

第32回NMR討論会

講演要旨集

日時 1993年11月4日(木)～6日(土)

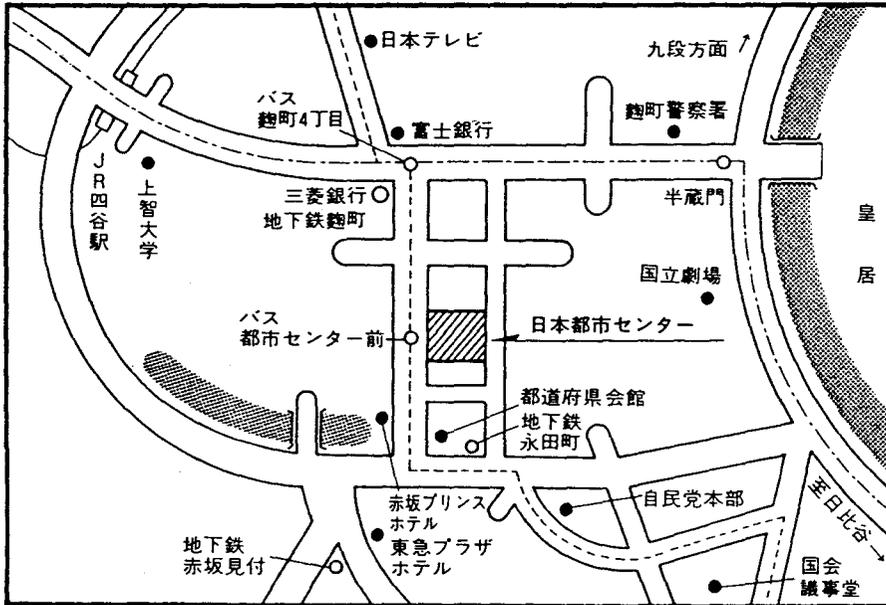
会場 日本都市センター

主催：日本化学会・日本薬学会・日本生物物理学会・日本生化学会
日本農芸化学会・日本分析化学会・高分子学会・日本物理学会

第32回 NMR 討論会 会場案内

日本都市センター

(東京都千代田区平河町 2-4-1)
電話 03-3265-8211



交通の御案内

<地下鉄>

- ・有楽町線 永田町駅より徒歩約2分
- ・丸の内線 赤坂見附駅より徒歩約5分

<JR>

- ・中央線 四谷駅より徒歩約15分

連絡先

〒152 東京都目黒区大岡山 2-12-1

東京工業大学工学部 高分子工学科

安藤 勲

TEL (03)3726-1111 内線 2139

FAX (03)3729-2786

第32回NMR討論会

プログラム

主催 日本化学会・日本生物物理学会・日本生化学会・日本分析化学会・
日本農芸化学会・日本薬学会・高分子学会・日本物理学会
日時 11月4日(木)～11月6日(土)
会場 日本都市センター
千代田区平河町2-4-1
電話 (03) 3265-8211
[交通] 有楽町線 永田町駅下車徒歩約2分
丸の内線 赤坂見附駅下車徒歩約5分
中央線 四谷駅下車徒歩約15分

一般講演 発表15分, 討論5分

11月4日(木)

(9:30-10:50)

座長 藤原英明

- L 1 クロロベンゾアントロンのNMRスペクトルにおける塩素置換の位置特異性と
準水素結合..... 1
(東邦大, 明星大) 竹川実・青木淳治・岩島聡・○上田豊甫
- L 2 アニリルリチウムとアニリンのLi-H交換に対するクラウンエーテルの効果... 5
(名工大・工) ○吉野明広・服部勇・中村典雅・高橋憲助

座長 北川 進

- L 3 水溶液中に形成された気体水和キレートに関する¹HNMRの研究..... 9
(物質研) ○早水紀久子・柳沢勝・菊地直人
- L 4 固体高分解能¹³C NMR法によるエチレンアイオノマーの構造解析..... 13
(名工大・材料工学) ○吉水広明・村田裕介・辻田義治・武井美幸・木下隆利

—休憩—

(11:10-12:10)

座長 松井 茂

- L 5 パルス磁場勾配NMR法による細胞内含¹⁹F化合物の制限拡散の解析..... 15
(生理研) ○瀬尾芳輝, ウテ アンマ, 石川透, 村上政隆
- L 6 磁場中に開放静置された水, 植物の緩和時間..... 19
(電総研) ○亀井裕孟
- L 7 PFG-NMR法を用いた多糖類ハイドロゲルの構造および内部の水の運動性に関
する研究 1..... 23
(東水産大) ○大塚章宏・渡部徳子

(12:30-15:00)

ポスターセッション

(15:00-17:00)

座長 横山茂之

- L 8 ベントDNAを認識する蛋白質、H-NSおよびその欠失断片の溶液構造..... 27
(東京薬大, 理研, 名大農, 中外製薬) ○神藤平三郎・岩城隆信・家田了一・
佐久間千勢子・松本潮・胡桃坂仁志・水野猛・久保庭均
- L 9 常磁性¹H-NMR飽和移動法によるフェリ型ミオグロビンの配位子結合反応の
研究..... 31
(東工大・生命理工, 西東京科学大・理工) ○山本泰彦・井上義夫・
中條利一郎

座長 稲垣 冬彦

- L 1 0 チトクロムC3の酸化還元電位とヘム軸配位子の性質…………… 35
(横浜国大・工) ○阿久津秀雄・平澤政明・M.M.Dhingra・堀住輝男
- L 1 1 坑けいれん作用を有するAralkyl Carbamate類のリン脂質リポソーム膜との
相互作用…………… 39
(神女薬大) ○杉浦眞喜子・山上知佐子

座長 阿久津 秀雄

- L 1 2 3重共鳴3次元、4次元NMRによるDNA結合蛋白質の構造解析…………… 43
(阪大・蛋白研) ○白川昌宏・松尾浩・上垣浩一・森田勇人・京極好正
- L 1 3 選択的同位体標識-NMR測定法における最近の進歩…………… 47
(都立大・理, 青学大・理工) ○甲斐荘正恒・楯真一・三宅洋子・鎌田創・
滝次由紀子・千野貴史・潮田利夫・鯨島達也

(17:00-18:20)

座長 瀬戸治男

- L 1 4 NMRによるショウジョウバエSxl蛋白質のRNA結合ドメインの解析…………… 51
(東大・理, 京大・理) ○武藤裕・木川隆則・武田佳宏・坂本博・志村令郎・
横山茂之
- L 1 5 多次元NMRによるタンパク質の構造解析…………… 55
(都臨床研, 日本バリアン) ○稲垣冬彦・神田大輔・永田宏次・畠中秀樹・
市川さおり・串田克彦

座長 神藤平三郎

- L 1 6 Nano-Scale Dynamics of Ferritin Channel as Revealed by ¹H NMR
Relaxation Techniques …………… 57
(新技術事業団) ○Daiwen Yang, 宝玉充・蝦名恵・永山国昭
- L 1 7 がん原遺伝子産物 c-Myb の DNA 結合領域及び特異的DNAとの複合体の
構造…………… 61
(横浜市大・総合理, 蛋白研, 阪大・蛋白研, 理研・筑波L S, 都臨床研)
○緒方一博・守川壮一・井上泰子・関川あい・佐々木元子・長土居有隆・
江成政人・張若・権娟大・北條裕信・相本三郎・中村春木・皿井明倫・
石井俊輔・西村善文

11月5日(金)

(9:00-10:00)

座長 京極 好正 (Y.Kyogoku)

- 特別講演 1
NMR in Biochemistry …………… 65
(Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, USA)
P.E.Wright

(10:00-11:00)

座長 斉藤 肇 (H.Saito)

- 特別講演 2
Multidimensional Solid State NMR of Polymers …………… 67
(Max-Planck Institute fur Polymerforschung, Germany)
H.W.Spiess

(11:00-12:00)

座長 森島 績 (I.Morishima)

特別講演 3
NMR Spectroscopy at High Pressure 69
 (Department of Chemistry, University of Illinois, USA)
 J.Jonas

(12:30-15:00)

ポスターセッション

(15:00-16:00)

座長 福井洋之 (H.Fukui)

特別講演 4
Some Recent Advances in Nuclear Shielding Calculations 71
 (Department of Chemistry, University of Surrey,UK)
 G.A.Webb

(16:00-17:00)

座長 赤坂一之 (K.Akasaka)

特別講演 5
Multinuclear and Multiple Quantum Filtered NMR Studies of the Heart 73
 (Department of Chemistry, Tel Aviv University)
 G.Navon

(17:00-18:00)

座長 甲斐荘正恒 (M.Kainosho)

特別講演 6
大きい系とNMR 65
 (東大・薬学部) 荒田洋治 (Y.Arata)

18:30 懇親会 (日本都市センターホール)

11月6日 (土)

(9:00-10:40)

座長 永山国昭

L18 シス-1,12-ジ置換[12]パラシクロファンの高圧高分解能NMR 81
 (神戸大・理) 山田博昭・椋野邦子・○梅田万美・前田孝泰・世良明

L19 NMR顕微鏡による植物組織のコンパートメントサイズの測定 85
 (農水省・食総研, 農水省・生物資源研, 日本電子データム) ○石田信昭・狩野広美・小川秀次郎

座長 亀井裕孟

L20 多重パルス2次元NMR法による液晶の同種核間双極子相互作用の新しい
 解析方法 89
 (京大・理) ○星野鉄哉・久保厚・寺尾武彦

L21 レーザー照射NMR法の開発とその応用 93
 (東工大・原子炉研) ○原田雅幸・富安博

L22 ¹³Cラベルした固体試料のMAS条件下での広帯域 J-HOHAHAと双極子
 HOHAHA実験 95
 (横国大・工, 日本電子・基礎研・生体研・NMグループ) ○藤原敏道・
 A.Ramamoorthy・永山国昭・樋岡克哉・藤戸輝昭

—休憩—

(11:00-12:40)

座長 遠藤一央

L 2 3 RPA/LORG法による視物質発色団の化学シフトの計算と構造の解析 97
(東工大・生命理工, 日本クレイ) ○和田光人・櫻井実・井上義夫・
田村祐介・渡辺庸一

L 2 4 化学シフトにおける電子相関効果 101
(北見工大) ○福井洋之・馬場雄久・松田弘喜・三浦宏一

座長 池田龍一

L 2 5 マジック角回転がスピン-格子緩和におよぼす影響 105
(物質工学工業技術研究所) ○林繁信・上田貴洋・早水紀久子

L 2 6 固体重水素NMRによる α -Lactalbuminの研究: リジン側鎖の
ダイナミクス 109
(北大・工, Calgary大) ○平沖 敏文・瀬川 和哉・H.J.Vogel・堤 輝廣

L 2 7 アセトキシおよびポリアセトキシトロポンの ^{17}O -ダイナミックNMRの研究 111
(第一薬大) ○加藤祐子・小川晴・野上靖純・古賀俊隆

(12:40-15:00)

ポスターセッション

(15:00-16:20)

座長 堀井文敬

L 2 8 固体高分解NMRによるカルドポリマーの構造研究 115
(新日鉄) ○斉藤公児・手島志帆・島山盛明・藤城光一・川里弘信・
古川雅也・寺本武郎

L 2 9 固体DNP(Dynamic Nuclear Polarization)- ^{29}Si NMR法によるシリカ
表面の選択的観察 119
(コロラド州立大) ○小林淳二・G.E.Maciel

座長 寺尾武彦

L 3 0 温度可変選択励起SASS ^{13}C NMRによる高分子の分子運動解析 123
(京大化研) 別府隆幸・高江洲昇・石田正登・○堀井文敬

L 3 1 固体高分解能 ^{13}C -NMRによるポリオレフィンの構造解析 127
(農工大・工, 徳山曹達) ○青木明良・伊達健・出村誠・林哲男・
朝倉哲郎

—休憩—

(16:40-18:00)

座長 朝倉哲郎

L 3 2 固体高分解能NMRによる距離測定 (I) 131
REDORによる ^{13}C - ^{15}N 精密原子間距離測定の基礎検討
(姫路工大・理, 東レリサーチ) ○内藤晶・西村勝之・荻野純一・辻暁・
斉藤肇

L 3 3 ^{15}N NMRによるポリペプチドの固体構造解析:
ポリ(β -ベンジル L-アスパラテート) 135
(群大・工, 東工大・工) ○芦川幹也・莊司顯・尾崎拓男・安藤勲

座長 内藤 晶

L 3 4 固体NMRによるアスパルテーム結晶の構造研究
—分子動力学計算によるスペクトルの解釈— 139

(味の素・中研, 北里大・薬) ○海老沢計慶・鈴木榮一郎・福原健一・
公文哲・米田茂隆・梅山秀明

- L 3 5 液晶NMR法の改良と応用。マジック角近くでの試料回転と二次元NMR …… 141
(阪大・薬) 鹿野哲司・高木達也・木村敦臣・○藤原英明

ポスターセッション演題

11月4日(木)

技術

- P 1 NMRの検出感度表 …… 145
(シーメンス旭メディテック) 入口紀男
- P 2 磁場勾配パルスを用いたHMBC法 …… 147
(理研, 日本電子, 理科大) ○輪澤洵・内海博明・越野広雪・日元徹・
安斎謙太郎
- P 3 1800℃まで昇温可能なNMR装置と無機化合物への応用 …… 151
(北大・理, 北大・工) ○前川英己・中尾俊章・加藤智史・横川敏雄・
下川繁三
- P 4 磁場勾配パルスを用いた多次元NMR …… 153
(日本電子) ○内海博明・阿部敦・山崎千春・日元徹・今成司
- P 5 ステアリン酸の固体構造研究における固体高分解能NMR法 …… 157
(東工大・工) ○荒田晋・黒子弘道・安藤勲
- P 6 多次元NMRデータの半自動解析システムの構築 …… 161
(都臨床研) ○市川さおり・畠中秀樹・神田大輔・永田宏次・稲垣冬彦
- P 7 トリプルレゾナンスNMR法を用いたフッ素化合物の構造解析手法の開発 …… 163
(セントラル硝子, 日本電子, 東工大・工) ○加藤悦子・小椋賢治・安藤勲
- P 8 固体における¹³C-¹⁵N間ペークダブレット観測のためのCPMG系列のパルス不
完全性効果の解析と改良型系列の提案 …… 167
(京大・理) ○石井佳替・芦田淳・寺尾武彦

理論

- P 9 固体状態におけるポリピロールの構造と電子状態 …… 171
(東工大・工) 菊池瑞代・○黒子弘道・安藤勲
- P 1 0 NMRケミカルシフトに及ぼす重原子効果 …… 175
(三菱製紙・筑波研) ○遠藤一央・山本京之介・藤田郁夫・相田正之

固体NMR

- P 1 1 交差緩和時間測定による合成高分子ゲル及びマウス水晶体内の水構造の研究 …… 179
(岐阜大・医, 藤田保衛大) ○恵良聖一・中村浩二・曾我美勝・高橋昭彦・
中上寧
- P 1 2 固体高分解能²⁹Si-NMRによるポリシランの構造研究 (II) …… 183
(神奈川大工, 東工大・工) ○高山俊夫・安藤勲
- P 1 3 固体¹⁵N NMRによる芳香族ポリアミドならびにポリイミドの構造解析 …… 185
(農工大・工, 三井東圧化学) ○出村誠・呂奏洪・朝倉哲郎・浅沼正
- P 1 4 p-t-ブチルカリクス[4]アレン包接化合物の固体高分解能NMRによる研究 …… 189
(群大・工, 東工大・工, 金沢大・工) ○山延健・中村一成・日比野和伸・
甲本忠史・黒子弘道・安藤勲・中本義章・石田真一郎
- P 1 5 固体状態におけるポリ(γ-n-アルキルL-グルタメート)の構造と分子
運動 (IV) …… 193
(東工芸大・工, 群大・工, 東工大・工) ○内藤良之・山延健・植松淑子・
安藤勲

甲本忠史・黒子弘道・安藤勲・中本義章・石田真一郎

- P 1 5 固体状態におけるポリ (γ -n-アルキル L-グルタメート) の構造と分子運動 (IV) 193
(東工芸大・工, 群大・工, 東工大・工) ○内藤良之・山延健・植松淑子・安藤勲
- P 1 6 重水素NMR法による液晶分子のコンホメーション解析 [2] 197
(東大教養) 鳥海弥和
- P 1 7 固体高分解能NMRを用いたポリビニルアルコール/ポリ (3-ヒドロキシブチラート) ブレンドの相溶性の検討 201
(東工大・生命理工) ○吉江尚子・東洋一郎・櫻井実・井上義夫
- P 1 8 ^{13}C CP/MAS-NMRによる油脂 (トリグリセリド) 結晶の解析 205
(不二製油・つくば研究開発センター) ○杉本恭子・有島俊治・佐藤清隆・木綿良介
- P 1 9 固体高分解能NMRによる距離測定 (II)
2D SLDF/CP-MAS NMRによるN-H原子間距離測定と水素結合との関連 207
(姫路工大・理) 内藤晶・福谷章・辻暁・○齊藤肇
- P 2 0 マジックエコーシーケンスによる ^1H - ^{13}C 交差分極 211
(住友化学・筑波研, 筑波大・物理工学) ○三浦等・松井茂
- P 2 1 固体2次元NMR法の高分子混合体への応用 213
(北大・理) ○竹腰清乃理・手塚亮典・引地邦男
- P 2 2 固体高分解能 ^{17}O NMRによるグリシン残基を含むペプチドの構造研究 217
(東工大・工, 群大・工) ○黒木重樹・高橋昭裕・安藤勲・莊司顯・尾崎拓男
- P 2 3 ハロゲン化ウラシルの ^{13}C -CPMAS NMRスペクトルにおける核四極子効果 221
(阪大・教養・理) ○永阪文憲・武田定・中村巨男
- P 2 4 状態相関二次元NMR。液晶分子の配向、構造、相互作用への応用 223
(住友化学, 日本電子, 神戸大学, 姫路工大) 木村雅晴・河原広典・今成司・藤原健一朗・奥田雄司・内藤晶・○赤坂一之

11月5日 (金)

生化学

- P 2 5 ^2H -NMR及び分子動力学/自由エネルギー計算による局所麻酔剤ジブカインの膜中での配向及びコンホメーション 225
(京大・薬学, 京都薬科大) ○黒田義弘・小川雅弘・川畑隆博・木山泰範・藤原靖弘・中川照真
- P 2 6 アリールマロン酸脱炭酸酵素の反応中間体のNMRによる構造研究 229
(新日鉄, 慶大・理工) ○手島志帆・斉藤公児・川崎平康・大田博道
- P 2 7 ディスタンスジオメトリ法および ^1H -NMR化学シフト計算によるタンパク質の立体構造解析 233
(農工大・工, 国際基督教大・日本電子) ○菊地淳・朝倉哲郎・成田光章・梅本公子・藤田憲一
- P 2 8 ET_B アンタゴニストRES701-1, RES701-2の溶液中の構造解析 237
(協和発酵) ○片平律子・松田譲・山崎基生・好田真由美
- P 2 9 一点修飾シクロデキストリンの分子内相互作用により形成される疎水性空洞の解析 239
(東工芸大・工) 高橋圭子・○島田利治・繁森禎夫・服部憲治郎
- P 3 0 コリシン免疫蛋白質の高次構造とコリシン活性ドメインとの相互作用の解析 243
(東大・農, 東大・理, 蛋白質工学研究所) ○大野光宏・矢嶋俊介・武藤裕・守川壮一・中村春木・横山茂之・正木春彦・魚住武司
- P 3 1 多次元NMRによるリボヌクレアーゼHの低分解能構造解析 247
(トロント大・医, 日本電子・基礎研, 東大・教養) 山崎俊夫・○加藤敏代・藤原正子・永山国昭

P 3 4	スピン拡散を利用したマスト細胞のヒスタミン分泌の解析 (京都府医大・生理) ○吉崎和男・早野尚志・有蘭直樹	259
P 3 5	脂質モデル膜の配向に影響を及ぼす脂質-ナイスタチンコンプレックスの 構造と機能に関する研究 (阪大・薬) ○木村敦臣・鹿野哲司・高木達也・藤原英明	263
P 3 6	無細胞蛋白質合成システムによる蛋白質の安定同位体標識 (東大・理) ○木川隆則・武藤裕・横山茂之	265
P 3 7	3重共鳴3D/4D NMRによるヒトc-Ha-Rasタンパク質の解析 (東大・理, 理研・バイオデザイン, 東大・工, 蛋白工学研, 日本ブルカー, 萬有製薬) ○伊藤隆・岩原淳二・仲野徳・山崎和彦・武藤裕・河合剛太・ M. Wächli・西村暹・宮澤辰雄・横山茂之	267
P 3 8	大腸菌イソロイシンtRNAとイソロイシルtRNA合成酵素との相互作用 (東大・理, 横国大・工, 東大・工, 蛋白工学研, 三菱化成・生命研) ○新美達也・武藤裕・河合剛太・春木満・河野俊之・村松知成・高柳正明・ 野口智明・林信宏・渡辺公綱・宮澤辰雄・横山茂之	269
P 3 9	安定同位体標識を用いたRNAオリゴマーの構造解析 (東大・理, 東大・工, 日本酸素・つくば研, 京大・理) ○渡部暁・河合剛太・ 福田裕章・井上丹・渡辺公綱・横山茂之	271
P 4 0	固体NMRによる長鎖ポルフィリン液晶の相転移挙動の研究 (大阪工技研) ○赤井智子・清水洋・山本仁・山中裕・見矢勝・永田章	273
P 4 1	PFGE-NMR法による食品中の水の拡散係数測定 (東京水産大, 農業研究センター) ○福岡美香・張偉文・渡辺尚彦・島田信二	275
P 4 2	¹ H-NMRによるカルボキシメチル化RNase T ₁ の熱安定化研究 (味の素・中研, 東大・理) ○水越利巳・宮野博・鈴木榮一郎・小島正樹・ 田之倉優・高橋健治	277
P 4 3	3次元NMRの天然有機化合物への応用 - 分子量3422の海洋天然物マイトト キシンの3D PFG-NOESY HMQC スペクトル (東北大・農, 日本電子) ○佐竹真幸・石田周・村田道雄・安元健・ 内海博明・日元徹	279
P 4 4	固体重水素NMR法のCa ²⁺ 結合蛋白質への応用 (北大・理) ○森安真彦・大木進野・竹腰清乃理・引地邦男	283
P 4 5	ガンマ毒butadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用(2) 主として α -pyrone環開裂化合物の構造について (神奈川大・理, 北陸大・薬学) 釜野徳明・○張恵平・小竹文乃・木津治久	285
P 4 6	部位特異的アミノ酸置換 P450camのNMRによる構造解析(2) (京大・工, 慶応大・医, 姫工大・理) ○若杉桂輔・石森浩一郎・森島嶺・ 島田秀夫・牧野龍・石村翼	289

11月6日(土)

ダイナミックス

P 4 7	¹³ C-固体NMR法によるチタニルフタロシアニンの分子運動の研究 (三菱化成, 東京水産大) ○原園としえ・横田悦造・渡部徳子	291
P 4 8	固体重水素NMR法によるPBLG側鎖の動的構造 (北大・工) ○北澤聡・平沖敏文・堤耀廣	295
P 4 9	¹ H PGSE NMR・ ¹³ C PST/MAS NMR法を用いた高分子ゲル中の網目高分子 および溶媒の構造と分子運動の研究 (北大・理, 東工大・工) ○安永秀計・黒子弘道・安藤勲	299
P 5 0	VDCN/VAc交互共重合体の ¹ H- ¹³ C核磁気交差緩和I. 強誘電的ドメインサイ ズの評価 (北大・工, 三菱油化) ○石井文明・金井輝人・堤耀廣・岸本学・瀬尾巖	303
P 5 1	ポリマーブレンド中のスピン拡散の研究	307

(北大・理) ○浅野敦志・竹腰清乃理・引地邦男

有機化学

- P 5 2 ^{13}C NMR化学シフトに対する重水素同位体効果の炭素-水素結合距離への依存性…………… 309
(名工大・応化, メニコンR & D) ○中島康喜・鈴木利弥・寺西卓・高橋憲助
- P 5 3 NMRによるDiphenylacetyleneのアルカリ金属還元過程の追跡…………… 313
(筑波大・化) ○横山幸弘・菊池修
- P 5 4 等価核のNMR的非等価性に着目した対称分子の構造解析法(3)
 ω_1 hetero half-filterの1D化による等価な ^1H への2つの $^1J_{\text{CH}}$ の区別…………… 315
(北大・農) 川端潤・○福土江里
- P 5 5 C_{60} 結晶にとりこまれたベンゼンやトルエンなどの存在状態…………… 319
(阪大・理, 東工大・工材研) ○武田定・山口兆, 田中俊明・川路均・阿竹徹

無機化学

- P 5 6 ^{13}C NMRによる水溶液中でのアルカリ土類金属イオン-カルボン酸間の相互作用に関する研究…………… 321
(上智大・理工) ○近藤晃子・大井隆夫・向田政男
- P 5 7 塩化プテリアンモニウムのRotator相における ^{35}Cl , ^2H NMRと分子運動…………… 325
(筑波大・化, 電総研, 無機材研, 筑波大・物理工, ドイツブルカー)
○服部賢和・大木寛・池田龍一・服部峰之・小野田義人・恵良田知樹・M.E.Smith
- P 5 8 柔粘性結晶アルカリ金属亜硝酸塩における ^{15}N NMRスペクトルと分子運動…………… 327
(筑波大・化, 筑波大・物理工, 広島大・学校教育) ○本多尚・鋸持基子・大木寛・池田龍一・恵良田知樹・田崎明・古川義宏
- P 5 9 ^1H 2次元交換マジック・アングル・スピニング(MAS)NMR法によるゼオライトNa-ZSM-5/p-キシレン包接化合物の研究…………… 329
(京大・理, プリテイシュ.コロンビア大) ○久保厚・Anil Dubey・Charles A. McDowell
- P 6 0 ニオブ錯体の ^{93}Nb NMR化学シフトの酸化数および配位子依存性…………… 333
(埼大・理, 阪大・基礎工) 永澤明・○笠谷尚史・川口博之・巽和行
- P 6 1 固体高分解能 ^{109}Ag NMRスペクトルを用いた銀(I)錯体の研究(2)…………… 337
(近畿大・理工総研, 都立大・理) ○前川雅彦・本田憲治・北川進・川田知・近藤満

イメージング

- P 6 2 ウシ血漿アルブミン溶液, ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究
-Magnetization Transfer Contrast(MTC) Imagingの基礎的研究…………… 341
(藤田保衛大・総医研・分子生理, 岐阜大・医, 筑波大・物工生理研)
○曾我美勝・恵良聖一・桑田一夫・高崎昭彦・恵良田知樹・田崎明・江尻和隆・梶原孝彦・加藤一夫・中村浩二・亘弘
- P 6 3 ^1H NMRイメージング法による高分子ゲルの電氣的刺激一応答についての研究…………… 345
(東工大・工, 北大・理) ○渋谷智弘・安永秀計・黒子弘道・安藤勲
- P 6 4 超高速NMR映像法によるTaylor渦流の速度場計測…………… 349
(筑波大・物理工) ○巨瀬勝美
- P 6 5 ^{31}P NMRによる筋エネルギー代謝機能の解析…………… 353
(環境研, 東大・教養, 筑波大・体育科学系) ○三森文行・久野譜也・鮮子撰・浅野勝己
- P 6 6 ラット脳内微量成分のNMRによる解析…………… 357
(日本女子大・理, 国立精神・神経センター) ○高橋征三・荻野孝史
- P 6 7 プロトン感度を利用したラット脳内 ^{13}C -標識代謝産物の追跡…………… 361
(滋賀医大・分子神経・脳外, 京大・医) ○犬伏俊郎・森川茂廣・木村亮之・半田譲二・鬼頭幸一・荒井俊之

- P 6 8 The Application of Cl NMR Null Point Spectral Analysis to the Study of Chloride Ion Binding to Human Serum Albumin 363
(物質研, National Taiwan University) ○William S. Price,
Nien-Hui Ge, Luan-Ze Hong and Lian-Pin Hwang
- P 6 9 Secondary Structure and Signal Assignments of HIV-1 Protease Complexed to a Novel Structure-Based Inhibitor by Heteronuclear Multidimensional NMR Spectroscopy 367
(NIH) ○Toshimasa Yamazaki, Linda K. Nicholson and Dennis A. Torchia

参加費 当日 (一般) 8,000円、 (学生) 5,000円

懇親会 11月5日 (金) 18時30分より、日本都市センターホールにて。
当日会費 (一般) 7,000円、 (学生) 4,000円。

第 1 日 目
11月 4 日 (木)

L 1 ~ L17

クロロベンゾアントロンのNMRスペクトルにおける
塩素置換の位置特異性と準水素結合

竹川 実、青木淳治、岩島 聡*、○上田豊甫*

東邦大 理 化、明星大 理工 化*

**Complete Assignment of ^1H and ^{13}C NMR Spectra of
Chlorobenzanthrones and Substitution Effects
of Cl and Quasi Hydrogen Bond**

Minoru Takekawa, Junji Aoki,

Satoshi Iwashima* and Otoyotoshi Ueda*

Department of Chemistry, Toho University,

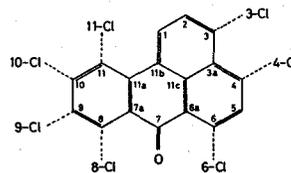
*Department of Chemistry, Meisei University

^1H and ^{13}C NMR studies were carried out on benzanthrone, 3-, 4-, 6-, 8-, 9-, 10- and 11-chlorobenzanthrones. Complete assignments of proton and carbon resonances were made with the aid of HH-COSY, HH-NOESY, CH-COSY and HMBC techniques. Substitution effects of chlorine are not large, but give a systematic change particularly to ^{13}C shift values. Anomalous downfield shift of the H(1) signal in 11-chlorobenzanthrone was explained by the electrostatic attraction with the opposite electronegative Cl atom like hydrogen bond, which was supported by the result of an MNDO-PM3 calculation.

縮合多環芳香族化合物は二次元 π 電子系として、優れた建染め染料の原料となるほか、珍しい半導体特性や導電性・光伝導性を示す。n-クロロベンゾアントロン(n-Cl)はベンゾアントロン(Bz)のnの位置を塩素置換したもので、上記化合物の出発原料であり、多数の異性体を単離精製し構造確認をする事が必要である。500MHz二次元 NMRは狭い領域の ^1H , ^{13}C の全シグナルの完全帰属を行うことが出来、多環芳香族異性体の構造同定に最適であることが判明した。解析の結果、両シグナルのBzからの化学シフト変移は、塩素原子を π 電子系に組み入れた形での局所構造を強く反映することが見出された。また 11-ClにおいてH(1)だけが極端に大きく低磁場シフトし、堅い π 電子配置に固定されたためにClとHの間に水素結合に類似した静電的相互作用が生じていることが認められた。本結果は先に報告した¹⁾、Bz骨格の各位置に芳香族六員環を縮合した場合に見られる C=Oとsp² CH間における準水素結合の存在を、確認しさらに拡大したものと考えられる。

〔実験〕

n-Clの合成はアントラキノンを出発原料として3法により行った。2-クロロアントラキノンのグリセリン縮合により4-Cl(mp. 198-199°C, λ_{max} 390nm)、9-Cl(185-186.5°C, 392nm)、10-Cl(187-188°C, 384nm)が得られた。1-クロロアントラキノンのグリセリン縮合からは6-Cl(147-148°C, 384.5 nm)、8-Cl(183.5-184.5°C, 387.4nm)、11-Cl(175-175.5°C, 387nm)が得



キーワード：2D- ^1H ^{13}C NMR、クロロベンゾアントロン、準水素結合、塩素置換効果

たけかわ みのる、あおき じゅんじ、いわしま さとし、○うえだ とよとし

られた。アントラキノンを経リセリン縮合して得られるBzの塩素化では3-Cl(179-180°C, 394nm)が得られた。

NMRの測定はJEOL JNM A-500分光器 (^1H 500MHz; ^{13}C 125.7MH) を使い、約3mgの試料をDMSO-d₆ 0.5mlに溶かし径5mmの試料管に封じて、90°Cに保持して行った。 ^1H および ^{13}C の一次元測定は65536点を用い、スペクトル幅を10000及び33898Hzとし、拡大因子を0.01及び0.5Hz、遅延時間を5及び3秒とし、44回及び3000回積算して行った。二次元HH-COSY及びHH-NOESY(混合時間750 μs)によって ^1H の帰属を、CH-COSY($^1\text{J}_{\text{H-C}} \sim 145\text{Hz}$)及びHMBC($^3\text{J}_{\text{H-C}} \sim 7\text{Hz}$)によって ^{13}C の完全帰属を行った。HMBCの測定は512 \times 256の点を各点256回積算して、その後両座標とも0を満たして1024点としSBELL形のウィンドウ関数を用いて換算した。多環芳香族のHMBCでは ^1H から結合3本隔てた ^{13}C の交差ピークが非常に規則的に現れた。唯一の例外としてCl置換した ^{13}C では結合2本隔てた交差ピークが弱く現れることもあった。

〔結果および考察〕

Bzおよびn-Cl合計8つの化合物の一次元 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルを図1、2およびTable 1, 2に示す。図1、2では比較しやすいように横軸の化学シフト値を揃えてあり、中に記した数字は各シグナルに帰属された位置である。一見して分かることは、各シグナルが親分子Bzのものにかなり良く対応していること、 ^1H ではtripletパターンが高磁場側にくること、塩素で置換された ^{13}C は低磁場シフトする事などである。17個全ての ^{13}C

Fig.1 ^1H spectra of Bz and n-Cl's

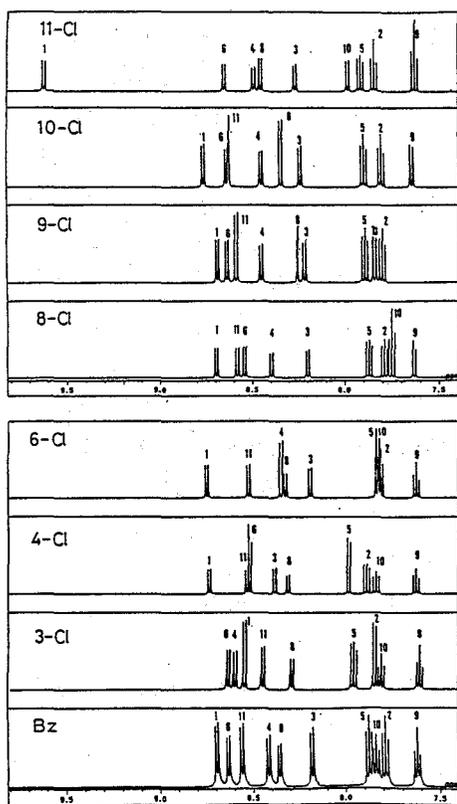
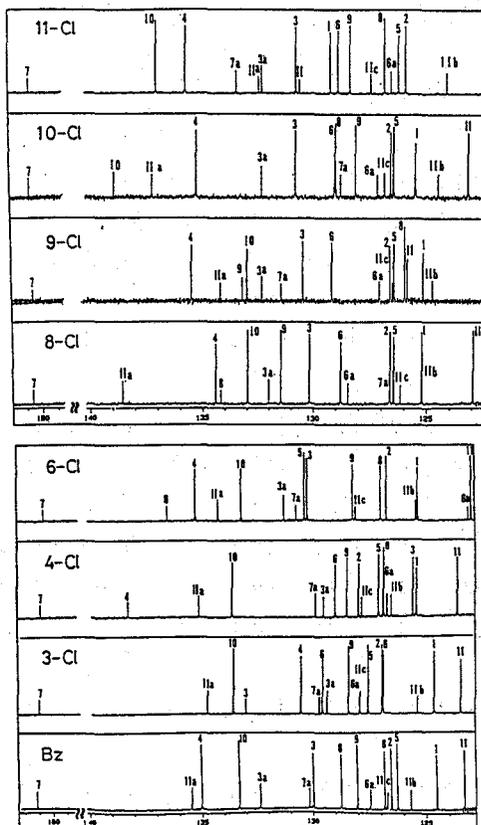


Fig.2 ^{13}C spectra of Bz and n-Cl's



のシグナルが分離して観測された (CH-COSY から8-ClのC(1)とC(11b)は125.25ppm に重なる) ことから、多環芳香族の解析には500MHzが必要なことが分かる。縮合環にCHが1個2個3個4個接続した通常のパターンは s; d, d; d, t, d; d, t, t, d となるが、良く分解されたパターンで

は後者2つがdd, dd, dd; ddd, ddd, ddd, ddd となる。例えばBzの H(8, 9, 10, 11)では最後の4つの ddd パターンとなり、スピン結合定数は

$J_{8,9}=7.8\text{Hz}$,
 $J_{9,10}=7.2\text{Hz}$,
 $J_{10,11}=8.1\text{Hz}$,
 $J_{8,10}=1.5\text{Hz}$,
 $J_{9,11}=1.1\text{Hz}$,
 $J_{8,11}=0.5\text{Hz}$ と算出される。

n-Clのシフト値の親分子Bzからの変移を

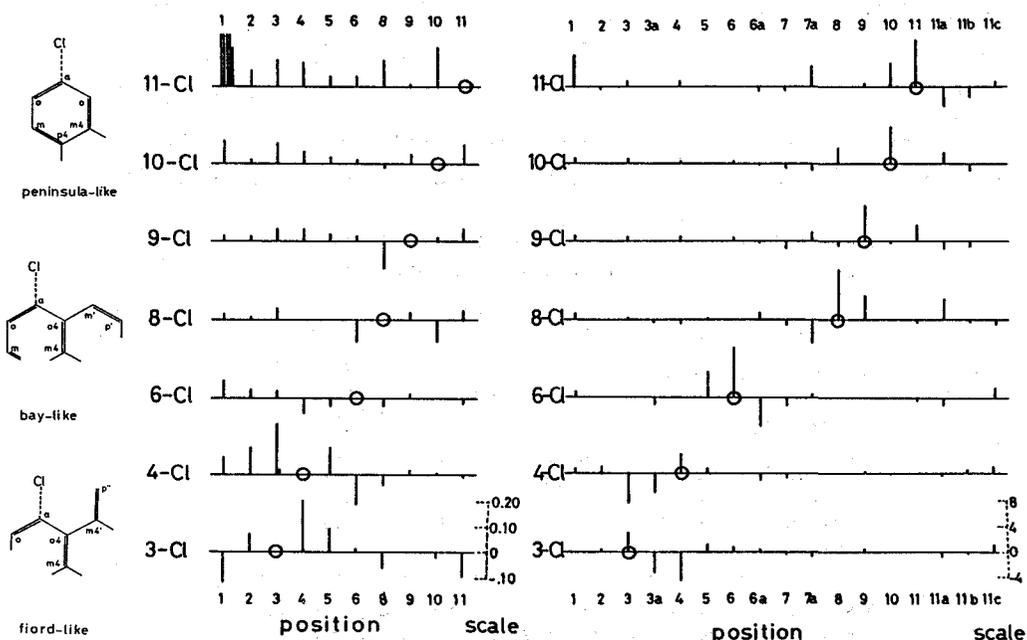
Table 1. ^1H chemical shifts of chlorobenzanthrones (ppm)

Proton	Bz	3-Cl	4-Cl	6-Cl	8-Cl	9-Cl	10-Cl	11-Cl
1	8.67	8.55	8.74	8.74	8.69	8.69	8.76	9.62
2	7.78	7.85	7.89	7.817	7.79	7.80	7.80	7.84
3	8.16	--	8.38	8.19	8.20	8.21	8.24	8.26
4	8.40	8.60	--	8.34	8.40	8.45	8.45	8.49
5	7.87	7.96	7.98	7.832	7.87	7.90	7.90	7.91
6	8.62	8.63	8.51	--	8.54	8.64	8.64	8.65
8	8.35	8.29	8.31	8.32	--	8.25	8.34	8.45
9	7.61	7.61	7.63	7.63	7.64	--	7.65	7.62
10	7.83	7.81	7.84	7.828	7.75	7.84	--	7.98
11	8.54	8.45	8.53	8.52	8.58	8.59	8.62	--

Table 2. ^{13}C NMR chemical shifts of chlorobenzanthrones (ppm)

Carbon	Bz	3-Cl	4-Cl	6-Cl	8-Cl	9-Cl	10-Cl	11-Cl
1	124.56	124.61	125.39	125.32	125.25	125.19	125.54	129.23
2	126.55	126.89	127.92	126.69	126.66	126.65	126.63	125.93
3	129.97	132.92	125.55	130.18	130.23	130.50	130.85	130.78
3a	132.37	129.29	129.46	131.22	132.05	132.36	132.38	132.32
4	135.01	130.46	138.22	135.23	134.47	135.54	135.35	135.78
5	126.28	127.49	127.05	130.31	126.50	126.48	126.50	126.24
6	128.73	129.50	128.94	136.48	128.83	129.21	129.08	128.88
6a	127.46	127.86	126.68	123.14	128.48	127.12	127.21	126.56
7	182.25	181.78	181.61	181.11	181.36	181.17	181.47	181.40
7a	130.16	129.64	129.82	130.68	126.68	131.49	128.82	133.47
8	126.84	126.84	126.84	126.95	134.22	126.00	129.04	126.86
9	128.02	128.34	128.43	128.16	131.51	133.24	128.17	128.37
10	133.31	133.51	133.58	133.16	133.02	133.03	139.00	137.10
11	123.36	123.46	123.63	123.01	123.00	125.89	123.24	130.61
11a	135.45	134.68	135.08	134.21	138.59	134.24	137.31	132.46
11b	125.70	125.32	126.49	125.41	125.25	124.78	124.54	124.13
11c	126.72	127.84	127.77	128.04	126.19	126.55	126.91	127.44

Fig. 3 ^1H shift diff. of n-Cl's from Bz Fig. 4 ^{13}C shift diff. of n-Cl's from Bz



$\Delta\delta_H(n\text{-Cl}) = \delta_H(n\text{-Cl}) - \delta_H(\text{Bz})$ 、及び $\Delta\delta_C(n\text{-Cl}) = \delta_C(n\text{-Cl}) - \delta_C(\text{Bz})$ として示したものが図3、4である。 ^1H 変移を見ると、11-ClのH(1)が異常に低磁場シフトしていることが分かる。次に大きな変移は3-Cl及び4-Clにおいてペリ位置の4位及び3位のプロトンが大きく低磁場シフトしている事である。これと対照的なことが図4に見られ、ペリ位置が ^{13}C で大きく高磁場シフトしている。即ち電気陰性度の大きなCl原子が隣接したために $\text{C}^{\delta+}-\text{Cl}^{\delta-}$ と $\text{H}^{\delta+}-\text{C}^{\delta-}$ と部分電荷を生じ結合分極をもたらしていることが分かった。この分極により、アルカリ融解中の二分子縮合は3-4, 4-3, 4-7 で進行することがよく理解できる。

図4の ^{13}C 変移を見ると塩素がどのような局所構造に置換されたかによって、変移が特徴付けられることが分かる。スキームのように1- α 、 β 、 γ 、半島状(peninsula-like; 9-C1, 10-Cl)、湾状(bay-like; 3-Cl, 4-Cl)、入江状(fiord-like; 6-Cl, 8-Cl, 11-Cl)にわけて考えると、順に $\alpha \gg p(-) > m \gg o$, $\alpha \gg m > m4 > p(-)$, $m'(-) > \alpha \sim o4(-) > p' > m4$, $\alpha \gg o \sim o4(-) > m4 > m4'(-)$ と全く異なる。ここに α はCl置換位置、 o, m, p は α, β, γ , β' 位を示し、4は四級炭素、'は隣接環、(-)は高磁場シフトを示す。しかし各グループ内ではよく似ており、脂肪族化合物と同じような加成則があり得ることが認められる。

11-Clの異常な低磁場シフトは9, 8- β 、 γ 、 β' 、 γ' の準水素結合と同類のものと考えられる¹⁾。後者では同位体置換、MS・IRスペクトル、分子軌道法によっても確かめた。後者の $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{C}$ では $\text{C}=\text{O}$ の異方性効果が大きいと思われるので、異方性効果のずっと小さい $\text{C}-\text{Cl}\cdots\text{H}-\text{C}$ で準水素結合を検討したものである。MSでもH(1)が極端にとれ易いことが分かった。MOPAC Ver. 6. 02による4異性体のMNDO-PM3の計算結果をTable 3に示す。本法の二中心エネルギー E_{AB} は通常の場合の結合エネルギーに相当するもので値自身は3倍ほど大きな値を示すが、定性的には信頼できるとされている。 $\text{Cl}\cdots\text{H}_{\text{nearest}}$ 間では11-Clのみ-0.76 eVの安定化を示し、さらにこの両端原子を繋ぐ2つの結合C-Clと $\text{C}\cdots\text{H}_{\text{nearest}}$ においても11-Clのみ0.2, 0.4eVほど不安定になっている。他の結合・非結合領域では全く変化がない。これは $\text{H}_{\text{nearest}}$ からClに電子が流れ、水素結合に準じた静電的引力相互作用を及ぼし、その反動として隣接2結合が弱まったものと考えられる。即ち縮合多環において、相似た原子間で過密を生じたときは反発して環の上下に振じれるが、陰陽原子の近接においては静電的に引き合って過密を緩和するものと解される。

1) β, γ , 森山、竹川、青木、大藪、岩島、上田; 日本化学会第65春季年会2A704(1993).

Table 3. Two-center bond energies ($^a E_{AB}$, eV) for 3-Cl, 8-Cl, 9-Cl and 11-Cl benzanthrones by MNDO-PM3

bond	E_{AB}/eV			
	3-Cl	8-Cl	9-Cl	11-Cl
$\text{Cl}\cdots\text{H}_{\text{nearest}}$	-0.08	-0.76
C-Cl	-11.90	-12.02	-11.94	-11.73
$\text{C}-\text{H}_{\text{nearest}}$	-13.07	-13.18	-13.02	-12.64
$\text{H}_1\cdots\text{H}_{11}$	-0.21	-0.22	-0.20	...
C=O	-25.52	-25.53	-25.53	-25.49
$\text{O}\cdots\text{H}_6$	-0.26	-0.26	-0.26	-0.26
$\text{O}\cdots\text{H}_8$	-0.26	...	-0.29	-0.29
$\text{O}\cdots\text{Cl}$...	-0.14	-0.08	...

^a E_{AB} is the total of electronic energy and nuclear energy between two atoms of A and B, and corresponds to bonding energy.

アニリルリチウムとアニリンのLi-H交換に対する
クラウンエーテルの効果

(名工大工) ○吉野明広・服部勇・中村典雅・高橋憲助

Effect of Crown Ethers on Lithium-Hydrogen-Exchange
Reactions between Lithium Anilide and Aniline

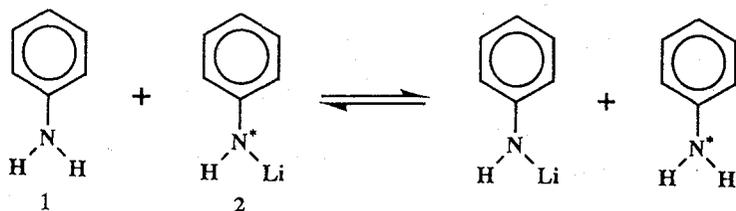
○Akihiro Yoshino, Isamu Hattori, Norimasa Nakamura,
Kensuke Takahashi

(Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Tech.)

We report Li-H exchange rates between lithium anilide and aniline in THF. The thermodynamical parameters for the title exchange reaction are obtained by means of the DNMR technique. The activation energy of exchange reaction is 6.6 kJ/mol lower than that of the restricted rotation of the N-C bond on lithium anilide. Effect of crown ether on exchange rates has been also discussed. The activation energy increases of 1.8 or 15.7 kJ/mol in the presence of 12-crown-4 or 15-crown-5, respectively.

1. はじめに

アニリン(1)にTHF中でn-ブチルリチウムを反応させるとリチウムアニリド(2)を生成する。2のN-C結合まわりの束縛回転についてはすでに活性化エネルギーが31.5 kJmol⁻¹と報告されている。¹⁾本研究では、Scheme 1で示されるように1と2がTHF中で等量存在する条件下において相互交換する速度を種々の温度で測定し、活性化パラメータを算出することを目的とする。また、クラウンエーテル(15-クラウン-5または12-クラウン-4)の共存がLi-H交換反応にどのような効果を及ぼすかを検証し、相互交換の機構を検討する。



Scheme 1

キーワード: DNMR・⁷LiNMR・¹³CNMR・リチウムアニリド・Li-H交換

よしの あきひろ・はっとり いさむ・なかむら のりまさ・たかはし けんすけ

2. 実験

出発物質はすべて市販品を CaH_2 を用いて脱水し、さらにそれを高真空下で蒸留したものを用いた。リチウムアニリドの合成はヘキサンを溶媒として $n\text{-BuLi}$ を高真空下において接触させて行い、その後 THF に溶媒交換した。試料の濃度はアニリン約 1.0 mol dm^{-3} に対し、 $n\text{-BuLi}$ を約 0.5 mol dm^{-3} となるように加えた。クラウンエーテルは後から約 0.5 mol dm^{-3} となるように添加した。NMRスペクトルの測定はVarianXL-200分光計を ^1H は 200MHz で ^{13}C は 50.31MHz で ^7Li は 77.72MHz で操作した。周波数の精度はそれぞれ ± 0.3 、 ± 0.4 、 $\pm 0.1\text{Hz}$ であり、温度可変実験は $-90 \sim 20^\circ\text{C}$ の範囲で行い、精度は $\pm 0.1^\circ\text{C}$ であった。計算に用いた1:2の組成比は ^1H の積分と ^{13}C 化学シフトより求めた。理論的なDNMRスペクトルは修正されたプログラムClatuxによりシャープMZ-80Bパーソナルコンピュータで計算した。²⁾

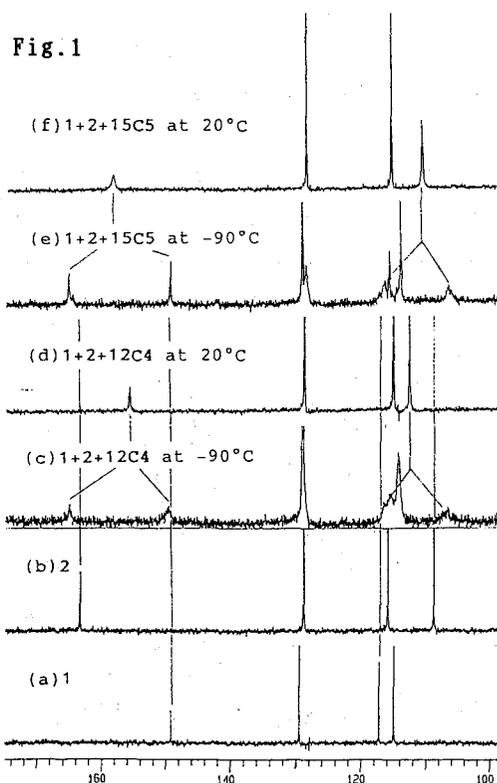
3. 結果と考察

1と2およびその混合物にクラウンエーテルを添加した試料の ^{13}C スペクトルを図1に示す。2では $\text{N}-\text{C}$ 結合廻りの回転も考えられるが、対称性より変化が現れるはずの C_2 、 C_3 、 C_5 、 C_6 の炭素は変化なく、 C_1 ・ C_4 の炭素の吸収線の低温での分裂が観測された。すなわちこの変化は1と2の相互変換によるものである。低温での化学シフトは1ではほとんど変化していないが、2では C_1 、 C_4 がそれぞれ低磁場と高磁場に移動している。特にパラ位に当たる炭素が 1.1ppm 高磁場シフトしていることよりクラウンエーテルがリチウムアニリドのリチウムに錯形成したものと推察される。アニリンからリチウムアニリドへの変化ではパラ位は 9.3 ppm 高磁場シフトするため錯形成により11%の余剰電子が増加したことになる。錯形成のために低温極限での化学シフトが異なるので、DNMR解析ではそれぞれの -90°C での化学シフトを用いた。リチウムアニリド-アニリン系では -90°C でも相互交換が止まらないため1と2の同一濃度の試料の化学シフトを用いた。

また、15-crown-5を添加した系では $\text{N}-\text{C}$ 結合廻りの回転に由来する吸収線の分裂も観測された。これは相互交換の速度定数の 5900 s^{-1} に対し回転の速度定数の 4000 s^{-1} が近いためである。

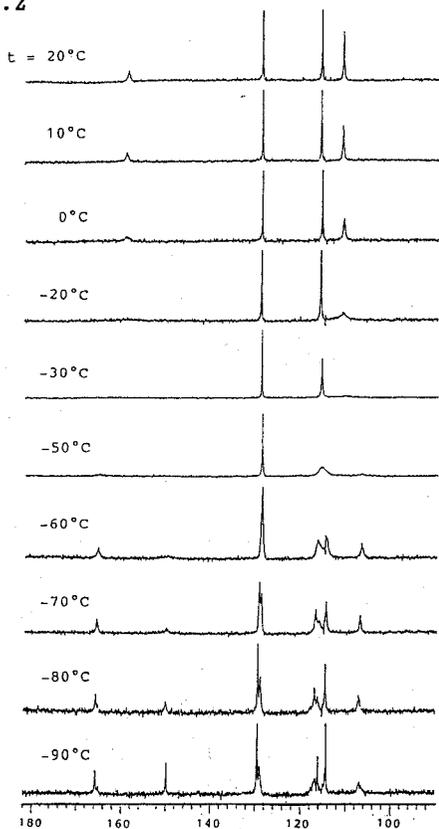
DNMR解析

図2に種々の温度で測定された ^{13}C NMRスペクトルを示す。15-crown-5では、低温になるとともに吸収線の線



幅が増大し、ついに -30°C で融合温度となったのち、 -50°C では2本の吸収線として再び現れる様子が分かる。一方、12-crown-4では融合温度は $-50^{\circ}\text{C} \sim -60^{\circ}\text{C}$ であり、クラウンエーテルを添加しない場合の融合温度は -90°C 以下であった。また、2のN-C結合回りの束縛回転の融合温度は -65°C と報告されている。DNMR解析は C_1 と C_4 に対して1と2の2サイトとして行ったが、 C_1 と C_4 から決定された速度定数は互いによく一致した。 C_1 と C_4 に対して求められた半値幅をそれぞれ図3と図4に示す。2つの図で C_1 と C_4 を比較すると1と2のシフト差が大きい C_1 の半値幅のほうが常に大きくなっている。各温度の速度定数は計算スペクトルと実測スペクトルを目視によるフィッティングをして求めた。決定された速度定数を用いてArrheniusとEyringのプロットを行い、種々の熱力学パラメータを算出した。図6にArrheniusプロットを示す。さらに、表1に算出した熱力学パラメータを示す。2のN-C結合回りの束縛回転の活性化エネルギーは 31.5kJ/mol と報告されているので、表1からLi-H交換の方が起こりやすいことがわかる。さらに表1から、Li-H交換の活性化エネルギーと活性化エンタルピーに対するクラウンエーテルの効果は12-Crown-4よりも15-Crown-5の方が大きい。

Fig. 2



^{13}C NMR spectra of phenyl region of 1+2+15C5 in THF.

Fig. 3 Half-line width of C-1 carbon

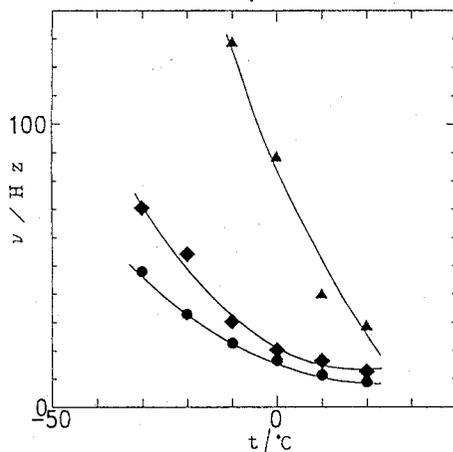
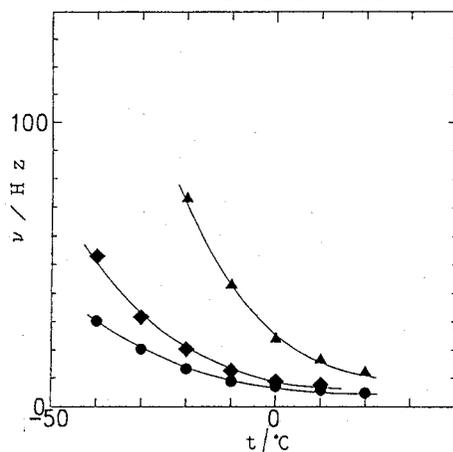


Fig. 4 Half-line width of C-4 carbon



また、活性化エントロピーについては大きな負の値が零の方向に移動している。活性化エントロピーが負の時には活性錯合体の生成を示唆している。すなわち、Li-H交換反応においては12-Crown-4よりも15-Crown-5の方が錯形成能が強く、活性錯合体の生成を阻止して反応しにくくしていると結論される。

⁷Li NMR

-80°Cで測定された⁷Li NMRの結果を図6に示す。12-Crown-4の添加は低温でもLiの線幅をさほど増大させていない。それに対して、15-Crown-5の添加は低温において3種のリチウムイオンを存在させる。それらの帰属はクラウンエーテルとリチウムアニリドが錯形成したもの、フリーのリチウムアニリドによるもの、THFに溶媒和されたものであると考えられる。このことより、15-Crown-5ではクラウンエーテルはLiイオンを2から引き離して溶媒和しているのではなく、2のLi原子の位置で2に強く錯形成してアニオン中心をかさ高くしていることが分かった。

4. まとめ

本研究で示されるようにDNMR法により求められた活性化パラメータはアニオン-カチオン相互作用に対し鋭敏である。ここで使用したクラウンエーテルはアニオン-カチオンの結合状態を適度に変化させ、アニオン-カチオン相互作用を詳しく研究する上で有用な添加剤となる。

Fig.6

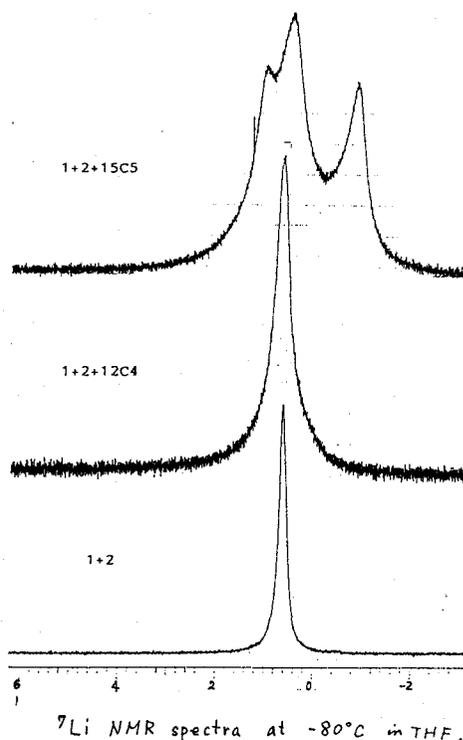


Fig.5 Arrhenius plots for Li-H exchange of anions

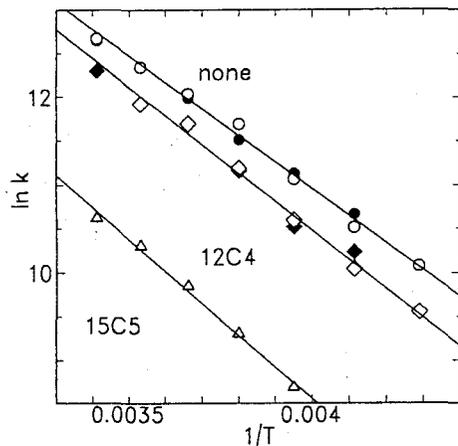


Table 1 Thermodynamic Parameters for Aniline Derivatives

	E_a [kJmol ⁻¹]	lnA	ΔH^\ddagger [kJmol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [JK ⁻¹ mol ⁻¹]
アニリン+n-BuLi	24.9±1.6	22.9±0.3	22.8±3.9	-61.2±14.3
アニリン+n-BuLi+12C4	26.7±0.9	23.3±0.4	24.4±0.9	-58.6± 3.3
アニリン+n-BuLi+15C5	40.6±2.9	27.9±1.3	38.3±2.9	-20.3±10.6

REF.

1) S. Ide et. al.

Magnetic resonance chem., 25, 675 (1987).

2) G. Binsch, *Topics in Stereochem.*, 3, 97 (1968).

(物質研) ○早水紀久子、柳沢 勝、菊地直人

¹H NMR study on the formation of hydrate clathrate of
1,1-dichloro-1-fluoroethane in the solution state○Kikuko Hayamizu, Masaru Yanagisawa and Naoto Kikuchi,
National Institute of Materials and Chemical Research

1,1-dichloro-1-fluoroethane (CH₃-CCl₂F, HCFC-141b) has been proposed to use as an alternative Freon for a cool storage system. Once the hydrate clathrates are formed in the H₂O solution, even if the temperature outside increases, its temperature can be maintained constant until all the hydrate clathrates vanish. The decomposition temperature of the hydrate clathrate of the H₂O-141b system was determined to be 8.4 °C. In this paper we observed ¹H NMR spectra of the methyl protons of 141b in D₂O solution and found the clear evidence that the hydrate chelates are formed in the liquid state after several freeze-thaw cycles.

ある種のフロンは水の中で容易に水和キレートを形成する性質があり、その性質により蓄熱に利用されている。即ち低温状態で水和キレートが形成されると、周辺温度が上昇しても水和キレートが存在する間はその水溶液は低温状態で保持される。代替フロンとして1,1-dichloro-1-fluoroethane (CH₃-CCl₂F, HCFC-141b)が提案され有効性が実証されている。熱力学的なデータや視覚的な研究から水和キレートの形成が仮定されているが、分子論的な観点からの証拠は未だ得られていない。一方種々の気体が固相において形成した水和キレートをNMRで証明し、その構造を解明する研究がカナダのRipmeesterらによって10数年前から行われている。これらの研究では、H₂S, CO, CO₂, PH₃, H₂Se, D₂Se, D₂S, CD₃F, CD₃Br, C₂D₂, C₂D₄, ¹³Cでラベルしたメタン、Xeなどの気体を水の中に閉じこめて水和キレートをつくり、液体窒素温度から融解するまでの温度で気体の示すNMRシグナルを観測して、その構造について研究している。これらの気体はサイズが小さいので、水の構造の大きなケージと小さなケージ内に存在することが示された。しかしながら、これらの研究はすべて水の系であって、水溶液の系については全く研究されていない。本研究では代替フロンとして蓄熱に対して有効であることが証明された141bが氷の中だけではなく、水の中でも水和キレートを形成していることを¹H NMRで研究した。

キーワード: ¹H NMR 水溶液状態 水和キレート 代替フロン

はやみず きくこ、やなぎさわ まさる、きくち なおと

実験

実験の確実さのためにH₂Oな代わりに重水素化率99%の重水(D₂O)を用いた。外径5mmのNMRサンプル管に0.5mlの重水を取り、これに約0.05mlの141bを加えてサンプルとした。¹H NMRはJEOL-GSH200によって199.76MHzで測定した。温度は室温(22℃)から-14℃の範囲で変化させた。温度変化の精度は±0.1℃以内である。温度変化時にはロックはかけていない。

結果と考察

1. 141bの均一系における¹H NMRスペクトル

最初に141b(CH₃-CCl₂F)を¹H NMRの標準的な条件で測定した。CDCl₃-TMS系では均一に溶解し、 $\delta = 2.453\text{ppm}$ 、 $J_{\text{HF}} = 16.5\text{Hz}$ であった。D₂O-TSPでは18℃において $\delta = 2.504\text{ppm}$ 、 $J_{\text{HF}} = 17.2\text{Hz}$ であり、スピン結合定数もわずかであるが有機溶媒中での測定値と比べると大きく、差は実験誤差よりは大きい。残存するH₂Oのシフト値は4.831ppmであり、シグナルの有無は氷結状態と融解状態の検証のために有効であった。TSPが含まれていると、後述のような不均一系のシグナルは観測できず水和キレートは形成されない。

2. 水和キレートの形成

本研究は熱力学的なデータと相関を持つためにH₂O-141b系で開始したが、圧倒的に大きな水シグナルに対して141bのメチルシグナルは相対的に極めて小さくなり、精度は低下する。また同時に水和キレートの中の141b分子はH-Hの双極子相互作用よりは小さなD-H双極子相互作用を受ける事になる。純粋のD₂Oの融点は3.81℃であるために、熱力学的な温度は軽水系と異なる筈であるが重水系のデータは得られていない。

2.1 温度サイクル

D₂O-141b系において、141bの溶解度が低いので過剰な141bを含むと均一系は形成されず、エマルジョン状になる。即ちシャープなダブルット($J_{\text{HF}} = 17.2\text{Hz}$)と幾分ブロードなダブルット($J_{\text{HF}} = 16.5\text{Hz}$)シグナルが重なる。徐冷してもスペクトル・パターンは変化せず、過冷却の後に-12℃で氷結してダブルットのシグナルが残る。このシグナル・パターンは温度を保持しても、温度を上昇しても3℃で融解が始まるまで変化しない。例として-2℃で測定した

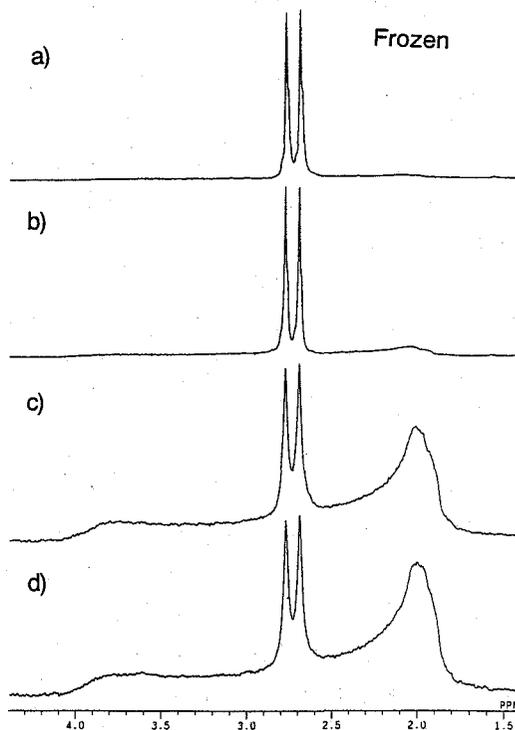


図1 141b-D₂O系の各サイクル毎の氷結した状態における¹H NMRスペクトル

スペクトルを図1(a)に示す。 $J_{HF}=16.5\text{Hz}$ である。完全融解直後(5°C)のスペクトルを図2(a)に示す。高磁場側にブロードなシグナルがわずかに見える。

一晚室温で放置した後で2回目の低温サイクルを行った。-14°Cで氷結しダブルットのピークが観測され、その後スペクトルの変化はなく4°Cで融解した。氷結時-2°Cおよび融解後6°Cのスペクトルをそれぞれ図1(b)と図2(b)に示す。同様に低温サイクルを繰り返した時の3回目と4回目のスペクトルを図1と図2の(c)と(d)に示した。4回目の温度サイクルではシャープなダブルットの J_{HF} は融解状態で17.2Hz、氷結状態では16.5Hzであった。シグナルの位置は氷結状態で-10°Cの時2.74ppm、2°Cの時2.71ppmで温度上昇とともにわずかながら高磁場側へ移動するが、融解時は $2.505 \pm 0.005\text{ppm}$ で温度変化しない。融解時と氷結時にスペクトル全体が約0.25ppm移動するのは系の反磁性磁化率の変化として説明できる。

2.2 サイトの性質

低温履歴を繰り返した後で141b分子は2種類のサイトに存在すると考えられる。即ち、サイトAでは141b分子はシャープなダブルットを示し等方的な自由運動をしている。サイトAは氷結した時にも大きな影響は受けず、安定した空間を形成していると考えられる。もう1つのサイトBは異方的な空間であり、温度の下降、上昇

を繰り返すことによって141b分子の移動が生じ、サイトBにおける占有率は増加する。サイトBでは141b分子は等方的な運動はできず、異方的な化学シフト値をもつようになる。氷結状態におけるこの異方的な空間での141bのメチル水素の化学シフト値は $\sigma_{11} = \sigma_{22} = 2.0\text{ppm}$ で $\sigma_{33} = 3.8\text{ppm}$ であり、等方的なシフト値 $\sigma_{iso} = 2.6\text{ppm}$ 、化学シフトの異方性 $\Delta\sigma = +1.8\text{ppm}$ となる。また融解後の化学シフト値は $\sigma_{11} = \sigma_{22} = 1.8\text{ppm}$ で $\sigma_{33} = 3.6\text{ppm}$ であり、 $\sigma_{iso} = 2.4\text{ppm}$ 、化学シフトの異方性 $\Delta\sigma = +1.8\text{ppm}$ となる。氷結時と融解後での化学シフト値の比較からシグナルは平行移動したものであり、これは系全体の状態の相違から生じた反磁性磁化率の差として説明できる。 ^1H 化学シフトの異方性 $\Delta\sigma$ は従来液晶に配向した分子から求められ141bそのもののデータはみつからなかったが、類似した化合物として $\text{CH}_3\text{-CCl}_3$ のデータがあり、 $\Delta\sigma = -4.1\text{ppm}$ と符号も異なっている。この点は今後の検討が必要である。

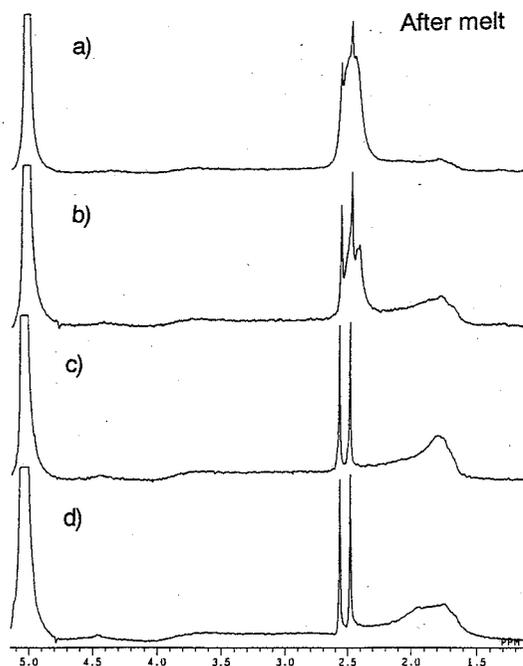


図2 141b-D₂O系の各サイクル毎の水結状態から融解直後の ^1H NMRスペクトル

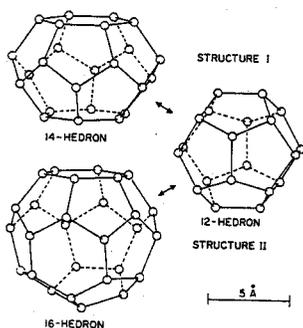


図3 水和物が形成する氷の構造Iと構造IIにおいて水分子がつくる多面体ケージ、○:酸素線の位置:水素結合²⁾

水和キレートを形成する氷の構造として図3に示すようなケージが提案されて、2種類のケージにより氷の構造IとIIが構成されると考えられている。141b-D₂O系で観測した¹H NMRスペクトルを、Ripmeesterらが報告している氷の中の水和キレートのNMRスペクトルと比較する。彼らの研究から141bは分子サイズが大きいのので12-Hedron (異法的空間)と16-Hedron (等法的空間)からなる氷の構造IIを取ると仮定できる。サイトBが異方的な空間の水和キレートであることは明かであるが、サイトAが水和キレートであるか自由空間であるかについてはもうすこし確認の必要がある。

3. まとめ

1) D₂O-141b系では過冷却状態を経て氷結するが、その温度は繰り返すサイクルにより変動する。また解氷・溶解温度も必ずしも一定しないうえに、平衡に達するまで長い時間が必要である。

2) 低温サイクルを繰り返すことによって水和キレートが形成され、141b分子は水和キレートの中に存在するようになる。141b分子をD₂Oと混合すると水和キレートが形成され、等方的な大きなケージ(自由空間に近い可能性がある)と異方的な小さなケージに141b分子が入る。低温への温度サイクルを繰り返すと141b分子はすべていずれかケージに入り、水和物の量は増加する。

3) 温度サイクルを繰り返す時に融解して水溶液になっても氷の構造、すなわち水和キレートは残り、履歴が存在する。水和キレート構造における2つのケージの形成およびそのケージ内における141b分子の存在割合は氷結・融解の過程で変化する。水和キレート構造は室温においても維持され、温度が上昇すると大きなケージ中の存在確率が増加し、分子運動が活性化していることがわかる。温度を下げて氷結するまでは存在確率は変化せず、氷結することによって141b分子を小さな異方的なケージへ移動させることができる。

4. 問題点

水和キレートの作成プロセスにおける再現性について現段階で不明確な点があるので、確実な再現性を達成するために現在検討中である。

文献

- 1) M. J. Collins, C. I. Ratcliffe, and J. A. Ripmeester, J. Phys. Chem. 1990, 94, 157-162.
- 2) D. W. Davidson and J. A. Ripmeester, J. Glaciology, 21, 33(1978)

固体高分解能 ^{13}C NMR法による エチレンアイオノマーの構造解析

○吉水広明、村田裕介、辻田義治、武井美幸、木下隆利
名古屋工業大学 材料工学科

A Structural Study of Ethylene-ionomer by High-Resolution Solid-State ^{13}C NMR

Hiroaki YOSHIMIZU, Yusuke MURATA, Yoshiharu TSUJITA,
Miyuki TAKEI, and Takatoshi KINOSHITA
Department of Materials Science & Engineering,
Nagoya Institute of Technology

The high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectra of zinc salts of ethylene-methacrylic acid copolymer (ethylene ionomer) were measured in order to clarify the structure and molecular dynamics of the ionomers. In ethylene ionomer, the ^{13}C NMR signals of the methylene carbons in the crystalline and amorphous regions were independently observed as well as the case of polyethylene. However, the ^{13}C spin-lattice relaxation time of the crystalline region of ionomer were shorter than that of polyethylene.

1) アイオノマーはカルボン酸などの解離基を数%有する高分子で、多くの場合これが金属等によって中和されるに従いイオンクラスターが形成され、諸物性が大きく変化する。アイオノマー中のイオンクラスターの形成や構造・機能については今なお活発に研究が行われているが、イオンクラスター相でない部分、即ちマトリックス相の構造や分子運動性の変化について検討することも重要である。既に市販され、様々な分野に応用されているエチレン-メタクリル酸共重合体では、エチレン鎖部分がマトリックス相を、メタクリル酸-金属塩部分がイオンクラスター相を形成する。本研究ではエチレン-メタクリル酸共重合体及びそのZn塩アイオノマーのマトリックス相の構造と分子運動性を、固体高分解能 ^{13}C NMR法を用いて検討した。

2) 今回用いた試料は酸含量は、5.4 mol%のエチレン-メタクリル酸共重合体 (EMAA:三井デュポンポリケミカル(株)より供与)及びそのZn塩(EMAA-0.9Zn:中和度は90%)である。固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルの測定はバリアン社製 UNITY 400 plus NMR分光計を用いて、100.58 MHzにて行なった。試料回転速度は約4k Hzであった。

キーワード: 固体高分解能 ^{13}C NMR、エチレンアイオノマー、分子運動、緩和時間

よしみず ひろあき、むらた ゆうすけ、つじた よしはる、たけい みゆき、きのした たかとし

3) Fig.1にEMAAとEMAA-0.9Znの ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示す。31 及び33 ppm付近にメチレン炭素由来の大きなピークが、15 及び47、185 ppm付近にメチル炭素及び四級炭素、カルボニル炭素由来の小さなピークがそれぞれ観測されている。2本のメチレン炭素ピークは、ポリエチレンのデータを参考にして、低磁場側を結晶部に高磁場側を非晶部にそれぞれ帰属した。これは、結晶部の T_1^{C} が非晶部のそれより長いことから確認された。しかしながら、結晶部の T_1^{C} 値は1秒未満であり、ポリエチレンで報告されている値に比べ、かなり短かった。一方、ポリメタクリル酸のメチレン炭素由来のピークは55-60 ppm付近に観測されるが、EMAA及びEMAA-0.9Znではこの付近にピークは観測されていない。これは、共重合体中にメタクリル酸の連鎖はほとんど存在していないことを示している。また、Asadaらはポリメタクリル酸の水素結合に参与しているカルボニル炭素の ^{13}C NMR化学シフト値は、180-187 ppmの領域に観測されると報告しており¹⁾、ここで得られたEMAAの値は、試料中の多くのカルボニル炭素が水素結合に参与していることを示唆している。一方、EMAA-0.9Znでは新たに189 ppmにピークが観測され、これはポリメタクリル酸Zn塩のカルボニル炭素の値¹⁾と良く一致している。

参考文献

- 1) M. Asada, N. Asada, A. Toyoda, I. Ando and H. Kurosu, *J. Mol. Struct.*, **244**, 237 (1991)

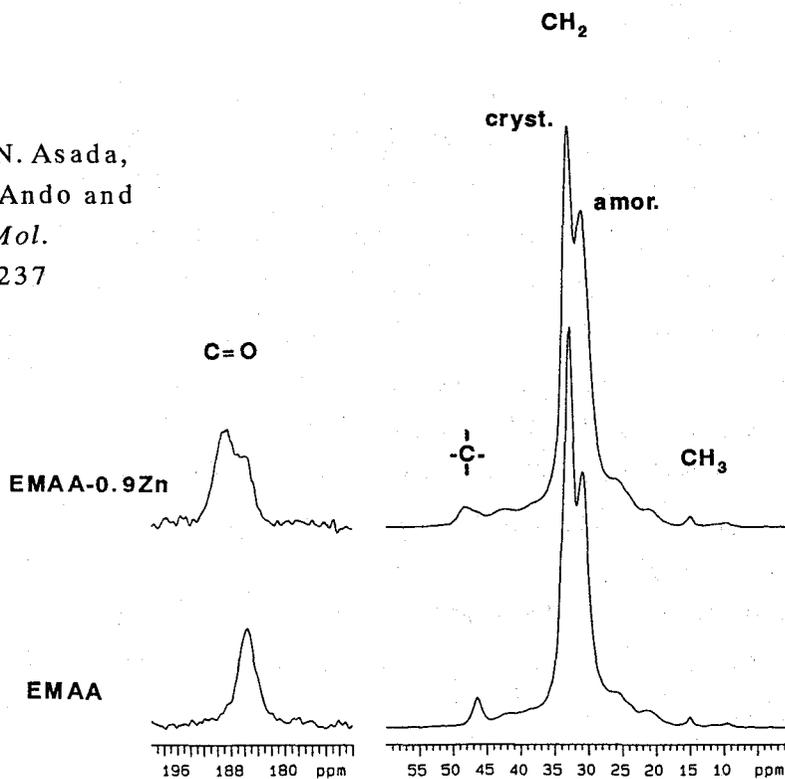


Fig. 1 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of EMAA and EMAA-0.9Zn at room temperature.

Restricted Diffusion of A ^{19}F Labelled Compound in the Intracellular Fluid Analyzed by ^{19}F Pulsed Fielded Gradient NMR

Yoshiteru SEO, Ute AMMER, Toru ISHIKAWA and M. MURAKAMI

Laboratory for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki Japan

パルス磁場勾配NMR法による細胞内含 ^{19}F 化合物の制限拡散の解析

瀬尾 芳輝、ウテ アンマ、石川 透、村上 政隆

生理学研究所、分子生理研究系、磁気共鳴装置室

医学生物学領域における ^{19}F -NMR応用として、生体に投与した ^{19}F ラベル化合物を用いての薬物代謝や膜輸送機構の観察が大きく進んでいる。しかしながら、 ^{19}F -NMRにおいては*in vivo*で有効な化学シフト剤がないことなどから、細胞内外の信号を分離して観察することができなかった。私たちは、パルス磁場勾配NMR法をもちいた細胞内信号の分離を試みてきた。前提条件として、細胞内の弗素ラベルした化合物のみかけの拡散速度が細胞外に比べて遅いことがある。ヒト赤血球及び赤血球ゴーストを用いて、3-trifluoromethyl hyppurateの拡散速度を拡散時間を変化させ測定した。拡散時間の延長に伴い細胞内分子の拡散速度の著しい減少が測定され、赤血球のサイズに依存した制限拡散がみかけの拡散速度の減少に大きく寄与していることが明らかになった。

Introduction: We have applied fluorescence spectroscopy [1] and ^{19}F NMR spectroscopy [2] to study organic acid excretion by the rat kidney *in situ*. One criticism on the ^{19}F NMR paper is uncertainty of signal quantification. We observed the total signal from the kidney, since chemical shift reagents are not able to separate the intracellular resonance from the extracellular one *in vivo*. Thus, we tried to discriminate the intracellular ^{19}F NMR signal by using the pulsed fielded gradient NMR technique [3]. We expect that diffusion velocity of intracellular molecules much slower than that of the extracellular one. In this paper, we tested this hypothesis by using human red blood cells and sealed right-side-out cell ghost.

Methods: From a healthy human volunteer, 5 ml of blood was collected, and the red blood cells (RBC) were washed 3 times by 0.9 % NaCl solution. The sealed right-side-out ghosts were obtained by a method reported by Steck and Kant [4]. The RBC or ghost suspension (2 ml) was filled in a 10 mm diameter NMR tube. ^{19}F NMR spectra were observed at 2.34 T at 25°C using an MSL-100 (2.34 T, Bruker) spectrometer with a ^{19}F RF-coil (15 mm in diameter tuned to 94.2 MHz) and a micro-imaging probe. Chemical shift of resonance was measured using an external reference (5% trifluoroacetic acid/water solution). Diffusion coefficients of ^{19}F compound in the RBC suspension were measured by the stimulated echo pulsed field gradient sequence (STE

PFG; $d-90^\circ-t_1-\delta-t_2-90^\circ-T-90^\circ-t_1-\delta-t_2$ -acquire). Typical values used are pulsed gradient field strengths varied from 0.5 to 4.0 mT/cm (16 values were used), 90° pulse of 12 μ sec, t_1 of 1 msec, t_2 of 17 - 15 msec, Δ (pulse distance = $t_1 + \delta + t_2 + T$) of 60 - 1000 msec and δ (width of pulsed gradient) was 2 - 4 msec [5].

Results and Discussion: Two ^{19}F labelled substances were measured: i) tetrafluorosuccinate (TFS, -41.6 ppm) and ii) 3-trifluoromethylhippurate (TFMH, 13.3 ppm) [2]. The both substances were added to the intact RBC suspension with the final concentration of 10 mM. The resonances from the intra- and extracellular TFS overlapped completely, but the resonance from the intracellular TFMH shifted by 0.4 ppm to the down field from the resonance from the extracellular TFMH. The broad resonance (shifted by 0.4 ppm from the sharp resonance) was assigned as the intracellular TFMH, since 1) the area of the broad resonance is proportional to Hct (fraction of cell volume) and 2) we can observe increase of the broad resonance after addition of TFMH in the RBC suspension. This shift might be due to changes in the bulk susceptibility, since the shift (in Hz unit) was proportional to the B_0 field strength and it disappeared in hemolyzed solution. The absence of the shift in TFS suggests that the ^{19}F chemical shift strongly depends on the chemical structure. The shift observed in TFMH is one of the largest shifts compared with reported values in RBC suspension (0.1 - 0.25 ppm [6]). However, the intrinsic shift may not be enough to discriminate the intracellular and the extracellular resonances in *in vivo* spectroscopy.

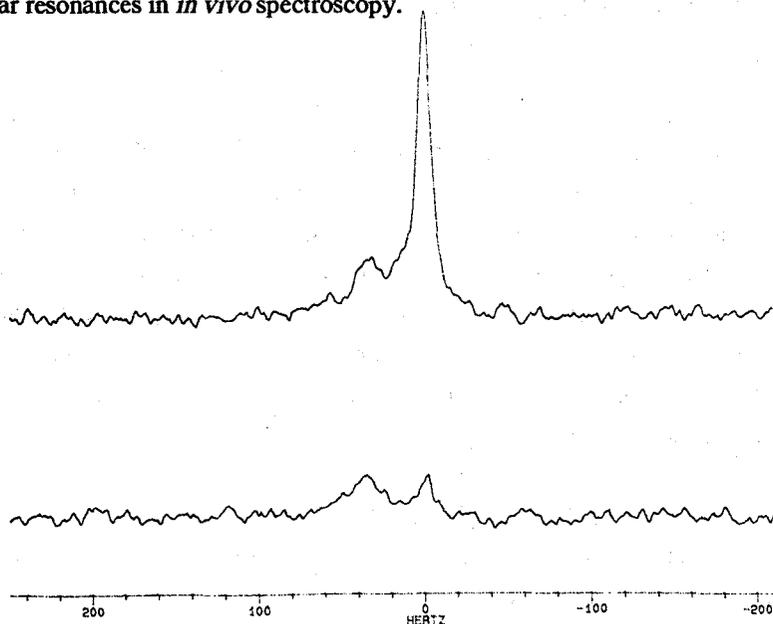


Fig. 1 ^{19}F NMR spectra of TFMH observed by STE PFG sequence in red blood cell suspension (Hct = 47.5%) with 10 mM TFMH at 25°C . The upper and lower spectra obtained with the gradient strength of 5 and 25 G/cm respectively. Δ and δ were 220 and 3 msec respectively. A sharp resonance at 0 ppm is the extracellular TFMH and the broad resonance at 0.4 ppm is the intracellular TFMH.

Fig. 1 shows a set of spectra of TFMH in the intact RBC suspension measured by STE PFG with a gradient strength from 5 and 25 G/cm. The extracellular TFMH resonance at 0 Hz reduced significantly by the higher field gradient, and the intracellular TFMH resonance at 34 Hz maintained its intensity. Peak heights of intra- and extracellular TFMH resonances were plotted in Fig. 2. The diffusion coefficient of the intracellular TFMH ($0.04 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}$) was significantly smaller than the value of the extracellular TFMH ($0.39 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}$).

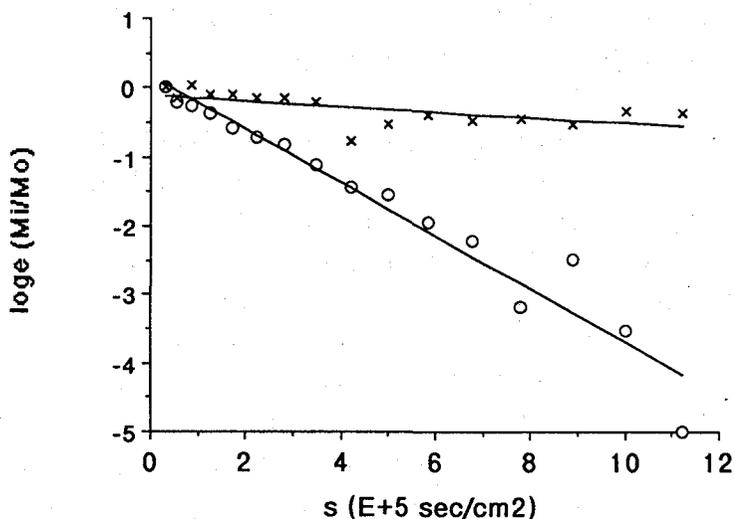


Fig. 2 ^{19}F NMR signal attenuation of resonances of intracellular TFMH (x) and the extracellular TFMH (o) observed by STE PFG sequence in red blood cell suspension (Hct = 46%) with 10 mM TFMH at 25°C. The s value for X axis was represented by $\gamma^2 g^2 (\Delta - \delta/3) \cdot 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}$.

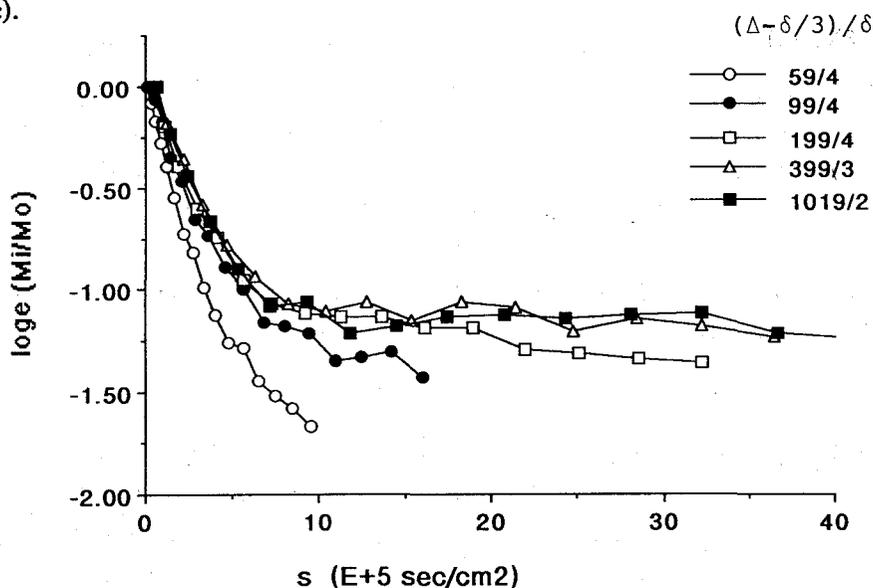


Fig. 3 ^{19}F NMR signal attenuation of resonances of intracellular TFMH with various diffusion time $(\Delta - \delta/3)$ observed by STE PFG sequence in sealed right-side-out cell ghost suspension (Hct = 55%) with 5.5 mM TFMH at 25°C.

There are several candidates to cause this small diffusion coefficient of the intracellular TFMH, such as viscosity, restricted diffusion by cell wall or reduced cross section by protein molecules. First of all we consider a restricted diffusion by cell boundary, since the transport process of TFMH in RBC membrane is much slower than $1/T_1$ of TFMH. Sealed right-side-out cell ghost from human red blood cells have almost the same size (except spherical shape), but the intracellular proteins and small molecules were washed out, and the intracellular fluid composition is as the same as the extracellular saline solution with 5 mM NaPi buffer at pH 8.0. Using a chemical shift reagents (DyTTHA) and Na-23 NMR spectra, we confirmed seal of ghost membrane and its stability.

A single resonance and a single T_1 relaxation time were obtained in 5 mM TFMH in the ghosts suspension. Biexponential decay was observed by STE PFG experiment, and the slower diffusion coefficient is assigned as the intracellular TFMH and the faster one is assigned as the extracellular TFMH. This biexponential behavior strongly suggest a contribution of restricted diffusion by cell membrane.

The diffusion coefficients of TFMH in ghosts were observed in several diffusion time (from 60 msec to 1 sec). Results are summarized in Fig. 3. The slower diffusion coefficient decreased significantly when the diffusion time ($\Delta - 1/3\delta$) was increased. On the other hand, the faster diffusion coefficient (corresponds to the extracellular TFMH) is kept constant value ($0.55 \pm 0.12 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2\text{-sec}$). The calculated values of the mean displacement ($R = (2D\Delta)^{1/2}$) were $2.6 \pm 0.54 \text{ }\mu\text{m}$. Additionally, the diffusion coefficient of the intracellular TFMH obtained in the intact RBC suspension is almost the same as the value obtained in the ghost suspension with the same diffusion time.

Conclusion: From these results, we conclude that the observed slow diffusion coefficient of the intracellular Fluorine substance mainly explained by the restricted diffusion by the cell boundary, and the effects of viscosity of intracellular fluid and the intracellular macro-molecules are not the major factor.

Acknowledgement: We thank Dr. H.P. Juretschke (Hoechst), Dr. M. C. Malet-Martino, and Dr. R. Martino (Université Paul Sabatier) for helpful discussion.

References:

1. Ammer U., Natochin, Y., & Ullrich K. J., J. Amer. Soc. Nephrology, 3, 1474-1487 (1992)
2. Ammer U. & Juretschke, H. P. , NMR Spectroscopy in Nephrology (in press)
3. Seo Y., Ammer U., Ishikawa T., & Murakami M., Proc. 12th Soc. Magn. Reson. Med., 611 (1993)
4. Steck T. L. & Kant J. A., Methods in Enzymology, XXXI, 172-180 (1974)
5. Kärger J., Pfeifer H., & Heink W., Advances in Magnetic Resonance, 12, p. 2-89 (1988)
6. London R. E. & Gabel S. A., Biochemistry, 28, 2378-2382 (1989)

L6 磁場中に開放静置された水，植物の緩和時間

亀井 裕孟

電子技術総合研究所

Effects of Magnetic Fields on the Concentration of Oxygen in Water and Plants.

Hirotake Kamei

Electrotechnical Laboratory

The concentration of oxygen dissolved in water and plant tissues is measured by means of proton relaxation. It has been found that the oxygen absorption processes in water and plants are modulated by magnetic fields.

生体機能に対する静磁場の影響を考える上で常磁性分子である酸素分子が機能に与える影響の重要性が指摘されている。例えば、過酸素状態における生体膜構成脂質分子の酸化による膜機能の失活、染色体の損傷等の可能性があげられている。¹⁾ 植物の発芽，成長，酸素消費量等に対する静磁場の影響は数多く研究されているが，²⁾ その機構については明確でない点が多い。一方，Ueno and Harada は水中に溶存した酸素の放出過程は磁場の影響を受けるが，酸素吸収過程に対する磁場影響は見いだされなかったと報告している。³⁾

生体組織中の溶存酸素濃度も静磁場の影響を受け，それが生体機能に影響することが予測される。そこで，生体組織中の酸素濃度に対する静磁場の影響を調べるため，植物の葉のプロトン緩和時間の静磁場中での経時変化を観測した。その結果，緩和時間の短縮が観測された。これは比較的小さな静磁場勾配でも，生体組織中の酸素濃度に影響を与えるものと解釈される。一方，純水を用いて雰囲気中の酸素濃度と緩和時間との関係を求め，無侵襲計測法である緩和時間測定法が溶液中溶存酸素量変化の計測法として有用であることを検証した。

1. 液中溶存酸素濃度の無侵襲計測法

核磁気共鳴法は優れた無侵襲計測法である。既に，イメージングおよびスペクトロスコピーが生体計測に広く利用されている。ここでは生体中の溶存酸素濃度の無侵襲計測のための基礎測定技術として，液中溶存酸素濃度の計測法を水を例にとって説明する。空気中に置かれた水の実測されるスピン-格子緩和速度 $(1/T_1)_{obs}$ は次式で与えられる。

$$(1/T_1)_{obs} = (1/T_1)_{inh} + (1/T_1)_o \quad (1)$$

ここで， $(1/T_1)_{inh}$ は溶存酸素による寄与， $(1/T_1)_o$ 以外の機構による緩和速度すなわち，脱酸素した水で観測される緩和速度である。水の場合主なものは分子内および分子間のプロトン同士の双極子相互作用によるものである。常磁性である溶存酸素分子による寄与は

キーワード：溶存酸素濃度，生体磁場効果，緩和時間，無侵襲計測

かめい ひろたけ

$$(1/T_1)_0 = 12\pi^2 \gamma^2 \eta N \mu_{eff}^2 / 5kT \quad (2)$$

で与えられる。ここで、 η は水の粘度、 N は水1cm³中の溶存酸素分子数、 μ_{eff} は酸素分子の有効磁気モーメントである。従って、緩和時間の測定から水中の溶存酸素量を知ることができる。しかし、生体の場合には、 $(1/T_1)_0$ を直接測定することは困難なので、溶存酸素濃度の絶対値を高い精度で求めることは難しいが、その相対的変化を知ることは容易である。

2. 装置および測定

使用した装置のブロック図を図1に示す。磁石はJMT社のB2.0/310型超伝導磁石を使用した。磁束密度プログラムはJEOL JNM-DP-1(改造)、変調および復調にはHP-10514A、高周波電力増幅にはENI-320L、

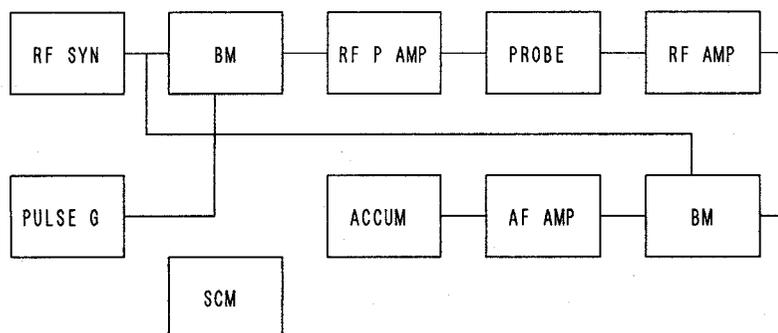


図1. 使用したNMR装置のブロック図。

信号検出には自家製のAnderson型ブリッジ、高周波信号増幅にはHP-8447D、音声周波増幅には自家製の増幅器、積算および信号表示にはAdvantest R9211Cを使用した。

磁石開口部には蓋をし、ボア内に窒素および酸素ガスを導入することによってボア内雰囲気中の酸素濃度を制御した。空气中酸素濃度測定にはジコー社のOM-25ANL型酸素モニタを使用した。水中溶存酸素濃度の測定には東亜電波工業DO-20A型溶存酸素計を使用した。

水はイオン交換および逆浸透法による精製水を使用した。試料管の外径は10mm長さは130mmで、上端から15mmまで水を満たした。水面近傍における試料管軸方向の磁場勾配は約0.5mT/mである。植物試料としてオリヅルランを使用した。試料の模式図を図2に示す。試料管底部にある水の信号は検出コイルから十分離れているため検出されない。

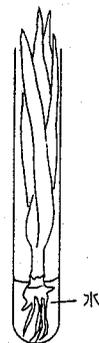


図2. 植物試料の模式図。

試料はボア内温度に対し $\pm 0.1^\circ\text{C}$ で制御された空気恒温槽内に保存し、緩和時間測定に対する温度差の影響をできるだけ小さくするようにした。 T_1 の測定には $180^\circ-90^\circ$ パルス列を、 T_2 の測定には $90^\circ-180^\circ$ パルス列を使用した。パルス列繰り返し時間は水の場合15s、オリヅルランの場合は9sとした。

3. 結果と考察

3. 1. 純水の緩和時間の雰囲気酸素濃度依存

雰囲気中の酸素濃度を変化させて水のプロトンの T_1 を測定した。磁場外に置かれ、酸素および窒素を

既知流量で導入し、所定の槽内酸素分圧に制御された恒温槽内に水を規定量入れた試料管を5時間開放静置した後取り出し、密栓して測定試料とした。測定温度は23.1°Cである。液体に対する酸素溶解度にHenryの法則が成り立てば、雰囲気中の酸素分圧 p_0 と純水の $(1/T_1)_{0.0}$ との間には直線関係が成り立つ筈である。実験結果を図3に示す。両者間にはよい直線関係が成り立つ。 $p_0=0$ のとき $(1/T_1)_{0.0}=0.305\text{ s}^{-1}$ が得られる。この値は脱気した純水の緩和速度 0.297 s^{-1} とよく一致する。水に対する酸素のBunsen吸収係数を 0.029 cm^3 とし、雰囲気酸素濃度100%のときの $(1/T_1)_{0.0}$ の実測値を用いると、 N に関する実験式

$$N = [5.14 (1/T_1)_{0.0} - 1.57] \times 10^{-9} \quad (\text{mol}) \quad (3)$$

が得られ、緩和時間の測定から溶液中の酸素濃度を知ることができる。

3. 2. 静磁場中に置かれた純水の緩和時間の経時変化

上端を開放した試料管中の水の T_1 の経時変化の様子を図4に示す。時間と共に T_1 は短くなり、2時間程度で一定値に達する。一方、脱気したのち封じた試料では図5に示すように経時変化はみられない。

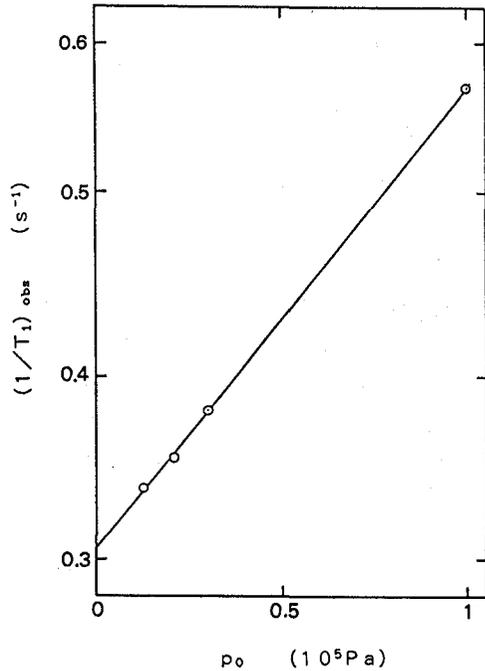


図3. 雰囲気酸素分圧と緩和速度.

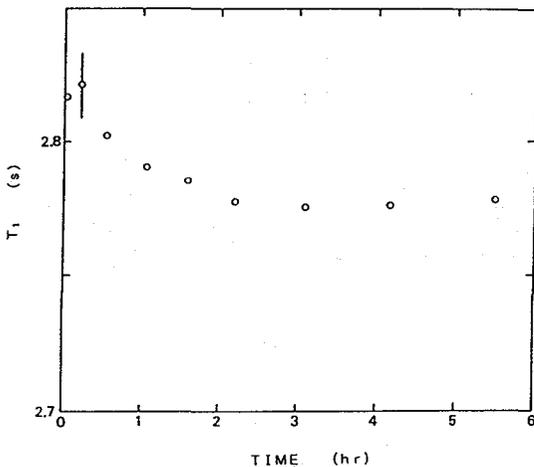


図4. 純水の T_1 の静磁場中での経時変化.

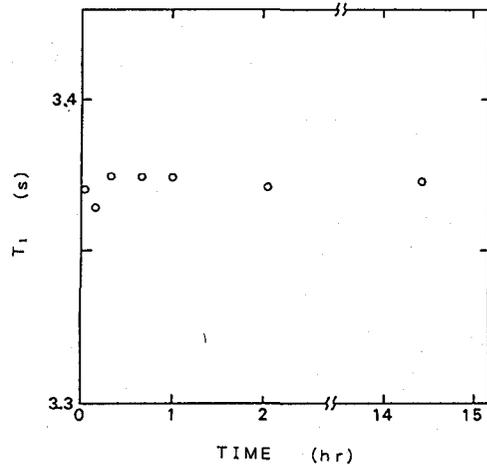


図5. 脱気した純水の T_1 の経時変化.

従って、開口試料における緩和時間の短縮は水中の溶存酸素濃度が増加したことに起因していると解釈される。このときの溶存酸素濃度を求めると、 $N=0.28 \times 10^{-9}\text{ mol}$ である。この値に対応する試料管開口部の雰囲気酸素濃度を推算すると21.9%となる。一方、試料中の溶存酸素濃度を隔膜形ガルバニ電池

式溶存酸素計を用いて測定したところ、 $N=0.246 \times 10^{-6}$ mol であった。

3. 3. オリヅランの緩和時間の雰囲気酸素濃度依存

雰囲気酸素濃度を变化させたときのオリヅランの葉のプロトン緩和速度を図6に示す。純水の場合と同様に雰囲気酸素分圧の増大とともに緩和速度は大きくなっている。このことは雰囲気酸素分圧の増大とともに葉中の酸素濃度が増大することを示していよう。純水の場合と異なり、生体の場合は雰囲気酸素分圧と緩和速度との間には、一般に、直線関係が成立しないと考えるのが妥当であろう。また、この関係の解析によって生体系の酸素取り込みに関する情報を得ることもできる。しかし、ここでは便宜的に狭い酸素分圧範囲では直線関係が成り立つと仮定すると、 $(1/T_1)_{obs}$ が求められ、その値は 0.309 s^{-1} となる。これは純水の値 0.305 s^{-1} とほぼ一致興味深い。一般に、生体中には大ざっぱに分けて結合水と自由水とがあり、これらの間では速い速度での交換が行われている。ここで観測しているのは自由水に相当するものであるが、水の状態を詳しく論じるためには、詳細な解析が必要である。

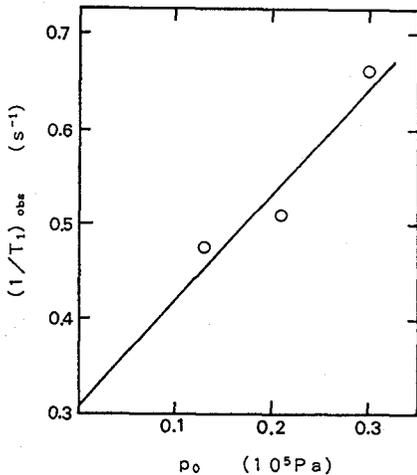


図6. 雰囲気酸素分圧とオリヅランの緩和速度。

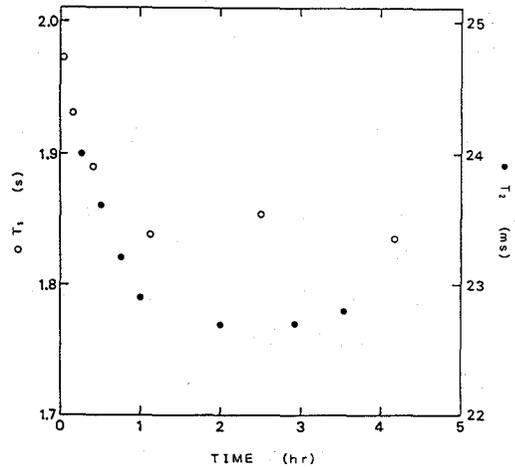


図7. 静磁場中におけるオリヅランの緩和時間の経時変化。

3. 4. 静磁場中に置かれたオリヅランの緩和時間の経時変化

静磁場中に置かれたオリヅランのプロトン緩和時間の経時変化を図7に示す。純水の場合と同様に、時間とともに緩和時間は減少し、約1時間後には一定値に達する。純水の場合に比べ、平衡値に達する時間が短いのは酸素との接触面積が大幅に大きいことによるものとみることができよう。緩和時間の短縮は磁場中での雰囲気酸素濃度増大に伴い葉中の酸素濃度が増大したものと解釈される。

核磁気緩和時間を用いた液中溶存酸素濃度無侵襲計測法の有用性を示し、オリヅランの葉中酸素濃度が静磁場の影響を受けることを明らかにした。この手法を生体系の酸素濃度計測に適用するには、まだ、定性的な域にあるが、今後の展開によって定量測定が可能となり、生体中酸素濃度の無侵襲計測法としての有用性を増すであろう。

【文献】 1) H. Aceto et al.: IEEE Trans. Magn. MAG-6, 368-373 (1970). 2) M. F. Barnothy ed.: Biological Effects of Magnetic Fields, Plenum Press, New York, 1964 and 1969. 3) S. Ueno and K. Harada: IEEE Trans. Magn. MAG-18, 1704-1706 (1982).

○大塚 章宏・渡部 徳子
東水産大 水産 食品

Study of Water Mobility in Polysaccharide Hydro Gels by PFG-NMR Method 1

○Akihiro Ohtsuka, Tokuko Watanabe
Department of Food Science and Engineering, Tokyo University of Fisheries

Water diffusion phenomena in potato starch gels were characterized as restricted diffusion by PFG-STE-NMR. We estimated the size of water compartments in the starch gels, diffusion coefficient of compartmentalized water, and permeability of barriers which restricts water diffusion. On the basis of these three parameters, concentration and retrogradation dependences of the starch gel structure will be discussed.

§1. 目的

澱粉ゲルは半透明であるため、その構造を非破壊的に直接観察することは困難である。一方、細胞中の水の様に障壁によって囲まれている水の拡散を短い時間スケールで観察すると、障壁間の距離、障壁の透過性等に依存した、見かけの拡散係数の減少、すなわち制限拡散が観察されることがある。澱粉のつくるゲルも、ゲルの骨格によってその内部に水のコンパートメントを形成していると考えられ、内部の水に制限拡散が観察されることが期待される。本研究では磁場勾配 NMR法を用い、馬鈴薯澱粉ゲル中の水の制限拡散を観察し、澱粉ゲルの構造についての知見を得ることを目的とした。また、澱粉ゲルは室温に放置することによって老化し、固くなって行くことが知られている。そこで本研究では上記の方法と同じ方法を用い、老化による構造の変化についても議論する。

§2. 試料の調製および測定方法

馬鈴薯澱粉は(株)和光純薬製のものを用いた。外径 5 mmのNMR用サンプルチューブに馬鈴薯澱粉と蒸留水を懸濁させ、3日間放置し、十分に膨潤させた。この懸濁液をよく攪拌しながら $98.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$ の温度で1時間加熱し、室温に10分間放置して冷まし、濃度17.1~42.0%の澱粉ゲルサンプルを調製した。また、それぞれの試料は測定後に5℃で保存し、老化澱粉試料とした。

NMRの測定にはブルカー社製MSL100を用いた。パルスシーケンスは、ステイミュレーテッドエコーパルスシーケンスを用いた。このシーケンスでは、長さ δ で大きさ

キーワード：パルス磁場勾配NMR、澱粉ゲル、制限拡散

○おおつか あきひろ、わたなべ とくこ

gの二つの等しい磁場勾配パルスを間隔 Δ で与えたことによるエコーの減衰比Rは以下の式(1)によって示される。

$$\ln[R] = -D(\delta g \gamma)^2 (\Delta - \delta/3) \quad (1)$$

ここで、Dは拡散係数、 γ はプロトンの磁気回転比である。本研究では、拡散時間 Δ を60~1010msの間で固定し、gを0.5~5.0mT/cmの間で変化させて、各々の Δ における見かけの拡散係数の値を測定した。また、 δ の値は1msを用いた。

§3. 結果と考察

濃度42.0%の澱粉ゲルにおける測定結果をFig.1に示す。この図は、(1)式の $(\delta g)^2(\Delta - \delta/3)$ に対して $\ln[R]$ をプロットしたものであり、この直線の傾きから見かけの拡散係数が求められる。見かけの拡散係数の値は、拡散時間 Δ の増加にともなって減少し、ある一定値に近づいて行く傾向を示した(Fig.2)。この結果は透過性のある障壁による水の制限拡散によって説明することができる。そこで、複雑な澱粉ゲルの構造を定量的に評価するために、澱粉ゲルの構造のモデルとして、透過性のある障壁が等間隔aで平行に並んでいる構造を仮定した。このような構造による制限拡散は、von Meerwall等によって数式化されている。この式と実測データを最小二乗法によりフィッティングさせることによって、障壁の透過性p[cm/s]、障壁間の距離a[μ m]、ゲル中の水の自己拡散係数 D_0 [cm^2/s]の値を求めた。Fig.2に、濃度17.1%、33.3%、42.0%の澱粉ゲルの場合についてのフィッティングの結果を示した。この図に示したように、計算より求められた曲線と、拡散係数の実測値は、非常に良い一致を示していた。そのほかのサンプルにおいても、計算によって得られた曲線は、実測値と良い一致を示していた。

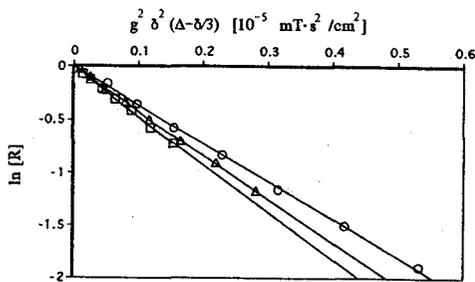


Fig.1 Result of diffusion measurement of starch gel (42%).

$\Delta =$ (□) ... 60ms, (△) ... 110ms, (○) ... 600ms

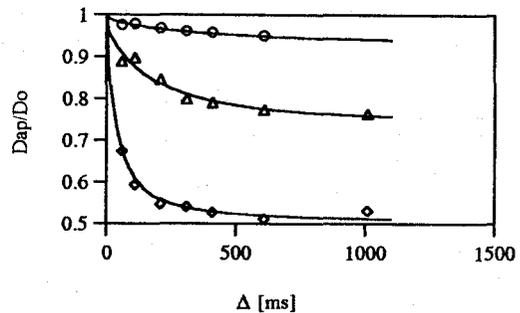


Fig.2 Diffusion time dependence of apparent diffusion coefficient D_{app} , solid line ... calculated curve,

(○) ... 17.1%, (△) ... 33.3%, (◇) ... 42.0%, ..

得られた p と D_0 をもとに、澱粉濃度とゲル構造の関係および、澱粉の老化によるゲル構造の変化についての考察を行った。

澱粉濃度と澱粉ゲルの構造との関係

障壁の透過性 p と澱粉濃度との関係を Fig. 3a に示す。 p の値は澱粉濃度の増加にもなって、徐々に減少していた。これは、澱粉濃度の増加にもなって、障壁が密な構造になって行くことを示している。また D_0 の値は、純水の自己拡散係数の値よりも小さく、濃度の増加にもなって減少して行く傾向を示していた (Fig. 3b)。もし、見かけの拡散係数の減少が制限拡散のみによって起こっているのならば、得られる D_0 の値は純水の自己拡散係数の値とほぼ等しくなるはずである。したがって、実測された D_0 の値の減少は、コンパートメントの中に存在している高分子による障害効果および水和効果が原因であると考えられる。よって、我々は澱粉ゲルの構造について以下のように考えた。

一部の高分子は凝集してゲルの骨格を形成しており、一部の高分子は骨格の形成に関与せずに骨格の作ったコンパートメント中で水に溶け込んだ状態で存在している。このようなモデルによれば、澱粉濃度の高いゲルにおいて、障壁はより密な構造になり、コンパートメント中の水に溶けている高分子の量はより増加するといえる。

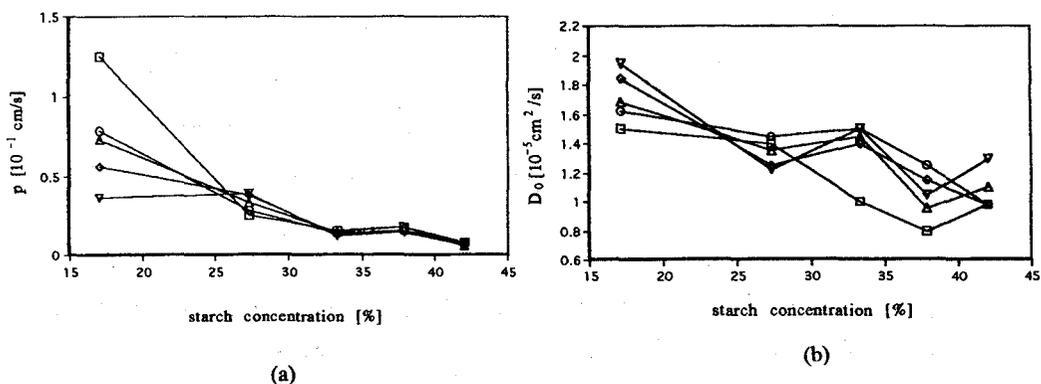


Fig.3 Starch concentration dependence of p (a) and D_0 (b). Each data correspond to storage at 5°C for (□) ... 0 day, (◇) ... 1 day, (△) ... 2 days, (○) ... 3 days, (▽) ... 4 days respectively.

澱粉の老化によるゲル構造の変化

D_0 の値は全てのサンプルにおいて、保存時間の増加にともなって徐々に増加する傾向を示した (Fig. 4a)。これは、澱粉の老化の進行にともなって、コンパートメントの中に存在していた高分子の量が減少していることを示唆している。 p の値は、濃度17.1%のサンプルにおいては、保存時間の増加にともなって減少する傾向を示していたが、そのほかのサンプル (濃度27.3%~42.0%) においては、保存時間によらずほぼ一定の値を示していた (Fig. 4b)。これらの結果より、澱粉ゲルの老化について、以下のようなモデルをたてた。比較的濃度の低い澱粉ゲルでは、澱粉の老化にともなって再結晶化した高分子はコンパートメントを形成している障壁に凝集する。また、比較的濃度の高い澱粉ゲルでは、水のコンパートメントの中に存在している高分子の量が多いため高分子の運動が束縛され、コンパートメントの中で再結晶化する。どちらの場合も、老化によって、コンパートメント中に溶けた状態で存在している高分子の量は減少するため、 D_0 の値は増加する。

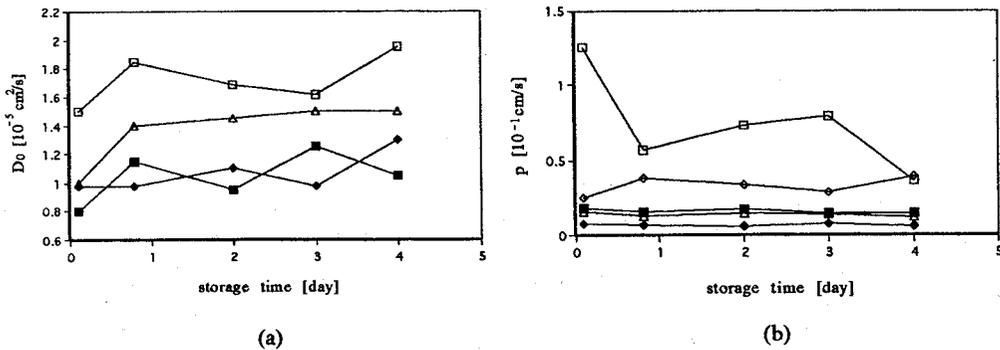


Fig.4 Storage time dependence of D_0 (a) and p (b). Each data correspond to starch concentration at (□) ... 17.1%, (◇) ... 27.9%, (△) ... 33.3%, (■) ... 37.9%, (◆) ... 42.0% respectively.

○神藤平三郎、岩城隆信、家田了一、佐久間千勢子、松本 潮、胡桃坂仁志¹⁾、
水野 猛²⁾、久保庭 均³⁾

東京薬大、¹⁾理研、²⁾名古屋大・農、³⁾中外製薬

Solution Structure of Deletion Mutants of H-NS Protein Which recognizes Bent DNA.

○ H. Shindo, T. Iwaki, R. Ieda, U. Matsumoto, H. Kurumizaka¹⁾,
T. Mizuno²⁾ and H. Kuboniwa³⁾

Tokyo College of Pharmacy, ¹⁾Riken Institute, ²⁾Nagoya Univ., and

³⁾Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.

Solution structures of H-NS protein and its trypsin-digested fragment HNS47(90-136) were studied by proton NMR spectroscopy. In the structure of HNS47, anti-parallel β -sheet (Ala94-Trp108) and α -helix (Val117-Gly126) were identified. The c-terminal region (Leu129-Leu133) is more likely to form an α -helix. One important feature of the structure is the formation of a hydrophobic cluster composed of the side chains of Tyr96, Trp98, Trp108 and Ile118.

H-NSは大腸菌由来の136アミノ酸残基からなる中性タンパク質であり、細胞中で2量体または3量体として存在すると考えられている。このタンパク質は、他のヒストン様タンパク質と同様に原核細胞中の核様体の形成に関与しているものと考えられていたが、最近の研究によれば¹⁾、このタンパク質は、プロモータ領域の湾曲したDNAに結合して多くの遺伝子の発現に対する抑制因子として機能していることが明らかにされつつある。このタンパク質の構造的な興味は、それが通常のrepressorタンパク質のように塩基配列ではなく、DNAの高次構造である湾曲構造を認識することにある。従って、このタンパク質の構造に興味注がれている理由は、タンパク質によるDNAの新しい認識モードやモチーフの可能性を秘めているからである。

昨年の本討論会において、我々は intact H-NSについてNMRによる研究結果を報告した。その中で、H-NSのCOSYおよび¹H-¹⁵N HMQCスペクトルにおいて予想されるクロスピークの数に比べて、観測されたピークの数約半分であるという、問題に直面した。それはH-NSが多量体として存在し、そのコアーの領域からの信号は広幅のため観測されないが、C端のflexibleな領域からの信号のみが観測されたものと考えた。²⁾

キーワード：¹H NMR, H-NSタンパク質、変異タンパク質、溶液構造

○しんどう へいさぶろう、いわき たかのぶ、いえだ りょういち、さくま ちせこ、
まつもと うしほ、くるみざか ひとし、みずの たけし、くぼにわ ひとし

今回、この問題を解決するために、H-N Sタンパク質の断片化あるいは欠失変異体の作成を試み、それらの構造解析を行ったので報告する。

【試料および実験方法】天然のH-N Sは大腸菌を用いた大量発現系から分離精製した。 ^{15}N で均一に標識したものおよび9種のアミノ酸 (Ala, Val, Leu, Ile, Arg, Lys, Thr, Ser) に対して選択的に標識したタンパク質を得た。N端を欠失した断片、HNS100 (40-136)は大腸菌を用いた大量発現系から分離精製した。また、欠失断片、HNS47 (90-136)はトリプシンによる部分消化により得られた。intact H-N S試料は、10 mM KPi, 0.3 M NaCl, pH 5.5 の buffer に対して透析後、セントリコンを用いて濃縮し、NMR測定に供した。HNS47の試料は、水に対して透析後、凍結乾燥し、上記 buffer に溶かしたものをNMR測定に供した。

NOESY, DQFCOSYおよびHOHAHAの測定には日本電子製 GX-500を、HMQCの測定には Bruker製AM-500を用いた。測定温度は27°Cで行った。

【結果及び考察】トリプシン処理したH-N Sは、ヘパリンカラムを用い、塩濃度勾配法により溶離させた。そのクロマトグラムは2本のピークを与え、対応する断片のアミノ酸配列の分析の結果、その一つは88番目の Lys 残基で、もう一つが89番目の Arg 残基のC端で切断されていることが分かった。欠失断片のDNA結合能に関するゲルシフトの実験に基づいて、HNS100はその結合能を維持するが、HNS47はそれを有しないことが分かった。

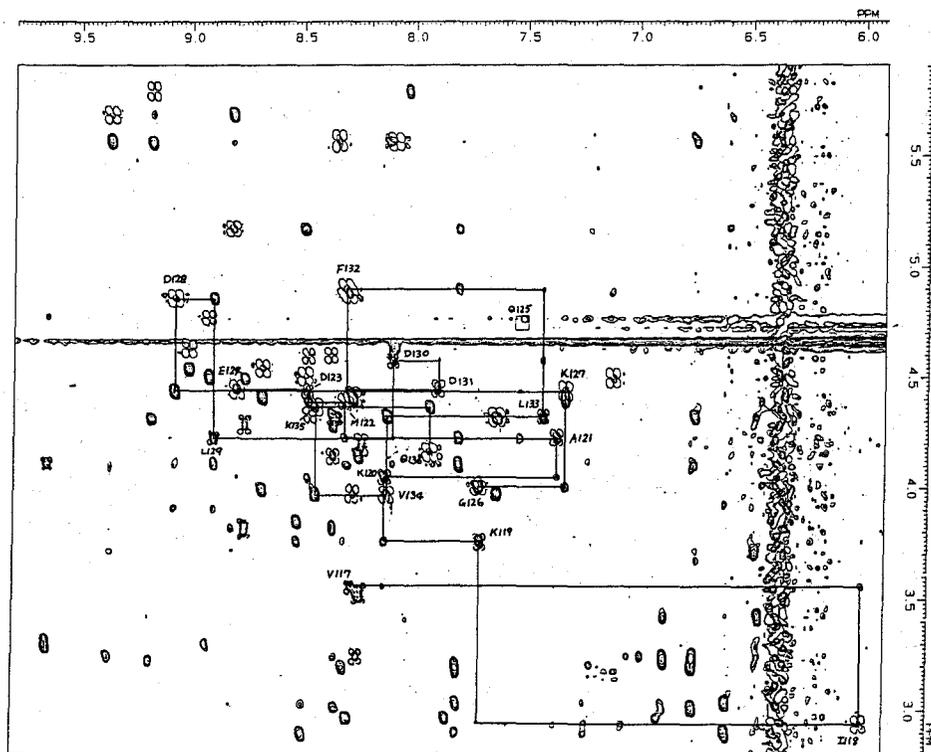


Fig. 1. Finger print region of superimposed NOESY and DQFCOSY spectra from HNS47.

一方、著者の一人（水野ら）によるポイント変異体に関する遺伝学的実験によれば、これらの変異体の機能の異常な低下または消失は、Arg89-Lys95 および Thr109-Thr114 の2つの領域に集中していた。これらの結果は、H-N SのDNA結合ドメインがC端側にあることを示唆する。それゆえ、HNS47もまた、DNAの結合ドメインの一部を構成するものと、予想される。

図1にHNS47のNOESYとDQFCOSYスペクトルの指紋領域を示す。スペクトルからも明かのように、HNS47は高次構造を有する。事実、これらのクロスピークの位置はH-N Sのそれらと驚くほど一致していた。それゆえ、HNS47はH-N Sの構造をそのまま保持していると結論できる。HNS47は分子中に4個の芳香族残基（1 Trp, 2 Tyr, 1 Phe）を含む。これらの ring proton の帰属から、指紋領域のC α プロトンの帰属を行い、これを基準に連鎖帰属を行った結果、N端側の数残基を除いて、すべての主鎖プロトンの帰属ができた。図には、混雑をさけるために、C端側の Val118-Asn136 までのNH-C α プロトンの連鎖を示した。ただし、Q125 は水の信号と重なるためこの点で帰属の連鎖が切れている。これらの帰属を基にして、NOESYピークを帰属して、図2に示すようなNOE map を作成した。

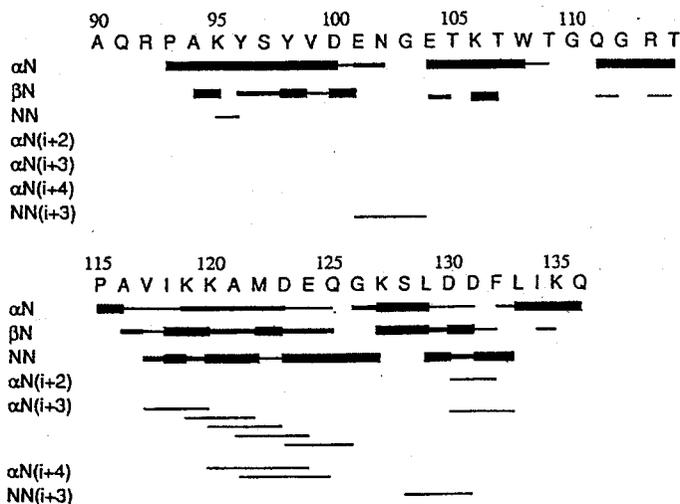


Fig. 2. Summary of the sequential and medium range 1H-1H NOE's in HNS47 fragment.

図から明らかなように、Ala94-Asp100, Glu104-Trp108, および Gln111-Thr114 の領域において α Nおよび β Nプロトン間で強いNOEが観測される事実は、これらの領域が β -sheet 構造であることが示唆される。Ala94-Asp100 と Glu104-Trp108 の間で strand 間NOEが観測されるので、これらは逆平衡 β -sheet を形成する（図3を参照）。また、Val117-Gly126 の領域では、 α N(i+3) あるいは α N(i+4)のNOEが観測されることから、この領域は α -helix 構造をとること、また、Leu129-Leu133 においては α -helix 様の構造が推察される。さらに、Trp108 は Tyr96, 98, Ile118 および Phe132 のプロトンに強い残基間NOEを与えること、また、Phe132 が Trp-108, Ile118 および Tyr96 のプロトンにNOEを与える。それゆえ、この欠失断片の構造の特徴は、これらの疎水的な残基が安定な疎水コアを形成していること

である。さらに、図1で示されたように、1118のNHおよびCaプロトンの異常な高磁場シフトはこれらのプロトンがいくつかの芳香族環の極近傍に存在することを示す。このように、疎水コアの形成はこのHNS47断片がなぜトリプシンの攻撃から保護されているかを説明する。

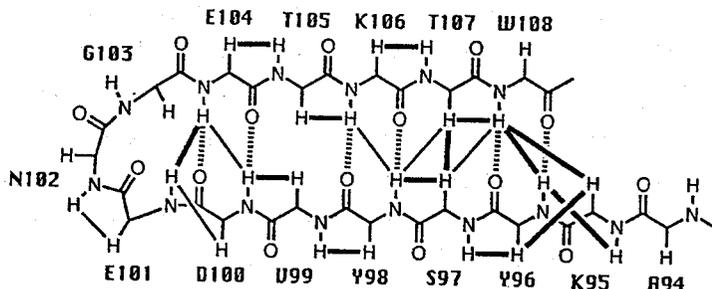


Fig. 3. Antiparallel β -sheet structure in the region of the residues (Ala94-Trp108) in HNS47.

現在、HNS47の側鎖プロトンのNOEピークの帰属を進めており、HNS47の立体構造の決定もそう遠くないものと思われる。H-N-Sの結果と合わせて議論する予定である。

文献

- 1) C. Ueguchi & T. Mizuno, EMBO J., 12, 1039(1993).
- 2) 家田了一他、第31回NMR討論会、p. 317、姫路、1992年

○山本泰彦、井上義夫（東工大生命理工）中條利一郎（西東京科大理工）

Paramagnetic ¹H-NMR saturation transfer study of ligand exchange in ferric myoglobinsYasuhiko Yamamoto¹, Yoshio Inoue¹ and Riichiro Chujo²¹Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology²Department of Material Engineering, Nishi-Tokyo University

¹H-NMR saturation transfer experiments have been successfully used in connecting ferric high-spin and low-spin forms of equine, a mollusc, *Dolabella auricularia*, and a shark, *Mustelus japonicus*, myoglobins. With the known signal assignments in the high-spin form, the heme peripheral proton resonances in met-azido and met-imidazole complexes of the myoglobins have been straightforwardly assigned via the saturation transfer connectivities. The analysis on the extent of the saturation transfer has provided the kinetics of the ligand exchange.

[はじめに] ある分子に二つの状態(A,B)が存在し、平衡反応によりA,Bが相互変換しているような場合、Aのある磁化に対してラジオ波照射により摂動を与えた時、Bでの対応する磁化にもその影響が及ぶ場合がある。実験的にはAのピークを飽和させ、交換反応によりBのピークへ伝達される飽和を観測する。飽和移動法は古くから知られた測定法であり、分子の一つの状態でのシグナル帰属が既知であれば、飽和移動による相関からもう一つの状態でのシグナル帰属が簡単に行なえることや飽和移動の程度を解析することにより交換反応速度を見積もることができることから幅広い研究分野で利用されている。NMRによるヘム蛋白質の研究でも、還元型、酸化型シトクロームc¹⁾、酸化型西洋ワサビペルオキシダーゼCN錯体²⁾でのヘム(図1)の側鎖プロトンのシグナル帰属が飽和移動法により行なわれている。本研究では、飽和移動法が常磁性ヘム蛋白質のNMRシグナル帰属にもっと一般的に利用できるはずであると考へ、その可能性について調べた。飽和移動が検出でき

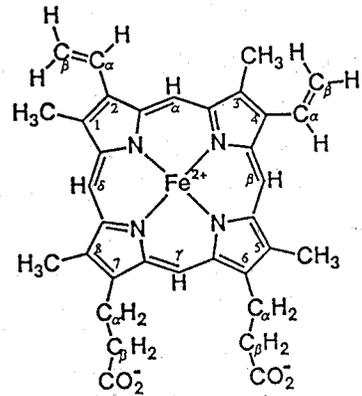


図1 ヘムの分子構造。

キーワード：常磁性NMR、ミオグロビン、ヘム、飽和移動、配位子結合反応

やまもと やすひこ、いのうえ よしお、ちゅうじょう りいちょう

る条件としては、2つの状態に由来するシグナルが分離して観測されること ($\tau^{-1} \ll \Delta\delta$; τ : 寿命、 $\Delta\delta$: 両状態のシグナルの共鳴周波数の差) と、シグナルの緩和速度が交換速度とほぼ同じ程度であること ($T_1^{-1} \sim \text{or} < \tau^{-1}$) が要求される。そこで、ヘム鉄に配位することによりスピン状態の変化を伴い、ヘム鉄に対して中程度の親和性を持つ N_3^- 、イミダゾールを配位子として選び、ミオグロビン (Mb) (ウマ心筋Mb, 軟体動物節足類 (*Dolabella auricularia*) Mb, サメ (*Mustelus japonicus*) Mb) で、配位子結合反応を介しての飽和移動の観測を試みた。

[実験方法] $^1\text{H-NMR}$ は、日本電子製GSX-270で行なった。標準的スペクトルは、スペクトル幅70kHz, 16k データポイント、 90° パルス幅9.5 μs で、約2000回積算して測定した。水のシグナルは40msの照射パルスにより飽和させることにより消去した。選択的スピン格子緩和時間($T_{1\rho}$)は、選択的ラジオ波パルス照射を用いた飽和回復法により測定した。一次元飽和移動差スペクトルの測定は、本質的にはNOE差スペクトルを測定する時のパルスシーケンスを利用した。二次元スペクトルを測定する際にはシグナルの緩和速度と飽和移動速度を考慮し混合時間を決定した。測定時間は、約4時間であった。タイムドメインデータ (1k \times 256) をゼロフィリングにより1k \times 512として二次元FTを行なった。ウィンドウ関数にはsin関数を使った。スペクトルは、絶対値表示で示してある。また、化学シフトの基準はDSSである。

[結果と考察] フェリ型ウマMb(pD 7.56, 35 $^\circ\text{C}$) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで低磁場に常磁性シフトしたシグナルの領域を図2Aに示した。観測されているシグナルのほとんどがヘム側鎖のプロト

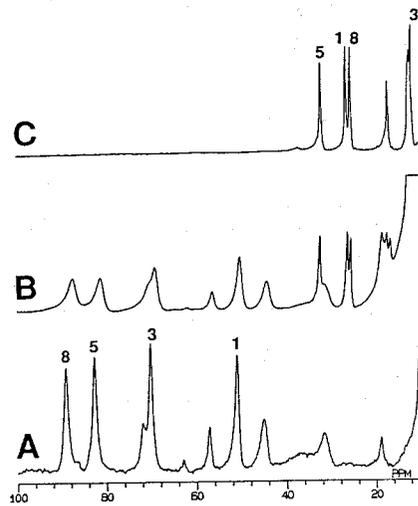


図2 0.5mM ウマ心筋フェリ型Mbの270MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの低磁場に超微細シフトしたシグナルの領域(35 $^\circ\text{C}$) . (A) pD 7.56. (B) +0.25mM N_3^- , pD 8.23. (C) +5 mM N_3^- , pD 8.41. N_3^- を加えるとともにフェリ型MbのがメトアジドMbに変わり、両者のシグナルはきれいに分離して観測される。番号はヘムメチルシグナルの帰属を示す。

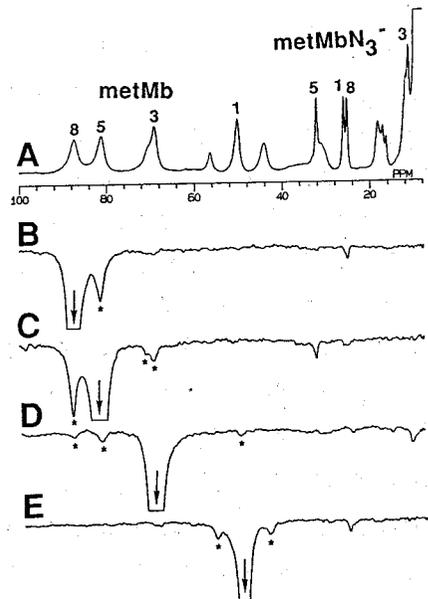


図3 図2(B) の試料で行った一次元飽和移動差スペクトル。フェリ型Mbのヘムメチルシグナルをそれぞれ選択的に照射することによりメトアジドMbの対応するシグナルに飽和移動が観測される。

ンに由来し、シグナル帰属は発表されている³⁾。ヘムの電子構造をNMRにより研究する際に重要なメチルプロトンシグナルの帰属は、スペクトルとともに番号で示されている。これまでに報告されているさまざまなフェリ型Mbのメチルプロトンシグナルのシフトパターンは、Mbの種類によらず不変である（すなわち低磁場側から8, 5, 3, 1-メチル）。このことは、 $S=5/2$ であるヘム鉄の3d電子の配置の場合、メチルプロトンシグナルのシフトパターンは、近位ヒスチジン側鎖のイミダゾール環のヘムに対する配向に、 $S=1/2$ の状態の場合⁴⁾ ほど影響を受けないことに起因する。0.5当量の N_3^- を加えた時のスペクトルを図2Bに示した。フェリ型ウマMbのヘム鉄には H_2O が配位しているが、 N_3^- がヘム鉄に配位してメトアジドMbとなるとスピン状態が高スピン($S=5/2$)から低スピン($S=1/2$)に変わり、メトアジドMbのシグナルは10-30ppmに観測される。また、フェリ型Mbのシグナルの線幅が広がっているのは、このMbでの酸-塩基平衡反応のexchange broadeningに起因する。このように2つのスピン状態のMbのシグナルの共鳴周波数の差は大きく、これら2状態間の交換反応を解析する際にきわめて有利なNMRタイムスケールを与えている。また、もし配位子の結合反応と解離反応との速度が等しいならば、シグナルの緩和時間が長い方で飽和移動を観測した方が有利である⁵⁾。フェリ型MbとメトアジドMbのメチルプロトンの T_1^{intr} はそれぞれ約10ms, 約20msであるので、これらの混在した試料での測定では、フェリ型Mbのシグナルを飽和させ（図中↓で示したピーク）メトアジドMbのシグナルへの飽和移動を観測する（図3）。*Dolabella auricularia* Mbで行った同様な測定結果を図4に示している。このMbでの配位子交換反応のタイムスケールは飽和移動観測に都合良く、メトアジドMb→フェリ型Mbの飽和移動も容易に観測できる（図5）。図4、5中○、+で示されたピークは、このMbに存在するヘ

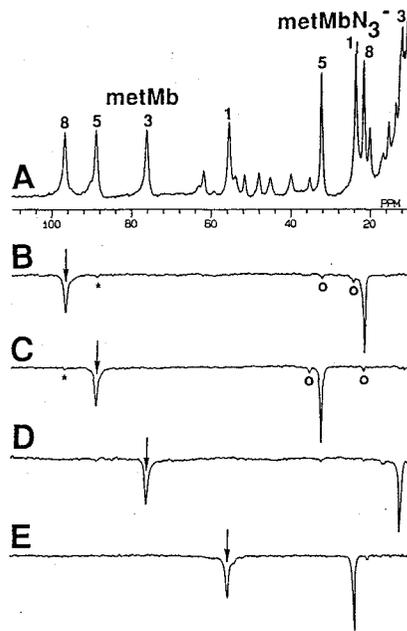


図4 *Dolabella a.* フェリ型MbとメトアジドMbが混在する試料(pD 8.23, 35°C)で、フェリ型Mbのヘムメチルシグナルを選択的に照射することによって観測される一次元飽和移動差スペクトル。

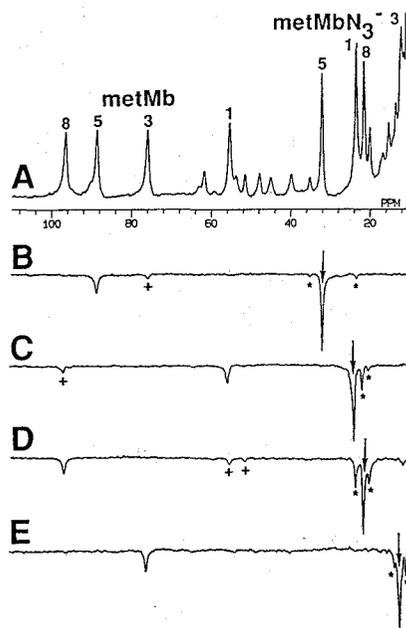


図5 図4の試料でメトアジドMbのヘムメチルシグナルを照射することによって観測される一次元飽和移動差スペクトル。

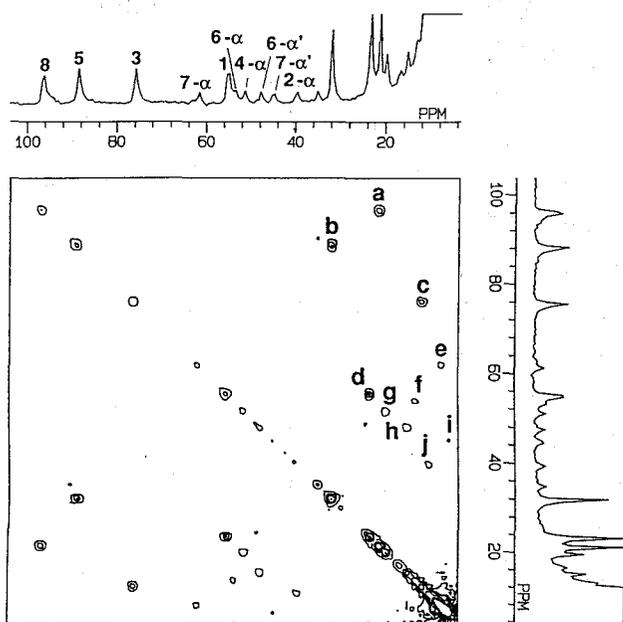


図6 図4、5で使用した試料について観測された二次元交換スペクトル。混合時間は 5ms. *Dolabella a.* フェリ型Mbのヘム側鎖プロトンシグナルの帰属はわかっているので、アルファベットで示したクロスピークよりメトアジド体での対応するシグナルの帰属が容易に行える。二次元法を用いることにより、一次元法にある照射パルスの選択性の問題(図3-5参照)を回避することができるが、クロスピーク、ダイアゴナルピークの強度は混合時間、展開時間での磁化の緩和により減少するので二次元法では飽和移動のための十分な時間をスピンス系に与えることができない。

μ回転異性体由来するシグナル間での飽和移動によるものである。

同じ試料で測定した二次元交換スペクトルを図6に示した。飽和移動による相関ピークは、Mbの二つの状態でのシグナルの対応をはっきりと表している。二次元法では、一次元差スペクトル法で生じる照射パルスの選択性の問題を回避することができる。一方、一次元法では飽和移動が平衡値に達するまでシグナルを飽和させている時間を十分長くすることができるが、二次元スペクトルのピーク強度は、これら常磁性ヘム蛋白質の場合、常磁性緩和によりmsのタイムスケールで減少するため、混合時間の設定には十分注意する必要がある。

飽和移動法は、系の交換反応と磁気緩和のタイムスケールによってその適用範囲が限定される方法論ではあるが、本研究で示されたように、常磁性ヘム蛋白質のNMRシグナルの帰属、配位子結合反応の動力的解析⁶⁾にはきわめて有力な手段となることがわかった。

〔謝辞〕 *Dolabella auricularia Mb*, *Mustelus japonicus Mb*をご提供下さいました高知大学理学部生物学科鈴木知彦先生に感謝致します。西東京科学大学工学部物質工学科の谷田部純氏には、図2のNMRスペクトル測定に関してお世話になりました。

〔参考文献〕 1. R. M. Keller and K. Wuthrich (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 1132-1139. 2. V. Thanabal *et al.* (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 265-272. 3. Y. Yamamoto *et al.* (1990) *Eur. J. Biochem.*, 192, 225-229. 4. Y. Yamamoto *et al.* (1990) *FEBS Lett.*, 264, 113-116. 5. N. R. Krishna *et al.* (1979) *Biophys. J.*, 26, 345-366. 6. Y. Yamamoto *et al.* (1992) *FEBS Lett.*, 310, 71-74; *Biochim. Biophys. Acta*, in press.

横浜国大工 ○阿久津秀雄、平澤政明、M. M. Dhingra, 堀住輝男

Redox Potentials of Cytochrome c_3 and the Properties of Its Axial Ligands.

○ H. Akutsu, M. Hirasawa, M. M. Dhingra, T. Horizumi
Department of Bioengineering, Yokohama National University

Cytochrome c_3 is distinguished from the more commonly studied cytochromes by the presence of multiple heme groups in a single polypeptide. All of the axial ligands are the imidazole groups of histidine residues. All of the C2 proton signals of the coordinated imidazole rings were identified by specific deuteration. They appeared at extremely high fields and scattered in a wide range from -4 to -22 ppm. This clearly shows that the chemical properties of the coordinated imidazole rings are quite different from one another. This might be responsible for the extremely low redox potentials of the four hemes. Characterization of these signals has been carried out.

1. はじめに

チトクロム c_3 は硫酸還元菌の電子伝達系において中心的役割を果たしている。その電子授受の中心であるヘム鉄には、ヒスチジンのイミダゾールが2つつつ配位しており、これらのヒスチジンは電子授受に深く関係している可能性がある。またチトクロム c_3 は、他のC型ヘムに比べてその酸化還元電位が非常に低いことを特徴としているが、これにも配位しているヒスチジンの化学的性質が関係している可能性がある。これらを調べる上で、ヒスチジンイミダゾールのC2あるいはC4プロトンは良いプローブとなる。このプローブを使うためには、チトクロム c_3 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルから、ヒスチジンのイミダゾールC2あるいはC4プロトン由来のシグナルを特定する必要がある。しかも、これらが同定でき、解析することができれば、軸配位しているヒスチジンがどのような形で分子内電子移動、及び酸化還元電位に関与しているかを知ることができ、得ることができる。ヘムモデル系、あるいは酸化還元電位の低いヘムタンパク質で、軸配位しているイミダゾールC2プロトンが $^1\text{H-NMR}$ でタンパク質領域よりもかなり高磁場側にシグナルを与えることが報告されている。そこで、本研究ではチトクロム c_3 内のヒスチジンイミダゾールC2プロトン由来のシグナルを同定し、アミノ酸配列上での帰属を行い、その酸化還元電位との関係を考察することを目的とした。

キーワード：電子伝達タンパク質、チトクロム c_3 、酸化還元電位、軸配位子

○あくつ ひでお、ひらさわ まさあき、M. M. ディングラ、ほりずみ てるお

2. 実験

ヒスチジンのイミダゾールC2プロトンの選択的重水素化は、ヒスチジンを p^2H 8.2の重水中、80°Cで48時間還流することによりおこなった。つぎに、当研究室で開発した化学合成培地に重水素化ヒスチジンを加えて硫酸還元菌宮崎F株を培養して、チトクロム c_3 のヒスチジン残基の重水素化をおこなった。硫酸還元菌宮崎F株およびHildenborough株からのチトクロム c_3 の精製には、陽イオン交換クロマトグラフィー(S-Sepharose)と分子ふるいクロマトグラフィー(Superdex)を用いた。純度はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびPurity Indexで確認した。チトクロム c_3 の 1H -NMRの測定にはBRUKER AM-400を用いた。縦緩和時間の測定はinversion-recovery法によった。差NOEスペクトルはon, off resonanceを16回づつ交互に積算したFIDの差をとることによって得た。

3. 結果と考察

(1) ヒスチジンのイミダゾールC2プロトンの同定

酸化型チトクロム c_3 の 1H NMRスペクトルの高磁場側-5~-25ppmあたりにはFig. 3に見るように、非常に幅の広いシグナルが観測された。このようなシグナルはヘムそのもの、あるいはヘムに配位しているものに由来すると考えられる。特に、配位ヒスチジンのC2プロトンが高磁場側に現れるとの報告があるので、チトクロム c_3 のヒスチジン残基の選択的重水素化を行った。すると、ヒスチジンを選択的に重水素化したチトクロム c_3 では、高磁場側の8個のシグナルの強度が著しく減少した。したがって、この8個のシグナルは、ヘム鉄に配位しているヒスチジンのC2プロトンに帰属できる。これらのシグナルに低磁場側から $Im_1 \sim Im_8$ と番号を付けた。これら8個のシグナルは、高磁場側に行けば行く程、線幅が広くなるという特徴を持っている。

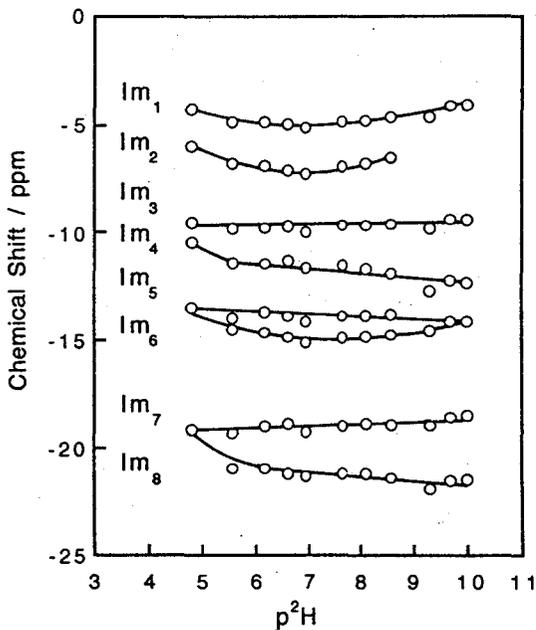


Fig. 1 pH dependence of the chemical shift of the ligated imidazole C2 protons

(2) ヒスチジンC2プロトンシグナルのキャラクタリゼーション

ヒスチジンC2プロトンの8つのシグナルのpH滴定実験の結果をFig. 1に示す。図からわかるように、このpH範囲内ではイミダゾールのNHプロトンの解離はないと考えられる。また、 Im_3 と Im_7 、 Im_4 と Im_6 がそれぞれ似たような変化を示すので、(Im_3, Im_7)、(Im_4, Im_6)が同じヘムの第5、第6配位子になっている可能性が示唆される。

次に、溶媒のヘム配位子への近接度を調べるために、ヒスチジンC2プロトンシグナルのアルコール濃度依存性を調べた。メタノール、エタノール、イソプロパノールについての結果をFig. 2にまとめた。 Im_2, Im_3, Im_6 の3つのシグナルだけが変化しており、(A)メタノール、(B)

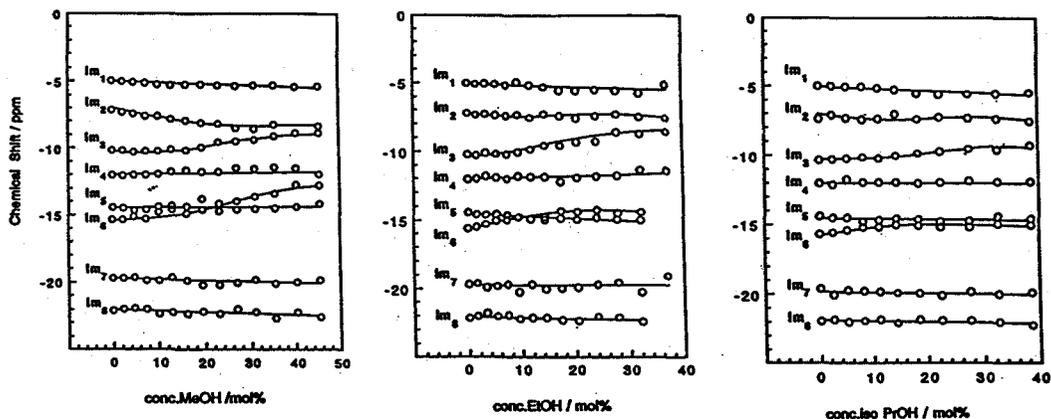


Fig. 2 Alcohol dependence of the chemical shift of the ligated imidazole C2 protons

エタノール、(C) イソプロパノールと、アルコール分子の大きさが大きくなるに従って、変化の割合が小さくなっていることがわかる。特に Im_2 については、メタノールでは変化があるものの、エタノールになるとほとんど変化が観られなくなっている。これらのシグナルの変化が、タンパク質の変性によるものかどうかを調べるために、 α ヘリックスの1つに含まれている His 67 の変化を追跡したところ、 $Im_{2,3,6}$ の変化とは異なっていた。したがって、 $Im_{2,3,6}$ の化学シフトの変化はアルコールとの相互作用の局所的影響によるといえる。ところで、X線結晶構造解析によれば、8個の配位ヒスチジンのうち、His 22, His 34, His 106 の側には、水が入り込んでいる。これら3つのヒスチジンは溶媒の影響を受け易いと考えられるので、 $Im_{2,3,6}$ は His 22, His 34, His 106 のどれかに対応していると考えられる。

シグナル $Im_1 \sim Im_8$ について、スピン格子緩和時間 (T_1) 値を測定したものを Table 1 に示す。なお、待ち時間 τ に対してプロットする際の強度については、シグナルがブロードであるため、その高さを強度として用いた。いずれのシグナルも、鉄の常磁性の影響を受けて、非常に短い緩和時間を持っている。その中であって、 Im_1 は比較的長い T_1 値を持っている。

Table 1 T_1 values of the ligated imidazole protons (at 30°C / ms)

	Im_1	Im_2	Im_3	Im_4	Im_5	Im_6	Im_7	Im_8
T_1	2.0	-	1.2	1.0	1.0	1.2	0.6	0.7

(3) 1次元NOE

本研究で対象にしているプロトンは、ヘム鉄に直接配位しているため、緩和が非常に速いことは前節で述べた。このため、そのプロトンのNOEを測定することは非常に困難で

ある。そこで本研究では、測定の繰り返し時間を短くして、緩和の速いプロトンのみを観測できるようにパラメーターをセットした。このようにして得られたNOEの差スペクトルを解析することで、そのシグナルの帰属を試みた。幸いにも、チトクロム c_3 の場合、X線結晶解析によって、各プロトンの座標が解っているので、その座標から、NOEが現れると期待される5 Å以内のプロトンに注目して測定を行った

$Im_1 \sim Im_8$ まで8個のシグナルについて様々な条件で測定してみたが、中でも比較的美丽にNOEの現れたのは、 Im_7 を照射したときであった。 Im_7 を照射によって観測された6.0 ppmのシグナルは、既に帰属されている Tyr 66 のシグナルで、このことから、 Im_7 はヘム4の第6配位子である His 70 に帰属できる。

(4) Hildenborough株のチトクロム c_3 のNMRスペクトルとの比較

D. v. Hildenborough (以下 D. v. H と記す) は宮崎株に非常に近い株で、チトクロム c_3 の一次構造はやく80%の相同性がある。配位子であるヒスチジンのイミダゾール基に水素結合している水分子は、D. v. M F 由来のチトクロム c_3 では3つあるのに対して、D. v. H 由来のチトクロム c_3 では2つしかないことが、姫路工大の安岡らのX線結晶解析によって明らかにされている。そこで、D. v. H チトクロム c_3 のNMRスペクトルをFig. 3に示す。D. v. Mで見られたヒスチジンC2プロトンシグナルのうち、高磁場側のものはほぼ同じ位置に見られるが、低磁場側のものはかなり高磁場側に移っている。また、化学シフトのアルコール依存性についても比較するために、D. v. H チトクロム c_3 のヒスチジンイミダゾールシグナルのメタノール濃度依存性を調べた。その結果、変化のあったシグナルは2つで、配位子に水素結合している水分子が2つであるというX線結晶解析の結果と対応している。

宮崎株とHildenborough株のチトクロム c_3 のイミダゾールシグナルの温度依存性をも調べた。宮崎株のチトクロム c_3 では Im_1, Im_2 がキュリー則からはずれるような挙動を示している。これに対し、D. v. H のチトクロム c_3 では、キュリー則からはずれるような挙動を示すシグナルはない。この結果は、D. v. M チトクロム c_3 のヘム配位子のうち2つは温度とともに、構造あるいは運動性に变化が起こることを示唆する。

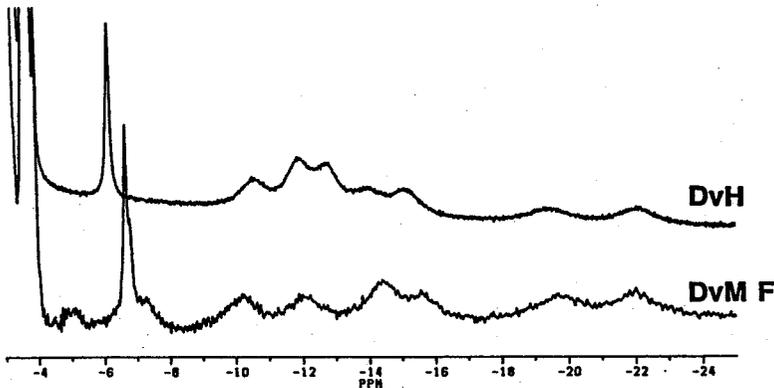


Fig. 3 1H -NMR spectrum of cytochrome c_3

(5) まとめ

以上の結果をもとに、8個のイミダゾールシグナルを4つのヘムに帰属した。この結果をもとに、配位子の性質と酸化還元伝の関係について考察する。

神女薬大 ○ 杉浦真喜子 山上知佐子

Interaction of Anticonvulsant Aralkyl Carbamates with Lipid Bilayer.

