

第21回NMR討論会 講演要旨集

1982年10月16日(土)・17日(日)・18日(月)

名古屋工業大学講堂

共 催

日本化学会・日本分析化学会・日本薬学会
日本生化学会・日本農芸化学会・日本生物物理学会

プログラム

10:00~12:00

1. ^{13}C -NMRの新しい手法, 選択的INEPTについて
(東大応微研, 日本電子*) ○降旗一夫, 瀬戸治男, 大岳 望, 大内宗城* 1
2. 多核の固体高分解能NMR
(日本電子) ○藤戸輝昭, 大内宗城, 出口健三, 清水章三 5
3. パルス系列の応用—Decouplingを中心として
(日本電子) ○大内宗城, 小作富雄, 樋口啓一郎 9
4. Multi Nuclei Surface Coil
(新潟大脳研, 日本電子*) 湯浅龍彦, 桑原武雄, ○江口恵二*, 鴨 修*, 大内宗城* 13
5. 各種パルス系列の2-スピン系の核磁気緩和への応用
(北大理) ○竹村信司, 引地邦男 17
6. 断層高分解能NMR
(電総研) ○亀井裕孟 21

13:00~15:00

7. 固体 ^{13}C NMRにおける分子間水素結合と化学シフト
(京大理) ○今城文雄, 前田史郎, 竹腰清乃理, 寺尾武彦, 雑賀亜帆 25
8. ポリビニルアルコールにおける ^{13}C 固体高分解能NMR
(京大理) ○前田史郎, 寺尾武彦, 雑賀亜帆 29
9. 固体高分解能J-分解NMR II
(京大理) 寺尾武彦, ○三浦 等, 雑賀亜帆 33
10. シクロデキストリン包接体の ^{13}C CP/MAS NMR。ゲスト分子の動的挙動
(国立がんセンター研・微化研) ○斉藤 肇, 和泉儀一, 多部田涼子 37
11. シクロデキストリン包接体の ^{13}C CP/MAS NMR。ホスト分子のコンホメーション変化と
コンホメーション依存シフト
(国立がんセンター研・微化研) ○斉藤 肇, 和泉儀一, 多部田涼子 41

講演時間

特別講演：30分(+討論10分)

一般講演：13分(+討論7分)

12. Ti-V系水素化物の構造

(化技研) ○林 繁信, 早水紀久子, 山本 修45

15:20~16:00 (特別講演. I.)

13. ^1H -NMRと結晶中のアルキルアンモニウムイオンの分子運動

(名大理) 池田龍一49

16:05~18:25

14. α -Biotinの二次元NMR及び ^{15}N -NMR

(北大理) ○伊倉光彦, 引地邦男53

15. ^{13}C NMRによる混合系の定性定量分析(II) $\text{Cr}(\text{AA})_3$ の利用

(化技研) ○早水紀久子, 柳沢 勝, 山本 修57

16. LSPD法によるシクロヌクレオシドの構造解析

(理 研) ○鶴沢 洵, 安齋謙太郎61

17. 核磁気緩和法により求めた $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{R}$ 型分子の ^{14}N 四極子結合定数

(九大薬) ○古賀けい子, 金沢洋子65

18. クエン酸マンガン(II)錯体の緩和時間と溶液内分子構造

(エーザイ筑波研) ○藤田忠男69

19. 水溶液中における酢酸イオンの核磁気緩和と分子運動

(東工大原研) ○垣花真人, 小高正敬, 岡本真実73

20. 遷移金属スズ配位錯体におけるスズ核のスピン格子緩和

(東大生研) ○森山広思, 山川 哲, 斉藤泰和77

9:00~12:00

21. 水溶液中の金属(Zn, Ag及びCd)錯体の金属イオンのnmrケミカルシフトと錯体構造, MO
アプローチ
(三菱製紙, 京大工*) ○遠藤一央, 中辻 博*, 諫田克哉*, 山本京之介, 鈴木重芳,
二木 清, 米沢貞次郎*.....81
22. 水溶液中の銀錯体の¹⁰⁹Ag nmr
(三菱製紙, 日本電子*) ○遠藤一央, 松下和弘*, 出口健三*, 山本京之介, 鈴木重芳,
二木 清.....85
23. Type 3 銅蛋白質モデル錯体のNMR
(近畿大理工) ○北川 進, 宗像 恵, 米沢正泰.....89
24. ポリエーテル系物質の金属イオン捕捉構造とNMR挙動
(シオノギ研) ○照井彬弘, 城 始勇, 中井 博, 辻 直樹, 長島一男, 通 和夫.....93
25. 高分子の¹³C磁気緩和と多相関時間モデル
(京大化研) ○村山浩一, 堀井文敬, 北丸竜三.....97
26. 高度配向ポリエチレンフィルムのdipolar-decoupled ¹³C NMR
(京大化研, 京大理*) ○堀井文敬, 北丸竜三, 寺尾武彦*, 前田史郎*, 雑賀亜帆*.....101
27. 充填剤表面及びエラストマーの化学構造がバウンドラバー構造に与える影響
(東京理大理) 芹澤 肇, 中村武房, 伊藤真義, 田中公二.....105
28. アミノ酸類の水和特性と溶質間相互作用
(味の素中研) ○鈴木栄一郎, 松井美穂子, 坂本一民, 永嶋伸也.....109
29. 反磁性二価金属(⁴³Ca, ²⁵Mg, ⁶⁷Zn)NMRの生体系への応用と限界
(東北大非水研) ○清水 透, 篠野昌弘.....113

13:00~15:00

30. NMRによる病態解析(Ⅱ) 関節リウマチ, 変形性関節症, 化膿性膝関節炎の関節液について
(熊本大医; 国立熊本病院*) ○山崎政城, 荘 明勝*, 森野能昌, 水岡二郎*.....117
31. NMRによる病態解析(Ⅲ) 悪性骨腫瘍診断のこころみ
(熊本大医生化学, 整形外科*) ○山崎政城, 水田博志*, 本田五男*, 森野能昌, 北川敏夫*...121

講演時間

特別講演：30分(+討論10分)

一般講演：13分(+討論7分)

32. cytosol局在 アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(cAAT)・ α -メチルアスパラギン酸複合体の構造
(熊本大医, 京大理*) ○森野能昌, 赤坂一之*, 棚瀬純男, 長島不二夫, 山崎政城125
33. ^{31}P -NMRによる軟骨組織代謝の研究
(京府医大) 西川弘恭, ○日下義章, 山下文治, 榊田喜三郎129
34. ^{31}P -NMRによる筋収縮におけるエネルギー利用の経過と張力の同時測定
(大分医大生理) ○山田和広, 田之倉 優, 米谷快男児133
35. NMR imagingによる脳浮腫の実験的研究
(京大医, 京大理*, 三洋電機中研**) ○安里令人, 半田 肇, 端 恒夫*, 八田純一**137

15:20~16:00 (特別講演. II.)

36. NMR-CTの展望
(東大物性研) 安岡弘志141

16:05~18:05

37. 唾液腺の ^{31}P -NMR測定
(大阪医大, 京府医大*, 生理研**) ○村上政隆, 瀬尾芳輝*, 亘 弘**, 今井雄介, 森本武利*, 志賀 潔**145
38. ^{31}P -NMRによるミエリン膜リン脂質の方向性の研究
(京府医大) ○西川弘恭, 吉崎和男, 田中忠蔵149
39. 生体同一組織(筋肉)における ^{31}P -, ^1H -, および ^{13}C -NMRスペクトル
(京府医大, 生理研*) ○吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭, 森本武利, 亘 弘*153
40. CCK-PZオクタペプチドの ^{360}P プロトンNMR
(生理研, 東大理*) ○亘 弘, 肥塚 泉, 高田宗春, 矢内原 昇, 永山国昭*157
41. TMRによる生体試料の測定
(生理研) 亘 弘, ○高田宗春, 肥塚 泉, 志賀 潔, 二科安三, 成瀬昭二161
42. リン酸イオンの解離平衡におよぼすイオンの影響
(京府医大, 大阪医大*, 生理研**) ○瀬尾芳輝, 吉崎和男, 西川弘恭, 森本武利, 村上政隆*, 今井雄介*, 亘 弘**165

18:30~20:30 (懇親会) 於 大学会館 3階 大集会室

9:00~12:00

43. アルコキシシラン類の ^{29}Si ランタニドシフト
(茨城大理) ○平山昌甫, 荒井寿一.....169
44. $\text{Pt}(\text{acac})_2\text{-Ln}(\text{fod})_3$ 系の ^{195}Pt ランタニドシフト — 溶液内平衡と配位構造 —
(茨城大理) ○平山昌甫, 佐々木裕子, 亀岡 肇.....173
45. 高分解能nmrによるデオキシピリジノリンの構造解析
(北里大衛生, 国立がんセンター研*) ○小野俊雄, 小川忠男, 川西康博, 前田満和*,
斎藤 肇*.....177
46. アゾベンゼンおよびベンゾ[c]シンノリンの ^{13}C NMR化学シフトに対する $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 同位体効果
(京大薬, 京都薬大) ○黒田義弘, 藤原靖弘.....181
47. 遷移金属ポリインポリマー液晶のNMR(Ⅱ)
(阪大産研, 阪市大原研) ○高井嘉雄, 森本秀子, 高橋成年, 菌頭健吉.....185
48. フェノチアジンの液晶内における配向と化学構造 — 3,7-ジブロモフェノチアジンについて —
(阪大薬) 藤原英明, ○山中 巖, 佐々木喜男.....189
49. 二, 三の元分子のジアニオンナトリウム塩の ^{13}C , ^{23}Na NMR (アセナフチレン, フロランテン, ジベンゾスベロン)
(茨城大理) ○平山昌甫, 鈴木秀登, 高木辰彰, 小祝和彦.....193
50. 置換ジアジンのN-15NMRスペクトル
(神戸女薬大, 東大教養*) 山上知佐子, 高尾栖雄, ○竹内敬人*.....197
51. NADPH-アドレノドキシシン還元酵素と NADP^+ との相互作用
(阪大医生化) ○藤井 茂, 堅中泰樹, 杉山俊博, 山野俊雄.....201

13:00~15:00

52. ^{13}C -NMRによるintactクロレラの炭素代謝の研究
(国立公害研) ○三森文行, 伊藤 治.....205
53. 溶液と結晶における構造の差異 — 神経毒蛋白を例にして —
(Oxford 大, 東大理*, 東北大理**) ○稲垣冬彦, R.J.P.Williams, 宮沢辰雄*,
遠藤斗志也*, 田宮信雄**.....209

54. ^{13}C 固体高分解能NMRによるフィブロインの構造研究
(阪大蛋白研, 蚕糸試験場*) ○藤原敏道, 小林祐次, 片岡紘三*, 京極好正213
55. 固体アミノ酸, タンパク質における $T_1\rho$ の機構 —スピン-スピンおよびスピン-格子緩和の寄与
(京大理, プリティッシュコロロンビア大) ○赤坂一之, S.Ganapathy, C.A.McDowell, 内藤 晶217
56. 筋蛋白ミオシンの水和特性
(北大低温研) ○花房尚史221
57. λ ファージの ^{31}P -NMR —DNAの構造に対するポリアミンの影響
(阪大蛋白研, 微研*) ○阿久津秀雄, 勝谷成男, 京極好正, 松代愛三*225
- 15:20~17:20**
58. 同位体ラベルによる蛋白質の構造研究 — ^{13}C -NMRによる *Streptomyces Subtilisin* Inhibitor (SSI) の構造研究
(味の素中研, 都立大理*) ○辻 尚志, 長尾洋昌*, 今村由紀子*, 甲斐荘正恒*229
59. *Streptomyces Subtilisin* Inhibitor の溶液中での構造 —トリプトファン, メチオニンの ^1H 信号の帰属とマイクロ環境
(京大理, 味の素中研*, 都立大理**, 生理研***) ○赤坂一之, 波多野博行, 辻 尚志*, 甲斐荘正恒**, 亘 弘***233
60. ヘムと二三の鉄錯体の ^{57}Fe NMR
(東北大非水研, 帝京大薬*) ○野沢庸則, 簗野昌弘, 佐藤三男*237
61. NMRによるヘモグロビンの研究
(日本女大化学, カーネギーメロン大) ○高橋征三, C・Ho241
62. NMRによるヘムc ペプチドのヘム近傍構造の研究
(京大工) ○舟橋 孝, 森島 績245
63. ヘム酵素西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)におけるカルシウムイオンの役割。ランタニドイオンプローブ法を用いるHRPの構造と機能に関する研究
(京大工) 森島 績, ○黒野益夫, 城 宜嗣249

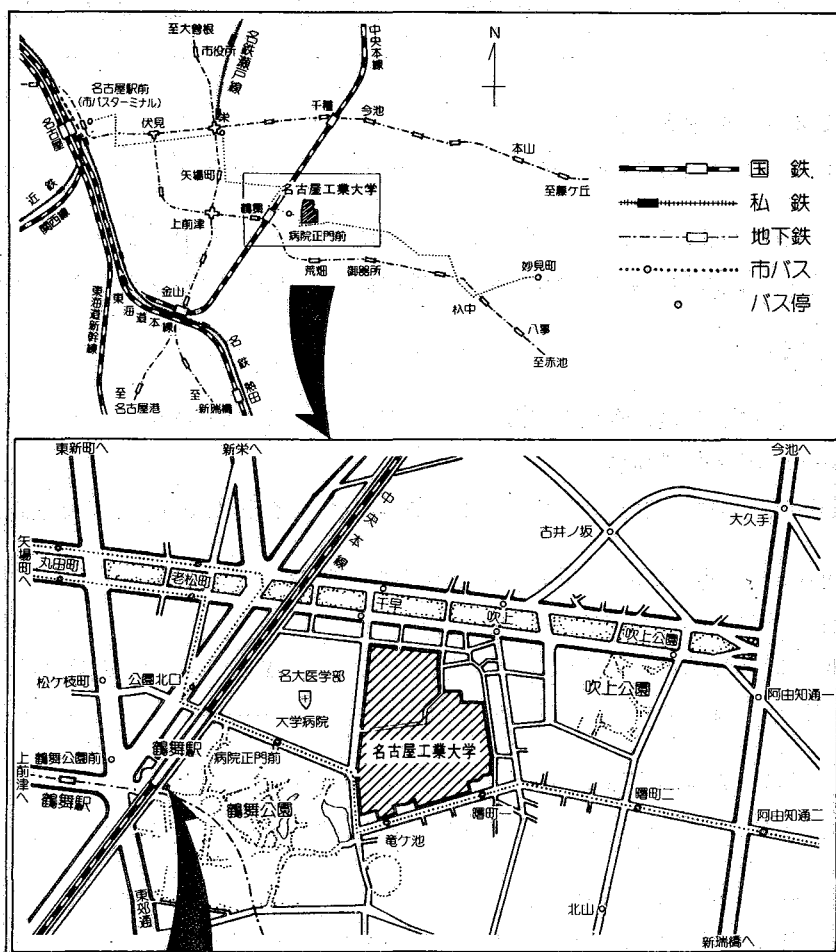
名古屋工業大学への交通案内

市バス ⑤⑩名古屋駅前↔妙見町 病院正門前下車 東へ約150m
(市バスターミナル) (注) ⑤⑩は市バスの系統番号

地下鉄 鶴舞線(伏見↔赤池) 鶴舞駅下車 4番出口 東へ約500m

国鉄 中央線 鶴舞駅下車 東へ約500m

大学構内への車輛入構制限がございますので、会場への御来場にはできるだけ上記の交通機関を御利用下さい。



○は地下鉄4番出口

連絡先

○名古屋工業大学 講堂：名古屋市昭和区御器所町

電話 052-732-2111 内線 264 : 土曜日午前中、月曜日全日

052-732-2125 : 土曜日午後、日曜日全日

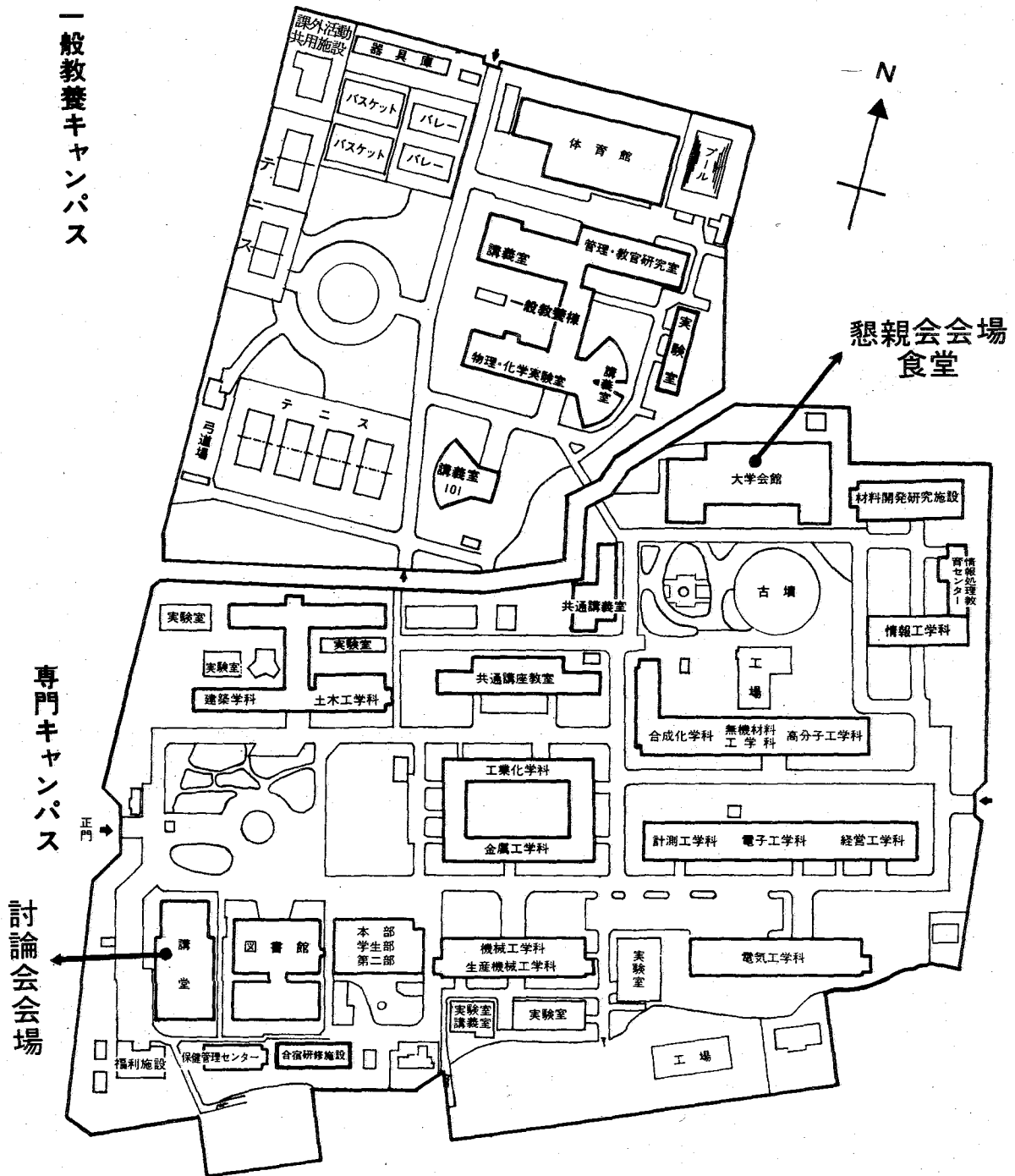
学会参加者に伝言致します。

○名古屋工業大学 工業化学科 高橋 憲助(討論会世話人)

電話 052-732-2111 内線 507

名古屋工業大学建物配置図

昭和57年4月1日現在



第 1 日

10月16日(土)

〔はじめに〕

^{13}C -NMRスペクトルに於て、炭素に結合している水素原子数の決定、次いで水素と炭素の化学シフトの関係づけは、有機化合物の構造解析の上で不可欠であり、この目的のためには従来off-resonance decoupling、selective proton decoupling(以下SEL)法が利用されてきた。

近年の超伝導NMRの普及に伴い ^1H -NMRスペクトルの解析が容易になった反面、非等価なメチレンプロトン(磁場が高くなるに従って分離が大きくなるため(400 MHz ^1H -NMRではこの差は400~500 Hzにも達する))複雑な化合物ではSEL法によるメチレン炭素の帰属は困難或いは不可能となった。そこでこの非等価なメチレン炭素の帰属を確実にを行うための実用的な方法を考案した。

〔方法〕

この方法の原理はINEPT法とSEL法の組み合わせである。INEPT法は ^{13}C -NMRスペクトルに於てメチル、メチレン、メチン炭素が水素とのスピン結合によつてそれぞれ四重線、三重線、二重線に分裂することを利用したスピンエコーの一つの応用手段である。いま非等価なメチレン($\text{H}_\text{A}-\text{C}-\text{H}_\text{B}$)の一方の H_A のみを照射するとこのメチレン炭素は残りの H_B とのスピン結合によつて二重線に分裂するため、INEPT測定条件下ではメチンと同じ挙動を示すと考えられる。従つて、メチレン水素の一方を選択的に照射し、メチンのシグナルが上向き、メチレンが下向きとなる条件でINEPT測定を行えば、照射した水素に結合したメチレン炭素のみが上向きとなり容易に識別することができる。

測定は第2照射ユニットを備えたJEOL-FX-400を使用した。Fig.1は使用したINEPTパルス系列、Fig.2は非等価なメチレンのSEL法とINEPT法とのシミュレーションスペクトルである。

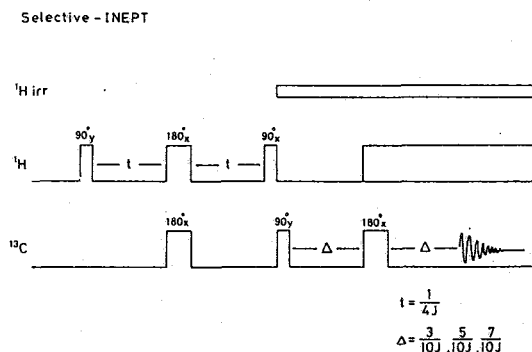


Fig. 1 INEPTパルス系列

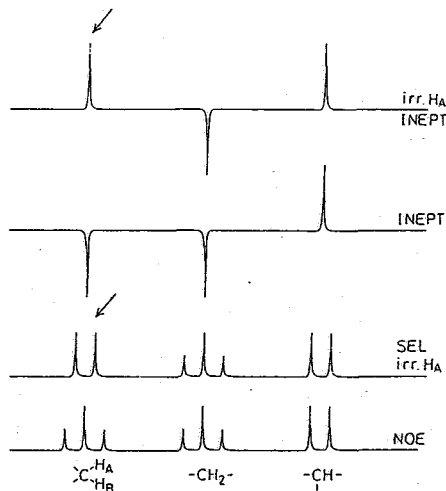


Fig. 2 SEL法とINEPT法のシミュレーションスペクトル

ふりはた かずお、せと はるお、おおうち むねき、おおたけ のぼる

〔実験〕

モデル化合物としてテルペン誘導体〔I〕を選び、化学シフト差の異なるいくつかの非等価なメチレンについて、SEL法及びSEL-INEPT法を比較検討してみた。

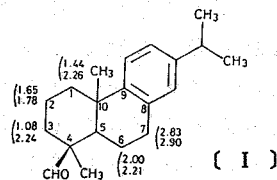
○SEL法

〔I〕の7位のメチレンは ΔH が28 Hzの非等価なメチレンである。この中心を照射すればシャープなシグナルを与え、またメチレンの片方だけを照射しても、もう一方のプロトンに照射磁場が及ぶため、一重線になりSEL法で満足し得る結果が得られる(Fig. 3)。1及び3位の300~400 Hzと大きく分離したメチレンに対してはメチレンの一方のみを照射することにより、三重線が二重線になりシグナルが他のシグナルと区別ができれば帰属が可能である(Fig. 4)。

6位のメチレンは $\Delta H = 84$ Hzの非等価なメチレンである。中心に照射するとシグナルに変化が認められるが、通常のSEL法で用いる照射出力レベルでは鋭い一重線にはならず識別が困難である。更に照射出力を上げるとシグナルは一重線になるが、選択性が失われてしまうため、実用的な手段とはなりえない。一方のメチレンプロトンのみを照射すると小さな二重線として観測することができるがシグナルが混みあっている領域での判別は実際上困難である(Fig. 5)。

○SEL-INEPT法

メチレンプロトンの一方を照射した時の他方に対する影響を考えた場合、非等価なメチレンの化学シフトの差が大きいほうがSEL-INEPT法はやりやすい。化学シフト差の大きさがどの程度のものまで本方法が応用できるか検討した。INEPT条件下で1、3位の非等価なメチレンの高磁場側 H_b を照射すると下向きのシグナルが上向きに変化し、他のシグナルと明確に判別することができる。また6位の $\Delta H = 84$ Hzの非等価なメチレンに対しても



〔I〕

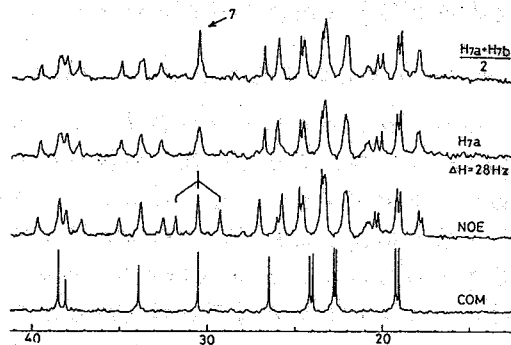


Fig. 3 テルペン誘導体のSEL法(1)
 $\Delta H (H_a - H_b)$ が小さい場合



Fig. 4 テルペン誘導体のSEL法(2)
 $\Delta H (H_a - H_b)$ が大きい場合

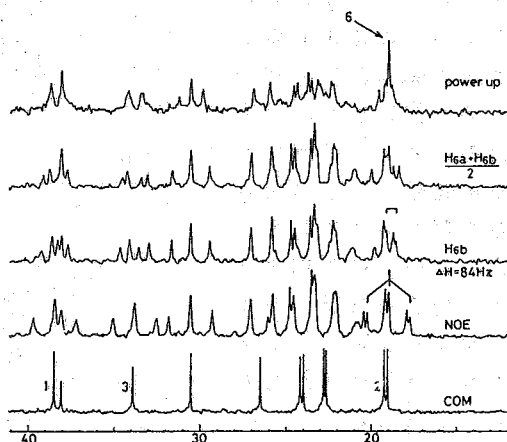


Fig. 5 テルペン誘導体のSEL法(3)
 $\Delta H (H_a - H_b)$ が中間の場合

シグナルが重なることなく判別することができる (Fig. 6)。この場合メチレンの一方のプロトンを照射することによる他方への影響をできるだけ少なくするために照射出力は通常の SEL 法よりやや弱めに設定したく $rH_2 / 2\pi = 100 \sim 125 \text{ Hz}$ である。このため INEPT の最適条件からややずれるためシグナル強度の増大は小さくなるが結果は満足し得るものである。

〔ポリエーテル抗生物質モネンシンの²⁾帰属〕

モネンシンのプロトンの帰属はすでに³⁾ Anteunis 等によつて詳細に帰属されているので、そのデータをもとに SEL-INEPT 法を適用した結果いくつかの誤りがあることがわかり decoupling 差スペクトル法等によりプロトンの帰属を再検討した (Fig. 7)。

10、11 位のメチレンは四級

炭素にはさまれた 4 スピン系であり化学シフトの異なる等価なメチレンなのか、あるいは化学シフトが等しい非等価なメチレンなのか decoupling では確認できないが SEL-INEPT 法の結果から、ともに非等価なメチレンであることが判明した。23、30 位はほぼ等価なメチレンである。

○SEL-INEPT 法による帰属

Fig. 8 は 10、11、8 位のメチレンのそれぞれ低磁場側のプロトンを照射したものである。Control のスペクトルに対し、下向きから上向きに変化したシグナルを容易に識別できる。尚、10、11 位のシグナルはプロトンの化学シフトがまったく等しいためこの方法によつては判別できず、構造の類似したロノマイシン⁴⁾との比較によりそれぞれ帰属した (Fig. 8)。

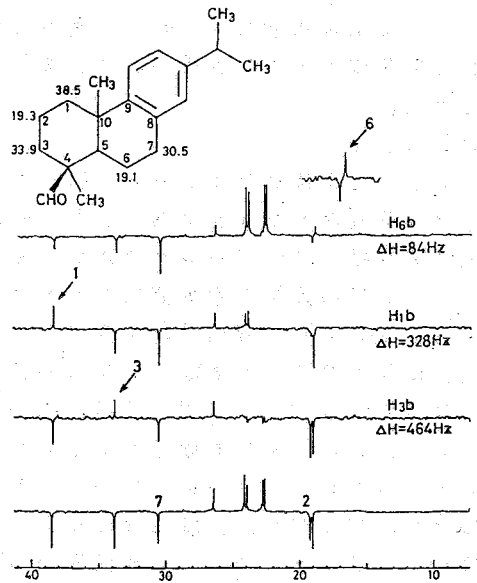


Fig. 6 テルペン誘導体の SEL-INEPT 法

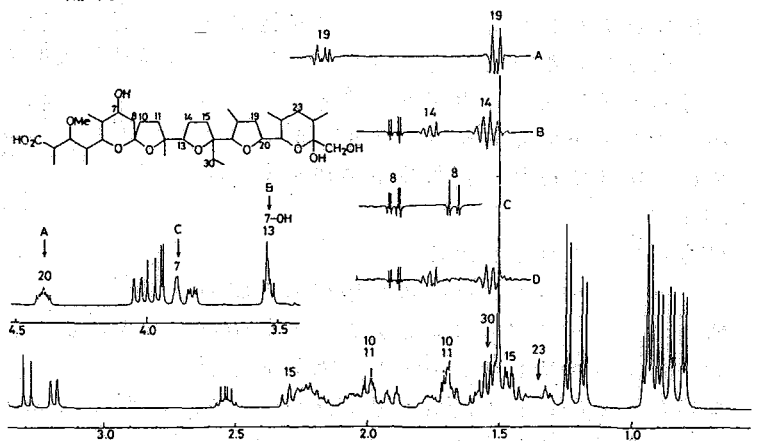


Fig. 7 モネンシンの 400 MHz ^1H -NMR スペクトル

- A) H_{20} (4.396) を照射した差スペクトル
- B) H_{13} と OH (3.54) を照射した差スペクトル
- C) H_7 (3.89) を照射した差スペクトル
- D) H_{13} と H_{15} (2.30) を照射したものから H_{13} を照射したものを差し引いたスペクトル

〔結果〕

モネンシンのような複雑な化合物の非等価なメチレンは400MHz NMRを使用してもSEL法による炭素のシグナルの帰属は困難である。最近 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ の二次元NMRを使用しているモネンシンの帰属が報告されているが、⁵⁾8、11、19位のメチレン炭素のシグナルは化学シフトの分離が悪く重なっているためそれぞれ区別されていない。しかし、SEL-INEPT法によればこの三本の近接したシグナルの区別が可能であった。

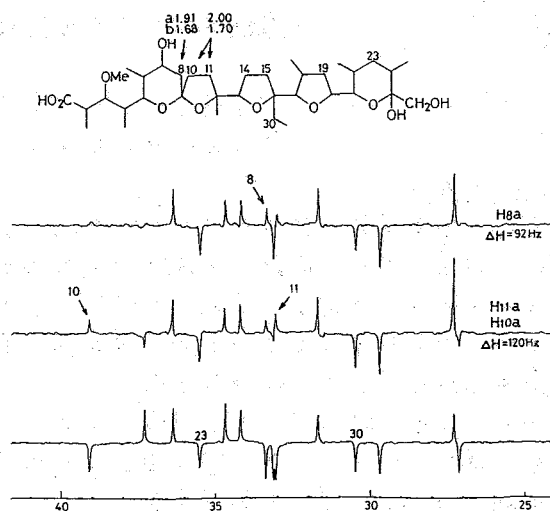


Fig. 8 モネンシンのSEL-INEPTスペクトル

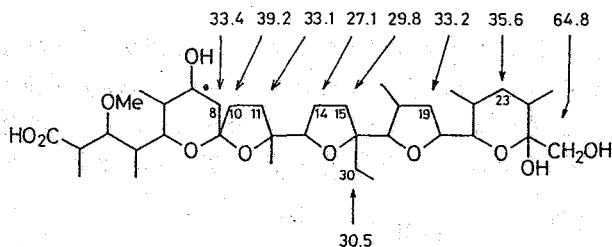


Fig. 9 モネンシンの ^{13}C -NMR 化学シフト

〔まとめ〕

SEL-INEPT法は非等価なメチレンプロトンが結合した炭素の帰属を行うための有力な手段であることが判明した。本方法の特徴は、(1)照射するプロトンは非等価なメチレンのいずれか一方でよく、従って分離の良い方のシグナルを選ぶことが可能であり選択性が増大する。(2)総ての炭素のシグナルが一重線であるため化学シフトの近接したシグナルであっても判別が容易となる。(3)更にINEPT法の感度の良さはそのまま保たれる。(4)80Hz以上離れた非等価なメチレンに適用可能である。化学シフトの差の少ないメチレンの場合は常法のSEL法がよい。(5)照射出力はSEL法よりも弱くすることが可能であり選択性をより高めることが可能である。

- 1) G. A. Morris & R. Freeman; J. Am. Chem. Soc., 1979, 101, 760.
D. H. Doddrell & D. T. Pegg; J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 6388.
- 2) H. Seto & N. Ōtake; Heterocycles, 1982, 17, 555.
- 3) M. J. O. Anteunis; Bull. Soc. Chim. Belg., 1977, 89, 367.
- 4) H. Seto, K. Mizoue & N. Ōtake; J. Antibiotics, 1980, 33, 979.
- 5) J. A. Robinson & D. L. Turner; J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1982, 148.

2

多核観測用固体高分解能NMR装置の開発とその応用

(日本電子) ○藤戸輝昭, 出口健三, 大内京城, 清水章三
(東北大金研. 大洗) 松沢孝男

1. はじめに

最近、固体高分解能NMR (CP/MAS) の分野においても、 ^{13}C 核の他に ^{29}Si , ^{31}P , ^{113}Cd , ^{209}Bi 等、多くの核種での測定が行なわれるようになって、その応用範囲がさらに広がってきつつある。溶液のNMRにおいては周波数可変型の多核観測用検出器 (フローブ) が普及しているが、固体高分解能用のフローブでは、回路上周波数可変範囲を広くすることはかなりむづかしかった。今回我々はこれを改良して1オクターブ (2倍) 以上の可変幅をもつフローブを考案し、数種の核で固体高分解能NMRの測定を行った。その際に直面した多核観測上の問題点と対策及びいくつかの測定例についても併せて報告する。

2. 装置

a) フローブ回路

固体の二重共鳴用に用いられるフローブ回路としては、低磁場 (100 MHz 用以下) 用には、LC共振回路を使用した Bartuska²⁾ の回路があり、高磁場に適したものとては、 $1/4$ 波長 (λ) ケーブルを使用する Cross³⁾ の回路がある。我々は後者の方式を元にして Narrow Bore β CM 用フローブを考案した。図1に Cross³⁾ の回路を示す。

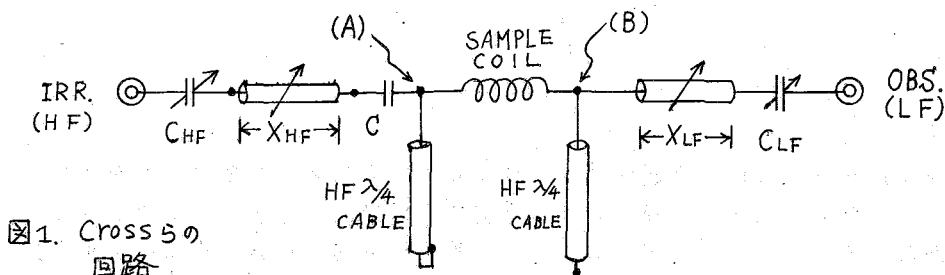


図1. Crossの回路

この回路の特徴は、①高周波 (HF) 用全ケーブルを使用することによって、一つのコイルで HF と LF に複同調することが出来ること、② HF, LF と同調用コンデンサがコイルからはなれたところにあり、スペースをとらないこと、である。欠点としては、① 50Ω の全ケーブルが観測用同調回路の高インピーダンス部 B 点にあるため Q の低下に伴う感度低下をおこす、② 周波数を変えるとインピーダンス整合 (マッチング) のためケーブル長 λ を変えねばならないことである。

我々はこの回路の欠点を克服するため、図2に示すような回路を考案した。この回路の特徴は、① 図1で B 点についていた全ケーブルを C 点に変えたこと、② マッチング用のコンデンサを高周波の入口側にとりつけて可変するようにしたこと、で

ふじとてゐるあき、でぐちけんぞう、おおうちむねき、しみずしょうぞう
まっざめたかお

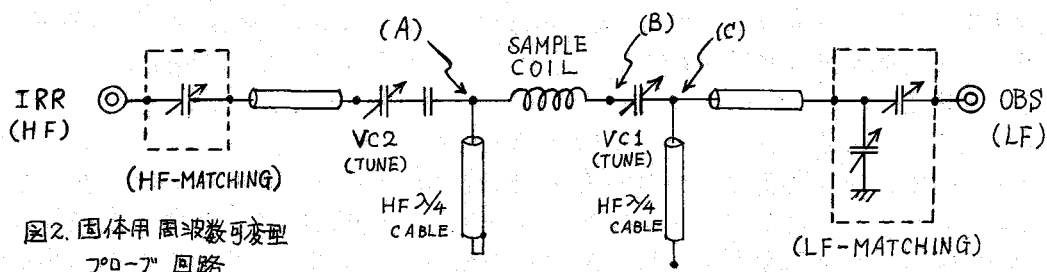


図2. 固体用周波数可変型
フローブ回路

である。これらの工夫によって次の点が改良された。

- ① 50Ω 全ケーブル使用による観測側のQ値の低下による感度低下がないこと。
- ② ケーブルの浮遊容量が入らないため周波数同調範囲の上限が高くなること。
- ③ マッチング回路がフローブ外部にあり、スペースが少なくてすみ、しかも各周波数で交換可能なこと。

b) 基本性能

今回の目的は Narrow Bore SCM用で、ハイパワー照射に耐え、しかも広域に周波数も可変出来るフローブを考案することであった。以下のように、このフローブは、十分この目的を満している。

- ① 周波数可変範囲：38 MHz ~ 110 MHz。200 MHz 装置で ^{29}Si ~ ^{31}P まで観測可能で、VC₁ を大きくすればさらに下方に広げることが可能。
- ② 高周波磁場の強さ： ^{13}C (50 MHz) で 60 Gauss (90°パルス幅 4 μsec), ^1H (200 MHz) で 15 Gauss (4 μsec)。ただし ^{13}C 500 W, ^1H 250 W パワーアップを使用している。
- ③ 感度： ^{13}C 観測時の感度はヘキサメチルベンゼンのメチル基 (10 回積算) で 150 であり、100 MHz 装置の 2.5 倍近くある。図3

は感度チェックのため 30 mg の $\beta\text{-CH}_3\text{-Guanosine}$ を overnight (16 時間) 積算したものである。この β/α から見ると数 mg 程度が ^{13}C での感度限界と考えられる。

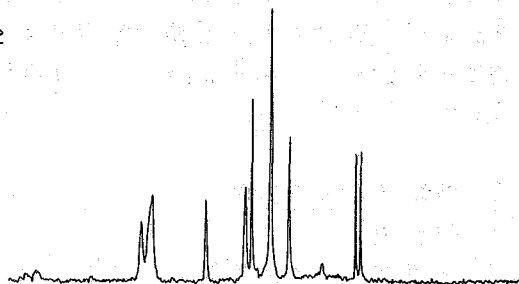


図3. 30 mg $\beta\text{-CH}_3\text{-Guanosine}$ の ^{13}C スペクトル

3. 多核観測上の問題点と対策

測定には JEOL FX200 を使用し、これに前述のフローブ及びハイパワーアップを併用した。また次のような方法を用いた。

a) 分解能調整

シリコンゴムを Magic Angle で回転させ、そのプロット上の FID を観測しながら、 γ 調整を行う事により線幅 15 Hz 程度 (^{13}C においては 4 Hz) が得られる。これは本測定に対しては十分満足する値である。

b) Magic Angle の設定と ハルトマン・ハーネ 条件の設定

角度調整は ^{13}C チャンネルにしてヘキサメチルベンゼンのフェニルシグナルを観測しながら行い、他の核に切りかえればよい。しかしハーネ条件の設定は観測核で行うしかない。直接観測核で調整する場合には ^{29}Si なら Hexamethylcyclotrisiloxane

を使用し、 ^{31}P の場合には Trimethyl phosphine 又は Trimethyl phosphine oxide を使用すれば角度調整も同時に行える。またこれらはそのまま EXT. Reference としても使用出来る。

C) スピンエングサイドバンド(SSB)とその除去。

200MHz 以上の装置で MAS 測定を行う場合に問題になるのは SSB が大きく表れてくることである。これは後述するように ^{31}P 観測においては特に顕著であり、3.5kHz 程度の回転数では Second side Band さえ表われる。異方性が 200ppm (16kHz) にも及ぶからである。この場合回転数を上げることが正攻法であるが限度があるので、Dixon³⁾ による SSB 除去法が用いられる。しかしこの方法はパルス系列が複雑であり使用しづらい。そのため我々は次のように2回の積算で一次の SSB を消す方法を用いた。そのパルス系列は図4のとおりである。

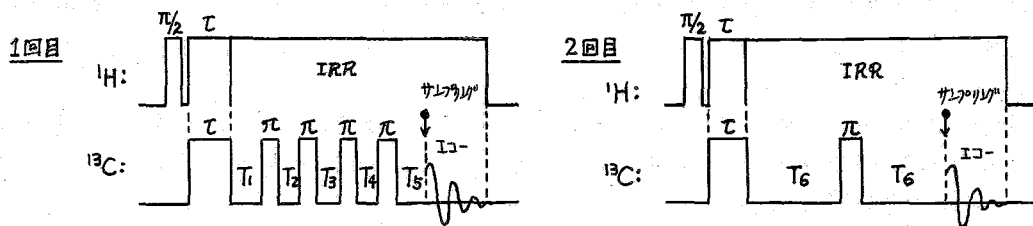


図4. 簡易型 SSB 除去パルス列

ここで各時間値は次の値である。

$$T_1 = 0.2098R - \pi/2, T_2 = 0.0804R - \pi, T_3 = 0.5R - \pi, T_4 = 0.9196R - \pi, T_5 = 0.2702R + \pi/2$$

$T_6 = R - \pi/2$, なお $R = (\text{回転数})^{-1}$ であり、いずれも単位は μsec である。このパルス系では、一次の SSB が除けないこと及び異方性の強い部分のシグナル強度が減少するの欠点があるが、方法が簡単であり、一次の SSB が見えな ^{13}C 観測には十分使用出来る。また ^{31}P に対しては回転数を上げ、一次の SSB のみに対してこの方法を併用すればよい。

4. 多核観測の応用例

a) ^{31}P 観測

^{31}P 観測例を図5及び図6に示す。積算はいずれも40回である。200MHz 装置で回転数3.5kHz 程度では SSB が非常に大きい。幸いなことに他のシグナルと重ならないの

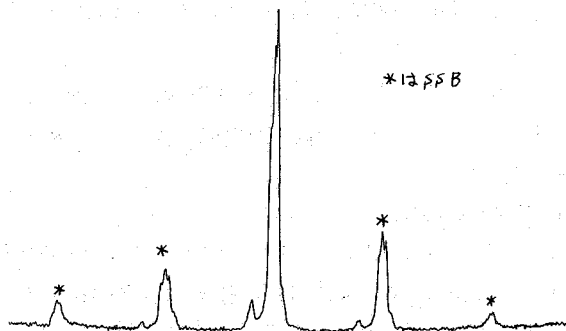


図5. トリポリリン酸の ^{31}P MAS スペクトル

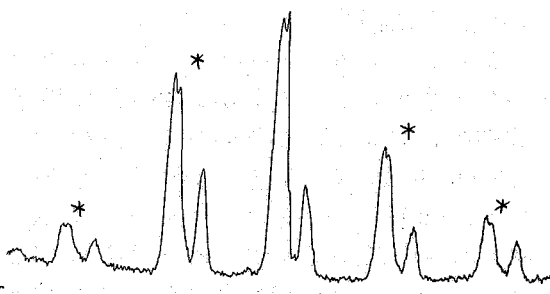
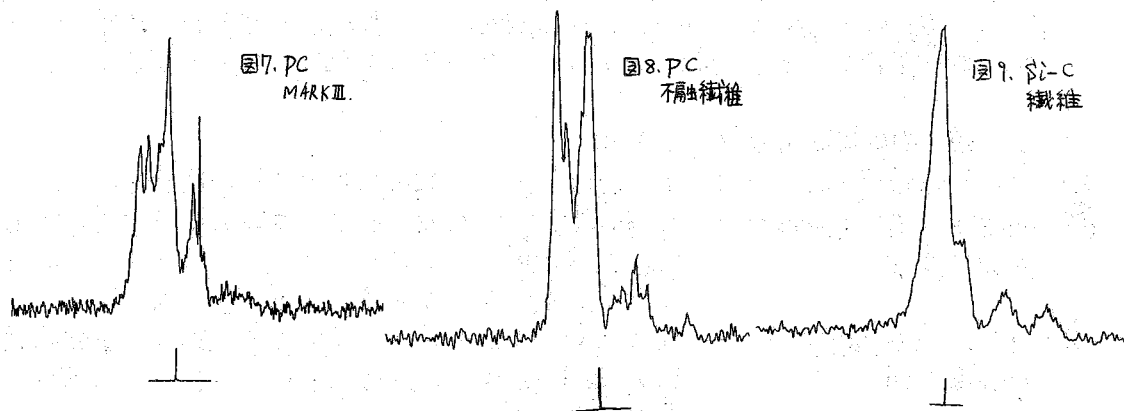


図6. ATP の ^{31}P -MAS スペクトル

で十分使用出来る。いずれも3個の ^{31}P シグナルが分離しており、トリホリリ γ 酸の場合には、3本以外にもピークらしいものが表われ、多量体形成時に一種以上のユニフオメーニヨンをもちものが出来ると考えられる。 ^{31}P は感度がよく、たとえば化合物中の濃度200ppm程度の微量のリ γ 酸塩でも overnight 積算で検出可能であり、 ^{31}P -MASは微量固体成分検出に有用であろう。

b) ^{29}Si 観測

^{29}Si は天然存在比が ^{13}C に比べて高く、シリコンポリマー等CP法が使える系では、感度は非常に良い。しかしセオライト等多くの無機系では、 ^1H と ^{29}Si との相互作用が弱くてCP法が使えず、通常の Gated decouple 法で測定を行わねばならないのでかなりの積算回数が必要となる。また Si-H 間の相互作用の強さがあると ^{29}Si への NOE 効果も変わってくるため、CP法が使える系に対し pulse saturation 法⁴⁾を使用すれば、下向きαピークが表れれども(γ比が負だから)とそうでないものが分離出来、解析に有効な手段となる。以下に ^{29}Si -MASの測定例として、ポリカルボシラン(PCと略す)⁵⁾及びそれを原料とした炭化ケイ素繊維のスペクトルを示す。図中の



上はシリコンゴムの位置を示す。PC III は $(-\text{Si}(\text{C}_6\text{H}_5)_2-\text{CH}_2-)_n$ と少量の $(-\text{Si}(\text{C}_6\text{H}_5)_2)_2\sim 8$ 及び $(-\text{Si}(\text{C}_6\text{H}_5)_2-\text{O}-)_n$ が存在することが分っているが、

PC 不融繊維及び Si-C 繊維についてはくわしいことは分っていない。

キエアリゲルによって Si-H が酸化されて架橋構造を作り、Si-O-Si や、Si-O-C が形成される過程が反映されていると思われるが詳細については究明中である。

文献

- 1) V.J. Bartuska, G.E. Maciel: J. Magn. Reson. **42** 312 (1981)
- 2) D.R. Cross, R.K. Hester, and J.S. Waugh: Rev. Sci. Instrum. **47** 1486 (1976)
- 3) W.T. Dixon: J. Magn. Reson. **44** 220 (1981)
- 4) 藤戸輝昭, 出口健三, 大内京城, 今谷 司, M.J. Albricht: 第20回 NMR 討論会, p68 (1981)
- 5) Y. Hasegawa, M. Imura, S. Yajima: J. Mater. Sci. **15** 720 (1980)

(日本電子) ○大内宗城 小作富雄 樋口啓一郎

C-13等、異種核間の結合を持つ核の測定においては、種々のデカップリング方法、つまり、ノイズ変調 (noise modulation) 矩形波位相変調 (square wave phase modulation), chirp frequency modulation 等を使用し、広域デカップリングを行なっている。昨年、我々は、本討論会で、MITのProf. J. Waughと、広域デカップリングについて発表した²⁾。最近、Oxford univ. の Doctor R. Freeman らが、composite pulse を使用したデカップリング法を発表した²⁾。また、Waugh も、理論的に最高のパルスデカップリング法を発表した³⁾。しかし、この二種類とも、測定条件が非常に困難であり（特に composite pulse を使用したもの）、実用上多少の問題点を持っている。我々は、この composite pulse と square wave phase modulation の長所を取り入れ、簡単で、しかも、条件選択のいらない新しいデカップリング法を開発したので報告する。

(一) 種々の広域デカップリング法

- ① noise modulation ----- random noise sequence を使用している。
- ② square wave phase ----- t_s 時間ごとに 180° 位相の異なる矩形波 (square wave) を使用し、デカップリングを行なう。これは $f_0 \pm (2n+1)f_s$ の成分より成っている。
- ③ chirp frequency ----- $f_0 \pm n f_c$ のサイドバンド成分より成り、中心周波数の $f_0 \pm f_x/2$ の外のサイドバンドは、急激に減衰している。
- ④ composite pulse ----- 基本的には、 $90^\circ x 240^\circ y 90^\circ x 90^\circ x 240^\circ y 90^\circ x$ のパルスで、デカップリングを行なうものである。
この方法を改良し $R=90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$, $\bar{R}=90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ とし、RRRR か これを 64 サイクルで回転するものがある。
- ⑤ waugh の方法 ----- 昨年、本討論会で 発表したように、スピンハミルトニアンを計算し、理論的に最高のパルス系列を使用し、デカップリングを行なっている。そのパルス系列は
- $\overline{8} \overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5} \overline{3} / \overline{4}$ $\overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5} \overline{3} \overline{5} \overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5} \overline{3} / \overline{4}$ $\overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5}$
- $\overline{8} \overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5} \overline{3} / \overline{4}$ $\overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5} \overline{3} \overline{5} \overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5} \overline{3} / \overline{4}$ $\overline{8} \overline{8} \overline{3} / \overline{4} \overline{3} \overline{5}$
- である。(ただし、数字は 90° パルスの数である。たとえば、3 は 270° パルスである。数字上の一は位相が 180° 変化している。)

おおうち おねき

こさく とみお

ひぐち けいいちろう

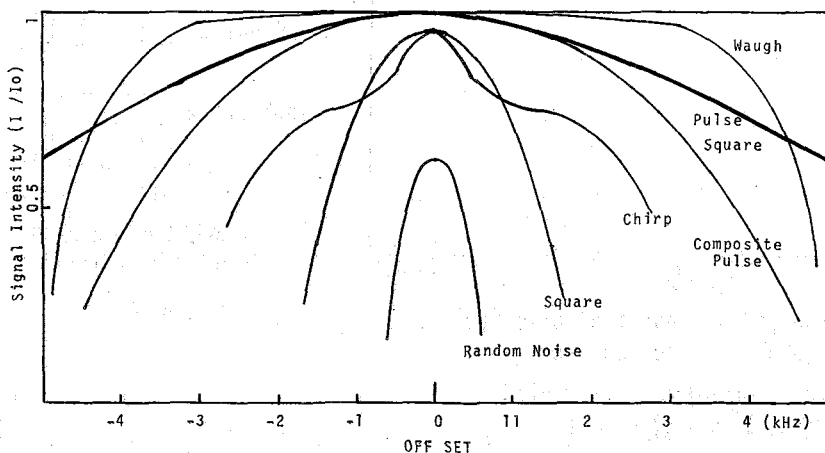
④ Pulse and Square wave 方法

我々は、前述パルスデカップリングに square wave modulation を併用することにより、デカップリング効率を上げることに成功した。そのパルス系列は、 $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- で位相の反転を square wave のタイミングを使用し行なっている。

また、このパルス系列のかわりに、 $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- 等を使用することも可能であり、このパルスを変化させることにより、ある程度広域デカップルの範囲を選択することが可能である。

この $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- の pulse and square wave 方法の square wave を取り除くと、composite pulse decoupling となる。 $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- は、 $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- $90^\circ x 180^\circ y 90^\circ x$ ----- より 広域デカップリングが可能である。

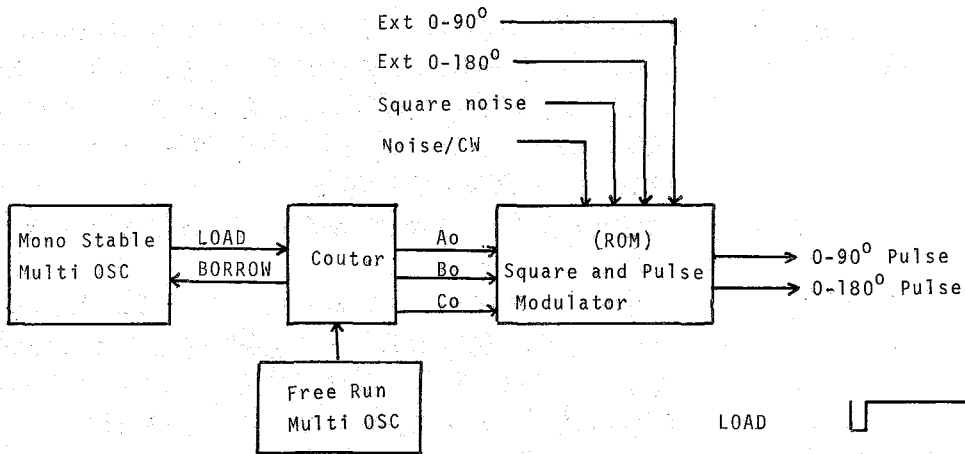
それぞれの広域デカップリングの効率の概念図を示す。



1H のケミカルシフトの中心よりの OFF SET

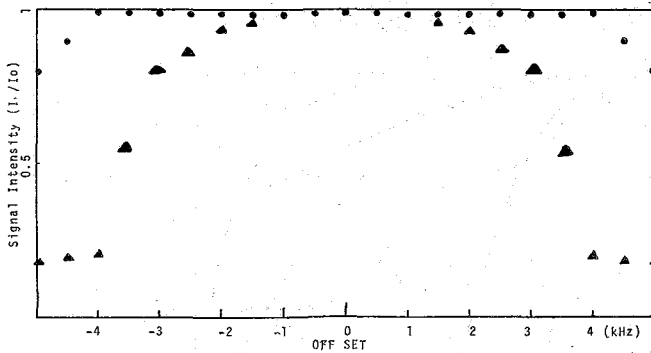
(二) 実験方法

デカップリングの効率チェックに使用したサンプルは、内径 5mm の球に、 ^{13}C をエンリッチした $HCOOH$ を入れ、これを 10mm OD 管の中に封入した。使用した装置は、GX 400 および FX 90 Q で、デカップリング用パルスは PG 200 および、次図のような回路より発生した。この時のタイムチャートも図に示す。



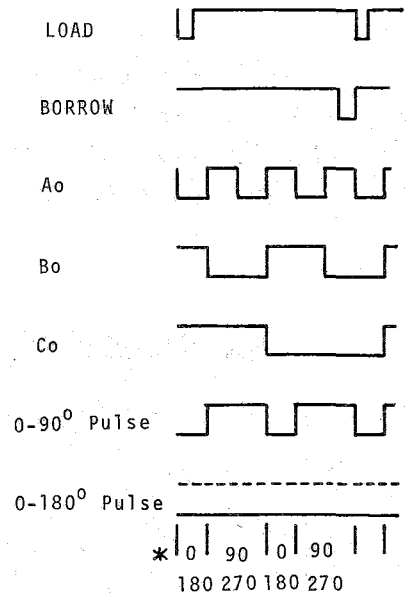
(三) 実験結果

照射パワー ($\delta H_z / 2\pi$) の時の照射効率を下図に示す。



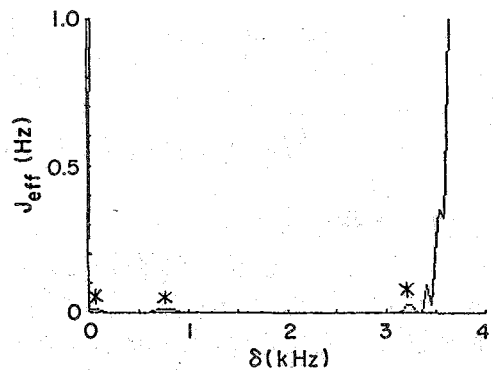
● $90^\circ 180^\circ 90^\circ 180^\circ 90^\circ \dots 90^\circ 180^\circ 90^\circ 180^\circ 90^\circ \dots$
 ▲ $90^\circ 180^\circ 90^\circ \dots 90^\circ 180^\circ 90^\circ \dots$

このように pulse と square wave を併用すると、照射効率が大幅に増大する。この理由として、昨年本討論会で発表した Waugh のデカップリング理論によると、右図のように pulse decoupling では residual coupling があるが、この小さな residual coupling を square wave のタイミングで、パルスの位相を変えることにより、消去しているものと考えられる。



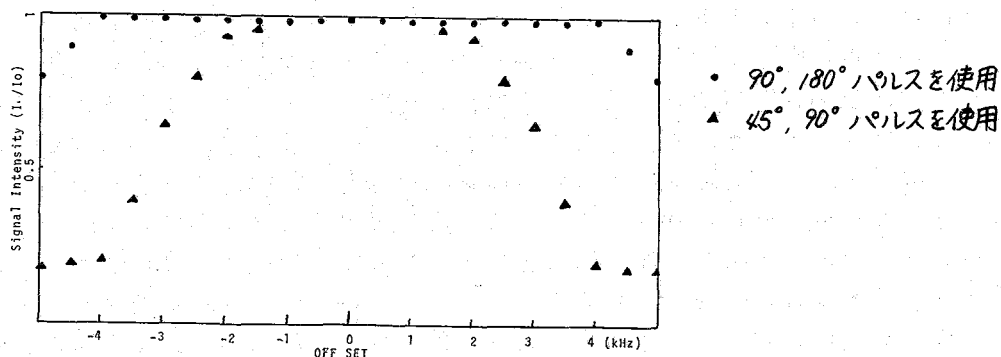
* この位相切り換えは square のタイミングを使用する。

タイムチャート

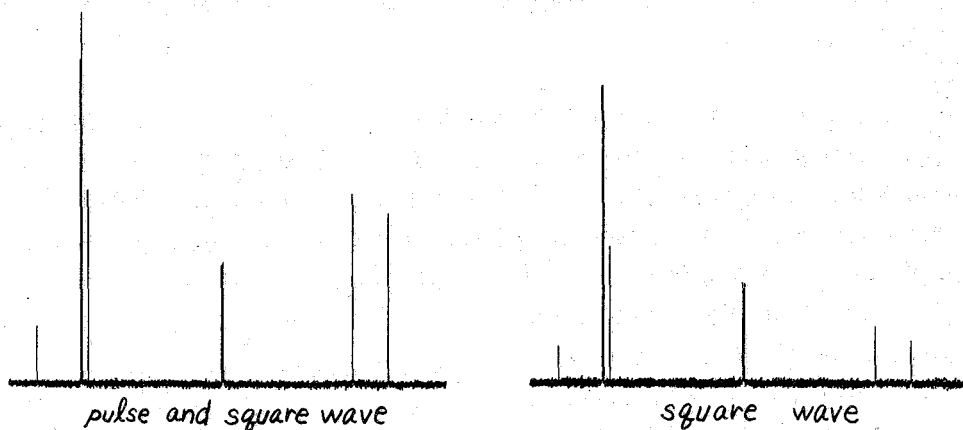


* residual coupling

又、composite pulseを使用したデカップリングでは、 90° , 180° 等のパルス幅が、約10%変化すると、デカップリング効率が、悪くなる欠点がある。しかし、pulse and square wave decouplingでは、下図のようにあまり変化がない。



この pulse and square wave decoupling の応用データを示す。



故意に、照射周波数を 中心より +2 KHz ずらしている。

(四) まとめ

種々のデカップリング方法を使用することにより、400MHz 以上の装置でも十分広域デカップリングが可能である。また、この pulse and square wave decoupling 法では、条件選択がほとんど不要であり、簡単に使用できる。

- 1) J.S.Waugh, M.Ohuchi, K.Higuchi, K.Goto and C.Charles 昨年本討論会発表
- 2) M.H.Levitt and R.Freeman J. Magn. Res. 43, 502 (1981)
- 3) J.S.Waugh J. Magn. Res. (1982)
- 4) V.J.Basus, P.D.Ellis, H.D.W.Hill and J.S.Waugh J. Magn. Res. 35 19(1979)

4

Multi Nuclei Surface coil

— ラットの ^{31}P 測定における生存酸素濃度の追跡 —

(新潟大 脳研) 宮武 正 湯浅龍彦 桑原武雄

(日本電子) ○江口恵二 鴨 修 梅田雅宏

NMRを用いて生きた生物そのものを研究する上で対象となり得る核としては ^1H , ^{13}C , ^{23}Na それに ^{31}P があげられる。中でも ^{31}P -NMRは生体中に含まれる高エネルギーリン酸化合物を短時間内にしかも同時に定量測定できることから生物研究の標準的方法となってきた。これまでにIntactな状態で研究された代表的なものとしては、Moon-Richards等の赤血球の例¹⁾ 昨年本討論会で今井らが発表した様に摘出したモルモットの心臓に人工塩類溶液を灌流しながら測定した例^{2,3)}

Ackerman等による手術等の外科的処置を施すことなく観測部表面に挿入コイルを設定するいわゆるSurface coil法を用いたラット脚筋や脳の研究例があげられよう。⁴⁾ 特に後者の例では、局部障害や虚血の結果生じる代謝物の変化追跡に主眼が置かれていた。我々は生体中で重要な ^{13}C , ^{23}Na , ^{31}P -NMRが観測できるMulti Nuclei Surface coilを用いて、小動物(小鳥, ウィスターラット等)の生存状態における各部位の測定を行っているが、今回 ^{31}P Surface coil法を用いてウィスターラットの脳を観測しながら生存酸素濃度を追跡したところ興味ある結果が得られたので報告する。

実験

実験にはJEO L FX 270, 54 mmボア径, SCMを用いた。Multi Surface coilの作製には、50 MHz ~ 110 MHzまでの同調可変幅を持つようにした。そのCoilの大きさは小動物の脳の大きさを考慮し、直径10 mm 3回巻巻き型としてプローブに取付けた。プローブ側での同調は図1に示すような回路を使用しその同調はコンデンサ(C_1)を可変して行う方式を採用した。

このCoilを使用した時、 ^{31}P の90°パルスはCoil面から5 mm離れた位置で20 μsec 分解能は直径10 mmの卵型管に詰めた1 % H_3PO_4 で15 Hz程度が得られた。実験に用いた小動物は体重150 g前後の雄ウィスターラットであり、静止させるため麻酔剤としてハロセン(CF_3CHBrCl)を使用した。ラットの全身はプローブに固定し顔面にはマスクをかぶせて常時麻酔剤を供給できるよう工夫した。(図2) 酸素と窒素ガスの混合比は流量調整器を用いて制御した。

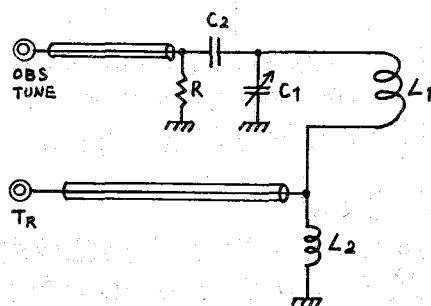


図1 Surface coilの同調回路

1) 麻酔剤効果の条件

酸素濃度は大気とほぼ等しい20%とし麻酔剤ハロセン濃度を0% ~ 3%変化してその効果を検討した。NMRの条件は、パルス幅 20 μsec , 観測範囲 10 KHz, 2 K みやたけ たけし ゆあさ たつひこ くわばう たけし えぐち けいじ かも おさむ うめだ まさひろ

Point, 繰り返し時間 2 sec, 250回の積算を行った。(8.3分積算) ^1H デカップリングは行っていない。麻酔効果の時間経過のスペクトルは自動測定で得た。

2) 生存酸素濃度の追跡条件

酸素濃度を種々変化させその生存過程を検討した。酸素濃度の変化時には待ち時間2分間とした。NMR条件は麻酔剤効果を用いた条件と同じにしている。データはコンボリューション差法を用いない通常の方法で自動処理した。 ^{31}P ケミカルシフトと定量の為に2mmφキャピラリーを用いたHMPA溶液をSurface coilに固定し同時に測定できるようにした。

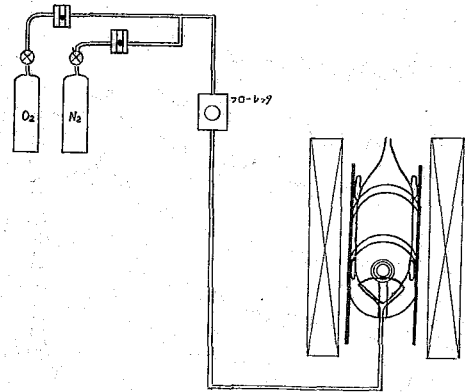


図2 実験様式

結果

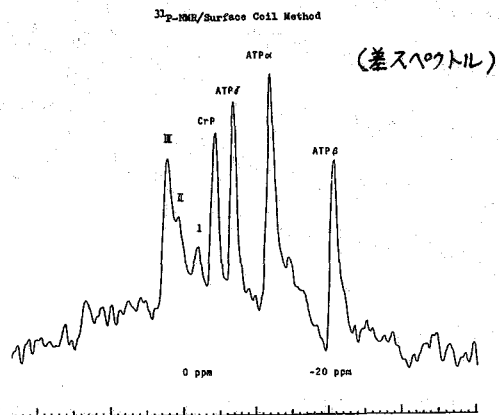
1) 麻酔剤効果 (動物静止濃度)

図3に前記方式により得られた雄ウィスターラットの脳の ^{31}P -NMRスペクトルを示す。スペクトルはATP (α , β , γ), クレアチンリン酸 (CrP), ホスホジエステル (I), 無機リン (II), 糖リン (III) とすでに帰属されている。

麻酔剤ハロセン濃度効果のNMRスペクトルに1%以下ではパターン変化は見られず2%以上で無機リンの近傍が変化した。さらに3%まで濃度を上げるとクレアチンリン酸のピークが減少し無機リンが増加した。尚0.5%では麻酔効果は現われなかった。このことから死亡に至らしめないでNMR測定に支障のない最適濃度は1%であった。

2) 生存酸素濃度の追跡

図4に1%ハロセン麻酔下で酸素濃度を変化させたスペクトルを示す。このスペクトルは酸素濃度20%から3%までATPレベルの変化は見られず3%濃度にて長時間放置すると徐々にクレアチンリン酸 (CrP) が減少し無機リン (II) 強度が増加した。1%まで酸素濃度を下げて



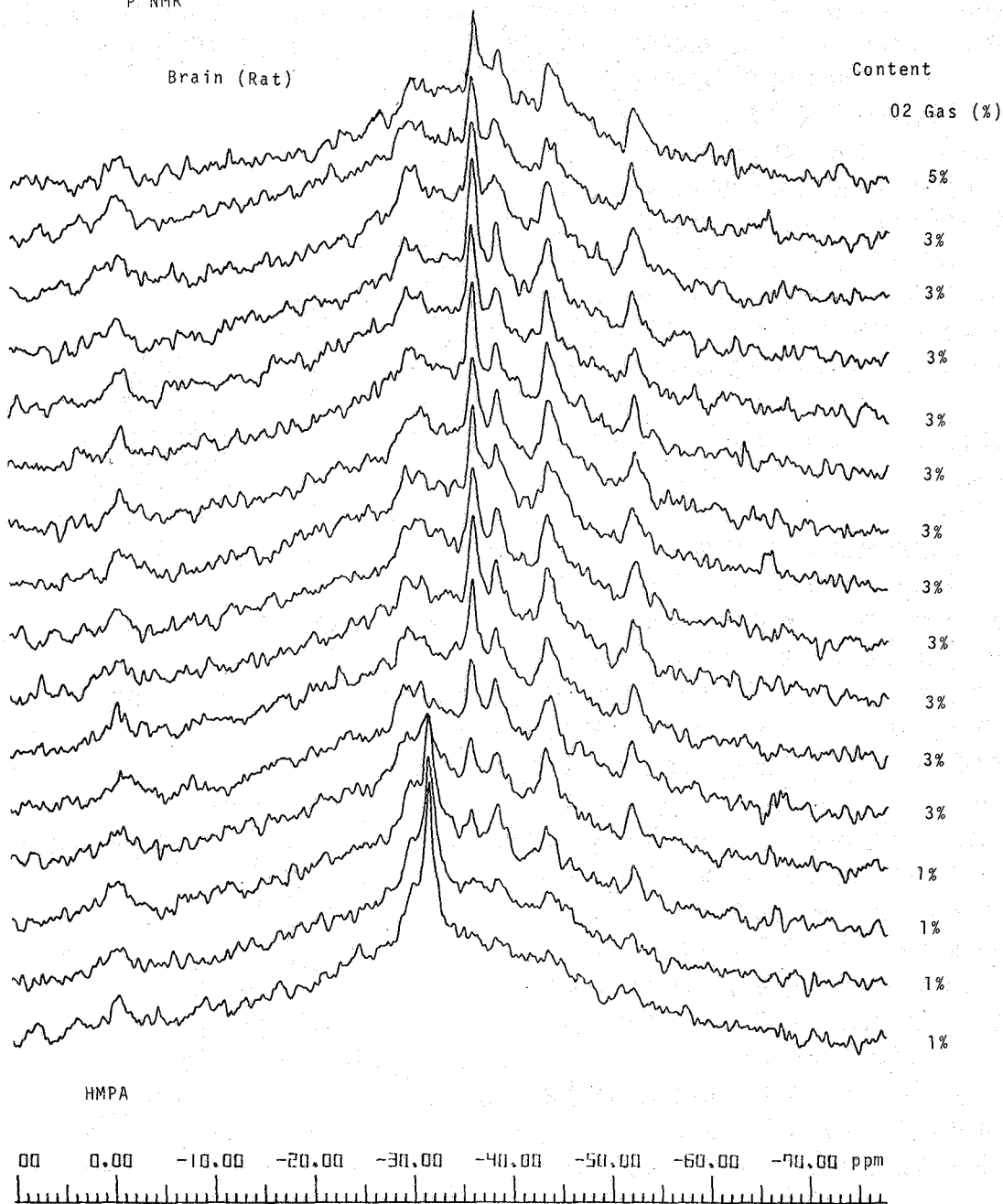
^{31}P NMR spectra obtained at 109.15MHz from a live anesthetized male Wistar rat brain.

- I phosphodiester
- II inorganic phosphate and the 2-phosphate of 2,3-diphosphoglycerate
- III sugar phosphates and the 3-phosphate of 2,3-diphosphoglycerate

図3

いくと両者は急激に増減し約25分後にATPの消滅が見られ検視の結果死亡していることが判明した。8匹のウィスターラットの実験を行った結果個体差でのバツキはあるが5%と3%の酸素濃度で約1~2時間生存することが確認された。

^{31}P NMR



^{31}P NMR spectra obtained at 109.19MHz from
a live anaesthetized male wistar rat Brain.

図 4

考察

Surface coil は Intactな状態で観測部位を接扶的に測定することができる利
点がある。今回我々が行ったように小動物の脳に限定して生存酸素濃度の追跡がで

さることを見いだした。動物の死亡認定には医学的な見知から心臓の鼓動、停止や脳波消滅などがあるが ^{31}P -NMR / ATPレベルの追跡による方法も採用できる可能性があると期待される。さらに心電図等の医療機器との相関関係が検討されればより明確な結果が得られると思われる。この方法は今後医学、生化学方面への応用として病態小動物の損傷の有無、薬理作用の追跡等の研究に有益となるだろう。

文献

- 1) Moon, R.B., Richards, J.H.: J. Biol. chem, 248, 7276(1973)
- 2) 今井, 仲沢, 片野, 秘下, 大内, 梅田 第20回NMR討論会 p189(1981)
- 3) Hoult, D.I., Busby, S.J.W., Gadian, D.G., Radda, G.K., Richards, R.E., and Seely, P.J.: Science, 225, 285(1974)
- 4) J.J.H Ackerman, T.H.Grove, G.G.Wong, D.G.Gadian and G.K.Radda
Nature, Vol 283, 167(1980)

<はじめに>

パルスフーリエ変換NMRのパルス系列をいろいろ変えた応用測定が最近注目されている。本研究ではその応用測定のひとつとして、異種核の2-スピン系の緩和の中でこれまで測定が困難であった非対称緩和を、INEPT法を応用して求めた。

<2-スピン系の緩和>¹⁾

化学結合した2種類の核(この場合 ^1H - ^{13}C)を含む系を考える。このような系を静磁場中に置いた時、各エネルギーレベルは図1のように分裂する。各レベルを1, 2, 3, 4とすれば、 ^1H と ^{13}C の α , β 2つの状態は各2つのレベルで図のようになる。

各レベルの占有数を $N_1 \sim N_4$ とし、各レベル間の遷移確率 W を図のように表わせば、 N の時間変化は、

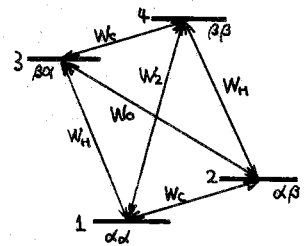


図 1

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_1 \\ N_2 \\ N_3 \\ N_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(W_c + W_n + W_2) & W_c & W_n & W_2 \\ W_c & -(W_0 + W_c + W_n) & W_0 & W_n \\ W_n & W_0 & -(W_0 + W_c + W_n) & W_c \\ W_2 & W_n & W_c & -(W_c + W_n + W_2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_1 - N_1^0 \\ N_2 - N_2^0 \\ N_3 - N_3^0 \\ N_4 - N_4^0 \end{pmatrix} \dots (1)$$

と表わせる。右肩の添字の0は熱平衡状態を示す。(以下の式も同じ)

ここで、

$$\begin{aligned} m_c &= N_1 - N_2 + N_3 - N_4 \\ m_n &= N_1 + N_2 - N_3 - N_4 \\ m_0 &= N_1 - N_2 - N_3 + N_4 \end{aligned} \dots (2)$$

と表わし、

$$\begin{aligned} \rho_c &= W_0 + 2W_c + W_2 \equiv 1/T_{1c} \\ \rho_n &= W_0 + 2W_n + W_2 \equiv 1/T_{1n} \\ \sigma &= W_2 - W_0 \equiv 1/T_{1ch} \\ \mu &= 2(W_c + W_n) \equiv 1/T_{10} \end{aligned} \dots (3)$$

と置けば

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} m_c \\ m_n \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \rho_c & \sigma \\ \sigma & \rho_n \end{pmatrix} \begin{pmatrix} m_c - m_c^0 \\ m_n - m_n^0 \end{pmatrix} \dots (4)$$

$$\frac{d}{dt} m_0 = -\mu m_0 \dots (5)$$

たけむらしんじ・ひきちくにお

が成り立つ。 n はレベル間の占有数の差だから、観測された磁化の大きさに比例する。従って、 $\rho_c, \rho_H, \sigma, \mu$ を測定すれば各遷移確率 W が求まる。

<Inversion Recovery 法による ρ_c の測定>

(4)式の連立微分方程式を厳密に解くのは難しいが、ある条件下でなら簡単に解ける。 ^1H デカップルした状態で ^{13}C の緩和をInversion Recovery法で測定する場合がそれである。パルス系列は図2のようになり、すべての時間 t にわたって $M_H=0$ であるから、

(4)式は、

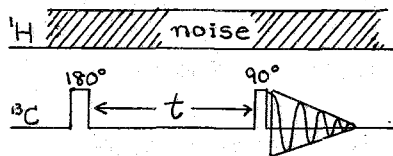


図 2

$$\frac{dn_c}{dt} = -\rho_c(m_c - m_c^0) + \sigma n_H^0 \quad \dots (6)$$

と書き直せる。

$n_H^0 = (r_H/r_C) n_C^0$ を用いて、初期条件 $t=0$ で

$$m_c(t=0) = -(n_c + \frac{\sigma}{\rho_c} n_H^0)$$

であることを利用して(6)式を解くと、

$$m_c = m_c^0 \left(1 + \frac{\sigma r_H}{\rho_c r_C} \right) (1 - 2e^{-\rho_c t}) \quad \dots (7)$$

が導かれる。観測値を $t=\infty$ の値で規格化し、対数の直線回帰の傾きから ρ_c を求めればよい。

ρ_H の方も原理的には ^{13}C デカップルの条件下で測定できるが、自然状態では ^{13}C は ^{12}C に比べて1%程度しか存在しないので、現実には、上のように簡単にはいかない。²⁾INEPT法を応用した簡便な方法が報告されているが、文献名を紹介するにとどめる。

<Dynamic NOE 法による交差緩和 σ の測定>

(7)式中の σ は、規格化により消去されてしまうので、上記の方法では求めることができない。(7)式のうち、 $(1 + \sigma r_H/r_C)$ は、デカップルによるNOEの効果だから原理的には、デカップルした場合としない場合の ^{13}C の強度差から計算できるが、本研究

では正確さを期すため図3のパルス系列を用いた。

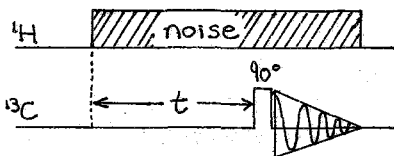


図 3

待ち時間 t の間にNOEが起こる。 $t=0$ では平衡状態 $m_c(t=0) = m_c^0$ であり、 $t=\infty$ ではNOEが完全に起こった ^1H デカップルの状態 $m_c(t=\infty) = m_c^0 (1 + \sigma r_H/r_C)$ である。

時間 t の間は、デカップルされているから(6)式が成り立つ。これに初期条件を入れて解けば、

$$m_c = m_c^0 \left\{ \frac{\sigma r_H}{\rho_c r_C} (1 - e^{-\rho_c t}) + 1 \right\} \quad \dots (8)$$

となり、観測値を $t=0$ の値(すなわちNOEの効果のないもの)で規格化し(これにより σ が消去されることはない)、計算機で非線形最小二乗法を用いて $\sigma r_H/r_C$ と ρ_c とを同時に求める計算をする。

<INEPT法>3)

INEPT法は、 ^1H の大きい磁化を ^1H などの感度の低い核に移して、相対的に感度をあげて観測する方法である。そのパルス系列を図4に示した。

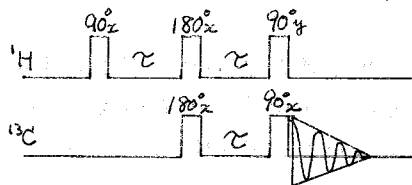


図 4

磁化が移る効果(Polarization Transferという)は図における待ち時間 τ を $1/4J$ sec (J は ^{13}C - ^1H の結合定数)にした時最大で、 ^{13}C - ^1H 2-スピン系ではダブル、トリプルピークシングルパルスに比べて、強度の絶対値の合計は $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}}$ 倍になる。ただし、 ^1H の α, β 状態により分裂した2本のピークは、 180° 位相が逆転する。すなわち ^1H の3番目のパルスの直後は、

$$M_{\text{C}\alpha} = N_1 - N_2, \quad M_{\text{C}\beta} = N_3 - N_4 \quad (\alpha, \beta \text{ は結合した } ^1\text{H} \text{ の 2 つ の 状態})$$

を定義しておくと、

$$n_{\text{C}\alpha} = \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{C}}} n_{\text{C}\alpha}^0, \quad n_{\text{C}\beta} = -\frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{C}}} n_{\text{C}\beta}^0 \quad \text{----(9)}$$

となる。

<INEPT法を応用した非対称緩和 μ の測定>

μ を求めるには、これまで、 ^1H ソフトパルスを用いて、 ^{13}C の α, β のどちらか一方と結合している ^1H だけを 180° パルスで逆転させる方法しかなく、装置上の問題もあって実験的に困難であった。

上述のようにINEPT法では、もしも ^1H の α, β によらず、 ^{13}C の磁化が 180° 逆転しているの、今回これを応用した図5のようなパルス系列で非対称緩和を測定した。

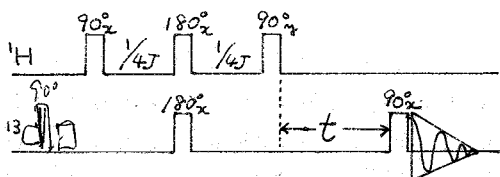


図 5

$\tau=0$ で ^{13}C の占有数の差は(9)式のようになっている。 $\tau=\infty$ では平衡状態に戻って、

$$n_{\text{C}\alpha} = n_{\text{C}\alpha}^0, \quad n_{\text{C}\beta} = n_{\text{C}\beta}^0$$

となる。尚、 $n_{\text{C}\alpha} = n_{\text{C}\beta}$ である。

$n_{\text{C}\alpha}$ と $n_{\text{C}\beta}$ の差が n_0 であるから、(5)式を $\tau=0$ での(9)式の条件で解けば、

$$n_0 = \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{C}}} n_{\text{C}\alpha}^0 e^{-\mu\tau} \quad \text{----(10)}$$

となり μ が求まる。実験的には、 $\tau=0$ の値を規格化し対数の傾きから計算する。

<実験>

本研究では簡単な ^{13}C - ^1H 2-スピン系のモデルとして蟻酸ナトリウム HCOONa を用いた。試料は重水溶液にし、溶けこんでいる O_2 の効果をなくするため、窒素でバブリングしながら沸騰させた。

装置はJEOL製のFX-60Qで、測定はすべて室温である。 ρ_{C} はいわゆる ^{13}C のT1で、測定装置のプログラムで自動的に求まる。 μ は、計算機で最適なパラメーターとして外挿して計算した。 μ は、線形の最小自乗法で、直線の傾きから計算できる。

〈結果〉

図6に図5の14ル系系列を用いて測定した結果を示す。図7は、 M_α と M_β の差を同じスケールの時間軸に対してプロットしたものである。この曲線は確かに単一緩和で、対数プロットは少ない誤差で直線になった。いずれも $t=0$ の値で規格化した。

ρ_H は、本研究で用いた装置では13デカッフルできないので測定できなかった。試料は液体なので、extreme narrowing case とみなし、 $\rho_H = \rho_C$ と仮定して計算した各々の W の値を表1に載せた。

表 1

ρ_C	0.0513 S ⁻¹	W_0	—
ρ_H	0.0513	W_2	0.0857 S ⁻¹
σ	0.0337	W_C	0.0843
μ	0.0843	W_H	0.0843

〈結論〉

4)

表1の結果は理論とは一致しない。また表には載せなかったが絶対値は小さいものの W_0 の値は負になつてしまつた。

これらの結果の大きな原因のひとつは脱気が充分ではなく、試料中に O_2 が残っている可能性があるということ。また、果たして $\rho_H = \rho_C$ として良いのかどうかということがあげられる。

本稿執筆時点ではまだ結果ができていないが、もっと徹底的に脱気したり、 ρ_H を求める方法を模索中であるので、これら最新の結果も含めせて紹介したい。

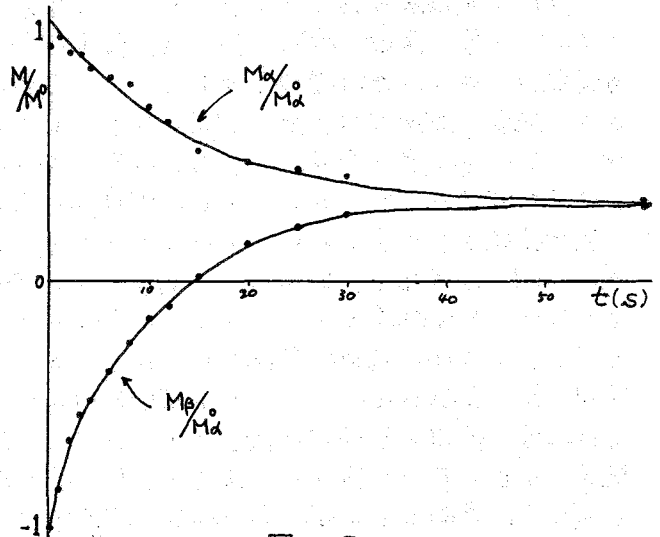


図 6

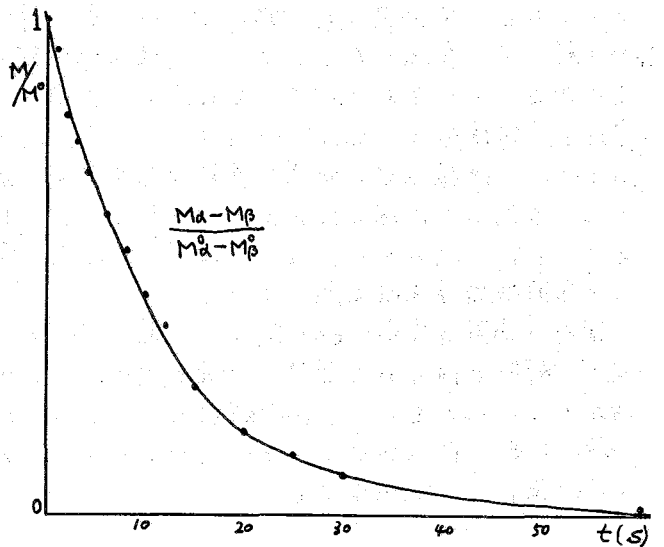


図 7

- REF. 1) C.L. Mayne, D.W. Alderman, and D.M. Grant, J. Chem. Phys., **63**, 2514 (1975).
 2) G.A. Morris, J. Mag. Res., **41**, 185 (1980).
 3) D.T. Pegg, D.M. Doddrell, W.M. Brooks, and M.R. Bendall, J. Mag. Res., **44**, 32 (1981).
 4) I. Solomon, Phys. Rev., **99**, 559 (1955).

(電総研) 亀井 裕孟

NMR映像法の¹⁾進歩は目覚ましく、映像法の最初の試みかなされてから10年足らずで、医学、医療の分野では、既に臨床評価の段階に入っている。NMR映像法の特徴は、単に物理的情報だけでなく、化学的情報をも非破壊的に取り出せる点にある。現在、NMR映像法で測定の対象としている核は、生体中の水のプロトンであり、それらの量の分布、 T_1 , T_2 の分布、あるいはそれらの混じり合った信号強度の分布を映像化している。これらは間接的には化学的情報を含んでいるが、主として物理情報を取り出しているとみてよからう。生体内でおこるさまざまな生化学的過程に関する情報を、*in vivo* 計測によって得ることができれば、生体機能を理解する上で、大変都合がよい。また、病変等も一次的には化学的過程の変化によっておこり、二次的に物理的变化が現われるとみることかできる。そこで、生体などの不均一系の各部位について、高分解能NMRスペクトルが得られるならば、それからは化学的情報を直接的に抽出できるので、生体機能を理解したり、病変を早期に発見する上で大いに役立つであろう。生体中の局所的な高分解能スペクトルを得る方法として表面コイル法、局所磁気共鳴(TMR)、交流磁場勾配法がある²⁾。

表面コイル法は、高周波磁場に勾配をもたせ、特定の領域の信号のみを検出する手法である。TMRは局所的に均一度の高い静磁場領域をつくりその部分の信号のみを検出する方法である。また、交流磁場勾配法は、静磁場に交流的に変動する勾配を加え、その反変に相当する部分で、磁場が変動しない領域の信号のみを取出す方法で、映像法の sensitive point 法と同様の方法である。したがって、これらの手法は、映像法での磁場焦点法に相当する。高周波磁場勾配を利用する手法としては、表面コイル法のほかに、回転系ズームマトグラフィ³⁾がある。これは高分解能スペクトルを得るのではなく、通常の映像法と同様に、スピン密度分布等を得るために高周波磁場勾配を用いている。

演者は高周波磁場勾配を用いて、高分解能スペクトルの空間分布を、比較的高い空間分解能で得られる手法の開発を試みた。この手法は信号強度に、位置に関する情報をもたせるもので、高分解能スペクトルを求める上記手法との対比でみれば、一種の投影-再構成法ということかできる。ここでは、予備的実験を行ったので、その結果について報告する。

方法

静磁場 H_0 は均一であるとする。したがって、得られる周波数情報からは化学シフト、スピン結合定数は求めることかできる。簡単のために一次元での空間分解を考える。高周波磁場 H_1 に x 方向の勾配を加える。スペクトル全領域を V_s とし、 $\gamma(H_1 + G_1 x) \gg 2\pi V_s$ とする。幅 tw の高周波パルスを加えると、 x における磁

かめい ひろたけ

化の章動角は $\gamma (H_1 + G_1 x)$ t_w である。共鳴周波数 ν_i の成分の位置 x における信号強度 A_{ix} は

$$A_{ix} = c N_{ix} \sin \gamma (H_1 + G_1 x) t_w \exp(-t/T_{2i}) \quad (1)$$

で与えられる。ここで N_{ix} は x において ν_i の信号を与えるスピンの数、 T_{2i} は ν_i の共鳴線を与えるスピン系の T_2 、 c は核種、装置、温度など測定条件によって定まる定数である。実際に観測される信号強度は (1) 式の x について積分で与えられる。いま、 t_w を系統的に変化させて、信号を観測すれば、それらから、 x 軸上の各点における ν_i の共鳴線の信号強度を求めることができる。すなわち、 x 軸上の各点における高分解能スペクトルを得ることができる。空間分解能は測定回数に依存する。二次元分布を求めるには、 x 方向勾配について、 y 方向勾配を加えることによって、位相エンコーディングし、これをデコーディングすることによって二次元断層高分解能スペクトルを得ることができる。

装置

使用したスペクトロメータは日本電子 PS-100 型で、パルス NMR に改造してある。プローブは勾配が加えられるように、トランスミッタコイルを改造した。トランスミッタコイルの形状を図 1 に示す。観測周波数は 100 MHz、磁場一周波数 10

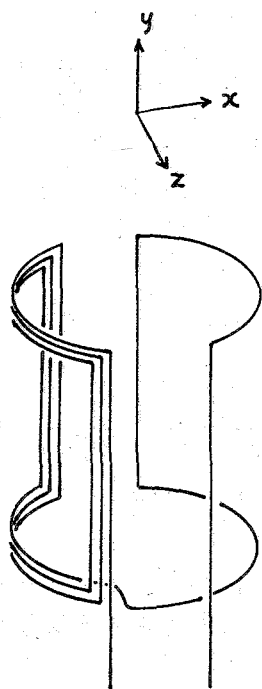


図 1. トランスミッタコイル模式図

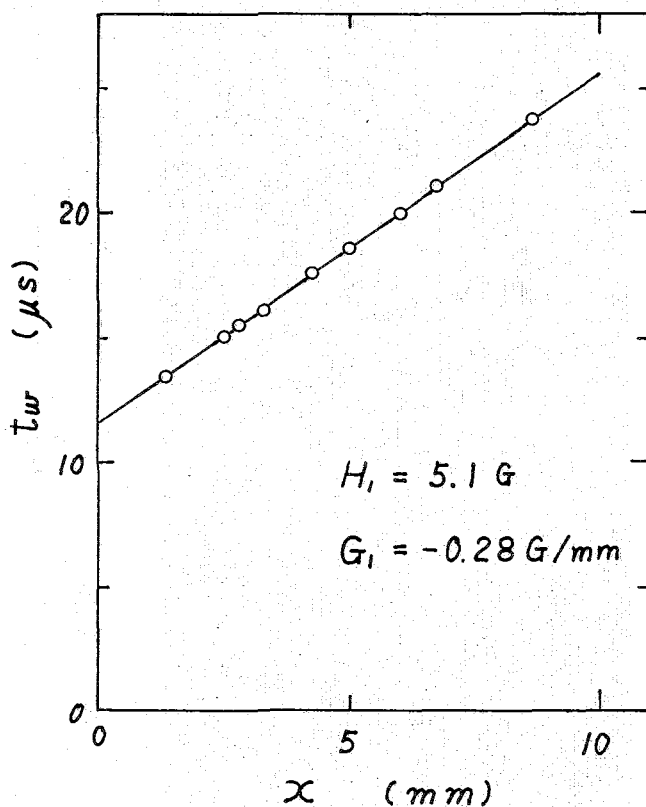


図 2. 距離と 90°パルス幅

ックはプロトンの外部ロック，測定温度は23°Cである。

結果

内径0.2mmの毛管に水を封入した試料を用いて、高周波磁場勾配の大きさを測定した。各点において章動角が90°となる時のパルス幅，すなわち90°パルス幅を距離 x に対してプロットした結果を図2に示す。 G の直線性はよく満足するものである。 $H_1 = 5.1 \text{ G}$, $G_1 = -0.28 \text{ G/mm}$ である。プロトンの化学シフトの範囲をほぼ10ppmとすれば、 $\nu_s = 1000 \text{ Hz}$ である。したがって、測定可能領域(10mm)全域にわたって $\gamma(H_1 + G_1 x) \gg 2\pi\nu_s$ なる条件が満たされており、信号強度は(1)式によって与えられる。

内径1.2mmの毛管中に、水、水-アセトン1:3溶液、アセトンに封入した試料を組合せて測定した。これら3本の毛管の中心距離2.2mmで直線上に並べた試料を用い、毛管を通る方向を x 方向としたとき、 x を変化させて得られるスペクトルを図3に示す。この場合には、各共振線は各毛管内でのスピン数の空間分布は反映しているが、毛管間での信号の重なりはないので、スペクトルの x 依存性と位置との関係がよくわかる。断層スペクトルを図4に示す。

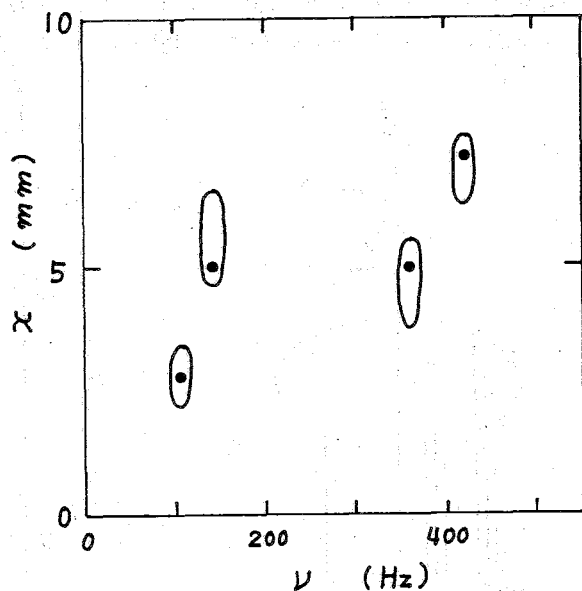
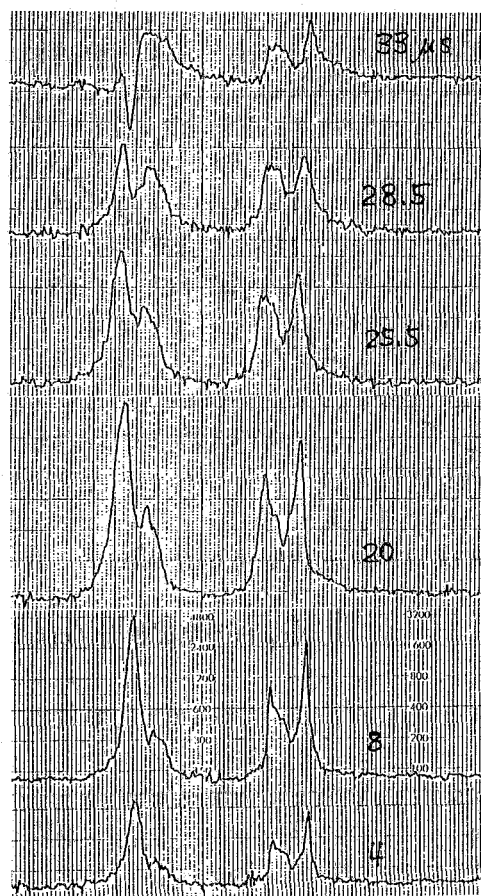


図4. 水、水-アセトン、アセトン系の断層スペクトル。●は試料本管の位置を示す。

← 図3. 水、水-アセトン、アセトン系のスペクトルのパルス幅依存。

水を封入した2本の毛管を、中心間距離を3.4mmでX方向に並べた試料で測定した結果を図5に示す。信号強度を t_w に対しプロットした結果を図6に示す。図6で実線は計算値である。断層スペクトルを図7に示す。

以上、断層高分解能NMRの予備的実験結果について述べた。この手法は、今後若干の改良を加えることにより、*in vivo* 生化学計測の有用な手段として展開されていきたい。

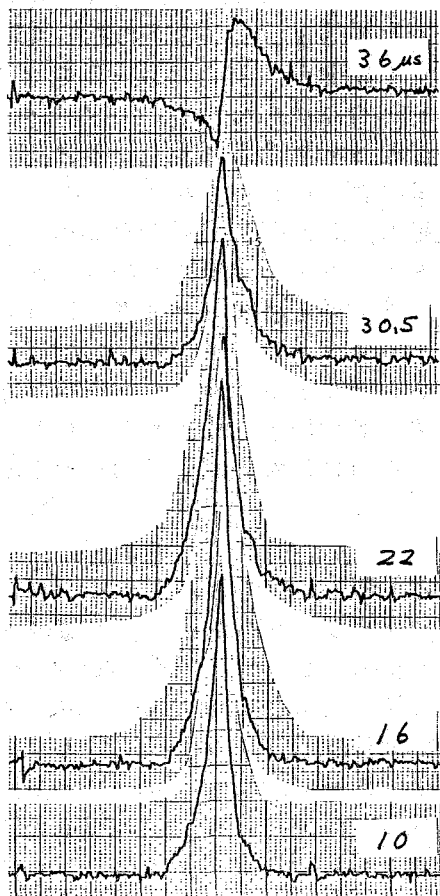


図5. 水-水系のスペクトルのパルス幅依存。

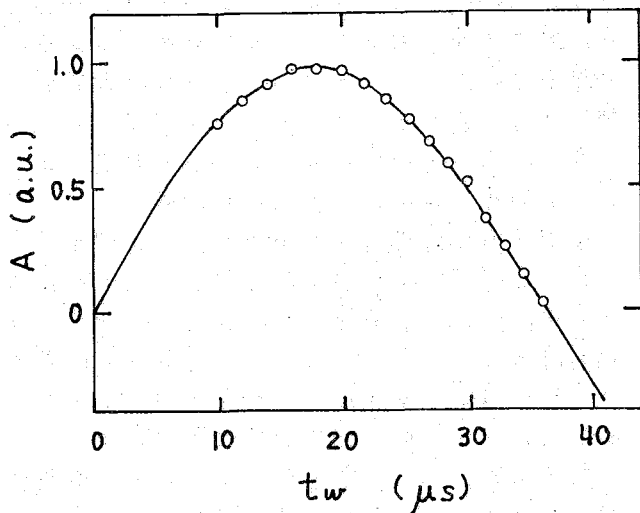


図6. 水-水系の信号強度とパルス幅。

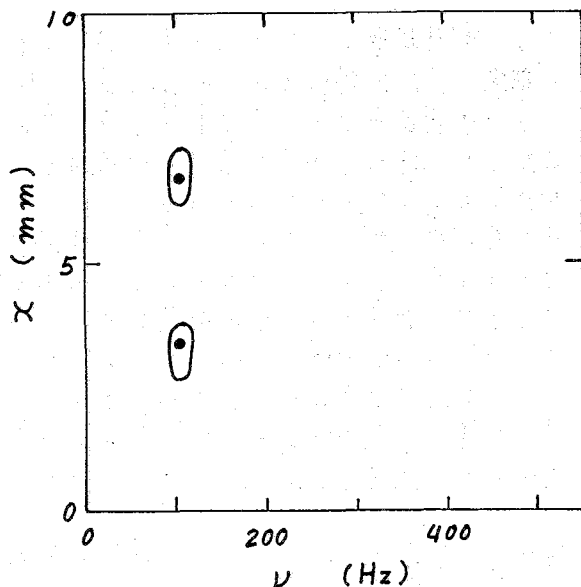


図7. 水-水系の断層スペクトル。●は試料本来の位置を示す。

- 引用文献 1) 例え12, 産刊: 映像情報 13 39 (1980).
 2) 例え12, D. Shaw: in L. Kaufman et al. eds. 'Nuclear Magnetic Resonance Imaging in Medicine' (Igakushoin, Tokyo, New York 1981).
 3) P.I. Hoult: J. Mag. Resonance 33, 183 (1979).

(京大理) 〇今城文雄, 前田史郎, 竹腰清乃理,
寺尾武彦, 雅斐亜帆

§1. 水素結合のNMR化学シフトに及ぼす効果については、溶液状態においては水素結合に関与している ^1H や ^{17}O や ^{13}C 核についての研究が多い。固体状態においては単結晶試料を用いた測定による ^1H 核や ^{13}C 核についての研究が行われてはいるが、その数はあまり多くない。固体状態では水素結合をしている酸素原子対を含む分子骨格が固定されているため特に分子間水素結合がNMRスペクトルに及ぼす効果を調べるのに適している。近年CP/MAS法を用いた固体高分解能 ^{13}C NMRにより固体における化学シフトが容易に測定されるようになってきたので、この方法を用いて固体状態での ^{13}C NMR化学シフトと水素結合との関係を調べた。CP/MAS固体高分解能NMRで得られる化学シフトの値は固体における化学シフトテンソルの主値の等方平均の値に等しい。この値は通常溶液中の測定で得られる化学シフト値に近いが、固体状態においては分子のコンホメーションが固定されることや結晶内のパッキングカにより、溶液中では等価な炭素が固体状態では非等価になり、たりして溶液中とは異なった化学シフトを示すことが知られている。従って両状態でのスペクトルから逆に固体状態での分子のコンホメーションについての情報が得られることになる。そこでいくつかの水素結合を含む化合物についてCP/MAS ^{13}C NMR及びDMSO- d_6 を溶媒とした溶液での ^{13}C NMRを測定して特に分子間水素結合の効果を研究した。

§2. 固体状態での ^{13}C NMRスペクトルは自作の装置(15.0MHz)を用いて293 Kで測定した。試料回転の周波数は2.3 kHzでありプロトンのデカップリング磁場の大きさは15 Gである。 ^{13}C 化学シフト値は以下のようにしてTMS基準の値(ppm)に換算した。即ち、MAS条件下で液体ベンゼンの化学シフトを測定して、この値がTMSから128.5 ppmにあるとする。次にCP/MAS条件下でアデマンタンの化学シフトを測定してそのメチレン炭素の共鳴周波数がTMSから39.7 ppmにあるとする。そこで次々のCP/MASスペクトル測定実験の前(後)でアデマンタンの測定を行なって ^{13}C 化学シフト値を決定した。DMSO- d_6 溶液でのプロトン全照射 ^{13}C NMRスペクトルは濃度0.7 mol/kgの条件でJEOL-FX 90Q (22.4 MHz, 測定温度308 K) 或はJEOL-GX 400 (100.4 MHz, 測定温度300 K)を用いて測定した。 ^{13}C 化学シフト値はDMSO- d_6 のメチル炭素の共鳴周波数がTMSより39.6 ppmにあるとして決定した。

§3.1. ジケトンのエノール体における水素結合と ^{13}C NMR化学シフト。 ジケトン類としてはジメドン(1), 1,3-シクロヘキサンジオン(2), 1,3-シクロペンタ

いましる ふみお, まえだ しろう, たけごし きよのり, てらち たけひこ,
さいか あぽろ

ンジオン(3), ジベンゾイル
ルメタン(4), バンゾイル
アセトン(5), トロポロン
(6)を選んで測定した。

結果は表1に示す。表中の
averageとは溶液中で平均な
炭素の固体での平均化学シ
フト値を表わしている。代
表的なスペクトルとして、
1, 4, 6の固体での ^{13}C
スペクトルを図1に示す。
これらの化合物において固
体での ^{13}C NMRスペクト
ルが溶液の場合と最も異な
っているところはカルボニ
ル炭素とエノール炭素が著
しく異なった化学シフトを
示すことである。以下の議
論では溶液中の値との比較
には主として平均化学シフ
ト値を用いる。

1の固体での平均化学シ
フトは $\text{C}_{1,3}$ を除いて 2.4 ppm
以内で溶液中の値に一致し
ている。 $\text{C}_{1,3}$ は溶液中の値
よりも 10.6 ppm も低磁場側
に移動している。1は結晶
内では互に異なった相手との
分子間水素結合により螺旋
構造をしているが、その水

素結合の $\text{O}\cdots\text{O}$ 距離 ($R_{\text{O}\cdots\text{O}}$) は 2.593-2.595 Å と非常に短く強い分子間水素結合である
ことがわっている。DMSO 中では溶媒との水素結合のためこの結合は切断され
る。溶媒との水素結合は固体状態での水素結合よりも弱いと考えられるから、 $\text{C}_{1,3}$
の固体での大きな低磁場シフトは分子間水素結合に基づくことと結論できる。1の C_1 と
 C_3 の DMSO 中での吸収は 308 K ではほぼ coalesce していたので固体での化学シフト
差 (19.2 ppm) を用いるとエノール-エノール間異性化の活性化自由エネルギーは 14.1
kcal/mol であると推定される。2は高温での溶液中の測定を行わなかったが、1の
常温でのスペクトルに非常に類似しており、3の固体での分子構造は1とよく似て
いると推定される。3のスペクトルも大体は1,2と似ているが、ここでは C_2 や $\text{C}_{4,5}$
の化学シフトの値の違いも少し大きく何らかの構造変化があると考えられる。

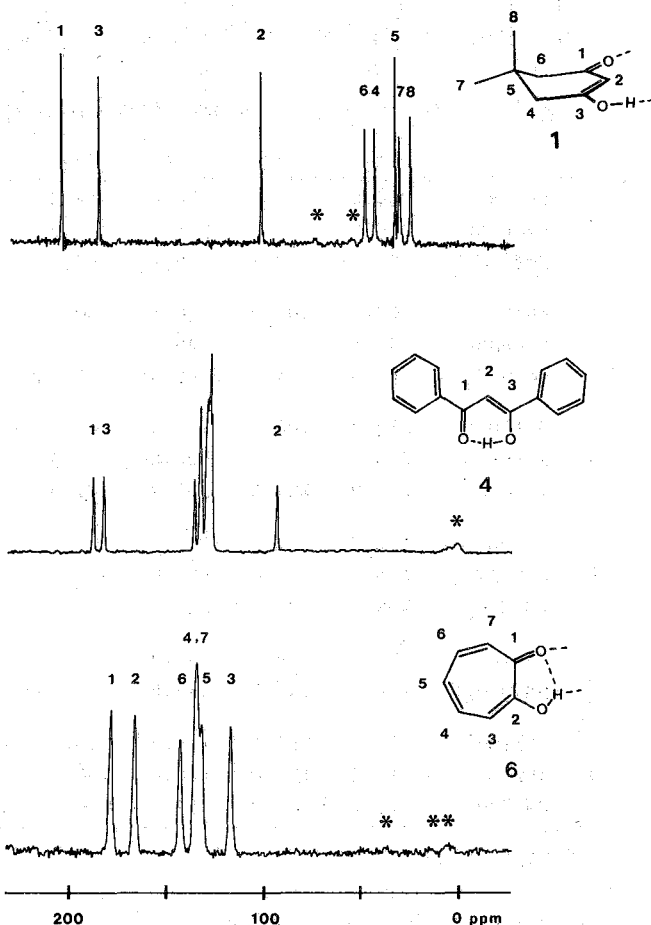


図1. ジケトンのエノール体の CP/MAS ^{13}C NMR
スペクトル: 上, ジメトン(1); 中, ジベンゾイルルメタン
(4); 下, トロポロン(6). *はスピニングサイドバンド。

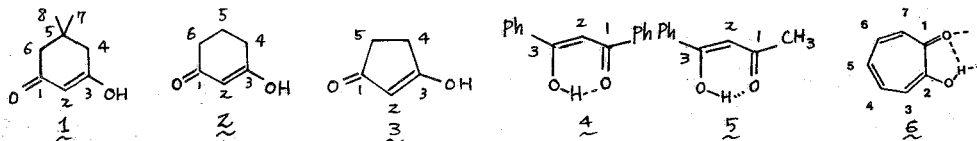


表1. ジケトンのエノール体の¹³C NMR 化学シフト値 (ppm)

		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8
1	Solid	205.8	102.9	186.6	44.3	33.8	49.3	31.6	25.8
	Average	196.2		196.2	46.8		46.8	28.7	28.7
	DMSO-d ₆ ^a	185.6	102.3	185.6	46.0	31.4	46.0	27.5	27.5
2	Solid	204.1	104.9	186.1	30.5	21.1	35.9		
	Average	195.1		195.1	33.2		33.2		
	DMSO-d ₆	very br	104.0	very br	32.2 br	21.0	32.2 br		
3	Solid	212.5	108.1	199.9	32.9	36.6			
	Average	206.2		206.2	34.8	34.8			
	DMSO-d ₆	197.7	105.1	197.7	31.4	31.4			
4	Solid	188.2	93.5	182.9					
	Average	185.6		185.6					
	DMSO-d ₆	185.2	93.3	185.2					
5	Solid	194.5	98.1	182.4					
	DMSO-d ₆	194.1	93.4 100.4	182.6					
6	Solid	178.1	165.9	116.7	134.4	131.5	142.4	134.4	
	Average	172.0	172.0	125.6	138.4		138.4	125.6	
	DMSO-d ₆	171.7	171.7	124.3	137.3	127.9	137.3	124.3	

^a 393 Kでの値.

1は結晶状態で強い分子内水素結合をしており、そのR_{OH}は2.466-2.468Åであるが、2のC-O結合距離は0.017-0.038 Åほど異なっている。固体でのC₁とC₃の化学シフトはこれを反映して5.3ppm異なっている。しかしながらC_{1,3}とC₂の化学シフトは固体と溶液中で非常に近く、DMSO中でも結晶状態と同じ分子内水素結合を保っていると考えられる。2も結晶状態で強い分子内結合をしていることがわかっていて、DMSO中では異なった二種のエノール構造が考えられる。それらの間の異性化速度が速ければC₁とC₃の化学シフト値は二つのエノール構造での化学シフトのエネルギー差を考慮した平均値となるはずであるが、大々の値が固体での値に近いことは固体での構造が溶液中での平均構造に近いことを示している。

2はX線解析により固体状態では分子内及び分子間水素結合を含む二量体構造をしている。C₁とC₂以外の炭素の化学シフトの帰属はこれだけのスペクトル情報では困難であり、ここではπ電子密度の値より推定した。C₅を除いて平均化学シフトと溶液中の値との一致は良いことから固体での分子間水素結合による化学シフトへの影響は小さいと考えられる。⁴これは固体での水素結合距離の違いが反映していると考えられる。即ちR_{OH}は分子内水素結合では2.553 Åであるのに対して分子間水素結合は2.754 Åと長いからである。

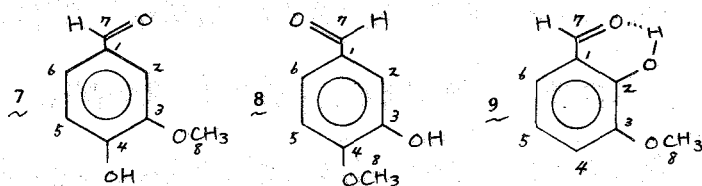


表2. バニリン類の¹³C NMR 化学シフト値 (ppm).

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8
7 Solid	133.1, 129.7	107.6, 105.7	148.3	154.2	117.4, 115.4	129.7	194.1, 191.9	57.4
7 DMSO-d ₆	128.9	110.9	148.3	153.2	115.5	126.2	191.0	55.7
7 Δ	4.2, 0.8	-3.3, -5.2	0.0	1.0	1.9, -0.1	3.5	3.1, 0.9	1.7
8 Solid	129.4	121.6	146.6	153.5	113.5	121.6	194.3	57.5
8 DMSO-d ₆	130.0	111.7	147.2	153.5	113.7	124.5	191.5	55.9
8 Δ	-0.6	9.9	-0.6	0.0	-0.2	-2.9	2.8	1.6
9 Solid	122.8	148.5	152.1	118.2	120.8	126.1	199.8	56.7
9 DMSO-d ₆	122.6	148.5	150.8	117.7	119.3	120.4	192.3	56.2
9 Δ	0.2	0.0	1.3	0.5	1.5	5.7	7.5	0.5

$$\Delta = \delta_{\text{solid}} - \delta_{\text{DMSO-d}_6}$$

§3.2. バニリン類における水素結合とコンホメーション バニリン(7)とその二種の異性体, イソバニリン(8)とオーバニリン(9), の内8と9の結晶構造は既知であるが7は未知である。藤戸ら²のCP/MAS¹³C NMRの測定結果等から7は単位格子内に二分子種の存在が示されている。そこで7の分子構造について8,9の結果をもとにして考察を試みた。測定結果は表2に示す。9は結晶中で上図の様な分子内水素結合しているが, C7の化学シフトがDMSO中で7.5ppmも高磁場側に移動していることからDMSO中ではこの水素結合は切れている。従って固体中でのC7の化学シフトが低磁場にあるのはO-シス構造に基づくと考えられる。8ではC7の吸収は固体で低磁場シフト(2.8ppm)しているが分子間水素結合距離の長さ($R_{O-H} = 2.74 \text{ \AA}$)を反映してその程度は小さい。C6は8とは逆に固体で2.9ppm高磁場側に吸収がある。またC2が9.9ppmも低磁場側に吸収が移動している。これは溶液中でほぼ自由回転しているアルデヒド基が固体中でO-トランス構造をとることによる。そこで7の化学シフト値を検討してみるとC7に関しては8と同程度の固体で低磁場シフトした吸収と殆どシフトしていない吸収があることから水素結合の強さに差のあるアルデヒド基が存在すると考えられる。またC6とC2の化学シフト値から二つの分子種とも8とは逆のO-シスコンホメーションをとっていることを示している。

分子間水素結合の代表例であるカルボン酸二量体における水素結合と¹³C NMR化学シフト値の関係についても検討する。

参考文献) 1. T. L. Brownら J. Am. Chem. Soc., 104, 1172 (1982).

2. 藤戸ら 第19回 NMR 討論会 要旨集 P.27 (1980).

