相対時間

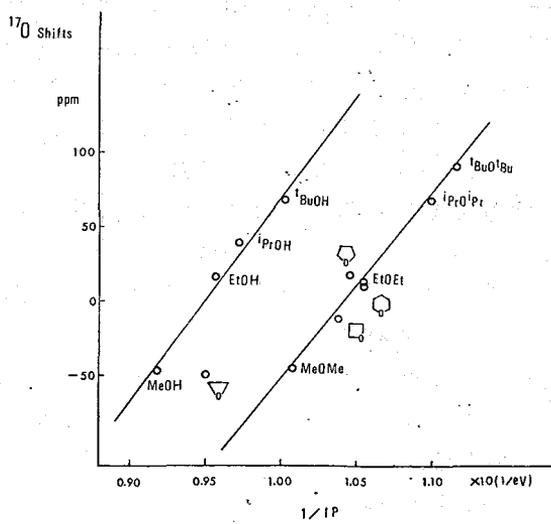


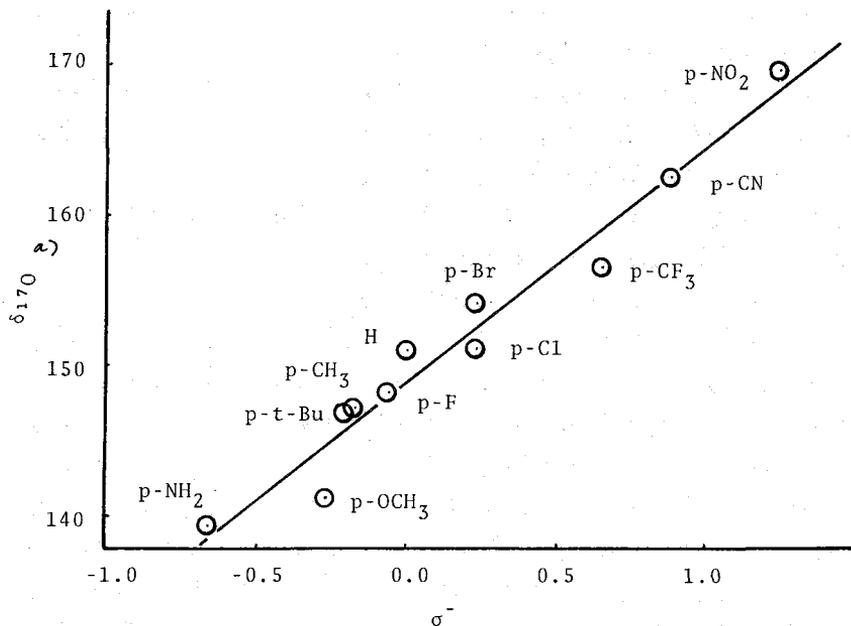
図2 $\delta^{17}\text{O}$ vs イオン化ポテンシャルの逆数

(T_c) が長く、温度をあげて T_c を短くする必要があると考えられる。(§3 参照)。p-位の置換基は、メトキシ基酸素とベンゼン環を通して、through conjugation がある為、大きな化学シフトの変化をもたらすと予想されるが、実際 p-ニトロ基は、アニソール自身に比べ、強磁場へ 15 ppm もシフトしており、又 p-アミノ基は、逆に高磁場へ 12 ppm シフトしていることがわかった。(図3 参照)。又、 ^{17}O 化学シフトは Hammett の σ^- と最も良い直線関係を与える。

($\rho = 16.2 \text{ ppm}$, $r = 0.963$)。ここで得られた置換基の電気的効果は、 ΔE が化学シフトに大きな比重を占める脂肪族エーテル類とは正に逆の傾向がある。アニソール類では、置換基が酸素原子の π -レベルのみならず π^* のレベルにも大きな擾動を与える為、 ΔE に対する効果が相殺してしまい、むしろ(1)式のうちの電荷密度に関連した $\langle \sigma^{-3} \rangle$ 及び $\sum Q_{AA}$ が大きな比重を持つようになると理解される。このことより、CNDO/2 法を用い、酸素原子上の電荷密度を計算したところ、非常に良い相関が得られたことから裏付けられる。

図3. p-置換アニソールの ^{17}O 化学シフトと σ^- の関係

(2540 ppm/electron, $r = 0.973$) 結論として、 ^{17}O 化学シフトを測定したアニソール類のメトキシ基酸素の電荷密度について、最も直接的な実験的情報をもたらすことができることであると言えよう。



a) 103 ppm を Δ と水からの相対シフト値を得る。

参考文献

1. T. Sugawara, Y. Kawada, and H. Iwamura, Chem. Lett., 1371 (1978)
T. Sugawara, Y. Kawada, M. Katoh, and H. Iwamura, Bull. Chem. Soc. Jpn., in press
2. H. Iwamura, T. Sugawara, and Y. Kawada, Tetrahedron Lett., 3449 (1979)
3. W.G. Klumperer, Angew. Chem. Int. Ed. 17, 246 (1978)

(宇部興産・中研) ○斎藤啓治 石田嘉明 大島時生

1. 序

CHEMICS-UBEシステムは、電算機を利用して有機化合物の構造解析を迅速・正確に行なうために開発されたプログラムで、分子式、IR、 ^1H -NMRならびに ^{13}C -NMRのスペクトルデータを入力して解析し、構造式をグラフィックディスプレイ上に出力する形になっている。しかし、鎖式化合物、多置換ベンゼンの場合には分岐位置の異なるものや、置換基の位置異性体を多数出力する。そこで、 ^{13}C -NMRの化学シフトの加成性を利用して推定構造式の各炭素の化学シフトを計算し、実測値と比較して両者のずれの度合を求め、閾値を設けて正しくない構造式をふるい落とす方法を検討した。

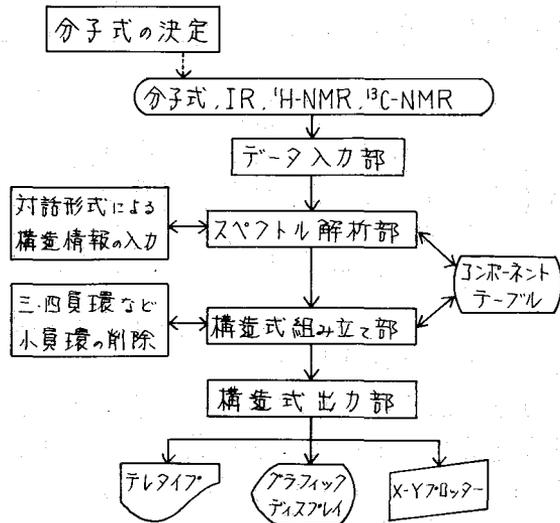


図1 CHEMICS-UBEシステムのご概念図

2. 化学シフトの加成性

化合物の各炭素を計算するパラメータを求める方法を検討した。

2.1 鎖式化合物

鎖式化合物については、Lindemanらが求めたアルカンについてのパラメータを利用して、それに置換基効果を考慮して化学シフトを計算する。

2.1.1 飽和アルコール

アルコールについては、OH基に結合している炭素を $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}-$ 、 $>\text{C}-$ の3種に分け、その各々についての α 、 β 、 γ 位炭素の化学シフトを求める。計算方法は、OH基を CH_3 に置き換えLindemanらの式を用いて各炭素の化学シフト($\delta_x^{\text{RCH}_3}$)を計算し、この計算値と実測値をプロットして得られる直線の勾配と切片から置換基パラメータ a 、 b を求め、式(1)を用いて化学シフトを計算する。

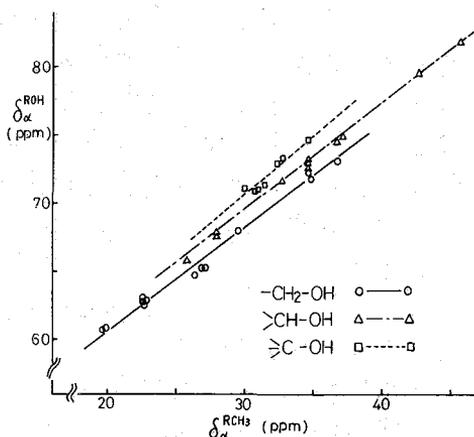


図2 α 位炭素の置換基効果

$$\delta_x^{\text{ROH}} (\text{Cal.}) = a_x \cdot \delta_x^{\text{RCH}_3} + b_x \quad (X = \alpha, \beta, \gamma) \quad \text{----- (1)}$$

α 位炭素について $\delta_x^{\text{RCH}_3}$ と δ_x^{ROH} (実測値) の関係をプロットしたものを図2に

示した。δ位から先の炭素ではδ^{RCH₃}とδ^{ROH}（計算値）にはほとんど差がないので、δ^{RCH₃}の値をそのまま用いた。アルコールの加成則パラメーターを表1に示す。

表1 アルコールの加成則パラメーター

分類	級	パラメーター		R	STD	データ数
		a	b			
α位炭素	1級	0.771	45.1	0.986	0.743	15
	2級	0.782	46.1	0.993	0.561	13
	3級	0.857	44.8	0.957	0.476	7
β位炭素	1級	0.931	3.5	0.985	0.772	14
	2級	0.970	1.6	0.999	0.360	20
	3級	0.990	0.1	0.999	0.451	12
γ位炭素	1級	0.981	-2.5	0.998	0.534	19
	2級	0.976	-0.4	0.999	0.330	18
	3級	0.985	0.6	0.999	0.599	8

2.1.2 飽和カルボン酸
カルボン酸のアルキル炭素については、アルコールと同じ方法で加成則パラメーターを求めた。

$$\delta_x^{\text{ROH}}(\text{Cal.}) = a_x \cdot \delta_x^{\text{RCH}_3} + b_x \quad (x = \alpha, \beta, \gamma)$$

一方、カルボニル炭素についてはこれに結合しているα, β位炭素を-CH₂-, >CH-, ≧C-の3種に分け、式(2)を用いて化学シフトを計算する。

$$\delta_{\text{C=O}}^{\text{RCOOH}}(\text{Cal.}) = \alpha_i + \sum_{i=1}^4 n_{\beta i} \cdot \beta_i + 182.2 \quad \text{----- (2)}$$

ここでα_i, β_iはα, β位炭素の種類、n_{βi}はβ_iの個数

2.1.3 飽和ケトン

ケトンのアルキル炭素についてはカルボニル基に結合している炭素をCH₃-, -CH₂-, >CH-, ≧C<の4種に分け、その各々についてα, β, γ位炭素の化学シフトを求める。後はアルコールの場合と同様にして加成則パラメーターを求める。

一方、カルボニル炭素についてはこれに結合しているα, β位炭素を先のように4種に分け、式(3)を用いて化学シフトを計算する。カルボニル炭素の化学シフトの実測値と計算値をプロットしたものを図3に示す。

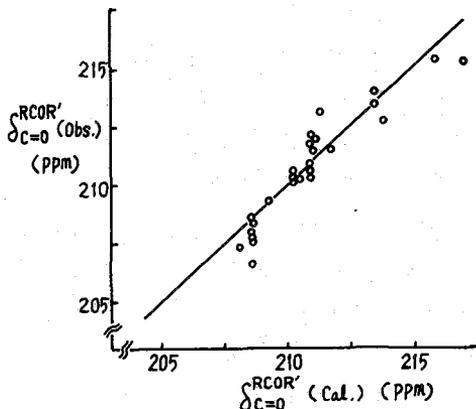


図3 カルボニル炭素の化学シフトの実測値と計算値

$$\delta_{\text{C=O}}^{\text{RCOR}'}(\text{Cal.}) = \sum_{i=1}^4 n_{\alpha i} \cdot \alpha_i + \sum_{i=1}^4 n_{\beta i} \cdot \beta_i + 206.2 \quad \text{----- (3)}$$

ここでα_i, β_iはα, β位炭素の種類、n_{αi}, n_{βi}はα_i, β_iの個数

2.1.4 モノアルケン

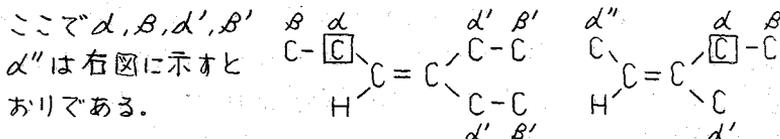
アルケンのアルキル炭素については二重結合の型により①CH₂=CH- ②CH₂=C< ③-CH=CH- ④-CH=C< ⑤>C=C<の5種に分け、その各々について、α位の化学シフトを求める。計算方法は二重結合を単結合に置き換え、Lindemanらの式を用いて各炭素の化学シフト(δ^{RC-CR'})を計算し、この計算値、実測値とα, β位炭素の種類(CH₃-, -CH₂-, >CH-, >C<)とその個数から加成則パラメーターを求め、式(4)を用いて化学シフトを計算する。アルキル炭素の加成則パラ

メーターを表2に示す。β位より先の炭素については δ^{RC-CR} の値をそのまま用いる。

表2 モノアルケンアルキル基についての加成分パラメーター

分類	アルキル炭素の種類	α位炭素				β位炭素				α'位炭素				β'(α'')位炭素				C	R	S T D
		CH ₃	CH ₂	CH	C	CH ₃	CH ₂	CH	C	CH ₃	CH ₂	CH	C	CH ₃	CH ₂	CH	C			
1	CH ₂ =CH-ⓐ	0.0	-0.2	2.7	5.4	-1.4	-0.2	0.0	0.6	—				—				2.1	0.973	0.244
2	CH ₂ =C-ⓑ	0.0	-1.2	1.7	4.8	0.0	0.7	0.9	-0.4	-1.4	0.1	0.0	3.0	0.0	-0.9	-1.5	0.7	0.0	0.967	0.566
3	ⓐ-CH=CH-	1.0	0.0	0.2	-1.4	0.2	0.0	0.0		0.2	0.0	0.0	0.1	-0.3	-0.1	0.0		3.0	0.908	0.232
	ⓑ-CH=CH-	0.0	-1.0	0.0	3.9	0.1	0.0	-0.2		-0.3	-0.2	0.0	0.9	0.0	0.2	0.5		-1.4	0.937	0.504
4	ⓐ-CH=C<	2.1	0.6	0.0	-1.3	0.5	0.1	-0.1		0.4	0.0	-0.8	-1.9	-0.1	0.1		-0.1	-0.1	0.921	0.322
	ⓑ-CH=C<	0.6	-1.0	1.4	0.0	0.0	0.8		1.8	0.6	0.0	-2.2	0.2	0.3	0.0	0.0		2.6	0.957	0.473
	ⓒ-CH=C<	0.0	0.0	1.4		0.4	-0.3			-2.0	-0.5	0.0	3.8	-0.2	0.3	0.0	0.12	-2.9	0.959	0.548
5	>C=C<	—				—				—				—				1.3		0.973

一方、二重結合炭素についてもアルキル炭素と同様に、α, β位炭素の種類と個数から加成分パラメーターを求め、式(4)を用いて計算する。



$$\delta^{RC-CR'}(\text{cal.}) = \sum_{i=1}^4 N_{\alpha_i} \cdot \alpha_i + \sum_{i=1}^4 N_{\beta_i} \cdot \beta_i + \delta^{RC-CR'} + C \text{ ----- (4)}$$

ここで α_i, β_i は α, β 位炭素の種類, $N_{\alpha_i}, N_{\beta_i}$ は α_i, β_i の個数 $\delta^{RC-CR'}$ は Lindeman らの式を用いて計算したアルカンの値

2.2 多置換ベンゼン

多置換ベンゼンの環炭素の化学シフトは一置換ベンゼンの化学シフトを利用して計算できるが、オルト位やパラ位に置換基がついている場合には実測値と計算値とのずれが大きくなる。そこで、まず一置換ベンゼンの置換基効果から各環炭素の化学シフトを計算し、オルト位やパラ位に置換基がある場合には更にこれらの置換基効果を修正項として加えることにした。メタ位の置換基につ

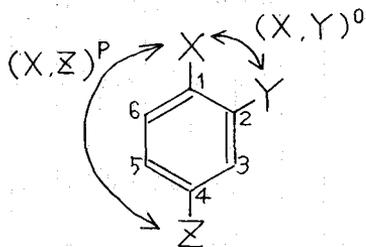
表3 オルト置換体の修正項

X \ Y	OCH ₃	OH	CH ₃	COCH ₃
OCH ₃	4.0	0.1	-3.8	-0.6
OH	5.5	2.6	-2.9	7.7
CH ₃	3.2	-0.4	-2.9	—
COCH ₃	5.3	-4.5	—	—



表4 パラ置換体の修正項

X \ Y	OCH ₃	OH	CH ₃	CHO
OCH ₃	1.9	1.1	0.9	-1.0
OH	2.5	2.4	1.0	2.4
CH ₃	-0.3	0.1	-0.2	2.1
CHO	-0.1	-1.1	2.6	-3.1



$$\delta_1^C = \delta_1 + \Delta X(X, Y)^0 + \Delta X(X, Z)^P \text{ --- (5)}$$

$$\delta_2^C = \delta_2 + \Delta Y(X, Y)^0 \text{ ----- (6)}$$

$$\delta_4^C = \delta_4 + \Delta Z(X, Z)^P \text{ ----- (7)}$$

$$\delta_3^C = \delta_3, \delta_5^C = \delta_5, \delta_6^C = \delta_6 \text{ ----- (8)}$$

ては実測値と計算値とのずれが小さいので無視する。1, 2, 4-三置換体の場合、式(5)~式(8)により各環炭素の化学シフトが計算できる。オルト置換体、パラ置換体の修正項を表3、表4に示す。

3. 構造式の決定法

上述のようにして推定構造式の各炭素の化学シフトを求め、これらの計算値と実測値のずれの割合を式(9)~式(11)を用いて計算する。これらをスペクトルの類似度係数とよぶ。化学シフトの計算値と実測値が

$$MAX = \text{最大値} (|X_i - Y_i|) \text{ ----- (9)}$$

$$SD = \sum |X_i - Y_i| \text{ ----- (10)}$$

$$SQ = \{ \sum (X_i - Y_i)^2 / N \}^{1/2} \text{ ---- (11)}$$

ここで X_i, Y_i は化学シフトの計算値、実測値、 N は炭素数

よく一致しているほどMAX、SD、SQの値は小さなものとなる。41種のアルコールについて加成則パラメータを用い、各炭素の化学シフトを計算し、スペクトルの類似度係数のうちMAXで評価したものを図4に示す。

正しい構造式のMAXの値は小さく、標準偏差は0.97である。そこでMAXの値が5.0を越える構造については正しくないものとして除去する。SD、SQも同様に小さな値となる。これらのパラメータのうち一番小さな値を示す構造式を選ぶことにより構造式の決定ができる。

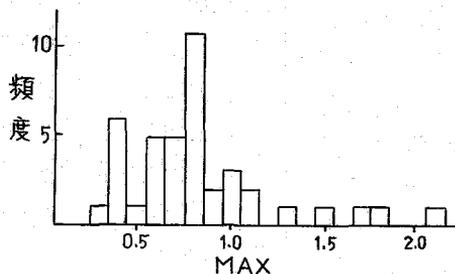


図4 正しい構造式に対するMAXの分布

4. CHEMICS-UBEシステムへの応用

CHEMICS-UBEシステムは、分子式、IR、 $^1\text{H-NMR}$ ならびに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルデータを入力して解析し、189種のコンポーネントと呼ぶ部分構造の中からこれらのデータに矛盾しないものを選ぶ。次にこれらの部分構造を用いて構造式を組み立て推定構造式を出力する。しかし、鎖式化合物の場合には分岐位置、多置換ベンゼンでは置換基の位置異性体の解析が十分に行なえず、多くの構造式を出力する。これらの各推定構造式の炭素の化学シフトを上記の方法で計算し、スペクトルの類似度係数を計算して最小の値のものを選ぶことにより正しい構造式を決定できる。各種の化合物についてテストした結果を表5に示す。

表5 各種化合物についてのテスト結果

No.	試料	出 数	順位 1			順位 2			No.	試料	出 数	順位 1			順位 2		
			MAX	SD	SQ	MAX	SD	SQ				MAX	SD	SQ	MAX	SD	SQ
1	<chem>CCCC</chem>	4	0.9	0.4	0.5	7.4	2.2	3.1	7	<chem>CCCCCCCC(=O)C</chem>	26	0.7	0.4	0.4	3.8	2.4	2.6
2	<chem>CCCC(C)C</chem>	3	0.8	0.3	0.4	9.7	4.1	5.5	8	<chem>CCCC=CC</chem>	12	0.5	0.2	0.3	5.5	1.7	2.5
3	<chem>CCCC(O)C</chem>	2	1.3	0.9	1.0	13.7	5.6	7.0	9	<chem>Oc1ccc(O)c(C=O)c1</chem>	6	1.8	1.0	1.2	6.8	3.9	4.3
4	<chem>CCCC(O)C(C)C</chem>	8	2.1	0.7	1.0	7.5	5.0	7.7	10	<chem>Oc1ccc(O)c(C=C)c1</chem>	6	1.1	0.7	0.8	6.0	2.7	3.6
5	<chem>CCCC(C)C(=O)O</chem>	13	1.2	0.6	0.7	7.1	3.7	4.2									
6	<chem>CCCCCCCC(=O)C</chem>	27	0.9	0.4	0.5	5.1	2.0	2.4									

(化技研) 山本 修 柳 沢 勝

各種スペクトルデータの蓄積が増加すると共に、これを整理、活用する方法が考案されて来たが、従来最も多用されて来たのは赤外のASTM方式、IRDC方式、またはサトラ-9データカードに見られるようなカード方式であった。これは最も簡便であったため、非常に実用化し易い方法であったが、データ数が10,000を超えたと検索に不便を感ぜしむようになり、また小さいカードに印刷されたアナログデータから精度のよい数値を読み取ることは困難である。そこで、最近急激な発達をしてきた電算機を用いて各種スペクトルデータをファイル化しようという試みが当然行われるようになった。問題はアナログデータをファイル化する場合、1資料当り、1メモリー当りのコストをできるだけ安くし、しかも必要の精度を保持しつつ、できるだけ検査の効率の良いファイルを作るようにして構成してゆくことである。この場合一口にスペクトルデータというでも各種スペクトルにはそれぞれの特徴があり、その特徴を最も活かした方法を考へて用いなければならないことは当然である。本講演に於いては¹H-NMRのデータ・ファイルについていくらかの問題点を考察した結果を報告する。

現在NMRスペクトルデータで最も良く測定が行なわれるのは¹Hスペクトルと¹³Cスペクトルである。この内¹³Cスペクトルは普通の状態では線スペクトルの集合と考へることができ、従って数値データとして取扱うことができて便利であるため、既にいくつもの研究グループでもそのファイル化の試案が発表され、あるいは試験的にファイルが作成されている。われわれの研究室においてもこの試案をもつてはいるが、ここではアナログデータとして取扱われるべきならぬ¹Hスペクトルに話を限ることにする。

一般にNMRスペクトルは化学シフト(δ)とスピン結合定数(J)との関数であり、この二つの量とそれらは計算によりスペクトルを忠実に再現できることはよく知られている通りである。計算は電子計算機を用いれば原理的には簡単であり、その意味においては¹Hスペクトルも数値データ、(しかも1資料当りのデータ化量が極めて少数の数値データとして取扱うことができた。このように方法による¹Hスペクトルの数値化は正しく行なわれ、多くのデータの集積があるか、反面ある程度はスペクトルから、これを解析して δ とJとを抽出する仕事はそれほかに楽なことではなく、行うための¹Hスペクトルとそれらの資料のすべてについてこれを行なうことは殆ど不可能に近いことである。そこで結局¹Hスペクトルを一つのパターンデータとしてとらえ、これをそのまま電算機に格納してファイルにすることと考へなければならぬ。

現在の市販のNMRスペクトロメータでは、その分解能として0.15~0.2 Hz程度の値は得ることができたため、高精度を要求する場合にはデジタル化した時のメモリー当りの分解能は少くとも0.1 Hzは欲しいものである。¹H-NMRではスペクトル

ルの認められた範囲は約 1000 Hz と考えられ、単純な計算では1試料当りの必要メモリー量は $10,000$ といいこゝにある。しかし ^1H スペクトルの今一つの特徴として、化合物の化学シフトでは、 1000 Hz 全体に亘りシグナルが現れることはむしろ少なく、せいぜい $200 \sim 300 \text{ Hz}$ (全体として) の領域以外はややスライズラインといふことが多い。ノイズと電算機のメモリーに格納する必要はないので、基本的な考え方として、1つの試料のスペクトルも、ファイル化を行う際には、可能な限り数個のプロックに分割して格納する方が有利であることがわかる。この意味では測定の際にはFT法よりもCQ法が有利である。何故ならファイル化の際には数プロックに分割するとしても、FT法の場合測定の際にはスペクトル全域を対象とせざるを得ないため、最終的にデジタル化の分解能として 0.1 Hz は必要とするところでは、Quadrature Detection を使用することも $10 \sim 20 \text{ K}$ のテータ領域を測定用のミニコンの中に確保しなくてはならないからである。

以上の点を考慮して次のような原則の下にファイル化を行った。(1) スペクトルは数プロックに分割して格納する。(2) デジタル化の分解能は 0.1 Hz とする。(3) 測定にはCQ法を用いる。(4) CQ法で掃引によるシグナルの歪を避けるだけ防ぐために、掃引速度は実際上可能な限り遅くする(実際には 1 Hz/sec)。

^1H スペクトルでの試料の収量に対しては種々の議論があるところではあるが、ここでは一応標準に CDCl_3 を用い、濃度は約 5 mol\% とした。測定はXL-100-15 \times $620/\text{L}$ コンビータを使用し、(TW version) のプログラムでデジタル化を行った。後の処理のためにこれを紙テープに打ちつけて保存した。約30個の試料にわたるこのようにファイル化を行ったが、その1例を Fig 1(a) に示す。(Fig 1(a) のスペクトルは以上の操作で紙テープに打ちつけたと、大型の計算機にフィードした後、そのまゝプロッターにより描かされたものである)。30個のテータのうち1試料当りの平均必要メモリー量は約 4 K であった。これは1メモリーユニット(16ビット) \times 177 計算であるが、縦軸の精度を8ビット(=256)まで落しても十分であることと考慮すれば、必要メモリー量はこの半分程度に不足することはない。(但しその場合プロックの上に一丁して打ちつける必要がある)。

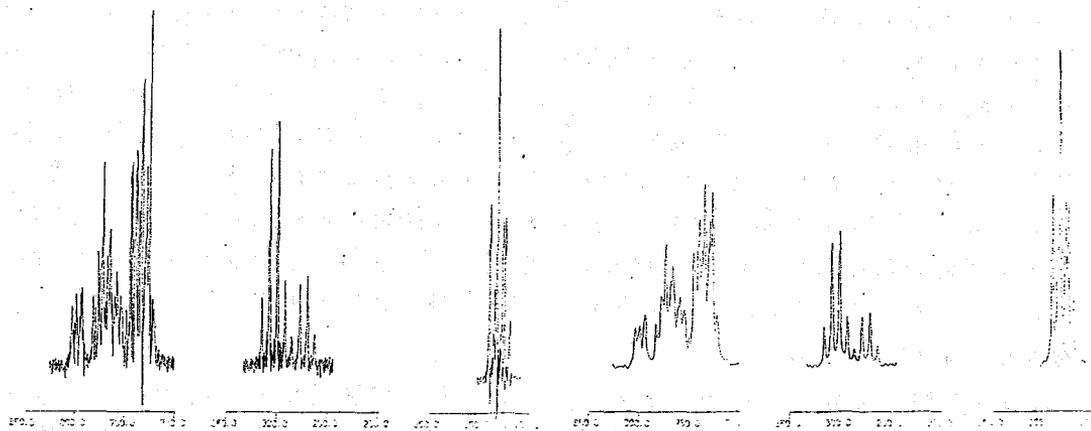


Fig 1(a) 未修正スペクトル

Fig 1(b) 修正スペクトル

スペクトル自身のファイル化はこれで行えばよいとしても、このファイルを用いるためには、これを簡略化したインデックスファイルを作り出す必要もある。例として未知のスペクトルをデータファイルと照合して検索をしようとする場合、1材料当たり4K程度のデータ量をもつファイルと照合するのはどう考えても不経済である。インデックスファイルとしてはそのスペクトルの特徴をできるだけ少くもデータ量で適切に反映する量を採らなければならない。そのために次のような量を採る。

- (1) スペクトルの重心の値
- (2) スペクトルの二次モーメント
- (3) ある閾値以上の強度をもつピークの位置と強度

このような量の採扱は極めて常識的であるとして別に目新しいことは何もないが、問題は多量のデータについてこれを行なう場合、自動的に計算によって次にインデックスファイルを作成してゆくのは必然であること、また実際の照合には、照合されるべき未知スペクトルの精度(例としては分解能、強度など)がまちまちであることにより、何等かの抽象化を行なわなければならない点である。換言すれば、採扱されるべき生データは高精度のものが必要であるが、インデックスファイルの方はそれと互換した取値の方がむしろ望ましいと思われたい。

そこでスペクトルの広幅化を行ない、その後に残ったピークをインデックスファイルの方に拾うことにした。こうすることにより少くも分解能悪いスペクトルとの照合も可能になる。広幅化には常法通り、一度フーリエ変換をして後にexponential型の広幅化関数を用いて再びフーリエ変換をすることにより簡単に目的を達することができる。またCIV法の測定によって必然的に生じるウィングの除去には、相関AMRの手段に頼りexp(- x^2)型の関数を用いたことにより或程度の効果が得られた。このようなして得られたインデックスファイルの内容を、Fig 1(a)のスペクトルに対応してFig 2に示す。なおFig 1(b)のスペクトルはFig 1(a)のスペクトルを、広幅化し、ウィングを除去してなされたスペクトルであり、このスペクトルからインデックスファイルの取値が計算された。

Fig 2の取値にありて重心および二次モーメントの値に見極めようのは、面積計算によって得られた(左側)とピークを採らうとして得られた(右側)との一致を示すものである。重心と二次モーメントは厳密には面積計算によるものか正しいことは勿論であるが、そのために未知スペクトルとの照合に際して、未知スペクトルをデジタル化を行なうが、または面積計算法を用いて面倒な操作を行わなければならないであろう。一方ピークを採らうと考えると、簡単にこれを求めることができる。両者の間には差がぬれたいことを見てもわかる通り、適当な許容度を設定して互を合わせ、これによって迅速な照合が可能であろう。ピークに関する情報は左側がppm単位によるシフトの値、右側が強度であって、強度は全体が100%に示すように規格化してある。この規格化の範囲内において、閾値は5%とし、それ以上のピークを拾い上げた。

インデックスファイルによる検索は次のように行なう。先に重心および二次モーメントの値と適当な許容値を設定し、これによって大まかに絞り込みを行な

HA0166

NUMBER OF BLOCKS

1	8.242	7.001
2	3.323	2.440
3	1.517	1.078

WINDOW FUNCTION = 1.000
 SCAN SPEED = 1.000
 THRESHOLD VALUE = 3

CENTER OF GRAVITY = 5.119 4.909
 SECOND MOMENT = 7.891 8.168 IN PPM

NUMBER OF LINES 30

8.015	13
7.972	14
7.921	18
7.808	15
7.786	12
7.755	24
7.714	42
7.663	30
7.640	35
7.572	24
7.534	19
7.484	10
7.435	39
7.385	51
7.330	63
7.278	50
7.254	61
7.212	18
3.144	13
3.069	43
2.994	47
2.920	17
2.774	17
2.694	19
2.624	7
1.396	58
1.322	109
1.269	56
1.245	54
1.194	21

Fig. 2. インテグレーション・ファイル用データ

う。実際は題としてこのふりの分けは非常に有効であり、これによって大部分が適合しな
 いスペクトルを除外するこゝからできる。次に
 各シグナルの位置及び強度の一致の程度を見
 るのであつたが、照合すべきスペクトルと資料
 スペクトルとして、それぞれ最大強度ピークを
 探し出し、それかシフトの許容範囲内で一致
 するかなかをみる。次に又各自の強度のピー
 クについて同様に操作を繰返してゆく。この
 ようにすることによって、分解能、濃度効果
 等によるずれを補正し、全体として的一致を
 見ることができたようにした。得られた一致
 の程度については適当に評定をつけ、100点
 満点で評価を行なう。

このよりの検索法と比較は、厳密には約1
 万個位の資料を集めた上でなると何とも言
 えないであろう。現在測定した約300個のデー
 タではすべて正確な結果が得られたが、こ
 れはもともデータの異なったパターンを示す
 スペクトルを探し出すだけであらう当然の結果であ
 る。

このデータに言及する事は、元素NMRスペクトルは化合物の部分構造を直接反
 映する特徴があり、従つて研究者が適切な判断を下すことによつて容易に構造を推
 定できる手段として今日の発展を見ることが出来る。従つてこのよりの機械的
 検索法に特色を意味する限界があり、それだけに頼ることは如何なるNMRスペクト
 ルの利便を失ふもので、こゝ々々こゝ々に留意をしなければならぬ。

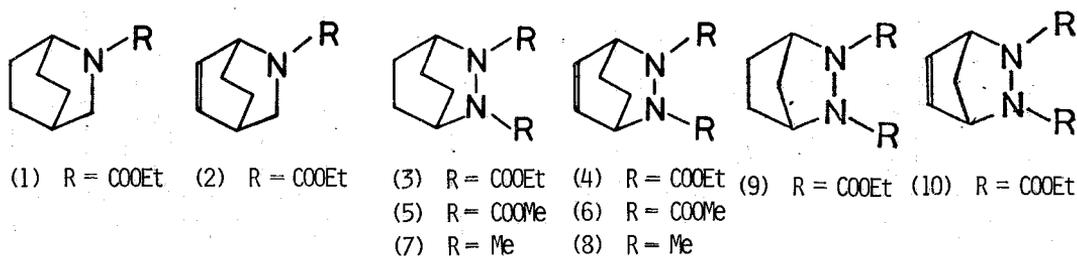
そうは言つても複雑なパターンを示すNMRスペクトルから、取扱う候補スペク
 トルを短時間で指摘できるならば、我々の研究上多大の助けとなることは論を俟
 たないであろう。今後の問題としては得られたデータと精度よくファイル化
 してゆくことであるが、同時にファイル化方式にも改善を加へられなければならない。
 今の方式はやはりFT法を用いるべきであるといふことである。CIV法では如何し
 てもしグールの妨害を避けることができないからである。最近のミニコンのメモリ
 ーも廉価になつたから、32K程度の容量のミニコンを用いることもその程度金がか
 かることではなくなるであろう。これは測定間隔取りの問題である。長く示してゆく
 ように、周波数が変わると色は変化するので、Jは変化しないため、複雑なスペクトル
 ではパターンそのものが変化するので、従つて上に述べた検索法は原理上成立しない。
 超電導磁石を用いたスペクトロメータはしばらく待つて、現在100 MHzと90
 MHzとのスペクトルが略、同じ位に測定されている。両者のパターンが相異な
 実際上どの程度の影響があるのか興味深い問題であり、今後の検討課題としておく。

207 ビシクロ型ピウレタンのステレオダイナミックス

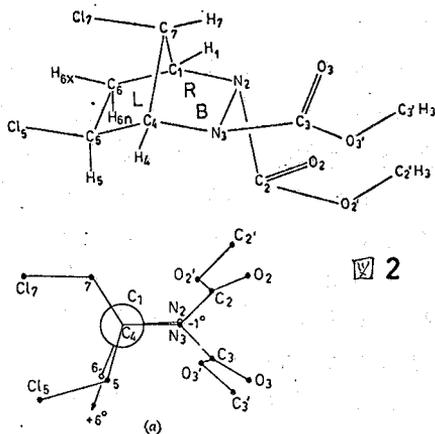
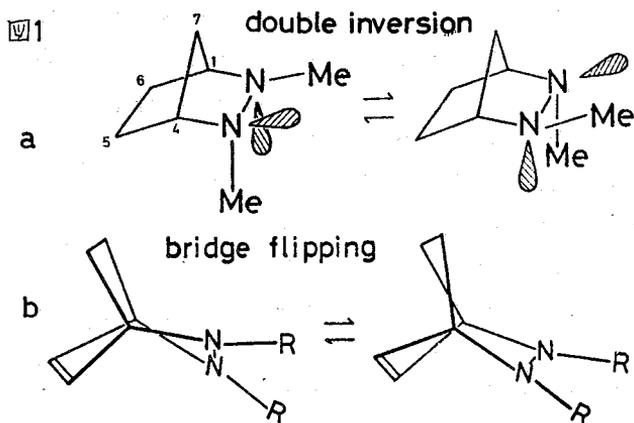
(東大教養) 野村祐次郎 O竹内 敬人

1. 序論

Anderson と Lehm^{1,2} は、ビシクロ型ヒドラジン **7** と **8**、およびビシクロ型ウレタン **3-6** のステレオダイナミックスを H-1 DNMR を用いて研究した。彼らの報告によると、**7**、**8** 等においては窒素の二重反転 (図 1a) が起っているのに対して、**3-6** ではピウレタン単位 $-N(COOR)-N(COOR)-$ が平面構造をとるため二重反転はあり得ず、よく知られたアミド $-N-CO-$ の束縛回転と、環構造の fluxional な運動に由来する bridge flipping (図 1b) だけが起っている。



しかし Altona³ の X 線結晶解析によると **9** の誘導体の一つでは、図 2 に示すように平面構造ではなくヒドラジン類似構造をとっている。以前我々は C-13 DNMR (CDNMR) を用いて検討したところ、これらの化合物は窒素の二重反転とアミドの二重回転の二つの速度過程を持つと考えられたので、予備的な結果を速報^{4,5} した。今回はモデル化合物として加えた **1-2** および **3-6** の CDNMR の詳細を報告する。



2. 結果

2.1 ビシクロ型モノウレタン この型の化合物は室温よりやや上の温度でシグナル変化を示す (図 3)。2 を例にすると、50°C では 10 本のシグナルが観測されるが、30~40°C 付近でほとんどのシグナルが強度比 0.62 : 0.38 の二重線に分裂する

(図3). 2本のピークの化学シフト差はすべて小さく, 最大(高磁場側の sp^2

図3

CDNMR of (2)

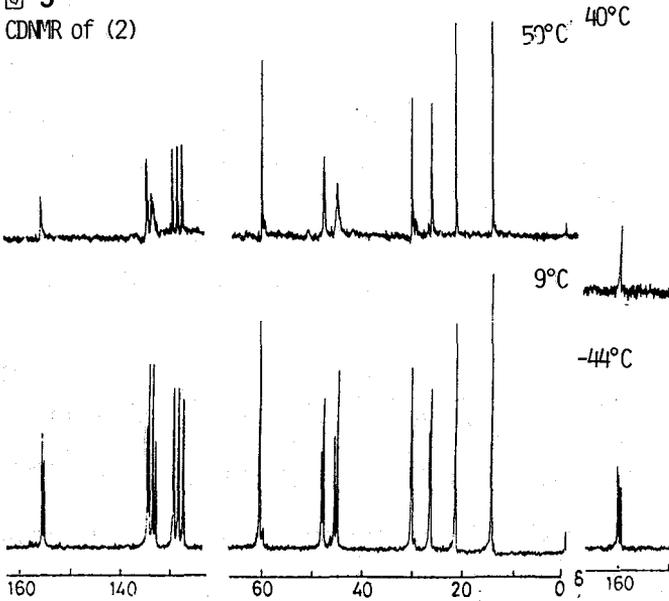
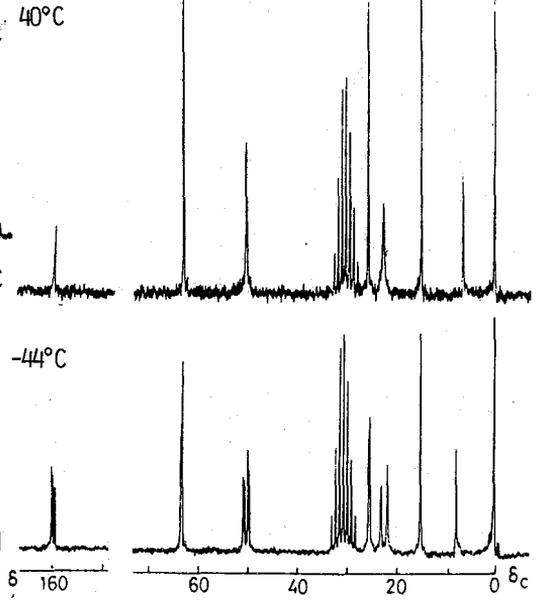


図4

CDNMR of (3)



炭素)でも0.4 ppm程度である。1も類似の挙動をするが, 化学シフト差は C_1 のそれ(0.7 ppm)を除くといずれも2の値より小さい。線形解析によると ΔH^\ddagger はいずれも17~18 kcal/mol程度である。-50°Cの範囲では2段目の変化は観測されなかった。

2.2 飽和ピシクロ型ビウレタン

転転のように3は高温(140°C)ではただ5本の

ピーク($C_{1,4}$; $C_{4,5,6,7,8}$; $C=O$; $-OCH_2$; CH_3)を与えるが, 温度の降下と共に $C_{5,8}$ のピークは強度の等しい2本に分裂する(T_c 92°C)。化学シフト差はかなり大きく, 40°Cではこのうち高磁場側のピークが二段目の変化を示しはじめている(図4)。

-30°C以下では $C_{5,8}$ の2本のピークはそれぞれ4本に分裂し, さらに $C=O$ や $C_{1,4}$ のピークも4本に分裂する(図5)。

2.3 不飽和ピシクロ型ビウレタン

高温で起る6のスペク

トル変化は3に類似している(図6)。70°Cでは6の $C=O$, $C_{5,6}$ および $C_{7,8}$ の各ピークはすでに広幅化を起し, 50°Cでは等強度の2本のシグナルに分裂している。 $C_{5,6}$ および $C_{7,8}$ では分裂した2本のうち1本はただちに二段目の温度変化を示すのは, 3の場合と同じである。6の $C_{7,8}$ では化学シフト差は3.55 ppmである。 $C=O$ ピークの温度変化から求めたこの速度過程の ΔH^\ddagger は16.7 kcal/molである。

CDNMR of (3)

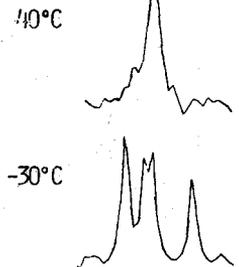


図5

$C=O$

温度をさらに下げると, ほとんどすべてのピークの著るしい分裂が同時に起る。 $C=O$, $C_{1,4}$ と $C_{7,8}$ の各ピークは強度の必ずしも等しくない8本に分裂する(図7)。線形解析による熱力学パラメーターの算出はやや困難だが, T_c 近似によると $\Delta G^\ddagger(T_c)$ は14~15 kcal/molと見積られる。

3. 考察

3.1 ビシクロ型モノウレタンの速度過程

(a) 1および2が示す速度過程はアミドの束縛回転である。C₁などのピークが1においても分裂するから、窒素の反転ではあり得ない。1の対称性から考えて、C₁やC₃の分裂は起らず、またC_{5,8}やC_{6,7}のピークが等強度で、かなりの化学シフト差をもつ2本に分裂しなければならぬからである。

1および2が窒素の反転を示さないのは、一般にC-N結合の回転障壁はN-N結合のそれより小さいからである。

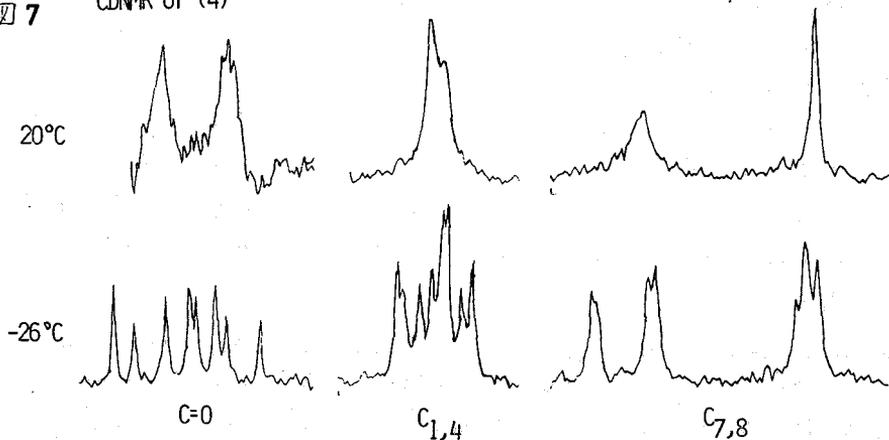
(b) 分裂した2本のピークは、それぞれアミドのC=Oが分子の外側("O")および内側("I")を向く配座異性体に対応する。一つの化合物についてはどの炭素においても2本の面積強度が等しいから、強度比が異性体分布に対応すると考えられる。

3.2 ビシクロ型ビウレタンの高温過程

Anderson と Lehn^{1,2} はビシクロ型ビウレタンのH-1 D N M Rで観測した高温過程をbridge flipping, 低温過程を二重回転に帰属した。我々は高温過程を二重反転に帰属したが、この帰属は以下の議論によって確認される。

(a) 3~6のbridge炭素C₇~C₈のシグナルが、sp²炭素, sp³炭素の別なく高温過程で示す大きな分裂(≈3.5 ppm)はbridge flippingでは説明が困難だが、二重反転ではよく説明できる。この大きさ差はかさ高い基が反ぼす効果の有無で説明できる。

図7 CDNMR of (4)



事実, *exo*-2-ノルボルナンカルボン酸メチルの $\delta(C_6)$ 値と対応する *endo*異性体の $\delta(C_6)$ 値との差は3.6 ppmである(図8)。(b) 4と6の高温でのC=O

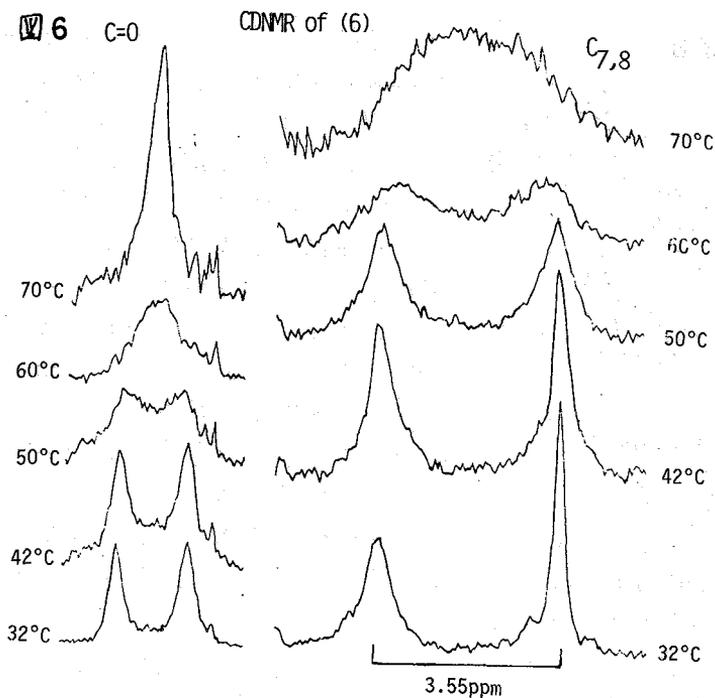
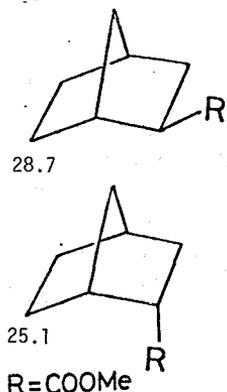


図8



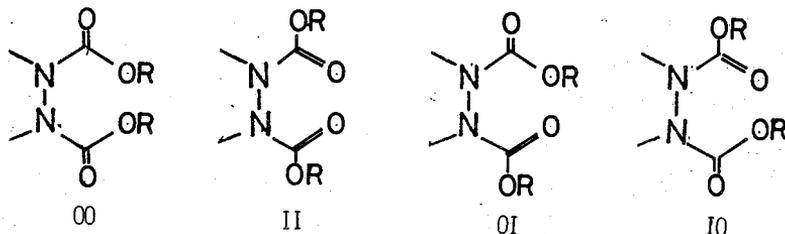
の分裂は、その値がほとんど2 ppmにも達するだけに、bridge flippingでは説明できない。飽和化合物3と5では対応する分裂が観測されないこともbridge flippingでは説明困難である。

しかし二重反転が減速すれば、4と6では二つのCOOR単位は sp^2 炭素に接近しているか、 sp^3 炭素に接近しているかに応じて非等価になるのに、3と5では二つのCOORは等価であるから、この過程ではシグナルの分裂には至らない。4と6において二本のピークの面積強度が等しいのは、二重反転はCOOR単位とbridge炭素との相互作用ではなく、二つのN-COOR単位間の反転で規定されているから当然である。

3.3 ビシクロ型ビウレタンの低温過程

(a) 3-6のスペクトルが示す低温領域での温度変化が二重回転に由来することには問題は無い。アミドの回転が減速すると、3-6にはC=Oが外側("O")か、内側("I")かに応じて4種の配座異性体が可能になる。AndersonとLehn²によると、ビシクロ型ビウレタン10

と11において対称型(OOとII)が35%と25% (OOとIIのどちらが安定かは述べられていない)、非対



称型(OIとIO)があわせて40%である。

図5に示した3の低温時のC=Oのピークの四重線のうち、強度の等しい内側の2本は非対称形、従って外側の2本は対称形に帰属される。4のC=Oのピークの八重線は、 sp^2 炭素または sp^3 炭素についてそれぞれ4種の配座異性体を考えれば説明できる。

(b) 3-6のbridge炭素($C_5 \sim C_8$)の分裂もまた二重反転+二重回転によって最もよく理解される。4の $C_{7,8}$ のピークを例とすれば、二重反転の減速によって二本に分裂した後、COORが接近したほうの炭素(低磁場側)のピークのほうが先にN-CO回転の減速の影響を受けはじめ、近いほうのCOOR基のC=Oが"O"か"I"によって(やや大きく)分裂し、さらに遠いほうのCOORのC=Oの向きに応じて(小さく)分裂し、都合4本のピークを与える。

COORから遠いほうの炭素(高磁場側)も4本に分裂するが、どちらの分裂も遠くのC=Oの向きによる小さな影響に基づくので小さく、観測がやや困難である。

(c) 全く同様に他の炭素のピークの分裂も、二重反転+二重回転の図式で矛盾なく説明できる。飽和化合物では4本、不飽和化合物では8本のピークが原則として各炭素に観測される。

文献 1) Anderson, Lehn, J. Am. Chem. Soc., **89**, 81 (1967). 2) Anderson, Lehn, Tetrahedron, **24**, 123 (1968). 3) Altona et al. Acta Cryst., **B29**, 2098 (1973). 4) Nomura, Masai, Takeuchi, J. C. S. Chem. Comm., 288 (1974). 5) Nomura, Masai, Takeuchi, J. C. S. Chem. Comm., 307 (1975).