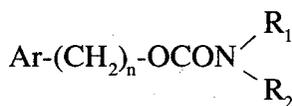
○ Makiko Sugiura and Chisako Yamagami
Kobe Women's College of Pharmacy

The interaction of a series of aralkyl carbamates which have anticonvulsant activities with lipid bilayer has been studied using $^1\text{H T}_1$ and signal line width. The values of $^1\text{H T}_1$ of the drugs are deduced with the incorporation in the lipid bilayer. This effect depends on the log p of the drug, and is larger in In-derivatives than in Ph-derivatives.

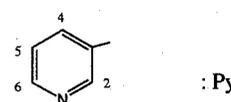
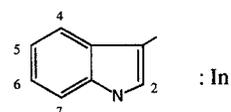
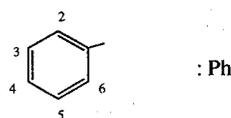
The values of $^1\text{H T}_1$ of lipid bilayer are not affected but the values of signal line width are deduced by the addition of the drugs. This observation suggests the increase of fluidity of the lipid bilayer, and this effect seems to depend on the length or volume of the drug.

[はじめに]

薬物と膜との相互作用を検討することは、その薬物の作用機序を知る手がかりとなることが多く、種々の手法を用いての実験、研究が数多くなされている。その内 NMR の緩和パラメータは、膜の側、あるいは薬物側の運動性の情報、そして時に距離の情報も与えることから、このような研究には欠かせない手法である。



	Ar	n	R ₁	R ₂	log P
PH1	Ph	0	Me	Me	1.69
PH2	Ph	1	H	H	1.22
PH3	Ph	1	Me	H	1.68
PH4	Ph	1	Me	Me	2.16
PH5	Ph	2	Me	Me	2.40
PH6	Ph	3	Me	Me	2.93
IN1	In	2	H	H	1.69
IN2	In	2	Me	H	2.17
IN3	In	2	Me	Me	2.54
IN4	In	2	Et	Et	3.30
PY1	Py	3	H	H	0.46

キーワード： リポソーム膜、 Aralkyl Carbamate、 $^1\text{H T}_1$ 、 シグナル半値幅

すぎうら まきこ、 やまがみ ちさこ

ところで $R_1OCONR_2R_3$ であらわされる一連の Aralkyl 及び Alkyl Carbamate は抗けいれん作用を有することが知られている。その定量的構造活性相関の研究はすでに詳細になされ、その $\log P$ と ED_{50} との間にはある相関のあることなどが見いだされている。¹⁾ 演者らは、これら薬物の薬理活性は、当然細胞膜の透過性、親和性とも関係あるものと考え、その基礎実験として、DPPC による合成リン脂質リポソーム膜とこれら薬物との相互作用について、主にシグナルの線幅と T_1 の変化を用いて検討を加えた。今回用いたのは前ページに示すような Aralkyl Carbamate である。

[実験]

DPPC 濃度 0.04 M、薬物濃度 0.01 M (M/薬物 = 4/1) または 0.04 M (M/薬物 = 1/1) になるように、常法によりリポソーム膜あるいは薬物を含んだリポソーム膜を調

表 1. Free な状態 (CD_3OD 中) とリポソーム膜中での薬物 $^1H T_1$ (sec) の比較 (40°C)

	R	CH ₂			Ar				
	CH3	1'	2'	3'	2,6	3,5	4		
PH1	4.56				6.28	5.75	6.06		
M + PH1	0.99				1.64	1.62	1.53		
PH2		3.61			6.55	6.39			
M + PH2		0.62 (0.71)			1.76 (2.20)	1.62 (2.00)			
PH3	3.97	3.38				6.40			
M + PH3	1.21 (1.30)	0.69 (0.64)				1.46 (1.45)			
PH4	4.70	3.97			7.15	6.88			
M + PH4	1.11 (1.18)	0.67 (0.67)			1.48 (1.41)	1.36 (1.27)			
PH5	4.23	2.90	2.89		5.81	5.71	6.54		
M + PH5	1.01	0.61	0.49		1.21	1.06	1.21		
PH6	4.21	2.70	2.43	2.72	5.68	5.72	6.73		
M + PH6	0.96	0.58	0.49	0.43	1.12	0.95	1.12		
IN1		1.78	1.89		5.14	5.68	3.61	3.91	4.10
M + IN1		--	0.46		0.69	0.84	0.73	0.77	0.59
IN2	3.16	1.73	1.89		4.70	5.54	3.48	4.30	4.04
M + IN2	0.80	--	--		0.61	0.73	0.73	0.75	0.60
IN3	3.64	1.85	1.96		5.28	5.91	3.74	4.14	4.26
M + IN3	0.68	--	--		0.55	--	0.65	0.69	0.63
IN4	2.16	1.62	1.67		4.75	5.46	3.42	3.78	3.91
M + IN4	0.42	--	--		0.48	--	0.54	0.59	0.53
PY1		1.83	1.77	2.01	4.19	4.35	4.33	5.01	
M + PY1		1.56	1.44	1.49	4.29	3.94	4.62	5.27	

() 内は、M/薬物 = 1/1 での値

整し、40℃、500 MHz で ^1H T_1 及びシグナル半値幅の測定を行なった。一部の物については、併せて ROESY の測定も行なった。

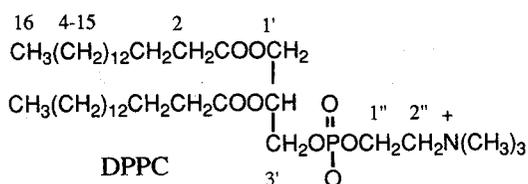
また、それぞれの薬物を 0.01 M 濃度で CD_3OD に溶解し、同じく 40℃で ^1H T_1 の測定を行なった。

[結果と考察]

表 1 に Free な状態とリポソーム膜中での薬物側の T_1 の変化を、また表 2、表 3 には、薬物添加によるリポソーム膜側の T_1 及び半値幅の変化を示した。

表 1 で明らかなように、PY1 は、リポソーム膜共存の状態でも、ほとんどその T_1 値は CD_3OD 中での値と差が見られない。このことは、この薬物がリポソーム膜中へは入り込んでいないことを示唆し、PY1 の小さい Log P からも十分に予想出来ることでもある。

PY1 以外の薬物は、いずれもその T_1 値が CD_3OD 中に比べ著しく小さくなっており、リポソーム膜内部に薬物の入り込んでいることが示唆される。おおざっぱに見て、リポソーム膜中での T_1 値は CD_3OD 中での T_1 値の 10~20 % に減少している。一般に Log P の大きいもの程その減少の度合いが大きく、リポソーム膜中に入りやすいことを示している。また、In 誘導体のほうが、Ph 誘導体より T_1 の値は大きく減少しており、その効果の大きいことが分かる。



一方表 2 から解かるように、リポソーム膜側の各プロトンの T_1 は、薬物添加によっても顕著な変化は見られない。このことは恐らくリポソーム膜の ^1H T_1 が主にリポソームの大きさで決まってきたこと、また薬物の添加の有無、種類にかかわらず、出来上がったリポソームの大きさはほとんど同じであることを示す結果と思われる。

これに対して各 ^1H シグナルの線幅には、薬物

表 2. 40℃に於けるリポソーム膜各 ^1H シグナルの T_1 値の変化 (sec)

	H 16	H 4-15	H 2	H 2'	H 1''	H 2''	NMe
M	0.75	0.62	0.38	0.30	0.31	0.39	0.44
M + PH1	0.83	0.61	0.39	0.31	0.30	0.41	0.46
M + PH2	0.78	0.58	0.36	0.26	0.31	0.37	0.42
	(0.74)	(0.56)	(0.35)	(0.25)	(0.25)	(0.36)	(0.41)
M + PH3	0.84	0.64	0.37	0.28	0.29	0.39	0.46
	(0.62)	(0.51)	(0.36)	(0.27)	(0.29)	(0.38)	(0.41)
M + PH4	0.88	0.63	0.40	0.30	0.31	0.42	0.46
	(0.62)	(0.50)	(0.34)	(0.26)	(0.29)	(0.38)	(0.40)
M + PH5	0.88	0.65	0.41	0.31	--	0.44	0.50
M + PH6	0.81	0.62	0.39	0.26	0.30	0.41	0.47
M + IN1	0.81	0.60	0.40	0.34	0.33	0.43	0.47
M + IN2	0.67	0.53	0.34	0.28	0.29	0.36	0.41
M + IN3	0.63	0.51	0.32	0.27	0.27	0.35	0.38
M + IN4	0.65	0.54	0.37	0.30	0.32	0.39	0.40
M + PY1	0.84	0.61	0.38	0.23	0.27	0.38	0.45

() 内は、M/薬物 = 1/1 での値

添加によって、一部を除き一般に細くなるという傾向が見られる。(表3)これは、薬物添加によってリポソーム膜の流動性が増したと解釈出来る。しかしその変化の仕方は、疎水性部分と膜表面にあたる親水性部分とでは微妙に異なり、また Ph 誘導体と In 誘導体との間にも差が見られる。ここでも In 誘導体の方が効果が大きい。

表 3. 40℃に於けるリポソーム膜各¹Hシグナルの半値幅変化 (Hz)

	H 16	H 4-15	H 2	H 2'	H 1"	H 2"
M	42	86	108	63	54	37
M + PH1	39	63	103	65	52	38
M + PH2	32	62	102	51	47	36
	(25)	(57)	(88)	(28)	(32)	(23)
M + PH3	32	58	101	55	48	37
	(26)	(59)	(99)	(31)	(31)	(25)
M + PH4	32	59	101	51	46	34
	(27)	(58)	(88)	(33)	(30)	(23)
M + PH5	31	58	89	51	--	30
M + PH6	30	60	89	46	40	29
M + IN1	26	53	88	44	60	34
M + IN2	27	63	83	44	55	36
M + IN3	28	70	85	45	45	37
M + IN4	28	71	105	38	48	28
M + PY1	38	57	111	57	51	33

() 内は、M/薬物 = 1/1 での値

ム膜内でのコンフォメーションの違いを反映していると思われる。すなわちPh誘導体は比較的長く伸びた型で存在し、より長く伸びた分子ほど疎水性部分末端のMe基の運動に影響を与え、一方In誘導体は折れ曲がって比較的コンパクトな型で存在しているため、より小さな分子の方が膜内部の疎水性部分に入り込んでいると解釈出来る。一方膜の外側に位置するH 2"には、両誘導体共に、薬物の大きさあるいは長さがある程度以上で初めて影響を与えており、薬物は、むしろ膜表面よりも膜内部に入りこんでいる可能性を示唆している。

以上のように、薬物側の¹H T₁、リポソーム膜側の線幅の変化によって、Ph誘導体、In誘導体共にリポソーム膜中に入り込んでいること、その入りやすさは分子の型とlog Pの両方に依存していることが明らかになった。また両誘導体共、かなり膜内部に入り込んでいる可能性が高いが、その膜中でのコンフォメーションには差があることも予想される。

- 1) M.Tanaka, K.Horisaka, C. Yamagami, N.Takao, and T.Fujita,
Chem. Pharm. Bull. 33, 2403 (1985).

膜の疎水性部分を代表する 16-Me 基では、Ph誘導体の場合分子の長さに依存して線幅の減少が見られ、Me基の運動性が増していることが分かる。一方R置換基の違いはあまり問題にならない。これに対しIn誘導体の場合は、その差は小さいがむしろR置換基の小さい程Me基の運動に影響を与えている。これは、Ph誘導体とIn誘導体のリポソーム

3重共鳴3次元, 4次元NMRによるDNA結合蛋白質の構造解析

○白川昌宏, 松尾浩, 上垣浩一, 森田勇人, 京極好正
(阪大 蛋白研)

Structural Studies of DNA Binding Proteins by Means of Triple-Resonance Three-Dimensional (3D) and Four-Dimensional (4D) NMR

○M. Shirakawa, H. Matsuo, K. Uegaki, E. H. Morita and Y. Kyogoku
(Institute for Protein Research, Osaka University)

Triple-resonance three-dimensional (3D) and four-dimensional (4D) NMR approach was examined in the structure studies of three DNA binding proteins. By using the techniques, almost all the resonances of ^1H , ^{15}N and ^{13}C in the proteins were assigned. Especially, the combination of three four-dimensional spectroscopies seems to be powerful. Determination of the solution structures of the proteins will also be discussed.

[序論] 3次元, 4次元などの多次元NMRへの次元の拡張と、 $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 3重共鳴NMRの開発により, NMRによる蛋白質の構造解析は飛躍的な進歩を遂げた。加えて, ^{15}N 核, ^{13}C 核に対するフィルターを使うことにより, 蛋白質-蛋白質複合体, 蛋白質-核酸複合体などの相互作用の解析も可能になってきた。

今回我々は、異なる構造モチーフを持つ3種類のDNA結合蛋白質であるλファージCro蛋白質, マウスIRF-2蛋白質DNA結合ドメイン, マウスOct-3のホメオドメインについて ^{15}N , ^{13}C 安定同位体を利用したNMRの全シグナルの解析と、それにもとづく構造決定を行ったので報告する。

蛋白質のNMRシグナルの帰属のかなりの部分は3重共鳴法とHCC H法によって行った。特に、いくつかの4次元NMRを組み合わせて行うことによりほぼ自動的に主鎖、側鎖とも帰属する手法についても検討した。

[キーワード] 3重共鳴NMR 4次元NMR DNA結合蛋白質 立体構造決定

しらかわ まさひろ, まつお ひろし, うえがき こういち, もりた はやと, きょうごく よしまさ

[実験] λ ファージCro野性型, 及びV55C変異体, マウスIRF-2蛋白質DNA結合ドメイン(1-112)及び62残基からなるマウスOct-3ホメオドメイン蛋白質はいずれもT7ファージ ϕ 10プロモーター, 又は大腸菌tacプロモーターの下流に対応する遺伝子を組み込むことにより大腸菌で発現させた. 安定同位体ラベルは大腸菌を培養するM9合成培地に $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 又は ^{13}C -グルコースを加えることにより行った. 結合するDNA断片は, Applied Biosystem社製DNA合成機で調製した.

NMR測定は主にBruker AMX-500 spectrometerとB.B.inverseプローブ, triple-resonanceプローブを使用した. 測定したスペクトルは以下の通りである.

2重共鳴2次元NMR: ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{15}N HMQC-J, ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY

2重共鳴3次元NMR: ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC, ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC, ^1H - ^{13}C NOESY-HSQC, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY, HCCH-TOCSY-J

3重共鳴3次元NMR: HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HCACO, HN(CA)CO, H(CA)(CO)NNH,

4次元NMR: HCA(CO)NNH, HNCAHA, HCCH-TOCSY

結果と考察

[1] 主鎖の帰属

(a) 3重共鳴3次元NMRを組み合わせる方法

まず主鎖を構成する5種類の核(アミドプロトン, アミド窒素, α 炭素, α プロトン, カルボニル炭素)の化学シフトの内, 分離がよく, 測定の容易なアミドプロトンとアミド窒素の化学シフトを, ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルで決定し, それを残基の同定に用いる.

残基間の相関を得るのには, (i) α プロトンを使う, [^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC, H(CA)(CO)NNH], (ii) α 炭素($^{13}\text{C}\alpha$)を使う, [HNCA, HN(CO)CA], (iii) カルボニル炭素を使う, [HNCO, HN(CA)CO] という3つの方法を使った.

実際には, これらのスペクトルを全て測り, 残基内のアミドプロトン, アミド窒素, α 炭素, α プロトン, カルボニル炭素, 及び, 一つ前の残基の α 炭素, α プロトン, カルボニル炭素の化学シフトを可能な限りすべて決定して表を作り, 簡単なソーティングプログラムによって半自動的な帰属を行う方法が有効であった.

これら3種の方法の内, 比較的化学シフトの分離がよく連鎖帰属に有効と思われたのは (i)と(iii)である. しかし, (iii)での残基内のアミドプロトン-カルボニル炭素の相関を求めるHN(CA)COの感度は他の測定法に較べて低く, また, $^{13}\text{C}\alpha$ 核の緩和時間に敏感なため, 適用し得る蛋白質の分子量, 及び濃度に制約がある.

3重共鳴法の中で比較的簡単に測定でき、比較的感度の良いスペクトルの組み合わせで行う(ii)の方法では、残基の種類が少なく、ヘリックス構造を多く持つDNA結合蛋白質では、 α 炭素の化学シフトの重なりが多いことによる制約があった。

(b) 2つの3重共鳴4次元NMRを使う方法

同一残基内のアミドプロトン、アミド窒素、 α 炭素、 α プロトンの化学シフトを同時に決定する4D HNCAHA と、残基内のアミドプロトン、アミド窒素と、一つ前の残基の α 炭素、 α プロトンの化学シフトを同時に決定する4D HCA(CO)NNHの2つの4次元NMRによって主鎖の連鎖帰属を行う。実際にはHNCAHAはかなりの割合で一つ前の残基の α 炭素、 α プロトンの化学シフトをも同時に与える。帰属の様子を図1に示す。まず ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上で同定したアミドプロトン、アミド窒素の化学シフトに対応する4D HNCAHAの $^1\text{H}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ 2次元プレーン上で残基内の α 炭素、 α プロトンを帰属し、その化学シフトを基に、4D HCA(CO)NNHスペクトル上で1つ前の残基のアミドプロトン、アミド窒素の化学シフトを求める。この作業を続けるのである。

利点としては、2つのスペクトルのみ(多くの場合は、4D HNCAHAの1つのスペクトルのみ)で帰属をするので、実験ごとの再現性の制約を受けないこと、次元を上げたことによりシグナルの重なりが激減すること、連鎖帰属の手順がかなり直線的で簡便であることなどが挙げられる。

この方法で帰属をし、(a)の(iii)の方法でカルボニル炭素の化学シフトの情報で相補、確認を行うのが効率的であると思われる。

[2] 側鎖の帰属

側鎖の帰属の場合、3D HCCH-TOCSYと3D HCCH-COSYを併用する方法は、Lys, Argなどの長い側鎖を持つ残基に関してはシグナルの重なりが著しく、また、炭素核の帰属の手順が複雑で誤りの無い帰属を得るのが困難であった。

4D HCCH-TOCSYを用いれば、その問題が解決される。4D HNCAHA, 4D HCA(CO)NNHなどで帰属した主鎖 $^1\text{H}\alpha$ 核、 $^{13}\text{C}\alpha$ 核の化学シフトに対応する $\omega 1(^1\text{H}\alpha)$ - $\omega 2(^{13}\text{C}\alpha)$ 2次元プレーン上で、側鎖のプロトン、 ^{13}C 核の帰属を行う。図2にスペクトルの1部を示す。Lysのように長い側鎖も簡便かつ確実に帰属できる。

[3] 構造計算

得られた帰属を基に主として、3次元 ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC, ^1H - ^{13}C NOESY-HSQCなどからプロトン間の距離情報を、 ^1H - ^{15}N HMQC-J, HCCH-TOCSY-J, E-COSYなどから角度情報を収集し、溶液中での立体構造を計算した。特にCroの場合には ^{13}C -double half filtered NOESYによって2量体間の分子間NOEを測定し、これを2量体構造の計算に用いた。構造計算にはGüntertらの開発した distance geometryプログラムDIANA, 中井らの開発したmolecular dynamicsプログラム EMOSS (Nakai, T.,

Kidera, A., and Nakamura, H. 1993, *J. Biomol. NMR.* 3, 19-40.) を用いた。Cro で得られた構造を図3に示す。

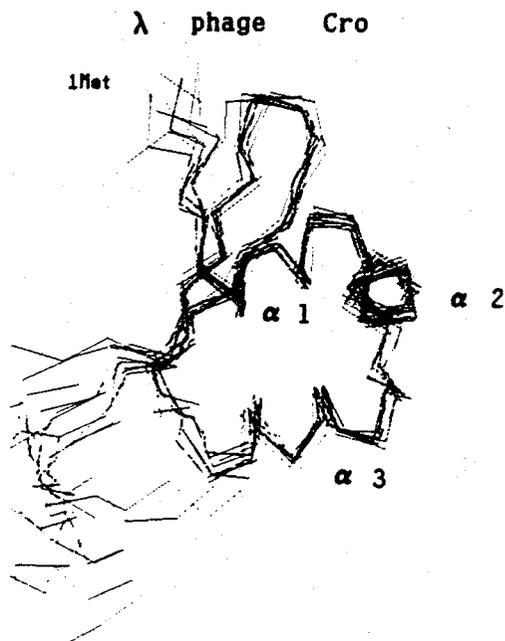
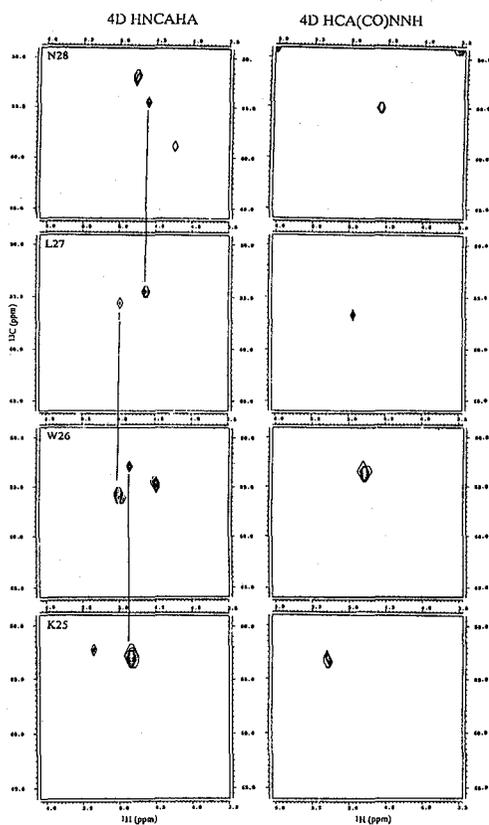
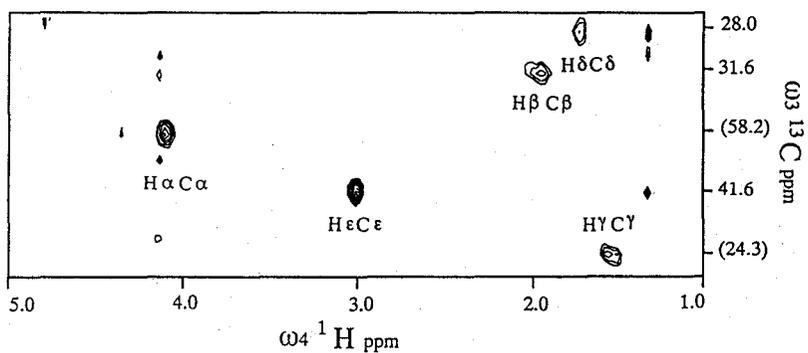


図3 λ Cro の立体構造

図1 2つの4次元NMRによる主鎖の帰属 (試料:IRF2)



$\omega_1(^1\text{H})=4.11\text{ppm}$ $\omega_2(^{13}\text{C})=58.2\text{ppm}$ Lys21
 図2 4D HCCH-TOCSY の一部 (試料: λ Cro)

L13 選択的同位体標識 - NMR測定法における最近の進歩

○甲斐荘正恒、楯 真一、三宅洋子、鎌田 創、滝沢由紀子、千野貴史
潮田利夫*、鮫島達也*
都立大・理、*青山学院大学・理工

Recent Progress in Mutidimensional NMR Methods Using Selective Isotope Labeling Techniques

Masatsune Kainosho, Shin'ichi Tate, Yoko Miyake, Hajime Kamada, Yukiko Takizawa
Takashi Chino, Toshio Ushioda * , Tatsuya Samejima*
Tokyo Metropolitan University, Aoyama Gakuin University *

ABSTRACT Selective isotope labeling methods have been compared with the conventional multidimensional multinuclear NMR methods in the aspect of structural studies of proteins over 20 kDa molecular weight. Laborious works to prepare variety of selectively labeled proteins seems to be rewarding for getting precise local structural information in the region of interest.

はじめに 遺伝子工学の進歩により容易に調製可能となった ^{13}C 、 ^{15}N -高濃度均一標識試料の利用により、タンパク質の溶液内立体構造の決定手法は画期的な発展を遂げた。様々な多核・多次元 (3D-, 4D-)NMR技術の発展が、対象となるタンパク質の分子量限界を大きく拡張するとともに、スペクトル解析の効率を著しく向上させる役割を担った。いうまでもなく、タンパク質の機能と構造との関連を解明するには、それらの立体構造の知識は不可欠である。しかしながら、タンパク質の構造化学的研究においてNMR 分光学の果たすべき役割が、単に立体構造の決定のみにあるとみなすのは正しくない。むしろ、現在のところ20kDa を大きく超える分子量を持つタンパク質においては、NMR シグナルの帰属そのものが困難であり、近い将来にこの程度の分子量を持つタンパク質の立体構造決定が日常的に行なわれるようになる見通しは明るくない。このような状況においては、立体構造決定における分子量限界を拡張する努力と並んで、NMR スペクトル法が本来持つ局所的構造情報をより精度高く、より効率的に入手する手法の開発にも再び目をむける必要がある。その意味で、我々が長年に渡って展開してきた様々な安定同位体利用NMR 技術を比較検討することは有意義であろう。

安定同位体標識法のバリエーション: 安定同位体標識法は多次元NMR 測定技術においては副次的な地位にあると見なされてきた。しかしながら、この両者は全く独立の手法であり、それらの相補的成長こそ今後のNMR 技術の発展の鍵となる。多次元NMR 法の最近の動向を振り返れば、高濃度に均一 ^{13}C 、 ^{15}N -標識したタンパク質の応用としては既に徹底的に利用し尽くされた感否めまい。現在の多次元NMR 技術ではカバーできない高分子量のタンパク質複合系に

安定同位体標識、タンパク質、多次元NMR、SSI、フラック標識アミノ酸、CT HSQC,

かいのしょう・まさつね、たて・しんいち、みやけ・ようこ、かまだ・はじめ、たきざわ
ゆきこ、ちの・たかし、うしおだ・としお、さめじま・たつや

ついて、より機能に密着した構造情報を得ようとするならば、戦略の抜本的再構築が不可欠である。我々が手にすることのできる同位体標識技術は実に様々であり、現在繁用されている均一同位体標識法はその内の最も簡便な一つに過ぎない。以下に、様々な同位体標識法のバリエーションを示し、それらの特徴を大雑把に説明する。

(1) 特定位置のみを同位体標識したアミノ酸の利用：例えば、 α 炭素やカルボニル炭素のみを高濃度に ^{13}C -標識したアミノ酸を合成し、それらを用いてアミノ酸タイプ別にタンパク質を標識する

方法であり、いわば最も古典的な手法である。このような標識タンパク質を用いれば、特定残基の、しかも特定原子に関する詳細な構造化学的知見が、より高感度な低次元(1D, 2D) NMR スペクトルを用いることによって得ることができる。低次元でのNMRは測定時間やディジタル分解能の点で有利であるだけでなく、NOEのクロスピーク強度のように多次元NMRにおいては

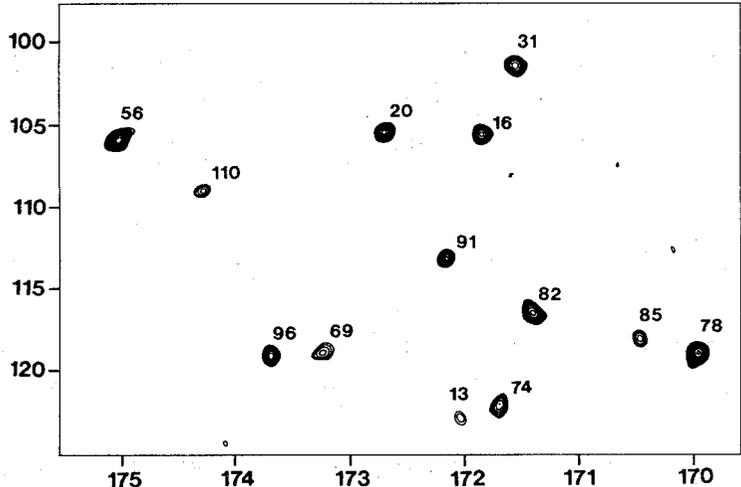


図-1 ^{13}C - ^{15}N HSQC スペクトル。[V, ul- ^{15}N] SSI 30mg/2ml, pH 7.3 0.05M リン酸バッファー; ^{13}C SW=250Hz; ^{15}N SW=1200Hz 32 complex. 50°C, UNITY-300。

は本質的に低下する場合には特に大きな利点となろう。さらに、特定部位を標識したアミノ酸とそれ以外のアミノ酸を異なったパーツで標識したものと組み合わせる方法も有効である。例えば、カルボニル炭素や α 炭素のみを ^{13}C -標識し、他のアミノ酸を含めて全ての主鎖アミド基を ^{15}N -均一標識することは比較的容易に達成できる。このような標識タンパク質はトランスアミナーゼによる ^{15}N -濃度の希釈がない為に、感度が低い2D ^{13}C - ^{15}N タイプの実験に適している。SSIにおいてはプロテアーゼ認識部位のループ部分に相当するアミドプロトンは高濃度均一標識体を用いての3D HNCA スペクトルにおいては一部シグナルが観測できないが、選択標識したSSIの2D ^{13}C - ^{15}N スペクトルからアミド窒素の ^{15}N -NMRシグナルを全て帰属することができた(図-1)。

(2) 複数の部位を同時に標識したアミノ酸の利用；主鎖カルボニル炭素シグナルの帰属に関しては、選択的ラベル法とアミノ酸変異体を組み合わせることにより、分子量78kDaのSSI-プロテアーゼ複合体においても一義的な帰属が可能であることを既に報告している。このような主鎖カルボニル炭素シグナルを必要とする側鎖部分の帰属へと関連づけることは、一対の隣接炭素間を同時に高濃度 ^{13}C -標識したアミノ酸を利用する方法が優れている。同様の帰属拡張は特定のタイプのアミノ酸のみを均一高濃度に ^{13}C -標識したタンパク質の3D HCCH TOCSY 実験によっても原理的には可能である。この場合が炭素鎖の帰属相関が一挙に得られる利点があるが、高分子量タンパク質においては T_2 の制約により、必ずしもそのような結果にならない場合が多い。

高濃度に ^{13}C -標識した炭素源(グルコース、酢酸)と非標識体との混合物を炭素源として生合成したアミノ酸は、生合成経路の立体・位置特異性を反映して、不均一な同位体分布を示し、それらの標識体を"ブロック"標識アミノ酸と名付けた。ブロック ^{13}C -標識したロイシンやバリン等では、プロキラル炭素に結合しているジステレオトピックメチル基の内、pro-Sはシグレット、pro-Rは隣接炭

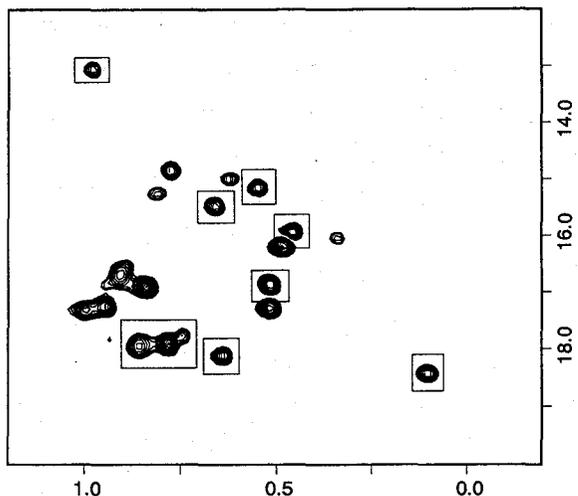


図-2. ^1H - ^{13}C CT HSQC スペクトル。33% [BL- ^{13}C]Leu
 ラベル SSI, pH 7.3、1.5 mM。2T=28ms, 32x14。
 測定時間、80 min。pro-S を四角で囲った。
 AMX-500 を用いて測定。
 決定することができる。最近は、高濃度・均一標識タンパク質を対象に側鎖の立体配座を推定し、立体構造の精密化に応用する報告がNIH グループを中心に報告されている。但し、これらの方法では直接にJ値を観測しているわけではなく、ここで述べたような選択的に ^{13}C -多重標識したタンパク質を用いれば、クロスピーク強度からJ-値を推定する手法に比べて、より確実なデータを与えることになる。

素も同時に標識されるためにグレットとなる。このような特徴を活かし、CT HSQC法を用いることによりpro-Sのみを測定することや、pro-Rとpro-Sの位相を反転させることもできる(図-2)。メチル基の立体特異的帰属以外にも、このようなpro-S選択条件をパルス列に組み入れることにより、タンパク質の内部構造の精密化に有用な構造情報が得られる。

適当な2ヶ所の炭素を同時・高濃度に ^{13}C -標識したアミノ酸を用い、 $^3J_{\text{CC}}$ 或いは $^3J_{\text{CH}}$ を正確に測定すること可能である。

このようなスピ結合の二面角依存性を利用して χ -アングルを実験的に、且つ正確に

(3)低濃度 ^{13}C -標識したアミノ酸の利用: 高分子量タンパク質の ^{13}C -NMRシグナルの直接観測は必ずしも一般的に利用されている手法ではない。しかし、我々のSSI、およびSSI-プロテアーゼ複合体の研究、或いは荒田等の免疫グロブリン関連の見事な研究から主鎖カルボニル炭素の ^{13}C -NMRシグナルの構造化学的有用性は明らかである。カルボニル炭素以外のスペクトルも十分実用的な時間内で測定が可能であるが、望みの位置を選択的に ^{13}C -標識するアミノ酸を合成することは必ずしも容易ではない。各位置の炭素シグナルを実際に観測するための便法として比較的簡単、且つ経済的に実行可能な方法として低濃度(例えば15%)に ^{13}C -標識したアミノ酸を調製し、これらを用いてタイプ別に標識したタンパク質の利用が可能である。この濃度では、殆ど全ての炭素は、天然存在比の場合と同じように、シングルシグナルとして観測されるために、その線幅はダイナミクスを直接反映し、またそれらのHSQCスペクトルを利用した ^{13}C -緩和時間の測定や化学シフトの測定を容易に行なうことができる。SSIに2残基含まれるLysの局所的存在状態に関して興味ある結果が ^{13}C -NMRの線幅から得られた。

タンパク質の ^{13}C -シグナルの化学シフトの精密な測定は高濃度に ^{13}C -均一標識した試料を用いて、CT HSQCにより測定される場合が多いが、この場合には ^{13}C -軸のデジタル分解能を上げることには大きな制約がある。一方、均一に15%程度に ^{13}C -均一標識したタンパク質では、CTの測定が不必要なためにそのような制約はなく、極めて高い精度が得られる。シタフンAに関する実験を現在行なっているが、選択的標識体を用いるSSIの結果を参照するば、測定感度の点からも満足すべき結果が得られている。現時点においては、15%に ^{13}C -標識したグルコースは一般的な入手は困難であるが、98% ^{13}C -標識体に比べれば当然安価でありタンパク質ダイナミクスの研究等に今後利用を検討すべきものの一つである。標識酢酸を炭素源とする発現系の利用も一つの方法である。

(4) 重水素との組み合わせ標識体の利用：高分子量ポリマーのNMR 研究において最大の問題点は T_2 が分子量に比例して短くなる点に起因する。カーボニル炭素の直接観測のように、化学シフトの異方性が大きなシグナルのID NMR測定であれば、線幅の減少という意味で低磁場での測定が有効である。一方、多次元NMR の場合は磁化移動の時間が長く、その間に失われる磁化は T_2 が短くなればなるほど大きな問題となる。また、分子量が大きくなるとポリマーの一部のmobileな領域のシグナル強度と、その他の比較的固い部分に由来するシグナル強度の差は極めて大きくなり、測定上の重大な障害となる。 T_2 を長く伸ばすことができれば、NMR により研究対象となるポリマーの分子量範囲は大幅に拡大し、また選択的同位体標識法との組み合わせがより大きな意味を持つことにもなる。重水素化がその唯一の実用的な可能性である。 ^{13}C 、 ^{15}N -標識したポリマーでのプロトンの緩和時間は直接結合している ^{13}C 、 ^{15}N との双極子緩和機構と共に、近隣に存在する他のプロトンとの双極子相互作用により定まる。後者の項は重水素化により減少させることができる。但し、重水素化率に関してはどこに最適の点があるかは、現在に至るも十分な実験的結論は得られていない。高磁場NMR 装置においては、重水素化に伴うプロトンの化学シフトの二次的同位体効果はかなり大きくなる。

我々は、50% の重水素化率と98% ^{13}C -標識したグルコースを用いて以上のような基本的な問題についての解答を得ようとしている。

将来への展望：NMR によりポリマーや核酸の立体構造が溶液内で決定できることが立証され、しかも短期間でかなり確立した方法論となったことの意義は図りしれない。一般に、溶液内で揺らいでいる領域が多いポリマーであっても、適当な分子量範囲にあり、良いNMR スペクトルが得られるポリマーであれば構造が強固な部分についてはハッキリと、揺らぐ部分については(NOE による距離制限が少ないために) ぼんやりとした描像が得られる。一般に、このようなポリマーは結晶化しにくいものが多く、NMR の立体構造決定手段としての意義はこのような場合に特に大きい。

しかしながら、ある程度以上の大きさにポリマーにとってはNMR を立体構造決定の手段とするのは著しく非効率となることは明らかである。多次元NMR の帰属の自動化についても既に長い間その登場が望まれているが、未だに完成したということを見聞かない。恐らく自動化可能な程度に良質のスペクトルが得られれば、その帰属はそもそもそれほど困難ではないのかもしれない。仮に、素晴らしい自動化ソフトが完成したところで、高分子量ポリマーの多次元NMR の測定・解析上の困難を解決することと、構造決定に必要とするNOE 距離制限を完全に集めることとは両立しない可能性が高い。このようなことを考えれば、我が国において最も盛んな高度な安定同位体標識法の利用や、 ^{13}C -NMR の直接観測等による構造変化部位のマッピング、pHや温度変化によるポリマーの局所構造の揺らぎに関する詳細な研究等のような、時代の波に乗り損なったようにも思えた研究が、新しい技術進歩を取り込みながら発展を遂げるといった事態も十分考えられるのではあるまいか。我々の今後の予定としてはパルス 磁場勾配法の利用、および外部磁場強度の影響などを組み合わせ、高分子量ポリマーのNMR スペクトルの困難さの原因を明確にしつつ新たな方法論の確立を目指したい。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、標識アミノ酸の微生物発酵に協力して頂いた味の素(株)中央研究所に深謝します。また、本研究は主として科学技術庁振興調整費の助成により行なわれたことを付記する。

NMRによるショウジョウバエSxl蛋白質のRNA結合
ドメインの解析

○武藤 裕¹⁾, 木川隆則¹⁾, 武田佳宏¹⁾, 坂本 博^{2), 3)},
志村令郎²⁾, 横山茂之¹⁾

(¹⁾東大・理・生化, (²⁾京大・理, (³⁾現・神戸大・理)

An NMR study on the RNP domain of Sxl protein by stable isotope-labeling technique

Yutaka Muto¹, Takanori Kigawa¹, Yoshihiro Takeda¹, Hiroshi Sakamoto^{2,3}, Yoshiro Shimura² and Shigeyuki Yokoyama¹
¹Graduate School of Science, University of Tokyo, ²Faculty of Sciences, Kyoto University, ³Present Address: Graduate School of Science, Kobe University

In order to elucidate the mechanism of interaction between one of the RNP domains (96 amino acid residues) of the Sxl protein and its target RNA sequence, we analyze the tertiary structure of the RNP domain by isotope-aided 2D and 3D NMR experiments for uniformly ¹⁵N - ¹³C labeled samples. First, all the backbone resonances (N, HN, α , H α) were assigned for the RNP domain by ¹H-¹⁵N NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC, CT-HNCA and CT-HNCOCA experiments. Second, were performed 3D HCCH-TOCSY and homo-nuclear 2D TOCSY experiments to observe side chain resonances. Third, the secondary structure were elucidated by ¹H-¹⁵N NOESY-HSQC and ¹H-¹³C NOESY-HMQC experiments. Thus, a four-stranded antiparallel β -sheet structure and two helices were found in the RNP domain.

【はじめに】 ショウジョウバエの性決定に関与する遺伝子として *sxl*, *tra*, *tra2* などが知られている。これらの遺伝子産物は、RNA結合蛋白質として働き、標的となる mRNA のスプライシングを調節することにより性決定のオルタナティブスプライシングの方向性を決定しているが、その作用の様式は、それぞれ異なっている。すなわち Sxl 蛋白質は、mRNA への結合によって、結合した部分のスプライシングを抑えて Tra 蛋白質の合成を促すのに対して、Tra2 蛋白質は、Tra 蛋白質とともにターゲットとなる *dsx* の mRNA のスプライシングを進める方向に作用し、メス型 mRNA の生成に働いていることが明らかになっている^{(1), (2)}。RNA 結合活性をもつこれらの因子の作用機序の違いを理解するためには、これらの因子と RNA との相互作用を解明することが必要である。本研究では、Sxl 蛋白質のなかの RNA 結合ドメインのみ発現する系を作成し、これを用いて ¹⁵N, ¹³C による安定同位体標識を行い、多次元核磁気共鳴分光法を用いることにより、その構造についての知見を得ることを目的とした。

Sxlタンパク質 安定同位体標識 二次元, 三次元NMR分光法

むとうゆたか きがわたかのり たけだよしひろ さかもとひろし しむらよしろう よこやましげゆき

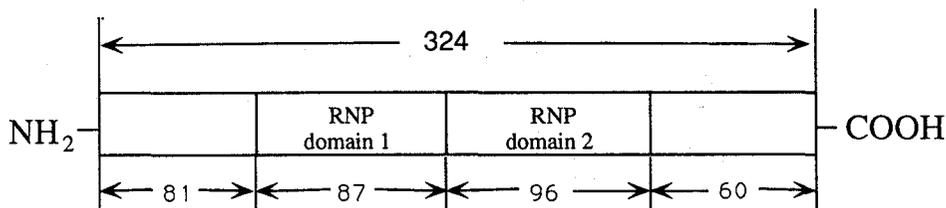


図1 Sxl蛋白質のドメイン構造

【材料および方法】

試料の調製 アミノ酸324残基からなるSxl蛋白質は、その分子中にRNA結合に関与すると考えられるドメイン(RNPドメイン)をタンデムにふたつもっている。このなかで二番目のRNPドメイン(アミノ酸96残基)部分の遺伝子をPCR法を用いて切り出し、T7RNAポリメラーゼをIPTGによって誘導できるBL21(DE3)株を利用し蛋白質の大量発現系を構築した。¹⁵N標識および¹³C標識を行なうために、2 x M9合成培地により大腸菌の培養を行なった。この場合唯一の窒素源、炭素源として¹⁵NH₄Clおよび[U-¹³C]グルコースを用いた。これにより、¹⁵N、¹³Cで二重標識された蛋白質を調製した。測定のために限外濾過を繰り返すことによって測定用緩衝液(50mM リン酸緩衝液 pH 5.5 10% ²H₂O)への溶媒置換を行ない、軽水中の試料とした。重水中の試料として99.9% ²H₂Oを用いた測定用緩衝液によって溶媒交換を行なった。

測定 NMR測定は、Bruker社製 AMX-500, AMX-600スペクトルメーターを用い測定温度25°Cで行なった。この条件で以下のスペクトルを測定した。

¹⁵N標識した試料について2D HSQC, HMQC-Jおよび3D NOESY-HSQC (mixing time=100ms), TOCSY-HSQC (DIPSI2によるmixing time = 35ms)の測定を行なった。¹⁵N、¹³Cで二重標識を行なった試料について軽水中で3D CT-HNCA, CT-HN(CO)CAの測定を行なった。さらに二重標識を行なった試料を用いて、重水中で2D ¹H-¹³C HMQC, 3D HCCH-TOCSY (DIPSI3によるmixing time=25ms)および3D ¹H-¹³C NOESY-HMQC (mixing time=100ms) スペクトルを測定した。

【結果および考察】

1) 主鎖部分のシグナルの帰属

主鎖アミドプロトンC α プロトンのシグナルの帰属のため、¹⁵N標識した試料について測定した3D NOESY-HSQCおよびTOCSY-HSQCスペクトルの解析を行なった。これにより、d_{NN}, d _{α N}などの相関を明らかにすることができる。この相関により、おもに β ストランド部分および α ヘリックス部分などのしっかりした二次構造をもつ部分のシグナルの帰属を進めることができた。さらに、NOEを用いたこのような連鎖帰属とともに、¹⁵N、¹³C二重標識を行なった試料を用いて測定したCT-HNCAおよびCT-HN(CO)CAスペクトルの解析から、すべてのアミドプロトンおよびアミド窒素のシグナルの帰属を一義的に進めることができた。

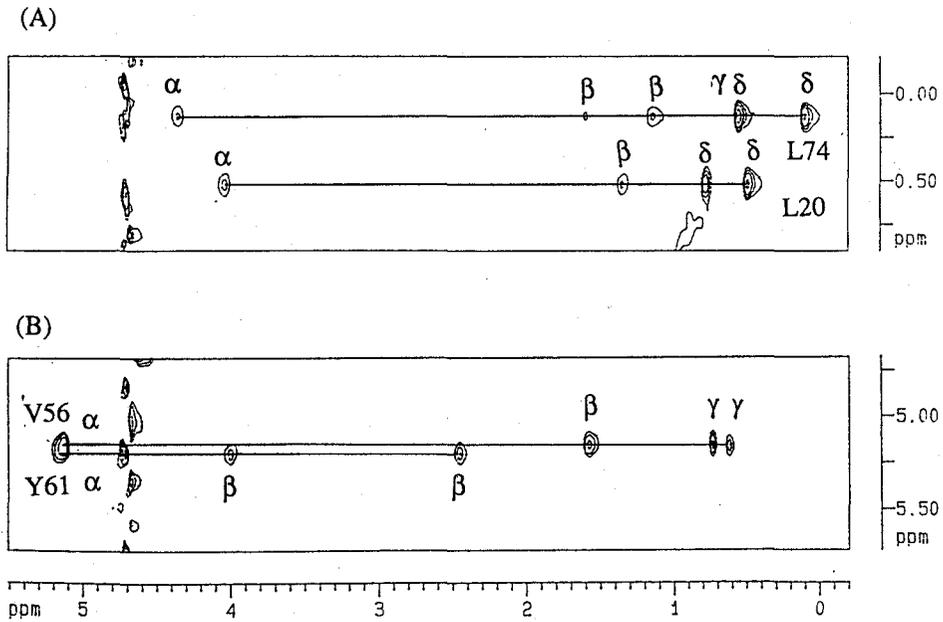


図2 Sx1蛋白質のHCCH-TOCSYスペクトル

mixingはDIPSI3を用いている。 ^{13}C 軸(F2軸)については、スペクトルの折り返しを利用している。(A)のスペクトルはnegative部分の表示であり、Leu残基のデルタメチル基からの展開である。(B)のスペクトルは、positive部分の表示でアルファプロトンからの展開を示している。

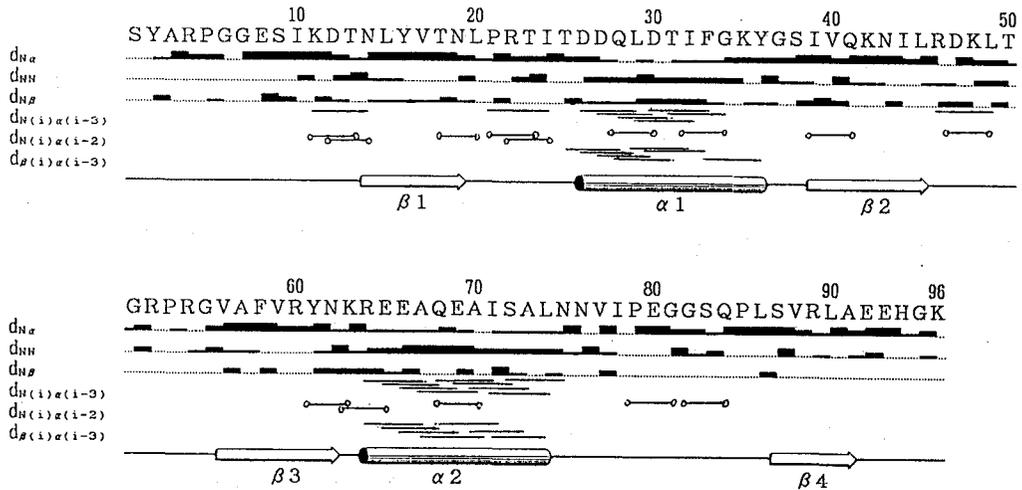


図3 Sx1蛋白質の2次構造

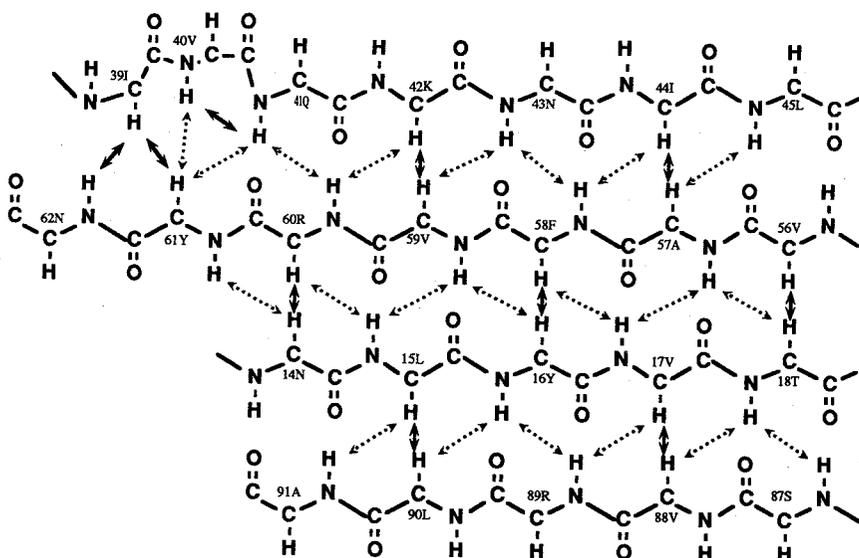


図4 β シート構造のトポロジー

太い矢印は、ストランド間の強いNOEを示す。破線の矢印は、中程度の強度のNOEが観察されたことを示す。

2) 側鎖部分のシグナルの帰属

Sxl蛋白質のRNPドメインは、アミノ酸が96残基で構成されているのでプロトンによる2Dスペクトルでも側鎖の短いアミノ酸残基については帰属を行なうことができる。しかし、側鎖の長いものでは、プロトンによる2D TOCSYスペクトルだけでは、磁化移動の効率が悪く完全に帰属をすることは困難となる。さらに構造情報を得るためには、側鎖プロトンの結合している ^{13}C 核の化学シフトも同定する必要がある。このため3D HCCH-TOCSYスペクトルの解析を行ない、ほぼすべてのプロトンシグナルについて帰属を行なうことができた。

3) Sxl蛋白質の2次構造の決定

プロトン2Dスペクトル、3D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ NOESY-HSQCスペクトル、および3D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ NOESY-HMQCスペクトルを用いた解析の結果、Sxl蛋白質のRNPドメインは、4本の β ストランドからなる逆平行 β シート構造と2本の α ヘリックス構造を持つことがわかった(図3)。さらにこの逆平行 β シート構造のトポロジーは図4に示すようになっていたことがわかった。現在立体構造を明らかにするため、さらに解析を進めている。

【文献】

- (1) K. Inoue, K. Hoshijima, H. Sakamoto & Y. Shimura, *Nature* **344** 461-463 (1990)
- (2) K. Hoshijima, K. Inoue, I. Higuchi, H. Sakamoto & Y. Shimura, *Science* **252** 833-836 (1991)

L15 多次元NMRによるタンパク質の構造解析

(財) 東京都臨床医学総合研究所、日本バリアン*

稲垣冬彦、神田大輔、市川さおり、永田宏治、島中秀樹、串田克彦*

Structural analysis of proteins by multidimensional NMR

Fuyuhiko Inagaki, Daisuke Kohda, Saori Ichikawa, Kouji Nagata, Hideki Hatanaka and Katsuhiko Kushida*

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science and Varian Japan*

At first, we report an algorithm for automatic assignments of NOESY cross peaks. This algorithm was applied for the structural determination of several proteins, which gave high resolution solution structures comparable to X-ray analysis. Thus, the detailed comparison of the protein structures in solution and in crystalline state is now feasible.

Recently, pulse field gradient technique (PFG) has been shown to be effective for water suppression. We incorporated PFG into several pulse sequences and compared the PFG spectra with those obtained by conventional techniques.

(1) はじめに

測定法の改良、構造計算法の進歩によりNMR法により溶液状態におけるタンパク質の立体構造をX線結晶構造解析に匹敵する分解能で決定することが出来るようになった。本報告では、はじめに自動構造解析を目的としたアルゴリズムの検討と、このアルゴリズムを用いて決定したタンパク質の立体構造について報告する。次に軽水シグナルの消去に有効な磁場勾配法(PFG)をタンパク質のNMR測定に適用し、実験条件の検討を行なったのでその結果について報告する。

(2) 立体構造計算法の検討

精密なタンパク質の溶液構造決定はタンパク質の機能を理解する上からも重要である。このためにはできるだけ多くのNOE交差ピークの帰属を正確に行なうことが必要である。しかし通常シグナルの重なるために一義的に帰属のつく場合は少なく、縮重した帰属の中から正しい帰属を選び出すことが必要となる。このプロセスを客観的な基準に従って行なうアルゴリズムの開発は立体構造決定の自動化に不可欠である。まづ一義的に帰属のついた交差ピーク(100個程度)と二次構造情報を用いてラフな構造を計算する。この構造を満足する帰属を縮重した帰属の中から選び出す。ついで新たに確定したNOEの帰属を含めて構造計算を行なう。このプロセスを繰り返すことにより9割以上のNOE交差ピークについて帰属を確立することが出来た。残った1割程度の交差ピークは二つ以上に帰属されるものであり、構造と比較しながらマニュアルで帰属を確認する。このようにして帰属の確定した総てのNOE交差ピークを用い、ランダム構造から出発し構造計算を行ない最終構造を得る。このアルゴリズムを β シート構造に富むエラプトキシンb、LS3等蛇神経毒タンパク質や α ヘリックス構造を多く含むと考えられる蚕のインシュリン族ペプチド、ボンピキシンに適用し、いずれも良好な結果を得た。このシステムを多次元NMRに拡張することを目的として、現在三重共鳴三次元NMRを用いたNMRシグナルの自動帰属の検討を行なっている。

(3) 磁場勾配法(PFG法)を用いたNMR測定の検討 軽水シグナルの消去はタンパク質のNMRスペクトルの測定に不可欠である。近年、磁場勾配(PFG)を用いると、軽水シグナルの消去が効率的に行なえることが報告されている。PFGの特徴は位相回しに代わって、目的とするコヒーレンス経

キーワード： 自動構造解析、ディスタンスジェオメトリー、多次元NMR、磁場勾配法、SSパルス

いながき ふゆひこ、こうだ だيسけ、いちかわ さおり、ながた こうじ、はたなか ひでき、くしだ かつひこ

路を選択することが可能な点であり、測定時間を著しく短縮することができる。多次元NMRの測定を行なう場合には、この点は極めて重要なPFGの特徴となる。ここではPFG法をタンパク質に適用し、実験条件を検討した。測定にはVarian UNITY 500を使用した。

(a) SSパルスと磁場勾配の組み合わせによる軽水シグナルの消去⁽¹⁾ 軽水シグナルの消去にはラジオ波照射の他にオフセット周波数(軽水の周波数)領域を励起しないbinomialパルスを観測パルスとして使う場合が多い。しかし、これらのパルスは周波数に依存した位相特性を持ち、ベースラインの歪みを生じる。そこでオフセットより高磁場、低磁場側にそれぞれ対称的に励起領域をシフトさせたラミネーパルス(SSパルス)を作製した。Smallcombeが提唱したこのパルスの位相特性は周波数依存性がなく二次元NMR測定の観測パルスとして使うことができる。SSパルスはオフセット周りのシグナルの非励起範囲が広いので、binomialパルスに比較して軽水シグナルの消去効率は高い。実際のNOESYの測定では、エコー取り込みとし、エコーの待ち時間に磁場勾配を加えることにより更に軽水の消去効率を高めたパルス系列を用いた。SSパルスと磁場勾配を用いて測定したエラプトキシンのNOESYスペクトルの特徴は、飽和移動がないためシグナル強度が強く観測される事、軽水と重なったシグナルについてもはっきりした交差ピークが観測される。またNOESYスペクトルには多くの軽水との交換ピークが観測される。しかし励起域の端では交差ピークの強度は弱くなり、強度補正を加える必要がある。磁場勾配を加えたSSパルスは通常の二次元、三次元NMRの観測パルスとして容易に組み込むことが出来、弱い磁場勾配でも十分軽水の消去はできるため、測定条件の設定は容易であった。

(b) 磁場勾配を用いたHSQC法の検討⁽²⁾ Keeler等が提唱した磁場勾配を用いたHSQC法のパルス系列を用いて測定した軽水溶液の¹⁵N/¹³C均一ラベルユビキチンの¹³C-HSQCスペクトルを図1(a)に示す。このパルス系列の特徴は磁場勾配をかけた時間内の位相の進みを補償するためdelay τ -180-gradient τ のユニットを用いている点である。また2番目の磁場勾配の極性をかえることによりPおよびNタイプを選択を行なう。即ち、Pタイプ、Nタイプの測定を交互に取り込むことにより、純位相スペクトルを得ることができる。HSQCフィルターに加えて磁場勾配による溶媒消去を行なうため軽水シグナルの消去効率は高い。しかし¹³C相互のスピンの結合によるシグナルの分裂のため大部分のシグナルは重なり合っている(図1(a))。そこで展開時間をコンスタントタイム(CT)に変更し、¹³C間のスピンの結合のデカップルを行なった⁽³⁾。図1(b)に示すように短時間で極めてS/Nが高く、かつシグナルの分離の良いスペクトルを得ることが出来た。

文献

(1) S. H. Smallcombe, J. Amer. Chem. Soc., 115, 4776-4785 (1993). (2) A. L. Davis, E. D. Laue and J. Keeler, J. Magn. Reson., 94, 637-644 (1991). (3) G. W. Vuister and A. Bax, J. Magn. Reson., 98, 428-435 (1992).

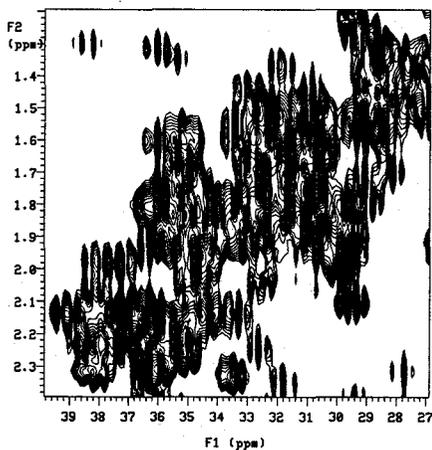


図1(a) ユビキチンの¹³C PFG-HSQC スペクトル、¹³C間のスピンの結合が観測

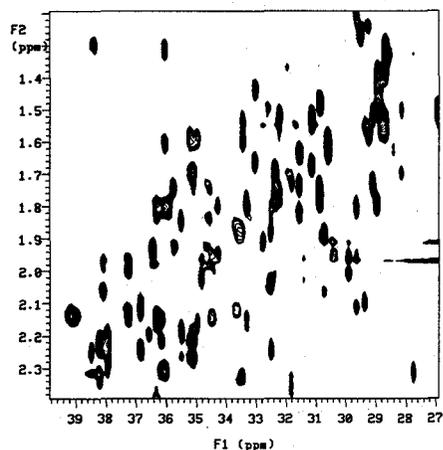


図1(b) (a)と同じ領域のCT-PFG-HSQCスペクトル

NANO-SCALE CONFORMATIONAL FLUCTUATION OF FERRITIN CHANNELS AS REVEALED BY ^1H NMR RELAXATION TECHNIQUES

○ダイウエン ヤン、宝玉 充、蝦名 恵、永山 国昭
つくば市東光台5-9-1 TRCパイロット研究棟
新技術事業団 永山たん白集積プロジェクト

○Daiwen Yang, Michiru Hogyoku, Satoshi Ebina, and Kuniaki Nagayama
Nagayama Protein Array Project, ERATO, JRDC, Tsukuba Research Consortium,
5-9-1 Tokodai, Tsukuba, 300-26 Japan

NMR relaxation techniques were used to investigate the dynamics of ferritin channels. By analyzing the relaxation time, T_2 , of the proton signals in apoferritin and the solvent accessible surface area, it was shown that there is a large degree of mobility in the interior regions of the ferritin shell. By comparing the proton relaxation times of probe molecules (water and $[\text{CaEDTA}]^{2-}$) in apoferritin and holo ferritin solutions, it was found that these probes transverse into the ferritin cavity through channels in the ferritin. Based on these results, we propose a model for ferritin molecules that involve flexible channels of which the size fluctuates in the range of 3-10 Å.

Holo ferritin consists of a protein shell (apoferritin, 23 Å thick and with an inner diameter of 76 Å), which is composed of 24 subunits (each 20 kDa), that surrounds an iron core (≈ 50 Å). The protein shell is transversed by channels with diameters of 3-4 Å (1). The channels are believed to be the pathways for the iron ions in the iron uptake and release process. For the iron release process, it is assumed that reductant and chelator can pass freely through the channels during the transversal process (2,3), although this mechanism has not directly been proven. To examine this mechanism, we used the ^1H NMR relaxation of the ferritin and probe molecules (H_2O and $[\text{CaEDTA}]^{2-}$) to analyze the mobility of the protein shell and the transversal of the probe molecules. The iron core was used to advantage as an intrinsic paramagnetic center.

MATERIALS AND METHODS

For the NMR samples, the water in the solution of ferritin was replaced four times with $^2\text{H}_2\text{O}$ by using an Amicon ultrafiltration apparatus (YM 100). The ^1H NMR spectra were obtained with an NMR spectrometer (JNM-A500, JEOL) at 500 MHz and 20 °C. Relaxation times

Key Words: Probe, Iron-Core, Mobility, and Transversal

○やん だいうえん、ほうぎょく みちる、えびな さとし、ながやま くにあき

T_1 and T_2 were measured using the IR and CPMG pulse sequences, respectively. All relaxation experiments were repeated three times and the results were averaged.

In large proteins, the relaxation time T_2 is sensitive to both the overall motion of the protein as well as internal motions in the protein. The effective correlation time, τ_{eff} , taking into account both the overall and internal motions, can be obtained from both T_2 and the interproton distance by using the relaxation equation of Solomon.

In ferritin solution, we may divide the probe molecules phenomenologically into two groups: A, probes far from the iron core, thus relaxation is not affected by the core; and B, probes near the iron core surface thus is strongly magnetically affected by the core. There will be exchange of probe molecules between the two groups A and B. If the exchange is much faster than the relaxation rate of the protons, the observable relaxation rate ($1/T_i$, where $i=1$ or 2) equals the weighted average of the relaxation rates for the molecules in group A ($1/T_{i,a}$ which is similar to the value of probe molecules in apoferritin solution) and B ($1/T_{i,b}$) (4), as shown in equation 1.

$$\frac{1}{T_i} = \frac{x_a}{T_{i,a}} + \frac{x_b}{T_{i,b}} \quad (1)$$

Here, X_a and X_b are the mole fractions of the probe molecules in groups A and B, respectively. If the exchange is much slower than the relaxation rate of the protons, the relaxation is described by a two-exponential decay (4).

RESULTS AND DISCUSSION

The ^1H spectra of apoferritin and holoferritin are shown in Figure 1. The T_2 decay curves of the resonance signals over the entire spectral range for the apoferritin and holoferritin protons could be fitted by two-exponential decays, indicating the presence of slow and fast relaxation components in the protein. There is no significant difference in the fraction of fast components for protons at different chemical shifts. For the slow motion component, the τ_{eff} and the fraction were about 2.5×10^{-7} s and 60%, respectively. For the fast motion component, they were 0.4×10^{-7} s and 40%, respectively. The τ_{eff} for the slow motion is comparable to the rotational correlation time of ferritin, τ_R , which is expected for a rigid sphere. This indicates that the slow motion corresponds to rigid regions and the fast motion to mobile regions. The fraction of mobile regions determined by NMR is 40%, while

that for all protons located at surfaces is 18% calculated by us from the surface area accessible to solvents based on the crystallographic structure. Consequently, nearly 20% of the mobile regions are located inside the protein shell, although the regions are not identified at this stage.

The value of T_2 for the fast motion components in holoferritin is found to be almost equal to that in apoferritin. Thus, the effect of the iron core on the relaxation of the protons near the outer surface of the shell is negligible. Therefore, we can consider the molecules outside and inside the protein shell as group A and group B, respectively. The T_2 and T_1 relaxation times of the solvent protons in $2\text{H}_2\text{O}$ solutions of holoferritin and apoferritin were monoexponential. Hence, the exchange between groups A and B is fast. Little variation of T_2 was seen at different pulse intervals, indicating that the local magnetic field inhomogeneities do not dominate the relaxation time T_2 .

The T_1 and T_2 of the protons in commercial $2\text{H}_2\text{O}$ were 15.4 and 4.4 s, respectively, while those for the filtrate of holoferritin were 14.8 and 3.6 s, respectively. The T_1 and T_2 for the protons of $1\text{H}_2\text{O}$ were 9.9 and 1.5 s, respectively, in a 4.8 mg/ml apoferritin solution, while they decreased to 1.5 s and 14.1 ms, respectively, in a 4.8 mg/ml holoferritin solution.

The values of T_1 for the H^a and H^b protons of $[\text{CaEDTA}]^{2-}$ were 290.0 and 385.1 ms, respectively, and remained almost the same for the holoferritin concentrations from 0 to 1.5 mg/ml. The T_2 (H^a) and T_2 (H^b) were 181.1 and 249.0 ms, respectively, in the absence of ferritin. The values were 168.9 and 230.4 ms, respectively, in the presence of 1.5 mg/ml of apoferritin, while they were 71.0 and 82.0 ms, respectively, in the presence of 1.5 mg/ml of holoferritin.

If the probe molecules do not transverse into the shell and approach to the core (i.e., $x_b = 0$), the relaxation times observed in holoferritin should be similar to those in apoferritin solution (eq 1). Otherwise, the relaxation times will be shortened in holoferritin solution. Experimental results indicate that the T_1 and T_2 of heavy water in 4.8 mg/ml holoferritin solution are about 7 and 70 times shorter, respectively, than those in the same concentration of apoferritin solution. The T_2 for $[\text{CaEDTA}]^{2-}$ in 1.5 mg/ml holoferritin solution is about 2.5 times shorter than that in apoferritin solution. Consequently, water molecules ($<3.4 \text{ \AA}$) and $[\text{CaEDTA}]^{2-}$ ions ($>7.6 \text{ \AA}$) transverse into the ferritin cavity and experience fast exchange.

Because large probes such as $[CaEDTA]^{2-}$ can transverse into the cavity through the channels, the channels must be flexible enough to allow such a transversal. Therefore, mobile regions should be located around the channels. Based on the studies of iron release using reductants, it has been suggested that the channels expand in solution to more than 10 Å (2,3). Because circular dichroism studies on ferritin indicate that the secondary structure of ferritin in solution is the same as that in crystal, these two structures have only local differences.

Based on the findings described above, a new model for the dynamic structure of ferritin channels and the transversal of probe molecules is proposed as shown in Figure 2. State I is similar to the structure obtained by X-ray crystallography. When ferritin is in State II, the channels open wider by compressing the mobile regions, thus allowing molecules larger than the size of the channels in State I to transverse into the interior. We propose that ferritin molecules can fluctuate between these two states, preserving the overall size and symmetry of ferritin.

In conclusion, the ferritin molecule contains a significant amount of mobile regions that are located near the channels. With rapid exchange between the two conformations, as proposed in our model, the size of the channels fluctuates in the range of 3-10 Å, thus allowing larger molecules to transverse into the ferritin cavity.

REFERENCES

1. Ford, G. C., Harrison, P. M., Rice, D. W., Smith, J. M. A., Treffry, A., White, J. L. & Yariv, J. (1984) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 304, 551
2. Harrison, P. M., Hoy, T. G., Macara, I. G., & Hoare, J. (1974) *Biochem. J.* 143, 445
3. Jones, T., Spencer, R. & Walsh, C. (1978) *Biochemistry* 17, 4011
4. Zimmerman J. R. & Brittin W. E. (1957) *J. Phys. Chem.* 61, 1328

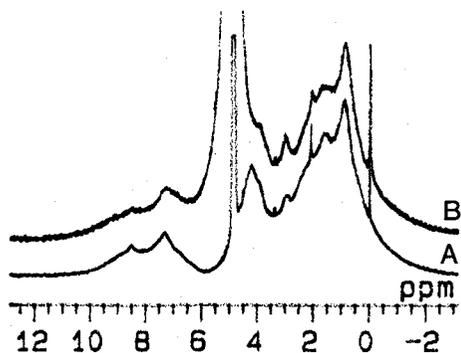


Figure 1. 1H NMR spectra of apoferritin (A) and holo-ferritin (B) at 4.8 mg/ml protein, 20 °C, and pH 7.4.

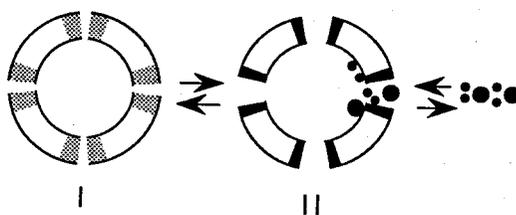


Figure 2. Model of the dynamic structure of ferritin showing how the transversal of probes occurs. The light shadows indicate loosely folded regions that are mobile while the dark shadows indicate the same regions packed more tightly.

L17 がん原遺伝子産物c-MybのDNA結合領域及び特異的DNAとの複合体の構造

(横浜市大・総合理¹、都臨床研²、蛋工研³、阪大・蛋白研⁴、理研・筑波LS⁵) ○緒方一博^{1,2}、守川壮一³、中村春木³、井上泰子¹、関川あい¹、佐々木元子¹、長土居有隆¹、江成政人¹、張若⁴、権娟大⁴、北條裕信⁴、相本三郎⁴、皿井明倫⁵、石井俊輔⁵、西村善文¹

Structure of a DNA-binding region of a protooncogene product, c-Myb and its complex with a specific DNA.

(¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, ²Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ³Protein Engineering Research Institute, ⁴Institute for Protein Research, Osaka University, ⁵Tsukuba Life Science Center, Institute of Physical and Chemical Research) Kazuhiro Ogata^{1,2}, Souichi Morikawa³, Haruki Nakamura³, Taiko Inoue¹, Ai Sekikawa¹, Motoko Sasaki¹, Aritaka Nagadoi¹, Masato Enari¹, Zhang Ruoheng⁴, Kwon Yeon-Dae⁴, Hironobu Hojo⁴, Saburo Aimoto⁴, Akinori Sarai⁵, Shunsuke Ishii⁵, Yoshifumi Nishimura¹

A protooncogene product, c-Myb, is a transcriptional regulator in the myeloid lineage, which binds specifically to a DNA with the consensus sequence AACxG. A DNA-binding region of c-Myb consists of three imperfectly-conserved repeats of 52 residues, referred as R1, R2, and R3 from N-terminus. Each repeat has three tryptophans at intervals of 18 or 19 residues. R23 (R2 and R3) is essential for specific DNA binding. Using homo and heteronuclear multidimensional NMR, high-resolved solution structures of each repeats were revealed and were conserved in the overall DNA-binding region containing all repeats. Specific DNA complexes of R23 and R123 were also analysed and the complex structure has been determined by NOEs between protein and DNA. And further, the dynamic structure of R23 and its stabilized mutant will be discussed.

[はじめに] がん原遺伝子c-*myb*は主に造血系細胞で発現され、その遺伝子産物c-Mybは分化制御に関与している。c-Mybはコンセンサス配列AACxGを含むDNAに対して特異的結合能を有する転写調節因子で、そのDNA結合領域は3つのリピートからなり、N端側からR1, R2, R3と名付ける。各リピートは52残基からなり、それぞれのリピート内には保存さ

がん原遺伝子産物、c-Myb、転写調節因子、DNA結合領域、複合体、動的性質

おがたかずひろ、もりかわそういち、なかむらはるき、いのうえたいこ、せきかわあい、ささきもとこ、ながどいありたか、えなりまさと、ざんるうへん、こんよんでえ、ほうじょうひろのぶ、あいもとさぶろう、さらいあきのり、いしいしゅんすけ、にしむらよしふみ

れた3つのトリプトファン残基が一定の間隔をおいて存在する。DNAとの特異的結合にはR2とR3を含む領域(R23)が必須で、R1の役割に関しては明確な結論は得られていない。我々は既にR3単独の立体構造を決定しているが(1)、今回、各リピートの精密な構造を明らかにし、R3についてもさらに精密化を図った。また全リピートを含むタンパク質を ^{15}N ラベル体の多次元NMRを用いて解析した(二次構造については昨年の本討論会要旨参照)。さらに特異的DNAとの複合体の測定から、Myb-DNA複合体の構造を決定した。また各リピートの動的性質の違いを ^{15}N 核の T_1 , T_2 , NOEの各緩和パラメーターの測定から調べ(昨年の本討論会)、その結果R2がR1やR3に較べて著しく構造的に不安定であることが明らかになったが、今回疎水性コアの検討からR2領域のアミノ酸変異体(R23V103L)を作製し、R2領域を安定化することができたので、併せて報告する。

[実験] ①R1, R2, R3の立体構造計算

化学合成した2.5mMのR1、4.2mMのR2、1.8mMのR3の各ペプチド溶液(pH6.8, 5.2, 8.2 284K~300K)についてTOCSY($\tau_m=9-100\text{ms}$)、NOESY($\tau_m=50, 150\text{ms}$)、DQF-COSYの各スペクトルをBruker製AMX-500を用いて測定し、NOEと角度データを基にEMBOSS(ディスタンス・ジオメトリー)とPRESTO(シミュレートド・アニーリング)により構造計算を行なった。

②R23, R123の構造解析

T7プロモーター支配下にR23, R123をコードする遺伝子を組み込み、BL21細胞で発現させ、 ^{15}N ラベル体を精製した。pH6.8、290-300Kで2mMの ^{15}N -R23, R123について3D NOESY-HMQC, TOCSY-HMQC, HMQC-NOESY-HMQCの各スペクトルを測定した(昨年の本討論会要旨参照)。

③R23-DNA, R123-DNA複合体の構造解析

^{15}N -R23, R123に対しコンセンサス配列(前記)を含む16merDNAを1:1の割合で混合し、pH5.2-8.2、290-310Kで H_2O サンプルについて、HSQC, 3D NOESY-HMQC, N-decoupled NOESY, D_2O サンプルについてNOESY, TOCSYの各スペクトルを測定した。

④R23におけるR2領域の変異体の作製

PCR法によりR2領域のV103をLに変異させたR23V103Lの発現系を作製し、 ^{15}N ラベル体を精製してpH6.8、290-300KでHSQC、 ^{15}N 核の T_2 , T_1 , NOEの各種緩和スペクトルを測定した。

[結果・考察] 各リピートのプロトンシグナルの帰属は交換の速い解離性プロトン(Lys, Tyrの側鎖等)以外全てについて行なった。立体特異的帰属に関しては、検討した測定条件全てにわたってシグナルの重なりが見られる場合以外は、側鎖のコンフォメーションが固定されているものについてすべて行なった。その結果 $C\beta$ プロトン以外に $C\gamma$ (Ile, Lys, Arg)、 $C\delta$ (Arg)プロトン、メチル基(Val, Leu)について帰属できた。その他プロリンの $C\beta$, $C\delta$ プロトン、側鎖アミド(Asn, Gln)プロトンについても特異的に帰属した。またペプチド骨格の構造が十分収束した段階でグリシンの2つの $C\alpha$ プロトンを特異的に帰属した。側鎖の角度制限は上記の特異的帰属に伴い、 χ^1 (Val, Ile, Thrを含む)、 χ^2 (Leu, Ile, Lys, Arg)、 χ^3 (Arg)について行なった。

構造計算はR1では640コのNOE(残基内8、残基間632)と65コの角度制限、R2では924コのNOE(残基内8、残基間916)と61コの角度制限、R3では536コのNOE(残基内6、残基間530)と70コの角度制限を用いた。残基内NOEは立体特異的帰属や側鎖の角度制限にも情報として含まれているので、長鎖を持った残基に限ってコンフォメーションを規定するために重要な残基内遠隔NOEのみ用いた。これらの制限から各リピートについてそれぞれ約190コの構造計算からエネルギーの低い50コの構造を求めた結果、RMSDはR1では骨格で0.37Å、側鎖

を含め0.95Å、R2では骨格で0.33Å、側鎖を含め0.82Å、R3では骨格で0.32Å、側鎖を含め0.83Åであった。violationは距離制限で0.1Å以下、角度制限で2°以下であった。

得られた構造から、各リピートともほぼ対応する領域に3本のヘリックスが認められ、第2から第3ヘリックスにかけてはヘリックス・ターン・ヘリックス類似の構造をとっていた。3つのトリプトファンインドール環はR3では2つのヒスチジンのイミダゾール環とともに芳香環コアを形成していたが、R1、R2では2つのヒスチジン残基に対応する部位にはパリンとアルギニン残基が存在し、パリンのメチル基とアルギニンのメチレン鎖部分が疎水性コアに寄与していた。さらにこのアルギニン残基は遠隔のアスパラギン酸とイオン対を作り、固定されていた。

各リピート内には前に述べたように第2から第3ヘリックスにかけてヘリックス・ターン・ヘリックス類似の構造モチーフを有し、第3ヘリックスがDNAのmajor grooveに入って塩基を特異的に認識する結合モデルが考えられた(1)。このモデルを検証するためにR23-DNA及びR123-DNA複合体の構造解析を行なった。R23、R123に対しコンセンサス配列(前述)を有するDNAを1:1になる様に加え、塩基プロトン(A-H8, H2; G-H8, H1; T-H6, Me, H3; C-H6, H5, H4)、糖プロトン(H1', H2', H2'', H3', H4')の帰属を行ない、DNA単独の化学シフト値と比較したところ、コンセンサス配列近傍で0.3ppmを超える大きなシフト差が見られた。またR23-DNAとR123-DNA複合体を比較してDNA側のシグナルのシフト差を調べたところ、最も大きなものでも0.1ppm程度で、R1領域とDNAとの相互作用はR23領域と比べてかなり弱いと考えられた。このことはR23領域のみでDNAに特異的に結合し、R23とR123の特異的DNAに対する解離定数の違いは数倍程度(R23-DNAで $\sim 4 \times 10^{-9}$ 、R123-DNAで $\sim 6 \times 10^{-10}$)であることと矛盾しない。一方、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQCスペクトルを用いてアスパラギン、グルタミン残基側鎖のアミドプロトンシグナルのDNA結合に伴う変化を見ると、R23領域で第3ヘリックス中のDNA側を向くと想定されるアミド基、第1ターン中の糖リン酸骨格と相互作用すると考えられるアミド基由来のシグナルがexchange broadeningを起こして消失するのに対し、それ以外のアミド基シグナルに大きな変化は見られなかった。このことからMybとDNAの結合は完全に固定されているのではなくある程度揺らいでいて、またこのことがDNAの塩基の芳香環やリン酸基の負電荷の影響で化学シフトの変化をきたすためにシグナルのbroadeningが生じている可能性がある。R3領域ではこの第3ヘリックス中のアスパラギン残基がDNAを特異的に認識していると考えられる。側鎖アミド基以外にも第3ヘリックス中のDNAに面する残基は非解離性プロトンを含め、シグナルのbroadeningが見られた。これに対しR1領域では側鎖アミドプロトンについて、第3ヘリックスでは両端に存在する残基のシグナルの消失が見られたものの、ヘリックス中央の残基ではシグナルの大きな変化は見られなかった。以上のことから、R1領域のDNAに対する作用は非特異的であると推定される。さらにR23-DNA複合体のD₂O, H₂O中でのNOESYスペクトルからR2-DNA間とR3-DNA間のNOEを同定し、26コの分子間NOEにより分子動力学計算を行ない、MybR23-DNA複合体の構造を求めた(図1)。なおR123-DNA複合体において、R1-DNA間のNOEは認められていない。

各リピートの動的構造については ^{15}N 核のT₁, T₂, NOEの緩和パラメータの測定により検討したが(昨年の本討論会)、特にR2領域においてT₂値の減少、T₁/T₂の増加が著しく、conformational exchangeの寄与が推定された。カロリメトリー(DSC)の実験からもmelting pointはR1, R3に比べR2で明らかに低く(2)、R2領域は不安定で揺らいでいると考えられた。R2領域がR1やR3領域に比べて構造的に不安定である理由として疎水性コアの安定性

の差異が一因となっていることが考えられ、コア形成残基を各リピート間で比較した。第1と第3ヘリックスの交差する領域は疎水性コアの中心部にあたり、R3では第1ヘリックスと第3ヘリックスから2つのイソロイシン側鎖が向い合って配置している。R1ではそれぞれロイシンとシステイン残基が対応しているが、R2ではバリンとシステイン残基が向い合っていてR3やR1に比べて互いの側鎖間のギャップが大きくなっている。そこでR23タンパク質においてこのR2領域の第1ヘリックス側のバリン残基(V103)をロイシン残基に置換したR23V103L変異体を site-directed mutagenesis を用いて作製した。wild type のR2領域はHSQC上リピート全体にわたってプロトン及び ^{15}N シグナルがbroadeningして特に第3ヘリックスで著しいが、これには疎水性コアを形成しているトリプトファン残基のインドール環のreorientationの影響があると考えられる。R23V103LのHSQCスペクトルではこれらの残基由来のシグナルは明らかに先鋭化し、 T_2 緩和時間も延長した。ケミカルシフト値は置換残基近傍の局所的なシフト以外ほぼ保たれ、3次元NOESY-HMQCスペクトル上ではwild typeと同様のNOEパターンを示しており、立体構造を変化させずにトリプトファン残基を含む疎水性コアの揺らぎを抑え、安定化させたと考えられる。現在この変異体の活性を検討中である。

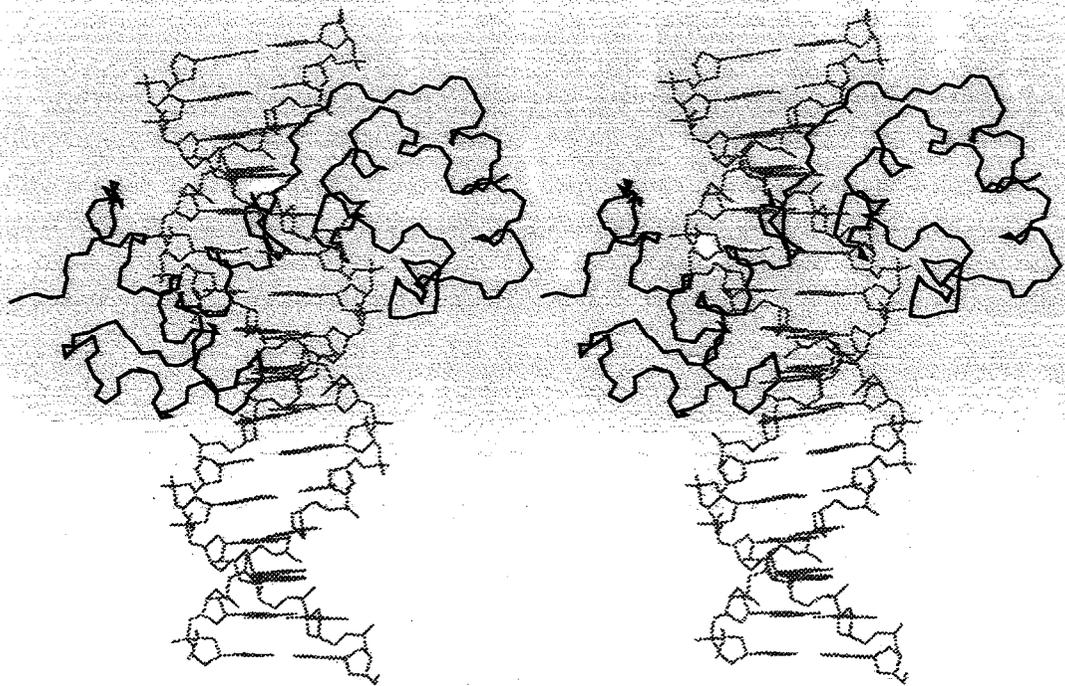


図1 MybR23-DNA複合体の構造(ステレオ図)

DNA配列は(上) 5'-CCTAACTGACACACAT-3' (下)。但し罫文字はコンセンサ配列
3'-GGATTGACTGTGTGTA-5'

DNAに対し左側がR2領域、右側がR3領域

文献

- (1) Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6428, 1992.
- (2) Sarai, A., Uedaira, H., Morii, H., Yasukawa, T., Ogata, K., Nishimura, Y., Ishii, S. *Biochemistry*, 32, 7759, 1993.

第 2 日 目
11月5日 (金)
特別講演

1 ~ 6



特別講演 1

NMR Structural Studies of Flexible Proteins and Peptides

Peter E. Wright
Department of Molecular Biology
The Scripps Research Institute
La Jolla, California 92037
United States of America

Abstract

Technological developments over the past decade have made multi-dimensional NMR spectroscopy a powerful tool for protein structure determination. Less attention has been directed toward measurement of protein dynamics and development of methods for structural characterization of conformationally averaged systems. ^{15}N and ^{13}C relaxation measurements offer great promise for providing detailed insights into protein dynamics on a picosecond time scale. In addition, exchange contributions to T_2 provide information on much slower events involving conformational fluctuations. The application of heteronuclear relaxation measurements to investigate the dynamics of several proteins [enzyme IIA^{glc} (1), zinc fingers (2), and oxidized and reduced thioredoxin (3)] will be described.

Conformationally averaged systems pose particular problems for NMR structure determination. Strategies for dealing with these problems to identify conformational preferences in linear peptides in aqueous solution will be described. Sequential backbone-backbone NOEs provide information on the relative populations of α and β backbone dihedral angles while medium-range NOEs allow identification of folded structures in the peptide conformational ensemble (4). Quantification of the population of folded structures remains problematic. However, by careful use of chemical shift, coupling constant, and NOE data, supplemented by circular dichroism in favorable cases, at least a semi-quantitative measure of population is frequently achievable. Examples of helical and reverse turn-forming peptides will be discussed.

References

- (1) "Backbone dynamics of the *Bacillus subtilis* glucose permease IIA domain determined from ^{15}N NMR relaxation measurements." M.J. Stone, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer III, J. Reizer, M.H. Saier Jr and P.E. Wright (1992) *Biochemistry* 31, 4394-4406.
- (2) "Characterization of amino acid side chain dynamics in a zinc finger peptide using ^{13}C NMR spectroscopy and time-resolved fluorescence spectroscopy." A.G. Palmer, III, R.A. Hochstrasser, D.P. Millar, M. Rance and P.E. Wright (1993) *J. Amer. Chem. Soc.* 115, 6333-6345.
- (3) "Comparison of backbone and tryptophan sidechain dynamics of reduced and oxidized *E. coli* thioredoxin using ^{15}N NMR relaxation measurements." M.J. Stone, K. Chandrasekhar, A. Holmgren, P.E. Wright and H.J. Dyson (1993) *Biochemistry* 32, 426-435.
- (4) "Defining solution conformations of small linear peptides." H.J. Dyson and P.E. Wright (1991) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 20, 519-538.

特別講演 1 NMR in Biochemistry

P. E. Wright

Department of Molecular Biology

The Scripps Research Institute

La Jolla, California, U. S. A.

特別講演 2

MULTIDIMENSIONAL SOLID STATE NMR OF POLYMERS

H.W.Spiess

Max-Planck Institut für Polymerforschung
Postfach 3148, D-55021 Mainz, Germany

Multidimensional solid NMR spectroscopy offers unique possibilities for studying structure and dynamics of polymer materials. This concerns both the spectral resolution needed to obtain the required selectivity in the solid state as well the information that can be extracted from the spectra. After a brief introduction into solid state NMR an overview of techniques developed in our laboratory and recent applications will be given.

The **increase of spectral resolution** will be demonstrated on multidimensional MAS sideband spectra. Here efficient ways of separating iso- and anisotropic chemical shifts offer various possibilities of generating highly resolved 3D-MAS NMR spectra, from which, e.g., the molecular order in partially ordered polymers can be extracted. More complex alignments of polymer chains, resulting from advanced industrial processing of films can effectively be studied by 2D- or 3D-exchange NMR. This technique, introduced by Henrichs back in 1986 has recently been extended by us (**DECODER NMR**) to show that it maps out the orientational distribution function into the multidimensional NMR spectra in complete analogy to X-ray scattering.

The information provided by multidimensional NMR probably is most unique as far as **slow molecular dynamics** in polymers and its relation to the materials properties are concerned. Here it will be shown that fundamental differences between the chain dynamics in crystalline and amorphous polymers are detected by 3D-exchange NMR. Chain dynamics above the caloric glass transition will be compared with internal dynamics within macromolecular chains and local dynamics of side groups in the glassy state. The **nature of the non-exponential loss of correlation** can be unraveled by reduced 4D-exchange NMR, which relates the loss of correlation during a given period of time at the beginning of the experiment with the loss of correlation the same molecules experience over an equally long period at much later times.

It will be shown how **spatial information** about the packing in amorphous systems and characteristic length scales of structural as well as motional heterogeneities can be probed both via spin diffusion (1-100 nm) and spatially resolved NMR (>50 μm).

The techniques will be demonstrated on various polymer materials including homopolymers, block copolymers and blends as well as liquid crystalline polymers of different molecular architecture.

References

H.W. Spiess, Chem. Rev. **91**, 1321 (1991)

H.W. Spiess and K. Schmidt-Rohr "Multidimensional Solid State NMR and Polymers", Academic Press (1994)

特別講演 3

NMR SPECTROSCOPY AT HIGH PRESSURE

JIRI JONAS

Beckman Institute for Advanced Science and Technology
and
Department of Chemistry
School of Chemical Sciences
University of Illinois
Urbana, IL 61801 USA

Nuclear magnetic measurements at high pressure provide unique information about the microscopic behavior of chemical and biochemical systems. In view of the high information content of advanced high resolution NMR techniques including 2D NMR, the ability of performing these experiments at high pressure opens a very promising direction in high pressure research.

This lecture is organized in the following way. The introduction, which outlines the fundamental reasons for performing high pressure experiments on chemical and biochemical systems, is followed by a discussion of the specialized instrumentation needed for high pressure NMR experiments. Specific examples of recent high pressure NMR studies on chemical and biochemical systems illustrate well how high resolution, high pressure NMR can study a wide spectrum of problems ranging from the dynamics of complex liquids, reaction kinetics in liquid solutions, to experiments on model membranes and studies of pressure-induced unfolding of proteins.

特別講演 4

Some Recent Advances in Nuclear Shielding Calculations

G A Webb

Department of Chemistry, University of Surrey,
Guildford, Surrey, England

It is generally thought that the theory of nuclear shieldings dates from the seminal paper by Ramsey in 1950.¹ In principle, it has therefore been known for many years how to calculate nuclear shieldings. However, it is only in recent years that a meaningful accuracy has been brought to such calculations.

In the quantum mechanical approach to nuclear shielding, the wave function of the molecule is perturbed by the applied magnetic field in the NMR experiment. The effect of this is to produce preferred currents which shield the nucleus from the applied magnetic field. The magnetic perturbation is expressed by the angular momentum operator which is not invariant with respect to translations. Consequently the calculated value of the nuclear shielding can become origin (or gauge) dependent whereas the experimental data do not have this property. Thus great efforts have been expended in attempts to remove the gauge dependence from the calculated results.

In ab initio molecular orbital calculations there have been two main approaches to dealing with this difficulty. One is to employ a sufficiently large basis set such that gauge dependent effects are minimised. The other depends upon using a smaller basis set and introducing gauge factors in such a way that the results are independent of gauge origin. The former of these avenues has been explored in calculation on small molecules whereas the latter approach is widely employed for larger molecules. Gauge Included Atomic Orbitals (GIAOs)² have found much use in nuclear shielding calculations^{3,4} Another approach uses Individual Gauge Origins for different Localised Molecular Orbitals (IGLO)⁵.

A different approach to calculating second order magnetic properties is to use the equations of motion method⁶. A variant of this procedure results in the use of localised molecular orbitals with Local Origins (LORG) for nuclear shielding calculations.⁷

The GIAO, IGLO and LORG methods are all reasonably successful in calculating nuclear shielding tensors.

More recently the inclusion of electron correlation effects in calculations of nuclear shieldings for electron rich molecules has been addressed. GIAOs and many body perturbation theory have been employed^{8,9} another approach is to use multiconfiguration IGLO calculations¹⁰ while the second order polarisation propagator approximation has been combined with the LORG procedure to give the SOLO method of including electron correlation effects in nuclear shielding calculations.¹¹ In general all of these calculations tend to overemphasise correlation effects on nuclear shielding but are more satisfactory than the corresponding calculations which do not include electron correlation.

A completely different approach to calculating molecular properties, not involving Hartree Fock theory, is the use of Density Functional Theory (DFT). DFT removes the necessity of calculating electron correlation effects and has been shown to be successful in calculating nuclear shieldings for molecules which show dynamic and strong electron correlation interactions.^{12,13}

Ab initio calculations have also been reported for the nuclear shieldings of heavy metals as well as for the lighter atoms of the periodic table.^{14,15} The results obtained reproduce a number of experimental trends in spite of using modest basis sets in the calculations. These data do not include either electron correlation or relativistic effects. Both of which may be reasonably expected to play a role in the determination of nuclear shieldings for heavier nuclei.

References

1. N.F. Ramsey, Phys. Rev., 1950,77, 567
2. F. London, J. Phys. Radium, 1937,8, 397
3. R. Ditchfield, J. Chem. Phys., 1972,56, 5688
4. K. Wolinski, J.F. Hinton and P. Pulay, J. Amer. Chem. Soc., 1990,112, 8251
5. M. Schindler and W. Kutzelnigg, J. Chem. Phys., 1982,76, 1919
6. D.J. Rowe, Rev. Mod. Phys., 1968,40, 153
7. A.E. Hansen and T.D. Bouman, J. Chem. Phys., 1985,82, 5035
8. H. Fukui, K. Miura and H. Matsuda, J. Chem. Phys., 1992,96, 2039
9. J. Gauss, Chem. Phys. Lett., 1992,191, 614
10. W. Kutzelnigg, C. van Wüllen, U. Fleischer, R. Franke and T. von Mourik, in Nuclear Shieldings and Molecular Structure, NATO ASI Series, 1993, 386C, 159
11. T.D. Bouman and A.E. Hansen, Chem. Phys. Lett., 1990,175, 292
12. V.G. Malkin, O.L. Malkina and D.R. Salahub, Chem. Phys. Lett., 1993,204, 80
13. V.G. Malkin, O.L. Malkina and D.R. Salahub, Chem. Phys. Lett., 1993,204, 87
14. H. Nakatsuji, T. Inoue and T. Nakao, Chem. Phys. Lett., 1990,167, 111
15. H. Nakatsuji and T. Nakao, Chem. Phys. Lett., 1990,167, 571

特別講演 5

Multinuclear and Multiple Quantum Filtered NMR Studies of the Heart

G. Navon

School of Chemistry, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Tel Aviv 69978, Israel

Open heart surgery is now the most common major operation in the Western world. During such an operation the heart is disconnected from its blood supply, and therefore ischemic. It is imperative to minimize the damage caused to the heart during this period. An emerging procedure that gains now a momentum is heart transplantation. Improved preservation of the heart during ischemia will enable the transportation of the heart over large distances. Multinuclear NMR can give us a comprehensive view of the heart physiology and biochemistry. It was found out that ionic fluxes play a crucial role in heart physiology. In fact, most of the drugs used today in treating heart diseases are directed toward ionic pumps and channels. We have found that during hypothermic ischemic preservation there is a massive influx of sodium into the myocardium [1]. The NMR shifts produced by the shift reagents [2-4] at concentration that are tolerated by the heart are usually not big enough to give an adequate separation between the intracellular and the extracellular ^{23}Na signals, and thus, the intracellular sodium signal is masked by the much larger extracellular signal. Recently the method of multiple quantum filtered (MQF) NMR spectroscopy was shown to suppress the signal for the extracellular sodium. The observation of MQF NMR signal depends on the presence of bioexponential transverse relaxation which is the result of sodium binding to slowly rotating macromolecules. Thus, the sodium outside the heart and in the vascular system is expected not to contribute to the MQF signal. However, the MQF experiment does not completely eliminate the signal of the sodium from the interstitial compartment. A complete elimination of the extracellular sodium signal in the presence of shift reagents could be accomplished by a selection of a particular delay time in the MQF sequence [5] (see Fig.1). It was shown that of the two possible MQF techniques for ^{23}Na ($I=3/2$), double and triple quantum filtering the latter is by far superior [5].

The measurement of intracellular volume is important because of two reasons: (a) in order to convert the amounts of metabolites measured by NMR to molar concentrations, (b) to assess the extent of intracellular edema, which may be a decisive factor determining the cell viability. We were able to measure intracellular volumes in rat hearts [6] using a combination of cobalt-59 NMR of $\text{Co}(\text{CN})_6^{3-}$ and H-2 NMR of D_2O [7] and found 16% increase of same volume during 30 min of normothermic global ischemia. The results also enabled us to calculate molar concentrations of Na^+ and phosphorus metabolites.

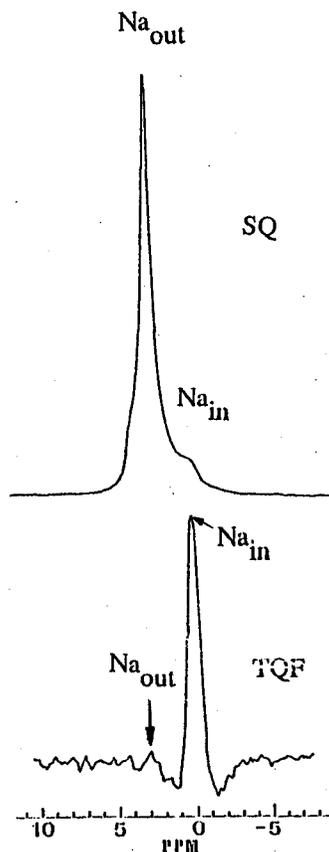


Fig. 1

References

1. Askenasy et al, *Magn. Reson. Med.* **28**, 249 (1992).
2. R.K. Gupta and P. Gupta, *J. Magn. Reson.* **47**, 344 (1982).
3. S. C-K. Chu et al, *J. Magn. Reson.* **56**, 33 (1984s).
4. A.D. Sherry et al, *J. Magn. Reson.* **76**, 528 (1988).
5. G. Navon, *Soc. Magn. Reson. Medicine*, 11th Ann. Sci. Mtg., p.843, Berlin (1992), *Magn. Reson. Med.*, in press.
6. N. Askenasy et al, *Soc. Magn. Reson. Med.*, 11th Ann. Sci. Mtg., p.2321, Berlin (1992).
7. H. Shinar and G. Navon, *FEBS Lett.* **193**, 75 (1985).

特別講演 6

大きい系とNMR

(東大・薬) 荒田 洋治

NMR and Bigger Systems

Yoji Arata

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

Abstract: Immunoglobulin G(IgG), which is a multidomain glycoprotein with a molecular weight of 150,000, plays a crucial role in immune response. We have been developing a multinuclear NMR strategy for the molecular structural analyses of the intact IgG and a variety of proteolytic fragments thereof. The standard method of NMR structural analyses of proteins in solution is of little use in these bigger systems. In the present talk, I will summarize how this difficult problem has been tackled and what kinds of information have so far been obtained.

【 走己 】 模索のとき：援軍来る

今年で32回を迎えたNMR討論会が誕生以来そのなかばにさしかかった頃、私は1971年から2年間滞在した研究室(スタンフォード大学)のOleg Jardetzky教授の傘の下からの脱出を模索していました。それまでの数十年の私のNMRの世界は、アクリル酸やアミノ酸のスペクトル解析、メタノールやエタノールにおける緩和現象の解析を中心とするものでした。スタンフォードで見たものは、その全てがそれまでの私の経験を越えたものでした。物理化学と生化学が渾然一体となって動いている研究室、使い捨ての実験器具、100リットルのドラム缶から、無雑作に湯水のごとく重水を汲みだすポスドク達、それにも況して、グループのリーダーであるJardetzky教授の「ストーリーテラー」としての驚くべき才能。この押し潰されそうなexcitingで有意義な2年間の経験を土台に、自分はこれから何をなすべきかを考えました。

研究室(藤原研究室)で使える装置は、CWの100MHz分光計(日本電子PS-100、1%エチルベンゼン、周波数掃引、S/N 30)でした。まず、S/NをFTなみとし、かつ100MHzなりに特徴を持たせるため、J.Dadok博士の発案になる高速掃引相関NMRの測定ができるよう、当時大学院学生であった小沢

宏君、中嶋佑次さん（中嶋技研）と凸凹コンビを組んでソフト、ハードの改造をはじめました。時間がかかりましたが、この改造は期待した以上に成功し、荻野孝史君は大腸菌代謝過程の解析で多大の成果を上げました。この仕事は、続いて今井康彦君によって光合成細菌へと発展しました。いずれも、水溶液中における低濃度物質の検出に相関NMR法が大いに役に立ちました。

NMRによるタンパク質の構造解析の方法論を発展させるべく熟慮したすえ、とりあえず Jardetzky 路線を継承し、蛋白研の成田耕造先生のグループと協同で、リボヌクレアーゼT₁の活性中心の解析を行いました。

何か新しい系でユニークな仕事をしたいと、ぼんやり考えていた時、ふと開いた本に免疫グロブリンの文字を見つけ、読み進むうちに胸が高まってきました。その本は濱口浩三先生の書かれた「蛋白質機能の分子論」でした。偶然是重なるもので、藤原鎮男先生の代理で出席した山村雄一先生の免疫の特定研究の班会議で清水章先生（当時、阪大第三内科）と知り合いました。清水先生は好奇心のかたまりのような方でした。ふたりはたちまち意気投合し、とにかくなにか初めようということになりました。私のそれ以後の十数年の進路を決める援軍との出会いでした。

【承】 見えるものを見る

免疫グロブリンは、未知を認識するために、自然が長い年月をかけて創り上げた、魅力に満ちた、芸術品ともいえるタンパク質群です。代表的な免疫グロブリンであるIgGは、2本のH鎖と2本のL鎖が12個のドメインを形成する、分子量15万のタンパク質です。当時、Wuthrich 教授のグループによって、低分子タンパク質の有機化学的、解剖学的解析が圧倒的な迫力で進められていました。タンパク質の全体構造を指向する、このWuthrich 路線の素晴らしさに魅せられて、NMRによる生体分子の構造研究の中心がそちらに移動し、私は、ひとり蚊帳の外に取り残された形になりました。そんな「化け者のようなもの」に手をだして何になるという声が聞こえてきました。しかし、私の方針は変わりませんでした。「心に決めた相手が偶々巨大であった」のですから、時の流行がなんであれ、方針を変えるわけにはいかなかったのです。

清水先生と相談の上、L鎖のダイマーである Bence Jones タンパク質（分子量5万）から初め、とにかく見えるものを見ようということになりました。最初のスペクトルを見た時、なかば予想したこととはいえ、大変ショックを受けました。水より低磁場には、ぼってりした芳香環プロトンの大きな山があるだけでした。それでも気を取り直してはスペクトルを何度も測定し、何度も何度もスペクトルを見直しているうちに、巨大な山の低磁場側に、小さいけれどシグナルらしきものがある

ことに気がつきました。 相関NMRの利点を生かし、その部分だけを測定し直して、これはシグナルに違いないと確信しました。 直ちにこの結果を電話で清水先生にお知らせし、「出来るだけ多種類の Bence Jones タンパク質」を世界中の研究室（といっても数箇所ですが）から集めて欲しいとお願いしました。 それからあとは、体力との闘いでした。 来る日も、来る日も、pH 滴定の実験を続けた結果、相当の量のデータを集めることが出来ました。 努力のわりには、得られた結果は多くはありませんでしたが、ここで明確になった点は以下の通りです。 ①見えたシグナルは、すべて、His 残基の C2-H プロトンに由来する。 ② Bence Jones タンパク質に共通なC領域の2個の His 残基は、つねに明瞭なシグナルを与える。 ③この His のシグナルは、成田-松尾法によって帰属できる。 ④C領域の2個の His のうち1個は異常に低い pKa を持ち、その pKa はアイソタイプ（アミノ酸-四残基の置換）によって鋭敏に変化する。 ⑤V領域由来の His のシグナルのpH 滴定曲線は、C領域由来の2個の His 由来の滴定曲線の間にランダムに分布する。 これらの結果を清水先生と協力して纏めて、Biochemistry に投稿して受理された時の感激は忘れることが出来ません。 努力して改造した100MHzの装置を使い、夜を日に継いでなんとかここまでたどり着いたからでした。

ずっとあとのことになりますが、阪大蛋白研の京極好正さんと林文晶君にお願いしてCIDNPの測定していただいた結果、林君が大変興味のあることを見つけました。 Bence Jones タンパク質の Tyr 残基のうち、CIDNPシグナルを与えるのは、①超可変領域にある Tyr 残基に限られる。 ②しかし、超可変領域にあるからといって、すべての Tyr 残基がCIDNPシグナルを与えるとは限らない。 この結果は、抗原結合部位になぜか多数存在する Tyr 残基について、今後解析を進めて行くにあたり、非常に役に立つのではないかと思い、記憶に留めておくつもりです。

話を元にもどしますが、Bence Jones タンパク質の pH 滴定の結果に力を得て、内心無謀とは知りつつ、IgG（分子量15万）に、100MHzの装置で挑戦することにしました。 芳香環領域に小さなシグナルが存在することを確認するのに、今回はさほど手間取りませんでした。 IgGから様々なフラグメントを切りだし、スペクトルの比較を丹念に行った結果、このシグナルがIgGのヒンジ領域の His 残基に由来することを結論しました。 NMRスペクトルが、環境の微細な変化に応じて敏感に変化することからいって、この帰属は完全なものとはいえませんでした。

その後、宮澤研究室に移り、遠藤聡史君が、正常のIgGとヒンジの欠損したIgGのスピンドiffusionを比較した結果、この帰属が正しいこと、さらにヒンジ領域が分子量15万のIgG分子のなかで極端にflexibleな部分であることが明らかになりました。 スピンドiffusionを用いるアイディアは、赤坂一之さんがミオシンでなさった

実験からヒントを得ました。遠藤君の実験には400MHzの装置を用いましたが、とびきりflexibleなヒンジのシグナルがHisのほかにも二、三見えたほかは、100MHzでの実験に付け加える新しいデータを得ることは出来ませんでした。この経験に基づいていいますと、Wuthrich路線を踏襲するタンパク質のNMR構造解析における分子量の壁は、たとえば仮に1000MHzになっても2000MHzになっても（こんな装置がそう簡単に出来るとは思いませんが）破れるとはとても思えません。なにしろ、緩和時間は、磁場が上がって短くなることはあっても、長くなることはありませんから。この時期、岩澤律夫君はさらに巨大なIgMに取り組んでいました。また、伊藤渉君はヒンジ領域のペプチドを切りだし、二本のジスルフィド結合とPro残基に富んだこの部分のコンホメーションを丹念に解析し、intactなIgG分子中におけるヒンジ領域の動的構造について大変魅力的なモデルを提出しました。しかし、見えるものを見るアプローチは、これが限界でした。当時、伊藤君が、intactなままIgGのヒンジを見たいと言っていたのをよく覚えています。この夢は、数年後に現実のものとなりました。

【車云】 見たいものを見る：新たな援軍来る

1965年東京で開かれた第1回磁気共鳴国際会議の講演で、Jardetzky教授は見たいものを見るためにタンパク質を安定同位体によって標識するというアイデアを夢として語りました。同教授（当時、メルク研究所）のグループは、1960年の末に重水素化アミノ酸を導入したStaph nucleaseの最初のスペクトルを発表しました。この夢の実現は、NMRによるタンパク質の構造解析の可能性に興味をもつ世界の研究者に大きなインパクトを与えました。Jardetzky教授はその後、スタンフォード大学に移られました。私が同教授のグループに加わったのはその頃です。

1980年代半ばに差し掛かった頃、スタンフォード大学のMcConnell教授の研究室では、Anglister博士を中心に、IgGの抗原結合部位の構造を、安定同位体標識法によって解析することを目標に仕事が初められました。このグループの仕事の最大の問題点は、スペクトルの帰属でした。

ちょうどこの頃、私は薬学部に移り、生まれて初めて研究室を持つことになりました。研究室では、田中俊之君を中心に、ハイブリドーマの無血清培地における培養のプロトコルを確立し、重水素ラベルIgGとそのフラグメントを調製し、学生諸君がそれぞれの進むべき道を模索していました。加藤晃一君と高橋栄夫君は、世界の研究の流れを多大の興味を持って注目していました。日本には、安定同位体標識法にかけては、甲斐荘正恒さんがすでに世界のリーダーの一人としての地位を確立し、¹³C標識SSIを用いて膨大なデータを集積しておられました。「灯台もと暗し」

とは正にこのことでした。研究室を訪れた加藤、高橋両君の話に熱心に聴いていただいた甲斐荘さんは、虎の子の Met-1- ^{13}C を 100 mg 恵与くださり、とにかくやってみるようと二人を励まして下さいました。加藤君は直ちに実験にとりかかりました。最初の ^{13}C 標識 I g G のスペクトルの測定結果が出たのは、1988年10月31日のことです。この日の感激と興奮は、いつまでも忘れることはないと思います。分子量15万の I g G に含まれるすべての Met 残基の主鎖カルボニル炭素のシグナルが分離していました。さらに、驚いたことに、甲斐荘さんが始められたダブルラベル法が、この巨大な系で利用できることが分かり、私たちの進路は決まりました。

ここから先は文字どおり一瀉千里でした。その結果は、「安定同位体標識多核種 NMR による I g G のドメイン構造解析と相互作用部位の構造構築」を主旨として本討論会で毎年報告すると共に、論文にも発表して来ました。

加藤君は、多くの学生諸君の協力を得て、これまでに、①ダブルラベル法に種々の方法を組合わせてシグナル部位特異的帰属が可能であること、②帰属されたカルボニル炭素のシグナルが、抗原結合部位や F c におけるプロテイン A 結合部位における相互作用解析のプローブとなること、③intact な I g G 分子のヒンジ領域の動的構造解析が可能であることを示して来ました。伊藤君の夢はここに正夢となりました。加藤君はさらに、より大きい方向を指向した研究を発展して来ました。その結果、④抗原・抗体コンプレックス（分子量110万）でも、ヒンジを含めいくつかのシグナルが観測可能であることが分かりました。これによって、抗原・抗体反応の本質に迫る構造化学的な方向が見えてきたのではないかと考えています。

私たちの研究は、多核種安定同位体標識法の導入によって、抗原結合部位の静的、動的構造解析へ広がって行きました。これは、次の二つの幸運を抜きにしては語る事が出来ません。まず何と言っても大きいのは、嶋田一夫君（当時、臨床研）の研究室への加入です。嶋田君の加入によって、研究室の NMR の力は革命的に向上しました。もう一つの幸運は、我々の用いている抗ダンシル I g G が、スタンフォード大学の Herzenberg 教授のグループによってスクリーンされた Switch variant 抗体であったことです。これら一群の抗体は完全に同一の V 領域をもち、C 領域が少しずつことなる点が特徴です。さらに、この抗体群には、C 領域の一つのドメインが欠落した variant が含まれています。これらの抗体群をもとにして、最小の抗原結合フラグメントである F v のほか、3ドメイン、4ドメインから成る F a b*、F a b を大量に調製するプロトコルが確立しました。これらの抗原結合フラグメントは、抗原・抗体反応におけるドメイン間相互作用の役割など非常に興味のある問題に迫るために重要な役割を果たすものと期待しております。

現在までに、嶋田君をリーダーとして、高橋栄夫君を中心に実験が進められ、抗原抗体反応の本質に徐々に迫りつつあると実感しています。さらに、中山智紀君は、抗原刺激を続けるにつれて、抗体の親和性、特異性が上昇していくマチュレーションの現象の構造化学的解明を目指して、分子量5万のFabを用いて興味ある成果を得つつあります。これらの研究の結果については、まとまったものから本討論会に報告し、またその都度論文にして発表して来しました。

【系吉】 努力して待てば海路の日和有り

現時点では、この項で語るべきことはまだ多くありません。研究室員諸君のこれまでの並々ならぬ努力によって、鍋の中は次第に煮えたぎって来しました。私たちの進むべき道は決まっています。これから先、どんな料理を創って行くか、研究室員一人一人にとってふたたび模索のときとなりました。ここでもう一度、初心に戻り、「原子一つづつを手にとって見ることのできる」NMRの原点を見据えつつ、知恵を絞りぬいて道を切り開かなければならないと決意を新たにしております。

謝 辞

NMRのABCから御指導いただいた藤原鎮男先生、清水博先生、昭和57年、研究室の一員に加えていただき、かつ多くの有益な助言をいただいた故宮澤辰雄先生に心よりお礼申し上げます。

私自身のアイディアといえば、①免疫グロブリンによる構造構築と認識の関連をNMRによって解析して見たい、②ドメイン間相互作用と機能発現部位の構造の関連を調べる上で、Switch variant抗体群が役に立つのではないかの二点だけです。それ以外のアイディアと成果は、援軍となっていたいただいた多くの方々、まとまりの無いことをたまにしか口にしない私を、これまで支えていただいた嶋田一夫君をはじめとする研究室の諸君全員にすべて帰されるべきものであります。研究室ではまた、嶋田君と学生諸君によって、さまざまな低分子量タンパク質のNMR構造解析が進行中です。ここに、嶋田君を中心とするスタッフ、学生諸君全員の熱意と努力に心より感謝の意を表したく思います。

研究費は、文部省の科学研究費、科学技術庁の振興調整費、三菱財団、上原記念生命科学財団、島津科学技術振興財団、医科学応用研究財団、すかいらくフードサイエンス研究所、さらに民間各社よりの奨学寄付金の御援助をいただきました。とくに、6年間にわたり、科学技術庁振興調整費の研究班の班員に加えていただき、抗体の安定同位体標識の実験に助言と理解と援助を惜しまれなかった甲斐荘正恒班長に厚くお礼申し上げます。

第 3 日 目
11月6日 (土)

L18 ~ L35

山田博昭、椋野邦子、○梅田万美、前田孝泰、世良明
神戸大 理 化

High-pressure NMR study on the Hindered Rotation in
cis-1,12-Disubstituted [12]paracyclophanes

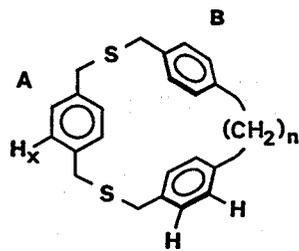
Hiroaki Yamada, Kuniko Mukuno, ○Mami Umeda, Takayasu Maeda,
Akira Sera

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University

Effect of hydrostatic pressure on the rate of internal rotation of title compounds has been examined by DNMR method up to 190 MPa. The high-pressure NMR spectra were obtained on 1,1,2,2-tetrachloroethane- d_2 solutions in a quartz high-pressure cell at 83°C and at 105°C using a Jeol FX-90Q spectrometer. An increase in pressure was found to accelerate the rotation of the benzene ring of cyclophane molecule.

シクロファンをはじめとするいわゆる大環状分子については、その特異な構造に由来する分子内回転運動に興味もたれ、DNMR法を駆使した詳細な研究がさかんにおこなわれている。1) しかしながら、それらはいずれも常圧におけるスペクトルの温度変化から交換平衡、交換速度等に関する熱力学的パラメーターを求めたものである。

大環状分子は骨格のフレキシビリティから想像されるように高圧力の印加によって骨格構造が変形したり、あるいは分子内運動の速度、モードが影響をうけると予想されるのであるが、この点に注目した高圧NMR²⁾の研究例は少ない。3,4) 以前われわれは、2,11-ジチア[3,3, n]パラシクロファン($n = 1,2$)の高圧NMRを測定し、加圧により環プロトン、 H_x が異常に高磁場シフト(8~9 Hz/ $\nu_0 = 100$ MHz, $\Delta p = 150$ MPa)することを見いだした。3) この現象は、高圧下でベンゼン環A、Bを結ぶ結合内の二面角が変化して、環全体がわずかに縮み、A~Bの距離が接近して、ベンゼン環Bによる磁気異方性効果が増大したためとして説明された。今回は表記の化合物についてベンゼン環の内部回転運動に対する圧力効果を調べようとしたものであるが、高圧下で環が縮小すること及び溶媒の粘度が増加することを想定すると、加圧によってベンゼン環の回転速度は小さくなるであろうと予想された。



$n = 1,2$

2,11-Dithia[3,3, n]paracyclophane

キーワード：高圧高分解能NMR、パラシクロファン、分子内回転、圧力効果、活性化体積

やまだ ひろあき、むくの くにこ、○うめだ まみ、まえだ たかやす、せら あきら

[実験]

高圧装置の基本的構成はFig.1に示すように、ノンスピニングタイプの高圧セルを従来の方法により昇圧装置に接続したものである。5,6) ただし、セルは酸・水素焰を用いて石英管から作製した。本体 (o.d./i.d. = 3 mm/0.8 mm) および、それからのびる毛細管部 (C, 300-400 mm length) から成り、毛細管の先端 (o.d. = 0.5 mm) をステンレス製ノズル (B) に接着してある。破壊テストはまだ行っていないが従来の2級硬質ガラス、あるいはパイレックスガラスよりも耐圧性能に優れているはずである。6)

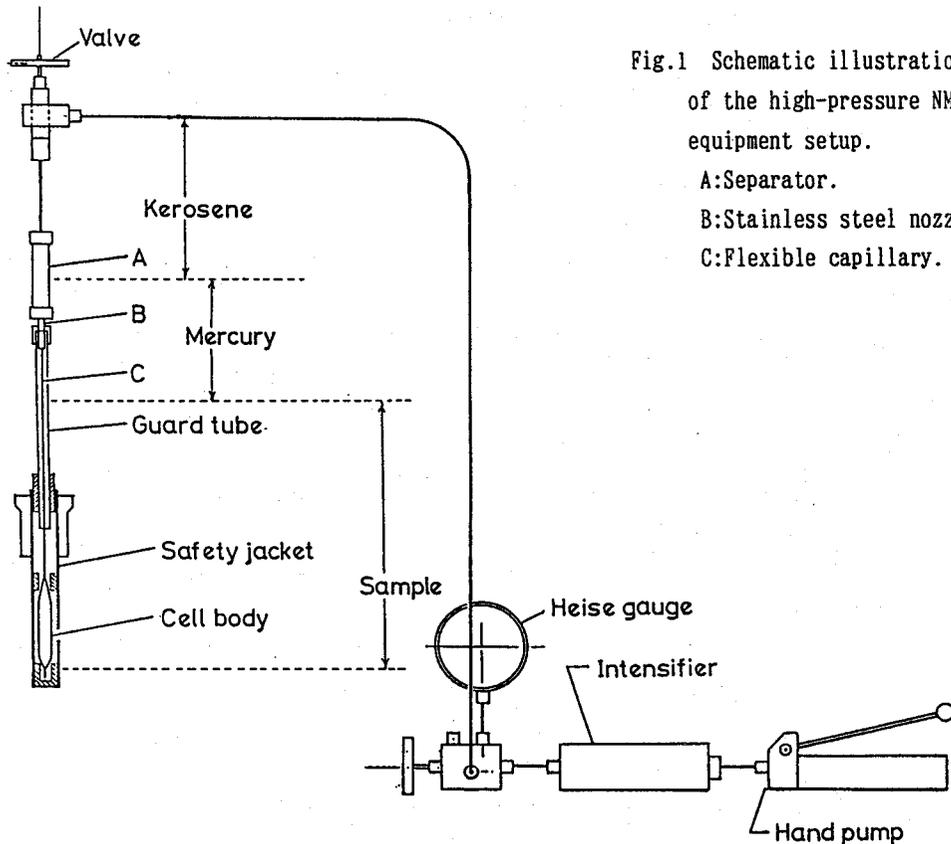
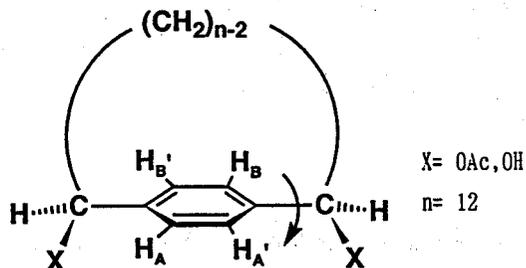


Fig.1 Schematic illustration of the high-pressure NMR equipment setup.

- A: Separator.
- B: Stainless steel nozzle.
- C: Flexible capillary.

試料溶液をまず小型ポンプ内に入れ、2-10 MPa (約20-100 atm.) の加圧によって、ヘリウムを満たしたセル内に導入する。その際、ヘリウムは圧縮され小さな気泡となるが、これを浮上させ毛細管部を通して逃がす。測定終了後、試料溶液は凍結、再融解して気泡を発生させ減圧により排出し (気泡がないと排出不能!)、適当な溶媒で洗浄、乾燥して次の実験に備える。このように、セルの繰り返し使用が可能となった。

試料のパラシクロファンはジプロモ体、ジヒドロキシ体、ジアセトキシ体の3種を中崎らの方法⁷⁾により合成したが、このうちジプロモ体はセパレーター (Fig.1, A) 内の水銀と反応するため使用できず、ジヒドロキシ体は溶解度が不十分でS/Nのよいスペクトルを得ることが出来なかった。従って今回はジアセトキシ体の測定結果を中心



cis-1,12-Disubstituted [12]paracyclophanes

に報告する。ジアセトキシ体 6 mol%の1,1,2,2-テトラクロロエタン-d₂溶液を上述の石英セル内に圧入し、27°C、60°C、83°Cおよび105°Cで高圧NMRを測定した。Jeol FX-90Q 分光計を使用し、external lockにより磁場安定化をはかり、約100回の積算を行った。

【結果と考察】

27°Cではベンゼン環の回転が停止しており、また $|J_{AB,AB}| \ll |\Delta\delta_{AB,AB}|$ なので環プロトンシグナルはH_A, H_A・とH_B, H_B・に対応するsinglet 2本となる。温度を上げるにともない、2本のシグナルは融合に向かうが、60°Cではまだ回転が遅すぎて波形の圧力変化をとらえにくい。そこで、T_cに近い83°Cおよび105°Cの環プロトンシグナルについて波形解析をおこなった。J_{AB} = 0, J_{AB}・ = 0と近似し、シフト差、 $\Delta\delta_{AB}$ は各圧力下、27°Cにおける $\Delta\delta_{AB}$ を元にして求め計算に使用した。

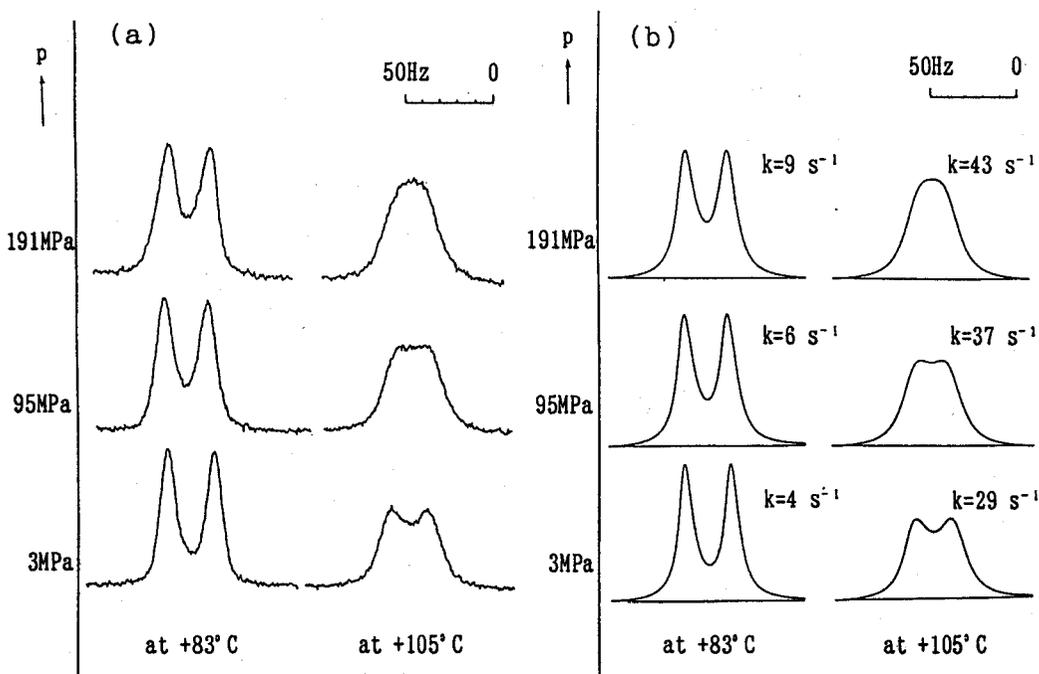


Fig.2 Observed(a) and calculated(b) ¹H NMR spectra ($\nu_0=89.55$ MHz) of the aromatic protons in cis-1,12-diacetoxy[12]paracyclophane at various pressures at +83°C and +105°C. (solv.:CDCl₂CDCl₂, conc.:6mol%)

観測波形と計算波形をFig.2に示す。高圧力の印加によって、ベンゼン環の回転が加速されていることがわかる。ジヒドロキシ体については上述のごとく、S/N不良のため波形のシミュレーションが困難であったが、3.5, 52, 95, 131, 194 MPa (105°C)での測定により、やはり加圧によって、回転が加速される($k = 30 \sim 40$ sec⁻¹/3.5 MPa, $50 \sim 60$ sec⁻¹/194 MPa)と推定された。

以上の結果は当初予想した圧力効果の方向とは逆である。このことは加圧による分子の変形(環構造の縮小)および粘度増大の効果が小さく、回転の遷移状態の体積が減少すること(負の活性化体積)による効果の方がむしろ支配的になったとして説明されよう。

Fig.3 は $\ln k$ を圧力 p に対してプロットしたものである。次式にしたがい、

$$d(\ln k)/dp = -\Delta V^\ddagger/RT$$

直線の勾配から回転の活性化体積を求めてみると、 $\Delta V^\ddagger = -6 \sim -7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ (105°C)、 $-5 \sim -10 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ (83°C) となった。これが遷移状態における体積の減少分に相当するものであるが、現段階では次の各項に起因すると考えている：

- 遷移状態でベンゼン環がメチレンブリッジの空洞内に入り込むため分子の体積が小さくなる。
- この遷移状態の構造は原系のそれに比べて扁平であり、溶媒とのパッキングが密になりやすい。
- もし、遷移状態で分子の極性が增大しているのであれば、その場合は静電気的な溶媒和がきつくなり、やはり ΔV^\ddagger に対して負の寄与となる。

しかし、これらの寄与因子の実証と、定量的評価は現段階ではできない。より高圧の領域における高分解能実験、SCM 分光計を使用した internal lock 法による測定の実現等と共に今後の課題である。

謝辞 ジヒドロキシおよびジアセトキシシクロファン合成、分離精製について大阪府立大学 総合科学部 山本浩司教授の御助言と御指導をいただきました。厚くお礼を申し上げます。

- M. Oki, *Methods in Stereochemical Analysis* (ed by A. P. Marchand) vol. 4, "Applications of Dynamic NMR Spectroscopy to Organic Chemistry" VCH Publishers, Inc. Florida (1985), Chapt. 5.
- J. Jonas, (ed), "High Pressure NMR" in the Springer-Verlag series., *NMR-Basic Principles and Progress*, 24, (1991) Springer-Verlag, Berlin.
- F. Imashiro, A. Saika, H. Yamada, and A. Sera, *Chem. Lett.*, 247 (1981).
- H. Yamada, K. Kotani, and A. Sera, *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1029 (1984).
- H. Yamada, "Glass Cell Method for High-Pressure, High-Resolution NMR Measurements" in ref. 2)
- H. Yamada, K. Kubo, I. Kakiyama, and A. Sera, "High-Pressure High-Resolution NMR Measurements of Liquid Solutions" in "High Pressure Liquid and Solutions" (Jpn. Soc. Mater. Sci.) Elsevier, to be published.
- M. Nakazaki, K. Yamamoto, and S. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 45, 1562 (1972).

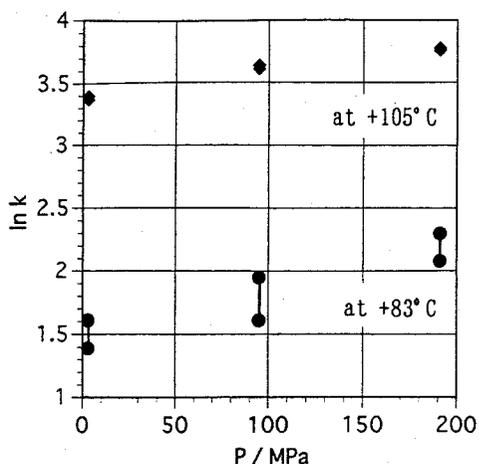


Fig.3 Pressure effect on $\ln k$ for cis-1,12-diacetoxy[12]paracyclophane.

(¹農水省・食総研、²農水省・生物研、³日本電子データム)○石田信昭¹、狩野広美²、小川秀次郎³

Measurement of Compartment Sizes of Cell-associated Water in Plant Tissues by an NMR Microscope.

(¹National Food Research Institute, ²National Institute of Agrobiological Resources, ³JEOL Datum Ltd.)Nobuaki Ishida¹, Hiromi Kano², Hidejiro Ogawa³

Self-diffusion coefficients and restricted diffusion of cell-associated water in barley seeds during ripening were examined by an NMR microscope using a pulse gradient spin-echo method and a pulse gradient stimulated-echo method. Self-diffusion coefficients of cell-associated water were maintained high ($>1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) throughout growth stages. Large compartments were observed in endosperm before ripening and those of the vascular bundle and the nucellar projection were 23 ± 9 and $32 \pm 7 \mu\text{m}$, respectively.

細胞の水は、主に細胞内を移動循環するが、その一部は他の細胞の水の動きと有機的な関係を持っている。そして、細胞の水の運動性または移動速度は基質及び代謝産物の輸送、酸素の供給と炭酸ガスの排出、さらには、細胞内で発生する熱の放出を通して細胞の活性をコントロールしており、組織の生育状態や生理状態と強い関連を持っているものと考えられる。本研究では登熟中の大麦種子を用いて、生育ステージに伴う細胞の水の移動速度及び移動距離の変化を、¹H-NMRマイクロイメージングによって検討した。

【材料及び方法】

登熟中の大麦の穂を生育ステージを追って採取し、一粒を残して子実を穂より取り去り、残った子実をサンプルとして用いた。

大麦子実の稈を水につけた状態で、JEOL GSX-270WB NMRスペクトロメーターに装着可能なマイクロイメージングプローブにセットし、pulse gradient spin-echo法及びpulse gradient stimulated-echo法 (Fig. 1, a, b) によって拡散イメージを測定した¹⁾。RFパルスはsinc-function-modulated pulse (270MHz 2ms、励起幅4KHz)を用いた。イメージングはX, Y, Z軸にそれぞれ58mT/mの磁場勾配を用いて、 $T_E = 27\text{ms}$ 、 $T_R = 5.0\text{s}$ で測定を行った。X軸方向のデータ取り込みは256ポイント、Y軸

キーワード：NMR顕微鏡、拡散、パルス磁場勾配、細胞の水、大麦、子実

いしだのぶあき、かのひろみ、おがわひでじろう

方向のエンコーディングは128ステップであり、画像は256x256のマトリックス上で構成した。イメージの平面分解能は0.05mmx0.05mmでスライス厚1.6mmであった。拡散イメージ測定用のパルス磁場勾配は最大278mT/mでZ軸方向に印加し、パルス長は3msであった。また、コンパートメントサイズはCallaghanの方法²⁾を用いて $\Delta=200$ msとし、パルス磁場勾配の強度を変化させて測定した。

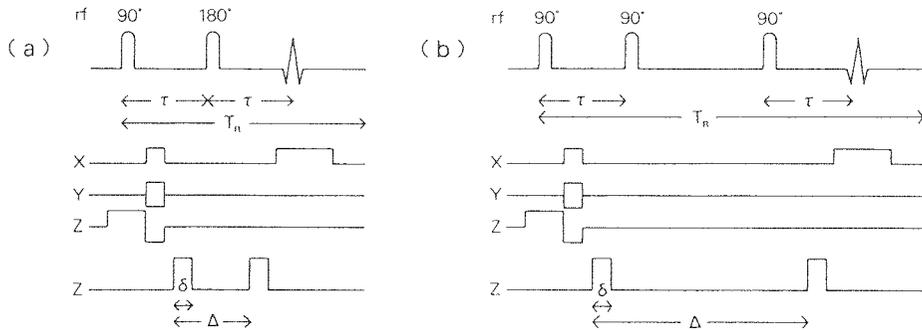


Fig.1 Pulse sequences of a pulse gradient spin-echo (a) and a pulse gradient stimulated-echo (b) method.

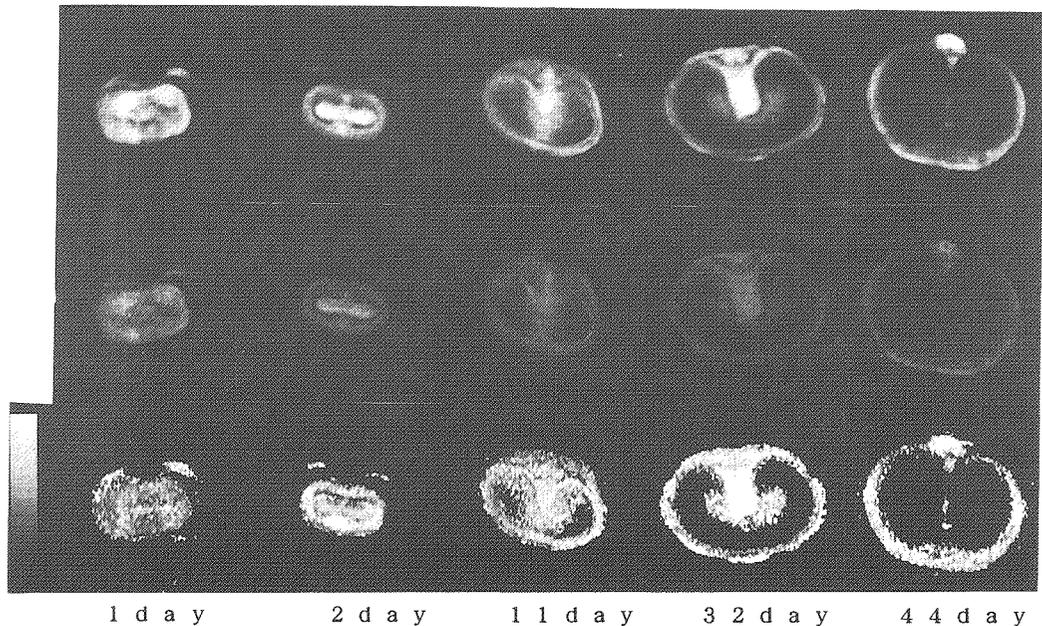


Fig.2 Diffusion images of ripening barley seeds measured by the pulse gradient spin-echo method ($\Delta=12$ ms, $G=278$ mT/m).
upper:¹H-NMR image, middle:diffusion weighted image
lower:diffusion rate image

【結果及び考察】

出穂後生育ステージを追ってpulse gradient spin-echo法 (Fig.1, a) で測定した

Table 1 Self-diffusion coefficients cell-associated water at various places of ripening barley seeds. ($\times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$)

day	husk or seed coat	vascular bundle	water cavity	endosperm
1	1.65±0.20			1.24±0.16
4	1.77±0.03	1.78±0.02		1.49±0.05
11	1.66±0.43	1.59±0.03	1.90±0.19	1.55±0.06
32	1.49±0.31	1.79±0.03	2.14±0.04	1.31±0.12
44	1.77±0.25	1.92±0.08	1.34±0.08	

Self-diffusion coefficients at three small areas in the individual tissues were measured on the data of Fig. 2.

$^1\text{H-NMR}$ イメージ、拡散イメージ、及び、それらをもとに計算した拡散係数イメージを、Fig. 2に示す。 $^1\text{H-NMR}$ イメージにおいて、胚乳の水は生育にともなって減少し、また、water cavityが小さくなった。しかし、NMRによって検出されるバルクの水の拡散速度は水の量と相関せず全生育ステージにわたって高く保たれた。Stejskal-Tannerの式³⁾により算出した各組織の自己拡散係数をTable 1に示した。自己拡散係数の最大値は $2 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ に達し、純水 ($2.14 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$) と同じレベルの値を示した。細胞の水は高濃度の溶質を含む溶液であることを考えると、細胞の水の運動性はエネルギー供給反応に強く依存しているものと考えられる。

細胞の水の移動を拡散時間 (Δ) を変えて pulse gradient stimulated-echo法によって測定した (Fig. 3)。子実全体の水のシグナルの拡散による減衰率 ($-\ln(A/A_0)$) は、出穂後30日頃までは拡散時間に対して曲線的に低下した。この変化は半透膜を通した水の拡散モデルに類似した変化である。一方、出穂後40日頃になるとシグナルの減衰率は拡散時間が150ms以上では一定値となり、典型的な制限拡散の様子を示した。この時期には胚乳の自由水はほとんど検出されなくなり、胚珠と維管束のみに水が観察された (Fig. 2)。出穂後32日目の子実の pulse gradient stimulated-echo法で測定したイメージをFig. 4に示す。この時期の子実の水の運動性はかなり高く保たれている (Table 1) にもかかわらず、 T_1 は短く A_0 の拡散時間に伴う低下が著しいことが測定上の問題点であった。

Fig. 4は、維管束の拡散係数は171msまで低下し、ほぼそのレベルを保つが、胚乳及びwater cavityではそれ以上の拡散時間の領域でも低下し続けることを示した。

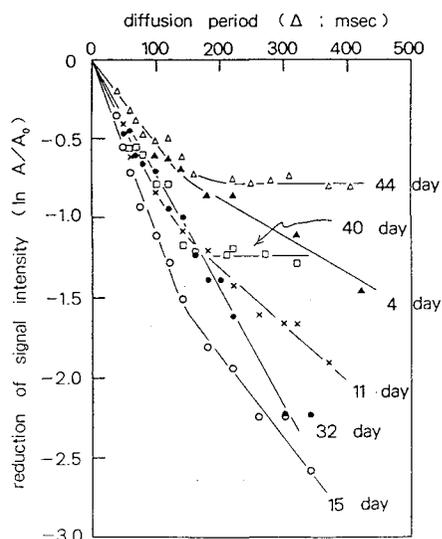
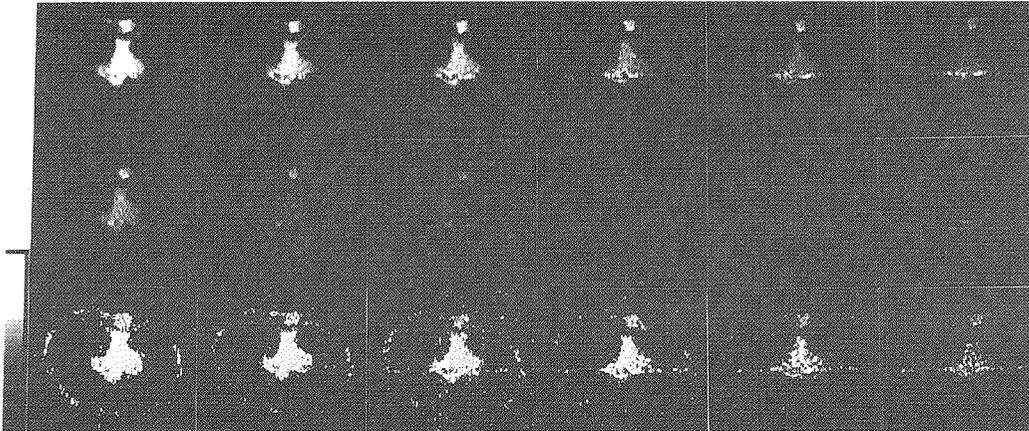


Fig. 3 Relationship between reduction of signal intensity and diffusion period. ($g=110 \text{mT/m}$)

Fig. 3、Fig. 4の結果を総合的に考えると、未熟な胚乳及び多量の水を含む water cavityは半透過性を持った大きなコンパートメントより構成されているものと考えられる。次に、Fig. 3において150ms以上の拡散時間でシグナル減衰率が一定となる40日目の子実を用いて、維管束と胚珠（部分的に小さくなったwater cavityを含む）のコンパートメントサイズを拡散時間（ Δ ）を200msとし、パルス磁場勾配の強さを変えてCallaghanの方法²⁾に従って測定した（Fig. 5）。維管束及び胚珠におけるコンパートメントの大きさは $23 \pm 9 \mu\text{m}$ と $32 \pm 7 \mu\text{m}$ となり、細胞のサイズとほぼ同程度であるものと考えられた。



$\Delta = 71 \text{ ms} \quad 121 \text{ ms} \quad 171 \text{ ms} \quad 221 \text{ ms} \quad 271 \text{ ms} \quad 321 \text{ ms}$
 Fig. 4 Changes of diffusion image with increasing diffusion period of a ripening barley seed at 32 day after heading measured by the pulse gradient stimulated-echo method ($G=89\text{mT/m}$).

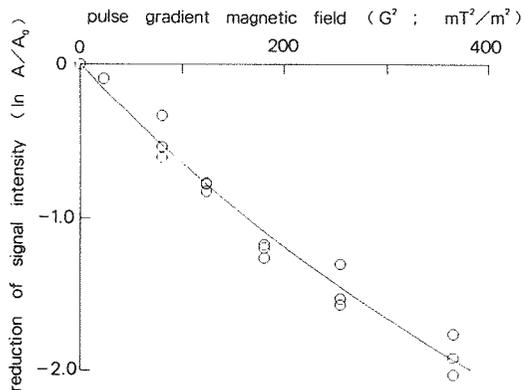


Fig. 5 Relationship between reduction of signal intensity and magnitude of the pulse gradient magnetic fields (the vascular bundle of a barley seed at 40 day).

【文献】

1. P. T. Callaghan, "Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy", Clarendon Press, Oxford, 1991
2. P. T. Callaghan and K. W. Jolley, J. Coll. Int. Sci., **93**, 521(1983)
3. E. O. Stejskal and J. E. Tanner, J. Chem. Phys., **42**, 288(1965)

多重パルス 2 次元 NMR 法による液晶の同種核間双極子相互作用の新しい解析方法。

○星野 鉄哉、久保 厚、寺尾 武彦

1. 京大理。

^1H and ^{19}F Multiple-pulse two dimensional NMR experiments on liquid crystalline materials.

○Tetsuya Hoshino, Atsushi Kubo, and Takehiko Terao

Department of Chemistry, Kyoto University

We tested the three types of the multiple pulse two dimensional (2D) experiments on liquid crystalline samples. At first, we performed a "Homonuclear Separated Local Field experiment" (HOSLF), in which, BR24 multiple pulse was applied during the t_2 period, while the spin evolves under chemical shift and dipolar interactions during the t_1 period. Next we performed two types of 2D exchange experiments, in which BR24 was applied both during the t_1 and t_2 periods. The cross-peak intensities were monitored as functions of the mixing period. In these experiments, we applied no r.f. pulses, or applied a spin-locking pulse during the mixing period. Theory was developed to determine the dipolar interactions of the liquid crystalline samples.