(結晶構造に関しては省略した)

京大理 ○前田史郎・寺尾武彦・雑賀亜帆

I. はじめに 高分子の立体規則性 $\times$ 共重合体の連鎖様式などの研究には、従来溶液の NMR が有用な実験的手段として用いられてきた。最近固体の ^{13}C 高分解能スペクトルが容易に測定できるようになったが、固体高分子では体積磁化率の異方性 $\times$ 化学シフトの分布に起因する線幅の広がり $\times$ 立体規則性の差異に基づく吸収線の分裂をおおい隠すために、これまでこの分裂は観測されなかった。我々はポリビニルアルコール (PVA) においてメチン炭素の吸収線が溶液の場合と同様に 3 本に分裂することを見い出した。固体で立体規則性分裂が観測されたのは初めてである。分裂は $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液の場合に比べて約 3.4 倍大きく、ピークは低磁場側へシフトしており、各ピークの相対強度は試料の立体規則性を反映しているが溶液で得られるトリアド比率とは一致しない。これらの結果から、固体では分子内水素結合が固定されるために大きく低磁場シフトするが、部分的に分子間水素結合が形成されるためにトリアド比率とは一致しないと結論した。

II. 実験 PVA-A, B, C はそれぞれ, *tert*-ブチルエーテルのカチオン重合、酢酸ビニルのラジカル重合、ギ酸ビニルのカチオン重合により得られた試料である。PVA-D (クラレ) とポリ酢酸ビニル (積永化学) は市販のアタクチック試料である。PVA-A, B, C は 338K で 24 時間減圧乾燥した試料を測定した。スペクトルは自作の装置を用いて測定した。共鳴周波数は ^{13}C に対して 15.0 MHz である。固体高分解能 NMR 法¹⁾としては、プロトンデカップリングを通常のシングルフリップス法 (SP) または交叉緩和法 (CP) と組み合わせた方法、さらにマジック角度回転法 (MAS) を併用する方法 (CP/MAS) を用いた。MAS スペクトルは室温で測定し、回転数は 2.4 kHz である。 $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液の 50 MHz ^{13}C スペクトルは JEOL-FX 200 で測定した。化学シフトは Me_4Si 基準である。SP, CP の場合は液体ベンゼン (Me_4Si から 128.5 ppm) を、MAS の場合は固体アダマントンのメチレン炭素 (Me_4Si から 38.7 ppm) を外部基準として用い、 Me_4Si 基準に換算した。

III. 結果と議論 PVA-B の $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液の ^{13}C スペクトルを図 1 に示す。46 ppm 付近の 4 本線、67 ppm 付近の 3 本線はそれぞれメチレンおよびメチンであり、40 ppm 付近の 7 重線は溶媒の $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ のメチルである。メチンの 3 本線は低磁場側からアイソタクチック (mm), ヘテロタ

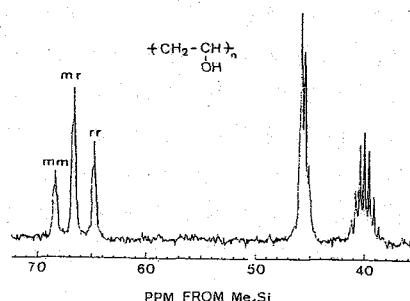


図 1. PVA-B の $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液の ^{13}C NMR スペクトル (7.8 % w/w, 353K)

まんだしろう・てらおたけひこ・さいかあぼろ

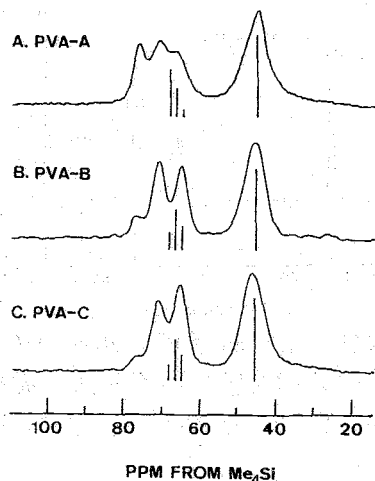


図2. PVAの ^{13}C CP/MAS スペクトル. (A) PVA-A; (B) PVA-B; (C) PVA-C. 棒スペクトルは $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液の ^{13}C NMR スペクトル

が溶液の mm, mr と比べて低磁場側に大きくシフトしていることであり、2番目は各ピークの比率が溶液で得られたトリアド比率と一致しないことである。

まず、ピーク1, 2の低磁場シフトについて議論する。PVAの結晶部分は立体規則性によらず同じ平面ジグザグ構造をとっているので、メチンの分裂の原因をコンフォーメーションの違いに帰することはできない。低磁場シフトの原因として考えられるのは水素結合である。溶液のNMRでは水素結合している酸素原子に直接結合している炭素原子の吸収線は低磁場シフトすることが知られている。固体では水素結合がもつ固定されるので、この低磁場シフトは溶液の場合よりも大きいこ

Table I
Triad Tacticities and Peak Intensities
of Methine Carbon Resonance

	Solution			Solid		
	mm	mr	rr	Peak 1	Peak 2	Peak 3
PVA-A	0.57	0.34	0.09	0.32	0.39	0.29
PVA-B	0.22	0.49	0.29	0.14	0.44	0.42
PVA-C	0.19	0.50	0.31	0.09	0.43	0.48

Table II
 ^{13}C Chemical Shifts of Poly(vinyl alcohol)

	Solution				Solid			
	CH			CH ₂	CH			CH ₂
	mm	mr	rr		Peak 1	Peak 2	Peak 3	
PVA-A	68.3	66.6	64.8	45.3	76.0	70.7	66.0	44.8
PVA-B	68.4	66.8	64.8	45.5	77.4	71.2	65.3	46.0
PVA-C	68.3	66.6	64.9	45.7	76.7	71.0	65.2	46.5

クチック (mr), シンジオタクチック (rr) のトリアドに 帰属されている。²⁾

PVA-A, B, CのCP/MASスペクトルを図2に示す。棒スペクトルは $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液のスペクトルを表わしている。CP/MASスペクトルでメチンが3本に分裂している。これらを低磁場側から、ピーク1, 2, 3とする。 $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液のメチン吸収線から決定したトリアドタクチシターとCP/MASスペクトルの各ピークの強度比を表I, 各吸収線の化学シフトを表IIに示す。PVA-Aはかなりアイソタクチック, PVA-Bはアタクチック, PVA-Cは少しシンジオタクチックである。

CP/MASスペクトルのメチンの各ピークの化学シフトは試料の立体規則性によらずほぼ一致し、また比率は各試料の立体規則性を反映している。これらのことから、メチンの分裂は試料の立体規則性に基づく分裂であると結論した。メチン吸収線に関して興味深い点が2つある。1番目はピーク1, 2

とが期待される。最近我々はエノール形のジケトン類で水素結合による低磁場シフトを観測した。³⁾ PVAでは隣りあうOH基がラセミ配置にある場合、O...O間距離は 3.41Å と水素結合するには遠すぎる。しかし、メソ配置の場合は 2.52Å であり強い分子内水素結合が示唆される。一方、分子間水素結合しているOH基のO...O間距離はBunn⁴⁾のX線結晶構造解析の結果によると、 2.8Å と 2.9Å である。分子間水素結合は分子内水素結合と比べてO...O間距離が長いことと立体規則性に特有な分子間水素

結合が形成されるとは考えられないことから、分子間水素結合の効果はせいぜい線幅を広げる程度であり、メチン吸収線の低磁場シフトは分子内水素結合によるものであると結論した。

mm または mr 配置の場合は中央のメチンに結合している酸素原子は、それぞれ 2 または 1 個の分子内水素結合を作れるが、rr 配置では水素結合を作れない。分子内水素結合 1 つ当たり約 6 ppm の低磁場シフトを起すと仮定すればメチンの 3 本線の化学シフトを説明できる。ポリ酢酸ビニルの場合はメチンに結合している酸素原子が水素結合を作れないので低磁場シフトは起こらないと予想される。図 3 に示した CP/MAS スペクトルはこの予想と一致し、PVA での低磁場シフトが分子内水素結合に起因するものとする我々の見解を支持する。

メチンの 3 本線の相対強度は図 4 に示されているようにコンタクト時間に依存せず、相対強度とトリアド比率が一致しないのは、各ピークの $T_{1\rho}(^{13}\text{C})$ や CP 効率に差があるためではない。この不一致はメソ配置にある OH 基の一部が分子間水素結合を作るためであろう。mm 配置の場合、分子内水素結合の数は 2, 1, 0 の 3 通りがあり、それぞれピーク 1, 2, 3 に属し、同様に mr 配置の場合、分子内水素結合を作るかどうかによってピーク 2 または 3 に属することになる。そうするとトリアド比率と比べてピーク 3 の相対比率は大きく、逆にピーク 1 の比率は小さくなる。

メチレンではメチンと違って分裂はみられないが、線形とピークの位置は試料の立体規則性に依存した変化がみられている。 $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ 溶液での 4 本線は低磁場側から rrr, rrm + mrm, rmr + mmr, mmm に帰属されている。¹⁾ 分裂よりも線幅の方が広い場合にはアタクチック PVA-B では対称、アイソタクチック PVA-A およびシンジオタクチック PVA-C ではそれぞれ高磁場側および低磁場側の傾きが鋭い非対称な線形が、またピークの位置は低磁場側から PVA-C, B, A の順であることが期待されるが、実際このようになっている。

空气中に 4 日間放置した後の PVA-A のスペクトルを図 5 に示す。乾燥試料 (図 2A) と比べると大きな変化がみられている。この変化はアイソタクチック PVA-A では PVA 分子間に水分子が入り込んでいることを示唆する。吸湿によってピーク 3 が減少し、ピーク 1 が増大することから、水分子は分子間距離を広げ一部の分子間水素結合を切り、その OH 基が新しい分子内水素結合を作ると結論した。

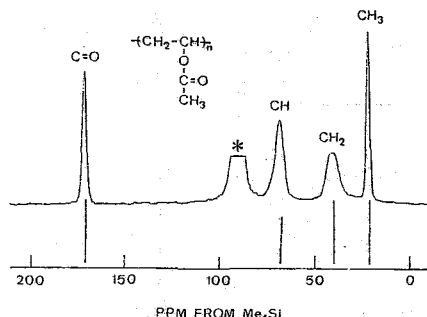


図 3. ポリ酢酸ビニルの ^{13}C CP/MAS スペクトル。棒線は CDCl_3 溶液の ^{13}C スペクトル

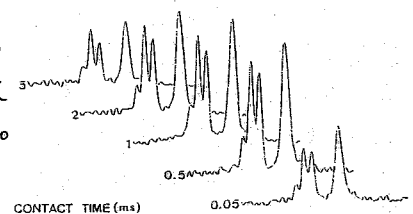


図 4. PVA-B の ^{13}C CP/MAS スペクトルのコンタクト時間依存性

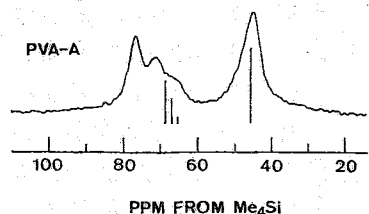


図 5. 空气中に 4 日間放置した後の PVA-A の ^{13}C CP/MAS スペクトル

PVA-B, Cは空气中に放置しておいても, またPVA-Bでは24時間水に浸した試料さえもピーク強度に変化はみられなかった。アタクチックPVAの分子間に水が入り込むかどうかに関しては議論が分かれている。しかしアイソタクチック部分が少ない程, 融点と水への溶解温度が高いことは, PVA-B, CではPVA-Aに比べて分子間凝集力が強いことを示しており, 吸湿しても分子間水素結合はもとのままであり, スペクトルに変化がみられなかったとして説明できる。

PVA-Bの ^{13}C の T_1 測定結果を図6, 7に示す。図6は T_1 CP法⁵⁾による T_1 プロットで, 磁化の回復は明らかに単一指教型でなく, T_1 が約80sと約6sの2つの成分の重ね合わせである。図7は通常のSaturation Recovery法で $\tau = 800\text{ ms}$ を熱平衡値とみなして τ の短い部分の測定を行った結果であり, T_1 が数100msの成分もあることがわかる。PVAのような結晶性高分子は結晶相・中間相・非晶相からなっているが, 数100msの T_1 をもつ成分は運動性の高い結晶相と考えられる。CPを用いると運動性の高い成分はしばしば測定にかからないことがある。 T_1 CP法で得られた T_1 が80s $\times$ 6sの成分はそれぞれ結晶相, 中間相に属する。図8はPVA-Dの308Kと433KにおけるCPおよびSPスペクトルである。結晶相・中間相の信号からなるCPスペクトルは温度変化を示さないが, くり返しが1.0sであり殆んど非晶相の信号からなるSPスペクトルでは温度上昇に伴い線幅の減少が認められる。このことから非晶相では高い温度で分子内および分子間水素結合に打ち勝つミクロブラウン運動が生じており, 一方結晶相・中間相では433Kでさえ水素結合が固定されていると結論した。308KでのSPスペクトルでは立体規則性分裂はみられていないが, 常温でくり返し1.0sのSP/MASスペクトルでは分裂が観測された。

〔謝辞〕 PVA試料を提供していただいたクラレ中研の植月正雄氏に感謝します。

- 1) T. K. Wu and D. W. Ovenall; *Macromolecules*, 6, 582 (1973).
- 2) 寺尾武彦, 藤戸輝昭; *化学と工業*, 33, 531 (1980).
- 3) F. Imashiro, S. Maeda, K. Takegoshi, T. Terao and A. Saika, to be published.
- 4) C. W. Bunn; *Nature*, 161, 929 (1948).
- 5) D. A. Torchia; *J. Magn. Reson.*, 30, 613 (1978).

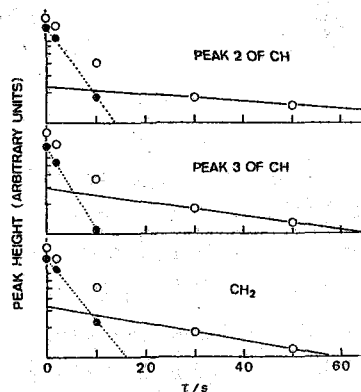


図6. T_1 CP法による ^{13}C T_1 プロット

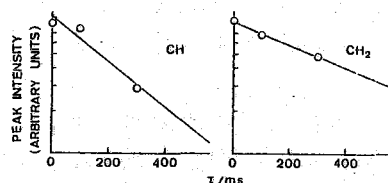


図7. Saturation Recovery法による ^{13}C T_1 プロット

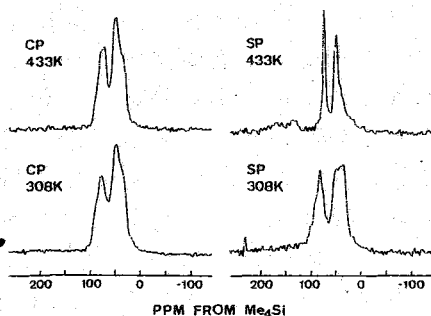


図8. PVA-Dの ^{13}C パウダースペクトル: (左) CP; (右) SP.

(京大理) 寺尾武彦・三浦 等・雑賀亜樹

〈序〉 前回我々は, abundant spin (I) と rare spin (S) の 2 種スピンを含む固体において, homonuclear decoupling と MAS (magic-angle spinning) とを併用することにより間接スピン結合 J_{IS} を残して双極子相互作用 J_{dIS} を消去し得る¹⁾ことを発表した。我々は今回, アダマンタンの正確な間接スピン結合定数 J の値²⁾ 各種 multiple pulse 法の比較, 二次元 J 分解 NMR へのアプローチ, 一般的な物質での 4 級炭素のみの観測, 分解能を決定する要因等について研究したので, その結果を報告する。

〈方法及び原理〉 図 1 に J 分解スペクトルを得るためのパルス系列を示す。homonuclear decoupling によって I-I 間の双極子相互作用 J_{dII} を抑え, 残る inhomogeneous な相互作用 J_{dIS} を MAS によって消去する。間接スピン結合 J_{IS} は, ある scaling factor f_s だけ縮小されるが, 生き残る。 f_s は homonuclear decoupling に用いるパルスサイクルの種類のみならず, 90° パルスの幅 t_w 及びパルス間隔 τ 等にも依存するので, f_s を正確に決定するために我々は固体の J を測定する場合と全く同一の条件の下でメタノールの J を測定し, それとメタノールの真の J の値との比を求めるといった方法をとった。図 2 には, 二次元 J 分解 NMR スペクトルを得るためのパルス系列を示す。この方法で得られる信号の強度は, J_{IS} のもとでの時間推進と T_2 による減少を考慮すると, 水素原子が n 個 ($n=0, 1, 2, 3$) 付加した炭素 (CH_n) に対して,

$$M(t_1) = M_0 \cdot \exp(-t_1/T_2) \cdot \cos^n(\pi J t_1) \quad (1)$$

と書かれる。(1) 式を t_1 で Fourier 変換すると間隔 J [Hz] で $(n+1)$ 本に分裂した吸収線が得られる。また, 幾通りかの特別の t_1 の値で実験を行うことにより, 付加水素数 n の値を決めることができる。

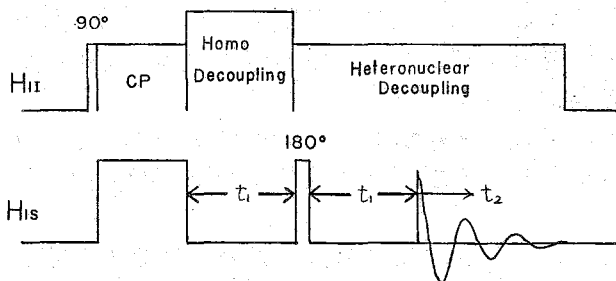


図 2. 二次元 J 分解スペクトルを得るためのパルス系列の例。

図 1. S スピンの J 分解スペクトルを得るためのパルス系列。

〈実験〉 実験は 1H の共鳴周波数が 60 MHz の自作の装置を用いて行った。 1H に対するラジオ波磁場の強さは, CP に対しては 15 G, homonuclear decoupling に対しては 24 G であり, 試料回転の速さは 2.2 kHz で

てらおたけひこ・みうらひとし・さいかあぽう

ある。

《結果及び議論》 図3にアダマンタンの ^{13}C スペクトルを示す。a)は通常のCP/MASスペクトルであり、Jによる微細構造は現れない。b)は図1のパルス系列を用いて得られたスペクトルであり、homonuclear decoupling に用いたパルスサイクルはBR-24³⁾である。表1には幾通りかの条件の下でアダマンタンのJを測定した結果をまとめておく。測定条件の違いによる結果のバラつきが少なく、互いに極めて良い一致を示している。この結果により、Jの値は、 CH_2 、 CH でそれぞれ $131.0 \pm 1.0 \text{ Hz}$ 、 $136.8 \pm 1.5 \text{ Hz}$ （溶液中ではそれぞれ 125.9 Hz 、 131.2 Hz ）と決定された。この値は前回報告されたものと異なるが、 τ_c を正確に求めることができたので、今回の結果の方が正しい値である。我々は同じ方法で β -キノール・メタノール包接化合物中のメタノールのJの値も測定し、 $133.8 \pm 3.2 \text{ Hz}$ （溶液のメタノールでは 140.8 Hz ）という結果を得た。

図4に示すのはアダマンタン及び β -キノール・メタノール包接化合物を図2のパルス系列を用いて t_1 を少しずつ変えて測定し、信号の強度をプロットしたものである。実験結果は(1)式で T_2 及びJを適当に与えて得られる理論曲線と非常に良く一致する。同じパルス系列を用いて特別の t_1 の値で得られたカンファのスペクトルを図5に示す。⁴⁾a)は通常のCP/MASスペクトルであり、b、cはそれぞれ $t_1 \approx (2J)^{-1}$ 、 $t_1 \approx J^{-1}$ として得られたスペクトルである。b)では4級炭素の信号のみが現われ、c)では4級炭素及びメチレン(CH_2)

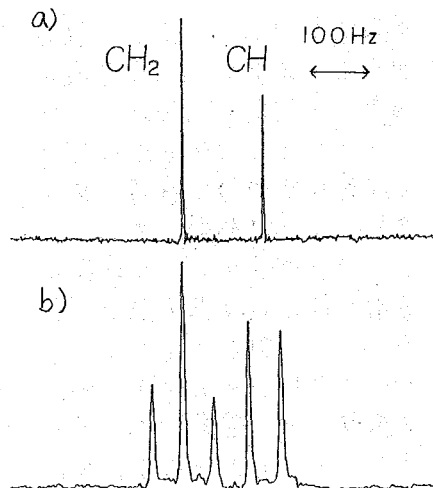


図3. アダマンタンの ^{13}C スペクトル。a) CP/MAS。b) J分解スペクトル。homonuclear decouplingはBR-24パルスサイクルで、 $t_w = 2.8 \mu\text{sec}$ 、 $T = 4.7 \mu\text{sec}$ で行った。

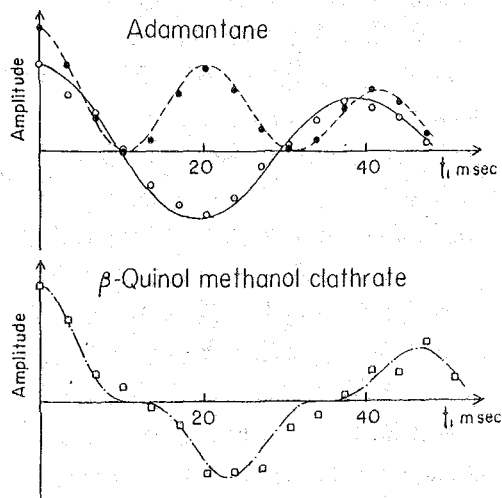


表1. 種々の条件の下で測定した、アダマンタンのJ値及び吸収線(CH_2)の半値幅。 $T = 4.7 \mu\text{sec}$ 。

Pulse Cycle	$t_w \mu\text{sec}$	$J(\text{CH}_2) \text{ Hz}$	$J(\text{CH}) \text{ Hz}$	線 幅 Hz
MREV-8	2.8	132.2	136.2	7.3
M-16	2.8	132.5	138.3	7.0
BR-24	2.4	132.5	137.3	6.5
	2.6	132.8	136.6	5.4
	2.8	133.4	137.3	4.8
	3.0	135.6	140.4	5.3

図4. 図2の方法で得られた信号の強度の t_1 に対するプロット。理論式(1)に良くフィットする。BR-24パルス($t_w = 2.8 \mu\text{sec}$ 、 $T = 4.7 \mu\text{sec}$)を用いてhomonuclear decouplingを行った。

炭素は上向きに、メチン(CH)炭素及びメチル(CH₃)炭素の信号は下向きに現われている。このようなスペクトルは信号の帰属にきわめて有用である。また、aでは分離していないC6,7の信号がcでは明確に分離されている点も注目される。更に、図6に1,5-ジメチルナフタレンのスペクトル例を示す。aは通常のCP/MASスペクトルであり、bは上に述べたやり方で4級炭素だけを選択的に観測したものである。測定条件は図4の場合と同一である。デルリンの信号が大幅に減少している点にも注目されたい。この方法ではOpellaらの4級炭素選択観測法と異なり、メチル基の信号が混入する恐れはない。

次に、この実験に用いる homonuclear decoupling と heteronuclear decoupling に関して述べる。まず、homonuclear decoupling として最も有効な multiple pulse法であるが、¹Hの固体高分解能NMRを行う場合と異なり、この実験ではかなり容易に実行できるということを指摘したい。まず第1に、この方法ではIスピン系へのラジオ波照射をしながらSスピンの信号を観測するので、Iスピンを観測する場合と異なりデッドタイムを心配する必要がなく、パルスサイクルの周期とは無関係にサンプリングができ

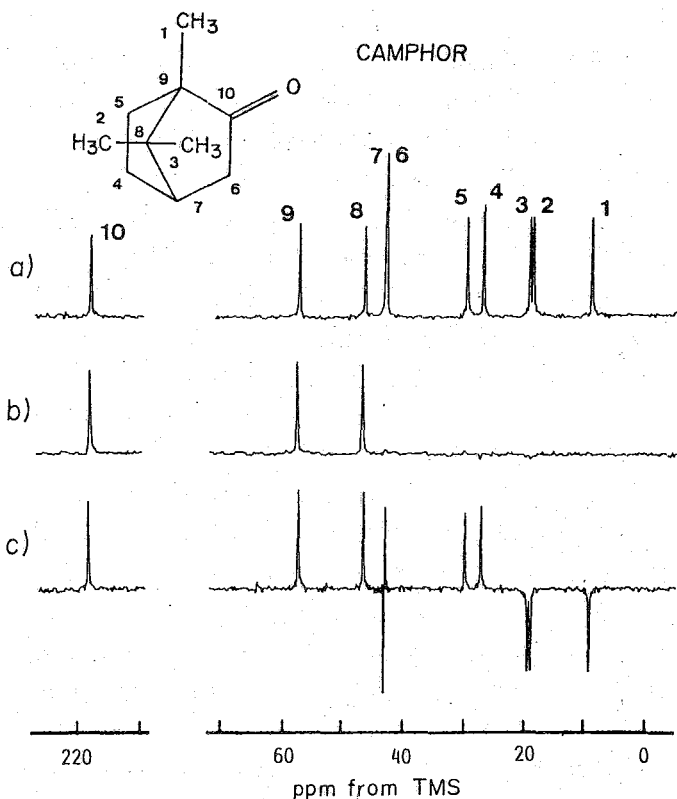


図5. 図2のパルス系列を用いて得られたカンファーの¹³Cスペクトル。a) $t_1=0$ (CP/MAS)。b) $t_1 \approx (2J)^{-1}$, c) $t_1 \approx J^{-1}$ として得られたスペクトルである。

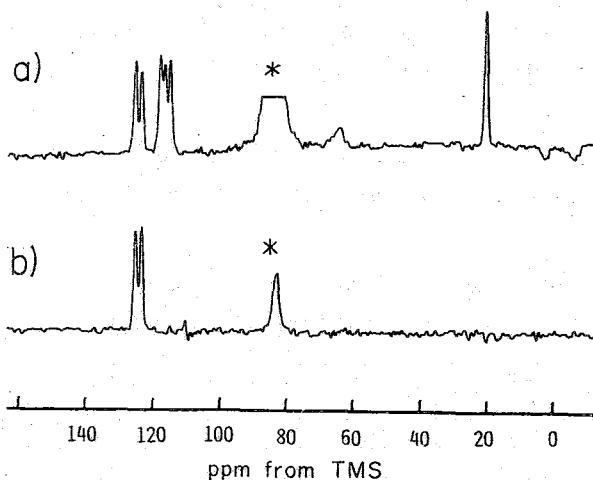


図6. 1,5-ジメチルナフタレンの¹³Cスペクトル。a)通常のCP/MAS ($t_1=0$)スペクトル。b) $t_1 \approx (2J)^{-1}$ として4級炭素のみを選択的に観測したものの。図中*印はデルリンローターの信号。

る。そしてHの高分解能NMRの場合とは異なり、Sスピンの化学シフトは縮小されず、J値が縮小されるがpulse imperfectionによるオフセットがないため、この点においても実験は容易である。さらにラジオ波磁場の不均一さによるflip-angleの $\pi/2$ からのずれの2乗平均根を ϵ とすると、共鳴周波数とラジオ波磁場の周波数との差が $\Delta\omega$ のときには、Iスピンの化学シフトの分布による線幅は $(\Delta\omega \cdot a \cdot \epsilon/2)$ となり、 $\Delta\omega$ が数kHzであるから線幅は非常に大きくなるが、Sスピンを観測する限りにおいては $\Delta\omega$ に対応するのはJであるため線幅のこの効果による増大はわずかである。また内部ハミルトニアンには、パルス幅の誤差、ラジオ波磁場の不均一さ、phase transientなどのパルスの不完全さによる項と双極子項との交叉項があり、静止した試料ではそれが大きな値をとるが、我々の方法ではMASを行っているのでこれらのうち因子 $(3\cos^2\theta-1)$ をもつ項は消える。また H_{dII} と H_{dIS} との交叉項の一部も同様にMASによって消去される。

上述のようにこの実験ではhomonuclear decouplingに関しては比較的容易であるが、heteronuclear decouplingに対しては次のような問題がある。 H_{dIS} はhomonuclear decouplingのもとでMASによって消去されるが、 H_{dIS} の大きさは数10kHzであるのに対してMASの周波数は3kHz前後である。したがって、スペクトルは多数のスピンングサイドバンド(SSB)に分裂しSN比の低下をもたらす。また静磁場に対して角度 θ をなす軸のまわりに試料を回転すると H_{dIS} による線幅 Δ は

$$\Delta \approx \frac{1}{2} |3\cos^2\theta - 1| \cdot f_s \cdot \|H_{dIS}\| \quad (2)$$

であり、 $\|H_{dIS}\|$ は一般に数10kHzであるので θ がmagic-angleから 0.1° ずれても Δ は50Hz程度にもなる。更に、MASによって消去されるのは H_{dIS} の1次項のみであり、高次項や H_{dII} との交叉項との一部は残る。最初のSSBの問題は図1のパルス系列ではMASに同期してサンプリングすることにより、図2においては $t_i = NTr$ (Tr は試料回転の周期)とすることにより解決することができる。ここに記した例のように、分子が等方回転している場合や、rigid latticeでも4級炭素やメチル炭素においては H_{dIS} が小さいため、このような条件は不要である。rigidな試料におけるメチン炭素およびメチレン炭素に対しても可能にすべく、上記の条件を満足できるように現在装置を改良中である。また、magic-angleのずれに対しては、パルスモーターとギアシステムにより、 0.004° 以内でmagic-angleを設定できるように準備中である。最後の問題に対してはBR-24パルス系列に改良を加えることにより解決する予定である。

参考文献；1) T.Terao, H.Miura, and A.Saika, J.Chem.Phys. 75, 1573 (1981).

2) T.Terao, H.Miura, and A.Saika, J.Magn. Reson. in press.

3) D.P.Burum and W.K.Rhim, J.Chem.Phys. 71, 944 (1979).

4) T.Terao, H.Miura, and A.Saika, J.Am.Chem.Soc. in press.

5) S.J.Opella and M.H.Frey, J.Am.Chem.Soc. 101, 5854 (1979).

シクロデキストリン包接体の ^{13}C CP/MAS NMR。ゲスト分子の動的挙動

(国立がんセンター研・生物物理, 微化研)

○ 斎藤 肇, 北泉儀一*, 多田涼子

1. はじめに

シクロデキストリン(CD; シクロアミロース)は, グルコースが α -(1 $\rightarrow$ 4) 結合で環状に結合したオリゴマーの総称であり, 6-, 7-, 8- 残基からなる α -, β -, γ -CD が最も一般的である。適当なサイズの低分子化合物とその空腔に包接し, またこれにより特異的な融性作用がなれるところから, 酵素の活性部位のモデルまたは薬物のデリバリーシステムとして各方面から関心を集められている。前報において, われわれは α -シクロデキストリン包接体の ^{13}C NMR スペクトルと結晶状態で測定し, 包接によって生じるホスト分子の“ゆがみ”と“シフト”特に C-1, C-4 シフトから検出し得ることを示した²⁾。さらに, これらのシフト値の差が二面角 ϕ , ψ とよい相関関係にある²⁾ことを示した。

本報ではさらに種々の分子を包接した α -CD, および空腔サイズの異なる β -, γ -CD 包接体の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルから詳細に検討し, 主としてゲスト分子の動的挙動が包接による影響について調べる。

2. 実験方法

各種包接化合物の結晶化は, 前報と同様の方法による。 ^{13}C CP/MAS NMR 測定も同様である。

3. 実験結果と考察

A β -, γ -CD の結晶化にともなう変化

図1および図2にそれぞれ β -, γ -CD の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。これらの場合, コンホメーションの自由度から考えても理解できるように, 粉末あるいは凍結乾燥試料のスペクトルはきつめで線幅が広がっている。特にこれはより自由度の高い γ -CD に著しい。 β -CD の粉末試料のスペクトル線の分裂については, ホスト分子の環のゆがみであるうと以前に指摘したが, 試料の処理によってこれらの値が変化した。前報の α -CD の結果と比較してこの考えが正しいことがわかる。 β -CD は12個の H_2O を包接し, その結晶回転³⁾がなされている。 α -CD にくらべて C-4-O-4-C-1 角が $119.0 \pm 0.3^\circ$ から $117.7 \pm 1.0^\circ$ と若干小さくなっている。他グルコピラノースのコンホメーションは変わっていない。このため, 図1でみられる C-4 ヒーグが本に分裂する ψ は $\psi = -179^\circ \sim -184^\circ$, $-172.7^\circ \sim -167.6^\circ$, $-160.7^\circ \sim -163.0^\circ$ の三つの領域に分かれ, しかも前報図4下段のフィットによくフィットする。これに対し, γ -CD $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 包接体のホスト分子は8回対称から著しくずれていることがX線回折から明らかにされており⁴⁾, その結果線幅が著しく広いスペクトルになったものと思われる。

α -CD とくらべて, β -, γ -CD が1-7,6-1-ルと包接すると, ホスト分子の

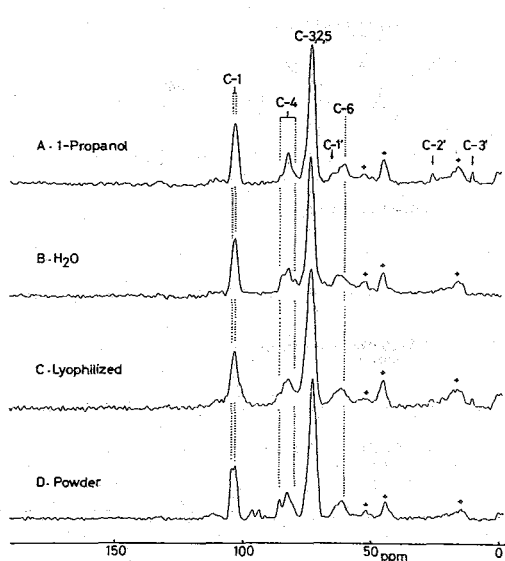


図1. β -シクロデキストリンの ^{13}C CP/MAS NMRスペクトル (CP時内 1 m³)

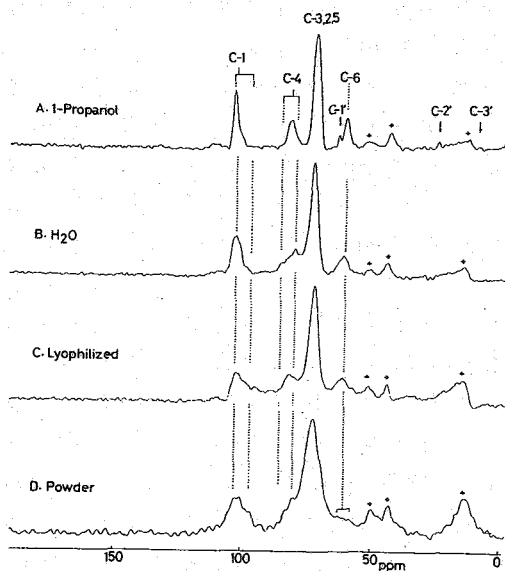


図2. γ -シクロデキストリンの ^{13}C CP/MAS NMRスペクトル (CP時内 1 m³)

対称性がきわめてよくあり、スペクトルからわかるように、8個のグルコース残基が等価と考えてよい。 α -CDの場合ホスト分子のゆがみがよることと前報において報告した。X線回折では、 β -、 γ -CD 中に包接された1-フロバノールは *disorder*、その位置が決定されてはいない。同一条件で測定した前報^(1,6)図1、およびこの図1、2の1-フロバノールのピーク強度を調べると、 α -CDにくらべて β -CD、 γ -CDの場合きわめて減少していることがわかる(いずれもコンタクト時内 1 m³)。このことは、 β 、 γ -CD内においてはゲスト分子の内部運動が大きく、結果としてホストの7つの1,6-グルコース残基のコンホメーションを等価にしている。分子運動によってCPトランスファーが阻害されるからである。

B. α -、 β -CD包接体の比較

同一ゲスト分子について、 α -、 β -CD包接体と比較し、ホスト、ゲスト分子の挙動と比較しよう。

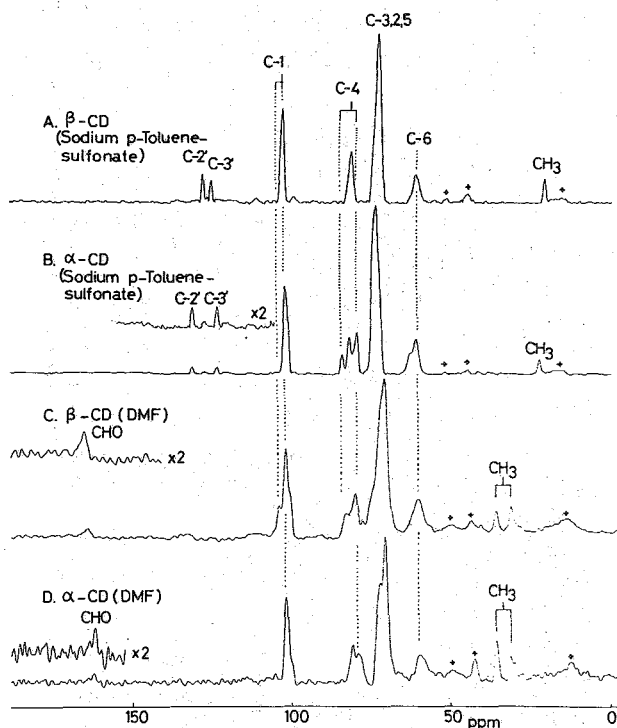


図3. α -および β -CD包接体の ^{13}C CP/MAS スペクトル

図3に示すように β -トルエンスルホン酸ナトリウム, DMF をゲストとした場合, α -, β -CD ともゲスト分子のピークが観測できる。前者をゲストとしたとき, 7個のグルコース残基はほぼ等価になり, 化学シフトの値も α -CD-ベンゼンスルホン酸ナトリウムの場合にほぼ同じとなっている。ただし, C-6 ピークは 59.9 ppm で, β -CD のコンホメーションでみることが異なる。しかし, α -CD に包接したときは図3Bのように環のひずみが生じ, C-4 ピークは3本に分裂する。ゲスト分子の C-2', C-3' シフトは α -CD で 131.0, 123.1 ppm, β -CD で 128.0, 125.6 ppm で, その差はそれぞれ 7.9 ppm, 2.4 ppm である。前報で α -CD にベンゼンスルホン酸ナトリウムが α -CD に包接したとき α -CD のシフト差が狭まって大きく変わったことと対応して, スルホン酸塩のゲスト分子の特性はきわめて興味ある問題である。

サイズの小さいゲスト分子の場合, β -CD に包接されるとその分子運動のためにピークが消滅してしう現象は, 図4C, E の場合にみてもみられる。しかし, ベンズアルデヒドの場合には逆に, α -CD のときピークが消滅し, β -CD のときにはゲスト分子のピークが明確にみられる。前者については原因のX線回折データがあり, ゲスト分子のベンゼン環が α -CD の空洞内にヒリこまれ, カルボニル基が突き出して α -CD の一級 OH 基とファンデルワールスコンプレックスを形成している。このことから考えて, ゲスト分子ピークが消滅する理由は現在のとこよくわからない。

図5および図4Eに載せるアミノ酸と β -CD に包接したときの CP/MAS NMR スペクトルを示す。まず α -CD に, これらの場合ゲスト分子のピークが全く観測されてはいない。さらに, 側鎖の違い (CD, L もしくは D) によるホスト分子への影響は全く変化していないことがわかる。また, スペクトル線がピークの分裂が少なく, L-メチ

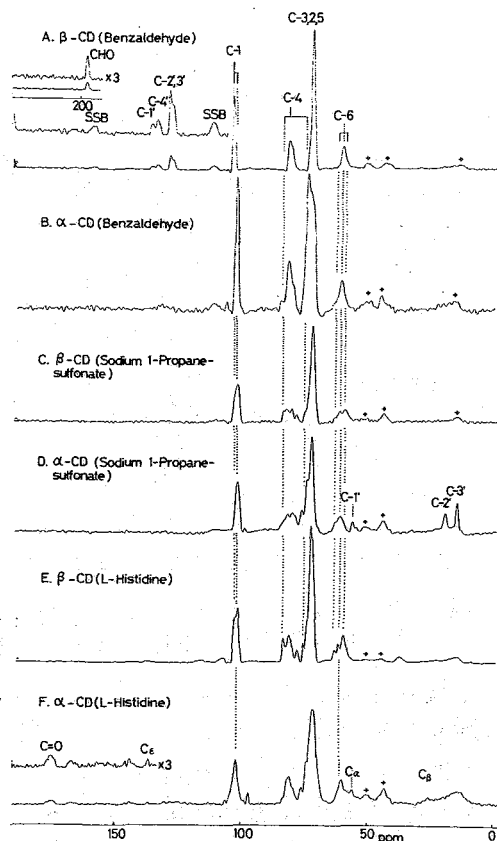


図4. 種々のゲストと包接した α -, β -CD の CP/MAS NMR スペクトル (CP 時間 1 秒)

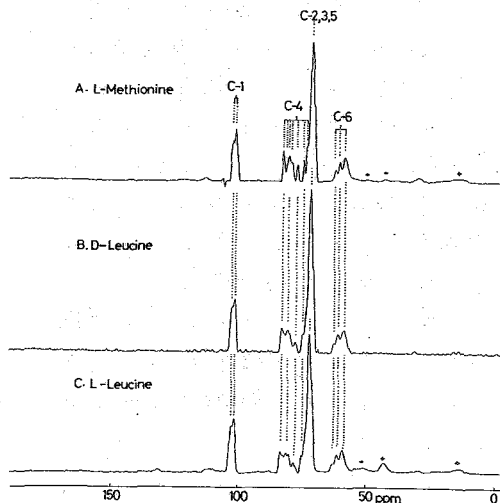


図5. 種々のアミノ酸と包接した β -CD の CP/MAS NMR スペクトル (CP 時間 1 秒)

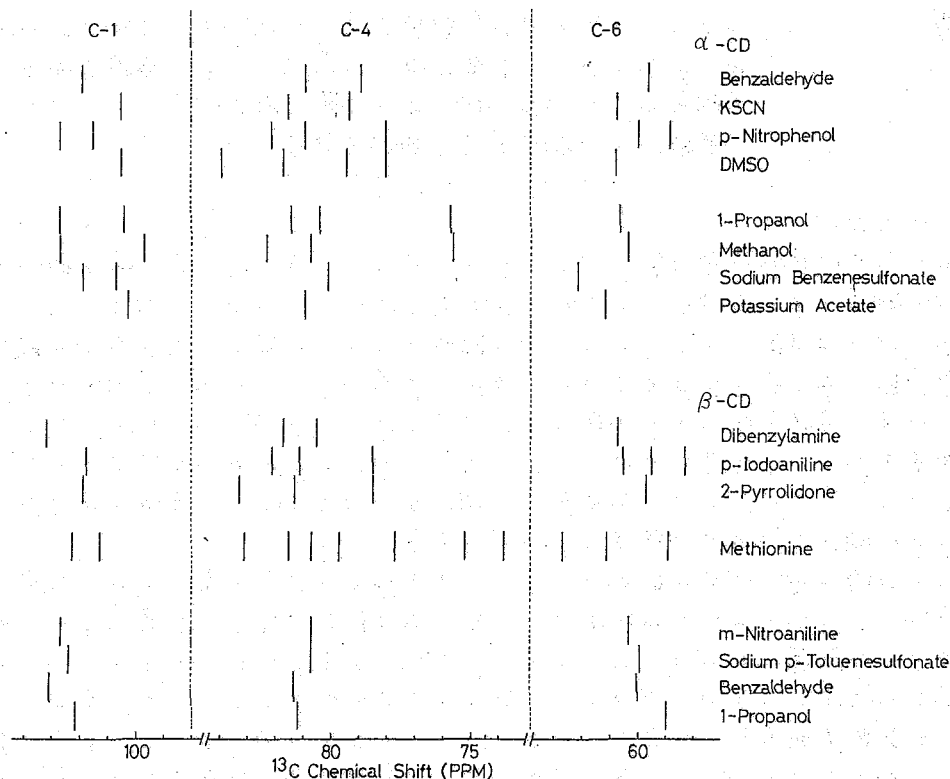


図6 各種ゲストとを接した α -, β -CD の C-1, C-4, C-6 ^{13}C シフトの比較

オニンの場合 7 種類のグルコース残基の C-4 ピークがすべて分離しており、7 種類のグルコース残基が非等価であることも示している。それゆえ、これらの包接化合物の X 線回折がみえれば、 ^{13}C シフトと X 線回折の解明にきわめて有用である。

図6にこれまでに調べたゲスト分子の包接化合物を示すため、これらのゲストの C-1, C-4, C-6 ピークと比較している。包接に与えるホスト分子のゆがみの程度は、明らかに化学シフトの分布から多様であることがわかる。とくに、X 線回折データが得られているものと電スペクトルが観測されているものは、逆にホストのコンホメーションが観測されていることが、これからの結果から結論できよう。

4. 結論

シクロデキストリン包接化合物のホスト-ゲスト相互作用、とくにゲストの動的挙動が相互作用に重要な役割りを果たしていることが、 ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルから明らかにすることができた。

(1) M. L. ベンダー, M. コシヤマ, “シクロデキストリンの化学”, 学芸出版センター,

(2) 斉藤, 和泉, 多田, 中川, 同 NMR 討論会要旨集, 1982

(3) K. Lindner and W. Saenger, Carbohydr. Res., 99, 103 (1982) (4) J. M. MacLennan and J. J. Stezowski, Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 926 (1980) (5) K. O. Jogun and J. J. Stezowski, Nature, 278, 667 (1979), (6) K. Lindner and W. Saenger, Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 933 (1980)

(7) K. Harata, K. Uekama, M. Otagiri, F. Hirayama, and H. Ogino, Bull. Chem. Soc. Jpn., 54, 1954 (1981)

シクロデキストリン包接体の ^{13}C CP/MAS NMR。ホスト分子
のコンホメーション変化とコンホメーション依存シフト
(国立がんセンター研・生物物理^{*}、微化研)
○齊藤 肇, 和泉儀一^{*}, 多田涼子

1. はじめに

われわれは通常溶液 ^{13}C NMRにおいてほすどのスペクトル線を観測する。これは内題といている分子のコンホメーションのゆらぎがあったとしても、個々のコンホマーに対応するスペクトル線を観測しているのではなく、NMR観測時間内の平均値のみをみているのに他ならない。通常はこのことが ^{13}C NMRピークの単純化に導き、分析手段として有用にしているわけであるが、コンホメーションに関する情報を失ってしまうことになる。しかし、 ^{13}C シフト値とコンホメーションと表現するパラメーター例えば二面体角とを対応がつけられれば、溶液状態のコンホメーションに関する¹情報がかりを得ることができよう。

この目的には、固体状態でのスペクトルを測定し、その ^{13}C シフトとX線回折その他で明らかにされているコンホメーション角と対応づけるのが最も良い。われわれは種々の多糖類において、コンホメーション依存 ^{13}C シフトと与えるのは、C-EおよびC-X炭素といずれもグリコシド結合にあるものであることと²、固体および溶液のシフト変化から論じてきた。しかし、このような目的にはシクロデキストリン包接体を用いるのがよい。これはゲスト分子の包接によって種々のコンホメーション角をもったグルコース残基が存在し得ることが、X線回折³によって明らかにされているからである。

本報告では、X線回折でその構造が明らかになる包接体を用いて、 ^{13}C シフトとコンホメーションの関係を明らかにする。

2. 実験方法

シクロデキストリンは生化学工業より購入し、 n -プロパノールを用いて再結晶により精製した。包接化合物の調製はいずれも、ゲスト分子と過剰にJくで水溶液から再結晶を行う。包接のチェックは、後述するように(1) ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルでゲスト分子のピークが観測できるか、(2)包接によるコンホメーション変化がみられるか、のいずれかによった。

^{13}C CP/MAS NMRスペクトルの測定は、Bruker CXP-300 スペクトロメーターを用い、75.46 MHzで行なった。試料は約 200~300 mg と重水素化 MMA から工作した Andrew-Beams 型ローターにつめ、30.4 KHz のマジックアングルスピニングを行なった。化学シフトはあらかじめベンゼン ^{13}C シフトを TMS に対して求めたとき、これを基準にあらわした。Contact 時間、くり返えし時間はそれぞれ 1 m 秒、2 秒、また積算回数は 500~1000 である。

3. 実験結果と考察

図1に α -シクロデキストリン(シクロヘキサアミロース)および各種のゲスト

分子の包接体の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。一般に、凍結乾燥試料(G)にくらべてゲスト分子ととりこめ結晶化した試料のNMR スペクトル(A~F)は線幅が著しく減少している。これは前者の場合必ずしも一義的なコンホメーションの集合体であるとは限らず、このために線幅の広がりが生じているからである。さらにピークの分裂パターンが、C-1およびC-4ピークにおいて、凍結乾燥試料と著しく変っており、ゲストを包接することによりホストのコンホメーション変化が起こることがわかる。いしか之れは、ゲスト分子の包接は、C-1およびC-4ピークのパターンが変化することにより容易に判定できる。さらに、A~Dのゲスト分子の場合、ゲストに由来するピーク(いずれもプライムをつけることによる表示)が観測できる

ゲスト分子の ^{13}C シフトは、表1にまとめようように一般には包接体において水溶液中の値とは変らない。(酢酸カリウムをゲストとした場合、天然存在比の条件ではカルボキシル基のピークの観測は困難であった。そのため、 ^{13}C 標識化合物をゲストとして使用し表1の結果を得た。)しかし、ナトリウムベンゼンスルホネートの場合、C-1'、C-4'ピークは包接体では水溶液中の値にくらべてそれぞれ26, 12 ppm 低磁場シフトしていることがわかる。このような異常なシフト変化は、一部にはナトリウムイオンがX線回折の結果シクロデキストリンのキヤビティの外側に分布していることか理由と考えられる。このような大きなシフト変化するゲストはその他のスルホネート化合物においてもみられた。

さて、ホスト分子のC-1およびC-4シフトの変化と、それに対応するグルコース残基のコンホメーションの関係を詳細に知るには、X線回折により与えられるグリコシド結合

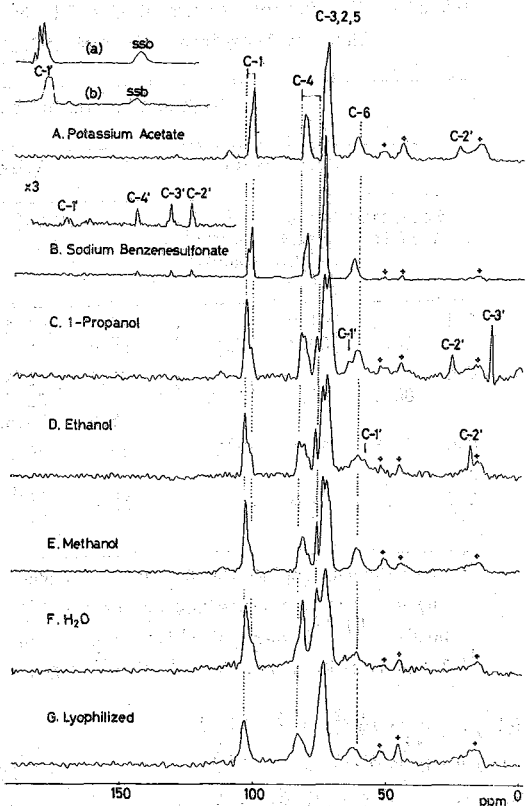


図1. 結晶 α -シクロデキストリン(シクロヘキサアミロース)包接化合物の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル (75.46 MHz)

Table 1. ^{13}C Chemical Shifts of Guest Molecules Enclosed in cyclodextrin (ppm from TMS)

	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'
Potassium acetate	177.6 (181.5) ^a	22.5 (21.1) ^a		
Sodium Benzene-sulfonate	169.3 (142.9) ^b	123.8 (122.7) ^b	131.4 (129.3) ^b	144.0 (131.8) ^b
1-Propanol	63.4 (63.9) ^a	24.4 (26.1) ^a	9.4 (10.3) ^a	
Ethanol	57.4 (57.3) ^a	17.6 (17.9) ^a		

^a Data taken from Stothers (Carbon-13 NMR Spectroscopy)

^b Measured at 75.46 MHz.

Table 2. ^{13}C Chemical shifts of crystalline cyclohexaamylose inclusion complexes together with those of V-amylose (ppm from TMS, ± 0.5 ppm)

Crystalline inclusion complexes								Amylose ^{b)}		
Symmetrical			Asymmetrical					V-amylose	Di-hedral angles ^{a)}	Aqueous soln.
Potassium acetate	Sodium benzene-sulfonate	Di-hedral angles ^{a)}	H ₂ O	Methanol	Ethanol	1-Propanol	Di-hedral angles ^{a)}			
C-1	101.9	169 $\pm 1^{\circ}$ ^{c)}	102.1	102.3	102.7	102.7	160 $\pm 2^{\circ}$ ^{d)}	102.6	179 $^{\circ}$ ^{e)}	100.3
	100.3		99.3	99.7	99.9	100.4	169 $\pm 7^{\circ}$ ^{d)}			
C-4			81.1	82.3	82.1	81.4	-183 $\pm 7^{\circ}$ ^{d)}	82.4	-180 $^{\circ}$ ^{e)}	77.9
	80.9	-171 $\pm 2^{\circ}$ ^{c)}		80.7	80.5	80.4	-168 $\pm 9^{\circ}$ ^{d)}			
			75.6	75.6	76.2	75.7	-150 $\pm 5^{\circ}$ ^{d)}			
C-6	61.1	g ⁺ t	60.7	60.3	60.1	60.6	g ⁻ g ⁺	62.4	g ⁺ t	61.4
C-3										74.2
C-2	72.6	73.6	72.6	73.0	73.6	73.1		73.2		72.4
C-5				71.6	72.0	71.5				72.0

a) The dihedral angles for C-1 and C-4 carbons are given by the ϕ and ψ , respectively. The angle for C-6 is expressed by the C-6-O-6 orientation with respect to C-4-C-5 and O-5-C-5 bonds. b) ^{13}C chemical shifts data taken from Ref. 1g. c) Taken from Refs. 2b and 2f. d) Taken from Refs. 2a, 2e and 2f. e) Taken from Ref. 3.

回りの二面体角 (ϕ, ψ)

との関係を知るのが好

ましい。図2に定義する

ように、 ϕ は $\text{O}(4)n \cdots \text{C}(1)n$

$-\text{O}(4)n+1-\text{C}(4)n+1$,

ψ は $\text{C}(1)n-\text{O}(4)n+1-\text{C}(4)n+1 \cdots \text{O}(4)n+2$ である。具

体的には、1-プロパノールを包接した場合のX線回

折結果を図3に示すが、残基5の二面体角はそれ

のものにくらべて著しくずれていることがわかる。

その他にコンホメーション依存シフトをしめるのは図3. 1-プロパノール-シクロ

C-6シグナルで、実際に図1ビーグを包接によって

変化していること、および凍結乾燥試料および未精製試料においてはC-6シグナル

に大きな分布がみられる。この場合はC-6-O-6結合が、C-4-C-5およびO-5-

C-5結合に対して g^+ または t であるによって分類することがよく、ここでは g^+ または

g^- または g^-g^+ の二つの配置に大ざっぱに分類することにした。

興味あることに、表2および図1から得られるC-1およびC-4のシフトの範囲は

それぞれ3 ppm, 6.7 ppmで、前者にくらべて後者のシフト範囲は2倍以上ある。

これはC-1-Ogly, Ogly-C-4結合距離がそれぞれ1.408 Å, 1.434 Åと後者の方が

長く、また ϕ と ψ の包接によって変化する角度が前者で 14° , 後者で $35 \sim$

50° であることに対応している。X線回折によれば、酢酸カリウム^{2a)2f)}, ベンゼンスル

ホン酸ナトリウムと包接した α -シクロデキストリンの6個のグルコース残基はほ

ぼ等面^{2f)}で、 $\phi = 169 \pm 1.2^\circ$, $\psi = -171 \pm 2^\circ$ である。これに対して、H₂O, メタノール

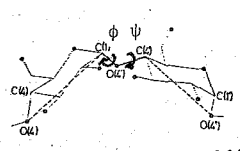
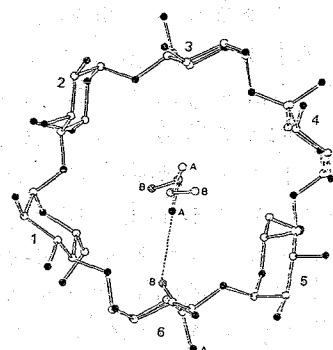
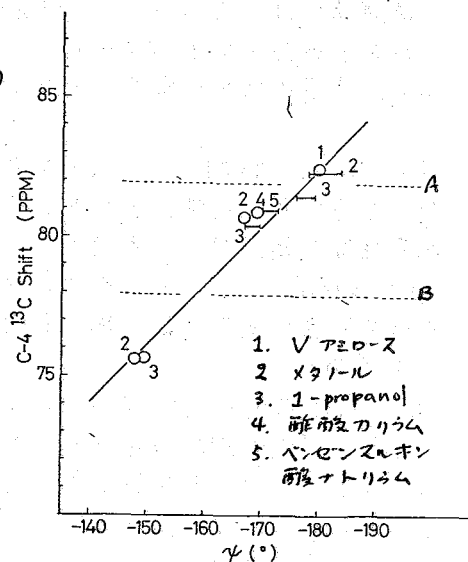
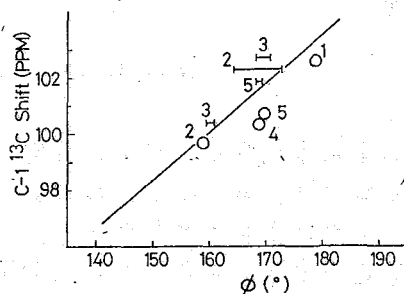


図2 二面体角の定義^{2a)}



2b) 1-フロバノール^{2a)}を包接したときの6個のグルコース残基はもはや等価ではなく、個々のグルコース残基の二面体角 ϕ , ψ は次の2, 3, 4, 5は3種類の領域に分布する。すなわち $\phi = 160 \pm 2^\circ$, $169 \pm 7^\circ$, $\psi = -183 \pm 7^\circ$, $-168 \pm 9^\circ$, $-150 \pm 5^\circ$ 。これらの値に於いて、酢酸カリウム、ベンゼンスルホン酸ナトリウムと包接した針形³⁾の包接体と、それ以外の非針形包接体ではC-1, C-4ピークの形が著しく異なり、しかも後者の場合は上の ϕ , ψ の分布の傾向に大きく一致する。図4に与えようように、V-アミロースをふくめて、メタノール、1-フロバノール、酢酸カリウム、ベンゼンスルホン酸ナトリウムのシフトと ϕ , ψ の関数のプロットはほぼ直線関係を与え、それぞれの方之方が正しいことを示している。すなわち、図4のプロットで、A, Bとしたのはそれぞれ水溶液中の α -シクロデキストリンと β -アミロースのシフト値であり、溶液中のアミロースは ψ の値として小さくても $\psi = -150^\circ$ に近づく傾向の結果とみていることにする。さらに、表2に於いてはC-6シフト値は g^+g^- , g^-g^+ 形で約2 ppmのシフト差があることを示している。



以上の結果とよみあわせ、グリコシド結合に 図4 のシフト値と二面体角の関係あるC-1, C-4炭素、そしてC-6 シフトは、コンホメーションによって変化した、X線回折に於いて得られた二面体角とよく一致する。これらの結果は、多糖の構造(アミロース)およびシクロデキストリンの包接化能のキャラクタリゼーションに使用できる。後者については、近報にその詳細を論ずる。

- 1) (a) H. Saito, T. Ohki, and T. Sasaki, *Biochemistry*, **16**, 908 (1977); (b) H. Saito, T. Ohki, N. Takasuka, and T. Sasaki, *Carbohydr. Res.*, **58**, 293 (1977); (c) H. Saito, E. Miyata, and T. Sasaki, *Macromolecules*, **11**, 1244 (1978); (d) H. Saito, T. Ohki, and T. Sasaki, *Carbohydr. Res.*, **74**, 227 (1979); (e) H. Saito, *ACS Symp. Series*, No. 150, pp. 125-147 (1981); (f) H. Saito, R. Tabeta, and T. Harada, *Chem. Lett.*, 1981, 571; (g) H. Saito, and R. Tabeta, *Chem. Lett.*, 1981, 713; (h) H. Saito, R. Tabeta, and S. Hirano, *Chem. Lett.*, 1981, 1479; (i) H. Saito, R. Tabeta, and S. Hirano, in "Chitin and Chitosan, Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan", ed. by S. Hirano and S. Tokura, p. 71, 1981, Japanese Society of Chitin and Chitosan.
- 2) a) W. Saenger, R. K. McMullan, J. Fayos, and D. Mootz, *Acta Cryst.*, **B30**, 2019 (1965); (b) A. Hybl, R. E. Rundle, and D. E. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2779 (1965); (c) P. C. Manor, and W. Saenger, *Nature*, **237**, 392 (1972); (d) P. C. Manor and W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3630 (1974); (e) B. Hingerty, and W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3357 (1976); (f) K. K. Chacko, and W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1798 (1981); (g) K. Harata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **98**, 1031 (1976).
- 3) W. T. Winter, and A. Sarko, *Biopolymers*, **13**, 1447 (1971).

(化技研) ○ 林 繁信, 早水 紀久子, 山本 修

金属水素化物は、水素の貯蔵・輸送手段として注目を集めている物質である。IVa族(Ti, Zr, Hf)及びVa族(V, Nb, Ta)の遷移金属は水素ガスと反応して安定した水素化物を形成する。TiとVは広い温度領域にわたって固溶体を作り、その合金の水素化物は組成に応じて変化する性質を持つと期待できる。

本研究では、 $Ti_{1-y}V_yH_x$ ($0.4 \leq y \leq 0.8$, $x \sim 1$) の構造を、X線回折に ^{51}V 及び 1H NMRを合わせて用い、明らかにした。さらに、 1H NMRを用いた温度変化の測定から、構造の温度依存性や水素の拡散に関する知見が得られた。

＜実験＞ i) 試料: Ti-V合金、Ti, Vを水素化・脱水素化のサイクルを繰り返して活性化した後、適量の水素を導入して水素化物を合成した。水素化物中の水素量は、高温にして脱離してくる水素の体積から求めた。

ii) X線回折: 粉末X線回折パターンを、理学電機 Rotaflex 及び Geiger-flex を用いて室温で測定した。格子定数は RSLC-3 プログラムを用い、最小二乗法によって求めた。

iii) NMR測定: 試料は200メッシュの粉末に粉碎し、ガラスアンプルに真空封入した。 ^{51}V 及び 1H ワイドラインスペクトルは、バリアン社ワイドライン分光器を用いて測定した。測定周波数はそれぞれ15, 35 MHzであり、バリアン社 V-7570 フィールドダイヤル Mark II を使って磁場を掃引した。

フーリエ変換 (FT) スペクトルの測定には、ブルカー社 CXP-100 を用いた。測定周波数は55 MHzで、125~425 Kの範囲で温度を変化させた。

＜結果及び考察＞ i) X線回折: Table 1に粉末X線回折パターンの解析結果をまとめた。

Ti-V合金の水素化物は、fcc, bct, hcpの構造を持つ三つの相から成っている。各相の割合は、合金の組成及び水素量によって異なっている。

$Ti_{0.20}V_{0.80}H_{0.77}$ では bct 相がほとんどであるが、 $Ti_{0.40}V_{0.60}H_{0.79}$, $Ti_{0.60}V_{0.40}H_{0.90}$ では bct と fcc がほぼ同量存在している。水素量の多い $Ti_{0.60}V_{0.40}H_{1.78}$ では

Table 1. Lattice constants obtained from the X-ray diffraction measurements.

Hydride	x	fcc		bct		hcp	
				a_0	c_0	a_0	c_0
TiH_x	0	—	—	—	—	2.950 ^a	4.686 ^a
	0.94	4.403	—	—	—	2.949	4.687
	1.95	4.458	—	—	—	—	—
$Ti_{0.60}V_{0.40}H_x$	0.90	4.42	3.06	3.55	—	—	—
	1.78	4.39	—	—	—	3.05	5.10
$Ti_{0.40}V_{0.60}H_x$	0.79	4.39	3.08	3.25	—	3.01	5.04
$Ti_{0.20}V_{0.80}H_x$	0.77	4.37	3.07	3.32	—	3.03	5.09
VH_x	0.77	—	3.034 ^b	3.410 ^b	—	—	—
	1.6	4.275	3.02	3.46	—	—	—

^a The Chemical Society of Japan, "Kagakubinran Kisoheon II," second ed, p.931, Maruzen, Tokyo (1975).

^b S. Hayashi, K. Hayamizu, and O. Yamamoto, submitted for publication.

^c The existence of this phase cannot be rejected.

はやし 繁信, はやみず きくこ, やまもと おさむ

fcc相がほとんどである。hcp相はどの水素化物においても少量しか存在しない。 TiH_x 及び VH_x においては水素量に応じて1つないし2つの相が存在するが、 $Ti-V$ 合金の水素化物の各相は、 TiH_x 、 VH_x のどれかの相に由来していると考えられる。hcp相は TiH_x の α 相、bct相は VH_x の β 相、fcc相は TiH_x もしくは VH_x の γ 相に由来していると考えられる。

ii) ^{51}V ワイドラインスペクトル:

図1に ^{51}V ワイドラインスペクトルを示した。Table 2にその結果をまとめた。

VH_x のスペクトルでは、 α 相は -80 G 、 β 相は $-90 \sim -100\text{ G}$ 、 γ 相は 0 G 付近に ^{51}V シグナルが現われる。

$Ti_{0.60}V_{0.40}H_{0.90}$ 、 $Ti_{0.40}V_{0.60}H_{0.79}$ 、 $Ti_{0.20}V_{0.80}H_{0.77}$ のスペクトルは、 β 相の ^{51}V シグナルしか示さないことから、 V 原子は β (bct)相にしか存在しないことがわかる。 α (hcp)相は少量しか存在しないため、 ^{51}V NMRでは検出できない。 γ (fcc)相は V 原子を含んでいないことから、 TiH_x の γ 相であることがわかる。

一方、 $Ti_{0.60}V_{0.40}H_{1.78}$ の ^{51}V スペクトルは β 、 γ の二相の存在を示している。X線回折の結果からは β (bct)相の存在は不明だが、 ^{51}V NMRによりその存在が立証された。また、水素量が多いと V 原子を含む γ 相が生成することがわかった。

iii) 1H ワイドラインスペクトル:

図2に 1H ワイドラインスペクトルを示し、Table 2にその結果をまとめた。線幅の異なる2つの成分が観測された。

TiH_x では線幅の広い γ 相の 1H のみが観測されるが、 VH_x では狭幅の β (及び α)相と広幅の γ 相が観測さ

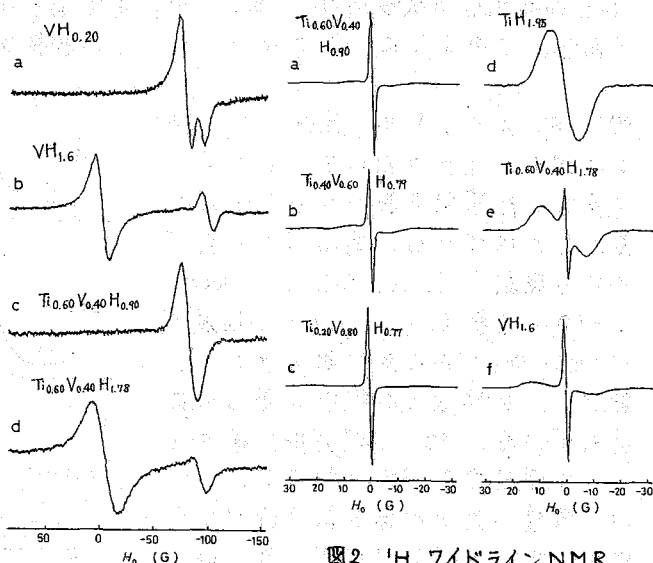


図1. ^{51}V ワイドラインNMR スペクトル (室温, 15MHz).
基準: NH_4VO_3 水溶液.

図2. 1H ワイドラインNMR スペクトル (室温, 35MHz).
基準: $CuSO_4$ 水溶液.

Table 2. Shifts and linewidths^a (in parentheses) of ^{51}V and 1H NMR spectra at room temperature in Gauss unit.

Hydride	x	^{51}V ^b			1H ^c	
		α	β	γ	narrow	broad
TiH_x	0.94					0.7(14)
	1.95					1.7(11)
$Ti_{0.60}V_{0.40}H_x$	0.90		-83(15)		0.6(0.5)	1.0(13)
	1.78		-93(14)	-5(25)	0.7(0.7)	1.3(17)
$Ti_{0.40}V_{0.60}H_x$	0.79		-84(20)		0.6(0.6)	1.0(14)
$Ti_{0.20}V_{0.80}H_x$	0.77		-99(11)		0.5(0.7)	
VH_x	0.20	-79(11)	-91 ^d		0.6(1.6)	
	0.41	-79 ^d	-92(10)		0.7(1.2)	
	0.77		-102(11)		0.7(0.8)	
	1.6		-100(11)	-1.5(13)	0.7(0.7)	2.2(24)

^a The width between the two extrema was measured in the derivative spectra.

^b NH_4VO_3 aq. is used as a reference.

^c H_2O is used as a reference.

^d This peak is a shoulder.

れる。Ti-V水素化物では、 $\text{Ti}_{0.20}\text{V}_{0.80}\text{H}_{0.77}$ が狭幅成分のみである他はすべて2つの成分が観測された。 $\text{Ti}_{0.20}\text{V}_{0.80}\text{H}_{0.77}$, $\text{Ti}_{0.40}\text{V}_{0.60}\text{H}_{0.79}$, $\text{Ti}_{0.60}\text{V}_{0.40}\text{H}_{0.90}$ の狭幅成分は、bct相とhcp相の水素である。また、 $\text{Ti}_{0.40}\text{V}_{0.60}\text{H}_{0.79}$, $\text{Ti}_{0.60}\text{V}_{0.40}\text{H}_{0.90}$ の広幅成分は、X線回折及び ^{51}V NMRの結果と合わせ考えて、 $\gamma\text{-TiH}_x$ (fcc)相である。一方、 $\text{Ti}_{0.60}\text{V}_{0.40}\text{H}_{1.78}$ の狭幅成分はbct, hcp相であるが、広幅成分はV原子を含むfcc相である。このように、 ^1H スペクトルから、拡散の速さの異なる水素が区別できる。

iv) ^1H FT スペクトル (室温): 種々のパルス系列を用いることによって異なった情報を持つスペクトルを得ることができる。通常は単一のパルスを照射して Free Induction Decay (FID) を観測する。Solid echo法では $90^\circ\text{-}90^\circ$ パルス系列後のエコーを観測し、広幅成分の線形を得るのに有用である。 $90^\circ\text{-}180^\circ$ パルス後のエコーを観測する Spin echo法においては、同種の核の双極子相互作用で広幅化している成分は観測されない。

図3に $\text{Ti}_{0.60}\text{V}_{0.40}\text{H}_{0.90}$ のスペクトルを示した。Spin echo法において広幅成分が消失することがわかる。Tiの双極子は無視し得るがVの双極子が無視できないことを考えると、この広幅成分の水素の近傍にはV原子が無いと言える。則ち、 TiH_x の相である。これは ^{51}V NMRの結果と一致している。 $\text{Ti}_{0.40}\text{V}_{0.60}\text{H}_{0.79}$ においても同じようなことが言える。

図4に $\text{Ti}_{0.60}\text{V}_{0.40}\text{H}_{1.78}$ のスペクトルを示した。この水素化物においては、Spin echo法を用いても広幅成分が現われる。これはV原子を含むfcc相の存在を裏づけている。Solid echo法においてSpin echo法より広幅成分の割合がはるかに大きいのはV原子を含まないfcc相の存在を示している。則ち、水素量の大きい水素化物では、fcc相はV原子を含む相と含まない相の二相が混在している。

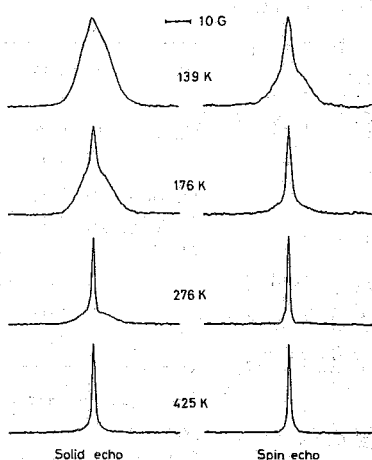


図5. $\text{Ti}_{0.40}\text{V}_{0.60}\text{H}_{0.79}$ の ^1H FT スペクトル。
パルス間隔は $10\ \mu\text{s}$ に固定。

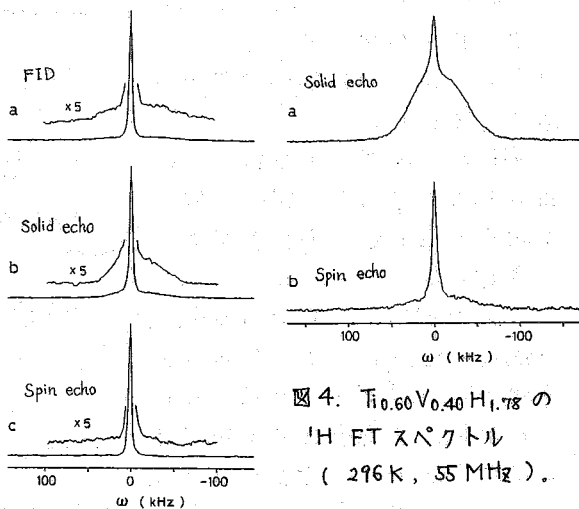


図4. $\text{Ti}_{0.60}\text{V}_{0.40}\text{H}_{1.78}$ の ^1H FT スペクトル
(296 K, 55 MHz)。

図3. $\text{Ti}_{0.60}\text{V}_{0.40}\text{H}_{0.90}$ の ^1H FT スペクトル (296 K, 55 MHz)。

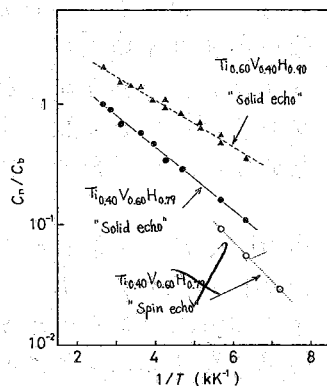
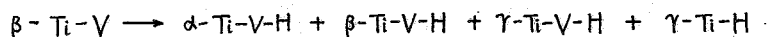


図6. ^1H FT スペクトルにおける
狭幅成分/広幅成分比。

v) Ti-V-H 系の構造:

Ti-V系は広い温度領域で固溶体 (β -Ti-V相) を作るが、水素化することによっていくつかの相に分離することがわかった。それを



と表わすことができる。 α -Ti-V-H相はhcp構造をとり、少量しか存在しない。X線回折でのみその存在が確認された。 β -Ti-V-H相はbcc構造をとっている。 β -Ti-V相(bcc)と β -Ti-V-H相の関係はバナジウム単独の場合のV金属(bcc)と β -VH_x(bcc)とに類似している。 γ -Ti-V-H相はfcc構造をしており、水素量が多い時に現われる。この相は γ -VH_x相類似と考えられる。 γ -Ti-H相はfcc構造をとっており、水素化する際に新しくできる相である。

このように、全率固溶体を作る系においても水素化による相分離が見られるが、これは、 γ -TiH_xが非常に安定なことに起因していると考えられる。

vi) 構造の温度依存性 (¹H NMR スペクトル): 図5にTi_{0.40}V_{0.60}H_{0.79}の¹H FTスペクトルの温度変化を示した。200~400 KにおいてSolid echo法では線幅の異なる2つの成分が観測されるが、Spin echo法では狭幅成分のみが観測される。狭幅成分は β -Ti-V-H相、広幅成分は γ -Ti-H相である。二成分の比の温度変化を図6にプロットした。約1.3 kcal/molの傾きである。400 K以上では、Solid echo法でも狭幅成分しか観測できない。 γ -Ti-H相の消失、もしくは¹Hの拡散による尖鋭化と考えられる。200 K以下においては、Spin echo法によるスペクトルにも広幅成分が現われる。 β -Ti-V-H相の一部の水素が双極子相互作用による広幅化を起こし始めたと考えられる。このことから、低温において拡散の速さの異なる二種類の水素が存在することがわかる。この β -Ti-V-H相における二種類の水素の割合を温度に対してプロットすると、そのエネルギー差は約1.5 kcal/molとなる(図6)。

Ti_{0.60}V_{0.40}H_{0.90}においても同様な温度変化が見られる。 β -Ti-V-H相と γ -Ti-H相のエネルギー差は図6より約0.9 kcal/molである。 β -Ti-V-H相の広幅成分は150 K以下で現われる。400 K以上では、Solid echo法でも狭幅成分しか観測されない。

Ti_{0.20}V_{0.80}H_{0.77}では、 γ -Ti-H相は¹H NMR スペクトルには現われない。 β -Ti-V-H相の広幅成分は170 K以下で現われる。

β -Ti-V-H相の水素が低温において二成分に分かれる現象は、 β -VH_xでも見られる。 β -VH_xでは、水素が規則的にbcc格子のすきまを埋めて、サイトの違いによって二種類の水素に分かれる。 β -Ti-V-H相でも同様な水素配列をしていると考えられる。

図7に、狭幅成分の線幅の温度変化を示した。低温においていずれも広幅化し始めているが、 β -Ti-V-H相の広幅成分の出現よりその温度は低く、motional narrowingの起きる温度領域が少しシフトしているために二成分が観測されるものと思われる。

X線回折の測定・解析にあたり有益な助言をいただいた本研究所の小野修一郎博士に謝意を表します。

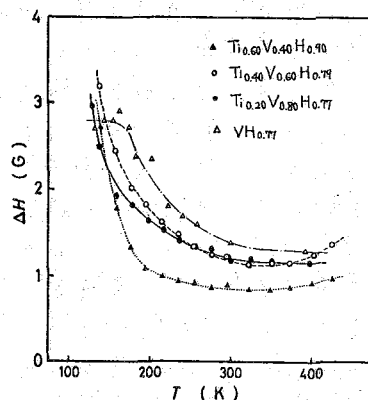


図7. ¹H FTスペクトルにおける狭幅成分の半値全幅の温度変化 (55 MHz).

(名大理) 池田 龍一

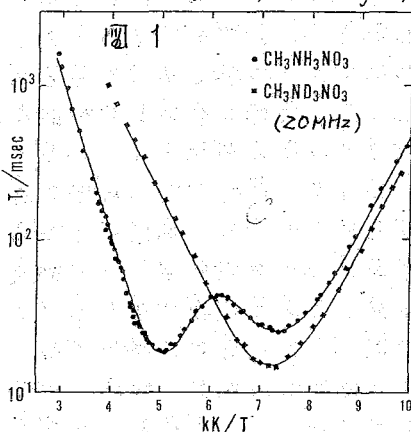
イオン結晶中のイオンの運動は、分子性結晶の場合と比較して、結晶場によって強く束縛されていることが多いと考えられる。筆者らは、イオン結晶内においても、束縛がでるだけ小さい、自由に運動するイオンの挙動に興味を持ち、その運動および、運動と相転移の関係をNMR, NQRなどを手段として研究してきた。本講演では、 ^1H -NMRを用いて、アンモニウムイオン、および簡単なアルキルアンモニウムイオンの結晶中における運動について明らかにした結果を報告する。

アルキルアンモニウムイオンについて、 ^1H -NMRで観測される主な運動は、陽イオン全体、または、イオン内のグループのrandomな再配向運動である。これらの運動は、通常、77K~室温の温度領域で、陽子間の磁気双極子緩和を強く引き起こすことはよく知られており、数多くの研究が報告されている。本研究で取り上げた束縛が小さいメチルアンモニウムイオンの場合、これらの運動の他に、運動が強く束縛されているイオンでは実現されない新しい型の再配向運動モードが見い出された。また、これら束縛の小さい再配向の相関時間が、室温以上で、液体中と同程度まで短くなる場合があり、そこでは、スピン回転緩和がスピン格子緩和時間(T_1)に寄与していると考えられる結果が得られた。さらに高温においては、NMRで観測している限りでは、陽イオンの融解と解釈される結晶相を数種のメチルアンモニウム化合物について見つけた。この結晶相では、陽イオンの等方的回転の他にイオンの拡散が起きている。一方、77K以下の低温では、これらの再配向運動に対応する量子力学的な陽子交換(tunneling)の T_1 および共鳴吸収の線形に与える影響が観測されるようになる。今回は、アンモニウムイオンのtunnelingによって生ずる特徴的な共鳴線形と、その線形から得られたように小さいtunnelingについて報告する。

1. 新しい型の再配向運動

methylnammonium ion: 温度上昇とともに CH_3NH_3^+ (以下 MA^+ と略す) イオンが取る運動状態の変化を考えてみる。通常の化合物では、 NH_3 基は CH_3 基に比べ、より強い水素結合を作っていると予測されるので、 NH_3^+ 基の C-N 軸まわりの 120° jump (再配向) は CH_3 基の場合より起りにくいと考えられる。したがって、図1に示した MANO_3 の例¹⁾ のように、 ^1H の T_1 を測定すると、低温側に CH_3 基の再配向による T_1 極小が観測され、高温側に NH_3 基の極小が現われている。しかし、 MA^+ イオンが受ける束縛が小さいと、運動モードが変わってくることもある。今、 CH_3 基、 NH_3^+ 基の再配向を妨げている potential barrier をそれぞれ V_C , V_N とし、イオン内回転の barrier を V_{CN} とする。 V_{CN} , $V_C < V_N$ であれば、上述のような運動の変遷が観測される。

いけて、りゆういち



しかし束縛が小さければ、 $\nu_C, \nu_N < \nu_{CN}$ となることも十分考えられる。そのととは、温度上昇とともに、まず MA^+ イオン全体が rigid な構造を保ったまま C-N 軸周りに回転 (correlated rotation) し、ついで CH_3 基、 NH_3 基の独立な回転 (uncorrelated rotation) が起こるようになる。実際このような運動が図2に T_1 を示した $(MA)_2MCl_6$ 型錯塩²⁾ において起っていることが明らかになった。図中の低温側の大きな T_1 極小が correlated rot. によるもので、 $kK/T \sim 10$ 附近の小さな極小が uncorrelated rot. による極小である。後者の T_1 曲線から MA^+ イオンのイオン内回転の活性化エネルギーの値 ($E_a \cong 8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) が求められている^{2,3)}。

tetramethylammonium ion: 結晶中の $(CH_3)_4N^+$ (以下 $tetMA^+$ と略す) イオンの運動は結晶場の対称性が高ければ、 CH_3 基の再配向とイオン全体の等方的再配向運動が考えられる。実際、種々の $tetMA$ 化合物について、これらの運動が観測されている。束縛が小さい陽イオンを持つ $(tetMA)_2MBr_6$ 型錯塩においては、 T_1 の温度変化の例⁴⁾ が図3に示されているように、実測の T_1 は三つの BPP 曲線を重ね合せになった。高温側の極小は陽イオン全体の等方的回転でほぼ説明できる。中・低温の二つの極小はどちらも CH_3 基の再配向に関連していると考えられるので、この結晶は、 CH_3 基の 120° jump が二段階のステップで起っていることを示唆している。 $tetMA^+$ イオンの conformation としては、通常、最も対称性が高い all-staggered conformation (図4) が考えられているが、この構造は最も安定なものではなく、各 CH_3 基を C-N 軸のまわりに少し回転させると、さらに安定と思われる構造が得られる。そうすると、 CH_3 基の右回転と左回転によってできる二つの同等な conformation 間の再配向運動が可能になる。これらの間を CH_3 基が角度 θ の再配向をすれば、この運動による T_1 は $T_1^{-1} = (9/40) \pi^4 h^2 r^6 (1 - \cos 2\theta) [T_c / (1 + \omega_0^2 \tau^2) + 4T_c / (1 + 4\omega_0^2 \tau^2)]$ ⁵⁾ となる。低温側で測定された T_1 極小値から回転角 θ が求められる。四種類⁴⁾ の錯塩について θ を決定し、 $\theta \cong 30^\circ$ という結果が得られた。

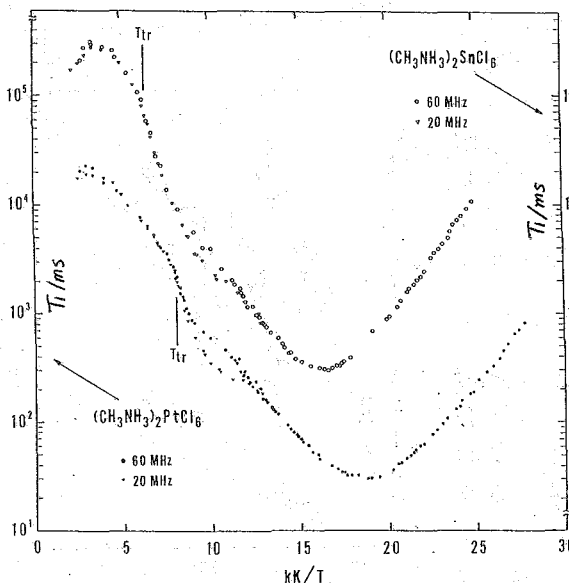


図2. $(MA)_2MCl_6$ 型錯塩の 1H T_1 (20, 60 MHz)

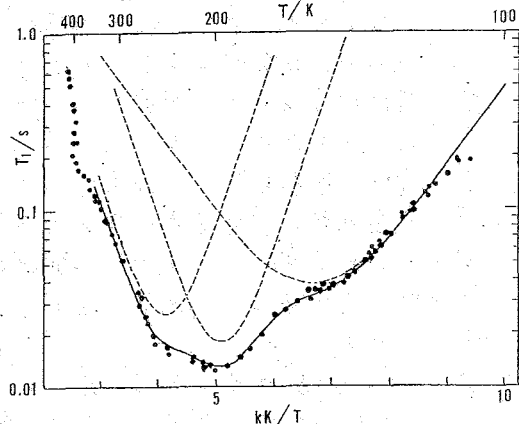


図3. $(tetMA)_2PtCl_6$ の T_1 (20 MHz)

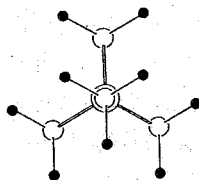
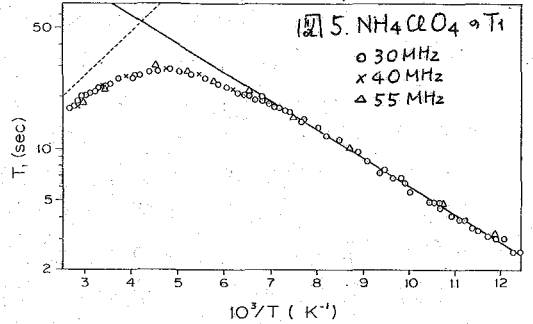


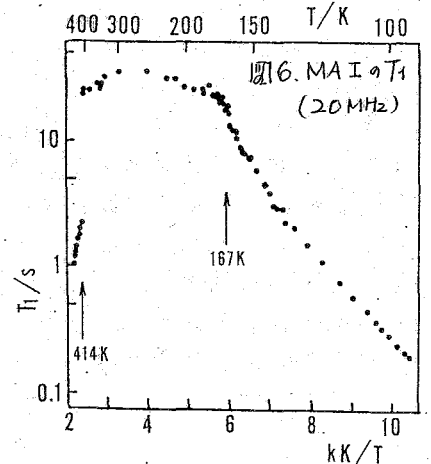
図4. $tetMA^+$ イオンの all-staggered conformation 1つの CH_3 基の C-N 軸方向への投影図

2. 高温での緩和機構(スピン回転緩和)

スピン回転緩和は分子の回転によって引き起されるが、通常は気体または高温の液体中の分子のように、回転の相関時間 τ_R が短い場合に顕著になる。以前、この緩和過程が NH_4ClO_4 の結晶中の NH_4^+ イオンにおいても起りうることを報告⁶⁾したが、この過程が結晶内の陽子系においても、液体中と同程度に T_1 に寄与しうるかどうかはまだ明白ではない。束縛の小さい NH_4^+ イオンや MA^+ イオンをもつ数多くの化合物において、スピン回転緩和の存在を予測させる T_1 の減少が高温で観測されている⁷⁾。その例を図5, 6に示す⁸⁾。図5において、低温側の実線は、イオン回転による磁気双極子緩和の $T_1(T_{1D})$ を示し、高温側の破線は、予測されるスピン回転緩和による $T_1(T_{1SR})$ である。



$\tau_R \ll \omega_0^{-1}$ のとき、球形分子については、 $T_{1SR} = (1/3)(\gamma^2 \hbar^2 / k) \tau_R$ となる。スピン回転相互作用定数 J を個々の分子について見積るとは容易でないが、類似分子では同程度の値になると仮定すれば、 T_{1SR} の大きさはほぼ τ_R によって決まると考えられる。 NH_4ClO_4 と同様な T_1 極大が高温で観測されているアンモニウム化合物について、 $T_{1D} = (9/2) \gamma^4 \hbar^2 \tau_R$ の式を用いて求めた τ_R の温度変化を図7に示す。同じ温度領域でスピン回転緩和が顕著になる液体の例として H_2O と NH_3 (どちらも加圧下)の τ_R の文献値を図中に示した⁹⁾。 NH_4^+ イオンの τ_R が室温以上で $10^{-13} \sim 10^{-14}$ s となり、液体分子の τ_R と同程度からそれより短い値になっている。同様な τ_R の振舞いが結晶中の MA^+ イオンについても得られた。このことにはある特定の運動モードに注目すれば、その相関時間が同温度の液体分子の値より短くなることがあることを意味し、スピン回転緩和がイオン結晶中でも液体中と同程度に起りうることを示唆している。



3. CH_3NH_3^+ イオンの拡散

MANO_3 と MAI はどちらも高温に結晶の融解点(一部分解)を持ち、室温と融解点の間に相転移点(それぞれ352 K, 414 K)があることがわかった。 MAClO_4 についても、相転移点の存在が報告されている。これらの化合物では、この転移点以上で、共鳴線の線幅が 10^{-2} 程度減少し、 T_2^* が数ms以上になることがわかった⁶⁾。このことは

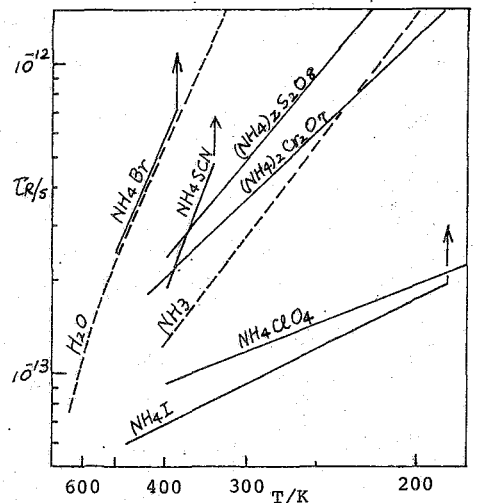


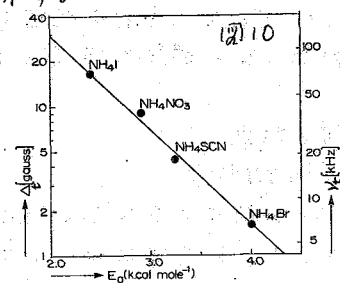
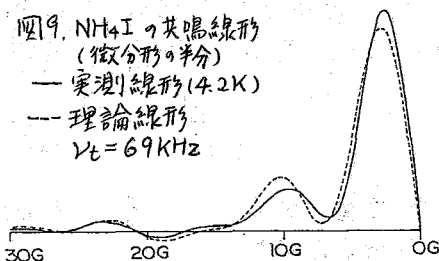
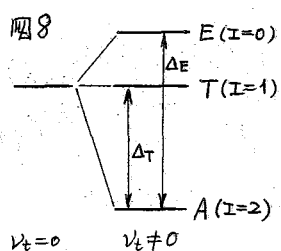
図7. 結晶中 NH_4^+ イオンの τ_R (矢印は相転移点)

MA⁺イオンは、イオン全体の等方的回転の他に結晶内で拡散していることを意味する。実際、この相でのMAIとMgClO₄の結晶構造はcubicで、MA⁺イオンの平均構造が球状であることを示している。また、MAIについて電気伝導度測定を行ったところ、この転移点以上で、伝導度が10³程度増加し、イオンの拡散が急激に増加していることが明らかになった。この相でのイオンの挙動は、既に報告されているNH₄NO₃⁽¹⁰⁾の最高温結晶相によく似ており、分子性結晶のplastic相に近いものと考えられる。

4. NH₄⁺イオンの Tunneling

NH₄Br, NH₄I 結晶中のNH₄⁺イオンは低温(4.2K以下)においては、ほとんどすべて libration の基底状態を占めていると考えられる。これらのNH₄⁺イオンはほぼTdの対称性をもつ結晶場に置かれているから、トンネル効果による陽子交換が無視できない場合、この基底状態は図8のように三つのエネルギー状態に分裂する。分裂の大きさを周波数単位で表わし($\Delta T = h\nu_t$)、 ν_t をトンネル周波数と呼んでいる。 ν_t の大きさは、NH₄⁺イオンの再配向のpotential barrierによって大きく変り、T₁の測定からMHzのオーダー、共鳴線形の測定からはkHzのオーダーの ν_t が求められている。

ハロゲン化アンモニウムは小さな tunneling の典型的な例で、図9のエネルギー分裂を考慮して計算した吸収線形と実験のスペクトルを比較することにより ν_t を決定した⁽¹²⁾。NH₄I の4.2Kでのスペクトルを図9に示す。図10にこのようにして決めた ν_t の値とNH₄⁺イオンの再配向の活性化エネルギー値(E_a)の関係を示す。



References

1. H. Ishida, R. Ikeda, and D. Nakamura, Bull. Chem. Soc. Japan, **55** (1982) 印刷中.
2. R. Ikeda, Y. Kume, D. Nakamura, Y. Furukawa, and H. Kiriyaama, J. Magn. Reson., **24**, 9 (1976).
3. Y. Furukawa, H. Kiriyaama, and R. Ikeda, Bull. Chem. Soc. Japan, **54**, 103 (1981).
4. S. Sato, R. Ikeda, and D. Nakamura, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., **86** (1982) 印刷中.
5. L. S. Prabhuramirashi, R. Ikeda, and D. Nakamura, ibid., **85**, 1142 (1981).
6. R. Ikeda and C. A. McDowell, Chem. Phys. Lett., **14**, 389 (1972).
7. F. Koksai and S. Bahceli, J.C.S. Faraday Trans. II, **74**, 1884 (1978); H. Ishida, R. Ikeda, and D. Nakamura, J. Phys. Chem., **86**, 1003 (1982).
8. H. Ishida, R. Ikeda, and D. Nakamura, Phys. Stat. Sol. a, **70**, K151 (1982).
9. D. W. G. Smith and J. G. Powles, Mol. Phys., **10**, 451 (1966).
10. M. T. Riggan, R. R. Knispel, and M. M. Pintar, J. Chem. Phys., **56**, 2911 (1972).
11. M. B. Dunn, R. Ikeda, and C. A. McDowell, Chem. Phys. Lett., **16**, 226 (1972).
12. R. Ikeda and C. A. McDowell, Mol. Phys., **25**, 1217 (1973).

(北大理) °伊倉光彦, 引地邦男

I. はじめに

2つの 90° パルスを組み合わせて、二次元フーリエ変換を行うことは1970年にJeenerによって提案された。以来ここ4,5年の間に、二次元(2D)NMRはめざましい進歩を遂げた。オーに、フーリエ変換の時間を急速に短縮させた計算機の進歩によってところかたきく、オニに、パルステクニックの進歩によって核スピンをある程度自由にあやつれるようになったことがあげられる。本討論会でも、 ^1H の2D J分解法、2D SECSY法、2D NOE法などの応用例が報告された。

今回、我々は CO_2 転移酵素の補酵素のビオチン(図1)について、種々のパルス系列を用いて ^1H だけでなく ^{13}C , ^{15}N のヘテロ核2D NMRの応用を試み、それらの核のピークの帰属を完成した。

II. 実験

測定は、すべてJEOL FX-400スペクトrometer (400 MHz)を用い、PG200パルスプログラマーでパルス系列を制御し、JEC-980Bで計算した。温度は図2(81°C)以外は23°Cで行った。

III. 結果

< ^1H NMR>

i) J分解スペクトル(図2): F2軸は化学シフト、F1軸はカップリング定数を表わす。化学シフトとJ splitting が分離するので、スペクトルが単純化される。F2軸に平行な面に 45° の角度で投影すると、いわゆるブロードバンドデカップルスペクトルが得られる。

ii) 相関スペクトル(図3): ^1H 相関スペクトルにはCOSY (correlated spectroscopy) とSECSY (spin echo correlated spectroscopy) がある。両軸とも化学シフトを表わす。対角線上にcenter peakがあり、カップルしているピークの間にはcross peakが現れる。

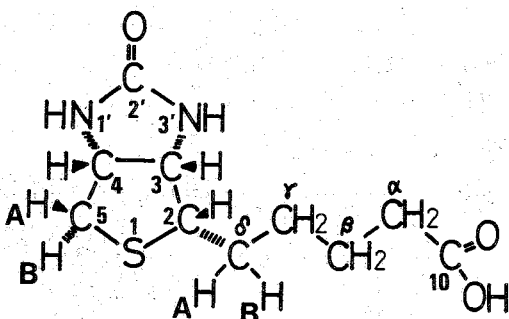


図1. d-Biotinの化学構造

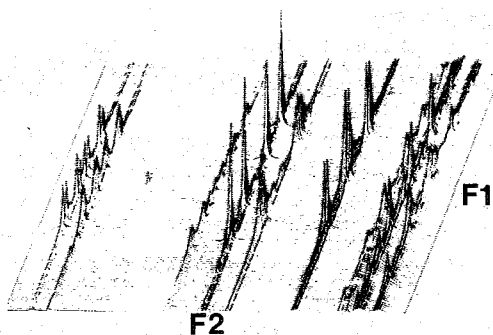


図2. ^1H J分解スペクトル (in D_2O)
 F1: カップリング定数 40 Hz / 64 points.
 F2: 化学シフト 1600 Hz / 256 points.

Two Dimensional NMR Spectroscopy on d-Biotin

(Faculty of Science, Univ. Hokkaido) M. Ikura and K. Hikichi

いくら みつひこ, ひきち くにお

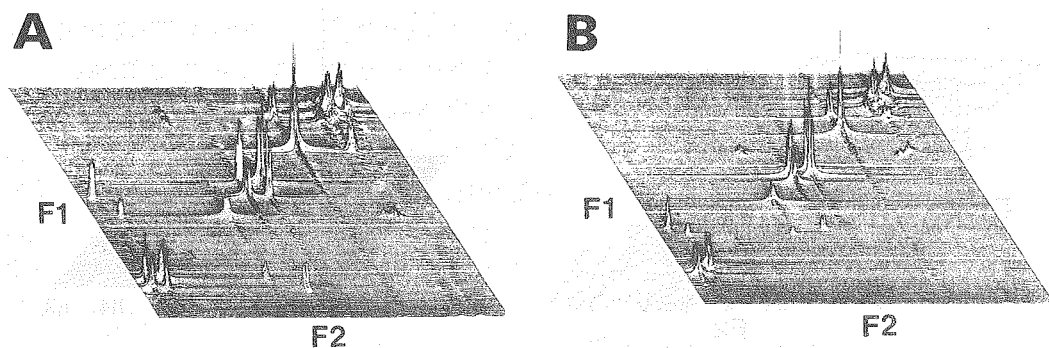


図3. ^1H 相関スペクトル A: COSY B: SECSY (P-type) (in D_2O)
 F2: 化学シフト 1600 Hz / 512 points F1: 化学シフト 1600 Hz / 256 points

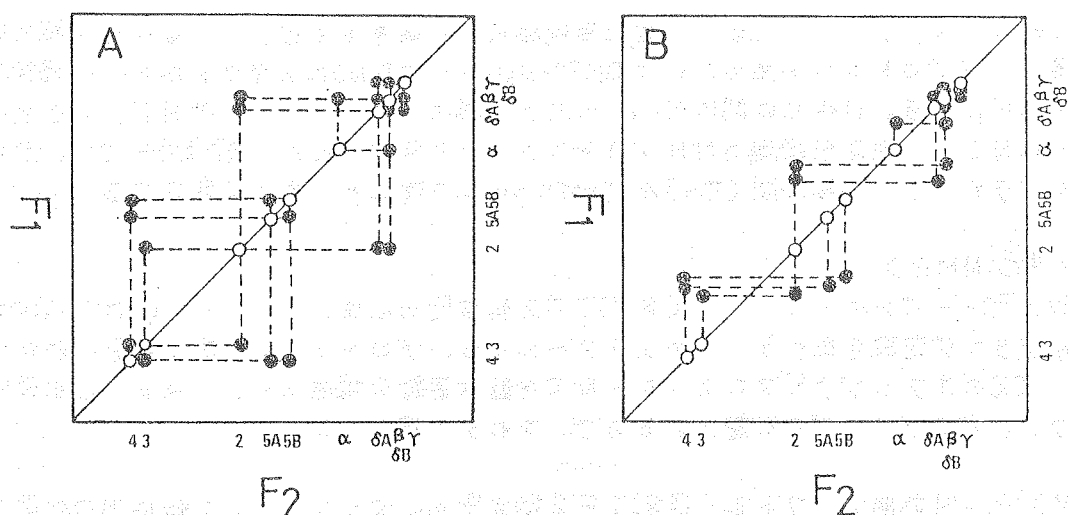


図4. ^1H 相関スペクトルの模式図 A: COSY B: SECSY (P-type)
 O: center peak, ●: Cross peak

Cross peak の位置は、それぞれ (f_A, f_B) , (f_B, f_A) と $(f_A, \frac{f_A+f_B}{2})$, $(f_B, \frac{f_A+f_B}{2})$ にある。図4に、それぞれのピーク位置を模式的に描き、各ピークの帰属も図中で示した。ここで示した spin echo タイプ相関スペクトル(図3B)は、phase cycling の点で永ふらのと異なる。永ふらののは negative type (N-type) であるが、ここでは positive type (P-type) の相関スペクトルを示した。これらのスペクトルを用いれば、デカップルすることなく、ピークの帰属は簡単に決まる。H5 と H6 プロトンはそれぞれ非等価で、H6 の一方は β と重、ている。

iii) NOE スペクトル(図) : 両軸とも ^1H の化学シフトを表わし、cross peak は NOE のあることを示している。H3 と H6A の間に NOE があり、C2-C6 bond のまわりの回転によって H3 と H6A が接触する時間が長いことを意味している。

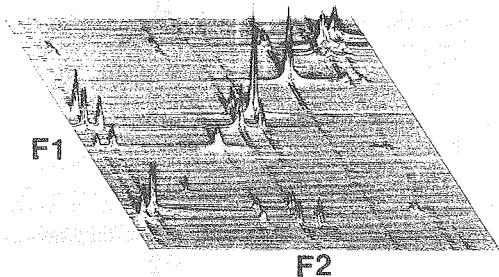


図5. 2D NOE スペクトル (in D_2O)

条件は図3と同じ。 $\tau_m = 100 \text{ ms}$.

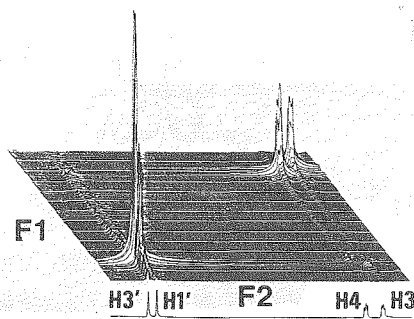


図6. 2D NOE スペクトル (in $DMSO-d_6$)

低磁場領域のみを示す。 $\tau_m = 100 \text{ ms}$.

これは、カップリング定数から回転異性体の存在確率を見積るとき重要な情報となる。NHプロトンの帰属のために $DMSO-d_6$ 中での 2D NOE スペクトルの低磁場領域を図6に示す。H4との間にNOEのある高磁場のNHプロトンがH1'、H3との間にNOEのある低磁場のNHプロトンがH3'と帰属された。2D NOEでは、 τ_m のパラメーター-接触時間 (τ_m) が cross peak の現れ方に大きく寄与する。

< ^{13}C NMR >

IV) ^{13}C - 1H J分解スペクトル (図7): F2軸は ^{13}C の化学シフト、F1軸は ^{13}C - 1H のカップリング定数を表わす。このスペクトルから、プロトンの結合数が簡単にわかる。一次元のオフレゾナンスのスペクトルで分離が困難な場合でも、2次元では化学シフトとカップリングが分離されるので、きわめて有力である。

V) ^{13}C - 1H 相関スペクトル (図8): F2軸は ^{13}C の化学シフト、F1軸は 1H の化学シフトを表わす。 1H の帰属にもとづいて、このスペクトルから ^{13}C の帰属が簡単に決まる。非等価なプロトンをもつ C_5, C_6 のピークは、それぞれ2つのプロトンの化学シフトの位置にピークを与える。

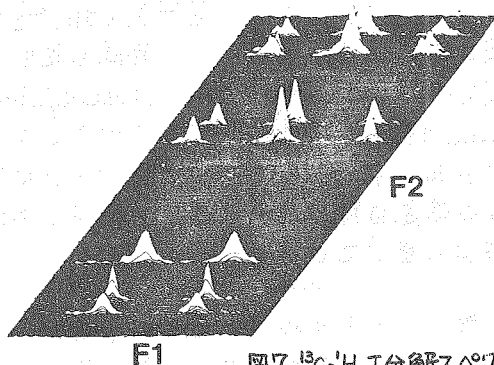


図7. ^{13}C - 1H J分解スペクトル (in D_2O)

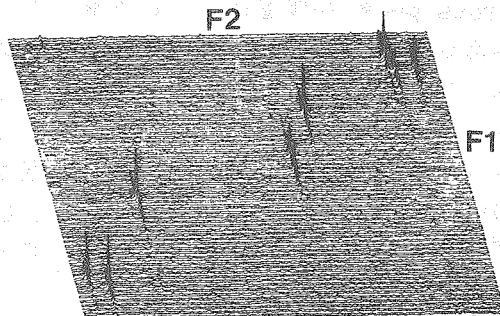


図8. ^{13}C - 1H 相関スペクトル (in D_2O)

F2: 化学シフト 4000 Hz/K , F1: カップリング定数 400 Hz/64 . F2: ^{13}C 化学シフト 4000 Hz/K , F1: 1H 化学シフト 1600 Hz/256 .

< ^{15}N NMR>

vi) ^{15}N - ^1H 相関スペクトル²⁾(図9): F2軸は ^{15}N の化学シフト、F1軸は ^1H の化学シフトを表わし、NHプロトンのみが現れる。NHプロトンの帰属から簡単に ^{15}N の帰属ができる。ヘテロ核相関NMRは、polarization transferを利用しているので、 ^{15}N では格段に感度が向上し、低感度の ^{15}N においてはきわめて有力な手法となる。

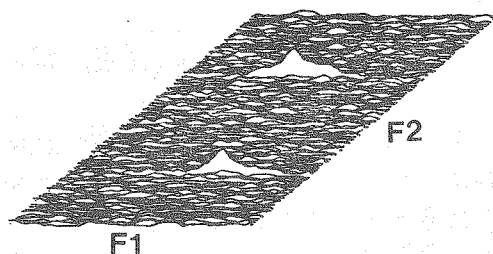


図9. ^{15}N - ^1H 相関スペクトル (mDMSO-d₆)

F1: ^1H 化学シフト 200Hz / 64 points.

F2: ^{15}N 化学シフト 800Hz / 1k points.

IV. 考察

2D NMRは、ピークの帰属にきわめて役に立つことがわかった。 ^1H 相関スペクトルで ^1H の帰属ができていれば、ヘテロ核相関スペクトルによって ^{13}C や ^{15}N の帰属も簡単に決まる。今回測定したジオチンでは、selective decoupleや誘導体との比較から得られた前報の ^{13}C の結果³⁾を、側鎖の帰属について一部修正した⁴⁾。ここで得られたジオチンの ^1H , ^{13}C , ^{15}N の化学シフトを表1に示す。

^1H 分解スペクトルから得られたカップリング定数とNOEスペクトルの情報にもとづいて、C2-C β bondのまわりの回転異性体の存在確率を見積った(図10)。3つのコンホマーのうちC α とC β がトランスのものが最も安定であった。

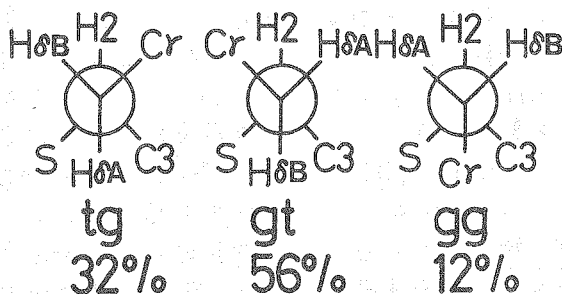


図10. C2-C β bondのまわりの回転異性体

[文献]

表1. ジオチンの化学シフト

1) K. Nagayama et al.,

B.B.R.C. 90, 305

(1979).

2) M. Ikura & K. Hikichi

(in preparation).

3) J.H. Bradbury et al.,

J.M.R. 35, 217

(1979).

4) M. Ikura & K. Hikichi

O.M.R. (1982)

in press.

^1H NMR		
	assignment	chemical shift ^a
in D ₂ O (23°C)	H4	4.61
	H3	4.45
	H2	3.36
	H5A	3.01
	H5B	2.78
	H α	2.20
	H δ A	1.73
	H δ B	1.6
	H β	1.62
	H γ	1.43
in DMSO-d ₆ (23°C)	H1'	6.34
	H3'	6.41

^a ppm from TSP in D₂O and TMS in DMSO-d₆.

¹³ C NMR		
	assignment	chemical shift ^b
in D ₂ O (23°C)	C10	184.3
	C2'	165.9
	C3	62.8
	C4	61.1
	C2	56.2
	C5	40.6
	Cα	38.2
	Cγ	29.2
	Cδ	28.6
Cβ	26.6	
b ppm from TMS.		

¹⁵ N NMR		
	assignment	chemical shift ^c
in DMSO-d ₆ (23°C)	N1'	279.0
	N3'	288.1
c ppm upfield of 6M NH ₄ NO ₃ .		

^c ppm upfield of 6M NH₄NO₃.

(化 技 研) 〇早水紀久子・柳沢勝・山本 修

よく知られてゐるように、 ^{13}C NMRの化学シフトの溶媒効果、濃度効果は一般に小さいので、 ^{13}C NMRによって混合系の定性分析を行なう場合には、 ^{13}C シフトに基づいて含有成分と推定できる。一方 ^{13}C NMRの強度は測定条件によって大きく変動すると同時に、同一の測定条件を用いても、強度の再現性は十分に良好とはいへない。我々はコンピュータと利用することによって、多成分の混合系を ^{13}C NMRを用いて定性定量分析を行なう方法を開発し、昨年のNMR討論会で発表した¹⁾。この方法では、純品の化合物の ^{13}C NMRと同一条件下で測定し、化学シフトと強度とをファイル化してコンピュータ内に格納しておく。同一条件で測定した混合系の ^{13}C NMRスペクトルとファイル内の化学シフトとを比較することにより定性分析を行ない、強度と含めたスペクトルパターンを再現するように最小二乗法を用いて定量分析を行なう。我々はこの方法を、縮合多環化合物の混合系に適用して、よい結果を得てゐる。化学シフトの値は測定装置によらず、一定精度内で再現性よく得られるが、強度は測定周波数、測定装置、測定条件、分解能その他装置の調整等々、数多くの因子に依存して、一般的・普遍的な再現性を得るのはなかなか難しい。この困難を解決するため、緩和試薬である $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を添加する方法を検討した。

$\text{Cr}(\text{AA})_3$ が長い緩和時間 T_2 をはたせることはよく知られてゐるが、縮合多環炭化水素系において、どの程度有効であるかという詳細な検討は行なわれてゐない。また実用上の問題として、 $\text{Cr}(\text{AA})_3$ の有効な添加量が明らかでない。適量とは $\text{Cr}(\text{AA})_3$ の T_1 及び NOE の添加効果を検討した。

実験 ^{13}C スペクトル測定用のサンプルでは、溶媒は CDCl_3 、内部規準は TMS である。縮合多環化合物は、固体の場合は 1g を 1.5ml の CDCl_3 に溶解し、液体の場合は 0.5ml を同量 1.5ml の CDCl_3 に溶解した。 $\text{Cr}(\text{AA})_3$ は秤量した。 ^{13}C NMR スペクトルの測定には Varian XL-100 を用い、比較のため JEOL FX-90Q を用いて測定した。スペクトル幅は 5120Hz 、フリック角 23° 、くり返し時間 6.6秒 、データ領域は 16K でデジタル分解能は 0.05ppm である。 T_1 は通常の $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ パルス法で測定し、 NOE はゲート付きデカップリングと交替に行なう方法で測定した。コンピュータは FACOM-M200 を用い、プログラムは TSS 方式で用いられるように作成してある。

結果と考察

T_1 と NOE に対する $\text{Cr}(\text{AA})_3$ の添加効果： $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を加えることによって ^{13}C NMR の緩和時間が短縮されることはよく知られてゐるが、縮合多環化合物及びその関連する化合物の場合については明らかでない。本分析法の主要な対象は石炭液化生成物であるので、問題点を明らかにするために、表1に示すような混合系と秤量して調製した。この系では、4環化合物のピレン、3環のフェナントレン、2環で側鎖のある 2,3-ジメチルナフタレン、含酸素化合物のビベンゾフラン、含窒素化合物のキ

表1. テストサンプル

	秤量(μl%)	計算値(μl%)	
		2.3mg添加	3.2mg添加
ピロリン(4環)	16.6	18.5	17.7
フェナトリン(3環)	22.8	21.7	21.5
2,3-ジメチルピロリン	31.6	31.1	32.3
ジベンゾフラン(含酸素)	11.6	11.4	11.8
キノリン(含酸素)	17.4	17.2	16.7

ノリンが含まれて
いる。多環化合物
の全量は0.48g
で1.5mlのCDCl₃
に溶解してある。
このような系にあ
いては、四級炭素

のT₁値は40~100μsであることに對し、プロトンが結合した炭素のT₁値は3.8~7.5μsである。またNOE値も非常に異なる。定量分析と精度よく行なうためには、不ぞろいのT₁値とをそろえておくことが重要である。またNOEをなくすためには、ゲート付きデカップリングの方法を用いて、NOE効果をなくすることが提案されて
いる。一方Cr(AA)₃を少量に加えると、線幅が広がる。また溶解性やD-ロックのため
に有効な溶媒であるCDCl₃と特殊な相互作用⁽²⁾があることも報告されて
いる。従
ってCr(AA)₃は必要最小限にしておくことが望ましい。

演者らは上記混合系にCr(AA)₃を加えておく方法を用い、T₁とNOEを求めると
同時に、定量性について検討を行なった。混合系の分離して測定された2本の
スペクトル線(そのうち重なっている線は3本)の各々についてT₁値とNOEを求めた。
 $1/T_{obs} = 1/T_0 + 1/T_{Cr(AA)_3}$ (ここで1/T₀はCr(AA)₃を加えていない時の値)
としてT₁Cr(AA)₃を求めたが、化合物による系統的なバラツキはみられなかった。
むしろ四級炭素とCH型の炭素との間に相違がみられなかった。

図1にCr(AA)₃の添加量を増加
した場合のT₁値の変化を示す。縦
棒は測定されたT₁値の範囲を示した。
Cr(AA)₃を加えるとT₁値が
短くなると同時に、T₁値のバラツ
キが小さくなっていくことがわ
かる。また線幅がbroadeningとする
直前までの添加量で、四級炭素と
CH型炭素のT₁値はほぼ相違があ
ることがわかる。ただT₁値は十分
に小さくなっていないので、フリフリ
角とパルス繰返し時間と適当に用
いられ、この相違の問題はなくなる。
演者らが用いている、フリフリ角が
23°の場合、約99%のmagnetization
が平衡値に戻るまでの待ち時間は
ほぼT₁値に等しく、99.9%の場合
にはT₁値の約2倍待つはよい。
本研究での標準的測定法である
くり返し時間6.6秒では、ほぼ

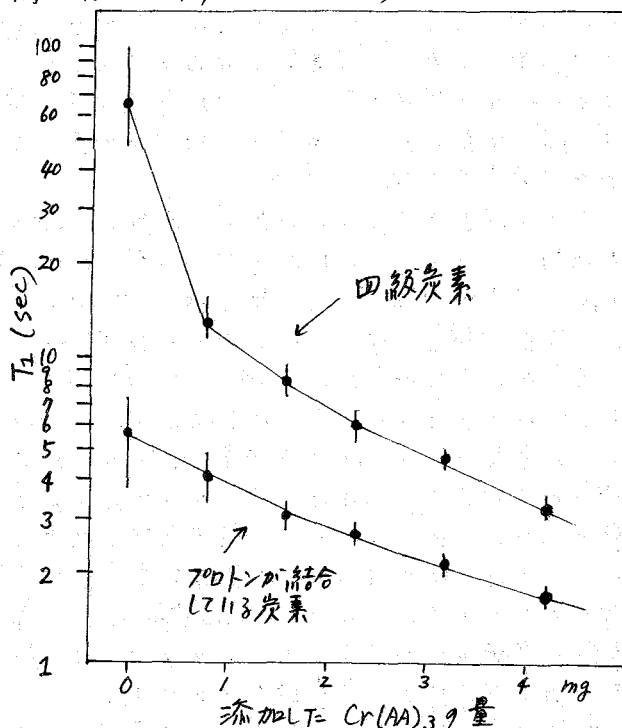


図1. Cr(AA)₃の添加量と¹³C NMRのT₁値

2mg以上の $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を加えればよりことが図1からわかる。

$\text{Cr}(\text{AA})_3$ を添加した場合の NDE の変化を図2に示す。 $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を添加して11% 混合系では、四級炭素でも NDE 効果で1.8倍となり、CH型の炭素では2.8倍になって11%。(平均値)。ところが $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を少量添加すると、CH型の炭素の NDE はあまり影響を受けず、四級炭素は著しく NDE 効果が減少することがわかる。四級炭素では NDE 効果は急速に減少するが CH 炭素ではスプロト線線の broadening が始まって NDE 効果が残っていることがわかる。CH 炭素の NDE 効果の値がバウツキは小さく、この点を考慮に入れれば定量分析が可能と思われるが、

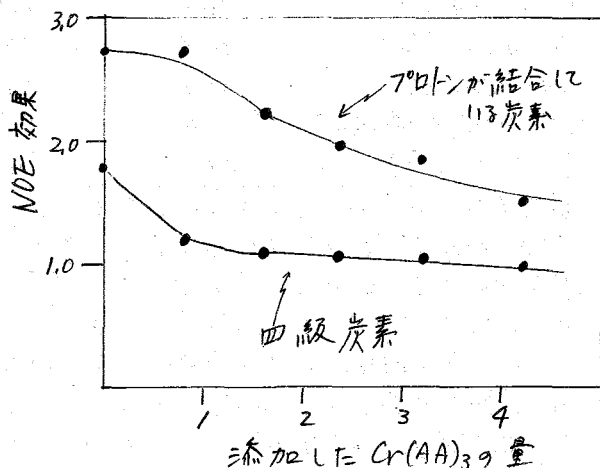


図2. NDE 効果に対する $\text{Cr}(\text{AA})_3$ の添加効果
本報告では、ゲート付きデカウプリングによる NDE 効果の相殺を行った。

混合サンプルにおける定量性の検討を行った。同一化合物の与えるスプロト線は炭素数に比例した強度と与えなければならぬ。2.3mg と 3.2mg の $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を添加した系で検討したところ、約15% の誤差内で上記の条件は満足していることがわかった。次に混合モル%を、スプロト線強度の比較から行った結果を、表1に含めてある。秤量値と比較してみると、実験誤差を考えた上で、一致は満足すべきものと思われる。 $\text{Cr}(\text{AA})_3$ の添加量を増加すると、線幅は増加してスプロト線線の分離が悪くなる上に S/N 比も悪くなるので、 $\text{Cr}(\text{AA})_3$ の量は2~3mg で十分であると考えられる。

この方法をクシオソート油(石炭乾留の際に生じる液体の bp 230-300° の留分)に適用してみた。クシオソート油 0.5ml (0.5280g) に $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を 2.6mg 添加し、 CDCl_3 1.5ml を加えた。測定は 23° ハルズで 6.6 秒の繰返し時間で約 8000 回(一積分)の積算を行った。ゲート付きデカウプリングを併用した。

測定されたスプロト線を図3(a)に示す。スプロト線1本/本について帰属することができ、同一化合物について、独立した線について検討してみたら、定量性についてはほぼ満足できるものと思われる。また線幅も singlet の場合以下である。このスプロト線の強度と化学シフト値とを紙テープで出力し、大型コンピュータに入力して、定性定量分析を行った。この際のプログラム 'HRCNMR' については、昨年度の NMR 討論会要旨集に詳述してある。本報告に用いるために行ったプログラム上の modification は、計算スプロト線と求めた線強度と、炭素数に単純に比例するとした事のみである。従って、強度の最小二乗法の計算を行なう際の手行列も、炭素数を入れてある。

計算結果を図3(b)に示す。測定スプロト線と一致は、ほぼ満足すべきものと思われる。測定線は11本で、未帰属線が3本、強度として7.8%である。

この種の混合系には多数の少量成分が含まれていることがわかる。計算結果を表2に示す。この表には $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を含むものに行った結果及び GC で求めたピーク積分値を示す。もし GC の結果を基準に考えれば、 $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を加えることにより、幾分かよい結果が得られたといえよう。

$\text{Cr}(\text{AA})_3$ を添加することによって生じる最大の利点は、測定条件によって変動する強度の値から独立して、本定性定量分析が利用されるという点にある。これを実証するために、同一サンプルを JEOL FX-90Q で測定したところ、ほぼ満足できる結果が得られることがわかった。

しかしながら、NDE となくすためにゲート付きデカップリングを行うことは、S/N 比の点からいえば、非常に不利であり、またデカップリング出力の調整が悪いと、強度の安定性は劣化するので、測定法としてはあまりよいとはいえない。

我々は定性分析の精度を上げるために、FIMS のデータと併用する方法を発表したが³⁾、

$\text{Cr}(\text{AA})_3$ を少量添加する方法を用いることにより、一般的に使用できるようになったといえよう。

1) 第20回NMR討論会講演要旨集

2) L. Edlund & H. Grahn, Org.

