第34回NMR討論会

講 演 要 旨 集

日時　1995年10月31日（火）～11月2日（木）

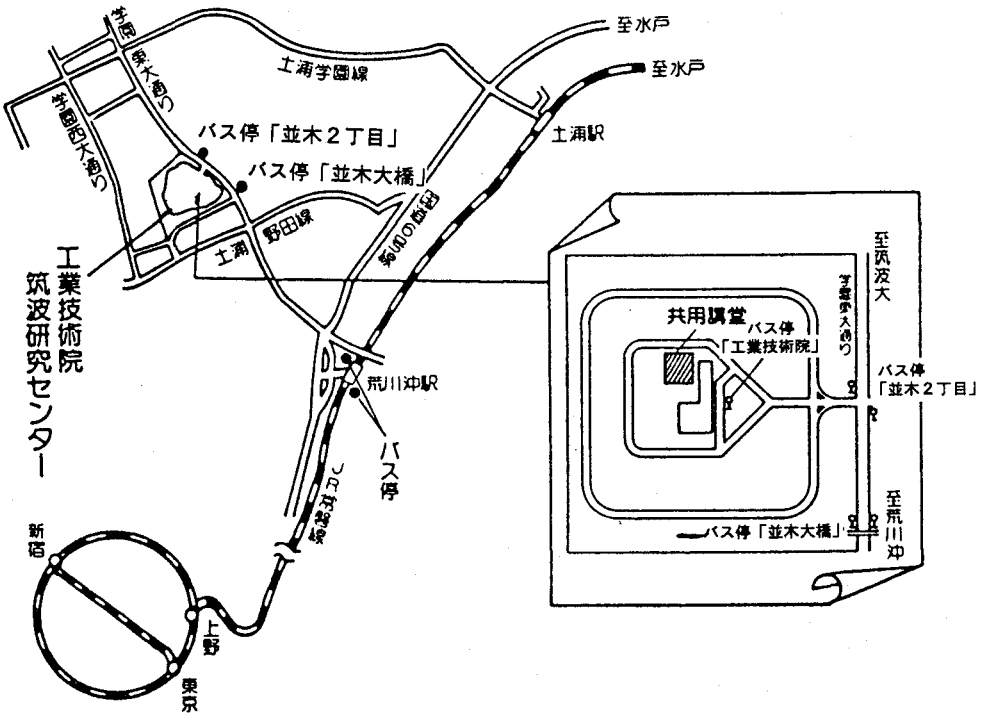
会場　工業技術院筑波研究センター共用講堂

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

第34回NMR討論会　会場案内

工業技術院筑波研究センター　共用講堂
（つくば市東１-１）
TEL:0298-54-2095

◇会場案内図



◇交通

JR常磐線「荒川沖」駅
　西口より関東鉄道バス「工業技術院行」（8:12,9:07,9:56）にて「工業技術院」（所要時間約16分）下車徒歩１分

　東口より関東鉄道バス「筑波大学中央行」（7:35,7:50,8:00,8:20,8:45,9:07,9:20,9:42,10:00,以下省略）にて「並木２丁目」（所要時間約15分）下車徒歩５分

東京駅八重洲南口より高速バス「つくばセンター行」にて「並木大橋」（所要時間60分以上）下車徒歩８分

◇連絡先

〒305　つくば市梅園1-1-4
電子技術総合研究所
亀井　裕孟
TEL:0298-54-5046
FAX:0298-54-5086

第３４回ＮＭＲ討論会
プログラム

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

日時　１９９５年１０月３１日（火）～１１月２日（木）
会場　工業技術院筑波研究センター共用講堂
つくば市東１－１

１０月３１日（火）

（９：００－１０：４０））

座長　寺尾　武彦

Ｌ１　^{1}H NMR（CRAMPS）によるポリペプチドの固体構造解析（１）…… 1
（群馬大・工[1]，日本電子[2]）　○荘司　顯[1]，尾崎拓男[1]，杉沢寿志，出口健三[2]

Ｌ２　固体高分解能NMR(REDOR)による生理活性ペプチドの原子間距離測定と構造決定 …… 3
（姫路工大・理）　内藤　晶，○西村勝之，辻　暁，斎藤　肇

座長　斉藤　肇

Ｌ３　固体における重水素交換NMRによる角度情報の取得 …… 7
（京大・理）　○寺尾武彦，伊藤　満，竹腰清乃理

Ｌ４　リン酸ジルコニウム系化合物の^{31}P固体NMRによる研究 …… 9
（阪大・理[1]，神戸薬大[2]）　○ 中山尋量[1]，江口太郎[1]，中村亘男[1]，津波古充朝[2]

－休憩－

（１１：００－１１：４５）

ポスター２分講演（１５題）

（理論，基礎，固体測定法）

座長　福井　洋之／内藤　晶

Ｐ１　NMR化学シフトに対するゲージ依存性およびスピン－軌道相互作用の
効果に関する理論的研究 …… 13
（京大・工）　○田中真司，高島　一，波田雅彦，中辻　博

Ｐ２　ケイ素ハロゲン化物のNMR化学シフトにおけるスピン－軌道相互作用の重要性 …… 15
（京大・工）　○中嶋隆人，高島　一，波田雅彦，中辻　博

Ｐ３　SnとAlのハロゲン化物のNMR化学シフトに対するスピン－軌道相互作用の効果 …… 17
（京大・工）　○金子広明，手島孝人，高島　一，波田雅彦，中辻　博

Ｐ４　化学シフトの計算 …… 19
（北見工大）　○馬場雄久，福井洋之，鳴海純一，三浦宏一，松田弘喜

P５　化学シフト計算によるロドプシン中の11-*cis*-レチナールの構造予測 …… 23
（東工大・生命理工[1]，日本クレイ[2]）○北條博彦[1]，浅川直紀[1]，和田光人[1]，櫻井　実[1]，
井上義夫[1]，田村祐介[2]，渡辺庸一[2]

P６　McWeeny理論によるポルフィリンの環電流効果の見積もり …… 25
（帝京大・薬）○戸原　明，佐藤三男

P７　^{27}Al NMRによる水-DMF混合溶媒中でのAl(Ⅲ)イオンの溶媒和 …… 27
（北見工大）○三浦宏一，松田弘喜，佐々木健一，馬場雄久，福井洋之

P８　変型マジックエコーシーケンスによる交差分極 …… 31
（住友化学・筑波研[1]，筑波大・物工[2]）○三浦　等[1]，松井　茂[2]

P９　Z方向のCross Polarization …… 35
（京大・理）○竹腰清乃里，寺尾武彦

P１０　^{13}C-^{13}C同種核間の選択的な磁化移動の測定法 …… 39
（京大・理）○野村　薫，竹腰清乃理，寺尾武彦

P１１　固体NMRによる^{13}C-^{15}N核間距離の精密測定法と^{1}H-^{13}C双極子相互作用の新しい
測定法の開発（Ⅱ） …… 43
（京大・理[1]，京大・化研[2]，帝京大・理工[3]，都立大・理[4]）　○石井佳誉[1]，寺尾武彦[1]，
林　宗一[2]，内田健一[3]，甲斐荘正恒[4]

P１２　二面角情報を得るためのMAS条件下異方的相互作用相関多次元固体NMR実験 …… 47
（横浜国大・工）　○下村泰次，藤原敏道，阿久津秀雄

P１３　固体^{13}C NMRを用いた[1-^{13}C]Glycylglycine単結晶試料の化学シフトテンソルの
主値および主軸の決定法 …… 51
（東工大・工）　○武田直登，亀田恒徳，水谷高彰，黒子弘道，安藤慎治，安藤　勲，
橋爪大輔，大橋祐二

P１４　DSX300用液体He温度領域NMRプローブの製作と二，三の核種の測定例 …… 53
（阪大・理）　○武田　定，丸田悟朗，山口　兆

P１５　DSX300用簡易型単結晶回転NMRプローブの試作と単結晶TiO2/0.3%Scの^{45}Sc-NMR …… 55
（阪大・理）　佐藤和則，○武田　定，山口　兆，南園忠則，福田茂一，大坪　隆，
福田光順，松多健策，野尻洋一

（１１：４５－１２：４５）

座長　　池田　龍一

特別講演１　高温超伝導体のNMRとその応用 …… 57
（東大・物性研）　　安岡　弘志

－昼食－

（１３：５０－１４：５０）

座長　　安藤　勲

特別講演２　Decoupling, Recoupling, and Dynamic Nuclear Polarization in Rotating Solids …… 61
（MIT）　R. G. Griffin

（14：50－15：35）

ポスター2分講演（15題）

（固体NMR）

座長　阿久津　秀雄／堤　耀広

P16　^{13}CNMRによる二量体液晶の配向特性の研究 …… 63
（東工大・工[1],東工芸大[2]）　○清水レナット宣男[1]，黒子弘道[1]，古屋秀峰[1]，安藤　勲[1]，安部明廣[2]

P17　固体NMRによるコレステリック液晶のオーダーパラメーターの決定 …… 65
（京大・理）　○西山裕介，久保　厚，今城文雄，寺尾武彦

P18　結晶及び液晶における異方的拡散係数テンソルの測定 …… 67
（分子科学研）　○宮島清一，大石　修

P19　固体，液晶用パルス磁場勾配NMR装置の開発 …… 69
（分子科学研）　○大石　修，宮島清一

P20　固体NMR法を用いたペプチドの構造研究 …… 73
（東工大・生命理工[1]，工[2]）　○浅川直紀[1]，安藤　勲[2]，櫻井　実[1]，井上義夫[1]

P21　固体高分解能^{13}C NMRによる^{13}C標識バクテリオオプシン-レチナール相互作用の解析 …… 77
（姫路工大・理）　辻　暁，○山口　悟，内藤　晶，斎藤　肇

P22　固体高分解能NMRによるエンケファリン結晶構造と分子運動の研究 …… 81
（姫路工大・理）　内藤　晶，○上平美弥，辻　暁，斎藤　肇

P23　固体高分解能^{13}C NMRによる生体膜中におけるバクテリオロドプシンの高次構造と膜-蛋白質相互作用の解析 …… 85
（姫路工大・理）　○辻　暁，内藤　晶，斎藤　肇

P24　固体^{13}C NMRおよびX線回折によるGlyGly結晶の構造解析 …… 89
（東工大・工[1]，東工大・理[2]）　○亀田恒徳[1]，黒木重樹[1]，黒子弘道[1]，安藤慎治[1]，安藤　勲[1]，橋爪大輔[2]，大橋祐二[2]

P25　結晶および非晶領域を含有する高分子試料の^{1}H-^{13}C NOE，^{13}Cスピン拡散および物質移動 …… 93
（京大・化研）　○梶　弘典，桑原和弘，堀井文敬

P26　固体NMRによるポリエチレンテレフタレートフィルムの相構造とダイナミクスの研究 …… 97
（帝人・構造解析セ[1]，阪大理[2]）　○永阪文惣[1]，松田裕生[1]，中村亘男[2]

P27　固体高分解能^{13}C-NMRによるAlkanediyl-α,ω-bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactantsの水和とコンホメーション変化 …… 101
（名工大・工）　○服部憲和，吉野明広，岡林博文

P28　N-アセチルグリシンオリゴマーの固体構造に関する研究 …… 105
（名工大・工）　○渡辺和哉，餌取英樹，吉野明広，岡林博文

P29　2次元固体^{13}C,^{15}N-NMRによる安定同位体標識アデノシンの完全帰属 …… 109
（横浜国大・工[1]，都立大・理[2]）　○菅瀬謙治[1]，藤原敏道[1]，小野　明[2]，甲斐荘正恒[2]，小野　晶[2]，阿久津秀雄[1]

P３０　固体高分解能^{15}N-NMR法を用いたグリシン含有ペプチドのN-H･･･O=C水素結合に関する研究 …… 113
（姫路工大・理）　内藤　晶，○福谷　章，辻　暁，斎藤　肇

－休憩－

（１５：５０－１６：３５）

ポスター２分講演（１５題）

（固体ＮＭＲ）

座長　　朝倉　哲郎／堀井　文敬

P３１　多重ラベルした^{13}C-^{15}N間の双極子相互作用の選択的測定法 …… 117
（京大・理）　○武田和行，竹腰清乃理，寺尾武彦

P３２　^{15}N NMRによるε-カルボベンゾキシ-L-リシン含有ポリペプチドの固体構造解析 …… 119
（群馬大・工）　○芦川幹也，河村智行，尾崎拓男，荘司　顯

P３３　固体重水素NMRによるpoly(β-phenethyl L-aspartate)の動的構造 …… 121
（北大・工[1]，東工大・工[2]，東京工芸大・工[3]）　○北澤　聡[1]，平沖敏文[1]，岡本　敏[2]，古屋秀峰[2]，安倍明廣[3]，堤　耀廣[1]

P３４　固体重水素NMRによる絹の構造とダイナミクスに関する研究 …… 123
（農工大・工[1]，北大・工[2]，フロリダ州立大[3]）　○南　雅史[1]，出村　誠[1]，朝倉哲郎[1]，平沖敏文[2]，堤　耀廣[2]，T.A.Cross[3]

P３５　強誘電性相転移を示す$(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$の^{15}N-CP/MAS NMRスペクトルの温度依存性 …… 127
（阪大・理[1]，名大・工[2]）　○武田　定[1]，山口　兆[1]，岩田　真[2]，石橋善弘[2]

P３６　1D, 2D-^{129}Xe-NMR法による高分子ブレンド構造の解析法の開発と評価 …… 129
（京大・理）　○三好利一，竹腰清乃里，寺尾武彦

P３７　固体高分解能^{113}Cd NMR法によるペプチド-Cd(Ⅱ)錯体の構造解析 …… 133
（神奈川大・工）　○高山俊夫，大内田　調，小池芳雄

P３８　遷移金属カルボニルクラスター化合物の^{13}C CP/MAS NMRにおける分子間交差分極効果 …… 135
（阪大・理[1]，リバプール大[2]，ボローニャ大[3]）　中山尋量[1]，○江口太郎[1]，宮城　慧[1]，中村亘男[1]，Brian T. Heaton[2]，Jens Nähring[2]，Giuliano Longoni[3]

P３９　リチウムイオン２次電池負極炭素中リチウムの固体NMRによる状態解析 …… 139
（旭化成工業・解析セ）　○山崎　悟，橋本知孝，入山恭彦，森　吉彦，白木弘之，田村亘弘

P４０　固体NMRによるキノリン型リチウム・イオノファーの研究 …… 143
（物質研）　○早水紀久子，柳沢　勝，杉原秀樹，平谷和久

P４１　青色蛍光体ZnS:Ag, Alの発光特性と固体NMRによる構造解析 …… 145
（三菱化学[1]，化成オプトニクス[2]，東京水産大[3]）　○原園としえ[1]，徳永幸夫[2]，安達隆二[2]，渡部徳子[3]

P４２　固体高分解能NMRによるアルミノシリケート系材料の構造と化学反応性に関する研究 …… 149
（積水化学・京都技術セ[1]，名工大・工[2]）○新田勝三[1]，神谷昌岳[1]，中野龍俊[1]，辻田義治[2]，吉水広明[2]

P４３　メタルフラーレンSc_2C_{84}の^{45}Sc-NMRによる研究 …… 153
（都立大・理）　○三宅洋子，小島康彦，鈴木信三，菊地耕一，真庭　豊，甲斐荘正恒，阿知波洋次

P４４　重原子の四極核のMASスペクトル …… 157
（物質工学工業技術研）　○林　繁信，上田貴洋

P４５　固体高分解能NMRによる$K_xRb_{1-x}X$（X=Br, I）の構造解析 …… 159
（三菱製紙・総合研[1]，Chemagnetics[2]，都立大・理[3]，JEOL・応研[4]）　釵持基子[1]，○遠藤一央[1]，James Frye[2]，本田憲治[3]，北川　進[3]，出口健三[4]

－休憩－

（１６：５０－１８：５０）

ポスター発表

１１月１日（水）

（９：００－１０：４０）

座長　引地　邦男

L５　磁場勾配パルスを使ったINADEQUATE法 …… 163
（理研）　○鵜澤　洵，越野広雪

L６　核磁気緩和－モデルフリーの取扱いの可能性と限界 …… 167
（京大・化研）　○堀井文敬，梶　弘典，石田宏之，石田正登

座長　赤坂　一之

L７　^{13}C-NMRによる側鎖型液晶性高分子の分子運動 …… 171
（北大・工）　○堤　耀広，八木達也，平沖敏文

L８　The Use of Pulsed Field Gradient NMR for Studying Diffusion and Transport of Small Molecules through Spherical Interfaces …… 175
（National Institute of Materials and Chemical Research）　○William S. Price, Alexander V. Barzykin, Kikuko Hayamizu

－休憩－

（10：55－11：20）

座長　三森　文行

L 9　マウス体内の低濃度代謝物画像化の試み－^{19}F NMR画像－ …… 179
（九大・薬）　○金沢洋子，新村俊幸，馬屋原慶子

（11：20－12：20）

座長　亀井　裕孟

特別講演 3　Spatio-Temporal Patterns of Brain Activation Seen by fMRI …… 183
（AT&T Bell Laboratories）　小川　誠二

－昼食－

（13：20－14：20）

座長　荒田　洋治

特別講演 4　NMR５０年 一つの歩み …… 185
（東京大学名誉教授）　藤原　鎭男

（14：20－15：45）

ポスター２分講演（２８題）

（測定法，装置，高圧）

座長　早水　紀久子

P 4 6　微量糖脂質のNMRによる構造解析 …… 189
（バリアンジャパン[1]，滋賀大[2]，都臨床研[3]）　○市川さおり，串田克彦，杉田陸海，稲垣冬彦

P 4 7　ラグランジュの乗数法により発熱が最小になるよう電流を制御するシム …… 191
（日本電子・分析機器技術）　○石川彦成，志野英雄，須藤　誠，工藤修士，木田　惇

P 4 8　H-X HSQC法におけるオフレゾナンス効果およびRFインホモジニティの影響の考察 …… 195
（日本電子・分析機器技術）　○末松浩人，栗原範明

P 4 9　INADEQUATE測定の改良 …… 199
（日本電子・分析機器技術）　○内海博明，宮林延良，藤井直之，鴨　修，日元　徹

P 5 0　選択的磁場勾配エコーを利用した１次元NMR測定法 …… 203
（日本電子・分析機器技術）　○熊木康裕，内海博明，鴨　修，日元　徹

P 5 1　磁場勾配パルスをコヒーレンス選択に用いた選択的１次元および２次元NMR測定法 …… 207
（理研）　○越野広雪，鵜澤　洵

P５２　一次元，二次元NMRの自動位相補正 …… 211
（日本電子・分析機器技術）　○宮林延良，河野静江，内海博明，日元　徹

P５３　誘電体共振器型マイクロ波温度ジャンプNMR検出器の開発 …… 215
（神戸大・自然科学）　○川上　勝，鎌足雄司，藤原健一郎，赤坂一之

P５４　高圧NMRによる蛋白質の変成状態の解析 …… 217
（神戸大・自然科学）　○山口　徹，神村耕二，山田博昭，赤坂一之

（緩和，運動）

座長　山本　泰彦

P５５　塩化ドデシルアンモニウム－水二成分系液晶における^{1}H, ^{2}H, ^{17}O, ^{35}ClのNMRスペクトルと緩和 …… 221
（筑波大・化学系）　○田中　晋，山室憲子，石丸臣一．池田龍一

P５６　^{13}CNMRによる反強誘電性液晶MHPOBCのアルキル鎖の配向と運動の研究 …… 223
（分子科学研）　○中井利仁，宮島清一

P５７　MASおよびNMAS条件下二次元液晶NMR法を用いたコンホメーション解析
―異方的環境下におけるMet-enkephalinの配向と構造― …… 227
（阪大・薬[1]，阪大・医[2]）　○國　直人[1]，木村敦臣[1]，藤原英明[2]

P５８　^{2}H-NMR緩和時間による医薬品添加剤に吸着した水分子の運動性の評価 …… 231
（国立衛生試）　○阿曽幸男，吉岡澄江，小嶋茂雄

P５９　高圧NMRによる疎水性有機溶媒中の水分子の回転に対する圧力効果の研究 …… 235
（京大・化研）　○若井千尋，中原　勝

P６０　エチレンアイオノマーにおけるイオン会合体の構造解析 …… 237
（名工大・工）　○曽我部啓介，鈴木康彦，吉水広明，木下隆利，辻田義治

P６１　不安定異常ヘモグロビン赤血球の磁化移動の研究 …… 239
（日本医大・生理[1]，藤田保衛大・衛生[2]，岐阜大・医[3]，稲沢市民病院[4]，関東逓信病院[5]，NIH[6]）　○上坂伸宏[1]，曽我美　勝[2]，恵良聖一[3]，加藤一夫[4]，長谷川節夫[1]，大西忠博[5]，A.N.Schechter[6]

P６２　酸性側における血清アルブミン構造転移の研究―molten globule-like state― …… 241
（藤田保衛大・衛生[1]，岐阜大・医[2]，生理研・分子生理[3]）　○曽我美　勝[1]，恵良聖一[2]，桑田一夫[2]，梶原孝彦[1]，亘　弘[3]

P６３　交差緩和時間測定による卵白アルブミン(OVA)モルテン・グロビュール状態の研究 …… 245
（岐阜大・医[1]，藤田保衛大・衛生[2]，近大・生物理工[3]）○恵良聖一[1]，曽我美　勝[2]，梶原孝彦[2]，小関泰平[3]，土井悦四郎[3]

P６４　新しい分子間交差緩和時間測定法とその応用 …… 249
（藤田保衛大・衛生[1]，稲沢市民病院[2]，岐阜大・医[3]，日本医大・生理[4]）　曽我美　勝[1]，○加藤一夫[2]，恵良聖一[3]，桑田一夫[3]，上坂伸宏[4]，梶原孝彦[1]，中上　寧[1]

P６５　酸素17-リン31分極移動法による選択的リン31-NMR観測 …… 253
（日立・基礎研）　○田村　充，原田義則

（in vivo，イメージング）

座長　金沢　洋子

P66　Analysis of Compartmentation and Anisotropy of Diffusive Motion of Water in Rat Sciatic Nerve Measured by ^{1}H Pulsed Field Gradient NMR ····· 255
（Dept. of Molec. Physiol., Natl. Inst. for Physiol.[1], Dept. of Ortho. Surg., Kyoto Pref. Univ. of Med.[2]）○Yoshiteru Seo[1], Yasushi Morita[2], Yoshiaki Kusaka[2], Masataka Murakami[1]

P67　10mmプローブを用いた脳組織の2D NMRによる代謝動態の解析 ····· 259
（日女大・理[1]，国立精神神経センター神経研[2]）○高橋征三[1]，荻野孝史[2]

P68　^{31}P-飽和移動NMR法によるヒト骨格筋の酸素反応速度の測定 ····· 261
（徳島大・医[1]，他京府医大[2]，神戸大・発達科学[3]，生理研[4]）○吉崎和男[1]，早野尚志[2]，平川和文[3]，村上政隆[4]，亘　弘[4]

P69　^{31}P NMRによるカドミウムの肝エネルギー代謝のアンカップリング作用に関する研究 ····· 265
（国立環境研[1]，放医研[2]，筑波大・放射線[3]）○三森文行[1]，吉岡　大[1,2]，板井悠二[3]

P70　高血圧症モデルラットの脳のMRIと病変組織，血管構築像との相関 ····· 267
（近畿大・医）千葉　惇，太田善夫，秩父志行

P71　NMR映像法による三次元泡構造の計測 ····· 269
（筑波大・物工系）巨瀬勝美

P72　テトラヘドラルマジックエコーによる固体NMRイメージング ····· 271
（筑波大・物工）○裏岡昭博，松井　茂，井上多門

P73　西瓜緩和時間のIN-VIVOでの測定 ····· 275
（神戸製鋼・電子技研[1]，マキ製作所[2]）○斎藤一功[1]，三木孝史[1]，林　征治[1]，西澤　節[1]，杉浦伸裕[2]，鈴木基文[2]

P74　植物組織の水の制限拡散の局所的な一次元プロファイルの測定 ····· 279
（食品総研[1]，日本電子データム[2]，生物資源研[3]）○石田信昭[1]，小川秀次郎[2]，小泉美香[3]，狩野広美[3]

P75　傾斜磁場NMRを用いた炊飯過程の解析 ····· 283
（東京水産大[1]，三菱電機[2]）○五味雄一郎[1]，福岡美香[1]，渡辺尚彦[1]，竹内繁樹[2]，前田満雄[2]

P76　NMRマイクロイメージング法による耐火物の空隙解析 ····· 285
（新日鉄・先端研[1]，日本電子[2]）○斉藤公児[1]，篠原正昭[1]，手島志帆[1]，田村信一[1]，津野久幸[2]，長谷川憲一[2]

－休憩－

（16：00－17：45）

ポスター発表

（18：00－20：00）

懇親会

11月2日（木）

（9：00－10：30）

ポスター2分講演（30題）

（天然物の構造解析）

座長　神藤　平三郎／中西　洋志

P77　選択的緩和法の改良とその応用　—Ascidiacyclamide 誘導体の構造とコンフォメーションの相関—　…… 289
（神戸薬大[1]，大阪薬大[2]）　○杉浦眞喜子[1]，上垣内みよ子，石田寿昌，篠崎史義

P78　等価核のNMR的非等価性に着目した対称分子の構造解析(第5報)
1D PASS-ROESY法　…… 293
（北大・農）　川端　潤，○福士江里

P79　ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用（6）　…… 297
（神奈川大・理[1]，北陸大・薬[2]）　釜野徳明[1]，○野川俊彦[1]，富岡　靖[1]，張　恵平[1]，小竹文乃[1]，木津治久[2]

P80　セイタカアワダチソウ*Solidago altissima L.*の生物活性ジテルペンの二次元NMRスペクトル　…… 301
（神奈川大・理）　釜野徳明，○小竹文乃，中山朋大，山下晃太

P81　HMBC法の新しい応用測定—生合成研究への応用—TANGO-HMBCについて　…… 305
（東大・農[1]，東大・分子細胞生物学研[2]）　○降旗一夫[1]，渡辺裕之[2]，瀬戸治男[2]

（糖質，核酸，生体ＮＭＲ）

P82　NMRスペクトルによる植物細胞壁由来キシログルカン糖鎖の構造解析　…… 309
（工技院・生命研）　○山垣　亮，三石　安，中西洋志

P83　ダンシルロイシン修飾シクロデキストリンの構造と機能　…… 311
（東工大・生命理工）　○池田　博，伊勢伸之，中村道衛，戸田不二緒，上野昭彦

P84　安定同位体利用NMRによるJ-結合定数測定のための問題点と測定の最適化　…… 313
（都立大・理）　○楯　真一，栗田順一，久保善大，牧田貴子，小野　明，小野　晶，甲斐荘正恒

P85　モノヌクレオシド塩基部分のヘテロ核間スピン結合定数　…… 317
（都立大・理）　○小野　明，甲斐荘正恒

P86　NMRPipeによる3次元NMR解析（1）　…… 321
（北工研[1]，北大・理[2]）　○津田　栄[1]，大木進野[2]，三浦和紀[2]，斎藤もよこ[2]，引地邦男[2]

P87　NMRPipeによる3次元NMRの解析（2）　…… 323
（北大・理[1]，北工研[2]）　○大木進野[1]，津田栄[2]，斎藤もよこ[1]，三浦和紀[1]，矢沢道生[1]，引地邦男[1]

P88　Transferred NOE法によるRecAタンパク質に結合したDNAの構造解析　…… 327
（東大・理[1]，理研・遺伝生化学[2]，理研・細胞情報伝達[3]）　○西中太郎[1,2]，伊藤　隆[2]，矢吹　孝[1]，井川粛子[2]，横山茂之[1,3]，柴田武彦[2]

P89　クロモプロテイン系抗腫瘍性抗生物質C-1027の二次元NMR解析 …… 329
（東北大・理[1]，大鵬薬品製薬セ[2]，サントリー生医研[3]）
○福田純子[1]，田中俊之[1]，平間正博[1]，大谷敏夫[2]，今城精一[3]，石黒正路[3]

P90　ET_BアンタゴニストRES-701-1の立体構造の再検討―新たに得られた特異な"投げ縄"構造について …… 331
（協和発酵・東京研）　○片平律子，柴田健志，山崎基生，松田　譲，好田真由美

（蛋白質）

座長　稲垣　冬彦／嶋田　一夫

P91　Solution Structure of Human Endothelin-2, as Determined by ^{1}H-NMR …… 333
（National Institute of Bioscience and Human-Technology）　○Klas Arvidsson, Tadashi Nemoto, Youji Mitsui, Shinichi Ohashi, Hiroshi Nakanishi

P92　NMRによるRafとRasの相互作用の解析 …… 335
（理研・細胞情報伝達，東大大学院理・生物化学[1]，理研・遺伝生化[2]，Department of Biochem., Univ. of Cambridge[3]）　○寺田　透[1]，伊藤　隆[2]，柴田武彦[2]，Ernest D.Laue[3]，横山茂之[1]

P93　O-ROESY法による核酸及び蛋白質分子内部運動の解析 …… 337
（岐阜大・医[1]，Dept. of Chem.Biochem., UCSC[2]）　○桑田一夫[1]，Thomas Schleich[2]

P94　タンパク質及びペプチド構造解析のためのNMR化学シフトの利用 …… 339
（農工大・工[1]，シェフィールド大[2]）　朝倉哲郎[1]，○伊達　健[1]，出村　誠[1]，M.P.Williamson[2]

P95　NMRによる天然型及び[Abu^{B7}]型モネリンの立体構造比較と構造活性相関研究 …… 343
（味の素中研）　○水越利巳，香村正徳，鈴木榮一郎，有吉安男

P96　プリンリプレッサーDNA結合ドメインの高次構造 …… 345
（横浜市大・総合理[1]，蛋工研[2]，神奈川大・理[3]，電通大[4]，Oregon Helth Sci. Univ.[5]）
○長土居有隆[1]，守川壮一[2]，中村春木[2]，江成政人[1]，小林邦子[1]，山本春彦[3]，三瓶厳一[5]，溝淵　潔[4]，Maria A.Shumacher[5]，Richard G.Brennan[5]，西村善文[1]

P97　がん原遺伝子産物c-MybとDNAとの複合体の動的構造 …… 347
（横浜市大・総合理[1]，理研[2]，都臨床研[3]）　○佐々木元子[1]，緒方一博[1,2]，畠中秀樹[3]，中沢賢一[1]，黒田仁志[1]，皿井明倫[2]，石井俊輔[2]，西村善文[1]

P98　NMRによるショウジョウバエSx1蛋白質のRNA結合ドメインとRNA分子との相互作用の解析 …… 349
（東大・理[1]，神戸大・理[2]，京大・理[3]）　○武藤　裕[1]，井上　真[1]，木川隆則[1]，武田佳宏[1]，坂本　博[2]，志村令郎[3]，横山茂之[1]

P99　負の転写調節因子H-NSの欠損変異体の溶液構造と相互作用 …… 351
（東京薬大[1]，名大・農[2]，蛋工研[3]，中外製薬[4]，農水生物研[5]）　○銀羽洋行[1]，神藤平三郎[1]，佐久間千勢子[1]，上口千春[2]，水野　猛[2]，中村春木[3]，久保庭　均[5]，山崎俊正[4]

P100　デストリンの立体構造決定 …… 353
（都臨床研）　○畠中秀樹，小椋賢治，森山賢治，市川さおり，矢原一郎，稲垣冬彦

P101　同位体フィルター法を利用したGRB2のN端側SH3とSos由来ペプチドの相互作用の解析 …… 355
（都臨床研[1]，第一製薬[2]）　○小椋賢治[1]，寺沢宏明[1,2]，稲垣冬彦[1]

P１０２　クロコウジカビ非ペプシン型酸性プロテアーゼAの高次構造解析 …… 359
（東大・理・生化[1]，現東京薬大・生命科学[2]，東大・生物工学セ[3]，味の素・中研[4]，
明治製菓・生科研[5]，工技院・生命研[6]，日本ブルカー[7]）　小島正樹[1,2]，田之倉優[3]，
大竹亮子[4]，鈴木榮一郎[4]，浜谷　徹[5]，河野敏明[5]，曽良達生[6]，M. Wälchli[7]，
高橋健治[1,2]

P１０３　^{1}H-NMRによる好熱性水素細菌由来チトクロームC-552の構造解析 …… 361
（第一製薬[1]，阪大・蛋白研[2]，農水省・生物資源研[3]，東大・農[4]）　○長谷川 淳[1]，
吉田卓也[2]，山崎俊正[3]，三本木至宏[4]，Yu Yihua[2]，児玉　徹[4]，山崎憲一[1]，伯水英夫[1]，
京極好正[2]，小林祐次[2]

P１０４　^{1}H-NMRによる局所麻酔剤ジブカインとNa^{+}-チャンネル不活性化
ゲートペプチドとの相互作用研究 …… 363
（京大・薬）　○黒田義弘，小川雅弘，石川順也，藤井信孝，中川照眞

P１０５　DNA二本鎖中にDNA・RNA二本鎖部位を含む二種の核酸の構造決定 …… 365
（北大・薬[1]，蛋工研[2]，北陸先端大[3]）　○西崎知子[1]，岩井成憲[1]，大久保忠恭[2,3]，大塚栄子[1]

P１０６　エンドセリンの分子内，および，分子間相互作用の光-CIDNP法による解析 …… 367
（日本チバガイギー・国際科学研）　○高島浩幸，野坂篤子

P１０７　尿素中でのヒトカルシトニン繊維化のNMRによる研究 …… 369
（日本チバガイギー・国際科学研）　○金折賢二，野坂篤子

－休憩－

（１０：５０－１２：５０）

ポスター発表

－昼食－　　【ポスター撤去】

（１３：５０－１４：４０）

座長　京極　好正

L１０　遠位グルタミンを持つミオグロビンでの配位子親和性調節の分子機構 …… 371
（筑波大・化学系）　山本泰彦

L１１　３重(^{13}C, ^{15}N, ^{2}H)ラベルによる高分子量蛋白質の核磁気共鳴の帰属法―
構造研究に向けて …… 375
（阪大・蛋白研[1]，Dept. of Medical Genetics, Univ. of Toronto[2]）山崎俊夫[1]，Lewis E. Kay[2]

－休憩－

（14：50－16：30）

座長　森島　績

L12 安定同位体標識DNAを利用した新しいNMR測定技術 …… 377
（都立大・理）　○甲斐荘正恒，小野　晶，楯　真一，小野　明，栗田順一，牧田貴子，久保喜大

L13 異種核多次元NMRを用いたRNAポリメラーゼαサブユニットの構造と相互作用の研究 …… 381
（阪大・蛋白研[1]，奈良先端大[2]，国立遺伝研[3]）　田　栄浩[1]，白川昌宏[2]，山崎俊夫[1]，○京極好正[1]，根岸智史[3]，藤田信之[3]，石浜　明[3]

座長　甲斐荘　正恒

L14 NMRによる抗体の親和力獲得機構の解明 …… 385
（東大・薬[1]，機水研[2]）　今里真実[1]，坂倉正義[1]，加藤晃一[1]，高橋栄夫[1]，○嶋田一夫[1]，荒田洋治[2]

L15 NMRによるリカバリンの三次元構造解析 …… 387
（オンタリオ癌研・トロント大・医学生物物理[1]，スタンフォード大・医[2]）　○田中俊之[1]，James B. Ames[2]，Lubert Stryer[2]，伊倉光彦[1]

NMR50周年を迎えて

青野　茂行　—NMR の仲間— …… 389

小中　敏康 …… 390

中條　利一郎　—縦軸情報を求めて三十有余年— …… 391

西岡　篤夫　—NMRを始めた頃— …… 392

祢宜田　久男　—廃墟からの遍歴— …… 393

松尾　拓　—A60と共に歩いた15年— …… 394

宮島　剛　—永久磁石開発の記— …… 395

山口　一郎 …… 396

山本　修　—ウィグルに魅せられて— …… 397

第１日

１０月３１日（火）

理論・基礎・固体測定法
固体ＮＭＲ

L1

^{1}H NMR (CRAMPS) による ポリペプチドの固体構造解析 (1)

(群馬大工、日本電子*)
○荘司　顯、尾崎拓男、杉沢寿志*、出口健三*

Structural Analysis of Solid Polypeptides by ^{1}H NMR (CRAMPS)

*(Department of Biological Sciences, Faculty of Engineering, Gunma University, and *NMR Application Laboratory, Analytical Instruments Division, JEOL Ltd.)*
Akira Shoji, Takuo Ozaki, Hisashi Sugisawa* and Kenzo Deguchi*

Abstract: The relation between the secondary structures, such as the right-handed α-helix (α_R–helix) and β-sheet forms, and the ^{1}H chemical shifts (δ) of polypeptides in the solid state was studied by means of ^{1}H NMR (CRAMPS). It was found that the α-proton chemical shift of solid polypeptides is conformation-dependent and this CRAMPS method is useful for conformational analysis of solid polypeptides.

1．緒　言

近年、固体高分解能 NMR の発展は目覚ましく、タンパク質や核酸など生体高分子の構造研究の有効な研究手段となってきた。我々はすでに、^{13}C、^{15}N、^{17}O 核種について、NMR 化学シフトがポリペプチドの立体構造の研究に極めて有効な情報を提供することを明かにしてきた。しかしながら、今までのところ、固体高分解能 ^{1}H NMR の研究は殆んど行われていない。

固体状態の試料の ^{1}H 化学シフト情報を得る手法として、Combined Rotation And Multiple Pulse Spectroscopy（CRAMPS）法が期待されてきた。この方法は、多重パルスで双極子相互作用を除去し、残った化学シフトの異方性をマジック角回転（MAS）で取り除くことで高分解能スペクトルを得る方法であるが、これまでは、複雑な調整が必要なことと、信頼できるデータが得にくく、広く活用される状況にはなかった。最近、ダイレクトデジタルシンセサイザ（DDS）の技術を NMR 分光計に取り入れることにより、上述の問題が改善され、また、信頼性が低いと考えられていた CRAMPS スペクトルの化学シフトの問題も内部基準を用いることで解決した。さらに、RF 回路と温度制御システムを分離したプローブの使用により、温度可変 CRAMPS 測定も可能となった。

そこで本研究では、CRAMPS 法がポリペプチドの 構造研究にどの程度有効であるかについてその可能性を探る。

固体高分解能 ^{1}H NMR・CRAMPS・ポリペプチド・化学シフト・コンホメーション

しょうじ　あきら、おざき　たくお、すぎさわ　ひさし、でぐち　けんぞう

2．実　験

^{1}H NMR (CRAMPS) スペクトルの測定は、Chemagnetics 社製 CMX-300 分光計により、300 MHz で測定した。測定条件は、パルスシークエンス：br24、90°パルス幅：1.30 ms、回転速度：1.5～2.5 KHz、スペクトル幅：9.3 kHz であった。^{1}H 化学シフトは シリコンゴムを内部基準（δ＝0 ppm）とした。測定精度は ±0.1 ppmである。

3．結果および考察

3-1　ポリペプチドのコンホメーション解析

分子量の異なるポリ (L-アラニン) の ^{1}H NMR (CRAMPS) スペクトルを Fig. 1 に示す。その結果、次の点が明らかになった：(1) α-H ピークは、主鎖コンホメーションに依存し、α_R-helix（3.9 ppm）が β-sheet（5.1 ppm）より1.2 ppm 高磁場に現われる。これは、α-H ピークがポリペプチドのコンホメーション解析に有効な手段となることを示すものであり、今後の実験データの集積が期待される。(2) β-H ピークは、主鎖コンホメーションには殆んど依存しない（1.2～1.4 ppm）。(3) N-H ピークはブロードである。

尚、現在このほかにもいくつかの実験データを集積中であり、講演発表では更にホットなデータ（温度可変 CRAMPS など）を紹介する予定である。

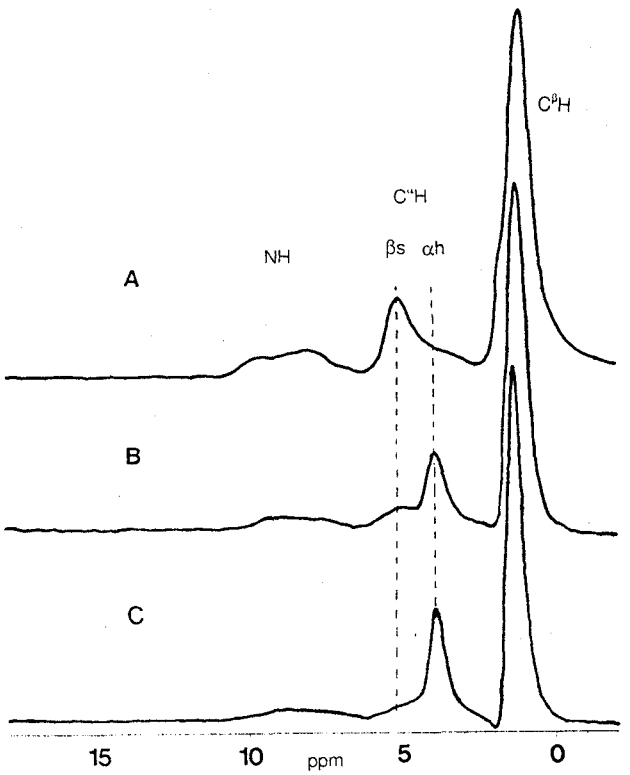


Fig.1. 300 MHz ^{1}H NMR spectra (CRAMPS) of poly(L-alanines) in the solid state; (A) H-(Ala)$_8$-NHBu (β–sheet), (B) PLA-1 ($\overline{DP}$=16, α_R–helix + β–sheet), and (C) PLA-5 ($\overline{DP}$=65, α_R–helix)

L2 固体高分解能NMR(REDOR)による生理活性ペプチドの原子間距離測定と構造決定

内藤 晶、 ○西村 勝之、 辻 暁、 斉藤 肇 (姫路工大 理)

Three dimensional Structure of Biologically Active Peptides Based on Interatomic Distances Measured by High Resolution Solid State NMR(REDOR)

Akira Naito, ○Katuyuki Nishimura, Satoru Tuzi, Hazime Saito,
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

We demonstrate here that the two types of β turn forms, type I and II, for N-acetyl-Pro-Gly-Phe whose interatomic distances differ each other less than 0.6 A are readily distinguished from the precise determination of interatomic distances with accuracy of 0.05 A. We also evaluated the effect of the infinite length of a π pulse on the plausible error of the REDOR experimets. We finally examined a possibility to distinguish two types of enkephalin polymorphs by means of the REDOR technique.

我々はこれまでN-acetyl-Pro-Gly-Pheを代表例とし、種々の位置を^{13}C,^{15}N二重標識したペプチド試料を合成し、注意深くREDOR法による^{13}C-^{15}N原子間距離の精密測定を行うことにより、±0.05Aの精度で距離決定が可能であることを報告した[1]。このとき、隣接分子中の安定同位元素標識体からの寄与の見積りと、天然安定同位体からの寄与の再評価などについての基礎検討を行い[1]、精密原子間距離測定結果に基づくペプチド平面の二面角の決定を行ってきた[2]。この過程で、X線回折による新たに結晶構造の検討を行い、同じ試料でX線結晶解析とNMRのデータの直接の比較が可能になった。ここではN-Acetyl-Pro-Gly-Pheの三次元構造の決定とその間の距離測定における問題点を検討し、三次元構造解析のための標準的なプロトコールとして確立することを目的としている。さらに我々のグループにおいては、生理活性ペプチドであるEnkephalinについて、結晶作成条件の違いによる種々の多形の生成とそれにともなう分子ダイナミックスについても詳細な検討を行っており[3)4)]、これらダイナミックスと高次構造解析の関連についての検討もあわせて行った。

実験

[試料] [1-^{13}C]N-acetyl-Pro-[^{15}N]Gly-Phe(1)、N-acetyl-[1-^{13}C]Pro-Gly-[^{15}N]Phe(2)、[1-^{13}C]N-acetyl-Pro-Gly-[^{15}N]Phe(3)、[1-^{13}C,^{15}N]Gly(4)、Leu-Enkephalin Tyr-[^{15}N]Gly-[1-^{13}C]Gly-Phe-Leu(5)、Met-Enkephalin Tyr-[^{15}N]Gly-[1-^{13}C]Gly-Phe-Met(6)、の6種類の試料を^{13}C, ^{15}N99%二重標識アミノ酸により合成した。まずそれぞれの標識アミノ酸をFmoc-OSuと反応させ、ABI社のペプチド合成機により固相法で合成した。さらに(1)～(3)は、無水酢酸とDMFからNアセチル化を行い、エタノールから結晶化した。試料(5)(6)はそれぞれH_2O/Met-OH、H_2O/Et-OHから結晶化を行った。

REDOR ペプチド主鎖の三次元構造決定 πパルスの有限長効果
ないとう あきら、○にしむら かつゆき、 つじ さとる、 さいとう はじめ

[測定] NMR測定はChemagneticsCMX-400スペクトロメータにより行った。図1に示すようにoff resonace効果およびラジオ波強度の変動を補償するXY4パルスシーケンスを用いた。180° パルス長は^{13}C,^{15}N核についてそれぞれ12μs,15.5μsであった。試料はそれぞれおよそ50mgを外径5mmφのジルコニア試料管に詰めて行った。NMR測定はREDORとUNREDORの実験を行い、データはT_2の寄与を削除するために(UNREDOR-REDOR)/REDOR=$\Delta S/S_0$としてREDOR効果を解析した。実際のスペクトルでは化学シフト異方性によりSSBが存在するので、全空間の寄与を考慮するため、センターバンドと全てのSSBの和をとり、REDORの解析を行った。

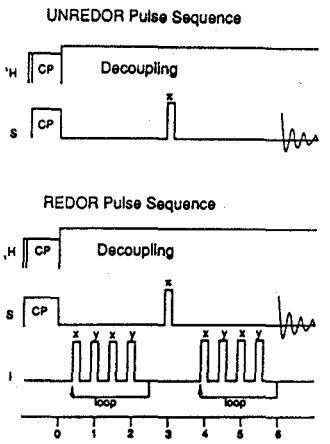


Fig 1 REDOR pulse sequence combined with XY-4 pulses.

結果及び考察

[πパルスの有限長効果] 平均ハミルトニアン理論を用いて有限長パルスを考慮した平均ハミルトニアンを求め、このハミルトニアンによって時間発展した密度行列を計算した。この密度行列を用いて観測核のエコー信号の期待値$<Iy(Tr)>$を以下の式を用いて求めた。

$$< Iy(Tr) > = Tr\{ \rho(Tr)\ Iy \} = \cos\{ (a^2+b^2)^{1/2}/2 \} \quad ----(1)$$

ここでaおよびbはr_{CN}、α、β、ω_r、t_wの関数になる。α、βはC-N方向を表すオイラー角、ω_rはローターの角速度、t_wはパルス長をそれぞれ表す。計算では(1)式の粉末平均を行い、理論エコー強度を求めた。図2に[1-^{13}C,^{15}N]GlyのREDORの実験解析について示す。縦軸に$\Delta S/S_0$、横軸にNcTrをとり、実験値をプロットした。Ncはローター周期の数、Trはローター周期である。この実験値に対して最適な理論曲線をフィッティングすることにより距離を決定した。実線がπパルスの幅を考慮していない場合、破線がπパルスの幅を考慮した場合のREDORの理論曲線である。通常は、3bond以上離れた原子間の距離を対象とする場合が多い。この場合は、$\Delta S/S_0$の値が1.0に到達するまでの曲線の立ち上がりの領域を観測することになるが、この領域ではπパルスの有限長効果の存在を確認できないことが分かる(図2)。これから実際のREDORの解析において全くπパルスの幅を考慮する必要がないと結論できた。

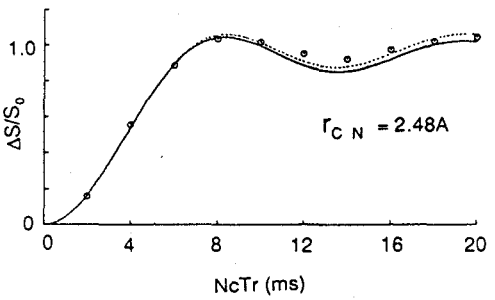


Fig 2 Plot of $\Delta S/S_0$ against NcTr for [1-^{13}C,^{15}N]Gly.

[N-Acetyl-Pro-Gly-Pheの主鎖の構造解析] ここではペプチド主鎖の立体構造決定のプロトコールを中心にして述べる。図3(a)、(b)に試料3の^{13}C-REDOR、^{13}C-UNREDORスペクトルとREDOR理論曲線を示す。試料(1)～(3)の距離はREDOR測定により、表1に示すように決定できた。ところがこの結果はすでに報告されてい

る単斜晶系のX線回折の結果と大きく異っていたため、この試料で新たにX線回折を行った。その結果、使用した結晶は全く異なる斜方晶系であることが分かった。またこれらの結果も表1に示す。これからREDORで得られた距離が正確であり、X線回折の結果と良く一致していることが分かった。

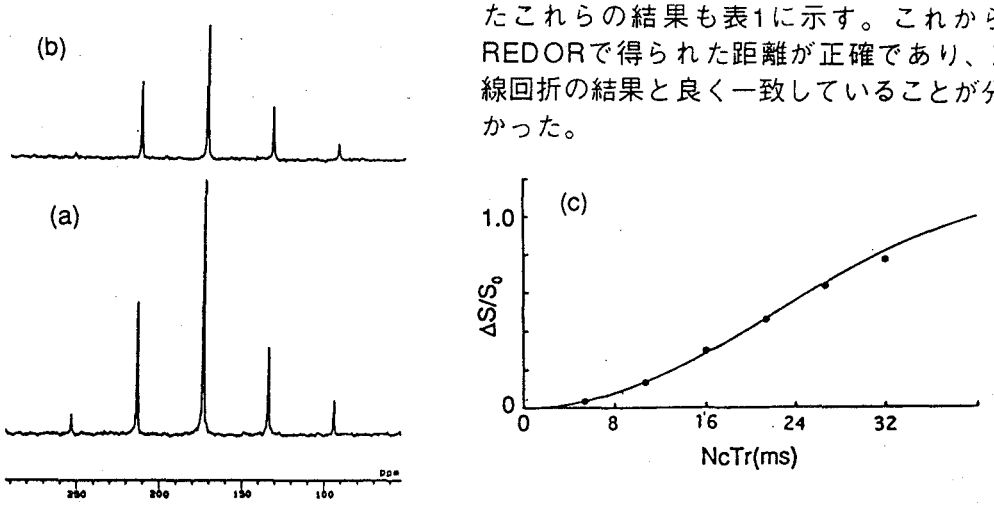


Fig 3 (a) ^{13}C-REDOR specutrum of [1-^{13}C]N-acetyl-Pro-Gly-[^{15}N]Phe.
(b) ^{13}C-UNREDOR specutrum of [1-^{13}C]N-acetyl-Pro-Gly-[^{15}N]Phe.
(c) Plot of $\Delta S/S_0$ against NcTr and theoritical carve fitting for [1-^{13}C]N-acetyl-Pro-Gly-[^{15}N]Phe

Table 1 Interatomic distances determined by REDOR experiment

Labeled peptides	C,N interatomic distances		
	REDOR	x-ray[a]	x-ray[b]
(1)	3.24	3.76	3.19
(2)	3.43	3.21	3.35
(3)	4.07	3.91	3.99

a J. Am. Chem. Soc., 103, 1703 (1981)
b This work

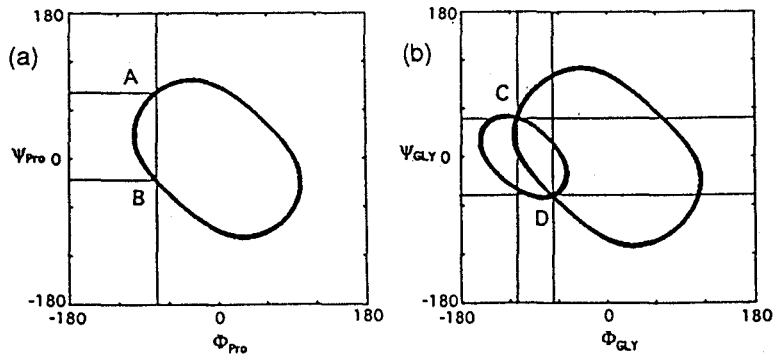


Fig 4 (a) Conformational map of Pro residue based on r_{CN} = 3.24±0.05A
(b) Conformational map of Gly residue based on r_{CN} = 3.43±0.05A

上述のREDORにより求めた距離を用いてペプチド主鎖のコンホメーションの決定を以下の手順で行った。試料(2)、(3)において与えられる距離は、それぞれPro残基、Gly残基のCαを中心とした4bond離れた距離であり、それぞれのCαを中心とする二面角(Φ_{Pro}、Ψ_{Pro})、(Φ_{Gly}、Ψ_{Gly})にのみ依存する。これらの関係を用いて、得られた距離を満たす二面角の組合わせを計算すると、それぞれ図4(a)、(b)に示す大きい黒環上の点のみとなる。Pro残基の二面角Φ_{Pro}に関しては-75°が最も安定であることが知られており、これを適用すると(Φ_{Pro}、Ψ_{Pro})=A(-75±2°、-28±4°)、B(-75±2°、83±4°)の二組の二面角が得られる。Ψ_{Pro}に関してはProのC_βとC_γの化学シフト値の差との相関を示す経験式[6]からAのみが選択できる。また試料(3)によって与えられる距離は(Φ_{Pro}、Ψ_{Pro}、ω_{Pro}、Φ_{Gly}、Ψ_{Gly})にのみ依存し、このProの二面角を用いて試料(3)の距離を満たすGlyの二面角の組合わせを計算すると、図4(b)の小さい黒環上の点のみとなる。これから小さい黒環と大きい黒環との交点が可能なGlyの二面角の組合わせのみとなり、(Φ_{Gly}、Ψ_{Gly})=C(-68±6°、-48±4°)、D(-112±6°、48±4°)の二組の二面角が得られる。以上の議論により、分子動力学などのエネルギー計算を全く用いずに、2つのβ-turn type Iコンホメーションまでしぼり込めることが分かった。

Table 2. Conformation of this peptide

		ΦPro	ΨPro	ΦGly	ΨGly
C		-75±2	-28±4	-112±6	48±4
D		-75±2	-28±4	-68±6	-48±4
X-ray I	monoclinic (β-turn II)	-59	128	81	-6
X-ray II	orthorhombic (β-turn I)	-76	-12	-86	-4.5

X-ray I : J. Am. Chem. Soc., 103, 1703 (1981)
X-ray II: This work

[Leu-、Met-Enkephalinのコンホメーション解析] 今回はREDORの応用として、5bond離れた一つの原子間距離の測定からそのペプチドの主鎖のコンホメーションの違いを判定できるかどうかについて報告する。それぞれ3番目のGlyのカルボニル炭素を^{13}C標識している試料(5)、(6)のCPMAS測定からカルボニル炭素のピークの帰属が行えた。二つの試料での化学シフト差は4.2ppmであり、二つの試料のコンホメーションが大きく異なる可能性を示唆している。これを検証すべく、5bond離れた原子間距離をREDORにより精密に測定した。ここで測定した距離はペプチド分子の中心に位置しており、この距離が分子の主鎖のコンホメーションを反映すると考えられる。この結果については講演において報告する。

謝辞 斜方晶系結晶のx線回折には安岡則武教授、分子動力学計算には相田美砂子博士に御協力を得ました。

1) A. Naito, K. Nishimura, S. Tuzi, and H. Saito, Chem. Phys. Lett., 229,506 (1994)
2) A. Naito, K. Nishimura, S. Kimura, S. Tuzi, M.Aida, N. Yasuoka and H. Saito, manuscript in preparation.
3) A. Naito, M. Kamihira, S. Tuzi, and H. Saito, J. Phys.Chem.99,12041 (1995)
4) A. Naito,T.Iizuka, S. Tuzi, and H. Saito, Peptide Chemistry, 405 (1993)
5) Von I. Z. Siemion, T.Wieland and K. H. Pook, Angew. Chem.,87,712 (1975)

L3 固体における重水素交換NMRによる角度情報の取得

京大理 ○寺尾武彦，伊藤 満，竹腰清乃理

Determination of Interbond Angles by Deuteron 2D Exchange NMR in Solids

Department of Chemistry, Faculty of Science
Kyoto University, Kyoto 606-01
T.Terao, M.Ito, and K.Takegoshi

A novel solid-state deuteron 2D exchange NMR method is proposed which allows us to determine *interbond angles* involving not only so-called bond angles but also dihedral angles, angles between bonds belonging different molecules, etc.

Deuteron NMR in solids has commonly been used for studies of molecular motions. In this study, we apply it for obtaining structural information in rigid solids. What are usually obtained in structural studies by solid-state NMR are internuclear distances through dipolar couplings, while we try to determine the angle made by two bonds.

In our approach, 2D exchange spectra due to spin diffusion between the two deuterons at different sites are observed to determine the angle between the principal-axis directions of the two quadrupolar coupling tensors. The tensors are almost axially symmetric around the corresponding bond orientations so that interbond angles may precisely be determined from the mutual orientation of the two tensors.

However, we have two problems in realizing such deuteron 2D exchange NMR in rigid solids: Firstly, the resonance frequencies of the relevant two deuterons are generally so different with each other that it inhibits spin diffusion. Secondly, very long deuteron T_1 in rigid solids demands to use a cross-polarization technique; however, a very broad spectral width of ca. 250 kHz allows only a part of the spectrum to be polarized.

Deuteron spectra for NH_2CD_2COOH were observed for various H_{1D} using single-quantum cross-polarization; the line-shapes are distorted to large extent. In order to reduce this distortion, we adiabatically changed H_{1D} from 20 to 100 kHz under a constant H_{1H} of 70 kHz, taking account of off-resonance dependence of the cross-relaxation rate. The shape of the1D spectrum obtained in this way is substantially improved.

2D exchange NMR, deuteron NMR, bond angle, dihedral angle

てらおたけひこ，いとうみつる，たけごしきよのり

Spin diffusion between the two distinct deuterons in rigid solids can be caused by level-crossing due to sample rotation during the mixing time. We realized it by rotating a sample around an axis perpendicular to the magnetic field by 180° and succeedingly by -180° during the mixing time of 1 sec.

A deuteron 2D exchange spectrum thus obtained for NH_2CD_2COOH is shown in Fig.1. The off-diagonal peaks draw 4 equivalent ellipses. If the two relevant quadrupole coupling tensors are axially symmetric with the same coupling constant, then the interbond angle is given by $\theta = \tan^{-1}(b/a)$, where a and b are the lengths of the long and short axes, respectively; this angle can directly be determined from the 2D ridge plot using a protractor. This is analogous to determination of molecular flip-angles by deuteron 2D exchange NMR (1). In the present case, however, the tensors do not completely satisfy the above condition; therefore, spectral simulation is in progress for precisely determining the bond angle.

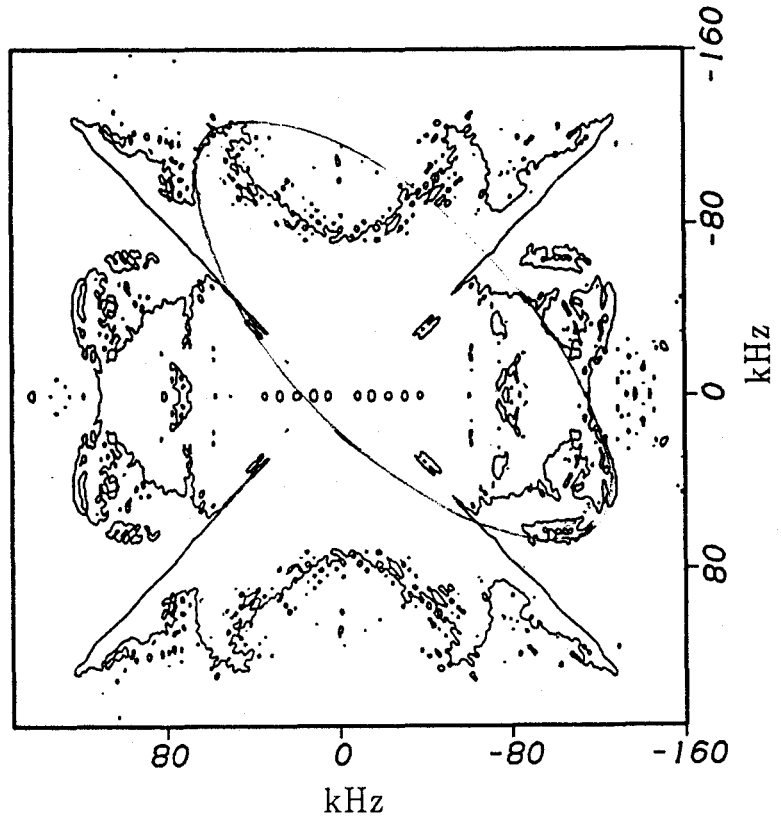


Fig.1 Deuteron 2D exchange NMR spectrum for NH_2CD_2COOH

Reference

(1) C. Schmidt, S. Wefing, B. Blümich, and H.W. Spiess, *Chem. Phys. Lett.*, 130, 84 (1986).

L4

リン酸ジルコニウム系化合物の^{31}P固体NMRによる研究

（阪大理、神戸薬大*）
○中山尋量、江口太郎、中村亘男、津波古充朝*

^{31}P Solid State NMR of Layered Metal Phosphates

Hirokazu Nakayama, Taro Eguchi, Nobuo Nakamura and
Mitsutomo Tsuhako*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University,
Toyonaka, Osaka 560, Japan
and
*Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Hyogo 658, Japan**

^{31}P Solid State NMR was applied to the study of the structure of $M(HPO_4)_2 \cdot nH_2O$ (M = Zr, Ti, Ce), $Zr(HPO_4)(NaPO_4) \cdot H_2O$ and $AlH_2P_3O_{10} \cdot 2H_2O$. ^{31}P isotropic chemical shift values for $(PO_4)^{3-}$, $(HPO4)^{2-}$ and $(H_2PO_4)^-$ groups were determined to be -10, -20 and -30 ppm, respectively, by MAS spectra with ^{1}H high power decoupling. The strength of ^{1}H and ^{31}P dipolar interaction was estimated by the measurements of the contact time dependence of the spectrum.

はじめに

Clearfield らは、組成が $Zr(HPO_4)_2 \cdot H_2O$ (α-ZrP) と $Zr(HPO_4) \cdot 2H_2O$ (γ-ZrP) の層状リン酸ジルコニウムを合成した[1-2]。これらの化合物は、組成上は層間の水分子の数が1つだけ異なるにも拘わらずイオン交換能力や触媒活性が大きく異なり、これらの特性と構造の間の相関が注目を集めている。α-ZrP には2種類の $(HPO_4)^{2-}$ が存在することが単結晶X線構造解析と粉末中性子線構造解析により明らかにされている[4-5]。一方、γ-ZrP の構造は、単結晶が得られないこともあって、粉末パターンに基づいて構造が提案されたが確証はなく α-ZrP との比較も困難な状況であった。Clayden は、^{31}P CP/MAS NMR により、γ-ZrP には、$(PO_4)^{3-}$ と $(H_2PO_4)^-$ が 1:1 の比で存在することを示し、以前からのモデルを否定した[6]。これらの結果は、今年発表された粉末パターンの詳細な解析によって得られた構造と符合する[7]。γ-ZrP の高いイオン交換能力は $(H_2PO_4)^-$ サイトによると考えられるが、粉末X線構造解析では H の位置を正確にきめるのは難しく、$(PO_4)^{3-}$ と $(H_2PO_4)^-$ を区別できない。

中心金属を Ti, Ce, Al に変えた化合物は、イオン交換能力や触媒特性が Zr 化合物とはかなり異なる。しかしながら、X線による構造解析が容易ではなく、構造とこれらの性質の相関ははっきりしていない。

リン酸ジルコニウム、層状リン酸塩化合物、^{31}P NMR

○なかやま　ひろかず、えぐち　たろう、なかむら　のぶお、つはこ　みつとも

一方、ゼオライト系と同様に分子選択性などを利用した特殊な機能物質開発をめざし、有機分子で修飾した層状リン酸化合物、たとえば水素イオンを ethylene oxide, n-alkylamine, phenyl phosphate などで置換した化合物が合成されている[3,8]。最近では、α-ZrP 層間への酵素や抗菌剤などの挿入が報告されている[9]。しかしながら、これらの化合物のキャラクタリゼーションは、粉末X線による層間距離から分子のならびを推定する域を出ていないのが現状である。

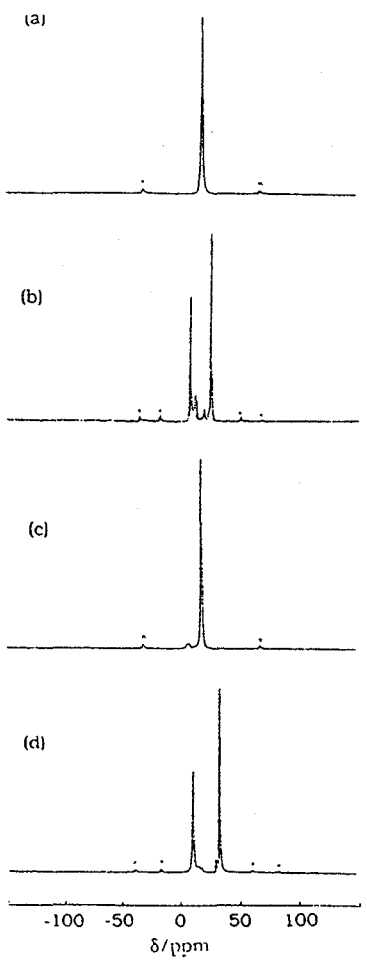


Fig. 1 ^{31}P MAS NMR spectra with ^{1}H high power decoupling for Zr and Ti phosphates: a) α-ZrP, b) γ-ZrP, c) α-TiP, d) γ-TiP. Spinning rates are 3.5 - 5 kHz. * show the spinning side bands.

本研究では、一連の層状リン酸化合物 $M(HPO_4)_2 \cdot nH_2O$ (M= Zr, Ti, Ce), $Zr(HPO_4)(NaPO_4) \cdot H_2O$, $AlH_2P_3O_{10} \cdot 2H_2O$ の ^{31}P 固体 NMR スペクトルからイオン交換能力と関連があると思われるサイトの帰属が簡単にできることを見出したので報告する。また、構造解析の結果とも比較検討した。さらに n-alkylamine で置換した $Ce(HPO_4)_2 \cdot 1.33H_2O$ の ^{31}P と ^{13}C NMR スペクトルのも併せて報告する予定である。

実験

試料は、既報の方法により合成した[1-2,10-11]。例えば、Ce 化合物は CeO_2 と 85% H_3PO_4 とをモル比 P_2O_5/CeO_2 = 2.0 となるように混合し、オートクレーブ中 150℃で 5 時間加熱して得た。生成物は、粉末X線回折により同定を行った。

^{31}P, ^{13}C NMR の測定は Bruker MSL-200 を使用した。それぞれの核種の測定周波数は、^{31}P, ^{13}C で 81.015, 50.323 MHz である。MAS スペクトルは Bruker 社製 CP/MAS プローブを用いて測定し、MAS の回転速度は、3-5 kHz であった。化学シフトの基準は、 ^{31}P, ^{13}C それぞれ 85% リン酸水溶液およびテトラメチルシランを用いた。

結果と考察

1) α, γ-$Ti(HPO_4)_2 \cdot nH_2O$ (n= 1, 2)

粉末X線構造解析によると、α-TiP (α-$Ti(HPO_4)_2 \cdot H_2O$) は α-ZrP と同形で、2 種類の結晶学的に非等価な P が存在するが、γ-TiP (γ-$Ti(HPO_4)_2 \cdot 2H_2O$) についてははっきりとした構造はわかっていない[12]。α, γ-ZrP および α-TiP, γ-TiP の ^{31}P MAS NMR のスペクトルを Fig. 1 に示す。α, γ-ZrP のスペクトルは Clayden の結果と一致した。

Ti 化合物に関しては、α, γ-型共に Zr と類似の スペクトルを示す。α-TiP に関しては、Zr と同様 1 種類のピークしか観測されず、結晶学的に非等価な $(HPO_4)^{2-}$ は区別できない。γ-TiP の -10.6 ppm のピークは ^{1}H decoupling をしないと非常に幅広くなり、γ-ZrP と同様に $(H_2PO_4)^-$ サイトによると考えられる。CP/MAS スペクトルの contact time 依存性の測定もこの結果を支持している。したがって、γ-TiP は、γ-ZrP と同形である。

また、MAS をかけないときの広幅スペクトルから求めた化学シフトの異方性は、Table 1 のようになる。この結果から、$(H_2PO_4)^- > (HPO_4)^{2-} > (PO_4)^{3-}$ の順に PO_4 四面体のひずみが大きくなることがわかる。一方、Ti と Zr では Ti のほうが歪みが大きく、これが両化合物のイオン交換能力の差になっていると考えられる。

2) α-$Zr(HPO_4)(NaPO_4)\cdot H_2O$

X線構造解析によると $(HPO_4)^{2-}$ と $(NaPO_4)^{2-}$ が交互に規則正しく並んでいる[13]。 つまり α-ZrP の 1 つの H^+ が Na^+ に置き換わった構造である。^{31}P MAS NMR のスペクトル も、α-ZrP の 1 本のピークが僅かに分裂しているだけで (Fig. 2) 、X線の結果と一致する。H^+ が Na^+ に置換しても HPO_4 四面体構造はほとんど変化していないことを示している。

3) $Ce(HPO_4)_2\cdot 1.33H_2O$

Fig. 2 に ^{31}P MAS NMR のスペクトルを示す。X線構造解析の結果は報告されていないが、化学シフトの値から予想すると γ 型の構造をとっていると推定される。-28.6 ppm のピークは、CP/MAS スペクトルの contact time 依存性の測定から γ 型に特有の $(PO_4)^{3-}$ に帰属できる。化学シフトの異方性は、γ-ZrP や γ-TiP よりも大きい。

4) $AlH_2P_3O_{10}\cdot 2H_2O$

$AlH_2P_3O_{10}\cdot 2H_2O$ は、上の化合物と異なり、PO_4 単位が独立して存在するのではなく一部酸素原子をを共有した架橋構造をとっていると考えられる。実際、広幅スペクトルは、非常に大きな化学シフトの異方性を示す。しかし、^{31}P MAS NMR のスペクトルから求まる等方的化学シフトの値 (δ_{iso}) は、他の化合物と同様の値を示す。この値だけから推定すると、2 種類の $(HPO_4)^{2-}$ と 1 種類の $(PO_4)^{3-}$ 単位が存在するように思われる。CP/MAS スペクトルの

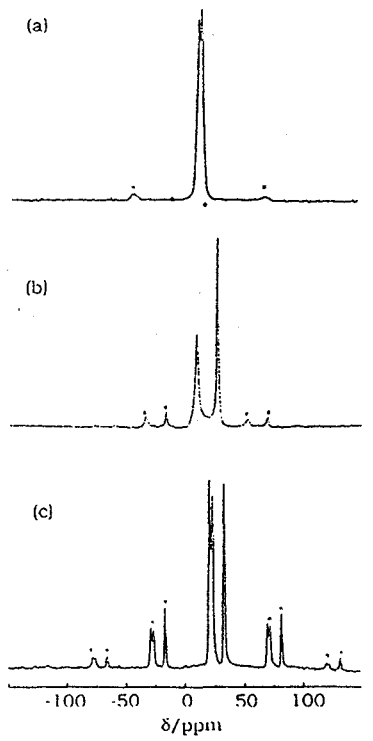


Fig. 2 ^{31}P MAS NMR spectra with ^{1}H high power decoupling for a) α-$Zr(HPO_4)(NaPO_4)\cdot H_2O$, b) $Ce(HPO_4)_2\cdot 1.33H_2O$ and c) $AlH_2P_3O_{10}\cdot 2H_2O$. Spinning rates are 3.5 - 5 kHz. * show the spinning side bands.

contact time 依存性の測定によってこの点が確認できた。

以上の結果をまとめて Table 1 に示す。一連の層状リン酸塩の構造を ^{31}P 固体 NMR スペクトルから簡単に分類できることがわかった。つまり、$(H_2PO_4)^-$, $(HPO_4)^{2-}$, $(PO_4)^{3-}$ による $\delta_{iso}(^{31}P)$ は、-10, -20, -30 ppm 付近に現れる。これらのサイトは ^{31}P CP/MAS および ^1H high power decoupling スペクトルにより同定できる。また、(H_2PO_4) の ^{31}P の化学シフトの異方性は γ-ZrP, γ -TiP, CeP の順に大きくなる。これらのデータはイオン交換能力と相関があることがわかった。

謝辞

有益な議論を頂いた大阪大学産業化学研究所の山口俊郎氏と神戸薬科大学の檀上真弓氏に感謝いたします。

Table 1 Chemical shifts of layered phosphates.

	δ/ ppm			site
	iso	11	22	33
α-$Zr(HPO_4)_2\cdot H_2O$[5]	-18.6	5	-24	-37 $(HPO_4)^{2-}$
α-$Ti(HPO_4)_2\cdot H_2O$	-18.4	4	-22	-37 $(HPO_4)^{2-}$
α-$Zr(HPO_4)(NaPO_4)\cdot H_2O$	-15.0	~2	~-15	~-32 $(NaPO_4)^{2-}$
	-17.3	~-7	~-17	~-41 $(HPO_4)^{2-}$
γ-$Zr(HPO_4)_2\cdot 2H_2O$[5]	-8.9	17	-16	-27 $(H_2PO_4)^-$
	-26.8	-14	-25	-38 $(PO_4)^{3-}$
γ-$Ti(HPO_4)_2\cdot 2H_2O$	-10.8	20	-19	-32 $(H_2PO_4)^-$
	-33.0	-15	-34	-48 $(PO_4)^{3-}$
$Ce(HPO_4)_2\cdot 1.33H_2O$	-10.6	28	-22	-39 $(H_2PO_4)^-$
	-28.3	-1	-28	-55 $(PO_4)^{3-}$
$AlH_2P_3O_{10}\cdot 2H_2O$	-22.0	~44	~-15	~-95 $(HPO_4)^{2-}$
	-24.2	~44	~-15	~-95 $(HPO_4)^{2-}$
	-29.6	~48	~-24	~-123 $(PO_4)^{3-}$

References

1) A. Clearfield and J.A. Stynes, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **26**, 117 (1964).
2) A. Clearfield, R.H. Blessing and J.A. Stynes, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **8**, 2249 (1968).
3) S. Yamanaka, *Inorg. Chem.*, **15**, 2811 (1976).
4) A. Clearfield and G.D. Smith, *Inorg. Chem.*, **8**, 431 (1969).
5) J. Albertsson, A. Oskarsson, R. Tellgren and J.O. Thomas, *J. Phys. Chem.*, **81**, 1574 (1977).
6) N.J. Clayden, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1877 (1987).
7) D.M. Poojary, B. Shpeizer and A. Clearfield, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 111 (1995).
8) M. Danjo, Y. Baba, M. Tsuhako, S. Yamaguchi, M. Hayama, H. Nariai and I. Motooka, Bull. Chem. Soc. Jpn., 68, 1607 (1995).
9) 檀上、馬場、津波古、山口、坂本、成相、本岡、日本化学会第６９春季年会、京都、1A418 (1995).
10) M. Tsuhako, Y. Horii, K. Kawamoto, N. Kawabata, H. Nariai and I. Motooka, Nippon Kagaku Kaishi, 11, 1810 (1988).
11) 津波古、馬場、檀上、山口、太田、石橋、成相、本岡、日本化学会第６９春季年会、京都、4B238 (1995).
12) A.N. Christensen, E.K. Andersen, I.G.K. Andersen, G. Alberti, M. Nielsen and M.S. Lehmann, Acta Chem. Scand., 44, 865 (1990).
13) P.R. Rudolf and A. Clearfield, *Inorg. Chem.*, **28**, 1706 (1989).

P1

ＮＭＲ化学シフトに対するゲージ依存性およびスピン－軌道相互作用の効果に関する理論的研究（京大工）○田中真司、高島一、波田雅彦、中辻博

The study of the effct of the gauge dependence and the spin-orbit interaction to the NMR chemical shift

(Faculty of Engineering, Kyoto University) Shinji, Tanaka; Hajime, Takashima; Masahiko, Hada; Hiroshi, Nakatsuji

We have studied the metal NMR chemical shifts by the ab-initio molecular orbital method and the finite perturbation method, and we have clarified the mechanisms of these chemical shifts. In this report, we present the calculations of the ^{129}Xe chemical shifts of the Xe compound and the the ^{13}C chemical shifts of CX_4 (X=H, F, Cl, Br, I) and CH_nI_{4-n} (n=1, 2, 3). The results are as follows.

(1) The calculated Xe chemical shifts well reproduce the experimental ones when we add the First-order higher basis function (FOBF). The Xe chemical shift is mainly due to the Xe valence p orbital.

(2) The spin-orbit effects are very large for Br and I ligands, and therefore only the results with the spin-orbit effects can reproduce the experimental trends.

当研究室では様々な核を含む化合物のＮＭＲ化学シフトを非経験的方法によって求め、その電子メカニズムを解明してきた。今回は、不活性ガスであるＸｅ化合物及び炭素化合物の^{129}Ｘｅ，^{13}Ｃ化学シフトについて計算を行った。また化学シフトに対する基底関数依存性についても研究を行った。

＜方法＞化学シフトは磁気遮蔽定数σの差である。σはHartree-Fock/有限摂動法を用いて計算した。また、既に我々は、最外殻に一次高い角運動量をもつ関数（ＦＯＢＦｓ）を加えることによりほぼゲージ不変な結果が実現され、ＮＭＲ化学シフトの計算値が実験値をよく再現することを見いだしており[1]、今回の計算ではＸｅ、Ｃの計算両方において、中心原子と配位子の両方にＦＯＢＦｓ($r\chi$)を加え、基底関数とした。一方、ハロゲン化炭素のＮＭＲ化学シフトは重ハロゲン化置換により高磁場シフトするという、いわゆるＮＨＤ(Normal Halogen Dependence)を示しているが、スピン軌道相互作用(LS)がこのＮＨＤに重要な役割をはたすと考えられていることから、われわれは、ＦＯＢＦｓを用いたうえでスピン軌道相互作用を取り込んだ化学シフトの計算を行った。また、今回の我々の研究結果より、配位子部分の基底関数依存性を解消するため配位子の内殻部分にはＥＣＰを用いた。

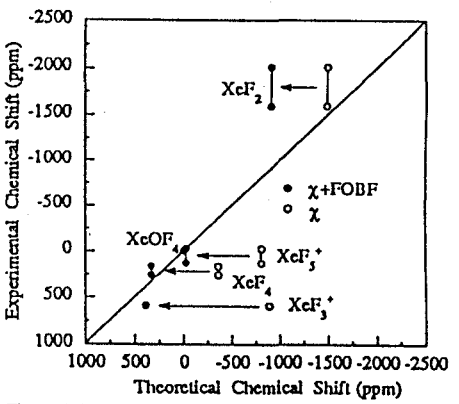


Figure 1 The comparison shift after adding FOBFs (filled circle) and before adding FOBFs (open circle)

＜結果＞

①Xenon化合物

まず、Xenon化合物について計算を行った。Fig.1では各基底関数でのＮＭＲ化学シフトの計算値と実験値との比較を示しており、Table1では磁気遮蔽定数の各

Table 1 Calculated Diamagnetic and Paramagnetic Contributions, σ^{dia} and σ^{para}, to the Xenon Nuclear Magnetic Shielding Constant σ and their Analyses into s,p,d AO Contributions and Ligand Contributions. (in ppm)

Molecule	σ dia (Xe)				σ dia (L)	σ para (Xe) a)			σ para (L)	σ tot.
	s	p	d	tot.	tot.	p	d	tot.	tot.	
$XeF^+SbF_6^-$	2572	2011	1035	5618	307	-4196	-76	-4272	-89	1552
XeF_2	2572	2011	1035	5618	92	-2986	-159	-3145	-70	2494
XeF_3^+(opt.)	2572	2002	1035	5610	137	-4208	-237	-4446	-100	1200
XeF_4	2574	1998	1037	5609	187	-4020	-375	-4396	-143	1256
XeF_5^+	2572	1992	1037	5600	233	-3544	-505	-4049	-170	1613
XeF_6	2578	1984	1037	5598	290	-3299	-520	-3819	-224	1845
$XeOF_4$	2573	1990	1037	5600	242	-3570	-503	-4074	-180	1588
XeO_2F_2	2571	1994	1037	5602	196	-3722	-454	-4176	-140	1483
XeO_3	2570	1999	1037	5606	144	-3837	-416	-4253	-96	1401
XeF^+(opt.)	2572	2012	1034	5618	46	-5530	15	-5514	-31	118
$(XeF_6)_4$	2573	1987	1037	5597	291	-3055	-531	-3586	-222	2080

a) The contribution of the s atomic orbitals is identically zero because the s AO does not have an angular momentum.

ＡＯの寄与を示している。Fig.1から明らかなように、Xenonフッ素化合物において従来のＦＯＢＦｓを加えない基底関数における^{129}ＸｅＮＭＲ化学シフトの計算値と較べてＦＯＢＦを加えた時の計算値は低磁場側にシフトしており、ＸｅＦ$_2$を除いてより実験値を再現できていることがわかる。また、Table1より各化合物における磁気遮蔽定数の変化量はσ^{para}(Xe)のｐ軌道で最大であり、各ＭＯの寄与を調べたところＸｅのvalence軌道の変化量が最大であったことから、化学シフトにはＸｅのvalence ｐ軌道の寄与が重要であるということがわかった。

②炭素化合物

続いて、ハロゲン化炭素において^{13}ＣＮＭＲ化学シフトの計算を行った。まず配位子部分の基底関数依存性について研究を行った。Table2はCCl$_4$においてＣ１の内殻部分に次々と内殻に由来するＦＯＢＦを加えることにより磁気遮蔽定数にどのような影響があるかを示したものである。この表より、ＦＯＢＦを加えることでＣ１のcore部分の常磁性項が大きく変化し反磁性項のcore部分と相殺する傾向にあることがわかった。我々は、Ｃ１の内殻が完全系である時はcore部分の反磁性項と常磁性項はキャンセルすると考え、配位子の内殻部分にＥＣＰ[2)]を用いることにより基底関数依存性を軽減しつつ計算の次元を減らし、以降の計算を行った。Fig.2はハロゲン化炭素のスピン軌道相互作用の考慮前と考慮後におけるＮＭＲ化学シフトの計算値と実験値との比較を示している。白丸が考慮前を、黒丸が考慮後を示しており、スピン軌道相互作用を考慮することにより比較的実験値のＮＨＤの性質を再現できている。Table3はスピン軌道相互作用の考慮前と考慮後における各ＡＯの寄与を示した物である。この表からわかるように、スピン軌道相互作用の考慮前と考慮後の両方において反磁性項と常磁性項に大きな相違は見あたらない。スピン軌道相互作用に由来する項特にFermi contact項が一義的に全化学シフトに影響を及ぼしており、スピン軌道相互作用が実験値におけるＮＨＤの性質に大きく係わっていることがわかった。

Table 2. The atomic contributions to the ^{13}C magnetic shielding constants in CCl$_4$.

	σ^{dia}			σ^{para}			σ^{loc}(val)
	C	Cl		C	Cl		
		core	valence		core	valence	
Basis set A [1)]	250.30	212.44	155.20	-216.26	-4.50	-102.02	87.22
Basis set A+ *1p* [2)]	250.42	212.36	155.16	-215.97	-51.48	-102.15	87.46
Basis set A+ *1p2p* [2)]	250.95	212.29	154.70	-213.22	-69.75	-102.78	89.65
Basis set A+ *2d* [2)]	248.21	213.08	156.68	-224.99	-132.33	-89.68	90.22
Basis set A+ *1p2d* [2)]	248.31	213.60	155.65	-224.67	-179.75	-89.73	89.56
Basis set A+ *1p2p2d* [2)]	248.85	212.93	156.18	-221.06	-198.52	-91.06	92.91
Basis set A+ *1p2p2d3p* [2)]	260.05	214.21	147.31	-189.35	-195.37	-126.05	88.36
ECP	252.5	0.0	152.8	-205.4	0.0	-126.7	73.2

1) Basis set A is (10s7p3d)/[4s3p2d]+*3d*(FOBF for 3p)
2) The italic orbitals *1p 2p 2d 3p* are the FOBFs for 1*s* 2*s* 2p 3*s*, respectively.

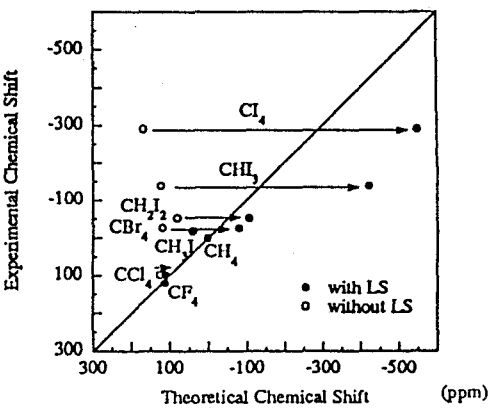


Figure 2 Correlation between experimental and theoretical values of the ^{13}C chemical shifts of the Carbon compounds with and without the spin-orbit interaction effect.

Table 3 The ^{13}C magnetic shielding constants with and without spin-orbit interaction, diamagnetic, paramagnetic, and, spin-orbit terms of CX_4 (X=H,F,Cl,Br,I) and CH_nI_{4-n} (n=1,2,3) (ppm)

	without LS				with LS						chemical shift		
Molecule	σdia	σpara	σtot.	σcal.	σdia	σpara	σLS			σtot.			
							SD	FC	total		LS[1)]	total[2)]	expt.
CF_4	453.6	-370.1	83.6	113.4	453.6	-370.1	0.0	1.8	1.8	85.4	-1.8	111.6	121.0
CCl_4	405.3	-332.1	73.1	123.9	405.3	-332.2	0.0	15.1	15.1	88.3	-15.1	108.7	98.8
CBr_4	392.2	-312.9	79.3	117.7	392.0	-315.8	0.2	201.2	201.4	277.6	-201.4	-80.6	-26.2
CI_4	378.6	-349.0	29.6	167.4	378.8	-356.6	1.9	721.8	723.7	746.0	-723.7	-549.0	-290.2
CH_3I	316.4	-159.2	157.1	39.9	316.5	-156.5	0.1	-1.0	-0.9	159.1	0.9	37.9	-18.4
CH_2I_2	336.8	-217.9	118.9	78.1	336.8	-220.8	-2.0	191.6	189.6	305.6	-189.6	-108.6	-51.7
CHI_3	357.5	-281.7	75.8	121.2	357.6	-289.5	-4.4	556.1	551.7	619.8	-551.7	-422.8	-137.6
CH_4 [3)]	296.4	-99.4	197.0	0	296.4	-99.4	0.0	0.0	0.0	197.0	0	0	0

1) chemical shifts calculated only by the spin-orbit terms.
2) chemical shifts calculated by the total magnetic shielding constants.
3) reference compound

1) M.Sugimoto and H.Nakatsuji, J.Chem.Phys. 102(1)(1995)285
2) P.A.Christiansen et al., J.Chem.Phys. 82(1985)2664; 84(1986)6840; 87(1987)2812

ＦＯＢＦ，スピン軌道相互作用、基底関数依存性、Fermi contact項、ＮＨＤ

たなか　しんじ

P2　ケイ素ハロゲン化物のNMR化学シフトにおけるスピン-軌道相互作用の重要性（京大工）○中嶋隆人、高島一、波田雅彦、中辻博

The importance of spin-orbit effect on the NMR chemical shifts of silicon tetrahalides

Faculty of Engineering, Kyoto University
Takahito Nakajima, Hajime Takashima, Masahiko Masahiko, and Hiroshi Nakatsuji

The Si NMR chemical shifts of silicon tetrahalides are calculated by the ab initio UHF / finite perturbation method including the spin-orbit (SO) interaction. The chemical shifts calculated with the SO effects show good agreement with the experiments for all the compounds studied here. The SO effects of the halogen ligands, especially bromine and iodine, are large and work to move the chemical shift to higher magnetic field. The anomalous normal halogen dependence (NHD) by the substitution from Cl to I in the silicon tetrahalides is caused mainly by the SO effect. In addition, the origin of the U-shaped relationship for the $SiBr_nF_{4-n}$ series is clarified to be the SO effect.

I. 緒言

ケイ素ハロゲン化物において、重ハロゲン置換すると（Cl→Br→I）、化学シフトの異常な高磁場シフトがみられることが知られている（normal halogen dependence, NHD)。また、これらのSi化学シフトは、配位子の種類と数により、linear型とU-shape型の依存性を示すことが知られている。例えば、$SiCl_nF_{4-n}$のSi化学シフトのnに対するグラフは、linear型の依存を示すが、$SiBr_nF_{4-n}$に対しては、U-shape型の依存性を示す。

このように、ケイ素ハロゲン化物のSi化学シフトには、興味深い点があり、豊富に実験データが揃っている。しかしながら、そのメカニズムは、ほとんどわかっていないのが現状である。本研究では、ケイ素ハロゲン化物のSi化学シフトにおけるNHDの原因とU-shape型依存性の原因を、スピン-軌道（SO）相互作用を考慮することにより解明する。

II. 方法

磁気遮蔽定数の計算には、SO相互作用を考慮したab initio UHF/有限摂動法[1)]を用いた。SO演算子は、ハロゲンの内核電子とともに、SOを考慮した有効内核ポテンシャル（ECP）で置き換えた[2)]。ECPの使用により、計算の次元を減らすだけでなく、配位子の内核軌道から生じるゲージ依存性を解消することができる。

III. 結果

Fig.1は、ケイ素ハロゲン化物のSi化学シフトを実験値と理論値を比較して示したグラフである。SO効果を考慮すると、計算値は、高磁場の方向に移動し、実験値と非常に良く一致するようになる。詳細は、当日に譲るが、ハロゲンが重くなるほど、

化学シフトにおけるSO効果は大きくなり、Fermi接触項が支配的になる。スピン-双極子項は小さく、Si化学シフトのSO効果に重要な寄与をするのは、Fermi接触項であることがわかる。

Fig.2は、SiX_4（X=ハロゲン）のSi化学シフトを示す。FからClのハロゲン置換では、SO効果は小さく、常磁性項が支配的であるので、低磁場シフトする。ClからIのハロゲン置換では、SO効果が重要になり、高磁場シフトする（NHD）ことがわかる。SO効果を考慮しない場合、NHDは、再現されない。結局、NHDの主たる原因は、SO効果であるといえる。

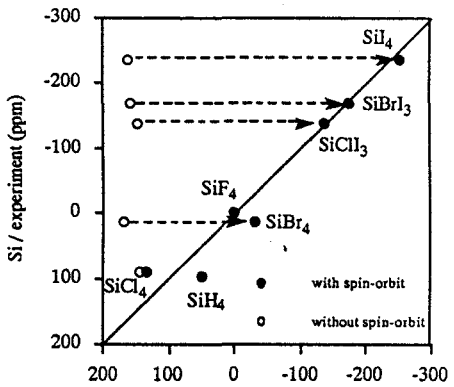


Fig.1

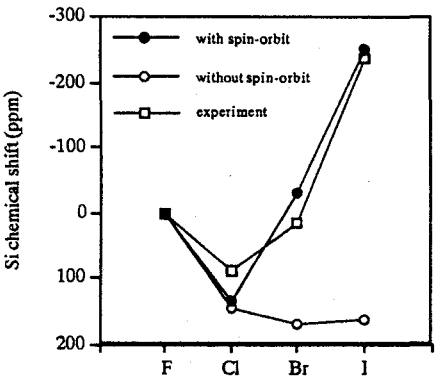


Fig.2

同様に、SO相互作用を考慮した化学シフトの計算を、$SiBr_nF_{4-n}$（n=0-4）系に適用した。Fig.3には、nに対する$SiBr_nF_{4-n}$のSi化学シフトを実験値と理論値を比較して示してある。SO効果を考慮しない場合、U-shape型の依存性は、再現されておらず、SO効果を考慮して初めて、U-shape型の依存性を再現することができる。結局、$SiBr_nF_{4-n}$（n=0-4）系のSi化学シフトにみられるU-shape型依存性の主たる原因は、NHDと同様、SO効果であるといえる。

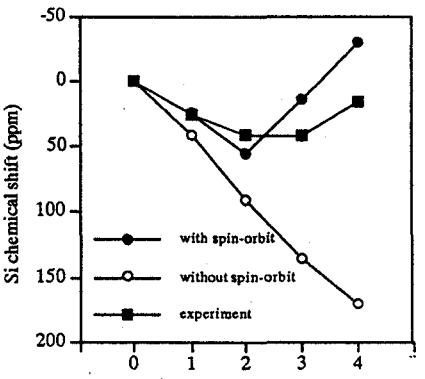


Fig.3

1) H. Nakatsuji et al. CPL 233 (1995) 95.
2) P. A. Christiansen et al. JCP. 82 (1985) 2664; JCP 84 (1986) 6840; JCP 87 (1987) 2812.

Si NMR化学シフト、スピン-軌道相互作用、ab initio UHF/有限摂動法

なかじまたかひと

P3

SnとAlのハロゲン化物のNMR化学シフトに対するスピン－軌道相互作用の効果（京大工）○金子広明、手島孝人、高島　一、波田雅彦、中辻　博

The spin-orbit effect on NMR chemical shifts in tin tetrahalides and aluminum tetrahalides

(Fucuty of Engineering, Kyoto Univesity) Hiroaki, Kaneko; Takahito Tejima; Hajime, Takasima; Masahiko, Hada; Hiroshi, Nakatsuji

We have studied the spin-orbit effect on the Sn and Al NMR chemical shifts of tin tetrahalides and aluminum tetrahalides using the ab initio UHF wavefunction and the finite pertubation method. The caluculeted chemical shifts show good agreement with experiment when the spin-orbit interaction is included. The spin-orbit effect is important for Br and I ligands. This effect causes the normal halogen dependence (NHD) in SnX4 and $AlX4^-$(X=Cl⇨Br⇨I). But the paramamagnetic term is dominant in inverse halogen dependence (IHD) in $AlX4^-$(X=F⇨Cl).

我々はこれまで金属錯体や金属核のNMR化学シフトを非経験的分子軌道法を用いてその電子メカニズムについて系統的に研究してきた[1)]。今回は、スピン－軌道相互作用がSn、AlハロゲンNMR化学シフトに及ぼす影響、SnX4と$AlX4^-$(X=Cl⇨Br⇨I)が示すNHDと$AlX4^-$(X=F⇨Cl)が示すIHDの要因について理論的に研究した。

＜方法＞今回、我々は$AlX4^-$(X=H, F, Cl, Br, I), SnX4 (X=H, Cl, Br, I), SnBr4-xIxを対象化合物とし、ab initio UHF/有限摂動法を用いてスピン－軌道相互作用を考慮した磁気遮蔽常数の計算を行った[2)]。その際、ゲージ依存性を無くすためfirst-order higher angular momentum basis functions (FOBFs)を加えた。また、ハロゲン原子に対してスピン軌道相互作用を考慮したeffective core potential (ECP)を用い、基底関数依存性の軽減につとめた。

＜結果＞

●Sn化合物

対象とするSn化合物について得られた化学シフトの計算値と実験値とをスピン－軌道相互作用を考慮した場合（●）としない場合（○）とで比較した物がFig. 1である。スピン－軌道相互作用を考慮した値は実験値をかなり良く再現し、この効果がNHDの大きな要因となっていることがわかる。

次にスピン－軌道相互作用考慮した場合としない場合とで得られた計算値を常磁性項σ^{para}, 反磁性項σ^{dia}, LS項σ^{LS}(spin-dipolar項+Fermi contact項)に分割した物がTable 1である。FC項がスピン－軌道相互作用に大きく寄与しており、その効果は配位子が重ハロゲンになる程大きくなっている。

ただし、SnBr4-xIxにおいて値が多少ずれているのは構造の不正確さによるものと考えられる。Table 2はスピン－軌道相互作用を考慮した場合の計算値に対するMO解析でSD項、FC項共にvalence電子の寄与が支配的である。

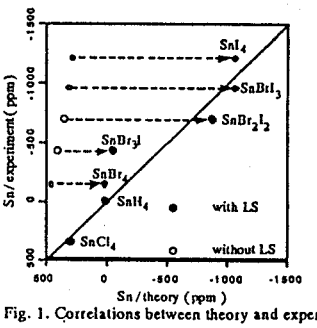


Fig. 1. Correlations between theory and experiment for Sn chemical shiftsin the tin tetrahydlide and tetrahalides. The marks shown by (○) and (●) are caluculated values without and with the spin-orbit (LS) interaction, respectively.

Table 1

The magnetic shielding constants and their components in tin tetrahidride and tin tetrahalides with and without the spin-orbit effects (ppm)

	without LS				with LS						
	σ^{dia}	σ^{para}	σ^{tot}	δ^{cal}	σ^{dia}	σ^{para}	σ^{LS}		σ^{tot}	$\delta^{cal}(LS)^a$	δ^{exp}
compound							SD	FC	total			
SnH_4	5097.86	-1703.03	3424.82	0	5097.67	-1677.02	16.03	-3.01	13.02	3433.67	0	0
$SnCl_4$	5184.65	-2079.55	3105.10	319.72	5184.65	-2079.45	-0.23	33.41	33.64	3138.85	285.97	350
$SnBr_4$	5184.56	-2204.16	2977.41	447.41	5181.36	-2193.13	8.47	416.69	425.16	3412.09	-11.93	-138
$SnBr_3I$	5179.39	-2152.75	3026.64	398.18	5179.34	-2144.22	6.71	437.61	444.32	3479.44	-54.62	-416
$SnBr_2I_2$	5182.85	-2104.84	3078.02	346.80	5182.89	-2114.89	8.06	1225.35	1233.41	4301.44	-876.62	-687
$SnBrI_3$	5170.65	-2065.45	3109.90	314.92	5170.61	-2082.99	14.29	1392.78	1407.07	4494.69	-1069.87	-947
SnI_4	5172.45	-2025.45	3147.50	277.32	5168.57	-2047.68	11.71	1347.51	1359.22	4480.11	-1055.29	-1201

[a] The caculated values for SnH_4 without LS are used as reference.

Table 2はスピン一軌道相互作用考慮した場合の計算値に対するAO解析で、FC項は中心金属のs AOの寄与が支配的であることがわかる。

●Al化合物

対象とするAl化合物においても化学シフト計算値はスピン一軌道相互作用を考慮すると実験値とかなり一致している。(Fig.2) Fig.3はAlH_4^-をreferenceとした場合のAlX_4^- (X=F, Cl, Br I)の各値を図に示した物である。

これを見ると反磁性項δdiaと実験値δexptl.がparallelであり、X=Cl, Br Iにおける常磁性項δparaの傾向とLS項δLSの効果が相殺することで計算値δcal(LS)と実験値δexptl.がほぼ一致していることが分かる。 つまり、IHD(X=F⇨Cl)は反磁性項に起因し、NHD(X=Cl⇨Br⇨I)はスピン一軌道相互作用の効果が重要であると考えられる。

Table 4, Table 5, Table 6ではSn化合物とほぼ同じ傾向が見られる。

Table 2

MO contributions in the spin-dipolar and Fermi contact terms of the Sn compounds (ppm)

compound	σ^{dia}	σ^{para}	σ^{LS}(SD) core	valence	total	shift	σ^{LS}(FC) core	valence	total	shift	σ^{tot}	δ^{cal}(LS)	δ^{exp}
SnH_4	5097.67	-1677.02	3.28	12.75	16.03	——	-6.92	5.90	-3.01	——	3433.67	——	——
SnH_4 [a]	5097.66	-1703.03	——	——	——	0	——	——	——	0	3434.82	0	0
$SnCl_4$	5184.65	-2079.45	0.06	0.17	0.23	-0.23	2.46	30.95	33.41	-33.41	3138.85	285.97	350
$SnBr_4$	5181.36	-2193.13	1.53	6.94	8.47	-8.47	18.95	397.74	416.69	-416.69	3412.89	11.93	-126
$SnBr_3I$	5179.34	-2144.22	1.22	5.49	6.71	-6.71	19.52	418.09	437.61	-437.61	3479.44	-54.62	-416
$SnBr_2I_2$	5182.89	-2114.86	1.26	6.80	8.06	-8.06	50.65	1174.70	1225.35	-1225.35	4301.44	-876.62	-687
$SnBrI_3$	5180.61	-2092.99	2.41	11.88	14.29	-14.29	101.32	1290.46	1392.78	-1392.78	4494.69	-1061.82	-947
SiI_4	5169.57	-2047.68	1.88	9.83	11.71	-11.71	97.33	1250.18	1347.51	-1347.51	4480.11	-1046.44	-1201

[a] The calculated values for SnH_4 without LS are used as reference.

Table 3

AO contributions in the spin-dipolar and Fermi contact terms of the Sn compounds (ppm)

compound	σ^{dia}	σ^{para}	σ^{LS}(SD) metal s	metal p	metal d	ligand	total	σ^{LS}(FC) metal[a] s	ligand	total	σ^{tot}	δ^{cal}(LS)[b]	δ^{exp}
SnH_4	5097.67	-1677.02	0.03	15.10	0.91	0.00	16.03	-3.50	0.49	-3.01	3433.67	0	0
$SnCl_4$	5184.65	-2079.45	0.00	0.23	0.01	-0.03	0.23	33.57	-0.16	33.41	3138.85	285.97	350
$SnBr_4$	5184.36	-2193.13	0.25	8.13	1.25	-1.16	8.47	414.90	1.79	416.69	3412.89	11.93	-126
$SnBr_3I$	5179.34	-2152.75	0.02	6.10	0.44	0.15	6.72	446.58	-8.97	437.606	3479.44	-54.62	-416
$SnBr_2I_2$	5182.85	-2104.84	-2.11	8.21	2.01	-0.04	8.06	1217.30	16.11	1233.41	4301.44	-876.62	-687
$SnBrI_3$	5170.61	-2082.99	-1.23	15.17	0.75	-0.40	14.29	1367.24	25.54	1392.78	4494.69	-1060.87	-947
SiI_4	5168.57	-2047.68	-0.56	11.91	0.03	0.28	11.71	1233.82	13.69	1347.51	4480.11	-1055.29	-1201

[a] The metal p and d AO contributions to the Fermi contact term are identically zero since they have a node at the position of the nucleus.

[b] The calculated values for SnH_4 without LS are used as reference.

Fig. 2

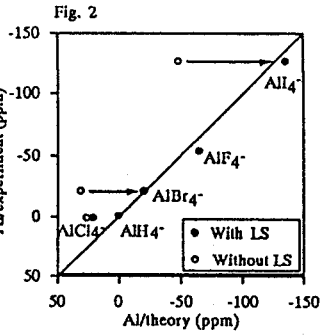


Fig. 3

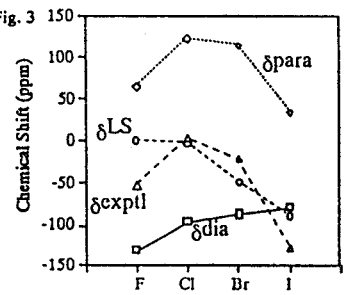


Table. 4 Al chemical shift in the tetra compounds with and without the spin-orbit effects(ppm)

Compound	Without LS σdia	σpara	σtot	δcal	With LS σdia	σpara	σLS SD	σLS FC	σLS total	σtot	δcal	δexp
AlH_4^-	817.66	-301.64	516.02	0	817.66	-301.59	-0.00	0.20	0.20	516.27	0	0
AlF_4^-	948.13	-367.89	580.24	-64.22	948.13	-367.89	-0.05	-0.00	-0.05	651.25	-63.92	-53.1
$AlCl_4^-$	914.30	-423.90	490.40	25.62	914.30	-424.12	-0.33	3.93	3.60	494.08	22.19	2.3
$AlBr_4^-$	904.73	-420.18	484.55	31.47	904.40	-416.18	1.06	47.16	48.22	536.44	-20.17	-20.5
AlI_4^-	897.13	-334.30	562.83	-46.81	897.19	-336.78	-0.22	91.06	90.84	651.25	-134.98	-127.2

Table. 5 MO contributions in the spin-dipolar and Fermi contact terms of the Al compounds(ppm)

Compound	σ^{dia}	σ^{para}	σLS(SD) core	valence	total	shift	σLS(FC) core	valence	total	shift	σ^{tot}	δ^{cal}	δ^{exp}
AlH_4^-	817.66	-301.59	0.01	-0.01	0.00	0	-0.22	0.42	0.20	0	516.27	0	0
AlF_4^-	948.13	-367.89	-0.01	-0.04	-0.05	0.05	-0.03	0.03	0.00	0.20	651.25	-63.92	-53.1
$AlCl_4^-$	914.30	-424.12	-0.02	-0.01	-0.03	0.03	0.21	-3.72	3.93	-3.73	494.08	22.19	2.3
$AlBr_4^-$	904.40	-416.18	0.11	0.95	1.06	-1.06	2.82	44.34	47.16	-46.96	536.44	-20.17	-20.5
AlI_4^-	897.19	-336.78	-0.21	-0.01	-0.22	0.22	4.95	86.11	91.06	-90.86	651.25	-134.98	-127.2

Table. 6 AO contributions in the spin-dipolar and Fermi contact terms of the Al compounds(ppm)

Compound	σ^{dia}	σ^{para}	σLS(SD) metal s	metal p	metal d	ligand	total	σLS(FC) metal	ligand	total	σ^{tot}	δ^{cal}	δ^{exp}
AlH_4^-	817.66	-301.59	0.00	-0.04	0.00	0.04	0.00	0.20	0.00	0.20	516.27	0	0
AlF_4^-	948.13	-367.89	-0.00	-0.06	-0.00	0.01	-0.05	0.03	-0.03	0.00	651.25	-63.92	-53.1
$AlCl_4^-$	914.30	-424.12	-0.06	-0.02	0.08	-0.03	-0.03	4.62	-0.69	3.93	494.08	22.19	2.3
$AlBr_4^-$	904.40	-416.18	0.17	1.59	0.53	-1.23	1.06	46.86	0.30	47.16	536.44	-20.17	-20.5
AlI_4^-	897.19	-336.78	0.03	0.02	0.01	-0.28	-0.22	89.57	1.49	91.06	651.25	-134.98	-127.2

1) H. Nakatsuji, Nuclear Magnetic Shielding and Molucular Structure, eds. J. A. Tossell (Kluwer, Dordrecht, 1993) p.263.

2) Nakatsuji et al. CPL 233 (1995) 95.

スピン一軌道相互作用、NHD、IHD、Fermi contact項

かねこ ひろあき

P4

化学シフトの計算

(北見工大) ○馬場雄久、福井洋之、鳴海純一、
三浦宏一、松田弘喜

Calculation of Nuclear Magnetic Shielding Constants

Kitami Institute of Technology
○T. Baba, H. Fukui, J. Narumi, K. Miura, and H. Matsuda

Abstruct: Nuclear magnetic shielding constants in first- and second-row hydrides were calculated with electron correlations through third order. The calculation was performed on the use of London's gauge-including atomic orbitals (GIAOs) and finite-field Møller-Plesset perturbation theory (FF-MPPT). The calculated shielding constants of the non-hydrogen atoms reproduced rather well experimental values, but the results for proton were poor. The vibrational motion corrections to the isotropic shielding constants were evaluated.

I. INTRODUCTION

In the last few years, several gauge-invariant or at least approximately gauge-invariant calculations of nuclear magnetic shieldings at electron-correlated levels have been presented.[1-6] Until several years ago, it was believed that the coupled Hartree-Fock(CHF) approximation, which includes only the first-order electron correlation correction in terms of the Møller-Plesset(MP) perturbation theory, give good results for calculations of nuclear magnetic shielding constants in most cases, *e.g.*, first-row hydrides.[7] Recently we reported on the second- and third-order MP correlation corrections of the nuclear magnetic shieldings in four first-row hydrides HF, H_2O, NH_3, and CH_4.[5,8] We showed that the second- and third-order correlation corrections are not so small as estimated before.[9]

Sometimes experiments and theoretical calculations are complementary each other. In fact it is a hard work to get experimentally absolute values of the magnetic shielding constants in the condition of an isolated molecule. On the contrary, in theoretical approaches it is a formidable task to calculate the effect of other molecules and estimate relative shieldings for substances in different circumstances. Usually theoretical computations yield the absolute shielding constant of an isolated molecule. Therefore, we may expect the possibility that precise theoretical values for absolute shielding constants would be more reliable than those evaluated from experiments. It is a work of importance to perform accurate calculations for absolute magnetic shielding constants of small and simple molecules which may be used as standard substances in NMR chemical shift measurements. In this work,

Keyword: SCF, Electron Correlation, Chemical Shift

○ ばば たけひさ, ふくい ひろゆき, なるみ じゅんいち, みうら こういち, まつだ ひろき

Table 1. Isotropic nuclear magnetic shielding constants in first-row hydrides (in ppm).[a]

			CHF	SCF	MP2	MP3	Exptl.
HF[b]	F	$\bar{\sigma}$	413.7	413.7	423.9	417.6	410.0±6
	H	$\bar{\sigma}$	28.57	28.57	29.23	29.41	28.8±0.5
H_2O[b]	O	$\bar{\sigma}$	328.0	327.2	344.1	335.4	343.8±17.2
	H	$\bar{\sigma}$	30.88	30.87	30.99	31.23	30.09
NH_3[b]	N	$\bar{\sigma}$	261.7	261.5	274.7	268.9	264.5
	H	$\bar{\sigma}$	31.78	31.78	31.66	31.82	30.68
CH_4[c]	C	$\bar{\sigma}$	194.9	195.3	201.3	199.2	198.7
	H	$\bar{\sigma}$	31.92	31.94	91.78	31.86	30.61

[a] Experimental geometries are used. [b] [8s5p2d/3s2p] basis set is used.
[c] [6s4p2d/3s1p] basis set is used.

Table 2. Isotropic nuclear magnetic shielding constants in second-row hydrides (in ppm).[a]

			CHF	SCF	MP2	MP3	Exptl.
HCl[b]	Cl	$\bar{\sigma}$	952.0	952.1	972.1	962.3	950
	H	$\bar{\sigma}$	30.85	30.80	31.08	31.39	31.5
H_2S[c]	S	$\bar{\sigma}$	728.1	728.4	761.0	750.3	752
	H	$\bar{\sigma}$	31.22	31.22	31.39	31.57	30.54
PH_3[d]	P	$\bar{\sigma}$	591.5	590.9	612.3	607.1	599.93
	H	$\bar{\sigma}$	29.85	29.85	29.89	29.97	28.3
SiH_4[d]	Si	$\bar{\sigma}$	491.8	491.8	495.1	494.3	475.3
	H	$\bar{\sigma}$	28.46	28.46	28.49	28.52	27.61

[a] Experimental geometries are used. [b] [8s6p2d/3s2p] basis set is used.
[c] [8s6p1d/3s1p] basis set is used. [d] [7s5p1d/3s1p] basis set is used.

we present correlated calculations of the nuclear magnetic shielding constants in first- and second-row hydrides and estimate the vibrational corrections to the shielding constants.

II. RESULTS AND DISCUSSION

A. The electron-correlation effect

We performed self-consistent-field(SCF), second-order Møller-Plesset(MP2) correlation, and third-order Møller-Plesset(MP3) correlation calculations for nuclear magnetic shielding constants in four first-row hydrides HF, H_2O, NH_3, and CH_4 and four second-row hydrides HCl, H_2S, PH_3, and SiH_4 with the use of gauge-including atomic orbitals (GIAOs) and finite-field (FF) method. The theory for these calculations of magnetic shielding constants is shown in our previous paper.[5] The magnitudes of the used FF parameters, magnetic flux density component and nuclear dipole moment component, were chosen appropriately from the condition that the SCF value reproduces well the CHF one. The CHF value was obtained with the use of the density matrix method proposed by Dodds *et al.*[10] We used the basis sets proposed by Schäfer *et al.*,[11] which were augmented by polarization functions.

The results for the calculation of nuclear magnetic shielding constants in the first-

and second-row hydrides at the experimental geometries are shown in Tables 1 and 2, respectively. Tables 1 and 2 show that the calculated magnetic shielding constants of the non-hydrogen atoms reproduce rather well experimental values, but the agreement between calculations and experiments for proton shieldings is poor. In order to improve the calculated shieldings we evaluated the vibrational corrections to the shielding constants.

B. Vibrational corrections

In diatomic molecules we have one vibration which couples with the rotational motion. Let us assume the following interatomic potential function:

$$U = (1/2)KR_e^2\xi^2(1 + a_1\xi), \quad \xi = (R - R_e)/R_e, \tag{1}$$

where K is the force constant and R_e is the equilibrium internuclear distance for the bond length R. The averages of ξ^n are expressible in terms of the parameter a_1 and the usual molecular constants ω_e and B_e, in cm^{-1}.[12] We have[13]

$$\langle\xi\rangle_{vJ} = -3\left(v + \frac{1}{2}\right)a_1(B_e/\omega_e) + 4J(J+1)(B_e/\omega_e)^2, \tag{2}$$

$$\langle\xi^2\rangle_{vJ} = 2\left(v + \frac{1}{2}\right)(B_e/\omega_e), \tag{3}$$

where v and J are the vibration and rotation quantum numbers, respectively. At room temperature we may assume that v is 0. The vibrational correction to the isotropic shielding constant $\bar{\sigma}$ is given by

$$\langle\bar{\sigma}\rangle - \bar{\sigma}_e = (\partial\bar{\sigma}/\partial\xi)_{\xi=0}\langle\xi\rangle_{vJ} + (1/2)(\partial^2\bar{\sigma}/\partial\xi^2)_{\xi=0}\langle\xi^2\rangle_{vJ}, \tag{4}$$

where $\bar{\sigma}_e$ is the $\bar{\sigma}$ value at the equilibrium bond length, $\xi = 0$. We have previously reported on the vibrational corrections for the HF molecule; $\langle\bar{\sigma}(\mathrm{F})\rangle_{300\mathrm{K}} - \bar{\sigma}_e(\mathrm{F}) = -9.9$ ppm and $\langle\bar{\sigma}(\mathrm{H})\rangle_{300\mathrm{K}} - \bar{\sigma}_e(\mathrm{H}) = -0.66$ ppm.[5] We calculated here the vibrational corrections to the $\bar{\sigma}$(Cl) and $\bar{\sigma}$(H) in the HCl molecule. We used the experimental value for a_1; $a_1 = -2.3$,[12] and obtained $\langle\bar{\sigma}(\mathrm{Cl})\rangle_{300\mathrm{K}} - \bar{\sigma}_e(\mathrm{Cl}) = -17.0$ ppm and $\langle\bar{\sigma}(\mathrm{H})\rangle_{300\mathrm{K}} - \bar{\sigma}_e(\mathrm{H}) = -0.35$ ppm. The vibration correction improves the shielding value of Cl.

For the non-diatomic molecules we use the potential function:

$$U = (1/2)K\xi^2(1 + a_1\xi), \tag{5}$$

where ξ is the non-dimensional displacement variable for a normal mode vibration. We obtain in this case

$$\langle\xi\rangle_v = -\frac{3}{2}\left(v + \frac{1}{2}\right)a_1(hc\omega_e/K), \tag{6}$$

$$\langle\xi^2\rangle_v = \left(v + \frac{1}{2}\right)(hc\omega_e/K), \tag{7}$$

where ω_e is the vibrational frequency, in cm^{-1}, of the normal mode. The results of calculations for the H_2O and NH_3 molecules are listed in Table 3. We calculated the force constant K and the unharmonic parameter a_1 from the SCF energies. Table 3 shows that the total correction to the O shielding due to the three vibrational motions is -10.1 ppm and the vibrationally corrected value for $\bar{\sigma}(O)$ may be 325.3 ppm. The experimental value for $\bar{\sigma}(O)$, 343.8 ± 17.2 ppm, may be too high. We note that the effects of stretching vibrations are larger than those of bending motions.

Table 3. Vibrational corrections to the isotropic shielding contants (in ppm).

		H_2O			
		A_1 stretching	B_2 stretching	A_1 bending	Total
$\langle\bar{\sigma}\rangle - \bar{\sigma}_e$	O	-8.73	-4.19	2.79	-10.1
	H	-0.24	0.11	0.03	-0.10
		NH_3			
		A_1 stretching	A_1 bending		
$\langle\bar{\sigma}\rangle - \bar{\sigma}_e$	N	-2.23	0.84		
	H	-0.10	-0.03		

References

1. J. Gauss, *Chem. Phys. Lett.* **229**, 198 (1994).
2. J. Gauss and J. F. Santon, *J. Chem. Phys.* **102**, 251 (1995).
3. J. Jaszuński, T. Helgaker, K. Ruud, K. L. Bak, and P. Jørgensen, *Chem. Phys. Lett.* **220**, 154 (1994).
4. K. Ruud, T. Helgaker, R. Kobayashi, P. Jørgensen, K. L. Bak, and H. J. Aa. Jensen, *J. Chem. Phys.* **100**, 8178 (1994).
5. H. Fukui, T. Baba, H. Matsuda, and K. Miura, *J. Chem. Phy.* **100**, 6608 (1994).
6. M. Sugimoto and H. Nakatsuji, *J. Chem. Phys.* **102**, 285 (1995).
7. D. B. Chesnut and C. K. Foley, *J. Chem. Phys.* **84**, 852 (1986).
8. H. Fukui, K. Miura, and H. Matsuda *J. Chem. Phys.* **96**, 2039 (1992).
9. M. Iwai and A. Saika, *J. Chem. Phys.*. **77**, 1951 (1982).
10. J. L. Dodds, R. McWeeny, and A. J.Sadlej, *Mol. Phys.* **34**, 1779 (1977).
11. A. Schäfer, H. Horn, and R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **97**, 2571 (1992).
12. C. E. Dykstra,*Quantum Chemistry and Molecular Spectoroscopy* (Prentice–Hall, Englewood Cliffs, 1992).
13. D. K. Hindermann and C. D. Cornwell, *J. Chem. Phys.* **48**, 4148 (1968).

P5

化学シフト計算によるロドプシン中の11-*cis*-レチナールの構造予測

（東工大生命理工，†日本クレイ）
○北條博彦，浅川直紀，和田光人，櫻井実，井上義夫，田村祐介†，渡辺庸一†

Ab initio study of NMR chemical shifts for the structure of 11-*cis*-retinal in rhodopsin

(Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology, and †Cray Research Japan Limited)
Hirohiko Houjou, Naoki Asakawa, Mitsuhito Wada, Minoru Sakurai, Yoshio Inoue, Yusuke Tamura† and Yoichi Watanabe†

The visual pigment rhodopsin shows an absorption maximum at about 500 nm, which is 60 nm longer than that for protonated Schiff base of 11-*cis*-retinal. The discrepancy, i.e. opsin shift, arises from the chromophore-protein interactions. The interactions also affect the ^{13}C NMR chemical shifts. One of the causes of the chemical shift differences would be a torsion of C12-C13 single bond. We carried out the *ab initio* chemical shift calculations in order to appreciate the effects of the bond rotation on the chemical shift variation. The calculation predicts that the chemical shifts of C9 to C14 of 11-*cis*-retinal vary about 5 ppm depending on the dihedral angle of C11-C12-C13-C14. From these results, it is supposed that there is a mixture of skewed 12*s*-*cis* and 12*s*-*trans* conformations in solution. If it is considered that 11-*cis*-retinalPSB in solution is a mixture of 12*s*-*cis* and 12*s*-*trans*, the tendency for chemical shifts of rhodopsin is explained by the torsion of C12-C13 bond.