[序] ^1H や ^{19}F など大きな磁気双極子相互作用を有する系では、スピン拡散のダイナミクスに関する基礎研究があまりなされていない。Haeberlen らは [1]、多重パルス NMR 法と 2 次元 NMR 法を組み合わせ、磁気双極子相互作用で分裂したスペクトルを化学シフトで分離している。(以下ではこの実験を "Homonuclear Separated Local Field experiment" = "HOSLF" と呼ぶ。得られたスペクトルよりシグナルの帰属をおこなった。また内藤、赤坂らは [2]、温度ジャンプ NMR 法を用い、液晶相と等方相の相関スペクトルを測定し、液晶の磁気双極子相互作用を決定している。今回、我々は Haeberlen らと同様の実験を繰り返すとともに、新たに t_1 および t_2 時間に BR24 多重パルスを用いた 2 次元交換 NMR の実験を行った。これらの方法を用いて、化学シフトの異なる ^1H または ^{19}F 間の磁気双極子相互作用の決定を試みた。

[実験] BR24 多重パルス [3] を用いて 3 種類の実験を行った。BR24 の 2 4 個の 90° パルスの位相として $(xy\bar{y}\bar{x})(\bar{x}y\bar{y}x)(yx\bar{x}\bar{y})(\bar{y}x\bar{y}x)(\bar{x}\bar{y}\bar{y}x)(\bar{x}y\bar{x}y)$ を用いた。この様な位相を用いた時、化学シフト相互作用の有効磁場の向きは $(-1,1,1)$ の方向になっている。後の説明が容易になるように、有効磁場の方向を z' 軸、 $(1,1,0)$ 及び $(-1,1,-2)$ の方向に x' 軸と y' 軸を定義する。

HOSLF の実験では次のパルス系列を使用した。

$$(90^\circ)_{\phi_1} - t_1 - (35.26^\circ)_{45^\circ} - \text{BR24}(\text{acquisition}; \phi_r) \quad (1)$$

cosine の実験では $(\phi_1, \phi_r) = (135^\circ, 0^\circ), (315^\circ, 180^\circ)$ の位相で実験を行い、シグナルを足し合わせた。sine の実験では $(45^\circ, 0^\circ), (225^\circ, 180^\circ)$ の位相を用いた。次に t_1 および t_2 時間に BR24 多重パルスを加えた 2 次元交換 NMR の実験を行い、クロスピークの強度の混合時間依存性を測定した。まず混合時間に何もパルスをかけない実験 ("Multiple Pulse NOESY"

キーワード： 多重パルス NMR、2 次元交換 NMR、液晶。

○ほしの てつや、くぼ あつし、てらお たけひこ

= "MPNOESY"と呼ぶ。)を、次のパルス系列を使用して行った。

$$\begin{aligned} &(\beta_1)_{\phi_1} - BR24(t_1) - (90^\circ)_{\phi_2} - t_m - (90^\circ)_{\phi_3} - BR24(acquisition, \phi_r) \\ &(\beta_1)_{\phi_1} - BR24(t_1) - (180^\circ)_{45^\circ} (90^\circ)_{\phi_2} - t_m - (90^\circ)_{\phi_3} - BR24(acquisition, \phi_r) \end{aligned} \quad (2)$$

cosine の実験では、 $(\beta_1)_{\phi_1}$ を $(90^\circ)_{135^\circ}$ に固定し、 (ϕ_2, ϕ_3, ϕ_r) を $(315^\circ, 135^\circ, 0^\circ)$ $(315^\circ, 315^\circ, 180^\circ)$ $(135^\circ, 135^\circ, 0^\circ)$ $(135^\circ, 315^\circ, 180^\circ)$ と変え位相回しを行った。sine の実験では、最初のパルスを $(35.26^\circ)_{45^\circ}$ とし、あとは同じ位相回しを行った。それぞれの実験について計 8 個の FID を足し合わせた。

また混合時間に rf 磁場を加える実験も行った。(以下、"Multiple Pulse ROESY" = "MPROESY"と呼ぶ。)使用したパルス系列を次の式でしめす。

$$\begin{aligned} &(\beta_1)_{\phi_1} - BR24(t_1) - (CW)_{45^\circ} : t_m - BR24(acquisition, \phi_r) \\ &(\beta_1)_{\phi_1} - BR24(t_1) - (180^\circ)_{45^\circ} - (CW)_{45^\circ} : t_m - BR24(acquisition, \phi_r) \end{aligned} \quad (3)$$

cosine の実験では $\beta_1 = 90^\circ$ とし、 $(\phi_1, \phi_r) = (135^\circ, 0^\circ), (315^\circ, 180^\circ)$ で (3) 式の 2 つの実験を行い、計 4 つの FID を足し合わせた。sine の実験では、最初のパルスを $(35.26^\circ)_{45^\circ}$ および $(35.26^\circ)_{225^\circ}$ に変え、あとは cosine の実験と同じ位相を用いた。

NMR の実験は Chemimagnetic 社製の CMX300 スペクトロ・メーターを用い、 ^1H と ^{19}F の共鳴周波数 300.47MHz、および 282.68MHz で実験を行った。実験は室温 ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) で行い、特に温度制御は行わなかった。 $\text{C}_6\text{F}_5\text{Cl}$ を液晶 ZLI1115 に溶かした試料および液晶試料 MBBA (4'-メトキシベンジリデン、4-n-ブチルアニリン) についてそれぞれ ^{19}F と ^1H の実験を行った。MBBA と $\text{C}_6\text{F}_5\text{Cl}$ は東京化成社製の試薬を、ZLI1115 は Merck 社製の試薬をそのまま使用した。 $\text{C}_6\text{F}_5\text{Cl}$ の試料はスピニングを行わずに、MBBA については磁場に対して 45.73° の角度で回転させながら測定を行った。

[理論] HOSLF の実験については 2 次元 FID は次の様に書ける。

$$S^{(1)}(t_1, t_2) = \text{Tr}\{F^+ U_{z'}(t_2) P U_0(t_1) F^- U(t_1)^{-1} P^{-1} U_{z'}(t_2)^{-1}\} \quad (4)$$

ここで F^\pm は全スピン・オペレーター $\sum_i I_i^\pm$ で、P はパルスの時間発展演算子である。 $U_{z'}(t)$ は BR24 パルス照射時の時間発展演算子で次式で与えられる。

$$U_{z'}(t) = \exp\left\{-i \sum_i \omega_i \cdot sf \cdot I_{iz'} t\right\} \quad (5)$$

sf はスケーリング因子で BR24 では、 (90°) パルスの長さ無限小の時、 $\frac{2}{3\sqrt{3}}$ となる。また $U_0(t)$ は自由歳差運動の間の時間発展演算子で、磁気双極子相互作用のハミルトニアン $H_D = \sum_{i>j} d_{ij} (2I_{iz} I_{jz} - I_{ix} I_{jx} - I_{iy} I_{jy})$ および化学シフト・ハミルトニアン $H_{CS} = \sum_i \omega_i I_{iz}$ を使って、次式の様に表される。

$$U_0(t) = \exp\{-i(H_D + H_{CS})t\} \quad (6)$$

(4) 式の F^+ を図 1 の $x'y'z'$ 座標系で表すとつぎのようになる。

$$F^+ = \frac{1}{2\sqrt{6}}(\sqrt{3}+1)(1+i)F^{+'} + \frac{1}{2\sqrt{6}}(\sqrt{3}-1)(1+i)F^{-'} - \frac{1}{\sqrt{3}}(1-i)F_z' \quad (7)$$

(4) 式の trace 中の順置換により、 $P^{-1}U_{z'}(t_1)^{-1}$ を F^+ の前に持ってくる。 $U_{z'}^{-1}F^+U_{z'}$ を計算すると $F_{z'}$ の項は $\omega_2 = 0$ の位置に、 $F^{+'}$ の項は $\omega_2 = \omega_1$ の位置に、また $F^{-'}$ の項は $\omega_2 = -\omega_1$ の位置にそれぞれピークを与える。BR24 の実験ではすべての共鳴線が rf 周波数の片側にくる様に rf 周波数を設定し、 $F^{+'}$ または $F^{-'}$ の一方のみを観測する。よって (7) 式のうち、 $F^{+'}$ のみを考えればよい。パルスのオペレーター P で逆変換すると、 $I_j^{+'}$ は I_j^{+} になる。結局、

$$P^{-1}U_{z'}(t_2)^{-1}F^+U_{z'}(t_2)P \longrightarrow \sum_j I_j^{+'} \exp i\omega_j s f t_2 \quad (8)$$

の置き換えが可能である。この式を (1) 式に代入し 2 次元 FID として次式をえた。

$$S^{(1)}(t_1, t_2) = \sum_i \text{Tr}\{I_i^{+'}U_0(t_1)F^-U_0(t_1)^{-1}\} \exp(i\omega_i t_2) \quad (9)$$

$\omega_2 = \omega_i$ のクロス・セクションは次式で与えられる。

$$s_i(\omega_1) = \int_0^\infty dt_1 \text{Tr}\{I_i^{+'}U_0(t_1)F^-U_0(t_1)^{-1}\} \exp(-i\omega_1 t_1) \quad (10)$$

同様な式が Haeberlen により導かれている。[1]

MPNOESY の実験については 2 次元 FID は次の式で与えられる。

$$S^{(2)}(t_1, t_2) = \text{Tr}\{F^+U_{z'}(t_2)P_2U_0(t_m)P_1U_{z'}(t_1)F^{-'} \times U_{z'}(t_1)^{-1}P_1^{-1}U_0(t_m)^{-1}P_2^{-1}U_{z'}(t_2)^{-1}\} \quad (11)$$

(11) 式において、(8) 式に類似した計算を行うと、次式をえる。

$$S^{(2)}(t_1, t_2) = \sum_{j,k} a_{jk}(t_m) \exp i s f (\omega_j t_1 + \omega_k t_2) \quad (12a)$$

$$a_{jk}(t_m) = \text{Tr}\{I_{jz}U_0(t_m)I_{kz}U_0(t_m)^{-1}\} \quad (12b)$$

ここで $a_{jk}(t_m)$ がクロス・ピークの強度となっている。MPROESY の実験ではクロス・ピークの強度は (11b) 式と同様の式で与えられる。ただし、z 軸を rf 磁場の方向に選び、混合時間の時間発展演算子を $U_1(t) = \exp -\frac{i}{2}H_D t$ に置き換えなければならない。

[結果及び考察] C_6F_5Cl の BR24 を用いて測定したスペクトルは 3 本の共鳴線を示した。これらの共鳴線は、高周波数側よりオルト、パラ、メタに帰属できる。図 1 はこの化合物の MPROESY スペクトルのダイアゴナルおよびクロス・ピークの混合時間依存性である。 C_6F_5Cl については、シングル・パルス・スペクトルのシュミレーションより、磁気双極子相互作用、化学シフト、J 結合のすべてを決定した。図 1 の実線はこれらの値を使用して計算した結果である。実験をほぼ再現できている。 C_6F_5Cl の双極子結合はオルト-メタの F 間で、770 Hz、メタ-パラ間で 420 Hz、オルト-パラ間で 130 Hz であった。クロス・ピークの振動の周波数はこれらの値よりも若干大きい。

図 2 に MBBA の HOSLF スペクトルの ω_1 方向の断面図を示した。 α -メチレン、ベンジリデン及びベンゼン環の 3'、5' 位の 1H では、単純な 2 スピン系では扱えないスペクトルとなった。隣の炭素についた 1H からの磁気双極子相互作用を考慮しなければならない。現在、これらのスペクトルと MPNOESY の実験についてシュミレーションを行っている。

[参考文献]

- [1] N. Schuff, and U. Haeberlen, J. Magn. Reson. **52**, 267 (1983).
- [2] A. Naito, M. Imanari, and K. Akasaka, J. Magn. Reson. **92**, 85 (1991).
- [3] D. P. Burum and W. K. Rhim, J. Chem. Phys. **71**, 944 (1979).

Fig. 1 Mixing time dependences of the diagonal and crosspeak intensities of MPROESY spectra of C_6F_5Cl in ZLI1115. (a) Δ (o, o), \diamond (m, m), \circ (o, m).

\blacktriangle \blacklozenge \bullet were obtained by the 1D MPROESY experiments. The calculated values are shown by

— (o, m), - - - (m, m), - · - · - (o, o). (b) Δ (o, p), \diamond (p, p), \circ (m, p).

\blacktriangle \blacklozenge \bullet were obtained by 1D MPROESY experiments. The calculated values are shown by — (m, p), - - - (o, p), - · - · - (p, p). Here, o; ortho, m; meta, p; para ^{19}F .

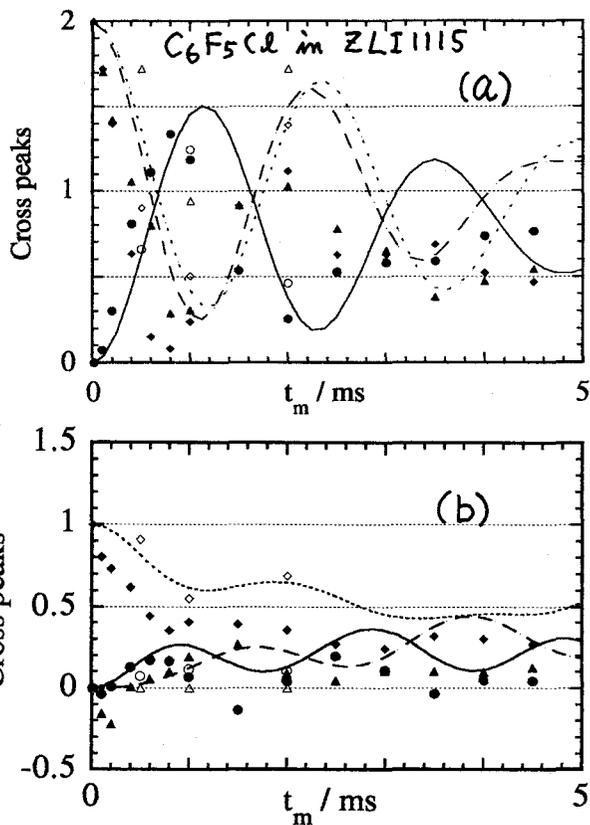
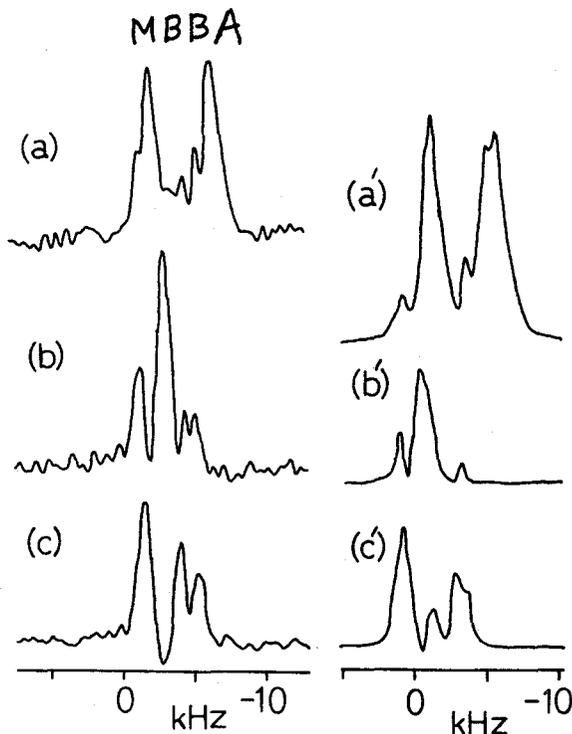


Fig. 2 ω_1 crosssections of a HOSLF spectrum on MBBA. (a) α -methylene (b) azomethine (c) 3',5'-benzene (ortho position with respect to the methoxy group). The corresponding simulated spectra are shown on the right hand side. (a'-c').



○原田雅幸、富安 博
東工大 原子炉研

The Development and Application of a Laser Irradiation NMR Instrument

○Masayuki Harada, Hiroshi Tomiyasu
Tokyo Institute Technology, Research Laboratory for Nuclear Reactors

A laser irradiation NMR instrument has been developed for the purpose of measuring high resolution NMR spectra under the irradiation of a laser. The laser irradiation was carried out from the bottom of a sample tube passing through the inside of temperature controller. The condition of photo-irradiation was quantitative and sufficient to measure the photo-induced effect for the ligand exchange reactions of metal complexes. NMR paramagnetic shifts and paramagnetic relaxations were observed from the photo-excitation of diamagnetic uranium(VI) (uranyl) ions. The rate of intramolecular exchange reaction was accelerated for acetylacetonato ligands in bis(acetylacetonato)(dimethyl sulfoxide) uranyl complex. The remarkable photo-induced effect was observed for the oxygen exchange in the uranyl ion by oxygen 17 NMR measurements.

光照射を行いながらNMR測定する方法は、CIDNPとして広く行われ、理論的取扱いもされている。しかしながら、金属錯体の光誘起効果及び、光誘起交換反応についての報告はない。このようなNMR装置による速度測定に係る光誘起効果は、定量的で、大光量の照射が必要である。特に測定に関しては試料温度が十分に制御されていることが重要である。そこで、定量的、大光量の光照射を行うことのできる装置を製作した。この装置を用いて、ウラン(VI) (ウラニル、 UO_2^{2+}) 錯体の分子間交換反応と置換反応、及びルテニウム錯体の電子交換反応についての光誘起効果に関する知見を得たので報告する。

【実験】 光照射装置はNMR装置本体の温度制御部を改造し製作した。図1にその概要を示した。光源は定量的で、大光量の照射が可能なアルゴンイオンレーザーとした。このレーザー光は光ファイバーケーブルを使用して、試料管の下部より試料へと導いた。従来の温度制御用熱電対は試料管直下にあるが、光照射の妨げとなるために、図の位置とした。このようにNMRプローブ本体には直接改造をしていないため分解能等に影響はなかった。試料温度は試料管に温度校正用の溶媒を入れた細管を挿入するか、直接熱電対を挿入することで校正を行った。試料管は5Φにおいて底の平らな特殊管を使用した。10Φの試料管は通常の試料管を使用して、5Φ試料管とともに二重管として使用した。交換反応の速度解析には2状態間の式、及びローレンツの式で

キーワード：光励起、光照射NMR、錯体、化学反応速度論

○はらだ まさゆき、とみやす ひろし

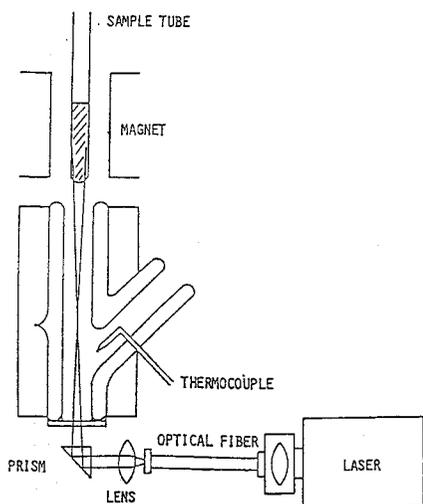


図1 レーザー照射装置の概要

した。図から、光照射時間とともにウラニルオキシ酸素の強度が大きくなって交換が起こっていることが分かる。この反応の速度定数は暗反応と比べて 10^4 倍大きな値となった。ビス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)、(III)の間の電子交換反応は2状態間の取扱いに関する fast exchange の範囲にあり、スペクトルの線幅は反応が速くなるにつれて狭くなる。この反応の光誘起効果を図3に示した。図から、ルテニウム(II)に配位したビピリジン配位子のNMRシグナルは光強度の増加に伴って、その線幅が狭くなり、電子交換反応は速くなっていることが分かる。

以上から、解離的の反応に関する光誘起効果は顕著であることが分かった。また、電子交換反応でも光誘起効果が初めてNMR法によって観測された。

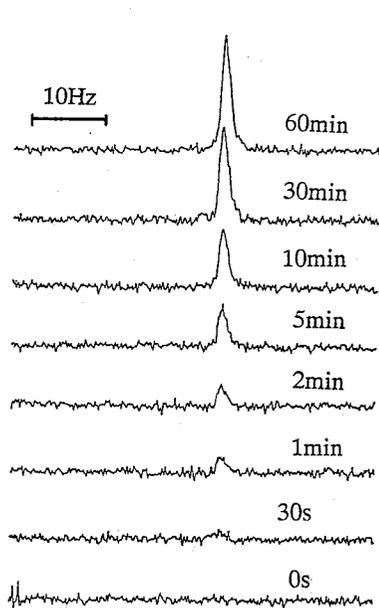


図2 ウラニル酸素のスペクトル変化 (レーザー強度0.1W 488nm)

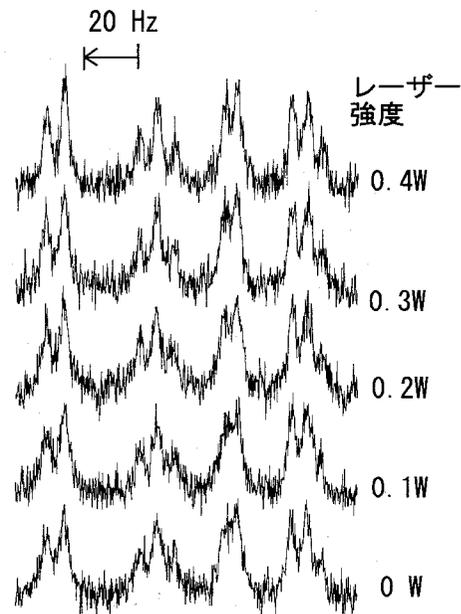


図3 ルテニウム(II)、(III)錯体の電子交換反応のレーザー強度依存性

カーブフィットして求めた。金属錯体は既知の方法で合成した。

【結果】ウラン(VI)に結合したウラニル酸素の ^{17}O -NMRは、ウラニルの光励起状態の常磁性緩和と常磁性シフトにより、線幅の広幅化と低磁場シフトを示した。解離的機構で進行するビス(アセチルアセトナト)(ジメチルスルホキシド)ウラニル(VI)錯体の分子内交換反応はレーザー照射により速くなることが分かった。一方、会合的反応であるフルオロウラニル錯体の反応は、光誘起効果が極めて小さいことが示された。ウラニルのオキシ酸素は水の酸素と交換するが、その光誘起効果を図2に示

^{13}C ラベルした固体試料のMAS条件下での
広帯域 J HOHAHA と双極子HOHAHA 実験

○藤原敏道、A. Ramamoorthy^a、永山国昭^b、樋岡克哉^c、藤戸輝昭^c
横浜国大・工、日本電子(株)・基礎研^a・NMグループ^c、東京大・教養^b

Broadband J and Dipolar HOHAHA Experiments under MAS
Conditions for ^{13}C -Labeled Solids

OT. Fujiwara¹, A. Ramamoorthy², K. Nagayama³, K. Hioka⁴, T. Fujito⁴

Department of Bioengineering, Yokohama National University¹; Basic
Research Division² and NM Group⁴, JEOL Ltd.; and Department of
Pure and Applied Sciences, the University of Tokyo³

RF pulse sequences for homonuclear Hartmann-Hahn (HOHAHA) dipolar and J cross polarization under MAS conditions have been developed. The dipolar HOHAHA sequence suppresses isotropic and anisotropic chemical shifts and heteronuclear dipolar interactions, and recovers the homonuclear dipolar interactions over broad ranges of offset and chemical-shift difference. The J HOHAHA sequence makes only the J interactions effective. The dipolar HOHAHA and J HOHAHA experiments, respectively, provide spin connectivities through space and bonds, similarly to NOESY and HOHAHA in liquid NMR. The two sequences were applied to ^{13}C -isotropic-shift correlated 2-D NMR. Experimental and numerically simulated results are shown for powdered amino acids enriched with carbon-13 spins.

[序] 複雑な生体分子などの構造解析を行う場合、スペクトルの分解能をよくし多くの構造情報を少数の実験で得ることが必要になる。そのためには溶液NMRと同様、 J 結合と双極子結合による等方化学シフト間の相関多次元NMRが有効である。

本研究では高分解能スペクトルが得られるMAS条件下での多次元NMRの開発を行っている。このために、2つの混合パルス系列を設計して実験した。双極子HOHAHAでは、多重パルスで異種核双極子結合と化学シフトを消して、広いオフセット帯域にわたって同種核双極子相互作用が残るように工夫する。これにより ^{13}C - ^{13}C の同種核間の through-space での磁化移動が可能になる。もうひとつのパルス列 J HOHAHA は、更に ^{13}C 双極子相互作用も除き ^{13}C 同種核間の through-bond のみによる磁化移動を行うものがある。これらのパルス列は、それぞれ溶液NMRにおけるNOEとHOHAHAに対応する。昨年の本討論会ではこの方法の理論と計算機シミュレーションについてのみ報告した。今回は、一様に ^{13}C ラベルしたアミノ酸を用いて実験に基づいてこれら方法の有効性を示す。

キーワード：固体多次元NMR、安定同位体標識試料、炭素間スピン結合、ラジオ波多重パルス。

○ふじわら としみち、えい らまむーしー、ながやま くにあき、ひおか かつや、
ふじと てるあき

[実験] ^{13}C -NMRスペクトルの測定は Chemagnetics CMX-300 を用いて、 ^{13}C 共鳴周波数 75 MHz で行った。直径 5 mm のローターを用い、試料回転数は約 4 kHz であった。CH双極子結合のデカップリングを行うために、HOHAHAによるミキシング中のラジオ波強度は ^{13}C について 50 kHz、 ^1H について 100 kHz とした。試料は、アラニンとグリシンで、それぞれについて 99.8%全 ^{13}C ラベルアミノ酸とラベルなしアミノ酸を 1:9 で混合したものである。

[双極子HOHAHA] このパルス列は、実効双極子結合定数の符号を変えないスピネコーとそれを変えるマジックエコーをマジック角試料回転と同期して照射するもの(USEME: Unified Spin Echo and Magic Echo)である。このパルス列によるグリシンのカルボキシル炭素からメチレン炭素への磁化移動の実験結果を図1に示す。この実験では、ミキシング期直前にメチレンの磁化を、選択励起している。0.15 nm 隔てられた2つの炭素については約 1.5 ms で、回転系における擬熱平衡値に達することがわかる。図中の実線は、 CH_2 とカルボキシル炭素の4スピンの数値シミュレーション結果である。

[J HOHAHA] このパルス列は、溶液NMRのHOHAHAパルス列に近いが、マジック角試料回転により変化する化学シフトの異方性や双極子相互作用を消すためにMASを積極的に利用している。このパルス列によるカルボキシル炭素からメチレン炭素への磁化移動実験の結果を図2に示す。約 8 ms で磁化の移動は最大になり初期磁化の 25% に達した。溶液中のように 100% の磁化移動にならないのは、主にCH双極子結合の影響である。シミュレーションによる解析結果では、この磁化移動の 90% が 53 Hz の J 相互作用によるものであった。

講演では、これらHOHAHAパルス系列による二次元スペクトルや、より高いMAS周波数での実験結果も示す予定である。

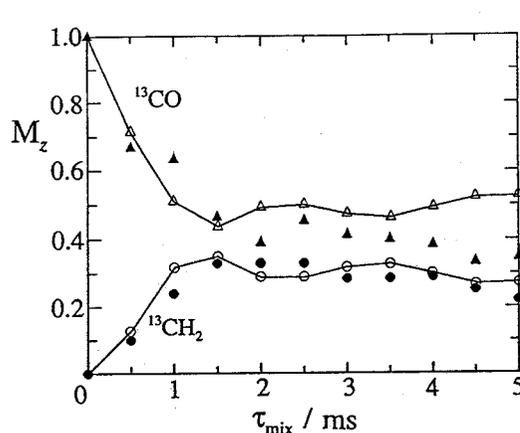


図1、双極子HOHAHAによる磁化移動。

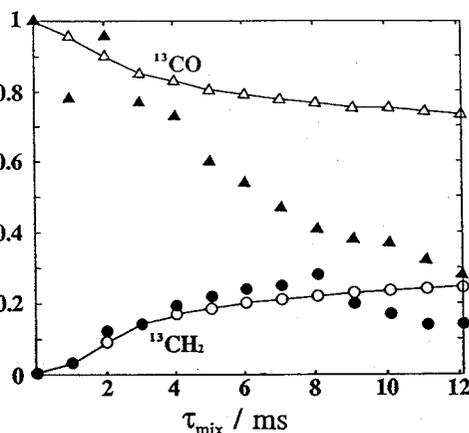


図2、 J HOHAHAによる磁化移動。

●: グリシンのメチレン ^{13}C 磁化の実験値。▲: カルボキシル ^{13}C 磁化の実験値。○: メチレン磁化の計算値。△: カルボキシル磁化の計算値。計算値は実線で結んでいる。MAS周波数は4kHz。

[文献] 藤原ら、第31回NMR討論会予稿集 (1992); T. Fujiwara *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* (1993) in press; A. Ramamoorthy *et al.*, *J. Magn. Reson.* (1993) in press.

○和田光人・櫻井 実・井上義夫（東工大 生命理工 生体分子）
田村祐介・渡辺庸一（日本クレイ）

Ab Initio Study of Electronic Structure and NMR Chemical Shift
of Visual Pigments

○Mitsuhito Wada, Minoru Sakurai, Yoshio Inoue, Yusuke Tamura,
Yoichi Watanabe
Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology
Cray Research Japan LTD.

The C5=C6-C7=C8 dihedral angle (ϕ) of chromophore retinals within rhodopsin and bacteriorhodopsin are estimated by means of ab initio shielding calculations, based on localized orbital / local origin method. The shielding calculations were carried out for a retinal analogue in order to investigate dependence of chemical shift on the dihedral angle ϕ . We found that the chemical shifts of C5 and C8 carbons are particularly sensitive to the change of this angle. The correlation between the ϕ angle and the chemical shifts of these carbons allows quantitative determination of the angle ϕ chromophores from the observed chemical shifts of rhodopsin and bacteriorhodopsin.

ロドプシンは、網膜中に存在する膜内在性蛋白質で、視覚の初期過程を担っている。その活性中心あるレチナールは、プロトン化した Schiff 塩基結合を介して、アポ蛋白質のリシン残基と共有結合している。光プロトンポンプを駆動するバクテリオロドプシンも、レチナール発色団をもち構造が類似していることから、ロドプシンのモデル系としても研究されている。

これらの蛋白質環境中でのレチナール発色団の構造を調べるために、固体固体高分解能 NMR を用いた数多くの実験的研究が行われてきた。しかし、観測される化学シフトに対して、必ずしもその電子構造に対応した解釈が行われてきたわけではない。我々の研究の目的は、化学シフト計算を通して観測される化学シフトを理論的に解釈し、蛋白質中におけるレチナール発色団の構造、電子構造を解析することにある。

本研究では、特にレチナールの環状部分と鎖状部分のねじれ角に着目し、化学シフト計

キーワード： ab initio、化学シフト、レチナール、ロドプシン、バクテリオロドプシン

○わだ みつひと、さくらい みのる、いとうえ よしお、たむら ゆうすけ、
わたなべ よういち

算を行った。というのも、このねじれ角の変化は、レチナル蛋白質の吸収波長を制御する主要因と成り得るからである。レチナルアナログを用い、このねじれ角と ^{13}C 化学シフトの相関を調べ、ロドプシン、バクテリオロドプシン中におけるレチナル発色団のこの部分のコンフォメーションを推測した。

《計算方法》

化学シフト計算には、Cray - YMP8E/8128 スーパーコンピューターを使用し、HansenとBoumanの開発したRPA(Random Phase Approximation)-LORG(Localized Orbital / Local Origin)法¹⁾に基づくプログラム RPAC9.0を、Gaussian90と接続して用い、。この方法では、化学シフトの常磁性項にRPAの理論を適用し、各局在化分子軌道に複素位相因子を作用させ、ゲージ依存性をなくしている。

まず、この方法の信頼性を確認するために、オールトランスレチナル

(Fig.1)の化学シフト計算を行った。炭素骨格の構造はX線の実験値²⁾を使用し、そのほかの幾何パラメーターは、4-31Gの基底関数系を用いて最適化を行った。 ^{13}C 化学シフトも

4-31G基底関数系を用いて計算した。 Figure 1 Structures of *all-trans* retinal and its analogue.

次にレチナルアナログ (Fig.1) を用い、C5=C6-C7=C8二面角 (ϕ) と ^{13}C 化学シフトの相関を調べた。 ϕ の値を固定し、残りの幾何パラメーターをPM3法により最適化した構造を用い、4-31Gレベルでの化学シフト計算を行った。

《結果》

①オールトランスレチナルの化学シフト計算

Figure 2 は、オールトランスレチナルの化学シフトの計算値と実験値³⁾の相関図である。化学シフト値は、両者ともにメタン基準に変換しており、正符号が低磁場側を表している。計算値は実験値を高い精度 (± 3.3 ppm) で再現しており、4-31Gレベルでの計算を行えば、レチナル発色団の化学シフトを定量的な議論が可能となることがわかる。

②レチナルアナログ1の化学シフト計算環状部分のC5から鎖状部分のC8の化学シフトの等方回転平均値 (σ_{iso}) は、 ϕ の値に依存した比較的大きな変化を示すの

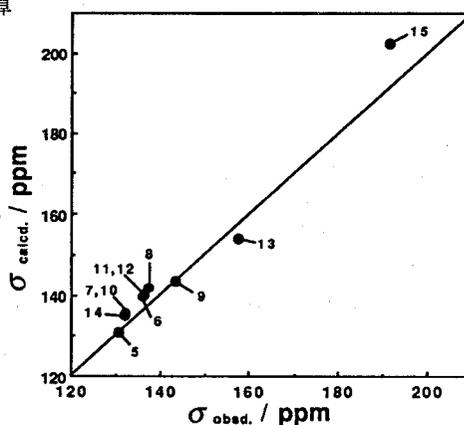
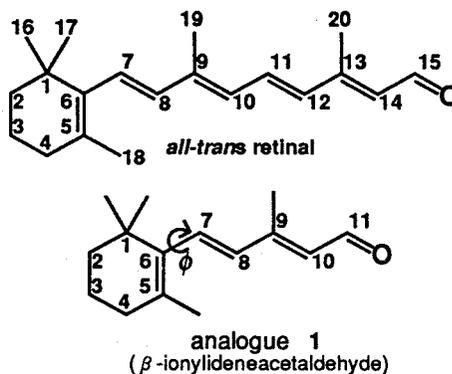


Figure 2 Correlation between the 4-31G and the experimental chemical shifts for the unsaturated carbons of *all-trans* retinal. Experimental data are taken from ref. 3.

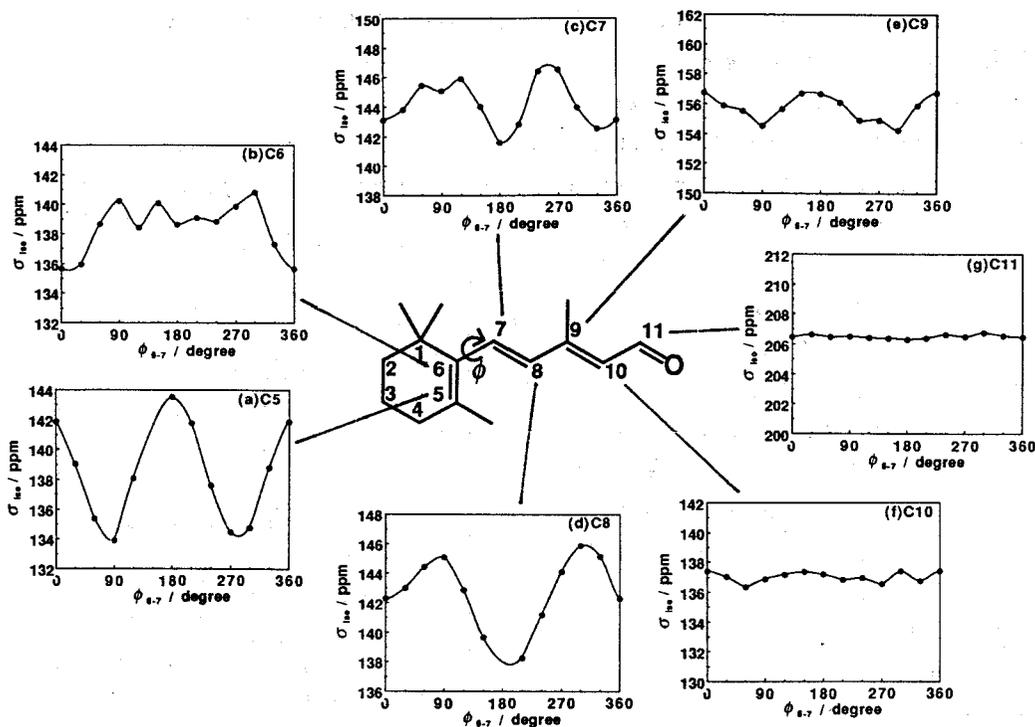


Figure 3 Isotropic chemical shifts for the unsaturated carbons of analogue 1 calculated as a function of the angle ϕ .

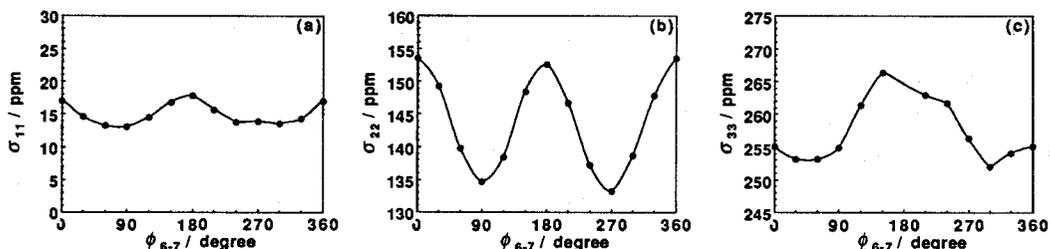


Figure 4 Principal components of the chemical shift tensor for C5 of analogue 1 calculated as a function of the angle ϕ .

に対して、鎖状部分のC9からC11までの σ_{iso} は殆ど変化しない (Fig. 3)。特にC5とC8の σ_{iso} は、 ϕ に対して周期的に変化することが見出された (Fig. 3)。化学シフトテンソルの主値を高磁場側から σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} 成分と定義すると、不飽和炭素核の場合、 σ_{11} 成分は共役系に対して垂直方向を指し、 σ_{22} 、 σ_{33} 成分は共役系平面内にある。C5、C8ともに、 ϕ に対して、 σ_{22} 、 σ_{33} 成分は周期的に変化するが、 σ_{11} 成分は殆ど変化しない (Fig. 4)。また、Mulliken Population解析により、atomic bond population及びchargedistributionを調べたところ、共役系の分断・回復が約 180° 周期で繰り返されることがわかった。これらのことから、C5及びC8の σ_{iso} の周期性起源は、C16、C17あるいはC18メチル基と8位の水素との立体障害にあるというより、共役系の分断・回復にあ

るといえる。周期性をもつこと確認された σ_{190} の値は、次式で示す2次までの ϕ のフーリエ級数でかなりよく近似できる。

$$\sigma_{C5} = 138.4 - 1.466\cos\phi + 4.238\cos 2\phi \quad (1)$$

$$\sigma_{C8} = 142.4 + 2.729\cos\phi - 2.368\cos 2\phi \quad (2)$$

さらに、 σ_{C5} と σ_{C8} との差を $\Delta\sigma$ ($=\sigma_{C5} - \sigma_{C8}$)と定義する。Fig. 5は、 $\Delta\sigma$ を ϕ に対してプロットしたものである。ここで注目すべきことは、 $\Delta\sigma$ が負になるのは planar 6-s-trans型 ($140^\circ < \phi < 180^\circ$) の場合に限られるということである。バクテリオロドプシンの場合、 $\Delta\sigma$ は -12.4 ppmと報告されており⁴⁾、この相関図から発色団は planar 6-s-trans型をとっていると推測される。またロドプシンの場合、 $\Delta\sigma$ は 8.4 ppmと報告されている⁵⁾。したがって、レチナル発色団のこの部分の構造はねじれていると推測される。しかし、 $\Delta\sigma$ は ϕ の一価関数ではないために、C5

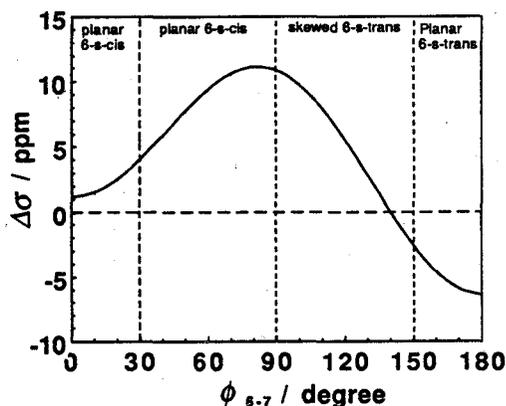


Figure 5 The $\phi - \sigma$ curve obtained from the subtraction of eq.5 and eq.6. For the sake of convenience, the C6-C7 conformation is classified the following four types: planar 6-s-cis ($0-30^\circ$), skewed 6-s-cis ($30-60^\circ$), skewed 6-s-trans ($90-150^\circ$) and planar 6-s-trans ($150-180^\circ$).

とC8の化学シフトの情報だけでは、skewed 6-s-cis か skewed 6-s-trans かを決定することはできない。

references

- 1) Aa. E. Hansen and T. D. Bouman, J. Chem. Phys., 82, 5035 (1985).
- 2) T. Hamanaka et al., Acta Cryst., B28, 214 (1972).
- 3) G. S. Harbison et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 4809 (1985).
- 4) G. S. Harbison et al., Biochemistry, 24, 6955 (1985).
- 5) S. O. Smith et al., Biochemistry, 29, 8158 (1990).

(北見工大) ○福井 洋之、馬場 雄久、松田 弘喜、三浦 宏一

**Calculation of nuclear magnetic shieldings.
Electron correlation effects**○H. Fukui, T. Baba, H. Matsuda, and K. Miura
Kitami Institute of Technology

Nuclear magnetic shieldings were calculated with electron correlations through third order. The calculation was performed on a use of London's gauge invariant atomic orbitals (GIAO) and the finite-field many-body perturbation theory (FF-MBPT), in which the two kinds of perturbation fields, *i.e.*, the external magnetic field and the field due to the nuclear magnetic moment, were introduced to get the perturbed one-electron states. The Hartree-Fock (HF) values and the second- and third-order correlation corrections of the nuclear magnetic shieldings were calculated in (i) four first-row hydrides, HF, H₂O, NH₃, and CH₄, and (ii) three linear molecules with a multiple bond, N₂, CO, and HCN. The calculations showed that the post-HF correlations are important and much improve the calculated shielding values, and that the second-order corrections are positive, but the third-order ones are negative. Furthermore, the vibrational corrections to the F and H shielding constants in the HF molecule at 300 K were estimated to be -9.9 ppm and -0.66 ppm, respectively.

I. INTRODUCTION

Nearly all *ab initio* calculations of nuclear magnetic shieldings σ have been performed using the coupled Hartree-Fock (CHF) approximation and its variants. Very few studies go beyond CHF. CHF calculations, which include first-order electron correlation, give in most cases quite good shieldings, and the successes of the CHF method have led to the general consensus that the post-CHF correlations are not so important in nuclear magnetic shielding calculations. Furthermore, difficulty due to the gauge origin dependence of σ , a problem that is absent in spin-spin coupling calculations, has prevented us from going beyond CHF. Thus, appearance of the correlation calculations in nuclear magnetic shieldings was long delayed. We presented the gauge invariant finite-field many-body perturbation theory (GIFF-MBPT)¹ to settle both the problems of the gauge origin dependence and

キーワード：化学シフト、電子相関効果、G I A O

○ふくい ひろゆき、ばば たけひさ、まつだ ひろき、みうら こういち

the electron correlation, which was applied to the calculation of the second-order electron correlation effects on the nuclear magnetic shieldings in four first-row hydrides, *i.e.*, HF, H₂O, NH₃, and CH₄. In our previous paper, we reported that the second-order correlation corrections are not small, *i.e.*, 11 – 15 ppm for N, O, and F in NH₃, H₂O, and HF, and about 6 ppm for C in CH₄. However, it was shown that the positive sign of the second-order correlation correction $\sigma^{(2)}$ even enlarges the difference between the calculated and experimental nuclear magnetic shieldings.

In our previous paper, we introduced only the external magnetic field as a finite field. In this paper, we introduce the two kinds of perturbation fields, *i.e.*, the external field and the field due to the nuclear magnetic moment, as finite fields, and estimate the correlation corrections through third order. The second- and third-order electron correlation corrections of the nuclear magnetic shieldings were calculated in (i) four first-row hydrides, HF, H₂O, NH₃, and CH₄, and (ii) three linear molecules with a multiple bond, N₂, CO, and HCN. To our knowledge, the present article is the first report on the third-order correlation effects on the magnetic shieldings. Section II is devoted to the presentation and discussion of the computational results.

II. RESULTS AND DISCUSSION

A. Electron correlation effect in first-row hydrides

The nuclear magnetic shieldings in hydrogen fluoride were calculated by using four different bases. The computational results are presented in Table I with the experimental values. Table I shows that the isotropic second-order correlation corrections $\bar{\sigma}^{(2)}(\text{F})$ for fluorine nucleus are positive, about +10 ppm, but the third-order ones $\bar{\sigma}^{(3)}(\text{F})$ are negative, about -6 ppm. We note that the introduction of the diffuse *sp* functions is important and provides a large decrement of the $\bar{\sigma}(\text{F})$, about -5 ppm. Our previous paper stated that the inclusion of the second-order correlation gives too high $\bar{\sigma}(\text{F})$ value with respect to experimental one. This work indicates that the negative third-order correlation corrections partly cancel the positive second-order contributions and improve the computational results. The calculated $\bar{\sigma}(\text{F})$ obtained with the largest basis and inclusion of the third-order correlation is more positive than the experimental value by *ca.* 8 ppm. However, we have to take the vibration corrections into account before attempting a comparison with experimental results, which will be stated later. Most part of the correlation correction in $\bar{\sigma}(\text{F})$ comes from the σ_{\perp} component. This is because the paramagnetic part in the σ_{\parallel} component is zero and the diamagnetic part has very small correlation contributions.

The proton shielding of hydrogen fluoride shows the very small correlation effects, about +1.0 ppm. Both the second- and third-order correlations are small positive. The $\bar{\sigma}(\text{H})$ obtained with the largest basis is more positive than the experimental value by *ca.* 1 ppm.

The isotropic nuclear magnetic shieldings in H₂O, NH₃, and CH₄ molecules are presented in Table II. Table II shows that the correlation effects are large in the heavy nuclei of H₂O and NH₃, that is, about +20 ppm for the second-order effect and about -10 ppm for the third-order one. The heavy nucleus correlation effects in CH₄ are smaller than those in H₂O

and NH_3 . That is, $\bar{\sigma}^{(2)}(\text{C}) = +10$ ppm and $\bar{\sigma}^{(3)}(\text{C}) = -2$ ppm. The diffuse sp functions considerably lower the calculated $\bar{\sigma}$ values for O, N, and C. Table II shows that the proton magnetic shieldings in H_2O , NH_3 , and CH_4 have smaller correlation contributions than that of H in HF. The second-order correlation corrections are small negative. The proton chemical shifts are too subtle to predict theoretically.

As a conclusion of this subsection we want to indicate that (i) the second- and third-order correlations in shielding calculation of first-row hydrides are not small, and (ii) the second-order term and the third-order one partly cancel out each other. The successes of the CHF method which includes only the first-order correlation may be due to fortuitous cancellation among the post-CHF correlations higher than first order. The inclusion of diffuse sp functions is important in GIAO basis.

We calculated the vibrational corrections to the F and H shielding constants in hydrogen fluoride at 300 K, and obtained -9.9 ppm and -0.66 ppm for the $\bar{\sigma}(\text{F})$ and $\bar{\sigma}(\text{H})$, respectively. The vibration correction makes the calculated value of $\bar{\sigma}(\text{F})$ a little lower (*ca.* 2 ppm) than the experimental value.

B. Linear molecules with a multiple bond

The nuclear magnetic shieldings in the three linear molecules with a multiple bond, N_2 , CO, and HCN, are presented in Table III. 6-311G* and 6-311G** give the same results for N_2 and CO. Table III shows that the correlation effects are very large in the shieldings of these molecules. Especially, the second- and third-order correlations in N_2 are largest in our calculations, that is, $\bar{\sigma}^{(2)}(\text{N}) = +70$ ppm and $\bar{\sigma}^{(3)}(\text{N}) = -30$ ppm. Oddershede and Geertsen² indicated that correlation effects play a large role in the shielding of N_2 , which has N lone pairs and N-N multiple bonds. The values which they reported for the $\bar{\sigma}(\text{N})$ in N_2 are $\bar{\sigma}^{\text{CHF}}(\text{N}) = -106.5$ ppm and $\bar{\sigma}^{\text{SOPPA}}(\text{N}) = -72.2$ ppm. So the second-order correlation $\bar{\sigma}^{(2)}(\text{N})$ by them is 34 ppm, which is smaller than that by us. Cybulski and Bishop³ recently reported the calculation of N_2 shielding, which are -111.25 ppm at the SCF level and -39.52 ppm at the MP2 level. Our results are similar to theirs. Table III shows that the calculated shielding values in N_2 , CO, and HCN are much improved by the inclusion of the third-order correlations.

Our basis sets used are rather small, but triple-zeta + polarization functions bases present quantitative agreement with the experimental values. The CHF calculations for the basis sets including diffuse sp functions show that the diffuse sp functions lower the magnitude of $\bar{\sigma}^{\text{HF}}$ values of the heavy nuclei by only a few ppm. Electron correlation effects seem to be much more significant than the basis set error.

References

- [1] H. Fukui, K. Miura, and H. Matsuda, *J. Chem. Phys.*, **96**, 2039 (1992).
- [2] J. Oddershede and J. Geertsen, *J. Chem. Phys.*, **92**, 6036 (1990).
- [3] S. M. Cybulski and D. M. Bishop, *J. Chem. Phys.*, **98**, 8057 (1993).

Table I. Nuclear magnetic shielding components, σ_{\perp} and σ_{\parallel} , and isotropic values $\bar{\sigma}$ in hydrogen fluoride. The symbols $HF = \sigma^{\text{HF}}$, $S = \sigma^{\text{HF}} + \sigma^{(2)}$, and $T = \sigma^{\text{HF}} + \sigma^{(2)} + \sigma^{(3)}$ are used (in ppm).

	6-311G**			6-311++G**			6-311G++(2d, 2p)			[7s4p2d/5s2p]			Expt.	
	HF	S	T	HF	S	T	HF	S	T	HF	S	T		
F	σ_{\perp}	386.2	399.7	390.9	379.8	395.8	386.1	379.6	395.6	386.1	379.3	395.0	385.6	
	σ_{\parallel}	482.5	482.4	482.4	480.5	480.1	480.3	480.5	480.0	480.2	482.5	481.9	492.0	
	$\bar{\sigma}$	418.3	427.2	421.4	413.3	423.9	417.5	413.2	423.7	417.5	413.7	424.0	417.7	410.0±6
H	σ_{\perp}	22.0	23.0	23.3	22.0	22.9	23.2	20.9	21.9	22.1	21.0	21.9	22.1	
	σ_{\parallel}	44.1	44.3	44.4	43.9	44.1	44.2	44.0	44.2	44.3	44.1	44.3	44.4	
	$\bar{\sigma}$	29.4	30.1	30.3	29.3	30.0	30.2	28.6	29.3	29.5	28.7	29.4	29.6	28.8±0.5

Table II. Isotropic nuclear magnetic shieldings $\bar{\sigma}$ in H₂O, NH₃, and CH₄. The symbols $HF = \sigma^{\text{HF}}$, $S = \sigma^{\text{HF}} + \sigma^{(2)}$, and $T = \sigma^{\text{HF}} + \sigma^{(2)} + \sigma^{(3)}$ are used (in ppm).

		6-311G*			6-311G(2d)			6-311++G*			6-311G**			Expt.
		HF	S	T	HF	S	T	HF	S	T	HF	S	T	
H ₂ O	O	339.2	360.8	352.9	341.2	364.8	351.0	322.1	345.1	336.2	342.0	359.6	350.7	334
	H	31.9	31.6	31.8	32.2	32.0	32.1	31.8	31.5	31.7	31.5	31.7	31.9	30.09
NH ₃	N	271.0	290.1	284.1	270.7	289.4	283.4	261.0	279.7	274.2	273.0	287.0	280.8	264.5
	H	32.7	32.3	32.4	32.8	32.4	33.0	32.5	32.0	32.1	32.3	32.3	32.4	30.68
CH ₄	C	194.9	204.0	202.4	193.7	203.0	201.2	195.5	204.6	202.9	196.1	201.9	199.8	197.4
	H	31.9	31.6	31.6	32.0	31.7	31.6	31.9	31.6	31.6	31.7	31.6	31.7	30.61

Table III. Nuclear magnetic shielding components, σ_{\perp} and σ_{\parallel} , and isotropic values $\bar{\sigma}$ in N₂, CO, and HCN. The symbols $HF = \sigma^{\text{HF}}$, $S = \sigma^{\text{HF}} + \sigma^{(2)}$, and $T = \sigma^{\text{HF}} + \sigma^{(2)} + \sigma^{(3)}$ are used (in ppm).

		6-311G*			6-311G**			6-311++G**		Expt.
		HF	S	T	HF	S	T	CHF		
N ₂	σ_{\perp}	-329.1	-219.0	-260.4	-329.1	-219.0	-260.4	-326.4		
	σ_{\parallel}	339.0	340.0	339.6	339.0	340.0	339.6	338.7		
	$\bar{\sigma}$	-106.4	-32.7	-60.4	-106.4	-32.7	-60.4	-104.7		-61.6
CO	σ_{\perp}	-332.5	-266.3	-295.0	-332.5	-266.3	-295.0	-326.9		
	σ_{\parallel}	410.6	410.1	410.3	410.6	410.1	410.3	410.7		
	$\bar{\sigma}$	-84.8	-40.8	-58.9	-84.8	-40.8	-58.9	-81.1		-40.1 ± 17.2
	σ_{\perp}	-166.6	-106.2	-127.2	-166.6	-106.2	-127.2	-167.0		
	σ_{\parallel}	271.1	273.3	272.7	271.1	273.3	272.7	271.2		
	$\bar{\sigma}$	-20.7	20.3	6.1	-20.7	20.3	6.1	-20.9		3.0 ± 0.9
HCN	σ_{\perp}	-244.2	-164.4	-201.6	-245.9	-164.8	-201.6	-236.9		
	σ_{\parallel}	339.3	341.2	339.8	339.5	340.3	340.0	339.4		
	$\bar{\sigma}$	-49.7	4.1	-21.1	-50.8	3.6	-21.1	-44.8		-20.4
	σ_{\perp}	-27.0	2.9	-7.6	-27.6	2.9	-7.4	-29.5		
	σ_{\parallel}	277.8	278.9	278.8	277.9	279.0	278.8	277.8		
	$\bar{\sigma}$	74.6	94.9	87.9	74.3	94.9	88.0	72.9		82.1
	σ_{\perp}	24.7	24.3	24.4	24.9	24.6	24.9	24.8		
	σ_{\parallel}	38.8	38.8	38.8	38.9	39.0	39.0	39.1		
	$\bar{\sigma}$	29.4	29.1	29.2	29.5	29.4	29.6	29.5		28.32

(物質研¹・筑波大化²) ○林 繁信^{1,2}、上田 貴洋¹、早水 紀久子¹

Magic-angle-spinning effects on the spin-lattice relaxation caused by paramagnetic impurities

(National Institute of Materials and Chemical Research¹ and University of Tsukuba²) Shigenobu Hayashi^{1,2}, Takahiro Ueda¹, and Kikuko Hayamizu¹

²⁹Si and ¹H spin-lattice relaxation times have been measured for kaolinite and talc under magic-angle-spinning conditions. The ²⁹Si relaxation time increases with the spinning rate for kaolinite, while it is constant for talc. ²⁹Si spins relax by the dipole-dipole interaction with electron spins on paramagnetic impurities, and spinning averages out the interaction with distant impurities. The ¹H relaxation time decreases at first and then increases with the spinning rate. Spin diffusion between ¹H spins plays an important role in the relaxation, and the diffusion rate reflects the spinning rate dependence of the relaxation time. The relaxations of the two spins have been analyzed theoretically.

天然の層状ケイ酸塩もしくは層状アルミノケイ酸塩は不純物として鉄やマンガンなどを含んでいる。これらの常磁性不純物は核のスピン-格子緩和における緩和中心として働く。我々は、天然および合成のカオリナイトについて¹H、²⁷Al、²⁹Si核のスピン-格子緩和時間の測定を行ない、緩和機構の検討を行なった¹⁾。その結果、どの核種においても鉄などの常磁性不純物が緩和中心として働いていることを明らかにした。さらに、¹Hおよび²⁷Al核においてはスピン拡散が律速であること、²⁹Si核ではスピン拡散の寄与がなく常磁性不純物の電子スピンの双極子-双極子相互作用で直接緩和していることを明らかにした。この研究の過程において、²⁹Siの緩和時間がマジック角回転(MAS)を行なうと変化すること、²⁷Alの緩和曲線の一部がMASによって変化することを見いだした。

本研究においては、²⁹Siの緩和時間の回転速度依存性を詳細に測定するとともに、¹Hの緩和についてもMASの効果調べた。試料としては、カオリナイト $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ とタルク $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$ を選択した。²⁹Siと¹Hとでは緩和機構が異なり、回転速度依存性において異なった結果が得られた。これらの結果に理論的な考察を加えた。

【実験】試料として、関白カオリナイト(日本粘土学会、参考試料 JCSS-1101)とタルク(J.T.Baker社)を用いた。NMR測定には、Bruker MSL400を用いた。測定周波数は、²⁹Si 79.496 MHz、¹H 400.14 MHzである。測定はすべて室温で行なった。

【結果及び考察】 Fig.1に²⁹Siスペクトルを示した。カオリナイトはテトラメチルシラン

キーワード: NMR、スピン-格子緩和、²⁹Si、¹H、マジック角回転

はやし しげのぶ、うへだ たかひろ、はやみず きくこ

基準で-90.9ppmと-91.4ppmにピークを示す。一方、タルクは-98.0ppmに1本のピークを示す。どのピークも非架橋酸素を1つもつSiO₄四面体、Q³ (0Al) に帰属される。AlもしくはMgにOH基が結合しており、この¹Hからのクロスポーラリゼーションによって²⁹Siスペクトルを測定することができる。

Fig. 2に、カオリナイトの緩和曲線を示した。2本のピークがあるが同一の緩和挙動を示す。緩和時間が非常に長いため、Torchiaのパルス系列を用いて測定した。また、個々の²⁹Siスピンの電子スピンとの双極子-双極子相互作用によって直接緩和しているため、横軸に時間の平方根をとると見かけ上指数関数的な減衰を示す。この直線の傾きから、平均的な緩和時間T_{1av}が得られる。Fig. 3にT_{1av}を回転速度に対してプロットした。回転速度の増加につれてT_{1av}は単調に増加する。

Fig. 4にタルクの緩和曲線を示した。この試料ではMASの効果は観測されなかった。T_{1av}は約46秒であり、カオリナイト試料に比べて1桁以上短い。用いたタルク試料がカオリナイトに比べて多量の常磁性不純物を含んでいるためである。

Fig. 5に¹Hスペクトルを示した。カオリナイトは線幅の異なる2つの成分が混在しているが、線幅の狭い成分は外表面に吸着した水であり本研究では除外する。線幅の広い成分がOH基であり、28kHzの線幅を示す。この線幅は、¹H-¹Hおよび¹H-²⁷Al間の双極子-双極子相互作用によるものであり、前者による線幅は約20kHzである。一方、タルクの線幅は9kHzであるが、線幅の磁場依存性の測定から双極子-双極子相互作用による線幅は5.8kHzと見積られた。これが¹H-¹H間の双極子相互作用の大きさである。残りの線幅は、常磁性不純物を比較的多く含んでいるために生じた体積磁化率に起因している。

スピン拡散の速度を決める¹H-¹H間の双極子相互作用の大きさがカオリナイトとタルクとは異なるため、回転速度依存性にも違いが出てくる。Fig. 6に、タルクの¹H緩和曲

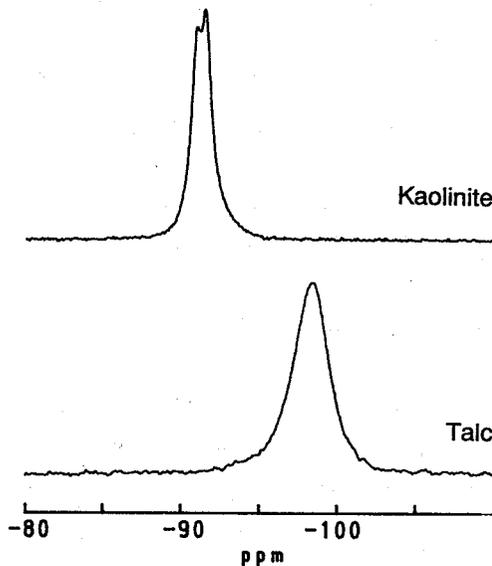


Fig. 1. ²⁹Si CP/MAS NMR spectra with a spinning rate of 3.000 kHz. (δ with respect to TMS.)

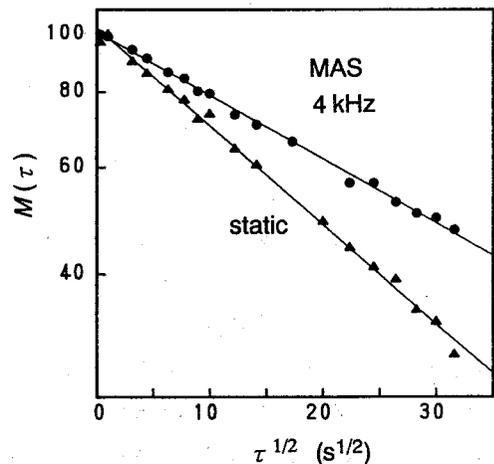


Fig. 2. ²⁹Si spin-lattice relaxation curves of kaolinite, measured with Torchia's sequence.

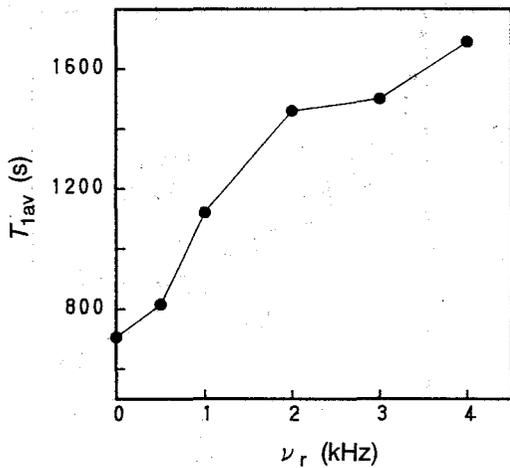


Fig. 3. Spinning rate dependence of the average value of ^{29}Si T_1 in kaolinite.

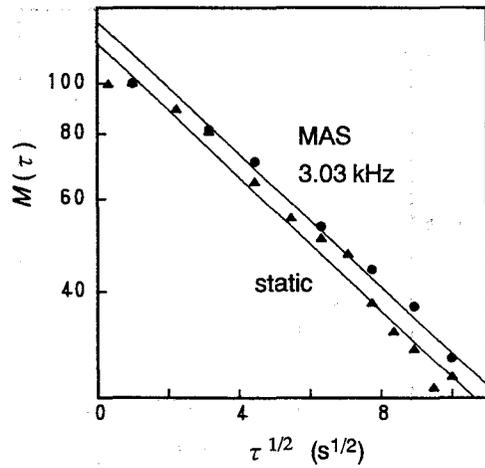


Fig. 4. ^{29}Si spin-lattice relaxation curves of Talc, measured with Torchia's sequence.

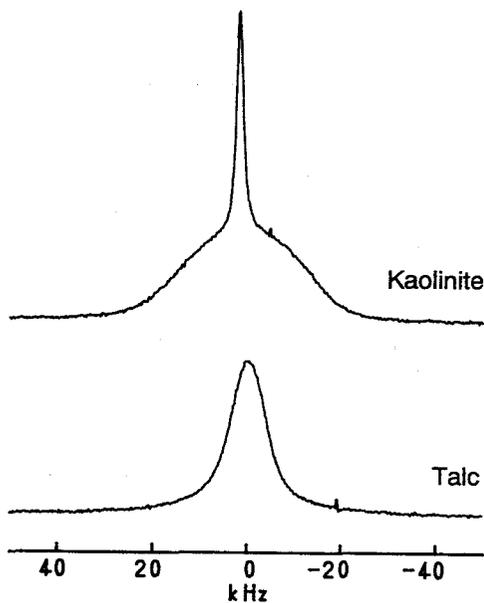


Fig. 5. ^1H NMR spectra for static samples.

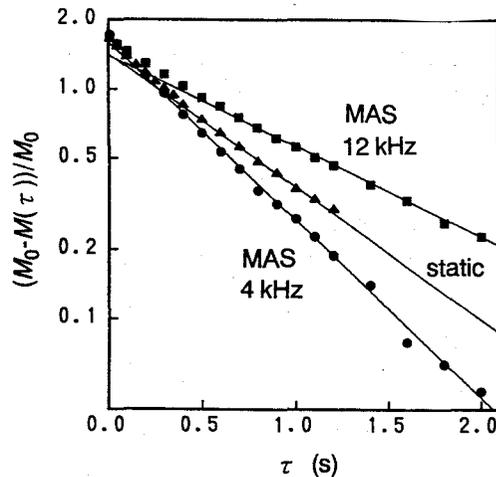


Fig. 6. ^1H spin-lattice relaxation curves of talc, measured with the inversion recovery method.

線を示した。MASによって緩和曲線は大きく変化する。 τ の長い部分の傾きからスピ
ン拡散律速の緩和時間を求め、Fi.7に回転速度に対してプロットした。緩和時間は回転によ
っていったん短くなり、それから増加傾向に転じる。MASによる線幅の尖鋭化によりス
ピン拡散がいったんは促進されるが、回転数の増加につれて双極子相互作用が平均化され
スピン拡散が抑制される。2つの効果の重ねあわせによって一見複雑に見える挙動を示す。

カオリナイトの場合もFig.8のようにタルクと同じような挙動を示すが、タルクに比べて

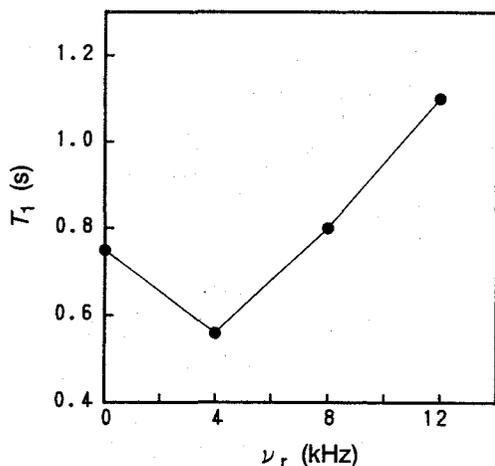


Fig. 7. Spinning rate dependence of ^1H T_1 in talc.

^1H - ^1H 間の双極子相互作用が強いため、12kHzの回転をしても静止試料より短い T_1 を示す。

^{29}Si 緩和の場合は ^{29}Si - 電子スピン間の双極子相互作用が、 ^1H 緩和の場合は ^1H - ^1H 間の双極子相互作用がマジック角回転によって抑制され、緩和が遅くなる。ここで、どの程度の双極子相互作用がマジック角回転によって抑制されるかを実験結果から見積った。ここで D_{cutoff} より小さい双極子相互作用は回転によってすべてゼロになり、それより大きい相互作用は影響を受けないと仮定した。計算の詳細は当日話すことにして、得られた結果のみを Fig. 9 に示した。カオリナイトの ^{29}Si 緩和とタルクの ^1H 緩和から得られた結果を同一のグラフ上に示したが、緩和機構や核種が異なっているにもかかわらずほぼ一致した結果が得られた。回転数の約 $1/10$ が数居値になっていると考えられる。

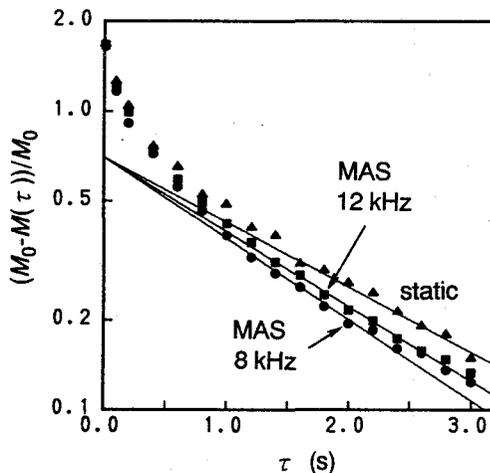


Fig. 8. ^1H spin-lattice relaxation curves of kaolinite, measured with the inversion recovery method.

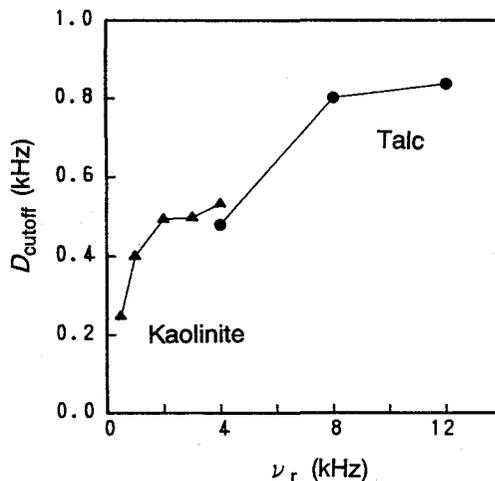


Fig. 9. Cutoff values of the dipole-dipole interaction as a function of the spinning rate.

【文献】 1) S. Hayashi, T. Ueda, K. Hayamizu, and E. Akiba, J. Phys. Chem., 96, 10928 (1992).

(北大工、Calgary大) °平沖 敏文、瀬川 和哉、Hans J. Vogel、堤 耀廣

Dimethylated-Lysin residues Dynamics of α -lactalbumin by Solid State Deuterium NMR

T. Hiraoki, K. Segawa, H. J. Vogel*, and A. Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060 and *Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

Solid-State ^2H -NMR was used to examine the dynamics of twelve lysyl and a N-terminal amino groups di-deuterio-methylated in bovine α -lactalbumin. Temperature-dependent line-shapes, their intensities, τ dependence and T_1 s were employed to characterize molecular motions of methyl groups on the surface of the protein. At low temperatures below -20°C a Pake pattern is observed, indicating fast limit motion, which is characterized by the three-fold jump motion. Temperature-dependent study yields the activation energy of 13 kJ/mol and the correlation time of 0.15 ns at -20°C . In addition, small-amplitude fast librational motions contribute to the line shapes.

固体重水素NMRは特定の部位を重水素でラベルすることで、その部位の分子運動を詳細に調べることができる有用な方法である。本研究では固体状態にある蛋白質の動的挙動を調べるため、牛 α -lactalbumin (α -LA)のリジン側鎖末端のアミノ基と α アミノ基を重水素ジメチル化して、その分子運動を検討した。この化学修飾により電荷数は変化せず、酵素活性と高次構造はintactな α -LAと同じである。¹⁾ この結果と結晶構造²⁾を考え合わせると、導入された大部分のメチル基は分子表面に露出しているものと考えられる。

牛 α -lactalbuminのアミノ基のジメチル化はJentofとDearbonの方法³⁾にしたがって D_2O 中で行なった。本法によりN端とリジン側鎖末端のアミノ基が選択的に重水素ジメチル化される。凍結乾燥した試料の重水素NMRの測定はBruker MSL-200(30.7MHz)で行なった。スペクトルは四重極エコー法でもとめ、観測幅は1MHz、 90° パルス幅は $1.5\mu\text{s}$ である。

Fig.1に重水素NMRスペクトルの温度依存性を示す。このスペクトルは $13 \times 2 = 26$ ヶのメチル基の重ね合わせである。測定した温度領域で線形が大きく異なるメチル基は観測されず、大部分のメチル基は同じような線形を持つ運動状態にあることを示唆している。 -60°C 以下では36kHzの四重極分裂幅を持つ粉末平均スペクトルが観測される。これはアミノ基の窒素原子に結合している2ヶのメチル基がそれぞれ C_3 軸のまわりを十分速く回転していることを示している。

キーワード；固体重水素NMR、 α -ラクトアルブミン、分子運動、ジメチル化、リジン、アミノ基

°ひらおきとしふみ、せがわ かづや、ハンス・J・ボーゲル、つつみ あきひろ

Fig.2に重水素NMRスペクトルの四重極分裂幅の温度依存性を示す。低温で観測される36kHzの分裂幅は理論値42kHzよりも小さく、 C_3 回転以外の運動が存在することを示している。四重極エコースペクトルの τ 依存性には明瞭な変化がなく、小振幅の速いlibrationが寄与していることを示している。分裂幅より求めたlibrationの大きさ(r.m.s.)はほぼ 18° である。昇温に伴い、分裂幅が減少し、線形も変化し始める。室温のスペクトルはかなりブロードで、 C_3 軸には C_3 回転とlibration以外に10kHzオーダーの運動が存在することを示している。

Fig.3に重水素NMRスペクトルの σ_{\perp} 成分の T_1 の温度依存性を示す。 T_1 は $+20^\circ\text{C}$ から -70°C までほぼ直線的に減少する。 -20°C 以下ではスペクトルの σ_{\perp} 成分と σ_{\parallel} 成分の T_1 は異なり($T_1(\sigma_{\perp}) \neq T_1(\sigma_{\parallel})$)、メチル基の C_3 回転が回転拡散ではなく、3-site jumpであることを示している。この運動の活性化エネルギーは $\Delta E = 12 \text{ kJ/mol}$ で、 0°C における相関時間は $\tau_c = 1 \times 10^{-10} \text{ s}$ である。これらの値はDL-valやL-leuのメチル基の場合とほぼ同じである。⁴⁾ ホモポリペプチド固体の側鎖末端の酸素原子に結合したメチル基の場合に比べ($\Delta E = 8 \text{ kJ/mol}$, $\tau_c = 3 \times 10^{-12} \text{ s}(0^\circ\text{C})$)、⁵⁾ アミノ基の窒素原子や炭素原子に結合した二ケのメチル基の C_3 回転はかなり抑えられていることを示している。

- 1) T. A. Gerken, *Biochemistry*, **23**, 4688(1984).
- 2) N. Jentoft and D. G. Dearbon, *J. Biol. Chem.*, **254**, 4359(1979).
- 3) K. R. Acharya, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **208**, 99(1989).
- 4) M. A. Keniry, *et al.*, *Biochemistry*, **23**, 288(1984).
- 5) 平沖敏文 他, 第30回NMR討論会, 283(1991).

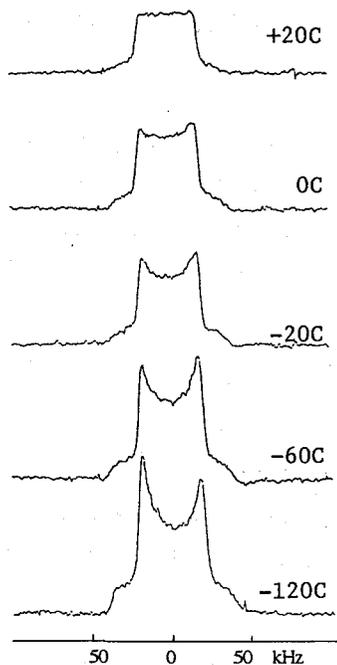


Fig.1 ^1H -NMR spectra of methyl groups on α -lactalbumin at various temperatures.

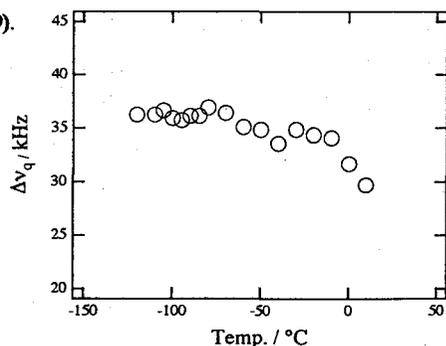


Fig. 2 Temperature-dependent quadrupole splitting.

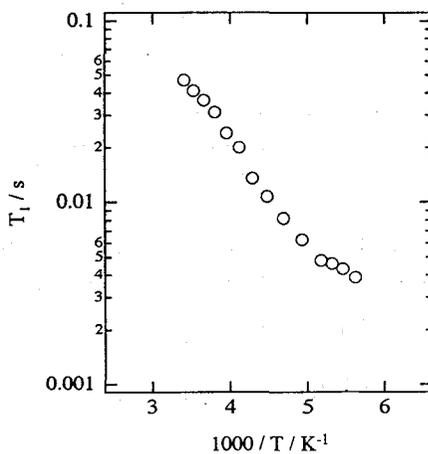


Fig. 3 Temperature dependent T_1 .

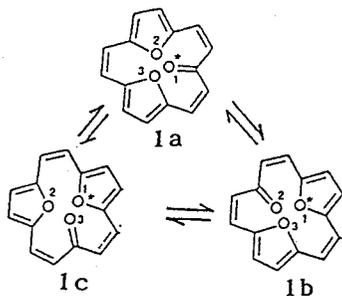
第一薬大 ○加藤祐子、小川 晴、野上靖純、古賀俊隆

¹⁷O-Dynamic NMR of Acetoxy and Polyacetoxy-tropones, Model Compounds of Acyl Group Transfer process in ProteinsYuuko Katoh, Haru Ogawa, Yasuyoshi Nogami, and Toshitaka Koga
Daiichi College of Pharmaceutical Sciences

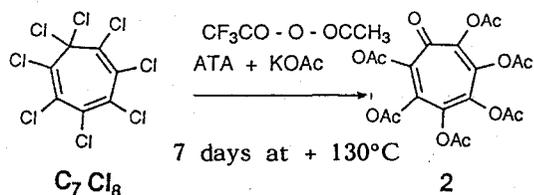
Summary: A "carousel"-type degenerated rearrangement, in which the positions of six acetoxy groups introduced on a tropone ring are equally exchangeable with that of the carbonyl oxygen, was studied by dynamic ¹⁷O-NMR spectroscopy.

[緒論] 動的な分子について、その分子を構成するすべての原子核の NMR を観測すると思いがけない転位反応や conformation 変化に気づくことが多い。さきに我々は、¹⁷O-NMR を用いて、トロポンの高級同族体である [15] アヌレノン1 が光照射によって、そのカルボニル酸素とフラン環のエーテル性酸素を互いに交換し合うという縮退転位 ($1a \rightleftharpoons 1b \rightleftharpoons 1c$) を証明することができた [Scheme 1]。¹⁾ 一方、Scheme 4 に示した、アセトキシトロポンの7員環上で起こるアシル基転位も $4a \rightleftharpoons 4b$ の様に縮退転位として起こる。²⁾ 今回、ヘキサアセトキシトロポン2 を Scheme 2 に従って合成し、²⁾ その ¹H-, ¹³C-, 及び ¹⁷O-NMR を測定してこの分子が NMR の時間尺度で "回転木馬型" 縮退転位 [Scheme 3] を与えることを発表する。この転位反応は ¹⁷O-NMR の温度変化によって最も劇的にかつ直接的に証明することができる。これに先立ち、まずアセトキシトロポンの ¹⁷O-NMR の温度変化について検討すると以下のような有意義な結果が得られた。

Scheme 1
Photochemical oxygen-bridge
exchange of [15]annuleneone 1



Scheme 2
Preparation of hexacetoxytropone

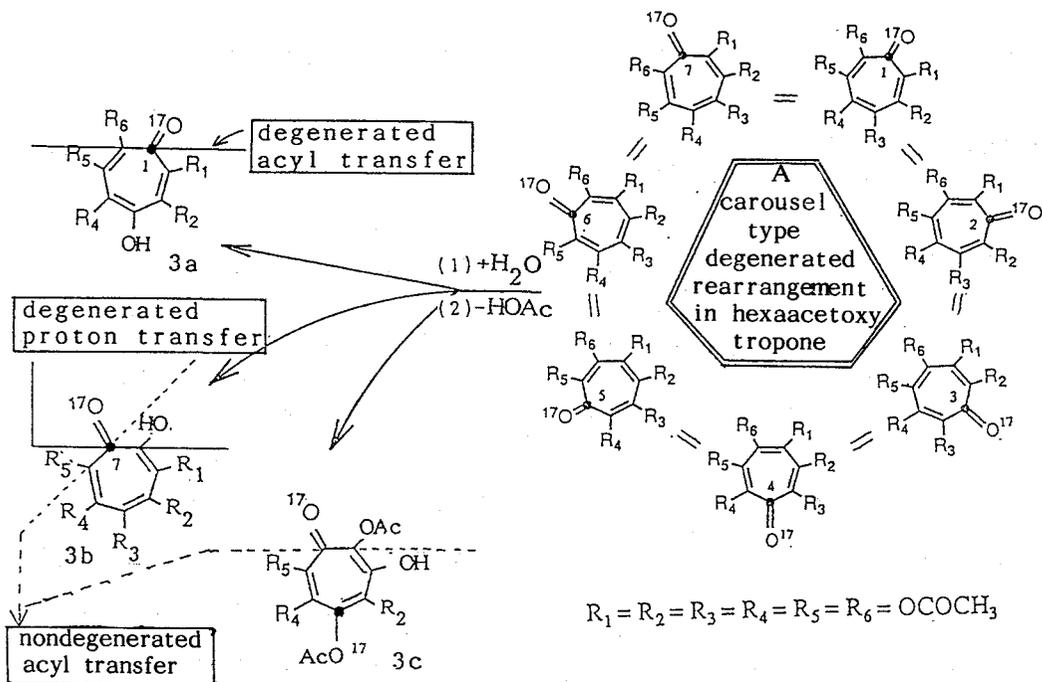


キーワード: ¹⁷O-ダイナミック NMR、アシル基縮退転位、"回転木馬型" アシル基縮退転位

○かとう ゆうこ、おがわ はる、のがみ やすよし、こが としたか

Scheme 3

A "carousel"-type rearrangement of hexaacetoxytropone and its escaping mode to lowered degree of degeneracy

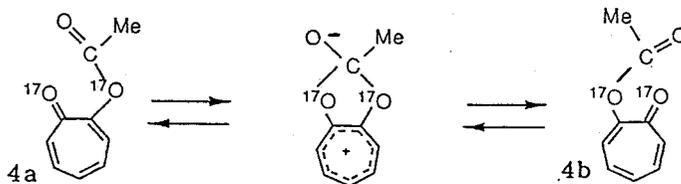


1. アセトキシトロポンの ^{17}O -NMR の温度変化

アセトキシトロポンの $>\text{C}=\text{O}$ 基と OAc 基間で起こる acyl 基転位 $4a \rightleftharpoons 4b$ [Scheme 4] は、 ^{13}C -NMR によって研究されているが、 ^{17}O -NMR による研究はこれまで前例がない。Fig. 1 に ^{17}O -NMR (67.8 MHz) による結果を示す。 CD_2Cl_2 中測定すると 0°C で既にアシル基交換の凍結が見られ始め、 $\delta(\text{C}=\text{O})$ を 463 ppm に、また、 $\delta(-\text{O}-)$ を 207 ppm に 2本の ^{17}O シグナルとして与えた。加温すると、これらの 2つのシグナルは融合し、 $15 \sim 70^\circ\text{C}$ の広い温度領域にわたってこの融合シグナルは nonvisible であった [Fig. 1]。融合シグナルはブロムベンゼン- d_5 中 100°C に加熱して始めて識別できるブロードなシグナルとして出現した。Fig. 1 の結果は本研究の主題であるヘキサアセトキシトロポンの ^{17}O -NMR スペクトルに関して以下のような予想づけを可能にした。

- (1) シグナルの融合はアセトキシトロポンのそれとほぼ同じ温度領域付近で起こる。
- (2) 2 のアセトキシ基転位の速度は 2 site exchange プログラムを用いて最も容易に算出できる。
- (3) (2) で得られる交換速度を 2 よりも縮退度の低いトロポン類から得られる交換速度と比較して速度に与える縮退の多重度の効果の有無について検討できる。

Scheme 4
Acetoxy group
rearrangement
in acetoxytropone



2. ヘキサアセトキシトロポンの合成とその¹⁷O エンリッチメント

ヘキサアセトキシトロポンの合成は Scheme 2 に示す方法で行った。アセチルトリフロアセテート (ATA) を用いるアセトリスによる 2 の収率は最高でも 0.5% という低収率である。しかしこの低収率ですら C₇Cl₈ を発煙硫酸中 220°C で長時間加熱しても C₇Cl₈ の 8 個の Cl のうち 2 個の Cl のみが OH 基に低収率で変換されるにすぎないという結果³⁾ と比較すれば、2 の良い合成ルートであるといえよう。ヘキサアセトキシトロポンは C₇Cl₈ が多段階のアセトリスを繰り返して生じる多数の中間体が最終的に収束する重複した縮退転位 product として得られる。C₇Cl₈ の acetolysate を液体クロマトグラフィーにかけ、マルチ分光光度計で生成物の各フラクションを分析した結果、2 は 7.2 分に留出するピークとして存在することがわかった。

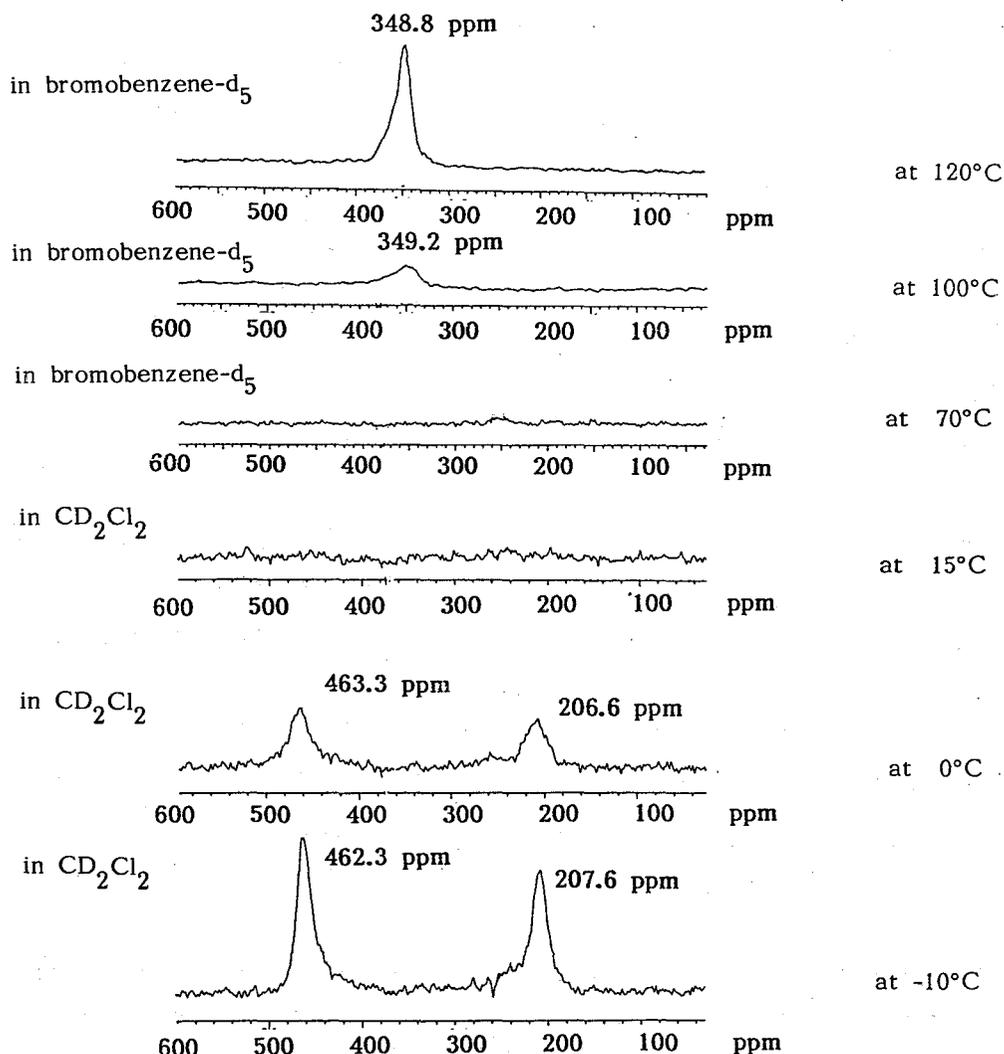


Fig. 1

The ¹⁷O-NMR Spectra of Acetoxytropone in CD₂Cl₂ at 67.8 MHz

3. 高歪分子としてのヘキサアセトキシトロポロンとその部分加水分解生成物 ペンタアセトキシトロポロンの生成

2は7員環上に6個のacetoxy基をもつため一種の高歪分子である。その一つのacetoxy基は2のクロマトグラフィーによる単離精製過程で容易に加水分解されて、ペンタアセトキシトロポロンを与えるという第2の重要な知見が得られた。ペンタアセトキシトロポロンには3種の位置異性体が存在する [Scheme 3]。その¹H-NMRの温度変化を調べた結果、加水分解物の構造は3bや3cでなく3aであることがわかった。この結果はアセトトロピーを行う3aがプロトトロピーを行う3bよりも優先して生成してくる事を示す点で興味深い。換言するとNMRが示唆する2の脱縮退経路はScheme 3の左側で示した経路なのである。3aはアセトキシトロポロン型の通常の縮退転位を行うに過ぎないが、一たびそのOH基がacetoxy基に変えられると"回転木馬型"縮退転位に移行する前駆体として存在し、アセトトロピーがC₁₇H₁₆O₁₂で示されるペンタアセトキシトロポロンの他のcongener, 3b, 3cよりも3aを優先させるというpictureがNMRによって示唆されたわけである。

4. ヘキサアセトキシトロポロンの"回転木馬型"アシル基転位の直接証明

ヘキサアセトキシトロポロンの"回転木馬型"アシル基転位に関して竹下らの¹³C-NMRによる報告がある。しかし報告された¹³C-NMRの温度依存性スペクトルはペンタアセトキシトロポロン3aとの関連においてなお詳細に検討する余地を残している。最も重要な事は2の転位を¹⁷O-NMRによる直接証明により証明することである。本研究では¹⁷OエンリッチしたATAを用いて"回転木馬型"アシル基転位の直接証明を計った。これらに関する最新の研究成果についてのべる。

5. 結び

内部変換を行う化学系の構造が、変換の遷移状態の構造と相似であると、その変換速度は酵素反応の速度オーダーに接近して来る。¹⁷O-NMRの化学シフトは通常0~800 ppmの広範囲に及ぶので、もし適当な¹⁷Oエンリッチメントが実現されれば、高速転位速度をNMRのシグナルの線形解析から測定可能となる。著者らはアセトキシトロポン誘導体のアシル基転移を¹⁷O-NMRを用いて調べた。この理由はアセトキシトロポンのアシル基転位はセリンプロテアーゼがその活性部位で起こすアシル基転位の遷移状態アナログとみなしうるからである。今後本研究を進展させて¹⁷O-NMRの広領域にわたる化学シフトを利用して、各種mutant enzymeの高速反応速度の実測を目指す将来的研究につなきたい。

謝辞 重要な合成中間体を快く提供して下さいました、大阪市立大学の楠田貢典 教授に深く感謝致します。

- 1) 第30回NMR討論会 講演要旨集 小川 晴, 本島浩之, 井本泰治, 加藤祐子, 野上靖純, 古賀俊隆
H. Ogawa, M. Maruoka, T. Imoto, Y. Kato, M. Tomita, Y. Nogami and T. Koga, J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1991**, 1775.
- 2) H. Takeshita, A. Mori, H. Watanabe, and T. Kusaba, Bull. Chem. Soc. Jpn., **60**, 4335 (1987).
- 3) K. Kusuda, N. Hara, and R. West, Chem. Letters, **1982**, 1119.

○斎藤公児, 手島志帆, 島山盛明, 藤城光一, 川里浩信,
古川雅也, 寺本武郎 (新日本製鐵 (株) 先端技術研究所)

Structural Studies of Cardo-polymers by High-Resolution Solid-State NMR

○ Koji Saito, Shiho Teshima, Moriaki Hatakeyama, Kouichi Fujishiro,
Hironobu Kawasato, Masaya Furukawa, Takero Teramoto

Advanced Materials & Technology Research Laboratories
Nippon Steel Corporation

We developed fluorene-based cardo polymers which had an excellent permeability for oxygen permselective property. So we measured a series of cardo-type polyimides by High Resolution Solid-State ^{13}C NMR. On the basis of the ^{13}C chemical shift and relaxation parameters (T_{CH} , $T_{1\rho}$, $T_{1\rho}$), we found a slight difference of both imide carbonyl and cardo carbon between filament and film types. Additionally, $T_{1\rho}$'s at imide carbonyl carbon had a good correlation to the permeabilities of this series of polymers. Therefore, gas separation prospectively depends on the molecular vibration about 10^{-8} sec of time scale.

1. 緒言

当社が開発したフルオレン環をカルド構造として保有するポリイミドは、耐熱性に優れているとともに、優れたガス透過性、酸素/窒素の選択的な分離能を保持している。しかし中空糸状とフィルム状の場合、ガス分離能に差があったり、またガス透過能に構造のどの部分が支配的かなど不明な点が多かった。そこで、固体高分解能NMRをカルドポリマーに適用し、それらの構造とガス分離能について検討したので報告する。

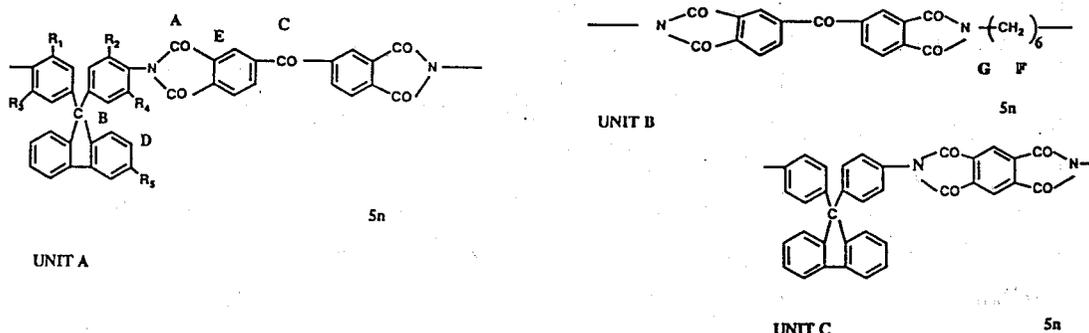


Fig. 1 Chemical structure of imide cardo polymer

固体高分解能NMR, カルドポリマー, ガス分離, 緩和時間

○さいとう こうじ, てしま しほ, はたけやまもりあき, ふじしろ こういち
かわさと ひろのぶ, ふるかわ まさや, てらもと たけろう

2. 実験

NMRの測定は、スピンコントローラーシステムを付帯した日本電子(株)製 EX-400 (^{13}C : 100.4 MHz)を使用した。多くの測定は、5.7 KHzでスピニングし、室温で測定された。化学シフトの基準は、外部基準としてヘキサメチルベンゼンを使用し、高磁場のメチル基の吸収を17.3 ppmとした。試料は、糸状及びフィルム状イミド系カルドポリマーをそのまま充填した。典型的な測定条件は、スペクトル幅: 2 KHz, データ点数: 2 K点, フーリエ変換点数: 8 K点, 90度パルス幅: $5 \mu\text{sec}$, コンタクトタイム $3000 \mu\text{sec}$, 積算回数: 1000回であった。パルスシーケンス等は、すべて装置に内蔵されているものをそのまま使用した。

3. 結果と考察

① 試料形態による構造の差異についての検討

Fig. 2 に HA55BT (UNIT A+UNIT B) の試料の原料モノマーと糸状及びフィルム状の ^{13}C NMR CPMASスペクトルを Table 1 に化学シフトと T_1 及び $T_{1\rho}$ の値を示す。糸状とフィルム状では、いくつかの部分で顕著に化学シフト 13 の差が見られるし、緩和時間の差も見られる。これは試料を糸状に引く時に、かなりの外部的な力が加わったため主鎖等の捻れが生じたためと考えられる。また緩和時間では T_1 よりも $T_{1\rho}$ に顕著な差が見られることから、糸状試料とフィルム状試料の透過速度や分離能のわずかな差は、主に結晶化度に依存したものと推定される。

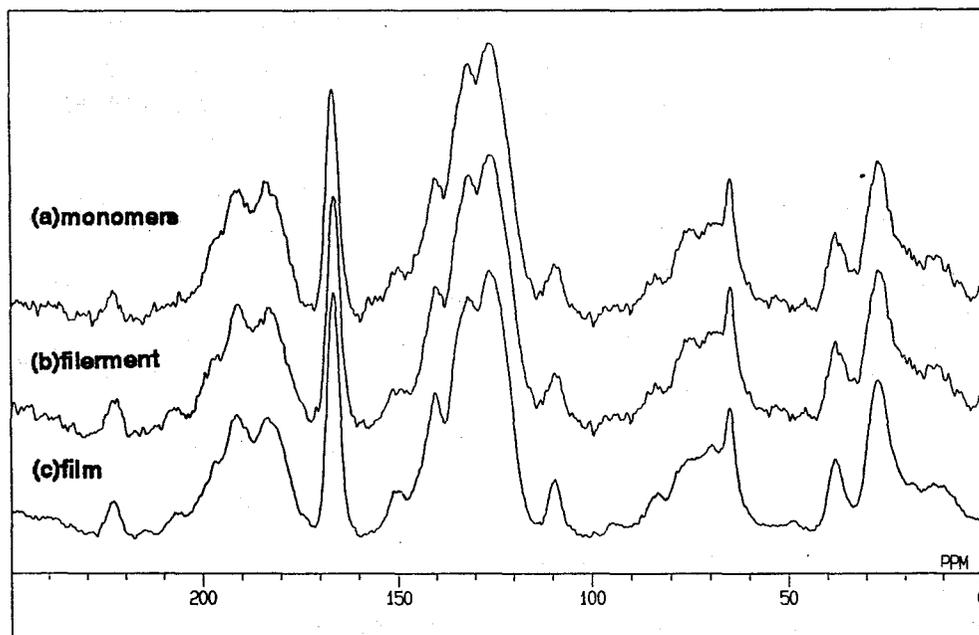


Fig. 2 ^{13}C CPMAS NMR spectra of (a) monomers, (b) filament and (c) film types of HA55BT (UNIT A+UNIT B) cardo-type polyimides

Table 1 The NMR parameters of monomers, filament and film types of HA55BT (UNIT A+UNIT B)cardo-type polyimides

	monomer		filament		film	
A	65.0	ppm	64.5	ppm	65.7	ppm
T ₁	28.2	sec	19.4	sec	19.6	sec
T _{1ρ}	25.7	msec	132.5	msec	103.4	msec
B	166.5	ppm	165.5	ppm	166.9	ppm
T ₁	32.2	sec	22.1	sec	21.9	sec
T _{1ρ}	79.1	msec	68.5	msec	58.4	msec
C	192.1	ppm	190.5	ppm	191.6	ppm
T ₁	31.7	sec	21.8	sec	20.1	sec
T _{1ρ}	63.4	msec	63.5	msec	59.6	msec
D	126.1	ppm	126.1	ppm	126.2	ppm
T ₁	22.0	sec	19.1	sec	17.5	sec
T _{1ρ}	58.9	msec	55.7	msec	40.9	msec
E	140.2	ppm	140.7	ppm	140.9	ppm
T ₁	32.2	sec	23.4	sec	24.0	sec
T _{1ρ}	64.4	msec	53.1	msec	41.9	msec
F	26.9	ppm	26.1	ppm	27.3	ppm
T ₁	0.6	sec	1.8	sec	1.4	sec
T _{1ρ}	8.0	msec	15.3	msec	10.8	msec
G	38.2	ppm	37.1	ppm	38.0	ppm
T ₁	1.9	sec	1.8	sec	1.7	sec
T _{1ρ}	10.5	msec	14.4	msec	11.5	msec
α _D O ₂ barrer			8.2		9.0	
			0.4		0.1	

②各種フィルム状カルド型ポリイミドの緩和時間による検討
 ガスの透過については、様々な研究がなされており、構成する分子の運動性が影響を与えていることが示唆されている²⁾。そこで、9種類のカルド型ポリイミドについて、様々な緩和時間の測定を実施した。その結果をガスの分離特性のデータとともに Table 2に示す。

Table 2 The NMR relaxation parameters of some films of cardo-type polyimides

	UNIT A CF ₃	UNIT A UNIT B	UNIT A R1=R2 =R3=R4 =Et	UNIT A R ₁₋₅ =H	UNIT A R5= COOH	UNIT A UNIT C	UNIT A R5= COOMe	UNIT A R5= COO C ₆ H ₁₃	UNIT A R1=R2 =Me
T ₁									
T _{1ρ}	-C- CF ₃								
A	sec	12.1	19.6	14.3	16.1	18.7	15.3	18.5	14.0
	msec	45.4	103.4	409.6	78.5	62.9	58.9	54.5	40.5
B	sec	12.8	21.9	17.1	18.9	20.9	18.4	20.1	19.5
	msec	108.7	58.4	109.4	124.5	118.4	106.5	149.3	104.8
C	sec		20.1	11.8	14.6	17.1	13.7	15.6	14.8
	msec		59.6	99.2	49.2	56.5	34.2	40.1	33.3
D	sec	11.2	17.5	12.3	13.3	14.1	13.0	15.4	14.0
	msec	35.5	40.9	101.0	38.5	36.8	33.3	37.2	35.6
E	sec	14.4	24.0	15.1	16.6	21.5	16.0	25.7	25.3
	msec	70.8	41.9	276.9	52.7	78.0	107.1	65.1	75.6
α _D O ₂		4.4	9.0	4.3	6.3	7.3	5.0	5.9	5.2
		16.7	0.11	13.0	2.3	0.53	7.0	1.3	2.0

ガスの透過性については緩和時間に依存しているとする報告³⁾があるが、構造のどの部分に敏感かについては不明である。Fig.3 にカルド中心の4級炭素とイミドカルボニル炭素における T_1 の逆数（緩和速度）とガスの透過速度との関係を示す。両者は高い相関性を示し、 CF_3 基を導入したポリマーを除いて、特にイミド系の相関度は非常に高い。一方、イミドカルボニルやカルド炭素部分の $T_{1\rho}$ の逆数とガスの透過速度の間には、特に相関が見られない。すなわち、ガスの透過速度は、分子の T_1 に関係する 10^{-8} 程度の分子の相関運動に主に依存していると推定できる。また2種の4級炭素に見られた T_1 の違いは、イミド構造が剛直であるためにポリマー主鎖の運動性を高く反映しているのに対して、カルド中心の4級炭素は、主鎖の運動性のみならず、様々な置換基のついたフルオレン環及びベンゼン環の運動性を受けていると予想される。すなわち、このことはガスの透過速度が主鎖の運動性の支配を強く受けていることを示唆している。

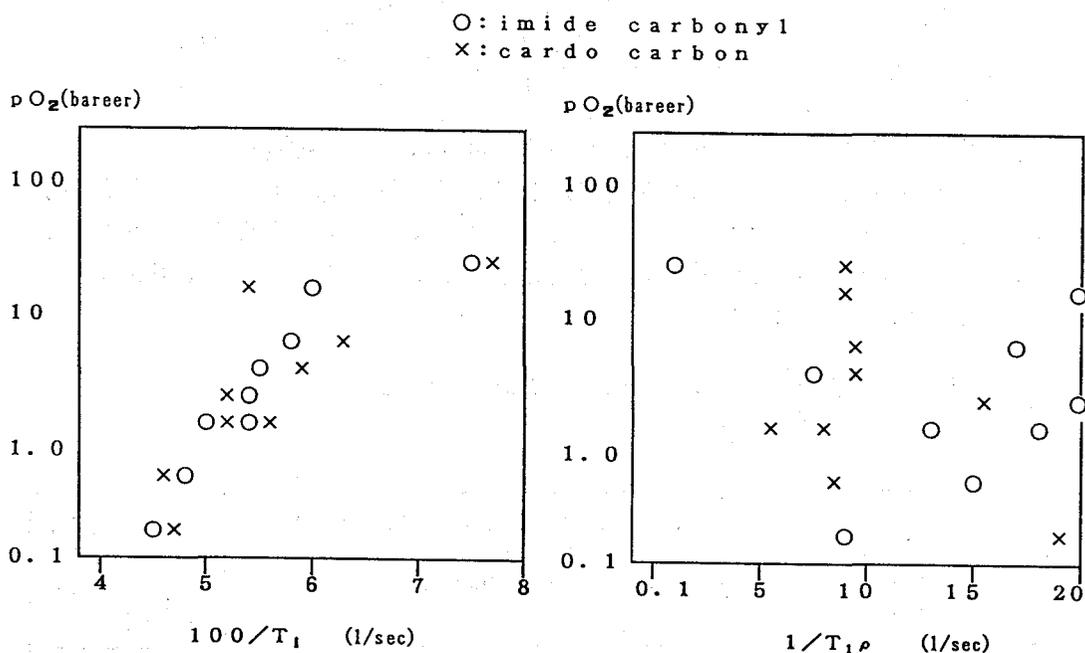


Fig.3 The relationship between $1/T_1$ or $1/T_{1\rho}$ and permeabilities of some films of cardo-type polyimides

4. 結論

カルド型ポリイミドの状態の差は、構造の差となって現れており、その原因は結晶化度の違いであると考えられる。またこれらのポリマーでのガスの透過性は、 T_1 に関係する分子の運動性が効いていることがわかった。

以上述べたように、高分子ポリマーでのガスの透過性のメカニズムを検討する上でも、固体高分解能NMRは非常に有効であることが確認された。

参考文献

- 1) J. L. Koenig et al. *Macromolecules* 14 1327-1333 (1981)
- 2) 岡本ら *高分子* 42(8) (1993)
- 3) 笠井ら *Polym. Preprint Jpn.* 40 536 (1991)

L29 固体DNP (Dynamic Nuclear Polarization) -²⁹Si NMR法によるシリカ表面の選択的観察

○小林 淳二^{*}、Gary E. Maciel
コロラド州立大 化学科 (^{*}現在：三菱電機 材研)

²⁹Si Dynamic Nuclear Polarization of Silica Surfaces

○Junji KOBAYASHI, Gary E. MACIEL
Department of Chemistry, Colorado State University

The polarization of a nuclear spin system can be enhanced by irradiating at or near electron Larmor frequency ω_e , yielding the dynamic nuclear polarization (DNP) effect. The DNP enhancement of NMR spectroscopy has not been reported so far on any surface species. We could observe the enhancement of at least a factor of 50 on ²⁹Si solid NMR spectra of silicagel covered with approximately 0.5%ML BDPA. The depth of enhanced regions of silica surfaces was deeper in the DNP effect from a electron spin system than in a CP effect from a ¹H nuclear spin system. We could not acquire the DNP enhancement of ¹H NMR signals.

<はじめに>

磁気核と不対電子が共存する物質に、電子のラーモア周波数 (ω_e) 付近の電磁波を照射すると、核分極が理想的には γ_e/γ_n 倍も増加する [DNP (Dynamic Nuclear Polarization)]。固体でも、電子が ω_e 程度の揺らぎを生じている場合 (金属、半導体様物質) は、まさに ω_e の周波数による照射が最大の増感効果を与える (オーバーハウザー効果)。一方、電子が固定されている系においては、電子・核スピン間の相互作用ハミルトニアン の空間部分が時間平均されない ので、例えば $I_{1z}S_{2z}$ 項により $|++\rangle$ 状態の $|-\rangle$ 状態への混成が生ずる。結果として、 $\omega_e + \omega_n$ の周波数において禁制遷移が有限の確率 W^+ にて起こり、核分極が増加することになる。(固体状態効果あるいは熱的混合効果)¹⁾。混成の程度あるいは W^+ は、電子核間距離の3乗で小さくなる一方、核スピンの格子緩和時間は、逆に大きくなるので、この増感率は一見距離に依存しない様に思えるが、電子の存在に独立な核緩和のために、電子の近傍で増感率は大きくなる。

したがって、固体のDNPは、固体NMR法の高感度化と同時に電子スピン近傍のみのNMRを選択的に取得できるという大きな特徴をもっている。しかし、これまで後者の特質を生かした研究は最近のJ. Schaefer等²⁾による異種ポリマー界面での仕事しかない。ここで

キーワード：DNP, 固体高分解能²⁹Si NMR, 表面, シリカ

○こばやし じゅんじ、Gary E. Maciel

は固体表面の選択的かつ高感度なNMR法の実現に向けて、特定のフリーラジカルを吸着させたシリカ表面において50倍程度のDNP増感を達成したことを報告する。固体表面においてDNP増感が観測されたのは本研究が初めてである。

<実験>

1. 装置とDNP/MAS測定： DNPのためのマイクロ波(39.4602 GHz固定)照射機構を備えた自作の固体高分解能用のNMR装置(60MHz, 1.4T可変、二重共鳴型)を用いた。Delft大(オランダ)型試料回転装置により、マジックアングルスピニング(4KHz)した。DNP現象は、照射するマイクロ波の周波数に非常に敏感である。本装置では、ロック周波数(約9.2MHz)の変化により磁場を変えている(ロック周波数 f_{mw} の0.0141MHzの変化が、 ω_e の60MHz変化に対応)。照射マイクロ波パワーは約5Wである。(詳細は、文献3)を参照)。

後記の様に、DNP効果の達成には、常磁性酸素の影響をのぞく必要から自作のイアータナスピナーを使用した。材質はKel-fである。(GAYタイプのがラス管を用いた回転システムはSiの測定には使用不可。)まず、BDPA/ポリスチレン試料にて ^1H -DNPの最適条件を見つけその後、磁場を多少ずらせた固体状態効果(あるいは熱的混合効果)の起こるべき条件で測定した。

2. 試料調整： シリカゲル(Fisher Scientific S-679, 550 m²/g)を150Cにて脱水後、グローブボックス内で、4種のフリーラジカル(BDPA, DPPH, TEMPO及びDoxyl-Cholestane)をそれぞれ、ベンゼンに溶解後、ローターハブをもちいて、表面に均一に物理吸着させた。その際、表面被覆率を0.01-15%の範囲で5、6段階、変えた。表面吸着種の運動性、緩和時間、均一性等を評価するために、ESR測定を行った。

<結果と考察>

1. ESR: ESRスペクトルから、表面被覆率の増加と共にプロトンとの超微細分裂が、スピン交換のため消失し、さらに交換ローイングを起こす様子がわかる。0.5%程度の被覆でも、結晶化した成分があり狭幅成分を生じた。飽和挙動から、電子スピンの格子緩和時間を評価した結果、空気中では、 10^{-8} sec台であり、100msec以下の核スピン緩和時間になってしまう。一方、真空中(10^{-3} Torr)では、BDPA(0.5%程度cov.)/silica系のみにおいて、約 10^{-6} sec台の緩和が得られた。DNP/MAS測定にはこの系の試料を用いた。

2. ^1H DNP-NMR: DNP現象とは結局、電子から核への分極移動である。したがって、DNP-NMRの実現経路として、本系では、1)電子 \rightarrow ^1H , 2)電子 \rightarrow ^{29}Si , 3)電子 \rightarrow ^1H \rightarrow ^{29}Si , という経路が考えられる。詳細は略すが、1)の経路ではDNP増感を得る事が出来なかった。理由として、1)BDPAの分子運動、及び2)シリカ表面での水素原子(-OH)の良好な運動、による効率的な近傍水素の緩和及びそのスピンの拡散があげられる。

3. ^{29}Si DNP-NMR: BDPA(0.5%被覆率)/シリカゲル系にて、電子スピンからシリカ核スピンへの直接的な分極移動によってDNP増感現象が観測できた。(図1にはCP/MASとの比較で示す。) CP/MAS測定と同程度のS/N比がDNP/MASでは、10分の1の測定時間で得られた。粗い見積では、約50倍の増感を達成できている。また、3本のピーク(A:Si*(OSi)₄:109.3

PPM, B: $(\text{HO})\text{Si}^*(\text{OSi}\equiv)_3$: -99.8及びC: $(\text{HO})_2\text{Si}^*(\text{OSi}\equiv)_2$: -90.6) のピーク強度比が、CP/MASで、2:9:6なのに対して、DNP/MASでは、2:10:14と後者では、プローブ領域がより深い事がわかる。

図2は待ち時間(RD)依存性であるが、3秒から250ミリ秒と短くなるにつれて、表面種(B, C)による信号の比が増加している。この理由は、1)表面種がより電子スピンの近く格子緩和時間が短い、2)待ち時間を長くすると急激に信号取得可能なバルクシリコンの数が増えるためであろう。

図3は、DNP増感の照射マイクロ波周波数依存性を示す。固体のDNP特有の変化を示しておりここでの増感現象がマイクロ波照射による熱的な緩和時間の変化等によるものでなく、固体状態効果あるいは熱的混合効果によるDNP現象によることが明かである。

このようなDNP増感現象は、スピナーのエアータイト性によって著しく影響される。本実験では、1日以上測定を続けると微量酸素の侵入の為DNP増感が消失した。今後は、GAYATIPの回転システムを用いたDNP/MASプローブの活用が望まれる。

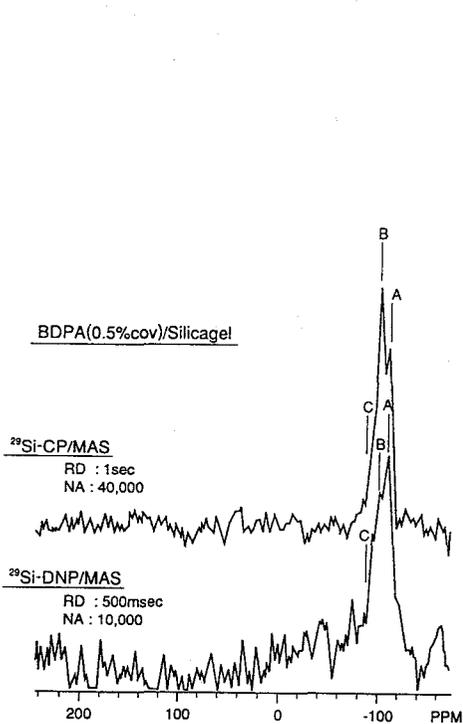


図1: BDPA(被覆率0.5%) /シリカゲルの²⁹Si-DNP/MAS及びCP/MAS スペクトル

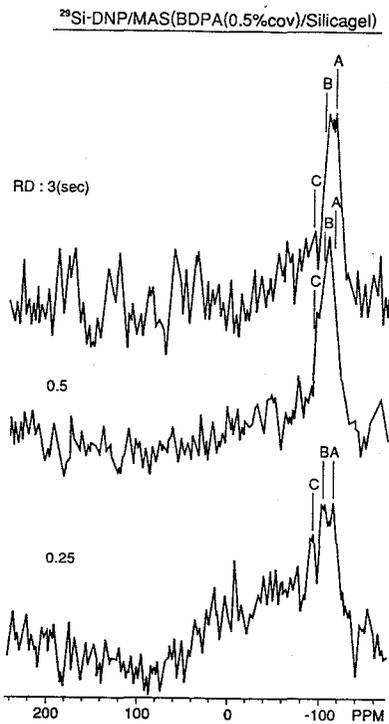
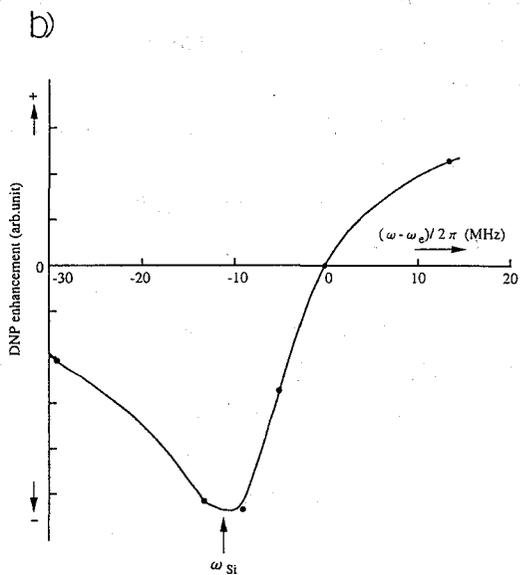
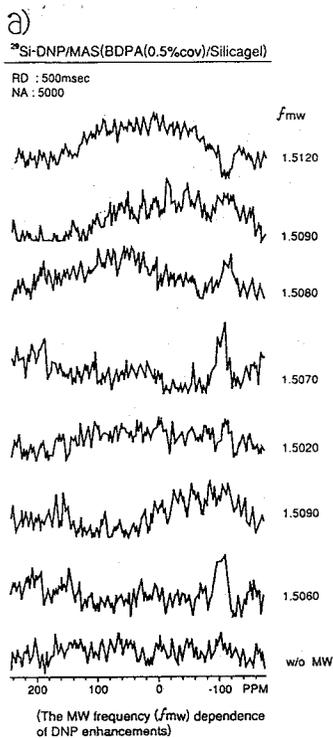


図2: ²⁹Si-DNP/MASスペクトルの待ち時間依存性



The ^{29}Si DNP enhancement of BDPA (0.5% Cov.) / Silicagel as a function of the microwave offset frequency, $\omega - \omega_0$.

図3 : DNPイオン化率の照射マイクロ波周波数依存性
(a) DNP/MAS スペクトル, b) ビーク強度)

4. 文献

- 1) R.A. Wind et al. Prog. in NMR Spectroscopy 17, pp33-67, 1985
- 2) Mobae Afeworki, Robert A. McKay, and Jacob Schaefer, Macromolecules 25, 4084-4091, 1992
- 3) R.A. Wind et al. J. Magn. Res. 52, 424, 1983

(京大化研) 別府隆幸、高江洲昇、石田正登、堀井文敬

Analyses of Molecular Motions of Polymers by
Variable Temperature Selective Excitation SASS ^{13}C NMR

T. Beppu, N. Takaesu, M. Ishida, and F. Horii
Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., Uji, Kyoto 611

^{13}C chemical shift anisotropy (CSA) spectra of natural abundant CH carbons of bisphenol A (BPA) residues have been measured for BPA polycarbonate and polyarylate, which is composed of BPA and phthalic acids, by the selective excitation switching angle sample spinning (SESASS) spectroscopy. Doty double spinning type rotors were partly modified by use of a screw cap for variable temperature measurements. CSA spectra obtained below around room temperature have been well analyzed in terms of the two site exchange model considering the distributions of flip angles of the phenylene ring around 0° and 180° . In contrast additional motions such as the fluctuation of the flip axis should be introduced for the phenylene motion above room temperature. Two dimensional SESASS have also been measured for the characterization of slower motions.

1. 緒言

高分子のガラス状態における $10^4 \sim 10^5 \text{ Hz}$ の分子運動は耐衝撃性や気体透過性などの巨視的な物性に密接に関係していると考えられているが、その分子運動の詳細はほとんど明らかにされていない。我々は化学シフトの異方性(CSA)を反映した共鳴線や ^2H NMR共鳴線によりこれらの分子運動解析を行ってきた。本研究では、選択励起switching angle sample spinning (SASS)によりビスフェノールAポリカーボネート(BPAPC)およびBPAを含有するポリアリレート(PAr)固体についてBPA残基のCH炭素のCSAスペクトルを室温以下の温度を含む種々の温度で測定し、2サイト交換モデルにより解析した結果を報告する。また、二次元交換選択励起SASSによる低速運動の検討結果についても述べる。

2. 実験

^{13}C NMR測定は、JEOL JNM-GSX200分光計により4.7Tの静磁場場下で行った。選択励起SASS法による二次元及び二次元交換スペクトルの測定は、Doty Scientific Inc.製のDASプローブを用いて行った。 ^1H および ^{13}C 核の回転磁場強度 $\gamma B_1/2\pi$ は62.5kHz、試料の回転速度はスピニングサイドバンドが無視できる7kHzとした。選択励起にはDANTEのパルス系列を用いたが、このパルス系列は試料の回転周期またはその2倍に相当する時間間隔をもつパ

キーワード：選択励起 SASS NMR、化学シフトの異方性、2サイト交換モデル、 180° flip

べっぶ たかゆき、たかえす のぼる、いしだ まさと、ほりい ふみたか

と45°または47°(off magic angle)の間で試料の回転軸を高速(20 μs以内)で切り換えた。本研究では、室温以下でのSASS測定も行ったが、このためDoty製のdouble spinningロータの上部キャップとしてネジ式のキャップを作製した。

用いた試料は非晶性のビスフェノールAポリカーボネート(BPAPC)およびBPAとフタル酸(テレフタル酸/イソフタル酸=1/1)からなるポリアリレート(PAR)フィルムである。

3. 結果及び考察

(1)BPAPC: 図1には、一次元選択励起SASSによるBPAPCのC5炭素のCSAの測定(25°C)を示す。ここで、(a)はDANTEパルス系列による選択励起の効率と試料の回転数の影響を調べるため、常にmagic angleにセットしてC5共鳴線を選択的に測定した結果である。DANTEの選択励起が有効であり、スピニングサイドバンドもほとんど現れないことがわかる。

図1(c)は、選択励起SASSにより測定したC5炭素のCSAスペクトルである。低速試料回転の場合に比べて共鳴中心付近の強度の減少がほとんど認められず、この場合は精度良くCSAが測定できたと考えられる。ここで、得られた共鳴線は、試料の回転軸を静磁場に対して $\theta_s = 45^\circ$ 傾けて測定しているため、共鳴中心を中心としてスケール因子 $f_s = (3\cos^2\theta_s - 1)/2$ だけスケールされている。図1(d)には、スケール補正後の静止状態に対応するCSAスペクトルを示す。

図2には、同様な方法により種々の温度で測定したC5炭素のCSAスペクトルを実線で示す。25°Cでは高磁場側に化学シフトテンソルの主値 σ_{33} 成分に基づくショルダが認められるが、温度上昇に伴ってこのショルダが消失し、かなり狭幅化する。これらの共鳴線の形状を説明するため、2サイト交換モデルによるシミュレーションを行った。すなわち、フェニレン環がその結合軸のまわりでフリップ運動をするとし、そのフリップ角 δ およびフリップ周波数を κ としてC5炭素のCSAのシミュレーションを行った¹⁾。しかし、これらの実測スペクトルは単一の角度 δ の2サイトフリップ運動に対するシミュレーションの結果とは全く一致しない。このことはフェニレン環のフリップの周波数およびフリップ角に分布が存在するためと考えられ、その検討を行った。

図2には、実測CSAスペクトルに最も良く一致するシミュレーションスペクトルを破線で示した。この解析では、 $\kappa \geq 10^5$ Hzでいわゆる

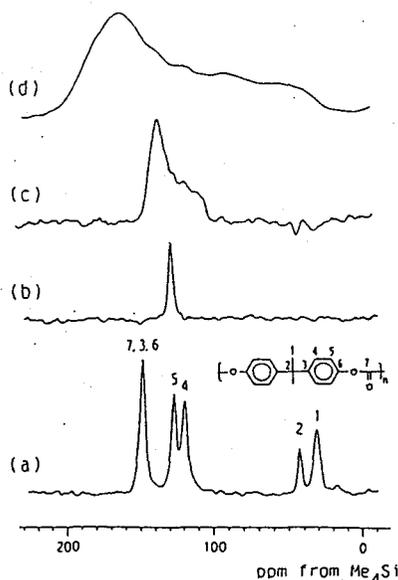


Fig.1. ¹³C NMR spectra of solid BPAPC at 25°C. (a) CP/MAS, (b) SE/MAS of C5, (c) SESASS, scaled C5 CSA spectrum, (d) descaled C5 CSA spectrum.

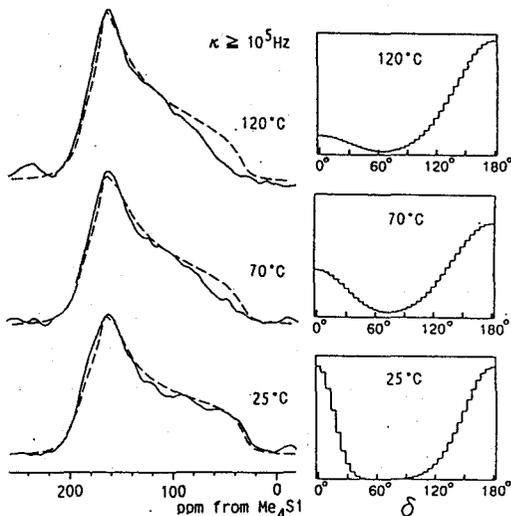


Fig.2. CSA spectra of the C5 carbon of BPAPC at different temperatures. (—): observed, (---): simulated.

first limitであり、 δ は 0° および 180° を中心としたガウス関数で近似される分布が存在すると仮定した。 25°C においては実測スペクトルとシミュレーションスペクトルは良く一致する。しかし、温度の上昇に伴って、高磁場側の不一致が増大する。このことは 70°C 以上ではフェニレンの回転軸自身の運動もCSAスペクトルの形状に影響するものと考えられる。本研究で得られた結果は、Jones²⁾らのマルチサイト交換モデルでも説明可能であるが、フリップの周波数が低く見積られ、 ^2H NMRの解析結果³⁾や次に述べる T_1 の解析結果と一致しない。サイトの数を特定しないでいたずらにサイトの数を多くとるとすれば、マルチサイト交換モデルの利用には問題があると考えられる。

フェニレン環のフリップ速度のオーダーを知るため、C5炭素の T_1 をCPT1または飽和回復法により種々の温度で測定した。図3には、C5炭素の T_1 を絶対温度の逆数に対してプロットした。この T_1 の温度依存性を我々の提案したモデルフリーの取り扱い⁴⁾により解析した。すなわち、フェニレン環の運動がいくつかの互いに独立なランダムな運動の重ね合せで記述されるとし、それらの運動の相関時間を τ_{ci} とすればスペクトル密度 $J_q(\omega)$ は

$$J_q(\omega) = K_q \sum_{i=1}^N A_i \frac{2\tau_{ci}}{1 + \omega^2 \tau_{ci}^2}, \quad q = 0, 1, 2 \quad (1)$$

で表わされる。ここで、 $K_0=2/5$ 、 $K_1=2/15$ 、 $K_2=8/15$ 、 A_i は各項の係数である。図3の実線は $N=2$ とした場合のシミュレーションの結果である。実験結果とシミュレーションの結果は良く一致する。この結果得られた各 τ_{ci} の温度依存性を図3上部に示した。 $i=2$ に相当するこの運動の相関時間がこの測定温度領域で $10^{-9} \sim 10^{-7}\text{s}$ であり、 ^2H NMRの解析結果³⁾と良く一致することからこの運動がフェニレン環のフリップ運動であると帰属される。一方、 $i=1$ に相当する運動はフェニレン環の回転軸まわりのポテンシャル極小付近の速い揺動運動と考えられる。したがって、これらの運動は図2に示した 180° を中心としたフリップ運動と 0° を中心とした小振幅の揺動運動に対応づけられる。

BPAPCのフェニレン環が1秒程度のタイムスケールでみた場合どのような運動を行っているかを検べるため、 ^{13}C CSA二次元交換選択励起SASSスペクトルを測定した。室温のC5炭素についての結果を図4に示す。混合時間は0.5sである。測定に約4日を要したが、なお

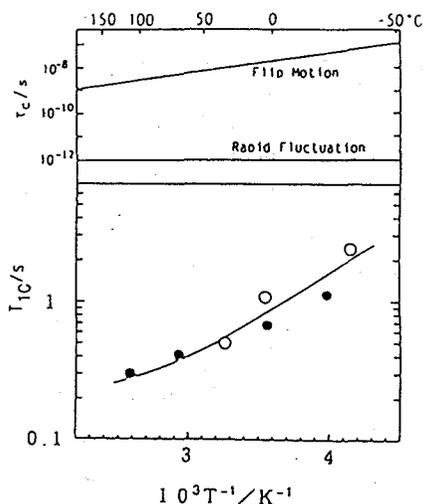


Fig.3. Temperature dependences of T_{1C} values for C5 of BPAPC. o: by CPT1, •: by the saturation recovery method, (—): simulated by model-free treatment.

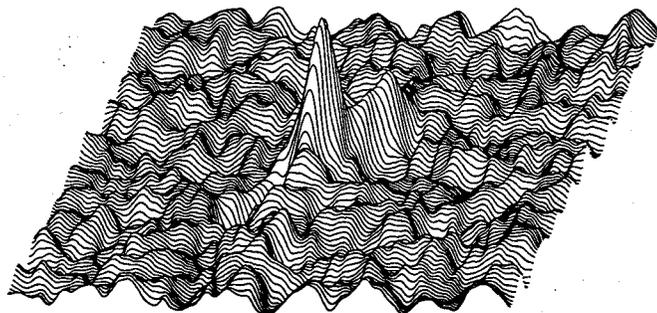


Fig.4 2D exchange selective excitation SASS spectrum of CSA for C5 carbon of BPAPC at room temperature.

S/N比は不十分である。しかし、対角線上には一次元CSAスペクトルが明瞭に認められ、ほとんど交差ピークは存在しないことがわかる。このことは、一次元CSAスペクトルの形状に關する 10^5 Hz以上の運動以外に1秒程度のタイムスケールで認められる運動は存在しないといえる。現在より高温での低速運動について同様な測定を行っている。

(2) P A r (U-ポリマー): 図5には、P A r フィルムの室温におけるCP/MAS 13 C NMRスペクトルを示す。BPA残基のC4炭素の共鳴線のみ独立の共鳴線であるため、この共鳴線についてBPAPCの場合と同様の解析を行った。図6には、選択励起SASS法により種々の温度で測定したP A rのC4炭素のCSAスペクトルを実線で示す。BPAPCのC5炭素の室温におけるCSAスペクトルに比べて、P A rのC4炭素のCSAスペクトルは室温および -30°C いずれの温度においてもかなり狭幅化している。また、 100°C のスペクトルは明らかに軸対称スペクトルとは異なっている。

BPAPCの場合と同様、シミュレーションを行った。その結果を図6の破線で示す。この場合も、フリップ速度はfast limit($\kappa \geq 10^5$ Hz)であり、フリップ角には 0° と 180° を中心としたガウス分布が存在すると仮定した。その結果、P A rの場合も室温以下の場合は実測スペクトルにかなり近いシミュレーションスペクトルが得られた。

一方、 60°C のスペクトルに関してはフリップ角の分布の中心を 135° 付近にとった場合、実測スペクトルにかなり近い結果が得られた。このことは、 60°C では $0 \rightarrow 180^{\circ}$ フリップを基本とする運動モードが崩れ始めていることを意味する。そして、この傾向は温度上昇とともにさらに助長され、 100°C における非軸対称スペクトルの出現につながっているものと考えられる。今後より精密なモデルによりP A rの分子運動の特徴を明らかにする予定である。

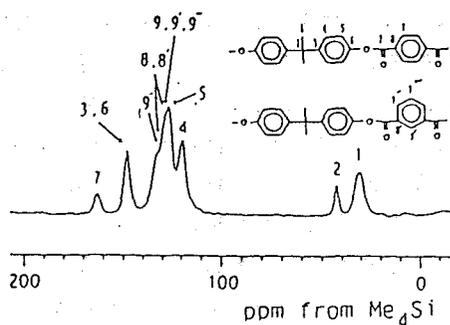


Fig. 5. CP/MAS ^{13}C spectrum of the PAr films at 25°C .

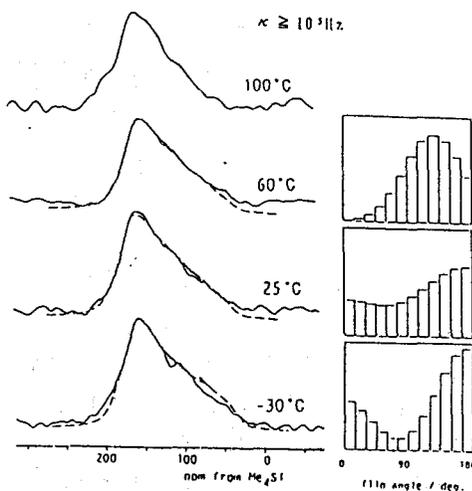


Fig. 6. CSA spectra of the C4 carbon of PAr at different temperatures. (—): observed, (---): simulated.

- 1) Horii, F. et al., Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., **70**, 198 (1992).
- 2) Roy, A.K. and Jones, A.A., J. Magn. Reson., **64**, 441 (1985).
- 3) Wehrle, M., et al., Colloid Polym. Sci., **265**, 815 (1987).
- 4) Horii, F. et al., Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., **66**, 317 (1988).

○青木 明良¹⁾²⁾、伊達 健¹⁾、出村 誠¹⁾、
林 哲男²⁾、朝倉 哲郎¹⁾

¹⁾農工大 工学部、²⁾徳山曹達(株) 樹脂研究所

High-Resolution Solid-State ^{13}C -NMR Spectroscopy of Polyolefines

Akira Aoki¹⁾²⁾, Takeshi Date¹⁾, Makoto Demura¹⁾, Tetsuo Hayashi²⁾

Tetsuo Asakura¹⁾ 1)Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2)Plastic Research Laboratory, Tokuyama Soda Co. Ltd.

The packing effect on the ^{13}C CP-MAS NMR spectrum of isotactic polypropylene was examined in detail by taking into account the intermolecular chain arrangement. The peak splitting observed for the methyl and methylene carbons of isotactic polypropylene with α -form were interpreted in terms with steric shielding effect proposed by Grant et al.

1. 緒言

ポリオレフィンの固体高分解能 ^{13}C -NMRによる研究はポリエチレン¹⁾²⁾をはじめアイソタクチックポリプロピレン(i-PP)³⁾⁴⁾⁵⁾やシンジオタクチックポリプロピレン(s-PP)⁶⁾⁷⁾、アイソタクチックポリ1-ブテン⁸⁾等について行われ、その ^{13}C -NMRスペクトルは分子鎖のコンホメーションや結晶中の分子鎖の配列様式(パッキング)の差を鋭敏に反映することが報告されてきた。

Fig. 1にi-PP(α -form)の固体高分解能 ^{13}C -NMRスペクトルを示した。メチル炭素領域と、メチレン炭素領域においてピークの分裂が観測される。一般にポリオレフィンの場合、溶液、固体を問わずピークの分裂は、 ^{13}C -NMR化学シフトの γ 効果とそのコンホメーションを関連づけて説明されてきた⁸⁾⁹⁾。しかしながら、このi-PP固体の分子鎖形態は 3_1 ヘリックス(TG)_nであり、各々の炭素種について他の炭素原子

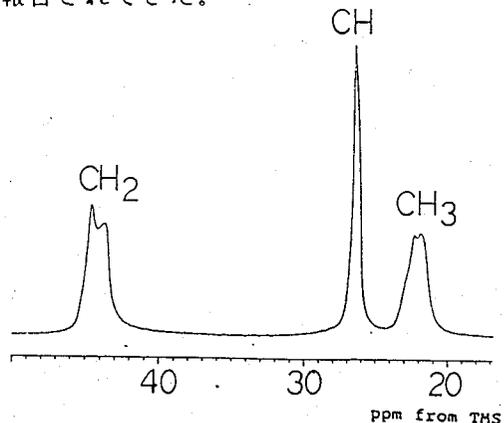


Fig.1 CP-MAS ^{13}C -NMR spectrum of α -form crystalline of i-PP.

キーワード 固体高分解能 ^{13}C -NMR、ポリプロピレン、 α -form、しゃへい効果

○あおき あきら、だて たけし、でむら まこと、はやし てつお、あさくら てつお

から受ける γ 効果の影響は同じであり、 γ 効果のみからはピークの分裂が生じないことが予想される。これらの分裂の原因について Bunnらは i-PPの結晶格子中における分子鎖配列様式の違い（パッキングの差）であると考察している³⁾。しかしながら、その配列を考慮して定量的に化学シフトを評価したわけではないので、何故、分裂が生じたかという理由については明確に説明できていないわけではない。

本研究の目的は i-PP (α -form) について X線回折法で報告されてきた結晶格子中の分子鎖パッキングが、 ^{13}C 化学シフトに与える影響を化学シフト計算に基づいて定量的に評価することである。

2. 実験

i-PPサンプルは m m m m ベンタッド分率が 0.95 以上の高立体規則性ポリプロピレンを用い、140℃で4日間熱処理することによりほぼ完全な α -form に調製した (X線回折法により確認)。 ^{13}C 固体高分解能 NMR 測定は J E O L 製 GX 4 0 0 スペクトロメータ (^{13}C :100.4MHz) を用いて室温で行った。接触時間は 1 m s、積算回数は 4 0 0、MAS 速度は 6. 2 k H z である。

3. ^{13}C -NMR 化学シフトの評価方法

分子鎖間の立体障害（パッキングの差）が、 ^{13}C -NMR 化学シフトに与える影響を評価するために、Grant¹⁰⁾らの式を用いた。Grantらはこの立体障害によるしゃへい効果が非結合水素間同士の反発相互作用に依存するとしてその効果を以下の式によって評価している。

$$\delta C^{13}(\text{ppm}) = 1680 \times \cos \theta \exp(-2.671r)$$

ここで $\delta C^{13}(\text{ppm})$ は注目している炭素原子が受けるしゃへい効果、 θ は注目している炭素原子と直接結合している水素原子とのなすベクトルと、炭素と結合している水素原子と隣接する水素原子がなすベクトルの間の角度、 $r(\text{\AA})$ は結合している水素原子と隣接する水素原子間の距離である (Fig. 2 参照)。この式は芳香環についた一連のメチル基の ^{13}C 化学シフトの実験データから求めたものであるが、最近の Ab-Initio の計算¹¹⁾ によるコンホメーション依存の化学シフト曲線は、この式で表現される曲線とよく対応している。

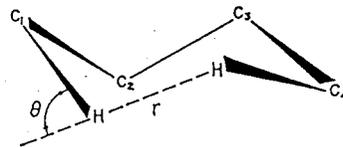


Fig. 2 The steric relationship between protons on 1,4-carbon atoms of n-butane.

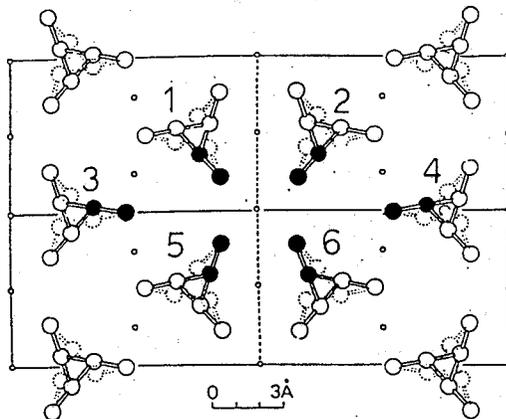


Fig. 3 Crystal Structure of α -form of i-PP.

1本の分子鎖は末端の影響が無視できるようにPPの9量体とし、その中央部の3量体部分に存在する各炭素についてしゃへい効果の計算を行った。結晶格子中の分子鎖の配列様式については、Natta¹²⁾らのX線回折による報告例を用いた (Fig. 3)。着目した炭素原子はFig. 3に示された1~6の分子鎖の●の位置に存在するものであり、各炭素について他の9本の分子鎖から受けるしゃへい効果を上式に基づいて計算した。

4. 結果及び考察

Table. 1に、しゃへい効果の計算結果を示した。表中の番号はFig. 3中のi-PP分子鎖番号に対応している。各炭素について、最もしゃへい効果の小さな値を0ppmとし、相対値として表した。

しゃへい効果の計算結果に基づいて、線幅を1ppmとしたガウス型ピークとして表示したスペクトルをFig. 4に示した。以下に各炭素領域について詳細に比較検討を進める。

メチル炭素領域

1, 2, 3, 4の分子鎖中のメチル炭素は5, 6の分子鎖中のメチル炭素より1.5~1.9ppm大きなしゃへい効果 (高磁場シフト) を受ける。そのため2本に分裂したピークが予想され、その強度比は高磁場側のピークが低磁場側のピークの2倍となる。この分裂の傾向は実測のNMRスペクトルの結果と対応する。

Table. 1 The calculated shielding effect for each carbon atom in i-PP with α -form.

Carbon type	δC^{13} (ppm)					
	1	2	3	4	5	6
CH ₃	1.50	1.62	1.89	1.71	0.00	0.01
CH ₂	0.04	0.00	2.12	2.12	0.29	0.41
CH	1.06	0.95	0.00	0.00	1.81	1.74

The positive value means high field shift.

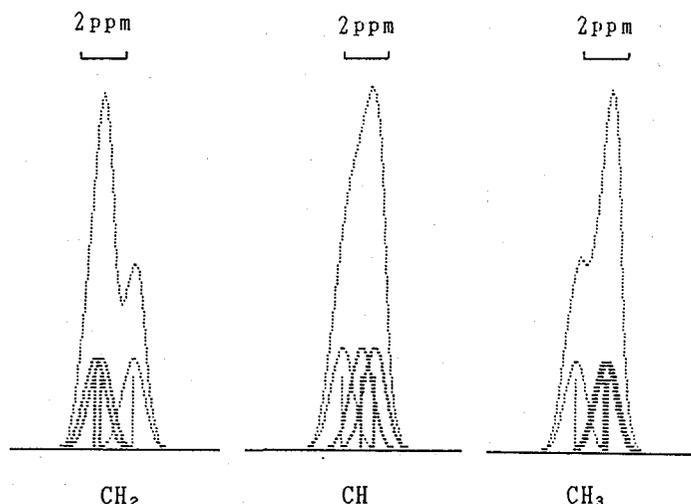


Fig. 4 Peak simulations based on the calculated shielding for ¹³C-NMR chemical shift.

メチレン炭素領域

3, 4の分子鎖中のメチレン炭素は1, 2, 5, 6の分子鎖中のメチレン炭素よりも約2 ppm大きなしゃへい効果を受ける。そのため、この領域では2本のピークが予想され、それらの強度比は低磁場側のピークが高磁場側のピークの2倍となる。この結果は実測のNMRスペクトルをよく再現する。

メチン炭素領域

しゃへい効果の計算結果から、1~6のメチン炭素間でしゃへい効果の大きさに大きな変化がなく、ピークの分裂は観測されないと予想される。この結果は実測スペクトル中でメチン炭素領域では、ピークの分裂がほとんど観測されないことと対応する。シミュレーションの結果は、実測のスペクトルより線幅が広がっている。

固体高分解能 ^{13}C -NMRスペクトルに現れる α 型のi-PPのピークの化学シフトについて、パッキングサイトの差によるピークの分裂を定量的に評価することを試みた。一部不一致点はあるものの、概ね実測のスペクトルを再現することができた。これまでポリオレフィンの1本の分子鎖のコンホメーションと ^{13}C -NMR化学シフトの相関については、 γ 効果によって定量的に説明できることが示されてきた。さらに本計算結果に基づいて分子鎖間のパッキング効果まで含めた系統的な ^{13}C -NMRピークの帰属が可能となった。

References

- 1) T. Yamanobe, T. Sorita, T. Komoto, I. Ando *J. Mol. Struct.*, 131, 267 (1985)
- 2) R. Kitamaru, F. Horii, K. Murayama *Macromolecules*, 19, 636 (1986)
- 3) A. Bunn, M. E. A. Cudby, R. K. Harris, K. J. Packer, B. J. Say *Polymer* 23, 694 (1982)
- 4) M. A. Gomez, H. Tanaka, A. E. Tonelli *Polymer* 28, 2227 (1987)
- 5) S. Saito, Y. Moteki, M. Nakagawa, F. Horii, R. Kitamaru *Macromolecules* 23, 3256 (1990)
- 6) A. Bunn, M. E. A. Cudby, R. K. Harris, K. J. Packer, B. J. Say *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 15 (1981)
- 7) A. Aoki, T. Date, T. Asakura *Macromolecules* submitted
- 8) A. E. Tonelli "NMR Spectroscopy and Polymer Microstructure", VCH Publishers, NY, 1989
- 9) T. Asakura, M. Demura, T. Hayashi " ^{13}C NMR Assignments of Polyolefines and Olefine Copolymer Based on the ^{13}C NMR Chemical Shift Calculation and 2D INADEQUATE NMR", *Ann. Repts. NMR Spectrosc.*, Academic Press, London, 1993, in press
- 10) D. M. Grant, B. V. Cheney *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 5315 (1967)
- 11) M. Barfield, S. H. Yamamura *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4747 (1990)
- 12) G. Natta, P. Corradini *Nuovo Cimento* 15, 1, 40 (1960)

L32

固体高分解能NMRによる距離測定 (I)

REDORによる ^{13}C - ^{15}N 精密原子間距離測定の基本検討

○内藤 晶、西村勝之、荻野純一*、辻 暁、斉藤 肇
(姫路工大・理、*東レリサーチセンター)

Measurement of Interatomic Distance Using High Resolution Solid State NMR (I)

Precise Determination of ^{13}C - ^{15}N Interatomic Distances by REDOR Method

Akira Naito, Katsuyuki Nishimura, Junichi Ogino*, Satoru Tuzi, and Hazime Saito

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, *Toray Research Center

Accurate determination of internuclear distances using REDOR method has been examined for the doubly labelled [^{15}N ,1- ^{13}C]glycine and its Cd and Zn complexes. Internuclear distances between the amino nitrogen and the carboxyl carbon were determined for glycine and the metal complexes. The origin of slight discrepancy from the results obtained by X-ray diffraction method was discussed by taking into account the contribution to the dipolar interaction of the natural abundant isotope and the scaling effect by finite lengths of π -pulses. Internuclear distance between [^{15}N]Gly² and [1- ^{13}C]Gly³ of pentapeptide, [Met⁵]Enkephalin was determined to be 5.7 Å. It turned out that REDOR method is useful means to determine fairly remote internuclear distances in the range of 2.0 to 6.0 Å.

【はじめに】 固体試料において原子間の距離情報、すなわち核間の双極子相互作用を精密に測定するためには、安定同位体による二重標識などで特定の原子対を選択的に観測することに加えて、高分解能を保ちながら双極子相互作用を復活させる工夫が必要である。この中で特に異種核間の比較的遠距離の距離情報を与えるREDOR(Rotational Echo Double Resonance)法を用いた原子間距離測定について基礎検討を行なったので報告する。

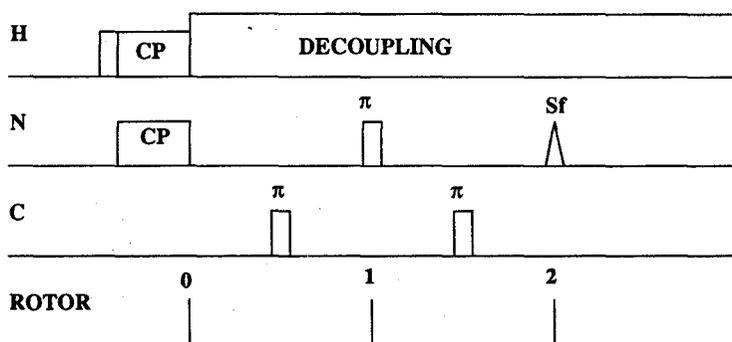
【REDOR法】 直接には化学結合していないサイトを安定同位体で二重標識した ^{13}C - ^{15}N 対に見られる比較的弱い異種核間双極子相互作用を、MASの条件で測定した場合、サイドバンドの強度も低く、スペクトルの線形から双極子相互作用の大きさを見積ることは困難である。このような弱い異種核間双極子相互作用をMASの条件下で巧みに復活させ、核間距離を精密に解析する方法の一つがREDOR法である。REDOR法では、観測核(S)と双極子結合をもつ核(I)の共鳴周波数の π パルスを回転周期の中間に挿入する。この π パルスによって観測核の歳差運動の方向が反転し、一周期毎の回転エコーの強度(Sf)が全エコー強度(So)に対して減少する。このエコーの減少の程度(So-Sf)は双極子相互作用の大きさに依存するので、このエコーの減少の程度から双極子相互作用の大きさを見積ることができる。これにより核間の距離を正確に決定することが可能となる。

REDOR, 原子間距離、双極子相互作用、グリシン、エンケファリン

○ないとう あきら、にしむら かつゆき、おぎの じゅんいち、つじ さとる
さいとう はじめ

【REDOR法の実際】 REDORの実験を行なうための基本パルス系列を図1に示す。距離情報を得るにはREDORとUNREDORの二つの実験を行なう必要がある。図1に¹⁵N核を観測する場合のパルス系列を示す。この系列では回転の二周期目にREDORにより減衰した回転エコー(Sf)が観測される。¹³C核には回転周期の中間に π パルスを照射してREDOR効果を起こしている。¹⁵N核に照射した π パルスによって化学シフトによる寄与を消去している。UNREDORのパルス系列では双極子結合核である¹³C核を照射しない実験を行ない全エコー強度(So)を得る。REDORの実験はChemagnetics社製CMX-400および三重共鳴用プローブを使用しておこなった。

REDOR



UNREDOR

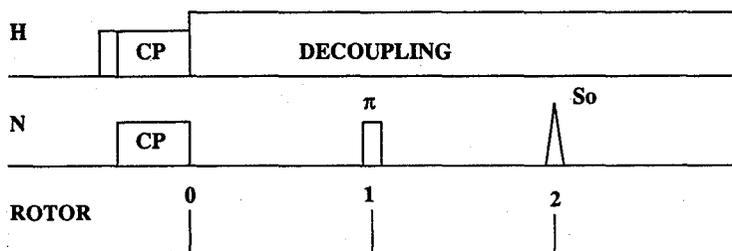


図1 REDORの基本パルス系列

【試料の調製】 本実験ではアミノ基の窒素とカルボキシル基の炭素核をそれぞれ¹⁵N,¹³C核で二重標識したグリシンを用いて、グリシン自身、Cd-グリシン錯体、およびZn-グリシン錯体の結晶を調製した。ここで、二重標識グリシンの希釈率はそれぞれ、20%,10%,10%である。生理活性ペプチドの構造解析への応用例として、¹⁵N]Gly²[1-¹³C]Gly³で二重標識した [Met⁵]Enkephalinと [Leu⁵]Enkephalinを、Applied Biosystems社製ペプチド合成器により合成し、EtOH/H₂O およびMeOH/H₂O溶液からそれぞれ結晶を調製した。

【結果】 図2に20%に希釈した二重標識グリシン結晶のREDORの結果を示す。図2aからREDORとUNREDORのエコー強度に大きな差のあることがわかる。さらにこのエコー強度の比をNcTrの関数として観測した結果を図2bに示す。ここでNcは

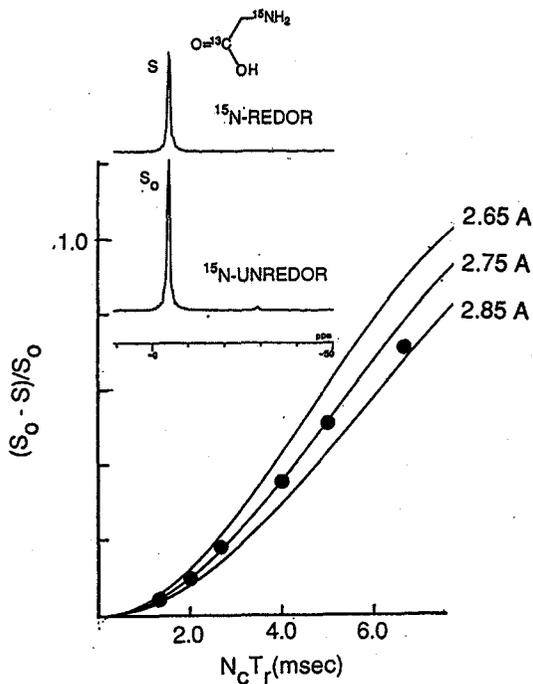


図2 グリシンの ^{15}N -REDOR

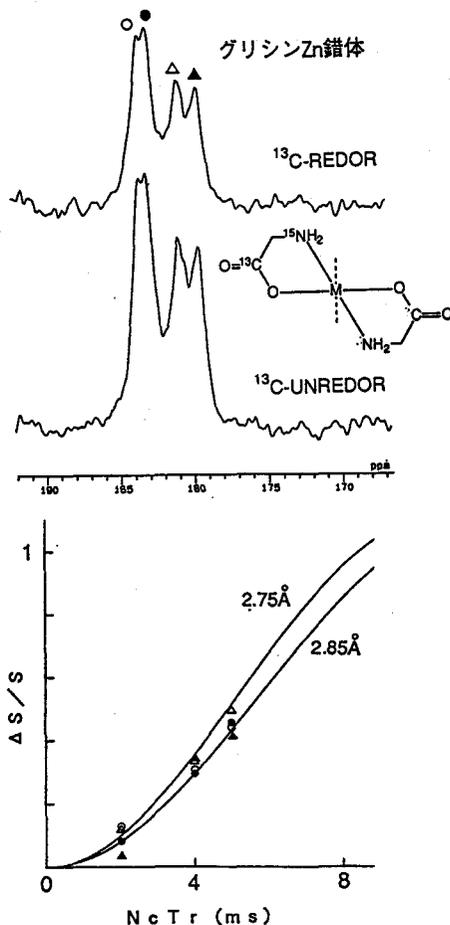


図3 グリシンZn錯体の ^{13}C -REDOR

ローター周期の数、 T_r はローターの回転周期である。実線は理論計算から求めた曲線である。この結果、 ^{15}N - ^{13}C 間の距離は2.75Åが最も実験値に近いことが判明した。図3にはZn-グリシン錯体の ^{13}C -REDORの結果を示す。ここでは4本の ^{13}C -NMR信号が現われた。この錯体の詳しいX-線回折の結果は報告されていないが、結晶の空間群から4種類のグリシン分子の存在が示唆されている事実とこの結果は一致する。 ^{13}C -REDORの実験から4種類のグリシン分子の核間距離が独立に決定でき、2.75Åと2.85Åの2種類の距離が得られた。図4には二重標識した[Met 5]Enkephalinの ^{15}N -REDORの結果を示す。この原子間距離を解析した結果、 ^{15}N - ^{13}C 間距離は5.6Åと決定できた。この結果は、結晶中で分子がextended formを形成していることを支持している。

【考察】 表1に示すようにREDORの実験から得られた核間距離と、X-線回折の結果には大きな差がある。この原因として天然同位体からの寄与およびパルス長の寄与について以下のように検討した。(1)対を形成していない同位体、例えば

(^{15}N - ^{13}C 、*は観測核)の割合はREDOR効果を減少する働きがあるのでREDORおよびUNREDORのエコー強度からこの寄与を差し引く必要がある。この寄与は20%に希釈したグリシンの ^{15}N -REDORの場合は1.5%程度である。さらに、(2)直接結合した同位体 ($^{15}\text{N}^*$ - ^{13}C - $^{13}\text{C}^*$ 、*は標識核)とのREDOR効果を除く必要がある。これはREDOR効果を増加する方向に作用し、1%程度の寄与になる。(3)特に遠隔の核間距離を測定するときには分子内のみならず分子間の寄与を考慮する必要がある。この寄与は二重標識分子を天然存在比の分子で希釈することによって十分低く押さえることができる。(4)次に π パルス長が有限であることによる双極子相互作用のスケールリングの効果を考慮する必要がある。 r_f パルス長のローター周期に対する割合を d とすると双極子相互作用のスケールリング効果は d となる。本実験ではローター周波数が2000Hzで ^{13}C 核と ^{15}N 核の π パルス長がそれぞれ16 μs , 20 μs であるので7.2%のスケールリング効果を補正しなければならない。これらの効果を考慮して補正した原子間距離の結果を表1にまとめる。この表からわかるように、REDORとX-回折の実験から得られた原子間距離は非常に良い一致を示すことがわかる。したがって、REDOR法は6Å程度までの核間距離の精密測定に非常に有効であることが判明した。

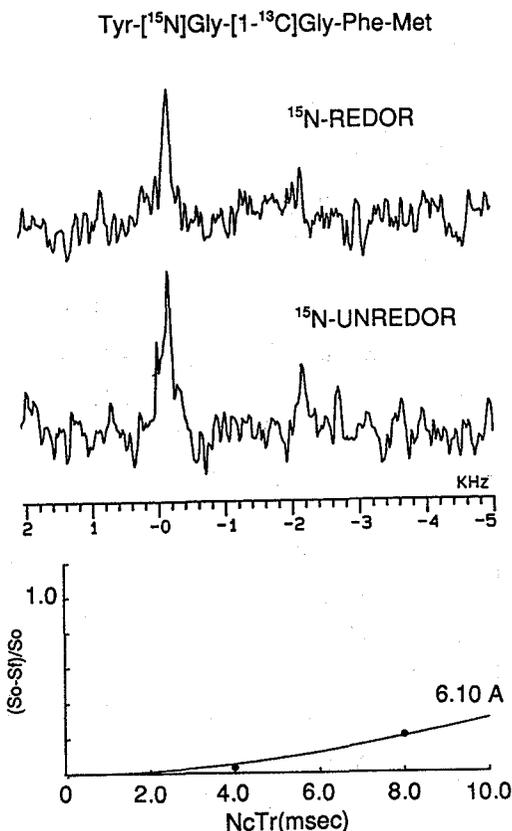


図4 [Met⁵]Enkephalinの ^{15}N -REDOR

表1 REDORより得られた ^{15}N - ^{13}C 原子間距離

	REDOR (Å) corrected		X-RAY(Å)
^{15}N ,1- ^{13}C]Glycine	2.75	2.51	2.48
Cd-[^{15}N ,1- ^{13}C]Glycine	3.00	2.74	2.57
Zn-[^{15}N ,1- ^{13}C]Glycine	2.75	2.56	
	2.85	2.65	
Tyr-[^{15}N]Gly-[1- ^{13}C]Gly-Phe-Met	6.10	5.57	

L33 ^{15}N NMRによるポリペプチドの固体構造解析： ポリ (β -ベンジル L-アスパラテート)

○芦川幹也、莊司 顯、尾崎拓男、安藤 勲*
(群馬大工、東工大工*)

Structural Analysis of Solid Polypeptides by ^{15}N NMR : Poly (β -benzyl L-aspartate)

Mikiya Ashikawa, Akira Shoji, Takuo Ozaki and Isao Ando*

(Department of Biological Sciences, Faculty of Engineering, Gunma University, and

*Department of Polymer Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology.)