電通大・材料科学教室 小宮 誠、〇 藍原有 敬

ベンジリアニリン, $C_6H_5CH_2NH-C_6H_5$, の分子は, いわゆる flexible な分子で, CH_2-NH 軸のまわりの分子内回転, $C-C_6H_5$ 軸および $N-C_6H_5$ 軸のまわりのフェニル基の回転, ならびに NH 基のプロトンの反転によつて, 種々の conformation を取ることが可能であり, また, NH 基による分子内水素結合, あるいは分子間水素結合を形成すると考えられる。

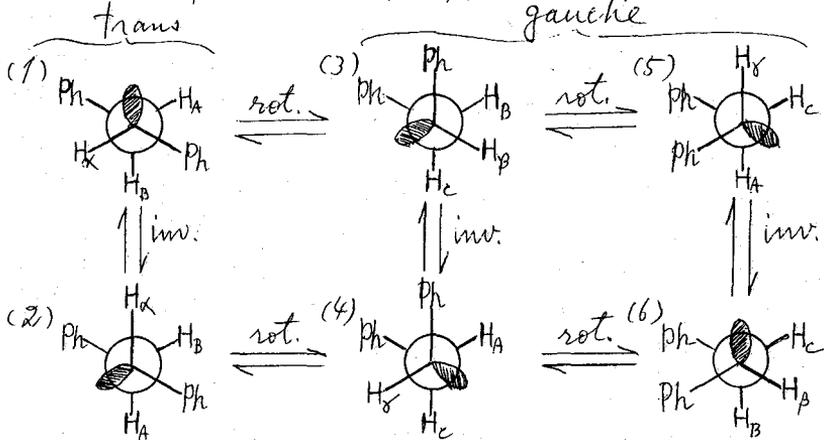
事実, この物質は, 融点 $36^\circ C$ であるが, 一旦融けた状態になると, 中々結晶し難く, 過冷却液体の状態を長時間のわたり保存することができ, また, 液体の蒸発熱は, 19.3 Kcal/mole であり, かなり大きな値と云うことができる。一方, 大木らの IR 測定によれば²⁾, 10^{-3} mole/l 程度の低濃度の溶液において, NH 伸縮振動による吸収帯が 2 本に分裂しており, $NH \cdots \pi$ 型の分子内水素結合の存在が示唆されている。

これらのことを念頭に置いて, 改めてこの分子に見られる水素結合の種類を, 核磁気共鳴吸収によつて追跡することを試みた。

NMR の測定は, 日立 R-20B 型 (60 MHz) によつた。また, 附属の温度可変装置によつて, $-10^\circ C \sim 130^\circ C$ の範囲でのスペクトルの変化を観察した。

ベンジリアニリンは, アルコールより数回再結晶した上, 充分乾燥させ, また, 溶媒は, モレキュラージエールによつて脱色処理を施したものを用いた。

下図に, ベンジリアニリンの分子が取り得ると考えられる種々の conformation を, それらの相互の遷移をつけながら示す ($NH-CH_2$ 軸についての Newman 投影)。



CH_2 の 2 個のプロトンについて, その磁気的等置性の差異に対処して A, B, C と区別し, また, NH プロトンをそれぞれ, α, β, γ の添字によつて区別した。(1), (2) の trans の場合は, 反転により, CH_2 のプロトン H_A, H_B は平均化され, 単一の

NMRシグナルを与えること予想される。一方, gauche形では, H_A, H_B, H_C の間での平均化が考えられ, NHプロトンについても, H_A, H_B 間での平均化を予測して良いであろう。なお, 2個の C_6H_5 基も, それぞれ, C-C結合およびC-N結合のまわりの回転によって種々の方位をとり, 平均化されたフェニルプロトンのNMRスペクトルを与えると思われるが, 今回は特に C_6H_5 およびNH基のプロトンを注目して検討を進めることにする。

(測定結果)

濃度 0.5 mole/l, 温度 35°C において測定した種々の溶媒中での化学シフトの値を表一表に示す。ただし, 2個のフェニル基のプロトンの化学シフトは省いた。

表一表

溶媒	濃度 mole/l	化学シフト (ppm)		J_{CH-NH} (Hz)	備考
		NH	CH_2		
CCl_4	0.500	3.733	4.225		CH_2 singlet
C_2Cl_4	0.500	3.728	4.227	5.5	CH_2 doublet
n- C_6H_{14}	0.500	3.550	4.132	5.3	"
C_6H_{12}	0.507	3.590	4.138	5.7	"
DMSO	0.500	6.140	4.268	6.3	"
$(C_6H_5)_2CO$	0.500	5.290	4.325	5.4	"
C_6H_6	0.510	3.410	3.935	5.4	"
C_4Cl_6	0.301	3.928	4.220		CH_2 singlet

NHプロトンのシグナルは, ^{14}N の核回極子緩和のため, broad であるが, DMSO溶液では, 明瞭に三重線として観測され, CH_2 プロトンとの coupling が確認される。また, C_2Cl_4 溶液の場合も, 1.0 mole/l の濃度で温度を $-10^\circ C$ に下げると, NHプロトンの三重線が観測される。なお, C_6Cl_6 (ハキサフルオロベンゼン) 溶液では, NHプロトンの交換が速いため(?)に単一プロトンシグナルが観測された。

一方, CH_2 プロトンは, doublet として観測されるが, CCl_4 溶液では, 不安定で, doublet として観測されたものが時間の経過と共に singlet に移行する。

$CH-NH$ のプロトン間の coupling については, 塩基性の小さいアミンの場合に観測される例が多いが, 上表に示した CH_2 プロトンのシグナルの分裂がNHプロトンとの coupling によるものであることは, 100 MHz での測定によって確認された(車工試の山本修氏の御好意による)。

濃度による化学シフトの変化

ハキサフルオロベンゼン, 四塩化炭素, 四塩化エチレンおよびDMSOを溶媒とした場合について, 濃度によるシフトの変化を追跡した。

NHプロトンのシグナル自体が broad であるため, 低濃度で誤差が大きくなるが, n- C_6H_{14} , CCl_4 および C_2Cl_4 溶液では, いずれも濃度の増加と共にシフトの値は

減少し、高磁場へ移行する。この傾向は、一般に水素結合による化学シフトの変化と逆の方向である。すなわち、ベンジルアエリンの分子間の相互作用が、NH...N型の水素結合であるよりは、NH...π型に近いことを意味する。

これに及び、DMSO溶液の場合には、濃度によるシフトの変化が極めて小さく、NHプロトンと溶媒分子との間に強い水素結合が形成され、芳香環との相互作用が妨げられるためと考えられる。CCl₄溶液の場合にも、濃度による化学シフトの変化は、C₆H₆溶液の場合に比べて小さく、NHプロトンとC=Cとの相互作用がかなり強いと考えられる。

CH₂プロトンの化学シフトの濃度変化の傾向は、NHプロトンと同様である。

m-C₆H₄ および DMSO 溶液について、濃度と化学シフトの間の関係を表わした式は次の如くである。ただし、δ は ppm, C は mol/l で表わす。

$$\begin{cases} \delta_{NH} = -0.22C + 3.660 & (m-C_6H_4), \\ \delta_{CH_2} = -0.25C + 4.250 \end{cases} \quad \begin{cases} \delta_{NH} = -0.03C + 6.151 & (DMSO), \\ \delta_{CH} = 4.269 \end{cases}$$

温度による化学シフトおよびベンザルの形の変化

NHプロトンの化学シフトは、温度の上昇と共に、~~20°C~~に高磁場側へシフトするが、この傾向は、予期されたように、DMSO溶液の場合に最も著しい。m-メキサン溶液で~0.3 mol/l の場合には、変化は極く僅かである。一方、CH₂プロトンの変化は、いづれの場合でも左程大きくないが、温度の上昇と共に低磁場側へ移動する。m-メキサン、CCl₄ および DMSO 溶液についての結果を以下に示す。

表二 化学シフトの温度変化 (ppm)

温度 °C	m-C ₆ H ₄ 0.295 mole/l		C ₂ Cl ₄ 0.500 mole/l		DMSO 0.500 mole/l	
	NH	CH ₂	NH	CH ₂	NH	CH ₂
35	3.575	4.168	3.728	4.227	± 6.140	4.268
40	3.575	4.176			± 6.113	4.268
50	3.570	4.195	3.725	4.243	± 6.050	4.272
60	3.573	4.195			± 5.989	4.270
70			3.705	4.248	± 5.903	4.270
75					± 5.875	4.269
80					5.850	4.270
90			3.675	4.250	5.775	4.275
95			3.670	4.248	5.750	4.275
100			3.663	4.257	5.700	4.275
104			3.660	* 4.263		
110			3.655	* 4.250	5.625	4.275
120					5.593	4.275
125					4.250	* 4.273

上表で、DMSO溶液のNHプロトンの化学シフト値の前に附した“d”は、シグナルが三重線であることを示す。CH₂プロトンの化学シフトは、*印を附したものを以外は、すべて二重線である。

C₂H₄ 溶液で、1.0 mole/l の濃度のものであるが、0 および -10°C での測定を行ったが、すでに触れたように、NHプロトンは明らかに三重線、(CH₂プロトンは二重線)として観測された。

$$\left\{ \begin{array}{l} 0^\circ\text{C} \text{ --- } \text{NH}, 3.675 \text{ ppm} ; \text{CH}_2, 4/60 \text{ ppm} \\ -10^\circ\text{C} \text{ --- } \text{ " } 3.700 \text{ " } ; \text{ " } 4/25 \text{ " } \end{array} \right.$$

DMSO 溶液において、CH₂プロトンの化学シフトは、温度による変化が極めて少ないが、120°C 以上で不連続的に変化し、二重線から単一のシグナルとなる。この変化は、NHプロトンの化学シフトが急激に減少することに対応して居り、この温度領域で、NH-CH の coupling が消滅することを示しているが、分解によるものではないことは、ベンゼン環プロトンのシグナルには変化が見られないことから判断できる。この点に因りては、更に検討を続ける積りである。

C₂H₄ 溶液についても、-104°C で CH₂プロトンのシグナルが単一のシグナルに変化するが、この温度は、濃度により異なり、1.0 mole/l の濃度では、88°C で変化が起る。

CH-NH の coupling が見られるのは、NHプロトンの交換の速さが適宜におよいたためと考えられるが、この“交換”が、如何なる機構のものであるかが問題である。大木氏等の赤外吸収スペクトルによる研究結果などを併せて検討を続けているが、分子内水素結合(NH-π)だけで説明することは無理があるように思われる。むしろ、分子の flexibility と NH 基の回転を考慮するのが良いのではないだろうか。(4)

なお、ベンゼンアニリンと類似した第2種の化合物についても比較検討を行った。

- 1) 益原爾敬, 蒸気圧測定による; 未発表。
- 2) 大木 彰村, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **32**, 955 (1959);
大木 裕治, " **32**, 984 (1960).
R.H. Russell, H.W. Thompson, *J. Chem. Soc.* **1955**, 483;
A.G. Monf, *Spectrochim. Acta*, **13**, 242 (1957);
P. von Schlegel, D.S. Trifun, R. Bacsai, *J.A.C.S.*, **80**, 6691 (1958).
- 3) J.C.W. Ma, E.W. Warnhoff, *Can. J. Chem.* **43**, 1849 (1965);
I.D. Rae, *Australian J. Chem.*, **19**, 409, 1983 (1966).
- 4) K.P. Suresha, K.L. Hemola, *J.A.C.S.*, **25**, 6699 (1973);
J.W. Shuppert, C.A. Angell, *J. Chem. Phys.*, **67**, 3050 (1977);
S. Skaarp, L.L. Griffin, J.E. Boggs, *J.A.C.S.*, **28**, 3140 (1976);
F.A. L. Anst, I. Yavari, *J.A.C.S.*, **27**, 2794 (1977);
C.H. Dushweller et al. *J.A.C.S.*, **27**, 4328 (1975);
F.H. Menges, T.Z. Thomas, *J.A.C.S.*, **28**, 3267 (1976).

1. 芳香族アゾ化合物として代表的なものの1つである4-アミノアゾベンゼン(AAB, Fig. 1 1a)の2種類の窒素原子、すなわちいわゆるピロール型(α型)のアミノ窒素(Nα)及びピリジン型(β型)のアゾ基窒素(Nβ)へのプロトン付加によるAABの¹⁵N-, ¹³C-NMRスペクトルより得られる種々のNMRパラメーターへの影響を調べ、またこれらのパラメーター自体の問題点(特にJ(CN)について)を検討し、あわせてAABの酸性溶液中におけるプロトン付加の位置及びこれに伴う構造変化に関して知見を得ることを目的とする。

2. ¹⁵N核の関与するスピン結合定数を得るために次の2種類の¹⁵NラベルしたAABを合成した。すなわちNα, Nβ全ても¹⁵N(95% enrich)置換したもの及びα位のみ¹⁵N置換したものをアニリン-¹⁵N及び亜硝酸ナトリウム-¹⁵Nより合成した。¹⁵N-NMRスペクトルは日本電子FX-100分光器(10.09MHz)にて、

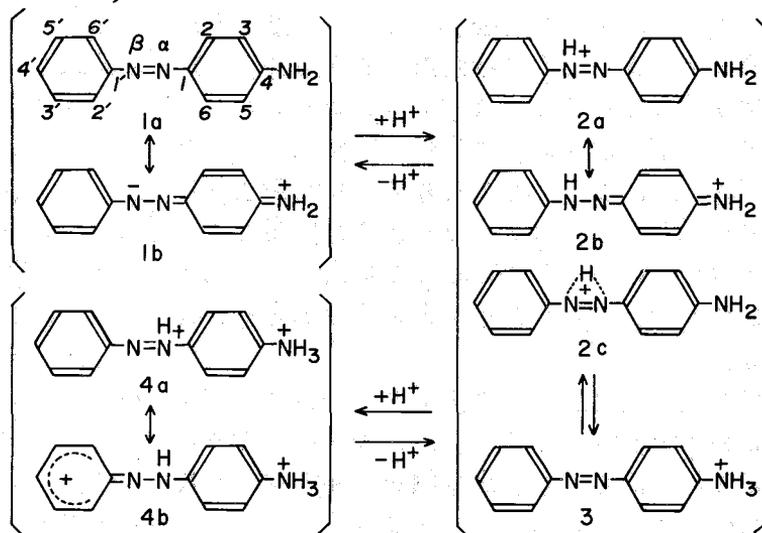


Fig. 1

また¹³C-NMRスペクトルは日本電子FX-100分光器(25.05MHz)及びVarian CF T-20分光器(20MHz)により測定した。中性溶媒としてDMSO-d₆を酸性溶媒としてはDMSO-d₆に20% HClを10:0.1~10:1 v/vの比で混合したものと及び強酸性溶媒として95% H₂SO₄を用い、試料濃度0.1~0.2Mにて測定した。

3. (I) ¹⁵N-NMRスペクトル Fig. 2に一例としてAABの酸性状態(DMSO-d₆:20% HCl 10:1 v/v)における¹⁵N-NMRスペクトルをTable Iに中性、酸性、強酸性条件下で得られたNMRパラメーターをまとめて示した。NOEパラメーター(γ) (NOE=1+γ)はNαを理論値-4.93と仮定したときのNα, Nβのγを示す。AABの酸性条件下(可視部吸収スペクトルにて326及び499nmの二カ所にλ_{max}を有する程度の酸性度, モノカチオンの状態)におけるプロトン化部位に関しては可視部吸収スペクトルやPKa値に基づいた議論が古くより多々あり[1]また最近共鳴

ラマン効果を利用した精力的な研究が少くなく
 され[2] 2a, 2b, 2c および 3 のようなプロト
 ニ化した構造がそれぞれ単独であるいは共鳴
 又は互変異性平衡混合物として存在していると
 推定されている。Fig. 2(A)の $N\alpha$, $N\beta$ のス
 ペクトルに見られる負の NOE (or Table I の
 n) および $N\alpha$ の化学シフトの中性→酸性への
 変化は $N\beta$ にプロトン化した species 2a と
 $N\alpha$ にプロトン化した species 3 の存在を明
 白に示しているが、一方 $N\beta$ の化学シフトの
 変化及び $^1J(N\beta-N\alpha)$ に変化がない点は $N\beta$
 にプロトン化した species の存在に反した結
 果を与える。これは今回用いた実験条件では
 大部分の AAB 分子は $N\alpha$ にプロトン化して
 あり、 $N\beta$ の近傍には“弱い”結合状態で H^+
 イオンが存在し、そのため $N\beta$ の化学シフト
 及び $^1J(N\beta-N\alpha)$ にはほとんど影響を与え
 ず(後で述べる $^2J(N\beta-C)$ も同様) $N\beta$ の
 NOE にのみ敏感に反映されたものと考えら
 れる。

(II) ^{13}C -NMR スペクトル Fig. 3 に AA
 B の中性状態における ^{13}C -NMR スペクト
 ルを示す。図に見られる細かい分裂は ^{15}N 核
 とのスピンの結合によるものである。各シグナルの帰属はモノ置換ベンゼン(アニリン)
 の置換基化学シフト(SCS)[3]をアニリンに対して応用した予測値との対比に基
 づいて決めた。実測値との差は最大 2.7 ppm (C4, C3,5) でその他は 1 ppm 程度であ
 った。C4 と C1' の区別は Fig. 3(B)において $N\alpha$ とのスピンの結合が存在するほうを
 C1' と帰属した。酸性条件下における ^{13}C -NMR スペクトルの帰属は Fig. 4 に示すよ
 うに DMSO- d_6 に対して 20% HCl の割合を少しづつ変えて各シグナルを追跡すること
 により定めた。強酸性条件下のスペクトルに関しては溶解度の問題からこのような

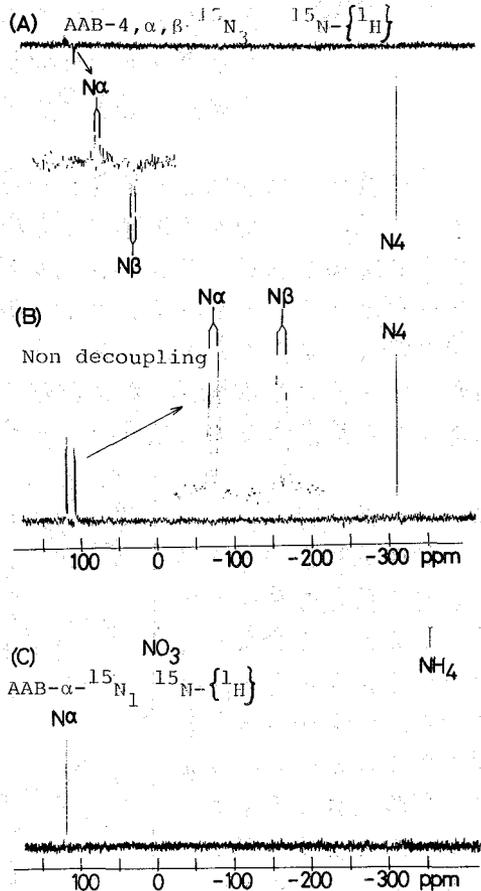


Fig. 2

Table I. Chemical Shifts, Spin-spin Coupling Constants ($^1J(N\beta-N\alpha)$, $^1J(N4-H)$) and NOE parameter (n) Obtained from the ^{15}N -NMR Spectra of 4-Aminoazobenzene

	DMSO- d_6			DMSO- d_6 + 20% HCl (10 : 1)			95% H_2SO_4		
	$N\alpha$	$N\beta$	$N4$	$N\alpha$	$N\beta$	$N4$	$N\alpha$	$N\beta$	$N4$
Chemical Shifts (ppm)	122.9	95.4	-303.3	118.9	107.5	-311.6	-	-	-328.2
$^1J(N\beta-N\alpha)$ (Hz)		15.5			15.4				
$^1J(N4-H)$ (Hz)			88.2						76.2
n	-0.4	-0.4	-4.93	-0.6	-1.9	-4.93	-	-	-

手法は使えず酸性条件下の ^{13}C シフトからの推定及び $^n\text{J}(\text{CN})$ を考慮して決めた。実測されたスピ結合定数の一部をTable II(Exptl.)に示す。AABの強酸性条件下(可視部吸収スペクトルにて326, 499 nmに λ_{max} を持つ吸収帯が消失して415 nmに λ_{max} を持つ、ジカチオンの状態)におけるプロトン化部位に関しても色々考えられているが[4] $^1\text{J}(\text{CC1-N4})$ の中性 \rightarrow 強酸性に伴う変化よりN4にプロトン化した4aの構造が正しいと考えられる。このときN4へのプロトン化の証拠は15N-NMRスペクトルにおいてN4がquartet ($^1\text{J}(\text{N4-H})=76.2\text{Hz}$)として観測されたことより明らかである。

(Ⅳ). INDO-MO法による電子密度および核スピ結合定数の計算

半経験的なSCF MO法による電子密度と ^{13}C 化学シフトの間には良い相関があることが知られている(e.g. [5]) この点をAABに関してINDO近

似でプロトン化による変化量について検討した。計算に際して構造パラメータはtransアゾアニセン(C_2 symmetry)及びアニリンから転用した。 NH_2 基

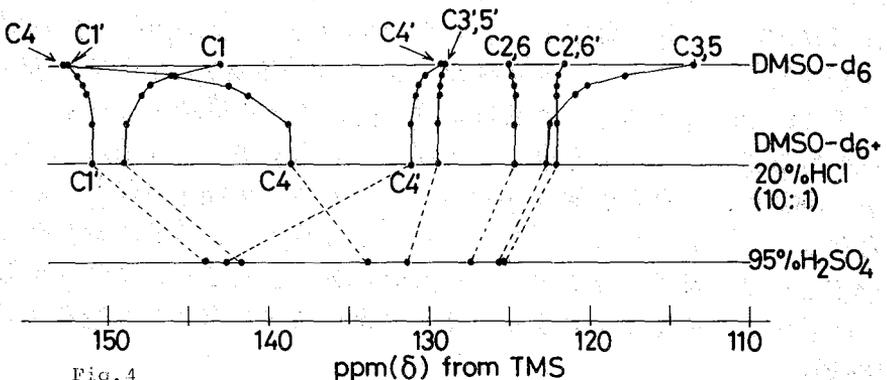


Fig. 4 Dependence on the acidity of ^{13}C chemical shifts of individual carbon atoms

は $^1\text{J}(\text{H-N4})$ の値から考えて平面を仮定した。実験値としては ^{13}C 化学シフトに関して $5.5 \times 10^{-3} \text{ e/ppm}$ [5]として換算した。モノカチオン体についてはほぼN4のみにプロトン化したモデルで、またジカチオン体についてはN4, N4'同時にプロトン化したモデルで実験値と良く対応した。一方、本研究で得られた $^n\text{J}(\text{CN})$ および $^1\text{J}(\text{NN})$ の値(全て絶対値のみ)はN原子のlone pairがs性を持つか(β 型), 持たないか(α 型)によってスピ結合定数の値およびそれに寄与する三つの項すなわちFermi Contact項(FC), Orbital-dipole項(OD), およびSpin-dipolar項(SD)の

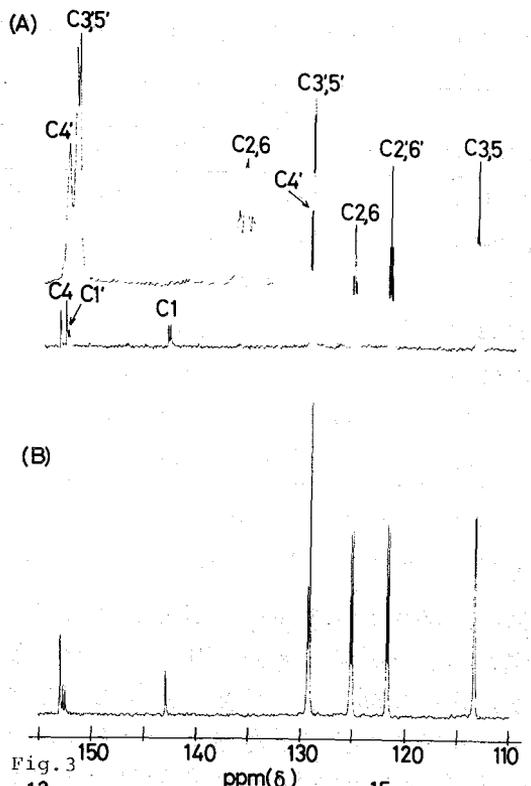


Fig. 3 ^{13}C NMR Spectra of (A) AAB-4, α, β - $^{15}\text{N}_3$ in DMSO-d_6 (B) AAB- α - $^{15}\text{N}_1$ in DMSO-d_6

Table II. Calculated and Experimental Coupling Constants in Hz

$nJ(A-B)^a$	AAB, Neutral					AAB, Acidic (Dication)				
	Exptl.	FC	OD	SD	Total	Exptl.	FC	OD	SD	Total
$^1J(C4-N4)$	13.8	-19.2	0.9	0.0	-18.3	9.0	-5.0	0.3	-0.2	-4.9
$^1J(H-N4)$	88.2	-89.7			-89.7	76.2	-68.1			-68.1
$^1J(C1-N\alpha)$	<0.6	0.7	0.7	-1.5	-0.1	12.0	-16.5	0.6	-0.3	-16.2
$^1J(N\beta-N\alpha)$	15.5	25.6	-11.7	5.7	19.6	-	-6.6	-4.2	0.8	-10.0
$^2J(C1'-N\alpha)$	5.5	2.9	-0.5	1.0	3.4	<0.8	4.1	0.1	0.1	4.3
$^1J(C1'-N\beta)$	1.1	1.4	0.6	-1.5	0.5	(3.7)	-0.0	2.2	-0.1	2.1
$^2J(C1-N\beta)$	5.0	3.3	-0.3	1.1	4.1	2.1	0.2	0.0	0.1	0.3

a The parameters employed were $S_N^2(0)=5.246$, $S_C^2(0)=3.012$, $\langle r^{-3} \rangle_N=2.472$ and $\langle r^{-3} \rangle_C=1.430$ except for $^1J(H-N4)$ where $S_N^2(0)=6.9265$ and $S_H^2(0)=0.3724$ were used.

相対的な重要性が符号も含めて変化するために単純にはCやN原子のs性(%)や原子間の結合次数等と関連づけることが出来ないことが知られている[6]。本研究におけるAABに関して α 型のN4と β 型のN α , N β に関するスピン結合定数に対する三つの項の寄与の程度及びプロトン化によってlone pairの種類が変化したときのスピン結合定数の変化を検討するためにINDO-FPT法[7]により三つの項の計算を行なった。Table IIにその結果の一部を示す。One-bond Couplingについて中性条件の測定値をみるとN4は典型的な α 型の場合の大きさを、またN α , N β はSchulman等の称するいわゆる"one-bond lone-pair effect"によって零に近い値を示しているがプロトン付加により $^1J(C4-N4)$ は小さく(絶対値として)、 $^1J(C1-N\alpha)$ はN4の中性条件に近い値に大きく変化している。これらのことは今回の計算値によってもしも再現されておるといえば $^1J(C1-N\alpha)$ や $^1J(C1'-N\beta)$ のFC項はプラス符号で絶対値は小さくODやSD項と同程度となっている。しかしながらTwo-bond Couplingあるいはそれ以上になると計算値と測定値の一致は必ずしも良くなくINDO近似の限界と考えられる。なお計算に際してSCFの収率は β 型より α 型のNの方がはるかに速く得られたことを最後に付記しておきたい。

[謝辞]

本研究において大変有益な御助言をいただいた京都大学 町田勝久輔先生に、 ^{15}N - ^{13}C -NMRスペクトルを測定していただいた日本電子株式会社の日元 徹、外山 純の両氏 (FX-100)並びに京都薬大の藤原靖弘氏(CFT-20)に深く感謝致します。

[文献]

- [1] G.E.Lewis, Tetrahedron 10, 129(1960)etc. [2] K. Machida et al., Bull.Chem.Soc. Japan 47, 78(1974)etc. [3] G. Miyajima et al., Chem.Pharm.Bull.(Tokyo) 19, 2301(1971). [4] See e.g., M.T.Rogers et al., J.Am.Chem.Soc. 73, 5122(1951); E. Sawicki, J.Org.Chem. 22, 365(1957); S-J Yeh and H.H.Jaffe, J.Am.Chem.Soc. 81, 3283(1959). [5] G.L.Nelson et al., J.Am.Chem.Soc. 94, 3089(1972). [6] J.M.Schulman and T. Venanzi, J.Am.Chem.Soc. 98, 4701(1976). [7] A.C.Blizzard and D.P.Santry, J. Chem. Phys. 55, 950(1971).

1. 序

アミド化合物は、有機化合物のうちで、基本的な化合物群の一つであり、また、たん白質やその他の多くの生体分子の基本単位であるので、これまで¹H NMRや¹³C NMRスペクトルを用いて、多くの研究がなされてきた。アミド構造の基本原子である窒素のNMRスペクトルに関しては、従来¹⁵N NMR法でいくつかの研究が行われた。最近のNMR分光器の発達により、¹⁵N NMRスペクトルの自然存在比(natural-abundance)のよきでの測定が可能となり、いくつかのアミド分子の研究がなされるようになった。我々は、アミドの最も基本的な化合物として、ギ酸アミド、酢酸アミド、安息香酸アミドを取り上げ、¹⁵N NMRスペクトル法を用いることにより、アミドのイソトプス異性、¹⁵N-Hスピン-スピン結合定数、¹⁵N化学シフトに対する置換基効果、溶媒効果、及び濃度効果などの問題について、やや系統的に検討を加えたので、ここに報告する。

2. 実験

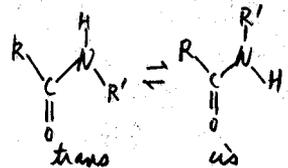
アミド化合物の単体のものは、減圧蒸留を行い、他のものは文献の方法により合成、精製した。純度は¹³C NMRスペクトルを測定しチェックした。

natural-abundance levelでの¹⁵N NMRスペクトルの測定は、Bruker WH-180分光器(18.25 MHz)を用いて行った。¹⁵N NMRスペクトルの測定は、¹⁵N核の自然存在比が小さく(0.36%)、感度も低く(¹³C核の約1/8)、緩和時間がかなり長い為、¹⁵N比の良好なスペクトルを得ることは、たとえ長時間積算することでも、相当困難なことである。その為、我々は、大口径試験管(25 mmφ)を用い、高磁場(180 MHz for ¹H)にし、quadrature検出法を用いて、ハルスーフーリエ変換法により積算を行った(FK)。化学シフトは、5 mmφ管に入った1.0 M H¹⁵NO₃ in D₂Oの化学シフトから高磁場側にとった。試料の温度は、full decoupling (4 watts)条件では50-60°C、gated decoupling条件では約30°Cである。

3. 結果と考察

①ホルムアミドの化学シフト

大部分の第二級アミドの立体配座はトランスであるが、ギ酸アミドではシス体が存在すること知られている。第二級ホルムアミドの¹⁵N NMRスペクトルは、¹⁵N核との四極子緩和による線幅の広がり、アミノプロトンとホルミルプロトンのスピン結合などにより、スペクトルパターンが複雑になり、解析が困難なことがある。プロトンをdecouplingした¹⁵N NMR法はこの点有利である。我々は、種々のN-アルキルホルムアミド及びアセトアミドを合成し、その¹⁵N NMRスペクトルを測定した。結果をTable 1に示す。従来の¹⁵Nや¹⁵N NMRの報告で目撃出来なかったN-メチルホルムアミド(2)のシス体(シス)を、5分の積算を行うことにより見出した。



シス体とトランス体の¹⁵N化学シフトを比較して、興味深いことは、アルキル基のNに結合している炭素が2級か3級かによる違いがある。トランス体のものより高磁場側にあるが、4級の α -プロパルや α -ブチル基になると、その逆に高磁場側にある。このように立体的に大きな基をもつ系では、¹⁵N化学シフトに立体効果があることが明らかである。

N-アルキルホルムアミドの¹⁵N化学シフトに対する置換基効果を検討した (Table 2)。メチル基による置換基効果を調べてみると、 α 置換効果は高磁場シフト (shielding shift, \oplus)、 β 置換効果は低磁場シフト (deshielding shift, \ominus)、 γ 置換効果は \oplus であることがわかった。

シス体とトランス体では、大小の違いはあるが、符号は変化する。今この報告が行われている。つまり、イミド、アセトアミド、ヒドラジン、及びアセトアミドの¹⁵N、¹⁴N及び¹³Cの化学シフトに於て、 β 置換効果は一様であるが、 α 置換効果は逆の傾向である。

アセトアミドも、同濃度で再測定したところ、やはり α 効果は \oplus であった。このように、アミドの¹⁵N化学シフトに対する置換基効果の異常性が明らかになった。これは勿論、アミドの強い水素結合と何らかの関係があるものと考へられる。

β 及び γ 置換効果の一例をFig. 1に示した。 β 置換するメチル基の数が3個になると、N-アルキルホルムアミドのシス体とトランス体で大きな差が出てくる。トランス体のみであったアセトアミドは、トランス体のホルムアミドと同様の挙動を示す。これらの差は立体効果と考へてよいであろう。 α 置換効果では、この3系列で余り大きな差異はない。これは立体効果の異常が小さいためと解釈される。

(b) N-アルキルホルムアミドの¹⁵N-Hスピン結合 (J_{NH})

N-メチル、N-エチル、N-イソプロピル、N- α -ブチルホルムアミド (2, 3, 11, 12) の gated couple ¹⁵N NMR スペクトルを測定した。試料は neat で約 20 時間待たせた。得られた J_{NH} の値を Table 3 に示す。トランス体の J_{NH} は

Table 1. ¹⁵N Chemical shifts of N-alkyl-substituted formamides and acetamides

R	Concentration in (CH ₃) ₂ SO	δ^a		$\Delta\delta$, ppm	% of cis isomer ^b
		trans	cis		
1 H-	neat	262.4 (269.0) ^c	-	-	-
2 CH ₃ -	neat ^d	265.6 (269.8) ^c	267.6	2.0	8
3 CH ₂ CH ₂ -	neat	247.7	248.8	1.1	12
4 CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	neat	250.8	252.2	1.4	14
5 CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	neat	250.9	252.3	1.4	14
6 CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	neat	250.8	252.3	1.5	12
7 (CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	neat	252.8	254.4	1.6	12
8 (CH ₃) ₂ CCH ₂ -	neat	255.0 (259.3) ^c	256.6	1.6	11
9 C ₆ H ₅ CH ₂ -	10 M	251.6 (254.2) ^c	252.9	1.3	13
10 C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ -	neat	252.4	253.8	1.4	14
11 (CH ₃) ₂ CH-	10 M	234.1	235.7	1.6	14
12 CH ₃ CH ₂ (CH ₂) ₂ CH-	neat	236.8	238.7	1.9	16
13 CH ₃ CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ CH-	10 M	236.9 (239.6) ^c	238.7	1.8	14
14 (CH ₃) ₂ CH-	10 M	246.3	249.2	2.9	18
15 (CH ₃) ₂ CH-	neat	237.6	239.9	2.3	12
16 (CH ₃) ₂ CH-	neat	236.6	237.3	0.7	14
17 (CH ₃) ₃ C-	neat ^d	230.8	228.8	-2.0	22
18 CH ₃ CH ₂ (CH ₂) ₂ C-	neat	233.0 (239.4) ^c	230.6	-2.4	22

Table 2. Substituent effects on ¹⁵N, ¹⁴N, and ¹³C NMR chemical shifts by a methyl group

Compound	Nucleus	α	β	γ	δ	ϵ	
Amine	RNH ₂	¹⁵ N	-8.7*	-18.2*	+2.7*	-3.0*	+1.8*
	RNHMe		-6	-22			
	RNH ₂	¹³ C	-9.09*	-9.40*	+2.49*	-0.31*	-0.11*
Ammonium ion	RNH ₃ ⁺ Cl ⁻	¹⁴ N	-3.5	-15	+11		
Hydrazine	RNHNH ₂	¹⁵ N	-3.6*	-24.8*			
			-6.8				
Imine	R'MeC=NR	¹⁵ N	-8.1	-15.3			
Acetamide	CH ₃ CONHR	¹⁵ N	-2.4	-19.0	+5.0	+0.1	-0.3
Formamide	HCONHR (trans)	¹⁵ N	+3.4	-17.9	+3.1	+0.1	-0.1
	HCONHR (cis)		+5.2	-18.8	+3.4	+0.1	0.0

* Figures obtained by linear-regression analysis.

シス体の J_{NH} より、之より見て大きいことは興味深い。トランス体で ${}^3J_{NC-CH_3}$ のかなり大きな値 (トランスで 2.5 Hz , シスで 2.9 Hz) が得られた。これは ${}^2J_{NH}$ より (1.4 Hz) 相当大きい。この3個の化学結合を介する J の大きさは、アンモニウム化合物の ${}^3J_{NH}$ の大きさに近いので、このことはアミドの共鳴構造に於て、 $H-C=NHR$ の寄与が非常に大きいことを示唆していると考えられる。

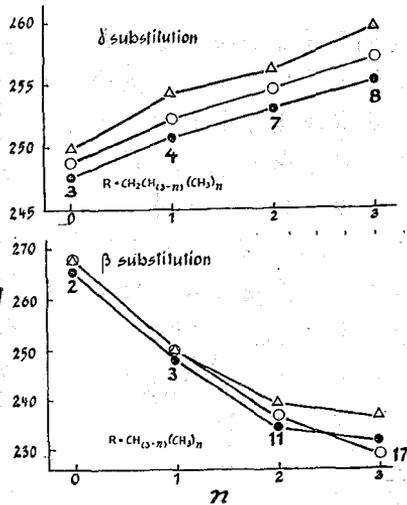


Figure 1. Correlation between the ${}^{15}\text{N}$ chemical shifts of N -alkylformamides and acetamides and the number (n) and placement of β , γ methyl substituents in the N -alkyl group. Δ , CH_3CONHR ; \bullet , *trans*- HCONHR ; \circ , *cis*- HCONHR .

(iii) アミドの ${}^{15}\text{N}$ NMR 化学シフトの溶媒効果

アミドのモデル化合物として、酢酸、酪酸、安息香酸の第一級アミド、 N -メチルアミド及び N , N -ジメチルアミド (RCONH_2 , RCONHR , RCONMe_2 , $\text{R}=\text{H}$, Me , Ph) を合成し、その ${}^{15}\text{N}$ NMR スペクトルを測定した。第一級、第二級アミドの濃度は 1.5 M 、第三級アミドは 5.0 M とした。用いた溶媒は、無極性、極性溶媒 16 種である。酢酸のアミドの例を Fig. 2 に示す。図から、アミドの ${}^{15}\text{N}$ 化学シフトが、溶媒によって非常に変化することがわかる。注目すべきことは、 N -メチルアセトアミド (18) の ${}^{15}\text{N}$ 化学シフトは、塩化炭素、クロロホルム、ベンゼン、アセトン溶媒では、余り大きくシフトしないが、 N , N -ジメチルアセトアミド (20) は、クロロホルム中で、かなり大きく低磁場シフトするところである。このような傾向は、酢酸アミドや安息香酸アミドの系列でも、ほぼ見い出された。第二級アミドの場合、溶質同士の水素結合が強く、溶質と溶媒との相互作用は、それら比べて弱いと考えられる。一方、第三級アミド

Table 3. J_{NH} spin coupling constants for acetformamides

Compound	J_{NH} (Hz)		${}^3J_{NHCOH}$		${}^3J_{NHCH}$		${}^3J_{NC-CH_3}$	
	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
2 HCONHCH_3	93.8	99.2	15.6	15.1	1.4	1.4		
3 $\text{HCO}\text{NHCH}_2\text{CH}_3$	92.2		15.1					
11 $\text{HCO}\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	92.4		15.3					
17 $\text{HCO}\text{N}(\text{CH}_3)_3$	92.3	86.6	14.7	14.5			2.5	2.9

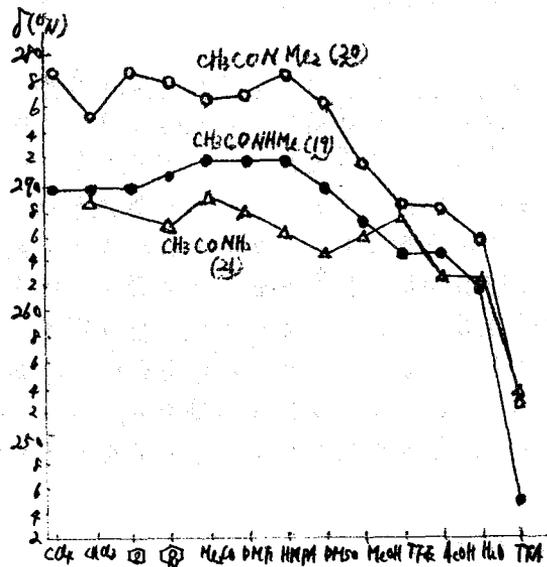
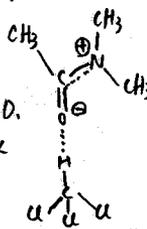


Fig. 2. Solvent effects on ${}^{15}\text{N}$ chemical shifts of amides.

の δ では、溶質間の相互作用の寄与が小さいので(水素結合が強い)、溶媒との相互作用の初歩が、あらかた形で表面に出てくること予想される。従つて、上述の δ のクロロホルム中での異常低磁場シフトは、 δ とクロロホルムとの下層より水素結合型の相互作用の存在を強く示唆しているものと見られる。R. L. LidderやJ. D. Roberts等は、クロロホルムの ^{13}C -Hの δ が、 δ 中で異常に大きいことを



見出ししている。¹⁾ このことを上に出した水素結合の存在を示唆しているものと解釈できるだろう。第一級アミドの酢酸アミド(17)の ^{15}N 化学シフトは、大部分の溶媒で、第二級アミド(12)のものより低磁場側にある。しかし、トリフルオロエタノール(TFE)や水中では、この傾向が逆である。このように溶媒中では、特殊な相互作用が存在するのかもしれない。強酸であるトリフルオロ酢酸(TFA)の ^{15}N の化学シフトは、他の溶媒中に比べて異常に低磁場側シフトしている。この現象は、 β 酸及び α 臭香酸アミドの系列でも見られた。これは、TFA溶媒中で右側の(B)のよう分子種が存在していることを示唆している。

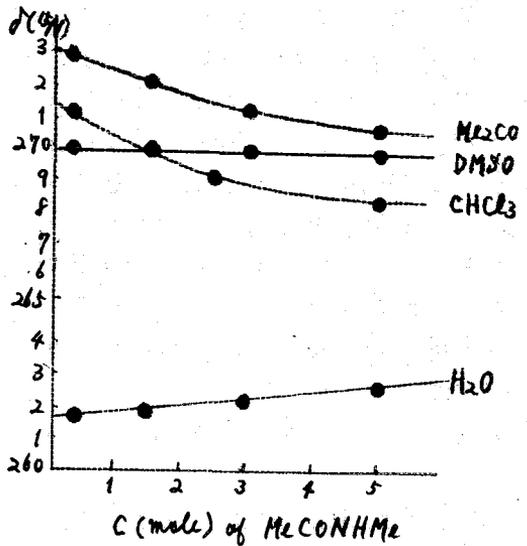
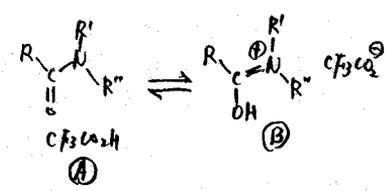


Fig. 3 Concentration effects on ^{15}N chemical shift of DMAc in several solvents.



(iv) アミドの ^{15}N 化学シフトの濃度変化

N-メチル酢酸アミド(17)のクロロホルム, アセトン, DMSO, 及び水中の ^{15}N 化学シフトを濃度を逐次測定した。その結果をFig. 3に示す。図から明らかになるように、溶媒によって、かなり濃度変化の挙動が異なることがわかる。このことは次のように説明できる。クロロホルムやアセトン中では、(12)と溶媒との水素結合より、溶質間同士の水素結合の方が強く、水素結合が強いといふことは、 ^{15}N 化学シフトを低磁場側シフトさせるので、(12)の濃度が濃くなるほど、(12)の ^{15}N シフトは低磁場側へ移動する。一方、水と(12)の水素結合は、(12)同士の水素結合より強く、従つて、(12)の割合が増すと、 ^{15}N シフトは高磁場側へシフトする。極性が水より小さいDMSO中では、この両者の中間にあり、(12)の化学シフトはほとんど変化しない。

文献

1) R. L. Lidder, and J. D. Roberts, J. phys. chem. 74, 912 (1970)

1. 序

多くのアリレ塩基や, DNA や RNA の基本単位である核酸塩基の一つであるアデニン化合物は, その環内に 4 個の窒素原子を含み, 酸性条件下では, こゝらの窒素原子に, プロトン付加がおこることがおこっている^(1,2). こゝらのプロトン付加は, この生体分子の生体機能とかかわりをもつのではないかと関心をもたれている. 本研究では, このようを基のいくつかの基本化合物を合成し, その自然存在比の ^{14}N NMR スペクトルを測定, 解析することによって, プロトン付加の位置と強さについて説明しようとした.

2. 実験

アリン, アデニン, 及び 1-β-D-リボシリンは市販品を用い, その他の化合物は, 文献の方法により合成した. 化合物の確認は, ^1H , ^{13}C 及び ^{14}N NMR スペクトル解析により行つた. 自然存在比の ^{14}N NMR スペクトルの測定は, Bruker WH-180 分光器 (62.5 MHz) で行つた. 試料管は 25 mm 中のパイレーク管を用い, 溶媒は DMSO を使用した. 化学シフトは 0.2 M D^{14}NO_3 in D_2O の硝酸のシフトから高磁場にといた. 測定温度は gated decoupling 条件では約 30°C, full decoupling 条件では 53~60°C である.

3. 結果と考察

(i) 7.5g の アリン ($\text{R}=\text{H}$, 1) を 10 ml の DMSO にとらし, ^{14}N NMR の full decouple スペクトルを 5 時間かけて測定した. スペクトルを図 1 に示す. 低磁場側に 2 本のやや鋭いピーク (a, b) と, 高磁場側に非常に幅広いの 2 本のピーク (c, d) が得られた. これは分子内に 4 個の窒素をもち, c, d のピークが幅広いうで (温度 54°C) イミダゾール環の互変異性体 (A), (B) が存在し, これが交換を起しているものと考えられる. a と b のピークが鋭いのは, これに相当する窒素の化学シフトが (A) と (B) で近いなりと考えられる. シグナルの帰属を行ふために, 1 の gated couple スペクトルを 20 時間かけて測定した (図 1 (b)). a のシグナルは 4 重線に, b のシグナルは二重線に分裂した. c, d のシグナルは, スピン結合の存在のために, 更に幅えくかつた. スペクトルにローテーションから, a が N1 に, b が N3 に帰属

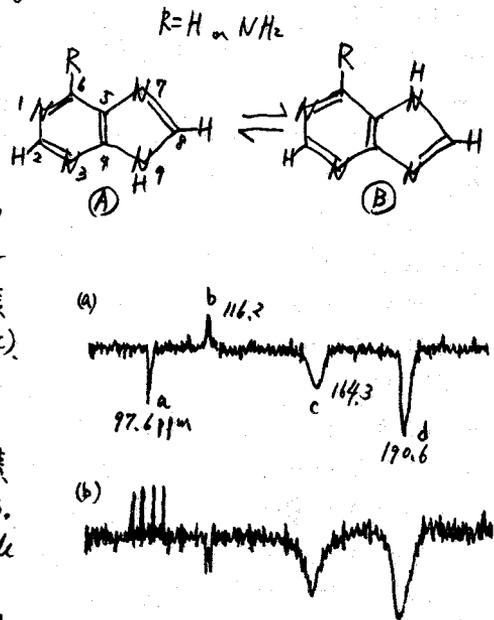


図 1. (a) full decouple spectrum of 1. (b) gated couple spectrum of 1.

なかにしかるし. J. D. ロバート

さ小る, $^1J_{NH}(H) = 10.2 \text{ Hz}$, $^2J_{NH}(H) = 15.0 \text{ Hz}$, $^3J_{NH}(H) = 14.5 \text{ Hz}$ である, δ のプロトン 2 付加が, δ の窒素原子に起こるかを調べるために, DMF $\text{-}d_5$ 中で, 炭酸であるトリフルロロ酢酸 (TFA) を加えて, ^{14}N NMR スペクトルを測定した. 結果を図 2 に示す.

図から明らかのように, N1 のシグナルは, TFA が增加すると, 大きく高磁場シフトする. N3 の化学シフトはほとんど変りない. N7 と N9 のシグナルが平均化した C のピークは, TFA の増加と共に, 最初はゆがかに高磁場シフトするが, 0.7 equiv. mol. より高濃度では, 少し低磁場シフトの傾向を示す. 同様のシグナル d は, 最初低磁場シフトするが, 以後はほとんど濃度変化を示さない. 窒素原子にプロトン 2 が付加すると, その ^{14}N の化学シフトは高磁場シフトするところだ. セリジニなどの研究でわかっているので,³⁾ さらうの結果は, δ のプロトン 2 付加が N1 に強く起っており, N3 にはほとんど起っていない.