【緒言】視物質ロドプシンは11-*cis*-レチナールを内包しており、それはリシン残基とプロトン化シッフ塩基（PSB）結合を形成している。ロドプシンの吸収波長は約500nmであり、遊離のレチナールPSBに比べて60nmの長波長シフトを示す。これはオプシンシフトといわれ、タンパク質と発色団の相互作用によるものと考えられている。

このような相互作用の影響は^{13}C NMRの化学シフトにも現れ、ロドプシン中のレチナールの化学シフトは遊離のレチナールPSBに比べて低磁場側にシフトすることが知られている[1]。このような化学シフト変化をもたらす原因の一つとして、C12-C13結合のねじれによる電子状態の変化が考えられる。我々は*ab initio*化学シフト計算により、C12-C13結合の回転が11-*cis*-レチナールの^{13}C NMRの化学シフトにおよぼす影響について調べ、ロドプシン中でのレチナールの構造についての考察を試みた。

【計算】11-*cis*-レチナールの二面角C11-C12-C13-C14(φ)を0°(12*s*-*cis*)~180°(12*s*-*trans*)の間で30°毎に固定し、他の部分はすべてプログラムGaussian 92をもちいて構造最適化した。プログラムRPAC 9.0をもちいて、LORG (Localized Orbital / Local Origin)法による化学シフト計算を行った。基底関数は4-31Gをもちいた。

【結果】Figure 1に各φに対するC11~C14の等方平均化学シフト(σ_{iso})の計算値を示す。各々の炭素について、C12-C13の回転に伴って5ppm前後の変化を示すことが予想される。この結果を、同じ方法で求められた*all-trans*-レチナールについての計算値[2]との差で表し、溶液NMRの実験値と比較した(Figure 2)。エネルギー的に極小値をとるφ=45°のものとφ=180°のものはC9からC13にわたって実験値を良く再現していることがわかる。C14では実験値は両者の中間に位置することから、溶液中ではねじれ型12*s*-*cis*と12*s*-*trans*の混合物になっていると予想される。C5~C8では計算値と実験値との間に2~3ppmの違いが見られるが、これらの炭素のσ_{iso}はC6-C7結合の回転によって大きく変化することが知られており、溶液中でのコンフォメーション変化によるものと考えられる。

レチナールPSBにおいてもレチナールと同様の傾向があらわれると考えられる。11-*cis*-レチナールPSBと*all-trans*-レチナールPSBの溶液NMRの化学シフトの差と、ロドプシンと固体の*all-trans*-レチナールPSBとの差を比較すると、ロドプシンでは11-*cis*-レチナールPSBにくらべてC9で高磁場シフト、C11, C12, C13で低磁場シフトが見られ、C14 では比較的一致している。溶液中の11-*cis*-レチナールPSBもね

じれ型12*s-cis*と12*s-trans*の混合物になっていると考えれば、この化学シフト変化の傾向はC12-C13結合のねじれによって説明することができる。すなわち、Figure 2に示すようにφ=150°のものではC12では溶液のデータに比べて低磁場側にあり、C14ではほぼ一致している。ただし奇数番目の炭素については >C=N$^+$< 基周辺のプロトンや対イオンの状態による変化が大きいと考えられるため、これだけでは説明できていない。

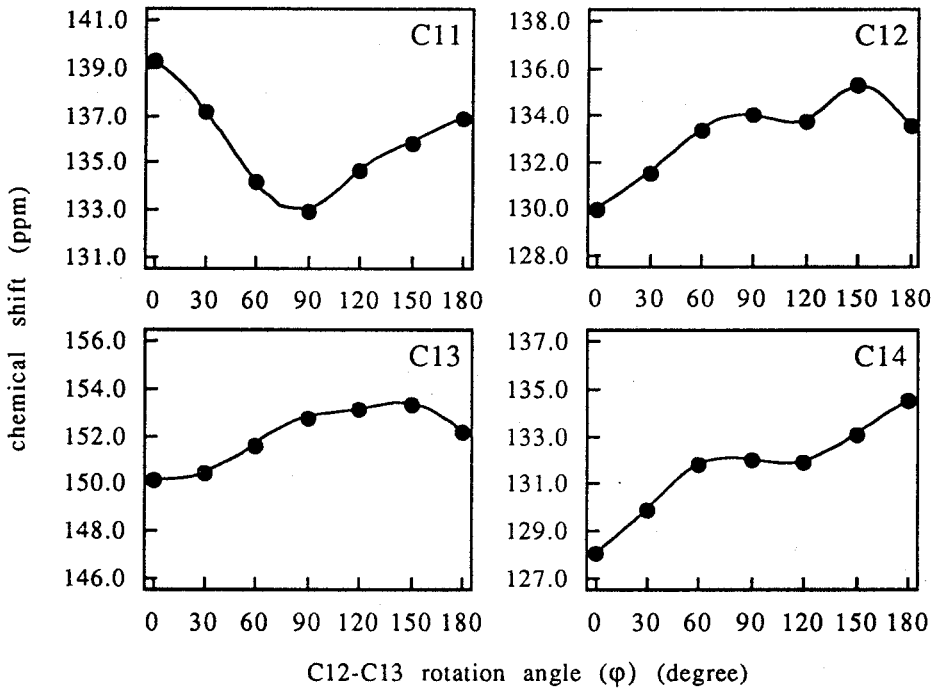


Figure 1. Calculated chemical shift of C11, C12, C13 and C14 of 11-*cis*-retinal shown in ppm from TMS. Showing a dependence on the dihedral angle C11-C12-C13-C14 (φ).

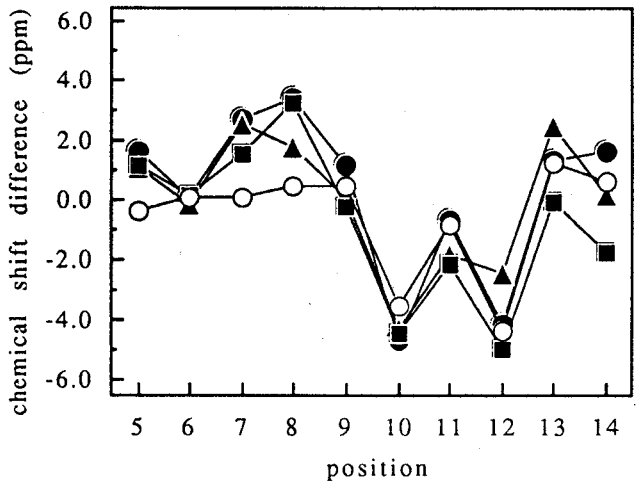


Figure 2. Chemical shift differences of 11-*cis*-retinal from *all-trans*-retinal; experimental value[3] (open circles) and calculated values (filled squares for φ=45, filled triangles for φ=150 and filled circles for φ=180).

1) S.O.Smith *et.al.*: *Biochemistry*, 29(1990)8158
2) M.Wada *et.al.*: *J.Am.Chem.Soc.*, 116(1994)1537
3) J.W.Shriver *et.al.*: *Biochemistry*, 18(1979)4785

P6

McWeeny 理論によるポルフィリンの環電流効果の見積もり

帝京大・薬　○戸原　明、佐藤　三男

Evaluation of the ring current effect of porphyrins by McWeeny's theory

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University
Akira Tohara, Mitsuo Sato

A model based on the entirely quantum-mechanical theory of McWeeny and the extended treatment by Haigh and Mallion is proposed to calculate magnetic deshielding constant Δδ in porphyrin. The parametrization of the model is carried to give precise agreement with the known ring current shifts of internal pyrrole protons, pyrrole β protons and *meso* protons of porphine. The model is generally applicable over a wide range of distance to the porphyrin ring. The validity of the model is verified with some TPP type porphyrins.

【はじめに】NMR スペクトルは、ヘム蛋白質やモデル化合物としての超構造ポルフィリンの構造研究にとって極めて強力な手段である。 その際、スペクトルに現れる、ポルフィリンの環電流が引き起こす遮蔽（脱遮蔽）効果を見積もる事によって、非常に詳細な構造情報が得られる事がある。ポルフィリンの環電流に起因する誘起磁場を記述する従来の計算モデルとしては、主に以下の二つが良く知られている。①ポルフィリン環をいくつかのループに分割し、各ループの中央に適当な大きさの磁気双極子をポルフィリン面に対し垂直に置く。これらの双極子がつくる双極磁場（の和）をもって誘起磁場とする。②ポルフィリン環にいくつかの円電流をあてはめ、ビオ－サバールの法則に従ってそれらの円電流が作り出す磁場（の和）をもって誘起磁場とする。 しかし、これらのモデルはポルフィリン環にかなり接近した領域では必ずしも満足のゆくものではない。一方、McWeeny によって量子化学的に導かれた理論（Haigh and Mallion によって拡張された）は、ベンゼンや多くの芳香族炭化水素のプロトンの化学シフトを正確に再現する事に成功している。 我々は、ポルフィリン環に非常に近い領域も含めた広い領域にわたって誘起磁場を記述する事が可能な計算モデルをめざして、McWeeny（及び Haigh and Mallion）の理論をポルフィリンに適用する事を試みたので報告する。

【McWeeny 理論の概略】基本的には、ヒュッケルの分子軌道法に依っている。基底としては通常の原子軌道関数 $p_z(\phi_z^0)$ のかわりに外部磁場と test dipole の作る磁場のベクトルポテンシャルをふくむゲージファクターのかかった関数 $\phi_z = \phi_z^0 \cdot exp\left(-\frac{ie}{\hbar c} A_z \cdot r\right)$ をもちいる。二次摂動の計算で磁場に依るエネルギーを求め、その中で test dipole が現れる項から誘起磁場を導きだす。結局、空間の任意の点 r における deshielding constant Δδ として次のような式が得られる。

$$\Delta\delta(r) = \text{constant} \times \sum_i J_i\left[K_i(r)\right] \cdots\cdots (1)$$

ここで i は loop を意味し、J_i は loop i をながれる電流、$K_i(r)$ は loop i からの相対的位置だけ

ポルフィリン、NMR、環電流効果

とはら あきら、 さとう みつお

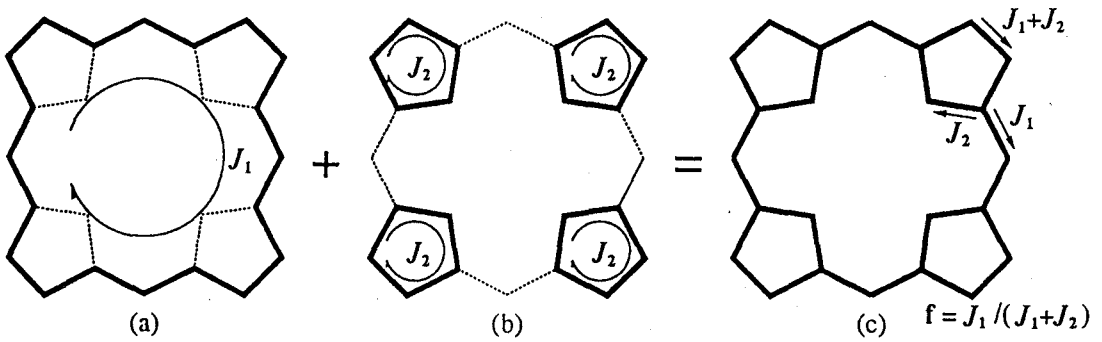


Fig. 1

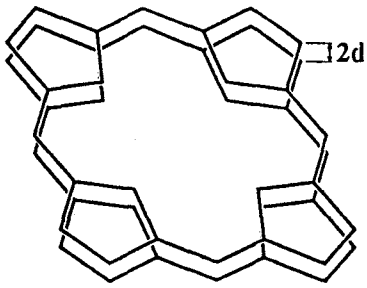


Fig. 2

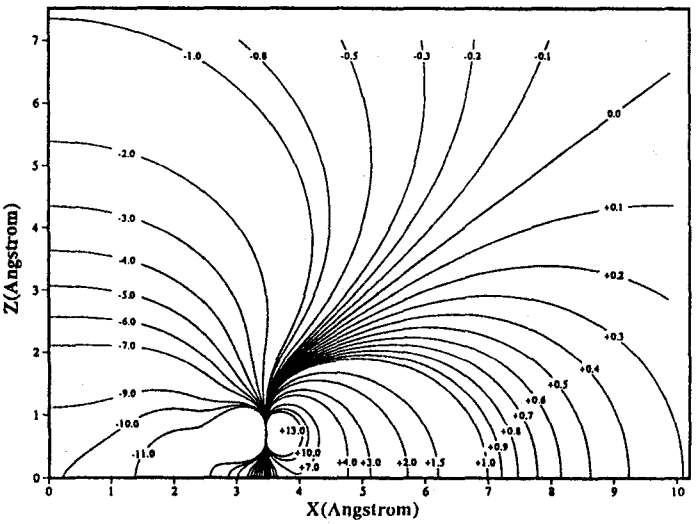


Fig. 3 Iso-deshielding lines for $\varphi = 0$. $\Delta\delta$ values are in ppm.

で決まる幾何学的因子である。

【porphyrin への適用】(1)式をポルフィリンに適用するにあたって、更に以下のような仮定をした。①ポルフィリン骨格に流れる電流を、Fig.1 の (a), (b) に示すように、大きな loop（電流は J_1）と四つのピロール環にそった loop（電流は J_2）に分割する。②電流ネットワークは実際の分子面に対して上下に間隔 2d だけ離れておかれる（Fig.2）。これらの前提のもとに、三つの既知の環電流シフト値（ピロール内部プロトン：-10.5ppm、ピロールβプロトン：+4.4ppm、メソプロトン：+5.2ppm）を再現するように J_1, J_2（constant も含めて）と d をパラメトリゼーションした。その結果、i) $f = J_1/(J_1+J_2) = +0.784$ となり、J_2 は J_1 と同符号である。よってピロール環を流れる電流は一方向である事を示しており極めて興味深い。ii)d=0.70 オングストロームとなった。Bovey がベンゼンの環電流効果を見積もった際に用いた 0.64 オングストロームに非常に近い値であり極めて興味深い。

Fig.3 に、ポルフィリン環の中心とメソ炭素を通りポルフィリン面に垂直な面内での等脱遮蔽線を図示した。現在、幾つかの TPP タイプのポルフィリンについて当モデルの検証を行っている。遮蔽領域と脱遮蔽領域の両方にわたって $\Delta\delta$ 値が良く再現されている。

P7

^{27}Al NMRによる水－DMF混合溶媒中でのAl(III)イオンの溶媒和

(北見工大)　○ 三浦 宏一、松田 弘喜、佐々木 健一、馬場 雄久、福井 洋之

^{27}Al NMR Study on Al(III) Ion Solvation in a Water–DMF Mixed-Solvent System

K. Miura, H. Matsuda, K. Sasaki, T. Baba and H. Fukui
(Kitami Institute of Technology)

^{27}Al NMR spectra were used to investigate the solvation of Al^{3+} in water–N,N-dimethylformamide (DMF) solvent mixtures. The ^{27}Al spectrum is in the slow-exchange limit at room temperature, which permits us to observe several peaks corresponding to different solvated $[Al(H_2O)_{6-x}(DMF)_x]^{3+}$ ($x = 0 - 6$) ions. The successive equilibrium constants for Al ion solvation in water and DMF mixtures have been evaluated by analyzing the ^{27}Al peak areas of spectra measured for various molar ratios of two solvents. The overall equilibrium constant $K^{1/6}$ indicates preferential solvation of Al^{3+} by water over DMF.

【緒論】

金属イオンを含む電解質溶液中でのイオンの溶媒和に関して、NMR分光法を適用した研究は古くから非常に多く行われている。1960年代後半からの20数年間は主として^{1}H、^{17}O、^{13}C NMRを用いて、電解質溶液中での溶媒分子の測定が多く行われ、その化学シフトや緩和時間の測定などから、金属イオンに対する溶媒和分子数の決定、配位した溶媒分子の運動、混合溶媒中における競合的溶媒和に関する知見などが数多く報告された。また、最近10数年間は、高磁場での測定を含めた装置の発達により、溶媒和しているイオンを直接観測する多核NMR測定が多く行われ、溶媒和殻構造や、金属イオンとアニオンのイオンペアに溶媒が配位した錯体種などについて詳細な情報が得られるようになっている。

多核測定の中でも、^{27}Al NMRはAl核のNMR感度が高いことや、Al^{3+}が比較的小さなイオン半径と高電荷を有することにより溶液中で配位子と強い結合をつくることを利用して 多種の研究が行われている。[1] このAlイオンと配位子間の強い結合による配位子交換速度の遅さが、溶液中に存在する複数のAl^{3+}錯体種を反映する化学シフ

キーワード　：　Alイオン、溶媒和、水、DMF

○ みうら こういち、まつだ ひろき、ささき けんいち、ばば たけひさ、ふくい ひろゆき

トの異なるピークとして観測される場合がある。我々は、この現象を混合溶媒中での Al(Ⅲ) イオンの競合的溶媒和現象の研究に適用した。溶媒としては水と N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) の混合溶媒を用いた。

【実験】

試料は水と DMF の割合を変えた混合溶媒に、Al 塩として $Al(ClO_4)_3 \cdot 6H_2O$ を Al と溶媒のモル比が 1:100 になるように溶解した溶液を調整した。

^{27}Al NMR スペクトルは、JEOL FX-200(^{27}Al 52.05 MHz) を用いて、室温 (22°C) で測定した。化学シフトは外部標準として用いた 0.1 M $Al(ClO_4)_3$ 水溶液の Al ピークを 0 ppm とした。

【結果と考察】

混合溶媒のモル比を変えて測定した^{27}Al NMR スペクトルを Fig. 1(a) に示す。配位子の交換速度が遅いため各溶媒和状態に応じた複数の Al ピークが存在している。全スペクトルを通して見ると、7 種類の Al ピークが確認できる。Al^{3+}に対する溶媒和数は 6 であることはよく知られていることから、これらの 7 種類のピークは $[Al(H_2O)_{6-x}(DMF)_x]^{3+}$ $(x = 0-6)$ の Al で、低磁場側から順に x が 0 から 6 に対応していると考えられる。

各ピークの分離があまり良くないので、測定スペクトルが再現されるように下記の条件でシミュレーションを行った。(1) $[Al(H_2O)_{6-x}(DMF)_x]^{3+}(x = 0-6)$ の 7 種類の溶

Table 1. Successive Equilibrium Constants for Al^{3+}–Water–DMF Systems.

mole ratio Al:H_2O:DMF	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5	K_6	$K^{1/6}$[a]
1:90:10	7.65	3.09	1.05				
1:80:20	6.80	3.15	1.18				
1:70:30	5.71	2.50	0.947	1.11			
1:60:40	9.80	1.98	0.572	0.988			
1:50:50		1.90	0.523	0.930	0.254		
1:40:60		1.25	0.528	0.660	0.275		
1:30:70		1.23	0.433	0.589	0.189	0.0290	
1:20:80		1.03	0.391	0.586	0.120	0.0529	
1:12:88			0.598	0.492	0.153	0.0507	
1:06:94				0.570	0.146	0.0496	
av. K_i	7.49	2.02	0.691	0.740	0.190	0.0455	0.637
statistical K_i[b]	3.82	1.59	0.849	0.478	0.255	0.106	

[a] $K^{1/6} = (\prod K_i)^{1/6}$. [b] Calculated by using eq. 4.

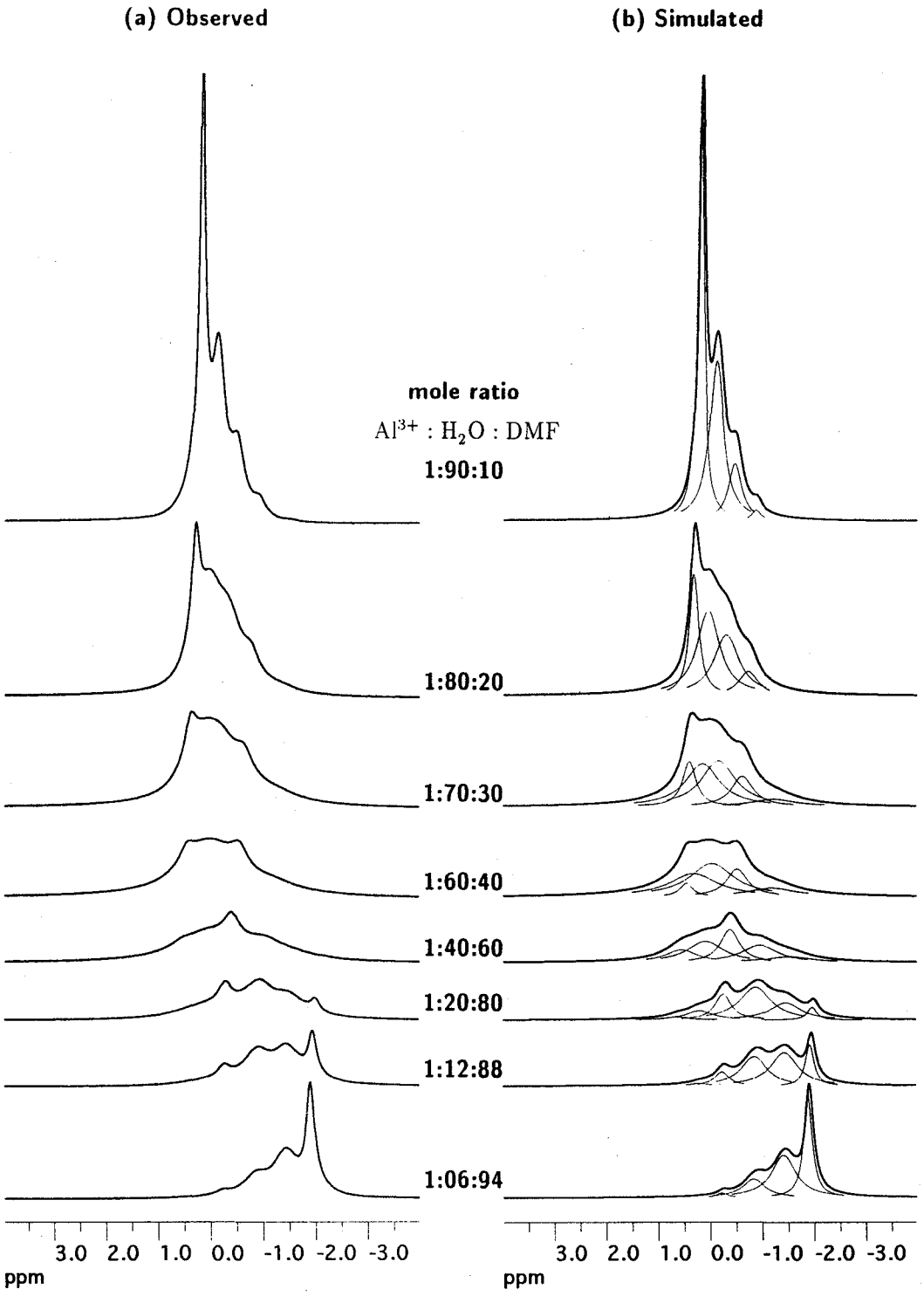


Figure 1. ^{27}Al NMR spectra for $Al(ClO_4)_3$ in water-DMF binary solvent mixtures with various mole ratios. (a) Observed spectra, (b) Simulated spectra.

媒和 Al イオンはそれぞれ化学シフトの異なる 1 つのローレンツ型のピークを生じる。6 配位した溶媒和 Al イオンのうち、$[Al(H_2O)_2(DMF)_4]^{3+}$ と $[Al(H_2O)_4(DMF)_2]^{3+}$ にはそれぞれ *cis-* と *trans-*、また $[Al(H_2O)_3(DMF)_3]^{3+}$ には *mer-* と *fac-*の構造異性体が存在している可能性が考えられるが、簡単化のためこれらの区別はつけない。 (2) 個々の溶媒和 Al^{3+} のピークは、溶媒効果から、溶媒の組成により僅かにシフトする。 これらのことを考慮に入れてシミュレーションを行った結果を Fig. 1(b) に示したが、測定スペクトルをよく再現することができた。

シミュレーションから得られた各溶媒和 Al イオンのピークから次のように溶媒和平衡を仮定した。

$$[Al(H_2O)_{n-i+1}(DMF)_{i-1}]^{3+} + DMF \overset{K_i}{\rightleftharpoons} [Al(H_2O)_{n-i}(DMF)_i]^{3+} + H_2O \qquad (1)$$
$$(n = 6 \quad , \quad i = 1-6)$$

(1) 式において配位数 n を 6 とし、$i = 1-6$ の各段階について加え合わせると

$$[Al(H_2O)_6]^{3+} + 6DMF \overset{K}{\rightleftharpoons} [Al(DMF)_6]^{3+} + 6H_2O \qquad (n = 6 \quad , \quad i = 1-6) \qquad (2)$$
$$K = K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6 \qquad (3)$$

となる。得られた各ピーク面積から求めた逐次平衡定数 $K_i (i = 1-6)$ と、各 K_i の平均値から算出した $K^{1/6}$ を Table 1 に示す。$K^{1/6} < 1$ であることから、水－ DMF 混合溶媒系では水分子の方が DMF 分子よりも優先的に Al^{3+} に配位することがわかる。

Covington 等[2] は、イオンの競合的溶媒和に関する上記の逐次溶媒和平衡モデルを、混合溶媒中で測定したイオンの化学シフトの解析に適用している。彼らの用いた statistical な取扱いに基づくと、K_i は次式で表される。

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} K^{1/6} = \frac{7-i}{i} K^{1/6} \qquad (4)$$

(4) 式を用いて計算した K_i を Table 1 の最下段に記す。これを面積測定から得られた K_i と比較すると、約$\frac{1}{2}$から 2 倍程度の違いを生じている。

さらに、シミュレーションから得られた $[Al(H_2O)_{6-x}(DMF)_x]^{3+} (x = 0-6)$ のピーク線幅 $\nu_{1/2}$ を比較すると、$[x = 0], [x = 6] < [x = 3] < [x = 2], [x = 4], [x = 5] < [x = 1]$ の傾向が明確に現れた。また、混合溶媒の割合により各 $[Al(H_2O)_{6-x}(DMF)_x]^{3+}$ ピークの $\nu_{1/2}$ も変化したが、これらについての考察も討論会で報告する。

【参考文献】

1. J. W. Akitt, *Progr. NMR. Spectrosc.*, 1989, **21**, 1.
2. A. K. Covington, T. H. Lilley, K. E. Newman and G. A. Porthouse, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1973, **69**, 963.

P8

変型マジックエコーシーケンスによる交差分極

住友化学　筑波研　三浦等、　筑波大　物理工学　松井茂

Cross polarization with a modified magic echo sequence

H. Miura and S. Matsui
Tsukuba Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co. Ltd., Tsukuba, Ibaraki 300-32
and
Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305

We report that a modified magic echo (MME) sequence can be used for ^{1}H spin locking in the ^{1}H-^{13}C cross polarization (CP) experiment. The amplitude of the effective spin-locking field has been evaluated indirectly by measuring the ^{13}C radio-frequency nutation fields corresponding to the Hartmann-Hahn condition and found to be made as weak as 0.01 G under certain conditions. Since the MME sequence can achieve quenching of the ^{1}H-^{1}H dipolar interaction and simultaneously modulation of the ^{1}H-^{13}C dipolar interaction by the virtually inserted 180° pulses, the dynamics of MME CP becomes analogous to that of usual CP under high-speed magic angle sample spinning.

Introduction

The magic echo (or magic sandwich echo) sequence was originally demonstrated in the famous NMR time reversal experiment in dipolar-coupled spin system [1]. The magic echo (ME) sequence can refocus the homogeneous free-decay signal which was regarded as being an irreversible decay. The echo formation is based on the sign change of the dominant homonuclear dipolar Hamiltonian between in the rotating frame and in the tilted rotating frame. Subsequently, Takegoshi and McDowell [2] simplified the originally complicated ME sequence to use it for high-resolution NMR spectrocopy of abundant spins in solids. This simplification was essential for practical applications [3].

Recently, it is further employed for NMR imaging of solids [4-12]. To obtain higher resolution, an additional modification for improving the ME refocussing effect has been made [4-7]: The modification was to invert the phase of the $90°_{-y}$ pulse for sandwiching (Fig. 1). The phase inversion results in incorporating the useful properties of the Meiboom-Gill (MG) pulse sequence [13] into the ME sequence, because $90°_{-y} + 180°_{y} = 90°_{y}$. While the simple modification of phase inversion has greatly improved the ME refocussing effect and thus permitted highly efficient line narrowing, it has given rise to a zero-frequency artifact in solid images [6]. The artifact was considered to result from the spin locking effect of the modified magic echo (MME) sequence. A compensated MME sequence was devised to eliminate the artifact by effectively cancelling the locking field [6]. However, details of the spin locking effect still remain to be elucidated.

To obtain deeper insight into the MME spin locking mechanism, we have conducted static ^{1}H-^{13}C cross polarization (CP) experiments [14,15] using the MME sequence for locking ^{1}H spins. This paper reports the results of the static MME CP experiments. It has been found that MME CP does occur and the effective spin-locking field is very weak. The amplitude of the weak locking field has been evaluated through the MME CP experiments. Furthermore, a close resemblance has been disclosed between the static MME CP and the usual CP under high-speed magic angle sample spinning (MAS) [16-18].

Experimental

All the experiments were carried out on a Chemagnetics CMX 300 spectrometer with a standard CP/MAS probe, operating at 300 MHz for protons. The pulse sequence for the ^{1}H-^{13}C

キイワード：　交差分極、　マジックエコー、　スピンロッキング

みうら　ひとし、　まつい　しげる

MME CP experiments is shown in Fig. 1. The radio-frequency (rf) field for ^1H was fixed at 13.9 G except the $90°_y$ pulses used for sandwiching. The overall CP contact time was fixed at 6 ms.

The evaluation of the effective spin-locking field was made indirectly by measuring the ^{13}C rf field amplitude which maximizes the ^{13}C CP signal. The calibration of the ^{13}C rf field amplitude was done by making use of the fact that if a 90° phase-shifted rf pulse is added immediately after the ^{13}C rf pulse applied for CP, then the ^{13}C signal is zero when the flip angle of the added rf pulse is exactly 90°, 270°, 450°, and so on. An adamantane powder was used as the test sample because of its reduced dipolar interactions compared to rigid solids, which was convenient for our experiments with a limited rf field amplitude. The sample length was about 1/3 of the rf coil length to reduce the rf field inhomogeneity.

Results and discussion

A previous study [6] showed that the MME spin-locking field is provided by the small flip-angle deviation of the sandwiching $90°_y$ pulses, δ (Fig.1). Therefore, to change the effective locking field, H_{1eff}, the nominal amplitude 13.9 G of the $90°_y$ pulses was first varied from 75 to 125 % with the time interval for pulse spacing, τ, fixed. In searching for ^{13}C rf amplitudes which maximize the ^{13}C CP signal corresponding to the Hartmann-Hahn (H-H) condition [14-15], we have found that for each flip-angle deviation, δ, there exist two distinct ^{13}C rf amplitudes which can be regarded as satisfying the H-H condition. Furthermore, the ^{13}C signals observed at the two rf amplitudes were nearly the same in amplitude but mutually opposite in phase.

Figure 2b and c show the ^{13}C spectra of adamantane obtained by the MME CP. A spectrum recorded with the usual CP by the simple spin locking is also shown in Fig. 2a for comparison. Note that the phase of spectrum c is opposite compared to spectra a and b. The signal amplitudes are approximately the same, indicating that the CP efficiencies over the 6 ms contact time are identical. In the experiments of b and c, the flip-angle deviation δ was 10 % with the time interval, τ, set at 15 μs and the ^{13}C rf amplitudes corresponding to the H-H condition were 5.9 and 4.0 G, respectively.

Another variable parameter for changing the spin-locking field was the time interval for pulse spacing, τ. By setting the time interval τ at 15, 25, 40 μs, we have further measured the ^{13}C rf amplitudes corresponding to the H-H condition as a function of the flip-angle deviation, δ. The results are plotted in Fig. 3. It is seen that the ^{13}C rf amplitudes depend almost linearly on the flip-angle deviation. Also noted is that there is an offset for each plot and the offset depends on the time interval, τ. For all the measurements in Fig. 3, the overall CP efficiencies were essentially the same; however, the CP efficiency dropped sharply when the time interval τ was set longer than 50 μs, which is the ^1H transverse relaxation time of the adamantane sample.

These experimental results can be explained by drawing an analogy between MME CP and usual CP under high-speed MAS [16-18]. The CP dynamics under high-speed MAS has recently attracted renewed attention and has been analyzed theoretically in detail [17,18]. The theories show that under high-speed MAS, the usual H-H condition for the CP nutation frequencies, $\omega_{1S} = \omega_{1I}$, (S = ^{13}C, I = ^1H) is modified and separated into the so-called zero- and double-quantum conditions [17-19]:

$$\omega_{1S} = \omega_{1I} + n\omega_r,$$
$$\omega_{1S} = \omega_{1I} + n\omega_r, \qquad (1)$$

where $n = 0, \pm 1, \pm 2$ and ω_r is the MAS modulation frequency.

The modification represented by eq. (1) is due to the quenching of the I-I dipolar interaction and the modulation of the I-S dipolar interaction; both effects result from high-speed MAS. The same effects of the quenching and the modulation are attained in the MME sequence: The I-I homonuclear dipolar interaction is averaged out by the suitably repeated time-reversal sequence and simultaneously the I-S dipolar interaction is modulated by the virtually inserted 180° pulses. The

modulation frequency, ω_π, can be given by the inverse of the cycle time, $t_c = 12\tau$ (Fig.1). Therefore, as far as $\delta << 1$, the H-H conditions in the static MME CP experiments are expected to be given by

$$\omega_{1S} = \omega_{1I} + n\omega_\pi ,$$
$$- \omega_{1S} = \omega_{1I} + n\omega_\pi . \qquad (2)$$

The zero-quantum CP corresponds to the usual flip-flop process and the double-quantum CP to the flip-flip process. The latter CP produces a negative S polarization relative to that induced by the former CP and is unobservable in the usual CP experiments under high-speed MAS because $\omega_{1I} + \omega_{1S} >> \omega_r$ (eq. (1)) [17-19]. An only exceptional experiment has been reported by Meier, who observed the double-quantum CP under high-speed MAS [20]. By contrast, in the MME CP experiments, the rf nutation frequencies can be made small to meet the double-quantum condition, $\omega_{1I} + \omega_{1S} = \omega_\pi$. Thus, the two types of CP can readily be observed in the static MME CP experiments.

The two distinct H-H conditions found for a given spin-locking field can therefore be regarded as being the zero-and double-quantum H-H conditions, as signified by the 180° phase difference between the ^{13}C spectra (Fig. 2). The ^{13}C spectrum.with the same phase as that obtained by the usual CP (Fig. 2b) corresponds to the zero-quantum CP and the ^{13}C spectrum with the opposite phase to the double-quantum CP (Fig. 2c). Further, the modulation frequency, ω_π, corresponds to the offset frequencies in the three plots shown in Fig.3. Namely, for $\tau = 15, 25, 40$ μs, the observed offset frequencies are about 5.3, 3.4, 2.2 kHz, in good agreement with the values, 5.6, 3.3, 2.1 kHz, obtained from the inverse of the cycle times, $t_c = 180, 300, 480$ μs.

The amplitude of the small spin-locking field can be evaluated from the slopes of the plots in Fig. 3. The effective locking fields, H_{1eff}, obtained by least-squares fitting to the plots are given by the slopes, $\gamma_H H_{1eff}/\gamma_C\delta = 6.7, 3.9, 2.7$ G for $\tau = 15, 25, 40$ μs. Since the effective locking-field amplitude depends on the time interval τ of the MME sequence as well as the deviation δ of the $90°_y$ pulses for sandwiching, it can be apporoximated as

$$H_{1eff} \approx H_1 \, \delta \, t_w/2\tau, \qquad (3)$$

where γ_H and γ_C are the ^1H and ^{13}C gyromagnetic ratios. $H_1 = 13.9$ G and $t_w = 4.23$ μs, being the amplitude and the width of the sandwiching 90° pulse. Equation (3) coincides with the expression for the averaged field amplitude deduced from the pulsed spin-locking experiment [21] if the time interval 4τ for the on-resonance rf irradiation is counted as a half time interval 2τ without the on-resonance rf irradiation. It turns out that the effective locking field can be made as weak as 0.01 G ($\tau = 40$ μs and $\delta \approx 0$, Fig. 3) in MME CP.

References

[1] W. K-. Rhim, A. Pines and J. S. Waugh, Phys. Rev. B 3 (1971) 684.
[2] K. Takegoshi and C. A. McDowell, Chem. Phys. Letters 116 (1985) 100.
[3] M. L. Buszko, C. E. Bronnimann and G. E. Maciel, J. Magn. Reson. A 103 (1993) 183.
[4] S. Matsui, Chem. Phys. Letters 179 (1991) 187.
[5] S. Matsui, J. Magn. Reson. 95 (1991) 149.
[6] S. Matsui, J. Magn. Reson. 98 (1992) 618.
[7] S. Matsui, Y. Ogasawara and T. Inouye, J. Magn. Reson. A 105 (1993) 215.
[8] S. Hafner, D. E. Demco and R. Kimmich, Meas. Sci. Technol. 2 (1991) 882.
[9] D. E. Demco, S. Hafner and R. Kimmich, J. Magn. Reson. 96 (1992) 307.
[10] M. L. Buszko and G. E. Maciel, J. Magn. Reson. A 104 (1993) 172.
[11] F. Weigand, B. Bluemich and H. W. Spiess, Solid State NMR 3 (1994) 59.
[12] M. A. Hepp and J. B. Miller, J. Magn. Reson. A 111 (1994) 62.
[13] S. Meiboom and D. Gill, Rev. Sci. Instrum. 29 (1958) 688.
[14] S. R. Hartmann and E. L. Hahn, Phys. Rev. 128 (1962) 2042.
[15] A. Pines, M. S. Gibby and J. S. Waugh, J. Chem. Phys. 59 (1973) 569.
[16] E. O. Stejskal, J. Schaefer and J. S. Waugh, J. Magn. Reson. 28 (1977) 105.
[17] S. Ding, C. A. McDowell and C. Ye, J. Magn. Reson. A 109 (1994) 1.
[18] S. Ding, C. A. McDowell and C. Ye, J. Magn. Reson. A 109 (1994) 6.
[19] M. H. Levitt, J. Chem. Phys. 94 (1991) 30.
[20] B . H. Meier, Chem. Phys. Letters 188 (1992) 201.
[21] W. K-. Rhim, D. P. Burum and D. D. Elleman, Phys. Lett. A 62 (1977) 507.

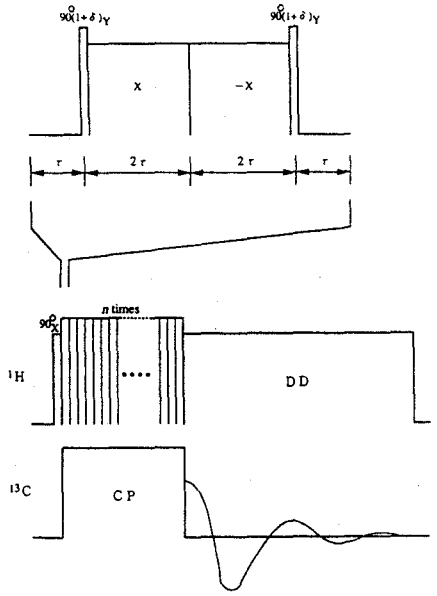


Fig. 1. Pulse sequence for ^{1}H-^{13}C cross polarization using the modified magic echo sequence. The modified magic echo sequence can work as a ^{1}H spin-locking sequence during which the ^{1}H-^{1}H dipolar interaction is effectively quenched and simultaneously the ^{1}H-^{13}C dipolar interaction is modulated by the virtually inserted 180° pulses. The 180° pulse insertion is made by reversing the phase of the latter sandwiching 90° pulse. The spin locking field is provided by the flip-angle deviation, δ, of the sandwiching 90° pulses.

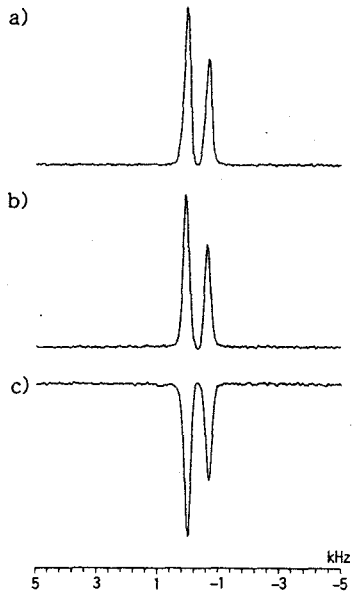


Fig. 2. ^{13}C spectra of adamantane obtained by cross polarization with (a) the usual spin locking, (b) and (c) the new spin locking using the modified magic echo sequence shown in Fig. 1. All the signal amplitudes are nearly the same but the phase of spectrum (c) is opposite to those of spectra (a) and (b). This phase difference indicates that spectrum (b) results from zero-quantum cross polarization and spectrum (c) from double-quantum cross polarization. The time interval τ (Fig. 1) was set at 15 μs and the flip-angle deviation δ was 10 %. The ^{13}C radio-frequency fields were 5.9 and 4.0 G for spectra (b) and (c) with the ^{1}H radio-frequency field being 13.9 G. The contact time for cross polarization was fixed at 6 ms.

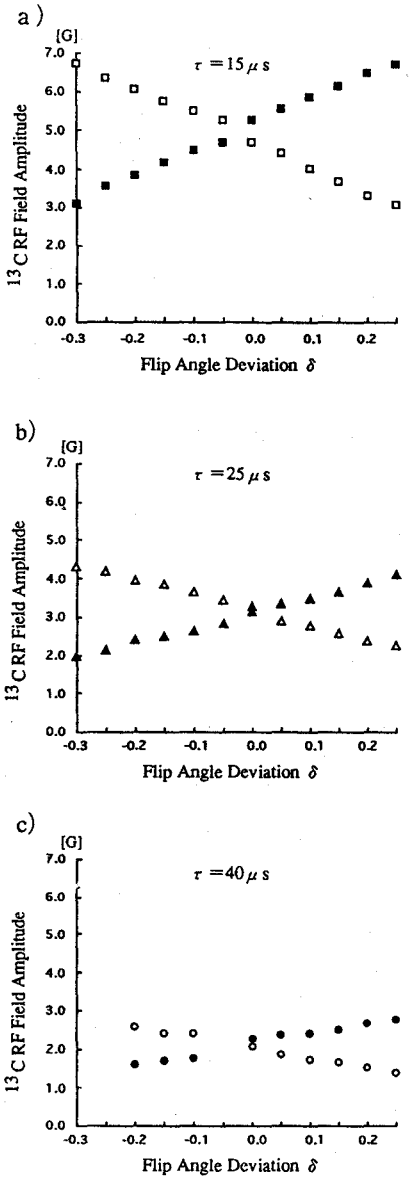


Fig. 3. Plots of ^{13}C radio-frequency field amplitudes which maximize the ^{13}C modified-magic-echo cross polarization signal corresponding to the Hartmann-Hahn condition. The plots are made against the small flip-angle deviation of the sandwiching 90° pulses, δ (Fig.1), which provides the small spin-locking field during the modified-magic-echo cross polarization. The time interval τ in the modified magic echo sequence was set at (a) 15 μs, (b) 25 μs and (c) 40 μs. Note that for each flip-angle deviation, δ, there exist two distinct ^{13}C radio-frequency field amplitudes which can be regarded as satisfying the Hartmann-Hahn condition. These two Hartmann-Hahn conditions correspond to zero- (filled squares, triangles, circles) and double-quantum (open squares, triangles, circles) cross polarization. Also noted is that the offset of each plot depends on the time interval τ. This reflects the fact that the ^{1}H-^{13}C dipolar interaction is modulated by the virtual 180° pulses inserted in the modified magic echo sequence, analogously to the modulation effect by magic angle sample spinning, resulting in the shift of the Hartmann-Hahn condition.

P9

Z方向のCross Polarization

(京大理) ○竹腰　清乃理、寺尾　武彦

Coss-Polarization along the Z axis

K. Takegoshi and Takehiko Terao
Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University,
Kyoto 606-01, Japan

Abstract

The conventional cross-polarization in solids occurs between transverse magnetizations of heteronuclear spins by the spin-locking rf fields along the X or Y axis. The cross-polarization along the Z axis can be achieved by WIM-24[1] and the rotor-synchronized 12-rotor sequence under magic angle spinning proposed by Geen et al.[2] In both methods, an isotropic coupling Hamiltonian for the heteronuclear interaction is realized by multiple pulse and the homonuclear dipolar coupling is vanished. This feature is pre-requisite for the heteronuclear correlation experiment, however, is not useful for other experiments. In this work, we have proposed a new cross-polarization scheme, which makes it possible to create the "enhanced" Z magnetization of a rare spin.

Theory

We consider a static heteronuclear two spin system $(I-S)$ under a rf irradiation. The I spin is abundant, and the S spin is dilute. The two spins interact with each other by a heteronuclear dipole interaction $\mathcal{H}_d = dI_Z S_Z$, where d is a dipole coupling constant. For simplicity, we shall neglect the chemical shift anisotropy interaction and the frequencies of the applied rf fields are "on-resonance" to the respective Larmor frequency of the I and S spins. The relevant Hamiltonian in a frame rotating at its respective Larmor frequency (the double rotating frame) may be given as

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_{rf} + \mathcal{H}_d \quad , \tag{1}$$

where $\mathcal{H}_{rf}$ represents the double rf irradiation along the X axis as

$$\mathcal{H}_{rf} = \omega_{1I} I_X + \omega_{1S} S_X \quad , \tag{2}$$

where ω_{1I} and ω_{1S} are rf-field strengths. The evolution of the spin system during the double rf irradiation is dictated by the propagator $U(t)$ written as

$$U(t) = U_0(t) U_1(t) \quad , \tag{3}$$

with

A key word: Cross polarization

たけごし　きよのり、てらお　たけひこ

$$U_0(t) = T\exp\{-i\int_0^t dt'\mathcal{H}_{rf}\} = \exp\{-i\mathcal{H}_{rf}t\} \ , \tag{4}$$

$$U_1(t) = T\exp\{-i\int_0^t dt'\widetilde{\mathcal{H}_d}(t')\} \ , \tag{5}$$

and

$$\widetilde{\mathcal{H}_d}(t) = U_0^{-1}(t)\mathcal{H}_d U_0(t) \quad . \tag{6}$$

This equation represents that the heteronuclear dipolar interaction is modulated by the rf irradiations, and becomes time dependent as follows:

$$\widetilde{\mathcal{H}_d}(t) = d\{I_Z\cos(\omega_{1I}t) + I_Y\sin(\omega_{1I}t)\}\{S_Z\cos(\omega_{1S}t) + S_Y\sin(\omega_{1S}t)\} \quad . \tag{7}$$

The Eq. (5) can be expressed by using the Magnus expansion as

$$U_1(\tau) = \exp\{-i(\mathcal{H}_d^{(0)} + \mathcal{H}_d^{(1)} + ...)\tau\} \ , \tag{8}$$

$$\mathcal{H}_d^{(0)} = \frac{1}{\tau}\int_0^\tau dt\widetilde{\mathcal{H}_d}(t) \ , \tag{9}$$

$$\mathcal{H}_d^{(1)} = \frac{-i}{2\tau}\int_0^\tau dt_1\int_0^{t_1} dt_2[\widetilde{\mathcal{H}_d}(t_1), \widetilde{\mathcal{H}_d}(t_2)] \ . \tag{10}$$

The zero-th order average Hamiltonian (Eq. (9)) for a pulse duration period t_W may be written as

$$\begin{aligned}\mathcal{H}_d^{(0)} &= \frac{d}{2t_W}[\{\frac{\sin(\Sigma t_W)}{\Sigma} + \frac{\sin(\Delta t_W)}{\Delta}\}I_Z S_Z \\ &+ \{\frac{1-\cos(\Sigma t_W)}{\Sigma} - \frac{1-\cos(\Delta t_W)}{\Delta}\}I_Z S_Y \\ &+ \{\frac{1-\cos(\Sigma t_W)}{\Sigma} + \frac{1-\cos(\Delta t_W)}{\Delta}\}I_Y S_Z \\ &- \{\frac{\sin(\Sigma t_W)}{\Sigma} - \frac{\sin(\Delta t_W)}{\Delta}\}I_Y S_Y] \ .\end{aligned} \tag{11}$$

where $\Sigma = \omega_{S1} + \omega_{I1}$ and $\Delta = \omega_{1I} - \omega_{1S}$. For the conventional cross-polarization (CP) experiment at the exact Hartman-Hahn condition $\Delta = 0$, we may choose a cycle time t_W to satisfy $\Sigma t_W = 2n\pi$ ($U_0(t_c) = U_0(t=0) = 1$), where n is an integer. Then, the $\mathcal{H}_d^{(0)}$ becomes

$$\mathcal{H}_d^{(0)} = \frac{d}{2}(I_Z S_Z + I_Y S_Y) \ . \tag{12}$$

Note that this commute with $\mathcal{H}_{rf}$ and the CP process is dictated by this $\mathcal{H}_d^{(0)}$ to achieve a quasi-stationaly spin-state, which is the eigen-state of the total Hamiltonian $\mathcal{H}_{rf} + \mathcal{H}_d^{(0)}$.

A dipolar interaction to realize the CP along the Z axis should have a flip-flop term $(I_X S_X + I_Y S_Y)$. The $I_X S_X$ can be realized when we shift the phase of the rf field of both spins from X to Y at $t = t_W$. The total zero-th order average Hamiltonian for $t = 0 \sim 2t_W$ becomes

$$\mathcal{H}_d^{(0)} = \frac{d}{2}(2I_Z S_Z + I_X S_X + I_Y S_Y) \ . \tag{13}$$

This Hamiltonian commutes with $I_Z + S_Z$, therefore, brings an quasi-equilibrium longitudinal magnetizations among the $I - S$ spin syetm. Note here that when one of the phases of the rf field of the I or S spin is inverted, namely Y to $-Y$, the resulting dipolar Hamiltonian is not the flip-flop term, nut the flop-flop(flip-flip) term. In this case, the transferred Z magnetization of the S spin appears along the $-Z$ axis.

Experimental

NMR measurements were carried out using a CMX300 FT NMR spectrometer, operating at 300.45MHz for ^{1}H, and 75.56MHz for ^{13}C. Pulse sequence for the CP along Z (the CPZ sequence) can generally be written as $\{(\theta)_{\phi_1} - (\theta)_{\phi_2} - (\theta)_{\phi_3} - (\theta)_{\phi_4} - \ldots\}_n$, where $(\theta)_{\phi_i}$ denotes that the θ degree pulse is applied to both spins with a phase ϕ_i. Several sequences can be envisaged, for example:

	ϕ_1	ϕ_2	ϕ_3	ϕ_4	ϕ_5	ϕ_6	ϕ_7	ϕ_8
Sequence-A	X	$-X$	Y	$-Y$	$-Y$	Y	$-X$	X
Sequence-B	X	Y	$-Y$	$-X$	$-Y$	$-X$	X	Y
Sequence-C	X	Y	Y	X	$-Y$	$-X$	$-X$	$-Y$

Results

Fig. 1 shows the t_W dependence of the intensity of the methylene carbon of adamantane, obtsined by using the CPZ sequence-A. As have discussed in the above, the CP efficiency is better at $\omega_1 t_W = n\pi$. Fig. 2 compares the ^{13}C spectra of adamantane obtained by using (a) the CPZ sequence-A with $\theta = \pi$ and by using (b) the conventional spin-lock sequence. In both methods, the contact time was 8ms. Fig. 3 shows the ^{13}C spectra of a single crystalline of ℓ-alanine obtained by (a) the CPZ sequence-B with $\theta = \pi$ and by using (b) the conventional spin-lock sequence.

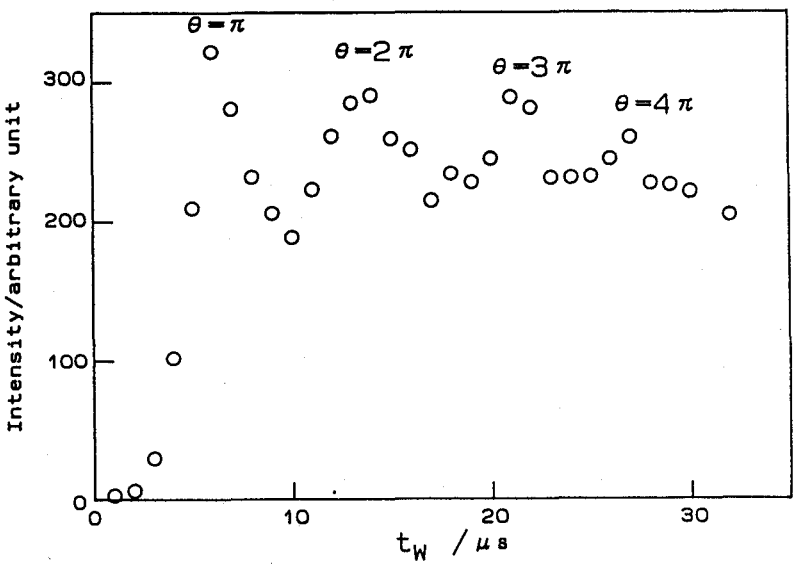


Figure 1:
The t_W dependence of the intensity of the methylene carbon of adamantane, obtsined by using the CPZ sequence-A.

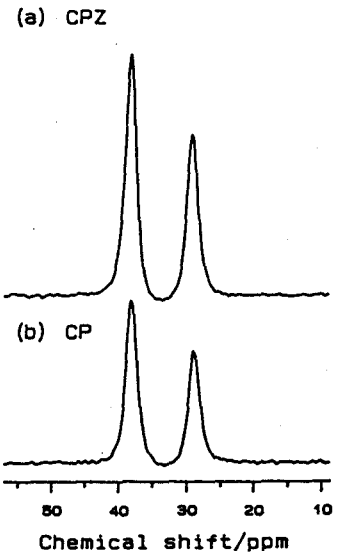


Figure 2: The ^{13}C spectra of adamantane obtained by using (a) the CPZ sequence-A with $\theta = \pi$ and by using (b) the conventional spin-lock sequence. In both methods, the contact time was 8ms.

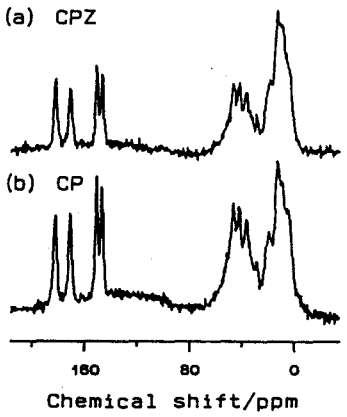


Figure 3: The ^{13}C spectra of a single crystalline of ℓ-alanine obtained by (a) the CPZ sequence-B with $\theta = \pi$ and by using (b) the conventional spin-lock sequence. The contact time was 560μs

Discussion

In the case of adamantane (Fig. 2), the enhancement factor (M/M_0) achieved by the conventional CP sequence was about 1.8, and does not reach to the theoretical value of 4. On the other hand, the enhancement realized by the CPZ sequence-A ($M/M_0 = 3.1$) is close to the theoretical one. For ℓ-alanine (Fig.3), the observed enhancement is CP $\geq$ CPZ (sequence-B) $\geq$ CP (sequence-A). This shows that a quick averaging of the ^{1}H-^{1}H homonuclear dipolar interactions during the irradiation phases of $\pm X$ and $\pm Y$ is necessary for the CPZ to work.

In the above, we have restricted ourselves to the matched Hartman-Hahn condition. The Eq.(11) shows that even at an unmatched condition [3], one can induce CP. Such experiments are in progress.

Reference

[1] P. Caravatti, L. Braunschweiler, and R.R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **100**, 305 (1983).

[2] H. Geen, J.J. Titman, and H.W. Spiess, *ibid.* **213**, 145 (1993).

[3] K. Takegoshi and C.A. McDowell, *J. Magn. Reson.* **67**, 356 (1986).

P10

^{13}C-^{13}C同種核間の選択的な磁化移動の測定法

京大理　○野村　薫、竹腰　清乃理、寺尾　武彦

Selective Homonuclear Coherence Transfer under Magic Angle Spinning

Kaoru Nomura, K.Takegoshi, and T.Terao

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University,

Kyoto 606-01, Japan

Abstract : A recent selective-recoupling method R2TR [1] (Rotational Resonance in the Tilted Rotating frame) for the homonuclear dipolar interaction under magic angle spinning (MAS) is applied to acheve selective homonuclear coherence transfer. The flip-flop and the flop-flop exchanges are demonstrated to occure between selected two carbons in triply ^{13}C enriched L-alanine.

Introduction

So far, many solid-state NMR methods for structural analysis in a powder sample have been proposed. Most of them are designed to obtain internuclear distances by measuring nuclear magnetic dipolar couplings. However, it is also desired to obtain parameters on orientations such as a dihedral angle. For this purpose, observation of 2D spectra in which two anisotropic interactions are correlated may be a powerful means. In a multiple-spin system, however, two-dimensionally broadened peaks overlap with each other. In oder to avoid such overlapping, a selective coherence transfer method is pre-requisite. Recently we developed a seletive recoupling method under MAS (R2TR). In this work, we applied this R2TR method to selective coherence transfer experiments in a homonuclear multiple-spin system.

MAS / dipolar interaction / solid state NMR

のむらかおる、たけごしきよのり、てらおたけひこ

Theory

We consider a dipolar-coupled homonuclear two-spin system under a rf irradiation and MAS. Neglecting the chemical shift anistoropies for simplicity, we have the total Hamiltonian in a doubly tilted rotating frame as

$$\mathcal{H}(t) = \mathcal{H}_{eff} + \mathcal{H}_D(t). \tag{1}$$

In this frame, the Zeeman interaction is expressed as

$$\mathcal{H}_{eff} = \omega_{eI} I_Z + \omega_{eS} S_Z, \tag{2}$$

where ω_{eX} is the strength of the effective field for the X spin, and Z indicates the direction of the effective field. By transforming the Hamiltonian to the interaction frame with respect to $\mathcal{H}_{eff}$, we can express the dipolar interaction as

$$\mathcal{H}_D^*(t) = U_{eff}\dagger \mathcal{H}_D(t) U_{eff}, \tag{3}$$

where $U_{eff}(t) = \exp(-i\omega_{eI} I_Z t)\exp(-i\omega_{eS} S_Z t)$. The spacial part of $\mathcal{H}_D^*(t)$ is modulated by MAS with the spinning frequency ω_R, while the spin part is modulated by the effective field with the frequencies of $\Sigma_{eff} = \omega_{eI} + \omega_{eS}$, $\Delta_{eff} = \omega_{eI} - \omega_{eS}$, ω_{eI}, and ω_{eS}. When one of the following R2TR conditions is satisfied, two time dependencies of $\mathcal{H}_D^*(t)$ are partially cancelled with each other, recovering a certain part of $\mathcal{H}_D^*(t)$;

$$\Sigma_{eff}, \Delta_{eff}, \omega_{eI}, or\ \omega_{es} = m\omega_R, \qquad m = \pm 1, \pm 2. \tag{4}$$

For example, when the condition $\Delta_{eff} = m\omega_R$ is satisfied, the flip-flop terms are recovered. Then the homonuclear zero-quantum transition provides an energy-conserving mechanism, and $< M_{IZ} + M_{SZ} >$ would be conserved. On the other hand, when the condition $\Sigma_{eff} = m\omega_R$ is satisfied, the flop-flop terms are recovered. Then the homonuclear double-quantum transition provides an energy-conserving mechanism, and $< M_{IZ} - M_{SZ} >$ would be conserved.

When none of the R2TR conditions are satisfied, the dipolar interaction is averaged to be 0 and the propagator may be given as

$$U(t) = \exp(-i\omega_{eI} I_Z t)\exp(-i\omega_{eS} S_Z t). \tag{5}$$

The I and S magnetizations oscillate with the resonance frequencies in their effective fields. On the other hand, if one of the R2TR conditions is satisfied, the dipolar interaction is recoupled and the propagator may be written as

$$U(t) = \exp(-i\omega_{eI}I_Z t)\exp(-i\omega_{eS}S_Z t)\exp(-i\overline{\mathcal{H}_D}^* t), \tag{6}$$

where $\overline{\mathcal{H}_D}^*$ is the average Hamiltonian of the dipolar interaction. In this case, the I and S magnetizations oscillate not only with their effective-field frequencies but also with the frequency of the recovering dipolar interaction $\mathcal{H}_D{}^*$.

Experimental

The NMR experiments were carried out on a Chemanetics CMX-300 spectrometer operating at a resonance frequency of 75.6kHz for ^{13}C, using a home built MAS probe. Triply ^{13}C enriched L-alanine was used as a sample. The experiments have been done by using the pulse sequence shown in Fig.1. We can observe the longitudinal magnetzations by setting $\phi = 90°$ or the transverse magnetizations by setting $\phi = 0°$.

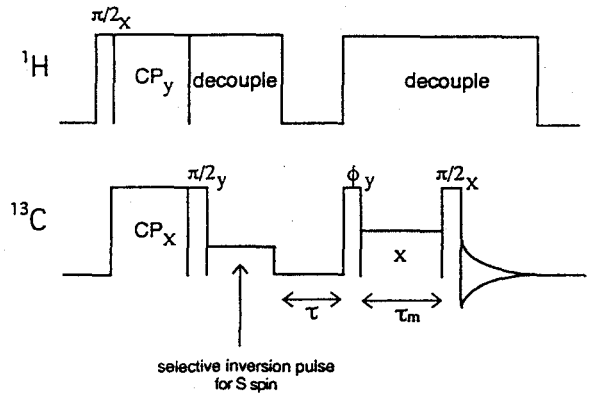


Fig.1 Pulse-sequence for the selective coherence transfer. τ is set longer than the transverse relaxation time of the S spin.
τ_m= mixing time

Results and Discussion

Fig.2 shows observed mixing time dependence of the normalized magnetizartions of the carboxyl (a), the methin (b), and the methyl (c) carbons. The left data indicate the selective coherence transfer from the carboxyl carbon to the methyl carbon which is caused under the condition $\Delta_{eff} = 2\omega_R$. In this case, we observed the longitudinal magnetizations. As expected, coherence transfer occurs between these magnetizations, and the flip-flop exchange is observed. In the right data, the dipolar interaction between the methin and the methyl carbons is recoupled under the condition $\Sigma_{eff} = \omega_R$; here

we observed the transverse magnetizations. We can see that coherence transfer takes place between these magnetizations by the flop-flop exchange process. Under either condition, the carbons irrelevant to the R2TR condition show no exchange behavior but only the precession around the effective field. Thus, we could confirm that the selective coherence transfer can be achieved by using the R2TR method.

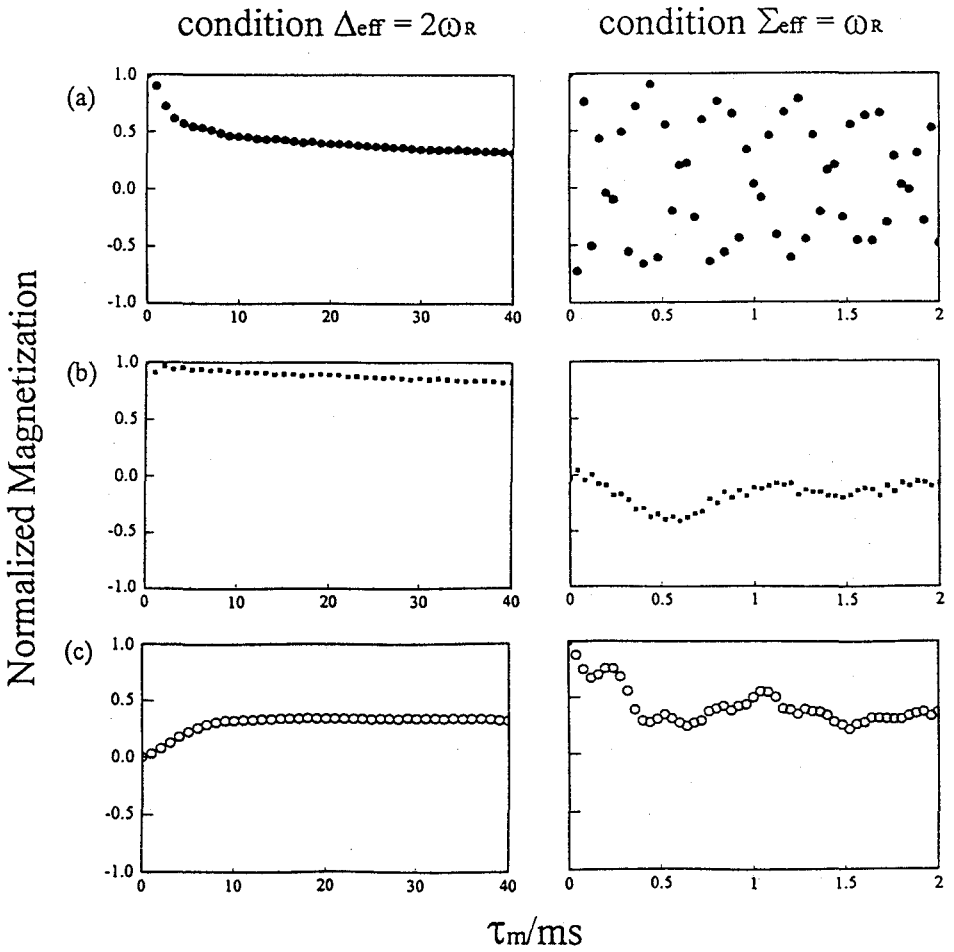


Fig.2 Mixing-time dipendence of the normalized magnetizations of the carboxyl (a), the methin (b), and the methyl (c)carbons under the condition $\Delta_{eff} = 2\omega_R$ (left) and the condition $\Sigma_{eff} = \omega_R$ (right).

Reference

1. K.Takegoshi, K.Nomura, and T.Terao, Chem. Phys. Lett. **232**,424 (1995).

P11

固体NMRによる^{13}C - ^{15}N核間距離の精密測定法と ^{1}H - ^{13}C双極子相互作用の新しい測定法の開発(II)

○石井佳誉（京大理）、 寺尾武彦（京大理）、林宗一（京大化研）、
内田健一（帝京大理工）、甲斐荘正恒（都立大理）

Measurements of dipolar spectra for ^{13}C-^{15}N using the MLEV8/8^{R} sequence and for ^{13}C-^{1}H using the combined use of the WIM-12/FSLG-2 sequence and MAS(II)

○Yoshitaka Ishii and Takehiko Terao (Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University), Souichi Hayashi (Institute of Chemical Research, Kyoto University), Kenichi Uchida (Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology , Teikyo University), Masatsune Kainosho(Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University)

Novel applications of our recent two solid-state NMR techniques are reported. Using the MLEV8/8^{R} sequence, the first determination of a J_{CN} coupling constant including the absolute sign by solid state NMR is accomplished in the peptide bond of glycylglycine, together with determination of the ^{13}C-^{15}N dipolar coupling constant. A 2D correlation spectrum was observed under MAS(magic angle spinning) using the WIM-12/FSLG-2 sequence for the determination of dihedral angle in the H-C-C-O of DL-alanine.

[Applications of the MLEV8/8^{R} sequence]

Recently, we proposed a new method MLEV8/8^{R} to determine accurate internuclear ^{13}C-^{15}N distances by observing Pake doublet patterns due to the ^{13}C-^{15}N dipolar couplings[1]. In this method, composite inversion pulse cycles highly compensating for finite pulse-width effects, off-resonance effects, and flip-angle errors are applied to both spins in a static sample.

キーワード：固体^{13}C-NMR、精密距離決定、異種核間双極子相互作用、二面角
○いしいよしたか、てらおたけひこ 、はやししょういち、うちだけんいち、
かいのしょうまさつね

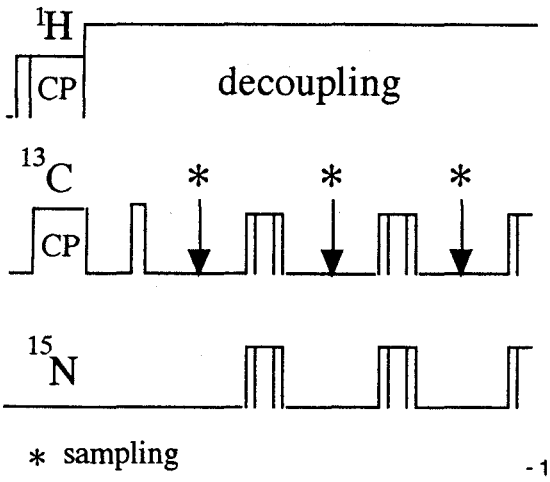


Fig.1 Pulse sequence for the MLEV8/8^{R} with composite pulses.

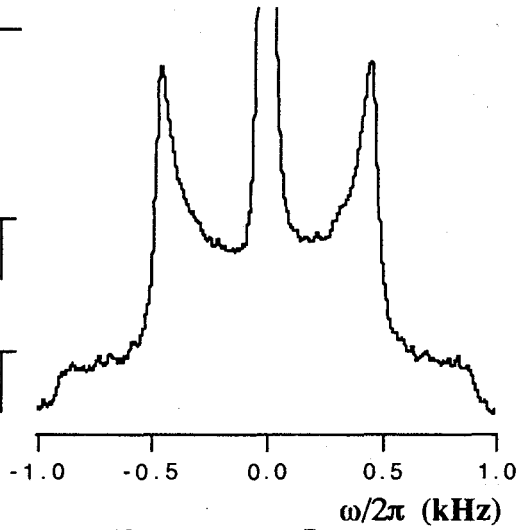


Fig.2 ^{13}C MLEV8/8^{R} spectra of 1-^{13}C Glycyl-^{15}N glycine.

In the present study, using the MLEV8/8^{R} sequence{^{13}C: τ-R-2τ-R-2τ-$\overline{R}$-2τ-$\overline{R}$-2τ-$\overline{R}$2τ-R-2τ -R-2τ-$\overline{R}$-τ / ^{15}N: τ-$\overline{R}$-2τ-R-2τ-R- 2τ-$\overline{R}$-2τ-$\overline{R}$2τ-$\overline{R}$-2τ-R-2τ-R-τ } (Fig.1), we observed a very clear Pake pattern for a 1-^{13}C Glycyl ^{15}N Glycine. Analyzing this spectrum, we determined the dipolar and J coupling constants between ^{13}C-^{15}N including the latter absolute sign. To our knowledge, it is the first J_{CN} value obtained by solid state NMR. In addition, we show that our technique can be applied to determine long internuclear distances. Also, we will discuss otional averaging effectsm on the measured dipolar coupling constants.

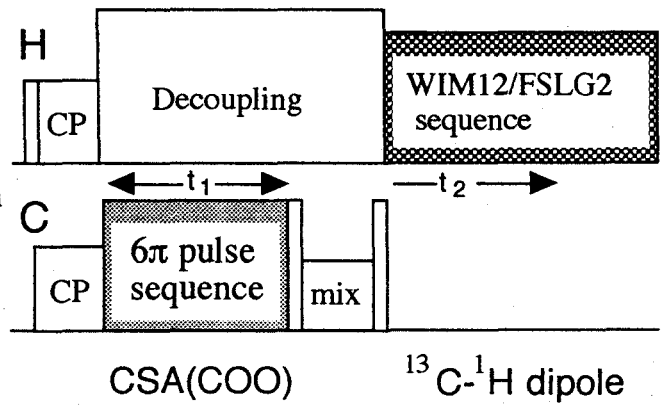


Fig.3 Pulse sequence for determination of dihedral angles. The 6π pulse sequence by Tycko et.al. and our WIM-12/FSLG-2 sequence are rotor-synchronously applied to obtain the CSA in the calbonyl carbon and the CH dipolar coupling constant in the methylene carbon, respectively .

[Determination of dihedral angles using the WIM-12/FSLG-2 sequence]

Many solid state NMR techniques for structural studies have been developed to determine internuclear distances. However, few techniques have been reported for determination of dihedral angles[2-4]. In our method, we observe a 2D correlation NMR spectrum in which a carbon magnetization is developed under an anisotropic interaction and transferred to an adjacent carbon after t_1, and the FID signal of the transferred magnetization developed under another anisotropic interaction is observed as a function of t_2. Because amino acids and peptides seem to be interesting for application of our technique, we treated a H-C-C=O system and a 2D correlation spectrum due to the ^{13}C=O CSA and the ^{13}C-^1H dipolar coupling. Determining their relative orientation, we can obtain the dihedral angle made by the C-H and the C=O bonds. Here we show a 2D correlation NMR spectrum of 1, 2 ^{13}C DL-alanine. We will also discuss the potential and limits of this technique in the poster presentation.

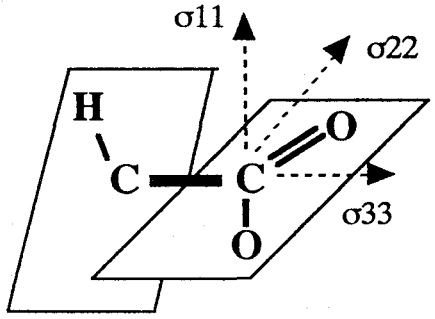


Fig.5 Assumed CSA principle axis direction in a calboxyl carbon. The dihedral angle ψ is defined to be the angle between the C-C-H plane and the O-C-O plane.

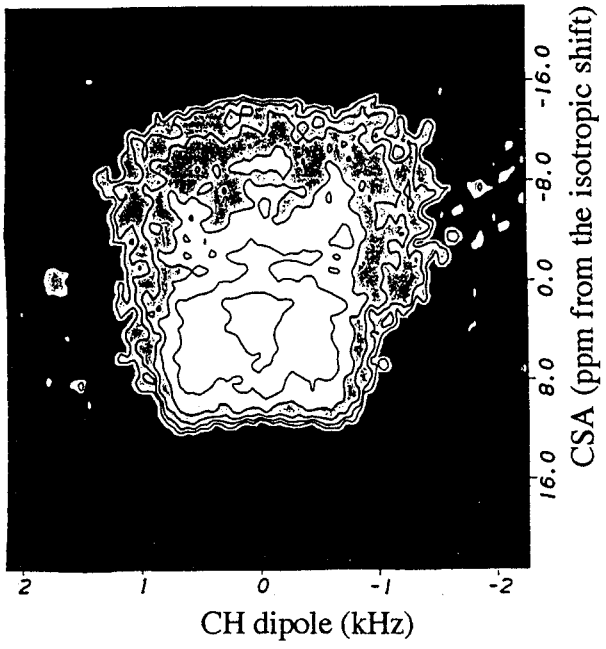


Fig.4 2D CSA(COO) - CH dipole(CH) correlation spectrum of 1, 2-13C DL-alanine obtained by the sequence in Fig.2.

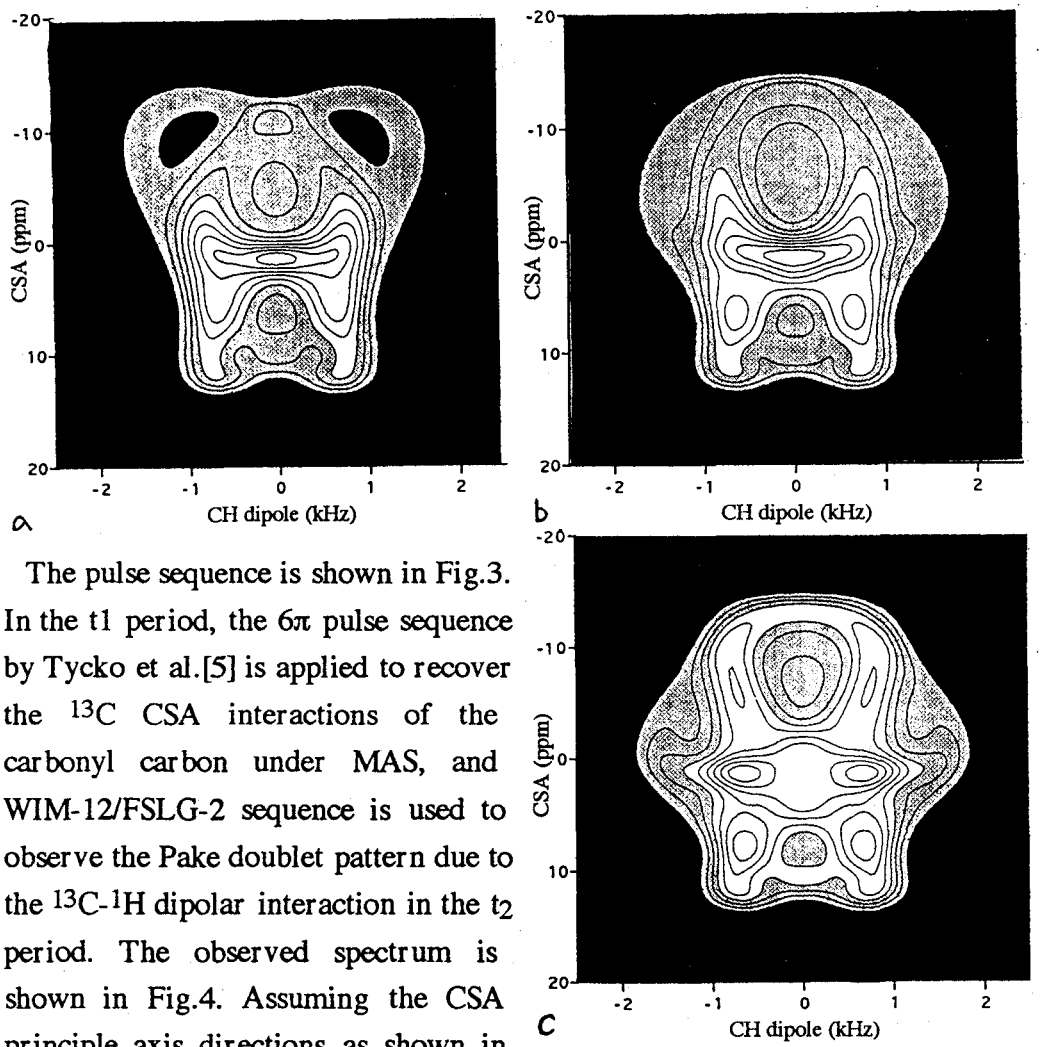


Fig.6 Simulated 2D CSA(COO) - CH dipole(CH) correlation spectra. The assumed dihedral angles ψ are (a)120.4°, (b)135.4° and (c)150.4°, respectively.

The pulse sequence is shown in Fig.3. In the t1 period, the 6π pulse sequence by Tycko et al.[5] is applied to recover the ^{13}C CSA interactions of the carbonyl carbon under MAS, and WIM-12/FSLG-2 sequence is used to observe the Pake doublet pattern due to the ^{13}C-^{1}H dipolar interaction in the t_2 period. The observed spectrum is shown in Fig.4. Assuming the CSA principle axis directions as shown in Fig.5, we simulated the dihedral angle dependence of the spectra(Fig.6). Clearly, the observed spectrum is similar with the spectrum in Fig.6b, which is calculated for the dihedral angle given by the X-ray crystal analysis.

[References]

[1] Y. Ishii and T. Terao, J. Magn. Reson. A 115 (1995) 116.

[2] Y. Tomita, J. O'Connor, and A. McDermott, J. Am. Chem. Soc 116 (1994) 8766.

[3]Y. Ishii and T. Terao, Proceeding of the 33rd NMR symposium(Kobe 1994)

[4]T. Shimomura, T.Fujiwara, H. Akutsu, Proceeding of the 33rd NMR symposium(Kobe 1994)

[5] R. Tycko, G. Dabbagh, and P. A. Mirau, J. Magn. Reson. 85 (1989) 265.

P12

二面角情報を得るためのMAS条件下異方的相互作用相関多次元固体NMR実験

横浜国立大学・工学部
○下村 泰次、藤原 敏道、阿久津 秀雄

Multidimensional Solid-State NMR Experiment for Obtaining Information on Dihedral Angles by Correlating Anisotropic Interactions under MAS Conditions

Taiji Shimomura, Toshimichi Fujiwara and Hideo Akutsu
Department of Bioengineering, Yokohama National University

Multidimensional NMR spectroscopy has been developed to correlate anisotropic interactions of different spins in rotating solids. An experimental spectrum of ^{13}C labeled alanine correlating $C^{\alpha}H^{\alpha}$ dipolar interaction with carbonyl ^{13}C shielding anisotropy was obtained. It was compared with the spectra simulated as a function of dihedral angle Ψ. The dihedral angle could be determined with accuracy of about 10° referring to the crystal structure. Numerical simulation showed that spectra obtained by this method is sensitive to the orientation of the $C^{\alpha}H^{\alpha}$ vector relative to the principal axis system of the carbonyl shielding anisotropy.

分子の立体構造を決めるためには、角間距離と二面角を求める必要がある。最近、固体高分解能NMRで粉末試料について核間距離を決められるようになってきたが、高分解能化の図れるマジック角高速回転下で共鳴周波数に依存せず非選択的に二面角情報を得る方法はない。昨年の本討論会で我々は、MAS条件で二面角情報を得る固体多次元NMR法を提案した。その原理は、等方シフトの違いを使って各スピンを分け、異なる核についてのCH相互作用や化学シフト異方性を相関させてその2つの相互作用テンソルの相対的な配向から二面角情報を得ようとするものである。

昨年は、主に数値シミュレーションでその方法の予備的な検討を行なった。今年は、その方法をさらに改良し、^{13}Cで完全ラベルしたアラニンに適用した。また、より正確な数値シミュレーションも行い、どのような精度で角度情報が得られるかを実験結果とも比べて検討したので報告する。

多次元固体NMR、マジック角試料回転、二面角、安定同位体標識

○しもむら たいじ、ふじわら としみち、あくつ ひでお

1-1. MAS条件で化学シフト異方性とCH双極子相互作用を相関させる3次元パルス系列

図1にアラニンに適用したパルス列を示す。【準備期】交差分極と^{13}Cへの90°パルスで非選択的に^{13}Cのz磁化を作り、C^{α}とC^{β}へのダブルDANTEでカルボニル^{13}C以外の磁化を消す。t_1期の直前にはカルボニル^{13}C横磁化が用意されている。【t_1期】コンスタント・タイムのt_1期では化学シフトの異方性のみで展開される。このために3つのπパルスをt_1とともに矢印の方向に移動させる。この部分は去年のに比べオフセット依存性がなくなるように改良した。【混合期】1.2msの双極子HOHAHA (USEMEパルス列)で炭素間双極子相互作用でC^{α}に磁化を移動する。【t_2期】コンスタント・タイムのt_2期では、CH双極子相互作用で展開する。昨年発表したように、t_2の増加とともにCWデカップリングをCH双極子相互作用の残るBLEW+/-パルス列と置き換えていく。【t_3期】CH双極子デカップリングのもとで等方シフトで展開しFIDを取り込む。

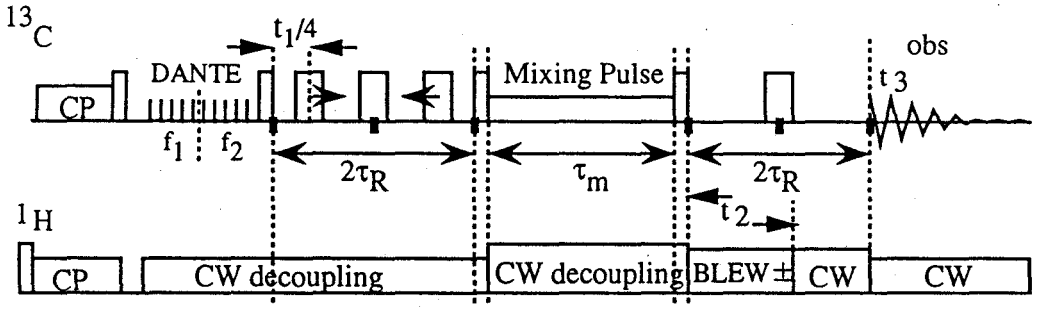


図1 異方的な相互作用を相関させるパルス系列
τ_mを約1.2ms,試料回転速度を4.960kHz (τ_R=201.6μs)にした。
太いパルスはπパルス、狭いパルスは$\pi/2$パルスを表す。

1-2. 実験結果

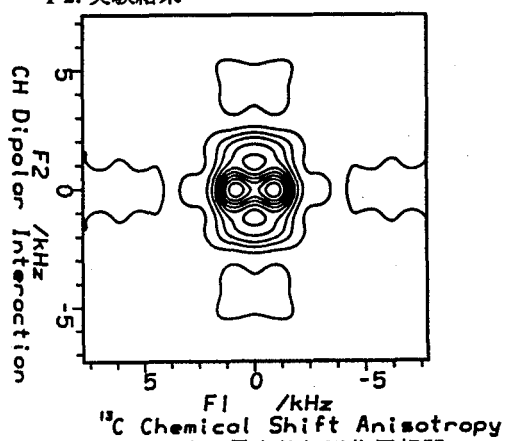


図2 Alaの2次元異方的相互作用相関の実験スペクトル

実験はChemagneticsのCMX400(B_0=9.4T)で5mm径のローターを用いて行なった。MAS回転数は4960Hz、用いたラジオ波の最大強度は、^{13}Cと^{1}Hについて100kHzであった。

図2に、F3周波数軸のC^{α}共鳴周波数での断面をとった実験二次元スペクトルを示す。F1軸にカルボニルの化学シフト異方性を、F2軸に$C^{\alpha}H^{\alpha}$双極子相互作用を取っている。スペクトルは、対称になるので、その時間領域では余弦成分のみを観測した。時間領域でのポイント数10x10を128x128にゼロフィルした後、余弦二重フーリエ変換した。

2. 計算機シミュレーションによる解析

図2の実験スペクトルと同様、カルボニルの化学シフト異方性と$C^{\alpha}H^{\alpha}$双極子相互作用相関のシミュレーション・スペクトルを図4に示す。シミュレーションはカルボニル^{13}C,$^{13}C^{\alpha}$,$^{1}H^{\alpha}$の3スピン系に約1300個の異なる配向の分子を重ね合わせて行なった。また、試料一回転は約100に時間分割しそれらについてのプロパゲータの積から、時間領域の信号を計算した。カルボニルの化学シフトは単結晶アラニンの値を用いた(A.Naito, S.Ganapathy, K.Akasaka, and C.A.McDowell, J.Chem. Phys. **74**, 3190 (1981))。

これら計算スペクトルについて2つの相互作用テンソルの相対的配向を図3に黒丸で示した。図3では、CH単位ベクトルの方向をカルボニル化学シフト・テンソルの主軸座標系で示している。点線は二面角ψについて回転したときのCHベクトルの軌跡を表している。σ_1軸がC-C結合軸にほぼ平行なので、二面角を回転することでCHベクトルはσ_{22}とσ_{33}軸との相対的な角度のみが主に変化する。図4のψ=-90°から30°のシミュレーションが示すように、二面角の変化に対して2つの分裂したピーク周辺の形と強度が変化しているのが分かる。ψ=-90°とψ=-30°のスペクトルが比較的似ているのは、両者についてのCHベクトルの向きがσ_1 σ_{22}平面に対して対称なためである。また、図4のAとBはCHベクトルとσ_1の向きを図3のA,Bのように変化させている。この変化に対して、スペクトルは極めて敏感に変化していることが分かる。

実験スペクトルと計算スペクトルを比較すると、実験スペクトルはψ=-30°と-18.5°の計算スペクトルにほぼ一致している。このことからψは約-24°と予測できる。一方、結晶解析ではψ=-18.5°であることが明らかになっている。従って、化学シフトの主値や主軸方向が二面角に依存しないと仮定すると、この方法では約10°の精度で二面角を見積もることができることが分かる。また、既に二面角と主値が分かっている場合には、逆にこの方法で主軸方向を同様な精度で求められることが分かる。

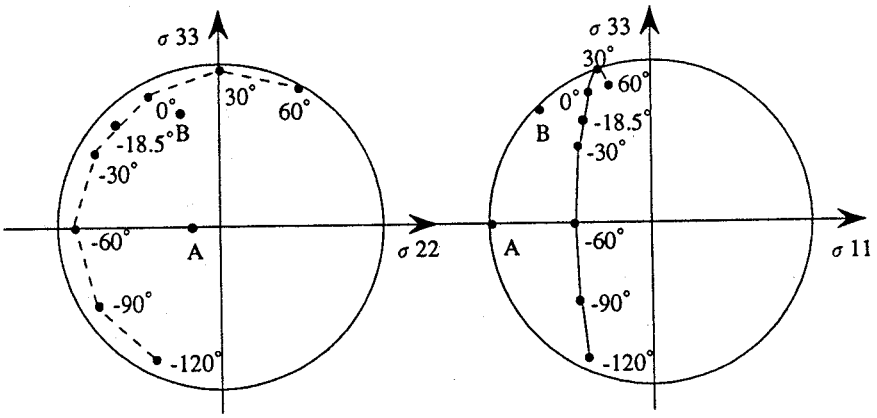


図3 CH単位ベクトルの方向をカルボニル化学シフト・テンソルの主軸座標系で示した図。角度は二面角ψを表す。

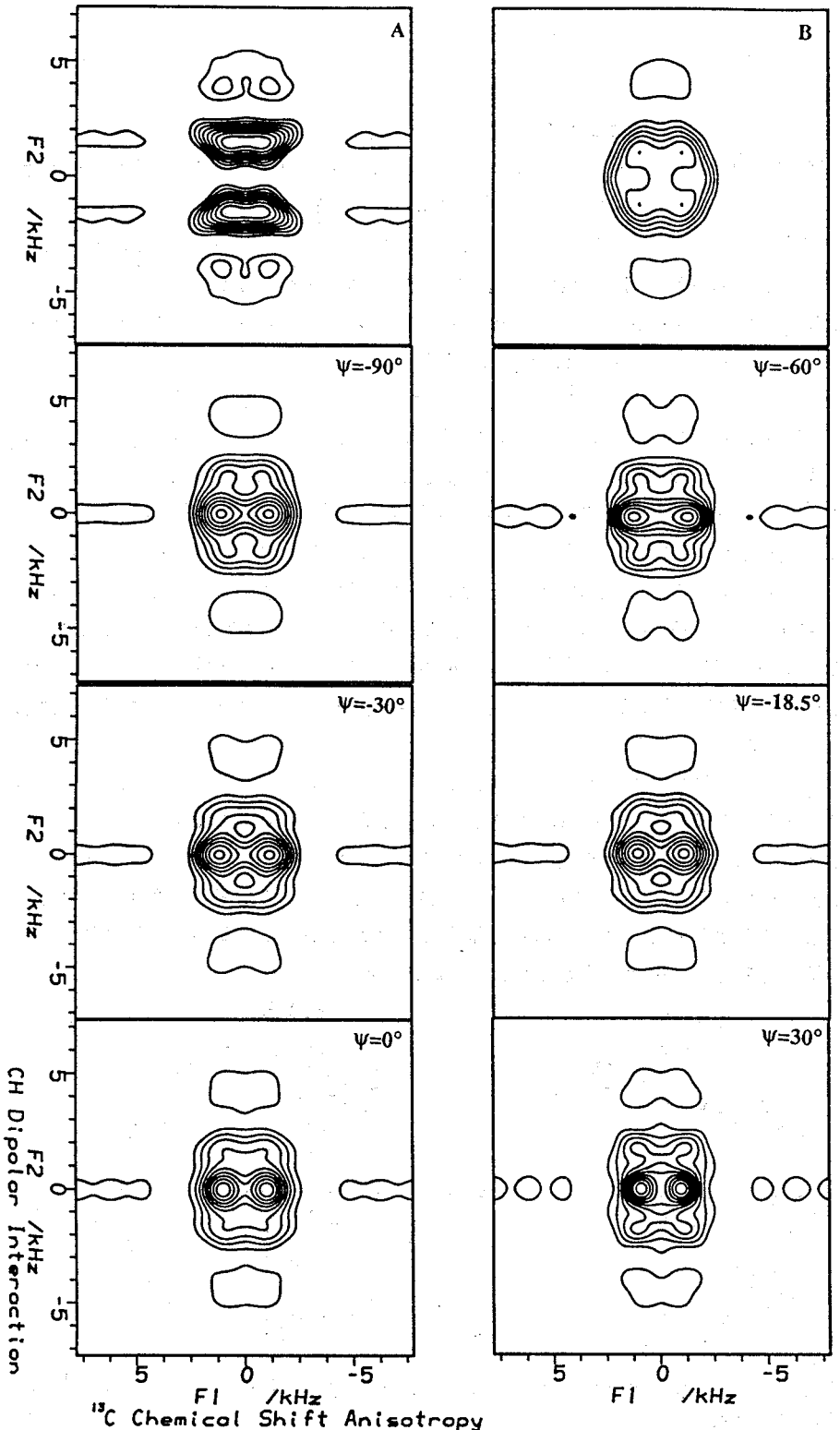


図4 シミュレーションした化学シフト異方性－CH双極子相互作用相関２次元スペクトルの等高線表示。

P13

固体^{13}CNMRを用いた[1-^{13}C]Glycylglycine単結晶試料の化学シフトテンソルの主値および主軸の決定

(東工大工) O武田直登、亀田恒徳、水谷高彰、黒子弘道、安藤慎治、安藤勲、橋爪大輔、大橋祐二

Determination of the ^{13}C NMR chemical tensor orientation of [1-^{13}C]Glycylglycine single crystal

Naoto Takeda[a],Tunenori Kameda[a],Takaaki Mizutani[a],Hiromiti Kurosu[a],Shinji Ando[a],
Isao Ando[a],Daisuke Hashizume[b],Yuji Ohashi[b]
a)Department of Polymer Chemistry,Tokyo Institute of Technology
b)Department of Applied Chemistry,Tokyo Institute of Technology

The ^{13}C chemical shielding tensor components and tensor orientations of [1-13C]Glycylglycine in a molecule-fixed coordinate system have been determined. But we have to use the special probe to rotate crystals parallel to H_0 if we make such a experiment. In this work we explain the way to determine tensor orientation by using special rotors.The amide carbon of glycylglycine is forming hydrogen bond so it is important to examine detail imformation of electrical structure.

1.序論

今まで単結晶試料を磁場の中で回転することにより、化学シフトテンソルの主軸の方向を決定する実験が数多くなされてきた。しかし、それらの実験は結晶を磁場の中で回転させる方向に制約があるために特別なプローブを使用しなければならなかった。今回は自作のローター(Fig.1)を考案することにより、通常のCP/MASプローブで同様の実験を行うための方法論を開発した。また、本実験で用いたα-[1-^{13}C]Gly-Gly単結晶試料は、カルボニル炭素が水素結合を形成しているジペプチドであり、水素結合構造とNMRパラメーターとの相関関係を調べることを目的とした。

2.実験

[試料] [1-^{13}C]Gly-Glyの10%ラベル試料を合成し、水とプロパノールの1:1水溶液から単結晶試料(8×5×1mm)を得た。この結晶の空間群は$P2_1/C$に属し単斜晶系である。

[測定] テフロン製の門松型ローターに単結晶試料を固体パラフィンで固定し、磁場の中で回転させる実験を切り角(θ)の違ういくつかのローターについて行った。NMR測定は日本電子製GSX-500NMR分光器とDOTY社製270NMR分光器を用いた。パルスシーケンスは交差分極法を用い、アダマンタンを外部基準とした。また、化学シフトテンソルの主値(σ_{11}=244.9ppm,σ_{22}=174.0ppm,σ_{33}=85.4ppm)はスピニングサイドバンド法により決定した。これらの値を利用し、ローターの回転角(ψ)に依存したスペクトルのシミュレーションを行い、分子軸と^{13}C化学シフトテンソルの主軸系とのオイラー角を決定した。

Oたけだなおと　かめだつねのり　みずたにたかあき　くろすひろみち　あんどうしんじ
あんどういさお　はしずめだいすけ　おおはしゆうじ

単結晶　門松ローター　水素結合

3.結果と考察

α-[^{13}C]Gly-Gly単結晶試料には単位格子中に4つの分子が存在するが、磁気的に非等価な分子は2種類である。(磁場の方向と結晶軸とが一致している場合には1本、それ以外の場合には2本である)。しかし、本実験で注目しているカルボニル炭素は直接^{14}N核と結合しているために、ピークは、それぞれ3本に分裂することが予想される。Fig. 2に結晶のb軸と磁場の方向が一致している時の^{13}CNMRスペクトルを示す。これらのピークは、四極子結合定数が0の時には等間隔(D)に分裂し、それ以外の時は中央のピークが2d、両側のピークが反対側にdだけシフトすることが知られている。シフトする方向は中央のピークについては、四極子結合定数が正の時は低磁場側、負の時は高磁場側である。従って、本実験で用いたα-[^{13}C]Gly-Gly単結晶試料の場合には、四極子結合定数が負であることがわかる。さらに、得られたスペクトルを解析することにより中央のピークを帰属することができる。ローター($\theta=50^0$)を1回転させた時の中央のピークの角度依存変化をFig. 3に示す。シミュレーションにより決定したオイラー角は($0^0,5^0,0^0$)であり、カルボニルの方向とσ22の方向が5^0ずれていることが示された。さらに、この結果は量子化学計算による結果と非常によく一致した。注目しているカルボニル炭素が水素結合を形成している場合と形成していない場合との議論は講演で行う。

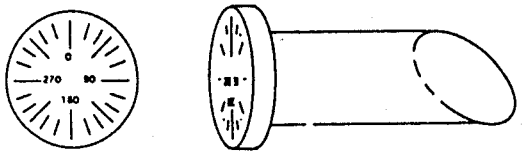


Fig.1 Teflon rotor built for crystal rotation.

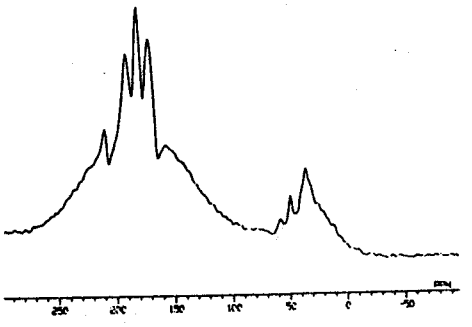


Fig. 2 Proton enhanced ^{13}C NMR spectrum of single crystal of [^{13}C]Gly-Gly with proton decoupling (h//b axis).

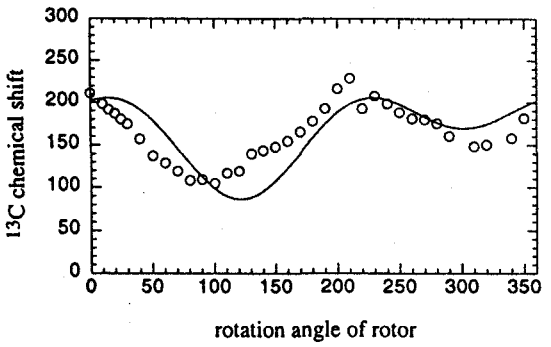


Fig.3 ^{13}C chemical shift rotation plots for carbonyl carbon of [1-^{13}C]glycylglycine. The calculated ^{13}C chemical shift is represented by solid line and the observed ^{13}C chemical shifts removed ^{13}C-^{14}N dipolar interactions are represented by dotted line.

参考文献

1.A.Naito,S.Ganapathy,P.Raghunathan,and C.A.McDowell,J.Chem.Phys.,79,4173(1983).

2.R.E.Stark,L.W.Jelinski,D.J.Ruben,D.A.Torchia,and R.G.Griffin,J.Magn.Reson.,55,266(1983).

3.A.B.Biwast,Edward W.Hughes,Brahama D.Sharma,and J.Norton Wilson,Acta Cryst.,B24,40(1968)

P14

DSX300用液体He温度領域NMRプローブの製作と二、三の核種の測定例

（阪大理）○武田 定、丸田悟朗、山口 兆

Construction of wide-band and liquid He temperature NMR probe for DSX300 system and measurement of NMR spectrum of several nucleus. Deuterium NMR of tunneling CD_3-groups.

Sadamu. Takeda, Goro Maruta, and Kizashi Yamaguchi

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka

A wide-band and wide-line NMR probe for the low temperature operation between 1.6 K and 300K was constructed for BRUKER DSX300 system. A wide range of the resonance frequency can be adjusted by changing the sample coil and low temperature capacitor. The resonance condition was tuned by a capacitor and matched to 50 Ω by a coil. The NMR measurements were tested for several nucleus between deuterium frequency (46MHz) and proton frequency (300MHz) for the wide temperature region between 4.2 and 300 K with a small consumption of the liquid He. A typical length of π/2-pulse was ≤2.0 μs for D-NMR (46MHz) and 1.3 ~ 2.0 μs for H-NMR (300MHz). The sample coils with inner diameter of 3.2 mm were used for these measurements. The deuterium NMR spectra of tunneling CD_3- group of $C_6D_2(CD_3)_4$ and $Sc(CD_3COO)_3$ are mainly presented in this paper.

固体物性の研究において、液体He温度領域で種々の核についてNMRスペクトルを測定する必要がしばしば生じる。ここでは、これらの測定をできるだけ安価に行うために、Bruker DSX300 用に、二重のガラスデュワーのクライオスタットに液体Heを溜める方式を採用した液体He温度領域NMRプローブを製作し、重水素核(46MHz)からプロトン(300MHz)までの周波数領域で、NMRスペクトルの測定を行った。その中で、今回は特に重水素核NMRによる重水素化メチル基(CD_3-)のトンネル回転現象について報告する。

［液体He温度領域NMRプローブと測定例］　クライオスタットはガラスの二重デュワー方式とし、外側に液体N_2、内側の内径45mmのデュワーに液体Heを溜める。サンプル部分より上までいっぱいに液体Heを溜めると(700ml)、4.2Kで、あるいはこれを排気して1.6K~4.2Kの間で、12時間程度設定温度を保つことができる。また、サンプル部分より下に300ml程度液体Heを溜めることにより、温度領域にもよるが、やはり

重水素NMR, 重水素化メチル基, Tunneling, 液体ヘリウム温度多核広幅NMRプローブ,

たけだ さだむ、 まるた ごろう、 やまぐち きざし

12時間程度4.2K-150K程度の間で設定温度に保つことができる。

このクライオスタットは、室温シムを取り外した直径89mmの室温ボアに挿入して使うが、Fig.1に示したように室温での$H_2O(CuSO_4)$のプロトンのNMRスペクトルの幅(FWHM)は100Hz程度であり、広幅NMRスペクトル用としては十分な磁場の均一度が得られている。使用したコイルは内径3.2mmのソレノイド型で$\pi/2$パルスは2μsである。他にも^{87}Rbなどの測定も行ったが、Fig.2とFig.3にはそれぞれ重水素化テトラメチルベンゼン($C_6D_2(CD_3)_4$)と重水素化酢酸スカンジウム($Sc(CD_3COO)_3$)の重水素核NMRスペクトルの温度依存性を示す。サンプルコイルはやはり内径3.2mmで試料の大きさは、直径3mm×長さ5mmである。$\pi/2$パルスはほぼ2μsである。Fig.4はLarowiczら(1988)によって計算された、CD_3基の重水素核NMRスペクトルのトンネル分裂(ν_t)依存性を示している。これによると、Fig.2の($C_6D_2(CD_3)_4$)の38.7Kのスペクトルは、トンネル分裂が重水素核の核四極子分裂と同程度の大きさであることを示し、Fig.3の4.2Kのスペクトルは、($Sc(CD_3COO)_3$)のトンネル分裂が、数MHzより大きいことを示している。Fig.3でCD_3基がトンネル回転していることは矢印で示した最も外側のピークに現れているが、温度上昇に伴いこのピークが消えていくことは、温度上昇によりトンネル回転から熱励起による回転へと移っていくことを示している。

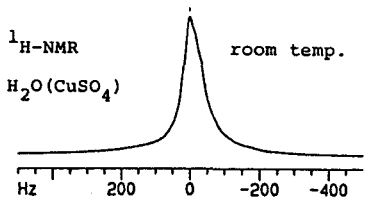


Fig.1 Test spectrum for resolution.

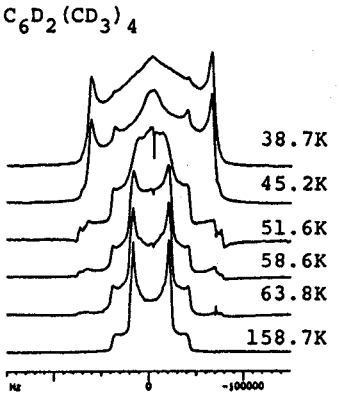


Fig.2 D-NMR of CD_3-tunneling of tetramethylbenzene.

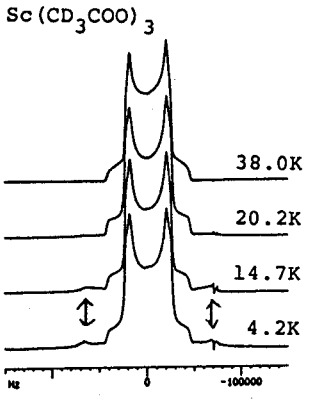


Fig.3 D-NMR of CD_3-tunneling of scandiumacetate.

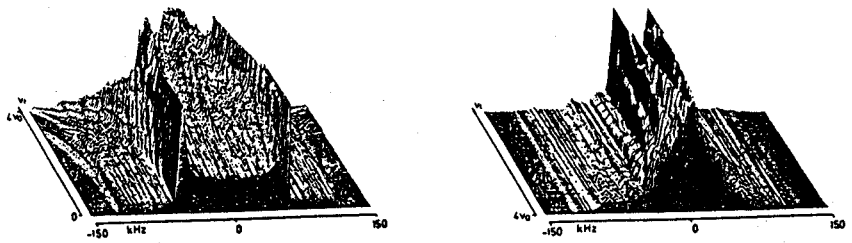


Fig.4 Simulation of D-NMR spectrum of CD_3 group due to tunneling splitting (ν_t) by Larowicz, *et al* (1988).

P15　DSX300用簡易型単結晶回転NMRプローブの試作と単結晶TiO_2/0.3%Scの^{45}Sc-NMR

(阪大理) 佐藤和則、○武田 定、山口 兆、南園忠則、福田茂一、大坪隆、福田光順、松多健策、野尻洋一

^{45}Sc-NMR and precise determination of quadruple coupling constants of 0.3% Sc doped in TiO_2 single crystal. An easy use of wide-line probe of DSX300 for the single crystals.

K. Satoh, S. Takeda, K. Yamaguchi, T. Minamisono, S. Fukuda, T. Ohtsubo, M. Fukuda, K. Matsuta, Y. Nojiri

Department of Chemistry and Physics, Faculty of Science, Osaka University

The doping effect of trivalent Sc ion into tetravalent Ti site of TiO_2 single crystal was studied. Rotational patterns of second order quadrupole shift of ^{45}Sc NMR were measured at room temperature and quadrupole coupling constants were precisely determined for 0.3% Sc doped in TiO_2 single crystal. The chemical shift anisotropy of the doped ^{45}Sc was determined from the external magnetic field dependence (at 7.05 and 9.40 T) of the rotational pattern of the NMR lines. ^{47,49}Ti NMR spectra were also measured to investigate the local lattice deformation of the crystal due to doping of 0.3% Sc. For the measurement of rotational pattern of the NMR spectrum, an easy attachment was constructed for a wide-line probe of BRUKER DSX300. Error of the rotation angle was estimated to be ± 1°.

ルチル(TiO_2)の四価のTiの代わりに三価のScを少量(0.3%)ドープした結晶中でのScの存在状態を調べるために、Ti(0.3%Sc)O_2の単結晶について^{45}Sc-NMRスペクトルの角度依存性を室温で測定することにより、^{45}Sc(I=7/2)の核四極子結合定数を精密に決定し、^{45}Scの化学シフトの異方性も決定した。また、ホスト格子の局所的な歪みなどを見積もるために、^{47}Ti(I=5/2)、^{49}Ti(I=7/2)のNMRスペクトルの測定も試みた。単結晶試料のNMRスペクトルの角度依存性を測定するために、Bruker-DSX300の固体広幅NMRプローブ用に簡易型の単結晶回転装置を自作し、測定を行った。

[実験]　試料は、TiO_2とSc_2O_3の溶融物から育成された単結晶から5x7x20mmの結晶を切り出したものを用いた。TiO_2結晶は正方晶系で($P4_2/mnm$)、すべてのTiは結晶学的に等価であり2回対称軸の上にのっている。またTiは6個のOが作る少し歪んだ八面体の中心に位置している。この結晶を自作した単結晶回転装置に接着剤で固定し、

Ti(0.3%Sc)O_2, 単結晶回転装置, ^{45}Sc-NMR, 核四極子結合定数, 化学シフトの異方性

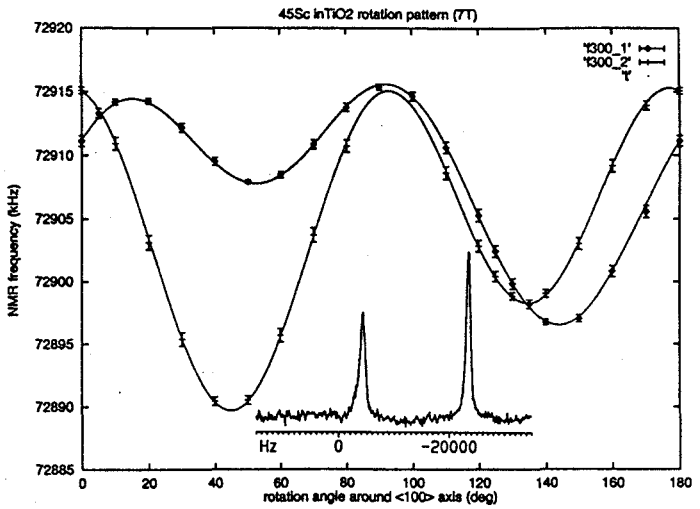
さとう かずのり、たけだ さだむ、やまぐち きざし、みなみその ただのり、ふくだ しげかず、おおつぼ たかし、ふくだ みつのり、まつた けんさく、のじり よういち

この結晶のａ軸にほぼ近い軸の回りに回転させることにより、NMRスペクトルの角度依存性を測定した。結晶の回転軸と試料の結晶軸とのなす角度はＸ線回折法により決定した。NMRスペクトルの測定は室温でBruker DSX300(7.05T, 72.9MHz) とDSX400 (9.40T, 97.2MHz)を用いて行った。

単結晶回転装置は市販の２枚の分度器を利用し、また若干の機械工作を行うことにより容易に作ることができる。またBruker広幅NMRプローブに容易に取り付けおよび取り外しができる。TiO_2の^{47}Ti, ^{49}TiのNMRスペクトルの角度依存性はすでに報告されているが、今回の測定結果と良く一致する。また吸収線幅は、四極子シフトの分布によって決まっているが、100~200Hz程度と極めて狭い(^{49}Ti: e^2qQ/h=14.00 MHz, η=0.19)。これを利用して今回自作した単結晶回転装置の回転角の設定誤差を見積もったところ、±1° 程度であった。

［結果］　7.05Tで測定した^{45}Sc-NMRスペクトルの角度依存性を下の図に示す。この図の中に挿入したスペクトルは、図の横軸の回転角が40° のもので、くり返し時間5秒で360回積算したものである。二種類観測されるのは、外部磁場の方向に対して結晶中に核四極子相互作用の主軸の方向だけが異なる二種類のScがあることと、回転軸が結晶のａ軸と一致していないためである。実線で示した曲線は核四極子相互作用の二次のシフトと化学シフトの異方性を考えに入れて計算した結果である。これにより、^{45}Scの核四極子結合定数は、e^2qQ/h=11.02MHz, η=0.983と求まった。三つの主軸の方向は結晶の[001], [110], [1-10]でTiのそれと一致する。$Ti(0.3\%Sc)O_2$の^{45}Sc-NMRの吸収線幅は7.05Tで約1000Hzであり、また9.40Tにすると線幅が狭くなることから、この線幅は核四極子相互作用の若干の分布により決まっていると考えられる。

DSX400での測定は分子科学研究所で行った。宮島、中井両博士に感謝する。



Rotational pattern of ^{45}Sc-NMR spectrum of $Ti(0.3\%Sc)O_2$ at 7.05T at room temperature. Inserted spectrum was measured at 40° of the rotation angle. Duration was 5 s and 360 scans were added.

特　別　講　演

特別講演1

高温超伝導体のＮＭＲとその応用

東京大学物性研究所　安岡 弘志

NMR in High-T_c Superconductors and their Application

Hiroshi Yasuoka, *Institute for Solid State Physics, University of Tokyo*

Recent development of the NMR/NQR research in high temperature superconducting Cu Oxides is reviewed. From the temperature dependence of the NMR parameters such as T_1, T_2, Knight shift and NQR frequency, the following characteristic features have been emerged.

1) In the normal state, the unconventional metallic properties are cahacterized by the strongly temperature dependent antiferromagnetic spin fluctuations and the "spin-gap" observed in the low doping regime of the two CuO_2 layer systems.
2) In the superconducting phase for all Cu oxides, $1/T_1$ decreases quite rapidly just below T_c and follows a power low, $1/T_1 \propto T^3$, suggesting unconventional superconducting properties. The d-wave symmetry of the superconducting order parameter is confirmed by the temperature dependence of the indirect nuclear spin-spin interaction, $1/T_{2g}$.

I. はじめに

我々が酸化物超伝導体のＮＭＲの研究を開始してから早１０年の歳月がたとうとしている。その間、ＮＭＲの研究に限っても、国内外で膨大な量のデータが蓄積され、かつ、それらの解釈に関しても数多くの直感的な説明や理論的モデルが提案されてきている。しかしながら、現時点においてさえ、超伝導状態のみならず常伝導状態において、ＮＭＲから得られる種々の実験データに対して、統一的な理論的解釈を与えることができない状態にある。ＮＭＲによる研究の世界的動向を眺めてみると、ここ数年、常伝導状態における電子状態を微視的に明らかにしようとする努力が数多くなされてきている。特に、超伝導を示す種々の銅酸化物系の、系固有の物理量ではなく、系に依存しない普遍的な特徴を見い出していく研究が一つの方向であると思われる。また、超伝導の秩序パラメターの対称性に関しても、s-波かd-波かという論争が数多くの実験結果をもとにして繰り広げられてきている。ＮＭＲの観点からすれば、現在では d-波であろうと言う結論が一般的になっているであろうが、最近のスピン・スピン緩和時間の測定より d-波超伝導の状態の中に、更に対称性の変化を伴う相転移の存在も指摘されている。このような研究では、均一な試料が作成できる物質系を選び、可能なすべての構成原子核それぞれにＮＭＲを適用して、種々の波数空間で温度やキャリヤ濃度に依存した磁気励起の詳細を明らかにする事が重要となる。

これらの研究の中で、本講演では、ＮＭＲの実験によって得られる物理情報を概観した後、いくつかの最近の話題を紹介することにする。それらは、①ホール濃度と常伝導状態での電子状態との関連を典型物質 $YBa_2Cu_4O_8$ (T_c=81K)、$YBa_2Cu_3O_7$ (T_c=92K)、$Tl_2Ba_2CuO_y$ (T_c=85K)のナイト・シフト、スピン・スピン緩和時間、スピン・格子緩和時間の温度依存性からその特徴を明らかにすること、② $YBa_2Cu_4O_8$ の Cu(2)サイトの核スピン・格子緩和時間の温度依存性で顕著にみられる反強磁性磁気励起におけるスピンギャップ的な振る舞い、及び③ $1/T_{2g}$ の温度依存性から明らかになった超伝導の対称性の問題である。更に、高温超伝導物質を用いたＮＭＲに関する応用についても、最近やっと話題に上り始めた事柄であるが、ＮＭＲコイルやMR用のマグネットについて報告する。

高温超伝導体、核磁気緩和、スピンギャップ、超伝導ギャップ、超伝導対称性

やすお かひろし

Ⅱ．高温超伝導体のNMR物理情報

Ⅱ－1）ナイトシフト

ナイトシフトK は、着目する原子核に働く局所磁場 H_{loc} の静的部分による共鳴磁場のシフトを用いて第１式で定義され、局所一様磁化率 $\chi(0,0)$ に比例する。

$$K = \frac{H_O - \langle H_{loc} \rangle}{H_O} \propto \chi(0,0) \propto \frac{\chi_O(0,0)}{1-\alpha_O}, \qquad (1)$$

$$\alpha_O = 2I\chi_O(0,0). \qquad (2)$$

ここで、$\chi_O(0,0)$、α_O はそれぞれ相互作用を無視した場合の一様磁化率および電子間の相互作用を表すパラメーターである。

Ⅱ－2）スピン・格子緩和時間

非平衡状態における原子核の磁化の熱平衡値 M_o への回復、M(t)、は第３式のごとく指数関数的に起こり、その時定数を T_1 で定義してスピン・格子緩和時間と呼ぶ。ナイトシフトが着目する原子サイトにおける静的な一様磁化率に比例しているのに対して、この緩和率と温度の逆数の積 $1/T_1T$ は、波数（q）と周波数（ω）に依存した一般化磁化率（動的磁化率と呼ぶ）の虚数部に比例している。

$$M(t) = M_O \left\{ 1 - \exp\left(\frac{-t}{T_1} \right) \right\}. \qquad (3)$$

$$\frac{1}{T_1T} \propto \sum_q \left| A_q^{xx,yy} \right|^2 \frac{\chi''(q,\omega_n)}{\omega_n}. \qquad (4)$$

なお、$A_q^{xx,yy}$ は波数に依存した超微細相互作用の結合定数の垂直成分で、ω_n は対象にしている原子核の共鳴周波数である。

Ⅱ－3）スピン・スピン緩和時間

スピン・格子緩和時間が原子核系と電子系のエネルギーのやりとりに関係しているのに対して、スピン・スピン緩和時間は原子核スピンの量子化軸と垂直成分の緩和現象で、エネルギー伝達には関係なく、「横緩和」とも呼ばれている。スピン・スピン緩和の最も基本的な過程は、原子核スピン間の直接相互作用で双極子相互作用による二次のモーメントに起因している（第５式右辺第１項）。しかしながら、磁性体の場合は色々な機構で電子スピン系を擬似的に励起することによる間接的な相互作用が存在し（第５式右辺第２項）、磁気励起に関して重要な情報を提供する場合が多い。

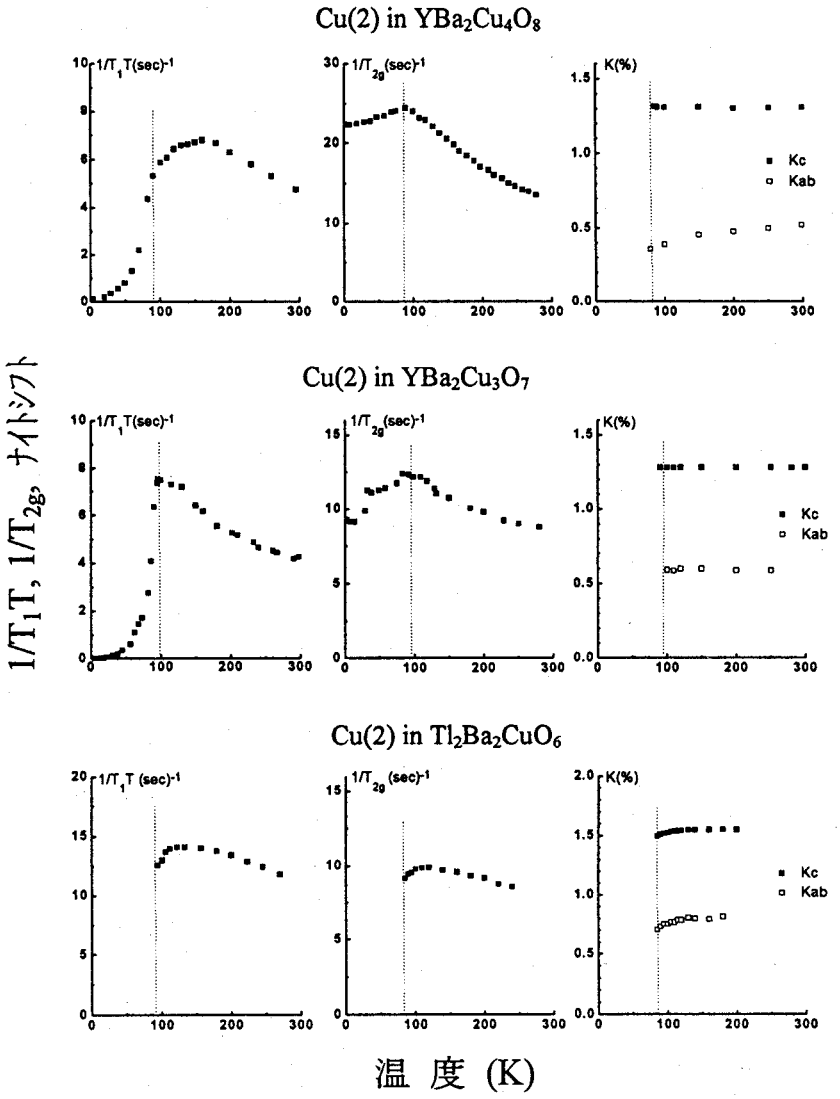
$$M(t) = M_O \exp\left\{ -\frac{(\Delta t)^2}{2} - \frac{(Rg)^2}{2} \right\} \qquad (5)$$

ここで、Δ は直接相互作用、R_g は間接相互作用の大きさを表す時定数である。

高温超伝導酸化物の Cu(2)サイトにおいてもこの間接相互作用が重要な役割を担っており、スピン・エコーの緩和率のガウシアン成分 $1/T_{2g}$ が、超微細相互作用の結合定数の平衡成分 A_q^{zz} と波数に依存した静磁化率、$\chi'(q,0)$、を用いて第６式のように表される。

$$\left(\frac{1}{T_{2g}}\right)^2 \equiv R_g(T)^2 \propto \sum_q \left|A_q^{zz}\right|^4 \chi'(q,0)^2 \qquad (6)$$

一般に、高温超伝導酸化物の Cu(2)サイトでは反強磁性的な Cu スピンの揺らぎが熱力学的な諸量を決定しており、かつ、構造上の観点より超微細相互作用の波数依存性も反強磁性波数ベクトル Qの位置で強く増大している。従って、波数ベクトル q で平均化された量として与えられる T_1 や T_{2g} は反強磁性成分が重要な意味を持つ。



第１図　*典型的高温超伝導体、 $YBa_2Cu_4O_8$ (T_c=81K)、$YBa_2Cu_3O_7$ (T_c=92K)、$Tl_2Ba_2CuO_y$ (T_c=85K)における$1/T_1T(T)$, $1/T_{2g}(T)$ および $K_\alpha(T)$ の相関*

Ⅲ. $1/T_1T(T)$, $1/T_{2g}(T)$ および K(T) の相関

NMRによって得られる物理量 $1/T_1T$, $1/T_{2g}$および K_α の温度依存性は、それぞれが低エネルギー領域における波数と周波数に依存した一般化磁化率、$\chi(q,\omega)$、の特徴的な波数領域についての情報を提供してくれる。第１図に、低濃度ドープ状態、最適濃度ドープ状態、過剰濃度ドープ状態と呼ばれている物質群の中から、典型物質として、それぞれ $YBa_2Cu_4O_8$(T_c=81K), $YBa_2Cu_3O_7$(T_c=92K), $Tl_2Ba_2CuO_y$(T_c=85K)を取り上げてそれ等の温度依存性を示す。ここで、ナイトシフトに関する情報については、一様静磁化率 $\chi(0,0)$ の温度依存性をいちばん反映しているのが K_{ab} であることに注意してほしい。図からも一目瞭然のごとく、一般化磁化率の温度依存性はドーピングの程度や波数成分によって特徴的な振る舞いを示している。これらを統一的に理解する理論は現在のところ存在しないが、以下に実験的に明らかとなったいくつかの特徴をあげてみる事にする。

① $1/T_1T$ の温度依存性は温度低下とともに反強磁性スピンの揺らぎの増大にともなって増大していくが、低ドープ領域においては、T_c以上のある温度（T_{sg}と定義する）でピークを持ちT_cに向かって急激に減少する。これが、いわゆるスピンギャップの振る舞いである。しかしながら、この振る舞いは、$1/T_{2g}$の温度依存性には全く現れておらず、静的な $\chi(q)$ は T_c 直上までCW的に増大し続けている。更に一様静磁化率の温度低下に伴う減少の様子、$K_{ab}(T)$、は $1/T_1T$ のそれとも異なっている。これらのことは、いわゆるスピン・ギャップの現象は、反強磁性スピン相関の動的な性質に特徴を持っており、静的な部分とは異なった温度依存性を示すと結論できる。

②ドーピングが最適領域に近づくにつれて、スピン・ギャップが起こる温度、T_{sg}、が T_c に近づき、一様静磁化率の温度依存性も無くなってくる。

③過剰ドーピング領域においては、電子系は反強磁性相関が弱まり、より金属的に振る舞うようになる。このような場合は、タリウム系のデータにおいてもみられるように、それぞれの物理量が同じような温度依存性を示すようになる。現在我々は、この温度依存性をバンド構造による温度効果であると考えている。

④最後に超伝導の秩序パラメーターの対称性の問題に触れておく。NMRからこの対称性を決定する場合、一般的にはT_c以下でのナイトシフトや $1/T_1$ の温度依存性から判断されてきた。しかしながら、高温超伝導銅酸化物の場合はそれ等の実験結果からは決定的な対称性が求められず、$1/T_1$ に関する銅サイトの異方性の温度変化や銅サイトと酸素サイトでの $1/T_1(T)$ のスケーリングから議論されてきている。それ等の結果は概ねd-波超伝導の予想と一致していたが、もっと直接的で疑いの余地のない実験的確証が $1/T_{2g}$ の T_c 以下での温度依存性から明らかとなった。$YBa_2Cu_4O_8$ の場合に典型的に見られるごとく、T_c以下での低温で静的な磁化率が有限に残っており、かつ $1/T_{2g}$ の温度依存性が d-波超伝導の理論式とも良い一致を示すことより、NMR的には d-波が決定的なものとなったと我々は判断している。更に、興味あることは、Y(又は La)$Ba_2Cu_3O_7$ のいわゆる１２３相においては、約３０Kの温度で $1/T_{2g}$ の急激な現象が観測され、d-波超伝導状態の中で、更に対称性の異なる他の超伝導状態（多分 s-波的）への転移が観測されたことである。従来から言われていた３０K近傍における種々の超伝導特性の異状と何らかの関係があるものとして注目している。

Ⅵ. おわりに

核磁気共鳴（NMRやNQR）を用いた、銅酸化物高温超伝導体の研究は、最近スピン・スピン緩和時間の詳細な実験が参加したことにより一般化磁化率の全貌が明らかとなり、種々のドーピング領域において、基本的な部分で収束の段階を迎えていると考えられる。今後は、それ等を理論的に解決していく過程で、強相関で特徴づけられている二次元 CuO_2 面内の電子物性が明らかとなり、併せて超伝導発現機構が解明されるものと期待したい。

特別講演2

Decoupling, Recoupling, and Dynamic Nuclear Polarization in Rotating Solids

R.G.Griffin
MIT, Cambridge, MA 02139

Composite pulses are used widely in liquid state experiments for ^{1}H spin decoupling. However, solid state MAS experiments have traditionally been performed with CW irradiation methods because the pulse train and the sample rotation interfere with one another. We have recently demonstrated that linewidths in MAS spectra can be reduced by factors of 2-5 with a simple two pulse, phase-modulated decoupling sequence. Optimization of the sequence produces substantial improvements in resolution of dilute spin MAS spectra over a broad range of spinning speeds at high magnetic fields.