Abstract: The relation between the chemical structures (right-handed α -helix, left-handed α -helix, left-handed ω -helix, and β -sheet conformations) and the ^{15}N chemical shift tensors (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) as well as the isotropic chemical shift (σ_{iso}) of poly(β -benzyl L-aspartate) containing ^{15}N -labeled β -benzyl L-aspartate residues [Asp(OBzl)*] was studied by means of ^{15}N NMR. It was found that the σ_{iso} of Asp(OBzl)* is conformation-dependent and is also sensitive to the helix sense. Further, it was confirmed that the ^{15}N chemical shift tensors (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) are useful for conformational analysis of solid polypeptides.

1. 緒 言

我々は今までに、固体高分解能 ^{15}N NMR 法による一連のモデルポリペプチドの立体構造の研究から、次の点を明らかにした^{1~4)} : (1) 等方性 ^{15}N 化学シフト (σ_{iso}) および ^{15}N 化学シフトテンソル主値 (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) はアミノ酸残基の種類、アミノ酸配列順序、およびコンホメーションに依存する ; (2) L-ロイシン残基およびL-バリン残基の σ_{iso} 値はポリペプチドやタンパク質のコンホメーション解析に有効である (但し、グリシンおよびL-アラニン残基の σ_{iso} 値から直接ポリペプチドやタンパク質のコンホメーションを決定するのは難しい) ; (3) ^{15}N 化学シフトテンソルの主値 σ_{22} は、ポリペプチドやタンパク質のコンホメーション解析に有効である。

今までの研究に用いたモデルポリペプチドまたはオリゴペプチドの試料は、いずれも同一試料では一種類のコンホメーションしかとらないもの (あるいは二種類のコンホメーションが混在するもの) であった。しかしながら、化学シフトとコンホメーションと

固体高分解能NMR・ポリ (β -ベンジル L-アスパラテート) ・化学シフト・コンホメーション

あしかわ みきや、しょうじ あきら、おざき たくお、あんど う いさお

の関係をより明確にするためには、同一試料で複数のコンホメーションをそれぞれとるようなポリペプチドを用いて研究を行うことが必要である。この点で、ポリ (β -ベンジル L-アスパラテート) は、同一試料から溶媒処理や熱処理を行うことにより、右巻 α -ヘリックス (α_R -helix)、左巻き α -ヘリックス (α_L -helix)、左巻き ω -ヘリックス (ω_L -helix)、および逆平行 β -シート (β -sheet) の四種類の異なるコンホメーションをとるため、研究対象として優れている⁵⁻⁷⁾。特に、今までは、調べたコンホメーションは α_R -helix と β -sheet 形が中心であったが、ここでは α_L -helix や ω_L -helix 形等のコンホメーションについても議論できる。更に、これまでは主にアルキル側鎖をもつアミノ酸残基について調べてきたが、側鎖にベンジルエステル基を持つアミノ酸残基での¹⁵N 化学シフトの実験結果は重要であると考えられる。

そこで本研究では、¹⁵N 標識 β -ベンジル L-アスパラギン酸残基を含むポリ (β -ベンジル L-アスパラテート) [Asp(OBzl)*]_n を合成し、これを溶媒処理または熱処理して得た四種類のコンホメーション (α_R -helix、 α_L -helix、 ω_L -helix、 β -sheet) について¹⁵N 化学シフト (σ_{iso} , σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) を測定し、¹⁵N 化学シフトとコンホメーションとの関係を調べた。

2. 実験

2-1 試料

本研究で用いた [Asp(OBzl)*]_n の試料は、N-カルボキシアミノ酸無水物 (NCA) 法により合成した。得られた試料には 99% ¹⁵N 標識アミノ酸が約 20% 含まれている。各コンホメーションの試料は、(1) 合成して得たそのままのもの (α_R -helix)、(2) クロロホルム溶液から溶媒をキャストしたフィルム (α_L -helix)、(3) 合成試料を 150°C で 3 時間熱処理したもの (ω_L -helix)、および (4) 合成試料を 220°C で 2 時間熱処理したものの (β -sheet) である。各試料のコンホメーション解析は ¹³C CP-MAS NMR スペクトルと赤外吸収スペクトルにより行った。

2-2 測定

¹⁵N および ¹³C CP-MAS NMR スペクトルの測定は、JEOL EX-270WB 分光計により、27.4 MHz (¹⁵N 核) および 67.8 MHz (¹³C 核) で測定した。NMR スペクトルの測定条件は、接触時間: 2 ms、繰返し時間: 5 s、90° パルス幅: 3.0~5.8 μ s、スペクトル幅: 20 kHz、データポイント: 8K、積算回数: 200~15000 回であった。¹⁵N 化学シフトは ¹⁵NH₄NO₃ を外部基準 ($\delta = 0$ ppm) とし、¹⁵NH₄Cl ($\delta = 18.0$ ppm) を二次基準とした。

赤外吸収スペクトルは、JASCO A-702 分光計を用い、KBr 錠剤法およびフィルム法により 4000-200cm⁻¹ の範囲で測定した。

3. 結果および考察

3-1 [Asp(OBzl)*]_n のコンホメーション解析

溶媒処理または熱処理によって得た 4 種類の試料の固体コンホメーションは赤外吸収スペクトルと ¹³C CP-MAS NMR スペクトルにより確認した。

ポリペプチドの赤外吸収スペクトルによるコンホメーションの確認は、主に、アミド I および II バンドより行った： α_R -helix (アミド I: 1660 cm^{-1} 、アミド II: 1555 cm^{-1})、 α_L -helix (アミド I: 1663 cm^{-1} 、アミド II: 1557 cm^{-1})、 ω_L -helix (アミド I: 1675 cm^{-1} 、アミド II: 1533 cm^{-1})、 β -sheet (アミド I: 1638 cm^{-1} 、アミド II: 1520 cm^{-1})。

次に、固体高分解能 ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルの測定結果に基づいて、ポリペプチドの主鎖カルボニル (アミド) ピーク、主鎖 C_α ピーク、および側鎖 C_β ピークの ^{13}C 化学シフトよりコンホメーションを解析した： α_R -helix (アミド CO: 175.1 ppm、 C_α : 54.2、 C_β : 35.9)、 α_L -helix (アミド CO: 172.0 ppm、 C_α : 52.1、 C_β : 35.3)、 ω_L -helix (アミド CO: 172.3 ppm、 C_α : 52.5、 C_β : 34.4)、 β -sheet (アミド CO: 171.0 ppm、 C_α : 51.1、 C_β : 39.36)。

以上のように、本研究で用いた $[\text{Asp}(\text{OBzl})]_n$ の四種類の各試料は、目的のコンホメーションをもつことが確認できた。

3-2 Asp(OBzl) 残基の ^{15}N 化学シフト (σ_{iso} , σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})

四種のそれぞれ異なるコンホメーションをとる $[\text{Asp}(\text{OBzl})]_n$ の ^{15}N CP-MAS NMR スペクトルを Figure.1 に、また、得られた σ_{iso} 値を Table.1 に示す。その結果、次の点が明らかになった：(1) α_R -helix (99.2 ppm) は β -sheet (100.4 ppm) より 1.2 ppm 高磁場に現われる。この傾向は、これまで行ったアルキル側鎖を持つアミノ酸残基の σ_{iso} の場合と良く一致している。(2) α_R -helix (99.2 ppm) は α_L -helix (97.0 ppm) より 2.2 ppm 低磁場にシフトしている。これは、ポリ (D-アラニン) の左巻 α -ヘリックスに巻こまれた L-Ala 残基の結果 (α_R -helix: 98.8 ppm、 α_L -helix: 96.7 ppm) と同様であった。従って、Asp(OBzl) 残基の σ_{iso} はヘリックスセンスに関する情報を提供すると考えられる。(3) ω_L -helix (96.8 ppm) は α_L -helix (97.0 ppm) の値と非常に近い。これは、両コンホメーションの類似した捩れ角を反映したものであろうと考えられる。

Table.1 Isotropic ^{15}N chemical shifts of $[\text{Asp}(\text{OBzl})]_n$ with various conformations (α_R -helix, α_L -helix, ω_L -helix, β -sheet). (ppm from $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$, ± 0.5 ppm)

sample	conformation	σ_{iso} (ppm)
PBLAsp	α_R -helix	99.2
PBLAsp-1	α_L -helix	97.0
PBLAsp-2	ω_L -helix	96.8
PBLAsp-3	β -sheet	100.4

また、 $[\text{Asp}(\text{OBzl})]_n$ のそれぞれのコンホメーションと ^{15}N 化学シフトテンソル (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) との関係については講演において詳細に発表する。

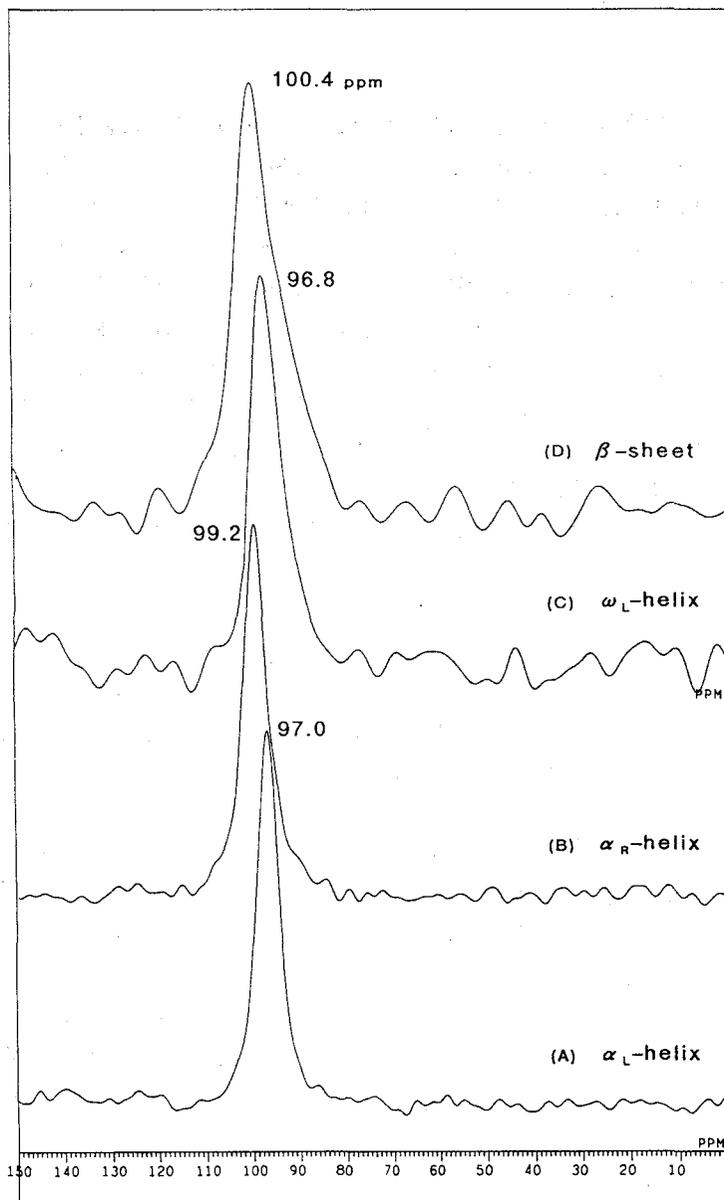


Figure.1. 27.4 MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectra of poly(β -benzyl L-aspartate) in the solid state; (A) α_{L} -helix, (B) α_{R} -helix, (C) ω_{L} -helix, and (D) β -sheet)

文献

- 1) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; I. Ando, *Macromolecules*, 1987, 20, 2441-2445.
- 2) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; S. Ando; I. Ando, *Macromolecules*, 1989, 22, 2860-2863.
- 3) A. Shoji; T. Ozaki; T. Fujito; K. Deguchi; S. Ando; I. Ando, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 4693-4697.
- 4) 莊司、尾崎、藤戸、出口、安藤：第28回 NMR 討論会講演要旨集、(1989) 5-8.
- 5) H. Saito; R. Tabeta; I. Ando; T. Ozaki; A. Shoji; , *Chem. Lett*, 1983, 1437-1440.
- 6) T. Akieda; H. Mimura; S. Kuroki; H. Kurosu; I. Ando, *Macromolecules*, 1992, 25, 5794-5797.
- 7) H. Kyotani; H. Kanetsuna, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, 1972, 10, 1931-1939.

固体NMRによるアスパルテーム結晶の構造研究
 -分子動力学計算によるスペクトルの解釈-

(味の素(株)・中研) ○海老沢計慶、鈴木榮一郎、福原健一、公文 哲、
 (北里大・薬) 米田茂隆、梅山秀明

Structural Studies on Aspartame Crystal by Solid State NMR
 - Spectral Interpretation by Molecular Dynamics Simulation -

Kazuyoshi Ebisawa*, Eiichiro Suzuki*, Ken-ichi Fukuhara*, Satoshi Kumon*
 Sigetaka Yoneda**, Hideaki Umeyama**

* Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

** School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University

In these years we have studied the crystal structure of Aspartame (AP) by using CPMAS ^{13}C -NMR, and could have determined almost the all carbon signal assignments. Considering the X-ray crystal structure, these assignments were reasonable except the amide carbonyl carbon (signal 4 in fig.1), which was observed as a doublet. That should be observed as a singlet, because AP has only one conformation in this crystal form (IIA). A reasonable answer to this problem was found by Molecular Dynamics (MD) simulation of AP crystal and a consistent ^{15}N -NMR result was obtained. The details will be presented in this symposium.

【緒言】

我々は、アスパルテーム (L- α -aspartyl-L-phenylalanine methylester、以下、AP) の結晶構造について、既に、本討論会において、 ^{13}C -固体高分解能NMRを用いた構造研究の経過を報告してきた¹⁾。その際、各シグナルの帰属については、溶液状態での完全帰属を基本に、結晶状態における重水素(D)化やアミド結合部の重窒素(^{15}N)化などの影響を調べることで、ほぼ全てのシグナルの帰属を終了している。また、AP結晶には、異なったコンフォーマーに基づく結晶多形が知られており、X線結晶構造解析の結果、I A晶については、結晶中に3種のコンフォーマーが存在すること、またII A晶については、結晶内のコンフォメーションが同一であることが分かっている。そこで、これらの知見と固体NMRによる各種の検討結果を総合することで、各々のスペクトルについて、全体としては、統一的な解釈が成り立つことを報告してきた。但し、II A晶のアミド結合部のカルボニル炭素については、fig.1に示すように、固体NMRシグナルの先端が2本に分裂しており、結晶内のコンフォメーションが同一であるというX線解析の結果では、単純に解釈できないため、課題となっていた。

一方、APの結晶状態における安定構造などを研究する目的で、II A晶の構造シミュレーションを行った結果、上記の課題に対して、1つの合理的な解釈を見出すことができた。即ち、II A晶では単位格子中に4分子のAPと2分子の結晶水が存在するため、結晶水の位置が原理的に、AP分子の対称性を崩すことになるが、X線解析では、空間平均を観測していたため、4分子は同一のコンフォーマーとして解析された、という解釈が得られたので報告する。

(KEY WORD) アスパルテーム、固体高分解能NMR、構造シミュレーション、

○えびさわ かずよし、すずき えいいちろう、ふくはら けんいち、くもん さとし
 よねだ しげたか、うめやま ひであき

【方法】

固体NMR測定には、JEOL EX-270 及び EX-400を使用した。また、II A晶の結晶構造には、ケンブリッジ結晶データベースに登録されているX線データをモデルとして利用し、構造シミュレーションには、北里大・梅山研で開発されたプログラムであるAPRICOTを結晶用にバージョンアップしたものをを使用した。

【結果】

1) II A晶の構造シミュレーションに関して

①結晶状態におけるAP分子の動的な揺らぎの大きさは、X線構造解析に基づく温度因子の値をよく再現していることが明かとなった。従って、本研究による構造シミュレーションの結果は、以下の議論においても、十分、信頼し得る情報を与えるものと考えられる。

②APのアミド結合部のカルボニル炭素は、結晶内で分子間水素結合を形成している。

構造シミュレーションの結果、この分子間水素結合の平均的な距離は、結晶水の対称性を反映して、2種類の状態を実現することが明らかとなった。

2) ^{15}N -CPMAS 測定による II A晶の窒素シグナルの観測

II A晶が上記のように、実際 2種類の分子間水素結合距離を有しているとすれば、そのアミド窒素の固体NMRシグナルも 2種類、観測される可能性がある。そこで、 ^{15}N -CPMAS 測定により、II A晶の窒素核の固体NMRシグナルの観測を行ったところ、アミド窒素のシグナルは、アミノ基の窒素のシグナルに比べ、約2倍の線幅であることが分かり、アミド窒素の領域には、2種類のシグナルが重なっていることが示唆された。これは、 ^{13}C -CPMAS および上記の計算結果と符号するものである。

【考察】

II A晶の構造シミュレーションの結果、アミドのカルボニル炭素シグナルの分裂は、結晶内の水素結合状態が結晶水の対称性の影響を受け、2種類存在することによるものであることが示唆された。この場合、2種類の水素結合距離の差は、約0.1Åであり、結晶構造の対称性の偏りは非常に小さいものである。従って、マクロに見れば、X線解析の結果は妥当であり、実際、他の固体NMRシグナルについては、前述のように、解釈上の問題はない。しかし、分子間水素結合のネットワークを形成しているアミド結合部のカルボニル炭素では、その結合距離の微小な変化が固体NMRシグナルに反映し、2状態を示している点は非常に興味深い。また、 ^{15}N -CPMASの結果は、 ^{13}C -CPMASの結果ほど、シグナル分離が明瞭ではないが、両者は同じ状態に起因するものとして、統一的に解釈できる点が重要である。

【文献】

- 1) 第30回NMR討論会要旨集(p.269) (1991)
- 第31回NMR討論会要旨集(p.263) (1992)

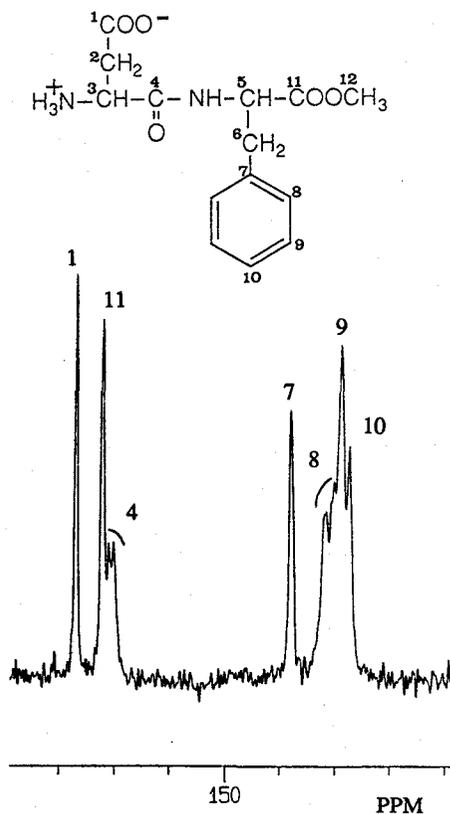


fig.1 II A晶の ^{13}C -CPMAS

液晶NMR法の改良と応用. マジック角近くでの試料回転と
二次元NMR

(阪大・薬) 鹿野哲司、高木達也、木村敦臣、○藤原英明

Development and Application of the Liquid Crystal NMR.
Sample Spinning at Near Magic-Angle and 2D NMR

Tetsushi Kano, Tatsuya Takagi, Atsuomi Kimura, and
○Hideaki Fujiwara

Faculty of Pharmaceutical sciences, Osaka University

A new version of the liquid crystal NMR spectroscopy has been developed which utilizes sample spinning at near magic-angle. Two dimensional NMR were measured under near magic-angle spinning for tyramine dissolved in a lyotropic liquid crystal, for which normal ^1H NMR spectra were heavily complicated and overlapped preventing a successful spectral simulation by a program including direct couplings. The J-resolved 2D spectra showed well resolved multiplet patterns for each methylene and aromatic protons.

The Liquid Crystal Near Magic-Angle Spinning 2D NMR (LC/NMAS 2D NMR) is expected to be applied more widely, withdrawing the restrictions hitherto observed in the original liquid crystal NMR.

液晶NMR法は、液晶ではあるが溶液内の精密な化学構造を与える点で他の構造解析法と著しく異なる。液晶内の溶存分子は固体と比べて比較的自由に運動しているが、特定方向の運動が優勢となるために核間の直接結合定数(D)がゼロとならない。このDは構造情報を直接的に含んでいるので、Dの値より液晶内の溶液構造を知ることができる。このような構造は安定構造の研究や、特にリオトロピック液晶の場合には、生体内構造の研究に興味ある情報を提供してくれる。ところで、Dの値をスペクトルから読みとるには、複雑なスペクトル解析が必要となることが多い。著者らは、既にいくつかの比較的大きな分子(特に医薬品関連分子)について、このような解析例を報告してきた。また、国内でも、このような研究例は最近増えつつある。

本報告では、複雑なスペクトル解析の一助として、また液晶NMR法の汎用性を高めることを目的として、液晶試料の Magic-Angle 近くでの回転によるDの大幅な減少を利用し、二次元NMRの測定法を種々検討した。用いたサンプルはチラミン (Fig. 1) である。

キーワード: 液晶NMR、二次元NMR、マジック角回転、チラミン

かの てつし、たかぎ たつや、きむら あつおみ、○ふじわら ひであき

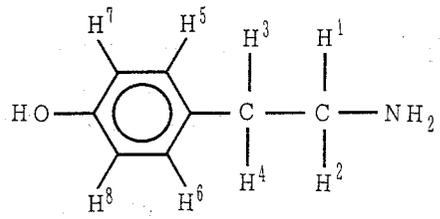


Fig. 1 チラミン分子

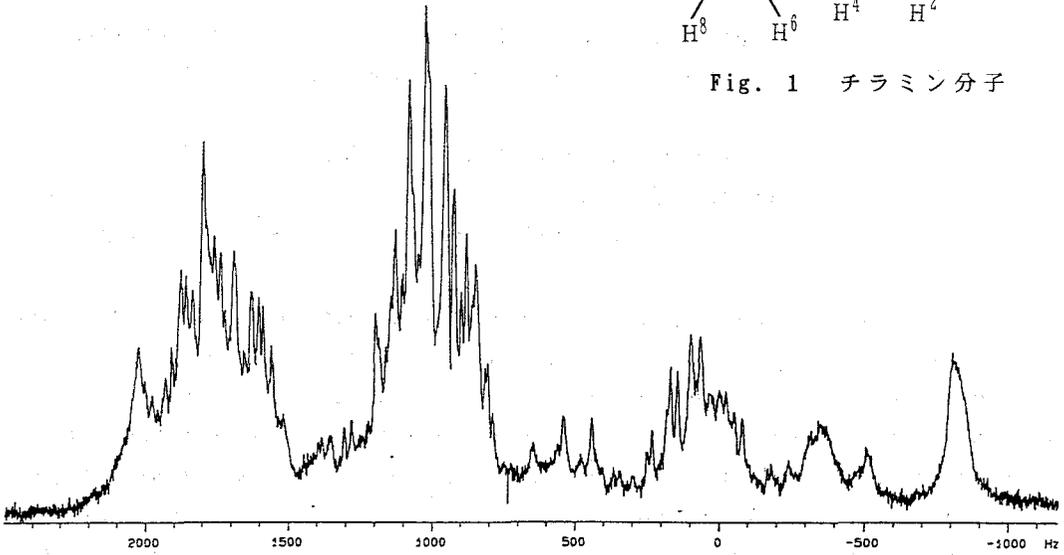


Fig. 2 リオトロピック液晶中のチラミンの¹H NMR スペクトル

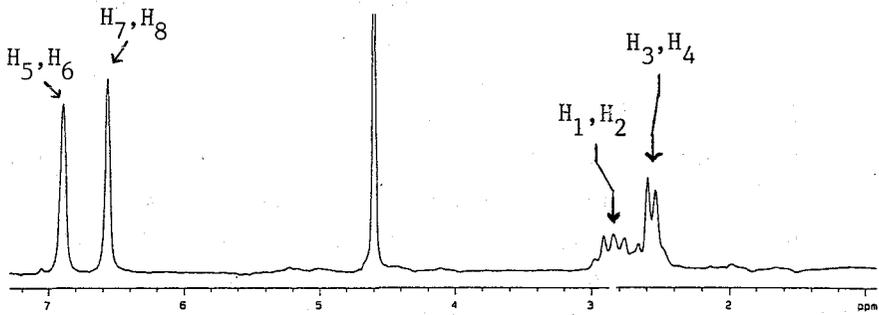


Fig. 3 Magic Angle + 2° の角度で回転した試料の¹H スペクトル

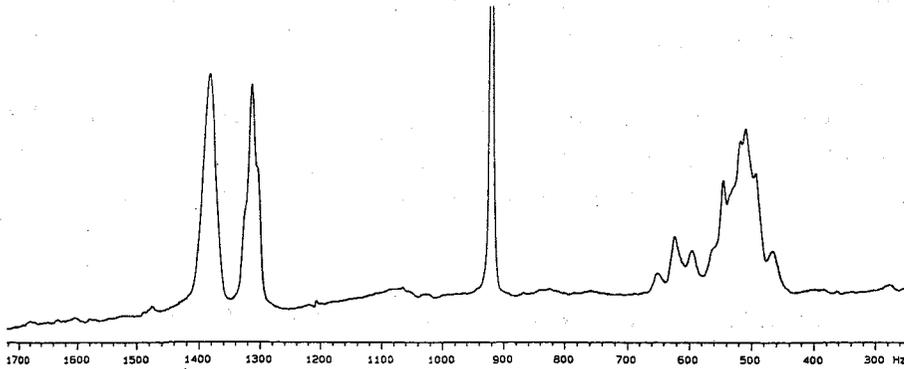


Fig. 4 Magic Angle + 8° の角度で回転した試料の¹H スペクトル

[実験] 液晶にはリオトロピック液晶を選んだが、通常のこの種の液晶はHを多く含み Magic-Angle 近くでの試料回転により溶媒の信号が強くなることを避けるため、Hを含まない Cesium Perfluorooctanoate を主成分とする系を用いた。試料回転には市販の CP/MAS 固体測定プローブを用い、Varian VXR200 分光器により 200 MHz にて ^1H NMR を測定した。この時の回転数は数百 Hz である。温度制御は、試料回転用の空気を 27 ° C 付近で一定にコントロールすることにより行った。また溶媒の D_2O 信号に Lock をかけた。

[結果と考察] チラミンの液晶中の ^1H NMR スペクトルは Fig. 2 のようであり、配向パラメーターの比較的小さい 8 スピン系となるので信号の重なりが著しく一部は幅広いピークしか与えず、このままでは詳しい解析は困難である。試料回転軸を Magic-Angle から 2° 大きい方向にずらせて測定したスペクトルは Fig. 3 となる。この図では 4 種類の ^1H が、殆ど 1st order に近いパターンとして観測される。Magic-Angle から 8° 大きい方向にずらせたスペクトル (Fig. 4) では、芳香族 ^1H 同士の間には D が見えている。また、メチレン部分は Fig. 3 と同様に高磁場側が quartet、低磁場側が doublet triplet であり、これらの重なりとして説明できる。Fig. 3 の条件下でシフト相関 (COSY) 二次元スペクトルを測定すると Fig. 5 となり、高磁場側のメチレン (H_3 , H_4) と芳香族プロトンとの間に交差ピーク (図中の○印) が明瞭に見られる。従って、スペクトルには明確に分裂は見えないが、これらの ^1H の間には有意の大きさの D があることが分かる。また、この交差ピークの出現は、 H_3 と H_4 がベンゼン環に近い方のメチレンであるとする帰属を支持している。

さらに同様の試料条件下で測定した J 分解 (hom2dj) スペクトルを Fig. 6 に示す。この図の multiplet が良く分かるようにスライス図形を示したのが Fig. 7 である。このように二次元測定することにより、一次元スペクトルでは磁場の不均一性のために観察出来なかった小さな分裂幅が明瞭に読み取れることが分かる。これらのパターンの解釈は、D による分裂が (通常の等方溶液のスペクトルでは) 等価と見なせる核の間にも実際に働くことを考慮して行われなければならない。例えば、メチレンプロトン同士の D も分裂パターンに大きく影響し、 H_3 と H_4 が基本パターンとして大きな D による doublet を示すのもこの D による。

芳香環プロトンの J 分解スペクトルにおける分裂パターンは特徴的である。高磁場側の芳香環プロトンは二つの D による doublet doublet パターンを示す。低磁場側のピークについては、一見 doublet であるが、符号の異なる D による doublet doublet の結果として、内側のピーク強度がかなり弱く出ていると解釈できよう。

以上の一次元および二次元 NMR スペクトルを LAOCN 等のプログラムを用いて詳細に解析することは、現在進行中である。スピン系の増大や信号の重なり等のために一次元スペクトルから D の値が決められない場合でも、液晶の Near Magic-Angle Spinning 二次元 NMR (LC/NMAS 2D NMR) により、必要な D の値が得られると期待される。どこまで複雑な系を扱い得るかは、今後種々の化合物を取り上げることにより追求して行きたい。

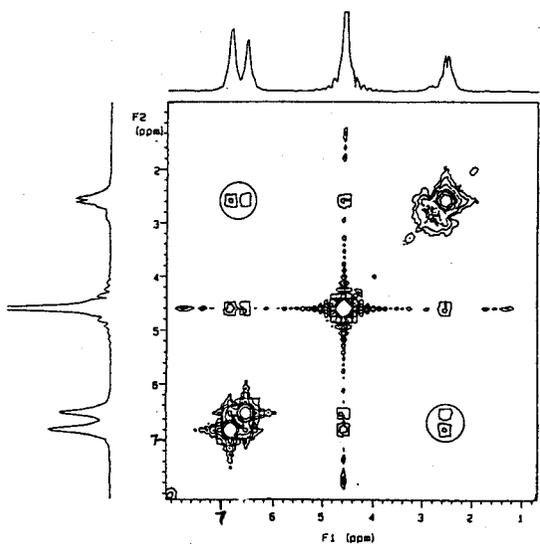


Fig. 5 シフト相関 (COSY) スペクトル.
試料は Fig. 3 と同じ条件

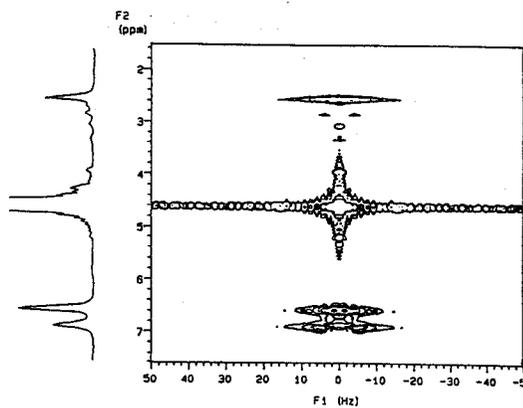


Fig. 6 J 分解 (hom2dj) スペクトル

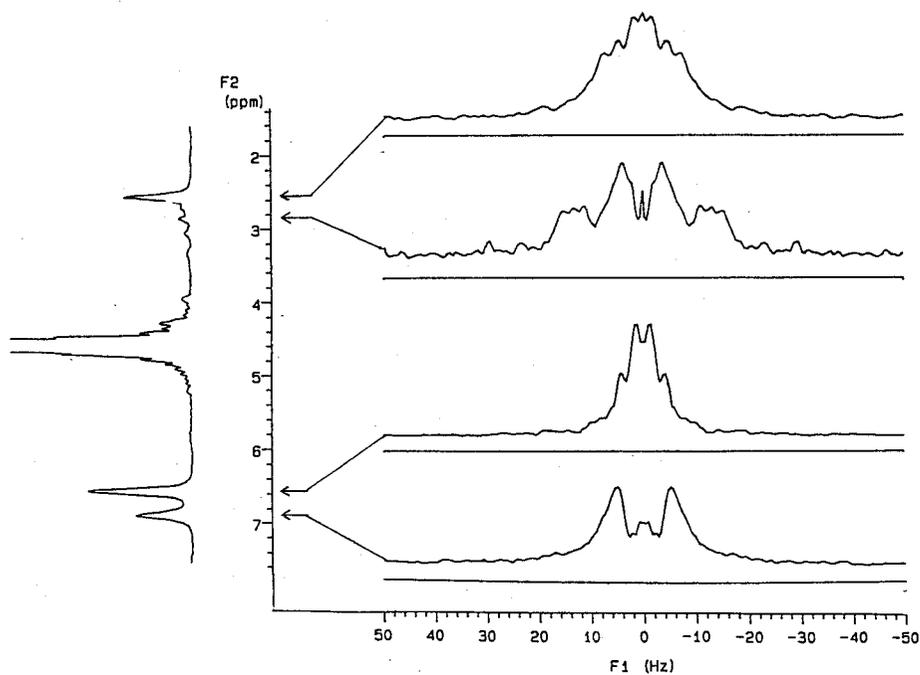


Fig. 7 J 分解スペクトルにおける各ピークの分裂パターン

ポスターセッション

P 1 ~ P69

○ 入口 紀男

シーメンス旭メディテック株式会社 開発製造本部

The Sensitivity of Magnetic Resonance Experiments

○ Norio Iriguchi

Siemens-Asahi Medical Technologies Limited

When the sample is conductive, noise is caused by randomly fluctuating currents in the sample. The inclusive resistance can be defined by $R = R_c + R_i$, where R_c is the coil resistance and R_i the sample inductive resistance. Any noise contribution from dielectric loss is neglected. On the basis of formulae given by Hoult and Lauterbur, these resistances are expressed as $R_c = \alpha \omega_o^{1/2}$ and $R_i = \beta \omega_o^2$. Both α and β depend upon the coil and sample geometries. In addition, α depends upon the coil conductivity, and β upon the conductivity of the sample. For low-loss samples ($\alpha \omega_o^{1/2} \gg \beta \omega_o^2$), the SNR (signal-to-noise ratio) $\phi \propto \omega_o^{3/4} \gamma = B_o^{3/4} \gamma^{3/4}$. For high-loss samples ($\alpha \omega_o^{1/2} \ll \beta \omega_o^2$), $\phi \propto \omega_o \gamma = B_o \gamma^2$. For physiological tissues, since the specific conductivity σ varies with frequency, the factor must be included in discussing the SNR.

核スピンの数が同じであるとき、磁気共鳴の検出感度は、 $\gamma \omega_o^2 I(I+1)$ に比例するものと考えられている。一方、 $\omega_o = \gamma B_o$ であるから、検出感度は $\gamma^3 I(I+1) B_o^2$ に比例し、もし磁束密度 B_o が一定なら、磁気共鳴の検出感度は $\gamma^3 I(I+1)$ に比例すると考えられている。様々な核種について、 γ と I の値から検出感度の表が作成されて参照されている。例えば、 ^{13}C は、 ^1H に対して1.6%の検出感度を有することになっており、そのことは広く信じられている。ところが実際には、 ^{13}C は ^1H に対して2~6%以上の検出感度を有している。その理由は、検出には、実験系に固有の雑音が伴うからである。 ^1H には高周波ゆえに ^{13}C よりも大きな雑音が伴い、相対的に ^{13}C の検出感度は従来考えられていたよりも高い。(あるいは、 ^1H の感度は、従来考えられていたよりも低い。)

SNR(signal-to-noise ratio)、サンプル損失抵抗、導電率
いりぐち のりお

コイルに単位電流を流して磁界 B_1 が発生するとき、逆に単位体積の核スピンの磁界 B_1 の照射を受けてそのコイルに誘導される起電力(EMF)は、 $\xi_s = -(\partial/\partial t)(B_1 \cdot M_0)$ で表される。⁽¹⁾ 単位体積の磁化のベクトルは、 $M_0 = n \gamma^2 \hbar^2 I(I+1)/(3kT_s)$ である。 n は単位体積のスピン数、 γ は磁気回転比、 I はスピン量子数、 k はボルツマンの定数、 T_s はサンプルの温度である。スピンの90°パルスを受けるとき、EMFのピーク値は、 $\xi_s = \omega_0^2 n \gamma \hbar^2 I(I+1)B_1/(3kT_s)$ であり、 ω_0 はラーモア角周波数である。一方、雑音EMFの実効値は、 $\xi_n = (4kT \Delta f R)^{1/2}$ で与えられる(Δf は受信帯域幅、 R は温度 T における有効抵抗値)。

サンプルが導電性を有するとき、サンプル中には熱雑音が発生する。総合的な抵抗値は、 $R = R_c + R_s$ で定義され、 R_c はコイルの抵抗、 R_s はサンプルの誘導抵抗である。誘電損失は無視される(コイルの設計に依存し小さくされ得る)。HoultとLauterburの式によって、抵抗値は、 $R_c \propto \alpha \omega_0^{1/2}$ および $R_s \propto \beta \omega_0^2$ と表される。⁽²⁾ 単位帯域幅あたりの信号雑音比(SNR) ϕ は、 $\phi = T_2^{1/2} \xi_s / (2^{1/2} \xi_n)$ より⁽³⁾

$$\phi \propto T_2^{1/2} n \omega_0^2 \gamma I(I+1) (\alpha \omega_0^{1/2} + \beta \omega_0^2)^{-1/2}$$

と表される。⁽⁴⁾ 定数 α と β は、コイルとサンプルの形状と寸法に依存する。 α は、コイルの導電性にも依存し、 β は、サンプルの導電性にも依存する。特に、生体組織においては、導電率 $\sigma(\Omega^{-1}\text{m}^{-1})$ は測定周波数によってはほぼ対数的に変化し、数100MHzにおける固有抵抗は、数MHzにおける固有抵抗よりも2~4倍高い傾向にある。⁽⁵⁾ 次の表は、以上を考慮した多核種に関するNMRの相対検出感度表である。

Nucleus	I	γ $10^7 \text{rad} \Gamma \text{s}^{-1}$	SNR at a given field			
			SNR at a given freq.	Low-loss	High-loss ($\alpha \omega_0^{1/2} \ll \beta \omega_0^2$)	
				($\alpha \omega_0^{1/2} \gg \beta \omega_0^2$)	$\sigma = \text{const.}$	$\sigma \propto \log \omega_0$
			$\gamma^2 I(I+1)$	$\gamma^2 I(I+1)$	$\gamma^2 (\log \gamma)^{-1/2} I(I+1)$	
¹ H	1/2	26.75	1	1	1	1
¹⁹ F	1/2	25.2	0.94	0.85	0.89	0.90
³¹ P	1/2	10.8	0.40	0.083	0.16	0.19
⁷ Li	3/2	10.4	1.9	0.37	0.76	0.90
¹¹ B	3/2	8.58	1.6	0.22	0.51	0.63
²³ Na	3/2	7.08	1.3	0.13	0.35	0.45
¹³ C	1/2	6.73	0.25	0.023	0.063	0.083
² H	1	4.11	0.41	0.015	0.063	0.096
¹⁷ O	5/2	3.63	1.58	0.048	0.22	0.35
¹⁵ N	1/2	2.71	0.10	0.0018	0.010	0.018
¹⁴ N	1	1.93	0.19	0.0019	0.014	0.031

1. D.I.Hoult and R.E.Richards, *J.Magn.Reson.*24:71,'76
2. D.I.Hoult and P.C.Lauterbur, *J.Magn.Reson.*34:425,'79
3. R.R.Ernst and W.A.Anderson, *Rev.Sci.Instr.*37:93,'66
4. N.Iriguchi, *J.Appl.Phys.*73:2956,'93
5. H.P.Schwan and K.P.Foster, *Proc.IEEE.*68:104,'80

磁場勾配パルスを用いたHMBC法

-天然存在 ^{15}N スペクトル解析への応用-

○ 鶴澤 洵、内海博明^{a)}、越野広雪、日元 徹^{a)}、安斎謙太郎^{b)}
(理研、日本電子^{a)}、理科大^{b)})

Pulsed Field Gradients HMBC Spectroscopy

-Application for Natural Abundance ^{15}N Spectroscopy-

Jun Uzawa, Hiroaki Utumi, Hiroyuki Koshino, Tetsu Hinomoto,
Kentaro Anzai

Recently, pulsed field gradients spectroscopy were widely applied for 2D NMR spectroscopy. In the case of HMBC, however, there are some introductory reports in spite of its usefulness for structural studies. In this symposium we report pulsed field gradients ^1H -Detected Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy (PFG-HMBC) of long-range proton-nitrogen correlation for natural abundance ^{15}N compounds (tubercidin cyclonucleoside, thiamine hydrochloride and nicotine).

In the PFG-HMBC spectra, useful cross-peaks were obtained and t1 noise were suppressed drastically.

1. 序文

最近、二次元NMRの分野で磁場勾配パルス (Pulsed Field Gradients、以下本文ではPFGと称す) によって特定のコヒーレンスを選択する測定法が実用化し、次々といろいろな測定法に適用されている。PFGでコヒーレンスの選択を行うことは二次元NMRの初期から提唱されてきたことであるが¹⁾、アクティブシールドされたプローブの開発によって初めて実用化が可能となった。PFGの基本的な特徴はコヒーレンスの選択性が著しく向上することである。

一方、HMBC (^1H -Detected Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy) 法は天然有機化合物の構造解析の分野で多用されている重要なNMR測定法である。この測定法のポイントは約99%を占める ^{12}C 核に結合した ^1H 核のシグナルを消去しなければならないことである。この目的のため現在まではパルスと積算の位相まわしの組み合わせで行ってきたが、PFGによるコヒーレンスの選択によりt1ノイズを減少させることができるはずである。しかしながら、PFGをHMBCと組み合わせた例は紹介程度で²⁾、具体的な応用例はない。演者らはPFGをHMBCパルス系列の中に組み込み、いくつかの化合物を例に測定条件等とその有効性を検討した。PFGを組み入れた ^{13}C - ^1H のHMBC法は試料の量によっては積算回数を大幅に節約できること、その時間の分はカラムポイントを増やして ^{13}C 側の分解能を向上させることができること、t1ノイズを劇的に減少させること等の長所を持っていることを確認した。

さらに、現在まで報告されていない ^{15}N - ^1H 間のHMBCスペクトルについて検討した。

キーワード：磁場勾配パルス、HMBC、N-15 NMR、シクロヌクオレシド、ニコチン

うざわじゅん、うつみひろあき、こしのひろゆき、ひのもとてつ、あんざいけんたろう

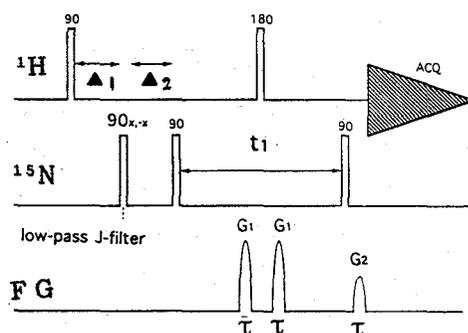
通常の ^{15}N - ^1H 間のHMBC法では ^{13}C の天然存在比が1.15%であるのに比べ、 ^{15}N では0.37%と約1/3であり、t1ノイズ等が大きく出る。さらに2~3ボンド隔てた窒素-水素間のスピン結合定数は炭素-水素間のそれに比べ小さくなり測定がさらに困難になる。そこで、PFG-HMBCを使うことによって観測されることを予想し試みた。

本討論会では、 ^{13}C - ^1H 間のPFG-HMBCによる応用例は省略し、 ^{15}N - ^1H 間のHMBC法により容易に測定できる例を挙げ、併せて測定条件など応用上の留意点を述べる。

2. 実験

NMR装置は特記しない図では日本電子製 $\alpha 600$ を用い、FGユニットとFGプローブ(5mm管H(X))を付属して使用した。PFG-HMBCのパルス系列は第1図の通りである。PFGの強度は、Z軸に最高144G/cmかけた。パルス長は0.6~1.8msとし、G1とG2の比は ^{13}C では2:1、 ^{15}N では4.94:1とした。

試料はシクロヌクレオシドは合成したもの³⁾、他は市販のものをそれぞれ溶媒に溶かして使用した。 ^{15}N の化学シフトはDMSOに溶解した $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ の値をOPPMとし、低磁場を+とした。



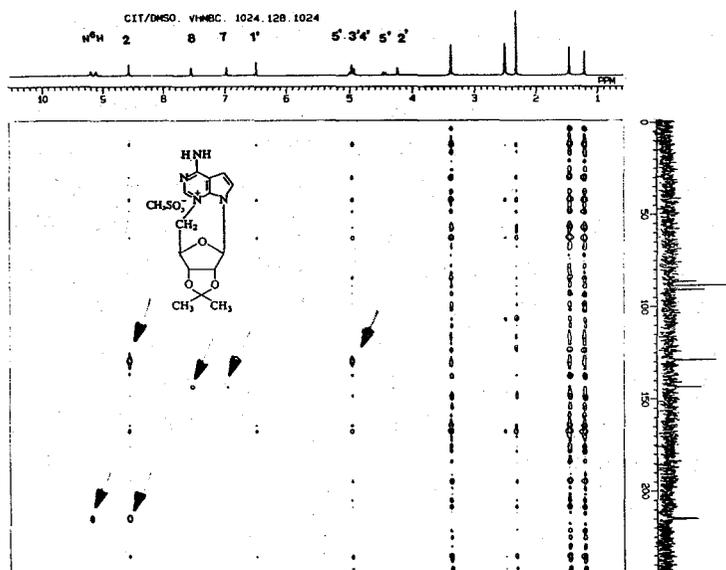
第1図 PFG-HMBCのパルス系列

3. ^{15}N - ^1H 間のHMBC法の応用

(1) シクロヌクレオシド 演者らは合成したいくつかのヌクレオシドの ^{15}N スペクトルを基本的なINEPT法や ^1H を選択的に励起したINEPT法によって構造と化学シフトおよびスピン結合定数について報告した⁴⁾。

第2図はその当時、同じ試料を使いPFGを用いないで測定した ^{15}N - ^1H HMBCスペクトルである。

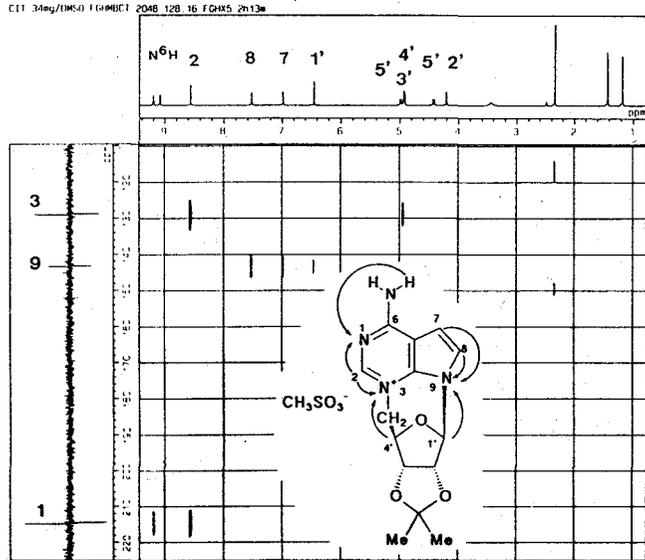
窒素原子と全く関係の無いメチル基等からのt1ノイズが大きく出ており、一次元スペクトル(17デカアプリケーション、約10時間)があるので、クロスピークとノイズを判別できるものの、一般的には ^{15}N - ^1H 間のHMBCスペクトルは使えないと判断し発表しなかったものである。



第2図 tubercidin cyclonucleosideの ^{15}N -HMBCスペクトル濃度は98mg/0.6ml、溶媒はDMSO、装置はGX-400にTHプローブで使用、測定時間約48時間

今回測定したPFG-HMBCスペクトルを第3図に示す。

t1ノイズのほとんどないクロスピークが得られるばかりでなく、第2図やINEPTでは観測されなかったH-1'からのクロスピークも得られた。2.2PPM付近のt1ノイズはメタンスルホン酸由来であり緩和時間が長く、パルス繰り返し時間を長くすれば消える。また、▲2を120msとし、17時間かけた結果ではH-2'からN-9、H-5'からN-3へのクロスピークの外、H-2からN-9やH-8からN3への4ボンド(W字型)スピン結合によるクロスピークも得られた。

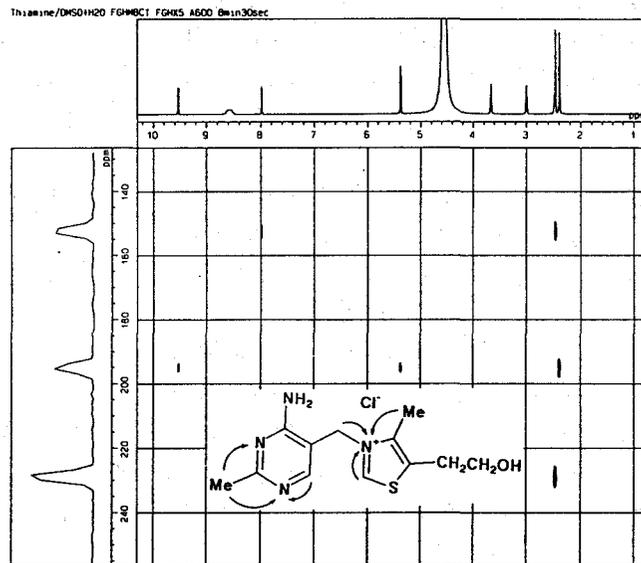


第3図 tubercidin cyclonucleosideのPFG¹⁵N-HMBCスペクトル 濃度は34mg/0.4ml、溶媒はDMSO、PFG強度36Gで1.2ms、測定時間は2時間13分

(2) チアミン チアミンのPFG¹⁵N-HMBCスペクトルを第4図に示す。¹⁵Nスペクトルはプロジェクションにより得た。

このように窒素を含む化合物では¹⁵N-¹H間の2ボンド～3ボンド隔てた結合状態が得られるので構造解析に役立つであろうし、今まで測定が困難であった窒素の化学シフトがプロジェクションにより容易にわかることにより分子間相互作用やプロトン化や酸化などの情報を得ることもできるだろう。

化学シフト値はあらかじめ同じ条件で測定した値である。



第4図 thiamine hydrochlorideのPFG¹⁵N-HMBCスペクトル 濃度は64mg/0.5ml、PFG強度72G/cmで0.8ms、積算回数は2回で測定時間8分30秒!

(3) ニコチン ニコチンには2個の窒素があり、性質が異なっているので興味をもつ

た。特にピロリジン環の窒素は多くのプロトンともスピン結合をする可能性はあるが、それはいずれも小さい値が予想される。低磁場部分に現れるピリジン環部分のクロスピークはシクロヌクレオシドやチアミンと同様の結果を示したので、第5図にPFG ^{15}N -HMB Cスペクトルの高磁場部分を示す。

プロトンの帰属は ^1H - ^1H COSYと ^1H - ^{13}C COSYにより行い、NOE差スペクトルにより立体構造を確認した。同一番号の ^1H は高磁場をa、低磁場をbとする。

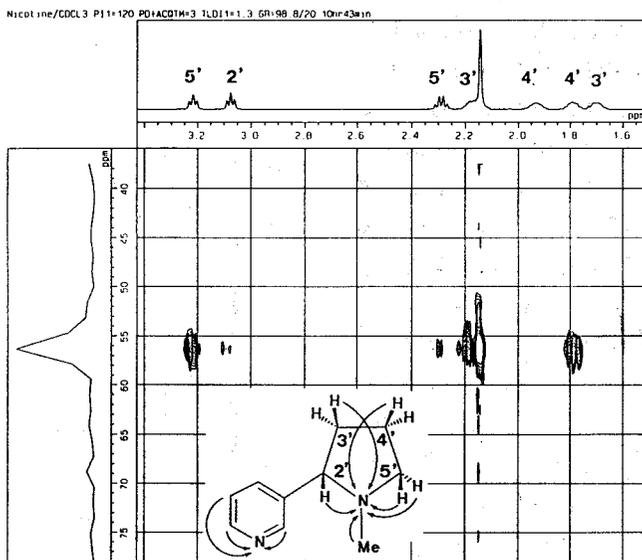
第6図にドライディングモデルによる立体構造とクロスピークの大きさについて検討した結果を示す。4'bと3'aからはクロスピークが無く、2'と5'aからは小さい。 ^1H - ^1H 間と同じくカープラスの関係が窒素-プロトン間にもありクロスピークの無いプロトンは窒素と90度の関係にある。小さいクロスピークのあるプロトンはいずれも窒素の隣の炭素に結合したプロトンで窒素のローンペアの方向とアンチの関係にあることがわかった。

4. 結論

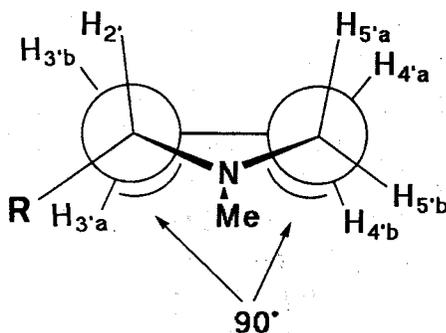
今回の報告が示すように、PFG-HMB C法は窒素含有化合物の研究にも極めて有用であり、この分野の研究に大いに貢献できるものと思われる。また、▲2を長くとれるようになり、Jの小さいX核- ^1H 間の相関でもt1ノイズの少ないクロスピークを観測できるようになった。4ボンドの J_{NR} が観測されたように、試料にもよるが2 Hz以下でも可能である。

以上の通り本法は極めて有用であり、今後大いに利用されるものと思われる。

- 1) A. Bax, P. G. Dejong, A. F. Mehlkopf and J. Smidt, Chem. Phys. Letters, 69, 567 (1980).
- 2) R. E. Hurd and B. K. John, J. Magn. Reson., 91, 648 (1991).
W. Willker and D. Leibfritz, Magn. Reson. Chem., 31, 287 (1993).
- 3) K. Anzai and M. Matsui, Agr. Biol. Chem. Japan, 37, 301 (1973).
- 4) J. Uzawa and K. Anzai, Liebigs Ann. Chem., 1195 (1988).
鶴澤、安斎 第26回NMR討論会講演要旨集41頁(1987).



第5図 nicotineのPFG ^{15}N -HMB Cスペクトル
濃度は約30%、溶媒は CDCl_3 、PFG-パルス
144Gで1.3ms、測定時間11時間



第6図 nicotineの立体構造

P3 1800℃まで昇温可能なNMR装置と無機化合物への応用

○前川英己、中尾俊章、*加藤智史、横川敏雄、**下川繁三
(北大・理・化学、*昭和電工(株)、**北大・工・NMRセンター)

Development of high temperature (1800°C) NMR apparatus
and its applications to inorganic materials.

○Hideki Maekawa, Toshiaki Nakao, *Satoshi Kato
Toshio Yokokawa, **Shigezo Shimokawa
Department of Chemistry, Hokkaido University
*Showa Denko Co. Ltd.
**NMR Laboratory, Hokkaido University

High temperature NMR probe attainable up to 1800°C which has an ability to measure less sensitive nuclei such as ^{29}Si is developed. A molybdenum wire is used as an electric heater which is wounded non-magnetically. The heater current is supplied by a stabilized DC power source. The electric power required for heating up to 1700°C is 600W. ^{23}Na and ^{27}Al NMR spectra of Albite melt have been recorded for the temperature up to 1700°C. The line width caused by the current flow was less than 40Hz for ^{23}Na NMR spectrum.

【序論】 最近、無機固体化合物の評価、構造解析にMAS、DAS法などの発展もあり、NMR法が用いられるようになってきた。それも、いろいろな温度、圧力条件下での測定が可能になってきつつある。無機固体あるいは液体化合物について、材料科学、地球科学などの側面から高温、高压状態での挙動を調べることは重要である。

無機化合物に対する高温下での高分解能NMR測定は、熔融塩や酸化物融体などの高温融体の構造と動的過程の研究、結晶の相転移のメカニズムの問題などに適応され成功をおさめている。現在、700℃まで昇温可能な高温MAS-NMRプローブは市販されているが、1000℃以上の高温下での無機化合物に適用できる高分解能NMRプローブは3グループによって独立に開発されている(1-3)。

Coteら(2)はレーザー加熱を用いて2000℃を越える温度下でのNMR測定に成功している。レーザー加熱方式を用いる利点は、電氣的な雑音なしに高温が得られること等であるが、均熱が得られない、正確な温度を制御しにくい、検出コイルの形状が制限されるため低感度核種の測定が出来ないことなどの種々の問題がある。われわれは、無機化合物中の ^{29}Si 、 ^{25}Mg 、 ^{17}O 等の低感度核種の1800℃までの温度範囲でのNMR測定が行えるこ

キーワード：高分解能多核NMR、高温(～1800℃)、固体無機材料、マグマ

○まえかわひでき、なかおとしあき、かとうさとし、よこかわとしを、しもかわしげぞう

とを目標に、電気加熱方式によるプローブを試作した。これにより、これまでの観測可能温度(1400℃)からさらに高温へ展開することが出来るようになり、対象とする物質系が拡張されることが期待される。

一方、代表的な高温液体であるケイ酸塩融体はマグマのモデル化合物と考えられる。マグマからの火成岩の生成等を考える際に融体の構造を理解することは重要であるが、各構成イオンの配位数など明らかになっていないことが多く、その構造は系統的に整理できていない。本研究では、ケイ酸塩融体の構造解析の他、ガラス-融体転移時の構造変化、高温での動的挙動などの情報を得ることを目指している。

【装置】 Brucker MSL200 wb(150mm) (北大工学部 NMR 研究室設置) に、自作の高温プローブを取り付けた。装置上の制限はNMRで用いる超伝導磁石の内部に非磁性材料で誘導磁場を持たない方法で電気炉を組み込む事である。発熱部分は、窒化ほう素製のヒーターホビンに発熱体線材を無誘導巻きした。線材としてはモリブデン、タングステン、タンタルを試し、発熱体周囲をモリブデン製の輻射シールドで二重に囲んだ。雰囲気はアルゴンあるいはアルゴン/水素混合ガスとした。同調回路部分、及びヒーター周囲は、それぞれ水冷されている。加熱は、直流安定化電源により行っており、試料部分が1700℃の時に、約600Wの電力が消費される。検出用コイルは、直径1mmのモリブデン線でソレノイド型である。

電気加熱方式による一番の問題は、ヒーター電流からくる磁場の揺動とそれにもなう分解能の低下である。本プローブでの1600℃でのAlbite(曹長石)融体の ^{23}Na 核のNMRスペクトルは単一のLorentz形で巾約40Hzであった。

【問題点】 何れの線材を用いても、窒化ほう素と発熱体の反応によるほう化物の生成、及び高温>2000℃による発熱体の劣化により使用可能な時間が1800℃で6~7時間と非常に短い。また、熱電対(W-Re)からのノイズが大きく、今のところ ^{29}Si 核の測定は難しい。今後、発熱体の形状、材質、測温法の変更などにより熔融シリカの ^{29}Si NMR信号を測定したい。現在、測温法を熱電対から放射温度計に変更し、またヒーター部分の形状を検討している。

references

- (1) Farnan, I. and Stebbins, J. F. J. Am. Chem. Soc., **112**, 32(1990)
- (2) Cote, B., Massiot, D., Taulelle, F., and Coutures, J.-P., Chem. Geol., **96**, 367(1992)
- (3) Shimokawa, S., Maekawa, H., Yamada, E., Maekawa, T., Nakamura, Y. and Yokokawa, T., Chem. Lett., 617(1990)

P4 磁場勾配パルスを用いた多次元nmr

○内海 博明、阿部 敦、山崎 千春、日元 徹、今成 司
(日本電子)

Multinuclear NMR using pulse field gradients

OHiroaki Utumi, Atsusi Abe, Tiharu Yamazaki, Tetsu Hinomoto
Mamoru Imanari
(JEOL)

Recent advances in pulse field gradient technology have led to the incorporation of pulse field gradients in many NMR experiments. PFG make it possible to decrease in the limited number of scan and t1 noise. Recent reports proposed free method of pure absorption PFG heteronuclear correlation spectra. We, therefore, propose a PFG-NOESY-HMQC, TOCSY-HMQC experiment in combination with the pure absorption methods.

序論

近年、磁場勾配パルスを用いたnmr測定が、行われるようになってきた。磁場勾配パルスを使うことに依って、多くの測定で最低積算回数やt1ノイズを減少させることができる。我々は、昨年主に1H観測異種核相関における磁場勾配パルスの使用について考察したが、今回、NOESY-HMQC, TOCSY-HMQCに代表される2核3次元に関して考察、実験を行ったのでそれを報告する。

磁場勾配パルスの3次元への利用法

現在発表されている、磁場勾配パルス(pulse field gradient)の使用法としては、大きく次の2種類に分けられる。

- a) コヒーレンス径路の選択を磁場勾配パルスを用いて行うことによって、主に不要信号の消去する。
- b) 磁場勾配パルスを高性能ホモスポイルパルスとして利用し、適切なタイミングに入れることによって、パルスの不完全性を補正し、主に最少積算回数の減少を計る。現在の所、DQF COSY等同種核相関測定及び天然存在比下のHMQC/HSQC等の異種核相関測定にはa)のコヒーレンス径路選択を主に使用し、¹³C、¹⁵Nをenrichした蛋白質等の3核3次元の実験においてはb)のパルスの不完全性の補正に主に使用している。

キーワード pulse field gradient, NMR, HSQC, pure absorption, 3次元NMR

○ひろあき うつみ、あつし あべ、ちはる やまざき、てつ ひのもと
まもる いまなり

る。

しかし、同じ3次元測定でもNOESY-HMQC, TOCSY-HMQCに代表される2核3次元測定における磁場勾配パルスは、a)のコヒーレンス径路の選択が主に用いられることが予想される。そこで、我々はこの2核3次元の実験における磁場勾配パルスの使用方法について考察した。

また、NOESY-HMQC, TOCSY-HMQC等の2核3次元の重要性は、これらの3次元のみが天然存在比下での測定の可能性がありそうなことである。今回これらの測定の有用性も合わせて考察してみたい。

磁場勾配パルスを用いた1H観測異種核相関スペクトルにおけるphase sensitive手法の考察。

まず、2核3次元のHMQCもしくはHSQC部分のphase sensitive手法に関して検討した。現在のところ、磁場勾配パルスを用いたコヒーレンス径路を選択しながらphase sensitiveにする方法は次の2種類が知られている。

- 1) コヒーレンス フィルタ-法
- 2) p-type, n-type を交互に測定しNagayama method もしくはStates methodの形式に変換する方法

この両方に関して、種々の測定条件を検討した。

まず、コヒーレンスフィルター法に関してはDavisらの提案したパルスシーケンスを試みてみた(fig.1)。この方法では、磁場勾配パルスを展開時間(t_1)にいないで ^{13}C の磁化が ^1H に戻される段階でコヒーレンスフィルターとして加えている。この方法を用いると通常のphase sensitiveの手法(tppi, States)が、そのまま使用できることを確認した。

つぎに、p-type, n-typeの絶対値2次元スペクトルを交互に測定する方法がある。この

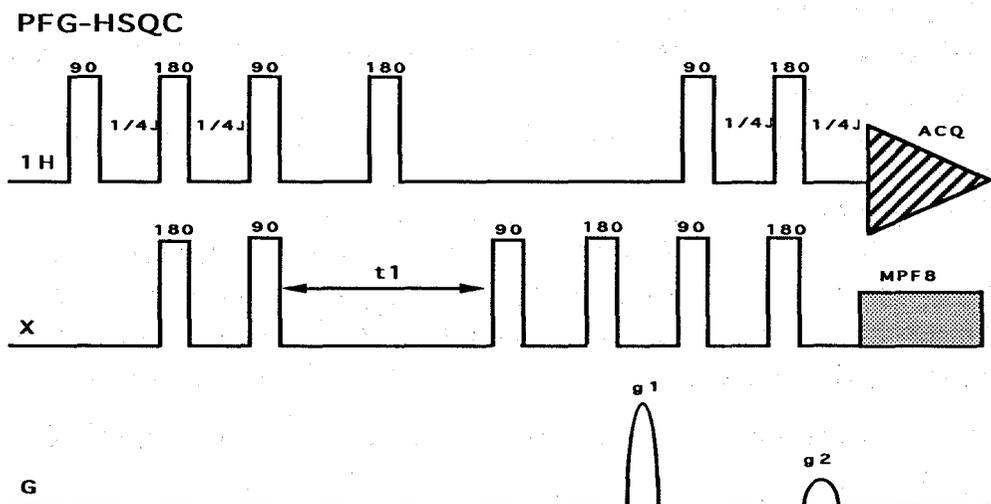


fig.1 PFG-HSQC pulse sequence /コヒーレンスフィルタ法

Nagayama method および、Statesフォーマットへの変換法の2種類の処理を行い、ほぼ同じ結果に成ることを確認した(fig3 ; Nagayama method ,fig.4 ; converion States method) .

今後、もう一つのコヒーレンスフィルター法との比較と2核3次元への組み込みを行う予定である.

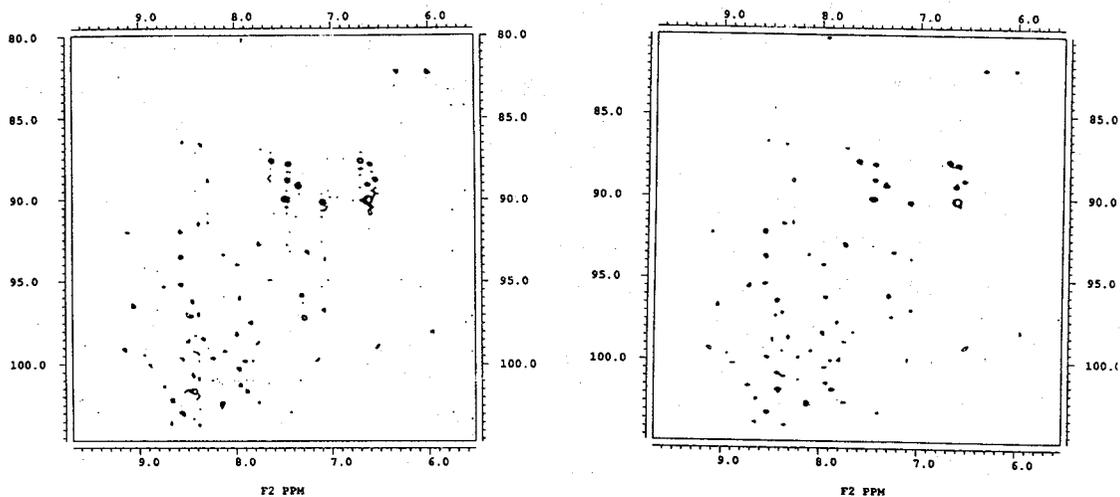


fig.3(左) 2mM 15N enrich ubiquitin(90%H₂O), pure absorption 1H-15N PFG-HSQC spectrum (nagayama method), fig.4(右) (converion States method).

文献

- L.E.Kay el , J.Am.Chem.Soc.,114.10663(1992)
- A.Ross el , J.Biomol.NMR .,3.215(1993)
- K.Nagayama , J.Magn.Reso.,66.240(1986)
- A.L.Davis el, J.Magn.Reso.,98.207(1992)

P5 ステアリン酸の固体構造研究における固体高分解能NMR法

(東工大工) 荒田晋・黒子弘道・安藤勲

Structural Study of Stearic Acid in the Crystalline State by ^{13}C CP/MAS NMR Spectroscopy

Susumu Arata, Hiromichi Kurosu and Isao Ando
Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of
Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152, JAPAN

The cross-polarization (CP) method has been widely applied to enhance the peak intensity for rare spins in the solid state. Magnetic dipolar interactions are dominant in solids containing ^{13}C and ^1H nuclei. The CP method utilizes such interactions to enhance the peak intensity. The interactions are well known to be proportional to R^{-6} , where R is the distance between nuclear spins. For this, it is possible to get information about the distance R through the observation of the peak intensity. According to this concept, in order to establish a methodology of determining R , the CP experiments of stearic acid were carried out, of which all the hydrogen atoms were substituted by deuterium except for carboxyl group. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of the deuterated stearic acid in the crystalline state were measured in order to elucidate the relationship between the peak intensity and the averaged distance R . From these results, it was found that the peak intensity of any specified carbon in the vicinity of carboxyl proton are decreased, in approximately proportion to R^{-6} , as R is increased.

1)はじめに

固体高分解能 ^{13}C NMRにおいて交差分極法 (CP法) は天然存在比の低い ^{13}C の信号を強調する手段として広く用いられている。一般に用いられる固体状態の ^1H - ^{13}C の系では、主要な相互作用は双極子-双極子相互作用である。CP法はこの相互作用を巧みに利用することにより ^{13}C スピン系と ^1H スピン系の間でエネルギーの移動を起こし、この結果として ^1H スピン系から ^{13}C スピン

低い ^{13}C の信号はHartmann-Hahnの条件が満たされている場合にはおよそ4倍に強調される。エネルギー移動の速さの目安となる交差緩和時間 (T_{CH}) はある程度双極子-双極子相互作用の強さを反映しており、理論的には

ステアリン酸/ 固体高分解能NMR/交差分極法 (CP法)

あらたすすむ くらすひろみち あんどういさお

次式に示すように $1/T_{CH}$ は双極子-双極子相互作用の二次モーメントに比例することが知られている。

$$T_{CH} = (1/2) \sin^2 \theta \sin^2 \theta_s M_{2,SI} J_x(\Delta \omega_{eff}) \quad (1)$$

従って、強調された ^{13}C の信号の強度から得られる $1/T_{CH}$ と ^{13}C と双極子-双極子相互作用している 1H との距離 R には $1/R^6$ に比例した関係があると考えられる。そこで、本研究では強調された ^{13}C の信号強度から 1H との距離についての知見を得ることを目的として、カルボキシル基のプロトン以外の全てのプロトンを重水素で置換したステアリン酸を用い、 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトル測定を行った。

2) 実験

試料としてFig.1に示すようなカルボキシル基の 1H を除いた全ての 1H を重水素で置換したステアリン酸試料およびprotonatedしたステアリン酸試料を結晶して用いた。

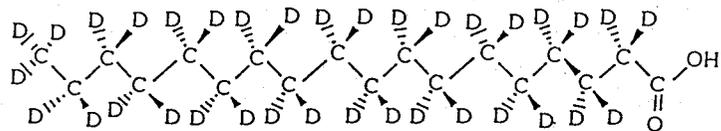


Fig.1 Structure of deuterated stearic acid.

ステアリン酸は結晶化条件によって多形を生ずることが知られている。本研究ではX線回折法によりこの構造解析が行なわれている結晶C-form(Fig.2)を融解後徐冷して調製した。得られた結晶がC-formであることを確認した。Fig.2からカルボキシルプロトンから各炭素までの平均距離 R を求めた。

固体高分解能CP/MASスペクトルは、日本電子製GSX-270分光器(観測周波数67.8MHz)を用い、コンタクトタイムを2-8 msまで変化させて測定した。これらのスペクトルに基づいてピーク強度をスペクトルシミュレーションにより決定した。

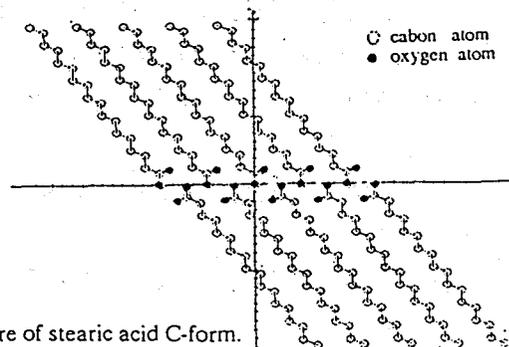


Fig.2 Crystal structure of stearic acid C-form.

3) 結果および考察

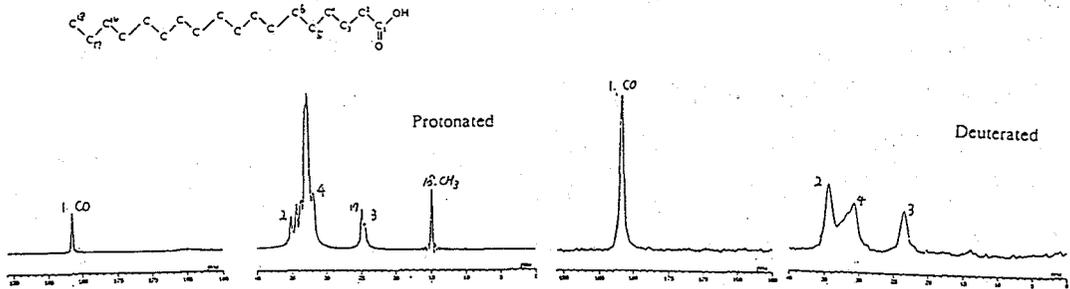


Fig.3 ^{13}C CP/MAS spectrum of protonated stearic acid C-form. Fig.4 ^{13}C CP/MAS spectrum of deuterated stearic acid C-form.

Fig.3にprotonatedステアリン酸の ^{13}C CP/MASスペクトル, Fig.4にdeuteratedステアリン酸の ^{13}C CP/MASスペクトルを示した。これらの図からわかるようにメチレンシグナル部分が両者で大きく異なっている。このは、protonatedステアリン酸のスペクトルでは全てのメチレンシグナルが現われているが、deuteratedステアリン酸のスペクトルではカルボキシルプロトンによるCPを受けているメチレン炭素のみが強調されていることによる。deuteratedステアリン酸のスペクトルにおいてどのメチレン炭素がカルボキシルプロトンによりCPを受けているかを解析するためにスペクトルシミュレーションした結果をFig.5に示した。

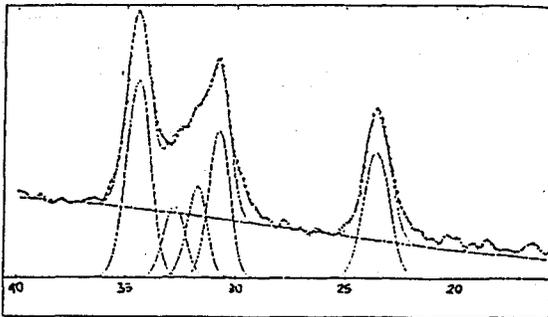


Fig.5 Observed and simulated spectra of the methylene carbons in stearic acid C-form.

この解析からカルボキシル炭素から5番目のメチレン炭素までCPによる効果が現われていることがわかる。Fig.6にこれらの炭素の信号強度がコンタクトタイムを変化させることによってどのように変化するかを示した。

これらのスペクトル解析から各炭素の化学シフト、相対強度、 T_{CH} と R^{-6} を求めた結果をTable 1に示した。なお各炭素の帰属は化学シフト、強度変化および R から行なった。

T_{CH} と R^{-6} の関係をFig.7にプロットした。この図からわかるように T_{CH} と R^{-6} は直線関係にあることがわかった。このことは、ステアリン酸結晶において式(1)が成り立つことが明かとなった。したがって、各炭素の T_{CH} を測定することによって結晶構造解析を行なうことが可能であることを示している。

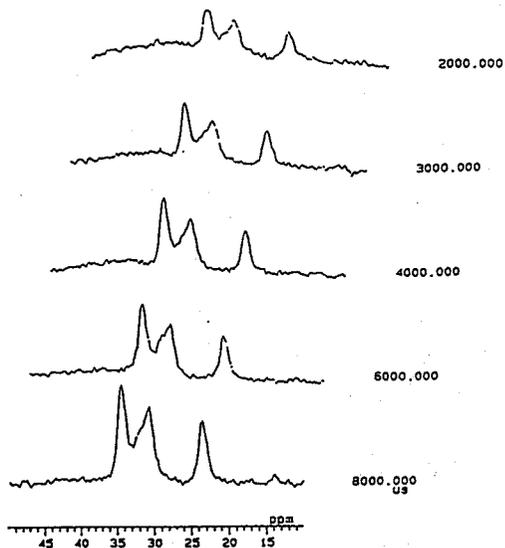


Fig.6 ^{13}C CP/MAS spectra of deuterated stearic acid C-form as a function of contact time.

carbon	chemical shift(ppm)	averaged r (Å)	T_{CH} (ms)
1(カルボキシル基)	181.7	2.84	1.23
2	34.5	3.76	1.96
3	23.6	4.70	3.31
4	30.8	5.02	3.53
5	31.9	6.03	5.29
6	32.8	6.56	7.56

Table 1 Determined chemical shifts, relative intensities, T_{CH} s and R^{-6} for deuterated stearic acid C-form.

参考文献

- 1) J.H.Van Vleck, *Phys.Rev.* 74,1168(1948).
- 2) D.Demco, J.Tegenfeldt, and J.S.Waugh *Phys.Rev.*11B,4133(1975).
- 3) C.H.Hlein Douwel, W.E.J.R.Maas, and W.S.Veeman, *Macromolecules.*23,408(1990)
- 4) C.P.Slichter, "Principle of Magnetic Resonance," 2nd ed. Springer-Verlag, Heidelberg, 1978.
- 5) M.Mehring, "High-Resolution NMR Spectroscopy in Solids." Springer-Verlag, Heidelberg, 1976.

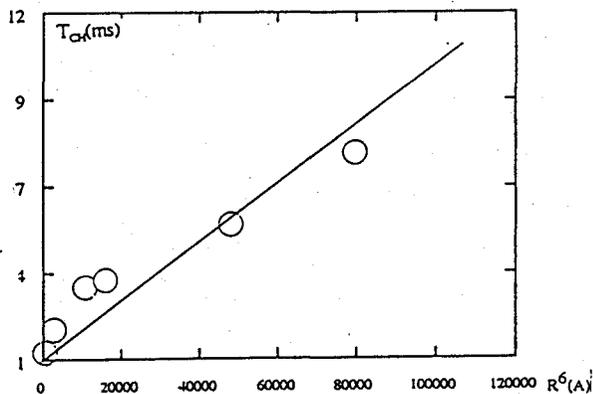


Fig. 7 Plot of T_{CH} against R^{-6} .

(都臨床研) ○市川さおり、畠中秀樹、神田大輔、永田宏次、稲垣冬彦

Semi-automatic assignments of backbone NMR signals of proteins

S. Ichikawa, H. Hatanaka, D. Kohda, K. Nagata, and F. Inagaki.

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22, Honkomagome,
Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

The program system was constructed for efficient and rapid assignments of protein NMR resonances using triple resonance 3D data. The system comprises the home-made C programs searching for the connectivities of the main chain atoms, and Felix macros, which enable us to inspect the corresponding connectivities on the CRT screen. This system was successfully applied for the assignments of the main chain NMR resonances of human ubiquitin with 76 amino acid residues.

序

異種核多次元NMRを用いた測定法を組み合わせることにより、シグナルの分離がよく曖昧さの少ないスペクトルを得ることができるが、その情報量は膨大で、すべての解析を人間の手のみで行うには時間と労力を要する。また一方で、コンピューターのみを使ってスペクトルを解析することは、不純物のピークやノイズの微妙な判断、シグナルの重なりと消失、分解能の問題などのため例外処理が必要となり困難である。このようなマニュアルによる帰属とコンピューターによる帰属の利点と欠点を考慮し、両者を連携させることは、将来的な全自動スペクトル解析への指針として重要である。そこで我々は、測定データを処理し、解析に至るまでのステップを有機的且つ効率的につなぐことを目的として、コンピューターを用いた半自動的なシステムの構築を進めている。本実験では、ヒトユビキチンというアミノ酸76残基からなる蛋白質をサンプルデータとして使い、プログラムの検討を行った。

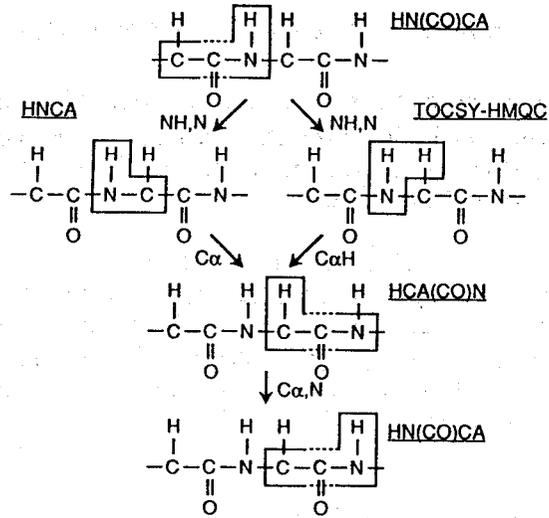
実験

主なプログラムは、C言語によるものと市販のNMRデータ処理ソフトであるFelix(Biosym社)のマクロ言語を使って作成した。測定データは、3重共鳴3次元NMRによるHN(CO)CA, HNCA, HCA(CO)N、および2重共鳴3次元NMRによるTOCSY-HMQCを用いた。まず、前記の4つのスペクトルに対してFelixでデータ処理を行い、自作のプログラムでピークピックをし、各スペクトルのピークテーブルを作成する。次に、Cプログラムを用いてHN(CO)CA → HNCA → TOCSY-HMQC → HCA(CO)N → HN(CO)CA → … の順に各ピークテーブルから可能性のある相関ピークを検索してつないでいく(図1)。

キーワード： 多次元NMR 半自動解析 Felix

いちかわ さおり、はたなか ひでき、こうだ だいすけ、ながた こうじ、
いながき ふゆひこ

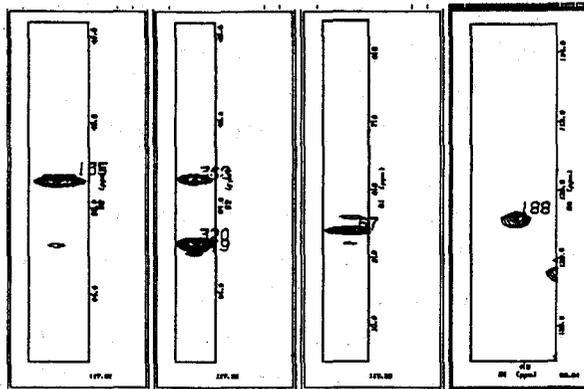
基本的な帰属の流れは伊倉らの方法(*Biochemistry* 29, 4659-4667, 1990)に類似しているが、Cプログラムと平行してFelixをベースとして組んだマクロプログラムも実行する。このプログラムは、4つのスペクトル間で相関のあるピークを自動的に画面に表示し、それを人間の目で見つけていくものである。コンピューターのみでは対処しづらいノイズや不純物のピークの問題を解決するために、画面上視覚的に区別していく。図2には、この解析の例を示す。なお、NMRの測定にはバリアン製Unity500、および日本電子製α600を用いた。



(図1) HN(CO)CA, HNCA, TOCSY-HMQC, HCA(CO)Nの帰属の流れ。各スペクトル間で共通した2つのケミカルシフトを介して次のピークへ関連づけていく。

結果と考察

NMRシグナルの帰属を円滑に進めるために、より一般性を持ったプログラムシステムを構築することが必要である。CプログラムとFelixで組んだマクロプログラムを連携させることにより、コンピューターによる判断に人間の目による経験的なピーク判断を同時に加えることができる。これにより、マニュアルによる帰属でかかった手間を省き、非常に効率よく帰属をすすめることができた。また、不純物のピークやノイズもほとんどの場合、画面上視覚的にピークと区別できた。



(図2) ヒトユビキチンを使ったFelixのマクロプログラム実行例。画面左からHN(CO)CA, HNCA, TOCSY-HMQC, HCA(CO)Nスペクトルのある領域を示す。HN(CO)CAとHNCAはNHとNが共通なので、Cαに対してピークを探す。以下同様にして共通した2つのケミカルシフトからある許容範囲で、相関のあるピークを自動的に表示し、残る一つの軸に対してピークを選んでいく。

P7 トリプルレゾナンスNMR法を用いたフッ素化合物の

構造解析手法の開発

○加藤悦子¹⁾, 小椋賢治²⁾, 安藤勲³⁾

1)セントラル硝子〔株〕東京研究所

2)日本電子〔株〕NM応用研究室

3)東京工業大学・工

A new development for structural analysis of fluorine-containing organic compounds by ^1H , ^{19}F and ^{13}C

Triple Resonance NMR method

○Etsuko Katoh¹⁾, Kenji Ogura²⁾ and Isao Ando³⁾

1)Tokyo Research Center, Central Glass Co.

2)NMR Application Laboratory, JEOL Ltd.

3)Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

^1H , ^{19}F and ^{13}C NMR spectra of fluorine-containing organic compounds were successfully measured. The obtained ^1H broadband decoupled ^{13}C - ^{19}F COSY spectra and ^{19}F broadband decoupled ^{13}C - ^1H COSY spectra were analysed. On the basis of results, sequential analysis of these experimental Poly(vinylidene fluoride)(PVDF) was carried out.

1. 緒言 フッ素を含む有機化合物は、その特徴的な性質により医・農薬を始め電子材料等のいろいろな分野に応用されている。これらの構造を解析するためには、他の有機化合物と同様にNMRが有効な手法となる。 ^{19}F を含む有機化合物のNMRスペクトルは、 ^1H と ^{19}F との双極子相互作用のために複雑となり解析が困難となる場合がある。そのような化合物のNMRスペクトルを解析するための方法として、Tonelli¹⁾らは ^{13}C NMRを測定し γ -効果の概念を用いて含フッ素ポリマーの解析を行っている。また、

キーワード：トリプルレゾナンス（三重共鳴）、高分解能NMR、PVDF

○かとう えつこ、おぐら けんじ、あんどう いさお

Hughes²⁾らは、フッ素を含むコレステロイドについてH-F COSYを用いて構造解析している。その他、高磁場NMRを用い含フッ素共重合ポリマーを解析することも報告されている³⁾。しかし、このような化合物のほとんどは、スピン1/2の¹H、¹⁹Fそして¹³C核が同時に存在するのでスピンカップリングによりスペクトルが複雑となり、解析を困難にすることが多い。そこで今回私どもは、¹H、¹⁹F¹³C核による三重共鳴法のパルスシーケンスを新たに開発し、その有効性について検討した。その結果、¹³C NMRにおいて、スペクトルの単純化や感度の向上が認められ、フッ素を含む有機化合物に対して有効であることが確認できた。また、応用例として強誘電性を示すポリマーとして知られるPVDFについて構造解析を行った。

2. 実験

2-1 試料調整：HCFC-245ca(CF₂HCF₂CFH₂)はCFC-225cbを還元することにより得た。

PVDF((CF₂CH₂)_n)はビニリデンフルオライド(CF₂=CH₂)を50度で懸濁重合することにより得た。重合反応における開始剤には、di-n-propyl peroxydicarbonate (日本油脂製)を用いた。

2-2 高分解能NMR測定：実験はJEOL A400装置に¹H/¹⁹F/¹³C三重共鳴プローブを装着して行った。¹H及び¹³C NMRについてはTMSを、¹⁹F-NMRについてはCFCI₃を基準とした。今回新たに開発したパルスシーケンスは次のとおりである。(1)¹³C 1D(¹H/¹⁹F decoupled), (2)¹³C-¹H COSY(¹⁹F decoupled), (3)¹³C-¹⁹F COSY(¹H decoupled) pulse sequenceをFig. 1に示す。

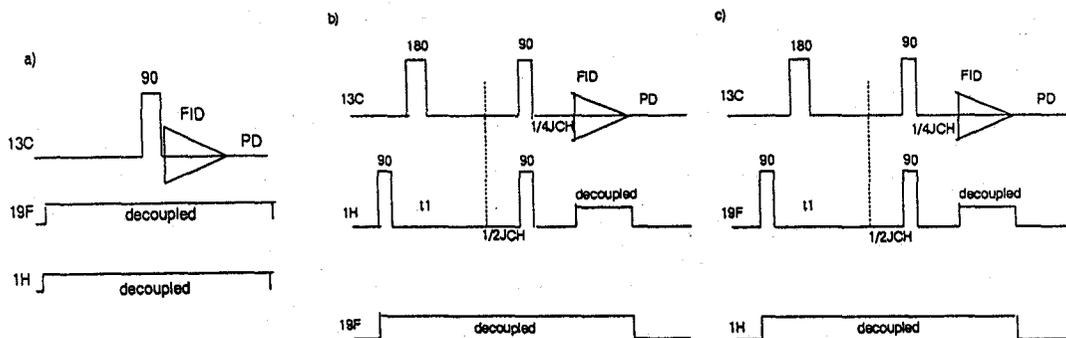


Fig. 1 Pulse sequences for a) ¹³C(simultaneous decoupling of both the ¹H and ¹⁹F nuclei)

b) ¹³C-¹H(¹⁹F decoupled)COSY and c) ¹³C-¹⁹F(¹H decoupled)COSY

3. 結果と考察

3-1 三重共鳴パルスシーケンスのHCFC-245ca化合物への応用

Fig. 3にHCFC-245caの ^{13}C - ^1H COSY(^{19}F decoupled)スペクトルを示す。また、従来の方法である ^{13}C - ^1H COSYスペクトルをFig. 2に示す。

Fig. 2とFig. 3のスペクトルを比較すると、 ^{19}F および ^1H とのカップリングにより分裂していた ^{13}C NMRスペクトルが単一共鳴線となって、スペクトルが単純化され、同時に感度も向上することがわかった。

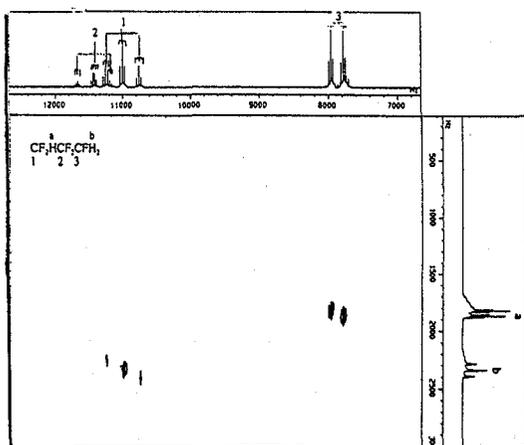


Fig. 2 Contour plot ^{13}C - ^1H COSY of 245ca

The positive countour only is shown.

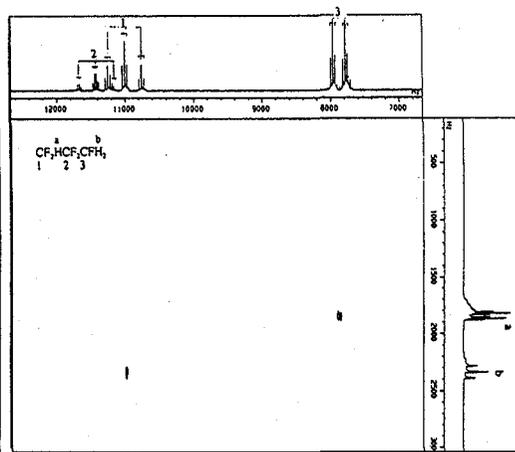


Fig. 3 Contour plot ^{13}C - ^1H (^{19}F decoupled) COSY

of 245ca The positive countour only is shown.

3-2 三重共鳴法を用いた1D及び2D NMRを用いたPVDFの構造解析例

PVDFは、強誘電性を示すポリマーとして、注目されている材料であり、近年多くの研究が報告されている。また、PVDFにはいくつかの異種結合が存在することが知られており、その異種結合の有無及び割合が、その性能を左右するため、一次構造を解析することは重要である。そのような観点からNMRによる構造解析についてもモン

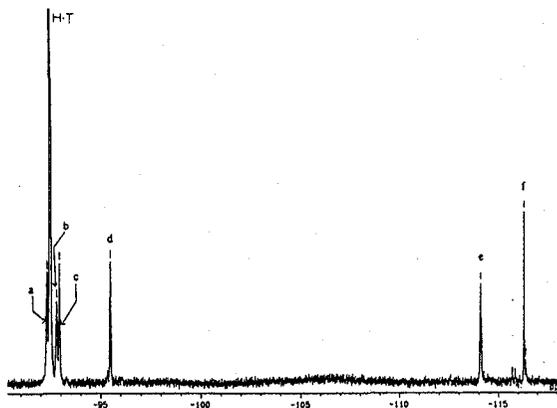


Fig. 4 ^{19}F (^1H decoupled) NMR spectrum for PVDF

固体における ^{13}C - ^{15}N 間ペークダブルレット観測のための
CPMG系列のパルス不完全性効果の解析と改良型系列の提案

京大理 ○石井佳誉、芦田淳、寺尾武彦

Pulse-imperfection effects on CPMG-like sequences for observing the Pake doublet of the ^{13}C - ^{15}N heteronuclear dipolar coupling and the solution by a new sequence MLEV8/8^R

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University

○Yoshitaka Ishii, Jun Ashida and Takehiko Terao

Approaches to determine the ^{13}C - ^{15}N distance in solids by observing the Pake doublet are studied. Finite pulse-width, offset and flip-angle error effects are discussed in detail using the average Hamiltonian theory and the multistep numerical calculation for "the dipolar CPMG sequence", in which two CPMG-like sequences are simultaneously applied to ^{13}C and ^{15}N . Such applications of CPMG-like sequences are found to yield a double doublet spectrum. A new sequence is proposed to solve these problems, enabling us to correctly determine the C-N distance.

[序論] 我々は静止した粉末固体試料に対して ^{13}C と ^{15}N に同時にCPMG型パルス系列を照射することによりペークダブルレットを観測し、 ^{13}C - ^{15}N 間の距離を正確に求めるアプローチ (dipolar CPMG法) を検討し、オフセット、フリップ角のエラーなどの非理想性がどれほど大きくスペクトルに影響を与えるかをアベレージハミルトニアン (AH) を用いた計算とマルチステップ法 (multistep numerical calculation) により詳細に示した。例えば、同じCPMG系列を ^{13}C と ^{15}N に適用した場合、パルス幅間に生じる交差緩和の効果のためダブルレットが2重になることが明らかになった。また、この効果の影響なしに両者の核間距離を求める改良型パルス系列を提案する。

[理論] 異種核に同時に π パルスをかける場合について、簡単に述べる。

<1.有限幅効果> ここで取り上げるdipolar CPMGのシーケンスを図1に示す。異種核スピンI、Sに対する回転系でのハミルトニアンは

$$H_R = H_{rf} + H_{off} + H_D \quad (1)$$

と表される。ただしラジオ波の強度 (ω)、オフセット (Ω)、双極子結合定数 (D) を用いて H_{rf} 、 H_{off} 、 H_D は次のように表せる。

$$H_{rf}(t) = \omega_I(t)I_x + \omega_S(t)S_x$$

$$H_{off} = \Omega_I I_z + \Omega_S S_z$$

$$H_D = DI_z S_z \quad (2)$$

キーワード：固体 ^{13}C NMR、CPMG、精密距離決定、異種核間双極子相互作用
○いしいよしたか、あしだじゅん、てらおたけひこ

ここで、このハミルトニアンによるプロパゲーターを相互作用表示に移し、AH理論を適用する。1サイクルに2つの π パルスを逆位相 $\times \bar{x}$ でかける場合の0次のAHは

$$\overline{H_D^{(0)}} + \overline{H_{off}^{(0)}} = \frac{1}{\tau_{cycle}} \left(2\tau_w \left[\frac{D}{2}(I_z S_z + I_y S_y) - \frac{2}{\pi}(\Omega I_y + \Omega S S_y) \right] + 4\tau D I_z S_z \right) \quad (3)$$

と計算できる。ここでパルス幅をIとSで等しいものとして(τ_w)、サイクルタイムを $\tau_{cycle} = 4\tau + 2\tau_w$ とした。式(3)からオフセットの効果が蓄積してしまうことが分かる。もし1サイクルに π パルスを同位相 $\times \bar{x}$ でかけるならば、0次のAHは次のように求められる。

$$\overline{H_D^{(0)}} = \frac{1}{\tau_{cycle}} \left(2\tau_w \frac{D}{2} (I_z S_z + I_y S_y) + 4\tau D I_z S_z \right) \quad (4)$$

交換関係： $[I_z S_z, I_y S_y] = 0$ より、式(4)に対してプロダクトオペレーターフォーマリズムを用いて、簡単にスペクトルの計算ができる。スピンIに初期磁化 I_x を用意すると

$$D_1 = D(1 - \tau_w / \tau_{cycle}) \quad (5)$$

$$D_2 = D \quad (6)$$

の二つの幅をもつ2重のダブルレットが観測されることになる。オフセットのない場合、つまり低磁場下においてはこの予想が正しい事がマルチステップ法により示される(図2)

<2. フリップ角エラーによる影響>

同位相でパルスをかける dipolar CPMG系列ではオフセットに起因する0次のAHは0となるが、この系列では同位相で全てのパルスをかけるため π パルス幅のエラーが蓄積しかねない。この効果をAH理論を用いて計算をした結果、0 Hzの位置に大きなピークが現われる事が分かった(式は省略した)。図3にマルチステップ法(右)と0次のAHからの計算(左)により得られた π フリップ角のエラーがある場合の dipolar CPMGスペクトルを挙げる。両者はほぼ完全に一致していることが分かる。

<3. オフセットの影響> 高磁場中でオフセットが十分に大きいときには1次以上の効果がスペクトルに無視できない影響を及ぼす(図4)。0 Hzに現われているピークは1次のAHによるスピンロック効果であると思われる。1次のAHが求められた

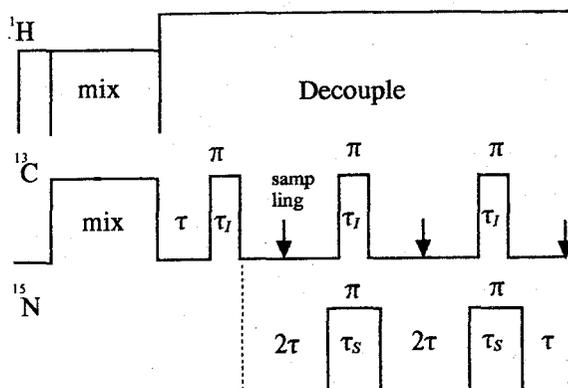


Fig. 1. Heteronuclear dipolar CPMG sequence.

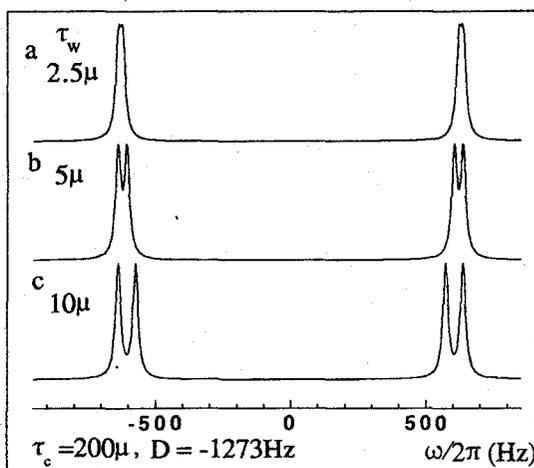


Fig. 2. τ_w dependence of dipolar CPMG spectra by multistep calculations.

結果(式は省略)、オフセットが双極子結合に比べて同程度か大きいときは I_x , S_x に比例する項のみがAHに残ることが分かった。この場合、 $\langle 2 \rangle$ と同様に解析的に計算ができて、0 Hz付近のセンターバンドを与えることが理解でき、シミュレーションの結果をほぼ説明できる。しかし面白いことに、オフセットを大きくしていくと、センターバンドが小さくなり、オフセットが小さいときに似たスペクトル(f)が得られるところがあることが分かった。

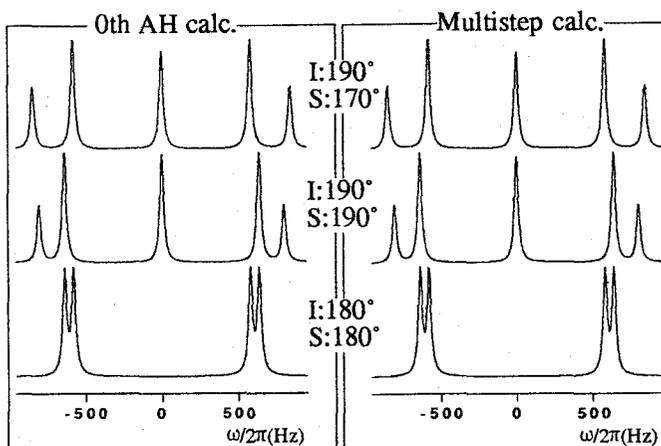


Fig. 3. Flip-angle error dependence of calculated spectra. $\tau_C = 200\mu\text{s}$, $\tau_W = 9.09\mu\text{s}$, $D = -1273\text{Hz}$.

< 4. 補償パルス系列 MLEV8/8^R >
 MLEV8等のパルス系列はフリップ角のエラーやオフセットに高い補償効果を示す。しかし、これを両方の核にかけると(MLEV8/8)、これまで述べたようにダブルレットが2重になったスペクトルになる。これは余分な項 $I_y S_y$ がAHの中に含まれるためである。我々は、MLEV8 (x x x x x x x x) をIスピんに、MLEV8の左右を反転したサイクル (x x x x x x x x) をSスピんにかけるパルス系列 MLEV8/8^Rを提案した。このシーケンスを使うことにより、余分な項がキャンセルされ2重になったダブルレットの平均位置に1つのダブルレットのみが得られること、MLEV8/8と同程度のオフセットに対する補償ができることがシミュレーションによって確かめられた。コンボジットパルスを用いた場合MLEV8/8^Rの有用性がさらに明らかになる。たとえば、補償πパルス $90_x 240_y 90_x$ をCPMG系列に使う場合 $I_y S_y$ の項のみならず $I_x S_x$, $I_x S_y$, $I_y S_x$ の項が0次のAHに含まれる。これらの項のため、MLEV8/8系列は線形が歪む(図5上)。MLEV8/8^R系列を用いることでこのような歪みを取り去ることができる(図5下)。この場合、10 kHz以内のオフセットに対しスプリット間隔をおよそ5 Hz (1%)程度変化させるにすぎない。

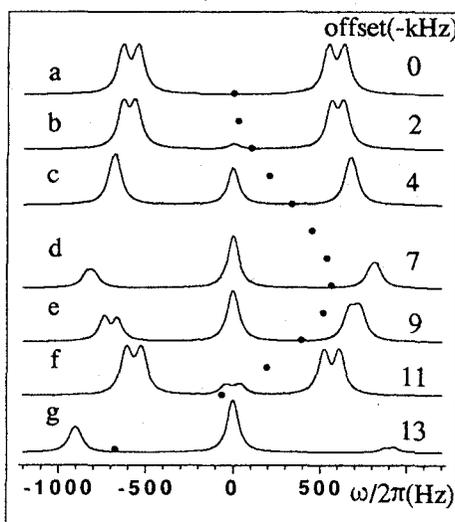


Fig. 4. Ω_I dependence of calculated spectra. $\tau_C = 200\mu\text{s}$, $\tau_W = 14.29\mu\text{s}$, $D = -1273\text{Hz}$. ● shows the I_x term of the effective AH with each ^{13}C offset.

[実験] Chemagnetics CMX300 spectrometer に自作の三重共鳴プローブを組

み込み、 $2\text{-}^{13}\text{C}$ と ^{15}N を6%ダブルラベルしたグリシンの単結晶を用いて実験を行った。Cross polarizationとエコーを用いて磁化を準備し、 ^{13}C 核を観測した。サンプリングは1サイクル毎ではなく1パルス毎に行った。結晶中の2つの非等価な分子のうち1つに対する信号のみが得られている(図6)。これは π パルスとデカップリングにより $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ 間の交差緩和が生じ、強いC-H間の双極子相互作用を持つ片方の信号が短時間に緩和してしまうことによる。対応するシミュレーションを図7に与える。

【結論】以上のように ^{13}C と ^{15}N の両者にCPMG型のパルス系列を照射し、C-N間の距離を決定しようとするとき、有限パルス幅、フリップ角エラー、オフセットの影響により吸収線の分裂・シフト・新たな吸収線の出現が起こることを単結晶のスペクトルの計算と実験から明らかにした。このようなことを無視して粉末パターン(ピークダブレット)からC-N間の核間距離を求めると大きな誤差を生じることになる。ここで提案したMLEV8/8^R系列を用いるとかなりの非理想性をキャンセルし $\tau_w/\tau_{\text{cycle}}$ のみに依存するスケールンクファクターを考慮するだけで正しいC-N間の距離を求めることができる。

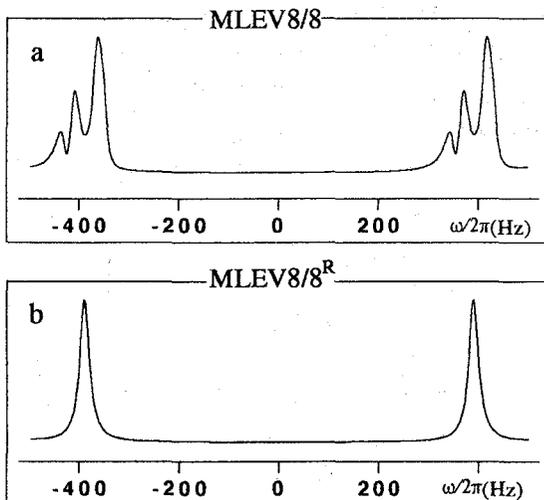


Fig. 5. Multistep calculated spectra for MLEV8/8 and MLEV8/8^R with a composite pulse of $90^\circ x 240^\circ y 90^\circ$. $\tau = 51.8\mu\text{s}$, $D = -907.35\text{Hz}$, 90° pulse width: $4.81\mu\text{s}$.

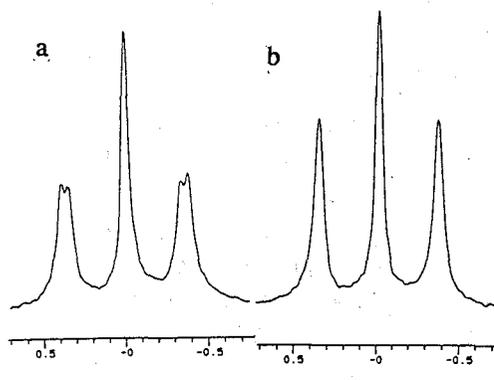


Fig. 6. ^{13}C dipolar CPMG spectra obtained by (a) MLEV8/8 and (b) MLEV8/8^R. $\tau_w \sim 10.5\mu\text{s}$, $\tau = 43\mu\text{s}$, $\tau_c = 772\mu\text{s}$.

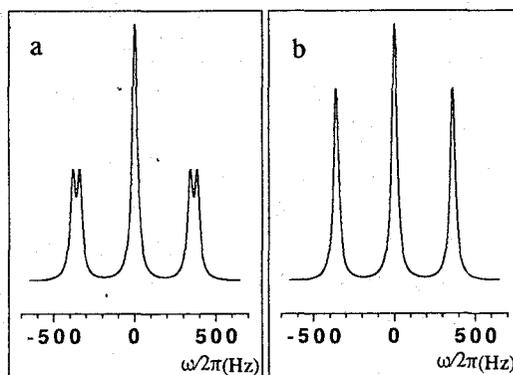


Fig. 7. Simulated spectra for those in Fig. 6. The center peak was added to both spectrum to represent a signal due to natural abundant ^{13}C . A ratio of the center-peak and dipolar CPMG peak intensities was set to be 2: 3.

固体状態におけるポリピロールの 構造と電子状態

東工大・工 菊池 瑞代・○黒子 弘道・安藤 勲

Structure and electronic state of polypyrrole in the solid state by high resolution
NMR spectroscopy

Mizuyo Kikuchi, Hikomichi Kurosu and Isao Ando

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama,
Meguro-ku, Tokyo)

The ^{15}N CP/MAS NMR spectra and ^{15}N spin-lattice relaxation time ($T_{1\text{N}}$) of doped and dedoped ^{15}N -labeled polypyrroles (PPY) at various temperature in the solid state, prepared by electrochemical polymerization, were measured by means of high-resolution solid state NMR and related to electrical conductivity. From these results, it was found that the ^{15}N signal of PPY consists of five peaks which were decomposed by line shape analysis. In order to obtain systematic information on the structure and electronic structure, quantum chemical calculations were carried out to assist in assignments of the ^{15}N NMR spectra.

【緒言】

電気伝導性を示すポリアセチレンフィルムの発見以来、多くの導電性高分子について研究が行われてきている。代表的な導電性高分子の1つである共役複素環ポリピロールは、Fig.1に示すような2つの化学構造があることが知られているが、ポリマーの非晶性、溶媒に対する不溶性のため、その構造は未だ十分に解明されていない。このため、その構造と電気伝導機構の関係については明らかにされていない。本研究では、ドーピングによるポリピロールの構造変化および電氣的性質の変化を固体高分解能 ^{15}N NMR化学シフト、電気伝導度を通して調べ、また、モデルを用いた量子化学計算により、ドーピングによる電子状態の変化に関する詳細な知見を得ることを目的とした。

ポリピロール／導電性高分子／固体高分解能 ^{15}N NMR／量子化学計算

きくち みずよ、くろす ひろみち、あんどう いさお

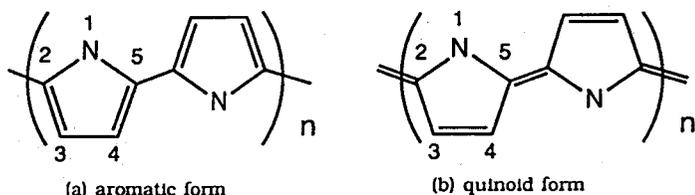


Figure 1 Aromatic (a) and quinoid (b) structures for polypyrrole

【実験】

ポリピロール試料は、 ^{15}N ラベルしたピロールをp-トルエンスルホン酸ナトリウムを支持電解質として、室温、アルゴン雰囲気下で電解重合により調製した。脱ドーブ試料は電極を反転させることにより得た。

電気伝導度の異なるポリピロール試料についての固体高分解能 ^{15}N NMR測定を行い、観測されたスペクトルの詳細な解析を行った。固体高分解能 ^{15}N NMRスペクトルは、CP/MASアクセサリを付属した日本電子製GSX-500NMRスペクトロメータ（金属材料研究所）を用い、50.55MHzで、また ^{13}C NMRスペクトルは、CP/MASアクセサリを付属した日本電子製GSX-270NMRスペクトロメータを用い、67.8MHzでいずれも室温で測定を行った。 ^{15}N NMRスペクトルは積算回数約30,000回、化学シフトの基準としては外部基準として ^{15}N グリシンを用い、その化学シフトを11.59ppmとして $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ 水溶液基準に換算し、 $T_{1\rho}$ 緩和時間測定はTorchiaの方法を用いた。電気伝導度測定は四端子法および二端子法により行った。

【量子化学計算】

NMR測定によって得られたデータに基づいて、より深い議論を行うため、理論的アプローチとして、 ^{15}N NMR遮蔽定数の量子化学計算を行った。低分子モデル化合物に対してはFPT-INDO法を用い、また、無限鎖ポリピロールに対してはtight-binding(TB)法を用いた遮蔽定数、バンドギャップの計算を行った。

【結果・考察】

ポリピロールの ^{15}N CP/MASスペクトルは非対称な1本の信号である。これまで我々は少なくとも4つのピークから成っていることを明らかにしてきたが[1]、本研究においては、さらに運動性の良い成分を強調するゲート

付きデカップリング法により得られたスペクトルや酸化試料のCP/MASスペクトルを詳細に検討することにより、この非対称な信号はFig.2に示したように5つの成分から成っていることを明らかにした。電気伝導性の異なる試料における、それぞれのピークの相対強度変化は、電気伝導度の上昇に伴いピーク ϵ の相対強度が増加し、ピーク γ の半値幅が増加した。ピーク ϵ の強度変化から、このピークは高い電気伝導性に関与するキノイド構造に相当すると考えられる。この時、ピーク γ の相対強度がかなり電気伝導性の良い試料で減少していることがスペクトルからも明らかであり、変化は、ドーパ濃度の増加によって電気伝導性が上昇し、ピーク γ に対応する構造が、ピーク ϵ に対応する構造に変化した結果と解釈できる。

室温および -100°C での ^{15}N スピン-格子時間 $T_{1\text{N}}$ の測定結果をTable 1に示す。温度が下がる（運動性が悪くなる）と $T_{1\text{N}}$ が長くなることから、ポリピロールの運動はslow motion regionの運動であることがわかる。室温での $T_{1\text{N}}$ の値は0.35 s と 13.8 s で、BPPの理論よりピーク γ (5.2s)、 δ (4.2s) に比べて前者はかなり運動性の良い成分、後者は運動性の悪い成分ということが出来る。低温での $T_{1\text{N}}$ から、低温では全体的に運動性が悪くなっているが、特にピーク β の $T_{1\text{N}}$ は長くなり、室温の時に比べて非常に運動性が悪くなっている。電子線回折測定から、ポリピロールには非晶部に囲まれた結晶領域が存在することが報告されており、この解析の結果より中性のポリピロールは単斜晶をとっていることが提案されている。ピーク β の運動性の悪い成分は、他の成分に比べかなり $T_{1\text{N}}$ が長いことから、このような結晶領域の信号であることが予想される。温度による電気伝導性の変化は、室温で $1.7 \times 10^{-2}\text{S/cm}$ の電気伝導度を示す試料が -23°C で $5.8 \times 10^{-3}\text{S/cm}$ になったことから、低温で電気伝導度が低下する傾向が示された。

さらに、NMR測定で観測されたポリピロールのスペクトルからドーピングによる電子状態の変化に伴う構造変化の情報を得るための、FPT-INDO法による低分子モデル化合物の ^{15}N 遮蔽定数の計算および、TB法を用いた無限鎖ポリピロールの ^{15}N 遮蔽定数の計算を行った。高分子の周期性や長距離相互作用を考慮したTB近似を用いた計算により得られた遮蔽定数、バンドギャップ、全エネルギーをTable 2に示す。この結果から、電荷がない場合のキノイド構造に比べ、電荷がある場合のキノイド構造の遮蔽定数は低磁場シフトすること、芳香族構造とキノイド構造ではキノイド構造の方が低磁場側であることがわかる。電荷の影響により遮蔽定数が低

磁場側にシフトすることは、ピーク γ に対応する構造が、ピーク ε に対応する構造に変化すると、ピークの化学シフトは低磁場シフトすることを支持している。また、ピーク β と γ は、それぞれ芳香族構造、キノイド構造に対応することが計算の結果からも示された。また、芳香族構造に比べキノイド構造 (電荷 0、1) ではバンドギャップが小さくなっていることがわかる。電荷 0 のキノイド構造は高い電気伝導性を持つことが期待できるが芳香族構造に比べてエネルギー的に不安定である。これに対し、電荷を持つキノイド構造は安定に存在すると考えられるが、芳香族構造に比べてバンドギャップは 4.93eV から 3.45eV と大きくは減少していない。本来バンドギャップは鎖内での電気伝導のしやすさを示しており、これらのことからポリピロールの電気伝導は鎖内の電気伝導よりホッピングによる電気伝導が優先されていると考えられる。

Table 1 T_{1N} values of polypyrrole

	T_{1N} (s)	
	room temp.	-100°C
β	0.35	7.0
	13.8	-
γ	5.2	7.2
δ	4.2	7.7

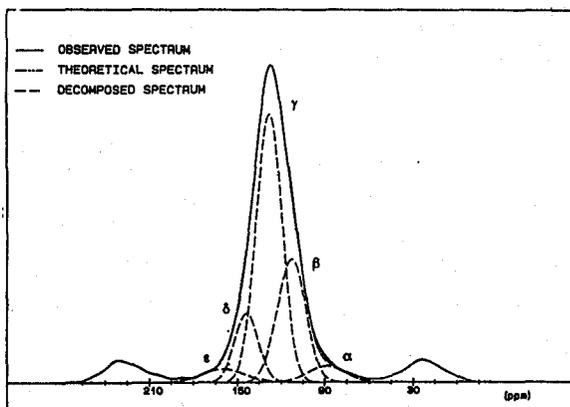


Figure 2 ^{15}N CP/MAS spectrum of polypyrrole: (α) the nitrogens in the oxidized form, (β) the aromatic form, (γ) the quinoid form (polaron), (ε) the quinoid form (bipolaron), (δ) the nitrogens which have the hydrogen atoms in the neighborhood.

Table 2 Calculated ^{15}N shielding, band gap and total energy of polypyrrole

model	σ iso/ppm	band gap/eV	total energy/a.u.
aromatic	-222.5	4.93	-30.79
quinoid (charge 0)	-225.1	1.76	-30.75
quinoid (charge 1)	-228.3	3.45	-30.79

【文献】

1. M. Kikuchi, H. Kurosu and I. Ando, *J. Mol. Struct.*, **269**, 183 (1992).

三菱製紙・筑波研究所

○遠藤一央、山本京之介、藤田郁夫、相田正之

Heavy Atom Effect on the Nuclear Shielding Constant

Mitsubishi Paper Mills LTD. Tsukuba Research Laboratory

Kazunaka Endo, Kyonosuke Yamamoto, Ikuo Fujita, Masayuki Aida.

For nuclear shielding the relativistic correction due to a heavy neighboring atom and a heavy diatomic molecule can be approximated by third-order and fifth-order perturbation theory with nonrelativistic functions. The contribution to shielding by third-order perturbation theory comes from the cross term involving the spin-orbit coupling and $I \cdot S$ interaction, and the external field-orbit interaction. We calculated the Si and Ge chemical shieldings of SiX_4 and GeX_4 ($X=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$), respectively, due to the X heavy atom. Furthermore, we explain the highfield shift of C 1 of chitosan for interaction between chitosan and I_3^- , using the theory. We studied theoretical models of the interaction between a glucose unit and I_2 (or I^-), using the semi-empirical MO method. In the fifth-order calculation, we discuss possibility of observable field-dependent chemical shift due to the heavy atom effect for metal molecules in NMR experiment. For Pb_2 molecule, the shift is estimated as 19.4 ppm at 14.1 T.

通常観測される反磁性物質 ($S=0$) のNMRケミカルシフトは、Ramseyによって提唱された摂動論による1次の反磁性項と2次の常磁性項によって説明される。この扱いの中では、電子の sp^3 状態を変える演算子を考慮する必要はなく、全波動関数の基底状態及び励起状態は1重項状態を考えればよい。ところで、ヨウ素や臭素等の重原子が隣接した化合物の ^{13}C や ^1H のケミカルシフトは、異常に高磁場に観測されることは、よく知られている。分子内において注目する原子及び隣接原子が重原子 (sp^3 軌道がリガ定数が大きい: (例) 1 eVに近い) の場合、このシフトを説明する為に、演算子としては、 sp^3 軌道 $L \cdot S$ 相互作用を考えねばならない。(この $L \cdot S$ 相互作用は、相対項 (relativistic term) の一つである。) 重原子効果によるシフトは、 sp^3 演算子 ($L \cdot S, I \cdot S$) を考える必要があるので、3次摂動論を用いると共に、全波動関数の励起状態としては、3重項及び1重項を考慮しなければならない。¹⁻⁴⁾ (但し、この中では、1電子励起のみを考えている。) この重原子効果に関しては、相対項を含めた波動関数 (relativistic function)⁵⁾ を用いて、2次の摂動論でも説明できる。⁶⁾

本稿では、まだ証明されていない重原子効果によるシフトに関して(1)分子内重原子効果、(2)分子間重原子効果、(3)磁場依存性シフトに分類し、半経験PM3 MO法⁷⁾を用いて報告する。まず(1)、(2)に関係した重原子効果によるシフトの一般論²⁾を簡単に述べる。

磁場中の分子に対するN個の電子系のHamiltonian (sp^3 軌道相互作用を含む) は、

$$\mathcal{H} = \sum_{k=1}^N [(1/2m) \{P_k - (e/c) A_k(q)\}^2 + 2S_k \cdot [\nabla_k \times A_k(q)] + \lambda L_k \cdot S_k + V(r_k)], \quad (1)$$

ここで、 $A_k(q)$ は、k番目の電子に作用するベクトルポテンシャルであり、以下のように書ける。

$$A_k(q) = \frac{1}{2} [\mathbf{H} \times (\mathbf{r}_k - \mathbf{q})] + [\boldsymbol{\mu}_A \times \mathbf{r}_{Ak}] / r_{Ak}^3, \quad (2)$$

但し、 \mathbf{H} は一定磁場、 $\boldsymbol{\mu}_A$ は、原子Aにおける磁気モーメントである。

キーワード: 重原子効果による磁場依存性シフト、第IV属元素ハロゲン化合物のシフト、分子間重原子効果、

○えんどう かずなか、やまもと きょうのすけ、ふじた いくお、あいだ まさゆき

基底状態及び励起状態に対する全波動関数を次の様に single determinant で表す。

$$\begin{aligned}
 {}^1\Phi_0 &= (\varphi_1\alpha)(\varphi_1\beta)\cdots(\varphi_n\alpha)(\varphi_n\beta), \\
 {}^1\Phi_{i\rightarrow j} &= (\varphi_1\alpha)(\varphi_1\beta)\cdots(\varphi_{i-1}\beta)(1/\sqrt{2})\{(\varphi_i\alpha)(\varphi_j\beta) - (\varphi_i\beta)(\varphi_j\alpha)\}(\varphi_{i+1}\alpha)\cdots(\varphi_n\beta), \\
 {}^3\Phi_{i\rightarrow j} &= (\varphi_1\alpha)(\varphi_1\beta)\cdots(\varphi_{i-1}\beta)\left\{\begin{array}{c} (\varphi_i\alpha)(\varphi_j\alpha) \\ (1/\sqrt{2})\{(\varphi_i\alpha)(\varphi_j\beta) + (\varphi_i\beta)(\varphi_j\alpha)\} \\ (\varphi_i\beta)(\varphi_j\beta) \end{array}\right\}(\varphi_{i+1}\alpha)\cdots(\varphi_n\beta),
 \end{aligned} \tag{3}$$

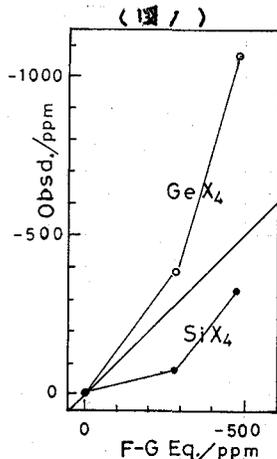
ここで、 ${}^1\Phi_0$ は基底状態、 ${}^1\Phi_{i\rightarrow j}$ は 1 重項励起状態、 ${}^3\Phi_{i\rightarrow j}$ は 3 重項励起状態に関する全波動関数である。この MO $\varphi_i(k)$ は、Hartree-Fock 演算子の固有関数である。注目原子 A の σ - π 定数に対して 3 次の摂動論を用い、 μ_A と H_k に比例する項を (双一次形式で) 拾い出せば、 σ - π 定数が求まるわけである。

$$\begin{aligned}
 \sigma_k &= \left(\frac{\partial^2}{\partial \mu_k \partial H_k} \left\{ \langle 0 | \mathcal{H} | 0 \rangle - \sum_{n \neq 0} \left(\frac{\langle 0 | \mathcal{H} | n \rangle \langle n | \mathcal{H} | 0 \rangle}{E_n - E_0} \right) \right. \right. \\
 &\quad \left. \left. + \sum_{i \neq 0} \sum_{m \neq 0} \left[\frac{\langle 0 | \mathcal{H} | i \rangle \langle i | \mathcal{H} | m \rangle \langle m | \mathcal{H} | 0 \rangle}{(E_i - E_0)(E_m - E_0)} \right] - \langle 0 | \mathcal{H} | 0 \rangle \sum_{n' \neq 0} \left[\frac{\langle 0 | \mathcal{H} | n' \rangle \langle n' | \mathcal{H} | 0 \rangle}{(E_{n'} - E_0)^2} \right] \right\} \right)_{\mu=H=0}.
 \end{aligned} \tag{4}$$

ここで、 $\langle 0 |$ は基底状態、 $\langle n |$ 、 $\langle i |$ 、 $\langle m |$ は励起状態の全波動関数を表す。(1)、(2)、(3) 式を (4) 式に代入して A0 まで展開すれば、(4) 式の右辺の第 1 項及び第 2 項が、Ramsey の反磁性項と常磁性項に対応し、第 3、4 項が重原子効果による (L·S) ツフトである。この第 3、4 項の支配的な項を詳しく書けば次の様になる。(notation は文献 2) を参考のこと)

$$\begin{aligned}
 \sigma_{LS}^{\mu}(1) &= -\frac{4}{3}\pi\lambda\alpha^2 |S(0)|^2 \left\{ \sum_i^{\text{occ}} \sum_{j,j'}^{\text{unocc}} [C_i^x \times C_j^z]_{\mu} [C_j^x \times C_{j'}^z]_{\mu} C_{si}^A C_{sj'}^A \left[\frac{1}{({}^3E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0)} + \frac{1}{({}^1E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0)} \right] \right. \\
 &\quad + \sum_i^{\text{occ}} \sum_{j,j'}^{\text{unocc}} [C_i^x \times C_j^z]_{\mu} C_{si}^A C_{sj'}^A [C_j^x \times C_{j'}^z]_{\mu} \{({}^3E_{ji} - E_0)({}^1E_{j'i} - E_0)\}^{-1} - \sum_{i,i'}^{\text{occ}} \sum_j^{\text{unocc}} [C_i^x \times C_j^z]_{\mu} [C_{i'}^x \times C_j^z]_{\mu} \\
 &\quad \times C_{si}^A C_{si'}^A \{ \{({}^3E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0)\}^{-1} + \{({}^1E_{ji} - E_0)({}^3E_{j'i} - E_0)\}^{-1} \} - \sum_{i,i'}^{\text{occ}} \sum_j^{\text{unocc}} [C_i^x \times C_j^z]_{\mu} C_{si}^A C_{si'}^A [C_j^x \times C_{j'}^z]_{\mu} \\
 &\quad \times \{({}^3E_{ji} - E_0)({}^1E_{j'i} - E_0)\}^{-1} + 2 \sum_{i,m}^{\text{occ}} \sum_j^{\text{unocc}} [C_i^x \times C_j^z]_{\mu} [C_m^x \times C_m^z]_{\mu} C_{si}^A C_{sj}^A \{{}^3E_{ji} - E_0\}^{-2}.
 \end{aligned} \tag{5}$$

(1) 第 IV 属元素ハロゲン化物 (SiX_4 、 GeX_4) の核シフト



杉本、金山、中辻ら⁸⁾ は、第 3 属元素ハロゲン化物の NMR ツフトに注目し、非経験 MO 法によって $\text{GaCl}_{4-n}\text{Br}_n$ ($n=0-4$) の Ga 核ツフトは、主に反磁性によって決定され、常磁性項は、内殻からの寄与と価電子からの寄与とが消し合うようになる為小さいと述べている。更にこの理論による反磁性項は、Flygare-Goodisman (F-G) の反磁性項の近似式⁹⁾ に良く対応することを述べた。我々は、先ず第 1 図に、 SiX_4 、 GeX_4 ($X=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) の Si 核、Ge 核のツフトの実測値¹⁰⁻¹²⁾ に対する F-G 近似式の値を示した。 SiX_4 のツフト実測値は、反磁性項の寄与の見積り過ぎに対し、 GeX_4 の実測値は、良く対応する様にみえる。ここでは、半経験 MO PM3 法⁷⁾ を用いて SiX_4 及び GeX_4 の重原子効果によるツフトを式 (5) によって見積った。表 1 の

SiX_4 に関する結果は、主な MO の寄与を考へての計算値であるが、実測値に対する傾向は良く一致している。又隣接重原子 Br 及び I による $\sigma_{L\cdot S}$ の寄与が、かなり大きいことが証明された。 GeX_4 に関しては、常磁性項が大きく実験傾向を説明することはできなかった。表 2 の

(Table 1)

	SiCl_4	SiBr_4	SiI_4
σ_{dia}	-54.2	-66.0	-74.6
σ_{para}	593.0	584.9	721.0
$\sigma_{L\cdot S}$	-7.5	-27.0	-296.0
$\sigma_{\text{(total)}}$	530.3	491.9	350.4
$\sigma_{\text{(calcd)}}$	0	-38.4	-179.9
$\sigma_{\text{(obsd)}}$	0	-73.6	-326.2

$\sigma_{L.S}$ は、実験値の傾向をよく示していることが分かる。ここでは、PM3法で第IV属元素のゲルマニウムの重原子効果の寄与を議論できたが、 GeX_4 の実験値に関しては、厳密な議論は、この方法では無理なように思われる。(PM3でのハミルトンが有機化合物に関してのものであるから)。最近、中辻、中尾ら¹³⁾は、非経験MO法を用いて「Ge化合物のGe核シフトは、主に σ_{para} によって説明される」を述べている。

(Table 2)

	$GeCl_4$	$GeBr_4$	GeI_4
$\sigma_{L.S}$	-21.0	-103.3	-279.1
$\sigma_{(obsd)}$	0	-62.0	-1111.9

(3) キチンとヨ素との分子間相互作用による C 1 高磁場シフト

キチンとヨ素との分子間相互作用に関しては、ヨ素が I_3^- か I_5^- (I_3^- と I_2 からなる。)かの二説があるが、矢島、遠藤ら¹⁴⁾との研究で、固体試料を作製し、 ^{13}C CPMAS測定(Bruker AC-250 CPMASユニット装着)を行い、図2の様な結果を得た。ヨ素量が増加すると共にキチン構成ユニットのC1が、高磁場シフト(5ppm)することが観測された。

このヨ素による高磁場シフトは、上述の(5)式によって説明されるのでこの式をもっと大胆に近似し、支配的な励起状態を考えて簡略化した。

$$\sigma_{L.S} = (2/3)\pi\lambda\alpha^2|S(0)|^2({}^3E_{ji}-E_0)^2 X X(P^2_{XB_{SA}} + P^2_{YB_{SA}} + P^2_{ZB_{SA}}) \quad (6)$$

この(6)式は、「重原子効果が、ヨ素とC1との相互作用によって高磁場シフトを与える」を意味している。ここでは、 π 計算として ${}^3E_{ji}$ と I_2 又は I^- の分子間相互作用をPM3法で行った。相互作用の型は、 I_2 (又は、 I^-)が(i)C1の真上、(ii)C1に結合しているOHのOの真上、(iii)ゲルマニウム中心の真上について考えた。各型の中で(i)での I^- との原子間距離が3Åの時、0.16ppmの高磁場シフトを与えた(但し、概算で ${}^3E_{ji}$ -bulk基準の σ_{dia} と σ_{para} との合計は、-1.59ppmの低磁場シフトになる)が、原子間距離を近づけると、 $\sigma_{L.S}$ が σ_{dia} と σ_{para} の合計を逆転して高磁場シフトを与えると思われる。

(3) 重原子の磁場依存性シフト

NMR核磁気共鳴定数の磁場依存性は、小さい為、Ramsey¹⁵⁾の提唱以来、未だに観測にかかる理論値及び実測値の報告もなされていない。しかし、最近の超伝導NMRの高磁場化によって、重原子の化合物の場合は、磁場依存性シフトが観測可能な数値になると考えてきた。その理由は、重原子のスピンの軌道結合定数が大きく、励起エネルギーは小さいからである。(両者共にその値は、1eVに近くなる)。既に演者らによって、当NMR討論会で誘導した式であるが、我々が、Ramseyの提唱式をMO法で一般化したその結果を用い、又、重原子に関する新しい磁場依存シフト・5次摂動論による誘導を簡単に述べる。

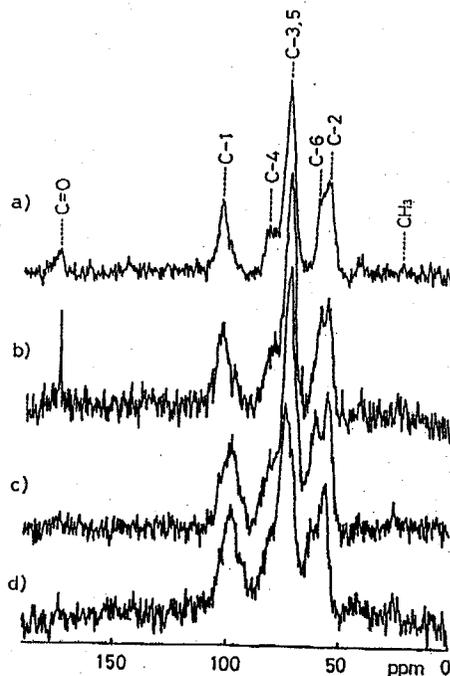
全核磁気共鳴について磁場依存を考えて π - π 展開すれば、

$$\sigma^T = \sigma + (\tau_1 + \tau_2)H_0^2 + \dots, \quad (7)$$

ここで、 σ は通常の核磁気共鳴定数(4)式、 H_0 の奇数べきは、対称性の要請から消える。 τ_1 はRamsey、 τ_2 は重原子による磁場依存項である。この式を共鳴条件式に代入すれば、

$$\omega = (1 - \sigma^T)\gamma H_0 = (1 - \sigma)\gamma H_0 - (\tau_1 + \tau_2)\gamma H_0^3 \quad (8)$$

(図2)



CP/MAS ^{13}C -NMR spectra of the partially acetylated chitosan-iodine complex film

a) I.C.=0 b) I.C.=0.84 c) I.C.=1.34 d) I.C.=1.56

(7)式では、 ω が H_0^3 に依存している。シフト量を求めるには、 $\mu \cdot H_0$ に比例する項を拾い出さねばならないから、磁場依存シフト $\tau_1 H_0^2$ 、 $\tau_2 H_0^2$ も摂動論によって得られ、4次及び5次の摂動法となる。ここで5次の摂動式を省くが、Hamiltonianは(1)式、全波動関数は、一般的には、(3)式が考えられるので、これらを用いた結果で以下の議論を進める。但し基底状態が3重項の場合は、¹⁶⁾ 改めてM0展開して式を導出する必要がある。5次摂動法による磁場依存シフトの簡略化式を書けば、

$$(\tau_2 H_0^2)_{ZZ} = (1/6) \pi \alpha^4 \lambda |S(0)|^2 (H_0^2/E^4) (P_{xy} Q_{xy} - P_{yy} Q_{xx} - P_{xx} Q_{yy} - P_{xy} Q_{xy}) \\ \times (P_{sx} Q_{xy} Q_{sy} + P_{sy} Q_{xy} Q_{sx} - P_{sx} Q_{yy} Q_{sx} - P_{sy} Q_{xx} Q_{sy}) \quad (9)$$

ここで、 $P_{ab} + Q_{ab} = 2 \mathcal{S}_{ab}$ である。Eは支配的な励起エネルギーである。

(Table 3)

	P _{sx}	P _{sy}	P _{xx}	P _{yy}	P _{zz}
Pb ₂	-0.1654	0.000	1.028	1.000	1.000
Sn ₂	-0.1738	0.000	1.031	1.000	1.000

(Table 4)

	最低励起エネルギー (a. u.)				
	D_0^0	${}^3E_{ij} - E_0$	${}^1E_{ij} - E_0$	λ (a. u.)	$ S(0) ^2$
Pb ₂	0.0299	0.0223	0.0407	0.0354	13.8
Sn ₂	0.0726	0.0293	0.0477	0.0354	8.16

(Table 5)

	$\tau_2 H_0^2$		$\tau_1 H_0^2$	
	$H_0 = 14.1(T), 23.5(T) ; H_0 = 14.1(T), 23.5(T)$			
Pb ₂	19.4	54.0	-1.5	-4.0
Sn ₂	2.6	7.3	-1.0	-2.8

(参考文献)

- 1) Y. Nomura, Y. Takeuchi, N. Nakagawa, Tetrahedron Lett., 639(1969).
- 2) I. Morishima, K. Endo, T. Yonezawa, J. Chem. Phys., 59, 3356(1973).
- 3) M. I. Volodichev, T. K. Rebane, Theor. Eksp. Khim., 14, 447(1978).
- 4) A. A. Cheremisin, P. V. Schastnev, J. Magn. Reson., 40, 459(1980).
- 5) L. L. Lohr Jr., P. Pyykko., Chem. Phys. Lett., 62, 333(1979).
- 6) P. Pyykko, A. Gorling, N. Rosch, Molec. Phys., 61, 195(1987).
- 7) J. J. P. Stewart, J. Comp. Chem., 10, 289(1989).
- 8) M. Sugimoto, M. Kanayama, H. Nakatsuji, J. Phys. Chem., 97, 5868(1993).
- 9) W. H. Flygare, J. Goodisman, J. Chem. Phys., 49, 3122(1968).
- 10) U. Niemann, H. C. Marsmann, Z. Naturforsch. B, 30B, 202(1975).
- 11) A. -R. Grimmer, R. Peter, E. Fechner, G. Moldegey, Chem. Phys. Lett., 77, 331(1981).
- 12) E. Liepinsh, I. Sekacis, E. Lukevics, Magn. Reson. Chem., 23, 10(1985).
- 13) H. Nakatsuji, T. Nakao, Int. J. Quantum Chem., 48, (1993) in press.
- 14) N. Oiyama, Y. Kiono, H. Yajima, R. Endo, Polymer Reprints(Japan), 42, No3, 1004(1993).
- 15) N. F. Ramsey, Phys. Rev., A1, 1320(1970).
- 16) K. Balasubramanian, K. S. Pitzer, J. Chem. Phys., 78, 321(1983).

重原子化合物として Pb₂ 及び Sn₂ について、PM3法でM0計算した。(9)式による磁場依存シフト量を求める為、Pb₂とSn₂の populationを表3に示した。

表4には、最低励起エネルギーの目安とされる D_0^0 (解離エネルギー)、3重項、1重項の最低励起エネルギーを原子単位で示した。1重項への最低励起エネルギーでも1eV前後であるから(Pb₂の3重項励起エネルギーは0.6eV)、この計算での励起エネルギーを0.0367a. u. (1eV)として見積った。

表5の結果では、Pb₂の場合、¹H相当600 MHzのNMRで約20ppmの磁場依存シフトが観測されることになる。今後磁場依存シフトは観測可能と思われる。

岐阜大・医・第2生理, *藤田保衛大・総医研・分子生理
○恵良聖一, 中村浩二, 曾我美 勝*, 高崎昭彦*, 中上 寧*

Cross-relaxation studies on the state of water in synthetic copolymer gel
and mouse lens

Seiichi Era, Koji Nakamura, Masaru Sogami*, Akihiko Takasaki*,
Yasushi Nakagami*

Dept. of Physiol., Gifu Univ. Sch. of Med., *Div. of Mol. Physiol., Inst.
for Compreh. Med. Sci., Fujita Health Univ.

We studied the physical state of water in mouse lenses compared with
those in various kinds of synthetic copolymer gels using 500 MHz $^1\text{H-NMR}$.

$1/T_1$ values in synthetic copolymer gels and mouse lenses were gradually
increased with increasing W (dry weight (%)). In contrast, $1/T_{1s}$ values in
copolymer gels were nearly zero at W of $\sim 15\%$, and increased gradually or
steeply with increasing W, indicating there might be changes in the state of
water and/or polymer-water interaction in copolymer gels. $1/T_{1s}$ vs W for
mouse lenses was approximately straight line with the slope which is almost
equal to that of copolymer gels synthesized with HEMA and GMA or HEMA and
N-VP. These linear relation between $1/T_{1s}$ and W for copolymer gels and
mouse lenses might indicate that these kinds of copolymer gels have almost
the same physical states of water as the living systems, observed by the
cross-relaxation NMR technique.

1. はじめに

1970年代の初めに $^1\text{H-NMR}$ を用いて, Damadian(1), Hazlewoodら(2)は種々の腫瘍
組織内の水の T_1 , T_2 が正常組織内の水の T_1 , T_2 よりも長いことを見だし, このこと
は, 単に生体組織内の含水量の差のみによるものではなく, 水構造に差のあることを
示唆した。このような生体組織内の水構造の系統的研究として, 我々は今までにタン

キーワード : 交差緩和時間, 合成高分子ゲル, 水晶体, 水構造

えらせいいち, なかむらこうじ, そがみまさる, たかさきあきひこ, なかがみやすし

パク質のゾル・ゲル変換(3), ラット正常・腫瘍肝組織(4), ラット正常・浮腫脳組織(5), ラビット正常・炎症関節軟骨組織(6)などの水構造変化を, 360 MHz $^1\text{H-NMR}$ により主として T_1 , タンパク質より水分子への分子間交差緩和時間(T_{1s})を測定し, 特に T_{1s} が生体組織内における水構造変化を鋭敏に反映し得ることを見いだした。今回は, 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ により合成鎖状高分子ゲルとしてソフトコンタクトレンズ(SCLs)を用い, その組成を種々に変化させることによって含水量の異なったSCLs内の水構造について検討し, 生体組織のモデル系としてマウス水晶体内の水構造と比較研究した。

2. 材料と方法

今回作製したSCLsのモノマー重量分率組成を表1に示す。SCLsとして, N-vinyl-2-pyrrolidone(NVP)とmethyl methacrylate(MMA)とのコポリマー(含水率, 18.4~79.2%; ○), 2-hydroxyethyl methacrylate(HEMA)とglycerol methacrylate(GMA)とのコポリマー(含水率, 50.6~74.2%; ●), HEMAとNVPとのコポリマー(含水率, 48.7~83.1%; ⊙), GMA, NVPとMMAとのコポリマー(含水率, 22.6~80.1%; ⊖)を合成した。これらのSCLsを円柱状に加工し, 内径1.1 mmのNMR用ガラス細管に入れ, ロック用溶媒としてDMSO- d_6 を入れた5 mmφのNMR試験管に挿入した。また, 2, 4または8週齢のddyマウス水晶体を内径3.2 mmのNMR用ガラス細管に入れ(2週齢~20個, 4週齢~15個, 8週齢~10個), SCLsの場合と同様に, ロック用溶媒を入れた5 mmφ NMR試験管

(表 1)

Weight Ratio of Monomers and Water Content (%) in Soft Contact Lenses				
HEMA	GMA	N-VP	MMA	Water content(%)
copolymers of N-VP and MMA				
-	-	33.9	58.1	18.4
-	-	42.9	49.1	28.5
-	-	51.9	40.1	40.0
-	-	60.9	31.1	53.3
-	-	69.9	22.1	64.7
-	-	78.9	13.1	73.2
-	-	87.9	4.1	79.2
copolymers of HEMA and GMA				
23.7	75.9	-	-	74.2
45.3	54.4	-	-	67.2
65.0	34.7	-	-	59.2
83.1	16.6	-	-	50.6
99.7	-	-	-	40.8
copolymers of HEMA and N-VP				
19.9	-	79.8	-	83.1
39.9	-	59.8	-	76.0
59.8	-	39.9	-	62.7
79.8	-	19.9	-	48.7
copolymers of GMA, N-VP and MMA				
-	41.7	52.3	5.5	80.1
-	37.0	46.3	16.3	69.7
-	32.3	40.4	26.9	57.5
-	27.7	34.6	37.3	45.0
-	21.0	26.2	52.5	22.6

HEMA, 2-hydroxyethyl methacrylate
GMA, glyceryl methacrylate
N-VP, N-vinyl-2-pyrrolidone
MMA, methyl methacrylate

に挿入して2時間以内に測定した。

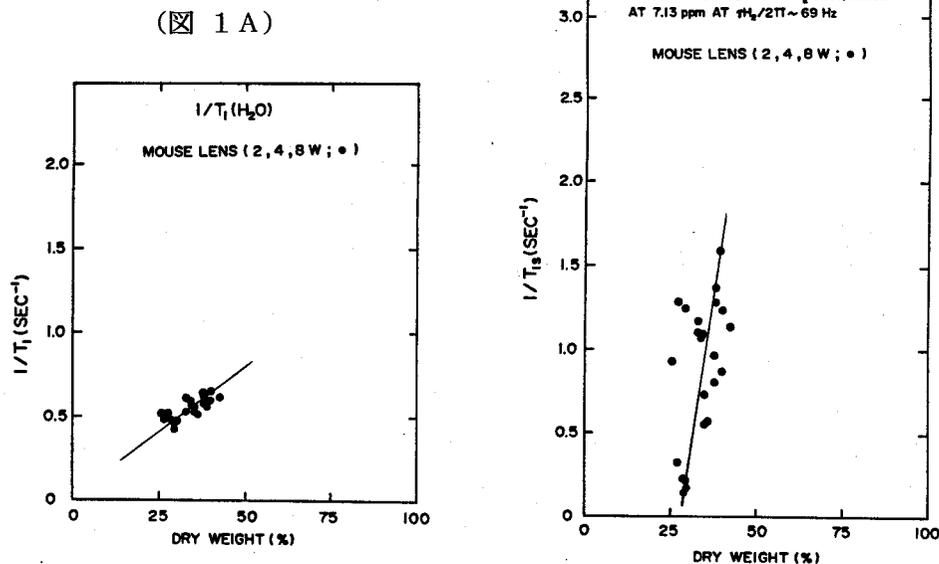
$^1\text{H-NMR}$ はBruker社製 AM 500 $^1\text{H-NMR}$ スペクトロメーターを用い, それぞれの試料の $T_1(\text{H}_2\text{O})$, $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ を測定した。 $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ は7.13または ± 4.00 p. p. m. を $\gamma \text{H}_2/2\pi \sim 69$ Hzで f_2 照射し, inversion recovery法(Akasaka, 7)により測定した。

3. 結果と考察

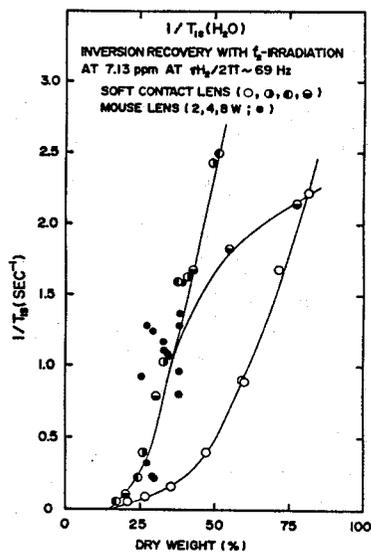
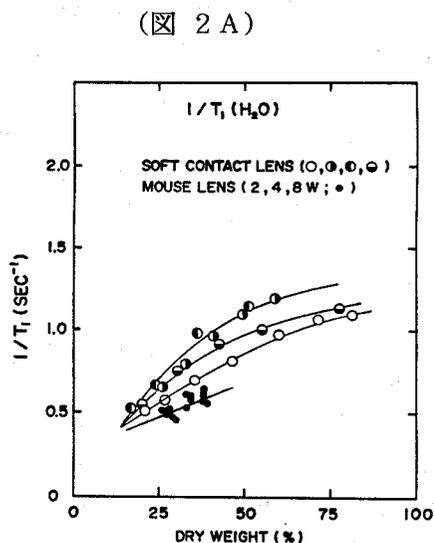
水晶体は水66%, タンパク質33%, その他の物質1%から構成される親水性の液晶的なゲル構築体であり, その透明性と屈折性は水-タンパク質-その他の微量物質群の三者間の巧妙な相互作用のバランスにより保持されている。Ozakiら(8)は水晶体の老化と水晶体タンパク質の構造変化について, ラマン分光法によりSD系ラット水晶体を測定し, 含水量及び水晶体タンパク質の構造変化は生後より生じ, 6ヵ月齢まで大きく変化することを見いだした。我々が得たddyマウス水晶体の360 MHz $^1\text{H-NMR}$ 測定結果においても, 週齢の変化により同様の傾向が認められた(前回の本大会において報告)。2, 4及び8週齢のマウス水晶体内の $T_1(\text{H}_2\text{O})$ の逆数及び $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ (7.13 p. p. m., 69Hz)の逆数を乾燥重量(W(%))に対してプロットしたものがそれぞれ図1A, 1Bである。また, SCLsにおける測定結果をマウス水晶体の結果と重ね合わせたものを図2(図2A, $1/T_1(\text{H}_2\text{O})$ vs W(%); 図2B, $1/T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ (7.13 p. p. m., 69 Hz) vs W(%))に示す。図2Aに示すように, SCLsにおいて, NVP-MMA系コポリマー(○), HEMA-GMA系コポリマー(●), HEMA-NVP系コポリマー(⊙), GMA-NVP-MMA系コポリマー(⊖)のいずれも $1/T_1(\text{H}_2\text{O})$ vs W(%)プロットでは, マウス水晶体で得られた結果(●)と同様の傾向を示し, W(%)の増加とともに $1/T_1(\text{H}_2\text{O})$ 値がゆるやかに増加する, 上に凸の曲線を示した。一方, 図2Bに示すように, $T_{1s}(\text{H}_2\text{O})$ の測定結果では, マウス水晶体の結果(●)と良く一致しているSCLsはHEMA-GMA系コポリマー(●)とHEMA-NVP系コポリマー(⊙)であり, NVP-MMA系コポリマー(○)及びGMA-NVP-MMA系コポリマー(⊖)は違った挙動を示した。

これらのことから, 合成鎖状高分子ゲル内の水分子の挙動に関する情報は, T_1 測定からはもはや得ることができず, 逆に, T_{1s} 測定は高分子ゲル内の水分子の挙動を鋭敏に反映していることが判る。さらに, マウス水晶体の結果と良く一致した合成鎖状高分子ゲル内の水の存在状態は, NMR的にみて生体組織内のそれに類似していることが示唆された。

(図 1 B)



(図 2 B)



4. 文献

- (1) Damadian, R., Science 171, 1151 (1971)
- (2) Hazlewood, C. F., Chang, D. C., Medina, D. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1478 (1972)
- (3) Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S. et al, Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130 (1986) ; Era, S., Kuwata, K., Sogami, M. et al, ibid. 33, 214 (1989)
- (4) Era, S., Kato, K., Sogami, M. et al, Biomed. Res. 7, Suppl. 2, 41 (1986)
- (5) Iwama, T., Yamada, H., Era, S. et al, Magn. Reson. Med. 24, 53 (1992) ; Iwama, T., Yamada, H., Andoh, T. et al, Magn. Reson. Med. 25, 78 (1992)
- (6) Sato, S., Kida, K., Takeuchi, S. et al, Acta Sch. Med. Univ. Gifu 38, 674 (1990)
- (7) Akasaka, K., J. Magn. Reson. 45, 337 (1981) ; Akasaka, K., ibid. 51, 14 (1983)
- (8) Ozaki, Y., Mizuno, A., Itoh, K. et al, Biochemistry 22, 6254 (1983)

P12 固体高分解能 ^{29}Si -NMR によるポリシランの構造研究 [II]

神奈川大工 ○高山 俊夫 東工大工 安藤 勳

A Structural Study of Substituted Polysilanes in the Solid State by ^{29}Si NMR [II]

○Toshio Takayama* and Isao Ando

(*Department of Applied Chemistry, Kanagawa University, Yokohama,

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo)

The ^{29}Si CP/MAS NMR experiments have successfully provided very useful information about conformation of polysilanes in the solid state. In this work, we study structural behavior of poly(diethylsilane) (PDES) and poly(dimethylsilane-co-diethylsilane) (PM-co-ES), by means of ^{29}Si CP/MAS NMR spectroscopy over a wide range of temperatures. PDES takes trans conformation in the solid state. The copolymer is more flexible compared with dimethyl polymer (PDMS). The ^{29}Si T_1 data indicate that there is a large differences in molecular motion between PDES and PDMS.