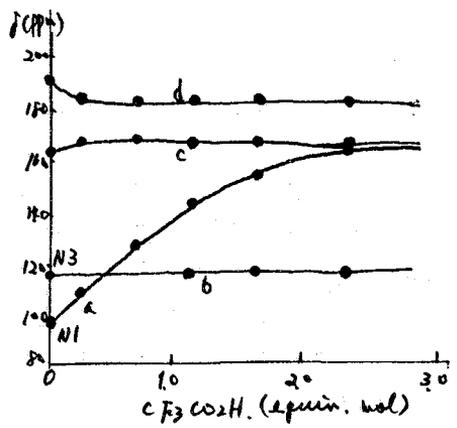


図 2. フリソンの化学シフトの TFA の濃度変化.

こと, 且つ イミダゾール環にもあずかに起っていることを示している. Markowski は, アデノシンや AMP では, N1 にのみプロトン 2 付加が起ると報告しているので, δ はこれらの系とは多少異なっていることが明らかである.

(ii) 9-エチルアデニン: アデニンなびに於て, プロトン 2 付加に對して, sugar 部分の影響があるかどうかを調べるために, 9-エチルアデニン (2) を合成し, その ^{14}N NMR スペクトルを測定した. δ の 5 個の窒素の化学シフトは, 既に決められているアデニンの化学シフトに非常に近く, 帰属は容易であった. δ の TFA 添加によるシグナルの変化を図 3 に示す. TFA の濃度の増大と共に, N1 のシグナルが大きく高磁場シフトし, N7, N9, C のシグナルは低磁場側にシフトする. N3 の化学シフトは不変である. 従つて, δ のプロトン 2 付加は, N1 へのみ起っていることが明らかになった. このことから, アデニンの 9 位にリボースがついても, δ がなくても, プロトン 2 付加には影響がないことがわかる.

(iii) 7-エチルアデニン: 7 位にリボースが結合した化合物類は, J.A. Montgomery⁴⁾ によつて研究が行われ, 抗がん剤などが注目を集めている.⁴⁾ 我々は, そのモデル化合物として, 7-エチルアデニン (3) を合成し, そのプロトン 2 付加が, 9-エチルアデニンとどうよりに異なるかを調べた. δ は DMF $\text{-}d_5$ に対する

溶解度が小さいので, 80°C に温度を上げて full decouple スペクトルを測定し, 5 本のピークを得た. (図 4). D のシグナルは N7 に, E のシグナルは NH_2 に容易に帰属できる. A, B, C のシグナルは δ のシグナルとかなり, 化学シフトが異なるため, 比較ができて, 丁度値から帰属を行なうとした. 80°C で, そのまま長時間測定すると, 結晶化するため, 0.1 equiv. の TFA を加えて,

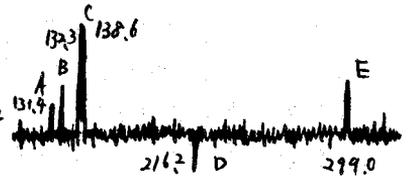


図 4. ^{14}N NMR スペクトル
PW: 35.0 μsec (90°), PD: 12.0 sec
SW: 6000 Hz, time ~ 3 hrs.

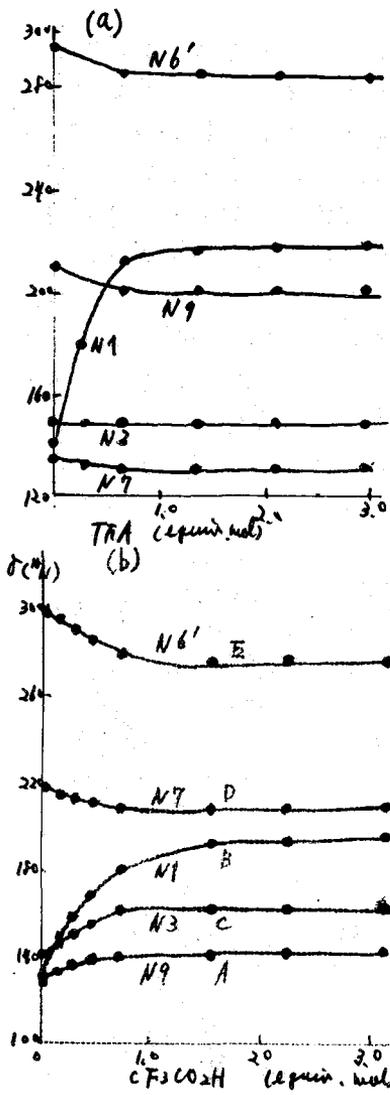


図2. (a)及び(b)の化学シフトのTFAの濃度変化

溶解度を良くし、20時間でcoupleスペクトルを得た。A, B, Cのシグナルはdoubletになり、J値はそれぞれ11.3 Hz, 13.7 Hzである。数種類のアデニン誘導体のcoupleスペクトルから得られたJ値から、Aは5員環のN9に、Cは6員環のN1 ~ N3であることが明らかになった。我々が測定した14種のアデニルやプリン化合物では、いずれもN1がN3より、その化学シフトが低磁場側にあるので、この場合も、BがN1のシグナル、CがN3のシグナルであると推論できる。この¹⁵NシグナルのTFAによる濃度変化を図3(b)に示す。N6', N7に帰属されるシグナルE, B, Dは、TFAの濃度が増加すると、予想通り低磁場側にシフトするが、N9, N1, N3に帰属されるA, B, Cのシグナルは、共に高磁場側にシフトする。高磁場シフトの程度はBのシグナルが最も強い。このことは、³と異なり、¹⁵では1位, 3位, よか9位にプロトン付加が起っていることを示している。このように、イミダゾール環の置換基の位置によって、プロトン付加の場所と、強さが変化するものは、大変興味深い。プロトン付加の程度が一つづつ同量として、TFAの濃度がゼロのとき、3.0 equiv. mol.の時の化学シフト差(ppm単位、プラスは高磁場シフト)をとり、図5に示す。

(iv): 6'-N-ベンジルアデノシン: 次に6員環ピリミジン環の置換基のプロトン付加の影響を検討しよう。6位が窒素への置換体として、6'-ベンジルアデノシン(4)を選んだ。このシグナルの帰属は、アデノシンのシグナルと比べるとにより、比較的容易にできる。化学シフトのTFAの濃度変化の結果を図5に示す。このプロトン付加は、アデノシンと同様にN1に強く起こるが、N3及びN7にもわずかに起っていることが明らかになった。アデノシンとN6'に置換した化合物先ほどプロトン付加に差がでたので、次にN6'に置換した化合物を検討した。

(v): 6',6'-N,N-ジエチルアデニル: 6-クロロプリンとアデニルアデニルから6',6'-N,N-ジエチルアデニル(5)を合成し、その¹⁵N NMRスペクトルを測定した。シグナルの帰属は、スピル結合定数の大きさを、他の類似の化合物の化学シフトと比較から行った。TFAの濃度変化の結果を図5に示す。TFAの濃度の増加と共に、N1, N3, N7のシグナルがN3 > N1 > N7の順序で高磁場シフトするようになることがわかった。他の化合物と比較して注目すべきことは、N3に最もプロトン付加が強く起っていることである。また、先に比べてイミダゾール環にもかなり強くプロトン付加が起っていることも興味を引く。

(vi) 6-クロル-9-エチルプリン: ヒリミジン環に3位ノ基以外の置換基が入る場合のプロトン付加の挙動を調べるために、6-クロル-9-エチルプリン(6)を合成し、その¹⁵N NMRスペクトルを測定した。6-プロトン付加は、プリンやアデニン誘導体と異なり、7位の窒素にのみ起る。1位や3位の窒素には起らざり。しかも、TFAを3.0 equiv. mol 加えても、N7のシグナルの高磁場シフトは、わずか16.0 ppmである。6位に塩素が入るとプロトン付加が非常に起りにくいとわかる。

(vii) 6-クロル-7-エチルプリン: 6と比較をするために、7位にエチル基が置換した6-クロル-7-エチルプリン(7)を合成し、その¹⁵N NMRシフトのTFAの濃度依存性を調べた。又は6とは異なり、9位に容易にプロトン付加が起ることが明らかになった。また、3位の窒素にもかなりプロトン付加が起るが、1位の窒素には、この化合物でもプロトン付加は起っていないとわかった。

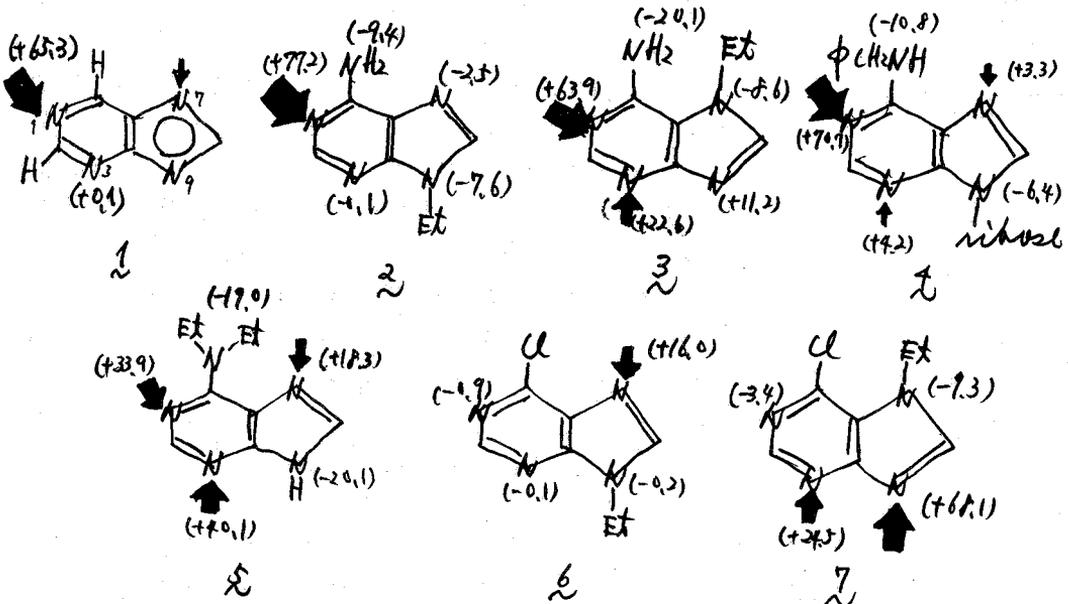


図5. プリン及びアデニン誘導体のTFAによるプロトン付加の位置と強度(カッコ内は化学シフト差(ppm))

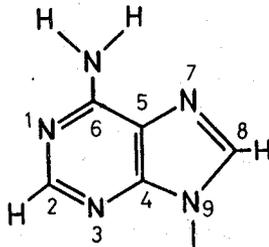
文献

- 1) "Fused Pyrimidines II" ed. by D.J. Brown. Wiley-Interscience New York, 1971
- 2) V. Markowski, G.R. Sullivan, and J. D. Roberts, JACS, 99, 714 (1977)
- 3) M. Witkowski, L. Stefank, and H. Januszewski. "Nitrogen NMR" M. Witkowski and G.A. Webb, ed. Plenum Press, New York, 1973 p 227.
- 4) J. A. Montgomery and H. J. Thomas, JACS, 85, 2672 (1963), J. A. Montgomery and C. Temple, Jr., ibid, 92, 5238 (1970)

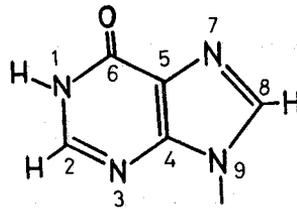
(味の素・中研) 甲斐正恒 小倉博子

はじめに

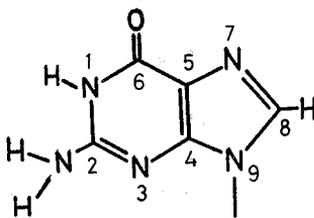
昨年の本討論会において、演者等は種々のモノヌクレオシド、モノヌクレオチド類の ^{15}N -NMR について報告し、 δ_{N} および $^2J_{\text{NN}}$ の pH 依存性を塩基構造との関連において明らかにした¹⁾。 $^2J_{\text{NN}}$ は分子の電子状態により鋭敏に変化し、かつその値は局所的な構造類似性によりほぼ定まっていることがわかった。したがって、 $^2J_{\text{NN}}$ は構造化学的に有用なパラメーターとなり得る要件を備えている。しかしながら、 $^2J_{\text{NN}}$ の値は一般に数 Hz 以下であり、種々の実験上の因子により観測が妨害されやすいことも同時に明らかとなった。 ^{15}N -ラベル核酸の構造化学的応用という観点からすれば、 ^{15}N の化学シフト、緩和時間 (NOE)、 $^2J_{\text{NN}}$ 以外にも有用な情報をもたらすパラメーターを探索するべきであろう。我々は J_{NH} 、 J_{CN} に注目してこれらの値と分子構造との関連を検討しており、 ^{13}C -NMR に関する一部のデータについては前回報告した^{1,2)}。 ^{15}N -核酸の ^{13}C -NMR スペクトルは ^1H -完全照射条件においても、複数の ^{15}N -核とのスピン結合により極めて複雑なスペクトルを示す (図-2)。 ^{15}N -NMR スペクトルにおいては ^{13}C -核とのスピン結合は、当然のことではあるが、観測できない。したがって、複雑に分裂した ^{13}C -NMR スペクトルの解析から得られる間隔 (J) が、どの ^{15}N -核とのスピン結合に由来するものであるかを定めることが困難であった。これらの $^2J_{\text{CN}}$ の帰属を確立し、分子構造との関連を明らかにすることが本報の目的である。

実験

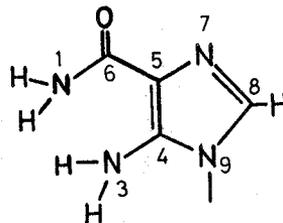
ADENOSINE



INOSINE



GUANOSINE



AICAR

図-1.
ヌクレオシ
ドの構造

かいのしょう まさつね, おぐら ひろこ

^{15}N -ヌクレオシド類(アデノシン, イノシン, グアノシン, AICA-R)は、各ヌクレオシド醗酵の培地中、無機窒素源として重窒素硫酸(98.4 atom%)を用い、かつその他の生育因子由来の ^{14}N 混入を最小にする条件で調製した。

10.1 MHz ^{15}N , 25.2 MHz ^{13}C NMRスペクトルは Varian XL-100 スペクトロメータに Nicolet NT-440 多核測定ユニットを付属させた装置により測定した。 ^{15}N -ケミカルシフトはキャピラリーに封入した重窒素硫酸水溶液のアンモニウムイオン由来の ^{15}N -シグナルから、 ^{13}C -ケミカルシフトは TMS (外部キャピラリー)からの ppm 表示である。三重共鳴スペクトル, ^{13}C - $\{^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ は Nicolet 社 L.F. Johnson 氏の御好意により、NT-200 (^1H ; 200 MHz) を用いて得られたものである。

結果と考察

^{15}N -ヌクレオシドの ^{13}C -NMRスペクトルは複数の JCN の存在により、一般に極めて複雑になる。一例としてグアノシン- ^{15}N の DMSO- d_6 溶液中の 25.2 MHz における ^{13}C -NMRスペクトルを図-2に示す。

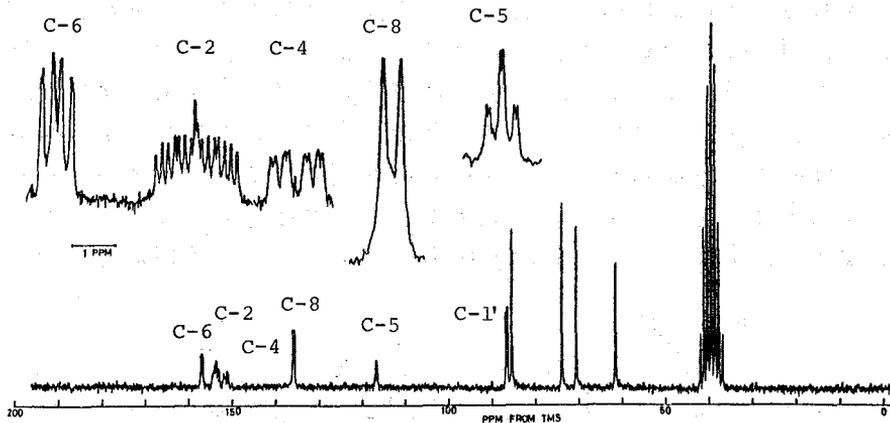


図-2. [^{15}N] グアノシンの $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C NMR スペクトル。 溶媒; DMSO- d_6

CHEMICAL SHIFTS*	GUANOSINE	INOSINE	ADENOSINE
C-2	153.6	146.8	152.5
C-4	151.3	148.4	149.2
C-5	116.6	124.7	119.5
C-6	156.8	156.8	156.3
C-8	135.7	139.0	140.0
N-1	126.9	154.2	215.3
N-3	145.4	193.7	202.2
N-7	226.3	228.2	220.2
N-9	149.6	154.2	149.3
NH ₂	52.9	---	61.1

表-1.

^{15}N -ヌクレオシドのケミカルシフト

* ppm from ext. TMS (C-13) or ammonium-N-15 ion (N-15)

J_{CN} の帰属法としては選択的に ^{15}N -ラベルしたヌクレオシドを合成するか、あるいは 1H -完全照射しつつ、更に ^{15}N -核を選択的に照射する三重共鳴実験によるかの何れかが適当である。本報では ^{15}N -ケミカルシフトの帰属が確立していること(表-1), およびより一般性があることを考慮して、三重共鳴法を用いて帰属した。三重共鳴実験 $^{13}C\{^1H, ^{15}N\}$ では、ロックに用いる 2D を含めると4種の異なる周波数を、必要があり、実験上の難点になるが、本法では 2D ロックチャンネルを ^{15}N -照射用のデカップリングチャンネルとして用いることにより装置の変更をさけた。

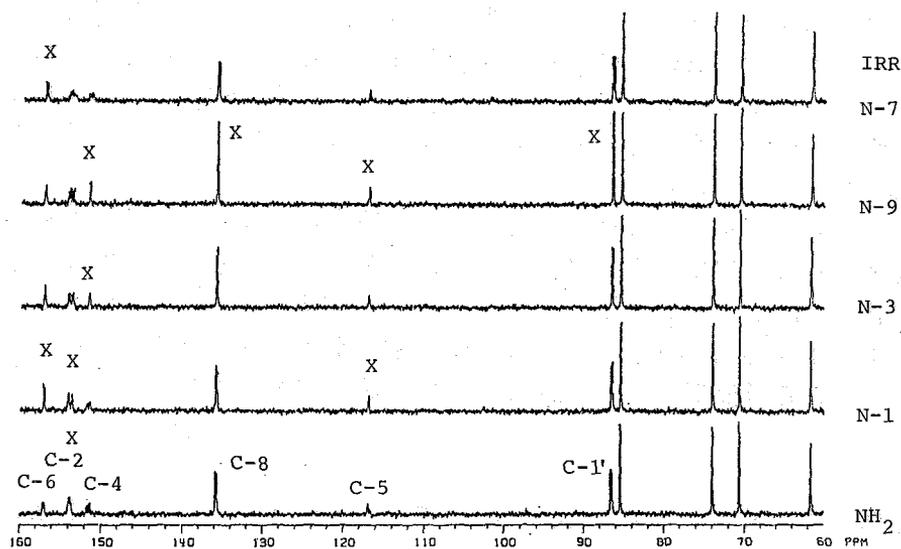


図-3. ^{15}N -7-アデノシンの $50.3\text{MHz } ^{13}C\{^{15}N, ^1H\}$ スペクトル。DMSO 溶液。
ケミカルシフト, ppm (TMS ext)。 ^{15}N -照射位置は右側に示した。

CARBON	J_{CN} , Hz		
	GUANOSINE	INOSINE	ADENOSINE
C-2	23.0 (NH_2)	8.1 (N-1)	-----*
	13.3 (N-1)		
	7.3 (N-3)		
	3.8 (N-9)		
C-4	19.8 (N-9)	18.9 (N-9)	19.6 (N-9)
	7.4 (N-3)	4.2 (N-3)	4.7 (N-3)
	2.2 (NH_2)		1.2 (N-7)
C-5	8.0 (N-9)	7.8 (N-9)	7.3 (N-9)
	8.0 (N-1)	7.8 (N-1)	1.0
	2.0	1.7	
C-6	11.1 (N-1)	10.1 (N-1)	20.6 (NH_2)
	6.3 (N-7)	6.3 (N-7)	4.3 (N-7)
	1.2		4.3
C-8			2.4
	10.2 (N-9)	10.1 (N-9)	10.4 (N-9)

表-2.
 ^{15}N - ^{13}C スピン結合定数
* 幅広いシグナルで J_{CN} 分離せず

図-3は ^{15}N -グアニシンの $\text{DMSO}-d_6$ 中の $50.3\text{ MHz } ^{13}\text{C}-\{^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ スペクトルである。 ^{15}N -核の照射位置は表-1に示した $\delta^{15}\text{N}$ に基づいており、Roberts等³⁾、Rüterjans等⁴⁾の報告したものと同一である。上から順に $\text{N}-7$, $\text{N}-9$, $\text{N}-3$, $\text{N}-1$, NH_2 のそれぞれに照射しつつ測定した $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ スペクトルが並べてある。“X”で印をつけたシグナルが特に強くデカップルされたものである。すなわち、 $\text{N}-7$ を照射すると $\text{C}-6$, $\text{N}-9$ を照射すると $\text{C}-4$, $\text{C}-8$, $\text{C}-5$ がそれぞれ単純化する。このような実験を他のヌクレオシドの DMSO 溶液についても行ない、表-2の結果を得た。ただし、スピン結合の値は 25.2 MHz の $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ スペクトルから読みとった値を与えてある。この理由は、当然のことではあるが、三重共鳴実験においては 2D -ロック機能が失なわれていることにより分解能が低下していることによる。したがって、数 Hz 程度の微細なスピン結合定数の帰属は確定できなかった。この点に関しては、近々 2D -ロックしつつ $^{13}\text{C}-\{^{15}\text{N}, ^1\text{H}\}$ 実験を行なう予定である。

表-2に示した $^2J_{\text{CN}}$ についてここでは軽く簡単にふれる。含窒素芳香環では良く知られていることではあるが⁵⁾、*lone pair*を有する窒素原子に隣接した炭素との間では極めて小さい値をとる。しかしながら、グアニシンでは2位のアミノ基の置換基効果により $J_{\text{C}(2)-\text{N}(3)}$, $J_{\text{C}(4)-\text{N}(3)}$ の値が著しく増大する。その他、塩基構造の $^2J_{\text{CN}}$ に及ぼす影響について既知の $^2J_{\text{CN}}$ 値と関連させて報告する予定である。

謝辞

三重共鳴実験を限られた *machine time* の中で、早速やっていたいただいた Nicolet 社 Roy Johnson 氏に感謝します。

文献

- 1) 甲斐荘, 小西, 才 17 回 NMR 討論会要旨集, 89 p., (1978)
- 2) M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 1031, (1979)
- 3) U. Markowski, G. R. Sullivan, and J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 714, (1977)
- 4) P. Büchner, W. Maurer, and H. Rüterjans, *J. Magn. Res.*, 29, 45, (1978)
- 5) G. C. Levy, and R. L. Lichter, "Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", John Wiley & Sons, New York (1979)

213 ^{15}N NMR による核酸塩基の相互作用の検出

(阪大蛋白質研) 〇京極好正, 渡辺まゆみ, 植口直樹, 岩橋秀夫
菅田宏 (三菱生命研) 大島泰郎 (味の素中研) 甲斐荘正恒

生体分子中の窒素原子は機能的に重要な役を果しており、特に相互作用の作用箇所に位置している場合が多い。したがってこれら生体分子の ^{15}N NMRスペクトルは分子間相互作用を敏感に反映することが期待される。われわれはこれまでにポリイミン¹⁾, フラビン²⁾の ^{15}N NMRについて報告してきたが、今回は核酸塩基の ^{15}N NMRと分子間結合の影響について述べる。

[実験] ^{15}N を95%以上エングリッチしたアデノシン, グアノシンと ^{15}N 核子を含む培地中、酸酵法で合成し、 ^{15}N アデノシンからクロロホルム可溶の2',3',5'-tri-O-acetyl-adenosine (A)とその8位とD化したもの、B化した(BrA)誘導体と合成した。 ^{15}N グアノシンからは、やはりクロロホルム可溶の ^{15}N -guanosine-2',3',5'-tri-O-isobutyl carboxylate (G)と ^{15}N -guanosine-3'-monophosphate (3'-UMP)と合成した。

^{15}N NMRはJEOL-PFT-100分光計で10.05 MHzで測定した。一部のスペクトルの測定にはJEOL-FX-100を用いた。試料は10 mmφチューブに入れ、中心キヤビラリ-中DMSO- d_6 に溶かした $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ を外部基準として用いている。測定は45°Cパルスで2~3秒の繰返して10000~100000回積算した。

[結果] (1) 核酸塩基間の水素結合対

アデニン誘導体はウラシルまたはチミン誘導体と相補的な水素結合対を有機溶媒中で作ることは知られているが、そのような水素結合の ^{15}N シフトの位置と強度(すなわちNOE)におよぼす影響を見た。互にAU結合を作る際N1位とN7位どちらがproton acceptorとして用いられ易いかが ^{15}N NMRで示されるか検討した。

^{15}N 化学シフト: Aのスペクトルは図1の如くなり、従来帰帰と確認した。

^{15}N 化学シフトと濃度に対してプロットすると図3の如くなる。これによると水

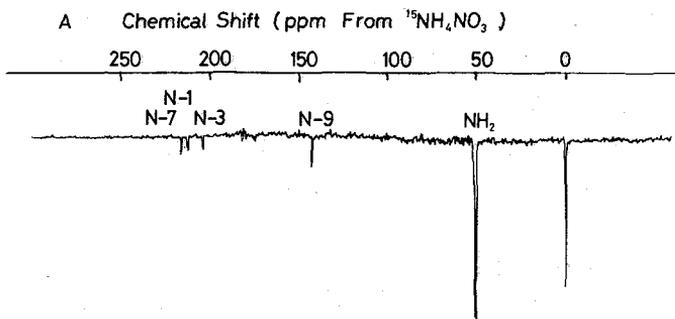


図1. ^{15}N エングリッチした2',3',5'-tri-O-acetyl-adenosineの ^{15}N NMRスペクトル。濃度0.05 M 10,000回積算。

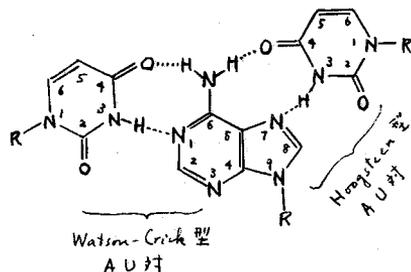


図2. AU, UAU水素結合対の構造。

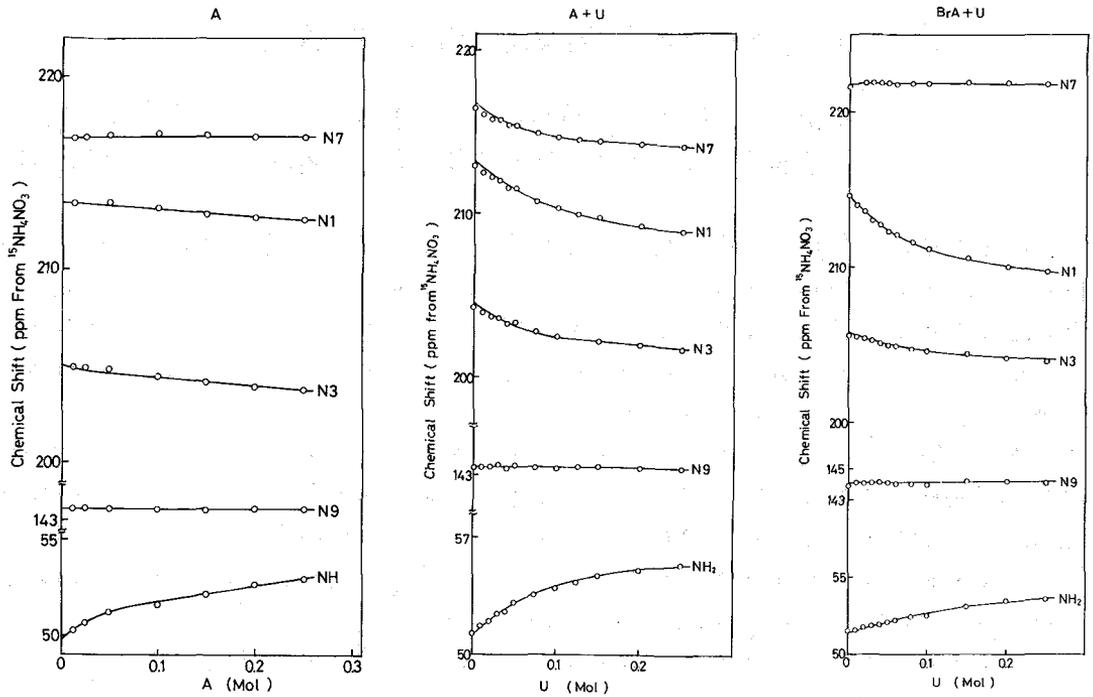


図3. ^{15}N -2',3',5'-tri-O-acyladenine (A) およびその 8-Br誘導体 (BrA) の ^{15}N 化学シフトの濃度依存性。A: A の自己会合, A+U: A (0.05 M) と各種濃度の 1-cyclohexyl-uracil (U) との混合変化, BrA+U: BrA (0.05 M) と各種濃度の U との混合溶液

素結合に直接関与する NH_2 基のシフトは低磁場シフトし、プロトンと受容する N のシフトは高磁場シフトするが、直接水素結合に関与していると考えられる N3 のシフトはかなり高磁場シフトする。 ^1H シフトの濃度変化の実験から A, U の自己会合定数, AU, AU_2 の会合定数と求め、その値を用いて上記のプロットから ^{15}N の限界シフト (limiting shift δ) を以前に述べた方法で計算した³⁾ (表1)。これを見ると AU_2 では N_1 , N_7 位の水素結合受容体として用いるべきであるにもかかわらず、その限界シフト差は 9 から 13 ppm と遠いがある。さらに AU 対の限界シフト差は 4 から 6 ppm であるが AU_2 の時の 4 割と 10 割であることから AU 対では N_7 を用いる Hoogsteen 型か Watson-Crick 型よりも優勢なことが示されている。この結果は前述に示す ^1H NMR の結論と一致する⁴⁾。これに対して、上図でもわかるように BrA-U の場合は Hoogsteen 型はほとんど形成されず。

表1. AU 対の ^{15}N 限界シフト (ppm) と会合定数。

	$\delta(^{15}\text{NH}_2)$	$\delta(^{15}\text{N}_3)$	$\delta(^{15}\text{N}_1)$	$\delta(^{15}\text{N}_7)$	K (M ⁻¹)
A	49.9 ± 0.1	205.3 ± 0.1	213.7 ± 0.2	216.9 ± 0.1	K(A-A) 2.45 ± 0.31
A-A	57.0 ± 0.3	201.7 ± 0.3	211.1 ± 0.4	216.9 ± 0.2	K(U-U) 5.71 ± 0.18
A-U	54.7 ± 0.1	201.7 ± 0.3	210.0 ± 0.2	213.9 ± 0.3	K(A-U) 81.6 ± 4.9
UAU	54.1 ± 0.6	200.8 ± 1.1	204.6 ± 1.0	213.9 ± 1.2	K(U-A-U) 347 ± 89 M ⁻¹

NOE: 図2に示されているようにNH₂基の¹⁵Nシグナルは強い負のNOEを示すが、これは直接結合したプロトンによる。しかしHが結合していない他の¹⁵N核も負のNOEを示すのは、近傍にあるHによる影響と見られる。特にα位とβ位の試料ではN₇シグナルは正のNOEを示した。8D結合物についてウラシル誘導体の添加量と変化する負のNOEを見ると徐々に0に近づいて行く。水素結合したウラシルのHがN₇核のNOEに影響を与えることが示された。

(2) Triostin A と G の相互作用

Streptomyces aureus の産生するβ-ラクタム抗生物質 Triostin A は核酸の生合成に阻害することが知られている。先の研究で、核酸塩基は単量体の段階で複合体を作り、特にア⁺⇒、グア⁺⇒誘導と強く結合することが示された³⁾。今回¹⁵N-GとTriostin A と複合体を作らせて¹⁵N NMRを測定した。Gのみではすべしシグナルが負のNOEを示しているが、Triostinと混合するとN₇のNOEは正に、他のシグナルのNOEは徐々に減少して行く。このことは複合体形成による、回転相関時間の増加によると考えられるが、Triostinの添加量に比べてNOEの変化が顕著なものは(特にN₇では)とこがあるが、Triostinに結合している微量の希磁性イオンの影響とも考えられる。化学シフトの方は、¹⁵NH₂、¹⁵NHのシグナルがTriostinの添加とともに二本に分かれ強度比が変うて行くので、Gの複合体≠非結合体との間、交換は10² sec⁻¹より遅いことが示された。

(3) リボヌクレアーゼ T₁ と 3'-GMP の相互作用

リボ核酸のグアニル酸残基部分のGp5'のエステル結合と機動的に切断するRNase T₁は3'-GMPと複合体を形成する。この結合の様式に関してこれまでにUVヤ円二色性の測定から、GのN₇位がRNase T₁のリン酸基の基によってプロトン化されているとの報告があったが、また、C8位のHの化学シフトの変化からプロトン化の徴候は無く、N₇とRNase T₁中のイミダゾール環と水素結合が形成された

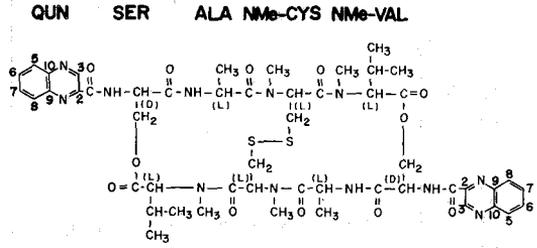


図4. Triostin A の化学構造

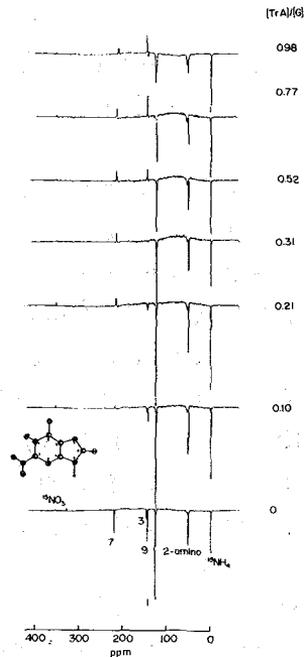


図5. 種々の比率にTriostin Aを加えたG (4mM) の¹⁵Nスペクトル。

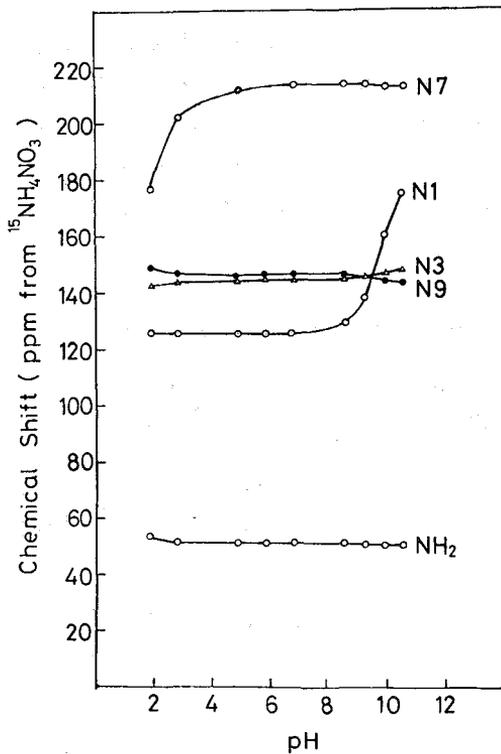


図6. ^{15}N -3'-GMP の ^{15}N 化学シフトの pH 依存性.

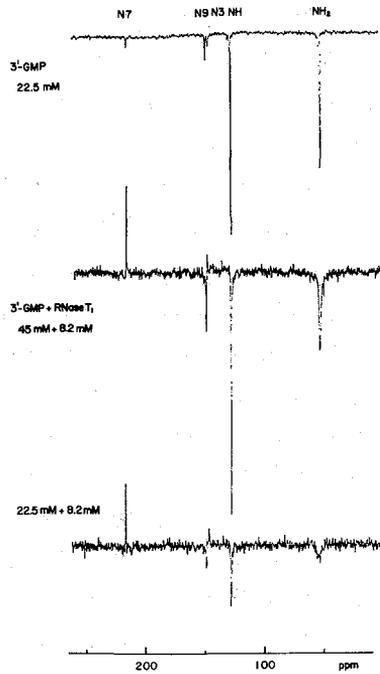


図7. ^{15}N 3'-GMP と RNase T₁ 混合物の ^{15}N スペクトル. 2~30,000 周

いふことが示されていふ”。今回、そのプロトタイプに比べて N_7 位に起る ^{15}N NMR の化学シフト、NOE に大きな変化が認められたと予想して測定を行った。
 3'-GMP の pH 変化による化学シフトは図6の通りであり、 N_7 がプロトタイプより pH 3 以下では高磁場へシフトし、しかも NOE は小さな値から大きな値へと変化する。これに対し RNase T₁ を加えた系では N_7 の NOE は正にあり、化学シフトは全く変化しない。この結果からは、やはり N_7 位にプロトタイプと比べていふことは結論できない。また N_7 位に水素結合の形成されていふか否かはこの結果からでは判断できない。最も顕著な変化は $^{15}\text{NH}_2$ 基のシフトと広中化とシフトであり、このことは 3'-GMP のアミノ基と介した強く RNase T₁ と結合していふことを示しており、それらの化学修飾の実験等から言われていふことと符合する。

[文献]

1. K. Kawano, Y. Ozaki, Y. Kyogoku, H. Ogoshi, H. Sugimoto and Z. Yoshida, J. Chem. Soc. Perkin II, 1319 (1978)
2. K. Kawano, N. Ohishi, A. Takai Suzuki, Y. Kyogoku and K. Yagi, Biochemistry, 17, 3854 (1978)
3. H. Sugeta, Bull. Chem. Soc. Japan, in press
4. H. Iwahashi and Y. Kyogoku, Nucleic Acids Research, Sp. Pub., s385 (1978)
5. Y. Kyogoku, B. S. Yu, H. Akutsu, M. Watanabe and K. Kawano, Biochem. Biophys. Res. Commun., 83, 172 (1978)
6. T. Oshima and K. Imahori, J. Biochem., 69, 987 (1971)
7. Y. Arata, S. Kimura, H. Matsuo and K. Narita, Biochemistry, 18, 18 (1979)

(名大医) 河野敬一, 鈴木彰子, 大石誠子, 八木國夫
(阪大蛋白研) 京極好正

1. はじめに

生体の電子伝達系を構成するフラビン酵素の構造と機能の研究は、これまで主としてその特徴的な吸収スペクトルと蛍光スペクトルを用いて行なわれてきた。一方、フラビンのイソアロキサジン環のどの部位がアポ蛋白あるいは基質と相互作用しているかを調べるためには溶液状態ではNMRが最も有力な手段と考えられる。しかし、フラビン蛋白の¹H-NMRの場合、ヘム蛋白などの金属酵素と異なり、フラビンのシグナルがアポ蛋白のシグナルと重なって活性中心近傍の有効な情報が得られない。また¹H-NMRではイソアロキサジン環の6, 7, 8, 9位(図1)についてのみ情報が得られ、酸化還元やアポ蛋白との結合に重要な役割を果たしている1, 2, 3, 4, 5, 4a, 10a位に関しては情報が得られない。この問題に関しては、各々の部位に¹³Cまたは¹⁵Nをラベルしたフラビンを用いることが有効と考えられる。われわれは2, 4, 4a, 10a位に¹³Cをラベルしたフラビンを合成し、卵白のリボフラビン結合蛋白(EWP)との相互作用を研究した¹⁾。また1, 3, 5位に¹⁵Nをラベルしたフラビンの¹⁵N-NMRスペクトルを測定した²⁾。フラビンの還元状態についても¹³Cおよび¹⁵N-NMRを測定し、構造に関する知見を得た³⁾。ここではリボフラビン(FR)とEWPとの相互作用を¹⁵N-NMRを用いて調べた結果を述べ、またフラビン蛋白を調べるための基礎データとしてフリーのフラビンの種々の状態での¹⁵N化学シフト、¹³C-¹³Cスピン結合定数を報告する。またルミクロム(Lc)のアルカリ性での互変異性について¹⁵N-NMRスペクトルから明確な結果を得たので併せて報告する。

2. 実験

(a) 試料 1, 3, 5-¹⁵N-FR²⁾, 1, 3, 5-¹⁵N-RBUT(2, 3, 4, 5'-リボフラビン酪酸エステル)³⁾, 1, 3, 5-¹⁵N-Lc²⁾は以前に報告した方法で合成した。2, 4, 4a, 10a-¹³C-FRは1, 2, 3-¹³C-マロン酸と¹³C-尿素を原料として合成した。EWPはRhodesらの方法⁴⁾により精製した。

(b) 測定 ¹⁵Nおよび¹³C-NMRの測定にはJEOL-FX 90Qを用い、それぞれ9.08 MHz, 22.53 MHzで測定した。測定の一部にはFX-100とPFT-100を用いた。¹⁵N-NMRシフト値の基準にはNH₄¹⁵NO₃を外部標準として用いた。

3. 結果と考察

(a) EWPの¹⁵N-NMR

フリーのFRの¹⁵N-NMRスペクトルはFMNのスペクトル²⁾とほぼ同じであるが、FRの溶解度が低いため十分なS/Nが得られない(図2)。特に5-Nのシグナルは¹H非照射の状態でも観測できず、微量の常磁性不純物の寄与が

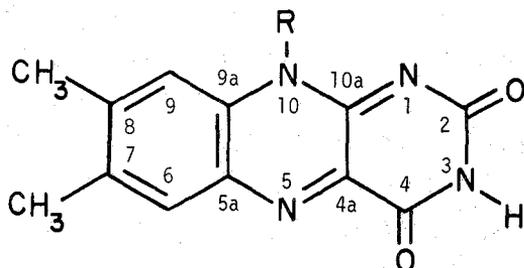


図1 中性酸化型フラビンの構造

かわのけいいち, すずきあきこ, おおいしのぶこ, やぎくにお, きょうごくよしまさ

考えられる。5-N は金属イオンとの結合部位であることがX線解析の結果から知られており、EDTAやchelexを加えてもシグナルの現われないことは常磁性金属との強い複合体の形成を示すと考えられる。FMN (リボフラビン-5'-リン酸エステル)では42.15 ppm に観測されるが²⁾、EWP との複合体ではそれより2.65 ppm 低磁場に現われ(表1)、5-N近傍が疎水的な環境であることを示している(5-Nのシフト値の溶媒変化から示唆される⁵⁾)。Walshらは化学修飾の実験から同様な結論を導いている⁶⁾。

1-NのシグナルはFRがEWPと結合することにより、0.7 ppm 高磁場シフトしている(表1)。高磁場シフトは水素結合として解釈できるが、このシフト値の大きさからはごく弱い水素結合の可能性しか考えられない。1-NシグナルはEWPとの結合により負のNOEを失っているが(図2)、これはFR分子の運動の相関時間が長くなったためと考えられる。

3-NのシグナルはEWPとの複合体形成により観測されなくなる(図2)。これが-1の強度の負のNOEによるものでないことは、¹H非照射のスペクトルでも3-Nが現われないことからわかる。シグナルの消失の原因としては相関時間の増大に伴うT₂の減少、N(β)-Hプロトンの速い交換、常磁性不純物の混在(EDTAやchelexを加えても変化しない)などが考えられる。また、EWPをモル比で $\frac{1}{2}$ だけFRに加えると、3-Nはブロードニングせずピークの高さが低くなることから、フリー体と複合体の交換は遅いことがわかる。3-Nシグナルの消失の原因については更に検討する必要があるが、直接結合しているプロトンとの双極子相互作用による線中の増大が原因だとすれば、巨大分子のイミノ窒素の観測は一般に困難ということになる。しかし図2に見られるように1-N、5-Nに関しては非常にシャープであり、同じ系の¹³Cのシグナル⁷⁾と対照的である。¹⁵Nの化学シフトは水素結合に鋭敏であるから、他のフラビン酵素にもこの方法を適用すれば基質との結合状態などに関して非常に有用

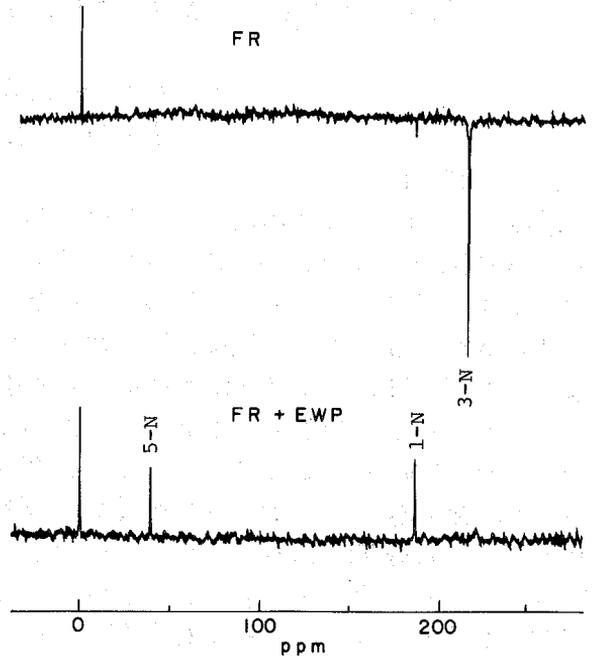


図2 リボフラビンおよびそのEWP複合体の¹⁵N-NMRスペクトル(1H-ノイズデカップリングモード、パルス繰返し時間2秒、約80,000回積算、FRとEWPは各々0.1Mリン酸バッファー、pH 7.1、に3mMの濃度に溶解)

表1 リボフラビンおよびそのEWP複合体の¹⁵N-化学シフト

	FR	FR+EWP
1-N	185.75	186.45
3-N	215.85	-
5-N	-	39.5

な情報を提供してくれるものと期待される。

(B) 酸・塩基中の FR の ^{15}N -NMR

^{15}N -NMR は窒素原子へのプロトネーションの様子を調べる上で非常に有効な手段であるが、フラビンに関しては酸化型が

3-N に、還元型が 1, 3, 5-N に 各々プロトネーションしていることを明確にしてきた³⁾。強酸中ではフラビンは 1-N にプロトネーションすると一般に考えられているが、2-C=O にプロトネーションする説もある⁷⁾。10% HCl 中の FR の ^{15}N -NMR スペクトルを測定してみると、強い負の NOE を受けた 2 本のシグナルが高磁場に観測される。これらを表 2 のように帰属したが、各々のシフト値は 1-N, 3-N にプロトネーションしている Lc のシフト値と対応する。以上のことから強酸中のフラビンでは 1-N にプロトネーションした互変異性体が優勢であると結論できる。一方、 ^1H 非照射の条件で測定しても 1-N, 3-N 共に ^{15}N -H のスピン・スピン結合は観測されず、N-H プロトンの交換が速いことがわかる。

FR の 0.1N NaOH 溶液についても ^{15}N -NMR スペクトルを測定し表 2 のように帰属した。DMSO 溶液の値との差をとると、3-N はプロトンがはずれることにより 56.6 ppm 低磁場にシフトしている。10% HCl 溶液についても DMSO 溶液の値との差をとってみると 1-N はプロトネーションによって 58.95 ppm 高磁場にシフトしている。プロトネーションによるシフトの変化は 1-N と 3-N でよく一致している。

(C) ^{13}C - ^{13}C スピン・スピン結合定数

$J(^{13}\text{C}-^{13}\text{C})$ は生合成の研究によく利用されるが、蛋白中のフラビンの存在状態を調べる上でも有用と考えられる。ここでは 2, 4, 4a, 10a- ^{13}C -FR を種々の状態で測定した。結果は表 3 にまとめてあるが、定性的な検討を以下に述べる。各スピン結合定数につ

いて比較していくと、 $^3J[\text{C}(2)-\text{C}(4a)]$ は近傍の N の孤立電子対がプロトンによって共有されると小さい値を示す。 $^2J[\text{C}(4)-\text{C}(10a)]$ が還元型のみ小さい値を示すのは、4a-10a の結合の変化に対応

表 2 リボフラビンの種々の溶媒中での ^{15}N -化学シフト

	in DMSO	in 10% HCl	in 0.1N NaOH
1-N	177.95	236.9	177.3
3-N	214.3	219.0	157.7
5-N	35.15	33.2	46.8

表 3 フラビンの種々の状態での ^{13}C - ^{13}C スピン結合定数

Assignment	$J(^{13}\text{C}-^{13}\text{C})$ (Hz)			
	Oxidized RBUT	Reduced RBUT	Protonated FR (in 10% HCl)	Deprotonated FR (in 0.1N NaOH)
$^1J[\text{C}(4)-\text{C}(4a)]$	75.4	78.9	78	65
$^1J[\text{C}(10a)-\text{C}(4a)]$	53.4	84.2	63	55
$^2J[\text{C}(4)-\text{C}(10a)]$	11.0	5.6	11	10
$^2J[\text{C}(2)-\text{C}(10a)]$	2.5	2.4	3	2
$^2J[\text{C}(2)-\text{C}(4)]$	1.5	1.1	1	0
$^3J[\text{C}(2)-\text{C}(4a)]$	3.3	0.0	0	6

するものであろう。直接結合した炭素間のスピン結合定数は第一近似として結合の次数に比例するから $\int [C(10a)-C(4a)]$ が還元型で大きい値を示すのは妥当といえる。 $\int [C(4)-C(4a)]$ はプロトンの外れたFRで小さい値を示しているが、この結合次数については報告例がなく興味深い結果である。

(d) ルミクロムの互変異性

ルミクロムは従来モノアニオンの状態では3位のN-Hプロトンが外れると考えられていた。しかし、その¹⁵N-NMRスペクトルでは1-Nと3-Nのシグナルが負のNOEを受けており、化学シフトのpH滴定を行なうと(図3)、1-N、3-Nの両者ともシフトする。中性では溶解度が低いので測定困難であるが、図3に黒丸で示したDMSO中のシフト値がよく対応する。この結果から図4に示すようにアルカリ性ではルミクロムは1-Nにプロトネーションした構造と3-Nにプロトネーションした構造の平衡になっていることが結論される。