Mag. Reson. 18, 207 (1982)

3) 日化第45春季年会発表

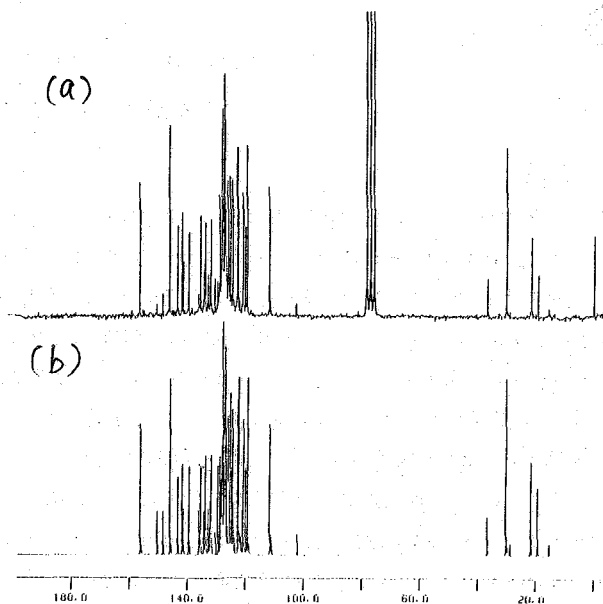


図3. クリオート油 (bp 230°-300°) に $\text{Cr}(\text{AA})_3$ を添加し、ゲート付きデカップリングを用いて測定したスペクトル(a)、および、定性定量分析後に得られる計算スペクトル(b)。

表2. クリオート油の組成分析結果。

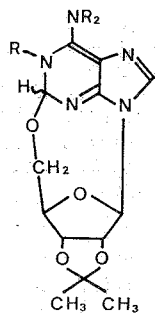
Compound	Ring	Mol%		Area%
		-	$\text{Cr}(\text{AA})_3$	
Naphthalene	2	6.1	3.9	3.4
1-Methylnaphthalene	2	8.0	9.0	8.1
2-Methylnaphthalene	2	22.6	17.8	18.1
2-Ethylnaphthalene	2	1.0	2.5	6.3
2,6-Dimethylnaphthalene	2	1.1	1.6	
1,4-Dimethylnaphthalene	2	1.6	1.1	
Diphenyl	1 + 1	4.4	4.8	5.8
Quinoline	2(N)	6.7	9.0	6.8
Indole	2(N)	4.6	4.4	2.8
Dibenzofuran	3(O)	12.9	13.2	12.5
Dibenzothiophene	3(S)	0.5	2.0	0.4
Acenaphthene	3	17.6	17.8	19.2
Fluorene	3	8.9	7.9	10.7
Phenanthrene	3	3.3	2.4	5.1
Anthracene	3	0.8	1.0	0.8

1 序論

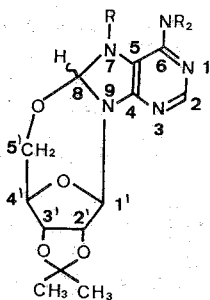
アデノシンおよびツベルシジン(7-デアザアデノシン)を出発原料として、安齊らによって合成されたシクロヌクレオシド¹⁾の中で2',3'-O-イソプロピリデン体の¹H NMRスペクトルは、ほとんどの場合、H-5'の2個のメチレンプロトンのシグナルがそれぞれ1 PPM程度離れており、その一方がH-4'と3 Hz程度でカップリングしている。また、H-1'は鋭いシングレットでH-2'との間にカップリングがなく、H-2'とH-3'は5 Hz程度でカップリングし、H-3'とH-4'の間にはカップリングがない。

さて、2',3'-O-イソプロピリデンアデノシンと塩化トルオイルの反応生成物はN⁶, N⁶, 5'-O-トリアロイル体であることが知られており、リボース部分の6個のプロトンはそれぞれカップリングしている。

ところが、この反応で塩化トルオイルの代りにクロル蟻酸フェニルを用いると、得られた生成物はN⁶, N⁶, 5'-O-トリアロイル体とは異なることがその¹H NMRスペクトルから示唆された²⁾ すなわち、H-2'とH-3'の間でのみ約5 Hzのカップリングが観測されるものの、5', 4', 1'のプロトンシグナルはいずれもシングレットであつた。また、塩基部分の2個のプロトンシグナルのうち1個のシグナルだけが高磁場シフトした。この化合物の構造は¹H NMRおよび¹³C NMRより(1)または(2)であると考えられるが、そのいずれが正しいかを定めることはできなかった。



1

R = COOC₆H₅

2

そこで、鵜沢らの開発したLSPD (Long range Selective ¹H Decoupling) 法により解析を行った結果

(2) であることが証明された。

本報はまず、LSPD法による上記生成物の構造決定の詳細を報告し、それに関連して他のいくつかのシクロヌクレオシドについて¹³C NMRを測定し、ケミカルシフト (δ)、1ボンドカップリング定数 (¹J_{QH})、3ボンドカップリング定数 (³J_{QH}) と構造との関係について考察する。

次に、塩基部分のTorsion Angleと³J_{QH-1'}の関係について、Lemieuxらによって得られた知見をさらに発展させることができたのであわせて報告する。

2 実験

測定には主として日本電子製FX-400型FT-NMR装置を用いた。測定条件は次のとおりである。

測定周波数 100.7 MHz (¹³C)、測定幅 16 KHz、データメモリ 32 K、Flip Angle 30°~40°、パルスくりかえし時間 1.8 秒、溶媒 DMSO-d₆、測定温度 23°C、¹H 照射パワー 7 H₂/2π=100 Hz

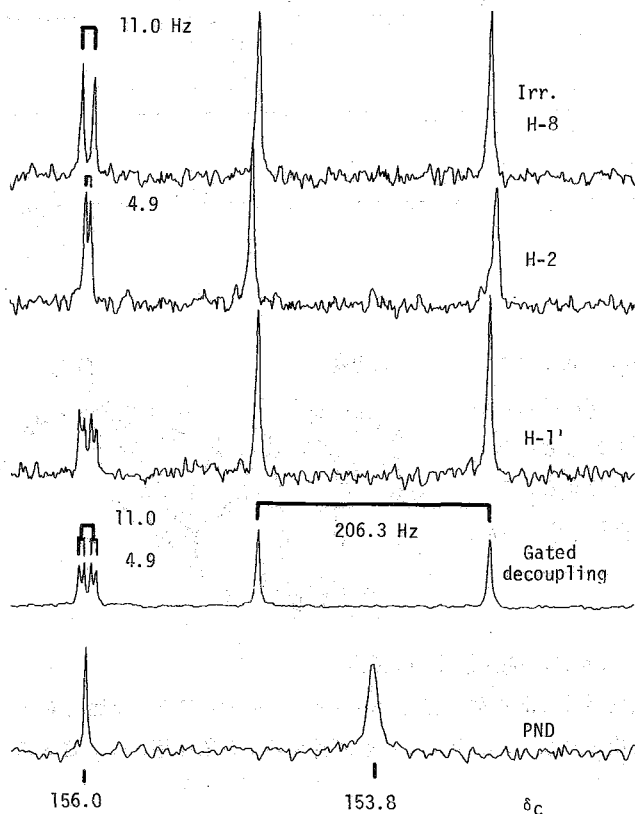
試料管はシゲミスタンダードK. K. と共同開発した「超伝導NMR用長円型試料管」を用いた。この試料管は感度、分解能および使い易さが優れている。

うざわ じゅん、あんざい けんたろう

3 LSPDによる構造決定

前述の生成物が(1)または(2)のいずれかかを決定するにはLSPDによってH-1'とC4、C8、C2の関係およびH-5'とC8、C2の関係をはつきりさせれば良い。すなわち、(1)ならばH-1'からC4とC8に、H-5'からはC-2にそれぞれカップリングが見られるはずであり、(2)ならばH-1'か

Fig.1 LSPD spectra

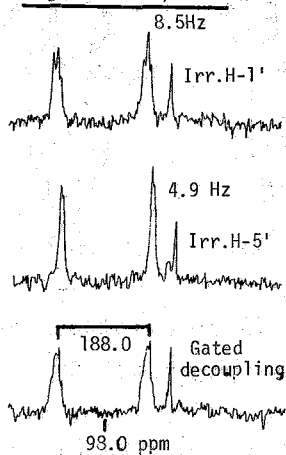


らC4とC8に、H-5'からC8にカップリングが見られるはずである。

ゲートッドデカップリングによるスペクトルには塩基部分の2個のシグナル、すなわち、153.8PPMに $^1J=206.3\text{Hz}$ の鋭いダブルレットと98.0PPMに $^1J=188.0\text{Hz}$ の幅の広いダブルレットが認められ、後者はケミカルシフトの値からアデニン核のC2またはC8が SP_3 炭素に変わったことを示唆している。

156.0PPMには4.9Hzと11.0Hzのカップリングを持った四重線がある。このシグナルはFig. 1に示すとおり、塩基部分の2個の水素を照射することによってパターンが変わる。しかし、H-1'を照射しても変化は認められない。153.8PPMのダブルレットは塩基部分の2個の水素を照射しても、また、H-1'を照射してもパターンは変わらない。一方、Fig. 2に示すように、98.0PPMのダブルレットはH-1'の照射によって幅の広いパターンが変化して8.5Hzの三重線が残り、H-5'の照射によって4.9Hzの二

Fig.2 LSPD spectra

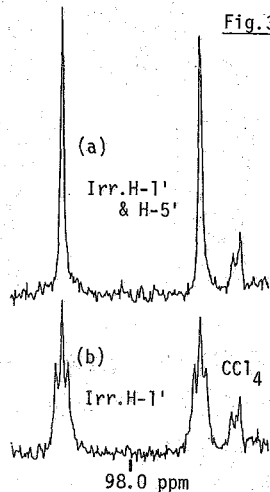


重線が残る。

以上の結果は前述の生成物が(2)であることを示し、153.8PPMのシグナルをC2に98.0PPMのシグナルをC8に、156.0PPMのシグナルをC4に帰属し、 $^3J_{C4, H-2}=11.0\text{Hz}$ 、 $^3J_{C4, H-8}=4.9\text{Hz}$ 、 $^3J_{C4, H-1'}=0\text{Hz}$ 、 $^3J_{C8, H-5'}=8.5\text{Hz}$ 、 $^3J_{C8, H-1'}=4.9\text{Hz}$ と帰属できる。

これらの関係は、さらに三重共鳴を行って確認した⁴⁾。Fig. 3 (b)はH-1'のみ照射した場合のC8のシグナルであり、(a)はH-1'とH-5'を同時に照射した場合のスペクトルを示す。

Fig.3



この変化から $H-1'-N9-C8-O-H-5'$ の環が確認された。

次に $O-8$ の配位について考察する。
 $O-O$ 結合については α 、 β の2種類の配位が考えられ、シクロヌクレオシドを形成することによって新たに生じた $1'-O-4'-5'-O-8-N9$ の7員環部分にはボート型、イス型類似の2つのコンホメーションが考えられる。もし α 配位ならば $H-8$ が $H-2'$ と $H-3'$ に非常に接近し、 β 配位ならば $H-8$ は逆に $H-1'$ と同方向となる。

そこで、 $^1H-^1H$ 間の差 NOE を測定した (Fig. 4)。

その結果によれば、 $H-8$ と $H-2'$ 、 $H-3'$ の間に NOE は無く、 $H-8$ と $H-1'$ の間に約 7% の NOE があることから β 配位と考えられる。また、 $H-5'$ を照射したとき、 $H-8$ に約 18% の NOE があることからイス型と考えられる。

以上の結果から (2) の構造式を Fig. 5 のとおりとした。

Fig. 4 Diff. NOE spectra of 2

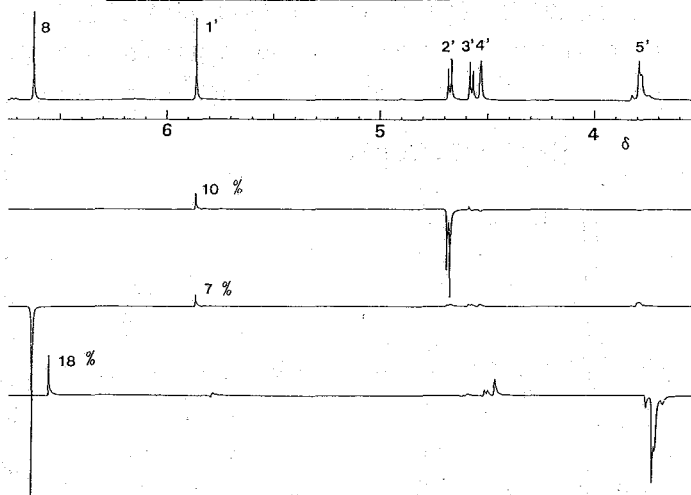
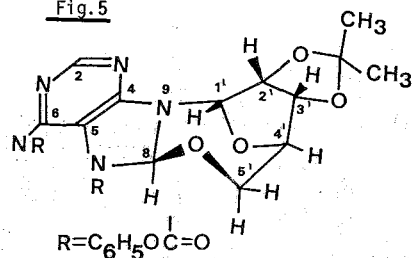
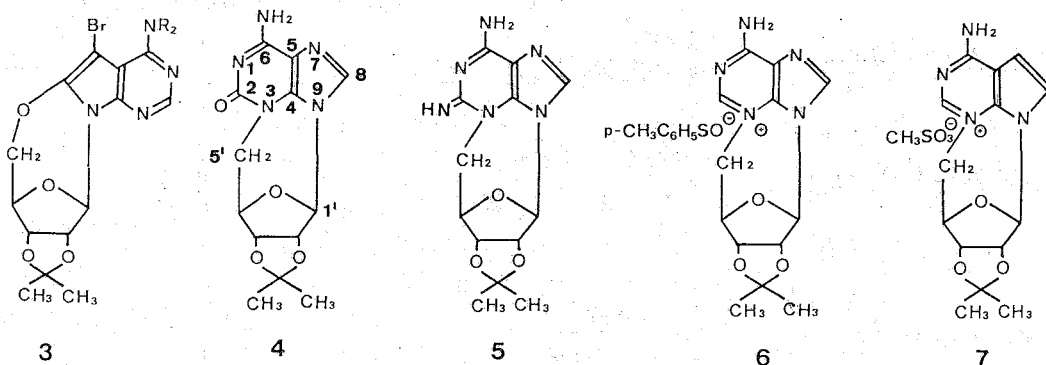


Fig. 5



4 $^3J_{O, H-1'}$ とシクロ体の Torsion Angle および酸素原子の影響

LSPD法は未知化合物の構造決定に有効な手法であるが、前述の如く $O-4$ に対して $H-1'$ からのカップリングが見られないときは間違った結論を出しかねない。そこで、構造既知の化合物を用いて、さらにこの点を詳細に検討した。



我々は (2) を始め、 $8-5'-O$ シクロ体と $3-5'$ シクロ体の両方を含む6種類のシクロヌクレオシドについて ^{13}C NMR を測定し、LSPD法により確実なスペクトルの帰属を行い三重共鳴を併用して δ_O 、 1J 、 3J を求めた。

δ_O と 1J からはヘテロ置換基の影響、イソプロピリデンヌクレオシドの特徴等巨視的な構造の違いはわ

かるが、シクロ体の結合位置、Torsion Angle等については情報を得られなかった。

Tableは塩基部分の $^3J_{C,H}$ を示す。
8-5'-Oシクロ体では $^3J_{C4, H-1'}=2.0\text{Hz}$ であり $^3J_{C8, H-1'}=4.9\sim 6.8\text{Hz}$ である。
3-5'シクロ体では逆に $^3J_{C4, H-1'}=6.0\sim 6.8\text{Hz}$ に対し、 $^3J_{C8, H-1'}=2.0\text{Hz}$ である。

このように、 $^3J_{C, H-1'}$ はシクロ体の結合位置の違いを明確に反映している。

最後に、(2)の $^3J_{C4, H-1'}$ が0Hzになる問題を検討する。

Remieuxらによれば $^3J_{C, H-1'}$ が0HzになるのはTorsion Angleが 90° または 270° になる場合である⁵⁾。(2)の場合、C4とH-1'のdihedral angleが 90° ならば、C-8との間は 270° になるはずで

あり、 $^3J_{C8, H-1'}=4.9\text{Hz}$ と矛盾する。

一方、SchwarczとPerlineはグルコピラノースやグルコフラノースの $^3J_{C, H}$ をまとめ、dihedral angleが 60° に近い場合で観測する炭素核から見てトランス位に酸素核があると0Hzになると報告している⁶⁾。

化合物(2)のC1'からN9を見た投影図は左に示すように、リボースの酸素原子がC4のほぼトランス位にあり、このために $^3J_{C4, H-1'}=0\text{Hz}$ になったと考えられる。

$^3J_{C4, H-1'}$ と $^3J_{C8, H-1'}$ の値が化合物により異なる原因の一つはリボースの酸素原子が関係しているものと思われる。

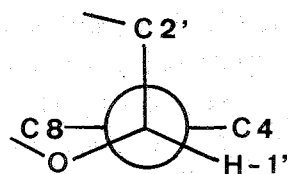
H-5'からC4やC-8へのカップリングコンスタントは3-5'シクロ体の $^3J_{C2, H-5'}$ の値がいずれも期待される値より小さいこと等さらに検討する必要がある。

本研究にあたり、有益な助言をいただきました理化学研究所 浦本昌和博士と小川智也博士に感謝します。

- 1) K. Anzai, M. Matsui: Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 618 (1973). K. Anzai, M. Matsui: Agr. Biol. Chem., 37, 345 (1973). K. Anzai, M. Matsui: ibid, 37, 2431 (1973). K. Anzai, M. Matsui: Bull. Chem. Soc. Japan, 47, 417 (1974). K. Asahi, K. Anzai, S. Suzuki, H. Iwasaki: Chemistry Letters, 1197 (1973). K. Anzai: Agr. Biol. Chem., 40, 373 (1973).
- 2) K. Anzai, M. Matsui: Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3228 (1973).
- 3) K. Anzai, J. B. Hunt, G. Zon, W. Egan: J. Org. Chem., in press.
- 4) 鷗沢、瀬戸、浦本、竹内: 第17回NMR討論会(1978)。Y. Tsuda, S. Nakajima, S. Udagawa, J. Uzawa: J. Natural Products, 43, 467 (1980). Y. Fujimoto, H. Tsunoda, J. Uzawa, T. Tatsuno: J. C. S. Chem. Commun., 83 (1982).
- 5) R. U. Lemieux, T. L. Nagabhushan, B. Paul: Can. J. Chem., 50, 773 (1972).
- 6) J. A. Schwarcz, A. S. Perlin: ibid, 50, 3667 (1972).

carbon	proton	2	3	4	5	6	7
2	5'			0	0	2.5	<1.9
	5'			0	0	0	0
4	1'	0	2.0	6.0	6.4	≈6	6.8
	5'			5~7	10.0	?	7.8
	5'			<2			5.9
	2	11.0	11.7			≈7	≈7
	8	4.9		≈6	10.0	≈7	≈7
5	8	2.4		11.7	9.8	11.7	8.8
6	2	13.4	10.7			11.7	11.7
8	1'	4.9	6.8	2.0	2.0	<1.5	1.9
	5'	8.5	9.8				
	5'	6.1 or 8.5	2.0				

0 Hz indicates < 1.2 Hz.



〔序〕 ^{14}N ($I=1$) の核緩和は主として四極子相互作用により支配されており、その解析には核四極子結合定数 e^2qQ/h の値が不可欠である。我々は、 ^{14}N NMR が脂質膜分子の動的性質の研究においても有力な手段であることを示してきたが、この研究を深めるためには e^2qQ/h をより詳しく知る必要がある。その理由は、 $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{R}$ 型の脂質分子を観測していることにある。 $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{R}$ 型分子は窒素核の周囲の結合の対称性が良いため e^2qQ/h の値はきわめて小さい。このような分子の e^2qQ/h を得るには溶液中の ^{14}N の緩和時間と別に求めた分子の再配向相関時間から求める方法⁽¹⁾、液晶中での ^{14}N 四極子分裂と独立に求めたオーダーパラメータより求める方法⁽²⁾ などが報告されているがまだ十分なデータの蓄積はなされていない。今回、水溶液中における $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ 型を持つ低分子化合物の $T_1(^{14}\text{N})$ に有効な e^2qQ/h を ^{14}N 、 ^{13}C NMR を併用することにより求め、R、溶媒(水、重水)、pHの違いがこの型の分子の e^2qQ/h にどのような影響を与えるかをみた。便宜上炭素原子を次のように命名する。

$$\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{X} \\ \quad \quad \quad \gamma \quad \quad \quad \beta \end{array}$$

〔実験〕 臭化アセチルコリン ($\text{X}; -\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, AcCh·Br) (和光、特級)、塩化アセチルコリン (AcCh·Cl) (和光、一般)、塩酸ベタイン ($\text{X}; -\text{COOH}$, Betaine·HCl) (和光) は 0.6 M、塩化コリン ($\text{X}; -\text{CH}_2\text{OH}$, ChCl) (東京化成) と塩化テトラメチルアンモニウム ($\text{X}; -\text{H}$, TMAC) (半井、ホーラログラフ用) は 1 M の水溶液、あるいは重水溶液とした。いずれも 1mM EDTA を含む。アルゴンガスあるいは窒素ガスにより酸素を除いた。 ^{14}N NMR 測定は 7.2 MHz パルス FT 法による。 ^{13}C NMR 測定は JEOL FX-100 により 25 MHz にてプロトン完全デカップリング下おこなった。 T_1 測定はいずれも $\pi-\tau-\pi/2$ パルス系列によりおこなった。温度制御は ^{14}N の場合 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 ^{13}C の場合 $\pm 1^\circ\text{C}$ であった。

〔結果と解析〕 図 1-A は、AcCh·Cl の ^{13}C 、 ^{14}N NMR スペクトルを示す。 $T_1(^{14}\text{N})$ が長いので $^{13}\text{C}_\beta$ 、 $^{13}\text{C}_\gamma$ は ^{14}N とのカップリングにより 3 本に分裂している。図 1-B-1、B-2 はそれぞれ pH 1 および pH 7 における Betaine·HCl の ^{13}C 、 ^{14}N NMR スペクトルである。pH 1 では $T_1(^{14}\text{N})$ の減少(表 I) によく対応した ^{13}C NMR スペクトルを示している。

ここで用いた大きさの程度の分子では ^{13}C の核緩和速度はほとんど直接結合している ^1H との双極子相互作用で説明される。(小さな分子の ^{13}C の緩和にはスピン回転相互作用もきくが、ここで用いた系では再配向相関時間は 5~9 ps でありその寄与は無視してよい。) また ^{13}C 、 ^{14}N 共に“線の極度な尖鋭化”の条件が満たされており次のようにかかる。ここで r は C に結合し、 r の距離にいる ^1H の数、 r はそれぞれの核の

$$\frac{1}{T_1(^{13}\text{C})} = n \left(\frac{h^2}{2\pi} \right)^2 \frac{\gamma_H^2 \gamma_C^2}{r^6} \tau_r \quad (1),$$

$$\frac{1}{T_1(^{14}\text{N})} = \left(\frac{3\pi^2}{2} \right) \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right)^2 \tau_r \quad (2)$$

こがけいこ、みなぎめようこ

磁気回転比、 τ_r' は
C-H軸の再配向相関
時間である。 τ_r は
N-C β 軸の再配向相
関時間である。 $\tau_{r\beta}'$
は τ_r と等しいとき、
(1) と (2) より $e^{2\theta_0/k}$
を算出することからで
きる。

図2は AcCh·Brの
 $T_1(^{13}\text{C}_\beta)$ と $T_1(^{14}\text{N})$
の温度変化を示す。
 $T_1(^{13}\text{C}_\beta)$ と $T_1(^{14}\text{N})$
のアレニウスプロッ
トの勾配は実験誤差
内で等しい。このこ
とから $e^{2\theta_0/k}$ が測
定温度範囲内で不変
ならば、二種の結合
の再配向運動の活性
化エネルギー $E(\tau_{r\beta}')$ と $E(\tau_r)$ とが等し
いといえるので $\tau_{r\beta}'$ と τ_r が同一運動に
よると考えるのは妥当であろう。

$\tau_{r\beta}' = \tau_r$ として解析した結果を緩和時間
とともに表1に示す。以下その結果をまと
める。第一にRの違いにより $e^{2\theta_0/k}$ の大き
さは異なる。いずれの分子も $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2$ -
であるが C_β に結合している基の違いによ
り $e^{2\theta_0/k}$ に大きな差が生じることかわか
った。第二に重水溶液と水溶液における
結果を比較する。AcCh·Br, Ch·Cl, Ch·Cl·Tris
のいずれの場合でも、重水と水とで T_1 は異
なるにもかかわらず $e^{2\theta_0/k}$ にあると差は
みられなかった。さらに AcCh·BrとAcCh·Cl
の間にも有意な差は認められる。陰イオ
ンの影響もほとんどないことがわかった。第三に pHを変えた場合の結果をみる。
Betaine の $\text{pK}_a = 1.8$ であり、pH1では大部分 COOH 型、pH7、pH12.5 では COO^- 型を
とっているはずであるが、 $e^{2\theta_0/k}$ の大きさはこの構造変化に対応して大きく変化し
た。すなわち pH1における値は pH7と pH12.5における値の約2.5倍である。これに対し
て分子種が変化しない場合、pHによる $e^{2\theta_0/k}$ への影響は Ch·Clの pH7と pH12.5 お

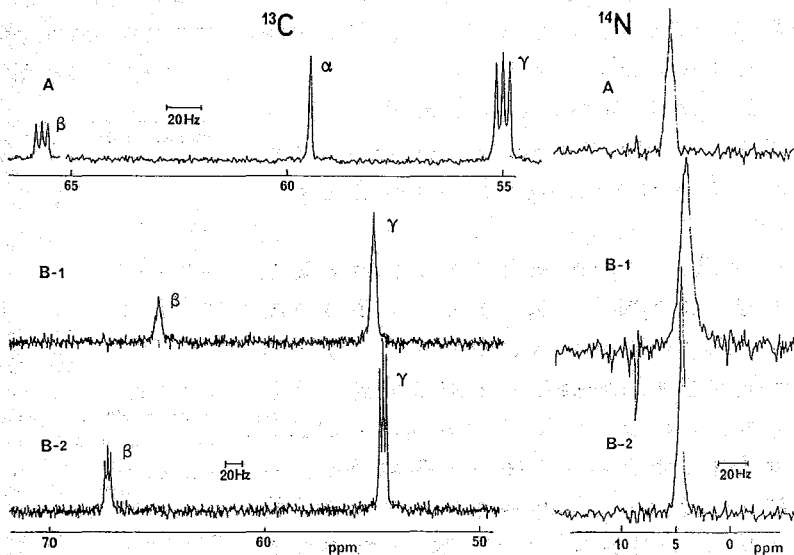


図1. ^{13}C および ^{14}N NMR スペクトル

A; AcCh·Cl (H_2O), B-1; Betaine·HCl (H_2O , pH1),
B-2; Betaine·HCl (H_2O , pH7) いずれも 30°C .
化学シフトの基準は $\text{TMS}(^{13}\text{C})$ および $\text{1M TMAC}(^{14}\text{N})$.

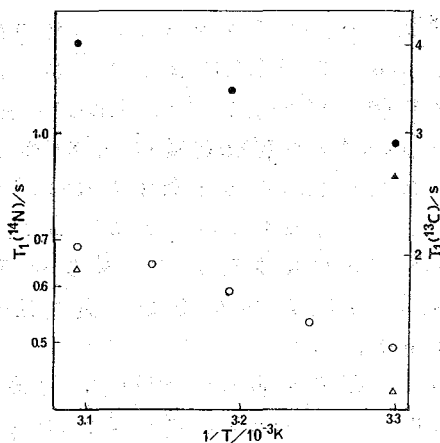


図2. AcCh·Brの $T_1(^{13}\text{C})$ および $T_1(^{14}\text{N})$
● $T_1(^{13}\text{C})$ (H_2O); ▲ $T_1(^{13}\text{C})$ (D_2O)
○ $T_1(^{14}\text{N})$ (H_2O); △ $T_1(^{14}\text{N})$ (D_2O)

よび Betaine·HCl の pH 7 と pH 12.5 と比較すればわかるようにほとんど変化がみられなかった。

表2には ^{14}N および ^{13}C の化学シフトを示す。 ^{14}N ではTMACからのシフトの欠き、 ^{13}C では C_α と C_β のシフトの差を示した。

〔考察〕 核四極子を持った核の緩和には、核四極子と核のまわりの電場勾配との相互作用の外に、分子の外からの局所的電場と核四極子との相互作用も寄与するといわれている⁽²⁾。Kuntzinger と Lehn⁽³⁾は溶媒である水の双極子と核四極子との相互作用によって球対称性を持つ分子種 NH_4^+ と $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ の $T_1(^{14}\text{N})$ を説明できることを示した。本研究において用いている $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{R}$ 型分子においても周囲の配位水の運動が $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ とそれほど違わないとすると、外場と ^{14}N 核の相互作用による緩和への最大寄与は $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ の $1/T_1(^{14}\text{N})$ と同程度とみなしてよいであろう。1M TMAC 水溶液の30°Cにおける $T_1(^{14}\text{N})$ は11sであった。AcCh·Br, -Cl ($1/T_1(^{14}\text{N})=2.0\sim 2.3\text{ s}^{-1}$)、Betaine·HCl ($1/T_1(^{14}\text{N})=20\sim 3.0\text{ s}^{-1}$)の緩和速度は $1/T_1(^{14}\text{N})=0.09\text{ s}^{-1}$ よりほかに大きくこれらの分子では外場による効果は無視してよいことがわかる。一方 Ch·Cl ($1/T_1(^{14}\text{N})=0.38\sim 0.34\text{ s}^{-1}$)には最大20%の寄与があり得、Ch·Clの e^2qQ/h の値は10%までの過大見積りの可能性を含んでいる。

(1)、(2)式より求めた e^2qQ/h は表1で示されるように同一の分子構造を持つ場合はpH、溶媒(重水と水)、温度によりほとんど変化しなかった。 $T_1(^{13}\text{C})$ と $T_1(^{14}\text{N})$ のアレニウスプロットの勾配が一致したことから $\tau_r' = \tau_r$ であるとしたが、これには① $E(\tau_r') = E(\tau_r)$ であれば $\tau_r' = \tau_r$ である②この温度領域において e^2qQ/h が一定であることが前提となっている。①はこのような系ではおそらく疑う余地がない。②の前提が崩れていたとすると $T_1(^{13}\text{C})$ と $T_1(^{14}\text{N})$ の温度勾配の一致は e^2qQ/h の変化分と τ_r/τ_r' の変化分が偶然相殺していたとしなければならぬ。これらの変化は周囲との相互作用と熱運動の双方によるものである。溶媒との相互作用が変化すると予想されるpH変化によっても e^2qQ/h が一定と求められたことは上記の偶然の相殺の可能性が小さいことを示す。なお、重水中と

表1. $T_1(^{14}\text{N})$, $T_1(^{13}\text{C})$ および e^2qQ/h

SAMPLE	pH	Temp. °C	$T_1(^{14}\text{N})$ s	$T_1(^{13}\text{C})$ s	e^2qQ/h kHz
			($\pm 5\%$)	($\pm 5\%$)	($\pm 5\text{ kHz}$)
AcCh·Br (H_2O)	5	30	0.49	2.9	131
	5	35	0.54	—	—
	5	40	0.59	3.5	130
	5	45	0.65	—	—
	5	50	0.69	4.0	131
AcCh·Br (D_2O)	5	30	0.43	2.6	133
	5	50	0.64	—	—
AcCh·Cl (H_2O)	5	30	0.50	2.9	130
Ch·Cl (H_2O)	3	30	2.9	—	—
	7	23	2.6	—	—
	7	30	3.0	5.1	71
	7	40	3.4	—	—
	12	30	2.6	4.8	73
Ch·Cl (D_2O)	7	30	2.5	4.6	74
Ch·Cl-Tris (H_2O)	7.9	30	2.8	5.1	72
Ch·Cl-Tris (D_2O)	7.9	30	2.5	4.3	70
Betaine·HCl (H_2O)	1	30	0.049	3.6	467(± 30)
	7	30	0.34	4.5	195(± 10)
	12.5	30	0.32	3.8	186
TMAC (H_2O)	5	23	9.3($\pm 10\%$)	—	—
	5	30	11	—	—
	5	40	12	—	—

D_2O 中の pH は pHメータの読みに0.4を加えた数字である。Ch·Cl-Tris は 50mM Tris·HCl 緩衝液中であることを示す。

表2. ^{14}N および ^{13}C の化学シフト

SAMPLE	pH	$\Delta\delta(^{14}\text{N})$ ppm	$\Delta\delta(^{13}\text{C})$ ppm
		(± 0.1)	(± 0.01)
AcCh·Br (H_2O)	5	5.5	10.62
AcCh·Br (D_2O)	5	5.5	10.64
AcCh·Cl (H_2O)	5	5.5	10.66
Ch·Cl (H_2O)	1	5.7	—
	7	5.7	13.50
	12	5.5	13.57
Betaine·HCl (H_2O)	1	3.9	9.98
	7	4.4	12.82
	12.5	4.6	12.80

$\Delta\delta(^{14}\text{N})$; TMAC からの低磁場方向へのシフト。
 $\Delta\delta(^{13}\text{C})$; $\delta(C_\alpha) - \delta(C_\beta)$, 30°C
X補正。

水中とを比較すれば $Ti(^{13}C)$, $Ti(^{14}N)$ 共に異なるにもかかわらず $e^{28}Q/\text{e}$ が一定であることは更に⑥の前提を支持する。これらのことより $e^{28}Q/\text{e}$ の大きさはほとんど分子の構造によって支配されているといえる。

$e^{28}Q/\text{e}$ の実験値を説明するためには既に理論が提出されており 計算方法も確立されているといえよう。しかし我々の研究対象である $(CH_3)_3N^+R$ 型の N ではその環境が球対称に近いので $e^{28}Q/\text{e}$ の教科書においても $e^{28}Q/\text{e}$ を持つ分子種としての取扱いがなされていない。この型の分子の Q の見種りは二次的なものとなっておりおそらく厳密な計算に頼る以外は困難と考えられる。ここではその試みは行わず、定性的に Q の値にどのように N の環境が反映されるかを検討する。 NR_3 型分子で sp^3 混成の場合 $e^{28}Q/e^{28}Q$ (Q は原子の値) は r 方向の軌道中の電子密度と C_{α} 側の 3 つの軌道中の電子密度の差に比例するという単純な取扱⁽⁴⁾ がある。ここで用いている系では電場勾配の大きさ Q が主として C_{α} と C_{β} の電子密度の差によるとすると CH_3 と R の電子吸引性の違いとしてタフトの置換基定数 σ_E との相関を検討するのが妥当である。 σ_E は $-COOH$ では $0.30 \sim 0.35$ であるが $-COO^-$ では $0.05 \sim -0.18$ である。(数字の中は出典による違いを示す。) $-CH_3$ では $\sigma_E = 0$ であり差の大きい $-COOH$ が $-COO^-$ より大きい $e^{28}Q/\text{e}$ を持つ。次に $AcCh$ と Ch を比較してみる。 $-OCOCH_3$ では $\sigma_E = 0.39 \sim 0.48$, $-OH$ では $\sigma_E = 0.25 \sim 0.46$ と前者の方が大きい。これらでは Betaine より更にもう一つ間に CH_2 が入るので置換基の影響は減少すると考えられ得られた $e^{28}Q/\text{e}$ の大きさとよく対応しているといえる。以上のように測定例は少ないものの $-R$ の σ_E によって $(CH_3)_3N^+R$ の $e^{28}Q/\text{e}$ がかなりよく説明できた。

表2に示されているように化学シフトの値は $e^{28}Q/\text{e}$ の大きさと相関を持っており $e^{28}Q/\text{e}$ が大きい場合 ^{13}C における C_{α} と C_{β} の化学シフトの差、 ^{14}N における TMAC からのシフトは共に小さかった。 $e^{28}Q/\text{e}$ の変化が観測されなかった系の間では化学シフトの値もほとんど変化していない。しかし ^{13}C , ^{14}N の化学シフトには種々の項(反磁性、常磁性、磁化率の異方性など)の寄与があり複雑なのでここで得られた $e^{28}Q/\text{e}$ との逆相関について説明は試みない。

なお、ここで求めた $e^{28}Q/\text{e}$ は ^{14}N の緩和に有効な $e^{28}Q/\text{e}$ である。 NMR の四極子分裂より求められる $e^{28}Q/\text{e}$ は時間平均された値であり $e^{28}Q/\text{e}$ の大きさに時間ゆらぎがある場合は必ずしもここで得られた $e^{28}Q/\text{e}$ と同一ではない。

[文献]

- (1). J-P.Behr and J-M.Lehn, Biochem.Biophys.Res.Comm., 49, 1573 (1972).
- (2). M.Witanowski and G.A.Webb, "Nitrogen NMR", Plenum Press, London and New York, (1973).
- (3). J-P.Kintzinger and J-M.Lehn, Helvetica Chimica Acta, 58, 905 (1975).
- (4). E.A.C.Lucken, "Nuclear Quadrupole Coupling Constants", Academic Press, London and New York (1969).

クエン酸マンガン(II)錯体の緩和時間と溶液内分子構造

エーサイ(株)筑波研。藤田 忠男

〈序〉 TCAサイクルにおけるアユニターゼ作用では、鉄(II)イオンはこの反応を活性化させるが、マンガンイオンはその反対に阻害する。この反応の中間体としてアユニターゼ-金属イオン-クエン酸の混合配位子錯体が生成している。この錯体の構造を知ることは生化学的に酵素反応メカニズムを理解する上で重要である。クエン酸は3つのカルボキシル基と1つのOH基をもち、金属錯体になったときにいくつかのキレート環のでき方があり、その金属錯体の構造を固体あるいは溶液状態において研究することは錯体化学的に興味がある。とりわけ、生化学的意義において溶液錯体の構造を研究することは非常に重要である。固体におけるクエンと鉄(II)及びマンガン錯体の構造はX線結晶解析で、中心金属イオンに対しクエン酸は3座配位子としてはたらくが、OH基は脱プロトン化せずに配位し、残りの2つのカルボキシル基は中心金属イオンには配位せず、別の等価の金属イオンと結合し、鎖状の構造をしていることがわかってゐる。しかし、クエン酸と鉄(II)あるいはマンガンイオンの溶液中の錯体の構造は、分析手法の点からあまりよく研究されてきていなかった。著者は既に、クエン酸とマンガンイオンとの錯体の水溶液中の構造を電子スペクトル、熱力学的データより検討し、八面体構造であることを示してきた。今回は、核磁気共鳴スペクトルを用い、クエン酸のメチレンプロトンの緩和速度を測定することにより、マンガンとメチレンプロトンの緩和経路を求めることにより、クエン酸マンガン錯体の構造について研究したので報告する。

〈実験〉 1) 測定溶液；クエン酸ナトリウムと塩化マンガンを表1の組成になるように重水の中に混合した。
2) 核磁気共鳴(NMR)スペクトル測定；装置は日本電子製FX-100スペクトルメータを用いた。測定温度は50°Cで測定した。
3) 測定方法；スピナー極子緩和時間(T₁)はInversion-Recovery法により測定した。パルスインタバルを合計3点として、通常の最小二乗

Table 1. Composition of Measurement Solution (pD=4.3)

Mn	0.0001 g-atom/dm ³
citrate	0.1 mol/l
Cl	2xMn
Na	3xcitrate
Mn/citrate	0.01
Solvent	D ₂ O

Relaxation Times of the Manganese Complex of Citric Acid and
its Structure in Solution

Eisai Co. Ltd. Tsukuba Research Laboratories o Tadao Fujita

法により T_1 を求めた。 T_1 は 11, 25 msec であり、分散は 0.002 であつた。

〈結果と考察〉

中心マンガンヒメチレンプロトンの核間距離は Solomon Bloembergen の式より、測定した T_1 から算出することが出来る。

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{1}{r^6} \cdot \frac{4}{30} \cdot S(S+1) \cdot (\hbar r_I g \beta)^2 \cdot f(\tau_c) + \frac{2}{3} \cdot S(S+1) A^2 j(\tau_e) \quad (1)$$

ここで、

$$f(\tau_c) = 3\tau_c / (1 + w_I^2 \tau_c^2) + (7\tau_c / (1 + w_S^2 \tau_c^2)) \quad (2)$$

$$j(\tau_e) = \tau_e / (1 + w_S^2 \tau_e^2) \quad (3)$$

とは 2つの核間(この場合はマンガンの電子ヒメチレンプロトンの核をさす)距離をあらわす。1)式より、金属イオンと配位子の濃度の比により規格化された T_1 は τ の6乗に 比例することがわかる。

マンガン錯体では一般的に $\omega_S^2 \tau_e^2 \gg 1$ であり、緩和時間に対する量子から考えて1)式の第2項は無視できると考えられる。従って、

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{1}{r^6} \cdot \frac{4}{30} \cdot S(S+1) \cdot (\hbar r_I g \beta)^2 \cdot f(\tau_c) \quad (1')$$

1)式は1')式のように簡略になる。

クエン酸マンガン系の安定度定数より、この測定溶液には、クエン酸:マンガン = 1:1 $Mn(citrate)(H_2O)_3$ 錯体が生成していると考えられる。一般的にマンガンの単錯体の τ_c は4式のように、

$$\tau_c(Mn(H_2O)_q^{#L}) = \tau_c(Mn(H_2O)_6) / (q\#/q) \cdot c_a \quad (4)$$

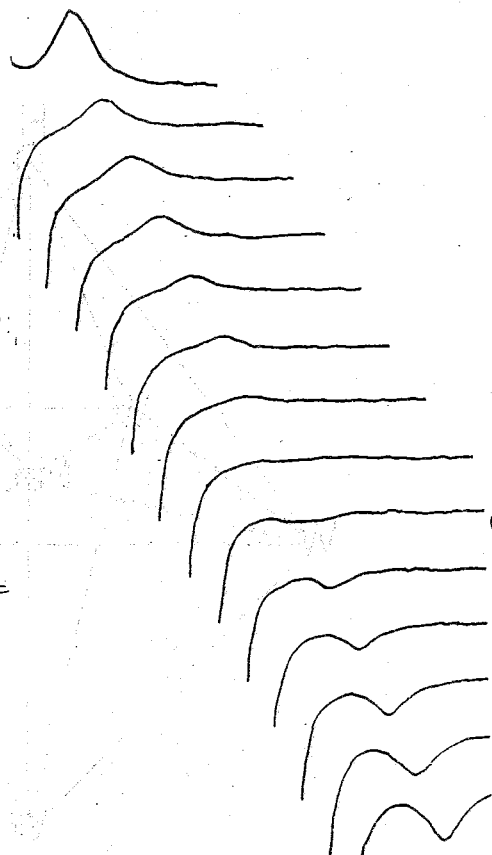


Table 1. NMR Spectrum of the CH_2 Protons at 50°

マンガンイオンの水和錯体の水のプロトンの T_c より算定される。クエン酸マンガン錯体ではマンガンイオンは大配位であり、 3 分子の水分子がマンガンイオンに結合していると考え、即ち $g^*/g = 1/2$ である。 ϵ_a を 1 とおき、マンガン水和錯体の T_c は 2.9×10^{-11} s と報告されているから、本錯体中のメチレンプロトンの T_c は 5.8×10^{-11} s と算定される。

図 1 に測定スペクトルを図示する。

パルスインタバルの長いスペクトルから上より下へ示したものである。表 2 に示すように、 T_1 は 11.25 msec であり、 $1/T_{1M}$ は $8.895 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ であった。Solomon-Bloembergen 式よりマンガン-メチレンプロトン間の距離は $4.2 \text{ \AA}$ であった。 T_1 , T_c による誤差は、結局 $1/6$ 乗になるので、結合距離に与える誤差は 10% 以下になると考えられている。

Table 2. Result from NMR Measurement

T_1	11.25 msec^{-1}
$1/T_{1M}$	$8.895 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$
$r_{\text{Mn} \cdots \text{CH}_2}$	$4.2 \text{ \AA}$

Crystal data from ref. ^{a)}	
$r_{\text{Mn} \cdots \text{CH}_2}$	$3.9 \text{ \AA}$
	$5.6 \text{ \AA}$

a) H. L. Carrell and J. P. Glusker, Acta Crystallogr., B29, 638 (1973).

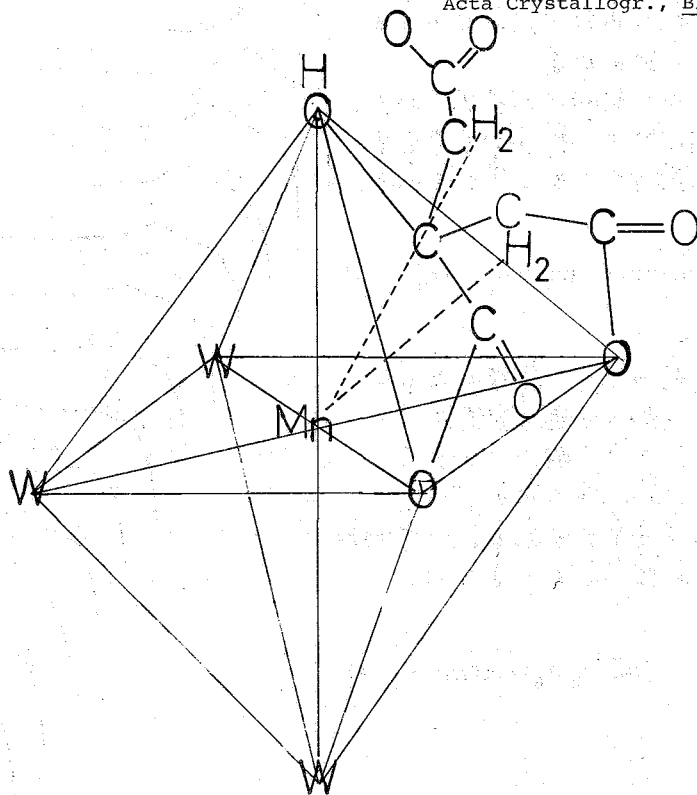
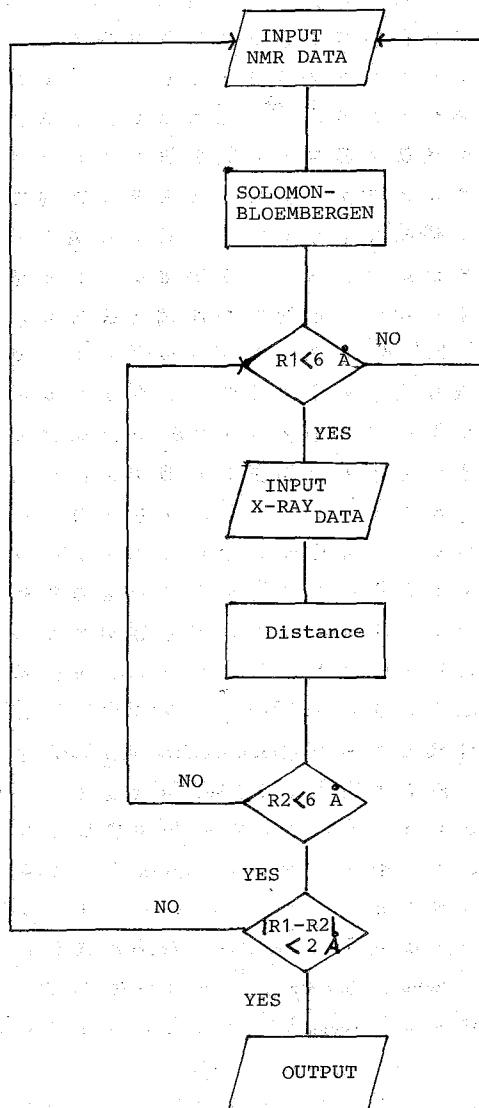


Fig. 2 Illustration of the Proposed Structure of $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})(\text{citrate})$ complex

図2のように、中心金属イオンからみて2通りのメチレンプロトンがあり、Carrellと Gluskerの結晶パラメータから計算すると中心金属イオンのオレート環上のメチレンプロトンへの距離は約3.9Å, またもう1つのメチレンプロトンへの距離は約5.5Åと求まる。両者の平均は約4.7Åになる。本研究のNMRスペクトルによるMn²⁺CH₂の距離は4.2Åであったので、結晶の前者の値に近いと考えられる。これは、本錯体中にキレートしているカルボキシ基はなにも示すと思われ、そのカルボキシ基は別のマンガンイオンに結合し、鎖状の構造をしていると思われる。クエン酸と2価金属イオンは鎖状の構造をとることは古くから特に結晶X線解析により示されてきたが、NMRスペクトルによっても鎖状構造をとることが示唆された。

図3のフローチャートは、NMRデータより核間距離を求め、また結晶パラメータより原子間距離を求め両者を比較しながら解析するフローを示したものである。

APL言語で対話形式で解析できるようになっている。コンピューターはIBM3032システムを用いた。



(東工大原子炉) O垣花 真人・小高 正敬・岡本 真実

【序】 ^{13}C -スピンの格子緩和時間 (T_1) の測定への応用の一つとして、メチル基の様な分子内回転を伴う基のポテンシャル障壁の決定が考えられる。一般に分子内回転を伴う基に含まれる ^{13}C の T_1 から得られる相関時間は分子全体の回転運動及び分子内回転運動を特性づけるパラメーターの関数になっていると考えられる。このような2種類の運動を分離する数学的なモデルは Woessner 等⁽¹⁾⁻⁽³⁾ によって与えられた。これを実験的に実現するためには、まず分子内回転を伴わない基—例えば CH_3 , CH_2 基—に含まれる ^{13}C の T_1 を測定し、分子全体の回転運動に関する情報を得ることから始める。この情報と分子内回転を伴う基に含まれる ^{13}C の T_1 の測定値とを組み合わせることにより、分子内回転に関する純粋な情報を得ることが可能となる。Woessner 等の理論にしたがって、いくつかの分子系についてメチル基の分子内回転におけるポテンシャル障壁の決定が行われた。⁽⁴⁾⁻⁽¹⁰⁾ ところで、本研究の対象物質である酢酸イオンの場合、分子全体の運動に関する情報を得ることが困難である。従来研究対象とされた化合物には、すべてプロトン化された分子内回転を伴わない炭素核が含まれており、この場合緩和の機構は主として ^{13}C -H の双極子-双極子相互作用に基づくので、容易に相関時間を決定できた。一方酢酸イオンの場合、カルボキシル炭素核の緩和の機構は明確でないで、直接相関時間を決めるのは困難である。そこで本研究では $^{12}\text{CH}_3^{13}\text{COO}^-$ 及び $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COO}^-$ のカルボキシル ^{13}C の T_1 を測定し、 ^{13}C - ^{13}C 双極子-双極子相互作用に基づく緩和速度の項を分離し、分子全体の運動の評価を行うこととした。この結果とメチル基の ^{13}C の T_1 及び NOE の測定値とを組み合わせ、Woessner 等の理論に従い、メチル基の分子内回転運動に関する情報を得た。またメチル基の分子内回転速度の温度依存性より、メチル基の分子内回転におけるポテンシャル障壁を決定した。なお、酢酸イオンの場合、そのポテンシャル障壁を他の方法で決定するのは困難である。もっとも可能性の高い方法は固相状態で遠赤外領域に現われるメチル基のねじれ振動による吸収スペクトルを観測することであるが、この場合、結晶格子振動による吸収線との区別が容易でないため、帰属のあいまいさが残ることになる。

【実験】 酢酸ナトリウム ($^{12}\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$ (1- ^{13}C), $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$ (2- ^{13}C), 及び $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$ (1,2- ^{13}C)) は ^{13}C を 90% まで濃縮したもの (Prochem. Co. Ltd. in London) を用いた。溶媒は2回蒸留した重水 (D_2O) を用いた。試料の濃度は 0.5 mol dm^{-3} である。1- ^{13}C 及び 1,2- ^{13}C 酢酸ナトリウムについては等モルの混合物について 0.5 mol dm^{-3} に調整した。Ar ガス雰囲気下で Ar ガスを溶液に通じ脱酸素した。測定はすべて Varian XL-200 により、 ^{13}C の共鳴周波数 50.3 MHz で重水系ロック及びブロードバンド・プロトンデカップリング下で行った。 T_1 の測定はメチル ^{13}C については通常の Inversion-Recovery 法 (待ち時間 $5 \times T_1$) で、カルボキシル ^{13}C については fast-Inversion Recovery 法⁽¹¹⁾ (待ち時間 $1.5 \times T_1$) で行った。メチル ^{13}C に対するプロトン NOE の測定は Freeman 等⁽¹²⁾ の方法によった (待ち時間 $10 \times T_1$)。

かきはな まさと・こたか まさひろ・おかもと まこと

【結果と考察】 (a) カルボキシル¹³CのT₁の解析 ¹²CH₃¹³COONaの1-¹³Cのスピン格子緩和時間—T₁(1-CO)—の逆数は(1)式の様に表わすことができる。

$$T_1(1-CO)^{-1} = T_1(^{13}C-H)^{-1} + T_1(SR)^{-1} + T_1(CSA)^{-1} + T_1(O)^{-1} \quad (1)$$

ここで各項はそれぞれ双極子-双極子(¹³C-H), スピン回転, 化学シフトの異方性, として他のすべての相互作用に相当している。同様に¹³CH₃¹³COONaの1-¹³Cのスピン格子緩和時間—T₁(1,2-CO)—は(2)式の様に書ける。

$$T_1(1,2-CO)^{-1} = T_1(^{13}C-H)^{-1} + T_1(SR)^{-1} + T_1(CSA)^{-1} + T_1(^{13}C-^{13}C)^{-1} + T_1(O)^{-1} \quad (2)$$

ここでT₁(¹³C-¹³C)⁻¹は¹³C-¹³C双極子-双極子相互作用に基づく項である。(1),(2)から,T₁(¹³C-¹³C)は(3)式の様になる。

$$T_1(^{13}C-^{13}C)^{-1} = T_1(1,2-CO)^{-1} - T_1(1-CO)^{-1} \quad (3)$$

測定結果を表Iに示した。

カルボキシル¹³Cの磁化の回復の挙動はいずれの場合も単一指数関数形でよく表わすことができた。従って, この場合 cross correlation による影響は無視できるものとした。

T₁(1,2-CO)は明らかにT₁(1-CO)より短く,¹³C-¹³Cの寄与が認められた。(3)式より得たT₁(¹³C-¹³C)も表Iに示した。T₁(¹³C-¹³C)と相関時間τ_{eff}との関係はτ_{eff}ω₁₃≪1の条件下で(4)式の様に表わされる。

$$\frac{1}{T_1(^{13}C-^{13}C)} = \frac{15 \cdot \mu_0^2}{640 \cdot \pi^4} \times \frac{h^2 \cdot J_C^4}{r_{C-C}^6} \times \tau_{eff} \quad (4)$$

ここでμ₀:真空の透磁率, h:プランク定数, J_C:¹³Cの磁気回転比, r_{C-C}:C-C結合距離=1.505 Å¹³。分子全体の回転運動が等方的であり, その再配向の過程が段階的な回転拡散で記述できれば

Table I: Carboxyl-¹³C Spin-Lattice Relaxation Times for 0.5 mol dm⁻³ Solution of Singly (1-¹³C) and Doubly (1,2-¹³C) Labelled Sodium Acetates in ²H₂O

Temp./K	T ₁ (1-CO)/s	T ₁ (1,2-CO)/s	T ₁ (¹³ C- ¹³ C)/s
273.7	78.0	65.3	401
	79.8	66.7	406
			Ave. 404
282.6	95.0	80.8	541
	94.2	80.9	573
			Ave. 557
287.8	103	89.3	671
	101	87.4	649
			Ave. 660
293.0	106	93.1	774
303.0	112	102	1140
	115	104	1090
			Ave. 1120

Table II: Methyl-¹³C Spin-Lattice Relaxation Times and Nuclear Overhauser Enhancements (η) for 0.5 mol dm⁻³ Solution of 2-¹³C Sodium Acetate in ²H₂O^{a)}

Temp./K	no. of runs		T ₁ (Me)/s	η	T ₁ (¹³ C-H)/s
	T ₁	NOE			
273.7	5	5	8.60 ± 0.35	1.44 ± 0.06	11.9 ± 0.9
282.6	3	7	10.3 ± 0.4	1.32 ± 0.06	15.5 ± 1.3
287.8	3	5	11.7 ± 0.3	1.30 ± 0.04	17.9 ± 1.0
293.0	3	3	12.6 ± 0.1	1.24 ± 0.09	20.2 ± 1.6
303.0	4	11	14.6 ± 0.3	1.07 ± 0.06	27.1 ± 2.1

a) The estimated uncertainty is 95% confidence limit.

(stochastic diffusion model), 相関時間は回転拡散定数 D を用いて (5) 式の様に書ける. $\tau_{\text{eff}} = 1/6D$ (5)

(4), (5) 式から得た τ_{eff} , D の値を表 III に示した. D の Arrhenius プロットは直線関係を示し (図 1), その見かけの活性化エネルギーは $(24 \pm 2) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった.

(b) メチル ^{13}C の T_1 の解析

$^{13}\text{CH}_3^{12}\text{COONa}$ の $2-^{13}\text{C}$ のスピン格子緩和時間— $T_1(\text{Me})$ —及びプロトン NOE— η —の測定結果を表 II に示した. この結果より (6) 式を用いて双極子-双極子 ($^{13}\text{C}-\text{H}$) 相互作用に基づいた緩和時間— $T_1(^{13}\text{C}-\text{H})$ —を分離した (表 II).

$$T_1(^{13}\text{C}-\text{H}) = (\bar{\tau}_H / 2\tau_c) \times (T_1(\text{Me}) / \eta) \quad (6)$$

ここで, $\omega_c \tau_{\text{eff}} \ll 1$, $\bar{\tau}_H$: プロトンの磁気回転比である. $T_1(^{13}\text{C}-\text{H})$ は相関時間 $\tau_{\text{eff}}(\text{Me})$ と (7) 式で関係づけられる.

$$\frac{1}{T_1(^{13}\text{C}-\text{H})} = \frac{n_H}{n_C} \times \frac{\mu_0^2 \cdot h^2}{64 \cdot \pi^4} \times \frac{\bar{\tau}_H^2 \cdot \tau_c^2}{6 \cdot r_{\text{C-H}}^6} \times \tau_{\text{eff}}(\text{Me}) \quad (7)$$

ここで $\omega_c \tau_{\text{eff}}(\text{Me}) \ll 1$, n_H : 直接炭素と結合している H の数, $r_{\text{C-H}}$: C-H 結合距離 $= 1.095 \text{ \AA}$ ¹⁴⁾. 一般に $\tau_{\text{eff}}(\text{Me})$ は分子の幾何学的構造パラメータと分子運動を記述するパラメータとの複雑な関数で表わされる. Woessner 等の理論を適用するために, 本解析は以下の仮定に基づいて行われた.

- i) 分子の幾何学的構造は軸対称を持つ回転剛体で近似できる.
- ii) 分子全体の運動は等方的である.
- iii) メチル基の分子内回転及び分子全体の運動は互いに独立している.

iv) メチル基の分子内回転は段階的な回転拡散で記述できる.

以上の仮定のもとで, Woessner 等³⁾は

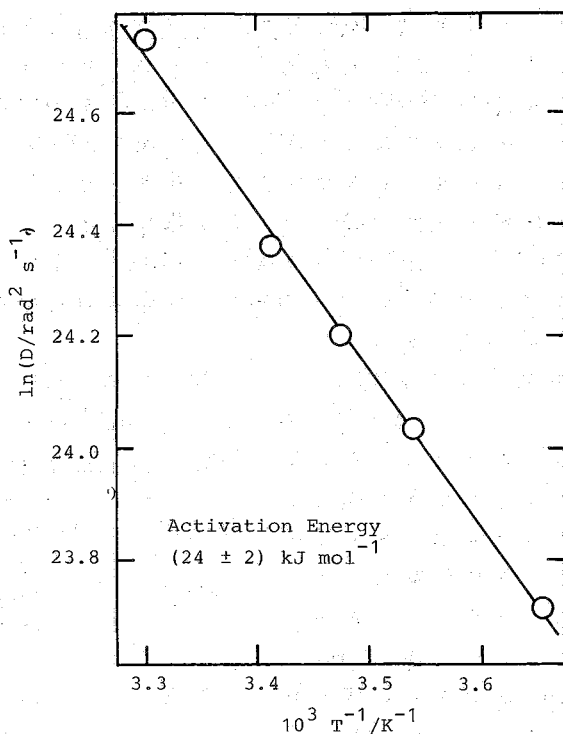


Fig. 1 Temperature dependence of isotropic rotational diffusion constant for 0.5 mol dm^{-3} sodium acetate in D_2O

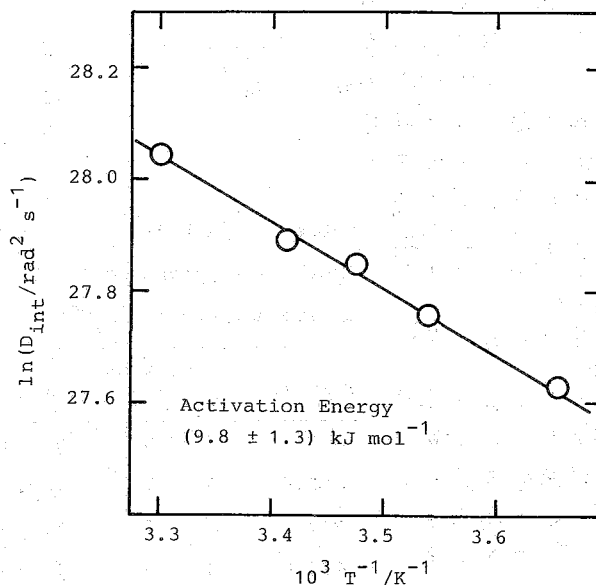


Fig. 2 Temperature dependence of internal methyl rotational diffusion constant for 0.5 mol dm^{-3} sodium acetate in D_2O

$\tau_{\text{eff}}(\text{Me})$ と回転拡散定数との関係が(8)式で与えられることを示した。

$$\tau_{\text{eff}}(\text{Me}) = \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{24 D} + \frac{3 \sin^2 \theta \cos^2 \theta}{6 D + D_{\text{int}}} + \frac{3 \sin^4 \theta}{4 (6 D + 4 D_{\text{int}})} \quad (8)$$

ここで D_{int} はメチル基の分子内回転における回転拡散定数、 θ は CCH の角度 (正四面体角とする) である。(5),(7) から得られた D , $\tau_{\text{eff}}(\text{Me})$ を(8)に代入し D_{int} を決定した(表III)。 D_{int} の温度依存性を図2に示した。 D_{int} は Arrhenius 型の挙動を示し、その見かけの活性化エネルギーは $(9.8 \pm 1.3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。Kowalewski 等¹⁵⁾ は Eyring の絶対反応速度論に基づいて、メチル基の分子内回転を速度過程として取り扱い、Arrhenius の活性化エネルギーは良い近似でメチル基の V_3 障壁に置き換えられることを示した。メチル基のねじれ振動に関する力の定数 H_2 は(9)式で示される。 $H_2 = 9 V_3 / 2$ (9) 本研究で得た活性化エネルギーが(9)式の V_3 と置き換えられれば、 H_2 を用いてメチル基のねじれ振動の吸収波数を計算できる。酢酸イオンの分子構造として文献値¹³⁾を用い基準振動解析を行った。メチル基のねじれ振動による吸収帯の計算値は 204 cm^{-1} (遠赤外領域)であった。

Table III: Effective Correlation Times, Motional Parameters, and Activation Energies for Overall Molecular and Internal Methyl Rotations for 0.5 mol dm^{-3} Sodium Acetate in $^2\text{H}_2\text{O}$

Temp./K	$10^{12} \tau_{\text{eff}}/\text{s}$	$10^{13} \tau_{\text{eff}}(\text{Me})/\text{s}$	$10^{-10} D/\text{rad}^2 \text{ s}^{-1}$	$10^{-11} D_{\text{int}}/\text{rad}^2 \text{ s}^{-1}$
273.7	8.42	13.5	1.98	9.94
282.6	6.11	10.3	2.73	11.3
287.8	5.15	8.95	3.23	12.4
293.0	4.39	7.93	3.79	12.9
303.0	3.04	5.91	5.49	15.1
Activation Energy ^{a)} /kJ mol ⁻¹			24 ± 2	9.8 ± 1.3

a) The estimated uncertainty is 95% confidence limit.

【文献】

- 1) D.E.Woessner, J. Chem. Phys., 36, 1(1962).
- 2) D.E.Woessner, J. Chem. Phys., 37, 647(1962).
- 3) D.E.Woessner, B.S.Snowden, Jr. and G.H.Meyer, J. Chem. Phys., 50, 719(1969).
- 4) K.F.Kuhlmann and D.M.Grant, J. Chem. Phys., 55, 2998(1971).
- 5) J.R.Lyerla, Jr. and D.M.Grant, J. Phys. Chem., 76, 3213(1972).
- 6) S.W.Collins, T.D.Alger, D.M.Grant, K.F.Kuhlmann and J.C.Smith, J. phys. Chem., 79, 2031(1975).
- 7) K.H.Ladner, D.K.Dalling and D.M.Grant, J. Phys. Chem., 80, 1783(1976).
- 8) D.E.Axelsson and C.E.Holloway, Can. J. Chem., 54, 2820(1976).
- 9) N.Platzer, Org. Magn. Reson., 11, 350(1978).
- 10) A.Ericsson, J.Kowalewski, T.Liljefors and P.Stilbs, J. Magn. Reson., 38, 9(1980).
- 11) D.Canet, G.C.Levy and I.R.Peat, J. Magn. Reson., 18, 199(1975).
- 12) R.Freeman, H.D.W.Hill and R.Kaptein, J. Magn. Reson., 7, 327(1972).
- 13) K.T.Wei and D.L.Ward, Acta Cryst., B33, 522(1977).
- 14) D.M.Chen, L.W.Reeves, A.S.Tracey and M.M.Tracey, J. Amer. Chem. Soc., 96, 5349(1974).
- 15) J.Kowalewski and T.Liljefors, Chem. Phys. Lett., 64, 170(1979).
- 16) W.G.Fateley and F.A.Miller, Spectrochim. Acta, 17, 857(1961).

(東大生研)

○ 森山 元思・山 璃 哲・斎藤 泰和

1 はじめに

トリクロロスタナト(SnCl_3)を配位子とする遷移金属錯体、なかでも白金族の錯体は、均一系錯体触媒として水素添加反応・ヒドロボリル化反応などに高い活性を示すことから、これまで多くの研究がある¹⁾。遷移金属スズ錯体は、金属-金属結合を有するとも考えられ、化学結合論的に興味深い。これらのような種々の触媒作用を十分に理解するには、錯体合成化学的な知見ばかりでなく、溶存錯体種に関する分光化学的情報が必要である。

パルスフーリエ変換核磁気共鳴法の発展により多核NMR測定が容易になり、溶液中の錯体種、とりわけ *in situ* の触媒種に関する直接的知見が得られるようになった。我々は遷移金属スズ錯体に含まれる ^{119}Sn 核(核スピン $I = \frac{1}{2}$, 自然存在率 8.6%)に着目し、錯体触媒化学の立場からいくつかのNMR情報を明らかにして²⁻⁴⁾。ここには特にルテニウム(II)-スズ(II)錯体, $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{SnCl}_3)_n(\text{Cl}_{6-n})]^{4-}$ ($n=4-6$)を対象に、核スピン結合定数, $J(^{119}\text{Sn}-^{119}\text{Sn})$ とスピン格子緩和時間 T_1 について検討した。ルテニウム-スズ錯体の特徴は、中心金属がロジウム²⁾や白金⁵⁾の場合と異なり、溶液中でも配位座が固定されているところにある。 $J(\text{SnSn})_{\text{trans}}$ と $J(\text{SnSn})_{\text{cis}}$ を同一錯体から求めることができるので、核スピン結合定数の量子化学的検討にとっても適切な検討対象であるといえる。

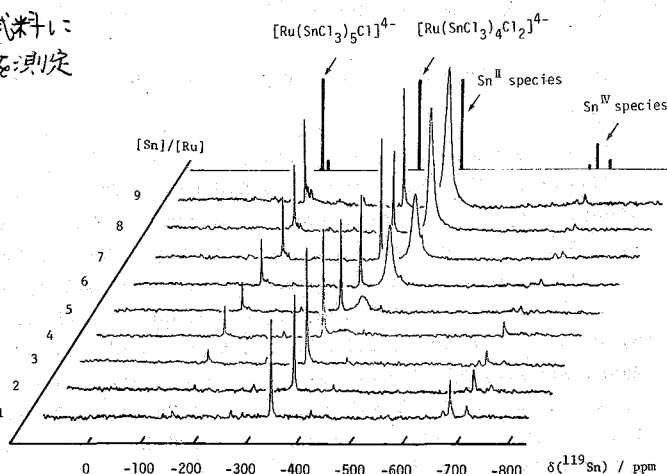
2 実験

不活性雰囲気下、 $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mmol) に、 $\text{SnCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.0 ~ 10.0 mmol) を加えて脱気した 3M HCl (3.0 ml) 溶液中で攪拌し、試料溶液を調製した。

スズ添加比と時間経過により色調が著しく

変化するので種々の $[\text{Sn}]/[\text{Ru}]$ 試料について時間をかえて ^{119}Sn NMR を測定し、溶存錯体種の同定を行なった。

^{119}Sn NMR は Jeol FX-600 (^{119}Sn 核専用プロブ 22.30 MHz) で測定した。同軸細管中に封入した重水を内部ロックに用い、 $\text{Sn}(\text{CH}_3)_4$ 50% v/v アセトン溶液を基準にして、低磁場側への化学シフトを正とした。



〈図1〉種々の添加スズ比での試料調製1時間後のスペクトル

もりせまひろし・やまかみてつ・さいとうやすかつ

スペクトル幅は通常 20,000 Hz, 90° パルス (10 μ s) を用い、パルス間隔は 1.0 秒とした。

スピン格子緩和時間 T_1 は Inversion-recovery 法を用い、 $(180^\circ - \tau - 90^\circ - T)_n$ パルス系列で $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_5\text{Cl})]^{4-}$ については $n=2400$, $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_6)]^{4-}$ については $n=240$ のくり返しで満足する S/N 比を得た。この時の待ち時間 T は 15.0 秒とした。

相互分極率に関する拡張ヒュッセル分子軌道計算は FACOM-M160AD 計算機を用いて行った。Slater exponent およびイオン化ポテンシャルは報告値⁶⁻⁸⁾を採用し、電荷感度因子 2.0 eV/charge で電荷収束を繰り返した。原子間距離および結合角は、 $[\text{N}(\text{GH}_5)_4]_4[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_5\text{Cl})]$ の X 線構造解析データ^{9,10)}を用いた。

3 結果と考察

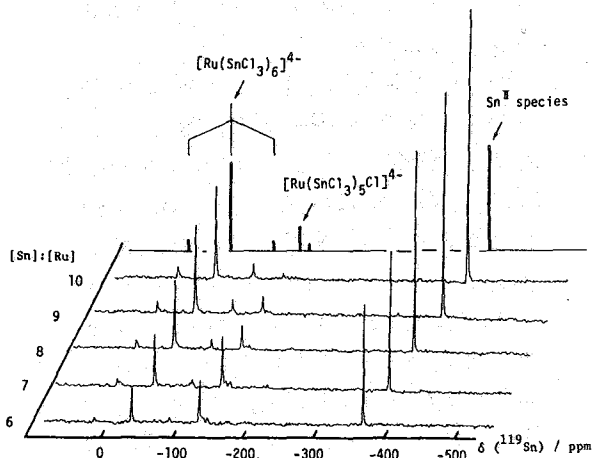
3.1 生成錯体種の同定

図 1 に各 $[\text{Sn}]/[\text{Ru}]$ 比で混合し攪拌 1 時間後の ^{119}Sn NMR スペクトルを示す。遊離の 4 価スズは速やかに進行する $\text{Ru}^{\text{III}} \rightarrow \text{Ru}^{\text{II}}$ 酸化還元過程のため生じたものである。また、 $[\text{Sn}]/[\text{Ru}] > 5$ の場合には遊離の 2 価スズピークが存在する。二種の錯体種が生成し、 ^{117}Sn ($I = \frac{1}{2}$, 7.6%) サテライトの解析により $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_4\text{Cl}_2)]^{4-}$ ¹²⁾ および $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_5\text{Cl})]^{4-}$ ^{9-11,13,14)} と同定された。図 1 から、生成比が添加スズ比に対応し顕著に変化することは明らかである。

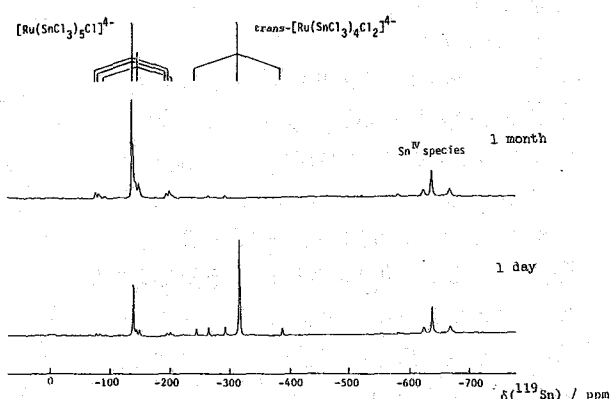
さらに試料管中室温で放置すると一日後には $[\text{Sn}]/[\text{Ru}] > 5$ の場合、試料溶液の色調がより濃い黄色系に推移した。 $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_4\text{Cl}_2)]^{4-}$ は消失していて、 $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_5\text{Cl})]^{4-}$ のほかに $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_6)]^{4-}$ が新たに生成することが見出された (図 2)。

$[\text{Sn}]/[\text{Ru}] < 5$ では、試料溶液の色調ははじめと同じ緑褐色のままであった。 ^{119}Sn NMR スペクトルから、この条件下では $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_6)]^{4-}$ の生成はほとんどおこらず、 $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_4\text{Cl}_2)]^{4-}$ は減少し、 $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_5\text{Cl})]^{4-}$ が相対的に増加することがわかった。

また、1 か月後の ^{119}Sn NMR スペクトルを見ると $[\text{Sn}]/[\text{Ru}] = 5$ を境として、スズ比がより大きいところでは、すべてが $[\text{Ru}(\text{Sn}(\text{Cl}_3)_6)]^{4-}$



〈図2〉 $[\text{Sn}]/[\text{Ru}] = 6-10$ の試料調製 1 日後のスペクトル



〈図3〉 $[\text{Sn}]/[\text{Ru}] = 3$ のスペクトル変化 (下: 1 日後, 上: 1 月後)

となり、より小さいと $[Ru(SnCl_3)_5Cl]^{4-}$ が選択的に生成していた。

図3に $[Sn]/[Ru] = 3$ の場合の ^{119}Sn NMR スペクトルの時間経過を示す。同じ d⁶ 錯体である、ロジウム(III)-スズ(II)錯体 $[Rh(SnCl_3)_nCl_{6-n}]^{3-}$ ($n=1-5$)¹²⁾ と比較すると溶液組成が比較的単純であり、かつスズ配位数が多いといえる。 $[Sn]/[Ru] = 1$ の場合でさえ、最終生成物はスズ5配位錯体であった。ルテニウム(II)-スズ(II)錯体種の変換過程をスキーム I に示した。錯体種組成は添加スズ比と経過時間に大きく依存する。 ^{119}Sn NMR を溶液組成のモニターとして用い、各々の錯体種を選択的に生成させ、かつ単離することができた。それぞれの元素分析値は満足すべきものである(表1)。

8 ^{119}Sn 核のスピン格子緩和

図4に $[Ru(SnCl_3)_5Cl]^{4-}$ 、図5に $[Ru(SnCl_3)_6]^{4-}$ および遊離の2価スズを含む塩酸水溶液に対する Inversion-recovery 法の結果を示す。分子内でスピン格子緩和に寄与する機構はいくつかあり、よく知られているように次のように分類される。a) 磁気双極子-双極子 (T_{DD}) の電気四極子 (T_{IQ}) の化学シフト異方性 (T_{ICSA}) のスカラー結合 (T_{ISC}) のスピン回転 (T_{ISR})。全スピン格子緩和時間はこれらの寄与の和で与えられる。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1DD}} + \frac{1}{T_{1SR}} + \frac{1}{T_{1IQ}} + \frac{1}{T_{1ISC}} + \frac{1}{T_{1ICSA}} \quad \dots (1)$$

緩和速度 $R_1 = \frac{1}{T_1}$ を用いて表わし

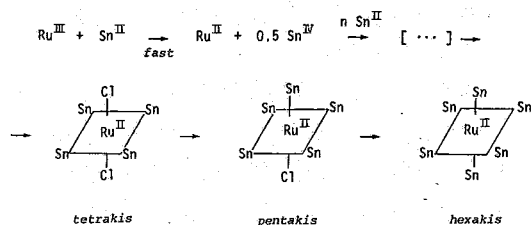
$$R_1 = R_{1DD} + R_{1SR} + R_{1IQ} + R_{1ISC} + R_{1ICSA} \quad \dots (2)$$

^{119}Sn 核の T_1 測定について
は報告例がきわめて少ない。^{16,17)}
比較的単純なスズ化合物では
 T_{ISR} が大きな寄与をすることば
報告されている。¹⁷⁾

ルテニウム(II)-スズ(II)錯体について
得られた結果を化学シフトならびに
核スピン結合定数 $J(^{119}Sn-^{119}Sn)$ のデータ
とともに表2にまとめた。

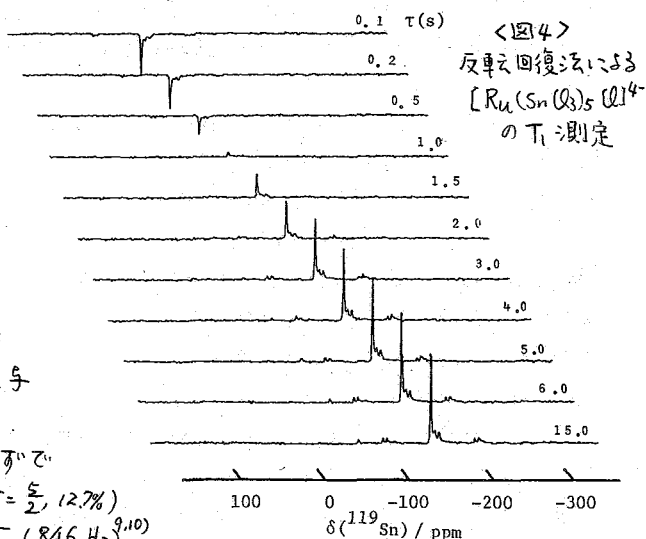
対称性のよい錯体の場合に T_{ICSA} は
無視できる。¹⁷⁾ ^{119}Sn 核に揺動磁場を与
える他の磁気活性なスピンの存在は
 T_{1DD} および T_{1ISC} に影響をおよぼすはずで
ある。まず第一に中心金属 ^{99}Ru ($I = \frac{5}{2}$, 12.7%)
とのスピン結合は、 $[Ru(SnCl_3)_5Cl]^{4-}$ (846 Hz)^{9,10)}

<スキーム I> 塩酸酸性水溶液中での ルテニウム(II)-スズ(II)錯体の生成過程



<表1> ルテニウム(II)-スズ(II)錯体の元素分析値

Complex	Analysis found (calcd.) (%)			
	C	H	N	Cl
$[N(CH_3)_4]_4[Ru(SnCl_3)_4Cl_2]$	13.88 (14.04)	4.07 (3.53)	4.10 (4.09)	36.89 (36.26)
$[N(CH_3)_4]_4[Ru(SnCl_3)_5Cl]$	12.24 (12.33)	3.67 (3.10)	3.63 (3.60)	36.37 (36.40)
$[N(CH_3)_4]_4[Ru(SnCl_3)_6]$	10.45 (10.99)	3.22 (2.77)	3.51 (3.21)	35.76 (36.51)



[Ru(SnCl₃)₆]⁴⁻
(754 Hz)¹⁵と見
出されているが、
これらのサテライト
ピーク強度は小さく、
T₁を測定することは難しい。

これに対して ¹¹⁷Sn (I=1/2, 7.6%)
とのスピン結合 ¹¹⁹Sn-¹¹⁷Sn)は
表2に示したように著しく大きく、
緩和機構への寄与が期待される。

実際 ¹¹⁷Sn サテライトの下実験値は
メインピークの T₁ より 0.2~0.4秒
短いと求められたが、T₁の測定誤差
を ±10%¹⁷⁾と見込むと、この差が確定的

であるかどうかは結論しがたい。しかしながら遊離の2価スズの T₁ (3.7s)に比較し
て錯体のスズ配位子の T₁ は短い (~2.0s) ことは明らかであり注目に値する。

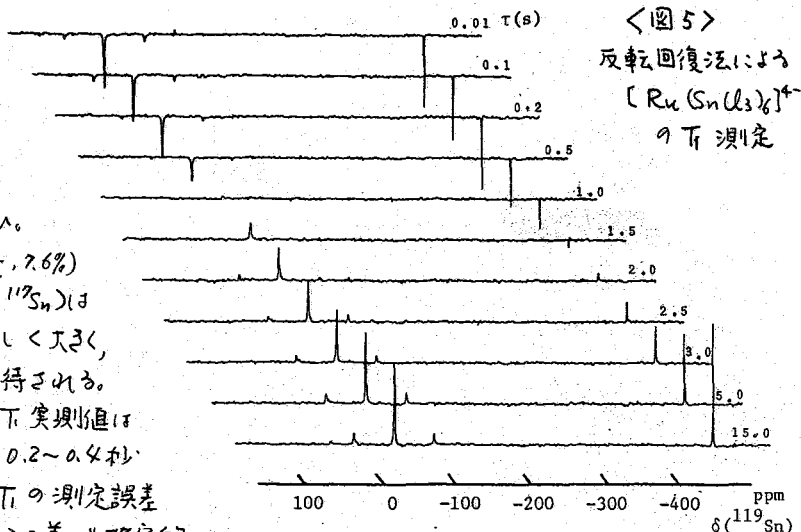
§3 核スピン結合定数 の量子化学的検討

[Ru(SnCl₃)_n(Cl_{6-n})]⁴⁻
(n=4-6) は いずれも著し
く大きな ¹¹⁹Sn-¹¹⁷Sn) を与える。
一般に遷移金属錯体に
おける核スピン結合定数
は Fermi 接触項支配である
とされ¹⁸⁾、Pople-Santry 近似
により¹⁹⁾

$$J(AB) = (16h\nu_A\nu_B^2/9) [S_A(0)]^2 [S_B(0)]^2 \pi(AB) \quad \dots (3)$$

$$\pi(AB) = -4 \sum_i \frac{\text{occ}}{i} \sum_j \frac{\text{unocc}}{j} (e_j - e_i)^{-1} C_{iS_A} C_{iS_B} C_{jS_A} C_{jS_B} \quad \dots (4)$$

のように表現される。J 値は結合の s 性格をよく
反映するが、相互分極率とよく対応することから
計算結果より確かめられる。



<図5>
反転回復法による
[Ru(SnCl₃)₆]⁴⁻
の T₁ 測定

<表2> ルテニウム(II)-スズ(II)錯体の ¹¹⁹Sn NMR 定数

Compounds	Solvent	$\delta(^{119}\text{Sn})/\text{ppm}$	T_1/s	$^2J(^{119}\text{Sn}^{117}\text{Sn})/\text{Hz}$	Refs.
[Ru(SnCl ₃) ₆] ⁴⁻	3M HCl	-37.6	2.0	12,783(trans) 2,386(cis)	4)
[Ru(SnCl ₃) ₅ Cl] ⁴⁻	CH ₃ NO ₂	-167.9(eq) -149.2(ax)	—	21,254(eq-eq trans) 2,938(eq-eq cis) 2,581(eq-ax cis)	9-11)
	3M HCl	-133.5(eq) -143.8(ax)	2.1 2.1	20,664(eq-eq trans) 2,873(eq-eq cis) 2,593(eq-ax cis)	15)
[Ru(SnCl ₃) ₄ Cl ₂] ⁴⁻	3M HCl	-316.5	—	26,455 3,301	15)

<表3> 拡張ヒュッケル法による SCC 計算

Compounds	$ ^2J_{\text{SnSn}}^{\text{trans}} / ^2J_{\text{SnSn}}^{\text{cis}} $ (obsd.)	$\pi_{\text{SnSn}}^{\text{trans}} / \pi_{\text{SnSn}}^{\text{cis}}$ (calcd.)
[Ru(SnH ₃) ₆] ⁴⁻	5.44	-7.13
[Ru(SnH ₃) ₅ Cl] ⁴⁻	7.28	-9.23
[Ru(SnH ₃) ₄ Cl ₂] ⁴⁻	8.01	-11.12

- 1) B.R.James, "Homogeneous Hydrogenation", Wiley, New York, 1973, p.327.
- 2) H.Moriyama, T.Aoki, S. Shinoda, Y.Saito, J.Chem.Soc., Dalton, 639 (1981).
- 3) H.Moriyama, T.Aoki, S.Shinoda, Y.Saito, J. Chem.Soc., Perkin II, 369 (1982).
- 4) H.Moriyama, T.Aoki, S.Shinoda, Y.Saito, J.Chem.Soc., Chem. Commun., 500 (1982).
- 5) J.H.Nelson, N.W.Alcock, Inorg.Chem., 21, 1196 (1982).
- 6) H.Berke, R. Hoffmann, J.Am.Chem.Soc., 100, 7224 (1978).
- 7) D.L.Thorn, R.Hoffmann, Inorg.Chem., 17, 126 (1978).
- 8) J.Silvestre, T.A.Albright, B.A.Sosinsky, Inorg.Chem., 20, 3937 (1981).
- 9) L.J.Farrugia, B.R.James, C.R.Lassigne, E.J.Wells, Inorg.Chim.Acta, 53, L261 (1981).
- 10) L.J.Farrugia, B.R.James, C.R.Lassigne, E.J.Wells, Can.J.Chem., 60, 1304 (1982).
- 11) C.R.Lassigne, E.J.Wells, L.J.Farrugia, B.R.James., J.Mag.Reson., 43, 488 (1981).
- 12) T.Kimura, M.Shima, K.Mizumachi, T.Ishimori, Proc. 30th National Meeting of Coord. Chem., (Tokyo), 1980, Abstr. 2A03.
- 13) H.Okuno, T.Ishimori, K. Mizumachi, H.Ihuchi, Bull.Chem.Soc.Jpn., 44, 415 (1971).
- 14) P.G.Antonov, Yu.N.Kukushkin, V.I. Konnov, Koord.Khim., 3, 757 (1977).
- 15) H.Moriyama, T.Yamakawa, Y.Saito, unpublished results.
- 16) R.R.Sharp, J.Chem.Phys., 57, 5321 (1972).
- 17) C.R.Lassigne, E.J.Wells, Can.J.Chem., 55, 927 (1977).
- 18) P.S.Pregosin, R.W.Kunz, "31P and 13C NMR of Transition Metal Phosphine Complexes", Springer-Verlag, Berlin, 1979.
- 19) J.A.Pople, D.P.Santry, Mol.Phys., 8, 1 (1964).

第 2 日

10月17日(日)

「水溶液中の金属(Zn , Ag 及び Cd)錯体の金属イオンの
 nmr ケミカルシフトと錯体構造. MO アプローチ」
 (三菱製紙(京都工場研究部), 京都大学工学部⁺) 遠藤 一央[○],
 中辻 孝⁺, 諫田 克哉⁺, 山本 宗介⁺, 鈴木 重芳⁺, 二本 清⁺, 米沢 貞次郎⁺

(緒言) 近年の nmr の技術進歩により、感度が低い端に測定できなかった水溶液中の金属核の nmr に関する報告¹⁾も少しずつ行われてきている。そこで筆者らは、水溶液中の金属錯体の構造や電子状態と金属錯体の金属核 nmr ケミカルシフトとの対応関係に着目し、 MO 法を用いて定性的な考察を試みる。

(方法)

MO 法は *ab initio Hartree-Fock SCF MO (STO-3G)* プログラムを用いた。金属錯体の構造は図1に示した立体配置をとり、金属イオンと配位子との距離は *Pauling*²⁾ の化学結合半径(実測値との対応が良く一致)を用いた。

(結果及び考察)

図1には、水溶液中の金属イオンの水和及び金属錯体の構造に関する電荷分布を示した。

この電荷分布の結果は、金属原子のイオンの価数や電気陰性度に対する特徴や電気的中性の原理を良く反映している。(例の水和物における電荷分布では、+1の金属原子は0.2、+2のそれは、0.8~0.9; Hが電荷を中和している。②+2の金属原子でも Zn より Cd の方が常に+0.1だけ電荷が正である。)

図2には、水溶液中(一部固体)の金属塩の ^{107}Ag , ^{67}Zn 及び ^{113}Cd nmr のケミカルシフトを表した。三者の金属イオンのシフトは、水和物を基準とした時、配位子が4個

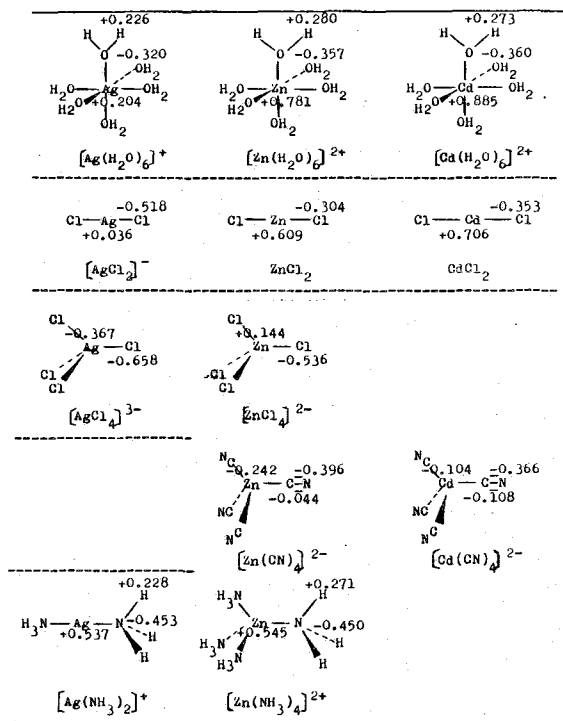


Figure 1. Gross Atomic Charge

えんどうがなせ、なかつばひ3し・かんたかや、やまときうすけ・すきしげよし・いなきまよし・よねざわていじろう

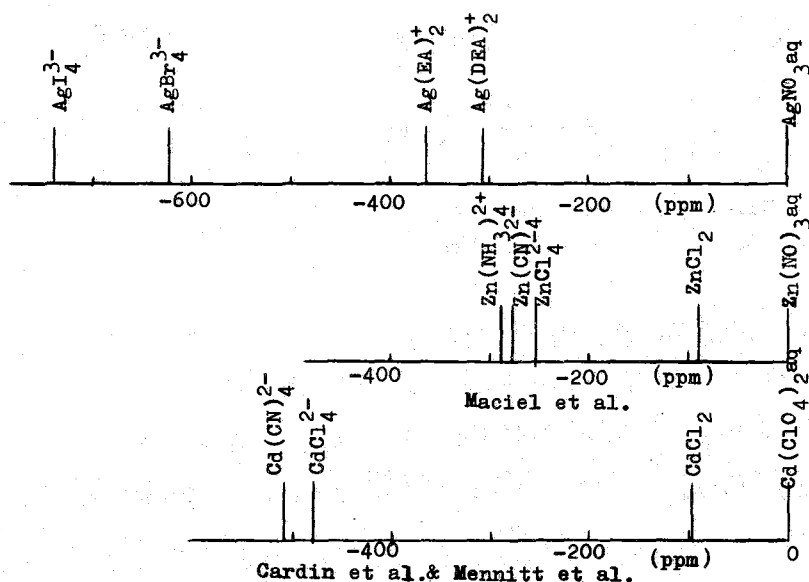


Figure 2. Chemical Shifts of Zinc, silver and Cadmium compounds

結合した四面体構造の金錯体のシフトが最も低磁場に存在し、正方形が2個結合した直線構造の金錯体のシフトが中間に位置していることが特徴的である。これは、シフトと配位結合の数と電子状態の間に相関関係があることを示唆している。

核磁気遮蔽定数 (σ_{total}) は、摂動論を用いて、主に反磁性項 (σ_{dia}) と常磁性項 (σ_{para}) の二項の和として次式で表される。

$$\sigma_{total} = \sigma_{dia} + \sigma_{para} . \quad (1)$$

測定値が数百ppmの領域に及び場合は、理論的に σ_{para} が支配的であると考えられる。そこで σ_{para} をくわしく表せば (2) 式になる。

$$(\sigma_{para})_{zz} = - \frac{\alpha^2}{2} \sum_{n \neq 0} \frac{[\langle 0 | \sum_i l_z^i | n \rangle \langle n | \sum_j l_{z,j}^{-1} | 0 \rangle + c.c.]}{E_n - E_0} . \quad (2)$$

ここで α : 微細構造定数, $\langle 0 |$, E_0 : 基底状態の波動関数及びエネルギー, $\langle n |$, E_n : 励起状態の波動関数及びエネルギー, $\sum_j$ は、Z方向の電子jに作用する角運動量演算子で、 $\langle l_z^j \rangle$ は、電子jの l のベキ平均値である。(2) 式の $E_n - E_0$ を ΔE

近似で置き、MO展開して簡略化すれば次式(3)を得る。

$$\sigma_{\text{para}} \sim -\frac{2\alpha^2}{3\Delta E} \langle 1/r^3 \rangle_{\text{np}} \cdot P_u \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{Where } P_u = & P_{xx} + P_{yy} + P_{zz} \\ & - (1/2)(P_{xx}P_{yy} + P_{yy}P_{zz} + P_{zz}P_{xx}) \\ & + (1/2)(P_{xy}^2 + P_{yz}^2 + P_{zx}^2) \end{aligned}$$

(3)式は、p電子の異方性電荷が核に deshield させるシフトへの効果を与えている。ここで同一の原子核について、粗いが ΔE を同一とし、

α 及び $\langle 1/r^3 \rangle_{\text{np}}$ は定数であるから (3)式及び (1)式を用いて

$$\sigma_{\text{exptl}}(ML_m^{(m-i)}) \propto (\sigma_{\text{para}}(ML_m^{(m-i)}) - \sigma_{\text{para}}(M(H_2O)_6^{+}))$$

が考えられ $\sigma_{\text{exptl}}(ML_m^{(m-i)})$ と $(P_u(M(H_2O)_6^{+}) - P_u(ML_m^{(m-i)}))$ には
相関があるといえる。(シフト) と (電子密度)

Table 1. Results for Ag-Complexes

	$Ag(H_2O)_6^+$	$AgCl_2^-$	$Ag(NH_3)_2^+$	$AgCl_4^{3-}$
Density				
Ag(5S)	0.1834	1.4531	1.1811	0.2559
Ag(5Px)	0.1279	0.1272	0.0080	0.6017
Ag(5Py)	0.1279	0.1272	0.0080	0.6017
Ag(5Pz)	0.1279	0.1043	0.1210	0.6017
Sum	0.5671	1.8318	1.3181	2.0610
Pu	0.3592	0.3373	0.1380	1.2620
in Eq. 3				
Paramagnetic				
term (ppm)	0		-363	-623
$\sigma(\text{exptl})$			(Ag(EA) ₂) ⁺	(AgBr ₄) ⁻

Table 2. Results for Zn-Complexes

	$Zn(H_2O)_6^{2+}$	$ZnCl_2$	$ZnCl_4^{2-}$	$Zn(CN)_4^{2-}$	$Zn(NH_3)_4^{2+}$
Density					
Zn(4S)	0.3208	1.4849	0.5057	0.4915	0.4593
Zn(4Px)	0.1906	0.1712	0.5112	0.5156	0.4759
Zn(4Py)	0.1906	0.1712	0.5112	0.5156	0.4759
Zn(4Pz)	0.1906	0.2843	0.5112	0.5156	0.4759
Sum	0.8926	2.1116	2.0393	2.0383	1.8870
Pu	0.4628	0.5634	1.1416	1.1480	1.0880
in Eq. 3					
Paramagnetic					
term (ppm)	0	-93	-253	-284	-288
$\sigma(\text{exptl})$					

ここで金錯体の金属核に

σ_{para} の生ずる原因を考えると、

金属イオン ($Ag^+(5s)(5p)$ など)

は、球対称な電荷分布であるが、

金錯体を形成する時、配位子から

金属原子の空の p 軌道に電子

移動が生じて σ_{para} が表れる。

(3)式中の P_u を与える

density (又は population)

は、金属原子の

Rambhall の電子密度

である。(数学的に

P_u は、density $P_x = P_y$

$= P_z$ とすれば $P_x = 1$ の時

P_u は最大になる。ここで

錯体の対称性から

$P_{xy}, P_{yz}, P_{zx} = 0$

である。)

Table 3. Results for Cd-Complexes

	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$	CaCl_2	$\text{Ca}(\text{CN})_4^{2-}$
Density			
$\text{Ca}(5s)$	0.2701	0.5516	0.3315
$\text{Ca}(5p_x)$	0.1671	0.1090	0.4017
$\text{Ca}(5p_y)$	0.1671	0.1090	0.4017
$\text{Ca}(5p_z)$	0.1671	0.2338	0.4017
Sum	0.7714	1.0034	1.5366
Pu in Eq. 3	0.4594	0.4204	0.9631
Paramagnetic shift (ppm)	0	-97.8	-509.8
$\sigma(\text{exptl})$			

表 1~3 には 銀錯体、亜鉛錯体及びカドミウム錯体(水和物を含む)の nS 及び np (zn は $n=4$, Ag と Cd は $n=5$) 軌道の density, その和, P_u , 水和物を基準としたシフト値 $\sigma(\text{exptl})$ とを示した。以上のことから次の様に結論できる。

① 理論式の ΔE 近似は悪い近似であるにもかかわらず

$$\langle P_u(M(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}) - P_u(ML_m^{(m-i)-}) \rangle \propto \sigma_{\text{exptl}}(ML_m^{(m-i)-})$$

が得られた。特に zn に関しては良い関連性を持っている。

② 錯体構造から四面体構造(すなわち)でのシフトの計算値及び測定値は、水和物を基準にとると三者のシフトの結果は良く一致している。

③ 電荷分布と構造からみると、直線構造の場合、金属原子の S 軌道に電子移動が大きい。

④ 結合性から考えると水溶液中での基準を Ag , zn^{2+} , Cd^{2+} とすれば、両配位子から金属原子の空の S 及び P 軌道への charge transfer がかなり大きい。

(文献)

- 1) G.E. Maciel et al. *J. Phys. Chem.*, **81**, 263 (1977)
A.D. Cardin et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1672 (1975)
P.G. Mason et al. *J. Phys. Chem.*, **85**, 2087 (1981)
- 2) L. Pauling, "The Nature of the Chemical Bond," 3rd. ed., Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1960.

「水溶液中の銀錯体の ^{109}Ag nmr」(三菱製紙(京都工場・研究部)・日本電子(nmr応研)[†])遠藤一夫[†], 松下和弘[†], 出口健三[†], 山本京之介, 鈴木重芳, 二本清

(緒言) 溶液中の ^{109}Ag nmrは感度が低く緩和時間が長い為、信号を検出することが、かなり難しい。従って、現在までの ^{109}Ag nmrは7報⁽¹⁻⁷⁾の記述のみである。著者らは、水溶性のニトロキシドラジカル・TANOL⁽⁸⁾を緩和剤として銀塩の水溶液に加えて測定時間を短縮することができた。又 AgNO_3 水溶液中にTANOLを加えて、ケミカルシフト及び緩和時間の測定から Ag^+ とTANOLとが一対一の錯体を形成することを見出した。この緩和剤を用いて未検出の銀塩のシフトを検出し、 ^{109}Ag のケミカルシフトが1000ppmの領域にあることも決定できた⁽⁹⁾。更に銀塩の銀電位測定を併用することにより、銀錯体のケミカルシフトも決定した。

(方法) 1) nmrはJEOL FX 90Qを用い、 ^{109}Ag は 4.11MHz で観測した。2~3sのくり返しで500~700回積算。銀塩水溶液は 1.0M とし、TANOLは 0.020M 加えた。測定した試料は、 10mm 管を用い、 30°C で保温した。測定誤差は $\pm 0.5\text{ppm}$ で測定規準は 1.0M AgNO_3 とし、シフトは $\delta_{\text{sample}} = (\nu_{\text{ref}} - \nu_{\text{sample}}) / \nu_{\text{ref}}$ で決めた。

2) 銀電位測定は、デジタルボルトメータMP1000-12(旭計器)を用い、銀電極は手製、比較電極として AgCl HS 305DS (東亜電波工業)を用いた。電位は、イオン強度 1.0M KNO_3 中の AgNO_3 を規準濃度とし、 $E_{\text{Ag}} = 0.592 - (0.060/10) \log [\text{Ag}^+]$ で決定した。測定温度は 30°C 、イオン強度は 1.0M KNO_3 である。

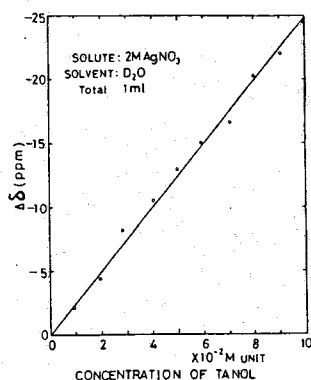
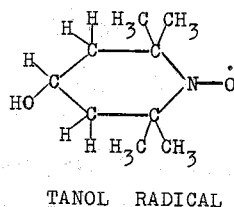


Figure 1. Plots of ^{109}Ag chemical shift versus the concentration of added TANOL radical at 30°C .

(結果及び考察)

1) 緩和剤としてのTANOL及び Ag^+ -TANOL錯体

図1には、ラジカル濃度に対する ^{109}Ag のシフトの変化を示した。(ラジカルの飽和濃度まで、直線関係を示した。) この図の直線の傾きを Solomon によるシフト式に代入し、ラジカル中心から Ag 核へ 4.3×10^{-4} の正のスピン密度が誘起されていることが見續られる。又 ^{109}Ag の緩和時間 T_1, T_2 の測定から T_1/T_2 の比が52になることから、 Ag^+ -TANOL錯体ができていることが分かる。(くゆくは、討論会で述べる。)



えんどうがづながまつたがづかり・でぐちけんぞう・やまもとさうのすけ・すずきげんし・ふたきさよし

緩和時間の測定値 (AgNO_3 対 TANOL のモル比が 20 の時, T_1 は $(8.3 \pm 0.5) \text{ms}$, T_2 は $(1.6 \pm 0.3) \text{ms}$) 及び Solomon-Bloembergen の式を用いて、この錯体の交換速度は、 1.7×10^{-8} と決まることが出来る。(この寿命の妥当性は、常磁性金属の水分子との錯体のそれが 10^{-8} である。)

図 2 には、MO 法によるエネルギー安定性及び正のスピン密度の誘起と云うことから、

Ag^+ -TANOL 錯体の最も可能性の高い構造を示した。

右図に銀塩水溶液の ^{109}Ag nmr スペクトルを示した。ここで緩和剤としての TANOL は、銀塩水溶液 1.0M に対し 0.020M 加えてある。この時の測定のくり返し時間は、2~3s で、銀の nmr の測定時間を通常の $1/50 \sim 1/40$ 位までに短縮できる。又 TANOL 0.020M 滴加した時のシフト補正值は -10ppm である。この時の銀塩の濃度は 1.0M である。

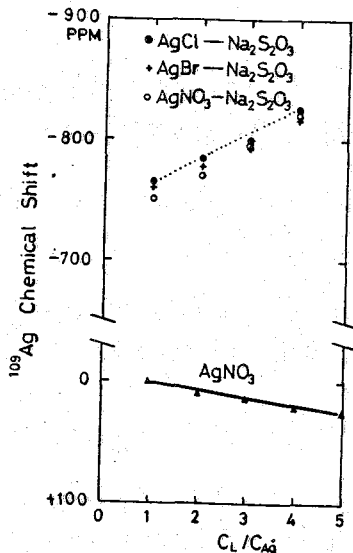


Figure 3. The dependence of the ^{109}Ag shifts of 1.0M silver salt solutions on added sodium thiosulfate. (upper) ^{109}Ag shift in aqueous solution of AgNO_3 as a function of the concentration. (lower)

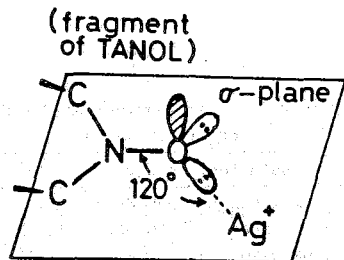


Figure 2. A model of the Ag^+ -TANOL bimolecular coordinate bond system.

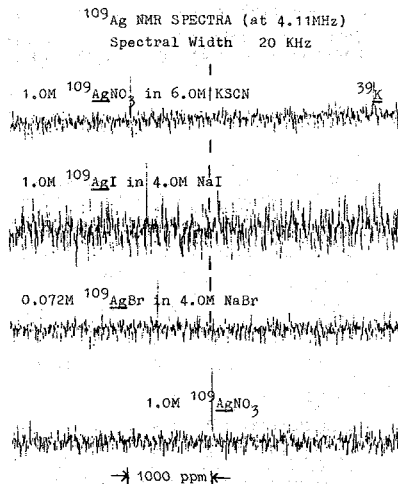


Figure 4. The dependence of the ^{109}Ag shifts of 1.0M AgNO_3 solutions on added aminoalcohol.

Table 1. ^{109}Ag chemical shifts for various solution of silver salts.

solution(in H_2O)	chemical shift(ppm)*
1.0M AgNO_3 in 4.0M $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$	-232
1.0M AgNO_3 in 4.0M $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$	-306
1.0M AgNO_3 in 4.0M $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	-363
0.072M AgBr in 4.0M NaBr	-623 +
1.0M AgI in 4.0M NaI	-739
1.0M AgCl in 4.0M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	-826
1.0M AgNO_3 in 6.0M KSCN	-951

* More negative values refer to lower shielding.
+ 27500 transients of 5s were collected for ^{109}Ag spectrum of 0.072M AgBr in 4M NaBr .

Table 2. Formation constants of silver complexes in aqueous solutions at 30 °C.

ligand	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$	$\log \beta_3$	$\log \beta_4$
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	8.0	12.7	13.9	
SCN^-	5.4	9.0	10.3	11.0
Br^-	4.5	7.6	8.4	8.8
I^-	8.7	11.8	14.1	14.9
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}^*$	3.0	7.0		
$\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2^*$	2.8	5.4		
$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3^*$	2.4	4.0		

(The error of this experiment is ± 0.05 .)

* denotes the formation constants corrected by means of pH measurements.

Table 3. An example of the mole fraction of silver complexes versus the silver and ligand concentrations in nmr samples.

concentration of sample	silver complex, (mole fraction)
1.0M AgNO_3 , 4.0M $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$	$[\text{Ag}(\text{TEA})_2]^+$, (1.0)
1.0M AgNO_3 , 4.0M $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$	$[\text{Ag}(\text{DEA})_2]^+$, (1.0)
1.0M AgNO_3 , 4.0M $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	$[\text{Ag}(\text{EA})_2]^+$, (1.0)
0.072M AgBr , 4.0M NaBr	$[\text{AgBr}_4]^{3-}$, (0.93)
1.0M AgI , 4.0M NaI	$[\text{AgI}_4]^{3-}$, (0.92)
1.0M AgCl , 4.0M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	$[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{5-}$, (0.90)
1.0M AgNO_3 , 6.0M KSCN	$[\text{Ag}(\text{SCN})_4]^{3-}$, (0.92)

2. 銀塩水溶液の ^{109}Ag NMRスペクトル

ここで用いた銀に対する錯化剤は Ag^+ /モルに対し、錯化剤を1/1で混合すると大部分の試料が沈殿物を生じた。そこで沈殿物を生じにくい試料について、銀塩の既知濃度依存性に対する ^{109}Ag のシフトを図3及び表1に示した。図3の $\text{Ag}^+ - \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 系では複雑な錯体 $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{5-}$ が生じる為、既知濃度に対してシフトがほぼ直線的に変化している。

これに対し図4の $\text{Ag}^+ - \text{アミンアルコール系}$ では、銀-アミン錯体の既知位数に対する滴定カーブが見られる。

表1には水溶液状態で初めて検出した銀塩(AgBr , AgI 及び AgSCN)の測定値を示した。(表1の測定値は、1.0M銀塩に対し0.020MのTANOLを加えてあるのでシフト値-10ppmを補正した)

3. 銀塩の E_{Ag} 測定(銀電位測定)を併用して得た銀錯体のシフト値

$[\text{L}^-] \gg [\text{Ag}^+]$ での銀錯体は、一般に AgL_m で表される。

銀イオンと配位子との錯体反応についての濃度式は、次のように書ける。

$$[\text{Ag}^+]_0 = [\text{Ag}^+] \left(1 + \sum_{n=1}^N \beta_n [\text{L}^-]^n \right). \quad (1)$$

ここで $[\text{Ag}^+]_0$ は Ag^+ の総濃度、
 $[\text{Ag}^+]$ は遊離している銀濃度、
 $[\text{L}^-]$ は遊離している配位子濃度。

N が錯体種の数及び β_n は生成定数である。

この式及び銀電位測定を用いて各配位子に対する銀錯体の生成定数を

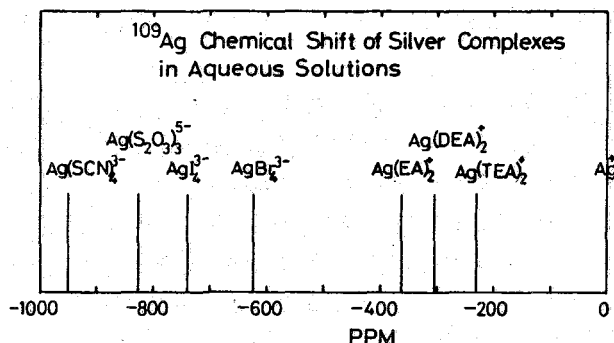


Figure 5. ^{109}Ag chemical shifts of silver complexes in aqueous solutions; All values are given in ppm relative to $\delta[\text{Ag}^+ (1\text{M AgNO}_3)] = 0$.

表2のように得た。
この値は文献値の
大體一致している。

更に錯体のモル分率を
求める為 $n\text{M}$ で
測定した同一濃度の
試料を再現し、銀電位
を再確認した。モル分率
を求める式は (1) 式より
次のようになる。

$$\text{AgL}_m^{(im-1)-} \text{のモル分率} = \frac{\beta_m [\text{L}]^m}{1 + \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n [\text{L}]^n} \quad (2)$$

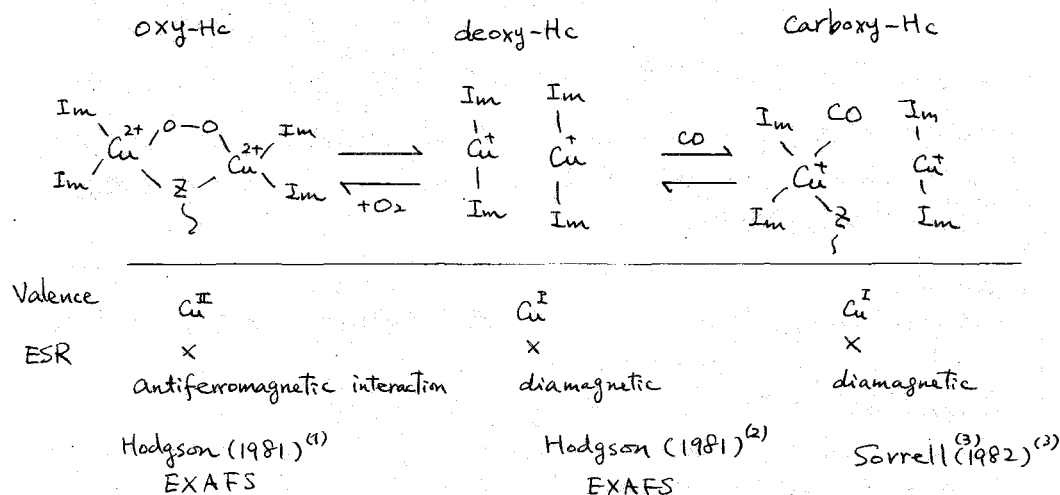
銀電位測定の結果を(1)に代入して $[\text{L}]$ を解、これを(2)に代入すれば
表3のモル分率が得られる。少し粗いが表3のモル分率が9割以上である
から銀錯体のシフト値を図5に示した。このシフトについての理論的
考察は次の講演で明らかにする。

References.

- 1) C.W. Barger, R. Koshmieder, W. Zahm & A. Schwenk, *Z. Naturforsch.*, **28A**, 1753 (1973).
- 2) A.K. Rahimi & A.I. Popov, *J. Magn. Resonance*, **36**, 351 (1977).
- 3) K. Jacher, W. Zahm & A. Schwenk, *Z. Naturforsch.*, **31A**, 1532 (1976).
- 4) E. Brum, J. Cesar, H. H. Staub & C. G. Jelschow, *Phys. Rev.*, **93**, 172 (1954).
- 5) P. B. Sogo & C. D. Jeffries, *Phys. Rev.*, **93**, 174 (1954).
- 6) P.M. Hennrich, J.J.H. Ackerman & G.E. Maciel, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2544 (1977).
- 7) P.M. Hennrich, B. Sheard, J.J.H. Ackerman & G.E. Maciel, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3222 (1979).
- 8) M.R. Neiman, Yu. G. Madadova & E. G. Rozantsev, *Agarb. Khim. Zh.*, **1962**, 37.
- 9) K. Endo, K. Matsushita, K. Suguchi, K. Yamamoto, S. Suzuki & K. Tsubaki, *Chem. Lett.*, *in press*.
- 10) R.A. Bernheim, T.H. Brown, N.S. Gutowsky & E. Wasserman, *J. Chem. Phys.*, **32**, 950 (1959).
- 11) J. Morishima, K. Endo & T. Yonagawa, *J. Chem. Phys.*, **58**, 3146 (1973); *Chem. Phys. Lett.*, **2**, 143, 203 (1971);
; STO-3Gを用いた LHF計算による。

(近畿大・理工) 河北川 進 桑原 恵 米沢 正泰

1. 銅蛋白質の中には、ESR Non-Sensitive な銅イオン (Type 3 銅と呼ばれる) を含む蛋白質が存する。ヘモシアニンは軟体節足動物の血リンパに存し、Oxygen-carrier の機能を有する。チロシナーゼは phenol を diphenol への酸素添加, diphenol $\rightarrow$ o-quinone への酸化を行う酵素である。これらはいずれも Type 3 銅を有し、分子量が 12~30 万にも達する巨大蛋白質であり、サブユニットでさえも 6~8 万の分子量を有する。この Type 3 銅は、一価状態もしくは複核構造による $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{Cu}^{\text{II}}$ antiferromagnetic interaction を行っているものと考えられている。近き EXAFS を用いて oxy-Hc, deoxy-Hc の構造を研究され、⁽¹⁾⁻⁽⁴⁾ 下図のような構造であると推定されている。しかしながら、研究者によっては配位するヒスチジン残基 (イミダゾール) の数は 3 であると考えられており、⁽⁴⁾ 決定的でなく、勿論 3 については全く明らかになっていない。



これら活性中心の構造と機能を調べる上で、低分子銅錯体を合成するモデル研究が不可欠である。特に一価の銅を用いた銅(I)-イミダゾール系の合成が重要である。これまで銅(I)-イミダゾール錯体は不安定であるため合成が成功した例は少ない。本研究では、①新しい銅(I)-イミダゾール錯体の合成方法を見出し、② deoxy-Hc のモデルと考えられる $\text{Cu}(\text{Im})_2$ または $\text{Cu}(\text{Im})_3$ を合成する、③ CO を付加した Carboxy-Hc モデルの合成 ④ $\text{Cu}(\text{Im})_2(\text{CO})\text{L}$ 4 成分系の合成を行うことを目的とする。銅(I)-イミダゾール錯体は可視スペクトルを与えず、そのため構造、性質を追究する有効な手段が数少ない。本研究では NMR を用いて錯体の生成、反応をモニターした。これより、Hc モデルの合成、反応性を追究する上で NMR 法は有用であることを明らかにした。

きたがわ すずむ

むはせた めぐむ

よねがわ まさひろ

2. 銅(I)-イミダゾール錯体の合成

市販の CuX ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) を精製してこれを starting material とした合成法 1, と文献により合成した $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$ を用いる合成法 2 の 2 つの方法により目的とする錯体を合成した。いずれも高純度窒素雰囲気下, アセトン- d_6 を溶媒を用いた。 Cu(I) の濃度は $1\text{ mM} \sim 5\text{ mM}$ とした。得られた錯体 ($[\text{CuX}(\text{Im})_2]_2$, $[\text{CuX}(\text{Im})_3]$, $[\text{Cu}_2\text{X}_2(\text{CO})_x(\text{Im})_4]$) 夫々の合成経路はスキーム 1 に示した。イミダゾール並にその誘導体は市販のものを精製して用いた。

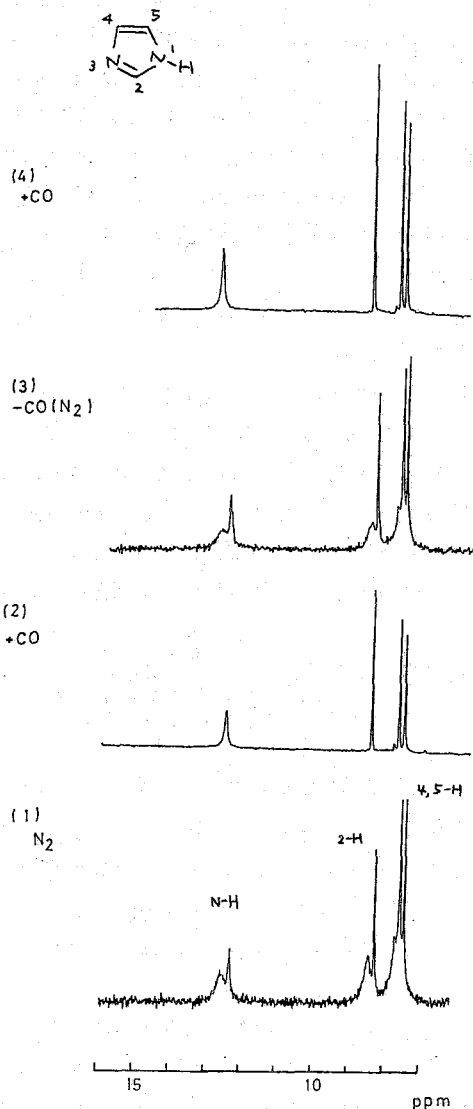


Fig. 1. $^1\text{H NMR}$ スペクトル. (1) $[\text{Im}]/[\text{CuI}] \approx 2$ 条件におけるスペクトル, (2) (1) + CO, (3) (2) の脱 CO, (4) (3) + CO. sharp τ_2 吸収は $[\text{CuI}(\text{Im})_2]_2$ (A-1). broad な吸収は $[\text{CuI}(\text{Im})_3]$ (A-2).