In addition to providing approaches for decoupling, we have also developed techniques for recoupling spins in rotating solids. Rf pulse trains or sample rotation are used to reintroduce the homo- and heteronuclear dipole interaction and to measure internuclear distances and determine structures. We use these techniques to perform ^{13}C-^{13}C distance measurements in a nine amino acid peptide derived from the C-terminus of the β-amyloid protein associated with Alzheimer's disease. The peptide is insoluble and noncrystalline, and therefore solution NMR and diffraction techniques cannot be used to determine its structure. The intramolecular peptide backbone structure is a highly pleated β-sheet. We also obtain data on the intermolecular packing.

Dynamic nuclear polarization (DNP) transfers the large polarization of unpaired electrons to nuclei and thus significantly enhances the signal strength in nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. High frequency DNP has been implemented in solid state NMR experiments using 140 GHz gyrotron as a microwave source and nitroxide radicals as the the paramagnetic polarizing agent in a water:glycerol frozen solution. The ^{1}H and ^{13}C NMR signal strengths of both the solvent and an amino acid solute have been enhanced by a factor of 185, which represents a reduction of >102 in sample size requirements or >104 in signal acquisition time. This high frequency DNP study using a water:glycerol:nitroxide system opens the possibility of acquiring enhanced NMR spectra of large proteins, membranes and other macromolecular biological samples.

固体ＮＭＲ

P16

^{13}C NMRによる二量体液晶の配向特性の研究

東工大工　○清水レナット宣男　黒子弘道　古屋秀峰　安藤勲
東工芸大　安部明廣

Orientational Characteristics of a Dimer Liquid Crystal studied by ^{13}C NMR

○Renato Norio Shimizu, Hiromichi Kurosu, Hidemine Furuya, Isao Ando and Akihiro Abe

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology
Department of Industrial Chemistry, Tokyo Institute of Polytechnics

High-resolution variable-temperature ^{13}C NMR measurements have been carried out on a dimer liquid crystal namely α,ω-bis[(4,4'-cyanobiphenyl)oxy]decane (CBA-10). A large transitional change of the ^{13}C chemical shift was observed in going from isotropic to nematic phase. The principal values of the ^{13}C chemical shift tensor are determined by the Herzfeld-Berger method and the evaluation of the order parameter along the molecular axis is attempted, taking into account the conformational behavior of the flexible spacer in the frame of rotational isomeric state (RIS) approach.

はじめに

剛直なメソゲンと柔軟なアルキルスペーサーの交互からなる高分子液晶は、アルキル鎖のメチレン基数の偶奇により液晶相－等方相相転移に伴うエンタルピーおよびエントロピー変化に振動を示し、その値は低分子液晶に比べてはるかに大きい。これは液晶相の配向秩序の形成にスペーサーがかなり大きな寄与をしていることを示す。一方、二個のメソゲンをアルキル鎖でつないだ二量体液晶は上のような特徴を示し、高分子液晶の構造的挙動を理解するためのモデル化合物として用いられる。以前の結果[1]から二量体液晶であるα,ω-bis[(4,4'-cyanobiphenyl)oxy]decane（CBA-10, NC-φφ-O(CH2)10O-φφ-NC）はネマチック相においてスペーサーのコンホメーションをほぼ一定に保ち、液晶場の影響を受けて分子軸の配向が変化していることが分っている。本研究ではこのCBA-10の配向挙動を^{13}C 化学シフトの異方性を観測することにより詳細に調べることを目的とする。

測定

固体高分解能^{13}C NMRスペクトルは、温度可変装置付属の日本電子製GSX-270NMR(67.5MHz)分光器およびDoty社製のCP/MASプローブを用いて測定を行った。化学シフトの基準としては外部基準としてアダマンタン（29.5ppm）を、そしてパルスシーケンスはpulse saturation transfer法(PST法)を用いた。

^{13}C NMR　二量体液晶　オーダーパラメーター　回転異性状態近似　スペーサー

○しみずれなっとのりお、くろすひろみち、ふるやひでみね、あんどういさお、あべあきひろ

結果と考察

CBA-10は166.4°C～186.9°Cの間でネマチック相を形成するためネマチック相および等方相において^{13}C NMR測定を行い、得られたスペクトルをFig. 1 に示した。Fig. 1aは等方相（190.0°C）、Fig. 1bはネマチック相（MASの周波数、2729Hz、170.0°C）そしてFig. 1c)はネマチック相(static、171.0°C）のものであり、^{13}C 化学シフトにみられる温度に対する変化は明らかに分子の配向によるものである。またFig. 1b、1c両スペクトルの違いはサンプルの回転に起因するものと考えられる。[2]

一方、ネマチック相で分子が一軸配向しているため、等方相（σ_{iso}）および液晶相（σ_{LC}）における^{13}C 化学シフトは次式で関係付けることができる。

$$\sigma_{LC} = \sigma_{iso} + \frac{2}{3} S\,(\sigma_{//} - \sigma_{\perp})$$

$$\sigma_{//} = \sin^2\beta\,(\cos^2\alpha)\sigma_{11} + \sin^2\beta\,(\sin^2\alpha)\sigma_{22} + (\cos^2\beta)\sigma_{33}$$

$$\sigma_{\perp} = (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33} - \sigma_{//})/2$$

ここでSは分子のオーダーパラメーター、α, βは主軸系と分子軸系を関係付けるEuler角である。$\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$は化学シフトテンソルの主値であり、Herzfeld-Berger法[3]により求める。分子長軸は両メソゲンの中心を結ぶ線の方向（Fig. 2）にあると仮定する。また、ネマチック相において、スペーサー・コンホメーションはかなり制限されるが各コンホマーの配向を考慮する必要があるため、以上の解析を回転異性状態近似法[1]と併せて行う。即ち、各コンホマーの配向秩序度を求め、その統計力学的平均を計算する。

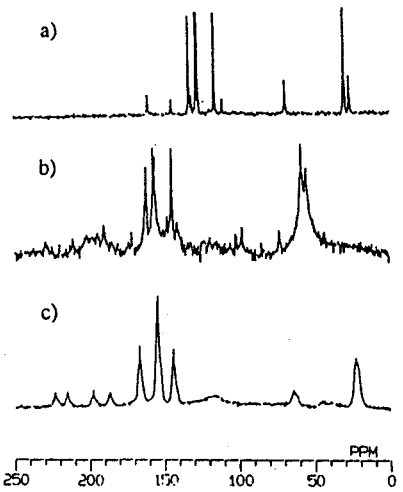


Fig. 1 ^{13}C PST spectra of CBA-10 recorded at different temperatures: a)190.0°C (isotropic state, with MAS); b)170.0°C (nematic state, with MAS); c)171.0°C (nematic state, static).

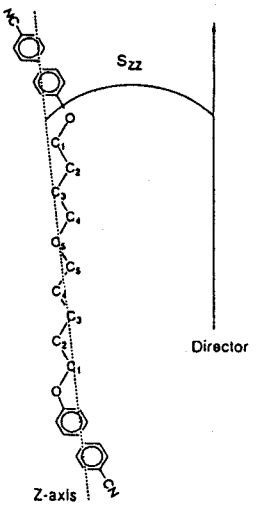


Fig. 2 Definition of the molecular axis.

1. Abe, A.; Furuya, H.; Shimizu, R. N.; Nam, S. Y. *Macromolecules* **1995**, *28*, 96.
2. Teeäär, R.; Alla, M.; Lippmaa, E. *Org. Magn. Res.* **1982**, *19*, 134.
3. Herzfeld, J.; Berger, A. E. *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 6021.

P17

固体 NMR による コレステリック液晶の オーダーパラメーターの決定

(京大理) ○西山 裕介 , 久保 厚 , 今城 文雄 , 寺尾 武彦

Evaluation of the order parameters of cholesteric liquid crystals by solid state NMR

We have recorded the ^{13}C CP(static) spectrum and the ^{13}C CP-MAS spectrum of the cholesteric liquid crystal. The peaks of the static spectrum are broader than those of the MAS spectrum. The center of each peak of the static spectrum is shifted from that of the MAS spectrum to higher or lower frequency. Assuming that the axis of the pitch is perpendicular to a magnetic field and that the molecular diffusion takes place along the pitch axis, we have simulated the spectrum.

1 はじめに

一般にネマティック液晶は、磁場方向の一軸のディレクターを持ち、NMR を使ってケミカルシフト異方性や、双極子相互作用、四極子相互作用などから、オーダーパラメーターが決定されている [1]。ところが、ネマティック液晶に分子構造の似たキラル分子からなるコレステリック液晶は、ピッチとともに一回転するディレクターを持つためネマティック液晶で仮定できた対称性が失われ、解析が困難となり、NMR を用いて各分子基のオーダーパラメーターは決定されていない。また、ネマティック液晶とは異なりコレステリック液晶では分子拡散が NMR スペクトルに直接の影響を与える。分子拡散が^{2}H の NMR スペクトルに与える影響についてはすでに Doane らによって解析されている [2]。分子拡散がケミカルシフトの異方性に与える効果を評価することによってケミカルシフトの異方性を得て、それをもとにコレステリック液晶のオーダーパラメータを決定することも可能になる。この目的のために今回、我々は、固体高分解能 NMR を用いてコレステリック液晶のケミカルシフトのパウダーパターンを測定し、それをもとにして分子拡散の影響を見積もった。

2 理論

ケミカルシフトテンソルの主軸方向をディレクター方向 (σ_{33}) とピッチ方向 (σ_{11})、それらに垂直な方向 (σ_{22}) と仮定する。分子の配向は、θ,ϕ の二つの角で与えられるがコレステリックであることを考えるとパウダーパターンは、このうち一つについて積分することによって得られる。ディレクター回りの回転により軸対称テンソルになることを仮定する ($\sigma_{11} = \sigma_{22}$) と、化学シフトの角度依存性は

$$\sigma(\theta) = \frac{\sigma_{11}+\sigma_{33}}{2} + \frac{\sigma_{33}-\sigma_{11}}{2}\cos 2\theta \qquad (1)$$

となる。分子拡散にブラウン運動を仮定して時刻 0 においてθ_0 の配向を取っていた分子の時刻 t における ケミカルシフトを Doane らと同様の手法を用いて計算すると

$$\bar{\sigma}(\theta_0, t) = \frac{\sigma_{11}+\sigma_{33}}{2} + \frac{\sigma_{33}-\sigma_{11}}{2}\cos 2\theta \exp(-\frac{16\pi^2 Dt}{p_0^2}) \qquad (2)$$

ただし、D は拡散係数であり p_0 はピッチである。(2) 式を用いて、数値的に FID のシミュレーションを行った。

キーワード : 液晶 NMR, ケミカルシフトパウダーパターン, 分子拡散, ^{13}C NMR, コレステリック液晶

○にしやま ゆうすけ、くぼ あつし、いましろ ふみお、てらお たけひこ

3 実験方法

試料として Benzenamine,N-[4-(ethoxy phenyl)methylene]-4-(2-methylbutyl)-(S) (以下 EBMBA) を用いた。実験装置は、Chemagnetics CMX300 spectrometer を用いた。ケミカルシフトの等方値は ^{1}H デカップリングクロスポーラリゼーション (CP) マジックアングルスピニング (MAS) により測定し、パウダーパターンは ^{1}H デカップリング CP により測定した。

4 実験結果と考察

実験結果を Fig.1 にしめす。分子運動のため、静止スペクトルもかなり先鋭化しているが、分子が配向しているため、 MAS スペクトルに比べてピークの位置がシフトしている。

コレステリック液晶のパウダーパターンは、分子拡散のないとき Fig.2(a) のようになるが、分子拡散によって Fig.2(b),(c) のように変化する。また、Fig.2(d) はこのピークの MAS スペクトルであるがパウダーパターンの peak が MAS のピークに比べてシフトしてることがわかる。

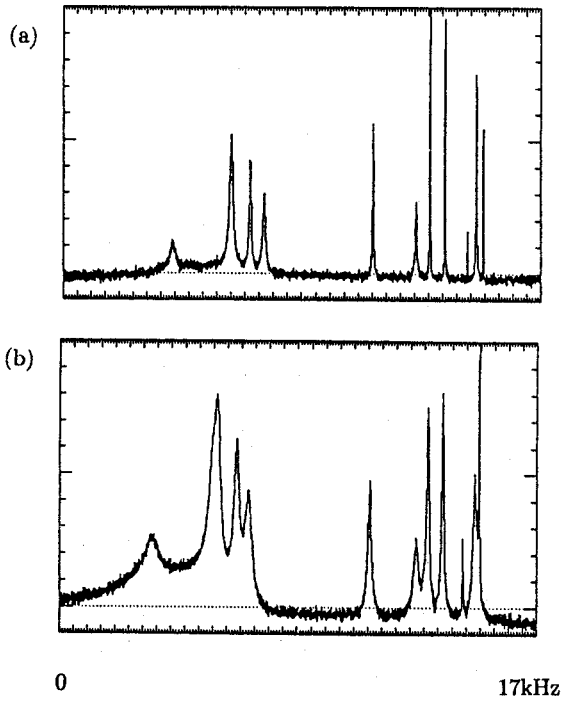


FIG 1: 75MHz ^{13}C CP NMR spectra of EBMBA recorded at 35°C with a 50kHz ^{1}H-decoupling,a 2ms cross-polalization time and a 2s recycle delay. (a) MAS frequency:2kHz, number of transients:512. (b) static, number of transients:4096.

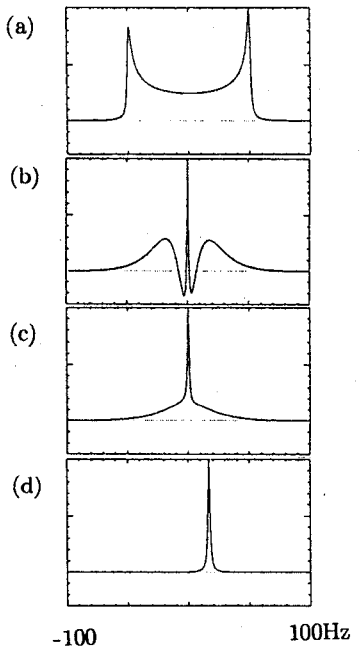


FIG 2: (a) simulated chemical shift powder pattern of cholesteric liquid crystal without diffusion. (b) same as (a) under the diffusion of $k = \frac{16\pi^2 D}{p_0^2} = 50$. (c) $k = 150(s^{-1})$. (d) simulated MAS NMR spectrum.

5 参考文献

[1] J. W. Emsley, in "*Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals*", D. Reidel Publishing Company, Holland, (1985)

[2] G. Chidichimo, Z. Yaniv, N. A. P. Vaz, and J. W. Doane, Phys. Rev. A 25, 1077 (1982)

P18　結晶及び液晶における異方的拡散係数テンソルの測定

（分子科学研究所）○宮島　清一、大石　修

Measurement of Anisotropic Self-Diffusion Coefficient Tensors in Crystals and Liquid Crystals

by Seiichi Miyajima and Osamu Oishi
(Institute for Molecular Science, Myodaiji,Okazaki, 444,Japan)

Application of pulsed field gradient NMR method to the study of slow and anisotropic self-diffusion is reported. To test the ability of measuring slow dynamics, the temperature-dependence of glycerol diffusion was measured, and gave good agreement with the known data. The diffusion coefficients component of the smectic liquid crystalline CBOOA was measured as a function of the angle between the quadrupole coil axis and the main external field. The component corresponding to the diffusion across the smectic layers was found to be 2.8 times larger than that within the smectic layer.

【序論】

パルス磁場勾配(PFG)NMR法を用いて異方的な拡散係数テンソルを測定することができる。講演P19で製作した装置を用いて比較的遅い拡散係数を持つ標準試料としてのグリセロールの拡散係数の温度依存性と、異方的拡散係数のを持つものとして4-Octyloxy-N-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA)のスメクティックA相の拡散係数の角度依存性を測定した。

【異方的拡散係数の測定】

P19の4極コイルにおいて、磁場勾配の線型性の高い領域においては

$\partial Bz/\partial z = (-2\mu_0 I/\pi a^2)\sin 2\phi$, $\partial Bz/\partial x = (2\mu_0 I/\pi a^2)\cos 2\phi$

と近似できる。zx面内で試料の軸（例えば液晶の配向ベクトル）をz''、これに直交する軸をx''とし、zとz''のなす角をθ_0とすると

$\partial Bz/\partial z'' = (2\mu_0 I/\pi a^2)\cos(2\phi - \theta_0)$, $\partial Bz/\partial x'' = (2\mu_0 I/\pi a^2)\sin(2\phi - \theta_0)$

となるので、例えば$\phi = \theta_0/2$となるように角度を設定するとz''方向に最大かつ均一な磁場勾配が生じ、これに直交する方向には磁場勾配が消失する。こうしてz''方向のテンソル成分が測定できる。

【グリセロールの拡散係数の温度依存性】

測定はHahn's two pulse echoに2発の磁場勾配を加えたtwo pulse echo法を用いた。この方法ではスピンエコー強度の減衰率は、磁場勾配強度(G)、磁場勾配パルス幅(δ)、拡散時間(Δ)を変えながら測定できるが、T_2が短い化合物を測定する時を想定してΔ=4 ms、G=6.23 T/m (設計値)に固定し、δを0.5 msから0.5msおきに3 msまで変化させてエコー強度の変化を測定した。設計値のコイル定数から計算された拡散係数は

異方的拡散・液晶・磁場勾配

みやじませいいち・おおいしおさむ

文献値とよく一致しており、本装置が設計通りの性能を有していることがわかった。また、10^{-11} m^2s^{-1}という液晶程度の拡散係数の領域で正確な実験ができることがわかった。

【CBOOAの異方的拡散係数】

CBOOAがスメクティックA相を示す75℃において、4極コイルの回転角(ϕ)を4.5°おきに回転させながらtwo pulse echo法と魔法角配向(MAO)法を用いて拡散係数を測定した。4極コイルを主外部磁場に対してϕだけ回転させると、主外部磁場に対して2ϕ方向にある拡散係数の成分を求めることが出来る。観測される拡散係数$D_{obs}(\phi)$はスメクティック相が一軸対称性を持つことを考慮すると

$$D_{obs}(\phi)=D_{\perp}\sin^2 2\phi+D_{//}\cos^2 2\phi$$

と表され、$D_{obs}(\phi)$は周期$\pi/2$の単振動となる。得られた拡散係数の角度依存性はよく理論曲線と一致しており、ϕ=0°、45°の時の観測値が各々$D_{//}$（層法線方向成分）、$D_{\perp}$（層内方向成分）に対応する。最少二乗法によるフィッティングにより求められた拡散係数はそれぞれ$D_{\perp}$=1.86 x 10^{-11}、$D_{//}$=5.20 x 10^{-11} m^2s^{-1}であった。拡散異方性$D_{//}/D_{\perp}$は2.8であり、層法線方向の成分($D_{//}$)の方が層内で拡散する成分($D_{\perp}$)より大きいことがわかった。これはこの物質のスメクティックA相の非常に乱れの大きい特質と密接に関わっている。

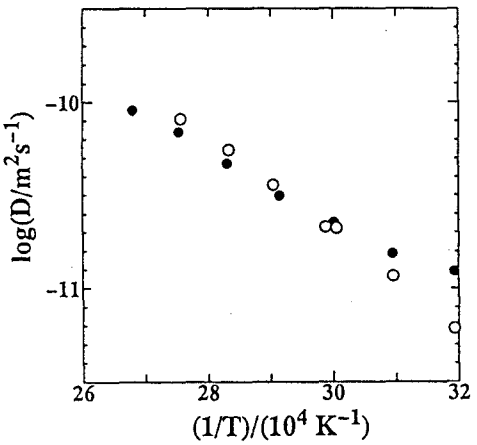


Fig. 1 Self-diffusion coefficients of glycerol

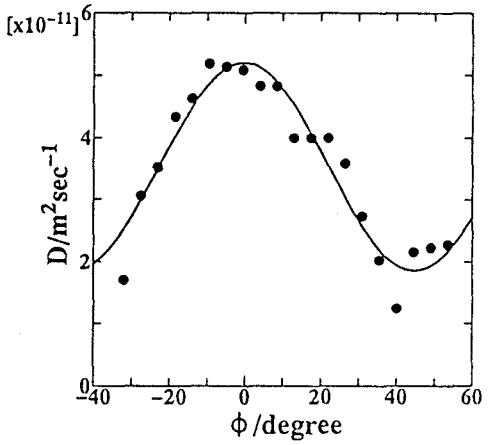


Fig. 2 Anisotropic self-diffusion coefficients of CBOOA (75℃)

【まとめ】

今回作成したパルス磁場勾配NMR装置はその基本性能においてほぼ設計値通りの性能を有していることが示された。今回は最も基本的なパルス配列(two pulse echo)において10^{-11} m^2s^{-1}の拡散係数まで測定できることを示したが、T_1が1秒以上ある物質に対してはパルス系列にstimulated spin echo[2]を用いることによりさらに1/100程度の10^{-13} m^2s^{-1}までの異方的拡散係数を測定できる。

1)S. Miyajima et. al., Chem. Phys. Lett., 212, 277(1993)
2)J. E. Tanner, J. Chem. Phys., 52, 2523(1970)

P19 固体、液晶用パルス磁場勾配NMR装置の開発

（分子科学研究所） ○大石 修、宮島清一

Design and Construction of Pulsed Field Gradient NMR Spectrometer for Solids and Liquid Crystals

by Osamu Oishi and Seiichi Miyajima

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

We designed and constructed a new pulsed field gradient NMR spectrometer for the study of slow and anisotropic self-diffusion in solids and liquid crystals. It has been shown that rotatable quadrupole coil generates intense and homogeneous field gradient in fairly large area. The spectrometer passed preliminary test experiments such as proton NMR imaging and the diffusion measurement of water.

【序】 パルス磁場勾配 (PFG) NMR 法は液体における分子の並進拡散を測定するために活用されており、固体中でも、高速で拡散している化学種が存在する場合に測定例がある。しかしこの手法を、強く双極子結合した（短いT_2を持った）系や、拡散が遅く、かつ異方的な系に適用することは、依然として容易でない課題である。

液晶においては、同種及び異種核間双極子結合が強く、また、並進拡散の異方性がその諸物性に重要な影響を及ぼしている。このため PFG-NMR 法を適用すべき対象として、これまでにもいくつかの努力が払われてきた。多重パルス法による同種核間双極子結合の消去[1]がBlincらによって試みられたが、その後この手法の限界も指摘され、粘性の高いスメクティック液晶の場合には魔法角配向(MAO)法の方が有効であることが示された[2,3]。低粘性の系であるネマティック液晶では、過渡的MAO法とも言うべき、主外部磁場の方向を高速スイッチングする方法が試みられている[4]。Pines, Vold らは実効磁場勾配を強めるために多量子コヒーレンスを用いている[5]。いっぽう、我々は、回転４極コイルを用いて主外部磁場方向の成分 B_z の任意の方向 (χ) に関する一次偏導関数 $\partial B_z/\partial\chi$ を一定にでき、しかもそれに直交する方向の成分をゼロにできることを示した[3]。このことは拡散異方性の測定に極めて有効である。また、４極コイルによって強力な磁場勾配を作り出せれば、多量子コヒーレンスの方法に代わるものともなりうる。

こうした状況の中で、液晶と有機結晶を対象として異方的で遅い拡散を測定するためには、回転４極コイルを用いてできる限り強力でかつ線型性の高い２次元磁場勾配を発生させ、それにいくつかの尖鋭化 (line-narrowing) の技術

キーワード：パルス磁場勾配ＮＭＲ、自己拡散、装置
おおいし おさむ、 みやじま せいいち

を適用すること、つまりスメクティック液晶にはMAO法で^{1}H-NMRを、ネマティック液晶や柔粘性結晶には^{1}Hデカップルと交差分極を伴った^{13}C-NMRを行うことが当面、最も有効なアプローチであると考えた。

【磁場勾配の設計】　主外部磁場をz方向にとり、図1のように、zx面内で磁石の中心から半径aの円周上の等間隔の4点にy軸に平行に長い導線を張り、これに図のような方向で定常電流Iを流すと、発生する磁場のz成分は

$$B_z = \frac{\mu_0 I}{2\pi a}\sum_{j=o}^{3}\frac{(-1)^j\left[\frac{x}{a}-\sin(\phi+\frac{\pi}{2}j)\right]}{\left[\frac{z}{a}-\cos(\phi+\frac{\pi}{2}j)\right]^2+\left[\frac{x}{a}-\sin(\phi+\frac{\pi}{2}j)\right]^2}$$

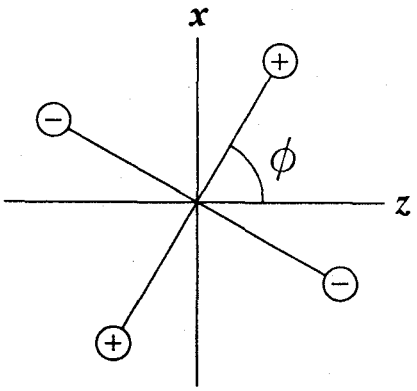


Fig. 1. The Quadrupole Coil. The z-axis is taken parallel to the main external field.

とあらわせる。これをもとにB_z及び　$\partial B_z/\partial z$をシミュレートしたのが図2である。回転角ϕ＝45°の時にz方向に最強の磁場勾配が生じ、その線型性もよい。試料空間を半径$0.2a$以内にとれば、磁場勾配の不均一性は1％未満、$0.3a$以内では4％未満である。リード線の太さを考慮に入れると、この不均一性はもっと小さくなる。

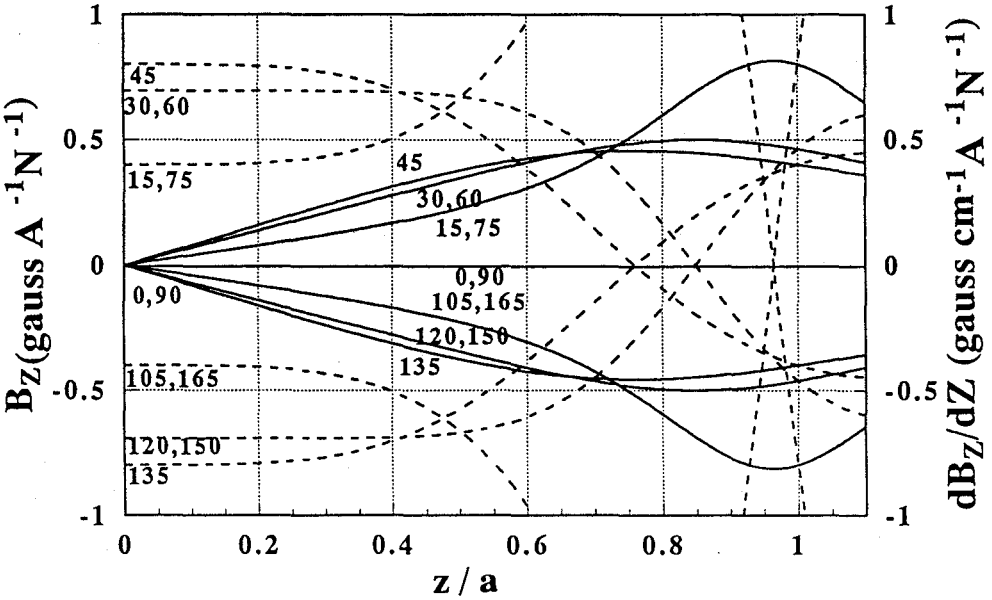


Fig. 2. Spatial distribution of B_z (solid line) and $\partial B_z/\partial z$ (dotted line).

我々は、a =6.5 mm の 4 極コイルを製作し、内径 3.2 φ, 4.2 φ の石英管を試料管として用いた。これらは $2a$ に対して各々 25%, 32% のサイズにあたる。$\partial B_z/\partial z = cI$ によってコイル定数 c を定義すると、我々のコイルの設計値は c= 0.156 T m^{-1} A^{-1} である。50 A のパルス電流によって 7.8 T m^{-1} (780 G cm^{-1}) の磁場勾配を発生できる。安定化電源から配給される正負電荷を各々 0.125 F のコンデンサに蓄わえ、MOSFET (2SJ50 + 2SK135) 各々12個を並列接続したスイッチング回路と負帰還による安定化回路でパルス電流を発生させている。

【プローブヘッドと分光器】
図 3 に示すように、プローブヘッドの特徴は、①主外部磁場に対して 4 極コイルと試料を各々独立に回転できる構造、② -180 ℃~+250℃程度の温度可変測定のためのステンレス鋼製真空 2 重槽型クライオスタット、③ ^{13}C- {^{1}H } 二重共鳴型の整合回路である。但し、二重共鳴の実験はまだ試行中であり、本討論会では^{1}H単共鳴のデータのみ紹介する。

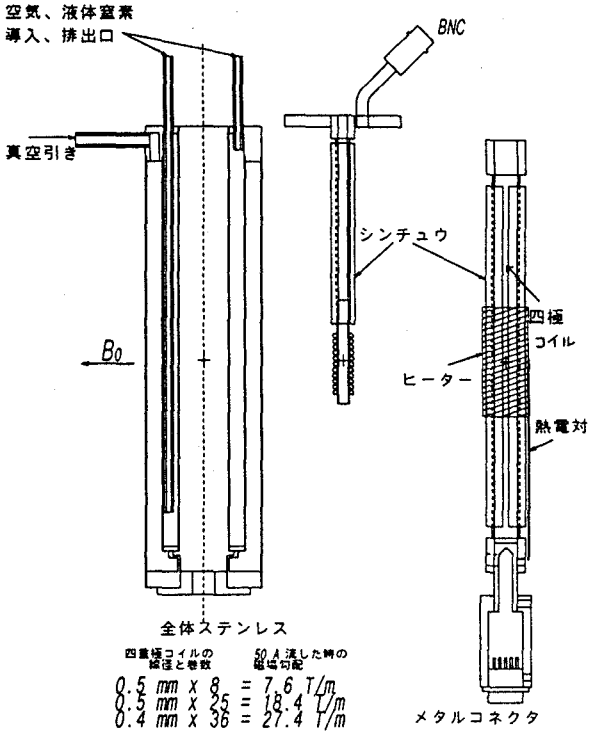


Fig. 3. The cryostat and probehead.

分光器のその他の部分は JEOL の1.4 T 電磁石、送信側には HP3335A シンセサイザ、自作のパルスプログラマ（コンピューター制御）と変調器、増幅器、井上電子特注品のパワーアンプ、受信側には Thamway N-141 前置増幅器、R&K 社とMCL 社のコンポーネントからなる主増幅器と直交検波器、パルスコントロールとデータ格納用に PC9821Ap (NEC) などである。

【実験結果】(1) 水のイメージング。　内径 2.4 φ の石英管に水を入れ、この FT スペクトルを磁場勾配下で測定することにより、円筒形の水試料の断面をイメージすることができた。この測定から、コイル定数として設計値と非常に近い値 を得た。また、磁場勾配下での FID を 第一 Bessel 関数に回帰する方法でも設計値に近い結果であった。

(2) 水の拡散係数。　Hahn's two pulse echo に磁場勾配パルスを加えると、スピンエコー強度の減衰率は

$$\frac{A(G,\delta,\Delta)}{A(0,0,0)} = \exp\left[-(\gamma G\delta)^2(\Delta-\delta/3)D\right]$$

とあらわされる。ここに D がスカラー拡散係数である。FG の強さ（G）、FG パルスの幅（δ）、拡散時間（Δ）の各々を変化させて 3 種類の方法で 23℃の水のスピンエコー減衰プロットを描いたのが図 4 である。Gを決めるのに、コイル定数の設計値を用いた。3 種の方法で共通の値 D=1.9×10^{-9} m^2 s^{-1} が得られたこと、及びこの値が 25℃の文献値 (2.14×10^{-9} m^2 s^{-1} by radio-tracer, 2.23×10^{-9} m^2 s^{-1} by ^{1}H-NMR) に近いことから、この装置が全体として正しく機能していることが明らかになった。

【まとめ】　結晶及び液晶中の遅くて異方的な拡散係数テンソルを測定することをめざして、パルス磁場勾配 NMR 装置を製作した。水を使った一連の試験測定により、性能が正しく発揮されていることが明らかになった。

1) R. Blinc et al., *Phys. Rev. Lett.*, **30**, 546 (1973).

2) G. J. Krüger, *Phys. Rep.*, **82**, 229 (1982).

3) S. Miyajima et al., *Chem. Phys. Lett.*, **212**, 277 (1993).

4) F. Noack, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **113**, 247 (1984).

5) J. F. Martin et. al., *J. Chem. Phys.*, **76**, 2632 (1982), D. Zax et al., *J. Chem. Phys.*, **78**, 6333 (1983).

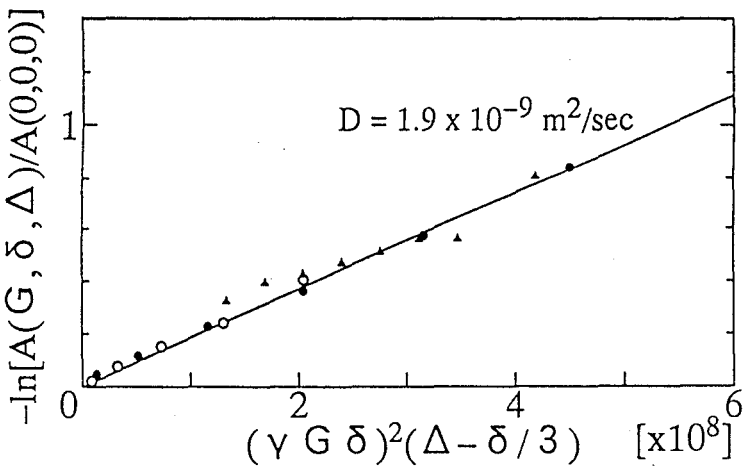


Fig. 4. ^{1}H-NMR spin echo decay plot of water at 23°C as a function of $(\gamma G\delta)^2(\Delta-\delta/3)$. The symbols ○, ●, and ▲ stand for the data taken by varying G, δ, and Δ, respectively.

P20 固体NMR法を用いたペプチドの構造研究

（東工大・生体分子[1], 高分子[2]）O浅川直紀[1]、安藤勲[2]、櫻井実[1]、井上義夫[1]

A Structural Study of Peptides and by Solid State NMR

ONaoki Asakawa[1], Isao Ando[2], Minoru Sakurai[1], Yoshio Inoue[1]
1) Department of Biomolecular Engineering and 2) Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

ABSTRACT: So far, it has been quite obscure whether the chemical shift tensor for the L-alanine residue α-carbon in peptides is sensitive to the differences in hydrogen-bonded structure. We made the extended chemical shift modulation(XCS) experiments in order to determine the small chemical shift anisotropy for the α-carbon in some solid peptides. From our NMR measurements and 4-31G-gauge invariant atomic orbital-coupled Hartree-Fock(GIAO-CHF) chemical shielding calculations, we found that the hydrogen-bonding causes the deviation of the chemical shift tensor components for the L-alanine residue α-carbon which have various main-chain dihedral-angles and hydrogen-bond distances.

Introduction: NMR chemical shift provides information about electronic structure around a nucleus. Particularily, principal values of chemical shift tensor involve the information about three-dimensional electronic structure and molecular motion, in addition to orientation of principal axis system with respect to molecular fixed frame. So far, it has been demonstrated that the chemical shift tensors for the carbonyl-carbons in several amino acid residues show the explicit dependence on hydrogen-bonding structure and main-chain dihedral-angles. On the other hand, chemical shift tensors for the α- and β-carbons have not yet determined because of small anisotropies and severe spectral overlaps. It is well known that the isotropic chemical shifts for the α- and β-carbons vary in associated with changes in electronic structure originated from the conformational isomerizations. This is called as 'the conformation-dependent chemical shift.' However, in the case of peptides, the term 'conformation-dependent' implies the dependence on not only 'the main-chain dihedral-angles' and but also 'the hydrogen-bonded structure.' Thus, in order to estimate the dependence of chemical shift for the α-carbon, we made the *extended chemical shift modulation*(XCS)[1] experiments for some peptides containing the L-alanine residue whose molecular structures in the crystalline state are already available.

keywords: ^{13}C, solid state NMR, XCS, peptide, molecular structure, chemical shift

あさかわなおき・あんどういさお・さくらいみのる・いのうえよしお

Experiments: Solid State NMR measurements were performed by JEOL GSX-270 NMR spectrometer equiped with the CP-MAS accessory. The rf-field intensity for the carbon-channel was 54kHz(4.6μs for the 90 degree pulse); the contact time for the matched cross-polarization between ^{1}H and ^{13}C was 2ms; the heteronuclear dipolar decoupling during acquisition period was carried out at the same intensity as ^{13}C channel. The MAS speed was at 2778Hz+/-5Hz;this corresponds to the rotor period of 360μs. The cross-polarization procedure is followed by the extended chemical shift modulation(XCS). Fig.1 shows the pulse sequences for the XCS with the effective rotor cycles of 2. NMR measurements include three steps. First, we made the XCS-plus and XCS-minus measurements with eight t_1-values. Secondly, we made both addition and subtraction for each data, and then obtained eight pairs of real(M_x') and imaginary part(M_y') for the complex magnetization. With taking into account of the magnitude of a carrier off-resonance, we made calculations for the true real(M_x) and imaginary part(M_y) by using the following equations:

$$M_x(t_1) = M_x'(t_1)\cos[\phi(t_1)] + M_y'(t_1)\sin[\phi(t_1)]$$
$$M_y(t_1) = -M_x'(t_1)\sin[\phi(t_1)] + M_y'(t_1)\cos[\phi(t_1)]$$
$$\phi(t_1) = 4\pi N_c \nu_{off} t_1$$

, where N_c is the effective rotor cycles; ν_{off} is the carrier off-resonance frequency.

Thirdly, 16 points Fourier transformation with 8 pairs of M_x +i M_y and the complex conjugates, was carried out. *Then, we*

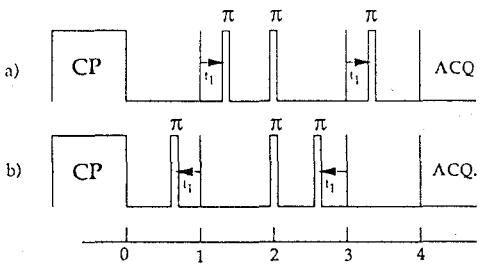


Fig.1 Pulse sequences for the extended chemical shift modulation (XCS). As a example, the sequences for the effective rotor cycles(N_C) of 2, are shown; a) the XCS plus and b) XCS minus sequences, respectively.

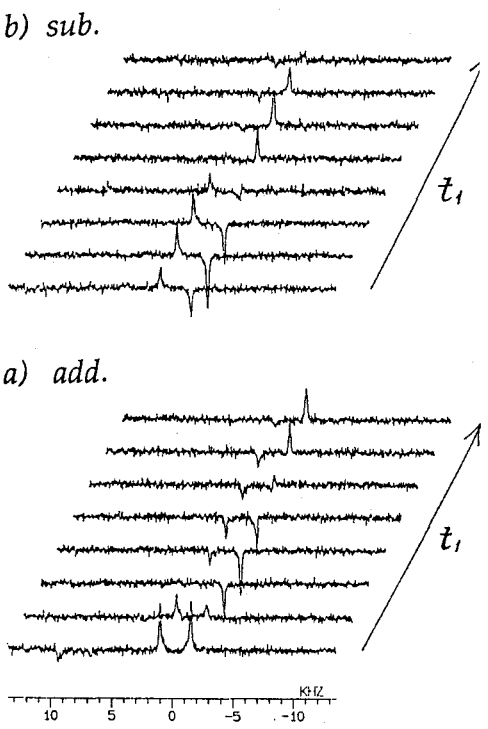


Fig.2 Stack spectra of (L-Ala)n (Mw=50,000) measured by XCS-Nc=2; botom: addition-spectra and top: subtraction -spectra between XCS-plus and XCS-minus, respectively.

obtained MAS sideband pattern at the MAS speed of $\nu_r/4$; here, ν_r is the actual MAS speed. This way, the enhancement of MAS sideband intensities can be performed. This approach enables us to determine small anisotropies of chemical shift tensors for the α- and β-carbons in amino acid residues in solid peptides.

Results and Discussion: Fig.2a and b show the addition- and subtraction-spectra for poly(L-alanine) [α_R-helix form;$<M_w> \approx$ 50,000] by the XCS(Nc=2) measurements, as a function of t_1. All the measurements were carried out at the MAS speed of 2778Hz. The signal for the L-alanine Residue α-carbon was set at 1kHz off-resonance condition, because in the case of on-resonance, we experienced difficulty to estimate the intensity of the imaginary part(M_y') - for the signal was almost aligned to the real-axis of the magnetization. From these measurements, we were able to build the sideband pattern at the MAS speed of 694Hz(Fig.3). By employing Herzfeld-Berger analysis, we determined the principal values of the chemical shift tensor for the α-carbon, as (δ_{11}, δ_{22}, δ_{33}) = (67, 60, 32)[the unit is p.p.m. from TMS]. We are also trying to perform the similar measurements for some other peptides containing the L-alanine residue. The results are listed in Table 1 with their X-ray crystallographic geometries. In order to gain further insight on the chemical shift behavior, we made 4-31G-GIAO-CHF chemical shielding calculations as well. The L-alanine dipeptide model, N-acetyl-N'-methyl L-alanine amide, was employed as a model compound for the

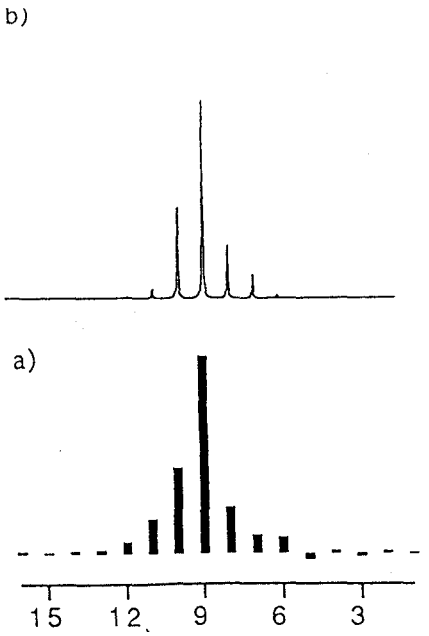


Fig.3 SSB intensities of the L-alanine residue α-carbon in (L-Ala)n at MAS speed of 694Hz; a) the observed and b) the calculated. XCS(Nc=2) experiments were performed at MAS speed of 2778Hz.

calculations; no hydrogen-bondings were considered in the calculations. Table 1 also shows the comparison between the experimental and the calculated chemical shifts for the samples used here. From this figure, we found that the hydrogen-bonding formed by the carbonyl-group affects principal values of the chemical shift tensor for the L-alanine residue α-carbon; specifically, the effects on δ_{22} and δ_{33} are large. The detailed discussion will be made at the meeting.

References

1) T.Gullion, J.Magn.Reson., 85, 614(1989)

Table 1 Observed chemical shifts(δ) and theoretical shielding constants(σ) for L-alanine residue α-carbon in some solid peptides, with their X-ray diffraction crystallographic geometries

sample	$\delta_{iso}/\sigma_{iso}$	δ_{11}/σ_{11}	δ_{22}/σ_{22}	δ_{33}/σ_{33}	$R_{N\cdots O}$(Å)	ϕ	φ	ω
L-$(Ala)_n$(α^R-helix)	53.0	67	60	32	2.87	-57.4	-47.5	-179.8
	45.52	61.9	43.7	30.9				
Ac-L-Ala-NHMe	49.3	66	53	32	2.92	-84.3	159.0	173.3
	50.4				2.72	-87.6	154.8	171.9
	43.72	65.8	45.5	18.9				
Boc-L-Ala-Aib-OH	52.3	64	60	32	2.58*	-66.3	-24.1	171.8
	45.71	64.7	46.0	26.4				
L-alanine(amino acid)**	51.2	65.1	56.5	31.3				

* *The intermolecular hydrogen-bond between the L-Ala residue carbonyl-group and the Aib carboxylic-group.*

** *The experimental results by Naito et al., J.Chem.Phys., 74,3190(1981)*

P21　固体高分解能^{13}CNMRによる^{13}C標識バクテリオオプシン-レチナール相互作用の解析

(姫工大・理)　辻　暁、○山口　悟、内藤　晶、斉藤　肇

A High-resolution Solid-Stase ^{13}C-NMR Study of Interaction between Bacterioopsin and Retinal.

Satoru Tuzi , ○ Satoru Yamaguchi , Akira Naito and Hazime saitô
Depertment of Life Science, Himeji Institute of Technology

We have recorded ^{13}C NMR spectra of [3-^{13}C]Ala labeled bacteriorhodopsin (bR), bacterio-opsin (bO) and retinal analog - bO complex in order to clarify how conformation and dynamics of extramembranous loops and transmembrane α–helices are aitered by removal of retinal from bR. It is noteworthy that conformational and dynamical changes were demonstrated in the transmembrane α–helices. Increase of motional flexibility by removal of retinal is characteristic of the loop and a part of the transmembrane helices in bO whose correlation time is in the order of 10^{-5} s as determined by measurements of spin dynamics. The presence of such motional flexibility seems to be very important to allow refolding of bO into the native form of bR by a specific interaction with retinal.

1　序論

Bacteriorhodopsin(bR)は高度好塩菌の細胞膜に局在する膜内在性光プロトンポンプ蛋白質で、7本のα–ヘリックスを持ち、その中央に発色団であるレチナールがLys216とシッフ塩基結合で結合している。レチナールの光異性化とそれに続く蛋白質高次構造の変化は光プロトンポンプの反応サイクルにおいて重要な役割を果たすと考えられており、生体膜中におけるレチナール-蛋白質間の相互作用を分子レベルで解析する必要がある。^{3}C標識蛋白質の固体高分解^{13}CNMRによりレチナールのアポ蛋白質の高次構造に対する寄与を直接解析出来る。本研究では、アラニン残基の側鎖メチル炭素に^{13}C標識を導入したbRから、レチナールを除去して得たBacterioopsin (bO)を試料とし、レチナールの脱

固体高分解NMR,バクテリオロドプシン,レチナール, 高次構造,ダイナミックス

つじ　さとる、やまぐち　さとる、ないとう　あきら、さいとう　はじめ

離による高次構造への影響と、bOにレチナールの類似体を導入した場合の高次構造変化を解析し、レチナール-アポ蛋白質の相互作用に関する知見を得たので報告する。

2　実験

試料調製

標識bRを含む紫膜は[3-^{13}C]Alaを含む合成培地で高度高塩菌(Halobacterium salinarium) を培養することによりバクテリオロドプシン(bR)のアラニン側鎖を^{13}C標識して得た。またこの試料にNH_2OHを加え、光照射を行なうことでLys 216 とレチナールとのシッフ塩基結合を切断し,Bovine serum albuminで洗浄することによりバクテリオオプシン(bO)を得た。レチナール類似体-bO複合体は、これにレチノールと β-イオノン をそれぞれ添加することで調製した。

3　結果と考察

1）　レチナール除去によるコンフォメーションの変化

図 1 に[3-^{13}C] Ala標識のbRとbOの20℃、-20℃における^{13}CCP-MAS NMRスペクトルを示す。これまでに得られている結果より、14.5～15.5ppm,15.5～16.5ppm , 16.5～17.5ppm の信号は、

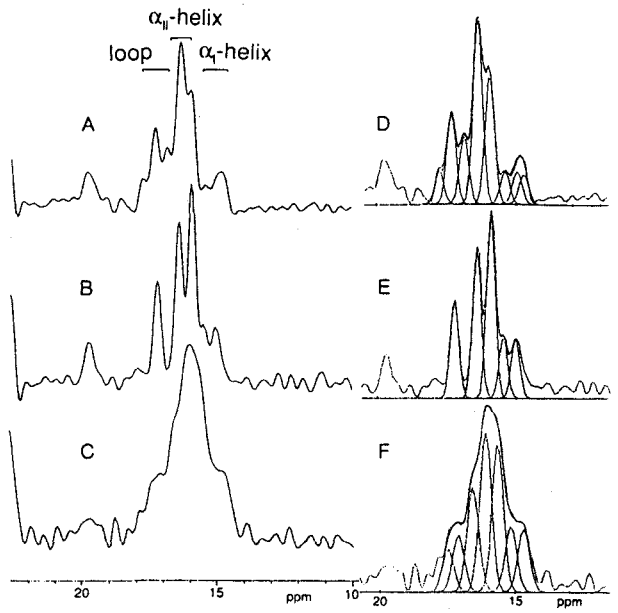


Figure 1　100.7 MHz ^{13}C CP-MAS NMR spectra of [3-^{13}C]Ala-bacteriorhodopsin recorded at 20° C (A) and of [3-^{13}C]Ala-bacteriopsin at 20 C (B) and at -20° C (C). Deconvoluted spectra, D, E, and F correspond with A, B, and C, respectively.

それぞれα_I-helix , α_{II}-helixおよびloop部位に帰属されている。[1) 2)] 図１のA、BよりbRからレチナールを除去することにより、α_{II}-helixの16.0ppmと16.3ppm の信号強度が変化し、さらに16.8ppm と17.7ppmのloop部位の信号が消滅してしまっているのが分かる。信号強度を定量的に取り扱うため図２にDD-MASス

ペクトルの測定を行ないガウス曲線でデコンボリューションを行なった。このデコンボリューションしたピークの中で膜貫通α-ヘリックスのみならずループ部位も含め、bRとbOの強度比の変化についてbRには29残基のAla残基が存在する事を考慮すると、少なくとも11個のAla残基に相当する信号変化が見られた。

2）レチナール除去によるダイナミックス変化

A、Bのloop部位に注目すると、bR-では、16.8,17.3および17.7ppmに3本の信号が観測されるのに対し、常温下のbOでは17.2ppmの信号のみが観測された。それに対し-20℃におけるbOのスペクトルではbRの信号のとほぼ同じ位置に信号が観測された。bOにおいてレチナールの除去によってloop部位の運動性が上昇し、16.8,および17.7ppmの信号は速い構造の交換により17.2ppmの信号と重複したと考えられる。このことからレチナールはループ部位の運動性に影響しており、除去によってループの揺らぎが増加することが分かる。表1はbR、bOそれぞれに関する^{13}Cスピン格子緩和時間(T_1)、交差緩和時間(T_{CH})、回転座標系の^{1}Hスピン格子緩和時間($T_{1\rho}$)である。loop部位に存在する17.2 ppmの信号のT_{CH}と$T_{1\rho}$で有意な差が認められる。T_1に変化が見られいのに対しT_{CH}、$T_{1\rho}$がbOでbRの約1.7倍の値をとることからbOにおいては10 ^8H_Z付近の速い運動成分は変化していないが10^5H_Zよりは速い運動成分の増加があることが分かる。上述の結果はbRからレチナールを除去することにより膜貫通α-ヘリックス構造の一部で構造変化が生じると共に膜表面に近いループ部位にゆらぎの増大が生じることを示している。

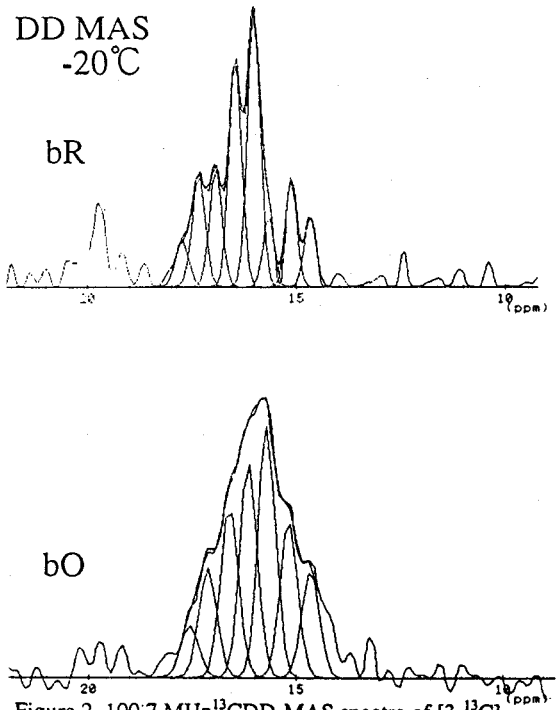


Figure 2 100.7 MHz ^{13}CDD-MAS spectra of [3-^{13}C] Ala-bacteriorhodopsin recorded at -20℃ and of [3-^{13}C]Ala-bacterioopsin at -20℃

Tabel I ^{13}C Spin-lattice Relaxation Times (T_1), Cross Polarization Times (T_{CH}) and Proton Spin-lattice Relaxation Times in the Rotaing Frame($T_{1\rho}$)of bR, bO and Lipid Methyl Groups.

		Apo-protein					Lipid methyl	
		17.2 ppm (a)	16.3 ppm (b)	16.5 ppm	15.9 ppm (c)	15.0 ppm (e)	22.5 ppm (terminal)	19.5 ppm (side)
bR								
	T_1 (s)	0.38		0.55		0.59	0.59	0.54
	T_{CH}(ms)	0.13		0.12		0.12	1.4	0.40
	$T_{1\rho}$ (ms)	6.5		5.9		7.4	24.2	5.98
bO								
	T_1 (s)	0.35	0.36			0.44	1.1	0.74
	T_{CH}(ms)	0.23	0.16		0.17	0.14	1.3	0.32
	$T_{1\rho}$ (ms)	11.0	6.4		11.2	6.3	> 30	21.1

3） レチナール類似体-bO複合体の コンフォメーション

bOにレチナール類似体でありシッフ塩基結合を欠くレチノールを導入した試料について測定を行ないレチナールアポ蛋白質の相互作用についてより詳細な情報を得ることを試みた。図３はbOとレチノール-bO複合体のDD-MASスペクトルおよびその差スペクトルをしめす。15ppmから16.7ppmのヘリックス部分は正に大きな信号を示し、17.2から17.4ppmの部分は負に大きな信号を示している。このことからレチノールを導入することでイオノン環およびポリエン鎖部分とアポ蛋白質の相互作用により変化が生じα-ヘリックスの減少とループ構造の増加が起きることが分かる。

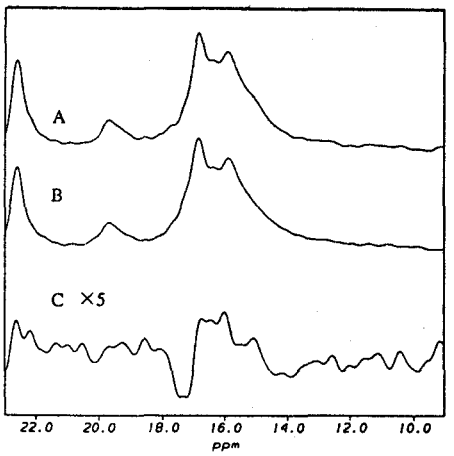


Figure 3 100.7MHz ^{13}C NMR spectra of bO (A), retinol-bO complex (B) and their difference spectrum (C).

1) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, Eur. J. Biochem., 218, 837-844(1993).

2) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, Biochemistry, 33, 15046-15052(1994).

P22 固体高分解能NMRによるエンケファリン結晶構造と分子運動の研究

（姫工大理）内藤　晶・○上平　美弥・辻　暁・斎藤　肇

Dynamics of enkephalin molecules in the crystals as studied by high resolution solid-state NMR

Akira Naito・○Miya Kamihira・Satoru Tuzi・Hazime Saitô
Department of Life Science , Himeji Institute of Technology

We have recorded ^{13}C CP-MAS NMR spectra of Leu^5- and Met^5-enkephalins crystallized from a variety of solvent systems. It was found that they are well related to the secondary structures of the enkephalins. Dynamics of these crystals were also evaluated by means of proton spin-lattice relaxation time in the rotating frame and ^{13}C spin-lattice relaxation time in the laboratory frame, respectivery, $T_{1\rho}^H$ and T_1^C. It turned out that not only the side chains of Tyr and Phe residues but also backbone around Gly-Gly residues show high frequency motion in the crystal of Leu^5-enkephalin grown in water solvent in contrast to those grown in other solvent systems. It is very interesting that the residues are mobile in view of ligand-recepter interactions.

エンケファリン（Tyr^1-Gly^2-Gly^3-Phe^4-Leu^5：Leu^5-エンケファリン、-Met^5：Met^5-エンケファリン）はモルヒネ様の鎮痛作用をもつ、内因性オピオイドペプチドの一種であり、そのN端に共通して見られる構造である。X線結晶構造解析によるエンケファリン分子の３次元構造は、結晶化溶媒の違いにより差が生じ、大きくβ-bend構造とextended構造に分類される。同じ構造でも結晶中に含まれる水などの溶媒分子の数やパッキングの違い等により分子側鎖の配向に変化が生じるなど、３次元構造がそれぞれわずかに異なる[1]。その結果、局所的な運動性にも違いが生じるものと考えられる。固体試料を用いた研究は、結晶化の過程でとり得る特定の高次構造の分子種について、その構造に関する知見と共に局所的な内部運動に関する情報が得られるという特徴をもつ。特にこの問題は、受容体ーリガンド相互作用を考える上で重要である。

［実験］

Leu^5-エンケファリン、およびMet^5-エンケファリンは、ABIペプチド合成機により合成した粗製試料をHPLCで精製した後、0.5N KOHで中和し、それぞれ以下の方法で結晶化を行った。1)Leu^5-エンケファリン：室温で蒸発(以下、H_2O結晶とする；X線結晶構造解析の結果、β-bend構造をとる)、2)Leu^5-エンケファリン：MeOH:H_2O=1:1とし、低温で静置(以下、MeOH/H_2O結晶；β-bend構造)、3)Leu^5-エンケファリン：DMF:H_2O=2:3とし、室温でゆっくりと蒸発(DMF/H_2O結晶；extended構造)、4)Met^5-エンケファリン：EtOH:H_2O=1:1とし、低温で静置(EtOH/H_2O結晶；extended構造)。

エンケファリン、結晶構造、スピン－格子緩和時間、分子運動、固体高分解能NMR

ないとう　あきら・○かみひら　みや・つじ　さとる・さいとう　はじめ

固体高分解能^{13}C NMR測定は、Chemagnetics CMX400 NMRスペクトロメータ（^{13}Cの共鳴周波数=100.7MHz）を用いて、繰り返し時間4～5sec、接触時間1msec、積算回数1000～2000回で行った。試料は、結晶を乾かさないように留意しながら多少の溶媒とともにサンプル管に入れ、アラルダイトで封じて溶媒がもれないようにした。

［結果と考察］

^{13}C CP-MASスペクトル(TOSS)

各試料の^{13}C CP-MASスペクトルを、図１に示す。共鳴線の帰属は、溶液のNMRによるアミノ酸炭素の帰属を参照して行った。さらに、dipolar dephasing測定や、depolarization測定によってそれらの帰属を確認した。

４つのCP-MASスペクトルをみると、共鳴線の線幅がややブロードであることや、Phe C_γ、Met C_δ等、共鳴線が２本に分裂しているものもあることから、Leu^5-エンケファリンのH_2O結晶、MeOH/H_2O結晶、そしてMet^5-エンケファリンのEtOH/H_2O結晶には結晶の単一格子の中に違う構造をもつ分子が２種類存在することがわかる。また、Leu^5-エンケファリンのDMF/H_2O結晶には４種類の異なる分子構造が存在することを反映して、共鳴線がTyr C_ζでは２本以上に分裂しているのが観測された。一方で、Gly^{3}のカルボキシル炭素を^{13}C標識したLeu^5-エンケファリンのMeOH/H_2O結晶とMet^5-エンケファリンのEtOH/H_2O結晶を測定すると、化学シフト値はそれぞれ、171.28、167.05ppmであり、β-bend構造とextended構造を反映する結果が得られた。また、β-bend構造（H_2O結晶、MeOH/H_2O結晶）のCP-MASスペクトルは、C_βの共鳴線がデカップリング周波数と干渉を起こしてピーク強度が小さくなっているのに対し、extended構造（DMF/H_2O結晶、Met^5-エンケファリン）のC_βピークははっきり現われている。このことは、β-bend構造とextended構造とではC_β近傍について10^5Hz領域の運動成分に違いがあることを表している。

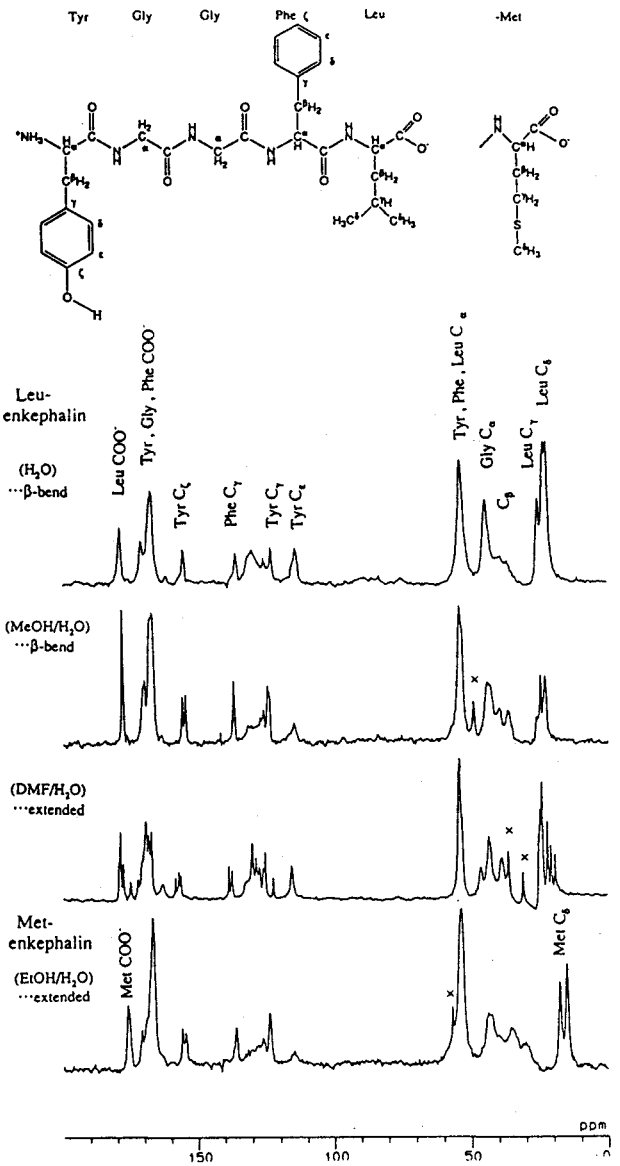


Fig.1 : Chemical structure of enkephalin molecule <top> and ^{13}C CP-MAS spectra (TOSS) <bottom>

緩和時間測定

内部運動の情報を得るために、それぞれの結晶について、接触時間を0.1～12msecの間で変化させて$T_{1\rho}^{H}$を測定し、さらにTorchiaの方法により、T_1^Cの測定を行った。この結果を表１に示す。

$T_{1\rho}^{H}$の値は、extended構造ではすべての炭素核においてほぼ均一で2～5msの小さな値を示すのに対し、β-bend構造ではそれよりはるかに大きく、特にH_2O結晶については各値が不均一になっている。このことからextended構造には、10^5Hz領域の遅い運動成分が多く存在し、逆にH_2O結晶については、この領域の運動成分は少ないものの、スピン拡散を大きく抑制する運動が存在することがわかる。

一方、T_1^Cの値は分子構造には関係なく、Leu^5-エンケファリンのH_2O結晶が極めて小さくなっている。特に、ペプチドの主鎖の中でGly C_αのT_1^Cの値は、H_2O結晶が他の約半分の値になっている。他の残基のC_αの値は大きく異なっていないことから、H_2O結晶中のエンケファリン分子の主鎖の中でGly-Glyは、他の結晶と比べてゆらぎをもっており、より運動性が高いことがわかる。また、側鎖の中でTyrのフェニル環の炭素も同様にH_2O結晶中で小さな値をとっている。TyrのC_εとC_ζの値を比べるとC_εが約半分の値になっており、さらにflip-flop運動の影響のないPheのC_γとTyrのC_ζの値を比べるとTyr C_ζの方が小さな値であることから、Pheと比べてN端に位置するTyrは、速い（10^2Hz以上）flip-flop運動のほかにT_1^Cの値に影響を与える別の運動成分をもつことがわかる。またすべてのLeu^5-エンケファリンの結晶について、Leuの側鎖は、Leu C_δだけでなくLeu C_γについても小さな値をとっていることから、メチル基の回転運動のみならずLeu C_β-C_γ間にも運動が存在することがわかる。このように、Leu^5-エンケファリン、Met^5-エンケファリンはどの構造をとるものでも分子の局所的な運動性が高く、特に、Leu^5-エンケファリンのH_2O結晶については、末端や側鎖のみならず主鎖の運動を含む、10^8Hz領域の速い運動成分が分子内に多く存在することが明らかになった。

Table1 : ^{13}C spin-lattice relaxation times in the laboratory frame (T_1^Cs ; sec), and proton spin-lattice relaxation times in the rotating frame ($T_{1\rho}^H$s ; msec) of Leu^5- and Met^5-enkephalins

		Leu or Met COO$^-$	Tyr, Gly, Phe, C=O	Tyr C_ζ	Phe C_γ	Tyr C_ε	Tyr, Phe, Leu (Met) C_α	Gly C_α	Leu C_γ	Leu or Met C_δ
Leu^5-enk H_2O	T_1^C	13.7	33.5	12.1	23.3	5.09	8.94	6.26	1.01	0.66
	$T_{1\rho}^H$	40.4	26.4	64.0	31.6	19.3	17.1	16.3	20.2	23.3
Leu^5-enk MeOH /H_2O	T_1^C	12.3	38.4	23.0	36.7	14.3	10.3	13.4	1.00	0.65
	$T_{1\rho}^H$	14.3	10.4	27.1	8.17	10.0	8.18	11.4	17.9	27.4
Leu^5-enk DMF/ H_2O	T_1^C	33.0	36.7	31.6	27.9	12.5	20.4	11.6	0.91	0.77
	$T_{1\rho}^H$	3.50	3.67	4.75	4.15	4.04	4.06	4.45	4.64	5.71
Met^5-enk EtOH/ H_2O	T_1^C	18.1	33.2	19.8	34.4	14.7	12.3	15.0	---	0.77
	$T_{1\rho}^H$	3.28	2.65	3.04	2.29	2.27	2.68	2.97	---	4.11

低温実験

Leu^5-エンケファリンのH_2O結晶、およびLeu^5-エンケファリンのDMF/H_2O結晶について温度を室温(25℃)から-140℃の間で変化させて^{13}C CP-MASスペクトル(TOSS)測定を行った。この結果、どちらの結晶についても、低温にするにつれて各共鳴線がブロードになり、室温で存在したピークの高磁場側に新たな共鳴線が現われた。こうしたスペクトルの低温での変化は、再び室温に戻すと元と全く同じスペクトルに戻ることから、これら２つの結晶は、低温においては可逆的な構造変化を起こしていることがわかった。このことは、溶媒の状態変化に伴う結晶中の分子構造の変化と考えることができる。

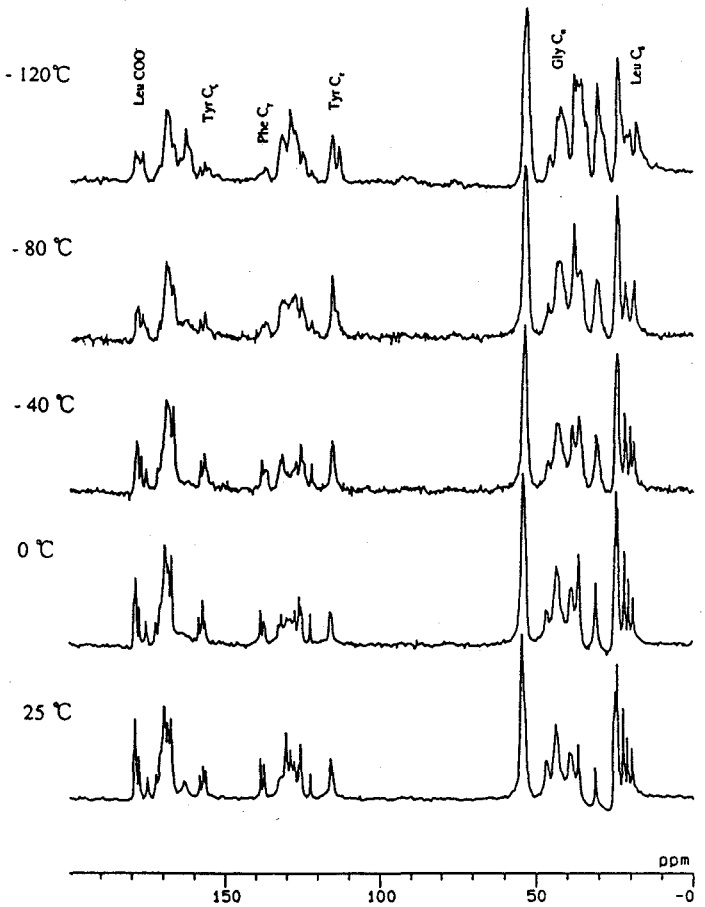


Fig.2 : ^{13}C CP-MAS spectra (TOSS) at low temperature of the crystal of Leu^5-enkephalin grown in DMF/H_2O solvent

δ受容体に結合するオピオイドペプチドについては、Tyr-Gly-Gly-Pheの構造がそれぞれ役割をもっており必要不可欠であることがわかっているので、エンケファリン分子のこれらの部位の運動性が高いことは、オピオイドペプチドの生理活性を理解する上で非常に興味深い。

1)A. Naito , M. Kamihira , S. Tuzi , and H. Saitô J. Phys. Chem. 99, 12041-12046 (1995)

P23

固体高分解能^{13}C NMRによる生体膜中におけるバクテリオロドプシンの高次構造と膜－蛋白質相互作用の解析

（姫路工大・理）○辻　暁、内藤　晶、斉藤　肇

A High-resolution Solid-state ^{13}C NMR Study on Lipid-mediated Dynamic Structure of Bacteriorhodopsin in Biomembrane

Depertment of Life Science, Himeji Institute of Technology
○Satoru Tuzi, Akira Naito, Hazime Saitô

We have recorded ^{13}C NMR spectra of [3-^{13}C]Ala-labeled bacteriorhodopsin (bR) in purple membrane at temperature down to -110°C, to examine how conformation and dynamics of bR vary with temperatures. The spectral broadening observed at temperatures lower than -40°C was interpreted in terms of the freezing of exchange process characterized by rate larger than 10^2 s^{-1}, at ambient temperature, among several conformations. This exchange process was found to be strongly dependent upon the organization of the lipid bilayers which in turn is influenced by the presence or absence of cations effective in electric shielding of negative charge of the polar head group. Furthermore, the secondary structures of [3-^{13}C]Ala-labeled bR at lower temperatures turned out to be not always tobe identical to those at ambient temperature, since the ^{13}C chemical shifts and relative peak intensities changed with temperature range from -110°C to 23°C.

序論

生体膜中に存在する各種の受容体をはじめとする膜貫通型の蛋白質は脂質－蛋白質複合体としての有効分子量が大きく、また良質の三次元結晶の作成が難しいために、蛋白質構造解析において通常用いられるX線回折、溶液多次元NMRによる構造解析が容易でない。また、高次構造と機能を関連づけて解析するためには生理的条件に近い生体膜中における動的な構造に関する情報が不可欠であると考えられる。我々は、固体高分解能NMRがこのような蛋白質－脂質複合体の動的な構造を解明する上で非常に適した手法であると考え、固体高分解能^{13}C NMRによる膜貫通型光プロトンポンプ蛋白質バクテリオロドプシンの高次構造の帰属と解析を行なってきた。[1),2)]ここでは、生体膜中におけるバクテリオロドプシンの固体高分解能^{13}C NMRスペクトルの温度および膜懸濁液組成に依存する変化から、生理的条件下におけるバクテリオロドプシン－脂質複合体の動的構造の解析を行なった結果について報告する。

バクテリオロドプシンは高度好塩菌（Halobacterium salinarium）の紫膜に含まれる光プロトンポンプ蛋白質で、膜を貫通する７本のα-ヘリックスとヘリックス間をつなぐ膜外のループ構造からなる高次構造を持ち、紫膜中では蛋白質と脂質を重量比３：１で含む二次元結晶に近い状態をとっている。蛋白質の高次構造モデルは-268°Cにおいて測定された低温電子顕微鏡による分解能3.5Aのデータから与えられているが[3)]、蛋白質のプロトンポンプ機能に直接関与する常温、生体膜中における生理的条件下での高次構造とダイナミックスに関する情報は十分に得られていない。ここでは^{13}C標識したアラニン残基を含む紫膜懸濁液を用い、23°Cから-110°Cの温度範囲、および異なる懸濁液組成において固体高分解能^{13}C NMR測定を行なうことで、蛋白質および脂質のコンホメーションとダイナミックスを解析し、生理的条件により近い条件下で蛋白質の動的構造、蛋白質－脂質相互作用に関する情報を得た。

固体高分解能NMR, バクテリオロドプシン、高次構造、ダイナミックス、脂質

つじ　さとる、ないとう　あきら、さいとう　はじめ

実験

^{13}C標識バクテリオロドプシンは[3-^{13}C]アラニンを含む合成培地中で培養した高度好塩菌より遠心分離により紫膜を分離精製して得た。

NMR測定は標識紫膜を緩衝液（通常：5 mM HEPES, 10 mM NaCl, 0.025 %(w/v) NaN_3, pH 7.0、低イオン強度における測定：5 mM HEPES, 0.025 % (w/v) NaN_3, pH 7.0）中に懸濁した懸濁液より遠心沈殿したペレットを試料として23°Cから-110°Cの範囲で行なった。測定方法として、CP-MAS法およびDD-MAS (single pulse excitation Dipolar Decoupled-MAS)法を使用した。

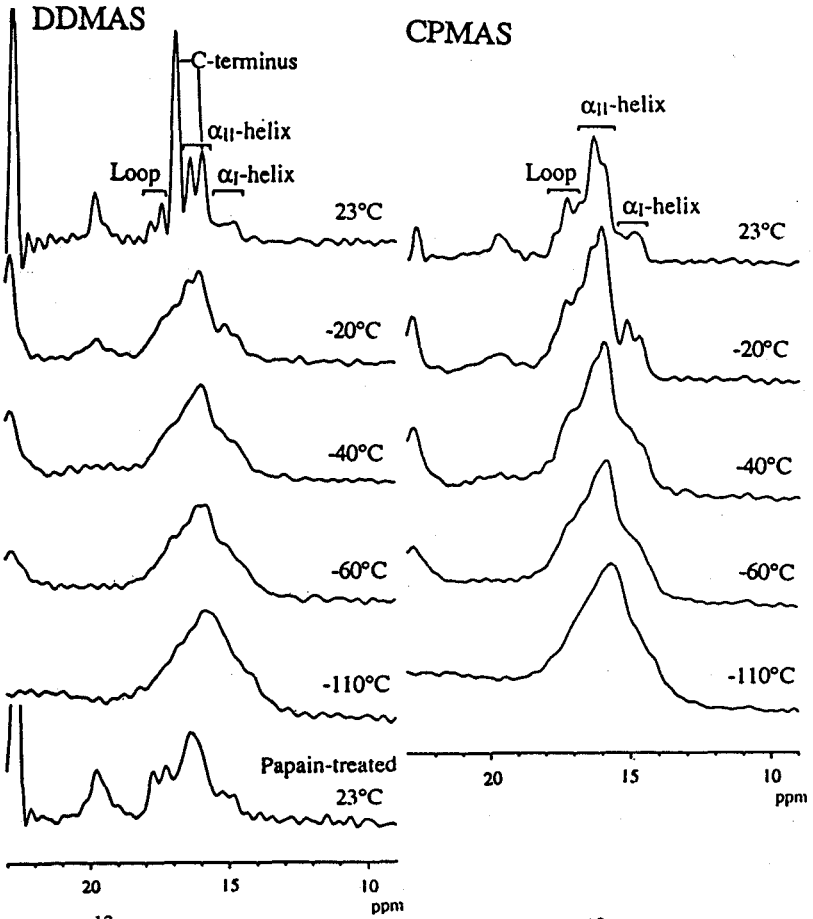


Fig. 1 ^{13}C DD-MAS and CP-MAS spectra of [3-^{13}C]Ala-bR recorded at temperatures between 23 °C and -110°C. The bottom trace of DDMAS spectra is for [3-^{13}C]Ala-bR in which the C-terminus moiety was cleaved by papain.

結果

23°Cから-110°Cにおける標識紫膜のCP-MASおよびDD-MASスペクトルをFig. 1に示す。14-18 ppmの範囲に見られる、アラニン側鎖メチル炭素の信号上に、これまでに帰属され、対応づけられた二次構造を示した。また、19.0 ppm および22.7 ppmには、菌体内の代謝によって標識された紫膜脂質の疎水鎖（3R, 7R, 11R, 15-tetramethylhexadecyl基）のメチル基の信号が観測される。[3-^{13}C]アラニンのスペクトルはCP-MAS、DD-MASとも23°Cから-20°Cの範囲で7-8種類の二次構造に対応する分離したピークを示しているが、-40°C以下では広幅化による分解能の低下が見られる。また、DD-MASスペクトルでは常温において17.0 ppmに見られるC-末端部分に対応する特徴的な信号が-20°C以下では加水分解酵素パパインを用いてC-末端部を除去した場合と同様に消滅している。さらに、脂質メチル基の信号も温度の低下とともに広幅化し、-40°C（19.0 ppm）および-110°C（22.7 ppm）において消滅している。

Fig. 2は低イオン強度の懸濁液（5 mM HEPES, 0.025 %(w/v) NaN_3, pH 7.0）中におけるスペクトルの温度依存性を示す。上述の温度依存スペクトル変化は懸濁液組成に強く依存し、低イオン強度では脂質、蛋白質とも温度依存変化が観測されず、-110°Cにおいても常温と同様の信号が得られた。

Fig. 3は23°Cと-20°C-、-20°Cと-40°C、-40°C-と-60°Cおよび-60°Cと-110°Cの間でのCP-MASおよびDD-MASスペクトルの差スペクトルを示す。DD-MAS差スペクトルより-60°Cから-110°Cの範囲でループ構造（16.6および17.1 ppm）およびα_{II}-ヘリックス構造（15.9および16.2 ppm）の信号が減少し、α_{I}-ヘリックスの信号（14.2および15.4 ppm）が増加していることがわかる。同様の傾向はCP-MASスペクトルにも観測される。23°Cから-20°C-で見られるDD-MASスペクトルの17.0 ppmの尖鋭な信号の減少はFig. 1で見られるC-末端の信号の消滅に対応する。

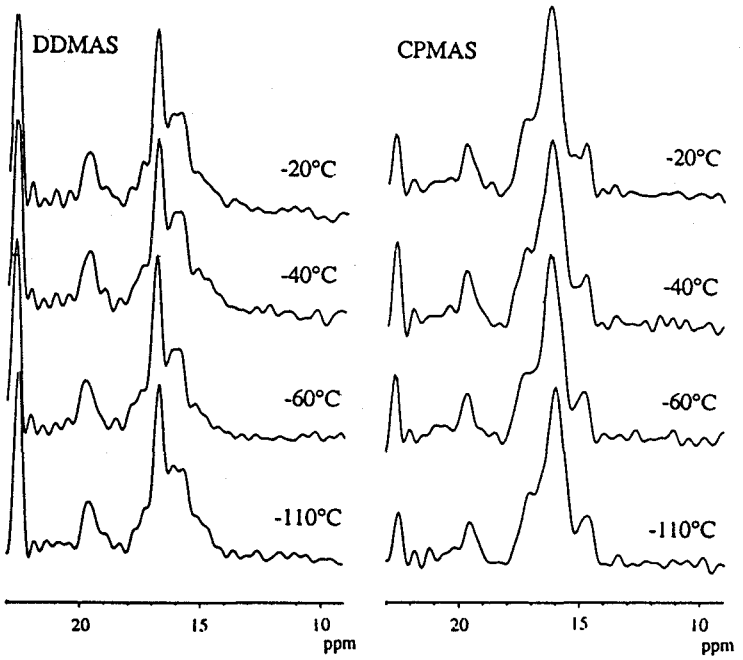


Fig. 2 ^{13}C DD-MAS and CP-MAS NMR spectra of [3-^{13}C]Ala labeled bR without added salts (at-20°C--110°C).

考察

1）バクテリオロドプシンのダイナミックス

Fig. 1でCP-MASおよびDD-MASスペクトル双方に見られる-40°C以下における広幅化は、低温の領域で二次構造がわずかに二面体角の異なる多数の構造に固定したことによる不均一な広幅化に対応すると考えられる。このことは、-20°Cおよび23°Cで観測される各二次構造の分離した信号が速い構造の化学交換により動的に平均化された構造に対応していることを示している。常温における交換速度は、化学シフトの広幅化の範囲（数ppm)より10^2Hz以上であると見積られる。このことから、生理的条件下におけるバクテリオロドプシンの二次構造は10^2Hz以上の速度の二次構造の揺らぎを含む動的な構造であるということができる。

DD-MASスペクトルの17.0 ppmに見られるC末端の信号は、CP-MASスペクトルで観測されないことから10^5Hz以上の速度の運動を持つランダム鎖構造に対応すると考えられるが、-20°C-以下ではDD-MAS法でも観測されない。低温における信号の消滅は、C-末端鎖の運動速度が低下し、双極子デカップリングの周波数(10^4Hz）と干渉する運動成分を持つことによるデカップリング効率の低下によると考えられる。同様のデカップリングとの干渉によると見られる信号の消滅は-40°Cおよび-110°Cにおいて脂質の信号にも観測され、これらの核が10^4 Hz付近の運動成分を持つことがわかる。このような核の運動による信号の消滅は、脂質-蛋白質複合体の信号の一部が固体高分解能NMRによって観測されない場合があることを示している。

2）脂質-蛋白質相互作用

上に述べたような温度の低下に伴う運動性低下に由来するスペクトルの変化は10 mM NaClを含まない緩衝液に懸濁した場合には観測されない（Fig. 2）。このことは懸濁液の組成が膜

蛋白質の動的構造に大きく影響していることを示している。紫膜中の脂質の80％以上は親水性頭部に負電荷を持つ極性脂質であることから、このような変化は脂質の負電荷と緩衝液中のカチオンの相互作用に由来すると考えることができる。NaClが存在する場合、脂質の負電荷間の静電的反発がカチオンによって遮蔽されることにより脂質分子間のパッキングが増し、脂質疎水鎖および蛋白質の運動性が制限されると考えられる。

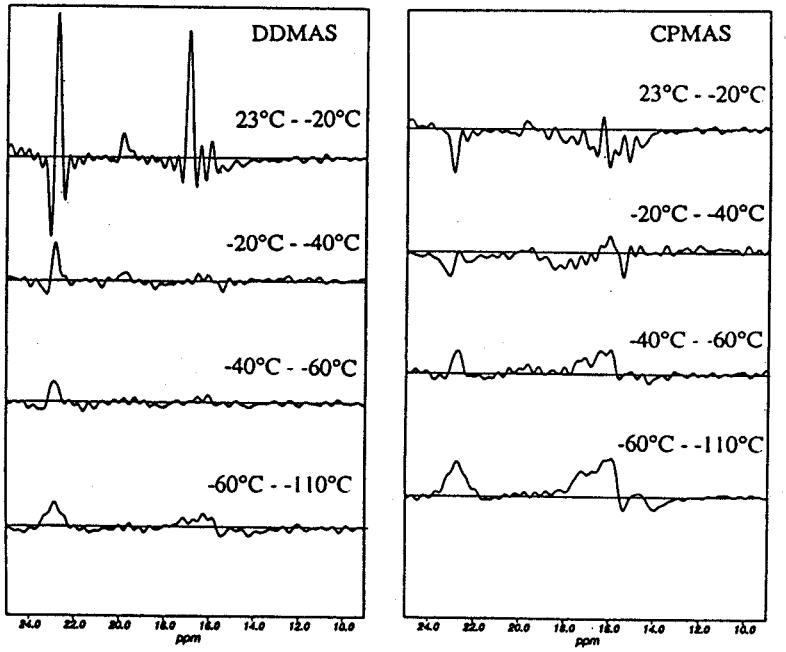


Fig. 3 ^{13}C difference DD-MAS and CP-MAS NMR spectra of [3-^{13}C]Ala-bR between the temperatures indicated.

この観測結果は生体膜中における脂質-蛋白質相互作用による動的構造の変化を固体高分解能NMRによって直接直接観測できることを示しており、また生理的条件化における膜蛋白質の構造を考える際に膜脂質および周囲の溶液中の低分子との相互作用を考慮する必要があることがわかる。

3）低温におけるバクテリオロドプシンの高次構造変化

Fig. 3のDD-MASスペクトルに見られるように、低温下において動的構造の変化とともに、二次構造の変化が観測される。主に-60°C以下において見られる15.9, 16.2, 16.6 および17.1 ppmの4本の信号の減少と、対応する強度の14.2 および15.4 ppmの信号の増大はループおよびα_{II}-ヘリックス構造の一部がα_{I}-ヘリックス構造へ変換していることを示している。同様の二次構造間の変換はCP-MASスペクトルにも観測されるが、異なる二次構造間の交差分極の効率の違いのために差スペクトルの強度はDD-MASの場合と異なっている。このような二次構造の変化は-60°C以下の低温下における高次構造と常温下における構造がダイナミックスだけでなく二次構造の分率においても異なっていることを示しており、常温、生理的条件下の高次構造が低温下（-268°C）において決定されたバクテリオロドプシンの構造モデルと異なっていることを示している。

1) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, Eur. J. Biochem., 218, 837-844 (1993).

2) S. Tuzi, A. Naito and H. Saitô, Biochemistry, 33, 15046-15052 (1994).

3) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing, J. Mol. Biol., 213, 899-929 (1990).

P24　固体^{13}C NMRおよびX線回折法によるGlyGly結晶の構造解析

東工大工　○亀田 恒徳　黒木 重樹　黒子 弘道　安藤 慎治　安藤 勲
東工大理　橋爪 大輔　大橋　祐二

Structure of GlyGly Peptide in the Crystalling State as Studied by X-ray Diffraction and Solid State NMR Methods

T. Kameda, S. Kuroki, H. kurosu, S. Ando, and I. Ando
Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152

D.Hashizume and Y. Ohashi
Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152

The crystal structure of a new type of GlyGly hydrate crystallized from aqueous solution was determined by X-ray diffraction method. The GlyGly hydrate crystal containing two water molecules per three molecules of dipeptides, taking parallel β-sheet arrangement. The GlyGly hydrate crystal was found to change into α form with an increase in time at room temperature by using ^{13}C solid-state NMR. Such a crystal transformation process was elucidated by ^{13}C solid-state NMR and FPT-MNDO MO calculation. It was found that transformation process falls into two steps; the first step is delocation of water molecules from GlyGly molecules, and the second step is conformational change of skeletal bonds.

【1、序論】

結晶中に水を含む透明な単結晶の中には、脱水によって失透（白濁化）するものがある[1]。すでに報告されているグリシルグリシン（GlyGly）の結晶型には、α型[2]、β型[3]およびγ型[4]があるが、今回我々は、これらいずれの結晶型にも属さない含水型単結晶を得た。この単結晶は、低温(3℃)では安定であるが、室温に放置すると数時間で失透する。さらに、高速回転を加えると、数分で失透する。

単結晶の構造を精度高く解析する手段としては、X線回折法および中性子線回折法が優れているが、試料が微結晶となると、その解析精度が低下するという問題点がある。一方、固体高分解能NMRから得られる化学シフトを用いた解析法では、固体試料の形状に関わらず、立体構造の解析を行うことができる。　そこで今回は、X線回折法と固体高分解能NMR法を相補的に用いることにより、含水型GlyGly単結晶の構造および失透過程について研究した。さらに、失透に伴う構造の変化と化学シフトの変化を理論的に結びつけるために、量子化学計算を行った。

【2、実験】

（試料）GlyGly水溶液をゆっくりと乾燥し、最大で10×7×4mm程度の含水型GlyGly

（キーワード）固体NMR、ペプチド、グリシルグリシン、単結晶、構造転移

○かめだ　つねのり、くろき　しげき、くろす　ひろみち、あんどう　しんじ、
あんどう　いさお、はしずめ　だいすけ、おおはし　ゆうじ

単結晶を得た。比較のために、水－n-プロパノール混合溶液からも同様な方法で結晶化することで、α型GlyGly単結晶を得た。

（測定）　固体高分解能^{13}CNMRスペクトルの測定は、CP-MASアクセサリーを付けた日本電子製GSX-270NMR分光器(観測周波数67.8MHz)を用い、室温で行った。化学シフトの基準としては外部基準としてアダマンタンを用い、その化学シフトを29.5ppmとして、TMS基準に換算した。

（量子化学計算）　有限摂動理論(FPT)の枠内において、半経験的分子軌道法であるMNDO-PM3法を用いることによって、核遮蔽定数を計算した。

【3、結果および考察】

ＮＭＲ；Ｘ線回折測定の結果、含水型GlyGly単結晶中では、GlyGly１分子に対し水分子がＮ端に２分子、Ｃ端に３分子水素結合しており、さらに平行に並んだGlyGly分子間で互いにアミドーアミド型水素結合していることが明らかとなった(Fig.1)。一方、α型GlyGly単結晶は、結晶内に水分子を含まず、また分子間のアミドーアミド型水素結合は、逆平行に並んだGlyGly分子間で形成されている。結合長、結合角および二面角について含水型とα型で比較した場合、結合長および結合角に関しては両者でほぼ一致したが、二面角に関しては両末端およびカルボニル部分で大きく異なっている(Table 1)。

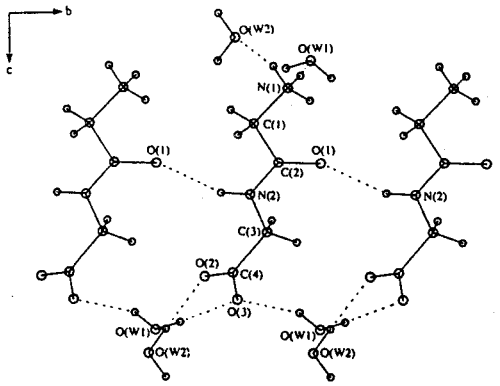


Fig.1 The molecular packing for GlyGly hydrate viewed along a-axis.

Table 1 Torsion angles (deg) for GlyGly hydrate and GlyGly form α determined by X-ray diffraction

	GlyGly -hydrate	GlyGly - α type
C(3) - N(2) - C(2) - O(1)	-6.53(0.38)	-0.5(5)
C(3) - N(2) - C(2) - C(1)	172.99(0.19)	175.8(3)
N(1) - C(1) - C(2) - O(1)	4.88(0.31)	-31.1(4)
N(1) - C(1) - C(2) - N(2)	-174.66(0.18)	152.4(3)
C(2) - N(2) - C(3) - C(4)	159.73(0.21)	154.4(3)
N(2) - C(3) - C(4) - O(2)	-21.85(0.30)	10.4(5)
N(2) - C(3) - C(4) - O(3)	-159.55(0.22)	-169.7(3)
H(1NA) - N(1) - C(1) - C(2)	-175.572	163.0(2)
H(1NB) - N(1) - C(1) - C(2)	-55.602	-81.0(4)
H(1NC) - N(1) - C(1) - C(2)	64.459	45.0(3)
H(1A) - C(1) - C(2) - N(2)	64.716	33.0(2)
H(1B) - C(1) - C(2) - N(2)	-54.014	-89.0(2)
H(2N) - N(2) - C(3) - C(4)	-20.249	-7.0(3)
H(3A) - C(3) - N(2) - C(2)	-79.216	33.0(3)
H(3B) - C(3) - N(2) - C(2)	38.597	-96.0(4)

含水型結晶は、室温に放置すると数時間で失透する。さらに、高速回転を加えると、数分で失透する。失透した試料は、微結晶となるためにその構造はＸ線回折法では解析することができなかった。そこで、固体NMRによる測定を試み、得られたスペクトルからα型と同定した。このことより、失透過程において含水型結晶はα型結晶に転移したと考えられる。

さらに、失透過程を固体NMRを用いて詳しく検討した。Fig.2は、4000Hzのスピニング下において、含水型結晶がα型に転移していく様子を固体NMRで測定した結果である。測定前透明であった含水型結晶試料は、測定70分後には完全に失透していた。　スピニング開始直後より3min積算して得たスペクトル(0～3　min)は、含水型

結晶に由来するものである。C(2)とC(3)は^{14}Nの影響で四極子分裂している。その後、時間とともに失透が進み、C(1)とC(4)のピークはそれぞれ41.5から40.7ppm、177.1から173.5ppmへと高磁場シフトしている。また、C(2)およびC(3)のピークは失透過程において化学シフト値に変化はないが、C(2)の^{14}N－^{13}C四極子分裂の形状に変化が見られる。60～70minで観測されたスペクトルは、α型のスペクトルと一致した。ここで興味ある点は、C(4)ピークの移動は30minで終了しているのに対し、C(1)ピークの転移、およびC(2)ピークの^{14}N－^{13}C四極子分裂の形状変化は、C(4)ピークの転移が終了した30min後も変化し続けていることである。このことは、すべての構造転移が同時に起こっているのではないことを意味している。前半で終了するC(4)ピークの高磁場シフトは、このカルボニル基が水分子と水素結合していることから考えて、『水分子の脱離』を反映していると考えられる。一方、後半にまでおよぶC(1)およびC(2)ピークの高磁場シフトおよび^{14}N－^{13}C四極子分裂の形状変化は、これらの原子が末端原子と隣接していないことから考えて、水分子の脱離よりむしろ、結合長、結合角および二面角によって決定される『主鎖コンホメーションの変化』、さらにその変化によって引き起こされる鎖間結合形態の変化を反映したものと考えられる。以上のことから失透過程が次のような2段階で進行していると推定した。

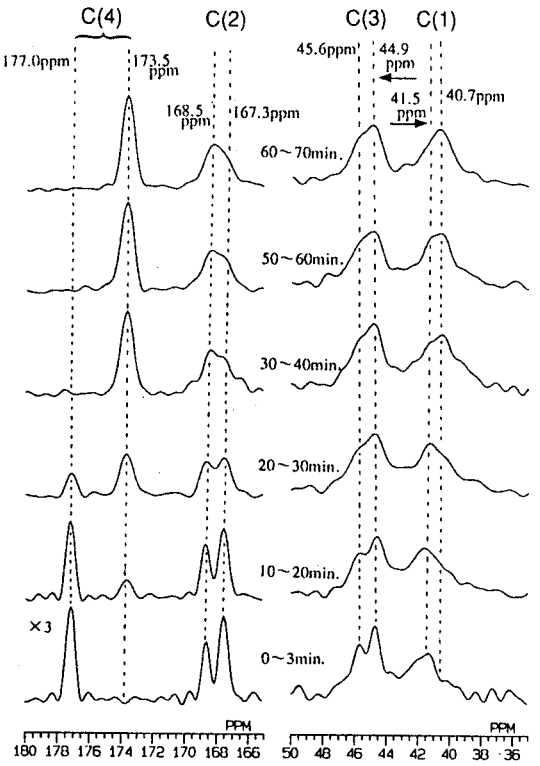


Fig.2 ^{13}C CP-MAS spectra of GlyGly hydrate as a function of time; accumulated from 0 to 3min, form 10 to 20min, from 20 to 30min, form 30 to 40min, from 50 to 60min and from 60 to 70min. The spectrum for 0～3min multiplicated by 3.

第１段階；　水分子の脱離
第２段階；　主鎖コンホメーションの変化

量子化学計算；　C(4)およびC(1)の化学シフトを決定する因子にはいくつかあるが、その中で水分子との水素結合、主鎖のコンホメーションおよび鎖間相互作用が与える影響は特に大きい。上述の考察では、失透過程におけるC(4)およびC(1)化学シフトの変化が、それぞれ水分子脱離および主鎖コンホメーションの変化を反映していることを前提とした。そこでここでは上述の前提に対する理論的な裏付けをするために、２種類のモデルについて量子化学的手法を用いて核遮蔽定数（NMR化学シフトに相当）を計算した。　まず計算－１としては、GlyGly1分子に５つの水分子が結合したモデルを考え、水分子とGlyGlyの水素結合距離を変化した場合におけるC(1)および C(4)の遮蔽定数の変化を計算した(Fig.3)。水素結合の距離は、計算

に用いた距離と実測値との比(Dratio)で表した。計算値は核遮蔽定数なので、負号は低磁場シフトを意味している。なお、モデルに用いた結合長、結合角、および二面角はX線回折法により決定された含水型結晶の実測値を用いた。次に、計算－2としてGlyGly 1分子モデルを考え、結合長、結合角および二面角に、含水型およびα型の実測値をあてはめた場合の遮蔽定数をそれぞれ計算した(Table2)。C(4)は計算－1において、Dratio>1の範囲内ではDratioの増大とともに高磁場シフトしており、脱水によって高磁場シフトした実測結果と定性的に一致している。それに対し、計算－2の結果はC(4)の低磁場シフトを示しており実測と矛盾している。このことから、C(4)ピークの高磁場シフトには『水分子の脱離』の効果が最も大きく寄与していると説明できる。一方、C(1)は、計算－1では、実測と矛盾しているが、計算－2では含水型からα型へ転移することで高磁場シフトしており、実測と定性的に一致している。このことより、失透過程におけるC(1)ピークの高磁場シフトでは『主鎖コンホメーションの変化』による効果が支配的であるとして説明できる。

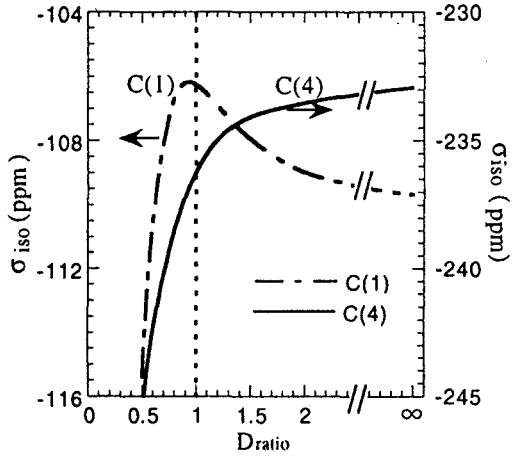


Fig.3 The calculated ^{13}C shielding constants(σ_{iso}) as a function of the ratio of $H_2O\cdots$ GlyGly distance to the observed $H_2O\cdots$GlyGly distance(D_{ratio}).

Table 2 Calculated shielding constants for a GlyGly molecule with some conformations by FPT-MNDO-PM3 method

molecule (conformation)	calculated / ppm	
	C(1)	C(4)
GlyGly (hydrate)	-109.68	-232.93
GlyGly (form α)	-108.93	-236.33

【参考文献】

[1] 井川時貫、横山文義、島村　薫、物部一男、森　義一、田中嘉充、繊維学会誌、42, T-403 (1986)

[2]A.B.Biswast, Edward W.Hughes, Brahama D. Sharma and J.Norton Wilson, Acta Cryst. B24, 40, 1968

[3]E.W.Hughes, and W.J.Moore, J.Am.Chem.Soc., 2618(1949)

[4]Barnal J.D., Z.Kristallogr, 78, 363(1931)

[5]S.Ando, I.Ando, A.Shoji, T.Ozaki, J.Am.Chem. Soc. **110**, 3380(1988)

P25

結晶および非晶領域を含有する高分子試料の ^{1}H - ^{13}C NOE、^{13}C スピン拡散および物質移動

京大化研 ○梶 弘典・桑原 和弘・堀井 文敬

^{1}H - ^{13}C NOE, ^{13}C Spin Diffusion, and Material Transfer in Polymer Materials containing Crystalline and Noncrystalline Components.

H. Kaji, K. Kuwabara and F. Horii
Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., Uji, Kyoto 611

^{1}H - ^{13}C NOE, ^{13}C spin diffusion, and material transfer have been examined in the polyethyene sample containing crystalline and noncrystalline components. Two dimensional CSA exchange measurements indicate both the spin diffusion and the material transfer hardly occur in this sample. In contrast, the large NOE beyond 2 is observed in the crystalline component. These results suggest that this large NOE is caused not by the spin diffusion and the material transfer but by the dipolar-dipolar interaction. The NOE above 2 is also observed for the high pressured polyethylene whose lamellar thickness is 457nm and crystallinity is nearly 100 %. This fact confirms the above idea.

1. 緒言

多くの多相系材料の NMR 測定では、各成分の磁化が^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用、^{13}C スピン拡散および物質移動等により複雑に関係しており、これらの寄与を明らかにすることは容易ではない。本研究では、運動性の異なる結晶および非晶の 2 成分からなる高分子試料の^{1}H - ^{13}C NOE、^{13}C スピン拡散および物質移動について考察した結果を報告する。^{1}H - ^{13}C 間の双極子相互作用により NOE が生じる場合、運動性の低下とともにその値は 3 から 1.2 に近づく。しかし、結晶および非晶領域を含有するポリエチレン試料の結晶成分に対し NOE を観測したところ、2 を超える NOE が観察された。この結晶中での大きな NOE の原因として次の 3 つの可能性が考えられる。1) 結晶 - 非晶間での^{13}C スピン拡散、2) 結晶 - 非晶間での物質移動、3) 結晶中の^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用。二次元 CSA 交換スペクトルの測定を行ったところ、^{13}C スピン拡散および物質移動の寄与は非常に小さいと推察された。また、ラメラ厚が 457nm でほとんど非晶成分を含んでいない高圧結晶化ポリエチレンに対しても、2 を超える NOE が観測された。これらの結果から、結晶における大きな NOE は結晶中の ^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用のためであると考えられる。

2. 実験

2.1. 試料：規則正しい間隔でブチル分岐の入った、線状低密度ポリエチレン (LLDPE) を、1-ヘキセンをコモノマーとし、メタロセン触媒を用いることにより得た。近年、活性点が均一なメタロセン触媒を用いることにより、従来のチーグラー・ナッタ触媒を用いて作製した LLDPE よりも遥かに分岐度分布の均一な LLDPE の重合が可能となっている。得られた LLDPE ($\bar{M}_n = 42,700, \bar{M}_w/\bar{M}_n = 2.3$) を 110 ℃で 18 時間等温結晶化させ測定に用いた。この試料は Reading 大学の Bassett 教授らに提供して頂いた。高圧結晶化ポリエチレ

キーワード：^{1}H - ^{13}C NOE、^{13}C スピン拡散、物質移動、結晶-非晶構造、ポリエチレン
かじ ひろのり、くわばら かずひろ、ほりい ふみたか

ン (HPPE) は、分別した高密度ポリエチレン ($\bar{M}_n = 23,400, \bar{M}_w/\bar{M}_n = 1.22$) を、4.95 kbar の圧力下、260 ℃で 1 時間融解後、降温速度 0.25 ～ 1.6 K/min で徐冷することにより結晶化させた。

2.2. NMR 測定：^{13}C NMR 測定は、JEOL JNM-GSX200 分光計により、4.7 T の静磁場下で行った。T_{1C} の測定には、CPT1 パルス系列を用い、T_{1C} の異なる各成分の分率は飽和回復法により決定した。室温、60 ℃および 80 ℃の各温度で T_{1C}、過渡的 NOE および二次元 CSA 交換スペクトルの測定を行った。

3. 結果および考察

3.1. 結晶成分中におけるスピン拡散および物質移動：図 1 に LLDPE の室温および 60 ℃における二次元 CSA 交換スペクトルの測定結果を示す。Mixing time は 10 秒である。対角線上の CSA の裾に σ_{11} と σ_{22} の交換を示すクロスピークが観察される。このクロスピークは、分子鎖軸まわりの 90 ° ジャンプ運動、結晶中での隣り合う分子鎖間 (約 0.5 nm) でのスピン拡散のいずれかに起因している。同様の測定をさらに 80 ℃ でも行ったが、クロスピークの増大は極めてわずかであった。したがって、分子鎖軸まわり運動の寄与はほとんどなく、結晶中でのスピン拡散によりクロスピークが生じていることがわかる。また、対角ピークと比べクロスピークが小さいことから、スピン拡散もわずかである。

3.2. 非晶成分中における ^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用：LLDPE の非晶成分に対する過渡的 NOE は、室温、60 ℃、80 ℃ いずれの温度においても数秒でほぼ平衡値に達した。非晶成分中の過渡的 NOE の測定結果は、^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用を考慮した式

$$M_C^{NON}(t) = M_C^{NON,eq}\left[1 + \frac{T_{1C}^{NON}}{T_{CH}^{NON}}\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\left\{1 - \exp(-\frac{t}{T_{1C}^{NON}})\right\}\right], \quad (1)$$

によりうまく fitting でき、その平衡値は NOE = 2.1 ～ 2.3 であった。

ここで、$M_C^{NON}(t)$ は非晶成分の ^{13}C 磁化、$M_C^{NON,eq}$はその熱平衡磁化である。また、T_{1C}^{NON} は非晶成分のスピン格子緩和時間、T_{CH}^{NON}は非晶成分中の^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用の時定数、γ_H、γ_C は ^{1}H および ^{13}C の磁気回転比である。

3.3. 結晶 - 非晶間におけるスピン拡散、物質移動、^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用：各温度における LLDPE の結晶成分に対する過渡的 NOE の測定結果を図 2 に示す。結晶成分中での ^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用 (時定数 T_{CH}^{CRY})、および結晶-非晶間のスピン拡散 (時定数 T_{SD}) を考慮すると、結晶成分の ^{13}C 磁化の時間変化は、

$$\frac{dM_C^{CRY}(t)}{dt} = -\frac{1}{T_{1C}^{CRY}}\left(M_C^{CRY}(t) - M_C^{CRY,eq}\right) - \frac{1}{T_{CH}^{CRY}}\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\left(M_H^{CRY}(t) - M_H^{CRY,eq}\right)$$
$$- \frac{1}{T_{SD}}\left\{\left(M_C^{CRY}(t) - M_C^{CRY,eq}\right) - \left(M_C^{NON}(t) - M_C^{NON,eq}\right)\right\}. \quad (2)$$

ここで、$M_C^{CRY}(t)$ 、$M_H^{CRY}(t)$ は結晶成分の ^{13}C 磁化および ^{1}H 磁化、$M_C^{CRY,eq}$、$M_H^{CRY,eq}$ はこれらの熱平衡磁化である。また、T_{1C}^{CRY}は結晶成分のスピン格子緩和時間である。

1) 一般に、高分子結晶中においては分子の運動性が低いため、^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用 ((2) 式第 2 項) は無視できると考えられている。この場合、NOE は、結晶-非晶間のスピン拡散 ((2) 式第 3 項) により生じると考えるのが妥当であろう。LLDPE の結晶成分には T_{1C}^{CRY} の異なる 3 成分が存在している (図 3)。各結晶成分が非晶成分との間でスピン拡散を起こすと考えると、$M_C^{CRY}(t)$ は次式で表される。

$$M_C^{CRY}(t) = M_C^{CRY,eq} + M_C^{NON,eq}\frac{T_{1C}^{NON}}{T_{CH}^{NON}}\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\sum_{n=1}^{3}\left(\frac{M_C^{CRY,n,eq}}{T_{SD,n}}\left[\frac{1}{1/T_{1C}^{CRY,n}+1/T_{SD,n}} - \frac{1}{1/T_{1C}^{CRY,n}+1/T_{SD,n}-1/T_{1C}^{NON}}\exp(-\frac{t}{T_{1C}^{NON}})\right.\right.$$
$$\left.\left. - \left(\frac{1}{1/T_{1C}^{CRY,n}+1/T_{SD,n}} - \frac{1}{1/T_{1C}^{CRY,n}+1/T_{SD,n}-1/T_{1C}^{NON}}\right)\exp\left\{-(\frac{1}{T_{1C}^{CRY,n}}+\frac{1}{T_{SD,n}})t\right\}\right]\right). \quad (3)$$

ただし、$M_C^{CRY,eq} = M_C^{CRY1,eq} + M_C^{CRY2,eq} + M_C^{CRY3,eq}$。このモデルに基づいた理論曲線を図中に破線で示したが、測定結果をうまく fitting できていない。

2) 一方、結晶-非晶間のスピン拡散は起こっておらず、^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用により NOE が生じていると仮定すると、$M_C^{CRY}(t)$ は、

$$M_C^{CRY}(t) = \sum_{n=1}^{3} M_C^{CRY,n,eq}\left[1+\frac{T_{1C}^{CRY,n}}{T_{CH}^{CRY,n}}\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\left\{1-\exp(-\frac{t}{T_{1C}^{CRY,n}})\right\}\right]. \quad (4)$$

このモデルに基づくと、測定結果をうまく fitting できた (図中の実線)。

3.4. 非晶成分をもたない高分子試料の NOE : HPPE は、T_{1C} が 4510 s、電顕から評価したラメラ厚が 457nm、密度から評価した結晶化度が 97 % であった。この、運動性が極めて低く、非晶領域がほとんど存在しない試料に対しても 2.4 と、LLDPE と同程度の NOE を示した。この試料の場合、ラメラ厚が極めて厚いことからスピン拡散および物質移動が起こっているとは考えにくい。

以上より、結晶領域の大きな NOE は、^{1}H - ^{13}C 双極子相互作用にほぼ起因しており、スピン拡散や物質移動の寄与は小さいと考えられる。この考察が妥当であれば、ラーモア周波数よりも大きな周波数を持つ運動モードが結晶中においても存在していることを示唆している。ただし、LLDPE に対してはラメラ厚が 10nm と薄く、結晶 - 非晶間の物質移動すなわち分子鎖軸方向の並進運動が、分子鎖軸まわりの 180° ジャンプに伴って起こる可能性がある。二次元 CSA 交換スペクトル測定では、この 180° ジャンプ運動をとらえることはできない。今後、結晶 - 非晶間での物質移動、スピン拡散を二次元高分解能交換スペクトルの測定から、より直接的に観測する必要がある。また、過渡的 NOE で、今回スピン拡散は結晶 - 非晶間のみで生じるとしたが、現在さらに T_{1C} の異なる 3 つの結晶成分間でのスピン拡散をも考慮した解析を行っている。

3.5. T_{1C} 測定に対する^{1}H デカップリングの影響 : CPT1 パルスや飽和回復法で T_{1C} を測定する際、CPT1 パルスに対しては、CP により得た磁化が減衰していく間、飽和回復法の場合には、磁化の回復時間の間、^{1}H デカップリングを行うことがある。この^{1}H デカップリングは、^{1}H 磁化の時間変化を消去し、解析を容易にすることを目的としているが、上述の過渡的 NOE が生じた場合に T_{1C} 値を正確に評価できるのか、検討を行った。LLDPE の結晶成分に対し CPT1 および 飽和回復法による T_{1C} 測定を行い、^{1}H デカップリングを行った場合と行っていない場合を比較した。図 3 には CPT1 の結果のみを示したが、いずれの測定に対しても、^{1}H デカップリングの有無にかかわらず実験誤差内で一致した。

(2) 式において、結晶-非晶間のスピン拡散を無視すると、飽和回復測定の場合は $t = 0$ で $M_C(0) = 0$ であるので、^{1}H デカップリングを行った場合 ($M_H(t) = 0$) は、

$$M_C^{CRY}(t) = M_C^{CRY,eq}\left(1+\frac{T_{1C}^{CRY}}{T_{CH}^{CRY}}\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\right)\left\{1-\exp(-\frac{t}{T_{1C}^{CRY}})\right\} \quad (5)$$

^{1}H デカップリングを行っておらず、^{1}H の磁化が熱平衡状態に保たれる場合 ($M_H^{CRY}(t) = M_H^{CRY,eq}$) は、

$$M_C^{CRY}(t) = M_C^{CRY,eq}\left\{1-\exp(-\frac{t}{T_{1C}^{CRY}})\right\} \quad (6)$$

となり、$t=\infty$ での磁化で規格化すると両式は一致する。CPT1 の場合は、z 軸方向に CP 磁化を倒した場合の ^{13}C の磁化 $M_C^{CRY}(t)^+$ と、$-z$ 軸方向に CP 磁化を倒した場合の ^{13}C の磁化 $M_C^{CRY}(t)^-$ との差をとるため、^1H デカップリングを行った場合も行なわなかった場合も、

$$M_C^{CRY}(t) = M_C^{CRY}(t)^+ - M_C^{CRY}(t)^- = 2M_{CP}\exp(-\frac{t}{T_{1C}^{CRY}}) \quad (7)$$

となる。ただし M_{CP} は $t=0$ で CP により生じた磁化である。以上の結果より、CPT1 パルス、飽和回復法とも ^1H デカップリングの有無にかかわらず、同じ結果が得られることが理論的にも確認できる。ただし、飽和回復法の場合は、NOE 効果の分だけ S/N 比がよくなる。

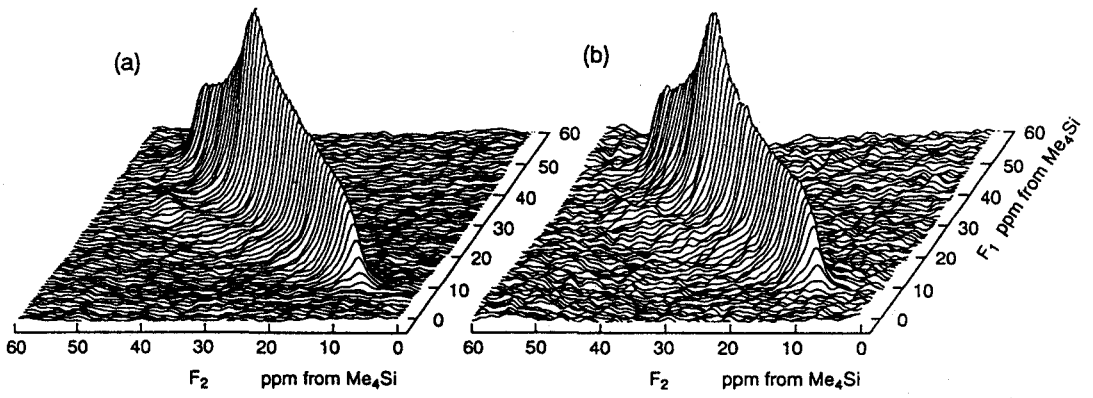


Fig. 1 2D CSA exchange spectra of LLDPE at (a) r.t. and (b) 60℃.
Mixing time is 10 s.

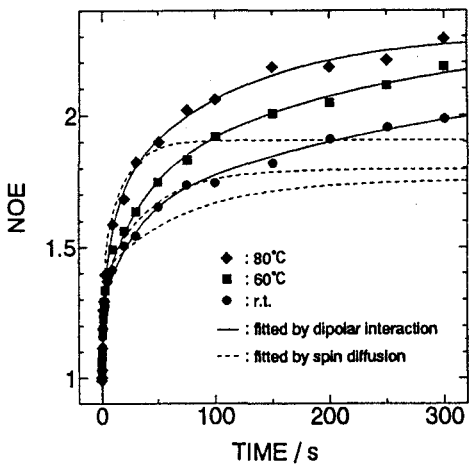


Fig. 2 Transient NOE for the crystalline component of LLDPE.