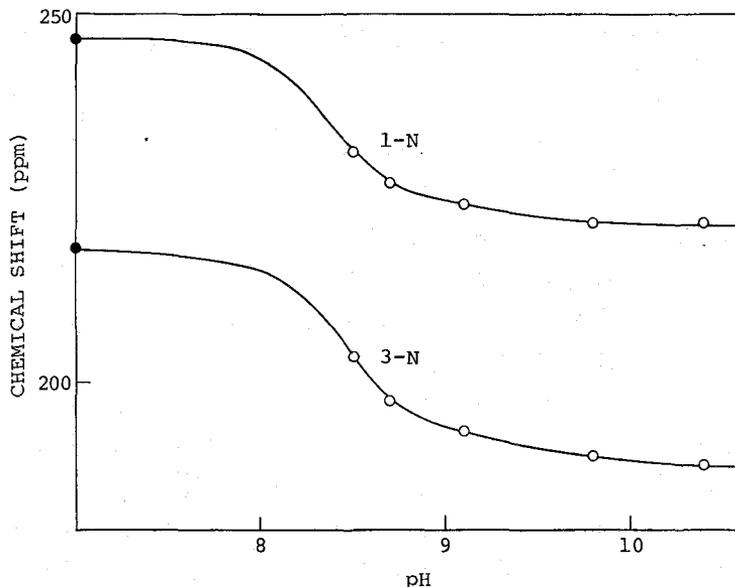


図3 ルミクロムの1-Nと3-Nの化学シフトのpH滴定曲線 (炭酸バッファー溶液, 飽和濃度, 各pHでのスペクトルは繰返し時間1秒, 約100,000回積算)

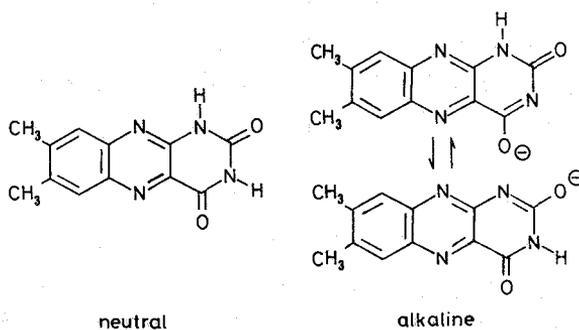


図4 ルミクロムの中性とアルカリ性における構造

- 1) K. Yagi, N. Ohishi, A. Takai, K. Kawano and Y. Kyogoku in "Flavins and Flavoproteins", T. P. Singer, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1976, pp. 775-781
- 2) K. Yagi, N. Ohishi, A. Takai, K. Kawano and Y. Kyogoku, *Biochemistry* **15**, 2877 (1976)
- 3) K. Kawano, N. Ohishi, A. T. Suzuki, Y. Kyogoku and K. Yagi, *Biochemistry* **17**, 3854 (1978)
- 4) M. B. Rhodes, N. Bennett and R. E. Feeney, *J. Biol. Chem.* **234**, 2054 (1959)
- 5) Y. Kyogoku, K. Kawano, N. Ohishi, A. T. Suzuki and K. Yagi in "Flavins and Flavoproteins", K. Yagi and T. Yamano, Eds., in press
- 6) C. Walsh, J. Fisher, D. W. Graham, W. T. Ashton, J. E. Brown, R. D. Brown and E. F. Rogers, *Biochemistry* **17**, 1942 (1978)
- 7) T. P. Fetisova, I. L. Volodarskii, V. Z. Mel'nikov, S. F. Dymova, Zh. K. Torosyan, I. M. Kustanovich and V. M. Berezovskii, *J. General Chem. USSR* **41**, 2329 (1971)

第 3 日

11 月 6 日 (火)

301 各種パルス系列の応用

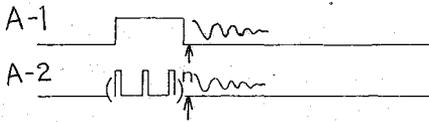
(日本電子) 〇細野政美, 大内京城, 松下和弘
中川恵策, 今成 司

I. はじめに

FTNMRは広い範囲を同時に励起し、短時間に情報を得ることや、種々のパルステクニックを使用し、それぞれの目的に合わせた有用な情報を得るというメリットがある。しかし、広い範囲のスペクトルが一度に励起されるため、非常に大きな Dynamic Range を必要とする系の測定が困難であった。そのため、不要な信号を飽和させる方法や、WEFT法が用いられている。しかしながらこれらの方法は必要な信号をも消去する欠点がある。こうした欠点を解決する方法として、Morris らの選択励起FTNMR¹⁾やDadok らの相関NMR²⁾があげられる。選択励起法はスペクトルを単純化するためにも使用でき、励起するパルス系列に種々のものが考えられる。このパルス系列を用いた測定データとその問題点を報告すると共に、その他の種々のパルス系列の展開によって可能となった応用データも合わせて報告する。

II パルス系列とサンプル

A) 部分測定



B) 2DNMR

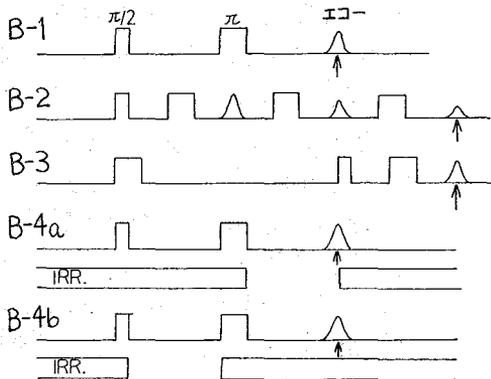


図1 パルス系列のタイムチャート
(↑より サンプリング開始)

測定は、日本電子製 FX200, FX100にFG/BGユニットを付加して行った。種々のパルス系列は、Programmable Multi Pulser³⁾により発生させた。

実験に使用したパルス系列を図1に示した。

A) 部分測定

A-1 選択励起 Weak Power法(SEL WEAK)

A-2 " Pulse Modulation法(SEL PUL)

部分測定に使用したRF出力(Pulse)は目的に合わせ可変した。Softwareはデータの縦軸精度を32bitとしたDouble Precision法であり、AD変換器は12bitである。

B) 2次元FTNMR (2DNMR)

B-1 Hahn Echo 法

B-2 Curr-Purcell-Meiboom-Gill 法

(C.P.M.G)

ほそのまさみ おおうちむねき まつしたかずひろ
なかがわけいさく いまなりまもる

B-3 $\pi \sim t \sim \frac{\pi}{2} \sim \tau \sim \pi \sim \tau \sim$ Echo法 (W.E.H.E) B-4 a.b Modulation of Carbon-13 Spin Echoes in "Gated Decoupling" (H.E. Gated)

Softwareは演者らが開発したもの(2DNMR)を使用した。測定における $\frac{\pi}{2}$ パルス幅は、 ^1H , ^{13}C 核とも20 μsec である。

測定したサンプルは、それぞれ次のように調整した。

- Ⓐ 2.4 mg, 20 mg リゾチーム (生化学研究所製卵白) を溶媒 ($\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O} = 9:1$) 0.2 ml に溶解し、5 mm ϕ チューブに封入した。
- Ⓑ 500 mg エルスロマイシン (アルドリッチ製) を 1.5 ml $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ に溶解し、10 mm ϕ チューブに封入した。
- Ⓒ 100 mg シンコニジン (和光純薬製) を 1.5 ml CDCl_3 に溶解し、10 mm ϕ チューブに封入した。

III 部分測定

C-H間のカップリング定数を測定する場合、スペクトルは非常に複雑に重なり合う。しかし目的の核の磁化のみ励起し、C-H間のカップリング定数を測定すればスペクトルは非常に単純化でき、解析が容易になる。演者らのように、一つのピークのみ又はある範囲のピークのみを励起する方法(選択励起法)が2種類ある³⁾。一つはパルスの出力を下げ、パルスを長い時間加えある範囲のみ励起する方法である(選択励起法 Low Powerという)。このパルス出力は通常FTNMRで使用される

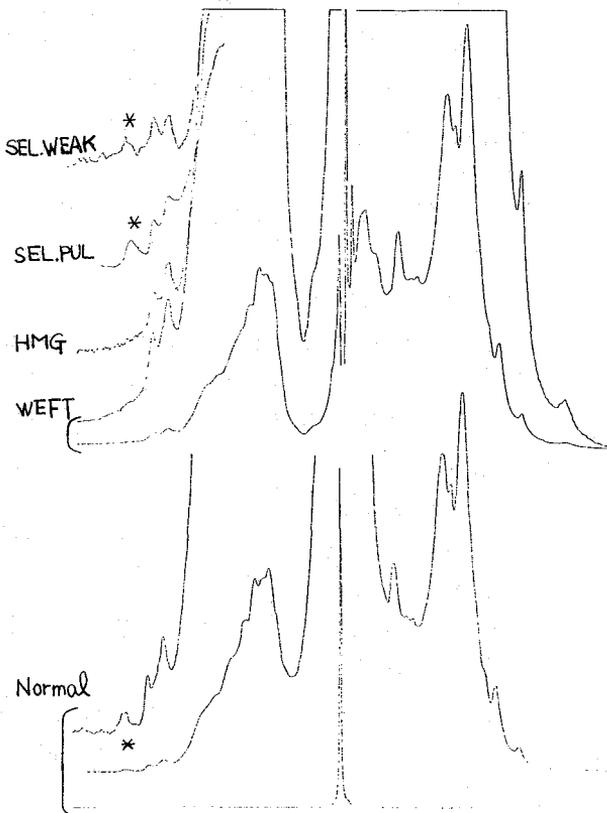


図2. 3 mM リゾチームの ^1H NMR (溶媒 $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O} = 9:1$) 99.60 MHz

パルス出力の 10^4 前後を使用する。もう一つはMorrisらの報告のように、出力を小さくし非常に短いパルスを数十回繰り返し、このパルス系列により1個の核の磁化のみ励起する方法である。(選択励起法 Pulse Modulationという)。これらのパルス系列は、次のように ^1H 測定にも応用される。

^1H -FTNMRにおいて軽水中の微量サンプルのように非常に大きなDynamic Rangeを必要とする系を測定することは困難とされており、荒田らの相関NMR⁴⁾が有効な手段とされている。この相関NMRは有効な手段であるが、緩和時間の測定(T_2 等)が困難であることや、種々のパルステクニックが使用不可能等の不利な点がある。FTNMRでは、重水中で測定、溶媒を飽和したHomo Gated Decoupling (HMG) 法やWEFT

法での測定等で Dynamic Range を解決していた。しかし重水中では、NHプロトン等、重水と交換するプロトンはD置換してしまい測定できないという問題がある。

一つの例としてリゾチームの軽水中でのスペクトルを図2に示す。下より Normul / WEFT / HMG / SEL, PUL (5 μ sec \times 100回) / SEL, WEAK (1/2 パルス 5msec) である。測定は Double Precision 法を使用しているので、軽水中での小さな信号も検出可能である (Normal)。さらに種々のテクニックを用いた測定を行った。WEFT法, HMG法では低磁場のNHプロトン (☆) が消去している。Normal, 選択励起法ではNHプロトンは観測されている。水のプロトンと交換しているNHプロトンは水のプロトンの緩和時間に依存しているため、WEFT法ではこのNHプロトンが消えるのであろう。またHMG法では、水のプロトンが飽和したため交換しているNHプロトンも消えるのであろう。つまりサチュレーショントランスファーを引き起こしていると考えられる。SEL, WEAK法は狭い範囲のみを励起するため Pulse 幅が長くなるという欠点を持っている。つまり T_2 の短い系においては Pulse 幅が無視できなくなってくる。このため T_2 の短い系を測定することは不可能である。SEL, PUL 法は、modulation が加わり高調波 (2f, 3f etc) が出るという問題があり、測定に注意を要する。

以上のようにそれぞれの測定法に長所、短所があるが、Double Precision 法と選択励起法を並用すれば、軽水中での測定が比較的容易に行える。

IV 2次元FTNMR (2DNMR)

2DNMRはAueらの報告⁵⁾以来多数の報告があり、現在では種々のパルス系列が使用されている。この2DNMRの詳細は文献を参照されたい⁵⁾。

1. ^1H 等 Homo Coupling のある系

^1H や ^{19}F 等における2DNMRのパルス系列は Curr-Purcell 法や C.P.M.G. 法では、Coupling 定数と Pulse の繰り返し時間との関係から、J modulation を観測しにくいいため、Hahn エコー法を使用している。しかしながらこのパルス系列で

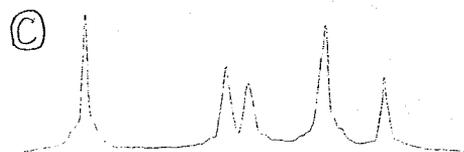
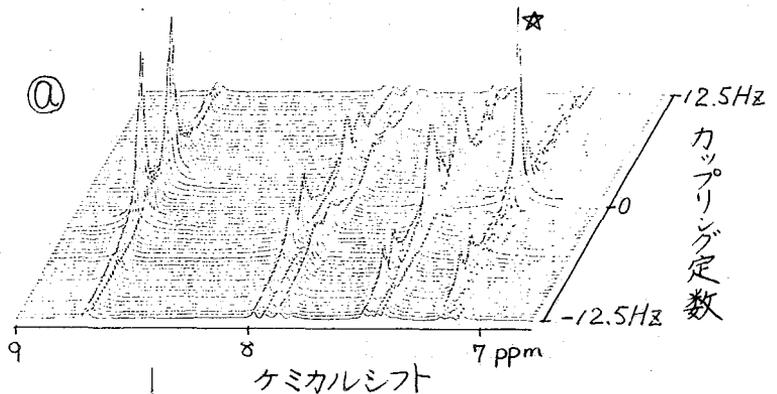


図3 シンコニジンの ^1H 2DNMR スペクトル (溶媒 CDCl_3)

は、図3㉔のように溶媒のピークが重なってしまうため解析を困難にしている。我々はこの問題を解決すべく、 π - τ - $\pi/2$ - τ - π - τ のパルス系列(図1, B-3)を考案し、この問題を解決した。 π - τ - $\pi/2$ パルスで溶媒を消去するとともに、溶質の信号を励起する。それに続く π パルスでスピンを反転し、エコー信号を得る。このエコー信号を2次元でFTすることにより2DNMRスペクトルを得る。図3㉔のスペクトルはHahn エコー法で得た2DNMRスペクトルである。☆ピークはSolvent中の CHCl_3 による信号である。図3㉕は π - τ - $\pi/2$ - τ - π - τ パルス法で得たものである。図3㉔と比較して明らかのように、 CHCl_3 のピークが消去している。このパルス系列は溶媒と溶質の緩和時間(T_1)に差のある場合に使用できる。また2DNMRで得たスペクトルを 45° で投影(Projection)を行うと、 ^1H のケミカルシフト情報のみが得られる(図3㉖)。

2. ^{13}C 等異種核の結合がある系

^{13}C 系における2DNMRのパルス系列は、 ^1H 照射にはGated Decoupling核を使用し、 ^{13}C 観測にはHahn エコー法が使用されている。Turnerらは、コレステロールの2DNMRスペクトル⁶⁾を得ているが、炭素数の多いサンプルの2DNMRスペクトルの報告は非常に少ない。我々はエルスロマイシンのスペクトル図4を得た。このスペクトルより、個々のC-H Coupling定数が分離して得られる。 ^{13}C 系の2DNMRにおける問題点は、非常に測定時間が長いことである。約15%濃度であるが、この測定には6時間程度を要した。

V まとめ

FTNMRにおいて、種々のパルステクニックを用いての測定は、目的の情報のみを取り出すことができ有用である。さらに他の測定結果も合せて報告する。

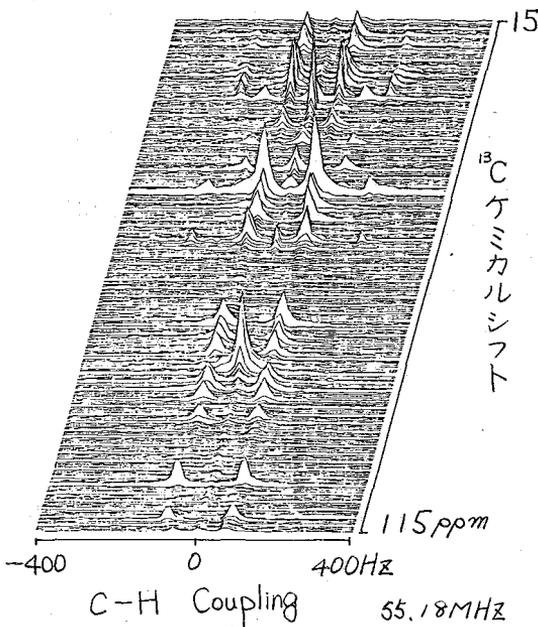


図4 エルスロマイシン

炭素- ^{13}C 2DNMRスペクトル

- 1) G.A.Morris et al. J. Mag. Res. 29 443 (1978)
- 2) J.Dadok et al. ibid. 13 243 (1974)
- 3) 細野 et al. 第14回応用スペクトロトリー要旨集(1978)
- 4) Y.Arata et al. J. Mag. Res. 21 67 (1976)
- 5) W.P.Ave et al. J. Chem. Phys. 64 2229 (1976)
- 6) D.L.Turner et al. J. Mag. Res. 29 587 (1978)

○(東大計セ) 小澤 宏, (東大理) 荒田 洋治, 藤原 鎮男

相関NMR分光法はスピン系を高速周波数掃引したときに得られるシグナル(高速掃引応答)を処理して定常スペクトルを求める方法である。我々は測定のダイナミックレンジの点でこの方法がパルスFT法より有利であることに着目し, JEOL PS 100 分光計を改造し TI 980 B 小型計算機と組合せて相関NMRシステムを作成してきたが, 今回はデータ処理の精度と実行速度の面から検討してみたい。

1. データ処理精度

相関NMRの処理の一部をなすフーリエ変換は通常FFTの手法により実行され, $N = 2^m$ 点のデータのFFTの第 l 段階 ($l=1, 2, \dots, m$) においては回転因子

$$\exp[i\pi \frac{2k-j+1}{k}] \quad (j=1, 2, \dots, k) \quad \text{ただし } k = N/2^l$$

を係数とする積和の計算が行なわれる。このため回転因子の求め方がFFTの精度および実行速度に大きく影響する。この値の求め方としては次のものが考えられる。

[方法A] j が整数のとき $C = -2 \sin^2 \frac{\theta}{2}$, $S = \sin \theta$ とおくと漸化式

$$\sin\{(j+1)\theta\} = \sin j\theta + C \sin j\theta + S \cos j\theta$$

$$\cos\{(j+1)\theta\} = \cos j\theta + C \cos j\theta - S \sin j\theta$$

が恒等的に成立する。この式は $\sin j\theta$, $\cos j\theta$ が与えられれば, 第2, 3項を付け加えるだけで $\sin\{(j+1)\theta\}$, $\cos\{(j+1)\theta\}$ が求められることを示している。このため任意の l に対して $\theta = -\frac{\pi}{k}$ とおくことにより $j=1, 2, \dots, k$ に対する回転因子を順次計算することができ, 計算機のメモリを節約しつつ必要な回転因子が必要な順序に次々に求められるという点でこの方法はきわめて有力である。

[方法A'] 方法Aに類した計算方法は他にもある。例えば x に関する漸化式

$$x_j = 2(\cos \theta) x_{j-1} - x_{j-2} \quad \text{ただし } x_0 = 0, x_1 = 1$$

で求められる x_j を用いると

$$\sin j\theta = (\sin \theta) x_j, \quad \cos j\theta = (\cos \theta) x_j - x_{j-1}$$

が恒等的に成立する。これを用いれば方法Aと同様に二つの定数 $\sin \theta$, $\cos \theta$ から回転因子を順次求めることができる。

[方法B] 回転因子を計算する第2の方法は単純に多項式近似を用いて $\sin \theta$, $\cos \theta$ を1点ずつ求める方法である。いま多項式を4項で打ち切ることになると

$$\sin \frac{\pi z}{4} = (((-a_3 z^2 + a_2) z^2 - a_1) z^2 + a_0) z$$

$$\cos \frac{\pi z}{4} = ((-b_3 z^2 + b_2) z^2 - b_1) z^2 + b_0$$

を解くことになる。ここで a_i, b_i は $-1 \leq z < 1$ の範囲でこの多項式が最良の値を与えるように選んだ係数である。この方法を用いる場合, θ が $-\frac{\pi}{4} \leq \theta < \frac{\pi}{4}$ の範囲にないときは $-1 \leq z < 1$ の範囲に入るように z と適当な偶数との和または差 z' を作って $\sin \frac{\pi z'}{4}$, $\cos \frac{\pi z'}{4}$ の値を求め, このどちらかに適当な符号を付けて求めるべき値

おざわひろし あらたようじ 小じわらしずお

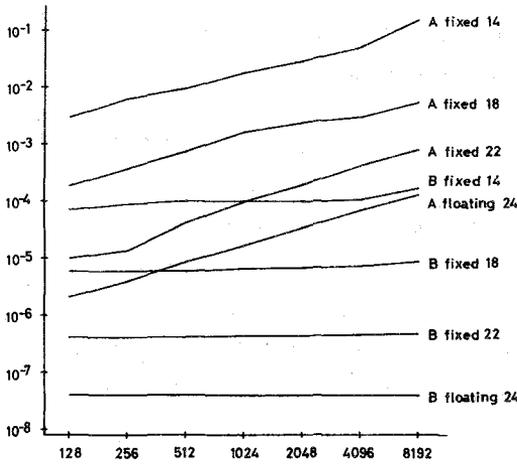


図1. $\sin \theta, \cos \theta$ の値の最大誤差

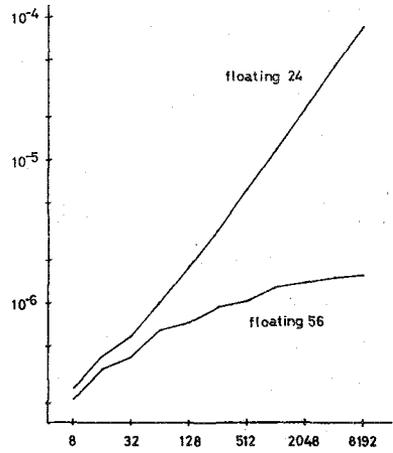


図2. 方法AによるFFTの誤差

としなくてはならず、この点で方法Bは方法A, A'より実用上手間がかかる。

[方法C] 回転因子を求める第3の方法は $0 \leq \theta \leq \frac{\pi}{4}$ の範囲の p 個の点 ($i=1, 2, \dots, p$) について $\sin \theta_i, \cos \theta_i$ の値を束の形でメモリに記憶しておき、内挿により必要な値を求める方法である。この場合も θ が上記の範囲にないときは方法Bの場合と同様に範囲内で値を求め、これに適当な処理を加える必要がある。内挿の方法としては二点間を単純に直線近似するほか

$$\sin \theta = \sin \theta_i + \left[\frac{\cos \theta_{i+1} - \cos \theta_i}{2} \frac{\theta - \theta_i}{\theta_{i+1} - \theta_i} + \cos \theta_i \right] (\theta - \theta_i)$$

$$\cos \theta = \cos \theta_i - \left[\frac{\sin \theta_{i+1} - \sin \theta_i}{2} \frac{\theta - \theta_i}{\theta_{i+1} - \theta_i} + \sin \theta_i \right] (\theta - \theta_i)$$

という複雑な式も提案されている [J. W. Akitt: J. Magn. Resonance 33, 665 (1979)]。

図1に方法AおよびBを用いて仮数部24bitのfloating(浮動小数点)形式、数値部14, 18, 22bitのfixed(固定小数点)形式で $0 \leq \theta \leq \frac{\pi}{4}$ の範囲を n 等分した点の $\sin \theta, \cos \theta$ の値を求めたときに生じる誤差の最大値を示した。この図から方法Aを用いて $\sin \theta, \cos \theta$ の値を求める場合には、計算を短いbit数で行なうと誤差が急激に増加することがわかる。これは漸化式において常時使用する二つの定数(CおよびS)の最小bitでの切り捨て(または丸め)が相対的に大きくなるためで、しかも漸化式を用いている結果、計算する点の数が増すにつれてこの誤差は求めるべき値に積算されてくる。特に方法A'においては方法Aよりこの誤差の積り方が大きく、fixed形式で計算する限り方法A'はほとんど実用にならないことがわかった。

図1の方法Bをfloating形式、fixed形式で用いたときの誤差はそれぞれ最小bitの丸め分、あるいはその数倍程度に相当し、多項式を4項までとれば十分な精度が得られることを示している。また方法Cは方法Bに比べて計算が面倒な割には精度が上らないことがわかった。

図2はfloating形式で方法Aにより作ったFFTプログラムを用いて $-1 \leq x \leq 1$ の範囲の一樣乱数を2回フーリエ変換して元の値に戻したときに生じる平均誤差をデータ点の数に対してプロットしたものである。図は大きなメモリを必要とする

データ領域の仮数部を24bitに固定しておいても、二つの定数CおよびSの仮数部を24bitから56bitに上げるだけで誤差が大幅に減少することを示しており、この二つの定数の精度が重要であることが確認される。

さらに図3は方法Aにより回転因子を求めるFFTプログラムを用いて実測の高速掃引応答から相関NMRスペクトル(wingを含めて2048

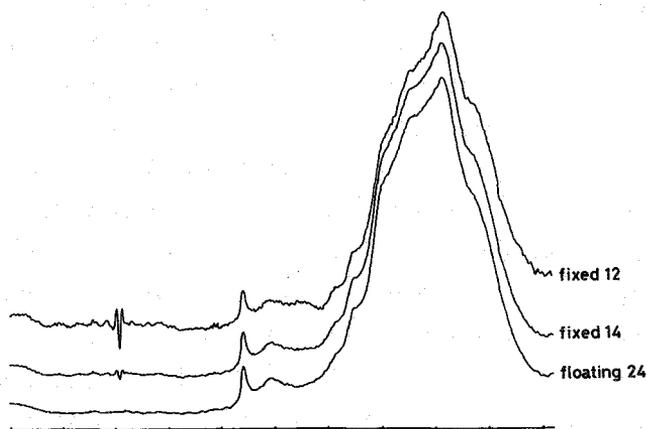


図3. 方法Aにより求めた Bence Jones タンパク重水溶液のスペクトル

点を求めた例であり、計算を仮数部24bitのfloating形式で行なうと正しいスペクトルが得られるが、数値部12, 14bitのfixed形式で行なうとゴースト振動が生じることを示している。fixed形式で計算する場合、この振動は数値部を18bitに上げるまで消えず、一般に1語が16bitの小型計算機でfixed形式で計算する場合には数値部を14bitとし、15bit目が1になったときに値を1/2に規格化しなおして1語をあふれないようにしていることを考えれば、方法Aを用いて相関NMRの処理を行なうときはfloating形式で計算を行なう必要があることがわかる。

2. データ処理の高速化

我々が作成した相関NMRシステムにおいては、従来、高速掃引応答からスペクトルを求める過程で必要な2回のFFT、および1回目のFFTの結果に $\exp[-ibt^2/2]$ (bは掃引速度)を乗じる計算はすべて仮数部24bitのfloating形式で行なってきた。このうち特にFFTに関しては方法Aを用いて回転因子を求めてきたが、これは前にも述べたようにこの方法によれば計算機のメモリを節約しつつ必要な回転因子を自動的に実用上十分な精度で求めることができるためである。また計算全体もfloating形式で行なったのは、fixed形式のときのように中間結果が大きな値になりメモリをあふれるという心配をしなくて済むためである。

しかし本システムで用いている小型計算機にはfloating形式演算用のハードウェアがなくその処理はサブルーチンを呼んでソフトウェア的に行なう必要があるため、floating形式で計算を行なうと時間がかかるという欠点があった。そこで我々はデータ処理の高速化をめざして前述の結果にもとづき次の改良を行なった。

- (1) 高速掃引応答のサンプリングに先立ち、データ点の数、掃引幅、掃引時間などの条件が決つたらまずデータ処理の際必要となる回転因子および $\exp[-ibt^2/2]$ の値を仮数部24bitのfloating形式で方法Bにより精度良く計算し、これを数値部14bitのfixed形式に変換して表の形でメモリに記憶しておく。
- (2) 次に個々の高速掃引応答のサンプリングおよび積算をfloating形式で行ない、floating形式のままメモリにしまう。

(3) データ処理を行なうときは、まずメモリ上の処理したい高速掃引応答を数値部 14 bit の fixed 形式に変換し、これを (1) で作った fixed 形式の表の値を参照しながら処理して、14 bit 精度のスペクトルを求める。

この方法においては、回転因子および $\exp[-ibt^2/2]$ の値はデータ処理の際一つずつ作るのではなくあらかじめ作成されている表から選ぶだけで済み、しかも計算は fixed 形式で行なわれるので、データ処理過程の速度を大幅に上げることができる。特に回転因子は、例えば 4096 点のデータの FFT を行なうときは 2048 組 (4096 個) の値を合計 10 万回程度使用する必要があるが、従来のシステムではこの値を必要になるたびに漸化式を用いて計算していたわけであるが、新しいシステムでは表を作成する段階で個々の値を 1 回だけ計算すればよく、方法 A の代りに方法 B を用いたのにもかかわらず、データ処理に要する時間は大幅に短縮された。また同一条件で複数の高速掃引応答を処理する場合には、計算機をリセットしない限り以前に作った表をそのまま使用することができるため、例えば 2048 点のデータを処理するのに従来のシステムでは 3 分 30 秒かかったのが新システムでは 1/7 の 30 秒ですむようになり、この比はデータ点の数が増すとともにさらに開いてくる。

また高速掃引応答のサンプリングおよび積算は従来どおり floating 形式で行なっているが、これは A/D 変換器の分解能を最大に保ちつつ多数回の積算を行なうことを可能にするためである。すなわち、もし積算を fixed 形式で行なうとすれば、積算の途中で値が 14 bit を越える点が生じるたびに A/D 変換された値およびそれまでの積算結果を 1/2 に規格化しなおしてすべての値を 1 語におさめるようにしなくてはならず、このため積算効率が低下するとともに積算結果に歪みを生じてしまう。なお (2) で積算結果を floating 形式のままメモリにしまっているのは、これをあとでカセットテープに出カし、積算結果そのままを大型計算機で処理できるようにするためである。

さらに、今回作成したシステムにおいては、データ処理は最終的にはすべて数値部 14 bit の fixed 形式で行なっていることになるが、この精度は従来方法 A を用いて仮数部 24 bit の floating 形式で求めていた回転因子の精度よりむしろ良く、拡大スペクトルを求める場合でも十分な精度があることが確認された。なお本システムは入出力部分を除いて FORTRAN によりコーディングしたが、14 bit fixed 形式の値同志の積を求める部分は倍長レジスタが使用できるよう特にアセンブラで作成し、乗算の過程で精度が落ちることのないよう注意を払った。

(東大理) 荻野孝史, ○荒田洋治, 藤原鎮男

我々は、水溶液系の高感度測定法である相関NMR法の開発、改良を行うと同時に、生体系への応用を行ってきた。今回は、方法論的立場から生きた大腸菌細胞の代謝の動的過程を対象として相関NMR法の応用の可能性を分解能、感度およびダイナミックレンジの点から検討した。今回は、大腸菌細胞の嫌氣的代謝反応および細胞膜透過反応の動的過程について詳細に検討したので報告する。

〔実験〕 大腸菌 K12 (IAM 1264) をスラントから移植し、一晚 M9 液体培地で前培養した後、適当な生理的条件にある菌を遠心機で集菌する。数回洗菌後、適当な濃度の¹³C-グルコースをNMR試料管に移し、N₂ ガス還流下グルコースを加えて封じる。これをNMRプローブ内(30°C)で嫌氣的に培養し、そのままNMRの測定試料とする。NMR測定は、JEOL PS-100を基礎に開発した相関NMRシステムを用い、通常2-5分間積算した。細胞内代謝物の濃度は、膜蛋白質濃度がOD1.5 (600nm)に対して10mg/ml および膜蛋白質1g当りの全細胞内体積が3.4±0.1mlであると仮定し推定した。

〔結果〕 大腸菌の嫌氣的代謝：相関NMRを用いて、大腸菌のグルコース代謝の時間的変化をその初期過程から非破壊的に追跡した。図1から明らかのように、この代謝の時間的変化で特徴的なことは、乳酸生成は単調に増加しているにもかかわらず、酢酸、エタノール、コハク酸の生成速度が約3時間後に level off していることである。これらの代謝速度が level off しはじめたとき、初めてピルビン酸のシグナルが観測されるようになる。酢酸とエタノールは最初1:1の比で生成するが、定常状態達成後は酢酸の生成がエタノールに比べて少なくなる。ギ酸生成の時間変化においても同様な level off が観測された。

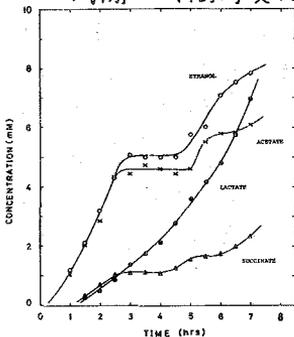


図1 E. coli (log phase) 嫌氣的代謝産物の濃度の時間変化
細胞濃度: 1.6×10^9 /ml

互いに競合する代謝経路である Embden-Meyerhof 経路と ペントース経路の代謝流れの定量的評価を含め、更に詳細に代謝調節機構を明らかにするためにグルコース [$1-^{13}\text{C}$] を用いて代謝の動的過程を調べた。図2は、グルコース [$1-^{13}\text{C}$] を炭素源とする静止菌による嫌氣的代謝の ^1H NMR スペクトルである。スペクトルは化学シフトおよび ^{13}C -H スピン結合定数により容易に帰属できる。代謝生成物の濃度の時間的変化を図3, 4に示す。グルコースの1位にラベルされた ^{13}C は Embden-Meyerhof 経路を通る場合はピルビン酸のメチル基に入るが、ペントース経路の場合には、脱炭酸の過程で逃げていく。すなわち、図4は Embden-Meyerhof 経路のみを通った場合の代謝

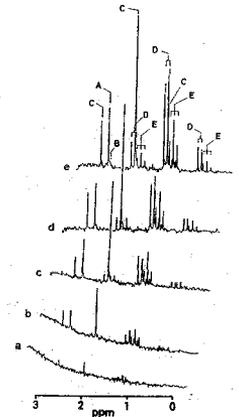


図2 E. coli (静止菌) 嫌氣的代謝産物の濃度の時間変化。細胞濃度: 2.0×10^9 /ml
A. コハク酸, B. ピルビン酸
C. 酢酸, D. 乳酸, E. エタノール

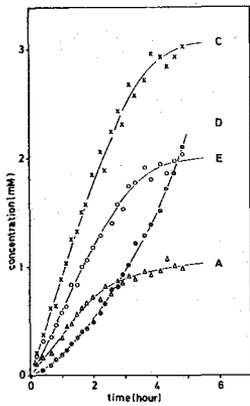


図3 図2と同一条件
12C由来

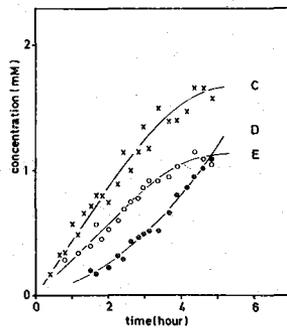


図4 図2と同一条件
13C由来(サテライトの一方を
アロートしたも、実際の濃度は
アロート値の2倍になる)

の時間変化である。したがって、 ^{13}C でラベルされたシグナルを ^1H NMRを用いて定量すれば、2つの競合する過程の寄与の定量的評価ができる。本実験条件においては、ペントース経路の寄与は22%であった。図3, 4に見られるように細胞分裂を阻害した静止菌の嫌氣的代謝においては、全体の代謝速度は約 $1/10$ に低下しているが、図1の場合と同様の代謝調節が見られる。また代謝産物の生成が level off した後でも両経路の割合に変化は見られない。ここで興味あることは、

静止菌の場合、酢酸生成がエタノール生成より約50%増加していることである。これはATP産生増加の方向へ代謝経路がきりかわったことを意味している。

大腸菌の嫌氣的代謝において最も生理的に重要である代謝経路を見出すために培地のpHの嫌氣的代謝に及ぼす影響を検討した。これまでの実験では、すべて大腸菌生育の至適pHである7.2の培地を用いた。低いpHでは代謝速度が大幅に低下し、乳酸生成を促進すると同時に酢酸生成はエタノール生成の2倍に増加し、ATP産生促進するように代謝経路は変化した。これから培地のpHは、代謝速度や代謝経路を決める重要な因子であることがわかる。図5は、解糖系をコード酢酸で阻害し、炭素源としてグルコースの他に酢酸および乳酸を培地に加え、28時間嫌氣的に培養したときの

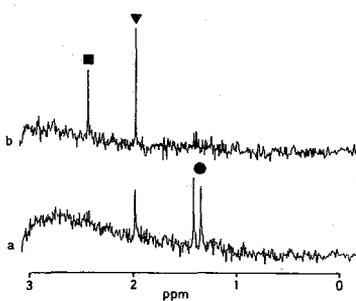


図5 解糖系阻害剤(モノコード酢酸)のピルビン酸代謝に及ぼす影響
incubation時間 0h(a), 28h(b) ■ピルビン酸, ▼酢酸, ●乳酸

ピルビン酸の膜透過反応： 前の実験であきらかなように、解糖系の中心に位置し、重要な代謝中間体であるピルビン酸が代謝調節が働き始めたところで初めて膜透過して培地中に出てくる。ピルビン酸の膜透過反応を明らかにすることは、膜透過反応と代謝調節機構との関係を明らかにする上で重要であると思われる。図6は、細胞内ATP濃度を下げるために1時間嫌氣的に前培養した後、培地のpHを5.0から徐々に下げた時の ^1H NMRスペクトルである。pHに依存して細胞内のピルビン酸が選択的に膜透過してでてくるのがわかる。このような細胞内の代謝中間体の選

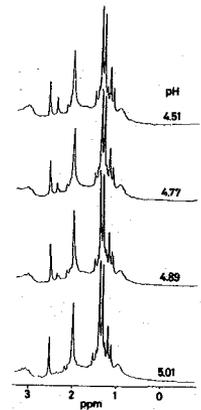


図6 pHシフトによる細胞内ピルビン酸の膜透過

択的な膜透過反応を追跡するためには、非破壊的に同時に多成分を分析する必要がある。すなわち、放射性的非代謝基質を用いて膜透過活性を測定するラジオ・トレーサー法は用いることができない。図7から明らかのように、pHシフトに伴うピルビン酸の選択的な膜透過反応は過渡現象であり、数分以内にその濃度勾配にさからって再び細胞内に取り込まれる。これは、細胞を超音波処理し、細胞内のピルビン酸の濃度を定量することにより確認した(図7C)。ピルビン酸の細胞内への取り込みは、脱共役剤ジニトロフェノール(DNP)により完全に阻害される。グルコース存在下において細胞の生理的条件を好気条件から嫌気条件に変えることによって同様なピルビン酸の膜透過反応が観測された(図8)。この場合は、酢酸や乳酸についても若干の変化が見られたのはピルビン酸が更に代謝したためと考えられる。従ってピルビン酸の膜透過反応は細胞の生理的条件—即ち代謝調節機構と極めて密接に関連して行なわれていることがわかる。この場合には、ピルビン酸の取り込みはDNPと同様にH⁺ATPaseの阻害剤DCCDによっても完全に阻害される。

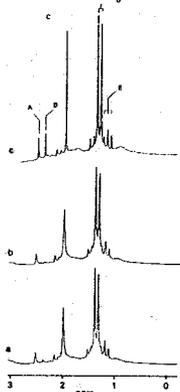


図7 pH勾配によるピルビン酸の能動輸送

[議論] 図9は、大腸菌の混合有機酸発酵の過程を示したものである。この代謝地図は既によく知られたものであるが、問題はこの代謝流水の定量的評価や競合する系への代謝流水の分配そして代謝流水の調節のような代謝の動的過程を明らかにすることにある。

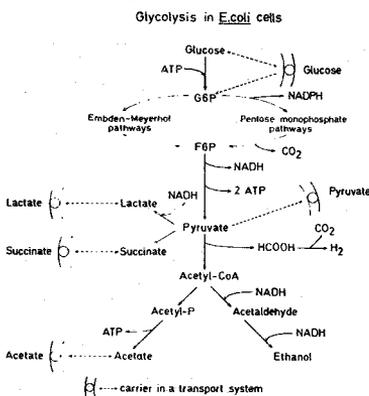


図9 大腸菌の嫌氣的発酵代謝地図
可能である。

図1~4において見られる代謝調節は、細胞の生理的条件の変化に伴って代謝過程がピルビン酸代謝をおさえる方向に変化したためと考えられる。図9からみて代謝調節は、ピルビン酸の加リン酸分解およびコハク酸生成の過程で起っている。現時点では、この変化が何に由来するのか確定的でないが培地のpHが代謝速度や代謝過程を決める重要な因子になっていることは明らかである。また静止菌による固有物質代謝との比較や各代謝過程のpH依存性、解糖系の阻害剤のピルビン酸代謝

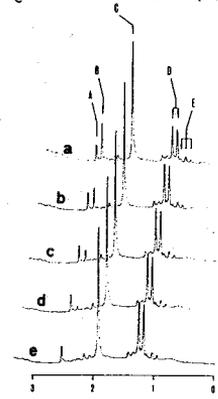


図8 生理的变化(好氣的→嫌氣的)に伴うピルビン酸の膜透過(補足、図2参照)
(a) 0分、(b) 20分、(c) 35分
(d) 50分、(e) 80分

Ugurbilらは³⁾、グルコース[1-¹³C]を炭素源に用い、¹³C NMRにより大腸菌の嫌氣的代謝を調べている。¹³C NMRは¹H NMRに比べて甚だ感度が悪い上に、図4の結果だけしか得ることができない。すなわち、ヤントース経路については何の情報も得られない。これに対し、本実験の場合、100MHzで5mmの試料管を用い、数分間の積算で両経路にあらわれる約0.1mM以上の濃度の代謝物の検出が可能である。

に及ぼす影響等から大腸菌の嫌氣的代謝の初期過程においては、ピルビン酸からアセチル-CoAを通してATP 1分子を産生し酢酸を生成する過程が生理的に最も重要な過程であり、最初に代謝調節を受ける過程であることが明らかである。生成したATPがまた代謝調節のエフェクターになるものと考えられる。比較のために酵母の嫌氣的代謝過程を同様にして調べたが、大腸菌で見い出された代謝調節過程は見い出すことができなかった。酵母は、アセトアルデヒドを直接酢酸に酸化する酵素を持っており、余分のATPを産生する機構を持たないのでこの結果は、大腸菌に特徴的な代謝調節過程に対する上の説明を支持する。図6から明らかのように細胞内のピルビン酸の選択的な膜透過は培地のpH変化に対応して起っている。またこのpH依存性の実験は極めて基質特異性が高く、 $pK_a \sim 4.7$ の解離基を持つ膜蛋白質が触媒的に関与していることを示唆している。ピルビン酸は中性型で膜透過するため恐らくこの蛋白質はピルビン酸を中和するようにプロトン授与的な相互作用をしているものと考えられる。図7に見られるようにピルビン酸は、濃度勾配にさからって細胞内に取り込まれており、この膜透過反応は、エネルギーに共役した能動輸送であることがわかる。この場合のエネルギー源は、人工的に作ったプロトン濃度勾配である。従ってこの膜透過反応は脱共役剤により完全に阻害された。MartinとKöningsは大腸菌から調製した膜小胞を用いてラジオトレーサー法によりピルビン酸の能動輸送を観測している。⁴⁾しかしながらこの方法では測定対象がラベルされた物質に限定されるため取り込まれた基質の代謝過程を追跡することやモデル系を用いて膜透過反応と代謝調節機構との関連を議論することはできない。WestとMitchell,⁵⁾および平田らは、プロトンと基質の共輸送を観測している。我々の実験においては、培地のプロトン濃度変化は代謝物の化学シフトの変化から追跡することができるとは、ピルビン酸の取り込みに共役したプロトン共輸送は見い出されなかった。恐らくpH変化に伴う化学シフトの変化が分解能より小さかったのであろう。

微生物の行なう代謝の動的過程を追跡することは、細胞の生理的变化に伴っておこる代謝調節の過程や代謝反応の細胞内における意義を明らかにする上で重要である。このためには正常に生命活動を行なっている生体系を用いて非破壊的に酵素の活性や物質の変化のダイナミクスをマイクロなレベルで迅速かつ多成分を同時に測定できる新しい分析方法の開発を必要とする。ここに述べた実験結果から明らかのように、相関NMR法はこの目的のためには甚だ適した方法であるということができよう。

本実験遂行にあたり便宜をはかっていただいた別府輝彦教授、祥雲弘文博士に感謝します。

1. Y. Arata & H. Ozawa, J. Magn. Res. 21, 67 (1976); Y. Arata, H. Ozawa, T. Ogino & S. Fujiwara, Pure Appl. Chem. 50, 1273 (1978).
2. T. Ogino, Y. Arata, S. Fujiwara, H. Shoun & T. Beppu, J. Magn. Res. 31, 523 (1978); Biochemistry 17, 4742 (1978).
3. K. Ugurbil, H. Rottenberg, P. Glynn & R. G. Shulman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2244 (1978).
4. A. Martin & W. N. Könings, Eur. J. Biochem. 34, 58 (1973).
5. P. Mitchell, Nature 191, 144 (1961); I. C. West & P. Mitchell, Biochem. J. 132, 587 (1973).
6. H. Hirata, N. Sone, M. Yoshida & Y. Kagawa, J. Biochem. 79, 1157 (1976).