1) 緒論

新しい機能性を有するポリシラン¹⁾の側鎖に各種アルキル鎖(R)を導入した場合、高分子ポリシラン-($-\text{R}_2\text{Si}-$) n -の主鎖がどのような構造の挙動を取るのかを明らかにすることは非常に興味がある。Rの炭素数によって主鎖構造が異なり、炭素数が1~3の場合ポリシランの主鎖構造はtrans planarであると言われている。しかし、R=2のポリ(ジエチルシラン)(PDES)及びポリ(ジメチルシラン)(PDMS)とのコポリマー(PM-co-ES)の構造解明に関してはいまだ十分に行われているとはいえない。本討論会では、いろいろな温度でのPDES及びPM-co-ESの主鎖と側鎖の構造および分子運動研究に温度可変(VT)固体高分解能 NMR(^{29}Si , ^{13}C)法を用いることは有用であることを議論する。

2) 実験

2-1 PDES 及び PM-co-ES の合成は Trujillo²⁾ の方法にて行った。

2-2 VT-固体高分解能 NMR 測定: JEOL EX270 装置を用いて CP/MAS 及び GHD/MAS法 (^{29}Si 観測周波数 53.54MHz, ^{13}C 観測周波数 67.80MHz) に行かない、化学シフトは全て TMS 基準に換算した。スピン-格子緩和時間(T_1)測定は Torchia 法にて行った。

3) 結果と考察

3-1 PDES: Fig.1にPDESの温度の関数における ^{29}Si (a)及び ^{13}C (b)-CPMAS NMR スペクトルを示す。 ^{29}Si スペクトルに大きな変化はなかった。 ^{13}C スペクトル(25℃)ではエチル基

固体高分解能 ^{29}Si NMR・アルキル置換ポリシラン・構造解析・コンホメーション

○たかやまとしお・あんどういさお

の2本のピークが2つに分裂していることより2種類の結晶形が存在することを暗示しているが、温度の上昇に伴って消失した。このことについては現在検討中である。GHD/MAS法によるスペクトルもCP/MAS法のスペクトルと同じであった。これはこの温度範囲で異なった相が存在していないことを示す。次に、PDESのSi主鎖及び側鎖の運動性を解明するために ^{29}Si 及び ^{13}C の T_1 を測定した(Table 1)。剛直なPDMSの25°Cでの T_1 値は ^{29}Si :494s, ^{13}C :11.6sであり、これと比較するといずれの T_1 値もはるかに小さく、PDESはPDMSと比較してかなり柔軟であることを示す。これはエチル基がメチル基より立体障害が大きく、Si主鎖が完全なtrans構造をとれないことによる。また、温度の上昇に伴って ^{29}Si 及び ^{13}C の T_1 値はいずれも増大する傾向を示した。これはこの温度範囲でPDESがBPP理論(T_1 と分子運動の相関関係を示す)における fast motion 範囲にあることが分かった。

3-2 PM-co-ES: Fig.2にPM-co-ESの ^{29}Si (a)及び ^{13}C (b)-CPMAS NMR スペクトルの温度変化を示す。温度の上昇に伴って ^{29}Si 及び ^{13}C スペクトルに大きな変化はなかった。また、25°Cにおける T_1 値(s)は ^{29}Si (PM:30.6,ES:11.2)及び ^{13}C (PM:CH₃=3.87,ES:CH₃=1.23,CH₂=0.94)であった。この値とTable 1の値を比較すると、コポリマーのES部の分子運動はホモポリマーと比べて大きな変化がないが、PM部の分子運動はホモポリマーと比べて大きく影響を受けていることを示す。更に広い温度範囲での測定結果を含めて詳しく議論する。

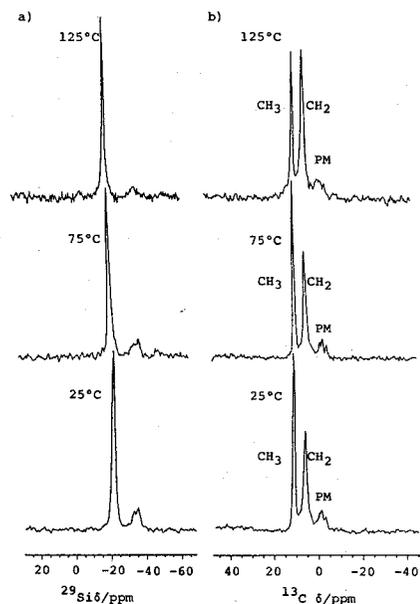


Fig.2 Temperature dependence of ^{29}Si (a) and ^{13}C (b)-CP/MAS NMR spectra of PM-co-ES.

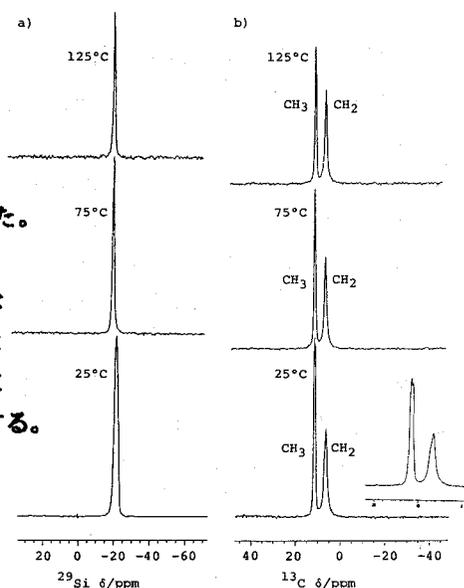


Fig.1 Temperature dependence of ^{29}Si (a) and ^{13}C (b)-CP/MAS NMR spectra of PDES.

Table 1 Temperature Dependence of ^{29}Si and ^{13}C Spin-Lattice Relaxation Times(T_1 /s) of PDES

Nucleus	Temp. / °C			
	25	75	125	
^{29}Si	10.1	16.8	34.9	
^{13}C				
	CH ₃	1.31	1.74	3.15
	CH ₂	0.86	1.18	1.95

- 1) T. Takayama and I. Ando, J. Mol. Struct., 222, 275(1990); 243, 101(1991).
- 2) R. E. Trujillo, J. Organomet. Chem., C27, 198(1980).

P13 固体¹⁵N NMRによる芳香族ポリアミドならびにポリイミドの構造解析

農工大工 ○出村誠・呂奏洪・朝倉哲郎
三井東圧化学 浅沼 正

Structural Analysis of Aromatic Polyamides and Polyimides by ¹⁵N Solid State NMR; Makoto Demura¹, Joo Hong Yeo¹, Tetsuo Asakura¹, and Tadashi Asanuma², ¹ Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, ² Central Research Lab., Mitsui-Toatsu Chemical Inc.

The structure in atomic level for aromatic polyamides and polyimides, was determined in the solid state by using ¹⁵N CP NMR method on the basis of the anisotropy of ¹⁵N chemical shift tensors. The ¹⁵N chemical shift tensors were determined by the simulation of the observed powder pattern spectra. The ¹⁵N CP NMR spectra of the oriented samples were observed by setting up the block samples at parallel and perpendicular with respect to the magnetic field. By the simulation of both spectra, the angles between the NH bond direction and the fiber axis of oriented samples were determined by using Euler angles defined for transformation of the principal axis system of the samples. Both the crystalline and non-crystalline structures of the polyamides and polyimides were discussed in detail.

緒言

固体¹⁵N化学シフト異方性と¹⁵N-¹³C双極子相互作用に着目することにより、ポリアミド系配向試料の原子レベルでの詳細な構造解析が可能であることをこれまでに報告してきた¹⁻⁴⁾。特に、N-C'またはN-H結合と繊維軸とのなす角度がこれらの解析から直接決定できるので、スペクトルパターンから、結晶、非晶領域の分離とともに個々の領域ごとに上記の平均角度とその角度分布が求められる。また、ポリペプチドでは、特定サイトの¹⁵Nまたは¹³Cラベリングによって、着目残基の内部回転角(ϕ, ψ)の決定にも応用できることを示してきた。

本発表では、固体¹⁵N NMR解析法を芳香族ポリアミドおよびポリイミドの構造解析に適用した結果について述べる。まず、ポリアミド系配向試料の¹⁵N化学シフトがそのN-H結合と配向軸とのなす角度に極めて敏感であることを実験と理論から証明する。さらに、ポリイミドの構造解析と合わせて、¹⁵N化学シフトと構造との関連について述べる。

実験

芳香族ポリアミド系繊維として、poly(paraphenyleneterephthalamide)(PPTA), poly(meta phenylene isophthalamide)(PMIA), poly(4-methylmetaphenyleneterephthalamide)(P4M-MPTA)を、ポリイミド織

キーワード： 芳香族ポリアミド、ポリイミド、固体¹⁵N CP NMR、
配向、化学シフトテンソル

でむらまこと、ようじゅほん、あさくらてつお、あさぬまたし

維として、poly3-3'(4,4'-dioxypiphenyl)-diphenylene pyromellit imide(TPI)を用いた。 ^{15}N 化学シフトテンソル値は、粉末状に裁断した試料の ^{15}N CP NMR測定を行ない、そのスペクトルシミュレーションから決定した。また、繊維およびフィルムの一軸配向ブロック試料(4x4x12 mm)を作製後、静磁場と繊維軸とのなす角度を0度(平行)または、90度(垂直)に設定し、 ^{15}N CP NMRを測定した。配向試料のスペクトルのシミュレーションにより、主軸系と繊維軸系間の変換のオイラー角 α_f, β_f を決定した¹⁾。さらに、ポリイミドの主軸系を分子軸系に変換するオイラー角 α_D, β_D を決定するために、 ^{13}C - ^{15}N ダブルラベルN-(フェニル)フタルイミドを合成した。 ^{13}C - ^{15}N 双極子相互作用によってモジュレートされたパウダーパターン²⁾のシミュレーションから α_D, β_D を決定した²⁾。計算の詳細については、文献参照¹⁻⁴⁾。

^{15}N CP NMRの測定は、ブロック試料の角度を任意に変えられるプローブを備えたJEOL GX-400 NMRスペクトロメーターを用い、40.5 MHzにて行った。CP時間は7 ms、繰り返し時間は7sとした。 ^{15}N 化学シフトは NH_4NO_3 を基準とした。

結果と考察

1. ポリアミド系配向試料の ^{15}N 化学シフトのN-H結合の角度依存性

ポリアミド系配向ブロック試料の ^{15}N CP NMR スペクトルパターンは、ブロック試料の一軸配向方向と静磁場方向とのなす角度によって大きく変化する。Fig. 1 に示した ^{15}N CP NMRスペクトル(実線)は、絹フィブロイン(Silk II), PPTA, ポリ- γ -ベンジル-L-グルタメート(PBLG), PMIAの配向軸をいずれも磁場に対して平行(0度)に設置した場合の結果である。破線は試料をランダムに詰めた場合のパウダーパターンを示しており、試料間の大きな差異は認められない。しかしながら、分子軸を配向させたブロック試料では、 ^{15}N 化学シフトの主軸系が全 ^{15}N 核で配向するため、試料固有のN-H結合と分子軸

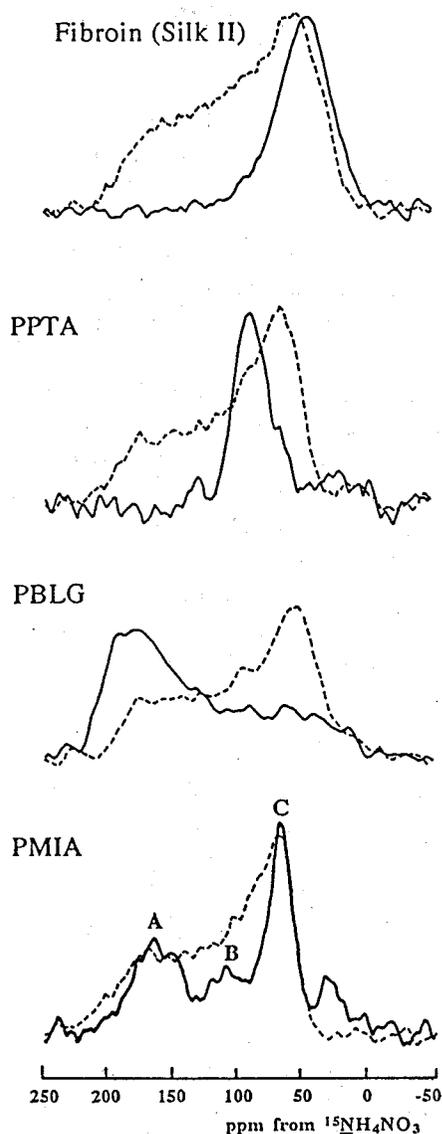


Fig.1 ^{15}N CP NMR spectra of polyamides, silk fibroin(Silk II), PPTA, PBLG and PMIA. Spectra of the uniaxially oriented and random state samples are shown as solid line and broken lines, respectively.

とのなす角度によって著しく異なることを示している。X線回折または固体NMR解析から明かにされているそれぞれの結晶部のN-H結合と配向軸とのなす角度, θ_{NH} は、絹フィブロイン(Silk II)では90度, PMIAでは75または80度, PPTAでは66度, PBLGでは13度であり、 θ_{NH} が小さいほどピーク($\sigma_{parallel}$)が大きく低磁場シフトした。

^{15}N 化学シフトテンソルの主軸系から繊維軸系または分子軸系の変換オイラー角 α_F, β_F と α_D, β_D を用いて θ_{NH} は以下のように表すことができる。

$$\cos\theta_{NH} = \cos\beta_F \cos\beta_D + \sin\beta_F \cos\alpha_F \cos\alpha_D \sin\beta_D + \sin\beta_F \sin\alpha_F \sin\alpha_D \sin\beta_D \quad (1)$$

あらかじめ、化学シフトテンソル($\sigma_{11} < \sigma_{22} < \sigma_{33}$)と α_D, β_D が決定されていれば、 θ_{NH} は α_F, β_F の関数として求められる。そこで、 $\sigma_{parallel}$ を与える次式

$$\sigma_{parallel} = \sigma_{11} \sin^2\beta_F \cos^2\alpha_F + \sigma_{22} \sin^2\beta_F \sin^2\alpha_F + \sigma_{33} \cos^2\beta_F \quad (2)$$

を基にして、各試料の $\sigma_{parallel}$ 実測値を満たす α_F, β_F 解の組から θ_{NH} の許容範囲を計算した(Fig. 2)。 $0^\circ < \theta_{NH} < 90^\circ$ の範囲で示したこの図から、 θ_{NH} が小さいほど $\sigma_{parallel}$ が低磁場シフトすることが再現されている。言い換えると、配向ブロック試料の配向軸を静磁場に対して平行に設置したスペクトルの $\sigma_{parallel}$ が求められれば、 θ_{NH} の許容範囲が推定できることを示している。さらに、垂直に設置したスペクトルパターンの解析と組み合わせて α_F, β_F 値を決定すれば、最終的に θ_{NH} 値を絞ることが可能である。①, ②, ③, ④は他の測定から決定された各試料の θ_{NH} について $\sigma_{parallel}$ をプロットしたものであり、いずれも実験誤差内で許容範囲内にある。

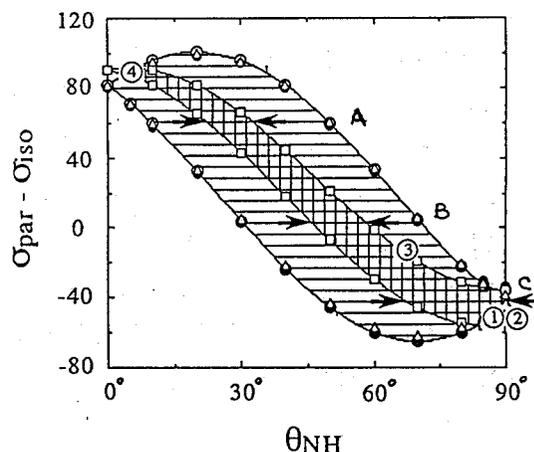


Fig. 2 Plots of $\sigma_{par} - \sigma_{iso}$ (ppm) as a function of θ_{NH} . ○; natural abundance silk fibroin, ●; ^{15}N Gly-labeled silk fibroin, △; PBLG, and □; PPTA. The regions painted by the horizontal and vertical lines are correspond to natural abundance silk fibroin and PPTA, respectively. The $\sigma_{par} - \sigma_{iso}$ values of natural abundance silk fibroin (①), ^{15}N Gly-labeled silk fibroin (②), PBLG (③) and PPTA (④) are plotted using the θ_{NH} values.

また、Fig. 1 のPMIA, P4M-MPTAのように配向ブロック試料の配向軸を静磁場に対して平行に設置

Table 1 Structural characterization of various polyamides based on the ^{15}N Chemical shift tensors.

	Aromatic			Aliphatic			
	PPTA	PMIA	P4M-MPTA	PBLG	Silk(Gly)	NMXD6	Nylon66
σ_{11} (ppm)	48	51	52	33	22	31	19
σ_{22} (ppm)	68	66	70	56	54	66	65
σ_{33} (ppm)	195	196	198	195	186	200	206
σ_{iso} (ppm)	104	104	107	95	87	99	97
fraction (%)	100	44	17	39	21	18	61
σ_{par} (ppm)	90	68	105	160	72	106	149
θ_{NH} (min) (deg)	53	65	48	25	64	48	31
θ_{NH} (max) (deg)	66	83	58	34	83	59	40
θ_{NH} NMR(deg)	58,65	75,80	50,55	27,32	79,84	61,66	42,47
p (distribution /deg)	8	3	9	15	9	24	29
θ_{NH} Xray(deg)	66	75,80	-	-	86,94	-	-
crystallinityXray(%)	75	25	-	-	25	-	-
					13	92.5	67
					20	40	30
							50-60

したスペクトルが分裂した場合、各成分A,B,Cの σ_{parallel} から同様に θ_{NH} の許容範囲が求められる(Fig.2の矢印A,B,C)。結果をTable 1にまとめた。

2. ポリイミド配向試料の結晶および非晶部の構造解析

Fig. 3はアニールされた延伸TPIフィルムの配向軸をそろえて作製したブロック試料の ^{15}N CP NMR スペクトルである。天然存在比の試料のため、積算回数は、配向軸を磁場と平行および垂直に設置した場合、それぞれ6500, 11000回であった。平行と垂直に設置したピークの線幅は約15ppmと130ppmで、大きく異なる。 ^{15}N CP MAS NMRスペクトルから得られる等方的化学シフトおよびランダムに詰めた試料のパウダーパターンから、 ^{15}N 化学シフトを79, 183, 192 ppmと決定した。このテンソル値を基に、Fig. 3の平行設置スペクトルの成分を配向分布 p の異なる2成分A (60%), B(40%)に分離した。配向分布の狭い成分Aが結晶成分由来と帰属されるものの、X線回折による結晶化度は約20%とされている。従って、個々の分子鎖は結晶構造のコンホメーションをとりながらもその分子間の空間的連続性は必ずしも高くないと推定される。

平行、垂直設置の両スペクトルを再現するシミュレーションを ^{15}N 化学シフトテンソルを用いて行い、主軸系と繊維軸系のなす角度 α_{F} , β_{F} を成分A, Bについて求めた。 β_{F} について依存性は高くそれぞれ 12 ± 2 度、 0 ± 2 度と決定されるが、 α_{F} についてはその依存性はほとんどなかった。また、 ^{13}C - ^{15}N ダブルラベルN-(フェニル)フタルイミドのパウダーパターンのシミュレーションから α_{DC} , β_{DC} を 0 , 106 度と決定した(Fig.4)。成分A, Bのイミド基のC'1-N-C'2について θ_{NC1} , θ_{NC2} をこれらのパラメータから計算すると、それぞれ 112 ± 7 , 170 ± 4 度と 106 ± 7 , 174 ± 4 度となる。これらの結果はアニールした延伸TPI分子鎖は、平均的にはそのほとんどが結晶性のコンホメーションをとっているが、その配向分布が高い成分と低い成分が共存することを示唆している。

参考文献

1. L.K.Nicholson, T.Asakura, M.Demura and T.A.Cross, *Biopolymers*, 33, 847(1993).
2. T.Asakura, J.H.Yeo, M.Demura, T.Itoh, T.Fujito, M.Imanari, L.K.Nicholson and T.A.Cross, *Macromolecules*, in press.
3. 呂奏洪, 朝倉哲郎, 高分子論文集, 印刷中
4. 呂奏洪, 出村誠, 小中沢岳仁, 朝倉哲郎, 伊藤卓郎, 藤戸輝昭, 今成司, 高分子論文集, 印刷中

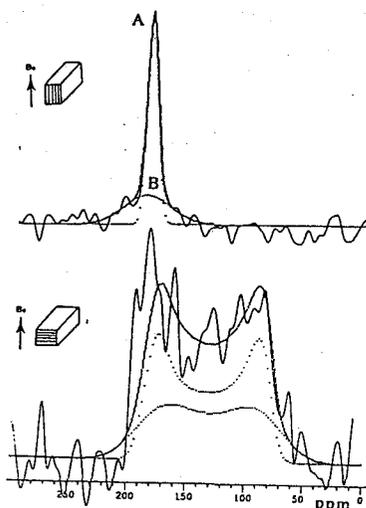


Fig.3 ^{15}N CP NMR spectra of polyimide, TPI, set parallel (upper) and perpendicular (lower) to magnetic field (solid line). dotted lines are spectral simulation.

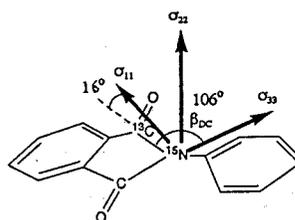


Fig.4 Direction of ^{15}N Chemical shift tensor of TPI imide plane.

P14 p-t-ブチルカリクス[4]アレン包接化合物の固体高分解能NMRによる研究

(群馬大工) ○山延 健、中村一成、日比野和伸、甲本忠史
 (東工大工) 黒子弘道、安藤 勲
 (金沢大工) 中本義章、石田真一郎

¹³C CPMAS NMR Study of p-t-butylcalix[4]arene Clathrate in the solid state

○ Takeshi Yamanobe ¹⁾, Ichinari Nakamura ¹⁾, Kazunobu Hibino ¹⁾, Tadashi Komoto ¹⁾,
 Hiromichi Kurosu ²⁾, Isao Ando ²⁾, Yoshiaki Nakamoto ³⁾ and Shin-ichiro Ishida ³⁾

¹⁾ Department of Materials Engineering, Gunma University

²⁾ Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

³⁾ Department of Industrial Chemistry, Kanazawa University

¹³C CPMAS NMR measurements were carried out for p-butylcalix[4]arene/alkylbenzene clathrates in the solid state. ¹³C chemical shifts of the alkyl group in the clathrates appear at higher field compared with those in liquid state. The upfield shifts of ¹³C chemical shift is understood as the ring current effect of host phenyl groups. Based on the ring current effect, it was found that the alkyl groups of the guest molecules are located in the cavity of p-t-butylcalix[4]arene depending on the size of the alkyl group. Variable temperature measurements were also carried out and the structure and mobility of clathrates are discussed.

〔緒言〕

フェノール樹脂を合成する過程で生成する環状オリゴマー、p-t-ブチルカリクス[4]アレンは内部に空孔を持つ物質である。カリクスアレン(図1)はその内部空孔に低分子量の物質や金属を取り込んで包接化合物を形成する。例えば、p-t-ブチルカリクス[4]アレンはクロロホルム、

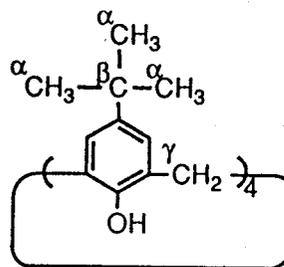


Fig.1 p-t-butylcalix[4]arene

ベンゼン、トルエン、キシレン、アニソールと結晶性の包接化合物を形成する。これらの包接化合物の構造についてはこれまで主にX線結晶解析によってなされてきた。しかし、ゲスト分子は包接された状態でも運動しており、X線解析によってその位置は推定にとどまっている。

カリクスアレンの空孔部分は主にベンゼン環によって構成されており、ベンゼン環の環電流効果は包接されているゲスト分子の位置に関して情報を与えてくれるものと考えられる。本研究では¹³C CPMAS NMRを用いてp-t-ブチルカリクス[4]アレンとアルキルベンゼンの包接化合物の構造に関して議論する。

キーワード：p-t-ブチルカリクス[4]アレン、固体高分解能NMR、包接化合物

○やまのべたけし、なかむらいちなり、ひびのかずのぶ、こうもとただし、
 くろすひろみち、あんどういさお、なかもとよしあき、いしだしんいちろう

[実験]

¹³C CPMAS NMR測定は日本電子製GX270NMRスペクトルメーターを用いて行った。観測周波数は67.8MHz、接触時間は5ms、MASは約2KHzで行った。測定温度は-120℃~120℃である。化学シフトの基準はアダマンタンのメチレンピークを29.5ppmとして行った。

[結果と考察]

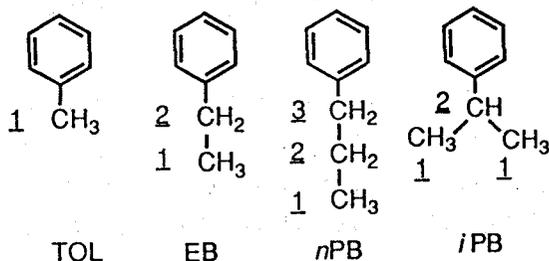
表1にカリクスアレンとトルエン(TOL)、エチルベンゼン(EB)、*n*-プロピルベンゼン(*n*PB)、*i*-プロピルベンゼン(*i*PB)の包接化合物のNMR化学シフト、包接されていないアルキルベンゼンの化学シフトとその差を示した。この表からわかるように、*i*PBを除いてTOL、EB、*n*PBのメチル基の化学シフトは包接されているものに比べて包接されていないものが約5ppm高磁場側に現れている。このことはTOLについて既に報告したように環電流効果によって解釈することが出来る¹⁾。すなわち、カリクスアレンの空孔部分は構成する4つのフェニル環によって囲まれており、包接されたアルキルベンゼンのメチル基はそれらのフェニル環から環電流効果を受けている。その環電流効果による化学シフト差を比べてみるとTOLが5.8ppmで最も大きく、EBが4.7、*i*PBが4.6ppmである。このことから、TOLが最も深くカリクスアレンに包接されており、EB、*i*PBは少し浅く包接されていることがわかる。C2炭素についてみるとEB、*n*PBともに約1ppmであり、メチル基より浅い位置にあると考えられるので弱い環電流効果を受けている。一方で*i*PBのメチル基の化学シフトは包接されていないものに比べて約1ppmの高磁場シフトであり、他のものに比べて包接がかなり浅いものと考えられる。EB、*n*PBのC2炭素の環電流効果が約1ppmであることから、*i*PBの場合は他のものに比べて単結合1つ分位浅い位置にある。

Table 1 ¹³C NMR Chemical Shifts of alkyl carbons of alkylbenzenes included in the *p*-*t*-butylcalix[4]arene in the solid state and their upfield shifts $\Delta\delta$ by the host-guest interaction

Guest	¹³ C chemical shift/ppm			Upfield shift($\Delta\delta$ ppm)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
TOL	15.5 (21.3)			5.8		
EB	10.9 (15.6)	28.0 (28.9)		4.7	0.9	
<i>n</i> PB	9.2 (13.8)	23.2 (24.6)	38.1 (38.2)	4.6	1.4	0.1
<i>i</i> PB	23.0 (24.0)	34.9 (34.9)		1.0	-0.7	

The number in the parenthesis indicates the chemical shift for the corresponding free alkylbenzene.
Table 2 ¹³C chemical shifts of α 、 β 、 γ carbons of *p*-*t*-calix[4]arene clathrates

	¹³ C chemical shift/ppm		
	α	β	γ
TOL	32.1	34.6	30.6
EB	33.6	35.0	30.7
<i>n</i> PB	33.3	34.9	30.5
<i>i</i> PB	33.4	34.9	30.7



この包接の違いはカリクスアレン自体の化学シフトにも現れている。表2にTOL, EB, nPB, iPBとの包接化合物のカリクスアレンのメチル基 (α)、メチレン基 (γ)、4級炭素 (β) の化学シフトを示した。メチレン炭素の化学シフトは4種類ともほぼ同じであるためホストとゲストの相互作用は空孔部分ではあまり大きな違いはないものと考えられる。これに対して、4級炭素とメチル基を比べてみると4級炭素で約0.5ppm、メチル基で約1.5ppm、TOLの方が高磁場側に現れている。すなわち、ゲスト分子とt-ブチル基の相互作用に違いがあると考えられる。

包接化合物の構造をより詳しく議論するために環電流効果の計算を行った。Johnson²⁾らによると環電流効果は以下の式で与えられる。

$$\delta' \times 10^{-6} = \frac{\pi e^2}{6\pi m c^2 a} \cdot \frac{1}{\sqrt{[(1+\rho)^2 + L^2]}} \left[K + \frac{1-\rho^2-L^2}{(1-\rho)^2 + L^2} E \right]$$

ここで、Lはフェニル環の中心からの垂直距離であり、 ρ は環中心からの水平距離である。X線解析から得られた座標を用い、トルエンのメチル基がカリクスアレンの中心軸上にあると仮定し、メチル基の位置を変化させて環電流効果を計算したのが図2である。ここで、Z軸はカリクスアレンの中心軸に平行である。この図からわかるようにZ=4.3において1個のフェニル環から最大の環電流効果1.04ppmを与えることがわかる。計算によって得られたフェニル環とトルエンのメチル基の位置関係を図3に示す。トルエンのメチル炭素はカリクスアレンの酸素原子がなす平面の上方3.23Å、フェニル環の中心がなす平面の上方0.91Åであることがわかる。Bott³⁾らはp-t-ブチルメトキシカリクス[4]アレン-ナトリウムとトルエンの包接体のX線構造解析について報告している。それによると、トルエンのメチル炭素はカリクスアレンの酸素原子のなす平面の上方3.91Å、フェニル環から3.54Åの位置にあると報告している。本研究で行った環電流効果の計算がベンゼン環に基づくものであること、カリクスアレンの構造が異なることを考慮すると、この値は我々の結果に非常に近いものであることがわかる。すなわち、この環電流効果に基づくカリクスアレン包接体の構造解析が有用であることが示唆される。

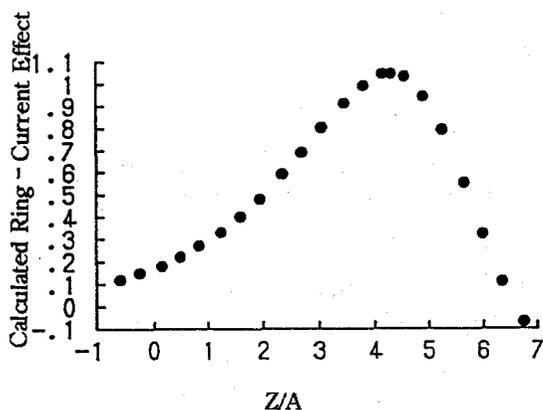


Fig.2 Calculated ring-current effect.

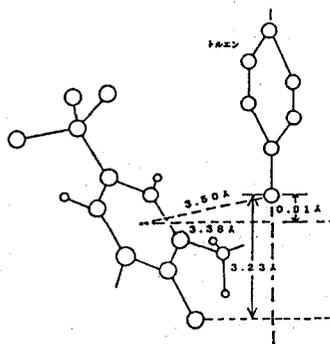


Fig.3 Structure of p-t-butylcalix[4]arene/toluene clathrate

図4にp-t-ブチルカリクス[4]アレン/トルエン包接体の ^{13}C CPMASスペクトルの温度変化を示した。-120℃ではフェニル環部分のピークがかなり複雑になっている。この部分はカリクスアレンとトルエンのピークが重なっているが明らかに両方の炭素数より多いピークが存在する。このことは低温側で宿主であるカリクスアレンの4つのフェニルの構造が非等価になっていることを示している。-90℃はほとんどスペクトルは変化がないが、-60℃以上ではフェニル環部分のピークが先鋭化している。これは温度上昇にともないカリクスアレン分子の運動が始まり、低温側では非等価であったフェニル環が運動することにより平均的に等価になったことを意味している。0℃と室温のスペクトルを比較してみるとカリクスアレンのフェニル基の部分、t-ブチル基の部分のスペクトルが急激に変化している。t-ブチル基のメチル炭素は約1.2ppm高磁場シフトしている。また、フェニル環の部分についても130ppm付近のピークが3本から2本になり線幅が広がっている。このことは0℃と室温の間でかなりの構造変化が起きていることを意味している。

トルエンのメチル基の化学シフトは温度上昇により徐々に低磁場シフトしている。このことは温度上昇により、ゲストであるトルエンの位置がカリクスアレンの空孔より徐々に外側に移動していることを意味している。メチル基の化学シフトは特に0℃と室温の間で大きな変化はないが温度に対する化学シフトの変化率は0℃以下では緩やかに変化し、0℃以上では急激に変化している。これらのことから、この温度付近で包接体の構造が変化していることが示唆される。

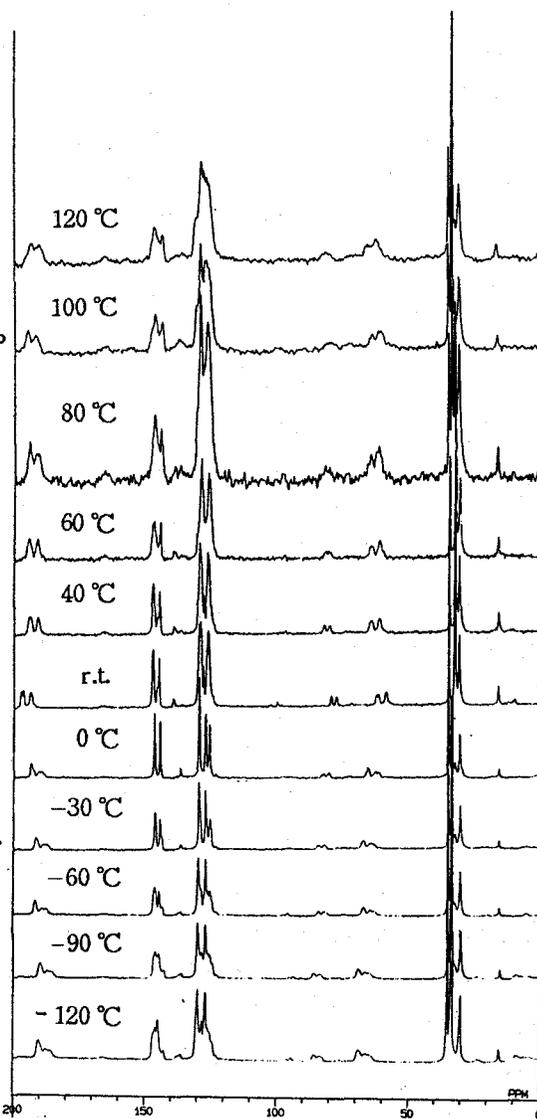


Fig.4 VT spectra of p-t-butylcalix[4]arene

- 1) T. Komoto et al, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 135(1988)
- 2) C. E. Johnson Jr. and F. A. Bovey, J. Chem. Phys., 29, 1012(1958)
- 3) S. G. Bott et al, J. Am. Chem. Soc., 108, 1709(1986)

○内藤 良之¹⁾、山延 健²⁾、植松 淑子¹⁾、安藤 勲³⁾

¹⁾東京工芸大、²⁾群馬大、³⁾東京工業大

Structure and Molecular Motion of Poly(γ -*n*-alkyl L-glutamate)s
in the Solid State [IV]

○Yoshiyuki Naito¹⁾, Takeshi Yamanobe²⁾, Yoshiko Uematsu¹⁾, Isao Ando³⁾

¹⁾Tokyo Institute of Polytechnics, ²⁾Gunma University,

³⁾Tokyo Institute of Technology

¹³C CPMAS NMR measurements were carried out in order to clarify the structure and the mobility of the main and side chain of poly (γ -*n*-alkyl L-glutamate)s. From VT spectra, it was found that the side chain peaks disappeared at $-20 - 0^\circ\text{C}$ independent of side chain length. At this temperature range, the rate of the side chain motion is thought to be close to ¹H decoupling frequency. For the polymer with longer side chain length than PG-6, peaks of main chain also disappeared at $20-40^\circ\text{C}$. The main chain of these polymers can attain high mobility by increase of the side chain mobility. The mobility of the side chain carbon is discussed through T_1 .

1. 序論

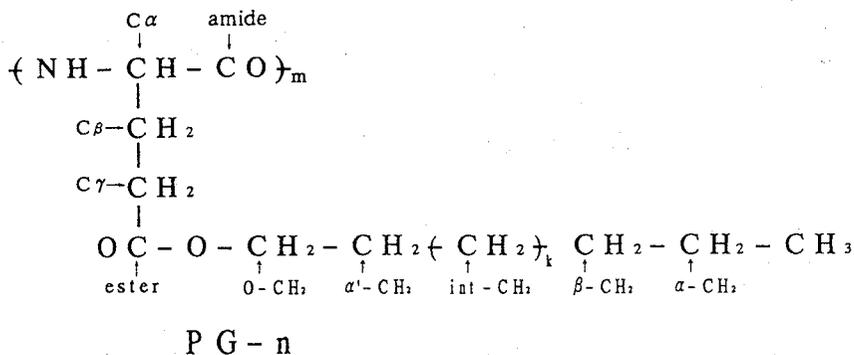
ポリグルタメート誘導体は主鎖が α ヘリックス構造を形成し、適当な条件下で液晶相を形成することが知られている。このポリグルタメートの側鎖に*n*-アルキル基を導入したポリアルキルグルタメート(PALG)は、その側鎖長に依存して様々な興味深い挙動を示す。例えば側鎖のアルキル炭素数が10以上ではサーモトロピック液晶を形成し、14以上では室温で側鎖が結晶相を形成する。このような性質と、側鎖長との関係を明らかにすることは非常に重要である。我々はこれまで固体高分解能NMRがポリアルキルグルタメートの構造解析に有用であることを報告してきた¹⁾。本研究では、一連のPALGについて広い温度範囲における主鎖及び側鎖の構造と運動性について、固体高分解能NMRを用いて議論する。

キーワード: ポリ(γ -*n*-アルキル L-グルタメート)、¹³C スピン-格子緩和時間、¹³C CPMAS NMR、 α -ヘリックスコンformation

○ないとう よしゆき、やまのべ たけし、うえまつ よしこ、
あんど う いさお

2. 実験

一連のポリアルキルグルタレートは、対応するn-アルコールとのエステル交換反応によって合成した。便宜上サンプルはPG-nと省略し、nはアルキル炭素数を示す。各試料はクロロホルムに溶かし、室温でシャーレにキャストしてフィルムを作成した。NMR測定は、JEOL JNM-EX400WB NMRを用いて行った。測定温度は-100から90℃である。



3. 結果及び考察

固体状態におけるPALGの運動性を調べるために、-100から110℃の温度範囲でCPMAS測定を行った。Fig.1は、PG-6の-100から80℃の温度範囲におけるCPMASスペクトルの変化を示したものである。-100から-80℃ではスペクトルはほとんど変化していない。線幅はブロードで、室温では十分に分裂している α と α' 、intと β -CH₂のピークは重なっている。この温度では側鎖の運動は停止している。また、PG-6では側鎖の結晶化はおきない。従って、側鎖は非晶状態にあり、このため化学シフトに分布が生じ線幅が広がったものと思われる。-60℃付近から側鎖のこの部分のスペクトルが分裂し始める。これは、この温度付近から徐々に側鎖が運動し始め、化学シフトの分布が若干平

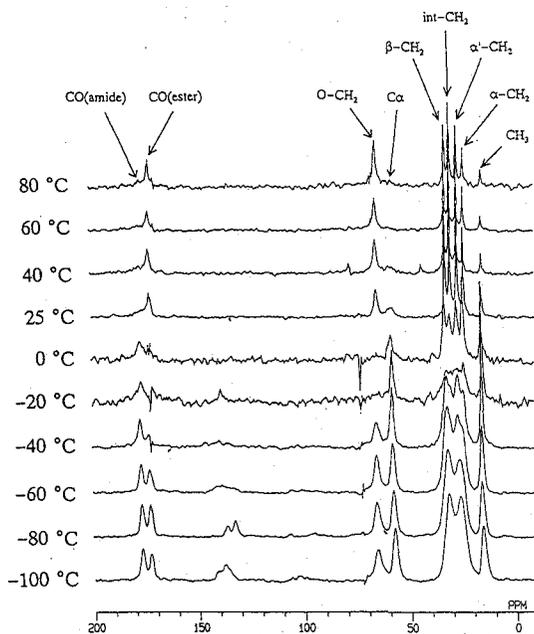


Figure.1 ¹³C CPMAS spectra of PG-6 at various temperature

均化されたためであると思われる。-20℃付近では側鎖炭素のピーク強度が急激に減少している。これは、この温度付近で側鎖の運動がプロトンのデカップリングの周波数と同程度の速さになったために、その運動にデカップリングのエネルギーが吸収されて、ピーク強度が減少したものと考えられる。他のサンプルについても同様に-20から0℃付近でピーク強度の減少が観測された。0℃以上では側鎖の各炭素のピークは十分に分裂する。

主鎖に関しては、PG-1では-100から90℃の範囲で主鎖ピークが消失することはないが、PG-2からPG-5と側鎖長が長くなるに従って、側鎖ピークがシャープになった後に主鎖ピークが消失する。その消失温度は、側鎖長が長くなるに従って、低温側へシフトする。このことから、側鎖長の短い試料では側鎖の運動が十分速くなくても主鎖同志の相互作用によって、主鎖の運動が起こりにくいものと考えられる。PG-6以上ではFig. 1から分かるように側鎖のピークの消失後すぐに主鎖ピークが消失している。このことから、PG-6以上では側鎖の運動が活発になると主鎖自身も運動が可能になることが分かる。

次に、室温以上の温度における側鎖の運動を詳細に調べるために、 ^{13}C スピナー格子緩和時間 T_1 の測定を行った。PG-1からPG-3ではTorchia²³⁾ のパルスを用い、PG-4以上の長いアルキル基を持つ試料ではパルスサチュレーションを利用し

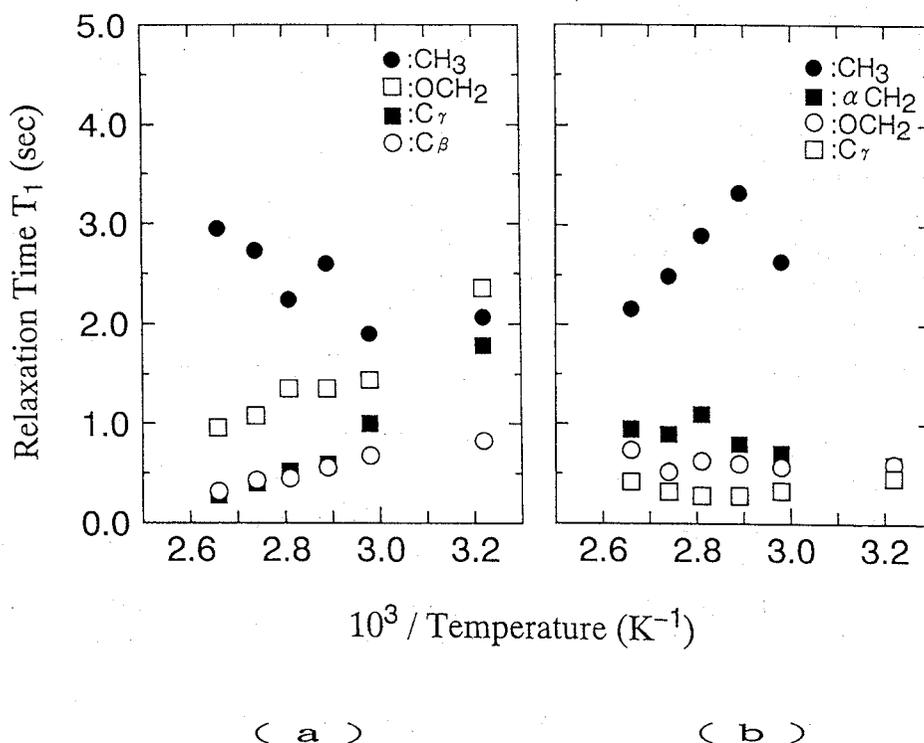


Figure.2 Temperature dependence of T_1 for side chain of PG-2 (a) and PG-3 (b)

たパルスシーケンスを用いた。Fig. 2(a) は、PG-2の側鎖炭素について室温から90℃における T_1 を温度の逆数に対してプロットしたものである。温度の上昇とともに T_1 の値は減少している。従って、側鎖炭素の運動性は増加しているが、 T_1 の極小値よりも遅い運動領域にあることがわかる。また、末端のメチル基も運動性は増加しているが、 T_1 の極小値付近から増加しているため、他の側鎖炭素よりも速い運動領域にあることがわかる。

Fig. 2(b)は、PG-3の側鎖炭素について、PG-2と同様に T_1 の温度変化をプロットしたものである。C β では T_1 は温度の上昇とともに減少しているが、C γ から末端の炭素は T_1 の極小値付近にあることが分かる。従って、PG-2からPG-3へと側鎖炭素が一つ増加したことによって、かなり側鎖全体の運動性が増加したことになる。また末端のメチル基に関しては、温度の上昇とともに T_1 が減少している。これは側鎖の運動性の増加にともなって末端に別の運動モードが生じたためであると考えられる。

Fig. 3は、PG-11の側鎖炭素について、同様に T_1 の温度変化をプロットしたものである。主鎖に近いCO(エステル)、O-CH $_2$ 炭素は、 T_1 の極小値付近にある。側鎖アルキル炭素数が4以上の他の試料についても同様に、CO(エステル)、O-CH $_2$ 炭素の T_1 は、極小値付近にあり、側鎖長に依存した変化は見られなかった。これに対して、O-CH $_2$ 炭素より外側の側鎖炭素については、温度の上昇とともに T_1 の値は増加し、その増加量が側鎖長とともに増加することから側鎖長が長い程側鎖の運動が速いことが分かる。

以上の結果から、側鎖アルキル基の短いPG-1からPG-3では、 T_1 の極小値付近からそれより遅い運動状態であることが分かった。PG-4以上の長いアルキル基を持つ試料では、側鎖末端ほど速い運動状態にあるが、CO(エステル)、O-CH $_2$ 炭素は側鎖長に依存しないことが分かった。

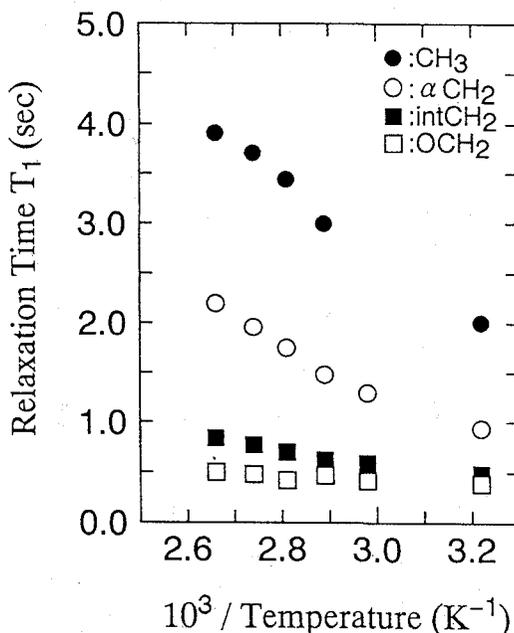


Figure.3 Temperature dependence of T_1 for side chain of PG-11

- 1) (a) M. Tsukahara et al, J. Mol. Struct., 159, 345 (1987)
- (b) T. Yamanobe et al, Macromolecules, 21, 48 (1988)
- (c) T. Yamanobe et al, J. Mol. Struct., 295, 25 (1993)
- 2) D. A. Torchia, J. Magn. Res., 30, 613 (1978)

Analysis of Conformational and Orientational Properties of Liquid Crystalline Molecules by use of Deuterium LCNMR [2]

Hirokazu Toriumi

Department of Chemistry, College of Arts and Sciences, The University of Tokyo

The conformational and orientational properties of liquid crystalline molecules in neat nematic phases have been analyzed by using deuterium LCNMR. The ^2H -LCNMR quadrupolar splitting patterns observed for n-alkylcyanobiphenyls and n-alkyloxycyanobiphenyls can be quantitatively reproduced based on a newly developed formulation of the potential of mean torque which includes contributions from orientational correlations between neighboring bond segments as well as those from individual bond segments (chord model). The results obtained in this study clearly demonstrate the predictive power of the chord model and the usefulness of the LCNMR technique for elucidating conformational and orientational properties of flexible molecules in liquid crystalline phases.

[序論] 磁場中で一軸配向させた液晶分子の NMR スペクトルは、双極子-双極子相互作用、核四極子相互作用に由来する複雑な splitting pattern の重ね合わせからなる。この複雑さは液晶 NMR (LCNMR) スペクトルが含む情報量の多さに由来するものであり、その解析が可能となれば、分子のコンホメーション特性および配向特性に関する詳細な知見を入手する新たな道が開けることとなる。例えば、磁場配向した液晶分子について重水素核をプローブとする ^2H -LCNMR 測定を行うと、図 1 に示すような核四極子相互作用による doublet が観察される。この分裂が核四極子分裂であり、その分裂幅 $\Delta\nu^i$ は C-D ボンドベクトルの配向秩序度 S_{CD}^i に直接比例する

$$\begin{aligned} \Delta\nu^i &= \frac{3}{2} (e^2qQ/h) \langle \frac{3}{2} \cos^2\theta_i - \frac{1}{2} \rangle \\ &= \frac{3}{2} (e^2qQ/h) S_{CD}^i \end{aligned} \quad (1)$$

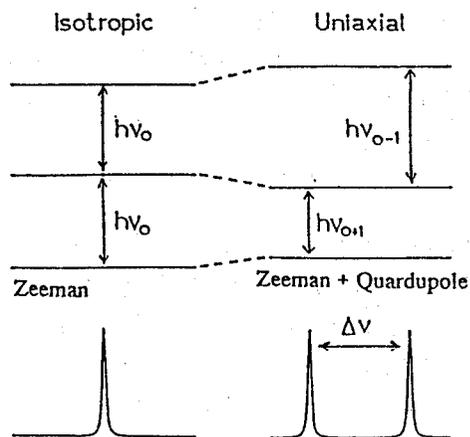


Fig. 1 Energy level of spin = 1 nucleus with quadrupole moment in magnetic field and deuterium NMR spectrum.

重水素 NMR / 液晶 / コンホメーション / 配向ポテンシャル / セグメント配向相関

とりうみひろかず

ここで θ_i は C-D ベクトルが磁場に対してなす角であり、分子中に配向様式のことなる複数の C-D セグメントが存在する場合には、そのすべてのセグメントに対してそれぞれ独立した $\Delta\nu^i$ 値、すなわち S_{CD}^i 値を得ることができる。

しかし、液晶 NMR データ解析のためには、液晶相における分子の配向ポテンシャルに関する正確な知識が必要であり、conformation-orientation 間の相関を任意に分離したりスケーリングしている限り正確な解析を行なうことはできない。筆者は、昨年の討論会において、フレキシブル鎖としてもっとも簡単な n-alkane を例に取り、そのネマチック溶媒中における配向ポテンシャルの厳密な表現について報告した¹⁾。本報では、この発展として、ネマチック液晶分子のニート相における ²H-LCNMR データを解析した結果を報告し、LCNMR 法により液晶分子のコンホメーション特性と配向特性に関する詳細な情報が得られることを示す。

[セグメント配向相関理論] 液晶分子の分子配向秩序度 $S = \langle S(\omega, n) \rangle$ を計算するためには self consistency equation を解く必要がある。例えば図 2 に示すような構造をもつ n-alkylcyanobiphenyl (nCB) に対する配向関数 $S(\omega, n)$ は、前報¹⁾ で報告した取り扱いに従い、以下のように書き表される。

$$S(\omega, n) = Y_{33}(e^0, e^0) + \rho_{C-C}^0 \sum_{i=1}^{N-1} Y_{33}(e^i, e^i) + \rho_{C-C}^1 \sum_{i=1}^{N-2} Y_{33}(e^i, e^{i+1}) \quad (2)$$

$S(\omega, n)$ のアルキル末端鎖コンホメーション (n) および配向 (ω) に対する依存性は、各 C-C セグメント・ペア (i, i+m) の配向相関関数 $Y_{33}(e^i, e^{i+m})$ 中で表現されている。ただし、 e^i はアルキル鎖中の i 番目の C-C セグメントに沿った単位ベクトルであり、 ρ_{C-C}^m は m 次相互作用項からの寄与の大きさを表わす定数である。式 2 の第 1 項はコアの配向秩序度、第 2 項、第 3 項はアルキル末端鎖中の C-C セグメントに対する直接および最近接の相関配向秩序度を示す。配向相関項 (第 3 項) は配向ポテンシャルの分子形状に対する依存性を表現する。式 2 を用いることにより、分子間ポテンシャルの異方性成分は

$$V_A(\omega, n) = -\frac{3}{2} (\sigma_{core}^0)^2 S(\omega, n) \langle S(\omega', n') \rangle \quad (3)$$

と書き表され、式 2-3 により分子配向秩序度 $\langle S \rangle$ 、または分子中の各 C-D ボンドのセグメント配向秩序度 S_{CD}^i に関する self consistent equation をとくことが可能となる。

セグメント配向相関理論による LCNMR データの解析は、すでにアルカン、^{2,3)} ジプロモアルカン、⁴⁾ 単量体液晶、^{5,6)} 二量体液晶⁷⁾ などについて報告済みである。セグメント配向相関理論は、これらいずれの系においても、ad hoc なパラメーター

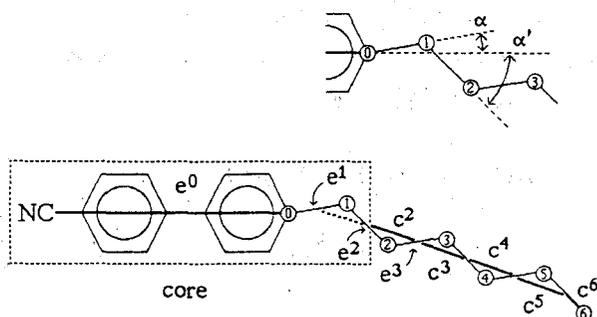


Fig. 2 The interacting unit of the n-alkylcyanobiphenyl liquid crystalline molecule.

を導入することなしに実験結果を定量的に再現することに成功している。以下では、その中から、図2に示した nCB 液晶に対する解析結果を紹介して、 ^2H -LCNMR 測定により液晶分子のコンホメーション特性について明瞭な知見が得られることを示す。

【結果と考察】 図3に nCB ($n = 5-8$) の末端アルキル鎖に対する C-H(D) ボンド配向秩序度の実測値 (●) と計算値 (実線) を比較する。また、5CB の pentyl chain について各メチレン基のセグメント配向秩序度の温度依存性を解析した結果を図4に示す。いずれの場合においても実測値と計算値との間に定量的な一致が得られていることがわかる。これらの例に示すように、セグメント配向相関理論は液晶分子そのもののニート相におけるコンホメーション特性および配向特性を定量的に解析することができる。なお、シアノビフェニル基のパラ軸方向の配向秩序度 S_{zz} に関する実測値 (計算値) は: 5CB, 0.49 (0.43); 6CB, 0.47 (0.40); 7CB, 0.48 (0.45); 8CB, 0.51 (0.51) であり、8CB の場合を除き計算値がいずれも小さな値を示しているが、これは計算においてコアの biaxiality を無視したためである (5CB に対する biaxiality の実測値は $S_{xx} - S_{yy} = 0.07$ と報告されている)。

LCNMR 法は液晶分子の配向特性に関する極めて豊かな情報を提供する手法であり、また LCNMR スペクトルの解析自体は通常の NMR 分光学に属する研究対象である。しかし、この情報をもとに、さらに分子のコンホメーション特性についても定量的な知見を得ようとするれば、非等方相における分子の配向ポテンシャルに関する正確な知識がただちに必要となる。本報で紹介した「セグメント配向相関理論」は、現在のところ、内部回転の自由度 (flexibility) をもつ実在液晶分子のコンホメーション解析が可

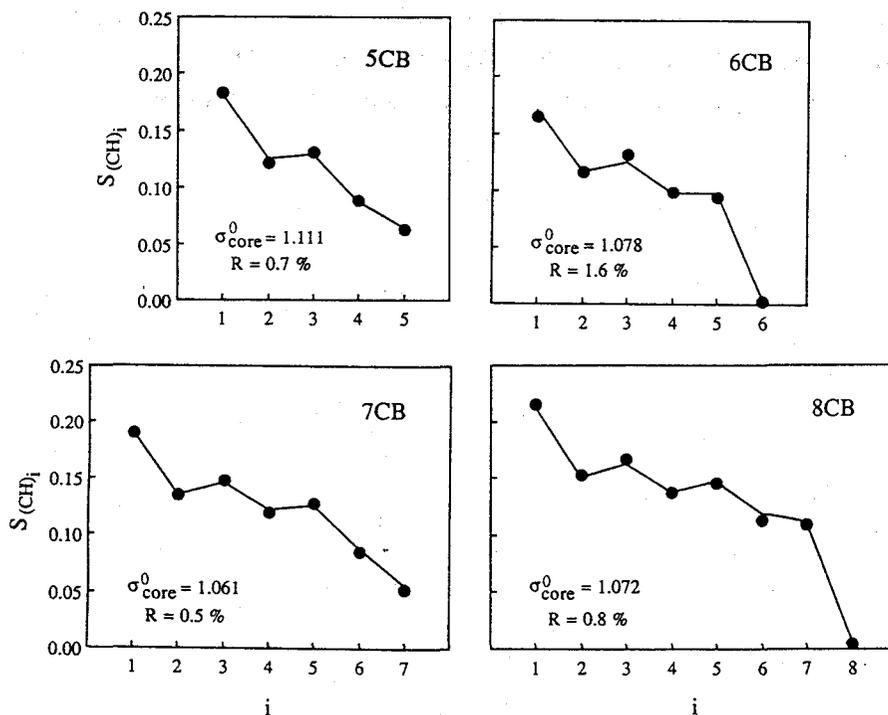


Fig. 3 Measured and calculated values of the C-H bond orientational order parameter for nCB ($n = 5-8$).

能な唯一の理論であり、この理論と LC-NMR 法を併用することにより液晶の分子設計支援システム開発への道が開けるものと期待している。

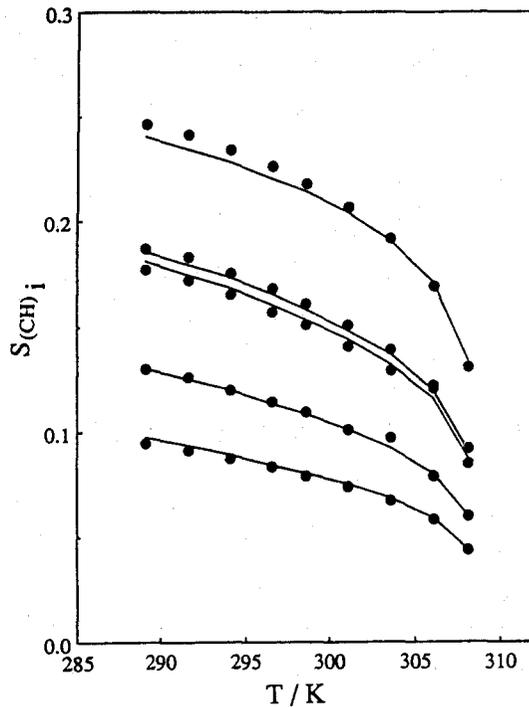


Fig.4 Temperature dependence of the C-H-bond order parameters of the 5CB chain. The filled circles are the experimental values and the solid lines represent the calculated values.

[References] (1) 第31回NMR 討論会講演要旨集, p.71; (2) J. Phys. Chem., 94, 4688 (1990); *ibid.* 94, 4659 (1990); (3) Mol. Phys., 72, 333 (1991); (4) J. Phys. Chem., 96, 8186 (1992); (5) J. Chem. Phys., 94, 2758 (1991); (6) Mol. Cryst. Liq. Cryst., 204, 161 (1991); (7) J. Chem. Soc., Faraday Trans., 88, 1875 (1992).

P17 固体高分解能NMRを用いたポリビニルアルコール/
ポリ(3-ヒドロキシブチレート)ブレンドの相溶性の検討

東京工業大学生命理工学部

○吉江 尚子・東 洋一郎・櫻井 実・井上 義夫

High-Resolution Solid-state ^{13}C NMR Study of Miscibility
between Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(vinyl alcohol)

⁰Naoko Yoshie, Yoichiro Azuma, Minoru Sakurai and Yoshio Inoue
Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology,
Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227, Japan.

Miscibility of a crystalline/crystalline polymer blend, poly(vinyl alcohol)(PVA)/ Poly(3-hydroxybutyrate)(PHB) were studied by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. The ^1H T_1 measurement demonstrated the composition dependence of the miscibility between PVA and PHB and the domain sizes of the component polymers in the blend. In the PSTMAS NMR spectra, the carbonyl carbon resonance from PHB showed down-field shift, which indicates that the miscibility of the PVA/PHB blends is due to the hydrogen-bonding interaction in the amorphous phase. The miscibility of PVA/PHB is also affected by the tacticity of PVA.

[はじめに]

今日、ポリマーブレンドは科学的にも工学的にも広く興味を集めているにも関わらず、結晶性ポリマーどうしのブレンドについては、あまり研究されていない。これは、この種のブレンドが非晶性ポリマーのブレンドよりも更に相溶化しにくい事に加えて、系が複雑になることも影響していると考えられる。結晶性ポリマーどうしのブレンドでは結晶相の存在により非晶相に関する情報が観測されにくくなるため、通常のポリマーブレンドの研究に利用

キーワード： 固体高分解能 ^{13}C NMR、結晶性ポリマーブレンド、
ポリビニルアルコール、ポリ(3-ヒドロキシブチレート)

○よしえ なおこ、あずま よういちろう、さくらい みのる、
いのうえ よしお

される様々な方法、例えば濁度やガラス転移点測定、などが役立たなくなる事がある。その点、固体高分解能NMR法は、結晶相と非晶相を区別して観測することもできるので強力な分析手段となりえる。

本研究では、結晶性ポリマーであるポリビニルアルコール(PVA)とポリ(3-ヒドロキシブチレート)(PHB)のブレンドの相溶性とドメイン構造を熱分析と固体高分解能NMRによって解析した。この時、PVAはアタクチックなもの(a-PVA)とシンジオタクチックなもの(s-PVA)の2種類を用い、立体規則性が相溶性の及ぼす影響についても検討した。

[実験]

PHB、a-PVAとs-PVAは重合度が、それぞれ、4100、2000と1690のものを用いた。a-PVAとs-PVAの立体規則性は、 ^{13}C NMRの結果より、 r r 連鎖で28%と35%であった。PVA/PHBブレンドはヘキサフルオロイソプロパノールを溶媒としてキャストすることによって得た。

NMR測定はJeol GSX-270装置を用いて行った。結晶部分を強調したスペクトルを観測するためにはCPMAS法を、非晶部分を強調したスペクトルを得るためにはパルスサチュレーショントランスファー法(PST MAS)を用いた。 ^1H T_1 測定は $(180^\circ)_x - \tau - (90^\circ)_x$ パルスシーケンスを用いた。スペクトルの解析にはLAB ONE NMR 1プログラムを用いた。

熱分析にはSEIKO DSC-20とSSC-570を用いた。

[結果]

図1にa-PVA/PHBの融点と融解熱の組成依存性を示す。a-PVAの融点はほとんど変化しないが、PHBの融点はa-PVA成分の分率が増すにつれて低下している。このとき、PHBの融解熱はa-PVA分率が50%程度で低下し始め、a-PVA分率70%以上で観測されなくなった。s-PVA/PHBでも同様の結果が得られた。PVAとPHBの間に相互作用が全く存在しなければ融点や融解熱は変化しないと考えられるので、ここで観測された融点と融解熱の変化はPVAとPHBの間に何等かの相互作用がある事を示唆している。

PVAとPHBの間に働く相互作用としては水酸基-カルボニル基間の水素結合が考えられる。このような水素結合は、NMRスペクトル上ではカルボニル炭素の低磁場シフトとなって現れる。¹⁾ まず、結晶部分の水素結合の可能性について

てCPMAS NMRスペクトルで検討した。PHBのカルボニル炭素の化学シフトはブレンド組成に依存せず、PHB結晶相がPVAと水素結合していないことが推測された。一方、非晶部分を強調するPSTMAS NMRスペクトルでは、ブレンド中のPVA分率の大きい領域で、PHBカルボニル炭素に低磁場シフトが観測された。このシフトのブレンド組成依存性を図2に示す。このことはPHB非晶部分がPVAとの間に水素結合を形成していることを示唆している。シフトの大きさはa-PVA/PHBよりもs-PVA/PHBの方がやや大きく、s-PVA/PHBの方が水素結合の密度が大きいことを示唆している。

PVAとPHBのドメインの大きさに関する情報を得るために ^1H T_1 を測定した(図3)。a-PVA/PHB、s-PVA/PHB両方のブレンドにおいて、PVA分率の大きい領域でPVAとPHBの ^1H T_1 値に一致がみられる。これはPVAとPHBのドメインサイズが数十nm以下であることを示している。a-PVA/PHBでは ^1H T_1 値の一致はa-PVA分率80%以上で起こり、s-PVA/PHBではs-PVA分率55%以上に広がっている。すなわち、相溶性の範囲はs-PVA/PHBの方がa-PVA/PHBよりも広い。このことはPSTMAS NMRスペクトルのシフト変化の結果と一致する。すなわち、PVAとPHBの相溶性はPVAの立体規則性によって変化する。

以上の結果をまとめると以下のような事が考察される。PVA/PHBでは非晶(メルト)部分はPHBとPVA間の水素結合が形成される程度に混ざりあっている。ドメインサイズは数十nm以下である。一方、PHB結晶はブレンド中でもPVAと水素結合を形成せず、モノマーレベルのスケールでは単体と同じ結晶構造をしていることが示唆された。しかし、オリゴマーレベルのスケールでは、例えばラメラ厚等の結晶構造の変化が、融点の組成依存性よりは示唆された。

(PVA結晶も同様であると考えても良いであろう。)結晶性ポリマーと非晶性ポリマーのブレンドでみられるように、メルト状態での相溶性はメルト状態の自由エネルギー減少を意味し、融点の低下と結晶化速度の減少となって現れる。しかし、熱力学的にはPVA、PHBともに結晶状態は相溶した非晶状態よりも安定であり、本研究で観測されたPVA分率の大きいPVA/PHBの相溶相も動力学的な準安定状態に過ぎないと考えられる。この状態はガラス転移点以上の温度では相分離-結晶化を進行するであろう。今後、このような相分離-結晶化の過程を検討して行きたいと考えている。

References

- 1) (a).Maciel,G.E. et al., J.Am.Chem.Soc. 1964,86,3893. (b).VanderHart,D.L. et al., J.Magn.Reson. 1981,44,361. (c). Zhang, X. et al., Polymer 1992,33,712.

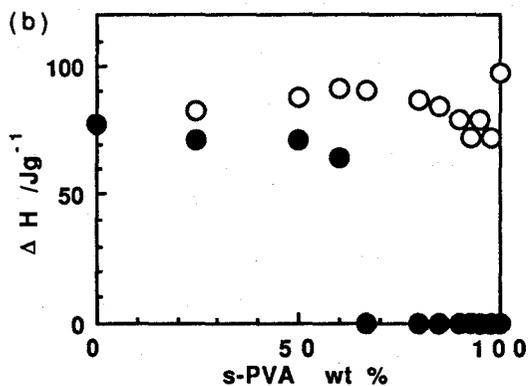
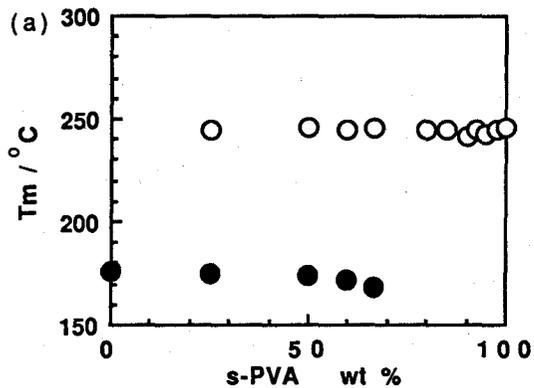


Figure 1 Composition dependence of (a) melting temperature and (b) heat of fusion of s-PVA(○) and PHB(●) in s-PVA/PHB

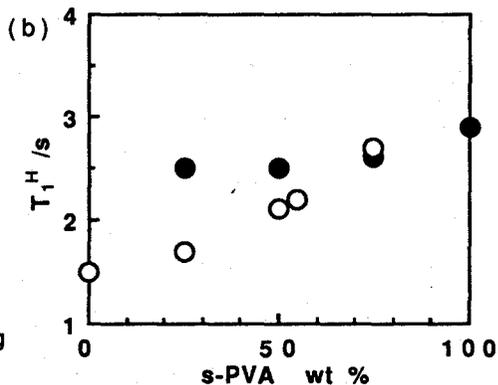
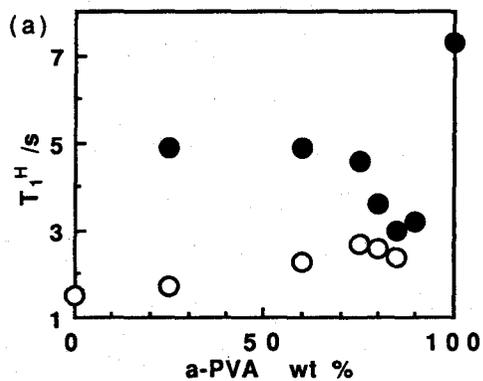


Figure 3 Composition dependence of proton T₁ of PHB(○) and PVA(●) in (a) a-PVA/PHB and (b) s-PVA/PHB.

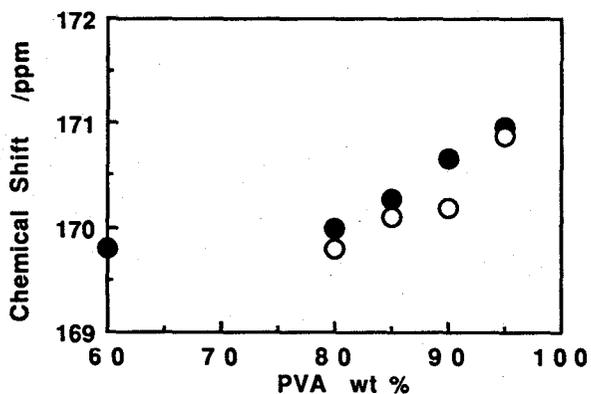


Figure 2 Composition dependence of chemical shift for carbonyl carbon of PHB in ¹³C PSTMAS NMR spectra of s-PVA/PHB(●) and a-PVA/PHB(○).

○杉本恭子 有島俊治 佐藤清隆* 木綿良介

不二製油（株）つくば研究開発センター *広島大学生物生産学部

^{13}C CP/MAS NMR Study of the Crystal Polymorphism of Triglycerides

K.Sugimoto, T.Arishima, K.Sato*, R.Kiwata

Tukuba R & D Center, Fuji Oil Co. *Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University

^{13}C CP/MAS NMR has been used in the study of the polymorphic forms of 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (SOS) and tristearoyl glycerol (SSS). Five different polymorphic forms of SOS and three polymorphic forms of SSS show characteristic ^{13}C NMR spectra. Variations in the ^{13}C chemical shift values and half-width for the different forms reveal information about the molecular structure. The chemical shifts of glycerol carbons in SOS are compared with those of SSS. The relationship between the chemical shifts of glycerol carbons and the structure of glycerol moiety of each form is inferred from given data. The effects of subcell structures on the ^{13}C chemical shifts values of methylene chains are discussed.

トリグリセリド(TG)は食用固体脂の主成分であり、その結晶の分子構造特性がチョコレートなどの外観、テクスチャー、口当たりを決める。それ故、トリグリセリド結晶を分子レベルから分析することは学問的に興味あり食品の品質向上にも極めて重要である。

トリグリセリドである1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol(SOS)は結晶の多形現象により α , γ , pseudo β' , β_2 , β_1 の5つ結晶形をとる。 β_1 が最も融点が高く安定であり β_2 , pseudo β' , γ , α の順に不安定となる。tristearoyl glycerolは α , β' , β の3つの結晶形をとる。それぞれの型については主にDSC、X線回折パターン、ラマンで研究されているが今回、分子レベルでの更なる情報を得るためCP/MAS NMRを用いて研究を行なった。

[実験]

^{13}C NMRはBrukerAC-250 NMRにCP/MASユニットをつけて測定した。

SOSは純度99.9%でありシグマより購入したSSSは純度99%であった。結晶の各型は融解後異なる温度で保存することによって作った。DSCでそれぞれの結晶形を確かめた後サンプルローターに詰め、測定中に固相転移が起こるのを避けるため-10℃で測定した。

[結果と考察]

SOSとSSSの分子構造をFig.1に、5つの結晶形の ^{13}C NMRスペクトルはFig.2に示した。それぞれの結晶形に対応して末端メチル基(14-16ppm)、メチレン、グリセロール骨格(57-70ppm)、オレフィン(128-130ppm)、カルボニル炭素ピーク(171-175ppm)の半値幅とケミカルシフト値は異なっていた。

キーワード；CP/MAS、 ^{13}C NMR、トリグリセリド、結晶、多形現象

○すぎもと きょうこ、ありしま としはる、さとう きよたか、きわた りょうすけ

SOSの5多形とSSSの3多形のスペクトルはいずれも安定性の順にピークがシャープであった。これは安定形に進むに連れて結晶の規則性が増し分子の運動性が小さくなる為と考えられる。

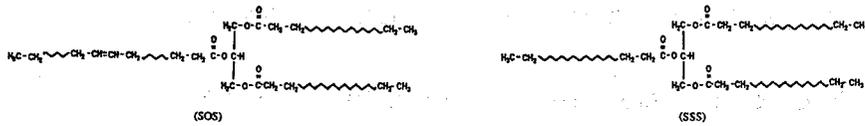


Fig.1 Molecular Structure of 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (SOS)and tristearoyl glycerol (SSS)

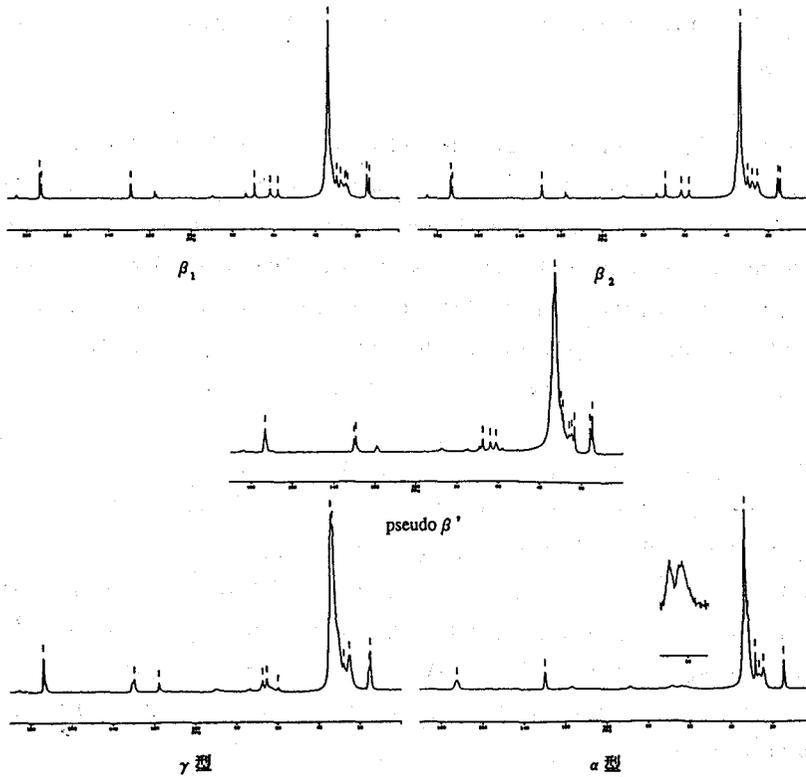


Fig.2 SOS結晶の¹³C CP/MAS NMRスペクトル

溶液のSOSとSSSではグリセロールの1,2,3の3つの炭素のケミカルシフト値のうち1と3は等価である為ピークは2本であるが、固体のβ型はFig.2に示すように1,3がそれぞれ非等価となる。SSSのβ型単結晶構造解析の報告によるとグリセロールの1,3位に結合した脂肪酸のアルキル鎖とメチル末端面(ペーサル面)が傾いている。この傾きによる1,3位の炭素の環境の違いがケミカルシフト値として2ppm異なっていると思われる。SOSのβ型では1位と3位のケミカルシフト値の差がSSSよりも大きい。このことは2位が不飽和のオレイン酸になることによってアルキル鎖とペーサル面の角度が変わる為と思われる。SOSとSSSのそれぞれの結晶形についてグリセロール、末端メチル、カルボニル炭素のケミカルシフト値よりグリセロール骨格の構造を中心に解析した。また、メチレン鎖のケミカルシフト値から副格子についての考察を行い、TORCHIA法パルス系列で同一のτ値のスペクトルを比較することによりSOSの各結晶の分子の運動性を調べた。

(姫路工大・理) 内藤 晶・福谷 章・辻 暁・○斉藤 肇

Determination of Interatomic Distances by High-Resolution Solid-State NMR (II). N-H Bond Lengths as Measured by 2D SLDF/CP-MAS NMR and Their Significance Related to Hydrogen Bonding

Akira Naito, Akira Fukutani, Satoru Tuzi, and Hazime Saito
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology,

The N-H bond lengths of simple peptides were determined under the condition of high-resolution spectroscopy by analyzing the dipolar side-band patterns obtained from samples of natural abundance, as recorded by ^{15}N two-dimensional (2D) separated local dipolar field (SLDF) NMR spectroscopy combined with cross-polarization and magic angle spinning techniques. The N-H bond lengths thus determined were 1.07, 1.12 and 1.09 Å for Ala-Gly, Gly-Pro-Ala, and Ala-Pro-Gly, respectively, with an accuracy of 0.01-0.02Å. The obvious difference in the bond lengths between the last two compounds suggests that the degree of inter-chain packing significantly differs between them, consistent with the data regarding the presence or absence of ring-puckering motion at Pro residue.

1 はじめに

一般に、水素結合X-H...Yがどのように形成されるかは、分子の三次元構造の決定、ダイナミクス、分子認識などに重要な役割をはたしている。水素結合におけるプロトン供与体X-H距離データは水素結合の性質を知る上で重要であるが、X線回折から求めた値は中性子回折からの値に比べ常に0.3Å程度短く出る傾向がある。この場合、中性子線回折データがより信頼性が高いといっても、より大きい結晶が要求されるなど測定対象に限界が出てくる。ところで、N-HまたはC-H対などの原子間距離情報は、それぞれ対応する双極子相互作用項にふくまれている。ここでは、2次元分離局所磁場(SLDF)法によってCP-MAS NMR条件下で、それらを選択的に復活させ距離測定を行った^{1,2}。ただし、この方法による測定値は中性子回折にくらべてN-H距離について0.035Å程度大きめに出るが、X線回折結果に比べてその差異は一桁小さい。本研究では、種々のペプチドについてそのN-H距離測定結果から、ペプチド鎖の分子間のパッキング状態をN-H...O=C水素結合状態およびプロリン残基のパッキングの有無から推定し、その間の相関に関する知見を得ること目的とする。³

N-H原子間距離、2D SLDF NMR、ペプチド、水素結合

ないとう あきら、ふくたに あきら、つじ さとる、さいとう はじめ

2 実験

NMR測定はChemagnetics CMX-400 スペクトロメータによって、 ^{15}N 共鳴周波数40.6MHzで行った。測定に使用したパルスシーケンスは図1の通りである。プロトンデカップリングは展開期、検出期それぞれBLEW12, cwによっておこなった。180°パルス位置はローター周期 t_r の n 倍に設定するために、回転を付属のコントローラーで+1Hz

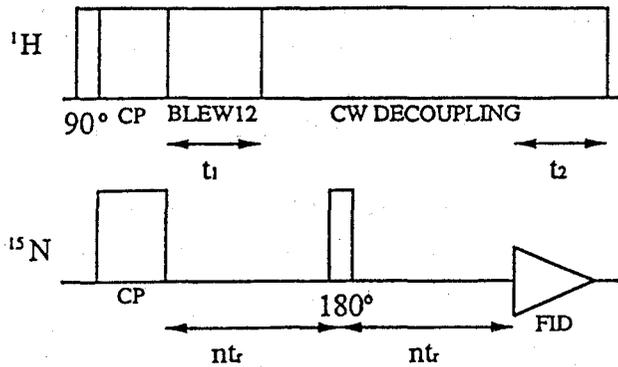


Fig. 1. Pulse sequence used to obtain the ^{15}N two-dimensional separated local dipolar field (2D-SLDF/CP-MAS) NMR spectra.

Silicon Graphics Personal IRISワークステーションにより、Hare Research FELIXを用いて処理した。スペクトルシミュレーションは、トランスピューターボード (INMOS) を付加したNEC 9801を用い、プログラムSLFDIPによって行った。

3 結果と考察

2D NMRにおける双極子サイドバンドパターンをもとに、以下に示すスペクトルシミュレーションからN-H結合距離を求めた。回転速度 ω_r のMAS条件では、N-H双極子相互作用によるダブルレットは時間依存性を示し、キャリアー周波数をその中心に設定した場合の共鳴周波数は

$$\omega_D(t) = \pm \frac{D}{2} \left\{ \sin^2 \beta \cos 2(\alpha + \omega_r t) + \sqrt{2} \sin 2\beta \cos(\alpha + \omega_r t) \right\}, \quad (1)$$

$$D = \frac{\gamma_N \gamma_H h}{2\pi r^3} \cdot S.$$

(1)式で表される。ここで、 r はN-H距離、 α 、 β は r ベクトルのMAS軸に対するオイラー角である。SはBLEW12の場合0.475である。2D SLDF実験で、磁化は展開期に y 軸から時間 t に Φ だけずれる。

$$\Phi(\alpha, \beta, r, t) = \int_0^t \omega_D(t') dt'. \quad (2)$$

FID信号はここで求めた角度から

$$g(t) = \exp [i\Phi(\alpha, \beta, r, t)]. \quad (3)$$

で表される。粉末試料を対象としているため、これらの角度についての平均を観測することになり、そのフーリエ変換から双極子サイドバンドパターンを計算することが出来る。

$$G(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \langle g(t) \rangle e^{-i\omega t} dt. \quad (4)$$

実際、N-H距離について角度 α 、 β をそれぞれ10° ずつ変化させた後その平均を計算し、フーリエ変換を行ったのが図2である。明らかに、中心ピークとサイドバンドピークの強度比をくらべることにより、0.01-0.02Åの精度で原子間距離測定が可能であることがわかる。

図3に種々のペプチド試料について実験から求めた双極子サイドバンドパターンと、上

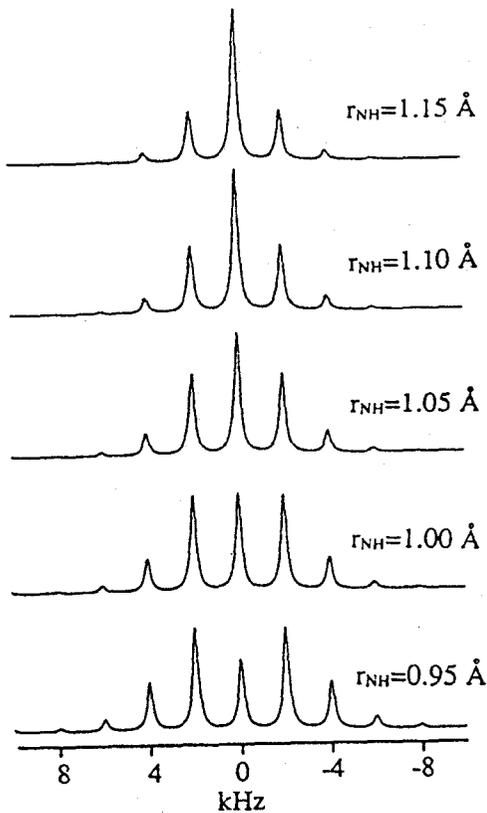


図2 N-H双極子サイドバンドの計算スペクトル。回転周波数2KHz、線幅300 Hzとして計算。

で求めたシミュレーションの結果を比較し、両者の最もよく一致した場合の結果を表したものである。従来のこのような研究は同位体置換試料を対象としていたものであるが、ここに示した結果は天然存在比の試料についても同様に距離測定が可能であることを示している。

これらの結果から、Gly-Ala, Gly-Pro-Ala, Ala-Pro-Glyそれぞれに対して、1.07, 1.12, 1.09ÅのN-H距離を決定することが出来た。

中性子回折の実験に基づく数多くの実験データから、一般にX...Y水素結合系においてX-H距離はX...Y距離に反比例するようである。すなわち、プロトン供与体X-Hが受容体Yに接近し、水素結合の生成が起こればX-H距離がいくらか伸びる可能性がでてくる。実際、黒木らは、N-メチルアセトアミドにおける水素結合で、N-H距離とN...O距離の相関をab initio MOで評価し、そのような相関を認めている⁴。それゆえ、Gly-Pro-Ala, Ala-Pro-Glyの間で0.03Åの距離の違いは、N...O距離の有意な差異として反映されるはずである。われわれは、

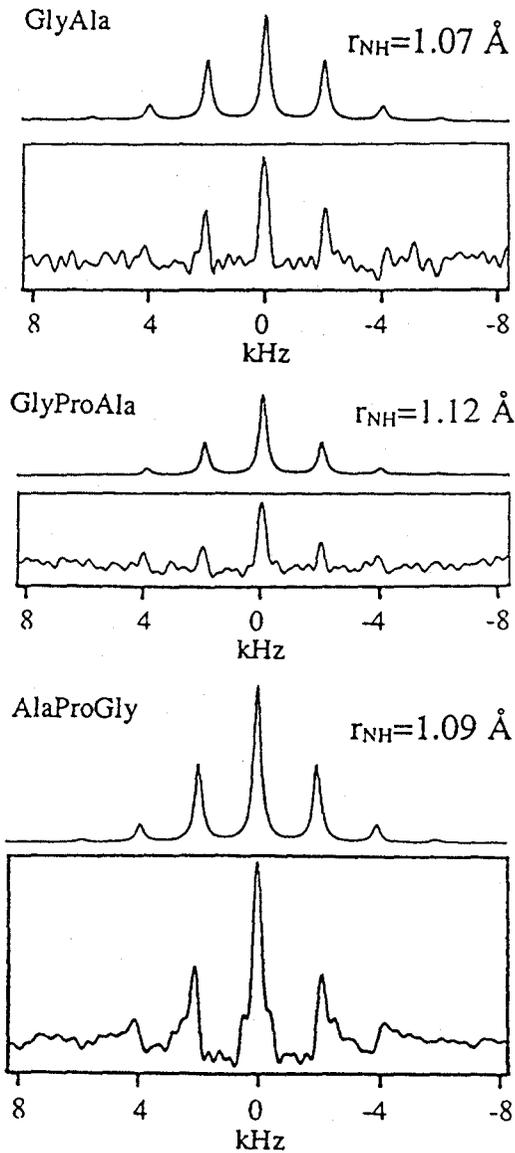


Fig. 3 Comparison of the experimental and simulated spectra (in the box) of the dipolar side band patterns for Gly-Ala, Gly-Pro-Ala, and Ala-Pro-Gly. The simulated spectra were obtained for a 2 kHz spinning frequency and with a linewidth of 300 Hz.

して反映されるはずである。

我々はこれまでに固体におけるペプチド鎖間のパッキングの違いの評価の一つとして、Pro残基におけるピロリジン環のパッカリング運動の有無⁸が使用できることを提唱して来た。ProまたはHyp残基におけるパッカリングは 10^{-8} sの時間尺度で起こるため、その有無は ^{13}C スピン格子緩和時間測定によって容易に評価できることを示した。すなわち、コラーゲンフィブリルやコラーゲン類似構造をとるポリペプチド、Ala-Pro-Glyでは、固体状態におけるパッカリング運動の存在のために、運動に直接関与した炭素すなわちピロリジン環のC β 、C γ 炭素の ^{13}C スピン格子緩和時間が2-3s程度までに短縮がおこる。一方、パッカリングのないGly-Pro-Ala、Pro-Leu-Gly-NH₂などのペプチドでは短縮が起こらず、その値は20-30s程度の標準的な値を示す。

上で述べたPro残基のパッカリングのデータは、Ala-Pro-GlyよりもGly-Pro-Alaの方がよりタイトな環境にあることを示す。ここで述べたN-H距離に関するデータもその結果を支持していることがわかる。それゆえ、ここで述べたような正確なN-H距離は、ペプチド鎖間の分子間パッキングの新しい指標として有用である。現在、 α -ヘリックス、 β -シート、 3_1 -ヘリックスなどの異なったコンホメーションをとるポリペプチドにおいて、水素結合様式の違いを反映してN-H距離がどのように変化するかの評価を行っている。

文献

- 1 M. G. Munowitz, R. G. Griffin, G. Bodenhausen, and T. H. Huang, J. Am. Chem. Soc., 103, 2529 (1981)
- 2 W. P. Power and R. E. Wasylischen, Ann. Rep. NMR Spectrosc., 21, 1 (1991)
- 3 A. Naito, S. Tuzi, and H. Saito, Bull. Chem. Soc. Jpn., 66, 0000 (1993) (November issue)
- 4 S. Kuroki, S. Ando, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki, and G. A. Webb, J. Mol. Struct., 240, 19 (1990)
- 5 H. Saito and M. Yokoi, J. Biochem., 111, 376 (1992)

P20 マジックエコーシーケンスによる $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 交差分極

○三浦 等、 松井 茂
住友化学工業(株)筑波研、 筑波大 物理工学系

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ Cross Polarization with a Modified Magic Echo Sequence

H. Miura and S. Matsui
Tsukuba Lab., Sumitomo Chemical Company and Inst. of Applied Physics,
Univ. of Tsukuba

We have found that cross polarization (CP) in the rotating frame can be achieved between proton and carbon spin systems with a modified magic echo (ME) sequence as applied for proton spin locking. Experiments on adamantane have disclosed certain unusual aspects of the ME CP. For example, when the flip angle of the sandwiching rf pulses deviates from the nominal 90° two distinct carbon rf fields maximize the CP carbon signals. The carbon signals thus obtained at different rf field strengths are same in amplitude but opposite in phase.

<序>

最近、松井らは、変形したマジック(サンドイッチ)エコーシーケンスを用いた固体高分解能NMRイメージング法を開発した[1,2]。この方法においては、サンドイッチング用の 90° pulse pairのうち、片方のpulseの位相が 180° 反転されている(図1)。この変形は、サンドイッチングpulseの位置に 180° pulseを挿入することと等価であり、マジックエコーシーケンスのline narrowingの効率を向上させ、イメージングの高分解能化につながるものである。しかしながら、変形にともなってprotonの磁化のごく一部がマジックエコーシーケンス中にspin-lockされ投影像の中心(zero-frequency position)にartifactを生じるという弊害をもたらした(このartifactはその後のシーケンスの改良により除去された)[3]。

本研究では、変形マジックエコーシーケンスによるspin lockingのメカニズムをより明らかにすることを目的として、回転系 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 交差分極の実験を種々行ったのでその結果を報告する。さらに、通常の $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 交差分極に比べ、どのような点がマジックエコー $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 交差分極の特徴であるか、またその有用性がどこにあるかについても議論する。

<実験>

実験はChemagnetics CMX-300を用いて行った。protonの共鳴周波数300MHzである。主としてadamantane($T_2=50 \mu\text{s}$)をtest sampleとして使い、図1に示すパルスシーケンスにより $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 間交差分極実験を行った。contact timeは6 ms、protonに対する rf fieldはサンドイッチング用 90° パルス以外は13.9 Gに固定し、carbonの信号を観測して交差分極の様子を調べた。rf fieldの不均一性を小さくするため sampleの長さは rf coilの長さの1/3程度とした。sampleのMagic Angle Spinningは行わなかった。

キーワード: 交差分極、 マジックエコーシーケンス、 スピンロッキング

みうら ひとし、 まつい しげる

< 結果と議論 >

locking field は主として、サンドイッチングパルス flip angle の 90° からのズレにより発生する[3]と考え、図1の 90° パルスの強度を $-25\% \sim 25\%$ の範囲で 5% ずつ 13.9 G から変化させ、carbon の信号が最大になる carbon の rf 強度を調べた。その結果、flip angle のズレ (δ) に対応して、通常とほぼ同じ効率で交差分極が起こり、且つ、Hartmann-Hahn 条件に相当する carbon の rf 強度が 1 つの δ に対して 2 種類存在することが解った。各強度は、flip angle のズレに比例してほぼ直線的に変化する。さらに、各々の強度で得られる carbon の信号は、carbon の rf field に対して in-phase のものと 180° out-of-phase のものになることが明らかとなった。

図2に、このような実験で得られた代表的な carbon のスペクトルを示す。図2 a は通常の交差分極で得られたスペクトルである (carbon rf = $13.9\text{ G} \times 4$)。b, c がマジックエコー交差分極で得られたもので、flip angle のズレはいずれも 10% 、carbon の rf 強度は各々 4.0 、 5.9 G である。マジックエコーシーケンスの時間 τ (図1) は $15\ \mu\text{s}$ に設定した。同様の実験を時間 τ を変化させて行った結果、 τ が $50\ \mu\text{s}$ 以下ではほぼ同等のスペクトルが得られた。 τ を $50\ \mu\text{s}$ 以上にすると交差分極は著しく制限された。以上のような実験結果の系統的な説明は、現在検討中であり、他の実験結果と併せて発表する予定である。

日本電子 (株) 藤戸輝昭博士には実験上の応援をいただきました、この場を借りて感謝します。

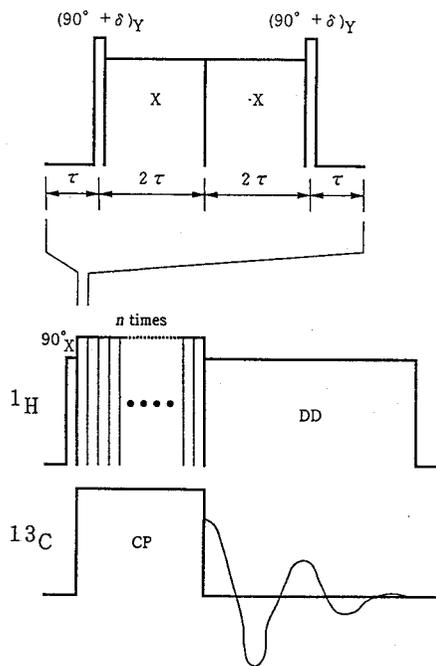


Fig.1 Magic Echo Sequence for ^1H - ^{13}C Cross Polarization.

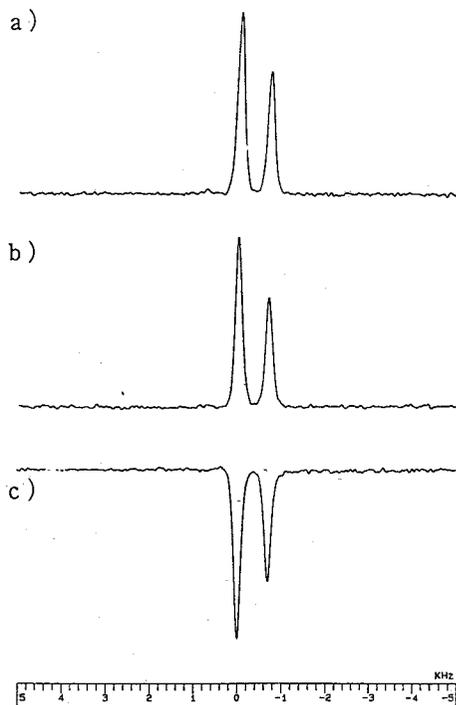


Fig.2 Cross Polarization ^{13}C Spectra of Adamantane. a) Usual CP, b) & c) ME CP

< 文献 >

- [1] S. Matsui, Chem.Phys.Lett. **179**, 187 (1991); J.Magn.Reson. **95**, 149 (1991).
- [2] S. Matsui, Y. Ogasawara, & T. Inouye, J.Magn.Reson. A, October 15, 1993.
- [3] S. Matsui, J.Magn.Reson. **98**, 618 (1992).

(北大・理) ○竹腰 清乃理、手塚 亮典、引地 邦男

Applications of 2D NMR Techniques to Polymer Blends

○K. Takegoshi, Akinori Tezuka, Kunio Hikichi

Department of Polymer Science, Faculty of Science,
Hokkaido University

In this work, two two-dimensional techniques in solids are applied to study polymer blends. The two-dimensional ^1H - ^{13}C heteronuclear correlation technique in solids is adopted to reveal miscibility of poly(vinylphenol)/poly(methacrylate) (PVPh/PMA). Intermolecular cross-polarization between protons of the main chain of PMA and the phenyl carbons of PVPh are observed to show microscopic mixing of PVPh and PMA. Further, the two-dimensional exchange NMR of ^2D is applied to polystyrene/poly(vinyl methyl ether)(PS/PVME) in order to investigate how the intimate blending does affect motion of component polymers. Selective 1D observation of chemical-shift-anisotropy is also examined.

異なる高分子間に負の混合エネルギーを生じる何らかの相互作用が存在したり、エントロピー的に有利な場合は、異なる高分子同士は均一に混ざり合う。我々は、高分子混合体の構造を固体NMR法を用いて研究する手法を検討してきた。本研究では、二つの2次元固体NMR手法を高分子混合体の相溶性と分子運動の研究に適用した。最初に2次元 ^1H - ^{13}C シフト相関NMR(1)をポリビニルフェノール/ポリメタクリレート(PVPh/PMA)の相溶性の研究に適用した結果を報告する。次に、重水素の2次元交換NMR法(2)により主鎖を重水素化したポリスチレンとポリビニルメチルエーテルのブレンド(d -PS/PVME)におけるPS主鎖の分子運動を研究した結果について報告する。また、Tychoraらが発表したパルス法によるMAS下での ^{13}C の化学シフト異方性観測法(3)に選択励起法を取り入れる改良を検討した。

[実験]

測定は日本電子社製JMN-GX270を用いた。多重パルス測定や重水素測定に必要な改良についてはすでに報告した(4)。さらに、MAS下での化学シフト観測のためにMAS回転速度制御器を自作して実験を行った。 d -PS以外は市販のもの

キーワード: 固体NMR、2次元NMR、ポリマーブレンド

○たけごし きよのり、てずか あきのり、ひきち くにお

を用いた。*d*-P Sは重水素化したスチレンよりアニオン重合して得た。

[$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ シフト相関NMR法]

図1に用いたパルス系列を示す。このパルス系列においては、 ^1H のmixingと ^1H から ^{13}C への磁化移動という2つのstepを通常のcross-polarization (CP) だけで行うという簡便化が行われている。図2 aにPVPh/PMAのスペクトル (CP時間 = $200\ \mu\text{s}$) を示した。CP時間が $200\ \mu\text{s}$ 以下では ^1H のmixingの効果は顕著ではなく、分子内の近接した ^1H と ^{13}C の間だけにCPによる相関ピークが現われている。図2 bにCP時間 = $1000\ \mu\text{s}$ の時のスペクトルを示した。PMAのC=OとPVPhの芳香族 ^1H との間に相関ピークが観測された (図2 bにboxで示した)。このピークの原因としては (i) CPの間のPVPhの芳香族 ^1H とPMAの ^1H 間のスピン拡散、および、(ii) PVPhの芳香族 ^1H とPMAのC=O炭素間の直接のCPが考えられる。この実験によりPVPhとPMAは ^1H のスピン拡散またはCPがきく程度 ($\sim 10\ \text{\AA}$) に近接している*i. e.* よく混合していることが示された。スピン拡散とCPを分けたパルス系列も考えられるが、両過程の距離的オーダーは近似しているので、得られる混合度合の情報は今回の簡便化したパルス法と同じだと考えられる。

[^2D - 2次元交換NMR法]

図3に用いたパルス系列を示す。溶液の2次元交換NMR法では t_1 、 t_m 、 t_2 という3つの時間領域は 90° パルスで区切られている。固体の ^2D の交換NMR法においては、四重極オ

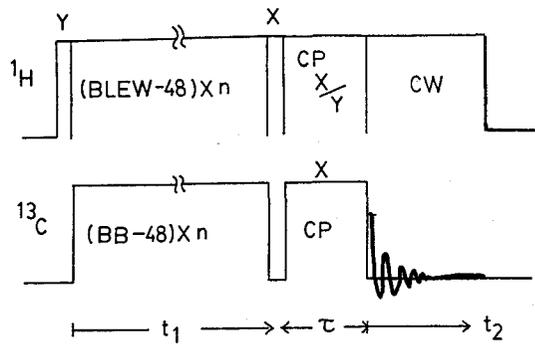


Fig. 1 Pulse sequence for $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ heteronuclear shift correlation

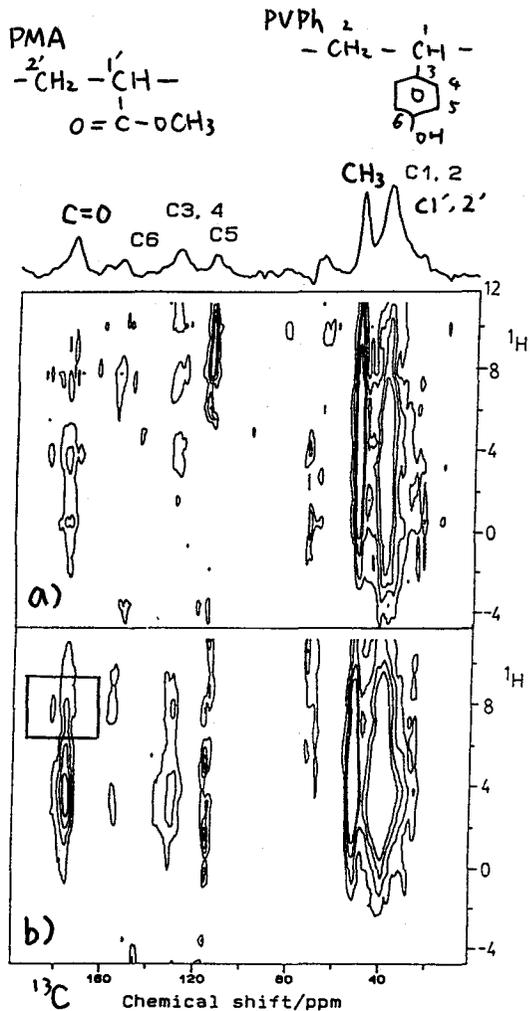


Fig. 2 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ heteronuclear shift correlation spectra of PVPh/PMA with (a) $\tau = 200\ \mu\text{s}$ and (b) $1000\ \mu\text{s}$

ーダーとゼーマンオーダーに磁化を貯える都合上二番目と三番目のパルス長は54.7度パルスになっている。またFIDを四重極エコー法で観測するために最後に90度パルスが加えられている。測定では t_m に10msを、またエコー時間 Δ に20 μ sを用いた。

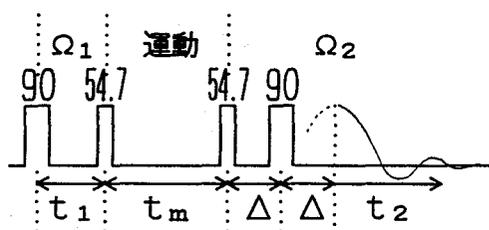


Fig. 3 Pulse sequence for 2D-exchange NMR for 2D

d -P S単体の測定を行った結果、100度以下では2次元スペクトルには非対角

成分は見られなかった(図4 a)。図4 bに d -P Sの120度におけるスペクトルを示す。一次元のスペクトルにはP S主鎖の分子運動による影響が顕著ではなかった。2次元に展開し10msという時間スケールで観測することで、分子運動による非対角成分が2次元スペクトルに現われていることが分かる。このパターンからP S主鎖の分子運動により重水素の四重極の主軸と磁場との角度が変化し、その変化は小さいことが分かった。すなわちP S主鎖の運動は特定のサイト間のjumpではなく、拡散運動であることが分かった。

図4 cに d -P S/PVME=50/50の60度におけるスペクトルを示す。 d -P S単体と異なり、柔らかいPVMEとミクロに混合しているために60度ですでに分子運動による非対角成分が観測された。また図4 bとの比較により混合は d -P Sの主鎖の運動のモードには影響を与えないことが分かる。

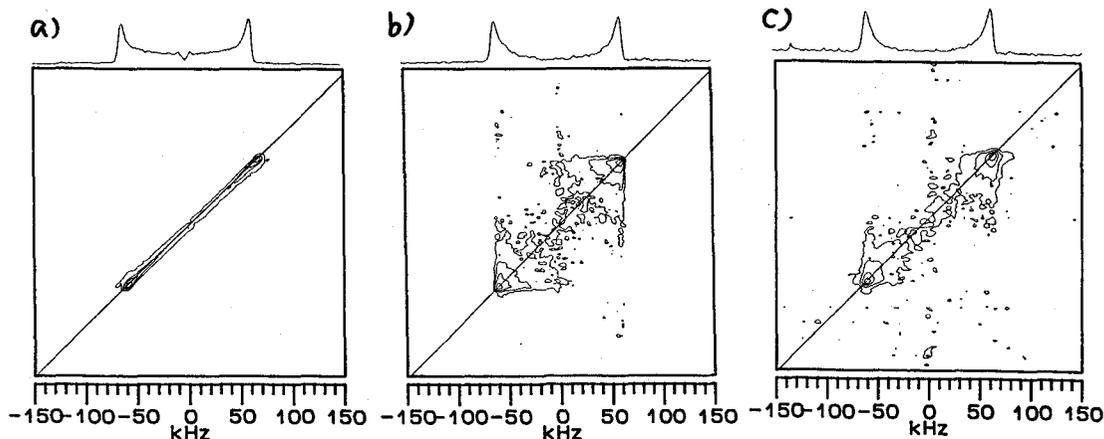


Fig. 4 2D-exchange NMR spectra for d -PS at (a) 80°C and (b) 120°C, and (c) that for d -PS in PS/PVME=50/50 blend at 60°C with $t_m=10$ ms.

[MAS下での ^{13}C 化学シフト異方性観測]

MASでの異方性はSASS法(5)で簡便に観測できるが、SASSのプロープを必要とする。TychoらはMAS回転と同期した四つの π パルスで化学シフト異方性を復活できることを示した。彼らの方法は2次元で行われたが、選択励起を用いて特定の ^{13}C の横磁化のみを励起し、一回のMAS回転(4つの π パルス)に同期し

てFIDデータを取り込むことで一次元で特定の ^{13}C のシフト異方性のみを短時間に測定できる。図5にパルス系列を示した。回転速度は $5000 \pm 3\text{ Hz}$ に安定化した。 ^1H と ^{13}C のrf強度は π (180度)パルス照射間のCross Polarization (CP)を防ぐために、 ^{13}C のrf強度63 kHz, ^1H のrf強度50 kHzで実験を行った。CPはTAPF法(6)を用いた。図6bにポリオキシメチレン(POM)の静止試料の ^{13}C スペクトルを示す。図5のパルス法によりMASしたPOMより得た一次元スペクトルを図6aに示す。現在180度パルスの不完全さなどの影響を検討している。

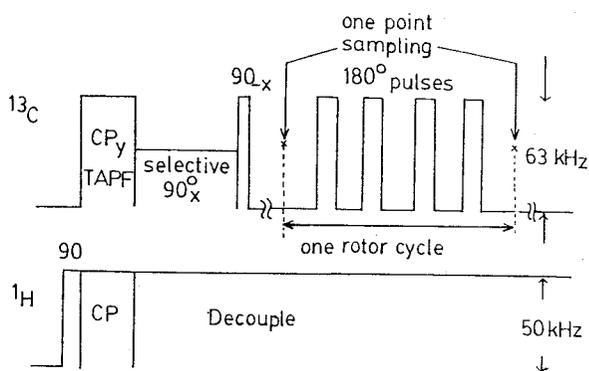
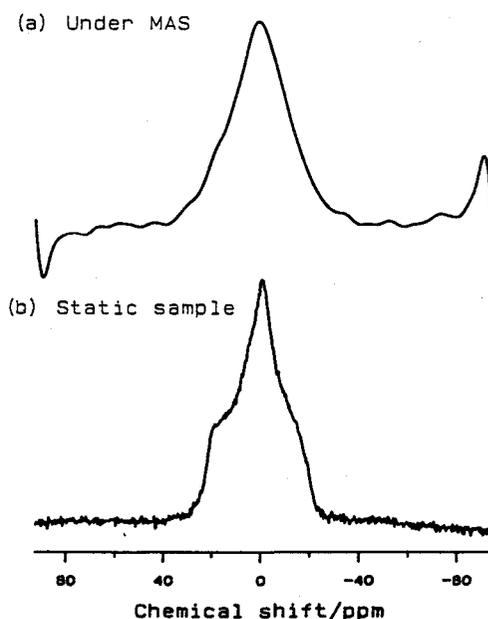


Fig.5 Pulse sequence for 1D observation of anisotropic chemical shift under MAS.

Fig.6 a) Spectrum of poly(oximethylene) (POM) obtained by the pulse sequence depicted in Fig. 5 under MAS.
b) spectrum of static POM.



[Acknowledgements]

この研究をおこなうにあたって徳山科学技術振興財団の助成を受けました。

[Reference]

- (1) P. Caravatti, et al. Chem. Phys. Lett., 89, 363 (1982);
C.E. Bronnimann, et al. J. Magn. Reson., 97, 522 (1992).
- (2) C. Schmidt, et al. J. Magn. Reson., 79, 269 (1988).
- (3) R. Tycho, et al. J. Magn. Reson., 85, 265 (1989).
- (4) 第30回NMR討論会要旨集 p. 321 (1991)。
- (5) J. Ashida, et al. Chem. Phys. Lett., 168, 523 (1990).
- (6) K. Takegoshi and C.A. McDowell, J. Magn. Reson., 67, 356 (1986).

固体高分解能¹⁷O NMRによるグリシン残基 を含むペプチドの構造研究

(東工大) ○黒木重樹・高橋昭裕・安藤 勲
(群馬大工) 莊司 顯・尾崎拓男

A Structural Study of Peptides Containing Glycine Residue in the Solid State by ¹⁷O NMR Spectroscopy

Shigeki Kuroki^a, Akihiro Takahashi^a, Isao Ando^a, Akira Shoji^b, and Takuo Ozaki^b

a) Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152

b) Department of Biological Science, Gunma University, Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma 376

Recently, high resolution solid state NMR techniques have been developed for studying structure of peptides and proteins in the solid state. We have already reported that ¹³C chemical shift of the carbonyl carbon and ¹⁵N chemical shift of the amide nitrogen are closely related to the nature of hydrogen bond.

On the other hand, the universality of the oxygen atom in intra- and intermolecular interactions and in certain physiological processes, and in particular in hydrogen bonding in biological systems makes this nucleus especially suitable as a probe for investigating the structure and dynamics of solids and solutions. ¹⁷O NMR studies of amino acids, amides and peptides in the solid state are virtually non-existent. In this study, we attempt to observe the solid state ¹⁷O CP static NMR spectra of polyglycines I (β-sheet structure) and II (3₁-helix structure) and oligopeptides containing glycine residue, to obtain the values of three NMR parameters (nuclear quadrupolar coupling constant (e^2qQ/h), asymmetric parameter (η), and chemical shift (δ)), and to reveal structural information through these parameters.

The three kinds of NMR parameters were determined to be $e^2qQ/h = 8.3$ MHz, $\eta = 0.27$ and $\delta_{iso} = 280$ ppm for form I, and $e^2qQ/h = 7.8$ MHz, $\eta = 0.3$ and $\delta_{iso} = 267$ ppm for form II, respectively. It was found large isotropic chemical shift difference between the forms I and II which came from hydrogen bond length.

1. 緒言

近年、固体状態でのタンパク質の構造研究に固体高分解能NMRが用いられるようになってきた¹⁾。この手法により、¹³C化学シフト及び¹⁵N化学シフトのコンホメーション依存性が見い出され、¹³C化学シフトと¹⁵N化学シフトを用いたコンホメーションの決定がなされている²⁾。演者らは既にペプチド中のカルボニル炭素の¹³C化学シフトおよびアミド窒素の¹⁵N化学シフトから固体結晶中の水素結合に関する情報が得られることを明らかにしてきた³⁾。

一方、¹³C及び¹⁵Nのようなスピン量子数 $I=1/2$ 以外の核の固体NMRがここ数年注目されつつある。特に酸素原子は生体分子中に多く含まれる上に、生体分子の機能および構造の発現に大いに寄与しているため、その同位体でNMR観測可能な唯一

固体¹⁷O NMR / ポリグリシン / 結晶構造 / コンホメーション

くろきしげき たかはしあきひろ あんどういさお しょうじあきら おぎきたくお

の核 ^{17}O ($I=5/2$)はペプチドおよびタンパク質の構造解析に今までの ^{13}C 、 ^{15}N とは違った面からアプローチできる可能性を秘めている。 ^{17}O 核は天然存在比 0.037%であるが溶液では T_1 が短いために繰り返し時間を短くして単位時間内の積算回数を稼ぐことが可能である。一方、固体では T_1 はそれほど短くないために繰り返し時間を短くすることは不可能であり、天然存在比でのスペクトル測定は今のところ困難であるので、 ^{17}O エンリッチラベルをする必要がある。また、 ^{17}O 核は四極子核であるため、核正電荷分布に偏りが生じ、核四極子モーメントが生じる。これが核周辺にある電場勾配と核四極子相互作用をもつ。この相互作用は固体における他の相互作用（化学シフト異方性、双極子-双極子相互作用）よりもはるかに大きい。この核四極子相互作用をゼーマン相互作用の摂動として扱うと、中央遷移($-1/2 \leftarrow 1/2$)は1次摂動ではシフトされないが、2次摂動によってシフトされる。これはMAS（マジック角回転）によっても回避することは不可能である。したがって、この2次の摂動により高磁場側にピークの位置がシフトする。理論式にしたがってスペクトルシミュレーション⁴⁾を行うことにより、核四極子結合定数 e^2qQ/h 、電場勾配テンソルの非対称パラメータ η 、および化学シフト δ を決定することができる。

本研究では ^{17}O ラベルしたポリグリシンI型 (β シート構造)、II型 (3_1 ヘリックス構造) 及びグリシン残基を含むオリゴペプチドを合成し、その固体高分解能 ^{17}O NMR スペクトルを観測した。得られたスペクトルから核四極子結合定数 e^2qQ/h 、非対称パラメータ η 、化学シフト δ を得て、その各々のパラメータが固体中での構造に関するどのような情報を持っているかを明らかにし、今後ペプチドだけでなく他の合成高分子にも固体 ^{17}O NMRによる解析が有用であることを述べる。

2. 実験

1) 試料の合成

まず、グリシンメチルエステルを Na^{17}OH /メタノール溶液によって加水分解することにより ^{17}O エンリッチグリシンを得た。溶液 ^{17}O NMRによりエンリッチ率は5.7%であることがわかった。この試料を用い、N-カルボキシアミノ酸無水物(NCA)法によりポリグリシンI型を合成し、これをII型に転化した。グリシン残基を含むオリゴペプチドは活性エステル法により合成した。

2) 固体 ^{17}O NMR 測定

固体高分解能 ^{17}O NMRスペクトルは、CP/MASアクセサリを付属した日本電子製GSX-270 NMRスペクトロメータ（観測周波数 36.6MHz）およびGSX-500 NMRスペクトロメータ（観測周波数 67.8MHz）を用い、室温で測定を行った。積算回数は500~9000回である。化学シフトの基準としては外部基準として H_2O を用い、その化学シフトを0 ppmとした。試料は静止状態で測定した。パルスシーケンスは交差分極法を用いた。接触時間は9 msで、繰り返し時間は3または5 sで測定した。

3) スペクトルシミュレーション

理論式に基づきスペクトルシミュレーションプログラムを作成した。必要となるパラメータは、 e^2qQ/h 、 η 、化学シフトテンソルの主値（低磁場側から δ_{11} 、 δ_{22} 、 δ_{33} ）、そして電場勾配テンソルと化学シフトテンソルの方向の関係を表す a 、 b 、 g である。Sunワークステーションで計算した理論曲線を NEC PC-9801 パーソナルコンピュータのCRT上で観測されたスペクトルと重ね合わせることにより、 e^2qQ/h 、 η および化学シフト δ を決定した。

3. 結果と考察

Figs.1 a), b)にそれぞれポリグリシンIのCP法による36.6MHzおよび67.8MHzの固体 ^{17}O CP NMRスペクトルを示す。36.6MHzでのスペクトルは主に四極子相互作用により観測幅いっぱい広がっており、種々のNMRパラメータを求める上で大きな誤差が生じる。しかし、低磁場のスペクトルから四極子相互作用に関するパラメータを見積ることにより、高磁場のスペクトルから化学シフト異方性に関するパラメータを得ることが容易になる。このように、異なった磁場における測定より ^{17}O 核のような四極子核では有用であることがわかる。

ポリグリシンIIの36.6MHz及び67.8MHzにおける固体 ^{17}O CP NMRスペクトルと重ね合わされた理論スペクトルをFigs.2 a), b)にそれぞれ示す。スペクトルシミュレーションの結果得られたNMRパラメータを他のペプチドと一緒にTable 1に示す。

これらの結果から等方平均 ^{17}O NMR化学シフト δ_{iso} 及び核四極子結合定数 e^2qQ/h を水素結合距離(N--O)に対してプロットしたものをFig.3に示す。水素結合距離が短くなると等方平均 ^{17}O NMR化学シフト δ_{iso} は高磁場側にシフトし、核四極子結合定数 e^2qQ/h は小さくなることがわかった。理論計算を含めた考察は講演で述べる。

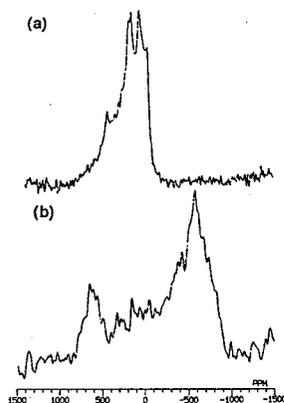


Fig.1 ^{17}O CP static spectra of polyglycine form I obtained at 67.8 MHz (a), 36.6 MHz (b), respectively.

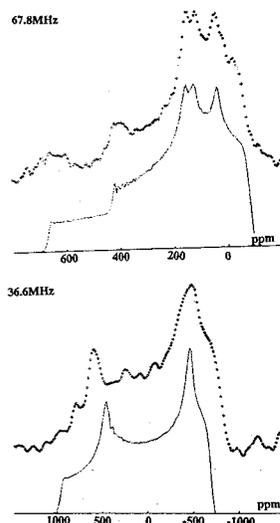


Fig.2 36.6 and 67.8 MHz ^{17}O CP static spectra of PG II with theoretically-simulated spectra.

Table 1 Determined ^{17}O NMR parameters of peptides containing Gly residue in the solid state.

sample	e^2qQ/h (MHz)	η	chemical shift tensor (ppm)				deg.			N--O length (Å)
			δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	δ_{iso}	α	β	γ	
PG II	7.8	0.30	550	550	-300	267	0	24	5	2.73
GlyGly	8.4	0.45	550	550	-280	273	-4	26	5	2.94
PG I	8.3	0.27	570	560	-280	280	0	20	4	2.97
GlyGlyHNO3	9.0	0.38	595	585	-315	288	-7	26	12	3.12

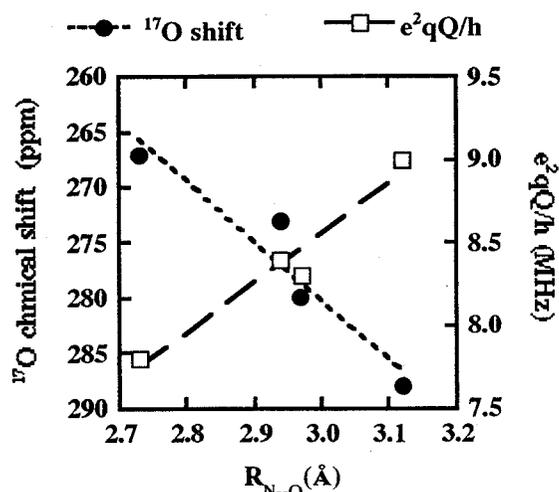


Fig.3 Plots of the ^{17}O chemical shift and the e^2qQ/h against the N--O length.

謝辞

67.8MHzのスペクトルは科学技術庁金属材料技術研究所磁界ステーション超精密磁界システムの日本電子製 GSX-500 NMR分光器を使用し測定させていただきましたことに感謝します。

文献

- 1) Saito.H and Ando.I, *Ann.Repts.NMR Spectroscopy*, vol.21, 209 (1989)
- 2) a) Ando.S et al., *J.Am.Chem.Soc.*, 107, 7648 (1985)
b) Shoji.A et al., *Macromolecules*, 20, 2441 (1987)
- 3) Kuroki.S et al., *J.Mol.Struct.*, 245, 69 (1991)
- 4) W.P.Power et al., *J.Phys.Chem.*, 94, 591(1990)
- 5) Kuroki.S et al., *J.Chem.Soc., Chem. Comm.* 5, 433 (1991)

○永阪 文惣、武田 定*、中村 亘男
阪大教養、阪大理*

Quadrupole Effects in ^{13}C -CPMAS NMR Spectra of Uracil Halides

○Bunsow Nagasaka, Sadamu Takeda*, and Nobuo Nakamura
College of General Education and *Faculty of Science
Osaka University

Asymmetric splittings in the ^{13}C -CPMAS NMR line of the carbon atom bonded to halogen atom were clearly observed as triplet for Cl- and Br-uracil. These splittings arise mainly from the residual dipolar coupling under magic-angle spinning between ^{13}C nuclear spin ($I=1/2$) and spin ($S=3/2$) of halogen quadrupolar nucleus. A calculation of ^{13}C -NMR lineshape was performed to analyze the asymmetric triplets under the adiabatic approximation. In the lineshape analysis for Br-uracil, scalar coupling as well as dipolar coupling was taken into account. The spectra calculated for both compounds agreed well with the observed lineshapes, from which the signs of the quadrupole coupling constants could be determined and the scalar coupling constant between Br and C was estimated. For I-uracil, ^{13}C -NMR signal of the carbon directly coupled to iodine was not detected due probably to quadrupolar relaxation.

【序】 固体高分解能NMRにおいて、マジックアングル回転(MAS)は化学シフトの異方性やスピン間の双極子相互作用を消す有用な手段の1つである。ところが観測する核スピン $I=1/2$ の原子が核四極子をもつ原子 ($S \geq 1$) と結合している場合、各スピンの量子化軸の方向が異なるためにこれらのスピン間の双極子相互作用はMASによって完全には打ち消されずに残る。この結果、例えば ^{14}N ($S=1$) に結合した ^{13}C ($I=1/2$) のシグナルが非対称な二重線に分裂することはよく知られている [1]。

原理的には、この分裂線から核間距離、核四極相互作用の符号及びその異方性、電場勾配の主軸と核間ベクトルのなす角を決めることができる。

同じ現象が $S=3/2$ の場合にも考えられるが、 ^{13}C と ^{35}Cl (^{37}Cl)、 ^{13}C と ^{79}Br (^{81}Br) の場合には著者等が知る限り明確な分裂線はこれまで報告されておらず [2]、今回はじめて ^{13}C のシグナルの明かな分裂を観測したのでこれらの結果を報告する。

キーワード： ^{13}C -CPMAS NMR、核四極子効果、ハロゲン化ウラシル

○ながさか ぶんそう、たけだ さだむ、なかむら のぶお

【実験】 試料は市販のC1-ウラシル、Br-ウラシル、I-ウラシルをそれぞれ水から再結晶して用いた。 ^{13}C -CPMAS NMRスペクトルにはBRUKER社のMSL200を用い、観測周波数は50.32 MHz、マジックアングル回転数は3205 Hzでいずれも室温で測定を行った。

【結果・考察】 C1-ウラシルについて得られた ^{13}C -CPMAS NMRスペクトルにおける、 $^{35}\text{C1}$ ($^{37}\text{C1}$) に結合した ^{13}C のシグナルの分裂を図aに(*)で示す。この3本の分裂についての線形解析は以下のようにして行った。断熱近似のもとで核四極子をもつ $^{35}\text{C1}$ ($^{37}\text{C1}$) の核スピンの固有状態を、数値的にハミルトニアンを対角化することによって求めた。この固有状態を使って $^{35}\text{C1}$ ($^{37}\text{C1}$) と ^{13}C の間の双極子相互作用による ^{13}C の周波数シフトを一次摂動で計算し、粉末スペクトル(図b)を得た。この解析で、電場勾配の主軸は核間ベクトルに一致させ、非対称パラメータ $\eta = 0$ を仮定した。核四極共鳴周波数 $e^2Qq/2h = 37.577\text{ MHz}$ ($^{35}\text{C1}$) , 29.64 MHz ($^{37}\text{C1}$) および核間距離 $R_{c-c1} = 1.715\text{ \AA}$ は実測値を使った[3, 4]。この結果、 $^{35}\text{C1}$ ($^{37}\text{C1}$) の核四極相互作用の符号が負であることも分かった。

Br-ウラシルについても同様な3本の分裂が観測された。この分裂を再現するためには双極子相互作用以外にスカラー相互作用および電場勾配の主軸と核間ベクトルのずれによる影響も考えに入れる必要があった。この解析から ^{79}Br (^{81}Br) の核四極相互作用の符号は正であると考えられる。塩化物と臭化物とで核四極相互作用の符号が異なるのは、C1とBrとで核四極子モーメントQの符号が異なることによる。

またI-ウラシルについては ^{127}I ($S = 5/2$) に結合した ^{13}C のシグナルは消失し観測されなかった。これは ^{127}I の四極子相互作用が大きいことと ^{127}I 核の緩和のためと考えられる。

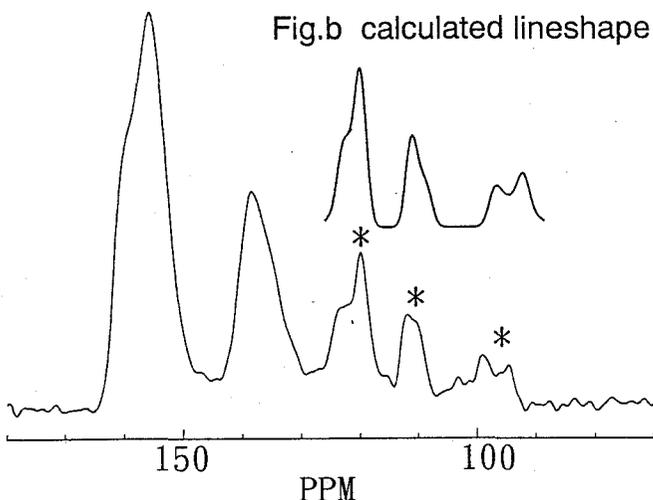


Fig.a ^{13}C -CPMAS NMR spectrum of Cl-uracil

REFERENCES

1. R.K.Harris and A.C.Olivieri, Progr. NMR Spectrosc. 24,435(1992)
2. W.W.Fleming, C.A.Fyfe, J.R.Lyerla, H.Vanni and C.S.Yannoni, Macromolecules 13, 460(1980)
3. Z.Trontelj, J.Pirnat and L.Ehrenberg, "Advances in Nuclear Quadrupole Resonance," Edited by J.A.S.Smith, Vol.1, P71(Heyden, London, 1974)
4. H.Sternglanz and C.E.Bugg, Biochim. et Biophys. 378,1(1975)

状態相関二次元NMR。
液晶分子の配向、構造、相互作用への応用。

木村雅晴、河原広典、今成 司、藤原健一朗、奥田雄司、
内藤 晶、O赤坂一之
京都大学理学部、日本電子、姫工大理学部、神戸大学理学部

State-Correlated 2D NMR Spectroscopy.
Application to Order, Conformation, and Interaction in Liquid Crystals.

M. Kimura, H. Kawahara, M. Imanari, K. Fujiwara, Y. Okuda, A. Naito and K. Akasaka
Faculty of Science, Kyoto University; JEOL Co. Ltd.; Faculty of Science, Himeji Institute
of Technology; and Faculty of Science, Kobe University

Using State-Correlated Two-Dimensional (SC-2D) NMR spectroscopy, one can separate a complex multi-proton signals into a set of simplified subspectra (cross sections), which arise from transitions of each individual proton under dipolar couplings to the surrounding protons. Theoretical consideration allowed simulation and analysis of the subspectra based on density matrix calculation, and gave information on local order parameters as well as on conformation in some favorable cases. Differential spin diffusion rates found between different chemical groups within a liquid crystal molecule or by mixing with another molecule are expected to give some insight into intra- and inter-molecular interactions in liquid crystal systems. In the present report, (1) principle of analysis of the cross sectional spectra, (2) determination of local order parameters, (3) possibility of using spin diffusion in molecular interactions, will be presented.

われわれはこれまでの研究において、液晶用状態相関二次元NMR検出器を開発し、これを用いていくつかの単独および混合液晶系について研究した。この新しい二次元化によりこれまでの極めて複雑でほとんど解析不能なプロトン一次元スペクトルが、各個プロトンの遷移に帰属されるより単純なサブスペクトルに分解されることを示した。しかし有限の転移時間内に起こる交差緩和またはスピンの拡散のため、試料や測定条件によってはこれらのサブスペクトル間で混合が起こり互いの分離が不十分となる場合が

キーワード：状態相関二次元NMR、液晶、配向、構造、スピン拡散

きむら まさはる、かわはら ひろのり、いまなり まもる、ふじわら けんいちろう、おくだ ゆうじ、ないとう あきら、Oあかさか かずゆき

ある。一方、分離が完全と仮定した場合、サブスペクトルの解析はパルス系列中のスピンドYNAMIXを考慮しても比較的単純な密度演算式で記述され、計算によるシミュレーションが可能であることが判明した。またスピン拡散を現象論的に取り入れた計算も可能である。これらの結果を総合すると、状態相関プロトン二次元NMR法の液晶への適用により得られる（又は可能性のある）情報は、次の3点にまとめることができる。

<状態相関プロトン二次元NMR法から得られる情報>

- (1) 最隣接プロトン双極子相互作用を用いた局所配向度の決定。
- (2) クロスセクションのシミュレーションによる遠達プロトン双極子相互作用パラメーターの決定とその分子構造解析への利用。
- (3) スピン拡散を利用した分子内分子間相互作用の解析。

ただしこれらの情報を完全に引き出すための実験的条件として、

- (1) サブスペクトルの分離が完全であること。（これは液晶一等方相間の転移時間をさらに短縮することを要求する）
- (2) クロスセクションが遠達プロトン双極子相互作用の効果をあらわに示すほど、高い分解能であること。（これは検出器のさらなる改良を要求する）
- (3) 分子間スピン拡散の観測

などが必要と考えられる。

以上の各点をこれまで行われたいくつかの系（4-n-pentyloxy-4'-cyanobiphenyl(SOCB)、4-methoxybenzylidene-4-acetoxyaniline(APAPA)、その他）の実例によって論じ、また将来への展望を考察する。

謝辞

この研究は旭硝子財団の援助によりなされたものである。

参考文献

1. A. Naito, H. Nakatani, M. Imanari, and K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* 87, 429 (1990).
2. A. Naito, M. Imanari, and K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* 92, 85(1991).
3. K. Akasaka, M. Kimura, A. Naito, H. Kawahara, and M. Imanari, to be published.
4. A. Naito, M. Imanari, and K. Akasaka, to be published.

○黒田 義弘、小川 雅弘、川畑 隆博^b、木山 泰範^a、藤原 靖弘^a、中川 照眞
京大 薬、京都薬大^a

Orientations and Conformations of Local Anesthetic Dibucaine as studied by ²H-NMR and Molecular Dynamics/Free Energy Calculation

○Yoshihiro Kuroda, Masahiro Ogawa, Takahiro Kawabata, Yasunori Kiyama, Yasuhiro Fujiwara, and Terumichi Nakagawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, 606-01 and Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, 607

Orientations and conformations of dibucaine which is interacting with membranes have been studied by ²H-NMR spectroscopy and molecular dynamics / molecular mechanics / free energy difference calculations. The ²H-NMR spectrum of dibucaine-d₃ which is deuterated at the butoxy group showed clearly resolved quadrupolar splittings, when it was allowed to interact with multilamellar dispersions of mixed lipids composed of PC, PS, and PE; the magnitude of these splittings increased when the membrane contained cholesterol. In contrast, no clearly resolved quadrupolar splittings have been observed when the dibucaine-d₃ was allowed to interact with the erythrocyte ghost membrane. These observations and the results of moment analyses indicate that the butoxy group of dibucaine is penetrating between the acyl chains of lipids in the case of the model membrane, while it is not penetrating deeply into the membrane in the case of the erythrocyte ghost owing to the high lateral pressure arising from cholesterol and proteins. The calculations of free energy of binding with a phosphatidylserine monolayer indicate that the interaction between the polar side chain of dibucaine and the polar moieties of phospholipids is likely to occur at the beginning of the interaction as expected; then, dibucaine binds with membranes more strongly placing its quinoline ring and the butoxy group more deeply in the membrane.

局所麻酔剤は、中性型で神経膜を通過し細胞内でカチオン型となり、Na⁺チャンネルの孔の内部に作用してNa⁺の流入を抑制するといわれている。また中性型は、Na⁺チャンネルが閉じた状態の時にカチオン型とは違った部位で作用を及ぼし、チャンネル構造を変化させNa⁺の流入を阻止する、という報告がある。この作用には、麻酔剤と生体膜脂質との相互作用が深くかかわっていると考えられる。

昨年のNMR討論会で我々は、キノリン環の3位を重水素化したジブカイン(Fig.1)を合成し、ブタ赤血球膜及びリン脂質二重膜との相互作用を重水素NMRスペクトルにより検討した結果を報告した(1)。本研究ではさらにブトキシ基を重水素化したジブカインを合成して重水素NMRスペクトルを測定し、昨年のNMRスペクトルとともにモーメント解析を行い、ジブカインの膜中での配向とコンホメーションをより詳しく検討した。また、脂質膜とジブカインとの結合の自由エネルギー変化の計算を行い、エネルギー的に膜中で安定な構造を検討した。これらの結果を報告する。

キーワード：²H-NMR、ジブカイン、リン脂質、赤血球膜、分子動力学、自由エネルギー

○くろだよしひろ、おがわまさひろ、かわばたかひろ、きやますのり、ふじわらやすひろ、
なかがわてるみち

^b現在、マリオン・メレル・ダウ株式会社 枚方研究所 #現在、日本新薬株式会社 薬剤研究所

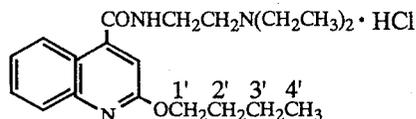


Fig.1 Chemical Structure of Dibucaine HCl

【実験方法】

モデル脂質を用いた実験では、脂質溶液から、メタノール/クロロホルム溶液を留去して薄膜をつくり、そこに310mOsmリン酸bufferを加え、vortexingを5分間行った。これに、プトキシ基を重水素化したジブカイン (Dibucaine- d_9)3mMを添加し、この懸濁液を5回 Freeze-thaw-vortexingした後、NMR測定用サンプルとした。ブタ赤血球膜を用いた実験では、赤血球膜を常法に従って調製し、310mOsmリン酸bufferで洗浄し、同じbuffer中に懸濁させた。そのゴースト懸濁液にDibucaine- d_9 (3mM)を添加し、5分間vortexingした後3時間放置しNMR測定用サンプルとした。リン酸bufferの調製は、Deuterium-depleted-waterを用いた。 ^2H -NMRの測定は、溶液用のブロードバンドプローブを備えたBrukerAM-600により、四極子エコー法により行った。 ^2H -NMRスペクトルのモーメント計算はAM-600で得られたNMRスペクトルをX-32にてJCAMP-DXの基準に従ったASCII形式にフォーマット変換した後、IRIS INDIGOにより行った。また、分子動力学および自由エネルギー計算は、Molecular Simulations社のNMR grafおよびPOLARISを用いてIRIS INDIGOにより行った。

【結果と考察】

(1) 膜中でのDibucaine- d_9 の ^2H -NMR測定

Fig.2にDibucaine- d_9 のPC (Phosphatidylcholine)、PS (Phosphatidylserine)、PE (Phosphatidylethanolamine) 混合脂質中 (Fig.2a) および、それにコレステロールを含む (Fig.2b) 脂質中の ^2H -NMRスペクトル (pH7.4,300K)を示す。PC、PS、PE、のモル比はヒト赤血球膜の内側におけるPC、PS、PEの組成と一致させて1:1:2.5とした。全脂質とコレステロールとのモル比は、ヒト赤血球膜の組成 (lipids:cholesterol=7:6 モル比) に対しコレステロール含量を1/2にした。Fig.2のスペクトルについて、各ピークに示した記号 (1',2',3',4')はFig.1の構造式中の記号に対応する。2つのスペクトル相互の比較から、Dibucaine- d_9 はコレステロールを含む脂質膜中のほうが、プトキシ基のどの部位についても広いquadrupolar splittingを示すことがわかった。このことは、脂質膜中にコレステロールを含むほうが、よりorderの高い状態で結合していることを示す。

Fig.3にDibucaine- d_9 のゴースト懸濁液中 (pH7.4、300K)における、 ^2H -NMRスペクトルを示す。ゴースト中では、プトキシ基のどの重水素も明確なquadrupolar splittingを示さなかった。

次に、これらのスペクトルの形状の変化を数値的にとらえるため、各条件で測定された ^2H -NMRスペクトルのモーメント計算を行った (Table.1)。混合脂質中のDibucaine- d_9 の場合、pH7.4、300Kで $S_{\text{CD}}=6.73 \times 10^{-3}$ であるのに対し、コレステロールを含むと、同条件で $S_{\text{CD}}=9.12 \times 10^{-3}$ と変化しorderが高くなったことを示している。また、カチオン型のジブカインが主に存在するpH4.7の場合でも、コレステロールを含むことで、orderが高くなったことが示された。

しかし、ゴースト中のDibucaine- d_9 では、pH7.4で $S_{\text{CD}}=6.39 \times 10^{-3}$ 、pH5.2で $S_{\text{CD}}=5.89 \times 10^{-3}$ というように、 S_{CD} 値が減少している。このように、ゴースト中では、

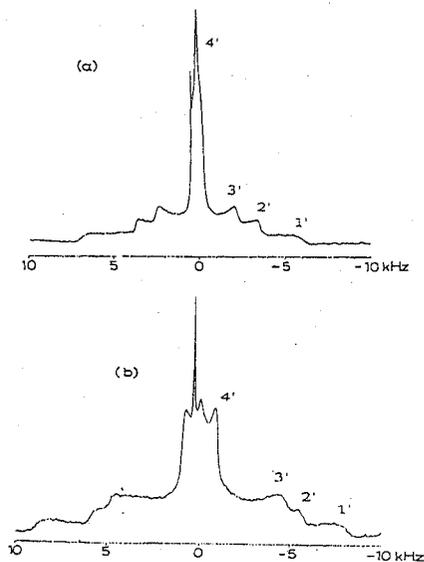


Fig.2 (a) ^2H -NMR spectrum of dibucaine- d_9 (3mM)-mixed lipids (PC:PS:PE=1:1:2.5 molar ratio 70mM) solution at pH 7.4 and at 300K; (b) as in (a), but contains cholesterol (total lipids:cholesterol=7:3 molar ratio).

ジブカインのプトキシ基はorderが低い状態で膜に結合していると考えられる。 Δ_2 値は、脂質膜中にコレステロールを含むことにより、逆に減少している。この結果は、コレステロールにより、ジブカインのプトキシ基が定まった配向をとり、order parameterの分散も小さくなった、と解釈される。しかし、ゴースト中では、 $\Delta_2=0.762$ と極めて高い Δ_2 値が得られた。このことから、ジブカインのプトキシ基は定まった配向をとらず、そのためにorder parameterの分散が大きくなったと解釈される。

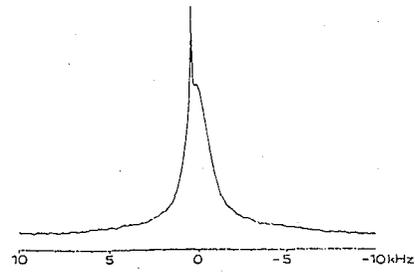


Fig.3 $^2\text{H-NMR}$ spectrum of dibucaine- d_9 (3mM)-ghost suspension at pH 7.4 and at 300K.

Table.1 Moment Data for the Dibucaine- d_9 -Mixed lipids (PC:PS:PE=1:1:2.5 molar ratio), Dibucaine- d_9 -mixed lipids-Cholesterol(total lipids:cholesterol=7:3 molar ratio), and Dibucaine- d_9 -Ghost Systems.

Membrane		Temperature	$M_1 \cdot 10^{-3} (\text{s}^{-1})^a$	$M_2 \cdot 10^{-6} (\text{s}^{-2})^a$	$\text{ScD} \cdot 10^{13}^b$	Δ_2^c
mixed lipids	pH7.4	300	2.04	9.38	6.73	0.670
		279	2.27	11.2	7.49	0.615
	pH4.8	300	2.38	12.6	7.86	0.649
mixed lipids+cholesterol	pH7.4	279	2.44	12.0	8.05	0.497
		300	2.76	13.7	9.12	0.337
	pH4.6	300	2.72	13.7	8.97	0.372
		279	3.23	17.8	10.7	0.265
ghost	pH7.4	300	1.94	8.92	6.39	0.762
	pH5.2	300	1.79	9.99	5.89	1.32

$a \quad M_n = \int_0^\infty \omega^n f(\omega) d\omega / \int_0^\infty f(\omega) d\omega$. $b \quad \text{ScD} = 2\sqrt{3}M_2 / (e^2 q O / \hbar)$; $e^2 q O / \hbar = 167 \text{kHz}$. $c \quad \Delta_2 = M_2 / 1.35 M_1^2 - 1$.

(2) PSとジブカインとの結合の自由エネルギー変化の計算

ジブカインが脂質膜中でどのような配向とコンホメーションをとるときに最も安定に存在するか、ということを検討するため、モデル膜として、PSの単分子膜を用い、脂質に対するジブカインの結合の自由エネルギー変化の計算をFig.4に示した手順に従って行った。先に我々は、PC膜中において、ジブカインは何分子かが会合して存在していることを報告した(2)。そこで、Fig.5に示すようなジブカインの側鎖に関して二種類のコンホメーションAおよびBがそれぞれダイマーとして会合したモデルを考え (Dibucaine AA, BB)、また、Dibucaineの脂質膜への結合様式についてはFig.6に示すような二種類のモデルを考えた (Model I, II)。Model Iは $^1\text{H-NMR}$ が観測される程に弱い結合をしたジブカインを、またModel IIは $^2\text{H-NMR}$ においてquadrupolar splittingを生じるほどに強く結合したジブカインを想定したものである。さらに、ジブカインのダイマーはFig.7に示すように16分子のPSの中央に結合させて、PSとの結合の自由エネルギー変化の計算を行った (Table.2)。カチオン型に関しては、ジブカインのコンホメーションにか

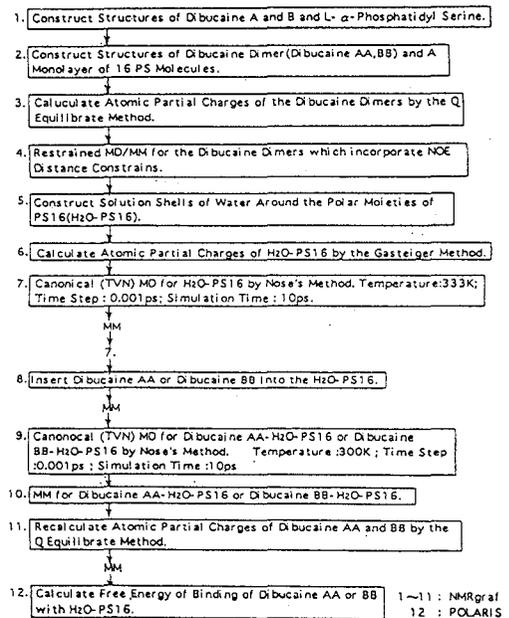


Fig.4 Scheme of calculation of free energies of binding of dibucaine AA and dibucaine BB with L- α -phosphatidyl serine monolayer.

かわらず、Binding Model Iの結合様式をとるときの方が、結合の自由エネルギー変化がより大きい負の値をとり、膜と安定に結合することがわかった。また、Binding Model IIにおいては、Dibucaine BBのコンホメーションの方がDibucaine AAよりも安定に結合することを示しており、Fig.2においてジブカインのプトキシ基が明瞭なquadrupolar splittingを示したことと良く対応する。中性型に関しては、結合の自由エネルギーは正の値となった。このことは、今回用いた自由エネルギー計算の方法ではジブカインの膜への結合に伴うエントロピー変化 (ΔS) が正しく考慮されていないためと考えられるがBinding Model IIにおいて、カチオン型と同様にコンホメーションBの方がAよりも低い自由エネルギーの変化値を示した。

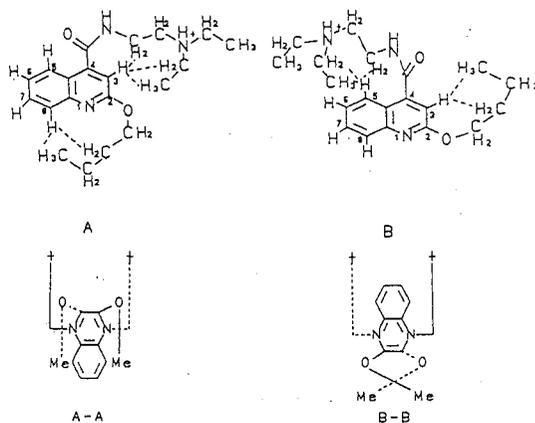


Fig.5 Schematic drawings for the association of dibucaine A and dibucaine B.

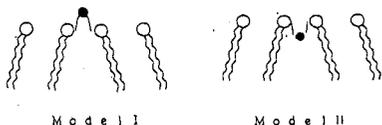


Fig.6 Schematic drawings for the binding model of dibucaine dimer. ●: Quinuclidine rings of dibucaine; /: polar side chains.

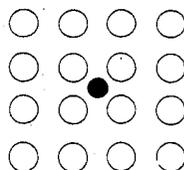


Fig.7
○: PS, ●: dibucaine dimer

Table.2 Free Energy of Binding of Dibucaine AA and Dibucaine BB with Phosphatidylserine (PS) Monolayer. ^a

	Binding Model I		Binding Model II	
	dibucaine AA	dibucaine BB	dibucaine AA	dibucaine BB
cationic form	-78.8	-80.7	-28.8	-64.7
molecular form	14.2	20.2	48.0	44.1

^a Energy (kcal / mol).

【結論】

上に述べた結果から、ジブカインはモデル膜中ではFig.5Bのようなコンホメーションで、プトキシ基を膜内部に深く結合させた構造をとっていると考えられる。²H-NMRによる情報より混合脂質にコレステロールを含むモデル膜の場合、プトキシ基はコレステロールにより、orderの高くなっている領域（脂質の脂肪酸鎖の2~10位のメチレン基の部分）に存在するため、コレステロールを含まないモデル膜中に結合したDibucaineのプトキシ基よりかなりorderが高くなっていると考えられる。また、ゴーストでは、さらにコレステロール含量が高く、また膜タンパクなどの影響により、コレステロール存在領域での側圧（lateral pressure）が非常に高いため、プトキシ基がそこまで深く結合できず、極性基に近い領域に定まった配向をとらずに存在すると考えられる。従って、この場合のジブカインの可能なコンホメーションとしてはFig.5Aを考えることができる。

【References】

1. Y.Kuroda, M.Wakita, M.Ogawa, Y.Kiyama, Y.Fujiwara, and T.Nakagawa, The 31th NMR Symposium (Japan), Himeji, 1992, Poster Presentation No.28.
2. M.Wakita, Y.Kuroda, Y.Fujiwara, and T.Nakagawa, Chem.Phys.Lipids 62, 45-54 (1992).

(新日本製鐵 先端研、慶応大学 化学科*)

○手島 志帆、齋藤 公児、川崎 平康*、太田 博道*

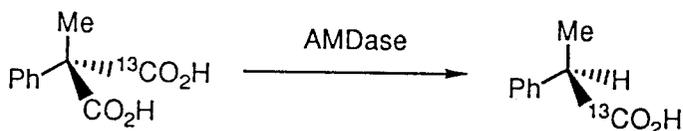
NMR analysis of intermediates on decarboxylation
by Arylmalonate decarboxylase (AMDase)

○Shiho Teshima, Koji Saito, Takayasu Kawasaki*, Hiromichi Ohta*,
(Advanced material and technology resarch laboratories,
Nippon Steel Corporation;
Department of Chemistry, Keio University*)

Methylphenylmalonic acid is asymmetrically decarboxylated by Arylmalonate decarboxylase (AMDase). This reaction accompanies with the configurational inversion on α -carbon of substrate. To study the reaction pathway, ^{13}C labeled carboxyl carbon of substrate was monitored by NMR. As the reaction proceeds, two peaks were newly observed on ^{13}C NMR spectra. These two peaks had constant intensities, and they disappeared when the enzyme was deactivated. Therefore, it was confirmed that intermediates peaks of this reaction were observed by NMR. According to the ^{13}C correlation with ^1H , we can suggest that these come from the substrate-and product-enzyme complexes.

[はじめに]

アリールマロン酸脱炭酸酵素 (AMDase) は、次の不斉脱炭酸反応を触媒し¹⁾、この反応は(1)補酵素を必要としない、(2)反応が立体反転を伴って進行する²⁾という特徴を持っている。



これまでに活性中心にシステイン残基が関与すること、中間体がアニオン性を帯びていることなどの知見が得られているが、その詳細な反応機構は明らかではない。ここでは、一方のカルボキシル基を ^{13}C でラベルした光学活性な基質を用い酵素反応を行い、その進行をNMRを用いて観測した。その結果中間体に由来する2本のピークを観測し、そこから2種類の酵素基質(あるいは生成物)複合体の存在が示唆されたので、その反応機構について考察した。

 ^{13}C NMR、反応中間体、酵素基質複合体、脱炭酸酵素

○てしま しほ、さいとう こうじ、かわさき たかやす、おおた ひろみち、

[実験]

NMRで反応中間体を観測するために、温度、pH、酵素と基質のモル比の他、基質の溶解度、酵素の濃度を考慮し測定条件を設定した。基質となるフェニルメチルマロン酸の ^{13}C ラベル体 (220mM) は、2Nトリム塩酸緩衝液と、1NのKOH (0.4ml) に溶解し、氷浴中で冷却しながらAMDase (0.17mM) を加え直ちに測定を開始した。測定には10ミリの試料管を用い、全液量3.5ml、基準にはキャピラリー-TMSを用い、重水でロックをかけた。反応は全てNMR装置中で行い、NMRによる観測を連続的に400時間まで実施した。装置は日本電子製核磁気共鳴装置 α -400にてT107 γ -ローブを用い、温度可変装置にて $-5\pm 0.1^\circ\text{C}$ に制御して測定を行った。

[結果と考察]

反応の進行を基質および生成物のカルボキシル炭素ピークの積分強度により追跡した(積算1000回、測定時間35分)。約60時間まで生成物のピーク強度は増加したが、その後は変化しなかった。このとき179.0ppm(ピークA)、182.4ppm(ピークB)に2種類のピークが新たに観測された。これらの強度は時間により変化しないため、この反応の中間体に由来すると考えられた(Fig.1)。さらに、ピークA, Bが基質や生成物の不純物でないこと、反応後の酵素液の残存活性が約80%であることを確認した。また -5°C での解離定数($K_m=7.6\text{mM}$)、最大反応速度($V_{\text{max}}=157.9\mu\text{M}$)より、観測された酵素反応はMichaelis-Menten式に従う通常の酵素反応系といえた。ここでもしピークA, Bが中間体に由来するならば、反応の終了時には消失すると予想される。しかし、これらは50日後にも変化せず(Fig.2)一定の強度で観測された。そこで塩酸の添加、あるいは加熱により酵素を失活させると、ピークA, Bは消失した。反応液中の生成物を分離膜で取り除いた場合にもピークは消失した。つまり今回の実験系では生成物の濃度が高く反応系の平衡が偏っていたために、中間体に由来するピークA, Bがこのように長時間観測されたものと考えている。

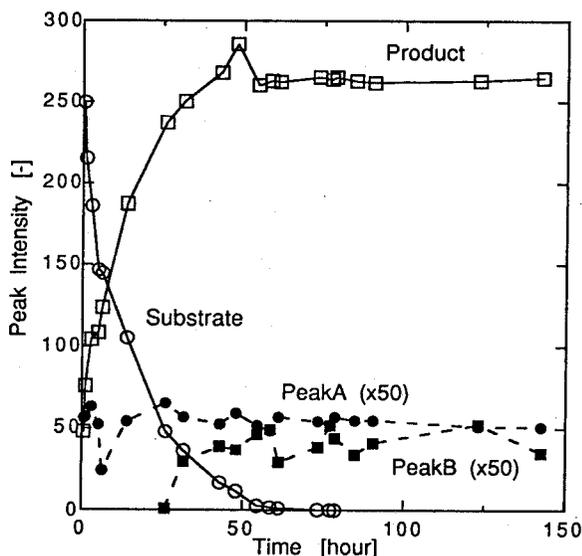


Fig.1 Time dependence of peak intensities (1000 FIDs were accumulated.)