$^1\text{H NMR}$ の測定

上記方法により合成した錯体のアセトン溶液を嫌氣的に 5 mm $^1\text{H NMR}$ サンプルチューブに移し封じたものを測定に供した。測定には FX 200 NMR スペクトロメーターを用い, 観測幅 $2.5, 4.0\text{ KHz}$, データポイント $8, 16\text{ K}$, $13\text{ } \mu\text{s}$ (90°) パルスにて $100 \sim 1000$ 回の積算を行って スペクトルを得た。試料温度は $25, -90^\circ\text{C}$ に設定し, 夫々を測定した。

3. [A] 複核銅(I)イミダゾール錯体

イミダゾールを CuX ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) にアセトン溶媒を用いて加えると無色の銅(I)イミダゾール錯体を与えた。この $^1\text{H NMR}$ スペクトルは $\frac{[\text{Im}]}{[\text{CuI}]} \leq 2$ の場合 Fig. 1 の (1) に示したように鋭い吸収線を持つ 4 種のシグナルを与えた。

$\frac{[\text{Im}]}{[\text{CuI}]} \geq 3$ の場合, Fig. 1 (1) に与えた幅広い吸収を持つシグナルを与えた。 $\frac{[\text{Im}]}{[\text{CuI}]} = 2 \sim 3$ では, 2 種のシグナルが化学交換により平均化されることなく同時によく分離して観測された。いずれの種もハライドイオン依存性を示した。Fig. 2 にその一例を示した。明らかに化学シフトが $\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ の順に高磁場シフトを示している。このことは, ハライドイオンが解離せずになお配位していることを示している。 $^1\text{H NMR}$ スペクトルの Im , Cu の濃度依存性, X

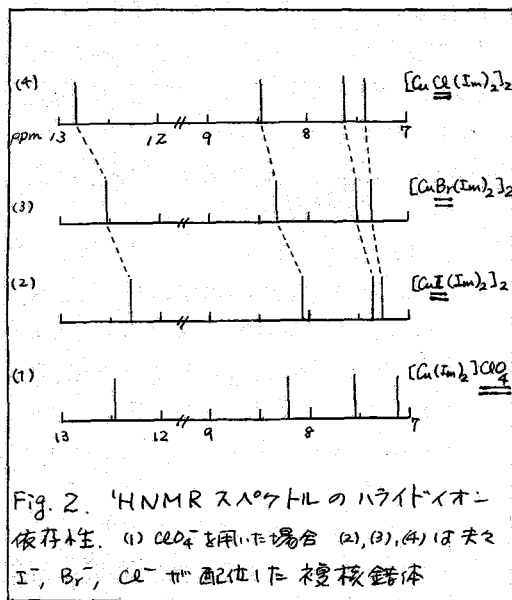
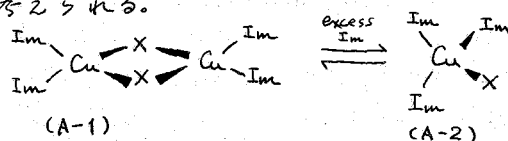


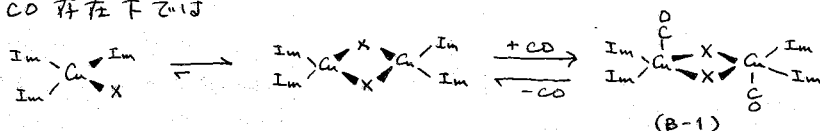
Fig. 2. ^1H NMR スペクトルのハイドイオン依存性. (1) ClO_4^- を用いた場合 (2), (3), (4) はそれぞれ I^- , Br^- , Cl^- が配位した複核錯体

依存性から、得られた錯体は次の2種であると考えられる。



これから2種の錯体は、 Im の各種誘導体についても同様に生成し、一般的傾向であると言える。次にハイドイオンを有しない $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]^+\text{ClO}_4^-$ を用いて Im 錯体を合成したところ $[\text{Im}]/[\text{Cu}] \geq 3$ では非常に不安定で容易に酸化された。一方 $[\text{Im}]/[\text{Cu}] \leq 2$ では比較的安定な錯体が生成した。これより、 $[\text{Cu}(\text{Im})_2]\text{ClO}_4$ (A-3) の生成が示唆される。($[\text{Cu}(\text{Im})_4]\text{ClO}_4$ (A-4) は不安定である)

[B] カルボニル錯体 (1) 複核カルボニル錯体. (A-1) は CO を通気することにより、容易に反応してカルボニル錯体を与える。Fig 1 の (1) ~ (4) は CO 配位、脱 CO のサイクルを ^1H NMR を用いてモニターしたものである。Fig. 1 は (1) CO と非常に良い可逆的反応を行うこと、(2) (A-1), (A-2) が共存していても生成するカルボニル体は一種であることを示している。4配位銅(I)錯体から5配位錯体と生成する場合、構造の flexibility が重要であり、演者は複核構造の有利なことを既に指摘した。(5) によい、 CO 存在下では



のような平衡反応により選択的にカルボニル体が生成するものと考えられる。 CO の配位により、遊離した Im の ^1H NMR シグナルを与えないこと、ハイドイオン依存性のあることから、五配位構造は支持される。その他 Im 誘導体についても同様の傾向が得られた。観測される ^1H NMR シフトは (A-1) 構造のものに比べ、(B-1) 構造のものは全て低磁場にシフトした傾向を与え、カルボニル体の特徴とされる。

(2) 単核イミダゾール錯体の CO との反応. $[\text{Cu}(\text{Im})_2]\text{ClO}_4$ (A-3) に CO を通気した時の ^1H NMR スペクトルはもとの ^1H NMR スペクトルと全く変わらなかった。これは $[\text{Cu}(\text{Im})_2]\text{ClO}_4$ が非常に安定で CO と反応しないことを示している。イミダゾールが2つ配位した bis 錯体は直線構造を有することが近年明らかにされた。本研究でもこの bis 体は直線構造をとっている、 CO に対し Nonreactive であることが理解される。これは deoxy-Hc の CO に対する反応性との関連で非常に興味深い。

一方、 CO 雰囲気下 $[\text{Im}]/[\text{Cu}] = 2$ で合成した Im 錯体は、上記 $[\text{Cu}(\text{Im})_2]\text{ClO}_4$ の ^1H NMR スペクトルと全く異なる化学シフトを与え、 CO 錯体の生成が理解された。

Table I. ¹H NMR シフト*

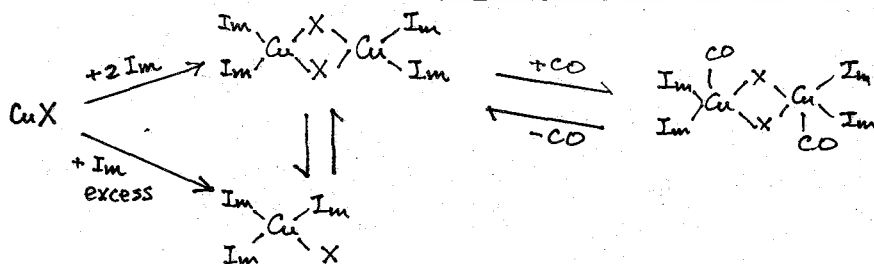
錯体	1-H	2-H	4-H	5-H
	12.30	8.08	7.28	7.39
	12.36	8.21	7.31	7.45
	12.34	8.28	7.52	7.52
	12.46	8.21	7.11	7.58
	—	8.18	7.11	7.55

* 単位 ppm (from TMS)

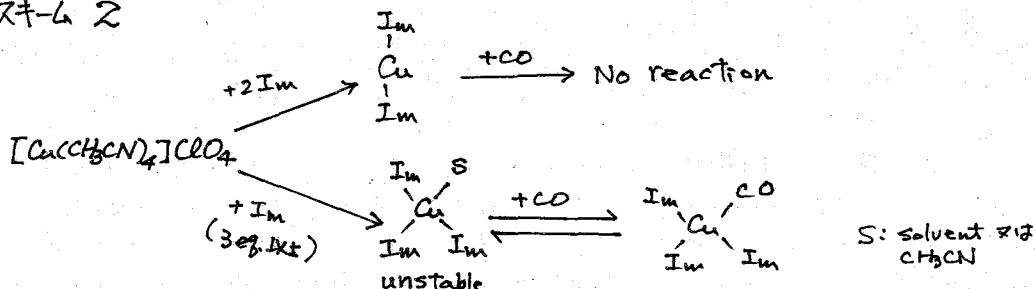
このことより、窒素雰囲気下で合成した場合には直線型の安定な $[\text{Cu}(\text{Im})_2]^+$ が主として生成していることが明らかとなった。これは deoxy-Hc の構造と関連で非常に示唆的である(即ち、カルボニル体は $[\text{Cu}(\text{Im})_2]^+$ への付加反応としては主として生成しにくい。3配位以上の条件下では生成しやすい)。次に、ハロゲンが存在する時は、 $\text{Cu}-\text{X}$ 結合が切れにくいため、特徴的な複核構造のものが主として生成する。5配位のカルボニル体は生成する。この構造モデルのシフト値も Table I に示す。

このように ¹H NMR スペクトルを用いることにより、 $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{Im}$ 系の構造と溶液平衡が明らかとなり、Type 3 型銅蛋白質のモデルで合成することが出来た。

スキーム 1



スキーム 2



REFERENCES

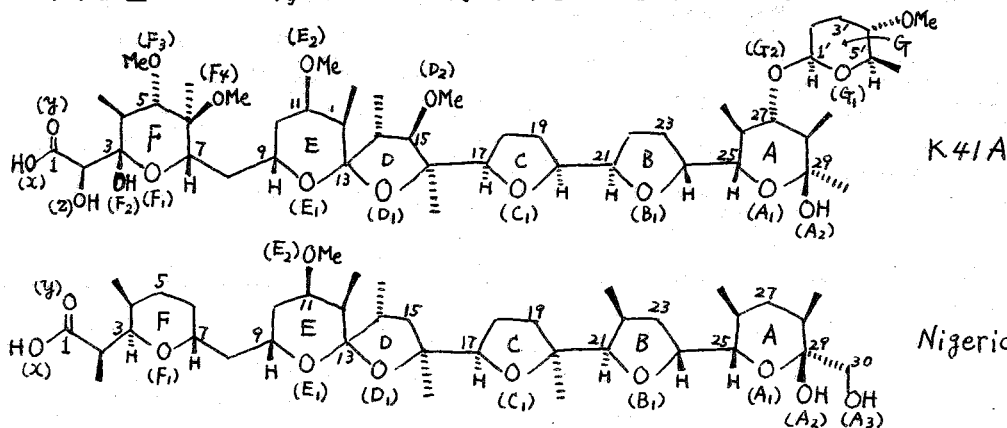
- (1) M.S.Co, K.O.Hodgson, T.K.Eccles, and R.Lontie, J. Am. Chem. Soc., 1981, **103**, 984.
- (2) M.S.Co, and K.O.Hodgson, *ibid.*, 1981, **103**, 3200.
- (3) T.N.Sorrell, and D.N.James, *ibid.*, 1982, **104**, 2053.
- (4) J.M.Brown, L.Powers, B.Kincaid, J.A.Larrabee, and T.G.Spiro, *ibid.*, 1980, **102**, 4210.
- (5) S.Kitagawa, and M.Munakata, Inorg.Chem., 1980, **20**, 2261. S.Kitagawa, M.Munakata, and N.Miyaji, *ibid.*, 1982 in press. S.Kitagawa, and M.Munakata, Inorg.Chim.Acta, 1982, **59**, 219. M.Munakata, and S.Kitagawa, J.Inorg.Biochem., 1982 in press.

〔序〕 ポリエーテル系物質がすぐれた金属イオン捕捉能を有する事はよく知られてゐるが、我々はこれに興味をいだき、ポリエーテル類の金属イオン捕捉に伴う特色あるNMR挙動について幾つかの事柄を明らかにして来た^{1a-c}。

今回は monocarboxylic acid polyether antibiotics, K4/A および Nigericin のNMR挙動から溶液中での金属イオン捕捉構造をさぐり、X線解析により明らかにされた結晶状態下の構造と対比を行う事より得られた知見について報告する。

〔実験〕 測定は主として XL-100-12A 型分光器に於て、必要に応じて NV-14, XL-200, NT-200, NT-360 などの分光器でも測定された。¹³C 測定には Ca. 0.2 mmol/ml, ¹H 測定には同濃度および 0.02 mmol/ml の CDCl₃ 溶液を用い、室温下で行われた。溶媒は市販のもりをそのまま用いた。δ 値 (¹³C) の測定誤差は ±0.1 ppm, J 値、¹H 測定では ±1 Hz の誤差が見込まれる条件下の実験である。

〔結果および考察〕 K4/A および Nigericin の free acid, Na 塩, Ag 塩, K 塩, Tl 塩 について得られた NMR data を Tables 1, 2 に示す。



これらおよび類似の Polyether 類は分子がまるまり金属イオンを収納するにやさしい Cavity をつくり出し、Cavity 内の複数個の O 原子の Participation にあつて金属イオンを捕捉する性質があると考えられている。この Cavity 形成に直接たずさわる部分のδ 値は金属イオンの差により変化を示すであろうし、無関係な部分のδ には殆んど変動のない事が予想される。この観点から NMR data を見てみると次の事が言える。

K4/A では、A, B, C, D, E, F の各環 および側鎖部により Cavity が構成されており、G 環 (Deoxysugar 部) は無関係な部分になつてゐると思はれる挙動を示す。また、5 つある OMe 基のうちで金属イオンにより大きく変化するδ 値を示すのは 11-OMe のみであり、直接金属イオンに participate する OMe 基はこれ 1 つと思はれる。これらの NMR 挙動は K4/A の Na 塩の X 線解析² により示された結晶状態における金属イオン捕捉構造とよい対応関係がつけられる。即ち、結晶状態では A, B, C, D, E, F 環および側鎖が中心金属 O であるよしひろ、しろもとお、なかいひろし、つじなおき、ながはかずお、とあつかずお

をとりまくおに配置し。そ二に含まれるO原子のうち、X, Y, E₂, D₁, C₁, B₁の6つのOのParticipationによる6配位型の捕捉形態が示されている。これに対してG環(Deo.部)は金属イオンのとりこみには無関係と思われる位置に残り出している事が示される。G環部がK4/Aの金属イオン捕捉上無関係部分に当る事はG環を切断したK4/Aの誘導体においてても同様の捕捉能が見られる事より明らかになった。

Table 1. NMR Data of K4/A[§]

Car H No.	Free Acid S _{HC} , S _H [†]	Na-Salt S _{HC} , S _H	Ag-Salt S _{HC} , S _H [†]	K-Salt S _{HC} , S _H [†]	TL-Salt S _{HC} (T _{rec}), S _H [†] (T _{rec}) [†]
例1	175.5	178.9	177.9	178.3	178.0 (0~2*)
2	72.1	71.9, 3.89	72.5	71.1	72.2 [63], 3.79
3	99.3	99.0	98.8	99.0	99.1
4	38.3	38.7, 2.19	38.5	38.9	38.8, 2.21
4-Me	11.8	12.1, 1.08	12.0	12.2	12.3, 1.08
5	84.5	85.6, 3.35	85.6	85.0	84.8, 3.34
5-OMe	60.8, 3.55	61.0, 3.56	61.0, 3.55	60.9, 3.55	60.9, 3.55
6	78.4	78.4	78.4	78.2	78.0
6-Me	11.1, 1.16	10.9, 1.16	10.9, 1.16	11.2, 1.17	11.2, 1.17
6-OMe	50.8, 3.36	50.8, 3.37	50.8, 3.37	50.6, 3.36	50.7, 3.37
7	67.9	66.8, 3.81	66.9	66.9	67.3, 3.81
8	33.1	32.4, 1.53 & 1.64	32.7	33.1	33.0, ~1.59 (2H)
9	61.0	61.4, 3.97	61.0	61.3	61.9 [91], 3.74
10	31.8	31.1, n.a.	31.2	31.4	31.3 [8], n.a.
11	77.9	79.8, 3.46	80.7	78.3	78.3 [35], n.a.
11-OMe	57.6, 3.31	57.3, 3.46	60.3, 3.52	57.8, 3.40	56.9 [54], 3.31 [18.2]
12	37.0	36.9, 1.78	36.8	36.8	36.9 [3], 1.84
12-Me	12.8	12.6, 1.00	12.4	12.8	13.1 [57], n.a.
13	106.2	106.9	107.2	106.5	106.8 [38]
14	45.9	46.2, 2.13	46.3	45.9	46.3, 2.03
14-Me	11.4	11.6, 1.025	11.5	11.4	11.5 [4], 1.03
15	94.9	94.7, 3.54	94.6	94.6	94.9 [14], 3.54
15-OMe	60.4, 3.42	60.2, 3.42	60.4, 3.42	60.4, 3.43	60.5, 3.43
16	83.1	83.4	82.8	82.2	82.2 [3], 3.43
16-Me	28.1, 1.48	28.5, 1.62	28.5, 1.67	28.4, 1.52	29.2 [90], 1.65 [3.0]
17	83.4	83.7, 3.75	84.0	83.6	83.7 [6], 3.71
18	25.5	25.6, n.a.	25.7	25.8	25.7 [12], n.a.
19	24.0	23.1, n.a.	23.2	22.8	22.4 [14], ~1.99 (2H)
20	79.2	79.3, 3.96	79.3	79.0	78.5 [2], 3.93
21	79.6	79.4, 4.53	80.0	79.3	78.8 [14], 4.42
22	29.5	29.2, n.a.	29.4	29.4	29.5 [13], n.a.
23	24.6	24.2, n.a.	23.9	24.2	24.4 [21], n.a.
24	80.0	80.8, 4.37	81.7	79.6	80.0 [12], 4.50
25	73.6	74.4, 3.91	75.3	75.1	74.4 [42], 3.30
26	39.2	39.1, 1.30	39.0	38.9	39.0, 1.34
26-Me	13.1	13.4, 1.045	13.5	13.4	13.4 [7], 1.04
27	81.7	82.9, 3.38	82.8	82.2	82.1, 3.35
28	46.7	47.1, 1.44	47.0	47.7	47.9 [17], 1.53
28-Me	12.8	12.8, 1.02	12.7	12.8	12.8, 1.08
29	98.5	98.4	98.4	99.0	99.3 [9], 3.35
29-Me	27.7, 1.33	26.9, 1.30	26.8, 1.29	26.6, 1.44	27.2 [33], 1.51
1'	102.6	102.7, 4.44	102.6	102.6	102.6, 4.45
2'	30.4	30.5, n.a.	30.5	30.5	30.5, n.a.
3'	27.3	27.3, n.a.	27.3	27.3	27.3, n.a.
4'	80.3, 2.79	80.4, 2.795	80.3, 2.79	80.3, 2.79	80.4, 2.79
4'-OMe	56.8, 3.34	56.7, 3.35	56.7, 3.35	56.7, 3.35	56.8, 3.35
5'	74.5	74.5, 3.29	74.5	74.5	74.5, 3.29
5'-Me	18.3, 1.23	18.3, 1.23	18.3, 1.23	18.3, 1.23	18.3, 1.23

§: CDCl₃ 中、室温下の data, †: 100 MHz による data のため、複雑なスペクトルの帰属は定かたではない, *: 0°C 下の値, n.a.: 確実な値は未定, ‡: スペクトルを一見して簡単に読めるもののみ記載, Δ: 極めて複雑なスペクトルを有するもの、大半は ¹³C-H cross correlation により算出された値。

次に, Nigericin であるが、この場合は K4/A の G 環 (Deo. 部) に相当する残存部分は全く、分子全体が cavity の構成にたずさわると思われる NMR 挙動を示す。OMe 基は 1 つしかないので、これは金属イオンに直接 Participate していると思われる挙動を示す。

Table 2. NMR Data of Nigericin⁵

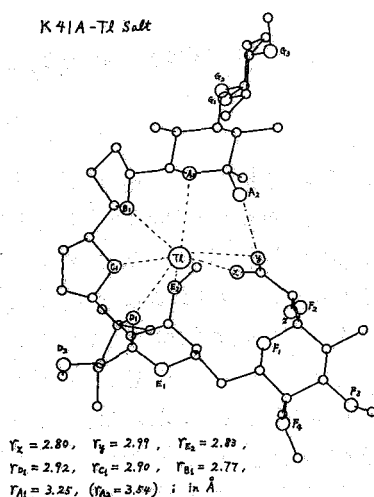
C or H No.	Free Acid δ^a , δ^b	Na-Salt δ^a , δ^b	Ag-Salt δ^a , δ^b	K-Salt δ^a , δ^b	Tl-Salt δ^a [TlCl], δ^b [TlCl] [†]
1	177.0	183.7	182.3	184.2	182.9 [17]
2	43.7	45.9, 2.36	45.7	45.8	46.7 [31]
2-Me	13.1	14.5, 0.96	14.3	15.0	14.7 [6]
3	73.3	73.1, 3.67	73.5	73.2	73.5
4	27.6	27.7, 1.74 ⁵	27.9	27.7	27.9
4-Me	10.9	11.6, 0.99 ⁵	11.5	11.2	11.2
5	26.0	26.4, 1.45 & 2.00	26.4	26.4	26.5
6	22.7	23.6, 1.06 & 1.99	23.6	23.7	23.9
7	69.3	68.4, 4.05	68.4	68.6	68.6
8	35.4, 2.47 & n.a.	35.8, 0.89 & 2.59	36.7, 2.53 & n.a.	35.6, 2.63 & n.a.	35.5, 2.59 & n.a.
9	60.2	60.4, 4.29	60.2	60.9	61.4 [76]
10	32.8	32.1, 1.01 & 2.32	31.9	31.7	31.3 [5]
11	77.0, 3.34	77.5, 3.36	79.6, 3.39	78.8, 3.36	78.4 [36], n.a.
11-OMe	58.3, 3.37	59.5, 3.64	60.0, 3.63	58.1, 3.52	57.2 [46], 3.38 [15.7]
12	37.0	36.8, 1.79	36.7	37.0	37.1 [5]
12-Me	12.8	13.0, 1.02	12.8	13.3	13.4 [70]
13	107.8	107.6	108.1	107.7	108.2 [45]
14	39.3	39.6, 2.19	39.6	39.6	39.4 [4]
14-Me	12.8	13.3, 0.91 ⁵	13.4	13.3	13.3 [4]
15	41.1	41.8, 1.64 & 1.80	41.7	41.9	42.4 [10]
16	82.8	82.3	82.2	81.9	82.6 [3]
16-Me	27.0, 1.35	27.0, 1.59	28.9, 1.64	28.7, 1.50	27.5 [108], 1.63 [2.0]
17	82.2	81.5, 3.63	82.0	81.6	81.9 [5]
18	26.0	26.0, ~1.80 (20)	25.7	25.5	25.4 [15]
19	27.8	27.6, n.a.	27.8	27.5	27.8 [17]
20	83.9	84.8	85.2	84.4	84.2
20-Me	23.1, 1.13	22.8, 1.14	22.4, 1.15	22.5, 1.13	22.6 [2], 1.14 [4.2]
21	86.4, 3.93	85.3, 4.35	87.3, 4.41	85.1, 4.13	84.0 [10], n.a.
22	35.4	35.2, 2.27	35.1	35.3	35.3 [12]
22-Me	15.6	16.2, 0.88	16.3	15.4	15.3 [14]
23	33.8	32.3, 1.42 & 2.39	32.4	32.0	32.0 [17]
24	77.5	76.5, 4.35	77.5	76.9	78.0 [6]
25	75.8, 3.74	76.8, 3.70	76.9, 3.68	76.1, 3.79	75.2 [54], n.a.
26	33.3	31.9, 1.33	32.4	32.0	32.4 [7]
26-Me	17.5	17.0, 0.81 ⁵	17.3	17.2	17.5 [10]
27	37.1	37.3, n.a.	37.2	37.0	36.9
28	35.4	36.7, 1.50	36.8	37.0	37.8 [17]
28-Me	16.2	16.4, 0.86 ⁵	16.6	16.4	16.4
29	96.9	97.2	97.0	97.7	98.2 [5]
30	67.8, ~3.50 (20)	67.2, 3.30 & 3.95	67.6, 3.42 & 3.77	67.6, 3.32 & 4.01	68.0 [25], 3.52 [6.8], 3.85 [~1]

^a, ^b, [†]: Table 1 の脚注に同じ, *: 帰属内容は文献値と若干の差が認められる^{3,4}

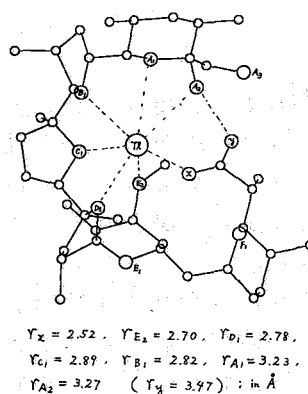
Nigericin の Na 塩および Ag 塩の X 線解析の結果^{5,6}によれば, A, B, C, D, E, F 環および側鎖の分子全体が中心金属をとりこむ様に配置され, いずれの場合も, X, E₂, D₁, C₁, B₁ の 5 つの O 原子による金属イオン捕捉形態が示されている。Cavity 構成の面では, NMR 挙動からの推察と一致するが, 尚ほ S 挙動のみからは, OMe 以外ではどの O が直接配位型か判断するのが難しい事である。(K4/A と同事情形にある)。

この点を追求する一方法として, Tl イオンをとりこませる事により生ずる Tl 核と ¹³C 核 (または ¹H 核) とのスピン結合を利用する試みを既に提案した^{1a, 1c}。その結果によれば, K4/A-Tl salt, Nigericin-Tl salt とともに, Na 塩や Ag 塩の X 線解析で示された直接配位型 O の他に, さらに A 環に属する O 原子の直接配位が考えられる J 挙動を示していた^{1c}。そこで, K4/A と Nigericin の Tl 塩の X 線解析を行ったところ, 次図に示す結果を得た。X 線解析による金属 ~ O 原子間距離をどのくらいのもうま直接配位型と見なすかは難しい問題を含むが, これまでの報告例に O と金属イオンの各半分の和より約 0.4 Å 大きい範囲内のものをその範囲としている例がある⁷。その基準に従い, 約 3.3 Å 以内にある O 原子を重視した。K4/A-Tl salt では, X, Y, E₂, D₁, C₁, B₁, A₁ の 7 つがこれに相当し, A₂ もこれに近い値とされている。

K4/A-Tl Salt



Nigericin-Tl Salt



Nigericin では X, E₂, D₁, C₁, B₁, A₁, A₂ の 7 つがこれに相当し、 r_Y もこれに近い値となっている。この様に Tl 塩の X 線解析の結果は NMR (J) 挙動から予想されていた事と良い対応関係を示す事より、Tl⁺ とのスピンの結合を利用する方法はかなり有効な手段と考えられる。Tl⁺ と K⁺ や Rb⁺ はイオンサイズが近い値なので、これらの金属イオン捕捉構造の研究にも役立てられるであろう。K4/A においては Tl 塩と K 塩の J 挙動がかなり似た傾向を示すので、良く似た捕捉構造をとっているものと思われる。

上記の Tl 塩の結晶状態においては、 r_{A1} や r_{A2} は Na 塩や Ag 塩に比べて確かに大きいものになってはいるが、他の直接配位型 O のそれに比べればまだ幾分長めであるから、結晶状態における A₁, A₂ の金属イオン捕捉への寄与の割合は小さめであると判断される。他方、溶液状態での J_{Tlc} の挙動は A 環部にも他の直接配位型 O に近づくものと大差ない値が観測され、A 環部の J_{Tlc} がむしろ小さいという傾向は見られる。この事実は溶液状態では A₁ や A₂ も他の配位型 O と大差ない中心金属との相互作用の状況下にあるのではなかろうかと推察に導く。結晶状態と異なり、溶液状態では分子の各部の動きが楽になる事を想定すれば、Conformational motion により、average としては X 線で示される構造に近いものがあるとしても、cavity の内側に配向した金属イオンの近くの O と金属イオンとの相互作用は平均化される傾向があっても不思議ではない。

[REFERENCES]

- (A) 照井, 通, 辻, 長島, 第 19 回 NMR 討論会要旨, PP109~112 (1980); (B) 照井, 通, 辻, 長島, Johnson, 第 13 回構造有機化学討論会要旨, PP67~70 (1980); (C) 照井, 通, 辻, 長島, *ibid.*, PP71~74 (1980).
- M. Shiro, H. Nakai, K. Nagashima, & N. Tsuji, *J.C.S. Chem. Comm.*, PP482~483 (1978).
- H. Seto & N. Otake, *Heterocycles*, **17**, PP555~580 (1982).
- N. A. Rodios & M.J.O. Anteuvis, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **86**:12, PP917~929 (1977).
- M. Shiro & H. Koyama, *J.C.S.(B)*, PP243~253 (1970).
- Y. Barrans, M. Alléaume, & L. David, *Acta Crystallogr. Sect. B*, **36**, PP936~938 (1980).
- J. F. Blount, R. H. Evans, jun., C-M. Liu, T. Herman, & J. W. Westley, *J.C.S. Chem. Comm.*, PP853~855 (1975).

京大化研 °村山 浩一、堀井 文敬、北丸 竜三

1. 緒言

^{13}C 磁気緩和による高分子の chain dynamics に関する研究は、これまで主として溶液状態について行なわれ、分子鎖運動を表すいくつかのモデルが提出されている。しかしながら、これらのモデルは個別の実験結果は良く説明できるものの、どのモデルが実際の高分子鎖の運動を表すのに適当かということに関しては必ずしもはっきりしていない。このことは、高分子溶液では分子鎖の運動性が比較的高く、 T_1 -温度曲線の極小点のような特異点付近で ^{13}C 磁気緩和パラメータを測定するのが一般には容易ではなく、モデルの適否を検討するのが困難なことによる。高分子鎖の種々の相関時間をもつ種々の運動モードすばまを詳細に検討するためには、例えば Kimmich¹⁾ が H について行なったように $10^4 \sim 10^8 \text{ Hz}$ という広い周波数範囲で磁気緩和パラメータの周波数依存性を測定すればよい。しかし、 ^{13}C の場合このような実験を行なうことは困難と思われる。これに対して比較的容易に行なえる一つの方法は、高分子鎖運動の特徴がよりはっきり表われる系を選ぶことである。例えば、ゴム状高分子、あるいは結晶性高分子の非晶鎖について T_1 の極小を含む広い温度範囲で ^{13}C 磁気緩和パラメータを測定すれば、これらの系では高分子鎖の運動が比較的制限されているために、分子鎖運動の特徴が良くとらえられる。

我々はこれまで、種々の塊状ポリエステル^{2,4)}、塊状ポリエチレン^{5,6)} について ^{13}C 磁気緩和パラメータの温度依存性を検討し、単一の相関時間モデル⁷⁾ はもちろん相関時間に分布を導入したモデル⁸⁾、あるいは defect diffusion モデル⁹⁾ ではこれらの緩和挙動を説明できないこと、また Woessner の 2-D モデル¹⁰⁾、Howarth の 2-D モデル¹¹⁾ は分子鎖の運動を表すには不十分なことを示した。これに対して、高分子鎖の運動を3種の相関時間で表す Howarth の 3-D モデル¹¹⁾ が各緩和パラメータの広い温度範囲にわたる挙動を良く説明できることを明らかにした。ここでは、相関時間の関数として表わされた ^{13}C T_1 、 T_2 、NOE 曲線に認められる極大、極小などの特異点と 3-D モデルに用いられた各パラメータとの関係を明らかにするとともに、morphology の異なる2種のポリエチレン (PE) 試料の磁気緩和挙動の 3-D モデルによる解析結果について述べる。

2. 実験

試料は、バルク結晶化 PE (分子量 199,000)¹²⁾ および溶液結晶化 PE (分子量 91,000)¹³⁾ を用いた。25.05 MHz 高分解能 ^{13}C NMR スペクトルは JNM-FX-100 spectrometer によりスカラーデカップリングの強度 $\gamma H_0 / 2\pi = 6.5 \text{ kHz}$ で測定した。 T_1 は inversion recovery 法、または saturation recovery 法により、NOE は gated decoupling 法により、 T_2 はスペクトルの線幅よりそれぞれ求めた。

3. 3-D モデル

よく知られているように、スピンを持つ核種が C、H のみであり、 ^{13}C 磁気緩和が C-H 間の双極子-双極子相互作用のみにより起るとすると、結合 ^1H 数 N の ^{13}C に対する

むらやま こういち ほりい ふみたか きたまる りょうぞう

る T_1 、 T_2 、NOE は次式で表わされる。

$$\frac{1}{NT_1} = \frac{\gamma_c^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{16 \pi^6} [J_0(\omega_c - \omega_H) + 18J_1(\omega_c) + 9J_2(\omega_c + \omega_H)]$$

$$\frac{1}{NT_2} = \frac{\gamma_c^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{32 \pi^6} [4J_0(0) + J_0(\omega_c - \omega_H) + 18J_1(\omega_c) + 36J_1(\omega_H) + 9J_2(\omega_c + \omega_H)]$$

$$NOE = 1 + \frac{9J_2(\omega_c + \omega_H) - J_0(\omega_c - \omega_H)}{J_0(\omega_c - \omega_H) + 18J_1(\omega_c) + 9J_2(\omega_c + \omega_H)} \cdot \frac{\gamma_H}{\gamma_c}$$

γ_c 、 γ_H はそれぞれ ^{13}C 、 1H の磁気回転比、 $\hbar$ は $h/2\pi$ 、 h は Planck 定数、 r は C-H の結合距離、 $J_m(\omega)$ はスペクトル密度である。

3- τ モデルでは図1に示す3種の独立な運動モードに基づいて $J_m(\omega)$ を計算する。すなわち、C-H ベクトルが頂角 θ_R のコーンの外周上を stochastic な回転運動をし、その回転軸 A は別の頂角 θ_L のコーンの内部を libration 運動をする。さらにそのコーンの軸 B は isotropic random 運動をする。それぞれの運動を規定する相関時間を τ_R 、 τ_L 、 τ_I とすれば、 $J_m(\omega)$ は次式で表わされる。

$$J_m(\omega) = K_m \left[AA' \frac{2\tau_I}{1+\omega^2\tau_I^2} + A(1-A') \frac{2\tau_a}{1+\omega^2\tau_a^2} + BA' \frac{2\tau_b}{1+\omega^2\tau_b^2} + B(1-A') \frac{2\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} + CA' \frac{2\tau_f}{1+\omega^2\tau_f^2} + C(1-A') \frac{2\tau_h}{1+\omega^2\tau_h^2} \right]$$

$$K_0 = 4/5, K_1 = 2/15, K_2 = 8/15$$

$$\tau_a^{-1} = \tau_I^{-1} + \tau_L^{-1}, \tau_b^{-1} = \tau_I^{-1} + \tau_R^{-1}, \tau_c^{-1} = \tau_I^{-1} + \tau_L^{-1} + \tau_R^{-1}$$

$$\tau_f^{-1} = \tau_I^{-1} + 4\tau_R^{-1}, \tau_h^{-1} = \tau_I^{-1} + \tau_L^{-1} + 4\tau_R^{-1}$$

$$A = 3(\cos^2\theta_R - 1)^2/4, B = 3\sin^2 2\theta_R/4$$

$$C = 3\sin^4\theta_R/4, A' = (\cos\theta_L - \cos^3\theta_L)^2(1 - \cos\theta_L)^{-2}/4$$

解析の際、高分子鎖の運動を考慮して $\tau_R < \tau_L < \tau_I$ の値は Arrhenius 型の温度依存性をするとし、 τ_R 、 θ_L 、 θ_R の値は温度に依存しないと仮定した。図2に、種々の θ_L に対する $T_1 - \tau_L$ 曲線を示す。なお、ここで用いた $\tau_R = 10^{-12}$ s、 $\theta_R = 30^\circ$ および $\tau_I/\tau_L = 10^2$ は実際の PE の解析で用いた値に近い値である。 θ_L が 10° 以下では $\tau_L = 5 \times 10^{-11}$ s

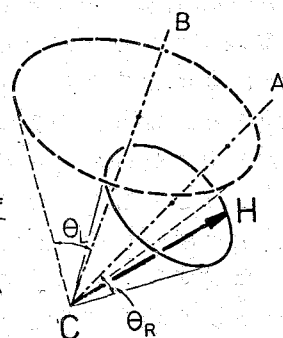


Fig.1 Schematic diagram of 3- τ model for the motion of a C-H internuclear vector.

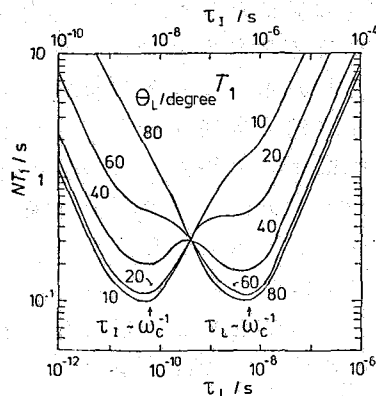


Fig.2 T_1 vs. τ_L for different values of θ_L . $\tau_I/\tau_L = 10^2$, $\tau_R = 10^{-12}$ s, $\theta_R = 30^\circ$.

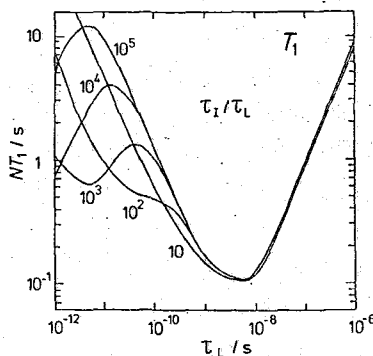


Fig.3 T_1 vs. τ_L for different values of τ_I/τ_L . $\theta_L = 60^\circ$, $\tau_R = 10^{-12}$ s, $\theta_R = 30^\circ$.

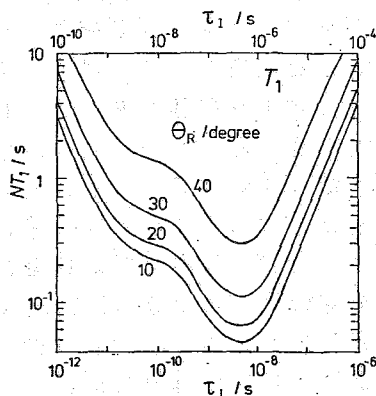


Fig.4 T_1 vs. τ_L for different values of θ_R . $\tau_I/\tau_L = 10^2$, $\theta_L = 60^\circ$, $\tau_R = 10^{-12}$ s.

付近に極小が現われるのみであるが、 θ_L が増大するとともに $\tau_L = 5 \times 10^{-9}$ s付近にもう一つの極小が現われ、さらに 80° 以上では後者の極小のみとなる。前者の極小を与える τ_L は 5×10^{-9} sで、後者の極小を与える τ_L と同様ほぼ $1/\omega_c (= 6 \times 10^{-9})$ に一致するため、それぞれ τ_L および τ_L が $1/\omega_c$ に達した結果出現した極小とみなせる。図3に種々の τ_L/τ_L の値に対する T_1 - τ_L 曲線を示す。 $\tau_L/\tau_L < 10$ の場合図2に示した2つの極小は重なって1つになり、極小を与える τ_L 、 τ_L は $1/\omega_c$ とはならない。一方、 τ_L/τ_L が増大するとともに、まず $\tau_L \sim 1/\omega_c$ の極小が出現し、その比が 10^3 以上では $\tau_L \sim 1/\omega_c$ の極小も出現する。なお、例えば $\tau_L/\tau_L = 10^3, 10^4$ の場合、 τ_L がそれぞれ $2 \times 10^{-10}, 6 \times 10^{-11}$ 以上ではこれらの T_1 - τ_L 曲線がほとんど一致する。このことは τ_L がおおよそ 10^{-6} 以上のとき等方運動は T_1 に影響しないことを示している。図4に種々の θ_R に対する T_1 - τ_L 曲線を示す。 T_1 の極小値が θ_R に著しく依存することは明らかである。

図5には、種々の θ_L に対するNOE- τ_L 曲線を示す。 $\tau_L < 10^{-4}$ sでは回転運動のためNOEはほぼ3に近いが、 τ_L の減少とともに減少する。 τ_L が $1/\omega_c$ 以下になるとNOEは増大するが、等方運動の影響で極大を経たのち再び減少する。さらに、 τ_L が $1/\omega_c$ 以下になるとNOEは再び3に近づくが、等方運動の影響の仕方は θ_L に強く依存する。図6には種々の τ_L/τ_L に対するNOE- τ_L 曲線を示す。 $\tau_L/\tau_L = 10^5$ の場合、 $\tau_L = 10^{-8}$ s付近でNOEが一度3に近づくことがわかる。

図7には、種々の τ_L/τ_L に対する T_2 - τ_L 曲線を示す。 T_2 が主として τ_L に依存することがわかる。

4. PEの ^{13}C 磁気緩和

図8a、b、cにバルク結晶化PEおよび溶液結晶化PEの T_2 、 T_1 、NOEの測定値(記号)および3- σ モデルによる解析結果(実線)、図8dに解析に用いた各相関時間の温度依存性を示す。図8bに示したようにバルク結晶化PEの T_1 は -35°C 付近で極小となり、 40°C 付近で変曲したのち融解領域でも不連続とならず単調に増加する。一方、溶液結晶化PEの T_1 は 30°C 付近まではバルク結晶化PEの値とほぼ一致するが、 40°C 以上 100°C 付近までは直線的に増加する。しかし、熱処理効果が庄じる 110°C 以上では T_1 は急激に減少し 120°C 以上では再びバルク結晶化PEの値と一致する。図8cに示したNOEは、バルク結晶化PEでは 10°C 付近で極大、 70°C 付近で極小となるのに対し、溶液結晶化PEでは 40°C 以上でほぼ3となる。図8aに示

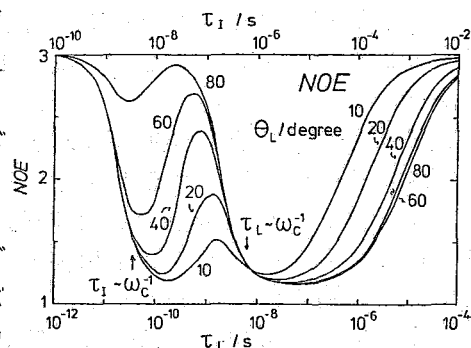


Fig.5 NOE vs. τ_L for different values of $\tau_L/\tau_L = 10^2$, $\tau_R = 10^{-12}$ s, $\theta_R = 30^\circ$.

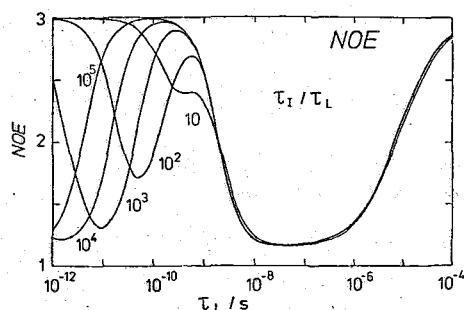


Fig.6 NOE vs. τ_L for different values of τ_L/τ_L . $\theta_L = 60^\circ$, $\tau_R = 10^{-12}$ s, $\theta_R = 30^\circ$.

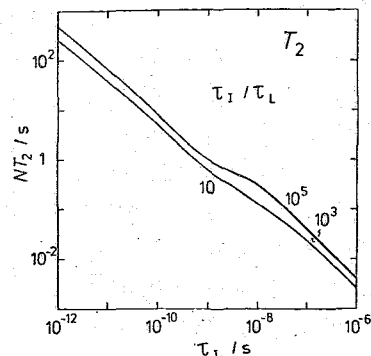


Fig.7 T_2 vs. τ_L for different values of τ_L/τ_L . $\theta_L = 60^\circ$, $\tau_R = 10^{-12}$ s, $\theta_R = 30^\circ$.

れた T_2 は、バルク結晶化PEでは昇温とともに単調増加するのに対し、溶液結晶化PEではほとんど変化しない。

これらの結果に対して3-モデルによる解析を行なった結果、バルク結晶化PEでは磁場の不均一性の影響の著しい T_2 を除き、 T_1 、NOEの実験値と理論値はよく一致した。一方、溶液結晶化PEでは T_1 を図8dに示したようにほとんど温度に依存せず 10^{-5} s程度の値とし、他のパラメータはバルク結晶化PEとほとんど同じとして解析したところ、 T_1 、 T_2 、NOEの実験値と理論値はいずれの場合も良く一致した。なお、 T_1 以外の他のパラメータはバルク結晶化PEに対する値とほとんど一致した。

以上の結果から両試料の非晶鎖には次のような著しい相違があるといえる。すなわち、バルク結晶化物では非晶鎖はその末端が微結晶表面に結合されている影響がほとんど無視できるようなconformationあるいは運動性をもつが、溶液結晶化物ではその影響が極めて大きく、分子鎖は著しく制限された状態にある。

文献

- 1) G. Voigt, R. Kimmich, Polymer, **21**, 1001(1980).
- 2) 村山 浩一、平井 諒子、堀井 文敬、北丸 竜三、
第30回高分子討論会予稿集, 20, 2006 (1981).
- 3) F. Horii, A. Hirai, K. Murayama, R. Kitamaru,
Macromolecules, in press.
- 4) 北丸 竜三、堀井 文敬、平井 諒子、村山 浩一、鈴木 俊光、
第20回 NMR 討論会予稿集, 1981, 5頁.
- 5) 村山 浩一、堀井 文敬、北丸 竜三、
第31回高分子年次大会予稿集, 31, 840 (1982).
- 6) 村山 浩一、堀井 文敬、北丸 竜三、
第31回高分子討論会予稿集, 印刷中.
- 7) I. Solomon, Phys. Rev., **99**, 559(1955).
- 8) J. Schaefer, Macromolecules, **6**, 882(1973).
- 9) B. I. Hunt, J. G. Powles, Proc. Phys. Soc., **88**,
513(1966).
- 10) D. E. Woessner, J. Chem. Phys., **36**, 1(1962).
- 11) O. W. Howarth, J. C. S. Faraday II, **75**, 863(1979).
- 12) R. Kitamaru, F. Horii, S. -H. Hyon, J. Polym.
Sci. Polym. Phys. Ed., **15**, 821(1977).
- 13) F. Horii, R. Kitamaru, J. Polym. Sci. Polym.
Phys. Ed., **19**, 109(1981).

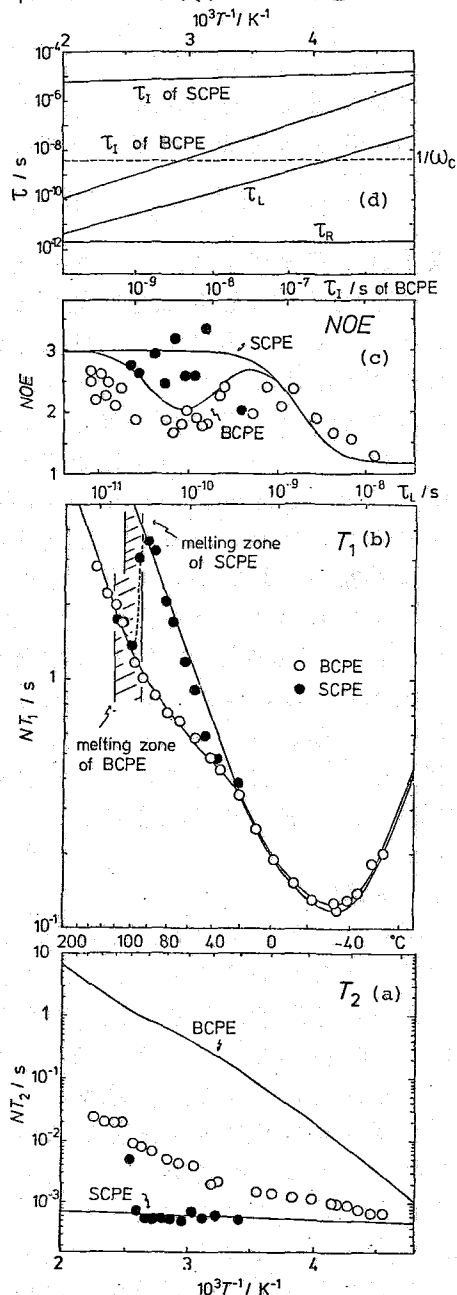


Fig.8 (a) $\ln(NT_2)$ vs. $1/T$, (b) $\ln(NT_1)$ vs. $1/T$, (c) NOE vs. $1/T$.
o, • : experimental data of bulk-crystallized PE (BCPE) and solution-crystallized PE (SCPE), respectively. —: calculated curves.
BCPE : $\theta_R=32^\circ$, $\tau_R=2.0 \times 10^{-12}$ s, $\theta_L=63^\circ$, $\tau_L=5.7 \times 10^{-15} \exp(27/RT)$,
 $\tau_I=5.7 \times 10^{-14} \exp(32/RT)$. SCPE : $\theta_R=32^\circ$, $\tau_R=2.0 \times 10^{-12}$ s,
 $\theta_L=70^\circ$, $\tau_L=5.7 \times 10^{-15} \exp(27/RT)$, $\tau_I=1.4 \times 10^{-5} \exp(1.1/RT)$.

京大化研 °堀井 文敬、北丸 竜三

京大理 寺尾 武彦、前田 史郎、雑賀 亜幌

1. 緒言

スピンをもつ原子核が C、H のみの化合物では、適当な単結晶が得られれば ^{13}C - ^1H 双極子相互作用を消去するだけで次式¹⁾で表わされる周波数位置に ^{13}C 高分解能

$$\nu_{\text{res}} = 2\pi^{-1} \gamma_{\text{C}} H_0 (1 - G_{11} \cos^2 \alpha \sin^2 \beta - G_{22} \sin^2 \alpha \sin^2 \beta - G_{33} \cos^2 \beta) \quad (1)$$

共鳴線が観測される。ここで、 G_{11} 、 G_{22} 、 G_{33} は化学シフトテンソルの主値、 α 、 β はその主軸座標系を実験室座標系に変換するための Euler 角 (α , β , γ) の一部である。しかしながら、適当な大きさの単結晶が得られない高分子化合物では、一般には多結晶である上コンホメーションや運動性の異なる非晶成分が含まれ、 α 、 β に試料特有の分布が生じるため得られるスペクトルはいわゆる化学シフトの異方性を反映レブロードである。通常はこの化学シフトの異方性を消去するため magic angle sample spinning (MASS) が併用されるが、繊維のように一軸配向試料の場合、延伸軸方向を静磁場 H_0 方向と平行にすれば (1) 式の β を 0 とすることができれば、 ^{13}C - ^1H dipolar decoupling (DD) のみで $\nu_{\text{res}} = 2\pi^{-1} \gamma_{\text{C}} H_0 (1 - G_{33})$ の位置に高分解能共鳴線を観測できる。本報では、このような方法で測定した高度に一軸配向したポリエチレン (PE) フィルムの固体高分解能 ^{13}C NMR スペクトルを示すとともに、化学シフト、 T_1 および $T_{1\rho}$ の異なるいくつかの成分について考察する。

2. 実験

試料は、結晶成分の分子鎖軸は極めて良く一軸に配向しているが非晶成分はほとんど配向していない PE フィルムである。作製方法の詳細²⁾は省略するが、 $\bar{M}_v = 3.8 \times 10^5$ の直鎖 PE 分別物を真空中で $85\text{Mrad } 60^\circ\text{C}$ の線を照射後ゾル分を沸騰キシレンで抽出した。このゲル試料を 180°C で 6 倍延伸し冷却結晶化した。延伸軸と隣接する C-C 結合の中心を結ぶベクトルのなす角を θ として定義される配向関数

$$f = (3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1) / 2 \quad (2)$$

は結晶成分および非晶成分に対してそれぞれ 0.996 および 0.266 である。また、密度から算出した結晶化度は 0.64 である。

ほりい ふみたか、きたまる りょうごう、まらお ちけいこ、まえだ しろう、さいか あげろ

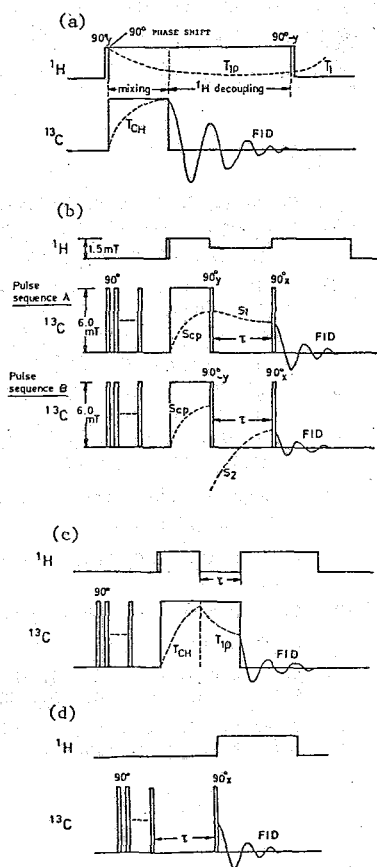


図1 用いた種々のパルス系列

^{13}C NMR測定は自作の装置³⁾を用い、試料の延伸軸を H_0 方向と一致させて行なった。 ^1H および ^{13}C の回転磁場の共鳴周波数は59.53および14.97 MHzで、その振幅 H_1 はそれぞれ1.5 mTおよび6.0 mTである。図1には本研究で用いたパルス系列を示す。a, b, cはcross polarization (CP) 法によりスペクトル、 T_1 および $T_{1\rho}$ を測定するためのパルス系列^{3,4)}である。なお、これらの場合のmixing-timeは2.5 ms、 ^1H decoupling後の待ち時間は2 sである。一方、dはgated dipolar decoupled saturation recovery法により縦緩和を測定するためのパルス系列²⁾、内包される各成分量を決定するために用いられた。

3. 結果および考察

図2に、延伸軸と H_0 の方向を一致させた場合の70°Cおよび100°Cにおける高度配向PEフィルムのCP/DDスペクトルを示す。いずれの温度でもTMSを基準とした化学シフトが約11.6 ppm および32.2 ppmの位置に明瞭に分離された共鳴線が認められる。前者の共鳴線(line B)は表1に示した化学シフトテンソルの主値^{5,8)}のうち σ_{33}

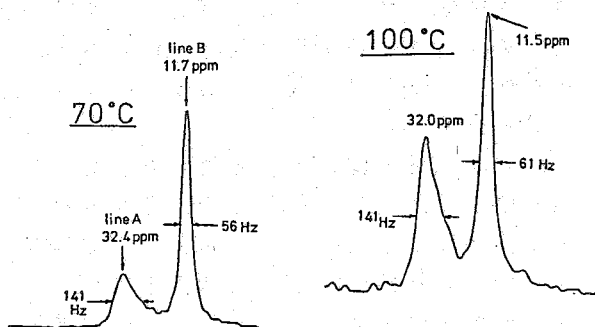


図2 高度配向PEフィルムのCP/DDスペクトル、延伸軸 $\parallel H_0$

Table 1 Principal Values and Directions of Principal Axes of Chemical Shift Tensors for Polyethylene

Tensor element	Value/ppm ¹⁾	Direction
σ_{11}	$51.4 \pm 1.3^{2)}$	$\text{H}-\text{C}-\text{H} \rightarrow$ proton-proton vector
σ_{22}	$38.8 \pm 1.3^{2)}$	$\text{C}-\text{H} \rightarrow$ CH_2 angle bisector
σ_{33}	$12.9 \pm 1.3^{2)}$	$\text{C}-\text{C}-\text{C} \rightarrow$ chain axis
$\sigma_{\text{av}}^{3)}$	$34.4 \pm 1.3^{2)}$	
$\sigma_{\text{iso}}^{4)}$	$31.0^{5)}, 29.6^{6)}$	

1) Chemical shifts referenced to TMS. 2) Ref. 8
3) $\sigma_{\text{av}} = (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3$, 4) σ_{iso} is shielding observed in the liquid n-alkane or in the solution for PE. 5) Ref. 6
6) Ref. 9

の値と良く一致することから分子鎖軸が H_0 方向に配向した成分である。一方、後者の共鳴線(line A)は乗ら⁹⁾やVanderHart⁸⁾がそれぞれPEのテトラクロルエチレン溶液および液状 $n\text{-C}_{17}\text{H}_{36}$ で認めた化学シフトにほぼ一致する。このことはline Aでは等方運動により異方性が消失していることを意味し、line Aに対応する成分はmobileな非晶成分と考えられる。このような2成分への共鳴線の間離はVanderHart⁸⁾が延伸比15倍の冷延伸PE試料でも認めているが、図2の結果は彼の結果より線幅が狭く分離が良い。この原因はこれらの試料が延伸試料とはいえ高度に配向した結晶成分とともにほとんど無配向のmobileな非晶成分を含有する極めて特徴的な構造をもつためである。

つぎに、line Aおよびline Bの T_1 および $T_{1\rho}$ を測定し、それぞれの成分が単一の成分かどうかを検討した。図3には40°Cにおけるline A, Bの回転系の縦緩和挙動を示す。line Aに対しては磁化は単

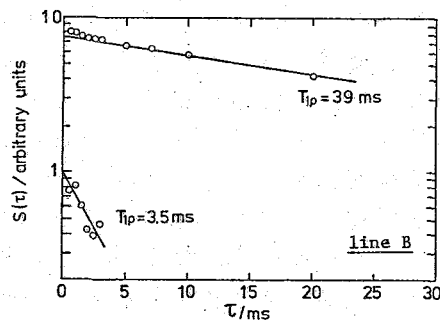
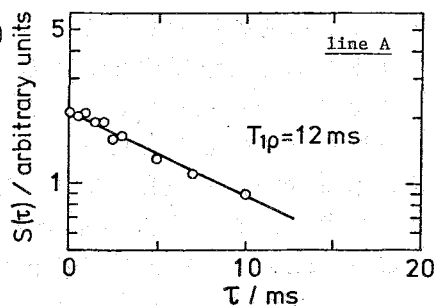


図3 40°Cにおける回転系の縦緩和 $T_{1\rho}$

一指数減衰となり、 $T_{1\rho}=12\text{ms}$ である。一方、line Bに対しては $T_{1\rho}=3.5\text{ms}$ および 39ms の2成分が存在することが明らかとなった。表2には、line Aおよびline Bに対する化学シフト、 T_1 および $T_{1\rho}$ をまとめて示す。 T_1 の結果からみてもline Aは単一成分、line Bは2成分であることは明らかである。

以上の測定ではCP法を用いたため運動性の著しく異なる各成分の分率をスペクトルの積分分率や磁化の減衰曲線の成分解析から決定できない。このため図1dに示したパルス系列を用い、各成分量を定量的に反映した縦磁化の時間変化を測定した。図4には、line Aおよびline Bに対する磁化の積分強度 $S(\tau)$ を時間 τ に対してプロットした。line Aに対しては単一の T_1 、line Bに対しては2種の T_1 、すなわち T_{11} 、 T_{12} を用い $S(\tau)$ の時間変化がよいで次の式

$$S_A(\tau) = S_A(\infty) [1 - \exp(-\tau/T_1)] \quad (3)$$

$$S_B(\tau) = S_1(\infty) [1 - \exp(-\tau/T_{11})] + S_2(\infty) [1 - \exp(-\tau/T_{12})] \quad (4)$$

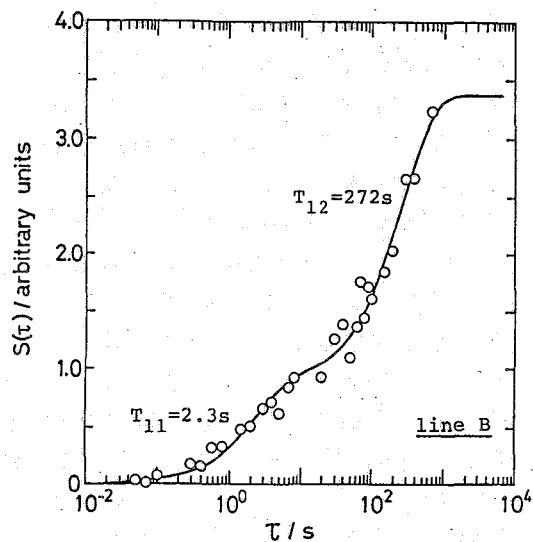
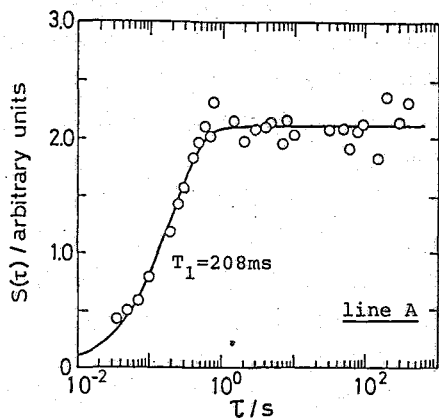
のように表わされると仮定し、 $S_B(\infty)$ を測定することが実験的に困難なためコンピュータによる最小2乗法で測定値と最も良く一致する各パラメータを決定した。図4に示したように計算曲線と測定値の一致は良く、line Aの T_1 は 208ms 、line Bの T_1 は 2.3s および 272s と決定された。また、 $S_B(\infty)/(S_A(\infty)+S_B(\infty))$ の値は 0.62 で、密度法で求めた結晶化度 0.64 と良く一致する。したがって、line Aは非晶成分、line Bの2成分はいずれも結晶成分と結論でき、本試料中にはVanderHart⁸⁾が

認めたような高度に配向した非晶成分は存在しないといえる。一方、 CH_2 の ^{13}C NMRスペクトルの成分解析により非晶成分には液体的運動性をもつ狭幅成分と運動がかなり拘束された中間幅成分の2成分が存在することを明らかにしており、 ^{13}C NMRによる本研究結果はこの ^1H NMRによる結果と矛盾するようにみえる。しかし、3モデルによるPE非晶鎖の T_1 の解析結果(本NMR討論会発表)を用い次のように考えれば両者の結果は矛盾しない。すなわち、PE分子鎖の運動を表わす種の相関時間の

Table 2 Chemical Shifts, T_1 and $T_{1\rho}$ of Highly Oriented Polyethylene Films.

	Chemical shift (ppm)*	$T_1(\text{s})$ at 70°C	$T_{1\rho}(\text{s})$ at 40°C
line A	32.0 —32.4	0.30	0.012
line B	11.5 —11.7	1.6 80	0.0035 0.039

* Chemical shift from TMS.



うち等方運動の相関時間 T_1 が約 10^{-6} s以上(PEでは室温付近以下に相当)のときは T_1 はほとんど T_2 には依存せず、より局所的なC-Hベクトルの回転運動およびこの回転軸のlibration運動の相関時間 T_R および T_L に強く依存する。したがって、 T_1 に反映される局所的な運動状態に関しては均質に

Table 3 ^{13}C T_1 Values of Isotropic Polyethylene Samples¹⁰⁾

sample	$(1-\lambda)_d^a)$	T_1 / s	
		crystalline	noncrystalline
<u>bulk-crystallized PE</u>			
fractionated			
$M_v=31,800$	0.922	1.0 —	0.23
$M_v=248,000$	0.761	3.6 —	0.26
unfractionated			
$M_v=3 \times 10^6$	0.620	1.6 $\sim 300^b)$	0.23
<u>soln-crystallized PE</u>			
$M_v=106,000$	0.825	2.0 ~ 250	0.23

a) degree of crystallinity determined by density measurements.
b) ref. 10.

みえる非晶成分も T_1 が 10^{-6} s以上の運動に関しては複数の状態が存在し、比較的遅い運動に鋭敏な ^1H の広幅スペクトルにはこのことが反映されたのかもしれない。

一方、line Bの2成分はいずれも高度に配向した結晶成分であるが、たとえ多少の運動はしているにしてもいゆる極度尖鋭化状態には達していないと考えられる。したがって、 T_1 の長い成分がrigidな結晶成分、 T_1 の短い成分がmobileな結晶成分と归属され、それぞれ全体に対する分率は0.46および0.16である。このmobileな結晶成分は分子鎖軸は高度に配向した状態を保ちながらその軸のまわりの回転運動あるいはその軸に沿った移動運動などいゆる 180° jumpあるいはflip-flop screw jump¹⁴⁾などの極めて制限された運動を行なっているものと思われる。同様な成分は ^1H 広幅NMR解析でも 60°C 以上で認められたが、¹³CNMR法の方が確認が容易である。

表3に示すように、同様な各成分が等方性のバルクおよび溶液結晶化PE試料にも存在することをDD/MASS法による研究で既に明らかにした。¹⁰⁾すなわち、これらの試料では表1に示した σ_{iso} と σ_{av} に相当する位置に2つの共鳴線が観測され、非晶成分に归属された前者に対しては単一の T_1 の値が得られたが、結晶成分に归属された後者には長短2種の T_1 が存在することが見出された。この結果、配向、無配向試料を問わず室温付近のPE試料にはmobileな非晶成分、mobileな結晶成分およびrigidな結晶成分の3成分が存在すると結論される。

文献

- 1) M. Mehring, High Resolution NMR Spectroscopy in Solids, Springer-Verlag, 1976.
- 2) R. Kitamaru and S. -H. Hyon, J. Polym. Sci. Macromol. Rev., **14**, 207 (1979).
- 3) 前田史郎, 寺尾武彦, 雑質亜幌, 第18回NMR討論会予稿集, 1979年, 49頁.
- 4) 北丸竜三, 堀井文敏, 寺尾武彦, 前田史郎, 雑質亜幌, 化繊講演集, 第38集, 1981年, 49頁.
- 5) D. L. VanderHart, J. Chem. Phys., **64**, 830 (1976).
- 6) W. L. Earl and D. L. VanderHart, Macromolecules, **12**, 762 (1979).
- 7) S. J. Opella and J. S. Waugh, J. Chem. Phys., **66**, 4919 (1977).
- 8) D. L. VanderHart, Macromolecules, **12**, 1232 (1979).
- 9) 浜智彦, 鈴木理夫, 小坂研一, 高分子論文集, **32**, 91 (1975).
- 10) R. Kitamaru, F. Horii, and K. Murayama, Polymer Bulletin, in press.
- 11) B. Schröter and A. Posern, Makromol. Chem., **182**, 675 (1981).
- 12) R. Kitamaru and F. Horii, Adv. Polym. Sci., **26**, 137 (1978).
- 13) F. Horii and R. Kitamaru, J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed., **19**, 109 (1981).
- 14) B. Ewen and G. R. Strobl, Faraday Disc., **69**, 1 (1980).

1. 序論

ゴム-充填剤系に於いて、ゴム分子鎖と充填剤表面の相互作用により溶媒で取り除く事の出来ないバウンドラバーが形成する事が知られており、バウンドラバー構造にエラストマー及び充填剤表面の化学的性質が大きな影響を与えていると推定される。カーボンブラック充填ゴムのNMRによる研究から、バウンドラバーにはスフの T_2 成分すなわち分子運動がかなり束縛された成分と比較的分子運動性に富む成分が存在する事が今までに報告されている¹。そこで本報では、表面化学的性質の異なる種々のカーボンブラックを天然ゴムに充填した試料及び種々のエラストマーにシリカを充填した試料からゲル試料を作製し、これらを用いて充填剤表面及びエラストマーの化学構造がバウンドラバー構造に与える影響を主にスピン-スピン緩和時間(T_2)により検討した。

2. 実験

試料：カーボンブラックはダイアブラックA(三菱化成製)を用い、油状含有物質をベンゼンで取り除き *original* カーボンブラックを作製した。それを硝酸を用いて処理条件を変えて酸化し、また酸化処理カーボンブラックを窒素雰囲気中で2時間熱処理して表面酸性官能基量の異なる種々のカーボンブラックを作製した。また、*original* カーボンブラックを四塩化炭素中で過酸化ベンゾイル(BPO)と反応させてBPO処理カーボンブラックを作製し、さらに水酸化ナトリウムを用いてケン化してケン化処理カーボンブラックを作製した。これらのカーボンブラック60部を10分間ロール素練りしたパールクレープ(天然ゴム)100部に加え、120°C, 30回転/分で4分間ブラベンダー練りして *Composite* 試料を調整した。一方、シリカ(ニップシールVN-3)60部を種々のエラストマー(IIIR, EPDM, BR, IR)100部に加え6分間ブラベンダー練りした *Composite* 試料も作製した。さらに、これらの *Composite* 試料を室温で2時間トルエン抽出を行ないゲル試料を調製した。

測定：日本電子製JSE-5B型パルスNMRスペクトロメーターを用い、*solid echo*法によりプロトンの T_2 を得た。*signal*の読み取りは岩通デジタルメモリーDM701を使用し、マイクロコンピュータにより積算された *signal* を使用した。*signal*の解析にはWeibull function²を適用して T_2 を求めた。カーボンブラックの表面積及び表面酸性官能基量はBET法(N_2)、Ricin³による滴定法によりそれぞれ求めた。

3. 結果及び考察

カーボンブラック-ゴム系：カーボンブラックを酸化処理する事によりカーボンブラック単位グラム当りの全酸性官能基量(N_H)を0.14 meq/gから0.73 meq/gの範囲で *control* した。そして、酸化処理カーボンブラックを熱処理する事により N_H は熱処理温度の上昇に伴い急激に減少した。また、カーボンブラックの表面積は酸化処理によりほとんど変わらなかったが、熱処理により700°Cまで熱処理温度の上昇に伴い増加し、その後減少した。

Fig. 1 に *original* カーボンブラック及び酸化処理カーボンブラックから調製したカーボンゲル試料に関して T_2 の温度依存性を示した。両試料は -40°C 以上に於いて 2 つの T_2 (*long* T_2 , *short* T_2) を示し、バウンドラバーが 2 つのバウンドラバー成分 (*loosely bound rubber*, *tightly bound rubber*) から成る事が明らかである。また、カーボンブラックの酸化処理により 30°C 以上に於いて *long* T_2 (T_{2L}) と *short* T_2 (T_{2C}) は共に長くなっており、酸性官能基の導入が各バウンドラバー成分の *segmental mobility* を増加させている事が解かる。Fig. 2 に *original* カーボンブラック及び酸化処理カーボンブラックを充填した試料のバウンドラバー中の T_{2C} 成分 *fraction* (f_C) と温度の関係を示した。 f_C は T_{2C} 成分分子鎖の凍結解除により -50°C から 0°C まで温度上昇に伴い急激に減少し、その後 T_{2C} 成分存在のために非常にゆるやかに減ずる。そして両試料間の f_C の差は見られない。

T_{2L} , T_{2C} , f_C が 30°C 以上であまり温度依存性を示さない事から、 40°C を基準温度として、カーボンゲル試料の互の N_2 依存性を Fig. 3 に示した。酸化処理及び熱処理カーボンブラックを充填したカーボンゲル試料の T_{2C} と T_{2L} は N_2 の増加に伴い増加し、両カーボンブラックの各 T_2 は同一線上にある。この事は酸性官能基をカーボンブラック表面に導入する事によりカーボンブラックーラバー間の相互作用が弱くなった事を意味している。Fig. 4 に全充填ゴム中の T_{2C} 成分 *fraction* (F_C) 及び T_{2L} 成分 *fraction* (F_L) と N_2 の関係を示した。 F_C 及び F_L は次式により求めた。

$$F_{C \text{ or } L} = F_{BR} \times f_{C \text{ or } L} \times 100$$

ここで F_{BR} は全充填ゴム中のバウンドラバー *fraction* であり、 f_C はバウンドラバー中の T_{2C} 成分 *fraction* である。 N_2 の増加に伴い F_C はわずかに増加するが、 F_L は N_2 値約 0.3 meq/g まで急激に増加し、その後ゆるやかに増加する。また、酸化処理及び熱処理カーボンブラックの各 *fraction* は同一線上にある。先にも述べた様に酸化処理カーボンブラックの表面積がほとんど変わらない事から、カーボンブラック表面へのゴム分子鎖の吸着は物理吸着よりむしろ化学吸着が支配していると考えられる。Fig. 3 と 4 の結果から、カーボンブラック表面に酸性官能基を導入する事により、*tightly bound rubber* 及び *loosely bound rubber* 量が共に増加するばかりでなく、各バウ

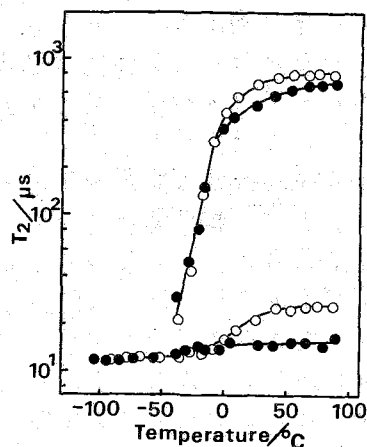


Figure 1. Temperature dependence of T_2 for gel samples prepared from original (●) and oxidized carbon blacks (○).

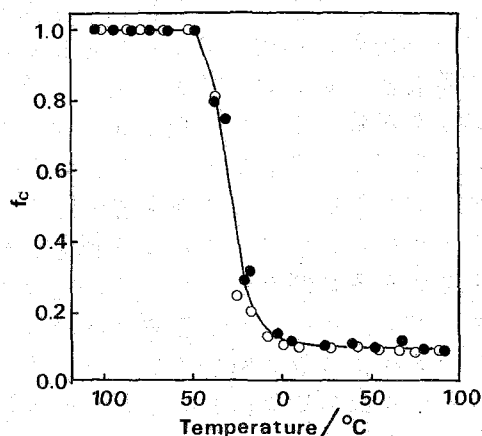


Figure 2. Short T_2 component fraction (f_C) of gel samples prepared from original (●) and oxidized carbon blacks (○) as a function of temperature.

ンドラバー構造はより *loose* な構造へと変化する事が解かる。また、カーボンブラックの熱処理による細孔の発達がバウンドラバー構造及び量におまゝり影響を与えていないと考えられる。

この様な酸性官能基量の増加に伴うバウンドラバー構造変化をさらに詳しく検討するために、カーボンブラック表面にベンゾイルオキシ基と水酸基を選択的に導入したBP処理カーボンブラックとケン化処理カーボンブラックを用いた。Table I に *original*, BP処理そしてケン化処理カーボンブラックを充填した試料のバウンドラバーに関して、 T_{2c} , T_{2L} , F_c , F_L としてカーボンブラックのNf値を示した。BP処理カーボンブラックに導入したベンゾイルオキシ基の量は *Ririn* の滴定法により直接求める事は出来ないが、ケン化処理カーボンブラックのNf値の増加量にほぼ等しいと考えられる。表から明らかな様にBP処理及びケン化処理により T_{2c} , F_c として F_L が増加しており、ベンゾイルオキシ基及び水酸基の導入によりバウンドラバーは *loose* な構造に変化している事が解かる。BP処理によりカーボンブラックの芳香環に直接結合している水素の量が減少する。カーボンブラックの酸化処理によってもその水素の量が減少し、そして熱処理によってその水素の量が増加する事が報告されている。カーボンブラック表面への不飽和エラストマー分子鎖の化学吸着にこの水素が関与している事が報告されており、今回得られた実験結果からカーボンブラックーゴム系に於いてバウンドラバー構造にこの水素が大きな影響を与えている事が推察される。

シリカーゴム系：シリカをIEIR, EPDM, BR, IRに充填した *composite* 試料のトルエン抽出を行なった結果、I

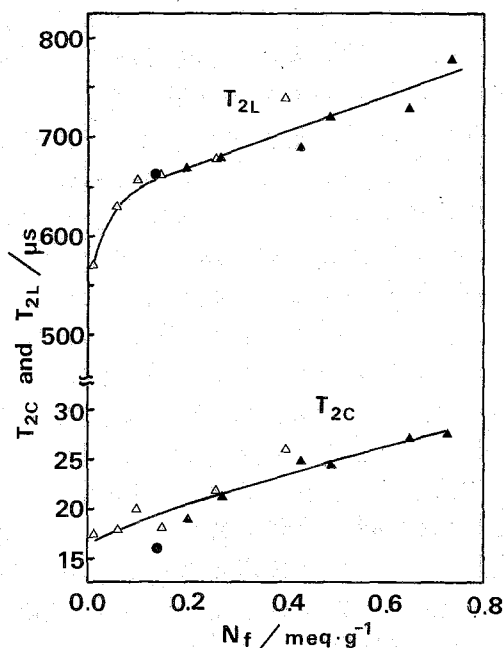


Figure 3. Short T_2 (T_{2c}) and long T_2 (T_{2L}) for gel samples prepared from original (●), oxidized (▲) and annealed carbon black (Δ) as a function of acid group concentration (Nf) on carbon black.

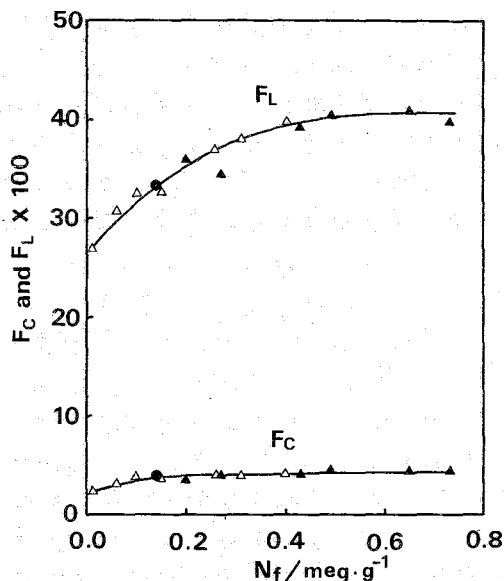


Figure 4. Short T_2 (F_c) and long T_2 component fraction (F_L) in filled rubber prepared from original (●), oxidized (▲) and annealed carbon blacks (Δ) as a function of Nf.

IRはゲルとして得られずバウンドラバー形成がほとんどないと見なされた。EPDM, BR, IRのバウンドラバー fraction はそれぞれ0.25, 0.25, 0.48であった。用いたシリカについてNMR測定を行なったところ、プロトンによる signal が得られずシリカに吸着する水がNMR測定に障害にならない程度の量である事が解った。そこで、これらの3種のエラストマーのゲル試料についてNMR測定を行なった。Fig. 5にシリカをEPDM, IRに充填したゲル試料について T_2 の温度依存性を示した。EPDMはゴム分子鎖の *micro-Brownian motion* に対応して -40°C から $long T_2$ が出現し、温度上昇に伴い増加している。そして 0°C 以上で *short* T_2 成分が消失して一成分となっている。IRは -40°C から $long T_2$ が出現し、 0°C まで急激に増加してその後ゆるやかに増加している。IRの *short* T_2 は約 0°C 付近に転位が見られるが、EPDMと異なり 100°C に於いても *short* T_2 成分が存在している。また、BRのゲル試料についてもIRとほぼ同じ様な T_2 の温度依存性が得られた。これらの事により、シリカへのゴム分子鎖の吸着は主に分子鎖中の二重結合が関係していると考えられ、二重結合の多いIR, BRのバウンドラバーは先に述べたゴム-カーボンブラック系のバウンドラバー構造に比較的類似した構造をとっている事が解った。しかし、IRとBRの間でバウンドラバー量にかなりの差があり、この事については現在検討中である。

Table I Properties of bound rubber prepared from original, BPO-treated and saponified carbon blacks

Type of Carbon Black	Nf (meq/g ⁻¹)	T _{2C} (μs)	T _{2L} (μs)	F _C	F _L
Original	0.14	16	666	0.041	0.332
BPO-treated	—	27	660	0.057	0.412
Saponified	0.29	27	730	0.057	0.391

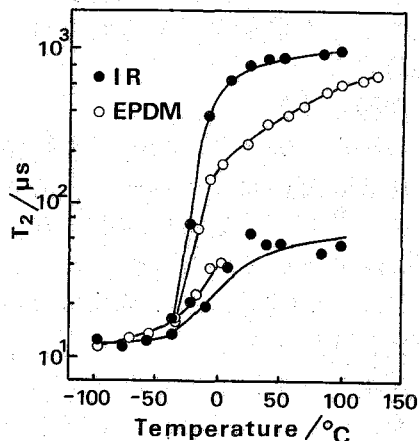


Figure 5. Temperature dependence of T_2 for gel samples prepared from silica.

References

1. J. O'Brien, E. Cashell, G. E. Wardell, and V. J. McBrierty, *Macromolecules*, 9, 4, 653 (1976).
2. V. J. McBrierty, *Polymer*, 15, 503 (1974).
3. D. Rivin, *Rubber Chem. Technol.*, 36, 729 (1963).
4. D. Rivin, *Rubber Chem. Technol.*, 44, 307 (1971).
5. E. Papirer, A. Voet, P. H. Given, *Rubber Chem. Technol.*, 42, 1200 (1969).

日化第45春季年会において、各種アミノ酸類の水溶液を広幅パルスNMR凍結曲線法¹⁾により調べた結果について、その大要を報告したが、²⁾その後、結果の熱力学的意義について考察するとともに、とくに、L-プロリンに関し、詳細な実験を行なったところ、水合特性及び溶質間相互作用の点で、DL-プロリンを初めとした他のアミノ酸類には見られない、その興味深い性質が明らかになったので、ここに報告する。

《実験方法》

各種水溶性アミノ酸類等を約10倍量の水に溶解し、その凍結-解凍過程を、試料温度を連続的に変えながら、広幅パルスNMR (Bruker, minispec p20) / YHP1000システム²⁾で、定量的に測定した。比較のために、熱分析(第2精工舎, SSC560U)と吸湿量測定も行なった。また、とくに、L-プロリン等については、高分解能NMR (JEOL, FX100)による凍結溶液の測定(^1H および ^{13}C)、並びに飽和水溶液の蒸気圧測定も行なった。

《結果と考察》 1. 結合水と不凍水、吸湿水

図1は、L-プロリン(以下L-Proと略す)の9.1%水溶液の凍結-解凍曲線である。この場合の温度変化速度は、凍結過程約5度/分、解凍過程約3度/分である。凍結過程で若干の過冷却(*)を示して凍結開始後、約 -10°C にかけて急激に凍結し、さらに約 -20°C でほぼ一定になるのがわかる。このとき、凍結せずに残る水は、溶質に強く束縛されて、氷晶に移行できない、所謂結合水に相当すると考えられるが、図2の高分解能NMR(-20°C)スペクトルを見ればよくわかるように、溶質も未凍結(液体状態)であり、そのプロトンが観測されている。そこで、凍結曲線上、 -20°C での見かけの不凍水量は、約 $1.9 \text{ gH}_2\text{O/gd.M.}$ (溶質1g当たり)であるが、溶質がすべて凍結せずにいるとすると、その寄与分である約0.7を差し引いた、約 $1.2 \text{ gH}_2\text{O/gd.M.}$ が真の不凍水量である。この不凍水と溶質のプロトン量比1:0.6は、高分解能スペクトルの面積比と

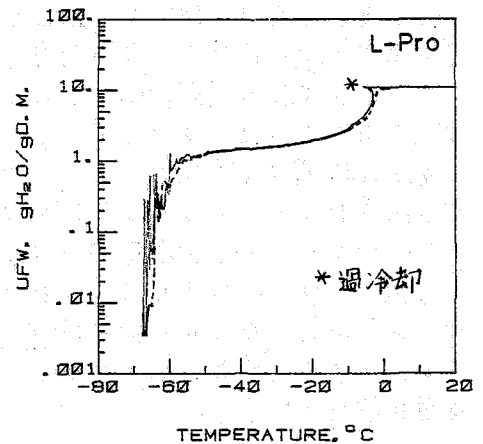


図1. L-Pro水溶液(9.1%)の凍結(—) - 解凍(---)曲線

UFW: Unfrozen Water

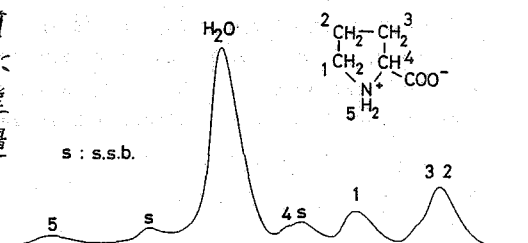


図2. L-Pro水溶液(9.1%)の凍結 -20°C における ^1H -NMRスペクトル

すずきえいいちろう、まついみほこ、
さかもとかずたみ、ながしまのぶや

ほぼ合致している値である。水溶性のよい各種アミノ酸類についても、溶質がすべて未凍結の濃縮状態にあると仮定して、真の不凍水量を計算し、吸湿量データと対応させてプロットしたのが図3である。これを見ると、大きな値となるもの同士では、両者はよく対応していることがわかる。すなわち、吸湿により、潮解性を示し、結晶性を維持できないようなアミノ酸類は、粉末の吸湿量と、溶液の不凍水量とは一致し、いずれも、結合水に対応する水分量であると言える。また、結合水量の順位は、L-PCA.Na > DL-PCA.Na > L-Lys > L-Pro > 他のアミノ酸の順となっている。吸湿測定が長期間を要するのに比べ、凍結曲線法は約1hrで測定解析できる点で有利である。³⁾

2. 保湿性と凍結曲線

このように、PCA.Naに比べれば、L-Proの吸湿性は低く、不凍水量も少ないが、脱湿(シリカゲルデシケータ中)速度は、PCA.Naの方が大きく、L-Proの保湿性は高いことが認められた。³⁾ これに対応し、凍結曲線の消失温度は、L-Proの方が低くなっている(L-Pro: -67°C, L-PCA.Na: -52°C)。

この凍結曲線の消失温度の意義を探るために、飽和溶液の相対湿度の異なる塩化アルカリ類の9.1%水溶液の凍結曲線を測定したところ、消失温度は、KCl, NaClについては、共晶点付近(それぞれ-11°C, -22°C)になるとともに、熱分析的には、特に明瞭な共晶点を示さないLiClについては、約-100°Cとなった。これらの飽和溶液の相対湿度は、それぞれ、室温で85, 75, 15%である。共晶点は、一般に、蒸気圧Pの温度依存式:

$$\log_{10} P = -\frac{\Delta H}{2.303R} \cdot \frac{1}{T} + \text{Const.}$$

に基づいて、氷の P_{ice} と不凍水の P_{unf} とが等しくなる温度として予測される。 ΔH_{unf} は、種々の溶質の飽和溶液の蒸気圧データ⁴⁾をみると、その相対湿度($P_{sat. soln}/P_{water}$)が、あまり温度に依存しないことから、ほぼ、 ΔH_{water} (=9.7 kcal/mole) に等しいとみられる。また、 ΔH_{ice} = 12.2 kcal/mole である。これらの値に基づいて、共晶点を計算したところ、KCl, NaClについて、実測値に近い値となった。また、LiClについては、凍結履歴を示すような明瞭な共晶点は観測されないが、計算結果は、約-100°Cとなり、凍結曲線の消失温度とよく対応している。

すなわち、凍結下で水分子は、系の共晶点に近づくと、その運動性が急激に低下するため、NMRで液体シグナルとして観測されなくなる。この温度が、凍結曲線の消失温度として測定されるわけである。

ところで、L-Proの場合、図4に示すように、その水蒸気圧の温度依存性から、共晶点は、約-31°Cと予測されるが、図1のように、凍結曲線の消失温度は、約-67°Cであり、かなり低い温度となっている。この原因について、保湿性の良さ

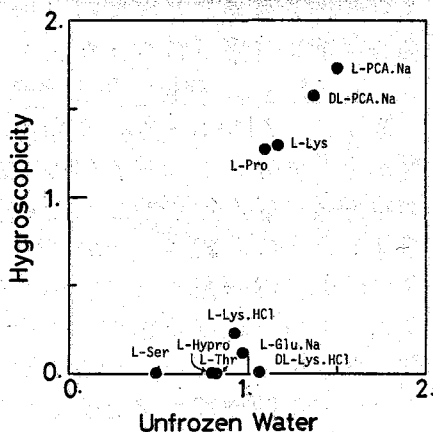


図3. アミノ酸類の吸湿性と不凍水量 (g H₂O/g D.M.)

Hygroscopicity: RH=85%, 25°C, 20 days

Unfrozen Water: 9.1% aq. soln., -20°C

との関連も含め、さらに以下のような詳細な実験と考察を行なった。

3. L-Pro 水溶液の凍結物性

図5に、9.1% L-Pro 水溶液の解凍速度が3度/分、1~2度/分の凍結曲線と、解凍速度2度/分のDSC曲線とを示す。まず、DSC曲線は、 -66°C を中心にした3つの小さな吸熱ピークを示した後、 -37.5°C に、ブロードな発熱ピークを示している。さらに、 -26.7°C 、 -22.0°C に2つのシャープな吸熱ピークを示した後、系全体の融解に至っている。これに対し、凍結曲線の解凍過程は、3度/分の場合、約 -67°C で立ち上がる以外、特にDSC曲線と対応した変化は見られないが、1~2度/分(または、 -35°C で昇温を止める)の場合、 -35°C 付近で曲線が降下するので、再度冷却(アニーリング)すると、シグナルの低下は進み、約 $0.7\text{gH}_2\text{O/gD.M.}$ の不凍水レベルで落ちつく。この温度範囲での、重水溶液の測定では、プロトン信号が観測されないことから、この信号は、水由来のものと考えられる。そして、濃度を40%に上げると、この不凍水レベルは、約 $0.3\text{gH}_2\text{O/gD.M.}$ となり、この値は一定しないことから、この水は、溶質固有の結晶水のさうなものではなく、析出した微結晶の間にはさまれた(または表面の)不凍水と考えられる。さらに、 -28°C と -23°C とに、2段階の明瞭な融解が認められており、DSC曲線とほぼよく対応している。尚、 ^{13}C -NMR スペクトルで、この融解温度付近を調べると、図6に見るさうに、

約 -28°C 付近で、NMR信号が出現するのがわかる。 ^1H -NMRでこの過程をみても極めてブロードであり、NMR信号の出現温度が不明瞭であるのに対し、不均一系NMR⁵⁾としての、 ^{13}C -NMRの有用性が、認識される。

ところで、この2段階融解の各段階の信号の増加量は、図5にみるさうに、それぞれ、 0.4 、 $0.8\text{gH}_2\text{O/gD.M.}$ となっており、合計 $1.2\text{gH}_2\text{O/gD.M.}$ であり、これは、溶質プロトン量 $0.7\text{gH}_2\text{O/gD.M.}$ よりも、 0.5 だけ多い値である。これは、L-Pro 1分子

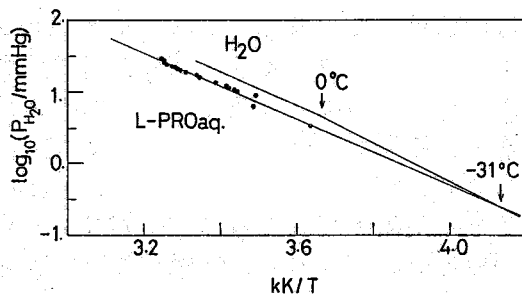


図4. L-Pro 飽和水溶液の水蒸気圧の温度依存性と共晶点予測

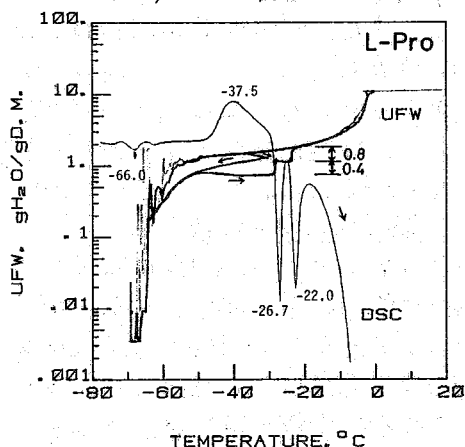


図5. L-Pro 水溶液の凍結曲線とDSC曲線との対応関係

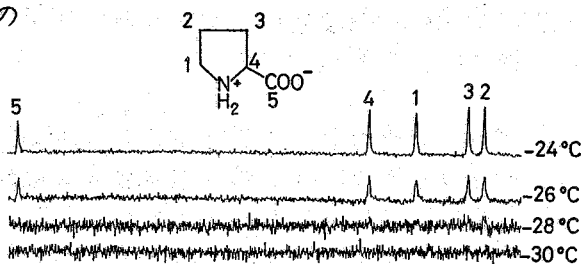


図6. L-Pro 水溶液の凍結下の ^{13}C -NMR スペクトル(積算250回)

当たり、約3分子の水に相当する。また、溶質プロトンのみ観測される重水溶液では、両段階の増加量は、ともに約0.3 gH₂O/gD.M. である。そこで、この2段階の解凍現象は、平均的には、約3分子相当の水を結晶水とするような、ほぼ等量の2種の水和物結晶の融解温度の相違に由来するものと考えられる。L-Proには、無水物の他、1水和物の存在が知られている。そこで、2段階の変化の片方、すなわち、変化量の少ない方(-28°C側)を1水和物にするとすると、他方は、5水和物であると計算される。

以上、仮定に基づく推論ではあるが、DSC曲線の-37°C付近のブロードな発熱は、1水和物、5水和物の2種の結晶からなる共晶の析出に対応すると考えられる。この仮説の検証は、凍結下での粉末X線回折にあり、まず、1水和物結晶と他の結晶形との混合物(共晶)であることの実証にさらなければならず、なお慎重を要するが、NMR手法でこのような定量的推論ができることは、有意義であると思われる。

このようなL-Pro水溶液の凍結物性を見ると、②で計算された、約-31°Cという温度は、1水和物・5水和物の共晶の析出温度とみなされるが、通常の凍結-解凍速度では、過冷却し易いと考えられる。それは、L-Proが、単に水和性が高いだけでなく、水和物が集合して、高次のクラスターを形成するためと推察される。また、それ故、L-Proの保湿性が高いと考えられるが、それは、凍結曲線の消失温度が低いことと、直に関連していると言えさう。尚、不凍水量は、酸性、アルカリ性のいずれでも、減少することが認められるので、中性の分子内対イオン構造がこのようなクラスター(集合体)の形成の原動力となっているものと思われる。

《文献》

- 1) 鈴木、坂本、永嶋、日化第45春季年会(1938)
- 2) a) 鈴木、永嶋、第20回NMR討論会(p139)
b) *Chem. Lett.* 1981, 181.
c) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in press.
- 3) a) 坂本、鈴木、田中、永嶋、第7回香粧品科学会('82.6.3東京)
b) 同学会誌投稿中
- 4) 高分子学会編、「材料と水分ハンドブック」(共立、1968)
- 5) M. Kainosho and K. Ajisaka, *Tetrahedron Lett.* 1563 (1978)

(東北大 非水研) ○清水達 後野昌弘

1. 序

Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} などの金属陽イオンは生体中で極めて重要な役割を果たしている。しかしそれらは反磁性であり無色であるために一般の方法ではそれらの物性を直接的に調べる事ができない。そのため多くの場合、希土類金属、 Mn^{2+} , Cd^{2+} などを置換させてモデル的にその金属自身又はその周辺の構造などに關して議論がなされてきた。しかしほとんどの場合その正確な結合部位や生物活性は元の金属と異なっている。我々は、 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} の生体系での物性を直接調べるために、 ^{43}Ca , ^{25}Mg , ^{67}Zn NMRの生体系への応用を試み、予備的にはあるいくつかの知見を得た。特に ^{67}Zn NMRの代学的、生物学的応用は最初はその応用の可能性が示された。しかしその実験及び解釈には多くの限界があることも認められた。

2. 実験

^{43}Ca , ^{25}Mg , ^{67}Zn の天然存在率は表1の如く低いので enriched した金属を購入した。これは用いよう金属濃度 5mm以下での測定が可能であった。天然存在率の金属も用いた場合

表1. NMRの測定条件			
核種	I	天然存在率(%)	購入した金属の同位元素率(%)
^{43}Ca	7/2	0.145	49.1
^{25}Mg	5/2	10.13	95.66
^{67}Zn	5/2	4.11	98.63
			測定周波数(MHz)
			20.19
			18.36
			18.77

50mm以上の濃度の約30%の積算でS/N>6が得られた。測定はすべて10mm管で行われ、外部D₂Oをロック用に使った。スピニングの効果は認められなかった。トランスミッターのピーク電圧はすべての場合300Vに設定し、その時の90°パルス(約80μs)で測定した。取り込み時間はフリーイオンの場合約45~15s、又蛋白質に結合した場合100ms以下まで短くした。S/Nを良くするために0.5~6HzのLine Broadeningをかけた。

3. 結果

(A) ^{43}Ca NMR

我々は ^{43}Ca NMRを Ca^{2+} がその酵素又は蛋白質の機能発現に必須であるサモライシン、コンカナバリンA及びカルモデユリンへ応用した。フリー $^{43}\text{Ca}^{2+}$ のNMRの半値巾(25Hz×0.5Hz)はアポサモライシン、アポコンカナバリンA及びカルモデユリンを添加することによりその濃度按比例1で著しく狭くなった(>200Hz)。 $^{43}\text{Ca}^{2+}$ アポサモライシンの45%はもう一方の必須金属である Zn^{2+} や不阻害剤であるL-ロイシンヒドロキサム酸の添加により大きく変化する事はなく、 Ca^{2+} 動き又はその周辺構造に大きな変化がない事が示唆された。しかし、 $^{43}\text{Ca}^{2+}$ コンカナバリンAの45%は必須金属の一つである Zn^{2+} や糖の添加により著しく変化した。しみずとある 1) 2) のまきひる

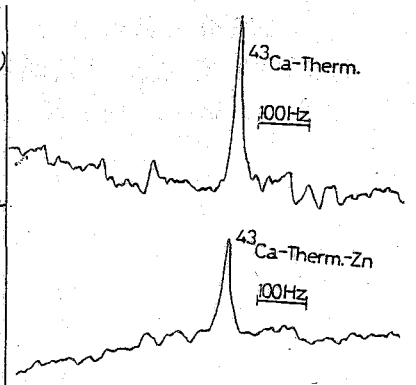


図1. $^{43}\text{Ca}^{2+}$ サモライシン及び $^{43}\text{Ca}^{2+}$ サモライシン-Znの ^{43}Ca NMRスペクトル

表 I. ^{43}Ca -カルモデュリンの ^{43}Ca NMR

		$\Delta\nu_{1/2}(\text{Hz})$	$T_2(\text{s})$	$T_1(\text{s})$	T_1/T_2
$^{43}\text{Ca}^{2+}$	2 mM	0.5	6.4×10^{-1}	1.2	1.88
$^{43}\text{Ca}^{2+}$	3 mM + Tet. CaM. 0.1 mM	33	9.6×10^{-3}	1.2×10^{-2}	1.25
$^{43}\text{Ca}^{2+}$	3 mM + Tet. CaM. 0.1 mM + TFP 0.625 mM	2	1.6×10^{-1}	3.4×10^{-1}	2.13
$^{43}\text{Ca}^{2+}$	3 mM + Tet. CaM. 0.1 mM + TFP 0.625 mM + Mg^{2+} 50 mM	1	3.2×10^{-1}	4.5×10^{-1}	1.41
$^{43}\text{Ca}^{2+}$	3 mM + Tet. CaM. 0.2 mM + TFP 1.0 mM + Mg^{2+} 10 mM	3	1.1×10^{-1}	1.7×10^{-1}	1.55
$^{43}\text{Ca}^{2+}$	2 mM + Tet. CaM. 0.067 mM	17	1.9×10^{-2}	—	—
$^{43}\text{Ca}^{2+}$	2 mM + Tet. CaM. 0.067 mM + Mg^{2+} 50 mM	11	2.9×10^{-2}	6.1×10^{-2}	2.10

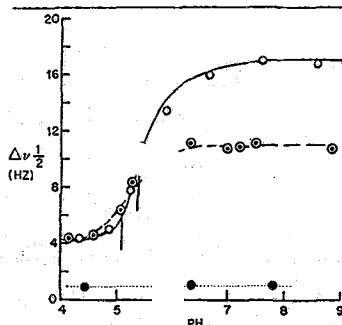


図2. ^{43}Ca -カルモデュリンのpH依存性
(○) Mg^{2+} 単独, (●) Mg^{2+} 存在下 (●) TFP 存在下

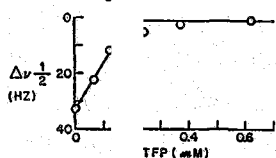


図4. ^{43}Ca -カルモデュリン- Mg^{2+} -TFP複合体の Inversion Recovery

図3. ^{43}Ca -カルモデュリンのTFP添加による変化

Ca^{2+} 結合構造が Mg^{2+} の存在下、 ^{43}Ca -カルモデュリンの結合の当量比を求めた(図3)。 ^{43}Ca -カルモデュリンの各種 Inversion Recovery法により T_1 を求め(図4)、この T_1 と $\Delta\nu_{1/2}$ から求めた T_1/T_2 における Ca^{2+} の移動の差を定性的に議論することからできた。この中で特に上の動きは TFP の結合により著しく低下することから示された。

これらの結果により変化した事が示された。 ^{43}Ca -カルモデュリンの $\Delta\nu_{1/2}$ は、 Ca^{2+} 単独である TFP の存在下より著しく異なった pH 依存性を示した(図2)。又、TFP と ^{43}Ca -カルモデュリンの結合の当量比を求めた(図3)。 ^{43}Ca -カルモデュリンの各種 Inversion Recovery法により T_1 を求め(図4)、この T_1 と $\Delta\nu_{1/2}$ から求めた T_1/T_2 における Ca^{2+} の移動の差を定性的に議論することからできた。この中で特に上の動きは TFP の結合により著しく低下することから示された。

ADP) の $\Delta\nu_{1/2}$ は既に 700 Hz 以上の値を持ち、この錯体がキナーゼに結合することにより $\Delta\nu_{1/2}$ はほとんど増大しないという予想されていた。ATP (ADP) の $\Delta\nu_{1/2}$ はクレアチンキナーゼやアセチルコリンキナーゼに著しく増大した(図5)。その増大した $\Delta\nu_{1/2}$ はもう一方の基質、ATP やアセチルコリンの添加により減少した。これらの酵素に結合した ADP) の ^{25}Mg NMR の $\Delta\nu_{1/2}$ は温度上昇と共に増大した。この傾向は、 ^{25}Mg -ATP (ADP) の ^{25}Mg NMR と逆の傾向であった(図6)。ATP (ADP) の ^{25}Mg NMR の $\Delta\nu_{1/2}$ は主に分子全体の動きと関係があり、一方酵素に結合した ^{25}Mg は ATP (ADP) の $\Delta\nu_{1/2}$ は主に代替交換に

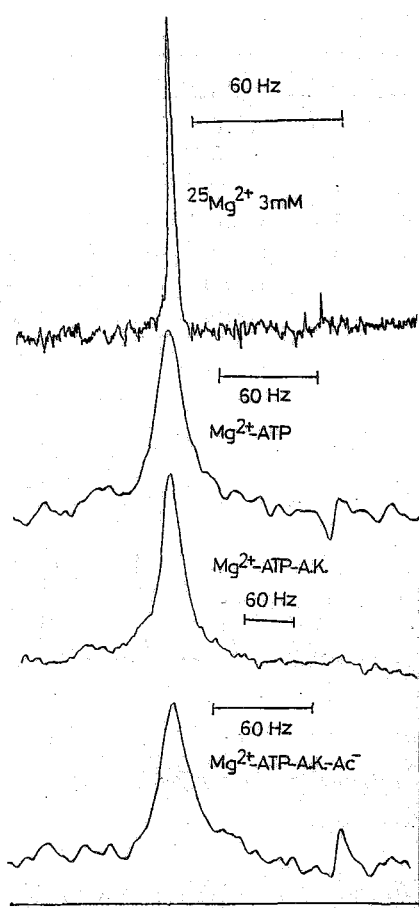
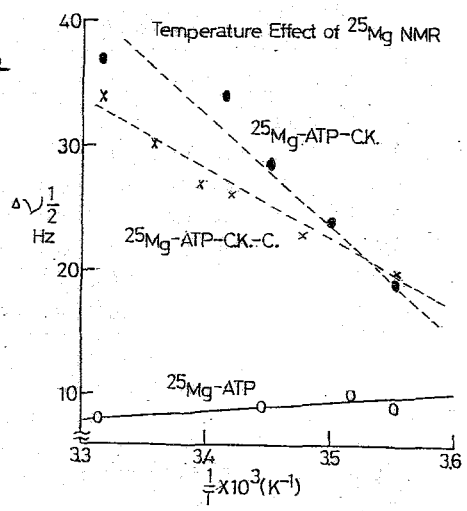


図5. フリー $^{25}\text{Mg}^{2+}$, $^{25}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$, $^{25}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$ -アセトキナーゼ, 及び $^{25}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$ -アセトキナーゼ-アセト複合体の ^{25}Mg NMRスペクトル

図6. $^{25}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$, $^{25}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$ -アセトキナーゼ, 及び $^{25}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$ -アセトキナーゼ-アセト複合体の ^{25}Mg NMRの温度依存性



支配されていると見られた。このことより、遷移状態においては Mg^{2+} の動きは低下するが、 Mg^{2+} 周辺の対称性は上昇していることが示唆された。
 NO_3 は $\text{Mg}^{2+}\text{-ADP}$ キナーゼ三者複合体に結合して一種の遷移状態類似体を形成すると言われている。 $\text{Mg}^{2+}\text{-ADP}$ -クレアチンキナーゼ- NO_3 複合体においては三者複合体に比較して Mg^{2+} の動きは低下するが、高い対称性を持つことが示された。しかし、 NO_3 を含むアセトキナーゼ複合体においては Mg^{2+} の動き又はその対称性がクレアチンキナーゼ複合体と異なることが示され

^{31}P NMRの結果もそれを支持した。

(C) ^{67}Zn NMR

高濃度 Zn^{2+} ($>1\text{M}$)の ^{67}Zn NMRの $\Delta\nu$ は170 Hz以上あり ^{67}Zn NMRの化学的及び生物学的応用の範囲は極めて限られていると見られていた。我々は Zn^{2+} の濃度が低ければ $\Delta\nu$ は10 Hz前後にまで下がる事が可能でありその応用の広い事を示した。即ち ^{67}Zn の $\Delta\nu$ は各種配位子の濃度で比例して著しく変化し、その変化の割合は配位子の種類に依存することが認められた。又その変化の割合は他の方法で決定されたこれらの Zn^{2+} 錯体の結合定数に密接に関係があることが見出された。

^{67}Zn NMRと Zn^{2+} は互に必須であるサモライシンに適用した。フリー Zn^{2+} の ^{67}Zn NMRの $\Delta\nu$ はかなりの量のアポサモライシンを添加しても大きな変化は認められなかった。しかしアポサモライシンに Ca^{2+} を添加する事によりその $\Delta\nu$ は著しく振かり、反応阻害剤であるL-ヒスチジンとロキサム酸の添加によりその $\Delta\nu$ はさらに大きく振かった。この ^{67}Zn NMRの変化は Ca^{2+} -サモライシンの ^{43}Ca NMR- Ca^{2+} の ^{67}Zn NMRスペクトル

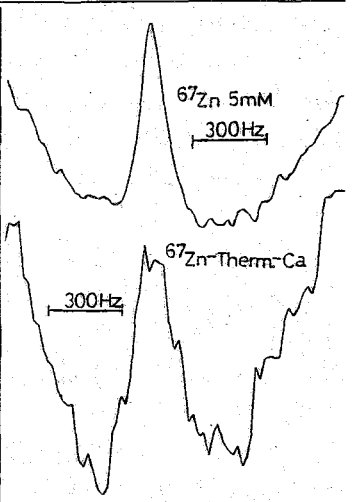


図7. フリー $^{67}\text{Zn}^{2+}$ 及び $^{67}\text{Zn}^{2+}$ -サモライシン- Ca^{2+} の ^{67}Zn NMRスペクトル

で認められた挙動と対照的である。

従ってNMRは他にコンナバリンA及びインシュリンへも応用し、各種添加剤によりその動き又はその周辺構造が変化することから示されその応用性も示された。
又考察

IZIの四重極モーメントを持った核については $\omega\tau_c \ll 1$ という条件下に次のように示される。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_0} = \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left(\frac{e^2 g_{zz} Q}{h} \right)^2 \left(1 + \frac{1}{3} \right) \tau_c \quad (1)$$

1か、この式は蛋白質のような巨大分子系や、化学交換が存在するような系にそのまゝは適用できない。 $\omega\tau_c \geq 1$ のような系については、縦磁化(Longitudinal Magnetization)及び横磁化(Transverse Magnetization)のDecayで示されその解釈は極めて複雑なものになる。1か、 $I=5/2$ 、 $3/2$ の核が巨大分子に結合した場合とフリーの場合との間に化学交換が存在し、1かも核の巨大分子に結合している確率をフリーの場合に比較してはるかに小さいと仮定すると、その緩和は近似的に単一の指数関数で表わされ、次のようになる。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3\pi^2}{10} \left(\frac{e^2 g_{zz} Q}{h} \right)^2 \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left[\frac{0.2\tau_c}{1+(\omega\tau_c)^2} + \frac{0.8\tau_c}{1+(2\omega\tau_c)^2} \right] \quad (2)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3\pi^2}{10} \left(\frac{e^2 g_{zz} Q}{h} \right)^2 \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left[0.3\tau_c + \frac{0.5\tau_c}{1+(\omega\tau_c)^2} + \frac{0.2\tau_c}{1+(2\omega\tau_c)^2} \right] \quad (3)$$

故に T_1 及び T_2 を知る事ができるが T_1/T_2 は $\omega\tau_c$ の関数で示され、これより τ_c 、四重極結合定数なども容易に求める事ができるといえる。この式は $\omega\tau_c \leq 1$ の場合でも充分に使えらうである。1か、これとて $^{43}\text{Ca}^{2+}$ 、 $^{25}\text{Mg}^{2+}$ 、 $^{67}\text{Zn}^{2+}$ などと巨大分子との結合定数が正確にわかっていないとその適用は危険である。

前節に述べた我々の実験は金属-蛋白質の結合定数に求められている系について行われたが、各種添加剤によるNMRの $\omega\tau_c$ の変化はその結合定数の変化をも含めた結果である。故にその解釈は一義的でなく 1)核のゆらぎ 2)核の周辺の対称性 3)分子全体のゆらぎ 4)核の化学交換 5)核の蛋白質への結合定数などの原因の組み合わせで $I=5/2$ 、 $3/2$ 核のNMRの $\omega\tau_c$ が決まり極めて複雑である。もし可能ならば相補的な知見が得られる他の方法をも併用すべきである。

1か、定性的に Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} などの核自身又はその周辺構造が各種の添加剤(Perturbant)によって微妙に変化することはこれらの金属NMRを用いてのみ生理的条件下で明確に把握することが可能であり、その化学的及び生物学的応用の可能性は極めて大きいと思われる。

本研究の一部は岐阜大学医学部野沢義則教授、長尾清治博士及び化学技術研究所小高正人氏との共同研究の結果であり、ここに深謝致す。

Ref. 1. T. Shimizu, M. Hatano, Biochem. Biophys. Res. Commun., 104, 720 (1982).

2. idem, ibid., 104, 1356 (1982).

3. T. Shimizu et al., ibid., 106, 988 (1982).

4. T. Shimizu et al., ibid., 106, 1112 (1982).

5. 清水彦, 野沢義則, 藤野昌弘, 生化学 53, 1027 (1981).

6. 清水彦, 藤野昌弘, 第9回生体分子構造に関する討論会要旨集 (1982).

7. 清水彦, 藤野昌弘, 第20回生物物理学会予稿集 (1982).

8. B. Halle, H. Wennerström, J. Mag. Res. 44, 89 (1981).

NMRによる病態解析(Ⅱ) 関節リウマチ・変形性関節症・ 化膿性膝関節炎の関節液について

○山崎政域, 莊明勝*, 森野能昌, 水岡二郎*
(熊本大・医・生化学, *国立熊本病院・整形外科)

n.m.r.は臨床医学の分野においても“病態解析”の有力な手段となりつつある。整形外科の領域でもn.m.r.への関心は大きく(雑誌「整形外科」トピックス欄“n.m.r.の臨床医学への応用”山崎政域(南江堂)印刷中), 今回われわれは病態解析(Ⅱ)として関節疾患, また病態解析(Ⅲ)として骨肉腫など“整形外科領域へのn.m.r.の応用”をこのようにする。

関節疾患について

関節疾患である慢性関節リウマチ(RA)は全国に30万人の患者がいるとされている。とくに強く侵されるのは手や足などの末節の関節で、腫脹・自発痛・運動痛・圧痛があり、そのために運動障害を呈する。とくに膝関節では関節の腫脹とその上下の筋の萎縮により、右図に示すように鉗形腫脹という形になる。関節リウマチは難治であり、その病態の悲惨さから早期の治療法の確立が望まれている。

関節疾患の病態を把握する上で関節液の性状が重要な意味をもつことから、今回炎症性・非炎症性関節疾患を代表する慢性関節リウマチ・変形性関節症(OA)などの関節液を“*intact* 糸”で測定し、“n.m.r.で得られた結果が、RA・OA・痛風(Gout)・化膿性関節炎(pyarthrosis)などの各疾患でどのような意味をもつのか”について考察する。



関節液のpHと病態像

関節液の役割は関節の潤滑と関節軟骨の栄養補給で、ヒト膝関節における正常な関節液量は1ml前後で、その粘性はヒアルロン酸含有量により左右される。一方、関節疾患の場合には関節液が70~80mlに達し、一般に粘性も低下する。

関節液のpHについて、Cummings, N.A.ら(1966年)は微小pH電極を用いて測定し、正常関節液のpHは7.43、RAおよびOAでは7.21, 7.48で、RAでは酸性に傾きOAでは正常との差が認められなさと報告している。したがって関節液の粘性は著しく低く(>300, *qr*, 25°C), pH電極での測定には困難がある。n.m.r.により

Inspection of Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis, Osteoarthritis
and Pyarthrosis by Nuclear Magnetic Resonance.

Yamasaki, M., Juang Ming S., Morino, Y., and Mizuoka, J.

Synovial Fluid pH Data for Patients

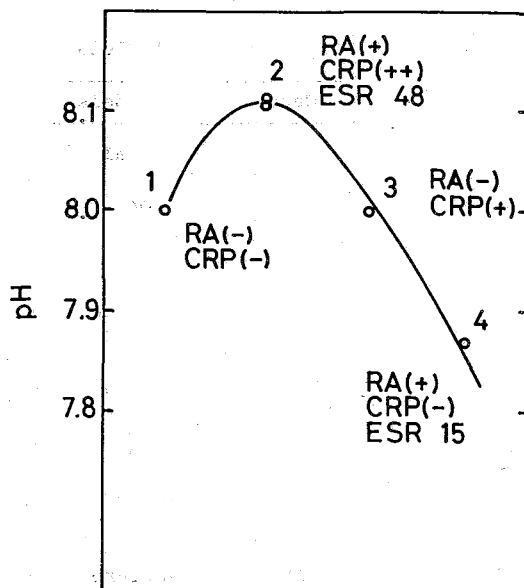
Case	Diagnosis	Sex	pH
1	RA	F	8.00
2	RA	F	7.90
3	RA	F	7.99
4	RA	F	8.11
5	RA	M	7.91
6	RA	M	7.68
7	RA	M	7.69
8	RA	M	7.94
9	RA	F	8.00
10	RA	F	7.77
11	RA	F	7.87
Mean pH cases 1 through 11			7.91
12	OA	F	7.98
13	OA	F	7.90
14	OA	F	7.92
Mean pH cases 12 through 14			7.93
15	GOUT	M	7.45
16	GOUT	M	7.75

RA・OA・痛風の関節液のpHを求めたところ、上の表に示すようにOAの関節液のpHは7.93また痛風では7.60前後であることを明らかにした。さうしてRAの関節液のpHは炎症の程度("classical" RAが"definite" RAがなど、また抗炎症剤の投与の有無など)を反映することと明らかにした。ヒトの正常な膝関節液は各疾患の関節液に比べて粘柱が太く、量的にも採取することが出来ないのでN.M.R.を用いてpHを求めることは不可能らしい。しかし、関節疾患では関節液のpHは必ずしも酸柱に傾くのではなく、むしろ塩基性側へ傾くことを明らかにした。

慢性関節リウマチ(RA)疾患の関節液

pHと臨床症状

慢性関節リウマチ(RA)の患者の関節液のpHと臨床症状との解析をこのようにした。その一症例(S.K., 男, RA)を右の図に示すと、まず最初には膝関節に関節液の貯留を認めたと関節リウマチ基準(11項目中7項目を満たすと"classical", 5項目では"definite", 3項目では"probable" RAとさういうに、診断におけるアメリカリウマチ協会の定めた基準)およびCRP(c-reactive protein, 正常ヒト血清では見られず、いろいろな疾患の血清中に出現する異常タンパク質、赤沈に沈むるとその鋭敏度は低く、炎症が起るときは赤沈の異常値になる)の陽性となり、赤沈が正常化する前に陰性



Therapeutic Course

K なる)ともK (-)であるが(①の状態), 1週後の②の状態では, RA(+) CRP(++) ESR(赤血球沈降速度, 正常値は10~15 mm, RAでは赤沈の亢進がみられ, これらの動きが症状の緩解, 増悪, 治癒効果と判定する)も48 mmを示し, この状態での関節液のpHは8.1 Kまで達した。その後ステロイド療法(③および④の状態)により, CRPは(+)から(-)に移行し赤沈も正常値へ近づくKつれてpHも7.6以下へと移行した。

現在のところ, RAの診断は種々の検査を総合し全身状態との関連を考慮して判断しているが, RAの初期または軽症の場合には診断に迷うことが多い, 決め手となる手技はない。今回, RAの患者の関節液のpHが治癒経過中の緩解増悪に比例することから, 診断および治療の客観的な評価に役立つことを明らかにした。

各疾患の関節液とT₁

慢性関節リウマチ, 変形性関節症, 痛風, 化膿性膝関節炎の各疾患の関節液のT₁値を下の表に示す。ヒトの正常膝関節液は入手不能のため, 手術時切開部より関節液を採取した。

下の表からも明らかのように, 各疾患とT₁値との間に相関は認められなかった。しかし同一のRA患者の関節液では, 治療効果があがるとつれてT₁値の増大が認められた(症例⑧と⑨, 症例⑩と⑪など)。痛風でもリウマチ疾患と同様の傾向が認められた(症例⑬と⑭)が, この傾向はOA疾患では認められなかった。リウマチ疾患の診断では治療歴(どのような薬を使い, それが有効であったかどうか, また副作用があったかどうかなど)が重要な意味をもつため, 関節液のT₁値の解析は“臨床経過”および“抗炎症療法”の客観的な評価に適していることを明らかにした。

Synovial Fluid T₁ Data for Patients

Case	Diagnosis	Sex	T ₁ (s)
1	Normal	F	1.9595
2	OA	F	2.3982
3	OA	F	1.9050
4	OA	M	2.4604
5	OA	F	2.6817
6	OA	M	2.5730
7	OA	M	2.6166
8*	RA	F	2.1646
9**	RA	F	1.7577
10**	RA	F	2.5665
11	RA	F	2.4400
12*	RA	F	2.7230
13	GOUT	M	2.5470
14	GOUT	M	3.0275
15	Pyarthrosis	F	2.3781

各疾患の関節液とT₂

ヒト正常関節液のT₂値は300 ms前後であるが、RAでは800 msよりOAでは400 ms前後、さらに化膿性関節疾患では500 msを示した。関節液のT₂値の解析によって、慢性関節リウマチ疾患と非炎症性関節疾患との鑑別診断に適用できることを明らかにした。

○山崎政成, 木田博志*, 本田五男*, 森野雅昌, 北川敏夫*
(熊本大・医・生化学, *整形外科)

なぜ現時点で ヒト悪性腫瘍組織の緩和時間を測定する必要があるのか

多くの研究者によって実験動物の悪性腫瘍組織中の水の緩和時間が測定され、正常組織にくらべて T_1 , T_2 値とも増加することが報告されてきた。さらにヒトレベルでもこの傾向が報告され、*n.m.r.*によるヒト悪性腫瘍診断の可能性が示唆されてきた。

しかし、これまでの悪性腫瘍組織の緩和時間に関する膨大なデータをそのままヒト悪性腫瘍の診断に適用するには、多くの問題点を含んでいる。まず第一に、実験動物を用いたデータはあくまでも“モデル実験”の域を出ないことである。すなわち同一年齢と系統の同産仔が利用され、同一環境で飼育され、同一条件下で癌の移植および疾患の診断を行うという“等質実験集団”であり、ヒトがん患者の臨床状態とは差がありすぎるためである。次に、ヒトレベルで悪性腫瘍組織の緩和時間を測定し、その検体数もそろえたとしても、各検体ごとの臨床症状との比較検討がなされていないばかり“緩和時間を測定した”ということ以上の進展は望めない。というのは、組織学的には同一に見える悪性腫瘍組織でも同一の抗がん剤により同一の治療効果が望めないとする事実が、このことを物語っている。

ヒトレベルでの *n.m.r.* のデータに対するそれぞれの指針

緩和時間をヒト悪性腫瘍の診断に適用しようとする場合、“どのような病態のとき、どのような T_1 , T_2 を示すのか”さらに“どのような T_1 , T_2 を示すとき、どのような病態が考えられるのか”といったように各検体の緩和時間を臨床像・病理像・組織像・治療および予後などと関連づけて考察すべきである。このような視点から、ヒト悪性骨腫瘍・ヒト悪性軟部腫瘍の“緩和時間と臨床症状”との関連について検討した。

悪性骨腫瘍について

手術時および生検 (biopsy) で採取したヒト悪性骨腫瘍組織6症例7検体(術前抗がん剤投与症例は4)について検討をこころみた。その内訳は、症例① Osteosarcoma (骨肉腫・+), 症例② Osteosarcoma (骨肉腫・+), 症例③ Malignant fibrous histiocytoma (MFH, 悪性繊維性組織球腫, 生検時-, 切断時+), 症例④ Chondrosarcoma (軟骨肉腫・-), 症例⑤ Metastasis of Lung cancer

New Approach for Diagnosis of Malignant Bone Tumor
with Nuclear Magnetic Resonance.

Yamasaki, M., Mizuta, H., Honda, I., Morino, Y., and Kitagawa, T.