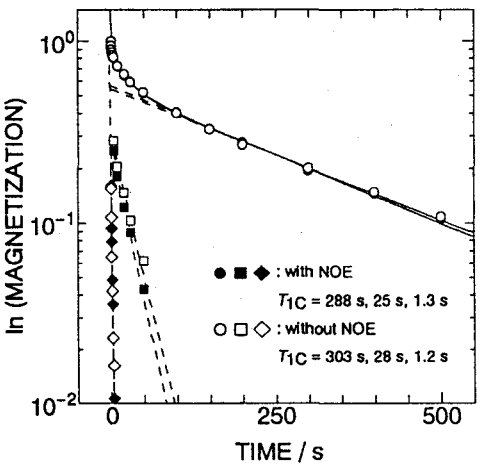


Fig. 3 T_{1C} decay curves for the crystalline component of LLDPE by CPT1 pulse sequence at r.t. with and without NOE.

P26　固体NMRによるポリエチレンテレフタレートフィルムの相構造とダイナミクスの研究

（帝人・構造解析センター、阪大理*）　○永阪　文惣、松田　裕生、中村　亘男*

Solid-State NMR Study of Molecular Dynamics and Structure of Poly(ethylene terephthalate) Film.

○Bunsow Nagasaka, Hironori Matsuda, Nobuo Nakamura*
Material Analysis Research Center, Teijin Ltd., Hino, Tokyo 191
*Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560

Abstract:
Biaxially-drawn poly(ethylene terephthalate) (PET) film has been investigated by the solid-state ^{13}C-CP/MAS NMR. It was found that the C=O signal splits into two components above 60 ℃ and the one of the components shifts in the high-field direction with the increase in temperature. The temperature depenence of the peak splitting is well interpreted by the two-sites jump model in an unequal potential well.

【序】
ポリエチレンテレフタレート（以下略してPET）は繊維やフィルムなど幅広く工業的に用いられているポリマーの一つで、加熱処理や延伸の条件によってその力学特性等の物性が大きく異なることがよく知られている。これまで固体高分解能NMRスペクトルや緩和時間測定によって運動性の異なる２つの非晶領域と結晶領域の３領域モデルが考えられ、これらの領域のサイズや相対量比でもってこの物性変化が説明されてきた[1-4]。特にPETを加熱処理あるいは延伸することによって結晶化していく現象を理解する上で、この非晶領域について調べることは非常に重要である。
今回、延伸した試料の^{13}C-CP/MAS NMRスペクトルにのみ顕著に現れる現象からこの非晶領域の動態について興味深い知見が得られたので報告する。

【実験】
試料はMw=46000のPETを280℃で溶融させてからフィルム状にして急冷し、直交２軸方向にそれぞれ４倍程度延伸したものを用いた。^{13}C-CP/MAS NMR測定にはJEOL製GX270を用い、観測周波数は67.8 MHzで室温から130℃の温度範囲で行った。

Keyword :　^{13}C-CP/MAS、PETフィルム、分子運動、延伸効果

○ながさか　ぶんそう、まつだ　ひろのり、なかむら　のぶお

【結果】

図１に室温におけるPETフィルムの^{13}C-CP/MAS NMRスペクトルを示す。164 ppm付近に現れる非対称な（低磁場側にテールをもつ）C=Oピークに注目すると、非晶性ピーク（165 ppm）と延伸によって現れた結晶性ピーク（163 ppm）からなっていることがわかる[3, 4]。これを高温にすると（図２）、60℃以上でC=Oピークが分裂し、結晶性ピークより高磁場側に新たなピークが観測され、温度上昇とともにさらに高磁場側にシフトすることがわかった。このC=Oピークの挙動は測定温度範囲で熱的可逆変化であった。

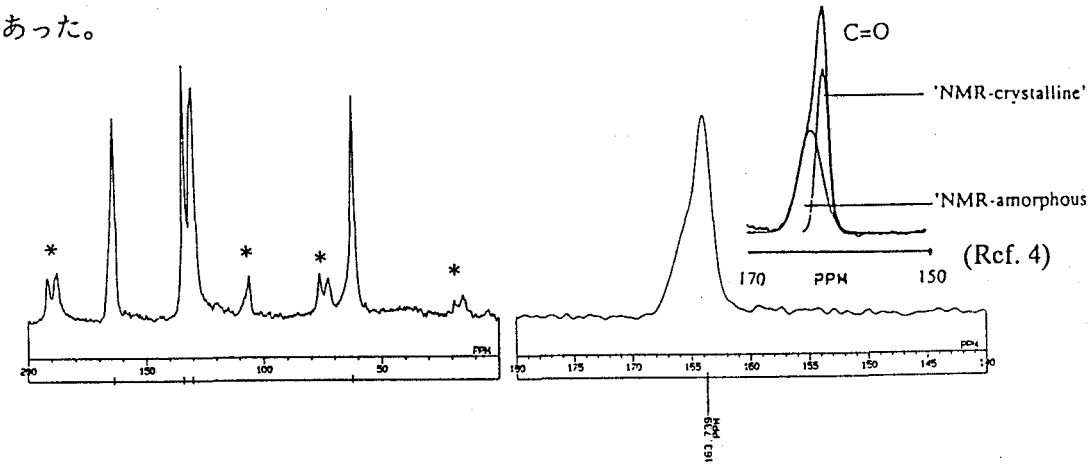


Fig.1 ^{13}C-CP/MAS NMR Spectrum of PET Film at room temp.
Spinning Side Bands are indicated by ＊.

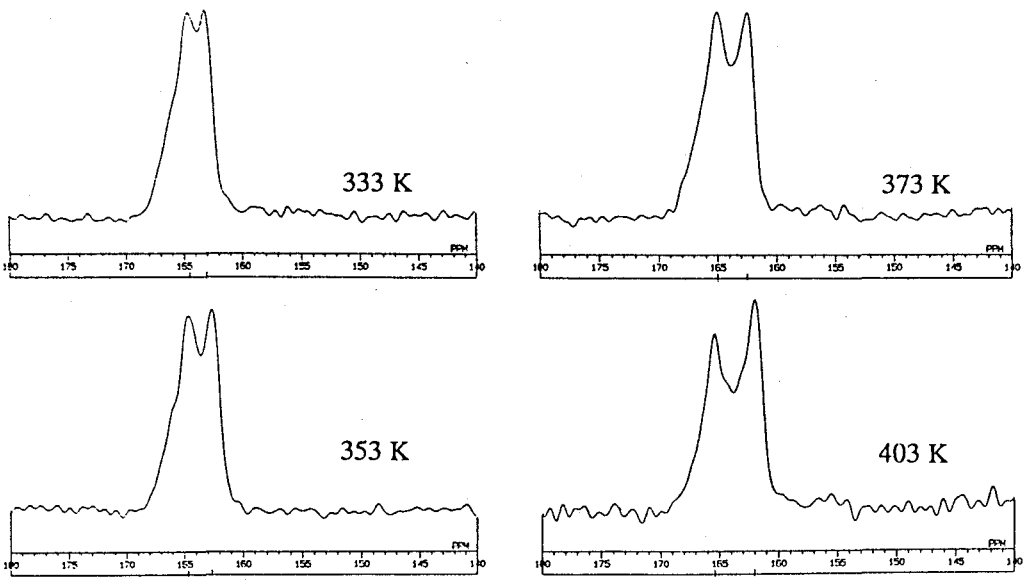


Fig.2 Temperature Dependence of the Lineshape of the C=O Peak in ^{13}C-CP/MAS NMR Spectrum of PET Film.

【考察】

この分裂して現れたピークの温度依存性は、図３のような深さの異なるダブルミニマムポテンシャルの２つの極小間におけるジャンプ運動を考えることによって説明できる。すなわち、室温付近で運動がすでに速い極限で起こっており、運動によって平均化された１本のmobileピークが結晶性ピークに重畳して隠れているが、より高温になるとポテンシャルの２極小間の占有数が変化するため、この１本のピークがシフトすることになる。一方、結晶性ピークは運動に関してrigidであるため殆どそのピーク位置を変えず、これがC=Oピークの分裂として観測されていると解釈できる。

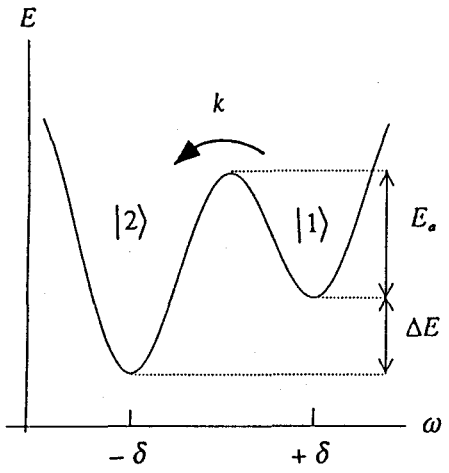


Fig.3 Unequal Potential Well Model for Two-Sites Jump System.

このmobileなC=Oピークに対する理論線形は以下のようにして与えられる。

運動を束縛するポテンシャルが図３のように表されるとき、状態ベクトルを

$$|1\rangle = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \qquad |2\rangle = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$$

にとれば、確率変数の位置を与える行列$\hat{\omega}$、及びJump行列$\hat{\pi}$は次のように表される。

$$\hat{\omega} = \begin{pmatrix} \delta & 0 \\ 0 & -\delta \end{pmatrix} \quad \hat{\pi} = \begin{pmatrix} -k & fk \\ k & -fk \end{pmatrix} \text{ ただし } f = \exp\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right) \quad k = k_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

ここで状態$|1\rangle, |2\rangle$に対する存在確率ベクトル$\hat{\mathbf{W}} = \begin{pmatrix} \frac{f}{f+1} & \frac{1}{f+1} \end{pmatrix}$を用いれば、相関関数$G(t)$は

$$G(t) = \hat{\mathbf{W}} \exp\left\{\left(i\hat{\omega} + \hat{\pi}\right)t\right\}\hat{\mathbf{1}} \quad \text{但し} \quad \hat{\mathbf{1}} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

となる。そうすると$\hat{\mathbf{A}} = i\left(\hat{\omega} - \omega\hat{\mathbf{E}}\right) + \hat{\pi}$（但しは$\hat{\mathbf{E}}$単位行列）とおけば吸収線形$I(\omega)$は

$$I(\omega) = re\left[\hat{\mathbf{W}}\hat{\mathbf{A}}^{-1}\hat{\mathbf{1}}\right]$$

で与えられ、これを求めると

$$I(\omega) = \frac{\frac{-k}{f+1}\left\{(f+1)^2\delta^2 - (f-1)^2\omega^2\right\}}{\left(\delta^2-\omega^2\right)^2 + \left\{k(\delta+\omega) - fk(\delta-\omega)\right\}^2}$$

が得られる。この理論式に対して運動に必要な活性化エネルギーE_aが13 kJ/molでエネルギー差ΔEが5 kJ/molのときに$\delta=10^3$ Hz離れていると仮定したサイト間を高温極限で$k_0=10^6$ Hzの速度で運動している場合について理論線形計算したところ（図４）、C=Oピークの温度依存性を半定量的に再現することができた。

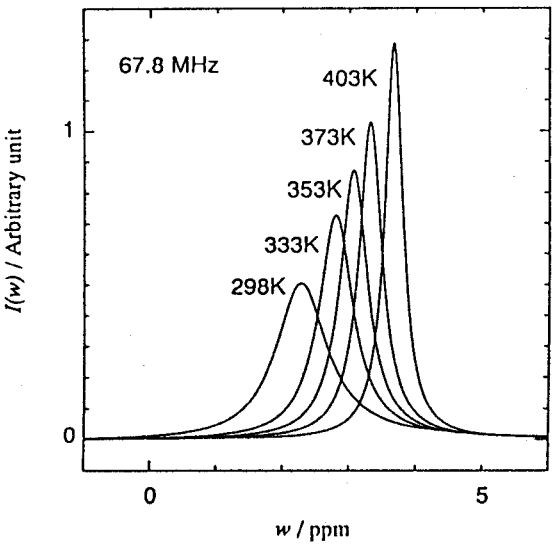


Fig.4 Theoretical Lineshape for Temperature Dependent C=O Peak in ^{13}C-CP/MAS NMR Spectrum of PET Film.

上記の機構によると、低温で運動が遅くなってくると、まず線幅の広がりが起こるはずであり[5]、これについても調べる予定である。

References

1. J.R. Havens and D.L. VanderHart, *Macromolecules*, **18**, 1663 (1985).
2. M.D. Sefcik, J. Schaefer, E.O. Stejskal, and R.A. McKay, *Macromolecules*, **13**, 1132 (1980).
3. D.L. Tzou, P. Desai, A.S. Abhiraman, and T.-H Huang, *J. Polym. Sci., Part* B, **29**, 49 (1991).
4. W. Gabrielse, H. Angad Gaur, F.C. Feyen, and W.S. Veeman, *Macromolecules*, **27**, 5811 (1994).
5. A. Abragam, "Principles of Nuclear Magnetism", Oxford Univ. Press, London, 1961.

P27

固体高分解能^{13}C-NMRによるAlkanediyl-α,ω-bis (dimethylalkylammonium bromide) surfactantsの水和とコンホメーション変化

（名工大工）○服部憲和、吉野明広、岡林博文

Hydration and molecular conformation of alkanediyl-α,ω-bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants studied by High-Resolution Solid-State ^{13}C-NMR Spectroscopy

○ Norikatsu Hattori, Akihiro Yoshino, Hirofumi Okabayashi
Nagoya Institute of Technology

Bipolar type surfactants, in which two quaternary ammonium species ($C_RH_{2R+1}N^+(CH_3)_2$) are linked at the head groups by a hydrocarbon spacer ($CH_2)_n$, were synthesized. The structural difference coming from conformational change , which was induced by hydration number , spacer chain length , alkylchain length and temperature is focused. We measured high-resolution solid-state ^{13}C-NMR spectra for bipolar surfactant molecules having various hydration numbers , different spacer chains and different alkylchain lengths at various temperatures. In the high-resolution solid-state ^{13}C-NMR spectra of these compounds , there exists a marked difference between anhydrous and hydrate samples , implying that hydration affects the molecular conformation for these bipolar surfactants.

【はじめに】

界面活性分子は水中で組織的な集合体を様々な形で形成することが知られている。例えば、ミセルや二分子膜（脂質二分子膜からなるリポソームなど）のラメラ構造はその例である。それらは生体膜構造に類似していることから、生体膜特性研究のモデル系を提供してきた。従来知られている界面活性分子は、ふつう一本鎖型のもので、例えばＤＴＡＢ（trimethyldodecylammonium bromide）や、ＣＴＡＢ（cetyltrimethylammonium bromide）などはその例で、一方が極性基でもう一方は疎水基からなる、２つの性質の異なる部分からなる。一本鎖型の界面活性分子２つをspacerでつないだものは、" Gemini Sufactants" [1] とも呼ばれており、新しい世代の界面活性分子の一つである。spacerにflexibleな炭化水素鎖$(CH_2)_n$を用いて２つの極性基($C_RH_{2R+1}N^+(CH_3)_2$)の極性基間を化学的に結合し、その距離に束縛を与えた分子（$C_RH_{2R+1}N^+(CH_3)_2$ $(CH_2)_nN^+(CH_3)_2C_RH_{2R+1}$ 2Br）は、現在世界的に興味の対象となっている。従来の一本鎖型の界面活性分子は球状ミセルをつくるのみであったが、今回紹介するdimericな界面活性剤は、低濃度においても長い棒状の絡まりあったミセルを形成することが知られている。本研究ではこれら一連の化合物を合成し、固体構造におけるその水和水量に伴うスペクトル変化を追跡して、水和水量と分子構造の関係を特にspacerの炭化水素鎖長に着目し検討した結果を報告する。

固体高分解能^{13}C-NMR、水和、コンホメーション変化、ｓｐａｃｅｒの効果

はっとりのりかつ・よしのあきひろ・おかばやしひろふみ

【実験】

化合物は３級アミン$(CH_3)_2N(CH_2)_nN(CH_3)_2$、及び臭化アルキル$Br\text{-}(CH_2)_{R-1}(CH_3)$をいろいろなｎとＲの組み合わせでアミンの徹底メチル化を行うことから合成した。これら一連の化合物は炭化水素数ｎ、Ｒの値を用いて、n-R２-４というような略称を用いる。固体高分解能^{13}C-NMRスペクトルは Varian Unity400 plus を用いて100.58MHzにて、室温（２５℃）でCP/MAS測定し、離水過程は室温から昇温し（３０～１００℃まで）１５分間待ってから測定した。試料のうち再結晶過程で得られた水和物（n-R２-４、n-R３-４）は元素分析により水和水量を計算した。また水和試料（n-R２-１２、n-R２-１０）については無水物を湿度９２％以上のデシケ-タ中で十分に水和させて調製しＴＧにより水和量を計算した。

$$(CH_3)_2\overset{+}{N}-(CH_2)_n-\overset{+}{N}(CH_3)_2\cdot 2Br^-$$
$$C_RH_{2R+1} \qquad C_RH_{2R+1}$$

Fig.1 Alkanediyl-α,ω-bis(dimethylalkyl ammonium bromide) surfactants.

【結果と考察】

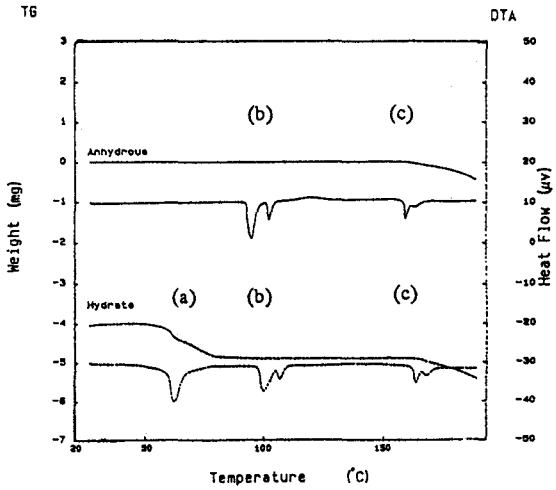


Fig.2 TG-DTA of n-R 2-12 anhydrous and hydrate.

Table1 Elemental Analysis

sample		C%	H%	N%	nH2O
n-R 2-4	m.	42.13	8.87	6.95	
	c.	42.12	8.84	7.02	1/2H2O
	m-c	0.01	0.03	-0.07	
n-R 2-4	m.	39.57	9.06	6.50	
	c.	39.45	8.99	6.57	2H2O
	m-c	-0.29	0.35	-0.18	
n-R 3-4	m.	43.51	9.13	6.64	
	c.	43.59	9.02	6.78	1/2H2O
	m-c	-0.08	0.11	-0.14	
n-R 3-4	m.	42.44	9.19	6.51	
	c.	42.66	9.07	6.63	1H2O
	m-c	-0.22	0.12	-0.12	

（１）ＴＧ－ＤＴＡ測定

昇温過程におけるダイナミックスを調べるためにＴＧ－ＤＴＡ測定を行った。Fig.2に示されているようにＤＴＡ曲線には吸熱過程に伴い、ＴＧ曲線から重量減少が確認されるもの（ａ）と、吸熱過程のみで重量減少が測定されないもの（ｂ）があった。前者は水和している水分子が化合物からとれる離水過程であり、後者は相転移の過程と考えられる。また、融解及び分解に伴い吸熱過程と急激な重量減少（ｃ）が見られた。

（２）元素分析値

各々の試料の水和水量を仮定するために用いた元素分析結果をTable１に示す。

（３）コンホメーション変化

固体高分解能^{13}C-NMRスペクトルをFig.3、4、5に示す。帰属はdipolar dephagingを行いメチル、メチレンの確認を行い各々を比較することから行った。

（i）水和による効果

Table１に示すようにn-R ２-４、n-R ３-４の試料は異なる溶媒から再結晶し、水和数の異なる化合物を調製した。水和数によりスペクトルは大きく異なり、複数観測された。水和数の増加に伴い水和数の少ない成分のシグナルは減少し、代わって水和数の多い成分に特有なシグナルがあらわれた（Fig.3(a)と(b),(d)と(e)）。後者は溶液のスペクトルで観測される対称性の高いシグナルに近づいている。また、n-R ２-１０、n-R ２-１２の無水物と水和物では水和水の有無により$N\text{-}CH_3$のシグナルの本数とアルキル鎖の各炭素のシグナルの化学シフト差に相違が見られた（Fig.4）。この結果は化合物のコンホメーションが水和により変化し、それぞれの水和物がＮＭＲにより同定可能であることを示している。

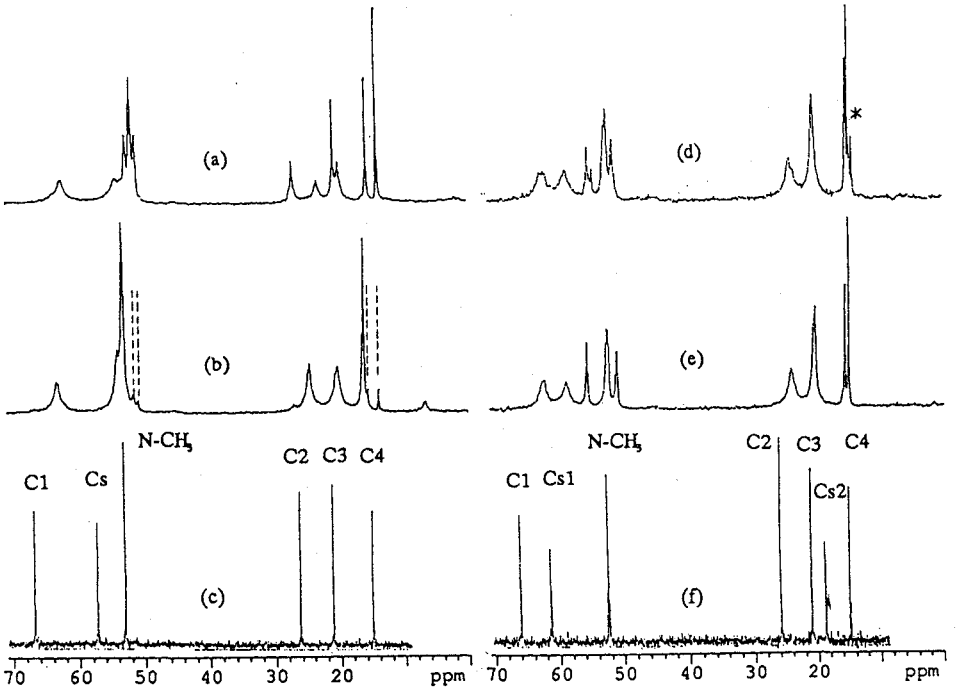


Fig.3 ^{13}C-NMR spectra of n-R 2-4 (a) 1/2H2O (b)2H2O (c) solution and n-R 3-4 (d) 1/2H2O (e) 1H2O (f) solution.

(ii) spacerによる効果

化合物の対称性をspacerを中心にして考えた場合その対称性による影響は化合物中に4つあるN-CH_3の観測されるシグナルの本数に大きくあらわれる。例えば、N-CH_3がC_2、C_i対称性を持つ位置に配置するならば、もともと4本に分かれて観測されるべきシグナルは2本となり、さらに対称性が増しC_{2v}対称性をもつ位置に配置したならば観測されるべきシグナルは1本のみである。n-R 2-4の2水和物（Fig.3(b)）、n-R 2-10の無水物、n-R 2-12の無水物のN-CH_3のシグナルは1本観測された（Fig.3(b)、Fig.4(a),(c)）。これらの化合物はspacerの炭素数が2である。ところでspacerの炭素数が3であるn-R 3-4ではシグナルは4本に分裂して観測されている（Fig.3(d),(e)）。

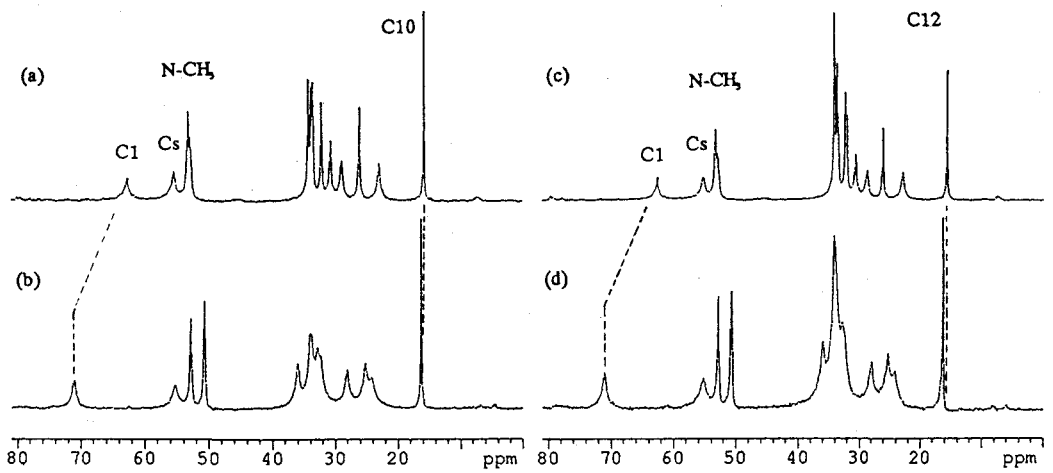


Fig.4 ^{13}C-NMR spectra of n-R 2-10 (a) anhydrous (b) hydrate and n-R 2-12 (c) anhydrous (d) hydrate.

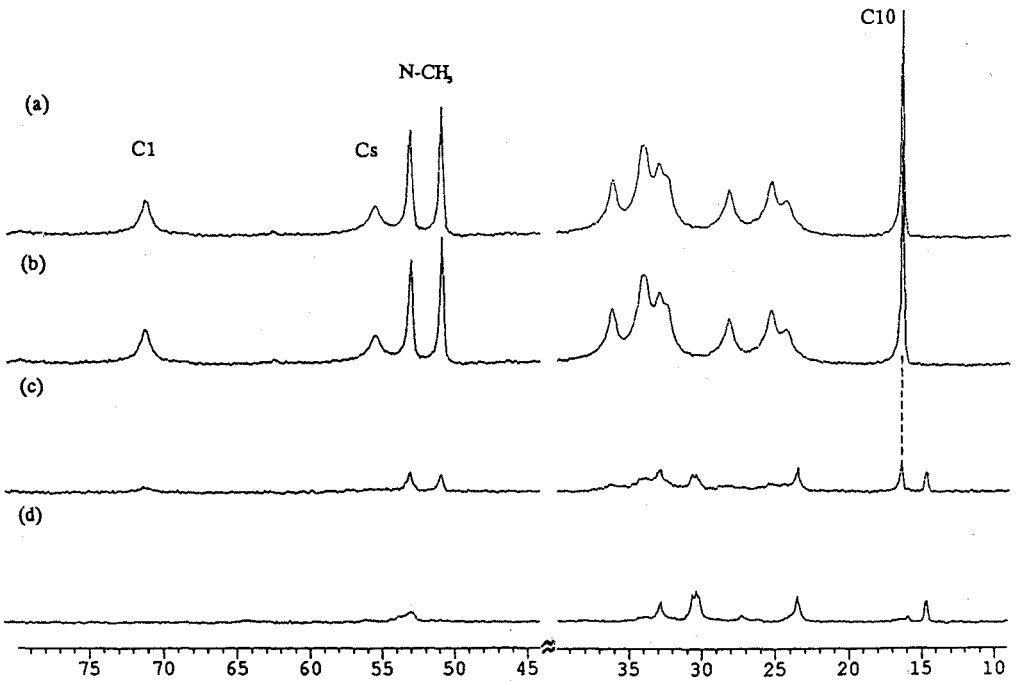


Fig.5 ^{13}C-NMR spectra of n-R 2-10 hydrate at various temperature

(a) room temperature (b) 30℃ (c) 40℃ (d) 40℃ after 1hour .

（iii）アルキル鎖長効果

N-CH_3の対称性はそのもののシグナルばかりでなくアルキル鎖にも影響を及ぼす。n-R 2-10、n-R 2-12の無水物から水和物への移行にともなうシグナルのシフトに着目すると、両化合物においてN-CH_3のシグナルが2本に分裂するとそれに対応してN^+に直接結合しているC1のシグナルは大きく低磁場側に（n-R 2-10では8.5ppm、n-R 2-12では8.6ppm）、アルキル鎖末端のメチル基では小さく低磁場側にシフト（n-R 2-10では0.5ppm、n-R 2-12では0.7ppm）している（Fig.4）。この観測結果からN-CH_3の対称性が崩れることによるアルキル鎖への影響は末端のメチル基からN^+の方向に近づくにつれ大きくなることがわかる。

（iv）温度による影響

n-R 2-10の温度可変のスペクトルを見ると、昇温に伴い末端のC10のシグナルで低磁場シフトが観測された（Fig.5）。低磁場シフトした理由はγ効果によるものと思われるが、シフト量は1.7ppmでありゴーシュートランスの回転運動が起こっていることが考えられる。実際、目視により40℃付近で融解が見られることからこのシグナルは非晶部でのシグナルと思われる。

【結論】

コンホメーション変化は化合物の構造に大きく影響を受けることがわかった。n-Rシリーズではこの変化はspacerの炭化水素数（n）、アルキル鎖長（R）を変化させることで確認できた。また、変化を誘導する因子として水和数が大きな影響をおよぼしていることがわかった。NMRはコンホメーション変化を明確に識別することができ、この現象を追跡することができた。

Reference

1）F.M.Menger,C.A.Littau,*J.Am.Chem.Soc*.**113**,1451,(1991).

P28

N-アセチルグリシンオリゴマーの構造に関する研究

(名工大工) ○渡辺和哉、鳥取英樹、吉野明広、岡林博文

Structual Analysis of N-Acetylglycine Oligomers by NMR Spectroscopy

○ Kazuya Watanabe, Hideki Etori, Akihiro Yoshino, Hirohumi Okabayashi
Nagoya Institute of Technology

Ethyl esters of N-acetylglycine oligomers (residue number = 3 - 9) and acid type of N-acetylglycine trimer were synthesized, and the formation of both polyglycine I (PG I) and polyglycine II (PG II) type crystal structures were investigated by means of X-ray diffraction powder patterns, and high-resolution solid-state ^{13}C-NMR. The results provided ample evidence that these oligomers take up the crystal structures similar to polyglycines I and II, and the PG I type <=> PG II type structural interconversion is possible for ethyl esters of N-acetylglycine oligomers above the residue number 6. It was also found from the results of wideline ^{2}H-NMR spectra that the PG II type oligomers are highly oriented compared with PG I type oligomers, and for acid types of N-acetylglycine oligomers both N- and C- terminal glycine residues are highly oriented.

序論

タンパク質を構成するアミノ酸のうち、最も基本的なグリシンが縮合してできたポリグリシン (PG) は、ジクロロ酢酸(DCA)処理を行うことにより、平面ジグザグ構造 (PG I) をとり、臭化リチウム水溶液 (LiBr) 処理を行うと、らせん構造 (PG II) をとることが知られている。PG Iは単斜晶系であり antiparallel chain-rippled sheet 構造を、PG IIは六方晶系であり 3_1-helix 構造を持ち、PG I及び、PG IIの分子間水素結合距離は、それぞれ 2.95Å、2.73Åであることが知られている。[1,2]

これまでにオリゴグリシンについて PG I型と PG II型のどちらのコンホメーションをとりうるかというグリシン残基数の臨界数についての知見は、少なからず得られている。我々はすでに、ポリグリシンに見られる同一物質での PG I<=>PG IIの相互変換が、非常に短いオリゴマー(トリマー)でも起こりうることを報告した。[3] 本研究では、種々の残基数の N-アセチルグリシンオリゴマーを合成し、DCA 及び LiBr 処理を行った後の両タイプの結晶構造の生成の有無を確認するために、X線パウダーパターン、固体高分解能 ^{13}C-NMR 及び、広幅 ^{2}H-NMR の測定を行った。

実験

(1)N-アセチルグリシンオリゴマーエチルエステルの合成

酸無水物法によりグリシン残基数が 1、2 及び 3 の N-アセチルグリシンを合成し、混合酸無水物法によりオリゴグリシンエチルエステルの塩酸塩と縮合させ目的の N-アセチルグリシンオリゴマーエチルエステルを得た。

(2)重水素化N－アセチルトリグリシンの合成

(1)と同様にして目的のメチレン部分を重水素化したN－アセチルトリグリシンエチルエステルを合成し、水中でアルカリ加水分解した後、酸を加え中和して結晶を析出させ目的の重水素化N－アセチルトリグリシンを得た。

キーワード： 固体高分解能 ^{13}C-NMR、広幅 ^{2}H-NMR、ポリグリシンI型、ポリグリシンII型

わたなべ かずや、 えとり ひでき、 よしの あきひろ、 おかばやし ひろふみ

(3)装置と測定法

X線パウダーパターンは、理学電機RAD-RCを用い、ステップスキャニング法で1.2～50°(2θ)の領域について測定した。X線は、Cu-Kα線を用いた。

固体高分解能^{13}C-NMRはVarian Unity400 plus (100.58MHz) を使用し、室温(25℃)でCP/MAS法を用いた。

広幅^{1}H-NMRの測定は同機 (61.40MHz) を使用し、室温(25℃)で測定を行った。

結果と考察

①X線パウダーパターン

すでに我々は、N-アセチルグリシンオリゴマーエチルエステルについて、IRスペクトル、ラマン散乱スペクトルの測定及び解析を行ってきた。その結果、グリシン残基数が3～5の場合は、DCA処理を行ってもPG I型へのコンホメーション変化は起きずにPG II型のままであり、一方、グリシン残基数が6のものについては、DCA処理がPG I型のコンホメーションを誘起すること、さらにこのヘキサマーをLiBr処理すると、PG II型のコンホメーションに転換することを見出した。[4] これらの観測結果について結晶格子内の分子間の距離を議論するためにX線パウダーパターンの結果を考察する。

DCA処理を施した試料では、すべてのパウダーパターンにおいて3.38Åと4.41～4.42Åの2本の非常に強い回折線が表われる。これはPG I型の3.45Åと4.40Åの回折線に相当するものであり、単斜晶系に配列した分子の分子軸方向に平行な2つの平面からの回折によるものである。LiBr処理を施した試料では、すべてのパウダーパターンにおいて4.16～4.19Åに非常に強い回折線が表われる。これはPG II型の4.15Åの回折線に相当するものであり、六方晶系に配列した分子の分子軸方向に平行な平面からの回折によると考えられる。

Fig.1にLiBr処理を施したグリシン残基数3～9のN-アセチルグリシンオリゴマーエチルエステルのX線パウダーパターンを示す。グリシン残基数が5以下のものではPG IIに表われる3.10Åの回折線の周辺に幾つかのPG IIには見られない回折線が見られ、PG II以外の結晶構造の存在によるものと考えられた。

上記のことから残基数が6～9のN-アセチルグリシンオリゴマーエチルエステルは、PG I型とPG II型の両方の結晶構造を持ちうることがわかった。

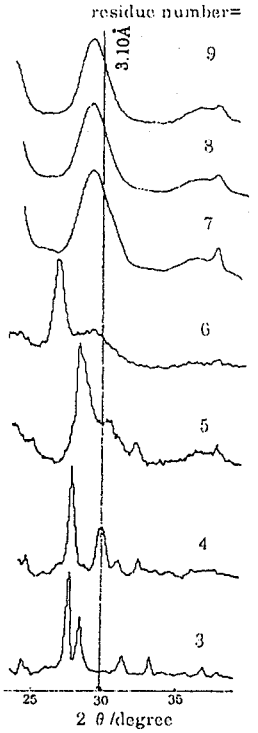


Fig.1 X-ray powder pattern of N-acethylglycine origomers of ethyl ester (LiBr treatment)

②オリゴマーエチルエステルの固体高分解能^{13}C-NMR

さらに、結晶構造を決定する上で重要な要因となる分子間の水素結合について議論するために固体高分解能^{13}C-NMRスペクトルの測定を行った。(Fig.2) グリシン残基中のカルボニル炭素のケミカルシフトと、水素結合距離との間には直線関係が成り立ち、(1)式で表わされることが浅川らによって示されている。[5]

$$\delta_{iso} = 206.0 - 12.4\,R_{N\cdots O} \quad \cdots(1)$$

DCA処理を施した試料においては、ペプチドC=Oの^{13}Cシグナルについては、グリシン残基数が6～9でほぼ一定の値(168.5ppm)を示し、(1)式よりその水素結合距離は3.02Åと見積もられた。LiBr処理を施した試料については、ペプチドC=Oの^{13}Cシグナルについては、グリシン残基数が3～9については、ほぼ一定の値(172.2～173.1ppm)を示し、(1)式より計算するとその水素結合距離は2.65～2.73Åとなった。これらの^{13}C-NMRから推定した結果から、

PG I型オリゴマーとPG II型オリゴマーの水素結合距離は、PG I及びPG IIの水素結合距離によく対応していることがわかる。

Fig.2 に示した固体高分解能 ^{13}C-NMRスペクトルの線形を比較するとLiBrを施した試料においてはグリシン残基数が6以上では、ほぼ同様なパターンを示すが、残基数が 3～5 では、ペプチドカルボニルより低磁場側に 172.02～174.51ppm の ^{13}C シグナルがはっきりと分離して見られ明らかに異なるパターンを示す。これは、グリシン残基数が6以上でないとPG Iのコンホメーションをとれないことに関係していると思われる。

③N-アセチルトリグリシンの固体高分解能 ^{13}C-NMR

C末端がOHの酸型においてはグリシン残基数が3以上でPG I型及びPG II型のコンホメーションをとりうるので、その臨界の残基数であるトリマーを用いて、より詳細なN-アセチルグリシンオリゴマーの固体構造について議論を行う。エチルエステルと同様にして(1)式を用いて水素結合距離を見積もった結果はDCA処理を施した試料は2.95Åであり、LiBr処理を施した試料は2.64Åであった。これらの値はPG IとPG IIの水素結合距離によく対応しており、酸型のオリゴマーにおいてもポリマーによく類似した水素結合構造をしていると考えられる。Fig.3 にN-アセチルトリグリシンの、DCA処理を施したもの、未処理のもの、LiBr 処理を施したものについて、ペプチドカルボニル炭素部分の ^{13}C-NMR スペクトルを示す。3 つのスペクトルの線形を比較してみると、Fig.3(a)とFig.3(b)ついては、非常にシャープな線形をしているが、Fig.3(c)については、線幅の広いスペクトルを示している。線幅が広がったのは Fig.2(b)のペプチドC=O のピーク(172.75ppm) とアセチルC=O のピーク(174.41ppm)が重なったためであり，水素結合様式が等しくなったと考えられる。一般的に、線幅の増大は運動性の低下を意味するので、このことはLiBr処理を施しPG II型のコンホメーションをとることによって、分子の運動が制限されていることを示唆している。この理由の一つとして分子の配向性の違いが挙げられる。

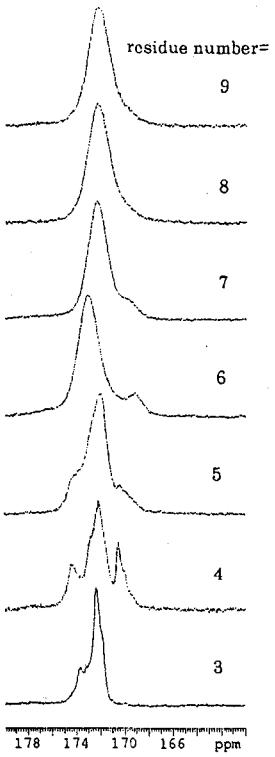


Fig.2 Solid-state ^{13}C-NMR spectra of N-acethylglycine origomers

④N-アセチルトリグリシンの広幅 ^{2}H-NMR

より詳細な固体構造についての知見を得るために、N-アセチルトリグリシンの各メチレン部分を一カ所だけ選択的に重水素化した3種の試料を合成し、それぞれの溶媒処理を施しPG I型、PG II型両タイプの試料を得て、^{2}H-NMR の測定を行い、分子配向性について比較・議論を行った。Fig.4 にN-アセチルトリグリシンの構造式を、Fig.5 に各重水素化されたN-アセチルトリグリシンの ^{2}H-NMR スペクトル示す。

各スペクトルの線形を比較してみると、未処理のものとDCA処理を施したものについては、数多くの ^{2}H シグナルが見られることから分子のどの部分においても一方向に配向していないことが示された。一方、LiBr 処理を施すことによって、N-末端側のメチレンを重水素化した試

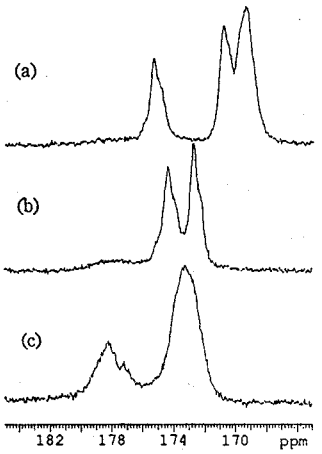


Fig.3 Solid-state ^{13}C-NMR spectra of N-acethyltriglycine
(a)DCA treatment (b)original
(c)LiBr treatment

料と、C-末端側のメチレンを重水素化した試料については、スペクトルが鮮明になることから、重水素化された付近の分子の配向性が高くなっていることがわかった。中央のメチレンを重水素化した試料については数多くの ^{2}H シグナルが見られることから、C-D 結合が一方向に配向していないことが推定された。これらの結果は先の ^{13}C-NMR スペクトルから得られた結果（LiBr 処理を施したものは線幅が広くなり運動が制限されているが DCA 処理を施したもの及び、未処理のものは線幅が非常に細くなり運動性が高い）と一致する。

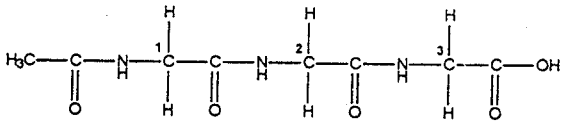


Fig.4 Structure of N-acethyltriglycine

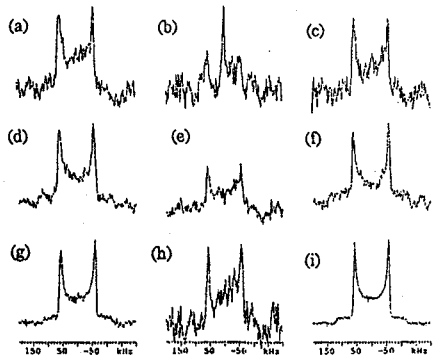


Fig.5 Wideline ^{2}H- NMR spectra of N-acethyltriglycine
(a),(b),(c) DCA treatment (d),(e),(f) original (g),(h),(i) LiBr treatment
(a),(d),(g) Deuterated at the 1 position (b),(e),(h) Deuterated at the 2 position (c),(f),(i) Deuterated at the 3 position

結論

N-アセチルグリシンオリゴマーにおいてもポリグリシンⅠ型とⅡ型に類似の結晶格子及び、水素結合距離を持つことがわかった。エチルエステルの場合，グリシン残基数が 3~5 までの間では、PG Ⅱ型のコンホメーションのみをとるが残基数が 6 以上では PG Ⅰ型、PG Ⅱ型双方のコンホメーションをとりうるようになる。このことは、グリシン残基数が 6 以上でポリグリシンの性質を持つようになることを示している。また、選択的に部分重水素化することによって、PG Ⅱ型の方が PG Ⅰ型よりも分子配向性が高く、その配向を決定しているのは両末端のグリシン残基部分である事が解った。

参考文献：
(1) Crick, F.H.C.;Rich, A. Nature(London)1955,176,780.
(2) Lotz, B. J.Mol.Biol. 1974,87,169.
(3) H. Okabayashi, K. Ohshima, H. Etori, K. Taga, T. Yoshida J. Phys. Chem. 1989,93,6638
(4) 日本化学会第 68 秋季年会 1F301(1994)
(5) N. Asakawa, H. Kurosu, I. Ando, A. Shoji, T. Ozaki J. Mol. Struct. 1994,317,119

P29

２次元固体^{13}C,^{15}N-NMRによる安定同位体標識アデノシンの完全帰属

（横浜国大工）○菅瀬 謙治、藤原 敏道、 阿久津 秀雄
（都立大理）小野 明、小野 晶、甲斐荘 正恒

Complete Assignments of Uniformly Isotope-Labeled Adenosine by Two-Dimensional Solid-State^{13}C,^{15}N-NMR

○Kenji Sugase[1],Toshimichi Fujiwara[1],Akira Ono[2],
Akira Ono[2],Masatsune Kainosho[2], and Hideo Akutsu[1]

[1]*Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Yokohama National University*
[2]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*

Two-dimensional solid-state ^{13}C dipolar HOHAHA and 2-D ^{13}C-^{15}N TEDOR experiments were performed for uniformly isotope-labeled adenosine. All the ^{13}C and ^{15}N signals were assigned from the ^{13}C-^{13}C and ^{13}C-^{15}N dipolar couplings. In the mixing periods, ^{13}C-^{13}C and ^{13}C-^{15}N dipolar couplings under MAS conditions were recovered by USEME and TEDOR pulses respectively, which are rf multipulse sequences applied synchronously with sample spinning. Dipolar mixing periods were set to times at which only spin pairs connected with direct covalent bonds give rise to cross peaks in the 2-D spectra. Thus, these high resolution 2-D spectra unveil a network of ^{13}C and ^{15}N spins connected with covalent bonds in solids.

【緒言】

溶液NMRでは、タンパク質など生体高分子の全構造解析を目的とした、安定同位体標識と多次元NMRを組み合わせた方法論が確立している。私たちは、固体状態の生体分子を対象に、同様な方法論の開発を試みている。複雑な生体高分子について多くの構造情報を効率よく得るには、分解能の高い等方化学シフト相関多次元NMRを用いることが不可欠である。今回は、２次元^{13}C dipolar HOHAHA法と２次元^{13}C-^{15}N TEDOR法を^{13}C,^{15}Nで一様に標識したアデノシンに適用し、^{13}C-^{13}Cと^{13}C-^{15}N双極子結合を用いてすべての信号の自己完結的な帰属を行ったことを報告する。

２次元固体NMR、信号帰属、安定同位体標識、マジック角試料回転、^{13}C-^{13}C,^{13}C-^{15}N双極子相互作用

○すがせ けんじ、ふじわら としみち、あくつ ひでお
おの あきら、おの あきら、かいのしょう まさつね

【実験】

すべてのNMR実験は静磁場強度9.4TでChemagneticsCMX400核磁気共鳴装置を用いて行った。

^{13}C同種核双極子相関

^{13}C同種核双極子相関を得るために用いたのは２次元^{13}C dipolar HOHAHA法(Fig.1)である。２次元^{13}C dipolar HOHAHA法では、初めにCPで^{1}Hから^{13}Cに磁化が移される。混合期において試料回転周期τ_Rに同期した多重パルス(SE+ME+π)を繰り返し照射すると^{13}C同種核双極子相互作用が復活する。それによって^{13}C磁化が^{13}C-^{13}C間を移動する。

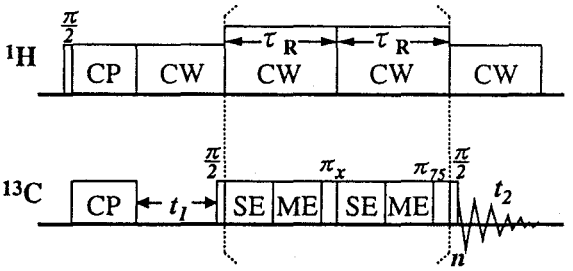


Fig.1 Pulse sequence for 2-D dipolar HOHAHA

この混合時間を調節すると共有結合で結ばれた^{13}C-^{13}C間にのみ交差ピークが生じるようにすることができる。すなわち、その２次元NMRスペクトルより共有結合で結ばれたスピン対の関係が明らかになる。実際の実験では、２チャンネルブロードバンド用CP/MASプローブで約20mgの標識アデノシンに対して5kHzのMAS条件下で測定を行った。CPの接触時間は4msとした。dipolar HOHAHAの混合期の^{13}C RFパワーは50kHz、^{1}Hのデカップリングパワーを95kHzとし、混合時間は1.2msとした。また積算の繰り返し時間を40s、１つのFIDを得るための積算回数を８回とした。

^{13}C-^{15}N異種核双極子相関

^{13}C-^{15}N異種核双極子相関を得るために用いたのは２次元^{13}C-^{15}N TEDOR法(Fig.2)である。２次元^{13}C-^{15}N TEDOR法では、CPによって^{1}Hから^{15}Nに移された磁化が、TEDORの混合期に復活した^{13}C-^{15}N異種核双極子相互作用によって^{15}Nから^{13}Cへ移される。

なお、^{13}Cの最初のπ/2パルスは観測時に^{15}Nから^{13}Cへ移動した磁化に^{13}Cの初期磁化が混入するのを防いでいる。

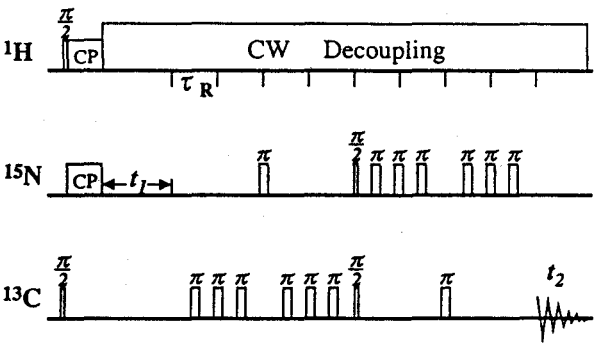


Fig.2 Pulse sequence for 2-D TEDOR

実験では、^{1}H,^{13}C,^{15}N ３チャンネル用CP/MASプローブで約40mgの標識アデノシンに対して5kHzのMAS条件下で測定を行った。^{1}H-^{15}NのCPの接触時間を7.5msとした。^{13}C,^{15}N RFパワーは42kHzで^{1}Hのデカップリングパワーを52kHzとし、混合時間は共有結合した^{13}C-^{15}N間にのみ交差ピークが生じるように1.6msとした。また積算の繰り返し時間を40s、１つのFIDを得るための積算回数を１６回とした。

【結果】

標識アデノシンの２次元^{13}C dipolar HOHAHAスペクトルをFig.3(左, 糖；右, 塩基)に示す。縦軸、横軸ともに^{13}Cの化学シフトである。まず糖ではC1'からC5'まで５個の炭素原子が共有結合で結ばれているのでスペクトル上でも５個の炭素原子のシグナルが相関ピークで結ばれている。ここで92.6ppmをC1'のシグナルと仮定すると、相関ピークをたどることによって75.4ppmがC2'と決まる。同じようにして相関ピークをたどると順に、C3'(71.5ppm),C4'(85.1),C5'(63.2)が決定する。また、塩基ではスペクトル上でC4,C5,C6の３個の炭素原子のシグナルが相関ピークで結ばれている。構造式から考えるとC5だけが２個の炭素原子と共有結合しているので２つのシグナルと相関ピークで結ばれた120.8ppmのシグナルがC5のシグナルと決定する。C4,C6についてはC5のシグナルと相関ピークで結ばれた148.5ppm,155.6ppmのシグナルの一方がC4で他方がC6のシグナルであると言うことしかできない。またC2,C8は相関ピークで結ばれた３つのシグナル以外の位置に存在するということ以上は分からない。なお、＊で表わされているものはスピニングサイドバンドである。

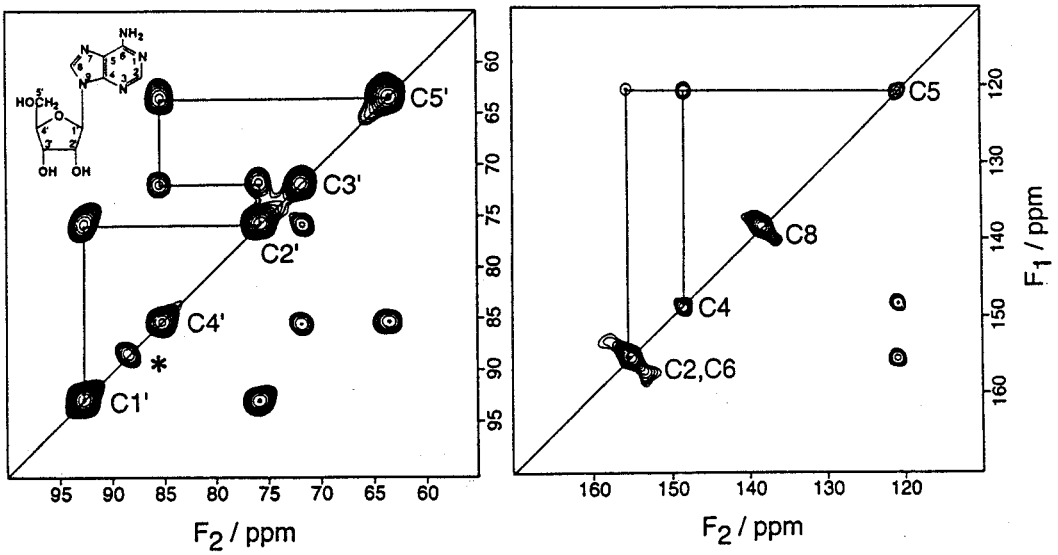


Fig.3 2-D ^{13}C dipolar HOHAHA spectra of ^{13}C and ^{15}N labeled adenosine

以上より^{13}C同種核双極子相関だけでは、完全な帰属をすることはできず、^{13}C-^{15}N異種核双極子相関が必要なことが分かった。

Fig.4は標識アデノシンの２次元^{13}C-^{15}N TEDORスペクトルである。縦軸が^{15}Nの化学シフト、横軸が^{13}Cの化学シフトである。ここでの帰属はC1'に着目する。糖ではC1'だけが窒素(N9)と共有結合しているので(^{13}Cの化学シフト[ppm],^{15}N の化学シフト[ppm])=(92.6,172.5)が(C1',N9)の相関ピークと決定する。これによって２次元^{13}C dipolar HOHAHAにおけるC1'の仮定が正しかったことが証明され、同時に糖の帰属が完了する。次に、N9を見るとN9はC4,C8と共有結合しているので(148.5,172.5)と(138.1,172.5)の相関ピークの一方は(C4,N9)で他方が(C8,N9)の相関ピークであることになる。ここで２次元

^{13}C dipolar HOHAHAの結果よりC4のシグナルは148.5ppmか155.6ppmに位置していることが分かっているので(148.5,172.5)が(C4,N9)の相関ピークで(138.1,172.5)が(C8,N9)の相関ピークと決まる。また同時にC6のシグナルが必然的に155.6ppmとなる。以下、同様に帰属を行った。

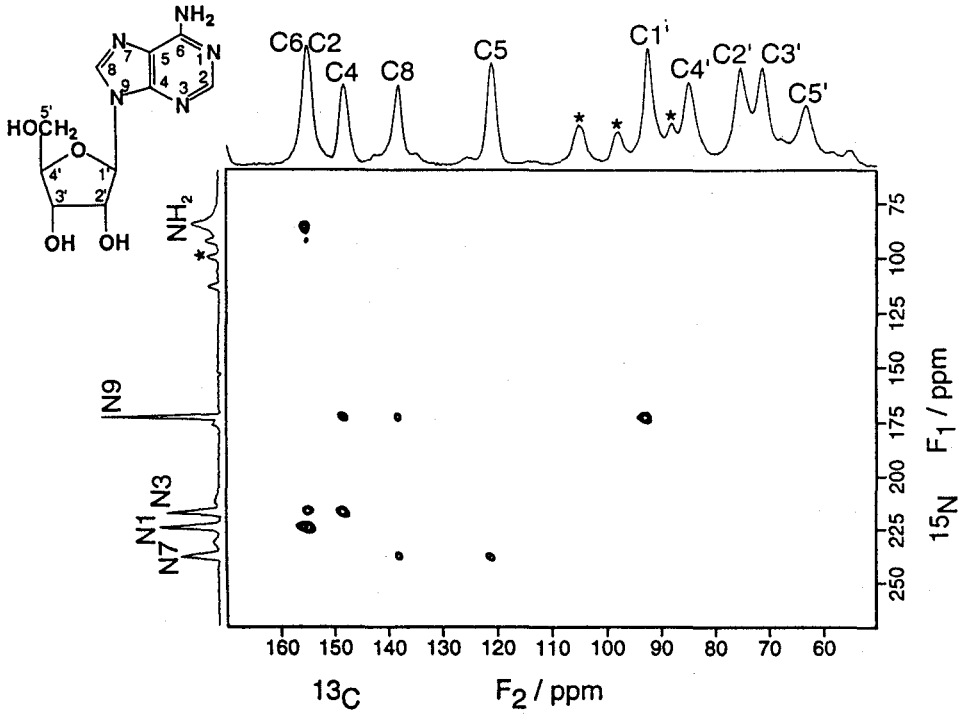


Fig.4 2-D ^{13}C,^{15}N TEDOR spectrum of ^{13}C and ^{15}N labeled adenosine

以上、２つの２次元NMR実験により標識アデノシンの^{13}C-^{13}C間と^{13}C-^{15}N間の双極子相関が得られ、これにより^{13}C,^{15}N-NMRシグナルの帰属が完了した。その結果をまとめると、C2(154.8ppm),C4(148.5),C5(120.8),C6(155.6),C8(138.1), C1'(92.6),C2'(75.4),C3'(71.5), C4'(85.1),C5'(63.2), N1(223.9),N3(217.2),N7(237.7),NH_2(85.2)となる。なお、標準物質として^{13}Cはヘキサメチルベンゼン(17.17ppm)、^{15}Nは飽和$^{15}NH_4Cl$(27.34ppm)を使用した。

【考察】

一般に天然に存在する核酸を試料に用いる場合、観測される^{13}C,^{15}Nに対して^{13}C-^{13}Cと^{13}C-^{15}Nのスピン-スピン結合がまずないため、そのシグナルを帰属するのは難しい。これまでの核酸の固体NMRシグナルの帰属は主に溶液NMRの結果に依存している。しかし、今回の私たちが行った実験のように^{13}Cと^{15}Nで一様に標識した試料を用いて^{13}C同種核双極子相関、及びに^{13}C-^{15}N異種核双極子相関を得ることによって自己完結的な帰属を行えることが分かった。また、今回の実験から固体生体分子についても同位体標識と多次元等方化学シフト相関NMRを組み合わせた方法が構造解析に有効であることが分かった。

P30　固体高分解能^{15}N-NMR法を用いたグリシン含有ペプチドのN-H···O=C水素結合に関する研究

(姫路工大・理)　内藤　晶、○福谷　章、辻　暁、斉藤　肇

Study on hydrogen bonding of N-H···O=C systems in peptides containing glycine residues by high resolution solid state ^{15}N-NMR

(Department of Life Science, Himeji Institute of Technology)

Akira Naito、○Akira Fukutani、Satoru Tuzi、Hazime Saito

In order to investigate the relationship between N-H bond lengths and their strengths of N-H···O=C hydrogen bond , we have measured N-H bond length accurately in amide nitrogen of simple peptides containing glycine residues by means of high resolution solid state ^{15}N-NMR spectroscopy. The results show that the longer N-H bond lengths make the weaker hydrogen-bondings. ^{1}H dipolar coupled ^{15}N powder pattern was obtained using homonuclear decoupling pulses. The ^{15}N-^{1}H bond direction with respect to the principal axis system of ^{15}N chemical shift tensor was evaluated by analyzing the powder pattern. It turned out that the direction is also sensitive to the strength of hydrogen bonding.

1.序論

N-H···O=C水素結合は、タンパク質の高次構造の形成にとって重要な役割を果たしている。この水素結合の強さを評価する方法として、赤外分光法によるN-H伸縮振動(ν_{NH})の観測や固体高分解能NMRによる^{1}H,^{13}C,^{15}N核の化学シフト(テンソル)値や^{17}O-NMR法による核四極子定数の研究がなされている。本研究では、構造に直接的なN-H原子間距離(r_{NH})を^{15}N-^{1}H磁気双極子相互作用の解析から決定しN-H···O=C水素結合の強さとの相関をペプチド中のグリシン残基のアミド窒素について検討してみた。また、^{15}N化学シフトテンソルの主軸と^{15}N-^{1}H原子間ベクトルの相対方向を決定する新しい方法の検討も行ない、水素結合との相関について議論する。

2. 実験

試料の調製

C末端に位置するグリシン残基のアミド窒素を^{15}Nで標識した試料としてGly-L-Pro-D-Leu-[^{15}N]Gly,Gly-[^{15}N]Gly,Val-Gly-[^{15}N]Gly、C末端から離れたグリシン残基のアミド窒素を^{15}Nで標識した試料としてTyr-[^{15}N]Gly-Gly-Phe-Leu・H_2O, Acetyl-

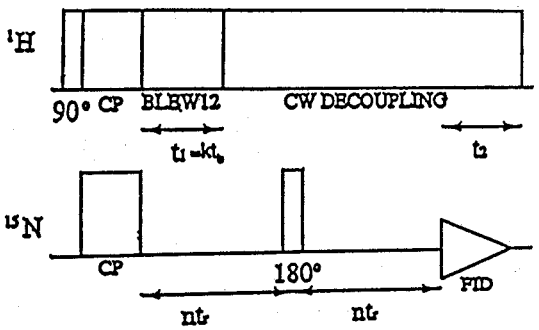
N-H原子間距離、N-H···O=C水素結合、SLDF法、^{1}H双極子結合^{15}N粉末スペクトル、グリシン含有ペプチド

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

Pro-[^{15}N]Gly-Phe, Val-[^{15}N]Gly-Gly, をペプチド合成機を用いて固相法により合成し、得られた粗製試料をHPLCで精製した。さらに、結晶化を行い多結晶を調製した。

固体高分解能^{15}N-NMR法

r_{NH}の決定は、SLDF (Separated Local Dipolar Field)法にCP-MASを併用して行った。このパルス系列をFig.1に示す。^{1}H核に対して、2次元の展開期にBLEW12(多重パルス)による同種核間デカップリングを行い、検出期にcwデカップリング下で^{15}N核を観測した。CPとFID検出の中間に^{15}N核にπパルスを照射することにより、FID検出開始時における^{15}N化学シフトの異方性による位相のずれを打ち消した。得られた2次元スペクトルのF1軸にはr_{NH}に依存する^{15}N-^{1}H双極子相互作用を示すスペクトルが、F2軸には^{15}Nの化学シフト相互作用のみを示す固体高分解能スペクトルが現われた。



t_1— Irradiation time of multiple pulses
k— Integer (Variable)
t_c— One cycle period of multiple pulses
t_2—Detection time of FID
n— Integer (Constant)
t_r— Rotor period

Fig.1 Pulse sequence for 2D-MAS-SLDF method

^{15}N化学シフトテンソルの主軸と^{15}N-^{1}H原子間ベクトルの相対方向の決定のためのパルス系列をFig.2に示す。通常のCP法において^{1}H核をcwデカップリングする代わりにBLEW12(多重パルス)で^{1}H核同種核デカップリングを行い^{15}N核でFID検出した。この方法を適用することより^{1}H双極子結合^{15}N粉末パターンが得られ、単結晶や配向試料を用いずにペプチド面における^{15}N化学シフトテンソルの主軸とN-H原子

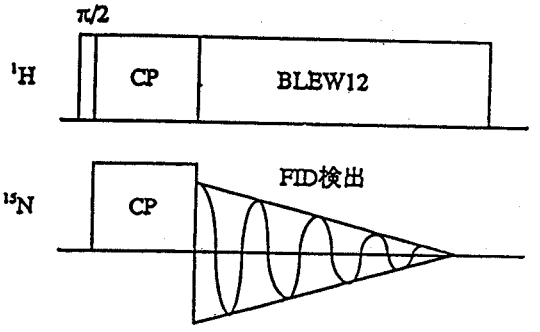


Fig.2 Pulse sequence for obtaining ^{1}H dipolar coupled ^{15}N powder pattern

間ベクトルの相対方向をFig.3のような(r,a,b)の極座標で決定した。

赤外吸収法によるN-H伸縮振動(ν_{NH})の観測

赤外吸収法によるグリシンアミドのν_{NH}の観測はKBr法を用いて行った。ν_{NH}のピークの帰属は、^{15}Nで安定同位体標識した試料が安定同位体標識していない試料に比べて、約8cm^{-1}低波数シフトすることを利用して行った。

3.結果および考察

^{15}N-^{1}H原子間距離(r_{NH})の決定

2D-MAS-SLDFによるVal-Gly-[^{15}N]Glyのr_{NH}の測定結果とF1軸のシミュレーションスペクトル(ローターの周期:1500Hz,N-H原子間距離:r_{NH},BLEW12のスケーリングファクター:0.475)をFig.4に示す。^{15}N化学シフト異方性のためF2軸のサイドバンドがローターの周期ごとに現われるので、それらのF1軸のクロスセッションを足し合わせた。足し合わせたスペクトルをシミュレーションスペクトルと比較して、r_{NH}を±0.01Åの精度でTable1のように決定した。なお、センターバンドは疑似信号が重なっているため、シミュレーションでは考慮しなかった。

測定されたN-H原子間距離とN-H···O=C水素結合の強さと相関を示すパラメーターとして知られている^{15}Nδ_{iso}(化学シフト等方値)、δ_{33}、N···O距離($r_{N\cdots O}$)およびν_{NH}との比較を行ってみた。これらの値もTable1に示した。これらのパラメーターについてN-H···O=C水素結合が強いペプチドほど、^{15}Nδ_{iso},δ_{33}の値は低磁場シフトし、$r_{N\cdots O}$は短くなる傾向があり、ν_{NH}は低波数シフトすることが報告されている。Table 1では、r_{NH}が長いものほど^{15}Nδ_{iso},δ_{33}は高磁場シフトし、$r_{N\cdots O}$は長くなり、ν_{NH}は高波数側へシフトする傾向がみられた。この結果は、N-H···O=C水素結合が強いほどr_{NH}が短くなることを示唆している。この現象を次のように解釈した。水素結合が強くなるほどプロトンの振動が束縛を受け熱振動の振幅が小さくなる。このため^{15}N-^{1}H双極子相互作用の平均化が起こりにくくなりr_{NH}は短く現われる。

^{15}N化学シフトテンソルの主軸と^{15}N-^{1}H原子間ベクトルの相対方向の決定

Tyr-[^{15}N]Gly-Gly-Phe-Leuにおける^{1}H双極子結合^{15}N粉末パターンとシミュレーションスペクトルをFig.5に示す。シミュレーションは、^{15}N化学シフトテンソルの主値:(δ_{11},δ_{22},δ_{33})、N-H原子間距離:r_{NH}、BLEW12のスケーリングファクター:0.475を定数とし、角度a,bを変数として±2° の精度で角度a,bをTable1のように決定した。解析の結果、δ_{22}軸がペプチド面にほぼ垂直であり、δ_{11}軸、δ_{33}軸がペプチド面上にあることが分かった。また、Gly-L-Pro-D-Leu-[^{15}N]Glyではδ_{22}とδ_{33}の大小関係が逆転していることが明らかになった。この大小関係の逆転は、通常の^{15}N化学シフト粉末パターンでは判別できないことを注意しておきたい。さらに、水素結合が強くなるほどN-H結合方向がδ_{11}の方向と一致する傾向が見られた。本研究により水素結合の評価に固体高分解能^{15}N-NMRが有用であることが判明した。

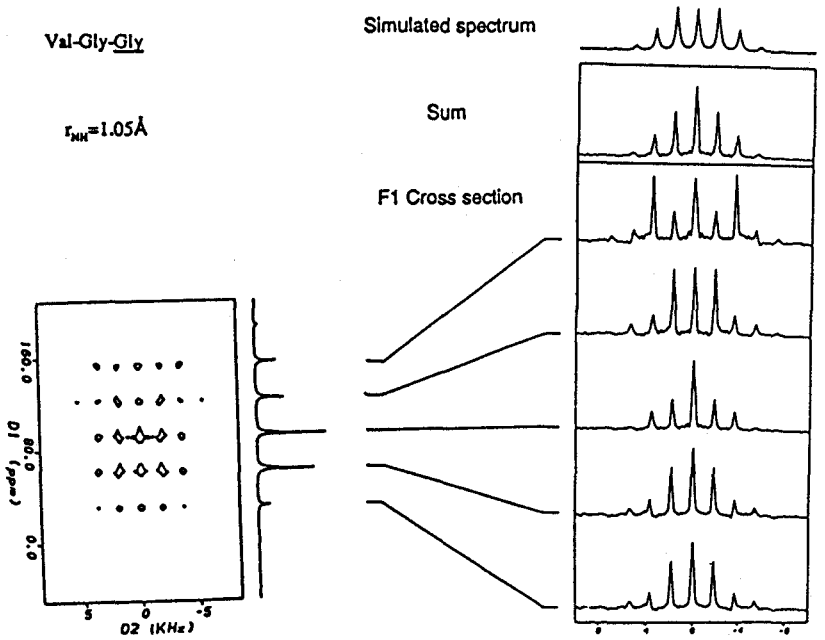


Fig.3 2D-MAS-SLDF spectrum, the slices of F1 dimension and the simulated spectrum

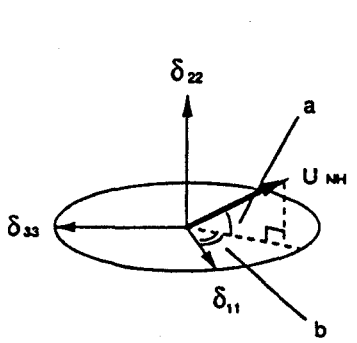


Fig.4 Direction of N-H bond in the principal axis system of ^{15}N chemical shift tensor

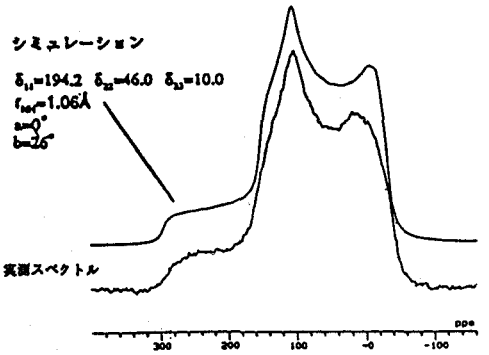


Fig.5 ^{1}H dipolar coupled ^{15}N powder pattern spectrum and the simulated spectrum

Table 1 N-H bond lengths,N-H stretching frequency, principal values of chemical shift tensors , N···O distances and a,b angle for various kinds of peptides

Sample	r_{NH} (Å)	δ_{iso} (ppm)	δ_{11} (ppm)	δ_{22} (ppm)	δ_{33} (ppm)	$r_{N\cdots O}$ (Å)	a	b	ν(N-H) (cm^{-1})
Gly-Pro-D-Leu-Gly	1.00	99.8	205.3	39.7	54.4	2.86	5°	14°	3311
Gly-Gly	1.02	95.9	203.2	57.3	27.2	2.94	10°	21°	3290
Val-Gly-Gly	1.04	94.0	199.6	62.5	19.9	3.05	5°	21°	3334
Val-Gly-Gly	1.05	92.3	203.3	54.9	18.7	3.05	5°	21°	3323
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	1.06	83.4	194.2	46.0	10.0	——	0°	26°	——
Acetyl-Pro-Gly-Phe	1.08	81.7	190.7	33.9	20.5	2.85	0°	21°	3347

P31

多重ラベルした^{13}C $-^{15}N$間の双極子相互作用の選択的測定法

京大理　○武田 和行、竹腰　清乃理、寺尾　武彦

Selective Recoupling of $^{13}C-^{15}N$ Dipolar Interactions in a Multiple Labeled Sample

Kazuyuki Takeda, K.Takegoshi, and T.Terao

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University,

Kyoto 606-01, Japan

Abstract

In order to observe a particular $^{13}C-^{15}N$ dipolar interaction in a multiple [^{13}C, ^{15}N] labeled sample, we have examined the effect based on the rotary resonance recoupling[1, 2]. Firstly, all the dipole interactions are averaged to be zero by magic angle spinning(MAS). Secondly, by applying an rf selectively on a particular ^{15}N, one can recover all dipole interactions between the ^{15}N spin and the ^{13}C spins.

Theory

The heteronuclear dipolar interaction for the I and S spins under MAS can be written as

$$H_d = d(t) I_Z S_Z \quad ,$$

where $d(t)$ denotes a spatial part of the interaction, which oscillates at frequencies of MAS(ω_r and $2\omega_r$). The rf irradiation on the I spin (^{15}N) rotates the spin part as

$$I_Z \rightarrow I_Z cos\omega_1 t + I_X sin\omega_1 t \quad ,$$

where the irradiation is along the Y axis and its intensity is ω_1. When $\omega_1 = \omega_r$, the time-averaging of the spatial part by MAS is interferred by the modulation on the spin part, thus, a part of interaction becomes time-independent.

MAS / rotary resonance / dipolar interaction / solid state NMR

たけだかずゆき、たけごしきよのり、てらおたけひこ

Experimental

NMR measurements were carried out using a modified JEOL GSX-200 NMR spectrometer, operating at 200 MHz for ^{1}H, and 50MHz for ^{13}C. A ^{1}H–^{13}C–^{15}N triply tuned MAS probe was developed.

Results and Discussion

Fig.1 shows observed ^{13}C spectra of 99% doubly enriched [^{15}N, 2–^{13}C] valine under MAS. Fig.1(a) shows a conventional CP-MAS spectrum without rf irradiation on ^{15}N. Fig.1(b) shows the effect of applied irradiation on ^{15}N with an intensity chosen to satisfy the rotary resonance condition ($\nu_1 = \nu_r = 1.8$kHz). The particular lineshape found in Fig. 1(b) can be analyzed by reintroduced anisotropic heteronuclear ^{13}C–^{15}N dipolar interaction. Modifications of the CW irradiation used in the original rotary resonance experiment are underway with a hope of improving the selectivity. Such modifications include a composite pulse and the double irradiation[2].

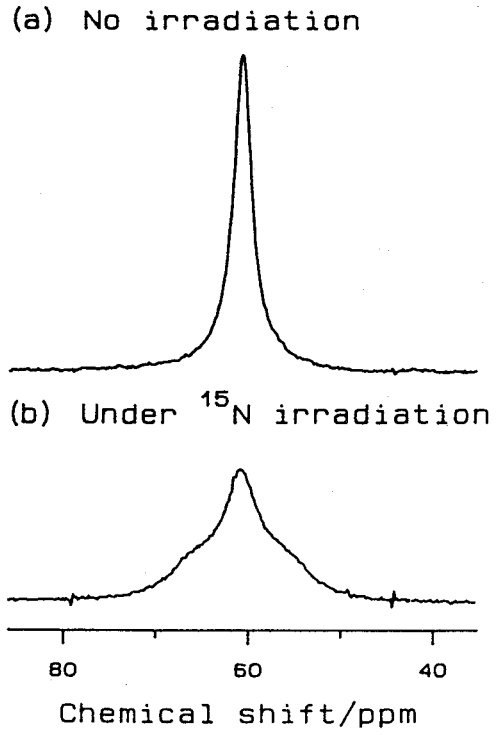


Figure 1. ^{13}C CP-MAS spectra of 99% doubly enriched [^{15}N, 2–^{13}C] valine (a) with no rf irradiation at ^{15}N and (b) with an rf irradiation "on resonance" to ^{15}N so as to fulfill the rotary resonance condition. The spinning frequency of the sample is 1.8kHz.

Reference

1. T.G.Oas, R.G.Griffin, M.H.Levitt, J.Chem.Phys. **89**(2), 692 (1988)

2. K.Takegoshi, K.Nomura, T.Terao, Chem.Phys.Lett. **232**, 424 (1995).

P32

^{15}N NMR によるε-カルボベンゾキシ L-リシン含有ポリペプチドの固体構造解析

(群馬大工)　○芦川幹也・河村智行・尾崎拓男・荘司　顯

Structural Analysis of Solid Polypeptides Containing ε-Carbobenzoxy L-Lysine Residue by ^{15}N NMR.

Mikiya Ashikawa, Tomoyuki Kawamura, Takuo Ozaki, and Akira Shoji

Department of Biological Sciences, Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma 376

Abstract : In order to elucidate the relation between the ^{15}N NMR chemical shift and the structure (amino-acid sequence and conformation) of solid polypeptides, we have synthesized poly (ε-carbobenzoxy L-Lysine) and some copolypeptides containing α-^{15}N-labeled ε-carbobenzoxy L-Lysine (Lys*(Z)) residue. It was found that the ^{15}N chemical shift of Lys*(Z) residue depends not only on conformation but also on amino-acid sequence of copolypeptide. Thus, the ^{15}N chemical shift of Lys*(Z) residue is very useful for the analysis of conformation of solid polypeptides.

緒言）われわれはこれまでに、ポリペプチドの^{15}N化学シフトがコンホメーションおよびアミノ酸残基の種類により異なるだけでなく、アミノ酸配列をも反映することを報告してきた[1,2]。本研究では、これまでのアルキル側鎖およびベンジルエステル側鎖を有するアミノ酸と異なり、側鎖にアミド結合を有するε-カルボベンゾキシL-リシンに着目し、そのホモポリペプチドおよびコポリペプチドについてε-カルボベンゾキシL-リシン残基の^{15}N化学シフトとポリペプチドのコンホメーション、および^{15}N化学シフトと共重合アミノ酸残基の種類との関係について検討した。

実験）本研究で用いたα-^{15}Nラベル(99 %) ε-カルボベンゾキシL-リシン（Lys*(Z)）残基を含むポリ(ε-カルボベンゾキシL-リシン)　($[Lys^*(Z)]_n$)、および他の天然存在比アミノ酸（X = Gly, L-Ala, L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Asp(OBzl), L-Glu(OBzl), D-Ala, D-Val）とのコポリペプチド（$[Lys^*(Z), X]_n$）はN-カルボキシアミノ酸無水物（NCA）法により合成した。各試料のコンホメーション解析は、赤外吸収スペクトルおよび^{13}C CP-MAS NMR スペクトルにより行なった。

^{13}Cおよび^{15}N CP-MAS NMR スペクトルの測定は、JEOL EX-270 WB 型分光計により、それぞれ67.8 MHzおよび 27.3 MHzで行なった。^{15}N化学シフトは$^{15}NH_4NO_3$を基準（δ = 0 ppm）とし、$^{15}NH_4Cl$（δ = 18.0 ppm）を二次基準とした。

固体高分解能NMR・^{15}N化学シフト・コンホメーション・ε-カルボベンゾキシL-リシン

あしかわ　みきや、かわむら　ともゆき、おざき　たくお、しょうじ　あきら

結果・考察）観測されたLys*(Z)残基の^{15}N化学シフトをFigure 1に示した。ホモポリペプチドの場合、[Lys*(Z)]$_n$-100ではα-ヘリックスのピーク（97.5ppm）のみが、[Lys*(Z)]$_n$-5ではα-ヘリックスのピーク（97.7ppm）に加えて低磁場側に二本のピーク（103.0, 107.1ppm）が観測された（Figure 2）。[Lys*(Z)]$_n$-5の^{13}C CP-MAS NMR スペクトル（Figure 3）では、β-シートのピークは一本しか観測されなかったことから、この二本のピークはいずれもβ-シートに由来するものと考えられるが現時点では詳細な帰属は不明である。

コポリペプチドの共重合アミノ酸残基（X）がL-アミノ酸の場合、β-シートのピーク（105.2～105.9ppm）は、α-ヘリックスのピーク（96.5～99.2ppm）より低磁場側に観測された。この様なコンホメーション依存性はVal*残基、Leu*残基、Asp(OBzl)*残基の場合と同じ傾向であり、Lys*(Z)残基の^{15}N化学シフトがポリペプチドのコンホメーション解析に有効であることが明らかになった。

共重合アミノ酸残基（X）がD-アミノ酸の場合、β-シートをとるD-Valは同じくβ-シートをとるL-Valよりも6.1ppm 高磁場シフトしている。これに対し左巻α-ヘリックスをとるD-Alaと右巻α-ヘリックスをとるL-Alaではほとんどシフト差は見られなかった。このことからLys*(Z)残基の^{15}N化学シフトは、β-シートの場合にポリペプチドの隣接残基効果を強く反映していることが分かった。

さらに、^{15}N化学シフトと共重合アミノ酸の側鎖構造および隣接残基効果との関係についても詳しく議論する。

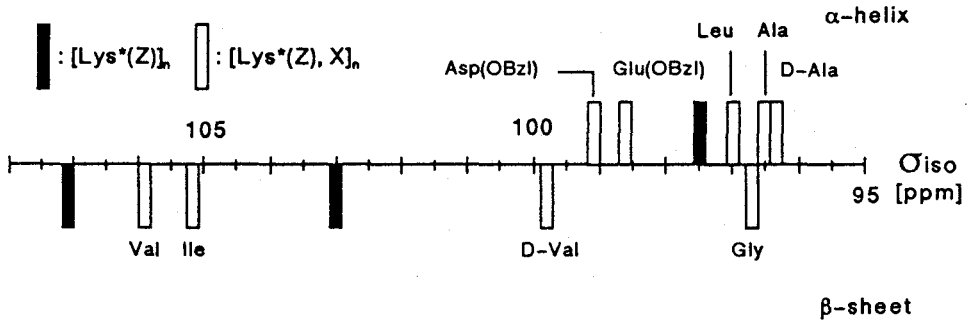


Figure 1 Diagram of the observed isotropic ^{15}N chemical shifts (σiso) of Lys*(Z) residue in some polypeptides in the solid state.

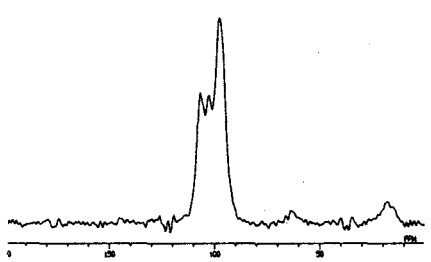


Figure 2 27.3MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectrum of [Lys*(Z)]$_n$-5.

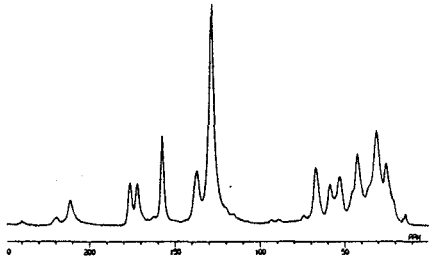


Figure 3 67.8MHz ^{13}C CP-MAS NMR spectrum of [Lys*(Z)]$_n$-5.

1. A. Shoji, S. Ando, S. Kuroki, I. Ando, G. A. Webb, *Ann. Rep. on NMR Spectroscopy*, 1993, *26*, 55.
2. 芦川, 荘司, 尾崎, 安藤, 第33回NMR討論会講演要旨集 1994, 195.

P33　固体重水素NMRによるpoly(β-phenethyl L-aspartate)の動的構造

○北澤　聡・平沖敏文・岡本　敏†・古屋秀峰†・安部明廣‡・堤　耀廣
北大工・†東工大工・‡東京工芸大

Dynamical Structure of Poly(β-phenethyl L-aspartate) by Solid State ^{2}H NMR

S. Kitazawa, T. Hiraoki, S. Okamoto†, H. Furuya†, A. Abe‡, and A. Tsutsumi
Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060, †Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152, ‡Tokyo Institute of Polytechnics, Atsugi 243-02

Poly(β-phenethyl L-aspartate) (PPLA) undergoes the irreversible conformational transition from the right-handed α-helix to the left-handed helix around 130 °C in the solid state. The dynamical structure of PPLA side chain was investigated by solid state ^{2}H NMR. Line shapes and spin-lattice relaxation times (T_1) of PPLA deuterated in the β_R- or ζ-methylen group were measured. There are rapid and large-amplitude motions in the side chain at higher temperatures, as well as rapid and small-amplitude librational motions. Although remarkable changes in the line shapes and T_1 were not observed around 130 °C, the temperature dependence of these parameters showed hysteresis, suggesting that the side chain motion depends on the main chain conformation.

poly(β-phenethyl L-aspartate)(PPLA)の主鎖は固体状態において、温度上昇に伴い 130～140 ℃で右巻きα-ヘリックスから左巻きヘリックスに不可逆的に転移する。[1),2)] 本研究ではPPLA側鎖の動的構造及び、主鎖のコンフォメーション変化との関連を調べるために、側鎖のβ-メチレン基の水素を一個のみ重水素化したPPLA-$\beta_R d_1$と、ζ-メチレン基を重水素化したPPLA-ζd_2を固体重水素NMRで測定した。固体重水素NMRは局所的な分子運動の研究に適した手段であり、スペクトルの線形やスピン-格子緩和時間(T_1)などから運動のモードと速さを識別することが可能である。

PPLA-$\beta_R d_1$及びPPLA-ζd_2のスペクトルの温度依存性をFig. 1とFig. 2にそれぞれ示す。PPLA-ζd_1のスペクトルは-75 °Cですでに静止状態の線形とは異なり、積分強度は-30 °C付近でexchange broadeningによる極小値をとる。これはこのような低温においても、側鎖末端には10～100 kHzオーダーの大振幅の運動が存在していることを示している。PPLA-$\beta_R d_1$のスペクトルは-29 °Cでは静止状態の線形に近く、主鎖に近いβ位では大振幅の運動はかなり制限されていることを示している。しかしPPLA-$\beta_R d_1$の四重極分裂幅は-29 °Cで122 kHzであり、静止状態の理論値128 kHzよりも僅かに小さい。これは側鎖には小振幅で高速のlibrationが存在していることを示している。温度上昇に伴い四重極分裂幅は徐々に減少し、librationの振幅は温度上昇とともに大きくなることを示している。

温度を上昇させるとスペクトルの線形は徐々に変化し、PPLA-ζd_2では約20 °Cから、PPLA-$\beta_R d_1$では約110 °Cからスペクトルの中央部の強度が相対的に大きくなる。これは大振幅の運動が速くなるためである。転移温度の130 °C付近では運動によって完全に平均化されたシャープなスペクトルが観測される。これは大振幅の運動の速さが四重極結合定数の大きさよりも十分速くなることを示している。大振幅の運動はPPLA-$\beta_R d_1$ではC_α-C_β軸まわりの内部回転、PPLA-ζd_2では側鎖に沿った多重内部回転に起因すると考えられる。

キーワード：Poly(β-phenethyl L-aspartate) / ヘリックスセンス反転 / 固体重水素NMR

きたざわ　そう、ひらおき　としふみ、おかもと　さとし、ふるや　ひでみね、
あべ　あきひろ、つつみ　あきひろ

PPLA-ζd_2 の T_1 は-86°C で 200 ms、温度上昇に伴い徐々に減少して、20 °C で 50 ms になる。さらに温度を上昇させると、T_1 は著しく減少し始め、110 °C で 8 ms の最小値をとる。PPLA-$\beta_R d_1$ の T_1 は-29 °C で 1.1 s、温度上昇に伴い徐々に減少して、80 °C で 70 ms になる。さらに温度を上げると、著しく減少し始め、140 °C で 5 ms となる。双方の T_1 とも高温では ms オーダーであり、理論計算から、転移温度の 130 °C 付近では側鎖の運動の速さは観測周波数の 30 MHz に近いと考えられる。

転移温度付近では双方の試料の線形と T_1 には著しい変化は観測されなかった。これはこの温度域ではζ位、β 位の運動の速さが重水素 NMR の観測タイムスケールに比べ十分速いためと考えられる。しかし、双方とも線形と T_1 の温度依存性にはヒステリシスが見いだされ、不可逆転移後は線形と T_1 の温度依存性はいずれも低温側にシフトする。これは側鎖の運動が主鎖のコンフォメーションに依存することを示している。

1) S. Sasaki, Y. Yasumoto, and I. Uematsu, *Macromolecules*, **14**, 1797 (1981).
2) S. Okamoto, H. Furuya, A. Abe, and J. Watanabe, *Polymer Preprints*, **42**, 3364 (1993).

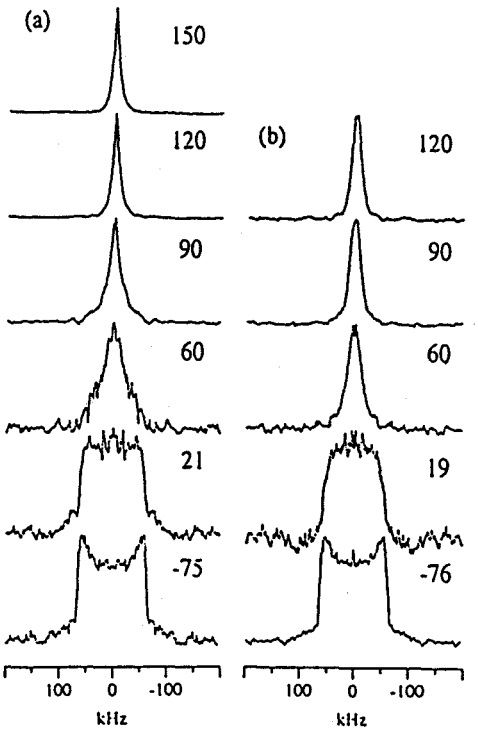


Fig. 1 Temperature dependence of ^{2}H NMR spectra of PPLA-ζd_2 (a) before the transition and (b) after the transition. The figures on the right-hand side of the spectra show temperatures.

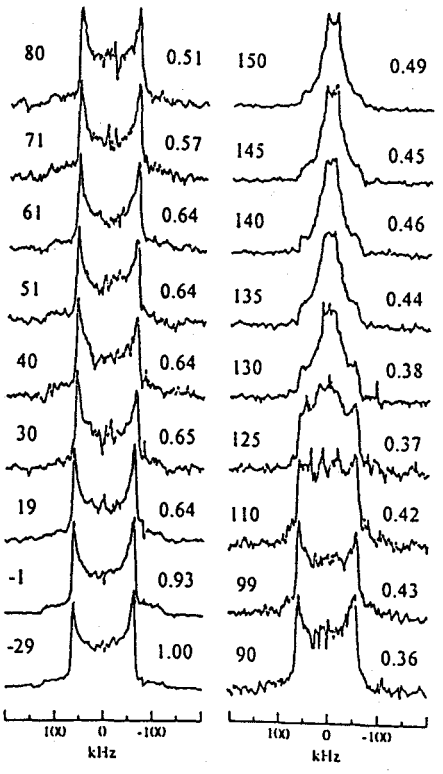


Fig. 2 Temperature dependent spectra of PPLA-$\beta_R d_1$. The figures on the left-hand side of the spectra indicate the temperatures. The figures on the right-hand side of the spectra indicate the integrated intensity values relative to the value at -29 °C.

P34

固体重水素NMRによる絹の構造とダイナミクスに関する研究

農工大工　○南雅史、出村誠、朝倉哲郎
北大工　平沖敏文、堤耀廣
フロリダ州立大　T. A Cross

The Study of Structure and Dynamics of Silk Using Solid State ^{2}H-NMR

Masashi Minami[1], Makoto Demura[1], Tetsuo Asakura[1], Toshifumi Hiraoki[2], Akihiro Tsutsumi[2] and T. A. Cross[3]

1. Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184
2. Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060
3. National High Magnetic Field Lab., Florida State University, Tallahassee, FL, USA

[2,2-$^2H_2$]Gly, [3,3,3-$^2H_3$]Ala and [2,3,5,6-$^2H_4$]Tyr labeled silk fibroins were obtained by oral administration of corresponding ^{2}H labeled amino acids to *Bombyx mori* silkworms. The solid state ^{2}H-NMR spectra of powder and the oriented fiber samples were observed in order to characterize the dynamics and structure of silk fibroin in solid state. The powder pattern spectra were analyzed with the program, MXQET, by Vold et al; The libration, rotation and flip-flop motions are the parameters for dynamics analyses. With the quadrupole splittings observed in the ^{2}H-NMR spectra of uniaxially oriented silk fiber which was set parallel with respect to the magnetic field, the C_α-^{2}H and C_α-C_β bond orientations with respect to fiber axis were determined for the Gly and Ala residues in the silk, respectively. The ϕ and ψ torsion angles of the Ala and Gly residues in the silk fibroin fibers were more rigorously determined by adding these ^{2}H-NMR data to the previous ^{13}C and ^{15}N CP NMR data.

緒言

これまでに、一軸配向試料の角度依存^{13}Cおよび^{15}N固体NMRの測定から結晶や非晶領域の配向構造について詳細な構造解析が可能であることを報告してきた[1),2)]。また、絹タンパク質配向試料についても、^{13}Cおよび^{15}N同位体ラベル絹フィブロインを用いて、固体NMR配向構造情報を検出し、その固体構造の原子座標を決定できることを報告してきた(Table I)[2)]。

固体重水素NMRは、立体構造や分子運動の様式・速度に敏感であるとともに、^{2}Hラベリングが主鎖・側鎖の任意の箇所で可能なため、多くの構造、運動情報が得られる。本研究では絹フィブロインに於いて、構造及び運動様式の大きく異なる３つのサイト（Gly主鎖CH_2, Ala側鎖CH_3, Tyr側鎖ring）を重水素化することを試みた。得られた^{2}Hラベル絹の、粉末試料と配向試料について固体重水素NMR解析を行い、絹中でのそれぞれのアミノ酸残基の運動性を解析すると共に、従来の絹の固体^{13}Cおよび^{15}N NMR解析の結果と合わせることにより絹主鎖の原子レベルでの構造解析を行った。

キーワード：^{2}H核安定同位体ラベル、固体重水素NMR、内部回転角、分子運動、絹

みなみまさし、でむらまこと、あさくらてつお、ひらおきとしふみ、つつみあきひろ、T. A. クロス

実験

各アミノ酸毎の固体構造情報を得るために、[2,2-$^2H_2$]Gly. [3,3,3-$^2H_3$]Ala. [2,3,5,6-$^2H_4$]Tyr, ^2H_2Oのカイコへの経口投与及び絹糸腺培養による絹の^2Hラベルを試みた（$^2H_5$-Gly. L-[3,3,3-$^2H_3$]Ala. L-[2,3,5,6-$^2H_4$]Tyr. ^2H_2Oの各重水素ラベル物(99 atom%)を使用）。該当するラベルアミノ酸水溶液を人工飼料に混入、５令期に４日間与える場合と、マイクロシリンジを用いて直接カイコに^2H_2Oを経口投与する場合を試みた。また、５令４日の家蚕４頭分の絹糸腺を取り出し、ラベルアミノ酸を添加した培地中で２４時間絹糸腺培養を行った。絹フィブロインの^2Hラベルサイトおよびラベル率の決定は、得られた^2Hラベル絹フィブロインをTFAに濃度7%で溶解し、^2H溶液NMRにより行った。続いて、^2Hラベル絹フィブロインについて粉末試料、及び配向試料の固体重水素NMR測定を行った。なお、配向方向と磁場とを変えて配向試料のNMRを測定した。NMR装置は、JEOL GX-400 (GSX固体ユニット付属)を使用し、配向試料用に作製された固体試料用プローブを装着して^2H (61.25 MHz) NMRスペクトルを測定した。パルスシークエンスは四極子エコー法を用い、90°パルスは3.4μs、90°パルス間隔は34μsとした。パウダーパターンスペクトルのシミュレーションにはVoldら[3]のプログラムを用いた。

結果と考察

*1. ^2H安定同位体ラベリング：*経口投与または絹糸腺培養法によってラベルした絹フィブロインの^2H溶液NMRスペクトルを測定し、そのスペクトルから絹フィブロインの^2Hラベル法を検討した。これまでに、絹を^{13}Cおよび^{15}N同位体ラベリングする場合、同位体ラベルアミノ酸存在下での絹糸腺培養及び経口投与によってそれが可能であり、前者の方がラベル率が高いことを報告してきた。しかしながら^2Hラベリングについては、絹糸腺培養では対応するアミノ酸は絹中に入らず、経口投与のみラベリングに有効であることが分かった。[2,2-$^2H_2$]Glyラベル、[2,3,5,6-$^2H_4$]Tyrラベルでは対応するラベルアミノ酸の経口投与が有効であった。またL-[3,3,3-$^2H_3$]Alaの経口投与ではSer側鎖CH_2への転移が認められた。マイクロシリンジを用いた ^2H_2Oのみの経口投与の方が、よりAla側鎖CH_3の高い^2Hラベリングが可能であることがわかり、後者を[3,3,3-$^2H_3$]Alaラベル法として採用した。

2. パウダースペクトル：[3,3,3-$^2H_3$]Ala、[2,2-$^2H_2$]Gly、[2,3,5,6-$^2H_4$]Tyrラベル絹フィブロイン粉末試料について,その固体^2H NMRスペクトルをFigure 1に示した。パウダーパターンスペクトルはそれぞれラベルサイトによって、運動性の違いを反映した異なった線形を示した。[2,2-$^2H_2$]Gly ラベル絹フィブロインのパウダーパターンは四

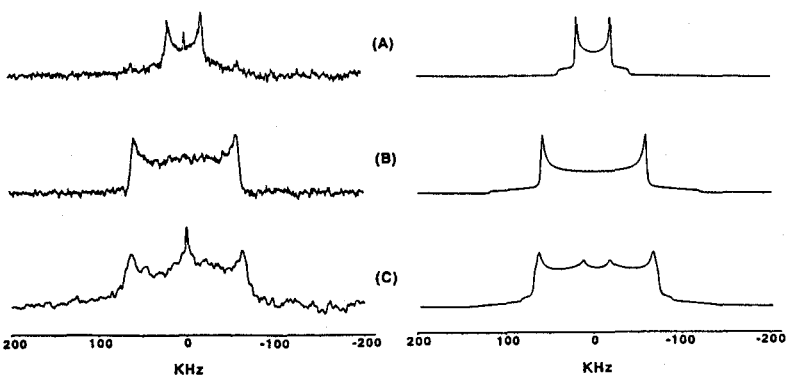


Figure 1. ^2H solid state powder pattern NMR spectra (left columns) and the simulated (right columns) spectra of (A) [3,3,3-$^2H_3$]Ala, (B) [2,2-$^2H_2$]Gly and (C) [2,3,5,6-$^2H_4$] Tyr labeled silk fibroin.

極子分裂幅が118 KHzであり、そのスペクトルシミュレーションからGlyのC_α-^{2}H結合は絹フィブロイン中で非常に運動が制限されており、12°の角度でlibration運動していることがわかった。またAlaのメチル基はそのパウダーパターンが四極子分裂幅38 KHzの運動平均化された線形を示していることから、C_α-C_β結合周りの速い回転運動をしていることがわかった[4]。さらに、スペクトルシミュレーションにより、C_α-C_β結合のまわりで、振幅10°のlibration運動が存在していることがわかった。一方、Tyrの芳香環は他の二つのパウダーパターンとは非常に異なった線形を示しており、非常に運動の遅い成分（四極子分裂幅が125 KHz）と芳香環のflip-flop運動由来の成分とが観測された。運動の遅い成分は絹中で水素結合などにより非常に束縛された、もしくは絹フィブロイン中の密なパッキング構造により制限された芳香環由来のものであり、運動の凍結した成分である。また、flip-flop運動由来の成分は室温で$1x10^7\ s^{-1}$の速度で運動しており、温度上昇する毎にその運動の速度とflip-flop運動成分の割合が増加し、温度上昇による運動性の向上が観測された。

3. 配向試料のスペクトル：繊維軸と磁場方向とを平行、及び垂直にセットし、配向絹の^{2}H-NMRスペクトルを測定した(Figure 2)。Alaのメチル基は固体^{2}H NMRのパウダーパターンより、C_α-C_β結合周りの速い回転運動をしていることがわかっているので、[3,3,3-$^2H_3$]Alaラベル絹フィブロイン配向試料の磁場平行固体^{2}H NMRの四極子分裂幅(39.8KHz)から求められる配向角は、繊維軸とメチルの回転運動軸方向、即ちC_α-C_β結合方向とのなす角である。配向試料の磁場方向と繊維軸とを平行においた場合に観測される四極子分裂幅から配向角θは次の式を使って求められる。

$$\Delta\nu Q=\frac{3}{4}\frac{e^2qQ}{h}(3\cos^2\theta-1) \quad (1)$$

しかし、これより決定される配向角は88°、35°の二つの解が得られ、これから一つの解を導くために磁場平行および、磁場垂直スペクトルについてのスペクトルシミュレーションを行った。磁場に平行の場合の計算スペクトルは88°、35°ともに同様の線形を示し、区別することは出来ない。しかし、磁場に垂直においた場合の計算スペクトルは明らかに異なった線形を示し、配向角が88°の場合と良く一致した。従って、繊維軸とC_α-C_β結合方向とのなす角度は88°と決定した(Table I)。

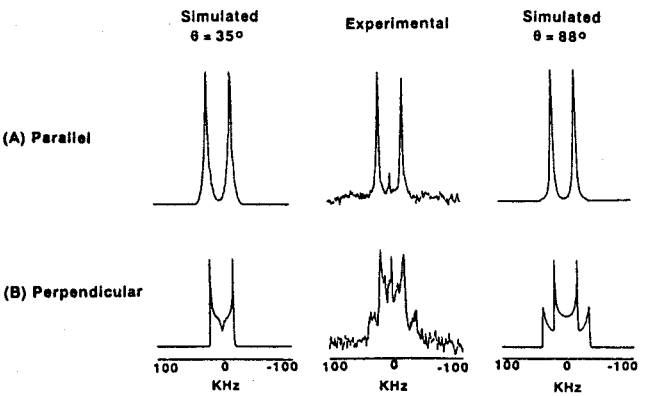


Figure 2. ^{2}H solid state NMR spectra set (A) parallel and (B) perpendicular with respect to magnetic field direction from uniaxially oriented [3,3,3-$^2H_3$]Ala labeled silk fibroin. The spectra on the left are based on the orientation angle of θ = 35°, while the spectra on the right are based on the orientation angle of θ = 88°.

絹フィブロイン中でGlyの$C\alpha$-^{2}Hはパウダーパターンスペクトルの線形から基本的に運動の凍結した状態にあることがわかった。[2,2-$^2H_2$]Glyラベル絹フィブロインの配向試料について、磁場平行固体^{2}H NMRの四極子分裂幅(117.8 KHz)から、繊維軸とC_α-^{2}H結合方向とのなす角度、θC^{2}Hが37°、82°と得られた。さらに、磁場と繊維軸のなす角度を変化させたときのスペクトルのシミュレーションによって、その角度は82°と決定した。

*4. 絹Ala残基の(φ, ψ)の制限：*固体重水素NMRにより得られた結果は、既に報告してきた^{13}Cと^{15}Nサイトの角度制限に矛盾せず、絹フィブロインの逆平行βシート面が繊維軸と平行であることと一致する。また、固体^{2}H NMRから得られた各アミノ酸残基のC-^{2}H結合の配向角は、^{13}Cと^{15}N核同様に、絹フィブロインの内部回転角の計算のための角度制限として使うことができる。絹フィブロインのAla残基について内部回転角(φ, ψ)の制限を行った(Figure 3)。既に報告してきた^{13}Cと^{15}Nサイトの固体CP NMR法から得られた繊維軸と分子軸とのなす角度をパラメーターとして用いた場合(Figure 4, Table II)、内部回転角(φ, ψ)の制限は典型的なβ-sheet領域(-150°,140°)に分布していた。この^{13}Cと^{15}Nサイトからの角度パラメーターに新たに本研究において固体^{2}H NMRから得られた、AlaのC_α-C_β結合に関する角度パラメーターを組み合わせることにより、内部回転角(φ, ψ)の制限がさらに加えられることがわかった（黒域）。

Table I. Orientation of the side chains with respect to the fiber axis determined by quadrupolar splitting, ΔνQ of ^{2}H NMR spectra placed the oriented sample parallel to the applied magnetic field.

Side chain	ΔνQ(KHz)	e^2qQ/h(KHz)	Orientation angle (deg)
[3,3,3-$^{2}H_3$]Ala	39.8	53	88 ($\theta_{C\alpha C\beta^2H_3}$)
[2,2-$^{2}H_2$]Gly	117.8	168[a]	82 ($\theta_{C\alpha^2H}$)

a. Burnett. L. J. et al (1971) *J. Chem. Phys.* **55**, 5829-5831

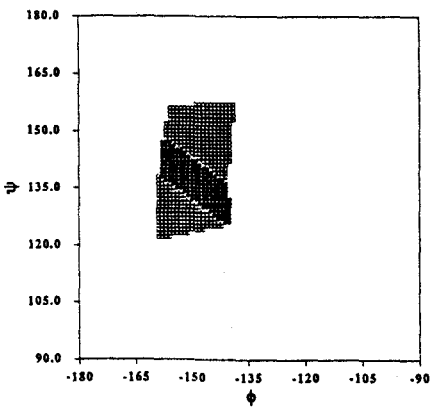


Figure 3. (φ, ψ) restriction of Ala residue in silk fibroin. The open circles show the results from ^{13}C and ^{15}N CP NMR analysis. The closed circles show the results added solid state ^{2}H-NMR analysis to ^{13}C and ^{15}N CP NMR analysis.

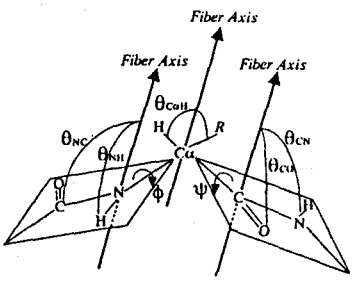


Figure 4. Determination of (φ, ψ) from the results of ^{13}C and ^{15}N CP NMR analysis.

Table II. Calculation of orientational angles (degree), θNH, θNC and θCO of Gly and Ala residues for the silk fibroin structure with β-sheet structure.

Gly				Ala			
^{15}N		^{13}C		^{15}N		^{13}C	
θNH	θNC	θCN	θCO	θNH	θNC	θCN	θCO
88.5	139.5	40.5	89.0	83.0	141.0	37.5	90.5
91.5	40.5	139.5	91.0	97.0	39.0	142.5	89.5

謝辞

蚕体内の代謝機構に関するご助言を頂いた金沢大、小山内実先生、固体重水素NMR測定に協力を頂いた日本電子（株）藤戸輝昭氏、配向スペクトルのスペクトルシミュレーションに協力を頂いたEMBL、A. Ulrich博士に感謝いたします。

参考文献

1) 朝倉哲郎、呂　奏洪、表面、**32**、264-270、(1994)

2) L. K. Nicholson, T. Asakura, M. Demura and T. A. Cross, *Biopolymers*, **33**, 847-861, (1993)

3) M. S. Greenfield, A. D. Ronemus, R. L. Vold, R. R. Vold, P. D. Ellis and T. E. Raidy, *J. Magn. Reson*, **72**, 89-107, (1987)

4) H. Saito, R. Tabeta, A. Kuzuhara and T. Asakura, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **59**, 3383-3387, (1986)

P35 強誘電性相転移を示す$(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$結晶の
^{15}N-CP/MAS NMRスペクトルの温度依存性

（阪大理、名大工＊）○武田 定、山口 兆、岩田 真＊、石橋善弘＊

Ferroelectric phase transition and ^{15}N-CP/MAS NMR spectrum of $(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$

S. Takeda, K. Yamaguchi, M. Iwata, and Y. Ishibasi**

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University

**Department of Applied Physics, School of Engineering, Nagoya University*

$(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$ is known to show ferroelectricity at room temperature and to undergo a second-order phase transition at 310 K. X-ray structure analysis suggested that this phase transition is due to disordering of $CH_3NH_3^+$ cation. To investigate precisely a relation between respective $CH_3NH_3^+$ cations and the phase transition, we measured the temperature dependence of high resolution ^{15}N-CP/MAS NMR spectrum of $CH_3NH_3^+$ cations. Only one of the resolved three kinds $CH_3NH_3^+$ cations showed remarkably a continuous change of the chemical shift and thus is closely related to the phase transition. The behavior is similar to that of $(CH_3NH_3)_5Bi_2Cl_{11}$.

$(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$は温度をあげていくと310Kで強誘電、常誘電の相転移を示す。これは$CH_3NH_3^+$イオンの運動性やディスオーダーと密接に関係するといわれている。$CH_3NH_3^+$イオンとこの相転移との関係を調べるために、^{15}N-CP/MAS NMRスペクトルの温度依存性を測定した。その結果、単位格子に含まれる20個のの$CH_3NH_3^+$イオンのうち一部だけが相転移近傍でその化学シフトが大きく変化し、相転移と密接に関係していると考えられる。

［結晶学的特徴と^{15}N-CP/MAS NMRの結果］ $(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$結晶は$(CH_3NH_3)_5Bi_2Cl_{11}$と同型であるが、塩化物の結晶構造の方が詳しく調べられているので、塩化物の結晶学的特徴を下の表にまとめる。この表に示すように、Lefebvre (1991)らによれば常誘電相では、結晶学的に異なる$CH_3NH_3^+$イオンのサイトが三種類あり、単位格子中に含まれる20個の$CH_3NH_3^+$イオンはそれぞれ8個、8個、4個に分けられる。サイト2とサイト3ではさらに二ヵ所にディスオーダーしていると言われている。表ではこれを＊マークで示している。一方、強誘電相では結晶の対称性が低くなるため常誘電相のサイト1とサイト2に対応するそれぞれ8個の$CH_3NH_3^+$イオンが、4個づつの非等価な環境（aとb）に分かれる。表では両相で互いに関係付けられ

^{15}N-CP/MAS NMR, 強誘電性相転移、 $(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$、 メチルアンモニウム、

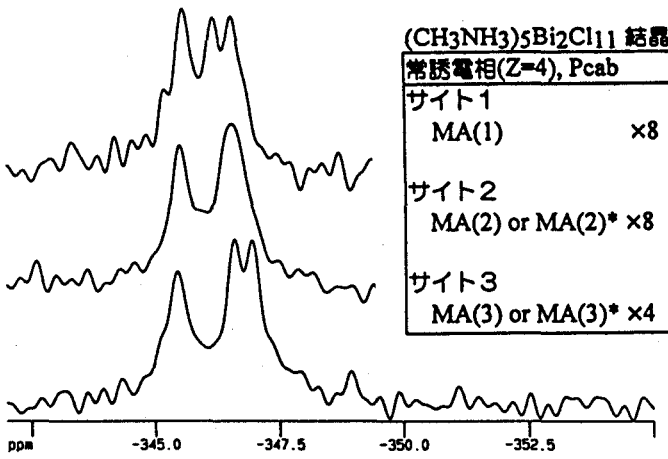
たけだ さだむ、 やまぐち きざし、いわた まこと、いしばし よしひろ

る$CH_3NH_3^+$イオンを同じ番号で表している。

本研究では、この各々の$CH_3NH_3^+$イオンと強誘電性相転移との関係を調べる試みとして、$CH_3NH_3^+$イオンに含まれる^{15}Nの固体高分解能NMRスペクトル（^{15}N-CP/MAS NMR）の温度依存性を測定した。測定はBRUKER DSX300型の分光器を用い，天然存在比の^{15}Nについて共鳴周波数30.4MHzで測定した。digital filterとover sampling法を用いることにより、通常の方法に比べS/Nを二倍以上あげることができた。

測定した^{15}N-CP/MAS NMRスペクトルの温度依存性を下の図に示す。化学シフトはニトロメタンを基準にしている。最下段の強誘電相（297K）のスペクトルからは3種類の$CH_3NH_3^+$イオンを見分けることができる。三つのピークの相対強度から対応する$CH_3NH_3^+$イオンの数の比を求めるのは困難であるが、表に示したサイト1, 2, 3に対応すると思われる。MA(1a)とMA(1b)、MA(2a)とMA(2b)は分離することができない。最も高磁場側に観測されるピークの化学シフトが温度上昇とともにシフトしていくように見える。つまり単位格子中に20個ある$CH_3NH_3^+$イオンのうちの一部だけの環境が相転移に伴って変化している。

$(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$と同型である$(CH_3NH_3)_5Bi_2Cl_{11}$は307Kで相転移するが、この塩化物の測定結果と考えあわせると、化学シフトが温度変化する$CH_3NH_3^+$イオンはサイト3に対応すると思われる。塩化物の^{15}N-CP/MAS NMRスペクトルは全体的に高磁場側(-374～-350ppm)に観測されるが、やはり三つのピークが観測され、しかももう少し大きく分離している。$(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$と同様に、最も高磁場側に観測されるピークだけが顕著に温度変化する。一方、^{13}C-CP/MAS NMRスペクトルは二つにしか分離せず、温度変化も極めて小さい。



$(CH_3NH_3)_5Bi_2Cl_{11}$ 結晶中での $CH_3NH_3^+$ のサイト

常誘電相(Z=4), Pcab		強誘電相(Z=4), $Pca2_1$	
サイト1		サイト1	
MA(1)	×8	MA(1a)	×4
		MA(1b)	×4
サイト2		サイト2	
MA(2) or MA(2)*	×8	MA(2a) or MA(2a)*	×4
		MA(2b) or MA(2b)*	×4
サイト3		サイト3	
MA(3) or MA(3)*	×4	MA(3) or MA(3)*	×4

Different sites of $CH_3NH_3^+$ ions in a unit cell and the temperature dependence of ^{15}N CP/MAS NMR spectra of $(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$above 297 K. $(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$ is isomorphic with $(CH_3NH_3)_5Bi_2Cl_{11}$.

P36

1D, 2D-^{129}Xe-NMR法による高分子ブレンド構造の解析法の開発と評価

京大理　　○三好利一、竹腰清乃理、寺尾武彦

One and two-dimensional ^{129}Xe-NMR study of a polymer blend

Toshikazu Miyoshi, K. Takegoshi, and Takehiko, Terao
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Kyoto University, Kyoto 606-1, Japan

Abstract

The ^{129}Xe NMR method is applied to study the structure of a polymer blend. One-dimensional spectra of ^{129}Xe dissolved in the blends at various compositions are found to show compositional dependent chemical-shifts. These chemical-shift values are interpreted by the free volume of the blends. Further, the phase-separation process is detected by observing one- and two-dimensional ^{129}Xe NMR spectra. The co-existent composition of the polymer blend is determined using one-dimensional spectra. The growth of the domain size is monitored by observing two-dimensional ^{129}Xe exchange NMR spectra.

1.Introduction

Recently, various NMR techniques have been applied to study the structure of a polymer blend. Among them, most powerful techniques are those examing an inter-polymer spin-diffusion(e.g. ^{1}H T_1, $T_{1\rho}$,[1] Goldman-Shen,[2] 2D-CRAMPS,[3] HETCOR,[4] and so on). These techniques elucidated the miscibility of the polymer blends on a scale of 5Å-200Å.

In this study, we use Xe atoms as a probe for the structure of the polymer blends. For testing ^{129}Xe NMR methods, we use a poly(styrene)/poly(vinyl methyl ether)(PS/PVME) blend. Firstly, the miscibility is examined via one-dimensional ^{129}Xe NMR spectra. Secondly, the phase-separation process is studied via one- and two-dimensional ^{129}Xe NMR spectra.

Keyword; ^{129}Xe-NMR/polymer blend/free volume/phase-separation/poly(styrene)/poly(vinyl methyl ether)

みよしとしかず、たけごしきよのり、てらおたけひこ

2.Experimental

A NMR sample was prepared by packing about 1g of a polymer blend into a NMR tube with a wall thickness of 1.5mm(o.d.=10mm and i.d.=7mm). After the tube was attached to a vacuum line, the sample was thoroughly evacuated for one hour. Xe gas was transferred to the NMR tube immersed in liquid nitrogen until the final pressure of 8.5atm. And then, the tube was sealed off. One- and two-dimensional ^{129}Xe NMR spectra were measured on a JEOL-GSX 200 spectrometer with a ^{129}Xe resonance frequency of 55.26MHz at room temperature. The chemical-shift value of ^{129}Xe was referred to that of free ^{129}Xe extrapolated at 0 pressure.

3-1. Miscibility and free volume

Fig.1 shows the ^{129}Xe spectra dissolved in PS, PVME and the PS/PVME=50/50 blend. The chemical shift value of ^{129}Xe dissolved in the PS/PVME blend(221ppm) differs from those dissolved in the pure PS(225ppm) and in the pure PVME(209ppm). Further, the line-width of ^{129}Xe, which reflects the chain mobility of polymer, is affected by blending. These results show that the PS/PVME blend is miscible and the mobility of the component polymers in the blend differs from those of the pure polymers.

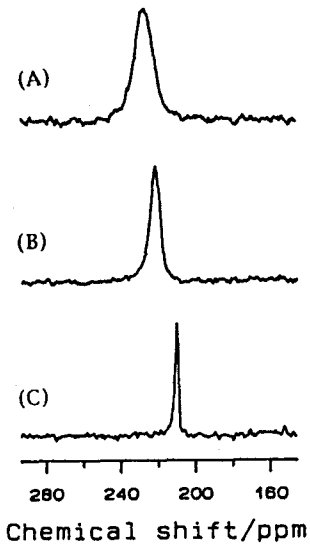


Figure 1. The NMR spectra of ^{129}Xe dissolved in (A) PS, (B) the PS/PVME=50/50 blend, and (C) PVME at room temperature.

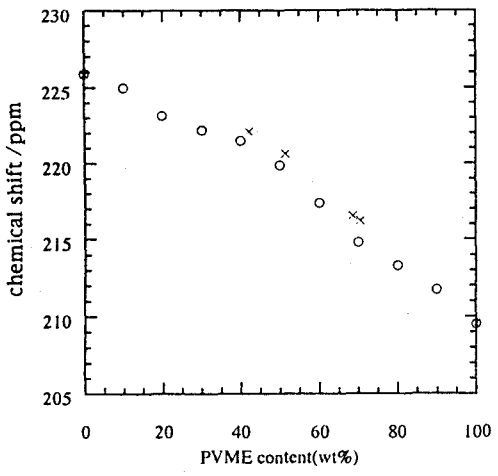


Figure 2. The observed (○) and the cauculated chemical shift values(×) from the density measurement of ^{129}Xe dissolved in the PS/PVME blends with various compositions.

Xe atoms reside in the void space of polymer. Since the chemical-shift value of ^{129}Xe is proportional to the collision rate, the chemical shift provides the measure of the free volume. Fig 2. shows the chemical-shift values of ^{129}Xe dissolved in the PS/PVME blend with various composition ratios(○). To compare these results with the free volume, we assume that the chemical-shift value of ^{129}Xe dissolved in the blends can be linearly correlated to its free volume. The calculated chemical shift values(×) obtained from bulky density measurement,[5] are plotted in Fig. 2. The good agreement between the observed(○) and the calculated(×) chemical-shifts shows that the Xe chemical-shift value can be a good measure of the free volume in a polymer.

3-2. Phase-separation

When a PS/PVME blend is heated above its binodal temperature, the phase-separation occurs and the two co-existent phases appear: the PS-rich phase and the PVME-rich phase. Fig. 3 shows the spectra of ^{129}Xe dissolved in the blends at various phase-separation times. With increasing phase-separation time above 10min, doublet character becomes more obvious. Further increasing phase-separation time above 10min brings about no spectral change. The higher-field and lower-field peaks are attributed to those dissolved in the PS-rich phase and the PVME-rich phase, respectively. The chemical-shift values of the two peaks can be used to elucidate the co-existent composition of the blends. From the chemical-shift values, the compositional ratios of the PS-rich and the PVME-rich phases, after the long separation time of 1200min, were calculated to be PS/PVME=94/6 and PS/PVME=15/85.

Further, we have measured the two-dimensional exchange spectra of ^{129}Xe dissolved in the phase-separated blends. All two-dimensional spectra were measured with mixing time of 1s. Fig 4(a) shows 2D spectra of ^{129}Xe dissolved in the blend with the phase-separation time of 30min. This spectrum shows that the cross peaks are clearly observed between the peak of ^{129}Xe dissolved in PS-rich phase and that of the PVME-rich phase. With further increasing phase-separation time(1200min), no appreciable cross peak was observed between those two peaks. These results indicate that the domain size gets too large for Xe to diffuse in the mixing time of 1s outside each domain.

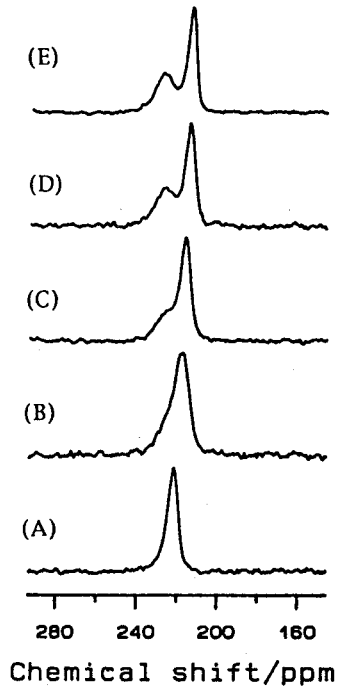


Figure 3. The NMR spectra of ^{129}Xe dissolved in the phase-separated PS/PVME blends with the phase-separation time of (A) no heating, (B) 2min, (C) 5min, (D)10min, and (E) 60min.