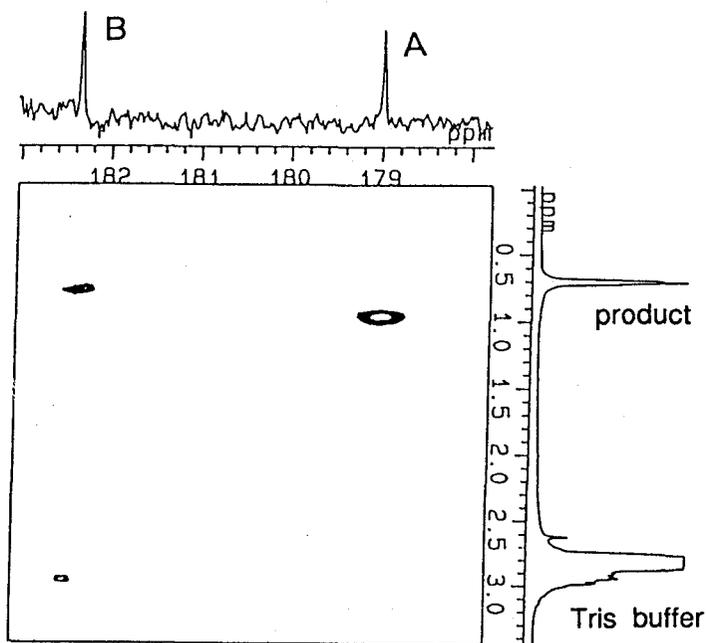
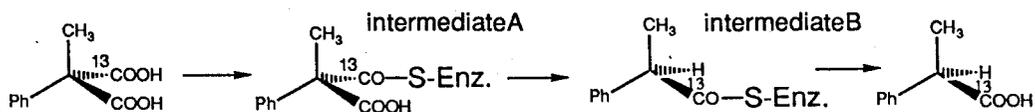


Fig.4 2D long range C-H shift correlation spectrum

これらの結果からAMDaseによるフェニルメチルマロン酸の脱炭酸反応には少なくとも2種類の間体が存在することが明らかになり、NMRの情報からピークAは基質、ピークBは生成物との酵素の複合体と推定された。AMDaseの活性にはシステイン残基が関与することがわかっており、チオールエステルの複合体を推定すると、次のような機構が考えられる。その他にセリン残基とのアシル複合体である可能性もあり、現在の段階では両者のいずれかであろうと考えている³⁾。



この他に、反応の進行に伴い、基質、生成物、ピークA,Bの¹³CNMR化学シフトは変化しないことから、これらは化学シフトのスケールよりも長い寿命を持つと考えられた。一方、線幅は反応が進行するにつれて狭くなり、60時間後には一定の線幅になった。これは反応が進むにつれて存在時間が長くなることを示し、基質の減少による反応速度の低下と一致する。この線幅の変化については今後検討していく予定である。

[文献]

- 1) Miyamoto K., Ohta H., J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 4077.
- 2) Miyamoto K., Tsuchiya S., Ohta H., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 6256.
- 3) Neil E. Mackenzie, J. Paul G. Maltjouse, A. I. Scott, Science, 1984, 225, 4665, 883-889.

計算法を確立することにより、溶液構造と結晶構造との局所的な構造の違いや活性発現に伴う構造変化などの新たな知見が得られると期待できる。

ここでは、タンパク質立体構造解析に際しNMR化学シフト計算法を適用する一つの試みとして、これまで用いられてきたNOEからの距離制限に加えて新たに環電流効果を強く及ぼす芳香環に関する距離情報を加えて行う構造計算の方法を提案した。

計算法 本研究の手順の概略を、図1に示した。

本研究の具体例として、最も詳細にNMR構造研究のなされているタンパク質、BPTI(Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor)を選んだ。NMRから得られた距離、および角度制限については既に報告されているので¹¹⁾、これらを用いて構造計算を行った。しかしながら当時は化学シフトの帰属が完全に終了していないうえに、特に側鎖に関する距離制限の数が少ないため、側鎖を含む全体構造を得ることが困難であった。

ここではこのような距離制限を用いて構造計算を追試した。つづいて、NOE実測データが不足する分を補う一つの試みとして、 $C\alpha$ -H化学シフトを0.3ppm以上シフトさせる芳香環と $C\alpha$ -Hとの距離を結晶構造(4PTI)より算出し、それを上述の距離制限に加えて構造計算を行った。

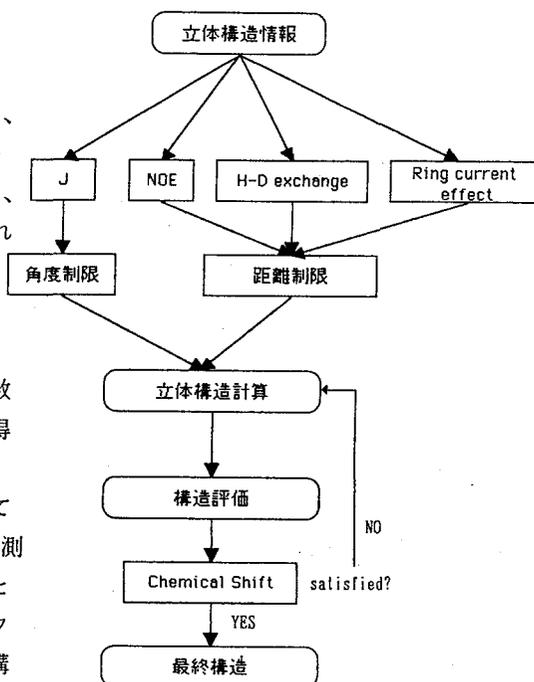


図1 ¹H-NMR化学シフト計算法を導入したタンパク質の立体構造解析法

ディスタンスジオメトリ(DADAS, Distance Analysis in Dihedral Angle Space)計算にはプログラムDADAS90(MoI Skop, JEOL)を用い、ランダムに与えた100個の初期構造について構造計算を行った。これらの中から距離、角度制限の侵害値の低い20個の構造を選び出し、これらを再度構造計算することにより収束構造を得た。

上述の構造計算により得られた各100構造のうち最初の50構造について、 $C\alpha$ -Hの化学シフト計算を行い構造を評価した。 $C\alpha$ -Hの化学シフトは環電流効果(σ^{ring})、磁気異方性効果(σ^{anis})、電場効果(σ^{elec})の和として計算した。 σ^{ring} の項の計算に用いる原子磁化率の値は、¹³C, ¹⁵Nについては固体NMR法で実測された化学シフトテンソルの値から計算した値を、¹⁷Oについては8つのタンパク質の $C\alpha$ -H化学シフトの実測値を用いた最適化によって求めた値を用いた⁹⁾。このようにして得られた化学シフトの計算値は、ランダムコイル化学シフト値¹²⁾を補正した実測値と比較した。

結果および考察 Wagnerらの距離制限を用いた場合(a)と環電流効果を加えた距離制限を用いた場合(b)について、各20個のNMR主鎖の収束構造(細線)と結晶構造(矢印間)との比較を図2に示した。両者を比較すると後者の場合には新たに加えた距離制限が芳香環のみならず主鎖原子(C α H)を含んでいるため、主鎖骨格の収束が格段に良くなっている。距離制限の少ないループ構造などは結晶構造と比較して両者の構造間のずれが大きい、ヘリックスや β -シートの部位に関しては構造間のずれが小さくなっている。

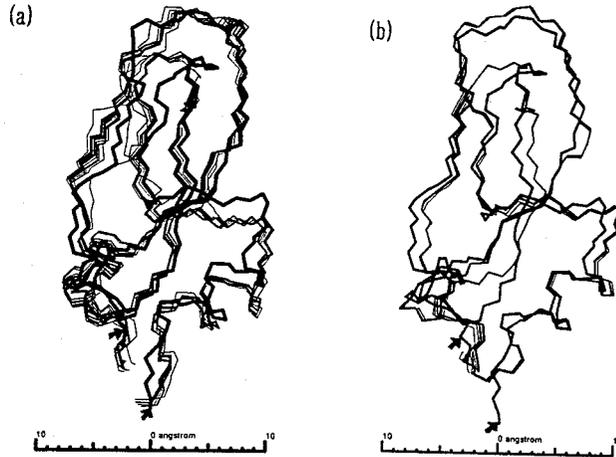


図2 DADAS計算により得られたBPT120構造(細線)と結晶構造(矢印間)との比較

- (a) Wagnerらにより報告された距離制限を用いて得た構造
 (b) (a)に芳香環に関する距離制限を加えて得た構造

図3にはランダムな初期構造から前述の二種の距離制限、(a)と(b)を用いてDADAS計算することにより得られた各50構造の中からそのターゲットファンクションの値と化学シフトの相関係数(実測値と計算値)の値をプロットした。(a)の場合は、化学シフトの相関係数自身がきわめて低く、ターゲットファンクションとの間に殆ど相関がない。一方、(b)の場合、ターゲットファンクションが低く距離、角度制限を良く満たす構造ほど化学シフトの相関係数が高く実測の化学シフトを良く再現する傾向にあることがわかる。これは芳香環の角度の違いやC α Hとの相対的な位置関係の正確さが化学シフトに大きく影響を及ぼしているためである。

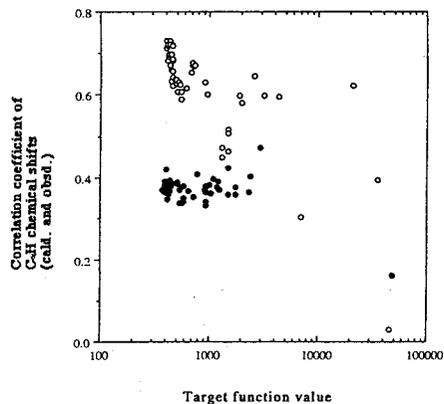


図3 DADAS計算により得られたBPT150構造のターゲットファンクションの値と化学シフト値の相関係数(計算値と実測値)
 (●: (a) Wagnerらにより報告された距離制限を用いて得た構造 ○: (b) に芳香環に関する距離制限を加えて得た構造)

これらの中から最も良く距離、角度制限を満たした構造について、実測値および計算値を残基毎にプロットしたものが図4である。これらの構造は、NOEおよびvdW半径の距離制限を各々0.5, 0.3Å以上侵害せず、角度制限を10°以上侵害しない構造である。芳香環ならびに環電流効果を受けるCaHとの間の距離制限が乏しい(a)の場合では、実測で観測されていないような大きな高磁場シフトを生じたり、反対に実測の著しい高磁場シフトを再現していない。芳香環に関する距離制限を加えた(b)の場合では実測の化学シフトを良く満足する構造が得られたと言える。

これまで述べてきたように、¹H-NMR化学シフトはタンパク質の立体構造の違いを鋭敏に反映する。本研究で用いたBPTIについての結果は、1987年に報告された距離制限、角度制限を用いているにも関わらず良い結果を導いており、この方法論は今後のNMRによるタンパク質立体構造解析法の発展に大きな寄与をもたらし得ると期待できる。

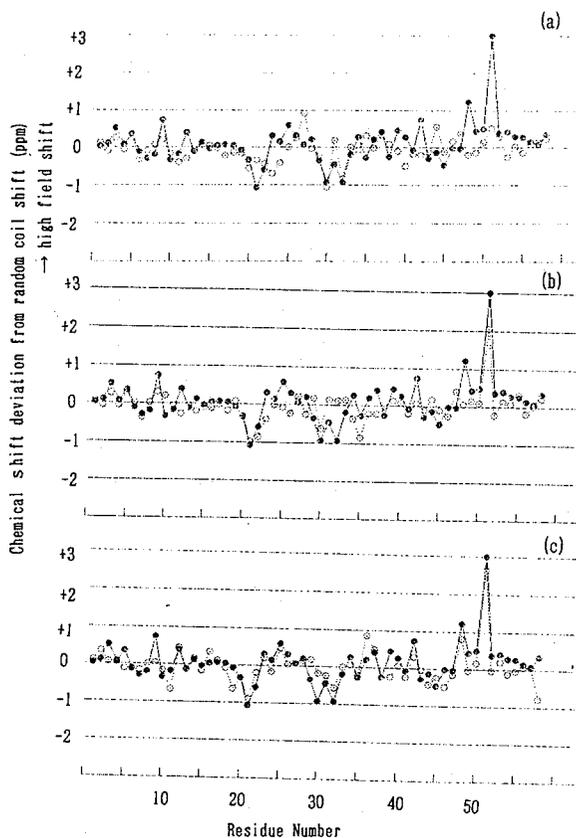


図4 BPTIについてCaH化学シフトの実測値(●)と計算値(○)の比較
(a) Wagnerらにより報告された距離制限を用いて得た構造 (b) (a)に芳香環に関する距離制限を加えて得た構造 (c) 結晶構造(SPT1)

参考文献

- 1) Asakura, T., Ando, I., & Nishioka, A., Makromol. Chem. (1977) 178, 1111
- 2) Asakura, T., Ando, I., & Nishioka, A., Makromol. Chem. (1977) 178, 1521
- 3) Asakura, T., Makromol. Chem. (1981) 182, 1097
- 4) Asakura, T., Nakamura, E., Asakawa, H., & Demura, M., J. Magn. Reson. (1991) 93 355
- 5) Williamson, M. P., & Asakura, T., J. Magn. Reson. (1991) 94, 557
- 6) Williamson, M. P., Asakura, T., Nakamura, E., & Demura, M., J. Biomol. NMR (1992) 2, 83
- 7) Williamson, M. P., & Asakura, T., FEBS Lett. (1992) 302, 185
- 8) Asakura, T., Niizawa, Y., & Williamson, M. P., J. Magn. Reson. (1992) 98, 646
- 9) 朝倉哲郎、出村誠、中村英二、安藤勲、高分子論文集 (1992) 49, 281
- 10) Williamson, M. P., & Asakura, T., J. Magn. Reson. (B) (1993) 101, 63
- 11) Wagner, G. et al., J. Mol. Biol. (1987) 196, 611
- 12) Wüthrich, K., NMR of Proteins and Nucleic Acids, John Willey & Sons (1986)

ET_BアンタゴニストRES701-1, RES701-2 の溶液中の構造解析
片平律子、松田 謙、山崎基生 好田真由美
協和発酵工業株式会社 東京研究所

Solution structures of ET_B selective antagonists RES701-1 and RES701-2
determined by ¹H-NMR

Ritsuko Katahira, Yuzuru Matsuda, Moto-o Yamasaki, Mayumi Yoshida
Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

The structures of endothelin B (ET_B) receptor selective antagonists RES701-1 and RES701-2 have been determined by ¹H-NMR in DMSO solution. These peptides consist of 16 amino acid residues with an internal loop between γ -carboxyl carbon of the 9th aspartic acid and amide proton of the N-terminal glycine. The structure calculations were carried out by the combined use of distance geometry and simulated annealing methods. The results show that the both peptides adopt highly ordered structure; the antiparallel β -sheet between the segments from A7 to D9 and F12 to Y14. The hydrophobic core associated with the orientation of the side chains in the antiparallel β -sheet structure would be indispensable for the activity.

(序) エンドセリン(ET)は、非常に強い血管収縮作用をもつ生理活性ペプチドであり、現在までに ET-1, ET-2, ET-3 の三種類の isopeptide が、報告されている。また、これらのペプチドのレセプターには、主に ET_A, ET_B という二種類のサブタイプがあることが知られている。ET_Aレセプターに対しては、ET-1, ET-2 が ET-3 よりも affinity が強く、ET_Bレセプターに対しては、ET-1, ET-2, ET-3 はほぼ同じ affinity を示す。ETの構造と活性の相関についてはNMRでも多くの研究がなされ、C末のTrpやTrpを含むC末付近の疎水コアの構造が、活性に必要なではないかと報告された¹⁾。このような構造活性相関を検討する場合、アンタゴニストの構造を調べる事がエンドセリンの活性を理解する上で重要となってくる。最近、ET_Aレセプター選択的アンタゴニストが幾つか報告されているが、ET_Bレセプターに対しては、IRL-1038 ([11-21] ET-1)のみが報告されているだけで²⁾、三次元構造の情報については未だ報告されていない。そこで我々は、ET_Bレセプターに選択的なペプチドRES701-1およびRES701-2を得³⁾、その立体構造を、distance geometry 法とsimulated annealing 法を用いることによって決定した。RES701-1の一次構造は、GNWHGTAPDWWFFNYWで(701-2に対しては、C末のTrpが7-hydroxyl-Tryptophaneに変わっただけのものである)、9番目のアスパラギン酸の γ -カルボニルとN末のアミドプロトンが結合した、ユニークなループ構造を有しており、三次元構造に興味を持たれる。今回明らかにになったこれらの構造から、活性と構造

キーワード : ¹H-NMR, ET, antagonist, three dimensional structure, distance geometry

かたひら りつこ、まつだ ゆずる、やまさき もとお、よしだ まゆみ

の相関について議論したい。

(実験) 5mgのサンプルを0.5mlのDMSO溶液にとかして、30°CでNMR測定をした。NOESY(混合時間 300ms), DQF-COSY, HOHAHA測定には、BRUKER AM-500を用い、NOESY (混合時間 100ms), E.COSY測定にはJEOL JNM-A400を用いた。

NOEの強度は、TITAN上のNMR2によってシグナルをvolume integrationすることによって、得た。¹Gly-⁹Aspの環状構造を作る為に、MolSkop (JEOL Ltd.)でアスパラギン酸の側鎖に修正を加えた。distance geometry 計算は、TITAN上で MolSkopのDADAS90を用いて行った。また、simulated annealing 計算は、IRIS上でX-PLORを用いて行った。³J_{HNα}は、1Dスペクトルより読み取り、³J_{αβ}はE.COSYより得た。

(結果及び考察) 1) RES701-1及び-2の立体構造 NOESY, DQF-COSY, HOHAHAスペクトルを用い、定法に従って¹Hシグナルの帰属を行った。RES701-1のNOEのconnectivityを、図1に示した。A7からD9の領域とF12からY14の領域の間でantiparalellのβ-sheet構造であることが分かった。この構造は、RES701-2についても観測された。NOEから得られた129個 (RES701-2に対しては120個) の距離情報と11個

(RES701-2に対しても同数) のphi angle constraints、8個 (RES701-2に対しては7個) のchi1 angle constraintsを用いて、400個の初期構造からDADAS計算を行った。次に、DADASで得られた構造に対して、1000Kから100Kまで温度を下げながら6ps dynamics計算を行った。その結果、RES701-1、701-2に対して最終的にはそれぞれ32個、24個のよく収束した構造が得られ、主鎖原子に対してのrmsdが0.42Å (1-16残基間)、0.55Å (1-15残基間) となった。RES701-2は、RES701-1に比べて収束が悪くなったが、これは前者のC末部分が後者に比べて揺らいでいる為であると考えている。

2) antagonist 活性部位の推定 IC₅₀の値から、RES701-1はリング部 ([1-10]RES701-1) のみの場合や、テール部分 ([10-21]RES701-1) のみでは、活性を殆ど失ってしまうことがわかっている。従って、リング部分の一部とテール部分の一部からなっているβ-sheet構造のあたりが活性に深く関与しているものと考えられる。また、RES701-2は、701-1と比べて活性が三分の一におちることからC末部分の構造も活性に寄与しているものと考えられる。

(謝辞) 今回のRES701のDADAS計算に当たって、JEOLの藤田憲一博士にご指導頂きました事を、深く感謝致します。

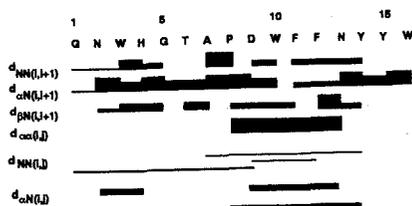


Fig. 1. NOE connectivities of RES701-1 in DMSO.

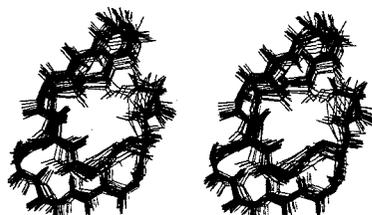


Fig. 2. Solution structure of RES701-1 in DMSO.

REFERENCES

- 1) Urade, Y., et al., FEBS Lett. 311, 12-16 (1992).
- 2) Robyn et al., Biochemistry 31, 5640-5645 (1992).
- 3) Tanaka et al., submitted.

高橋 圭子, ○島田 利治, 繁森 禎夫, 服部 憲治郎
東京工芸大 工

**The Shape of Hydrophobic Cavity of Monosubstituted Cyclodextrin
With Intramolecular Complex Formation.**

Keiko Takahashi, ○Toshiharu Shimata, Yoshio Shigemori and
Kenjiro Hattori

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Tokyo Institute of Polytechnics

Several monosubstituted cyclodextrins(CD) which have aromatic moiety (carbobenzoxy group:Z) and flexible arm with some weak interaction points (hydroxy group, amide bond) were prepared. From the 1D and 2D(COSY and ROESY) ^1H and ^{13}C NMR measurement, the structure of macrocyclic ring and the position of phenyl moiety in macrocyclic ring has been represented. Z binding CDs displayed here include Z groups in their cavity forming "intramolecular complex". The distortion of macrocyclic ring, the position of Z group and flexibility of hydrophobic cavity depended on the length of arm.

D-グルコースが6~8個 α -1,4結合した環状オリゴ糖シクロデキストリン(CD)はその中央の疎水性空洞に様々な分子をゲストとして包接し、酵素モデルのみならず、分子認識の基盤としておおくの研究がなされている。本研究室ではCDの分子認識力の向上を目的として、CD上の一つの水酸基にある程度の炭素鎖(アーム)を介して芳香族を導入してきた。¹⁾²⁾³⁾この様な一点修飾CDは芳香族がいわば自己ゲスト分子として疎水性空洞と相互作用し多彩なホスト空間を形成する。そして、この多彩なホスト空間がCDの機能を制御する端緒も得ている。⁴⁾このホスト-ゲストのコンフォメーションを明らかにする上で、NMRは最も有用な手段の一つである。今回はカルボベンゾキシ基(Z基)を持つ各種アミノ酸をCDに導入し、アームの長さ、アームの構造(アミド結合とメチレン鎖のバランス)を系統的に変化させ(Fig.1)形成するホスト空間を1D-、2D-NMRにて解析した結果を報告する。

キーワード: シクロデキストリン、疎水性相互作用、分子内包接錯体

たかはし けいこ, ○しまた としはる, しげもり よしお, はっとり けんじろう

では説明できず、CDの疎水性空洞の影響であると考えられる。実際、包接化合物を形成しないことが知られているDMSO中では、5個のプロトンが1つのグループで観察されており、(Fig. 2(c))さらにCDの良好なゲスト分子として知られているシクロヘキサノールを添加した場合もこの化学シフトは変化する。(Fig. 2(b))したがって、Z基のプロトンの化学シフトの変化は、いわゆる“intramolecular complex”を形成していることに起因すると考えられる。また、C1Hの分裂もCD空洞の非対称性を意味し、上記の仮定を支持する。我々は先にN-formylphenylalanyl-およびglycyl- β -CD (f-Phe-CD, f-Gly-CD)を合成し、その1D、および2DNMRより、f-Phe-CDはintramolecular complexを形成し、f-Gly-CDは形成しないことを報告している。³⁾この場合も、2:1:2の比で観察される芳香族プロトンが3:2の2グループで観察される。ここで最小のアームの長さであるZ-A-CDもf-Phe-CDと同じ長さであり、この長さがintramolecular complexの形成に必要とした我々の仮定を支持している。

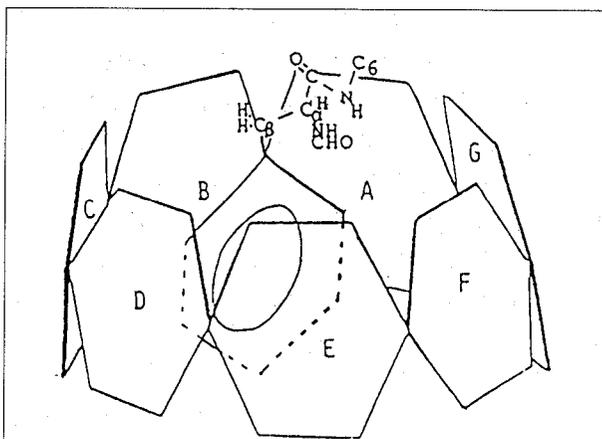


Fig. 3 Schematic diagram of the most possible averaged conformation of f-L-Phe- β -CD in D_2O at 40°C. Its f-L-Phe-residue is inserted into the CD cavity from the primary-hydroxyl group side of own macrocyclic ring.

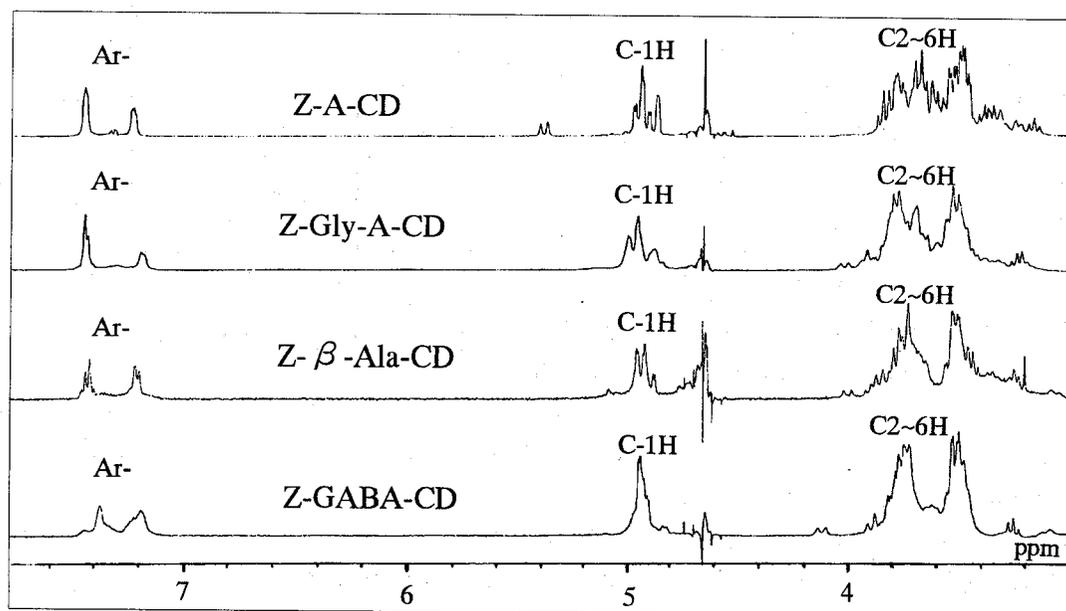


Fig. 4 1H -NMR spectra of Z-A-CD, Z-Gly-CD, Z- β -Ala-CD and Z-GABA-CD in D_2O

[アームの長さおよび相互作用の変化によるコンフォメーションの変化]

アームの長さを変化させると、芳香族の化学シフトの幅およびC 1 Hの分裂幅共に減少している。(Fig. 4)これは、メチレン鎖でアームを伸長させた場合も、アミド結合でジペプチド結合型にしても同様であった。このNMRの変化は、アームが長いほど芳香族の自由度が大きくなり、しかもCD環に歪みをかけずにintramolecular complexを形成していることを意味している。分子内包接の主な駆動力は疎水性相互作用であるが、水素結合等も無視できず、水酸基やアミド基の存在が環の歪みやCD機能に影響を及ぼすことを我々は見いだしている。^{1) 5)}そこで、Z-Gly-CD, Z-Ala-CD, Z-Ser-CDで比較してみたところ、顕著な差異はみられなかった。

[分子間包接作用]

Table 1 に各CD誘導体のZ基の2グループの δ 値の差を示す。まず各CD誘導体のホストのみのときは、アームの長さが短いものほど分裂幅は大きくなる。そしてアームの長さが同じものは側鎖官能基の種類に関係なくほぼ同様な結果を示した。よってこれらのCD誘導体のコンフォメーションはアームの長さに依存していることが分かる。また、シクロヘキサノールを加えるとすべてのCD誘導体で $\Delta\delta$ 値の減少が観察され、アームの短いものほど大きかった。Z-Ser-Gly-CD, Z-Ala-Gly-CDについてはほとんど変化がなかった。これらの違いはコンフォメーションの違いによると考えられる。

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ δ value shift of CD derivatives

Host	$\Delta\delta$	+ cyclohexanol	$\Delta\Delta\delta$ (ppm)
Z - CD	0.235	0.128	0.107
Z - Ser - CD	0.269	0.055	0.214
Z - Ala - CD	0.271	0.059	0.212
Z - Gly - CD	0.257	___ a)	___ a)
Z - β - Ala - CD	0.177	___ a)	___ a)
Z - GABA - CD	0.181	0.087	0.094
Z - Ser - Gly - CD	0.166	0.162	0.004
Z - Ala - Gly - CD	0.149	0.144	0.005
Z - Ser - GABA - CD	0.188	0.109	0.079
Z - Ala - GABA - CD	0.199	0.132	0.067

a) cannot measure for poor solubility

1) K. Takahashi, Bull. Chem. Soc. Jpn., **66**, 550-554(1993)

2) W. Saka, et. al., Bull. Chem. Soc. Jpn., **63**, 3175-3182(1990)

3) K. Takahashi, Chem. Lett., 1990, 2227-2230.

4) H. Moon, M. Wadamori, K. Takahashi, K. Hattori, J. I. Phenomena submitted.

5) K. Takahashi Supramolecular Chemistry in press.

P30 コリシン免疫蛋白質の高次構造と コリシン活性ドメインとの相互作用の解析

○大野光宏¹、矢嶋俊介¹、武藤裕²、守川壮一³、中村春木³、横山茂之²、
正木春彦¹、魚住武司¹

(¹東京大学農学部応用生命工学、²理学部生物化学、³蛋白工学研究所)

Solution structure of the colicin E3 immunity protein and the interaction with the RNase domain

○Mitsuhiro Ohno¹, Shunsuke Yajima¹, Yutaka Muto², Soichi Morikawa³, Haruki Nakamura³,
Shigeyuki Yokoyama², Haruhiko Masaki¹ and Takeshi Uozumi¹

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, and ²Department of Biophysics and
Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo. ³Protein Engineering
Research Institute.

Colicins E3 and E6 kill sensitive *Escherichia coli* cells by the RNase activity located on the C-terminal domain, T2A, of each colicin protein. Colicin producing cells also produce specific inhibitor proteins, ImmE3 or ImmE6, to protect from the colicin action by binding to E3-T2A or E6-T2A, respectively. Our genetic analysis suggested that one or two amino acids dominantly specify the recognition in both Imm and T2A. Here we report the solution structure of ImmE3 and chemical shift perturbation experiment between T2A and Imm. The results suggest that a four-stranded antiparallel β -sheet constitutes a part of the protein surface, and Imm interacts with T2A on its β -sheet and a part of a loop.

はじめに

大腸菌が生産する殺菌性蛋白のコリシンE3とE6は、リボソームの16SRNAの一箇所を特異的に切断する特殊なRNase活性を持つ。このRNase活性は、分子量約6万のコリシン蛋白のC末端領域、T2A領域に局在する。またコリシンの生産菌は、外来のあるいは内在のコリシン活性を防ぐために、インヒビタータンパク、Immを同時に生産している。E3とE6間のアミノ酸配列は非常に相同性が高く、T2Aとそれに対応するImmの領域にのみ相違が見られる。しかもその違いは、T2Aで97残基中10個、Immで84残基中12個と

コリシン蛋白質、蛋白質間相互作用、ディスタンスジオメトリー

おおのみつひろ、やじましゅんすけ、むとうゆたか、もりかわそういち、なかむらはるき、よこやましげゆき、まさきはるひこ、うおずみたけし

僅かである。しかしながら、T2A-Imm間の認識は非常に厳密で、E3の活性はImmE3のみにより抑えられ、E6の活性はImmE6のみによって抑えられる。このことから、E3とE6で僅かに異なるアミノ酸残基が、T2A-Imm間の認識においてE3/ImmE3とE6/ImmE6のタイプを見分けるのに重要な役割を果たしていると考えられる。事実、我々が行なった分子遺伝学的手法を用いた実験から、ImmE3でGlu-19とCys-47、ImmE6でHis-5とTrp-47がE3またはE6の特異性を担う残基、即ち特異性決定基であることが分かっており^{1,2)}、これに向かい合うE3-T2Aでも2残基が決定基であることがわかっている。このように僅かな数の特異性決定基によって蛋白同士を見分けており、共に分子量が約1万のヘテロダイマーを形成するT2AとImmは、蛋白間相互作用を解明するための理想的なモデルであると考え、研究を行なっている。既にImmE3については2次構造を明かにしているが³⁾、今回は、ImmE3の溶液中での三次構造、及びImmとT2Aとの相互作用面の同定について報告する。

材料と方法

NMRスペクトルの測定

スペクトルの測定は、Bruker社、AM-600またはAMX-500を用いた。測定条件は、pH 6.0、30°Cである。

3次構造の計算

NOEの強度を、strong, medium, weakの3段階に分類し、それぞれをプロトン間の距離の上限として3A, 4A, 5Aに変換した。距離の下限には、van der Waals半径を用いた。立体特異的帰属が行なわれていないプロトンに関しては、Wuthrichの方法に従い距離の補正を行った。また、 $^3J_{\text{HN}\alpha}$ の値から求められた ϕ 角の制限と水素結合からの距離制限も用いた。まず、EMBOSSプログラムによりディスタンスジオメトリーの計算を行ない、得られた構造の中からviolationの低いものを選び、PRESTOプログラムによりrefinementを行なった。

ImmとT2Aの混合実験

¹⁵Nで均一標識したImmE6蛋白と非標識のE6-T2Aを混合しHMQCスペクトルを測定した。ImmE6のシグナルのケミカルシフトの差からImmにおけるT2Aの結合面を考察した。

結果と考察

ImmE3の3次構造

172個の残基内NOE、595個の残基間NOEと水素結合に由来する22個の距離制限、29個のφ角の制限に基づきEMBOSSによりディスタンスジオメトリー計算を行なった。得られた70個の構造の中で、total distance violationが4Å以下の22個の構造を選びPRESTOによりrefinementを行った。得られた結果のうちでviolationの小さい10個の構造に関して、その平均構造に対するRMSDは、3-78番の残基の主鎖に関して $1.76 \pm 0.18 \text{ \AA}$ 、β-シートを構成する3-9, 19-22, 44-49, 73-78番に関して $0.94 \pm 0.16 \text{ \AA}$ であった。

ImmE3の構造は、4本鎖からなる逆平行β-シート構造を主要なモチーフとし、シートの疎水面側に二つの長いループが存在し、シートとループの間に疎水コアを形成する構造であった。2つのループのうちのN末端側のループの中央部に短いα-ヘリックスが存在していた。シートの親水面側は蛋白分子の表面を構成していた。β-シートをモチーフとする蛋白は数多く知られている。抗体のようにβ-シートだけをモチーフとする分子もあれば、HLA-A2の抗原認識領域のようにβ-シートとその片面に位置する2本のα-ヘリックスによって構成されている分子もある。またこれらの分子は、他の蛋白質などと相互作用をする。ImmもT2Aと相互作用する蛋白であるがそのフォールディングは、RNA結合蛋白のRNA結合領域と類似している。RNA結合領域はその分子量がImmとほぼ等しく、4本鎖のβ-シートとその片面に2本のα-ヘリックスが存在する。また、β-シートの両端付近の塩基性アミノ酸と、シート上の芳香族アミノ酸の存在がImm蛋白にも認められる。リボソームRNAを特異的に切断するコリシンのインヒビターであるImmは、このRNA結合蛋白と何らかの関係を持っているかも知れない。

Immの特異性決定領域

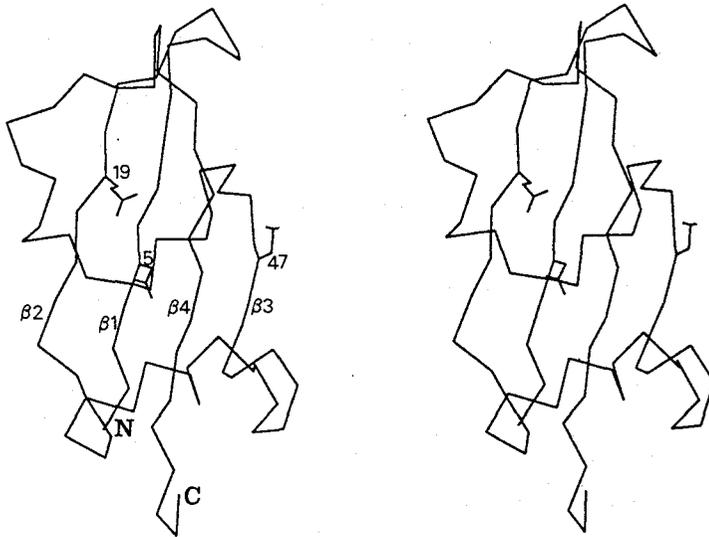
先に述べたように、Immでは、E3とE6を見分けるための特異性決定基が明らかとなっている。興味深いことに、ImmE3またはImmE6における特異性決定基ののべ3箇所のアミノ酸残基は、ともにβ-シートの中央部に含まれその側鎖を揃って溶媒中に突き出していた。このことから、Imm蛋白におけるT2Aとの結合はこのβ-シートを含んでいると推察された。

ImmとT2Aの相互作用

Imm蛋白のT2Aとの結合面をさらに検討するために次の実験を行った。

¹⁵Nで均一標識されたImmE6と非標識のE6-T2Aを混合し、HMQCスペクトルを測定した。T2Aの有無でImmE6のシグナルのケミカルシフトの差を調べた。その結果、β-シートを構成するアミノ酸残基に顕著なケミカルシフトの差が観測され、特にImmE3とImmE6で共に特異性決定基である47番を含むβ-鎖に繋がるループ(40番付近)部分に大きな変化が見られた。また、2本のループのうちC末端側のループにはほとんど変化が

見られなかった。このループ部分は、ImmE3とImmE6でアミノ酸配列が同一である。このようにT2Aの結合によりImmE6中の残基は、ケミカルシフトの変化が見られた残基と見られなかった残基とに分かれたが、これらの残基がImmE6の3次構造上どの部分にあたるかが問題となる。ImmE6の3次構造はまだ決定されていないが、NMRによる解析の結果、ImmE6の2次構造は、ImmE3とほとんど同一であった。そこでこれらの変化が見られたアミノ酸残基をImmE3の3次構造上にマップしてみると、蛋白分子の表面の一部を覆うことが明かとなった。このことからImmはT2Aとの結合を β -シートと、シートの横端に位置するループの一部で行なっていると言えるであろう。



restrained minimization を行ったImmE3蛋白の平均構造をCa原子を結んで示した。ImmE3あるいはE6の特異性決定基である3箇所 (4, 19, 47)のアミノ酸の側鎖も示した。

参考文献

- 1) Akutsu, A. et al (1989) *J.Bacteriol.* 171, 6430-6436.
- 2) Masaki, H. et al (1991) *Gene* 107, 133-138.
- 3) Yajima, S. et al (1992) *Biochemistry* 31, 5578-5586.

P31 多次元NMRによるリボヌクレアーゼ Hの低分解能構造解析

山崎俊夫¹、○加藤敏代²、藤原正子²、永山国昭³

¹トロント大(医)、²日本電子(基礎研)、³東大(教養)

Low-Resolution Solution Structure of RNase H by Multidimensional Heteronuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Toshio Yamazaki¹, ○Toshiyo Kato², Masako Fujiwara² and Kuniaki Nagayama³

¹Dept. of Medical Genetics, University of Toronto, ²Basic Research Division, JEOL Co. Ltd.,

³Dept. of Pure and Applied Sciences, The University of Tokyo

The low-resolution three-dimensional solution structure of RNaseH, an enzyme of ~17.6 kDa (155 amino acid residues) which plays a key role in cleaving RNA moiety of RNA-DNA hybrid duplex, has been determined using three-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. The structure is based on a total of 1311 experimental NMR restraints. NMR compatible structures have been determined using distance analysis in the dihedral angle space with the DADAS90 program. A best fit superposition of the NMR structure of RNase H with the X-ray structure has revealed that global fold of the enzyme is similar between them except a flexible C-terminal region.

<はじめに>

リボヌクレアーゼ H(RNase H)はDNA-RNAハイブリッド分子のRNA部分を特異的に切断する酵素である。大腸菌由来のRNase Hについては多くの研究が進み、その生理機能が明かにされつつある¹⁾。この酵素は155アミノ酸残基から成り、分子量は17.6kDaである²⁾。X-線結晶回折による立体構造解析から、RNase Hは5本の α -helixと5本の β -strandから構成されることが示された^{3,4)}。一連の部位特異的突然変異生成実験からは、活性にはAsp10, Gln48, Asp70が重要な役割を果たしていることが分かっている。また、これらの残基は結晶構造中では5本の β -strandから構成される β -sheetと α -helix間にできた裂け目に位置していることなどが報告されている^{3,4,5)}。同位体標識法と多次元NMR法により、大腸菌由来のRNase HのNMRで観測できる核(¹H, ¹⁵N, ¹³C)のうち殆どの核の帰属(95%)が既に完了している^{6,7)}。昨年は、溶液中の酵素反応のメカニズムを研究する上で重要な解離基を有するアミノ酸側鎖を含む側鎖に関する帰属の結果について報告した。立体構造に関しては、既に主鎖間の近接残基間NOE情報から5本の α -helixと5本の β -strandの存在、および5本の β -strandが1枚の β -sheetを形成していることが分かっている⁶⁾。しかしさらに詳細な2次構造間の配置を明らかにするためにはより多くのNOE情報が必要である。¹H, ¹⁵N, ¹³C核の帰属結果を基に、¹⁵Nまたは¹³Cでユニフォーム標識した試料で測定した3次元NOESYスペクトルを解析することにより、NOE情報を収集した。今回は、これらのNOEから得られる距離制約条件とJ-結合値から求まる二面角制約条件を用いて構造計算を行った結果について報告する。

キーワード：多次元NMR、リボヌクレアーゼ H、安定同位体標識、タンパク質構造

やまざき としお、○かとう としよ、ふじわら まさこ、ながやま くにあき

<3D NMR>

以下の2核3次元NMRスペクトルからNOEを収集し、水素核間距離を得た。また、2D ^1H - ^{15}N HMQCスペクトルから 主鎖の $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ による角度情報を得た。NMR測定はすべてGSX-400(JEOL)を用いて行った。試料は H_2O 溶液とし(pH5.5、0.1M酢酸バッファー)、試料濃度は約2mM、測定温度は27°Cであった。

(1) 3D ^1H - ^{15}N - ^1H NOESY-HMQC: ^{15}N ユニフォーム標識試料を用いて測定したスペクトルで、主に主鎖アミドプロトンと脂肪鎖プロトン間のNOE解析を行った。2種の溶媒消去法、(i) DANTEによるpresaturationと、(ii) 1-1 echoパルスによるフィルター観測を適用したスペクトルをそれぞれ相補的に解析した。(i)は水信号近傍の H^α の磁化の飽和、(ii)は観測周波数領域が狭いという欠点を持つからである。(ii)を適用したパルスシーケンスを図-1(a)に示す。

(2) 3D ^{13}C - ^1H - ^1H HMQC-NOESY: ^{13}C ユニフォーム標識試料を用いて測定したスペクトルで、主に脂肪鎖プロトンとアミドプロトン間、脂肪鎖プロトンと環状鎖プロトン間のNOEを解析した。分解能と感度を向上させるため、 ^{13}C 軸方向はカルボニル炭素をデカップリングした(HMQC部分にselective inversion 1-1パルスを導入。パルスシーケンスを図-1(b)に示す)。この場合、信号強度が観測中心(C^α)で最も強く、 ^{13}C 軸に依存して徐々に弱くなるため、特に脂肪鎖プロトン間のNOEは3D ^1H - ^{13}C - ^1H HMQC-NOESYのスペクトルを相補的に用い解析した。溶媒信号の除去はpresaturationを用いたが水近傍の H^α 信号は大きな J_{CH} 結合で分裂しているため飽和の影響を受けない。環状鎖残基(Phe, Tyr, His, Trp)を除いて ^{13}C 標識した試料を用いた同様の測定スペクトルもメチルプロトンと環状鎖プロトン間のNOE解析に有用であった。

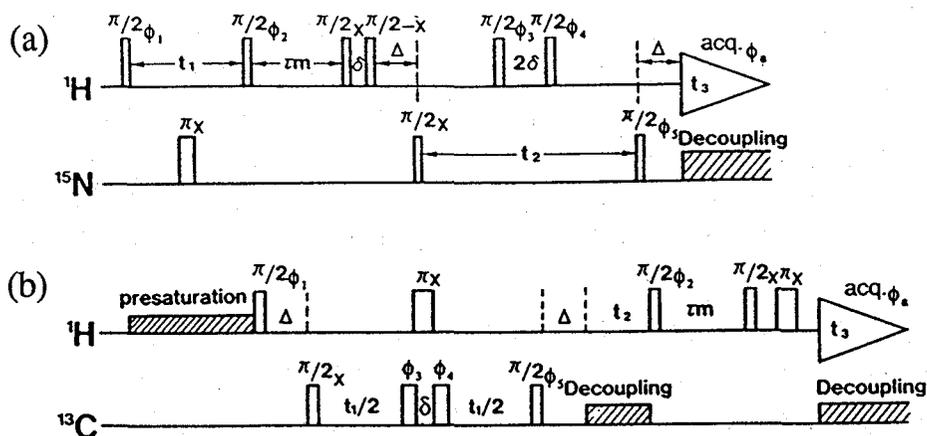


図-1 3D NOESY測定で用いたパルスシーケンス⁶⁾

(a) 3D ^1H - ^{15}N - ^1H NOESY-HMQC. $\tau_m=100$ ms. τ_m 後の90°, 180°パルスを90°- δ -(-90°)と90°-2 δ -(-90°)に置き換えた。(b) 3D ^{13}C - ^1H - ^1H HMQC-NOESY. $\tau_m=100$ ms. selective inversion 1-1 パルスをHMQC部分(t_1)に挿入した。

<構造計算>

構造計算はMolSkop(JEOL)に組み込まれたDADAS90プログラムを用いた。DADAS法は立体構造を記述する際二面角を独立変数とする方法で⁸⁾、デカルト座標を変数とする方法と比べて変数の数が約1/8に減る。このためRNase Hのような大きなタンパク質の計算には、より速い計算が実現される。DADAS法のもう一つの特徴は、NMRから導かれる原子間距離などの制約条件をもとにした擬似エネルギーを目的関数として設定し、これを極小化することによってNMR距離条件を満たす構造を求めることである。大きな分子の構造計算で問題となるのは、探索する構造空間が非常に広いため、単なる極小化だけではなかなか真の最小値に到達しないことである。しかしDADAS90プログラムは、高温でのモンテカルロ法や二次微分法を用いた極小化法などのツールを備えており、MolSkopシステムのグラフィックツールと組み合わせて用いることにより、上に述べた困難を回避し効率のよい構造計算が可能となる⁹⁾。すでに分子量1万以上のタンパク質の構造解析に適用され成果をあげている¹⁰⁾。

<結果>

NOEの解析から水素原子間距離制約条件が1155個得られた。距離制約条件の内訳は、残基内191個、隣接残基間262個、非隣接残基間702個であった。これらの距離とJ-結合値から求まる156個の二面角制約条件を組み込んだ目的関数を極小化することにより、出来るだけ多くの制約条件を満たす構造を求めた。ランダムな二面角を持つ多数の初期構造から得られた最終構造のうち制約条件をよく満たす5つの構造を重ね合わせたものを図-2(a)に示す。最もNMR情報を良く満たす構造とX-線で得られた構造との重ね合わせを(b)に示す。C末端の揺らいでいるところを除いては、X-線で得られたものとよく似た立体構造であることがわかる。一般にNMRより解析される分子構造の信頼性は、どれだけ多くの距離及び角度の制約条件を与えるかによって決まる。従ってNMRの実験からこれらのデータをどれだけ多く採集できるかに依存している。現在この計算は、アミノ酸残基あたり7個程度の距離制約条件を用いたものとなっているが、X-線構造とのより詳細な構造比較が可能となるためには残基当たり13個程度の制約条件が必要とされている¹¹⁾。現在さらに多くの制約条件を収集することを目標に解析を進めている。結晶構造と溶液構造の精密な比較は、活性部位等において特に重要と思われ、構造と機能についても知見が得られることが期待される。

<参考文献>

- 1) 堀内崇(1986) 蛋白質核酸酵素, **31**, 2, 132-143.
- 2) Kanaya, S. and Crouch, R. J.(1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 1276-1281.
- 3) Katayanagi, K., Miyagawa, M., Matushima, M., Ishikawa, S., Kanaya, S., Ikehara, M., Matuzaki, T. and Morikawa, K.(1990) *Nature*, **347**, 306-309.
- 4) Yang, W., Hendrickson, W. A., Crouch, R. J, and Satow, Y.(1990) *Science*, **249**, 1398-1405.
- 5) Kanaya, S., Kohara, A., Miura, Y., Sekiguti, A., Iwai, S., Inoue, H., Ohtuka, E. and Ikehara, M.(1990) *J.Biol.Chem.*, **265**, 4615-4621.
- 6) Yamazaki, T., Yoshida, M., Kanaya, S., Nakamura, H. and Nagayama, K.(1991) *Biochemistry*, **30**, 6036-6047.
- 7) Yamazaki, T., Yoshida, M. and Nagayama, K.(1993) *Biochemistry*, **32**, 5656-5669.
- 8) Braun, W. and Gö, N.(1985) *J.Mol.Biol.*, **186**, 611-626.

- 9) Endo, S., Wako, H., Nagayama, K. and Gō, N.(1991) *In Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*(Eds, Hoch, J. C., Poulsen, F. M. and Redfield, C.) Plenum Press, New York, 233-251.
- 10) Tanaka, T., Hiramata, M., Fujita, K., Imajo, S. and Ishiguro, M.(1993) *J.Chem.Soc. Chem.Comp.*, in press.
- 11) Theriault, Y., Logan, T. M., Meadows, R., Yu, L., Olenjniczak, E. T., Holzman, T. F., Simmer, R. L. and Fesik, S. W (1993) *Nature*, **361**, 88-91

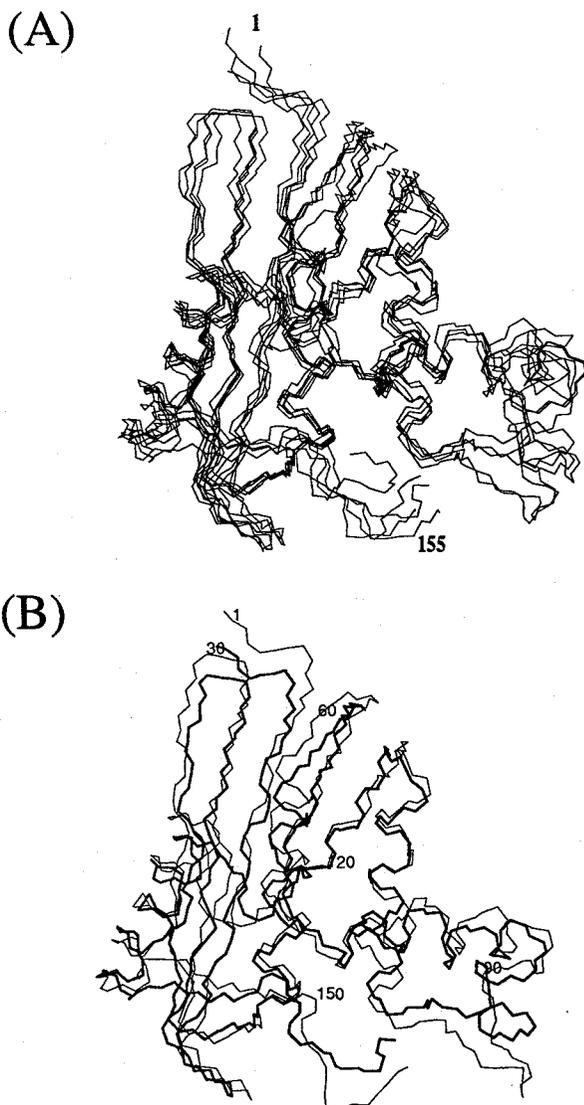


図-2 NMRで決定されたRNase Hの立体構造

(A) 5個のNMR構造の主鎖(N,C α ,C')に関する重ね合わせ。(B) NMR構造とX線結晶構造の重ね合わせ(— NMR; — X線).

(神戸女子薬大) ○蔡 東玲、高尾 植雄、杉浦 眞喜子

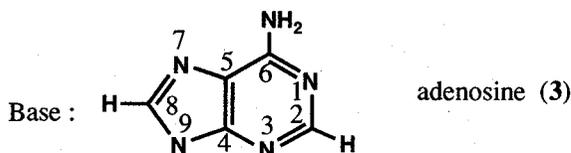
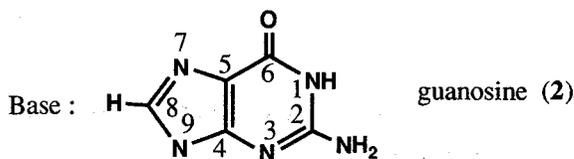
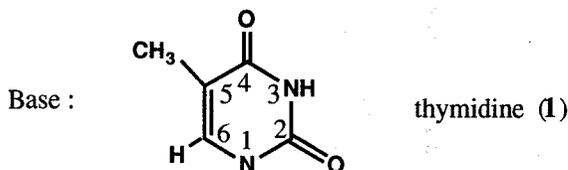
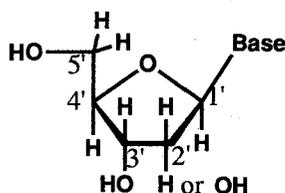
Conformational Analyses of Nucleosides in Solution by Selective Relaxation Method—
Orientation around Glycosidic Bond

○Torei Sai, Narao Takao, Makiko Sugiura (Kobe Women's College of Pharmacy)

The "Selective Relaxation Method" (which is shown in flow chart) was applied to three nucleosides, thymidine(1), guanosine(2) and adenosine(3). The conformational properties in DMSO- d_6 , especially about the orientation of a base around the glycosidic bond were analyzed. The conformations around the glycosidic bond were determined, (1): *anti* ($\chi = -150^\circ \sim -140^\circ$), (2): *syn* ($\chi = -10^\circ \sim 0^\circ$) and (3): *syn* ($\chi = 10^\circ \sim 20^\circ$), respectively.

[はじめに]

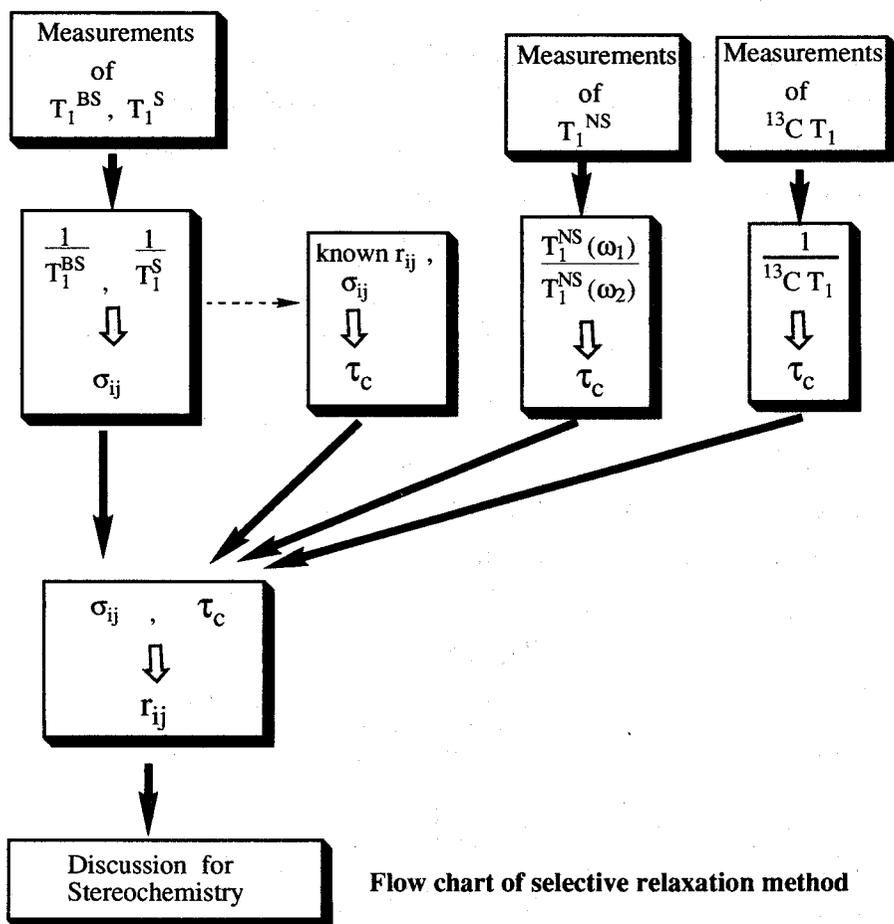
ヌクレオシドのコンホメーションで問題とされるのは、(a)糖部分のパッカリング様式、(b)グリコシル結合回りの配向(糖分子に対する塩基の配向)、及び(c)C-4'-C-5'結合回りの配向の三種である。この内、(a)、(c)については、 ^1H スピン-スピン結合定数で決定する方法¹⁾が確立されている。しかし、(b)については、 $^1\text{H}T_1$ 、^{2,3)} ^1H NOE、⁴⁾ $^3J(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ ^{5,6)}を用いる方法などが提案されているにもかかわらず、いづれの方法にも一長一短があり、(a)、(c)の場合程、確立された方法とはなり得ていない。



key words: selective T_1 , bi-selective T_1 , cross-relaxation, conformational analysis,
glycosidic bond

さい とうれい、 たかお ならお、 すぎうら まきこ

ところで我々は、すでに selective T_1 , bi-selective T_1 を用いて交差緩和 σ_{ij} を求め、その σ_{ij} と、いずれかの方法で得た τ_c (この場合は、 T_1^{NS} の周波数依存性より得ることとした) とから、 ^1H - ^1H 間距離を得、コンホメーション解析を行なう方法 (選択的緩和法) を確立し、これまでにいくつかの化合物に応用している。そこで今回は、RNA, DNA を構成する基本的なヌクレオシドである thymidine (1), guanosine (2), adenosine (3) を取り上げ、従来の NMR 法では決定しにくいグリコシル結合回りの配向の決定方法として、この選択的緩和法の適用を試みた。以下にそのフローチャートを示す。



[実験]

Thymidine (1), guanosine (2), adenosine (3) は市販品を用い、 0.06 mol dm^{-3} の濃度で DMSO- d_6 に溶解し、脱ガス、溶封して測定サンプルとした。

VXR-500 (499.84 MHz) での T_1^{NS} , T_1^S , T_1^{BS} の測定は、先に報告したパルス系列に待ち時間、展開時間に水を飽和させるソフトパルスを組み入れ用いた。

分子モデルによって ^1H - ^1H 間距離を求めるのに、パーソナルコンピューターで GUMMOS⁷⁾ プログラムを用いた。

[結果と考察]

T_1^{NS} の測定を 200MHz 及び 500 MHz、 T_1^S, T_1^{BS} の測定を 500 MHz でそれぞれ行ない、フローチャートに従い、 τ_c 及び交差緩和 σ_{ij} を求め、得られた τ_c と σ_{ij} から r_{ij}^{est} を得た (Table 1)。これら得られた r_{ij}^{est} を満足するコンホメーションがそれぞれの化合物の優位コンホメーションである。以下にその優位コンホメーションを求める手順を述べる。

まず、分子モデルを用い、糖のコンホメーションを C-2'-endo (S) 及び C-3'-endo (N) に固定した時の $^1H-^1H$ 間距離 (r_{ij}^{calc}) を、グリコシル結合回りの角度 χ (ピリミジンヌクレオシド: $\angle O-4'-C-1'-N-1-C-2$ 、プリンヌクレオシド: $\angle O-4'-C-1'-N-9-C-4$) を変化させて、求めた (GUMMOS)。一方、 $^3J_{HH}$ を用いる方法¹⁾により、糖部分の S/N コンホマーの割合を求めた ((1):65/35, (2):64/36, (3):62/38)。これら S/N 比と上記の r_{ij}^{calc} の値より、それぞれの計算値 r_{ij}^{calc} を得 (Table 1)、 r_{ij}^{est} と比較検討した。その結果、 r_{ij}^{est} を満足するコンホメーションとして、(1): $\chi = -150^\circ \sim -140^\circ$, (2): $\chi = -10^\circ \sim 0^\circ$, (3): $\chi = 10^\circ \sim 20^\circ$ を得ることができ、これらがそれぞれの優位コンホメーションであると結論できた。即ち (1):*anti*, (2):*syn*, (3):*syn* である。

Table 1 The r_{ij}^{est} values and r_{ij}^{calc} values for several proton pairs of (1), (2) and (3).

	H_i	H_j	$r_{ij}^{est}/\text{\AA}$	$r_{ij}^{calc}/\text{\AA}$				
				$\chi = -150^\circ$	-140°	-130°	-120°	-110°
(1)	H-6	H-2'a	2.73	2.87	2.63	2.39	2.12	1.87
		H-3'	3.51	3.62	3.41	3.21	3.05	2.94
(2)	H-8	H-1'	3.12	3.25	3.13	3.01	2.90	2.80
		H-2'	2.95	2.49	2.71	2.95	3.19	3.42
(3)	H-8	H-1'	2.83	3.25	3.13	3.01	2.90	2.80
		H-2'	3.24	2.48	2.70	2.94	3.17	3.40

以上のように、これまでヌクレオシドのグリコシル結合回りのコンホメーションは、簡便で的確な決定方法がなかったが、今回我々の開発した選択的緩和法を用いれば、比較的簡単に精度のよい結果を得ることができる。

Table 2 に従来の方法で得られた結果と、我々の開発した選択的緩和法で得られた結果をまとめた。

Table 2 Results about the orientation of a base around the glycosidic bond from several different methods.

	$^1\text{H}\text{T}_1$	NOESY	3J (^{13}C , ^1H)	Selective Relaxation Method
(1)	----	<i>anti</i>	<i>anti</i> ($\chi = -170^\circ$ or -70°)	<i>anti</i> ($\chi = -150^\circ \sim -140^\circ$)
(2)	<i>anti</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i> ($\chi = -160^\circ$ or -80°)	<i>syn</i> ($\chi = -10^\circ \sim 0^\circ$)
(3)	<i>syn</i>	<i>syn</i>	<i>anti</i> ($\chi = -150^\circ$ or -90°)	<i>syn</i> ($\chi = 10^\circ \sim 20^\circ$)

[参考文献]

- 1) D. B. Davies and S. S. Danyluk, *Biochemistry*, **13**, 4417-4434 (1974).
- 2) C. Chachaty, T. Zemb, G. Langlet, Tran-Dinh Son, H. Buc, and M. Morange, *Eur. J. Biochem.*, **62**, 45-53 (1976).
- 3) T. Imoto, K. Akasaka, and H. Hatano, *Chem. Lett.*, **1974**, 73-74.
- 4) R. E. Schirmer, J. P. Davis, J. H. Noggle, and P. A. Hart, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 2561-2572 (1972).
- 5) R. U. Lemieux, T. L. Nagabhushan, and B. Paul, *Can. J. Chem.*, **50**, 773-776 (1972).
- 6) J. Uzawa and M. Uramoto, *Org. Magn. Reson.*, **12**, 612-615 (1979).
- 7) a) 相川 泰, *JAPC*, 8(3-4), 3(1986).
 b) 相川 泰, *現代化学*, 1989, 2月号, 46(1989).

NMRによるCINC/GROの構造解析

○半沢宏之、春山英幸、渡辺一義、鶴藤丞
 (三共 分析代謝研、サイトシグナル研)

Structural analysis of CINC/GRO by NMR

Hiroyuki Hanzawa, Hideyuki Haruyama, Kazuyoshi Watanabe
 and Susumu Tsuruhuji.

(SANKYO Co., Ltd. Analytical & Metabolic Research Laboratories
 and Cytosignal Research Laboratory.)

The solution conformation of rat cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC/GRO) which is a small protein consisting of 72 amino acid residues with proinflammatory activities was investigated by NMR spectroscopy. Under the low ionic condition, the NMR resonances assignable to the exchange between monomer and dimer states were detected in HOHAHA and NOESY spectra, while those signals disappeared with increasing NaCl concentration. In this study, the three dimensional structure of CINC/gro in dimer state with the coexistence of 200 mM NaCl was determined.

1、はじめに

CINC/gro (Cytokine induced neutrophil chemoattractant) はラットにおいて好中球の誘走を活性化し、炎症の初期過程において重要な役割を担うサイトカインであり IL-8 family と呼ばれる 1 群のタンパク質に属する。すでに構造の明らかになっているヒト IL-8 とは 47 % の相同性を有するが 1 次構造上同じ family に属するヒト MGSA (GRO) とは 67 % の相同性を有することからラットにおけ

2 量体、平衡、IL-8

はんざわひろゆき、はるやまひでゆき、わたなべかずよし、つるふじすすむ

るMGSA (GRO) であると考えられている。

現在までCINC/groの構造解析を 200 mM NaCl, pH 5.3 において行なってきた。昨年の本討論会において同種核3次元NMRを用い、連鎖帰属、2次構造の同定を行なったこと、さらにサブユニット間のNOEにより、この溶液条件ではCINC/groは2量体を形成していることを報告した。今回さらに解析を進めCINC/groの3次元構造を得ることが出来たので報告する。

また低温濃度 (0 mM NaCl) において、CINC/groが1量体-2量体の平衡に存在していることがほぼ明らかになった。現在この低温濃度 (0 mM NaCl) における解析を進めているのでこれに関しても報告する。

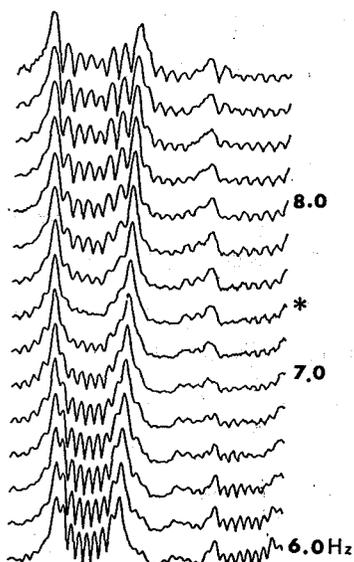
2. 方法

試料は同種核の実験には化学合成によって得られたものを用い、 ^{15}N 標識体は大腸菌JM109株を用いて調製した。NMR測定は日本電子GSX-500, ALPHA500を用いおこなった。 ^1H -NMRシグナルの帰属およびNOEの収集は昨年の本討論会で報告した様に同種核3次元NMRを用いて行なった。 $J_{\text{NH}\alpha}$ は線幅が広いため、HOHAHA, NOESY スペクトルのF2スライスにJ doubling 法を適用することによって求めた。サブユニットあたり残基内NOE 132個残基間NOE 481個、水素結合 25個、 $J_{\text{NH}\alpha}$ より ϕ 45個、サブユニット間のNOE 22個を用いて計算を行なった。立体特異的帰属は9残基に関して行なった。2個のS-S結合もそれぞれ3個の距離情報として加えた (C9-C35, C11-C51)。構造計算はプログラムDIANA, XPLORを用いて行なった。

図1 J doubling 法による
 $J_{\text{NH}\alpha}$ の測定

Ala 16 残基内NOE:NH- β HのF2 slice.

*より $J_{\text{NH}\alpha} = 7.4\text{Hz}$



3、結果と考察

3-1 1量体-2量体の平衡

低塩濃度 (0 mM NaCl) の HOHAHA スペクトルにおいて1次構造より期待されるシグナルより多くのシグナルが観測され、それらの中にはアミドプロトンの化学シフトのみ異なり、 α 、 β プロトンの化学シフトの等しいペアが数組観測された。さらにこれらのアミドプロトン間に HOHAHA, NOESY において交換のシグナルが観測されたことから、CINC/groはこの条件において2個の状態が存在し、それらは平衡になっていることが明らかになった。塩濃度を上げる (200, 500mM) ことにより交換のシグナルは消失し1状態になった。同じ IL-8 family に属するヒト PF-4 において1量体-2量体-4量体の平衡が報告されていることから、CINC/groにおいて観測された2種の状態も1量体-2量体であると考えられる。

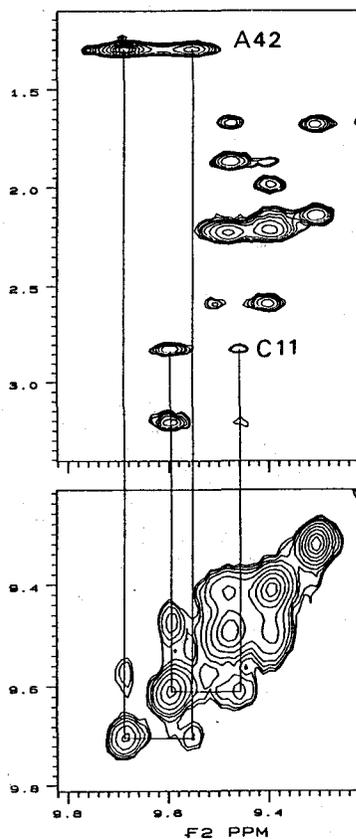
3-2、2量体の3次元構造

計算ははじめ DIANA を用いて1量体の計算を行なった。350個の初期構造を計算し Target 関数の低いものから50個を選んだ。それらをサブユニット間のNOEを考慮に入れて2量体にして、XPLORの初期構造とした。この時点でサブユニット間のNOEのviolationは10~15 Å程度である。この構造よりsimulaed annealingを行ない、NOEを良く満たしているものを、20個選んだ。long range NOEのないN末、C末を除いた Leu7 ~Val170 に関して、平均構造に対する R.M.S.D. は

図2 0mM NaCl でのHOHAHA

上：1量体-2量体の2組のシグナルが観測される

下：2組のアミドシグナルの間に観測される交換のシグナル

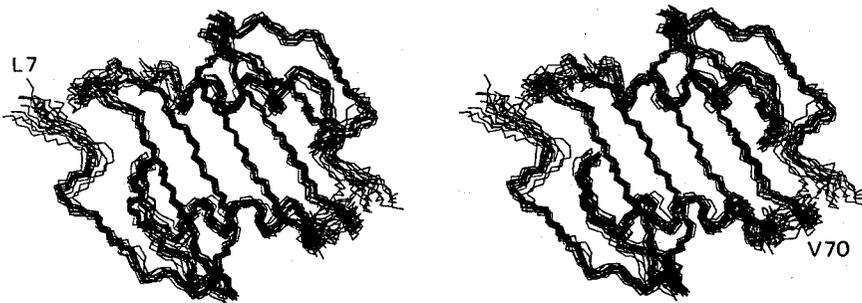


主鎖で 0.83 Åであった。Pro31 ~Thr38 の長いループと、このループと S-S で結ばれた N 末、Leu7~Cys9 の領域の収束が悪いものの、他の領域は良く収束している。C I N C / g r o の 3 次元構造は逆平行 β シートの上に C 末の α ヘリックスが 2 本並んだ構造をしておりヒト I L - 8 と同じトポロジーをしている。

現在 1 量体 - 2 量体の平衡が存在する低塩濃度における解析を進めている。図 2 に示した C 1 1 だけでなく C 3 5, C 5 1 のアミドプロトンシグナルが 2 個ずつ観測されている。これらは β シートの 2 量体形成部位の反対側に位置する、S-S 結合のある領域であり、相手のサブユニットに接していないこの領域が 1 量体 - 2 量体の構造変化を受けていることがわかる。

謝辞 ^{15}N 標識体の培養に関して有用な助言を頂きました大阪大学蛋白研の京極好正教授、白川昌宏博士に感謝いたします。

図 3 200mM NaCl における 2 量体の C I N C / g r o の 3 次元構造



(徳島大学・医・生理、*京府医大・生理、**同・医動物)

○吉崎和男、早野尚志*、有菌直樹**

Evaluation of Histamine Release Mechanism from Rat Mast Cells Using Spin-Diffusion Phenomenon.

Kazuo Yoshizaki, Takashi Hayano*, and Naoki Arizono** (Dept. Physiol., Sch. Med., Univ. Tokushima, Tokushima 770, *Dept. Physiol. and **Dept. Med. Zool., Kyoto Pref. Univ. Med., Kyoto 602, Japan)

Histamine in mast cells was detected by $^1\text{H-NMR}$ using a selective spin-excitation technique. However, a selective presaturation technique of water resonance did not give us resonance lines, indicating that spin-saturation was transferred to the histamine protons. Thus, the histamine molecule must be in a certain "bound" state in the cells. When exocytosis was induced in the cells suspended in a sucrose solution, free histamine resonances did not appear. In the presence of NaCl free histamine was detected. Thus, histamine in mast cells is released from the granule as an ionic exchange mechanism.

〔はじめに〕

気管支喘息やアナフィラキシー・ショックなどのアレルギー反応はマスト細胞(肥満細胞)からのヒスタミンなどの分泌によって引き起こされる。ヒスタミンはマスト細胞の細胞質に多数ある顆粒に高濃度に含まれる。以前に、マスト細胞のヒスタミンが $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに検出できること、さらにcompound 48/80による顆粒分泌時にヒスタミンの細胞外への放出が検出され、同時に乳酸の出現することを報告した¹。

今回、アレルギーで感作されたラットのマスト細胞からのヒスタミン遊離の際にも乳酸が出現すること²、さらにスピン拡散現象を利用し、マスト細胞内のヒスタミンが分泌顆粒に結合したまま放出され、細胞外のイオンの存在下に顆粒基質から遊離することを報告する。

〔方法〕

マスト細胞はラット腹腔内の浮遊細胞からPercollで分離・収集し、0.1%ウシ血清アルブミンならびに5.6mMブドウ糖を含むHanks溶液に浮遊させた。Hanks溶液の組成は137mM NaCl、5.4mM KCl、1.3mM CaCl_2 、0.8mM MgSO_4 、0.34mM Na_2HPO_4 、0.44mM KH_2PO_4 、4mM NaHCO_3 (pH 7.3~7.4)である。また、5.6mMブドウ糖を含む等張のスクロース溶液(280mM sucrose、5mM Tris-Pi)も用いた。脱顆粒薬はマスト細胞の浮遊液に直接追加した。アレルギー刺激には、線虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)を経皮感染させたラットのマスト細胞

肥満細胞、マスト細胞、ヒスタミン、乳酸、 $^1\text{H-NMR}$ 、スピン拡散、開口分泌、アレルギー

よしざき かずお、はやの たかし、ありぞの なおき

を用い、脱顆粒させるアレルゲンは線虫の分泌/排泄液から得た。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定には日本電子製GX-200SMR(^1H の共鳴周波数:200MHz)を用いた。NMR試料管(直径5mm)にマスト細胞($2 \sim 10 \times 10^6$ cells/0.4ml)の浮遊液を入れ、室温(24 °C)で測定した。測定には選択的スピン励起法である $133\bar{1}$ パルス系列をおもに用い、基線のうねりを引算してスペクトルを表示した。また、ゲーティド・デカップリング法による選択的水飽和法も用いた。外部基準には0.1M TSP ((3-trimethylsilyl) tetradeuteriopropionate sodium)を重水に溶かしたものを同軸の挿入管にいた。

[結果および考察]

1. アレルゲンによるマスト細胞のヒスタミン分泌とその $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの変化。

マスト細胞浮遊液の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルには水の共鳴線(4.8ppm)の低磁場側に二つの幅の広い共鳴線(8.6および7.3ppm)が選択的スピン励起法で検出できる(図1a)。これらの共鳴線はマスト細胞に含まれるヒスタミンのイミダゾール環のC2-HおよびC4-Hに由来する。脱顆粒を増強させるためにphosphatidylserine(25 $\mu\text{g/ml}$)をあらかじめ投与した後、アレルゲン(10 $\mu\text{g/ml}$)を加えると、遊離ヒスタミン(7.8および7.1ppm)ならびに乳酸(1.3ppm)の共鳴線の強度が増加した(図1c)。残存したマスト細胞内のヒスタミンはアレルゲンを追加投与しても遊離されなかった。

この細胞浮遊液の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを選択的水飽和法で測定すると、マスト細胞内ヒスタミンの共鳴線強度が著明に減少した(図1d)。lactate oxidase(5 U)を加えると乳酸の共鳴線が消失し、その反応産物であるピルビン酸が検出できた(図1e)。従って、消失した共鳴線が乳酸に由来することが確認でき、しかも細胞外に出たことを示している。なお、反応産物である過酸化水

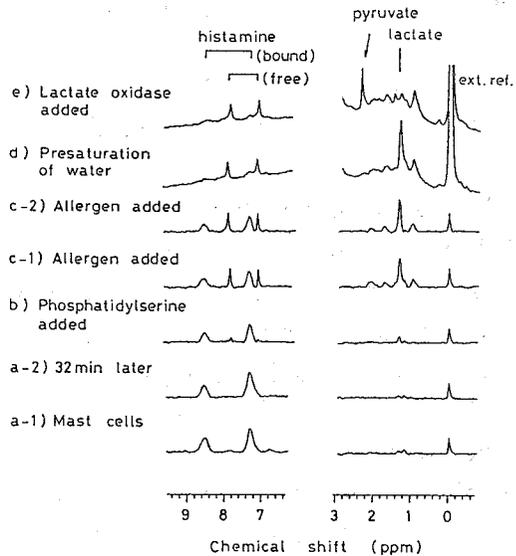


図1 アレルゲンによるマスト細胞の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの変化。(a, b, c: 選択的励起法、d, e: 選択的水飽和法、本文参照)。

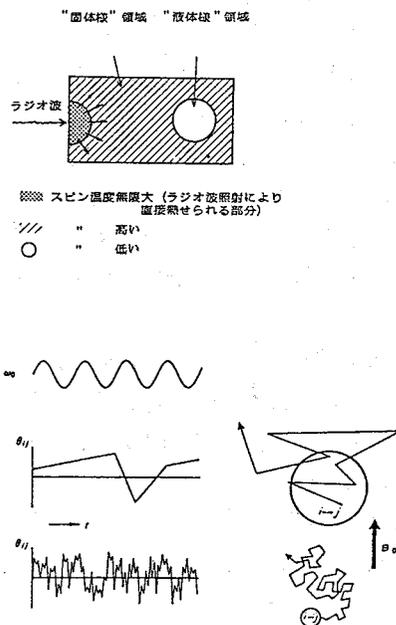


図2 スピン拡散現象の概念図(上)³と負のNOEが生じる条件(下)⁴

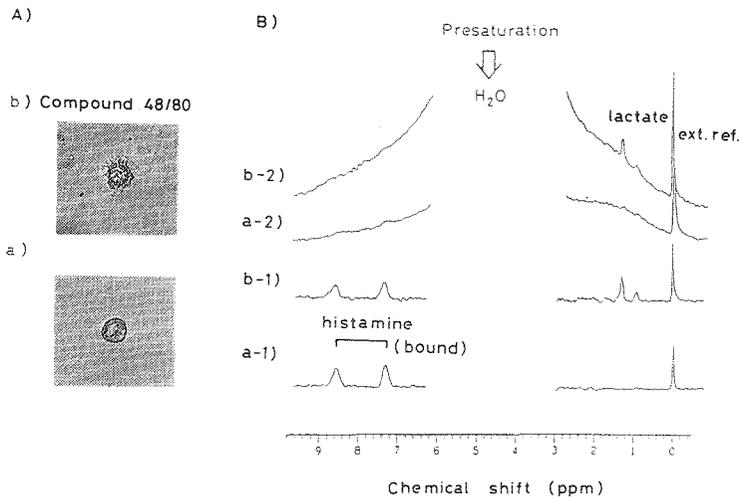


図 3 スクロース溶液中におけるマスト細胞の顕微鏡像(A)とその¹H-NMRスペクトル(B)。(顆粒分泌前(a)、およびCompound 48/80の投与による顆粒分泌時(b)の選択的励起法(1)、ならびに選択的水飽和法(2)によるスペクトルを示す)。

素を除くためにカタラーゼ(150U)を加えた。

以上のように、compound 48/80と同様に、抗原刺激によるヒスタミン分泌の際にも解糖系の亢進することが明らかになった。

2. マスト細胞からのヒスタミン遊離機序のスピンド拡散を利用した解析。

マスト細胞の¹H-NMRスペクトルを選択的水飽和法で測定すると、細胞内ヒスタミンの共鳴線の強度が著明に減少し、検出が困難となる。しかし、遊離ヒスタミンは容易に検出できる(図 1d, e)。このことは選択的水飽和法では水分子のみならず、顆粒基質のプロトンも磁気飽和され、この磁気飽和が顆粒基質近傍にあるヒスタミンのプロトンに伝わったと考えられる(図 2)。このスピンド拡散が生じたことは、ヒスタミンと顆粒基質のプロトンの磁気的な双極子相互作用の相関時間が共鳴周波数の逆数(10^{-8} 秒)よりも長く、交差緩和が緩和の主たる

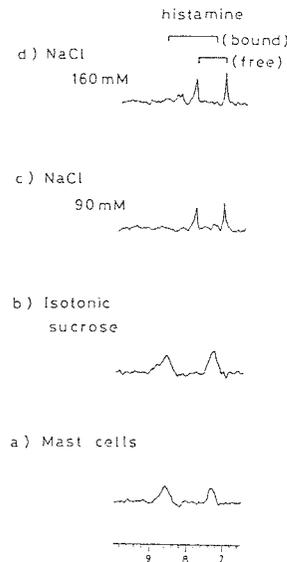


図 4 スクロース溶液中で顆粒分泌したマスト細胞の¹H-NMRスペクトルのNaCl投与による変化。

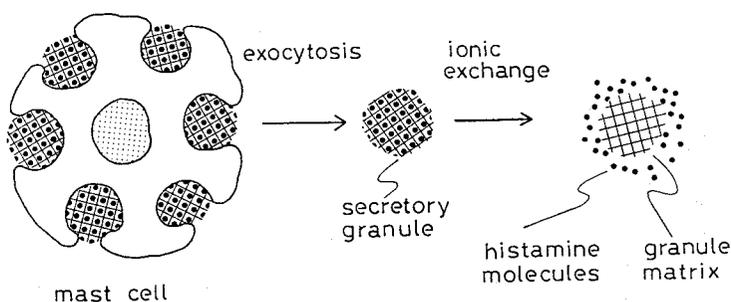


図 5 マスト細胞の開口分泌によるヒスタミン遊離機序。

原因になっていることを意味している。すなわち、マスト細胞内のヒスタミンは回転ならびに並進拡散が制限された、いわゆる結合状態であると考えられる。

つぎに、以前に報告したように、マスト細胞浮遊液にcompound 48/80を投与すると脱顆粒が生じ、遊離ヒスタミンが選択的励起法で検出できる。ところが、マスト細胞をスクロース溶液に浮遊させ、compound 48/80を投与した後、選択的励起法で ^1H -NMRスペクトルを測定すると、遊離ヒスタミンの共鳴線は出現せず、結合型ヒスタミンのままであった(図 3B)。しかも、この共鳴線は選択的水飽和法では消失した。しかし、顕微鏡下ではマスト細胞の脱顆粒が確認できた(図 3A)。この浮遊液にNaClを追加すると、遊離ヒスタミンの共鳴線が出現した(図 4)。すなわち、ヒスタミンは陽イオンを含まないスクロース溶液では分泌された顆粒に結合しており、 Na^+ イオンの存在下に顆粒から離れると考えられる。

以上から、マスト細胞のヒスタミンは分泌顆粒に結合していること、顆粒分泌にはエネルギーを必要とし、ヒスタミンは顆粒に結合したまま細胞外に放出された後、外液の Na^+ イオンと交換して顆粒から遊離すると考えられる(図 5)。

[謝辞]

本研究の一部はライフサイエンス振興財団の援助による。

[文献]

- 1) 吉崎和男、有藪直樹(1991) 第30回NMR討論会講演要旨集 325
Yoshizaki K. and Arizono, N. (1991), Exp. Cell Res. 193:279.
- 2) Yoshizaki K. et al. (1993), Magn. Reson. Med. 29:732.
- 3) 赤坂一之 (1979) 化学 34:338
- 4) Wüthrich, K. (1986)、京極・小林訳(1991)、「タンパク質と核酸のNMR」、p. 102、東京化学同人

(阪大・薬) ○木村 敦臣 鹿野 哲司 高木 達也 藤原 英明

NMR studies on the structure and the function of the lipid-nystatin complex which has an effect on the order of the lipid model membrane

Atsuomi Kimura, Tetsushi Kano, Tatsuya Takagi and Hideaki Fujiwara

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

Nystatin is a membrane-active polyene antibiotic which has been shown to increase ion and small molecule permeability in a variety of model and biological membrane systems. A possible mechanistic model states that nystatin forms stable complexes with the membrane phospholipid and that sterol molecules help to organize these complexes into channels. The interactions between nystatin and phospholipid were investigated in chloroform solution. In chloroform nystatin strongly interacts with phospholipid molecules to form a complex. The results suggest that there are interactions between the conjugated heptene stretch of nystatin and the methylene groups of lipid acyl chains.

1、序論

ポリエン系抗生物質は生体膜の構成成分であるコレステロールと複合体を形成し、チャンネルとなって、イオンや小分子の膜に対する透過性変化を引き起こすことにより活性発現に至ると考えられている。これに対し近年、ポリエン系抗生物質の作用機序として membrane-defect model が提唱された。しかし、このモデルにおいてチャンネルを安定化するリン脂質の役割については、明らかにされていない。そこで我々は、ポリエン系抗生物質であるナイスタチンとリン脂質の相互作用について NMR を用いて研究することとした。

2、実験

卵黄レシチンの CDCl₃ 溶液に、ナイスタチンの DMSO-d₆ 溶液を加えたものをサンプルとした。NMR 測定は、Varian VXR-200 により 25°C にて行った。NOESY スペクトルは対角ピークを小さくするためスピニングおよびロックオフにて得た。

ナイスタチン、リン脂質、2D-NOESY

きむら あつおみ、かの てつし、たかぎ たつや、ふじわら ひであき

3、結果と考察

Fig.1 にリン脂質-ナイスタチンの 200MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。ナイスタチンのヘプテンのピークは 5.8ppm から 6.4 ppm の間に現れており、これらのピークは脂質のピークと重ならず明瞭に確認できる。ナイスタチンを加えることによって、脂質のピーク幅の増大が認められ、脂質とナイスタチンとのコンプレックス形成を示唆するものと考えられる。

脂質とナイスタチンを 1 : 1 の濃度比で混合したサンプルの 2D-NOESY スペクトルを Fig.2 に示す。

Fig.2 においてナイスタチンのヘプテンと脂質のメチレンピークおよびNメチルピークとの間にクロスピークが観測されている。

これらの分子間NOEを検証するため

1D-NOE実験を行った結果を Fig.3 に示す。

NOESY実験の結果と一致して5.0%の正のNOEが観測された。

これらの結果からナイスタチンのヘプテン領域と脂質のメチレン領域は空間的に近接している事が分かる。今後、さらにナイスタチンとリン脂質およびナイスタチンとコレステロールとの相互作用について詳細な知見を得るため、現在、重水素化リン脂質の合成を検討中である。

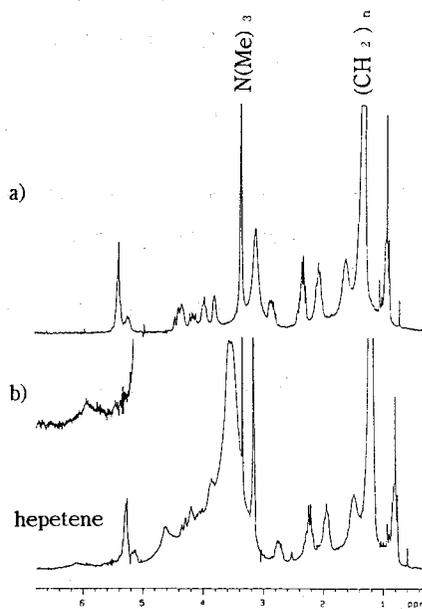


Fig.1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of lipid-nystatin.
a) Free lipid ; b) lipid:nystatin(4:1)

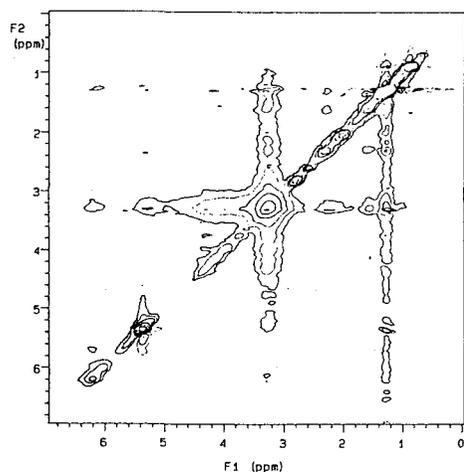


Fig.2 2D-NOESY spectrum of lipid-nystatin(1:1)
in $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$ (5:1 v/v)(300ms mixing time)

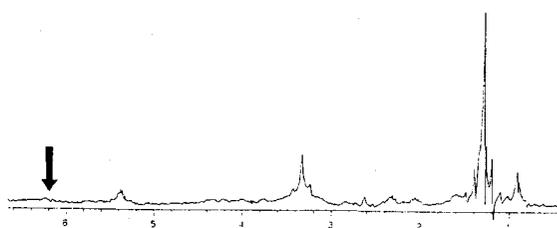


Fig.3 1D NOE difference spectrum
of lipid-nystatin(1:1).

○木川隆則, 武藤 裕, 横山茂之
東大・理・生化

**The Stable-Isotope Labeling of Protein Using the Cell-Free Protein
Synthesis System**

○Takanori Kigawa, Yutaka Muto, Shigeyuki Yokoyama
*Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science,
University of Tokyo*

The stable-isotope labeling is a powerful tool for analysis of protein structure in combination with multi-dimensional NMR techniques. Problems of this method are that some types of amino acid residues cannot be labeled efficiently and selectively by *in vivo* expression system generally used for preparation of labeled proteins. In the cell-free protein synthesis system, highly efficient and selective stable-isotope labeling of proteins can be achieved since the amino acid metabolism is not active. In this study, we have succeeded in preparation of a selectively (Ser or Asp residues) ^{15}N -labeled human c-Ha-ras oncogene product (Ras) by optimization of the cell-free system. HSQC experiments confirmed that the Ras prepared by the cell-free system were efficiently labeled with a high selectivity. Thus, our cell-free system is useful for preparing stable-isotope labeled proteins.

【序】

近年、蛋白質を安定同位体標識し、多次元NMRの手法を用いた解析をおこなうことにより、NMRをもちいた蛋白質の高次構造決定の限界は飛躍的に上昇した。蛋白質の安定同位体標識をおこなう場合には、生細胞を用いた発現系が用いられる。ところが生細胞の系では、代謝により標識が他のアミノ酸にも及ぶため、特に選択的にアミノ酸を標識したい場合には、標識効率が低く、しかも目的残基のみの標識が困難であることが問題であった。無細胞蛋白質合成系は、代謝系がほとんど機能しないので、効率よく、しかも選択性高く蛋白質を標識できると考えられる。従来の無細胞蛋白質合成系は合成量が少なく、蛋白質を調製する手段として用いることは困難であったが、我々は反応液組成を最適化することなどにより、1mlの反応液当り100 μg 程度の蛋白質を得ることを可能とした。そこで、この系を用いて、ヒトのがん遺伝子c-Ha-rasの産物 (Ras) をアミノ酸 (セリンないしはアスパラギン酸：生細胞の系では単独に標識することが困難) 選択的に安定同位体標識することを試みた。

キーワード：安定同位体標識，無細胞蛋白質合成系

○きがわ たかのり, むとう ゆたか, よこやま しげゆき

【方法】

試料の調製：大腸菌S30抽出液とT7 RNAポリメラーゼを用いる転写翻訳共役系を反応系として用いた。鋳型は、RasのC末端18残基を除いた171残基からなる短鎖型の遺伝子を、T7プロモーターに接続したプラスミドpK7-Rasを用いた。反応液中の特定アミノ酸を ^{15}N 標識アミノ酸に置き換えて反応をおこなうことにより、アミノ酸選択的に ^{15}N 標識したRasを合成した。合成したRasは、FPLCのMono QカラムおよびSuperdex 75カラムを用いて反応液から精製した。

試料の測定： ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの測定は、20mM NaPhosphate (pH 5.5), 10mM MgCl_2 , 150mM NaCl, 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ 中、 32°C で、AMX600 (Bruker)を用いておこなった。

【結果と考察】

ユニフォームに ^{15}N 標識したRasのHSQCスペクトル (図1) を、本研究で調製した選択的に ^{15}N 標識RasのHSQCスペクトル (図2) と比較した結果、セリン残基ないしはアスパラギン酸残基のみが標識されており、他のアミノ酸残基へは標識が及んでいないことがわかった。このように本研究の結果、多次元NMRのための標識蛋白質調製法として、無細胞蛋白質合成系を利用することが可能である。我々の系を人工的遺伝暗号系と組み合わせれば、位置特異的に安定同位体標識をした蛋白質を調製することが可能となり、蛋白質の局所的な動的微細構造を、NMR法を用いて調べることができると考えられる。

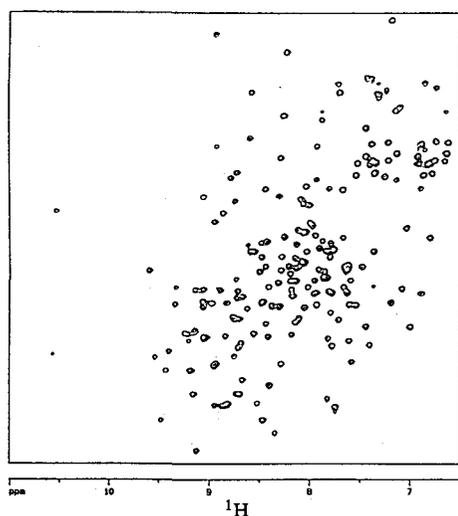


図1. ユニフォームに ^{15}N 標識したRasのHSQCスペクトル。

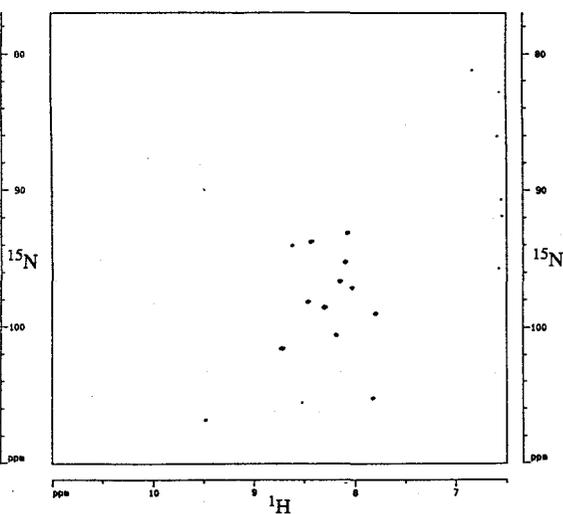


図2. アスパラギン酸残基を選択的に ^{15}N 標識したRasのHSQCスペクトル。

○伊藤 隆^{1,2}, 岩原 淳二¹, 仲野 徳¹, 山崎和彦^{1,3}, 武藤 裕¹,
河合剛太⁴, M. Wälchli⁵, 西村 暹⁶, 宮澤辰雄³, 横山茂之¹
(¹東京大学・理, ²理研・バイオデザイン, ³蛋白工学研,
⁴東京大学・工, ⁵日本ブルカー, ⁶萬有製薬つくば研)

Triple-Resonance 3D/4D NMR Studies of Human c-Ha-Ras Protein

Yutaka Ito^{1,2}, Junji Iwahara¹, Noboru Nakano¹, Kazuhiko Yamasaki^{1,3}, Yutaka Muto¹, Gota Kawai⁴,
Markus Wälchli⁵, Susumu Nishimura⁶, Tatsuo Miyazawa³, and Shigeyuki Yokoyama¹

¹Faculty of Science, University of Tokyo, ²Biodesign Research Group, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), ³Protein Engineering Research Institute, ⁴Faculty of Engineering, University of Tokyo, ⁵Bruker Japan, ⁶Banyu Tsukuba Research Institute in Collaboration with Merck Research Laboratories.

In order to assign the side chain ¹H and ¹³C resonances of the truncated human c-Ha-Ras protein (residues 1-171) bound with GDP, 3D/4D triple-resonance NMR experiments were performed for an uniformly ¹³C/¹⁵N-labeled sample. By 3D CT-HCCH-COSY, 3D HCCH-TOCSY and 4D HCCH-TOCSY experiments, about 80% of the side chain ¹H and ¹³C resonances were assigned. The 3D CT-HNHB experiment technique was found to be useful for assignment of H β resonances. For the complete assignment, additional triple-resonance experiments (HCACO-TOCSY, HCC(CO)NNH etc.) are in progress.

【目的】 Rasタンパク質は、アミノ酸189残基からなる分子量約21Kのタンパク質であり、細胞の増殖・分化に関与するシグナル伝達系において重要な役割を果たしている。Rasは、GDPあるいはGTPを一分子結合している。GDP結合型はシグナル伝達活性を持たないが、結合ヌクレオチドの交換によって生じるGTP結合型は、ターゲット分子との相互作用が可能になりシグナルを伝達する。最近の報告によると、ヌクレオチド交換因子としてmSos1が、ターゲット分子の候補として、従来から知られていたGAP、NF1に加えて、Raf1がRasと相互作用することが明らかになってきている。われわれは、GDP結合型からGTP結合型への転換にともなう高次構造変化を同定し、さらにRasと他のタンパク質との相互作用のメカニズムを明らかにするために、NMRを用いた解析を行ってきた。既に、¹H-¹⁵N 3D NMR, ¹H-¹³C-¹⁵N 3重共鳴 3D NMRの手法を用いることで、GDP結合型、GTP結合型双方について主鎖¹H, ¹³C, ¹⁵Nシグナルの帰属を行なった。本研究では、水溶液中での高次構造決定のための足掛かりとしてGDP結合型Rasの側鎖¹H, ¹³Cシグナルの帰属を試みた。

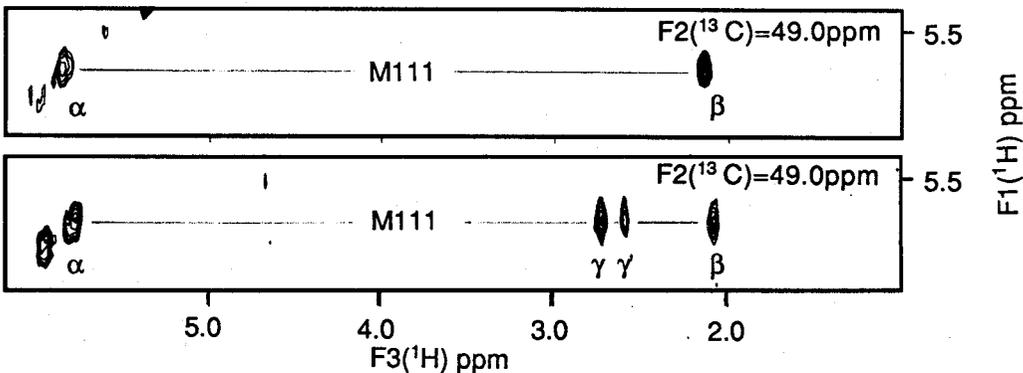
【手法】 従来、分子量10K程度までのタンパク質において用いられてきた、³J_{HH}を用いた手法では、分子量20K程度のタンパク質の側鎖シグナルの帰属は非常に困難である。したがって本研究では、¹J_{Hc}, ¹J_{cc}を利用した、HCCH-COSY, HCCH-TOCSYの実験を行ない、側鎖¹H, ¹³Cシグナルの帰属を行なった。HCCH-TOCSYについては4Dの実験も行なった。また、主鎖¹⁵N核とH β との³J_{HN}を用いてH β の帰属を行なうHNHBスペクトルの測定も行なった。さらに、最近いくつかのグループから提案されている、側鎖¹H, ¹³Cシグナルを主鎖¹⁵N核やカルボニル¹³C核の周波数で分離する測定法も試みている。

キーワード：3重共鳴3D/4D NMR, Rasタンパク質

○いとう ゆたか, いわはら じゅんじ, なかの のぼる, やまさき かずひこ, むとう ゆたか,
かわい 剛太, まるくすう 暹るひり, にしむら すずむ, みやざわ たつお, よこやま しげゆき

【結果・考察】 図1, 2に3D CT-HCCH-COSY, 3D HCCH-TOCSYスペクトルの F3(¹H)-F1(¹H) 断面を示した。図中に示したように, ¹³C-¹³C COSY transfer, TOCSY transferに起因するクロスピークが観測されており, 約半数弱の側鎖¹H, ¹³Cシグナルについてはこの2つの3Dスペクトルを用いることで帰属することができた。しかし, 主としてF2(¹³C)軸の分解能の不足という問題から (foldingを用いて約29ppmのスペクトル幅で測定しているが) 帰属が困難なシグナルが多数残された。これら帰属が困難なシグナルについては, 4D HCCH-TOCSYスペクトルを用いた解析が有効であった。また図3には3D CT-HNHBSペクトルの F3(¹H)-F1(¹H) 断面を示したが, この測定によって, HCCHの実験とは独立に, 約半数の残基についてH β シグナルを帰属することができた。現在HCACO-TOCSY, HCC(CO)NNHなどのスペクトルの解析を行っており, 完全帰属を目指している。

【今後の展望】 今後は, GTP結合型についても同様の解析を行っていく予定である。また, 本研究で得られたGDP結合型の側鎖シグナルの帰属を基にして, ¹H-¹H間のNOE情報の解析 (有用な新たなパルス系列の開発も含めて) を行ない, 水溶液中の高次構造の決定を行っていく。さらに, これまで野生型で行なってきたような異種核多次元NMRによる解析を, Rasのいくつかの変異体についても行なう計画である。このような, 3D/4Dスペクトルのルーチンの解析のために, 3D/4Dのピーク・テーブルを入力ファイルとする簡便な半自動帰属プログラム (4D-assist) を開発中である。このプログラムを用いることで複数の3D/4Dスペクトルにおけるピークの相間性の検索と帰属 (例, HNCAHAとHCA(CO)NNHのピーク・テーブルからの主鎖シグナルの自動帰属) を行なうことが可能になる。



上. 図1 GDP結合型Rasの3D CT-HCCH-COSYスペクトル F3(¹H)-F1(¹H)断面。

下. 図2 GDP結合型Rasの3D HCCH-TOCSYスペクトル F3(¹H)-F1(¹H)断面。

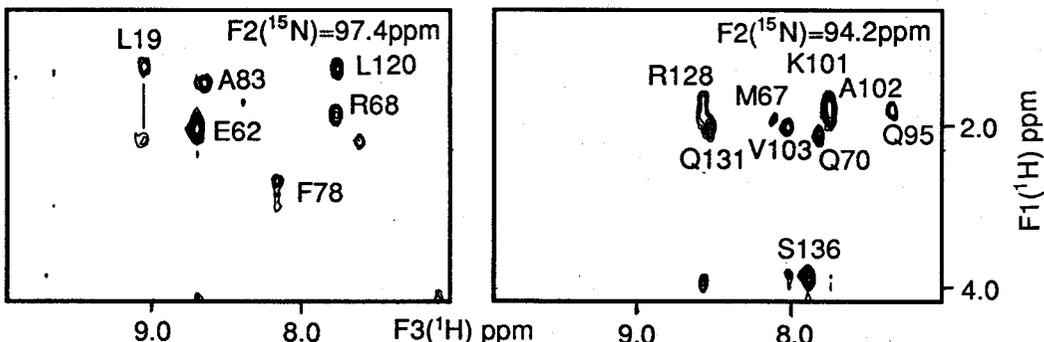


図3 GDP結合型Rasの3D CT-HNHBSペクトル F3(¹H)-F1(¹H)断面。

○新美達也¹, 武藤裕¹, 河合剛太^{2, 3}, 高柳正明², 野口智明², 林宜宏³, 河野俊之^{1, 4}, 春木満^{1, 5}, 村松知成¹, 渡辺公綱³, 宮澤辰雄^{2, 6}, 横山茂之¹

¹東大・理, ²横浜国大・工, ³東大・工, ⁴現三菱化成生命研,

⁵現蛋白工学研究所, ⁶蛋白工学研究所

NMR studies on the interaction between isoleucine tRNA and isoleucyl-tRNA synthetase from *E. coli*.

○Tatsuya niimi¹, Yutaka Muto¹, Gota Kawai^{2,3}, Masaaki Takayanagi², Tomoaki Noguchi², Nobuhiro Hayashi³, Toshiyuki Kohno^{1,4}, Mitsuru Haruki^{1,5}, Tomonari Muramatsu¹, Kimitsuna Watanabe³, Tatsuo Miyazawa^{1,5}, Shigeyuki Yokoyama¹

¹Graduate school of Science, the University of Tokyo, ²Faculty of Engineering, Yokohama National University, ³Faculty of Engineering, the University of Tokyo,

⁶Protein Engineering Research Institute.

⁴Present adress, Mitsubishi Kasei Institute of Life Science,

⁵Present adress, Protein Engineering Research Institute.

Interaction of isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) and tRNA^{Ile} from *E. coli* was analyzed by ¹H and ¹⁵N-¹H NMR experiments. tRNA^{Ile} species was labeled with ¹⁵N *in vivo* and purified by an HPLC. For free tRNA^{Ile}, the NH resonances of all the secondary base pairs and five tertiary base pairs were assigned by NOESY and ¹⁵N-¹H HMQC experiments. In the HMQC spectrum of the complex of tRNA^{Ile} and unlabeled IleRS, most of the ¹⁵N-¹H cross peaks of tRNA^{Ile} were still observed at the same chemical shifts as those of the ¹⁵N-¹H cross peaks of tRNA^{Ile} in the free state and appreciably broadened. However, some resonances were shifted, more broadened than other observed ones, or even missing. These results suggest that the conformation change in the secondary and tertiary structure of tRNA^{Ile} was induced upon binding with IleRS.

アミノアシルtRNA合成酵素は遺伝暗号上で対応するアミノ酸に特異的なtRNAのみを厳密に認識してアミノアシルする。この分子認識は蛋白質の生合成に重要な役割を果たす。本研究では、大腸菌のイソロイシンの系における認識機構解析を試みた。イソロイシルtRNA合成酵素 (IleRS) およびイソロイシンtRNA^{Ile} (tRNA^{Ile}) の分子量はそれぞれ約113,000, 26,000と巨大なため¹H NMRによる解析だけでは困難である。そこで¹⁵Nユニフォーム標識されたtRNA^{Ile}分子を調製し、そのイミノプロトンシグナルを帰属する。そして酵素と複合体を形成することで生じたシグナルの変化を観測して、酵素の結合によって誘導された構造変化を解析した。

[方法]

¹⁵Nユニフォーム標識されたtRNA^{Ile}は、¹⁵NH₄Clを含む最少培地で培養した大腸菌A19株のtRNA画分からHPLCによって精製した。非標識のtRNA^{Ile}は大腸菌A19株から同様に精製した。IleRSは発現系を用いて調製した。全てのNMR測定は、100mM NaCl, 10mM MgCl₂, pH 6.7, 310Kで行い、溶媒シグナル消去にはjump and return pulseを用いた。非標識tRNA^{Ile}のNOESYは試料濃度3.0mMで、¹⁵N標識tRNA^{Ile}のHMQCは試料濃度0.4mMで、

キーワード：tRNA, アミノアシルtRNA合成酵素,¹⁵N-NMR

○にいみ たつや, むとう ゆたか, かわい ごうた, たかやなぎ まさあき,
のぐち ともあき, はやし のぶひろ, こうの としゆき, はるき みつる,
むらまつ ともなり, わたなべ きみつな, みやざわ たつお, よこやま しげゆき

^{15}N 標識tRNA $^{\text{Ile}}$ -IleRS複合体のHMQCは試料濃度0.4mM/0.6mMで、それぞれ測定した。

[結果と考察]

tRNA $^{\text{Ile}}$ のイミノプロトンシグナルの帰属はNOESYスペクトルから行なった。まず各システムについて二次構造塩基対の全イミノプロトン(23個)を連鎖帰属し、ついで三次構造形成に関わる塩基対のイミノプロトン(7個)を帰属した。その結果、このtRNA分子は典型的なL字型三次構造を形成していることが確認された。次にtRNA $^{\text{Ile}}$ 単独のHMQCスペクトルを測定し(図1)、イミノプロトンシグナルの帰属に基づいて各クロスピークを帰属した。これによってほとんどのシグナルの重なりを解消することが出来た。そしてIleRSとtRNA $^{\text{Ile}}$ との複合体についてHMQCスペクトルを測定し(図2)、tRNA $^{\text{Ile}}$ 単独のスペクトルと比較した。多くのイミノプロトンシグナルは、分子量の増加にともなってブロードニングしたが、化学シフトの変化は観測されなかった。しかし、いくつかのイミノプロトンシグナルにおいて、化学シフトの変化、強いブロードニング、更にはシグナルの消失が観測された。これらの変化は、酵素のアミノ酸残基が接近した、あるいは水分子のプロトンとの交換が促進された、などを反映していると考えられる。しかし $^1\text{H-NMR}$ で観測されるイミノプロトンは基本的に、塩基対のスタッキングによって形成される疎水性領域において水素結合に関与しており、溶媒や酵素に対して露出していない。このためイミノプロトンシグナルの変化は、何らかの構造上の変化を反映している可能性が高い。シグナルに変化が観測されたプロトンを含む塩基対をtRNA $^{\text{Ile}}$ 分子上に表してみた。まずステム領域の3箇所に着目しており、この部位で二次構造上の変化が生じていることが示された。さらに、2個の三次構造塩基対のイミノプロトンシグナルが消失しており、IleRSの結合によってtRNA $^{\text{Ile}}$ の三次構造に大きな影響が及んでいることが示唆された。これらの結果を、すでに明らかにされている変異体解析およびフットプリンティング解析の結果(文献1)と併せることで、IleRSによるtRNA $^{\text{Ile}}$ の認識機構について考察を行なった。

文献1 Nureki, O., et al., (1993) *J. Mol. Biol.* in press.

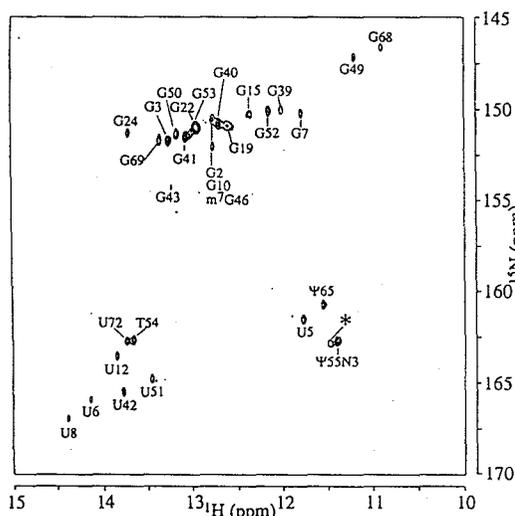


図1 ^{15}N ユニフォーム標識tRNA $^{\text{Ile}}$ の ^{15}N - ^1H HMQCスペクトル。クロスピークの番号は残基番号を示す。

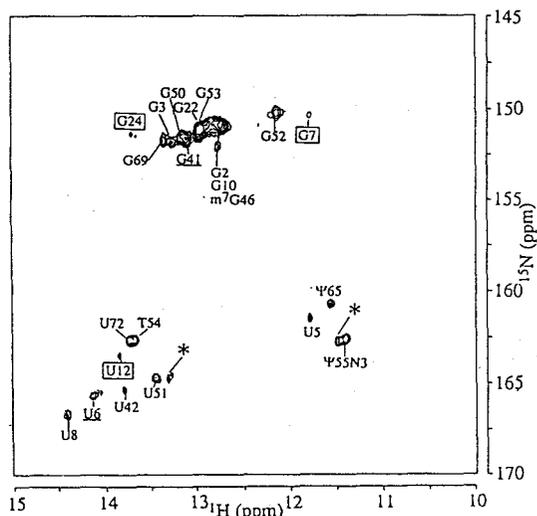


図2 ^{15}N ユニフォーム標識tRNA $^{\text{Ile}}$ とIleRSとの複合体の ^{15}N - ^1H HMQCスペクトル。クロスピークの番号は図1に対応する。下線で示した残基はイミノプロトンシグナルの化学シフトが変化した残基を、枠で囲んだ残基はブロードニングが大きかった残基を表す。

P39 安定同位体標識を用いたRNAオリゴマーの構造解析

○渡部 暁¹、河合剛太²、福田裕章³、井上 丹⁴、渡辺公綱²、横山茂之¹
¹東大・理、²東大・工、³日本酸素・つくば研究所、⁴京大・理

Conformational analysis of an RNA oligomer by heteronuclear multidimensional NMR

Satoru Watanabe¹, Gota Kawai², Hiroaki Fukuda³, Tan Inoue⁴, Kimitsuna Watanabe² and Shigeyuki Yokoyama¹

¹ Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate school of Science, Univ. of Tokyo, ² Faculty of Engineering, Univ. of Tokyo, ³ Tsukuba Laboratory, Nippon Sanso Corporation, ⁴ Faculty of Science, Univ. of Kyoto

Uniformly labelled nucleotide 5' triphosphates (NTPs) were prepared from yeast or *E. coli* grown in ¹³C and/or ¹⁵N enriched media. Template DNAs were chemically synthesized and amplified by PCR. By *in vitro* transcription, we obtained designed RNAs that include sequences of a putative guanosine binding site and 3' splice site of *Tetrahymena* group I intron. First, we measured 1D and 2D ¹H NMR spectra of unlabelled RNAs. In H₂O, 10 resonances were observed in the imino proton region. In order to resolve and assign ribose proton resonances as well as base proton resonances, heteronuclear experiments are in progress.

【序】

触媒活性をもつRNAが見つかった以来、様々な機能を持つRNAの研究が進められている。RNAがその機能を実現するためには精密に折りたたまれた高次構造をとることが重要であるが、高次構造を直接的に調べる手段は限られている。なかでもNMRは最も有効な手段である。NMRはタンパク質の高次構造解析に広くつかわれているが、核酸の場合にはタンパク質に比べてシグナルの重なりが激しい問題点がある。従って、RNAの構造解析には安定同位体標識の導入によるシグナルの分離が不可欠である。今まで、標識したRNAの高次構造解析は天然に存在するtRNA、rRNAなどに限られていた。今回は安定同位体標識をしたヌクレオシド5'三リン酸を大腸菌もしくは酵母から調製し、T7 RNA polymeraseを用いた*in vitro* transcriptionの系を用いることで、任意の配列の安定同位体標識RNAを得ることを試みた。

group I intron (図1) は自己触媒活性をもつリボザイムで、*Tetrahymena* のrRNA intronなどいくつかは*in vitro*でも活性を持つ。その3' splice siteでは、グアノシンがtransesterificationする反応 (G交換反応) とアルカリ条件で特異的加水分解反応が起こることが知られている。これらの反応では、10個の保存されたステム (P1からP10) のうち、全てが活性に必要というわけではなく、いくつか2次構造の要素を欠いたmutantでも活性を持つことが知られ

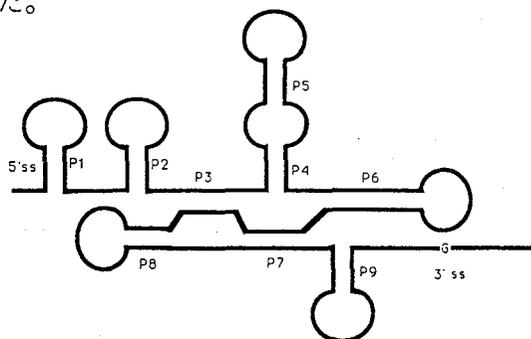


図1 group I intronに保存されている2次構造

キーワード：RNA、安定同位体標識、リボザイム、高次構造、group I intron

○わたなべ さとる、かわい ごうた、ふくだ ひろあき、いのうえ たん、わたなべ きみつな、よこやま しげゆき

ている。本研究では、そのなかでも最も重要な要素であるP7と3' splice siteをもつRNA (P7-3'ss)Gを上述べた方法を用いて調製し、水溶液中での構造解析を試みた。

【材料と方法】

標識NTPの調製：安定同位体[^{13}C , ^{15}N]または[^{15}N]を含んだ培地で培養した大腸菌もしくは酵母から超遠心または塩による沈殿よりrRNA画分を調製した。rRNAをnuclease P1で加水分解し、ヌクレオシドモノリン酸 (NMP) を得た。NMPを酵素によりリン酸化し標識ヌクレオシド三リン酸 (NTP) を調製した。

in vitro 転写反応：T7 RNA promoterと目的の配列とを含む合成DNAをpUC119に組み込み (pGIP7A)、PCRで鋳型DNAを調製した。T7 RNA polymeraseを用いた*in vitro* transcription反応を行い、20% urea PAGEにより目的のRNAを精製した。

NMR測定：測定は20℃、pH 7.5の条件で行った。軽水中の測定はジャンプ・アンド・リターンを用いた。装置はBruker AMX600またはAMX500で行った。

【結果】

安定同位体[^{13}C] 酢酸 1 gから、ATP, CTP, UTP, GTP各26, 18, 11, 18 OD 単位を得ることに成功した。また、同じ菌体からtRNAとrRNAの両方の画分をえて、後者からNTPを得ることもできた。*in vitro* transcriptionで、比較的鎖長さの短い (30 mer程度) のRNAを、10 mL反応でNMRスケール (~5 mg) 調製することができた。

まず、未標識のサンプルで ^1H の測定を行った。軽水中の測定ではイミノプロトン領域に10個のシグナルが観測された (図2)。ピークの間隔は比較的良好であり、1D NOEおよび温度依存性の測定により帰属を進めている。重水中TOCSY及びNOESYでは塩基プロトンのピークはよく分離されて得られたが、リボースのプロトン領域ではシグナルの重なりが激しく解析は困難であることがわかった (図3-a,b)。この問題を解決するためユニフォームに安定同位体標識されたNTPを用いてラベルサンプルを現在調製し3D HCCH-TOCSYを測定する予定である。

【考察】

安定同位体標識したRNAサンプルがNMRスケールで得られることがわかり、修飾ヌクレオシドを除く任意の配列の解析が可能となった。RNA oligomerのシグナルの分離・帰属に標識を用いたが、この手法は、RNAのライゲーションと併用することでリボザイム、rRNAといった巨大分子の特定の位置の高次構造情報を知ることが可能にする。ただしこれらの材料は現時点で非常に高価であり、培地から得られる画分をできるだけ利用することが望まれる。その意味でtRNAとrRNAの両方が回収できたことは意味があると思われる。

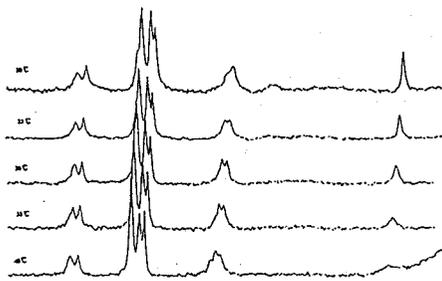


図2 イミノプロトンの温度依存性

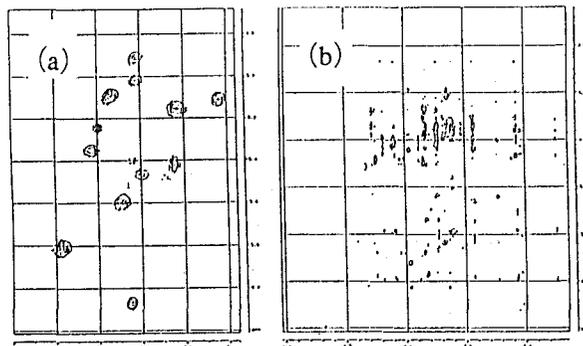


図3 重水中の (a) TOCSY (mixing time = 50 ms)
(b) NOESY (mixing time = 200 ms)

○赤井智子・清水洋・山本仁・山中裕・見矢勝・永田章
大阪工業技術試験所

Solid state NMR study on the phase transitions of tetraphenyl porphyrin with long aliphatic chains.

○T. Akai, Y. Shimizu, H. Yamamoto, H. Yamanaka, M. Miya, and A. Nagata.
Government Industrial Research Institute of Osaka.

The dynamic structures of mesophases of 5,10,15,20-tetrakis(4-n-alkylphenyl)porphyrin have been studied by Solid State NMR. The rate of motion in the alkyl chain was qualitatively estimated by temperature dependence of ^{13}C CPMAS spectra. ^1H CRAMPS and ^{13}C CPMAS spectra suggested that two inequivalent sites exist for the alkyl chain in crystal and the lower mesophase (D_L). These NMR data are discussed in comparison with the results of IR spectra and X-ray diffraction analysis.

【はじめに】

液晶や柔軟性結晶の総称であるメソフェーズ(中間相)では一般に液体では見られないような分子の長距離秩序と結晶固体とは異なる分子のダイナミクスが存在し、それに起因する電子、ホール、励起子の移動等の物性にはたいへん興味深いものがある。我々は、機能性分子として固体や液体で多くの物性が研究されてきたポルフィリン系化合物、特に比較的合成の容易なテトラフェニルポルフィリン(TPP)について液晶性の検討を行っており、フェニル基の*P*位のアルキル長鎖誘導体が非常に粘性の高いディスコティックラメラ(D_L)相をもつメソゲンであることを明かにした。¹⁾さらに、この液晶性長鎖TPPを2枚のITO薄膜ではさんだ構造のセルにおいて、発生する光電流の電圧依存性が液晶相転移に伴って大きく変化するという興味深い結果を見いだしている。²⁾

本研究では、このような物性に深く関連すると考えられる分子配列及び分子ダイナミクスを固体NMR(^{13}C CPMAS, ^1H CRAMPS)を用いて定性的に検討した結果を報告する。

本研究においては、液晶性TPPとしてFig. 1のような構造をもつポルフィリン液晶, 5,10,15,20-Tetrakis(4-n-dodecylphenyl)porphyrin (C12TPP)を取りあげた。この物質はTable.1に示すような相転移挙動を示す。

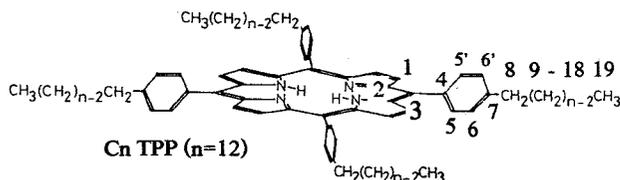


Fig. 1 Structure of C12TPP

Table. 1 Phase transition sequence of C12TPP.

$$\text{C} \xrightarrow[11^\circ\text{C}]{31^\circ\text{C}} \text{D}_L \xrightarrow[50^\circ\text{C}]{52^\circ\text{C}} \text{D}_L \xrightarrow[149^\circ\text{C}]{155^\circ\text{C}} \text{Iso.}$$

	C	D_L	D_L	Iso.
$\Delta H(\text{kJ/mol})$	46	14	23	
$\Delta S(\text{J/K}\cdot\text{mol})$	152	43	54	

キーワード：液晶、長鎖ポルフィリン、 ^{13}C CPMAS、 ^1H CRAMPS

○あかい ともこ・しみず よう・やまもと ひとし・やまなか ひろし・みや まさる
・ながた あきら

【実験】C12TPPは、以前に報告した方法で合成した。¹⁾ NMR測定にはすべて、Chemagnetics C MX200を用いた。¹³Cの共鳴周波数は50.3527MHz、CPMAS測定時のプロトン90°パルスは、4.5μs、回転数は5kHzとした。¹H CRAMPSは、BR-24を用いて90°パルス1.3μsで測定した。

【結果】アルキル部分の¹³C CPMASスペクトルは、31°C~44°C、58°C~68°Cで、線幅に著しい変化を示した。DSCから決定された相転移温度から、それぞれ結晶相からD_{L'}相、D_{L'}相からD_L相への転移に対応していると考えられる。Fig.2は結晶相、D_{L'}相、D_L相のアルキル部分の¹³C CPMASスペクトルを示す。各ピークの帰属は溶液のC-H COSYスペクトルを用いて同定した¹³Cケミカルシフト値を用いた。結晶相においては、アルキル鎖末端のC18、C19を除いて広い線幅を示す。これは回転速度を変えても線幅が変化しないことより、運動によるデカップリング効率の低下のためであると考えられ、C8~C17においてはプロトンデカップリングの周期(数十kHz)に近い速さの再配向運動が起こっていることを示している。つまり結晶相においては、末端のC18とC19が速く運動しているのに対して、その他のCの運動は周囲からの束縛を受けて運動の速度が遅いと考えられる。D_{L'}相に転移すると、C8~C17の線幅が減少し、しだいにこのタイムスケールより運動が速くなりつつあることを示している。D_L相に転移すると、C8まですべて先鋭化し、アルキル基全体がこのタイムスケールに比べて速い運動を示すことがわかる。

また、D_{L'}相において末端メチルの吸収線が先鋭化すると、ピークは二つに分裂していることがわかる。また¹H CRAMPSスペクトル(Fig.3)において、結晶相に存在する二つのピークがD_Lでは消失している。これらの事実は、結晶相からD_{L'}相においてアルキル末端部分において磁気的環境の異なる二つのサイトが存在していることを示唆している。

また、芳香族部分の¹³C CPMASスペクトルをFig.4に示す。結晶→D_{L'}→D_Lと変化するに従ってアルキル基の場合と同様な線形の変化がみられ、次第に運動性が高くなることがわかる。C5、C6のピークは二つに分裂をしている。これをC5、C6とC5'、C6'の磁気的環境の違いによるものとする、フェニル基の回転運動は、結晶相からD_Lにいたるまでこのシフト差のタイムスケール(百Hz程度)よりはるかに遅いと考えられる。芳香族部分のCPMASスペクトルの強度、シフト値などは、ポルフィリン環どうしの相互作用についての情報を含むと考えられるが、それについては、¹H CRAMPSスペクトルの温度変化の結果とあわせて現在検討中である。

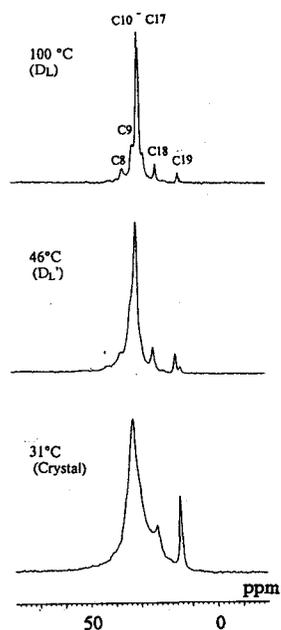


Fig. 2 ¹³C CPMAS spectra of aliphatic group of C12TPP.

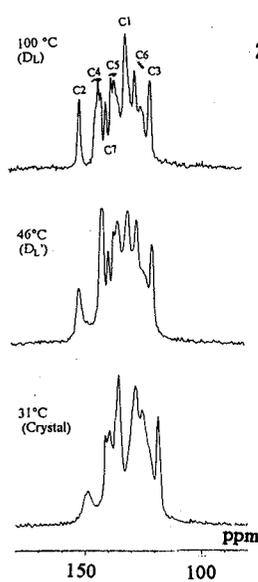


Fig. 4 ¹³C CPMAS spectra of aromatic group of C12TPP.

- 1) Y. Shimizu et al., *Liq. Cryst.*, 14, 795 (1993); *Chem. Lett.*, 25 (1991).
- 2) Y. Shimizu et al., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 656 (1993).

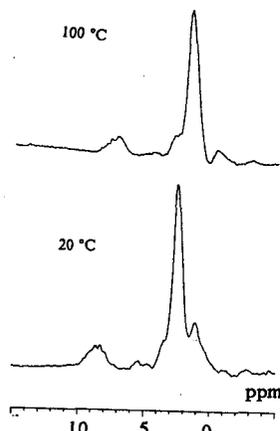


Fig. 3 ¹H CRAMPS spectra of C12TPP.

○福岡美香、張 偉文、渡辺尚彦（東京水産大学）、島田信二（農業研究センター）

Measurement of Moisture Diffusion in Food materials by Pulsed-Field-Gradient NMR Method

Mika Fukuoka, Hisahiko Watanabe, Shinji Shimada

Although there is need for moisture diffusivity data in food materials, only a little diffusivity data is available in literature. One of the main cause of this gap may be the difficulty in methods for measuring diffusivity. PFG-NMR may be an alternative which enables to measure effective diffusivity varying diffusion time, scale of observation. In this study, diffusion coefficient of moisture in food materials, intact as well as processed ones, was measured using PFG-NMR.

【はじめに】 食品原料である生物素材は組成及び構造が多様で物成値の特定が難しい。しかしながら食品の貯蔵、加工といったプロセスの設計上、それら物成値を解明することは重要な課題である。本研究の目的は、PFG-NMRを用いて食品中の水の有効拡散係数を食品の組成と構造とに対応させて予想できるようにすることにある。昨年度、本討論会で食品素材として大豆種子について報告したが、今回は大豆種子とともに試料として魚肉筋肉を用いた結果も報告する。

【方法】 試料として大豆種子 (*Glycine max* cv. Enrei) および鮮魚（市販生鰯肉）を用いた。魚肉については、切り身を破碎しゲル状にしたもの等調整した。水分含量は80°Cで通風乾燥させた乾物重量を基準として求めた。

NMRの測定は、Burker AM200WB (4.7Tesla) マイクロイメージング付きを用い、RFコイル直径15mm、測定温度25°C、Stimulated echo法で行なった。磁場勾配パルスを与えた場合と与えなかった場合のシグナルの強度比 (R) は以下の式で表せる。

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

この式の中で、 D は拡散係数、 γ は核磁気回転比、 δ は磁場勾配パルスをかけた時間、 g は磁場勾配パルスの強度、 Δ は拡散時間に相当する。

【結果及び考察】

1. Moisture Diffusion in Soybean Seed

拡散時間に対するエコーシグナルの減衰を Fig.1. に示した。図には登熟状態が異なる3種類についての測定結果を載せてある。登熟過程が進行するとともにエコーシグナルの減衰が小さくなり拡散時間の変化に対して一定値に近づくようになる。この結果を説明するために最も単純なモデルとしてTanner (1979) により表されたパラレルモデルを用いシミュレーションを行った (Fig.2)。用いた解析解は次の通りである。

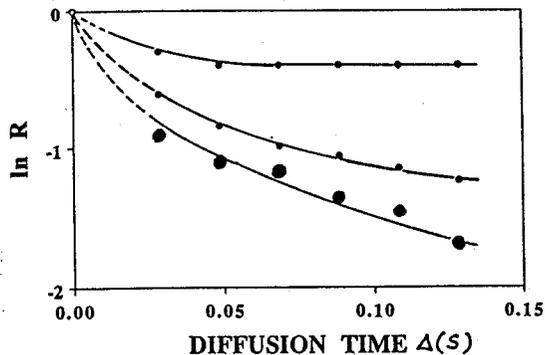


Fig.1 A semi-log plot of echo attenuation vs. diffusion time.

$$R = \frac{2[1 - \cos(\gamma \delta g a)]}{(\gamma \delta g a)^2} + 4(\gamma \delta g a)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \left(\exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 \Delta D}{a^2}\right) \frac{1 - (-1)^n \cos(\gamma \delta g a)}{[(\gamma \delta g a)^2 - (n\pi)^2]^2} \right) \quad (2)$$

(2) 式の中で a はパラレルに配列した壁の間隔に相当し、等間隔に並べられた壁の中を分子が拡散し、壁から外へは自由な拡散ができず制限されていると仮定したモデルである。シミュレーション

キーワード：パルス磁場勾配NMR法、拡散係数

○ふくおか みか、ちょう いぶん、わたなべ ひさひこ、しまだ しんじ

では2種類の拡散係数についてそれぞれ間隔 a を変えた場合を示してある。この結果から、登熟過程が進行するとともに水分含量が減少し見かけの拡散係数も小さくなり、それと同時に拡散する場のサイズも小さくなるということを実測値が表していると解釈できる。

2. Moisture Diffusion in fish flesh

Intactおよび破碎した魚肉

(1) 式に従ってプロットした結果をFig. 3 (Intact) 及びFig. 4 (破碎した魚肉) に示す。Intactな場合には、拡散時間を変化させても、得られる直線の傾きが全て同じであることがわかる。このことは、本実験で用いた拡散時間 ($\Delta = 28\text{ms} \sim 108\text{ms}$) の範囲内では、魚肉筋肉中の水の自由な拡散運動が観測されていると言える。一方、破碎した魚肉では、拡散時間 Δ を大きくしていくと直線の傾きが小さくなっていくことがわかる。このことは、破碎したことで魚肉中の水の自由な拡散運動が制限され、その効果が観測されていることを示している。

Intactな試料中の水が自由拡散で、破碎した場合に制限拡散を示したことは、予想外の結果であった。なぜなら、大豆種子中の水の拡散が制限拡散を示すことから、筋肉組織中での水分子の運動も水分子が自由に移動できる空間が増え、その結果自由拡散を示すと予想された。Fig. 3の直線より算出した拡散係数、 $D = 1.88 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ を用いて、分子運動の平均移動距離 X を $X^2 = 2D\Delta$ の関係式より推算すると、拡散時間 $\Delta = 28\text{ms} \sim 108\text{ms}$ では $10 \mu\text{m} \sim 20 \mu\text{m}$ となる。今回観測した魚肉中の水分子の運動は狭い空間=筋原繊維

(直径 $1 \mu\text{m} \sim 2 \mu\text{m}$) 中ではなく、もっと広い空間=筋繊維 (直径 $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$) の中(筋原繊維の間隙を埋めている水溶液の中)での分子拡散と考えられる。拡散時間 Δ をもっと長くして測定すると、制限拡散が観測されるものと考えられる。一方、魚肉を破碎することで筋肉組織の構造は壊されるが、同時に、筋繊維を構成するタンパク質に水分子が吸着することで自由に移動できる水分子が減るとともに移動できる空間も減少したため、制限拡散を示したと考えられる。

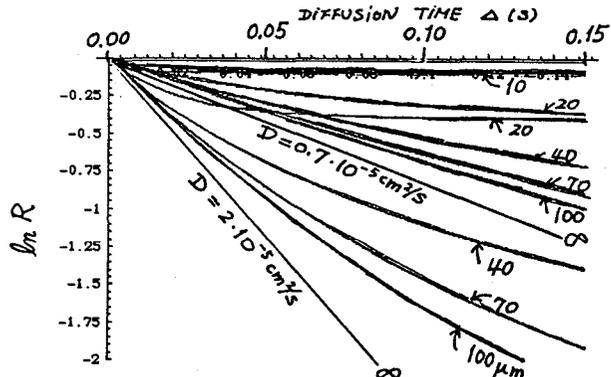


Fig.2 Calculated echo attenuation by the parallel model.

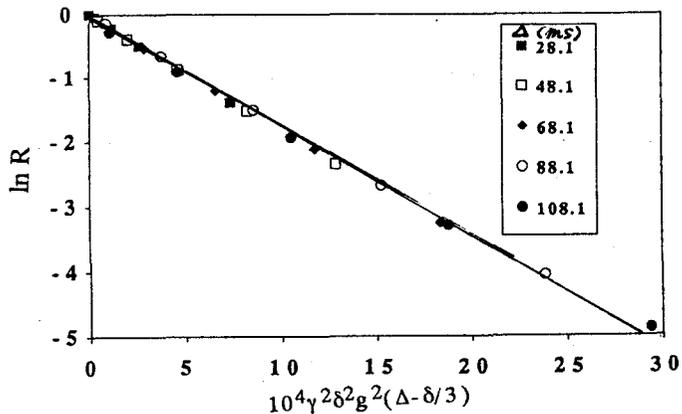


Fig.3 A semi-log plot of echo attenuation vs. $\gamma^2\delta^2g^2(\Delta-\delta/3)$ for moisture in intact fish flesh.

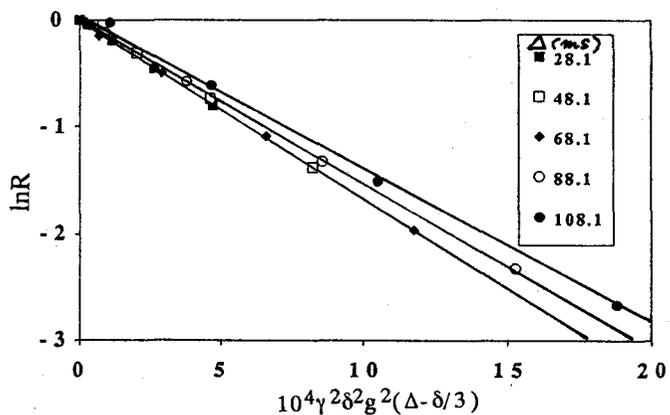


Fig.4 A semi-log plot of echo attenuation vs. $\gamma^2\delta^2g^2(\Delta-\delta/3)$ for moisture in minced fish flesh.

○水越利巳¹、宮野博¹、鈴木榮一郎¹、小島正樹²、田之倉優²、高橋健治²
 (¹味の素(株)・中研、²東大・理)

¹H-NMR Study of Thermal Stability of Carboxymethylated
 Ribonuclease T₁

○Toshimi Mizukoshi¹, Hiroshi Miyano¹, Ei-ichiro Suzuki¹,
 Masaki Kojima², Masaru Tanokura² and Kenji Takahashi²

¹Central Research Laboratories, Ajinomoto Co.,Ink.,

²Faculty of Science, University of Tokyo

Ribonuclease T₁ (RNase T₁) is inactivated by carboxymethylation at Glu-58, while it retains the substrate-binding ability. To study the effects of carboxy methylation on the thermal stability, ¹H-NMR spectra were measured at various temperatures for intact and Glu58 carboxymethylated ribonuclease T₁ (CM-RNase T₁). For both intact and CM-RNase T₁, the results indicate that the thermal unfolding occurs at the same time for the whole molecule. In addition, CM-RNase T₁(thermal unfolding temperature : 334K, unfolding enthalpy : 900kJ/mol) is more stable than intact RNase T₁ (325K, 550kJ/mol) which is consistent with previous studies. The model structure of RNase T₁ using BIOGRAF suggests that the salt bridge between CM-Glu58 and Arg77 stabilizes the CM-RNase T₁ molecule.

【要旨】

Ribonuclease T₁(RNase T₁)は、*Aspergillus oryzae*から単離されるRNA分解酵素であり、極めて選択的にグアノシン-3'-リン酸部分のホスホジエステル結合を切断する¹⁾。RNase T₁は化学修飾や、X線結晶構造解析などの研究から、His40、Glu58、Arg77、His92が活性発現に不可欠であることが明らかになっている。特にGlu58は、温和な条件下で、ヨード酢酸にて処理すると、選択的にカルボキシメチル (CM) 化され、基質結合能を保ったまま活性を完全に失う²⁾。これまでの¹H核の2D-NMRを用いた構造解析により RNase T₁ はCM化後も二次構造はほぼ保たれていることがわかってきている³⁾。本研究では、温度による構造変化の様子を¹H-NMRにて観測でき、いくつかのシグナルの強度変化により変性状態を定量的に扱うことを試みた。その結果、CM-RNase T₁の方がRNase T₁よりも熱安定性が高いことが明らかになった。また、BIOGRAF(Molecular Simulations)プログラムによって構築したCM-RNaseT₁の三次元構造から、得られた温度安定性の結果を考察した。

【実験】

CM-RNase T₁は、既知の方法にて合成したものをを用いた。試料は、RNase T₁、CM-RNase T₁ともに、重水(99.5%)に溶解した。濃度は1~2 mM、pHは4.4とした。NMR測定は、Bruker社製AMX600スペクトロメーターを用いた。測定温度は、303Kより徐々に昇温しながら行った。変性の転移温度は、他のシグナルと比較的分離の良いAsn81のαプロトンと、Ile90のδメチルプロトンシグナルの相対強度を、測定温度に対してプロットすることにより求めた。変性状態へ転移するためのエンタルピー ΔHは、熱平衡式 $\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$ より求めた。CM-RNaseT₁の三次元構造は、Protein Data Bankに登録されているLys25 RNase T₁と、2'-GMPのコンプレックスの座標をもとに構築したのち、BIOGRAF (Molecular Simulations)プログラムによるモレキュラーダイナミクスシミュレーションとエネルギー極小化で計算した。

(KEY WORD) カルボキシメチル化、Ribonuclease T₁、温度安定性

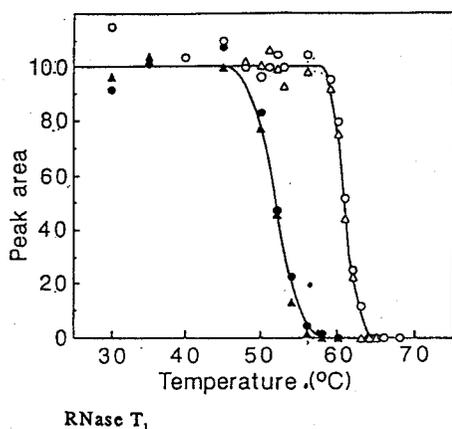
○みずこし としみ、 みやの ひろし、 すずき えいいちろう、 こじま まさき
 たのくら まさる、 たかはし けんじ

【結果と考察】

RNase T₁とCM-RNase T₁のnativeな状態における¹H-NMRスペクトルの中で、Ile90のδメチルプロトンとAsn81のαプロトンは、他のシグナルとよく分離しており、しかも、ランダムコイル中の化学シフトよりも大きく値が異なっているため、三次構造変化に敏感な部分であると思われた。また、前者は主鎖のプロトンであり、後者は側鎖の末端にあること、両者は異なるβストランド中にあることから、分子の離れた部分の変化を比較観測するには良い指標になると考えられた。これらの変性状態への変化をより定量的に考察するために、図1に温度変化対ピーク強度のグラフを示した。RNase T₁、CM-RNase T₁とも、温度の上昇につれて、主鎖Asn81αプロトン、及び側鎖Ile90のδメチルプロトンのシグナル強度が同じように減少しており、変性がほぼ同時におきていることがわかった。nativeから変性状態への転移カーブの midpoint は、RNase T₁で52℃、CM-RNase T₁で61℃であり、この値を変性温度とした。こうして求めたRNase T₁の変性温度は、CDや蛍光分析より求められた値とほぼ同様であった⁴⁾。また、ピークの相対強度はnativeな状態な分子の存在率を示していると考えられるので、それぞれの測定温度での平衡定数が求められる。図2にlogK対温度のグラフを示した。前述した熱平衡式 $\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$ より、変性状態へ転移するために必要なエネルギーΔHは、RNase T₁で550kJ/mol、CM-RNase T₁で900kJ/molであり、RNase T₁のエンタルピーの値は、他の分析手法により求められた値と近い値を示した。

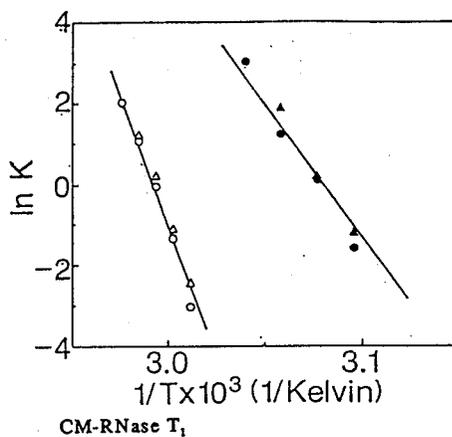
以上のことからRNase T₁は、カルボキシメチル化により活性が完全に失われると共に、温度安定性が增大することが（およそ350kJ/mol）明らかとなった。また、Ile90δメチルプロトンと、Asn81αプロトンを個別に観察することにより、RNase T₁、CM-RNase T₁ともに変性が分子の離れた残基でも同時におこっていることも示唆された。

BIOGRAFにより構築したCM-RNase T₁のモデリング構造では、CM-Glu58のカルボキシアニオンとArg77のグアニジウムカチオンが塩結合を形成することが可能な距離（最短で2Å）に接近する結果が得られた。このため、カルボキシメチル化による熱安定性の増大は、一つには静電相互作用によるものであると考えられる。しかし、塩結合（21kJ/mol程度と考えられる）だけではおよそ350kJ/molのエンタルピーの増加を説明できないので、分子構造全体との関連や、温度変化速度の適切性等の検討が必要である。



RNase T₁

● Ile90 δ Me ▲ Asn81 α H



CM-RNase T₁

○ Ile90 δ Me △ Asn81 α H

図1 Ile90 δ Me、Asn81 α Hピーク強度の温度変化

図2 RNase T₁、CM-RNase T₁の変性時における Van't Hoff plots

【文献】

- 1) K. Takahashi and S. Moor, *The Enzymes* 15, 435 (1982)
- 2) K. Takahashi, W. H. Stein and S. Moor, *J. Biol. Chem.* 242, 4682 (1967)
- 3) 宮野、鈴木、田之倉、高橋、第31会NMR討論会要旨集L21
- 4) M. Oobatake, S. Takahashi and T. Ooi, *J. Biochem.* 86, 55 (1979)

P43 3次元NMRの天然有機化合物への応用 -分子量3422の海洋天然物マイトトキシンの3D PFG-NOESY HMQCスペクトル-

○佐竹真幸、石田 周、村田道雄、安元 健 (東北大農)
内海博明、日元 徹 (日本電子)

Application of 3D PFG-NOESY HMQC to Maitotoxin, a Marine Natural Product with a Molecular Weight of 3422 Da

○Masayuki Satake, Shu Ishida, Michio Murata, and Takeshi Yasumoto (Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981, Japan); Hiroaki Utsumi and Tetsu Hinomoto (JEOL Ltd. Akishima, Tokyo, 196, Japan)

3D Pulse Field Gradient (PFG)-NOESY HMQC was successfully measured as to maitotoxin (MTX, 1), a potent marine toxin with a molecular weight of 3422 Da. ^{13}C -enriched MTX at a rate of 4-5 % was produced by culturing the unicellular alga (dinoflagellates) in $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ media. The 3D NMR was measured with an A-600 (JEOL, 600 MHz) equipped with a pulse field gradient system with use of 9 mg of the enriched sample to furnish a data set of F1 128(^1H) x F2 32(^{13}C) x F3 512(^1H). Consequently, the 3D experiment was proven to be a practical method for structural elucidation of a large natural product.

1. はじめに

3次元NMRは、主にタンパク質の構造解析法として開発され今日まで発展してきた^{1,2}。従って、タンパク質については既に膨大な3次元NMRの解析例があり、標準法の一種となっていると云っても過言ではない。なかでも、インバース法を用いたヘテロ3次元法 (もしくは4次元法) は立体構造の解析に威力を発揮している。この場合、天然存在比の低い ^{13}C や ^{15}N を高度にエンリッチしたタンパク質を調製する必要があるが、これは遺伝子工学的方法が発達した今日では解決可能な問題である。

しかし、演者らの研究対象である天然有機化合物の場合は事情がかなり違っており、ヘテロ3次元NMRの応用例は皆無に等しい。その理由として、天然物はタンパク質や多糖と違って、一般に繰り返しユニットを持たないこと、一部の発酵産物を除いて ^{13}C をエンリッチする方法が確立されていないこと、3次元測定によって有効なデータが得られるケースがまれなこと等が考えられる。ヘテロ3次元NMRを天然有機化合物の構造決定に適用するためには、このような問題を解決する必要がある。

そこで、演者らは、2次元NMRのみでは構造解明が不可能であった海洋天然物マイトトキシンを試料として³、3D PFG (Pulse Field Gradient)-NOESY HMQCを測定し^{2,4}、構造解析法としての評価を行ったので報告する。

キーワード: 3次元NMR、3D NOESY-HMQC、PFG、フィールドグラジエント、マイトトキシ、海洋天然物、超活性天然物、ポリエーテル化合物

○さたけ まさゆき、いしだ しゅう、むらた みちお、やすもと たけし
うつみ ひろあき、ひのもと てつ

2. 実験方法

マイトトキシシン (maitotoxin 1, MTX, Mw. 3422 Da) は、南方島嶼域で多発する食中毒・シガテラの原因毒の一つとして発見命名された³。その後の研究で、天然物としては前例のない大型の分子であること、非常に強い毒性とユニークな薬理活性を有すること等が明らかにされ、現在最も注目されている天然物のひとつである。本研究では、MTXが培養可能な単細胞藻類 (渦鞭毛藻) によって生産されることに着目し、¹³C-炭酸塩 (Na₂CO₃, 50 mg/L) を添加して培養を行った。2000 Lの培養から¹³C同位体濃度は4-5%のMTXを約9 mg (2.6 μmol) 得ることができた。

この試料全量を300 μLの重メタノール-重ピリジン(1:1)溶液に溶かし、3D PFG-NOESY HMQC測定に供した。パルス系列は通常のものを用い⁴、Pulse Field Gradientを併用した。測定は日本電子社製 A-600 (600MHz)を用いて約5日間 (64回積算/increment) 行い、F1(¹H) 128 point (4000Hz), F2(¹³C) 32 point (12674Hz), F3(¹H) 512 point (4000Hz)のデータを得た。最終的にF2軸(¹³C)に4倍のzerofillingを行い、128 x 128 x 512の3次元スペクトルに変換した。

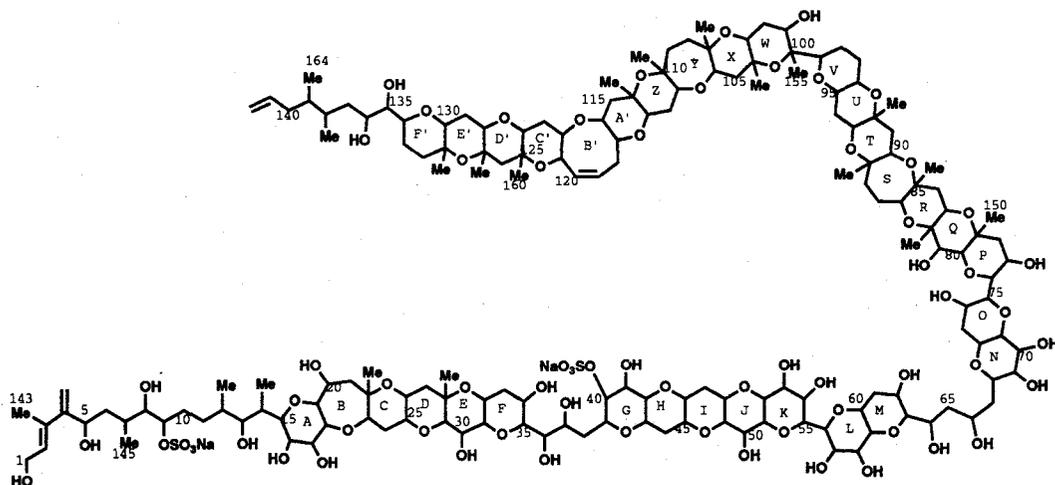
3. 結果および考察

Fig 1.に、3D NOESY-HMQCの128枚のNOESYプレーンの内、¹³C化学シフトでの77.5ppm付近に対応する一枚を2D NOESYと比較して示した。2Dスペクトルでは約500個のcross-peaksの多くが重複しており解析が非常に困難であるが、3Dチャート上には約30個のcross-peaksが現れているのみであり、重複はほとんど認められない。F2軸が32pointと少なく、¹³C軸上の分解能が低かったため、強度の強いcross-peaksは3-5枚程度のプレーン (約4 ppmに相当) に広がって観測されているが、各プレーン間のシグナル強度を比較することによりある程度限定することができた。

¹³C軸に展開することによってcross-peaksの重複がなくなり、NOEの解析が簡略化した事に加えて、¹³Cケミカルシフトの帰属が容易になった。すなわち、2次元 C-H COSYや TOCSY-HMQCなどの情報のみでは¹Hシグナルが完全に重なっている場合、シグナルの帰属は困難である。このような時でも、¹³C化学シフトでは分離していることが多く、従って3D NOESY-HMQCにおいては化学シフトの近い¹Hシグナルでも異なったプレーンに観測される。

今回のヘテロ3次元NMR実験を詳しく検討した結果、今後の課題として次の3点が指摘された。

- 1) 大きなNOEを与える¹Hシグナルに関して、直接結合した¹³C化学シフトと無関係なプレーンにNOEによるcross-peaksが観測される (Singlet methylや交換性水素等で顕著に現れた、このF1,F2ノイズが、Pulse Field Gradientの適用によって大幅に改善された)。



1 Maitotoxin

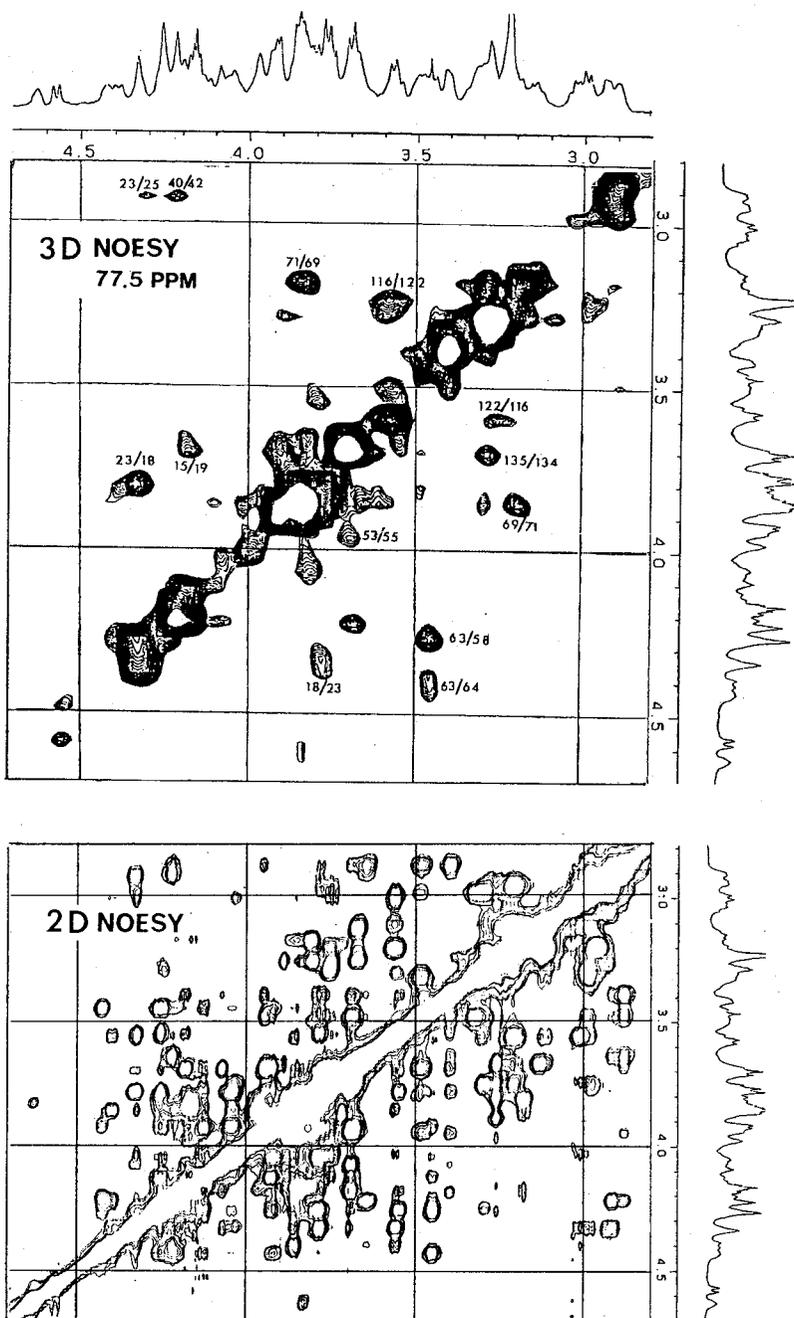


Fig.1. One NOESY Plane at 77.5 ppm (part) of 3D PFG-NOESY HMQC of Maitotoxin 1 (top) in Comparison with 2D NOESY (bottom).