(転移性骨腫瘍・+)，症例⑥ Osteosarcoma (骨肉腫・-)である。とくに症例3に肉ひとは生検時および抗がん剤使用後切断時の2回の標本について後継時間の測定を行った。正常なヒト骨組織は入手不能なため、おもに悪性腫瘍で切断せうけた四肢の組織的に非悪性部の骨組織、すなわち Cortex (骨皮質)、Bone Marrow (骨髓)、Cancellous Bone (海綿骨)を採取して使用した。さうに測定後、光顕顕微鏡において腫瘍組織が認められないことを確認した。

ヒトレベルでは、年齢や性別差および検体採取時の抗がん剤投与の有無などのため、同じ Osteosarcoma を例にとつて正常群と悪性群との T_1 、 T_2 値の単独の比較では“悪性度の判定”に明確さを欠いた。そこで T_1 および T_2 値を組み合わせた Malignancy Index (Goldsmithら)を用いることをこころみた。その結果、下の表に示すように正常群と悪性群の両群を完全に鑑別できることが明らかになった。

Malignancy Index (Bone)

		Compared to		
		Cortex	Bone Marrow	Cancellous Bone
Malignant Tumor				
Case	1.	5.09	3.14	4.69
	2.	4.77	2.89	4.44
	3. (Biopsy)	4.65	2.77	4.37
	(Amputation)	2.76	1.59	2.66
	4.	7.98	4.69	7.58
	5.	7.54	4.34	7.27
	6.	8.77	4.86	8.66
Non malignant Tissue				
Cortex	7.	0.83	0.55	0.72
	8.	2.91	1.86	2.61
	9.	1.15	0.71	1.06
	10.	3.07	1.77	2.96
Bone Marrow	11.	2.60	1.47	2.53
	13.	3.65	2.21	3.40
	14.	3.89	2.33	3.66
Cancellous Bone	15.	2.02	1.26	1.85
	16.	2.38	1.50	2.14

悪性軟部腫瘍について

悪性軟部腫瘍として、症例① Synovial sarcoma (悪性腫瘍)、症例② Extra-skeletal Osteosarcoma (骨肉腫)、症例③ Liposarcoma (脂肪肉腫)、症例④ MFH (悪性繊維性組織球腫)、症例⑤ Fibrosarcoma (繊維肉腫)、症例⑥ Ewing's sarcoma (ユーング肉腫)の6病変部について、その病変像との関連を求めた。

術前抗がん剤投与症例は症例①の一例のみであった。正常組織としては、軟部腫瘍がおもに存在すると考えられる筋肉および脂肪組織を用いた。悪性軟部組織においては、悪性骨腫瘍と同様に T_1 、 T_2 値を組み合わせた Malignancy Index を用いることにより、両群の鑑別診断が不能であることを明らかにした。

悪性軟部腫瘍では術前抗がん剤投与の症例は少なかつたが、悪性骨腫瘍の症例の

多くが術前に抗がん剤の投与を受けているため、悪性群と正常群との間には、今回得られた結果よりもさらに大きな差があるものと考えられる。

Malignancy Index (Soft Part)		Compared to	
		Muscle	Fat
Malignant Tumor			
Case	1.	3.59	4.31
		3.93	4.70
	2.	3.32	3.89
	3.	5.20	6.08
	4.	8.71	9.19
	5.	8.47	8.47
	6.	4.76	5.49
Non malignant Tissue			
Muscle	7.	1.76	2.60
	8.	2.23	3.02
Fat	10.	1.33	1.88
	11.	1.73	1.90
	12.	1.97	2.22

悪性骨腫瘍の緩和時間と病態像との関連

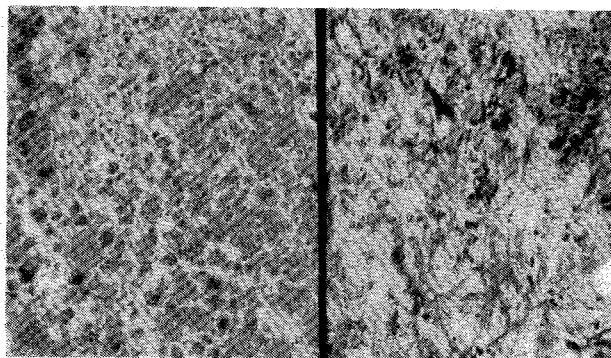
大腿骨に発生したMFH(悪性線維性組織球腫, 17才男)の現病歴および経過を下記に示す。主接により悪性病変を認めため(サ-回n.m.r.測定), 抗がん剤投与後(Adriamycin 60mg, Vincristine 4mgの動脈内注およびMethotrexate 450mg/kg)大腿部からの切断術を行った。

主訴 : 左膝部痛, 跛行

現病歴及び経過 :

- S 56. 10. 誘因なく左膝に歩行時痛出現。
某医受診し湿布投薬で疼痛軽快。
12. 25. 再度歩行時痛出現。他院を受診し、レ線上異常陰影を指摘され、当科を紹介。
12. 26. 当科初診、入院
57. 1. 7. 血管造影
1. 11. 骨シンチ
1. 12. 動注ポンプ設置し、生検施行 → NMR測定①
1. 25. HD-MTX-CF療法開始。
(100 → 150 → 200 mg/kg と漸増)
2. 22. 手術(大腿切断) → NMR測定②
3. 8. VACA化学療法開始。
7. 義足にて歩行中。肺転移も認めず経過良好。

生検時(左)および切斷時(右)のレ線像を示した。X線によるびり生検時および切斷時の間に特記すべき変化は認められなかった。生検時および切斷時の組織像では、切斷時標本(右)では病変部分のびり部分の部分が壊死に陥っており細胞成分はわずかに存在するものの、その性状は生検時と大きく異なり、化学療法効果組織学的判定基準(大星ら)では Grade III に相当するものと考えられる。



つき、生検時と切斷時の緩和時間を比較すると、 T_1 値は $1.43s$ から $0.67s$ へ、また T_2 値は $10.47ms$ から $7.16ms$ へと切斷時での T_1 , T_2 値の減少が認められた。さうに Malignancy Index でも、切斷時標本では正常群のための数値を示した。これらの結果より、緩和時間ががん剤に対する効果の判定の指標となり、予後を推定する上でもきわめて有用な診断法と考えられる。

Cytosol 局在アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・ α -メチルアスパラギン酸複合体の構造

(熊本大・医学部, *京都大・理学部)

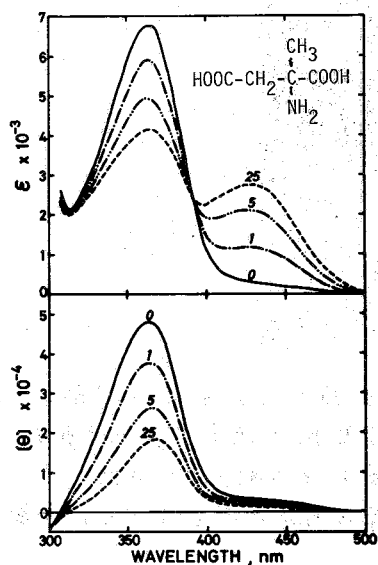
○森野能昌・赤坂一之・棚瀬純男・長島不二夫・山崎政成

Cytosol 局在アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (CAAT) は、分子量 93,000, 同一サブユニットより成る 2 量体構造をもち、モノマーあたり 1 分子のピリドキサルリン酸を結合する [1]。基質アナログである α -メチルアスパラギン酸 (MA) は、ピリドキサル型酵素と反応し、イミノ基転移の段階で安定な複合体を形成する [2]。

本研究では、MA との結合によってもたらされるコンホメーションの変化と結合部位の環境を、 $^1\text{H-NMR}$ 差スペクトル、リガンド分子、酵素分子間 NOE 差スペクトルから検索するとともに、結合 MA の α -メチルプロトンのシグナルの線幅の観察から、その運動性、DL-光学異性体の結合性、リガンド結合の stoichiometry に関する知見を得た。

(実験方法)

CAAT はフタ心筋から精製し [3], α -型酵素を用いた。吸光分光測定は、日立 200 型分光光度計を用いた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (199.5 MHz) は、超電導マグネットを用いる JNM-FX-200 型装置にて測定した。酵素濃度は通常モノマー単位として



(図 1) CAAT (ピリドキサル型) と α -MA との反応上、吸収スペクトル; T, CD スペクトル

0.8 mM, 15 mM リン酸カリバッファー (pH 7.35), 20 mM 硼酸ソーダバッファー (pH 8.23) を用い、すべて 99.97% $^2\text{H}_2\text{O}$ (メルク) にて調製した。試料管は 5 mm, 容量は通常 0.45 mL, 温度は原則として 30°C, スペクトルは、60°~70° パルス, 400~1000 回積算, 繰返し時間 2 秒, 観測幅 2.5 KHz, データポイント 8 K にて得た。NOE 差スペクトルは、 f_2 の照射位置を 9 ppm から -1 ppm (TSP 規準) にわたり、0.05~0.1 ppm 間隔で変え、off resonance 照射スペクトルとの差として得た。pH はメーターの読みそのものを記載した。

(結果・考察)

① MA 結合に伴う吸収スペクトルの変化:

MA の DL 体を、ピリドキサル型 CAAT に添加すると 362 nm の吸収帯の減少とともに、新たに 430 nm に吸収帯が生ずる (図 1)。この吸収スペクトルの変化から下記のプロットを行い、pH 7.35 にて $K_d = 1.08 \text{ mM}$, pH 8.23 にて $K_d = 0.48 \text{ mM}$ を得た。

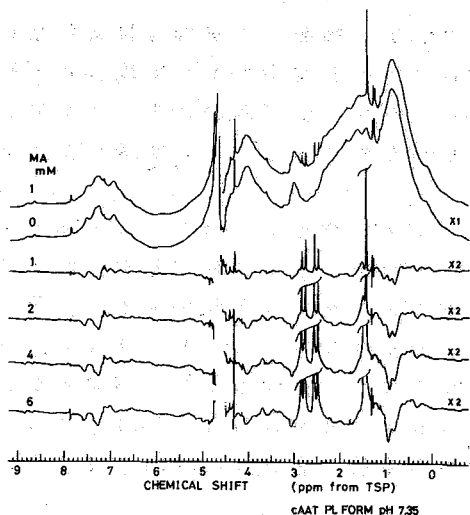
Structure of the complex of cytosolic aspartate aminotransferase with α -methyl-aspartate

Morino, Y., Akasaka, K*, Tanase, S., Nagashima, F. & Yamasaki, M.
(Kumamoto University Medical School, *Kyoto University Faculty of Science)

$$\frac{A_{\infty}}{A} = 1 + \frac{Kd}{[MA]}$$

[MA]: メチルアスパラギン酸濃度 (L型として)

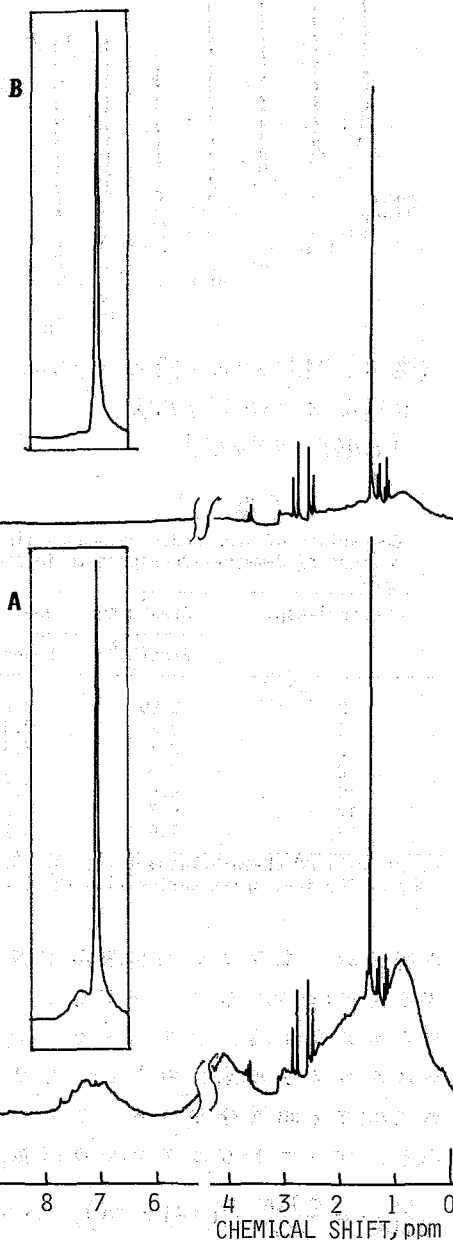
A: 430 nmにおける吸収増加, A_{∞} : MA飽和時の
Complex の 430 nmにおける吸収値, Kd: 解離定数



(図2) CAATの α -メチルアスパラギン酸との反応に伴う ^1H -NMRスペクトルの変化。

② MA結合に伴うCAATの ^1H -NMRスペクトルの変化。ピリドキサル型CAATにDL-MAを加える前後に得た ^1H -NMRスペクトルの差から、芳香領域に10~20プロトン、メチル領域に30~40プロトンに相当する正負の変化が観察された。この変化の度合は、MA濃度の増大とともに大きくなり(図2)、①で観察した吸収スペクトルの変化とほぼ平行した。

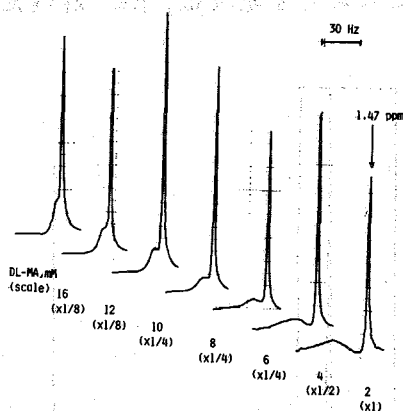
③ 分子間スピン拡散による結合リカンドの選択的飽和: CAAT存在下でのMAのメチル基のシグナルを詳細に観察すると、シャープな成分の低磁場側に常にブロードな成分が附随していることがわかった(図3A)。この2種のシグナルについて、CAATとの相互作用の有無を直接的に調べるために分子間スピン拡散(4)の方法を適用した(図3B)。比較的強いpresaturationパルス(f_2)を芳香族領域(~7ppm)に照射すると、スピン拡散により、たんに部分のシグナルはほとんど飽和する。



(図3) 分子間スピン拡散による結合MA-d-メチルの選択的飽和。
A. f_2 非照射, B. 7.13ppmに照射。
(insetは~1.5ppmシグナルの横幅拡大)

INTERACTION OF 2-METHYL-DL-ASPARTATE WITH CAAT

pH 8.23



(図4) MA メチルシグナルのシャープな成分とブロードな成分
[CAAT: 0.8 mM]

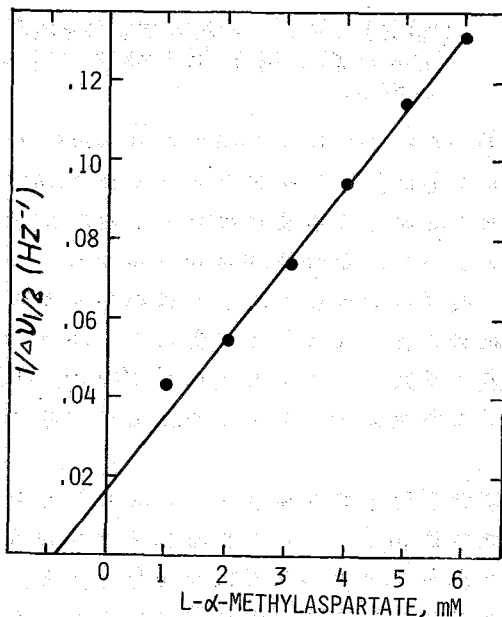
(表1)

Comparison of area under resonance line for methyl protons of 2-methyl-DL-aspartate in presence of CAAT

DL-Methyl-Asp. mM	Area ^a under signals for		
	Free(F) ^b	Bound(B) ^c	F/B
2	0.90	0.95	0.95
4	2.2	2.4	0.92
6	3.1	2.9	1.1
8	3.8	3.8	1.0
10	4.4	4.8	0.92
12	6.7	6.9	0.97
16	7.6	6.9	1.1

a. 1.0 for 1 mM DL-methylaspartate; b. At -3.23 ppm from H₂O; c. Chemical shift varies with the ligand concent.

本酵素がL型アミノ酸に厳密な特異性を示す事実(1)から、シャープなシグナルはD型MAのメチル基、ブロードなシグナルはL型MAのメチル基に由来し、L型MAのみがCAATと相互作用することかは、確実である。ブロードなシグナルの線幅の変化を



(図5) (線幅)⁻¹ vs. L-メチルアスパラギン酸濃度のプロット. (pH 7.35)

$$\frac{1}{\Delta\nu_{1/2}} = \frac{\pi T_{2B}}{(E_0)} ((MA) + Kd), \quad \Delta\nu_{1/2} = \nu_{\frac{1}{2} obs} - \nu_{\frac{1}{2} F}, \quad \{E_0\}: \text{酵素濃度}, \{5\}$$

に従ってプロットすると図5のごとくなり、 $Kd = 0.93 \text{ mM (pH 7.35)}, 0.50 \text{ mM (pH 8.23)}$ が得られ、①において述べた吸収スペクトル測定によって得た値とよく一致した。またこのプロットから $T_{2B} = 4.65 \text{ ms}$ が得られる。

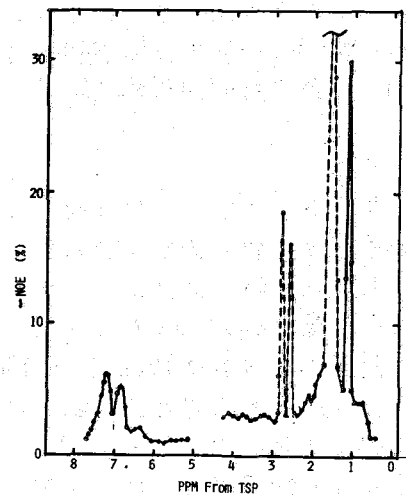
さらに、MAのシグナルのうちブロードな成分の強度も著しく(〜4に)減少する。これに対し、シャープな成分の強度はほとんど影響を受けない。この事実は、MAのメチルプロトンのうち、CAATに結合して双極子相互作用にあづかるのはブロードな成分として現われるもののみであり、シャープな成分はまったく相互作用していないものであることを明確に示している。

④ CAATと相互作用するMAのメチルシグナルのシフトと線幅：上記のごとく、種々リカント濃度で差スペクトルを観察すると、常に、化学シフト一定のシャープなシグナルと、リカント濃度に応じて、化学シフトと線幅を変えるブロードなシグナルが共存する(図4)。この2種のシグナルの面積強度は常に1:1である(表1)。

⑤結合したMAの存在状態： CAATと相互作用するL-MAの α -メチル基の運動性は下記のごとく T_{2B} の2つの極限值として表現される。[a]メチル基の回転が速く、その相関時間で $\tau \ll c$ （ここで c ：CAAT分子全体の回転相関時間）を仮定すれば、 $T_{2B} \sim 6.17 \text{ ms}$ となる。[b] α -メチル基の回転が完全に妨げられる環境では、その運動性はまったくCAAT分子の c に依存し、 $T_{2B} \sim 1.54 \text{ ms}$ となる[6]。[b]の場合は実測の T_{2B} （ $= 4.65 \text{ ms}$ ）値と明らかに矛盾する。一方[a]の場合の T_{2B} 値との差はMAのメチレンプロトンおよびCAATの活性域内側鎖プロトンと、MAの α -メチルプロトンの間の双極子緩和によるものと解釈される。

以上により、L-MAはCAATの活性域中心に特異的に結合するが、そのメチル基の内部回転は速く（ $\tau \ll 4.3 \times 10^{-8} \text{ s}$ ）、また α -メチルプロトンは活性域近傍の側鎖プロトンと近接距離にあると考えられる。

⑥酵素・リガント分子間NOE： リガント・MAの α -メチル基の近傍に位置するたんぱく側アミノ酸側鎖を検索するため、酵素たんぱく側鎖プロトンの飽和に伴う、リガント・メチルプロトン（ブロードな成分）への負のNOE[7]の観察を試みた。スピン拡散による非特異的な飽和移動現象をできるだけ少なくするため、照射ラジオ波(f_2)の出力を小さくし且つ、測定温度を 50°C に上げ、定量的、系統的な測定により、7.2, 6.8, 1.1 ppmに有意の分子間NOEを認めた(図6)。これらは、結合L-MAの α -メチル基に近接する活性域側鎖プロトンを反映するものと考えられる。結晶解析の結果[8,9]と照合するとTyr-70, Tyr-40, Leu-39, Ala-37などが考慮の対象になる。



(図6) CAAT-MA Complexにおけるたんぱく側鎖照射によるMA- α メチルへのNOE. CAAT 0.8mM, pH 7.35, L-MA 12.6mM, 50°C .

[文献]

1. Braunstein, A.E. (1973) The Enzymes (Boyer, P.D. ed.) 3rd Edn., Vol. 9, pp.379-481, Academic Press, New York
2. Fasella, P., Giartosio, A. & Hammes, G.G. (1966) Biochemistry 5, 197
3. Morino, Y., Tanase, S., Kagamiyama, H., Watanabe, T. & Wada, H. (1977) J. Biochem. 78, 847
4. Akasaka, K. (1979) J. Magn. Res. 36, 135
5. cf. Dwek, R.A. (1973) NMR in Biochemistry, Chapter 6, Clarendon Press, Oxford
6. Woessner, D.E. (1962) J. Chem. Phys. 36, 1
7. Balaram, P., Bother-By, A.A. & Dadok, J. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94, 4015
8. Ford, G.C., Eichele, G. & Jansonius, J.N. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2559
9. Arnone, A., Bailey, P.D., Rogers, P.H., Hyde, C.C., Metzler, C.M. & Metzler, D.M. (1982) in Molecular Structure and Biological Activity (in press)

(京都府立医科大学・オ－生理)

西川 弘恭, ○日下 義章, 山下 文治, 柳田 喜三郎

目的

proteoglycanやcollagenなど高分子を基質とし、それらの産生細胞としての軟骨細胞より構成される軟骨組織は、酸素や栄養補給のための血管を持たず、それらは細胞外液の浸潤、拡散によって補なわれている。また組織中の細胞密度は他の実質組織に比してきわめて低い。したがって軟骨細胞のエネルギー代謝は従来より解糖系によるATP産生の占める割合が大きく、低酸素分圧溶液中でも生存することが知られている⁽¹⁾⁽²⁾。一方軟骨細胞の機能としての基質産生にはUDPを必要とし、その産生は酸素消費と相関を持つとされている⁽³⁾。現在まで軟骨組織のエネルギー代謝と基質産生に重要な関わりを持つリン化合物の研究はほとんどなされていない。今回 ^{31}P -NMRを環流条件下の軟骨組織に適用し、軟骨細胞内リン化合物を種々の条件下で観測し、軟骨細胞内代謝を解析したので報告する。

方法

試料： 体重約1 kgの家兎より、皮膚および軟骨周囲の結合組織を剝離した耳介弾性軟骨を得、約1 mm²の小片とし、10 mm中 NMR試料管に入れた。試料の調製は全て氷温にて行なわれた。また、試料管中の試料は種々の条件で環流された。試料の乾燥重量は約200 mgであった。

装置： 装置はJEOL-PFT-100 NMRで、 ^{31}P で40.29 MHzであった。測定はproton decoupling 下で行なわれ、試料は測定中分解能向上のためspinningされた。スペクトル幅は2 kHzで、データポイントは4096であった。照射パルスは75°パルスで1.5 secの繰り返し時間であった。スペクトルは1000回FID加算平均毎にフーリエ変換し、10000~15000回加算平均で得た。測定温度は全て25°Cであった。化学シフトの基準として、phosphocreatineを用いた。

環流液： 通常 Krebs-Ringer液 (10 mM-HEPES-NaOH, pH 7.3) を用いた。酸素濃度の異なる環流液は、95% O₂については Krebs-Ringer液 (25.5 mM NaHCO₃, pH 7.3) を95% O₂ + 5% CO₂ ガスで平衡させて調製し、20% O₂については Krebs-Ringer液 (10 mM-HEPES-NaOH) を空気と平衡させて調製し、7% O₂については同環流液 (10 mM-HEPES-NaOH) をN₂ガスにて平衡させて調製した。0% O₂については流入側ビニール管を二重管とし、外側腔にN₂ガスを通し、内側腔にN₂ガスに平衡させた溶液を通した。O₂濃度はNMR試料管中の環流液について酸素電極を用いてモニターした。解糖系の代謝阻害剤として、0.5 mM monoiodoacetate (MIA)、TCA cycle の uncoupler として、0.1 mM dinitrophenol (DNP)、呼吸鎖の阻害剤として1 mM KCN を用いた。

結果および考察

にしかわ ひろやす、くさか よしあき、やました ふみはる、さかきだ きさぶろう

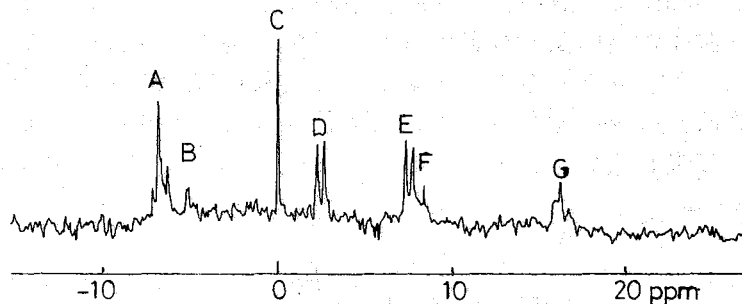


図1. 家兎耳介軟骨の7% O₂ Krebs-Ringer 氏溶液環流での³¹P-NMRスペクトル。

(1) 軟骨組織のcontrolの³¹P-NMRスペクトルとして7% O₂の酸素濃度の環流液を、1.5 ml/minで環流して得たスペクトルを図1に示した。得られた共鳴線はA: *sugar phosphates (sugar P)* (-6.86 ppm)、B: *inorganic phosphate (Pi)* (-5.16 ppm)、C: *phosphoCreatine (Pcr)* (0 ppm)、D: δ -phosphorus of ATP (γ ATP) (2.26, 2.64 ppm)、E: α -phosphorus of ATP (α ATP) (7.32, 7.73 ppm)、F: NAD⁺ (8.37 ppm)、G: β -phosphorus of ATP (β ATP) (15.8, 16.2, 16.6 ppm)であった。軟骨細胞は基質産生のため、UTPまたはUDPを必要とするため、細胞内にそれらを持ち、かつそれらの化学シフトはATPまたはADPのそれに一致する。故に図1のD、E、Gの共鳴線はUTPまたはUDPをも含む。また共鳴線Bの化学シフトから得られたpHは7.3で、環流液のpHに一致していた。カエル筋の³¹P-NMRスペクトルに比して、*sugar P*の信号強度が大きく、Pcr/ATP比が小さいことが特徴で、解糖系エネルギー代謝が、エネルギー産生で大きな比重を占めていることを示唆している。

(2) 環流液O₂濃度と³¹P-NMRスペクトルの関係は、95% O₂、20% O₂、7% O₂では*sugar P*、*Pi*、*Pcr*、ATPの相互の信号強度比に変化はなく、高いO₂濃度を必要とする他の実質臓器と異なり、低いO₂濃度で生存しうることを示した。しかし0% O₂では約8時間の経過で、上記のリン化合物が消失した。

(3) 環流中止後6.5時間目から測定した³¹P-NMRスペクトルを図2に示した。-4.5 ~ -3.4 ppmに*Pi*の共鳴線が得られ、細胞内pHが大きく酸性側に傾いていることが示された。これは解糖系の最終代謝産物である*lactate*によるもので、環流中止により試料中より洗い出されないため蓄積したものである。一方高エネルギーリン化合物はすべて消失している。

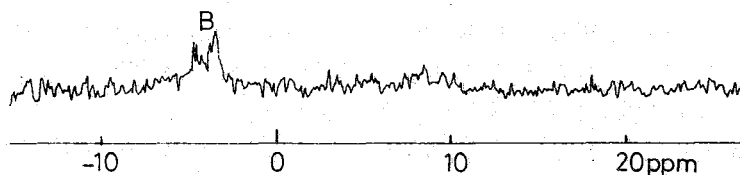


図2. 環流中止後6.5時間目より15000回加算平均されたスペクトル。

(4) *glucose free* 環流液による軟骨細胞内リン化合物の変化を経時的に図3に示した。図3上の最初の6時間30分のスペクトルではcontrolの図1と変わらない。

図3中の次の6時間30分では *Per*, *ATP* が減少し、*sugar P* の共鳴線に変化が現われ、図3下の測定開始後19時間30分目からのスペクトルでは酸性側へシフトした P_i と、わずかな *sugar P* がみられるのみである。これらは軟骨細胞が長時間 *glucose free* 環境下で、細胞内 *glycogen* 顆粒または *lipid* を使うことにより、エネルギー代謝を維持していることを示している。

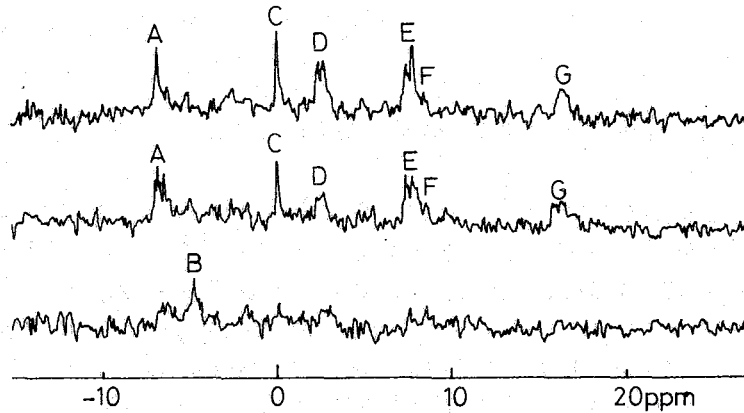


図3. *glucose free* 溶液の環流で得たスペクトル。上；最初の6.5時間のスペクトル，中；6.5～13.0時間のスペクトル，下；19.5～26時間のスペクトル。

(5) 代謝阻害剤の軟骨細胞内代謝への影響

a) *MIA* は解糖系の *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* を阻害することが知られている。図4に $5 \times 10^{-4} M$ *MIA* における NMR スペクトルを示した。-6.59 ppm にピークを持つ共鳴線を示し、その線幅が広いことは、数種類の *sugar P* が同時に増加したことを示している。一方、*ATP* や *Per* は見られず、かつ P_i も見られない。

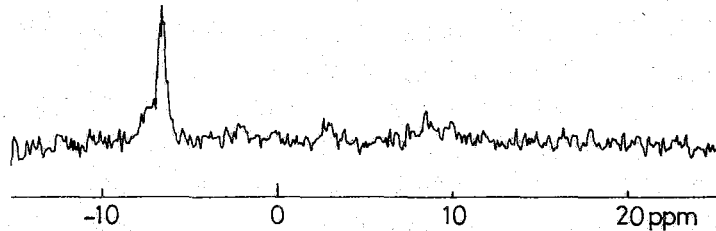


図4. $5 \times 10^{-4} M$ *MIA* 含有、7% O_2 *Krebs-Ringer* 代溶液環流で得られたスペクトル。

b) *KCN* は *TCA cycle* の電子伝達系における *cytochrome* の阻害剤である。1 mM *KCN* におけるスペクトルを図5に示した。-6.54 ppm に線幅 0.81 ppm の共鳴線を示し、数種類の *sugar P* が細胞内に蓄積されることを示している。また、 P_i , *Per*, *ATP* の共鳴線が見られないことから、軟骨細胞は低酸素環境下においてもエネルギーレベルを維持することが可能であるものの、*TCA cycle* による *ATP* 産生が細胞内 *Per*, *ATP* の蓄積に働き、解糖系による *ATP* 産生のみではエネルギーレベルを維持できないことが示された。

c) *DNP* は *TCA cycle* における *ATP* 産生での *uncoupler* である。1 $\times 10^{-4} M$ *DNP* にお

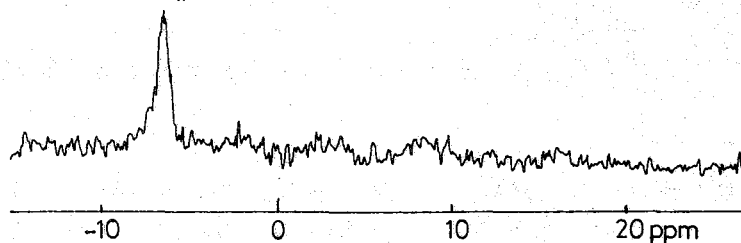


図5. 1×10^{-3} KCN 含有、7% O_2 Krebs-Ringer 代溶液環流で得られたスペクトル。

けるNMRスペクトルを図6上に示し、図6下に続いてDNPを洗い出した時のスペクトルを示した。B(-4.46ppm)のPiから細胞内pHの酸性側へのシフト、およびA(-6.50ppm)のsugar Pの高磁場側へのシフトが見られ、Pcrの消失、ATPの減少が認められた。一方DNPの洗い出しにより、B'(-5.09ppm)、A'(-6.76ppm)とPi, sugar Pの各々がアルカリ側へシフトし、またPcrが出現し、controlの状態にもどりつつあることを示した。

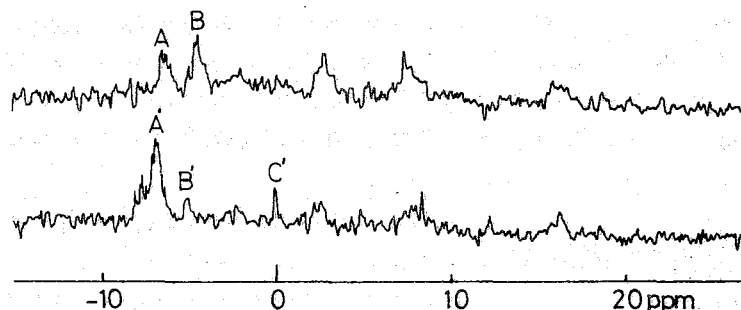


図6. 上; 1×10^{-4} M DNP 含有、7% O_2 Krebs-Ringer 代溶液環流で得られたスペクトル。下; 7% O_2 Krebs-Ringer 代溶液環流によりDNP除去中に加算平均して得たスペクトル。

まとめ

- (1) ^{31}P -NMRに環流法を適用し、家兔耳介弾性軟骨の ^{31}P -NMRスペクトルを得、種々の環流条件下における軟骨細胞のエネルギー代謝を連続的に観察出来た。
- (2) controlのスペクトルでは、sugar phosphate, inorganic phosphate, phosphocreatine, ATPおよびUTPの α , β , γ , そして NAD^+ の信号が認められた。軟骨細胞のスペクトルでは、Pcr/ATP比が小さく、sugar phosphateの信号強度が大きく、またPiの化学シフトにより得た細胞内pHは7.3であった。
- (3) 軟骨細胞は7% O_2 という低酸素環境下においても、そのエネルギーレベルを維持することが可能であるものの、TCA cycle がATP産生に重要な役割を演じていることが、そのuncoupler, inhibitorを用いた実験で示された。

文献

- (1) B.G.L. BYWATERS et al., J. Pathology, 1973, 44, 247-268
- (2) F. TUSHAN et al., J. Lab. & Clin. Med., 1969, 73, 649-656
- (3) C.T. BRIGHTON et al., Arthritis and Rheumatism, 1974, 17, 245-252

(はじめに)

^{31}P NMRを用いた生体組織の代謝物質の測定は、Houltら(1974)によって始めて試みられ、その結果筋肉などの組織がよい燐のシグナルを与えることが示された。その後 Wilkie の研究室では、 ^{31}P NMRを筋収縮の生理学的研究に用いるための方法の開発が行われた(Dawsonら, 1977)。その方法は1)筋に O_2 を十分に供給するために O_2 で飽和したリンガー液で灌流を行うこと、2)灌流液およびプローブ内の温度をコントロールすること(4°C)および3)プローブ内で筋を刺激し、その発生した張力を測定することであった。Wilkieの研究では、試料管および筋の大きさの制約から、十分によいS/N比をもって燐代謝物質の量の変化を測定するためには長い時間を要し、したがってよい時間分解能をもって生理学的実験を行うことはできなかった。したがってわれわれはできるだけ多数の筋肉をプローブ内でよい生理的条件下に保つことによってNMRの感度を向上させよい時間分解能を達成することによって、 ^{31}P NMRを生理学的研究のために用いることを意図して、以下のような方法の開発を行い、この方法を用いて筋収縮によるエネルギー利用の研究を行った。

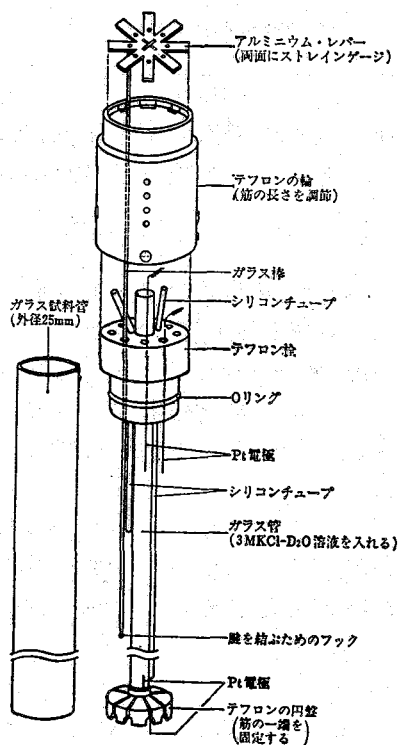


図1

図1. 外径25mmの試料管用にデザインされた筋4チャンバー。下方の円盤の8ヶのスリットと、上方の星型のレバーの8本の腕を用いて、最大16のカエル縫工筋をとりつけることができる。温度を調節した外部槽から、 O_2 (5% CO_2 を含む) で飽和したリンガー液を灌流する。リンガー液を吸引する速度は流入の速度の2倍であり、複数のチャンネルを備えたポンプを用いることによって、リンガー液のプローブ内への流出を防ぐ。1対のPt電極を用い、持続3msで約70Vのパルスのトレインで筋を刺激する。等尺性張力を張力は、4チャンバーの上方の星型レバーの上下両面に貼ったストレインゲージを用いて記録する。ほぼ同じ大きさの筋肉を用いることができれば、このような構造のレバーを用いて、発生張力を最も簡単に測定することができる。中心にあるガラス管の内部には高濃度のKClを溶かした重水を入れ、ロックシグナルを得る。刺激電流はこのKCl溶液を経て、最下端の一方の刺激電極に達する。

やまぢかすいう、たのくらまさる、このたにかある

(方法)

スペクトロメータはBruker WM 200wb であり、試料管として外径25mmのものを用いた。筋組織は重量約300gのヒキガエル (*Bufo bufo japonicus*) から摘出した縫工筋である。筋収縮の生理学的研究を行うために、図1に示す筋ケエンバーを作製した。その主なデザインはDawsonら(1977)に従ったが、このケエンバーには16の縫工筋をとりつけることができる。このときの筋の総重量は6-8gに達する。静止状態の筋のスペクトルから、このていどの大きさの筋を用いるとき、約毎時1Lの速度で O_2 (5% CO_2 を含む) で飽和したリンガー液を灌流することによって、筋の無機磷の量を低いレベルに保つことができることが判る。リンガー液はPipesバッファーを含み、pHは7である。また5% CO_2 を含む O_2 で飽和させることによって、筋細胞内pHが7.05に保たれることが、無機磷の化学シフトから判明している(Wilkie, Yamada, Tanokura & Kometani, 未発表)。以下の測定は4°Cで行った。

(結果と考察)

スペクトロメータから得られる外部パルスを用いて刺激装置を駆動することによ

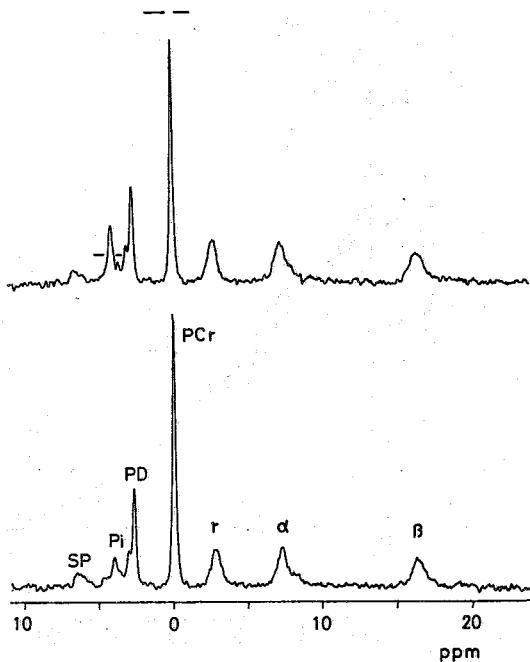


図2. 下方のスペクトルは収縮の直前の静止筋より得た 32×16 (512) 回の積算スペクトルである。ATP (α , β および γ)、クレアチン磷酸 (PCr)、ATP α に重なる NAD、磷酸ジエステル (PD)、無機磷 (Pi) および糖磷酸 (SP) のピークがみとめられる。上方のスペクトルは16秒間の連続収縮(強縮)が終った直後の 32×16 (512) 回の積算スペクトルである。収縮によって ATP が分解されるが、ローマン反応が速く進行するため、ATP濃度は一定に保たれ PCr が減少する。PCr ピークの上方の横線は刺激前の静止筋のピークの高さを示す。一方 Pi は収縮によって増大している。その他の物質のピークはほとんど変化していない。

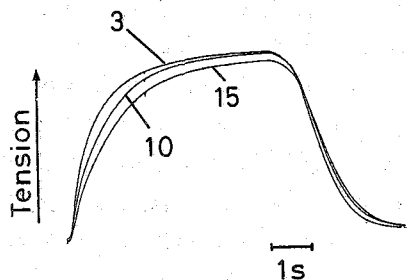


図3. 刺激により発生した筋の等尺性張力の記録。20Hz 5秒間の強縮刺激。図2のスペクトルはこのような収縮を16回くり返して得られたシグナルを積算したものである。各々の収縮の間には約1時間の回復時間をおいた。この図が示す張力発生は3回目、10回目および15回目の収縮によって生じたものである。

って、収縮と同期したスペクトルの変化を調べた。筋に2秒、5秒、10秒および16秒間持続する収縮を発生する強縮刺激(20Hzのパルス列)を加え、2秒に1回の率で60°パルスも照射してスペクトルを積算した。飽和を補正するためのファクターはクレアチン燐酸の面積強度では1.34、無機燐では1.5であった。積算回数は8、32および128回を用いた。1に於いて測定の時分解能はそれぞれ約14秒、1分および4分である。また、S/N比をよくするために同じ収縮を16回くり返してそれぞれ対応するスペクトルを積算した。図2は16秒間持続する収縮の直後の約1分間の積算スペクトルを、収縮直前のスペクトルと比較して示したものである。

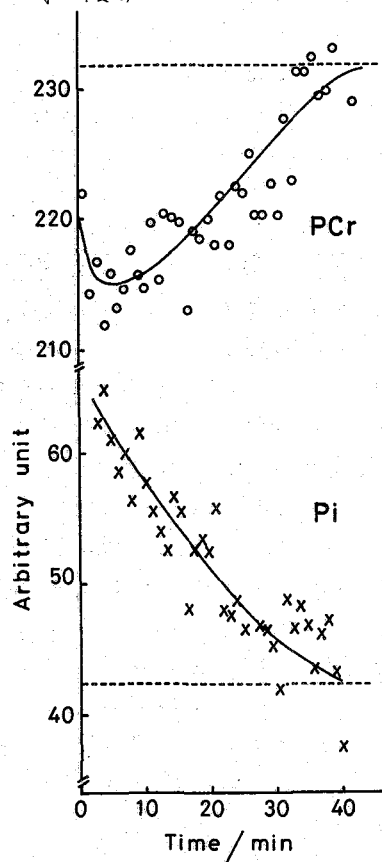


図4. 5秒間の強縮刺激の終了直後およびその後の回復過程におけるクレアチン燐酸(PCr)および無機燐(Pi)の変化の時間経過。実線は刺激前における各々のレベルを表わす。収縮によってATPが分解されるため、収縮直後はPiが増大し、収縮後約40分でPiは回復する。PCr(ATP分解量と対応)は収縮後も減小が数分間続いた後回復する。右表は32×16回の積算スペクトルピークの面積強度を飽和ファクターで補正して求めた。

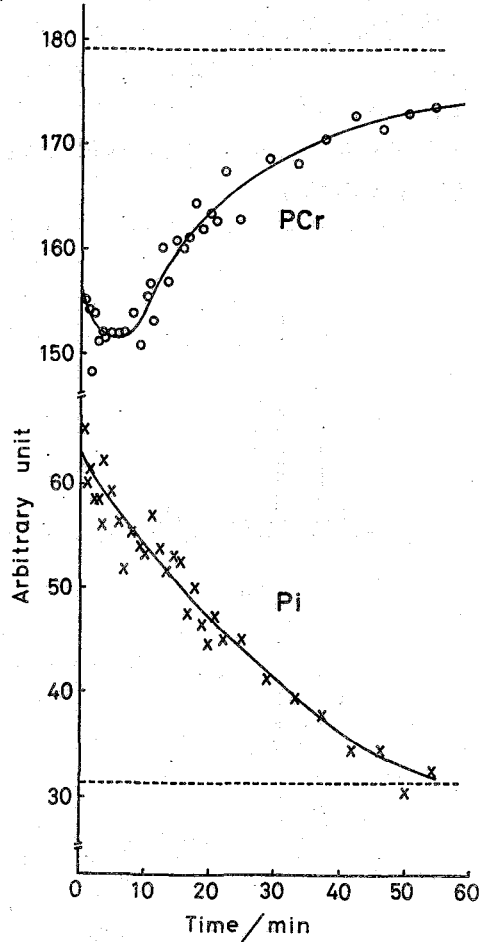


図5. 16秒間の強縮刺激の終了直後およびその後の回復過程におけるPCrおよびPiの変化。右表は32回(約1分)×16回、および128回(約4分)×16回の積算スペクトルから、図4と同じ方法で求めた。16秒間の強縮による ΔPCr および ΔPi は、5秒間の強縮によって生じたものよりも大きい。

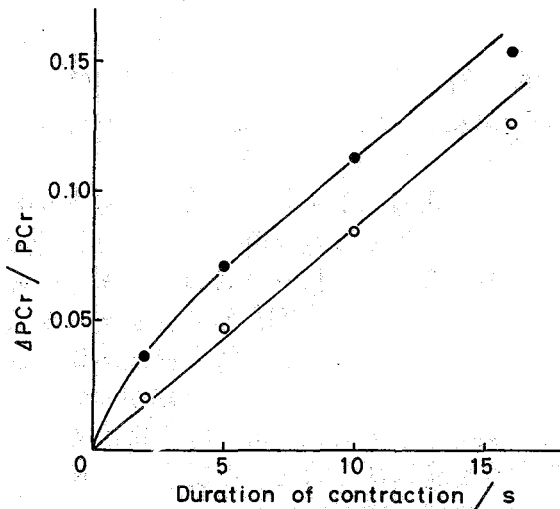


図6. 収縮の持続とクレアチン磷酸 (PCr) の分解量。○; 収縮後の PCr の変化を時間零に (収縮直後) 外挿して得た値。刺激直前の PCr 量に対する比として表わしてある。●; 収縮終了約5分後における、PCr 分解の最大量。したがって収縮後の PCr 分解も含んでいる。

16回収縮をくり返すことによる発生張力の変化を図3に示す。5秒間および16秒間の強縮刺激によるクレアチン磷酸 (PCr) および無機燐 (P_i) の変化とその回復の経過を図4及び図5に示す。 P_i レベルは収縮直後が最も大きく、直ちに回復が始まって減小する。一方 PCr は収縮後もさらに分解が続き、数分後に回復に移行する。このような収縮後の PCr の分解は、本研究において ^{31}P NMR の時間分解能が約10倍向上した結果はじめて見出されたものであり、またこれまでの筋の化学分析による研究によっても見出されていない。一方 P_i は収縮直後に最大値に達し直ちに回復が始まっている。したがって収縮直後の数分間は PCr 分解量と P_i 遊離量が一致し、この余分の P_i は収縮タンパク (ミオシン ATPase) の反応中間体から遊離されたものと考えられる。

図6は収縮後の PCr の変化を時間零に外挿して得た値、すなわち収縮直後の PCr 分解量 (○) と、PCr 分解の最大量 (●) について、それぞれの刺激前の PCr 量に対する比を、収縮時間に対して表わしたものである。収縮終了直後の PCr 分解量は収縮の持続とともに直線的に増大するのに対して、収縮後の PCr 分解を含む PCr 分解の最大量は、収縮の持続の初期に増大が大きい。以上の結果は Wilkie (Gilbertら、1971) によって示された、収縮によるエネルギー遊離 (熱と仕事) の和と PCr 分解との間の収支の不一致と関連していると考えられる。すなわち上にのべたエネルギー収支の不一致は、収縮後の PCr の分解によると考えられる。収縮後の PCr の分解は、収縮の活性化の過程でとくに収縮の初期に遊離されるカルシウムイオンを、筋小胞体が再び能動的に取り込む過程で生じるものか、あるいは収縮タンパクであるミオシン ATPase の反応中間体が、収縮後再び元の静止筋における状態に戻る過程で生じるもののいずれかであると考えられる。

(文献)

Dawson, M.J., Gadian, D.G. & Wilkie, D.R. (1977), J. Physiol. 267:703-735.

Gilbert, C., Kretzschmar, K.M., Wilkie, D.R. & Woledge, R.C. (1971), J. Physiol. 218:163-193.

Hoult, D.I., Busby, J.W., Gadian, D.G., Radda, G.K., Richards, R.E. & Seeley, P.J. (1974), Nature 252:285-287.

京都大学医学部脳神経外科学教室 〇安里 令人・半田 肇 同理
学部物理学教室 端 恒夫 三洋電機(株)中研 八田 純一

はじめに

独自の開発した mini-NMR imager の実験機を用い、ラット脳切片を用いた imaging を試みた。実験の目的は NMR 画像の特徴を検討すること及び神経病理学の分野での解析手段としての可能性を検討することにある。我々は 1978 年以降 氷の ^1H -NMR 緩和時間が生体組織の内部環境を物理学的に捉えた測定値であるという仮説に立脚し、生体機能を NMR によって解析する研究を続けてきた¹⁾。従来は切除組織を用いた in vitro 実験によるしかなかったが、近年各種の画像法が相次いで実用化され、生体内微小領域の緩和時間を精密に測定することになり、近い将来可能になると考えられる。NMR 画像法については臨床的な検討が行われ、実験室での基礎的な研究は一部を除いて報告をみる²⁾。我々は実験的脳浮腫モデルのラット脳の凍結損傷浮腫を対象に、NMR 画像について組織学的研究による結果を基礎にした検討を行なうと共に、従来 in vivo での検索が困難であった 血液脳関門 (Blood-brain barrier) 障害を NMR 画像により捉える方法を開発した。

＜方法・材料＞

α. 凍結損傷脳浮腫

体重 300~350 g 雄性 Wistar 系ラット 34 匹を用い Klatzos の方法に準じて凍結損傷を作成して浮腫モデルとした。脳浮腫 (brain edema) とは脳組織の水分含有量増加に伴う脳容積の拡大と定義される。脳組織の fluid compartments は ①血液：3-4% ②細胞内液：ca. 80% ③間質液：14-15% に大別され、更に脳を取りまく水として ④脳脊髄液がある。普通脳浮腫と称するのは ②、③が増加した場合で、①又は④からの水の移動を伴う。脳浮腫の成因は概念的に ①vasogenic edema (血管障害性) ②cytotoxic edema (細胞障害性) ③interstitial edema (間質性) に分けられるが、実際にはいくつかの成因が混在している。本研究で用いた実験モデルは vasogenic edema の代表的なもので、均質な edema を容易に作成できる。凍結損傷を加えた場合に直接冷却される脳の表面には不可逆的変化が生じるが、その直下では毛細血管壁の透過性が極めて亢進し、これが成因の本態と考えられている。Somnopentyl[®] で麻酔したあと右頭頂部に直径 2 mm の穿頭を行ない、液化空素で冷却した金属棒を用いて凍結損傷を作成した。従来は脳表を露出し直接冷却する方法が採られていたが、脳表又は脳内に出血し易いため、ごく薄く頭蓋骨内板を裁きその上から間接的に 30 秒間冷却した。この方法により何ら出血を伴わずしかも極めて均質な lesion を容易に作成できるようになった。ラットは腹腔内瀉血により殺し、湿潤箱内で厚さ 2 mm の冠状断脳切片を採取し、アフルル容器内に密封した。切片は冷氷保存し、採取後 60 分以内に撮像した。

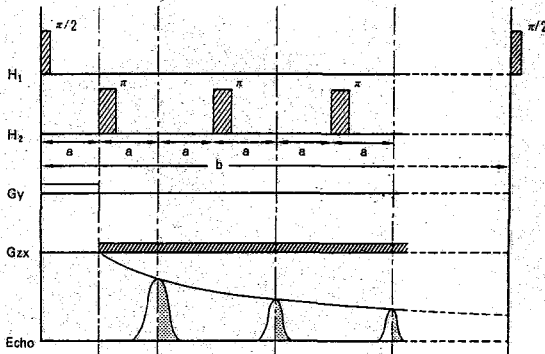
あとで れいじん・はんだ はじめ・はし つねお・はった じゅんいち

b. マンガン投与実験

緩衝試薬として用いられる $MnCl_2$ の水溶液は強い酸性で血漿を凝固させるため、静脈内に投与できない。Mn を化学的に EDTA と結合させた EDTA-2Na-Mn salt (Analytical grade, Nakarai chemical LTD, Kyoto) の水溶液は中性で静脈内に投与でき、肝・腎からの体外排泄が速やかである。予備実験で、我々の投与量では肝・腎・脳の蓄積が起らないことを確認した。脳切片採取2時間前に $0.1 \sim 0.2 \text{ mM} / 100 \text{ g body weight}$ を静脈内および腹腔内に投与した。

c. NMR imaging

Fig. 1.



撮像 program は Fig. 1 に示す。Y 軸方向のスライス面選定は実現されているので ($G_y = 0$) $2 \times$ 面を平行に脳切片を置いて planar projection を行なった。JEO 製電磁石で 47 KGauss (19.8 MHz) の静磁場を得、 0.1 Gauss/mm の線型勾配磁場を重畳して spatial labelling を行なった。Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence を用いて echo signal を測定したが S/N

比改善のための数個の echo を積算する必要があり、echo の安定化に留意した。1 回の pulse sequence で 8 個の echo を得、1 方向の投影につき 12 回 sequence を反復した。投影方向は 45° から 180° 回転し 45° 方向のデータから computed tomography (CT) のアルゴリズムを用い filtered back projection による reconstruction を行ない、spin density を計算し画像を得た。画像は 85×85 の matrix を 170×170 に補間して構成され pixel dimension は 0.2 mm^2 である。モニターテレビは 16 階調の白黒濃淡又は 16 色調のカラーで画像を表示した。パルス系列のパラメータは可変で、Window level 及び Window width を任意に設定できる。通常の撮像条件では 1 画像の撮像に 15 分要した。

<結果・考察>

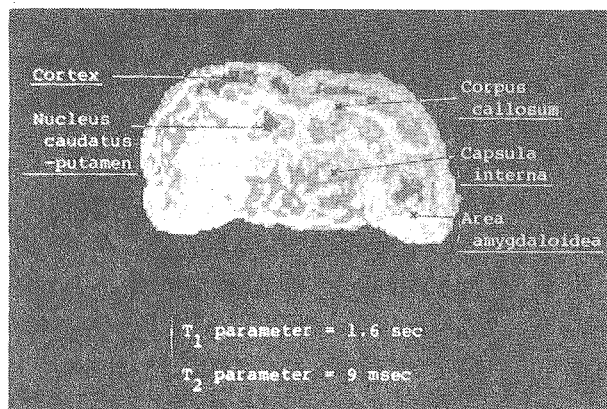
a. spatial and contrast resolution of the image

Table 1: Molar Concentration of ^1H in Brain (guinea pig)

Gray Matter: 64.66%		White Matter: 63.99%	
protein	7%	8%	8%
lipid	7%	17%	17%
water	86%	75%	75%

ラット脳切片の主要な内部構造がよく示された (Fig. 2)。脳組織で灰白質と白質のプロトン含有量はほぼ等しいが、白質では myeline sheath などを構成する phospholipids に含まれるプロトンが灰白質より 10% 多い (Table 1)。我々の場合 signal height を signal intensity とし、

るが、phospholipids などの aliphatic protons の NMR signal は broad であるため、sharp な water protons の signal だけが計測される。従って我々の NMR 画像は組織の含水量を反映していると考えられる。ラット脳梁は白質から成りその厚さは 0.2~0.4 mm であるが NMR 画像上明確に区別できる。phantom 実験で spatial resolution は 0.2 mm 以下である。だが、脳切片のように含水量が連続的に変化し、しかも内部構造が不均一な物体として良好な resolution が得られた。



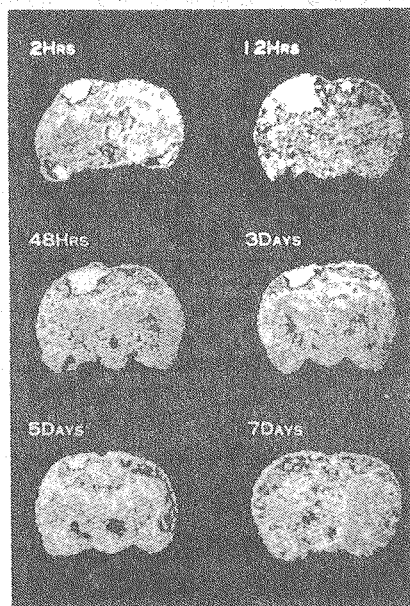
(Fig. 2)

Fig. 3 に示すように brain edema が明確に捉えられているが (Fig. 3 で各画像左上の白色の領域) normal cortex = grey matter と edematous cortex との含水量差は数%であり、画像構成の原理からすると Contrast が非常に強調されていると分かる。

spin echo の echo Train で最初の echo の信号強度は $I = A \cdot f(v) \cdot [1 - \exp(-b/T_1)] \cdot [\exp(-2a/T_2)]$... (1) と表わせる。I は信号強度、A は spin density、 $f(v)$ は血流するだけ無、左巨視的なプロトンの移動度、a, b は Fig. 1 に示すパルス系列の parameters である。eg (1) からわかるように、I は緩和時間の T_1, T_2 値により enhancement を受ける。即ち T_1 が短い T_2 が長いプロトンは、I が大きくなる。echo を積算する場合にもこの考え方が適用されると云い、 T_2 が長いほど信号が増強されると考えられる。(1) 式が示すように NMR 画像では spin density, relaxation time constants, pulse sequence の parameters が signal intensity を決めるため、画像の contrast を上げるには parameter a, b を適宜に選ぶ必要があり、edematous tissue では T_2 の延長が著明なため $a = 9 \text{ msec}$, $b = 1.6 \text{ sec}$ の条件で含水量差数%が信号強度差で 10 倍以上に enhance されたものと考えられる。

b. chronological sequences of the brain edema.

従来脳組織の含水量変化を検討するには、微小組織を切り出して乾燥重量法又は比重法で測定するしか無かった。しかしこれらの手法は熟練を要し、含水量分布の連続的な計測が困難なうえ、同一断片での経時的な観察は不可能であった。

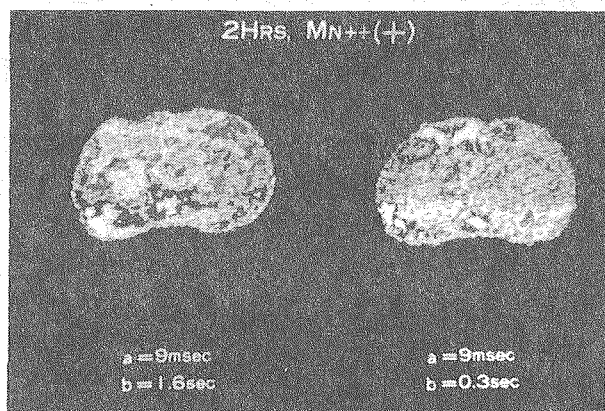


(Fig. 3)

NMR 信号強度は含水量の絶対値は与えられ、含水量の相対値も反映するため、脳浮腫など脳の水分量に変化する病態の観察は非常に有用である。Fig. 3 に示すように浮腫の時間経過が明確に捉えられた。病的に観て興味をひくのは、①ラットでは大脳皮質は灰白質だけから成り、白質が未発達である。このため従来考えられていたより早期に浮腫性変化が頂角に達することが分った。②浮腫は凍結損傷部から垂直に、くさび状に深部へ進行し側方への伸展は殆んど無いとされているが、その様子が含水量変化を反映した NMR 画像などでは、より捉えられた。③脳梁での変化は 24~48 時間と著明で、浮腫が脳梁内を側方へ拡散している様子が認められ、12 時間以降、この変化は消失した。④脳梁での変化が進行する時期、灰白質病変は既に根柢を始める などである。とりわけ、凍結損傷作成 10 分後に既に病変が灰白質の可成りな範囲に及んでいることが述べられ、これは含水量変化が始る以前に組織水の $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間を変化させるような物理化学的変化が進行することと示唆する所見と見られる。Window level を変えると Fig. 3 ごとく同質に見える浮腫像の内的信号強度勾配を知ることができ (Grading procedure) その結果によると浮腫は凍結損傷を印した脳表の直下から周囲に拡大していき、再び原発部分に収束していく過程が明確に捉えられた。このことは、浮腫源の漏出が凍結損傷局所の毛細血管壁から起り、圧勾配に従って周囲組織に拡がっていくという仮説⁽³⁾を支持する。

c. paradoxical enhancement with Mn-EDTA

血管障害性脳浮腫の本態は毛細血管壁の透過性亢進であるが、従来の画像法では



(Fig. 4)

分解能低く、しかるに明瞭にこれを示すことが出来るかった。

Mn-EDTA は $^1\text{H-NMR}$ の緩和時間を短縮するが、⁽⁴⁾ 正常の脳血管壁は Mn-EDTA を透過しない。

このためこれを投与して画像が変化する部分では血流脳関門が障害され、毛細血管壁の透過性が増進しているといえる。先に述べたように緩和時間の差を contrast 強く表現するに、parameter a, b の最適値を定むことが必要だが、Mn-EDTA のこの parameter 値による enhancement

に関して特異な効果を示すことが分った。我々はこれを Paradoxical enhancement 効果と名付けたが、この方法により NMR 画像で血流脳関門障害を探索することが可能になった (Fig. 4)。

(Ref.) (1) Asafo R, et al (1981) Brain and Nerve 33, 603-609. (2) Buonanno S. et al (1982) Radiology 143, 187-193. (3) Reulen HJ (1976) Dynamics of Brain Edema, 103-112.

(4) Cope FW (1969) Biophys J 9, 303-319. (5) Asafo R, et al (1982) Brain and Nerve, in press.

I. はじめに

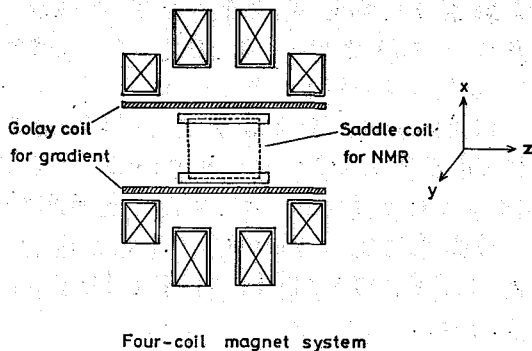
核磁気共鳴(NMR)は過去数十年間にわたる電子工学の急速な発展と相まってその実験技術的基礎が固まり、原子、分子、ガス、液体および固体におけるさまざまな研究に応用されてきている。特に物性物理、化学の分野においては、物質を微視的な立場より理解出来るという意味において、他に見られない有力な研究手段となっている。このNMRの特徴は、何と云ってもただ一称静磁場と弱い高周波磁場ののみを用い、測定系と極めて弱く相互作用する電波分光学の一手法であることにある。この特徴は、早くから、いわゆる無侵襲的な生体計測技術として、医用面においても注目され、古くは、血流測定、又、最近では、NMRを用いたトモグラフィー(NMR-CT)と、その臨床的应用が研究されてきている。特に、後者においては、人体の約60%内外を占める水分の分布を、二次元画像として正確に決定し、その組織内における生理的情報を得ようとする要求に研究の端を発していると思われる。しかし、それにもまして、悪性腫瘍における水分子を構成している水素原子核(プロトン、 ^1H)の核磁気緩和時間が正常の組織のそれに対し、2~3倍長いという興味あるDamadianによる報告に刺激されているように思われる。NMR-CTの技術開発は、主として欧米を中心に、研究が開始され、又最近では、ATPで代表される細胞活動にとり重要な代謝生成物を体内の特定部位から検出し、 ^{31}P の高分解能NMRスペクトルを得ようとするTMR(Topical Magnetic Resonance)の研究へと発展してきている。

我々は数年前より、このようなNMRを用いた生体研究、特に、NMR-CTの技術開発を念頭におき、東大総研、医用機器事業部と共同で研究を行ってきている。現在、ほぼ満足出来るNMR-CTの臨床機を完成させ、東大中央病院において、臨床データの収集及び評価を行っており、又、前述の核磁気緩和の問題に関連し、良性、悪性腫瘍の T_1 の系統的な研究と、早期胃癌組織をはじめとして、開始している。本講演では、これ等の研究を紹介し、将来の研究課題につき議論したいと考えている。

II. NMR-CT. (NMR-Computerized Tomography)

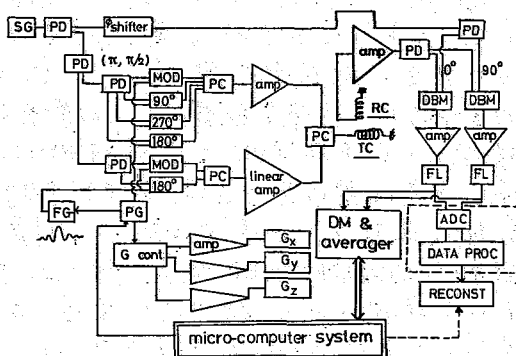
NMR-CTは、1970年代前半、特にLauterburによるその原理の提唱以来、数多くの研究グループにより種々の具体的技術が試みられてきており、現時点でも、その画質向上、映像化時間の短縮といった技術開発的研究が行われている。これ等については、我国でも既に多くの紹介があるので、ここでは、我々のグループが独自に開発した装置及びそれを用いて得た人体断層像を紹介する。実験室段階における小型空芯マグネットを用いたイメージ(やすおか ひろし)

シング方式の基礎研究から、我々が今回採用した方式は、選択励起法によるスライス面指定と投影再構成法とを組合わせた映像法である。マグネットはオート図に示すごとく4つのソレノイドコイルを同心円状に配置した常電導4コイルシステムで、内部にGolay式勾配磁場用コイルを配置してある。最大磁場は0.15 T、均一度は350 mm中×100 mmの空間で 2×10^{-5} である。NMRの励起、検出には鞍型コイルを用いてあり、装置全体の基本的なブロックダイアグラムをオ二図に示す。

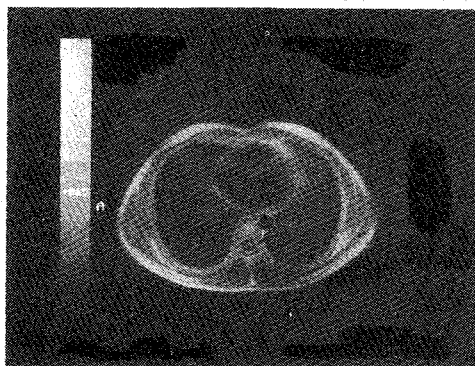


オ一図

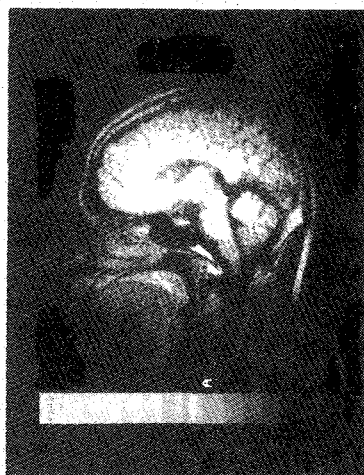
各方向からの投影スベクトルは、一方向の磁場勾配下における選択励起パルスによって決定されたスライス面内で、磁場勾配の方向を変化させ観測されるスピニエコー信号のフーリエ解析から得る。任意の方向からみた断層像は、これ等の投影スベクトルをフィルター補正逆投影法によって画像化されている。このようにして得られた例をオ三図に胸部断層像、オ四図に頭部矢状像として示す。いずれも測定時間は、2分、スライス面の厚さは約10 mm、空間分解能は2 mm程度である。更に組織内における T_1 の差異を強調する目的で、 180° パルスを最初に加え、その後、映像化した。いわゆる反転回復法を用いた頭部断層像の例をオ五図に示す。又、この方法において



オ二図



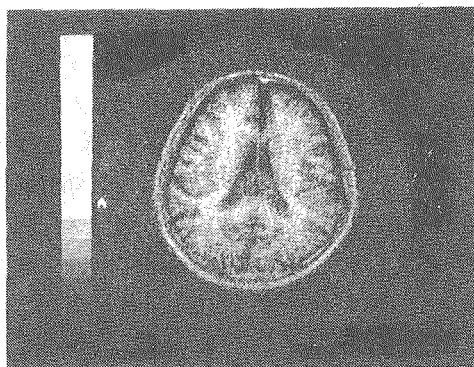
オ三図



オ四図

180°ハルス後の時間を変化させた画像を数枚とり各画素位置での T_1 の決定及びその値を用いて画像化したいわゆる T_1 イメージングも行われている。

以上の如く、我々は医用NMR-CT診断装置としての一つの方法を一応確立したと考えている。今後、実用面からの要求に従い、新方式の開発及びTM Rに関する技術開発にも着手する計画である。



Ⅲ. 悪性腫瘍における T_1

才五図

既に述べた如く、NMR-CTの医用面における重要なポイントは、悪性腫瘍の T_1 が正常組織と異っている点であろう。その原因の徹視的な説明は今になされていないと思われるが、NMR-CT画像の読影には、人体各組織の T_1 の系統的な研究が重要となる。我々は、その第一段階として、早期胃癌の粘膜組織につき T_1 の測定を行ってみた。いずれも、高知県立中央病院の協力を得、胃切除手術後、速やかに病巣及び周辺の正常粘膜組織を採取し T_1 を測定した。又、測定後、東京大学医学部病理学教室において詳細な病理学的組織検査を行った。結果を才五表にまとめてある。ここで行ったものは症例も少く、初歩的な段階であり、これから一般的な結論に言及するのは早計であるが、特に症例1で示されている如く、胃粘膜という限定された組織でもガン化すれば T_1 の延長が認められる。しかしながら、 T_1 の絶対値に対しては、正常組織においても個体差が随分あり、それのみからでは、診断の材料には、なりにくいように思われる。しかしながら、同一個体における T_1 の相対比較は、十分な判断材料になり得ると思われる。特に症例3のように難治性胃潰瘍の場合、殆んど T_1 に差が認められなかったことは、注目に値する。従って、NMR-CTにおいても T_1 を強調した映像法、或は、 T_1 イメージングそのものは、今後この方面の主流となり、

表 1 本研究で行った胃粘膜組織の病理学的検査結果と T_1 値

	Muscularis mucosae	Intestinal metaplasia	Inflammatory reaction	^1H nuclear relaxation time T_1 (Sec)
Case 1 (K. Y., 69, ♂)				
No. 1 mucosa, atrophic	(+)	(冊) I_2	(-)	0.47 ± 0.02
No. 2 Group 2~3 mucosa	(+)	(+) I_1	(-)	0.37 ± 0.03
No. 3 tubular adenocarcinoma (Group 4~5)	(-)	(-) I_0	(-)	0.64 ± 0.02
No. 4 mucosa, atrophic	(+)	(冊) I_2	(-)	0.38 ± 0.03
Case 2 (H. I., 54, ♀)				
a fundic gland mucosa	(-)	(+) I_1	(+)	0.81 ± 0.02
b tubular adenocarcinoma (Group 5)	(-)	(-) I_0	(-)	0.92 ± 0.02
c mucosa	(+)	(+) I_2	(+)	0.81 ± 0.02
Case 3 (Y. O., 66, ♂)				
No. 5 cardiac gland mucosa	(+)	(+) I_1	(+)	0.65 ± 0.03
No. 6 cardiac gland mucosa (ulcer edge regeneration)	(-)	(+) I_1	(+)	0.58 ± 0.05
No. 7 fibrous tissue (ulcer bed tissue)	(-)	(-) I_0	(+)	0.67 ± 0.05
No. 8 cardiac gland mucosa	(+)	(-) I_0	(+)	0.61 ± 0.05

* 腸上皮化生の程度分類は平福による¹⁾

特に後者における解像度の向上、画像化時間の短縮が期待される。

Ⅳ. おわりに。

最近の医療技術の発展は疾患の早期発見、早期治療さらには予防医学という立場より、X線、

放射性同位元素、超音波や種々の光学的方法などを用いたより高度な総合医療技術の確立へと進んでいる。その中で、特に最近注目されている NMR-CT も現在に至って、その基礎的技術は、確立されようとしている。X 線 CT と比較しても画質そのものは見劣りがなくなり、X 線 CT では認められない新しい情報が医学の各方面において発見されようとしている。これ等の技術は今後更に改良され、より高度な技術が確立されていくと思われる。特に NMR-CT と TMR を組合わせたもの、或は、X 線 CT と組合わせるとか種々の総合イメージング技術の開発も盛んになると思われる。しかしながら、一方において人体組織の NMR による "Characterization" は、今だ系統的な研究が少いように思われる。例えば生体内におけるプロトン T₁ の問題も、系が基本的に不均一であるが故に、その理論的解明は、大変困難なように思われる。今後、臨床、病理学者を含めた、系統的な研究が望まれる。NMR-CT が医学診断に全く新しい情報を提供するものとして、確立するには、映像法を含めた装置の技術的な問題より、臨床におけるソフトウェアの確立が重要であり、この意味で、NMR による生体組織の "Characterization" は避けて通れない問題である。

(大阪医大) 村上政隆 今井雄介 (京府医大) 瀬尾茅輝 森本武判
(生理研) 巨 弘

【まえおき】

イヌ顎下腺は刺激により大量の唾液分泌を行い、同時にエネルギー代謝が亢進する。唾液分泌の本態はイオン能動輸送に伴う浸透流と考えられ、分泌時に増加した代謝エネルギーはイオン能動輸送系に主としてATPの形で供給され、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ などのイオンポンプで消費されると予想される。このことは種々の上皮膜輸送を行う器官・組織(腎、腸、など)について共通の性質であり、中でもイヌ顎下腺は水分分泌を主機能とするコンパクトな器官で扱いやすく、産熱測定やガス代謝(O_2 消費、 CO_2 産生)測定によって分泌のエネルギー代謝が研究されてきた。上皮膜輸送を供給エネルギーから理解するためには、静止時および分泌時にわたる灌流イヌ顎下腺のリン化合物の動態を無侵襲計測により明らかにする必要がある。

今回30mm中広径試料管に灌流イヌ顎下腺を設置し、灌流(静止時、灌流停止時、アセチルコリン投与による分泌刺激時)について ^{31}P -NMR法によって腺組織のリン化合物の変化およびpHを測定したので報告する。

【実験方法】

イヌは10~14 kgのものを、ナオペンタール麻酔下で顎下腺を灌流できるように手術した。灌流液はPVP(ポリビニルピロリドン)3%を腸管浸透圧維持のために添加したKrebs-Henseleit Ringer液(Na^+ 151, K^+ 4.3, Ca^{2+} 2.5, Mg^{2+} 1.0, Cl^- 136.3, HCO_3^- 25, H_2PO_4 1.0, glucose 5 mM, pH 7.5, PVP 3%)を95% O_2 と5% CO_2 の混合ガスで飽和させ用いた。刺激にはACh(アセチルコリン)を $5 \times 10^{-6}\text{M}$ の濃度で上述の灌流液に溶解し側管より2 ml 灌流系に流した。灌流は定流ポンプを用い、10 ml/分の流速で駆動した。灌流停止は定流ポンプを止め、これを行った。

灌流腺は図1に示したように、支持具を用い、30mm中の試料管に設置した。分泌唾液は導管に挿入したカニコーレを介し装置外で分泌量をモニターした。静脈よりの流出液は試料管内の一定レベルに設置したチューブで吸引し装置外に排除し、試料管は常に一定レベルの溶液で満たされるようにした。

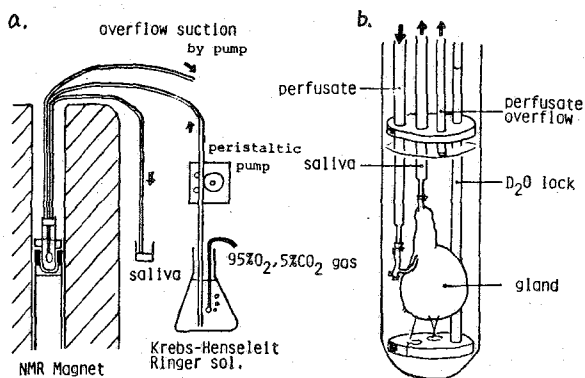


図1. a. イヌ顎下腺の灌流とNMR装置への設置
b. 灌流顎下腺のNMR試料管(30mm中)への装着

み さら かも まさたか、 いまい ゆうすけ、 せお よしてゐる、 もりもと たけとし、
めたり ひろし、

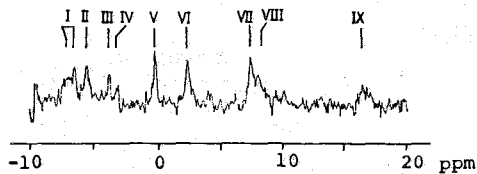


図2. 灌流状態のイヌ膵下腺 ^{31}P -NMR スペクトラム, 256回積算で約6分要した。

積算し, 6分または11分要した。 ^1H デカップリングは用いなかった。FIDには指数関数的重み関数 ($LB=20$) をかけた後フーリエ変換を行った。くり返し時間には1.36秒かけたが, この間にクレアチン燐酸の核のスピン-格子が完全に緩和するので吸収線の強度にはゆがみが生じていない。

定量は各吸収のピークの面積から行った。図2に灌流状態で得られたイヌ膵下腺の ^{31}P -NMR スペクトラムを示す。ピークIは sugar phosphate もしくは AMP, ピークIIは 無機燐酸 (-6.0 ppm), ピークIIIは glycerol-3-phosphoryl ethanolamine (-3.7 ppm), ピークIVは glycerol-3-phosphoryl choline (-3.2 ppm), ピークVはクレアチン燐酸 (0 ppm), ピークVIは γ -ATPと β -ADP (2.6 ppm), ピークVIIは α -ATPと α -ADP (2.6 ppm), ピークVIIIは NAD^+ と NADH (8.4 ppm), ピークIXは β -ATP (16.6 ppm) と同定した。

また, pK 値を6.65として, ^{31}P -NMRスペクトラム上の無機燐酸の化学シフトより組織の pH をもとめた。

灌流液は室温 (23°C) で流し, NMR測定も室温 (23°C) で行った。時間経過の追跡は自動測定で行った。

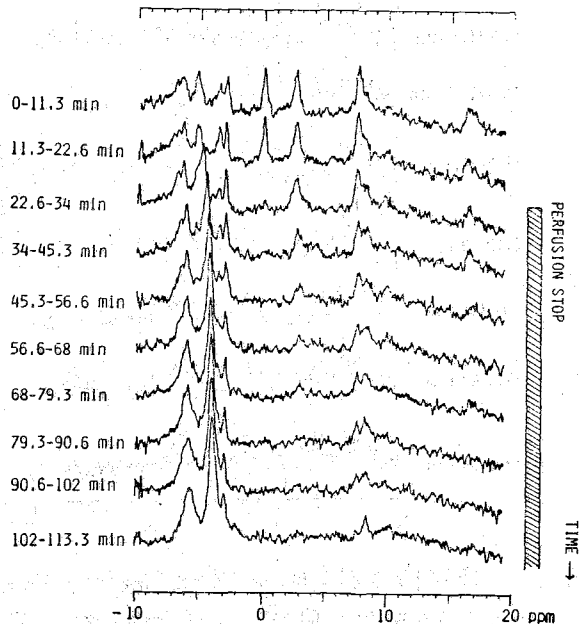


図3. 灌流停止によるイヌ膵下腺の ^{31}P -NMR スペクトラム変化。500回積算で約11分要した。

[結果]

1. 灌流停止による変化

灌流を開始して 20分~40分でスペクトラムは落ち着き静止時のリン化合物の測定を行った。ATPは平均0.43mM (9 glands), クレアチンリン酸は平均0.62mM (9 glands)であった。この時点より長時間灌流を停止して変化をみたのが図3と図4である。クレアチンリン酸のピークは灌流停止によってすみやかに低下し0になった。ATPはゆるやかに低下し約1時間で消失した。その後、大きな変化のなかったADPも消失した。これらの変化と平行して無機燐の吸収が増加し、ピークは高磁場側へシフトして、無機燐酸の増加と組織の酸性化を示した。pHは指数関数的に低下し、約1時間で1 pH単位低下し、約2時間で安定した。

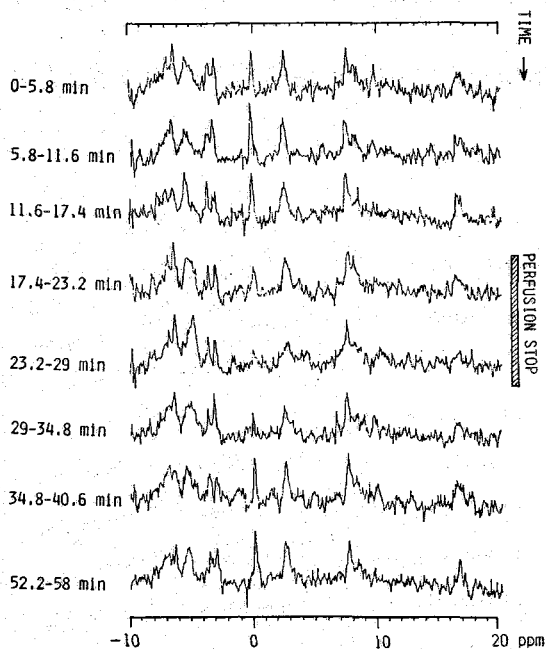


図5. 一時的灌流停止による鼠顎下腺³¹P-NMRのスペクトラム変化と回復, 256回積算で6分要した。

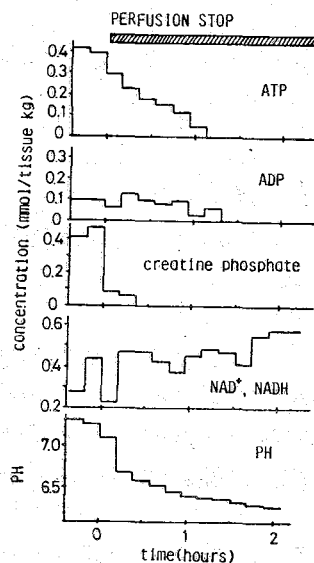


図4 灌流停止による鼠顎下腺の³¹P-NMR変化より得られた、リン化合物およびpHの経時変化。

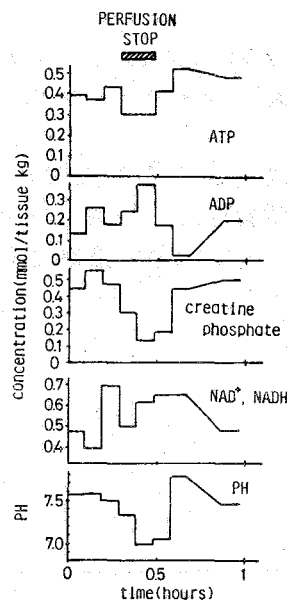


図6. 一時的灌流停止によるリン化合物とpHの経時変化。

一時時に灌流を止め再開した時の変化を図5と図6に示した。停止時ATP, クレアチン燐酸の低下があり, pHは酸性化した。ADPは増加した。灌流を再開するといずれも静止レベルに戻った。

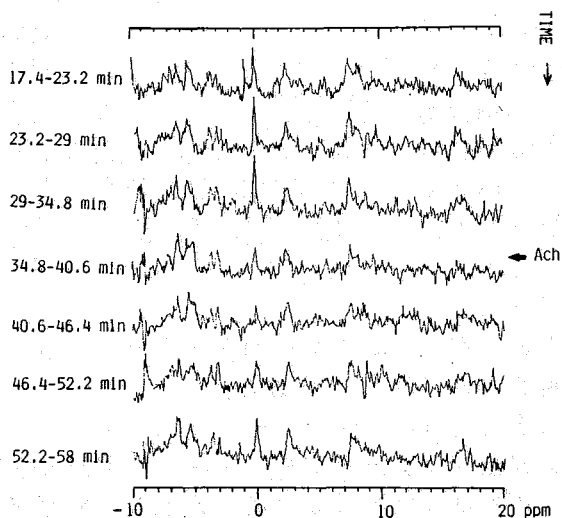


図7. $5 \times 10^{-6} M$ ACh投与により分泌を誘発した時の灌流イヌ膵下腺の 3P -NMRスペクトラム変化, 256回積算, 約6分要した。

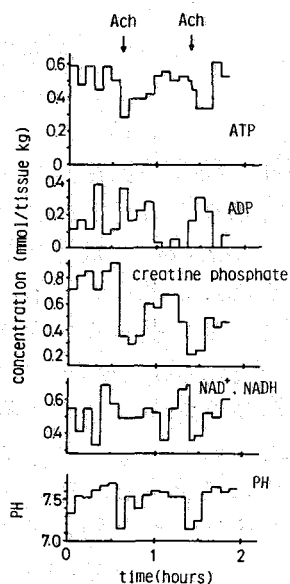


図8. $5 \times 10^{-6} M$ ACh投与により分泌を誘発した際の灌流イヌ膵下腺のリン化合物およびpHの経時変化。

2. ACh (アセチルコリン) $5 \times 10^{-6} M$ 投与による変化。

ACh ($5 \times 10^{-6} M$) 2 ml を灌流チューブの側管より注入すると唾液が分泌された。このAChの濃度は灌流イヌ膵下腺ではOptimalな値であり, 1回目の刺激で約0.6 ml分泌した。この時分泌開始30秒で0.3 ml分泌した。30分後再びAChで刺激すると0.7 ml分泌し, 初期30秒に0.25 ml分泌した。この時の 3P -NMRの変化を図7に, 2回の刺激を通してのリン化合物とpHの経時変化を図8に示した。

分泌に対応してATPは約50%減少, クレアチン燐酸は約70%減少したが, ADPは増加した。クレアチン燐酸の変化が最も大きく, 分泌時に急速に低下し, 静止レベルへの復帰も迅速であった。NAD⁺とNADHの変化は不明瞭であった。

組織pHは分泌時一過性に低下(約0.4 pH単位)し, また静止レベルに戻った。

(おわりに) 灌流イヌ膵下腺を用いて 3P -NMR測定を行いつつあるが灌流技術(手術操作, 十分なO₂供給法)がまず問題になるが今回はcontrolとしての灌流系が完成された。現在, 灌流液組成を変えての実験等を経営中である。

(京都府立医科大学 オー生理)

○西川弘恭, 吉崎和男, 田中忠蔵

はじめに

リン脂質極性部の ^{31}P -NMRにおいて、その共鳴線の形は ^{31}P の *chemical shift anisotropy* と ^{31}P - ^1H *dipolar interaction* に依存する。後者は ^1H -decouplingにより除去されるが、前者はリン脂質の存在状態によりその表れ方が異なる。通常リン脂質の *chemical shielding tensor* 値は三方向で異なるが、リン脂質の種類による差異は小さい。 *chemical shielding tensor* は $\sigma_{\parallel}$: リン脂質の回転軸方向と、 $\sigma_{\perp}$: それに垂直な方向によっても表わされる⁽¹⁾。扁平な方向性をもつ二重層リン脂質膜の場合、回転軸と静磁場のなす角を δ とすると、共鳴位置は

$$\nu(\delta) = (g_N \beta_N H_0 / h) (1 - \sigma_{\perp} \sin^2 \delta - \sigma_{\parallel} \cos^2 \delta)$$

と表わされる。一方、円筒状 *hexagonal phase* のリン脂質液晶の場合、円筒軸と静磁場のなす角(θ)が 0° では δ は全て 90° 、 θ が 90° では δ は種々の角度に分散し、共鳴位置は

$$\nu(\theta) = (g_N \beta_N H_0 / h) (1 - \sigma_{\perp} \cos^2 \theta - \frac{1}{2}(\sigma_{\parallel} + \sigma_{\perp}) \sin^2 \theta)$$

と表わされる。これらは *chemical shift anisotropy* による人工膜中リン脂質の状態解析に用いられている。今回、上記理論・事実をミエリンに適用し、その構成リン脂質(表1)の方向性と動態を解析した。

試料と方法

試料として、神経線維をうづまき状にとりまくミエリンをもつ有髄神経線維の束である脊髄白質を用いた。脊髄白質では神経線維が大部分一方向性に走る。調製は、ウシ脊髄から硬膜と軟膜を除去し、脊髄白質部分のみを一辺7mmの立方体に切り、図1-Aのごとく、各小片の神経線維走向を揃え、10mm Φ NMR試料管に入れた。これら操作は全て氷温で行われた。また白質を破砕し、ガラス管(内径: 1mm, 長さ: 6mm)に充填し、図1-Bに示したように、10mm Φ NMR試料管に入れた。白質中の水可溶性物質の抽出は *perchloric acid* により行い、リン脂質の抽出は *chloroform-methanol* により行った。緩衝液として *Krebs-Ringer* 氏溶液-*HEPES*-*NaOH* を

表1. ウシ白質の脂質組成⁽²⁾

	weight%/lipid
cholesterol	28.1
glycolipid	27.6
phospholipid	43.0
phosphatidyl ethanolamine	17.4
ethanolamine-plasmalogen	14.1
phosphatidyl choline	10.9
phosphatidyl serine	6.5
phosphatidyl inositol	0.8
sphingomyelin	7.1

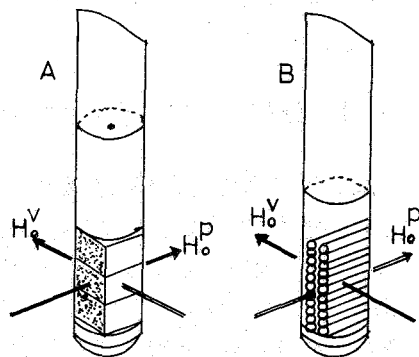


図1. A: NMR試料管中のウシ脊髄白質小片の神経線維走向と静磁場方向。 H_P^0 は両者は平行、 H_V^0 は両者は直交することを示す。B: 破砕された脊髄白質を充填したガラス管と静磁場の方向関係をAと同様に示す。

にしかわ ひろやす, よしざき かずお, たなか ちゅうぞう

pH = 7.3 で用いた。装置は JEOL PFT 100 NMR (^{31}P で 40.29 MHz) で、通常 *proton decoupling* を用いた。スペクトル幅は 5 kHz, データポイントは 4096 であった。スペクトルは 500 回または 200 回 FID 加算平均毎に FT, 2000 回加算平均で得られた。測定温度は室温 (24°C) であったが、高温は JNM-VT-3C で制御された。T₁ 測定は 180°-τ-90° パルス系列, T₂ 測定は 90°-τ-180° パルス系列で行われた。化学シフトの基準として正リン酸を用いた。

結果と考察

1) ミエリンリン脂質の方向性。(a) 白質小片に対し図 1-A に示したように、静磁場が H₀ 方向に位置する場合、図 2-A の a, b, c の共鳴線をどうスペクトルが得られ、一方、H₀ 方向に位置する場合、図 2-B の a, b の共鳴線をどうつが、c のピークが平坦となり、0 ppm より低磁場側の信号強度の増加を示すスペクトルが得られた。しかし、A, B 両スペクトルの面積は等しかった。(b) *perchloric acid* による白質内水溶性リン化合物抽出液の ^{31}P -NMR スペクトル (図 3) では図 2 の a, b に対応する共鳴線が見られ、化学シフト値より、それらは無機リン酸および同定されないリン化合物によると考えられた。(c) ガラス管中の破砕された白質のスペクトルを図 1-B に示したガラス管の長軸に関して 2 方向で観測し、図 4-A, B に各々 H₀

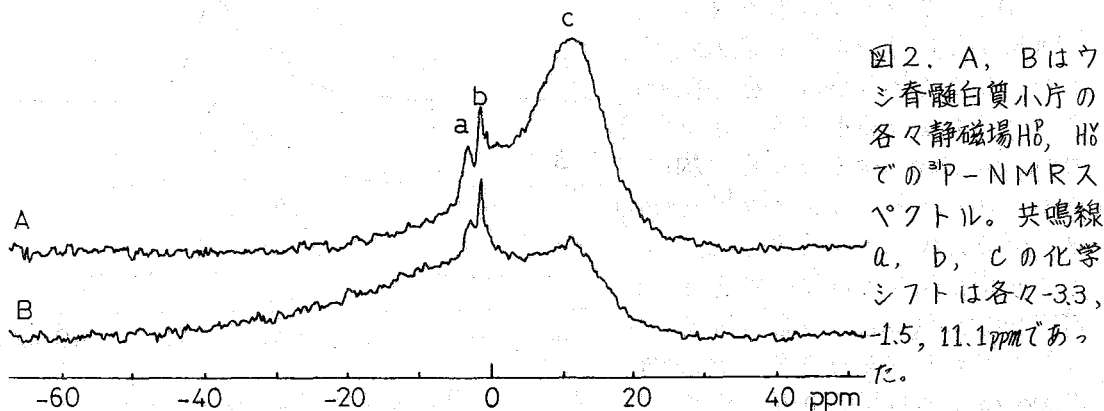


図 2. A, B はウシ脊髄白質小片の各々静磁場 H₀, H₀ での ^{31}P -NMR スペクトル。共鳴線 a, b, c の化学シフトは各々 -3.3, -1.5, 11.1 ppm であった。

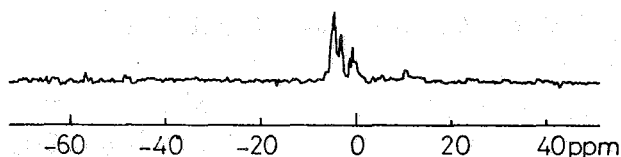


図 3. 脊髄白質中の水溶性リン化合物の *perchloric acid* 抽出液 (pH 7.3) の ^{31}P -NMR スペクトル。

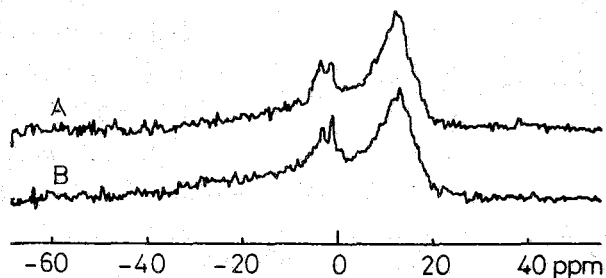


図 4. A, B は図 1-B の各々静磁場 H₀, H₀ での ^{31}P -NMR スペクトル。共鳴線の位置は低磁場側より、-3.7, -1.5, 12.2 ppm であった。

^1H によるスペクトルを示した。これらスペクトルに図2-Aのa, b, cに対応する共鳴線がほぼ同じ共鳴位置に見られた。以上の事実より、図2-Aの共鳴線a, bは白質中の水溶性リン化合物によるものであるが、線幅の広い共鳴線cは表1に示したほぼ等しいchemical shielding tensorをもつ白質のリン脂質によるもので、共鳴位置は扁平多重層リン脂質膜の $\delta = 90^\circ$ の場合⁽³⁾にほぼ一致する。ガラス管中の白質のスペクトルの形は磁場中での試料の位置的变化では変らないことを示し、故に図2-A, Bのスペクトルの形の変化は磁場中での試料の位置的变化によるものではなく、 ^{31}P のchemical shift anisotropyの角度依存性によるものであるといえる。図2-Bの0~11 ppmが平坦となったのは δ が0~180°に分散し、そのためミエリンリン脂質の共鳴位置が分散したためである。故に、ミエリンリン脂質は多重層リン脂質膜またはhexagonalなリン脂質液晶と同様に方向性をもって配列しているといえる。

2) 温度のミエリンリン脂質の方向性への影響。図5に24°C, 50°C, 80°Cでのスペクトルを示した。温度の増加に伴い、11.1 ppmの共鳴線は低くなり、-3.5 ppm付近では信号強度の増加がみられた。これはリン脂質の熱振動の増強によりその方向性が乱れ、chemical shift anisotropyによるchemical shiftが見られなくなったためである。図5-Cのスペクトルが-3.5と11.1 ppmにピークをもつのはミエリン構成リン脂質間の転移温度のバラツキによると考えられる。

3) ミエリンリン脂質のNOE。
 ^{31}P のNOEはリン脂質で最大2.2であるが、種々の緩和機構や分子運動により、その値は減少する。リン脂質のaqueous dispersionでNOEは約1.4である。図6-A, Bに各々 ^1H -decoupling on, offのスペクトルを示した。これらより得たNOEは1.24であり、比較的aqueous dispersionの値に近く、ミエリン中のリン脂質のPはaqueous dispersionに近い ^1H との相互作用をもつことを示している。

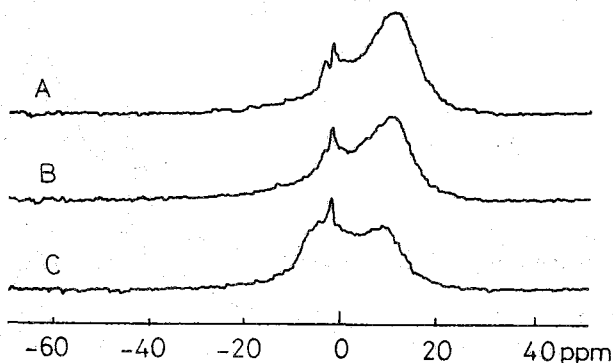


図5. 白質に対し H_0 方向の磁場でA, B, C各々24°C, 50°C, 80°Cで測定した。

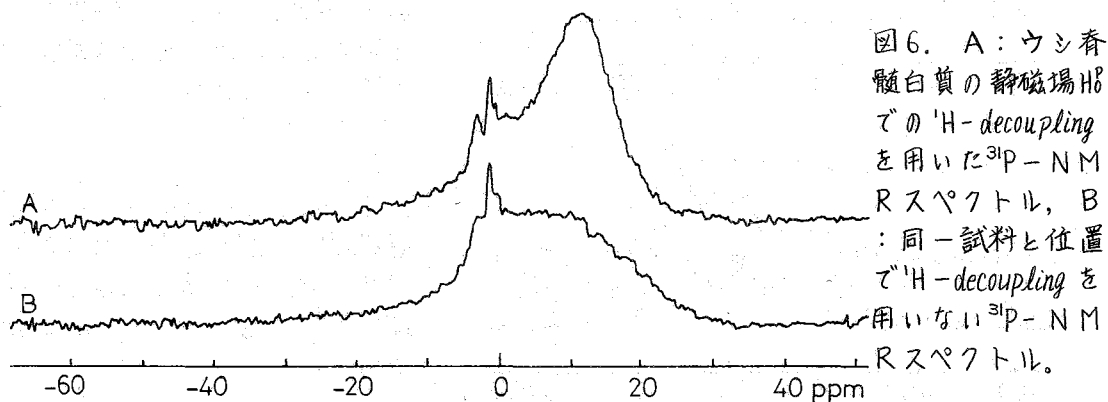


図6. A: ウシ脊髄白質の静磁場 H_0 での ^1H -decouplingを用いた ^{31}P -NMRスペクトル, B: 同一試料と位置で ^1H -decouplingを用いない ^{31}P -NMRスペクトル。

4) ミエリシンリン脂質の緩和時間。図7に 180° - τ - 90° パルス系列による T_1 測定、図8に 90° - τ - 180° パルス系列による T_2 測定を示し、各々 $T_1 = 0.40 \text{ sec}$, $T_2 = 1.2 \text{ msec}$ を得た。一方 11.1 ppm の共鳴線の線幅は 542 Hz (13.5 ppm)であり、白質よりの抽出リン脂質多重層ミセルaqueous dispersionの線幅は 664 Hz (16.5 ppm)であった。これらより、 T_1 の線幅への寄与はほとんどなく、 T_2 の寄与は 265 Hz で、線幅 542 Hz との差はリン脂質のchemical shift anisotropyと δ の 90° からのバラツキによると考えられる。

おわりに、試料を提供して下さいました京都市食肉衛生検査所に心からの謝意を表します。

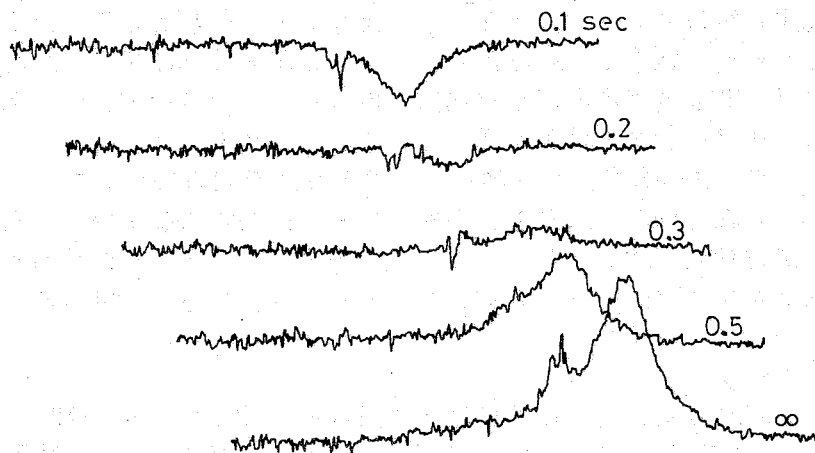


図7. 白質に対しH₈磁場方向での T_1 測定。右肩にてを示した。

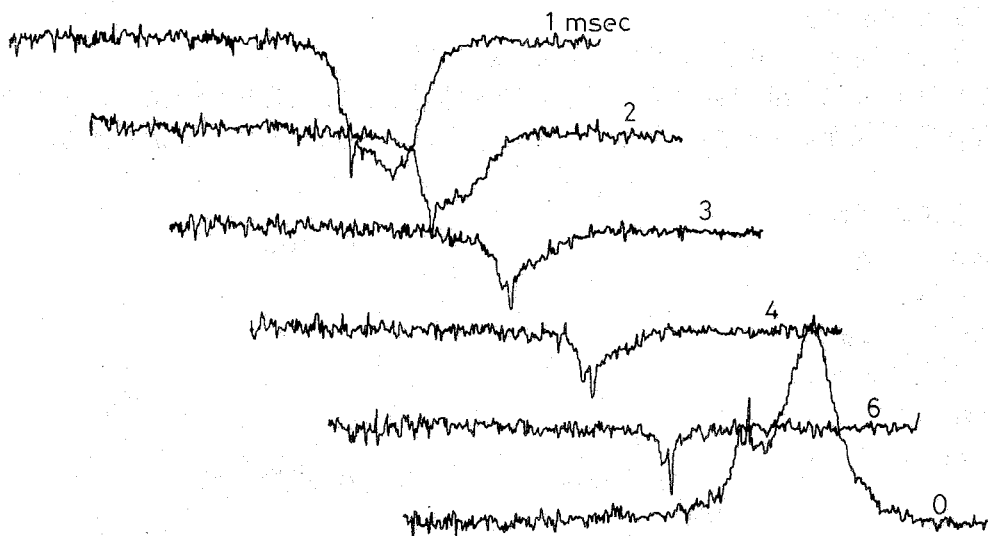


図8. 白質に対しH₈磁場方向での T_2 測定。右肩にてを示した。

文献

- 1). J. SEELIG, Biochem. Biophys. Acta, 1978, 515, 105-140
- 2). "Basic Neurochemistry", 2nd Ed. ed. by G.J. Siegel et al., Little Brown and Co., Boston, p74, 1976
- 3). J. SEELIG et al., Biochemistry, 1976, 15, 5199-5204

(京府医大, 生理研*)。吉崎知男, 瀬尾孝輝, 西川弘恭,
森本武利, 亘 弘*

〔序〕

生体組織の ^{31}P -NMRスペクトルを用い, その生理機能と代謝や細胞内pHの研究が活発に行われている。我々もすでにカエル筋肉などの ^{31}P -NMRスペクトルを測定し, エネルギー代謝や, 細胞内pH, および細胞内拡散係数の測定を報告してきた。さらに ^1H -NMR法に選択的水飽和法を用いれば, 筋肉などの ^1H -NMRスペクトルが得られ, 脂肪や乳酸の検出も可能となることを報告した。

一方, 生体組織の ^{13}C -NMRスペクトルの有用性については, 植物組織におけるKainosho *et al.* や三森らの報告, ならびに動物組織におけるYoshikawa *et al.* の報告が本討論会ですでになされている。今回, 我々はカエル筋肉の ^{13}C -NMRスペクトルおよびその同定について報告するとともに, ^{31}P および ^1H -NMRスペクトルとの関連についても報告する。

〔方法〕

試料は食用ガエルの下肢筋肉を用いた。 ^{31}P および ^1H -NMRスペクトルの測定にはJEOL PFT-100 NMR (^{31}P : 40 MHz, ^1H : 100 MHz)を用い, 試料管は $\phi 10\text{mm}$ である。一方, ^{13}C -NMRスペクトルの測定にはBruker WM-360 WB (^{13}C : 91 MHz)を用い, 試料管は $\phi 15\text{mm}$ を用いた。測定は室温(24°C)で行った。

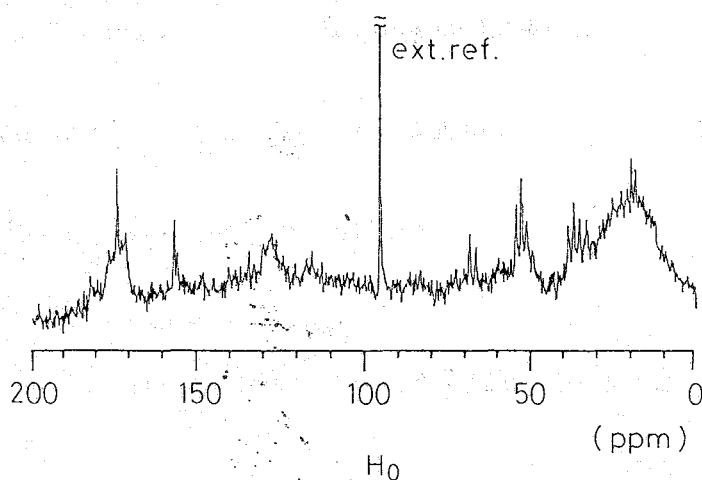
〔結果および考察〕

1. カエル筋肉の ^{13}C -NMRスペクトルとその同定。

カエル筋肉の ^{13}C -NMRスペクトルを11時間積算した結果をFig. 1に示す。スペクトルは幅の広い成分とその上に重なった幅の狭い高分解能スペクトルから成る。

Fig. 1. カエル筋肉の
 ^{13}C -NMRスペクトル (11 hr. 積算)。

ext.ref. は $\phi 5\text{mm}$ に入れた CCl_4 であり, 95.4 ppmとした。 ^1H decoupling は行っていない。



よしざき かずあ, せお よしてゐる, にしかわ ひろやす, もりもと たけとし,
ぬたり ひろし

このスペクトル (Fig. 2-a) の同定を行うため、モデル溶液の ^{13}C -NMR スペクトルを Fig. 2-b 以下に示す。Fig. 2-b はウサギ腸脾筋から作成したグリセリン筋の ^{13}C -NMR スペクトルであり、幅の広い成分は検出できたが、幅の狭い高分解能成分は、グリセリン筋では細胞内可溶成分が流出しているため、検出できなかった。従って、カエル筋肉のスペクトルの高分解能成分は細胞内可溶成分に含まれる低分子に由来すると考えられる。幅の広い成分は構造蛋白や脂質に由来し、化学シフトから 20 ppm 付近はメチル、メチレン基、130 ppm 付近は $\text{C}=\text{C}$ 基、175 ppm 付近は $\text{C}=\text{O}$ 基に由来すると考えられる。幅の狭い高分解能成分の同定を行うため、モデル溶液として細胞内に多量に存在する乳酸、クレアチン磷酸、カルノシン、グリコーゲン、グルコース、ATP およびクレアチニンなどの ^{13}C -NMR スペクトルを測定し、一부를 Fig. 2-c~f に示した。これらの化合物のスペクトルと比較することにより、カエル筋肉の高分解能スペクトルのうち、20 および 70 ppm 付近は乳酸、35 および 55 ppm 付近はクレアチン (磷酸) とカルノシン、さらに 155 および 175 ppm 付近はクレアチン磷酸に主に由来すると考えられる。しかし、ATP やグルコースの共鳴線は得られなかった。

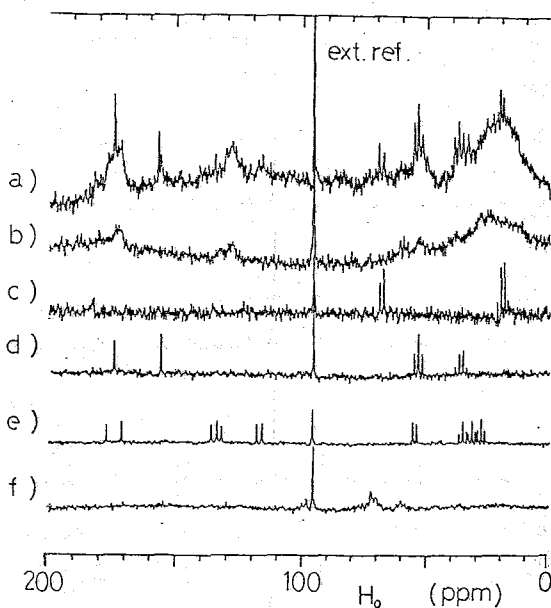


Fig. 2. カエル筋肉およびモデル溶液の ^{13}C スペクトル

- a) カエル筋肉
- b) ウサギ腸脾筋のグリセリン抽出筋
- c) 55 mM 乳酸
- d) 100 mM クレアチン磷酸
- e) 100 mM カルノシン
- f) 100 mM 単位のグリコーゲン

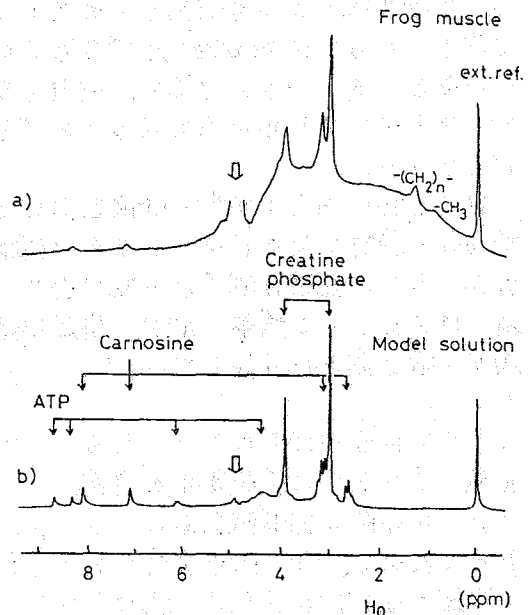


Fig. 3. カエル筋肉およびモデル溶液の ^1H -NMR スペクトル (選択的水飽和法)

- a) カエル筋肉
 - b) モデル溶液 (30 mM クレアチン磷酸, 14 mM カルノシン, 5 mM ATP)
- 矢印は水照射を示し、ext. ref. は 10 % TMS である。

以上の様に ^{12}C -NMRを用いるとカエル筋肉のクレアチン(磷酸)、乳酸、カルノシンの検出が可能となるが、 ^{12}C の自然存在比が小さいため(1.1%)、検出感度が悪く、積算に時間を要する。

2. カエル筋肉の ^1H および ^{31}P -NMRスペクトル。

カエル筋肉の ^1H および ^{31}P -NMRスペクトルについては本討論会ですでに報告してきたので簡単に述べる。 ^1H -NMRスペクトルでは選択的水飽和法を用いると、水の巨大な共鳴線を消すことができ、Fig. 3aに示す様に、約15分の積算で幅の広い成分と、その上に重なった幅の狭い高分解能スペクトルが得られる。この高分解能スペクトル上の共鳴線はFig. 3bのモデル溶液の共鳴線と比較することにより、クレアチン(磷酸)、カルノシンさらにext. ref. 近くの高磁場側の乳酸に由来する。

一方、 ^{31}P -NMRスペクトルではFig. 4に示す様にATP、クレアチン磷酸、無機磷酸の共鳴線が得られ、また解糖系の中間体である糖磷酸エステルが無機磷酸の低磁場側に検出される。ところでFig. 4に示した ^{31}P -NMRスペクトルは30分間の積算を行ったものであるが、測定条件の改善により、たとえば、zero filling 法、RF パルスの繰り返し時間の短縮とホモスプイールの採用、ならびにwindow 処理などを最適に行うと、5~10分の積算で、S/N比の良い ^{31}P -NMRスペクトルが得られることが明らかとなった。

以上の様に ^1H および ^{31}P -NMRを用いると、約10分の積算で前者ではクレアチン(磷酸)、カルノシン、乳酸の測定が可能であり、後者ではクレアチン磷酸、ATP、無機磷酸、糖リン酸の測定が可能となる。

3. カエル筋肉における ^{31}P 、 ^1H および ^{12}C -NMRスペクトルの経時変化の追跡。

カエル筋肉をNMR試料管にリンゲル液とともに入れて、 ^{31}P -NMRスペクトルの変化を追跡するとFig. 4に示す様に、嫌気的条件下のため、クレアチン磷酸の減少と、無機磷酸の増加がみられる。この時、ATPはほぼ一定に保たれる。従って静止筋におけるエネルギー消費により、細胞内のエネルギー貯蔵であるクレアチン磷酸が消費される。この時、無機磷酸の共鳴線が若干、高磁場側に移動しており、細胞内pHの酸性化が生じている。

^1H -NMR で同様にカエル筋肉のスペク

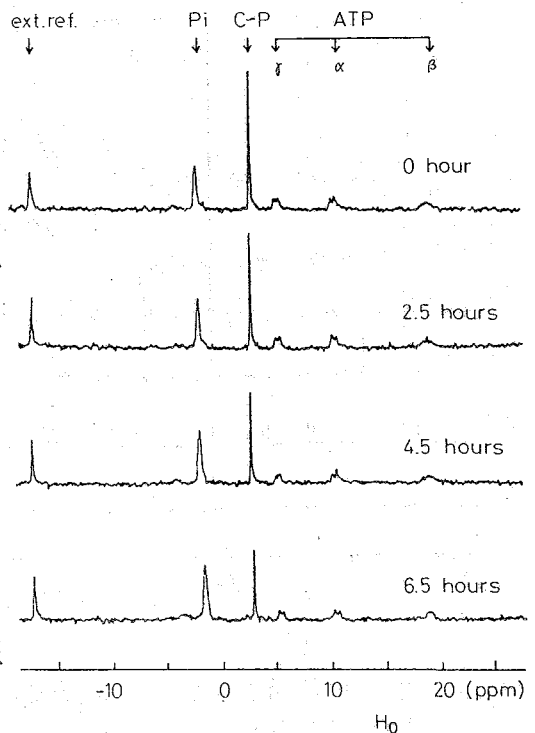


Fig. 4. カエル筋肉の ^{31}P -NMRスペクトルとその経時変化。

ATP、クレアチン磷酸(C~P)、無機磷酸(Pi)が検出されている。

トルを追跡したのをFig. 5に示す。1.5ppm付近の乳酸に由来する共鳴線が大きくなっている。上記の細胞内pHの酸性化の原因は、嫌氣的解糖系の働きにより乳酸が産生されたためである。従って嫌氣的条件下の静止筋では、エネルギー産生が解糖によりおこなわれているにもかかわらず、そのエネルギー産生ではエネルギー消費に対し不十分なためクレアチン磷酸が減少していることになる。

同様に ^{13}C -NMR スペクトルでカエル筋肉の経時変化を追跡したのをFig. 6に示す。積算時間が1時間のため、Fig. 1に比べ、 S/N が悪いが、70ppm付近の乳酸の経時的な増加が認められる。特に ^1H -NMRでは乳酸の共鳴線が、脂肪のメチレン基の共鳴線に重なるため、分離不可能であったが、 ^{13}C -NMRを用いれば両者を分離して、乳酸のみの検出が可能となる。

以上の様に ^{31}P および ^1H -NMRだけでなく、 ^{13}C -NMRでも代謝の追跡が可能であり、 ^{13}C をラベルした物質の追跡だけでなく、自然存在比の ^{13}C でも最適な測定条件を用いれば、 S/N の改善が期待でき、代謝などの研究に有用となるであろう。

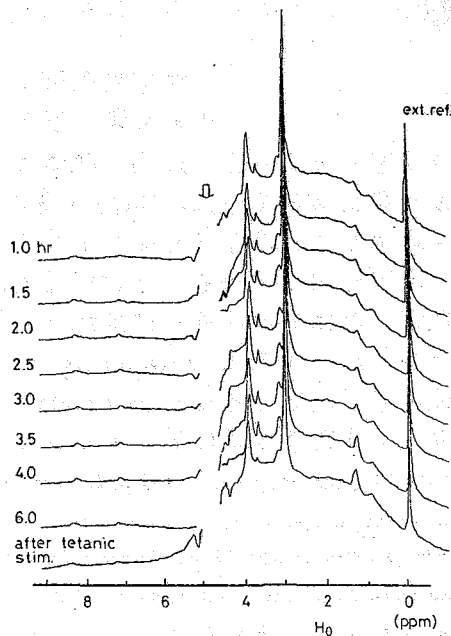


Fig. 5. カエル筋肉の ^1H -NMRスペクトルの経時変化。

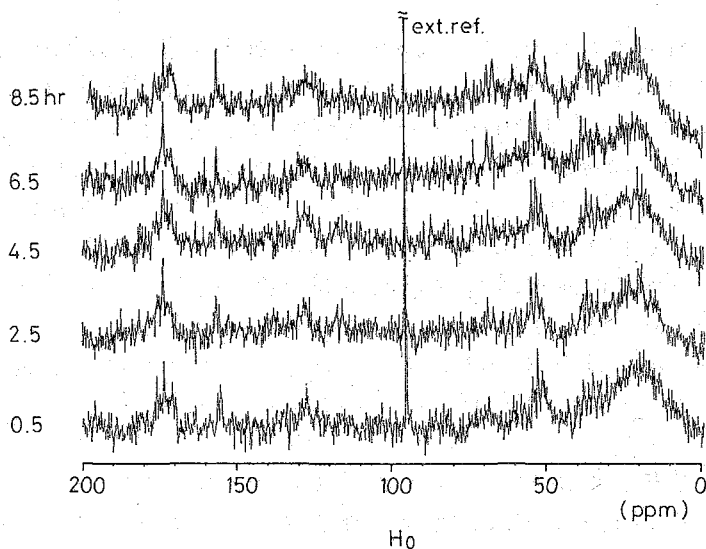


Fig. 6. カエル筋肉の ^{13}C -NMRスペクトルの経時変化。各スペクトルは1時間の積算である。

(生理学研究所) 亘 弘, 肥塚 泉, 高田宗春, 矢内原 昇
(東京大学・理) 永山国昭

消化管の分泌および運動, 胆嚢の収縮や膵の外分泌は自律神経により調節されていると考えられていた。Bayliss & Starling が十二指腸粘膜の稀塩酸抽出物中に膵外分泌腺を刺激して膵液分泌を促進する物質を発見してこれを secretin と命名した。以来体液性調節因子が脚光を浴び現在では消化管ホルモン gastrointestinal hormone による体液性調節機構が個体の自律神経の調節機能の一環として働いているものと認められている。1928年 Ivy & Oldberg は Bayliss らの secretin の中に胆汁分泌および膵酵素分泌を促進する物質を分離し cholecystokinin と命名した。一方1943年 Harper & Raper は膵酵素分泌を促進する消化管ホルモンとして pancreozymin を分離, 抽出した。1966年 Jorpes & Mutt は pancreozymin と cholecystokinin は同一物質である事を報告しこれが39個のアミノ酸 Lys-(Ala₁-Gly₁-Pro₁-Ser₁)-Arg-Val-(Ileu₁-Met₁-Ser₁)-Lys-Asn-(Asn₁-Gln₁-His₁-Leu₂-Pro₁-Ser₂)-Arg-Ileu-(Asp₁-Ser₁)-Arg-Asp-(Tyr-(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met)-Asp-Phe-NH₂ からなる事を明らかにした。現在 cholecystokinin in pancreozymin (CCK-PZ) 作用のあるものは4個から39個までのアミノ酸よりなっているがそのうち最も強力な生理活性を有するのはC末端の octapeptide (CCK-8) である。最近このCCK-8が消化管のみでなく中枢神経系, とくに大脳基底核に大量に存在し neurotransmitter あるいは neuromodulator として働いている事が報告されておりまたCCK-8の中枢神経系における減少による病態についても数多く報告されている。したがってその高次構造と生理活性の関係を知る事が必要である。今回我々は合成されたCCK-8について 360MHz NMRを測定したので報告する。

試料および方法—— 360MHz ^1H NMRの測定は Bruker WM-360wb 分光計を用いた。SHIM調整は auto SHIM装置および auto SHIM program "TAXIS" にて行なった。試料はCCK-8 [Asp-Tyr-(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-COOH] で液相法により合成した。試料は 0.5mg を 0.2ml の D_2O あるいは $\text{DMSO}-d_6$ に溶解した。前者は $\text{pD } 9.4$ に調整した。試料管は 5mm φを用い内部基準としてTMSを用いた。 40° パルスでスペクトル幅 5000Hz データポイントは 16K あるいは 32K として128回～512回の加算を行なった。温度を変化させる場合は, Bruker BVT1000温度可変装置を用いたがそれ以外は室温で行なった。スペクトルの帰属は積分およびホモデカップリングによった。デカップリングは nuclear overhauser 効果によるスペクトルの変化をさけるために inverse-gated decouplingにより行ない, デカップリングパワーは $20\sim 50\text{mW}$ を使用した。

実験結果と考察——CCK-8の 360MHz ^1H NMR スペクトルを図1に示す。また, DMF 溶液および D_2O 溶液での各々のシグナルのケミカルシフト, 結合定数を表1に示す。図および表中のピーク番号は構造式に示した番号と対応する。 $\text{DMSO}-d_6$ 溶液において H_2O のピークをデカップリングにて suppress すると新たなピーク(16)が現わ

れたりひろし, こいつが いすみ, たかだそうしん, やないはらのぼる, なかやまくにあき

れた。各ピークのケミカルシフトはそれぞれのアミノ酸を単体でDMSO- d_6 溶液あるいはD $_2$ O 溶液で測定したものと大きく異なっており、ケミカルシフトを用いての各ピークの帰属は困難であった。なお、両溶液のスペクトルに於いて芳香族のプロトンはトリプロトファンのインジカンを除き帰属が得られなかった。

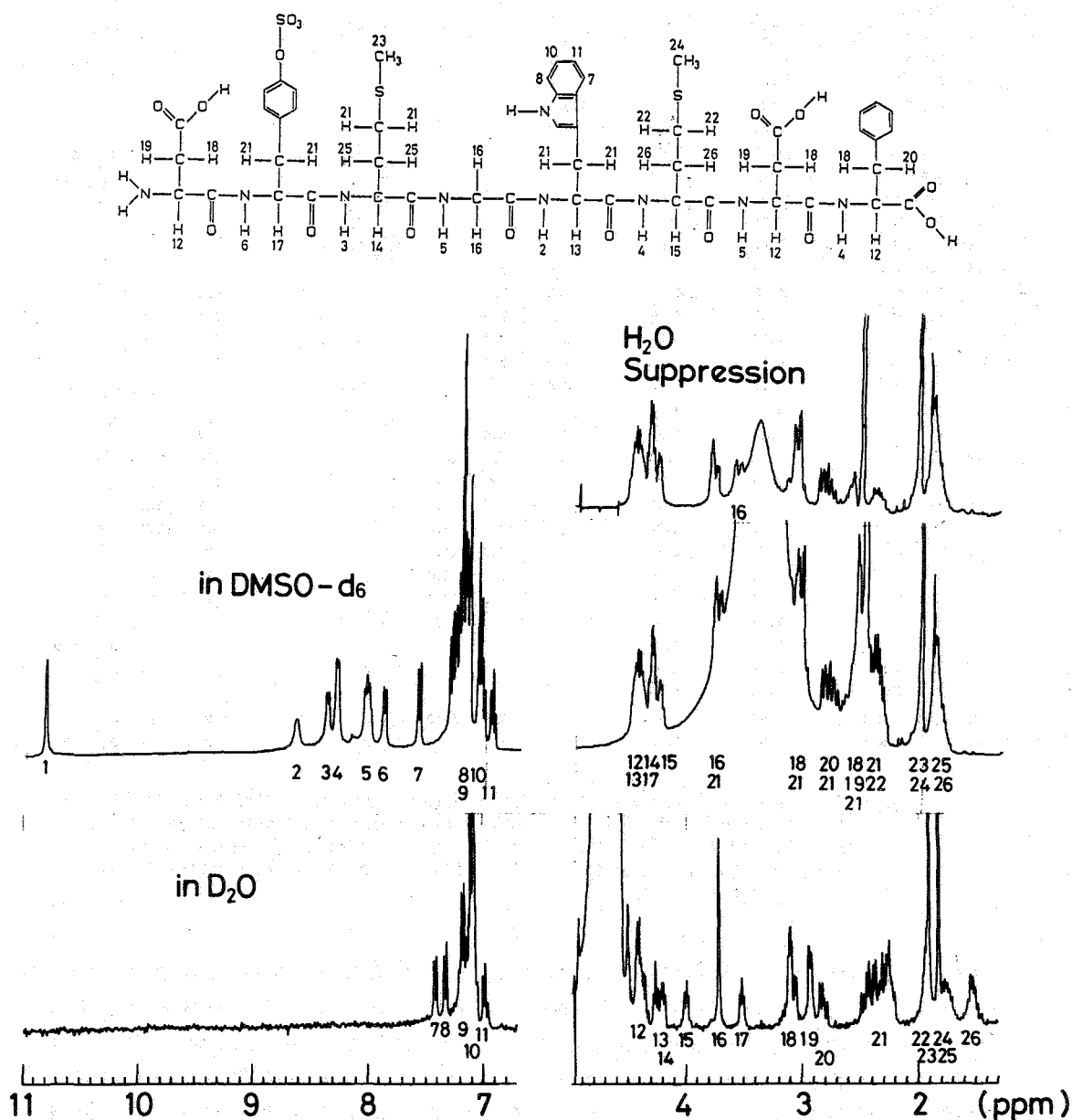


図1. CCK-8 の 360 MHz ^1H NMR スペクトル, TMS の信号を 0 ppm とした。DMSO- d_6 溶液では水を含むために H $_2$ O を suppression したものを右中段に示した。DMSO 溶液スペクトル中 2.45 ppm のピークは DMSO による。また D $_2$ O 溶液スペクトル中 4.7 ppm 付近の広いピークは水による。

peak No.	assignment	chemical shift(ppm)		coupling constant(Hz)							
		DMSO-d ₆	D ₂ O	J _{HNα}	DMSO-d ₆			D ₂ O			
					J _{αβ}	J _{ββ}	others	J _{αβ}	J _{ββ}	others	
1	Trp-indican NH	10.81									
2	Trp-NH	8.64		-							
3	Met-NH	8.37		7.0							
4	Met-NH	8.29		6.2							
	Phe-NH	8.29		6.2							
5	Asp-NH	8.03		7.0							
	Gly-NH	8.03		7.0, 8.0							
6	Tyr-NH	7.88		7.0							
7	Trp-C4H	7.60	7.41				J _{4,5} 8.0			J _{4,5} 8.0	
8	Trp-C7H	#	7.33				-----			J _{6,7} 8.0	
9	aromatic						-----			-----	
10	Trp-C6H	7.04	#				J _{6,7} 8.0			-----	
11	Trp-CSH	6.94	6.98				J _{5,6} 7.5			J _{5,6} 7.6	
12	Asp- α x 2	4.45	4.38	7.0	7.0			7.0			
	Phe- α x 2	4.45	4.38	6.2	7.0			5.5			
13	Trp- α	4.45	4.26	0	7.0			7.0			
14	Met- α	4.33	4.20	6.2	8.0			5.0			
15	Met- α	4.26	3.99	7.0	7.3			5.0			
16	Gly- α	3.77	3.71	7.0, 8.0			J _{αα} 17.0			J _{αα} -	
	Gly- α	3.57	3.71	7.0, 8.0			J _{αα} 16.0			J _{αα} -	
17	Tyr- α	4.53	3.51	7.0	8.0			5.7			
18	Phe- β	3.06	3.07		4.0	14.2		4.6	7.2		
	Asp- β x 2	2.57	3.07		?	?		5.0	?		
19	Asp- β x 2	2.57	2.93		?	?		1.8	2.2		
20	Phe- β	2.80	2.81		9.2	14.0		9.2	13.5		
21	Trp- β	3.77	2.39		4.0	14.2		?	?		
	Tyr- β	3.06	2.39		9.2	14.0		?	?		
	Tyr- β	2.80	2.39		6.0	17.0		?	?		
	Trp- β	2.57	2.39		?	?		?	?		
	Met- γ x 2	2.38	2.39				J _{βγ} ?			J _{βγ} 6.0	
22	Met- γ x 2	2.38	1.94				J _{βγ} ?			J _{βγ} ?	
23	Met- CH ₃	2.01	1.90								
25	Met- β x 2	1.88	1.73		7.9	14.0	J _{βγ} ?	?	?	J _{βγ} ?	
26	Met- β x 2	1.88	1.52		6.5	14.0	J _{βγ} ?	?	?	J _{βγ} ?	