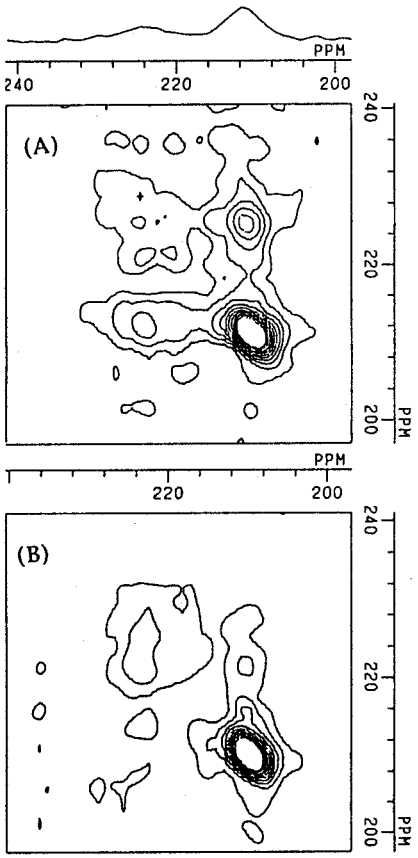


Figure 4. The two-dimensional exchange NMR spectra of ^{129}Xe dissolved in the phase-separated PS/PVME blend with the phase-separation time of (A) 30min, (B) 1200min.

References

1. K. Takegoshi Annual Report on NMR Spectroscopy 1995, 30, 97.
2. R. A. Assink Macromolecules 1978, 11, 1233.
3. P. Caravatti, P. Neuenshwander, R. R. Ernst Macromolecules 1985, 18, 119.
4. K. Takegoshi, K. Hikichi Polym, J., 1994, 26(12), 1377.
5. T. Shiomi, F. Hamada, T. Nasako, K. Yoneda, K. Imai, A. Nakajima Macromolecules 1990, 23, 229.

P37 固体高分解能^{113}CdNMR法によるペプチド－Cd(Ⅱ)錯体の構造解析

神奈川大工 ○高山 俊夫，大内田 調，小池 芳雄

A Structural Study of Dipeptide-Cd(Ⅱ) complexes in the Solid State by ^{113}Cd NMR

○Toshio Takayama, Shirabe Ohuuchida, and Yoshio Koike
(Department of Applied Chemistry, Kanagawa University, Yokohama)

The ^{113}Cd CP/MAS NMR experiments have successfully provided very useful information about structure of cadmium complexes in the solid state. In this work, we study structural analysis of dipeptide-Cd(Ⅱ) complexes in the solid state by means of ^{113}Cd CP/MAS NMR powder spectroscopy. The cadmium shielding tensor for two 5-membered chelate rings in Cd(glygly)$_2$ pH6 and Cd(glyval)$_2$ is axially symmetry, and for a slightly distorted octahedral type in Cd(glygly)$_2$ pH9 and Cd(glyala)$_2$ is nonaxial symmetry.

1） 緒論

生体内における金属蛋白質・酵素基質と金属イオンとの相互作用の基礎的な研究の1方法として，小分子ペプチドを基質モデル化合物とした金属イオンとの相互作用の解明という方法が行われている。金属イオンとして生体内で重要な役割を持つ亜鉛属金属，なかでもNMR測定が可能でありZn(Ⅱ)のプローブイオンとしてのCd(Ⅱ)に注目した。^{113}Cd-NMR法は構造解析及び金属－配位子間相互作用の直接的情報を得る方法として期待されるが，ペプチドーCd(Ⅱ)結合が溶液中では置換活性であり，特に溶液のpH変化に敏感に対応した平衡化学種が多数存在することが分かっている。これらのことは溶液NMR法によるペプチドーCd(Ⅱ)結合の構造及び相互作用の議論において障害でもあり，結合構造とNMR化学シフトとの相関の詳細な解明が必要である。そこで，固体状態での錯体の構造と固体113Cd-NMR化学シフトとの相関を確立することを目的に固体^{113}Cd-NMR測定を行った。

2） 実験

2-1 錯体合成：$Cd(NO_3)_2$：ジペプチド(1:2)を水に溶解し1M NaOH溶液でpH(6,9)を調整後，有機溶媒を用いた拡散法により結晶化させた。

2-2 ^{113}Cd固体高分解能NMR測定：JEOL EX270装置を用いて観測周波数59.79MHz，化学シフトは基準物質として$Cd(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$(δ=0.0)を用いた。

3） 結果と考察

ジペプチドとしてN端にグリシル基を有するグリシルグリシン(GG:pH6,pH9)，グリシルアラニン(GA pH9)，とグリシルバリン(GV pH6)を用いて合成したCd-ジペプチド錯体の固体^{113}CdNMRスペクトルとパウダーパタン及びシフトテンソルの主値(δ_{11} δ_{22} δ_{33})，異方性($\Delta\delta$)，非対称パラメータ(η)及び等方値(δ_{iso})の実験値をFig. 1に示す。$Cd(GG)_2 \cdot 2H_2O$ pH6(A)と$Cd(GG)_2 \cdot H_2O$ pH9(C)の単結晶X線回折法にて得られた構造図をFig.2に示す。(A)は5員環キレート2個を同一平面に有した6配位(2N-4O)Distorted Octahedral型をしており，Honkonen[1]が報告している$Cd(G)_2 \cdot 2$

^{113}CdNMR化学シフト，パウダーパタン，ペプチドーCd錯体，構造解析

○たかやま としお，おうちだ しらべ，こいけ よしお

H_2OのX線構造と^{113}CdNMRパウダーパタンが非常によい類似をしていることからCd周りの構造は同一の型をしていると考えられる。化学シフトテンソルδ_{11}, δ_{22}の値がほぼ同じであるのでCd-N,Cd-O分子軸の相関を決定しにくいが,最大遮弊を示すδ_{33}はキレート環(5員環)平面と垂直な方向である。以上の考えから，Cd(GV)$_2$ pH6(B)についての構造決定を行った。^{113}Cdδ_{iso}は(A)とほとんど同じ値であることから，同じ(2N-4O)結合八面体構造と推定できるが，最大遮蔽テンソルが2成分あることから(A)とは主軸方向が異なっていることを示す。これはL-バリンのイソプロピル基の立体障害によって構造が微妙に異なっていることを示す。

次に，(C)はキレート環を有していない6配位(2N-4O)Slightly Distorted Octahedral型をした構造である(X線)。(A)より高磁場シフト，$\Delta\delta$が小さい，非対称パターンであることより，Cd周りの結合角がほぼ90°の6配位8面体を形成していることを支持している。このことから，Cd(GA)$_2$ pH9(D)の立体構造を類推するとδ_{iso}が(C)とほぼ同じであることから，Cd周りの構造はほぼ同一であると考えられるが，(C)より$\Delta\delta$がやや大きく，ηが小さくなっているのはメチル基の影響でCd周りの対称性が崩れていることを示す。

以上のように，^{113}CdNMRパウダーパタンの測定から得られた種々のパラメータよりCd－ジペプチド錯体のCd周りの構造を決定しうることを議論する。

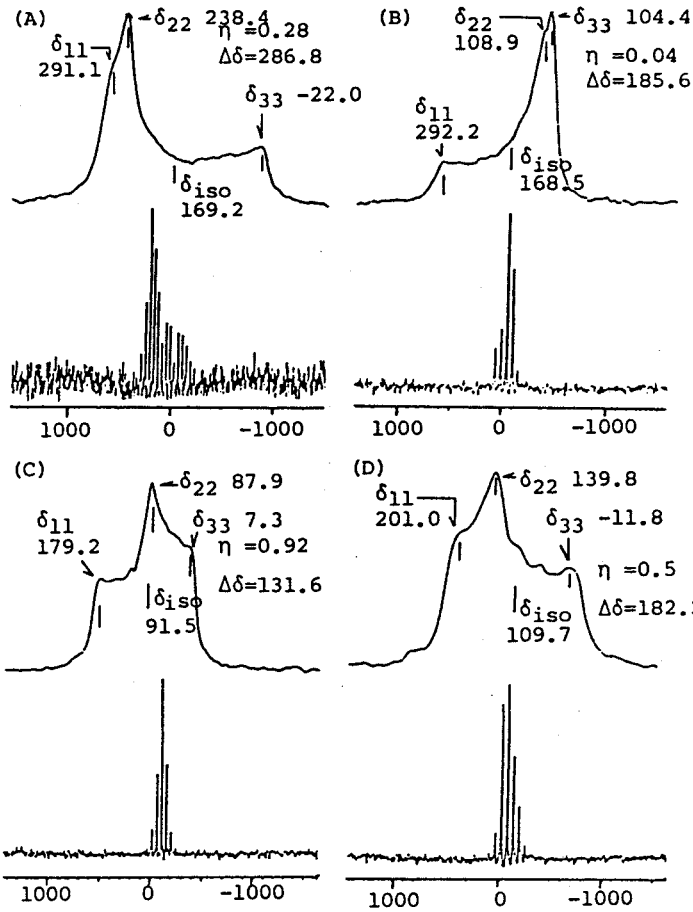


Fig.1 ^{113}Cd CP/MAS(δ/ppm) and powder spectra of Cd(GG)$_2$・2H$_2$O pH6(A),Cd(GV)$_2$ pH6(B),Cd(GG)$_2$・H$_2$O pH9(C), and Cd(GA)$_2$ pH9(D).

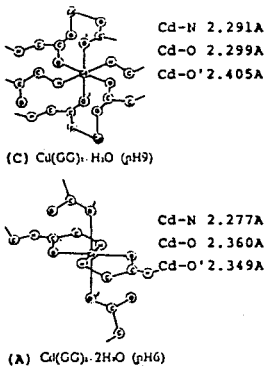


Fig.2 Prespective views of Cd(GG)$_2$・2H$_2$O pH6(A) and Cd(GG)$_2$・H2O pH9(C).

1)R.S.Honkonen,P.S.Marchetti,and P.D.Ellis, J.Am.Chem.Soc., 108,912(1986).

P38

遷移金属カルボニルクラスター化合物の ^{13}C CP/MAS NMR における分子間交差分極効果

(阪大理、リバプール大*、ボローニャ大**)
中山尋量、○江口太郎、宮城慧、中村亘男、B.T. Heaton*,
J. Nähring*, G. Longoni**

Intermolecular Cross-Polarization Transfer in the Solid State ^{13}CO NMR of Transition Metal Carbonyl Clusters

Hirokazu Nakayama, Taro Eguchi, Kei Miyagi, Nobuo Nakamura, Brian T. Heaton*, Jens Nähring* and Giuliano Longoni**

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560, Japan
and
*Department of Chemistry, University of Liverpool, Liverpool L69 3BX, UK**
and
*Dipartimento di Chimica Fisica ed Inorganica, Viale del Risorgimento 4, 40136, Bologna, Italy***

The cation effect on the natural abundance ^{13}C CP/MAS spectra of $[Ni_6(CO)_{12}]^{2-}$ was examined for nickel carbonyl cluster complexes, $A_2[Ni_6(CO)_{12}]$ (A = $(NMe_4)^+$, $(NEt_4)^+$ and $(AsPh_4)^+$). It was found that the intermolecular magnetization transfer makes it possible to observe the carbonyl resonances in $(NMe_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$ with excellent S/N ratio. The possible mechanism for this observation will be presented.

はじめに

遷移金属カルボニルクラスター化合物中のカルボニル基やヒドリドは、水素化触媒機能と関連して注目されており、NMR による溶液中での配位状態や運動状態の研究が盛んに行われている。しかしながら固体中でのこれらのクラスターの構造やヒドリドの配位と運動状態に関する研究は少ない[1,2]。我々は、一連の遷移金属カルボニルヒドリドクラスターの結晶中での構造と動態を ^1H MAS, ^2H, ^{13}C CP/MAS NMR などにより調べてきた[3]。その際 $(NMe_4)_2[Ni_{12}(CO)_{21}H_2]$ クラスターのカルボニル基の ^{13}C CP/MAS スペクトルがきわめて感度よく観測できることを見出し、昨年の本討論会で報告した[4]。

遷移金属カルボニルクラスター、固体 ^{13}C CP/MAS NMR

なかやま ひろかず、○えぐち たろう、みやぎ けい、なかむら のぶお、ブライアン ヒートン、エンス ナーリング、ジュリアーノ ロンゴーニ

溶液中でカルボニル基の ^{13}C シグナルを観測するためには、^{13}CO ガスにより enrich するのが普通である。一方、固体中で ^{13}C シグナルを観測するには、^{1}H との交差分極を利用して信号の増幅を行う。ところが遷移金属カルボニルクラスター（陰イオン）の場合、相手側（陽イオン）の ^{1}H が遠く離れており交差分極の効果があまり期待できない。実際、$PPN[Co_6(CO)_{15}H]$, $PPN[Ru_6(CO)_{18}H]$ などでは、陽イオンの ^{13}C シグナルしか観測できない。そこで、$[Ni_{12}(CO)_{21}H_2]^{2-}$ クラスターにおいて予想外に強い ^{13}CO の信号を観測できた理由を検討するため、陽イオンの異なる一連の $[Ni_6(CO)_{12}]^{2-}$ クラスター化合物を合成し ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルの測定をした。

実験

$(NMe_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$ は文献の方法に従って合成した[5]。他の化合物 $A_2[Ni_6(CO)_{12}]$ (A = $(NEt_4)^+$, $(AsPh_4)^+$) は、イオン交換によって得た。

^{13}C CP/MAS スペクトルおよび ^{1}H T_1, ^{1}H $T_{1\rho}$ の測定は、Bruker 社製 MSL-200 により行った。

結果と考察

Fig. 1 に示すように $[Ni_6(CO)_{12}]^{2-}$ クラスターは S_6 対称性をもつ[6]。Ni 原子は、歪んだ trigonal antiprism を構成し、terminal CO と bridging CO が 1 種類ずつ存在する。溶液中では、この形をとり 237 と 197 ppm に bridge と terminal ^{13}CO の信号が観測される[6]。X線構造解析によると $(NMe_4)^+$ 塩では結晶中でも $[Ni_6(CO)_{12}]^{2-}$ クラスターは S_6 の対称性を保存し、すべての terminal CO と bridge CO は等価である[5]。一方、bulky な陽イオンの場合は S_6 の対称性は保存されない。例えば、PPN^+ 塩では、対称性は C_i に低下し、結晶学的に非等価なサイトが bridge, terminal CO のどちらにも三つ存在するようになる[7]。

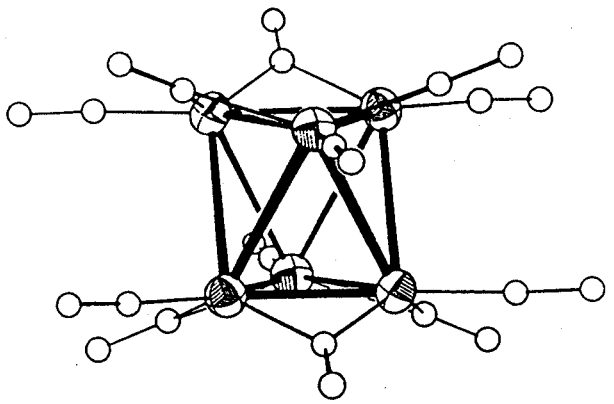


Fig. 1 Structure of the $[Ni_6(CO)_{12}]^{2-}$ anion.

$[Ni_6(CO)_{12}]^{2-}$ クラスター中の ^{13}CO CP/MAS スペクトルを Fig. 2 に示す。カルボニル領域のスペクトルの強度が陽イオンにより大きく異なることがわかる。$[Ni_{12}(CO)_{21}H_2]^{2-}$ クラスターの場合と同様に、3 種の陽イオンのうち $(NMe_4)^+$ では、240 と 200 ppm に非常に強い ^{13}CO の信号が観測され、X線の結果と一致する。一方、$(NEt_4)^+$ では、同じ位置に強度が 4 分の 1 以下で観測され、$(AsPh_4)^+$ では信号はほとんど観測できなかった。これらの傾向は、これまで我々が得た遷移金属カルボニ

ルヒドリドクラスターについての結果と一致する。ただし $[Ni_6(CO)_{12}]^{2-}$ では、^1H は陰イオンには存在しないので、CO の ^{13}C CP/MAS スペクトルは分子（イオン）間の交差分極の結果として観測されたと結論できる。

CP/MAS のスペクトルの強度は、Hartmann-Hahn condition が満足されていても様々な要因によって左右される[8]。例えば、^1H の T_1, $T_{1\rho}$, T_{CH} などが挙げられる。これらの条件について検討するために、^1H の T_1, $T_{1\rho}$ の測定をおこなった。Table 1 にその結果を示す。今回の測定では、contact time は 1-3 ms、積算のための繰り返し時間は 4 s に設定した。T_1, $T_{1\rho}$ の値は、いずれの化合物に関しても CP/MAS スペクトルを感度よく観測するための条件を満足している。つまり、^1H side に関しては、3 種の陽イオンで違いがないことを示している。一方、交差分極の効率を示す T_{CH} に関しては、分子内の CP が支配的な有機化合物の場合と異なり、分子間の交差分極によるため陽イオンによる違いが大きいと考えられる。交差分極を引き起こす ^{13}C と ^1H との coupling は、双極子－双極子相互作用により、$1/r^6$ の依存性を示す。X 線構造解析によると $(NMe_4)^+$ の場合[5]、最も短い C-H 距離が 3.16 Å で有機物などにおける 0.9 Åに比べるとかなり長くなっておりこの値だけからすると交差分極の効果はほとんど期待できない系である。また、PPN^+ 塩結晶の場合も最も短い C-H 距離は、$(NMe_4)^+$ に比べそれほど差がない[7]。このことから、スペクトル強度の陽イオン依存性

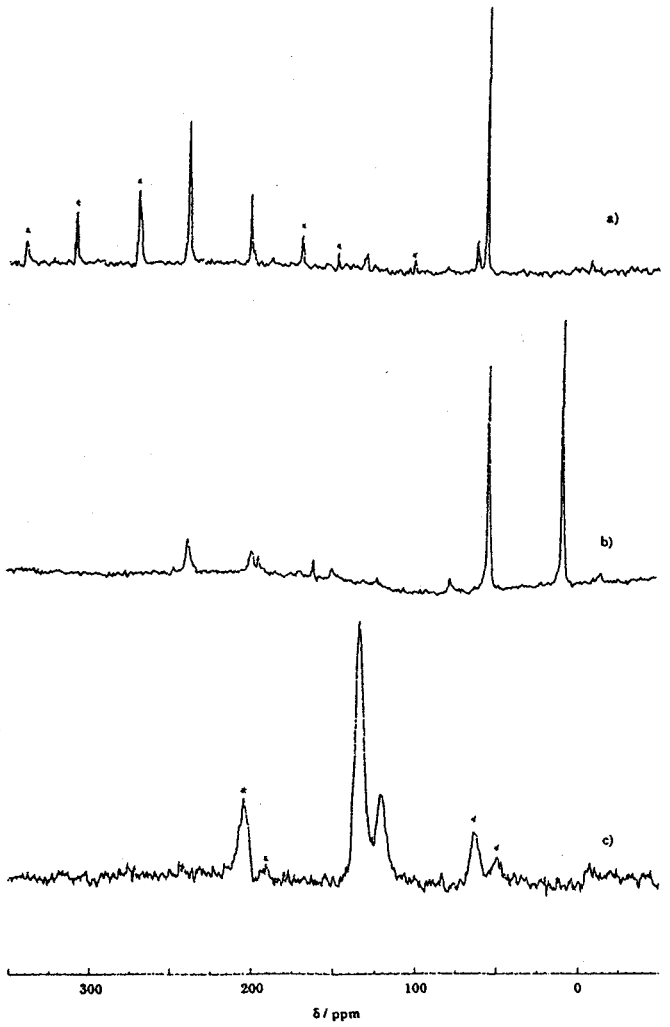


Fig. 2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) $(NMe_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$ (480 scans), (b) $(NEt_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$ (5240 scans), (c) $(AsPh_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$ (2400 scans) with the spinning rate of 3.5 kHz. * represent the spinning side bands.

は、packing の違いによる C-H 距離の差では単純には説明できない。

Table 1 ^{1}H T_1 and $T_{1\rho}$ in $A_2[Ni_6(CO)_{12}]$ (A = $(NMe_4)^+$, $(NEt_4)^+$ and $(AsPh_4)^+$) at room temperature.

	T_1/ms	$T_{1\rho}$/ms
$(NMe_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$	220	124
$(NEt_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$	87	17
$(AsPh_4)_2[Ni_6(CO)_{12}]$	243	12

MSL-200 was used for measurements. $T_{1\rho}$ was measured in CP/MAS experiment.

まとめると、$(NMe_4)^+$ のような小さな球形陽イオンを使うと ^{13}CO CP/MAS スペクトルを感度よく測定できることがわかった。正確な理由は、現在のところわからないが、幾つかの因子、例えば packing、site symmetry、陽イオンの運動状態などが複雑に関係しているものと思われる。

References

1) T. Eguchi, H. Nakayama, H. Ohki, S. Takeda, N. Nakamura, S. Kernaghan and B. T. Heaton, *J. Organomet. Chem.*, **428**, 207 (1992).
2) B. T. Heaton, J. Sabounchei, S. Kernaghan, H. Nakayama, T. Eguchi, S. Takeda, N. Nakamura and H. Chihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 3019 (1990).
3) 江口太郎、中山尋量、宮城慧、中村亘男、B.T. Heaton, J. Nähring, G. Longoni, *分子構造総合討論会*、東京、2D20 (1994). 江口太郎、中山尋量、中村亘男、B.T. Heaton, C. Seregni, *日本化学会第69春季年会*、京都、4B212 (1995).
4) 江口太郎、中山尋量、宮城慧、中村亘男、B.T. Heaton, J. Nähring, G. Longoni, *第33回 NMR 討論会*、神戸、P67 (1994).
5) J.C. Calabrese, L.F. Dahl, P. Chini, G. Longoni and S. Martinengo, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2616 (1974).
6) G. Longoni, B.T. Heaton, P. Chini, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1537 (1980).
7) R.E. Bachmann and K.H. Whitmire, *Acta Crystallogr.*, Section C, **49**, 1121 (1993).
8) R. Voelkel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1468 (1988). J.R. Long, B.Q. Sun, A. Bowen and R.G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11950 (1994). M. Mehring, *Principals of High Resolution NMR in Solids*, Springer, Berlin (1983).

P39　リチウムイオン２次電池負極炭素中リチウムの固体NMRによる状態解析

（旭化成工業・解析センター・電池開発研）○山崎悟、橋本知孝、
入山恭彦、森吉彦、白木弘之、田村亘弘

Study of the states of Li doped in carbons as an anode of LIB by ^{7}Li-NMR
(Asahi Chemical Industry Co.,Ltd.) Satoru yamazaki, Tomotaka Hashimoto, Takahiko Iriyama, Yoshihiko Mori, Hiroyuki Siroki, Nobuhiro Tamura
^{7}Li-NMR were used to investigate the states of Li in graphite, needlecoke and two disorderd carbons which exhibit large charge capacities above that of LiC_6. The signals attributed to intercalated Li were detected in graphite and needlecoke. However, in a coke heat-treated at 750 ℃ two types of Li were detected, and one was assigned to Li located at the edges of carbon layers and the other was intercalated Li. In the case of nongraphtizable carbon charging 498mAh/g, a signal was observed near 90ppm which was lower field than LiC_6 in graphite. The signal was splitted into two peaks with reducing mesurement temperature and the lower field signal was shifted to near 190ppm at 140K, which of linewidth turned out broader than that of metal Li.

１．序

現在、リチウムイオンを用いた２次電池の開発が活発に行われ、様々な負極用炭素が作られている。グラファイトの場合、吸蔵されたＬｉは炭素網面の層間に入り、いわゆる黒鉛層間化合物（LiC_6）を形成する（Fig.1）。一方、非結晶性炭素においては、炭素の種類によって吸蔵されるＬｉがLiC_6に満たない炭素から、LiC_6の容量以上に吸蔵される炭素まで存在することが分かってきた。容量のみならず、放電電位などの特性にも炭素の種類に依存した特徴がある。本研究ではＬｉを吸蔵した炭素にＬｉの固体ＮＭＲを適用し、炭素の種類によって吸蔵Ｌｉの状態がどの様に異なるのか検討を行った。

２．実験方法

本研究に用いた炭素は、グラファイト（ＧＰ）、ニードルコークス（ＮＣ）、低温焼成炭素（Ｃ－７５）、難黒鉛化性炭素（Ｈ－１０）の４種類である。低温焼成炭素（Ｃ－７５）はコークスを７５０℃に加熱処理してサンプルとした。一方、難黒鉛化性炭素（Ｈ－１０）は原料を１３００℃で加熱処理してサンプルとした。各炭素粉末をラッテクス系バインダーを添加して銅箔上に成膜し電極とした。対極、参照極に金

リチウムイオン２次電池　負極炭素　^{7}Ｌｉ－ＮＭＲ　低温焼成炭素　難黒鉛化性炭素

やまざきさとる、はしもととともたか、いりやまたかひこ、もりよしひこ、しろきひろゆき、たむらのぶひろ

属リチウムを用いた３極式セルを作製し、定電圧・定電流法により充電を行った。

^{7}Ｌｉ-ＮＭＲ測定はBruker社製ＭＳＬ４００Ｐを用いた。^{7}Ｌｉの共鳴周波数は、１５５．５０３ＭＨｚでＭＡＳ法およびＳＴＡＴＩＣ測定を行った。低温ＮＭＲ測定はＳＴＡＴＩＣプローブを用いて、１４０～３９０Ｋの範囲で測定した。

３．結果と考察

（１）各炭素の放電特性

本研究に用いた炭素の放電カーブの測定から、ＧＰはステージ構造を形成するために低電位で放電され、ＮＣは放電と共に電位が上昇していく。Ｃ－７５は、ＮＣ同様に放電と共に電位が上昇するが、途中で電位変化の少ない高電位プラトーが生じる。この高電位プラトーを形成するＬｉが存在することで、LiC_6以上の高容量となる。同じく非結晶性であるが難黒鉛化性のＨ－１０では、まず低電位で放電プラトーが存在し、途中からＮＣと同様に放電と共に電位が上昇していく。Ｃ－７５、Ｈ－１０ともにLiC_6の容量以上にＬｉを吸蔵できるが、放電特性に大きな違いがある。

（２）Ｃ－７５の室温測定

Ｃ－７５のフル充電状態について、^{7}Ｌｉ-ＮＭＲのＭＡＳ測定を行ったところ、５ｐｐｍ付近のブロードなピークと１８ｐｐｍ付近のピークが現れ、２つの状態のＬｉが存在することが分かった（Fig.2）。前者をＳサイトＬｉ、後者をＣサイトＬｉと命名した。充放電過程を^{7}Ｌｉ-ＮＭＲのＭＡＳ測定で追跡すると、充電初期にはＣサイトＬｉが出現し、充電後期になるとＳサイトＬｉが出現してくることが分かった。また、放電時には最初にＣサイトＬｉが消失していき、Ｓサイトは放電末期においても残存する。更にＳサイトＬｉは、およそ２００ｋＨｚの範囲にスピニングサイドバンドが出現する。このスピニングサイドバンドは出現範囲から、サテライトピークの広がりに由来すると判断され、ＳサイトＬｉ核近傍の電場勾配が大きいことを示す。以上の結果から、ＳサイトＬｉは炭素網面の端に存在するＬｉで、一方ＣサイトＬｉは炭素網面の層間にあるＬｉと推定した。Ｃ－７５は炭素網面の端部にＬｉを取り込むことでLiC_6の容量以上に吸蔵できるが、放電しにくいＬｉとして放電時に高電位のプラトーを生むと考えられる。

（３）難黒鉛化性炭素（Ｈ－１０）の室温測定

Ｈ－１０の充電過程では充電初期から３５０ｍＡｈ／ｇ程度までは、２０ｐｐｍ付近にＣ－７５のＣサイトＬｉ同様の層間Ｌｉが出現するが、充電量が更に増大し４００ｍＡｈ／ｇを越えると、LiC_6より低磁場の６０ｐｐｍ付近にブロードなピークが出現し、４８０ｍＡｈ／ｇでは９０ｐｐｍまでピークが低磁場シフトする（Fig.3）。このことからＨ－１０においては、充電途中でイオン性が高い層間Ｌｉ状態から、より金属に近い状態のＬｉに転移することが推定される。

（４）温度可変測定

各炭素中のＬｉについて、温度可変測定を行った。ＧＰ中のLiC_6はおよそ２５０Ｋ以下では線幅の変化は見られず、２５０Ｋ以上でＬｉの線幅と同程度の熱拡散が生

起することが分かる（Fgi.4）。ＮＣは１６０Ｋにおいても線幅は一定せず、低温から熱拡散が起こっていることが示唆される。Ｃ－７５の層間Ｌｉ（ＣサイトＬｉ）も１７０Ｋ程度から線幅が一定になり始める。線幅の変化から各Ｌｉの拡散の活性化エネルギーおよび頻度因子を求めると、ＮＣおよびＣ－７５のＬｉはＧＰ中のＬｉに比べて熱拡散の程度が大きいことが推測された。

また、ＧＰ中のＬｉC_6はＫｏｒｒｉｎｇａの関係が成り立っているが、ＮＣおよびＣ－７５中のＬｉはこの関係を満たさない（Fig.5）。このことはＧＰ中のＬｉのシフトや緩和の原因がフェルミ接触相互作用によるもの、即ちナイトシフト的であり、フェルミ面における電子の波動関数がＬｉ核の位置においてｓ性を持つことを示す。ＧＰに対して、ＮＣやＣ－７５ではＬｉ核はよりイオン的であり、炭素との間に電子の共有はほとんどないことを示唆する。この様な電子的な差異が放電時の電位挙動の違いと関連すると考えられる。

一方、Ｈ－１０では低磁場ピークが降温と共に２つに分離し、低磁場側のピークは１９０ｐｐｍ付近までシフトする（Fig.6）。低温における低磁場側のピークの線幅は金属リチウムより大きく（Fig.5）、低温においてはＬｉの状態は金属リチウムと同程度ないしより短い原子間距離で存在することが示唆される。また、$(シフト)^2$と縦緩和時間および温度の積は、室温から２５０ＫまではＧＰより小さいが、降温していくと金属Ｌｉと同程度の大きさになる（Fig.6）。これらの結果から、Ｈ－１０中のＬｉは低温では金属状態と同程度ないしそれ以上に密にＬｉが集合した状態となり、室温では層間Ｌｉ状態との遷移が起こっていることが推測される。この様なＬｉ状態が生成するためにＨ－１０は、ＬｉC_6以上のＬｉが吸蔵され低電位で放電されるものと考えられる。

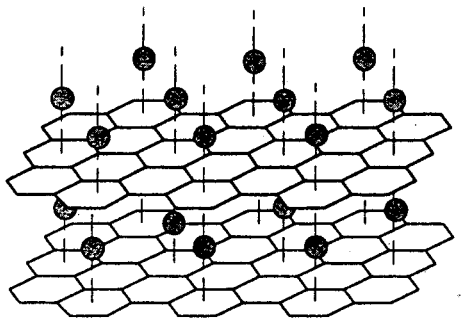


Fig. 1. Structure of Li-intercalated graphite compound LiC6.

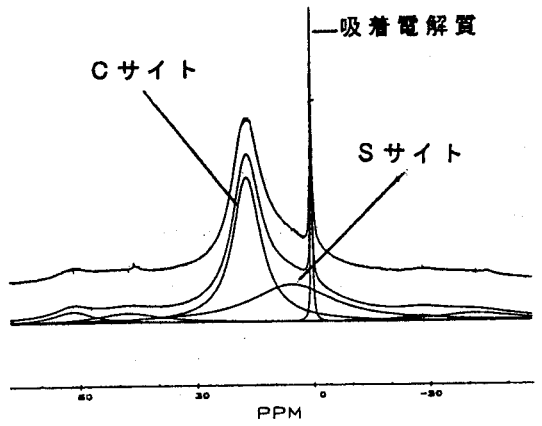


Fig. 2. ^{7}Li-NMR spectrum of the C-75.

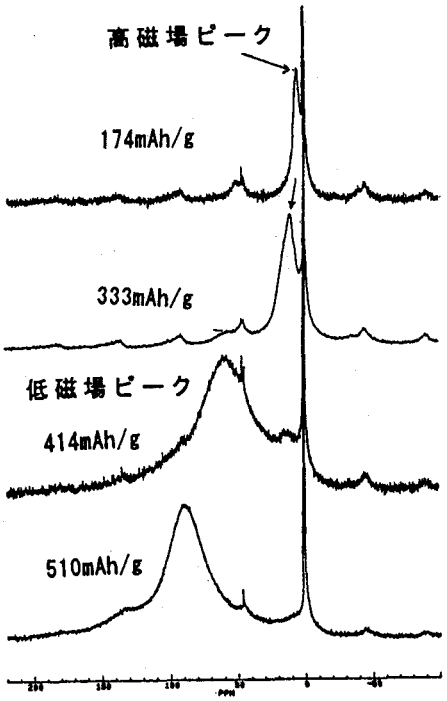


Fig. 3. ^{7}Li-NMR MAS spectra of H-10 at various stages of charging.

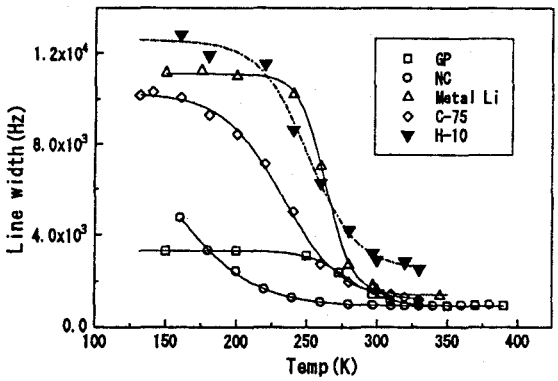


Fig. 4. Linewidths of 7Li peaks as a function of temperature.

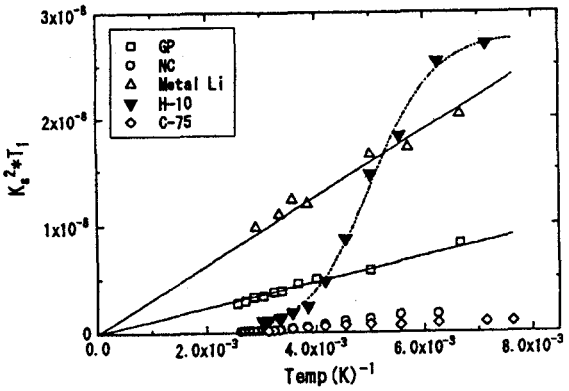


Fig. 5. $K_s^2 \cdot T_1$ as a function of temperature.
K_s : Knight shift
T_1 : spin-lattice relaxation time

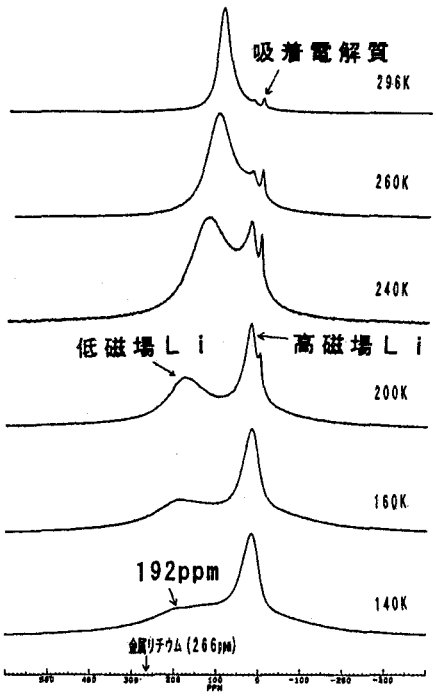


Fig. 6. ^{7}Li-NMR static spectra of H-10 at various temperature.

P40 固体NMRによるキノリン型リチウム・イオノファーの研究

（物質研）○早水紀久子、柳沢　勝、杉原秀樹、平谷和久

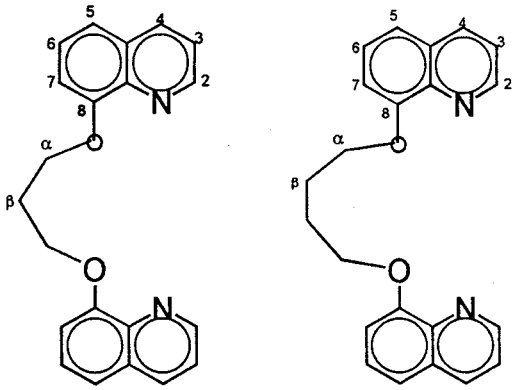
Solid-State NMR Studies on Lithium Ionophores of Quinoline Derivatives

K. Hayamizu, M.Yanagisawa, H. Sugihara, and K.Hiratani

National Institute of Materials and Chemical Research, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

High-resolution solid-state ^{13}C NMR and ^{7}Li NMR spectra of lithium ionophore (compound I) having Li^{+} high selectivility and the homologue (compound II) with less selectivity were observed. The stability of the Li ions in the complex with I was confirmed.

選択的にリチウムイオンを捕らえるリチウムイオノファーとしてキノリンタイプの化合物 (I)を提案しているが[1,2]、メチレン鎖の数ｎ＝３の場合にはｎ＝４に比べると際だって大きな分離能を持つことを見いだしている。一般に骨格構造が同じ同族体でメチレン鎖の数が化合物の性質に対して大きな効果を及ぼすことが知られている。リチウムイオンとの相互作用の観点から、メチレン鎖の数による分子運動の相違をＮＭＲによって研究した。



化合物Ｉ（Ｑ３）　　化合物ＩＩ（Ｑ４）

実験：化合物 (I), (II)をQ3、Q4と省略し、Q3およびQ4、またモル比で１：１のコンプレックス Q3-$LiSO_3CF_3$ 及び Q4-$LiClO_4$ の４種類の化合物の固体高分解能 ^{13}C NMRと^{7}Li NMRを測定した。^{13}C NMRの測定は50MHzで行った。^{7}Li NMRは77.5MHzでは固体モードで室温で測定し、155MHzは，溶液モードでは室温から110 ℃まで測定した。

結果：

^{13}CＮＭＲ：　Q3において溶液状態から固相状態へ変化した時に大きな化学シフト値の変化を示す炭素はC_2：-1.4ppm、Cα：-3.3ppm、 Cβ：-1.5ppm であり、メチレン鎖の炭素に大きな高磁場シフトが見られる。一方Q4ではC_2，C_3，C_4，C_{4a}の炭素で

-1.8ppm程度の高磁場シフトが見られ、C_6：2.5ppm、C_7：-2.6ppmと隣接した炭素で逆方向にシフトし、メチレン鎖のCαはシフトは小さく、Cβ：2.1ppmと低磁場方向である。メチレン鎖がひとつ異なるだけで、固化するときに異なった構造変化をしていることが分かる。さらにLiーコンプレックスにおいて、Liの添加効果としてQ3-Liの系では、C_2：5.8ppm, 1.6ppm、C_3：1.2ppm、C_4：3.0ppm、C_8：-1.3ppm、Cα：3.1ppm であり、X線構造解析[3]でLiが2個の酸素、2個の窒素、及びアニオンと5点で相互作用している結果と一致している。一方、Q4-Liの系ではLiの添加にNを含む環炭素では低磁場シフトがみられ、C_6：-1.7ppm、C_7：3ppm、 Cα ：1.7ppm、 Cβ ：-3.5ppmと固化シフトとは逆方向へのシフトとなっている。言い換えるとコンプレックスが形成した時の^{13}Cシフト値は溶液状態のQ4の値に近い。

^{7}ＬｉNMR： ^{7}ＬＩはＩ＝２／３で、四極子の性質をもつ核種であるが、Ｑ３及びＱ４のＬｉコンプレックスのスペクトル線はローレンツ型に近く、Ｌｉが対称性のよい状態にあるか、あるいは運動により平均化がなされていることを示唆している。Table 1に室温（２５ ℃）で固体モードで測定した結果を示す。

Table 1. ^{7}Ｌｉ NMR of Li-complex

	Line Width(kHz)				T_1(sec)	
	no-irradiation		^{1}H-irradiation		^{1}H-irradiation	
	steady	MAS	steady	MAS	steady	MAS
Q3-Li$^+$	4.2	0.44	1.5	0.19	52, 85	52, 78
Q4-Li$^+$	3.7	0.42	1.0	0.10	4.9 6.3	4.5

^{1}H照射によって線幅が先鋭化することにより、Ｌｉとプロトン間に双極子相互作用があることが分かる。またマジックアングルスピニング (MAS)によってさらに線幅が狭くなることは、二次的な四極子相互作用の平均化としてよいであろう。緩和時間はＱ３－Ｌｉの系では非常に長く、２つの成分があるが、ＭＡＳによって長い方の緩和時間は多少短くなる。Ｑ４－Ｌｉでは緩和時間は約 1/10 の短さであり、ＭＡＳによって一つの緩和時間に変化している。この現象については、現在検討中である。緩和時間の相違からリチウムイオンはＱ３の方がＱ４より遥かに強く包接されているといえるが、^{7}Ｌｉの線幅に大きな相違は見られなかった。

リチウムイオンの運動性をみるために、温度を１１０ ℃まであげて^{7}ＬｉNMRを測定した。その結果、Ｑ３－Ｌｉの系では線幅、T_1ともに温度効果は少なく、室温の値と際だった変化は見られなかった。Ｑ４－ＬｉではＴ$_1$は徐々に短くなるが線幅の変化は僅かであった。クラウンエーテルにＬｉが包接された系の固体NMRでは、温度変化が観測されているので、本報告で取り扱った包接力の大きなイオノファーの特徴を今後詳細に検討する予定である。

1. K.Hiratani, K.Taguchi, H.Sugihara, and T.Okada, Chem. Letts., 197 (1986)

2. K.Haratani, T.Okada, and H.Sugihara, Anal. Chem.,59, 766 (1987)

3. K.Ueno, K.Hiratani, K.Taguchi, T.Okada, and H.Sugihara, Chem. Letts, 949 (1987)

P41

青色蛍光体ＺｎＳ：Ａｇ、Ａｌの、発光特性と固体ＮＭＲによる構造解析

（三菱化学総研・化成オプトニクス[1]・東京水産大[2]）
○原園としえ・徳永幸夫[1]・安達隆二[1]・渡部徳子[2]

Luminous characteristics and ^{27}Al Solid state NMR of blue phosphor, ZnS:Ag,Al

(Mitsubishi Kagaku Research Center, Kasei Optonix[1], Tokyo University of Marine Sciences[2]) O Toshie Harazono, Yukio Tokunaga[1], Ryuji Adachi[1], Tokuko Watanabe[2]

^{27}Al(I=5/2) STATIC NMR spectra were measured in blue phosphor, ZnS:Ag,Al, where Zn atoms in ZnS were replaced with Ag or Al. The spectra indicated the presence of three Al sites, that is, (A); Al replaced to a Zn site, which is present in the neighborhood of Ag replaced to a Zn site, (B); Al replaced to a Zn site, which is present in the neighborhood of an interstitial Ag; (C); Al released from a lattice site, e.g. Al_2O_3 or $Al(OH)_3$ etc.. The analysis of spectra revealed that the phosphor holding no Al compounds released from a lattice site and no interstitial Ag, has a stronger emission intensity.

序：昨年度の緑色蛍光体、$Y_3Al_5O_{12}$：Ｔｂ、及び、赤色蛍光体、Y_2O_3：Ｅｕの報告[1]に引き続き、今回は、ブラウン管や投写管等に用いられる青色蛍光体、ＺｎＳ：Ａｇ、Ａｌの、発光特性と固体ＮＭＲによる構造解析について、新たな知見を得たので報告する

試料：本研究に用いた試料は、$ZnSO_4$水溶液にH_2Sガスを吹き込むことによって得られるＺｎＳに、ＡｇをＡｇNO_3水溶液として添加し、ＡｌをＡｌ$_2$（CH_3COO）$_4$・$4H_2O$として添加し、他の融剤と共に９３０°Ｃで焼成して得られた。得られた試料のＡｇ、及び、Ａｌ濃度を表１に示した。なお、ここで用いた原料、及び、得られた試料の不純物濃度は全て、ｐｐｍ以下であった。

装置、及び測定：試料のＡｌ、Ａｇ、及び、不純物濃度は、Ｓｅｉｋｏ　ＳＰＳ－１２００Ａ　ＩＣＰ装置とＲｉｇａｋｕ　３３７０　蛍光　Ｘ－線装置を用いて定量した。さらに、Ｐｈｉｌｉｐｓ　ＰＷ１７００　Ｘ－ｒａｙ　回折装置で結晶構造を確認した。発光スペクトルと発光強度は、ＴＯＰＣＯＮＡＢＴ－３２　電子線励起装置で測定した。粒径の大きさは、Ｍｏｄｅｌ　ＰＡ－２　コールターカウンターで測定した。　ＮＭＲの測定にはBruker社製ＭＳＬ－３００固体ＮＭＲ装置を用いた。^{27}Ａｌの共鳴周波数は７８．２ＭＨｚで、測定は、ＳＴＡＴＩＣプローブを用い、、四極子エコー法で

青色蛍光体、ＺｎＳ：Ａｇ、Ａｌ、^{27}Ａｌ　ＳＴＡＴＩＣ　ＮＭＲ

○はらぞの　としえ　・　とくなが　ゆきお　・　あだち　りゅうじ　・　わたなべ　とくこ

結果：ＺｎＳは図１に示した様な立方晶型の結晶構造を有し、ＺｎサイトをＡｇ、または、Ａｌが置換する。試料が電子線励起されると、ＡｇとＡｌが近傍に存在している場合、ドナーであるＡｌ準位から、アクセプターであるＡｇ準位に電子遷移が起こり青色発光が起こる。発光スペクトルを図２に示した。各試料の^{27}Ａｌ　ＳＴＡＴＩＣ　ＮＭＲ　スペクトルを図３～図５に示した。図３は、Ａｇの投入量が１００ｐｐｍのＭＡシリーズ、図４はＡｇの投入量が７００ｐｐｍのＭＢシリーズ、図５はAl/Ag（モル比）＝1.5のＭＣシリーズのスペクトルである。ＭＡとＭＢシリーズのスペクトルには、１２９ｐｐｍのシャープなシグナル（Ａ）、Ａのシグナルの裾に現れるブロードなシグナル（Ｂ）、０ｐｐｍ付近のブロードなシグナル（Ｃ）の３種類のシグナルが現れている。Ｃのシグナルは、Al/Agが1.5位までは現れないが、それ以上のモル比では、モル比の増加と共に増加した。ＢのシグナルはＡｇの量が少ないＭＡシリーズでは顕著には現れないが、Ａｇの量が多いＭＢシリーズでははっきりと現れている。ＭＡとＭＢシリーズでＣのシグナルが現れないAl/Ag=1.5のＭＣシリーズでは、ＡｇとＡｌの量が増加してもＣのシグナルは現れない。一方、Ｂのシグナルはａｇ、及び、Ａｌの添加量が増加すると共に多くなっている。

考察：Ａのシグナルの半値幅はいずれも５６０Ｈｚ前後と極めてシャープであり、Ａｌが対称性のよい電場の中に存在していることが示唆されることから、Ｚｎサイトを置換した４配位Ａｌ（Ａｌ－S_4）であると考えられる。この場合、Ａｌの近傍に存在するＡｇはＺｎサイトを置換した格子点上にあると考えられる。ＢのシグナルはＡのシグナルとケミカルシフトがほぼ同じなので、Ｂのシグナルもまた、Ｚｎサイトを置換したＡｌであると思われる。Ｂのシグナルは、Ａｇの量が増えると増加しており、また、シグナルの形から四極子結合定数がかなり大きいことがわかる。これらのことより、このＡｌは対称性の悪い電場の中に存在していることが示唆される。置換Ａｌの電場の対称性を低下させる原因の１つに格子間Ａｇの存在が考えられる。即ち、Ｂのシグナルは近傍に格子間Ａｇが存在している置換Ａｌに帰属されるのではないか、と考えられるが、さらに詳細な検討を行っている。Ｃのシグナルはケミカルシフトが０ｐｐｍで、Ａｌの割合が多くなると現れるので、遊離したＡｌ化合物、例えば、Al_2O_3や$Al(OH)_3$等であると考えられる。一方、表１から、発光強度の大きいものは、ＭＡシリーズではＭＡ３、ＭＢシリーズではＭＢ４～５、ＭＣシリーズではＭＣ５であった。^{27}Ａｌ　ＮＭＲ　スペクトルから、これらの試料には遊離したＡｌ化合物や格子間Ａｇ等が存在していないことが明らかになった。即ち、遊離したＡｌ化合物や格子間Ａｇ等が存在していない試料が高い発光強度を持つことが判明した。

結論：^{27}Ａｌ　ＳＴＡＴＩＣ　ＮＭＲ　スペクトルから、青色蛍光体ＺｎＳ：Ａｇ、Ａｌは、遊離したＡｌ化合物や格子間Ａｇ等が存在していない試料ほど、高い発光強度を持つことが判明した。

１）第３３回ＮＭＲ討論会要旨集、ｐ．２５３～ｐ．２６０、１９９４．

sample	Ag ppm	Al ppm	Al/Ag mol	granular size d_{50}/μm	emis.int. %
MA1	70	3	-	12.8	57.4
MA2	80	20	1.0	12.4	87.0
MA3	80	40	2.0	9.6	93.5
MA4	80	100	5.0	7.2	91.2
MA5	90	200	8.9	6.0	89.7
MA6	80	270	13.5	5.9	89.1
MA7	90	470	20.9	6.1	89.7
MA8	90	1200	56.0	5.0	84.8
MA9	90	2220	98.7	5.6	67.7
MB1	580	0	-	13.7	13.7
MB2	680	3	-	14.4	28.1
MB3	740	7	0.04	14.5	45.2
MB4	610	110	0.7	13.2	95.0
MB5	630	250	1.6	10.8	95.0
MB6	660	390	2.4	8.4	92.1
MB7	690	390	2.3	7.8	88.1
MB8	650	1350	8.3	5.7	81.7
MC1	20	10	2.0	11.2	66.8
MC2	60	10	0.7	10.9	83.1
MC3	100	50	2.0	11.8	90.0
MC4	200	80	1.6	11.6	97.9
MC5	490	180	1.5	11.0	100
MC6	660	200	1.2	13.7	99.5
MC7	980	360	1.5	14.3	93.0
MC8	1550	560	1.4	15.2	65.2
MC9	1730	740	1.7	13.9	78.3

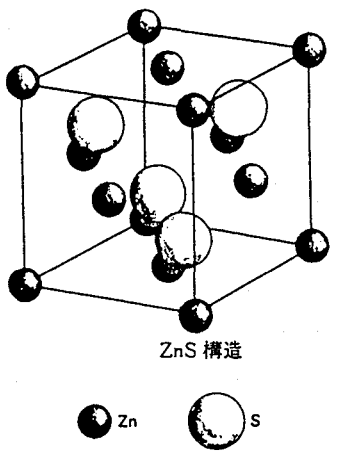


Fig.1 Structure of ZnS.

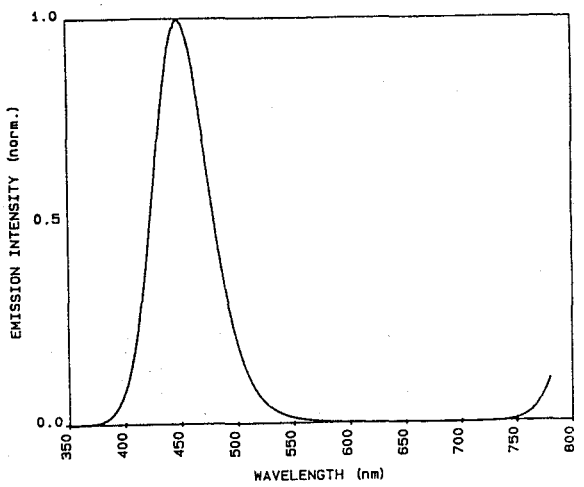


Fig.2 Emission spectrum of ZnS:Ag,Al.

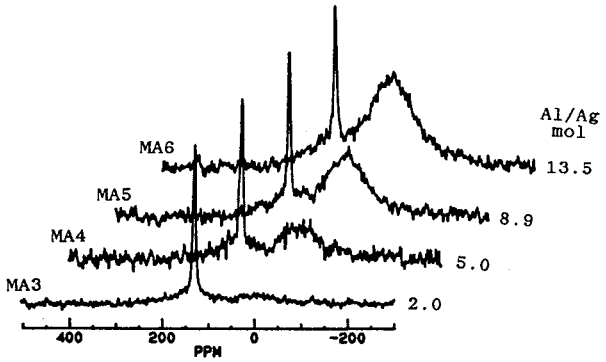


Fig.3. ^{27}Al STATIC NMR spectra of Al in Zn:Ag,Al, where Zn site was replaced with Al. The content of Al was kept constant at 100 ppm for all samples.

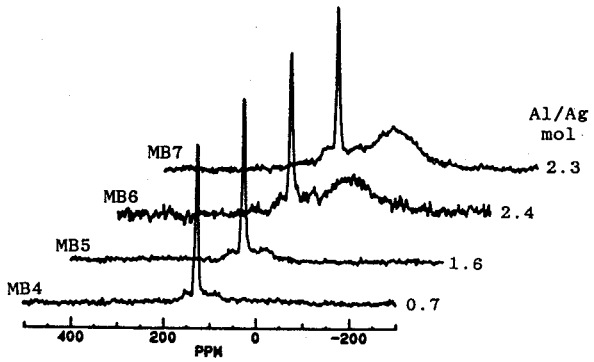


Fig.4. ^{27}Al STATIC NMR spectra of Al in Zn:Ag,Al, where Zn site was replaced with Al. The content of Al was kept constant at 700 ppm for all samples.

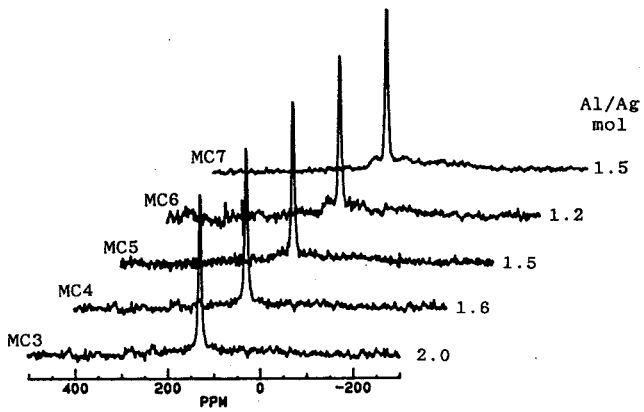


Fig.5. ^{27}Al STATIC NMR spectra of Al in Zn:Ag,Al, where the molar ratio, Al/Ag , was held 1.5.

P42

固体高分解能NMRによるアルミノシリケート系材料の構造と化学反応性に関する研究

(積水化学工業*，名古屋工業大)
○新田勝三*，神谷昌岳*，中野龍俊*，辻田義治，吉水広明

Structures and Chemical Reactions of Aluminosilicates as Studied by High-Resolution Solid-State NMR

Katsumi NITTA*, Masataka KAMITANI*, Tatsutoshi NAKANO*, Yoshiharu TSUJITA and Hiroaki YOSHIMIZU
Kyoto Technology Center, Sekisui Chemical Co., Ltd.*
Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology

Structures of heat-treated kaolinites were investigated by solid-state NMR measurement together with both its solubility to an alkaline solution and its reactivity with an alkaline silicate solution. Kaolinites with two different heat treatments showed amorphous XRD patterns, but their local structures were different. The whole structure of kaolinite calcined at 700℃ was strained. When kaolinite was cooled quickly after had been heated in a moment at temperatures above the melting point, kaolinite structure partly in its particle and amorphous SiO_2 was found to be formed on the surface of the particle. The resulting SiO_2 showed enhanced dissolution of Si in an alkaline solution. Heat-treated kaolinites were able to react with an alkaline silicate solution providing consolidated material which included 4-coordination Al.

1．はじめに

粘土鉱物であるカオリナイトを徐々に昇温していくと500℃付近から層間水の脱離が開始し、非晶質であるメタカオリンに変化する。更に昇温を続けると1000℃を超えたあたりからムライト，γ-アルミナ，クリストバライトが形成される。これらの熱変性挙動はMacKenzieらによってNMRを用いて検討されている[1,2]。本研究では代表的なアルミノシリケートであるカオリナイトを二種類の熱処理方法により非晶質化させ、その構造を^{27}Al，^{29}Si MAS NMR及び^{29}Si CP/MAS NMRの測定により解析し、アルカリに対する溶解性との相関性を調べた。更に珪酸アルカリ溶液との化学反応性についても評価したので報告する。

2．実験

2.1 サンプル調製

カオリナイトの標準サンプルはジョージアカオリンを使用し、カオリナイトを700℃で3時間焼成した粉体A（メタカオリン）と約2000℃の火炎バーナー中を瞬時に通過させ10 μm以下に分級した粉体Bを用意した。各粉体の特性をTable1に示す。

2.2 アルカリ水溶液に対する溶解度測定

粉体5gを36%KOHaq.50g中に20℃で5分間分散させた後、遠心分離器および濾紙により

Keywords; Aluminosilicate, Kaolinite, ^{27}Al MAS NMR, ^{29}Si MAS NMR and ^{29}Si CP/MAS NMR

○にった　かつみ、かみたに　まさたか、なかの　たつとし、つじた　よしはる、よしみず　ひろあき

溶液と固形分を分離し、溶液中のAl，Si濃度をICPにより測定した。

2.3 化学反応性評価

熱処理したカオリナイトの珪酸アルカリ溶液との化学反応性を評価するため、アルミノシリケート：珪酸カリウム溶液（SiO_2; 21%，K_2O; 24%，H_2O; 55%）：珪砂（結晶性SiO_2；クラック防止のため添加）＝1：2：3（重量比）の割合で混合し85℃で2時間加熱し、固化を試みた。

2.4 NMR測定

固体高分解能^{27}Al MAS NMRおよび^{29}Si MAS NMRスペクトルの測定はバリアン社製UNITY 400 plus NMR分光計を用いて共鳴周波数はそれぞれ104.22MHz，79.46MHzにて行った。試料回転速度はそれぞれ12kHz，4.5kHzであった。

3．結果と考察

3.1 アルミノシリケートの構造解析

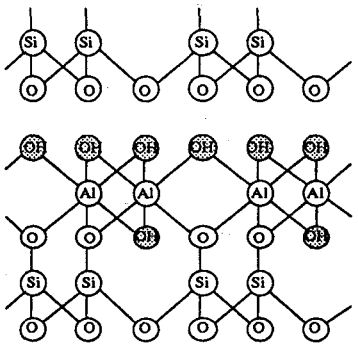


Fig.1. Structure of kaolinite.

Table1. Properties of aluminosilicates

		Kaolinite	Powder A	Powder B
Composition (wt%)	SiO_2	45.2	52.3	53.8
	Al_2O_3	38.8	44.6	41.3
	TiO_2	1.0	1.7	0.2
	Fe_2O_3	0.5	0.6	0.9
	other	0.4	0.8	1.7
	H_2O	14.1	0.6	2.1
BET specific surface area (m^2/g)		14.7	13.9	34.5
Concentration of dissolved elements (ppm)	Si	132	558	15809
	Al	325	979	870

Fig.1にカオリナイトの構造を示す。カオリナイトの理想的な化学組成は$Al_2Si_2O_5(OH)_4$でSiO_4四面体層とAl(OH,O)$_6$八面体層とが1：1で1つの層を形成している。OH基はAl原子に結合しておりSiO_4四面体の酸素原子と水素結合している。Fig.2に示すXRDパターンでは結晶構造を有する。このカオリナイトを熱処理することにより結晶構造が歪み粉体A，B共に非晶質になり、XRDパターンからはこれらの粉体の構造解析は不可能である。しかし、Table1に示すBET比表面積やアルカリ水溶液に対する溶解度から粉体AとBは明らかに異なる性能を有しており、局所的には構造が異なると考えられる。

各粉体の^{27}Al，^{29}Si MAS NMRおよび^{29}Si CP/MAS NMRスペクトルをFig.3に示す。カオリナイトは^{27}Al MAS NMRスペクトルから0 ppm付近に6配位を示すピークと、^{29}Si MAS NMRスペクトルから-93 ppmにQ^3構造を示すピークが検出された。このカオリナイトを700℃で焼成した粉体Aの^{27}Al MAS NMRスペクトルから6配位のピーク以外に28，50 ppmにそれぞれ5，4配位のピークが検出され、^{29}Si MAS NMRス

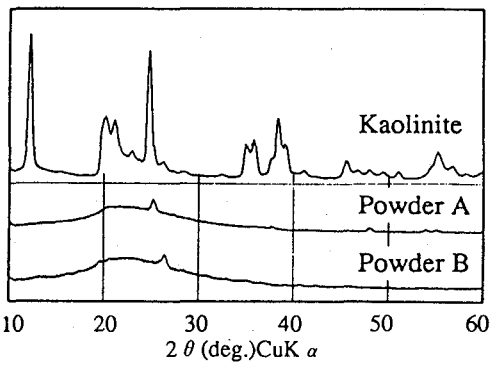


Fig.2. XRD pattetrns of aluminosilicates.

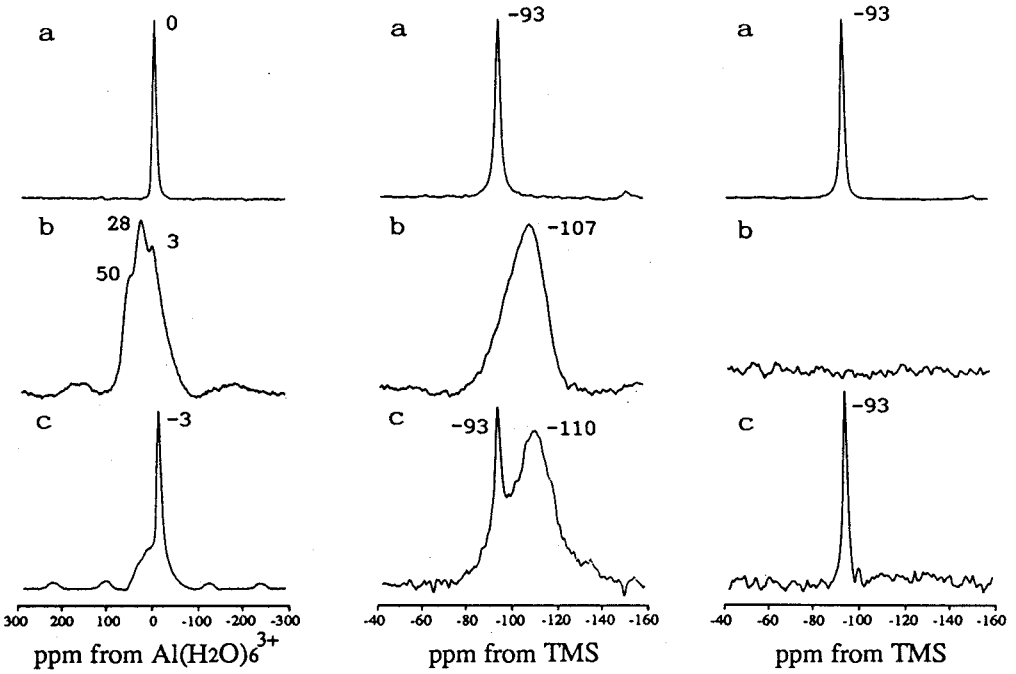


Fig.3. NMR spectra of aluminosilicates. (left) ^{27} Al MAS NMR spectra, (center) ^{29} Si MAS NMR spectra, (right) ^{29} Si CP/MAS NMR spectra.
a; kaolinite b; powder A c; powder B.

ペクトルでは -107 ppm を中心とした線幅の広いピークに変化した。これらの変化は層間水の脱水（Al-OH 間の縮合）によるものであり、6 配位中 4 個の Al-OH の結合が 1 or 2 個切れることにより 5 or 4 配位の Al が出現し、それに伴い SiO_4 四面体層構造が歪むためである。また、プロトンが消失するため粉体 A は CP/MAS 法ではスペクトルは得られない。一方、粉体 B においても ^{27}Al MAS NMR スペクトルで 4，5 配位の Al の存在が確認されるが、粉体 A に比して比率が小さくカオリナイトにみられた 6 配位の Al の鋭いピークが残る。更に、^{29}Si MAS NMR スペクトルで -110 ppm を中心とした線幅の広いピークがみられたが、-93 ppm にもピークが検出され、^{29}Si CP/MAS NMR スペクトルでもこの -93 ppm のピークは消失しないことからカオリナイトの Q^3 構造を残していることがわかる。これはカオリナイトを融点以上の温度で瞬時に加熱し急冷させているためカオリナイトの粒子表面で構造変化が主に起こり、粒子内部ではカオリナイト構造を残していると考えられる。カオリナイトは Fig.4 に示す状態図において a → b の点線に沿って変化し、最終的にはムライト（$3Al_2O_3 \cdot 2SiO_2$）とクリストバライト（SiO_2）に分解するが[3]、粉体 B の粒子表面における構造変

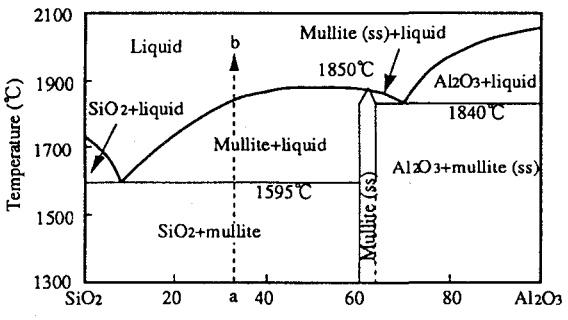


Fig.4. The binary system Al_2O_3-SiO_2.
(S.Aramaki et al.,1962)

化はムライトとSiO_2が融解し急冷されるため非晶質化したものと考えられる。ただし、SiO_2はムライトに比して融点が低いため非晶質SiO_2が多く生成したと考えられ、このことが粉体Bのアルカリ溶液に対するSiの溶解量が多いことを裏付けている。

3.2 固化体の構造解析

カオリナイトと珪酸カリウム溶液は反応せず固化体は得られないが、前述した条件で熱処理したカオリナイト（粉体A，B）からは固化体の合成が可能であった。この反応機構は現在検討中であるが、Al成分がSiO_4ユニットに入るか否かが議論となっている。粉体Aから得られた固化体はFig.5に示すXRDパターンから粉体Aと同様非晶質であることがわかる。固化体の^{27}Al，^{29}Si MAS NMRおよび^{29}Si CP/MAS NMRスペクトルをFig.6に示す。

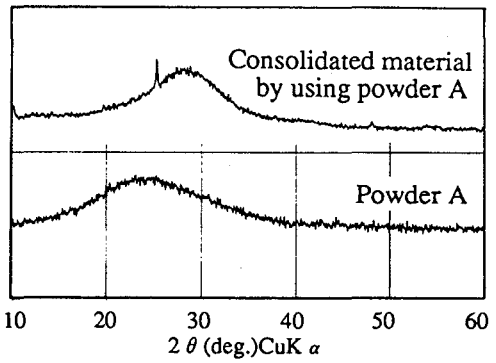


Fig.5. XRD pattetrns of consolidated material and powder A.

^{27}Al MAS NMRスペクトルにおいて54 ppmにピークが検出されていることからAlが4配位に変化したことがわかる。^{29}Si MAS NMRスペクトルでは-94 ppmを中心とした-80～-110 ppmの線幅の広いピークが検出され、種々のQ^n(mAl) (n=3,4 m=1～4)が共存する構造であると考えられる[4]。なお、^{29}Si MAS NMRスペクトルの-109 ppmにみられる鋭いピークは反応に関係しない結晶性SiO_2である。^{29}Si CP/MAS NMRスペクトルでは-93 ppmにピークが検出され、SiO_4ユニットにAlO_4とOH基が一個ずつ結合した状態であると考えられる。更に-80～-100 ppmにかけてもピークがみられることから、固化体内部に脱水縮重合反応に関与しないOH基が部分的に残っているものと考えられる。

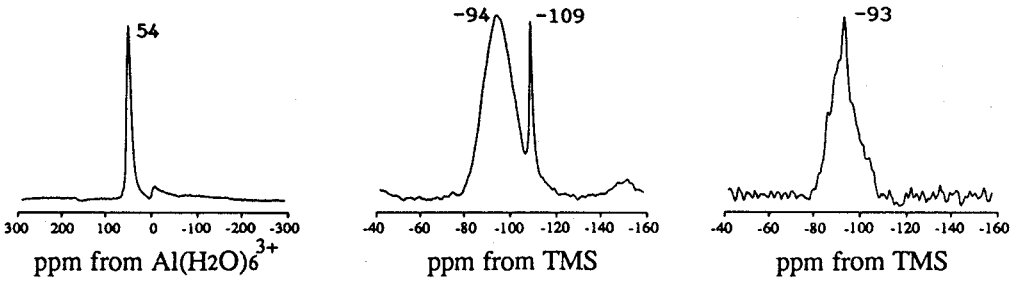


Fig.6. NMR spectra of consolidated material by using powder A.
(left) ^{27}Al MAS NMR spectra, (center) ^{29}Si MAS NMR spectra,
(right) ^{29}Si CP/MAS NMR spectra.

参考文献

1) K.J.D.MacKenzie, I.W.M.Brown, M.E.Bowden, and R.H.Meinhold, J.Am.Ceram.Soc., 68, 293 (1985)
2) I.W.M.Brown, K.J.D.MacKenzie, R.H.Meinhold, and M.E.Bowden, J.Am.Ceram.Soc., 68, 298 (1985)
3) 荒井康夫，セメントの材料化学，p72，(1991)
4) 斉藤肇，森島績編，東京化学同人，高分解能NMR　－基礎と新しい展開－，p141，(1987)

P43

メタルフラーレン Sc_2C_{84}の^{45}Sc－NMRによる研究

（都立大・理）○ 三宅洋子、小島康彦、鈴木信三、菊地耕一、
真庭豊、甲斐荘正恒、阿知波洋次

"^{45}Sc-NMR study of Metallofullerenes, Sc_2C_{84}"

(Tokyo Metro. Univ.) Yoko Miyake, Yasuhiko Kojima, Shinzo Suzuki, Koichi Kikuchi, Masatsune Kainosho and Yohji Achiba.

We have studied the ^{45}Sc-NMR spectra for two kinds of di-metallofullerene Sc_2C_{84}, which have been purified and isolated by use of two-stage HPLC technique. In Sc_2C_{84}-B (second fraction), there is only one peak observed in the NMR spectrum. It indicates that the two Sc atoms are located in the equivalent position of the fullerene cage. The motion of the Sc atoms in the carbon cage has been also estimated, that its activation energy was 8.5 kJmol^{-1} (88meV), and its correlation time was about 10^{-8}s. In Sc_2C_{84}-A (first fraction), two Sc atoms have been found to be located in the non-equivalent positions. In this case, two kinds of motions of the Sc atoms have been observed. One was the comparatively fast motion which could be very similar to that of in Sc_2C_{84}-B. The other was the exchange of the non-equivalent Sc atoms. Its activation energy and the life time have been estimated as 80 kJmol-1(0.8eV) and 10^{-4}s, respectively.

「序」

金属原子が内包されたフラーレン類はその電子状態及び分子構造において特異な状態が期待されるため非常に興味深い。La, Y, Sc, Gdなど様々な金属原子つきフラーレンの存在が確認されており、いくつかについて単離精製されている。また、金属核のNMRはその金属原子の状態の情報を得る最も有力な手法の１つである。^{45}Scはスピン7／2、天然存在比100％でγが^{13}Cと同程度であり、金属核のNMRの中で非常に感度がよく観測し易い原子核である。Scつきのフラーレン類についてはScが１個から３個のものまで種々存在が確認されており、ScC82及びSc3C82についてはすでにESRスペクトルによってSc核近傍の不対電子の存在とその状態について研究されているが、C_{84}にScの２個ついたメタルフラーレン（Sc_2C_{84}）についてはESR不活性であるため、これまで金属核自身の磁気共鳴分光は行われていなかった。本研究では、HPLCによって単離精製された２種類のSc_2C84（A,B）について溶液の^{45}Sc－NMRを用いてメタルフラーレン中のSc核の化学的環境や運動状態について検討を行った。

「実験」

２種類のメタルフラーレンSc_2C_{84}はHPLCカラムにより単離精製した。（ここではretention timeの順にSc_2C_{84}-A, Sc_2C_{84}-Bとする。）両メタルフラーレンともCS_2を溶媒として低温（-35 - 35 C）のN後高温（20 - 160 C）の測定を行った。NMRはVarian Unity plus-500,及びUnity-300を用いて121.5MR測定を行った後、溶媒を減圧除去し、o－ジクロロベンゼン溶液として、脱気、Ar置換を行った後高温（20 - 160 C）の測定を行った。NMRはVarian Unity plus-500,及びUnity-300を用いて121.5

メタルフラーレン、溶液^{45}Sc－NMR、緩和、

みやけ　ようこ、こじま　やすひこ、すずき　しんぞう、きくち　こういち、まにわ　ゆたか、かいのしょう　まさつね、あちば　ようじ

MHz、73 MHzで測定した。Scのケミカルシフトは1M Sc_2O_3／HCl（H_2O）（原子吸光標準液）を0 ppm（外部標準）とした。

「結果及び考察」

1）Sc2C84-B（等価）について

Fig.1に様々な温度でのSc_2C84-BのCS$_2$及びo-ジクロロベンゼン溶液の^{45}Sc－NMRスペクトル（121.5 MHz）を示した。ほとんどシフトの温度変化のいない10000－1500Hz程度の線幅のシグナルとして観測されたことは、少なくともSc核付近には不対電子を持たないことを示している。また、ケミカルシフトの値は230ppmとSc^{3+}の錯体について観測されている範囲（-50－250ppm）内に一本のシグナルとして観測された。室温CS$_2$溶液については73 MHzでの測定も行い121.5 MHzでのスペクトルと線幅、線形ともにほぼ一致したことから、このブロードな1本のシグナルはケミカルシフトの違う2つ以上の成分の重ね合わせやそれらの化学交換によるブロードニングではないことを確認した。このことから、Sc_2C84-Bの2つのSc核は等価であることが明らかになった。また、室温においてinversion recovery法を用いてT_1測定を行い、線幅より求められるT_2はT_1に等しいことを確認した。この系の緩和は大部分が四極子結合による緩和と考えられる。$T_1=T_2$の時、四極子結合による緩和は

$$\frac{1}{T_1}=\frac{1}{T_2}=\frac{3\pi^2}{10}\,\frac{2I+3}{I^2(2I-1)}\,\frac{e^2qQ}{h}^2\,\left(1+\frac{\beta^2}{3}\right)\,\tau_c$$

で表され、相関時間τ_cが分子全体の運動である時には溶媒の粘性係数h及び温度Tに関係する。

$$\tau_c = 4\pi R^3\eta/3kT \qquad (Rは分子の半径)$$

したがって分子全体の運動が緩和に寄与している場合、線幅（Lw=1／πT2　τ_c）はη／Tに比例し、その傾きは溶媒によらず一定のはずである。しかし、各温度での観測された線幅をη／Tに対してプロットするとその傾きは2つの溶媒でほぼ3倍と大きく異なっていた。（用いた2つの溶媒の粘性係数は同じ温度で約3倍である。）線幅、すなわちこのSc核の緩和に寄与する相関時間はFig.2で示したように溶媒の粘性に無関係であり1／Tのみに関係し、指数関数の相関を示している。

$$Lw = 148.5 * \exp(1020/T)$$

一方最も簡単なモデルとして活性化エネルギーEaの活性化過程を考えると相関時間τ_cはArrheniusの式から

$$\tau_c = C * \exp(Ea/RT)$$

と表せることから、Sc_2C84-BのSc核の緩和に寄与する相関時間を持つ運動は活性化エネルギーEa＝8.5 kJmol^{-1}(88meV)でであり、運動の時間オーダーは、分子全体の運動（2*10^{-11}s程度）よりも緩和に大きくに影響することからNMRの共鳴周波数（10^{8}s）の逆数により近いと考えられる。溶媒の粘性に無関係な運動であることは明らかなため、この運動はフラーレン内でのSc原子の運動であると考えている。

2）Sc_2C84-A（非等価）について

Sc2C84-Aについても様々な温度での^{45}Sc－NMRスペクトル（121.5 MHz）を観測した（Fig.3）。室温付近でのスペクトルに注目すると、200ppmと260ppmに1:1の2本のシグナルが観測されている。このことからSc_2C84-Aの2つのSc核は非等価であることが明らかとなった。（Sc_2C84-Aについても2つのSc核ともほぼSc^{3+}であることはSc_2C84-Bと同様にそのケミカルシフト及び線幅から明らかである。）しかもこの2つのシグナルは高温では1本に観測され可逆的であったことから、2つの非等価なSc核は化学交換し得る位置にあることが解った。Sc_2C84-Aについてはその温度変化から少なくとも2種類の緩和に寄与する運動があることは明らかである。一つは各シグナルの線幅に寄与する運動、もう一つは異なるケミカルシフトを持つ核の化学交換である。化学交換による寄与を差し引いてみると各シグナルの線幅は温度が上がるにつれてシャープになっていることがわかる。この線幅はやはり溶媒によってほとんど変化しなかった。化学交換が線形にほとんど表れない程度遅い時（25 - 80 C）について、その線幅を1／Tに対してプロットするとSc2C84-Bの時とかなり近い指数曲線となった（Fig.4）。

したがって、Sc_2C84-Aについても線幅に寄与する運動があり、それはSc_2C84-Bと同程度（活性化エネルギー数十meV、$10^{-8}s^{-1}$程度）の運動であるといえる。化学交換については、交換を含んだBloch方程式を用いて線形のシュミレーションを行い（Fig.5）、観測されたスペクトルと比較することにより各温度での交換速度を決めた。各温度での交換の非常に遅いときの線幅には（Fig.4）から見積もった値を代入した。交換速度kは活性化エネルギーEaの2 siteの交換として考えると、

$k = A * \exp(-Ea/RT)$

であるから、交換速度kの対数を1／Tに対してプロットし（Fig.6）、その傾きから活性化エネルギーEaを80kJmol-1（0.8eV）と見積もることができた。この交換速度kは110 C (coalesce temperature)で

$10^4\ s^{-1}$程度である。

3）Sc_2C84-A及びSc_2C84-Bの分子構造とその内部運動の状態についてのモデルの検討

1. Scの存在位置

Sc_2C84-Aでは2つのSc原子は化学交換可能であり、Sc_2C84-Bでは等価であることから、両Sc_2C84とも2つのSc原子は2つとも内包か2つとも外付きと考えられるが、Sc核の運動が溶媒の粘性によらないことから内包の可能性が強い。2つのScは酸化状態0+の時に考えられるようなSc間の強い共有結合はなく、むしろ電荷の反発によりある程度離れていると考えられる。電荷の反発のあるScの間に相互作用があることも外付きよりも内包を示唆している。したがって両Sc_2C84とも2つのScはFullerene Cageの内側に2つのScの距離ができるだけ長くなるような位置に存在していると考えられる。Sc2C84-Aではその位置が非等価な環境であり、Sc_2C84-Bでは等価であるといえる。Fullerene Cageの構造に関して篠原ら（名大）はSc2C84-Bの^{13}C-NMRを測定した結果D2d対称であることを明らかにしている。永瀬ら（都立大）はD2d-C84の対称軸上における2つのSc原子の安定点を計算することによりD2dの最も長い軸上でSc核はCageにかなり近い位置が最安定であることを見いだしSc2C84-Bの構造を示しているが、それは本実験結果に合致している。Sc_2C84-AのCageの対称性は決定されていないが、2つのSc核は非等価であることから、フラーレンの2つのScを結ぶ軸に垂直な対称面は存在しないといえる。

2. Sc核の内部運動について

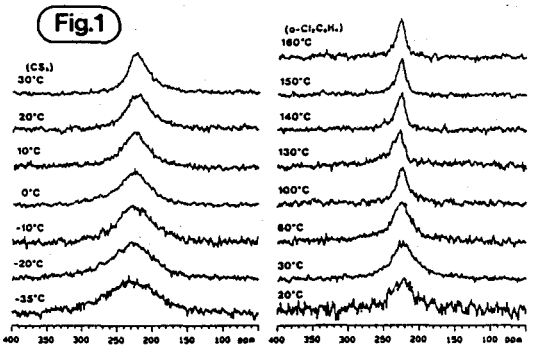
2-1. 速い運動

活性化エネルギーEa = 8.5 kJmol^{-1} (88meV)程度、相関時間10^{-8}s程度の比較的速い運動の存在はSc_2C84-A、Sc_2C84-Bの両方について見いだされた。この程度の相関時間であることは、間に活性化エネルギーの存在する2状態以上の状態間の運動であることは明らかである。特にSc_2C84-Aに関しては、この速い運動の平均位置が非等価であることが示されていることから、この運動はかなり局所的な位置での運動であると考えている。

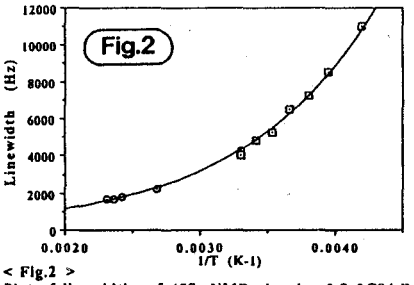
2-1. 遅い運動

Sc_2C84-Aにおいては活性化エネルギーEa = 80kJmol-1（0.8eV）程度、相関時間10^{-4} s程度の遅い運動が存在することが見いだされた。この運動は非等価な磁気環境の2つのSc核が交換する運動である。Sc_2C84-Bについては2つのScが等価であるためこのような交換の運動の有無を確認することはできなかった。

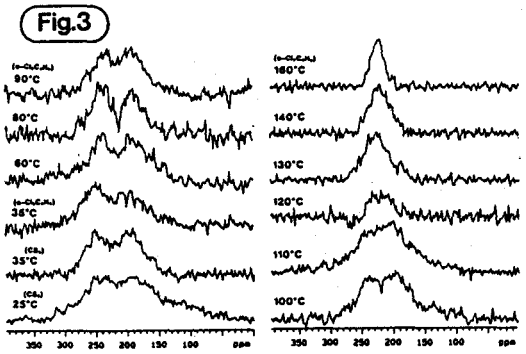
Fig.7にSc核の内部運動についてのモデルを示した。



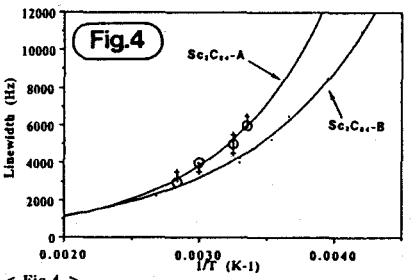
< Fig.1 >
^{45}Sc-NMR Spectra of Sc_2C_{84}-B in CS_2 (-35°C - 30°C, left side) and o-dichlorobenzene (20°C - 160°C, right side) solvents at various temperature



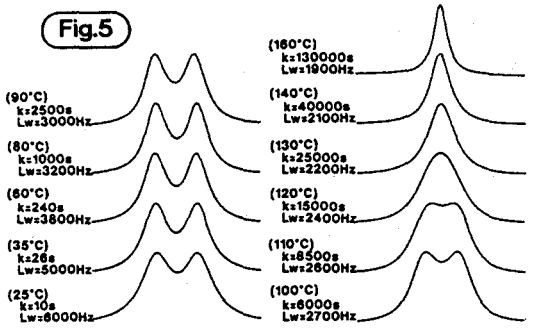
< Fig.2 >
Plot of linewidths of 45Sc-NMR signals of Sc2C84-B in CS2 (□) and o-dichlorobenzene (○) solvents at various temperature.



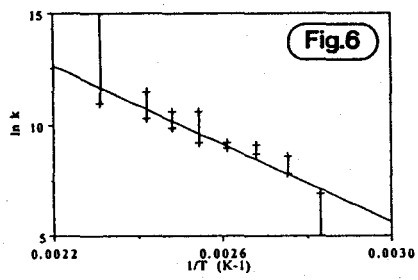
< Fig.3 >
^{45}Sc-NMR Spectra of Sc_2C_{84}-A in CS2 (25°C, 35°C) and o-dichlorobenzene (35°C - 160°C) solvents at various temperature.



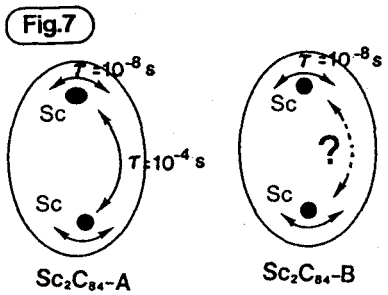
< Fig.4 >
Plot of linewidths of ^{45}Sc-NMR signals of Sc_2C_{84}-A vs. reciprocal temperature at 25 °C, 35°C (in CS2 solvent), 60°C and 80 °C (in o-dichlorobenzene solvent). In this temperature range, the exchange were slow enough to have no influence on the lineshapes.



< Fig.5 >
Simulated spectra of Sc_2C_{84}-A at various temperature. The lineshape is simulated by the classical Bloch equations with the exchange on various exchange rate k.



< Fig.6 >
Plot of logarithm of the exchange rate vs. reciprocal temperature.
The limit of ln k values, where the simulated spectra are seems to be fit to the observed one, on each temperature is shown as (⟷) on the figure.



< Fig.7 >
Model for the motions of the Sc atoms in Sc_2C_{84}-A and Sc_2C_{84}-B.

P44

重原子の四極核のＭＡＳスペクトル

物質工学工業技術研究所　○林　繁信・上田　貴洋

MAS and off-MAS NMR spectra of half-integer quadrupole nuclei of heavy atoms (National Institute of Materials and Chemical Research)　Shigenobu Hayashi and Takahiro Ueda

Quadrupole interaction and chemical shift anisotropy have the effects of comparable magnitude in NMR spectra of quadrupole nuclei of heavy atoms. MAS and off-MAS NMR spectra of ^{59}Co and ^{51}V nuclei have been measured for cobalt(0) acetylacetonate and ammonium metavanadate, respectively. Spinning sidebands originated from satellite transitions are erased experimentally in the off-MAS spectra. We have analyzed the patterns of the central transition in the off-MAS spectra theoretically, taking into consideration both quadrupole interaction and chemical shift anisotropy.

四極核の固体ＮＭＲスペクトルは１次の核四極相互作用が働くことにより数百ｋＨｚから数ＭＨｚに容易に広がってしまう。半整数のスピンの場合は m=+1/2↔-1/2 の遷移のみを観測することが多い。一方、重原子核になると化学シフトの異方性も大きくなる。このため、重原子の四極核においては、核四極相互作用と化学シフトの異方性を同時に考慮する必要が出てくる。静止試料において、１次および２次の核四極相互作用に化学シフトの異方性が働いた場合のスペクトルの線形については既に理論的な解析がなされている。一方、マジック角回転（MAS）を行ったスペクトルでは、１次の核四極相互作用と化学シフトの異方性の線幅への影響が消去され、スピニングサイドバンドが数多く観測される。 Satellite Transition Spectroscopy ではこのスピニングサイドバンドの強度を主に問題にしている。核四極相互作用が大きい場合は、２次の効果により各サイドバンドがあるパターンを示すようになる。１次および２次の核四極相互作用と化学シフトの異方性すべてを考慮してスペクトルシミュレーションを行えば２つの相

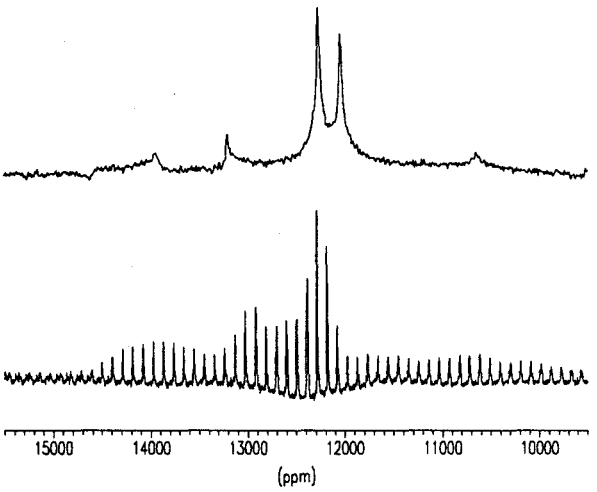


Fig. 1.　^{59}Co NMR spectra of $Co(acac)_3$, measured at 94.94 MHz　Top: a static sample and bottom: a sample spinning at the magic angle and at a rate of 10.00 kHz .

固体ＮＭＲ・マジック角回転・四極核・化学シフトの異方性・核四極相互作用

はやし　しげのぶ　・　うえだ　たかひろ

互作用に関するパラメータが得られるが、そのためにはスペクトル１つ計算するにも膨大な時間がかかる。

本研究では、マジック角から少しずらして試料を回転させ、off-MAS NMR スペクトルの測定を行って m=+1/2↔-1/2 の遷移のみを観測した。そのスペクトルの線形の解析から、化学シフトおよび核四極相互作用のパラメータを得ることを試みた。

NMR 測定は、ブルカー社製 MSL400 および ASX200 を用いて行った。外径 4 mm のローターを用いて、試料を 10 kHz 以上の高速で回転させた。^{59}Co （Co(0)アセチルアセトネート $Co(acac)_3$）および ^{51}V 核（メタバナジン酸アンモニウム）について測定を行ったが、以下に示すのは ^{59}Co の例である。スペクトルは、$K_3Co(CN)_6$飽和水溶液を 0 ppm として表示した。

Fig. 1 上に静止試料のスペクトルを示した。サテライトの遷移を含めるとスペクトルは 10000 ppm (1 MHz)近くにわたって広がっており、線形を正確に測定することは困難であった。中央付近に見られる３本のピークは化学シフトの異方性に起因していると考えられる。MAS を行うと Fig. 2 下に見られるようなスペクトルが得られた。10000 ppm 近くにわたってサイドバンドが観測された。サイドバンドの強度は左右対称ではなく、１次の核四極相互作用に化学シフトの異方性の効果が混在していることがわかる。

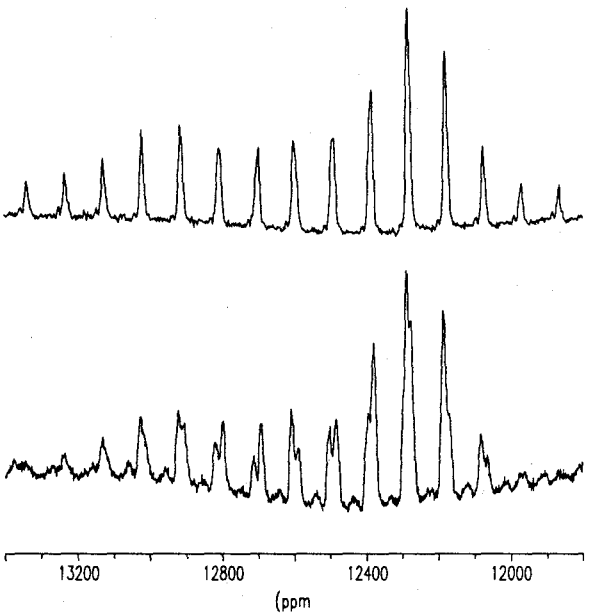


Fig. 2. Central part of ^{59}Co NMR spectra of $Co(acac)_3$, measured at 94.94 MHz A sample is spinning (top) at the magic angle and (bottom) at the angle deviated about 1 degree from the magic angle. Spinning rates were both 10.00 kHz

Fig. 2 上に MAS スペクトルの中央付近を拡大して示した。等方ピークの位置から、みかけの化学シフト値（２次の核四極相互作用によるシフトを補正していない値）は 12495 ppm である。 m=+1/2↔-1/2 の遷移は１次の核四極相互作用の影響を受けていないから、その遷移のみを拾い出すことよって、サイドバンドの強度から化学シフトの異方性を求めることができる。そこで、回転軸をずらして off-MAS スペクトルの測定を行った。回転軸をずらしていくと急激にサテライトの遷移に起因するサイドバンドの強度が減少し、約１度ずらしたところほぼ無視しうる強度となった。Fig. 2 下にそのスペクトルを示した。このスペクトルのサイドバンドの強度を解析して化学シフトの異方性を見積った。off-MAS にすることにより、各サイドバンドが特有の線形を示すようになったが、これは化学シフトの異方性が復活して２次の核四極相互作用と混在した効果を示したためと考えられる。この線形を解析して核四極相互作用の大きさを見積った。

P45　固体高分解能NMRによる$K_xRb_{1-x}X$（X＝Br、I）の構造解析

（三菱製紙（株）総合研究所[1]、Chemagnetics[2]、東京都立大　理学部[3]、JEOL応用研究所[4]）　釼持基子[1]、○遠藤一央[1]、Frye James[2]、本田憲治[3]、北川進[3]、出口健三[4]

Structure Analysis of $K_x Rb_{1-x} X$(X=Br, I) Mixed crystal by ^{39}K and ^{89}Rb MASNMR

Research Center, Mitubishi Paper Mills, Ltd [1], Chemagnetics [2], Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University [3], and Applied Research Laboratory, JEOL [4]
M. Kenmotsu [1], K. Endo [1], J. Frye [2], K. Honda [3], S. Kitagawa [3], K. Deguchi [4]

Mixed $K_x Rb_{1-x} X$(X=Br, I) crystals were prepared by the melt-annealing method. X-ray diffraction profiles indicated that the crystals are a face-centered cubic structure and the method produced a complete solid-solution. ^{39}K and ^{89}Rb MASNMR method have been used to perform a structure analysis of the mixed crystals, $K_x Rb_{1-x} X$(X=Br, I); to determine the local structure. We emphasize that the high-field shifts of ^{39}K and ^{89}Rb nuclei were observed with increasing the lattice parameters of the mixed crystals. The chemical shifts can be explained by considering components which involve second-order quadrupolar coupling tensors. In order to compare the experimental lattice parameters with the theoretical values, we calculated a quarter lattice unit of $Na_x K_{1-x} I$ by a semi-empirical MO method, PM3 program, [*1] using $Na_x K_{1-x} I$(X=0, 0.25, 0.5, 0.75, 1) model.

＜序＞

イオン導伝体として知られている$Cu_xAg_{1-x}I$の混晶について、その構造と^{63}Cu、及び^{109}AgMASNMR CENTRAL PEAKの高磁場シフトについて考察されている[*2]。それによると格子定数の増加に伴う金属核の高磁場へのシフトは^{63}Cu核については二次の核四極子相互作用、^{109}Ag核についてはケミカルシフトの異方性によって説明されている。今回は、$K_xRb_{1-x}X$（X＝Br、I）について試料の合成と^{39}K、^{89}Rb核MASNMR測定を行い、構造とケミカルシフトの関係について考察した。

また MO法を用いて、$Na_xK_{1-x}I$をモデルとしてエネルギーの最適化における原子間距離を求め、X線回折結果との対応を考察した。

^{39}K and ^{89}Rb MASNMR, X-ray diffraction, mixed $K_x Rb_{1-x} X$(X=Br, I) crystals, semi-empirical MO method

けんもつ　もとこ、えんどう　かずなか、フライ　ジェイムス、ほんだ　けんじ
きたがわ　すすむ、でぐち　けんぞう

＜実験＞

①試料作成

$K_{0.25}Rb_{0.75}X$、$K_{0.5}Rb_{0.5}X$、$K_{0.75}Rb_{0.25}X$（X＝Br、I）の6種類についてそれぞれのモル比で（KBr、RbBr）、（KI、RbI）を混合し、電気炉を用いて融点以上の温度で共融させて合成した。

②粉末X線測定

粉末X線測定には理学RAD　Cを用いた。

③MAS－NMR測定

^{39}KについてはJEOLE GSX 270スペクトロメーターを用い（観測周波数12.5MHz）、^{87}RbについてはChemagnetics　CMX－300、200（観測周波数　98.23MHz、65.47MHz）を用いた。

④MO計算

混晶単位格子1／4のモデル$Na_xK_{1-x}I$（X =0, 0.25, 0.5, 0.75, 1）の計算はSEMI-EMPIRICAL　MOのPM3プログラムで行い、エネルギーの最適化から原子間距離を求めた。

＜結果と考察＞

Fig. 1に$K_xRb_{1-x}I$（X =0.25、0.5、0.75）の粉末X線回折のチャートを示す。ここで取り上げたKI、RbIは共に立方晶でNaCl型をとり、各々の格子定数は6.956A、7.290Aである。Fig. 1から分かるように各々のモル比で合成した混晶は完全固溶体を形成している。その格子定数の変化をグラフに表すとFig. 2のようになり、ほぼモル比と格子定数が直線関係を示している。[*3]
$K_xRb_{1-x}Br$（X =0、0.25、0.5、0.75、1）についても同様のことがみられる。Fig. 3、4に$K_xRb_{1-x}I$における^{39}K、^{87}RbのMASNMRのチャートを示す。^{39}K核、^{87}Rb核両方とも格子定数の増加に伴ってケミカルシフトのCENTRAL PEAKが高磁場側にシフトしているのが分かる。格子定数の増加にともない結晶のパッキングがゆるみ他核からのシールドが減少し高磁場側へシフトするのは当然と言える。各々の核に着目してみると^{39}Kは、回りに^{87}Rbが増加するにつれてKIからのケミカルシフトの差が増加し同様に、^{87}Rbも回りに^{39}Kが増加するにつれてRbIからのケミカルシフトの差が増加している。この様にこれらの混晶は結晶格子は保っているが各々の核の回りの電子状態には歪みが生じていると考えられる。

^{39}K、^{87}RbはそれぞれI＝3／2、7／2で核四極子モーメントを持っている。これらの核のMASNMRのケミカルシフトの原因としては、2次の核四極子相互作用が考えられる。その場合MASNMRのCENTRAL PEAKのシフト（$\Delta\omega$）は以下のようになる。[*4]

$$\Delta\omega = -1/30\,\omega_0^2/\omega_0\,[I(I+1)-4/3]\,(1+\eta^2) \quad \cdots (1)$$

$\Delta\omega$：CENTRAL PEAK のシフト（ppm）　　ω_0：共鳴周波数

ω_0：$3e^2qQ/h2I(2I-1)$　　η：異方性パラメータ

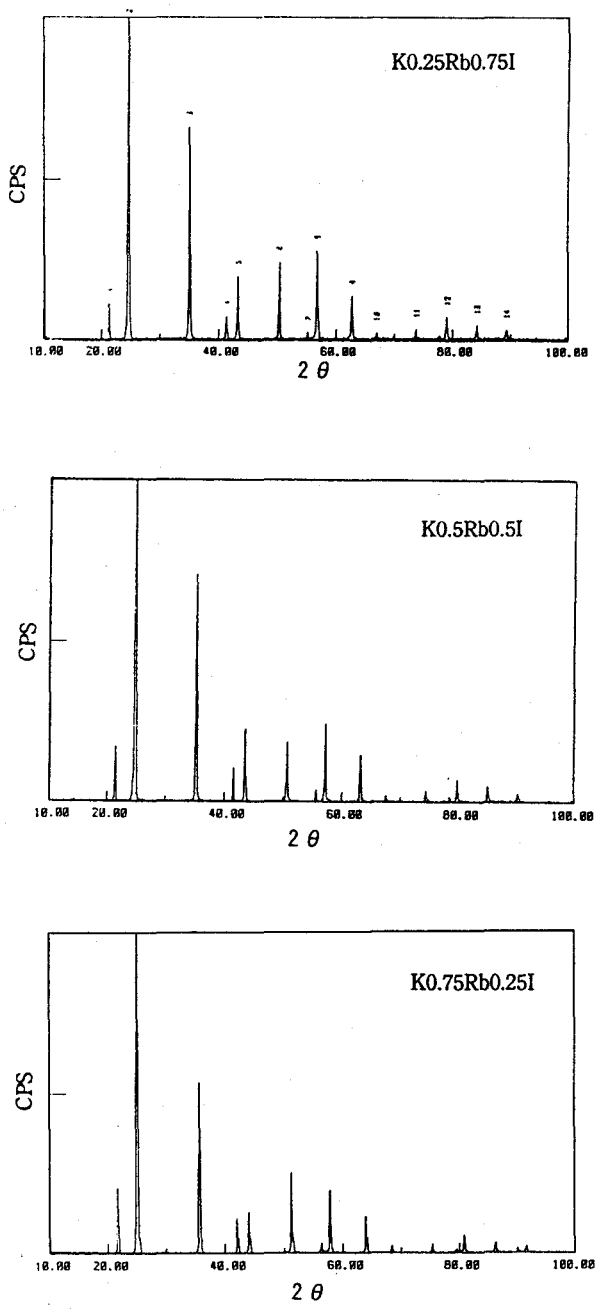


Fig.1.X−ray diffraction profiles of KxRb1−xI
(x= 0.25,0.5,0.75)crystals.

式（１）からKxRb1-xIの核四極子結合定数(e^2qQ/h）を計算した。その結果をTABLE1に示す。この様にこれらの混晶は結晶格子は保っているが、各々の核の回りの電場には歪が生じておりその結果ケミカルシフトがシフトすると考えられる。また核四極子結合定数の変化はKよりRbのほうが大きいことが分かった。

ＭＯの計算結果からも格子定数の直線的変化がみられこのような現象は理論的にも裏付けられる。

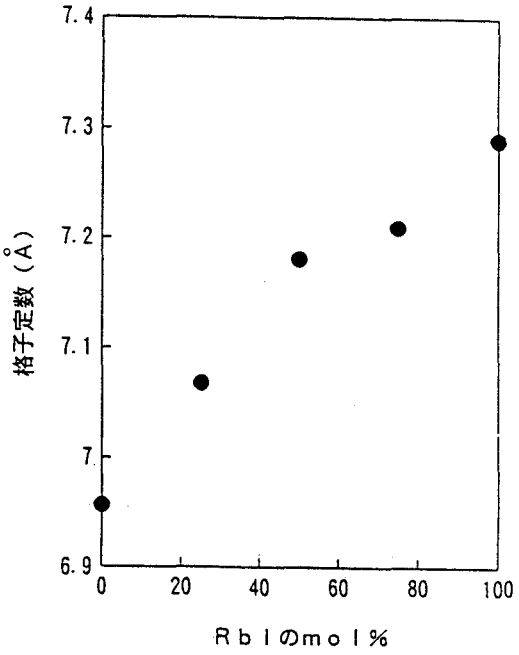


Fig.2.Lattice parameter ofKxRb1−xI
(x=0,0.25,0.5,0.75,1)crystals
vs K:Rb ratio.

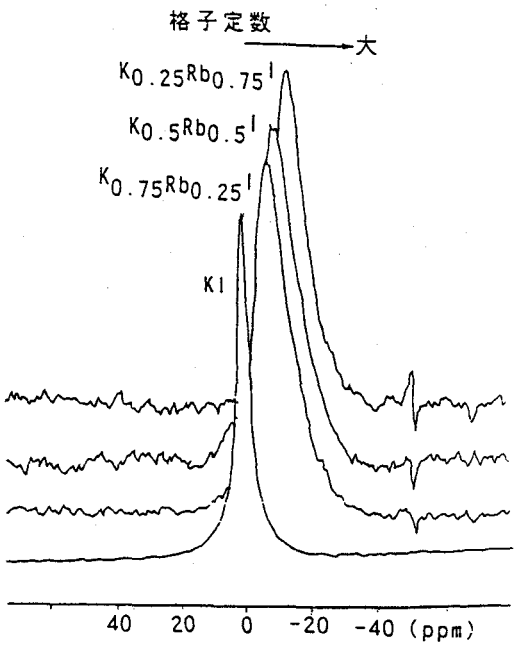


Fig.3. ^{39} K MAS NMR spectra of KxRb1−xI (x=0,0.25,0.5,0.75,)crystals.

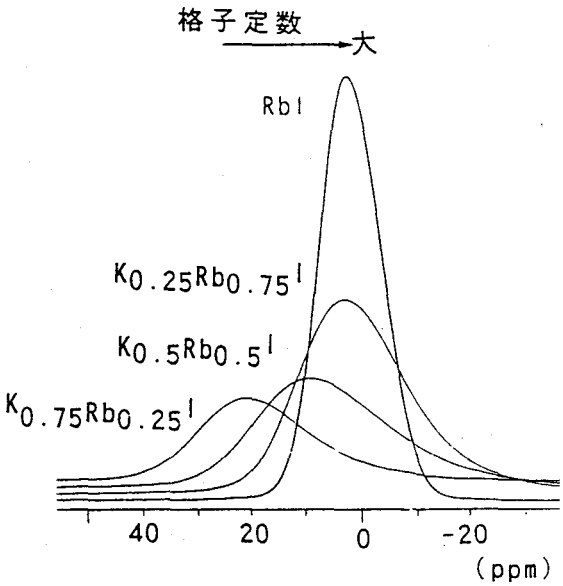


Fig.4. ^{87} Rb MAS NMR spectra of KxRb1−xI (x=0.25,0.5,0.75,1)crystals.

TABLE1.Lattice parameters of KxRb1−xI(x=0,0.25,0.5,0.75,1)crystals, ^{39}K, ^{87}Rb chemical shift and quadrupole coupling constants.

	RbI	KRb_3I_4	$K_2Rb_2I_4$	K_3RbI_4	KI
格子定数(A)	7.290	7.210	7.180	7.068	6.956
Rbケミカルシフト (ppm)	*0	1.1	7.6	19.3	
e^2Qq/h (MHz)	0	1.665	4.377	6.974	
Kケミカルシフト (ppm)		-13.56	-9.29	-7.75	**0
e^2Qq/h (MHz)		0.291	0.241	0.220	0

*Refered to the shifts for RbI(0ppm).

** Referd to the shifts for KI(0ppm).

参考文献

＊１） Stewart J. J. P. , *J. Comp. Chem.* 10, 289(1989).

＊２） 遠藤ら　第３３回ＮＭＲ討論会要旨集 33, 281−284(1994).

＊３） Vegard L. and Skofteland G. , *Arch . Math. Naturv.* 45, 163(1942).

＊４） Kundla E. , Samoson A. and Lippmaa E. , *Chem. Phys. Lett.* 83, 229(1981).

第２日

１１月１日（水）

測定法・緩和・運動・イメージング

L5　磁場勾配パルスを用いたＩＮＡＤＥＱＵＡＴＥ法

理研　○鵜澤　洵、越野広雪

INADEQUATE Spectroscopy using Pulsed Field Gradient

Jun Uzawa and Hiroyuki Koshino
The Institute of Physical and Chemical Research(RIKEN)

The INADEQUATE experiment carried out using phase cycling,but it is not sufficient for t1 noise and some "ghost signal" suppression. Nowadays, Pulsed Field Gradient(PFG) techniques are widely applied to several multi dimensional NMR spectoroscopy for purposes of coherence selection.

Here we present the application of PFG-INADEQUATE experiment, it detect not only one bond correlation, but two or three bond carbon-carbon connectivities and measurement of the spin coupling constants($^{2}J_{C,C}$ and $^{3}J_{C,C}$) values. These values will be useful for stereo chemical analysis.

１．はじめに

磁場勾配パルス（ＰＦＧ）法をコヒーレンス選択に使うことの利点は必要とする信号成分のみを試料コイルの段階から選択することにある[1)]。位相回しによるコヒーレンス選択は、ＨＭＢＣやINADEQUATEの場合、200倍以上の不必要な信号成分をプリアンプ、中間周波増幅器、Phase Sensitive Detectorなど全ての信号経路を経て最後に近いコンピュータで差し引きすることになる。このことが装置に与える負担は大きい。これら増幅系のダイナミックレンジが狭ければ、大きい信号成分のクリッピング歪が発生して必要とする小さな信号成分より大きなノイズが発生する。この成分は位相もそろっていないので差し引きしてもかなり残る。増幅器の直線性が悪い場合は非直線歪や混変調歪を発生させる。これらのノイズはｔ1ノイズや解釈不可能なアーティファクトの原因となる。我々はＰＦＧをコヒーレンス選択に使う利点に注目し、天然存在比率のままで^{15}Ｎ信号を観測する^{15}Ｎ－ＨＭＢＣ法を93年と94年の本討論会を始めＥＮＣなどで発表してきた。今回はINADEQUATE法に適用し[2)]、直接結合した炭素同士の結合関係ばかりでなく、２ボンドないし３ボンド離れた炭素間の結合関係や$^{2}J_{C,C}$と$^{3}J_{C,C}$値を観測するなどの結果を得たので報告する。ボルネオールのメチル基の帰属が$^{3}J_{C,C}$値と差ＮＯＥの結果から訂正された[3)]。　なお、36回ＥＮＣやＩＳＭＡＲ’９５における報告と一部重複する。

キーワード　INADEQUATE, Pulsed Field Gradient, $^{13}C-^{13}C$ coupling constant, Borneol

ふりがな　　うざわじゅん、こしのひろゆき

２．装置と測定条件

ＦＴ－ＮＭＲ装置は日本電子製α４００に磁場勾配ユニットを付属させて測定した。プローブはＴＨ５／ＦＧ型で10％エチルベンゼンのＳ／Ｎは９４であった。

パルス系列を第一図に示す。磁場勾配パルスの強度は概ね28ガウス／ｃｍで、0.8～1msecのサイン波を用いた。重クロロフォルムを溶媒とした場合、必要に応じて㈱シゲミ製の対象型ミクロチューブを用いた。パルス繰り返し時間はＴ1の1.2～1.4倍とした。カルボニル基や４級炭素などＴ1が長い炭素とのクロスピークのＳ／Ｎは長い方の炭素で決まる。

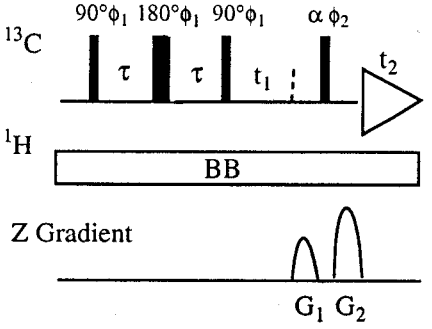


Fig. 1. Pulse sequence of the PFG-INADEQUATE. For N-type spectrum, gradients ratio of $G_1 : G_2 = 1 : 2$ and read pulse of $\alpha = 120°$ were used. For P-type spectrum, gradients ratio of $G_1:G_2 = -1 : 2$ and read pulse of $\alpha = 60°$ were used (4). For the gradients, a sine shape was used. Phase cycling was same that of conventinal one as follows: ϕ_1 = x, y, -x, -y, -x, y, x, -y; ϕ_2 = 4x, 4y, 4(-x),4 (-y); rec = 2(x, -x), 2 (-y, y), 2(-x, x), 2(y, -y).

３．位相回し法とＰＦＧ法の比較

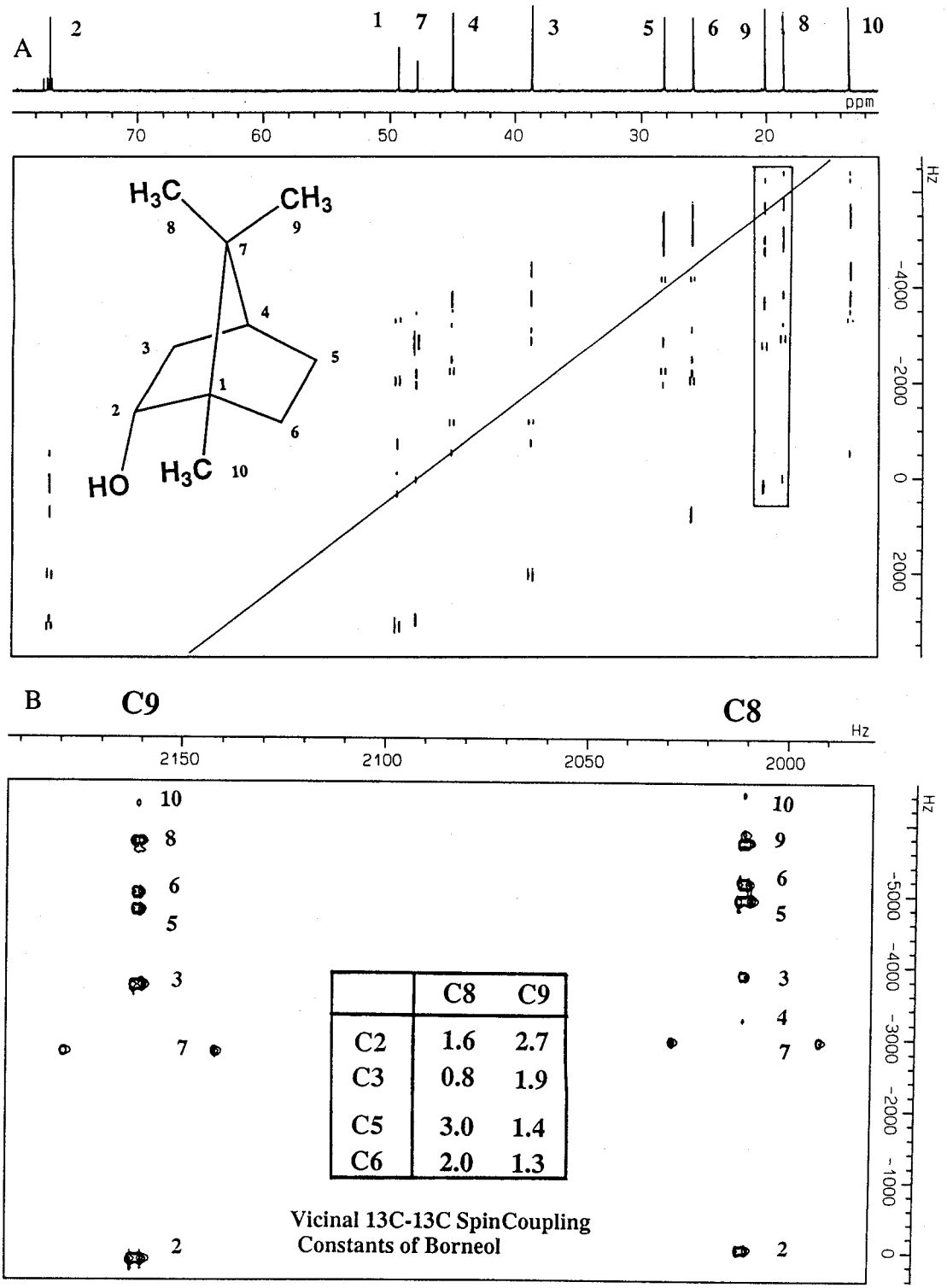
INADEQUATE法は^{13}Ｃ－^{13}Ｃの結合を天然存在比で測定するが、その存在確率は約１／8000であり、例え試料が充分使えてもてもｔ1ノイズやアーティファクトに悩まされてきた。位相回し法ではｔ1ノイズはどうしても残るし、ＰタイプとＮタイプの選別が厳密にできないので[4]、どうしても対象処理などが必要となる。ＰＦＧ法ではこのような処理をしなくても良い。位相回し法ではｔ1ノイズやアーティファクトを小さくするために、繰り返し時間を長く取らなければならなかったが、ＰＦＧ法ではＴ1の1.2～1.4倍でよい。そして位相回し法で困るのは、積算回数をある程度以上増やしてもｔ1ノイズやアーティファクトは減少せず、実質的なＳ／Ｎの向上には効果がなくなることが多いが、ＰＦＧ法では積算回数とＳ／Ｎの関係は理論通りの結果が期待できる。実際は一次元スペクトルの結果をみて全体の測定時間を判断する。この段階で、欲しい^{13}Ｃ信号のＳ／Ｎからみて無理なものは無理である。

４．^{2}Ｊc,cと^{3}Ｊc,c値の測定

ｔ1ノイズやアーティファクトが無くなったので、^{2}Ｊc,cと^{3}Ｊc,c値がラベルせずに測定できるようになった。試料としてボルネオールを使った例を第２図に示す。

他にニコチン、メントール、ロテノン、２ノニルアルコールについて測定した。ラベル体では抗生物質カチオノマイシンの酢酸１，２ラベル体と２ラベル体について測定した[5]。

ボルネオールのgem-メチル基の^{13}Ｃ帰属はシフト試薬を使った結果が報告されているが[3]、環の炭素とメチル基との^{3}Ｊc,c値は報告されている帰属ではいずれもcisが大きくtransが小さくなる。ベンゼン溶媒中での差ＮＯＥとＣ－ＨＣＯＳＹ実験を行った結果、水酸基の付け根のプロトンにＮＯＥのあるメチル基は文献の帰属とは逆であった。よって、図中の帰属とした。



	C8	C9
C2	1.6	2.7
C3	0.8	1.9
C5	3.0	1.4
C6	2.0	1.3

Vicinal 13C-13C SpinCoupling Constants of Borneol

Fig.2. PFG-INADEQUATE spectra of Borneol(229mg in $CDCl_3$) at 100MHz. A 16K(F2) x 256(F1) data matrix with 256 scans / t_1 increment and spectral width of 8457Hz in ω_2 and 14KHz in ω_1. τ= 62.5msec. G_1 and G_2 are 7.2 and 14.4 G/cm with 1msec duration.(A) Full spectrum. (B) Expanded region of the box in (A).

５．むすび

位相回しを使う従来のINADEQUATE法では、例え試料が大量に有っても難しい測定法であった。また、生合成的にラベルした場合などラベル率が大きい場合でもアーティファクトを消すために測定回数を増やさねばならなかった。しかしＰＦＧ法では位相回しは最低４回でも良い。

さらに、$^{2}J_{C,C}$と$^{3}J_{C,C}$値がラベルせずに測定できるようになったので、今後様々な化合物の$^{2}J_{C,C}$と$^{3}J_{C,C}$値が得られ、立体化学への利用の範囲を広げることができる。[6)]

測定感度の問題は、今回使用したプローブがプロトタイプとでも言うべきもので、測定に大量の試料を必要とし、また溶解度の問題から実験試料に限界があったが、今後、様々なタイプのプローブが作られ感度の改善が図られれば、PFG-INADEQUATEは実用的な測定法になるであろう。試料管の径は、５mmφを標準にして感度のよいプローブの出現が待たれる。試料の溶解度の問題もあるので太い試料管を使うとすれば、超伝導磁石を一般的なボアー径を使うとすれば、対象型試料管の問題も考慮して８mmφ用が最適と思われる。一方、溶解度がよい試料の場合やラベルした試料を測定する場合は３mmφ用を使えば少ない試料で測定できる。

ＮＭＲの本質からみて、INADEQUATEが多くの試料を必要とすることに変わりはないが、もはや名人芸的な測定法ではなく、誰もが使える「普通の測定法」になったと言って良い。その結果、構造決定が正確かつ迅速に行えるようになるであろう。

参考文献

1. R.E.Hurd, J.Magn.Reson.,87.422(1990).
2. A.Bax,R.Freeman and T.A.Frenkiel, J.Am.Chem.Soc.,103.2102(1981). A.Bax,"Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquid" p.155 Delft Univ.Press, The Netherlands, 1982.
3. H.Duddech,B.Blagoev,N.D.Berova and V.Vassilev, Org.Magn.Reson.,21,122(1983).
4. T.H.Mareci and R.Freeman, J.Magn.Reson.,48.158(1982).
5. M.Ubukata,J.Uzawa and K.Isono,J.Am.Chem.Soc.,106,2213(1984).
6. O.Kalinowski,S.Berger and S.Braun, "Carbon-13 NMR spectroscopy",p.549,John Wiley & Sons Ltd.(1988).

L6

核磁気緩和－モデルフリーの取扱いの可能性と限界

京大化研　○堀井　文敬、梶　弘典、石田　宏之、石田　正登

Nuclear Spin Relaxation—The possibility and Limitation of Model-Free Analyses

Fumitaka Horii, Hironori Kaji, Hiroyuki Ishida, and Masato Ishida

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

A large number of molecular motion models have been proposed to interpret the nuclear spin parameters such as T_1,T_2,NOE for ^{13}C, ^{15}N, etc. In this paper, the validity and limitation of these models mainly used for macromolecules are discussed after classifying them into three groups; correlation time distributed models, conformation jump models, and multi correlation time models. On the basis of the discussion, the first- and second-order model-free treatments are proposed and their validity is confirmed by analyzing the frequency and temperature dependencies of ^{13}C T_1 and NOE for poly(methyl methacrylate) solution.