The 3D spectrum of 1 was measured with an A-600 NMR spectrometer (JEOL, 600 MHz) in $CD_3OD-C_3D_5N$ (1:1) equipped with a field gradient system. The 2D NOESY was recorded under the same conditions. Chemical shifts of the carbons of which adjacent protons gave the cross-peaks in the 3D spectrum are those of: C15= 74.8; C18= 76.0; C23= 76.3; C40= 78.7; C53= 79.0; C63= 77.0; C69= 76.3; C71= (75.2); C116= 76.4; C122= 79.8; C135= 77.3 ppm.

2) 天然物の場合、 ^{13}C 化学シフトと部分構造との関係がタンパク質ほど明瞭ではないので、150ppmにも及ぶ広範囲の ^{13}C 化学シフトを観測する必要があるが、今回の3次元の ^{13}C 軸のpoint数では十分な分解能が得られない。

3) 3次元データの測定に数日から1週間を要する。

これら問題点の解決法として、a) ^{13}C 濃度が天然存在比に近い試料の3次元NMR用の測定条件(Field Gradientを含む)を最適化する; b) 部分励起を用いて ^{13}C 軸の測定範囲を狭め、さらにLinear Prediction等の適用により ^{13}C 側の分解能を上げる; c) 培養方法を改良して ^{13}C の存在比を高める(MTXと同サイズの化合物の場合は10%に ^{13}C 存在比を上げることができれば測定時間およびpoint数の面でもヘテロ3次元法は実用的な方法と思われる)などが考えられる。MTXの場合は、培養により生産できたので ^{13}C のエンリッチがある程度可能であったが、多くの天然物は培養できない生物から得られており、a)の方法の確立が3次元NMRを天然物に適用する上での最重要課題と言える。

近年、MTX以外にも海洋生物から分子量2000 Daを越す化合物が発見されてきている⁵。これら化合物の多くは強力な生物活性を有しており、構造と活性の関心に興味をもたれている。しかし、これらは難結晶性のものが多く、部分分解物について2次元NMR等の解析を行うという従来の方法が現在でも唯一の構造解析法であり、構造決定には多大の労力と時間を必要とする。従って、3次元NMRが実用化されれば、これら天然物の構造解析が大幅に進むことが期待される。

天然物の場合には、2次元NMRのみで構造決定可能な分子サイズは約2000 Da以下と考えられる。タンパク質に比べて分子量の上限が低い理由として、天然物では可能性のあるすべての構造の内から真の構造を選別しなければならず、従って、解析に必要な分子量あたりの情報量が格段に多くなることが考えられる。また、全ての水素シグナルと炭素シグナルを帰属できなければ真の構造に到達できないことが多く、解析の対象となるシグナル数が同サイズのタンパク質に比べて多くなるのも理由の一つである。以上のように天然物とタンパク質を比べてみると、3次元NMRの測定とデータ解析においてかなりの相違点がある。しかし、本研究は、 ^{13}C を4-10%にエンリッチできる天然物に関しては、現在の実験方法を若干改良することによって、ヘテロ3次元NMRは実用にたえる構造解析手段となることを示した。

[謝辞] マイトトキシンの構造決定に関しては、サントリー生物有機科学研究所・直木秀夫・岩下孝両博士、東京大学農学部・松永茂樹博士、東北大学安元研究室卒業生・横山昭裕氏、佐々木雅浩氏の協力を得た。

4. 参考文献

- 1) 例えば、a) Fesik, S.W.; Zuiderweg, E.R.P. *J. Magn. Reson.*, 78, 588 (1988); b) Clore, G.M.; Gronenborn, A.M. *Prog. NMR Spectros.*, 23, 43-92 (1991).
- 2) Ikura, M.; Kay, L.E.; Tschudin, R.; Bax, A. *J. Magn. Reson.*, 86, 204-209 (1990).
- 3) Murata, M.; Naoki, H.; Iwashita, H.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 2060-2062 (1993).
- 4) Geerten, W.V.; Boelens, R.; Kaptein, R.; Burgering, M.; Van Zijl, P.C.M. *J. Biomol. NMR*, 2, 301-305 (1992).
- 5) 例えば Nakamura, H.; Asari, T.; Murai, A.; Kondo, T.; Yoshida, K.; Ohizumi, Y. *J. Org. Chem.* 58, 313 (1993).

○森安真彦・大木進野・竹腰清乃理・引地邦男

北大 理 生物科学 高分子機能学教室

Application of Solid Deuterium NMR for Calcium-Binding Protein

Masahiko Moriyasu, Shin-ya Ohki, Kiyonori Takegoshi, and Kunio Hikichi

Division of Biological Sciences, Hokkaido University

In order to study local motion of calcium-binding protein parvalbumin, we apply the solid deuterium NMR. We exchange the His26 C2 proton with deuterium. The solid deuterium NMR spectra are observed in a 9.4T magnetic field. The powder spectra indicate no fast motion of the protein without regard to calcium binding of the protein.

パルブアルブミンは、分子量12000の酸性水溶性のカルシウム結合蛋白質である。NMRは分子の運動を測定するのに適しているが、水溶液中で緩和時間を測定する方法では、そのスペクトルが示す分子の運動は、分子全体の並進・回転運動に大きく左右される。そこでパルブアルブミンのカルシウム結合による分子の局所的な運動の変化を調べるために固体重水素NMR法の適用を試みた。

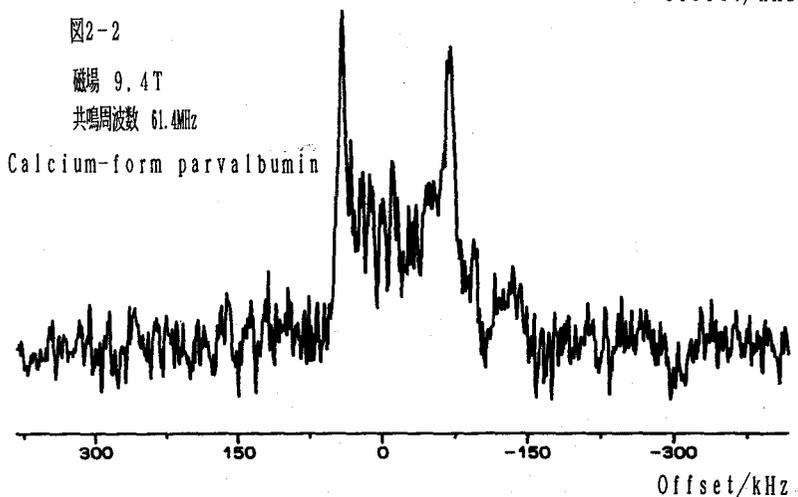
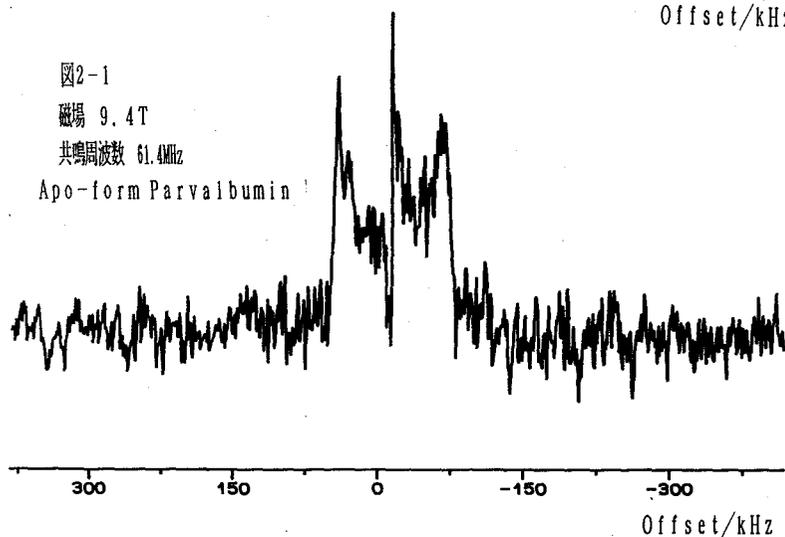
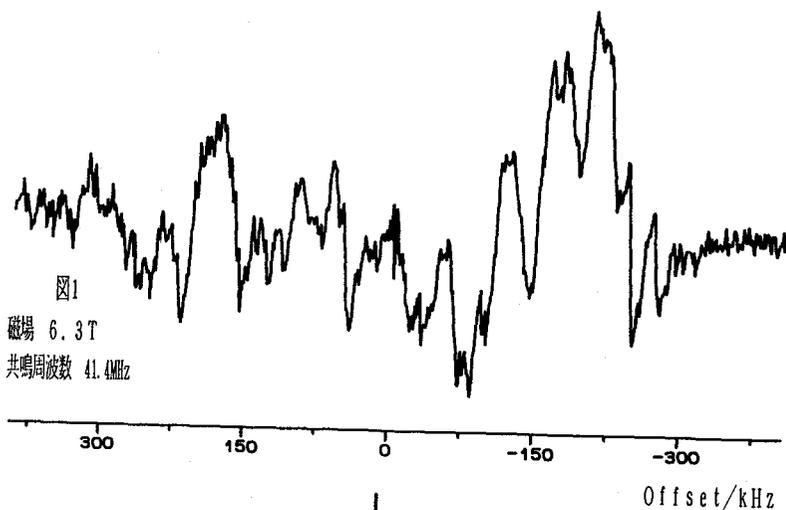
コイをTCA法を用いて精製したコイパルブアルブミン3をサンプルとして用いた。コイパルブアルブミン3の26番目のヒスチジン残基のC2プロトンを特異的に重水素化した。アミドプロトンやその他の交換性プロトンとヒスチジンC2プロトンの重水素との交換速度の違いを利用した。カルシウムフォームのパルブアルブミンを0.2M塩化カリウム、10mMジチオスレイトール、pH7、60°Cの条件下で1週間重水中放置し交換性のプロトンを全て重水素化し、4°C、アンモニアによるアルカリ性の条件下で2日間限外ろ過を軽水を用いて行い脱塩し、同時に、ヒスチジンC2プロトン以外の交換性プロトンを元に戻した。このパルブアルブミンの水溶液中の¹H-NMRスペクトルを測定したところヒスチジンのC2プロトンシグナルのみが半分減少していた。このサンプル溶液に80mgのジチオスレイトールを加え、凍結乾燥し、160mgのアポフォームコイパルブアルブミン3のNMRサンプルを得た。再びこのサンプルを軽水中に溶かし3mgの塩化カルシウム4水和物を加え、凍結乾燥し、カルシウムフォームのサンプルとした。

固体重水素NMRスペクトルを $90x-\tau-90y-t_1$ のクワドロポールエコーのパルスシーケンスでパルス待ち時間を10秒とし、6.3T及び9.4Tの磁場中、室温でそれぞれほぼ30000回積算

キーワード： 固体重水素NMR、カルシウム結合タンパク質、分子運動

○もりやす まさひこ, おおき しんや, たけごし きよのり, ひきち くにお

して観測した。6.3Tの磁場中ではS/Nが悪く、良いスペクトルを観測することはできなかった(図1)。9.3Tの磁場中で30000回積算する事で解析可能な固体重水素NMRスペクトルを観測することができた(図2)。そのスペクトルは、カルシウムの結合にかかわらず、と



もに幅の広い、いわゆるパウダースペクトルであり、室温ではその運動がともに数10kHz以下であることがわかった。これはパルプアルブミンの26番目のヒスチジン残基が疎水性アミノ酸残基の核の中に存在しているので、その運動がカルシウムの結合にかかわらず制限されているためであると考えられる。

ガンマ毒 bufadienolide の二次元NMRによる帰属とその応用(2).
主として α -pyrone 環開裂化合物の構造について

(神奈川大理) 釜野徳明 ○張 恵平 ・ 小竹文乃
(北陸大薬) 木津治久

Structural Assignment and Application of The Toad Poison
Bufadienolides by 2D NMR Spectra (2). About Structure of
The α -Pyrone Ring Opening Compounds

Yoshiaki Kamano, ○Huiping Zhang, Ayano Kotake
(Faculty of Science, Kanagawa University)
Haruhisa Kizu
(Faculty of Pharmacy, Hokuriku University)

We wish to present the perfect structural determination of the base-catalyzed α -pyrone ring opening compounds, 4, 5, 6 and 8, were obtained from natural bufadienolides, 1, 2, 3 and 7, respectively (Fig.1). For structural assignment, the 2D NMR spectral techniques as ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H COSY, COLOC, HMBC, NOESY, etc. were utilized, in addition to 1D NOE difference spectra. In Fig.2 and Fig.3, the COLOC and NOESY experimental results of isobufalin Me ester 1 were indicated. In Fig.4, the COLOC and HMBC analytical results of diepoxide 8 (C-K-Me-A) were shown. The detail NOE result of 8 including it's stereochemistry was illustrated in Fig.5.

緒言 ガンマ毒 bufadienolide は、強心・呼吸興奮・血圧上昇・抗癌・抗ウイルス作用など多様な生理活性を有する重要なステロイドである。その構造は、ステロイド17 β 位に α -pyrone環を有し、A/B cis, C/D cisの特異な形をとり、NMRスペクトルもその特徴を示す。このbufadienolideの2D NMR研究については、従来詳細な報告がなく、演者らは初めて一連の天然型bufadienolideの構造解析を行い、その結果を報告した。¹⁾その後、bufalin(1), bufotalin(2), gamabufotalin(3)およびcinobufagin(7)のアルカリによる側鎖 α -pyrone環開裂体4, 5, 6および8の構造を決定し、さらに興味ある知見を得たのでここに報告する(Fig.1)。

反応 14 β 位に水酸基を有するbufadienolideをアルカリ処理、ついで酸性にするとiso体と称する化合物が得られることは、古くから知られていたが、その構造は不確実であった。メタノール中bufadienolides (1, 2, 3)の上述の反応から得られる化合物は、それぞれ4, 5, 6の構造を有するものであった。エタノール中の反

キーワード: ガンマ毒、bufadienolide、 α -ピロン環アルカリ開裂、2D NMR, NOE

かまのよしあき、○ちようけいへい、こたけあやの、きづはるひさ

応では、ethyl esterを与えた。また、これらの生成物(iso体)は、同じ出発物質を光照射($h\nu$, N_2 , アルコール中)して得られる化合物²⁾とまったく同一物であることがわかった。一方、 14β , 15β -epoxy体のアルカリ処理により得られる化合物は、従来、まったく不明であった。今回、cinobufagin(7)をアルカリ処理、酸性にすると、薄層クロマトグラフィー上数種の生成物を与えることがわかった。そのうち最も強いスポットを示す主生成物を単離(C-K-Me-A, 8)し、構造を決定した(Fig.1)。

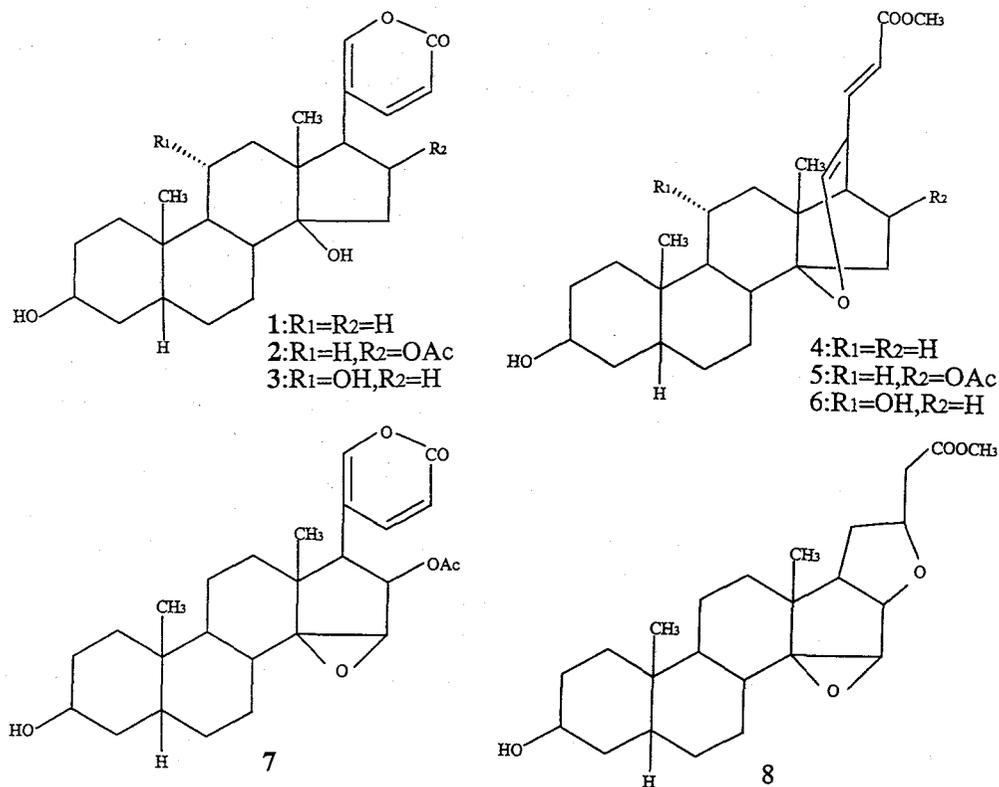


Fig.1

実験 sample: 10mg-50mgを0.5mlの重クロロホルムに溶解、内部標準にTMSを使用。必要に応じて重ピリジンを用いた。**機種:** JNM-EX400スペクトロメーター。**測定法:** (a) 1D NMR- 1H , ^{13}C , DEPT, NOE差スペクトル測定を行った。 1H は399.65MHzで、 ^{13}C は100.40MHzで記録; NOE差スペクトル測定における照射パワーは250または300。(b) 2D NMR- 1H - 1H COSY, ^{13}C - 1H COSY, COLOC, HMBC, NOESY 測定を行った。 ^{13}C - 1H COSYの結合定数は $J_{CH}=140\text{Hz}$, long range結合定数は $J_{CCH}=10.3\text{Hz}$; NOESYに用いたmixing timeは $PI_3=700\text{ms}$ であった。

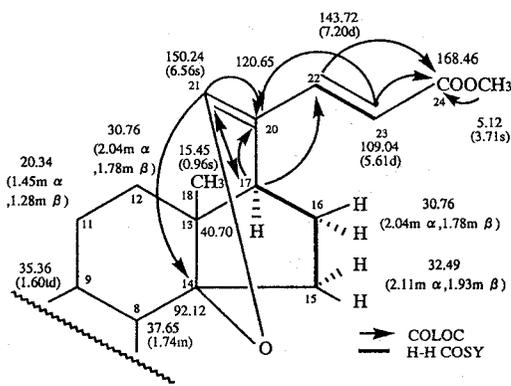
結果

1. Isobufalin Me ester(4), Isobufotalin Me ester(5), Isogamabufotalin Me ester (6)の構造決定

Isobufalin Me esterの構造は、物性とスペクトル(IR, UV, MS, 1D NMR)より、 14β から21位へのether結合と21位から24位への共役二重結合の存在がわかり、構造

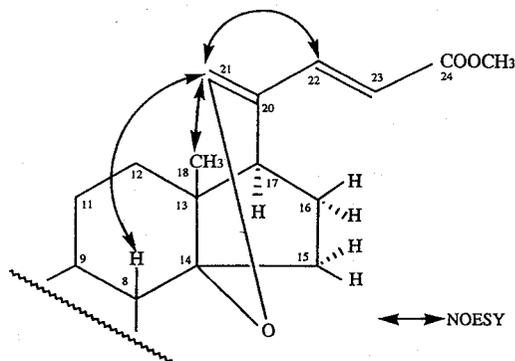
を **4** と推定した。二重結合のJ値は、15.5Hzであり、transであることがわかった。ついで、 ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H COSY, COLOC, NOESYなど 2D NMR を詳細に検討し、構造 **4** を確認した。COLOC 測定により、Fig.2に示すように、21位とそれぞれ14位、17位、20位との相関が得られ、さらにNOESY 測定(Fig.3)により、21位とそれぞれ $8\beta\text{-H}$ 、 18-CH_3 、 22-H との間にNOEが観察された。これらのことから、Isobufalin Me ester (**4**)のD環と側鎖の立体構造に新しい知見が得られた。

同じような方法により、Isobufotalin Me ester (**5**)とIsogamabufotalin Me ester (**6**)の構造も明かになった。また、別途メタノール中光照射により得られた化合物も、それぞれこれらの化合物 (**4**, **5**, **6**)とまったく同じであった。²⁾



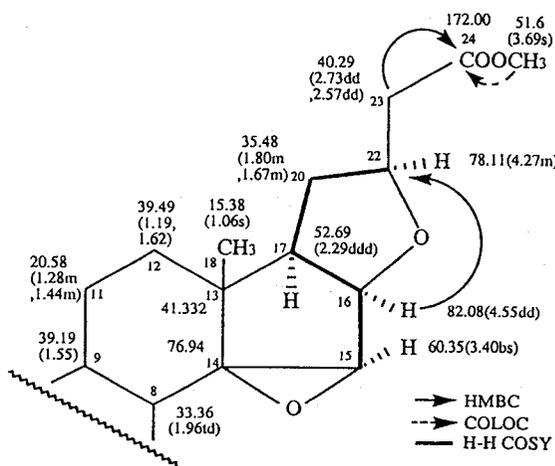
Isobufalin Me ester

Fig.2



Isobufalin Me ester

Fig.3



C-K-Me-A

Fig.4

2. Cinobufagin(7)のアルカリ開裂体 C-K-Me-A(8)の構造決定

cinobufagin のアルカリ開裂体 C-K-Me-A($C_{24}H_{36}O_5$)は、物性・スペクトル(IR, UV, MS, 1D NMR)測定から、その構造を **8** と推定した。**8** は cinobufagin(7)より carbonが一つ少ない。16β位のアセチル基がなく、二重結合も存在しない。一方、16β位と22位にether結合が存在し、22位の配置の決定が必要であった。重クロロホルム中で測定した所、C-14が溶媒のpeakと重なり、またC-10とC-20のchemical shiftも重なった。しかし、重ピリジン中で測定すると、この重複はさげられた。 1H - 1H COSY実験から、Fig. 4に示すようなC-15からC-25のつながりがわかった。さらに、COLOC 実験により、ester CH_3 とC-24との相関が得られ、また、HMBC 測定により、C-23とC-24の相関、16位と22位との相関が観察され、Fig. 5に示す構造 **8** が確認できた。構造 **8** の立体構造を検討するために、NOE差スペクトルを測定した。その結果、21-Hは α 位と決定、Fig. 5に示すような立体構造が得られた。

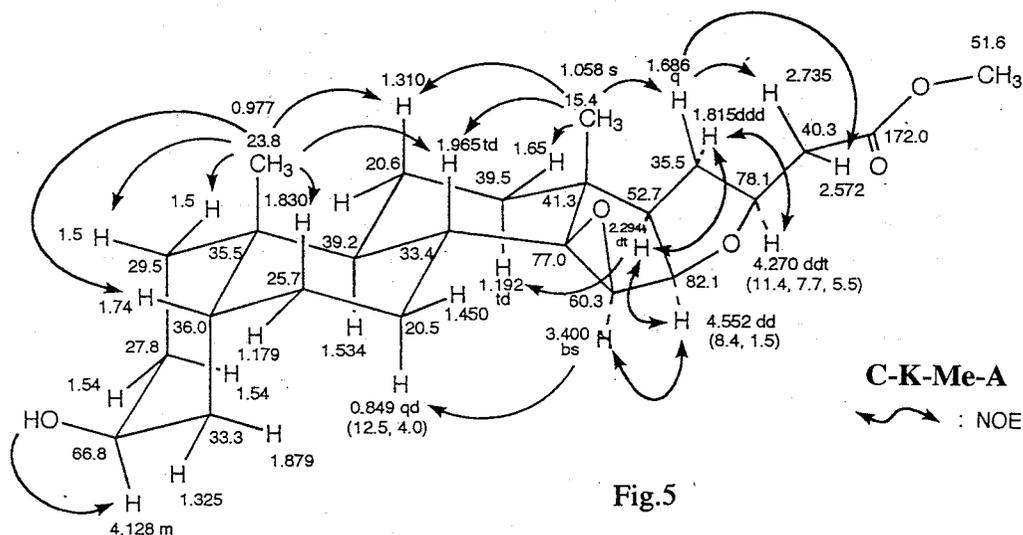


Fig.5

考察 本研究の結果、14β-OH基を有する bufadienolide のアルカリ開裂体が、光照射によって得られる化合物と同じであったことは、反応機構の上からも興味ある事実である。また、cinobufagin の開裂体は、今回の主生成物 C-K-Me-A 以外にも生成物があり、それらの構造および16位に acetoxy 基のない化合物の開裂体の解明が必要である。また、生成物の立体構造を検討するために、温度変化、濃度変化、溶媒効果なども今後検討したい。

謝辞 本研究のNMR測定に協力戴いた神奈川大学理学部NMR担当の山田はるかさんおよび協力戴いた吉田基幸君に深謝致します。

文献

- 1) 張 恵平、小竹文乃、釜野徳明、木津治久 日本化学会第65春季年会(1993)、講演予稿集II, P.503 (No.2 H1 11).
- 2) Y. Kamano, H. Yamamoto, M. Komatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **17**,1698(1969).

○若杉桂輔^a, 石森浩一郎^a, 森島 績^a, 島田秀夫^b, 牧野龍^c, 石村巽^b
(京都大学工学部^a, 慶応大学医学部^b, 姫路工業大学理学部^c)

NMR Study of Recombinant P450cam Mutants (2)

Keisuke Wakasugi^a, Koichiro Ishimori^a, Isao Morishima^a, Hideo Shimada^b, Ryu Makino^c,
Yuzuru Ishimura^b

(^a Graduate School of Engineering, Kyoto University; ^b School of Medicine, Keio University;
^c Faculty of Science, Himeji Institute of Technology)

Site-directed mutants, in which Thr-252 had been changed to Ala or Val, were employed to study the role of the hydroxy amino acid¹⁾. The amount of 5-hydroxycamphor decreased in the mutant enzymes with respect to the wild-type enzyme¹⁾. In order to investigate structural difference between wild-type and mutant enzymes, we utilized paramagnetic¹⁵N- and ¹H-NMR spectroscopy. Based on their NMR spectra, the Val-substituted enzyme exhibited the structural alteration in the presence and absence of the substrate. On the other hand, the substitution of threonine for alanine caused some structural changes only in the absence of d-camphor.

1. 緒言 P450cam は、*d*-camphorの水酸化を触媒する一原子酸素添加酵素である。酸素の活性化に重要な働きをすると考えられる252ThrをAla, Valに置換したP450cam を作製し、酵素活性を調べた結果、ともに、camphorに対する水酸化活性が、野生型に比べ著しく低下していることがわかった¹⁾。しかし、Ala 変異体の酸素消費速度は、野生型とほぼ同程度であるが、Val 変異体の場合には、野生型の約1/3程度まで遅くなっていることが明らかになった¹⁾。このような違いは、アミノ酸置換を行うことで酵素の立体構造に変化が生じたために起こったと考えられる。そこで、野生型、Ala 変異体、Val 変異体の立体構造、特にヘム近傍の構造を検討するために、常磁性¹⁵N-および¹H-NMRスペクトルの測定を行った。

2. 結果および考察 図1に、基質として *d*-camphorが結合した鉄3価シアン体のNMRスペクトルを示す。シアン体は、ヘム鉄に配位子(酸素)が結合した場合のモデルの一種と考えるこ

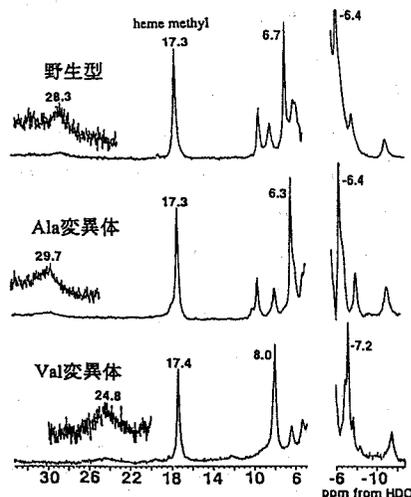


図1。 *d*-camphor結合時のシアン体P450camの¹H-NMRスペクトル

keyword : P450cam、シアン体、¹⁵N-NMR、¹H-NMR、鉄3価低スピン

氏名：わかすぎけいすけ いしもりこういちろう もりしまいさお しまだひでお
まきのりゅう いしむらゆずる

とができる。温度依存性の測定などから、野生型の17.3ppmのシグナルは、ヘムのメチル基のシグナルに帰属されている³⁾。このシグナルのシフト値は、変異体でも野生型とほぼ同じ値になった。しかし、野生型の6.7, -6.4ppmのシグナルは、Ala変異体では6.3, -6.4ppmとほとんど変化しないのに対し、Val変異体では8.0ppm, -7.2ppmとシフトするのが認められた。このことから、基質結合体(+cam)では、Val変異体のヘム近傍構造により大きな変化が生じていると考えられる。次に、基質非結合体(-cam)のシアン体の¹H-NMRを測定した(図2)。野生型において、19.5ppm, 11.5ppmに観測されたシグナルは、プロトン三個分のシグナルであり、ともにメチル基に由来するものと考えられる。これらのシグナルは、Ala変異体においても天然型とは異なる位置に観測され、基質非結合体ではAla変異体においても有意な構造変化が起こったことを示している。さらにこのことを詳細に検討するために、ヘム近傍の構造及び電子状態を直接反映する常磁性¹⁵N-NMRを測定した。図3に示すように、基質結合時のVal変異体の¹⁵Nのシグナルは約40ppmもシフトしたのに対し、Ala変異体のシフト値は野生型とほとんど同じであった。しかし、基質非結合体では、野生型からAla変異体でも27ppm, Val変異体では60ppmシフトして観測され、基質非結合体では、Ala変異体、Val変異体ともに252番目のアミノ酸残基の変異の影響が大きく現れていることを示している。さらに、基質(d-camphor)の解離定数を測定すると(表1)、野生型とAla変異体とはほぼ等しく、Val変異体のみ大きな値が得られ、基質が解離しやすいことを示している。このことはVal変異体の場合にはヘム近傍の基質結合部位の揺らぎが大きいことを意味している。以上の結果をまとめると、基質が結合していない場合にはAla, Val変異体ともにThr252の置換によりヘム近傍に構造変化が生じるが、基質(d-camphor)が結合することにより、Ala変異体では野生型とほぼ同じ構造を回復すると考えられる。一方、Val変異体では置換により基質結合部位付近まで構造変化が及んでおり、基質も野生型のように安定に結合せず、ヘム近傍の構造変化も十分回復しないことを示している。

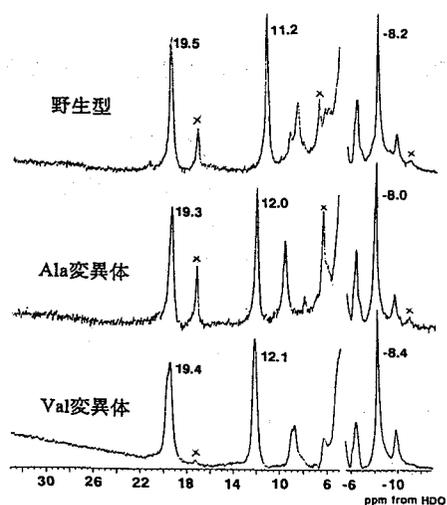


図2。d-camphor非結合時のシアン体P450camの¹H-NMRスペクトル

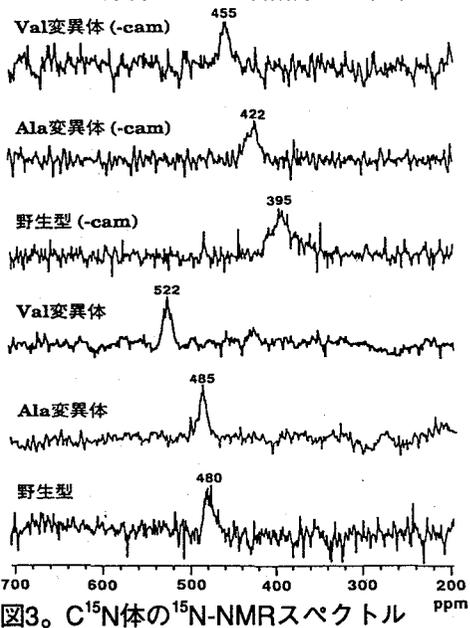


図3。¹⁵N体の¹⁵N-NMRスペクトル

	野生型	Ala変異体	Val変異体
K_d (μ M)	3.0	3.4	7.1

表1。d-camphorの解離定数

一方、Val変異体では置換により基質結合部位付近まで構造変化が及んでおり、基質も野生型のように安定に結合せず、ヘム近傍の構造変化も十分回復しないことを示している。

3.参考文献 1) Inai, M. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7823. ; 2) Poulos et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 16122. ; 3) Keller et al. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2073.

(三菱化成総研・東京水産大*) ○原園としえ・横田悦造・渡部徳子*

Study of the molecular motions of TiOpc

by ¹³C-solid state NMR

(Mitsubishi Kasei Research Center, Tokyo University of Marine Sciences) ○ Toshie Harazono, Etsuzo Yokota, Tokuko Watanabe

¹³C spin-lattice relaxation times (T_1) for A-TiOpc with different lengths of crystal size along C axis (L_c) were measured in order to elucidate the relationship between the molecular motions and the sensitivities of TiOpc in laser beam printer use. T_1 of C1, which is carbon atom adjacent to nitrogen atom, was shorter as L_c decreased, T_1 (C2-C4), however, showed the opposite tendency. These results mean that the relaxation mechanism of T_1 (C1) is considered to be different from that of T_1 (C2-C4). Detailed investigation with respect to the molecular motions of TiOpc is in progress.

序) 近年、レーザープリンターのCGM (電荷発生物質) として、チタニルフタロシアニン (TiOpc) が注目をあびている。TiOpcはいくつかの結晶型を有するが、A型とB型のみが単結晶でX線解析がされている。¹⁾ フタロシアニン (Pc) からTiOpcになると、フェニル基からTi=Oの方に電子が流れること、TiOpcの分子運動の大きさが、有機溶媒への溶解度とレーザープリンターの感度と相関があることについては、既に報告した。²⁾ 著者らは、TiOpcの感度を支配する因子を明らかにする目的で、 L_c (C軸方向の結晶子の長さ) の異なったA型-TiOpcの T_1 を種々の温度で測定し、分子運動の研究を行った。

測定) TiCl₂PcとN-メチルピロリドンから作られたA-TiOpc²⁾の¹³C-NMRをBruker製MSL-300にて測定した。共鳴周波数は75.47MHz、¹³C、及び、¹Hの90°パルスはいずれも4.9μsであり、回転数は4400 rps、コンタクトタイムは3.5msであった。 T_1 測定はTorchia法にて行った。X線回折はPhilips PW1700を用いて行った。C軸方向の結晶子の長さ (L_c) は $L_c = K \lambda / \beta \cos \theta$ より求めた。ここで、 $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ 、 β (radian) は 2θ が 26° 付近の (004) のピークの半価幅、Kは定数で1である。

チタニルフタロシアニン、¹³C-固体NMR、スピン-格子緩和時間、分子運動

○はらぞの としえ、よこた えつぞう、わたなべ とくこ

結果) A-TiOp c の分子構造を図1、結晶構造を図2に示した。更に、A-TiOp c の ^{13}C -CPMAS NMRスペクトルを図3に示した。シグナルは、低磁場側からC1、C2、C3、C4に帰属された。図4は、Torchia法で測定したスペクトルである(サンプルNo.5、室温)。待ち時間、 τ にたいする $\ln M_z$ (M_z :磁化)のプロットを図5に示した。Lcの異なったA-TiOp cの各温度における T_1 を表1に示した。

考察) T_1 のLc依存性をみると、Lcが短くなるにつれて T_1 (C1)は短くなっており、一方、 T_1 (C2~C4)は長くなる傾向がある。これより、 T_1 (C1)と T_1 (C2~C4)の緩和機構は異なっていると思われる。各サンプルのC1の室温での T_1 を比べると、Lcが275Åよりも長くなると T_1 が非常に長くなり、値を見積もることができなかった。おそらく、3000s以上の値ではないかと思われる。これに対してLcが270Å以下になると T_1 はLcが短い方が短くなっている。図2から明らかなように、TiOp cのC1は上下のTiOp cのNと3.41Åしか離れておらず、分子間双極子相互作用が可能である。また、C1はTiに配位しているNと結合していること、および、Tiの第一配位圏を形成している環内に存在することから、分子内N核スピンの双極子相互作用も受けている。Lc依存性に直接関連するのは、主に、分子間N- ^{13}C 双極子相互作用であると思われるが、環 π 電子系との相互作用による影響もあるかもしれない。C2の T_1 が、C3の T_1 に比べて長いのは、結合しているHがなく、かつ、上下の分子との相互作用でC3、C4に比べて分子運動が抑えられるからであると考えられる。

No.4のサンプルの各温度での T_1 を比べると温度が上昇するにつれ T_1 が減少している。TiOp cの分子運動、及び、分子運動と物性との対応について、さらに詳しく研究中である。

- 1) W. Hiller and J. Strahle, J. Zeit. Kristall., 159, 173(1982).
- 2) T. Harazono, I. Takagishi, and T. Matsuzaki, Analy. Sci., Suppl., 1301(1991).

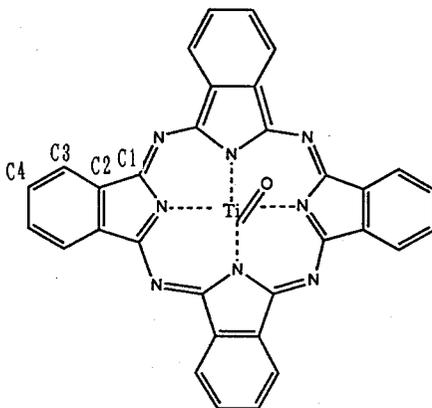


図1. A-TiOp cの分子構造

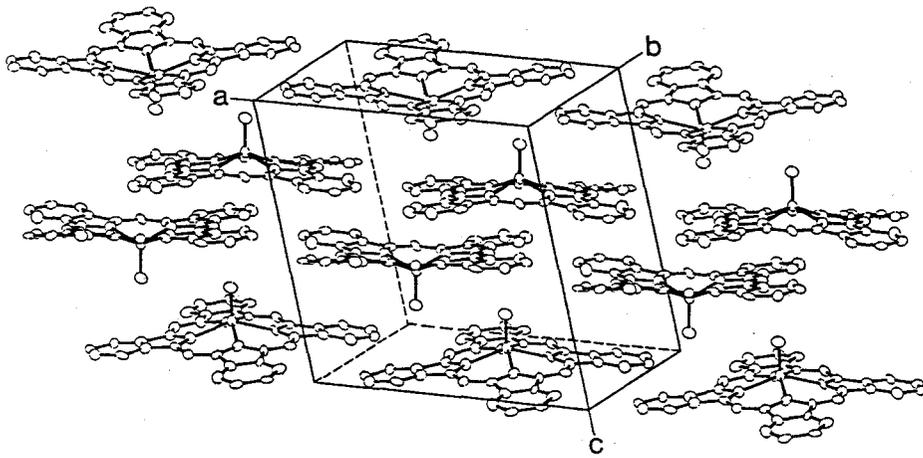


図2. A-TiOpcの結晶構造

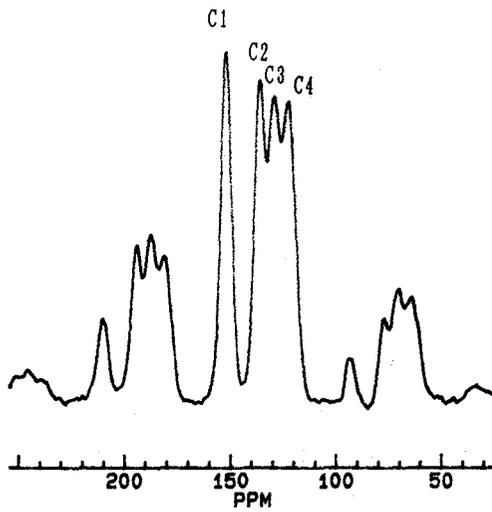


図3. A-TiOpcの ^{13}C -CPMAS NMRスペクトル

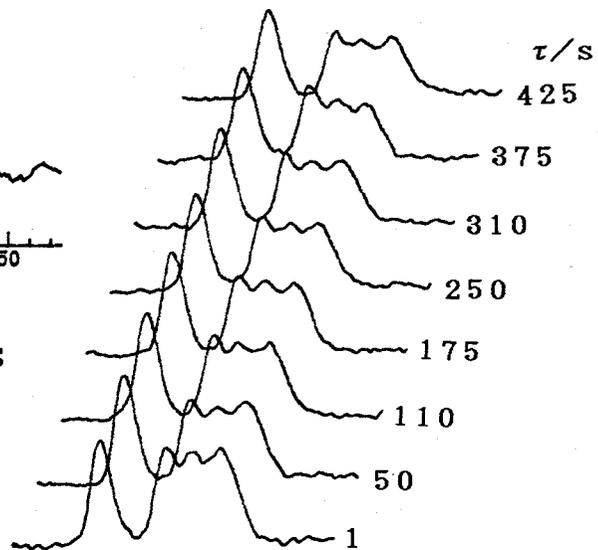


図4. Torchia法で測定した ^{13}C -CPMAS NMRスペクトル

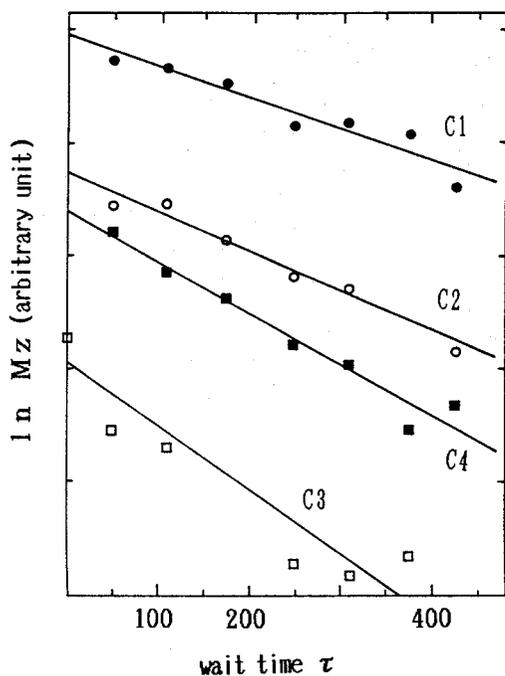


図5. τ に対する $\ln Mz$ のプロット

Table 1. ^{13}C spin-lattice relaxation times (T_1) for A-TiOpc with different lengths of crystal size along C axis (L_c)

sample No.	T_1 (C1)/s	T_1 (C2)/s	T_1 (C3)/s	T_1 (C4)/s	temp./ $^{\circ}\text{C}$	$L_c/\text{\AA}$
1	-	740	550	620	RT	400
2	-	900	670	520	RT	320
3	-	1300	650	700	RT	275
4	700	310	300	280	140	270
4	2800	960	450	500	75	270
4	3000	1400	800	1200	RT	270
5	2100	1400	750	1200	RT	235

- means that T_1 is too long to measure. T_1 is probably longer than 3000 s.

○北澤 聡、平沖敏文、堤 耀廣

北大 工

Side Chain Dynamics of Poly(γ -benzyl L-glutamate) by Solid State ^2H -NMR° So Kitazawa, Toshifumi Hiraoki, Akihiro Tsutsumi
Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060.

In order to study side chain motions of poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG), we measured ^2H -NMR spectra of PBLGs deuterated in γ , ζ , and κ positions, respectively. The line shapes below about -50°C for each sample are similar to the static powder patterns, showing the absence of large amplitude motions. The slightly smaller quadrupole-splittings observed suggest rapid and small amplitude librations at each site. From T_1 correlation time of the librations is of the order of 10^{-11}s . Remarkable intensity loss is observed at around 50°C , corresponding to the glass-like transition temperature of the side chain. With increasing temperature, the spectra recover their intensities and become sharp, due to the multi-internal rotations. There exists at least two motional modes for the PBLG side chain motions. One is rapid, small-amplitude librational motions, and the other is large amplitude motions caused by the multi-internal rotations.

poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) は固体中では主鎖はCO基とNH基との間の水素結合のために非常に安定で剛直な α -helix構造をとっている。これまで様々な方法でPBLG側鎖の運動は研究され、室温付近で通常アモルファスポリマーの主鎖運動に見られる様なガラス様転移が観測されているが、側鎖の運動の様子を明確に捕らえるまでには至らなかった。側鎖運動は基本的には各C-C結合まわりの内部回転運動に起因しているため、側鎖全体の運動の様子を知るには各結合部における局所的な運動の情報が必要となる。そこで本研究では局所的な分子運動を調べるために非常に有力な手段である固体重水素NMRを用い、PBLG側鎖の運動を側鎖に沿って調べるため、ベンジル基のパラ位(κ 位)とベンジルメチレン基(ζ 位)、及び γ 位のメチレン基をそれぞれ重水素化し、スペクトルの線形とスピン-格子緩和時間(T_1)を測定した。

Fig. 1にPBLG側鎖の化学構造を示す。PBLGは側鎖の末端にフェニル環を有している。このフェニル環は $C_\zeta-C_\kappa$ 軸のまわりに高速のフリップ-フロップ運動をしており、この運動に加えて $C_\zeta-C_\kappa$ 軸自身も運動していることが重水素NMRを用いた研究によって明らかになっている。¹⁾側鎖末端の κ 位はフリップ-フロップ運動の影響を受けないので、重水素NMRスペクトルは $C_\zeta-C_\kappa$ 軸自身の運動を反映する。もし $C_\zeta-C_\kappa$ 軸自身の運動が ζ 位よりも主鎖側の部分の運動に起因するもので

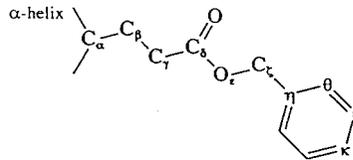


Fig. 1 The side chain structure of PBLG.

キーワード：固体重水素NMR、PBLG、側鎖、大振幅の運動、libration

○きたざわ そう、 ひらおき としふみ、 つつみ あきひろ

あれば、 ζ 位のスペクトルにも κ 位の運動と同じ運動が反映するはずである。更に γ 位のスペクトルも調べることによって、側鎖全体の運動はどのあたりから起こっているのかが明らかになる。

用いた試料は、ベンジル基のパラ位を重水素化した poly(γ -[κ - $^2\text{H}_1$]benzyl L-glutamate) (PBLG- κd_1)、ベンジルメチレン基を重水素化した poly(γ -[ζ - $^2\text{H}_2$]benzyl L-glutamate) (PBLG- ζd_2)、及び γ -メチレン基を重水素化した poly(γ -benzyl L-[γ - $^2\text{H}_2$]glutamate) (PBLG- γd_2) である。NMRの測定はBruker MSL-200(30.7MHz)で行い、スペクトルは四重極エコー法により得た。 T_1 はinversion-recovery四重極エコー法により得た。シミュレーションスペクトルはGreenfieldらのMXQET²⁾を用いた。

各試料の重水素NMRスペクトルの温度依存性をFig.2に示す。 -50°C 以下ではいずれの試料のスペクトルも線形は静止状態の軸対称な粉末平均スペクトルに近く、各部位の $\text{C}-^2\text{H}$ 軸の運動は非常に遅く制限されていることを示している。しかし完全に静止状態の線形とは異なっており、 σ_{11} 成分が不明瞭で α_1 成分も鋭くない。特に κ 位のスペクトルに顕著である。また四重極分裂幅もそれぞれ静止状態の値よりも僅かに小さい。これは低温でも小振幅で高速のlibration様の運動が存在していることを示唆している。温度を上昇させるとexchange broadeningが起こり始め、いずれの部位のスペクトルも強度が徐々に減少して 50°C 付近で最小になる。これはこの温度域で側鎖の各部位に100kHzオーダーの運動が起こっていることを示している。さらに温度を上昇させると運動によって平均化されたスペクトルが現れ、いずれの部位のスペクトルも中央部の強度が増すと共に線形も大きく変化し、 κ 位と ζ 位のスペクトルはsinglet-likeになり、 γ 位のスペクトルは分裂幅が12kHzのdoubletスペクトルになる。 κ 位や ζ 位だけではなく γ 位のスペクトルも大きく変化していることから、側鎖は C_α - C_β 軸あるいは C_α - C_δ 軸まわりから全体が大振幅で運動していることを示唆している。

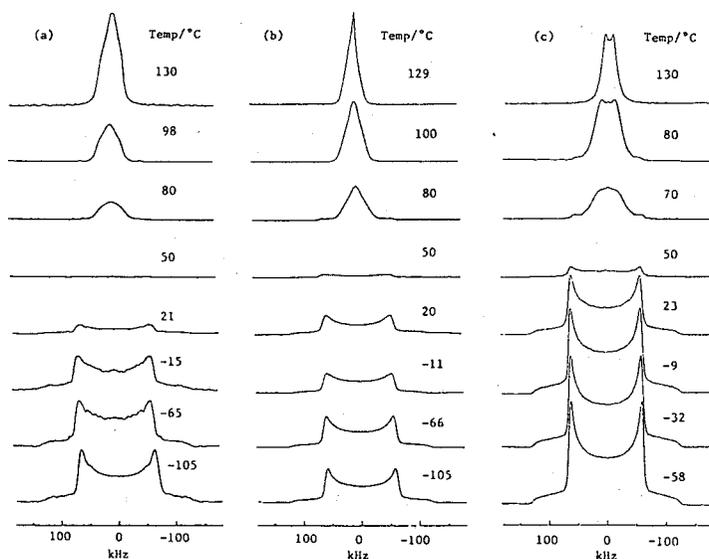


Fig. 2 Temperature dependence of ^2H -NMR spectra for (a)PBLG- κd_1 , (b)PBLG- ζd_2 , (c)PBLG- γd_2 .

これらの側鎖の各部位の運動をより定量的に検討するために線形のシミュレーションを行った。

(1)libration様の運動

libration様の運動を再現するために3-site jumpモデルを用い κ 、 ζ 、 γ 位の低温域の線形シミュレーションを行った。このとき回転軸とC-²H軸とのなす角にはガウス分布を仮定した。 ζ 位の-105°Cの実測スペクトルと計算スペクトルをFig.3に示す。3-site jumpモデルを用いたシミュレーションスペクトルは完全に静止状態のシミュレーションスペクトルと比較すると、四重極分裂幅も小さく、 σ_{11} 、 σ_{12} 成分等の低温の実測スペクトルの特徴が非常に良く再現されている。jump rateは後述する T_1 の解析から求められた値の10GHzとした。ガウス分布の平均角は14°、標準偏差は5°と求められた。また平均角は温度の上昇とともに徐々に増加していくことが分かった。これはlibration様の運動の振幅が温度の上昇とともに増加していくことを示している。他の部位の線形でもほぼ同様の結果が得られた。

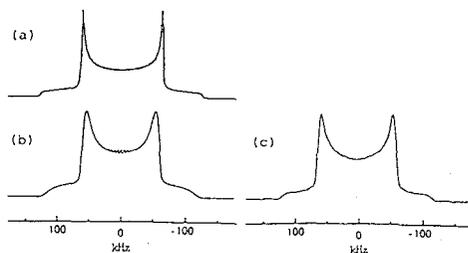


Fig. 3 Simulated spectra of PBLG- ζ d₂ at -105°C. (a)rigid state, (b)3-site jump model, (c)observed.

(2)大振幅の運動

高温では側鎖に沿って各C-C結合まわりの内部回転が高速になり側鎖全体が運動をしている。特に側鎖末端では多重の内部回転によってかなり複雑な運動をしていると考えられる。しかし運動が速く観測されるスペクトルは平均化されているため、単純な3-site jumpモデルを用いてこれらのスペクトルを再現することが可能である。回転軸とC-²H軸とのなす角は多重内部回転運動によるC-²H軸の平均振れ角を意味する。 κ 、 ζ 位の110°Cと60°Cのスペクトルに対する結果をFig.4に示す。高温での線形が良く再現されている。ここでjump rate、回転軸とC-²H軸とのなす角にはガウス分布を仮定した。角度に関するパラメータはTable 1に示した。 γ 位に関しては内部回転運動はC_β-C_γ軸かC_α-C_β軸まわりしか考えられないため、それぞれの軸まわりにT、G⁺、G⁻の三つのサイトを仮定し、存在比を考慮した3-site jumpモデルを用いて計算を行った。その結果高温ではC_α-C_β軸まわりから高速の3-site jump運動を行っていることが分かった。詳細はポスターに発表する。

各試料の T_1 の温度依存性をFig.5に示す。低温ではいずれの T_1 も数百msのオーダーであり、温度上昇に伴い徐々に減少していく。室温近くから著しく減少し始め、いずれも約110°Cで最小値をとる。最小値から求めた運動の相関時間は110°Cで5nsである。スペクトルの温度依存性を考え合わせると、 T_1 には低温ではlibration様の運動が、高温では側鎖全体を含む大振幅の運動がそれぞれ支配的であると考えられる。libration様運動の速さを見積もるため、線形シミュレーションで得られたパラメータを使い、2-site jump、3-site jump及びコーン内でのdiffusionの三つ

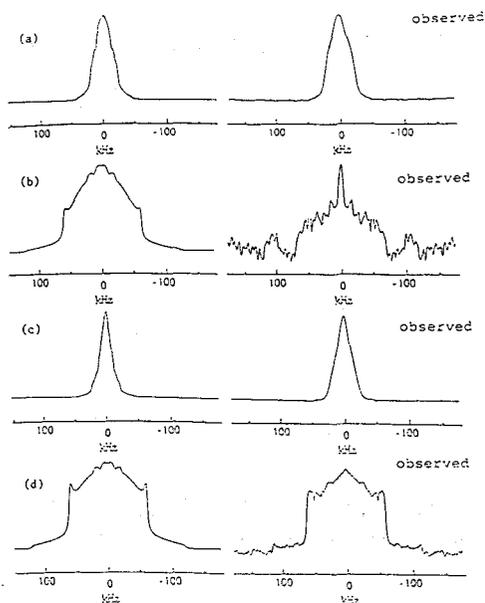


Fig. 4 Simulated spectra for (a) κd_1 at 110°C, (b) κd_1 at 60°C, (c) ζd_2 at 110°C, (d) ζd_2 at 60°C.

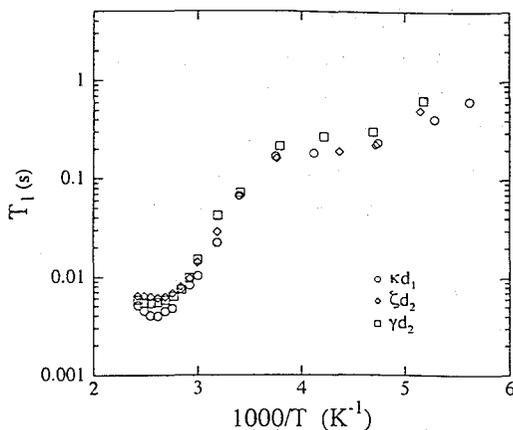


Fig. 5 Temperature dependence of T_1 .

Table 1 Simulation parameters for the motional model at higher temperatures.

temp(°C)	PBLG- κd_1		PBLG- ζd_2	
	$\langle\theta\rangle$ (deg)	α (deg)	$\langle\theta\rangle$ (deg)	α (deg)
110	46.5	3.8	49.0	3.8
60	37.5	13.0	37.5	13.0
56	37.5	13.0	37.5	13.0
54	37.5	13.0	37.5	13.0

のモデルそれぞれに対して計算したところ、いずれのモデルでもほぼ同じ運動の相関時間 10^{-11} s が得られた。

以上の結果から PBLG 側鎖には少なくとも二つのモードの運動が存在していることが分かった。小振幅で高速の libration と、C-C 結合軸まわりの内部回転に起因する側鎖全体を含む大振幅の運動である。高温での大振幅の運動の影響はそれぞれの部位のスペクトルや T_1 の温度依存性にも現れており、側鎖が γ 位から運動していることを示している。固体重水素 NMR の線形と T_1 の結果をこのような手法を用いて解析することにより、ある程度鎖の長いものでも運動の速さやモードを詳細に調べることが可能であることが分かった。ここで得られたパラメータの値は当然側鎖の周囲の環境を反映しているものであり、今後さらに複雑な系への応用が期待される。

1) K. Matsuo *et al.*, Rept Prog. Polym. Phys. Jpn, 32, 495(1989)

2) M.S. Greenfield *et al.*, J. Magn. Reson., 72, 89(1987)

P49

^1H PGSE NMR・ ^{13}C PST/MAS NMR法を用いた
高分子ゲル中の網目高分子および溶媒の構造と分子運動の研究

(東工大 工) ○安永秀計・黒子弘道・安藤 勲

Structure and Dynamics of Network Polymer and Solvent in
Crosslinked Polymer Gel as Studied by ^1H PGSE NMR and
 ^{13}C PST/MAS NMR

Hidekazu Yasunaga, Hiromichi Kurosu and Isao Ando

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology)

^1H NMR measurements on relaxation times (^1H T_1 and ^1H T_2) and self-diffusion coefficient ($D_{\text{H}_2\text{O}}$) of water and ^{13}C NMR measurements on T_1 of network polymer in the poly(methacrylic acid) (PMAA) gel were carried out to understand the change in molecular motion as a function of the degree of swelling and the degree of crosslinking of the gel. From experimental results, it was found that the molecular motion of water molecules and the network polymer in the PMAA gel decrease with decreasing the degree of swelling, and that an increase in the degree of crosslinking in the gel leads to an increase of the restraint for the molecular motion of the water and the network polymer even when the water content in the gel is constant.

1) 高分子ゲルの局所的な構造及び運動とゲルの物性との関係を明らかにすることは非常に重要である。そのような分子の構造や運動を調べるのにNMR法は非常に有用な手法であり、ゲルの解析に用いることにより新たな知見が得られると考えられる。本研究では、様々なNMR法を用いて、橋かけ密度と高分子ゲルの構造と運動との関係を明らかにすることを目的としている。今回は、橋かけ度の異なるポリメタクリル酸(PMAA)ゲル中の水の自己拡散係数($D_{\text{H}_2\text{O}}$)を磁場勾配スピンエコー(PGSE)法により求め¹⁾、またPMAAゲル中の水のスピン-格子緩和時間(T_1)・スピン-スピン緩和時間(T_2)を反転回復(IR)法・Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)法で測定し¹⁾、橋かけ密度と水の分子運動の関係を調べた。さらに、固体高分解能NMR法の一つである ^{13}C パルス飽和移動/マジック角回転(PST/MAS)NMR法を用いて、橋かけ度の異なるPMAAゲルの網目高分子の運動を調べた²⁾ので報告する。

高分子ゲル・磁場勾配スピンエコー法・パルス飽和移動/マジック角回転法・橋かけ

やすなが ひでかず・くろす ひろみち・あんどう いさお

2) メタクリル酸 (MAA) を N,N' -メチレンビスアクリルアミド (MBAA) を橋かけ剤、過硫酸カリウムを開始剤としてラジカル重合させ、洗浄ののち純水で平衡膨潤させて PMAAゲルを合成した。このとき MBAA の仕込み比 ($F = (\text{MBAAの物質の量}) / (\text{MAAの物質の量}) \times 100$ / mol%) を調整して、橋かけ度を変化させた。

ゲル中の水の T_1 と T_2 は GSX500 NMR 分光器 (500 MHz、日本電子製) を用いて測定し、拡散係数は試作した高磁場勾配発生装置を接続した GSX270 NMR 分光器 (270 MHz、日本電子製) を用い、300 K で磁場勾配強度を $3.8\text{-}5.9 \text{ Tm}^{-1}$ として測定した。固体高分解能 NMR スペクトルは、 O -リング付ローターに詰めた PMAAゲルを GSX270 NMR 装置 (日本電子製、67.8 MHz (^{13}C)) を用い、 ^{13}C PST/MAS NMR 法で測定して得た。ゲル中の高分子網目のスピン-格子緩和時間 (^{13}C T_1) は PST/MAS 法を併用した IR 法で測定した。

3) 橋かけ度の違いによって膨潤度 q ($q = \text{ゲルの膨潤質量} / \text{ゲルの乾燥質量}$) が $3.4\text{-}105.8$ となっている PMAAゲル中の水の化学シフト値・ ^1H T_1 ・ ^1H T_2 ・ $D_{\text{H}_2\text{O}}$ をそれぞれ Table 1 に示す。水の化学シフト値は橋かけ度が増加して q が減少すると低磁場側にシフトする。この結果とクラスターを形成した水の化学シフト値は水素結合距離が減少するにつれて低磁場側にシフトするという計算結果³⁾から、橋かけ度の増加にともなう q の減少によってゲル中の水の水素結合距離が減少したことが示唆される。

また、水の ^1H T_1 と ^1H T_2 は q が減少するにつれて減少する。 ^1H T_1 と ^1H T_2 を $q^{1/3}$ に対してプロットした結果を Fig. 1 に示す。 ^1H T_1 と ^1H T_2 はともに $q^{1/3}$ が低下するにつれて直線的に減少する。この結果より、ゲル中の水は BPP 理論⁴⁾における極度先鋭化領域にあり、膨潤度の減少とともにゲル中の水の運動が束縛されることがわかった。さらに、 $D_{\text{H}_2\text{O}}$ を $q^{1/3}$ に

Table 1 Determined ^1H chemical shift value, ^1H T_1 , T_2 and $D_{\text{H}_2\text{O}}$ value of water in the PMAA gel as a function of the degree of swelling (q)

q	Chemical Shift / ppm	T_1 / s	T_2 / s	$D_{\text{H}_2\text{O}} / 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
3.4	4.48	0.09	0.006	1.37
3.6	4.56	0.93	0.010	1.37
4.7	4.48	1.03	0.020	1.53
21.7	4.27	2.06	0.191	1.90
59.4	4.16	3.29	0.577	2.16
105.8	4.16	3.78	1.095	2.19

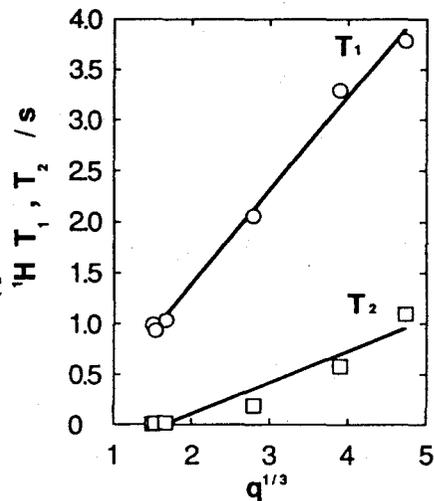


Fig. 1 Plots of ^1H T_1 and ^1H T_2 of water in PMAA gel against $q^{1/3}$ at 300 K.

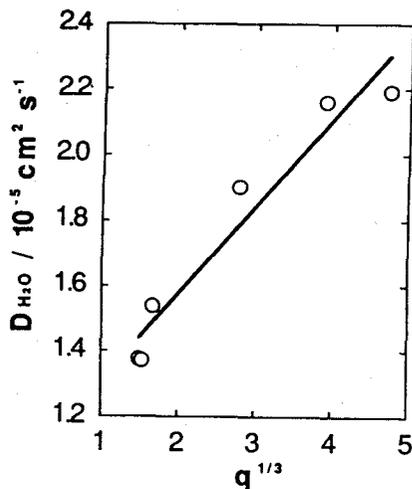


Fig. 2 Plots of self-diffusion coefficients of water ($D_{\text{H}_2\text{O}}$) in PMAA gel against $q^{1/3}$ at 300 K.

対してプロットしたものをFig. 2に示す。 D_{H_2O} も $q^{1/3}$ が減少するにつれて直線的に減少する。したがって、ゲルの膨潤度が減少するにつれてゲル中の水分子の拡散運動も束縛されることがわかる。いま、Fig. 3に示すような一定質量(M_{dry})の網目高分子を含む、1辺の長さが r の立方体形をしたPMAAゲルを考えると、

$$r = Aq^{1/3} \quad (1)$$

$$A = (M_{dry} / \rho_{swollen})^{1/3} \quad (2)$$

M_{dry} : ゲル中の網目高分子の質量

$\rho_{swollen}$: ゲルの密度

なる関係がある¹⁾。Aは膨潤度の変化に対してほぼ一定で、 r と $q^{1/3}$ が比例関係にあることから、 ${}^1H\ T_1 \cdot {}^1H\ T_2 \cdot D_{H_2O}$ と r に直線関係があることがわかる。 r は網目高分子間の距離と相関をもつので、橋かけ度の増大にともなう網目高分子間距離の減少によってゲル中の水の運動が束縛されることが明らかになった。

一方、PMAAゲルの膨潤度($q=3.4$)を一定にして橋かけ度(F)のみを変化させた場合は、Fig. 4に示すようにゲル中の水の D_{H_2O} はFの増加とともに減少する。このとき、 $0 \leq F \leq 0.31$ の範囲では D_{H_2O} が急激に減少するのに対して、 $0.31 \leq F \leq 2.0$ の範囲では勾配がなだらかになる。ゲル中に含まれた水の量は一定で、高分子網目中のPMAA鎖の密度も一定であることから、このような変化はゲル中に存在する水(結合水・中間水・バルク水など)の組成の変化では説明できない。そこで水の自己拡散係数の変化は網目高分子の運動に影響を受けているのではないかと考えられる。

そこで、PMAAゲル中の網目高分子について固体高分解能NMRを用いて調べた。膨潤度の異なるPMAAゲルの化学シフト値をTable 2に示す。各 q に対して化学シフト値は一定で、 q の変化にともなう特定の構造変化は化学シフト値からは観測されない。側鎖のカル

Network polymer

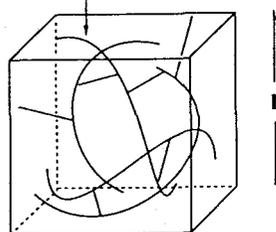


Fig. 3 Schematic illustration of a cubic volume of PMAA gel containing water and a constant amount of network polymer.

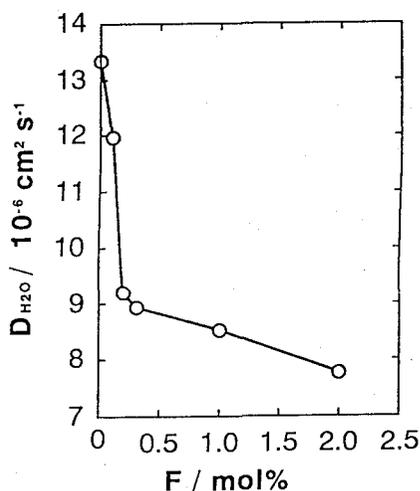


Fig. 4 Plots of D_{H_2O} of water in PMAA gel against F value at 300 K.

Table 2 ${}^{13}C$ NMR chemical shift of PMAA gel as a function of the degree of swelling (q) at 300 K

q	${}^{13}C$ chemical shift / ppm							
	C=O(rr)	C=O(mr)	C=O(mm)	CH ₂	$\overset{\ominus}{C}$	CH ₂ (mm)	CH ₂ (mr)	CH ₃ (rr)
105.8	182.4			54.7	45.3			18.3
59.4	182.9			54.6	45.9			17.4
21.7	182.8			54.6	45.9	22.2	19.3	17.9
4.7	182.9			54.1	45.7	21.7	19.2	17.8
3.7	182.7	181.8		54.2	45.8	22.2	19.5	17.9
3.4	182.5	181.5	180.8	54.6	46.0	22.3	19.8	18.2

ボキシル基 (C=O) と α -メチル基 (CH₃) は立体規則性にに基づき3本のシグナルを与える。その面積比からゲル中の高分子網目の立体規則性は、トリアッドタクティシティーで

rr : mr : mm = 67.4 : 27.1 : 5.5 % と求められる。次に、得られたC=O・4級炭素 (-C-)・CH₃の¹³C T₁を10/qに対してプロットした結果をFig. 5に示す。側鎖のC=OとCH₃の¹³C T₁はqの増加とともに増大し、主鎖の-C-のT₁は減少する。qの増加は分子運動を高めることになり、これは相関時間が減少することに相当する。そこでBPP理論にしたがえば、側鎖のC=OとCH₃は極度先鋭化条件をみたす領域にあり、主鎖の-C-は運動の遅い領域にあると考えられる。したがって、ゲル中の高分子網目において側鎖は主鎖よりも運動性が高いことが明らかとなった。ゲル中の網目高分子において、主鎖は橋かけによってつなぎとめられることによってその運動が束縛されているといえる。また、側鎖のC=OとCH₃では膨潤度の変化に対する運動の変化の仕方が異なることがわかる。

さらに、PMAAゲルの膨潤度 (q=3.4) を一定にして橋かけ度 (F)のみを変化させた場合の網目高分子の¹³C T₁を、Fに対してプロットした結果をFig. 6に示す。-C-はFの増加とともに増加し、C=O(rr)とC=O(mr)は一旦減少したあとで増加する。これとFig. 5の結果より、ゲルの含水量が一定でも橋かけ度の増加とともに主鎖の運動は束縛されるといえる。これがゲル中の水の運動にも影響を及ぼしていることが示唆される。また、C=O(rr)とC=O(mr)のT₁はFが0.31 mol%で極小となり、ここで緩和の効率が最大になることがわかる。

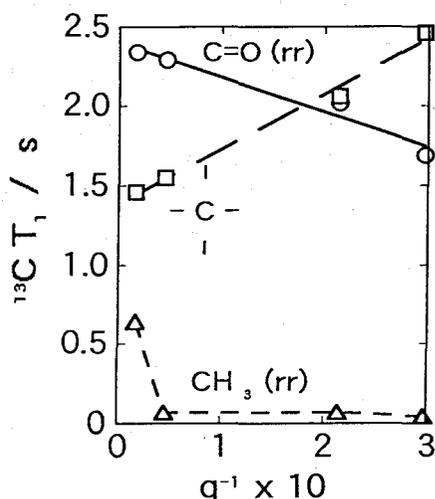


Fig. 5 Plots of ¹³C T₁ for the triad carboxyl [C=O(rr)], α -methyl [CH₃ (rr)] and quaternary (-C-) carbons of PMAA in the gel against 10/q at 300 K.

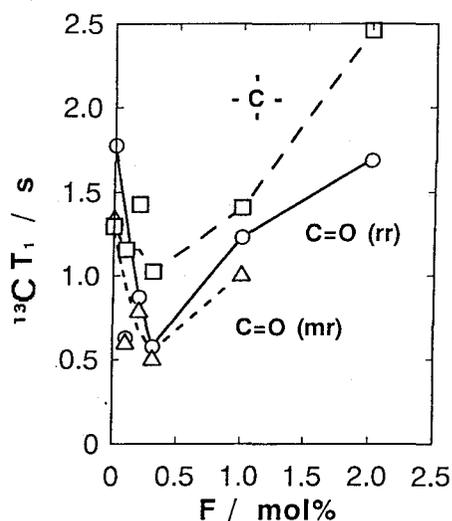


Fig. 6 Plots of ¹³C T₁ for the triad carboxyl [C=O(rr) and C=O(mr)] and the quaternary (-C-) carbons of PMAA in the gel against F at 300 K.

- 1) H. Yasunaga and I. Ando, *Polymer Gels and Networks*, 1, 83 (1993).
- 2) H. Yasunaga and I. Ando, *J. Mol. Structure*, (1993) in press.
- 3) H. Yasunaga and I. Ando, *J. Mol. Structure*, (1993) in press.
- 4) N. Bloembergen, E. M. Purcell and R. V. Pound, *Phys. Rev.*, 73, 679 (1948).

(北大工)[○]石井文明・金井輝人・堤耀広、(三菱油化)岸本 学・瀬尾 巖

¹³C Nuclear Relaxation in the Alternative Copolymer of Vinylidene Cyanide and Vinylacetate I. Estimation of Ferroelectric Domain

Fumiaki Ishii, Teruto Kanai, Akihiro Tsutsumi,
Manabu Kishimoto* and Iwao Seo*

Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido
Univeristy and * Advanced Material Laboratory, Petrochemical
Co.Ltd., Amimachi, Inashikigun Ibaragi.

¹³C-¹H cross polarization spectra of -CH₃, >C<, >CH₂, >CH-, >CO and -CN were measured as a function of contact time t_c transferring ¹H magnetization to ¹³C spin systems. The intensity of ¹³C spectrum, ¹³C magnetization against t_c was analyzed from a cross relaxation theory which the relaxation of ¹H spin system depends on a ferroelectric polarization fluctuation in the remarkable structure domain. The size of the domain was estimated by fitting the theoretical results and the experimental data. The average size of the domain was 14.3Å. This value agreed well with the value of domain size, 13.2Å, which 12 monomers obtained from the dielectric relaxation strength near T_g put in two-dimensional order

§1. はじめに

ビニリデンシアナイト(VDCN)とビニルアセテート(VAc)の交互重合体[P(VDCN/VAc)]は大きな圧電性を示し、強誘電的クラスであると報告された¹⁾。この強誘電性の発現は大きな電気双極子を持つ側鎖CN基の秩序性と関係していると思われるが未解決である。我々は以前²⁾、P(VDCN/VAc)の一軸延伸熱処理フィルムについて¹H NMRスペクトルの測定を行い、その¹H NMR 2次元能率の延伸方向と磁場との交角に対するNMR解析から、主鎖は延伸方向に僅かに配向し、側鎖のアセチル基やCN基は延伸軸に垂直に、2次元的に良く配向した高次構造がフィルム内に存在する事を明らかにした。今回は、この無配向試料の¹H-¹³C交差分極による¹³Cスペクトルを測定し、その強度と¹H-¹³C接触時間 t_cの関係を空間的分極ゆらぎに基づくスピンドル拡散理論から考察し、分子鎖の高次構造“ドメイン”の知見を得る事が目的である。

VDCN/VAc共重合体, ¹³C NMR交差分極, 接触時間, 強誘電的“ドメイン”, スピンドル拡散, “ドメインサイズ”

[○]イイ フミキ カイ テルト ツミ アキヒロ キシモト モリヲ セオ イワオ

*石井 文明, 金井 輝人, 堤 耀広, 岸本 学, 瀬尾 巖

§2. 実験方法

試料: 用いた試料はP(VDCN/VAc)のN,N-ジメチルホルムアミド(DMA)溶液からDMAを80°Cで24時間かけて蒸発させフィルムを作成し、メタノールで溶媒置換後、減圧乾燥した厚さ60μmのキャストフィルムである。

NMR測定: 用いた装置はBruker社製、MSL-200型固体高分解能FTNMR分光計で、測定周波数は50MHzである。各官能基のNMRスペクトルはCP/MAS法で測定され、回転系のスピンの格子緩和時間 $T_{1\rho}$ と交差緩和時間 T_{CH} はスペクトル強度のCP接触時間変化から算出された。MASの回転数は3.5KHzで、測定温度域は20°C~110°Cである。

§3. 結果

Figure 1は20°Cに於けるP(VDCN/VAc)の ^{13}C NMRスペクトルである。横軸はグリシンを基準とした共鳴周波数のppm表示である。P(VDCN/VAc)の官能基のスペクトルはJora³⁾によって帰属されており、21 ppm, 32 ppm, 42 ppm, 66 ppmと171 ppmでの良く分離したスペクトルはそれぞれ $-CH_3$, $>C<$, $>CH_2$, $>CH-$ と $>C=O$ の基に、116 ppmのブロードなスペクトルはサイトラングを伴った $>CN$ 基に依っている。

Figure 2は20°Cにおける各基の ^{13}C NMRスペクトル強度(磁化)と接触時間 t_c の関係である。各基の磁化は接触時間が t_m でピークに達し、その後減少している。 $-CH_3$, $>C<$, $>CH_2$ と $>CH-$ の各基の t_m は2msecで、 $>C=O$ 基や $>CN$ 基の t_m は1msecである。

§4. 考察

交差緩和と無定形強誘電的ドメイン:

核スピンの間相互作用が強い 1H スピンの系から ^{13}C スピンの系への交差分極時、両系はそれぞれ格子系と相互作用し、 $T_{1\rho H}$ と $T_{1\rho C}$ の緩和時間で熱平衡になり、また ^{13}C 系は 1H 系より冷たいので交差緩和時間 T_{CH} で 1H 系と相互作用している。

一般に、 $T_{CH} < T_{1\rho H} \ll T_{1\rho C}$ 故、 ^{13}C 核磁化と接触時間 t_c との関係は

$$M(t) = M(0) \{ \exp(-t/T_{1\rho H}) - \exp(-t/T_{CH}) \} \quad (1)$$

で表される。 $M(t)$ は主に $1/T_{CH}$ の速さで増加し t_m で最大となり、その後 $1/T_{1\rho H}$ で減少

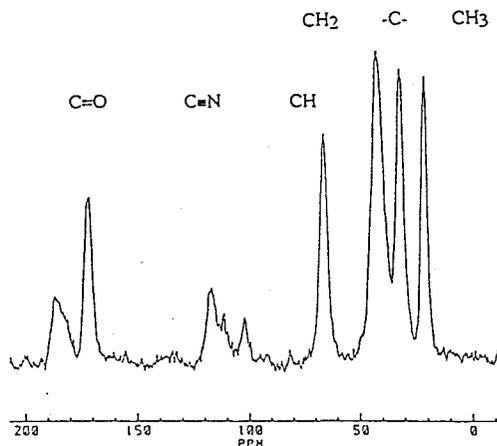


Figure 1. CP/MAS ^{13}C NMR spectrum of P(VDCN/VAc) obtained at 20°C.

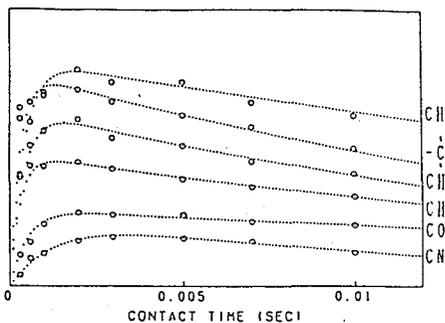


Figure 2. Plots of peak intensities as a function of CP contact time for P(VDCN/VAc) at 20°C.

する。これはM(t)が核間相互作用の強い¹Hスピンの系の局所場揺らぎに強く依存していることを意味している。

いま、我々はP(VDCN/VAc)フィルム内で側鎖CN基電気双極子¹Hの2次元的高次構造が強誘電的ドメインを形成し、更に¹H磁化の非一様な空間分布が分極の空間揺らぎで生じ、その局所的¹Hスピンの緩和中心として作用しているドメインとスピンの拡散によって相互作用していると仮定する。この¹H核スピンのからの¹³C核の交差磁化は

$$dM(r,t)/dt = D\nabla^2 M(r,t) - M(r,t)/T1\rho_H(r), \quad (2)$$

で緩和する。ここで、M(r,t)は時刻tに於けるサイトrの局所磁化密度、1/T1\rho_H(r)はサイトrの¹Hスピンの緩和速度、Dはスピンの拡散常数である。

M(r,t=0)|_{r<L} = 1とdM(r,t)/dt|_{r=0, L=0} = 0の初期条件や境界条件を用いると、(2)のM(r,t)は

$$M(r,t) = M(t) + M(r,t)_S, \quad (3)$$

で与えられる。

第一項はスピンの拡散がない時の磁化で、

$$M(t) = M_{q=0}(0)\exp(-t/T1\rho_H), \quad (4)$$

第二項はスピンの拡散による局所磁化で、

$$M(r,t)_S = (1/V)\sum\{\delta A(-q)/Dq^2\}Mq(t=0)\{\exp(-t/T1\rho_H,q) - \exp(-t/T1\rho_H,q=0)\} \quad (5)$$

で与えられる。ここで、

$$\begin{aligned} M(r,t=0) &= \sum Mq(t=0)\exp(iqr), \quad \delta A(q) = \int \delta A(r)\exp(-iqr)dr, \\ 1/T1\rho_H,q &= 1/V \int dr A(r) + Dq^2 + 1/V^2 \sum q' = q \{ \delta A(q', -q)/D(q^2 - q'^2) \} \end{aligned} \quad (6)$$

とした。

M(r,t)や\delta A(r)が大きさLのドメイン内で空間的に対称:

$$M(r,t) = M_{n=0} + \sum_{n=1} M_n \cos 2\pi rL, \quad \delta A(r) = \sum_{n=1} \delta A_n \cos 2\pi rL$$

とし、更に M(r) = \exp[-\{r/(L/2 - \Delta)\}^2], L/2 - \Delta \le \Delta, のガウス分布をし、\delta A(r)が-L/2からL/2で連続的に変化しているとすると、(3)のM(r,t)は単純に

$$M(r,t) = M(0)\exp(-t/T1\rho_H)[1 + \beta\{1 - \exp(-\alpha t)\} + \gamma\{1 - \exp(-4\alpha t)\}] \quad (7)$$

と表わされる⁴⁾。ここで、\alpha = (2\pi/L)^2(D \cdot T1\rho_H),

$$\beta = -(\delta A_1 L^2 / 4\pi^2 D)(M_1/M_0),$$

$$\gamma = -(\delta A_2 L^2 / 16\pi^2 D)(M_2/M_0) \quad (8)$$

である。スピンの拡散常数Dは最近接分子鎖間の距離を"a"とすると

$$D \cong 0.13a^2/T1\rho_H \quad (9)$$

で与えられる。それ故、¹H-¹³C交差分極における¹³C磁化M(t)の緩和は

$$\begin{aligned} M(t) &= M(0)[\exp(-t/T1\rho_H)[1 + \beta\{1 - \exp(-\alpha t)\} \\ &\quad + \gamma\{1 - \exp(-4\alpha t)\}] - \exp(-tc/T_{CH})] \end{aligned} \quad (10)$$

で与えられる。

強誘電的ドメインサイズの評価: Figure 2に示されている接触時間に対する各官能基のスペクトル強度の点線は(10)を実測値に最適化した理論曲線で、それらは各官能基の実測値とそれぞれ非常に良く一致している。(10)の β と γ の最適値はそれぞれ各官能基によらず $\beta = 2$, $\gamma = 0.5$ であり、 α , $T1\rho_H$ と T_{CH} の値はTable 1に示されている。(8)と(9)とを用い、 $a=5A$ と官能基の α 値から計算されたP(VDCN/VAc)フィルムの強誘電的ドメインサイズ L の値がTable1に示されている。 $-CH_3$, $>CH_2$ と $>CH-$ 基は直接的に 1H と ^{13}C とが結合しているので、これらの交差緩和にスピン拡散挙動は正確に反映される。それ故、これらのデータから見積もった L の平均値は14.3 Aであった。

一方、古川ら⁵⁾はガラス転移温度近傍で誘電緩和強度の異常増加が12Eマ-双極子の協同運動によっていることを明らかにした。この12Eマ-の側鎖が体積が円筒的に2次元配列し、強誘電的ドメインを形成していると仮定すると、そのドメインサイズ L は密度 11.2 g/ccとマ-の分子量 164g/molから、13.2 Aと評価される。この値はNMR実験からの14.3Aと良く一致している。

Table 1. Domain sizes and best-fitting values of α , $T1\rho_H$ and T_{CH} , which were obtained from comparison between theory and experimental for $>C=O$, $-CN$, $>CH-$, $>CH_2$, $>C<$ and $-CH_3$ groups.

	$>C=O$	$-CN$	$>CH-$	$>CH_2$	$>C<$	$-CH_3$.
α	0.1	0.3	0.4	0.8	0.7	0.9
$T1\rho_H$ (ms)	44	14	25	20	20	33
T_{CH} (ms)	0.5	1.3	0.3	0.3	0.4	0.43
L (A)	36	21	18	13	14	12

References

- 1) T.T.Wang and Y.Takase; J. Appl.Phys.,62,3466(1987).
- 2) T.Kanai, T.Furuse,F.Ishii,M.Kisimoto and I.Seo; Rep.Progr. Polym. Phys., 35,493(1992).
- 3) Y.S.Jo,Y.Inoue,R.Chujo,K.Sato and S.Miyata; Macromolecules,18,1850(1990).
- 4) T.T. Cheung; J.Chem.Phys.,76,1248(1982).
- 5) T. Furukawa, M. Tada, K. Nakajima, I. Seo; J. Appl. Phys.,27.200(1988).

○浅野敦志、竹腰清乃理、引地邦男
北大 理 生物科学 高分子機能学教室

Spin Diffusion in Polymer Blends

Atsushi Asano, K. Takegoshi, Kunio Hikichi
Division of Biological Sciences, Hokkaido University

Spin diffusion process via the ^1H dipole-dipole interaction homogenizes the heterogeneous magnetization. Therefore, homogeneous polymer blends can be described by a single spin temperature.

The $T_{1\rho\text{H}}$ decay curves of polystyrene (PS) and poly(vinyl methyl ether) (PVME) in the PS/PVME blend including 50wt% PS are a single-exponential at lower temperature. At 38°C , however, the $T_{1\rho\text{H}}$ decay curves are observed to be multi-exponential. This is due to suppression of the inter-polymer spin diffusion which is caused by the molecular motion of PVME. Furthermore, the decay curves obtained by the phase-separated blend are also multi-exponential. This is ascribed to nonexistence of spin diffusion between the phase-separated domains.

ポリスチレン (PS) とポリビニルメチルエーテル (PVME) のブレンドの回転系における ^1H スピン-格子緩和 ($T_{1\rho\text{H}}$) は、ガラス転移点以下の低温では単一の指数関数曲線となる。ところが 38°C では複数の指数関数で減衰する曲線として観測される。この減衰曲線を図1に自然対数プロットした。○はPS、△はPVMEのメトキシ基 (OCH_3)、そして×はPVMEのメチン基 (CH) より得られた実測の緩和曲線を示す。ここで注目したいのは、 38°C では純粋なPVME内においても OCH_3 と CH の $T_{1\rho\text{H}}$ は一致していないということである。これはPVME内のスピン拡散が効果的に働いていないことを示す。これらのことから T_g 以上では分子運動によって

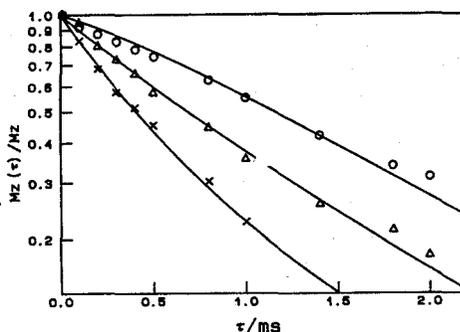


Figure 1. $T_{1\rho\text{H}}$ decay curves of PS/PVME blend (50wt%/50wt%) at 38°C .

キーワード： スピン拡散、PS/PVME、 ^1H スピン-格子緩和時間

○あさの あつし、 たけごし きよのり、 ひきち くにお

PSとPVME間のスピン拡散の速度が遅くなっているものと考えられる。

このことを定量的に議論するために、スピン系を3つに分けて考えてみる。PSの ^1H 、PVMEの側鎖である OCH_3 の ^1H 、そしてPVMEの主鎖の ^1H の3種類である。3つのスピン間の交差緩和速度を見積もることで、スピン拡散が効果的に働いているかどうかを知ることができる。3種類の ^1H は図2に示されるようにスピン拡散(交差緩和)を通して磁化を交換する。このスピン系における磁化の微分方程式は次式の様に書ける。

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_A \\ M_B \\ M_C \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\xi_1 & f_A k_{AB} & f_A k_{CA} \\ f_B k_{AB} & -\xi_2 & f_B k_{BC} \\ f_C k_{CA} & f_C k_{BC} & -\xi_3 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_A \\ M_B \\ M_C \end{pmatrix}$$

ここで、 $\xi_1 = K_A + f_B k_{AB} + f_C k_{CA}$ 、 $\xi_2 = K_B + f_A k_{AB} + f_C k_{BC}$ 、 $\xi_3 = K_C + f_A k_{CA} + f_B k_{BC}$ であり、 M_i はそれぞれの磁化を表わし、 $i=A, B, C$ は順にPS、PVMEの側鎖 OCH_3 、PVMEの主鎖である。 f_i は ^1H のモル分率、 K_i は真の緩和時間を表わす。 k_{ij} は*i*番目と*j*番目のスピン間の交差緩和速度を表わす。初期条件として平衡磁化を $M_A^0 : M_B^0 : M_C^0 = f_A : f_B : f_C$ とおき、数値解析することにより上式から磁化の時間変化を得ることができる。図1の実線はパラメーター K_A 、 K_B 、 K_C 、 k_{AB} 、 k_{CA} 、 k_{BC} を変えて実測を一番良く再現した値を用いて描いている。それらの値は $K_A=0.40 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$ 、 $K_B=1.06 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$ 、 $K_C=1.85 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$ 、 $k_{AB}=1.0 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$ 、 $k_{CA}=1.1 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$ 、 $k_{BC} \leq 100 \text{sec}^{-1}$ である。

シミュレーションから得られた真の緩和速度はブレンド中のPSとPVMEの初期緩和速度と良い一致を示す。交差緩和速度 k_{AB} と k_{CA} は k_{BC} よりも1桁以上速いが、これはPVME内のスピン拡散よりもPSとPVMEとのポリマー間のスピン拡散の方がより効果的に働いていることを示している。PVME内では OCH_3 の内部回転により ^1H 双極子相互作用が平均化されているものと考えられる。

緩和時間の違うポリマーA、Bを混合したとき、得られる緩和時間が平均化されてある1つの値を持つためにはシミュレーションしてみるとポリマー間の交差緩和速度がスピン系の中で一番速い緩和速度よりも10-100倍速くなければならないことがわかる。PS/PVMEブレンドの $T_{1\rho\text{H}}$ の場合 $2 \times 10^4 \text{sec}^{-1}$ よりも速く交差緩和が起こらないと緩和時間が平均化されない。逆に交差緩和速度がスピン系の中で一番遅い緩和速度よりも4-10倍遅いと、ブレンドから得られる緩和時間はブレンドする前と変わらない値として観測される。

相分離させたPS/PVMEブレンドの緩和曲線の解析についてもポスター発表時に触れる。

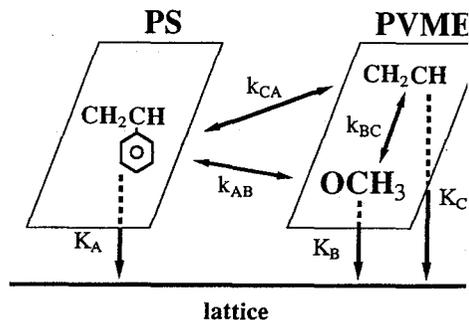


Figure 2. A model of three ^1H spin system for relaxation process for PS/PVME blends.

P52

^{13}C NMR 化学シフトに対する重水素同位体効果の

炭素-水素結合距離への依存性

名工大応化, メニコン R&D* ○中島康喜*, 鈴木利弥, 寺西卓, 高橋憲助

Dependencies of Deuterium Isotope Shifts in ^{13}C NMR on C-H Bond Lengths

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology,

and *Menicon Co., Ltd. R&D Division

* Yasuki Nakashima, Toshiya Suzuki, Takashi Teranishi, and Kensuke Takahashi

One-bond deuterium isotope effects on ^{13}C NMR chemical shifts ($^1\Delta$) for a number of organic compounds are investigated in terms of C-H bond lengths. All $^1\Delta$ investigated linearly correlate with the related C-H bond lengths. The correlated straight lines are obtained for each hybridization of the observed carbons. In general, $^1\Delta$ are expressed as a simple function of C-H bond lengths.

〈序論〉

分子中の原子をその同位体で置換すると、その近傍の原子核の NMR 化学シフトが小さく変化する。この現象を同位体シフトと呼び、古くから知られているが、過去のデータは精度に問題のあることが少なくない。我々は、 ^{13}C NMR スペクトル上で観測される重水素同位体シフト ($^1\Delta$) を系統的に調べている¹⁾。これまでに、多くの有機化合物で $^1\Delta$ を精密に測定した。多くの $^1\Delta$ を、対応する C-H 結合距離とプロットしたところ、観測炭素の混成状態ごとに、それぞれ C-H 結合距離 (r_{CH}) と $^1\Delta$ は直線相関を示すことがわかった。これらは、炭素-水素結合の非調和伸縮振動に基づくモデルによって全て説明できた。

キーワード: ^{13}C NMR、重水素同位体効果、C-H 結合距離

○なかしまやすき、すずきとしや、てらにしたかし、たかはしけんすけ

〈実験〉

バリアン Gemini-200 FT-NMR 分光計 (50.3 MHz) を用い、水素体と重水素体の混合物を試料として、 ^{13}C NMR スペクトルを得て、 $^1\Delta$ を測定した。測定精度は、0.005 ppm (5 ppb) よりも良い。 $^1\Delta$ は、147.8 - 472.2 ppb の高磁場シフトであった。 ^{13}C NMR スペクトルの例を図 1 に示す。 r_{CH} は、気相 IR スペクトルで孤立 C-H 伸縮振動数を得て、Mckean らの示した経験式²⁾を用いて見積った。気相 IR スペクトルは、ヒューレットパッカード GC-IR システム (5890 II ガスクロマトグラフ+ 5965B FT-IR 検出器) で得た。

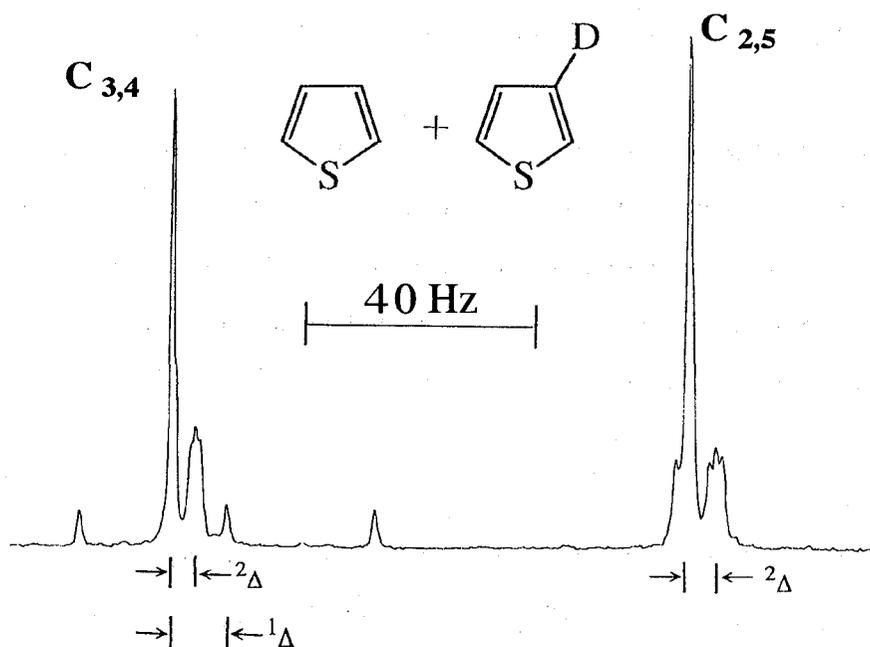


図 1. チオフェンとチオフェン-3-d の混合物の ^{13}C NMR スペクトル (芳香族領域の拡大, neat, 室温)。C-D カップリングとともに、ワンボンドシフト ($^1\Delta$) とツーボンドシフト ($^2\Delta$) が観測される。

〈結果・考察〉

得られた $^1\Delta$ と、対応する r_{CH} のプロットを図 2 に示す。炭素の混成状態ごとに、傾き正の直線相関が得られた。混成ごとに直線が得られたことは、C-H 結合の伸縮振動の非調和ポテンシャルカーブが、観測炭素の混成状態によって異なることを意味すると考えられる。

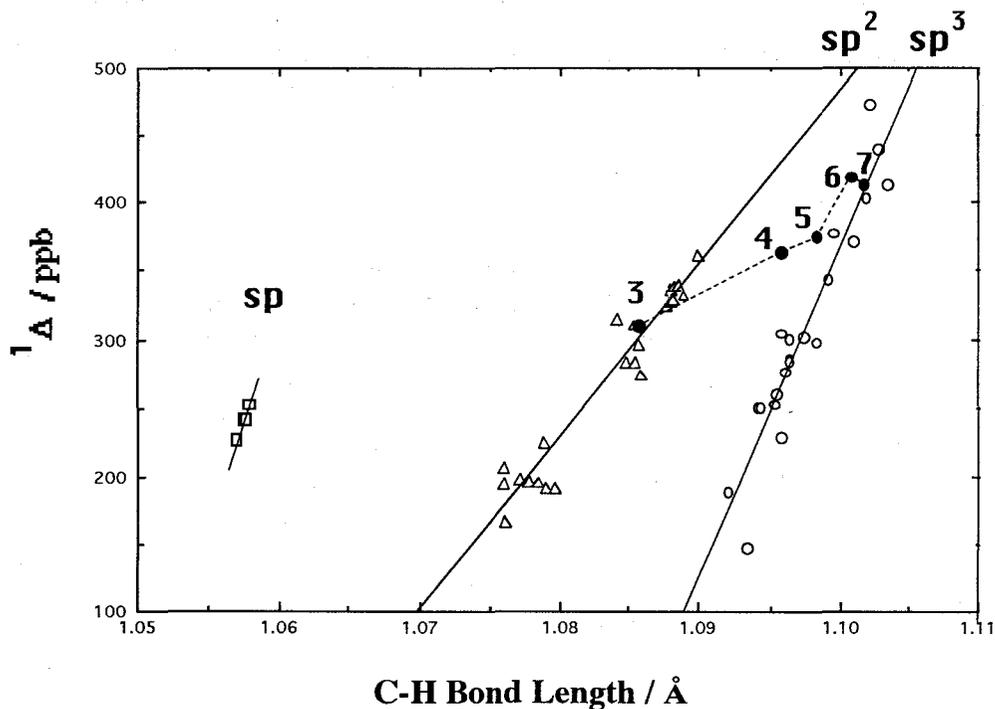


図2. r_{CH} と ${}^1\Delta$ の相関。 sp (\square), sp^2 (Δ), sp^3 (\circ)混成炭素それぞれで直線が得られる。シクロアルカン(●、数字は炭素数)は興味深い挙動を示す。

図2に●で示すように、シクロプロパンからシクロヘプタンのシクロアルカン類では、炭素数の増大に伴って、データは、 sp^2 混成炭素の相関直線から sp^3 混成炭素の相関直線へ近づいて行く。シクロプロパンのデータ(図2の3)は sp^2 混成炭素の相関直線にのる。シクロプロパンの炭素は、 sp^3 よりも、むしろ sp^2 混成の性格をもつといわれている。図2のデータも、それを示していると考えられる。

また、エタン(sp^3)、エチレン(sp^2)、アセチレン(sp)とそのフェニル置換体の系で、 ${}^1\Delta$ は ${}^1J_{CH}$ と直線関係を示すことが知られている³⁾。つまり、 ${}^1\Delta$ は炭素のS性と関係づけられる³⁾。これは、 ${}^1\Delta$ と r_{CH} との関係に置き換えて説明できる。また、メタンを

出発として、その水素をメチル基あるいはフェニル基で置換するときに観測される $^1\Delta$ は、置換基の数に比例して増大する。つまり、 $^1\Delta$ に対する置換基効果には単純加成則が成立する^{1,3)}。これらも、置換に伴う r_{CH} の増大の結果として $^1\Delta$ が増大することで説明できる(図3)。

	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{D}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{D}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{D}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{Me} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{D}-\text{C}-\text{Me} \\ \\ \text{Me} \end{array}$
$^1\Delta$ ³⁾	187.0	284.0	375.9	472.2
$\Delta^1\Delta$ ³⁾		97.0	91.9	96.3
C-H 結合距離 (r_{CH})	1.0921	1.0964	1.0995	1.1021
Δr_{CH}		0.0043	0.0031	0.0026

図3. $^1\Delta$ に対する置換基効果と、C-H 結合距離に対する置換基効果(メチル基)

すなわち、すべての $^1\Delta$ の変化は、 r_{CH} の変化と関係づけることができ、 $^1\Delta$ の変化は次のように説明できる。 r_{CH} の増大に伴って、C-H 伸縮振動に対する非調和性寄与が増大し、その結果、NMR タイムスケールにおける見かけの結合距離 $r_0(\text{C-H})$ と $r_0(\text{C-D})$ の差が大きくなる⁴⁾。その結果、H 体の化学シフトと D 体の化学シフトの間のより大きな差、すなわち $^1\Delta$ が観測される。 $^1\Delta$ は C-H 結合距離の単純な関数として、統一的に理解できるといえる。

(References)

- 1) Y. Nakashima *et al.*, Bull. Chem. Soc. Jpn., **62**, 1401 (1989),
 Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **63**, 2025 (1990), Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **64**, 3694 (1991),
 Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **64**, 3166 (1991), Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **65**, 2894 (1992),
 Y. Nakashima *et al.*, *ibid*, **66**, in press (1993).
- 2) D. C. Mckean *et al.*, J.Mol.Structure, **116**, 313 (1984).
- 3) J. R. Wesener *et al.*, J. Am. Chem. Soc., **107**, 7307 (1985).
- 4) C. J. Jameson, "Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences", Vol.2, Isotopic Applications in NMR Studies, E. Buncell and J. R. Jones eds., Elsevier, 1991, 1-55.

○横山幸弘、菊池 修
筑波大 化学系

Direct NMR Spectroscopic Studies of the Dianions from Alkali
Metal Reduction of Diphenylacetylene

○Yukihiro Yokoyama and Osamu Kikuchi
Department of Chemistry, University of Tsukuba

Three diamagnetic anions are generated by lithium reduction of diphenylacetylene and characterized by NMR spectroscopy and quenching experiments. Reduction with lithium for 3-5 hr yielded dimer dianion 1 produced from diphenylacetylene dimer anion radicals. Reduction for 10-15 hr yielded 1,2,3,4-tetraphenylbutadiene 2 and diphenylacetylene 3 dianions. Reduction for 2 days with lithium yielded diphenylacetylene dianion 3. Thus diphenylacetylene dianion can not be interpreted as the product of disproportionation reaction between the corresponding radical anions.

アセチレンジアニオンは、電子状態および構造の観点から興味ある分子種である。しかし、この化学種は未だ溶液中で調製、観測されていない。一方、そのモデル分子であるジフェニルアセチレンは、電子スペクトルにより研究されている。¹⁾ しかし、報告されているジフェニルアセチレンジアニオンの構造や生成機構には、幾つかの疑問があり、それらは未だ明らかではない。このことは、構造に関する情報の欠如にある。NMRは溶液中の有機イオン種の構造を調べる上で有効であるが、ジフェニルアセチレンジアニオンのNMR研究は、未だなされていない。そこで、我々は、このジアニオンの構造および生成機構をNMRによる直接観測により明らかにすることを試みた。

【実験】

出発物質は、市販のものを脱水、精製して用いた。アニオン試料は高真空、低温下で乾燥脱気したTHF- d_6 溶媒中、ジフェニルアセチレンを金属リチウムと接触させ、得られる暗赤色の溶液をろ過し、NMR試料管に密封した。反応時間は、数点変化させた。また0-6時間の低温下でNMR連続測定も行った。アニオンのクエンチ実験は、脱水脱気したエタノールを用いて行った。NMR測定は、JEOL-JNM-GXS400を用いておこなった。化学シフトは、アニオン試料では溶媒の高磁場ピーク (THF- d_6 : δ (1H)=1.750, δ (^{13}C)=25.40)、クエンチ生成物では、 $CDCl_3$ 中TMSを基準とした。

Keywords: NMR, Diphenylacetylene dianion, Alkali metal reduction

○よこやま ゆきひろ、きくち おさむ

[結果と考察]

Fig.1に得られたアニオン種 (1-3) のスペクトルを示した。またTable1にアニオン1-3およびスチルベンジアニオン4、ベンジルアニオン5の¹H化学シフト、シフトの重心G、およびベンゼン環1つ当たりの高磁場シフトΔ1、1電子収容するに必要なフェニル基の数Nを示した。クエンチ実験による結果は、アニオン1,3の主生成物はそれぞれcis,cis-テトラフェニルブタジエン、ジベンジルであった。アニオン2では、cis-,trans-1,2,3,4-テトラフェニル-2-ブテンがca.3:1で得られた。これらの結果から、アニオン1は

all-cisの構造を持つ4量体ジアニオンであり、アニオン2は2量体ジアニオンのcis-,cis-1,2,3,4-テトラフェニルブタジエンジアニオン、アニオン3はジフェニルアセチレンジアニオンであると考えられる。ジフェニルアセチレンジアニオンにおけるオルソ、メタ位は、非等価でありフェニル基が屈曲した構造を取ることが分かる。さらに、これらのアニオン種は1→3の順に生成することから、ジフェニルアセチレンジアニオンはジフェニルアセチレンラジカルアニオンの不均化反応により生成するのではないことが明らかとなった。

本研究にあたり、NMR分光装置の使用を許可して頂いた(株)ハリマ化成筑波研究所の近藤 寿博士と畑 憲明博士に深謝致します。

[参考文献]

[1] G. Levin et al., J. Am. Chem. Soc., 92, 2268 (1970)

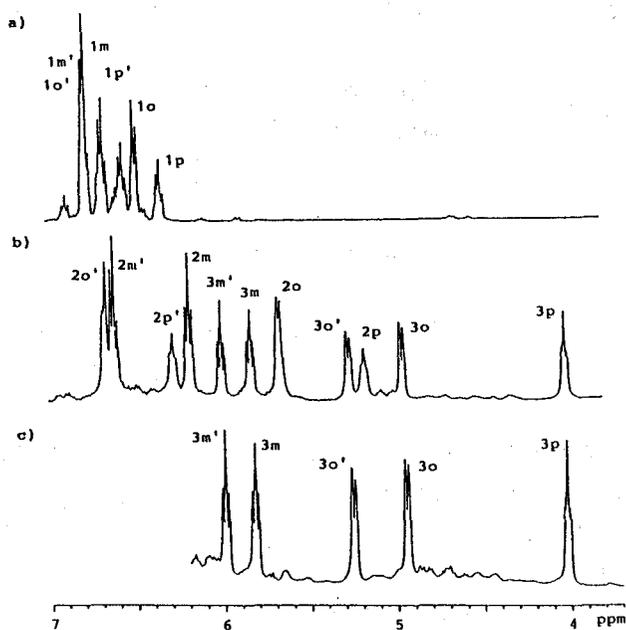


Fig.1 ¹H NMR spectra of anions 1-3.

Table 1. ¹H NMR Data of Related Carbanions in THF-d8

Compd	Chemical Shifts / ppm						
	ortho	meta	para	G	Δ0	Δ1	N
1	6.48	6.7	6.34	6.63	0.64	3.20	4
	6.8	6.7	6.56				
2	5.66	6.18	5.17	6.17	1.11	5.53	2
	6.66	6.61	6.27				
3	4.96	5.99	4.02	5.21	2.06	10.3	1
	5.26	5.82					
4	5.02	5.88	4.71	5.51	1.76	8.80	1
	5.73	6.21					
5	5.59	6.12	4.79	5.64	1.63	8.16	1

Structure Elucidation of C_2 Molecules from a Viewpoint of the Non-equivalency of Equivalent Nuclei in NMR (Part III). Discrimination of two $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ to equivalent protons by 1D ω_1 hetero half-filtered HH correlation.

Jun Kawabata and Eri Fukushi

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

In a C_2 symmetric molecule containing a CaHa--CbHb--Cb'Hb'--Ca'Ha' system as a structural fragment, discrimination of Ha/Cb and Ha'/Cb correlations was achieved by a 1D variant of the ω_1 hetero half-filtered HH correlation methods. This resolution-enhanced and time-saving 1D version was constructed by using an unprecedented PASS (paired satellite selection) technique. In some case, discrimination of intra- and inter-unit NOEs would be made by the same concept.

1. はじめに

C_2 対称分子は通常のNMRスペクトルにおいて等価なユニット2つ分のシグナルが重なって現れるため、構造決定においていくつかの問題が生じる。各ユニットを右手にたとえ C_2 対称分子を表すと(Fig.1)、それぞれの指(a,b)は、どちらの手のものか区別できない。このため例えば、通常のNOESYあるいはNOEDSスペクトルでH-aとH-bの間に観測されるNOEは

ユニット内のNOE(H-b'/H-a')(同じ手の人差指と親指)

ユニット間のNOE(H-b'/H-a)(一方の人差指と他方の親指)

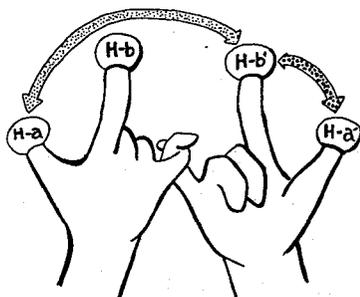


Fig.1. Inter-unit NOE or intra-unit NOE ?

の2つの可能性があり、通常的手法では区別はできない。しかし、これらの区別は私たちがこれまで行ってきた対称分子の構造解析の考え方¹⁾により、一方の手に ^{13}C を持たせることにより次のように可能となる。 ^{13}C の天然存在比は1.09%と低いことから、一組の等価なカーボンに着目して対称分子を以下

Keywords: C_2 symmetric molecule, isotopomeric asymmetry, equivalent nuclei, 1D ω_1 hetero half-filtered TOCSY, PASS, Intra-unit NOE, Inter-unit NOE.

かわばたじゅん、ふくしえり

の3つのアイソトポマーに分類する(Fig.2)と(A)両方が ^{12}C ...97.8%、(B)一方が ^{12}C もう一方が ^{13}C ...2.18%、(C)両方が ^{13}C ...0.01%となる。(A)は ^{13}C NMRで観測不能でありこれを除外すると残りの99.4%が(B)であり、 ^{13}C を含む測定法では非対称な(B)のみを観測していることになる。このとき ^{13}C に直結したプロトン(H-b)だけが百数十Hzの大きな $^1J_{\text{CH}}$ で分裂し、他と区別できる。さらにこの ^{13}C は2-3結合以内のプロトン(たとえばH-a)と遠隔カップリングしており、 ω_1 hetero half-filtered 相関法^{2,3)}の相関ピークから J 値を読むことが可能である⁴⁾。対称化合物の場合相関ピークには、H-b'/H-a'とH-b'/H-aの2種類の相関が重なる可能性があるが、その区別は $J(\text{C-b}/\text{H-a}')$ と $J(\text{C-b}/\text{H-a})$ の値の違いによって行えるはずである。しかし従来の2D法ではこれらを分離するには分解能が不十分であり、また実際の化合物でこの2Dスペクトルを十分な感度で得るには時間がかかりすぎる。そこで、2D ω_1 hetero half-filtered 相関法で $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ を求めるときに用いる2つのスライスに相当する2つのサブスペクトルを得る1D化を試みた。この2つのスライスはH-b'が t_1 の間に $^1J(^{13}\text{C-b}/\text{H-b}')$ により展開したものであるため、通常の1D化法で別々に得ることは不可能である。そこで、カーボンの選択パルスに加えて、適当な遅延時間とプロトンパルスの周波数中心(O2)の設定を組み合わせ、2つのサテライトシグナルを別々に励起するPASS(paired satellite selection)を開発した。この手法を応用して2つのPASS-TOCSYスペクトルのピークのずれからこれら2種類の $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ の分離に成功した。

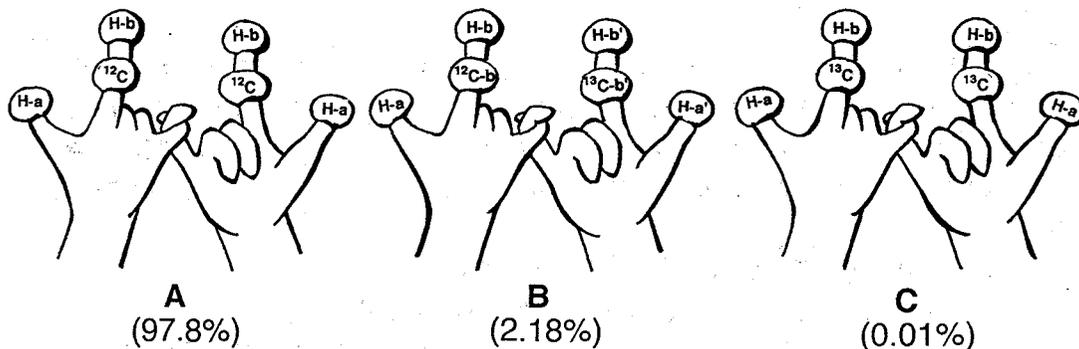


Fig.2. Three isotopomers of a C_2 symmetric molecule

2. PASSによる ω_1 hetero half-filtered法の1D化

1D化法の検討は、モデル化合物に1-butanol (1)を用い、感度のよいTOCSYで行った。1の ω_1 hetero half-filtered TOCSYスペクトルの $F_1=\text{H-1}$ 部分の拡大をFig.3に示す。この範囲はC-1が ^{13}C であるアイソトポマーだけが選ばれている。ピークは F_1 方向に大きな $^1J_{\text{CH}}$ で分裂し、相関ピークのシグナルは F_2 方向に $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ だけずれて現れる。このピークを通る2つの F_2 スライス(Fig.3b,c)に対応する2つの1Dスペクトルが目標とする1Dスペクトルである。通常、2Dの1D化は選択パルスを使用し、 t_1 を固定して行なわれるが、今の場合、この手順では2つのスライスの重ね合わせに相当する1D HMQC-TOCSY⁵⁾ スペクトルが得られるのみである。PASSでは、この1D HMQC-TOCSYの refocusing delayを $1/(4J_{\text{CH}})$ と設定しさらにO2をH-1のサテライトの一方に置くことによりそのサテライトを通る F_2 スライスに相当するサブスペクトルを得ることができる (PASS-

TOCSY, Fig.4)。1の部分構造を $SI_1-(CH_2)-CI_3$ と表し、このシーケンスで測定したときの取り込み時間 t における I_3 の直積演算子を観測に関係する項のみ示すと、

$$\begin{aligned}
 & -I_{3y}\cos\Omega_{I_1}(\Delta-\tau)\cos[\pi J_{HH}(\Delta+\tau)]\sin\pi J_{I_1t}\cos\Omega_{I_3}t\cos\pi J_{HH}t\cos\pi J_{I_3}st \\
 & -I_{3y}\sin\Omega_{I_1}(\Delta-\tau)\cos[\pi J_{HH}(\Delta+\tau)]\cos\pi J_{I_1t}\cos\Omega_{I_3}t\cos\pi J_{HH}t\sin\pi J_{I_3}st\dots\dots [1]
 \end{aligned}$$

となる($\Delta=1/(2J_{I_1s})$)。このとき待ち時間 τ を $1/(4J_{I_1s})$ と設定するとH-1のサテライトの2つのシグナルの位相は互いに90度ずれる。さらにO2をH-1のサテライトの低磁場側のシグナル上に置くと $\Omega_{I_1}=\pi J_{I_1s}$ となり、これらを式[1]に代入すると

$$\begin{aligned}
 & -1/2(I_{3y}\cos[\pi J_{HH}(\Delta+\tau)]\cos\Omega_{I_3}t\cos\pi J_{HH}t\cos\pi J_{I_3}st \\
 & -I_{3y}\cos[\pi J_{HH}(\Delta+\tau)]\cos\Omega_{I_3}t\cos\pi J_{HH}t\sin\pi J_{I_3}st)\dots\dots [2]
 \end{aligned}$$

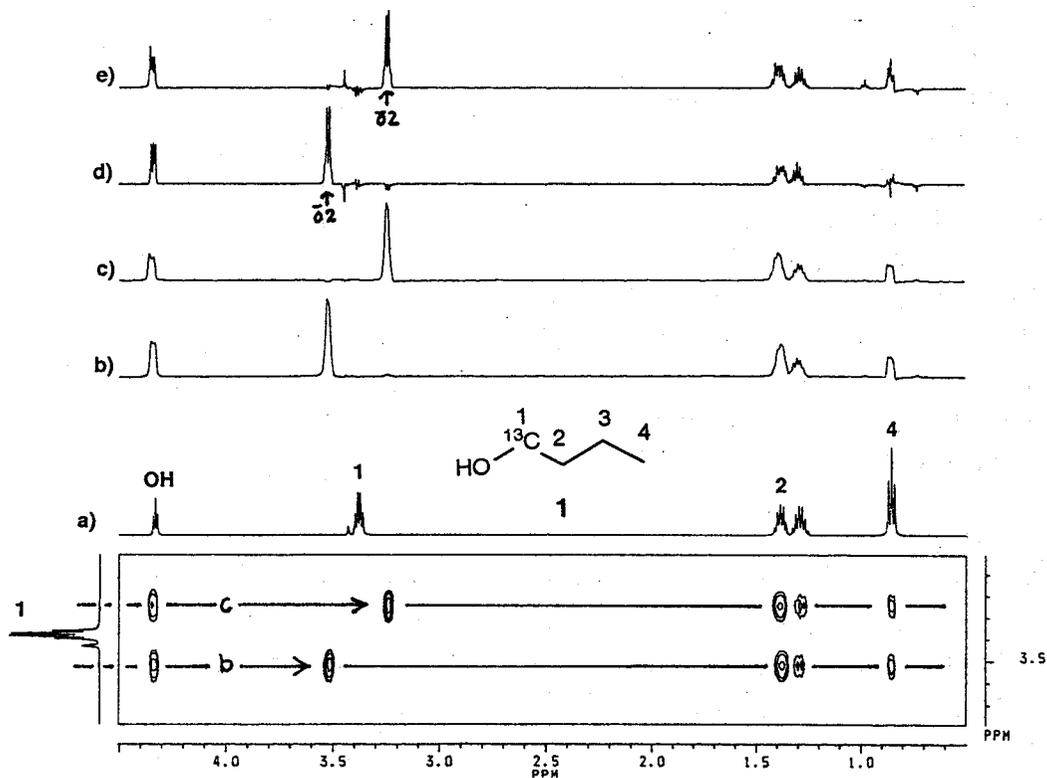


Fig.3. (a)Part of 2D ω_1 hetero half-filtered TOCSY spectrum, (b,c) its slices and (d,e) PASS-TOCSY spectra of 1

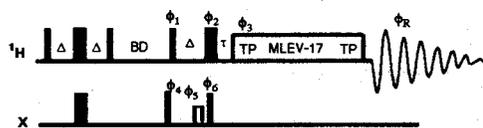


Fig.4. Pulse sequence of PASS-TOCSY

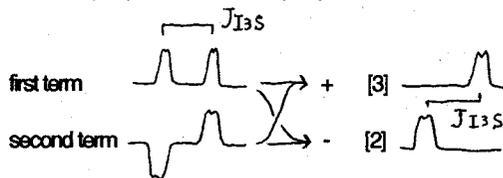


Fig.5 Schematic drawing of eqn.[2] and [3]

となる。 ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ についてみると第1項は同位相、第2項は反位相であり、これらの差として得られる1Dスペクトル(Fig.3d)はスライスbに対応している。同様にO2をサテライトの高磁場のシグナル位置におくと

$$-1/2(I_3y\cos[\pi J_{\text{HH}}(\Delta+\tau)]\cos\Omega_{I_3}\tau\cos\pi J_{\text{HH}}\tau\cos\pi J_3st + I_3y\cos[\pi J_{\text{HH}}(\Delta+\tau)]\cos\Omega_{I_3}\tau\cos\pi J_{\text{HH}}\tau\sin\pi J_3st)\dots\dots[3]$$

となり、2項の和としてスライスcに対応する1Dスペクトル(Fig.3e)が得られる(Fig.5)。

3. PASS-TOCSYによる対称分子の等価なプロトンへの2つの ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ の区別

1,6-hexanediol(2)は等価なユニット

HO-CH₂-CH₂-CH₂が中心結合3-4で結ばれた対称化合物である。通常のTOCSYスペクトルでは、すべてのプロトン間に相関ピークが与えられる。しかし、たとえば、H-3からの磁化移動では、H-1へ(ユニット内TOCSY)およびH-6へ(ユニット間TOCSY)の2種類の相関が同じ位置に重なっている。この2種類の相関を区別するため、2の3位のPASS-TOCSYを測定し、H-1およびH-6への相関を観測した(Fig.6b(O2はH-3サテライトの低磁場シグナル)、6c(高磁場))。 ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ は通常3結合以内のC-Hに存在するので、ずれているトリプレット(*印)から ${}^3J_{\text{C-3/H-1}}=+4.2\text{Hz}$ が読み取れた。C-3/H-6は4結合離れているのでずれは存在しない(O印)。

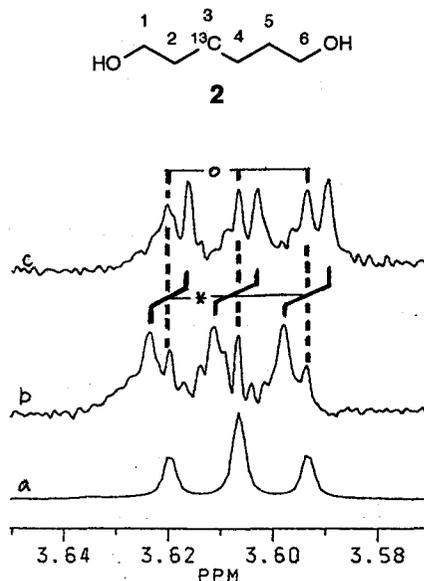


Fig.6. Part of PASS-TOCSY spectra of 2

4. おわりに

今回開発したPASSにより、通常の方法では不可能であった ω_1 filtered法の1D化に成功した。1D化による分解能の向上により ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ をピークのずれから読むことの利点がさらに生かされるようになった。また、この方法を用いた対称化合物のユニット内NOEとユニット間のNOEの区別について現在検討中である。

REFERENCES

- 1) J. Kawabata, E. Fukushi and J. Mizutani, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1115(1992)
- 2) M. Kurtz, P. Schmieder and H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 1329 (1991).
- 3) U. Wollborn and D. Leibfritz, *J. Magn. Reson.* **98**, 142 (1992).
- 4) 川端 潤、福士江里、水谷純也、第31回NMR討論会講演要旨集、P.133(1992).
- 5) R. C. Crouch, J. P. Shocker and G. E. Martin, *Tetrahedron Lett.* **31**, 5273 (1990).

(阪大理) ○武田 定, 山口 兆
(東工大工材研) 田中俊明, 川路 均, 阿竹 徹

Inclusion of Benzene and Toluene in Solid C₆₀

S. Takeda and K. Yamaguchi

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University,
Toyonaka, Osaka 560

T. Tanaka, H. Kawaji and T. Atake

Research Laboratory of Engineering Materials, Tokyo Institute of
Technology, 4259 Nakatsuda-cho, Midori-ku, Yokohama 227

The structural and dynamical properties of benzene and toluene included (5 mol%) in solid C₆₀ was studied by ¹H- and ¹³C-NMR. The high resolution ¹H-NMR spectra under magic angle spinning evidenced a splitting of the proton signal of benzene in solid C₆₀. This indicates that there are at least three nonequivalent protons of benzene with different chemical shifts in the plastic phase of C₆₀ and suggests a strong adsorption of benzene molecule to C₆₀.

フラーレンの代表であるC₆₀はその特異な分子構造や電子構造に由来して、様々な興味深い物性を発現し注目されている / 1 /。例えば柔粘性結晶、ガラス状態、超伝導、強磁性、非線形光学効果などである。一方、C₆₀結晶はベンゼンやトルエンなどの溶媒分子をとりこみやすく、これらの溶媒分子を完全に排除することが困難なことは知られてはいるが / 2 /、この溶媒分子がどのような状態に取り込まれているかについてはほとんど調べられていない。またこれら溶媒分子がC₆₀の示す様々な物性にどの程度影響するかについても不明な点が多い。

本研究では5 mol% (約0.5 wt%)のベンゼンやトルエンを含むC₆₀結晶についてプロトンの固体高分解能NMRスペクトルや¹³C-NMRスペクトルを測定することによりC₆₀結晶中でのベンゼンやトルエンの存在状態について調べた。ここではベンゼンの場合を中心に述べる。

C₆₀の試料は粗製物からベンゼンを溶媒として液体クロマトグラフィーで精製し、乾燥させて粉末試料を得た。これをさらに400℃で数時間真空乾燥した。この試料のCS₂溶液と標準溶液のH-NMRの信号強度を比較することによって、このC₆₀の試料中には5 mol%のベンゼンが含まれていることがわかった。H-NMR (200.1 MHz) と¹³C-NMR (50.3 MHz) の測定はBRUKER MSL 200でおこなった。

図1にベンゼンから得たC₆₀のプロトンのNMRスペクトルの温度依存

C₆₀結晶, ベンゼン, トルエン, ¹H-NMR, ¹³C-NMR

○たけだ さだむ, やまぐち きさし, たなか としあき, かわじ ひとし, あたけ とおる

性を示す。これらのスペクトルは、試料管やプローブからのバックグラウンドシグナルを差し引いたものである。相転移温度は252 Kであるが、低温相でも相転移点に近い温度では柔粘性結晶相と同様に線幅はせまい（約1 kHz）。温度を下げると線幅は広がる。このベンゼンのプロトンのスペクトル幅の温度依存性はホスト格子であるC₆₀分子の¹³CのNMRスペクトル幅の温度依存性／3／とよく似ており、ベンゼン分子の運動状態はC₆₀分子の運動状態に強く影響されていることがわかる。またベンゼンのプロトンのスピン格子緩和時間は相転移点でとびを示す。

図2に298 K（柔粘性結晶相）でのプロトンのMASスペクトルを示す（TMS基準）。スピン速度は3.1 kHzである。1.07 ppmの信号は水の信号であることをほかの測定から確認した。7 ppmあたりに見えるのがベンゼンのプロトンの信号であるが、少なくとも3本に分裂していることがわかる。最大の分裂幅は0.26 ppmである。298 KではC₆₀分子は非常に速い等方的な回転運動を起こしている。この相関時間は 2×10^{-12} sと非常に短い／4／。ベンゼンにとってホスト格子であるC₆₀分子がこれほど速い回転運動をしているにもかかわらず、ベンゼンのプロトンは等価ではなくなっている。これはベンゼン分子がC₆₀分子に強く吸着しているためと思われる。

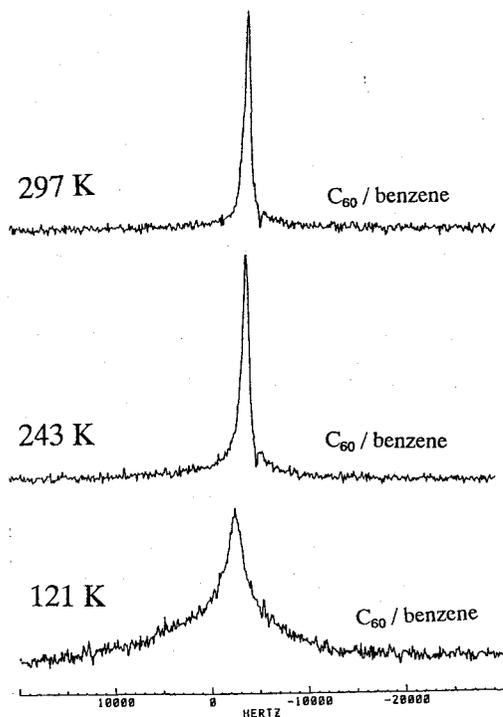


図 1

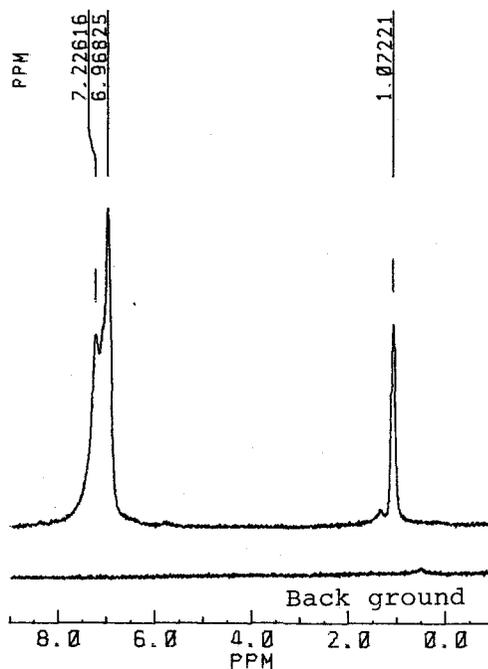


図 2

- /1/ 武田 定, 阿竹 徹, 固体物理 28 (1993) 183.
- /2/ T. Atake et al., Chem. Phys. Lett., 196 (1992) 321.
- /3/ R. Tycko et al., Phys. Rev. Lett., 67 (1991) 1886.
- /4/ R. D. Johnson et al., Science 255 (1992) 1235.

(上智大・理工) ○近藤晃子、大井隆夫、向田政男

Interactions between alkaline earth metal ions and carboxylic acids
in aqueous medium studied by ^{13}C NMRAkiko KONDOH, Takao OI and Masao MUKAIDA
(Department of Chemistry, Sophia University)

Interactions between alkaline earth metal ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) and selected carboxylic acids (formic, acetic, propionic, lactic, succinic, malic, tartaric, tricarballic, and citric acids) in aqueous medium were investigated by ^{13}C NMR spectroscopy. For every metal ion - acid combination, the carboxylic ^{13}C NMR signal(s) showed monotonous up-field or down-field shift(s) as the degree of the ion association between the metal ion and carboxyl group(s) increased. Shifts of the alcoholic ^{13}C NMR signals in the hydroxycarboxylic acid systems indicated that the metal ions interact with hydroxylic oxygens as well. In the citric acid systems new signals were observed, irrespective of the kind of metal ions, which suggests the formations of relatively stable complexes.

【緒言】

当研究室で既に行ったイオン交換に伴うアルカリ土類金属の同位体分別に関する研究において、これらイオンの同位体効果は対イオン (Cl^- , CH_3COO^- , $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}^-$) によってその大きさが異なることが報告されている。イオン交換体と水溶液との間で同位体が分別する要因としては、主に水和の効果、錯形成 (イオン会合を含む) の効果が挙げられるが、上記の研究は、金属イオンと弱酸間にはそれらの組み合わせに応じて異なる相互作用が存在することを示唆している。そこで、本研究では ^{13}C NMR を用いて水溶液中でのアルカリ土類金属イオンと種々のカルボン酸との相互作用の性質や程度、更には構造について調べることを目的とした。

【実験方法】

アルカリ土類金属 (Mg, Ca, Sr, Ba) の酢酸塩、乳酸塩、又は塩化物とカルボン酸 (モノカルボン酸として蟻酸; HCOOH 、酢酸; CH_3COOH 、プロピオン酸; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ 、乳酸; $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ 、ジカルボン酸として琥珀酸; $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、林檎酸; $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ 、酒石酸; $\text{HOOCCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ 、そしてトリカルボン酸としてトリカルバリル酸; $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$ 、クエン酸; $\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$) を様々な割合で混合し、イオン強度一定 ($0.6\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) で金属/カルボン酸濃度比の異なる水溶液を調製した。

キーワード: ^{13}C NMR、アルカリ土類金属、カルボン酸、水溶液内相互作用

○こんどう あきこ、 おおい たかお、 むかいだ まさお

この溶液を塩酸或いは水酸化カリウムを用いてpH調整した後、JEOL JNM-GX270 スペクトロメーターを用いて300Kでノンデカップルで ^{13}C NMR測定を行った。但し、軽水(H_2O)溶液中での相互作用を観測するため、全ての測定において二重管を使用し、外部標準物質として1,4-ジオキサン ($\delta = 67.8$) 重水溶液を用いた。

【結果と考察】

1. 水酸基を持たないカルボン酸とアルカリ土類金属との相互作用

図1にpH7.0、即ち殆ど酸が解離している時の酢酸系における金属イオン濃度に対する ^{13}C NMRシグナルの化学シフトの変化を示す。酢酸系では、全てのアルカリ土類金属について金属イオンの添加によりカルボキシル基炭素のシグナルは低磁場側に単調にシフトした。この変化は、金属イオンとの相互作用により酢酸の $-\text{COO}^-$ 基上の電子が金属イオンに吸引されているためであると考えられる。一般的に、カルボン酸に対するアルカリ土類金属の安定度定数は $\text{Mg}^{2+} \approx \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ の順とされているが、本研究での化学シフト値の変化の大きさは $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ の順になっている。マグネシウムだけが一般的な順序から大きく外れているが、これは Mg^{2+} が水和の為に見かけ上 Ba^{2+} よりも大きなイオンとして振る舞っていると考えると合理的に説明することができる。ここで Ba^{2+} のイオン半径は10配位の場合166pmであるが、 $\text{Mg}^{2+} \cdot \text{H}_2\text{O}$ の水和を想定した場合のイオン半径は210~220pm程度と推定される。一方、メチル基炭素のシグナルの金属濃度依存性はカル

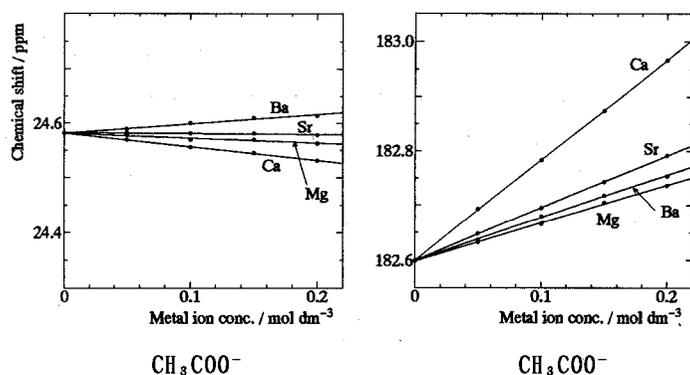


図1：アルカリ土類金属-酢酸系の化学シフト

ボキシル基炭素の場合に比べかなり小さく、カルボキシル基上の電子密度の変化がメチル基までは余り伝わっていないことが示唆される。

他の水酸基を持たないカルボン酸（蟻酸、プロピオン酸、琥珀酸、トリカルバリル酸）の系についても酢酸系と同様の傾向が見られた。

2. オキシカルボン酸とアルカリ土類金属との相互作用

乳酸、林檎酸、酒石酸、クエン酸等、水酸基を1つ以上持つカルボン酸の系では前述の単純なカルボン酸系とは少し異なる結果が得られた。一例として図2にpH7.0における乳酸系の化学シフトを示す。pH7.0では乳酸は殆ど乳酸イオンとして存在している。カルシウム、ストロンチウム、バリウムを含む系のシフトの傾向は非常によく似ており、カルボキシル基炭素よりもむしろ水酸基の直接結合している炭素の方が化学シフトの変化が大きい。そこでこれらの系では金属イオンがカルボキシル基と水酸基の双方と相互作用し、図3に示すような5員環を形成していることが示唆される。水酸基の結合した炭素に比較しカルボキシル基炭素の化学シフトの変化が鈍いのは、金属イオンに吸引された電子密度の

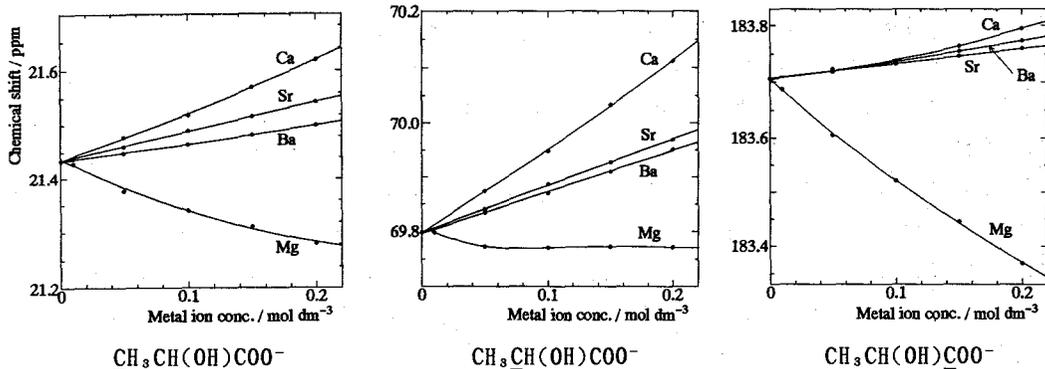


図 2 : アルカリ土類金属-乳酸系の化学シフト

減少分が二重結合している酸素原子から幾らか補われているためと考えられる。

ところがマグネシウムに関しては、全てのシグナルについては高磁場シフトが観測された(図2)。このようなMg-オキシカルボン酸系での配位形式として図4に示す構造が考えられる。即ち、1.の場合と同様にマグ

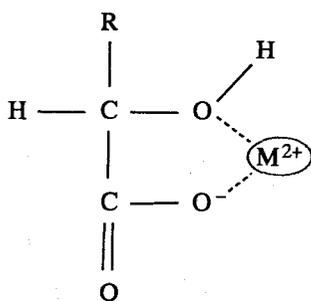


図 3

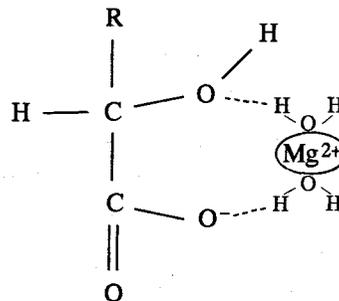


図 4

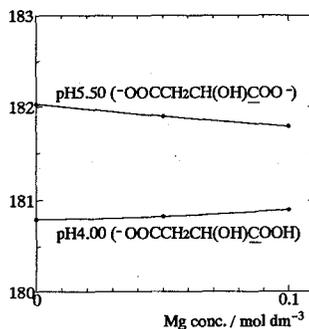
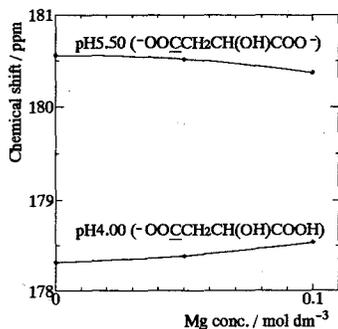
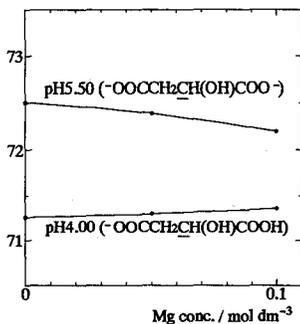
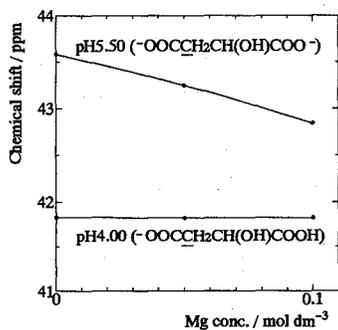


図 5 : マグネシウム-林檎酸系の化学シフト

ネシウムイオンは水和水を介してカルボン酸と相互作用するが、カルボキシル基と水酸基によってある程度固定されるため、カルボキシル基にはプロトンが結合しているような状態になり高磁場シフトが観測されることができると考えることができる。

(一般的な電子密度を用いた考え方と矛盾する例として、カルボン酸からカルボン酸イオンになる際の低磁場シフトが挙げられる。)

2種類の異なるカルボキシル基を持つ林檎酸、クエン酸については、金属イオンにMg²⁺を用いて更にpH依存性を調べる実験を行った

ところ、-OH基に対し α 位にある(-OH基と同一のCに結合している)カルボキシル基がプロトンで塞がっていると考えられる低いpHでは1.と同様な低磁場シフトが見られたが、この-COOH基のプロトンが外れたと考えられる高いpHにおいては高磁場シフトが観測された。例えば林檎酸 $\text{H}^+\text{OOCCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}^{\ominus}$ ($\text{pK}_1 = 3.24$, $\text{pK}_2 = 4.71$) -マグネシウム系においては、pH4.00、即ち H^+ のみ外れていると考えられる水溶液では金属イオンの増加に伴いシグナルは低磁場側にシフトするが、pH5.50、即ち酸が完全に解離していると思われる水溶液で初めて高磁場シフトが観測された。図5にpH4.0とpH5.5における林檎酸-マグネシウム系の化学シフトを示す。同様の結果はクエン酸-マグネシウム系でも見られ、このことから Mg^{2+} を含むオキシカルボン酸の系では図4に示した α 位にある-OHと-COO $^-$ による構造が支持される。尚、カルシウム以下のアルカリ土類金属と林檎酸、クエン酸系の場合は、pHの値に関わらず、乳酸系と同様の単調な低磁場シフトが観測された。

3. アルカリ土類金属-クエン酸間の相互作用

図6にpH7.0における配位していないクエン酸イオン、及びマグネシウム-クエン酸水溶液の ^{13}C NMRスペクトルを示す。2.で述べたように、カルボキシル基炭素のシグナルはMg系では高磁場シフト、それ以外の系では低磁場シフトしているが、この他に165~176ppmの間に新たなシグナルが見られる。このことから本系では図3、4に示した構造以外に比較的安定な配位構造が存在すると考えられる。183ppm付近に現れる-OH基に対して α 位にあるカルボキシル基炭素のシグナルと180ppm付近の β 位にある2つのカルボキシル基炭素のシグナルの面積比はアルカリ土類金属を加えても殆ど変化していないことから、比較的安定な配位構造に対して図7の様な構造が考えられる。175ppm付近のシグナルは、カップリングの様子が元のカルボキシル基のシグナルとよく似ていることから環を形成していないカルボキシル基に対応するものと推測されるが、165~169ppmの2本のシグナルの帰属はできていない。尚、余っているカルボキシル基が更に別の金属イオンと相互作用している可能性もある。

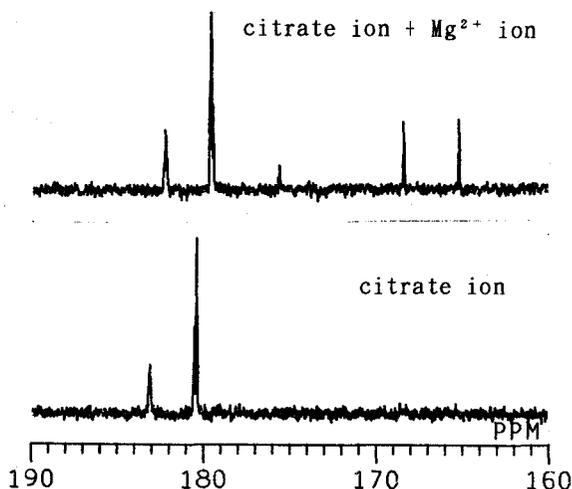


図6：クエン酸イオンの ^{13}C NMRスペクトル

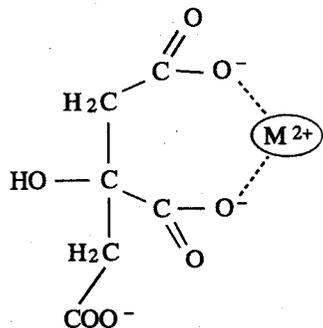


図7

○服部賢和・大木 寛・池田龍一・服部峰*・小野田義人**・
恵良田知樹***・M. E. Smith****

筑波大化・電総研*・無機材研**・筑波大物理工***・ドイツブルカー****

^{35}Cl and ^2H NMR and Molecular Motion in the Rotator Phase of Butylammonium Chloride

○Masakazu Hattori, Hiroshi Ohki, Ryuichi Ikeda, Mineyuki Hattori*, Yoshito Onoda**,
Tomoki Erata***, M. E. Smith****

Department of Chemistry, University of Tsukuba; Electrotechnical Laboratory*;
National Institute for Research in Inorganic Materials**; Department of Applied
Physics, University of Tsukuba***; Bruker Analytische Messtechnik****

Temperature dependences of ^{35}Cl and ^2H quadrupole coupling constants and ^{35}Cl NMR spin-lattice relaxation times in polycrystalline samples were measured in the rotator phase of butylammonium chlorides, $\text{C}_4\text{H}_9\text{NH}_2\text{Cl}$ and $\text{C}_4\text{H}_9\text{ND}_2\text{Cl}$, obtainable above the phase transition temperature of 241K. Rapid decrease of the quadrupole coupling constants of both nuclei upon heating was attributed to increasing dynamic disorder formed around the polar head. The presence of self-diffusion of Cl^- ions was revealed from the spin-spin relaxation time and the resonance line-width obtained on single crystals, and confirmed by measuring dc electrical conductivity.