表1. CCK-8のDMSO-d₆溶液およびD₂O溶液(pD 9.4)360MHz ¹H NMRの各ピークの帰属ケミカルシフトおよび結合定数を示す。表中、#の記号のついたピークは芳香族のピークの中に含まれ、ケミカルシフトが測定できなかった事を示す。----は測定が不可能だったもの、?は今回の実験では結合定数が測定できなかった事を示す。芳香族のピークは広範囲のため測定不可能とした。

DMSO-d₆溶液とD₂O溶液でのスペクトルが大きく異なっているのはグリシンのα-プロトンの信号である。DMSO-d₆溶液に於いてグリシンの2つのα-プロトンはABX型のABに対応する信号を示し、2つのα-プロトン間で0.2ppmのケミカルシフトを持つ。D₂O溶液ではこの2つのα-プロトンが1本の信号となりA₂X型のA₂に対応する信号となった。このことはCCK-8がD₂O溶液中ではグリシンを中心に双方のchainが自由に回転を行なっているのに対しDMSO-d₆溶液中ではこの回転がなくなり何等かのconturmatunをとる可能性のあることを示唆する結果が得られた。このCCK-8のC末端よりグリシンまでの5個のアミノ酸Gly-Trp-Met-Asp-Pheは胃塩酸及びペプシンの分泌を促進するgastrinと共通のアミノ酸組成であり、そのためgastrin

は弱いながら CCK-PZ と同様の生理作用を有し、また反対に CCK-PZ も弱いながら *gastrin* と同様の生理作用を示すことが知られている。このことはこれらグリシンより C 末端までの 5 個のアミノ酸がこれら 2 つの消化管ホルモンの receptor への結合に際し重要な働きをし、残りの部分はそれぞれのホルモンに特有の作用を発現する際、必要な部分である事を示している。今後さらにこの溶媒の変化に伴う *conformation* の変化とその生理作用発現との関係についての検討が必要であると思われる。

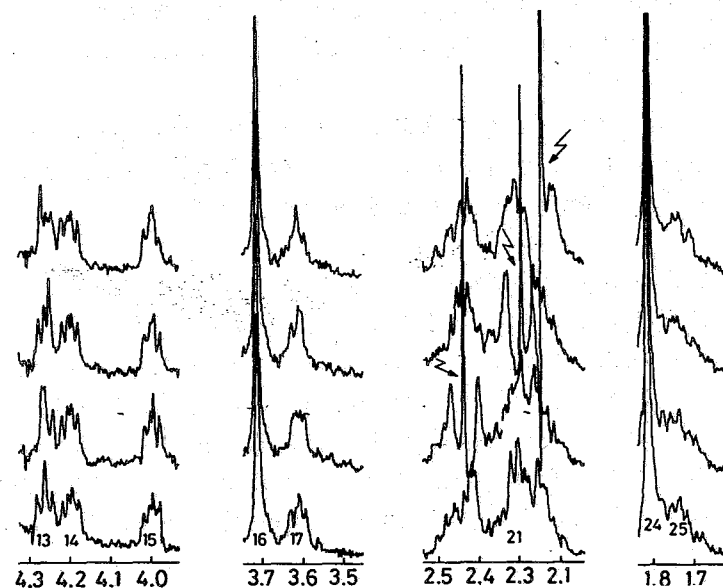


図2. CCK-8 D₂O 溶液 (pD 9.4) の 360 MHz ¹H NMR. 上の3つのスペクトルがデカップリングしたもので矢印はその位置を示す。ピーク(21)の各部をデカップリングする事によりピーク(13)のトリプトファンのα-プロトン、ピーク(17)のチロジンのα-プロトン およびピーク(25)のメチオニンのβ-プロトンに影響が現われる。inverse-gated decoupling にて行った。

D₂O 溶液にて選択的ホモデカップリングを行った際、帰属の困難であったピーク(21)のデカップリングの結果を図2に示す。ピーク(21)には6個のプロトンが含まれている。低磁場側をデカップリングするとピーク(13)のトリプトファンのα-プロトンおよびピーク(17)のチロジンのα-プロトンに影響が現われた。またピーク(21)の中心付近および高磁場側をデカップリングしても同様の影響が見られた。さらに高磁場側をデカップリングした際はピーク(25)のメチオニンのβ-プロトンにも影響が現われた。これらの結果、ピーク(21)にはトリプトファン及びチロジンのβ-プロトンが広範に混在し、さらに高磁場側にはメチオニンのβ-プロトンも含まれている事がわかった。また DMSO-d₆ 溶液および D₂O 溶液両スペクトルよりトリプトファンおよびチロジンの対になっている2個のプロトンのケミカルシフトの差は D₂O 溶液の方が、DMSO-d₆ 溶液より小さい事がわかった。なお、このピーク(21)は上記3つのアミノ酸のプロトンが混在しており、各々のピークについての細かい帰属は困難であった。

温度変化実験は 300 K ~ 325 K の範囲で行なったが、解析を行っている。

(生理学研究所) 亘 弘, 高田宗春, 肥塚 泉, 志賀 潔,
二科安三, 成瀬昭二

(はじめに)

NMR法の医学生理学分野への応用は, R. Damadianのプロトン緩和時間相違による悪性腫瘍診断の可能性の示唆と Hoult D. Iによる骨格筋リン酸代謝物観測への応用以来, 近年急速に展開されている。その測定対象も組織切片より, 灌流装置を用いた臓器標本, さらにB. Chanceによるマウス頭部へと次第にin vitroよりin vivoの生物試料へと広められてきた。

最近, 試料の部位を選択的に観察することが可能なTMR (Topical magnetic resonance)が開発され, これをOxford Research System社により10ヵ月間借入れ, 生物試料, とくに頭部を対象とした ^{31}P -NMRスペクトルを得たので報告する。

(装置)

TMRの磁場強度は1.8T, ボアの直径は20cmであり, この中心部にはほぼ球状の焦点磁場(信号選択領域)を形成させる。その直径を1.5cmより40cmまで連続して変えることが可能である。この焦点磁場の周辺では不均一磁場となり, そこに存在する核種の信号は極めて速い緩和を示す。また, 焦点磁場内あるいは近傍に置かれたトランスミッターとレシーバーコイルを兼ねる表面コイルは目的に適するものを製作し, ボア内部のプロープに接続する。表面コイルは ^{31}P の共鳴周波数125.76MHzに同調させ, カップラーユニットを用い ^1H の共鳴周波数80.285MHzに整合させ, 最大入力及び最大出力を得ることができる。

本装置の被測定領域の確認をするため, 図1に示すような二重試料管の外・内球にそれぞれ0.1M (pH 6.25), 0.3M (pH 8.0)のリン酸緩衝液を入れた。これを磁場焦点の中心におき, 40mm中で1ターンの表面コイルを用いた。磁場焦点径を40mm, 21mm, 18mmにした場合に得られた ^{31}P -NMRのスペクトルを図2に示す。磁場焦点を絞る

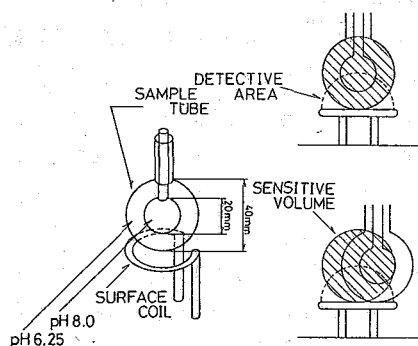


図1. 二重試料管. 外球に0.1M (pH 6.25), 内球に0.3M (pH 8.0)リン酸緩衝液を入れている。

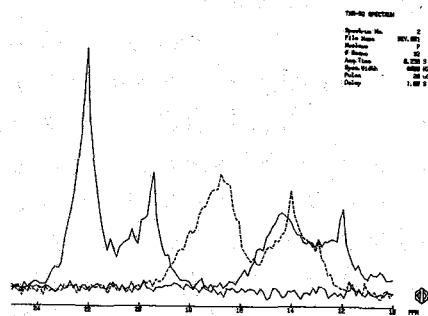


図2. 磁場焦点径を変えたときのスペクトル
40mm, --- 21mm, 18mm,
縦軸は任意のスケール

わたりひろし, たかだそうしゅん, こいつがいずみ, しがきよし, にしなやすぞう, なるせしやうじ

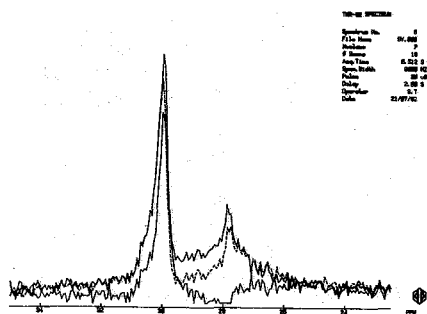


図3. Left Shift 処理(FIDのデータ数は4096). — 処理なし, --- 10点処理, 40点処理

ことによって、次のようなことがわかる。i) 信号が低磁場側に移動するが、磁場強度が焦点を絞るとともに減少することを意味している。ii) 内球の信号の半値巾は減少するが、磁場均一性が高まることを示唆している。iii) 外球の信号強度は内球に比して相対的に減少するが、内球径以下に焦点径を絞ると内球の信号も減少する。磁場焦点径を内球径以下にした場合でも、外球よりの信号が完全に除去できないのは、磁場焦点に対する試料のずれに加え磁場焦点中心より2cm下方にある表面コイルの空間的感度分布の不均一性がこの影響を拡大している為と考えられる。

得られたFIDにprofile correction (convolution difference), あるいはleft shiftの操作を加えることにより、緩和の速い信号を除去することが可能となる。磁場焦点を15mmにした場合のFIDにleft shift 操作を行ったスペクトルを図3に示す。これにより、外球よりの信号はほぼ除去することが可能となる。

(実験結果及び考察)

1) ラット頭部モデルの測定

測定対象をラット脳とするため図4に示すようなラット頭部を模した試料管を作りモデル実験を行った。図4に示すようにpHが8.0と6.25の0.1Mのリン酸緩衝液を入れている。表面コイルとして25mmφと15mmφの2ターンのものを用いた。この系でパルス巾を変えて信号強度の変化をみた。結果を図5に示す。信号選択領域に比してコイルが小さいので、励起パルス(H_1)の照射により、得られる信号が種々の部位よりの信号の総和となり、極小値が求められなかったものと思われる。なお H の共鳴周波数に整合させてあるのでプロトンについての信号の極小値が得られるパルス巾を求めることを試みたが成功しなかった。この結果からわかるように90°及び180°パルスの決定には、信号選択領域に比して充分大きなコイルを用いる必要がある。

この試料管と表面コイルを用い、横方向に5mm及び10mm移動させてスペクトルを得たものを図6, 図7に示す。前者は磁場焦点径18mm, 後者は15mmである。この実験結

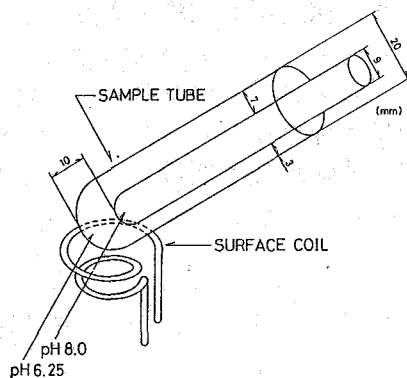


図4. ラット頭部モデル。外側管は頭蓋骨外の筋肉を、内側管は脳を模すように製作された。

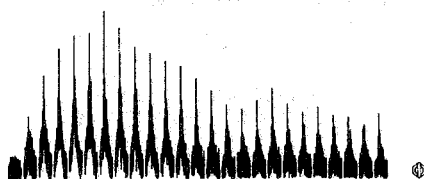


図5. パルス巾と信号強度の関係。パルス巾を5μsecから5μsecずつ増してFIDを求め、FID后の信号を図示。

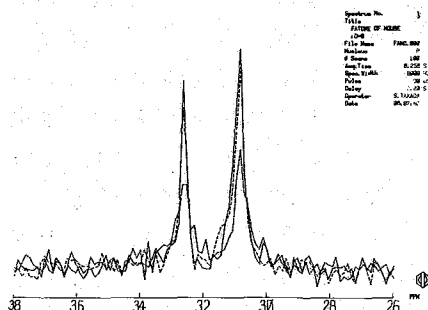


図6. ラット頭部モデルの³²P-TMRスペクトル。外側管にはpH6.25, 0.1M, 内側管には0.1Mの磷酸緩衝液を入れてある。破線は直径18mm、——コイル中心、-----5mm横方向移動、-----10mm横方向移動。

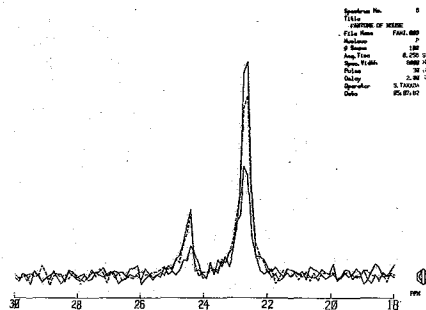


図7. ラット頭部モデルの ^{31}P -TMRスペクトル。外側管には $\text{pH } 6.25, 0.1\text{M}$ 、内側管には 0.1M の薄酸緩衝液を入れてある。磁場焦点径 15mm 、——コイル中心、----- 5mm 横方向移動、----- 10mm 横方向移動。

果より, i) 1cm以下の大きさのものに対する測定には, 少なくとも磁場焦点径を最小の15mmにする必要があり, ii) 移動させたスペクトルの差から選択的な信号を得ることは不可能であることがわかった。

2) ラット頭部の p-TMR スペクトル
ラット頭部に対しパルス中の測定を行った。結果を図 8 に示す。これはほぼ前述のモデル試料管と同様の変化を示したが極大の信号を与えるパルス中は μsec で、モデル試料管の約半分であった。この原因は生体中の水の含料が約 70% であるので、誘電損失が減弱したものと考えられる。

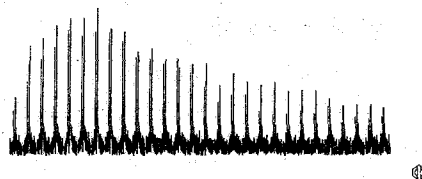


図8. パルス巾と信号強度の関係。パルス巾を1 μ secから2 μ secずつ増してFIDを求め、FT右の信号を図示。

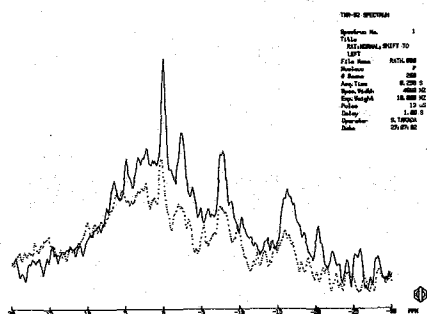


図 9. ラット頭部の ^{31}P -TMR スペクトル。
— コイル中心, ----- 5mm 横方向移動。

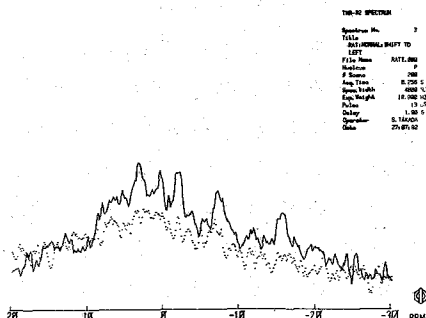


図10. ラット頭部の筋を除いたTMRスナップル。
——コイル中心。-----5mm横方向移動。

ペントバルビタール腹腔内注射により麻酔したラット(約200g)の頭部を磁場焦点径15mm, 表面コイルとして25mmφと15mmφと2ターンのものを用いて³¹P-スベクトルを測定したものを図7に示す。信号のアサインメントはOppmのものかクレ

アチン燐酸で、 -2.5 , -8 , -16.5 ppm にそれぞれ ATP (γ) と ADP (β), ATP (α) と ADP (α), ATP (β) の信号がみえる。5 ppm に無機燐の信号が 6.5 ppm に糖燐化合物の信号が観測されている。2.5 ppm の信号はグリセロールフォスフォリールエタノールアミン、グリセロールフォスフォリールコリン及び 2,3-DPG のものであろうと思われるが、確証はない。図 9 の点線はコイルの中心から 5 mm 横方向に移動したときに得たスペクトルであるが、全体的には大きく変化していない。ラットの頭部には咬筋や眼筋、後頭筋などが多量に存在しているため図 9 の 2 つのスペクトル共、筋肉中に存在する燐化合物の寄与が大きいものと考えられる。このため側頭筋や後頭筋群をできるだけ切除したラットの頭部を測定したものを図 10 に示す。なお点線のスペクトルはコイル中心から 5 mm 横方向に移動させたときのスペクトルを示している。図 10 のスペクトルは筋肉の影響をできるだけ除いたもので脳の燐化合物による信号を反映したものと考えている。しかし、咬筋などが残存しており、また、筋切除という手術の侵襲が大きかったため循環障害を起こし、低酸素状態による結果とも考えられるので再検討を行っている。

なお動物の活動状態の示標として心電図及び脳波の測定が要請されるが、前者については四肢誘導によれば TMR 測定中も可能であるが、後者については電極が表面コイルに影響を及ぼし、TMR との同時測定は不可能であった。

(おわりに)

TMR による生体試料の測定は対象が磁場焦点より大きい局所あるいは臓器であることが好ましく、適用が限定される。本報告以外でモルモットの心臓、免腎臓などの測定を行っているが、測定に際して困難なのは表面コイルの製作である。若しも適当な表面コイルを作ることが出来れば、短い時間分解のスペクトルを求めることができ、生体の代謝の変動を生理機能と関連して求めることが可能である。TMR の分解能自身はよくはないが、上にのべた意味で生理学者にとって強力な武器となる。

最後に TMR の借入について機会を与えて下さった Oxford Research System 社、ロンビア貿易(株)に感謝します。

(京府医大) 〇 瀬尾芳輝、吉崎和男、西川弘恭、森本武利、
(大阪医大) 村上政隆、今井雄介、(生理研) 巨 弘

〔目的〕

磷酸イオンは生体内エネルギー代謝のみならず、酸塩基平衡にも重要な役割を有している。ところで、一般に解離平衡には各種イオンが影響を及ぼすことが知られている。今回、磷酸の第2解離平衡におよぼす、イオン強度、共存するイオン種(K^+ , Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+})、磷酸の濃度および温度の影響を明らかにするとともに、磷酸の化学シフトのpH依存性を用いた生体内pH測定への適用について報告する。

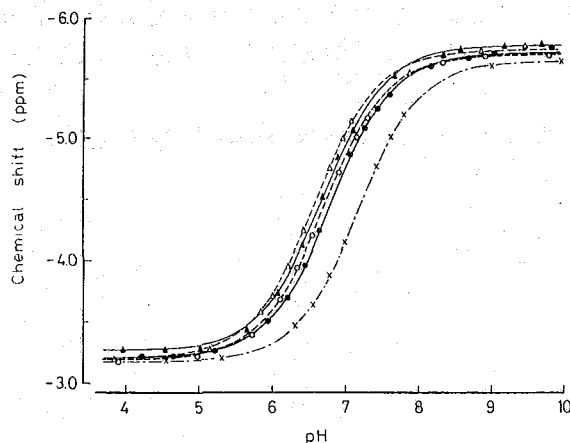
〔方法〕

試料は主に1mM磷酸ナトリウム水溶液(2%の重水を含む)を用い、pH4から10の範囲で化学シフトを測定した。温度は24℃、化学シフトは、クレアチン磷酸(1mM水溶液、pH7.2)を基準とした。装置はWM-360WB(BRUKER)を用いた。磷酸の pK' 値は、磷酸の化学シフトが、第1磷酸イオンと第2磷酸イオンの間での速い交換反応に依存していることに準拠し求めた。

〔結果および考察〕

1) イオン強度、 K^+ , Na^+ , Li^+ イオンの影響。

図1に示すように、KCl 溶液中の磷酸のpH滴定値は、第1磷酸イオンと第2磷酸イオンの間での速い交換反応を仮定して求めた滴定曲線(実線)とよく一致した。1mM磷酸ナトリウム水溶液(イオン強度=0.002)の磷酸の pK' 値は7.18であった。KClでイオン強度を0.15, 0.30とあげると、 pK' 値は、6.82, 6.71と小さくなった。



共存塩によるイオン強度の効果(塩効果)を、Debye-Hückel式を用い次式により推定した。

$$pK' = pK - \frac{3A\sqrt{I}}{1 + \alpha B\sqrt{I}} \quad \dots (1)$$

A, BはDebye-Hückelの定数で、25℃の値として、 $A = 0.5115$, $B = 0.3291$ を用いた。 α は、最近接イオン間距離で、4 Åを用いた。Iはイオン強度である。(1)式によると、イオン強度が0.002, 0.15, 0.30のときの pK' 値の変化は、各々、

図1. 1mM磷酸ナトリウム水溶液の滴定曲線へのイオン強度、 K^+ , Na^+ イオンの影響。共存イオン

X $Na-Pi$ のみ; $\bullet$ 150mMKCl; $\circ$ 150mMNaCl; $\blacktriangle$ 300mMKCl; $\triangle$ 300mMNaCl

せお よしてる, よしざき かずお, にしかわ ひろやす, もりもと たけとし,
むらかみ まさたか, いまい ゆうすけ, わたり ひろし

-0.08, -0.39, -0.49となる。磷酸の pK 値を7.20とすると、KCl溶液中での pK' 値の変化は、各々、-0.02, -0.38, -0.49であり、(1)式による推定値とよく一致した。また、J. K. M. Robertsら(1), D. G. Gadianら(2)により報告されているKClによるイオン強度の磷酸の pK' 値への影響も、(1)式による推定値とよく一致した。

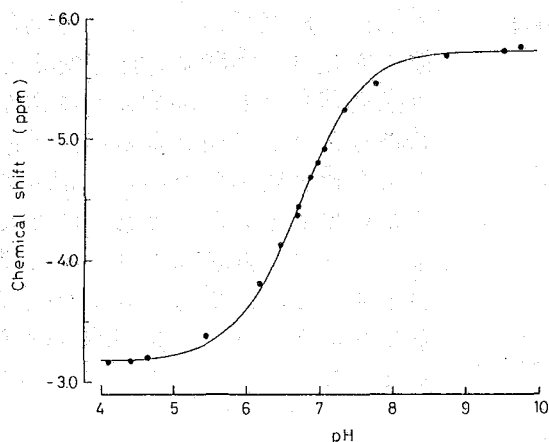


図2. 1 mM 磷酸ナトリウム, 150 mM LiCl 溶液の滴定曲線.

と K^+ , Na^+ , Li^+ イオンとの相互作用の効果も考えられる。特に、 Li^+ イオンについては、滴定曲線の形が異なり、 Li^+ と磷酸との多重な交換反応系の存在を示していると考えられる。

2) Mg^{2+} , Ca^{2+} イオンの影響。

5, 10 mM の $MgCl_2$, $CaCl_2$ の磷酸の pK' 値への効果を図3に示す。イオン強度は、KCl で約 0.15 とした。 Mg^{2+} および Ca^{2+} イオンにより、磷酸の pK' 値は、約 0.1~0.15

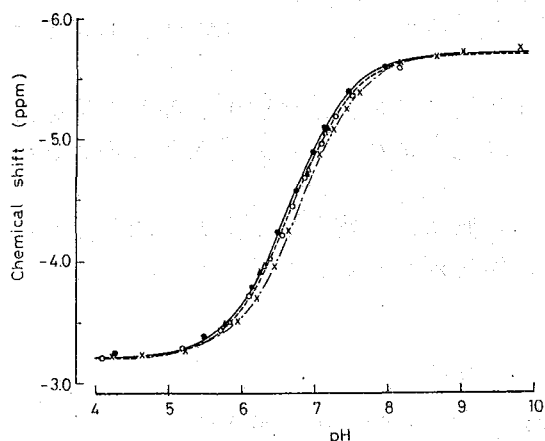


図3. 1 mM 磷酸ナトリウム溶液の滴定曲線への、 Mg^{2+} , Ca^{2+} イオンの影響

共存イオン $\times$ 150 mM KCl; $\bullet$ 5 mM $MgCl_2$, 135 mM KCl; $\blacktriangle$ 10 mM $MgCl_2$, 110 mM KCl
 $\circ$ 5 mM $CaCl_2$, 135 mM KCl; $\triangle$ 10 mM $CaCl_2$, 110 mM KCl

一方、NaCl, LiCl を用いた場合、同一イオン強度において、磷酸の pK' 値はKCl 溶液に比べ、約 0.1 小さい値を示した。また、図2に示すように、LiCl 溶液中の磷酸のpH滴定は、第1磷酸イオンと第2磷酸イオンの交換反応のみ(実線)では表わすことができなかった。 pK' 値の差異の原因として、一つは、溶液のイオン零囲気の違いが考えられる。 K^+ , Na^+ , Li^+ イオンの遮蔽効果は、 Li^+ , Na^+ , K^+ の順で大きく、すなわち、 pK' 値もこの順で小さいことになり、実験結果と一致する。また、磷酸イオン

小さくなったが、5 mM と 10 mM とでは、ほとんど差がなく、また、 Mg^{2+} 溶液の方が Ca^{2+} 溶液に比べ、若干 pK' 値が小さかった。このように、 Mg^{2+} , Ca^{2+} イオンの磷酸の pK' 値への影響は、1価イオンよりも大きく、 Mg^{2+} , Ca^{2+} イオンと磷酸イオンとの相互作用が pK' 値に反映しているものと考えられる。

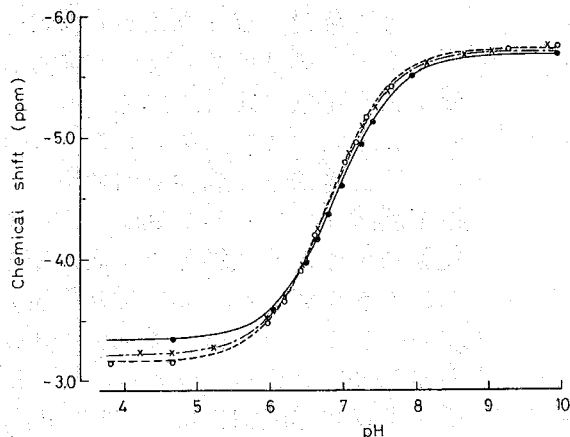
3) 磷酸濃度の影響。

磷酸濃度を、1, 10, 25, 50 mM と

し、KCl でイオン強度を約 0.15 とした溶液について、磷酸の pK' 値を求めた。これらの pK' 値は、測定誤差範囲 (± 0.015) 内で一致し、一定の傾向を持たなかった。

4) 温度の影響。

1 mM 磷酸ナトリウム, 150 mM KCl 溶液について、37°C, 24°C, 4°C で滴定行な



た。磷酸の pK' 値は各々 6.80, 6.82, 6.91 であった。この pK' 値の変化は、磷酸の解離平衡定数の温度依存性と、塩効果の温度依存性の二つで説明されるが、実際の pK' 値の変化への寄与は前者がほとんどであった。また、図 4 に示すように、温度により、第 1 磷酸イオンと第 2 磷酸イオンの化学シフトが異なり、滴定曲線の形が変化する。

図 4. 1 mM 磷酸ナトリウム, 150 mM KCl 溶液の滴定曲線への温度の影響

○ 37°C ; × 24°C ; ● 4°C

〔まとめ〕

生体内 pH 測定への適用について、以上の結果をまとめる。

- (1). 磷酸の pK' 値は主として、溶液のイオン強度に依存する。Debye-Hückel 式を用いると、イオン強度から、およそその磷酸の pK' 値を求めることができる。
- (2). しかし、同一イオン強度の溶液であっても、 K^+ , Na^+ , Li^+ イオンの順に pK' 値は小さくなり、また、生理的濃度の Mg^{2+} , Ca^{2+} イオンにより、 pK' 値は小さくなり、その大きさは、約 0.1 ~ 0.15 であった。
- (3). 一方、同一イオン強度では、磷酸濃度の変化は、 pK' 値に影響を与えなかった。
- (4). さらに、温度は、 pK' 値ばかりでなく、滴定曲線の形にも影響を与えることがわかった。

従って、磷酸の化学シフトを pH 測定に用いる際には、測定する系と、同温度、同組成の溶液について滴定し、滴定曲線と pK' 値を求めることが望ましい。

文献

- 1). J.K.M. Roberts, N. Wade-Jardetzky, and O. Jardetzky (1981), *Biochem.* 20, 5389-5394.
- 2). D.G. Gadian, G.K. Radda, R.E. Richards, and P.J. Seely, (1979), in *Biological Applications of Magnetic Resonance* (R.G. Shalman Ed.) pp 463-535, Academic Press, New York.

第 3 日

10月18日(月)

アルコキシシラン類の ^{29}Si ランタニドシフト
—シリコンの結合性について—
(茨城大・理) ○ 平山昌甫、荒井寿一

1. 序

^1H , ^{13}C のランタニドシフトが広く分子構造の探求に利用されているが、我々は、他核特に種々の金属核につつまランタニドシフトの実験を試み、配位子に酸素を有するいくつかの金属錯体について ^{59}Co , ^7Be , ^{195}Pt , ^{27}Al 等の測定に成功している¹⁾。これらについて擬コンタクトシフト (pcs) とコンタクトシフト (cs) が分離出来れば、cs の定量的議論よりこれら金属の結合性について違った側面から考察することが出来ると思われる。

今回は、アルコキシシラン類 $\sim \text{Ln}(\text{fod})_3$ 系について、 ^{29}Si のランタニドシフトの結果を報告し、合わせて、分離された cs と、シリコンを炭素に置換した同型の分子の cs の分布と比較することにより、シリコンと隣接する原子間での (d-p) π bonding との関連において考察する。

2. 実験

基質: triethoxyethylsilane (TEOESi), 1,1,1-triethoxypropane (TEOP), diethoxydimethylsilane (DEODMSi), methoxytrimethylsilane (MOTMSi), triethoxyvinylsilane (TEOVSi) すべて市販品。シフト試薬: $\text{Ln}(\text{fod})_3$ ($\text{Ln} = \text{La}$, Pr, Nd, Eu, Sm, Dy, Ho, Er) 当研究室にて合成。溶媒: CDCl_3 。
装置: ^{29}Si , ^{13}C , CFT-20 (バリアン) (Broad Band Accessory 付) $\nu_0 = 15.801 \text{ MHz}$; ^1H , R-20A (日立)。内部基準: TMS。基質濃度: 0.4 ~ 1.4 M。シフト試薬対基質の濃度比 $[\text{L}]/[\text{S}]$ (P) は、L ~ S の平衡定数。および S の限界シフト (δ_{LS}) 算定時は 0 ~ 2.3 (25 度) とし、 $\delta \sim \text{P}$ plot の初期勾配より δ_{LS} がおめられる時は、0 ~ (0.05 ~ 0.2) (5 度) とした。 ^{29}Si 測定時は緩和剤 $\text{Cr}(\text{acac})_3$ を 0.01 M 加えた。これは、平衡定数 (K) および δ_{LS} に影響を與えないことを確認してある。Sampling 時、湿気に十分注意した。

3. 結果と考察

(i) 平衡定数 (K) および限界シフト (δ_{LS}) の決定

酸素 (1 ~ 3 個) で Ln イオンに配位するものとして、一段階平衡のみを考え、 $\delta_{\text{obs}} \sim \text{P}$



plot (25 度) の (2) 式への fitting analysis より K, δ_{LS} をおめた。(詳細は省略) $\text{Pr}(\text{fod})_3$, $\text{Eu}(\text{fod})_3$ を用いた時の結果を表 1 に (^1H よりデータと共に)、plot の例を Fig. 1 に示す。配位酸素数と共に K が増大しているのは合理的である。

Lanthanoid-induced ^{29}Si Shifts of Alkoxysilanes

-- Bonding Nature of Silicon --

(Ibaraki University) Masatoshi Hirayama and Juichi Arai

シフト試薬の自己会合機構 $L + L \rightleftharpoons L_2$ を加えてみたが実験値と一致はあまり改善されなかった。また MOTMSi の場合等可能性のある $LS + S \rightleftharpoons LS_2$ 機構も加えてみたが、特に実験値をよく説明するとは云うことはない。

(ii) TEOESi $\sim Ln(fod)_3$ 系,

表 1 より, $K[S_0] \gg 2(1+P)$

が満足されているので,

$\delta_{obs} \approx P \cdot \delta_{LS}$ より $\delta \sim P$ plot

の初期勾配から δ_{LS} を求めた。

$La(fod)_3$ により求められた

反磁性錯形成シフト $\delta_{LS}(La)$

について補正をした限界シフト

δ'_{LS} を炭素のデータと共に

表 2 に示す。3ヶの酸素原子

で Ln イオンに配位する時の

アタクトは軸対称性を有する

($Si-Et$ 結合は自由回転)

ので常磁性シフト δ'_{LS} につい

て式 (2) が成立し (A は超微細

結合定数, G は幾何因子,

D は Bleaury による値, $\langle S_z \rangle$

は Golding による値), A と

$\delta'_{LS} = A \langle S_z \rangle + G \cdot D$ (2)

G が Ln に依らないとすれば

$\delta'_{LS} / \langle S_z \rangle = A + G \cdot D / \langle S_z \rangle$ (3)

式 (3) で $\delta'_{LS} / \langle S_z \rangle \sim D / \langle S_z \rangle$

plot が直線になることが期

待される。その plot を Fig. 2

に示す。Sm(fod)₃ のデータは

$\langle S_z \rangle$ が小さ過ぎるため、誤差

が大きく、ここでは省くこと

にする。Yb, Tm, Tb 試薬は後で追加する予定である。Fig. より明らかになように Lan-

thanoid の前半と後半で異なった直線を示している。graphically に求めた G と

A の値を表 3 に示す。

(iii) TEOP $\sim Ln(fod)_3$ 系,

TEOESi に比較して、TEOP では $^{13}C-LIS$ が全般的に大きいが、後半の Ln 試薬

ではほとんどシフトが見られず、線中の右半に多いはずらしく、 LIS の測定が困

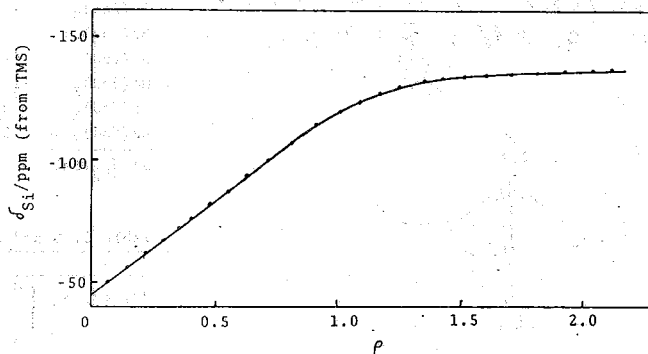


Fig. 1. ^{29}Si -LIS vs. $[L_0]/[S_0]$ plots for the TEOESi-Pr(fod)₃ system

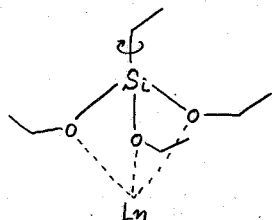
Table 1. K_1 and δ_{LS} values obtained from the fits of LIS data to one step equilibrium with no association mechanism^{a)}

		H	K	δ_{LS}
MOTMSi	Eu(fod) ₃	CH ₃	11	2.8
		OCH ₃	11	6.1
	Pr(fod) ₃	CH ₃	11	-2.9
		OCH ₃	8.7	-3.9
DEODMSi	Eu(fod) ₃	CH ₃	20	8.4
		CH ₃ (O)	21	2.9
		CH ₂ (O)	21	4.9
	Pr(fod) ₃	CH ₃	57	-9.9
		CH ₃ (O)	39	-9.9
		CH ₂ (O)	53	-19.9
TEOVSi	Eu(fod) ₃	Si	17.2 ^{b)}	-84.2 ^{b)}
		CH ₃ (O)	120	2.5
		CH ₂ (O)	180	5.7
		Vinyl { CH (A)	140	3.9
	Pr(fod) ₃	CH ₂ { (B)	120	6.5
		(C)	130	7.9
		CH ₃ (O)	470	-8.5
		CH ₂ (O)	490	-15.0
		Vinyl { CH (A)	380	-4.4
		CH ₂ { (B)	400	-6.7
TEOESi	Pr(fod) ₃	(C)	950	-10.0
		Si	450 ^{b)}	-77.0 ^{b)}

a) δ_{LS} in ppm. Negative signs denote high-field shifts.

b) Values obtained from ^{29}Si -LIS.

難である。Lanthanoid series 前半
についての、La 反磁性を補正し
た常磁性 LIS, δ'_{LS} を表 4 に示し、
 $\delta'_{LS}/\langle S_2 \rangle \sim D/\langle S_2 \rangle$ plot を Fig. 3
に、 G, A 値を表 5 に示す。



(iv) G 値分子内比の比較

表 3, 5 の G 値分布は大きくばに云
つて、とりあえず、仮定されてい
る 3 ケの酸素による配位構造を表
付けるものである。現在、分子モ
デルによる *geometric factor*
を計算し、 G (実験) 値と比較模
試を行なっているところである。
series 前半で TEOESi と TEOP
の G パターンの違いは、おもに、
O—Ln 距離の差に起因するもの
と思われ、これは Si と O 結合の
ために O の配位力が弱まっている
ことに対応するところが期待される。
また、series 後半で TEOESi の場
合 G が非常に小さいことは、Ln—Si
距離が非常に大きいことを反映し
ており、TEOP では、それが極端
に大きくなりほとんど LIS が観
測されない。しかし、現段階では、Ln の測定値が少ないため、 G 値 (勾配) の許
容誤差の見積りが不確かであり、配位構造に関する詳細な考察は、Tm, Yb, Tb のデ
ータ追加後に行なう。

(v) ^{29}Si の hyperfine coupling

Ln の測定値が少ないのに加えて、plot は理論値 $\langle S_2 \rangle$, D を用いているので、この種
の graphical な決定にはかなりの不確かさが伴うと思われる。特に G より A にそ
れが大きいと予想される。しかし、表 3, 5 の比較より、series 前半で TEOESi の
 ^{29}Si の A は TEOP の central C の A よりいすずるしく大きいことは明確に読みとれ

Table 2. δ'_{LS} values for TEOESi—Ln(fod)₃ system obtained from the initial slopes of δ - ρ plots (ppm)

	CH ₃ (O)	CH ₂ (O)	CH ₂	CH ₃	Si
Pr(fod) ₃	-12.12	-29.86	-16.88	-7.60	-78.9
Nd(fod) ₃	-4.42	-14.41	-7.16	-4.40	-37.3
Eu(fod) ₃	4.20	17.44	9.44	6.75	75.70
Dy(fod) ₃	-51.9	-119.6	-95.0	-45.1	-235.3
Ho(fod) ₃	-21.2	-55.5	-56.8	-27.0	-125.3
Er(fod) ₃	9.1	18.7	24.2	15.0	66.7
La(fod) ₃ ^{a)}	-0.6 ^{a)}	2.06 ^{a)}	-0.04 ^{a)}	-0.4 ^{a)}	5.3 ^{a)}

a) $\delta'_{LS}(\text{La})$

Table 3. G and A for the TEOESi—Ln(fod)₃ system

	CH ₃ (O)	CH ₂ (O)	CH ₂	CH ₃	Si
Pr, Eu, Nd	G 1.11 (0.44) A 0.04 (0.05)	2.51 (1.00) -0.77 (-1.00)	1.45 (0.58) -0.29 (-0.38)	0.58 (0.23) -0.43 (-0.56)	6.07 (2.42) -3.82 (-4.96)
Dy, Dy, Er	G 0.42 (0.44) A 0.29 (0.53)	0.96 (1.00) 0.83 (1.00)	0.90 (0.94) 0.49 (0.59)	0.47 (0.49) 0.11 (0.13)	2.28 (2.38) 0.80 (0.96)

Values in parentheses are relative to that for CH₂(O).

Table 4. δ'_{LS} values for TEOP—Ln(fod)₃ system obtained from the initial slopes of δ - ρ plots (ppm)

	CH ₃ (O)	CH ₂ (O)	CH ₂	CH ₃	C
Pr(fod) ₃	-12.3	-37.1	-17.8	-30.3	-93.6
Nd(fod) ₃	-5.6	-17.0	-8.9	-13.7	-52.7
Eu(fod) ₃	7.0	22.3	13.6	17.7	32.9
La(fod) ₃	-1.0 ^{a)}	3.1 ^{a)}	-1.0 ^{a)}	1.1 ^{a)}	5.1 ^{a)}

a) $\delta'_{LS}(\text{La})$

Table 5. G and A for the TEOP—Ln(fod)₃ system

	CH ₃ (O)	CH ₂ (O)	CH ₃	CH ₂	C
G	1.05 (0.34)	3.13 (1.00)	1.43 (0.46)	2.57 (0.82)	8.09 (2.58)
A	-0.27 (-0.30)	-0.89 (-1.00)	-0.70 (-0.79)	-0.67 (-0.75)	-1.93 (-1.04)

Values in parentheses are relative to that for CH₂(O).

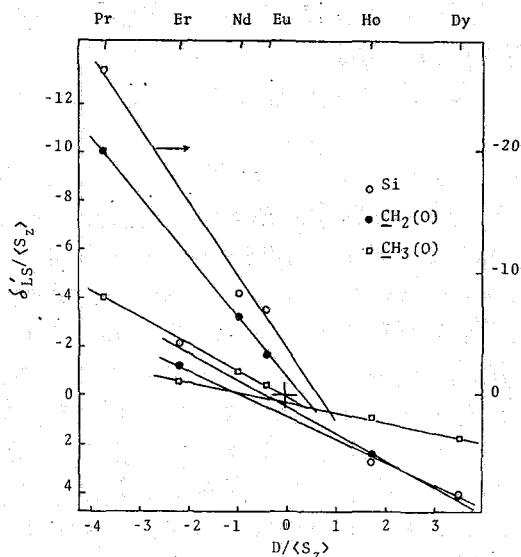


Fig. 2. $\delta'_{LS}/\langle S_z \rangle \sim D/\langle S_z \rangle$ plots for the TEOESi-Ln(fod)₃ system

る。TEOESi と TEOP では結合状態が類似しているにもかかわらず、二様の傾向が見られることから、TEOP では Ln より O の lone pair に誘起されたスピンの通常のスピンスピン分極により中心炭素に到達するが、TEOESi の場合は Si-O 間の (d-p) π bonding を経由して伝達されるスピンの寄与が加わっていることが期待される。

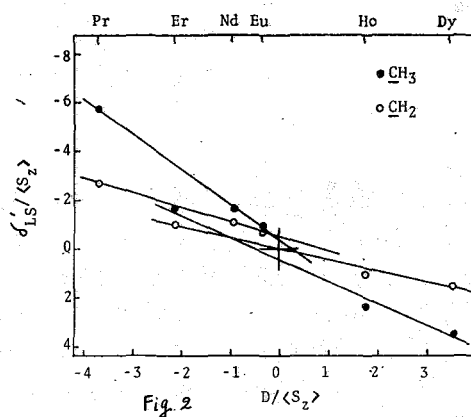


Fig. 2

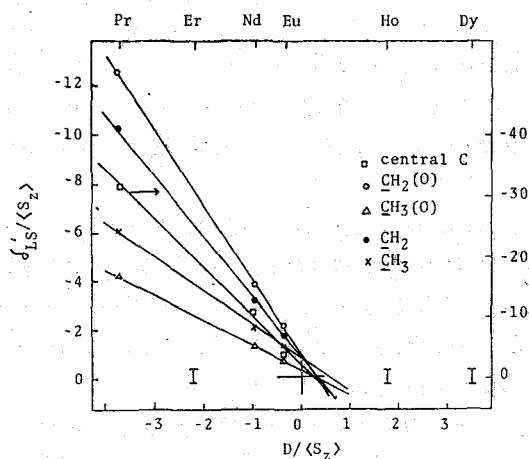


Fig. 3. $\delta'_{LS}/\langle S_z \rangle \sim D/\langle S_z \rangle$ plots for the TEOP-Ln(fod)₃ system

- 1) M. Hirayama and Y. Kawamata, Chem. Lett., 1980, 1295.
M. Hirayama and K. Kitami, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1980, 1030.
M. Hirayama and Y. Sasaki, Chem. Lett., 1982, 195.
M. Hirayama, Y. Kawamata, Y. Fujii, and Y. Nakano, Bull. Chem. Soc. Jpn., 55, 1798 (1982).

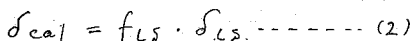
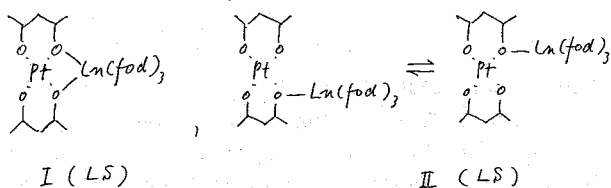
1 序

配位子に酸素をもつ遷移金属錯体(S)がその酸素の剰余配位力により *Sievers* 試薬(L)と結合し、ランタニドシフト(LIS)が観測されている例がいくつか報告されており、グリツジ酸素が3ヶの場合は NMR time scale にくらべて L-S の交換速度が非常に小さく、2ヶの場合はかなり速い²⁾ことが知られている。我々はこれにヒントを得て、錯体内の金属イオンの LIS を観測を試み、いくつかのものについて、⁵⁹Co, ²³Al, ⁹Be の観測に成功している³⁾。これらのデータは錯体内の他の磁気核(¹H, ¹³C 等)の LIS と共に立体構造の探求に利用出来るが、凝コンタクトシフト(pcs)とコンタクトシフト(cs)に分離が完全に出れば、特に cs の定量的考察より、金属周辺の電子状態について興味ある知見が得られることが期待される。この研究の延長として今回は Pt(acac)₂ の ¹⁹⁵Pt-LIS の観測結果と、これを用いて決定された溶液内 L-S 平衡の平衡定数と Ln(fod)₃ への配位状況について報告する。

2 実験

Pt(acac)₂ (S)は K₂PtCl₆ と acetylacetonone より合成した。溶媒は CDCl₃。内部基準は ¹H の場合は TMS, ¹⁹⁵Pt の場合は同時に測定された ¹³C の TMS レグナルを用いた。Ln(fod)₃ (L)は Hfod と Ln(NO₃)₃ より合成した。(Ln = La, Pr, Nd, Eu, Sm, Gd, Ho, Er, Yb) 装置は ¹H は R-20A (日立), ¹⁹⁵Pt は CFT-20 (バリアン) (Broad Band Accessory 付) を用い、Pt の ν は 17,089 MHz である。基準濃度 [S₀] は 0.2 M (¹H), 0.2 ~ 0.5 M (Pt)。シフト試薬と濃度比 [L₀]/[S₀] (P) を最高 2.0 ~ 3.8 まで変化させながら LIS を測定した。測定角は 10 ~ 30 度。LIS ~ P plots の解析はプログラム LIS-A2 を用い、HITAC M-200H, 8250 により行った。

3 溶液内平衡



$$f_{LS} = \frac{1}{2} \left[\left(1 + P + \frac{1}{K[S_0]} \right) - \left\{ \left(1 + P + \frac{1}{K[S_0]} \right)^2 - 4P \right\}^{\frac{1}{2}} \right]$$

1:1 アダクトとしては、これまでの研究例との類似性より構造 I を考え、平衡式 (1) により S と LS の非常に速い交換による平均化の結果、LIS は (2) 式で表わされる。K は平衡定数、δ_{LS} は 1:1 アダクトの限界シフトである。尚、1:2 アダクト LS₂ および L + L ⇌ L₂ の機構は必ずし

も実験の $\delta_{obs} \sim p$ plots への一致を改善しないのを取り入れたことにした。

4. 結果と考察

(i) K と δ_{CS} の決定

1H のスペクトルおよび $\delta_{obs} \sim p$ plots の例をそれぞれ Fig. 1, 2 に示し、また ^{195}Pt のスペクトルおよび $\delta_{obs} \sim p$ plots の例を Fig. 3, 4 にそれぞれ示す。 δ_{obs} が式(2)に fit するように computer 解析した結果得られた K 値を表 1 に示す。9~18 とかなりバラツキているが二種の解析ではまだバラツキが大きい方である。平均値 $K \approx 23$ を得た。また同時に得られた δ_{CS} を表 2 に示す。

(ii) δ_{CS} の pcs , cs , CFS への分離

先づ、錯形成レフト(CFS)は $La(fod)_3$ により誘起されるレフトであるとこれとすべし Ln によるレフト δ_{CS} から差し引き、 δ'_{CS} とした。

$$\delta_{CS} = pcs + cs + CFS, \quad \delta'_{CS} = pcs + cs$$

分離についてはこれまでいくつかの方法が提案されているが、アダクトが磁気的に軸対称性を有していれば

$$\delta'_{CS} = A \langle S_z \rangle + G \cdot D \quad \text{----- (3)}$$

とおけ、 $\langle S_z \rangle$, D はそれぞれ Golding, Bleaney による値) A と G が Ln に依らないとすれば

$$\delta'_{CS} / \langle S_z \rangle = A + G \cdot D / \langle S_z \rangle \quad \text{---- (4)}$$

(4)式で $\delta'_{CS} / \langle S_z \rangle$ vs. $D / \langle S_z \rangle$ plot が直線になるはずである。(== A と G はそれぞれ超微細分裂定数、幾何因子である) これらの条件を満たしているかどうか test するためには plot 1 をみたし、Fig. 5, 6 のようになり、 1H , ^{195}Pt においても lanthanoid series の前半と後半についてそれぞれ2本の直線が得られた。しかもこれらの勾配がそれぞれ非常によく対応しており、全般的に見て、直線関係が成立しないといふことは少ない。この結果からみて、 $Ln-Pt$ 軸のまわりには面軸運動することによる平均化により見かけの軸対称性を保っていると思われる。この直線の勾配と切片より G と A を見限り、 cs と pcs を分離した。種々の不確かさが混入しているため δ_{cal} と δ_{CS} の一致は必ずしもよくないが、結果を表 3, 4 に掲げる。series の前半と後半で異なった傾向がみられるのは大変興味深い。(4)

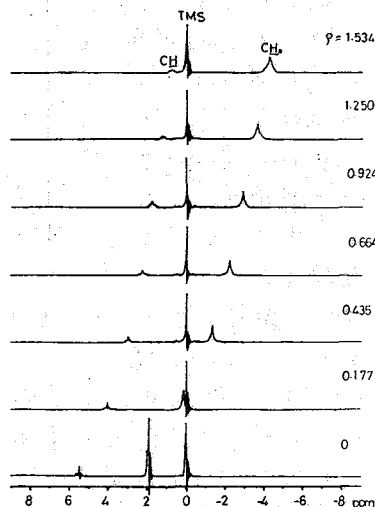


Fig. 1. Variation of 1H -shifts with the concentration of $Pr(fod)_3$ in $CDCl_3$ at $25^\circ C$. $[S_0] = 0.21 M$

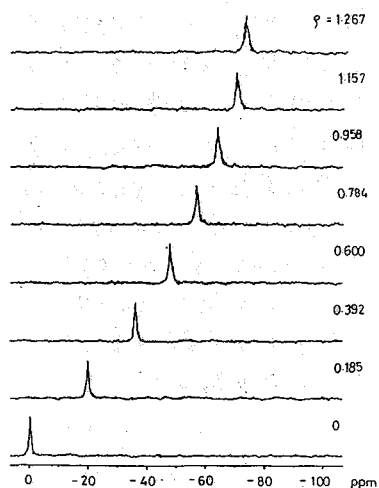


Fig. 3. Variation of ^{195}Pt -shifts with the concentration of $Pr(fod)_3$ in $CDCl_3$ at $25^\circ C$. $[S_0] = 0.46 M$

(iii) 配位構造の考察
(ii) で決定した G の分子内比に於いて *geometric factor* の計算を行なった。 $Pt(acac)_2$ の分子パラメータは、 $Pd(acac)_2$ の X-ray 解析データを用いた。まず、アダクトの座標を Fig. 7 のように決め、配位パラメータとしては $O-Ln$ 結

合距離 (R) と $Pt(acac)_2$ を平面としてこれが ZX 平面となる角を α とした。 G の比に関する計算値と実測値の間の *fitting analysis* の結果得られた、2つのパラメータに関する Q -map を Fig. 8 に示す。 (R_1) は適当に選んだ α に対する媒介変数である) この結果、かなり深い谷がえぐれえぐれ得られ、妥当な結果になったと思われる。 Q_{min} より取り出される値は、series 前半では $R=1.7 \text{ \AA}$, $\alpha=65^\circ$ 後半では $R=1.9 \text{ \AA}$, $\alpha=59^\circ$ である。 R の値は $Ln-\beta$ ジェクトンに見られる一般的な長さに比較してかなり短かい。

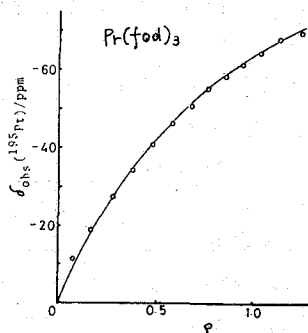


Fig. 4. $\delta_{obs}(^{195}\text{Pt})$ vs ρ plots

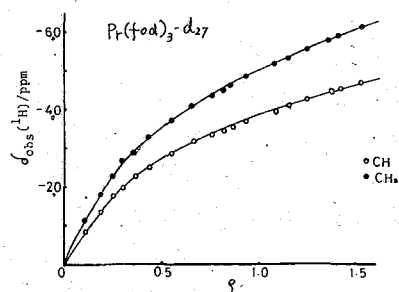


Fig. 2. $\delta_{obs}(^1\text{H})$ vs ρ plots

Table 1. K_1 values obtained from the fits of LIS data to one step equilibrium with no association mechanism

	^{195}Pt	CH	CH_3
$\text{La}(\text{fod})_3$	57.5	----	----
$\text{Pr}(\text{fod})_3$	9.8	25.4	24.4
$\text{Nd}(\text{fod})_3$	49.7	16.6	17.6
$\text{Sm}(\text{fod})_3$	----	16.6	15.6
$\text{Eu}(\text{fod})_3$	30.2	19.5	19.5
$\text{Dy}(\text{fod})_3$	17.6	----	8.8
$\text{Ho}(\text{fod})_3$	20.0	29.3	60.5
$\text{Er}(\text{fod})_3$	48.8	34.1	21.5
$\text{Yb}(\text{fod})_3$	20.0	20.0	20.0

Table 2. δ_{LS} values obtained from the fits of LIS data to one step equilibrium with no association mechanism^{a)}

	^{195}Pt	CH	CH_3
$\text{La}(\text{fod})_3$	-24.02	----	----
$\text{Pr}(\text{fod})_3$	-105.93	-6.03	-7.97
$\text{Nd}(\text{fod})_3$	-40.91	-2.35	-3.15
$\text{Sm}(\text{fod})_3$	----	-0.36	-0.67
$\text{Eu}(\text{fod})_3$	29.59	1.26	1.84
$\text{Dy}(\text{fod})_3$	-72.95	----	-26.85
$\text{Ho}(\text{fod})_3$	-21.69	-10.53	-6.85
$\text{Er}(\text{fod})_3$	8.12	1.82	3.69
$\text{Yb}(\text{fod})_3$	3.25	1.17	1.88

a) In ppm. Negative signs denote high-field shifts.

- 1) L.F.Lindoy, H.C.Lip, H.W.Louie, M.G.B.Drew, and M.J.Hudson, J.Chem.Soc., Chem. Commun., 1977, 778; L.F.Lindoy and H.W.Louie, J.Am.Chem.Soc., 101, 841(1979).
- 2) L.F.Lindoy and W.E.Moody, J.Am.Chem.Soc., 97, 2275(1975); 99, 5863(1977); J. K. Beattie, L.F.Lindoy, and W.E.Moody, Inorg. Chem., 15, 3170 (1975).
- 3) M. Hirayama and Y. Kawamata, Chem. Lett., 1980, 1295; M. Hirayama and K. Kitami, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1980, 1030; M. Hirayama, Y. Kawamata, Y. Fujii, and Y. Nakano, Bull. Chem. Soc. Jpn., 55, 1798 (1982).
- 4) B. A. Levine, J. M. Thornton, and R. J. P. Williams, J.C.S.Chem. Commun., 1974, 669; A. D. Sherry and E. Pascual, J. Am. Chem. Soc., 99, 5871 (1977).

Table 4. Separation of $\delta'_{LS}(^{195}\text{Pt})$ into cs and pcs by the graphical method^{a)}

	cs	pcs	δ_{cal}	δ_{LS}	$\delta'_{\text{LS}}^{\text{b)}$
La(fod) ₃	0	0	0	-24.02	0
Pr(fod) ₃	0.54	-80.98	-80.44	-105.93	-81.91
Nd(fod) ₃	0.82	-30.92	-30.10	-40.91	-16.89
Sm(fod) ₃	-0.01	-5.15	-5.16	-----	-----
Eu(fod) ₃	-1.91	29.45	27.50	29.59	53.61
Dy(fod) ₃	39.85	-100.21	-60.35	-72.59	-48.93
Ho(fod) ₃	31.59	-39.08	-7.49	-21.69	2.33
Er(fod) ₃	21.46	33.07	54.53	8.12	32.14
Yb(fod) ₃	3.61	22.04	25.63	3.25	27.27

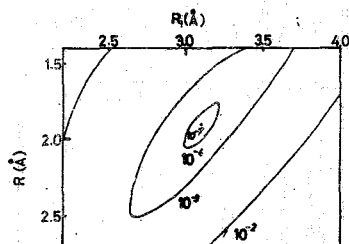
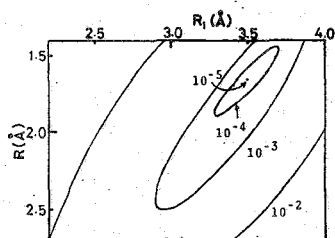
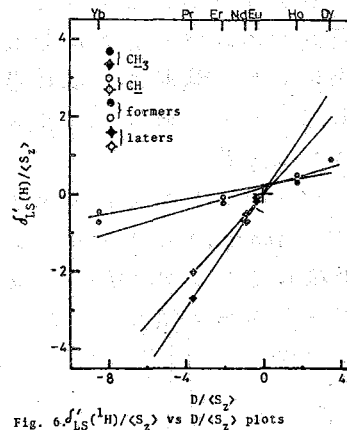
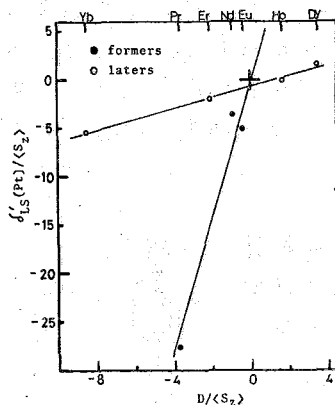
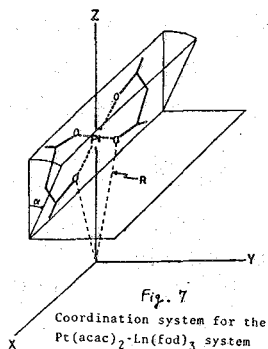
a) In ppm. Negative signs denote high-field shifts.

b) $\delta'_{\text{LS}} - \delta_{\text{LS}}(\text{La})$

TABLE 3. SEPARATION OF $\delta'_{\text{LS}}(^{1}\text{H})$ INTO CS AND PCS BY THE GRAPHICAL METHOD

	CS	PCS	δ_{CAL}	δ'_{LS}
LA	0	0	0	0
PR	1.68	-6.62	-4.54	-6.03
ND	2.54	-2.37	0.17	-2.35
CH	SM	-0.04	-0.39	-0.43
EU	-6.04	2.26	-3.78	1.26
DY	-6.25	-8.5	-14.75	-----
HO	-4.96	-3.32	-8.28	-10.53
ER	-3.37	2.81	-0.56	1.82
YB	-0.57	1.87	1.30	1.17
LA	0	0	0	0
PR	0.17	-8.16	-7.99	-7.71
ND	0.25	-3.12	-2.87	-3.15
CH ₃	SM	0.00	-0.52	-0.67
EU	-0.60	2.97	2.37	1.84
DY	-6.91	-12.90	-19.81	-26.85
HO	-5.48	-5.03	-10.51	-6.85
ER	-3.72	4.26	0.54	3.69
YB	-0.63	2.84	2.21	1.88

A) In ppm. Negative signs denote high-field shifts.



○小野俊雄 小川忠男 川西康博 (北里大・衛生)

前田満和 斉藤 肇 (国互がんセンター・研)

コラーゲンの架橋物質ピリジノリンは3個のヒドロキシリジン(Hyl)から誘導されるピリジニウム環を有する物質で、エラスチンの架橋物質デスモシンに類似している。これは藤本らにより100MHz ^1H -nmr や ^{13}C -nmr, MS などにより Fig.1 のように構造決定された。我々の研究室で得たピリジノリンの同定のため、300MHz nmr による測定を行うとメチン、メチレン領域のプロトンシグナルのよく分離したスペクトルが得られ、デカップリング測定を繰り返して全シグナルの帰属を行って Fig.1 の構造を確認した。我々が骨コラーゲンから分離した新しい蛍光物質はピリジノリンと分光特性は同じであるが、nmr により構造を比較するとピリジノリンの芳香環 N に結合する残基が Hyl ではなく Lys である *N*-(5-amino-5-carboxypentyl)-3-hydroxy-4-(2-amino-2-carboxyethyl)-5-(3-amino-3-carboxypropyl)-pyridine で、これをデオキシピリジノリンと命名した。(Fig.2)

実験

ピリジノリンおよびデオキシピリジノリンはウシ大腿骨の不溶性コラーゲンから分離精製した。 ^1H -および ^{13}C -スペクトルは Bruker CXP-300 の装置を使用し FT 法により測定した。試料は重水に溶解しプロトン化学シフトは溶媒中の HDO のシグナルを内部標準として計算し ^{13}C 化学シフトは TMS を内部標準とした。

結果と考察

1) ピリジノリンの ^1H -スペクトル

60MHz, 100MHz ではデスモシン類との相違は明確にできなかったが、300MHz ではピリジニウム環側鎖のメチン、メチレン

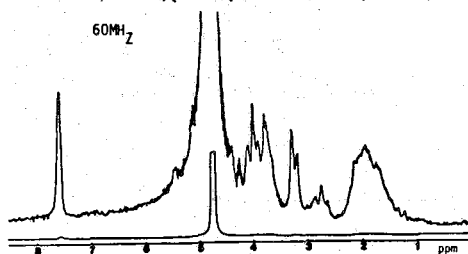


Fig.1 pyridinoline

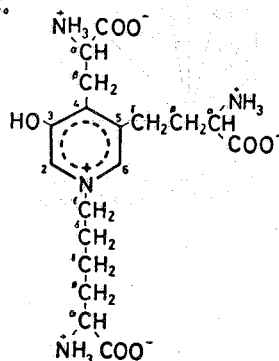
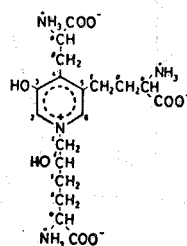


Fig.2 Deoxypyridinoline

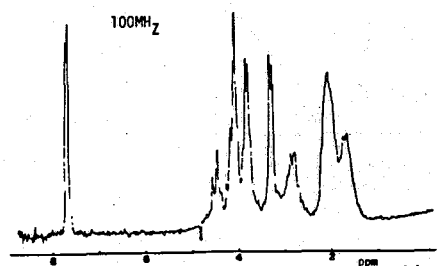


Fig.3

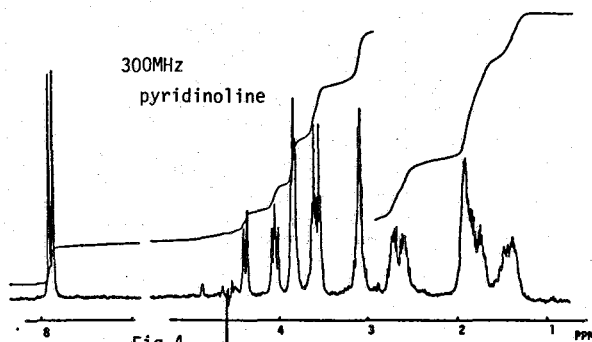


Fig.4

おのとしお おがわただお かわにしやすひろ まえだみつあき さいとうはじめ

領域のスペクトルは主要な遷移がすべてよく分解され観測されている。この芳香環側鎖メチレンプロトン6個、およびHyl残基由来の α 位メチンプロトンが3個、それぞれ低磁場側にシフトし分離されている。各 α 位メチンはその側鎖の長さに応じて芳香核環電流効果により4位の α 位が最も低磁場側に、そして5位および1位がつづいている。 δ 7-8の芳香環プロトンは2個分が割当てられ2本のシグナルは各々独立したカップリングのみみられない2位と6位のピリジニウム環プロトンである。60MHzでは芳香環プロトンは1個と誤って帰属されたものが3位の-OHの影響を受け2位のプロトンが低磁場側にシフトし6位のプロトンから分離されている。(Fig.4) 芳香環Nの側鎖Hyl残基の δ および ϵ のCH, CH₂は δ 位が不斉炭素原子になるので立体構造を反映してC δ -C ϵ の自由回転が阻害され ϵ 位のプロトンは非等価となっている。 δ と ϵ 位に電気陰性原子が置換した J_{gem} H-Hの配置はJを大きくしている。(Fig.6)これは60MHz・100MHzでの δ H_A, H_Bおよびサブスペクトルがきわめて小さく J_{A-B} は決定できなかったが、300MHzにより明瞭に分離したシグナルは δ 4.4の四重線を照射すると δ 4.0の四重線は二重線に、またこの δ 4.0を照射すると δ 4.4は一重線に、そして δ 3.8を照射すると δ 4.0は二重線となる。同様にしてFig.5のようにデカップリング測定でABX型の帰属が容易にできた。1位および5位の β , γ -CH₂もそれぞれC β -C γ の自由回転が阻害され、 J_{vic} と J_{gem} の組合せによる複雑な関係を構成し多重線に分裂しているが、5位の δ 位プロトンは β 位の照射によりAB型の四重線となり J_{gem} が明瞭になっている。1位の β 位および γ 位とは区別できる。

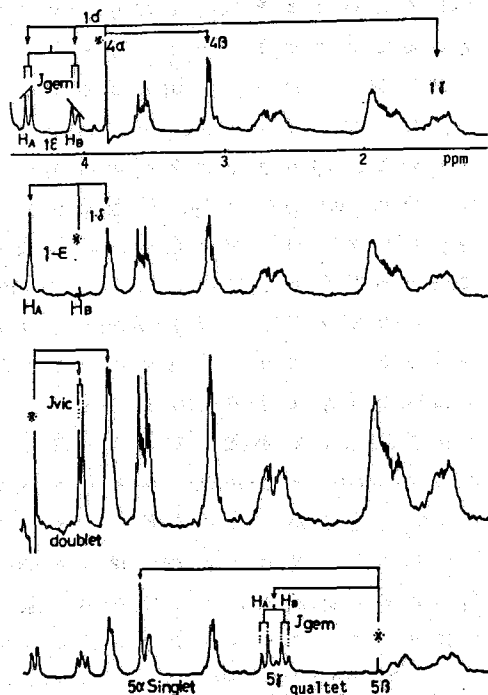


Fig.5 Spectrum recorded during irradiation at 4 mark

2) デオキシピリジノリンの¹H-スペクトル

芳香族プロトン2個分がピリジノリンと同様、 δ 8.0, π 9に2本のシグナルとして観測され、芳香環構造に差はない。 δ 3-5では分裂パターンに著しい相違があり、ピリジノリンの δ 3.8のプロトン2個分の多重線シグナルはみられず、新たにプロトン1個分の三重線が明瞭に観測された。

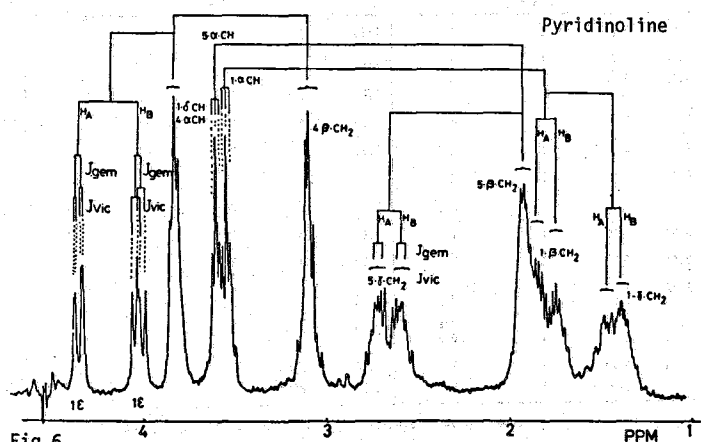
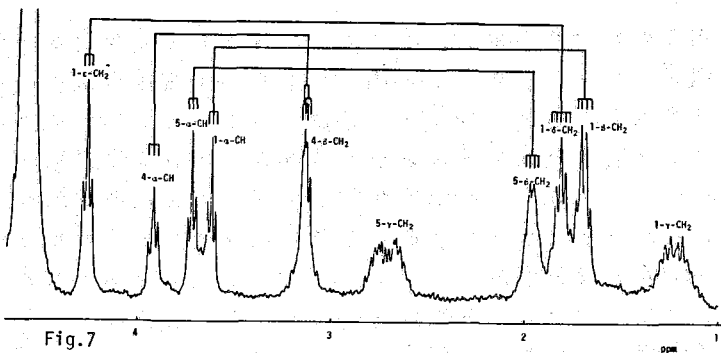


Fig.6

δ 4-5 ではピリジノリンの2組の四重線シグナルは二項定理に従った面積比を示す典型的な三重線になっており、これら化学シフトやスピン分裂パターンの相違はピリジニウム環Nに結合する残基に帰属されるシグナルに顕著で、この残基が



Hyl でないことを示しており、その他の4位、5位の側鎖はそのまの構造を保持していることが推定される。プロトンの数の帰属からはピリジノリンとの差はプロトンが7個多いのみで、新たなシグナルの出現もなくCHからCH₂の変換によるもので、ピリジノリンのδ4.4の1個分のプロトンはδ4.2でプロトン2個分の三重線になっている。即ちδ位に2個の等価なプロトンが帰属でき、芳香環Nに結合する残基はδ位に-OHのないLys残基を当てることができる。δ1.5-2.0領域のメチレンスペクトルからは、Nの電子求引効果と環電流効果によりピリジノリンにおいて、5-βCH₂との重なりで観測された1-β-CH₂はデオキシピリジノリンでは1-δ-OHがプロトンに置換することにより、それぞれのC-C結合の自由回転が寄与し1-β-CH₂と1-δ-CH₂は四重線と五重線として分離してきたと考えられる。また4-β-CH₂と5-β-CH₂はともにベンジル型のCH₂であるが、それぞれジエミナルスピン結合を示し、特に5-γ-CH₂は5-β-CH₂が4位側鎖との立体関係によりH_A, H_Bに分離し、それぞれがジエミナルカップリングで分裂して

Comparison of chemical shifts in D₂O of protons in Pyridinolines and in Deoxypyridinolines

Pyridinolines				Deoxypyridinolines			
ppm	Assignment	Number of protons	Multiplicity	ppm	Assignment	Number of protons	Multiplicity
1.68	1 δ	2	M	1.23	1 γ	2	M
1.76	1 β	1	M	1.70	1 β	2	Qua
1.86	1 β	1	M	1.82	1 δ	2	Qui
1.95	5 β	2	M	1.79	5 β	2	M
2.62	5 γ	1	M	2.71	5 γ	2	M
2.73	5 γ	1	M				
3.13	4 β	2	M	3.15	4 β	2	M
3.59	1 α	1	T	3.64	1 α	1	T
3.64	5 α	1	T	3.74	5 α	1	T
3.87	1 δ 4 α	2	M	3.93	4 α	1	T
4.06	1 ε	1	Qua	4.28	1 ε	2	T
4.40	1 ε	1	Qua				
7.88	6-ring	1	S	7.96	6-ring	1	S
7.93	2-ring	1	S	8.03	2-ring	1	S

Fig. 8

M: Multiplet S: Singlet T: Triplet Qua: Quartet Qui: Quintet

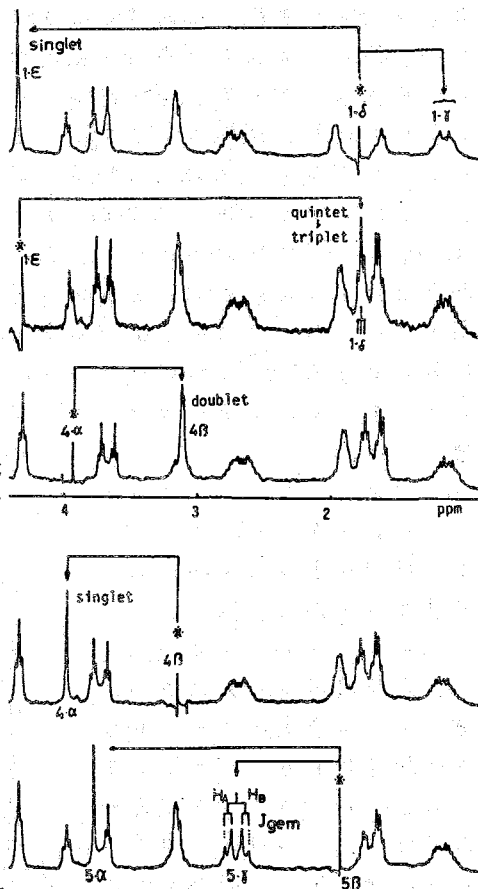


Fig. 9 Spectrum recorded during irradiation at * mark

複雑なスペクトルを示している。Fig. 9 のようにスピンデカップリング法により δ_{H^9} の 5β を照射すると AB 型の四重線となり大きな J_{gem} が観測された。

3) ピリジノリンの ^{13}C スペクトル

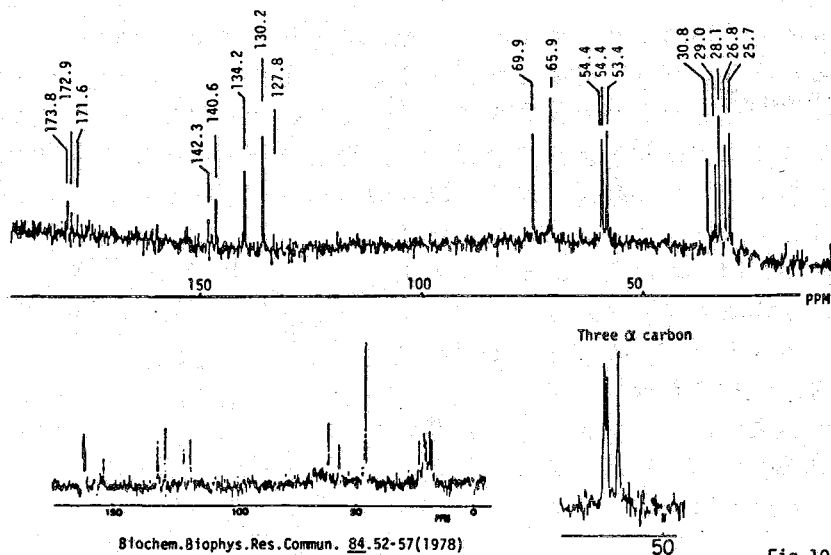


Fig. 10

CXP-300装置により約 3mg のピリジノリンで ^{13}C -スペクトルが得られた。プロトンデカップリングによる NOE 測定では、低磁場側のカルボキシル基のシグナルの $\%N$ 比は小さいが全骨格炭素が帰属できた。 δ_{20-30} 領域に 4 位および 5 位の CH_2 が 3 個と 1 位の β, δ - CH_2 が 2 個帰属でき 1 位の ϵ - CH_2 は芳香環 N の強い電子求引性により約 40 ppm 低磁場側にシフトし δ 位のメチンと同じ領域にみられる。3 個の Hyl 由来の α 位メチンは藤本 & Deyl のスペクトルでは 3 本が重なった 1 本のシグナルとして帰属されているが、高分解能 nmr では δ_{53-54} に 3 本のシグナルとして検出され、アミノ酸 3 個から形成されることをより明確にしている。また芳香環領域の 5 本のシグナルはそれぞれの置換基により NOE は異なっているが骨格構造は炭素 5 個からなる芳香族 6 員環であることがわかった。(Fig. 10)

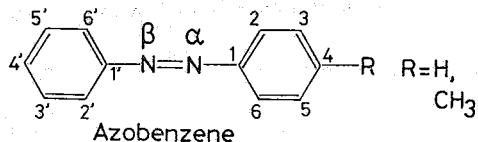
以上の結果より 60 MHz, 700 MHz では明確にできなかった帰属が 300 MHz では容易にでき、コラーゲンの新しい架橋物質デオキシピリジノリンの構造を決定することができた。300 MHz を使用すれば特定シグナルの解析から、これらの架橋物質の低分子ペプチド中の存在を検出することも可能であると思われる。

- Fujimoto D, Moriguchi T, Ishida T. and Hayashi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84** 52-57 (1978)
 Tsuda M., Ono T., Ogawa T. and Kawanishi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104** 1407-1412 (1982)
 DEYL Z., MACEK K., ADAM M. and VANČÍKOVÁ, *Biochim. Biophys. Acta* **625** 248-254 (1980)

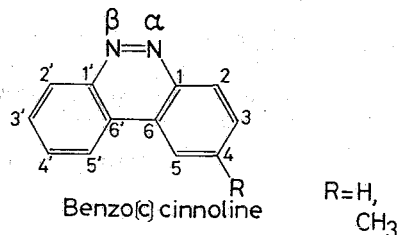
アゾベンゼンおよびベンゾ[C]シニリンの ^{13}C NMR化学シフト
に対する $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 同位体効果
(京大薬, 京都薬大) の黒田義弘 藤原靖弘*

1. 昨年のNMR討論会においてアゾベンゼン(AB)およびベンゾ[C]シニリン(BC) [図1]の $^1\text{J}(\text{C}-\text{N})$ の符号について報告した。¹⁾ 今回はこれらアゾ化合物について $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 同位体効果の ^{13}C 化学シフトへの影響を $^{14}\text{N}_2$ -, $^{15}\text{N}_1$ -, および $^{15}\text{N}_2$ -体の3種混合試料溶液で観測し、あわせて昨年の符号決定の過程で見出された $^{15}\text{N}_1$ -体における $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 同位体効果のC-1化学シフトへの影響に関する次の(1),(2)についてさらに詳しく検討する。

(1) 中性溶液において *trans*-AB- $^{15}\text{N}_1$ では ^{15}N に結合したC-1, $\text{C}1(^{15}\text{N})$, は ^{14}N に結合したC-1, $\text{C}1(^{14}\text{N})$, よりも高磁場に観測される。しかし *cis*-AB- $^{15}\text{N}_1$ および BC- $^{15}\text{N}_1$ では逆に $\text{C}1(^{14}\text{N})$ の方が高磁場側に観測される。



(2) 強酸性溶液においては AB- $^{15}\text{N}_1$, BC- $^{15}\text{N}_1$ の両方とも $\text{C}1(^{15}\text{N})$ と $\text{C}1(^{14}\text{N})$ の化学シフト差が中性溶液中における値よりも相当に大きく(6-7倍)なる。



(1) についてはC-1の帰属そのものが重要であり、その帰属を再検討するために4位にメチル基を、 β 位のNを ^{15}N 置換した化合物を合成し、 $^1\text{J}(\text{C}-\text{N})$ を実測しABおよびBCの値と比較検討した。また(2)については中性溶液中とは異なった同位体シフトの機構を考察して説明することを試みた。

Fig. 1 Structures and numbering scheme.

2. ABおよびBCの ^{15}N 置換体は先に合成したものを用了。メチル置換アゾベンゼン(Me-AB)はアニリン- ^{15}N と4-ニトロソトルエンから合成し、メチル置換ベンゾ[C]シニリン(Me-BC)はMe-ABの光環化反応により合成した。 ^{13}C NMRスเปクトル: 中性溶液はJEO L F X-200(50MHz)にて、強酸性溶液はVarian CFT-80(20MHz)にて測定を行なった。実測された同位体シフト(ppm)をTable Iに示す。

3. (1) については: *trans*-AB および BC の中性(CDCl_3) 溶液中での測定スเปクトル例を図2,3に示す。 $^{14}\text{N}_2$ -体および $^{15}\text{N}_2$ -体のC-1位の化学シフトの中心位置は $\text{C}1(^{14}\text{N}_2)$, $\text{C}1(^{15}\text{N}_2)$ と記した。図2から明らかなように化学シフトの順序は低磁場側から *trans*-AB については $\text{C}1(^{14}\text{N}_2)$, $\text{C}1(^{14}\text{N}_1)$, $\text{C}1(^{15}\text{N}_1)$, $\text{C}1(^{15}\text{N}_2)$ である。この順序は「重い同位体置換は隣接核に高磁場シフトを引き起こす」という normal な同位体シフトの方向と一致する。ところがBCでは $\text{C}1(^{14}\text{N}_2)$, $\text{C}1(^{15}\text{N}_1)$, $\text{C}1(^{14}\text{N}_1)$, $\text{C}1(^{15}\text{N}_2)$ となり $^{15}\text{N}_1$ -体の $\text{C}1(^{15}\text{N}_1)$, $\text{C}1(^{14}\text{N}_1)$ に関して順序が逆になる。先の報告¹⁾ においてはこの $^{15}\text{N}_1$ -体のC-1の帰属は $^1\text{J}(\text{C}-\text{N})$ についてのいわゆる「One-bond lone-pair 効果」²⁾ によって決定くろだよしむろ ふじわらやすむろ

した。この *One-bond lone-pair* 効果を考慮すればアゾ基窒素に関する $J(C-N)$ の絶対値は一般に小さい(2~3 Hz以下)と期待されるので、たとえば BC については 3.4 Hz の J 値を示す C-1 と 7.3 Hz の J 値を示す C-1 のうち前者を $J(C-N)$ と考えて C(^{15}N) に、残り 7.3 Hz は $^2J(C-N)$ と考えて C(^{14}N) と帰属した(同様に cis-AB では $J=3.9$ Hz, $^2J=10.0$ Hz と帰属)。一方、同位体シフトの方向については必ずしも重い同位体置換により高磁場シフトするとは限らず、しばしば低磁場シフトする例も報告されている。³⁾ その中でも、cis- および trans-CHF=CDF の 1H シフトに対する D/H 同位体効果の金沢等の報告^{3a)} は興味深い(trans 形の CHF=CDF では 0.005 ppm 高磁場シフトし、cis 形では 0.0017 ppm 低磁場シフトする)。いずれにしても ^{15}N -体における 2 個の C-1 の帰属を決定する確実な手段は、AB- ^{15}N および BC- ^{15}N のものについては考えられない。そこで今回さらに分子に置換基を導入することによって非対称となし 2 個の C-1 の化学シフトを置換基効果により少しずらしたものの(C-1 および C-1' と称す)について $J(C-N)$, $^2J(C-N)$ を観測することを試みた。この場合どちらの窒素が ^{15}N enrich されているかは合成上既知であるので J と 2J の区別は C-1, C-1' の帰属が確実であれば明らかとなる。置換基としては、この C-1, C-1' の帰属を確実に行なえてしかも、全体として $^2J(C-N)$ の大きさにはほとんど影響を与えそうにはないメチル基を選び、合成の都合により 4 位[図 1]にメチル基を導入し、また β 位の N を ^{15}N 置換した。C-1, C-1' の帰属はまず 1H NMR においてメチル基を照射して NOE を観測して近いプロトン(たとえば Me-AB では H-3,5)を見出し、さらに順次 NOE または Decoupling により 1H NMR スペクトルを帰属した後、プロトンの Selective Decoupling により ^{13}C スペクトルを帰属した。4 位にメチル置換したアゾ化合物の $^2J(C-N)$ はもとの化合物の $^2J(C-N)$ と良く一致したが BC- ^{15}N (およびその類推から

Table I: Observed $^{15}N/^{14}N$ Isotope Effects on ^{13}C Chemical Shifts of Azobenzene and Benzo[c]cinnoline

compd	solvent	isotope shift ^a (δ_{IS})			
		Cl($^{14}N_2$)-Cl(^{14}N)-Cl(^{15}N)-Cl($^{15}N_2$)		Cl($^{14}N_2$)-Cl($^{15}N_2$)	
azobenzene	CDCl ₃	0.005	0.010	0.003	0.018
	CCl ₄ +C ₆ D ₁₂	0.004	0.012	0.002	0.018
	22N D ₂ SO ₄	-0.025	0.075	-0.020	0.030
	(+15% EtOH)				
benzo[c]-cinnoline	CDCl ₃	0.002	0.017	0.003	0.022
	CCl ₄ +C ₆ D ₁₂	0.001	0.018	0.003	0.022
	16N D ₂ SO ₄	-0.040	0.105	-0.045	0.020
	(+10% EtOH)				

^aIn ppm. A positive sign indicates an upfield ^{15}N isotope effect on a ^{13}C chemical shift. ± 0.002 ppm for neutral solutions and ± 0.01 ppm for acidic solutions. The assignments of Cl(^{14}N) and Cl(^{15}N) in benzo[c]cinnoline have been interchanged from those given in ref 1.

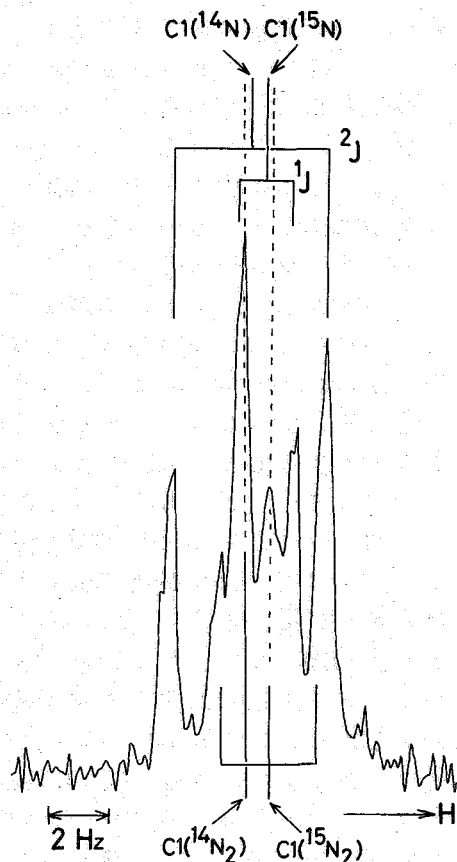


Fig. 2 ^{13}C NMR spectrum of ipso (C1) carbons of mixture of trans-azo-benzene- $^{14}\text{N}_2$ (a), trans-azobenzene- $^{15}\text{N}_1$ (b), and trans-azobenzene- $^{15}\text{N}_2$ (c) in CDCl_3 , a:b:c=1:5:2.

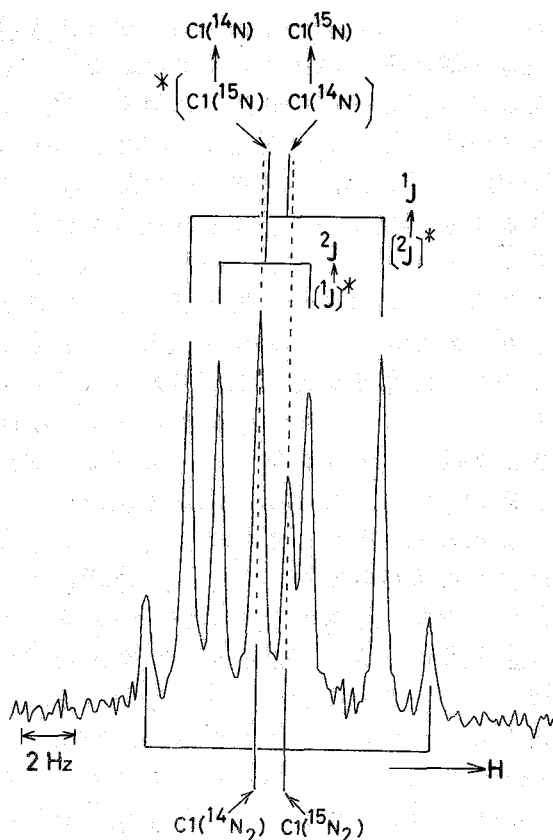


Fig. 3 ^{13}C NMR spectrum of ipso (C1) carbons of mixture of benzo[c]cinnoline- $^{14}\text{N}_2$ (a), benzo[c]cinnoline- $^{15}\text{N}_1$ (b), and benzo[c]cinnoline- $^{15}\text{N}_2$ (c) in CDCl_3 , a:b:c=1:3:1. * Assignments have to be interchanged; see the text.

cis-AB- $^{15}\text{N}_1$) については $\text{C1}(^{14}\text{N})$, $\text{C1}(^{15}\text{N})$ において先に報告した帰属は誤りで、逆であることがわかった。C1 の帰属を逆にすることにより同位体シフトの方向は normal なものとなるが、 $^1J(\text{C-N})$ 値は異常に大きな値 ($J=7.3 \sim 10.0 \text{ Hz}$) となる。この原因としては cis の関係にある隣り合った lone pair orbital からの π の寄与が異常に大きいと思われる。事実 INDO-MO 計算によれば Fermi 項がたしかに π の方向に大きくなる (trans-AB に比べて) 傾向は示している。しかし定量的な合いは良くない。

(2) について： 化学シフトへの同位体効果の機構は i) 真正 (intrinsic) 同位体効果と、ii) 平衡同位体効果に大別することが出来る。 CDCl_3 溶液中での平衡過程としてはアゾ基窒素と CDCl_3 との水素結合が考えられるが、Table I に示すように CDCl_4 での同位体シフト値とほとんど変わらないので中性溶液中では i) の機構のみによる同位体シフトと結論出来る。一方、酸性溶液中の同位体シフトについて今回新たに得られた知見は $\text{C1}(^{14}\text{N}_2) - \text{C1}(^{15}\text{N})$ および $\text{C1}(^{15}\text{N}) - \text{C1}(^{15}\text{N}_2)$ 間のシフト値が π つまり $\text{C1}(^{15}\text{N}_2)$

と $C(1^{15}N_2)$ が $^{15}N_1$ -体の $C(1^{14}N)$ と $C(1^{15}N)$ の間に出現する事である。(低磁場側から $C(1^{14}N)$, $C(1^{14}N_2)$, $C(1^{15}N_2)$, $C(1^{15}N)$ の順)。さらに注目すべき事は $C(1^{14}N)$ - $C(1^{15}N_2)$ 間の同位体シフト値が中性溶液中の値にほぼ等しい事である。

これらの結果は $i)$ の機構のみでは説明出来ない。そこで $ii)$ における平衡過程としては図4のようなプロトン-シヨニを考えた。

いま図4に示すような ^{15}N -体においてプロトン付加が ^{14}N (A) が ^{15}N (B) に片寄りば $C(1^{14}N)$ - $C(1^{15}N)$ 間には $i)$ の機構による同位体シフトに新たな化学シフト差が加算される。このプロトン付加の片寄りは ^{14}N と ^{15}N の pK_a の違いに帰因するものであるがその pK_a 差, ΔpK_a , は小さいので強酸性中での $^{14}N_2$ -体と $^{15}N_2$ -体1のプロトン付加の程度を大きく変えるものとは考えられない。それゆえ $^{14}N_2$ -体と $^{15}N_2$ -体の C-1 のシフト差は中性溶液中でのそれとほとんど同じであると解釈出来る。

図4において $A \rightleftharpoons B$ の平衡定数 $K = B/A$ は $K = (\delta - \delta') / (\delta + \delta')$ から算出することが出来る。³⁾ ここで δ はプロトン付加が一方の窒素に固定したときの両方の C-1 の化学シフト差, δ' は Table I における $C(1^{14}N)$ - $C(1^{15}N)$ 間のシフト値から真性同位体シフトを引いたものである。 Δ 値は Me-AB および Me-BC の C-1, C-1' のプロトン付加シフト値から推定した。計算結果を Table II に示した。 K は約 1.05 となり約 5% ^{14}N にプロトン付加が多く起こることを示している。これを ^{14}N と ^{15}N の pK_a 差に置き換えれば ΔpK_a Table II: Δ and δ Values, and Calculated Equilibrium Constants (K) and pK_a Differences (ΔpK_a) between ^{15}N and ^{14}N of Azobenzene- $^{15}N_1$ 2.02 が得らる。

謝語試料の合成に

便宜をはかっていただいた京都薬大の岡本正夫教授に感謝致します。

compd	acid	Δ^a	$\Delta(\text{cor})^{a,b}$	δ^a	K	ΔpK_a^c
azobenzene- $^{15}N_1$	D ₂ SO ₄	-2.20	-2.49	0.065	1.054	0.0228
	H ₂ SO ₄	-2.08	-2.35	0.055	1.048	0.0204
benzo[c]cinnoline- $^{15}N_1$	D ₂ SO ₄	-2.11	-4.03	0.088	1.045	0.0191
	H ₂ SO ₄	-1.96	-3.73	0.073	1.040	0.0170

^a in ppm, ± 0.01 ppm.

^b Corrected by taking into account the extent of protonation.

^c $\Delta pK_a = pK_a(^{15}N) - pK_a(^{14}N)$.

文献

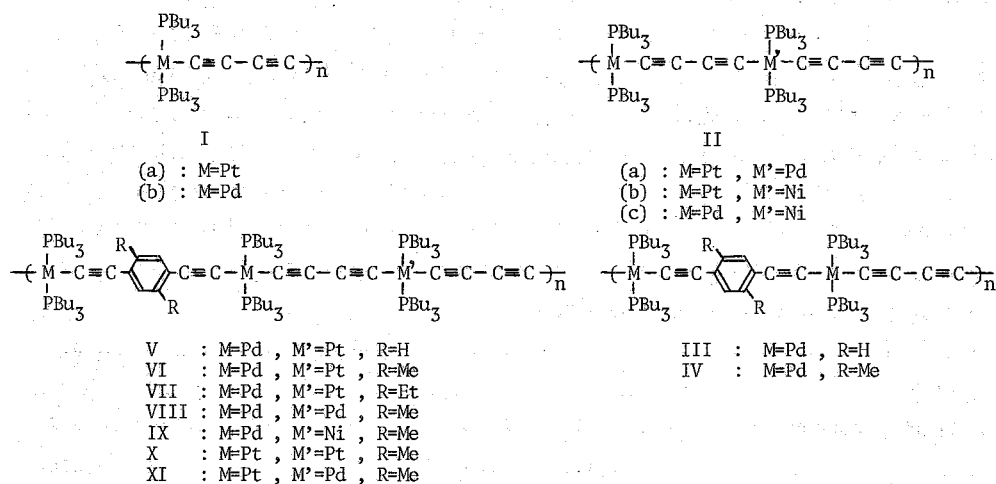
- 1) 黒田藤原 第20回 NMR 討論会(1981)要旨集 p.224 J. Phys. Chem. 1981, 85, 2655-9.
- 2) Schulman, J. M.; Venanzi, T. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 4701-5. 3) (a) Kanazawa, Y.; Baldeschwieler, J. D.; Craig, N. C. J. Mol. Spectrosc. 1965, 16, 325-48. (b) Yonemitsu, T.; Kubo, K. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1981, 309. (c) Aydin, R.; Gunther, H. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 1301-3. (d) Ernst, L. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 299-300, and many references cited therein. 4) Saunders, M.; Telkowski, L.; Kates, M. R. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 8070-1.

(阪大産研・阪市大原研)[※] 高井嘉雄 森本秀子 高橋成年
園頭健吉[※]

1) 序

剛直棒状高分子の遷移金属ポリインポリマーは、トリクロルエチレン溶媒中濃度40%~50%付近でリオトロピック・ネマティック液晶を呈する。前回、我々は遷移金属ポリインポリマー (Ⅰ) (Ⅱ) 液晶相の強磁場下 (23.5kG) の C-13、P-31 NMR から (Ⅰ) (Ⅱ) のポリマー軸が、磁場に対し垂直方向に配列する性質を有することを報告した¹⁾。

溶媒として利用されているベンゼン環を含んだサーモトロピック液晶やPBLG 液晶など、一般的には磁場に対し分子の長軸は平行に配向する。ポリマー (Ⅰ) (Ⅱ) の希れな磁場配向を考慮するため、今回、我々は、遷移金属ポリインポリマー (Ⅰ) (Ⅱ) のアセチレン-アセチレン結合間にベンゼン環やパラキシレン環を挿入した遷移金属ポリインポリマー (Ⅲ) ~ (Ⅺ) を合成し、それらの液晶相の P-31、C-13 NMR 的観察を行ない、ポリマ (Ⅰ)、(Ⅱ) の結果をつけ加え、これら遷移金属ポリインポリマー液晶の化学構造と磁場配向について検討した。



2) 実験

遷移金属ポリインポリマー (Ⅲ) ~ (Ⅺ) は既報の方法により合成した²⁾。液晶に用いたポリマーの分子量は、20000~50000位でその決定は GPC 法によった。

液晶生成溶媒はトリクロルエチレン (試料調整直前に蒸留) を用いた。遷移金属ポリインポリマー液晶の生成濃度は、ポリマーの分子量の大きさにより多少異なるが40~50%で、液晶試料調整は NMR 試料管 (10mm) 中で行なった。

P-31、C-13 NMR 装置は、JEOL-JNM-FX 100 を使用した。P-31 NMR スペクトルは、プロトンデカップリング条件下、RF 40.32MHz、パルス照射時間 7 sec (パルス角45°)、パルス間隔 0.5~2sec、観測周波数幅 5~10 KHz、データポイント 4~8K等の測定条件を用い、数回の積算を行ない得た。一方、C-13 NMRスペクトルは、RF25.05MHz、パルス照射時間 6 sec、以下 P-31測定とほぼ同様の条件で得た。すべての測定は外部磁場ロック方式を用いた。

たかいよしお もりもとひでこ たかはししげとし そのがしらけんきち

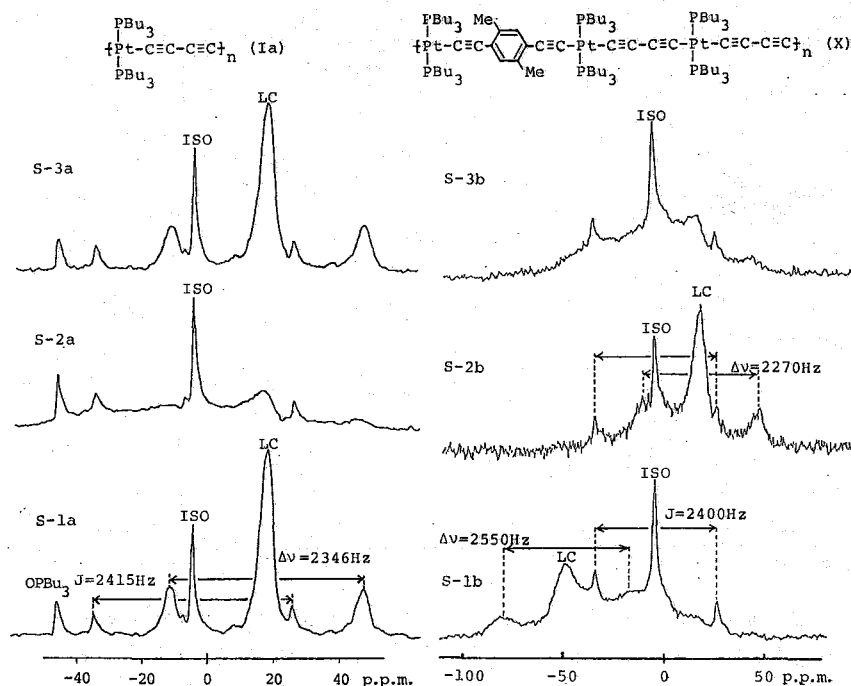


図 1. 遷移金属ポリインポリマー (Ia)、(X) 濃厚溶液の $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ nmr スペクトル

LC : 液晶相 ISO : 等方相

3) 結果および考察

遷移金属ポリインポリマー (X) 液晶の磁場配向

ポリマー (X) はポリマ (Ia) の 3 単位に 1 個のパラキシレン環を主鎖中に含む。その液晶はネマティック液晶相を呈する。この液晶相の磁場配向に関する知見は下記の 3 実験により、P-31 NMR スペクトル (図 1) から得た。比較のためポリマー (Ia) 液晶のスペクトルを図 1 左側に示した。実験 1. 試料を磁場内挿入 30 分後の静止スペクトル S-1a、S-1b の液晶相のケミカルシフトは、各々の等方相のシャープなシグナルを基準にして、ポリマー (X) で -43ppm 低磁場シフト、ポリマー (Ia) で 21ppm 高磁場シフトを示し、シフトの符号は異なり、ポリマー (X) のシフト値はポリマー (Ia) の倍に相当する。P-Pt 結合分裂幅は、各々の等方相の分裂幅を基準に、ポリマー (X) で 150Hz 大きく、一方、69Hz と小さく現われている。さらに、液晶シグナルの半値幅はプロトンデカップリング化にかかわらず、ポリマー (X) で 500Hz、ポリマー (Ia) 250 Hz 位いとシフトや分裂と同様の結果である。これらの結果は、ポリマー構造に差がないと考えられるから、ポリマー (X) 液晶がポリマー (Ia) 液晶の磁場に対する order パラメータのほぼ倍の値をもつと考えられる。実験 2. 試料を磁場内挿入 30 分後、スピニング軸回りに試料管を 90° 回転し、直後数秒間の測定を行なった。このようにして得られたスペクトル S-2b は、スペクトル S-2a と異なり、S-1a のケミカルシフト、P-Pt 結合分裂幅、シグナルの半値幅等と一致する。ポリマー (X) 液晶の director は、ポリマー (Ia) 液晶の director に対して 90° 位相が異なることを意味している。実験 3. スピニング (7 Hz) スペクトル、S-3a は、S-1a のスペクトル

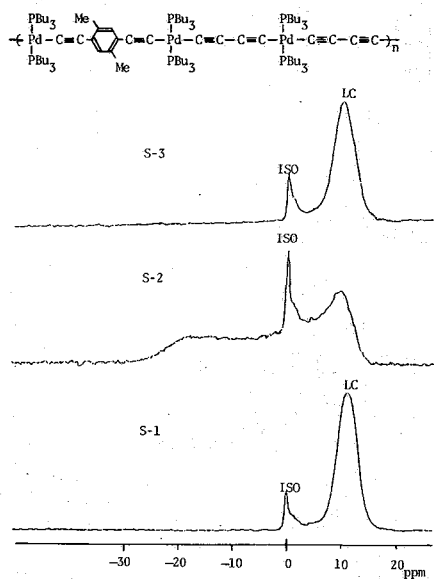


図2. パラジウムポリインポリマー
(Ⅶ) 液晶の $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ スペクトル

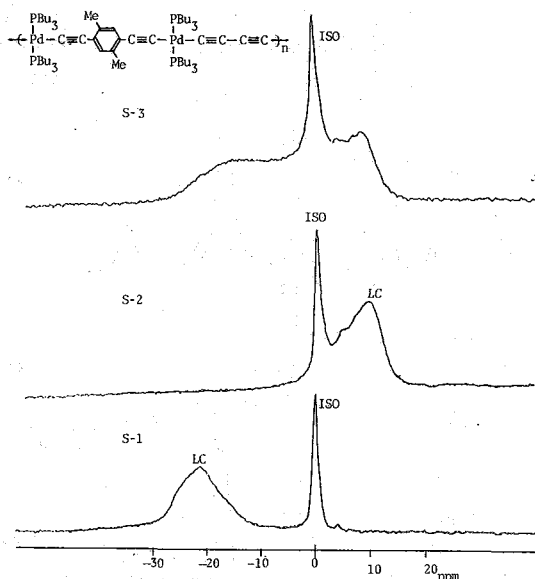


図3. パラジウムポリインポリマー
(Ⅳ) の $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ スペクトル

ルとほぼ同じスペクトルを与える。一方、ポリマー (X) 液晶のS-3bは、S-1b、S-2b等に対応せず、ポリマー (I a) のS-2aとほぼ同じスペクトルを与えている。このスペクトルの差はスピニングの外力により液晶相のdirector が磁氣的に安定な配向を示すものと、液晶相のdirectorがスピニング軸回りに配向が分散するものとの違いによると考えられる。この液晶の超電導 NMR による静止、スピニングスペクトルは、図1のS-1a、S-1bと同一であった。

上記結果および遷移金属ポリインポリマー (I a) 液晶のdirector (ポリマー軸) のorderパラメータ0.44等から、今回の遷移金属ポリインポリマー (X) 液晶のポリマー軸のorderパラメータは、おおよそ0.88と推定できる。

遷移金属ポリインポリマー液晶の磁場に対する配向は、その主鎖中にパラキシレンを含むと主鎖が磁場に平行、一方パラキシレンを含まないジアセチレン体の場合主鎖は磁場に垂直と、パラキシレンとアセチレンの異方性磁化が大きく磁場配向を決定していると考えられる。例えば、ポリマー (X) の一単位 of 異方性磁化率は、パラキシレンの $\Delta\chi = -68 \times 10^{-6} \text{ erg gauss}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ 、アセチレンの $\Delta\chi = -7 \times 10^{-6} \text{ erg gauss}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ から単純に $\Delta\chi = 26 \times 10^{-6} \text{ erg gauss}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ となる。

パラジウムポリインポリマー (Ⅶ) 液晶の磁場配向

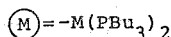
ポリマー (X) の白金をパラジウムで置換したポリマー (Ⅶ) の液晶のP-31 NMR スペクトルは、上記3実験条件下で行い、図2に示した。この3つのスペクトルは、ポリマー (I a) のスペクトル (図1) に対応している。またポリマー (I b) と同じスペクトルを示す。故に、強磁場中のポリマー (Ⅶ) 液晶のポリマー軸は磁場に垂直に配向している。

ポリマー (Ⅶ) 液晶の磁場に対するこの挙動は、ポリマー (X) と異なり、上の単純な異方性磁化率の取扱に、遷移金属回りの結合を考慮せねばならないことを意味する。

各種遷移金属ポリインポリマー液晶のポリマー軸の磁場配向の結果を表1にまとめた。図3は

Table 1. Orientation of the Director (the Main Chain) in Liquid Crystals of Metal-Poly(yne) polymers aligned by a Magnetic Field

I	$\{ \text{M} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$	(a): M=Pt (b): M=Pd	perpendicular
II	$\{ \text{M} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{M}' - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$	(a): M=Pt, M'=Pd (b): M=Pt, M'=Ni (c): M=Pd, M'=Ni	perpendicular
III	$\{ \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		parallel
IV	$\{ \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		parallel
V	$\{ \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		perpendicular
VI	$\{ \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		parallel
VII	$\{ \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{Et})_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		parallel
VIII	$\{ \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		perpendicular
IX	$\{ \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Ni} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		perpendicular
X	$\{ \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		parallel
XI	$\{ \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pt} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{Pd} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} \}_n$		parallel



、キシレン環とアセチレンの 1 : 4 の比のパラジウムポリインポリマー (IV) 液晶の P-31 スペクトルで、キシレン環、アセチレン比 1 : 6 のポリマー (VIII) 図 2 と異なり、ポリマー (X) と同様のスペクトル変化を示す。

以上、遷移金属ポリインポリマー液晶の director (ポリマー軸) の磁場配向は、ベンゼン環やキシレン環が主鎖中に含まれると磁場に平行、そのような環を含まない場合磁場に垂直で、遷移金属が Ni $\Rightarrow$ Pd $\Rightarrow$ Pt になるに従って磁場に平行になろうとする、等傾向をもつ。

謝辞

本研究に際して、数々の御助言と SCM の測定をして下さいました大阪大学タン白質研究所 京極好正教授、阿久津秀雄助手に感謝いたします。

文献

- 1) 第19回 NMR 討論会講演要旨集、Mol. Cryst. Liq. Cryst., 72, 101 (1981)
- 2) J. Polym. Sci. Chem. Ed., 18, 349 (1980); J. Organometal. Chem., 160, 319 (1978)

〔序〕

液晶内に配向した分子のNMRスペクトルはその分子の化学構造および優勢な配向に関する詳細な情報を含んでいる.¹⁾ この解析により得られる知見は, 液晶が生体膜のモデルであることを考えると, 生体中での薬物間および薬物と媒質との相互作用, あるいは薬物の膜透過等に関して興味ある手がかりを与えると考えられる.

今回我々は, 生理活性物質であるフェノチアジン系化合物について上記の方法による検討を試みた. フェノチアジン系化合物は中枢系交感神経を抑制し向精神薬として広く知られているが, 薬理作用機序に関しては未解決な問題も多い. これまで薬理活性と化学構造について種々の議論がなされているが, その中で二芳香環のなす角(二面角)の重要性が指摘されている.²⁾ しかし特に分子内運動を有する分子に

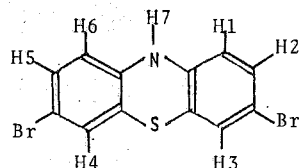


Fig. 1

関して議論を正確に行なうためには, 溶液状態での情報が不可欠であると思われる.

今回解析を行なったのは, 3,7-ジブロモフェノチアジンである. フェノチアジン自身については, 液晶中でsharpな信号を見い出せず, 重水素置換その他の方法によりスペクトルの単純化が必要と思われる.

〔実験〕

3,7-ジブロモフェノチアジンは, Bo deaら³⁾の方法により合成し, フロロホルムにより数回再結晶を行なった. ¹H-NMRにより不純物のないことを確認した. 液晶溶媒としてZLI1167 (Merck製: トランス, トランス-4'-アルキルビシクロヘキシル-4-カルボニトリル誘導体の三成分混合物, Fig. 2参照)を用いた. 試料濃度0.05MでNMR試料管中で加熱混合し, 定温に達した後測定を行なった(プローブ温度34°C).

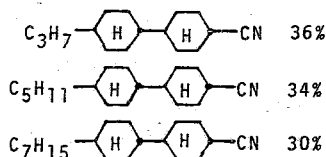


Fig. 2

液晶性試料の¹H-NMR測定は, 日立R-900M FTNMR装置(90MHz)により行なった. 取り込み幅は80ppm, パルス角度は約60°(90°パルスが45μsec), 記憶点数は16K点でありFIDを4000回積算した. 液晶溶媒自身によるバックグラウンド信号を際くため「ベースライン補正」を数回行なった. 得られたスペクトルの平均半値幅は, 約20Hzである.