1．はじめに

^{13}Cや^{15}NのT_1、T_2、NOEは、高分子をはじめとする多くの有機化合物の分子運動を解析するために広く利用されている。これらの系では、主として^{13}C-^1Hまたは^{15}N-^1H磁気双極子－双極子相互作用が緩和を規定すると考えられ、２スピン系の理論に基づけば、結局これらの緩和パラメータはC-Hベクトルのランダムな時間変動を表わす相関関数$G(\tau)$あるいはその周波数ωに関するフーリエ変換であるスペクトル密度$J(\omega)$で表わされる。したがって、これまでC-Hベクトルの時間変動を表わす数多くのモデルが提出され、解析に用いられてきた。本報告では、これらのモデルのうち高分子に関係の深いモデルを３つのグループに分け、実験との比較によりそれらの妥当性と限界を考察する。また、できるだけモデルに依存しない解析を行うため、第一次と第二次のモデルフリーの取扱いについて検討した結果を報告する。

2．実験

用いた試料は、ラジカル重合ポリメタクリル酸メチル(PMMA, M_n= 10^5, M_w/M_n=1.05)の 10% toluene-d_8 溶液である。^{13}C NMR 測定は、JEOL GX400 および FX100 spectrometer により、それぞれ 9.4T および 2.35T の静磁場下で種々の温度で行った。

3．結果および考察

(1) 相関時間τ_cに分布を導入したモデル

高分子の分子運動が多様であることを考慮して、τ_cに幅の広い分布が導入されてきた。既に PMMA/クロロホルム溶液系について報告したように[1]、CH_2(rr)、α-CH_3炭素のT_1またはNOEのそれぞれの周波数依存性は、τ_cに monomodal な分布を導入することにより良く説明できる。しかし、同一の分布モデルではT_1と NOE の周波数依存性を同時に説明することはできない。また、PMMA トルエン溶液系のT_1の温度依存性についても検討した結果、monomodal な分布をもつモデルでは実験で得られるT_1の極小値を説明できないことが判明した。

核磁気緩和、T_1,T_2,NOE、分子運動、多相関時間モデル、モデルフリー解析

ほりい　ふみたか、かじ　ひろのり、いしだ　ひろゆき、いしだ　まさと

(2) コンホメーションジャンプモデル

分子鎖の運動をより実際に近い状態で記述しようとするモデルで、代表的なモデルはHall-Weber-Helfand (HWH)モデル[2]である。このモデルでは、2種のコンホメーション+と−を仮定し、単独の+⇔−ジャンプと協同的な+−⇔−+ジャンプが起こるとした。これらの運動の相関時間をそれぞれτ_0, τ_1とすれば、この場合の自己相関関数$G_q(\tau)$は次式で与えられる。

$$G_q(\tau) = K_q \exp(-\tau/\tau_0)\exp(-\tau/\tau_1) I_0(\tau/\tau_1) \qquad q=0,1,2 \qquad K_0=4/5, K_1=2/15, K_2=8/15 \qquad (1)$$

ここで、$I_0(\tau/\tau_1)$は修正Bessel関数である。この式には2種の運動の相関時間しか含まれていない。したがって、次に述べる2τモデルに相当し、2τモデルと同様T_1, NOEの温度依存性、周波数依存性を説明するには不十分なモデルであることが判明した。

Dejeanら[3]は、第3の運動としてジャンプの回転軸自身がlibrationするとして3種の運動に基づくモデル(DLMモデル)を提出した。このモデルは後述の3τモデルに相当し、3τモデルと同様多くの高分子系のT_1,T_2,NOEの周波数依存性或いは温度依存性を説明するのに妥当なモデルである。しかし、式の誘導は経験的に行われており、厳密な理論的根拠に乏しい。

(3) 多相関時間モデル

C−Hベクトルの運動をいくつかの互いに独立な運動の重ね合わせで記述しようとするモデルである[4,5]。このモデルでは、各運動の単位に設定された直交座標系を小さい運動単位から大きな運動単位の順でそれぞれO_1、O_2、…、O_{p-1}とし、O_pが実験座標系に一致するとする。また、O_{j-1}座標系はO_j座標系においてオイラー角(ϕ_j, θ_j, ϕ_j)により表わされるとすれば、実験室座標系におけるC−Hベクトルのx,y,z軸に対する方向余弦l,m,nは次式で与えられる。

$$\begin{pmatrix} l \\ m \\ n \end{pmatrix} = T_p \cdots T_2 T_1 \begin{pmatrix} l_1 \\ m_1 \\ n_1 \end{pmatrix} \qquad (2)$$

ここで、T_jはO_{j-1}座標系からO_j座標系へ座標変換するためのマトリックスであり、l_1,m_1,n_1はO_1座標系におけるC-Hベクトルの相当する方向余弦である。したがって、各座標系の運動モードが決まれば各緩和パラメータを計算できる[4,5]。

Woessner[6]の提出したモデル(2τモデル)は、p=2の場合に相当する。HWHモデル同様2τモデルでは、T_1とNOEの周波数依存性を同時に説明することはできない[1]。また、今回のPMMAトルエン系のT_1とNOEの温度依存性もこのモデルでは説明することができない。一方、p=3に相当するHowarth[7]の提出したモデル(3τモデル)では、C-HベクトルはO_1座標系のz_1軸のまわりを回転拡散するが、z_1軸はO_2座標系のz_2軸のまわりのコーンの内部をランダムに揺動(librationと呼ぶ)する。さらに、z_2軸自身は実験室座標系に対して等方ランダム運動をする。既に報告したように[1]、この3τモデルによりT_1およびNOEの周波数依存性を同時に説明できる。3τモデルの妥当性は、今回のPMMA/トルエン溶液のT_1およびNOEの温度依存性に対しても認められた。

これらの結果および先に述べたDLMモデルの結果から、高分子の運動を記述するためには少なくとも3種の独立な運動が必要であること、またこれらの運動のモード自身は余り重要ではないことが指摘できる。

したがって、次に述べるモデルフリーの取扱いが重要であると考えられる。

(4) モデルフリーの取扱い

以上に述べたモデルに基づいた解析とは異なり、できるだけモデルに依存しないで、考慮すべき運動の数およびそれらの相関時間、さらには各運動の制限の程度などの情報を得る方法を開発することは重要である。ここでは、第一次および第二次のモデルフリーの取扱いに分けて検討した。

(a) 第一次モデルフリーの取扱い： C－Hベクトルの運動がいくつかのランダムな独立の運動の重ね合わせで記述されるとし、それらの相関時間に著しい違いがあるとすれば、$G_q(\tau)$は各運動の寄与の一次結合で表わされるとみなす[5]。すなわち、

$$G_q(\tau) = K_q \sum_{j=1}^{p} A_j \exp(-\tau / \tau_{cj}) \qquad (3)$$

ここで、pはランダムな運動の数、τ_{cj}は各運動の相関時間である。また、A_jは$\Sigma A_j = 1$で、各運動の重みにみえるが、通常は物理的意味をもたせないで、単なるadjustable parameterとみなすのを第一次モデルフリーの取扱いと呼ぶ。なお、Kingら[8]はより一般的な方法で(3)式を誘導した。

(2) 第二次モデルフリーの取扱い： (3)式の各項の係数A_jに物理的意味をもたせる場合が第二次のモデルフリーの取扱いである。Lipari,Szabo[9]はC-Hベクトルの運動が全体的な等方運動と異方性の内部運動の重ね合わせで表わされるとし、全体の$G_q(\tau)$は次式のようにそれぞれの寄与の積で表わされるとした。

$$G_q(\tau) = G_I(\tau) G_A(\tau) \qquad (4)$$

$$G_I(\tau) = K_q \exp(-\tau / \tau_I) \qquad (5)$$

$$G_A(\tau) = S^2 + (1-S^2)\exp(-\tau / \tau_A) \qquad (6)$$

ここで、S^2は運動の制限の程度を表わし、一般化されたオーダーパラメータと呼ばれる。(4)式で、$\tau_I \ll \tau_A$のときは次式が成立し、形式的には(3)式のp=2の場合に一致する。

$$G_q(\tau) = K_q[S_2 \exp(-\tau / \tau_I) + (1-S_2)\exp(-\tau / \tau_A)] \qquad (7)$$

この式で明らかなように、T_1,T_2,NOEは2種の運動の相関時間、内部運動のオーダーパラメータにより記述できる。だだし、先にも述べたように2種の運動では高分子の運動を表わすには不十分である。

そこで我々は、(6)式を一般化し、p-1個の独立に重なり合った内部運動のそれぞれの相関関数に次式が成立するとみなすことにした。

$$G_{Ai}(\tau) = S_i^2 + (1-S_i^2)\exp(-\tau / \tau_{Ai}) \qquad (8)$$

いまp=3とし、各相関時間は著しく異なり、たとえば$\tau_{A1} \ll \tau_{A2} \ll \tau_I$であるとすれば、全体の相関関数は

$$G_q(\tau) = K_q[S_2^2 S_1^2 \exp(-\tau / \tau_I) + (1-S_2^2)S_1^2 \exp(-\tau / \tau_{A2}) + (1-S_1^2)\exp(-\tau / \tau_{A1})] \qquad (9)$$

で与えられる。この式は、相当する条件下の3τモデルに対する式、第一次モデルフリーの(3)式[p=3]に相

当する。一方、Clore ら[10]は(9)式と同様な式を誘導したが、(9)式はより具体的に各運動のオーダーパラメータにより記述されている。

図1、2には、PMMA クロロホルム溶液の $CH_2(rrr)$炭素の T_1,NOE の周波数依存性[1]を第一次のモデルフリーの取扱いにより解析した結果を示す。実験値(○)と実線で示した計算値は良く一致することがわかる。また、図3、4には、PMMA トルエン溶液の $CH_2(rrr)$炭素の周波数 25MHz および 100MHz における T_1,NOE の温度依存性を示す。実線は(9)式に基づく計算結果である。この場合 τ_{A1} は温度に依存しないが、τ_{A2}, τ_I は Arrhenius の式に従って温度変化すると仮定した。実験結果と計算結果はいずれの周波数においてもかなり良く一致する。これらの結果は、第二次のモデルフリーの解析が妥当であることを示すが、現在他の炭素についても解析を行っているので、総合的な考察は発表時に行う。

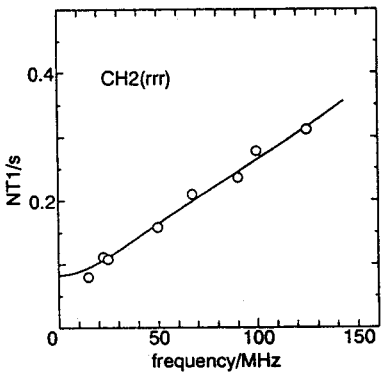


Fig.1 Frequency dependence of T_1 for $CH_2(rrr)$ of of PMMA in chloroform solution.

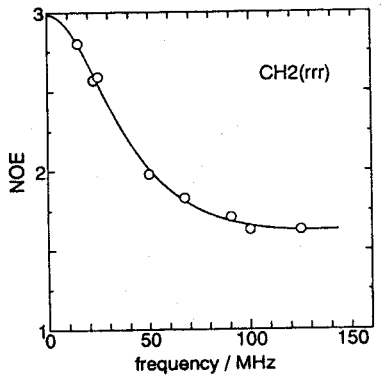


Fig.2 Frequency dependence of NOE for $CH_2(rrr)$ PMMA in chloroform solution.

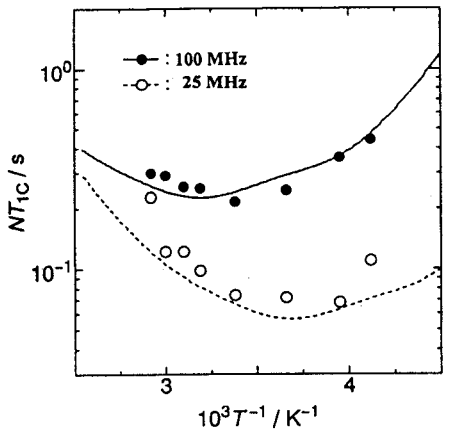


Fig.3 Temperature dependences of T_1 for CH_2 (*rrr*) of PMMA in toluene solution.

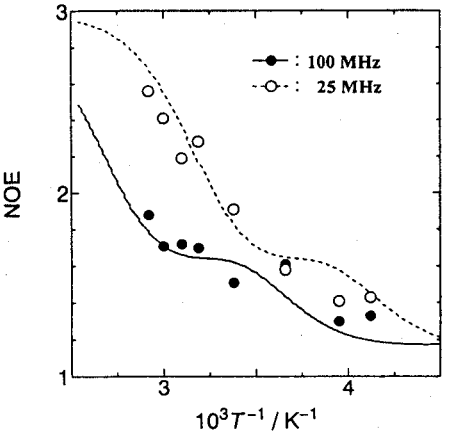


Fig.4 Temperature dependence of NOE for $CH_2(rrr)$ of PMMA in toluene solution.

1) F. Horii et al., *Polym. J.*, **24**, 1155 (1992). 2) C.K. Hall, E. Helfand, *J. Chem. Phys.*, **77**, 3275 (1982).

3) R.Dejean et al., *Macromol.*, **21**, 2045 ('88). 4) K. Murayama et al., *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **61**, 229 ('83).

5) F. Horii et al., *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **66**, 317 (1988). 6) D.E. Woessner, *J. Chem. Phys.*, **36**, 1 (1962)

7) O.W. Howarth, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **75**, 863 (1979). 8) R. King et al., *Chem. Phys. Lett.*, **55**, 15 (1978).

9) G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Che. Soc.*, **104**, 4546 (1982). 10) G.M. Cloreet al., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**,4989 (1990).

L7 ^{13}C－NMRによる側鎖型液晶性高分子の分子運動

（北大工） °堤　耀広・八木達也・平沖敏文

^{13}C-NMR Investigations of Molecular Motion in Side-Chain Liquid Crystalline Polymers (Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060) A. Tsutsumi, T. Yagi and T. Hiraoki

In order to investigate the molecular motion in side-chain liquid crystalline polymers, ^{13}C-NMR relaxation measurements on poly(acrylate)s having mesogenic side groups were carried out in $CDCl_3$. The effects of spacer length and side-chain end groups on the mobility of mesogenic group were discussed. The rate and amplitude of internal motion were estimated using the model free approach by Lipari and Szabo. For samples with a constant length of side-chain end group, an increase of the spacer length causes a rapid increase in the expand of the internal motion at the mesogenic group keeping the rate at a certain value. On the other hand, for the samples with a constant length of spacer, motion of mesogenic group is slower and constrained in the longer end group.

剛直で異方的なメソーゲン基を側鎖に有する poly(acrylate) は側鎖型液晶性高分子として知られている。本研究ではこの化学構造的に特徴ある高分子の分子運動を調べるために、側鎖メチレン基（スペーサー）、側鎖末端メチレン基の長さを系統的に変えた試料について^{13}C-NMR によるスピン－格子緩和時間、核オーバーハウザー効果の測定をを溶液中で行い、特にメソーゲン基の運動性の化学構造依存性について検討した。**Table I** に試料の化学構造を示した。Xは側鎖スペーサー部、Rは側鎖末端基を表す。Xはメチレン基数で0、2、6から成っている。また、Rはカーボン数で0、1、4から成っている。これらの試料をクロロホルム（$CDCl_3$）中に溶解させ NMR 測定を行った。

メソーゲン基と主鎖の間にスペーサーを含まない試料（PAB, PAEB）の主鎖メチンに対する T_1 の温度変化を **Fig. 1** に示す（測定周波数 75 MHz)。T_1 はほぼ一定値、170 － 190 ms、を保っていることから、この温度範囲は T_1 極小に近く、主鎖は室温で相関時間10^{-9} s オーダーの運動を行っていることが分かる。この傾向は他の試料についても同様である。T_1、NOE の値は相関時間に適当な分布を仮定することにより説明でき、例えば、簡便な Cole-Cole 分布の場合パラメータ値は$\gamma \sim 0.7$ 程度であった。

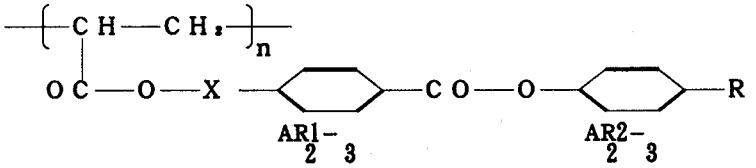
Fig. 2 に PAB のメソーゲン基内の２つのアロマチック環炭素 C3 （AR1-3、AR2-3）の T_1 の温度依存性を示す。T_1 は温度と共に増加し、主鎖 -CH- より大きいこと

キーワード：側鎖型液晶性高分子 / Poly(acrylate) / メソーゲン基 / 核磁気緩和 / 内部運動 /

つつみ　あきひろ、やぎ　たつや、ひらおき　としふみ

Table I Chemical Structure and Abbreviation for Samples

R	X		
	–	$(CH_2)_2O$	$(CH_2)_6O$
H	PAB	PAEB	–
OCH_3	MPAB	MPAEB	MPAHB
$O(CH_2)_3CH_3$	BPAB	BPAEB	BPAHP



からメソーゲン基は高速の内部運動を行っていることが分かる。さらに、側鎖末端側のアロマチック炭素（AR2)の値が大きいことはメソーゲン基内でも高速の内部運動が存在することを示している。このような結果は他の試料についても観測された。以上のような観測結果から各試料の側鎖の内部運動の速さを見積もり、側鎖構造依存性を検討した。

ここでは、主鎖に対する内部運動の相対的な速さと振幅のオーダーを見るため Lipari、Szabo 等による簡便な model free approach を採用し、試料間の比較を試みた結果を示す。スペクトル密度には以下の式を用いた。

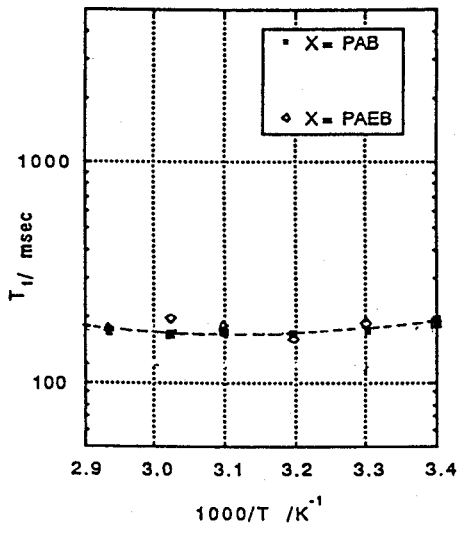


Fig. 1 Temperature dependence of T_1 for PAB and PAEB. Dotted line represents calculated T_1 for for γ =0.7.

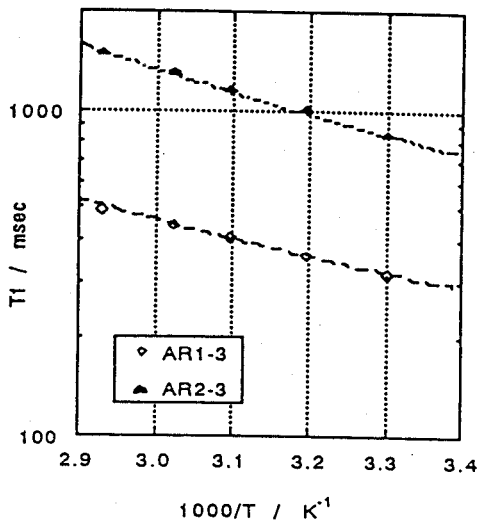


Fig. 2 Temperature dependence of T_1 for AR1−3 and AR2−3 of PAB. Dashed lines represent calculated T_1.

$$J(\omega) = \int_0^\infty \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_M}{1 + \omega^2 \tau_M^2} + \frac{(1-S^2)\tau_e}{1 + \omega^2 \tau_e^2} \right] G(\tau_M) d\tau_M$$

$$\tau_e^{-1} = \tau_M^{-1} + \tau_i^{-1}$$

ここで、τ_M は主鎖の相関時間、$G(\tau_M)$ はその分布関数（ここでは Cole−Cole 分布を仮定）である。また、τ_i、S は内部運動の相関時間、オーダーパラメータである。**Fig. 2** に示した PAB のメソーゲン基の 2 つのアロマチック炭素 AR1−3、AR2−3 については、それぞれ τ_i は 1.0×10^{-10} s、3.5×10^{-11} s、S は 0.56、0.29 でありメソーゲン基内でも側鎖末端側のアロマチック環はかなり高い運動性を持つことが分かる。

Fig. 3、4 に側鎖末端基として R = OCH_3 を持つ試料（MPAB、MPAEB、MPAHB）の 303K での τ_i、S を示した。τ_i はスペーサーに関してはスペーサーが長くなると全体として減少、メソーゲン基に関しては実験誤差の範囲内で系統的なスペーサー長依存性を示さない。しかしながら、S はスペーサーおよびアロマチック環（特に主鎖に近い AR1）においてスペーサーが長くなると急激に低下した。一方、AR2 ではその依存性は小さい。この傾向は他のシリーズ（PAB、PAEB R=H)、（BPAB、BPAEB、BPAHB R= $O(CH_2)_3CH_3$）においても同様であった。これらの結果より、一般的傾向として、スペーサーが長くなるとメソーゲン基の運動の振幅は増加するが、その速さはそれほど変化しないことが分かる。

Table II はスペーサーを持たない試料（PAB、MPAB、BPAB) に対し、メソーゲン基の τ_i と S の側鎖末端長 (R = H、OCH_3、$O(CH_2)_3CH_3$) 依存性をまとめたものである（303 K)。いずれの試料においても AR2 のほうが τ_i は短く、S は小さい。即ち、側鎖末端側のアロマチック環のほうが運動性が高い。また、側鎖末端基が長くなると τ_i は増加、S は減少している。これらの傾向はスペーサーを有する試料においてスペーサー長を一定にした場合も同様に観測される。以上のことより、側鎖末端基はメソーゲン基の運動の振幅、速さの両方を抑制する（重りの）働きをしていることが分かる。

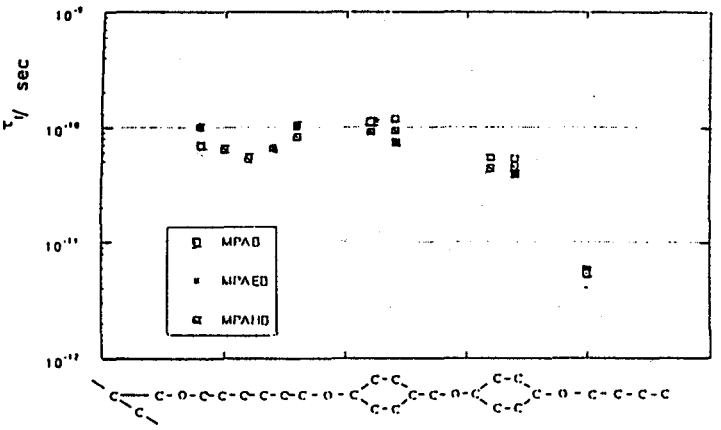


Fig. 3 τ_i for carbons having protons in poly(acrylate)s with different spacers at 303K.

以上、全試料に対する

共通の解析法として、簡便な model free approach を適用した場合の結果を述べたが、個々の試料についてより適切なモデルを用いて得た結果も併せて報告する。

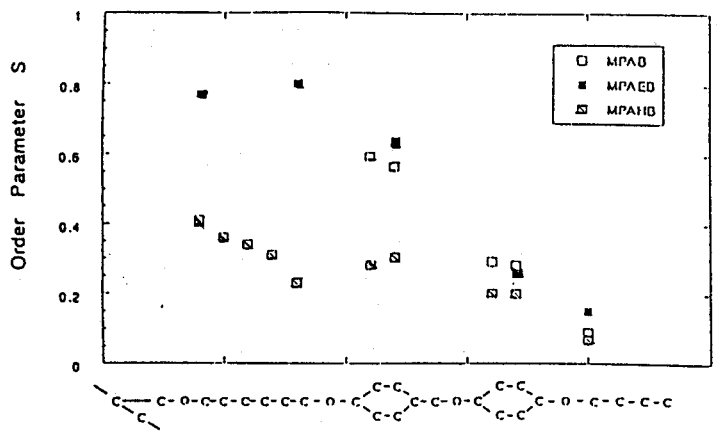


Fig. 4 Order parameter S for carbons having protons in poly(acrylate)s with different spacers at 303K.

Table II Internal corelation Time τ_i and order parameter S for mesogenic group

	AR1-3		AR2-3	
	τ_i(sec)	S	τ_i(sec)	S
PAB	9.7×10^{-11}	0.55	3.5×10^{-11}	0.28
MPAB	1.2×10^{-10}	0.55	5.3×10^{-11}	0.28
BPAB	1.8×10^{-10}	0.65	7.1×10^{-11}	0.40

L8

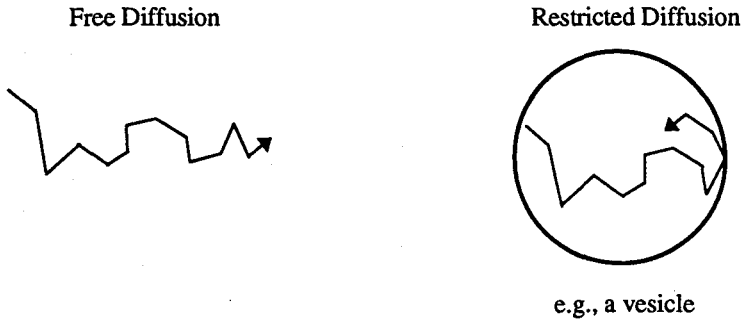
The use of Pulsed Field Gradient NMR for studying diffusion and transport of small molecules through spherical interfaces

William S. Price*, Alexander V. Barzykin and Kikuko Hayamizu

National Institute of Materials and Chemical Research
1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305

1. INTRODUCTION

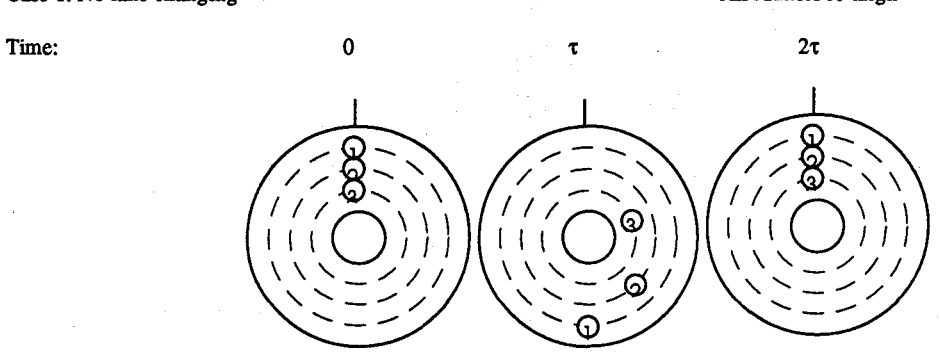
Pulsed Field Gradient NMR (PFG NMR) is one of the most powerful methods for determining diffusion coefficients and microgeometry in chemical and biochemical systems (1-3). It has major advantages over traditional methods, such as radioactive tracers, for measuring diffusion in that it is non-invasive and rapid. PFG NMR has a displacement sensitivity of about 100 nm and a lower limit for measuring diffusion coefficients of about 10^{-14} m^2s^{-1}. If the diffusion is unrestricted on the NMR time-scale the determination of the diffusion coefficient is straightforward. However, if the diffusion is restricted on the experimental time scale, more information is available, but theoretical difficulties exist in determining the 'true' (as against 'apparent') diffusion coefficient.



PFG NMR can also be used to measure transport between regions of differing diffusion coefficients. Recently, we have been developing the theory for analyzing PFG NMR experiments of diffusive transport through spherical interfaces (4,5,6).

2. THE PFG EXPERIMENT

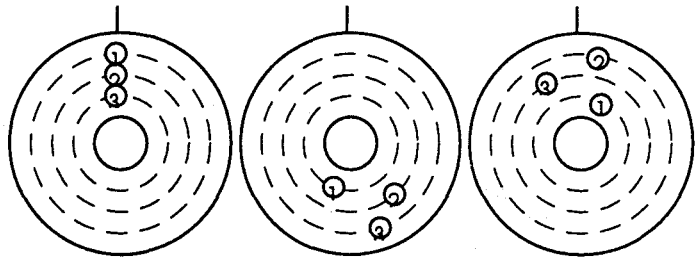
An analogy: imagine a race track with 3 lanes. Each lane has a different surface so that the 'speed' of each lane is different. Suppose that we let the runners run in one direction for a time τ. After time τ they run in the opposite direction for the same period of time. So long as the runners don't change lanes they will all end up at the start at the same time.



Key Words: Diffusion, Pulsed Field Gradient, Restriction, Transport.
Present Address: Water Research Institute, Sengen 2-1-6, Tsukuba, Ibaraki 305

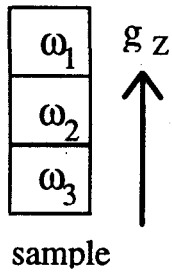
Case 2 Lane changing allowed

The runners do not re-align

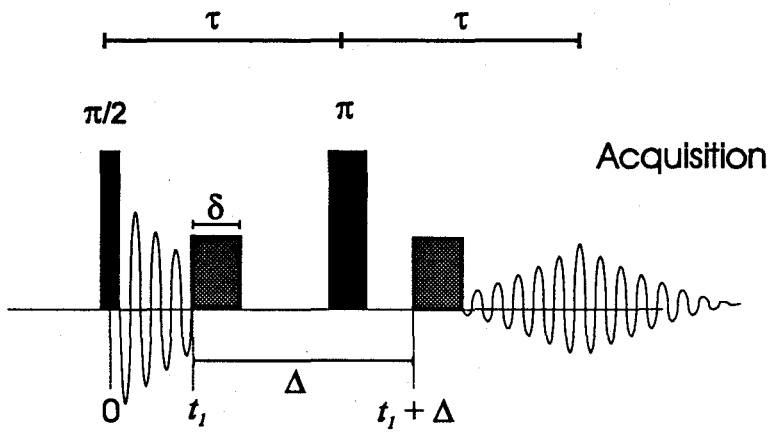


Diffusion corresponds to random lane changing and the greater the diffusion the less the runners re-align at time 2τ.

The NMR experiment: the precession frequency is proportional to the strength of the applied magnetic field. So if we impose a magnetic field gradient (g_z) along the z-axis through the sample, species at different positions with respect to the z-axis will have different precession frequencies (ω). Diffusion causes the molecules (or ions) to move to different positions (with respect to the z-axis) and therefore to obtain different precession frequencies.



The NMR experiment is a variation of the standard spin-echo experiment (i.e., $\pi/2$-τ-π-τ-Acq.) including magnetic field gradient pulses of magnitude g and duration δ applied along the direction of the static magnetic field (i.e., z axis).



The diffusion is studied during the period Δ. The effects of diffusion cause a decrease in the echo intensity (E).

3. CORRELATING DIFFUSION WITH SIGNAL ATTENUATION

In the short gradient pulse approximation, where motion during the gradient pulse is ignored ($\delta \ll \Delta$), the PFG spin-echo amplitude is given by,

$$E(\mathbf{k},\Delta) = \int\int d\mathbf{r}_0 \; d\mathbf{r}\, \rho(\mathbf{r}_0,0)\, G(\mathbf{r}_0,\mathbf{r},\Delta)\; e^{-i\mathbf{k}\cdot(\mathbf{r}_0-\mathbf{r})} \qquad [1]$$

where $\mathbf{k} = \gamma\delta\mathbf{g}$ and γ is the gyromagnetic ratio, $\rho(\mathbf{r}_0,0)$ is the equilibrium spin density. The Green function (or diffusion propagator), $G(\mathbf{r}_0,\mathbf{r},t)$, is the conditional probability that a spin starting at position $\mathbf{r}_0$ will migrate to $\mathbf{r}$ in a time Δ. $G(\mathbf{r}_0,\mathbf{r},t)$ satisfies the diffusion equation

$$\frac{\partial G(\mathbf{r}_0,\mathbf{r},t)}{\partial t} = D\nabla^2 G(\mathbf{r}_0,\mathbf{r},t) \qquad [2]$$

subject to the initial condition

$$G(\mathbf{r}_0,\mathbf{r},t) = \delta(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}) \qquad [3]$$

and appropriate boundary conditions (e.g., reflecting boundaries,absorbing walls, transport).

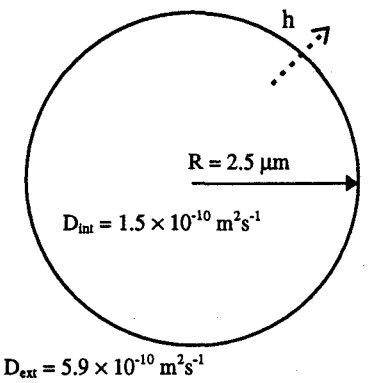
For unrestricted diffusion on the timescale of Δ the solution of Eqn. [1] is particularly simple and is given by

$$E(\mathbf{k},\Delta) = \exp\left(-\mathbf{k}^2 D\Delta\right) \qquad [4]$$

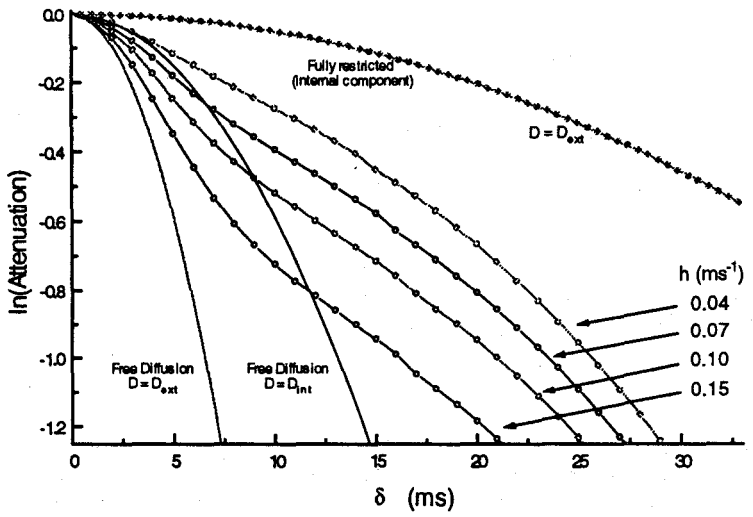
For systems in which the diffusion is restricted the solution to Eqn.[1] becomes much more complicated. In some cases analytical solutions are not possible and numerical methods must be used. If diffusion is studied within a restrictive geometry using large values of Δ, such that all the diffusing molecules feel the effects of the restriction, the echo attenuation can approximately be described by Eqn. [4] but with a scaling factor smaller than unity.

4. DIFFUSION THROUGH A SPHERICAL INTERFACE

Consider an 'idealized' spherical interface (e.g., red blood cells) with some small molecule (or ion) that is undergoing diffusive exchange between the internal and external environments. The parameters used in the simulation below come from a PFG study of hypophosphite transport in red blood cells (4). R is the effective radius of the red blood cells, h is the permeability coefficient and the ratio of the internal to external concentration (i.e., [Internal] : [External]) = 41:66. Other experimental parameters were Δ = 100 ms and Gradient strength (g) = 28.2 Gauss cm^{-1}



Using the above model system and our mathematical model for the signal attenuation for various values of the permeability coefficient we can show that the attenuation of the echo signal is very sensitive to differences in permeabililty.



5. CONCLUSIONS

PFG NMR provides a convenient means for measuring transport even in the absence of a chemical shift difference between the two domains. The echo attenuation is also sensitive to the microgeometries in which the diffusion occurs.

6. REFERENCES

1. W.S. Price, *Ann. Rep. on NMR Spec.* (1995) in press.
2. W.S. Price, B.E. Chapman, B.A. Cornell and P.W. Kuchel, *J. Magn. Reson.* **83** (1989) 160.
3. W.S. Price, B.E. Chapman and P.W. Kuchel, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **63** (1990) 2961.
4. W.S. Price and P.W. Kuchel, *J. Magn. Reson.* **90** (1990) 100.
5. A.V. Barzykin, W.S. Price, K. Hayamizu and M. Tachiya, *J. Magn. Reson.* **A114** (1994) 39.
6. W.S. Price, A.V. Barzykin, K. Hayamizu and M. Tachiya, to be submitted to *Biophys. J.* (1995).

L9

マウス体内の低濃度代謝物画像化の試み
—^{19}F NMR画像 —

（九大薬）金沢洋子、新村俊幸、馬屋原慶子

^{19}F NMR Metabolic Imaging of F-hexoses at Low Concentration in Mice

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University
Yoko Kanazawa, Toshiyuki Shimmura, Keiko Umayahara

Metabolic mapping of drugs and of pharmaceuticals for diagnosis will be a useful method in the field of pharmaceutical sciences. NMR is a method capable of determining physical and chemical properties as well as spatial information, and is particularly suitable for this purpose. The application of NMR imaging to the dynamical study of pharmaceuticals, however, is a challenge to the well known limitation from the detection sensitivity. This work is a trial of NMR imaging of an NMR-pharmaceutical at the level lower than 1 mmol/kg. Chemical shift selected images and the simultaneous imaging of 2 species using F-labeled hexoses will be presented, and the feasibility of F NMR method for the animal study at high magnetic field will be discussed.

医薬品の適正使用に向けて薬品およびその代謝物の分布や存在状態を無侵襲で視覚化することの意義は大きい。薬物濃度や代謝物の同定はもとより物性情報から存在状態が無侵襲で推定でき、これらの画像描出も可能なＮＭＲ法はもっと活用されるべきである。技術が確立されればＮＭＲ画像に基づく診断試薬 －集積だけでなくその代謝や存在状態を指標とした造影剤－ 開発の可能性も広がろう。一方、薬品や診断試薬の許容濃度は一般に低いので、ＮＭＲ法でどこまで検出できるかが成否の鍵となる。本研究は無侵襲生体測定に有利な^{19}Ｆ標識化合物によりマウス体内のＦ標識糖代謝物の画像化を試み、

１．化学シフト選択画像、
２．２信号の識別同時画像化、
３．高分解能ＮＭＲ用縦型超伝導磁石 (9.4 T) による動物画像の可能性、
４．本研究対象であるFDGの画像が病態診断(第33回NMR討論会で報告)に役立つか、

等について所要濃度、測定時間を含めて評価を行った。

［背　景］

研究対象であるフッ素糖のマウス体内および腫瘍内動態の概略を図１に示す。2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (FDG) はグルコースと同様6-リン酸化されるが、さらにそのエピマーである 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose (FDM) に変換され、ヌクレオチド体になる。これは腫瘍に集積し長時間保持される。従って腫瘍画像化試薬となる可

キーワード：NMR画像、化学シフト画像、Ｆ標識糖、がん診断

著者：かなざわ　ようこ、しんむら　としゆき、うまやはら　けいこ

能性がある[1]。一方、2-deoxy-2-fluoro-D-galactose (FDGal) は肝臓集積性であり、1-リン酸化の後UDP-FDGal となり、さらに UDP-FDG へと変換される[2]。

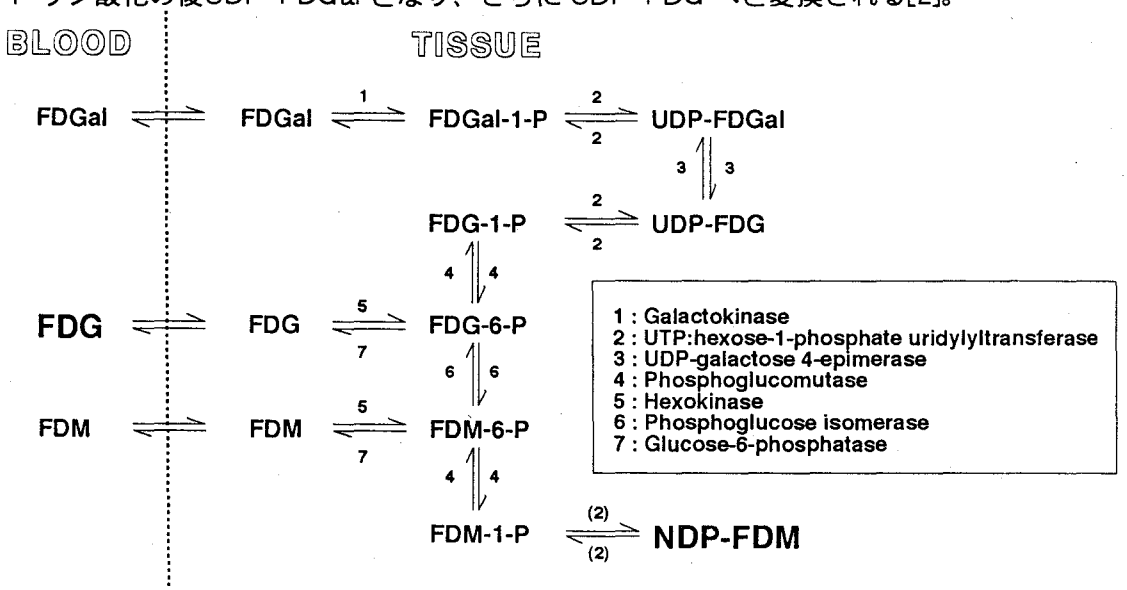


Fig.1. Metabolic Pathway of Fluorohexoses in Tumors and Organs

[実　験]

測定試薬[3]：実験A：2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (FDG)　　腫瘍集積性.
　　実験B：2-deoxy-2-fluoro-D-galactose (FDGal)　肝臓集積性.

実験動物：実験A：雌性C3Hマウスに肝がん由来細胞MH134を8－9日前に皮下移植し、実験前16時間は絶食させた。実験時腫瘍サイズ 3.0 x 1.8 cm、1.3 g. FDG (200mg/kg) 投与後、ハロタン麻酔下でNMR測定を行った。

実験B：健常ICRマウスを16時間絶食させて使用。FDGal (100mg/kg) 投与後、ペントバルビタール麻酔下にNMR画像撮像を行った。

なお、いずれの系においても in vivo 測定直後、腫瘍と健常臓器を摘出、酵素失活し、通常のNMRスペクトルを得て代謝物定量を行った。

NMR測定：*In vivo* NMR は Varian Unity 400plus (9.4T, vertical, 89 mm) により、内径 40 mm の遮蔽型勾配とrf コイル(^{1}H/^{19}F tunable) を装備したプローブを用いた。 F定量用スペクトルは JEOL FX-100 (2.3T, 10 mm tube) により測定。

実験A：^{1}H画像測定後、^{19}Fスペクトルにより測定周波数を決定し^{19}F－画像を作成。

F－画像条件：スピン-エコー法、2.5 ms の gauss 型 rf パルスによりFDGあるいは α-FDMを選択し、画像化を行った。Tr = 1 s, Te = 4 ms、観測領域 6 x 4 cm スライスなし、64 x 16 points (zero filled to 256 x 128)、測定所要時間 107 分 (FDG), 160 分(α-FDM).

実験B：Aと同様、H画像測定後、F画像作成。

F－画像条件：Dixon 法 [4] により 2 信号同時画像作成。Tr = 1 s, Te = 4.1 ms,

観測領域 6 x 4 cm スライスなし、128 x 16 points (zero filled to 256 x 128), 測定所要時間 107 min.。なお、Dixon法はδ離れた２つの信号に対して通常のエコー信号とこれと２信号の位相差180° に対応する時間(1/2δ)ずらせたエコーを得、それらの和および差によって２種類の画像を得る方法である。

[結果と考察]

実験Ａ：　図１に実験ＡにおいてＦＤＧ投与マウスから得たＨ画像ならびにＦスペクトルと画像を示す。プロトン画像はＦ測定に用いるものと同一コイルのチューニングを変えて厚さ１mmで９枚撮像したうちから中央の部分を示したものであるが、その時の形態をあらわしており、右肩から背中にかけて腫瘍が存在すること、それにより脊椎が曲がってセットされていることがわかる。図には示してないが全体を詳細にみると腫瘍は背から腹側へと回り込んでいた。ＦＤＧ投与後１時間のＦ画像はＦＤＧ-groupの信号(主としてFDG-6-PでUDP-FDGから成る)を選択したものであり、投与後２５時間の画像はその時点での主要代謝物であるＦＤＭのヌクレオチド体近傍の信号（α-ＦＤＭ-グループ、α-FDM-6-Pとα-FDM-1-Pをも含む、FDGより-5 ppm）を用いたものである。１時間と２５時間の画像共にほぼ同じ位置に信号が観測され、Ｈ画像で腫瘍が認められた位置と一致する。直後に摘出した腫瘍および臓器内のＦスペクトルでは心臓と腫瘍以外には信号は観測されず、腫瘍内FDMは0.29 mmol/kgと得られた。この結果とin vivoスペクトル強度を用い、腫瘍以外の臓器からの寄与が無視できると仮定して換算するとFDG投与１時間後のFDG濃度はほぼ１mmol/kgであったと推定される。

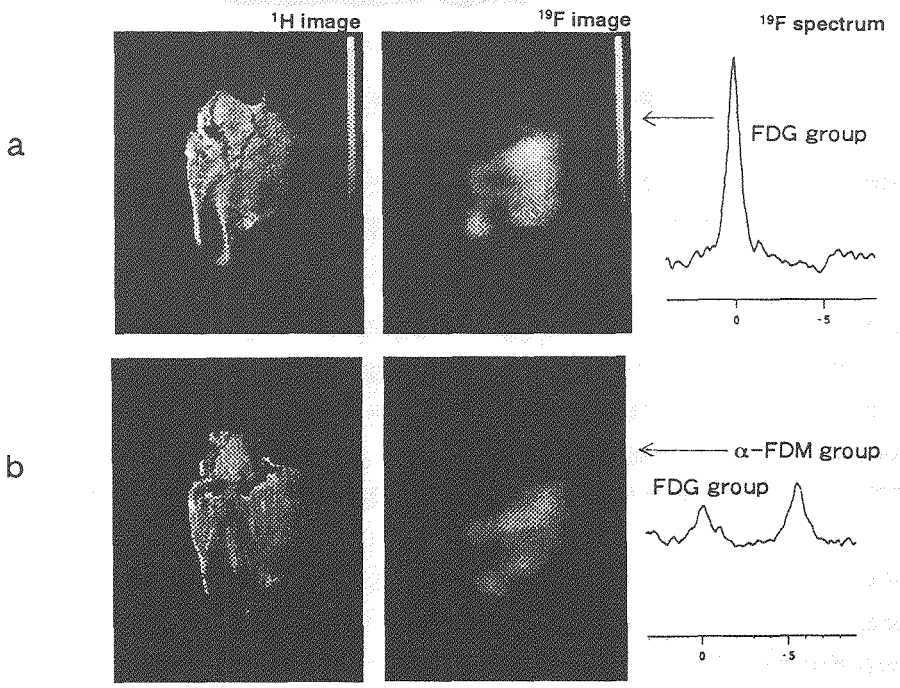
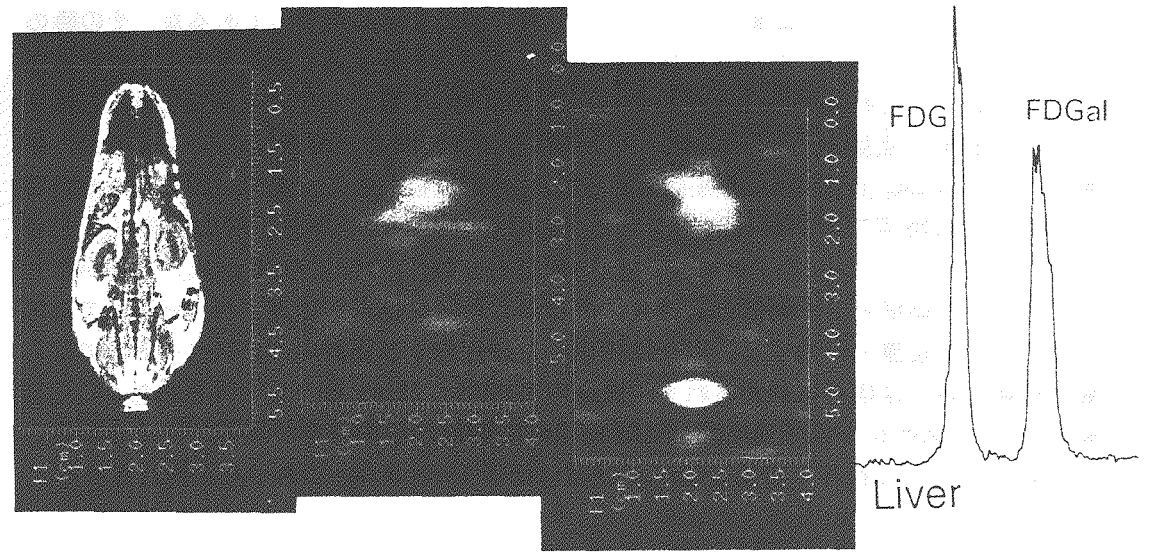


図２．FDG投与担がんマウスの^{1}Ｈ画像、^{19}Ｆ画像、^{19}Ｆスペクトル
a. １時間後、FDG推定濃度１mmol/kg.　b. 25時間後、FDM濃度0.3 mmol/kg.

実験Ｂ：　図３にＦＤＧal 投与５時間後のＨ画像およびＦスペクトルと画像を示す。肝臓に集積したFDGalは、FDGal-1-リン酸、UDP-FDGalを経てUDP-FDGへと変換される[2]のであるが、in vivoスペクトルの分解能ではFDGalグループ(FDGより８ppm高磁場側)とFDGグループ(低磁場側)との２信号に見える。ここで用いた５時間では２グループ間での平衡に近づいており、可成りの量のUDP-FDGが生成している。FDGalを選択した画像では肝臓の位置および膀胱と考えられる位置に強い信号がみられる。FDG選択画像では肝臓の位置に信号が得られた。



^{1}H 画像(コロナル)　^{19}F (FDG) 画像　^{19}F (FDGal) 画像　^{19}Fスペクトル

図３．FDGal投与マウス(たて置き)の *in vivo* NMR 測定　(投与後５時間)

実験後の動物には格別の異常は認められず、また、代謝物濃度は *ex vivo* 実験で得られた値の範囲であった。つまり、この程度の *in vivo* 実験条件では結果の信憑性は高い。

［評　価］

1. 空間分解能 3 mm で 0.3 mmol/kg の代謝物画像が得られ、腫瘍画像化に成功した。
2. 化学シフト選択は必ずしも完全ではないが、２画像同時測定ができた。２信号系では反応の追跡にこのような単純な方法が適用可能と考えられる。
3. 9.4T の縦型磁石内での動物画像化が可能であることが示された。
4. パルス系列等には改善の余地があり、F-NMR代謝画像法には将来性が認められる。

［文　献］

1. Kojima,Kanazawa et al. (1988) Chem.Pharm.Bull., *36*, 1194 と中の文献。
   Shimmura, Umayahara, Kanazawa, Yamashita (1994) Proc.2nd SMR, *3*,1156等.
2. Kanazawa, Kuribayashi, Kojima et al. (1988) Chem.Pharm.Bull.,*36*, 4213.
3. ダイキン工業化学事業部研究部の山下恒雄氏の合成によるものでここに深謝する。
4. Dixon, WT (1984) Radiology,*153*, 189.

特　別　講　演

特別講演3

Spatio-Temporal Patterns of Brain Activation Seen by fMRI

Seiji Ogawa
AT&T Bell Laboratories, Murray Hill, New Jersey, USA 07974

In addition to its complete non-invasiveness as a method to study human brain function, functional MRI claims to have capabilities to provide reliable spatial information of functional activation sites with high spatial resolution and to acquire useful data on an individual subject, and above all the capability of following the time course of the brain function in real time. In the past few years, efforts have been made in many institutions in the world to push the technique forward. Fast imaging, such as EPI or spiral k-space scanning, enable one to acquire image at a rate of ~ 50 msec/image or covering the whole brain within a few second. Understanding of the nature of fMRI signal changes based on the hemodynamic response to neuro-activation is advanced and various interesting ways of measurements have been presented. They include not only BOLD imaging (Blood Oxygenation Level Dependent T2* changes with the balance between oxygen consumption and delivery in the brain vascular system) but also imaging inflow blood water signals enhanced by the activation induced CBF increase. To the question of the site of fMRI signal relative to the area of neuro-activation, an attempt has been made to image individual ocular dominance column activation in the visual cortex in man. Learning from PET studies, task imposing technique has been improved to make fMRI data useful for neuro imaging community.

In spite of these advances, fMRI still have problems which prevent the potential of the technique to be fully realized. They are of course S/N problems mainly due to image signal fluctuation in time. Major parts of these signal fluctuations, in addition to the unstability of the MRI hard ware outputs, are physiological (cardiac and respiratory) and they may be called physiological oscillations. The nature of the physiological oscillation of MRI signal is not clear. They may be water movements mediated by the cardiac pressure wave or the B_0 variation and the circulatory modulation by respiratory motion. Some improvements in reducing these noises have been made by correlating MRI signal with physiological data monitored simultaneously. Brain motion during fMRI measurements (only a fraction of the image pixel) have been identified and the effect on the image can be corrected. Recently, we have taken an approach to get around these problems by a way of post processing. It can eliminate large portions of the contribution of uncorrelated noises, cardiac and respiratory oscillations and small shifts in the brain position to the image signals. It is a well known

data processing method of principal component analysis with several modifications and additions. Raw data are processed to decompose into a set of principal components each with its time series. Among these components, some show position shifts in the image by intensified edges, some have a strong oscillations coherent to cardiac or respiratory motion monitored during the fMRI acquisition. One can discard components irrelevant to brain function or remove the part of time series coherent to the physiological oscillations. Since the functional signal in fMRI usually changes very slowly in time, one can apply low pass filtering to these time series. After that the residual principal components with the processed time series is reconstructed to yield original data back except those unwanted components. The processed data thus obtained is essentially the oscillation free and reveal the undergoing phenomena originally covered by the physiological signal oscillation unrelated to the brain function (Proc Soc Magn Reson 1995 page 817). Since the processing is independent of the input event of the fMRI tasks, one can follow the dynamic variation of the spatial and temporal patterns of the brain image. If one needs to make a functional map for the input event, one can make a correlation analysis with the event. Followings are examples. In a large field visual stimulation we observed not only the visual area being activated and making undershoot after cessation of the stimulation, but also adjacent areas being depressed in signal during the stimulation and then slightly overshoot back in the recovery period. This looks like a phenomenon of blood steal by the activated area from neighbors. In a motor activation study, we see rather a chaotic state during the resting period (MRI signal appears to make rather random jumping in an uncorrelated way in distance) and then suddenly the whole areas become quiet at the start of the task input and the activation appears in the motor related areas only. Similar dynamic phenomena are also observed in a visual stimulation experiment. In a visual attention experiment, some parietal areas are activated as a response to the cognitive function in addition to the modulation in the signal response in visual area including V1 by the attention. At a major activated site in parietal area (right hand side), signal activation is steady except occasional dip down and recovery during attention period. At an equivalent parietal area at the left side, the signal shows much more frequent up and down variation and therefore often missed in mapping with usual statistical analysis because of the large signal variation. Understanding these activation phenomena and also minor signal variations seen in the various parts of the images of these processed data is still left for the future studies, but the ultimate feature of fMRI, which reveals multi-dimensional spatial-temporal correlation in the functioning brain, may be within our reach.

特別講演4

ＮＭＲ５０年一つの歩み

A Sketch of NMR 50 Years in Japan

藤原鎮男（東京大学名誉教授）

1　黎明期：ｄａｗｎ　(1949-1953)

Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, John Wiley, 1995

"Early development of NMR in Japan" S. Fujiwara

阪大の伊藤順吉教授と神戸大の神田貞之助教授はサイクロトロンが破棄された後、核研究の継続を念じており、たまたま、隣りの米文化センターでPakeとGutowskyのＮＭＲの論文を知り、研究を開始した(1951)。藤原は当時、高周波分析をしており、ＮＭＲの発明を風説で聞き、それが高周波分析に外部磁場をかけた現象であると覚り、文献が全く無い状態の中で手探りで、林昭一助手と装置を自作し実験を開始した(1952)。阪大はPakeの流れに従い、複塩の結晶水解析に向かった。藤原はこれに対し、核の定性定量分析化学の観点で研究をすることとし、核磁気能率の精密測定をし、Ｈ1、Ｆ19、Ｐ32、Ｎａ23、Ｃｏ59、Ｃｕ63､65、Ｂｒ73､75、Ｉｎ113を測定した。感度と精度で、電通大のデーターは評価された(Chem.Rev.1953)。

１９５３年、自前の装置での研究の限界を感じ、Gutowsky教授の所に留学し、高分解能ＮＭＲの装置造りに参加させてもらった。

2　高分解能ＮＭＲ分光計：High Resolution NMR in Illinois (1953-55, Univ.Ill. Prof. H. S. Gutowsky)

イリノイの装置は永久磁石、２８MHzの装置で、精密電波発信器、高感度ブリッジ、高速記録計の構成であった。１９５４年の正月に試料の回転の技術がＳｔａｎｆｏｒｄ(Prof.F.Bloch)で生まれ、翌日イリノイでも試行し、成功した。これが今日の、真の高分解能ＮＭＲの始まりである。　これがバリアン社(Stanford)やヒューレット　パッカード社(Illinoi)の製品の基礎となった。Ｇｕｔｏｗｓｋｙ氏は日本で装置を復製することを快く許してくれ、電通大で科学研究費の援助で再現した(1957)。この装置は国内研究者に解放されＮＭＲ研究が一挙に活発になった。

3　第１回　ＮＭＲ討論会(1962)：　The　1st　NMR　Symposium

１９６０年代に入り、日本電子（ＪＥＯＬ）、バリアン社が装置をつくり（ともに当初は４０ＭＨｚ、ついですぐ９０、１００ＭＨｚとなる）。Ｖ社の装置は阪大産研の湯川研、ついで東北大非水研の羽里研、ついで、原子力研、東工試にも導入され、わが国のＮＭＲ人口が十分育ったので、この討論会を始めた。

4　第１回ＮＭＲ国際会議(1965)：　The　1st　ISMAR　in　Tokyo

藤原は、ＮＭＲの分野が基礎、応用さらには、物理、化学にわたり、それも各個別々に展開しているので、これらを統合総合し、一体となって研究発表する場を持つことが必要、有効と考え、世界の有力研究者に呼びかけたところ、賛成を得、この会議が発足した。これはＩＳＭＡＲとなって現在に至っている。

ちなみに、第２回はサンパウロ（伯）、第３回はモナッシュ（豪）である。

5　第１回生体関連ＮＭＲ国際会議：ボストン(1964)

The　1st　MRBS　in　Boston

ハーバード大医学部の　O.Jardetzky　教授や、Bell研の　Shulman博士らが１９６４年にこの会議を開催した。藤原は招かれてＮＭＲによるアミノ酸のＮＭＲ（桃井、荒田と共著）を報告した。この会議は、ＭＲＢＳとして今に及んでおり、藤原は、第９回を奈良で主催した。

藤原のアミノ酸のＮＭＲは鏡像体の研究として今に続いている。

6　水溶液系の酸素効果：

Oxygen　Effect　in　Aqueous　Media

第１回ＮＭＲ討論会(1965)で藤原は、エチルアルコールのｈｆｓの切れが酸素の存否に影響されることを報告した。これは、水中の酸素がアルコール分子内の水素の核の場に関係することの発見である。当時、藤原は「分子空間反応」の研究（第２回朝日科学奨励金）としてこの現象の考察を初めたものであって、その後、東大と千葉大で、分子空間の下限と上限が、海水とヒト血液の塩濃度、０．５Ｍおよび０．１Ｍ　ＮａＣｌに相当することを証明し、神奈川大で下記のまとめに到達した。

7　非生体系における、アミノ酸、糖の光学異性体の完全分別
NON-BIOLOGICAL COMPLETE DIFFERENTIATION OF
ENANTIOMERIC ISOMERS OF AMINO ACIDS AND SUGARS

０．１Ｍ塩水溶液において、酸素ないし硫化水素は、塩と水の共晶（ＮａＣｌ・２Ｈ２０）と錯体を作る。そしてこの錯体が、アミノ酸および糖のＬ体とＤ体を、１００％分別的に反応することを、ＨおよびＣ－ＮＭＲと示差熱分析で明かにした。これは、生体系以外で光学異性体が完全分別されるということの最初の発見である。

これはまた、生理食塩水の塩濃度（０．１ＭＮａＣｌ）が生合成の代理場となることを示唆する。長年関わったＮＭＲと生体系と分子空間が全部此処で融合したように思う。

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

残念記録　：Ｅｘｐｅｒｉｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｒｅｇｒｅｔ

ＮＭＲ５０年一つの歩みの途中にはいくつも　'ああすれば良かった'ということがある。その中の目星いものを二三挙げる。

－１）　核磁気共鳴による核温度上昇の利用
Application of Heat-up of Nuclei by NMR

１９５０年、日本にアイソトープが初めて輸入された。輸入された錫のアイソトープのなかに不純物としてＩｎ１１３ｍがあることがあった。準安定なＩｎ核である。小生は共鳴による核温度の上昇が核の半減期に関係するかどうか見たいと思った。それで、Ｉｎ１１３ｍ共存状態でＩｎの共鳴をさせ、In113の半減期を測った。半減期の測定はローリッエン験電器である。うまくゆくはずはない。渡米してすぐGutowskyに言ったが同氏は、核の回転ｴﾈﾙｷﾞｰと核子の結合ｴﾈﾙｷﾞｰは桁が違うとして取り合わず、その他皆そうだった。ひとり、Bloembergen氏だけは反対せず、有り難うと言われた。そして３年後、Ｃｏ６０の核磁気共鳴をガンマ線の放出方位の変化から見出した（角度相関）と報告され感服した。この研究はその後多くの追随があり、最近は、核医学医療機器に応用されている。

追加後日談：１９６４年ころ、原子力産業会議で、雨宮綾夫氏と一緒に放射性アイソトープの廃棄処分法を研究したことがあった。そして、ｂｕｒｎ　ｕｐの関連で先のことをもう一度検討した。その結果、有効だろうが日本の総発電量が必要だという結論になった。

－２）　環式有機化合物の電子局在の実証／分子軌道法の実証
1st Observation of Localization of orbital electrons in aromatic molecules

５３年秋、イリノイを去る直前Ｇｕｔｏｗｓｋｙ教授がﾓﾉﾌﾞﾛﾓﾍﾞﾝｾﾞﾝを持ってこられ、スペクトルを見たいのだがということであった。結果は単純なｄｏｕｂｌｅｔであった。帰国して装置が再現されたとき、島村修教授にﾓﾉﾌﾙｵﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝを工面して頂き、実験したら複雑な微細線を伴う二重線で清水博氏がｵﾙｿ、ﾊﾟﾗ、ﾒﾀ　位に電子の局在を仮定してスペクトルを解析した。

これは当時では世界最高の高分解能スペクトルであり、さらに、６ｓｐｉｎ系の解析で抜群の結果であった。それよりなにより、Ｍｕｌｌｉｋｅｎの分子軌道法に対して、分子電子の局在を明かにした最初の例だったのである。Ｇ教授、清水氏に稔りをもたらし得なかった小生の不才を残念遺憾に思う。

(S.Fujiwara & H.Shimizu, J.Chem.Phys., 32, 1636 (1960))

－３　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ＮＭＲ

１９６０年代初頭、手当たり次第にＥＳＲ、ＮＭＲを測定した。蚕の授精、産卵、ふ化以後の成長をＥＳＲで記録出来、報告した。(S.Fujiwara & M.Nakajima, N. Y. Acad.Sc.,222.677(1973)) この報告のあとワシントンのＮＳＦに呼ばれてもう一度話しをしたら、今なにがほしいかと言うので、人間が入れる磁石と答えた。翌年ラウターバー氏からＺｅｕｇｍａｔｏｇｒａｐｈｙに予算がついたと手紙があった。傾斜磁場のアイデアは北大にも以前あった。しかし当時の日本の科学力とくに計算機のそれでは到底手の届く問題ではなかったと思う。

関連追加：蚕とつきあっている途中、あるとき、糸を吐く直前の蚕のＮＭＲをとったら４０数Ｈｚの　ｈｆ間隔の７または５本線のプロトン共鳴を測定した。第９回ＭＲＢＳ国際会議の直前のことでJardetzky氏にも見せ、感嘆を博した。ところが残念なことにこの現象が再測定出来ない。絹が出る直前に、絹糸材料と燐酸基とで錯体でもつくるのか。生命一瞬の機作なのであろう。とすれば見る経験を得ただけでも幸せなのかも知れない。

「一つ」の歩みとしてのささやかな記録を述べさせて頂いた。「ＮＭＲの５０年」間、私は、公私にわたり、また直接間接に多数のかたがたから、数え切れない御支援御好誼を頂いた。あらためてそれらの方々に深甚の謝意を表し、今日のこの機会を与えられた本討論会の主催者に感謝する。

測定法・装置・高圧
緩和・運動
in vivo・イメージング

P46

微量糖脂質のNMRによる構造解析

○市川さおり、串田克彦、*杉田陸海、**稲垣冬彦
（バリアン ジャパン・NMR応用部、滋賀大・教育・化学*、都臨床研・生理活性物質**）

Structural Analysis of Microgram Order Glycolipids by NMR.

Saori Ichikawa, Katsuhiko Kushida, Mutsumi Sugita* and Fuyuhiko Inagaki **
(Varian Japan Ltd., Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University* and Department of Molecular Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science**)

Summary:
We have been studying structural analysis of glycolipids and report here the following two subjects.
1) We determined chemical structure of novel glycolipid containing inositolphosphate by NMR.
2) We demonstrate the application of a Varian Nano-probe, which has been specially designed for very small volume (< 40μl) liquid samples. The spectrum is obtained from a 50μg/40μl sample of glycolipids taken by Magic-angle spinning. High sensitivity and high resolution of nano probe made it possible to identify sugar components and sugar linkages of microgram order glycolipids.

序）我々は幾種類かの微量な糖脂質の構造解析を行っており、今回以下の２つの項目について知見を得たので報告する。

1）イノシトールリン酸を含有する新規糖脂質の構造解析
我々はイノシトールリン酸を含有する糖脂質について、糖とイノシトールとの結合位置を決定した。サンプルには動物寄生性線虫の一種であるブタカイチュウ（袋形動物、線虫綱）由来の糖脂質を1mg用い、DQF-COSY, TOCSY, NOESYを測定し解析を行った。Fig.1にTOCSYスペクトル、Fig.2にNOESYスペクトルを示す。

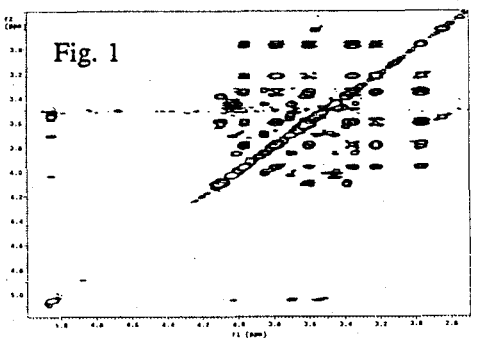


Fig. 1

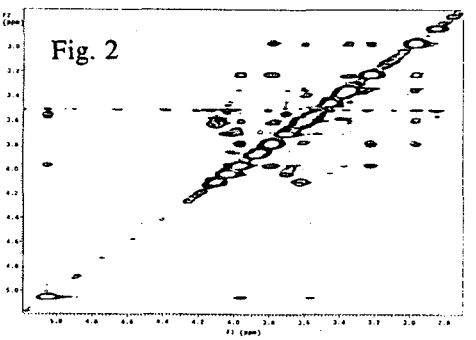


Fig. 2

キーワード：糖脂質　イノシトール　ナノプローブ　NMR

いちかわ　さおり　くしだ　かつひこ　すぎた　むつみ　いながき　ふゆひこ

TOCSYスペクトルにはGalαに特徴的なスピン系とイノシトールのスピン系が観測されている。DQF-COSYスペクトルではイノシトールのJ_{12}とJ_{23}の大きさがゴーシュの配置を反映していることからMyo-イノシトールと同定した。更に、NOESYスペクトルにはGalα H1からの展開にイノシトールH2とのNOEピークが観測されている。これによりこの糖脂質がGal(α1-2)Inositol-P-Cerという構造であることを決定した。イノシトールリン酸を含有する糖脂質の存在は極めて珍しいと思われる。

2）ナノプローブの微量糖脂質への応用

糖脂質ではサンプルが微量でしか得られないため、NMRで測定する際に感度の問題が大きな障害となる。今回我々は、微量サンプルを高感度で測定するためにVarian社で開発されたナノプローブを用いて、糖脂質の構造解析を試みた。ナノプローブは外径4mm、長さ20mmのチューブに40ulのサンプルをつめ、磁場主軸に対して54.7度傾けて高速で回転させる（Fig.3）。コイルがソレノイド型のため、サドル型コイルを使ったプローブに比べてfilling factorが高く、高感度で分解能のよいスペクトルを得ることができる。

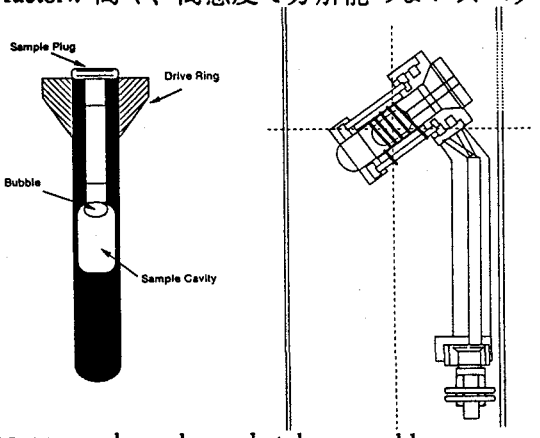


Fig. 3 Nano nmr probe and sample tube assembly cross section

Fig.4 はミミズ由来の糖脂質を50μg/40μl用い、ナノプローブで測定した1Dスペクトルである。積算4回で十分な感度と分解能が得られている。Fig.5 は積算64回、mixing time 100msで測定したTOCSYスペクトルである。TOCSYおよびNOESYスペクトルからこの糖脂質がGlcα1-4Galβ1-6Galβ1-6Galβ1-Cerという糖鎖構造であることを決定した。微量糖脂質の構造決定にナノプローブが有用であることを確認した。

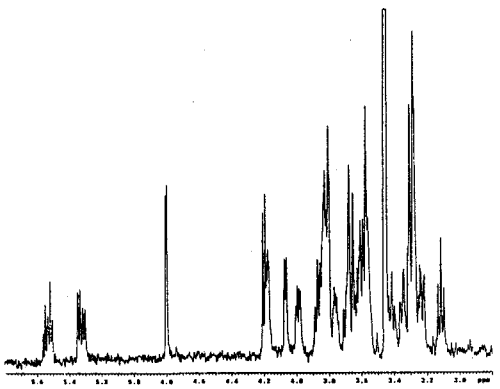


Fig. 4 1D spectrum of glycolipid from annelida.

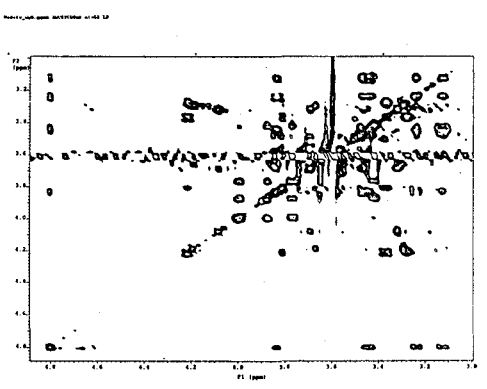


Fig.5 TOCSY spectrum

P47

ラグランジュの乗数法により発熱が最小になるよう電流を制御するシム

(日本電子・基礎研究部) ○石川彦成, 志野英雄, 須藤 誠, 工藤修士, 木田 惇

Minimum power-dissipation shim designed by Lagrange method of undetermined multipliers

JEOL Ltd. Hiroshige Ishikawa, Hideo Shino, Makoto Sudou, Nobuo Kudou, Jun Kida

A shim with 44 gradients controls has been developed. The winding section comprises independent 92 coils whose currents are determined by Lagrange method of undetermined multipliers so as to minimize overall power dissipation. This minimization allows complete correction of inhomogeneity especially in high field SCM by compact power supply unit avoiding temperature disturbance for sample.

1．はじめに

ＮＭＲで必要な磁場均一度を得るために、試料を回転させている。しかし、この回転は安定度の低下、スピニングサイドバンドの発生など種々の副作用を引き起こし、測定に悪影響を与えるため、最近のタンパク質などの高度な測定では、試料の回転を行わずに均一な磁場を発生できる装置を求めていた。

このため、磁場補正項数を通常使用しているシムの約２倍にした、より高次の回転方向の補正磁場成分を発生する４４の補正項を持つシム（ラグランジュシム）を開発した。試料を回転させた場合には及ばないものの、磁場均一度が通常よりかなり低い超伝導磁石（ＳＣＭ）に対しても試料の回転を行わずに実用的な分解能を得ている。補正項数を増加すると一般にシムの発熱が増加し試料を加熱してしまう傾向がある。しかし、本設計ではラグランジュの乗数法を用いてコイルの形状、配置と個数の自由度を増加させ、これを利用して発熱を大幅に低減し、通常の状態では試料の温度上昇をシムの空冷を使用せずに十分低い値に制限できた。また、個々のシムコイルに供給する電流が電源設計での精密技術の導入が可能な程度に小さくなり、さらに高品質電源を開発して、ＮＭＲ測定の安定度、信頼度の向上を図った。

ラグランジュの乗数法を応用したシムコイルの設計としてはHoult & Deslauriersが行った補正項とシムコイルが１対１に対応するコイルパターンの設計方法[1]があるが、本設計

shim, resolution, magnetic field homogeneity

いしかわ ひろしげ, しの ひでお, すどう まこと, くどう のぶお, きだ じゅん

は、複数の補正項に複数のコイルを対応させ、その電流を決定するためにラグランジュの乗数法を用いている。

2．磁場補正項

一般にＳＣＭの中心軸をＺ軸とし Z 方向磁場 Bz を 極座標（r,θ, φ）により（1）式のように表現し、各項に名称をつけてシムの補正項、あるいはシムの軸と表現している[2]。

$$B_z = \sum_{n=0}^{\infty} A_n r^n P_n(\cos\theta) + \sum_{n=1}^{\infty} r^n \sum_{m=1}^{m=n} \{ P_n^m(\cos\theta) \ (A_n^m \cos m\phi + B_n^m \sin m\phi) \} \quad (1)$$

$P_n^m(\cos\theta)$：ルジャンドル倍関数　　A_n^m, B_n^m ：定数で磁場傾斜を表す.

ところがシムの名称は設計者ごとに異なり統一していない。 ここでは、下記の表記法を用いる。

Ｚｎ　　：A_n 項　例　Ｚ０, Ｚ１, Ｚ２　　（2）

ＸｍＺ（ｎ－ｍ）　：A_n^m 項　例　Ｘ１, Ｘ２Ｚ, Ｘ３Ｚ２　　（3）

ＹｍＺ（ｎ－ｍ）　：B_n^m 項　例　Ｙ１, Ｙ２Ｚ, Ｙ３Ｚ２　　（4）

（2）－（4）式の表現方法で本シムの補正項を表示すると表１で示す４４項になる。 細線で囲った部分が通常使用しているシムの補正項 ２１項である。

n \ m	0	1	2	3	4
0	Z0				
1	Z1	X			
		Y			
2	Z2	XZ	X2		
		YZ	Y2		
3	Z3	XZ2	X2Z	X3	
		YZ2	Y2Z	Y3	
4	Z4	XZ3	X2Z2	X3Z	X4
		XZ3	Y2Z2	Y3Z	Y4
5	Z5	XZ4	X2Z3	X3Z2	X4Z
		YZ4	Y2Z3	Y3Z2	Y4Z
6	Z6	XZ5	X2Z4	X3Z3	X4Z2
		YZ5	Y2Z4	Y3Z3	Y4Z2
7	Z7				

Table 1. Name of shim axis

3．原理と構成

シムの設計には、表１の補正磁場項と補正コイルを１対１に対応させコイルの位置と形状で単一の出力磁場項を発生する方法と、磁場項Ｎｂ個にコイルＮｃ個を対応させ、シムに特有な行列から計算によって各コイルの電流値を求め複数の磁場項を発生する方法がある[3]。 後者は ｍ＝０ 即ち（２）式で Ｎｂ＝Ｎｃ の場合のみの適用が存在していたが、 本設計では ｍ≠０ の場合にも適用し，更に Ｎｂ＜Ｎｃ の場合でもラグランジュの乗数法と発熱最少条件により適用できるようにした。これによりコイルの配置と個数の自由度が確保できるので、単位電流あたりの磁場発生効率が大幅に上昇し、シムコイルに供給する電流とコイルでの発熱を大幅に減少できた。また、電流の減少はシム電源での電力素

子の発熱が原因となる回路設計への望ましくない影響を防止している。コイルの形状はソレノイドコイルと面状の馬蹄形コイルで、シムはこれらのコイルの９２個の集合である。

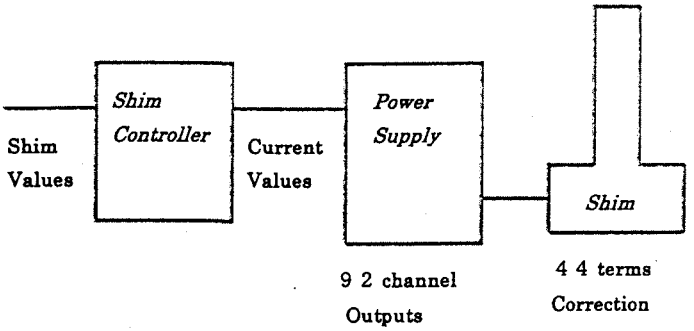


Fig 1.
Block diagram
of a shim system

シム系は、図１に示すようにコントローラ、電源、シムで構成している。 コントローラは入力したシム値から電流値を行列計算により求め電源に設定する。 ロックとホモスポイルの信号は高速性を保つため専用の信号経路を使用しているが、それ以外の電源への入力はコントローラからの光ケーブルのみで行い、ＮＭＲ信号へのデジタル雑音の混入や電源の基準電圧の変動を防止している。電源は基準グランドと電源グランドを分離して基準電圧を安定化し、雑音を排除して相互干渉のない極めて高い安定度を実現し、表面実装の大幅な導入で補正項数が倍化しても従来とほぼ同じ寸法を保っている。電源の概要を表２に記す。 各電源の平均的な動作電流は最大値よりかなり小さい。

本シムの導入による、 シム調整、シム値の管理、自動シミングなどの操作性への影響はほとんどない。電流値を求める計算によるシム調整時の応答の遅れは実際上ほとんど感じられない。また、追加した高次の補正項の調整はロック信号を指標としての調整が困難であるので, その調整の前に磁場測定を行って決める[4]。

Table 2.
Power supply characteristics

Number of channels	92
Maximum current	300 mA
Current resolution	20 ～ 21 bit
Maximum voltage	12 V
Dimensions	480×140×720 mm

４．磁場の補正結果と分解能データ

概略の磁場分布の均一化は、微小サンプルをＺ軸上と円筒表面を移動して磁場分布を測定し、その解析結果からシム値を求めて行う。 約２０台のＳＣＭのデータを解析した結果では、磁場補正時の発熱は最大でも４W以下で、補正項数を倍加しても従来のシムの通常の発熱以下である。シムの発熱による試料温度の上昇は、通常行っている試料の空冷があれば最大発熱時でも３℃程度である。また、かなり均一度の低いＳＣＭも含め磁場補正に成功して

おり、本シム系でＳＣＭによる分解能の差異を吸収できることを示している。

試料の回転のない場合の８mm径のプローブのＣＨＣｌ$_3$の信号を図２に示す。カーボンサテライトの高さで５.７ Hz、その 1/5高さで９.８ Hzであり、実用上十分な分解能を得ている。

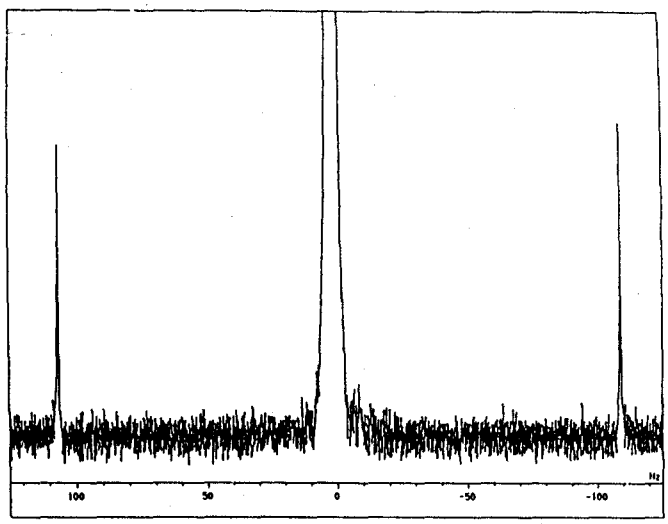


Fig 2. $CHCl_3$ non-spinning lineshape

[文献]

1） D.I.Hoult,R.Deslauriers J.Magn.Reson.A 108, 9 ,(1994)

2） M.D. Sauzade, S.K. Kan; Advance in Electronics and Electron Physics, 34,1,(1973)

3） 石川, 木田, 野中; 第２３回ＮＭＲ討論会講演要旨集 (1984) 仙台 p1

4） H.Ishikawa, J.Kida; JEOL news 26A, 8,(1990)

P48

H-X HSQC法におけるオフレゾナンズ効果およびRFインホモジニティの影響の考察

(日本電子) ○末松浩人, 栗原範明

Study of the off-resonance effect and the RF-inhomogeneity effect in H-X HSQC experiment

(JEOL Ltd.) ○ Hiroto Suematsu, Noriaki Kurihara

In recent NMR experiments,pulse sequences that contain multiple pulses are used. In such experiments the pulse imperfection often reduces the signal intensity. We have studied about two kinds of pulse imperfection,the off-resonance effect and the RF-inhomogeneity,in H-X HSQC experiment. We estimated that loss in experiments and simulations.

1 はじめに

近年のNMR実験においては，パルスを多数使用した測定法が広く使われている。パルスを多数使用する実験においては，パルスの不完全性が観測される信号強度に影響する。今回は，HSQC法[1]を例にとり，パルスの不完全性が観測される信号強度にどの程度影響するかを調べた。H-X HSQCにおいて観測される信号強度は，以下のパルスの不完全性により低下する。

1. H核,X核のパルス幅，オフセット周波数によるオフレゾナンス効果。
2. プローブのH核，X核用コイルの作り出すRF磁場の不均一性(RFインホモジニティ)

本研究では上記1,2の信号強度に対する影響を，実験およびシミュレーションにて解析した。

2 実験およびシミュレーション

2.1 オフレゾナンス効果の影響

今回はX核(^{13}C, ^{15}Nなど)のオフレゾナンス効果のみを考慮する。Fig.1に使用したH-X HSQCのパルスシーケンスを示す。通常のHSQCから$t1$によるX核の展開を消去したものを使用した。通常のHSQCの$t1 = 0$の時のデータとほぼ等価なデータが得られる。Fig.2にX核(^{15}N)のオフセット周波数を変化させながら観測したスペクトルを示す。^{1}H核のオフセット周波数は0Hzに固定した。サンプルは^{15}Nをエンリッチした NH基を持つ化合物(^{15}Nラベルメチオニン)を使用した。

X核のRF磁場をB1とした場合，オフセットが0.45B1で信号強度が半分になってしまうことがわかる。これは2次元のH-X HSQCを採った場合，(^{1}H,X)の周波数が(0Hz,0Hz)の位置のピーク強度を1とすると，(0Hz,0.45B1 Hz)の位置のピーク強度は0.5しかないことと等価である。

Fig.1のシーケンスをシミュレーションした結果もFig.2に示す。シミュレーションは，磁化の追跡はプロダクトオペレータ[2][3]により行い，パルスのオフレゾナンス効果はブロッホ方程式[4]にて計算する半古典的方法を用いた。シミュレーションと実験は良く一致している。

HSQC, オフレゾナンス効果,RFインホモジニティ

すえまつ ひろと, くりはら のりあき

Fig.1のX核側の最初と最後の180度パルスを90X-180NX-270Xのコンポジット180度パルス[5]に置き換えた場合のデータとシミュレーション結果をFig.3に示す。Fig.2と比べると帯域が大きく改善されていることがわかる。

2.2 RFインホモジニティの影響

プローブのH核，X核用コイルの作り出すRF磁場の不均一性(RFインホモジニティ)も信号強度を低下させる原因となる。Fig.5に通常のH-X HSQC法(Fig.4)にてX核(^{13}C)のパルス幅を変化させながら観測したスペクトルを示す。X核のパルス幅は180度パルス法にて求めた90度パルス幅を100%とした。サンプルは^{13}Cをエンリッチした蟻酸(HCOOH)を使用した。また，オフレゾナンス効果を小さくするため，オフセット周波数は^{1}H,^{13}CともCH基の共鳴周波数に合わせた。Fig.5の縦軸の100%は^{1}H 90度パルスにより得られたデータの信号強度とした。

H-X HSQC法は理想的な場合^{1}H 90度パルス法と同じ信号強度で磁化を観測出来る。ところがFig.5のデータでは信号強度の低下が見られる。(同図A)

実際のプローブのRF磁場分布をモデリングして信号強度をシミュレーションした。オフレゾナンス効果等，他の要因は無視した。結果をFig.5に示す。シミュレーションと実験結果は約5%の誤差で一致した。よって，この信号強度の低下はプローブのRFインホモジニティが主な原因と考えられる。

またFig.5より180度パルス法で求めたパルス幅の90%のパルス幅で信号強度が最大になっていることがわかる。(同図B)これは実際のプローブの中心RF磁場が，180度パルス法で決めたパルス幅から求められるRF磁場よりも，10%大きいことを意味する。この誤差はRF磁場分布が中心RF磁場に対してやや低磁場側に片寄った分布をしていることから生じていると考えられる。(Fig.6)

3 おわりに

本研究にて次のことがわかった。

1. H-X HSQC法において，オフレゾナンス効果およびRFインホモジニティは，信号強度低下の大きな要因となる。
2. X核のオフレゾナンス効果は，コンポジットパルスを使用することにより改善することが出来る。
3. 両効果の影響はシミュレーションにより定量的に計算できる。

両効果の影響はシーケンス中のパルス数が多いほど顕著になる。今後，本手法を更にマルチパルスの実験の感度計算にも応用していきたい。

参考文献

[1] G.Otting and K.Wuthrich, *J.Magn.Reson.*, **76**, 569 (1988)

[2] O.W.Sorensen et al, *Prog.NMR Spectrosc.*, **16**, 163 (1983)

[3] P.Guntert et al, *J.Magn.Reson.*, **A101**, 103 (1993)

[4] エルンスト他, "2次元NMR", 吉岡書店 (1991)

[5] M.H.Levitt and R.R.Ernst, *Molecular Physics*, **50**, 1109 (1983)

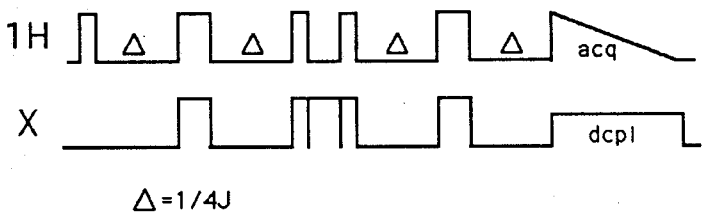


Fig. 1: HSQC pulse sequence to investigate the off-resonance effect

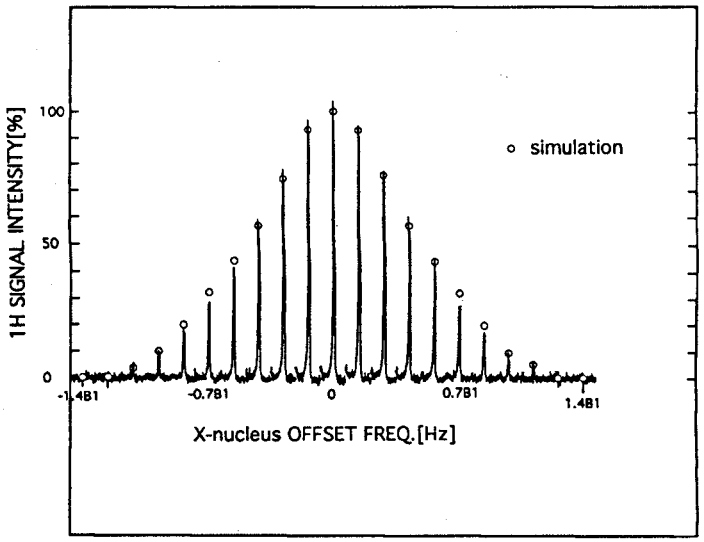


Fig. 2: The off-resonance effect of X-nucleus to HSQC signal intensity

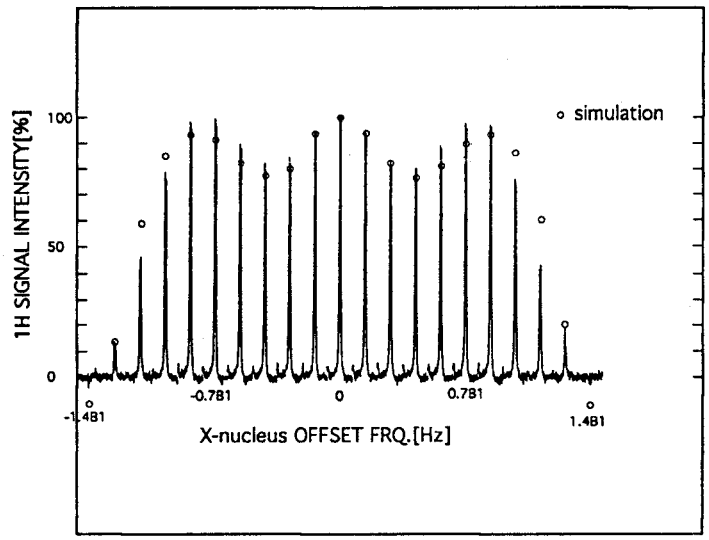


Fig. 3: The off-resonance effect of X-nucleus to HSQC signal intensity (with "WALTZ" composite pulse)

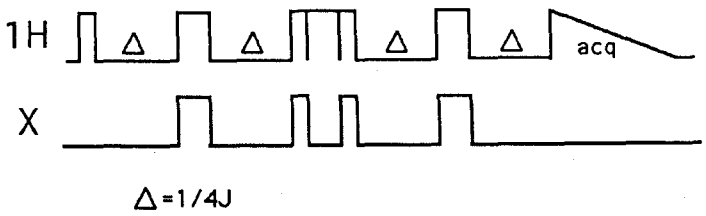


Fig. 4: HSQC pulse sequence to investigate the effect of RF field inhomogeneity

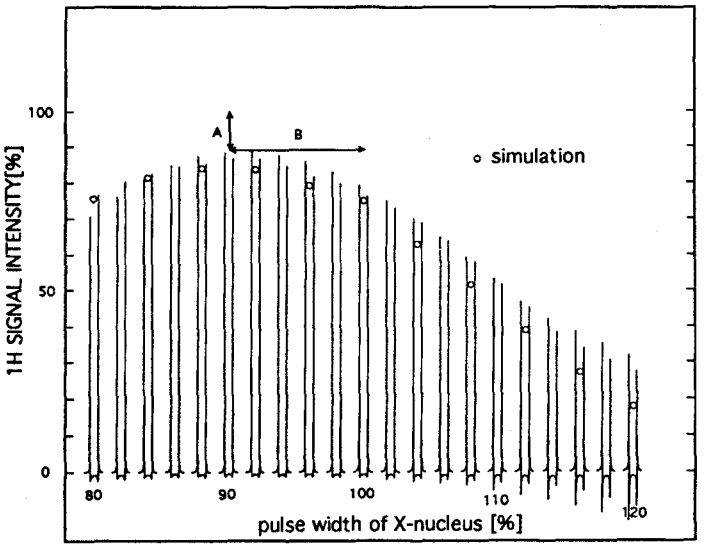


Fig. 5: The effect of RF field inhomogeneity to HSQC signal intensity

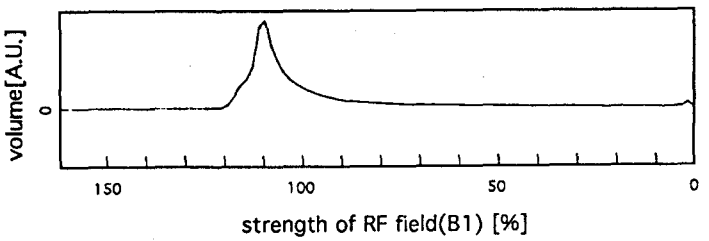


Fig. 6: An example of RF field distribution

P49

INADEQUATEの改良

○内海　博明、宮林　延良、藤井　直之、鴨　修、日元　徹
日本電子株式会社分析機器技術本部
〒１９６　東京都昭島市武蔵野3-1-2

Modified INADEQUATE to measure small amount samples

○Hiroaki Utumi,Nobuyoshi Miyabayashi,Naoyuki Fujii,Osamu Kamo,
Tetsu Hinomoto
JEOL LTD. NMR Application Laboratory
1-2 Musashino 3-chome Akishima Tokyo 196 JAPAN

INADEQUATE has great possibility of establishing carbon skeletons of organic compounds. But the experiment has also substantial difficulty to require long measuring time because of low natural abundance and long relaxation time of 13C.
The latter difficulty is even severer when quaternary carbons are measured, which have much longer T1 than protonated carbons. To get connectivity of quaternary carbons, the conventional INADEQUATE requires unfavorable long repetition time to avoid saturation of the signals.
We propose a modified INADEQUATE which can make the repetition time shorter by using JCP (J-cross polarization)

はじめに

多次元NMRの発達は、ＮＭＲスペクトルから有機化合物の機械的な平面や立体構造の解析を可能にしつつある。この中で、注目されるのはINADEQUATEスペクトル[1],[2]の構造解析における重要性である。INADEQUATEスペクトルはC-Cの骨格連鎖を直接的に導くことが可能であるため、他の測定（HSQC,HMBC等）で求められるより情報精度が高い。それに対して、INADEQUATE以外の測定では、1Hの化学シフトの分離が基本になっているため、化学シフトの分離が充分でない場合、その有効性は落ちざる得ない。しかし、INADEQUATEの問題点は、その感度の低さと四級炭素の縦緩和時間の長さに由来する時間当たりの積算効率の低さである。感度の低さは、近年の磁場の向上プローブの改良によってかなり改善されている。我々は、今回、1H-13C間における磁化移動を用いて緩和時間による積算効率の低さを改善することを試みた。

感度に対する対策

近年、少量サンプルを測定するため、プローブの内径を小さくする試みが行われている。そこで、以前に比べて少量のサンプルでも13Cのスペクトルが容易に測定できるようになってきた。このことは、13Cの同種核相関を求めるINADEQUATEの感度も向上することを意味する。今回は３mmφのPFGチューナブルプローブを使用して測定を試みた。プローブの観測領域（通常液量1.2~2cm)にサンプルを濃縮することも感度を上げる方法

の一つである。従来より、このような方法は行われていたが分解能をあわせることが困難なためあまり使用されなかった。しかし、近年、シゲミ社製の磁化率補正マイクロセルサンプル管を使用することによって、これらの欠点が克服されつつある。今回は、3mmφ用のマイクロセルも使用した。

JCP(=Hetero TOCSY)による磁化移動

INADEQUATEの測定に長時間かかる理由は、13Cの天然存在比が低いことが第１の原因であるが、13C特に四級炭素の緩和時間が長いことが次に挙げられる。

一般に分子量500程度の分子では、1Hが直接結合している炭素の縦緩和時間(T1)は１秒以下なのに対し、四級炭素のT1は4~5秒になる。また、構造によっては40~50秒になる四級炭素が存在することが知られている。このように、四級炭素と1Hの結合している炭素とのT1の差が大きいことはINADEQUATEの測定をより困難にしている。すなわち、1Hに結合している炭素のT1に合わせてパルス繰り返し時間を設定すると四級炭素は飽和して信号感度は著しく低下する、そして、逆に四級炭素のT1に合わせて繰り返し時間を設定すると単位時間当たりの積算回数が少なくなり1Hの結合している炭素の信号感度が悪くなる。

これらの問題を解決するために、従来INEPT,DEPT等の1Hの磁化を1H-13Cの直接スカラー結合定数を利用して13Cに磁化移動する方法により1HのT1に合わせた繰り返し時間で測定することが提案されてきた[3],[4],[5]。しかし、これらの方法は、1Hが結合している炭素間の相関や、1Hの結合している炭素と四級炭素の相関を得るには有効であるが、四級炭素同志の相関は四級炭素には磁化が移動しないため信号は消失していた。また、INEPT,DEPTではロングレンジ結合定数に条件を合わせることは、磁化移動が位相変調であるため困難であった。

近年、これらの問題を解決するべく提案されているのが、INEPT,DEPTの代わりにJCP(別名Hetero TOCSY)を使用することである[6]。このHetero　TOCSYは、その接触時間をロングレンジ結合定数に条件をあわせることによって、四級炭素を含めた13Cに1Hの磁化をinphaseで移動することが可能になる。この方法によって四級炭素間相関も1Hの緩和時間で測定ができるようになる。

しかし、Hetero TOCSYの問題点は、そのカバーする範囲である。一般にHetero TOCSYはWALTZ16 ,DIPSI3で行うが、高磁場(500,600MHZ)で13Cの0~230ppmをカバーするのは難しい。今回、我々は、これらの問題に関して種々の実験を行った。

fig.2.に示すように、7mgのCedrolで、63時間程度で解析可能なINADEQUATEのスペクトルが得られた。

PFGを使用することによるイメージ信号の消去

今回、INADEQUATEの測定にはPFGのコヒーレンス経路選択を使用した。これは、INADEQUATEの測定で現れやすいイメージ信号を消去するためである。また、イメージ信号が無いことは、プログラムによるINADEQUATEスペクトルの解析の精度を上げることを意味する。

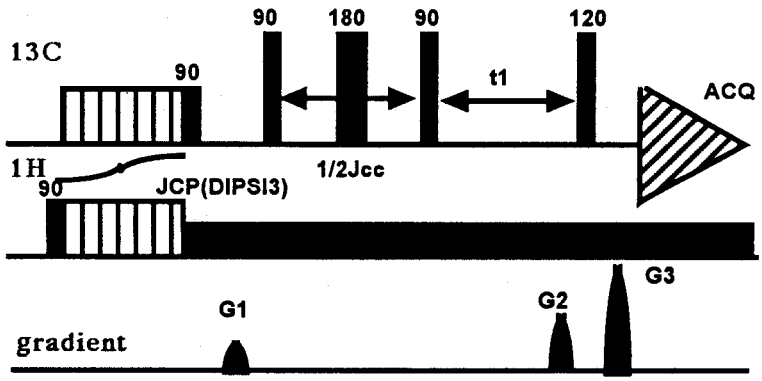


Fig.1 Pulse sequence for JCP PFG INADEQUATE
G1 is a homo spoiling gradient pulse. The gradient strength of G2 and G3 are 10 and 20 G/cm respectively.

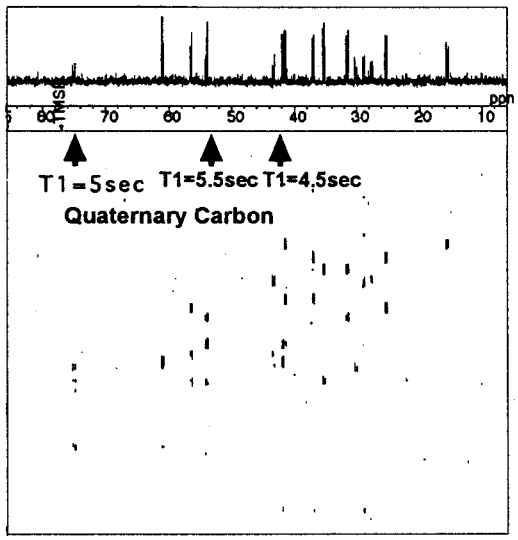


Fig.2 JCP PFG INADEQUATE spectrum of Cedrol 7 mg/56 ul.
The experiment took 63 hours and 35 miniutes. The pulse repetition time was 2.25 seconds. JCP was achieved with DIPSI3. The matching period was 7 msec.

文献

(1)A.Bax et al .,J.Magn.Reson.,43,478(1981)
(2)T.H.Mareci et al .,J.Magn.Reson.,48,158(1982)
(3)O.W.Sφrensen ., J.Magn.Reson.,46,180(1982)
(4)S.W.Sparks et al.,J.Magn.Reson.,62,1(1985)
(5)I.S.Podkorytov.,J.Magn.Reson.,89,129(1990)
(6)C.Dalvit,G.Bovermann.,J.Magn.Reson.,109A,113(1994)

P50 選択的磁場勾配エコーを利用した1次元NMR測定法

○熊木康裕、内海博明、鴨修、日元徹
日本電子株式会社分析機器技術本部

1D NMR method using selective pulsed field gradient echo

Yasuhiro Kumaki, Hiroaki Utumi, Osamu Kamo, Tetsu Hinomoto (JEOL Ltd.)

Compared to conventional difference method, 1D NMR method using selective pulsed field gradient echo gives better spectrum which contains no subtraction artifacts. But this method has some factors which cause sensitivity losses such as the selection of only one coherence transfer pathway, and the diffusion during mixing time. The latter effect deeply depends on molecular diffusion coefficient, PFG strength, and mixing time. Especially in case of small molecular dissolved in solvent of low viscosity, sensitivity loss is not negligible.

＜序論＞

選択励起を利用した各種差スペクトル測定は、特定の信号について交差緩和やスピン結合による相関を得るのに有効である。しかしながらこの測定は対象とする信号を選択励起／非励起のスペクトルの差をとることで、最終的なスペクトルを得ているため、不完全な差し引きによる信号の消え残りが現れることは避けがたい。これは小さな信号を判別する上で障害になっていた。近年磁場勾配を利用してこの問題点を解消する測定法が提案された。この方法は選択的磁場勾配エコーをとる間に、交差緩和やスピン結合を介して磁化移動を行うものである。この方法では注目する信号やそれから磁化移動によって生じた信号以外は観測されないので、消え残り信号が現れないという利点がある。しかしその反面コヒーレンス移動経路の選択、また混合時間における分子拡散などにより感度が低下するのも事実である。このうち前者では感度は常に$\sqrt{2}$だけ低下する。一方後者の場合感度の低下は拡散係数や混合時間の長さ、磁場勾配強度に依存し、サンプル系によっては重大な感度の低下を生じる。今回はこの後者の影響に注目し、拡散係数の異なる複数のサンプル系について、この方法を利用したTOCSY、NOESY、ROESYについて実験を行った。

キーワード　選択的磁場勾配エコー　分子拡散　消え残り（subtraction artifacts）

くまき　やすひろ　うつみ　ひろあき　かも　おさむ　ひのもと　てつ

＜実験と結果＞

Fig.1、Fig.2 はそれぞれ GOESY (Gradient enhanced nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)[1], 及び PFG1D-TOCSY[2]のパルスシーケンスである。基本的には混合期間以外は同じである。

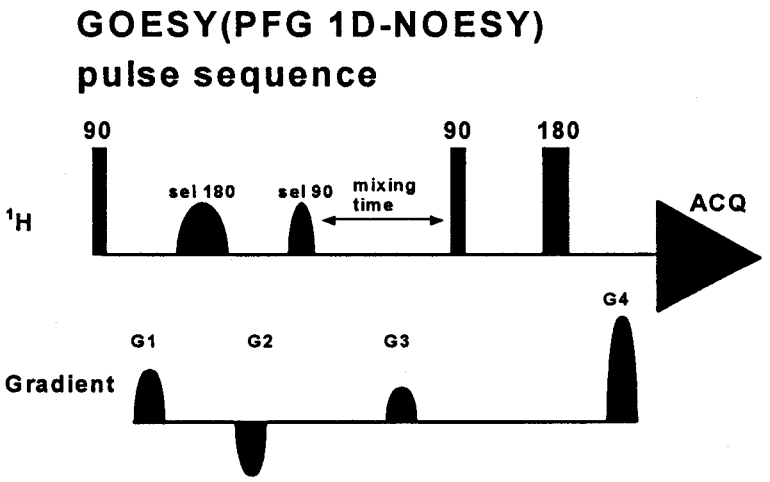


Fig.1 Pulse sequence scheme of GOESY (Gradient enhanced nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) [1]

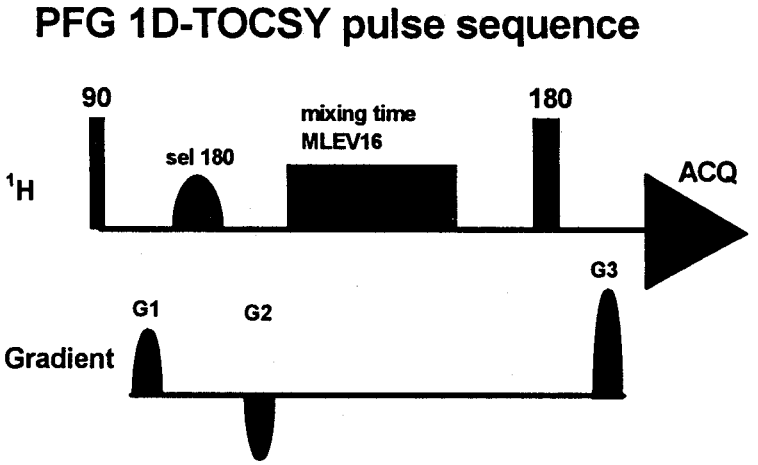


Fig.2 Pulse sequence scheme of PFG 1D - TOCSY [2]

Fig.3 の a)、b)はそれぞれ D_2O 溶媒でのラフィノース（分子量 504）の GOESY スペクトル及び通常の過渡的 NOE 差スペクトルである。装置は JEOL-A500 を使用した。ともに測定に要した時間は 3 分、混合時間は 700msec である。

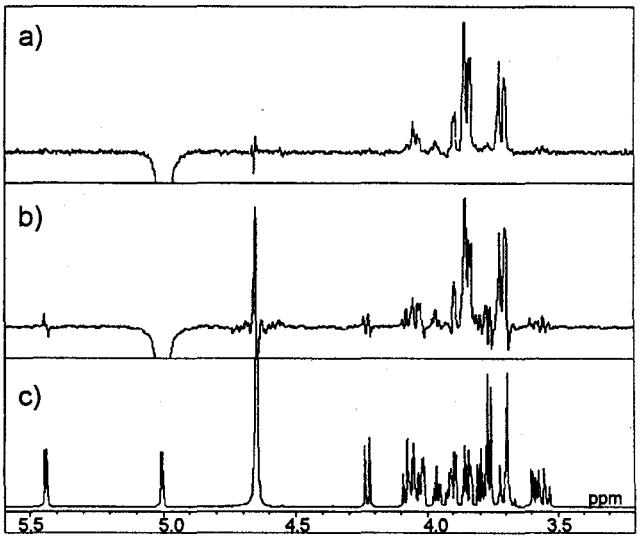


Fig.3 NMR spectra of 20 mg raffinose in D_2O.These spectra were measured by JEOL A500. a) is GOESY spectrum. PFG strength and pulse width are 6G/cm and 1msec, respectively. b) is conventional transient NOE difference spectrum. Both a) and b) have the total time required 3min. and mixing time 700msec.. c) is ^{1}H-NMR spectrum. Compared to b), a) has little subtraction artifacts.

a)はb)に比べ、全体的に消え残りが小さく溶媒（水）のピークも良く消えていることがわかる。ちなみにこのサンプルでは、ピークのS/Nは磁場勾配強度にほとんど依存しなかった。

Fig.4はCDCl3溶媒でのサントニン（分子量246）のGOESYスペクトルである。測定に要した時間は6分、混合時間は700msecである。a)、b)はそれぞれ磁場勾配強度6G/cm、12G/cmで測定した。この場合ではS/Nが磁場勾配に依存していることがわかる。

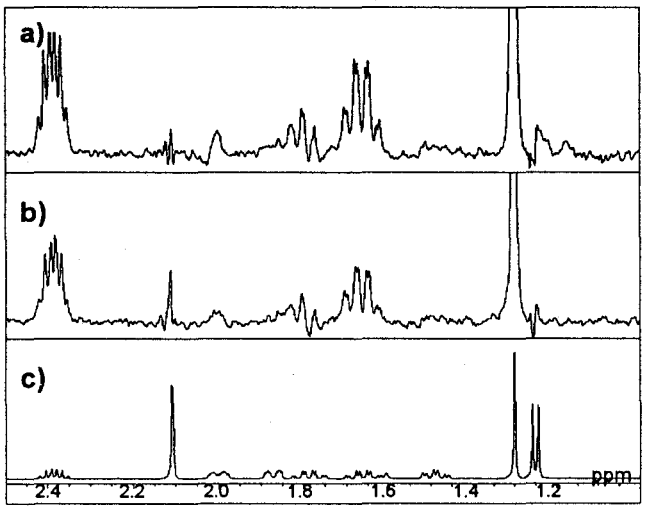


Fig.4 NMR spectra of 20mg santonin in $CDCl_3$. These spectra were measured by JEOL A500. a) is GOESY spectrum , PFG strength is 6G/cm. b) is GOESY spectum, PFG strength is 12G/cm. c) is ^{1}H-NMR spectrum. Compared to a), peak intensity is reduced in spectrum

Fig.5はラフィノースのPFG 1D-TOCSYスペクトルである。

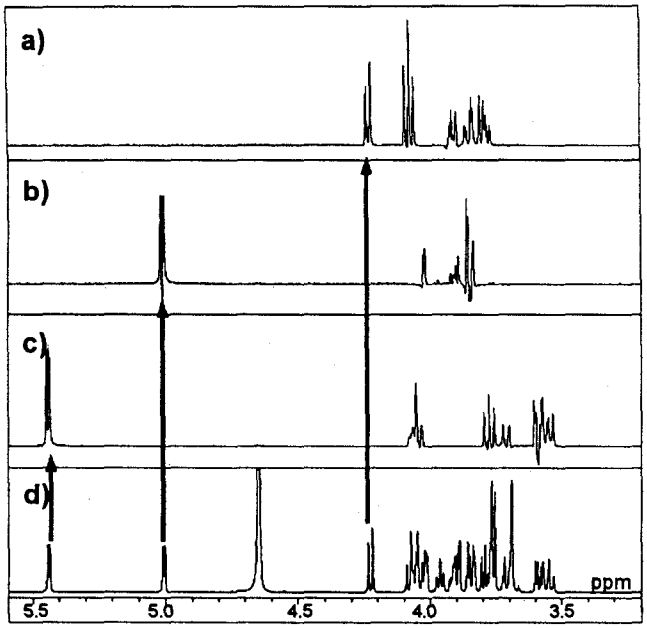


Fig.5 PFG 1D-TOCSY specta of raffinose in D_2O. These spectra were measured by JEOL A500. In spectra a), b), c), H3 of fructofuranose, H1 of galacto -pyranosyl, H1 of glucopyranosyl (arrows) were selectively excited, respectively. d) is 1H-NMR spectrum. Each of TOCSY spectra have the total time required 3min. and mixing time 110msec..

a)、b)、c)はそれぞれ構成単糖であるフルクトースの3位、ガラクトースの1位、グルコースの1位を（矢印）を選択パルスのキャリアーとした。測定に要した時間は約3分、混合時間は110msecである。このように選択的磁場勾配エコーを利用すると、消え残りが存在しないので構成単糖のサブスペクトルが綺麗に抽出できる。

＜今後の課題＞

今回使用したサンプルであるラフィノースとサントニンでは磁場勾配強度の感度への影響のしかたが大きく異なった。これは溶媒の粘性の違いからくる分子拡散の影響が、選択的磁場勾配エコーを利用したこれらの測定法において大きいことを示唆するものと思われる。種々のサンプル系において実際に拡散係数を求め、磁場勾配強度と拡散係数の感度に与える影響を定量的に調べる。

＜参考文献＞

1. Stonehouse,J.; Adell,P.; Keeler,J.; Shaka,A.J. J.Am.Chem.Soc. 116, 6037 (1994).
2. Facke,T.; Berger,S. J.Magn.Reson. A113, 257 (1995).
3. Dalvit,C. J.Magn.Reson. A113, 120 (1995).

P51

磁場勾配パルスをコヒーレンス選択に用いた選択的１次元および２次元NMR測定法

（理研）O越野広雪、鵜澤　洵

Selective 1D and 2D NMR Experiments Using Pulsed Field Gradient for Coherence Selection

The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)
Hiroyuki Koshino and Jun Uzawa

Recently promising 1D selective TOCSY experiment related GOESY experiment using 180°soft inversion pulse and pulsed field gradient for selection of the desired magetization and coherence pathway is reported by T. Fäcke and S. Berger. We propose new 2D NMR experiments with selective TOCSY such as sel-TOCSY-COSY, sel-TOCSY-ROESY, sel-TOCSY-HMQC and sel-TOCSY-HMBC experiments which are application of the 1D selective TOCSY pulse sequence to the 2D NMR experiments. Additionally, we would like to show 1D selective TOCSY and ROESY experiments with homo spin decoupling. These NMR techniques are useful and effective to analysis of the interesting unit of target molecule which is selected by TOCSY.

磁場勾配パルスをコヒーレンス選択に用いることにより必要な興味あるコヒーレンスのみを観測できるようになり、様々な測定法が改善されたり、新たに可能になってきた。我々は、磁場勾配パルスを有効にコヒーレンス選択に用いた測定法として、天然存在比で測定可能な^{15}N HMBC法や^{13}C-^{13}C DQFCOSY, INADEQUATEについて報告してきた[1)]。また安定同位体で標識が困難で3D-NMR法を用いることが出来ない化合物の解析を目的に開発したselective 2D-PFG-TOCSY-HMQC, TOCSY-HMQC-COSY,TOCSY-HMBC法について昨年度の本討論会で報告した[2)]。今回は最近報告されたGOESY[3)]で用いられた選択的磁場勾配エコーを利用したselective 1D-TOCSY[4)]を２次元NMR法に組み込んだselective 2D-TOCSY-COSY, TOCSY-ROESY, TOCSY-HMQC, TOCSY-HMBCについて報告する。

T. Fäcke とS. Bergerによって報告された、selective 1D-TOCSYのパルス系列を以下に示す[4)]。　　90°(x) - G1- 180°(x, selective) - G2 - MLEV16 - τ - 180°(x) - G3 - Acq.

このパルス系列を２次元NMR法のCOSY, ROESY, HMQC, HMBC の最初の90度パルスと置き換えてselective 2D-TOCSY-COSY[5)], TOCSY-ROESY[6)], TOCSY-HMQC, TOCSY-HMBCのパルス系列を作成した。モデル化合物としてstrychnineを用いて測定した結果を以下に示す。Fig. 1はselective 2D-TOCSY-ROESYの部分拡大図で4.29ppmを選択したスペクトルである。対角線上のピークにはTOCSYで磁化が移動したプロトンの信号が現われ、さらにそこからROESYの相関ピークはF2軸と平行に２次元に展開されて現われる。比較のために4.29ppmを選択した1D-TOCSYおよび1D-ROESYと3.86ppmを選択した

キーワード　：Selective 2D experiment, TOCSY, ROESY, PFG, homo spin decoupling

こしの　ひろゆき、　うざわ　じゅん

1D-ROESYのデータを示す。Fig. 2には4.29ppm を選択したselective 2D-TOCSY-HMQCのデータを示す。TOCSYで磁化移動したプロトンのみにHMQCの相関ピークが現われる。Fig. 3には今回作成したselective 2D-TOCSY-HMQCのパルス系列を示す。これは昨年報告した選択的ガウス型180度パルスをon/offさせて２次元の差スペクトルをとる方法[2a]よりも、今回報告するパルス系列の方が差スペクトルではないので　t1ノイズがでにくい。また選択的反転パルスの磁場勾配エコーを利用しているので選択性に関しても優れている。

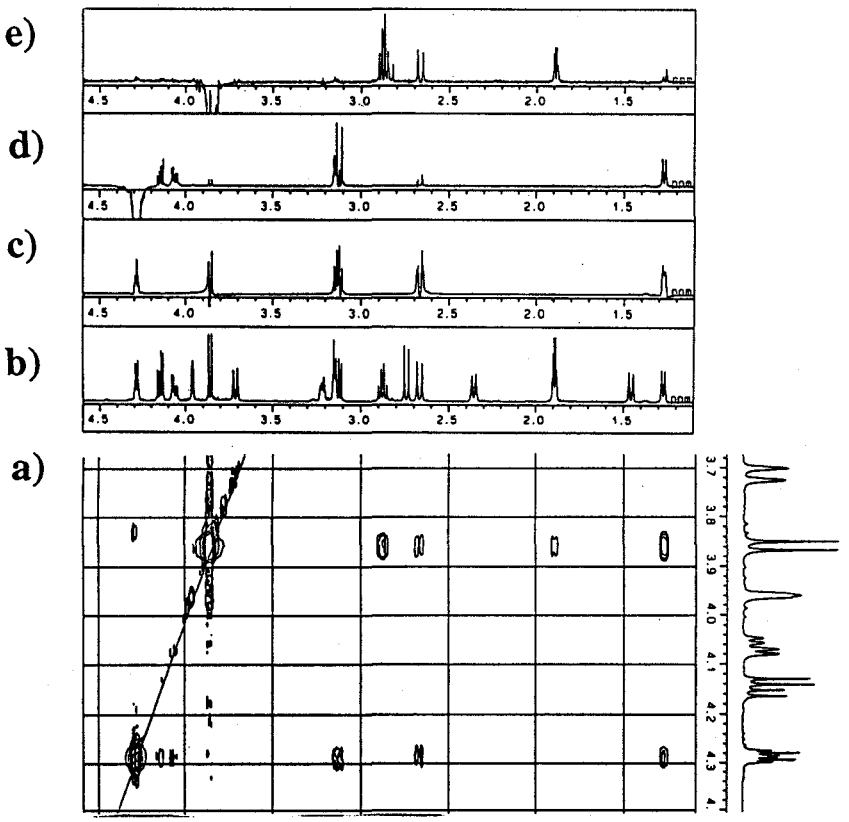


Fig. 1 a) Expanded selective 2D-TOCSY-ROESY spectrum of strychnine(40mg in $CDCl_3$). 68ms Gaussian 180° pulse were used for selection of 4.29ppm proton. Using mixing time were 180ms and 400ms for TOCSY and ROESY mixing respectively. Total acquisition time was 4hr 26min. b) 600MHz ^1H spectrum of strychnine. c)Selective 1D-TOCSY spectrum. 4.29ppm signal was selected. d)Selective 1D-ROESY spectrum. 4.29ppm signal was selected. e) Selective 1D-ROESY spectrum. 3.86ppm signal was selected.

磁場勾配エコーを利用した1D-selective TOCSY[4]やROESY[7]は差スペクトルをとらないので消え残り信号がなく、以前の差スペクトルよりもスピン結合定数を１次元スペクトルから読みやすくなった。そこでこの特徴をより活かすために、1D-selective TOCSYとROESYについてホモスピンデカップリングを併用することをこころみたところ良好な結果がえられた。Fig. 4に2.83ppmを選択したROESYとさらに1.36ppmを照射したホモスピンデカップリングを併用した結果を示す。ホモスピンデッカプリングは分裂パターンの単純化や結合順序の解析に有効であり、TOCSYの場合にはスピン結合が小さいためにTOCSYで効率良く磁化移動出来ない部分の結合を確認するなどの応用が可能である。

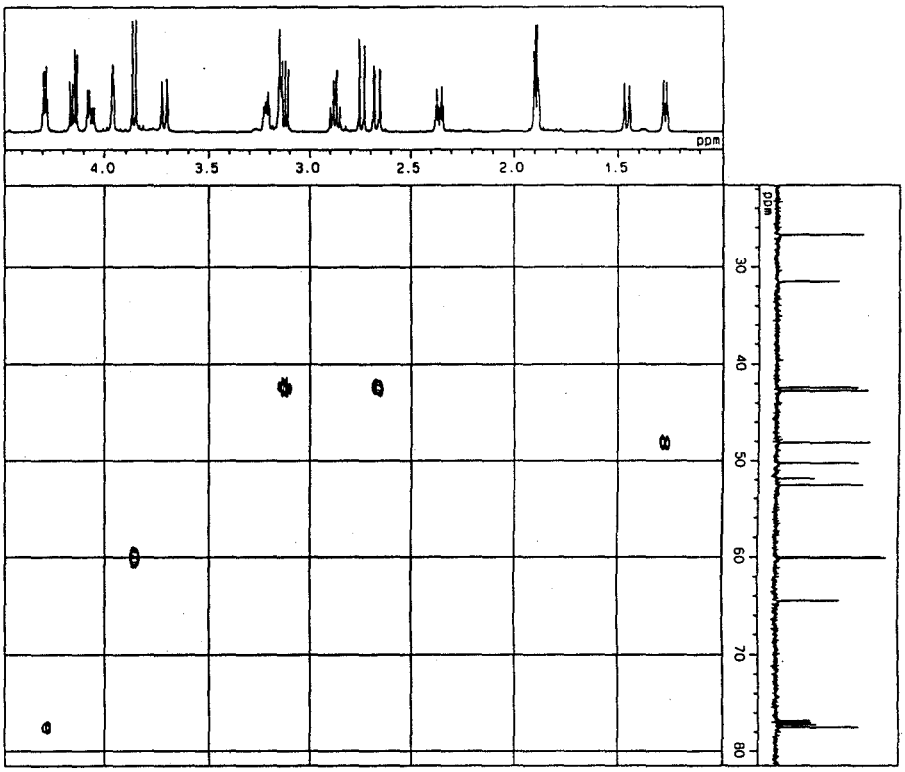


Fig. 2 Expanded selective 2D-TOCSY-HMQC spectrum of strychnine. 68ms Gaussian 180°pulse were used for selection of 4.29ppm signal. Using TOCSY mixing time was 180ms. Total acquisition time was 3hr16min.