(緒言) 昨年度、われわれは数種の毒素により、ラット皮膚に惹起させた浮腫の進行・治癒過程をNMRを用いて研究した結果について報告した。そこでは、¹H-NMRにより、皮膚組織を測定すると、水以外に相当量の中性脂肪が観測されることを明らかにし、組織中の水の真のT₁値を得るためには、これら“有機分子”による寄与を取り除く必要があることを示した。更に、浮腫生成・治癒に伴う、「自由水」の変動と、「結合水」の変動のパターンが互いに異なることや、脂肪分子の存在状態も変化していることなどの、いくつかの新しい知見を得ている。

今回は、これらの研究を更に進め、NMRを、その他の疾患の病態解析にも応用することを試みたので、その結果を報告する。

(実験) NMR測定には、日本電子FX-100, FX-90Q分光器を用いた。

(結果・考察)

アレルギーによる組織の変化 メチル化人血清アルブミンを抗原として、マウスの足に遅延型アレルギーを惹起させた。図1は、数十匹のマウスの皮膚を切りとって集め、それを0.85% NaCl一重水にて抽出したものの、¹H-NMRスペクトルである。乳酸、ア

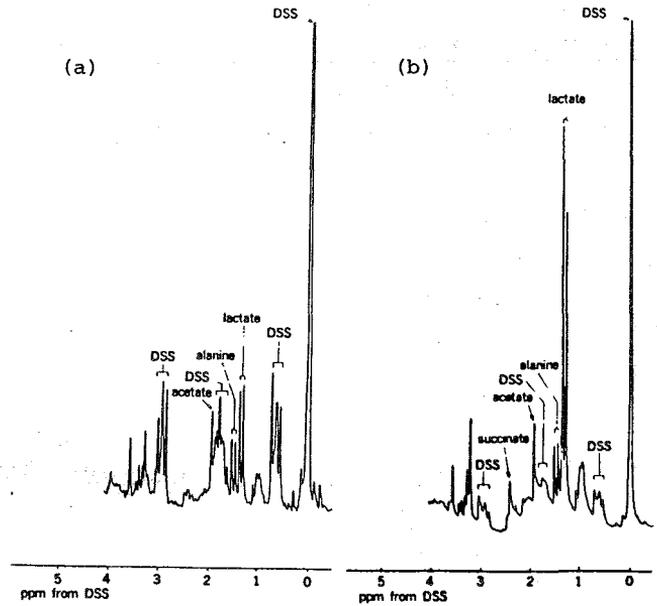


図1 マウスの足の皮膚の生理食塩水抽出液の¹H-NMR (a)正常 (b)遅延型アレルギー(抗原注射後24時間)

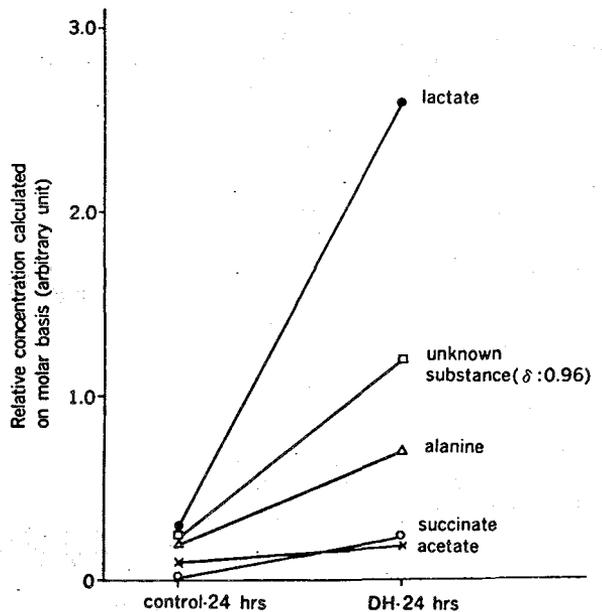


図2 遅延型アレルギーによる皮膚組織中の分子種の変動

よしかわ けんいち, おおさか あきら

ラニン、コハク酸、酢酸などのシグナルが出現している。図2には、正常組織とアレルギーを有する組織の抽出物の量的変動を示した。特に、乳酸とアラニンが、アレルギーにより、顕著に増量していることが注目される。他の通常の分析手段により、これらの組織中の有機酸やアミノ酸を定量するには、除タンパクなどの前処理が必要であり、その上、各成分の同時定量は困難である。これに対して、 $^1\text{H NMR}$ は、迅速かつ簡便な分析方法として、有用であると思われる。

各種臓器の NMR と、その病態解析への応用 図3には、Homogated decouple法により、水を選択的に飽和させたときの、ラット臓器の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを示した。各臓器とも、脂肪側鎖のメチル・メチレン基プロトンに由来するシグナルを与えている。図4には、臓器の $^{13}\text{C NMR}$ を示した(肝臓については、図

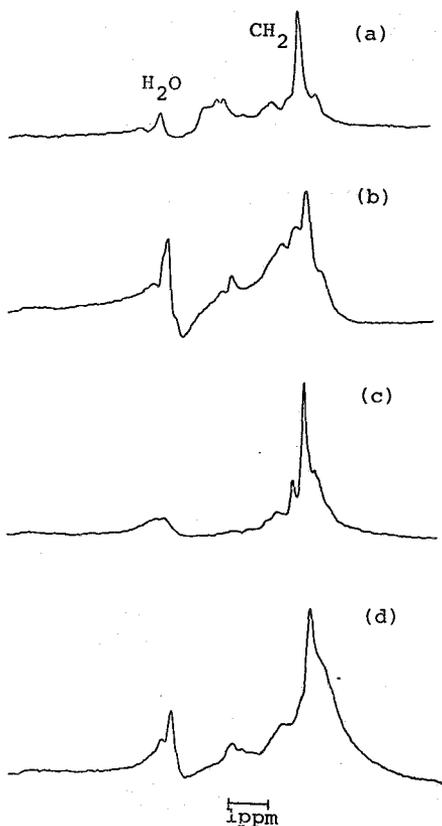


図3 ラット臓器の $^1\text{H NMR}$
(a)肝臓、(b)腎臓、(c)脾臓、(d)心臓

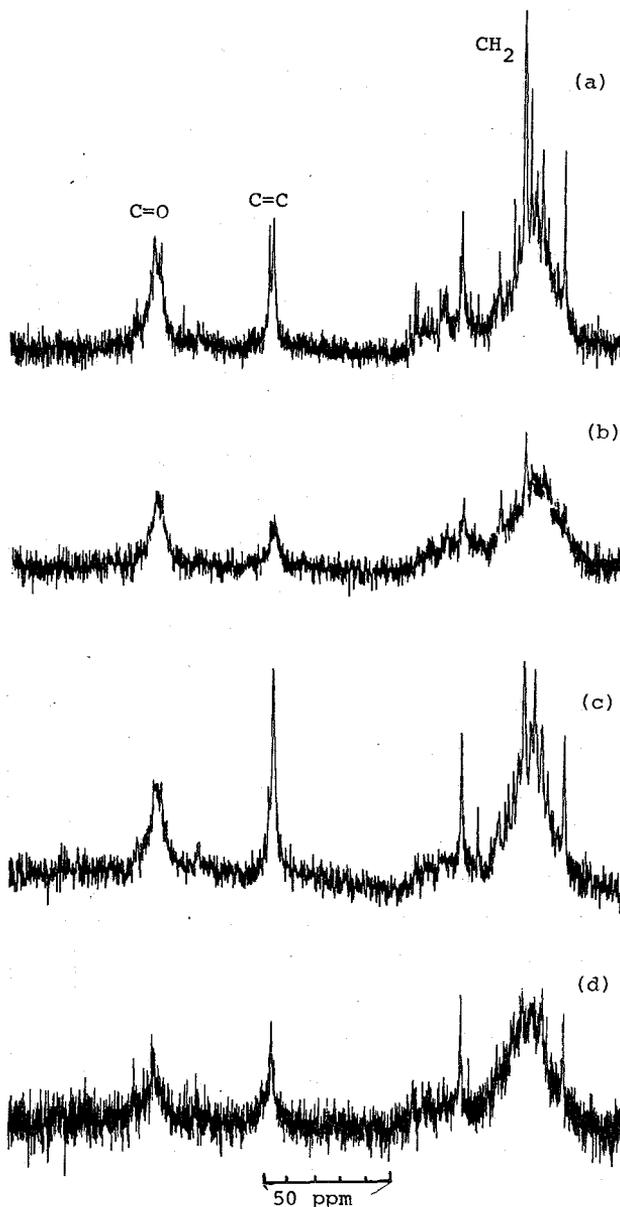


図4 ラット臓器の $^{13}\text{C NMR}$ (a)腎臓、(b)脾臓、(c)心臓、(d)脳

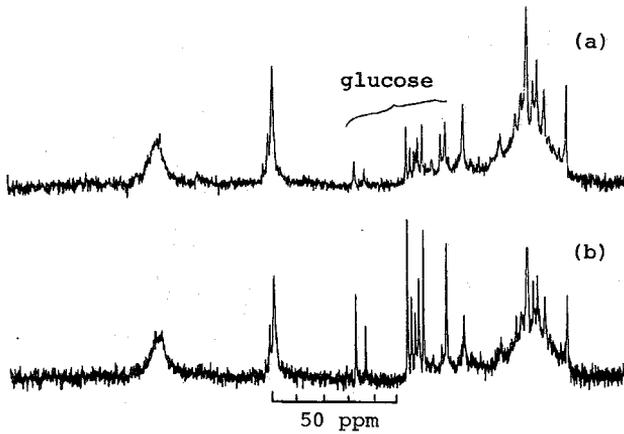


図5 フザレノンXによるラット肝中のグルコースの量的変動, ^{13}C NMR (a)病変肝 (b)正常肝

5 参照)。これから、各臓器とも、脂肪類に帰属されるシグナルが主であるが、二重結合の割合や、リン脂質のN-メチル基の強度などに差異がみられることがわかる。特に、肝臓については、図5、6で明らかのように、ブドウ糖のシグナルが明瞭に出現している。

又、図5(a)は、カビ毒であるフザレノンXを投与した時の肝の ^{13}C NMRであるが、(b)の正常肝と比して、ブドウ糖が大巾に減少していることがわかる。図6では、死後のラット肝の ^1H NMRの変化が示されているが、時間が経るに従い、ブドウ糖が増加していることが明らかである。これは、死後、肝グリコーゲンが加水分解されていくためであると考えられる。

人血清のNMR—ガン診断への応用 図7には白内障患者血清、図8には、ガン患者の ^1H NMRスペクトルを示した。

この場合も水を選択的に飽和させて測定をおこなった。積算回数は40~60回、所要時間は、

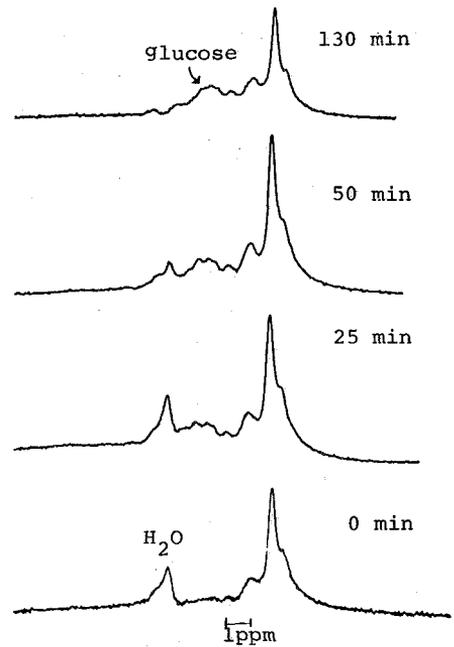


図6 ^1H NMRによる、ラット肝の死後変化。数字は死後の経過時間(分)

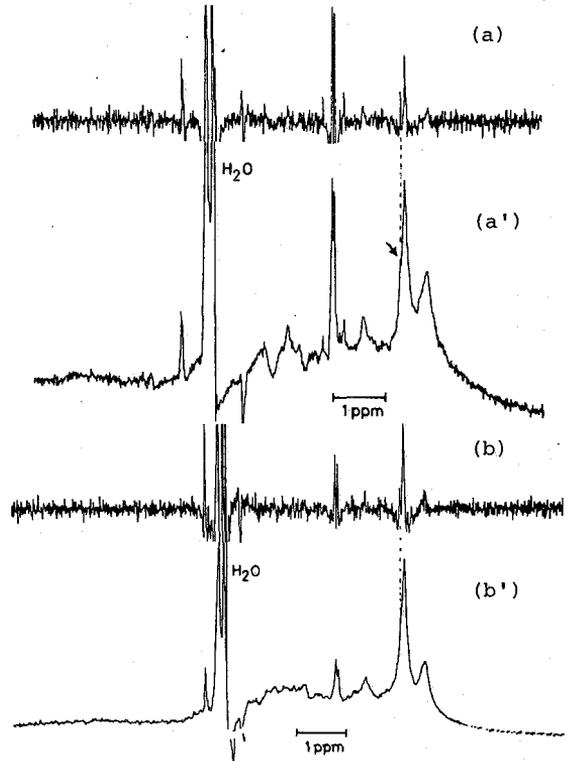


図7 白内障の人血清の ^1H NMR

3 - 4 分程度である。 δ : 1.3 に乳酸のメチルプロトンが shoulder に出現しているものがあることがわかる。図 7 に示したように window 関数を適当に設定することにより、脂肪・タンパク由来の線中の広いシグナル成分を除去することが可能である。この方法を用いることにより、正常人の通常の乳酸のレベル (0.5 ~ 1 mM 程度) の定量が可能である。

図 8 には、ガン患者の血清の $^1\text{H NMR}$ スペクトルの典型的な例を示した。(a) の場合は乳酸が、(b) では、乳酸と酢酸が著しく増量していることがわかる。現在までに、われわれは、各種ガン患者 (脳腫瘍、食道ガン、乳ガン、直腸ガン、肝ガンその他) 23 例の血清について、 $^1\text{H NMR}$ 測定をおこない、正常人血清 (25 例) のそれと比較した。この結果、ガン患者の血清には、ガンの種類 (部位) にほぼ関係なく、75% の高率で、2 mM 以上 ($^1\text{H NMR}$ により、明瞭にシグナルの観測される濃度) の乳酸が出現することが見い出された。これに対し、正常人血清では、この濃度以上の試料は、わずか 9% であった。

これにつけ加えて、ガン患者の 30% に、血清中に酢酸が検出されることが判明した。従って、血清試料中の、乳酸および酢酸量を、 $^1\text{H NMR}$ により同時定量することにより、ガンの一次的な診断が可能であると考えられる。従来、血清中の乳酸を定量する方法としては、酵素法が最もひろく用いられてきているが、この方法には、①試料に対して除タンパクなどの前処理が必要である、②酵素反応を含め、定量に 1 時間以上の長時間を要する、③高濃度 (3 ~ 5 mM 以上) の乳酸の定量値が不正確、④試料の濁りの影響を受けやすい、などの欠点がある。これに対し、 $^1\text{H NMR}$ を用いれば、少量の試料を、何の前処理を施すことなく、迅速に定量することが可能となる。

更に、酢酸・アラニン・ピルビン酸などの同時定量が可能であるので、各種の代謝疾患の診断にも応用できるものと思われる。

〔謝辞〕 本研究の一部に協力していただきました徳大医の原田氏、日本電子の今成・松下両氏に感謝します。

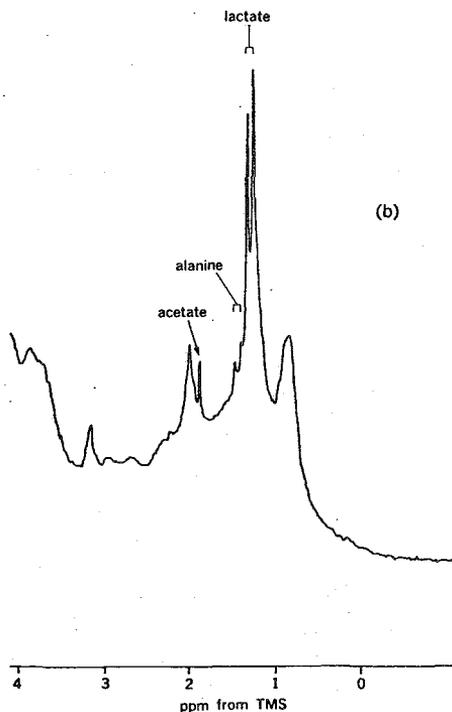
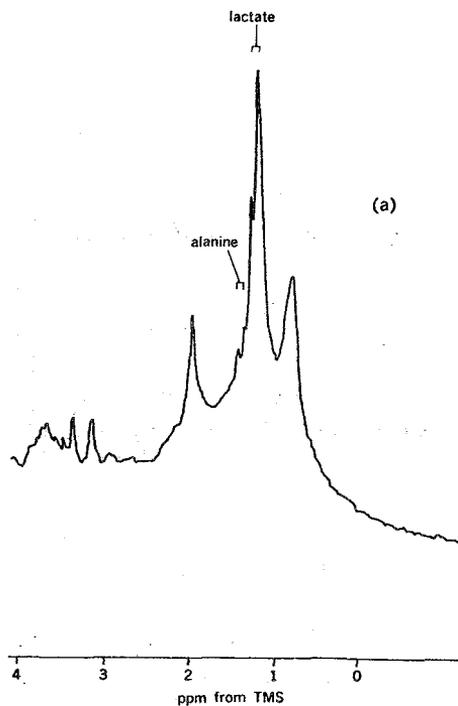


図 8 人血清の $^1\text{H NMR}$ 測定例
(a) 胃粘膜下腫瘍 (b) 結腸ガン

(京府医大) °吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭
(生理学研究所) 巨弘

〔序〕 ³¹P-NMR法を用いると生体組織中の燐化合物が非破壊的に測定でき、さらに無機燐酸等の化学シフトから細胞内pHの計測も可能になる。¹⁾一方、²H-NMR法では試料濃度が高く高感度であり、たとえば相関NMR法による大腸菌の代謝の研究²⁾、皮膚組織³⁾への有用性が示されているが、一般に生体試料の場合、水のシグナルが巨大なため他の化合物の検出は困難である。この難点を克服するべく、選択的水飽和法を用いて水のシグナルを飽和・減少させることにより初めて生体組織の水以外の化合物の高分解能スペクトルが測定可能となった。今回、この選択的水飽和法の基礎的研究ならびに生体組織、主に筋肉の高分解能スペクトルについて報告する。

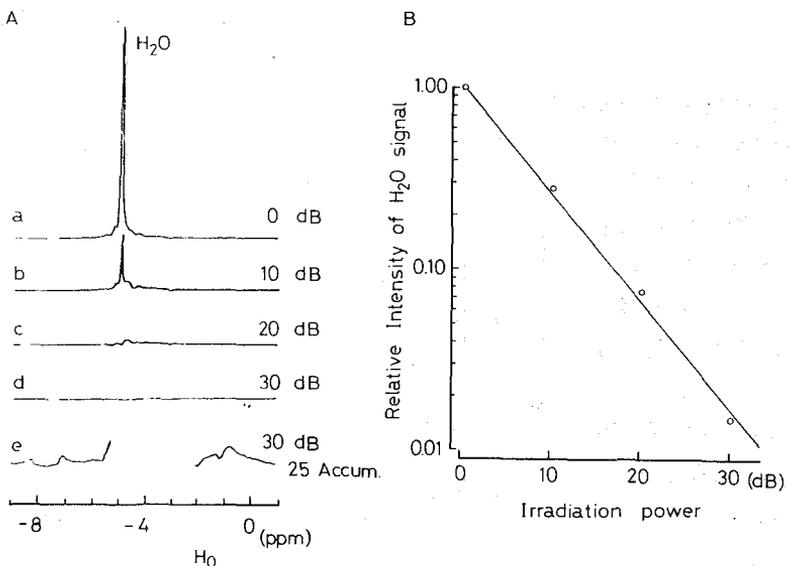
〔方法〕装置はJEOL PFT-100NMR(¹H:99.54MHz)で、¹H-probeはhomogated decoupling用に一部改良した(JEOLサービス加川)。選択的水飽和法にはhomogated decoupling pulse⁴⁾を用いて水の共鳴周波数で試料に照射し、水の磁化を飽和後RFパルス($\pi/2$)でスペクトルを得た(100回積算, 約15分)。試料は食用ガエルおよびラットの臓器で、主にカエルの大腿二頭筋を用い、重水リンゲル液を少量加えた。

〔結果および考察〕

カエル筋肉の¹H-NMRスペクトルは通常水のみである(Fig.1)。この水のシグナルを選択的水飽和法により照射すると、照射強度の増加と共に減少し2%以下となり、この条件下で積算すると微弱なシグナルが検出できた(Fig.1e)。Fig.2に100回積算のスペクトルを示す。スペクトルは中の広い成分(半値巾約4ppm)とその上に重なった中の狭い高分解能スペクトルよりなる。この中の広い成分は蛋白質等の巨大分子由来と考えられ、後述

Fig.1 選択的水飽和法によるカエル筋肉中の水のシグナルの減少

A: カエル筋肉のスペクトル
a. 照射なし(1回積算)
b~d. 照射強度の増加
e. dの条件で25回積算
B: 筋肉中の水のシグナル強度と照射強度の関係



よしざぎ かずお, せお よしてゐる, にしかわ ひろやす, わたり ひろし.

するように筋肉ホモジネートの上清をトリクロロ酢酸にて除タンパクすると、この中の広い成分の減少が認められた。なお照射強度の増加に伴いこの中の広い成分の著明な減少が認められ、同様な現象が蛋白質水溶液でも認められることが Akasaka et al. により報告され、彼らはこれを spin diffusion によると説明している。さらに照射強度を増加すると S/N 比が悪くなり、また中の狭い高分解能スペクトルの部分も照射位置に近いシグナル程減少する。従って選択的水飽和法を用いる場合、適切な照射強度を用いる必要がある。一定照射強度での照射位置近傍のシグナル強度への影響を Fig.3 に示す。100mM CH₃COONa のメチル基のシグナル強度が照射位置から 1 ppm 離れた所で約 50%、2 ppm で約 90% に減少している。従って選択的水飽和法を用いて測定したスペクトルの定量的分析には、この補正が必要である。

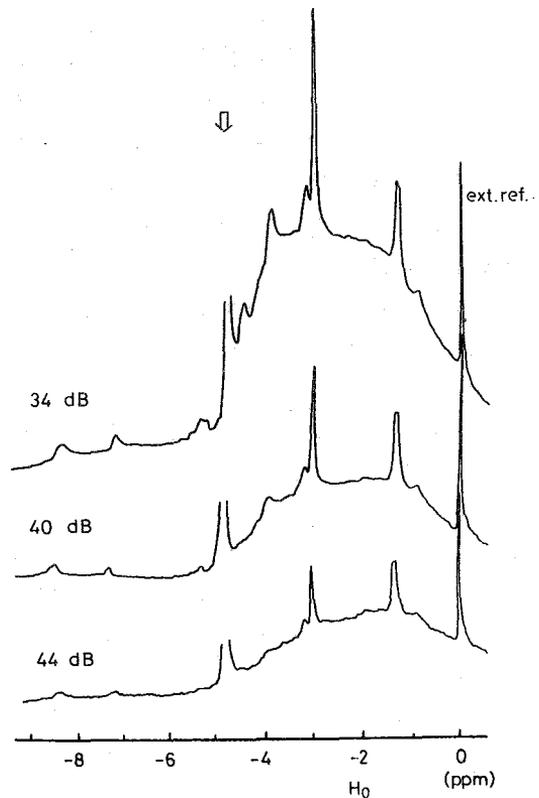


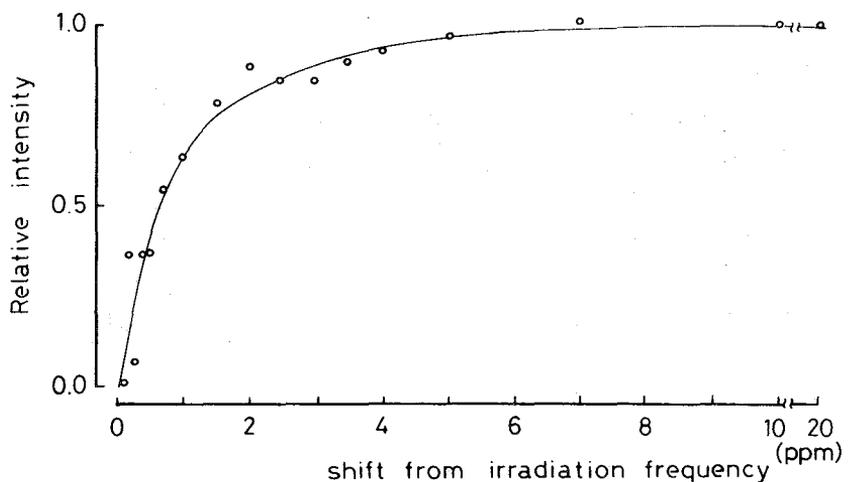
Fig.2 カエル筋肉の¹Hスペクトルと、その照射強度依存性。矢印は水の照射位置を示し、ext. ref. は外部基準用に毛細管に封入した 10% TMS の重クロホルム溶液である。

Fig.3: 選択的水飽和法による照射位置近傍のシグナル強度への影響

試料は 100mM 酢酸ナトリウムの重水溶液である。

横軸は照射周波数とメチル基の共鳴周波数の差、縦軸は、照射しない時との相対的シグナル強度である。

(照射強度 40 dB, 10 回積算)。



次にカエル筋肉の¹Hスペクトルの同定を行った。まず筋肉ホモジネートを遠心分離によりミトコンドリア分画(2万G), 筋小胞体分画(10万G), 及び上清分画に分け各々のスペクトルを同一条件で測定すると、筋肉の高分解能シグナルは上清分画に属し(Fig4)。又ウサギ腸腰筋から作成したグリセリン筋では細胞の可溶成分が流出しているため、この高分解能スペクトルは得られなかつた。すなわち筋肉で得た高分解能スペクトルは筋細胞内のアクトミオシン由来ではなく、細胞の可溶成分に含まれる化合物由来である。さらに筋肉の上清分画をトリクロロ酢酸で除タンパクした後でもこの高分解能スペクトルは変化せず、むしろ中の広い成分の減少が認められた。従つて中の広い成分は蛋白質等の巨大分子由来であり、高分解能スペクトルは低分子の化合物由来であると考えられる。この上清分画をさらにクロロホルムで脂質抽出するとaliphatic regionのシグナルが検出され、-0.9ppm, -1.3ppmのシグナルは脂質のメチル, メチレン基由来と考えられる。

なお上記以外のシグナルは検出されず、従つて-3ppm付近のシグナルは磷脂質のコリン由来でなくむしろ水溶性の低分子由来である。この様な筋細胞内に多量に含まれる化合物としてクレアチン磷酸, ATP, 及びカルノシン(β-Ala-His)が考えられる。

これらの化合物のスペクトルと比較することにより(Fig4)。カエル筋肉の高分解能スペクトルでの-3及び-4ppm付近のシグナルは主にクレアチン(磷酸)由来であり、aromatic regionの-7, -8ppm付近のシグナルはカルノシン由来と考えられる。以上の様に選択的水飽和法を用いると筋細胞内の可溶成分に含まれる脂質や低分子特にクレアチンやカルノシンが非破壊的に測定可能となる。

次にこの方法を他の生体組織に用いて測定した結果をFig5及びFig6に示す。Fig5はカエルの胃(平滑筋), 肝臓および脂肪組織で各々脂質由来のメチル, メチレン基のシグナルが検出でき、特に脂肪組織は1回積算で充分であり、大部分は中性脂肪であることからその同定を示した。又、Fig6はラットの肝臓, 腎臓及び筋肉のスペク

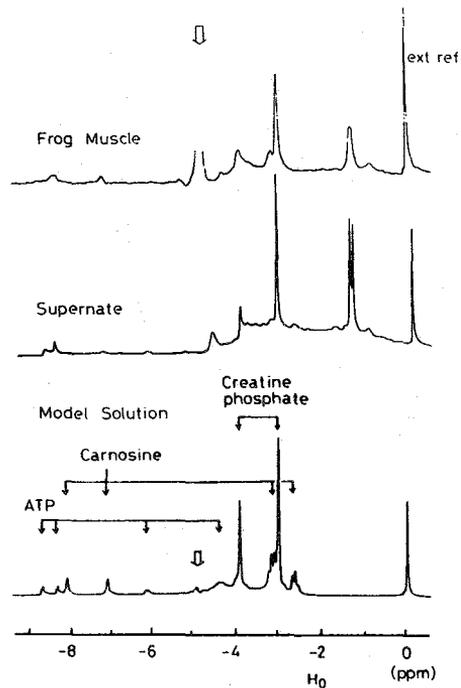


Fig4. カエル筋肉、その上清分画及びモデル溶液のスペクトル

カエル筋肉のスペクトルは中の広い成分をデータ処理により引算して除去した高分解能のスペクトルを示す。上清分画は筋肉ホモジネートを遠心分離(10万G)しトリクロロ酢酸にて除タンパク後のスペクトルを示す。モデル溶液は筋肉に多量にある30mMクレアチン酸, 10mMカルノシン, 及び5mM ATPを含む。

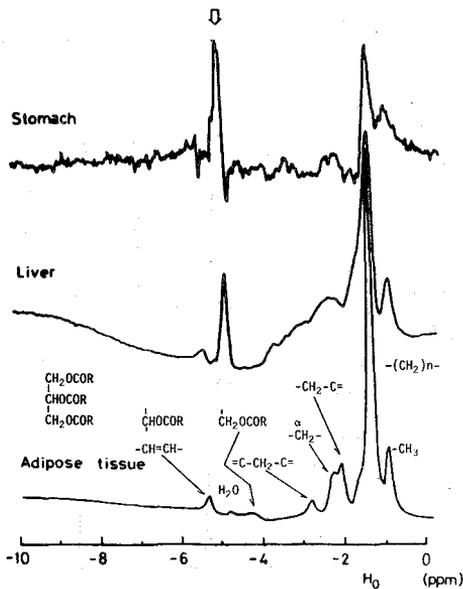


Fig 5. 食用ガエルの胃, 肝臓, 脂肪組織の¹H-スペクトル

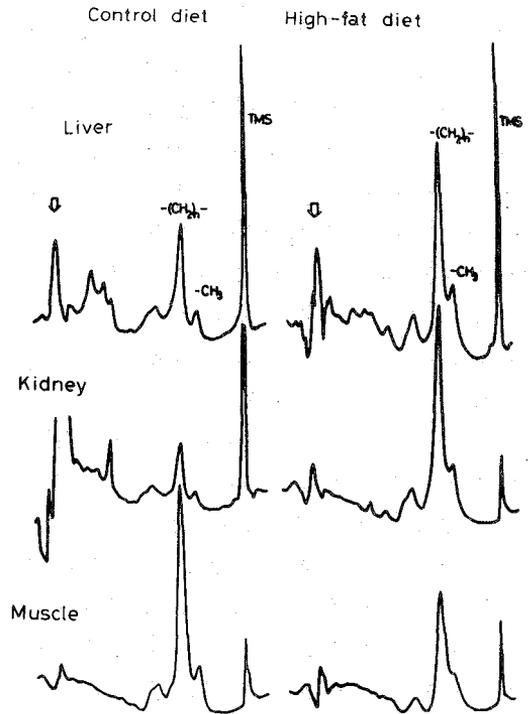


Fig 6. ラットの肝臓, 腎臓及び筋肉の¹H-スペクトル。右は高脂肪食で飼育したラットの臓器のスペクトルである。

トルを示し、各々脂質のメチル、メチレン基のシグナルが検出でき、特に高脂肪食で飼育したラットの肝臓及び腎臓ではこの脂質のシグナルの著明な増加が認められた。同様にカエルにおいても冬ガエルは夏ガエルに比べて筋肉の脂質のシグナルが大きい。このように選択的水飽和法を用いることにより¹H-スペクトルが容易に、しかも非破壊的に測定でき、今後³¹P-NMR法と併用することにより、生体組織のエネルギー代謝や脂質代謝の解析に役立つものと思われる。

〔謝辞〕 選択的水飽和法のため probe 等の改良の技術的援助をして頂きました JEOL サービス、加川 勲氏に感謝の意を表します。

〔文献〕

- 1) Yoshizaki, K. et al. J. Biochem., 84, 11 (1978); Jpn. J. Physiol., 29, 211 (1979)
- 2) Ogino, T. et al. Biochemistry, 17, 4742 (1978)
- 3) Yoshikawa, K. & Ohsaka, A. VIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Abstract, C4 (1978)
- 4) Jesson, J.R. et al. J. Amer. Chem. Soc., 95, 618 (1973)
- 5) Akasaka, K. et al. FEBS Letters, 96, 287 (1978)

(京大理) 赤坂一之

要旨

重水溶液中のタンパク質の高磁場プロトン NMR において、一部の吸収の飽和がスペクトル全域に速やかに伝達されることを示す。この現象はタンパク質の 1012 トン双極子相互作用に基づく“スピン拡散”として理解される。いくつかのタンパク質で、このスピン拡散が起る易い部分と起り難い部分があることがわかった。このことを用いてタンパク質の“固い部分”と“柔らかい部分”を識別することが可能と思われる。一方、タンパク質のプロトンの飽和が共有する溶媒 (H₂O) や配位子リガンドのプロトンへ伝達されることを見出した。この現象は“分子間スピン拡散”として理解することが出来る。この現象の高分子-低分子相互作用研究への応用の可能性についても考察する。

緒言

スピン拡散は本来固体の NMR において重要な現象である。しかし近年溶液を対象とする NMR 装置が高周波数化して測定対象が高分子化するに伴って、スピン拡散は溶液においても無視できない現象となり、こまた(1,2)。従来の延長上での T₁ や NOE の利用という観点からは、これは一つの建設材料として捉えらる(1)。演者は先述高分子タンパク質 ミオシン (分子量 470,000) において、スピン拡散が分子内選択的に起ることを示し、これが生体高分子の内部運動を推定手段となりうることを指摘した(3)。今回の研究は、構造が詳しく知られておるより低分子の球状タンパク質、Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI, 分子量 23,000) などを対象としてタンパク質内部のスピン拡散現象を詳しく解析し、タンパク質の内部構造とスピン拡散の関連を追求することを目的の一つとする。また ミオシン、Heavy Meromyosin (HMM, 分子量 320,000) なども用いて、分子間スピン拡散の現象を解析し、その応用について考察する。

方法

用いた NMR 装置は Bruker HX-360 (マクスプランク量子研究所, Heidelberg) 及び WH-400 (Univ. of British Columbia, Vancouver) スピン拡散の実験は装置内蔵のデカップリングチャンネル (f₂) を第 1 回のタイミング (gated decoupling mode) で利用し、スペクトルの一部を飽和させ (presaturation) たとき、スペクトル H₂O の他部分に飽和が伝達されることによる吸収強度の減少を測定することにした。f₂ の実効出力は H₁ に 2 100 mG 以内である。

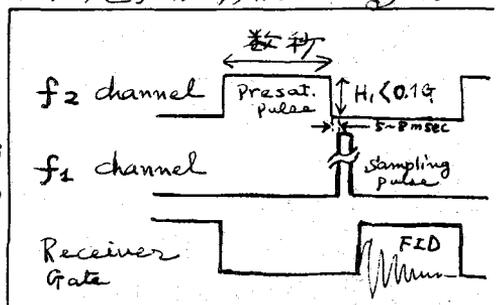


図1. 各種パルスのタイミング

結果と考察

I. タンパク分子内でのスピン拡散

スピン拡散の実験的証拠

図2は SSI についてスペクトル上の2つの部位, $\delta=7.1$ の環状アミノ酸部位と $\delta=0.61$ のメチル基部位, での飽和度が presat. pulse (f_2) の照射位置により, どう変わるかを見たとのものである。(以下ケイ光の場合にならう "励起スペクトル" と呼ぶ)

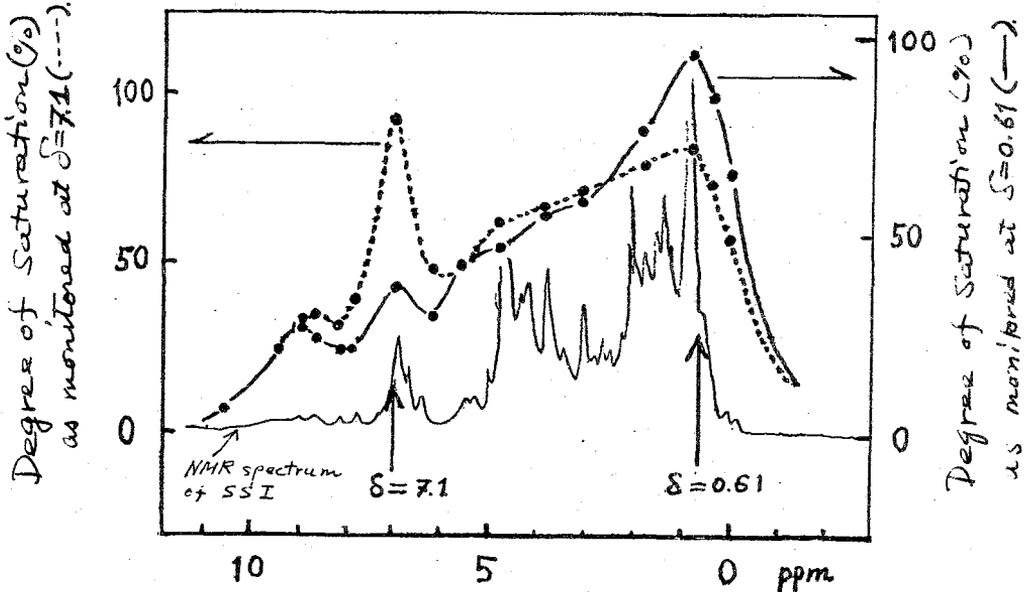


図2. SSI の 360 MHz プロトン NMR における飽和度の f_2 位置依存性。
(pH 7, 25°C).

図2の注目すべきことは (i) 2つの全く異なる部位でモニターした "励起スペクトル" が互に似通っていること, (ii) この "励起スペクトル" が元の NMR 吸収スペクトルにほぼ対応していること, である。以上のことから, SSI ではどのプロトンを f_2 で照射するかに加わらず飽和はタンパク分子全体に伝わりやすいこと, またその飽和の度合はタンパクプロトンによるラジオ波 f_2 の吸収効率にほぼ比例していること, がわかる。

一方別の実験から, 飽和がタンパク分子の一部から他の部分へ伝わる平均の速さは $T_{st} \approx 100$ ms の程度であることがわかった (但し γ -70% 吸収成分を除く)。これは T_1 (700 ms 程度) より遅く, T_2 (50 ms) より速い。即ち,

$$T_2 < T_{st} < T_1 \quad \dots \dots \dots (1)$$

が成り立つ。 $T_{st} < T_1$ はタンパク値のプロトン系と, 共通の "スピン温度" が成立する条件を示している。結果を右図の自身か, f_2 照射によりタンパク分子のプロトン系のスピン温度がほぼ一様に熱くなることを示している。このことは別の T_1 測定の実験からも確認された。即ち SSI のプロトン T_1 は (γ -70% 吸収成分を除いて) プロトンの種類にかかわらずおおよそ一定である。

選択的なスピン拡散とタンパク分子の内部運動

以上はタンパク分子を構成する大部分のプロトンに2つの2成分の緩慢な動きがこれに紐付いたプロトンもある。図3は SSI に2つの 4キラル領域 $S=0.39$ に照射した場合に起る NMR スペクトルの変化を示す。大部分の吸収は消失して(まうか), いくつかの鋭い吸収線の強度は余り変化を受けていないことと気が付く。このことは SSI 中の2つのスピン拡散が, 実は一様に起るのではなく, 分子部分には選択的に起り他の部分には起らないことを示している。

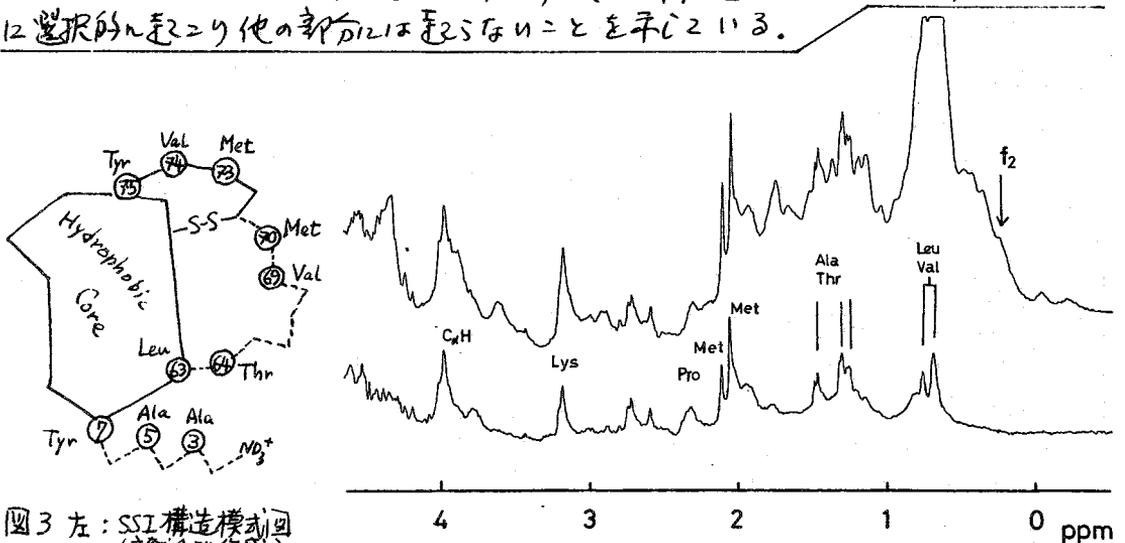


図3左: SSI構造模式図
(文献4より作成)

右: SSIの360MHz NMRスペクトルに対する f_2 照射の効果 (pH 7, 25°C). 高磁場領域. 上は通常のスペクトル, 下は f_2 照射後のスペクトル.

X線解析の結果(4)によれば, SSIの結晶構造は強い hydrophobic core とこれより張りのない2つのセグメント(63-75; 1-7)より成る2つの(図3の模式図参照). 残基1-7と63-70の位置は結晶中でもハッキリしない(4). NMRの結果によれば Tyr および Met 70, 73 の側鎖は明確な内部運動を示す。これらの結果からセグメント 1-7; 63-75 の大部分の側鎖は溶液中では速い内部運動状態にあると考えられる。このためにこれらの側鎖のプロトンに付いては $\omega_{rot} \gg \nu$ の条件(1-3)が成立せば, 従ってスピン拡散も起らないと考えられるが, 図3に同定されたメチル基の帰属はこれらのセグメントに含まれるメチル基と一致を示し, この矛盾のほぼ正しいことを裏書きしている。この結果は, 生体高分子の内部運動領域 (flexible region) とそれ以外の rigid region からスピン拡散を通じて filtering するという以前の提案(3)が比較的長分子の球状タンパク質に対しても適用可能であることを示すものである。

II. タンパク分子—リガンド間のスピン拡散

ミオシンと過剰の ADP (Adenosine 5'-diphosphate) と H₂O が共存する系で, 図4に示すように Presat. pulse f_2 をミオシンのみを照射するよう選んだ場合に, ミオシンの吸収(広中成分)が減少するだけでなく, リガンド (ADP, H₂O) の吸収も著しく強度を減らすことがわかった。重要なことはこれらの吸収の減少がすべてこのプロ

トロンに同じ power (51db) が起ることはこのことである (図5)。この事実も溶液中の水分子のラジカルが磁気的に強く結合されていることを示している。即ちリガンドのラジカルからの吸収の減少はタンパク分子からのものと同一原因で起る。これは結合しているリガンド分子のラジカルにタンパク分子のラジカルからの飽和が伝わることを示さなければならない。

タンパクラジカルからの飽和が最終的に bulk solution のリガンドラジカルに伝達されるためには、次の過程を踏むと考えられる:

- (1) タンパク分子の一部ラジカルからの飽和 ($\approx f_2$)
- (2) タンパク分子中での飽和の伝達 ($T_2 \ll T_{st}^{intra} \ll T_1$)
- (3) タンパクラジカルから結合リガンドのラジカルへの飽和の伝達 (T_{st}^{inter})
- (4) 飽和を受けた結合リガンドの解離 (T_D)
- (5) 飽和を受けた遊離リガンドの緩和 (T_{1A})
- (6) 緩和した遊離リガンドの再結合 (T_A)

以上のような過程を至るとすれば、

- (i) リガンドラジカルからの飽和はタンパクのものより遅いだろう。
- (ii) リガンドラジカルからの平衡吸収強度は飽和伝達の速度と自身の緩和速度とのバランスで定まるだろう。

この予想が立てられる。図6の結果は (ii) の予想が正しいことを裏書きした。また (1) ~ (6) の過程と関連した modified Bloch Eq. と適当な条件下で解くと、

$$M_A/M_A - 1 = T_{1A}/T_A = T_{1A}/T_D$$

となり (ii) の予想と一致するが、上式は結合リガンドラジカルからの吸収強度の減少割合 (M_A/M_A) を測定して、高分子ラジカル相互作用の kinetics に関する見解が得られることを示している。

〈謝辞〉 以上の研究遂行に当たり、

装置、試料面で御援助下さり、左 Prof. K.H. Hauser, Dr. R.S. Goody (NIH MPI), Prof. C.A. McDowell (UBC) 及び村松孝雄 (政大) の諸氏へ感謝申し上げます。

〈文献〉

- 1) A. Kalk and H.S.C. Berendsen, J. Magn. Resonance 24, 343 (1976).
- 2) 赤坂一之 「化学」 1979年5月号
- 3) K. Mutsaers et al. FEBS Lett. 96, 287 (1978)
- 4) Y. Mitsui et al. J. Biol. Chem. 252, 295 (1977)

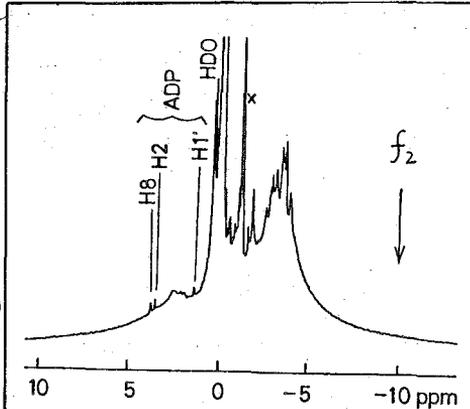


図4 過剰のADPを含むミオシンの360 MHz NMRスペクトル (25°C)

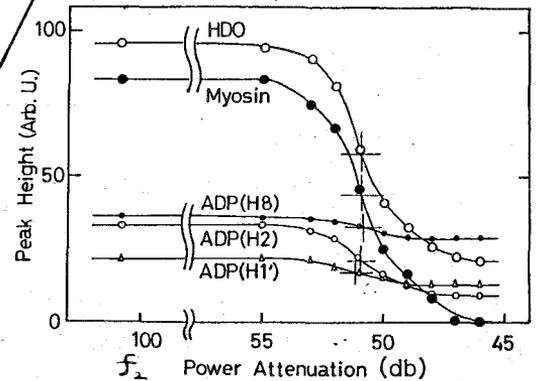


図5 各種ラジカル飽和の f_2 出力依存性

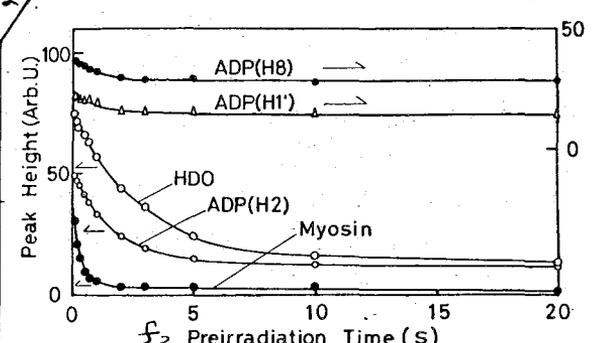


図6 各種ラジカル飽和の f_2 照射時間依存性 (f_2 Power atten. = 48db)

京都府立医科大学・オー生理

○西川弘恭, 安里令人, 吉崎知男, 巨 弘, 森本武利

(序) 生体膜脂質極性基部位は膜を構成する脂質-脂質, 脂質-タンパク質および脂質-膜周囲溶液中のイオン間の相互作用が主たる役割を担っている。これらの相互作用を明らかにするために脂質のパラフィン部分ではなく極性基部位を直接観測することは重要なことである。この目的に ^{31}P -NMRはリン脂質極性基部位のリン原子を外來のプローブを用いることなく観測できる点から有力な方法である。生体膜のうち赤血球ゴースト膜に対する ^{31}P -NMRの適用はCULLIS¹⁾により初めてなされ、室温での半値巾が約18ppmであることが報告された。西川ら²⁾も弱い超音波処理を加えたresealed赤血球ゴーストで約10ppmの半値巾をとつ2つの共鳴線を報告している。これらはいづれも、リン脂質vesicleの ^{31}P -NMRスペクトルで見られる狭い共鳴線に比し非常に中広である。これは極基部位のlocal anisotropic motionによるもので、中広の共鳴線を示すモデル膜としてはリン脂質リポソームや超音波処理を加えないリン脂質のaqueous dispersionがある。西川ら³⁾は赤血球ゴーストの ^{31}P -NMRスペクトルのphosphatidylserineとphosphatidylethanolamineの共鳴線が Ca^{++} の添加によりbroadeningすることを報告したが、今回この事実を赤血球ゴースト膜構成リン脂質のaqueous dispersionを用い、リン脂質- Ca^{++} 相互作用、この相互作用に対する他のリン脂質やコレステロールの影響を ^{31}P -NMRにより観測し検討したので報告する。

(方法) リン脂質は市販のphosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylserine(PS), phosphatidylcholine(PC), sphingomyelin(Sph)を用いた。リン脂質のaqueous dispersionの調製: リン脂質(100mg)を95%フクロホルム-5%メタノール溶液に溶解し、窒素ガスで溶媒を除去した。さらに凍結乾燥器で溶媒を十分に除いた後1.5mlの緩衝液(5mM NaCl, 5mM HEPES/NaOH) pH 8.0を加えVortex mixerで5分間攪拌し、dispersionを得た。2種類のリン脂質を含むaqueous dispersionは溶媒に2種類のリン脂質(各R 50mg)を同時に溶解した系と、各々リン脂質100mgのaqueous dispersionを調製した後半量づつ混合した系を用いた。コレステロールを含む試料はリン脂質を溶媒に溶解する時コレステロールとリン脂質が等モルになるようにコレステロールを加えて調製した。 Ca^{++} は1M- CaCl_2 を用い、各図に示した濃度となる量を各々リン脂質aqueous dispersionに加えた ^{31}P -NMR測定装置はJNM-PFT-100(JEOL, Tokyo)を40.3 MHz, 24,000ガウスで使用した。測定中proton noise decouplingを行った。スペクトル中は10,000 Hz, データポイントは4096であった。測定温度は全て24°Cであった。

(結果と考察) (1) リン脂質aqueous dispersionの極性基と Ca^{++} の相互作用。Fig.1はリン脂質aqueous dispersionの各々 Ca^{++} 濃度における半値巾をプロットした。各々リン脂質濃度は約80~90mMである。Sphでは $\text{Ca}^{++}=0$ で半値巾は1060Hzあり極性基部位のorderingが強く、 Ca^{++} によるmobilityの減少による半値巾の増加はごくわずかである。

にしかわひろやす, あさとれいにん, よしざきかずお, わたりひろし, とりととたけとし。

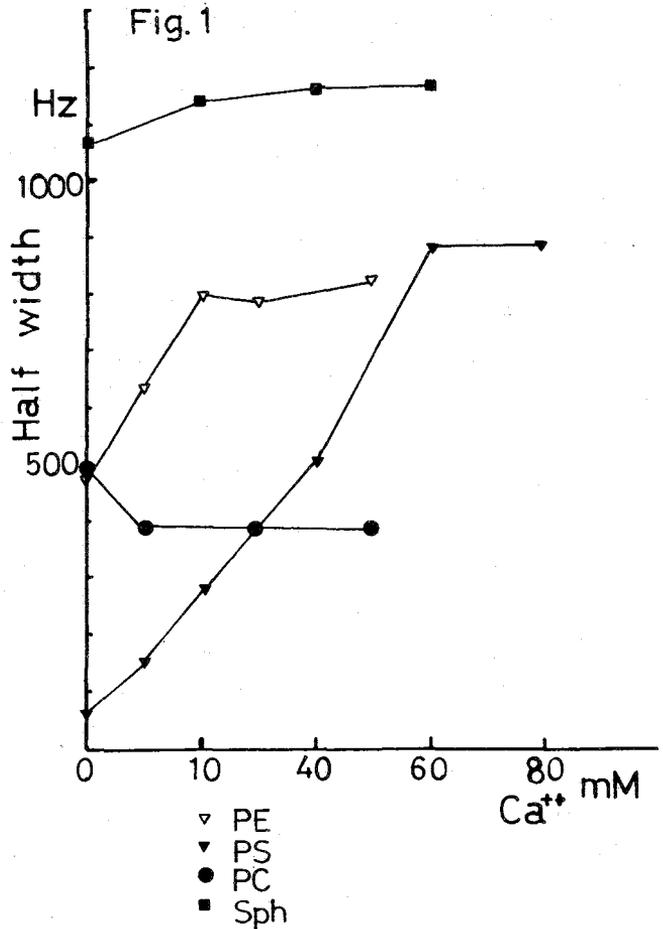
PCではCa²⁺添加により、わずかなではあるが半値中の減少がみられ、他のリン脂質と対照的にmobilityの増加を示す。PEはSphやPCと同様に極性基のnet charge = 0であるがCa²⁺による極性基部位のmobilityの顕著な低下を示す。これは正のchargeの立体的な位置関係のちがいによる-chargeとCa²⁺の相互作用の差に由来する。PSはnet chargeがnegativeであるためCa²⁺ = 0でのmobilityは高いがCa²⁺添加によりその著明な低下を示す。Ca²⁺ = 0でproton decoupling条件下でのPE, PS, PC, Sphのpeak positionは正リン酸を基準とした場合各々0.2, 1.7, 16.8, 16.0 ppmである。これらのうちPC, Sphのpeak positionはNIEDERBERGERら⁴⁾によるとaxially symmetric chemical shift anisotropyによるもので、order parameterの関数である。