等方性溶液中での¹H測定は日立R-22NMR装置(90MHz, 34°C)を用い, 内部ロック方式のCWモードで行なった. 試料はDMSO- α 6+ニトロベンゼン- α 5(1:1)溶媒中0.05M溶液とした. 化学シフトの読み取り誤差は±0.1Hz以下である.

ふじわらひであき ○やまなかいはお ささぎよしお

〔結果および考察〕

等方性溶液中のスペクトル解析 (Fig. 3)

スペクトルは、AMX系とみなされ一次近似で解析が可能であった。解析の際にはJ_Bおよび異なる芳香環上のプロトン間のJは0と見なした。Jの符号については他のフェノチアジン誘導体の報告例⁴⁾を参考にして全て正とした。Table 1に結果を掲げる。なおDMSOのみを溶媒とする場合にはCの信号がdと重なり一次近似で解析できない、またニトロベンゼン中ではeの信号がブロードとなり観測できない。

液晶中のスペクトル解析

配向した3,7-ジブロモフェノチアジンのスペクトルはAABB'C'D系となる。シミュレーション計算では入力データとしてシフト値 ν_i 、間接結合定数J_{ij}、直接結合定数D_{ij}を入力し、 ν_i とD_{ij}を可変とした。J_{ij}は等方性溶液中の値をそのまま引用した。この場合、未知数は $\nu_1, \nu_2, \nu_3, \nu_4, D_{12}, D_{13}, D_{14}, D_{15}, D_{16}, D_{17}, D_{23}, D_{24}, D_{25}, D_{27}, D_{34}, D_{37}$ の計16個である。一般にD_{ij}は下の(1), (2)式の様に表示される

$$D_{ij} = -\frac{\hbar \gamma_i \gamma_j}{4\pi^2} \frac{S_{ij}}{r_{ij}^3} \quad (1), \quad S_{ij} = \sum_{p,q} \cos \alpha_p \cos \alpha_q \cdot S_{pq} \quad (2)$$

ここで α_p, α_q は核iとjを結ぶ軸がある瞬間にp, q軸となす角度であり、S_{pq}は磁場に対する分子の配向パラメーター、 $\hbar$ はプランク定数、 γ は磁気回転比、 r_{ij} は核iとjのある瞬間における距離、S_{ij}は核iとjを結ぶ軸の磁場に対する配向パラメーターである。式(1)と(2)よりD_{ij}はS_{xx}, S_{yy}および構造パラメーター r_{ij} と α_p, α_q により決まる。ここで構造パラメーターは二芳香環のなす角 ϕ およびN-S軸とN-H結合軸がなす角 θ により事実上支配されるので、4種のシフト値及び配向パラメーターS_{xx}, S_{yy}, 二面角 ϕ 及び θ が主なパラメーターとなる。

まず予備計算において、これらの適当に変化させ計算スペクトルが実測スペクトルに近くなる値を見い出し、それをもとにして、

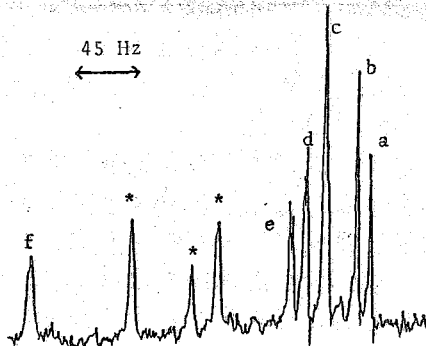


Fig. 3 ¹H nmr spectra of 3,7-dibromophenothiazine in DMSO-d₆+nitrobenzene-d₅(1:1). *Signal due to nitrobenzene

Table 1 Spectral parameters in isotropic solvent

Parameter*	Value(Hz)
$\nu_2 - \nu_1$	39.2
$\nu_3 - \nu_1$	23.8
$\nu_7 - \nu_1$	199.1
J ₁₂	8.15
J ₂₃	2.2
J ₁₃	0

*The numbering is shown in Fig. 1

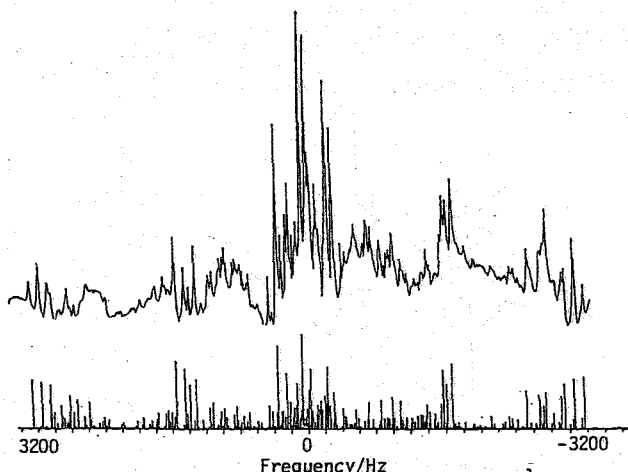


Fig. 4 Experimental(top) and simulated(bottom) ¹H nmr of 3,7-dibromophenothiazine partially oriented in ZLI 1167

iterationを行なった。最終的には51本のピークについて iterationを行ない Table 2 を得た。この時の実測と計算によるシフト値の根平均二乗偏差は1.50 Hz であった。

計算には次のように修正された LAOCN3 プログラムを使用した：①直接結合定数 D_{ij} が考慮されている、②同じ周波数ピークが強度の総和をとり出力される、③ピークの出カ最小強度が任意に指定できる、④予備計算では速い対角化サブルーチン（約7倍）を使用する、⑤ iteration 時には高精度計算を行なうことができる、⑥計算スペクトルをグラフィックディスプレイに表示しコピーできる。

化学構造について

化学構造解析の場合は独立なプロトンの座標8個と配向パラメーター2個の計10個が未知数であるのに対して、実験から得られる独立な直接結合定数は12個であるので、この系は *overdetermined* である。プログラム SHAPE を用い D_{ij} の実験値から構造パラメーターおよび配向パラメーターを求め Table 3 の結果を得た。なお角 θ を求める際には NH 間距離および N, S 原子の位置については X 線データ⁹⁾を利用した。二面角 ϕ はフェノチアジンそのものについて Kern 効果の実験¹⁰⁾から得られた溶液中の概略値 $150 \pm 7^\circ$ の範囲内にある。一方固相では 153.3° (単斜晶系)¹¹⁾および 158.5° (斜方晶系)¹²⁾と報告されており、本実験とは明らかな相異が認められる。この差はチアントレンの場合(液晶中 141° 、固相では 128°)と逆の傾向にあるが溶液中と固体との安定構造の違いを示すものとして興味がある。角 θ については、固相におけるフェノチアジンでは 181.4° 、2-メトキシフェノチアジンでは 186.4° であり、臭素置換を考えると液晶内における本実験の値が後者に近いことは合理的な結果である。何れにせよ

Table 2 Spectral parameters in ZLI 1167

Parameter*	Value(Hz)
$\nu_2 - \nu_1$	59.08 ± 1.12
$\nu_3 - \nu_1$	66.29 ± 1.53
$\nu_7 - \nu_1$	158.80 ± 1.16
D_{12}	843.75 ± 0.33
D_{13}	60.75 ± 1.26
D_{14}	37.31 ± 1.32
D_{15}	48.10 ± 0.49
D_{16}	160.44 ± 1.71
D_{17}	1048.58 ± 0.41
D_{23}	107.66 ± 0.91
D_{24}	24.92 ± 1.07
D_{25}	22.23 ± 0.62
D_{27}	138.56 ± 0.66
D_{34}	100.49 ± 0.72
D_{37}	59.18 ± 0.54

* The numbering is shown in Fig. 1

Table 3 Geometrical parameters for 3,7-dibromophenothiazine

Parameter	Value	Parameter	Value
r_{13}/r_{12}	1.978 ± 0.018 (1.997)*	r_{27}/r_{12}	1.900 ± 0.005
r_{14}/r_{12}	2.851 ± 0.013 (2.737)*	r_{34}/r_{12}	2.220 ± 0.008
r_{15}/r_{12}	2.813 ± 0.008 (2.727)*	r_{37}/r_{12}	2.175 ± 0.017
r_{16}/r_{12}	1.898 ± 0.009 (1.871)*	ϕ	$149.8 \pm 1.6^\circ$
r_{17}/r_{12}	0.977 ± 0.004	θ	$187.0 \pm 0.6^\circ$
r_{23}/r_{12}	1.708 ± 0.012		
r_{24}/r_{12}	3.317 ± 0.007		
r_{25}/r_{12}	3.641 ± 0.007 (3.588)*		

* Value for Dibenzo-p-dioxin⁸

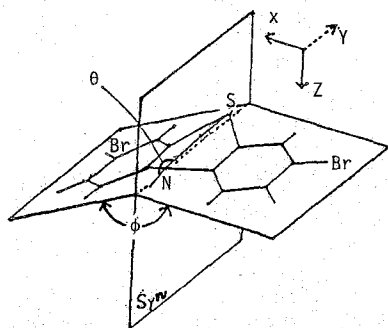


Fig. 5 Geometry of 3,7-dibromophenothiazine

3, 7-ジブロモフェノチアジンでは *endo* 型が安定と結論される。芳香環の臭素置換による環の変形は、プロトンに関する限りないことがわかる。これはモノブロモベンゼンと同様の結果である。

endo 及び *exo* 間の平衡について (参照 Fig. 6)

フェノチアジンは C_2 対称面を有する分子であるが、溶液中では誘電緩和⁸⁾、*dipole moment* の測定等から環の反転あるいは NH の反転運動が可能であることが知られている。しかし本研究では、液晶中のスペクトルから *endo* 型のみにより合理的に解釈できたことから、①フェノチアジン自身について *endo* 型が非常に安定である、あるいは②臭素置換が *endo* 型を安定化させる、の向れかが考えられる。臭素置換は N の反転に立体効果を及ぼすとは考えられないため①の原因が有力であるが、この点について今後 N-メチル誘導体その他を含めて詳しく検討したい。

配向パラメーターについて

上記反転運動の活性化エネルギーは、2、4 kcal/mol⁹⁾ と小さく、反転の速度は NMR の *time scale* より非常に速いと予想される。したがって溶液中でのフェノチアジンは、 C_{2v} 対称性をもつ配向パラメーターとしては二つ (S_{xx} , S_{yy}) が独立変数と考えられる。今回用いた ZLI 1167 は例外的に磁場に垂直に配向するため、Table 4 の ZLI 1167 中の S_{xx} , S_{yy} は液晶に対する配向を議論するためには -2 倍する必要がある ($S_{yy} = -2S_{xx}$)。 S_{xx} で比較すると三化合物とも分子の長軸が液晶分子に平行に配向していることがわかる。1 は分子の長軸方向に Br が入ったために 2 に比べて S_{xx} が大きくなり代わりに S_{yy} が小さくなったと判断できる。

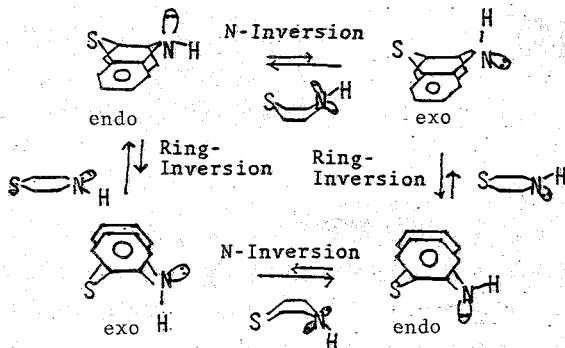


Fig. 6 Configuration changes by the different inversion processes.

Table 4 Order parameters of tricyclic compounds

No.	Compound	S_{xx}	S_{yy}	Solvent
1	3,7-dibromophenothiazine	-0.12352 ± 0.00756	-0.0523 ± 0.01844	ZLI 1167
2	thianthrene ¹⁰⁾	-0.11429 ± 0.00055	-0.05818 ± 0.00001	ZLI 1167
3	dibenzo-p-dioxin	0.29741 ± 0.00018	0.04982 ± 0.00001	Merck phase IV

References

1. P. Diehl and W. Niederberger, J. Mag. Reson., **9**, 495 (1973).
2. J.J.H. McDowell in "Molecular and Quantum Pharmacology", ed. by E. Bergmann and B. Pullman, 269 (1974).
3. C. Bodea and M. Raileanu, Ann. Chem., **631**, 194 (1960).
4. M. Rouillard, N. Giulieri and M. Azzaro, Bull. Soc. Chim., **9**, 2141 (1974).
5. J.J.H. McDowell, Acta Cryst., **B32**, 5 (1976).
6. M.J. Aroney, G.M. Hoskins and R.J.W. Lefèvre, J. Chem. Soc., B, 1206 (1968).
7. J.D. Bell, J.F. Blount, O.V. Briscoe and H.C. Freeman, Chem. Commun., 1656 (1968).
8. G. Fronza and E. Ragg, J. Chem. Soc. Parkin II, 292 (1982).
9. Y. Koga, H. Takahashi and K. Higashi, Bull. Chem. Soc. Japan, **46**, 3359 (1973).
10. 藤原, 河村, 高木, 佐々木, 日本薬学会 102 年会講演要旨集, 334 (1982).

二、三の分子の π -ジアニオンナトリウム塩の ^{13}C , ^{23}Na NMR
(フルオランテン、アセナフチレン、ジベンゾスベロン)
(茨城大・理) の 平山昌南 鈴木孝登 高木辰彰
小祝和彦

1. 序

π 軌道に過剰電子を2ケもつ π -ジアニオンの ^1H , ^{13}C NMRシフトの測定は、これら分子の反結合性軌道の性質、あるいは環電流効果の本質を追求するに貴重なデータを提供すると思われるが、NMR測定に足る高濃度での安定性や、平衡系に微量に存在するアニオンラジカルとの電子交換のため限られたものしか測定されていない。特にヘテロ原子を含むものについてはほとんど報告がない¹⁾。一般に多縮合環芳香族化合物はジアニオンを作りやすいが、標題のフルオランテン、アセナフチレンについては、Lawler等²⁾によりNa還元で得られる ^1H -NMRが測定されているだけで、 ^{13}C スペクトルは我々の知る限りではまだ観測されていなり。またジベンゾスベロンはTabner等³⁾により電解還元アニオンラジカルが測定されているが、我々は、THF中注意深く長時間に渡ってNaと接触させたところ紫色の安定な物質を得、 ^1H , ^{13}C NMRを測定したので合わせて報告する。

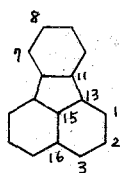
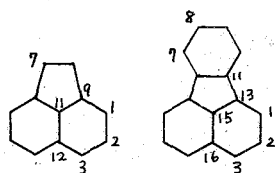
2. 実験

ESR測定用のアニオンラジカル生成法を用い、真空中Na, K, Li還元(THF中で)によりサンプルを調製した。還元前の濃度は0.2~0.3M、コンタクト時間は10~48時間、装置はR-20A(H), CFT-20(^{13}C , ^{23}Na) (Broad Band Accessory付) $\nu_0(\text{Na})=21.037\text{ MHz}$ 。MO計算は東大センターHITAC 8800/8700で行なった。

3. 結果と考察

(i) フルオランテン

^{13}C スペクトルをFig. 1に示す。Tiの大きさによるpeak heightの差と、中性分子の帰属の結果との対応より11, 13, 15, 16位については帰属出来たが、他は後述のMO計算による電子密度を用いて暫定的帰属に止まった。(後にSelective decouplingの予定)次に一般に認められている経験式 $\delta_c = 49 \cdot k$ ($k \approx 160\text{ ppm}$)を用いて excess π -chargeを算出し、SCF-MO計算よりの49と比較してみる。(Table 1)この場合ベンゼンを基準にとっているのでJohnson-Boveyの式に従って各炭素の δ について環電流の補正を行なった。全般的にみて一応よい相関が得られている。ただし1, 2, 3, 7, 8位の帰属の確定についてはSelective decouplingの結果を待たなければならぬ。詳細な議論のためには、この様に炭素のシフトは電荷の大きさに非常に敏感であるから隣りの炭素の電荷の影響とか、あるいはこのような多縮合環の場合は外周型の常磁性環電流効果等理論的成果を待たなければならぬ。 ^{23}Na 吸収線の線巾は3.8



ppmで自由イオン(〜1 ppm)に比べてかなり大きく、このことはジアニオンに結合して ^{13}C and ^{23}Na NMR of Several π -Dianion Disodium Salts (Fluoranthene, Acenaphthylene, Dibenzosberone). (Ibaraki University) Masatoshi Hirayama, Hideto Suzuki, Tatsuki Takagi, and Kazuhiko Koiwai

いることを示すものである。

(ii) アセナフチレン。 ^{13}C スペクトルを Fig. 2 に、レフトと $\Delta\delta$ の比較を Table 2 に示す。帰属については(i)と同様の状況にある。相関はかなりよいと思われる。 ^{23}Na 吸収線の線中は 11.5 ppm で、このことは会合定数が(i)の系に比べて大きいからあるいはイオン対の結合力が強いから一方あるいは両方に対応する。

(iii) ジベンゾスベロン。 (iii)-④ ^1H スペクトル。 Na, K 還元によりほぼ同じスペクトルが得られる。(Fig. 3) Li 還元によるスペクトルは 7 ppm 附近に broad な一本線があるだけで解析不能である。真空中でこのものに H_2O を加えるとジベンゾスベロールのスペクトルが得られ、空気を導入すると元の分子が復活する。またニトロベンゼンはこのものに還元されてニトロベンゼンアノイラジカルになる。一方 Fig. 3, Fig. 4 に見られるように ^1H , ^{13}C 共に全般的に高磁場シフトしている。これを総合してみるとダイマージアノオン(ピナコレート型)の生成は考えられず、やはりモノマージアノオンの可能性が強い。そこで先ず中性分子の低磁場ピークを 4H に、1, 2, 3H をまとめて高磁場グループの中心に (± 0.1 ppm) 対応させ、ジアノオンでは triplet の最大値を $\Delta\delta_{\text{calc}}$ と対応させた。2H に「デカップリング」より 6.20(D) と 1H に、従って 6.69 (T), 6.95 (D) とそれぞれを、4H に帰属した。ナチレンブリッジを無視してベンゾフェニンの π 密度を SCF-MO 法により計算した。ベンゼン平面同志のねじれに対応して 5-13 結合の共鳴積分パラメーターを 1.5~1.8 に増加して計算を試みた。中性分子を基準としたレフト値とそれに対応する $\Delta\delta$ ($\Delta\delta \sim 10.7$ ppm) と比較した。(Table 3) 従って環電流効果による補正は必要がない。(過剰電荷による環電流への寄与は無視出来る。) リングプロトンレフトの大きさは全体としては α 傾向がよく対応しているが $\text{C}=\text{O}$ に対してパラ位の 2H が特に計算の α が大き過ぎる。これは $\text{C}=\text{O}$ へ

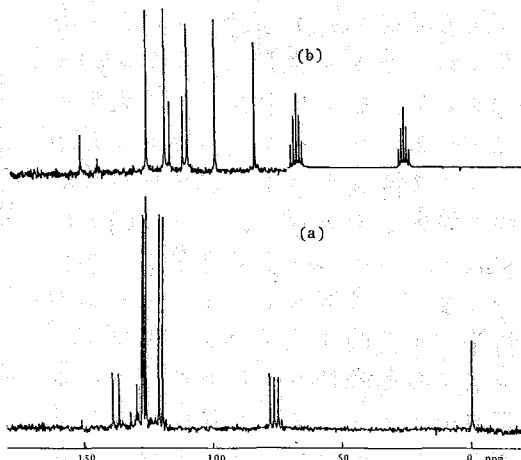


Fig. 1. ^{13}C spectra of fluoranthene; (a) Neutral molecule in CDCl_3 , (b) Dianion disodium salt in THF-d_8

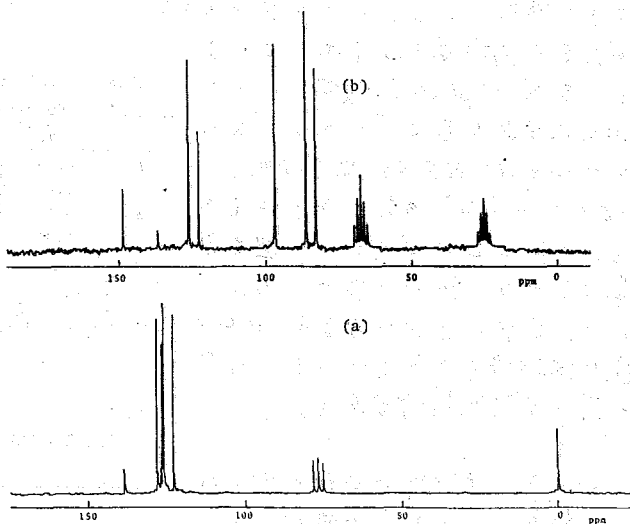
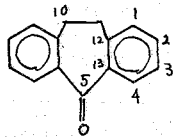


Fig. 2. ^{13}C spectra of acenaphthylene; (a) Neutral molecule in CDCl_3 , (b) Dianion disodium salt in THF-d_8



分パラメーターを 1.5~1.8 に増

加して計算を試みた。中性分子を基準としたレフト値とそれに対応する $\Delta\delta$ ($\Delta\delta \sim 10.7$ ppm) と比較した。(Table 3) 従って環電流効果による補正は必要がない。(過剰電荷による環電流への寄与は無視出来る。)

リングプロトンレフトの大きさは全体としては α 傾向がよく対応しているが $\text{C}=\text{O}$ に対してパラ位の 2H が特に計算の α が大き過ぎる。これは $\text{C}=\text{O}$ へ

の Na^+ の結合による電子吸引効果により説明される。

(iii)-② ^{13}C スペクトル。スペクトルを Fig. 4 に示す。5, 12, 13 位は π による peak height の差、シフトと Δq との比較等により Table 4 のように帰属した。4 ケの環炭素のうち Δq との対比より、もつともシフトの大きいものを 2c に、残り 1, 3, 4 位は現在 α と π 帰属せず、表 4 に暫定的な帰属をかりけておいた。(後で Selective decoupling で考察する予定がある。) 全体として α の大まかな計算との相関が見られる。先づ 5c の大きな高磁場シフトに比べて計算値は小さ過ぎ、2c では逆に大き過ぎる。2H では Δq が大き過ぎるのと同じ原因によるものと思われる。つまり、 $\text{C}=\text{O}$ への Na^+ の結合に起因すると期待される。ジアニオン α の 5c が大きな高磁場シフトをしているが、また aliphatic 領域には 40 ppm ほど足りなく (ジベンゾスベールでは TMS より 76.8 ppm), $-\text{OH}$ と $-\text{ONa}^+$ の差はあるにしても、 π の π とはピナコーン型を至定する一つの強力な材料となる。また、ジアニオンになる時、10C は逆に低磁場シフトしているのは興味深い説明困難である。

このように全般的に炭化水素に比べて計算値との相関が悪いのは、
① $\text{C}=\text{O}$ グループへの強い Na^+ の相互作用の効果。② π ケレンブヤリ取りの取り扱い等 π 密度計算の不確実性。③ $\text{C}=\text{O}$ グループの α = シフト効果のジアニオンと中性分子における差。等が考えられる。

Table 1. ^{13}C shifts of fluoranthene dianion (ppm) and comparison of experimental and calculated excess π -charges

	δ^a	δ'_{ring}^b	δ'^c	Δq_{exp}^d	Δq_{calc}^e
1	-29.43	0.69	-30.12	0.19	0.211
2	-3.25	0.37	-3.62	0.02	0.072
3	-44.45	0.56	-45.01	0.28	0.335
7	-10.34	0.30	-10.64	0.08	0.033
8	-19.00	0.24	-19.24	0.12	0.188
11	-12.23	2.21	-14.44	0.09	0.097
13	-17.27	2.36	-19.63	0.12	0.135
15	15.86	3.35	12.51	-0.08	-0.110
16	22.68	1.97	20.71	-0.13	-0.032

a) Relative to benzene. b) Correction due to ring current. c) $\delta - \delta'_{\text{ring}}$. d) $\delta/160$ ppm. e) Excess π -charges calculated by SCF MO method.

Table 2. ^{13}C shifts of acenaphthylene dianion (ppm) and comparison of experimental and calculated excess π -charges

	δ^a	δ'_{ring}^b	δ'^c	Δq_{exp}^d	Δq_{calc}^e
1	-31.14	0.51	-31.65	0.20	0.237
2	-1.10	0.35	-1.45	0.01	0.081
3	-45.23	0.61	-45.84	0.29	0.353
7	-41.87	0.67	-42.54	0.27	0.285
9	-4.55	1.99	-6.54	0.04	0.096
11	9.57	3.07	6.50	-0.04	0.008
12	21.32	1.84	19.48	-0.12	-0.114

a-e) See Table 1.

Table 3. Comparison of ^1H observed and calculated shifts for the purple species (ppm)

	δ_P^a	δ_N^b	$\Delta\delta^c$	$\Delta q \cdot k^d$
1	6.20	7.3 $\pm$ 0.1	-1.1 $\pm$ 0.1	0.59 (0.56)
2	5.45		-1.9 $\pm$ 0.1	3.39 (3.43)
3	6.69		-0.6 $\pm$ 0.1	1.02 (1.01)
4	6.95	8.1 $\pm$ 0.1	-1.2 $\pm$ 0.1	1.00 (1.07)
10	2.57	3.15	-0.58	-----

a) Values of p-species. (from TMS) b) Values of Neutral molecule. (from TMS) c) $\delta_P - \delta_N$ d) Values calculated by SCF MO method taking 10.7 as k .

Table 4. Comparison of ^{13}C observed and calculated shifts for the purple species (ppm)

	δ_P^a	δ_N^b	$\Delta\delta^c$	$\Delta q \cdot k^d$	Δq^e
1	62.57	65.53	-2.96	8.77	0.0548
2	36.37	59.77	-23.34	50.62	0.3164
3	60.96	63.97	-3.01	15.31	0.0957
4	59.54	62.69	-3.15	15.01	0.0938
5	52.44	127.08	-74.68	47.74	0.2984
10	-26.62	-31.60	4.98	-----	-----
12	44.22	75.71	-31.49	17.92	0.1120
13	70.43	72.25	-1.82	3.70	0.0231

a) Relative to lower shielding peak of THF. b) Relative to lower shielding peak of THF. c) $\delta_P - \delta_N$. d) Calculated shifts by SCF MO method taking 160 ppm as k .

- 1) M. Hirayama and M. Kaneko,
Bull. Chem. Soc. Jpn., 55, 1803
(1982).
- 2) R. G. Lawler, C. V. Ristagno,
J. Amer. Chem. Soc., 91, 1534
(1969).
- 3) B. J. Tabner and J. R. Zdysiewicz,
J. C. S. Perkin II, 811 (1973).

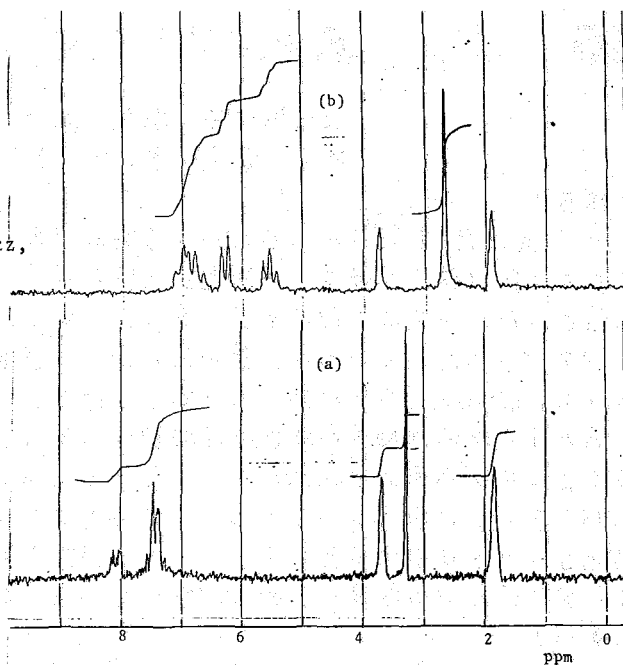


Fig. 3. ^1H spectra of dibenzosuberone in THF-d_8 ; (a) Neutral molecule, (b) Purple species

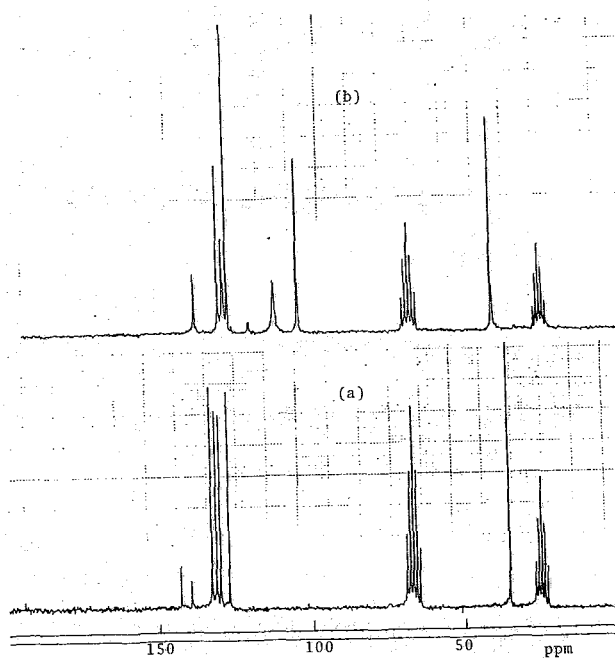


Fig. 4. ^{13}C spectra of dibenzosuberone in THF-d_8 ; (a) Neutral molecule, (b) Purple species

山上知佐子 高尾 植雄(神戸女薬大)

○竹内 敬人(東大教養)

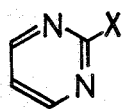
〔緒言〕

FT NMR および新しいパルス系列の発達・普及によって、N-15 NMR スペクトルの天然存在比条件下での測定が比較的容易になった。しかしながら従来までに蓄積されたデータはまだ不十分である。例えば、生理活性物質の骨格として重要なジアジンに因して言えば、最も基本的な一置換体については、僅かにその2,3について Phillipsborn ら¹⁾が報告しているだけである。

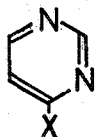
我々は生理活性物質の構造活性相関法の基礎データとして、各種ジアジンの1-オクタノール/水系の分配係数Pを必要としたのでこれらを合成した。これらのN-15 NMR データは基礎データとして有用である。さらに青藤ら²⁾の報告のように、N-15 化学シフトは水素結合によってかなり影響される。従ってこれらの溶媒シフトもまた分配係数Pの構造依存性を理解する一助になると期待される。

〔実験〕

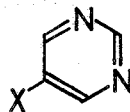
化合物 本研究では、2-置換(I)、4-置換(II)、5-置換ヒリミジン(III)、2-置換ピラ



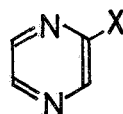
I



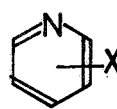
II



III



IV



V

Fig 1 NATURAL ABUNDANCE N-15 NMR SPECTRA OF

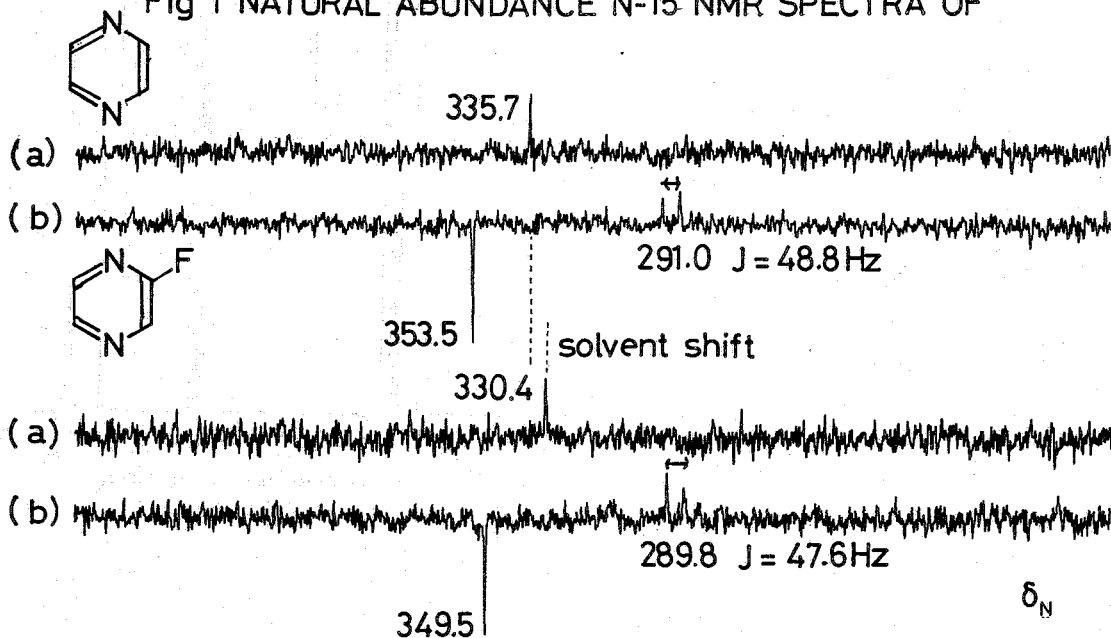


TABLE 1 NITROGEN CHEMICAL SHIFTS OF PYRIMIDINES AND PYRADINES ^a

	NH ₂	OCH ₃	CH ₃ ^b	H	F	Cl	CN ^c	CO ₂ CH ₃ ^c NO ₂
I N _{1,3}	251.0 (244.1)	257.0	295.3 (291.3)	297.1 (292.8)	259.7	294.3		
X	83.9 (78.6)							
II N ₁	283.8 (275.8)	276.5	297.7 (292.6)	297.1 (292.8)				
N ₃	250.2 (243.8)	254.6	297.7 (292.6)					
X	81.6 (85.2)							
III N _{1,3}		(290.7)	296.4 (292.8)	297.1 (292.8)				298.3 (295.9)
X								366.2 (363.8)
IV N ₁	276.7 (269.8)		334.2 (328.5)	335.7 (330.4)	291.0 (289.8)	325.8	338.3	337.9
N ₄	337.1 (326.3)		336.3 (331.2)		353.5 (349.5)	334.9	336.9	335.0
X	73.9 (68.3)						263.6	

^a δ (ppm) relative to liquid NH₃, measured with respect to external aq. NH₄NO₃, conversion constant = 376.25:° in CD₃SOCD₃ and (in CD₃OH).

^b the highfield peak is assumed to be ortho to the substituent.

^c the highfield peak is assumed to be meta to the substituent.

ジン(IV)の各種一置換体を用いた。I(X=NH₂, Cl, H), II(X=CH₃), III(X=CH₃), IV(X=NH₂, CH₃, H, Cl)は市販品を、他の化合物は合成品を用いた。

測定 天然存在比でのN-15 NMRスペクトルはCD₃SOCD₃またはCD₃OH溶液(液体試料の場合20~50%)として、JEOL FX-90Qで測定した。化学シフトは外部基準NH₄NO₃に対して求め、 $\delta(\text{liq. NH}_3)=0$ を基準とするスケールに換算した。各試料について、緩和試薬(RR; Cr(acac)₃)を加えない場合と加えた場合(~10mg)の双方を測定した。以下に代表的測定条件を示す。テータ8 K, スペクトル幅5 K, 待ち時間4~9 s, パルス角45°, 積算回数0.5 K~10 K, 測定温度~30°C(ただし難溶性固体の場合には50°C位まで加温)

[結果と考察]

緩和試薬の影響 X=Hの場合、試料濃度50%程度までは全くシフトレスであり、RR添加の影響は無かった。しかしX=NH₂では、試料濃度50%以下でもRRの添加によって最高1 ppm程度のシフトが見られた。シフトの大きさはNとNH₂とで特に顕著な差はなかった。X=CH₃, ハロゲンではシフトはほとんど無視できる程度であった。

帰属と化学シフト IIとIVの置換体には環窒素による2本のピークがあらわれる。その帰属は原則として一置換ピリジン(V)のSCSの一般的傾向に従い、高磁場側のピークを、Xが電子供与基の場合はXに対してオルト位の、Xが電子求引基の場

TABLE 2 NITROGEN-15 SUBSTITUENT CHEMICAL SHIFTS(SCS) OF DIAZINES AND PYRIDINES.^a

			NH ₂	OCH ₃	CH ₃	F	Cl	CN	CO ₂ CH ₃	NO ₂
o-SCS	V	ref 1	-50.8	-49.7	-0.4	-41.6	-9.6	+0.4	+1.5 ^b	
		I this study	-46.7 (-48.7)	-40.1	-1.8 (-1.5)	-35.8	-2.8			
		ref 1	-49	-41		-47	-6	+19	+13	
		ref 1	-45.0	-38.1	-0.2		-4.4			
	IV	this study	-59.0 (-60.6)	(-51.1)	-1.5 (-1.9)	-44.7 (-40.6)	-9.9	+2.6	+2.4	
		II this study	-46.9	-42.0	+0.6					
		ref 1	-44.0	-38.1	-0.2		-5.6			
m-SCS	V	ref 1	-0.9	+5.3	+0.3		+5.2	-0.8	-0.3	-4.0/+2.0
		III this study		(-1.9)	-0.7 (0.0)					+2.9 (+3.1)
		ref 1	-3.3		-1.1			+9.8	+0.1	-3.1
		IV this study	+1.4 (-4.2)		+0.6 (+0.8)	+17.8 (+19.1)	-0.8	+1.2	-0.7	
p-SCS	V	ref 1	-40.7	-23.1	-8.0	-17.4	-4.9	+10.6		
		II this study	-13.3 (-16.9)	-20.6	(+0.5)					
		ref 1	-35.1	-27.6	-8.3		-3.7			

^a $\delta(H) - \delta(X)$ in ppm. negative sign denotes highfield shift. in CD₃SOCD₃ and (in CD₃OH). ^b this study

合はXに対してメタ位の窒素に帰属した。

X=Fの場合、Fに対してオルト位のNはN-Fスピン結合³⁾により2本に分裂(図1)するので、容易に帰属が確認される。

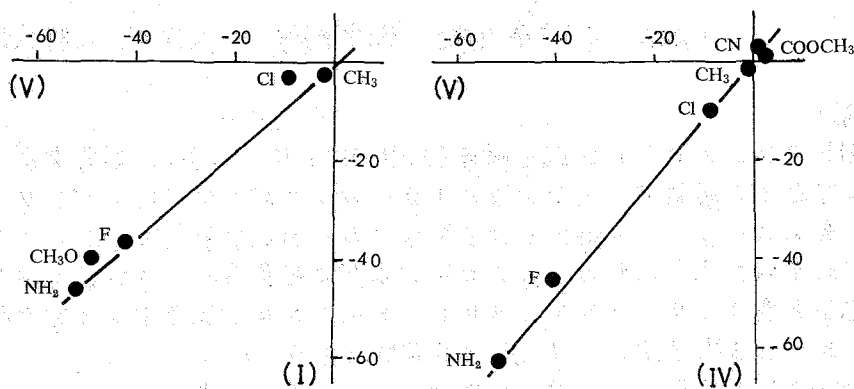
置換基化学シフト(SCS) Phillipsborn^らは10数種のピリミジンのN-15 NMRデータを報告しているが、3種の他は多置換体のデータである。彼らはこのデータからピリミジン一置換体での置換基化学シフト(SCS)を逆算した。

表2に本研究で得られた一置換体(ピリミジン, ピラジン)のSCSを、比較のためのVのSCS, Phillipsborn^らの値^りとともにまとめた。図2には、比較的数据の多いIおよびIVのo-SCSを、それぞれVのo-SCSとプロットしてみた。どちらの場合もほぼ直線が得られるが、その勾配はIでは1よりも小さく、IVでは1よりもかなり大きかった。オニのNが観測しているNに対してメタ位にあるときよりもパラ位にあるときのほうが、化学シフトは置換基による振動に対して鋭敏であるといえる。

Phillipsborn^らは電子求引基のo-SCSに対して+10~+20のような大きな値を算出しているが、一置換体にはその様な大きな値は観測されなかった。これは明らかに多置換体から一置換体のSCSを見積る際の限界を示している。

m-SCSは値が小さいため、V等との比較が困難であるが、Fに対する値が極めて大きいのが注目される。Vのm-F SCSは知られていないが、置換ベンゼンのm-F C-13 SCSも、この様に大きな値ではない。

Fig 2 Plot of o-SCS



溶媒シフト 表3に溶媒シフトをまとめた。溶媒を CD_3SOCD_3 から CD_3OH に変えると、各ピークは例外なく水素結合による高磁場シフトを示す。²⁾ シフトの大きさは窒素原子の位置と置換基の種類によって変化する。青藤ら²⁾ によるとヒラジンにおいて CH_3COCH_3 から CH_3OH に溶媒を変えると (50 モル%), ~ 9 ppm の高磁場シフトとなる。ジアジンでは、測定条件において $X = \text{H}, \text{CH}_3$ のとき $3 \sim 6$ ppm のシフトがあるが、ヒラジンの値のほうがヒラミジンの値より大きい。

溶媒シフトの大きさは、電子供与基が置換すると大きく、電子求引基が置換すると小さくなる。 $X = \text{NH}_2$ のときこの傾向は特にはっきりする。これが電子密度だけで説明できるか、水素結合のサイトの数も関係するのを見極めるにはデータ不足である。

TABLE 3. SOLVENT-INDUCED SHIFTS FOR DIAZINES.^a

		NH_2	CH_3	H	F	NO_2
I	$\text{N}_{1,3}$	-6.9	-4.0	-4.3		
	X	-5.3				
II	N_1	-8.0	-2.7	-4.3		
	N_3	-6.4				
	X	-3.6				
III	$\text{N}_{1,3}$		-3.6			-2.4
	X					-2.4
IV	N_1	-6.9	-5.7	-5.3	-1.2	
	N_4	-10.8	-5.1		-4.0	
	X	-5.6				

^a δ (in CD_3OH) - δ (in CD_3SOCD_3) in ppm.

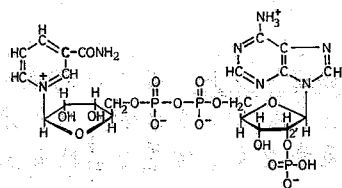
REFERENCES

- 1) W. Städeli and W. von Phillipsborn, *Org. Magn. Resonance*, **15**, 106 (1981).
- 2) H. Saitō, Y. Tanaka and S. Nagata, *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 324 (1973).
- 3) M. P. Sibi and R. L. Lichter, *Org. Magn. Resonance*, **14**, 494 (1980).

(阪大・医) 藤井 茂, 堅中泰樹, 杉山俊博, 山野俊雄

〈序 論〉

NADPH-アドレノドキシシン還元酵素 (AdR, EC 1.18.1.2) は、副腎皮質のミトコンドリアに存在する酵素で、1分子当り1分子のフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を含んでいる。この酵素の分子量はゲルろ過法や電気泳動法により約 54,000 と求められている¹⁾。AdR は、ステロイド水酸化酵素系の一つ酵素であり、NADPH から2電子を受けとり、2分子のアドレノドキシシンに1電子ずつの電子伝達を行うと考えられている²⁾。AdR は、NADH をも基質としうが、NADPH を基質とした場合に比べて、その K_m 値は数千倍も大きい。遊離の NADP^+ および NAD^+ の酸化還元電位がほとんど異なることを考えると、この大きな差異は、NADPH と NADH との間のアデノシン部分のズリン酸基の有無による可能性があると考えられる。また NADP^+ の AdR への特異的な結合はセミキノンの安定化など生理的にも重要な意義をもつことが見いだされた³⁾。本研究は、ピリジンヌクレオチドの AdR との相互作用の機構を明らかにするために行なったものである。

図1. NADP^+ の構造式

〈実 験〉

AdR は、牛副腎皮質よりアドレノドキシシンアフィニティーカラムを用いて精製した⁴⁾。AdR の濃度は、450 nm の吸光度 $1.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて計算した。

化学修飾——アルギニン残基に特異的な修飾試薬である p-ヒドロキシフェニルグリオキサールを用いて、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 25 °C 暗所において化学修飾を行なった。修飾に伴う活性値の変化は、フェリシアン化カリに対する活性により調べた。修飾されたアルギニン残基の個数は、Sephadex G-25 のカラムを用いて遊離の修飾試薬を除いた後、340 nm の吸光度 $1.83 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて計算した。また、 NADP^+ および NAD^+ などを修飾反応系に加えることにより、これらの失活速度への影響を調べた。

NMR測定—— ^{31}P -NMR スペクトルの測定は、バリアン社製 XL-200 を用いて行なった。プローブには、10 mm 多核用プローブと 16 mm 多核用プローブを併用し、それぞれ外径 10 mm および 16 mm のサンプルチューブを用いて測定した。測定に用いた AdR 溶液は、セントリーフロー・コーン (CF 25) を用いて遠心機で濃縮した後、重水化緩衝液を加えて均一にし、再び濃縮する方法を 7, 8 回くりかえして重水素化を行なった。AdR 溶液の pH 変化も同様の方法で行なった。化学シフト値は、外部標準として 85% リン酸と D_2O を 1:1 (V/V) 混合したものを利用した。測定は 23.5 ± 0.5 °C の温度で行なった。

ふじいしげる, のなかやすき, すぎやまとしひろ, やまのとしお

〈結果 および 考 察〉

化学修飾 — AdR は、p-ハイドロオキシフェニルグリオキサールにより、約10個のアルギニン残基が容易に修飾され、これらのアルギニン残基の修飾に伴い AdR が失活した。この修飾反応系に NADP^+ を加えることにより、アルギニン残基の修飾は抑制され、AdR 1分子当り5個のアルギニン残基が修飾された段階では、ほとんど AdR の失活はみられなかった。これらの結果は AdR への NADP^+ の結合により、およそ5個のアルギニン残基の修飾が保護され、これらの残基のいくつかが AdR の活性発現に関与するものと考えられる。さらに NADP^+ , NAD^+ やこれらの類似物質の修飾反応に対する保護作用を調べ、その結果を表 I にまとめた。この結果は、アデノシン部分のズリン酸基の有無が、修飾反応に対する保護作用に大きく関与していることを示している⁵⁾。すなわち、このズリン酸基が AdR への結合に大きな役割を果たしているものと考えられる。

NMR測定

pH変化 — 遊離の NADP^+ のズリン酸基の化学シフトは、図2の○印で示した様に、pHをあげるとともに低磁場側に变化する（遊離の NADP^+ のスペクトルは図3(a)に示す。）。この変化は、ズリン酸基が一価の陰イオンから二価の陰イオンに変化することに対応する。この結果から、遊離の NADP^+ のズリン酸基の pK 値は6.05であると求められた。この pH 変化は pH 4.07 から pH 8.05 の範囲について行なったが、ピロリン酸基の部分の化学シフトの変化は、ほとんど観測されなかった。また、この pH 滴定曲線は 20 mM の濃度の NADP^+ に対するものであるが、pH 7.0 において 20 mM から 0.1 mM の範囲で濃度変化を行なったところ、化学シフト値に変化はみられなかった。

次に図3(b)に遊離の FAD のスペクトルを示してあるが、このピロリン酸基に由来するシグナルの化学シフトも、2 mM の濃度において pH 6.08 から pH 7.48 の範囲において、また pH 7.0 において 2 mM から 0.1 mM の濃度範囲で変化は観測されなかった。

図3(c)は、AdR のスペクトルを示している。

表 I. p-ハイドロオキシフェニルグリオキサールによる AdR の失活に対する NADP^+ , NAD^+ などの保護作用^{a)}

protector	second order rate constant	percent protection ^{b)}
μM	$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	%
none	0	0
NADP^+	101	69
2'-AMP	100	73
2',5'-ADP	100	76
NAD^+	100	3
5'-AMP	95	3

a) 5 μM の AdR に 20 mM の p-ハイドロオキシフェニルグリオキサールを加えて5分間反応を行なった。b) percent protection = $(2.9 - \text{second order rate constant}) \times 100 / 2.9$

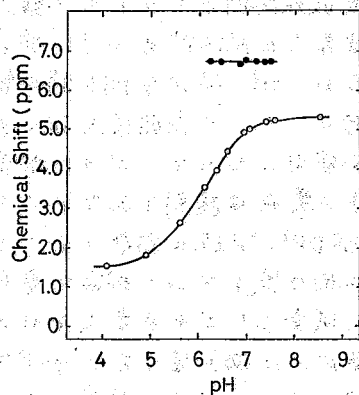


図2. 遊離の NADP^+ および AdR に結合した NADP^+ のズリン酸基の pH 滴定曲線

○—○ ; 遊離の NADP^+ (20 mM)
●—● ; AdR に結合した NADP^+
(50 mM PIPES, 50 mM KCl を含む。AdR の濃度は 240 ~ 320 μM)

このスペクトルから明らかなのは、フラビンモノヌクレオチド(FMN)側の ^{31}P のシグナル(P_F)あるいは、アデニル酸側の ^{31}P のシグナル(P_A)のいずれか一方が、補酵素としてタンパク質に結合することによって大きく高磁場側にシフトし、遊離のFADではAB型であったスペクトルパターンが、AdRではAX型になっていることである。この様な例は、FAD酵素であるグルコース酸化酵素においても観測されており、FAD酵素におけるFADとタンパク質の結合に一定の様式が存在する可能性を示している。最近 ^{31}P -NMRスペクトルからタンパク質に共有結合したリニン酸基の存在が、いくつか報告されているが、AdRにはそのようなリニン酸基の存在は確認されなかった。

図3(d)はAdRと NADP^+ を等モル混合した時のスペクトルを示している。低磁場側に存在する NADP^+ のズリン酸基のシグナルは、溶液のpHが6.92であるにもかかわらず、遊離の NADP^+ の二価陰イオンの状態での化学シフト位置よりも1.37ppmも低磁場側にシフトして観測された。このAdRに結合した NADP^+ のズリン酸基の存在状態を調べるため、pH 6.25からpH 7.48の範囲においてpH変化を行なった。その結果を図2の●印で示した。このpH範囲において、ズリン酸基のpHによる化学シフトの変化は観測されなかった。この結果は、 NADP^+ がAdRに結合することによりズリン酸基が二価の陰イオンの状態で安定し、そのpK値が大きく減少したことを示している。 NADP^+ のズリン酸基が、二価の陰イオンの状態で安定に存在する要因として、ズリン酸基の近くに陽イオンが存在しイオン結合していることが考えられる。このような陽イオンとして、化学修飾の結果からアルギニン残基の存在が強く示唆される。補酵素により活性部位にヒスチジン残基の存在が示唆されている⁹⁾が、もしこのヒスチジン残基が NADP^+ との結合に関与していれば、 NADP^+ との結合によりこのヒスチジン残基のpK値の変化がみられると予想されるので、さらに ^1H -NMRの測定により検討を加える予定である。 NADP^+ およびFADのピロリン酸基に由来するシグナルは、-10 ppm付近のAB型のパターンを示す一組のシグナルとさらに高磁場側に存在するもう一組のAB型のパターンを示すものである。この結果のみでは、FADに由来するシグナルを同定することが出来なからどちらのシグナル対に対応するにしても、補酵素のFADに由来するシグナルは、 NADP^+ の結合により変化している。この結果は、 NADP^+ の結合により少なくとも

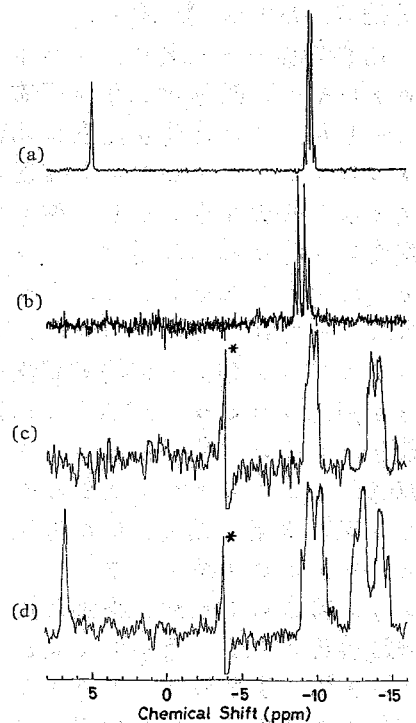


図3. 遊離の NADP^+ 、FADとAdRならびにAdRと NADP^+ の複合体の ^{31}P -NMRスペクトル
(a) 遊離の NADP^+ (20 mM, pH 6.92)
(b) 遊離のFAD (0.5 mM, pH 6.92)
(c) AdR (320 μM , pH 6.93, 50 mM PIPES, 50 mM KClを含む)
(d) AdRと NADP^+ の複合体 ([AdR]=[NADP^+]=270 μM , pH 6.92, 50 mM PIPES, 50 mM KClを含む)
* はノイズによるものである。

FADのピロリン酸基の構造に変化があらわれていることを示している。

塩濃度変化——NADP⁺とAdRとの結合が、KClの濃度によりどのように変化するかを³¹P-NMRと可視分光法により検討した。500 mMのKClを含む溶液でのAdRのスペクトルを図4(a)に示す。このスペクトルは

50 mMのKCl濃度でのAdRのスペクトル(図3(c))

とよく一致している。この結果は、塩濃度の変化により補酵素部分の構造に変化がないことを示している。この塩濃度において、NADP⁺を加えたスペクトルを図4(b)に示す。このスペクトルは、50 mMのKCl濃度で測定した図3(d)のスペクトルと大きく異なっている。NADP⁺の

プーリン酸基のシグナルは高磁場側にシフトし、遊離のNADP⁺の共鳴位置に近づいている。この結果は、塩濃度の増加によりNADP⁺のAdRに対する結合が弱くなり、AdRに結合した状態と遊離

の状態との加重平均の位置にシグナルが現われたものと考えられる。可視分光により50 mMから500 mMのKCl濃度変化によるK_dを求めたところ、塩濃度の増加に伴いK_dが大きくなることが

確認され、これらの結果はNMRの結果とも一致した。ピロリン酸基の部分に関しては-10 ppm

付近の大きなシグナルとさらに高磁場側にダブレットのシグナルが観測されるのみである。この結果も、NADP⁺がAdRに結合した状態と遊離の状態との間の交換があると考えれば、よく理解でき、AdR(図4(a))の高磁場側に現われるシグナル位置と

図4(b)のダブレットのシグナル位置がほぼ同じであることから、50 mMのKCl濃度で高磁場側に観測されたAB型のシグナル対(図3(d))がFADに由来するものであり、

低磁場側の対がNADP⁺に由来するものと同定できた。

以上の結果をまとめると、補酵素のFADは遊離の状態とは異なった状態をとっているが、NADP⁺の結合により少なくともFADのピロリン酸基部分の構造がさらに変化することが明らかとなった。またNADP⁺とAdRの結合には、プーリン酸基が大きく関与し塩濃度の増加により著しく結合が弱くなることから、この結合はイオン結合による寄与が大きいと考えられる。プーリン酸基とイオン結合に関与している残基として、化学修飾の結果からアルギニン残基が考えられる。NADP⁺のピロリン酸基部分に関しては、結合に伴う大きな変化が観測されないことから、結合に伴う大きな構造変化はなく、AdRとの結合にこの部分の寄与はあまり大きくないと考えられる。

このことがNADP⁺とNAD⁺の親和性の大きな差異の原因と思われる。

このことがNADP⁺とNAD⁺の親和性の大きな差異の原因と思われる。

このことがNADP⁺とNAD⁺の親和性の大きな差異の原因と思われる。

<文献> 1) Chu, J.-W., Kimura, T. (1973) J.B.C. 248, 2089 2) Lambeth, J.D., Kamin, H. (1977) J.B.C. 252, 2908 3) Kitagawa, T., Sugiyama, T., Yamano, T. (1982) J.B.C. in press 4) Sugiyama, T., Yamano, T. (1975) FEBS Lett. 52, 145 5) Nonaka, Y., Sugiyama, T., Yamano, T. (1982) J.B. in press 6) Hiwatashi, A., Ichikawa, Y., Maruya, N., Yamano, T., Aki, K. (1976) Biochemistry 15, 3082

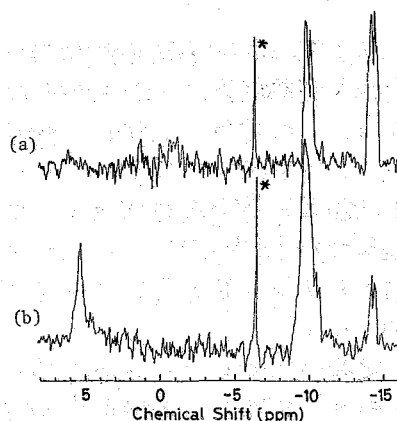


図4. 500 mMのKCl濃度でのAdR
およびAdRとNADP⁺の混合溶液の
スペクトル
(a) AdR (800 μM, pH 6.93)
(b) AdRとNADP⁺の混合溶液
([AdR]/[NADP⁺] = 0.9, pH 6.93)
*はノイズによるものである

(国立公害研) 〇三森文行, 伊藤 治

〈序〉第20回本討論会において、演者らは ^{13}C をトレーサーとして用い、高等植物の光合成炭素代謝を ^{13}C -NMRにより有効に追跡できることを示した。本報告において、この方法を *intact* 細胞系に適用する最初の試みとして、緑藻の一種であるフロレラを用いて ^{13}C トレーサー実験を行なった。フロレラは炭酸ガスを炭素源として光合成を営むだけでなく、グルコース等を与えると従属栄養的にも生育する。本報告では *intact* なフロレラに炭素源として、 ^{13}C 標識した酢酸、グルコース、炭酸水素ナトリウムを与え、これらがフロレラ細胞内で代謝される過程を ^{13}C -NMRで観測した。

〈実験〉フロレラ (*Chlorella vulgaris*) は、グルコースを栄養源として培養したものを、グルコース供与実験ではそのまま、酢酸供与実験では炭素源を酢酸に授えて1昼夜馴化したものを、光合成実験では光照射下で4% CO_2 を与える~4日間生育させたものを、それぞれ実験開始直前に遠心して細胞を集めた(酢酸馴化細胞はフロレラ工業より提供を受けた)。この細胞1 ml に ^{13}C 標識を含んだ培養液を加えて2 ml とし(細胞数 $\sim 5 \times 10^9$ 個/ml)、10 mm Φ NMR 試料管内で incubate しながら測定を行なった。加えた酢酸、グルコースは混合直後の濃度が50 mM となるようにした。なお、Lock 用として重水を培養液に最終濃度が10% となる様に加えた。好気的条件を保つために、テフロンキャピラリーを試料管底部に挿入し、10 ml/min の流速で O_2 バブリングを行なった。NMR 測定は JEOL GX-400 分光計を用い、 ^{13}C を 100.4 MHz で測定した。測定時は 9 W と 4 W のバイレベルのプロトノイズデカップリングを行なった。スピニングは行なっていない。プローブ内の試料温度は 25°C。シフト基準は、heat ターノールキャピラリーを外部基準として用い、このシフト値を 49.96 ppm として記載した。

〈結果〉2- ^{13}C -酢酸ナトリウム (30 atom%) を与えた *intact* フロレラの ^{13}C -NMR スペクトルを図1に示す。45°パルスで、パルス繰り返し時間 0.6 秒、1000 回の積算 (10 分間) でグルタミン酸、コハク酸、リンゴ酸、アラニン、アスパラギン酸、炭酸水素イオン等への ^{13}C 標識の取りこみが観測される。プロードニングオフター 5 Hz で処理した場合、グルタミン酸 C-4 の半値巾は約 30 Hz である。こうして、バブリングに起因する磁場の不均一度の増加は数 Hz 以内である。Ugurbil らは大腸菌に 1- ^{13}C -グルコース (90 atom%) を与え、1~8 分間の時間分解能で測定を行なっているが、彼らの測定結果では、半値巾約 15 Hz と報告されているので、フロレラ細胞では感度的に不利となっている。¹⁾

2- ^{13}C -酢酸の減少過程および各代謝物質の ^{13}C 標識の推移を図2~4に示す。酢酸はアセチル CoA として TCA 回路にはりり効率的に代謝される。N₂ バブリング下では酢酸のヒープ強度は変化しないが、 O_2 バブリングを行うと直線的に減少を開始する。この傾きから求めた酢酸の消費速度は 1.8 $\mu\text{mole/ml packed cell} \cdot \text{min}$ でみつかり、ふみゆき、いとう、おさむ

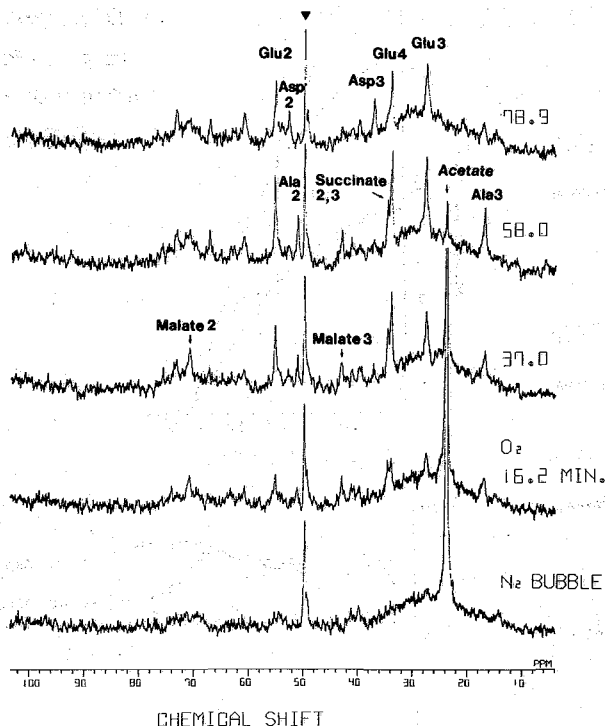


図1. 2- ^{13}C -酢酸 (30 atom%) を供与した intact フロラの ^{13}C -NMR スペクトル. ∇ : external MeOH. 10分間積算. 右端の数字は O_2 バブリング開始後の経過時間.

あった。 ^{13}C 標識の取りこみはコハフ酸、リンゴ酸の C-2, C-3 で良く似たパターンが認められ、これが TCA 回路の中肉体の標識パターンを代表すると考えられる (図2)。グルタミン酸は TCA 回路の α -ケトグルタル酸から生成するが、TCA 回路の1回転目では C-4 のみに標識がはいり、C-2, C-3 は2回転目以降にしか標識されない。ピーク高をプロットした図3では一応 C-4 位がやや高いが、線巾を考慮するとその差はあまり小さくなり、これは TCA 回路での ^{13}C 標識位置の mixing が急速に進んでいるためと考えられる。アラニン、アスパラギン酸は以上の物質とは異なった挙動を示す (図4)。 HCO_3^- イオンは初期にはゆっくりと生成して行くが、酢酸が消費しつくされると急激に増加する。

1- ^{13}C -グルコース (90 atom%) を炭素源とした場合のフロラの経時的な ^{13}C -NMR スペクトルを図5に示す。この場合は10分間の積算では TCA 回路の中肉体系観

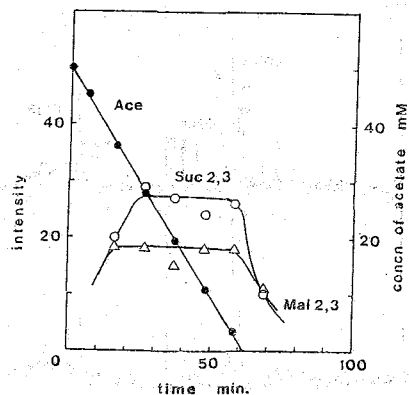


図2. 2- ^{13}C -酢酸供与後の酢酸の減少とコハフ酸、リンゴ酸の標識のタイムコース

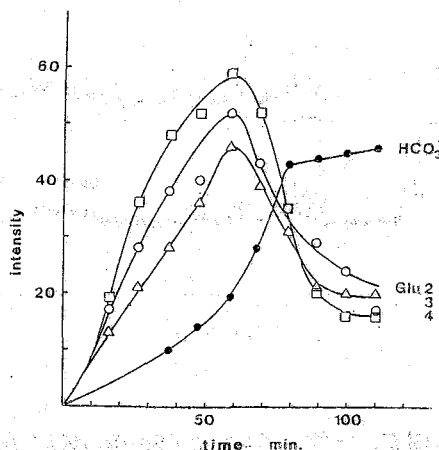


図3. 2- ^{13}C -酢酸供与後の Glu, HCO_3^- の ^{13}C 標識のタイムコース

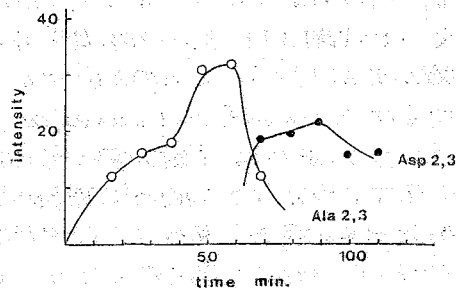


図4. 2- ^{13}C -酢酸供与後の Ala, Asp の ^{13}C 標識のタイムコース

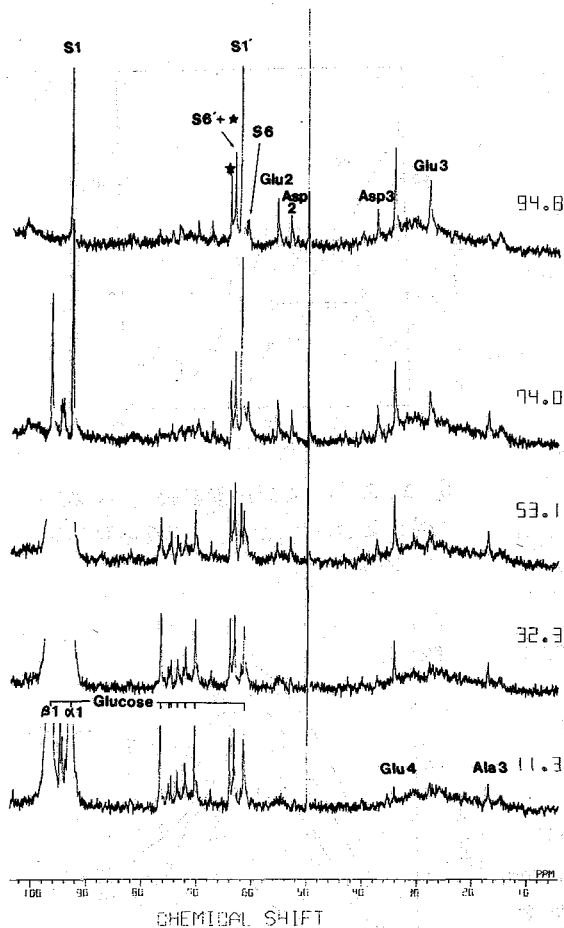


図5. 1-¹³C-グルコース (90 atom%) を供した70レラの¹³C-NMRスペクトル. 10分間積算. 右端の数字はO₂バブリング開始後の経過時間.

☆: impurity, S: sucrose.

測されたり。グルコースは供与直後にはゆくりと代謝され、30~40分以降、直線的に減少する(図6)。この時期のグルコース消費速度は2.4 $\mu\text{mole} / \text{ml packed cell} \cdot \text{min}$ である。図7, 8に各代謝物質の¹³C標識パターンを示す。グルタミン酸の¹³C標識の取りこみは酢酸供与の場合と異なり、C-4位が明らかにC-2, C-3位より高くなっている。またグルコースが消費しつくされた後もピーク強度は上昇している(図7)。アラニンはC-3のみが標識される。酢酸供与の場合と最も異なるのは、ショ糖への¹³C標識の流入が見られる点である(図8)。しかもショ糖のC-6, C-6'

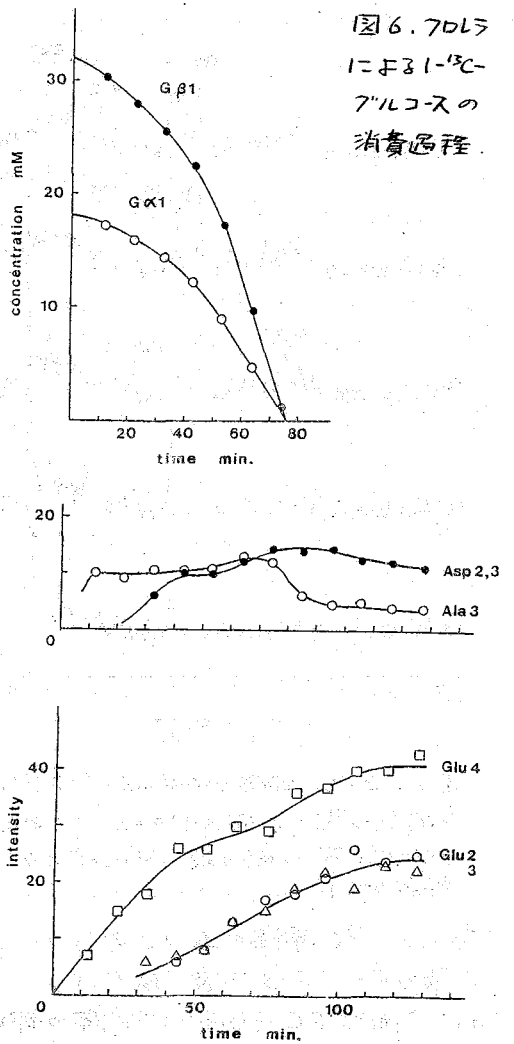


図6. 70レラに於て1-¹³C-グルコースの消費過程.

図7. 1-¹³C-グルコース供与時のGlu, Ala, Asp. の¹³C標識のタイムコース

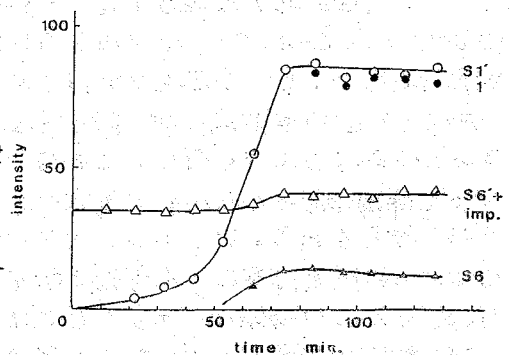


図8. 1-¹³C-グルコース供与時のショ糖の¹³C標識のタイムコース.

にもC-1, C-1'の10%前後の ^{13}C 標識の取りこみが認められる。

$\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を供えた場合のフクロウの ^{13}C -NMRスペクトルを図9に示す。現在、フクロウ内で光照射を行うことができるので、室内で $2.5\text{mM NaH}^{13}\text{CO}_3$ をえ、 40000 lux の光照射を10分間行なって光合成を行なわせた。暗黒下10分間の測定で細胞内のショ糖、アラニン、グルタミン酸への ^{13}C 標識の取りこみが観測された。現在、さらに詳細な実験を行なっている。

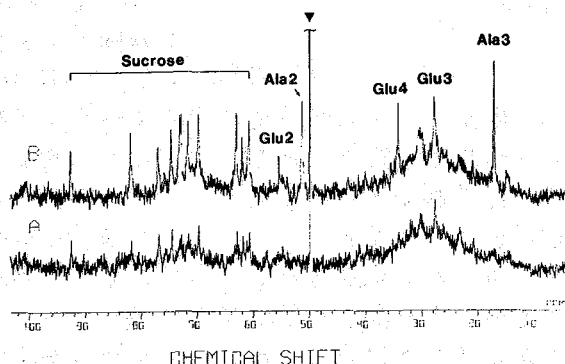


図9. $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (90atom%) 供え、10分間光照射後のフクロウの ^{13}C -NMRスペクトル(B), (A)は、naturalのフクロウ、10分間積算。

〈考察〉 グルタミン酸のC-2, C-3, C-4の標識パターンを見ると、酢酸供えの場合、グルコース供え時に比べC-4の特異性がそれほどは、まりしない。これは酢酸供えの場合、TCA回路の中肉体の各炭素位置への標識の取りこみが急速に均一化していることを示す。これはコハク酸やリンゴ酸のC-2, C-3の ^{13}C 標識が急速に飽和することと符合している。この事実がグルコース供えに比して酢酸供えの場合、TCA回路の代謝回転が速いことを示唆している。また酢酸供えでは最終産物である HCO_3^- が観測されるのに、グルコース供えではこれが認められないことも、この結果を支持している。酢酸のC-2よりTCA回路に取りこまれた ^{13}C 標識はTCA回路を4回転以上になり、と脱炭酸されて CO_2 として放出されてこない。一方、アラニンの標識パターンを見ると、グルコース供え時にC-3のみが標識されるのは、解糖系のピルビン酸からアラニンが生成されることで説明されるが、酢酸供え時にC-2も同様に標識されることは、酢酸が単独に解糖系を逆のほうに、ピルビン酸からアラニンとなることで説明できない。この場合はアラニンは、 ^{13}C 標識がTCA回路を回転して標識位置の均一化が起こった後にリンゴ酸、なりしはオキサロ酢酸からピルビン酸を経由して生成したと考えられる。グルコース供えの場合、 ^{13}C 標識は解糖系へ流入するだけでなく、ショ糖の合成にも用いられている。しかも標識はC-6, C-6'にも入ることが明らかになった。これはグルコースの一部が、解糖系の少なくともフルクトース-1,6-ニリン酸まで代謝された後、ショ糖の「グルコシド」、フルクトシドとして取りこまれたことを意味している。これとは対照的に酢酸供えではショ糖への ^{13}C 標識は行なわれな。また、グルコース供えではデンプンにも ^{13}C 標識が取りこまれることが明らかになった。以上の標識パターンを総合すると、グルコースの一部は解糖系を経てTCA回路へと代謝されるが、ショ糖やデンプンの合成へと使われる部分も大まかに考えられる。これに対し、酢酸をえるとTCA回路が急速に回転し、炭酸ガスの放出が行なわれること、解糖系を逆のほうでショ糖の合成はみられないことがわかった。

Reference

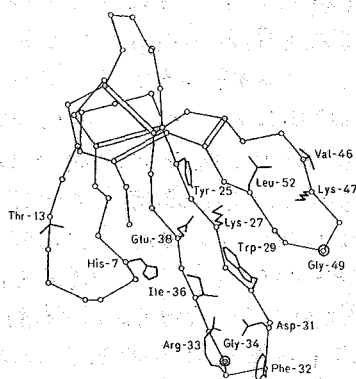
1) K. Ugurbil, T.R. Brown, J.A. DenHollander, P. Glynn and R.G. Shulman, Proc. N.A.S., 75, 3742 (1978).

(Oxford大, 東大理*, 東北大理**)

○稲垣冬彦[†], R. J. P. Williams, 宮沢辰雄^{*}, 遠藤斗志也^{*}, 田宮信雄^{**}

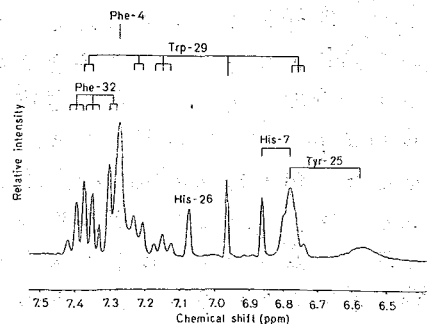
生体高分子の高次構造に関する知見はX線結晶構造解析によるところが多い。そして結晶構造解析の知見にもとづき、酵素反応機構の解析など、分光学データの解析が行われてきたのである。しかし結晶中における構造が溶液中の構造と同一であるか否かという点については、未解決の問題である。実際単結晶を作製する場合に、高イオン強度溶液や有機溶媒中から単結晶を成長させることが多く、これらの因子が生体高分子の高次構造形成にいかなる影響を及ぼすか、今後解明すべき問題である。また結晶格子のパッキングや分子間の相互作用が生体高分子の高次構造に及ぼす効果も個々の分子について検討する必要がある。この点に溶液中における生体高分子の高次構造の研究の重要性の一つがあるといえよう。NMRは個々の核について構造情報を与える点でユニークな分光法である。特に近年の超伝導磁石を用いた超高磁場NMRや新しい測定法の発展により、分子量一万程度の生体高分子について、数多くのNMRシグナルの帰属を行なうことが可能となった。そしてこれらの帰属のついたシグナルをプローブとして用いることにより、詳細な生体高分子の高次構造研究を行なうことができる。一般に分子全体の折りたたみ方についてはX線結晶構造解析は唯一の方法であるが、一方NMRは分子の局所構造を調べるのに鋭敏な方法といえる。したがってこれらの方法を相補的に用いることが、溶液中の生体高分子の高次構造研究を行なうために不可欠な方法となる。本研究では神経毒蛋白であるエラブトキシン α および α -コブラトキシンについて、このような比較研究の際に見出した結晶と溶液における明らかなる構造上の差異について報告する(1, 2)。

エラブトキシシンb 毒へビの毒腺よりとれる神経毒蛋白はアミノ酸残基数60~62よりなる短鎖神経毒と、アミノ酸残基数71~74よりなる長鎖神経毒の二つに分類される。いずれも後シナプス膜のアセチルコリンリセプター蛋白に強く結合することにより、神経→筋肉への刺激伝達を阻害する。図1は短鎖神経毒であるエラブトキシシンbの結晶構造解析より求められた主鎖の構造を示したものであり、三つのループとコア部分よりなる特徴的な構造をもつ(3,4)。エラブトキシシンbについては、pH滴定、温度変化、スピンドカップリング、常磁性プローブ、化学修飾およびN.O.Eの実験とくみあわせて、芳香族シグナル、メチルシグナル、リジンのεメチレンシグナルについて各アミノ酸残基への帰属を行なうことができた(5,6)。一例として、エラブトキシシンbの芳香族領域の¹H300 MHz NMRスペクトルとシグナルの帰属を図2に示す。これらのシグナルを用いて蛋白

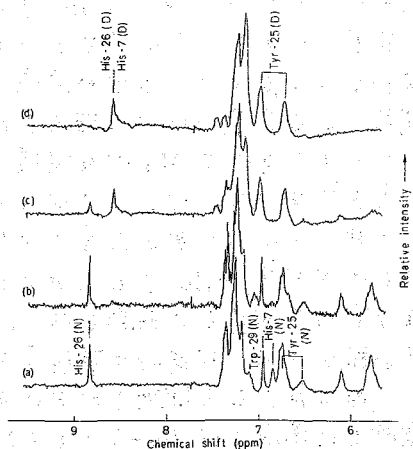


(図1) 結晶構造解析より求められた
エラブトキシンの主鎖の構造。機能
性残基および His-7 の側鎖の位置を示す。

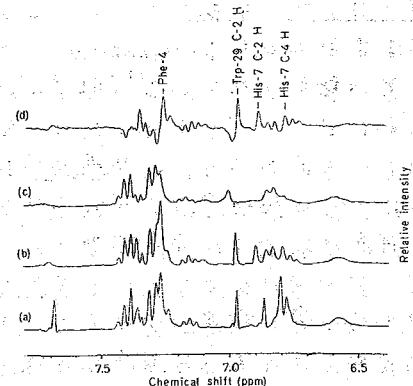
質の構造を詳細に調べることが可能になる。水溶液における構造は、結晶における構造と大部分はよく対応しているが H_{is}-7 の残基周辺の構造は全く異なることが明らかとなった。結晶構造によれば、H_{is}-7 のイミダゾール環は第一ループより突出し、第二ループの Ile-36 に近接しており、溶媒への露出度も大きい。したがって H_{is}-7 は酸性領域ではプロトン化していることが期待される。図3にエラブトキシシンbの芳香族プロトンシグナルの pH 依存性を示す。pH が低くなるに従い、H_{is}-7 の C2 プロトンシグナル (H_{is}-7 (N)) の線中はひろくなり、pH 3.21 では完全に消失する。pH 2.48 ではかわって ~8.6 ppm にブロードなシグナル (H_{is}-7 (D)) があらわれる。このようなスペクトル変化はエラブトキシシンb分子全体の可逆的な酸変性過程に対応していることが、他の芳香族シグナル、メチルシグナル、CD スペクトルの pH 依存性の解析の結果明らかとなった。即ち、H_{is}-7 は pH 3.96 においてもプロトネーションをうけないこと、分子全体が酸変性をうけてはじめてプロトン化するのである。このことは native の状態では H_{is}-7 のイミダゾール環が結晶構造のように溶媒に露出しているのではなく、埋もれた状態にあることを示している。更に H_{is}-7 の C2 プロトンの化学シフトが ~1 ppm 高磁場側にシフトしていることは他の芳香族環の環電流効果によるものと考えられ、H_{is}-7 が蛋白質内部に埋もれかつ芳香族環と近接した疎水的環境にあることを示唆している。エラブトキシシンbには H_{is}-7 以外に H_{is}-26 がある。そこでイミダゾール環と反応することが知られている ethyl mercury phosphate を用いこれら二つの H_{is} 残基の反応性の差異を調べた。図4に ethyl mercury phosphate によるエラブトキシシンbの滴定結果を示す。数倍モルの試薬の存在下で H_{is}-26 は完全に反応するが H_{is}-7 は ~20 倍モルの試薬を必要とする。このことは H_{is}-7 と H_{is}-26 の反応性が著しく異なることを示しており、溶液中で H_{is}-26 は比較的露出しているのに対し、H_{is}-7 は埋もれていることを支持する。ヨウ素による H_{is} 残基の化学修飾は H_{is}-26 は



(図2) エラブトキシシンbの芳香族領域の 300 MHz ¹H NMR スペクトルとその帰属



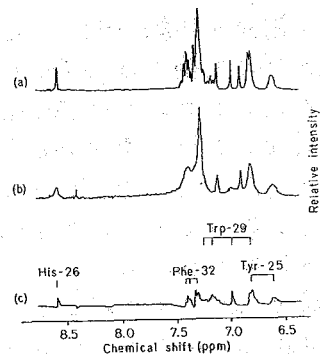
(図3) エラブトキシシンbの芳香族シグナルの pH 依存性 (a) pH 3.96 (b) pH 3.21 (c) pH 2.48 (d) pH 1.80. Nは接性、Dは変性ピークを示す。



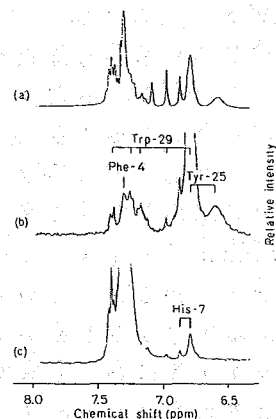
(図4) エラブトキシシンbと ethyl mercury phosphate との結合実験。モル比はそれぞれ (a) 0.0 (b) 5.0 (c) 20.0 (d) (b)-(c) の差スペクトルである。

容易に修飾をうけるのに対し、His-7は変性してはじめて修飾をうけることが報告されており、上の結果ともよく対応している。次に常磁性多価アニオンである $Gd(dipic)_3^{3-}$ とエラブトキシンbとの結合実験を行った(図5)。 $Gd(dipic)_3^{3-}$ との結合により、Trp-29, phe-32, Tyr-25の芳香族シグナルの線巾が増大しており、差スペクトルをとることによりその影響を明瞭に示すことができる。これらのシグナルの他にも Lys-47, Ile-36 に顕著な影響が観測されたが、結晶構造では Ile-36 に近接した His-7 には何らの影響も認められない。即ち、His-7 は Ile-36 の近傍には存在しないとすることが妥当である。以上の実験事実から His-7 のイミダゾール環が溶液中では、結晶構造から期待される位置ではなく埋もれた状態にあることを示している。そこで His-7 の環境を調べるため NOE の測定を行なった。図6は His-7 および phe-4 を照射した時の NOE の効果を差スペクトルとしてとり出したものである。His-7 C4 プロトンに照射した場合には phe-4 に NOE が観測される。(Tyr-25, Trp-29 の芳香族プロトンも同時に照射しているためリングプロトン内の NOE も観測されている。) 一方、phe-4 を照射した場合には His-7 の C2, C4 プロトンに NOE が観測される。以上より His-7 のイミダゾール環は結晶構造に示されるような露出した状態ではなく、むしろ第一ループの内部かつ phe-4 の芳香族環と近接した疎水的環境に存在することがわかった。

α-コブラトキシン α-コブラトキシンは長鎖神経毒蛋白であり Walkinsaw らにより X 線結晶解析の結果が報告されている⁽⁷⁾。図7は結晶構造解析より求められた α-コブラトキシンの主鎖の折りたたみ方を示したものである。結晶構造解析に用いられた結晶は pH 2.8 の酸性溶液より成長させたものである。そこで結晶母液および中性溶液の二つの pH で CD を測定したところ、230 nm の CD バンドが pH により大きく変化することがわかった。このことは中性および酸性溶液で蛋白質の構造が変化することを示している。この構造変化を詳細に検討するため NMR による pH 滴定の実験を行なった(図8)。pH 6.50 より pH 5.55 に下げていくと 7.8 ppm にある共鳴シグナル α (His-18 のイミダゾール環の C2 プロトン) はしだいに弱くなり、8.7 ppm にピークが現われてくる。この新しいピークはプロトン化したイミダゾール環の C2 プロトンによるものであり、この共鳴シグナルは pH 5.55 より pH 4.97 に下げると強くなる。(したがって中性溶液で安定な構造は pH

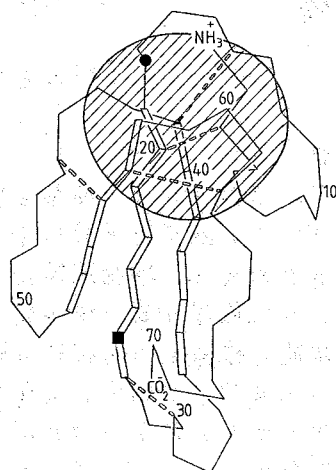


(図5) エラブトキシンbと $Gd(dipic)_3^{3-}$ との結合実験 (a) $Gd(dipic)_3^{3-}$ ナシ、(b) 0.06 倍モルの $Gd(dipic)_3^{3-}$ 存在、および (c) (a)-(b) の差スペクトル。 $Gd(dipic)_3^{3-}$ 近傍の核の線巾は選択的にひろがるため、差スペクトルをとる影響をうけた核のみ残るようになる。



(図6) (a) エラブトキシンの芳香族領域の 300 MHz 1H NMR スペクトル、(b) His-7 C4 プロトンに照射した時の NOE 差スペクトル、(c) phe-4 を照射した時の NOE 差スペクトル

を下げると、His-18のイミダズール環にプロトン化するとともに、酸性溶液中で安定な構造に移りかわっていることが明らかである。このように生理条件下での α -コブラトキシンの構造は結晶における構造とは異なっていると考えられる。この構造変化に対応するHill係数は1であることから、His-18のプロトン化がこの構造変化を誘起していることがわかる。His-18のほかにも phe-4 (図8のbとc) と Tyr-21 (d) の芳香族シグナルが遅い交換を示す。主鎖の α プロトンのうち Cys-20 残基のシグナルf, Tyr-21 残基のシグナルg, Cys-41 残基のシグナルhも遅い交換を示す。したがって His-18のプロトン化にともなう構造変化は主として、コア領域 (図7の斜線部分) に局在していることがわかる。生理条件下の中性溶液中において His-18のイミダズール環はプロトン化しないで、疎水的なコア領域の構造を保持する役割を果たしていると考えられる。溶液のpHが低くなって His-18がプロトン化するとコア領域の構造がかわって 結晶 (酸性溶液から



(図7) 結晶構造解析より求められた α -コブラトキシンの主鎖の構造。斜線部分はHis-18のプロトン化により、構造変化の起る領域

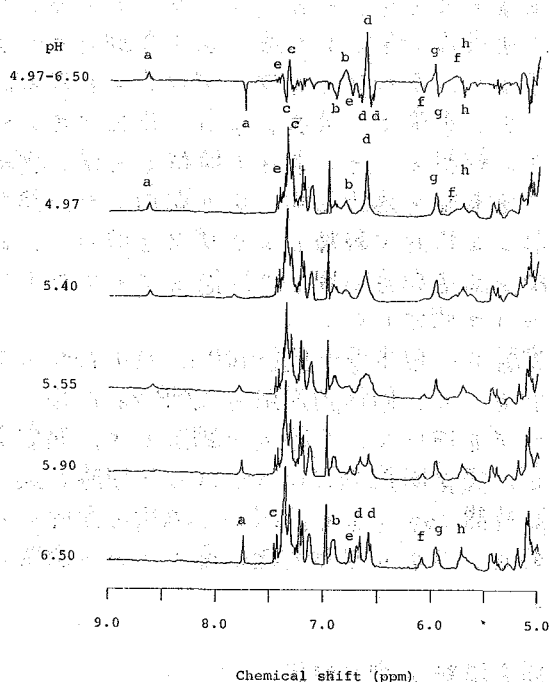
析出) で見いだされたように His-18は分子表面に露出するのであろう。pHによる His-18 周りの構造変化は、NOEの実験からも支持された。このコア領域は抗体の結合部位であることが見いだされている

以上、二つの例を示したように、NMRによる構造解析法は、結晶解析の方法と補いあって、溶液中における蛋白質の構造を調べるのに重要な手法となる。

【謝辞】 α -コブラトキシンの研究は Essex大 R.C. Hider 博士との共同研究である。また、種々討論いただいた Oxford Enzyme Groupの I.D. Campbell, R.A. Dwek, C.M. Dobson 博士らに感謝いたします。

【文献】 (1) Inagaki, Tamiya, Miyazawa, Williams. Eur. J. Biochem. **118**, 621 (1981), (2) Hider, Drake, Inagaki, Williams, Endo, Miyazawa. J. Mol. Biol. **158**, 275 (1982), (3) Kimball, Sato, Richardson, Rosen, Low. Biochem. Biophys. Res. Commun. **82**, 950 (1979), (4) Taernoglou, Petsko. FEBS Lett. **62**, 1 (1970), (5) Inagaki, Miyazawa, Hori, Tamiya. Eur. J. Biochem. **89**, 433 (1981), (6) Inagaki, Tamiya, Miyazawa. Eur. J. Biochem. **109**, 129 (1980), (7) Walkinshaw, Saenger. Proc. Natl. Acad. Sci. **77**, 2400 (1980).

〒現所属 東リサーチセンター



(図8) α -コブラトキシンの芳香族および α プロトン領域の300 MHz ^1H NMR スペクトルのpH依存性

(阪大蛋白研, 要系試*) 藤原敏道, 小林祐次, 片岡紘三*
京極好正

序

フィブロインは、絹糸を構成する構造タンパク質のひとつで、グリシンとアラニンで、その組成の半分以上を占めている。フィブロインの濃厚な溶液に、ずりの張力を与えると、繊維状態になり、その構造は、X線回折より β 構造であるとされている。また、低温で低い延伸倍率の際は、 α 型という構造をとることも言われる。これらの状態の構造をより詳細に調べ、また固体状態での運動性を調べるために、 ^{13}C をラベルしたフィブロインを生合成して、固体高分解能NMRの測定を試みた。今回は化学シフトの大きいカルボニル炭素をラベルし、それより、 β 構造についての解析と運動性について検討した。また、アミノ酸組成の違う別種のカイコのフィブロインについても比較する。

試料と実験方法

試料は、*Bombyx mori*(家蚕)と*Antheraea perni*(柞蚕)のフィブロインで、アラニンのカルボニル炭素のみ ^{13}C でエンリッチしている。人工飼料の蛋白質成分をすべてアミノ酸におきかえて、そのうちアラニンのみ、 ^{13}C 90% エンリッチした飼料を、フィブロイン生合成がもっとも盛んな5令期のカイコに与えて、ラベルしたフィブロインを得た。エンリッチ率は、家蚕について13%であった(図1)。試料として、糸を精練して得た繊維と、絹糸腺を急激にひっぱり配向させ、張力を与えた状態で乾燥したデグスを用い、この二種の結晶化度の異った状態のフィブロインについて測定した。

実験は、日本電子FX-100にハイパワー・アンプをつけ、固体測定用の $^{13}\text{C}/\text{P}$ デュアル・プローブを用いて、CP法で測定した。測定条件は、積算回数約1500回、パルス間隔8sec、接触時間1msである。試料を磁場に配向させる時は、うすりガラス板に巻きつけて測定した。

粉末試料の測定結果

図2bのように、CP法のスペクトルでは、化学シフトの異方性、 ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用による線中の広がりは見えないので、カルボニル領域とそれ以外の領域の

ふじわらとしみち、こばやしゆうじ、かたおかこうぞう、きょうごくよしまさ

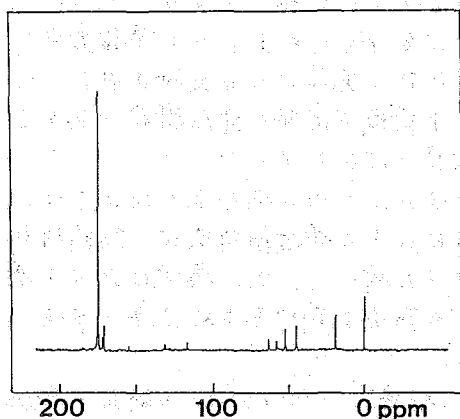


図1, ^{13}C -NMR, 共鳴周波数50MHz
アラニン残基のカルボニル炭素をエンリッチした液状絹,
(家蚕)

みが分離した2つのブロードなピークが得られる。

また、図2(a)のように、MAS/CP法を用いると、さらにC_α領域とメチル領域が分離できるが、それ以上のシグナルの分離は出来ない。シグナル中の原因は、¹⁴N(I=1)の四極子の影響で、C_α炭素とカルボニル炭素のシグナルが分裂し、量子化の方向がずれることによる。さらに、¹⁴Nの影響を受けにくいC H₃のシグナル中も広いことから、あがるようにコンフォメーションが複数あることも原因であろう。

配向試料の測定結果とスペクトルのシュミレーション

図3, 4は、フィブロインの繊維とデグスを磁場に対して、配向させた時のスペクトルである。ともに、よく似たスペクトルを示しており、磁場に対して平行な時に比べ、垂直な時に、高磁場側にシフトしている。

配向試料のスペクトルを解析するために、スペクトルのシュミレーションを行った。シュミレーションは、化学シフトの異方

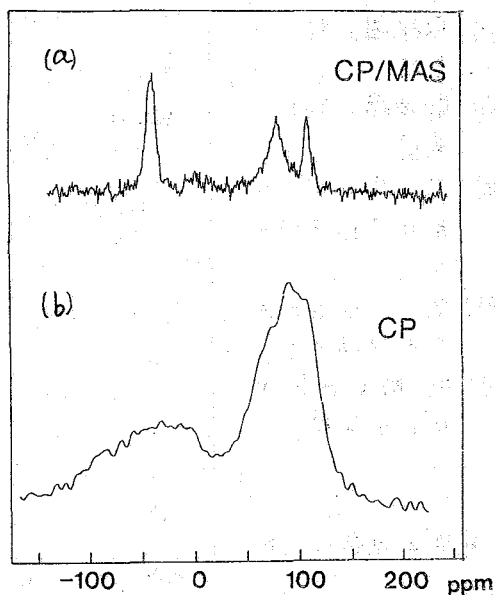


図2, エンリッチしていないフィブロイン繊維の¹³C固体高分解能NMR
(a) CP/MASによるスペクトル
(b) CPによる粉末パターン

図3

一軸配向させた繊維状態のフィブロイン

(左): 静磁場に対し平行

(右): 静磁場に対し垂直

(上): エンリッチしていないフィブロイン

(中): アラニン残基のカルボニル炭素のみエンリッチしたフィブロイン

(下): (上)と(中)のスペクトルの差

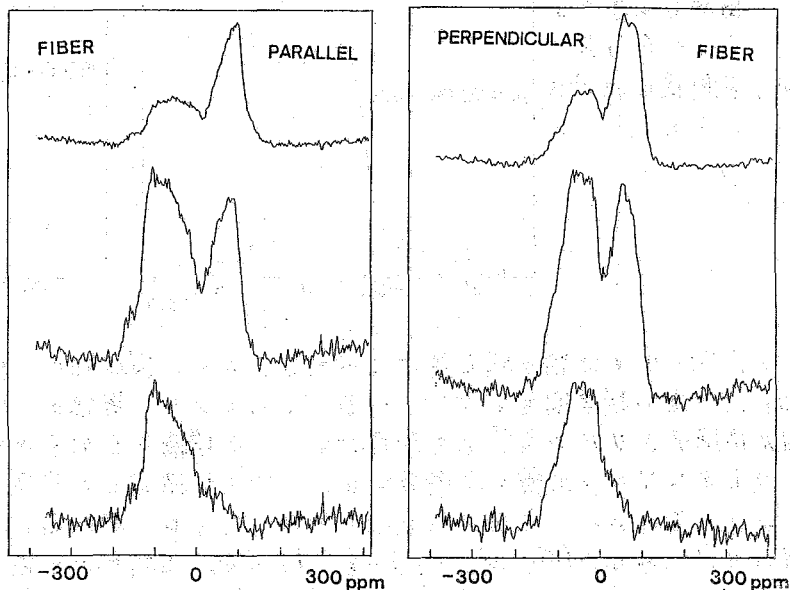


図4

- (左): 静磁場に対して
平行
- (右): 静磁場に対して
垂直
- (上): エンリッチして
ないフィブロイン
- (中): エンリッチした
フィブロイン
- (下): (上)と(中)とのスベ
クトルの差,

基準は液体ベンゼ
ン

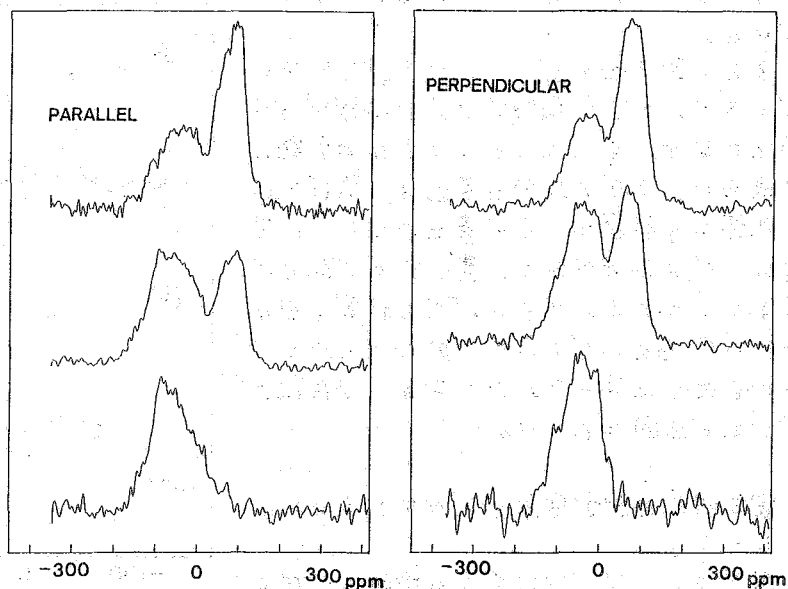
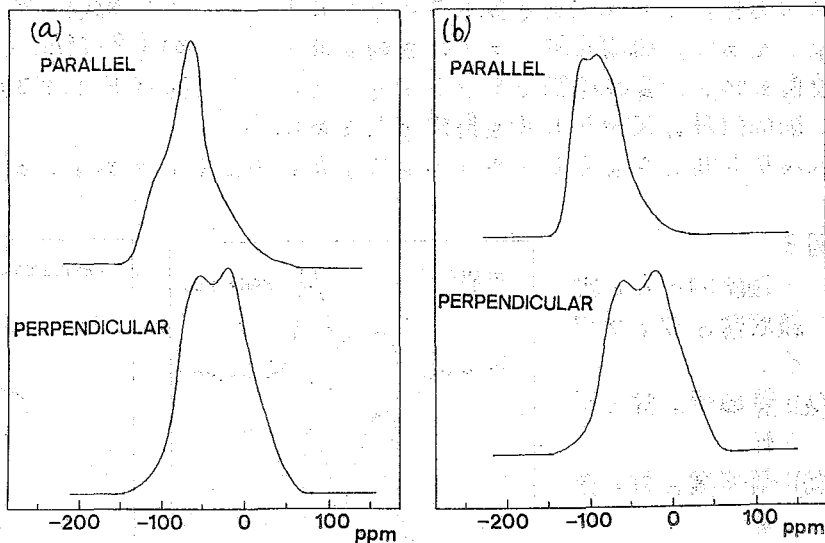


図5

- 不完全配向モデル
によるスペクトル
シミュレーション
- (a) 逆平行ひだ付 β
構造によるシ
ミュレーション
- (b) 実測値に近ざ
れたシミュレー
ション



性と, ^{14}N - ^{13}C の双極子相互作用を仮定し, また, 繊維軸は一軸配向で, 配向した方向に, 一定の標準偏差でガウス分布しているとし, 最後に, 線巾を与えた。双極子相互作用テンソルの主値と主軸方向は, 分子構造から明らかである。しかし, 化学シフトテンソルの主値と主軸方向は, ペプチド結合したアラニン残基の値が, 決められていないので, 今回のシミュレーションでは, 単結晶アミノ酸アラニンの値を用いた。⁽¹⁾ これは, $(\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}) = (-111, -54, 23)$ ppm である。これに, X線解析より得られた逆平行ひだ付 β 構造を仮定して, 主軸座標系から, 分子座標系へ変換するオイラー角は, 双極子相互作用テンソルについて $(135.2^\circ, -44.9^\circ, 12.5^\circ)$,

化学シフトテンソルについて $(-155^\circ, -60^\circ, 0^\circ)$ としている。なお、図は、繊維軸のまわりの分布の標準偏差は 15° 、線中のブロードニングは 8 ppm としたものである。図5(a)のシミュレーションでは、静磁場に垂直な場合は、実測のスペクトルをよく再現するが、平行な場合は、実測と違った形状である。図5(b)は、上述のようにして与えたオイラー角を少しずらし、実測スペクトルに近い形状を搜したものである。その場合、オイラー角は、化学シフトテンソルについて $(-150^\circ, -75^\circ, 0^\circ)$ となった。このように、単結晶アラニンのNMRとフィブロインのX線より予想される値から、実測のスペクトルが、ずれている理由は、2つ考えられる。1つは、フィブロインの β 構造が、平面状のひた付構造でなく、ねじれた β 構造であることで、もう1つは、アラニンとアラニン残基で、化学シフトテンソルの主値と主軸方向が、ずれていることである。

温度依存性

図6は、エネルギーしていない家蚕のデグスを、高温で静磁場に平行に配向させた時、CP法で得たスペクトルである。カルボニル炭素の線巾が、温度上昇に伴い狭くなっていることが、わかる。また、垂直に配向させた時も、同様に、低磁場側でシグナル強度が弱くなっている。このようなことは、結晶度が高い繊維では、おこっていない。従って、高温では、非晶領域で 10^3 Hz 以上の速さのミクロブラウン運動がおこり、化学シフトの異方向性を部分的に平均化しているためであると考えられる。特に、低磁場側でシグナル強度が弱くなっていることより、仮に軸対称な運動を考えれば、の軸に近い軸での運動と考えられる。

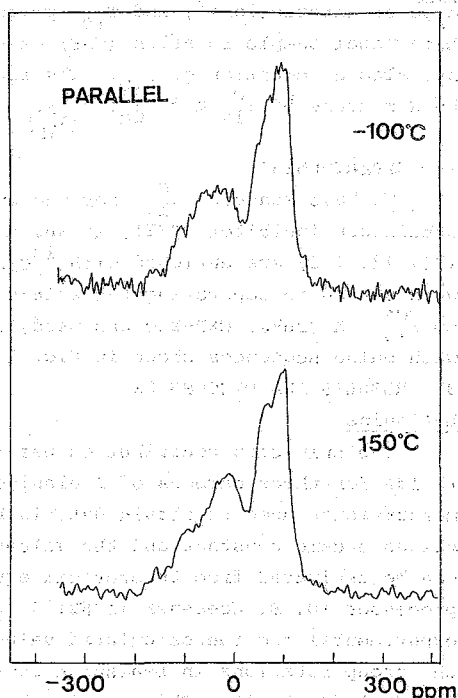


図6、エネルギーしていないデグスの ^{13}C -NMRスペクトル、静磁場に対して平行に配向

文献

- (1) 内藤晶, S. Ganapathy, 赤坂一之, C.A. McDowell, 第19回NMR討論会講演要旨集, P.19

(Department of Chemistry, University of British Columbia)

K. Akasaka, S. Ganapathy, C. A. McDowell, and A. Naito

1. INTRODUCTION

Spin-lattice relaxation time measurements for individual dilute spins (e.g. ^{13}C) in different chemical environments in solids become plausible by combining cross-polarization (CP) and dipolar decoupling together with magic angle spinning (MAS). ^{13}C spin-lattice relaxation times in the rotating frame ($T_{1\rho}$) are of particular interest, because they can provide information about slow molecular motion in the solid state. A simple thermodynamical model (McArthur, Hahn, and Walstedt (1969) Phys. Rev. 73, 679; VanderHart and Garroway (1979) J. Chem. Phys. 71, 2773) shows that the observed relaxation time for the decay of rotating frame ^{13}C magnetization ($T_{1\rho}^{C*}$) includes effects depending on the relative magnitude of $T_{1\rho}^C$ (spin-lattice process), T_{CH}^D (spin-spin process caused by the spin fluctuation of proton due to mutual static dipolar interactions), and T_{1D} (proton dipolar spin-lattice relaxation time) (Fig. 2). Mechanical sample rotation (MAS) causes not only the narrowing of the resonance lines but also a reduction of T_{1D} . Therefore, $T_{1\rho}^{C*}$ in the rotating sample can be assumed to be a mixture of $T_{1\rho}^C$ and T_{CH}^D :

$$(T_{1\rho}^{C*})^{-1} = (T_{CH}^D)^{-1} + (T_{1\rho}^C)^{-1} \quad (1)$$

2. EXPERIMENTAL

We have measured $T_{1\rho}^{C*}$ for the amino acid, L-alanine, and ^{13}C -labeled Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI), in which the carbonyl carbons of the three methionines (70, 73, 103) are enriched with ^{13}C , as a function of the ^{13}C spin-locking field, with a view to separating the spin-spin, T_{CH}^D , and spin-lattice, $T_{1\rho}^C$, contributions to $T_{1\rho}^{C*}$. A Bruker CXP-200 was used, and the measurement was done at room temperature, with pulse sequences shown in Fig. 1.

3. RESULTS AND DISCUSSION

L-Alanine

The spin-spin contribution was found to be exponential at low spin-locking fields for three carbons of L-alanine (Fig. 4). Figure 3 shows an example of $T_{1\rho}^{C*}$ measurements used to obtain data in Fig. 4. At high spin-locking fields, the $T_{1\rho}^{C*}$ values became constant and the values are the true $T_{1\rho}^C$ s (spin-lattice). These values can be estimated from theoretical equations describing the spin-lattice relaxation processes (D. E. Woessner (1962) J. Chem. Phys. 36, 1). Good agreement between the experimental and the calculated values is obtained by considering both the NH_3^+ and CH_3 group rotations in L-alanine in the solid state (Andrew et al. (1976) Mol. Phys. 32, 795) (Table 1). This result shows not only that $T_{1\rho}^C$ can be separated from T_{CH}^D but also that reliable motional parameters can be obtained from $T_{1\rho}^{C*}$ measurement in simple biomolecules in the solid state.

^{13}C -labeled SSI

$T_{1\rho}^{C*}$ of SSI was also found to be exponential at low spin-locking fields, but showed saturation at high spin-locking fields. Obtained parameters are also listed in Table 1. However, the interpretation of $T_{1\rho}^C$ in this case is not so simple as in alanine. Possible implications of the results will be discussed.

The ^{13}C -labeled SSI sample was prepared by Dr. Kainosho of Tokyo Metropolitan University and Mr. Tsuji of the Central Research Laboratory of Ajinomoto Co. We are greatly indebted for their cooperation.

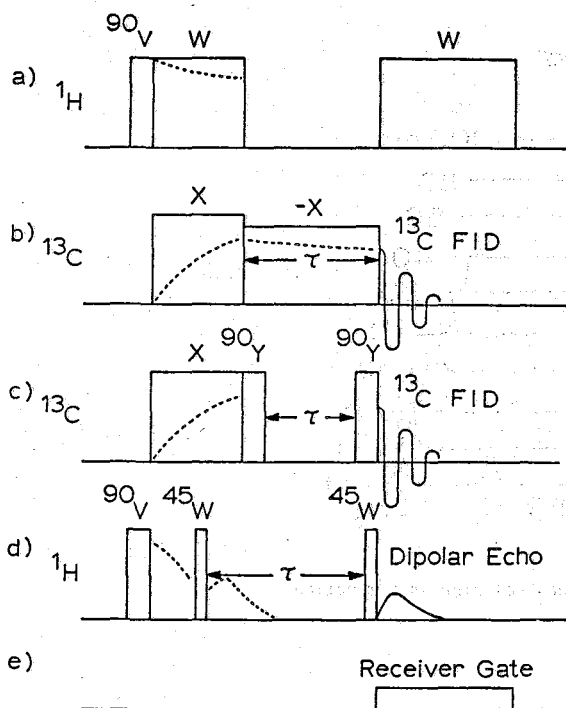


Fig. 1. Pulse sequences used in the present work:

(a) + (b); for $T_{1\rho}^{C*}$

(a) + (c); for T_1^C

(d); for T_{1D}^H (Jeener-Broekaert)

CP:

Mixing time : 500 μ s

rf field H_{1H} : 10 G

H_{1C} : 40 G

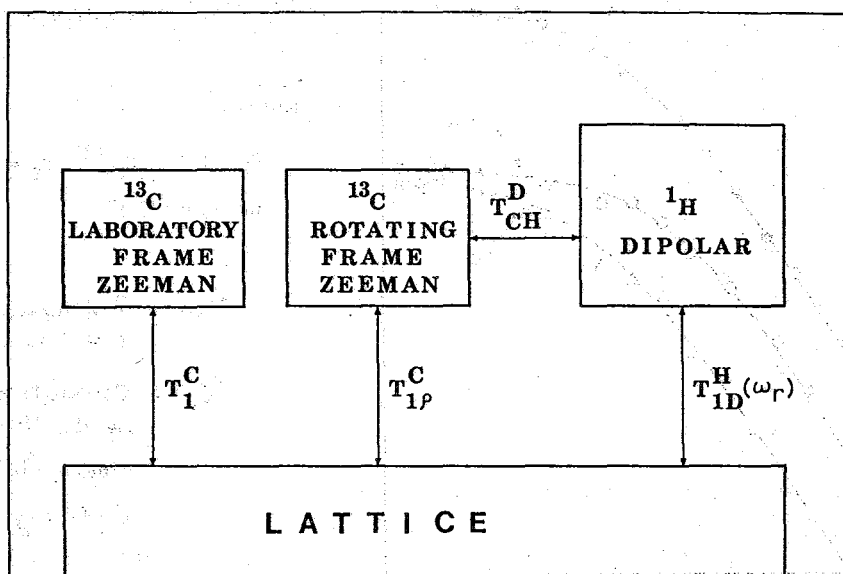


Fig. 2. Thermodynamic model used to analyze ^{13}C spin-lattice relaxation in the laboratory and the rotating frames (VanderHart and Garroway (1979) J. Chem. Phys. 71, 2773). Mechanical rotation of the sample dramatically reduces T_{1D}^H , in which case,

$$T_{1\rho}^{C*-1} = T_{1\rho}^{C-1} + T_{CH}^{D-1}$$

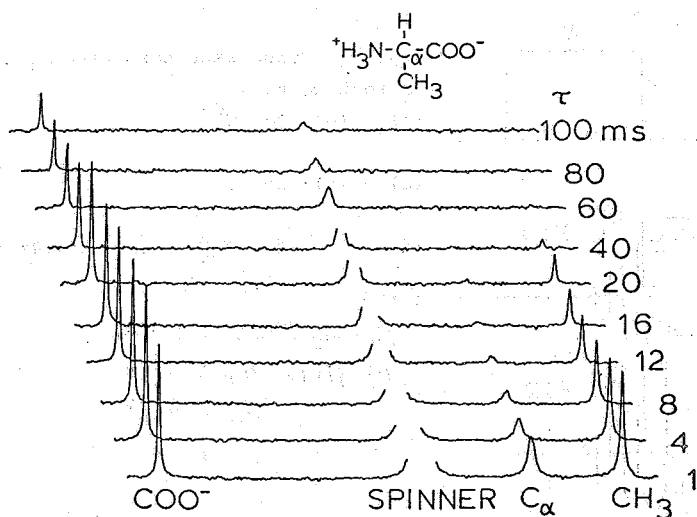
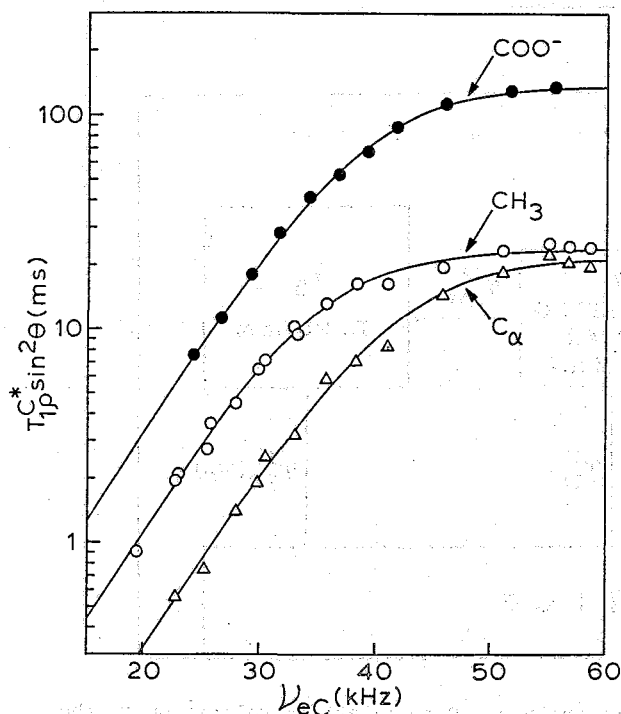


Fig. 3. CP MAS ^{13}C NMR spectra of polycrystalline L-alanine as a function of the ^{13}C spin-locking time τ .



$$(T_{1\rho}^{C*} \sin^2 \theta)^{-1} = P_1 \exp(P_2 \nu_{ec}) + P_3 \quad (1')$$

where

$$P_1 = (\pi/2) \tau_D M_{CH}^{(2)}, \quad P_2 = -2\pi \tau_D$$

$$\text{and } P_3 = (T_{1\rho}^C)^{-1}.$$

$M_{CH}^{(2)}$: 2nd moment for C-H interaction

τ_D : correlation time of the 'H-'H dipolar fluctuation (cf. Fig. 5)

Fig. 4. Plots of the deduced $T_{1\rho}^{C*} \sin^2 \theta$ values for individual carbons as a function of the effective ^{13}C spin-locking field. The solid lines were obtained from the non linear least squares fit of Eq. (1') above. $\tan \theta = H_{1C} / (H_{0C} - \omega_{1C} / \gamma_C)$.

Table 1. $T_{1\rho}^c$, $M_{CH}^{(2)}$, and τ_D values deduced from Fig. 4, and those theoretically calculated.

		L-Alanine (polycrystalline)			SSI (lyophilized) Met C=O
		C_α	CH_3	COO^-	
$T_{1\rho}^c$	(msec)	21.7	23.4	138.2	151.2
$T_{1\rho}^c$ (calc.)	(msec) ^{a)}	50.6	24.8 ^{d)} -25.8 ^{e)}	>152	
$M_{CH}^{(2)}$	(Hz ²)	31.3×10^8	9.5×10^8	3.0×10^8	1.06×10^8
$M_{CH}^{(2)}$ (calc.)	(Hz ²) ^{b)}	44.9×10^8	16.0×10^8	2.2×10^8	
τ_D	(μsec)	30.7	32.1	31.2	24.0
τ_D (calc.)	(μsec) ^{c)}	34	34	34	
T_1^c	(sec)	4	0.038	13	24.8
T_1^c (calc.)	(sec) ^{a)}	3.1	0.032	>8.9	

a) Woessner expression (Woessner (1961)) is extended to ^{13}C T_1 and $T_{1\rho}$.

b) calculated from the Van Vleck second moment formula.

c) $(\tau_D)^{-2} = \langle M_{HH}^{(2)} \rangle / 9$ (Stokes & Ailion (1977) J. C.P. 21, 2723).

d) isotropic NH_3 rotation assumed.

e) CH_3 rotation only considered.

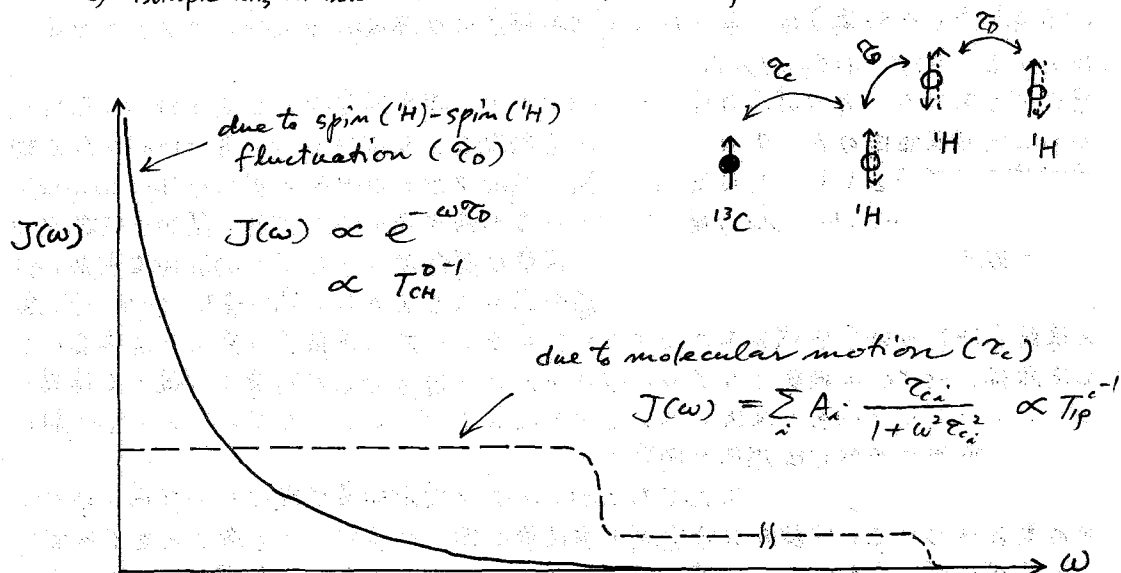


Fig. 5 Two kinds of fluctuations modulating the ^{13}C - 1H dipolar interaction and their effects on $J(\omega)$.