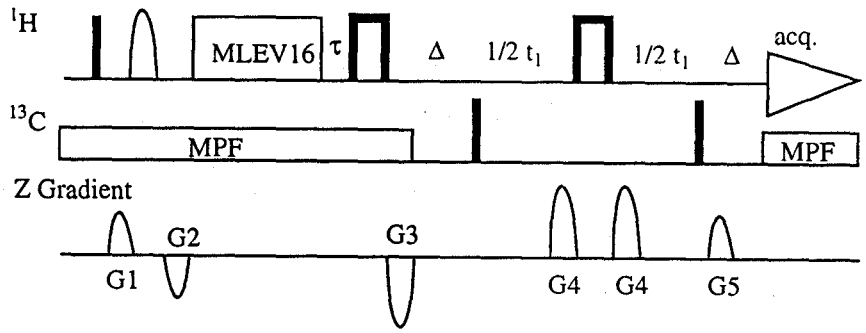


Fig. 3 Pulse sequence for selective 2D-TOCSY-HMQC. The narrow bars represent 90°pulse and the large bars correspond to 180°pulses. The second pulse is a 180°selective Gaussian pulse. Used gradient ratio is G1 : G2 : G3 : G4 : G5 =1 : -1: -2 : 4 : 2 with 1ms duration.

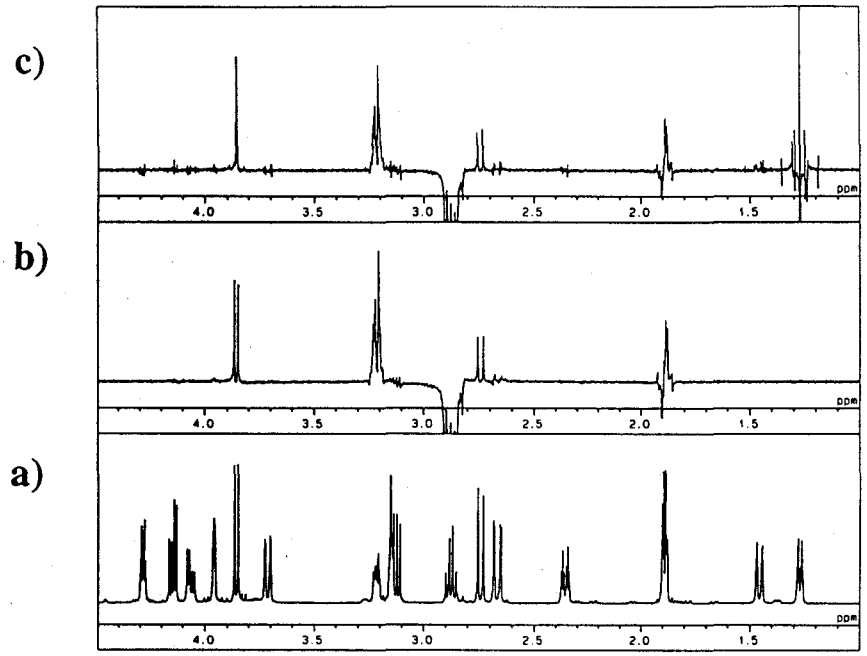


Fig. 4 a) ^{1}H spectrum of strychnine. b) Selective 1D-ROESY spectrum. 2.83 ppm signal was selected. c) Selective 1D-ROESY spectrum with homo spin decoupling. 2.83 ppm signal was selected for ROESY and 1.36ppm was irradiated for decoupling.

最近GOESYが報告されて以来、従来の1次元測定法が見直され、また1次元のTOCSY-NOESY, TOCSY-ROESY,COSY-NOESYなども報告されている[8]。今回報告した測定法は1D selective TOCSYの2D NMR法への応用であるが、TOCSYで磁化移動するスピン系の内、最低ひとつのシグナルが分離していれば残りのシグナルが複雑に他のシグナルと重なっていてもその部分構造を詳細に解析することを可能にするものである。今後、安定同位体で標識が困難な糖鎖や複雑な天然物の解析に応用されるものと期待される。

1a)鵜澤　洵、越野広雪　第33回NMR討論会講演要旨集 121頁(1994). 1b)J. Uzawa and H. Koshino, 36th ENC Abstracts p115(1995). 1c) H. Koshino and J. Uzawa , 12th ISMAR Abstracts (1995).

2a)越野広雪、鵜澤　洵　第33回NMR討論会講演要旨集 125頁(1994). 2b)H. Koshino and J. Uzawa 36th ENC Abstracts p115(1995).

3)J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler and A. J. Shaka J. Am. Chem. Soc., 116, 6037(1994).

4)T. Facke and S. Berger, J. Magn. Reson. A 113, 257(1995).

5a)J. M. Nuzillard and G. Massiot, J. Magn. Reson. 91, 380(1991). 5b)降旗一夫、瀬戸治男　第28回NMR討論会講演要旨集 83頁(1989).

6)H. Kessler, G. Gemmecker and B. Haase, J. Magn. Reson. 77, 401(1988).

7)C. Dalvit, J. Magn. Reson. A 113, 120(1995).

8)P.Adell, T. Parella, F.Sanchez-Ferrando and A. Virgili, J. Magn. Reson. A 113 124(1995).

P52

一次元，二次元ＮＭＲの自動位相補正

(日本電子) ○宮林延良，河野静江，内海博明，日元微

Automatic Phase Correction for One- and Two-dimensional NMR Spectra

(JEOL Ltd.) ○ Nobuyoshi Miyabayashi, Shizue Kohno, Hiroaki Utsumi, Tetsu Hinomoto

NMR spectrum has a phase shift represented in a polynomial of frequency for each observed axis of that. High order terms of polynomial are canceled by simulating causes of phase shift; delay time of measurement, analog filter, off-resonance effect in pulses.Constant (0 order) term of polynomial is canceled by analyzing maximum distribution of data points on baseline and signal foot of the spectrum after simulation. This approach gives one- or two-dimensional spectrum enough to analyzing it.

1 序文

NMRスペクトルは，全ての観測軸に対して，観測周波数の多項式で表される位相シフトを持っている．各々の観測軸に対して，位相シフト$\Phi(\omega)$の完全な表記は，

$$\Phi(\omega) = P0 + \omega P1 + \omega^2 P2 + \cdots \quad (1)$$

である．ωは角周波数，$P0, P1, P2$は0次，1次，2次の位相補正係数である [1].

現在，利用可能な自動位相補正プログラムは，位相補正係数の決定問題を簡単にするため式(1)を一次式で近似している．そしてそれらは，複数の信号のDISPA円 [2] の方向をモデル円のフィッティングによって求め，その方向が一次式を満足するように最小二乗法を用いて位相補正係数を決定している．しかし，この種の方法は以下の欠点を持っている．

1. 一次式による近似では，スペクトルの両端20%の範囲にある信号の位相を完全に補正できない．
2. ひとつの信号を構成するNMRデータ点の数が少ないと，誤ったDISPA円のフィッティング結果を与えることがある．
3. DISPA円のフィッティングに際して，オーバーラップのない信号のみを選択する必要がある．
4. 選択された信号の数が少ないと，最小二乗法によって決定された位相補正係数が最適でないことがある．

一次元ＮＭＲ，二次元ＮＭＲ，自動位相補正

みやばやしのぶよし，こうのしずえ，うつみひろあき，ひのもとてつ

これらの問題を解決する方法として，位相シフトの高次項をその原因をシミュレーションすることによって補正し，0次項をベースラインと信号のすそ部分を構成するNMRデータ点の最大分散方向から決定・補正するアルゴリズムを開発した．この方法は一次元NMR[3]のみならず，二次元NMRにも適用可能である．

2 実験

二次元NMRの位相シフトの原因は，F2軸とF1軸において異なる (Table1)．F2軸の

Table 1: Causes of phase shift

	F2 axis	F1 axis
Delay Time	○	○
Analog Filter	○	
Off-resonance Effect	○	○
Carrier & Reference	○	

位相シフトは，測定の遅延時間，周波数フィルタ，オフレゾナンス効果，キャリア波と検波参照波の位相差の4つを原因とする．一方，F1軸の位相シフトは，測定の遅延時間とオフレゾナンス効果の2つを原因とする．一次元NMRでは，二次元NMRのF2軸と同様の位相シフトを持つ．これらの原因のうち，測定の遅延時間，周波数フィルタ，オフレゾナンス効果は，観測軸の周波数の関数で高次の位相シフトのみを生じる．またキャリア波と検波参照波の位相差は，周波数に依存しない0次の位相シフトを生じる．このことより，式 (1) から次式が導かれる．

$$\begin{aligned} \Phi_{F2}(\omega_{F2}) &= \phi^{dt}_{F2}(\omega_{F2}) + \phi^{af}_{F2}(\omega_{F2}) + \phi^{of}_{F2}(\omega_{F2}) + \phi^{cr}_{F2} \\ \Phi_{F1}(\omega_{F1}) &= \phi^{dt}_{F1}(\omega_{F1}) + \phi^{of}_{F1}(\omega_{F1}) \end{aligned} \tag{2}$$

測定の遅延時間 t_d と位相シフト $\phi^{dt}(\omega)$ の関係は，

$$\phi^{dt}(\omega) = \omega t_d \tag{3}$$

である．この式により $\phi^{dt}(\omega)$ を t_d から計算した．F2軸に対しては測定遅延時間を用い，F1軸に対しては展開時間の初期値を用いた．

周波数フィルタの設計式は，

$$T(\omega) = \prod_{k=1}^{2} \frac{Q_k^2}{(i\omega/\omega_c)^2 + (\Omega_k/Q_k)(i\omega/\omega_c) + \Omega_k^2} \tag{4}$$

が良く使われる．$T(\omega)$ はフィルタの通過特性，ω_c はカットオフ周波数，Ω_k と Q_k は設計定数である．次式を用いて $\phi^{af}(\omega)$ を $T(\omega)$ から計算した．

$$\exp\{i\phi^{af}(\omega)\} = T(\omega)/\mid T(\omega) \mid \tag{5}$$

オフレゾナンス効果による位相シフト$\phi^{of}(\omega)$は，二次元NMRの場合マルチパルス実験であるため，単一の数式による計算で求められない．そこで観測軸の全てのNMRデータ点に$M(\omega)=(0,0,1)^T$なる核磁気モーメントを仮定し，それらが観測核に与えられるパルスによってどのように運動するかを追跡した．追跡の完了した$M(\omega)$の回転座標系上のX, Y, Z成分の比率から，個々のNMRデータ点の位相シフトを計算した．

キャリア波と検波参照波の位相差は，NMR分光計のチューニング状態によって左右される．従って，位相シフトϕ^{cr}は数式化できない．本法では，F2軸とF1軸の高次位相シフトをシミュレーションにより補正したスペクトルに対して，ベースラインと信号のすそを構成するNMRデータ点の複素空間における最大分散方向を解析した．ϕ^{cr}の補正されたスペクトルでは，これらのNMRデータ点が複素空間の虚軸に一致する方向に最も分散することを利用した．最大分散方向を決定するのに，一次元NMRの場合はスペクトル全域を，二次元NMRの場合は信号の存在するF2軸スライスを連結した仮想一次元NMRを用いた．まず全てのNMRデータ点に対して隣りあったNMRデータ点を結ぶベクトルを想定し，さらに隣り合うベクトル同志の外積を計算する．これらの外積は，信号上では必ず正になり，ベースラインや信号のすそ部分では正・負になる．従って外積が負になるNMRデータ点のみを選択すれば，ベースラインと信号のすそを構成するNMRデータ点を取り出したことになる．取り出されたNMRデータ点に対して，複素空間上で主成分分析を行なうことにより，データ点の最大分散方向を決定した．最終的に最大分散方向を虚軸に一致させるだけ，スペクトル全体を回転させてϕ^{cr}を補正した．

3 結果と考察

Fig.1に，位相補正を実施したDQF-COSYスペクトルを示した．メッシュの信号は，負の強度を示している．信号強度が正負反転しているが，十分にスペクトルを解析できる程度で位相補正が完了している．信号強度の反転は，ϕ^{cr}の決定アルゴリズムが信号強度を考慮できないためである．

Fig.2に，位相補正を実施したNOESYスペクトルを示した．これもメッシュの信号が，負の強度を示している．NOESYスペクトルは，微弱な負の信号の積分値が必要なので十分な位相補正を要求するが，そのために十分な精度で位相補正が完了している．

参考文献

[1] J. J. van Vaals, P. H. J. van Gerwen: *J.Magn.Reson.*, **86**,127(1990).

[2] D. T. Degg, D. M. Doddrell, M. R. Bendall: *J.Chem.Phys.*, **77**,2745(1982).

[3] 宮林延良: *BUNSEKI KAGAKU*, **44**,549(1995).

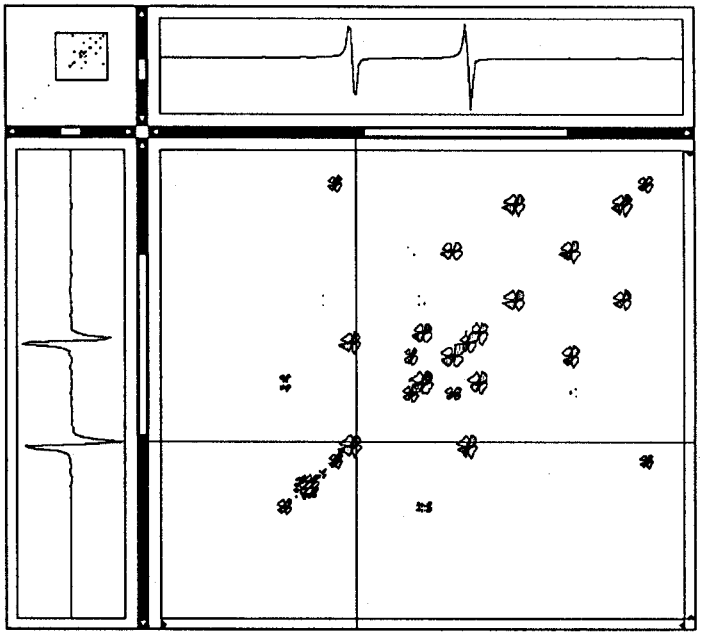


Fig. 1: DQF-COSY spectrum of 20mg strychnine in 0.5ml $CDCl_3$

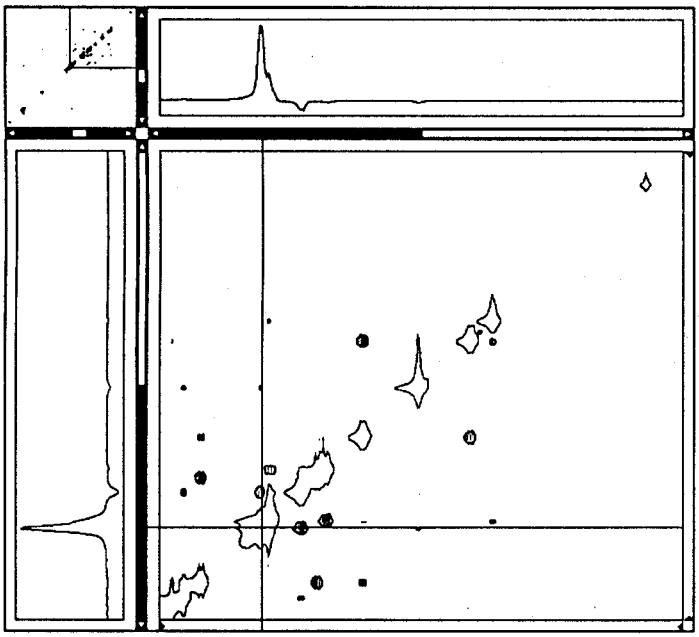


Fig. 2: NOESY spectrum of 20mg strychnine in 0.5ml $CDCl_3$

P53　誘電体共振器型マイクロ波温度ジャンプNMR検出器の開発

神戸大学大学院自然科学研究科
○川上　勝、鎌足　雄司、藤原　健一郎、赤坂　一之

Development of a microwave temperature-jump NMR probe using dielectric resonator

The Graduate School of Science and Technology,Kobe Univercity

Recently,we have devised a new type NMR probe using dielectric resonator as a microwave mediator. With this new technique,we have been able to realize some 15 ℃ temperature-jump in an aqueous environment in only a few tens of milliseconds,and showed,for the first time,that the unfolding of the entire polypeptide chain of ribonuclease A takes place within 25 ms.

はじめに）　当研究室では数年来マイクロ波を用いた温度ジャンプNMR法の開発に取り組んできた。液晶試料に対しては、すでに安定した動作をみせている。しかしタンパク質試料といった水溶液系に対しては、これまでのプローブ（RFとマイクロ波の2重コイル方式）では以下のような問題点があった。

1．マイクロ波のチューニングを銅板コイルの形状を変えることにより調節していたため、マイクロ波照射効率の最適化が難しい。
2．大出力のマイクロ波を照射したときに放電が起こり、ラジオ波コイル、マイクロ波コイル両方にダメージを与えてしまうなど、安定した動作が困難である。
3．ラジオ波コイルとマイクロ波コイルとの干渉が大きいためラジオ波コイルの形状の制限が大きく、この結果としてラジオ波の感度の低下、磁場の不均一によるスペクトルの分解能の低下を起こす。

そこで本研究では、新たに誘電体共振器をこの系に導入し、開発を行った。

装置の改良）　図1に新しい温度ジャンプNMRプローブを示す。それまでのプローブではマイクロ波の導体として銅板をコイル状にしたものを試料と検出器コイルとの外側に巻きつけてマイクロ波を照射していたが、この方式を廃止し、新たにマイクロ波発生装置の周波数（2.46　GHz）と同じ特性周波数を持つ誘電体共振器を作成し、ループ状にしたマイクロ波回路とカップリングさせることによって、この空洞部分にマイクロ波を集中させるとともに、試料管にはシゲミ製の特殊セルを用い、空洞部分のみに試料を集中させるようにして、マイクロ波を効率よく照射させる方式をとった。使用した誘電体共振器は村田製作所の好意によって作成されたもので、誘電率38を持ち、波長12.5 cmのSーバンドマイクロ波をおよそ～1／30に短縮してプローブ内に閉じ込める効果を持つ。この方式ではラジオ波コイルの形状のマイクロ波回路への影響が少ないことがわかったので、ラジオ波コイルは市販のものと同じサドル型にすることができ、分解能、感度を向上させることができた。

実験）　このプローブを使ってタンパク質水溶液に温度ジャンプを試行し、すぐにシグナルの取り込みを行うという1次元温度ジャンプNMR実験を行った。試料は重水中より2回凍結乾燥したribonucleaseA (Sigma,type XII-A)を用い、試料溶液は100 mg protein/mg,0.15 M KCl,pH 1.0に調製した。このとき

キーワード：温度ジャンプNMR、誘電体共振器、ribonucleaseA、熱変性

かわかみ　まさる、かまたり　ゆうじ、ふじわら　けんいちろう、あかさか　かずゆき

ribonucleaseAの変性中点は43 ℃である。観測にはJEOL LA-400型ＮＭＲ分光計を用いた。観測条件はポイント数 4096、観測幅5000 Hz、積算回数 16 回、ダミー 4 回、積算間隔 80 秒とし、試料を32.5 ℃に保ち、30 Hzでスピニングさせながら、マイクロ波を25 msec照射して温度ジャンプを行った。

結果）　温度指標としてＨＤＯピークの化学シフトを用い、得られたスペクトルを解析した結果、わずか２５ミリ秒のマイクロ波照射によって平均１０ ℃以上の温度上昇がみられ、このときすでに、ribonucleaseAのＮＭＲ信号はジャンプ前とは大きく異なり、ランダムコイル状態とよく似た形状を示していた（図２）。このことから、ribonucleaseAは熱変性によって非常に短い時間内に高次構造が壊れるということを初めて確認したことになる。

考察）　今回開発した装置は安定性、感度、ジャンプ効率、分解能の全てにおいて以前のものに比べ大きく改善された。また、数十ミリ秒以内の短時間でのジャンプが可能となったことにより、タンパク質のアンフォールディングおよびフォールディングの中間体をＮＭＲによって観測することが現実のものとなってきた。

謝辞）　誘電体共振器の使用を勧めてくださったスイスＥＴＨのSchweiger博士、誘電体共振器の設計製作において種々御協力いただいた村田製作所原材料事業部の阿部博次氏に感謝いたします。

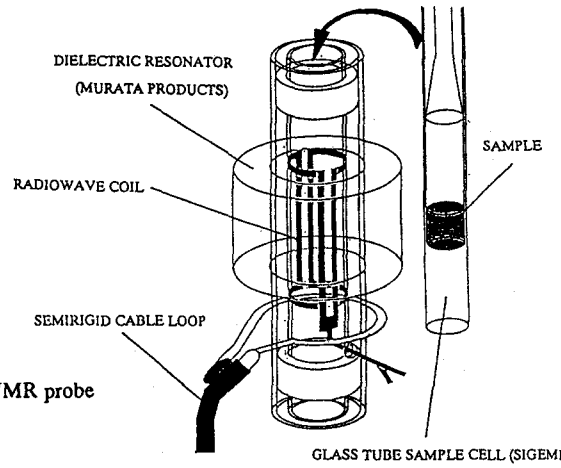


Fig. 1. New Temperature-jump NMR probe

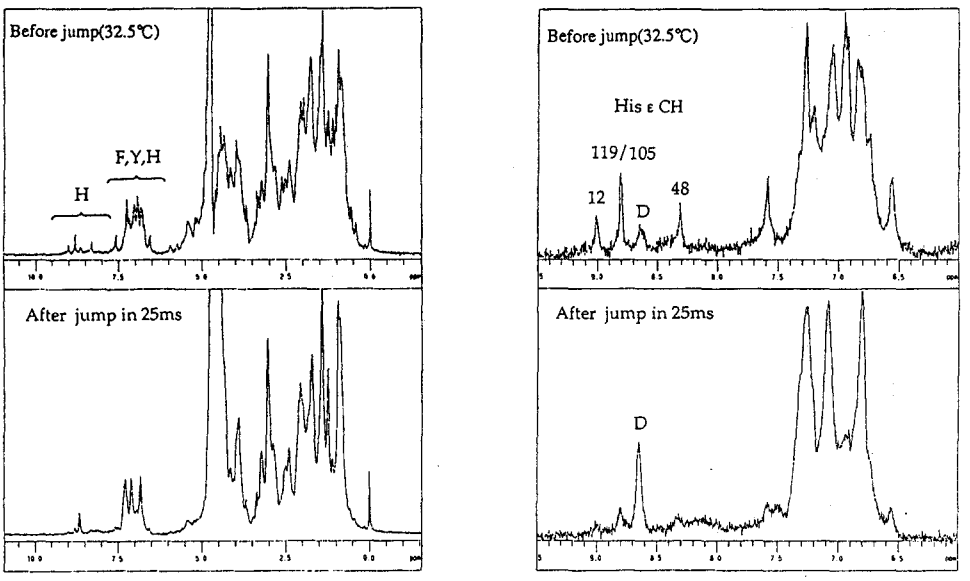


Fig. 2. 1-D TJ NMR spectra of ribonucleaseA

P54

高圧 NMR による蛋白質の変性状態の解析

○山口 徹、神村耕二、山田博昭、赤坂一之
神戸大学大学院自然科学研究科物質科学専攻

High Pressure NMR Study of Denatured States of Proteins

○T.Yamaguchi, K.Kamimura, H.Yamada and K.Akasaka
The Graduate School of Science and Technology, Kobe University

On-line high pressure NMR system has been developed for measurement of denaturation of proteins in aqueous solution. This system is advantageous over the glass cell method in that measurement under constant pressure can be conducted. By this system, cold denaturation of ribonuclease A was observed.

我々は、1) 高圧NMRの手法の開発および改良、および 2) 高圧NMRの蛋白質の変性状態の解析への応用を目的に研究を行っている。昨年の年会では、2) に関して、熱膨脹型高圧セル[1]を用いて1-2000 atmの範囲で圧力と温度を変えて蛋白質 ribonuclease A の構造安定性を調べた研究について報告した[2]。これにより、ribonuclease A の変性に際して起こる熱容量の増加分 (ΔCp) が圧力とともに減少することを初めて見出し、圧力変性における疎水水和の寄与について一石を投じた[3]。この熱膨脹型高圧セルは測定自体に関しては通常のNMR測定と全く同様に行うことができるので、高圧力の下での測定には適しているが、温度可変実験を行なう場合、温度を変えることによってセル内部の圧力までもが変化するという難点がある。この内圧の変化については既に較正曲線が得られており、解析の段階で補正することが可能であるので、この熱膨脹型高圧セルを用いて、例えば、一定圧力の下での熱力学関数を求めることも可能である[3]。しかしながら、厳密に定圧力の下での実験を行うためには、別の方法で行う必要がある。今回我々は上記の1) に関連して、試料セルを直接に加圧ポンプにつないで測定を行う装置を蛋白質水溶液に対して応用し、一定圧力の下での実験を可能にした。

装置の概要をFig. 1.に示す。試料を封入するセルの部分は基本的には熱膨脹型高圧セルと同様であるが、圧力媒体側の端は配線を通じてハンドポンプにつながっていて、Heise ゲージでセルの内圧を直接確認することができる。この方法でもNMRプローブ自体に改造を加えることなく測定を行うことが可能である。

Keywords : high pressure NMR, ribonuclease A, cold denaturation, pressure denaturation, protein stability

やまぐちとおる，かみむらこうじ、やまだひろあき，あかさかかずゆき

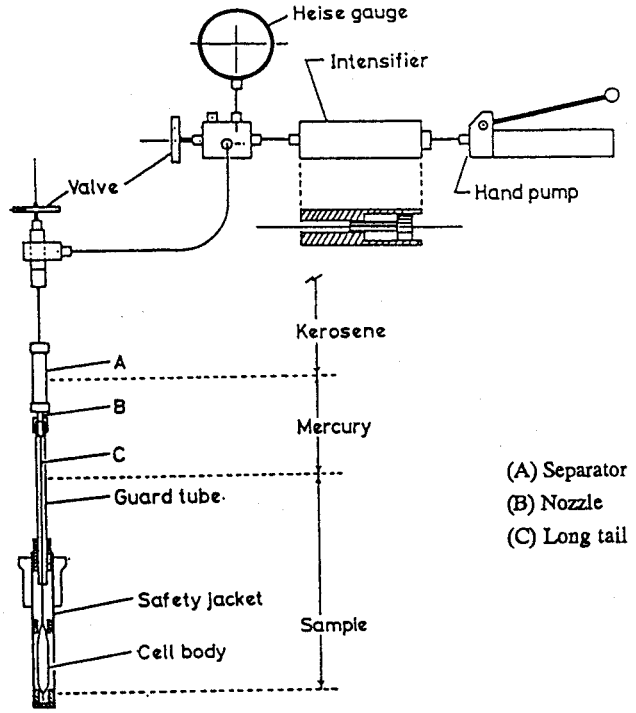


Fig. 1. Block diagram of a on-line high pressure NMR system.

この装置を用いて一定圧力の下で温度を変えて測定したスペクトル (His ε 領域) をFig. 2.に示す。測定には JEOL GX-400 NMR分光計を用い、試料として用いたのは先の熱膨脹型高圧セルでの実験に用いたものと同じ ribonuclease A の水溶液 (90 mg protein/ml, 0.15 M KCl, pH 1.0) である。

このスペクトルから、一定圧力(2000 Kg/cm^2)の下で温度を0°Cから-15°Cへ下げると変性状態に由来するピークが大きくなっていることがわかる。これは低温変性が起こっていることを示している。前回の実験で用いた熱膨脹型高圧セルでは、40°Cで2000 atmであった内圧は0°Cまで温度を下げると約400 atm圧力が低下し、このために今回の加圧ポンプ式で見られたような低温変性現象は顕著には観測できなかった。よりS/Nを向上して熱力学関数を用いた解析を行なうため、試料セル部分の改良を行っている。

このように、今回の実験で蛋白質溶液を含む試料セルを直接に加圧ポンプにつないで測定を行うことが可能になったことにより、我々の高圧NMRの測定は蛋白質の圧力変性についての知見を得るための方法としてさらに大きく前進した。なお、この加圧ポンプ式の手法の改良とともに、熱膨脹型高圧セルによる種々の蛋白質の圧力変性の熱力学的解析も現在進行中である。

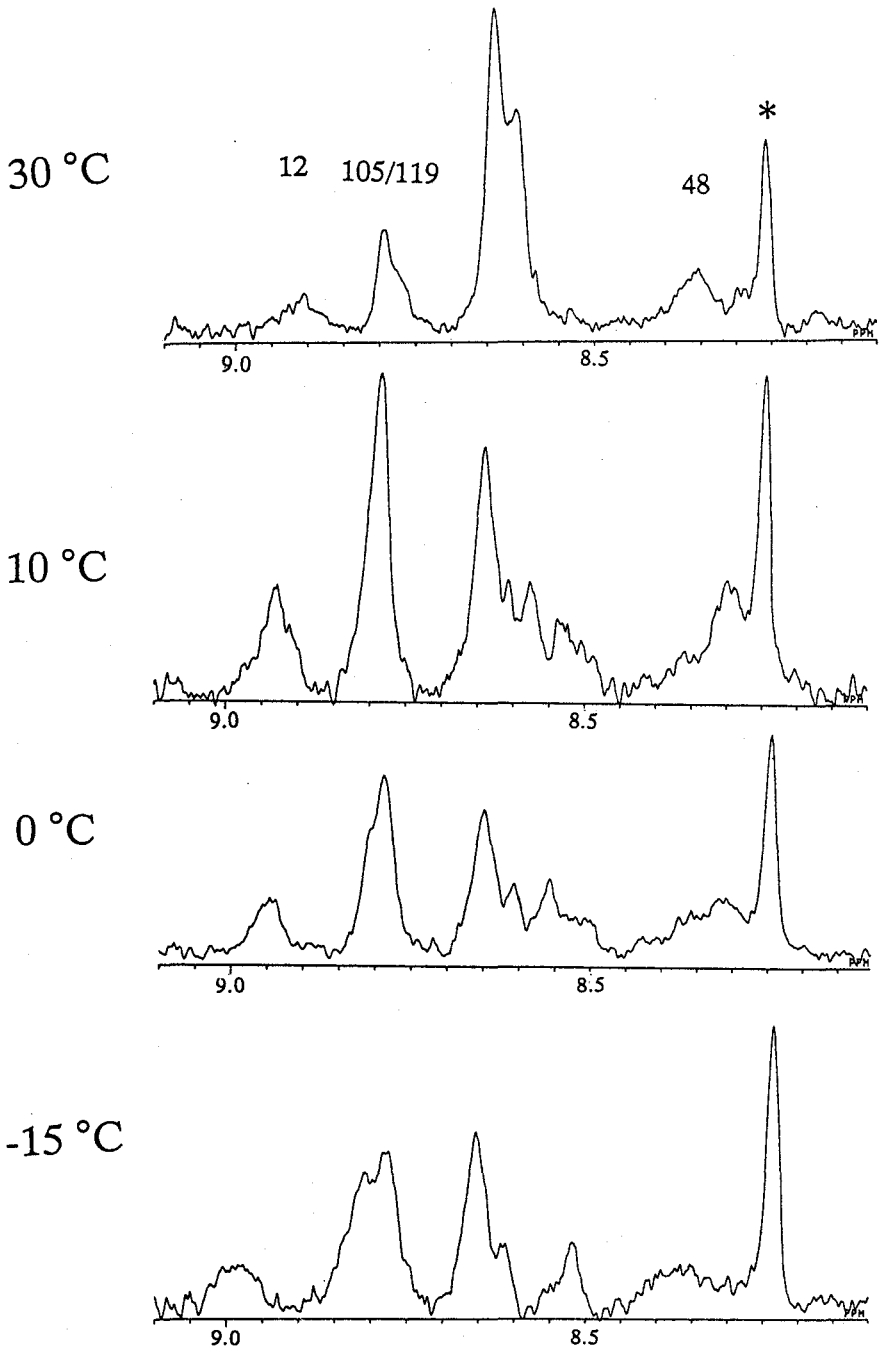


Fig. 2. The His ε proton region of the ^{1}H NMR spectrum of ribonuclease A under a constant pressure (2000 Kg/cm^2) and various temperatures (as indicated to the left of each spectrum) measured at 400 MHz at various temperatures. The number on each peak specifies the number of His residue. * indicates an impurity signal.

文献

1. H.Yamada, K.Kubo, I.Kakihara and A Sera (1994). in Y.Taniguchi, M.Senoo and A.Hara eds., "*High pressure Liquids and Solutions.*", 49-66, Elsevier.
2. 山口徹, 山田博昭, 赤坂一之. 第33回NMR討論会, 1994.11. (神戸).
3. T.Yamaguchi, H.Yamada and K.Akasaka (1995). Thermodynamics of unfolding of ribonuclease A under high pressure. A study by proton NMR. *J. Mol. Biol.* **250** 689-694.

P55

塩化ドデシルアンモニウム-水二成分系液晶における $^{1}H,^{2}H,^{17}O,^{35}Cl$ の NMR スペクトルと緩和

(筑波大・化) ○田中 晋、山室 憲子、石丸 臣一、池田 龍一

$^{1}H,^{2}H,^{17}O,^{35}Cl$ NMR Spectra and Relaxation in a Liquid Crystal Phase of Dodecylammonium Chloride-Water System

(Department of Chemistry, University of Tsukuba)
Susumu Tanaka, Noriko Yamamuro, Shin'ichi Ishimaru and Ryuichi Ikeda

Solid dodecylammonium chloride(DACl) transforms at 347 K into a "rotator phase" in which the axial rotation and two-dimensional self-diffusion of cations take place. In DACl-water system, a lamellar-type liquid crystal phase is obtained above room temperature. This phase is formed even in a mixture containing a few water molecules per DACl molecule. ^{1}H, ^{2}H, ^{35}Cl and ^{17}O NMR measurements were carried out to investigate the dynamics and structure in the lamellar phase of DACl-water system and compare with those in the rotator phase of DACl crystal. From the analysis of NMR data, it was found out that molecular motions of dodecylammonium ions in the lamellar phase are quite similar to those in the high-temperature rotator phase.

塩化ドデシルアンモニウム (以下 DACl と略記) の結晶は、347~458 K の温度範囲で Rotator 相 (低次元柔粘性結晶相) を形成する。この DACl に水を加えた二成分系は、水の濃度が 10~50 wt%程度のものについて、約 300 K 以上でラメラ型の液晶相を形成する。本研究では、DACl 結晶と比較しながら、DACl-H_2O 二成分系液晶における構造と分子運動を明らかにすることを目的とした。特にこの二成分系は一個の DACl 分子に対し二、三個程度の水分子しか含まない高濃度領域においても液晶相を形成するので、比較的水の濃度の低い液晶相に着目し、$^{1}H,^{2}H,^{17}O,^{35}Cl$ NMR 測定を行った。

^{1}H, ^{2}H, ^{35}Cl NMR 測定では、DACl の-NH_3^+の^{1}H を重水素に置換した試料 DACl-d_3 と D_2O の二成分系を用いた。^{17}O NMR 測定では水分子の運動のみを観測するために、^{17}O 濃縮水 (ICON 社製 $H_2{}^{17}O$ 10 atom %) と DACl の二成分系試料を使用した。^{1}H NMR 測定には BRUKER 社製 SXP-100 分光器を使用し、^{1}H 核のラーモア周波数 40.0 MHz、測定温度範囲 118~417 K において、吸収線幅の二次モーメント M_2、スピン-格子緩和時間 T_1 を測定した。^{1}H 以外の核については BRUKER 社製 MSL-300 分光器を使用し、^{2}H, ^{35}Cl, ^{17}O 核のラーモア周波数 46.073, 29.407, 40.686 MHz、測定温度範囲 155~380 K にて NMR スペクトルおよび^{17}O の T_1、スピン-スピン緩和時間 T_2を測定した。

Key Words: Solid State NMR, $^{1}H,^{2}H,^{17}O$ and ^{35}Cl NMR Spectra, Liquid Crystal, Dodecylammonium Chloride, Rotator Phase

○たなかすすむ、やまむろのりこ、いしまるしんいち、いけだりゅういち

クロスニコル状態の偏光顕微鏡による観察およびX線回折の測定から、液晶相ではラメラ型の層状構造が保たれているが、層面内の並進秩序は失われていることが分かった。液晶相における^{1}H の M_2、^{2}H および^{35}Cl の核四極子結合定数 e^2Qqh^{-1}では、結晶の Rotator 相とほぼ等しい値が得られた。したがって、高濃度液晶相でのアルキルアンモニウムイオンの運動状態は基本的に結晶 Rotator 相中と変わらず、アルキル鎖の乱れた一軸回転と層内の二次元拡散と考えられる。

^{2}H の e^2Qqh^{-1}については液晶相で 17.5 kHz 前後と 8 kHz 以下の異なった二種類の値が得られ、NMR スペクトルの面積比より前者を-ND_3^+基の重水素によるもの、後者を D_2O の重水素によるものと帰属した (Fig.1)。-ND_3^+基の e^2Qqh^{-1}は液晶相の転移点直上で温度上昇とともに増加した。この傾向は^{35}Cl 核にも見られた。一方 D_2O については、転移点直上に限らず液晶相の広い温度範囲で、e^2Qqh^{-1}が温度上昇とともに徐々に増加し続けた。^{17}O 核でも同様の傾向が見られ (Fig.2)、転移点直上とより高温側の液晶相で異なった構造を持つ可能性がある。

さらに^{17}O の T_1は液晶相と自由水で値は異なるが、温度変化はよく似た傾向を示した (Fig.3)。活性化エネルギー E_aは W_{H_2O}=22.8, 30.7wt%の二成分系液晶相でそれぞれ 16.2, 18.8 kJ mol^{-1}となり、自由水での値 19.3 kJ mol^{-1}と近くなった。このことから液晶相に含まれる水と自由水で、緩和を支配している運動の速度は異なるが運動モードはよく似ていると推測される。

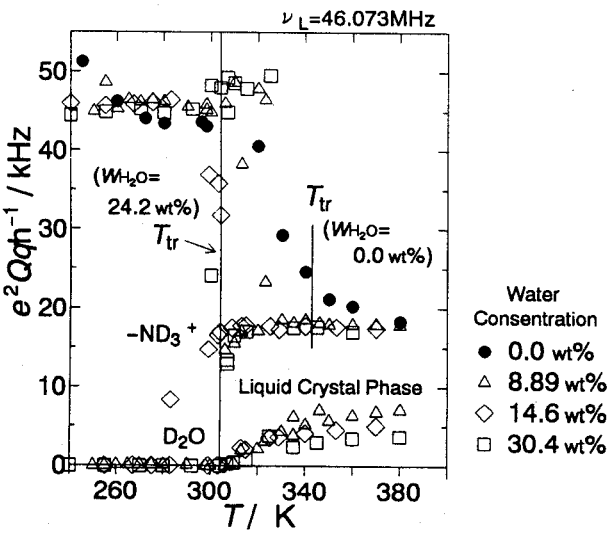


Fig.1 ^{2}H Nuclear Quadrupole Coupling Constant in DACl-d_3-D_2O System

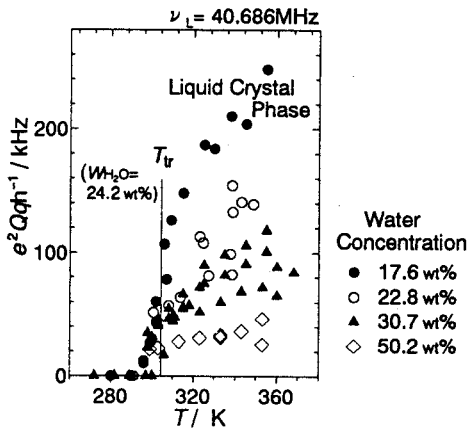


Fig.2 ^{17}O Nuclear Quadrupole Coupling Constant in DACl-$H_2{}^{17}O$ System

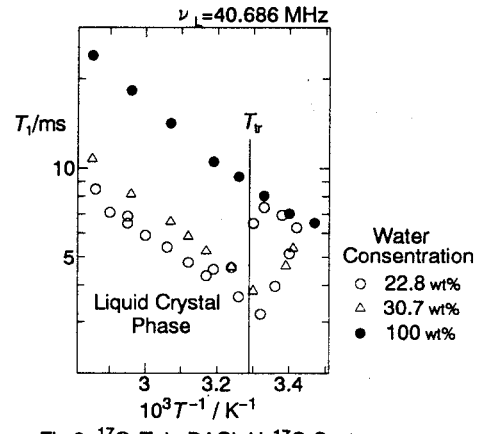


Fig.3 ^{17}O T_1 in DACl-$H_2{}^{17}O$ System

P56 ^{13}ＣＮＭＲによる反強誘電性液晶ＭＨＰＯＢＣのアルキル鎖の配向と運動の研究

分子科学研究所　○中井利仁、宮島清一

^{13}C NMR Study on the Orientations and Motions of Alkyl Chains in Anti-ferroelectric Liquid Crystal MHPOBC

Institute for Molecular Science, Toshihito Nakai and Seiichi Miyajima

The orientations and motions of alkyl chains in anti-ferroelectric liquid crystal MHPOBC were studied via the measurements of ^{13}C MAS and stationary NMR spectra as well as T_1. The alkyl chain involving the chiral carbon (chiral chain) of this compound was found to be bent with respect to the molecular axis in all the liquid-crystal phases, allowing the approach of the interlayer carbonyl groups to which the electric dipoles are attributed. In smectic-A phase, not showing anti-ferroelectricity, the bent chiral chain exhibits large-amplitude precession around the molecular axis. This motion becomes slow drastically in anti-ferroelectric smectic-C_A^* phase, exposing the dipoles perpendicular to the molecular axis and leading to the interlayer dielectric ordering.

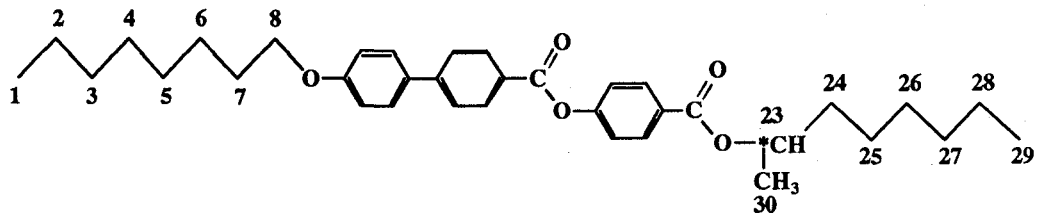
【序】一般に反強誘電性液晶では、分子が層構造をもつスメクティック相において、隣り合う層の間で誘電分極が反平行に秩序化している。この秩序形成が電気双極子間の直接の相互作用によって起こっているのならば、双極子を担うカルボニル基が層を越えた分子間で接近する必要がある。しかし、カルボニル基に連なるかさ高いアルキル鎖はこれを阻むように思われる。この問題を回避するためのひとつのモデルとして、少なくとも反強誘電性を示す相ではアルキル鎖は根元で大きく折れ曲がっているのではないかというアイデアが出された。このような折れ曲がりモデルの妥当性を判断することは、液晶における反強誘電性の発現機構を解明する上で重要であるが、これまで直接的な証左は得られていない。本研究の対象とするＭＨＰＯＢＣ（4-(1-methylheptyloxycarbonyl)phenyl 4'-octylbiphenyl-4-carboxylate）は液晶の反強誘電性が初めて発見された物質であり、液晶状態での分子構造に多くの関心が注がれて来た。ＭＨＰＯＢＣではカルボニル基に隣接してキラル炭素を含むアルキル鎖（キラル鎖）があり、このキラル鎖の折れ曲がりの有無が問題となる。本研究では広い温度範囲にわたって、ＭＡＳ（magic-angle spinning）させた試料に対する^{13}Ｃスペクトルおよび^{13}ＣT_1、また静止させた試料に対する^{13}Ｃスペクトルを測定することにより、折れ曲がりモデルの可否を明らかにし、さらにより詳細な分子の挙動に関する知見を得た。

キーワード：反強誘電性液晶、ＭＨＰＯＢＣ、^{13}ＣＮＭＲ

○なかい　としひと、みやじま　せいいち

【実験】試料は(*R*)-ＭＨＰＯＢＣおよび化学シフトの比較のために(*R*)-ＴＦ(trifluoro)ＭＨＰＯＢＣを、東工大福田敦夫教授から御提供頂いた。ＮＭＲ測定は日本電子製GSX-270分光計（^{13}Ｃ共鳴周波数 67.8 MHz）およびＭＡＳプローブを用いて行なった。特に断らない限り、^{13}Ｃ測定には^{1}Ｈ核からのＣＰ（cross polarization）を利用して信号感度を増加させ、また^{1}H decoupling パルス（RF磁場の強さ：約70kHz）を印加した。^{13}Ｃ T_1はＣＰ直後の磁化を $-z$ 方向に用意し、その回復から評価した。試料温度は加熱した圧縮空気を試料に送ることで室温から160℃まで変化させた；測定はいったん試料が等方液体相のスペクトルを示すまで昇温してから徐冷して行なった。ＭＡＳ実験における試料回転速度は 3 - 4 kHzである。

【結果と議論】ＭＨＰＯＢＣの分子構造とアルキル鎖中の^{13}Ｃ核の番号付け、および相系列は下の通りである。



Cry－(73℃)－SmC_A^*－(117℃)－SmC^*－(122℃)－SmA－(150℃)－Iso

反強誘電相　　強誘電相

^{13}Ｃ ＭＡＳスペクトル

図１にさまざまな温度で測定したＭＨＰＯＢＣの ^{13}Ｃ ＣＰＭＡＳスペクトルを示す；本研究で関心のあるaliphatic炭素に対する化学シフト領域のみを表示した。参考のため等方相に対するスペクトルを吸収線の帰属とともに示した。吸収線の帰属はまず類似の化合物の化学シフト値を参考にして行ない、残る曖昧さをＴＦＭＨＰＯＢＣのスペクトルを考慮して取り除いた；ＴＦＭＨＰＯＢＣでは側鎖メチル基の水素がフッ素置換されており、この置換により大きくシフト変化する吸収線をキラル鎖側の炭素に帰属させた。

図１より明らかなように、測定したすべての相に対して^{13}Ｃ化学シフト等方値に有為な変化は見られない。このことは折れ曲がりconformationが、強誘電相SmC^*あるいは反強誘電相SmC_A^*で突如出現するわけではないことを示唆している。

一方、SmA相からSmC^*、SmC_A^*相への変化は、スペクトル上ではいくつかの吸収線の強度の変化として現れている；たとえばC6とC25の相対強度はSmA相からSmC^*の相転移に伴い急激に変化している。この変化の主たる原因は、SmA相においてC25などキラル鎖中の炭素に対してＣＰが効果的でないためであることが、ＣＰを行なわないで得たスペクトルとの比較によりわかった（スペクトルは省略した）。これはSmA相でキラル鎖が^{1}Ｈ-^{13}Ｃ磁気双極子結合を振り切るような何らかの大振幅運動をしており、この運動がSmC^*、SmC_A^*相に転移することで極めて緩慢になることを意味する。このような効果は非キラル鎖中の炭素に対しては見られない。

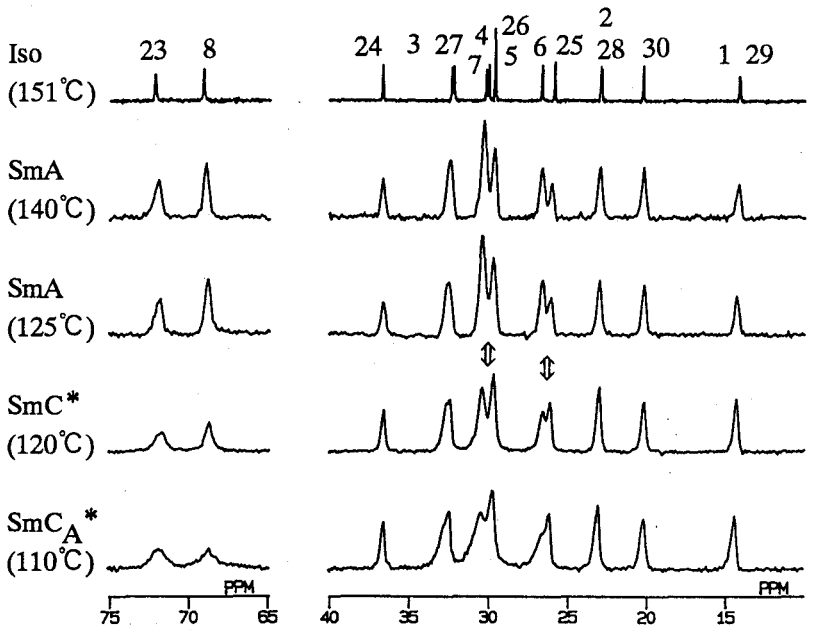


Fig.1 ^{13}C CPMAS spectra of MHPOBC.

^{13}C T_1

ＣＰ効率より明らかにされたキラル鎖と非キラル鎖の運動性の違いは、^{13}C T_1によってより明確に反映されることがわかった。図２にそれぞれの鎖中のいくつかの炭素に対する^{13}C T_1の温度変化を示す。温度降下に伴い、非キラル鎖中の炭素のT_1は相転移と無関係に減少し、この鎖の運動が徐々に遅くなることを示している。これに対し、キラル鎖中の炭素のT_1はSmA相で急激に減少し、SmC*、SmC$_A$*相ではほぼ一定になっている。すなわち、SmA相では大きな立体障害をもつ運動ー大振幅運動ーがキラル鎖に生じており、この運動はSmC*、SmC$_A$*相で（T_1の時間尺度で）凍結することが明らかになった。

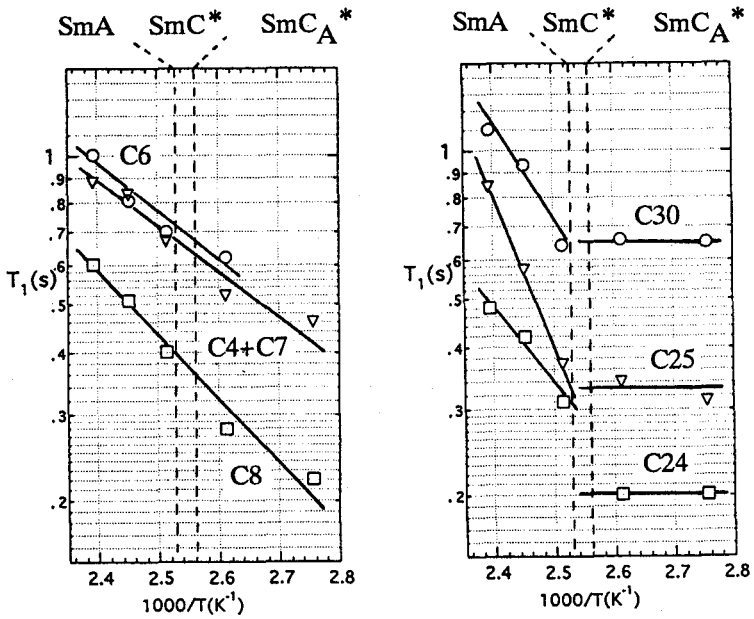


Fig.2 ^{13}C T_1 of MHPOBC.

^{13}C 静止試料スペクトル

磁場中で静止させた液晶では、分子軸が磁場方向に揃い、また化学シフトテンソルが分子の長軸周りの回転により平均化されるため、^{13}Cスペクトルはテンソルの分子軸方向への射影成分を反映する。たとえばメチレン炭素は鎖方向に最大しゃへい成分をもち、メチレン鎖が分子軸に沿う方向にあれば^{13}C吸収線は等方シフト位置に比べ高磁場シフトする。このようにして、分子軸に対する鎖の方向を明らかにすることができる。

図3にMHPOBCの^{13}C静止試料スペクトルを示す。各液晶相に対するスペクトルを比べた場合、吸収線の位置が大きく変化することはなく、鎖の方向がSmC^*、SmC_A^*相で急激に変化するものでないことを表している；若干のシフトは秩序パラメータの変化およびSmC^*、SmC_A^*相における分子全体の10°程度の傾きによると考えられる。

図3において注目すべき点は、液晶相での吸収線が等方化学シフト位置から大きく高磁場シフトするもの（図中点線）とほとんどシフトしないもの（実線）に分けられることである。ここで吸収線の帰属はSmC_A^*相でのCP効率を考慮して行なった；すなわちCPを行なわないで得たスペクトルに比べ、CPを行なって観測したスペクトルではキラル鎖中の炭素の相対強度が著しく減少することを利用した。この結果、非キラル鎖中のメチレン炭素はほとんどすべて約6ppm高磁場シフトするのに対し、キラル鎖中のメチレン炭素はすべて±1ppm程度の変化しか見せない。前者のシフト値はメチレン鎖が分子軸方向にあるとし、また典型的な化学シフトテンソル主値と秩序パラメータを仮定した場合の計算値に一致する。一方後者は鎖が分子軸に対して50°程度の角度を成す場合に対応する。こうしてMHPOBCでは、すべての液晶相でキラル鎖のみが折れ曲がり構造を取っていることが明らかになった。またSmA相で起こっているキラル鎖の大振幅運動は、折れ曲がったこの鎖の分子軸周りの才差運動であるといえる。

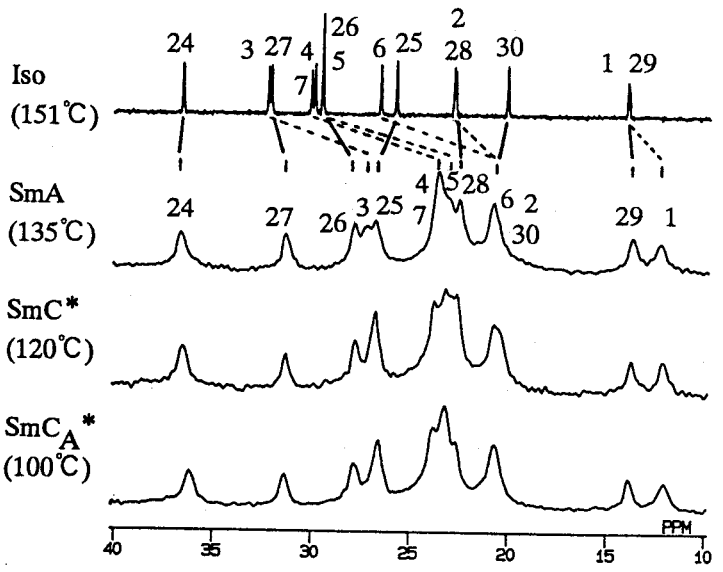


Fig.3 ^{13}C spectra of MHPOBC in the stationary sample.

【結論】以上の実験結果より、MHPOBCの反強誘電性発現についてひとつのシナリオを描くことができる。MHPOBCでは、液晶状態において分子間の電気双極子結合を強めやすい、キラル鎖の折れ曲がった分子構造が実現しており、このことは不可避的にこの鎖の大振幅分子運動を生んでいる。この運動は大きな立体障害を伴うため低温では急速に凍結し、分子軸に垂直な方向に存在する電気双極子が顕在化する。この結果、層を越えた分子間の双極子が結合し、反強誘電的に秩序化する。

P57

MASおよびNMAS条件下二次元液晶NMR法を用いたコンフォメーション解析 ー異方的環境下におけるMet-Enkephalinの配向と構造ー

(阪大・薬[1], 阪大・医[2]) ○國　直人[1], 木村　敦臣[1], 藤原　英明[2]

The Conformational Analysis of Methionine Enkephalin using Liquid Crystal-Two Dimensional NMR under MAS and NMAS conditions —The Orientation and Conformation of Methionine Enkephalin under Anisotropic Environment—

○ Naohito Kuni [a)], Atsuomi Kimura [a)], and Hideaki Fujiwara [b)]
a) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University
b) Faculty of Medcine, Osaka university

Conformation of a methionine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) has been determined by liquid crystal NMR spectroscopy after exploiting magic-angle-spinning(MAS) and near-magic-angle-spinning(NMAS) two-dimensional methodology. The solvent used for this investigation is cesium perfluorooctanoate(CsPFO) lyotropic liquid crystal. Analysis of the conformation of Met-enkephalin dissolved in anisotropic environment is based on a measurement of ^1H-^1H homonuclear dipolar couplings obtained under NMAS and a measurement of space proximity of ^1H-^1H spin pairs from ROESY experiment under MAS condition. By these approaches, preferred conformation of Met-enkephalin and their orientation in liquid crystal membrane were determined successfully.

《はじめに》

双極子 - 双極子相互作用由来の直接結合定数 (D_{ij})を解析する液晶NMR法は異方的環境下にある分子の構造と配向に関する情報を与えるため、膜作用性薬物の作用機序の解明等に有用な研究手法となりうる。我々はこの液晶NMR法の汎用性を高め、一般的な手法とすることを目的としてmagic-angle-spinning(MAS)及びnear-magic-angle-spinning (NMAS) を利用した二次元NMR法を提唱し、Lasalocid A（昨年の本討論会）及びLeucine-enkephalin（本年のISMAR'95国際会議）について報告した。今回この方法をmethionine-enkephalinに適用し、得られた距離情報および直接結合定数からコンホメーション及び配向を決定したので報告する。

今回溶質としたMet-enkephalinはオピオイドレセプターと作用してモルヒネ様作用を示す生理活性物質で、その作用機序としては一度生体膜と結合し、次いで膜上に存在するレセプターと結合すると考えられている。したがってMet-enkephalinは膜中において、膜を構成する分子との相互作用によりその活性コンホメーションが安定化していると考えられる。そこで生体膜モデルとみなせる液晶を溶媒としてMet-enkephalinのコンホメーションを解析することにより、作用機序に関する考察に貴重な情報が得られると期待される。

【キーワード】二次元液晶NMR　Met-enkephalin 直接結合定数
Magic-Angle-Spinning　Near--Magic-Angle-Spinning

くに　なおひと、きむら　あつおみ、ふじわら　ひであき

《実験》

溶媒はリオトロピック液晶であるCesium Perfluoroctanoate (CsPFO/H_2O/D_2O = 40:48:12 wt%) を用い、溶質であるMet-Enkephalin (acetate form)を0.7 wt%溶解させたとき、^{2}H-NMRスペクトルは25℃で2本に分裂したピークを与えたので、これによりこの溶質の濃度で液晶を形成していることを確認した。

NMR測定はVarian Unity-500 ナノプローブを用いてROESY 実験を行った。またVarian VXR-200 固体プローブを用い、マジック角から試料回転軸を-2.0°、-1.0°、0,0°(マジック角)、+1.0°、+2.0° 傾けた5点でHomo-2DJ実験を行った。すべての測定を通じ、試料温度は25(±0.1)℃に保った。

帰属についてはW.H.Grahamら[1]の値を参考にしてCOSYスペクトル、ROESYスペクトルの結果にもとづいて行った。

構造計算は使用言語Fortranにてすべて自作プログラムにより行った。

《結果および考察》

MAS測定条件下でROESY測定を行い、Fig.1に示す様なROESYスペクトルが得られた。観測されたROEは合計35個であった。プロトン間距離はクロスピーク強度のオフセット依存性を考慮した補正を加え[2]、$Gly^2\alpha_1$-$Gly^2\alpha_2$を基準 (1.75Å)として算出した。

次にHomo-2DJ実験において観測された分裂幅を試料回転軸の角度に対してプロットした図をFig.2に、またアミドプロトンの回帰直線を外挿することにより求めた直接結合定数をTable1に示す。

直接結合定数Dは次のような（1）式で与えられる。

$$D_{ij}=-\frac{h\gamma_i\gamma_j}{4\pi^2 r_{ij}^{\ 3}}S_{ij} \qquad (1)$$

ここで γ_i, γ_j は核 i, j の磁気回転比、r_{ij} は核 i, j 間の距離、hはPlank定数、S_{ij} は核間ベクトルi-jの配向性を表わしている。

配向パラメータ S_{ij} は分子座標軸X,Y,Zに関する配向パラメータS_{pq}を用いて次のような（2）式で表わすことができる。

$$S_{ij}=\sum_{p,q}\cos\alpha_p^{ij}\cdot\cos\alpha_q^{ij}\cdot S_{pq} \qquad p,q=x,y,z \qquad (2)$$

また配向パラメータS_{pq}は次のような（3）式で表わすことができる。

$$S_{pq}=\frac{1}{2}<3\cos\theta_p\cos\theta_q-\delta_{pq}> \qquad p,q=x,y,z \qquad (3)$$

θ_p、θ_q はp、q軸と外部磁場 H_o とのなす角であり、δ_{pq} はkroneckerのデルタで、p=qのときは $\delta_{pq}=1$ でそれ以外は0となる。

直接結合定数を構造解析に利用するために次の（4）式で表わされる目的関数を定義した。

$$E_{DD}=W\{(Dcalc)^2-(Dexp)^2\}^2 \qquad (4)$$

この（4）式を内部変数θ_x、θ_y及びθ_zの関数とみなし、powellの共役勾配法により最小化した。ここでWは重みを表わす。

直接結合定数Dには（1）式に示したように距離と配向に関する項が含まれるた

め、それぞれについて一義的に決定するのは困難である。したがって距離をあらかじめ固定しておく意味で、前述のROEにより得られた距離情報を用いてランダムに３８６個の初期構造を発生させ、build-up method[3]により８個のコンホーマーを得た。次にそれぞれのコンホーマーについてランダムに１２８個の外部磁場の方向を発生させ、実験的に得られた直接結合定数Dの値を用い（４）式によって定義される目的関数が最小になるような外部磁場の方向をピックアップした。なお、Dの計算において、チロシン及びフェニルアラニン側鎖の芳香環の運動を180° flip-flopと仮定した。それらについてさらに距離情報と直接結合定数Dとを同時に用いて目的関数の最小化を行い、最終的に2つのコンホーマーを得、それぞれについて１つの配向を得た(Fig.3)。これらの直接結合定数の計算値と配向パラメータをそれぞれTable1、Table2に示す。

Met-enkphalinについて得られたコンホーマーはともに主鎖に関してβ-bend構造をとっており、チロシン、フェニルアラニンの芳香環が膜方向へ向いていることはLeu-enkephalinと一致していたが、それらの芳香環についてLeu-enkephalinの場合、ともに膜中に埋っているのに対し、Met-enkphalinの場合、チロシンの芳香環はやや膜に入り込み、フェニルアラニンの芳香環は膜表面に吸着しているといった構造をとっている。したがってMet-enkphalinはLeu-enkephalinに比べて伸びた構造をとっていると考えられる。

《謝辞》
500MHzでのナノプローブを用いた測定に際し御協力いただきましたバリアンジャパンリミテッドの串田克彦氏に感謝いたします。

《参考文献》

１） W. H. Graham, E. S. Carter II and R. P. Hicks, *Biopolymer*, **32**, 1755(1992)
２） C. Griesinger and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **75**, 261(1987)
３） W. Brawn and N. Go, *J. Mol. Biol.*, **186**, 611 (1985)

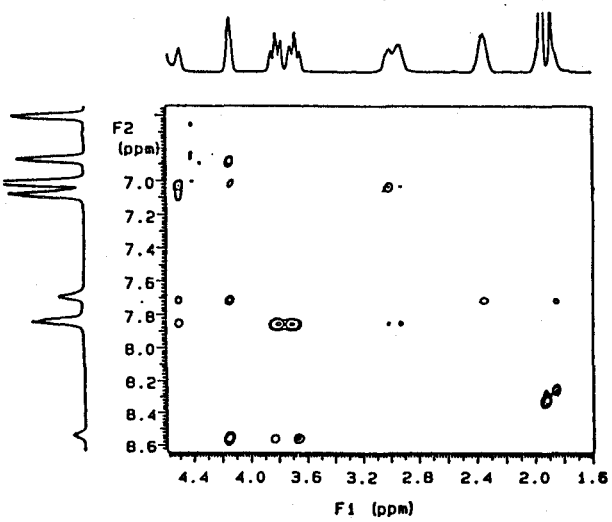


Fig. 1 Partial ROESY spectrum of Met-enkephalin dissolved in CsPFO liquid crystal. mixing time 100ms; 2k×2k data matrix

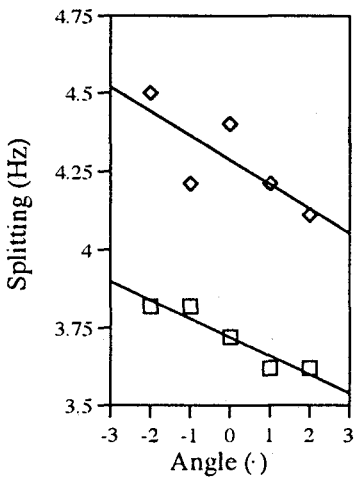


Fig.2 Dependence of splitting on difference from magic angle.
□ Met NH; ◇ Phe NH

Table1 Observed and Calculated Direct couplings

		calculated	
	observed[a)]	conformer1	conformer2
Tyr^1Ar_2 - Tyr^1Ar_3	2.93 (0.66)	-2.73	-3.08
Tyr^1Ar_5 - Tyr^1Ar_6	2.93 (0.66)	-2.73	-3.08
$Gly^2\alpha_1$ - $Gly^2\alpha_2$	5.33 (0.08)	-5.33	-5.33
Phe^4Ar_2 -Phe^4Ar_3	6.72 (1.42)	-6.73	-6.76
Phe^4Ar_3 -Phe^4Ar_4	6.72 (1.42)	-6.73	-6.69
Phe^4Ar_4 -Phe^4Ar_5	6.72 (1.42)	-6.73	-6.69
Phe^4Ar_5 -Phe^4Ar_6	6.72 (1.42)	-6.73	-6.76
Phe^4NH - $Phe^4\alpha$	2.13 (1.01)	-2.10	-2.36
Met^5NH - $Met^5\alpha$	1.64 (0.33)	-1.69	-1.63

a) absolute value
b) The standard deviations are given in the parentheses through the column of observed value.

Table2 Order Parameter for two orientations

	S_{xx}	S_{yy}	S_{zz}	S_{xy}	S_{xz}	S_{yz}
conformer1	0.0212	0.0087	-0.0299	0.0488	0.0635	-0.0722
conformer2	0.0206	0.0120	-0.0326	0.0435	0.0604	-0.0667

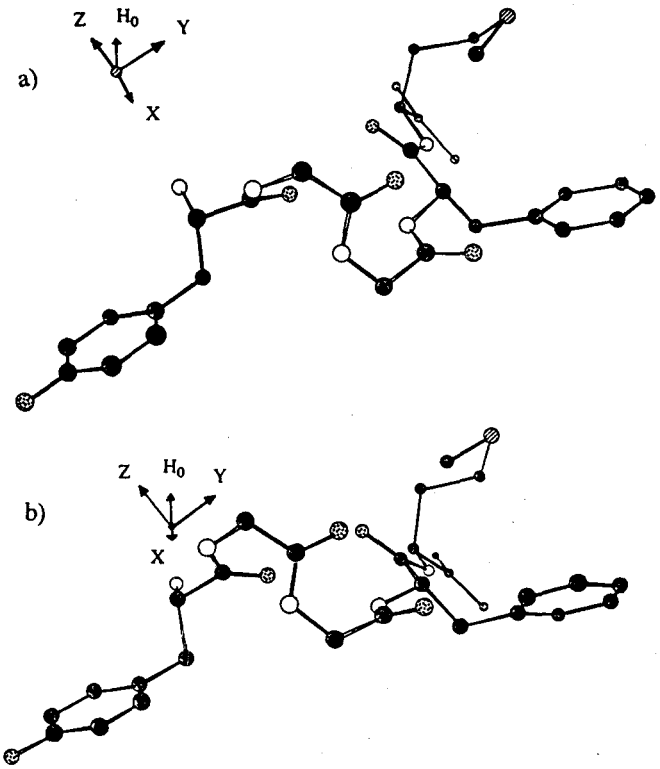


Fig.3 Conformation and orientation of Met-enkephalin; a) conformer 1, b) conformer2. Vectors on one side represents direction of the magnetic field direction and molecular flame

P58 ^{2}H-NMR 緩和時間による医薬品添加剤に吸着した水分子の運動性の評価

(国立衛生試験所) ○阿曽幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄

Water mobility absorbed in some pharmaceutical excipients as determined by ^{2}H spin-lattice relaxation time

Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima
National Institute of Health Sciences

Hydrolysis rate of cephalothin (model of chemical stability of drugs) and crystallization rate of amorphous nifedipine (model of physical stability of drugs) in the mixtures with 6 pharmaceutical excipients were examined as a function of water content. ^{2}H spin-lattice relaxation time (T_1) of deuterium oxide absorbed in the mixtures was also determined as a measure of water mobility. Both of the reaction rates and T_1 increased for all the excipients studied as water content of the mixtures increased. The extent of increase in the reaction rate and T_1 ,however, was different between the excipients. It was found that the reaction rates in most of the mixtures were correlated with T_1, indicating that water mobility is one of the important factors which affect stability of drugs.

はじめに

固体不均一系医薬品の安定性は水分含量の影響を大きく受けるが、それのみでは説明できないことが多く、系に存在する水の動的状態すなわち水の運動性も安定性に影響することが示唆されている[1)]。そこで、モデル医薬品に吸着した水分子の運動性をあらわす指標として NMR 緩和時間を用い、それを不均一系医薬品の安定性評価に適用することを目的とし、以下の実験を行った。医薬品の化学的な安定性に及ぼす水の運動性の影響を明らかにするために、β-ラクタム系抗生物質であるセファロチンの加水分解反応をモデルとした。また、溶解性の改善を目的として非晶質化したニフェジピン非晶質体の結晶化を物理的な安定性のモデルとした。6 種類の医薬品添加剤との混合物の系において、それらに吸着した重水の NMR 緩和時間 T_1 を測定し、加水分解速度および結晶化速度との相関を検討した。

実験

試薬

医薬品添加剤としてトウモロコシデンプン(STA)、溶性デンプン(SSTA)、結晶セルロース

キーワード:NMR 緩和時間、安定性、水、運動性

あそゆきお、よしおかすみえ、こじましげお

(MCC)、メチルセルロース(MC)、ポリビニルピロリドン(PVP)およびポリビニルアルコール(PVA)を用いた。STA、MCC および PVP は 100 ℃において 4 時間乾燥して用いた。その他の添加剤は前処理せずにそのまま用いた。セファロチンと医薬品添加剤との混合物はセファロチンナトリウム(Sigma 製)の水溶液に医薬品添加剤を懸濁あるいは溶解し、それを凍結乾燥することにより得た(セファロチンナトリウム:添加剤=1:200)。ニフェジピンの非晶質体はニフェジピン(Sigma 製)を 180℃で融解した後、 液体窒素で急冷することにより得た[2)]。得られた非晶質体と医薬品添加剤とをメノウ製乳鉢で混合することによりの重量比 1:1 の物理的混合物を得た。

セファロチンの分解速度の測定

セファロチンと医薬品添加剤の混合物約 20mg を試料管にはかりとり、その管を塩の飽和水溶液の入った管に入れ、40℃の水浴に保存した。適当な時間間隔で試料を水浴から取出し、残存するセファロチンを高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。セファロチンの残存率の経時的な変化を擬一次反応速度式にあてはめ、みかけの反応速度を算出した。

結晶化速度の算出

ニフェジピンの非晶質体と医薬品添加剤の物理的混合物を 25℃、11～75%の相対湿度(RH)に 1 時間保存し、その水分含量を調整した。非晶質のニフェジピンの結晶化にともなう発熱を等温ミクロ熱量計(2277 型、ThermoMetric AG)を用いて測定した。測定された熱-時間曲線から非晶質ニフェジピンの残存率が 50%となる時間 t_{50} を算出し、その逆数 $1/t_{50}$ を結晶化速度の指標とした[2)]。

NMR の測定

VXR400s(Varian)を用い、inversion-recovery 法により薬物と添加剤の混合物に吸着した重水のスピン-格子緩和時間(T_1)の測定を行なった。

結果および考察

Fig. 1 に添加剤との混合物におけるセファロチンの加水分解速度とその水分含量の関係を示す。何れの添加剤においてもセファロチンの加水分解速度は混合物の水分含量が大きいほど大きかった。しかしながら、同じ水分含量であっても加水分解速度は添加剤によ

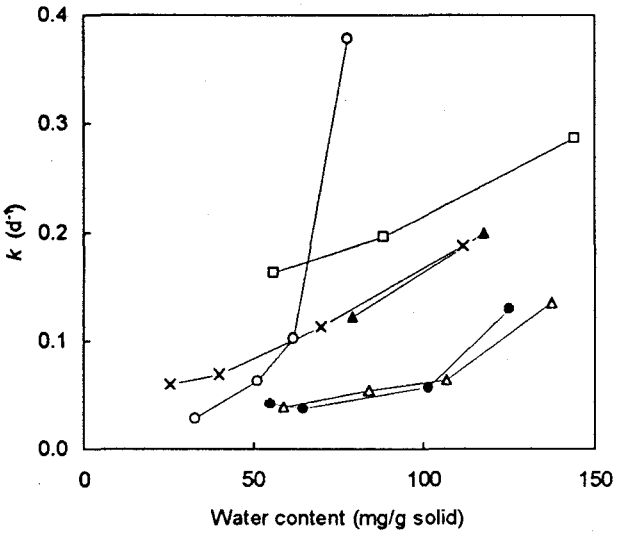


Fig. 1 Hydrolysis rate of cephalothin in the mixtures of some pharmaceutical excipients as a function of water content
△, STA; ●, SSTA; ○, MCC; ×, MC; □, PVP; △, PVA

って大きく異なることが明らかとなった。セファロチンの水溶液における加水分解速度はpH2～8の領域ではpHに依存しないことが知られており、添加剤による分解速度の違いは添加剤に吸着した水分子の運動性が異なることによるものと考えられる。

Fig. 2 に混合物に吸着した重水の T_1 と水分含量の関係を示す。水分含量の増加に伴いいずれの添加剤の系においても T_1 の上昇が観測され、上昇の程度は添加剤によって差があることが明らかとなった。このことは水分含量が同じであっても混合物に吸着した水の運動性が添加剤によって異なっていることを示している。

Fig. 3 にセファロチンの分解速度と添加剤に吸着した重水の T_1 との関係を示す。 PVP、PVA 以外の添加剤の系では T_1 が大きいほど分解速度が大きく、添加剤による差は加水分解反応速度を水分含量の関数としてプロットしたFig. 1の場合よりも小さいことが示された。 PVP、PVA の系において他の添加剤の系と差が見られたのは不純物あるいは添加剤自身がセファロチンに対して触媒作用を持つためと考えられる。

反応速度と T_1 の関係は物理的な変化であるニフェジピンの結晶化においても観察された。Fig. 4 に示すようにニフェジピンの結晶化速度はいずれの添加剤の系においても混合物の水分

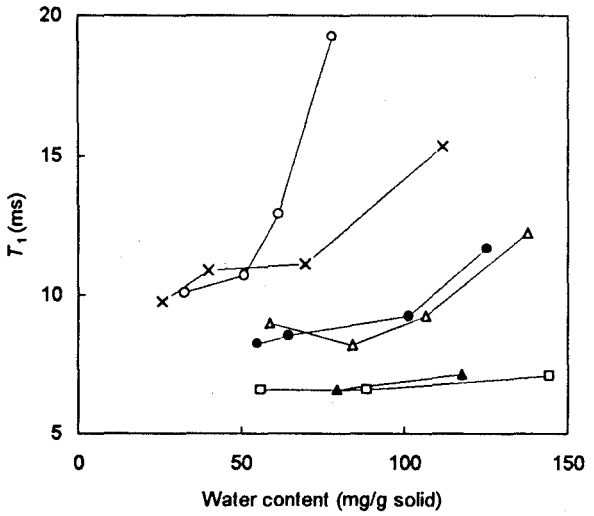


Fig. 2 Spin-lattice relaxation time of deuterium oxide in the cephalothin-excipient mixtures as a function of water content
△, STA; ●, SSTA; ○, MCC; ×, MC; □, PVP; △, PVA

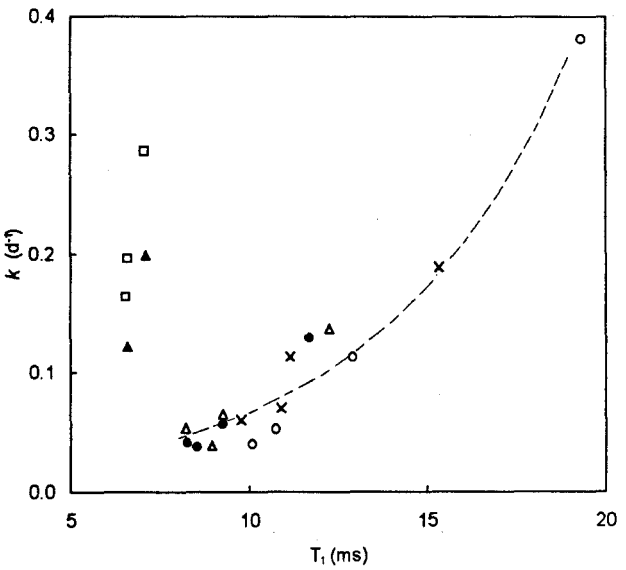


Fig. 3 Relationship between hydrolysis rate of cephalothin and T_1 of deuterium oxide in the cephalothin-excipient mixtures
△, STA; ●, SSTA; ○, MCC; ×, MC; □, PVP; △, PVA

含量が高いほど大きくなったが、速度と水分含量の関係は同一の水分含量で比較すると添加剤により差が見られた。結晶化速度と T_1 の関係は Fig. 5 に示すようにPVP、SSTA 以外の添加剤の系では添加剤で差が見られず、T_1 が大きい混合物ほど結晶化速度が大きかった。

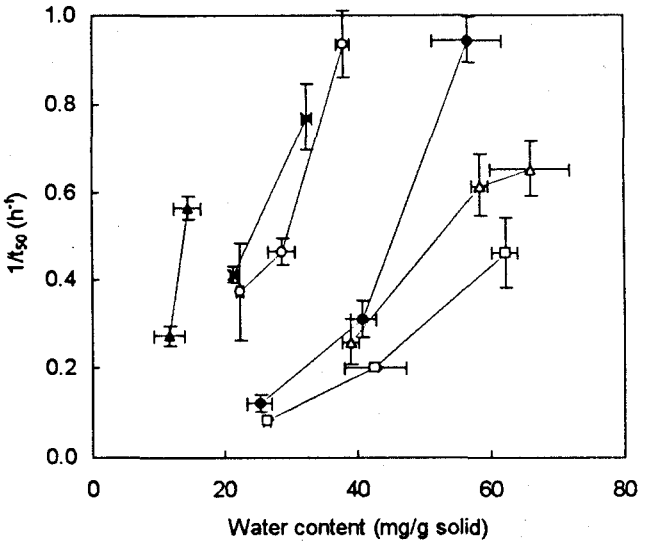


Fig. 4 Crystallization rate of nifedipine in the mixtures with some pharmaceutical excipients
△, STA; ●, SSTA; ○, MCC; ×, MC; □, PVP; △, PVA

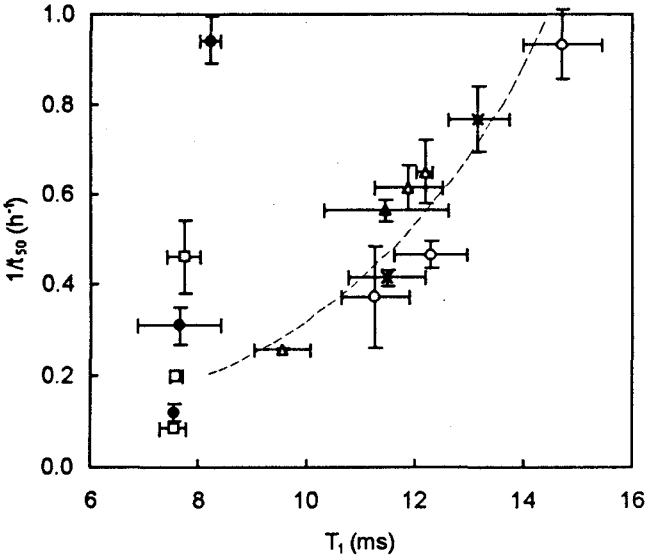


Fig. 5 Relationship between crystallization rate of nifedipine and T_1 of deuterium oxide in nifedipine-excipient mixtures
△, STA; ●, SSTA; ○, MCC; ×, MC; □, PVP; △, PVA

まとめ

6 種類の医薬品添加剤との混合物の系において、それらに吸着した重水の NMR 緩和時間 T_1 を測定し、モデル医薬品の加水分解速度および結晶化速度との相関を検討した結果、加水分解反応速度、結晶化速度はいずれの添加剤においても混合物の水分含量が高いほど大きくなったが、速度と水分含量の関係は同一の水分含量で比較すると添加剤により差が見られた。反応速度と T_1 の関係は例外があるものの、添加剤間で差が見られず、T_1 が大きい混合物ほど反応速度が大きかった。従って、系に存在する水の運動性が医薬品の安定性に大きく影響することが示唆された。

文献

1) Y. Aso, S. Yoshioka and T. Terao, *Chem. Pharm. Bull.* 42, 398 (1994).

2) Y. Aso, S. Yoshioka, T.Otsuka and S. Kojima, *Chem. Pharm. Bull.* 43, 300 (1995).

P59 高圧ＮＭＲによる疎水性有機溶媒中の水分子の回転に対する圧力効果の研究

（京大化研） ○若井千尋・中原勝

High-Pressure NMR Study on Pressure Effect on Rotational Dynamics of Water Molecules in Hydrophobic Organic Solvents

(Kyoto Univ. Inst. Chem. Res.) Chihiro Wakai and Masaru Nakahara

Deuteron spin-lattice relation times T_1 have been measured for solitary water molecules at low concentrations in apolar and polar organic solvents such as benzene, chloroform, and acetonitrile at 30 °C at high pressures up to 300 MPa. The rotational correlation times τ_{2R} for D_2O in organic solvents increase with increasing pressure. In contrast to the prediction of the hydrodynamic model, the pressure effect on τ_{2R} for D_2O in solution is not equal to but smaller than that on τ_{2R} and viscosity for the neat solvent. When τ_{2R} is plotted against solvent viscosity divided by temperature, the temperature-variable slope (S_T) and pressure-variable one (S_p) are markedly different, the ratios of S_T to S_p being 0.2-0.3. This remarkable discrepancy for the very small solute molecule is caused by the difference between varying solute-solvent interaction by pressure and varying kinetic energy by temperature.

［序］流体力学的モデルによるStokes-Einstein-Debye(SED)則によれば、液相中での溶質分子の回転相関時間τ_{2R}は溶媒の粘度を温度で除した量(η/T)に比例し、その比例定数は溶質の有効体積を表わし、溶媒、温度、圧力によって変わらない定数である。これまで我々は疎水的環境下にある水分子の回転運動について研究し、温度変化では、溶媒によって傾きが大きく異なり、溶質の体積で傾きを説明できないことが分かった。溶媒を変えて粘度を変化させた場合、粘度に比例せず反比例するというSED則の大きな破綻を報告した。[1] これらの破綻の理由は、溶質－溶媒分子間の引力的相互作用の無視による。そこで本研究では、圧力を変数とすることにより、温度や溶媒を変化させずポテンシャルエネルギーのみを変えて、溶質－溶媒分子間相互作用の効果を取り出し、同一溶液系での温度変化と圧力変化に対し、流体力学的モデルが有効か否かを検討した。我々は300 MPaまでの高圧下で測定可能な高圧用プローブを開発することにより、疎水性溶媒中の水分子の回転に対する圧力効果を明らかにすることができた。[2,3]

［実験］高圧用プローブは、日本電子と共同制作したもので、圧力容器はチタンでできている。[2] 熱電対とラジオ波コイルの導線の絶縁用にはセラミックジルコニアを用いている。この点が従来の雲母や高分子を使ったものとの違いであり、繰り返し実験に耐え得る。疎水性有機溶媒としてベンゼン、クロロホルムを用い、重水を約30 °Cで飽和に溶解させた溶液（それぞれ35、76 mM）を試料とした。比較として極性溶媒であるアセトニトリルを溶媒とし、重水の100 mMの溶液を調整して試料とした。重水のＤ核のスピン－格子緩和時間T_1を反転回復法により測定し、回転相関時間τ_{2R}を求めた。

［結果と考察］ベンゼン中の水分子と溶媒分子のτ_{2R}および溶媒の粘度の常圧での値に対する比をFig. 1に示す。純液体の水の場合とは異なり、すべての溶媒中で水分子のτ_{2R}は圧力増加とともに増加する。純液体の水の場合、水素結合のネットワークが圧縮によって壊され、水素結合が弱くなるために回転が促進された。しかし有機溶媒中では圧縮によって溶質－溶媒分子間の距離が縮まり、回転がより束縛されていることが分かった。すべての有機溶媒中で圧力効果の大きさの順序は、

溶媒粘度 > 溶媒分子回転 > 水分子回転

高圧・回転相関時間・水

わかいちひろ・なかはらまさる

であった。ただし極性溶媒のアセトニトリルでは、溶媒分子回転と水分子回転の圧力効果の差は小さかった。弱い溶質－溶媒分子間相互作用のために、水分子回転の圧力効果が溶媒分子の圧力効果より小さいことが分かる。

SED則によれば、液相中の溶質分子のτ_{2R}は溶媒の粘度に比例し、τ_{2R}の圧力による変化は粘度の変化と同じとなるはずであるが、Fig. 1に示したように大きく異なっている。この圧力効果を温度効果と比較するために、Fig.2ではアセトニトリルおよびクロロホルム中の水分子のτ_{2R}をη/Tに対しプロットした。SED則に従うとすると、同一溶液系においては温度効果と圧力効果の結果は一つの線になるはずであるが、実際には傾きの大きく異なる二本の直線に分かれる。圧力および温度を変化させた時の傾きをそれぞれS_pおよびS_Tと表わす。その比S_p/S_Tは、溶質が水分子の場合には0.2-0.3と、流体力学的モデルの予想値である1から大きくはずれている。このように比が小さくなるのは、溶質分子のサイズが小さいときの特徴である。Table 1に示すとおり、分子サイズが溶質と溶媒が同程度(純液体)の場合、溶質が溶媒よりかなり大きい場合(色素)とでその比を比べると、

水 (0.2-0.3) < 溶媒 (0.75-0.78) < 色素 (1)

という順になる。括弧内の数字が比である。溶質がかなり大きいときには1となり、流体力学的モデルに従う。

温度効果では分子間のポテンシャルエネルギーとともに運動エネルギーも変化しているが、圧力効果はポテンシャルエネルギーのみ変化する。温度効果と圧力効果の違いは、運動エネルギーの変化のあるなしである。しかし、二体間衝突を考慮したExtended diffusionモデルではこのような大きな温度効果は全く説明できない。温度効果と圧力効果の違いは、回転の活性化エネルギーの指数因子にあると考えられる。

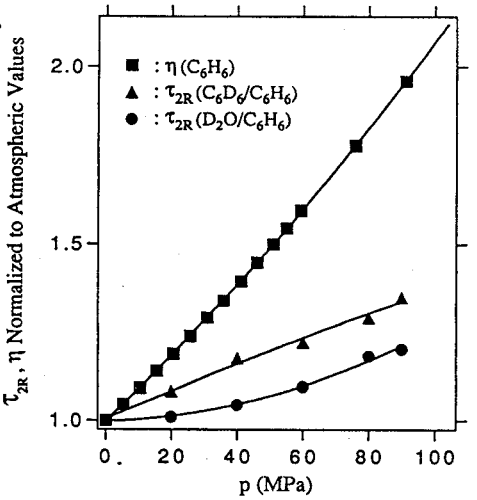


Fig. 1. Pressure effect on the relative τ_{2R} for D_2O/C_6H_6 and C_6D_6/C_6H_6 and the relative viscosity for C_6H_6 at 30 °C.

[1]M. Nakahara and C. Wakai, *J. Chem. Phys.* **97**, 4413 (1992).
[2]C. Wakai and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.* **100**, 8347 (1994).
[3]C. Wakai and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.* **103**, 2025 (1995).

Table 1. Slopes of linear plots of τ_{2R} vs. η/T for various solute molecules; η, solvent viscosity (P) and T, temperature (K). S_T and S_p denote the slopes obtained by varying solvent viscosity through temperature and pressure, respectively.

Solute	Solvent	S_T (10^{-8} s K P^{-1})	S_p (10^{-8} s K P^{-1})	Ratio S_p/S_T
D_2O	D_2O	0.66	—[a]	—[a]
D_2O	CH_3CN	0.65	0.19	0.29
D_2O	$CHCl_3$	0.12	0.022	0.18
D_2O	C_6H_6	0.077	0.022	0.29
CH_3CN	CH_3CN	0.82	0.64	0.78
$CDCl_3$	$CHCl_3$	0.65	0.49	0.75
C_6D_6	C_6H_6	0.28	0.21	0.75
DPE[b]	DPE	5.2	5.2	1.0
CV[c]	C_3H_7OH	0.34	0.34	1.0
VOAA[d]	CCl_4	—	—	1.0

[a]No linear relation. [b]DPE is diphenyl ether. [c]CV is Crystal Violet. [d]VOAA is vanadyl acetylacetonate.

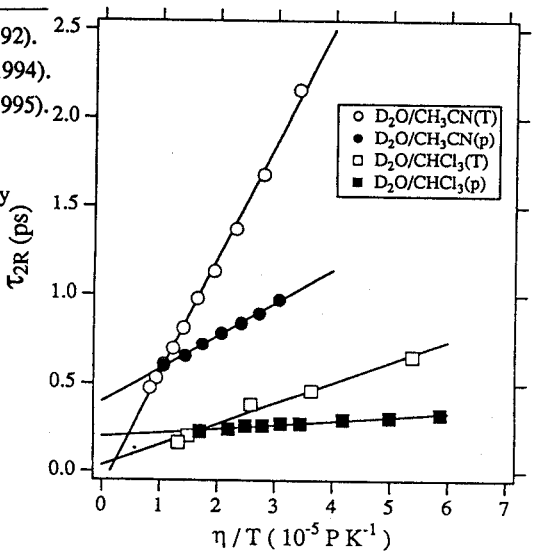


Fig. 2. Plots of the rotational correlation times for D_2O in CH_3CN and $CHCl_3$ against solvent viscosity divided by temperature. Open and solid symbols are for temperature- and pressure-variable viscosity variations, respectively.

P60 エチレンアイオノマーにおけるイオン会合体の構造解析

名工大工
曽我部啓介○ 鈴木康彦 吉水広明 木下隆利 辻田義治

Structural Anarysis of Ionic Cluster of Ethylene Ionomers

K. Sogabe, Y. Suzuki, H. Yoshimizu, T. Kinoshita and Y. Tsujita
Department of Materials Science and Engineering,
Nagoya Institute of Technology

The high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectra of ethylene ionomers were measured in order to discuss the influence of thermal treatment on crystal and ionic cluster in the ionomer. At first, we tried to determine the crystallinity of the ionomer at various temperatures from ^{13}C DD/MAS NMR spectra. There was no change of the crystallinity from r.t. to 80℃, but when the sample was cooled from 100℃ to r.t., the crystallinity become low. Next, we examined the line shape of ^{13}C=O signal of methacrylic acid moiety in ^{13}C CP/MAS NMR spectra of the ionomer. The line shape was changed at high temperature (above about 80℃) and in the samples annealed or quenched at above 80℃ for 24h. It was reported that the tetracoodinated zinc salt changed to the hexacoodinated zinc salt and the acid salt stracture, when the sample was keeping at high temperature for long time (ca. over 10h). Therefor, it was considered that the change of chemical shift (from 189ppm and 185ppm to 187ppm) was occered by the structural change of the ionic cluster.

目的…エチレンアイオノマーの有するイオン会合体の熱処理による変化と、エチレンマトリクス相の形成する結晶がイオン会合体の存在により受ける影響を固体 ^{13}C NMR 法を用いて検討する。

実験…試料は三井・デュポンケミカルより供与されたものを長時間室温にて保存した、エチレンメタクリル酸共重合体（酸含量 5.4mol %）およびその Zn 塩、Na 塩（E-0.054MAA、E-0.054MAA-Zn、E-0.054MAA-Na）を使用した。測定には NMR 測定は Unity400plus NMR 分光計（Varian 社製）を用いた。

結果と考察…Fig. 1 に E-0.054MAA-0.6Zn を室温にて測定した ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを帰属と共に示す。

CH_2 ピークはポリエチレンと同様に結晶、非晶を反映した 2 本のピークに分裂した。定量性のよいDD／MAS 法により結晶の挙動を観察したところ90℃程度まで昇温するとその結晶は殆ど融解した。これはDSC 測定による結果と一致する。また 100℃まで昇温した後に室温まで冷却し測定を行うと結晶化度は熱を加える前と比べ低下した。これは 2 次結晶化の進行する時間が十分に与えられなかったためと考えられる。

アイオノマーの中和度の違いにより結晶化度がどのように変化するかをNMR 法を用いて見積もった。 (Fig.2) 他の測定で得られた結果と同様に中和度が低いほどその結晶化度は大きかった。

一方イオン会合体は80℃以上の熱を加えると4配位から6配位のＺｎ塩と酸塩構造へと変化する。Fig. 1から明らかなように後者の ^{13}C=O のピークは 187ppm に現われることが分かった。今回の実験では一度変形したイオン会合体は少なくとも 6 ヵ月経過しても元の４配位Ｚｎ塩には戻らなかった。

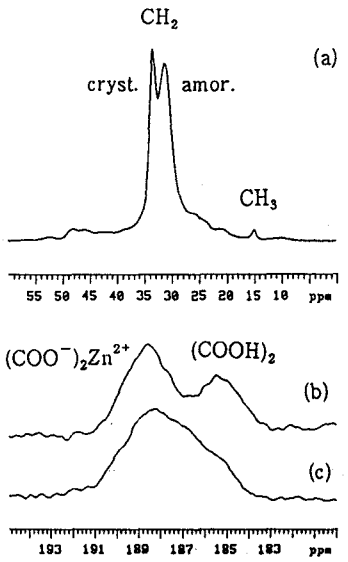


Fig.1 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of E-0.054MAA-0.9Zn at room temperature. (a), (b)as given.(c)annealed at 100℃ for 24h.

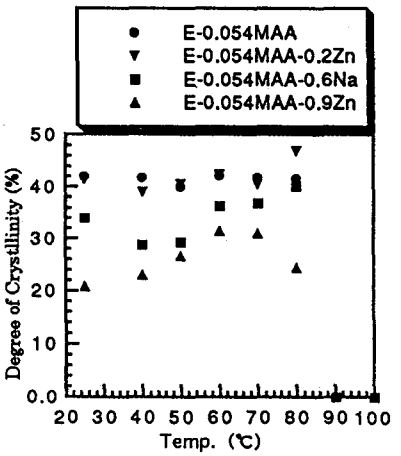


Fig.2 Degree of Crystallinity of E-0.054MAA, E-0.054MAA-0.2Zn,E-0.054MAA0.6Na and E-0.054MAA-0.9Zn

キーワード…エチレンアイオノマー、イオン会合体、結晶化度、^{13}C NMR

著者ふりがな…そがべけいすけ、すずきやすひこ、よしみずひろあき、きのしたたかとし、つじたよしはる

P61 不安定異常ヘモグロビン赤血球の磁化移動の研究

○上坂伸宏、[1]曽我美勝、[2]恵良聖一、[3]加藤一夫、長谷川節夫、[4]大西忠博、[5]A.N.Schechter
日本医大・1生理、[1]藤田保衛大・衛生・生理、[2]岐阜大・医・2生理、[3]稲沢市民病院・中検、[4]関東逓信病院・医用情報、[5]Lab. of chem. Biol./ NIDDK/ NIH

MAGNETIZATION TRANSFER CHARACTERIZATION OF RED CELLS FROM PATIENTS WITH UNSTABLE HEMOGLOBIN DISEASE .

Uyesaka, N., [1]Sogami, M., [2]Era, S., [3]Kato, K., Hasegawa, S. [4]Oonishi, T., [5]Schechter A.N. Dept. of Physiol., Nippon Med. Sch., Tokyo, [1]Dept. of Physiol., Sch. of hygienics, Fujita Health Univ., Toyoake, and [2]Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ. Gifu, [3]Inazawa Municipal Hospital, Inazawa, The Kanto Teishin Hospital, Tokyo, Lab. of chem. Biol./ NIDDK/ NIH, Bethesda, MD.

ABSTRACT

The magnetization transfer characteristics of red blood cells (RBC) from patients with unstable hemoglobin (Hb) disease were analysed, using RBC from patients with Hb Koln and Hb Yokohama, with the aim of elucidating the biophysical state of those Hb and related pathophysiologic events. We measured intermolecular cross-relaxation times (T_{IS}) from irradiated macromolecule protons to observed water protons and spin-lattice relaxation times (T_1) of water protons. We found that unlike conventional T_1 measurements, T_{IS} measurements are very sensitive for the detection of conformational changes of Hb molecules within RBC and may be useful for studing other diseases due to Hb-membrane association, such as thalassemia syndromes and sickle cell disease.

INTRODUCTION

The formation of membrane-bound Heinz bodies, i.e., the presence of precipitated, denatured hemoglobin (Hb) aggregates within red blood cells (RBC), is the primary event for hemolytic anemia in unstable Hb disease. We have recently demonstrated and confirmed a marked impairment in the deformability of Heinz body-forming RBC and conjunctival hemolytic significances, using our own developed porous thin metal filter with both 3-μm and 5-μm pores (1,2). In this study, we investigate the magnetization transfer characteristics of RBC from patients with unstable Hb disease (Hb Koln and Hb Yokohama) and RBC treated with phenylhydragine to elucidate the biophysical state of those Hb.

MATERIALS AND METHODS

We measured intermolecular cross-relaxation times (T_{IS}) from irradiated protons to water protons with off-resonance (f_2) irradiation at 7.13, -4.00 or -8.79ppm, at a power level of $\gamma H_2/2\pi \sim 69$Hz, as well as conventional spin-lattice relaxation parameter (T_1), according to the method introduced by Akasaka (3). To investigate effects of biophysical state of Hb on the magnetization transfer within RBC, we used RBC treated with phenylhydrazine and RBC from patients with unstable Hb disease. The formation of Heinz bodies was examined by both scanning

and transmission electron microscopy. Also, we measured RBC filterability using gravity-based, nickel mesh filtration method (2).

RESULTS AND DISCUSSION

Phenylhydrazine-treated RBC showed dispersed formation of small Heinz bodies and impaired filterability through nickel mesh in a dose-dependent manner (1, 2). RBC from a patient with Hb Yokohama (the substitution of a proline for a leucine at position 31 of the β-chain) presented many large and often solitary Heinz bodies and strongly impaired filterability (1, 2), while RBC from a patient with Hb Koln (the substitution of a methionine for a valine at position 98 of the β-chain), who does not undergo splenectomy, showed few microscopically typical Heinz bodies and virtually normal filterability. RBC from the patients , even in Hb Koln disease, exhibited a more marked shortening of T_{1S} than phenylhydrazine-treated RBC. Conventional T_1 measurements were not sensitive to these differences. Further, to look explicitly at the effect of macromolecule-water interactions within RBC, we applied the saturation transfer technique (3); the degree of saturation of the water signal for RBC clearly demonstrated the broad component of the ^{1}H-NMR spectrum in the off-resonance region of water protons. Thus, we confirmed that saturation transfer from irradiated protons of macromolecules to observed water protons actually occured within RBC, in particular, RBC from the patients. Since T_{1S} values are primarily determined by the efficiency of spin diffusion and the shortening of T_{1S} occured prior to an existence of unstable Hb molecules as well as a high yield of Heinz body-formation, it is likely that these unstable Hb molecules themselves have strong inter-residue interactions and lead to eventual restricted motion of Hb molecules, thereby suggesting that the oxidant-treated RBC are not a suitable model for studing the molecular pathophysiology of unstable Hb disease. We conclude that T_{1S} measurements are very sensitive for the detection of conformational changes of Hb molecules and resultant association of Hb molecules within RBC and may be useful for studying other diseases due to Hb-membrane association, such as the thalassemia syndromes, or reversible association within the RBC, as in sickle cell disease, in cells *ex vivo*.

REFERENSES

(1) Hasegawa, S. et. al., Biorheology 30, 275-286, 1993
(2) Nakamura, T. et. al., Blood Cells 20, 151-165,1994
(3) Akasaka, K. et. al., Physica B 164, 163-179, 1990

Key words: Nuclear magnetic resonance (NMR), Cross-relaxation times, Red blood Cells (RBC), Unstable hemoglobin, Hemolytic Anemia.

○うえさか のぶひろ、[1]そがみ まさる、[2]えら せいいち、[3]かとう かずお、はせがわ せつお、[4]おおにし ただひろ、[5]Alan N. Schechter

P62

酸性側における血清アルブミン構造転移の研究
—— molten globule-like state

1. 藤田保衛大・衛生・生理, 2. 岐阜大・医・生理, 3. 生理研・分子生理
○曽我美　勝[1], 恵良聖一[2], 桑田一夫[2], 梶原孝彦[1], 亘　弘[3]

^{1}H-NMR and CD studies on structural transition of serum albumin in the acidic region
—— the molten globule-like state

1. Dept. of Physiol., Sch. of Health Sci, Fujita Health Univ., 2. Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ. and 3. Dept. of Mol. Physiol., Natl. Inst. for Physiol Sci.
Sogami, M[1]., Era, S[2]., Kuwata, K[2]., Kajihara, T[1]. and Watari, H[3].

Helical content (f_α) of bovine mercaptalbumin (BMA) showed the two-step decrease in the acidic region, one corresponding to the N→F transition (pH 4.4→3.7, f_α, 0.68→0.58) and the other to the F→E transition (pH 3.6→2.9, f_α, 0.58→0.48). ^{1}H-NMR spectra and cross-relaxation times (T_{IS}) showed the two-step change from native to intermediate and from intermediate to unfolded spectra and the two-step elongation in the N→F and F→E transitions, respectively. On the other hand, f_α of human serum albumin (HSA) mainly decreased in the N→F transition (N→F : pH 4.6→3.4, f_α, 0.70→0.55 ; F→E : below pH 3.0, f_α, 0.55→0.52). ^{1}H-NMR spectra and T_{IS} values showed the one-step change from native to unfolded spectra and the one-step elongation in the N→F transition, respectively. Obtaind results on HSA might coincide with the Wallevick's model (1973) that the N→F and F→E transitions of HSA are independent but more or less simultaneous processes. Reported hydrodynamic data and obtained results might suggest that the F-form of HSA is the molten globule-like state which has a native-like globular form with native-like high helicity and fluctuating tertiary structure. The F-form of BMA may be presumably the molten globule-like state.

[はじめに]　ウシ血漿アルブミン(BPA)は酸性側において２段階の構造転移, 即ち, N→F(pH 4.40→3.75), F→E (pH 3.60→2.80)転移を示す(1)。筆者らも含めて，多くの研究者は，BPA とヒト血清アルブミン(HSA)の酸性側における構造転移は全く同等であろうと仮定した。しかしながら，ヘリックス含量(f_α)の pH 依存性(2)，結合ビリルビンの誘起 CD の chilarity，特殊なレジンとの相互作用等に，HSA と BPA に大きな差があることが報告された。筆者らは，CD, ^{1}H-NMR スペクトル，交差緩和時間(T_{IS})などの pH(pD)依存性を測定し，少なくとも，HSA の F 型は，Ptitsyn ら(3)，Wada ら(4)により報告されたモルテン・グロビュール状態に近い構造であることを見いだした。

[実験材料と方法]　脱脂したヒト血清アルブミン(HSA)，ウシメルカプトアルブミン(BMA)を使用した。8.23 M 尿素中の実験は，ヨードアセトアミドにより SH 基を化学修飾した IA-HSA, IA-BPA を用いた。CD 測定は JASCO J-40S を用い，αヘリックス(f_α)，β構造(f_β)，ランダムコイル(f_R)量を求めた(5)。^{1}H-NMR 測定は，Bruker AM 500 を用い，交差緩和時間(T_{IS})は Akasaka らの方法により求めた(6)。

[結果と考察]　<u>二次構造変化</u>：図 1 に HSA(0.10 M NaCl)の f_α, f_β, f_R の pH 依存性を示した。HSA は N→F 転移(pH 4.6→3.4)，酸膨潤(F→E 転移，pH 3.0 以下)を示した。N 型の f_α 量は 0.69～0.70 で X 線結晶解析の 0.67 に，ほぼ等しかった。N→F, F→E 転移における f_α 量の変化(Δf_α)は，次のようであった：(N→F), Δf_α = - 0.15 ; (F→E), Δf_α = - 0.02。BMA(0.10 M KCl)の二次構造変化を図 2 に示した。BMA は，明らかに N→F 転移(pH 4.40→3.75, Δf_α = - 0.10), F→E 転移(pH 3.60→2.90, Δf_α = - 0.09)の２段階構造転移を示し，N 型の f_α 値は 0.68 であった。図 1 の f_α の pH 依存性は，Wallevick の〔α〕$_{233}$ の pH 依存性と良く一致した(2)。

キーワード：cross-relaxation, molten globule-like state, ^{1}H-NMR, serum albumin, structural transition

そがみ　まさる，えら　せいいち，くわた　かずお，かじはら　たかひこ，わたり　ひろし

Wallevick は，HSA の N→F 及び F→E 転移(酸膨潤)は独立の構造転移であるが，かなり同時進行の現象であると説明した(Wallevick モデル)。BMA または BPA の N→F，F→E 転移(図 2)は，明らかに Hilak ら(7)のモデルのように，2 段階転移であった。Hilak らによれば，BMA，BPA の N→F 転移は C 端側の共同的アンフォルディングと f_α 量の変化を伴わない N 端側の異性化反応，ついで F→E 転移でこの N 端側の f_α の減少が起こると説明した。

^{1}H-NMR スペクトルと交差緩和時間(T_{IS})：HSA の N，F，E 型(4.84%，0.10 M Cl^-)及び 8.23 M 尿素中の IA-HSA(1.50%，0.10 M Cl^-，pD 7.93)を図 3 に示した。HSA の F，E 型の ^{1}H-NMR スペクトルは，尿素による低磁場側への僅少の化学シフト，高 pD による His C2H の差を除いて IA-HSA(8.23 M 尿素)と全く同じであった。HSA N 型の ^{1}H-NMR スペクトルは低分子量タンパク質(10-20 kD)のスペクトル(4)と異なり，吸収線はシャープでなく，広い範囲にわたって分散せず，化学シフトは，F，E 型及び IA-HSA(8.23 M 尿素)と著明な差が観測されなかった。タンパク質分子の「ゆらぎ」増加の指標となる -2.45，0.40，7.13 または 8.65 p.p.m.を γ $H_2/2\pi$ 単位で 39～107 Hz で f_2 照射して求めた主鎖(4.26 p.p.m.)，側鎖(CH_3 (0.92～0.93 p.p.m.)，Lys の ε CH_2 (2.99 p.p.m.)，芳香族側鎖(7.11～7.12 p.p.m.)，His C2H(8.61 p.p.m.)の T_{IS} 値を表 1 に示した。HSA は N→F 転移により約 2 倍に増加し，明らかに三次構造のゆらぎの増加を示した(fluctuating tertiary structure)。BMA の N，F，E 型及び 8.23 M 尿素中の IA-BPA の ^{1}H-NMR を図 4 に示したが，HSA と異なり N→F，F→E 転移で段階的に変化し，E 型の ^{1}H-NMR スペクトルはアンフォルディング状態のスペクトルに殆ど同じであった。F 型のスペクトルも E 型に大変似ていた。主鎖，側鎖の T_{IS} 値は，HSA と異なり，^{1}H-NMR スペクトルと同様に 2 段階に増加した。BMA の F 型の ^{1}H-NMR スペクトル，T_{IS} 値は明らかに主鎖，側鎖のゆらぎの増加を示唆した。

F 型構造と molten globule-like state：HSA の N→F 転移は，BMA，BPA の N→F 転移と殆ど大部分の性状は似ているが，若干異なる点がある。N→F 転移における分子容は，HSA，BPA の何れも，大きな増加は報告されていない(1，8-10)。図 1，2 に示すように，何れの F 型も，かなり f_α 含量は大きい。即ち，HSA の N→F，F→E 転移は，Wallevick モデル(2)のように，独立に，しかも，かなり同時進行している。これに対して BMA の場合は Hilak らのモデル(7)のように 2 段階に進行している。HSA の ^{1}H-NMR スペクトルは，N→F 転移で 1 段階的に，尿素アンフォルディング状態に，ほぼ同じになり，しかも，分子のゆらぎを反映する T_{IS} 値も 1 段階的に変化した。これらの結果は，HSA の F 型は molten globule-like state であることを示唆するだろう。また，BMA の ^{1}H-NMR スペクトル，T_{IS} 値は 2 段階的に変化したが，BMA F 型も少なくとも molten globule-like state に近い構造であろう。

[文献]

1. Foster, J. F. (1975) in Albumin, Structure, Function and Use (Rosenoer, V. M., Oratz, M., Rothshild, M. A., eds), pp. 58-84, Pergamon Press, Oxford
2. Wallevick, K. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2650-2655
3. Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V. et al (1981) FEBS Lett. 136, 311-315
4. Ohgushi, M. & Wada, A. (1983) FEBS Lett. 164, 21-24
5. Era, S., Nagaoka, S., Sogami, M. et al (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 26, 21-32
6. Akasaka, K. (1981) J. Magn. Resonance 45, 337-343 ; Akasaka, K.(1983) ibid. 51, 14-25 ; Akasaka, K., Ishima, R & Shibata, S. (1990) Physica B 164, 163-179
7. Hilak, M.C., Harmsen, B.J.M., Braam, W.G.M. et al (1974) Int. J. Peptide Protein Res. 6, 95-101
8. Clark, P., Rachinsky, M. R. & Foster, J. F. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2509-2513 ; Foster, J. F. & Clark, P. (1962) ibid. 237, 3163-3170
9. Aoki, K. & Foster, J.F. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 3385-3393 ; Aoki, K. & Foster, J. F. (1957) ibid. 79, 3393-3396
10. Era, S., Kuwata, K., Kida, K.et al (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 26, 575-583

Fig. 1 pH-profiles of f_α(○), f_β(●) and f_R(◐) of HSA in 0.10 M NaCl at 25°. N-F and EXPANSION indicate the N→F and F→E transitions, respectively.

Fig. 2 pH-profiles of f_α(○), f_β(●) and f_R(◐) of BMA in 0.10 M KCl at 25° . N-F and EXPANSION indicate the N→F and F→E transitions, respectively.

Fig. 3 ^{1}H-NMR spectra of the N-(pD 5.02), F-(pD 3.74), E-forms(pD 2.97) of HSA(4.84%) and IA-HSA(8.23 M urea, pD 7.93, 1.50%) in 0.10 M Cl^- at 25° . ★-marked signals indicated protons in deuterated urea.

Fig. 4 ^{1}H-NMR spectra of the N-(pD 5.41), F-(pD 4.00), E-forms(pD 2.96) of BMA(4.80%) and IA-BPA(8.23 M urea, pD 6.42, 1.50%) in 0.10 M Cl^- at 25° . ★-marked signals indicated protons in deuterated urea.

Table 1 Cross-relaxation times(T_{1S}) of HSA in 0.10 M Cl^- AT 25 °C, obtained by the inversion recovery method.

Form	pD	f_2(ppm)	$\gamma H_2/2\pi$(Hz)	T_{1S}(sec)				
				CH_3	εCH_2	αCH (4.26 ppm)	Arom	His C2H
N	5.02	-2.45	107	1.08	1.23	1.13	1.98	2.94
F	3.74			2.65	3.26	2.32	4.82	8.13
E	2.97			2.60	3.45	3.96	5.00	7.86
N	5.02	0.40	39	0.69	0.84	0.72	1.50	2.42
F	3.74			1.59	2.18	2.32	3.26	5.88
E	2.97			1.45	2.24	2.76	3.16	6.25
N	5.02	7.13	69	0.81	0.92	0.88	—	2.18
F	3.74			1.82	2.20	2.22	—	5.88
E	2.97			1.77	2.21	2.53	—	6.25
N	5.02	8.65	107	1.08	1.23	1.07	2.06	—
F	3.74			2.70	3.18	3.34	3.95	—
F	3.74			2.74	3.26	3.94	3.37	—

Table 2 Cross-relaxation times(T_{1S}) of BMA in 0.10 M Cl^- AT 25 °C, obtained by the inversion recovery method.

Form	pD	f_2(ppm)	$\gamma H_2/2\pi$(Hz)	T_{1S}(sec)				
				CH_3	εCH_2	αCH (4.28 ppm)	Arom	His C2H
N	5.31	-2.45	107	1.36	1.46	1.22	2.05	5.15
F	4.00			1.58	1.92	1.94	2.59	8.43
E	3.02			3.09	4.23	4.83	9.22	※
N	5.31	0.40	39	0.82	0.88	0.55	1.68	8.07
F	4.00			1.03	1.35	1.34	2.07	12.22
E	3.02			1.54	2.52	2.56	6.14	※
N	5.31	7.13	69	0.83	0.93	0.62	—	5.30
F	4.00			1.17	1.40	1.40	—	9.41
E	3.02			1.80	2.37	2.17	—	※
N	5.31	8.65	107	1.13	1.25	0.82	1.86	—
F	4.00			1.58	1.84	1.96	2.36	—
F	3.02			2.72	3.47	3.73	5.34	—

※. data were not given, because of too long.

Fig. 1

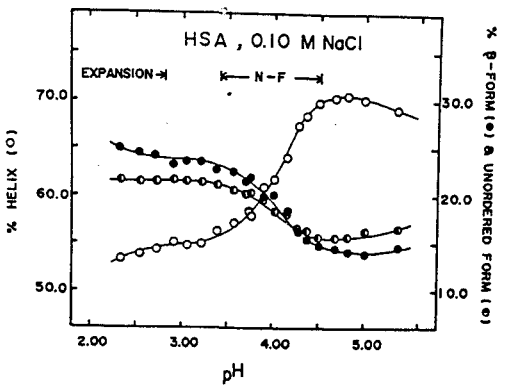


Fig. 2

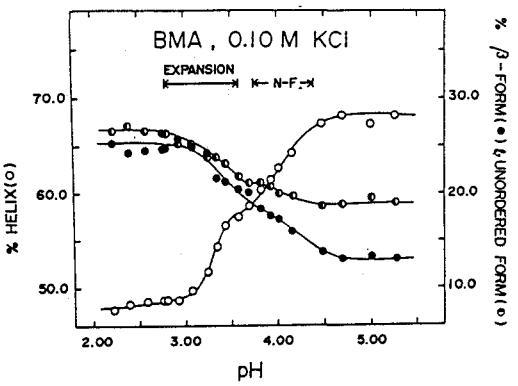


Fig. 3

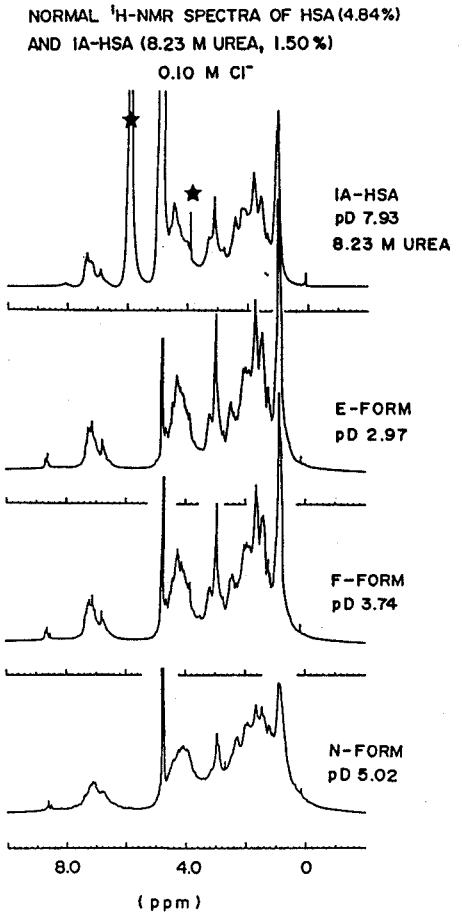
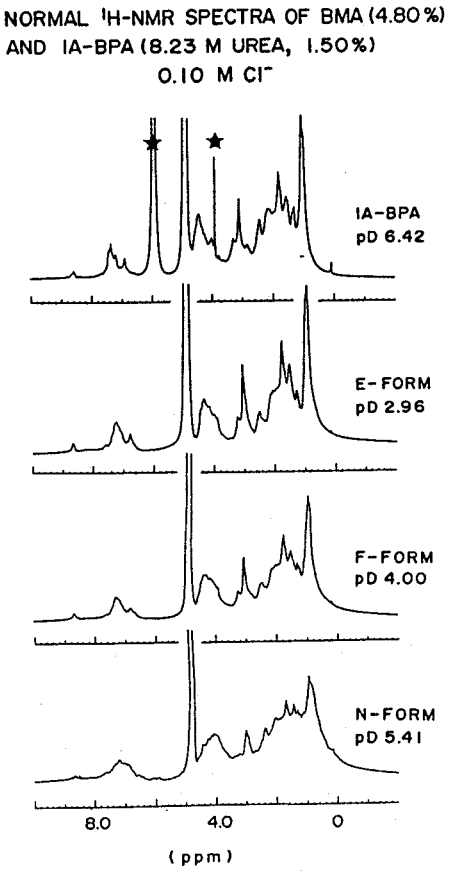


Fig. 4



P63

交差緩和時間測定による卵白アルブミン(ＯＶＡ)モルテン・グロビュール状態の研究

[1]岐阜大・医・生理，[2]藤田保衛大・衛生・生理，[3]近大・生物理工・生物
○惠良聖一[1]，曽我美　勝[2]，梶原孝彦[2]，小関泰平[3]，土居悦四郎[3]

Cross-relaxation studies on the molten globule state of ovalbumin

Seiichi Era[1], Masaru Sogami[2], Takahiko Kajihara[2], Taihei Koseki[3], Etsushiro Doi[3]
[1]Dept. of Physiol., Gifu Univ. Sch. of Med., [2]Dept. of Physiol., Sch. of Health Sci., Fujita Health Univ., [3]Dept. of Biotech. Sci., Faculty of Biotech. Oriented Sci. Tech., Kinki Univ.

Structural characteristics of ovalbumin (OVA) in the acidic (E-form) and neutral (N-form) regions were studied by measuring hydrodynamically equivalent radii, CD spectra, ^{1}H-NMR spectra and cross-relaxation time (T_{1s}).

Hydrodynamically equivalent radii and T_{1s} values for main and side chains protons showed 1.08 and 1.5 ~ 2.0 times increases, respectively, on going from the N- to E-forms. Molecular characteristics of the E-form, infard from far and near UV-CD spectra, hydrodynamically equivalent radii and elongation of T_{1s} values might indicate that the E-form of OVA might be the molten globule state.