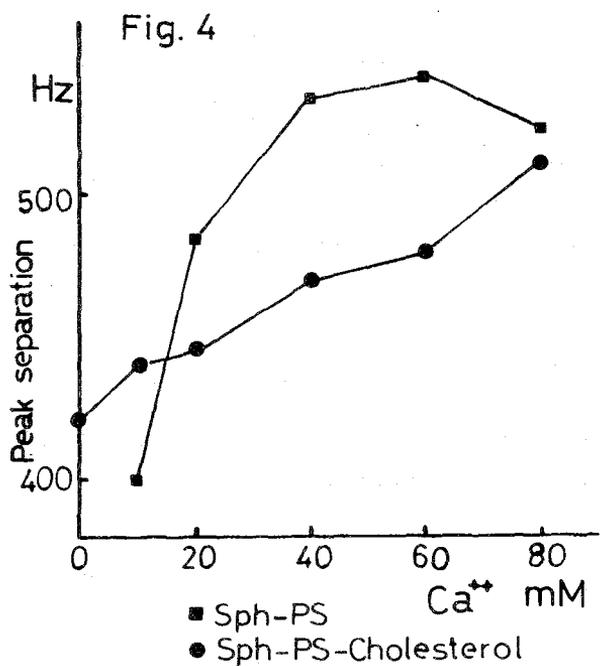
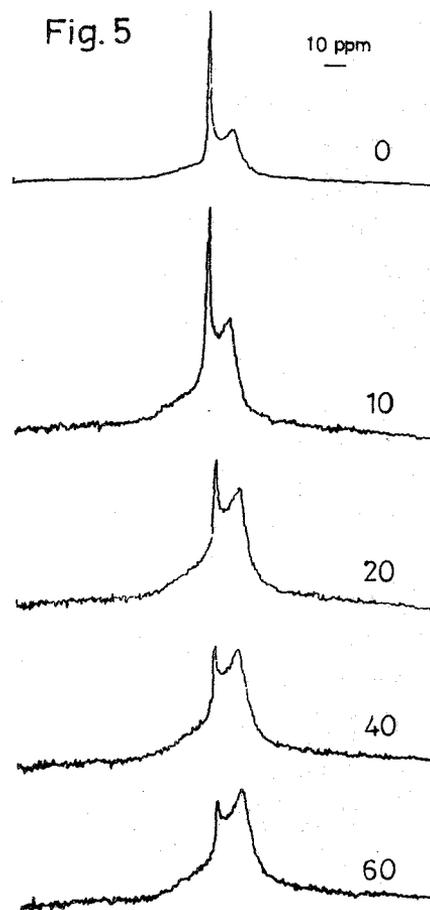
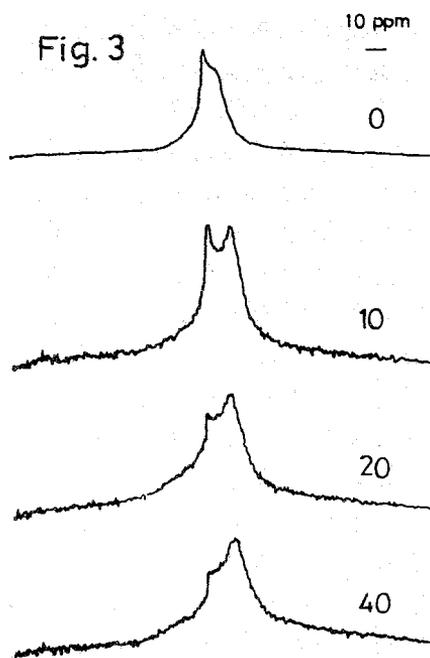
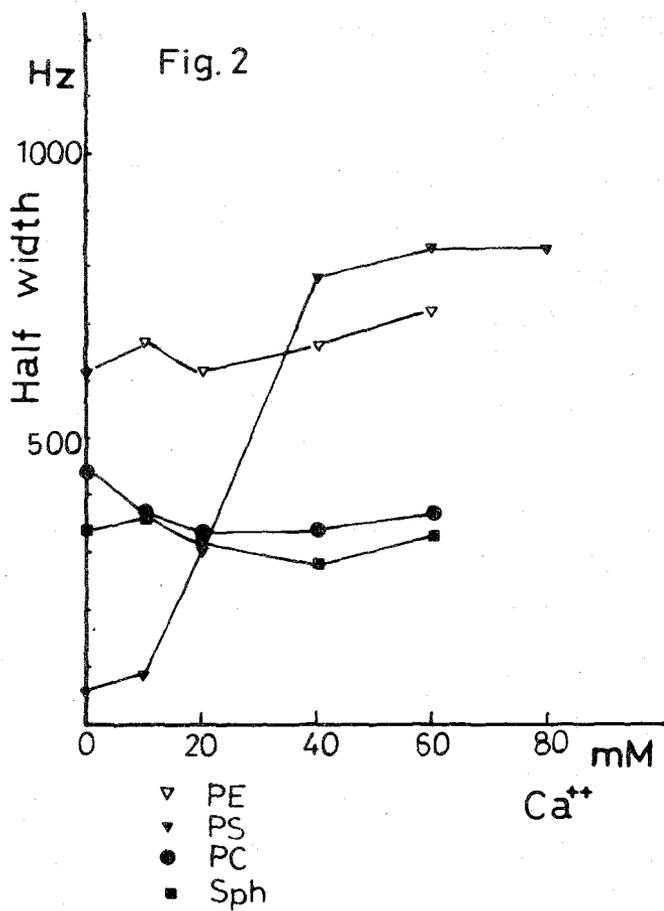
一方PE, PSはCa²⁺添加により半値

中は著明に増加するがpeak positionに変化がない。これは極性基のmobilityの減少はあるがorderingがないことを示している。

(2). 極性基とCa²⁺の相互作用に対するコレステロールの影響。Fig.2はリン脂質と1:1の割合でコレステロールを含んだaqueous dispersionの各々Ca²⁺濃度での半値中をプロットした。SphではCa²⁺で半値中がコレステロールを含まない系に比し60%減少している。これはコレステロールのfluidizing効果によるもので、Ca²⁺添加の影響はみられない。この時peak positionに顕著な変化がないことからorderingは保たれている。PCではコレステロール添加による変化はなんらみられない。PEではcondensing効果によりCa²⁺ = 0のとき半値中の増加がみられるがCa²⁺添加による影響は小さい。PSではCa²⁺ = 40mMのときコレステロールのない系とある系で半値中は各々510Hzと780Hzであり、コレステロールはPSとCa²⁺の相互作用を促進している。

(3). 極性基-Ca²⁺相互作用に対する他のリン脂質の影響。YEAGLEら⁵⁾はPC, PEのvesicleを用い³¹P-NMRでNOEEを測定し脂質-脂質間の極性基での相互作用を明らかにしたごとく脂質分子間相互作用がCa²⁺と脂質の相互作用に影響をもつと考えられる。Fig.3はSph (50mg)とPS (50mg)を同時に溶媒に溶解して得たaqueous dispersionに図の右肩に示した濃度(mM)でCa²⁺を添加して得たスペクトルである。左磁場側のPSのpeak





position に変化はみられないが高磁場側の Sph の peak position は Ca^{2+} 濃度の増加に伴い Fig. 4 に示したごとく高磁場側へシフトする。一方 Sph (50mg) と PS (50mg) とコレステロール (50mg) で調製した aqueous dispersion の Ca^{2+} 添加によるスペクトルの変化を Fig. 5 に示し、それらの peak separation を Fig. 4 に示した。前者の系は後者の系に比し低い Ca^{2+} 濃度で peak separation の増加がみられ Sph が Ca^{2+} 添加でコレステロールのない系の方が ordering しやすいことを示す。またコレステロールを含んだ系の PS の共鳴線の peak が 60mM でもみられ、含まない系では肩となっている。これは PS 単独の aqueous dispersion から逆の現象であり、これは Sph の極性基との相互作用によるものである。Fig. 6 は PC (50mg) と PS (50mg) を同時に溶解して得た aqueous dispersion に図の右肩に示した濃度 (mM) で Ca^{2+} を添加して得たスペクトルであり、Fig. 7 は PC (50mg) と PS (50mg) とコレステロール (50mg) で調製した aqueous dispersion の Ca^{2+} 添加によるスペクトルの変化を示した。PS の broadening はコレステロールを含んだ系の方が低い Ca^{2+} 濃度で大きく生じており、これは PS 単独の場合と同じ現象であるが、高濃度 Ca^{2+} では PS の半値巾は PC の約 2 倍である故に PS の peak は PC に比し低く出るはずであるがコレステロールを含まない系では PS の peak の方が高い。これは PC との相互作用により PS の broadening の程度が PS 単独の場合に比し小さいためであろう。以上と同様の脂質よりなるヒト赤血球ゴーストにおいてもリン脂質極性基と Ca^{2+} の相互作用はリン脂質極性基間の相互作用およびコレステロールにより修飾されていると考えられる。

Fig. 6

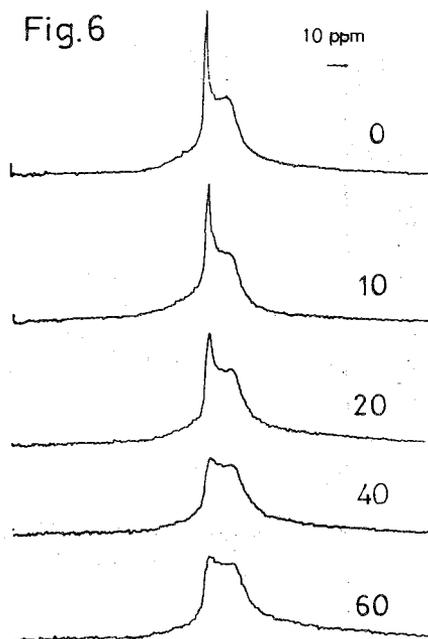
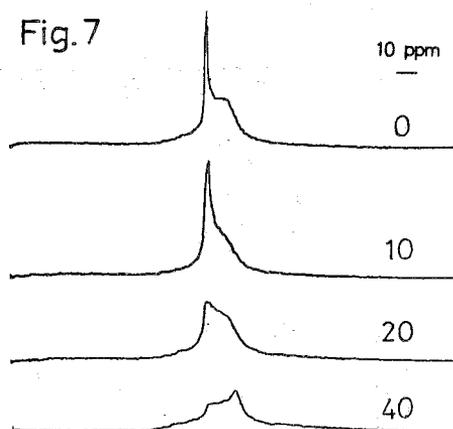


Fig. 7



(文献)

- 1). P. R. CULLIS, FEBS LETT., 68, 173, 1976.
- 2). 西川弘恭, 山田誠二, 吉崎知男, 巨 弘, 才16回 NMR 討論会講演要旨集, 37, 1977
- 3). A. C. MCLAUGHLIN, P. R. CULLIS, J. A. BERDEN & R. E. RICHARDS, J. Magn. Resonance, 20, 146, 1975.
- 4). W. NIEDERBERGER & J. SEELIG, J. Amer. Chem. Soc., 98, 3704, 1976.
- 5). P. L. YEAGLE & R. B. MARTIN, In Membrane Transport Processes Vol. 2 (ed. D. C. TOSTESON, Yu. A. OVCHINNIKOV & R. LATORRE) p. 13. Raven Press, New York, 1978.

理研 $^{\circ}$ 柴田俊之, 鶴沢 洵, 杉浦嘉彦
群医 林 浩平

緒言

リン脂質が有機溶媒中で形成する逆ミセルの極性基の集合状態は、局所的には二次元 bilayer のそれと似ており、生体膜モデルの基礎的研究に使用できる。この報告ではベンゼン中のリン脂質逆ミセルと Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} の相互作用を ^{31}P NMR の化学シフトと線幅によって調べた。又、リン脂質- Ca^{2+} 複合体に対するベンジルアルコール(局所麻醉剤の一種)の効果を調べた。 ^{31}P NMR の結果は ^1H , ^{14}N NMR の結果と併せて検討される。

リン脂質と二価イオンの相互作用について最もよく調べられているのは phosphatidylserine (PS) である。PS に対する作用が Ca^{2+} と Mg^{2+} で相違のあることが ESR¹⁾、熱測定^{2),3)}、X線回折³⁾ などで報告されている。Paphadjopoulos³⁾ らは熱測定とX線回折の研究から PS と Ca^{2+} , Mg^{2+} の結合は静電的相互作用では説明できず、配位結合的であろうと暗示している。大西¹⁾は ESR (スピンラベル法) により、 Ca^{2+} は PC-PS の mixture を二相分離し PS の分子運動を束縛するが、 Mg^{2+} はその効果がないことを報告した。Phosphatidylcholine (PC) と Ca^{2+} の相互作用については X線回折⁴⁾, ^{31}P NMR⁵⁾ の報告がある。Grasdalen⁵⁾ らは PC vesicle の ^{31}P NMR のシグナルが約 0.4 M の Ca^{2+} により 0.5 ppm 高磁場シフトすることを

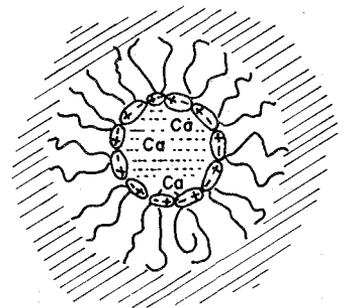
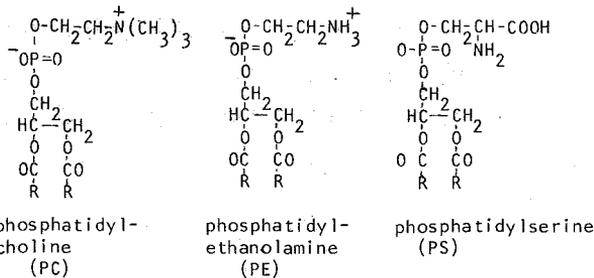


図1

見出し、静電的相互作用の結果であろうと考えた。

有機溶媒中の球状の逆ミセルは、内側に極性基が寄り集っており(図1)その極性基のコアに高濃度の二価イオン水溶液を含み得る。水がなく二価イオンのみでも安定な逆ミセルを形成し、リン脂質の極性基の全てがイオンと相互作用した状態を容易に作る事が出来る。ベンゼン中の PC 逆ミセルは 60~70 分子で形成する球状ミセルだと考えられており、従って、NMR のシグナルは lamellar phase や vesicle の状態に比べて sharp で測定が容易であるという利点がある。

実験

dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (DPPC) と dipalmitoyl-L- α -

しばたとしゆき, うざわじゆん, すぎうらよしひこ, はやしこうへい

phosphatidylethanolamine (DPPE) は Sigma 社製のものをそのまま用いた。phosphatidylserine は牛の脳から抽出した。リン脂質に CaCl_2 又は MgCl_2 の水溶液を加えて T_c 以上の温度で良く攪拌した後メタノールを加えて蒸発乾固し、さらにクロロホルムを加えて蒸発乾固した。dry なリン脂質 - Ca 又は Mg complex を C_6D_6 に溶かして 8% 溶液にし、試料とした。逆ミセルへの水の添加は C_6D_6 の 8% 溶液に 30mM Tris-HCl buffer (PH 7.5) の水を加えた後、リン脂質の T_c 以上の温度で Voltex mixer で良く攪拌して行った。

^{31}P NMR の測定は JEOL FX-100 FT-NMR spectrometer と multinuclear observing system の組みあわせで行った。パルス繰り返し時間 1.8 秒, flip angle 45° 、積算回数 100 回である。化学シフトは 85% H_3PO_4 を外部基準として測定した。

結果

(i) phosphatidylcholine

図 2 は benzene- d_6 中の水の含まない DPPC 逆ミセルの ^{31}P NMR スペクトルである。DPPC 1 mol に対して 1 mol の NaCl を作用させても化学シフトはほとんど変化しない。(図 2 a b) 線幅も変化せず 2.9 Hz である。DPPC

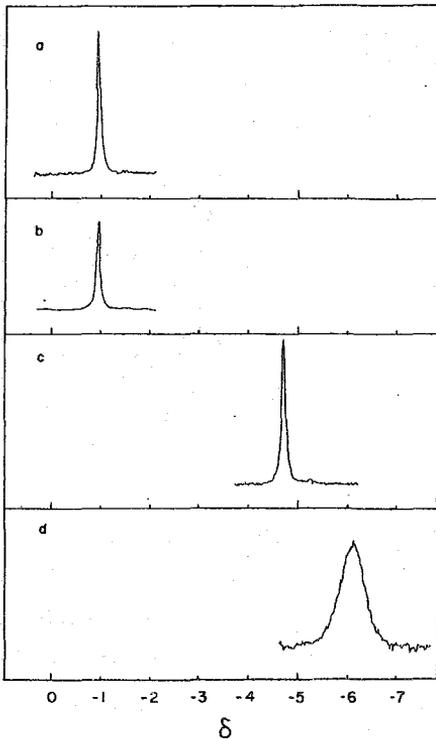


図 2 C_6D_6 中の DPPC 逆ミセルの ^{31}P NMR スペクトル。a) 塩がない場合 b) $\text{NaCl}/\text{DPPC} \approx 1/1$ mol/mol, c) $\text{CaCl}_2/\text{DPPC} \approx 1/2$ mol/mol, d) $\text{MgCl}_2/\text{DPPC} \approx 1/2$ mol/mol. 全て無水状態で測定温度は 60°C . 85% H_3PO_4 を外部基準とした。

- CaCl_2 complex (DPPC/ $\text{CaCl}_2 = 2/1$ mol/mol) の ^{31}P は塩を含まない DPPC に比べて 4 ppm 高磁場シフトしている。線幅は 3.4 Hz でほとんど変化がない。MgCl₂ を作用させると (DPPC/ $\text{MgCl}_2 = 2/1$ mol/mol) 大きく高磁場シフトすることは CaCl_2 の場合と同じであるが、線幅は 2.3 Hz に増加している。 CaCl_2 と MgCl_2 による大きな高磁場シフトは逆ミセルの極性基

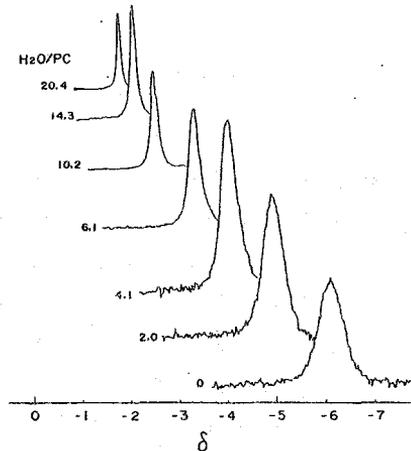


図 3 C_6D_6 中の $\text{MgCl}_2/\text{DPPC}$ ($1/2$ mol/mol) complex の ^{31}P NMR スペクトル。水の添加によって低磁場シフトしている。測定温度 60°C 。

に水 (30mM Tris-HCl buffer, PH 7.5) を添加すると低磁場へシフトした。DPPC- MgCl_2 の ^{31}P のスペクトルの線幅も $\text{H}_2\text{O} = 0$ のときの 2.3 Hz から $\text{H}_2\text{O}/\text{PC} = 20.4$ mol/mol のときの

3.4 H₂O へと水の増加と共に減少する (図3)。図4にそれぞれの complex の化学シフトの含水量による変化が示されている。塩をもたない DPPC の ³¹P 化学シフトはわずかな水の添加によって一旦高磁場シフトし、水の増加に伴って低磁場の方へ戻っている。

DPPC-Na⁺ complex は、含水量の増加に伴って若干高磁場シフトしている。逆に言えば、NaCl の濃度の増加に伴って低磁場シフトして行くことになる。

Na イオンによる DPPC の ³¹P のシフトが小さいのは Na イオンと PO₄ 基との相互作用が単に静電的な相互作用であり結合による電子の移動がないためであろう。それに比して Ca²⁺ と Mg²⁺ の場合の大きな高磁場シフトは単なる静電的相互作用でなく、PO₄ 基の電子の状態の大きな変化を示しており、Ca²⁺ や Mg²⁺ の PO₄ に対する結合が配位結合的であろうことを推定させる。

水の添加によって DPPC-Ca, Mg の系の化学シフトが低磁場シフトするのは PO₄ 基と二価イオンの結合の割合が減少するためであろう。いずれの場合もシグナルは一本しか観測されないので二価イオンが結合した状態と free な状態の交換は速やかなものであろう。今、二価イオンが PO₄ 基に結合する割合が Langmuir の吸着等温式に従うと考えると、

$$\Delta\nu/\Delta\nu_B = \frac{[M^{2+}]}{C_0 + [M^{2+}]} \quad (1)$$

となる。ここで $\Delta\nu_B$ は全ての PO₄ 基にイオンが結合した時の化学シフトの変化、 $\Delta\nu$ はあるイオン濃度 $[M^{2+}]$ の時の化学シフトの変化である。(1)式は酵素反応の Michaelis-Menten の式と同じ形をしており、 C_0 は解離定数 k_m と同じ物理的意味を持つ定数である。図5は DPPC-Ca²⁺ の系の実験結果を(1)式と比較したものである。実験は $C_0 = 2.8 M$ とした時の理論曲線と比較的良く一致している。同様な整理をして DPPC-Mg²⁺ の場合の解離定数 $C_0 = 5 M$ を得た。DPPC に対する親和性は Mg²⁺ よりも Ca²⁺ の方が高い。我々の実験は逆ミセルの測定によって、非常に高い塩濃度の結合の実験から解離定数を求めたところが特徴である。

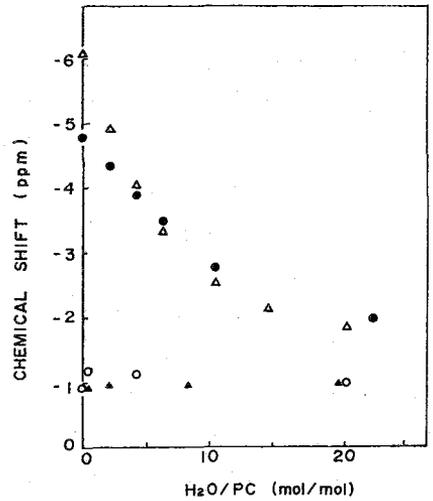


図4 DPPC 逆ミセルの ³¹P の化学シフトと極性基に添加した H₂O 量との関係。(○) 塩のない場合 (●) CaCl₂/PC = 1/2 mol/mol, (△) MgCl₂/PC = 1/2 mol/mol (□) NaCl/PC = 1/4 mol/mol, 測定温度 60°C

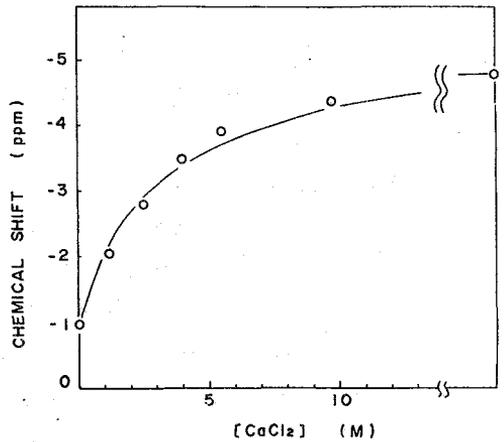


図5 CaCl₂/DPPC complex の ³¹P の化学シフトと塩濃度との関係。

実線は Langmuir の吸着等温式に基づく理論曲線である ($C_0 = 2.8 M$)。

線幅に対する Ca^{2+} と Mg^{2+} の effect の違いは際立っている。DPPC- Mg^{2+} の系が viscous になった様子はないので線幅の broadening は、逆ミセルを形成する分子の運動が束縛された結果であると思われる。 Ca^{2+} と Mg^{2+} が PC の極性基の運動におよぼす影響の違いは、各々のイオンの PO_4^- 基以外への結合部位を明らかにすることによってある程度明らかになるかもしれない。 1H , ^{14}N NMR を合わせて検討している。 $H_2O/PC \approx 20 \text{ mol/mol}$ になると DPPC- Ca^{2+} も DPPC- Mg^{2+} もほぼ同じ程度の線幅になっている。

(ii) phosphatidylethanolamine と phosphatidylserine

図6は DPPE の benzene- d_6 中の逆ミセルの ^{31}P NMR スペクトルを $CaCl_2$ が無い場合とある場合で比較したものである。 $CaCl_2$ によって ^{31}P のシグナルが高磁場シフトしていることは DPPC の場合と同じであるが線幅は DPPC- Ca と違い broadening を起こしている。逆ミセルへの水の添加によって DPPE- Ca^{2+} の系のシグナルは低磁場へシフトする。

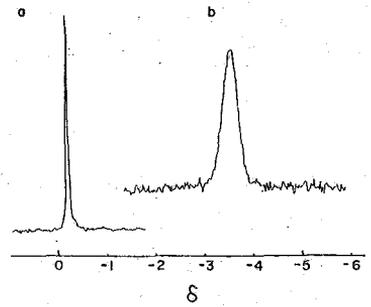


図6 DPPEの ^{31}P NMR スペクトル。
a) 塩がない場合。
b) $CaCl_2/DPPE = 1/2 \text{ mol/mol}$ 。
無水。測定温度 $70^\circ C$

図7は PS と $CaCl_2$ の系についての ^{31}P スペクトルである。PS に $CaCl_2$ を作用させると高磁場シフトした三本の line にわかれる。低磁場側の二本の line は比較的 sharp であり水を添加してもシフトしない。高磁場側の line は非常に broad であり、水の添加によって低磁場へシフトする。

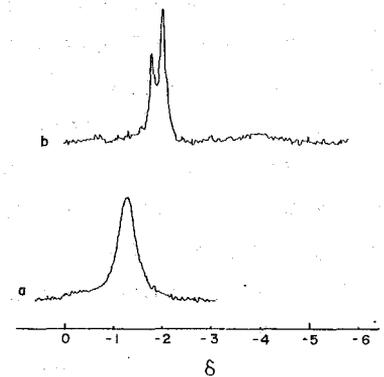


図7 PS の ^{31}P NMR スペクトル。
a) 塩がない場合。
b) $CaCl_2/PS = 1/2 \text{ mol/mol}$ 。
無水。測定温度 $26^\circ C$

(iii) benzyl alcohol の効果

図8は DPPE- $CaCl_2$ ($H_2O/PE \approx 6$) の C_6D_6 溶液に約10%の benzyl alcohol を添加した時の ^{31}P NMR スペクトルを添加する前と比較したものである。benzyl alcohol の添加によってスペクトルは低磁場へシフトし、線幅が減少している。benzyl alcohol は Ca^{2+} の PO_4^- 基への結合の割合を減少させる働きをもつものと思われる。

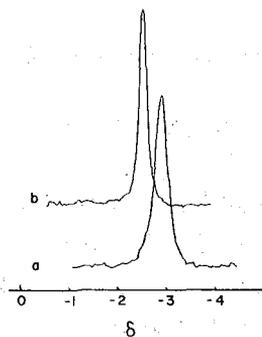


図8 DPPE- Ca^{2+} complex の ^{31}P スペクトル。a) ベンジルアルコール無の場合。b) 存在する場合。
($H_2O/DPPE \approx 6 \text{ mol/mol}$)

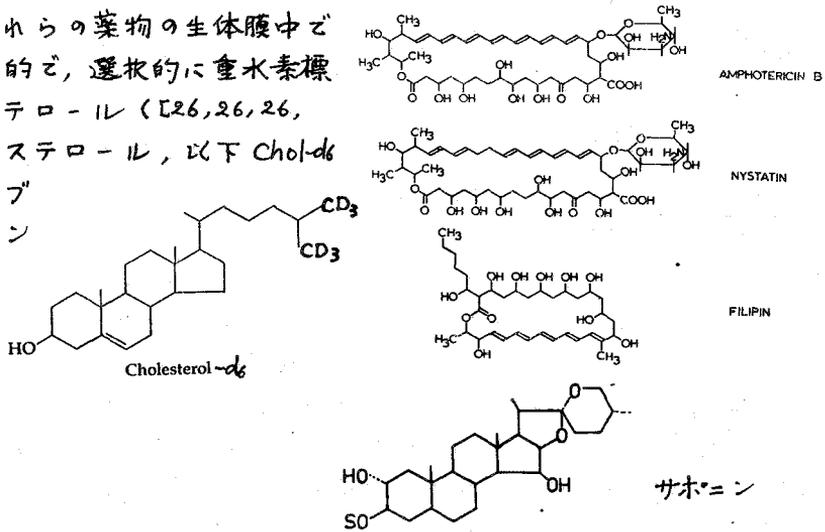
References

- 1) S. Ohnishi and T. Ito; Biochemistry 13 881 (1974)
- 2) K. Jacobson and D. Papahadjopoulos; Biochemistry 14 152 (1975)
- 3) D. Papahadjopoulos et al.; Biochim. Biophys. Acta 506 281 (1978)
- 4) Y. Inoko et al.; Biochim. Biophys. Acta 413 24 (1975)
- 5) H. Grasdalen et al.; Biochim. Biophys. Acta 469 151 (1977)

309 レシチン多重膜におけるホリエンマクロライド, サホニンとコレステロールの相互作用。²H NMRによる研究
 (国立がんセンター研) 齊藤 肇, 稻荷昌司
 (東大薬) 秋山敏行, 高木重和, 三川 潮

1. はじめに

アンホテリシンB, ナイスタチン, フィリピンなどのホリエン-抗生物質は, 共役二重結合をもった抗生物質で, ステロールを持つ真菌類に強い抗菌作用を示す。その機構は, ステロールとのコンプレックス生成によって, 水, イオン, 非電解質を透過させる pore を作るためであると考えられている。一方, ジギトニンに代表されるサホニンはトリテルペンやステロイドをアグリコンとした配糖体で, 赤血球膜に作用して溶血作用がある。この場合も, コレステロールが作用部位である可能性がきわめて大きい。これらの薬物の生体膜中での作用を解明する目的で, 選択的に重水素標識を行なったコレステロール ([26,26,26, 27, 27, 27-²H₆]コレステロール, 以下 Chol-d₆ と略する) をプローブとして用い, レシチン多重膜中での上記の薬物との相互作用を²H NMR スペクトル変化から追跡した。



2. 実験方法

Chol-d₆は化学合成によって得た。レシチンは卵黄から常法により抽出し, 上記の chol-d₆ 薬物をクロロホルム-DMSO 溶媒系で均一に混合した後, 高真空下で溶媒を除去した。さらに大過剰の水を加えて, Vortex Mixer ではげしく振り混ぜ, ラメラ多重層を得た。²H NMR の測定は, 日本電子 PFT-100 スペクトロメータ (15.28 MHz) 及び Bruker CXP-300 スペクトロメータ (46.06 MHz) によって行ない, 特に後者の場合は Quadrupole echo のパルスシーケンスを用いた。

- | | | |
|-----|-------------------------|--------------------------------|
| I | s = Xyl-Glu-Gal-Gul-Gal | Digitonin |
| II | s = Xyl-Glu-Gal-Gal | Desglucodigitonin |
| III | s = Glu-Gal | Glucosylgalactosyl-digitogenin |

3. 実験結果と考察

3.1. Chol-d₆ の²H NMR レシチン多重膜中のリン脂質やコレステロール分子は, 多重膜の法線に平行に配列していることが知られている。したがって, ²H NMR スペクトルパターンは, 液体中におけるようなシングルピークではなく, 複重

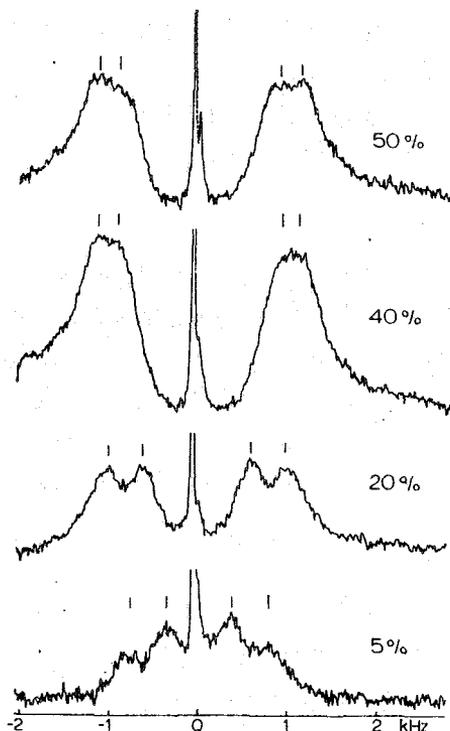


図1. レシチン多重膜中の Chol-d6 の ^2H NMR スペクトル。

として観測されているわけである。なお中央の強度が大きいピークは、水中にふくまれる天然存在比の HDO (0.02%), その右側の小さいピークは "小さな Vesicle" 中の Chol-d6 の ^2H NMR スペクトルである。核四重極分裂の大きさ D_Q は、C- ^2H 結合に関する配向パラメータ S_{CD} を用いて

$$D_Q = \frac{3}{4} \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right) S_{CD} \quad (1)$$

で表わされる。核四重極結合定数 $\left(\frac{e^2 q Q}{h} \right)$ は sp^3 混成の C- ^2H に関して 170 kHz であるから、 D_Q がわかるとたちどころに S_{CD} を計算することが出来る。図1の場合には D_Q を直接スペクトルから読みとることが出来るが、ポリエー抗生物質やサホニン系に加えた場合、スペクトル線のブロードニングのために D_Q の決定は必ずしも容易でない。このため、図1にみられるスペクトル線を "powder pattern"

$$g(\omega) = \frac{\int_0^\pi \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi \left[\left(\frac{1}{2} \right)^2 + \left\{ \omega \pm \frac{3}{2} \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right) S_{CD} (3 \cos^2 \theta - 1) \right\} \right]} \quad (2)$$

の理論式³⁾ にカーブフィットさせることにする。なお、"小さな Vesicle" 中の ^2H シグナルとして $g(\omega) = \frac{1}{\left(\frac{1}{2} \right)^2 + (\omega')^2} \quad (3)$

を求めた。

図2から明らかのように、Chol-d6 の濃度を上げると核四重極分裂 D_Q はシグモイド様の変化をする。ゲル→液晶転移温度以上では、コレステロールの作用は膜

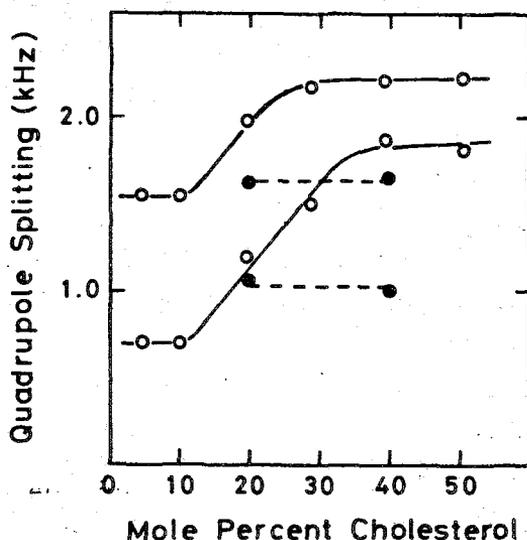


図2. Chol-d6 の核四重極分裂の大きさの濃度依存性。(●は 47°C のデータ)

核分裂によって二本に分れたダブルレットとなる。図1に示す ^2H NMR スペクトルは、26, 27-位に標識した CD_3 基の配向状態が多重膜の法線に対して異なるため、四本線

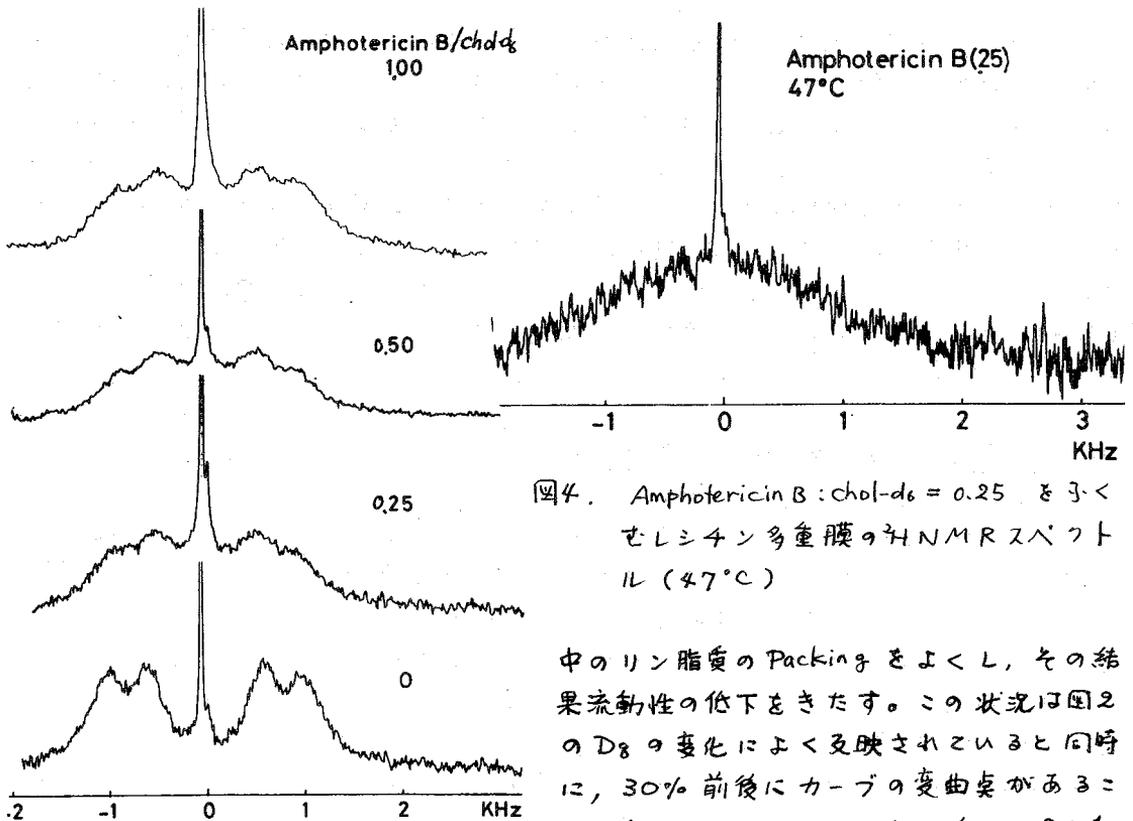


図3. レシチン多重膜中の chol-d₆ ²H NMR スペクトルに対する Amphotericin B の効果

図4. Amphotericin B:chol-d₆ = 0.25 とおくせレシチン多重膜の ²H NMR スペクトル (47°C)

中のリン脂質の Packing をよくし、その結果流動性の低下をきたす。この状況は図2の D₈ の変化によく反映されていると同時に、30% 前後にカーブの変曲点があることからコレステロール:レシチン = 2:1 の stoichiometry があることを示していると思われる。

3.2. ポリエン-抗生物質 - コレステロール相互作用

レシチン多重膜の chol-d₆ を 20% に固定して以下の実験を行なう。図3は 28°C にあける、アンホテリシン B:コレステロールの比を変化させて得た、chol-d₆ の ²H NMR スペクトルである。いずれの場合も、コレステロールの核四重分裂は二種類しかみられず、また二種類しかないと仮定して求めた (2)(3) 式にもとづくシミュレーションは図3の結果とよく両現することがわかる。このことは、直接アンホテリシン B とコン

Table I. Changes of Order Parameters of Chol-d₆ in the Presence of Polyene Macrolides

	Ratio	Inner ($\Delta S/S$)	Outer ($\Delta S/S$)
Control (20%)	0	0.0089 (0)	0.015 (0)
Amphotericin B	0.25	0.0073 (0.18)	0.014 (0.07)
"	0.5	0.0073 (0.18)	0.014 (0.07)
"	1	0.0069 (0.22)	0.014 (0.07)
Nystatin	0.5	0.0078 (0.12)	0.015 (0)
Filipin	0.5	0.0063 (0.29)	0.013 (0.14)

プレックスを作り得る距離にある chol-d₆ とそれ以外の chol-d₆ の間で速い交換過程にあることを示している。実際に、スペクトルシミュレーションから求めた配向パラメータと比較してみると(表1)、ポリエン-抗生物質をよくまな Control に比して、いずれも配向パラメータが減少していることがわかる。また、この減少の程度 ($\Delta S/S$) は、濃度とともに、あるいは同濃度では フィリピン > アンホテリシン B > ナイスタチン と変化しており、特に後者の傾向は *A. laidlawii* 膜におけるコレステロールへの結合の度合いや赤血球膜への溶血作

用などの Biological Activity と平行関係が見られ興味深い。図3を用いた試料を 47°C に加熱して ³¹P NMR スペクトルを測定すると、図4のように非可逆的な変化がみられた。すなわち、室温 (28°C) にもどしても、図3の下から2枚目のスペクトルにはもどらない。シミュレーションから求めた配向パラメーターは、内側、外側のペアそれぞれ 0.0051, 0.012 と、図2●のデータを規準にして ΔS/S はそれぞれ 0.29, 0.14 とある。これらの結果は、ポリエントの相互作用によつて、chol-d₆ の配向パラメーターはいずれも減少することと示しており、この実験条件下ではこれまでに提唱されているような規則的な配列状態にあるコンプレックス形成には対応していない。

3.3. サポニン-コレステロール相互作用⁵⁾ ジギトニン:コレステロール比が 0.3 以下の場合、ジギトニン量を増加させると chol-d₆ の複重極分裂が減少していくことがわかり、この傾向は上ごのべたポリエントの場合と同じである。しかし、1:1 モル比付近あるいは、モル比が 0.3 以下であっても 47°C に加熱した場合、いずれも、15.28 MHz スワッチャーではピークが全く消滅してしまふことがわかった。しかし、図4Bに示すように、Quadrupole echo ではジギトニン:chol-d₆ 等モル混合物の D₂ は 14 kHz に増大してあり、図4Aに示す固体状態のスペクトルに近くなる。これは、レシチン多量膜上においても "Digitonide" 状の rigid complex が形成されていることを示している。ジギトニンの末端の糖鎖を部分的に除去すると、溶血作用が著しく減少する。実際、表2に示す配向パラメーターの変化は、これと平行関係にあり、デスグルコジギトニン、グルコシルガラクトシルジギトニン(才1ページ目のダイアグラム参照)の配向パラメーターの変化は著しく減少している。コレステロールとの相互作用部位は、サポニンのアグリコンであることと化学構造から内側というところであろうが、多量膜の外側に位置する糖鎖が相互作用に影響を与えている点、きわめて興味深い。

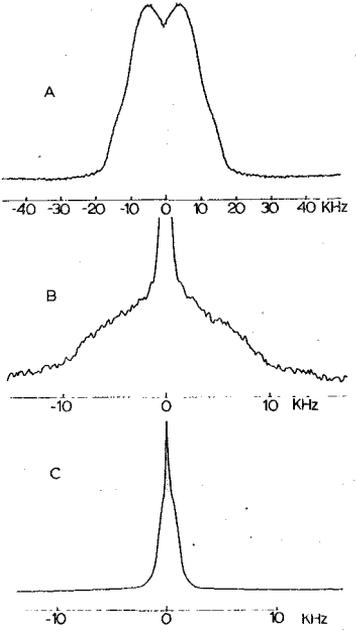


図4. 46.06 MHz ³¹P NMR
A: 固体 chol-d₆, B: レシチン多量膜中ジギトニン:chol-d₆ = 1:1
C: 同ジギトニン:chol-d₆ = 0.15:1

Table II. Changes of Order Parameters of Chol-d₆ in the Presence of Saponins

	Ratio	Inner (ΔS/S)	Outer (ΔS/S)
Control	0	0.0089 (0)	0.016 (0)
Digitonin	0.15	0.0047 (0.47)	0.012 (0.25)
Desglucodigitonin	0.15	0.0073 (0.18)	0.015 (0.06)
Glucosylgalactosyl-digitogenin	0.15	0.0084 (0.06)	0.015 (0.06)

(1) Mantsch, H. H., Saito, H. and Smith, I. C. P., Prog. NMR Spectr., 11, 211 (1977)
 (2) Seelig, J., Q. Rev. Biophys., 10, 353 (1977)
 (3) Stockton, G. W., Polnaszek, C. F., Tulloch, A. P., Hasan, F., and Smith, I. C. P. Biochemistry, 15, 954 (1976)
 (4) Norman, A. W., Denel, R. A., Kruyff, B. De., Geurts Van Kessel, W. S. M., and Van Deenen, L. L. M., Biochim. Biophys. Acta, 290, 1 (1972)
 (5) 秋山敏行, 高木重和, 三川潮, 箱崎昌司, 齊藤肇, 才23回天然有機化合物討論会要旨, 1979.