塩化ブチルアンモニウムは室温付近でRotator相(241~487K)を形成し、その構造は長軸まわりに回転している棒状の陽イオンと球状の陰イオンが交互に積み重なった二重のラメラ型である。我々はこの2次元的な層内で、異方的な陽イオン拡散が起こることを ^1H NMRスピン格子緩和時間 T_1 と $T_{1\rho}$ 、またac電気伝導度を測定することで示した。この微視的な運動状態と熱的性質から、Rotator相が“低次元の柔粘性結晶”と呼びうる状態であることが明らかになった。本研究では、これまで不明だった陰イオンの自己拡散について情報を得るために多結晶と単結晶の $\text{C}_4\text{H}_9\text{NH}_2\text{Cl}$ の ^{35}Cl NMRの測定を行い、またRotator相での極末端まわりの無秩序な分子運動を知るために粉末 $\text{C}_4\text{H}_9\text{ND}_2\text{Cl}$ の ^2H NMRスペクトルの観測を行った。

【実験】

Rotator相における ^{35}Cl NMRの中央遷移($m_1=-1/2 \rightarrow +1/2$)スペクトルと緩和時間 T_1^* 、 T_2 及び T_2^* は、MSL-300分光器を用いLarmor周波数29.4MHzで、MSL-400分光器を用い39.2MHzで、それぞれ測定した。スペクトルは、quadrupole-echoパルス系列の後に観測されたエコーのフーリエ変換によって得られた。用いたパルス幅を非選択的照射の 90° パルス幅の半分にして測定した。信号飽和後の磁化の回復が、ほとんど指数関数的であったので、飽和パルス系列後のエコー強度を測定することでみかけのスピン格子緩和時間 T_1^* を決定した。粉末結晶のスピン-スピン緩和時間 T_2 の値と単結晶のスピン-スピン緩和時間 T_2^* の値は、それぞれエコーの高さとスペクトルの線幅の減衰曲線から決定した。

^2H NMRスペクトルは140K~370Kの温度範囲内でMSL-400(61.4MHz)及びMSL-300分光器(46.1MHz)を用いて四極子エコー法により粉末サンプルについて測定した。

キーワード：固体NMR、核四極子結合定数、スピン-格子緩和時間、自己拡散、Rotator相

○はっとり まさかず、おおき ひろし、いけだ りゅういち、はっとり みねゆき*、
おのだ よしと**、えらた ともき***、M. E. スミス****

【結果】

中央遷移に対する³⁵Cl NMRスペクトルから求めた核四極子結合定数 (e^2Qq/h) の温度変化を図1に示す。この際、非対称定数 η を0と仮定した。この仮定は、Rotator相の結晶対称性からも予測できる。300Kから480Kまで温度上昇した際、 e^2Qq/h が約1.2MHzから0.85MHzへ減少したのは格子振動や結晶の熱拡散の簡単なモデルでは説明できず、陽イオン極末端の大振幅運動の励起を意味している。 T_1^* 、 T_2 と T_2^* の温度変化を図2に示す。 T_1^* は、既に報告されている¹H NMRの T_1 の温度上昇時のふるまいにかなり類似しているので、主に¹Hの T_1 に寄与している陽イオンの軸回転による電場勾配の変動に起因していると推測される。また T_2 も温度上昇と共に増加するが、温度勾配が T_1^* と大きく異なるため T_1^* の T_2 への寄与は小さいことを示す。 T_2 と線幅から見積もった T_2^* との一致は、線幅が³⁵Cl-¹H核双極子相互作用によるものであることを意味している。また高温の T_2^* が分子間双極子相互作用の大きさから見積もった計算 T_2^* より長くなることは、Cl⁻イオンの自己拡散によって説明できる。 T_2 と温度の逆数のプロットの傾斜から求めた陰イオン自己拡散の活性化エネルギーは、 $25 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ であった。この値は¹Hの T_1 から求めたものと一致する。

非対称定数 η を0と仮定することで²H NMRスペクトルから e^2Qq/h を求め、その温度変化を図3に示した。転移点 T_{tr} 以下で観測された2種類の e^2Qq/h 値 (160KHzと45KHz) は、試料中に ND_3^+ の回転に対して異なる障害を持つ二つの非等価な陽イオンの存在を示す。大きな e^2Qq/h 値は、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{ND}_3\text{Cl}$ で観測された静止した陽イオンについて報告されている値 (168~177KHz) に近いことから、静止した陽イオンによるものと推測される。また小さな e^2Qq/h 値は、 T_{tr} を経る温度下降時に形成された準安定状態によるものと推測される。Rotator相内では $\eta=0$ のPake doubletが再び観測されたが、その e^2Qq/h 値 (240Kで26.1KHz) は T_{tr} 以下で観測されたものより小さい。この相内での温度上昇時 (~370K) にスペクトルは同じ形を保ったまま26.1KHzから20.5KHzへと連続的に減少した。これらの結果は $-\text{ND}_3^+$ を持つ陽イオンの新しい運動の励起と温度に伴うその振幅の増大を示す。この運動は¹H NMRのデータを参照し、長軸まわりの陽イオンの回転に帰属した。また T_{tr} 以上での温度上昇時の e^2Qq/h 値の減少は、陽イオンの長軸に沿っている電場勾配の主軸の方向が徐々に乱雑さを増した結果として理解される。この乱雑な回転は、c軸まわりの歳差運動として図式的に表現される。

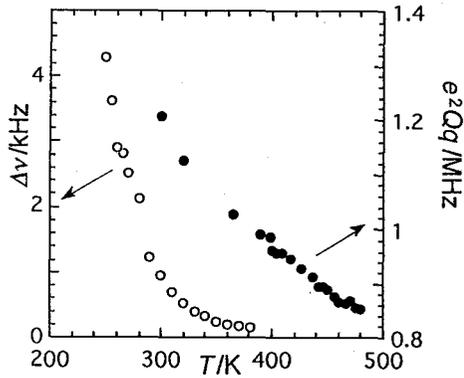


図1 ³⁵Clの e^2Qq/h (●) の温度変化

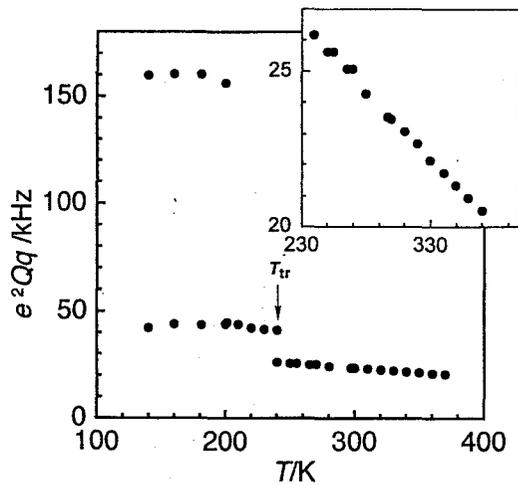
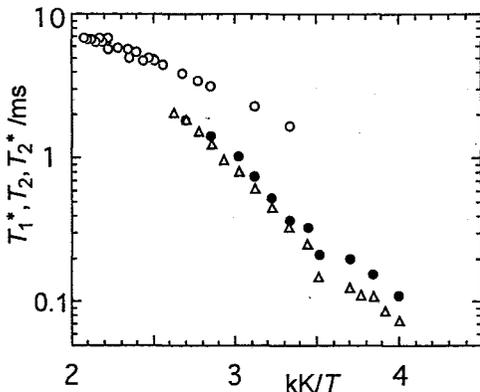


図3 ²Hの e^2Qq/h の温度変化

図2 ³⁵Cl NMRのスピンスピン格子緩和時間 T_2 (●)、 T_2^* (△) とスピンスピン格子緩和時間 T_1^* (○) の温度変化

○本多 尚・釘持基子・大木 寛・池田龍一・恵良田知樹*・田崎 明*・古川義宏**
筑波大化・筑波大理工*・広島大学校教育**

Ionic Dynamics in Plastic Crystal MNO_2 (M=alkali metals) Studied by ^{15}N NMR

○Hisashi Honda, Motoko Kenmotsu, Hiroshi Ohki and Ryuichi Ikeda

Department of Chemistry, University of Tsukuba

Tomoki Erata and Akira Tasaki

Department of Applied Physics, University of Tsukuba

Yoshihiro Furukawa

Faculty of School Education, Hiroshima University

The temperature dependence of ^{15}N NMR spectra in solid K^{15}NO_2 forming the plastic phase above room temperature, was measured to reveal ionic dynamics in the three solid phases. In the low-temperature phase (Phase III), the spectra exhibited three different principal components of chemical shift tensor, while in the intermediate phase (Phase II), spectra of an axially symmetric chemical shift tensor were observed. These results together with the data of ^{15}N T_1 were explainable, by the models of 180° flips of the NO_2^- about an axis perpendicular to C_2 -axis in Phase III, and the C_6 -reorientation of NO_2^- in Phase II. In the plastic phase (Phase I), a narrowed sharp spectrum was observed indicating the existence of NO_2^- isotropic reorientation.

固体の MNO_2 (M=K, Rb, Cs, Tl) は、室温以上で柔粘性結晶を形成する¹⁾。今回取り上げた KNO_2 は三つの固相をもち(高温側から I 相、II 相、III 相)、I 相が柔粘性結晶相(314.7~710 K)である。熱容量の測定から、これらの固相間の転移において、大きな転移のエントロピーが観測されており、 NO_2^- イオンの運動の自由度が温度上昇とともに大きく変化することが期待される。本研究では ^{15}N を導入した K^{15}NO_2 について ^{15}N NMR スペクトルの温度変化を測定し、化学シフトの異方性の温度依存性から分子運動についての情報を得ることを試みた。

各温度でのスペクトルを Fig. 1 に載せる。 ^{15}N の標準(0 ppm)として 45% の H^{15}NO_3 水溶液を用い、BRUKER MSL-300(7.05 T)で測定した。

キーワード：固体 ^{15}N NMR スペクトル、柔粘性結晶、化学シフトテンソル

○ほんだ ひさし、けんもつ もとこ、 おおき ひろし、 いけだ りゅういち、 えらた と
もき、 たさき あきら、 ふるか わ よしひろ

KNO_2 のⅢ相 (< 264.1 K) で、異なった三つの主値の化学シフトテンソル成分を持ったスペクトルが得られた。一方、 ^{39}K の T_1 、 T_2 及び ^{15}N の T_1 はいずれもⅢ相で極小を与えた。 ^{39}K の深い T_1 、 T_2 極小は NO_2^- イオンの運動による ^{39}K 核での電場勾配の揺らぎによるものと考えられる。Ⅲ相で ^{15}N のスペクトルの形が大きく変化していないことから NO_2^- イオンの運動は C_2 軸に垂直な軸周りで 180° フリップ運動で説明できる。

Ⅱ相 (264.1 ~ 314.7 K) では軸対称な化学シフトテンソルを持つスペクトルが得られたが、このスペクトルは NO_2^- がある軸周りで分子回転をしていることを意味する。結晶解析によるとⅡ相の構造は空間群 $R\bar{3}m$ に属し、 NO_2 分子面に垂直に C_3 軸がある²⁾。よってⅡ相では、Ⅲ相での 180° フリップ運動に加えて、分子平面に垂直な軸周りの C_3 再配向運動が起こっていると考えられる。さらに、温度上昇に伴うスペクトル幅の減少がⅡ相で見られた。この結果は、分子回転軸の歳差運動がⅡ相で起こっており、歳差角が温度上昇に伴い大きくなり σ 、 σ が平均化されたと考えると説明できる。

Ⅰ相 (柔粘性結晶相) で、液体なみの鋭い1本のスペクトル (線幅 6 ppm) が観測された。これはⅠ相で NO_2^- イオンの等方回転が存在していることを示している。Ⅱ相で起こっている分子回転とその軸の歳差運動が激しくなり相転移を起こし、等方回転が起こると考えられる。また、 ^{39}K の T_1 、 T_2 及び電気伝導度の実験から自己拡散の存在が明らかになった。

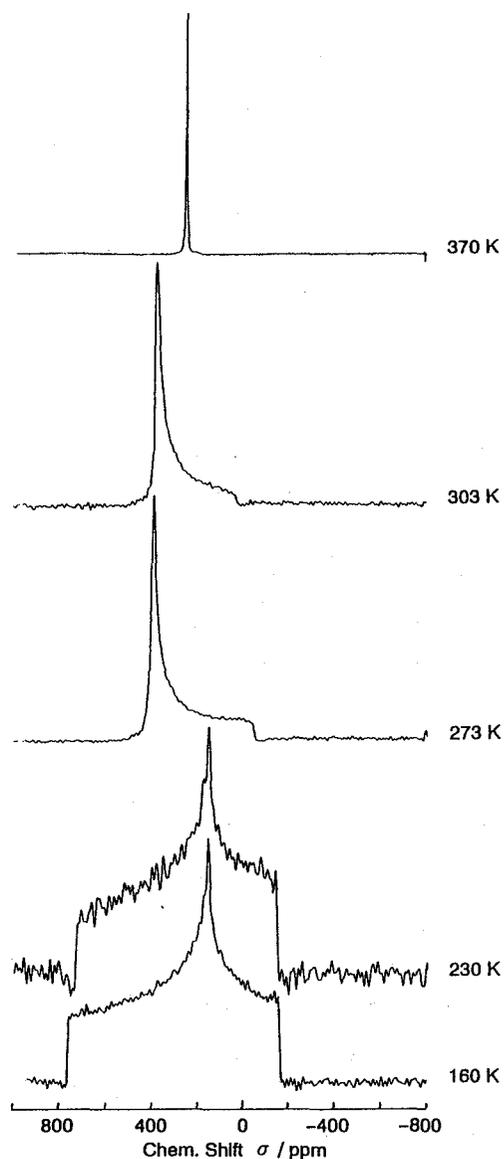


Fig. 1. The temperature dependence of ^{15}N NMR spectra in solid K^{15}NO_2 .

1) K. Moriya, T. Matsuo and H. Suga, *Thermochim. Acta.*, **132**, 133 (1988)

2) K. O. Stromme, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 1475 (1970)

^1H 2次元交換マジック・アングル・スピニング (MAS) NMR 法によるゼオライト Na-ZSM-5/p-キシレン包接化合物の研究。

○久保 厚¹、Anil Dubey²、C. A. McDowell²

1. 京大理、2. ブリティッシュ・コロンビア大。

^1H Two Dimensional (2D) Exchange Magic-Angle-Spinning NMR Experiments on a Zeolite Na-ZSM-5/p-xylene α -, α' -d6 Inclusion Compound.

○Atsushi Kubo¹, Anil Dubey², and C.A. McDowell²

1. Department of Chemistry, Kyoto Univ.,

2. Department of Chemistry, The Univ. of British Columbia.

The ^1H two dimensional(2D) exchange NMR experiments and the T_{1D} measurements were performed under the magic-angle-spinning (MAS) on a zeolite Na-ZSM-5 / p-xylene α - α' -d6 inclusion compound. The value of T_{1D} was found to be 3.2ms, which was much longer than the T_{1D} values reported for the rigid solids when the sample is spun perpendicular to the static magnetic field. This long T_{1D} can be interpreted as arising from the weak intermolecular ^1H - ^1H dipolar interactions, because of the distal separation of the molecules in the cavities of the host. The theoretical treatment which describes the 2D spectra, were developed. The 2D spinning sideband intensities depended on the flip-angles of the 2nd and the 3rd pulses, when the mixing times were short. When the mixing time was increased, the 2D spinning sideband intensities became less dependent on the pulse flip angles. This experimental feature was interpreted to occur because of the decay of the dipolar order. This was confirmed by computer calculations of the 2D spinning sideband intensities.

[序] ^1H は周波数が高く NMR を観測するには有利な核種である。しかしながら、固体試料では磁気双極子相互作用のために線幅が広がり、特徴のない線形になってしまう事が知られている。マジック・アングル・スピニング (MAS) を行くと、液晶や包接化合物などではシャープなスペクトルが得られる。我々はスピニング・サイドバンドの強度の解析から、個々の ^1H について磁気双極子相互作用の大きさが決定できることを示した。[1] 2次元交換 NMR 法からは、分子運動やスピン拡散などの有用な情報が得られる。本研究ではゼオライトにメチル基を重水素化したキシレンを包接させた化合物において、 ^1H の2次元交換 MAS NMR スペクトルを測定した。同じ試料において、 ^1H の T_{1D} を MAS 条件下で測定した。また、この2次元 MAS NMR スペクトルのスピニング・サイドバンドの強度を解析する理論を考えた。

[実験] 実験は Bruker MSL200 NMR スペクトロメーターと Doty CPMAS プローブを用いて行った。プロトンの共鳴周波数は 200.13MHz であった。 T_{1D} の測定には次のパルス・シーケンスを用いた。

$$(\pi/2)_x - t_1/2 - (\pi)_x - t_1/2 - (\pi/4)_y - t_m - (\pi/4)_\phi - (\text{acquisition})_\phi, \quad (1)$$

$$\phi = \phi_r = x, y, -x, -y$$

キーワード: ^1H NMR、マジック・アングル・スピニング、2次元交換 NMR、ゼオライト

○くぼ あつし、あにーる どうべい、ちゃーるず まくだうえる

ただし ϕ_r は受信機位相である。また ^1H 2次元交換 MAS NMR スペクトルの測定には次のパルス・シーケンスを用いた。

$$\begin{aligned} & (\pi/2)_x - t_1 - (\beta_1)_{\phi_1} - t_m - (\beta_2)_{\phi_2} - t_2 - (\text{acquisition})_{\phi_r} \\ (\phi_1, \phi_2, \phi_r) = & (-x, x, x), (-y, x, y), (x, x, -x), (y, x, -y) \\ & (-x, -x, -x), (-y, -x, -y), (x, -x, x), (y, -x, y) \end{aligned} \quad (2)$$

これにより得られる2次元の信号はエコー・モードの信号となっている。混合時間 t_m は試料の回転周期の整数倍になるように選んだ。絶対値モードの2次元 Fourier 変換を行い、2次元スペクトルを得た。ゼオライト包接化合物は市販のp-キシレン α, α' - d_6 を用い、Kustanovichらの報告している方法で合成した。[2]

[結果] 図1に ^1H MAS NMR スペクトルを示した。Kustanovichらの報告しているスペクトルとほぼ一致した。スピニング・サイドバンドの幅より T_2^* は800Hzとなった。図2に(1)式のパルス・シーケンスにより得られた信号を示した。 t_1 を100 μs に設定した。 t_m を回転周期の整数倍に保ち増加させた時、得られる信号の形は同じとなり、強度が指数関数的に減少した。図2の横線で示したふたつのサイドバンドの強度の差を t_m の関数として測定し、 T_{1D} を決定したところ、3.2msとなった。図3に2次元スペクトルの等高線プロットを示した。(a-c)は(2)式で $\beta_1 = \beta_2 = 45^\circ$ の、(d-f)は $\beta_1 = 135^\circ$ 、 $\beta_2 = 45^\circ$ のパルス・シーケンスを使って測定した。スピニング周波数は2.3 kHzに制御し、混合時間 t_m をスピニング周期の整数倍に一致させながら変化させた。混合時間は(a,d)で1 μs 、(b,e)で1.74ms、(c,f)で13.91msであった。

[理論] ^1H 2次元交換 MAS NMR スペクトルのサイドバンド強度を計算するための理論を考えた。まず混合時間がゼロの極限を考える。ゼロ量子フィルターを行うために、第1番目と2番目のパルスを ϕ だけ位相回しし、受信機位相は固定したまま信号を足し合わせる。2番目のパルスの位相を y とした時、初期磁化の位相が $-x$ ならば \cos の信号が、 $-y$ ならば \sin の信号が得られる。エコー・モードの2次元 FID を得るには \cos の信号に \sin の信号を受信機位相を $\pi/2$ だけ進めて足せば良い。これは式で書けば \sin の信号に虚数 i を掛けて \cos の信号に足す事になる。結局、2次元 FID は次式で与えられる。

$$\begin{aligned} S(t_1, t_2) = & \sum_{\phi} \text{Tr} \{ F^+ U(t_1, t_1 + t_2) P^{(y)}(\beta_2) P^{(z)}(\phi) P^{(y)}(\beta_1) U(t_1) F^+ \\ & \times U(t_1)^{-1} P^{(y)}(\beta_1)^{-1} P^{(z)}(\phi)^{-1} P^{(y)}(\beta_2)^{-1} U(t_1, t_1 + t_2)^{-1} \} \end{aligned} \quad (3)$$

ただし

$$F^+ = \sum_k I_k^+ \quad (4)$$

ここで $P^{(y)}(\beta)$ はフリップ角 β の y 軸方向のラジオ波パルスに対する時間推進演算子である。また $U(t_2, t_1)$ は時刻 t_1 から時刻 t_2 の間の時間推進演算子である。液晶や包接化合物のように、分子間磁気双極子相互作用が小さく分子が回転運動を行っている場合、スピン・ハミルトニアン固有値はMASを行っていても時間依存しなくなる。この時 U は次のように書ける。

$$U(t_2, t_1) = \sum_p |p\rangle \exp\{-i\omega_p \Phi(t_2, t_1)\} \langle p| \quad (5)$$

ここで ω_p は固有状態 $|p\rangle$ に対する固有値である。また Φ は文献[1]の $f(t)$ の時刻 t_1 から t_2 までの積分値である。この式を用いれば(3)式は簡単化できる。特に孤立した2スピン系について計算すれば、次式を得る。

$$S(t_1, t_2) = \sum_{n,m=\pm 1} Z_{n,m} \exp\left\{-\frac{3ind}{2}\Phi(t_1+t_2, t_1) - \frac{3imd}{2}\Phi(t_1, 0)\right\} \quad (6a)$$

$$Z_{\pm 1, \pm 1} = -\frac{1}{8} \sin \beta_1 \sin \beta_2 + \frac{3}{32} \sin 2\beta_1 \sin 2\beta_2 \quad (6b)$$

$$Z_{\pm 1, \mp 1} = -\frac{1}{8} \sin \beta_1 \sin \beta_2 - \frac{3}{32} \sin 2\beta_1 \sin 2\beta_2 \quad (6c)$$

(6b,c)式で第1項はゼーマン秩序による項、第2項は双極子秩序の信号となっている。それぞれパルスのフリップ角 β_1 および β_2 に対する依存性が異なっている。次に混合時間を長くしていった時のスペクトルの変化を考える。通常、静止試料の平衡状態を考える場合、スピン温度の考え方を導入する。MAS下では磁気双極子相互作用は時間依存する。したがってゼーマン秩序のみに関してスピン温度を考え、 t_m の充分長い時の密度行列、 ρ_m が次の形になると仮定する。

$$\rho_m = \beta_Z H_Z = \beta_Z \omega_0 F_z \quad (7)$$

ここで H_Z はゼーマン・ハミルトニアンである。比例定数 β_Z は2番目のパルスの直後の密度行列、 $\rho_m^{(0)} = P^{(y)}(\beta_1)U(t_1, 0)F^+U(t_1, 0)^{-1}P^{(y)}(\beta_2)^{-1}$ から次式を使って計算する。

$$\beta_Z = \frac{Tr\{\rho_m^{(0)} H_Z\}}{Tr\{H_Z^2\}} \quad (8)$$

この様な計算を行うと、2次元FIDは(6a)式と(6b,c)式のうちの第1項で与えられる事がわかる。この2次元FIDは β_1 および β_2 に関して単一の関数しか含まないので、これらのパルス・フリップ角を変えてもスペクトルの形は変化しないことがわかる。

[議論] p-キシレン、 α -、 α' - d_6 は近似的に2スピン系と見なせる。2スピン系では、(6a)式で $n, m = \pm 1$ の4つの2次元スピニング・サイドバンドの成分が期待できる。これらのうち $n = m$ の項を対角成分、 $n \neq m$ の項を非対角成分と呼ぶことにする。対角成分は対角線上にのみサイドバンドを与え、非対角成分は2次元平面上に広がったサイドバンドを与える。[3](6a,b)式から、ゼーマン秩序の信号では対角成分および非対角成分が同符号となり、双極子秩序の信号では逆符号となることがわかる。 $\beta_1 = (180 - 54.74)^\circ$ 、 $\beta_2 = 54.74^\circ$ の時、ゼーマン秩序と双極子秩序の非対角成分は打ち消しあってゼロとなる。 $\beta_1 = \beta_2 = 54.74^\circ$ の時は、逆に対角成分の信号がゼロになる。我々の行った実験条件($\beta_1 = 45, 135^\circ$ 、 $\beta_2 = 45^\circ$)ではゼーマン秩序と双極子秩序の信号の大きさは2:3の比になっている。実験のスペクトルでは混合時間が1.74msの時、(e)では対角線上のサイドバンドの強く現れ、(b)では逆に強度がほぼゼロになっている。これらのスペクトルは双極子秩序が減衰し、 $t_m = 1.74ms$ ではゼーマン秩序の信号と同じ大きさになっているとすれば説明できる。双極子秩序が $t_m = 0$ に比べて70%に減少したとして、2次元サイドバンドの強度をシュミレーションしたところ実験のサイドバンド強度と良い一致を示した。さらに混合時間を長くし、 $t_m = 13.91ms$ では、2次元スペクトルのフリップ角 β_1 依存性は小さくなっている。(c, f)これは双極子秩序が減衰してかなり小さくなっていることに対応している。

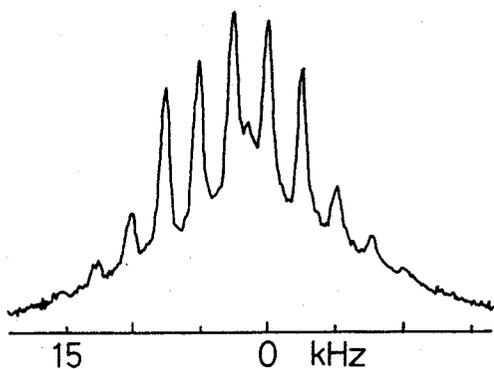


図1 ^1H MAS NMR スペクトル

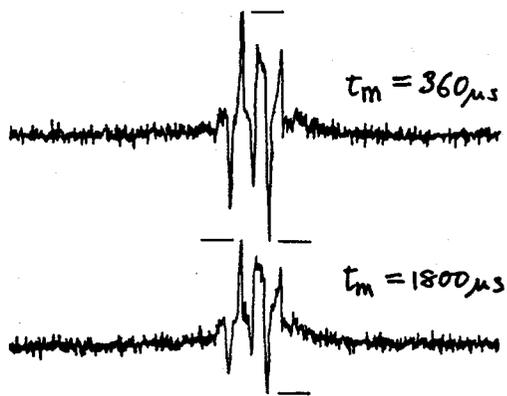


図2 T_{1D} の測定。スピニング周波数は 2.523 kHz 。 $t_1 = 100\ \mu\text{s}$

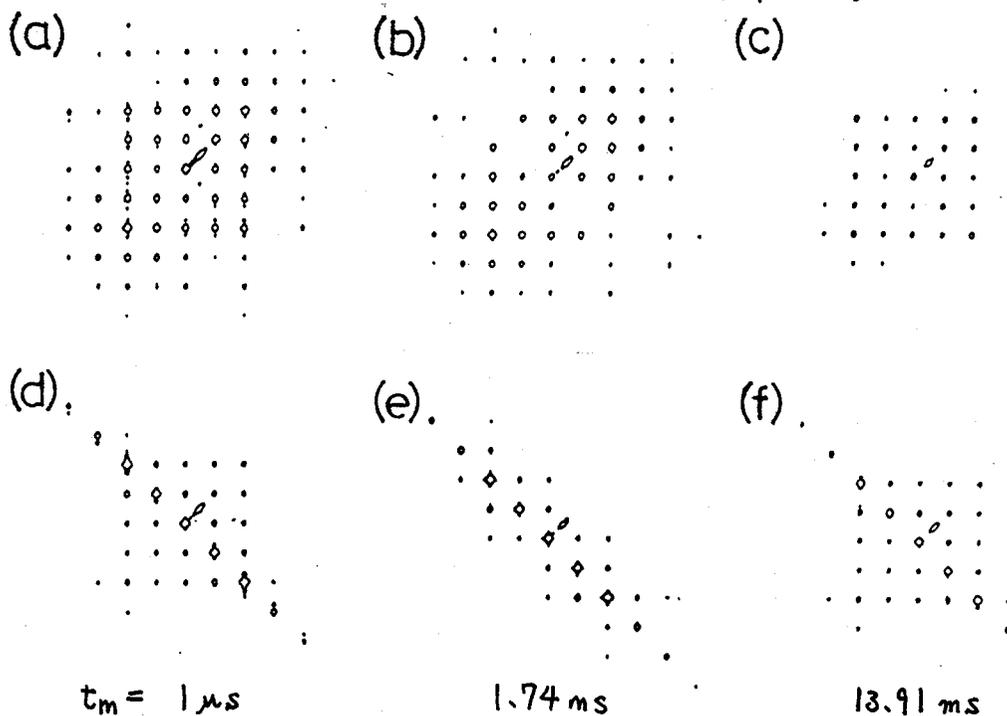


図3 $\text{NaZSM-5/p-キシレン-d}_6$ の ^1H 2次元交換 MAS NMR スペクトル。スピニング周波数は 2.3 kHz 。3パルスシーケンス、 $(90^\circ)-t_1-(\beta_1)-t_m-(45^\circ)-t_2$ を用い、(a-c) では $\beta_1 = 45^\circ$ 、(d-f) では $\beta_1 = 135^\circ$ とした。

[参考文献]

[1] S. Sekine, A. Kubo, and H. Sano, Chem. Phys. Lett. 171, 155 (1990); H. Ohe, A. Kubo, M. Katada, and H. Sano, Chem. Phys. Lett. 172, 284 (1990); A. Kubo, and C. A. McDowell, J. Magn. Reson. 100, 517 (1992). これらの論文の引用文献。
 [2] I. Kustanovich, D. Fraenkel, Z. Luz, S. Vega, and H. Zimmermann, J. Phys. Chem. 92, 4134 (1988).
 [3] A. P. M. Kentgens, E. de Boer, and W. S. Veeman, J. Chem. Phys. 87, 6859 (1987).

(埼玉大理・*阪大基礎工)永澤 明・○笠谷尚史・川口博之*・巽 和行*

 ^{93}Nb NMR chemical shift dependence on oxidation number and ligand in Niobium complexes

Akira Nagasawa, Takashi Kasaya, Hiroyuki Kawaguchi*, Kazuyuki Tatsumi*

(Faculty of Science, Saitama University *Faculty of engineering Science, Osaka University)

Abstract: ^{93}Nb NMR of a series of Niobium(V) mononuclear complexes with oxygen and sulfur ligating atoms, and a trinuclear complex with an oxidation number 3.66 and Nb-Nb direct bonds have been studied under inert atmosphere in solution. The chemical shift increases with substitution of S for O in Nb(V) complexes. For the di- and tri-nuclear complexes with Nb-Nb bonds, the shielding increases in the sequence Nb(III) < Nb(+3.66) < Nb(IV).

[緒言] 金属核NMRは近年、測定装置の進歩により、広く研究が行われるようになってきた。遷移金属核にはNMR感度の高いものもあり、一般に化学シフトの範囲も広いので小さな構造の変化に敏感である。緩和時間や結合定数も含めて、中心金属の電子状態や、中心金属-配位子間の結合に関する情報を直接得られる点でNMRは有力な手段である。これまで遷移金属錯体に関しては ^{51}V , ^{59}Co , ^{95}Mo , ^{183}W , ^{195}Pt などの核種のNMRがよく研究されてきた。¹⁾

^{93}Nb 核は ^3H , ^1H , ^{19}F に次ぐ高感度の核であり、NMR法を用いる利点は多い。しかしその測定例は比較的少なく、それも5価及び1価、-1価の有機金属錯体の一部に限られていた。

5価の単核錯体で同じ構造の場合、 ^{93}Nb 化学シフトの大きさは配位原子が $\text{Se} > \text{S} > \text{O}$ の順であること見いだされている。²⁻³⁾ 本研究ではその化学シフトのカルコゲン依存性を正確に見積もるため酸素あるいは硫黄を配位原子とする一連の錯体を合成し、 ^{93}Nb NMRを測定した。

また以前、鎌田らにより2価、3価、4価の金属間に直接結合を持つ複核クラスター錯体の ^{93}Nb NMRが測定され、中心金属の酸化数が $4 \rightarrow 3 \rightarrow 2$ の順に、Nb核は脱遮蔽されることが見いだされた。⁴⁾ 本研究では化学シフトと金属間結合や酸化数の関係について

表1. ^{93}Nb 核の性質¹⁾

核スピン	9/2
天然存在比	100%
感度(/ ^{13}C)	2770
核四極モーメント	$-0.32 \times 10^{-28} \text{ m}^2$
磁気回転比	$6.57 \times 10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$
共鳴周波数	24.55MHz
(1H TMS resonance at 100MHz)	

キーワード：金属核NMR ^{93}Nb NMR ニオブ錯体 多核錯体 クラスター錯体

ながさわあきら・かさやたかし・かわぐちひろゆき・たつみかずゆき

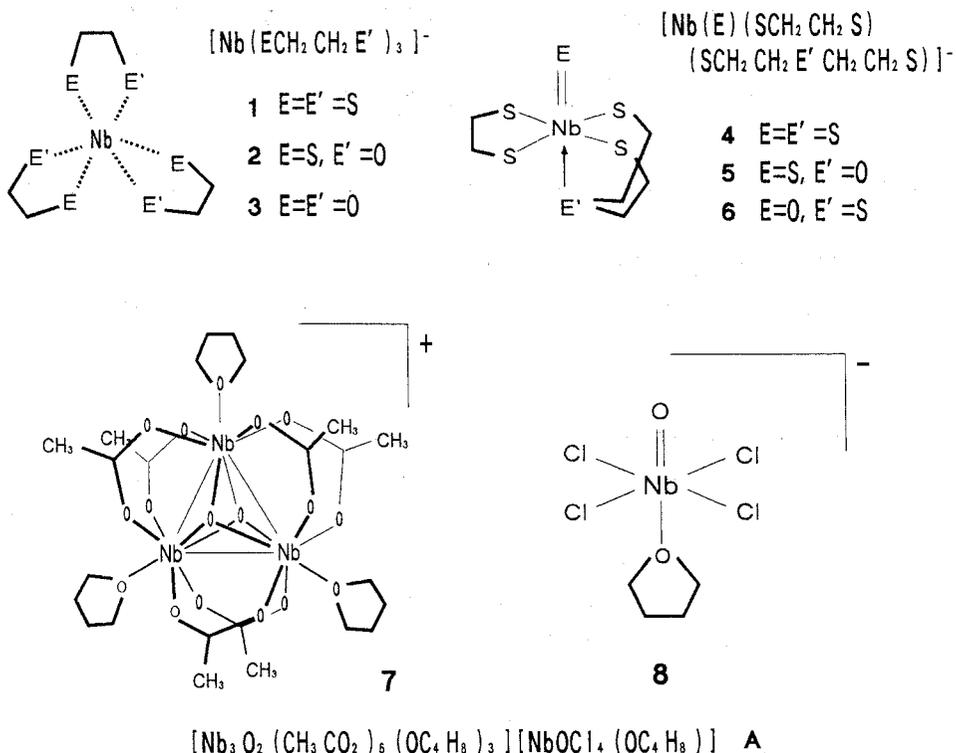


図1 ニオブ(III,IV,IV)三核およびニオブ(V)単核錯体の構造

の理解を深めるために、新たに三核クラスター錯体の ^{93}Nb NMRを測定した。
対象とした錯体を図1に示す。

[実験] 試料の錯体1-6は文献⁵⁾の方法により合成した。これらの錯体はいずれも単結晶のX線構造解析により同定されている。錯塩A(7と8の塩)は既知の方法⁶⁾により合成し、 ^1H NMR(CDCl_3 溶液)より錯体を同定した。NMR測定に用いた溶液はすべて不活性気体中で調製し封管した。測定はBruker AM400を用い10mm ϕ 管中、室温25 $^\circ\text{C}$ 、観測周波数 97.9MHz、

表2 ニオブ単核錯体の ^{93}Nb NMR

溶媒/ $(\text{CH}_3)_2\text{NCHO}-\text{CD}_3\text{CN}(4+1)$

錯体		δ	$W_{1/2}/\text{Hz}$	配位環境
$[\text{Nb}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})_3]^-$	(1)	1280	2500	NbS_6
$[\text{Nb}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O})_3]^-$	(2)	-136	290	NbS_3O_3
$[\text{Nb}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_3]^-$	(3)	-685	280	NbO_6
$[\text{Nb}(\text{S})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})]^-$	(4)	821	3393	NbS_5
$[\text{Nb}(\text{S})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S})]^-$	(5)	72	2330	NbS_5O_1
$[\text{Nb}(\text{O})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})]^-$	(6)	79	4840	NbS_5O_1

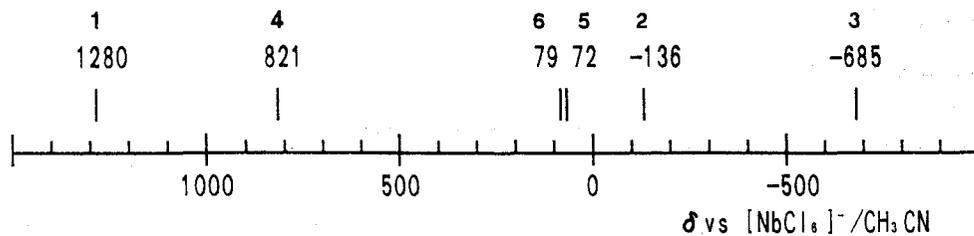


図2 ニオブ(V)単核錯体の ^{93}Nb NMR化学シフト

フリップアングル 90° ($13.8 \mu\text{s}$)、パルス繰り返し時間 0.1-0.23sで10,000-320,000回積算した。化学シフトの外部標準に飽和 $[\text{NbCl}_6]^-/\text{CH}_3\text{CN}$ を用いた。ロック用に重水素化溶媒を20-50%程度加えた。

[結果] 表2で1-6のシグナルの化学シフト(δ)、半値幅($W_{1/2}$)、配位環境を示す。表3にAのシグナルの化学シフト(δ)、半値幅($W_{1/2}$)、中心金属の酸化数、金属間結合距離(Nb-Nb)、及び結合次数を示す。錯塩Aについてはスペクトルを図4に示す。

[考察] (1)単核錯体の ^{93}Nb 核の化学シフトのカルコゲン依存性 1-6のいずれの錯体も、速い緩和による幅の広いスペクトルを与えた。これらの化合物ではNbの電子配置は d^0 である。1-3においては硫黄が酸素に置換されるにつれ、 $\delta = +1280 \rightarrow -136 \rightarrow -685$ と高磁場シフトしている。これは金属空d軌道準位の上昇により、中心金属の遮蔽が大きくなったためと考えられる。4-6においては硫黄が酸素に置き換わると $\delta = +821 \rightarrow +72$ または $+79$ と大きく高磁場シフトする。しかし、5,6において大きな差は見られない点が興味深い。

表3 ニオブ三核錯体の ^{93}Nb NMR 溶媒/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{CDCl}_3$ (1+1)

錯体	酸化数	δ	$W_{1/2}/\text{Hz}$	Nb-Nb/Å	結合次数
$[\text{Nb}_3\text{O}_2(\text{CH}_3\text{CO}_2)_8(\text{OC}_4\text{H}_8)_3]^+$ (7)	3.66	-87	3040	2.84	2/3
$[\text{NbOCl}_4(\text{OC}_4\text{H}_8)]^-$ (8)	5	-511	1100		

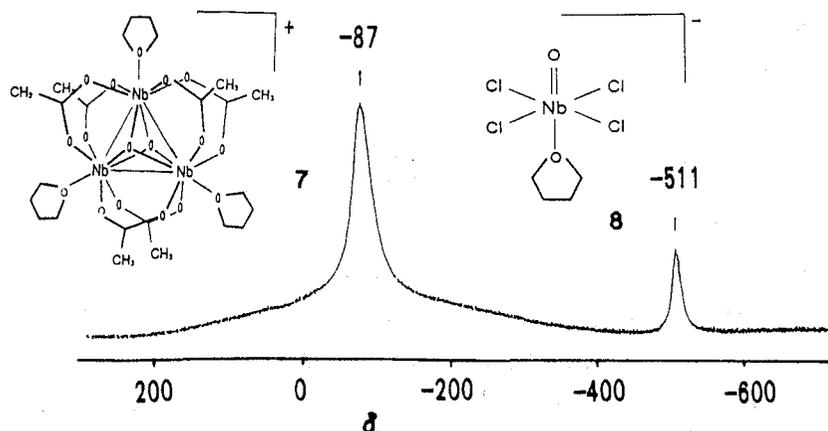


図3 $[\text{Nb}_3\text{O}_2(\text{CH}_3\text{CO}_2)_8][\text{NbOCl}_4(\text{OC}_4\text{H}_8)]$ の ^{93}Nb スペクトル

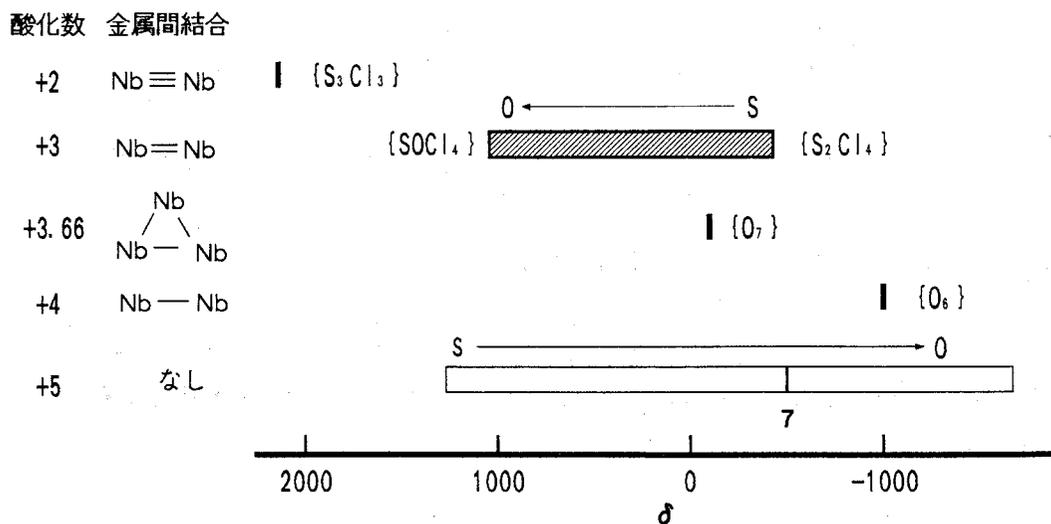


図4 ^{93}Nb NMRの化学シフトの比較 []はニオブまわりの配位原子

(2) **Nb**二核錯体における ^{93}Nb 核の化学シフトの従来の知見 既報の二核錯体での化学シフトは、2価が+2117、3価が+1041~-443、4価が-1010であり、酸化数が低くなると非遮蔽方向に移行する傾向がある。⁴⁾ また3価の錯体で配位原子が1つS→Oに置換されると、化学シフトが1484ppm低磁場シフトする。この傾向はNb(V)単核錯体の場合と逆であることが興味深い。

(3) **Nb**三核錯体の化学シフト 錯体7は幅の広いスペクトルを示し、 $\delta = -87$ でやや遮蔽されている。図4に既知の二核錯体の化学シフトとの比較を示す。化学シフトは4価の二核錯体のものより低磁場側であり、既知の傾向に一致する。また、7は3価の二核錯体のS配位のものより低磁場である。これは7の配位原子がすべてOであるために、非遮蔽側に現れたのだと考えられる。金属間に直接結合をもつニオブ錯体の場合、S→Oの置換に対してNb核が脱遮蔽されるという傾向は、ここでも現れているようである。

(4) **まとめ** Nb(V)単核錯体では、カルコゲン(硫黄または酸素)を配位原子とする錯体においては化学シフトが系統的な依存性をもつことが明かとなった。

多核錯体における中心金属の酸化数が低くなるほど ^{93}Nb 核化学シフトが大きくなる傾向は、三核錯体にも同様である。また、多核錯体における配位子依存性については、さらに研究例を増やす必要がある。

- [文献] 1) J. Mason (Ed.), "Multinuclear NMR," Plenum, New York (1987).
 2) Buslaev, Yu. A., et al., Sov. J. Coord. Chem. (Engl. Transl.) 1979, 5, 143.
 3) Tarasov, V. P., Sov. J. Coord. Chem. (Engl. Transl.) 1980, 6, 773.
 4) 鎌田ら, 第28回NMR討論会講演要旨集(1989)東京, L34.
 5) 巽ら, 第41回錯体化学討論会講演要旨集(1991)岡山, 1B15.
 6) F. A. Cotton, et al., Inorg. Chem. (1988), 27, 2347.

前川 雅彦^{*1} 本田 憲治^{*2} 北川 進^{*2} 川田 知^{*2} 近藤 満^{*2}

*1近畿大学 理工総研 *2東京都立大学 理学部

High Resolution Solid State ¹⁰⁹Ag NMR Spectra of Silver(I) ComplexesMasahiko Maekawa,^{*2} Kenji Honda,^{*1} Susumu Kitagawa,^{*1} Satoshi Kawata,^{*1}
and Mitsuru Kondo^{*1}⁽¹Department of Chemistry, Tokyo metropolitan University, ²Research Institute for Science and technology, Kinki University, and ³Department of Chemistry, Kinki University)

High resolution solid state MAS ¹⁰⁹Ag NMR spectra of eleven inorganic silver salts were measured by using 11.7 T NMR spectrometer and the conditions for measurements were examined. The CPMAS ¹⁰⁹Ag NMR spectra of various silver(I) complexes have been observed. The chemical shifts range from -314 to 788 ppm, very sensitive to the structure around the silver atom. The pyridine complexes show the downfield shift with increasing pKa value, indicating that the σ- mechanism is principal for the ¹⁰⁹Ag chemical shift..

【序論】 近年、種々の多核錯体や金属クラスターの合成がなされており、それらが特異的な反応や種々の優れた物性を有するため各種分野から注目を集めている。このような化合物の構造や電子状態などを明らかにする手段として種々の分光法が用いられているが、中でも金属核高分解能NMR法は錯体を構成している中心金属の状態を、直接的かつ非破壊的に調べることができることから益々発展するものと考えられる。現在までに各種金属錯体について金属核NMRが観測されており、錯体の構造や金属-配位子結合について研究がなされている。

ところで、銀(I)錯体は銀の光学的特性などの興味ある特性により各種分野から注目されている錯体であり、これまで単核のみならず多核およびAg...Ag間距離が極めて短い銀クラスター錯体の合成が行なわれている。

しかし、Ag核のNMRは特殊な場合をのぞいて多くは観測されていない。これは主に次の三つの理由によるものである。第一に、Ag核には¹⁰⁷Agと¹⁰⁹Agがあるが、いずれの核も極めて低い共鳴周波数を持つために感度が非常に悪い(表1)。第二に緩和時間が極めて長いいため積算に多大な時間がかかり

[銀(I)錯体、¹⁰⁹Ag NMR、固体高分解能NMR、ピリジン誘導体、銀-配位子結合性]
まえかわまさひこ、ほんだけんじ、きたがわすすむ、かわたさとし、
こんどうみつる

FT法のメリットが生かせない(例えば T_1 (^{109}Ag) 900~1000 s、 AgNO_3 水溶液)。第三に Ag 錯体は一般に labile であるため、溶液中では常に配位子の置換が起こっており、その結果、ケミカルシフトは各化学種の平均化したものを与える。このため、温度、濃度、溶媒などに対する依存性が非常に大きく明確な化学シフト値を求めることができないことが多い。その他にハードウェアの観点から、パワーアンプやプローブの特殊性により観測ユニットが汎用機種として市販されていないことも上げられる。

本研究では、このような特徴を有する銀(I)錯体のNMR測定手段として固体高分解能 ^{109}Ag NMRを用いた。この手法では、錯体を固体状態で測定するため、溶液状態でのような化学交換が起こらず、温度や濃度に対する依存性がないため、明確なシフト値を求めることができる。さらにCP法を用いることにより理論的には20倍以上の感度向上が見込まれる上に、繰り返し時間を劇的に短くすることができる。このようにして、各種配位子を有する銀(I)錯体の固体状態におけるスペクトルを観測し、各種銀錯体のケミカルシフトを決定した。さらに金属-配位子間の結合性についても考察した。

【実験】 (1) 試料の調製 銀(I)塩としては市販の11種の銀(I)塩をAldrichから購入そのまま使用した。また各種銀(I)錯体に関してはピリジン誘導体溶液に AgPF_6 あるいは AgNO_3 を溶解し、得られた溶液を数日間冷暗所に静置することにより微結晶として分離した。再結晶を行った後、銀(I)錯体の組成を元素分析より確認し、固体 ^{109}Ag NMR測定用試料として用いた。

(2) 測定 固体高分解能 ^{109}Ag NMRスペクトルの測定はJEOL GX500 NMRスペクトルメータに、低周波核専用固体観測システムNM-GSH50TL6/VTを接続し、観測周波数23.2801MHz、観測幅30000Hz(約1300ppm)、point数8192にて行った。 ^1H を有しない無機塩についてはパルスdelay time 60s、パルス幅 $5\mu\text{s}$ にてMAS法のみで測定した。無機錯体についてはパルスdelay time 10s、パルス幅 $7\mu\text{s}$ 、contact timeを10ms(マシンに入力できる最大値)にてCP MAS法を用いて測定した。試料は約0.3gの銀(I)錯体を口径6mm ϕ の試料管に詰めて用いた。

【結果および考察】 (1) 銀(I)塩の固体 ^{109}Ag NMRスペクトル 測定した各種銀(I)塩の固体高分解能 ^{109}Ag NMRスペクトルのうち代表的なものをFig.1に示した。

極めてシャープな線幅をもつ AgF (30 Hz) は高々10 scansで充分S/N比の良い吸収線を与えた。従ってこれは、固体高分解能 Ag NMRの外部基準試薬として使用できるこ

表1. Ag 核の定数

	^{107}Ag	^{109}Ag
I	-1/2	-1/2
天然存在比(%)	51.82	48.18
共鳴周波数	4.048	4.654
相対感度(^{13}C)	4.21×10^{-3}	6.42×10^{-3}
総合相対感度	1.97×10^{-1}	2.79×10^{-1}

とが判明した。以後これを用いてシフトの外部基準とし、このシフト値で AgClO_4 からのシフトに換算した。このようなシャープなシグナルは全てではなく、むしろ Ag_2S のように幅広い吸収線を持つものもあった。この場合は約700 scansも要した。固体 Ag NMRについては低感度であるために報告数は極めて少ないが^{1,2}、本研究の結果では、化学シフトは右表に示すように788~250ppmの範囲にあり、線幅に対する化学シフト幅は比較的大きく、球対称 $4d^{10}$ 電子配置をもつ系としては、銀原子の化学的環境の変化を充分検出可能な程¹⁰⁹Ag NMRスペクトルは鋭敏であることがわかった。ここで AgI は3種のピークを与えた。これは β (Wurtzite type, hexagonal)、 γ (Zinc blend type, cubic)型の異なる結晶形が混在するために、それを分離して観測したものと考えられる。

銀(I)ハロゲン化物である AgF , AgBr , AgI を比較したところ、各々-92, 380, 731ppmに¹⁰⁹Ag NMRシグナルが観測され、 $\text{AgF} < \text{AgBr} < \text{AgI}$ の順に低磁場シフトをし、spectrochemical series支配の逆ハロゲン依存の傾向を示した。また対アニオンに酸素原子を持つものは0~300ppmの範囲に、イオウ原子を持つものは-100ppm付近に、また直接イオン結合をしていない BF_4 や PF_6 を対アニオンに持つものは、-250ppm付近に観測されることが明らかとなった。

(2) 銀(I)錯体の固体¹⁰⁹Ag NMRスペクトル

Fig.2にピリジン誘導体の固体高分解能¹⁰⁹Ag NMRスペクトルを示した。溶液試料の場合、濃度依存性があるため、明確な化学シフト値の決定はおこなわれていないが、固体状態で測定することにより、化学交換の無い単一化学種の化学シフトを決定することができた。Agの化学シフトは配位子の電子供与性(σ 機構)と電子受容性(π

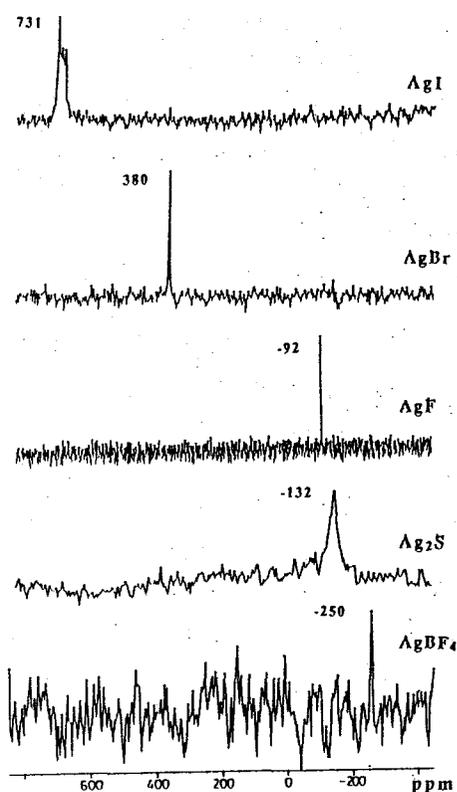


Fig. 1. Solid ¹⁰⁹Ag NMR Spectra of Silver(I) Salt

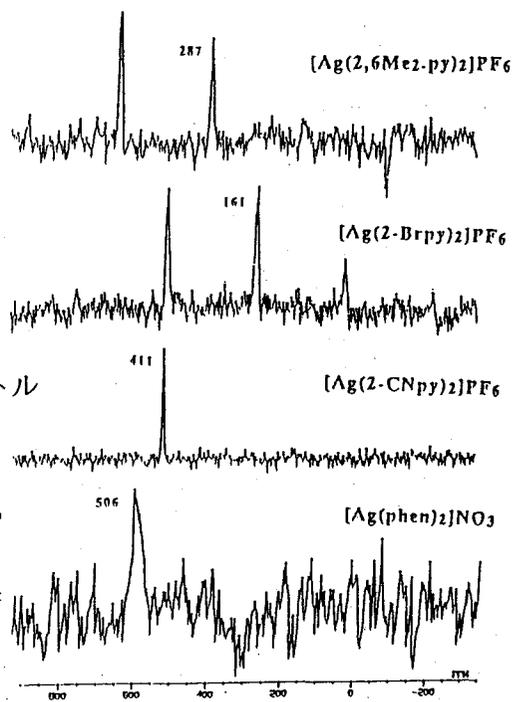


Fig. 2. Solid ¹⁰⁹Ag NMR Spectra of Silver(I) complex.

機構)の双方の寄与が考えられている³。Fig.3を見ると第一次近似としては、配位子のpKaの上昇に従い化学シフトも低磁場側にシフトしている。このことから σ 機構が支配的であるといえる。しかしながら、例えばpicolineやlutidineの系ではpKaの増大にたいし、高磁場シフトを示す逆転傾向が見られる。これには、二つの原因が考えられる。第一には、 α 位の置換基(CH₃)を持つ系は金属-CH₃間の相互作用により、bondが無置換体に比べて弱まり、その結果高磁場シフトを生じる、いわゆる立体効果である。これは¹¹³Cd NMRでは見いだされている⁴。第二には π 機構も若干寄与しているためにMc導入による π^* 準位の変化にともなう π -back bondingが弱まることから生じる高磁場シフトである。これらにいずれの機構の寄与が支配的であるかは錯体のX線構造と比較する必要がある、現在構造解析を進めている。

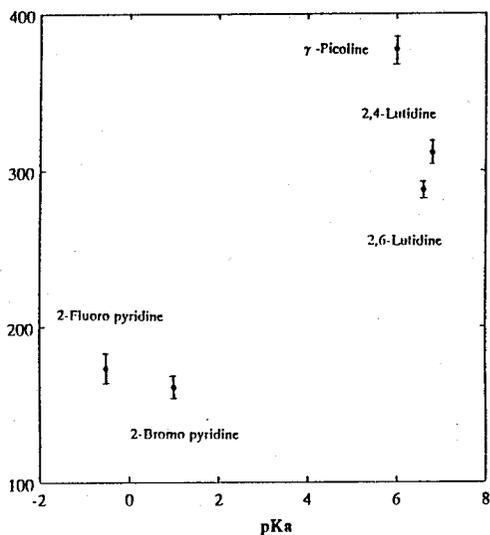


Fig. 3. Relation of ¹⁰⁹Ag NMR chemical shift with pKa of ligand in Ag(I) complexes

Table 2. Solid ¹⁰⁹Ag NMR Chemical Shifts and Line-widths of Silver(I) Complexes with N-donor atom

	$\delta(^{109}\text{Ag}, \text{ppm})^*1)$	$\Delta\nu_{1/2}(\text{Hz})$	pKa
[Ag(2-Fpy) ₂] ₂ PF ₆	173	452	-0.2
[Ag(2-Brpy) ₂] ₂ PF ₆	161	271	1.0
[Ag(2-CNpy) ₂] ₂ PF ₆	411	136	
[Ag(4-Me-py) ₂] ₂ PF ₆	368	377	6.0
[Ag(2,4Me ₂ -py) ₂] ₂ PF ₆	311	316	6.8
[Ag(2,6Me ₂ -py) ₂] ₂ PF ₆	287	241	6.6
[Ag(bpy) ₂] ₂ NO ₃	525	1130	4.4
[Ag(phen) ₂] ₂ NO ₃	506	753	5.5

*1) Observed solid ¹⁰⁹Ag NMR chemical shifts from 1.0M AgClO₄ aqueous solution as a reference.

文献

- (1)H.Looser and D.Brinkmann, J.Magn.Reson., **64**,76(1985).
- (2)L.H.Merwin and A.Scabald, J.Magn.Reson., **97**,628(1992).
- (3)H.Nakatuji, K.Kanda, K.Endo, and T.Yonezawa, J.Am.Chem.Soc., **106**,4653(1984)
- (4)M.Munakata,S.Kitagawa,F.Yagi,Inorg.Chem.,**25**,964(1986)

ウシ血漿アルブミン溶液, ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究
 ——Magnetization Transfer Contrast (MTC) Imagingの基礎的研究

○曾我美勝¹, 恵良聖^{1,2}, 桑田一夫², 高崎昭彦¹, 恵良田知樹³, 田崎明³,
 江尻和隆¹, 梶原孝彦¹, 加藤一夫², 中村浩二², 亘弘⁴

¹藤田保健大・総医研・分子生理, ²岐阜大・医・生理, ³筑波大・物工, ⁴生理研

Intermolecular cross-relaxation from protein to water in solution and gel states ----- Basic studies on the magnetization transfer contrast (MTC) imaging

○M. Sogami¹, S. Era², K. Kuwata², A. Takasaki¹, T. Erata³, A. Tasaki³, K. Ejiri¹, T. Kajihara¹, K. Kato², K. Nakamura², H. Watari⁴

¹Div. of Mol. Physiol., Inst. for Comprehen. Med. Sci., Fujita Health Univ., ²Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ., ³Inst. of Appl. Phys., Univ. of Tsukuba, ⁴Dept. of Mol. Physiol., Inst. for Physiol. Sci.

Spin-lattice relaxation ($T_1(\text{HDO})$) and intermolecular cross-relaxation times ($T_{IS}(\text{HDO})$) from irradiated protein protons to observed water protons were reduced, with the strongest effect on $T_{IS}(\text{HDO})$ in the solution→gel transition of bovine plasma albumin. Large $1/T_1(\text{HDO})$ in the gel state might indicate a large amount of hydration compared with that in the solution state. An extremely broad Lorentzian component at ~ 1.70 ppm and two kinds of intramolecular cross-relaxation processes, that is, fast and slow processes, were observed in the gel state. On the other hand, a broad Lorentzian component and fast intramolecular cross-relaxation process were not observed in the solution state. Large $1/T_{IS}(\text{HDO})$ values in the gel state, obtained by irradiation at extreme upfield portion from water, do not correlate only with a large amount of hydration but also strongly with an extremely broad Lorentzian component at ~ 1.70 ppm and presence of the fast intramolecular cross-relaxation process in the gel state.

市販ウシ血漿アルブミン(BPA)は微量のプロテアーゼを含み、この酵素はpH 3.8でBPAペプチド鎖の特定の部位を1~2箇所、切断し、BPA→BPA*→BPA**と変化する。D₂O中ではBPA*, BPA**の混合物は透明なゲル(BPA*ゲル)を形成する。非常に精製したBPA、即ちウシ・メルカプトアルブミン(BMA)は、前述のプロテアーゼを含まずpH 3.8においても安定な溶液状態である。また、結晶BPAもpH 5.0以上では、安定な溶液状態である。溶液→ゲル変換における水性状、水とタンパク質分子の相互作用について研究を進めて来た(1-3)。BPAの溶液→ゲル変換により $T_1(\text{HDO})$ 、 $T_2(\text{HDO})$ が短縮した。Akasaka(4-6)の方法より求めた分子間交差緩和時間($T_{IS}(\text{HDO})$)が、 $T_1(\text{HDO})$ などに比べて、特に大幅に短縮した(1-3)。筆者らは、 $T_{IS}(\text{H}_2\text{O})$ 測定をラット正常肝、腫瘍肝(2)、脳浮腫(7)などに応用し、大きな差を見いだしたので、交差緩和時間強調画像(交差緩和イメージング)の開発を試みた(8)。この方法はWolff, Balaban(9)により報告されたMTC imagingと全く同等の方法であった。このMTC imagingの基礎的研究として、タンパク質の溶液→ゲル変換における水性状変化を、 $T_{IS}(\text{HDO})$ を用いて研究した。

キーワード：交差緩和, 水構造, magnetization transfer contrast imaging, 溶液・ゲル変換

○そがみ まさる, えら せいいち, くわた かずお, たかさき あきひこ, えらた ともき,
 たかさき あきら, えじり かずたか, かじはら たかひこ, かとう かずお, なかむら こう
 じ, わたり ひろし

実験材料及び方法

BPA*ゲル(pD 4.0, 0.10 M Cl⁻), BMA溶液(pD 4.0, 0.10 M Cl⁻)及びBPA溶液(pD 7.1, 0.10 M Cl⁻)は、筆者らの方法に従って作製した(1-3)。BPA*ゲル、BPA溶液中の粒系分布は大塚電子社、LPA-3000/3100動的光散乱装置を用いて測定した。分子内交差緩和時間(T_{IS})、分子間交差緩和時間(T_{IS}(HDO))は、Bruker社 AM 500を用い、Akasakaの飽和移動法、インバージョン・リカバリー法(4-6)を用い、特定のプロトンを $\gamma H_2/2\pi$ 単位、20~107 Hzの f_2 照射をした。Akasakaによると、仮に、S、I 2種類のスピン系を考え、Sスピン系をラジオ波で選択的に f_2 照射するとSスピン系の磁化は速やかにゼロになり、Sスピン系より観測するIスピン系にスピン拡散し、時間 $\tau = 0$, $\tau = \infty$ におけるIスピン系の磁化を、それぞれ I_0 , I_∞ とすると I は [1], [2] 式で与えられる。

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

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

$1/T_1^* = 1/T_1 + 1/T_{IS}$ のため、 T_1^* より T_{IS} を求め得る。また、 $I_\infty/I_0 = T_1^*/T_1$ となる。最近、照射されたタンパク質などのプロトンより、水への飽和移動において、プロトンの two-pool model (9, 10) が提案され、[1] 式と全く同等の式が MTC imaging の解析に利用されているので比較のため、[1], [2] 式を示した。Iスピン系の磁化が I_∞ の状態でインバージョン・リカバリー法により、[3] 式を用いても T_1^* を求め得る。

$$I = I_\infty [1 - 2 \exp(-\tau/T_1^*)] \quad [3]$$

[3] 式の I_∞ , T_1^* は [1], [2] と同じである。-19~24 ppm を $\gamma H_2/2\pi$ 単位、20~107 Hz で 10 秒間 f_2 照射し、水分子への飽和移動の作用スペクトルを求めた。作用スペクトルは $[1 - (I(\tau = 10 \text{ s})/I_0)]$ vs $f_2(\text{ppm})$ を用いて表示した(6)。

結果と考察

(I) BPA*ゲル中における分子集合体：BPA溶液(pD 7.20, 0.10 M Cl⁻)及びBPA*ゲル(pD 4.03, 0.10 M Cl⁻, 13.8%)の動的光散乱測定 ($\lambda = 632.7 \text{ nm}$) 結果は半定量的であるが、PBA溶液、BPA*ゲルの粒径は、それぞれ 4.9 ± 2 , $7108 \pm 953 \text{ nm}$ であった。これらの結果は透明なBPA*ゲル中には、巨大なBPA*、BPA**の分子集合体が存在することを示唆するものであろう。ついで、Bruker社 MSL 400を用い、BPA*ゲル(pD 4.01, 0.10 M Cl⁻, 12.98%)の¹H-NMR スペクトルを Lorentz型吸収線に成分わけすると、~1.70 ppm にピークをもち、半値幅~1900 Hz の大変線幅の広い成分が観測された。ほぼ、同濃度のBMA溶液(pD 4.01, 0.10 M Cl⁻)中には、この成分は観測されなかった。BPA*ゲルの上述の成分は、おそらく巨大な、しかも相対的に「固い」BPA*分子集合体によるのだろう。Akasakaら(6)はタンパク質の T_{IS} は分子回転相関時間が増加すると、 T_{IS} 値が減少することを報告している。BPA*ゲルの T_{IS} 値を飽和移動法により測定すると、長短2種の T_{IS} 値が観測され、短い T_{IS} 値は長い T_{IS} 値の ~1/10 であった。しかしながらインバージョン・リカバリー法では長い T_{IS} 値に対応した成分のみ観測可能であった。その半定量的機序については、Eraらにより報告されているが(3)、BPA*ゲル中の巨大BPA*集合体には大粒径でしかも固い集合体があり T_{IS} 値の短い成分が観測されたのだろう。同一pD値のBMA溶液では、飽和移動法、インバージョン・リカバリー法でも、BPA*ゲルの長い T_{IS} 値に対応した1成分のみが観測された。

(II) 飽和移動作用スペクトル：飽和移動の作用スペクトル、 $[1 - (I(\tau = 10 \text{ s})/I_0)]$ vs $f_2(\text{ppm})$ を、 $\gamma H_2/2\pi$ 単位、20~107 Hz にわたり測定した。BPA(pD 7.14, 0.10 M Cl⁻, 12.0%)の飽和移動作用スペクトルは溶液のNMRスペクトルを、スムージングしたものに似たスペクトルで

あった。BPA*ゲルの飽和移動作用スペクトルは $\gamma H_2/2\pi \sim 20$ HzではBPA*ゲルのスペクトルと線幅の大きいLorentz型吸収線の和に似ているが、 $\gamma H_2/2\pi$ が39→69→107 Hzと増加するにつれ、線幅の大きいLorentz型吸収線の寄与の非常に大きい作用スペクトルになった(図1)。これは、例えば、-18.99 ppmを $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hzで f_2 照射したとき、水への飽和移動において、巨大BPA*集合体の寄与が大きいことを示唆する結果であろう。

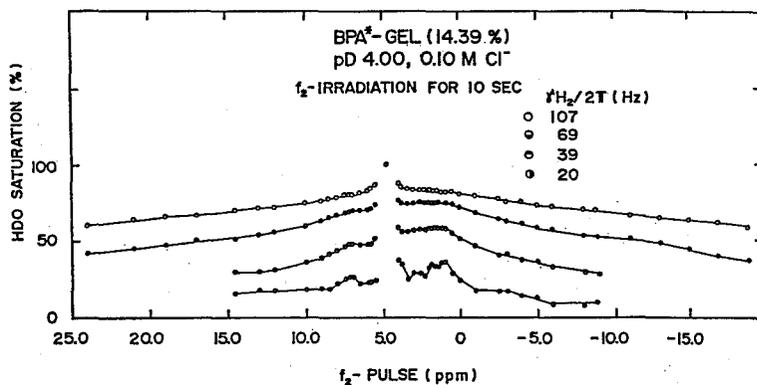
〔Ⅲ〕 BPA*ゲル、BMA及びBPA溶液の $T_{IS}(\text{HDO}) : 1/T_1(\text{HDO})$ vs タンパク質濃度(W(%))を図2に示してある。タンパク質の溶液、ゲル状態における結合水量を、図2の濃度依存性より推定すると、ゲル状態では4~5倍増加した(1, 3)。8.65, 7.13, 0.40, -2.45, -8.79, -13.00, -18.99 ppmを $\gamma H_2/2\pi : 39 \sim 107$ Hzを用い、 $T_{IS}(\text{HDO})$ を測定した。8.65 ppm (107 Hz)により求めた $1/T_{IS}(\text{HDO})$ vs W(%)を図3に示してある。溶液とゲルの間に非常に大きな差があった。BPA*ゲルでは、前述のように結合水量が多いことと、〔Ⅰ〕章で述べた短い T_{IS} 値が存在するため、タンパク質の照射部位より速やかに分子全体にスピン拡散し、ついで結合水さらに自由水へと化学交換(拡散)により飽和移動するためであろう。

-8.79 ppm($\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz), -13.00 ppm (107 Hz), -18.99 ppm (107 Hz)を f_2 照射し、 T_{IS} , $T_{IS}(\text{HDO})$ を測定し興味ある結果を得た。-18.99 ppm(107 Hz)の f_2 照射により求めた各種側鎖の T_{IS} の平均値(\tilde{T}_{IS})の濃度依存性を図4に示した。BPA溶液(pD 7.1)の $1/\tilde{T}_{IS}$ の濃度依存性は認められなかった。BMAはpD 4.0でF型構造をとり、正荷電をもつが、分子表面に疎水性側鎖が露出し、15~16%以上ではゲル化するほどの分子間相互作用がある。このBMA溶液(pD 4.0)の $1/\tilde{T}_{IS}$ は図4のように濃度依存性が認められた。BPA*ゲルの $1/\tilde{T}_{IS}$ vs W(%)は、図4に示すように変化した。〔Ⅰ〕章で述べたように、飽和移動法で求めたBPA*ゲルの T_{IS} 値には、長、短2種類の T_{IS} 値があり、インバージョン・リカバリー法では、長い T_{IS} 値のみが観測された。図4(☆)の $\tilde{T}_{IS}(\text{SLOW})$ は長い T_{IS} 値の平均に対応し、 $\tilde{T}_{IS}(\text{FAST})$ の約10倍であった。BPA*ゲルは濃度増加につれ、動的光散乱で求めた粒径も増加したが、 $1/\tilde{T}_{IS}(\text{SLOW})$ 値もAkasakaらの理論(6)のように増加した。図5に $1/T_{IS}(\text{HDO})$ vs W(%)を示してあるがBPA*ゲルの $1/T_{IS}(\text{HDO})$ は約8%以上において $1/\tilde{T}_{IS}(\text{SLOW})$ より大になった。この現象は水への飽和移動において、 $\tilde{T}_{IS}(\text{FAST})$ の寄与を明確に示唆している。-18.99 ppm (107 Hz)の f_2 照射により求めた $1/T_{IS}(\text{HDO})$ vs W(%)を図5に示してある。BPA*ゲル(pD 4.0)とBPA*溶液(pD 7.1)の間には非常に大きな差があった。pD 7.1ではBPAは負電荷をもち、分子間で反発し、動的にも分子集合体がなく、-13.00, -18.99 ppmを占めるLorentz型吸収線をもたないためであろう。

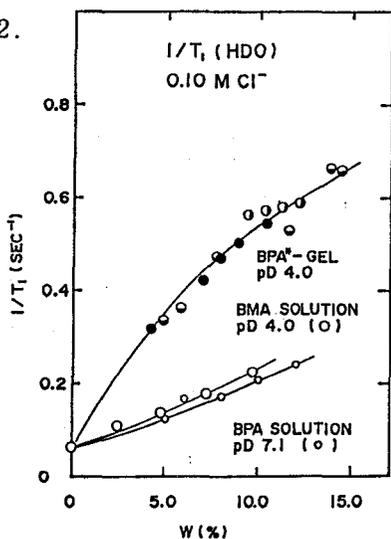
文 献

1. M.Sogami, S.Nagaoka, S.Era et al, Int.J.Peptide Protein Res. 28, 130(1986)
2. S.Era, K.Kato, M.Sogami et al, Biomed.Res. 7, Suppl. 2, 41(1986)
3. S.Era, M.Sogami, K.Kuwata et al, Int.J.Peptide Protein Res. 33, 214(1989)
4. K.Akasaka, J.Magn.Reson. 45, 337(1981)
5. K.Akasaka, J.Magn.Reson. 51, 14(1983)
6. K.Akasaka, R.Ishima, S.Shibata, Physica B 164, 163(1990)
7. T.Iwama, H.Yamada, S. Era et al, Magn.Reson Med. 24, 53(1992)
8. Y.Ueshima, M.Sogami, K.Kato et al, SMRM Abstracts, p.585(1990)
9. S.D.Wolff, R.S.Balaban, Magn.Reson.Med. 10, 135(1989)
10. J.V.Hajnal, C.J.Baudouin, A.Oatridge et al, J.Comput.Assist Tomogr. 16, 7(1992)

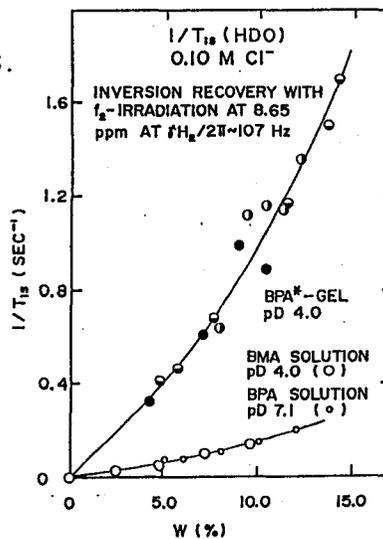
☒ 1.



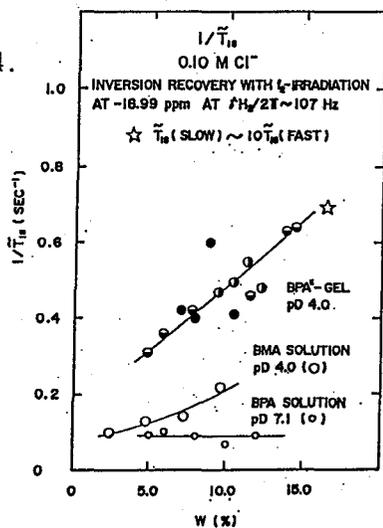
☒ 2.



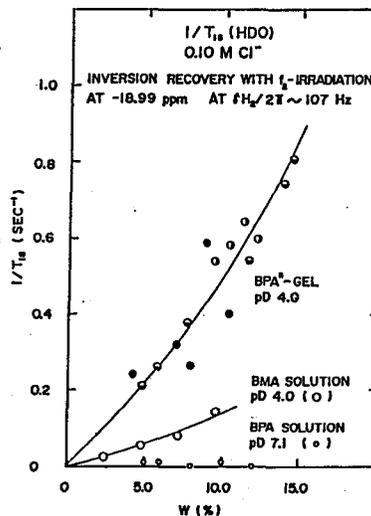
☒ 3.



☒ 4.



☒ 5.



P63 ^1H NMRイメージング法による高分子ゲルの電気的刺激一応答についての研究

(東工大) ○渋谷智弘・黒子弘道・安藤勲
(北大理) 安永秀計

Spatial Information on a Polymer Gel
As Studied by ^1H NMR Imaging
II. Application of Electric Field to Polymer Gel

○Tomohiro Shibuya, Hidekazu Yasunaga,
Hiromichi Kurosu and Isao Ando
Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of
Technology
Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152

A proton NMR imaging spectroscopy noninvasively offers spatial distributions of enhanced proton spin density and these relaxation times, T_1 and T_2 , for a mobile component such as water in gel with a help of additional magnetic field gradients. We can determine these parameters from some imaging patterns by using appropriate pulse sequence. These relaxation times give us information about the mobility of molecules. Application of an electric field to poly(methacrylic acid) (PMAA) gel leads to shrinkage of the gel with exhausting water. For the purpose of studying the shrinkage process, we measured process for changes of spatial distributions of ^1H spin density and these T_2 . From these results, it was found that the spatial distributions of the ^1H spin density and the behavior of water molecules in PMAA gel are changed by applying an electric stimulation to the gel.

1・目的

高分子ゲルの構造・運動性とその物性・機能の発現機構の関係を分子レベルから明らかにすることは、ゲルを本質的に理解する上でも、また新たな機能性ゲルを構築する上でも非常に重要である。現在臨床医学の分野で広く普及している ^1H NMRイメージング法は、試料中の核の密度と運動性についての時間的及び空間的変化の情報が非破壊でそのままの状態で見られる。そこで私共は、上記のような特徴を持つ ^1H NMRイメージング法を用いて高分子ゲルに印加した応力により生じる歪を画像化し、応力とゲル中の水の分布・分子運動の変化について研究してきた。そして、 ^1H NMRイメージング法が、外的刺激に対する高分子ゲルの変化を研究する有力な手法であることを明らかにしてきた。

近年、電圧印加によって高分子電解質ゲルが、収縮、膨潤等の体積変化を起こす事が見い出され、アクチュエーターへの応用研究がなされている。しかし、その収縮挙動について完全に解明されているとは言えない。そこで、本研究の目的は、定電圧印加された高分子ゲルの収縮過程において、ゲル中の水の ^1H 密度分布の変化と運動性の目安となるスピン-スピン緩和時間 $^1\text{H} T_2$ の空間分布の変化を ^1H NMRイメージング法により測定し、ゲル中の水の振る舞いからゲルの収縮機構を解析することである。

キーワード： ^1H NMRイメージング、ゲル、電圧印加、収縮、スピン-スピン緩和時間

○しづや ともひろ、くろす ひろみち、やすなが ひでかず、あんどう いさお

2・実験

試料として用いたポリメタクリル酸 (PMAA) ゲルは、N, N'-メチレンビスアクリルアミド (MBAA) を橋架け剤に、ペルオキシ二硫酸カリウム ($K_2S_2O_8$) を開始剤としてメタクリル酸 (MMA) をラジカル重合させ、洗浄の後純水で平衡膨潤させて合成した。今回は橋架け度0.25mol%で合成し、膨潤度は40前後、また膨潤時の形は全長2.5cm直径8.0mmの円柱であった。膨潤度 (q) は、ゲルの膨潤時の質量 $M_{swollen}$ と乾燥時の質量 M_{dry} とを用いて以下の式で定義した。

$$q = M_{swollen} / M_{dry}$$

1H NMRイメージング測定はNM-GIM270イメージングシステム (日本電子製) を接続したGSX270NMR分光器 (270MHz, 日本電子製) を用い、 $2 \times 10^{-2} T m^{-1}$ の磁場勾配を印加してスピンエコー法によって行った。本研究で使用したNMRイメージング法は、一般的には3次元の立体的な試料を一枚の面に沿って切りだした2次元平面の情報の集合として捉える方式になっている。空間的に分布した試料の位置は静磁場の他に線形磁場勾配をかけることで識別されている。

NMR信号からの画像化は、本研究で用いた2次元フーリエ変換法では、 $\pi/2$ パルスと π パルスの間に磁場勾配 G_y を印加すると共に生じたスピンエコー信号を磁場勾配 G_x を印加しながら取り込み、2次元フーリエ変換して行われる。 G_x , G_y , G_z はそれぞれ周波数標識, 位相標識, 切片選択のための磁場勾配である。

電圧印加はFig. 1に示す容器中で行った。電圧印加されたゲルを電流の方向に対して水平な方向に切断面を取り画像化した (Fig. 2)。

3. 結果と考察

PMAAゲルに極板である白金板を接触させて電圧 (3Vの直流電圧) を加えるとゲル中を電流が流れ、水を吐き出しながら収縮していく。その挙動は、プラス極に近いほど収縮の度合いが激しい。印加時間に伴う 1H 密度分布変化と T_2 分布変化をそれぞれにFig. 3, 4に示す。さらに、 1H 密度分布変化の3次元ヒストグラム表示をFig. 5に示す。実際にはイメージング画像はカラーで画像化されている。この画像では、個々の試料の 1H 密度の強度を256段階に分けた相対的な強度比なので、各試料間における定量的な評価ではない。今回用いたゲルの場合、重量の約98%が水なので、Fig. 6に示した密度変化の挙動は観測にかかるゲル中の水の 1H 密度の挙動を示している。このグラフによって、相対的な評価しかできないイメージング法の欠点が補われ、各試料間におけるより定量的な 1H 密度の評価が可能になる。以上より、 1H 密度は電圧印加にともない全体的に減少し、かつその分布は一様化しつつも詳細には4つの領域に分けられることが見いだされた。また、 T_2 も同じ4領域に分けられて減少することが見いだされた。それぞれの変化モデルをFig. 7, 8に示す。

得られた知見ををもとに、電気的刺激-応答によってゲルに現れるイメージングパターンの発現機構を検討した。ゲル中の 1H 密度分布は、全体的には電圧印加によってばらつきが少なくなり一様化されつつも、細かく見ていくと分布の仕方は場所のよって4つの領域に分けられる。しかも、全体の 1H 密度は印加時間に伴い徐々に減少している。一方 T_2 の減少は、電圧印加につれて水が移動したり押し出されながら縮むことによって高分子鎖が互いに近づき、水の分子運動が側鎖によって束縛されたため引き起こされたものと考えられる。したがって、 T_2 の減少の仕方はゲルの直径の長さと同様である。つまり、直径の長さが短くなればなるほど、 T_2 は小さくなる。しかし、Fig. 7, 8の領域3のところは直径の減少にもかかわらず T_2 はそれほど減少せず、他の領域ほど運動が束縛されてないと考察される。

このように 1H NMRイメージング法を用いると、ゲルに電圧を印加することで引き起こされたプロトン密度分布や T_2 分布などの内部変化の空間分布が測定できるので、観測するのが困難なゲル内の微小環境情報を得るのに非常に有力な手法となることが明らかになった。 1H NMRイメージング法のこのような性質を利用することにより、ゲルに関する新たな知見が今後益々引き出されていくと期待される。

なお、PMAAゲルに水酸化ナトリウム水溶液を吸収させ、Naイオンの移動についての実験に関しては講演で述べる予定である。

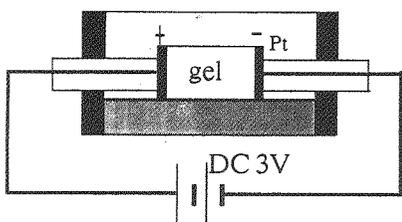


Fig.1 Apparatus of applying an electric field to gel

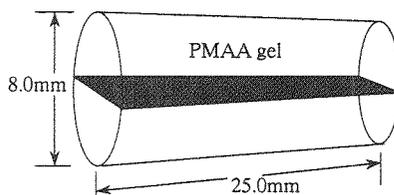


Fig.2 Image of transverse slice of polymer gel

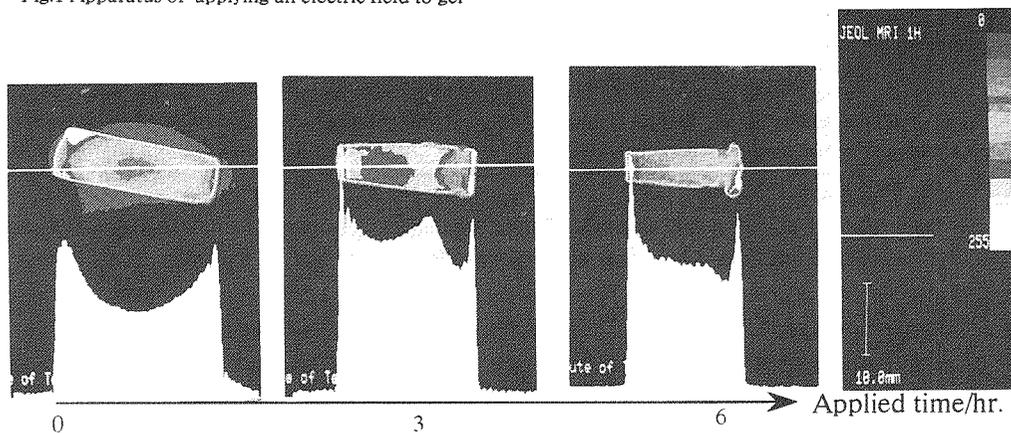


Fig.3 A change of ^1H spin density

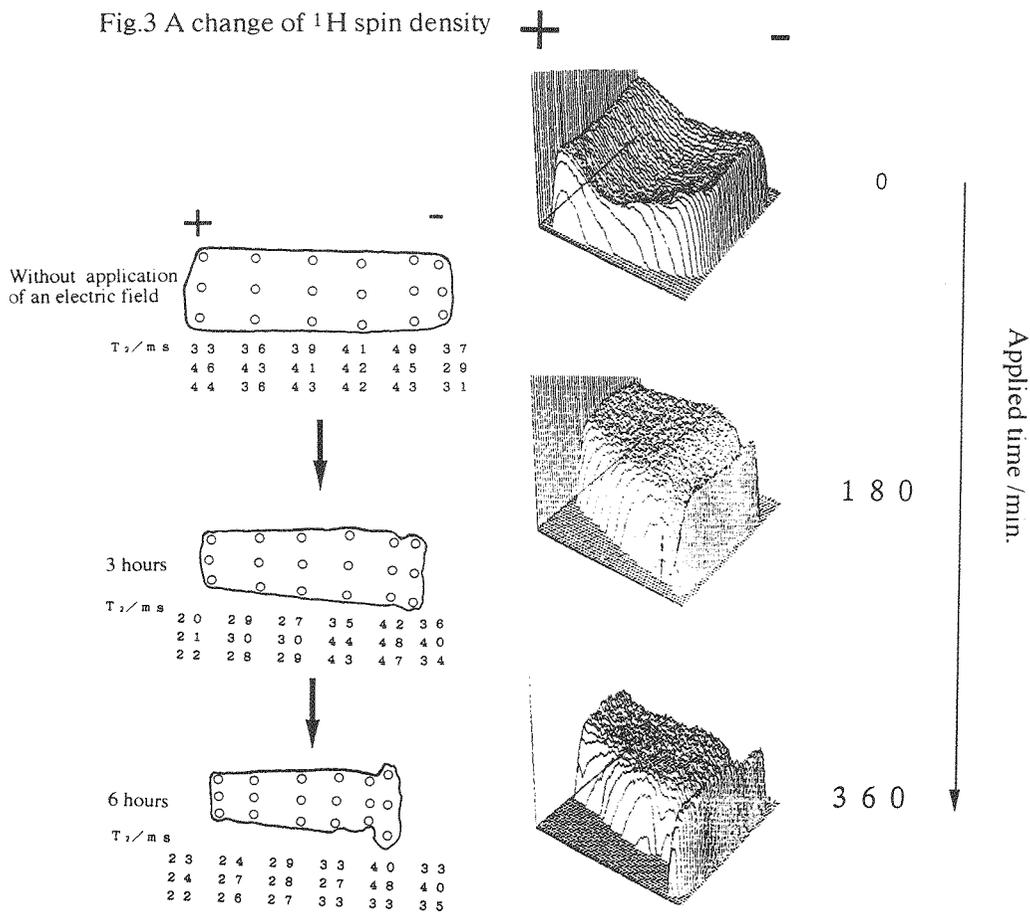


Fig.4 T_2 distribution

Fig.5 The histogram representation of change of ^1H spin-density distribution in a polymer gel

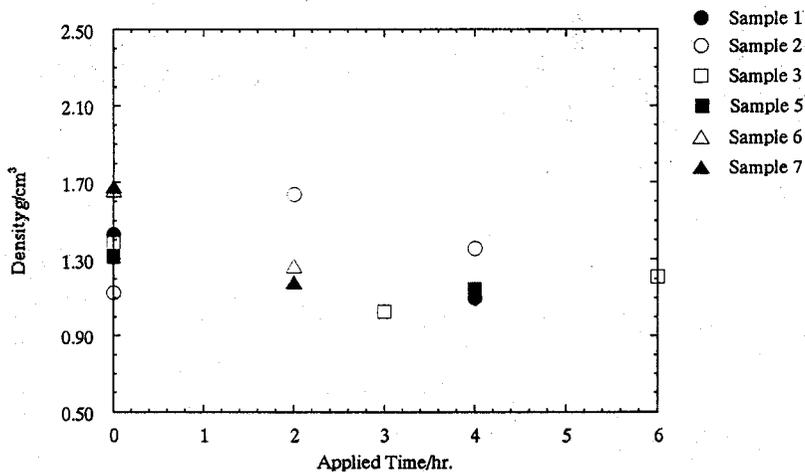


Fig.6 The density variation of PMAA gel for applied time

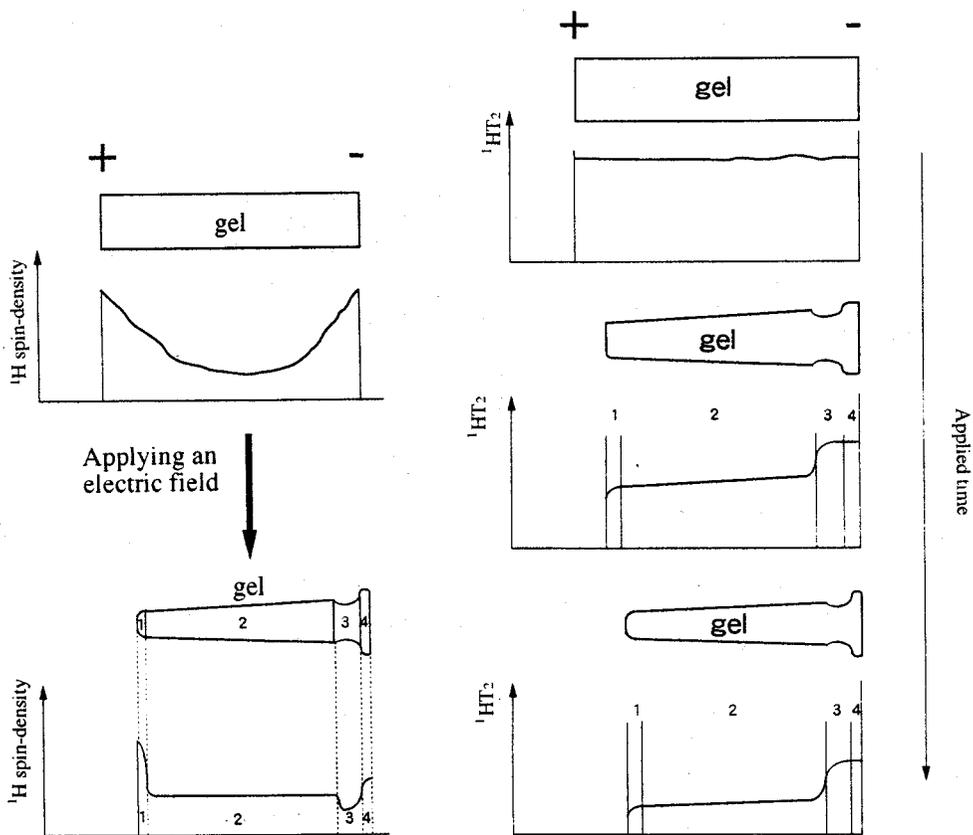


Fig.7 A model for change of ¹H spin-density distribution

Fig.8 A model for T₂ distribution

P64 超高速 NMR 映像法による Taylor 渦流の速度場計測

筑波大学物理工学系 巨瀬勝美

Measurement of velocity distribution in Taylor vortex flow using ultrafast NMR imaging

Katsumi Kose, Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

The most powerful feature of ultrafast NMR imaging in flow measurements is that velocity component distribution in a cross-sectional plane can be measured in a very short time (~50 ms). This technique was applied to a Taylor-Couette flow between a rotating inner cylinder and a fixed outer cylinder. The radii of the cylinders were 5.00 and 9.00 mm (the ratio:0.556) and the aspect ratio was 35. Working fluid was CuSO₄ dissolved water. NMR images designed to give radial velocity-component distributions in a cross-section containing the rotational axis were measured successively at 250 ms time-intervals when the flow was in the wavy Taylor-vortex region. The acquired image time-sequences were Fourier-transformed to obtain two-dimensional spatial maps of velocity power spectra in the plane. The obtained spectral maps clearly demonstrate the spatial distribution of wavy spectral components (in 'jet mode') as calculated by C. A. Jones.

1. はじめに

超高速 NMR 映像法 (エコー・プレーナ法: EPI) は, 他の流体計測法にはない様々な特長を備えているが, そのなかでも最大の特長は, 任意の断面における流速分布が非常に短い時間 (約 50ms) で得られるということであろう (1). この手法は, これまで, 円管内の層流-乱流の遷移領域で発生する乱流塊 (パフ) の研究に用いられ, 従来の手法では不可能であった, 管軸に垂直な断面における乱流渦分布の可視化や瞬間的速度場の計測などにその威力を発揮してきた (1-4).

一方, EPI が有効に適用できる対象は, いくつかの (特殊な) 条件を満たす必要がある. その一つに, 対象が高い対称性を持つことが挙げられる. これは, 計測対象の核スピンの, 不均一な共鳴磁場中にある場合には, 顕著な画像歪が発生するためである. すなわち, 対象に均一な静磁場を印加するだけでなく, 対象も均一な反磁場を発生する必要がある. このため対象は, 回転楕円体, もしくはそれと同様の対称性を持つものでなければならない. 円管内の流れは, この条件を満たしていたが, 今回の研究で行った, 回転する同軸二円筒間を流れる Taylor-Couette 流も, この条件を満たし, EPI が有効に適用できるものと期待される.

よく知られているように, Taylor-Couette 流は, 層流から周期流を経て乱流へと遷移する典型的な系として, これまで実験的, 理論的にさまざまな研究が行われてきた (5). そして, 内外円筒の半径比が 1 に近く, しかも外円筒が静止し, 内円筒のみが回転する系においては, その遷移の実体はかなり明かにされてきている. しかしながら, 周期流や乱流の空間的構造に関しては, 実験的研究も少なく, まだ解明されていないことも多い. そこで本研究では, 回転精度の非常に高い NMR 試料管を用いて, 同軸回転円筒セルを作成し, Taylor-Couette 流の可視化と速度場計測を行った.

2. 実験装置と実験方法

図 1 に示す Taylor-Couette セルの外円筒と内円筒には, 外径, 内径, 長さがそれぞれ 20mm, 18mm, 200mm, そして 10mm, 9mm, 190mm の NMR 用高精度試験管を用いた. すなわち, 内円筒と外円筒の半径はそれぞれ 5.00mm, 9.00mm である. なお, 内円筒にテフロン製の回転スパーサーを固定することにより,

Key Words: NMR imaging, ultrafast, EPI, Taylor vortex, Taylor-Couette flow
こせかつみ

流体の高さ (h) を 140mm とした。よって、流れを特徴づけるパラメタである内外半径比 η は 0.556, ギャップ d は 4.0mm, アスペクト比 Γ (h/d) は 35 であった。作業流体には, 硫酸銅を少量加えた水を用い, 外円筒の下から空気を吹き付けることにより, 水温を $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に制御した。テイラー渦が発生する臨界レイノルズ数 Re は 70 であり, この温度における水の動粘性係数は $0.72cSt$ であるので, Re における内円筒の回転数は 24rpm であった。

外円筒は, NMR の送受信コイル (直径 23mm) の中に鉛直に固定し, 内円筒は鉛直軸回りに自由に回転できるアクリル棒 (長さ約 50cm) に接続した。アクリル棒の上部にプーリーを取り付け, 超伝導磁石から約 1.5m 離れた場所に設置した DC コントロールモーターと, 合成ゴム製のベルトで接続した。そして DC モーターの回転数は, パーソナルコンピュータで制御した。

撮像は, Oxford 社の 4.7T, 89mm 垂直ボア超伝導磁石と, Doty 社の active shield 勾配コイルを用いた自作の映像化システムで行った。撮像領域は, 回転軸を含む, スライス厚 2mm, 19.2mm \times 19.2mm の鉛直断面とした。撮像方法は, 通常の 2DFT 法 (128 \times 128 画素) と, EPI 法 (64 \times 64 画素) を使用した。よって, 面内の画素の大きさは, それぞれ, 0.15mm \times 0.15mm, 0.3mm \times 0.3mm である。2DFT 法では, 繰り返し時間 600ms, エコー時間 24ms のスピン・エコー系列を用い, EPI では, 繰り返し時間 250ms, エコー時間 48ms, データ収集時間 40.96ms のスピン・エコー系列を用いた。

3. 結果と考察

図 2 に, $R=4Re$ のときに, 2DFT 法で可視化した定常なテイラー渦の画像を示す。これらの画像は, 最初に, 流体に格子状の核磁化の飽和パターンを生成し, τ 時間後に撮像することによって, その間の流体の動きを可視化したものである。格子の間隔は 2.0mm であるので, テイラー渦の回転軸方向の波長 (λ) や, 面内の流速を定量的に評価することができる。 λ/d は, Re においてはほぼ 2.0 であるが, R が Re より大きい場合には, R とその状態までの系の履歴に大きく依存することが知られている。 λ は図 2 においては約 6.0mm であり, λ/d は約 1.5 である。この値は, 内円筒の回転数を Re 以下から上昇させる実験の度に 10% 程度のばらつきを示した。

この系 ($\eta = 0.556$) では, λ/d が 1.5 のときに, R が約 4.5 において wavy なテイラー渦へと遷移することが知られている (6)。図 3 に, $R=5.5Re$ のときに, 250ms の時間間隔で連続的に測定した画像の位相分布の例を示す。この位相分布は, 動径方向の速度成分の分布を示すものであり, 画像面において右方向の流れは白く, 左方向の流れは黒く示されている。画像の上端と下端には

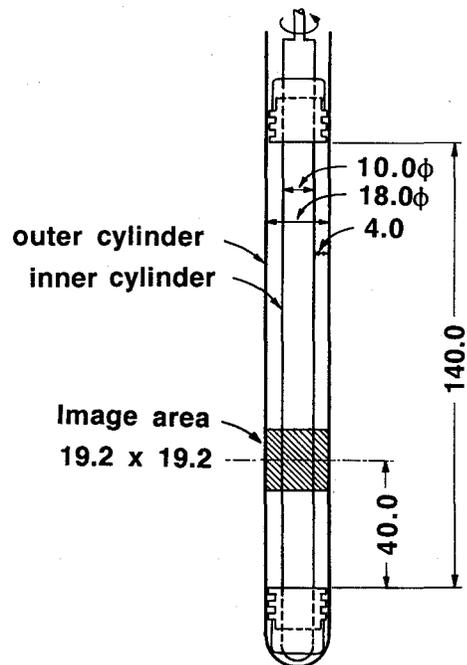


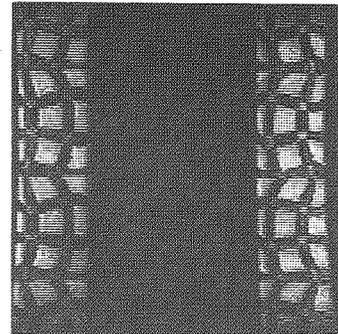
図 1. 同軸回転二円筒セル
(単位は mm)

静磁場の不均一性のため画像歪がみられるが、内円筒から外円筒に向かって噴出しているジェットが上下に振動しているのが見られる。この振動の周波数を算出するために、連続的に取得した256枚の位相（速度成分）分布を、時間軸方向にFourier変換を行った。このようにして、動径方向の速度成分のパワースペクトル分布を一挙に得ることができた。R=5.5Rcのときに得られた速度パワースペクトルの空間分布の一部を図4に示し、速度のパワーの全断面にわたる総和の周波数変化を図5に示す。このように、EPIを用いることにより、従来同時刻においては、点（レーザードップラー）(7)ないしは線上（超音波）(8)でのみ行われていた速度スペクトル計測が、一挙に二次元面において可能となった。

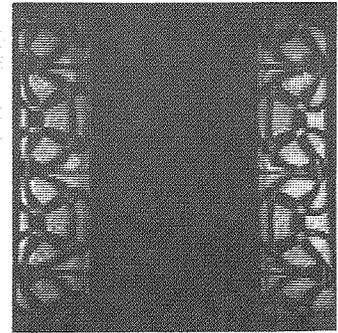
ところで、図5にみられるように、R=5.5Rcにおいては、0周波数以外に1.5Hzあたりに大きなピークが存在している。これは、テイラー渦のwavyな運動の最も主要な周波数成分であり、図3からわかるように、内円筒から吹き出すジェットの軸方向の振動に対応している。この振動では、吹き出しの地点は一定で、先端が大きく振動しているため、その速度スペクトル強度は、図4(c)に示されているように、吹き出し地点から動径方向においては非常に小さな値となっている。すなわち、振動成分は、予想されるように、ジェットの辺縁部において大きな強度を持っていることが、図4に明瞭に示されている。これは、かつて同様の条件において計算されたwavyな運動のスペクトル成分の空間分布によく一致している(6)。なお、1Hz近傍に比較的にブロードなピークがみられ、特徴的な空間分布を示しているが、現在のところ、どのような振動に対応しているのかは検討中である。

4. むすび

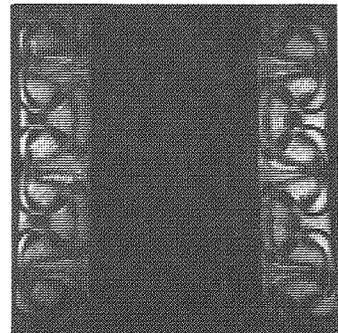
速度スペクトルの計測は、流れの不安定性を研究する上で不可欠であり、これまで、熱線流速計はもちろん、レーザードップラー流速計などを用いて計測が行われてきた。しかし、ほとんどの計測が、一つの時刻では一点のみであり、また最近の超音波を用いた計測でもいくつかの線上で行われているにすぎなかった。超高速NMRE映像法は、速度スペクトルを一つの断層面上で一挙に求めることができるため、流れの不安定性を研究する上で、非常に強力な手法とな



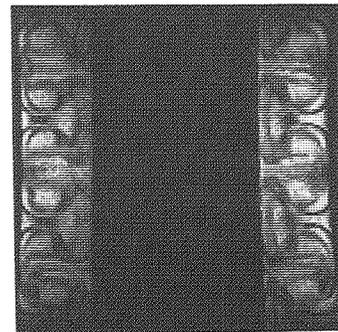
(a) $\tau_d=50\text{ms}$



(b) $\tau_d=100\text{ms}$



(c) $\tau_d=150\text{ms}$



(d) $\tau_d=200\text{ms}$

図2. 定常テイラー渦流

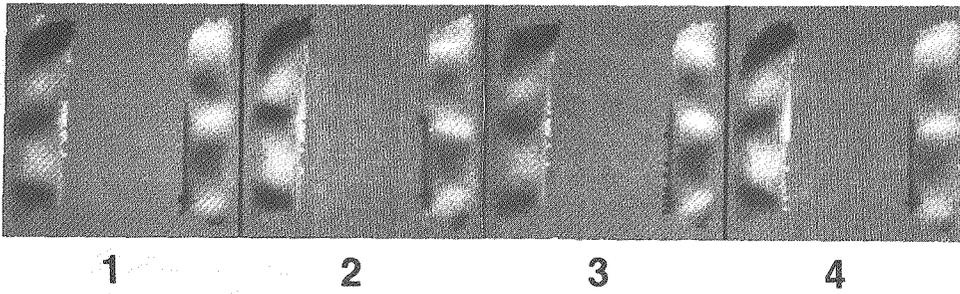


図3. 250ms間隔で連続的に撮像した動径方向の速度分布の時間変化

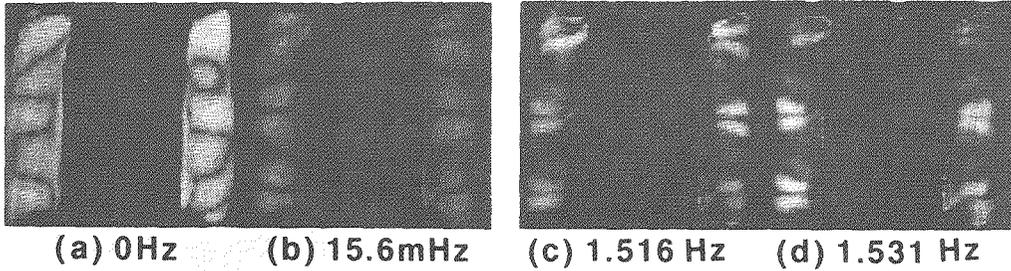


図4. $R=5.5R_c$ における速度スペクトルの空間分布

ることが期待される。

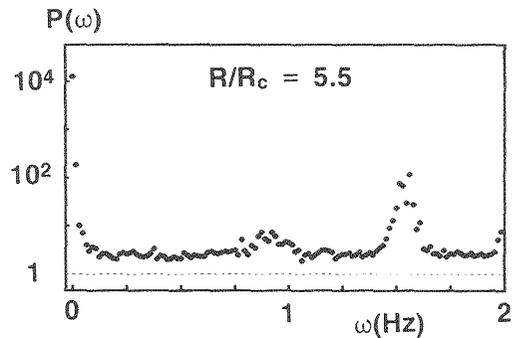


図5. 速度パワースペクトルの全断面における総和

< 参考文献 >

- 1) K. Kose, *Phys. Rev. A* **44**, 2495(1991). 2) K. Kose, *J. Magn. Reson.* **92**, 631(1991). 3) K. Kose, *J. Magn. Reson.* **96**, 596(1992). 4) K. Kose, *J. Magn. Reson.* **98**, 599(1992). 5) R. C. Di Prima and H. L. Swinney, *Hydrodynamic Instabilities and Transition to Turbulence* (ed. H. L. Swinney and J. P. Gollub), 139-180. 6) C. A. Jones, *J. Fluid Mech.* **157**, 135(1985). 7) P. R. Fenstermacher, H. L. Swinney, and J. P. Gollub, *J. Fluid Mech.* **94**, 103(1979). 8) Y. Takeda, W. E. Fisher, K. Kobashi, and T. Takada, *Exp. Fluids* **13**, 199(1992).

○三森文行¹、久野譜也^{1,2}、鮮干 撰^{1,3}、浅野勝己⁴

(¹国立環境研究所、²東大教養、³筑波大大学院、⁴筑波大体育科学)

Analysis of energy metabolism in the skeletal muscle by ³¹P NMR
Fumiya MITSUMORI¹, Shinya KUNO^{1,2}, Sub SHUNOO^{1,3}, Katsumi ASANO⁴

³¹P NMR spectroscopy was used to follow the changes in high energy phosphorus metabolites and pH in rat hindlimb muscles at rest, during submaximal twitch contractions stimulated by electric pulses, and recovery in a noninvasive manner. Changes in the PCr/(PCr+Pi) ratio were described as two state transition between the rest and work states, while no change in ATP. The steady state level of PCr/(PCr+Pi) at work, or the transition rate of PCr between the two states changed in the endurance-trained rat where the oxidative metabolic capacity had been increased, or in the rat exercising under hypoxic conditions. We tried to analyze the results semi-quantitatively based on two different regulation models of oxidative ATP formation reaction.

【はじめに】 In vivo NMRにおいては新しい測定法の開発とともに、得られた結果の定量的解析法の研究もきわめて重要である。現在までの研究の多くは観測された代謝物の定常濃度、変化率の記述にとどまり、それをもたらず生体の代謝機能、酵素活性まで解析する方法は確立されていない。本研究では、筋の酸化的リン酸化機能を例として、³¹P NMRスペクトルより得られたパラメータを用いて筋の酸化的リン酸化機能を半定量的に解析する試みを行った。合わせて、同一個体を2年間にわたってin vivo NMR法により追跡した結果から、機能の個体評価の可能性についても紹介したい。

【方法】 Wistar系ラットの後肢に表面コイルNMR信号検出器、張力ゲージ、電気刺激用電極を装着し、筋に一定の運動負荷を与え、安静→運動→回復の各過程で³¹P NMRスペクトルを測定した。測定はBruker Biospec 24/30分光計を用い、最も単純なpulse & collect法を用いた。一群のラット（実験群、コントロール群各8匹）では筋の酸化的代謝機能を増進させるため2年間にわたる持久トレーニング（トレッドミル上での26.8m/minの走運動、45分間、週3回）を負荷し、3か月ごとに上記の測定を繰り返した。他のラットでは酸化的リン酸化反応を酸素リミットの状態で観測するために、吸気ガ

In vivo NMR、³¹P NMR、エネルギー代謝、酸化的代謝機能、骨格筋

みつもり ふみゆき、くの しんや、せんう せつ、あさの かつみ

ス中の酸素濃度を50, 28, 21, 11, 8%と変えて、同様の測定を行った。

【結果】 後肢筋の安静→運動→回復の各過程で図1に示すように連続的に³¹P NMRスペクトルが得られる。パルス高20V、幅2ms、1Hz繰り返しDC電気パルスによる筋の収縮はクレアチンリン酸(PCr)の低下とそれに見合う無機リン(Pi)の増加をもたらすが筋ATPは全く変化しない。

スペクトルより各共鳴線強度を読みとり、PCr/(PCr+Pi)を時間に対してプロットすると図2(トレーニング6か月の例)を得る。PCrの挙動は安静、運動の2状態モデルで記述できる。トレーニング群では運動状態でのPCr/(PCr+Pi)が0.83とコントロール群の0.67に比べて高く保たれており、運動→安静への回復速度も速くなっている。このプロットより安静状態のPCr、運動時のPCr、またPi化学シフト値より得た筋pHをパラメータとしてトレーニング開始前から21か月までの8回のデータを評価した。ここでは、一例として2年間を通して測定できたトレーニング群5匹、コントロール群4匹の運動時PCrの個別プロットを図3に示す。これよりトレーニング効果の個体ごとの評価が可能である。

一方吸気中の酸素濃度を变化させた状態での運動からはトレーニングの場合と同様の

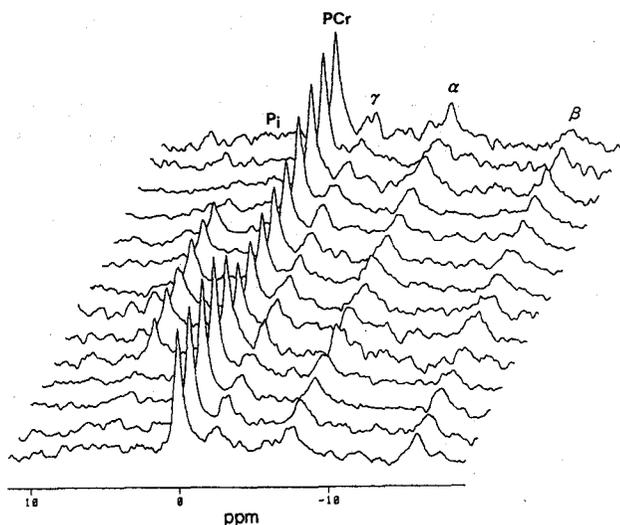


Fig.1 A series of phosphorus-31 NMR spectra obtained from rat hindlimb muscles in vivo at rest(lower 4 traces), during exercise (middle 6) and recovery (upper 4). The NMR spectra were measured by accumulating 32 FIDs with a pulse length of 25us, and a recycling time of 3s.

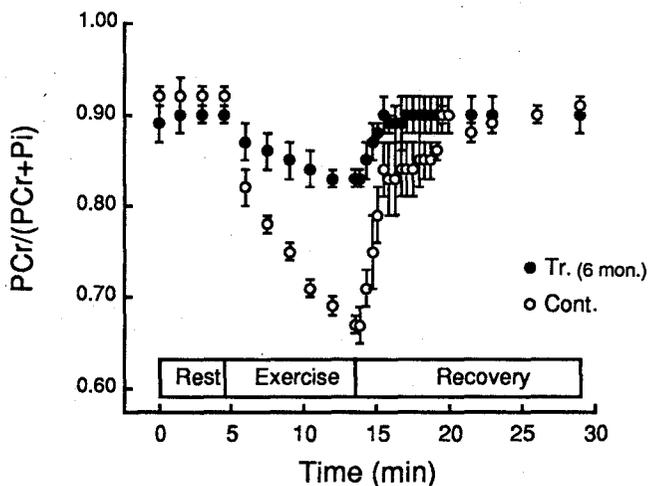


Fig.2 Changes in PCr/(PCr+Pi) at rest, during exercise, and recovery in the hindlimb muscle of rat trained for 6 month (●) and control (○). PCr and Pi at early stage of recovery were obtained from the spectra accumulated 8 times (24s) in order to improve the time resolution.

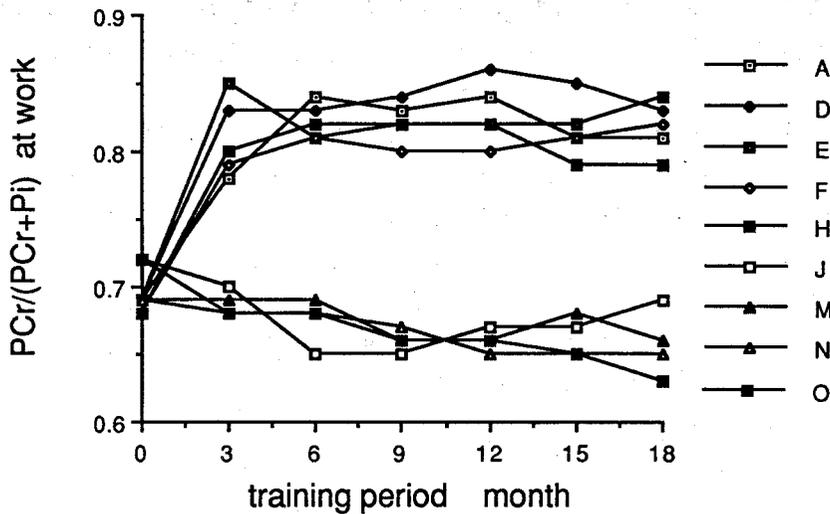


Fig.3 Individual plots of the steady state PCr/(PCr+Pi) ratio during exercise for the trained rats (A, D, E, F, H) and for the control rats (J, M, N, O) up to 18 months of training.

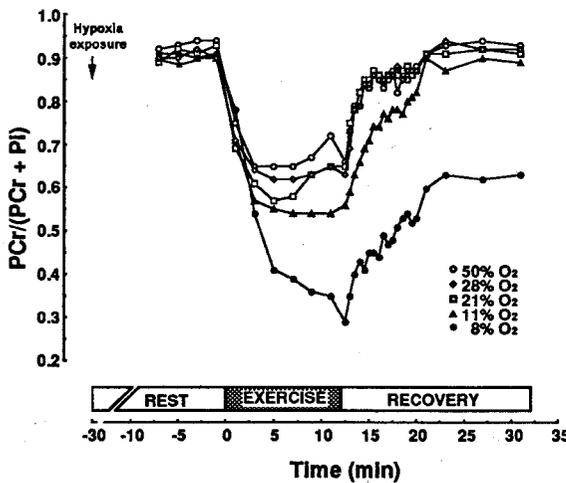


Fig.4 Changes in PCr/(PCr+Pi) at rest, during exercise, and recovery in the hindlimb muscles of rat inspired with 50, 28, 21, 11 or 8% O₂.

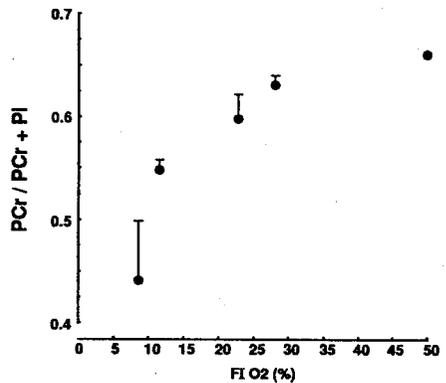


Fig.5 Steady state PCr/(PCr+Pi) ratio at various inspired O₂ (%).

プロットが得られる(図4)。酸素濃度が50→8%と低下すると。運動時のPCrレベルはこれに対応して低下し(図5)、回復速度も遅くなる。

【筋の酸化的リン酸化機能の解析】 トレーニング、低酸素運動それぞれの群で運動強度が等しいにもかかわらず、運動状態におけるPCrの定常レベル、安静、運動の2状態間の遷移速度に系統的な変化が見られた。すなわち、酸化的代謝機能を高めたトレーニング群では運動時の高いPCr定常値およ

び速い遷移速度、酸化的代謝機能を制限した低酸素運動では、PCr定常値及び遷移速度の低下が見られた。この2つの指標をより定量的に筋の酸化的リン酸化機能と結び付けることを検討した。

上記の結果を解析的に解くことはできないので、2つの酸化的リン酸化反応の制御モデルを利用した。第1はChanceらの提唱するATP生成反応のMichaelis-Mentenモデルで、ATP生成速度 V についての制御式 $V/V_{max}=[ADP]/([ADP]+K_M)$ にクレアチンキナーゼの平衡反応式を代入した $V/V_{max}=1/(1+a/([Cr]/[PCr]))$ を用いる。Chanceらは $[ATP]=5\text{mM}$, $\text{pH}=7.1$, $K_M=20\text{ uM}$ の条件下で $a=0.53$ を用いたが、我々は pH 等を実測にあわせて再計算した a 値を用いた。この式をトレーニング6か月のPCr定常値に適用すると、トレーニング群及びコントロール群それぞれの V/V_{max} 値、 0.48 ± 0.03 、 0.59 ± 0.04 よりトレーニング群での V_{max} が23%増大していると算出された。

第2のモデルとしてMeyerらの提唱するATP生成速度が $[PCr]$ に比例するとするリニアモデルを用いた。この電気的モデルの解析から $[PCr]$ の安静、運動の2状態の指数関数的遷移が解析でき、その時定数はミトコンドリアにおけるATP生成反応の抵抗に比例することが導かれる。第1の場合と同様にトレーニング6か月での運動→安静へのPCrの遷移の単一指数関数によるフィッティングの時定数はトレーニング群、コントロール群でそれぞれ $57.1\pm 40.3\text{ s}$ 、 $132.0\pm 10.7\text{ s}$ であった。これよりリニアモデルによればミトコンドリアの酸化的リン酸化機能はトレーニング群では約2.3倍に増大していることになる。酸化的代謝機能マーカーの一つであるコハク酸脱水素酵素の活性をトレーニング1年目にラットのgastrocnemius筋表層で求めた値はトレーニング群で27.7%増加しており、第1モデルでの推定値に近かった。

【文献】

1. 三森文行, 運動生化学 5, 34 (1993).
2. S.Kuno, M.Akisada, F.Mitsumori, Eur.J.Appl.Physiol. 65, 197 (1992).
3. B.Chance, J.S.Leigh, Jr., B.J.Clark, J.Mariss, J.Kent, S.Nioka, D.Smith, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82, 8384 (1985).
4. R.A.Meyer, Am.J.Physiol. 254, C548 (1988).

○高橋征三¹⁾, 荻野孝史²⁾

1) 日本女子大・理・物生, 2) 国立精神・神経センター, 神経研究所

Spectral Analysis of Minor Components in Rat Brain Tissue by NMR.

○Seizo Takahashi¹⁾ and Takashi Ogino²⁾

1) Dept. Chemical and Biological Sciences, Japan Women's Univ.

2) Institute of Neuro Science, NCNP

Rat brain tissue was investigated by CH-COSY and HMQC spectra. By means of 2 dimensional spectra, most of the NMR resonances in the brain was clearly isolated by taking the correlation between ^1H and ^{13}C . Resonances of serine was presently assigned which is physiologically important for the brain function. The 2 dimensional HMQC method was found promising enough to in vivo studies considering the spectral resolution and its acquisition time. It is, however, necessary to improve the pulse train to obtain the spectra of higher molecular weight components in the brain.

生体組織は複雑な形状の固体成分と細胞液という液相からなる不均質系であり, 種々の分子量の物質が多種類混合した多成分系である. これをNMRで研究する場合, 分解能は上がらず, NMRスペクトルは複雑に重なり合うという, in vivo 系特有の問題がある. また生体系は時々刻々, 代謝物質に量的変化があるため, できるだけ短時間に測定を終了しなければならない. 本研究の目的は, 生体の組織や細胞レベルでの生理反応を研究するために, 複雑に重なるスペクトルを分離し, それぞれの分子を同定すると同時に, 定量的に代謝物質の変化を評価するための方法を開発することである.

【実験】試料は7週令のWister Ratの脳を用いた. 酸可溶性成分の試料は, 過塩素酸で除タンパクしたのち重炭酸カリウムで水冷下中和した. 中和過程で生じた塩は遠心と濾過で除き, 上清を凍結乾燥した. 測定のための試料調製は, ミクロNMR試料管の中で重水中凍結乾燥し, 再度重水に溶かした. 新たに生じた過塩素酸カリウム塩は, 遠心し管底に密着させて測定した. ラット脳の測定のためには, 脳の前頭葉を適当な大きさにスライスして試料管に入れ, ロックのために重水素化した生理食塩水を約50 μL 共存させた. 生理食塩水には, 微量のナトリウムアジドを混ぜ, 脳組織の呼吸酵素を止めた.

装置はBruker AMX-400WBを用い, 298Kで測定した. ^1H -および ^{13}C -NMRの測定周波数はそれぞれ400.13および100.6MHzである.

【結果および考察】従来 in vivo NMRはほとんど1次元の測定であり, NMR信号のごく一部しか利用していなかった. たとえば次ページの表に ^1H および ^{13}C で帰属されたものをそれぞれ○と*で示すが, ラット脳内のアミノ酸で帰属されたのは一部であること

NMR, in vivo, HMQC, スペクトル, 脳, セリン

がわかる。しかも信号が重なるため帰属された信号の中でも実際に利用できるのはごく一部でしかない。

最近、脳の発達過程にともない、これまでの常識に反し、種々のD-アミノ酸が脳内に微量蓄積することが報告され、D-アミノ酸の脳内機能との関係が非常に興味を持たれている。そこで脳内分布が選択的で、NMDA受容体と類似した分布を示すセリンに着目した。表

アミノ酸	大脳 ($\mu\text{mol/g}$ 脳組織重量)	血漿 (mM)	NMRスペクトルの帰属
グルタミン酸	11.6	0.16	○ *
タウリン	6.63	0.42	○ *
N-アセチルアスパラギン酸	5.6	—	○ *
グルタミン	4.48	0.48	○ *
アスパラギン酸	2.63	0.02	○ *
γ-アミノ酪酸 (GABA)	2.33	0.01	○ *
セリン	0.98	0.19	
グリシン	0.68	0.22	○ *
スレオニン	0.66	0.19	○
アラニン	0.65	0.31	○ *
リシン	0.21	0.30	
アルギニン	0.11	0.10	
プロリン	0.07	0.16	
チロシン	0.07	0.09	
バリン	0.07	0.14	○
ヒスチジン	0.05	0.05	○
フェニルアラニン	0.05	0.05	
トリプトファン	0.05	0.10	
ロイシン	0.05	0.10	○
システイン	0.04	0.11	
メチオニン	0.04	0.04	
イソロイシン	0.02	0.07	
オルニチン	0.02	—	

表 ラット大脳組織および血漿のアミノ酸濃度と帰属の有無

○と*はそれぞれ ^1H , ^{13}C スペクトルによる帰属を示す。

からセリンは濃度的に十分に検出範囲内であると考えられる。しかるにまだ帰属されていない理由は、セリンの共鳴位置に、高濃度存在する他の物質の共鳴信号が重なっているためであると考えられる。このような信号を検出し定量化するためには2次元または3次元NMRを利用するのがよいことは分かるが、問題はそれが *in vivo*測定に使えるほど、じゅうぶん短時間に測定できるかである。

^1H -COSYや ^1H -NOESYを測定から、intact細胞の場合磁場の不均一のため、水の近傍にある共鳴線は水からの寄与を完全に排除することが極めて困難であることがわかった。その結果、感度を多少犠牲にしてもスペクトルの分離が優先すると考えた。そこで ^{13}C の分離能を利用して ^1H スペクトルを編集する方法を検討した。まず完全なスペクトル・パターンを得るためにCH-COSYを測定した。その結果 ^{13}C の全領域をカバーするためには2K点あれば十分であることが分かった。またセリンの信号が、他の信号から分離されて、明瞭に観測できることが分かった(図1)。

つぎに線形予測法の効果を調べるために、CH-COSYにおいてデータがどの程度再現されるかをチェックした。その結果、データ点が128Kでそれを2K点に拡張しても、ノイズ成分は増えるものの、artifactの発生は注意すれば問題にならないことが分かった。図2の上のスペクトルは通常の方法で測定した1次元のNMRスペクトルで、下はCH-COSYのF1成分を線形予測でデータ点を拡張して得たprojectionスペクトルである。図から明らかのように、CH-COSYスペクトルは緩和の速い高分子成分を落とし、低分子成分だけの、しかも分解能をenhanceしたスペクトルに対応する。

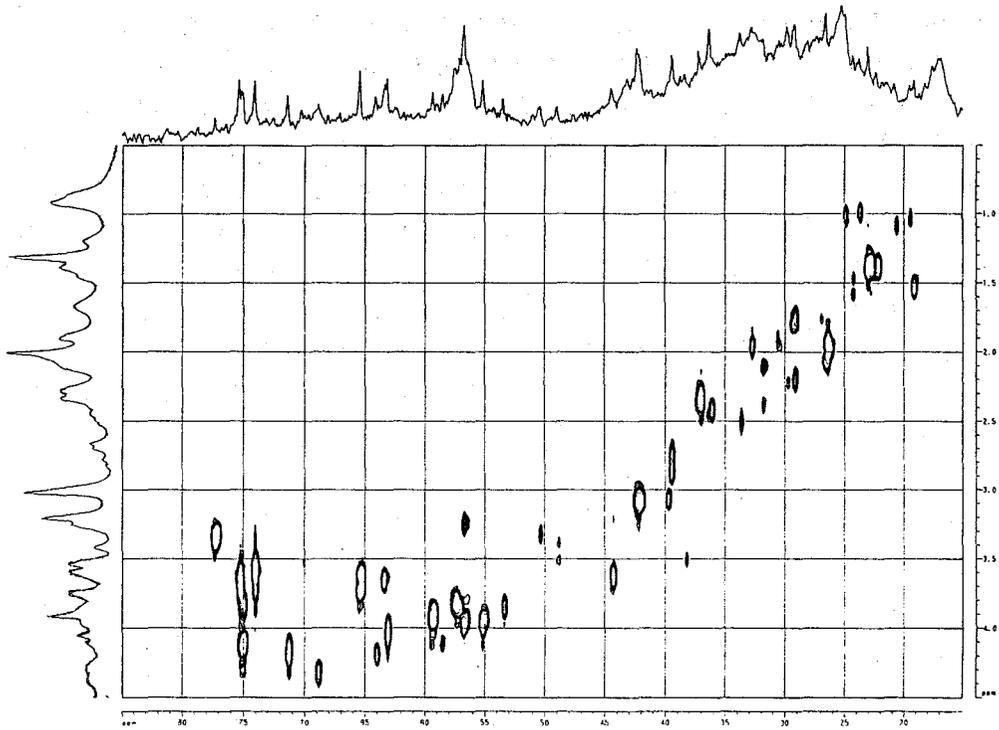


図1 ラット脳のCH-COSYスペクトル

F1, F2 方向にそれぞれ ^1H および ^{13}C の通常スペクトルを示した。

HMQCスペクトルは $2\text{K} \times 2\text{K}$ 点で測定し、約16時間で良好な結果を得た。スペクトルはCH-COSYの結果と良い一致を示した(図3)。セリンの信号も明瞭に分離して観測できた。これは脳組織の外からセリンを加え、信号が強くなることで帰属した。

つぎに測定時間を短縮するための検討を進めた。まずF1側のスペクトル幅を脂肪族領域だけをカバーする範囲、つまり75 ppmにし芳香族領域を折り返すことで、分解能をまったく犠牲にすることなくデータ点数を128にできた。これで測定時間は3ないし4時間まで短縮できた。繰り返し時間は1秒以下に短縮できた。HMQCの測定は ^{13}C

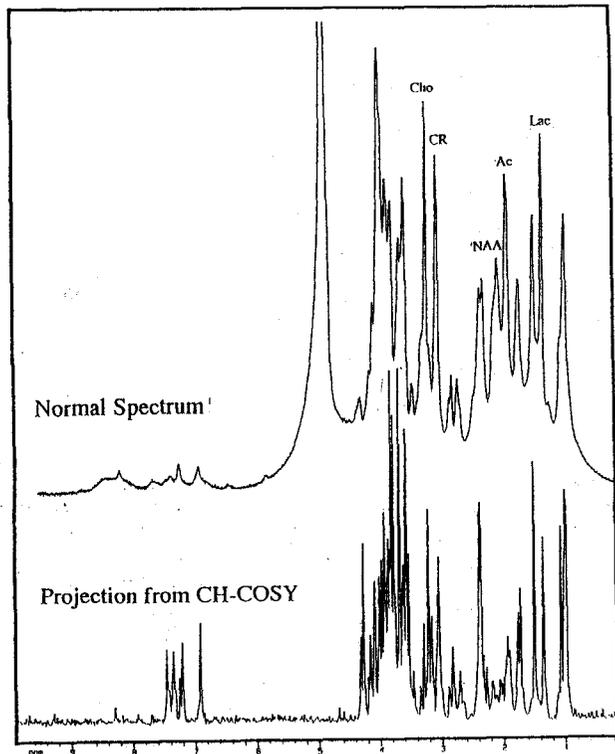


図2 通常スペクトルとCH-COSYのprojectionスペクトル

と ^1H の間の2量子遷移を利用する方が、単純なBirdパルス法より良好なスペクトルを得た。これはintact細胞に固有な磁場の不均一性が大きく寄与しているものと思われる。

スペクトルの分布から判断して、脂肪族領域の信号をさらに折り返して線形予測法と組み合わせれば、F1のデータは16点前後で必要な分解能が得られるものと思われる。そうすると測定時間は15分以内に行うことができ、in vivo 測定法として2次元NMRは十分実用可能と判断される。しかし現在の方法は、たとえば得られたピークがアミノ酸由来のものかペプチド由来のものか区別ができない。またprojectionスペクトルから判断して、高分子由来の信号を大部分落としているものと思われる。in vivo 測定では、低分子だけでなく高分子の変動も生理的に重要である。したがってin vivo 測定に適したパルス列を工夫し、それらの区別をつけ、かつ短時間で測定できる方法を開発することが今後の課題として残されている。

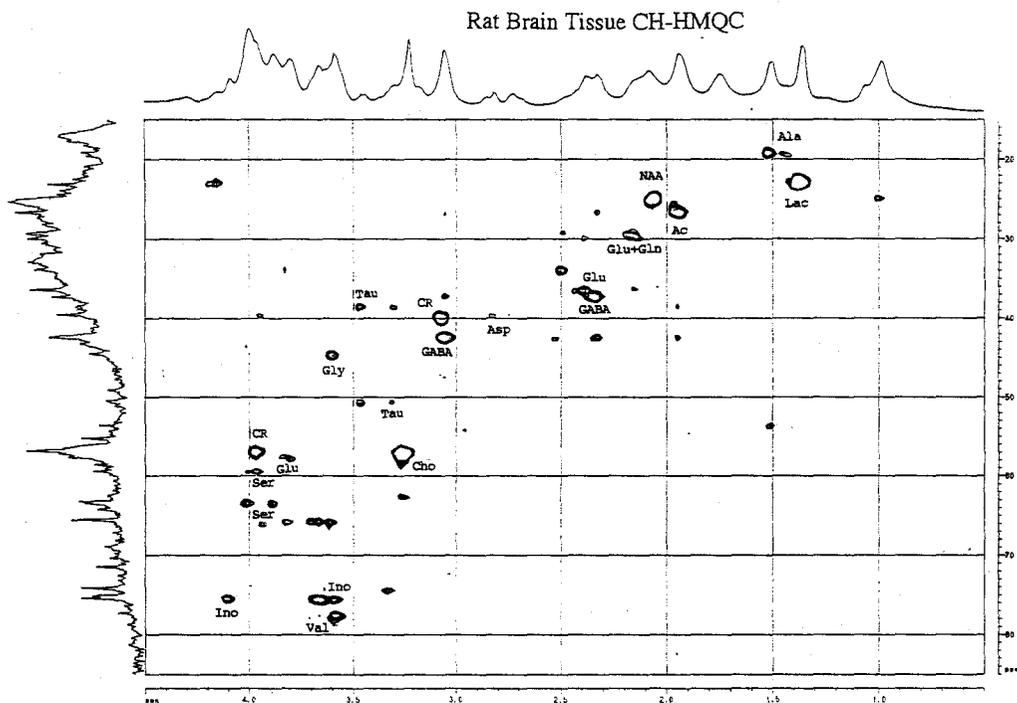


図3 ラット脳のHMQCスペクトル

^{13}C をスペクトル幅75ppmでとり、 $2\text{K} \times 128$ の測定で、測定時間は約3時間である。1次元のスペクトルは通常測定の結果である。 ^{13}C は約16時間積算した。この結果からスペクトル幅はさらに半分にしてもピークは重ならないし、1カラム当たり3ないし4つ以上ピークは存在しないことが結論できる。この結果は、線形予測を行えば、F1方向に16点以下のデータしなくてもピークが十分に分離されることを示唆する。

○犬伏俊郎¹、森川茂廣¹、木村亮之²、半田譲二²、鬼頭幸一³、
荒井俊之³

(¹滋賀医大 分子神経、²脳外、³京大医 麻酔)

Detection of ^{13}C -Labeled metabolites in rat brain utilizing the sensitivity of ^1H NMR

○Toshiro Inubushi¹, Sigehiro Morikawa¹, Ryoji Kimura², Jyoji Handa²,
Kouichi Kito³ and Toshiyuki Arai³

(¹Molec. Neurobiol. Res. Centr., and ²Neurosurgery, Shiga Univ. of Med. Sci.,
and ³Anesthesiology, Sch. of Med., Kyoto Univ.)

In the previous report, we presented the metabolism of $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose and the distribution of the metabolic products in vivo by ^1H -detected approach, a gradient enhanced version of hetero nuclear multiple quantum coherence (GE-HMQC). Here, we applied this method to some brain diseased models prepared on animals. One of the examples was the hypoxic condition of rat brain. A doublet ^1H signal attached to the methyl group of $3\text{-}^{13}\text{C}$ -lactate which was derived due to oxygen lack from the infused $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose was detected immediately after the death. Partial brain infarction was also investigated and the distribution of ^{13}C -labeled metabolites was analyzed in the brain.

【緒言】 ^{13}C -核を利用したNMR標識法は広範な有機代謝産物を網羅し、またその同位体の天然存在比が低いために、選択的に標識物質の時間的、並びに化学的消長を追跡できることから、生体において様々な応用が展開されてきた。しかし、 ^{13}C 核のNMR感度が低いことから、生体中の標識化合物を直接観測するには、試薬の大量投与や、長時間の測定を余儀なくされる。そこで、演者等は磁場選択法による ^1H 検出-多量子(MQ)相関スペクトロスコピー法を発展させ、 ^1H -核の感度を利用することから、ラット脳内のグルコース代謝産物が低磁場NMRでも追跡でき、その脳内分布を示す画像が得られることを昨年の本討論会で報告した(1)。今回は、臨床応用を目指して脳虚血モデルを作成し、この方法の適用を試みた。

【方法】 測定にはS-150自己遮蔽傾斜磁場コイルを附備したGE社製2T CSI装置を用い、 ^{13}C 核のRFは広域デカップラーを利用した。信号検出には自作

キーワード： ^{13}C -標識、磁場選択-HMQC、 ^1H -検出、 ^{13}C -化学シフト画像

○いぬぶし としろう、もりかわ しげひろ、きむら りょうじ、はんだ じょうじ、
きとう こういち、あらい としゆき

の ^{13}C - ^1H 二重同調の表面コイルを用いた。パルス系列には傾斜磁場パルスを利用した Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (GE-HMQC) 法を用い、 ^{13}C RFパルスには DANTE の周波数選択パルスを採用した。傾斜磁場パルスは 2 ms の幅で、最大 7 G/cm まで負荷した。ラットはハロセン麻酔下、1 g/Kg BW の $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose を静脈より投与した。

【結果と考察】 前回の討論会でラットに $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose を投与後脳内の同標識化合物とその代謝化合物 $3\text{-}/4\text{-}^{13}\text{C}$ -Glx ($3\text{-}/4\text{-}^{13}\text{C}$ -Glu, $3\text{-}/4\text{-}^{13}\text{C}$ -Gln) が低磁場 NMR 装置を用いても ^1H NMR の感度で数分以内に検出でき、また、それらの脳内分布を示す画像も得ることができると示した。今回はこの方法の病態モデルへの応用としてラット脳梗塞を取り上げた。図 1 にはこの最も極端な例として $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose を投与後に屠殺し、その前後、10 分毎に観測される ^1H NMR スペクトルを示す。この図に示されるように死亡以前には観測されない $3\text{-}^{13}\text{C}$ -lactate が死亡直後から急速に増大し、その後数時間、一定の信号強度で検出された。ちなみに、この状態で $3\text{-}^{13}\text{C}$ -lactate の画像を得ると、かなりの信号が脳以外の周辺部の筋肉組織から検出されていることが明らかになった。

また、ラットの半脳梗塞モデルを作成し、同様の測定を行った。梗塞の作成 2 日後のラット脳では、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose と $3\text{-}/4\text{-}^{13}\text{C}$ -Glx はともに梗塞部位では観測されなかった。これに対し、シャム手術を施したラットでは両者の化合物が脳全体にほぼ均一に観測され、梗塞部位でのブドウ糖代謝の阻害がこの方法で確認できた。この方法により病態の特徴を表す ^{13}C -標識化合物の検出が ^1H 核の感度で行え、低磁場画像用 NMR によっても短時間にその局所化、或いは、画像化も可能なものと考えられる。これらの病態モデルに実験に加え、より広範な空間領域を確保するボリューム・コイルによる結果についても併せて報告したい。

【文献】 (1) 犬伏等、第 31 回 NMR 討論会講演要旨集 p17 (1992)。

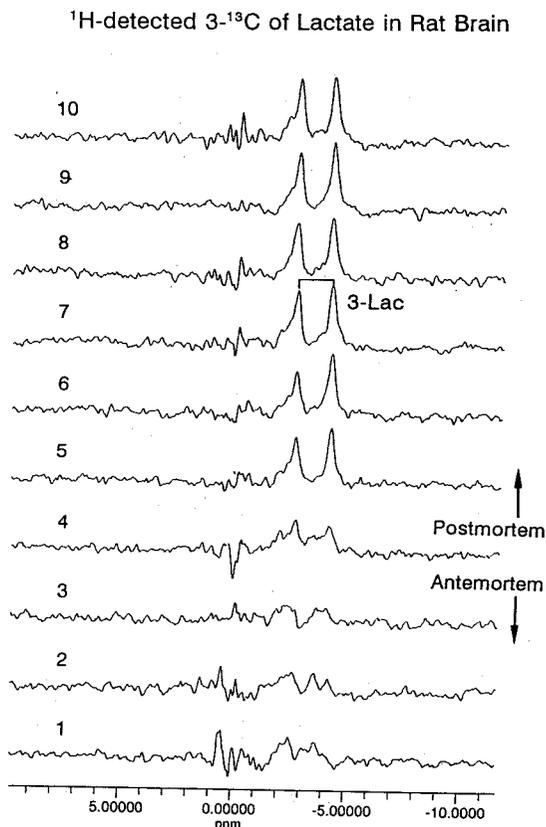


Fig. 1. A series of ^1H NMR spectra for the postmortem rat brain (4 - 10). Reference spectra during the $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose infusion were presented in (1) - (3).

**P68 The Application of CI NMR Null Point Spectral
Analysis to the Study of Chloride Ion Binding to
Human Serum Albumin**

William S. Price, Nien-Hui Ge[†], Luan-Ze Hong[†] and Lian-Pin Hwang[†]

National Institute of Materials and Chemical Research, Tsukuba, Ibaraki-ken 305.

[†]Department of Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC and
Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, ROC.

The binding and exchange of quadrupolar nuclei play important roles in biological systems. Normally quadrupolar nuclei are in exchange between free solution and being bound to a macromolecule. Generally the free population greatly exceeds the bound population. The ions in the free solution are usually in the extreme narrowing condition while the slowly reorienting bound ions are in the dispersion region. Previous NMR ion binding studies have generally been based on T_1 and T_2 measurements. The data were then analyzed to extract the fluctuation correlation time at the bound site and the exchange rate. The bound population occurs in the relaxation equations as a product of the square of the quadrupolar coupling constant of the bound site. This product forms a constant and can only be separated if one of the two terms can be independently determined. However, generally the fluctuation correlation time of the electric field gradient and the quadrupolar coupling constant at the free site can be determined independently. Generally the longitudinal relaxation appears to be exponential and a single exponential approximation has been derived which is suitable for small deviations from the non-extreme narrowing condition. However, with NMR spectrometers having increasingly larger static magnetic fields, the assumption of the relaxation approximating a single exponential becomes less realistic. Recently we have been developing a new NMR method for studying quadrupolar relaxation based on the observation and subsequent analysis of the fine spectral structure near the null point in inversion-recovery experiments (i.e., π - τ - $\pi/2$ -Acq.; see Fig. 1).¹⁻³ The fine spectral structure also provides a convenient means to observe the dynamic frequency shift. The shape of the null point contains information complementary to normal longitudinal and transverse relaxation measurements. The time evolution of the spin-density matrix is calculated using the Redfield equation. The relaxation equation is simplified by expressing it in a basis of state multipoles in which the individual elements of the density matrix transform as components of the full rotation group.

Keywords: binding, human serum albumin, null point, state-multipole

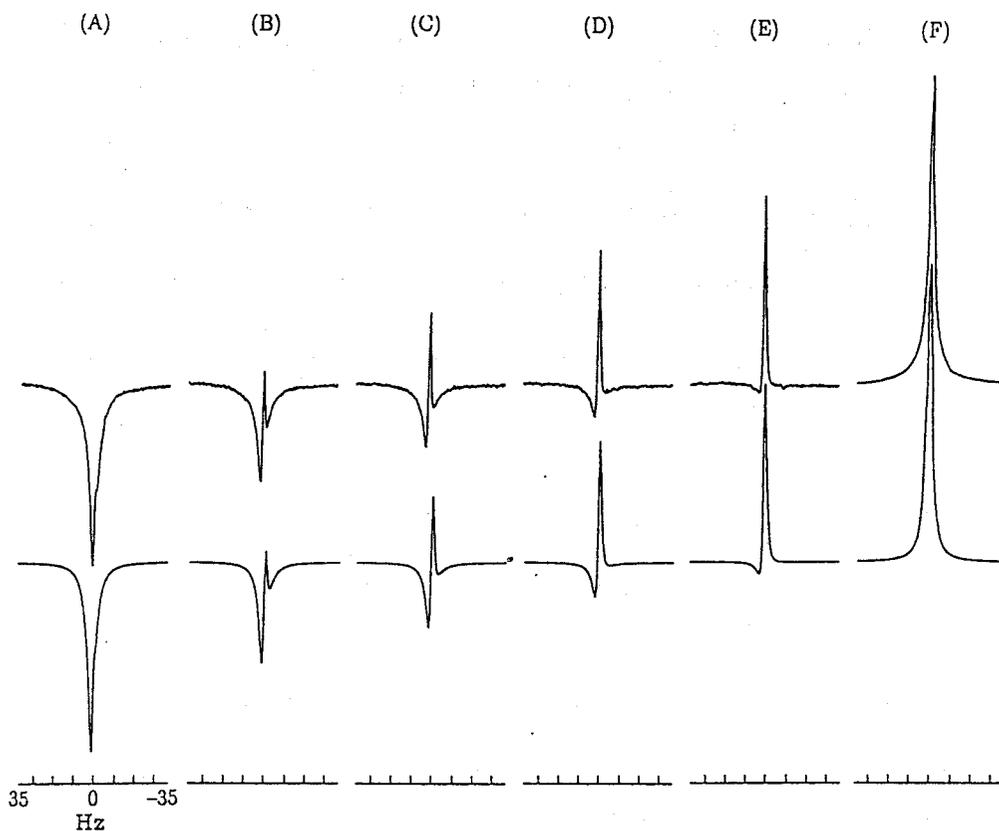


Figure 1. Experimental (top) and simulated (bottom) ${}^7\text{Li}$ inversion-recovery spectra as a function of the τ delay time of a sample containing 0.2 M LiCl and 9M D_2O in isopropanol-dg at 225 K. The τ values and ordinate magnifying factors for the spectra are respectively (A) 250 ms, 16; (B) 260 ms, 16; (C) 265 ms, 16; (D) 270 ms, 16; (E) 275 ms, 16; (F) 4 s, 1. The asymmetry in the spectra results from the dynamic frequency shift.

The results of previous NMR studies on chloride ion binding to human serum albumin (HSA) suggest that there are two classes of chloride binding sites: a small number of strong binding sites to which chloride binding can be inhibited by stoichiometric amounts of sodium dodecyl sulfate (SDS), and weak (SDS-insensitive) binding sites (see Fig. 2). In the present study the binding of chloride ions to HSA was studied using Cl NMR null point spectral analysis (see Fig. 3). We found that: (1) the results were consistent with a weak and a strong class of binding sites; (2) relaxation at the weak sites could be modeled using a single correlation time for the fluctuation of the electric field gradient at the bound site whereas binding at the strong site was modeled using a two-step model; (3) for the weak sites the enthalpy of dissociation

was 20.2 kJ mol^{-1} and at 310 K the correlation time was 3.4 ns; (4) for the strong site the dissociation constant was determined to be 0.1 M and at 310 K the slow correlation time was 35 ns and the upper limit for the fast correlation time was 0.5 ns. This study shows that analysis of the fine spectral structure at the null point provides a more detailed source of motional information than the normal longitudinal and transverse relaxation measurements. This method also allows more accurate determination of correlation times as well as enabling the interpretation of quadrupolar ion binding data when the relaxation is too non-exponential to allow the use of usual methods.

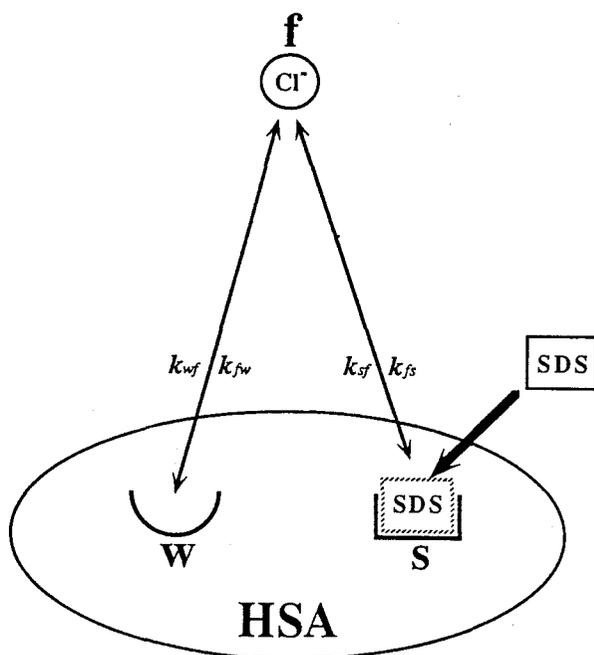


Figure 2. Schematic representation of chloride ion binding to HSA. The chloride ion exchange between the free (f) and weak (w) sites occurs independently of the exchange between the free and strong (s) sites. There are n_s and n_w strong and weak chloride binding sites per HSA molecule. The population of the chloride ions at the free, strong and weak sites is denoted by p_f , p_s and p_w , respectively. k_{xy} is the microscopic rate constant for transfer from site x to site y (where x, y = f, s, w). Direct exchange between sites s and w would be slow as it is limited by surface diffusion.

1. Price, W.S., Ge, N.-H. and Hwang, L.-P. (1992) Effects of higher-rank multipoles on spectral lineshapes of $I=3/2$ quadrupolar nuclei near the null point in inversion recovery experiments. *J. Magn. Reson.* **98**, 134-141.

2. Ge, N.-H., Price, W.S., Hong, L.-Z. and Hwang, L.-P. (1992)
Application of null point spectra in inversion recovery experiments for studying $I = 3/2$
quadrupolar nuclei involved in exchange processes.
J. Magn. Reson. **97**, 656-660.

3. Price, W. S., Ge, N.-H., Hong, L. -Z. and Hwang, L.-P. (1993)
Characterization of Chloride Ion Binding to Human Serum Albumin Using Cl NMR
Null Point Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1095-1105.

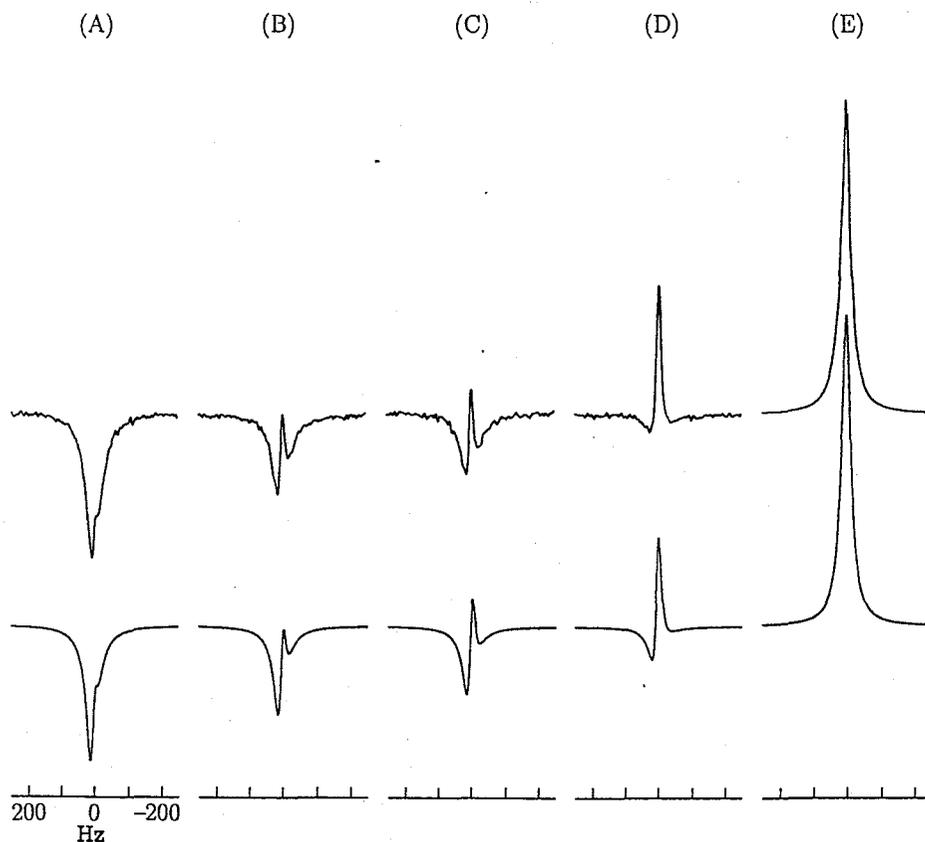


Figure 3. Experimental (top) and simulated (bottom) ^{35}Cl inversion-recovery spectra as a function of the τ delay time of a sample containing 0.45 mM HSA, 7.2 mM SDS 1 M NaCl and 50 mM Tris buffer in D_2O at pH 7.5 and 310 K. The τ values and ordinate magnifying factors for the spectra given respectively by (A) 10.4 ms, 32; (B) 10.5 ms, 32; (C) 10.55 ms, 32; (D) 10.65 ms, 32; (E) 250 ms, 1.

Secondary Structure and Signal Assignments of HIV-1 Protease
Complexed to a Novel Structure-Based Inhibitor by
Heteronuclear Multidimensional NMR Spectroscopy

Toshimasa Yamazaki, Linda K. Nicholson, and Dennis A. Torchia
Bone Research Branch, National Institute of Dental Research, National
Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA, (FAX) 301-402-0824

The aspartic protease encoded by HIV is essential for assembly and function of the virion. Because inhibition of the protease leads to the production of non-infectious viral particles, the protease is a leading candidate for target antiviral drug design. An impressive effort in rational drug design is underway, in which structural information obtained from X-ray crystal structures of the protease and protease-inhibitor complexes, is being used to identify the interactions that are crucial in stabilizing the protease-inhibitor complex.

In contrast with the extensive structural information now available about the protease and protease-inhibitor complexes in the crystalline state, virtually no information about the structure and dynamics of these systems in solution is available. Because the effects of crystal packing on local structure, dynamics, and solvent interactions are eliminated by working in solution, information provided by solution studies is a necessary complement to X-ray crystallographic data. Here, we report the first comprehensive NMR studies of the HIV-1 protease in solution. Essentially complete ^1H , ^{13}C and ^{15}N signal assignments of the protease complexed with a designed cyclic urea inhibitor DMP 323 which is a novel, structure based, highly specific inhibitor of the HIV protease were accomplished by using a variety of triple resonance experiments. We also determined the solution secondary structure and topology of the protease from NOE distance constraints, coupling constants, and hydrogen exchange data. The solution structure is compared with the canonical structure of the inhibited protease as derived from X-ray diffraction studies.

A ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of uniformly ^{15}N -labeled HIV-1 protease complexed with DMP 323 shows well dispersed intense signals, indicating that the protease assumes a well defined structure. Nearly all backbone ^{15}N , $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, and HN signals were assigned from the analysis of correlations observed in a 3D CBCA(CO)NH spectrum and a 3D CBCANH spectrum. The former experiment correlates each ^{15}N , HN signal pair to the $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}\beta$ signals of the preceding residue, while the latter provides these correlations in addition to the intraresidue ^{15}N , HN, $^{13}\text{C}\alpha$ and ^{15}N , HN, $^{13}\text{C}\beta$ correlations. In spite of the 23 kDa molecular weight of the protease-DMP 323 complex, 90% of the possible sequential correlations and all possible intraresidue correlations, except

for those involving the C α and C β of T4 and L5 and the C β of T31, were observed in the CBCANH spectrum. In addition, excepting the C α and C β of T4 and T5, all possible correlations were observed in the CBCA(CO)NH spectrum. Using the nearly complete sets of correlations available from these two experiments, stretches of amide resonances were sequentially aligned and various residue types were identified by their C α and C β chemical shifts. This enabled each stretch of amino acids to be assigned to a unique section of the amino acid sequence. The assignments were checked and extended to backbone H α and ^{13}C O signals, and to ^1H and ^{13}C side chain signals by correlations observed in the following 3D spectra; ^{15}N -separated HOHAHA-HSQC, HBHA(CO)NH, H(CCO)NH, C(CO)NH, HNCO and HCCH-TOCSY. Side chain ^1H and ^{13}C signals were assigned to the various types of aromatic amino acids from crosspeak patterns observed in ^1H - ^{13}C CT-HSQC and CT-HSQC-RELAY spectra that are optimized for aromatic side chains. The aromatic H δ and $^{13}\text{C}^\delta$ signals were then correlated to sequentially assigned backbone signals through crosspeaks observed in 3D ^{15}N separated NOESY-HMQC and $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY-HMQC spectra, respectively.

With the availability of essentially complete signal assignments, interproton distance constraints were derived from NOE connectivities observed in 3D ^{15}N separated NOESY-HMQC and $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY-HMQC spectra. Dihedral constraints for ϕ angles were obtained from $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$ coupling constants determined from H α /HN intensities measured in a 3D HNHA experiment. Slowly exchanging amide protons were assigned in a ^1H - ^{15}N HSQC hydrogen exchange experiments, and were identified as protons involved in interresidue hydrogen bonds. The β -strand and helical domains indicated by the NOE and J coupling data are enforced by the secondary structural elements predicted by the observed displacement of C α and C β chemical shifts from their random coil values.

Comparison of the structural results with the canonical structure of the inhibited protease derived X-ray diffraction studies shows that, in general, there is good agreement between the secondary structure found in solution with that seen in the crystalline state. The nine β -strands, the helix, and reverse turns observed in the crystal structure correspond well with the secondary structures identified in the present studies. However at more detailed level, there appear to be several differences in local structure of the protease in the two states.

第32回NMR討論会要旨集

発行日 平成 5 年 10 月 20 日

発行者 第32回NMR討論会

世話人 安藤 勲

〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1

東京工業大学工学部高分子工学科

TEL (03)3726-1111 内線2139

FAX (03)3729-2786

印刷 (財) 学術文献普及会

東京工業大学内

TEL (03)3726-3117