〔はじめに〕 筋蛋白のミオシンは分子量50万、H-メロミオシンとL-メロミオシンで構成される棒状の蛋白で、種々な変性剤に対して不安定で、凍結融解や凍結乾燥でも容易に変性し、ATPase活性の低下と高次構造の変化を起す¹⁾。凍結変性の場合、凍結の最終到達温度が低いほど、又、凍結速度の小さいほど変性の程度は著しい。糖によってこれらの変性は防御出来る。この変性が凍結条件に依存することから、凍結過程でのミオシンの水和戸と溶媒相の氷との相互作用が変性の機構に関与することが示唆された。今回の報告は、ミオシン溶液の凍結過程での水和構造の変動と蛋白-水和水間相互作用の変化を、凍結に対して安定な球状蛋白のものと比較して¹⁾H-NMRで調べ変性の機構を明らかにしようとしたものである。蛋白の水和量の¹H-NMRによる測定については、Kuntz 等²⁾の、不凍水量一定の領域の水分量を水和量とする方法で多くの球状蛋白について測定されたDSCなどの方法で得られる値と一致することが確かめられてゐるが、ミオシンについては、Hydrodynamicな方法以外に報告されてゐない。

〔材料と方法〕 ミオシンはウサギ骨格筋から通常の方法で抽出、精製し、0.5M KCl溶液として用いた。他の蛋白はX2結晶標品を溶解、遠心して不溶画分を除き使用した。蛋白濃度は278mμの吸収から決定した。変性度はORD, CDかららせん含量を求めた。NMRは、JEOL FX100 (温度可変, スピノロッキングユニット附主)で、¹Hプローブ(至パルス幅4.5μsec)を用い、観測中20KHzで測定した。不凍水量(水和量)は、単一パルスで各温度での不凍水の吸収スペクトルの面積について、24% LiCl, 0.1% MnCl₂ 溶液を水分量の標準³⁾(H₂O 48.5M)として積分強度比から求めた。この溶液は室温から-70°Cまで積分強度比は変化しない。蛋白-水和水間相互作用の大小は、T₁, T_{1ρ}の緩和測定から求めらる⁴⁾の¹Hの回転の分子間時間をも指標とした。T₁は反転回復法, T_{1ρ}はスピノロッキング法(H_ρ=6 gauss)により求め、ln T₁, T_{1ρ} 1/T₁, T_{1ρ} 1/T_{1ρ}の緩和曲線から各曲線の極小値を求め、緩和の機構が双極子-双極子相互作用によるものとして通常の緩和式からスピノ向距離を求め、任意の温度に外挿した緩和時間の値から近似的に⁵⁾を求めた。試料量は140μlで、急速凍結(KF)の場合は試料を入れたサンプラキューブを液体ネックス中に直接投入して凍結後、-50°Cに調整したプローブ中に入れ昇温の過程で測定し、緩慢凍結(SF)は-13°Cに調整(溶媒0.5M KClの氷晶点は-12°C)したプローブ中で試料を凍結し、降温の過程で段階的に測定した。

〔結果と検討〕 これまでNMRによって水和量が調べられてゐるいくつかの蛋白について、比較のため実施した結果を図1に示す。その他、ヘモグロビン、ミオグロビン、カタラーゼ等も調べたが、いづれの場合も、種類により要すが、-20°C~-40°Cの間に、これまで報告されてゐるような、不凍水量一定の温度領域

がみられ、この領域での不凍水量、即ち蛋白質の水和量はこれから報告せられてゐる値とほぼ完全に一致してゐる。これに対して、ミオシン 0.5M KCl 溶液では、“生”の試料ではこのような不凍水量一定の温度領域はまったくみられず、温度の増減と共に増減する。しかも、SF(緩慢に凍結)では、高温側での不凍水量はRF(急速凍結)より多いが、温度の低下と共に急激に減少する。球状蛋白質の水和量として用いられる -35°C での不凍水量はRF, SF 共に $0.31 \sim 0.35$ の範囲で、他の蛋白質と同程度である。しかし、SFの試料を一度融解して再び凍結したもの(FT, 氷せん含量からは非変性)や、 40°C で10時間インキュベートして、氷せん含量から完全変性した試料(ID)では、 $-35 \sim -50^{\circ}\text{C}$ の領域で不凍水量 $0.3 \sim 0.2$ ほぼ一定となり、球状蛋白質と同様のパターンを示す。しかしこの水合量は“生”のものよりかなり小さく、一般に球状蛋白質では変性により埋没してゐたアミノ酸残基が溶媒に露出するため水合量は増大すると全く逆の結果を示してゐる。

図3, 4. はミオシンのSFとRFの緩和曲線で、一般の球状蛋白質では T_g は1~2成分、 T_g が1~2成分で、各成分はつづいてこの温度範囲では極小点は一つおのれに対し、ミオシンでは T_g は3成分、 T_g が2成分で、その T_g では極小点が2~3箇所あり、極めて複雑な多成分系であることを示してゐる。尚、この系は0.5M KCl 溶液なのでミオシンに対する水合とKClに対する水合を含めた成分系であるが、KClの水合の寄与は約5%なのでここではそれも含めた見掛け上の緩和時間とする。ミオシンで常にみられる T_g の -35°C と -50°C の極小点は、球状蛋白質の極小点が -11°C と -37°C の内の -37°C に対して著しく低温側へシフトしており、極小点での τ_c ($9.6 \times 10^{-5}\text{s}$) からも、同一温度でミオシンの蛋白質-水和水合相互作用が球状蛋白質より小さいことを示してゐるが、更に、各々の極小点について、 0° , -35° , -45°C に外挿した値から求めると表1, 2のようになる。このように、 -35° , -45°C の領域では T_g から求めらる τ_c は球状蛋白質より小さく、相互作用は小さくなつてゐるが、 T_g から求めらる long range の相互作用は大きくなつてゐる。RF(最も native な状態)とSF(部分的に変性)、ID(完全変性)との差は τ_c の値からはあまり明瞭ではないが、 T_g から求めらる τ_c の値は、RFでは他の二者と比べて非常に小さい。

球状蛋白質と比べ、ミオシンでは不凍水量が温度の低下と共に減少すること、球状蛋白質で不凍水量一定の温度領域での τ_c がミオシンの場合より小さいことなどから、ミオシンの水合構造は非常に不安定で、温度の低下と共に水和水合の水分子は周囲の溶媒の水との相互作用で脱水、凍結して水和水合は次第に崩壊してゆく事を示してゐる。更に、SFの場合、高温側で不凍水量がRFより大きく、温度の低下と共に急激に減少することは、部分的に過冷却して不凍結の部分が残り、それが温度の低下と共に局所的に不均一に脱水、凍結してゐることを示してゐる。

糖の影響については、例えば $5 \times 10^{-2}\text{M}$ sucrose が存在すると、高温側では不凍水量は非常に多いが、sucrose の水合の寄与 ($0.3\text{g H}_2\text{O/g sucrose}$) を差し引くと、 -20°C から急激に減少し、 -40°C 以下ではミオシンの水合量はほとんどゼロとなる。このように、 τ_c の値は高温側では非常に小さいが、 -15°C 以下では糖の存在とをよりはるかに大きくなり、相互作用が大きくなつたことを示してゐる。つまり、肝臓の報告と同様に、凍結の場合も糖は蛋白質の水和量を減少させて水-蛋白質間の結合を強くする。

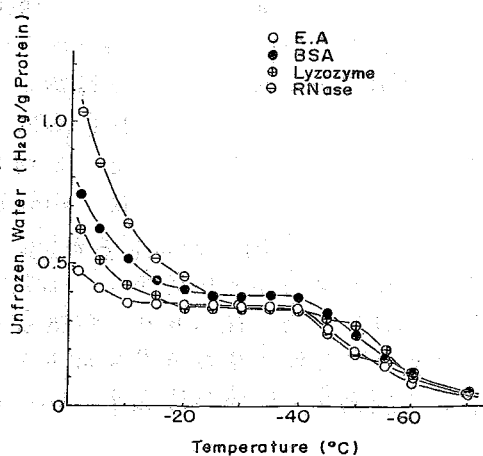


図1. 種々の蛋白質の不凍水量の温度による変化.

蛋白質濃度 $5 \sim 8 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$, 水溶液を -80°C から昇温の過程で測定. $-25^\circ\text{C} \sim -35^\circ\text{C}$ の不凍水量一定のときの値が氷結量を示す.

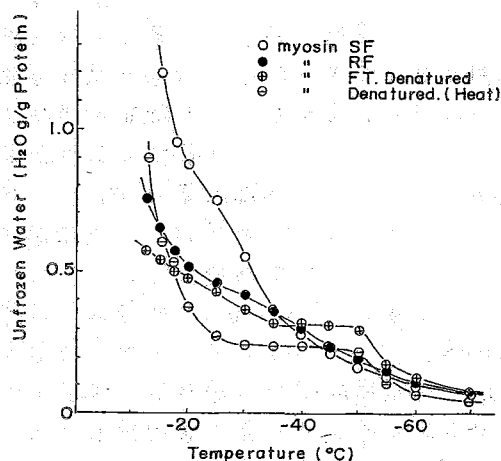


図2. ミオシンの不凍水量の温度による変化.

ミオシン, $7.8 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$, 0.5 M KCl
SF; 緩ま凍結, RF; 急速凍結
FT; SFの試料を融解後測定, 完全変性
ID; 40°C 10時間イソキコバーンによる完全変性

SFを除きいづれも昇温の過程で測定

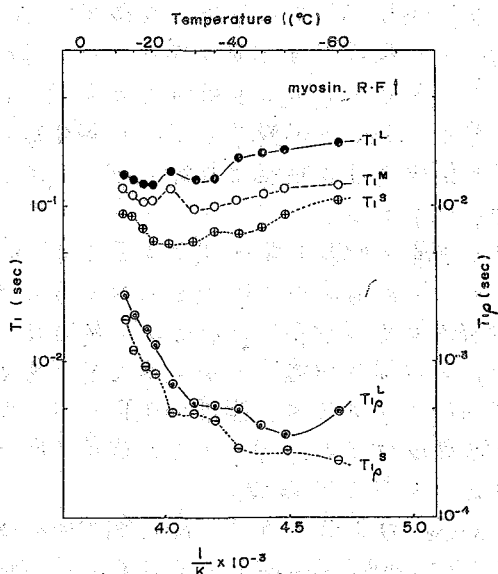


図3. 急速凍結したミオシンの不凍水の緩和曲線.

ミオシン 7.8 g/ml , 0.5 M KCl
昇温の過程で測定.

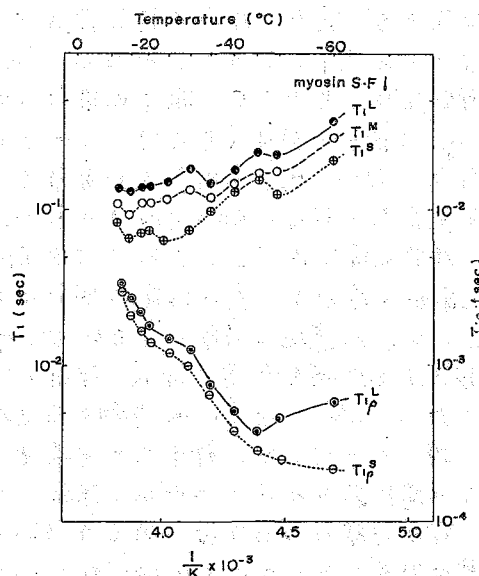


図4. 緩ま凍結したミオシンの不凍水の緩和曲線.

濃度, 溶媒は左と同じ.
降温の過程で測定

表1 Molecular Correlation Time of Hydration Water of Some Proteins

		a)		b)		r (Å)	τ_c		
		Temp. (Min.) (°C)	τ_{co} (sec)				0°C (sec)	-35°C (sec)	-45°C (sec)
liquid layer on ice	T_1	-35	9.6×10^{-10}	1.65	1.8×10^{-10}		9.6×10^{-10}	9.6×10^{-10}	1.5×10^{-9}
	T_{1p}	-65	1.1×10^{-5}	4.30	1.9×10^{-7}		1.3×10^{-6}	1.3×10^{-6}	2.4×10^{-6}
Ovalbumin	T_1	-25	9.6×10^{-10}	1.90	3.4×10^{-10}		1.4×10^{-9}	1.4×10^{-9}	2.4×10^{-9}
	T_{1p}	-65	1.1×10^{-5}	2.27	9.2×10^{-7}		3.1×10^{-6}	3.1×10^{-6}	4.4×10^{-6}
RNase	T_1	-11	9.6×10^{-10}	1.60	1.1×10^{-10}		2.4×10^{-9}	2.4×10^{-9}	4.0×10^{-9}
	T_{1p}	-53	1.1×10^{-5}	2.09	7.9×10^{-8}		3.6×10^{-7}	3.6×10^{-7}	6.6×10^{-7}
Hemoglobin	T_1	-20	9.6×10^{-10}	1.40	3.4×10^{-10}		1.4×10^{-9}	1.4×10^{-9}	2.4×10^{-9}
	T_{1p}	-75	6.4×10^{-6}	2.23	1.1×10^{-7}		5.4×10^{-7}	5.4×10^{-7}	8.9×10^{-7}
catalase	T_1	-15	9.6×10^{-10}	1.37	6.2×10^{-10}		2.5×10^{-9}	2.5×10^{-9}	4.0×10^{-9}
	T_{1p}	-65	1.1×10^{-5}	2.35	5.4×10^{-7}		7.6×10^{-7}	7.6×10^{-7}	8.7×10^{-7}
Myosin (RF)	$T_1(L2)$	-35	9.6×10^{-10}	1.97	2.4×10^{-10}		9.6×10^{-10}	9.6×10^{-10}	1.8×10^{-9}
	T_{1p}	-45	3.1×10^{-6}	2.35	5.0×10^{-9}		5.8×10^{-7}	5.8×10^{-7}	3.1×10^{-6}

a; 極小点を示す温度

b; " ので

c; 水野、花房、第19回NMR討論会
講演要旨集

表2 Molecular Correlation Time of Hydration Water of Myosin

		Temp. (Min.) (°C)	τ_{co} (sec)	r (Å)	τ_c 0°C (sec)	τ_c -35°C (sec)	τ_c -45°C (sec)
Myosin (RF)	$T_1(L2)$	-35	9.6×10^{-10}	1.97	2.4×10^{-10}	9.6×10^{-10}	1.8×10^{-9}
	T_{1p}	-45	3.1×10^{-6}	2.35	5.0×10^{-9}	5.8×10^{-7}	3.1×10^{-6}
" (SF)	$T_1(L2)$	-35	9.6×10^{-10}	2.09	1.1×10^{-10}	9.6×10^{-10}	2.3×10^{-9}
	T_{1p}	-45	3.1×10^{-6}	2.31	8.4×10^{-9}	1.3×10^{-6}	3.1×10^{-6}
" (ID)	$T_1(L2)$	-35	9.6×10^{-10}	2.02	2.5×10^{-10}	9.6×10^{-10}	2.9×10^{-9}
	T_{1p}	-40	3.1×10^{-6}	2.87	2.2×10^{-7}	1.5×10^{-6}	2.7×10^{-5}

RF; 急速凍結 (本文参照)

SF; 緩まき

ID; 40°C で10時間イソキエバート

に円筒の表面に配列、水和した水分子は相互に協同作用がおよぼし、非極性的なエネルギーで離合集散がおよぼし、高温側では非常に水和量が多いため、温度の低下と共に急速に崩壊するものと思はれる。

1) Hanafusa, N., 1972, Contr. Inst. Low Temp. Sci., 17, 1..

2) Kuntz, I. D. et al., 1969, Science, 163, 1969.

3) Hays, D. and O. Fenema, 1982, Arc. Biochem. Biophys., 213, 1.

4) 花房尚史, 1981, 第20回NMR討論会要旨集, 135.

というところを示している。

これらの結果から、ミオシンでは、他の凍結に対して安定な蛋白の比較的稳定な水和構造と比べ、温度の低下と共に次第に壊れてゆく非常に不安定な水和アであることが、凍結変性の主要な原因と考えられる。変性の原因としてもう一つ、溶媒中の非水化による疎水性相互作用の変動も考えられ、それとあわせて、水和アの崩壊がミオシン分子自体の高度構造の変化をひき起すものと思はれる。凍結変性の温度依存性はこのことによつて説明されるが、凍結速度が早いほど変性度が大なりことは、先に述べたように、局所的に速凍した部分が残る、凍結が局所的に不均一に進行するため、水和アの脱水によるストレスが不均一に及ぶのでなければと想像される。

糖は、凍結乾燥の場合と同様、水分子と選択的に置換、結合して水分子-蛋白-糖間の相互作用を強め、協同的水和アを安定化させるものと思はれる。

安定した水和構造を維持するというミオシンの水和の特性は、ミオシンの構造的な分子形態に由来するものと考えられる。構造的、1) 各は近似的

[はじめに]

DNAは遺伝情報を担う重要な生体物質であり、機能的及び構造的な研究が幅広く行なわれている。NMRの分野においても、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{31}P 等の高分解能NMRにより、モノマーヌクレオチドから、オリゴヌクレオチドに至るまで、精緻な情報が得られている。しかし、本来DNAは巨大な分子であり、生体中で機能している時はヌクレオソームなどで知られているように、更に次元の高い構造をとっている。このような巨大分子としてのDNAの性質を調べるためには、高分解能NMRの手法を使うことは難しい。そこで固体NMRによる研究が注目されるようになった。特に、神藤らによって始められたDNA配向試料を用いた ^{31}P -NMRによる研究はDNA骨格構造の不均一性について重要な知見を与えた¹⁾。われわれは先に、高分解能NMR装置を用いて、脂質二重膜を持つPM2ウイルスのintactな状態での ^{31}P -広幅NMRを測定し、ウイルス内に折りたたまれたDNAのスペクトルを帰属し、その性質を若干調べ、報告した²⁾。そこでぶつかった方法的限界を克服する為に、われわれは大きな構造体中のDNAの構造と動的性質を固体 ^{31}P -NMRシステムによって研究する試みを遂めている。今回はその最も簡単なモデルとして、蛋白質とDNAのみを含むλファージをとり上げた。

λファージは丁偶数系ファージと似た形態をしており、径約 0.05μ の正20面体の頭部と長さ約 0.15μ の尾部よりなる。蛋白質は約20種類よりなり、DNAとほぼ等重量で存在する。

DNAの分子量は、 3.08×10^7 daltonsで、塩基対にして約46500である。

[試料の調整とNMRシステム]

λファージは東大理学部桂塾博士よりおけていただいた溶原菌(λcI857S7をE.coli K-12 C600に溶原化させたもの)を用い、100ℓの大量培養を行なって得た。ファージの精製は常法に基づいて行

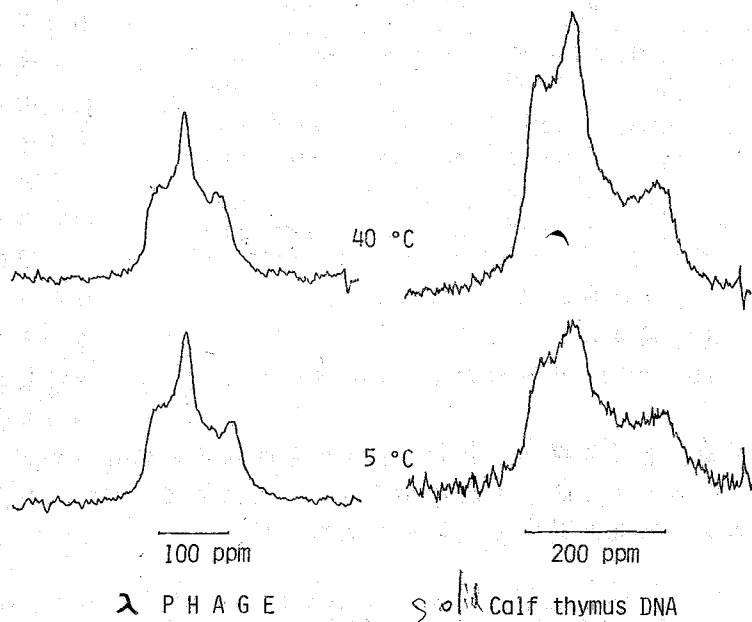


図1 λファージ、固体DNA (calf thymus) の 40.3MHz ^{31}P -NMR スペクトル

なった。最終的に得られた試料ではフオーク形成が求めた粒子数とOD₂₆₀から求めた粒子数がほぼ一致し、intactなフオークが十分精製されていることを示す。入フオーク100~150mgを30%蔗糖を含む緩衝液に透析したものをNMR測定に用いた。緩衝液としては通常は20mM MgCl₂, 10mM NaCl, 10mM Tris pH7.3 (T₁測定の際は更に1mMEDTA)を用い、スバルミンの影響を見る時は、10mM スバルミン, 10mMEDTA, 10mM Tris pH7.3を用いた。

NMRの測定はJEOL FX-100 NMR分光計(³¹P 40.3MHz)に固体用増倍器及び、温度制御可能な³¹P高出力ローブヘッドを接続させて行なった。振動磁場H₁はHで12.5カウス、³¹Pで30.7カウスである。クロスポーラリゼーションのmixing timeは1msである。

〔結果と考察〕

入フオーク中に折りたたまれたDNAの性質

図1にシングルパルス法で測定した5℃及び40℃での入フオークの³¹P-NMRスペクトルを示す。入フオークはDNA中にしか³¹P核を持たないので、これはフオーク中のDNAのスペクトルである。これらのスペクトルはどちらも非対称的パウターパターンを示している。そのみかけの化学シフトテンソルの主値は、5℃で $\sigma_{11} = -64$ ppm, $\sigma_{22} = -5$ ppm, $\sigma_{33} = 76$ ppmで、40℃では $\sigma_{11} = -60$ ppm, $\sigma_{22} = -2$ ppm, $\sigma_{33} = 66$ ppmである。パウターパターンスペクトルはリンの化学シフトテンソルを平均化する運動の影響を受ける。今の場合、入フオーク中のDNAの運動とフオークそのものの回転運動がそれに当る。これらの運動が $2\pi|\sigma_{11} - \sigma_{33}|$ に較べて十分遅ければスペクトルに影響を与えない。フオーク粒子の回転運動を抑制して、その

影響を除く為に、30%の蔗糖を共存させた。この条件が十分であることは60%蔗糖存在下でも全く同じスペクトルが得られることで確かめた。従って、スペクトルに表われる諸性質はDNAそのものに由来すると考えることができる。化学シフトの異方性を示す($\sigma_{11} - \sigma_{33}$)を温度変化に対してプロットしたものが図2の丸印である。その温度依存性は先に報告した~~で~~フオークに較べると若干大きい。十分に水知させたB型DNA³⁾に較べると非常に小さい。40℃までこのように大きな異方性を保つことは入フオーク内のDNAの運動が増液状態に比較して、著しく制限されていることを示す。

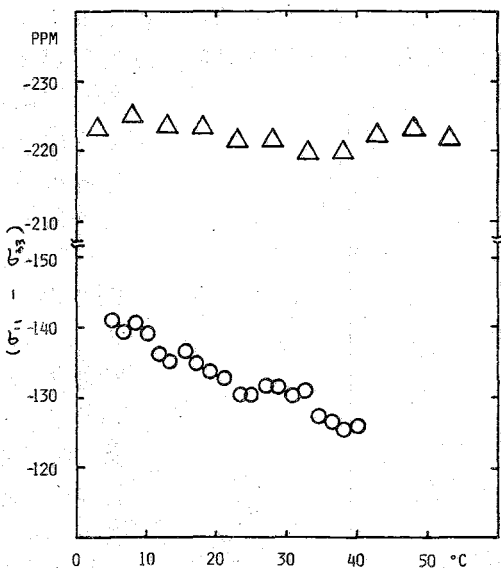


図2 化学シフトの異方性($\sigma_{11} - \sigma_{33}$)の温度変化

O: 入フオーク Δ: 固体DNA (calif thymus)

入フオークとの比較の為に、固体DNA (calif thymus) の同様なスペクトルをクロスポーラリゼーション法で測定した。5℃

と40°Cのスペクトルと、(G11-G33)の温度依存性を図1及び2に合わせ示してある。固体DNAにおいては(G11-G33)が温度にあまり依らず、約-220 ppmと非常に大きな異方性を示す。固作で求まるG11, G22, G33 がリンの本来の化学シフトテンソルの主値に対応すると考えられるので、入ファージ内での運動は制限されているとは言い、リンの化学シフトテンソルを部分的に平均化するのには十分な程度であることを示す。Spiessによれば、パウラーパターンが変化し始め、しかも完全に平均化されるまでの条件は

$$0.1 < \omega \tau < 10$$

である。今、DNAのリンの運動を等方的と仮定すれば、その運動の速さ ν は

$$5 \times 10^3 \text{ sec}^{-1} < \nu < 5 \times 10^5 \text{ sec}^{-1}$$

である。

固体状態と intact なファージ内でのDNAの運動性の違いはクロスポーラリゼーションの効率にも表われる。固体DNAではその効率はほとんど変わらないが、ファージの場合は図3のように著しい温度依存性を示す。クロスポーラリゼーションの効率はプロトンの $T_{1\rho}$ と交叉緩和時間 T_{1s} によって支配されるので、ファージの場合 $T_{1\rho}$ が mixing time と同じ位になっているが、双極子-双極子相互作用の平均化がこの温度領域で著しく進むものと思われる。

次に、DNAの動的性質を調べるもう一つの方法として、入ファージの緩和時間 T_1 を測定した。図4に30°Cにおける inversion recovery のスペクトル系列と、強度の時間に対する半対数プロットを示す。スペクトルの全成分がほぼ同じように挙動し、そのプロットは直線に乗った。このことは入ファージの中のDNAは全て、

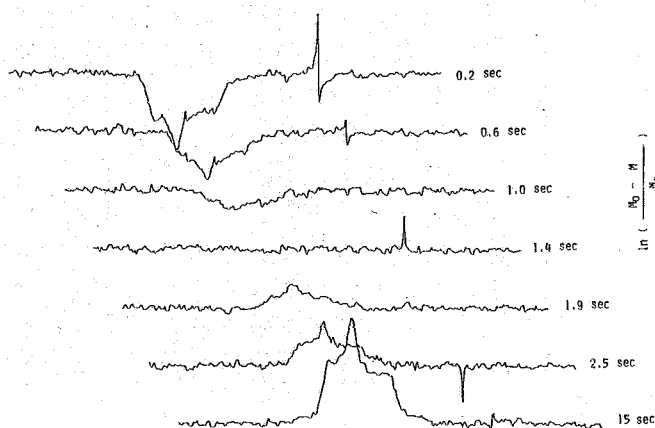


図4 λ ファージの 30°C における T_1 測定

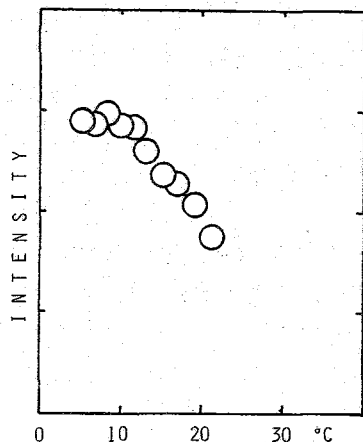
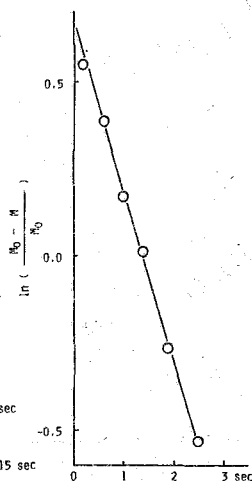


図3 λ ファージの ^{31}P -NMR スペクトルにおけるクロスポーラリゼーションの効率の温度変化



動的学的に見てほぼ同じ環境下にあることを示唆する。図5に、求めた T_1 の温度変化をプロットした。得られた T_1 はチロシンや14S塩基対のDNAフラグメントについて

得たものにほゞ近い。ファージ頭部中で、全体としての運動は著しく制限されたDNAと、溶液中のDNAフラグメントがほぼ同じ T_1 を与えるのは興味深い。温度の上昇と共に T_1 は長くなるので、 T_1 を支配する運動の相肉時間は所謂 fast correlation time regimeにあると言える。一方、 T_1 の温度依存性は 20°C 以下では顕著であるが、 20°C 以上では変化が小さくなる。この理由としては二つ考えられる。一つは 20°C 付近を境として、二つの状態の間での転移が起っていることである。もう一つはDNAの運動が著しい異方性を持つため、 T_1 が相肉時間に対して二つの極小を持つ場合である⁵⁾。どちらを反映しているのかは今後の検討課題である。

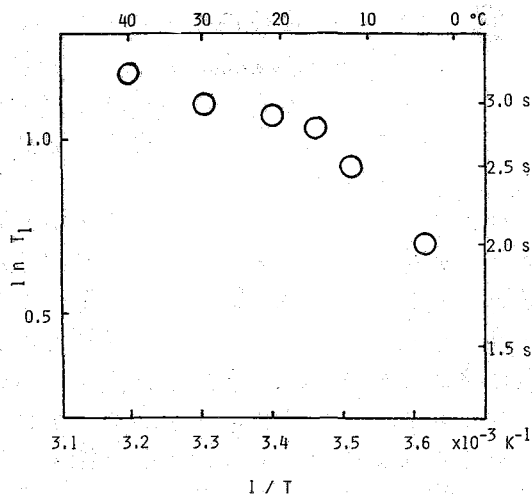
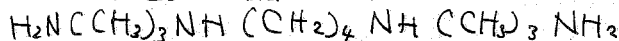


図5 λファージの縦線と相肉 T_1 の温度変化

λファージ中のDNAに対するスパールミンの影響

λファージは二価金属イオンが存在しなくなると著しく不安定になる。これはDNAのパッキングを弱める為と思われる。ポリアミンもファージを安定化させることのでき、その際二価金属イオンを全く必要としない⁶⁾。又、感染の際にポリアミンが存在するとDNAの injectionが阻害されることも知られている⁶⁾。従って、ポリアミンは折りたたまれたDNAの構造を安定化させるにあたって、二価金属イオンとは異なる作用様式を持つことが考えられる。それを 31P-NMR スペクトルにどう反映するかをスパールミンを使って調べてみた。スパールミンの構造式は



である。精製したλファージをスパールミンを含む緩衝液に透析し、更に10%, 30%の蔗糖を含む同緩衝液に透析して、NMR測定試料とした。その 31P-NMR スペクトルは 20 mM Mg^{2+} 存在下のものとほとんど変わらなかった。 $(\eta-\eta_{90})$ の温度変化も T_1 の温度変化もほぼ同じ挙動を示した。従ってスパールミンがDNAの運動性を大きく変えるような相互作用をしていることは考えにくい。

〔文 献〕

- 1) H. Shindo and S. B. Zimmerman (1980) Nature, 283, 690-691
H. Shindo et al. (1980) Biochemistry, 19, 518-526
- 2) H. Akutsu et al. (1980) Biochemistry, 19, 5264-5270
- 3) J. A. DiVerdi and S. J. Opella (1981) J. Mol. Biol., 149, 307-311
- 4) H. W. Spiess (1974) Chem. Phys., 6, 217-225
- 5) H. Shindo (1980) Biopolymers, 19, 509-522
- 6) D. P. Harrison and V. C. Bode (1975) J. Mol. Biol., 96, 461-470

同位体ラベルによる蛋白質の構造研究 — ^{13}C -NMRによる
Streptomyces Subtilisin Inhibitor (SSI) の構造研究
 (味の素本研) $^{\circ}\text{E}$ 尚志
 (郡立大・理) 長尾 洋昌、今村 有紀子、甲斐花 正恒

<序> 蛋白質の構造研究は、百くから種々の分光学的手法によりて行われてい
 るが、近年、NMRのこの分野における有用性が注目されている。NMRによる方
 法は、蛋白質の特定の部分に注目し、化学シフト、結合定数、緩和時間等のパラメ
 ータから溶液中での動的・静的情報を引き出すことを特徴とし、プローブとなる適
 当な核があれば、他の手法では得がたい情報が得られる。しかし、実際、蛋白質の
 ような巨大分子を対象とする場合、プローブとなりうるものは特定のアミノ酸残基
 に限られるのが常である。これに対し、どのような同位体で蛋白質をラベルする方
 法は、目的の部分とよくラベルする手段があれば、極めて有用な方法となる。我々
 は、微生物起源の蛋白性プロテアーゼ阻害剤SSIを用い、微生物による同位体ラベ
 ルアミノ酸の蛋白質への取り込みを利用して、特定の残基を同位体ラベルしたSSI
 を調製し、それを用いて ^{13}C -NMRによる構造研究を行ない、いくつかの重要な知
 見を得て来た¹⁾²⁾。今回は、Phe残基のカルボニル炭素、及び、Arg残基のグアニジル
 炭素をラベルしたSSIを調製し、それらを用いて種々の実験を行ない、たので、そ
 の結果について報告する。

<実験> ラベルSSIの調製: 同位体ラベルしたアミノ酸を含むアミノ酸混合物を
 窒素源とする培地中で、*Streptomyces albogriseolus* S-3253を45°Cで6~7日間
 振とう培養し、得られた培養液から、DEAE-セルロース、Sephadex G-100カラムフ
 ロマトグラフィー等の手段により、培養液500mlから約70mgのラベルSSIを得
 た。

^{13}C -NMRの測定: ラベルしたSSI 20~40mgを、1.2mlの緩衝液に懸濁させ、
 pHを調整後、10mm管で測定した。スペクトロメータは日本電気のFX-100, Varian
 XL-200を用い、化学シフトは内部標準として用いたジメチルジホスホン酸の化学シフト値
 を67.8ppmとしてTMSからの値に換算した。なお、温度は記録槽直下に設置さ
 れた熱電対により、測定した。

<結果及び考察>

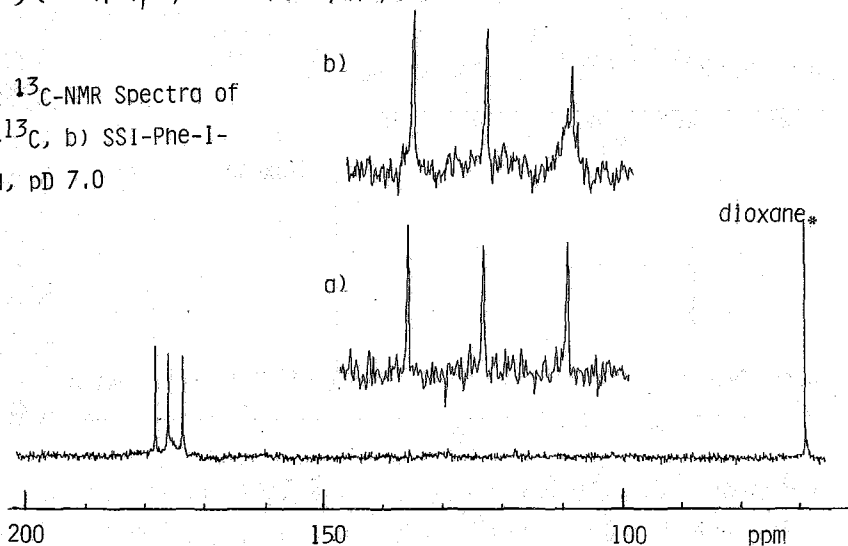
1. Phe残基のカルボニル炭素をラベルしたSSIの ^{13}C -NMRスペクトル
 のシグナルの帰属 — ^{13}C , ^{15}N = 重標識による帰属

SSIはアミノ酸残基113個からなる27の等価なサブユニットからなるダイマー
 構造をもっているが、サブユニット当たり3個のPhe残基を含む。Phe残基のカルボ
 ニル炭素を ^{13}C で標識したSSIはカルボニル領域に3本のシグナルを示した(図-1a)。
 3個のPhe残基のC末端側α残基は、Phe-97がSer, Phe-111がAlaであり、Phe-
 113は、C末端に位置する。Phe残基のカルボニル炭素に併せ、Alaのα窒素を ^{15}N
 ラベルしたSSIは、最も基磁場側のシグナルに、 ^{13}C - ^{15}N カップリングによるサテラ

ックを示した。しかし、なお、ひらき、いまむら、ゆきこ、かいのしやう、まきつね

イトシグナルも示した(図-1b)。従って、このシグナルはPhe-111に帰属された。又、残りの2本のうち低磁場側のシグナルは、次に述べるD-H交換反応による変化を及ぼすことから、C末端のPhe-113に帰属された。

Fig-1. 50 MHz ^{13}C -NMR Spectra of
a) SSI-Phe-1- ^{13}C , b) SSI-Phe-1- ^{13}C & Ala- ^{15}N , pD 7.0



③ D-H交換反応

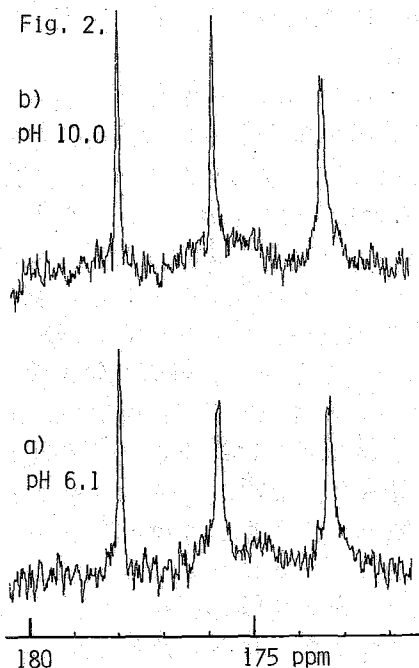


図-2aは、pH 6.1における50% D_2O 中で測定したPhe残基のカルボニル炭素シグナルである。3本のPhe残基シグナルのうちPhe-113は変化を示さないのに対して、Phe-111は2本に分裂し、Phe-97は小さくなった。これは観測するカルボニル炭素を含むアミド基のD-H交換反応に帰因するものと考えられる。すなわち、アミド基のD-H交換が遅いものは ^{13}C -NH及び ^{13}C -NDによる二重線を示す。実際、広巾化したPhe-97のシグナルは、pHを上げる(図-2b)か、温度を上げて、重水素交換反応を進めることにより、鋭いシグナルとなった。三井らによってX線結晶構造解析の結果に基づいて計算されたアミド窒素の溶媒接触能を見ると、Ser-98は18%、Ala-112は0%となっており、観測された結果が、静的な状態での溶媒接触能の順と、よく一致することが判った。又、この数字にも表わされているように、結晶構造では、Phe-111は分子の内部にまぐり込んだ疎水領域にあり、静的な状態では水分子の侵入を許さないように見えるが、溶液中では分子のゆらぎによって水が接触し得る状態にあることが明らかになった。蛋白質の構造の手段として、D-H交換反応は広く応用されているが、ここに述べた方法は、特定の部位に注目している点、他の方法では得難い情報が得られると共に、逆に、三次構造が明らかになる場合には、カルボニル炭素の帰属にも応用出来る。

2. Arg残基のグアニジル炭素とラベルしたSSIの ^{13}C -NMRスペクトル

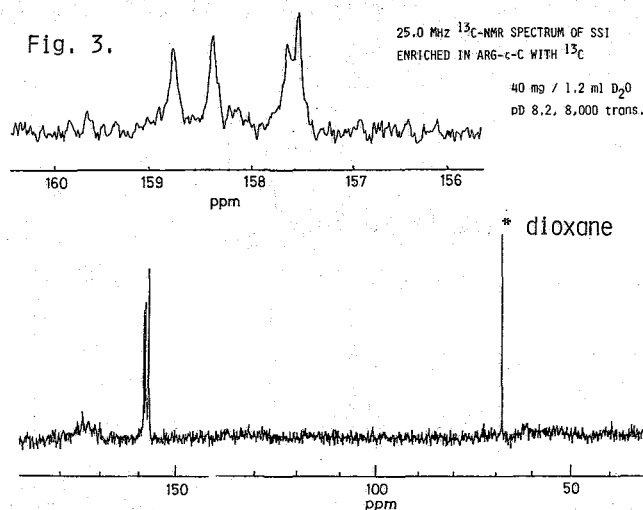
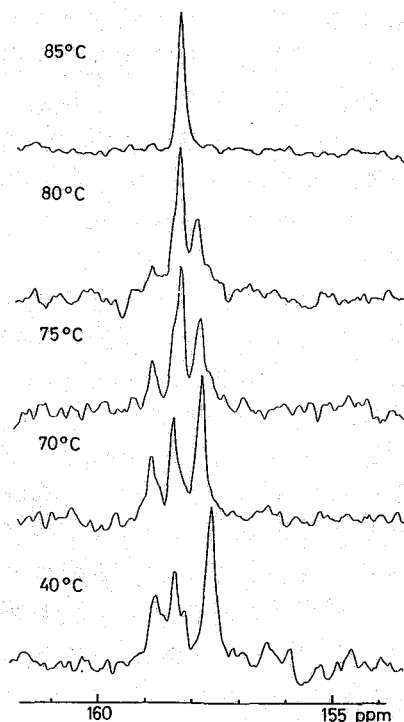


図-3にArg残基のグアニジル炭素を ^{13}C でラベルしたSSIの ^{13}C -NMRスペクトルを示した。Arg残基は、SSIのサブユニット当たり4個含まれるが、そのうちArg-29の側鎖は、Phe-113のカルボキシレートと、Arg-90の側鎖は、キラーのサブユニット中のThr-5のOr及びAla-22のカルボニル炭素と水素結合としてあり、他の2つ、すなわ

ちArg-65, 95は分子表面にあり、水素結合には関与していないことが、X線解析により明らかにされている⁴⁾。Arg-29はサブユニット間の結合に際し、又、Arg-90はモノマーの構造保持に重要な役割を果たしており、SSIの構造を調べる上で有用なプローブになるものと考えられる。そこでまず、Arg側鎖をプローブとして、熱変性について調べた。

Fig. 4. Thermal Denaturation of SSI Monitored by Arg-C- ^{13}C .



① Arg側鎖をプローブとした熱変性

図-4に、種々の温度で測定したArg側鎖を ^{13}C でラベルしたSSIの ^{13}C -NMRスペクトルを示した。75℃付近からスペクトルに変化が見られ、高磁場側のシグナルと低磁場側のシグナルが強度を減じ、58-3 ppmに強いシグナルが現れた。80℃では、低磁場側のシグナルはほぼ消滅したが、高磁場側のシグナルは、約1個分の強度が残っている。85℃では、シグナルは完全に1本となり、他の実験結果と比較して、熱変性で達する完全な変性状態に達したものと思われる。完全な変性状態に達する前、すなわち、80℃におけるスペクトルで、変化していないシグナルの帰属とする為、次の実験を行った。

② 修飾によるグアニジル炭素の帰属

SSIは、アルギニンの修飾対象物である。ノーストロヘキサンジオンにより、サブユニット当たり4個のArg残基のうち、2個が修飾される。グアニジル炭素を ^{13}C でラベルしたSSIを同様に修飾処理したところ、図-5aに示すような

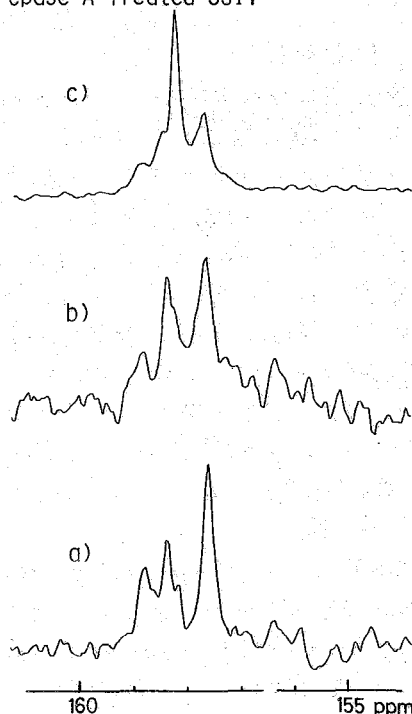
スペクトルが得られた。NativeなSSIのスペクトル(図-5-a)と比較すると、高磁場側のシグナルと、低磁場側のシグナルに、強度の減少が見られた。修飾されるArg残基は、分子表面にあるArg-65及び95と考えられるので、最も低磁場側の1本と、高磁場側で2個分重なったシグナルのうち1個分を、Arg-65及び95に帰属した。又、SSIは、カルボキシペプチダーゼAによって、C末端の4残基が切断されることが知られている。⁵⁾ Arg-29の側鎖は、C末端のPhe-113と水素結合しているので、この処理によって、何らかの変化を受けるものと予想される。実際に、CPase A処理したSSIは、図-5-cに示したようなスペクトルを与えた。NativeなSSIのスペクトル(図-5-a)と比較すると、単にArg-29のみの変化にとどまらず、大きな変化を示した。この場合も、最も高磁場側のシグナルはもとの位置にある。又、このときの分子量をゲル透過によって調べたところ、依然としてダイマーに相当する分子量を示しており、サブユニット間結合は、保たれているものと予想されるので、この変化しないシグナルは、Arg-90のグアニジル炭素に由来するものと考えられ、従って、Arg-29のシグナルは、低磁場側から2本目のシグナルであると考えられる。これらの帰属から、図-4中の80°Cにおけるスペクトルでは、残存しているシグナルは、サブユニット境界面にあるArg-90のものであろうと予想される。すなわち、SSIの熱変性過程において、まず、モノマー中での構造破壊が進行し、それに続いてサブユニットの解離が起ることが明らかになった。又、図-4中の80°Cにおけるスペクトルと、図-5cが酷似していることから、ダイマー中での各サブユニットの構造破壊は、少なくとも、Arg-29とPhe-113の水素結合を断ち切る程度に大きいものであると予想される。

以上のように、 ^{13}C ラベルによる蛋白質の構造研究は、原理的には目的とするすべての残基を修飾することが可能であり、又、他の分光学的手法とは、質の異なる情報が得られる為、有力な手法となりうるものと思われる。

(参考文献)

- 1) M.Kainosho & T.Tsuiji, Biochemistry, in press.
- 2) 辻, 甲斐荘, 才20回NMR討論会要旨集(1981)
- 3) Y.Satow, Y.Watanabe & Y.Mitsui, J.Biochem., **88**, 1739(1980).
- 4) Y.Mitsui, Y.Satow, Y.Watanabe, & Y.Iitaka, J.Mol.Biol., **131**, 679(1979).
- 5) M.Sakai, S.Odani & T.Ikenaka, J.Biochem., **87**, 891(1980).

Fig. 5. 25 MHz ^{13}C -NMR Spectra of
a) Native b) 1,2-Cyclohexanedione Treated
c) Cpase A Treated SSI.



Streptomyces subtilisin Inhibitor の培養中での構造
 —— トリプトファン, メチオニンの ^1H 信号の帰属とミクロ環境
 (京大理・味の素中研・都立大理・生理研)
 赤坂一之, 波多野博行・辻 尚志・甲斐正恒・巨 弘

① はじめに

Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI) は革新的な2個のサブユニットが疎水性結合により強く会合した二量体 (分子量23,000) の球状タンパク質で、微生物起源のセリンプロテアーゼを強く阻害する。サブユニット当り2個の S-S 結合を有し、3個の Met の他、芳香族アミノ酸として2個の His, 3個の Tyr, 1個の Trp 他に3個の Pheを含む (Ikenaka et al., J. Biochem. 26, 1191-1209 (1974))。既に報告するは His 43, 106 (Fujii et al. (1980) J. Biochem. 80, 289-296) および Tyr 7, 75, 93 (Fujii et al. (1981) Biochemistry 20, 518-523) の同定を行ったが、今回は Trp 86 の ring proton (Akasaka et al. (1982) BBA 206, 503-508) および Met 20, 73, 103 のメチルプロトン (Akasaka et al. (1982) J. Biochem. 22, No. 2) の帰属およびこれらのミクロ環境について報告する。特に Trp 86 および Met-103 側鎖のミクロ環境の安定性, 4かけの“固定”について考察した。

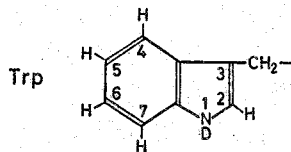
② 実験

SSI は *Streptomyces albobacillus* S-3253 から精製 (Sato & Muro (1973) Agric. Biol. Chem. 37, 1067-1074) により単離したものを精製して用いた。宿主菌 SSI (His, Tyr, Trp の側鎖) は同上株をこれらの重アミノ酸を含む培養液中で培養することにより得た (Kainosho & Tsuji (1982) Biochemistry, in press)。 ^1H NMR測定は Bruker 社製 HX-360 (247 スワロラック型), WH-400 (VBC), WM-360 (生理研) により行った。

③ 結果と考察

Trp 86 ring proton signal の同定

Trp ring は5個のプロトン (H_2 : singlet, H_4, H_5 : doublet, H_6, H_7 : triplet) が存在する (右図参照)。これらの信号は Fig. 1a に示すように $\delta = 6.5 - 7.5$ の間に、3個の Tyr, 3個の Phe, 2個の His $\text{C}_4\text{-H}$ の信号と重なって存在する。



(1) α ピークの帰属

α ピークは single proton intensity であり且つ $J \approx 8.2 \text{ Hz}$ (Fig. 1b) であることから、Phe の C_2, C_6 または Trp の C_4, C_2 プロトンが割り当てられる。而して Trp の宿主菌化により α ピークは完全に消失する (Fig. 1c) ことから、 α は Trp のプロトンに間違いない。free の Trp では H_4 が H_2 より $\sim 0.2 \text{ ppm}$ 低磁場に集まることから α ピークは Trp の C_4 プロトンである可能性が高い。

(2) ϵ ピークの帰属

ϵ ピークは single proton intensity であり且つ J coupling を示さない (Fig. 1b) ことから、His の $\text{C}_4\text{-H}$ または Trp の $\text{C}_2\text{-H}$ が割り当てられる。このうち His 106 の C_4 プロトンであることは、His 106 の C_2 プロトンが側鎖に 0.8 ppm 低磁場にシフトしている位置が不変であることから明らかである。また、His 43 の C_4

doublet pattern

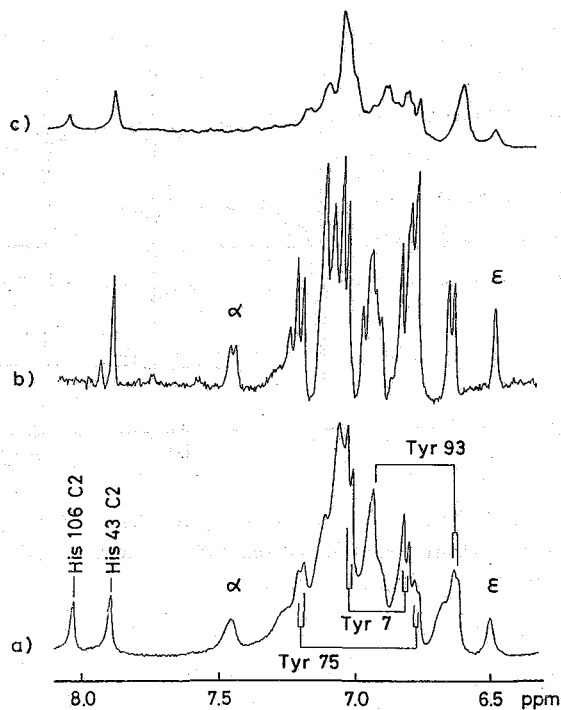
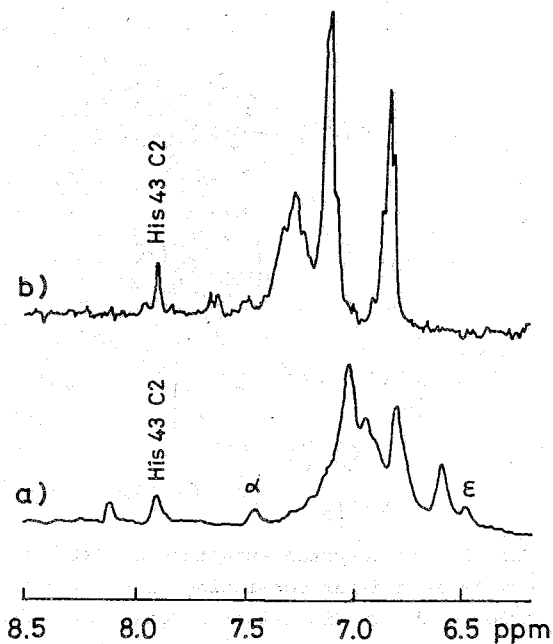


Fig. 1. The aromatic region of the 360 MHz ^1H NMR spectra of SSI in 0.1 M deuterated phosphate buffer, pH 7. a) normal sample at 65°C b) normal sample at 85°C (convolution difference spectrum) c) selectively deuterated SSI in which most ring protons of Trp, Tyr, and His are deuterated. Note that α and ϵ peaks are totally missing or greatly diminished in c).

Fig. 2. The aromatic region of the 360 MHz ^1H NMR spectra of SSI in 0.1 M deuterated phosphate buffer, pH 7, measured at

a) 50°C
b) 50°C, but after treatment with excess dithioerythritol to break the disulfide bridges and standing at 70°C for 40 min. Note that the α peak is completely missing in b), while the C2 proton peak of His 43 remains at the same position as in a).



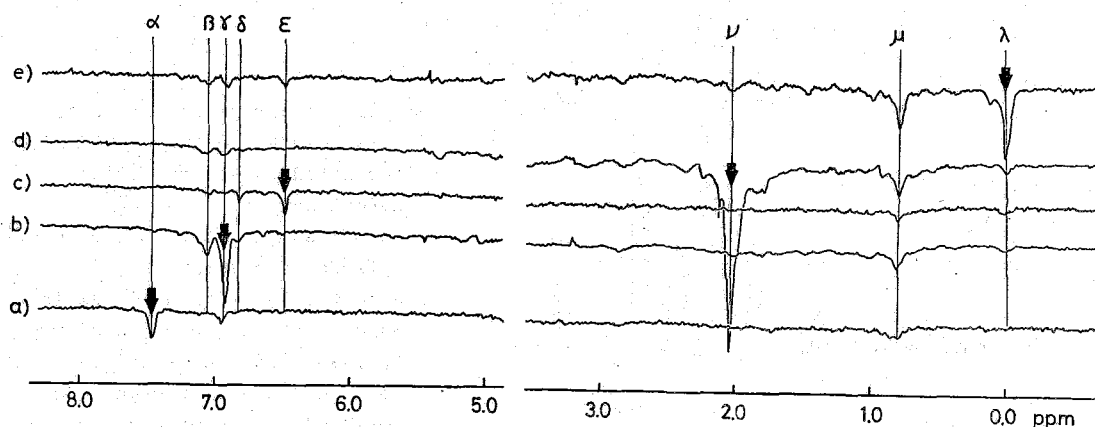


Fig. 3. ^1H NOE difference spectra of SSI (in 0.1 M deuterated phosphate buffer, pH 7) measured at 60°C at 400 MHz. The arrows indicate the positions of the saturation pulse. Assignments: α : C_4H , β : C_6H , γ : C_5H , δ : C_7H , ϵ : C_2H .

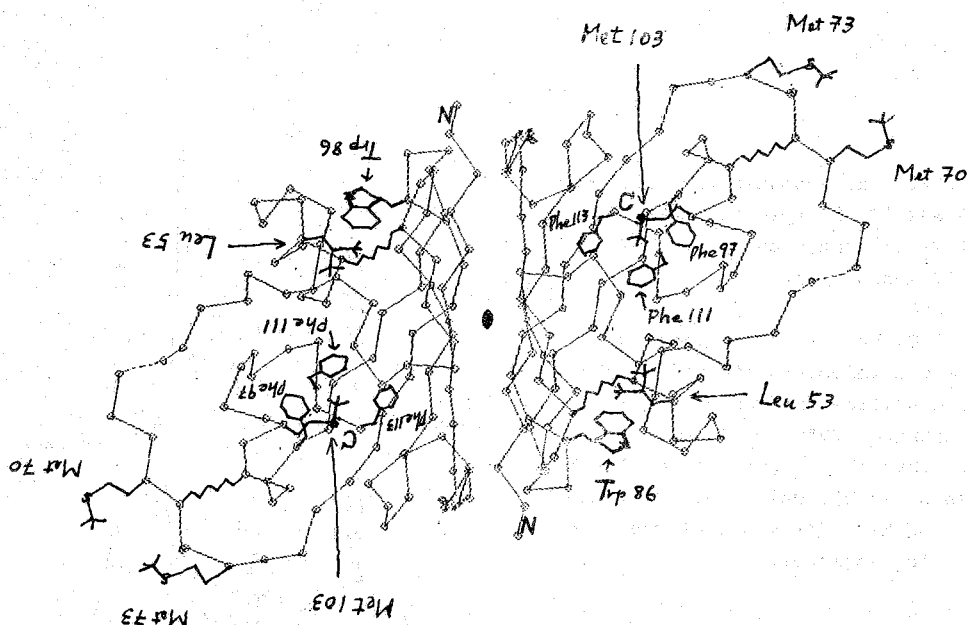


Fig. 5. The crystal structure of SSI viewed along the diad axis. The SSI molecule exists as a dimer consisting of two identical subunits each consisting of 113 amino acids with two disulfide bridges. As a protease inhibitor, the peptide bond between Met 73 and Val 74 constitutes the reactive site. The picture depicts the C_α -backbone with approximate positions of relevant side chains. The picture is drawn after Mitsui et al. (J. Mol. Biol. 131, 697-724(1979)).

700トンのこととは, Fig. 2に於いて SS 結合の切断により His 43 の C₂ 700 トン位置は不変であるのに E ピークが完全に消失していることから明らかである。以上のより E ピークは Trp 86 の C₂ 700 トンに同定される。

(3) 他の3つの proton signal の同定

これらの信号は毫々のズレのままであれば観測困難である。そこで Fig. 3 に示すように NOE の方法により同定 (C₂ (β, γ, δ))。この結果, β は C₆H (2 は C₅H), γ は C₅H (2 は C₆H), δ は C₂H (2 は C₄H) に同定された。

Trp 86 のミクロ環境

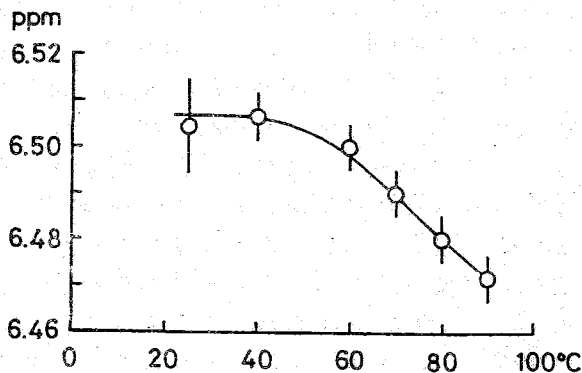
(1) C₂ 700 トン (E ピーク) は "free" の位置から, 約 0.85 ppm も高磁場側に "高次構造" シフトしている。これも拘うが 25°C - 90°C (変性直前) までの昇温によるシフトはエラに高磁場側に ~ 0.04 ppm ほどでない (Fig. 4)。C₂ 700 トンの高磁場シフトの原因は明らかでないが, 昇温による平均構造の崩れはみかけ上 ~ 5% 程度ということになる。

(2) Fig. 3 の NOE データは 2D のメチル基 (λ, μ) と 1D の チレン基 (ν) 如 Trp 86 ring の近傍にあることを示している。結晶構造 (Mitsui et al. (1991) J. Mol. Biol. 131, 692-724) との対比から, これらは Leu 53 のメチル基とメチレン基に同定される。λ は SSII の ¹H NMR スペクトル上で最も高磁場位置に位置するピークで, その "高次構造" シフト (Trp 86 の ring current によると考えられる) は ~ 0.9 ppm に達する。これも拘うが 25-90°C 間で, その寄与位置は実験誤差以内で不変である! SSII サブユニットの内部はサブユニット接触面の 5 本の β シートと反対側にある 2D の α ヘリックスに囲まれた形をしている (Fig. 5)。Trp 86 の側鎖は β シート側 (β₄) から, Leu 53 の側鎖は α₂ ヘリックスから内部に突き出る形で互いの近接座標を保っているに過ぎない。これも拘うがその空間的座標が温度変化に対して極めて安定であることは, 一方で結晶構造における原子の熱振動の大きさと (~ 0.5 Å 程度) と考え比べると, タンパク質の分子運動に比べて極めて不変な結果であると考へる。

Met 側鎖のミクロ環境

Trp 86 - Leu 53 の間でみられた側鎖間の "強固" な空間的座標は, SSII 疎水領域の別の部分に存在する Met 103 - Phe (92, 111) の間にも見られる。

Fig. 4. Temperature-induced chemical shift of the C₂ proton of Trp 86 of SSI (in 0.1 M deuterated phosphate buffer, pH 7) measured at 360 MHz. Note that the temp-induced shift is only ~0.04 ppm, while the total "structure-induced shift" of the C₂ proton amounts to ~0.85 ppm.



(東北大・非水研) 野沢肅則, 篠野昌弘
(京大・薬) 佐藤三男

1. 目的: 錯体の電子状態を直接金属イオンの核磁気共鳴(NMR)スペクトルから解析する: とを目的とし, 種々の金属錯体の金属イオンのNMRの測定を行っている。この研究の一つとして ^{57}Fe のNMRの共鳴周波数とスピン・格子緩和時間, T_1 についての測定結果を報告する。ヘム・タン白質の構造と機能との関連を解析する上に, ヘム鉄の電子状態を知る: とは不可欠であり, 電子スピン共鳴, 磁気円偏光二色性, 共鳴ラマン, Xスバウアー効果等の測定や分子軌道計算による研究がヘム・タン白質及びそれらのモデルについて数多くなされている。ヘム鉄の電子状態を解析する一つの新しい方法として ^{57}Fe NMRを測定した。

^{57}Fe のNMRは核スピンの $1/2$ という好ましい条件にもかかわらず, 相対感度が極めて低く(^{13}C の 0.2%), 天然存在比も 2.2% と低く, しかも緩和時間が極めて長いものと考えられ, 最も測定し難い核種の一つである。従って, ^{57}Fe NMRの測定には特殊な方法, 例えば *quadrupole FT* 法や ^{57}Fe のスピン・カップリングを利用した *heteronuclear double resonance* 法のみが用いられてきた¹⁾。しかし, 我々は高磁場下で大口径の試料管($\phi = 15\text{ mm}$)を用い, 適切なFTパルス系列により ^{57}Fe NMRを測定することに成功した。本研究の一部は昨年の錯塩討論会で発表した。

2. 方法: ^{57}Fe NMRの測定にはBruker CXP-300 FT NMR装置を用いた。この装置における ^1H NMRの共鳴周波数は 300.066 MHz で, 静磁場は 7.05 T である。測定に用いた $\text{Fe}(\text{CO})_5$, FeDSC はStrem Chemicals, Inc.から購入した。 ^{57}Fe を挿入したヘム錯体の合成法は別途報告する。 ^{57}Fe 含量 $\approx 95\%$ 。

3. 結果: ^{57}Fe のNMRの測定に先立ち, ^{57}Fe の共鳴周波数に近い感度の高い核である ^{73}Ge の測定を行った。 GeCl_4 (90% CDCl_3 溶液)の ^{73}Ge のNMRは40回の積算で $S/N \approx 14$ のシグナルを 10.46774 MHz に観測した。 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ の天然存在比での ^{57}Fe NMRは150ボルトパルス入力(peak to peak)の測定でパルス幅 $120\mu\text{s}$, 繰返し時間 20 s の条件で 1000 Hz の掃引を行い, 1100回積算で $S/N \approx 5$ のシグナルを 9.715683 MHz に観測した。緩和時間, T_1 を約 100 s と予測し, 繰返し時間を 800 s とし, 掃引幅 100 Hz , 積算52回, Xエネルギー 8 K の条件でパルス幅を $5\mu\text{s}$ 間隔で変化させ, ^{57}Fe NMRのシグナルを最大にする 90° パルスの場合のパルス幅を $180\mu\text{s}$ と決定した。この条件での H_1 fieldは 10.0 Gauss (10.00 T)と計算された。この 90° パルス幅を用い, 180° と 90° パルス系列のInversion Recovery法で T_1 を求めた。繰返し時間 800 s , 掃引幅 100 Hz , 積算52回, 温度 293 K の条件で T を $1, 60, 120, 180, 240, 800\text{ s}$ と変化させた。この測定結果からの $-\ln[(A_\infty - A_T)/2A_\infty]$ vs T のプロットから $T_1 = 90\text{ s}$ を求めた。この T , A_∞ , A_T はそれぞれ充分大きな T の値およびの場合の ^{57}Fe NMRシグナルの大きさである。図1には繰返し時間を 400 s , T とのざわつねのり, はたのまじろ, さとうみつお。

0.1, 20, 40, 60, 80, 100, 140 s と変化させた場合の部分緩和 NMR スペクトルを示した。この測定から $T_1 = 70$ s と求められた。

一方、これらの基礎的データをもとにフェロセンの ^{57}Fe NMR を測定した。パルス幅 20 μs 、繰返し時間 40 s、掃引幅 10000 Hz、X モーリー・サイズ 8 K、積算 570 回の ^{57}Fe NMR シグナルを 9.73056 MHz に得た。この値は GeCl_4 の ^{73}Ge NMR の共鳴周波数との比 0.929576 と一致、文献値 0.929577 と一致した¹⁾。フェロセンの緩和時間 T_1 の測定は Inversion Recovery 法により、繰返し時間 50 s、掃引幅 150 Hz、積算 520 回、温度 308 K の条件で T を 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 30.0 s と変化させて行った。図 2 にこの時の部分緩和 NMR スペクトルを示した。この測定結果から $T_1 = 4$ 秒と求められた。フェロセンの緩和機構を考察するために ^{57}Fe NMR を測定したと同一試料の ^{13}C NMR の緩和時間 T_1 を Inversion Recovery 法で繰返し時間 50 s、掃引幅 10 kHz、積算 16 回、Broad Band Decoupling 2 W の条件で T を 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 s と変えて測定した。この結果 T_1 が 308 K で 12.3 s, 298 K で 10.0 s と求められた。

4 考察

化学シフト

大きくは Fe(II) 低スピン錯体と分類される状態のヘム錯体も磁気円偏光二色性から判定²⁾すると様々な種類が存在する。また、Resonance Raman スペクトルでも大きく二つに分類できる Fe(II)-軸配位子の相互作用を明らかにしている³⁾。このような系の Fe(II) ヘムの化学シフトの値は従って微妙な Fe(II) 低スピン錯体の電子状態を区別できるものと期待される。

上述の ^{57}Fe NMR の測定結果から現段階で確定的に求められている化学シフト値は表 I に示されるが現在、 $^{57}\text{Fe(II)}$ TPP(Py)₂, $^{57}\text{Fe(II)}$ TPP(Py)₁(CO) 錯体等について測定を行っている。再現性のあるシグナルの検出は難かしく詳細については当日融れることにある。

表 I でフェロセンの shielding

Fig. 1.

Partially relaxed ^{57}Fe NMR for $\text{Fe}(\text{CO})_5$

SF: 9.715 MHz
O1: 710 Hz
SW: 100 Hz
D1: 180 μs
D0: 400 s
NS: 52
SI: 8 K
LB: 1 Hz
Hz/CM: 4 Hz

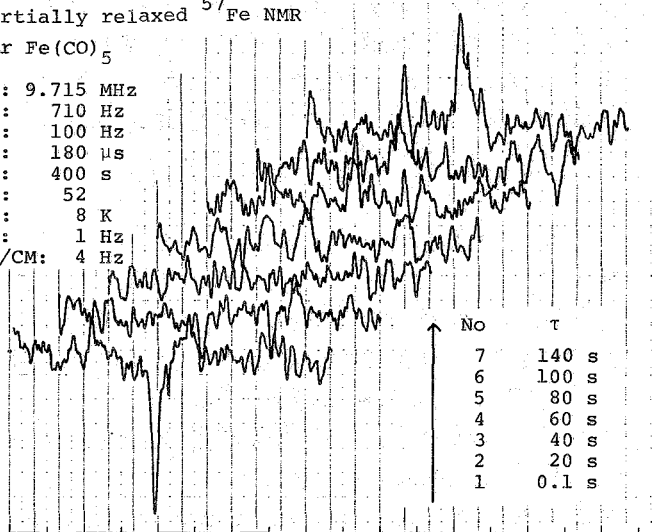


Fig. 2.

Partially relaxed ^{57}Fe NMR for ferrocene.

SF: 9.734 MHz, O1: -3385 Hz, SW: 150 Hz,
D1: 180 μs , D0: 50 s, NS: 520, SI: 8 K,
LB: 2 Hz, Hz/CM: 10 Hz

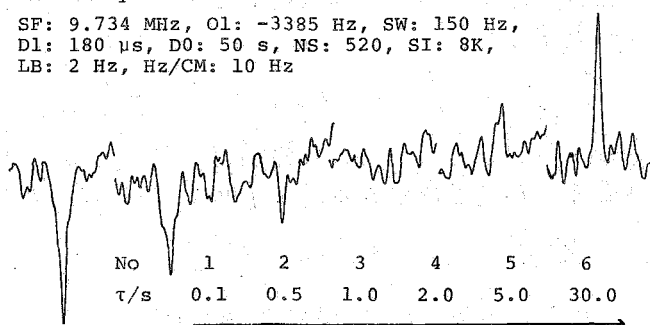


表 I 鉄錯体の ^{57}Fe NMR

化合物	溶媒	δ	Field Reference $\nu(^{57}\text{Fe})/\nu(^{56}\text{Fe})$
フェロセン	Benzene-d ₆	1531	0.929576
$\text{Fe}(\text{CO})_5$	neat liquid	0	0.928155

が $\text{Fe}(\text{CO})_5$ から 1531 ppm 減少していることは Fe(II) から Fe(0) への変化に対応づけられる。

緩和機構:

予想外に短いフェロセンの T_1 の原因を探るために上述の ^{13}C の T_1 の測定値を踏まえ緩和機構の考察を行う。

^1H (S) - X 核 (I) 間の分子内双極子-双極子相互作用による X 核の T_1^{dd} は

$$\frac{1}{T_1^{\text{dd}}} = \frac{\mu_0^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{240 \pi^2} (S)(S+1) \sum \frac{1}{r_{IS}^6} \left[\frac{2}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{12}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \right] \tau_c \quad (1)$$

で与えられる。ここで μ_0 は真空中の透磁率, γ_I, γ_S は I 核および S 核の磁気回転比, $\hbar$ はプランクの定数を 2π で割ったもの, S は S 核の核スピン量子数, r は ^1H と X 核との核間距離, $\sum$ は X 核に作用しているすべての ^1H について和をとることを示す。 ω_I, ω_S は X 核および ^1H 核のラモア周波数の 2π 倍したもので、 τ_c は両配向の相関時間である。極度尖鋭化の条件 ($\omega \tau_c \ll 1$) のもとで (1) 式は

$$\frac{1}{T_1^{\text{dd}}} = \frac{\mu_0^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{12 \pi^2} S(S+1) \left(\sum \frac{1}{r_{IS}^6} \right) \tau_c \quad (2)$$

となる。(2) 式を用いてフェロセンの ^{13}C の τ_c を上述の $T_1 = 1.23 \text{ s}$ を用いて計算すると

$$\tau_c = 2.2 \times 10^{-12} \text{ s} \quad (\text{at } T = 308 \text{ K}) \quad (3)$$

となる。この τ_c が ^{57}Fe について用いられると、 ^{57}Fe のスピン-格子緩和が ^1H と ^{57}Fe の双極子-双極子相互作用のみに依存するとして (2) 式を用いると

$$T_1^{\text{dd}}(^{57}\text{Fe}) = 2.9 \times 10^4 \text{ s} \quad (4)$$

さらに (1) 式から、この緩和機構での最少の T_1^{dd} ($T_1^{\text{dd, minimum}}$) が

$$T_1^{\text{dd, minimum}} = 110 \text{ s} \quad (5)$$

と求められる。従って、フェロセンの ^{57}Fe のスピン-格子緩和への ^1H と ^{57}Fe 間の双極子-双極子相互作用の寄与は小さいと考えられる。

次に、化学シフトの異方性によるスピン-格子緩和時間 (T_1^{CA}) を考える。軸対称を仮定すると

$$\frac{1}{T_1^{\text{CA}}} = \frac{1}{15} \gamma_I^2 H_0^2 \Delta\sigma^2 \left[\frac{2 \tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \right] \quad (6)$$

となる。ここで H_0 は外部磁場の強さ, $\Delta\sigma$ は 1γ への定数の異方性 ($\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$) を表す。極度尖鋭化の条件のもとで (6) 式は (7) 式となる。

$$\frac{1}{T_1^{\text{CA}}} = \frac{2}{15} \gamma_I^2 H_0^2 \Delta\sigma^2 \tau_c \quad (7)$$

フェロセンの ^{13}C での $\Delta\sigma$ の実測値を用いて (3) と (4) 式から

$$T_1^{\text{CA}} \approx 5 \times 10^4 \text{ s} \quad (8)$$

が求まる。従って、Fe ロセンの ^{13}C の緩和への化学シフトの異方性の寄与は充分小さいことがわかる。さて、Fe ロセンの ^{57}Fe の緩和が化学シフトの異方性で説明できるためには ^{57}Fe の再配向の相関時間 T_c が(1)式で与えられた ^{13}C の T_c が用いられるとある仮定のもので(7)式に(3)式と $T_c^{\text{CA}} = 4.5$ を代入し

$$\Delta\sigma = 2.2 \times 10^4 \text{ ppm} \quad (9)$$

の化学シフトの異方性が必要となる。この値は $\text{Co}(\text{III})[(\text{C}_5\text{H}_5)_2]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ の測定値⁽⁴⁾4200 ppm より5倍程大きい。従って、Fe ロセンの ^{57}Fe の緩和機構を化学シフトの異方性のみにあることは多少無理があり、他の緩和機構であるスピン-回転も考える必要が示唆される。

一方 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ の ^{13}C の緩和機構として化学シフトの異方性とスピン-回転機構が考えられるが、 ^{13}C の共鳴周波数が61 MHzにおいて化学シフトの異方性にもとづく緩和が支配的であると報告されている。⁽⁵⁾そして、この時の ^{13}C の $\Delta\sigma$ は408 ppmと求められている。⁽⁵⁾また、 ^{13}C の再配向の相関時間 T_c は $\sim 293 \text{ K}$ で $\sim 5 \times 10^{-12} \text{ s}$ と計算されている。⁽⁵⁾さて、Fe ロセンの場合と同様に $\text{Fe}(\text{CO})_5$ の場合も ^{13}C の再配向の相関時間を ^{57}Fe に適用し(7)式を用いると $T_c^{\text{CA}} = 80 \text{ s}$ のとき

$$\Delta\sigma = 4000 \text{ ppm} \quad (10)$$

と計算される。この値は $\text{Mn}(\text{CO})_5\text{Cl}$ についてのMnの $\Delta\sigma$ の測定値⁽⁶⁾1300 ppm と比較すると多少大きい。が $\text{Fe}(\text{CO})_5$ の ^{57}Fe NMR ジナールの主たる緩和機構は化学シフトの異方性にもとづくことを示唆している。

緩和機構を実験的に決定するには温度効果、NOEの効果と測定する必要がある。ヘム錯体の ^{57}Fe の化学シフトの確定とともにこのような実験結果も合わせて報告したい。

謝辞： 本研究にあたり種々御協力、御討論頂いた日本フルカーの戸井田良晴氏 E. Bartholdi氏に感謝致します。

文献

- 1) T. Jenny, W. Von Philipsborn, J. Kronenbitter and A. Schwenk, J. Organometal. Chem. **205**, 211 (1981).
- 2) T. Yamamoto, T. Nozawa, A. Kaito and M. Hatano, Bull. Chem. Soc. Jpn., **55**, 2021 (1982).
- 3) T. Kitagawa, Y. Kyogoku, T. Iizuka, and M. Saito, J. Amer. Chem. Soc., **98**, 5169 (1976).
- 4) H. W. Spiess, H. Haas and H. Hartmann, J. Chem. Phys., **50**, 3057 (1969).
- 5) H. W. Spiess and H. Mahnke, Berichte Bunsen-Gesellschaft, **76**, 990 (1972).
- 6) H. W. Spiess and R. K. Sheline, J. Chem. Phys., **54**, 1099 (1971).

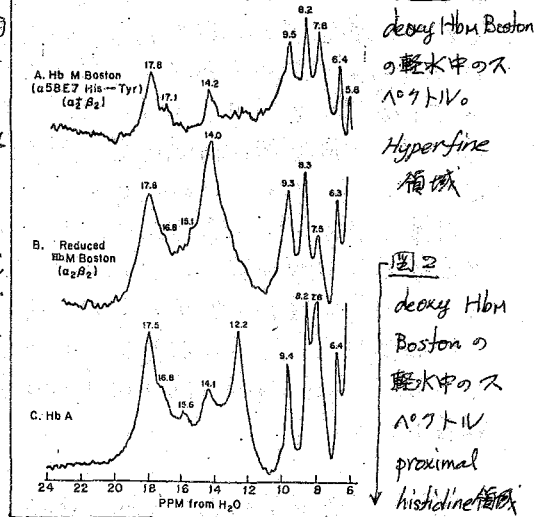
(日本女子大ノカーネギーメロン大) 高橋征三, C. ホー*

脊椎動物のヘモグロビン(Hb)は α 鎖と β 鎖が1対ずつ会合した $\alpha_2\beta_2$ 型の4量体である。Monodらはこのような相互作用している複数の反応部位を有するタンパク質は、一次構造は同じでも幾つかの立体構造を採ることができ、立体構造の違いによって部位の反応性が異なる、と考えた。そしてHbはこのようなallostericタンパク質の代表的な一例であり、タンパク質の協同的リガンド吸着の定量的説明のために、所謂MWCモデルを提唱した。PerutzはX線結晶解析の結果から、Hbはデオキシン型(T型)とオキシン型(R型)の2型しか存在しないとして、更に詳細な分子論的モデルを提唱した。一研究者らはNMRによる研究から、Perutzのtwo-state allosteric modelに矛盾する幾つかの実験的証拠を傳た。異常Hbの実験結果を矛盾なく説明するためには、種々のT状態が存在するとした方がよいことは多くの研究者が認めつつあるが、研究者らは更にR状態についても複数の構造があり得るのではないかと考えて、実験を行なった。

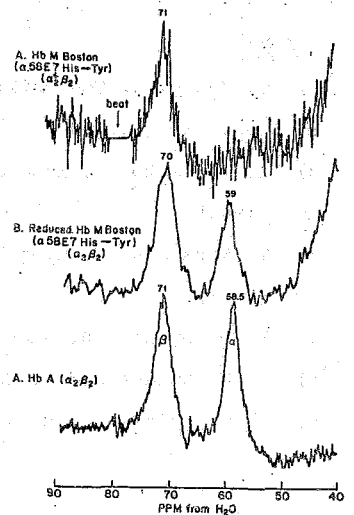
[Hb M Boston ($\alpha 58E \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$) の構造について]

Hb M Bostonは突然変異の結果、 α 鎖のdistal ヒスチジンがチロシンに変わったため、天然の状態で α 鎖のproximal ヒスチジンとヘム鉄との結合が切れて、distal のチロシンと結合して、3価の鉄となり酸素と結合できない。従ってこのHbはdeoxy状態でもoxy状態でもT型構造をとる。しかしNMRスペクトルではT型構造のプロープである6.5 ppmと9.5 ppmのexchangeable resonancesの他にR型構造のプロープの5.8 ppm resonanceが明瞭に観測される。しかも温度を上げて行くとT型のプロープシグナルはbroadeningし強度が減少するのに対し、R型のプロープシグナルにはその徴候が見られなかった。Hb M Bostonの α 鎖の3価の鉄を2価に還元すると、5.8 ppmのresonanceは消失するが、同時に7.5 ppmのresonanceが半分の強度になる。更に不思議なのは図2に示したように、 α 鎖のproximal ヒスチジンのシグナルが半分の強度で現われることである。これは鉄

250MHz ^1H NMR Spectra of Deoxyhemoglobins
in 0.1M Bis-Tris in H_2O at pH 6.6 at 27°C



250MHz ^1H NMR Spectra of Proximal Histidine
NH Exchangeable Resonances of Deoxy hemoglobins
in 0.1M Bis-Tris in H_2O at pH 6.6 and 27°C



proximal ヒスチジンの結合が「半分」だけ回復したことを意味する。しかし図1から明らかなように、2種類の構造を持ったHbが共存する訳でも、還元が不完全だった訳でもない。そこで著者は α 鎖の構造に非対称性があると考えた。このような例はHbM Bostonに特有なことではなく、 α 鎖に存在するようである。図3はその一例で、Hb Osler ($\beta 145$ HC2 Tyr $\rightarrow$ Asp) の場合1HP存在下で明らかに α 鎖の proximal ヒスチジンのシグナルは非対称であるし、Hb McKees Rocks ($\beta 145$ HC2 Tyr $\rightarrow$ Term) の場合は1HP存在下で β 鎖の proximal ヒスチジンのシグナルは明瞭に2本に分裂する。

さてHbM Bostonは殆んど酸素吸着に対する協同性を示さないが、これはNMRの結果からも支持される。oxy formにした時、subunit間の水素結合が殆んど変化せず、T型とR型のプロローブシグナルが共存してたまである(図4)。従って酸素化に伴うsubunit間の構造変化は殆んどないと解釈できる。しかし全く構造変化がない訳ではなく、低濃にすると6.4 ppmの resonance が分裂して6.8 ppm resonance が出現する。これはdeoxy状態にはなかった現象である。

以上の結果から著者は、HbM Bostonは単純にT型構造であるとするのは間違いであり、少なくともある種の変異Hbでは、subunit間結合に関して、T型とR型の中間状態が存在しうる、と解釈している。

[Hb A の exchangeable proton resonances について]

600 MHz ^1H -NMR スペクトルでは、 H_2O から0.002 ppm 離れたシグナルから十分に測定可能である。Hb A の場合は事実上 hyperfine resonances を無視して exchangeable resonances の化学シフトを正確に求めることができる。図5は D_2O と H_2O 中で測った deoxy Hb A のスペクトルを比較したものであるが、exchangeable proton resonances には比較的速く交換するものと、事実上交換しないものがあることが解る。今回の新たな知見は、R型構造のプロローブである5.8 ppm resonance が実は O_2 -Hb A の場合5.76, 5.85, 5.98

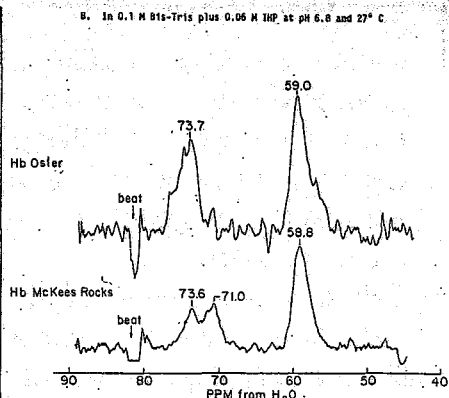


図3 deoxy Hb Osler, McKees Rocksの軽水中の ^1H -NMR, proximal histidine領域

250 MHz ^1H NMR Spectra of Oxy Hb M Boston ($\alpha 58$ E7 His $\rightarrow$ Tyr) [$\alpha_2 \beta_2 (\text{O}_2)_2$] in 0.1 M Bis-Tris in H_2O at pH 6.7

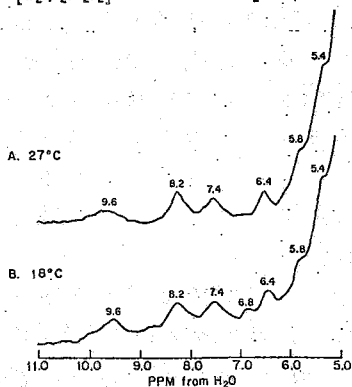
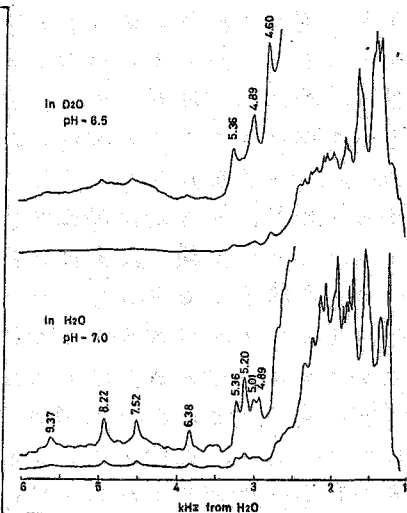


図4 oxy Hb M Bostonの軽水中の ^1H -NMR

図5 600 MHz ^1H -NMR Spectra of deoxy Hb A



ppmの3本が3つ成っており、CO-HbAの場合はその内の1つがおよそ5.42 ppmに shift し、残り2本が5.70, 5.89 ppmに観測されることである。これは600 MHzで測定することによって初めて明瞭に観測することができた。その他にもO₂-HbAとCO-HbAとでは数カ所スペクトル上の違いが見られ、両者で何らかの三次構造上の違いがあることは明らかである。

[HbAの ring-current shifted resonances について]

O₂-HbAやCO-HbAではハムの環電流の影響で高磁場側にいわゆる ring-current shifted resonances と呼ばれる一群のシグナルが観測される。図6はその一例であるが、pH滴定すると複雑にスペクトルパターンは変化する。これらのシグナルを利用した系統的研究は幾んどなされていず、pH滴定も行なったのも知る限り前者が初めてである。スペクトルの帰属はCO-HbAについてされており、一番高磁場側の二本はそれぞれα鎖、β鎖のE11 Valineのメチル基のシグナルである。O₂-HbAではこの2本は分離しないと考えられていたが、図6のようにpHを下げて行くと分裂することが解った。

図7に pH滴定曲線の一部を図示したが、左側がO₂-HbA、右側がCO-HbAの結果である。O₂-HbAで約-7.2 ppmに見られる resonances はCO-HbAでは約-6.7 ppmに観測される。このことからバリンのメチル基の位置が両者で異なる位置にあることが推察される。pHの違いに対するα鎖、β鎖のメチル基の挙動は、丁度逆方向で、O₂-とCO-とは似たような振舞いをする（図8）。しかし今回はO₂-HbAのβ鎖バリンのもう一方のメチル基のシグナルの位置については帰属することができなかった。それはバリン側鎖の位置は平行移動だけでなく回転移動も考慮する必要があるため、必ずしも両者のメチル基のシグナルが平行して変化するとは限らないからである。図6から明らかなのは、pH滴定を詳細に見て行くとO₂-HbAとCO-HbAとで違っていることである。α鎖のバリンのシグナルの変化はO₂よりもCO-HbAの方が大きい。β鎖の変化の仕方も

600 MHz ¹H-NMR Spectra of HbA in H₂O

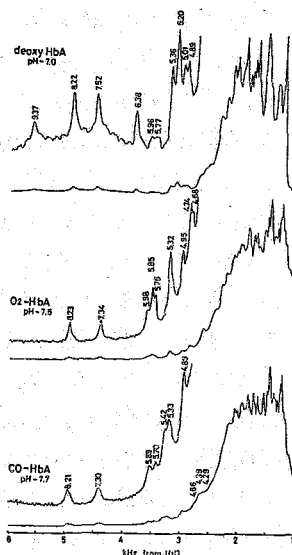


図6 HbAの真水中のスペクトル

pH Titration of Oxyhemoglobin A in 0.1M Bis-Tris/Cl⁻

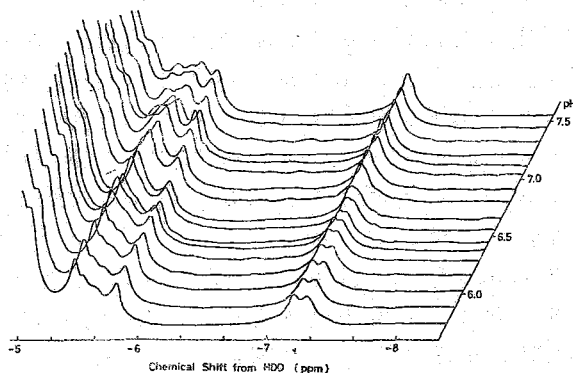


図7 O₂-HbAの ring-current shifted proton resonances

pH Titration of O₂- & CO-Hb A
0.1M Bis-Tris

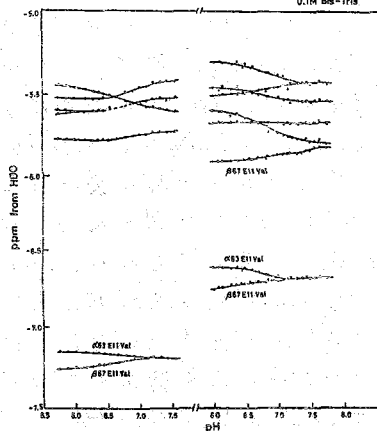


図8 O₂-, CO-HbAの pH 滴定

果はっている。更に *allosteric effector* に対する挙動を調べるために DPG, IHP を添加して pH 滴定を行ったのが図9, 図10 である。その結果 O_2 -HbA と CO -HbA との挙動の違いは更に明らかになった。 O_2 - もしくは CO -HbA に IHP は結合するが, DPG は結合しない, とされていたが, 何らかの相互作用があることは明らかである。更に CO -HbA の挙動から, このバリンのシグナル変化には複数のヒスチジン残基が関与していることが明らかである。しかもどれか一つのヒスチジンの影響が決定的に強くということがないので, バリンのすぐ近傍にある *distal* ヒスチジンはこの pH 範囲ではプロトン化しないと示唆される。従ってバリン残基はやはり遠方の分子表面にあるヒスチジンの酸解離の影響を受けることになり, 更に分子表面のヒスチジンのミクロ環境が O_2 -HbA と CO -HbA とでは異なっていることが示唆される。このことは *Histidine resonances* の pH 滴定に於て, CO -HbA の帰属が O_2 -HbA では全く役に立たず, pK_a や化学シフトが全く異なっていると言う知見と一致する。

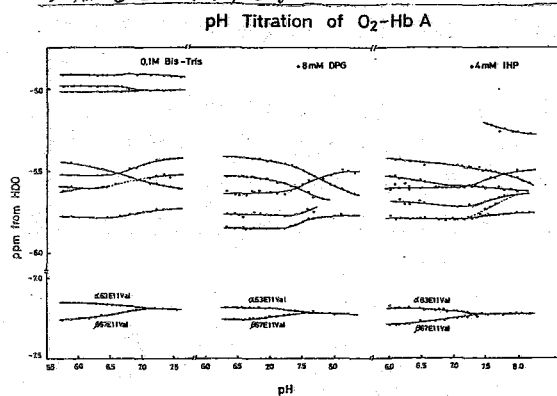


図9 O_2 -HbA の pH 滴定

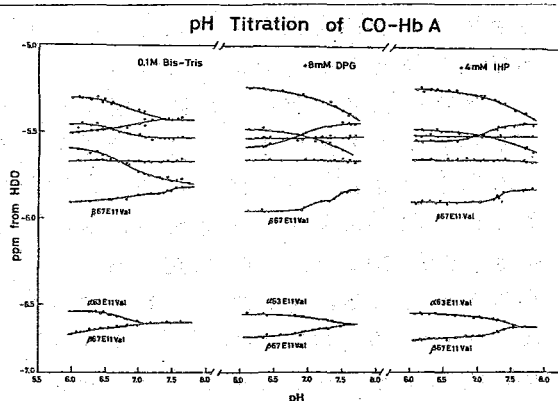


図10 CO -HbA の pH 滴定

[結論]

HbM Boston の創り, T と R 型の中間状態をとり得る可能性, α 鎖同志, β 鎖同志の構造の対称性がくずれる可能性を指摘した。また O_2 -HbA と CO -HbA の *exchangeable proton resonances* と *ring-current shifted proton resonances* の創り両者では明らかに構造上の違いがあることを指摘した。従来 O_2 -HbA と CO -HbA との構造上の差異はないものとされ, R 型の構造は共通であるからとして O_2 -HbA の代りにメト HbA の構造で代用されて議論されていた。今回の結果は従来看過されていた幾つかの諸点を再検討すべきであることを強く示唆している。

(京大工) 森島 績, 舟橋 孝

1 序論

チトクロームCよりタンパク部分を一部残して切り取ったヘムCペプチド(MP-11及びMP-8)は、電子移動モデルや、ヘムタンパク質モデルとして近年注目を集めてきている。これらのヘムペプチド、特に、MP-11は、サンプル固有の性質である *aggregation* のために、明確な情報を得にくく、NMRスペクトルを用いた詳細な構造決定は、行なわれていない。しかしながら、これらのヘムペプチドの構造の解明は、新しい機能の発見や、ヘムタンパク質モデルの構成のための基本的知見を得る上で、重要な意義を持つものと考えられる。本研究では、ヘムペプチドのpH依存性を¹H NMRスペクトルを用いて検討し、ヘム近傍の構造に関する知見を得ることを目的とした。

MP-11及びMP-8は、図1に示す構造を持つが、溶液内では、他のヘムペプチドのアミノ酸残基が、才6配位子となるために、複雑な構造をとり得る。従来、磁化率の研究¹⁾から、MP-11は、酸性領域で、高スピン(HS)、アルカリ領域で低スピン(LS)状態で、そのpKは、6.3であり、分光学的研究等²⁾から、pHに依存した変化は、3.4, 5.8, 7.6, 10で起こることが報告されている。そして、これらの変化は、His-18, Val-11, Lys-13,そしてポリマー化に関係すると考えられている。一方、MP-8は、pH10以下で、磁化率は、HSに近く、pH10以上でLSに近く、pHに依存した変化は、3.8, 10で観測され、それらは、His-18, 配位子の木の交換であると解釈されている。¹H NMRのスペクトルは、中性付近で、これらのペプチドが、類似の環境を持つことを示し、(図2)。またMP-8は、pH10で、LS成分が、現われることが、わかった(図7)。これらの結果は、従来の説明が、十分でないことを示している。今回、MP-11の *aggregation* の原因の検討、そして、MP-11のpHに依存した構造を推定したので、ここに述べる。

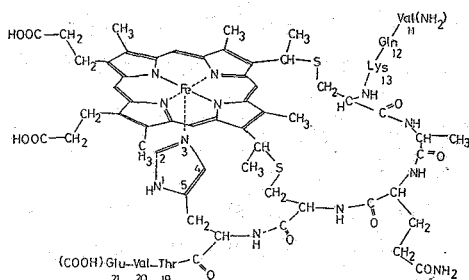


図1 MP-11の構造

MP-8は、14-21のアミノ酸残基を持つ。

2 実験

MP-11は、チトクロームCから、HanburyとLoach³⁾の方法に従って得たものを用

もりしま いさお, ふなはし たかし

いた。MP-8 は、シグマ社から購入したものを用いた。 $^1\text{H NMR}$ の測定は、NT-300 (300 MHz)を用いた。軽水中での測定には、Low-power presaturation法 (Low-power modeで、メシグナルを saturation させ、続いて、high-power modeで、シグナルを観測する) を採用した。MP-11の重水中での pH 変化は、aggregationの効果を避けるために、pH 12.4 から 5.2 までの pH 変化と、pH 1.9 から 7 までの pH 変化を行なった。また、detergent は、2% の sodium dodecylsulphate と、0.1 M の tetramethylammonium bromide 混合溶液を文献¹⁾に従って用いた。

3 結果 及び 考察

(A) pH 7 での構造

図 2 で、A と B の比較から、pH 変化の方法によって、スペクトルや、サンプルの性状が、異なり、その原因が、HS2 及び LS1 成分によることがわかる。A と C の比較から、両ペプチドが、類似の環境を持つことが、予想される。MP-8 は、中性溶液中で aggregation を起こさないの、構造(図1)の比較から、MP-11の側鎖である Val-Gln-Lys が、HS2, LS1 成分の出現を妨げて、aggregation を起こしていると考えられる。次に、HS1, 2, LS1 の構造を推定する。HS2 は、LS1 と同時に現われ(図2, A, B), His-18 の ^1H プロトンのシグナルは、軽水中での測定で、得られなかった。このことから、HS2 は、bis aquo 体と考えられる。LS1 は、シフトが、ポリジン体のそれに近いこと (Table 1) 及び、MP-8 では、pH 5.5 から 10 で LS1 が観測され(図7)、その領域で、配位子となるアミノ酸は、His-18 及び Cys-14 であるが、pH 10 で、Cys-14 によると考えられる LS が、現われるので、LS1 は、bis Im 体の可能性がある。

HS1 は、bis aquo 体以外の HS が、とりうるものとして、mono aquo 体が考えられる。

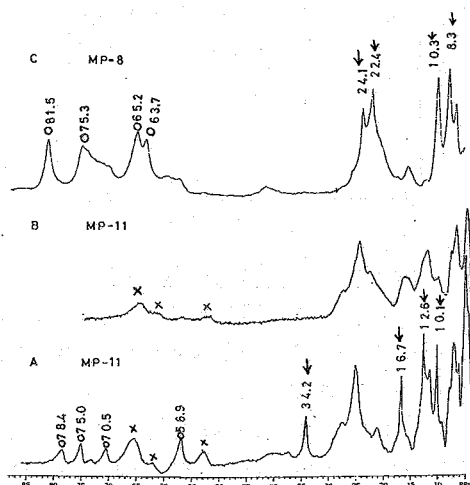


図2 ヘムペプチド、pH 7 の

$^1\text{H NMR}$ スペクトル (H₂O 基準)

A: pH 12 から段階的に pH を下げた。
B: 一挙に pH を下げた。粘度が高い。
両ペプチドとも、HS, LS のまじりである。A と B の比較から、HS が 2 種類ある。

x 印 HS1, o 印 HS2, ↓ 印 LS1

Table 1: Hyperfine Shift of High Spin Type 2 and Low spin Type 1

MP-8	high spin type 2	low spin type 1	pyridine complex	MP-11	high spin type 2	low spin type 1	pyridine complex
heme methyl shifts	81.5 75.3 65.2 63.7	24.1 22.4 10.3 8.3	25.94 (8 ^a) 20.22 (5) 13.80 (1) 11.01 (3)		78.4 75.0 70.5 56.9	34.2 16.7 12.6 10.1	25.9 (8) 19.7 (5) 12.1 (1) 10.3 (3)
spread	17.8	15.8	14.93		21.5	24.1	15.6
average	71.4	16.3	17.74		70.2	18.4	17.0

a) J. Am. Chem. Soc., (1981), 103, 4912

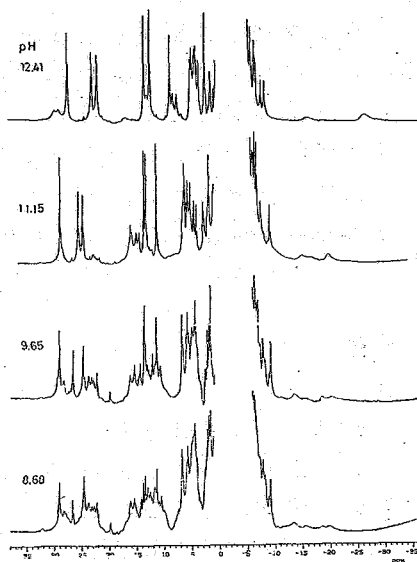
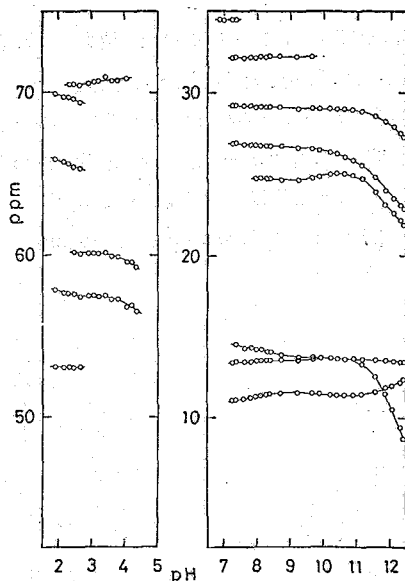


図3
(左)MP-11の代表的なピークのpH依存性(H₂O基準)
(右)MP-11のアルカリ領域のスペクトル(H₂O基準)

(B) MP-11のpH依存性

図3からMP-11は、強アルカリ領域で、2成分以上が、存在する。これは、才6配位子に、Val-11とLys-13が、配位する2成分の混在が、考えられる。また、pH10以上にかけて、ピークが、大きくシフトし、同様の変化が、MP-11及びMP-8のシアン体でも観測されることから、His-18のアニオン化が、示唆される。pH9.6の変化(図3)は、ヘム鉄に配位しないVal-11の可能性がある。その理由は、MP-11のシアン体のpH依存性の報告⁴⁾で、Valに固有のpK値付近で、変化が、起こることによった。pHを下げるに従って増加するLS成分は、この変化に関係することと思われる。HS1の出現は、pK7.6の変化に対応する。pH12で見られる成分は、中性になるにしたがって強度を減ずること、及び、ValとLysの固有のpK値から考えて、Lysによる変化であると考えられる。pH7付近では、MP-8と似た構造を持つ成分が、現われる。中性以下のpH依存性の検討には、detergentを加えた実験が、有効である。pH4.2で、His-18のNiHシグナルが、軽水中で、観測されることは、pK5.8が、Valに関係することを示す(図5)。このスペクトルは、タンパク質に近いスペクトルを持つことから、HSモデルとして用いうる可能性が、ある。pH4以下の変化(図5)は、His-18に関係することから、わかり、pH1.90のスペクトルは、ヘミンのbis-HMSO体に近いことから、pK3.4は、His-18

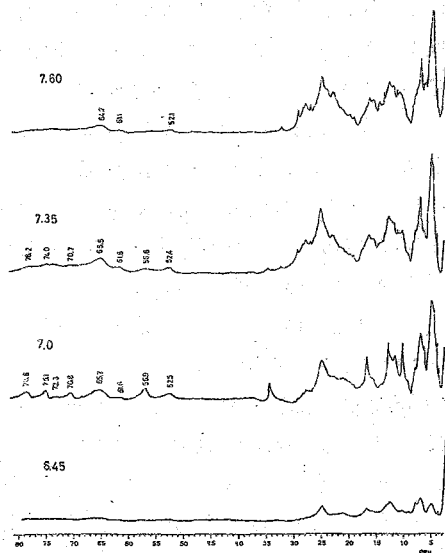


図4 MP-11の中性領域のスペクトル(H₂O基準)
HS2は、pH7のわずかの領域で、現われる。

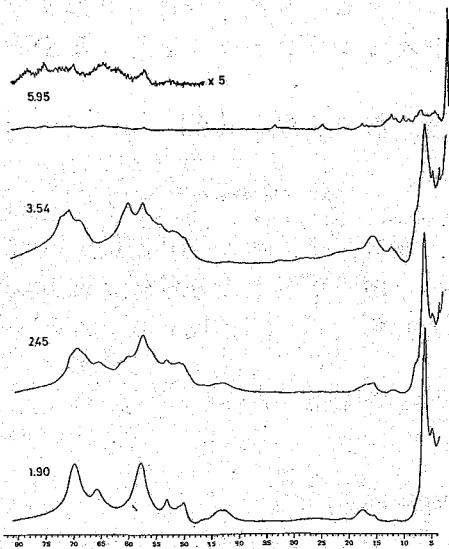


図5 MP-11の酸性領域のスペクトル (H₂O基準)
pH 5.9付近の狭い領域で、HS 2.LS1が得られたが、pH 7では、図 2.Bのスペクトルになった。

よることが、わかる。

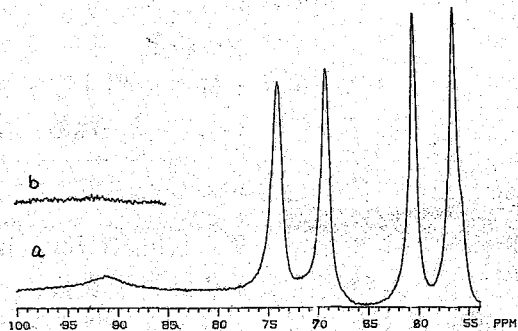


図6 MP-11. detergentを加えたスペクトル
pH 4.2 a. 軽水中 b. 重水中 (H₂O基準)

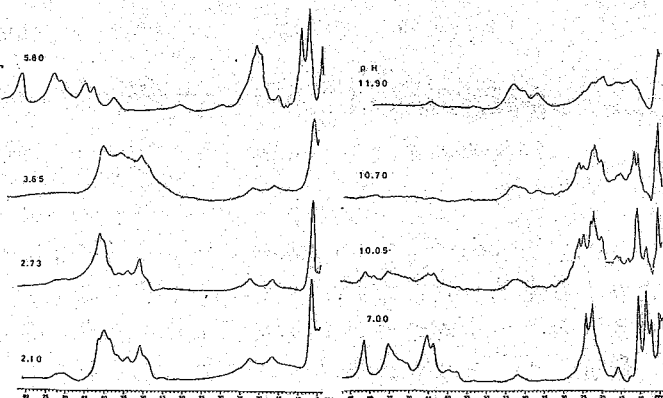


図7 MP-8の¹H NMR スペクトル (H₂O基準)
pHに依存した変化は、pH 10.7以上、10、6以下4以下で認められる。

4 まとめ

MP-11及び、MP-8のpHによる構造の変化を検討した結果、以下のことが、明らかになった。

- 1) MP-11は、従来の報告以外に、pH 7付近に、MP-8に類似のHS成分が、存在し、それらは、bisaguo体とbisIm体の可能性が、考えられ、MP-11のaggregationの原因は、これらの成分による。
- 2) MP-11は、pHのほとんどの領域で、多成分系となる。しかしながら、detergentを加えることで、pH 4付近に、mono体が現われ、タンパク質モデルとなる可能性がある。

5 文献

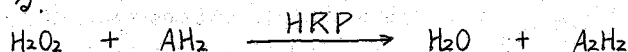
- 1) Jehamli, A.M.T., Stotter, D.A., and Wilson, M.T., (1976) *Eur. J. Biochem.* **71**, 613-616
- 2) Wilson, M.T., Ranson, R.J., Masiakowski, P., Carnecka, and Brunori, M., (1977) *Eur. J. Biochem.* **77**, 193-199
- 3) Harbury, H.A., and Loach, P.A., (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 3640-3645
- 4) Kimura, K., Peterson, J., Wilson, M., Carlson, D.J., and Williams, R.T.P., (1981) *J. Inorg. Biochem.* **15**, 11-25

ヘム酵素西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)におけるカルシウムイオンの役割 —ランタニドイオンプローブ法を用いるHRPの構造と機能に関する研究—

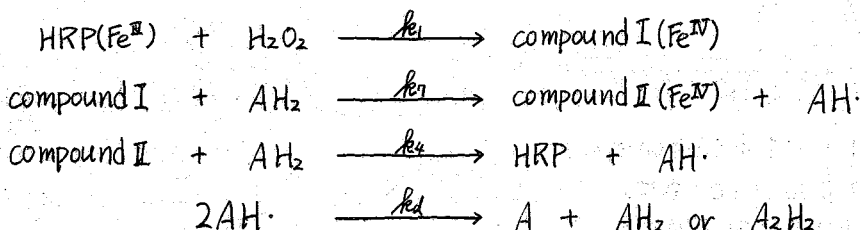
(京大・工) 森島 績,[○]黒野 益夫, 城 宜嗣

1. 序 論

西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)は、補欠分子族として、ヘム鉄が $Fe^{II}(S=\frac{5}{2})$ であるプロトヘムⅢを1分子含む分子量約42000のヘム酵素であり、過酸化水素(H_2O_2 ; 第一基質)による、フェニール・芳香族アミン等の各種電子供与体(AH_2 ; 第二基質)の酸化を触媒する。



この反応は以下の反応サイクルで触媒される。¹⁾



ここでcompound I, compound IIはもとの酵素に対し酸化当量がそれぞれ2当量および1当量高い反応中間体である。HRPには1分子に2つの α が結合しており、そのうちの1つが酵素活性と温度安定性に大きく寄与している。²⁾

最近、カルシウム結合タンパク質であるトロポニンCやパラバルブミンのカルシウムイオンがタンパク質の構造を変える事なく、常磁性シフト効果をもつランタニドイオン Pr^{3+} や Yb^{3+} で置換されること、またその際に新たにシフトされたシグナルが観測されることが明らかにされた。³⁾ 昨年の本討論会で我々は、 Yb^{3+} の結合したHRP(Yb^{3+})について報告したが、⁴⁾ 今回、種々のランタニド系イオンのHRPの α 結合部位への結合について詳細に調べ、それらを用いて α 結合部位周辺のより微細な構造について知見を得たのでここに報告する。

2. 実 験

HRPは東洋紡社G-C-I及びSigma社タイプIVを用い、塩酸グアニジン、EDTA溶液中に透析することにより、 α を除いた。⁵⁾ この α を除いたHRP($-\alpha$)にランタニド系イオンを含んだ水溶液を加えることにより、ランタニド系イオンの結合したHRP(L^{3+})を調製した。¹H-NMRスペクトルは、Nicolet NT-300を用い、QPD方式によるF.T.法により得た。化学シフトはサンプル中の水のプロトンシグナルを内部基準とし、低磁場側をプラスとした。

3. 結 果・考 察

もりしま いさお, くろの ますお, しろ よしつぐ

3.1. 酵素反応サイクルにおける Ca^{2+} の働き

Ca^{2+} が酵素活性に大きく寄与していることはすでに明らかにされてはいるが、反応サイクルのどの素反応に寄与しているかを調べるため、速度定数 k_1, k_2, k_4 を測定した。表1に結果を示す。 k_4 に Ca^{2+} の効果が現われることがわかる。これら測定された k_1, k_2, k_4 の値を用いて計算した酵素活性の割合は実験のそれとよい対応を示している。 Ca^{2+} が酵素活性を支える大きな役割を果たしていることは明らかである。

表1. 酵素反応サイクルの速度定数($\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)

	HRP(nat.)	HRP(- Ca^{2+})	re.HRP
k_1	1.60×10^7	1.42×10^7	1.57×10^7
k_2	1.06×10^4	1.31×10^4	1.30×10^4
k_4	7.87×10^2	3.97×10^2	7.26×10^2
酵素活性(計算)	100%	53%	94%
〃(実験)	100%	40%	80%

HRP(nat.): Ca^{2+} を除く前のもとの酵素

HRP(- Ca^{2+}): Ca^{2+} を除いた酵素

酵素活性は、 k_1, k_2, k_4 より求めた計算値と、実験より求めた実験値の二つを示した。それぞれの場合で、HRP(nat.)を基準として比較した。

3.2. ランタニド系イオンのHRP(- Ca^{2+})への結合

ランタニド系イオンをHRP(- Ca^{2+})に加え、その ^1H -NMRスペクトルを測定した。用いたイオンは、常磁性シフト効果をもつ Yb^{3+} , Pr^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} , そして反磁性のためシフト効果をもたない La^{3+} の計5種である。ランタニド系イオンはいずれも酵素と1:1でHRP(- Ca^{2+})に結合し、その活性は約70%まで回復した。又、これらの溶液に Ca^{2+} を滴下するとHRP(nat.)のスペクトルが再現した。これはランタニド系イオンが Ca^{2+} 結合部位に結合することを示している。図1にこれらのイオンの結合したHRPおよびもとのHRP(nat.)の ^1H -NMRスペクトルを示す。HRP(nat.)では観測されなかった多くのシグナルが高磁場側・低磁場側に観測された。これらのシグナルは反磁性である La^{3+} をHRP(- Ca^{2+})に加えたときには見られなかった。これらは、それぞれの金属イオンの電子状態の違いを反映して異なったスペクトルパターンを示す事から、HRPの Ca^{2+} 結合部位周辺のアミノ酸残基のプロトンシグナルがランタニドイオンの常磁性の影響でシフトしたものである事が確かめられた。ハム側鎖メチル基のプロト

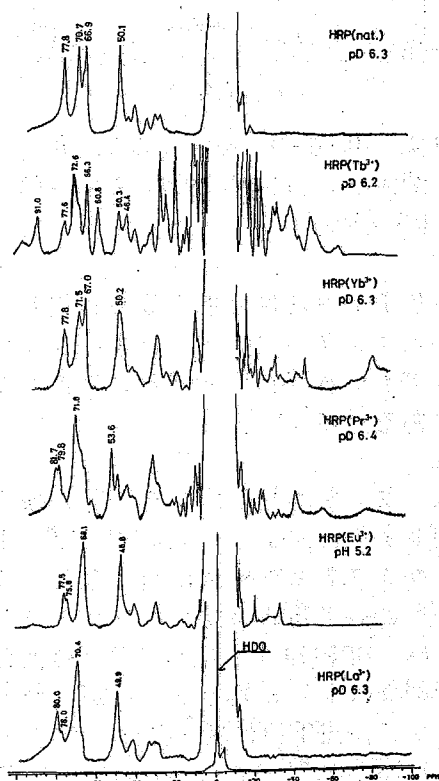


図1. ランタニド系イオンの結合したHRPの ^1H -NMRスペクトル 23°C

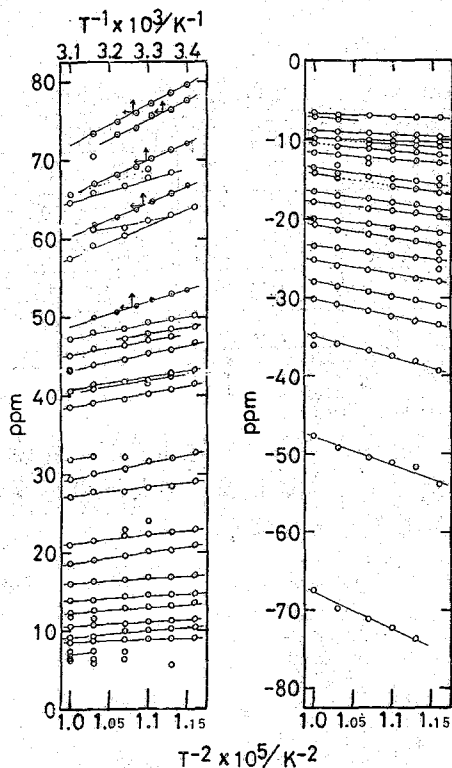


図2. HRP(P³⁺)のヘムメチルを $\frac{1}{2}$ に、 P^{3+} によってシフトしたシグナルを $\frac{1}{2}$ に対してプロット

ンシグナルは $\frac{1}{2}$ に比例するのに対し、それ以外のランタニドイオンによってシフトしたシグナルが $\frac{1}{2}$ に比例することからも明らかである。(図2)。

3.3. ランタニドイオンのシフト効果

Yb^{3+} によるdipolarシフトは P^{3+} , Tb^{3+} によるこれらのシフトと符号が反対である。すなわち Yb^{3+} によって高磁場側にシフトされたシグナルは、HRP(P^{3+}) HRP(Tb^{3+})では低磁場側に観測されることになる。事実、図1で示すように、HRP(Yb^{3+})の-80ppm付近のシグナルはHRP(P^{3+})では60ppm付近、HRP(Tb^{3+})では100ppm付近に観測される。このことは図3のシアニド体(Fe, S=1/2)のスペクトルにおいても観測された。

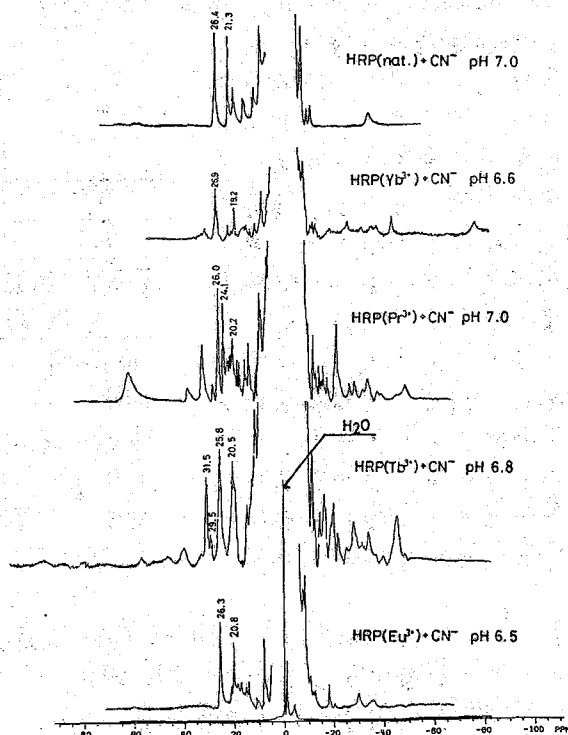


図3. ランタニド結合HRPのシアニド体の 1H -NMRスペクトル 23°C

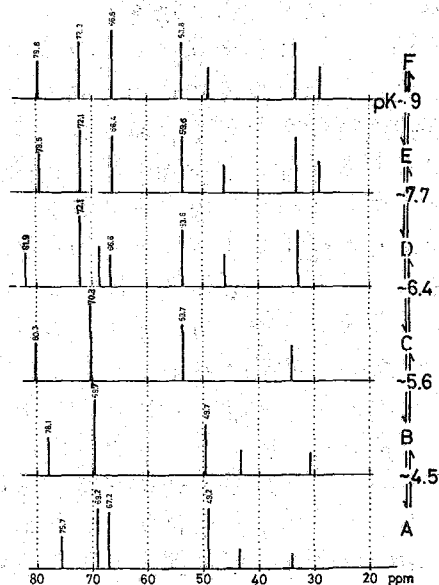


図4. HRP(P³⁺)の 1H -NMRスペクトルのpH依存性. 低磁場側のシグナルをスティックダイヤグラムで示した。

HRP(Yb^{3+})の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのpH依存性から $\text{pK} \sim 5$ と ~ 10 の2つの pK 値がすでに示され、AspかGlu、及びTyrが Ca^{2+} の結合に関与していると考えられていた⁴⁾。今回さらにはくわしく検討すると図4に示すように、HRP(Ln^{3+})のスペクトルのpH依存性から、 $\text{pH} \sim 4.4$ 、 ~ 6.2 付近でも小さく変化し、 $\text{pK} \sim 5$ 、 ~ 10 以外にさらに2つの pK 値が示唆された。これよりランタニドイオンには周辺に4~5のアミノ酸残基が配位し、残りの配位圏には5~4の水分子が配位していると考えられる。また、HRPの酸-アルカリ転移は、HRP(nat.)、HRP($-\text{Ca}^{2+}$)では共に $\text{pK} 11$ であったが、HRP(Tb^{3+})やHRP(Yb^{3+})では、酸-アルカリ転移は $\text{pH} \geq 12$ で起こる。このことは、HRP(Ln^{3+})では、HRP(nat.)やHRP($-\text{Ca}^{2+}$)に比べてタンパク部分の構造が異なっていることを示唆している。

3.5. ランタニドイオンの結合部位周辺の様子

図1のHRP(Yb^{3+})、HRP(Pr^{3+})のスペクトルでは共に高磁場側に約 -80ppm というトロポニンCやパラバルナミンでは観測されなかった非常に大きくシフトしたシグナルが観測された。このシフトされたプロトンとランタニドイオンとの距離をSykesらの方法により求め、距離 $r \approx 2.3\text{\AA}$ という値を得た。ランタニドイオン

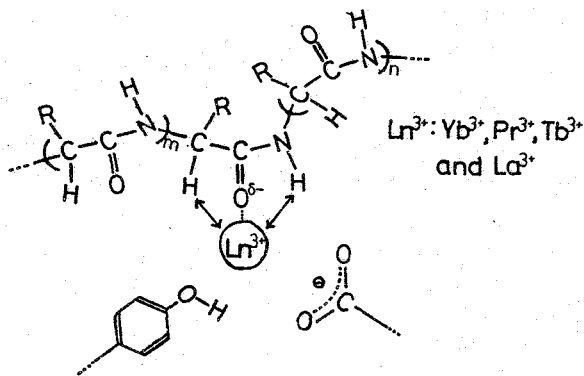


図4. ランタニドイオン結合部位周辺の模式図

から $2.3\text{\AA}$ というこのような短い距離にあるプロトンはアミノ酸残基の側鎖の置換基のプロトンでは考えにくく、ランタニドイオンは、タンパクの主鎖のペプチド部分のカルボニル基の酸素にも直接結合している可能性が考えられる(図4)。

3.6. 基質結合ならびにヘム鉄へのリガンド配位によるHRPのタンパク構造の変化
HRP(Yb^{3+})を用いて、このタンパク部分のシグナルをマーカーとして検討した結果以下のことが明らかとなった。

- 1) HRPはその酵素反応サイクルにおいて基質の結合に伴って、タンパク構造は大きく変化しない。
- 2) $\text{CN}^\ominus$ 、 $\text{N}_3^\ominus$ のリガンドの違いにより、タンパク構造の変化に有無があり、 $\text{CN}^\ominus$ が配位するとタンパク構造は変化し、 $\text{N}_3^\ominus$ では変化しない。

以上の結果をもとにHRPのタンパク構造と機能との関連性を総合的に考察する予定である。

4. 文 献

- 1) B.Chance, Arch. Biochem. Biophys., 41, 416 (1952)
- 2) Ogawa, S., Shiro, Y., Morishima, I., B.B.R.C., 90, 674 (1979)
- 3) Sykes, B.D. et al., FEBS Letters., 51, 169 (1980); Biochemistry., 19, 3208 (1980)
- 4) Shiro, Y., Morishima, I., 第20回 NMR 討論会講演要旨集, 115 (1981), 投稿中
- 5) Haschke, R.H. & Friedhoff, J.M., B.B.R.C. 80, 1039 (1978)