310 ランタニドイオンの存在下におけるウロン酸の¹³C-NMRスペクトル

(京工織大・工学・化学) 泉 邦彦

ウロン酸、とくにD-グルコピラヌロン酸(D-GA)とD-ガラクトピラヌロン酸(D-GalA)は細胞壁や細胞間質を構成する多糖の成分として天然に広く分布している。演者は、これらの多糖の構造、性質および生物学的機能を解明するのにNMR分光法を利用することを検討し、これまでにD-GalAを含む一連のガラクトース系構成単糖について¹H-NMRスペクトルの特徴を詳細に解析した。¹⁻³⁾今回はさらにD-GAをも加えてウロン酸成分の¹³C-NMRスペクトルを測定し、各シグナルの化学シフト、スピン格子緩和時間(T₁)およびそれらのランタニドイオンによる変化の特徴を調べたので結果を報告する。

〔方法〕

スペクトロメーターはバリアン社製FT-80(20MHz)を使用し、10mm試料管中の重水溶液についてプロトンデカップル下のスペクトルを38°Cで測定した。ロックは重水への内部ロックの方式を用い、通常、パルス幅は10μ秒、繰返し時間は7秒、積算回数は1000に設定した。標準試料は内部基準として1,4-ジオキサン(δ_c=67.28)を使用した。T₁の測定は180°-α-90°パルス法によってC-1~5とC-6について別個に行ない、繰返し時間(T₁の約5倍)の違いに応じて積算回数は100-1200の範囲内で適宜変化させた。また、6個以上の値に対するデータから最小自乗法によってT₁を求め、同一条件での測定を3回くりかえして平均値を算出した。誤差はC-1~5について4%以下、C-6について約10%であった。

(表1) D-グルコピラヌロン酸(D-GA)、D-ガラクトピラヌロン酸(D-GalA)およびそれらのナトリウム塩の¹³C-化学シフト(δ_c) (かっこ内の数字は遊離酸のδ_cとの差を示す)

〔結果と考察〕

1. 化学シフト——表1にD-GA、D-GalAおよびそれらのNa塩(pD=7.0)に含まれる炭素の化学シフトを示す。これらの帰属は主として遊離酸試料(市販品)の溶解後20分以内に測定したスペクトルにおけるアノマー間のシグナル強度の違い(D-GAではβ>α、D-GalAではα>β)と、pD変化によって誘起されるシフトの大小(カルボキシル基に近いものほど大)にもとずいて行なった。この表からα-アノマーはβ-アノマーに

		D-GA	D-GA (Na塩) (pD=7.0)	D-GalA	D-GalA (Na塩) (pD=7.0)
α- アノマー	C-1	93.02	92.77 (-0.25)	93.04	92.90 (-0.14)
	C-2	71.77	71.91 (0.14)	68.52	68.70 (0.18)
	C-3	73.09	73.28 (0.19)	69.35	70.00 (0.65)
	C-4	72.12	72.66 (0.54)	70.80	71.49 (0.69)
	C-5	71.14	72.38 (1.24)	70.80	72.12 (1.32)
	C-6	173.82	177.53 (3.71)	173.40	176.61 (3.21)
β- アノマー	C-1	96.78	96.48 (-0.30)	96.88	96.62 (-0.26)
	C-2	74.41	74.66 (0.25)	71.99	72.27 (0.28)
	C-3	76.00	76.23 (0.23)	72.97	73.53 (0.56)
	C-4	71.92	72.45 (0.53)	70.31	71.01 (0.70)
	C-5	75.14	76.62 (1.48)	74.60	76.22 (1.62)
	C-6	172.89	176.61 (3.72)	172.49	175.79 (3.30)

いずみ くにひこ

比して一般にC-1, 2, 3, 5の化学シフトが3-4 ppm小さいがC-4, 6のそれは逆に0-1 ppm大きいことが分かる。

2. ランタニドイオン(Ln)による誘起シフト——表2にD-GAとD-GalAの各Na塩(1.5M)に0.1MのLa³⁺, Eu³⁺, Pr³⁺またはNd³⁺を硝酸塩として加えたときの化学シフトの変化(Δδ, ppm)を示す。Δδ値はウロン酸濃度が一定(1.5M)の場合にLn濃度0.1Mまではこれに比例した。そこでこれらのΔδ値を、主としてReillyら⁴⁾の方法にしたがって、錯体形成シフト(CFS)、コンタクトシフト(CS)および擬コンタクトシフト(PS)に分離することを試みた。すなわち、まずLa³⁺による誘起シフトをCFSとしてΔδ値から差し引いたのち、残りをF_i<S_z>_j(CS)とG_iC_j

[表2] ランタニドイオン(0.1M硝酸塩)によるD-グルコピラヌロン酸とD-ガラクトピラヌロン酸(いずれも1.5M Na塩)の¹³C-化学シフトの変化(Δδ)およびそれらのコンタクトシフト(CS)と擬コンタクトシフト(PS)への分離

		La ³⁺		Eu ³⁺		Pr ³⁺			Nd ³⁺			F _i	G _i	
		Δδ(CFS)	Δδ	CS	PS	Δδ	CS	PS	Δδ	CS	PS			
D-グルコピラヌロン酸(α-アノマー)	C-1	0.08	1.08	0.39	0.61	-1.78	-0.11	-1.75	-0.93	-0.20	-0.81	-0.038	0.162	
	C-2	-0.04	0.12	-0.09	0.25	-0.71	0.02	-0.69	-0.29	0.04	-0.29	0.008	0.064	
	C-3	0	0.07	-0.04	0.11	-0.32	0.01	-0.33	-0.14	0.02	-0.16	0.004	0.031	
	C-4	-0.02	0.07	0.06	0.03	-0.12	-0.02	-0.08	-0.21	-0.10	-0.09	-0.009	0.009	
	C-5	-0.07	-5.47	-5.03	-0.37	2.34	1.38	1.03	2.76	2.39	0.44	0.479	-0.096	
	C-6	0.24	2.89	3.45	-0.80	1.48	-0.96	2.20	-1.10	-1.93	0.59	-0.339	-0.190	
	β-アノマー	C-1	0.02	-0.04	-0.11	0.05	-0.08	0.03	-0.13	0	0.04	-0.06	0.010	0.012
		C-2	-0.01	-0.08	-0.08	0.01	-0.02	0.02	-0.03	0.03	0.05	-0.01	0.008	0.003
		C-3	0.03	-0.25	-0.29	0.01	0.08	0.08	-0.03	0.14	0.12	-0.01	0.027	0.003
		C-4	0	0.28	0.30	-0.02	-0.03	-0.08	0.05	-0.14	-0.16	0.02	-0.029	-0.004
		C-5	-0.11	-5.26	-4.74	-0.41	2.32	1.30	1.13	2.71	2.31	0.51	0.453	-0.106
		C-6	0.18	3.03	3.25	-0.40	0.40	-0.89	1.11	-1.31	-1.79	0.30	-0.318	-0.095
D-ガラクトピラヌロン酸(α-アノマー)	C-1	0.18	2.88	0.99	1.71	-4.93	-0.27	-4.84	-2.49	-0.50	-2.17	-0.106	0.489	
	C-2	-0.05	0.70	0.04	0.71	-2.06	-0.01	-2.00	-0.89	-0.02	-0.82	-0.004	0.199	
	C-3	-0.13	1.01	0.78	0.36	-1.34	-0.22	-0.99	-0.89	-0.35	-0.41	-0.081	0.099	
	C-4	-0.03	-0.36	-0.44	0.11	-0.19	0.12	-0.28	0.01	0.16	-0.12	0.043	0.029	
	C-5	0.47	-4.04	-4.26	-0.25	2.31	1.17	0.67	2.71	1.96	0.28	0.441	-0.068	
	C-6	0.27	-0.42	0.89	-1.58	4.18	-0.26	4.17	0.86	-0.51	1.10	-0.099	-0.401	
	β-アノマー	C-1	0.04	0.19	-0.01	0.16	-0.46	0	-0.50	-0.20	0	-0.24	0.001	0.051
		C-2	-0.01	0.05	-0.01	0.07	-0.18	0	-0.17	-0.05	0	-0.04	0.001	0.017
		C-3	-0.05	-0.09	-0.05	0.01	-0.05	0.01	-0.01	-0.03	0.03	-0.01	0.006	0.002
		C-4	-0.01	0.08	0.14	-0.05	0.09	-0.04	0.14	-0.05	-0.08	0.04	-0.016	-0.013
		C-5	0.03	-3.90	-3.59	-0.34	1.94	0.98	0.93	2.15	1.71	0.41	0.374	-0.095
		C-6	0.16	1.89	2.24	-0.51	0.95	-0.62	1.41	-0.49	-1.10	0.45	-0.235	-0.136

(PS)の和として表わした。ここに F_i と G_i はそれぞれ各炭素(i)に固有のCS因子とPS因子であり、後者はその比が $(3\cos^2\theta_i - 1)/r_i^3$ (r_i は L_n と炭素の間の距離、 θ_i はこの距離ベクトルと磁気テンソルの主軸がなす角度を示す)の比に等しい、いわゆる幾何因子でもある。また、 $\langle S_z \rangle_j$ と C_j はそれぞれ各 $L_n(j)$ に固有のCS因子とPS因子である。次に $\langle S_z \rangle_{Eu} = -10.68$ 、 $\langle S_z \rangle_{Pr} = 2.97$ 、 $\langle S_z \rangle_{Nd} = 4.49$ および $C_{Eu} = 4.0$ 、 $C_{Pr} = -11.0$ 、 $C_{Nd} = -4.2$ の各理論値^{5,6)}を用い、各炭素ごとに得られる3つの関係式から最小自乗法によって F_i と G_i を算出した。そしてこの値から計算した $F_i \langle S_z \rangle_j$ と $G_i C_j$ の値の割合に誘起シフトを按分してそれぞれCSおよびPSとした。CSと $F_i \langle S_z \rangle_j$ 、およびPSと $G_i C_j$ の間の誤差は大部分が10%以下であった。これらの値は同じく表2に示されているが、この表からCSはC-5に最も大きく現われ、ついで符号を変えてC-6にもかなり大きく現われること、およびPSもC-5とC-6に概して大きく現われるが α -アノマーに限りC-1にも非常に大きく現われることが分かる。

3. T_1 とその Gd^{3+} による変化——表3にD-GAとD-GalAの各Na塩(1.5M)に含まれる炭素の T_1 、および Gd^{3+} を加えたときのそれらの変化を示す。D-GA(Na塩)についてはC-5(α)とC-4(β)のシグナルがほとんど重なり合うので25mMの Eu^{3+} を加えてこれらを分離した条件において Gd^{3+} の影響を調べた。この表から、まず Gd^{3+} を加えない場合の T_1 は、

C-1と5の間では、 β -D-GalA(Na塩)のC-4がやや低い値を除いて概して変りがないが、0.1mMの Gd^{3+} (硝酸塩)を加えると、C-6の T_1 に最大の変化(減少)が起こるほかに他の炭素の T_1 も大なり小なり減少することが分かる。とくにこの変化をBarryら⁷⁾の方法にしたがって、 Gd^{3+} が結合した分子の緩和速度の比(表3)として表わすと、先に見たPSの場合と同じように、C-6とC-5が概して大きい値を示すのに加えて α -アノマーに限りC-1も相対的に大きい値を示すことが分かる。

(表3) D-グルコピラヌロン酸(D-GA)とD-ガラクトピラヌロン酸(D-GalA)(いずれもNa塩)の¹³C-スピン格子緩和時間(T_1)およびそれらのガドリニウムイオン(硝酸塩)による変化

		1.5M D-GA (Na塩)				1.5M D-GalA (Na塩)			
		T_1 (秒)			Gd^{3+} が結合した分子の緩和速度の比*	T_1 (秒)			Gd^{3+} が結合した分子の緩和速度の比*
			25mM Eu^{3+}	25mM Eu^{3+} + 0.1mM Gd^{3+}			0.1mM Gd^{3+}		
α -アノマー	C-1	0.80	0.64	0.33	0.224	0.67	0.29	0.475	
	C-2	0.85	0.67	0.46	0.101	0.69	0.50	0.128	
	C-3	0.84	0.67	0.48	0.087	0.69	0.56	0.076	
	C-4	0.89	0.70	0.35	0.217	0.66	0.44	0.177	
	C-5		0.70	0.29	0.309	0.67	0.35	0.330	
	C-6	15.1	4.91	0.15	1.000	12.5	0.24	1.000	
β -アノマー	C-1	0.86	0.67	0.54	0.069	0.69	0.63	0.062	
	C-2	0.81	0.67	0.58	0.042	0.69	0.62	0.073	
	C-3	0.82	0.72	0.53	0.098	0.67	0.63	0.039	
	C-4		0.72	0.41	0.213	0.58	0.54	0.056	
	C-5	0.84	0.71	0.35	0.297	0.67	0.56	0.152	
	C-6	15.9	5.38	0.20	1.000	12.7	0.53	1.000	

* Gd^{3+} を添加する前後における緩和速度(T_1 の逆数)の差から内部基準物質(1,4-ジオキサン)の緩和速度変化分を差し引いたものの比

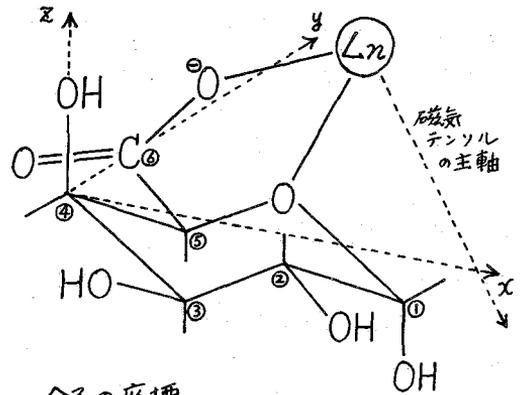
4. L_n の結合部位——

以上の結果から、 L_n がこれらのウロン酸のカルボキシル基酸素(O-6)と直接に結合していることはほとんど疑いないが、 L_n の結合部位をより正確に知るために、次に表3の緩和速度の比から、その6乗根の逆数を求めて L_n と各炭素原子の間の距離(r_i)の比を算出した。また、まず α -D-GalA (Na塩) について分子の座標を図1に示すように設定し、 r_i の比が実測値にもっとも近似する L_n の位置を 0.5 \AA 単位で探した結果、 $x=3.0 \text{ \AA}$, $y=3.5 \text{ \AA}$, $z=2.0 \text{ \AA}$ の位置が立体化学的に可能な範囲内の最小の

[表4] D-グルコピラヌロン酸(D-GA)とD-ガラクトピラヌロン酸(D-GalA)(いずれもNa塩)に結合するランタニドイオンと各炭素原子の間の距離(r_i)および幾何因子(G_i)

		D-GA (Na塩)		D-GalA (Na塩)				
		r_i (比)	G_i (比)	r_i (比)		G_i (比)		
		実測値	実測値	実測値	計算値	計算値(A)	実測値	計算値
α - アノ マー	C-1	1.28	0.85	1.13	1.15	4.30	1.22	1.22
	C-2	1.47	0.34	1.41	1.40	5.22	0.50	0.54
	C-3	1.50	0.16	1.54	1.56	5.83	0.25	0.20
	C-4	1.29	0.05	1.33	1.34	5.02	0.07	-0.03
	C-5	1.22	-0.51	1.20	1.08	4.04	-0.17	-0.06
	C-6	1.00	-1.00	1.00	1.00	3.74	-1.00	-1.00
β - アノ マー	C-1	1.56	0.13	1.59			0.38	
	C-2	1.70	0.03	1.55			0.13	
	C-3	1.47	0.03	1.72			0.01	
	C-4	1.29	-0.04	1.62			-0.10	
	C-5	1.22	-1.12	1.37			-0.70	
	C-6	1.00	-1.00	1.00			-1.00	

R値⁹⁾ (0.040) を与えることが分かった。この位置と環酸素(O-5)の間の距離は 3.11 \AA であり、 L_n は O-6 に加えてこの酸素ともキレート様に結合している可能性が大きい(図1参照)。一方、この L_n の位置について、表2の G_i の比にもっとも近似するように磁気テンソルの主軸の方向を探した結果、図1に示すように X 軸上 4.4 \AA の位置と L_n を結ぶ方向が最小の R 値 (0.084) を与えることが分かった。これらの r_i や G_i の実測値と計算値は表4に示されているが、この表から、D-GA (Na塩) の場合にも α -アノマーについては類似のキレート様結合の存在が推定されるのに対して、 β -アノマーについては両ウロン酸とも O-6 との結合のみしか考えられないことが分かる。ウロン酸におけるこのようなアノマー間の性質の違いは、多糖中でのそれらの機能との関連において非常に興味深い。



分子の座標

- { X 軸: C-4 → O-5 と C-2 を結ぶ線の
中点
- { Y 軸: C-4 → C-6
- { Z 軸: C-4 → O-4

[図1] α -D-ガラクトピラヌロン酸(Na塩)へのランタニドイオン(L_n)の結合部位

[文献] 1) Agric. Biol. Chem., 35, 1816 (71) 2) Carbohydr. Res., 27, 278 (73) 3) J. Biochem., 81, 1605 (77)
4) Anal. Chem., 47, 2110 (75) 5) Aust. J. Chem., 25, 2577 (72) 6) J. Chem. Soc., Chem. Comm., 791 (72)
7) J. Mol. Biol., 84, 471 (74) 8) J. Am. Chem. Soc., 94, 1742 (72)

311 2'-Fluoro-2'-deoxyadenosine を含むジヌクレオチドモノ
 ホスフェートのコンホメーションのNMRによる研究
 (阪大・薬) 〇上杉晴一, 高塚陽子, 池原森男
 (Johns Hopkins 大) D.M. Cheng, L. S. Kan, P.O.P. Ts'o

1. はじめに

ヌクレオチド誘導体のフuran-ス環の pucker ing は, 近似的に, 図1に示した
 ような 3'-endo 体と 2'-endo 体との間の平衡として表わされる。これらのコン
 ホメーションの population は, $^1\text{H-NMR}$ における結合定数 ($J_{1'2'}$ と $J_{3'4'}$) から求
 めることが出来る。我々の研究室では, 2'位に種々の置換基を導入した 2'-置換 2'-
 デオキシアデノシン (図2)²⁾ やそれを含むポリマー³⁾ を合成し, その性質を調
 べている。ヌクレオチド誘導体を $^1\text{H-NMR}$ により調べると, 3'-endo 体の

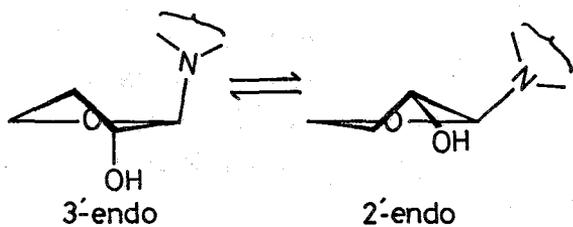
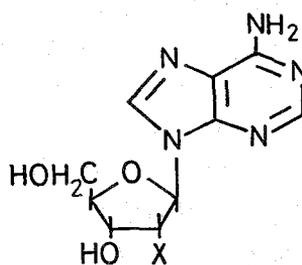


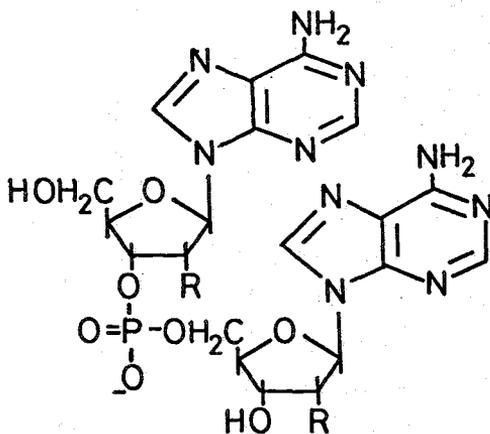
図1. ヌクレオチド誘導体におけるフuran-ス環の pucker ing の平衡



X = H, OH
 NH₂, N₃
 F, Cl, Br, I

図2.

population は, 置換基の大きさにはあまり関係せず, 置換基の電気陰性度に依存していることが判った (京極ら, 未発表データ)。これら誘導体の中で特に注目されるのは, 2'-fluoro-2'-deoxy-adenosine (図2 R=F, Af) で, 著しく 3'-endo 体の population が多く, 約 70% にも達していた (同条件で, R=H のデオキシアデノシンでは約 20%, R=OH のアデノシンでは 36% であった)。X 線解析による研究により, RNA は A 型のらせん構造のみをとり, そのヌクレオチド単位は 3'-endo 型をとっていることが判っている。溶液中においても, 一般に, *rubo*-oligomer 中のヌクレオチド単位は, monomer に



$R_1 = R_2 = \text{F}$ Af_pAf
 $R_1 = \text{F}, R_2 = \text{OH}$ Af_pA
 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{F}$ Ap_pAf
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$ Ap_pA

図3.

うえすぎ せいいち, たかつか. ようこ, いけはら もりお
 ドリス M. チェン, ルウ S. カン, ポール O.P. チョー

較べ、より大きな 3'-endo population をもつことが判っている。従って、又クレオシドの段階で既に非常に大きな 3'-endo population をもつ Af を含むジヌクレオシドモノホスフェートを合成しその性質を調べることにより、糖部のコンホメーションのオリゴマーコンホメーションに及ぼす影響が明らかにされると予想される。今回合成したダイマーは図3に示したような ApA のアナローグで、R が両方とも F の AfpAf、片方のみが F の AfpA 及び ApAf の 3 種である。これらのダイマーの UV 吸収及び CD による研究については既に発表している⁴⁾ので、今回は ¹H-NMR による研究について主に述べる。

2. 実験方法

ダイマーは、適当に保護したヌクレオチド成分とヌクレオシド成分との縮合反応により合成した。測定試料は Na 塩の D₂O 溶液 (0.05 M) とし、DSS を標準物質として用いた。溶液の pD は、ダイマーの場合 7.5、モノマーの場合 5.5 に調整した。(但し、pAB 及び Ap のデータは pD 7 で測定したもの)。¹H-NMR スペクトルは、Bruker WH-360 (360 MHz) で測定し、測定温度は 25°C である。化学シフトは DSS から低磁場方向に測り、ppm で表した。シグナルの帰属は、化学シフト値、¹H-¹F 結合定数、Mn²⁺ による特異的線幅増大、逐次デカップリング法の結果等を考慮して行った。

3. 実験結果と考察

AfpAf のスペクトルを図4に示した。H-1' 及び H-2' のシグナルは大きな ¹H-¹F 結合定数 (それぞれ約 16 Hz と 51 Hz) をもつため、容易に他のシグナルと区別できる。H-1' シグナルに注目すると、H-1' と H-2' との間の結合定数、 $J_{1'2'}$ は非常に小さいことが判る。表1にダイマー及び関連するモノマーの化学シフトと $J_{1'2'}$ を示した。モノマーの

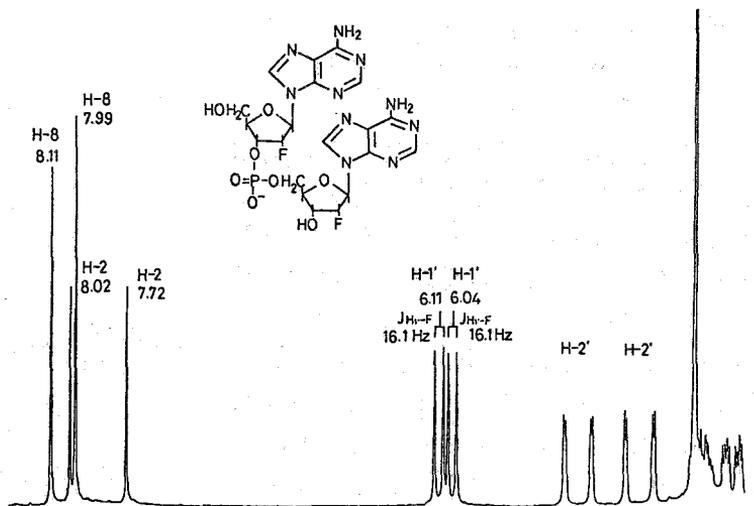


図4. AfpAf の ¹H-NMR スペクトル (360 MHz)

Afp 及び pAf の $J_{1'2'}$ は 2.9 Hz と 2.1 Hz で、それぞれ約 70% と 80% の 3'-endo population に相当する。ところが、ダイマー中の Af 残基の $J_{1'2'}$ は 1.1 ~ 1.2 Hz で、3'-endo 体の population は約 90% に増大している。一方、ダイマー中の A 残基の $J_{1'2'}$ は、モノマーのそれよりも小さいが、3.9 Hz と 3.6 Hz で、約 60% の 3'-endo population に相当する。これらの値は、ApA 中の対応する A 残基のそれと殆ど同じである。一般に ribo-dimer 中のヌク

レオシド残基の $J_{1'2'}$ は対応するモノマーのそれよりも小さくなり、3'-endo population が増大すること加知られており、その程度はよく stack している時に大きくなる。従って、Af を含むダイマーについても、塩基間に安定な stacking が予想される。stack したダイマーにおいては、塩基の環電流しゃへい効果によるプロト

表1. ダイマー及び関連モノマーの化学シフトと結合定数

Compound	Chemical Shift (ppm)				Coupling Constant (Hz)	
	H-8	H-2	H-1'	H-2'	$J_{1'2'}$	
AfpAf	Afp-	7.99	7.72	6.04	5.39	1.2
	-pAf	8.11	8.02	6.11	5.08	1.2
AfpA	Afp-	8.10	7.74	6.04	5.37	1.2
	-pA	8.11	7.99	6.87	4.39	3.9
ApAf	Ap-	8.08	7.82	5.78	4.64	3.6
	-pAf	8.12	8.02	6.16	5.19	1.1
Afp		8.30	8.15	6.35	5.54	2.9
Ap		8.36	8.26	6.12		6.4
pAf		8.36	8.13	6.33	5.37	2.1
pA		8.57	8.27	6.15		5.9

シグナルの高磁場シフトが観察される。

表2. ダイマーの Dimerization Shift 値

この効果を調べるため、いわゆる dimerization shift 値, $\Delta\delta_D = \delta(\text{monomer}) - \delta(\text{dimer})$, を求めた(表2)。この場合、モノマーの δ 値は、リン酸の才2解離の影響を除くため pD5.5 付近のもの加望ましい。表2には同様の条件(20°C)で得られた A_pA の dimerization shift 値も、比較のために示した⁵⁾。Af を含むダイマーはいずれも、各々のプロトンにおいて、よく似た $\Delta\delta_D$ を示しており、その大きさは A_pA のそれよりも大きい。以上のことから、Af を含むダイマーの stacking は A_pA のそれよりも安定であるときえる。又、各

Compound	$\delta(\text{monomer}) - \delta(\text{dimer})$			
	H-8	H-2	H-1'	
AfpAf	Afp-	0.31	0.43	0.31
	-pAf	0.25	0.11	0.22
AfpA	Afp-	0.20	0.41	0.31
	-pA	0.46*	0.28	0.28
ApAf	Ap-	0.28	0.44	0.34
	-pAf	0.24	0.11	0.17
ApA	Ap	0.16	0.30	0.26
	-pA	0.25	0.20	0.18

* pA のデータ加 pD6.9 のものであるため大きめに示している。

々のプロトンの $\Delta\epsilon_D$ の大きさの相対的關係をみると、これらのダイマーの stack の様式は ApA のそれに似ていると言える。

4. 結論

UV吸収の hypochromicity 及び CD スペクトル (図5) の分析により、次のような結論が得られていた。1) Af を含むダイマーはいずれも ApA と同様式の stack 構造をとるが、その安定性は ApA より高い。2) 3つのダイマーのうち、AfpAf が最もよく stack しており、AfpA 及び ApAf は、AfpAf と ApA との中間で、同じような安定性の stack 構造をとる。H-

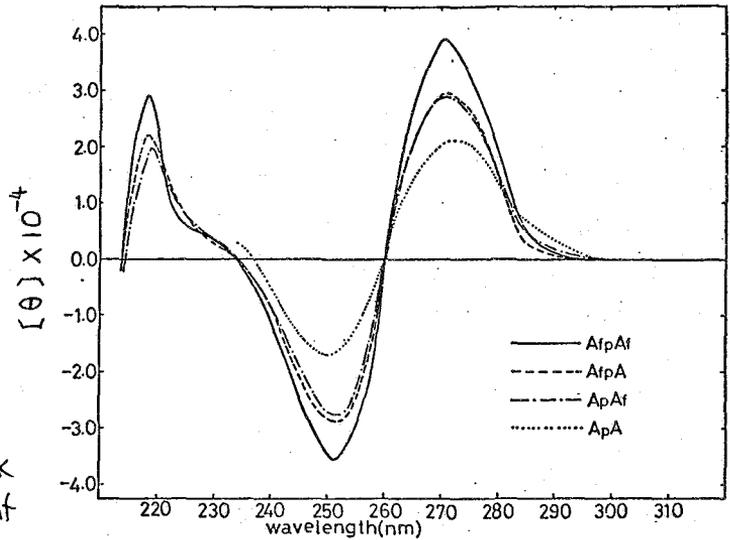


図5. ダイマーの CD スペクトル

NMRによる分析結果も、これらのダイマーが ApA よりも強く stack していることを示している。又、AfpAf 中の両ヌクレオチド残基は殆ど純粋に近い 3'-endo 型のコンホメーションをとっており、従って、DNA や RNA の繊維の X 線解析で示されている A 型らせん構造の一部に似た構造をとっているものと見られる。事実、AfpAf の CD スペクトルのバンドの大きさは、ポリアデニル酸のそれに近いほど大きくなっている。以上のことを総合して考えると、モルマーの段階で 3'-endo 型を非常にとり易い Af 残基を含むダイマーは、ApA よりも安定な stack 構造をとるが、両方とも Af の場合が最も安定で、片方が Af の場合はどちら側にあっても同程度に安定である。言い換えると、stack の安定化には 3'-endo 型をとることが必要であり、どちらの残基の 3'-endo コンホメーションも同程度の寄与があると思われる。

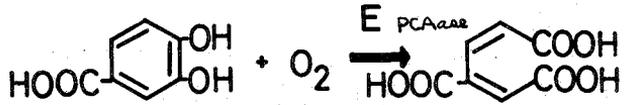
5. 文献

- 1) C. Altona and M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2333 (1973).
- 2) M. Ikehara, T. Maruyama and H. Miki, *Tetrahedron*, **34**, 1133 (1978);
M. Ikehara and H. Miki, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2449 (1978).
- 3) M. Ikehara, N. Kakiuchi and T. Fukui, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3315 and references therein.
- 4) 上杉晴一, 高塚陽子, 池原森男, 日本薬学会第99年会講演要旨集, p.218 (1979)
- 5) C.H. Lee, F.S. Ezra, N.S. Kondo, R.H. Sarma and S.S. Danyluk, *Biochemistry*, **16**, 3627 (1976).

312 非ヘム鉄酸素添加酵素, プロトカテキン酸-3,4-ジオキシゲナーゼの活性中心構造と基質の結合 (京大・工) 小川 諭, 森島 績, 米沢 貞次郎, 遠藤 一夫 (滋賀医大) 佐伯 行一, 岩城 正佳, 野村 奇光 洋

序

プロトカテキン酸-3,4-ジオキシゲナーゼ (PCAase) はカテコール類の水酸基間を開裂する反応と酸素を媒介する二原子酸素添加酵素 (図1) であり非ヘム鉄 (Fe^{II}) を唯一の補因子として有している。鉄は酵素活性発現に必須でありこれが反応中心と考えられ、鉄周辺の構造 図1 PCAase の酸素を媒介する反応



と明らかにする事は酵素の反応機構を知る上で重要である。

Pseudomonas aeruginosa より精製した PCAase は分子量約 76kD で $\alpha_2\beta_2$ のプロト二-八個 (α, β の分子量は各々 22500, 25000) よりなり酵素 1 分子当り 8 個の Fe^{II} を有している。近年共鳴ラマンスペクトルの測定より PCAase の鉄配位位子の 1 つとして酵素蛋白のチロシン残基が明らかになった⁽¹⁾。しかしその他の鉄配位位子についてはまだ不明である。また酵素反応機構においては酵素 (E) はまず有機基質 (S, カテコール) と反応し酵素-基質複合体 (ES) を形成し、さらにこの ES と酸素 (O_2) が反応し、酵素-基質-酸素複合体 (ESO_2) を経て酵素反応サイクルが進行する⁽²⁾。従来カテコールは Fe^{II} と金属体を形成する事が知られているが、PCAase の場合有機基質が酵素活性中心で及ぶ鉄 (Fe^{II}) に直接配位するのか、又は酸素分子が鉄に配位するのかなどの詳細な酵素反応メカニズムについての理解はまだ得られていない。

今回 PCAase の Native 酵素, 還元型酵素, 酵素基質複合体のバルク水及び基質プロトこの水素核磁気共鳴スペクトルの緩和時 (T₁) を測定し、水分子の PCAase 鉄への配位, 基質-鉄間距離を明らかにする事ができたので報告する。

実験

PCAase は p-クロロキシ安息香酸と炭素三原として生育させた *Pseudomonas aeruginosa* より常法により精製した。NMR 測定はすべて 50mM トリス-塩酸緩衝液 pH 8.5, 酵素濃度 1~2mM にて行った。水素核磁気共鳴スペクトルの緩和時 (T₁) の測定は 180°-τ-90° パルスシーケンスにより 100MHz は JEOL-FX100, 5~60MHz は Bruker BKR-322 FT-NMR (阪大・産研) にて行い、0.01~10MHz は Dr. Keonig の好意により IBM 研究所 (ニューヨーク州, ヨークタウンハイツ) のオリビタル NMR にて行った。

おがわ I とし, もりしほい I とあ, よね I とわていじろう, えんどうかず I となか I とまきこういち, いわきまさよし, の I とまみつひる

緩和時間, T_1 , の解析

常磁性核緩和時間, T_{1p} , の解析は Swift and Connick, Luz and Meiboom, Solomon-Bloembergen の式に従った⁽⁵⁾。今回の場合その温度及び磁場依存性より次の2式を用いて解析した。

$$T_{1p}^{-1} (Fe^{II})^{-1} = \frac{f_{pr}}{T_{IM}} \quad (1), \quad \frac{1}{T_{IM}} = \frac{6}{15} \frac{g^2 \mu_B^2 S(S+1) \rho^2}{r^6} \tau_c \quad (2)$$

なみ, f_{pr} は 酵素結合分子及び非結合分子のモル分率である。

結果

バルク水プロトンの緩和時間の測定は Native 酵素及び **図2** に示した3つの基質の 酵素-基質複合体について酸化型 (Fe^{III}), 還元型 (Fe^{II}) の両酵素について行った。なみ

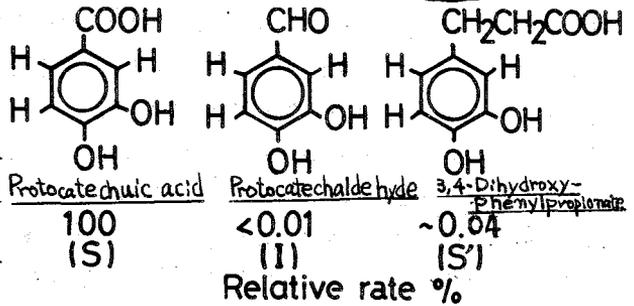


図2 基質(S) イニヒター(I) 偽基質(S')

Protocatechuic acid は PCAase の本来の基質(S)であり, Protocatechalddehyde はインヒター(I), 3,4-Dihydroxy-phenylpropionate は偽基質(S')である。**図3** に 0.01~10MHzの間の PCAase (0.8mM) 溶液のバルク

水プロトンの緩和速度, T_{1obs}^{-1} , を 5° 及び 25°C について測定した結果を酸化型, 還元型の酵素について示す。 T_{1obs}^{-1} は Fe^{III} , Fe^{II} 酵素とも 0.01~10MHzの間に大きく変化し, 25°C において酸化型酵素の場合 $\tau_c = 4.6 \times 10^{-10}s$ を得た。従来酸化型高スピン鉄 (Fe^{III}) の電子スピン緩和時間 (τ_s) は $\sim 10^{-10}s$ である事が知られており, 今求められた $\tau_c = 4.6 \times 10^{-10}s$ の値は 系の相関時間 τ_c が酵素の常磁性鉄電子スピンの緩和時間によって支配されている事を示している。**図4** に 100MHzにおける Native 酵素(E) 及び 酵素-イニヒター複合体 (EI) のバルク水プロトンの規格化した常磁性核緩和速度 ($T_{1p}^{-1}(Fe^{II})^{-1}$) の温度依存性を示した。各々昇温に伴い $T_{1p}^{-1}(Fe^{II})^{-1}$ の値は減少した。ES 及び ES' 複合体の場合も native 酵素(E) と同様な温度依存性を示した。これらの結果は水分子のプロトンの緩和時間が酵素常磁性鉄

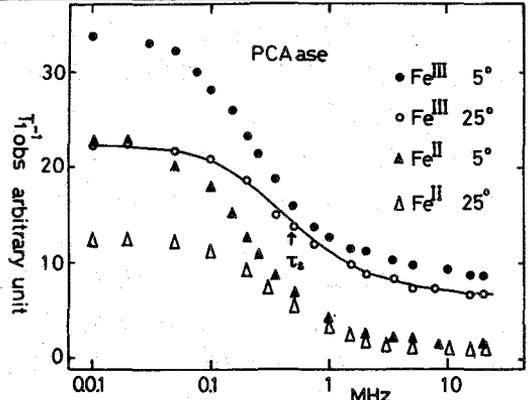


図3 PCAase バルク水プロトンの緩和速度

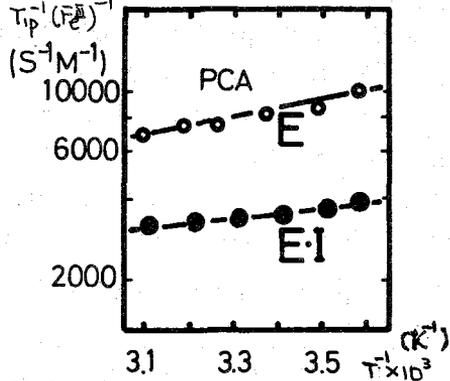


図4 PCAase 及び EI complex のバルク水プロトンの緩和速度

の影響を大きく受けている事を示し、水分子が酵素活性中心とバルクとで速い化学交換をしている事を示唆している。図3で求められた $T_{c25} = 4.6 \times 10^{-10} s$ の値を用い水プロトンと鉄との距離を式(1),(2)より計算し、native 酵素(E)、酵素-基質複合体(ES)、酵素-偽基質複合体(ES')とも3.1Å、酵素-インヒビター複合体(EI)について3.6Åの値を得た。

基質の酵素上結合サイトを知る目的で上記ES, ES', EI, の3つの酵素-基質複合体溶液のバルク基質の緩和時間と測定した。

図5に酵素-インヒビター複合体(EI)について測定されたインヒビターの各プロトンの $T_{ip}(Fe^{2+})^{-1}$ の温度依存性を示す。昇温に伴い $T_{ip}(Fe^{2+})^{-1}$ の値は減少し、その大きな値よりインヒビター分子が活性中心に近い酵素結合サイトとバルクで速い化学交換をしている事を示唆する。ES及びES'の各複合体についても各基質のプロトンの温度依存性はEIの場合と同様昇温に伴いその $T_{ip}(Fe^{2+})^{-1}$ の値は減少した。これらの結果より $T_s = 4.6 \times 10^{-10} s$ を用い各基質プロトンについて計算した鉄-基質間距離を図6に示す。

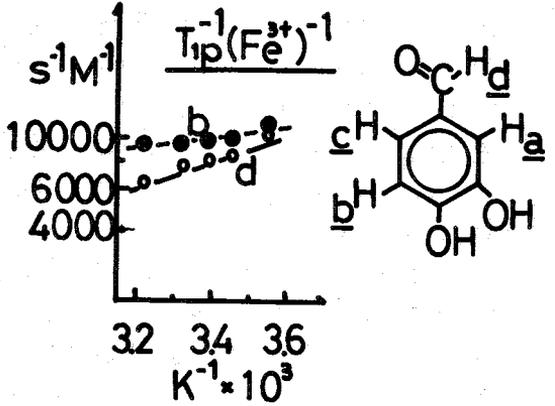


図5 インヒビター プロトンの緩和速度の温度依存性

考察

Native 酵素のバルク水プロトンの緩和rateは大きく酵素中心鉄の常磁性的な効果を受け計算した水プロトン-鉄間距離3.1Åは水が鉄に配位している事を示唆する。またES, ES'複合体に於いても水は中心鉄に配位していると考えられるがEI複合体ではその距離が3.6Åと長く、鉄に水分子が配位しているものと思われる(図7)。

Iron - Substrate proton distance(Å)

	H _a	H _b	H _c	
	8.5	8.4	8.5	
	H _b	H _d	H _e	
	8.9	9.2	9.5	
	H _a	H _b	H _c	H _d
	6.4	6.4	6.4	6.8

計算した基質(S)及び偽基質(S')の各リンクプロトンと鉄との距離は8~9Åと長く、この値はこれらの基質が直接鉄に配位しない事を示す。インヒビター(I)のI結合リンクプロトンと鉄との距離は6~7ÅとS及びS'にくるべより中心鉄の近くに結合している。このインヒビター(I)のより鉄に近い結合のためEI複合体では水が鉄に配位できないものと推定される。

図6 各基質と求められた基質プロトン-鉄間距離

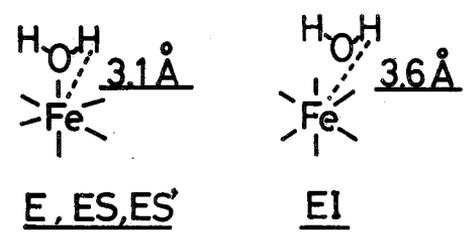


図7 水分子-鉄間距離

図8に推定された酵素-基質
 複合体の酵素-インヒビター複合体の
 構造を示した。

結論

1 PCAaseの鉄には1分子の水
 が配位している。酵素-基質
 複合体においてもこの水分子
 の鉄への配位は変わらない。

2 基質(プロトカテキニ酸)は直接
 鉄には配位しない。鉄より8~9Åの位置の酵素蛋白質上に結合すると
 推定される。

3 インヒビター(プロトカテキエートアルデヒド)は基質より鉄に
 より近い位置の酵素蛋白質上に結合し、水分子の鉄への配位を阻止すると推定される。

酵素-インヒビター複合体(EI)が酸素分子と反応しない事(E-I-O)を作ら
 ない)から推定すると酸素分子は水にかわり酵素-基質複合体では
 鉄に配位するものと推定される。

Proposed Structure of ES Complex

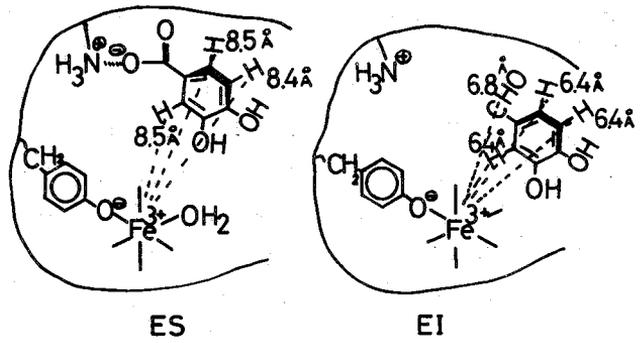


図8 ES及びEIの推定構造

文献

(1) Tatsumo, Y., Saeki, Y., Iwaki, M., Yagi, I., Nozaki, M.,
 Kitagawa, T., Otsuka, S. J. Am. Chem. Soc., 100 4614 (1978)

(2) Fujisawa, H., Hiromi, K., Uyeda, M., Okuno, S., Nozaki, M., Hayaishi, O.
 J. Biol. Chem. 247 4422 (1972)

(3) Mildvan, A. S. Cohn, M. Adv. in Enzymology 33 1-70 (1970)

(東大・理, 京大・薬*)

○遠藤斗志也 箱垣冬彦 林恭三* 宮沢辰雄

コブروتキシンはタイワンコブラの毒液から単離される神経毒タン白で、4つのS-S結合を含むアミノ酸残基数62個の比較的小さなタン白である(1次構造を図1に示す)。タイワンコブラ以外のコブラ科及びウミヘビ科の毒ヘビからも多くの神経毒タン白が単離されて1次構造が決定されているが、これらは1次構造上類似性が高い。ここでは270 MHz ^1H NMRを用いてコブروتキシンの水溶液中の構造を考察し、既にX線結果の出ているエラプトキシシロの結晶構造¹⁾とも比較する。

〔実験〕

コブروتキシンは報告された方法²⁾に従って単離・精製したものをを用いた。270 MHz ^1H NMR スペクトルは、Bruker社WH-270分光計によって記録した。化学シフトは内部基準DSSからppmで測った。測定はすべてパルスFTモードで行ない、2重共鳴実験はゲート制御した適当なパルス系列を用いた。

〔結果・考察〕

シグナルの帰属 NMRによってタン白の構造の詳しい解析を行なうためには、特定の共鳴シグナルが分離され、それが分子中の個々の共鳴核へ厳密に帰属されることが必要となる。芳香族領域の各シグナルの帰属に関しては既に報告したので³⁾、その結果を示すだけに留め(図2)、ここではメチル領域の各シグナルの帰属について述べることにする。

コブروتキシンには計16個のメチル基、すなわち Thr 11, 13, 14, 15, 22, 37, 56, 57 にそれぞれ1個、Ile 50, 52, Leu 1, Val 46 にそれぞれ2個がある(Ala と Met はない)。これらのメチル基のプロトンのシグナルは、図3に示した様に convolution difference 法で線幅の大きい成分を除去することにより、比較的良く分離して観測される。

シグナル2はトリプレットであるので、Ile の δCH_3 に由来することがわかる。またダブレット1, 10~16は4ppm付近のラジオ波照射によりデカップルされるの

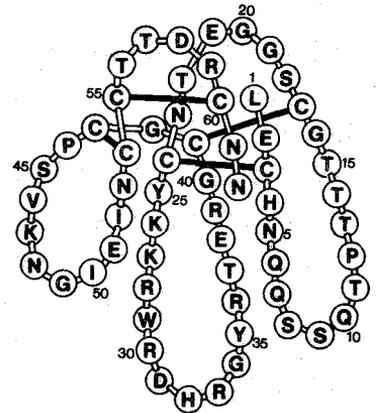


図1. コブروتキシンの1次構造

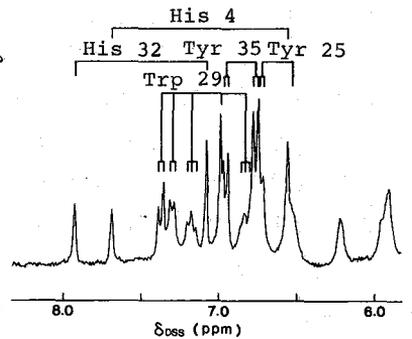


図2. コブروتキシンの芳香族領域の帰属 (23°C, pH 6.3)

えんどうとしや いながきふゆひこ はやしきょうどう みやざわたつお

で、すべて Thr の γ CH₃ に、ダブルット 6 と 7 は、2.08 ppm のラジオ波照射で同時にデカップルされるので Leu 1 か Val 46 の δ - または γ CH₃ に帰属される。

しかし通常のスピン・デカップリング実験のみでは、シグナル 2, 3, 4, 5 付近の様な混み入った領域でのデカップルの詳細を知ることは、かなり困難である。この様なとき、スピン・エコー⁴⁾ 2重共鳴法が非常に効果的である。

弱いスピン-スピン結合の条件下で、90°- τ -180°- τ のパルス系列で生ずるスピン・エコーの後半をフリーエ変換して得られるスピン・エコー・スペクトルでは、スピン結合しているシグナルの線形は、分散モードと吸収モードの線形の一次結合となる。例えば $\tau = 1/2J$ の条件では、ダブルットは 180° 位相がずれて負のシグナルとなり、シングレットやトリプレットは正常な位相をもつ。ここで、トリプレット・シグナルとスピン結合している 2 つの核のシグナルの τ -オモディレイ時間 2 τ の間だけラジオ波照射してデカップルすると、トリプレット・シグナルはダブルットとしての J 変調を与えるため、デカップルしたスピン・エコー・スペクトルとデカップルしていないスピン・エコー・スペクトル間の差スペクトルをとると、デカップルされたトリプレットのみが正のシグナルとして抽出される。同様に、デカップルされたダブルットは J 変調を生じないので、 $\tau = 1/2J$ としたときのスピン・エコー・デカップル差スペクトルでは、負のシグナルとして現われることになる。

図 4 に (A) 通常の convolution difference スペクトル、(B) 1.42 ppm を照射したときのスペクトル、(C) 通常のスピン・エコー・スペクトル ($\tau = 0.07$ 秒)、(D) 2 τ の間のみ 1.42 ppm を照射したときのスピン・エコー・スペクトル、(E) C と D の差スペクトルを示した。2 のトリプレット (Ile の δ CH₃) が 1.42 ppm にあるシグナルとスピン結合していること、ダブルット 3 と 4 は同時にデカップルされていることから Val か Leu のメチル・シグナルであることがわかる。また 1.23 ppm を照射したスピン・エコー・デカップル差スペクトル (図 4-F) により、0.72 ppm にもう一つの Ile の δ CH₃ シグナルが重なっていたことも判明した。

この方法は通常のスピン・デカップリング法に比べて、デカップルに伴う多重構

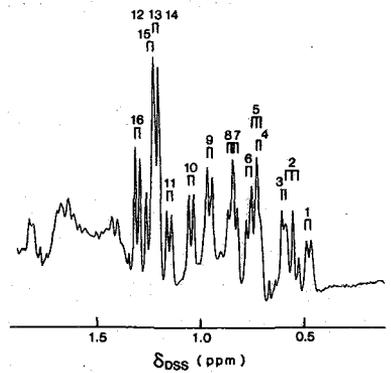


図 3. コブロトキシンのメチル領域の帰属 (33°C, pH 6.3) 1 Thr a, 2&8 Ile 50, 3&4 Leu 1, 5&9 Ile 52, 6&7 Val 46, 10-16 Thr b-h

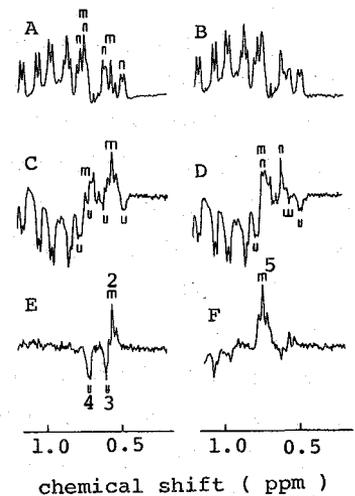


図 4. スピン・エコー 2重共鳴法によるメチル領域の帰属。(詳しくは、本文参照)

造のコラプシングから来る解釈の曖昧さがない, Bloch-Siegelt シフトが無いいため正しい化学シフトを差スペクトル中で読むことができる, 等の利点がある。

他にメチル・シグナルの pH 依存性 (図5) と考慮し, またコプロトキシンと1次構造が極めて良く似た *Naja mossambica mossambica* のニューロトキシンIIとメチル領域のスペクトル⁵⁾を比較することにより, 最終的に図3の様な帰属結果を得た。

pH 滴定と NOE の測定 化学シフトの pH 滴定曲線には, その核の属す残基の解離だけでなく, 空間的に近接する解離基の影響, あるいはタン白の構造変化を反映した滴定シフトが乗られる。また NOE は双極子結合している核間に表われるので, ポリペプチド鎖上の異なるセグメント間の空間的相互作用が明らかになる。図5にメチル領域の pH 滴定曲線, 図6にメチル・シグナルと既に帰属の確立している芳香族プロトン・シグナルの間の NOE 測定結果 (FID 取込みの前に1秒間特定の核のシグナルを選択的に飽和) を示す。

Ile 50 と Trp 29 の間, Ile 52 と Tyr 25 の間, Leu 1 と His 4 の間に各々 NOE が観測され (Leu 1 の pH 滴定曲線には His 4 の解離の影響も出ている), これらの残基の側鎖が互いに近い位置にある様な3次構造が示唆される。ここで Tyr 25 は神経毒タン白に共通して含まれ, Ile 52 も Leu, Val にしか置換せず, 作用上不変残基とみて良いが, これらの残基が近接して疎水領域を作っていることは興味深い。

Leu 1 の pH 滴定曲線に表れている pH 9.5 付近での滴定シフトは, N 端の α アミノ基の解離の影響であるが, この値 ($pK_a \sim 9.5$) は正常な値 (~ 8.0) よりも高く, 例えば近くに Asp や Glu が存在することが考えられる。Ile 50 の2つのメチル・シグナルは pH 10.6 付近で滴定シフトを示し, Lys の ϵ アミノ基が近くにある事が推測される。

Thr a の γ CH₃ シグナル 1 は, アミノ酸の場合に比べて 0.9 ppm も高磁場側へシフトしているが, これは NOE 測定の結果 (図6) から, His 4 のイミダazol 環の環電流効果によるものであることがわかった (したがって Thr a は Thr 13, 14, 15 のいずれかであると考えられる)。シグナル 1 の pH 5 付近での大きな滴定シフト (図5) も, $pK_{a1} = 3.9$, $pK_{a2} = 5.3$ (His 4 の pK_a に一致) という値が得られ, やはり His 4 のイミダazol 環が Thr a の側鎖のかなり近くにある事が裏付けられた。

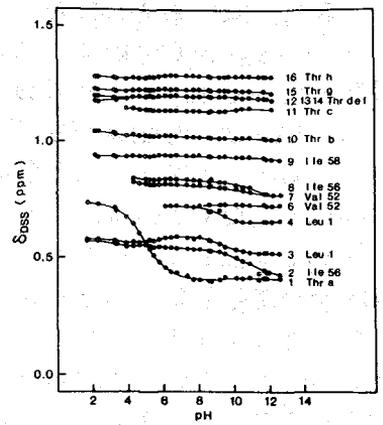


図5. コプロトキシンのメチル・シグナルの化学シフトの pH 依存性 (23°C)

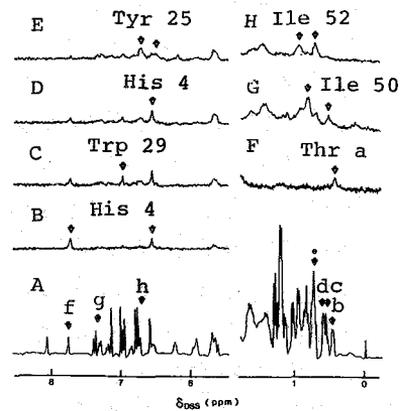


図6. NOE 測定 (pH 6.0, 23°C) (A) の \downarrow と照射して, 現れた NOE (B) を NOE 差スペクトルで取出した (B~H; B-b, C-c, ... H-h に対応)

また、既に報告した様に³⁾芳香族領域の各シグナルの pH 依存性を解析することにより、神経毒作用に必要とされる Trp 29, 共通残基である Asp 31, として His 32, Tyr 35 の側鎖がコブロトキシン分子から同じ方向に向かって突き出して空間的に近接していることが明らかになっている。また His 4 のイミダゾール環解離の pKa は 5.3 とかなり低く、H⁺ ⇌ D 交換反応の塩基触媒の速度定数も大きい (k_b = 1.7 × 10³ sec⁻¹, 37°C) が、これはエラプトキシニンに於いて Phe 4 と Val 59 の間に NOE が観測される⁶⁾ ことを考慮すると、Arg 59 のグアニジノ基が近くにある事によると考えられる。

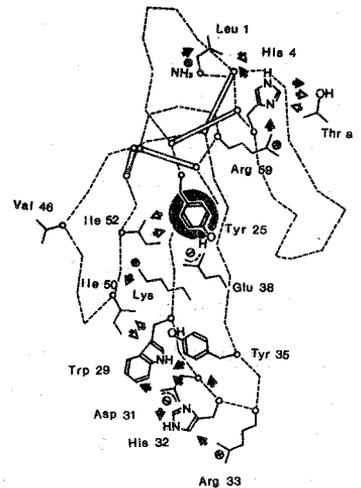


図7. コブロトキシンの水溶液中の構造；△ NOE, ▲ 測定シフト, ○ pKa の変化

以上考察してきた NMR のデータから導かれたコブロトキシン分子の水溶液中の構造と、主鎖をエラプトキシニンの結晶構造¹⁾に重ねて描いたのが図7である。Ile 52 と Tyr 25, Ile 50 と Trp 29 の近接した関係は、エラプトキシニンの中央のループと第3のループの間の逆平行βシート構造に良く一致し、活性に関与している Trp 29, Asp 31, として His 32 や Tyr 35 の側鎖の近接した関係は、中央のループで主鎖がヘアピン状に折れ曲がった部分により最も良く説明できる。従ってコブロトキシンも水溶液中で、エラプトキシニンの結晶構造と良く似た高次構造を取っている事が明らかになったと判断される。

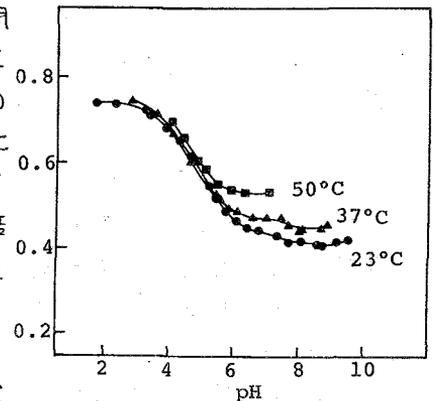


図8. Thr a の 8-CH₃シグナル(1)の化学シフトの温度依存性 (E 軸は化学シフト (PPM))

温度に依存した局所構造の変化 最後に Thr a の γ-CH₃シグナル(1)の化学シフトの pH 依存性を 37°C, 50°C でも調べたところ、pH 6 以上で化学シフトが温度に大きく依存することが明らかになった(図8)。湿度を上げると、シグナル1の線幅も増大する。これらの結果は、湿度を上げることにより His 4 の付近に局所的な構造の変化(乱れ)が起こって、Thr a への環電流効果が変化したと考えられることにより、説明することができる。His 4 の近くには Arg 59 の正電荷が存在するので、His 4 のイミダゾール環の解離に伴い静電相互作用が変化することが、局所的な構造の乱れの原因であると考えられる。

〔参考文献〕

- 1) Low, B.W. et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 971-974.
- 2) Yang, C.C. (1965) J. Biol. Chem. 240, 1616-1618.
- 3) 遠藤ら(1978) 第51回日本生化学会大会.
- 4) Campbell, E.D. et al. (1975) J.C.S. Chem. Commun. 750-751.
- 5) Lauterwein, J. et al. (1978) Eur. J. Biochem. 92, 361-371.
- 6) 箱垣ら(1979) 第6回生体分子の構造に関する討論会.

(東大・理) ○柴田康行, 稲垣冬彦, 宮沢辰雄

水溶液中の蛋白分子を¹H-NMRで研究する場合、その長所の一つとして個々の残基のシグナルを個別に追跡し得る点があげられよう。分子量一万前後の小さな蛋白では、芳香族アミノ酸残基のシグナル以外にも多くのシグナルが分離して観測され、それらを詳細に解析することによって生体分子の水溶液中での構造及びその機能との関連についてのより細かい議論が可能になると期待される。中でもメチル基プロトンはシャープなシグナルを与え、その位置は周囲の磁気的環境を敏感に反映してきまってくるので、蛋白分子の機能発現等にもなる構造変化を研究する上で有力なプローブと考えられる。本研究では、これまで我々の研究室でヌクレオチドやアミノ酸単体の構造解析に用いてきたランタニドプローブ法を中心にいくつかの方法を用い、結晶構造との比較によって個々のシグナルの帰属を行なうとともに、結晶中と溶液中の構造の異同についても解析を試みた。

bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) は、分子量約6500、アミノ酸58残基からなる小さな蛋白で、トリプシン、カリクレインなどいくつかのセリンプロテアーゼと強固に結合し、その活性を阻害する。Ala-6個、Thr-3個、Met-1個、Leu-2×2個、Ile-2×2個、Val-1×2個、計20個のメチル基を有している。X線結晶解析は現在分解能1.5Åまで進んでいる¹⁾。

【方法及び結果】

(1) アミノ酸の種類による區別

上記6種のアミノ酸のメチルシグナルは、それぞれのアミノ酸種類に応じていくつかの一般的特徴を持っている。

- ① Metはシグレット、Ileの δ -メチルはトリプレット、他はダブルットシグナルを与える。
- ② 通常、Ala, Thrは4ppmよりも低磁場側に、Ile, Leu, Valは2ppm付近をいしより高磁場側にスピン結合の相手を持つ。
- ③ Alaの β -メチルのスピン結合定数は7.2Hz前後、Thrでは6.4Hz前後である。

デカップリングとスピンエコーを併用²⁾(図2)、20個のメチルシグナルのカップリングパターン、及びスピン結合の相手の位置を明らかにした(表1)。

①~③をもとに分類した結果はアミノ酸組成とも一致している。

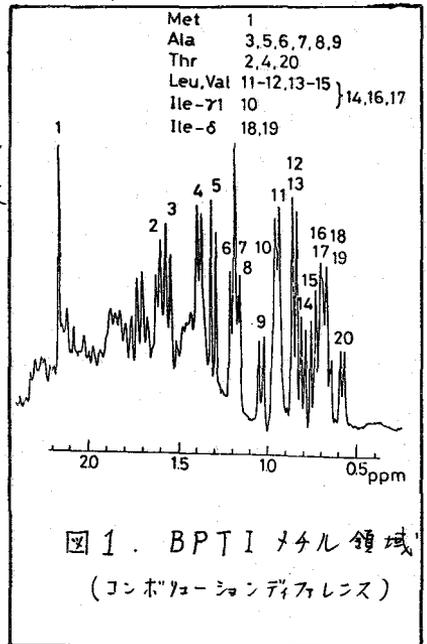
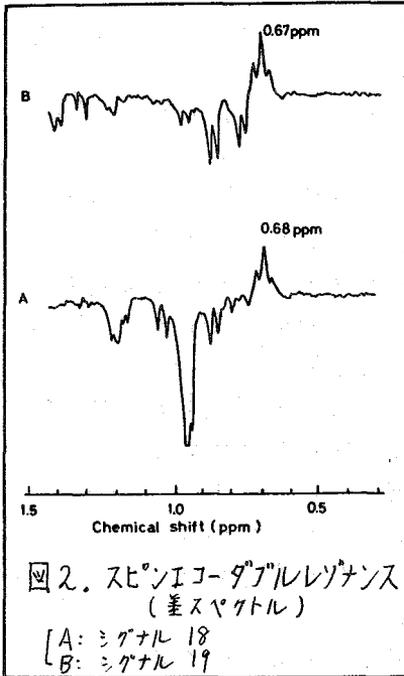


図1. BPTIメチル領域 (コンボリューションディフュージョン)

しばた やすゆき, いながき ふゆひこ, みやざわ たつお



Peak No.	Chemical shift (ppm)*	Coupling pattern (***)	Coupling J/Hz	Coupled resonance (ppm)*	Assignment
1	2.16	S			Met (Met-52)
2	1.61	D	6.4	4.0	Thr
3	1.55	D	7.3	3.8	Ala
4	1.38	D	6.4	4.0	Thr
5	1.30	D	7.3	4.0	Ala (Ala-58)
6	1.19	D	7.1**	4.1	Ala
7	1.18	D	7.3	4.3	Ala
8	1.17	D	7.4**	4.3	Ala
9	1.03	D	7.3	3.2	Ala
10	0.96	D		1.9	Ile-γ
11,12	0.94, 0.85	D,D		1.7	Leu (or Val)
13,15	0.85, 0.75	D,D		1.5	Leu (or Val)
14,17	0.80, 0.70	D,D		2.0	Val (or Leu)
16	0.72	D		2.0	Ile-γ
18	0.68	T		1.0, 1.4	Ile-δ
19	0.67	T		1.4, 1.5	Ile-δ
20	0.58	D	6.4	4.0	Thr

* from DSS at pH 6, 37°C
 ** at pH 11, 37°C
 *** S:singlet, D:doublet, T:triplet

表1. アミノ酸の種類による区別

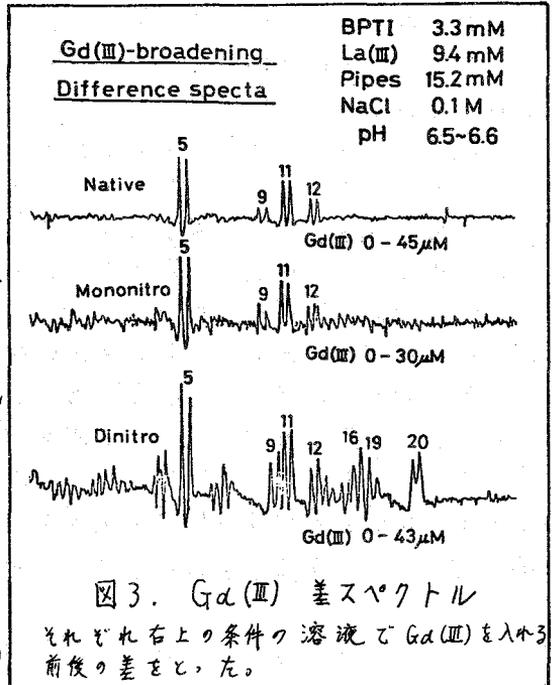
(2) 個々の残基への帰属

Metはただ一つしかないのでシグナル1はMet-52, またpH滴定の結果からシグナル5はカルボキシル末端のAla-58に帰属した。さらに帰属をすすめるため、以下のような方法で結晶データとの対応づけを行なった。

(A) ランタニドプローブ法

カドリニウムイオン(Gd(III))は、結合部位の近傍の核の緩和速度に、距離の6乗に反比例する大きさで影響を与え、その核に由来するシグナルの線幅を拡げる。ここではまずチロシン残基をニトロ化することによって特異的なGd(III)結合部位を導入し³⁾その周囲の残基のシグナルを帰属した後、さらに結晶構造をもとに4つのカルボキシル基への結合を仮定して無修飾BPTIでの結合実験の結果を解析していた。テトラニトロメタンでBPTIを処理すると、Tyr-10のみニトロ化されたモノニトロ体と、Tyr-10, 21の2つがニトロ化されたジニトロ体が得られる。ニトロ化により活性に変化はなく、構造変化はないと考えられる⁴⁾。

① ジニトロ体とモノニトロ体を比較すると、9, 16, 20の3つのシグナルのpH滴定曲線が変化し、さらにこの3つとシグナル19にニトロ化したTyr-21へのGd(III)



Peak No.	Gd-binding pH-titration			Ring current shift	Assignment
	Dinitro-	Mononitro-	Native-		
1					Met-52
2		Thr-54	Thr-54	Thr-54	Thr-54
3		Ala-25	Ala-25	Ala-25	Ala-25
4		Thr-11	Thr-11	Thr-11	Thr-11
5			Ala-58		Ala-58
6		Ala-40			Ala-40
7			(Ala-27)		(Ala-27)
8			(Ala-16)		(Ala-16)
9	Ala-48	Ala-48	Ala-48	Ala-48	Ala-48
10	Ile-18 γ			Ile-18 γ	Ile-18 γ
11,12		Leu-6	Leu-6	Leu-6	Leu-6
13,15		Leu-29		Leu-29	Leu-29
14,17		Val-34		Val-34	Val-34
16	Ile-19 γ			Ile-19 γ	Ile-19 γ
18	Ile-18 δ			Ile-18 δ	Ile-18 δ
19	Ile-19 δ			Ile-19 δ	Ile-19 δ
20	Thr-32	Thr-32	Thr-32	Thr-32	Thr-32

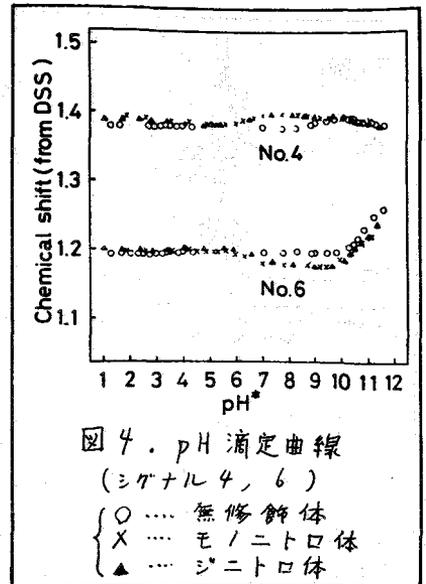


表2. 帰属結果

の結合の影響が顕著に現れた(図3下段)。すなわち、これらは Tyr-21 の近傍に存在する残基のシグナルと考えられる。結晶データから([1]の帰属結果をもとに)それぞれ Ala-48, Ile-19 γ , Ile-19 δ , Thr-32 (シグナルの番号順)と帰属した。

② モノニトロ体と無修飾体を比較すると、シグナル4と6の2つの pH 滴定曲線が変化した。結晶データより、Tyr-10 の近傍(10Å以内)にあるのは、Thr-11 と Ala-40 のみであり、[1]の結果をもとにシグナル4は Thr-11 と、26は Ala-40 と帰属した。

③ 無修飾体に微量の Gd(III) を加えると、5, 9, 11, 12 の4つのシグナルに顕著な影響が現れた(図3上段)。うち、5と9はすでに Ala-58, Ala-48 に帰属されているが、この影響の出方は結晶構造からの予想と完全に対応している。そこで加える Gd(III) の量を徐々に増やしてゆき、アミノ酸種類別に、結晶構造からの予想と各シグナルの線幅増大速度を比較しながら帰属を付けていった(図5)。たとえば、3つの Thr シグナルの線幅増大速度は 4 > 20 > 2 の順に落ちていく。一方、結晶中でのカルボキシル基までの距離をくらべてみると、Thr-11 が最も近く、ついで Thr-32, Thr-54 の順となる。したがってこの順に帰属した。この帰属結果は、ニトロ化による帰属(①, ②)とも完全に一致している。

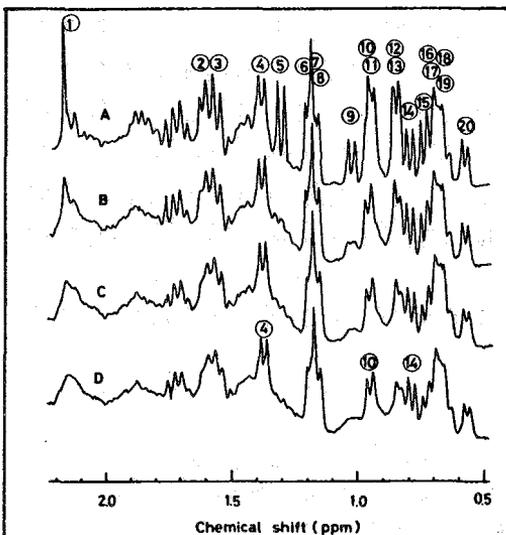
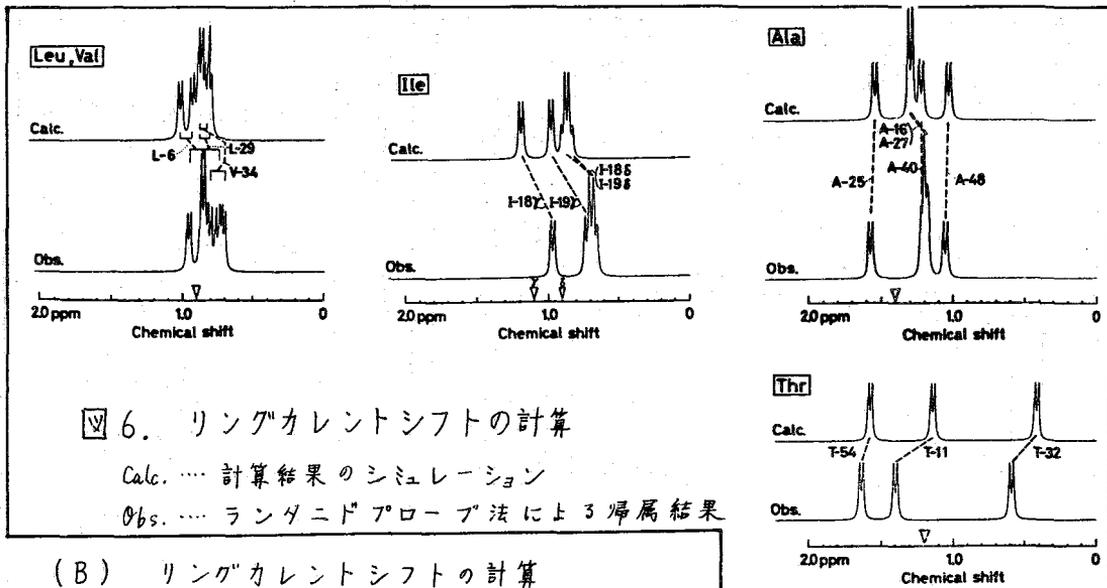


図5. Gd(III) の影響 (無修飾体)

BPTI 3.3 mM pH 5.3, 37°C
 La(III) 10 mM
 Pipes 15.1 mM
 NaCl 0.1 M

Gd(III)
 A: 0
 B: 200 μM
 C: 400 μM
 D: 600 μM



6. リングカレントシフトの計算

Calc. … 計算結果のシミュレーション

Obs. … ランタニドプローブ法による帰属結果

(B) リングカレントシフトの計算

フォールディングした蛋白中で各メチルシグナルの位置をきめる要因のうち最も大きいと考えられるのは、付近の芳香族環の与えるリングカレントシフトである。各残基について、結晶構造をもとにリングカレントシフトの計算を行ない、ランタニドプローブ法による帰属結果と比較した。計算にあたっては、Phe はベンゼン環の値 (Johnson-Bovey) をそのまま用い、Tyr は、これに係数 0.94 をかけた⁵⁾ 位置の計算の際は、ランダムコイル状態での各アミノ酸位置を基準に用いた。アミノ酸種類別に比較してみると、いずれも (A) の帰属結果とよく対応している (図 6)。

〔結語〕

以上のように、結晶構造をもとにいくつかの方法で帰属した結果は互いに良い一致を示しており、この帰属結果の正しさを示すとともに、BPTI 分子が水溶液中においても、平均的に見て、側鎖のコンフォメーションまで含めて結晶中とよく似た構造をとっていることを強く示唆している。さらに運動性の高い残基ほど一般に鋭いシグナルを与えることからみて、C 末の Ala-58 (シグナル 5 … 図 1) の運動性が他の部分より高いこと、すなわち BPTI 分子の C 末付近はかなり mobile であることが予想される。なお、以上の結果は、Wüthrich 等の最近の報告⁶⁾ と、彼等が帰属した範囲内で一致している。

最後に、貴重な試料を快く分けて下さった、沢井博士、黒沢博士 (帝國臓器) に厚くお礼を申し上げます。

[REFERENCES]

- 1) Deisenhofer, J. and Steigemann, W. (1975) Acta Cryst., **B31**, 238
- 2) Campbell, I. D. and Dobson, C. M. (1975) J. C. S. Chem. Commun., 750
- 3) Marrinetti, T. D. et al. (1976) Biochem., **15**, 4600
- 4) Meloun, B. et al. (1968) Eur. J. Biochem., **4**, 112
- 5) Giessner-Prettre, C. and Pullman, B. (1969) C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, **268**, 1115
- 6) Wüthrich, K. et al. (1978) Biochem., **17**, 2253

(埼玉大工) °飯田武場・西尾正敏・荒川陽一・三田村孝

1. 緒言

酢酸キナーゼ[EC 2.7.2.1]は微生物の代謝において次式の反応を触媒する。



嫌気性窒素固定菌 *Clostridium pasteurianum* では本酵素がヒルビン酸の代謝および窒素固定反応と密接に関連していることが Carnahan らや Biggins らによって明らかにされた。*C. kluyveri* や *E. coli* では、本酵素がホスホトランスアセテラーゼと共役することにより酢酸を活性化してアセチルCoAを生成することが知られている。近年になって他の多くの微生物にも酢酸キナーゼが存在していることが明らかにされたが、中でも中島と今堀¹⁾によって好熱菌 *B. stearothermophilus* から精製された酢酸キナーゼは分子量約160,000で分子量約40,000の同一の4つのサブユニットからなるテトラマー酵素であることが明らかになり、高度に精製され、結晶化するなど興味深いものである。本酵素は活性域にヒスタジンを持つがアミノ酸分析の結果システイン残基が存在しないことが分り、SH基は酢酸キナーゼの活性発現には必ずしも必須でない点から、*E. coli* らの酢酸キナーゼと異なっている。

反応の動力学的性質は各微生物によって異なり *B. stearothermophilus* の酵素ではサブユニット構造をもつために反応に協同性が認められ、フルクトース1,6-ニリン酸(FBP)がアロステリックなエフェクターとして作用することが見出された¹⁾。一方、*E. coli* の酢酸キナーゼはすべての基質濃度に対して反応速度は双曲線型となり、Michaelis-Mentenの速度式に従っていること、ゲルクロマトグラフィーとSDS電気泳動のメインバンドから求めた分子量(45,000~57,000)から考えて、多モノマー酵素であろうと推測されている。

E. coli の酢酸キナーゼの活性中心にはリン酸基の結合するグルタミン酸残基のカルボキシル基、システイン残基のSH基、金属の結合するヒスタジン残基、アミノ基が活性発現に重要な役割を演じていることがわかってきている。われわれはこの4つの基の中でSH基の機能に着目し、ここをスピンラベル化することにより、ESR法を通して *E. coli* の酢酸キナーゼと金属-ヌクレオチドの ternary complex の解離平衡を解析し、酵素と基質との特異的相互作用について研究した。

2. 実験

酵素のSH基を定量的に化学修飾するスピンラベル剤、tempyradoacetamideはSynvar Associatesより購入した。*E. coli* より精製された酢酸キナーゼは比活性220 units/mg. prot. のSigma社の市販品を使用した。スピンラベル化は0°CにてpH8.0, 20mM Tris-Cl, 0.1M KClと2%グリセリン緩衝液中で上記のラベル剤を1mMになるように加え、酵素の活性を測定しながら行なった。1時間後に活性が初期の1~2%に減少したところで、スピンラベル化を終了し、Sephadex G-25のカラムを通して過

いいた たけあき、にしお まさとし、あらかわ よろいち、みたあら たかし

剰なスピンラベルを除去した。試料に用いたスピンラベル化酢酸キナーゼ(以下これを E^{\cdot} と略す)の濃度は $60\sim 80\mu\text{M}$ であった。ESRスペクトルは Varian E-9型装置で Xバンド, 9.53GHz , $3400\pm 100\text{Gauss}$, 走査速度 8分 , 変調磁場 100kHz , 出力 10mW , 変調幅 4Gauss で測定した。基質としては ADP と ATP を用い, 0.1M から 20mM まで変化させた。ADP と ATP から Mg(II) と十分に MgADP と MgATP 錯体を形成するよりに Mg(II) の量は常に ADP と ATP の濃度の 1.5 倍を加えた。金属-ヌクレオチドによる E^{\cdot} の ESR シグナル強度の滴定曲線は Reed や Cohn の方法²⁾ すなわち Pring の作製による N 元系解離平衡を解くプログラムを用いた解析法, に従って埼玉大の Hitac 8250 型電子計算機を使って計算した。

3. 結果

E^{\cdot} の ESR スペクトルはニトロキシドラジカルの不対電子と ^{14}N の核スピン ($I=1$) との相互作用で triplet のシグナルを与えるが, 酵素分子に結合しているため, 三本のシグナルは図 1 に示すよりに非対称になつて異方的回転を反映している。すなわち $I_z=0$ の等方的項からくる中央ピークが, $I_z=1$ or -1 の方向を持つ低および高磁場ピークより高く鋭くなっているのが特徴である。この中央ピークの高さは ADP および ATP を加えることにより減少する。この減少は ADP および ATP の濃度が 1mM でそれぞれ 5% , 8% 程度で, ヌクレオチドからスピンラベルの運動を抑制させると同時に, 異方的運動に共鳴ピークのブロードニングを起すためと説明される。 Mg(II) をこの系に加えると図 2 に示すよりに MgADP および MgATP 錯体から E^{\cdot} と結合し 1mM の濃度あたりから減少し始め, 10mM で 60% に達する。 MgADP と MgATP を比較すると MgATP の方が濃度の低いところから減少し始め, E^{\cdot} により強い親和力を持っていることを示している。酢酸キナーゼの反応の阻害剤として知られる Zn(II) の場合, ZnADP と ZnATP の形成とそれらの E^{\cdot} への強い結合のために, 図 2 に示すよりに滴定曲線は基質濃度 0.1mM から減少を始める, ZnADP と ZnATP とで大きな差が認められるのが特徴的である。

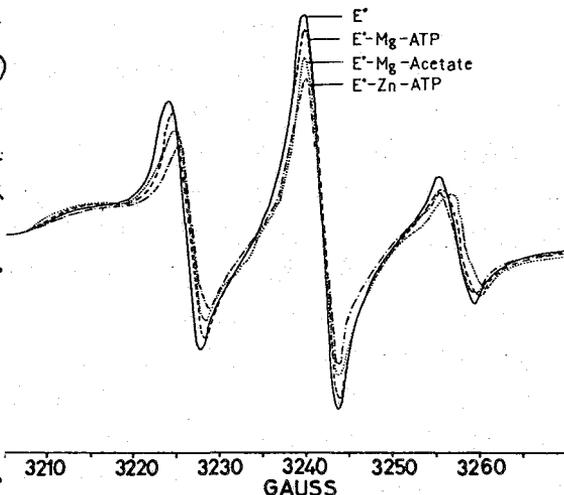


Fig. 1 A comparison of the effect of MgATP and of ZnATP on the EPR spectrum of spin-labeled acetate kinase. $T = 22^{\circ}\text{C}$.

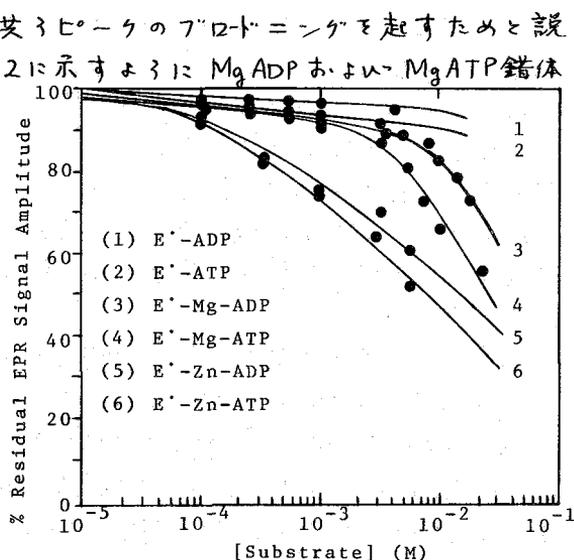


Fig. 2 EPR titration of spin-labeled acetate kinase with MgADP, MgATP, ZnADP and ZnATP.

4. 考察

酵素(E), 金属イオン(M), 基質(S)の三元系が溶液中で解離平衡をなすとき相互の解離平衡定数 K_1, K_D, K_S, K_2 を次のように定義する。

$$K_1 = \frac{[M][S]}{[MS]} \quad (1), \quad K_D = \frac{[E][M]}{[EM]} \quad (2),$$

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3), \quad K_2 = \frac{[E][MS]}{[EMS]} \quad (4)$$

解離平衡の保存式は $[E]_T, [M]_T, [S]_T$ をそれぞれ酵素, 金属, 基質の全濃度とすると次式で与えられる。

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EM] + [EMS] \quad (5)$$

$$[M]_T = [M] + [MS] + [EM] + [EMS] \quad (6)$$

$$[S]_T = [S] + [MS] + [ES] + [EMS] \quad (7)$$

測定される ESR スペクトル中の E° のピーク強度比の値 ϵ^* は次式で与えられる。

$$\epsilon^* = \sum \epsilon_i E_i / [E]_T = \frac{[E] + \epsilon_a [ES] + \epsilon_b [EM] + \epsilon_t [EMS]}{[E]_T} \quad (8)$$

ここで $\epsilon_a, \epsilon_b, \epsilon_t$ はそれぞれ $[ES], [EM], [EMS]$ の suppression factor で ϵ_a と ϵ_b は実験から決めることができるが, ϵ_t は予めある範囲を仮定し, 基質による滴定曲線をシミュレートしてゆく過程で最適値が求められる。

(1)~(7) 式の 7 連立方程式中で $[E]_T, [M]_T, [S]_T, K_1, K_D$ 以外は未知数で, 未知数の数は 9 個あり, このままでは原理的に解を得ることは不可能である。そこで K_S と K_2 をある範囲内で変化させ, $[E], [M], [S], [EM], [ES], [MS], [EMS]$ の濃度を Pring 的 N 元系解離平衡式のサフルータンにて計算し, (8) 式によって ϵ^* を計算し, それで実験で得られた値と比較しながら解析を進めた。

MgADP の場合には既に決められている K_1 の値は 0.46 mM であり³⁾, 前回の報告に K_D は 1.5 mM ⁴⁾ とした。 ϵ_a と ϵ_b は図 2 の結果より $0.90 \sim 0.95$ の値を取ると見積ることが出来る。 $[M]_T = 1.5 \times [S]_T, [E]_T = 65 \mu\text{M}, K_2$ および K_S を $5 \text{ mM} \sim 30 \text{ mM}$ の範囲で変化させ, ϵ_t も $0.01 \sim 0.1$ の範囲で見積って計算し, (8) 式の ϵ^* を $[S]_T$ の対数値に対してプロットしてみた理論曲線を図 4 に示す。 図 4 の黒丸は測定された ϵ^* の値である。 MgADP による E° の滴定曲線は K_2 の値に大きく依存し, K_S にはほとんど依存しない。 実測値とよくシミュレートする K_2 の値は 22 mM である。

ϵ_t の値は 0.01 と 0.1 とでは前者の方が 5% 程度減少が増加する程度である。 この系では 0.1 として計算した方が実測と近くなることかわかる。

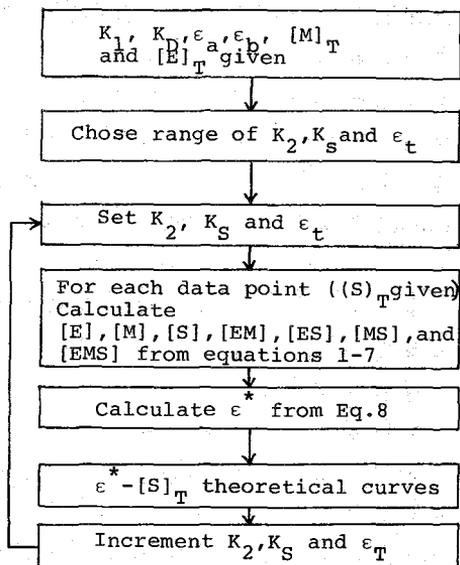


Fig. 3 Outline of computer program for solving simultaneous equilibria of EPR data: K_2 and K_S are varied.

同様な解析法を使つて MgATP の場合について計算した。用いた各定数は $K_1 = 2.6 \text{ mM}$, $K_D = 1.5 \text{ mM}$, $\epsilon_a = 0.90 \sim 0.95$, $(M)_T = 1.5 \times (S)_T$, $[E]_T = 65 \mu\text{M}$, $\epsilon_t = 0.1 \sim 0.01$, $K_S = 5 \sim 30 \text{ mM}$ の範囲を選んだ。図 2 に示した MgATP の実測値を最もよくシミュレートする K_2 の値は 5 mM , K_S は 8 mM であった。

$[E]_T$ の濃度を $30 \mu\text{M} \sim 1 \text{ mM}$ と変化させてみたが、理論曲線はこの濃度範囲でほとんど変わらなかつた。

E. coli の酢酸キナーゼと MgATP または MgADP の ternary complex の解離定数の値 5 mM と 22 mM はこれまで報告され

た creatine kinase, phosphoglycerate kinase, adenylate kinase などの K_2 と比較すると 1~2 桁も大きいし, Rose らが反応動力学から決めた Michaelis 定数 K_m の値, ATP で 2 mM , ADP で 1.5 mM とくらべても大きくなっている。これらの差の原因として考えられるのは $\alpha 1$ にスピラブル化によって活性域が native をものより変化して, コンフォーメーションが変ってしまったこと, $\alpha 2$ に Anthony らの報告によれば *E. coli* の酢酸キナーゼは精製が困難で最高 70% の純度でしか得られず, 夾雑タンパク質の混入が避けられないとしている点である。 $\alpha 1$ の点は確かに SH 基は活性域の 3 次, 4 次構造に寄与して活性発現に重要な役割を演じている。Anderson らによつて示されたキナーゼ系酵素の Space-Filling Model では図 5 A の割れ目 (cleft) が活性中心にあり, コンフォーメーションが図 5 B のように基質の結合によって閉じることが活性発現と関係していることを述べている。しからば活性域の SH 基をスピラブル化することはかなりの変化をもたらし得るものと解釈できる。 $\alpha 2$ の夾雑タンパク質の影響があるか, もしこの夾雑タンパク質が SH 基を持ちスピラブル化されているとしたら K_2 の値そのものが問題になる。この点は E の SDS 電気泳動の結果を十分に検討してみないと結論は出せない。

References

- 1) 中島宏, 今堀和友, 蛋白質核酸酵素 24, 1088 (1979)
- 2) G.H. Reed et al, J. Biol. Chem., 245, 6547 (1970)
- 3) H.G. Wood et al, *ibid*, 241, 5692, (1966)
- 4) 飯田武揚, 谷又司, 三田村孝, 16 回 NMR 討論会 P97 (1977)
- 5) C.W. Anderson et al, Science, 204, 375 (1979)

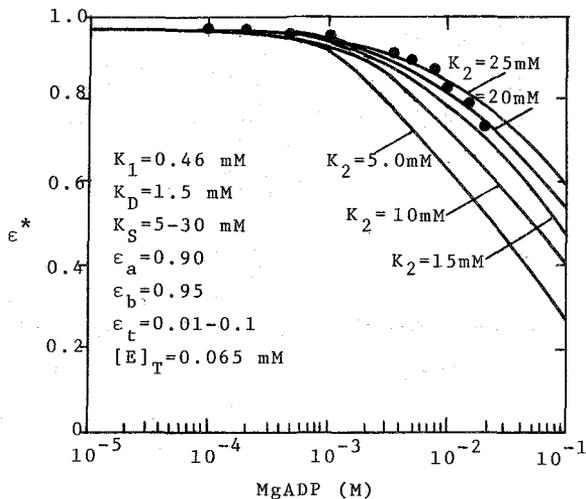


Fig. 4 EPR titration of spin-labeled acetate kinase with MgADP.

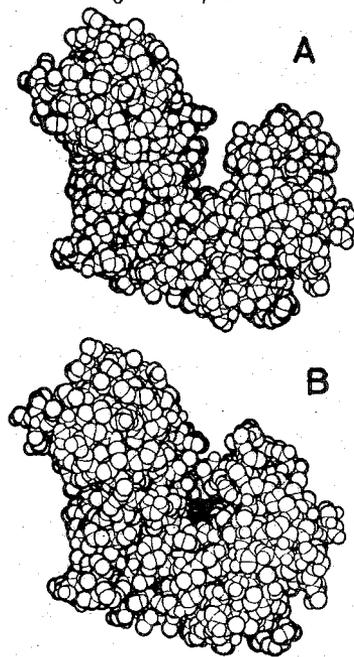


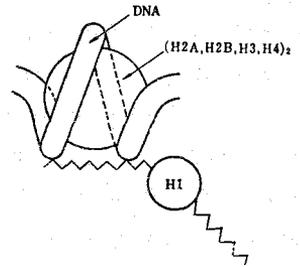
Fig. 5 A stereo drawing of a space-filling model of yeast hexokinase, B complexed with glucose, A in its unliganded, native conformation.⁵⁾

316 ^{13}C NMRによるクロマチンゲルのヒストン-DNAの相互作用の研究

(国立がんセンター研) 齊藤 肇, 大杉義彰, 児玉昌彦
永田親義

1. はじめに

高等生物のDNAは細胞核内の染色質あるいはクロマチンと呼ばれる部分に存在する。すなわち、クロマチンは、DNA、ヒストンおよび5種類の蛋白(H1, H2A, H2B, H3, H4)、少量の非ヒストン蛋白、およびRNAからなるコンプレックスで、高度に折りたたまれた構造をもつ。この基本単位はヌクレオソームと呼ばれるヒストンのオクタマー(H2A, H2B, H3, H4)₂とコアにDNA(140塩基対くらい)が糸まり状にまきついた部分と、そのつぎのLinker DNAにH1が結合したものの、くり返し構造をとることが知られている。このような構造をとることの必然性は、DNAの持つ遺伝情報の発現、抑制に大いに関係があることはいままでもない。クロマチンは単離した状態ではゲルとしての性質を示し、マクロな形状はイオン強度により大きく変化する。このような性質はクロマチン中でのDNAとヒストン、特にH1との相互作用により大きく影響を受けるわけである。演者らは、これまでに高分解能 ^{13}C NMRスペクトルが種々のゲル化合物のミクロ構造の知見を与えることを示してきた²⁾。今回は特にクロマチンにおけるDNAとヒストンの相互作用に着目し、 ^{13}C NMRによる実験を行った。



2. 実験方法

図1のスキームに従って、子牛胸腺からクロマチンを分離し、クロマチンのペレットを得た。この後の処理により、A. 凍結乾燥クロマチン、B. Intact クロマチン、C. H1除去クロマチンの3種類の試料を得た。凍結乾燥クロマチンは、ペレットを透析チューブに移してイオンを除去した後凍結乾燥を行ったものである。 ^{13}C NMR測定前にD₂Oを加えて膨潤させ、Protease阻害剤であるNaHSO₃さらに所定のNaClまたは尿素を加えた。Intactクロマチンは、ペレットを透析する際に外液と所定のイオン強度に調整し、得られるゲルを測定に供する。H1除去クロマチンは、ペレットを10mM Tris HCl バッファ (PH 7.5) に懸濁し10000xg 30分遠心後上清部分にイオン交換樹脂AG50W-X2を加え、H1が解離するイオン強度0.45M NaClに45分放置後低速遠心により樹脂を除去することによって得た。試料中のDNA、蛋白およびヒストンの定量は、それぞれ、Schneider法、Lowry法および核酸抽出+Lowry法により行った。試料の4エツクはアクリルアミドゲル電気泳動パターンの変化を ^{13}C 測定後に調べた。

- Calf thymus 0.1M NaCl
- 0.01M NaCitrate
- 0.05M NaHSO₃
- Polytron homogenizer
- Gauze Filt.
- Wash x5 (4000 rpm, 10 min.)
- 図1. クロマチンペレットの調整

^{13}C NMR スペクトルの測定は、JEOL PFT-100 スペクトロメータを用い、25.03 MHz で行った。45°パルス、くり返し時間1秒の条件を用いて、1000 回のプロット積算により、4万回以上の積算を行った。

3 実験結果と考察

3.1. クロマチンゲルの ^{13}C NMR スペクトルのイオン強度による変化

図2に Intact クロマチンゲルの ^{13}C NMR スペクトルを示す。ゲルの ^{13}C NMR スペクトル強度は、イオン強度によって著しく変化していることがわかる。高塩に変性させない限り、二重鎖らせん構造のDNAに由来するシグナルは観測できない。それゆえ、 ^{13}C NMR スペクトルが観測し得るのはヒストンおよび非ヒストン蛋白であるが、1%程度の含有量しかないので後者の場合はスペクトルへの寄与は小さくないと考えられる。一方、H1陰性クロマチンの ^{13}C NMR スペクトルを同一条件で測定した場合、シグナルは全く観測することができなかった。したがって、ここにみられる ^{13}C シグナルは、ヒストンH1にもとづくものであることがわかる。

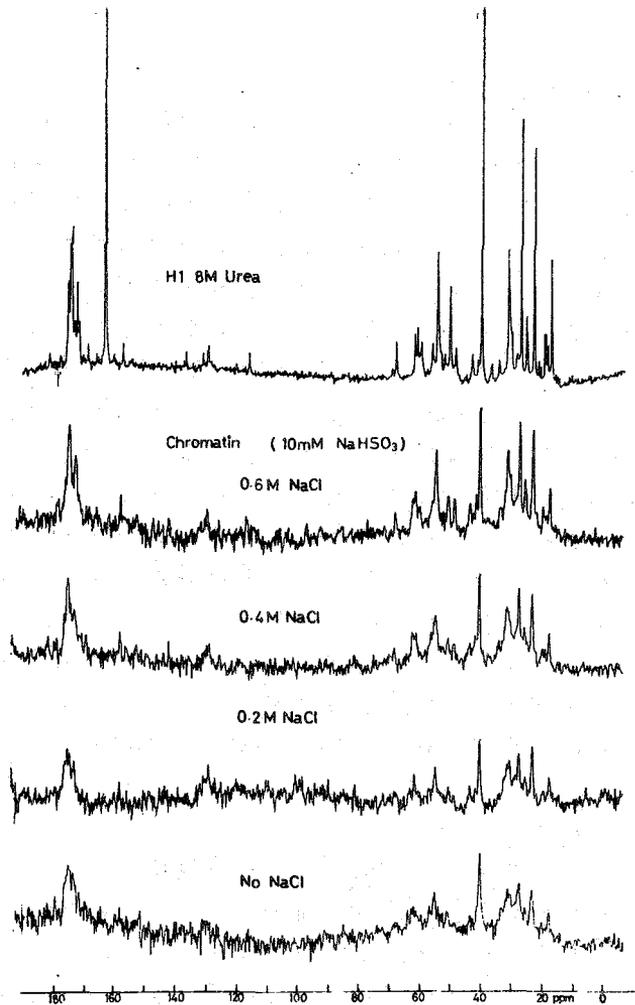


図2. Intact クロマチンゲルの ^{13}C NMR スペクトル。イオン強度の影響

実際、分離したヒストンの各分子種の Lys/Arg 比を比較してみれば、H1が20に対して、

H2A, H2B, H3, H4 は0.7~2.5にしかならず、40~42 ppm にあらわれる Lys C ϵ と Arg C δ のピーク比にこの違いが大きく反映されている。このため、図2のスペクトルは図3に与えたヒストン各分子種の Lys C ϵ , Arg C δ ピークの比にくらべて大きく違っており、これから、ここで用いたイオン強度の範囲ではオクタマーからの寄与は無視できることがわかる。又クレオソームモデルからも容易に理解できるように、DNAに強く結合し、さらにオクタマー構造(分子量100,000以上)をとる場合の分子内運動の Mobility は高分解能スペクトルと与える相関時間 10^{-8} 秒よりもはるかに長くなり得ることは想像に難くない。

	Lys		Ala	Lys			
	C α	C ϵ	C α	C α	C γ	C δ	C ϵ
No NaCl	1	1	1	46	39	42	25
0.2 M	1.1	0.81	1.2	35	21	25	18
0.4 M	1.4	0.85	1.3	53	21	25	18
0.6 M	1.8	1.1	2.1	28	18	18	14

表1に、イオン強度を変えたときのクロマチンゲルの ^{13}C NMRのピーク強度および線巾の変化の一例をまとめた。ヒストンH1のDNAへの結合様式は、側鎖に正電荷をもつLysのエアミ基とDNAの負に荷電したリン酸基との間のイオン結合である。このため、Lysのエアミ基に隣接したC ϵ ピークの強度変化が、イオン強度変化をもっとも鋭敏に反映すると予想される。しかしながら、表1の結果は予期に反してC α ピークの強度変化が最も大きい。Lys C α ピーク強度の変化は、DNAへの結合に直接関与しているAla C α ピークと同じ程度である。このことは、通常のランダムあるいは折りたたまれた蛋白とは違って、アミノ酸残基のMobilityは、隣接の過程でC α > C ϵ であることを示しており、0.6Mのイオン強度条件下でも未解アミ基がDNAに結合しているfractionが大きいためであると考えられる。このことは、表2に示すように、Lys残基のC ϵ /C α 比がイオン強度を上げると逆に小さくなることや、Lys, ArgのいずれもC ϵ /C δ ピーク強度比がfreeのヒストンH1にくらべてきわめて小さいこととも対応している。上記の結果は、イオン強度変化にともなうゲルの体積変化とは必ずしも対応していない。ゲルの体積は、イオン強度がゼロのときには最も大きく、イオン強度が0.2では最も収縮し、さらにイオン強度を上げていくと体積が大きくなっていく。0.2M NaClの場合、表1あるいは図2でLys C α の線巾が0.4Mの場合よりも逆に小さくなっていくのは、ゲルの収縮の際に液相へ溶出している成分がオーバーラップしているのが大きな原因であると考えられる。

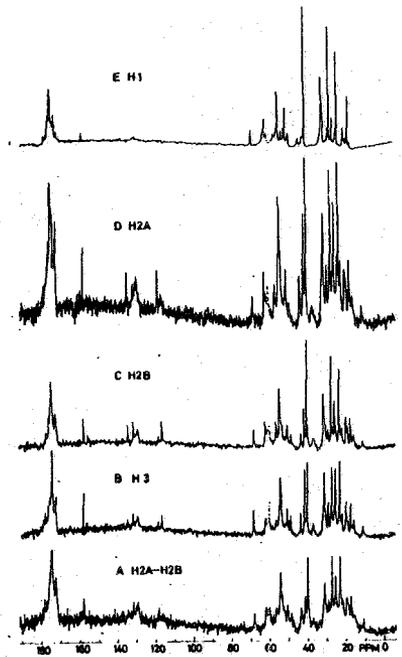


図3. 種々のヒストン成分の ^{13}C NMRスペクトル

Table 2 Relative peak intensities of C ϵ /C α (Lys) and C ϵ (Lys)/C δ (Arg)

	NaCl	C ϵ /C α (Lys)	C ϵ (Lys)/C δ (Arg)
Histone H1	--	1.3	19
Chromatin	--	1.4	2.7
	0.2M	0.95	3.0
	0.4M	0.78	2.8
	0.6M	0.83	3.0
Urea			
Chromatin	--	1.4	2.7
	2M	0.93	3.9
	4M	0.86	2.8

3.2. フォーマチンゲルへの尿素の効果

図4にフォーマチンゲルに対する尿素添加の効果を示す。4M尿素はDNAと変性させたい。また、H1除去フォーマチンについて尿素と同様に加えても、 ^{13}C スペクトル

ルピークは全く出現
 してこないことか
 かった。それゆえ、
 図4の尿素を加えた
 ための ^{13}C スペクトル
 変化は、前節の場合
 と同様、ヒストンH1
 の unfolding による
 ため効果がある。
 ヒストンH1の fold-
 ing は、35-120
 の部分が Globular
 構造をとるとして
 いる。したがって、
 H1とDNAへの
 結合状態が大きく
 変化するに、H1の
 みを変化させると
 すれば、この場合

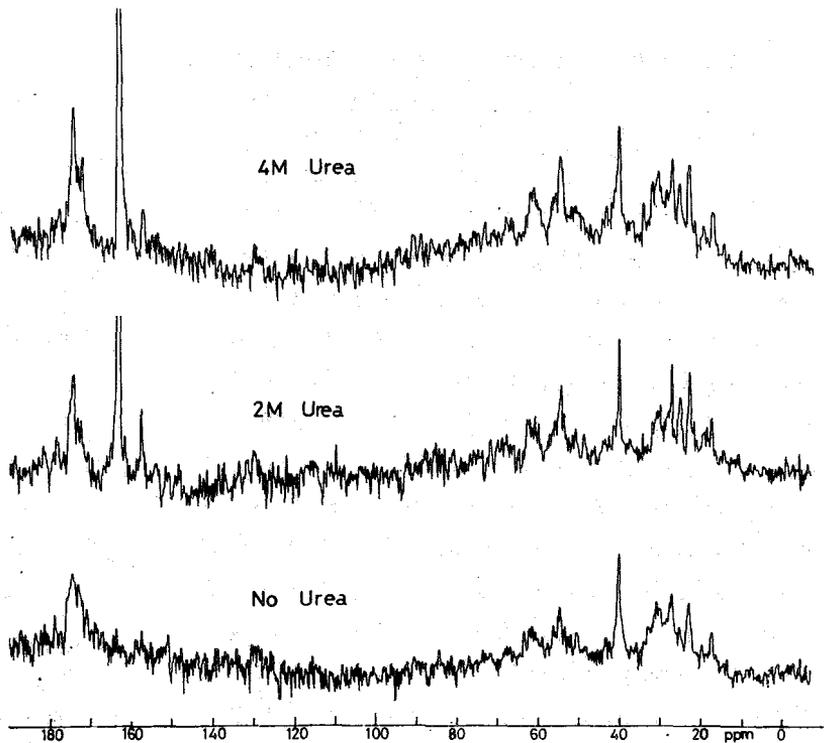


図4 クロマチンゲルの尿素添加による ^{13}C NMRスペクトル変化

も前節の NaCl の
 場合と同様、アミド酸残基とくに Lys の骨格にあたる C α 側鎖の末端 CE 原子も
 Motional freedom を待たずとも不思議はない。実際、長さ死が図4から読み取
 られるように、Lys の C α /CE ピーク比が尿素量に応じて逆に減少しているわけであ
 る。

凍結乾燥クロマチンと水で膨潤させた ^{13}C スペクトル、および NaCl 尿素の効果は
 上と同じである。ただし、この場合は膨潤の条件に十分注意を払う必要がある。

- (1) Kornberg, R. D., Ann. Rev. Biochem., 46, 931-954 (1977)
- (2) 齊藤 肇 化学の領域, 33, 609-618 (1979)
- (3) Johns, E. w. Biochem. J., 92, 55-59 (1964)
- (4) Kato, Y. and Iwai, K., J. Biochem., 81, 621-630 (1977)
- (5) Chapman, G. E., Hartman, P. G., Cary, P. D., Bradbury, E. M.
and Lee, D. R., Eur. J. Biochem., 86, 35-44 (1978)