１．はじめに

一般に，球状タンパク質の構造について，安定で正しい立体構造をもったネイティヴ状態と，立体構造が完全にほぐれた変性状態とが知られているが，タンパク質の立体構造形成過程において，両者の間に折りたたみの中間体が存在することが明らかになり，この中間体の構造は，1983年に，OhgushiとWadaによって，モルテン・グロビュール状態と呼ばれ[1]，これまでに多くの球状タンパク質で見いだされてきている。

卵白アルブミン(OVA)においては，Kosekiら[2]は，固有粘度やCDの測定によって，OVAの酸性pH域でのE型構造では，分子容や二次構造は，安定な中性pH域でのN型構造

キーワード：交差緩和時間，モルテン・グロビュール状態，卵白アルブミン

えらせいいち，そがみまさる，かじはらたかひこ，こせきたいへい，どいえつしろう

における値とほとんど同じであるが，芳香族側鎖の可動性の指標となる近紫外の誘起CDが消失することから，OVAのE型は，モルテン・グロビュール状態であろうと推論した。

従って，我々はさらに，動的光散乱法，500 MHz ^{1}H-NMRスペクトル及び交差緩和時間(T_{1s}; Akasaka[3]) を測定し，OVAのN型とE型におけるゆらぎの変化について検討した。

2．材料と方法

OVAはSigma社のGrade Vを使用した。このOVAを，さらに精製することなく，D_2O中に溶解し，pD 3.0～3.1，pD 7.2～7.3で希望するタンパク質濃度に，0.10 M DCl，0.10 M NaOD，0.10 M NaCl(D_2O)を用いて調節した。

OVAの分子容測定には，大塚電子社の動的光散乱測定装置(LPA 3000/3100型 ；励起波表，632.7 nm)を用いた。

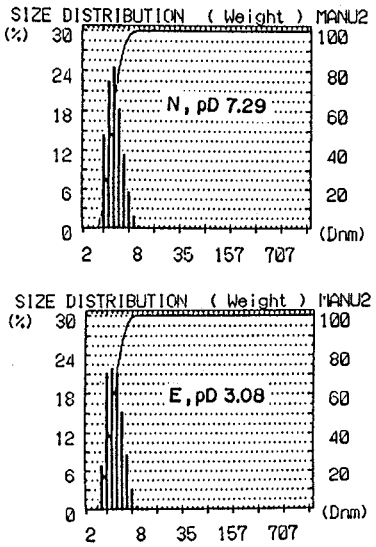
^{1}H-NMR測定には，Bruker社のAM 500スペクトロメーターに，インバース・プローブヘッド(5 mmφ)を装置し，25±0.02 ℃で測定した。タンパク質の主鎖及び側鎖のT_1は，インバーション・リカバリー法，T_2は，CPMG法を用いて測定した。T_{1s}は，Akasakaの方法[3]，即ち，f2照射下でのインバーション・リカバリー法によって測定した。

3．結果と考察

N→E転移におけるOVA溶液の粒径分布測定

632.7 nmのレーザー光を試料に照射すると，タンパク質分子からの散乱光は，それぞれの粒径に対応したゆらぎを示す。このゆらぎ，即ち，散乱強度の変動を光子相関法を用いて解析すると，タンパク質溶液の粒径重量分布が得られる。このようにして求めたOVAのN型(pD 7.29，0.10 M Cl^-)とE型(pD 3.08，0.10 M Cl^-)の測定例を，図1に示す。これによると，OVAはN型でもE型でも単分散で，それぞれの平均直径は4.8および5.2 nmであり，E型の平均直径及び分子容は，それぞれ，N型の1.08倍及び1.26倍であった。このような，E型における分子容の増加の程度は，他のタンパク質のネイティヴ状態からモルテン・グロビュール状態への構造変化で観測される増加(1.25～1.36倍)とほぼ同程度であった。

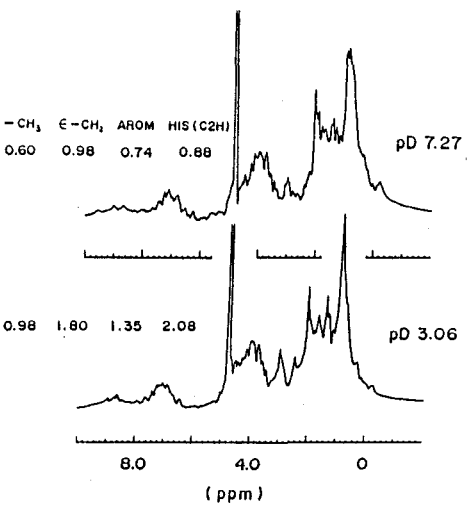
(図1)



N→E転移における^{1}H-NMRスペクトルの変化

OVAのN型(pD 7.27, 0.10 M Cl^-)とE型(pD 3.06, 0.10 M Cl^-)における500 MHz ^{1}H-NMRスペクトルを，図2に示す。この図において，OVAのN，E両型のスペクトル性状の明瞭な相違点を指摘することは困難であるが，このことは，OhgushiとWada[1]が最初にモルテン・グロビュール状態を定義したとき，そのNMRスペクトルの特徴として，モルテン・グロビュール状態においては側鎖などの可動性が増加するために，タンパク質分子内の磁場が平均化され，さらに均一になるためと説明したが，このことに起因する結果として，N型，E型の通常の^{1}H-NMRスペクトルでは，明瞭な相違点が観測されなかったと考えられる。しかし，この図の左側に付記しているT_{1s}値は，両構造間では大きく異なっているので，我々はこの点に着目した。

(図2)

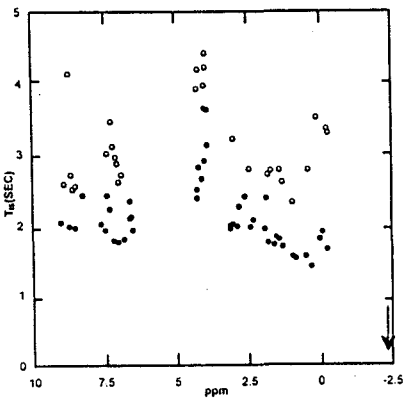


N→E転移と主鎖及び側鎖のT_{1s}の変化

^{1}H-NMRによるタンパク質構造の「ゆらぎ」の研究に，T_{1s}の測定が非常に有用であることが，Akasaka[3]によって指摘されている。彼によると，タンパク質分子のゆらぎが増すと，T_{1s}値は一般に長くなる。さらに，タンパク質分子の回転相関時間，即ち分子量が増すと，スピン拡散の速度が速くなり，しかもf_2照射部位より離れたプロトンまで，ほぼ一様な速さでスピン拡散すると報告している。

OVAのN型(pD 7.29, ●)とE型(pD 3.08, ○)を，-2.45 p.p.m.(↓，f_2照射部位)の部位を，107 Hz($\gamma H_2/2\pi$単位)の照射強度でf_2照射したときの，各側鎖のプロトン及び主鎖のαCプロトンのT_{1s}値を周波数(p.p.m.)に対してプロットした結果を，図3に示す。この結果から，E型においては，側鎖及び分子の内部構造のゆらぎが明らかに増加していることが分かる。

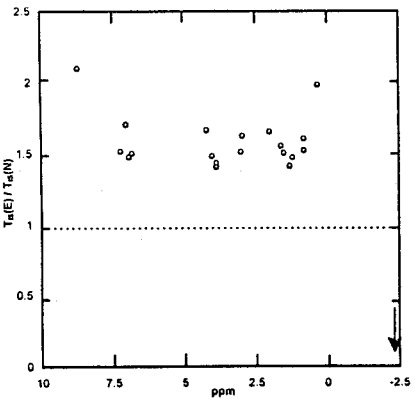
(図3)



さらに，図3に対応した側鎖プロトン及び主鎖のαCプロトンのT_{1S}(E)/T_{1S}(N)比の値を周波数(p.p.m.)に対してプロットした図を，図4に示す。T_{1S}(E)/T_{1S}(N)比は，約1.5～2.0となり，OVAのE型で有意に延長していることが分かる。

モルテン・グロビュール状態は，ネイティヴ構造に比較して，分子容，二次構造はさほど変化しないが，分子のゆらぎが増加した状態である。従って，以上の結果から，OVAのE型において観測される分子容の若干の増加，特徴的な^{1}H-NMRスペクトル，分子間スピン拡散速度の低下(T_{1S}の延長)によって示唆された，タンパク質分子ゆらぎの増加及びKosekiら[2]による遠紫外CDスペクトル(二次構造)，近紫外CDスペクトル(芳香族アミノ酸側鎖の誘起CD)の結果などから，OVAのE型構造は，典型的なモルテン・グロビュール状態であると結論される。

(図４)



４．文献

（１）Ohgushi, M., Wada, A. FEBS Lett. 164, 21 (1983)

（２）Koseki, T., Kitabatake, N., Doi, E. J. Biochem. 103, 425 (1988)

（３）Akasaka, K. J. Magn. Reson. 45, 337 (1981) ; Akasaka, K., ibid. 51, 14 (1983)

P64 新しい分子間交差緩和時間測定法とその応用

1. 藤田保衛大・衛生・生理，2. 稲沢市民病院・中研，3.岐阜大・医・生理，
4. 日本医大・生理
曽我美　勝[1]，○加藤一夫[2]，恵良聖一[3]，桑田一夫[3]，上坂伸宏[4]，
梶原孝彦[1]，中上　寧[1]

Magnetization transifer from irradiated protein or polymer protons to observed water protons

1. Dept. of Physiol., Sch. of Health Sci, Fujita Health Univ., 2. Clin. Labor., Inazawa City Hospt., 3. Dept. of Physiol., Sch. of Med., Gifu Univ. and 4. Dept. of Physiol., Nippon Med. Sch.
Sogami, M[1]., Kato, K[2]., Era, S[3]., Kuwata, K[3]., Uyesaka, N[4]., Kajihara, T[1]. and Nakagami, Y[1].

As the basic studies on the magnetization transfer contrast imaging (cross-relaxation imaging), the saturation transfer from irradiated protein or polymer protons to observed water protons with f_2-irradiation at -100～100 p.p.m. at $\gamma H_2/2\pi$ of 69～350 Hz were monitored with the Akasaka's saturation transfer method (1981, 1983). Plots of intermolecular cross-relaxation times (T_{IS}) vs position of f_2-irradiation (p.p.m.) were obtained on protein solutions, protein gels, synthetic polymer gels and living tissues. Plots of T_{IS} vs f_2 (p.p.m.) indicated that significant saturation transfer of protein gels, polymer gels and living tissues in the off-resonance f_2-irradiation might be attributed to extremely broad component in ^{1}H-NMR spectra.

[はじめに]　ウシ血漿アルブミン(BPA)の溶液→ゲル(BPA*ゲル)変換において，水分子のスピン格子緩和時間(T_1)，スピン・スピン緩和時間(T_2)が短縮するが，特に，タンパク質プロトンを f_2 照射して求めた水への分子間交差緩和時間(T_{IS})が大幅に減少することを見いだした。ついでラット正常肝，腫瘍肝の水の T_1 値は腫瘍肝が長いが，特に腫瘍肝の T_{IS} 値が正常肝に比べて長いことを見いだし，交差緩和イメージング法(MTC imaging，磁化移動イメージングと同等)を開発した(2)。磁化移動イメージングの基礎的研究としてオフ・レゾナンス照射による磁化移動を，Akasaka の飽和移動法(3)を用い，各種試料について系統的に研究した。

[実験材料と方法]　BPA 溶液，BPA*ゲル(1，2)，各種ソフトコンタクト・レンズ(SCLs，成高分子ゲル；筆者らのファントム)，ラット肝及び脳組織を Bruker 社 AM 500 を用いて測定した。T_{IS} 値は，原理的に Akasaka の方法を用いた(3)。S，I 2スピン系を仮定し，S スピン系プロトンをラジオ波で f_2 照射し，I スピン系の磁化変化を観測すると，[1]，[2]式のように変化する(飽和移動法，SAT.法)。

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

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

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

$$I_\infty/I_0 = T_1^*/T_1 \qquad [3]$$

インバージョン・リカバリー法(INV. REC.法)による T_{IS} 測定は，前述のように I スピン系の磁化が定常状態に到達した後，INV. REC.測定をすると，観測する I スピン系の磁化変化は[4]式のようになり，[2]式と同様 $1/T_1^* = 1/T_1 + 1/T_{IS}$ である。

$$I = I_\infty \{1 - 2\exp(-\tau / T_1^*)\} \qquad [4]$$

ところが，BPA*ゲル，生体組織などでは，f_2照射タンパク質プロトンより水への飽和移動の際，[4]式の INV. REC.法により求めた T_1^*を使用すると[3]式が成立しなかった。SAT.法により

キーワード：gel，magnetization transfer，off-resonance irradiation，water-polymer interaction

そがみ　まさる，かとう　かずお，えら　せいいち，くわた　かずお，うえさか　のぶひろ，なかがみ　やすし，かじはら　たかひこ

求めた T_1^*では[3]式が成立する。ただし，均一な合成高分子ゲル，タンパク質溶液では，何れの方法による T_1^*を用いても，[3]式は成立した(4)。筆者らは通常の方法で水分子の T_1 を測定し，ついで[3]式の SAT.法により，I_∞/I_0 を測定して飽和(磁化)移動の作用スペクトル，〔1 - (I_∞/I_0)〕 vs f_2 (p.p.m.) (3)及び T_1^*を求め，T_{IS} vs f_2 (p.p.m.)を +100～ -100 p.p.m.にわたって測定した。

［結果と考察］ 図 1 に BPA*ゲル(14.39%，pD 4.00，0.10 M Cl^-)の -30.00 p.p.m.，γ H_2/2 π ～350 Hz の f_2 照射前，後の ^{1}H-NMR スペクトルを示した。BPA*ゲルでは，大変ブロードな吸収線があった。この系で T_1，T_{IS} は，それぞれ 1.57，0.63 秒であった。IA-BPA(ヨードアセトアミドで SH 基を化学修飾した BPA，4.74%，pD 9.31，0.10 M Na^+)ではブロードな吸収線は観測されず，T_1，T_{IS} 値(図 1 と全く同一の f_2 照射条件)は，それぞれ 8.10，318 秒であった。即ちブロードな吸収線の観測されない場合は，オフ・レゾナンス照射による水分子への飽和移動は殆ど観測されなかった。BPA*ゲル(4.83%，pD 4.00，0.10 M Cl^-，○)，BPA*ゲル(14.39%，pD 4.00，0.10 M Cl^-，●)及び BPA 溶液(12.0%，pD 7.14，0.10 M Cl^-，□)を，それぞれ T_1 の 5 倍，γ H_2/2 π ～350 Hz で f_2 照射した際の作用スペクトル，〔1 - (I_∞/I_0)〕 vs f_2 (p.p.m.)及び T_{IS} vs f_2 (p.p.m.)を図 2A，2B に示した。12.0% BPA 溶液の ^{1}H-NMR スペクトルには図 1 のようなブロードな吸収線がなく，ブロードな吸収線をもつ 4.83%，14.39% BPA*ゲルの作用スペクトルと非常に異なった(図 2A)。また，図 2B に示したように，T_{IS} vs f_2 (p.p.m.)にも大きな差が観測された。γ H_2/2 π 単位で 69，107，150，200，250 Hz の f_2 照射においても，溶液，ゲル間に同様の差が観測された。図 1，2A，2B の結果は，オフ・レゾナンス照射による水分子への飽和移動における，巨大高分子集合体によるブロードな吸収線の寄与を示唆している。

合成高分子ゲル(SCL)(含水量，40.8～76.0%)は 2-hydroxyethyl methacrylate(HEMA)，glycerol methacrylate(GMA)，methyl methacrylate(MMA)，N-vinyl-2-pyrrolidone(N-VP)と架橋剤，allyl methacrylate(AMA)の重合体である。これらの ^{1}H-NMR スペクトルは，図 1 と同様にブロードな吸収線が観測された。γ H_2/2 π 単位で 107，150，250 ，350 Hz で f_2 照射し，〔1 - (I_∞/I_0)〕 vs f_2 (p.p.m.)及び T_{IS} vs f_2 (p.p.m.)を測定した。γ H_2/2 π ～350 Hz の結果を図 3A，3B に示した。図 3A の含水量 76.0(▲)，62.7(▽)，48.7%(△)は HEMA，N-VP が，それぞれ 39.9，59.8%；59.8，39.9%；79.8，19.9%であった(重量%)。含水量 76.0%の SCL(▲)の作用スペクトルは 12.0% BPA 溶液に良く似ており，対応した f_2 照射部位における T_{IS} 値は BPA の～1/2 であった。

ラット脳組織のγ H_2/2 π ～350 Hz の作用スペクトル，T_{IS} vs f_2 (p.p.m.)は図 3A，3B の■と▽，○の SCL の中間であった。脳組織では，150，250Hz の f_2 照射も使用した。ラット脳組織では，150，250，350 Hz の f_2 照射を用いた。350 Hz の f_2 照射による作用スペクトル，T_{IS} vs f_2 (p.p.m.)は，図 3A，3B の▽，○に近い結果を得た。上記の生体組織と BPA 溶液の結果より，合成高分子ゲル(SCL)は磁化移動イメージングのファントムとして有用であろう。

［文献］

1. Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S. et al (1986) Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130-140 ; Era, S., Sogami, M., Kuwata, K. et al (1989) ibid. 33, 214-222
2. Era, S., Kato, K., Sogami, M. et al (1986) Biomed. Res. 7, Suppl. 2, 41-46 ; Ueshima, Y., Sogami, M.,Kato, K. et al (1990) 9th SMRM Abstract p. 585
3. Akasaka, K. (1981) J. Magn. Resonance 45, 337-343 ; Akasaka, K.(1983) ibid. 51, 14-25 ; Akasaka, K., Ishima, R & Shibata, S. (1990) Physica B 164, 163-179
4. Sogami, M., Era, S., Kato, K. et al (1995) Magn. Reson. Med. (submitted)

Fig. 1 ^{1}H-NMR spectra of BPA*-gel (14.39%, pD 4.00, 0.10 M Cl^-) with f_2-irradiation at -30.00 p.p.m. and γ H_2/2 π ～350 Hz for 0.0001(☆) and 8.000(★) sec.

Fig. 2A Action spectra for the saturation transfer from irradiated protons to water protons (〔1 - (I_∞/I_0)〕 vs f_2 (p.p.m.)) for BPA*-gel (●, 14.39%, pD 4.00, 0.10 M Cl^-), BPA*-gel (○, 4.83%, pD 4.00, 0.10 M Cl^-) and BPA solution (□, 12.0%, pD 7.14, 0.10 M Cl^-), obtained by f_2-irradiation at γ H_2/2

π ~350 Hz at 25° .

Fig. 2B Plots of cross-relaxation times (T_{IS}) vs f_2 (p.p.m.) for BPA*-gel (●, 14.39%, pD 4.00, 0.10 M Cl^-), BPA*-gel (○, 4.83%, pD 4.00, 0.10 M Cl^-) and BPA solution (□, 12.0%, pD 7.14, 0.10 M Cl^-), obtained by f_2-irradiation at γ $H_2/2$ π ~350 Hz at 25°

Fig. 3A Action spectra for the saturation transfer from irradiated protons to water protons ([1 - (I_∞/I_0)] vs f_2 (p.p.m.)) for synthetic polymer gels, obtained by f_2-irradiation at γ $H_2/2$ π ~350 Hz at 25° .

Fig. 3B Plots of cross-relaxation times (T_{IS}) vs f_2 (p.p.m.) for synthetic polymer gels, obtained by f_2-irradiation at γ $H_2/2$ π ~350 Hz at 25°

Fig. 1

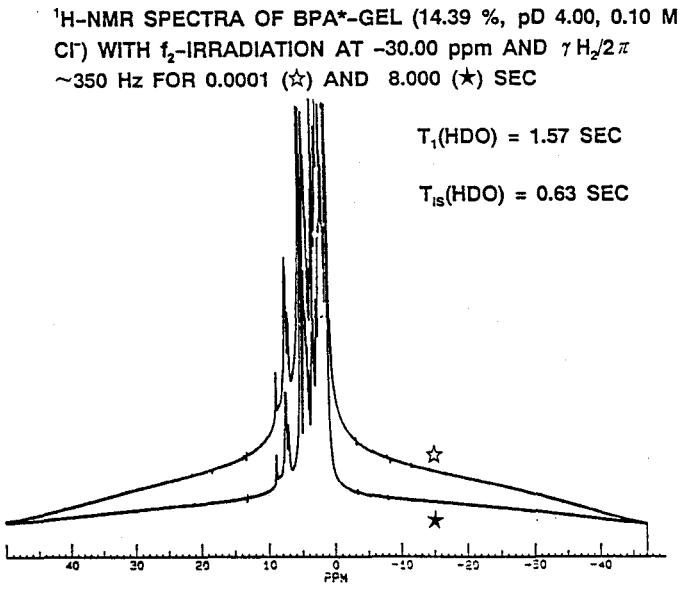


Fig. 2A

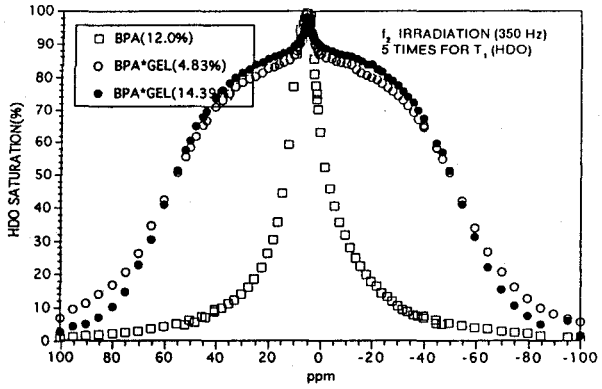


Fig. 2B

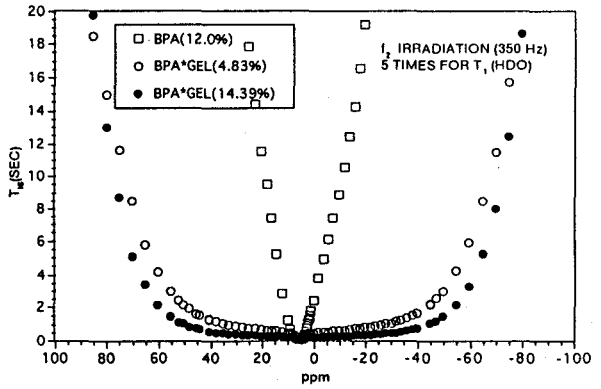


Fig. 3A

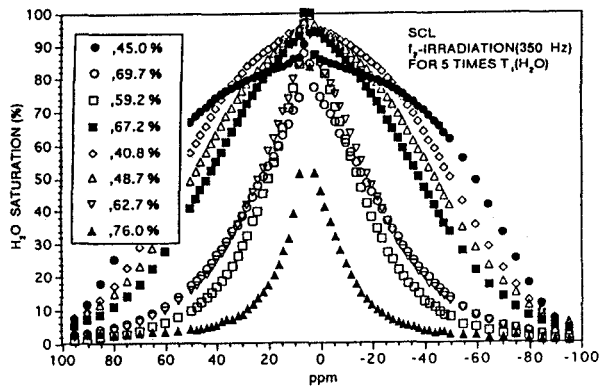
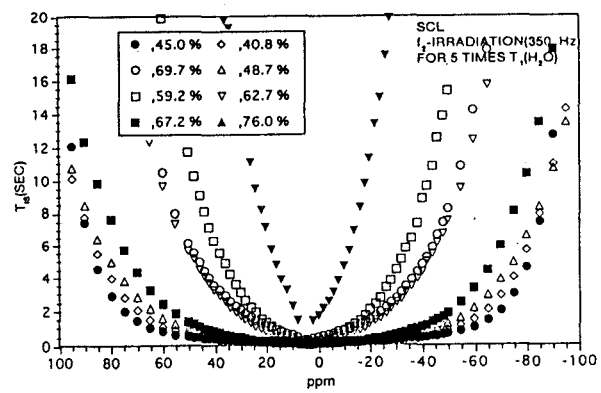


Fig. 3B



P65

酸素17-リン31分極移動法による選択的リン31-NMR観測

（日立基礎研）　○田村　充、　原田　義則

^{17}O-^{31}P Polarization Transfer Applied for the Chemically Specific Observation of a Phosphate Mixture

M.Tamura, Y.Harada, *Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd.*

ABSTRACT: To separate chemically specific ^{31}P-NMR spectra in the mixture, one dimensional ^{17}O-^{31}P HMQC experiments of oxygen-17 labeled phosphoric acid groups were done by a home-built ^{31}P-{^{17}O} NMR probe for wide-line NMR use connected to a commercial spectrometer. The relative sensitivity and specific observation examples of mixed solutions are presented.

1.動機、目的

^{31}P-NMRはリン酸代謝系の*in vivo*観測や、リン脂質膜の動態解析などに利用される[1]。生体などの混合物系において、リン酸基を含む化学種ごとの^{31}P-NMRスペクトルの識別ができれば、代謝追跡や、膜蛋白質を含む混合脂質膜の動態解析など、個々のリン酸基が含まれる化学種ごとの経時変化や動的挙動に基づくスペクトルを混合状態で分離測定できる点で利点がある。

そこで我々は、酸素17（安定同位体、天然存在比0.037%）標識リン酸基を対象とし、酸素17-リン31分極移動をリン31-NMRで検出することにより、標識リン酸化合物と無標識物のリン31-NMRを識別することを試みている[2]。以下、相対信号強度、混合試料における選択観測スペクトルについて述べる。

2.方法

現在までに、^{17}O照射、^{31}P検出コイルを有する広幅NMRプローブを製作した[2]。測定試料は直径5mmのガラス管に充填して検出コイル内に固定した。分極移動の検出は、図1に示す1次元HMQC[3]パルス系列を用いた。

酸素17標識リン酸化合物として79.1wt% 25.7atom% $H_3P^{17}O_4$ (Isotec, Inc.)を用いた。混合試料として、2mM無標識ADP, 150mM KCl, 8mM 25.7atom% $H_3P^{17}O_4$, 120mM KCl, 4mM $MgCl_2$, 20mM MOPS緩衝液(pH7.0)の水溶液を調整して用いた。

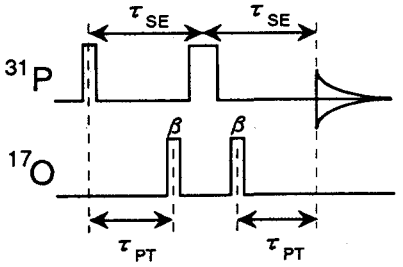


Fig. 1　One-Dimensional ^{17}O-^{31}P HMQC Pulse Sequence

リン31、酸素17、HMQC、選択観測

たむら　みつる、　はらだ　よしのり

3.結果[4)]

図2に、現状の装置での1次元^{17}O-^{31}P HMQCスペクトル信号強度の^{17}Oパルス幅依存性を示す。^{17}Oパルス幅を短縮すると信号強度が0に外挿されることから、孤立^{31}P由来の信号は消去され、HMQC信号のみが観測されたと言える。HMQC信号の最大強度は、スピンエコーを基準として -3.1×10^{-2} であった。この値は、観測条件(τ_{PT}=320μs, τ_{SE}=630μs)と分極移動の増強因子[5)]から次式によって見積もられる信号強度比 -3.0×10^{-2} とほぼ一致していた。

$$M_{HMQC}/M_{SE} = R\,\eta f$$

ここに、Rは同位体標識率、ηは分極移動の増強因子、fは観測パルス系列中の待ち時間τ_{PT}を変数とする周期関数である。なお、横緩和時間T_2よりもエコーインターバルτ_{SE}を短く設定するので、上式ではT_2による減衰は無視している。

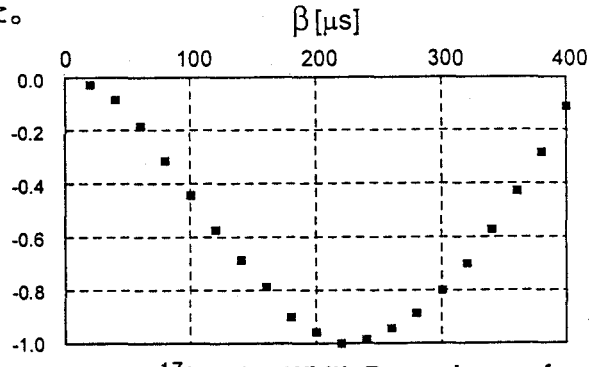


Fig. 2 ^{17}O Pulse Width Dependence of ^{17}O-^{31}P HMQC Spectra
Normalized by the intensity of β=220 μs

図3に、混合試料のHMQCスペクトルを示す。線幅およそ400Hzの、酸素17と結合したリン31が選択観測された。

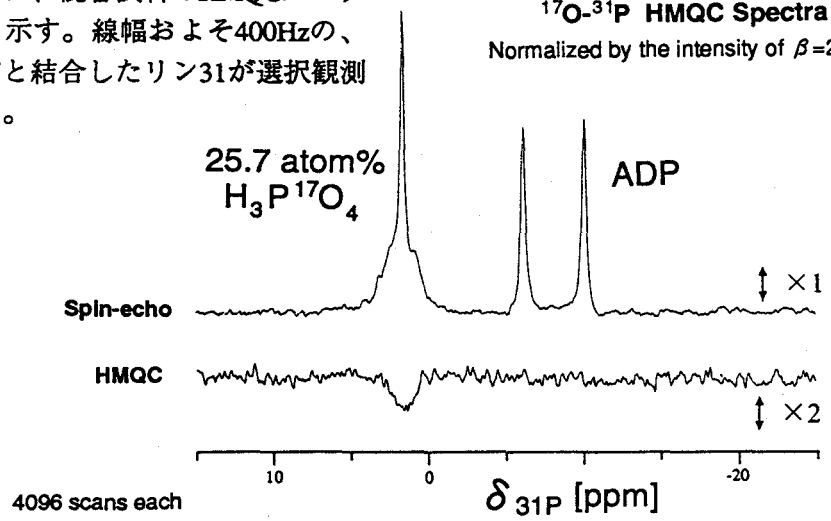


Fig. 3 ^{17}O-^{31}P HMQC Spectra of ^{17}O-phosphoric acid and non-labeled ADP in a buffered solution

References

1) P.L.Yeagle, *"^{31}P NMR and the Phospholipid Headgroups of Membranes,"* in C.T.burt eds., *"Phosphorus NMR in Biology,"* 95-133, CRC Press (1987)

2) 田村, 原田, 「酸素17標識リン酸基の選択的リン31-NMR観測」, 第33回NMR討論会要旨 (1994)

3) A.Bax, R.H.Griffey, B.L.Hawkins, *J.Magn.Reson.*, **55**, 301 (1983)

4) M.Tamura, Y.Harada, *J.Magn.Reson.(B)*, Oct. 1995, *in press*

5) R. R. Ernst, G. Bodenhausen, and A. Wokaun, *"Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions,"* Chap. 4, 184, Oxford University Press (1987)

P66 Analysis of Compartmentation and Anisotropy of Diffusive Motion of Water in Rat Sciatic Nerve Measured by ^1H Pulsed Field Gradient NMR.

°Yoshiteru SEO, Yasushi MORITA*, Yoshiaki KUSAKA* and Masataka MURAKAMI

Lab. for Magn. Reson. Imaging & Spectro., Dept. of Molec. Physiol., Natl. Inst. for Physiol. Sci., 38 Myodaiji, Okazaki, 444 Japan and *Dep. of Ortho. Surg., Kyoto Pref. Univ. of Med., Kamikyo-ku, Kyoto, 602 Japan

Summary Diffusion of water was measured in rat Sciatic nerve at 22.5 ± 0.5°C using the spin-echo pulsed-field gradient sequence. Three diffusion coefficients (ca. 1.1, 0.23 and $0.02 \cdot 10^{-9}$ m²/sec at a diffusion time of 10 msec) were obtained in the fresh nerve and showed minimal orientation dependency. The extracellular water signal was quenched by 10 mM $MnCl_2$ saline solution, and 10% of water signal remained. Two diffusion coefficients of water were observed. The faster diffusion coefficient (65% of the remained signal) was $0.8 \cdot 10^{-9}$ m²/sec when the axis of the nerve fiber was set in parallel to the gradient field (D_0), and was $0.3 \cdot 10^{-9}$ m²/sec when the axis of the nerve fiber was set in perpendicular to the gradient field (D_{90}) at a diffusion time of 10 msec. Values of D_{90} and D_0 decreased when diffusion time was changed from 3 msec to 50 msec. A diameter of cylinder (5.4 μm) was obtained on an assumption of restricted diffusion in cylinders, which agree with an average of inner diameter of axons in the Sciatic nerves.

Introduction Several reports demonstrated that apparent diffusion coefficients (D_a) of water in the central and peripheral nerve tissues depend on direction of axonal fibers, and suggested a restricted diffusion of water across axon fibers since the axon is tightly wrapped by the myelin sheath which might be a diffusional barrier of water. However, this hypothesis is not proven yet since they could not get diffusion time dependency of D_a. It is also very curious that all reports presented a single diffusion coefficient of water. We expect at least two diffusion coefficients correspond to the intra- and extracellular water. In this experiment, I tried to detect intracellular water in rat Sciatic nerve which is expected to be a quarter of the total nerve volume, and wish to confirm a restricted diffusion of water in axons.

Key Words: water, diffusion, pulsed-field NMR, restricted diffusion, peripheral nerve

Materials and Methods Diffusion coefficients were measured by using the spin-echo pulsed-field gradient sequence (SE-PFG; d-90°-t_1-δ-t_2-t_3-180°-t_1-δ-t_2-t_3-acquire). ^{1}H NMR spectra were acquired at 22.5 ± 1°C using an NMR spectrometer (MSL-100, 2.34 T, Bruker) with a diffusion probe (Diff25) consists with a 10 mm diameter RF-coil and an actively shielded gradient coil which can produce field gradient up to 6 T/m in parallel to the static field (Z-axis), and the eddy current settle down within 0.3 msec.

Pair of Sciatic nerves (wet weight 50 mg) were isolated from rat and the outer coat of adipose and connective tissues were removed very carefully in the saline solution (155 mM NaCl). The nerve was cut by 4 mm in length, and pieces of nerves were placed in parallel to an orthogonal axis a polyethylene box. The cube was placed in a flat-bottom NMR tube.

The diffusion coefficients (D) were calculated from the attenuation of the echo signal (M/M_o) described by the following expression:

$$M/M_o = \exp[-\gamma^2 \cdot \delta^2 \cdot g^2 \cdot (\Delta - \delta/3) \cdot D]$$

where δ is the width of the gradient pulse and Δ is the pulse interval.

Results and Discussion Three diffusion coefficients (ca. 1.1, 0.24 and $0.02 \cdot 10^{-9}$ m²/sec at a diffusion time of 10 msec) were obtained in the fresh nerve (Fig. 1a, b). The three diffusion coefficients showed minimal orientation dependency and diffusion time dependency with the diffusion time varied from 3 to 400 msec. A nerve consists of several compartments: an axon is tightly wrapped tenth times by the myelin sheath of the Schwann cells, hundreds of myelinated fibers are enclosed in concentric layers of connective tissue (perineurium), several fascicles are associates together by collagenous fibers running longitudinally (epineurium). Three T_1 and T_2 relaxation times of water were observed in the nerve after incubation in the Mn^{2+}-saline solution. Since the perineurium and epineurium can pass molecules such as sugars and ions, the myelin sheath might be the distinct diffusional barrier for Mn^{2+} ion.

The extracellular water signal was quenched by Mn^{2+}-saline solution, and 10% of water signal remained in the SE-PFG experiment. This water corresponds to the slowest T_2 relaxation compartment, and might be corresponds to the intra-axonal water. Two diffusion coefficients of water were observed. The faster diffusion coefficient (65% of the remained signal) was $0.8 \cdot 10^{-9}$ m²/sec when the axis of the nerve fiber was set in parallel to the gradient field (D_0), and was $0.3 \cdot 10^{-9}$ m²/sec when the axis of the nerve fiber was set in perpendicular to the gradient field (D_{90}) at a diffusion time of 10 msec (Fig. 1c, d).

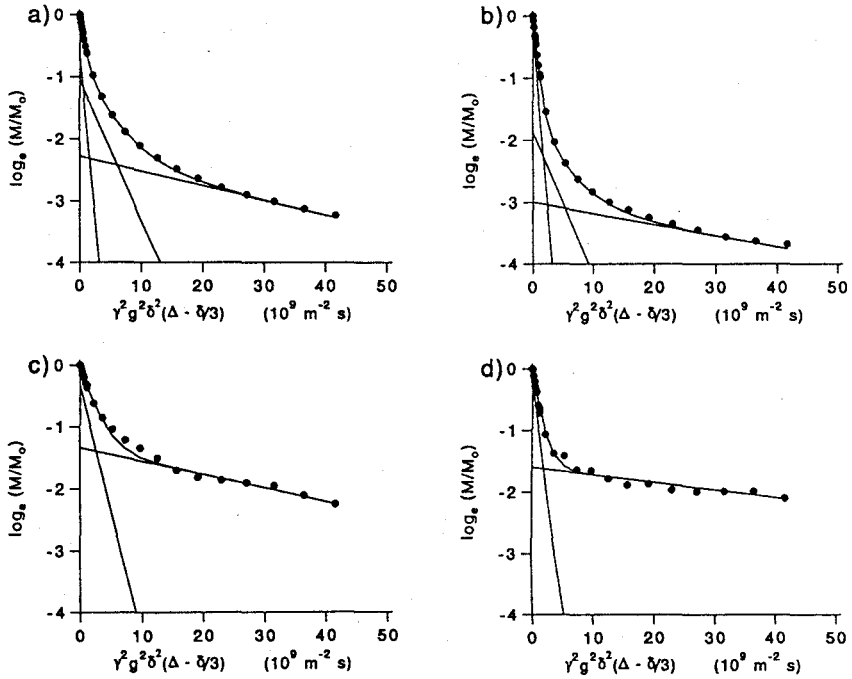


Fig. 1 Attenuation of the ^{1}H resonance of water in the rat Sciatic nerve observed with the SE-PFG sequence at 22.5°C. The gradient strength (g) was varied from 0.2 to 5.3 T/m (24 values were used), and fixed values of Δ (10.48 msec) and δ (1.44 msec) were used. Results of a non-linear two-exponential or three-exponential fitting were represented as bold lines. In the fresh nerve, a) three diffusion coefficients (0.024 ± 0.001, 0.226 ± 0.003, and 1.055 ± 0.006·10^{-9} m^2·sec^{-1}) were observed when the axis of the nerve fiber was set in perpendicular to the gradient field (D_{90}), and b) three diffusion coefficients (0.018 ± 0.002, 0.230 ± 0.008, and 1.185 ± 0.007·10^{-9} m^2·sec^{-1}) were observed when the axis of the nerve fiber was set in parallel to the gradient field (D_0). After the nerve was incubated for 30 min in the Mn^{2+}-saline solution, c) two D_{90} (0.022 ± 0.002, 0.408 ± 0.014·10^{-9} m^2·sec^{-1}), and d) two D_0 (0.012 ± 0.002, 0.725 ± 0.024·10^{-9} m^2·sec^{-1}) were observed.

Values of D_{90} and D_0 decreased when diffusion time was changed from 2.9 msec to 50 msec. The D_{90} reduced from 0.40 to 0.22·10^{-9} m^2/sec when the diffusion time was varied from 2.9 msec to 50 msec. This decrease is much smaller than the value expected from the restricted diffusion in the impermeable boundary. If the nerve fibers exactly oriented in parallel to the longitudinal axis, the D_{90} should reduce in the order of 10^{-11} m^2/sec due to the impermeable boundary. This higher D_{90} value might be due to variation of direction of nerve fibers.

We used a model for restricted diffusion in cylinders based on the dependence of the trace of the diffusion tensor on diffusion time [vanGelderen et al., JMR B103: 255, 1994].

Assuming cylindrical symmetry, the trace of the diffusion tensor is independent of orientation, and is the same as the average of the observed diffusion coefficients (D_0, D_{90}):

$$1/3 \cdot Tr(D) = 1/3(D_{//} + 2 \cdot D_{\perp}) = D_{av} = 1/3(D_0 + 2 \cdot D_{90}).$$

The diffusion coefficient of parallel to the cylinder axis ($D_{//}$) is the same as the diffusion coefficient of unrestricted (free) diffusion of intracellular water (D_f). The restricted diffusion coefficient perpendicular to the cylinder axis ($D_{\perp}$) described as follows,

$$D_{\perp} = 2 \cdot \{\Sigma [2 \cdot D_f \alpha_m^2 \delta - 2 + 2 \cdot \exp(-D_f \alpha_m^2 \delta) + 2 \cdot \exp(-D_f \alpha_m^2 \Delta)$$
$$- \exp(-D_f \alpha_m^2 (\Delta - \delta)) - \exp(-D_f \alpha_m^2 (\Delta + \delta))] / [D_f^2 \alpha_m^6 (R^2 \alpha_m^2 - 1)]\} / [\delta^2 (\Delta - \delta/3)],$$

where R is the radius of the cylinder, and α_m are the roots of the derivative of the Bessel function of the first kind, order one,

$$J'_1(\alpha_m R) = 0.$$

Numerical figures used for fitting were provided generously from Dr. van Gelderen. Results of fitting the observed D_{av} to the $1/3 \cdot Tr(D)$ are shown in Fig. 2. The estimated free diffusion coefficient (D_f) is $1.1 \cdot 10^{-9}$ m²/sec and the radius of cylinders (R) is 2.7 μm.

The Sciatic nerve is the typical peripheral nerve consists of motor and sensory neurons, so that diameter of axons varied from 1 to 30 μm. The calculated diameter of cylindrical diffusion barrier (5.4 μm) is in good agreement with the diameter of the axons (inner diameter of myelin sheath) 4 ± 2 μm (mean ± S.D.).

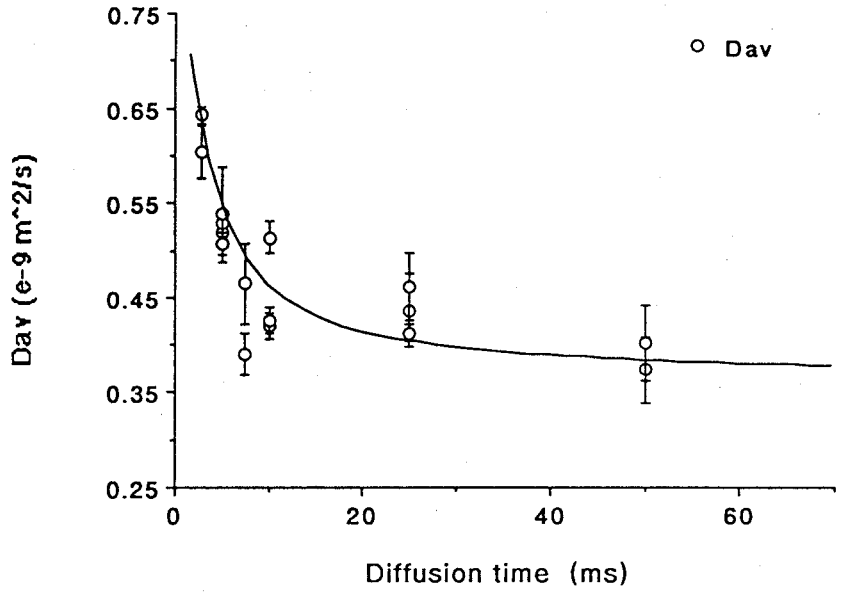


Fig. 2 The averaged diffusion coefficient ($D_{av} = 1/3(D_0 + 2 \cdot D_{90})$) of water at various diffusion times ($\Delta - \delta/3$) in the nerve incubated in the Mn^{2+}-saline solution. A bold line shows a result of fitting D_{av} to the $1/3 \cdot Tr(D)$. The estimated free diffusion coefficient (D_f) is $1.1 \cdot 10^{-9}$ m²/sec and the radius of cylinders (R) is 2.7 μm.

P67

生体試料のための高速２次元HMQC測定法の開発

○高橋征三、荻野孝史*
日本女子大・理・物生、国立精神・神経センター神経研究所 *

Rapid 2D-HMQC Measurement of *in vivo* Samples

Seizo Takahashi and Takashi Ogino*

Dept. Chemical and Biological Sciences, Japan Women's Univ., and
*Institute of Neuro Science, NCNP

Rat brain tissue was investigated by CH-HMQC spectra. Since the signal decay is profound due to the intrinsic inhomogenious environment in the sample, the conventional pulse sequence was considered to be more improved. Thus, the T_1 decay sequence of ^1H center peak by BIRD pulse was replaced by T_2 decay sequence. Preliminary result indicates that the center peaks are suppressed reasonably well within the order of ms which is in contrast to some 100 ms of waiting time by BIRD pulse. With the aid of this new pulse sequence together with the help of 10 mm probe, 2D-HMQC spectra of *in vivo* samples are expected to get in an hour with reasonably well S/N ratios.

生体組織は複雑な形状の固体成分と細胞液からなる不均一系であり、その中に多種多様の物質が混合して存在する多成分系である。しかもこれらの成分は動的平衡にあり、時々刻々と変化すると考えられる。このような生体組織を対象とする *in vivo* NMRには*in vivo*系固有の問題が存在する。NMRで脳の代謝機能を研究する場合、スペクトルが複雑に重なり合い、従来行なわれている１次元NMRスペクトルからの解析では研究対象がきわめて限られていた。我々はこの問題を克服するために 2次元NMRを*in vivo*系へ適用することを試みている。

昨年、本討論会において、super-COSYの結果について報告した．super-COSYは、感度も申し分なく、一般的な代謝物質の追跡には最も強力な方法であることが分かった。しかしこの方法は、微量で観測にかからない特定の成分をラベルをして追跡する目的には適していない。そこで本研究ではCH-HMQCについて検討した。HMQCは^1H-COSYに比べて感度が低いので、感度向上の方策としてT_2による信号の減衰に注目し、パルス間の待ち時間の短縮をはかった。

キーワード: NMR、in vivo、HMQC、pulse
○たかはし せいぞう、おぎの たかし

［実験］装置はBruker AMX-400WBを使い298Kで測定した。プローブはBrukerの5mm HXプローブとNaloracの10 mm HXプローブを用いた。in vivo試料としては7週令の Wister Ratの脳を用た。

［結果］in vivo試料はT_1や本来のT_2に比べて、試料の不均一による見かけの T_2が極端に短いという特徴がある。この性質を積極的に利用するために、目的の核スピンが XY軸上に滞在する時間をできるだけ短縮し、かつ見かけの T_2を利用して不要の信号を消去することを考えた。

図1は今回テストしたパルス列である．BIRDパルスの代わりに、Y方向から90度パルスをかけsatelliteピークをZ方向にしてcenterピークがT_2で減衰するのを待った後、もとの方向に戻し通常の方法で測定するという、考えられる限り最も単純なパルス列である。

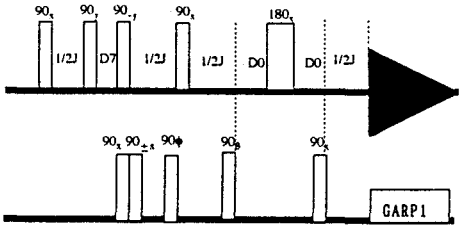


図 1 HMQC Pulse Sequence

図2はcenterピークがどの程度抑制されるかを示すために、 0.1Mグルコース溶液について待ち時間が5msと500msという両極端の場合について示した。図から明らかなように、均一試料の場合でも、待ち時間は数 ms程度で十分である。待ち時間を変えても不要信号抑制の程度はほとんど変化しなかった。

大口径の試料は磁場の不均一などで、思ったほど効果があがらないのが普通である。事実10mm試料管で ^1H super-COSYを測定しても全く効果がなかった。HMQCは、COSYより有利であると考えられるので、今後検討する予定である。

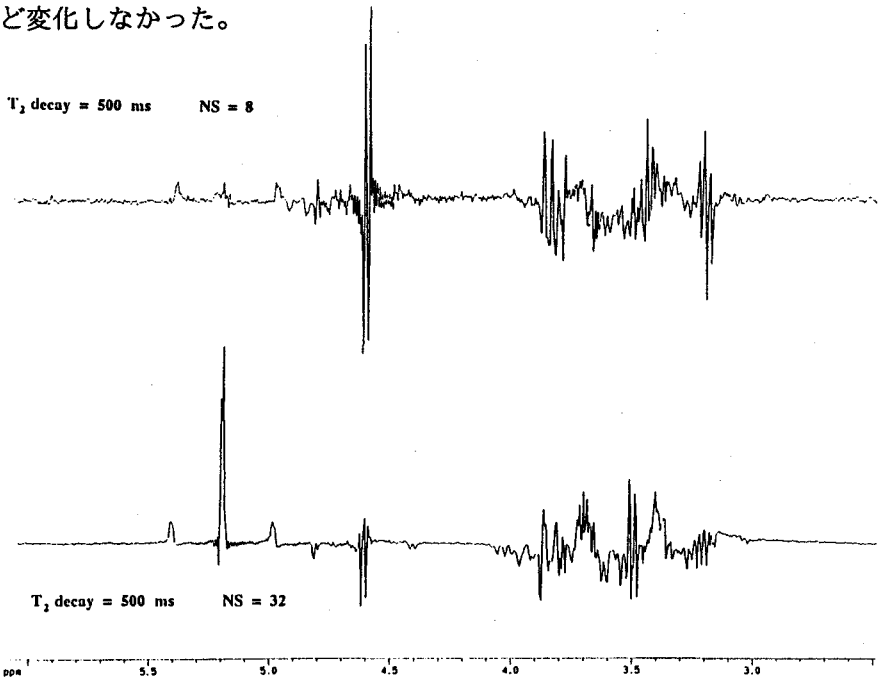


図 2 The Effect of Center Peak Suppression by T_2 Decay Pulse

P68 ^{31}P-飽和移動NMR法によるヒト骨格筋の酵素反応速度の測定

(徳島大・医・生理[1]、京府医大[2]、神戸大・発達科学部[3]、生理研[4])
○吉崎和男[1]、早野尚志[2]、平川和文[3]、村上政隆[4]、亘　弘[4]

^{31}P-Saturation Transfer NMR Study on Creatine Kinase Flux in Human Skeletal Muscle.

K. Yoshizaki[1], T. Hayano[2], K. Hirakawa[3], M. Murakami[4], and H. Watari[4] ([1]Dept. Physiol., Sch. Med., Univ. Tokushima, [2]Kyoto Pref. Univ. Med., [3]Kobe Univ., and [4]Natl. Inst. Physiol. Sci.)

^{31}P-saturation transfer NMR system was successfully developed on an MRI/MRS system to measure the flux of creatine kinase reaction in human skeletal muscle using a surface coil.

^{31}P-飽和移動NMR法の生体系への応用として、高分解能NMR装置を用いてカエル骨格筋におけるクレアチン・キナーゼ反応のフラックス測定について、本討論会ですでに報告した[1]。ところが、人体用MRI/MRSシステムでは種々の制約のため、^{31}P-飽和移動NMR法が通常装備されていない。

今回、人体用MRI/MRS装置で^{31}P-飽和移動NMR法が実施できるように改良し、ヒト骨格筋のクレアチン・キナーゼ反応の非侵襲・非破壊的な測定が可能となったので報告する。

【方法】

NMR装置として、生理研・磁気共鳴室の日立製MRI/MRS装置の横置型超伝導磁石(磁場強度2.1T、ボアー径 67cm)ならびにスペクトル測定に日本電

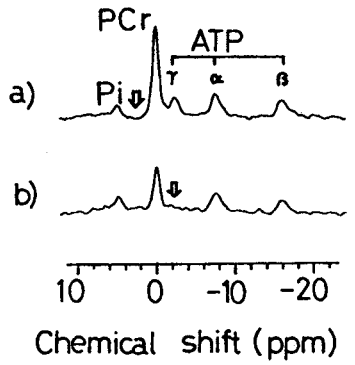


Fig. 1 ^{31}P-saturation transfer NMR spectra of human skeletal muscle to measure the flux of creatine kinase reaction. (The arrow: the irradiation position, PCr: phosphocreatine).

キーワード：^{31}P-NMR、磁化移動、骨格筋、クレアチン・キナーゼ、ヒト

よしざき　かずお、はやの　たかし、ひらかわ　かずふみ、むらかみ　まさたか、わたり　ひろし

子製JNM-EX90システムを用いた。^{1}Hおよび^{31}Pの共鳴周波数は89.9および36.3MHzであり、直径4cmの表面コイルをNMR信号の検出に用いた。

測定対象として、100mM無機リン酸および50mMピロリン酸の水溶液(pH 7)をプラスチック容器にいれた試料を^{31}P-飽和移動NMR法のための調整に用いた。安全性の確認として実験動物に用いた後、ヒト(健康成人)の四肢の骨格筋に応用した。

[結果および考察]

1.^{31}P-飽和移動NMR法の開発。

人体用NMR装置において、^{31}P-飽和移動NMR法を実施するためにハードウエアおよびソフトウエアを改良した。まず、特定の共鳴線を磁気飽和させるために、その共鳴周波数のラジオ波(RF)を照射するパルス系列を作成し、その照射強度、照射時間、照射幅を決定した。

その際に最も問題になったのはRF照射にともなうノイズの増加を抑えることであった。とくに、RF送信部の最終段のRF電力増幅器について、通常使用していたpulse modeを照射のためにcw modeにすると、^{31}P-NMR信号が埋もれてしまうほどにノイズが大きくなった。このため、RF電力増幅器のcwとpulse modeの手動切り替えをコンピュータ制御できるように改良した。さらに、RF受信部ではRF前置増幅器にgateを設けた。RF送信中にはRF前置増幅器が稼働しないようにし、ノイズの増加ならびにRF前置増幅器の劣化を防いだ。

このような装置の改良のもとに、ヒト骨格筋におけるクレアチン・キナーゼ反応の測定に応用した。ヒト骨格筋の^{31}P-NMRスペクトルを表面コイルで測定し、ATPのγ位のリンの共鳴線を磁気飽和させて測定すると、クレアチンリン酸の共鳴線の強度(面積)が65±7% (n=4)に減少した(Fig. 1)。すなわち磁気飽和されたATPのγ位のリン原子がクレアチン・キナーゼ反応によって、クレアチンリン酸のリン原子へ移動していることが観測できた。

2.表面コイルによるスピン・格子緩和時間の測定。

^{31}P-飽和移動NMR法でクレアチン・キナーゼ反応のフラックスを求めるには、クレアチンリン酸のスピン・格子緩和時間T_1を測定する必要がある。

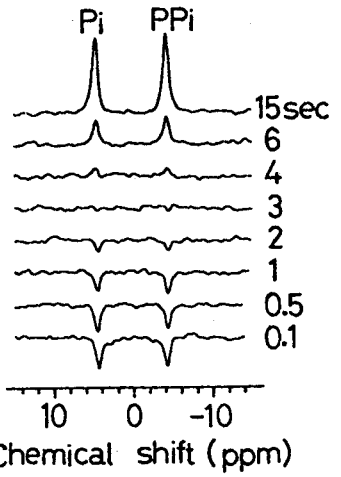


Fig. 2 ^{31}P-NMR spectra of a model solution of inorganic phosphate (Pi) and pyrophosphate (PPi), showing the inversion of magnetization detected by a surface coil. A depth pulse was used for the inversion-recovery sequence ($2\theta-\tau-\theta$), and the interval (τ) is shown on the right-hand side of each spectrum.

表面コイルではB_1磁場が不均一であるため、$\pi/2$およびπパルスが一義的に設定できない。しかし、Bendall & Gordon[2]が提唱したdepth pulseを用いると、表面コイルでもinversion-recovery法($2\theta-\tau-\theta$パルス系列)で磁化を反転させることができた(Fig. 2)。簡単に説明すると、θパルスによるNMR信号の観測には、実際には$\theta\cdot 2\theta\cdot 2\theta\cdot$acquisitionを実行する。$\theta$を$\pi/2$パルスと考えると、これはスピン・エコーのパルス系列であり、2回目のエコー信号を計測することになる。このことによって、測定対象の試料のうち、B_1磁場が$\pi/2$ならびにπパルスになった部位からはエコー信号が生じるが、他の部位からのNMR信号は、RFパルスの位相を変化させてNMR信号の積算の際に消去させるのである(Fig. 2のスペクトルは16回の積算である)。従って、パルスとパルスの間隔(・)は、最短の時間に設定し、スピン・スピン緩和による信号の減衰をできるだけさける。この方法によって、表面コイルでも磁化を反転させることができ、T_1測定にinversion-recovery法が利用できる。しかし、パルス系列の繰り返しの待ち時間を5～6倍のT_1にする必要があり、生体を対象とする場合には実用的でないため、これ以上は検討しなかった。

つぎに、パルス系列の繰り返しが短時間でよいsaturation recovery法を検討した。最初に、すべての核スピンを磁気飽和させる方法として、Reesら[3]がヒトに用いたhomospoil saturation recovery法を追試した。横磁化を消去するためのホモスポイル・パルスにはイメージング用傾斜磁場を用い、そのパルス制御回路を試作した。RFパルスとNMR信号を消去するためのホモスポイル・パルスの一組を10msで32回繰り返した。しかし、初期磁化の飽和が完全でなく、残存磁化が有意に生じるという問題が生じた。

さらに、表面コイルによるT_1測定法についてEvelhoch & Ackerman[4]が推奨するpulse-burst saturation recovery法を検討した。RFパルスのみを多数回繰り返して磁気飽和させる方法であり、初期磁化の飽和もほぼ完全であった(Fig. 3)。

ヒト骨格筋について、ATPのγ位のリンを磁気飽和させた条件下で、このpulse-burst saturation recovery法でクレ

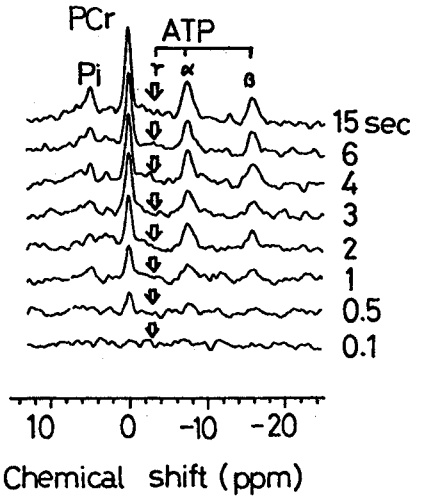


Fig. 3 ^{31}P-saturation recovery NMR spectra of human skeletal muscle in the presence of irradiation at ATP γ-phosphate resonance. The recovery time of the magnetization is shown on the right-hand side of each spectrum.

アチンリン酸のT_1を計測すると、2.8±0.5s (n=4)となった(Fig. 4; T_{1m}と表す)。

3.ヒト骨格筋における筋細胞内クレアチン・キナーゼ反応のフラックス。

^{31}P-飽和移動NMR法によって得られたヒト骨格筋の測定結果をここにまとめる。^{31}P-NMRスペクトルを表面コイルで測定し、ATPのγ位のリンの共鳴線を磁気飽和させると、クレアチンリン酸の共鳴線の強度が65%になった。ATPのγ位のリンの共鳴線を磁気飽和させた条件下で、クレアチンリン酸のスピン・格子緩和時間(T_{1m})を測定すると、2.8 sであった。これらから計算したクレアチンリン酸のintrinsic T_1は4.3 sとなり、クレアチン・キナーゼ反応(PCr -> ATP)のみかけの速度係数は0.13 s^{-1}となった。ATP濃度を8.2 mmol/l cell water(= 5.5 mmol/kg wet weight)と仮定すると、共鳴線の面積比からクレアチンリン酸の濃度は30 mmol/l cell waterとなった。この値に速度係数を乗算して、クレアチン・キナーゼ反応のフラックスは3.9 mM/sとなった。組織重量あたりで示すと、2.6 mmol・kg^{-1}wet weight・s^{-1}であり、以前に報告したカエル骨格筋の値[1)]、3~4 mmol・kg^{-1} wet weight・s^{-1}と同じオーダーとなった。

以上のように人体用のMRI/MRSで^{31}P-飽和移動NMR法の応用が可能となった。今後、筋組成ならびに運動負荷による変化、さらに脳などへの応用についても検討する予定である。

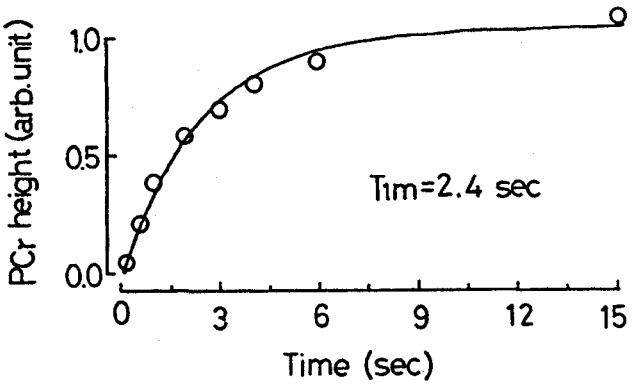


Fig. 4 Time course of the recovery of magnetization of phosphocreatine in human skeletal muscle obtained from Fig. 3.

[謝辞] 本研究は生理研・生理機能研究施設の磁気共鳴装置を利用した。表面コイルでの緩和時間測定について助言頂いた環境研・三森文行氏、技術的援助を賜った生理研・市川修氏、日本電子データム・小川秀次郎氏ならびに徳島大・北村光夫氏に感謝します。

[文献]

1) Yoshizaki, K. et al. (1991) NMR Biomed. 4:25.
吉崎和男ほか、第28回NMR討論会講演要旨集 pp.289 (1989)
2) Bendall, M.R. & Gordon, R.E.(1983) J. Magn. Reson. 53:365.
3) Rees D. et al.(1989) Magn. Reson. Med. 9:39.
4) Evelhoch, J.L. & Ackerman, J.H.(1983) J. Magn. Reson. 53:52.

P69

^{31}P NMRによるカドミウムの肝エネルギー代謝のアンカップリング作用に関する研究

○三森文行[1]、吉岡　大[1,2]、板井悠二[3]
([1]国立環境研究所、[2]放医研治療診断部、[3]筑波大放射線)

^{31}P NMR study of uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver caused by cadmium chloride

Fumiyuki MITSUMORI[1], Hiroshi YOSHIOKA[1,2], Yuji ITAI[3]
([1]National Institute for Environmental Studies, [2]National Institute of Radiological Sciences, [3]Tsukuba Univ. Radiol.)

Cadmium is known to be the causative factor in Itai-Itai disease, and damages liver, kidney, and other organs. The aim of this study is elucidation of effects of Cd on energy metabolism in rat liver using phosphorus-31 NMR. In the liver of rat which was injected with $CdCl_2$, both Pi and NTP peaks gradually decreased over a 6 hour period. However, an increase in Pi along with a decrease in NTP was observed in the perchloric acid extract of the Cd-treated liver. From these results we concluded that Cd uncouples the oxidative phosphorylation reaction in liver mitochondria, which decreses the visibility of Pi due to its uptake into mitochondria.

【はじめに】　Cdはイタイイタイ病の原因物質として知られる重金属であり、多くの体内臓器に変調をきたすことが知られている。しかし、その毒性発現の機構は十分には解明されていない。本研究ではラットに塩化カドミウムを投与し、その結合蛋白質であるmetallothioneinが発現される前の急性期の肝エネルギー代謝系の変化を^{31}P NMRにより追跡した。

【方　法】　ラット肝の^{31}P NMRスペクトルは、麻酔下で開腹処置により露出させた肝上面に直径17mmの自作表面コイル検出器（^{1}H、^{31}P、^{13}C３核同調）を当て、単一パルス法により、Biospec24/30分光計システム(2.35T)で測定した。麻酔は50％O_2、50％N_2Oガス吸気中に1％halothaneを用いて行った。ラットの大腿静脈にカニューレを挿入し、これよりCd投与群では、10mM $CdCl_2$水溶液を1mg Cd/kg体重、コントロール群では、同量の生理食塩水を投与した。^{31}P NMRスペクトルは、パルス繰り返し時間2秒で600回積算し、30分ごとに測定を繰り返した。得られたスペクトルは、プロファイル処理後、カーブフィッティング法により面積強度を定量した。面積強度は、パルス繰り返し時間７秒で測定された完全緩和スペクトルとの比較により部分飽和の補正を行い、未処置肝の

in vivo ^{31}P NMR, rat liver, cadmium, oxidative phosphorylation, Pi visibility

みつもり　ふみゆき、よしおか　ひろし、いたい　ゆうじ

ATPβの強度を2.8μmol/g wwとして代謝物濃度を定量した。測定後、液体窒素を用いてフリーズクランプした肝の過塩素酸抽出を行い、中和後、抽出液の^{31}P NMRスペクトルを日本電子GX400分光計(9.4T)により測定した。

【結果と考察】　正常ラット肝ではATP, Pi, PME, PDE等の代謝物が6時間にわたってほぼ定常状態に保たれるのに対し、$CdCl_2$投与ラット肝ではATPβ, Piの共鳴線強度が徐々に減少した（図１）。定量の結果、投与後310分までで、ATPは2.88→2.28μmol/g ww、Piは1.28→0.64μmol/g wwと減少していた。この結果はCdが肝のATP生成の阻害、または消費の増大をもたらしていることを意味する。通常ATPの減少は、その加水分解によるPiの増加を伴い、ここでみられるようにPiも共に減少するのは普通ではない。しかし、Cd投与ラット肝抽出液の測定では、in vivoとは逆に正常肝に比べてPiが増加していることがわかった（表1）。この結果は、in vivoでのPiの減少がvisibilityの低下によるものであることを強く示唆する。

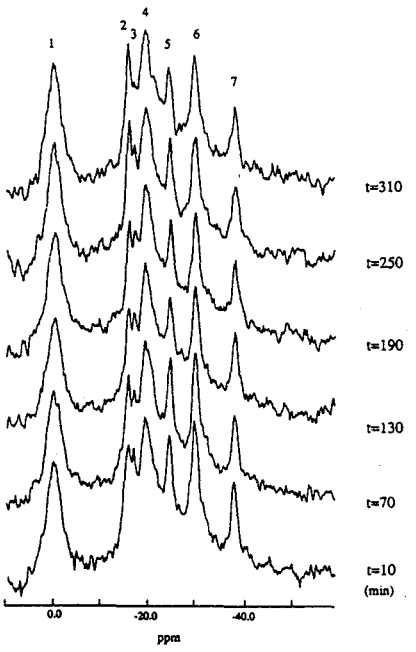


Fig.1. In vivo ^{31}P NMR spectra of the liver of a Cd-treated rat. Time after injection of $CdCl_2$ is shown. 1, MDP (ref.); 2, PME; 3, Pi; 4, PDE; 5-7, γ, α, β of NTP.

一方、寺田らはラット肝より調製した遊離ミトコンドリアにおいてCd^{2+}イオンがアンカプラーとして働くことを示している[1]。さらに、Cd^{2+}のアンカプリング作用にはPiのミトコンドリア内への取り込みが必須であるとされる。本研究でみられたCd投与肝でのATPの低下と、Piのvisibilityの低下はこの遊離ミトコンドリアで得られた結果とよく一致している。すなわち、in vivo肝でもCdはアンカプラーとしてミトコンドリアに作用し、この結果ATPが低下、またこのアンカプリングに伴うPiの細胞質からミトコンドリアへの取り込みによってPiのvisibilityが低下したと考えられる。正常ラット肝ではPiのvisibilityは34%と算出され、この値は既報の結果とほぼ一致するが、Cd投与肝ではPiのvisibilityは10%と著しく低下している。

Table 1. Concentrations of phosphorus metabolites in the liver extracts measured by ^{31}P NMR

	Pi	NTP	NDP	GPC	GPE	P-cho
control	4.18 ± 0.23	2.82 ± 0.19	1.92 ± 0.10	1.66 ± 0.11	1.57 ± 0.18	3.22 ± 0.42
Cd	6.06 ± 0.58*	1.68 ± 0.22**	2.03 ± 0.06	4.34 ± 0.84*	1.77 ± 0.13	4.85 ± 0.44*

Results are means ± standard error expressed as μmol / g wet wt.　*$p < 0.05$; **$p < 0.01$

【文　献】

[1] H.Koike, Y.Shinohara, H.Terada, Biochim.Biophys.Acta, 1060, 75-81 (1991).

P70 高血圧症モデルラット脳のMRIと病変組織、血管構築像との相関

（近畿大、医、生理学１）○千葉　惇、秩父志行
（近畿大、医、病理学１）　太田善夫

Relations among MRI , pathological changes and vascular architecture in M-SHRSP

Atsushi Chiba, Yoshio Ohta* and Shiko Chichibu

Departments of Physiology and *Pathology, Kinki University School of Medicine, Osaka-Sayama, Osaka 589

MRI, histopathological and vascular architecture in the brain of malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats (M-SHRSP) were studied to establish solid relations between MRI and structural changes in the brain. Both edema and infarct were clear in the coronal T2 weighted images than in the coronal T1 weighted images. After magnevist injection, T1 weighted images clearly showed areas of injured blood-brain barrier. Comparison of the above-stated score values showed that the parallel relationship between MRI and histopathological findings is fairly good. The vessel visualized by vascular cast formed multiple microaneurysms with the severity of hypertension.

M-SHRSP（悪性脳卒中易発性高血圧自然発症ラット）は、SHRSPから分離樹立された高血圧症モデルラットの一つである。このラットは、週令７週より血圧が上昇し始め１５週で収縮期血圧が約３００mmHgまでに上昇し、死亡する特徴をもつ。そのため、もっとも悪性の高血圧モデルラットとして有用である。

本研究では、高血圧症の病変の進行を推定するために、M-SHRSPを用いて脳のMRIとその病変組織、血管走行を調べた。

「材料と方法」

１４週令のオスのM-SHRSPを用いた。pentobarbital (30 mg / kg)腹腔内投与後に4.7テスラーのMRIシステム(OMEGA CSI-II, GE Inc.)を用いてT1とT2一強調画像を求めた。造影剤であるマグネヒストを尾静脈内に0.1 mmol /kgを投与してT1一強調画像を得た。前頭葉先端から小脳の後端までを８等分し、それぞれの前額断面について調べた。MRI画像と病理組織学的所見をスコア化（表１）し、両者を客観的に比較した。脳を前額断面で８等分した標本のそれぞれについてスコアを求め、総和した。病理組織切片は、H.E.染色を行った。脳血管鋳型像を得るために左心室に直径1.2mmのカテーテルを挿入し、脱血灌流後にメルコックスを注入した。組織をアルカリで処理したのちに脱水、臨界点乾燥し、SEMで観察した。

MRI, M-SHRSP, cerebrovascular lesion, MRI score, vascular cast

ちばあつし、ちちぶしこう、おおたよしお

「結果と考察」

検索したラットにおいて病理組織学的に浮腫あるいは軟化巣の認められた部位は、T2強調画像では高信号を示し、出血部位は低信号を示していた。T1強調画像では顕著な軟化巣、出血巣は、低信号領域として認められた。マグネビスト投与後のT1強調画像では、高信号領域内にはangionecrosisを来した細小動脈が高頻度に認められた。この部位の血管鋳型像では毛細血管レベルにおいて血管の途絶がSEMでも観察された。２８匹についての組織スコアとMIRスコアとの相関図から、両者間に強い相関があることが示された。浮腫あるいは軟化スコアとT2強調画像スコア、血管壊死スコアとマグネビスト投与後のT1画像スコアとの間には強い相関関係があった。出血スコアとT2強調画像スコアおよびマグネビスト投与後のT1画像スコアとの間にも有意義な相関が認められた。

脳血管病変を起こしたラットの所見より、MRI画像と病理組織像、血管鋳型像との間に極めてより一致することが明らかになった。病巣のうち、脳浮腫あるいは脳梗塞巣では、T2強調画像において鮮明に描出された。T2強調画像に比べてT1強調画像は、マグネヒスト投与後における病変部位の読み取りが更に明らかとなった。

Table 1 Criteria for comparison of MRI and histological findings

A) MRI SCORE

SCORE	0	1	2
T1	NO	MILD	SEVERE
T2	NO	MILD	SEVERE
MV	NO	MILD	SEVERE

B) HISTOPATHOLOGICAL SCORE

SCORE	0	1	2
EDEMA, SOFTENING	NO	EDEMA	SOFTENING
HEMORRHAGE	NO	SMALL	LARGE
ANGIONECROSIS	NO	FEW	MANY

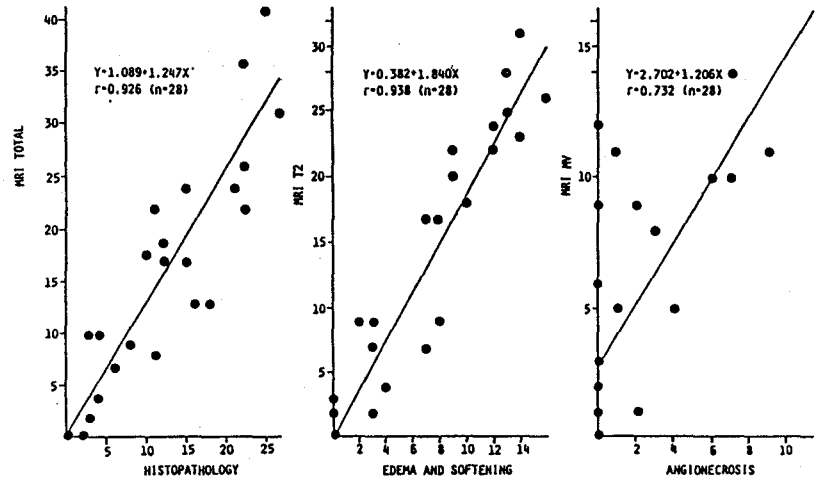


Fig. 1 Scatterdiagram showing correlations between histological score and MRI score in M-SHRSP

P71 NMR映像法による三次元泡構造の計測

筑波大学物理工学系　巨瀬勝美

NMR Imaging of 3D Foam Structures

Katsumi Kose, *Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Japan*

Abstract

3D foam structures were measured using NMR imaging and their 3D geometrical properties were analyzed. Eight bubble polyhedra were extracted from 3D NMR image data of a polyurethane foam specimen using a newly developed 3D geometrical structure analysis program and quantitative geometrical data were measured for the first time for real foam systems. The results qualitatively agreed with the study by Matzke with soap bubbles but did not agree with the solution by Weaire and Phelan for 3D space division into equal volume cells with minimum partitional area. The reason for this disagreement is not clear, however, improved foam preparation and more systematic measurements using the method developed here may clarify this difference.

INTRODUCTION

How to divide 3D space into equal volume cells with minimum partitional area is a classical mathematical problem (1). Recently, a better solution than that by Lord Kelvin has been proposed (2), but this solution has not been verified experimentally. Since it is considered that a foam gives the solution for this problem, quantitative measurements of 3D foam structures are essential to this problem. The purpose of this study is thus to visualize 3D structures of foams using NMR imaging, to measure 3D geometrical quantities, and to evaluate the observed structures.

METHOD

Two specimens were prepared by immersing two kinds (different in cell sizes) of commercially available polyurethane foam into $CuSO_4$ doped water in 20 mmϕ NMR sample tubes. 3D microscopic MR images (FOV:$(19.2mm)^3$, matrix:128^3, voxel:$(150\mu)^3$) were obtained with a home built NMR imaging system using a 4.74T, 89mm vertical bore superconducting magnet and an actively shielded gradient coil. The pulse sequence used was a conventional spin-echo 3D imaging sequence (TR=200ms, TE=12ms) to avoid susceptibility artifacts (signal loss). Image distortion due to the gradient nonlinearity was checked using a phantom and that due to the static field inhomogeneity was evaluated using two images measured with positive and negative read-out gradients.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Since only cross-sections of edges and vertices of bubble polyhedra were visualized in 2D slices of the 3D MR images, minimum intensity projection (mIP) images were computed to visualize network structure of the edges. Figures 1 and 2 are mIP images computed from 8 and 24 contiguous 2D slices, respectively, of the 3D image data.

A computer program to measure geometrical quantities of the bubble polyhedra was developed on the X-window system running on a workstation and eight

Key words: NMR imaging, MRI, foam, bubble, 3D

こせ　かつみ

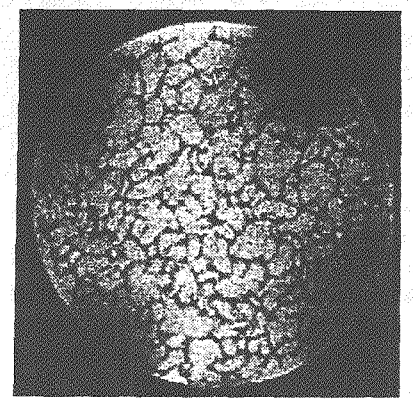


Fig.1 mIP image computed from 8 contiguous slices of the 3D image of the smaller cell-size foam.

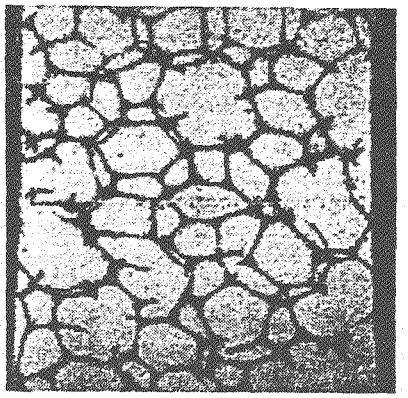


Fig.2 mIP image computed from 24 contiguous slices of the 3D image of the larger cell-size foam.

bubble polyhedra were extracted interactively on the CRT screen using three series of mIP images of which projection directions were x, y, and z directions. Some of them are shown in Fig.3.

Summary of the results is:

1. Only 12-, 13- 14-, and 15-sided polyhedra were observed. The average number of faces per polyhedron was 13.63. 2. Only quadrilateral, pentagonal, and hexagonal faces were observed. The ratio of the numbers of them was 9 : 70 : 21. 3. The cell size was nearly uniform. 4. The average value of isometric quotient for polyhedra was improved to 0.723 by contraction of the polyhedra along one direction. 5. There is a positive correlation between the surface area and the number of sides of the faces. 6. Intersection angles at vertices distributed around the tetrahedral angle of 109.47°.

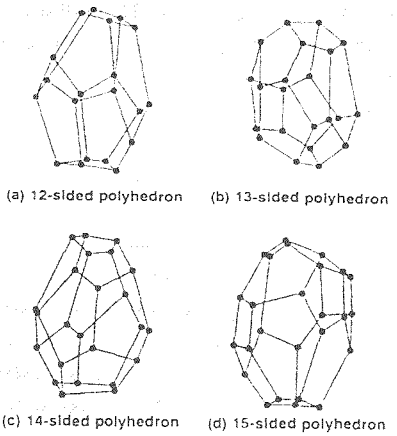


Fig.3 Bubble polyhedra extracted from the 3D image data of the larger cell-size foam.

The results agreed well with the study with soap bubbles (3) but did not agree with the solution recently proposed (1). The reason for the discrepancy is not clear at present, however, more systematic study using the method developed here may clarify the difference.

REFERENCES

(1) J. Gray, *Nature* 367, 598-599 (1994).
(2) D. Weaire and R. Phelan, *Phil. Mag. Lett.* 69, 107 (1994).
(3) E. Matzke, *Am. J. Botany* 32, 58 (1946).
(This paper has been submitted to *Journal of Magnetic Resonance*.)

P72

テトラヘドラルマジックエコーによる固体NMRイメージング

筑波大学物理工学系　　○裏岡昭博、松井茂、井上多門

Solid-State NMR Imaging by Tetrahedral Magic Echoes

A.Uraoka, S.Matsui, and T.Inouye
Inst. of Appl. Phys., Univ. of Tsukuba

A new approach to solid-state imaging using tetrahedral magic echoes(TME) is demonstrated. Experimental comparison with the other magic echo(ME) approaches has shown that the degree of TME line narrowing is almost the same as that of modified magic echo(MME) line narrowing. The imaging performance of the TME approach is however significantly superior to the previous ME approaches. This is because the cycle times of the TME sequences are generally shorter than those of the ME sequences, allowing a correspondingly stronger field gradient to be used. Further, the incorporation of the self phase encoding technique into a TME imaging sequence was also made to improve the resolution further.

【はじめに】

固体NMRイメージングは液体の場合と異なり、依然として開発の初期段階にある。これは非常に強いdipolar interactionが原因で、これを克服するための方法がこれまでにいくつか報告されている。我々はModified Magic Echo(MME)(1)と呼ばれるシーケンスにより高い効率でline narrowingを実現し、固体イメージングを行ってきた。このMMEシーケンスは、homogeneous interactionのみをrefocusするMagic Echo(ME)(2)に仮想的に180°パルスを挿入した形になっており、homogeneousばかりでなくinhomogeneousなinteractionも同時にrefocusできるようになっている。しかしながらこのrefocusingは近似的なものであり、このことがこれらのシーケンスのline narrowingの限界をつくる原因の一つとなる可能性がある。

今回我々はline narrowing、分解能がさらに向上するよう、Tetrahedral Magic Echo(TME)(3,4)を使った新しい手法を提案する。これにより理論的には完全なrefocusingが可能となり、MMEのときよりも高効率のline narrowingが期待できる。実際、実験においてTMEはMMEと同程度のline narrowingを達成した。またTMEはMMEに比べデータのサンプリングの間隔が短くできることを考慮すると、より大きい磁場勾配を印加することが可能になるため、この手法は高分解能を与える優れたイメージングシーケンスといえる。

【Magic EchoとTetrahedral Magic Echo】

H^R、H^{TR}をそれぞれ回転系（R）、tiltされた回転系（TR）の全secularハミルトニアンとすると、homogeneous、inhomogeneousそしてZeeman（RF）項を含めたものはそれぞれ、

$$H^R = H_{homo} + H_{inho} + (H_{Z,RF}{}^R)$$

$$H^{TR} = (3\cos^2\theta - 1)H_{homo}/2 + \cos\theta\, H_{inho} + (H_Z{}^{TR})$$

と表される。ただしθは静磁場と有効磁場のなす角、H_{homo}はtruncateしたhomonuclear dipolar interaction、そしてH_{inho}はtruncateしたheteronuclear dipolar interactionでこれにはchemical shift、磁化率の効果などが含まれている。（）内の項は最終的には実験結果に直接寄与しないので無視する。

keywords:　solid imaging, tetrahedral magic echo, resolution

うらおかあきひろ、まついしげる、いのうえたもん

ここで上の２つの式より次の２つのことが理解できる。１つはθが90°のときすなわちon resonanceのときで、この場合homogeneousな項のみが$(-1/2)H_{homo}$と反転したものとなる。２つ目は$\theta = \theta_t = 109.5°$の時でこの角度では$(3\cos^2\theta_t - 1)/2 = \cos\theta_t = (-1/3)$を満たし、先ほどの場合と異なり、全ハミルトニアンが$H^{TR} = (-1/3)H^R$と反転したものとなる。これによって$[H_{homo}, H_{inho}] \neq 0$であっても、理論的には完全なrefocusing、ひいてはtime suspensionが達成できる。このエコーはTetrahedral Magic Echoと呼ばれており、このTMEによるline narrowingはMMEに比べ向上したものが期待できる。このTMEは実験でθ_tでのoff resonanceを達成するためdc fieldの切り替え(3)が必要であるが技術的に困難であり、我々はその代わりに周波数のスイッチングを利用して行った。ただしスイッチングの後にも位相のcoherenceは維持されていることが必要である。

【実験】

今回全ての実験は1.4Tの（JEOL FX60）自作の装置を用いて行った。プローブコイルは直径９mm長さ10mm、ＲＦ磁場の大きさは100kHz、τは30μsである。そして、TMEの周波数のずれΔfは35.36kHzである。先に述べたように、ダイレクトデジタルシンセサイザー(PTS250)でスイッチングの前後で位相のcoherenceが保存されるような周波数の切り替えを行った。用いた磁場勾配の大きさGは例えばMMEシーケンスの場合2.6G/cmで、self phase-encodingの実験の際には磁場勾配は通常の４倍の大きさのものを使用した。

【結果、考察】

表１に数種類のMEシーケンスでのline narrowingの実験結果を示す。この表よりTMEによるline narrowingは他のシーケンスのものと同程度の効率であることがわかる。図１には、２種類のイメージング用のTMEを掲示している。(a)はＲＦ照射のないところでのみグラディエントを印加するタイプで、これに対し(b)はＲＦ照射の際にも印加するタイプである。この(b)で印加するグラディエントは(a)の1/2の大きさで、それにより(b)においてはグラディエントのスイッチングが容易になる。前者のタイプをTME-I、後者をTME-IIと呼ぶことにする。今回実験で用いたサンプルはアダマンタン、フェロセン、ポリカーボネイトの３種類で、それぞれTREV8、MME、TME-I、TME-IIのイメージングシーケンスでプロジェクションを得、比較を行った。

図２にはフェロセンのプロジェクションを示している。TMEによる飛躍的な分解能の向上は見られないが、(c)と(d)の分解能の差は比較的よく現れており、また(b)(MME)の分解能は(d)(TME-II)より劣っているのがわかる。最後の結果は表１の結果と必ずしも一致していない。この現象は表１のMMEのT_2がspin lockingの影響により実際の値よりも長く見えているために生じたものであると考えられる。またアダマンタン、ポリカーボネイトの場合もほぼ同様の結果であり、TMEの有用性が認められる。

次にアダマンタンのサンプルを用いてTME-IIのイメージングシーケンスにより二次元画像を得た。１００個のプロジェクションから再構成された画像を図３に示す。また分解能をさらに向上させることができるself phase encoding(5)の手法を用いた実験も行った。今回はこの手法をポリカーボネイトのサンプルを用いて、TME-II（ただしtc=8τのもの）のイメージングシーケンスに適用して分解能の向上を図った。結果を図４に示す。サンプルが矩形であることがより鮮明に見えており、self phase encodingとTME-IIとの組み合わせが有効であることがわかる。

文献

1. S.Matsui, Chem.Phys.Lett. 179 (1991) 187.
2. K.Takegoshi and C.A.McDowell, Chem.Phys.Lett. 116 (1985) 100.
3. D.E.Demco, Phys.Lett. 45A (1973) 113.
4. T.Terao and S.Matsui, Phys.Rev. B 21 (1980) 3781.
5. S.Matsui, A.Uraoka and T.Inouye, J.Magn.Reson. A 112 (1995) 130.

TABLE 1

Line Narrowing Obtained on Test Samples by Using the TREV-8, MME, and TME Sequences

sequence	adamantane	ferrocene	polycarbonate
free	0.05	0.03	0.03
TREV-8	3.5	2.0	1.4
MME	8.0	4.5	2.0
TME	9.0	4.5	1.7

Note. T_2 values (in milliseconds) obtained by assuming an exponential decay for the echo envelopes are shown. The time interval τ was set at 30 μ s and the RF field strength was fixed at 100kHz.

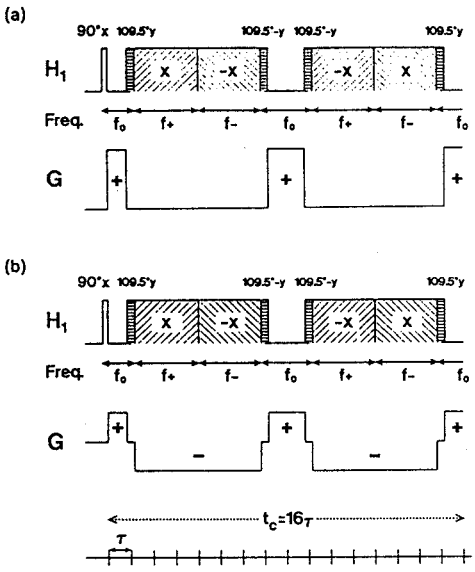


FIG.1. TME (tetrahedral magic echo) sequences for solid-state imaging. In the TME-I sequence (a), no gradient pulses are applied during the RF irradiations to avoid deterioration of the tetrahedral angle conditions. In the TME-II sequence (b), however, negative gradient pulses are applied even during the off-resonance RF irradiations. This optional application of the negative gradient pulses is useful to reduce the peak amplitude of the gradient, making the gradient switching easier. As far as the offset frequency induced by the gradient is small compared to the RF amplitude, the optional gradient application does not interfere significantly with the tetrahedral angle off-resonance conditions and rather leads to improved resolution.

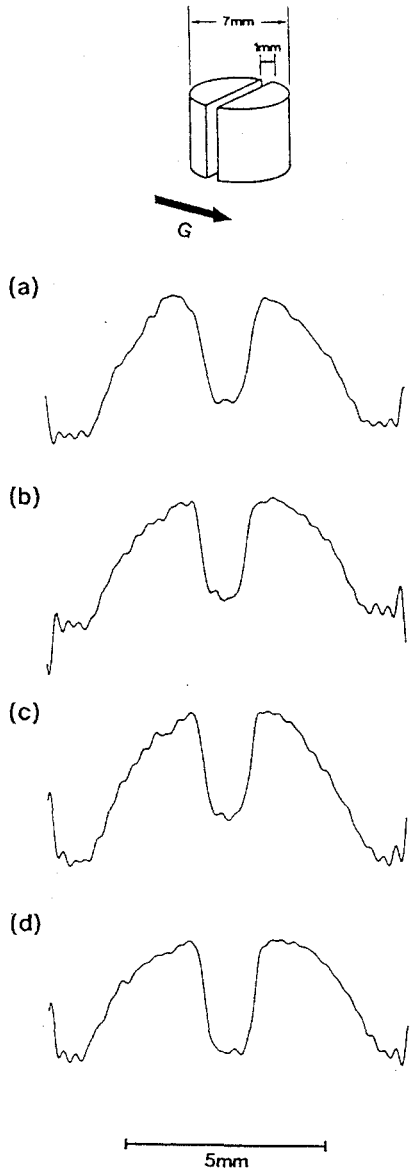


FIG.2. Projections of the test sample of ferrocene obtained by (a) TREV-8(2), (b)MME(modified magic echo), (c)TME-I(tetrahedral magic echo,Fig.1a),and (d)TME-II(Fig.1b) imaging sequences. The shape of the center hole in each projection is a measure of resolution actually achieved. Some results are not necessarily consistent with the line-narrowing results listed in Table 1.

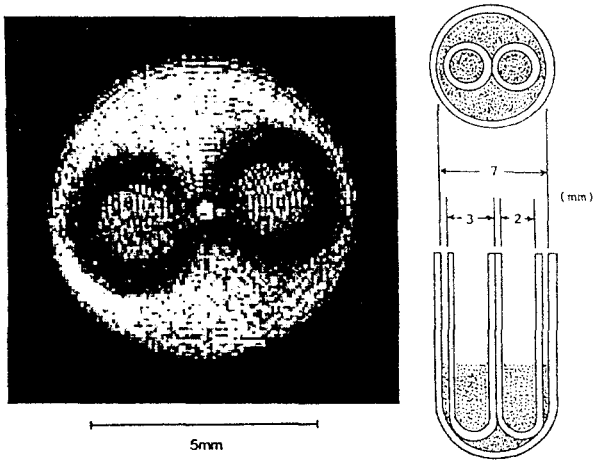


FIG.3. Two-dimensional image of the adamantane sample shown. The 128x128 image was reconstructed from 100 projections obtained by the TME-II imaging sequence shown in Fig.1b.

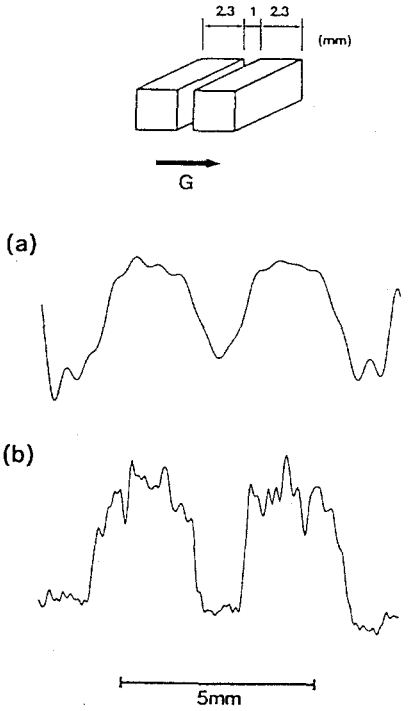


FIG.4. Projections of the test sample of polycarbonate obtained by (a) the basic TME sequence with the bipolar gradient pulses applied and (b) with the four-fold self phase encoding technique(5) further incorporated. The expected resolution improvement is clearly demonstrated.

P73

西瓜緩和時間の
ＩＮ－ＶＩＶＯでの測定

(㈱神戸製鋼所[1] 、㈱マキ製作所[2])
○斉藤一功[1] 、三木孝史[1] 、林　征治[1] 、西澤　節[1] 、杉浦伸裕[2] 、鈴木基文[2]

IN-VIVO measurement of NMR relaxation time in watermelons

Kazuyoshi Saito, Takashi Miki, Seiji Hayashi, Takashi Nishizawa,
Nobuhiro Sugiura, Motofumi Suzuki
(Kobe Steel Ltd. , Maki Engineering Ltd.)

The possibility of utilizing NMR relaxation time for the measurement of sweetness in watermelon was investigated. A 0.5T superconducting magnet with 68cm horizontal bore was used. The spin-lattice relaxation times(T1) and spin-spin relaxation times(T2) of watermelons were measured as in-vivo by the volume localized spectroscopy technique STEAM(STimulated Echo Aquisition Method). The strong correlation between T1,T2 and sugar content of watermelon was found.

はじめに

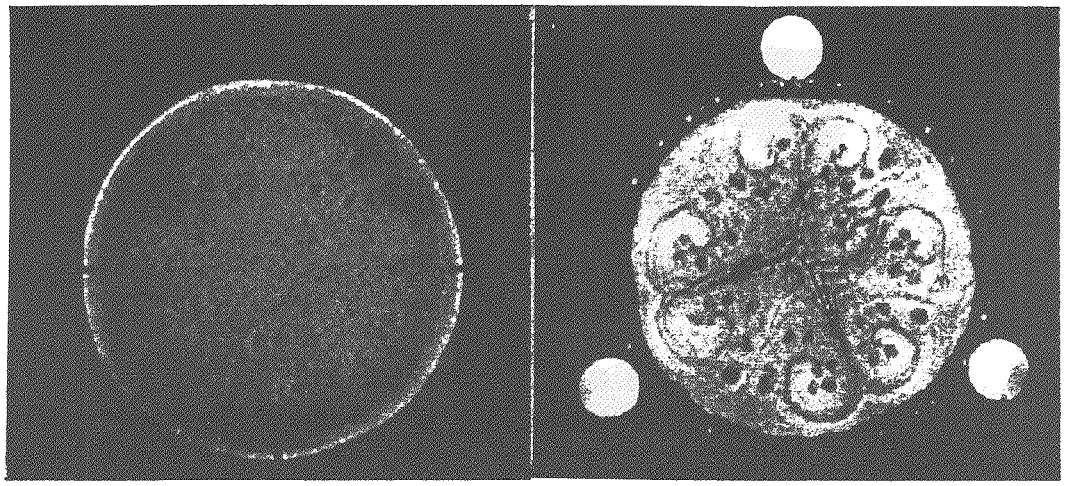
近年、果実の糖度や熟度等の内部品質を非破壊で評価する事が課題になっており様々な計測手法が用いられている。例えば、近赤外線スペクトルを用いて桃やリンゴの糖度をオンラインで測定する装置が既に実用化されている。[(1),(2)]

ＮＭＲも非破壊計測方法として優れた手段でありこれまでにＮＭＲを用いた果実の糖度や脂肪量の測定も試みられている。[(3)－(6)]

我々はＮＭＲによる西瓜の非破壊糖度測定の可能性を探るためin-vivo で西瓜の選択領域緩和時間測定をおこない、糖度との相関関係を調べたので報告する。

キーワード:IN-VIVO、緩和時間、果実、非破壊、糖度

さいとう　かずよし、　みき　たかし、　はやし　せいじ、　にしざわ　たかし
すぎうら　のぶひろ、　すずき　もとふみ



(A)　　(B)

Fig.1 NMR images of a watermelon. (A) T1-weighted image. (B)T2-weighted image. Three small circles on the watermelon are phantoms.

装置

NMR 実験に用いた装置の構成はJMT 社の横型超電導マグネット(磁束密度0.5 テスラ、ボア径68cm) 、SMIS社のスペクトロメータ、MAGNEX SCIENTIFIC 社のアクティブシールドグラディエントシステム(最大勾配磁場10mT/m) である。またRFプローブは直径39cmのバードケージ型である。西瓜糖度の測定には一般的に選果場等で使われている屈折式の糖度計(アタゴ製) を用いた。これは果汁の屈折率から糖度を求めるものである。

実験

最初に西瓜の緩和時間の部位による依存性を調べるために、スピンエコーイメージングを行い、西瓜の緩和時間分布の様子を調べた。イメージングのパラメータはFOV が300mm ×300mm 、スライス厚が10mmであり、エンコード数は128 ×128 のマトリックスである。Fig.1 (A) はTRが300msec TEが40msecのT1強調画像である。Fig.1(B)はT2強調画像でTRが5000msec 、TEが200msec で得られた。これらの画像から分かるように、緩和時間は部位によって異なっており外皮近くの位置と中心付近の位置で明らかに異なっている。このため全体からのNMR 信号によって緩和時間を求める方法では有効な情報が得られないことがわかる。そこで領域を選択して緩和時間を測定した。測定にもちいたシーケンスはスティミュレイテッドエコーと領域選択用の勾配磁場を組み合わせたVolume Localized STEAM(STimulated Echo Aquisition Method)と呼ばれるものでFig.2 にそのRFパルス、勾配磁場の動作をしめす。得られるスティミュレイテッドエコーの強度S は選択領域のスピン密度が一定と仮定すれば

$$S = A \cdot EXP(-TM/T1) \cdot EXP(-TE/T2) \cdot \{1-EXP(-TR/T1)\}$$

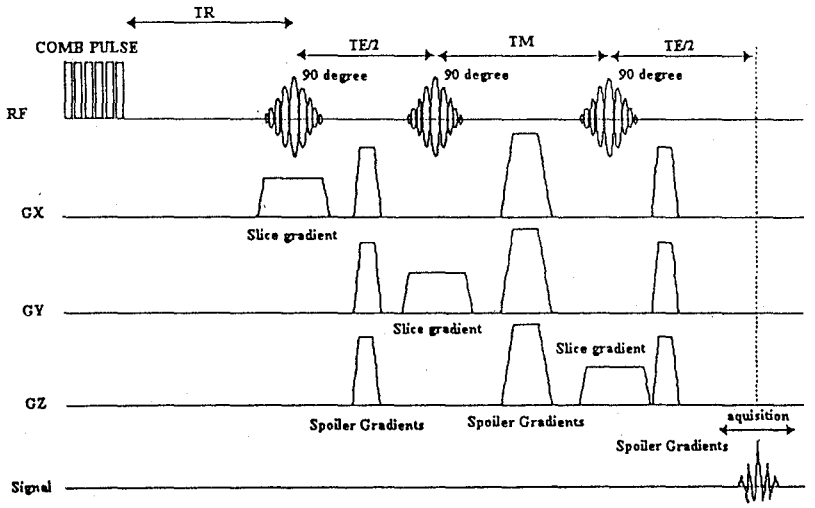


Fig.2 Volume Localized STEAM squence

で与えられる。ここでA は装置の関数である。従って、TEを変えながら測定することでスピン- スピン緩和時間(T2)が求まり、TMを変えながら測定することでスピン- 格子緩和時間(T1)が求まる。あるいはTRを変えながらも測定をおこなってもT1を求めることができる。我々はT1の測定に関しては後者を採用した。

測定は次の手順で行った。

1)メージングを行い、得られた画像から緩和時間を測定する位置を決める。

2)TRを500ms から10000ms の間で変えながら信号を取得しT1を求める。

3)TEを40msから200ms の間で変えながら信号を取得しT2を求める。

4)NMR 測定終了後に西瓜を破壊し、選んだ部位の糖度を測定する。

測定したサンプルは市販の西瓜70個である。測定領域の大きさは3cm 角とし、1 個のサンプルから3 ～5 点の領域を測定対象とした。トータルの測定点数は280 点である。1 つの対象領域の測定に要した時間は40秒であった。測定温度は25℃で一定とした。

結果と考察

得られたT1の値は1700ms～2200ms、T2の値は90ms～150ms の範囲であった。

Fig.3に糖度とT1、Fig.4 に糖度とT2の相関関係を表す。図より糖度とこれらの緩和時間との間には負の相関があることが分かる。これは果糖等の分子の数が水分子の運動性に影響を与えるためであると推測される。すなわち水分子の運動が糖類の分子によって制約されるためと考えられる。ただし糖度とT1との相関係数は0.67となり、T2とは0.64となった。どちらの場合も小さく実用的とは言えない。そこで次にこれらT1、T2と糖度との重回帰分析を行うと糖度の予測値と糖度の実測値の関係はFig.5 の様になり強い相関があり、このときの相関係数は0.84となった。したがって、T1とT2の双方の測定を行うことにより、本方法は西瓜の糖度測定方法として実用レベルであるといえる。

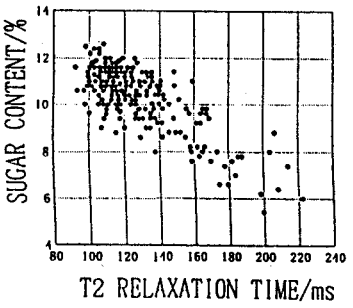


Fig. 3 The correlation between sugar content, as determimed with a refractometer and T2 relaxation times for watermelons.

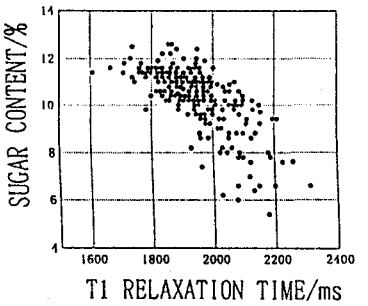


Fig. 4 The correlation between sugar content, as determimed with a refractometer and T1 relaxation times for watermelons.

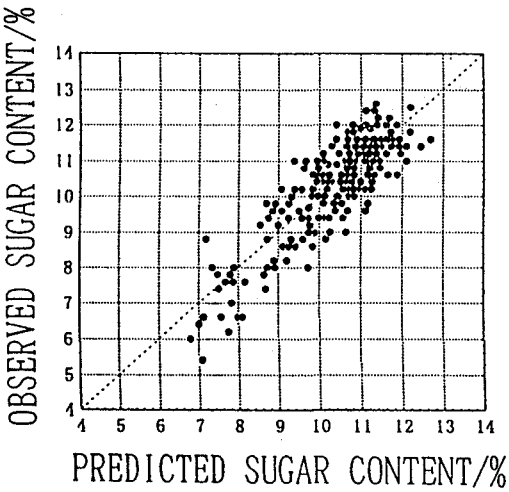


Fig. 5 Result of the multiple regression of sugar content plotted against T1 and T2 relaxation times for watermelons.

今後の課題は測定時間の短縮である。実用性を向上させるために現在40秒を要している測定時間の短縮を目指し、測定条件の見直しや高速でT1、T2を測定できる新しいシーケンスの開発等を行っていく。

参考文献

(1) 秋元　浩一　　：食品流通技術, 17(1989), 4
(2) 杉山　純一　　：計測と制御, 33(1994), 823
(3) G. A. Barry et. al.　　：J. Food Technol., 18(1983), 401
(4) R. Jambunathan et. al.　：J. Sci. Food Agric., 36(1985), 162
(5) M. E. Salveit Jr.　　：Postharvest Biol. Technol., 1(1991), 153
(6) S. I. Cho et. al.　　：Trans. ASAE, 36(1993), 1217

P74 植物組織の水の制限拡散の局所的な一次元プロファイルの測定

○石田信昭（食総研）、小川秀次郎（JEOLデータム）、
小泉美香、狩野広美（生物研）

Measurement of localized restricted diffusion profiles of cell-associated water in plant tissues.

Nobuaki ISHIDA[1], Hidejiro OGAWA[2], Mika KOIZUMI[3] and Hiromi KANO[3]
[1]National Food Research Institute, [2]JEOL Datum Co. Ltd. &
[3]National Institute of Agrobiological Resources

One dimensional profiles of restricted diffusion of cell-associated water in growing cherry fruits at 18 diffusion times were measured in a short period, by the pulse gradient stimulated-echo method combined with selective excitation. The data were transferred to a micro-computer, and transport rate of water, compartment size and membrane permeability in definit areas in the seed and the pericarp were estimated according to the Meerwall-Ferguson's modification (1981) of the model of Tanner(1978). These parameters did not fluctuate significantly except for in the early growth stage and the ripened stage.

生体組織の水の動態は組織の生理活性と密接な関係を持っていると考えられている（Hazlewood 1979）。植物細胞は細胞壁に囲まれた膜構造によって構成され、細胞の水の大部分は膜で囲まれたコンパートメント内を動き、一部分のものがコンパートメントを通して移動する。そのような組織の水の動態はNMRによる制限拡散の測定によって解析が可能であると考えられる。植物組織は部位によって解剖学的な形態及び生理状態が異なるので、測定は部位を限定して行う必要がある。本研究ではサクランボの果実を用い、生育ステージを追って選択励起法によって限定した狭い範囲における制限拡散の一次元的なプロフィルを拡散時間を変えながら短時間の内に測定して、異なる組織の水の移動速度、コンパートメントサイズ及び細胞膜の透過性の変化を追跡した。

キーワード：NMR顕微鏡、細胞の水、制限拡散、選択励起、サクランボ

著者：いしだのぶあき、おがわひでじろう、こいずみみか、かのひろみ

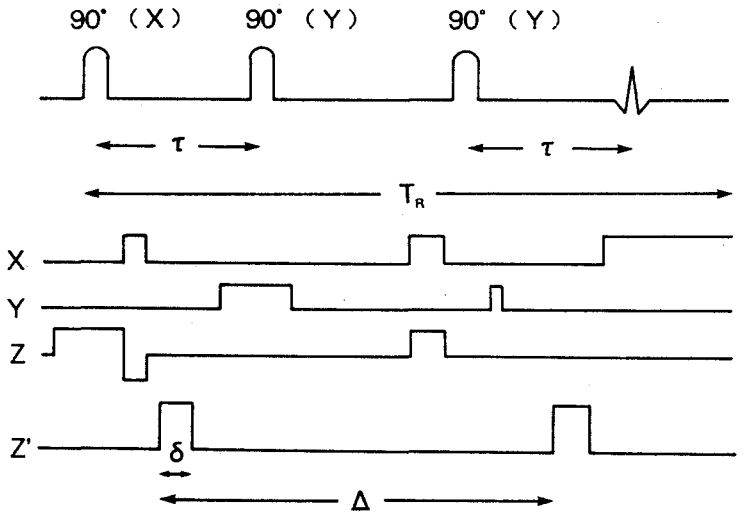


Fig. 1 Pulse sequence for the measurement of localized restricted diffusion profile.

【材料及び方法】

植物試料：栽培用のサクランボ（サトウニシキ）の木を鉢植えとして、果実着生後、生育ステージを追って採取してサンプルとした。

ファントム：20%、30%及び40%のアクリルアミドゲルをガラスキャピラリーにつめて作製した。

測定：270 MHzの超伝導NMRスペクトロメーター（JEOL GSX-270 WB）に装着可能なミクロイメージング装置と自作の磁場勾配発生装置を用いて測定した。^{1}H-NMRイメージは2D-FT法によって、拡散イメージはPulse Gradient Spin-echo法で測定した。拡散イメージ測定時の磁場勾配の強さは278 mT/m、 3msであり、拡散時間は12msであった。画像の分解能は50μm x 50μm x 1.6 mm（Slice thickness）である。

制限拡散はPulse Gradient Stimulated-echo法によって拡散時間を変化させて測定した。選択励起法を加えた制限拡散測定用のパルスシークエンスをFig. 1に示した。2番目の90°（Y）パルスと同時にY軸に89mT/mの磁場勾配を与えて画像のX軸に平行な線に沿った制限拡散のプロファイルを得た。選択励起部位の分解能は50μm x 1.0 mm（選択励起幅） x 1.6 mm（Slice thickness）であった。制限拡散測定用の磁場勾配は68 mT/mでZ軸方向へ3msとした。

約3時間で18ポイントの制限拡散データーを測定し、結果をミクロコンピューターに転送して、拡散イメージより求めたD（拡散係数）を初期値として非線形最小自乗法によってTannerのモデル（1978）をMeerwall-Ferguson（1981）が変形した式に当てはめて水の移動速度（Do）、コンパートメントサイズ（a）及び膜透過率（D∞/Do）を求めた。

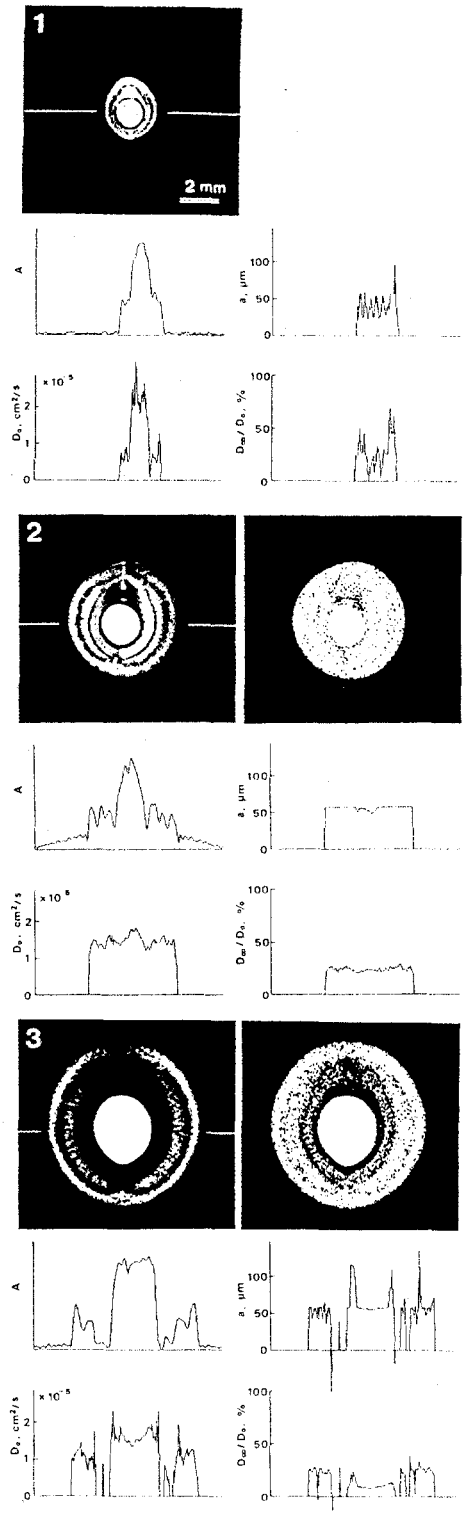


Fig. 2 Changes of physical states of cell-associated water along with growth stages.

Images: ^{1}H-NMR images (left) and diffusion-coefficient images measured by pulse-gradient spin-echo method (right).

Profiles: water distribution (upper left), water transport rate(D_o) (lower left), compartment size(a) (upper right) and permeability of membrane($D\infty/D_o$) (lower right)

【結果及び考察】

20%、30%及び40%のアクリルアミドゲルをファントムとしてFig. 1のパルスシークエンスによって制限拡散を測定した結果、ゲルが含有する水の量はゲル濃度が高くなるほど少なくなった。水の量が減少するほど水の移動速度（Do）は低くなりゲルの間隙（a）は狭くなった。一方、水の透過率（D∞/Do）には著しい差は認められなかった。

Fig. 2にサクランボの生育ステージを追って測定した^{1}H-NMRイメージ、拡散イメージ及び^{1}H-NMRイメージ上の線に沿って測定した制限拡散プロファイルから計算した水の量、水の移動速度（Do）、コンパートメントサイズ（a）、膜透過率（D∞/Do）の変化を示した。種子の水の量は果実の生育ステージが進むと低下した。一方、果肉では増加した。水の移動速度は種子では始め高く、その後わずかに低下するが、水が存在する間は高く保たれた。果肉では、初期には低く、生育中期以降は高く保たれた。膜の透過率は、種子では生育の後期で水が少なくなる時期、果肉では生育初期の水が少ない時期を除いては20-40%程度であった。種子のコンパートメントサイズは水が少なくなると小さくなった。果肉では生育ステージを通じて著しい変化は認められなかった。

種子及び果肉組織の水の量は生育ステージによって著しく変化して、組織の構造が大きく変化することを示している。一方、水の移動速度（Do）、コンパートメントサイズ（a）及び膜透過率（D∞/Do）は生育の初期や種子が充実した後のような特別な時期を除いては水の量の変化と平行した変化は示さず、むしろ、組織の違いによらず近い値を示した。これは組織の違いを越えて各コンパートメント間が有機的な統一性、または、熱力学的な平行を保つためには、著しい差のないコンパートメントサイズ、水の移動速度及び膜透過性を持つ事が有利なためであろうと考えられる。

制限拡散を解析するために充分な数のイメージデーターを通常の方法で測定するためには、植物の組織を生理的に安定に保っておくことが困難な程長い時間がかかるので、本研究では短時間に限定された部位より多数の拡散時間を変えた測定値を得るために選択励起法を用いたが、エコープラナー法などによって短時間に多数のイメージデーターを測定するとより詳細な検討が可能であると考えている。

【文献】

Hazlewood, C.F. (1979) Cell-associated Water. pp.165-259. Academic Press, New York

Meerwall, E. & R.D. Ferguson (1981) J. Chem. Phys. 74: 6956-6959

Tanner, J.E. (1978) J. Chem. Phys. 69: 1748-1754

P75

傾斜磁場NMRを用いた炊飯過程の解析

（東京水産大）○五味雄一郎、福岡美香、渡辺尚彦
（三菱電機）竹内繁樹、前田満雄

An Analysis of the Process of Cooking Rice by Pulse-Field-Gradient NMR

(Tokyo Univ.of Fisheries.) ○Yuichirou Gomi,Mika Hukuoka,Hisahiko Watanabe
(Mitsubishi Electric Co.) Shigeki Takeuchi,Mitsuo Maeda

Moisture diffusion and gelatinization in rice starch/water system was studied by pulse-field gradient NMR.Moisture diffusion coefficient in rice starch with a selected amount of water was measured after the sample was raised to and held at a preset temperature for 30 minutes.The present temperature was scanned from 20℃ to 80℃. The moisture diffusion coefficient increased as the increase of temperature until the moisture diffusion coefficient was lowered when temperature reached to about 60℃.This lowering was assumed to be caused by starch gelatinization which released swollen polysaccharides into the free water pool surrounding the starch granules; turning the free water pool into viscous solution. And in order to collect information on the rate of gelatinization in rice starch/water system,a detailed observation of the change of moisture diffusion coefficient in the course of gelatinization was made for starch/water samples.

1はじめに

米をクッキング（炊飯）すると米粒内の含水率は経時的に増加する。この増加の機構はいかなる因子によるものだろうか。我々はこれを米粒周囲に存在する水の米粒内部への拡散と米粒内の澱粉の糊化の2つに因るものと仮定した。

澱粉を糊化させるには一定以上の温度と含水率が必要であるが、炊飯ではこれらは米粒表面から内部へと進行する水及び熱の拡散によって供給されると考えられる。そして糊化によって澱粉粒子は水を多く取り込み膨潤する。従って米粒中心部へと進行する水の拡散が糊化によって律速されるといえる。そこで我々は米粒を澱粉粒子の集合体と仮定し、米澱粉 - 水混合系試料を用いて糊化の水の拡散挙動に及ぼす影響について検討した。

2実験

市販の米澱粉に常温の水を加え、含水率を４７～６０%の範囲で調整し、これを直径９mm　高さ１０mmのテフロンチューブ容器に詰め、１０mm径 NMR試験管に挿入し、底部に固定させ測定に供した。プローブ内の温度を２０～８０℃の範囲で昇温させ、その間の各温度において試料中の水の拡散係数を測定した。試料には光ファイバー温度計を接触させ、試料温度が確認できるようにした。更に含水率を４２～８９%の範囲で調整した米澱粉ー水系サンプルを一度６０℃以上で加熱し、糊化（米澱粉の糊化温度はおよそ６０℃）させ、これを常温に戻し、上記と同じ方法で試料中の水の拡散係数を２０～８０℃の各温度にて昇温させながら測定した。測定は STIMULATED-ECHO 法を用いて行ない、拡散時間は５００ msec とした。この間の水分子の拡散による移動距離は数十μm となり、米澱粉粒の粒径と同じオーダーとなる。よって得られる水の拡散係数は澱粉粒の障害効果によって見掛け上低くなる。

キーワード：米、炊飯、澱粉、糊化、拡散係数

ごみ　ゆういちろう、ふくおか　みか、わたなべ　ひさひこ
たけうち　しげき、まえだ　みつお

尚、実験はすべてBLUKER 社製 AM２００磁場勾配出力 AMP 付を用いて行なった。

３結果

fig１－A は米澱粉－水系サンプルについて２０～８０℃の範囲で昇温させ、その間の各温度ごとに測定したサンプル中の水の拡散係数Dの結果を拡散係数の対数値と絶対温度の逆数のプロットに直したもので、fig１－B は一度試料を６０℃以上の温度で加熱して糊化させ、常温に戻した後、上記と同様の測定をした結果である。これらを見ると、fig１－Aでは横軸の値０.００３（６０℃に相当）を境に、それより低い温度では温度の上昇とともに拡散係数は大きくなるが、更に高い温度では減少することが分かる。一方、fig１－B のように一度６０℃以上で加熱し、糊化させたサンプルでは、拡散係数は温度の上昇とともに常に増加する。以上のことから fig１－A を解釈すると、６０℃以下では米澱粉－水系サンプルはスラリーの状態で、その中の水は自由水として澱粉粒子間のすき間で拡散挙動を行なうが、６０℃以上では澱粉粒子が糊化し、サンプル中の水は澱粉分子との相互作用の強い粘性の高い溶液中で拡散挙動をとるので拡散係数の値は低くなるといえる。又、fig１－A ,B を見ると、プロットの傾きはそれぞれ含水率に関係なく同じであることが分かる。従って、米澱粉－水系サンプル中の水の拡散係数 D は、$D=D_0 EXP(-A/T)$ (A は定数、Tは絶対温度) と記述でき、このうち $1/T \rightarrow 0$ のときのD 即ち D_0 は含水率の関数と考えることができる。

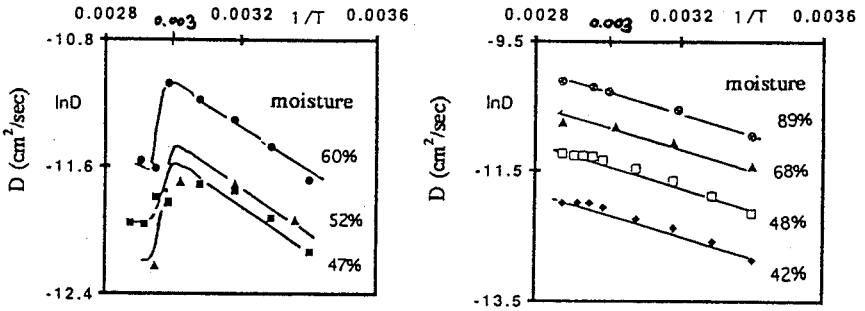


fig1-A　　fig1-B

fig1-A: raw rice starch/water system

fig1-B: gelatinized rice starch/water system

ところで、fig１－A, Bでは各温度で測定に約３０分かかっているので、fig１－A の６０℃付近での拡散係数の減少がどのくらいのオーダーの時間で起きるものか判らない。そこで、米澱粉－水系サンプルを外径３ mm,内径２mm,高さ１０cmのガラス管に詰め、両端をふさぎ、これを６０℃以上の温度にセットした湯につけて、サンプルの温度を短時間（数秒内）に湯温と均一にさせ、その温度に保持する時間を変えたサンプルを作り、これらの拡散係数を測定することにより拡散係数の減少の時間的変化を求めた。尚、測定はサンプルを所定の時間加熱保持した後、冷水にて急冷し、２０℃のもとで行なった。

fig ２はその結果を示す。
横軸は加熱保持時間、縦軸は拡散係数で、
サンプルの含水率は５０％である。
これを見ると、６３.５℃では拡散係数
の時間的変化は見られないが、７０,７５℃
で加熱した場合は、拡散係数の減少に約１分
要し、その後は一定値をとることが分かる。
このことから、糊化による拡散係数の減少は
およそ１分で完了することが分かった。

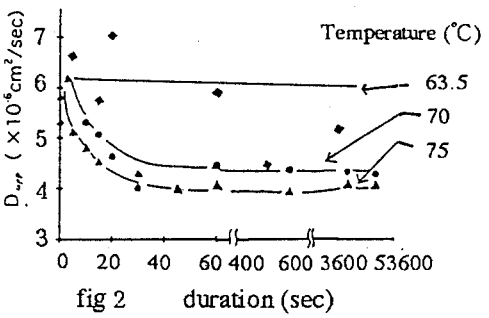


fig 2　　duration (sec)

P76

ＮＭＲマイクロイメージング法による耐火物の空隙解析

新日本製鐵（株）先端技術研究所，日本電子*
○斎藤公児，篠原正昭，手島志帆，田村信一，津野久幸*，長谷川憲一*

The voids analysis of the refractories using NMR micro-imaging method

○Koji Saito,Masaaki Shinohara,Shiho Teshima,Hisayuki Tsuno*,
Kenich Hasegawa*,and Shinichi Tamura

NIPPON STEEL CORPORATION , ADVANCED TECHNOLOGY RESEARCH LABORATORIES
1618 IDA ,NAKAHARA-KU KAWASAKI CITY 211 ,JAPAN
*JEOL LTD.

The refractories ,which have the voids,were very important for the steel-making industries,so the huge and many kinds of refractories were used to avoid very high temperature enviroments which were produced from the iron and steel making process. But there were no suitable methods for the void analysis,so only the potentiometer method with muercury were conventionally used. And then,we demonstrated the voids analysis of the refractories using NMR micro-imaging method. The results of NMR micro-imaging method,which reflected completely the voids image contrast,were very clear and consitent with the results of the potentiometer method. Additionally,we could easily understand those size and distribution maps from some statistical calculation. Fianally,we are sure that NMR micro-imaging method is a powerful method for the voids analysis of the refractories in the steel-making industries.

１．はじめに

鉄鋼業において、耐火物はその耐熱性や耐衝撃性という性質から非常に重要である。また耐火物は各プロセスにおいてのコストを支配しており、長寿命耐火物の開発が急務となっている。このような特徴のある性質は、構成する成分とともに空隙の大きさや分布によって支配されているにも関わらず、その空隙の分析法は従来から水銀を活用した圧入法が主であり、直接空隙を観測・解析する手法がなかった。

ＮＭＲマイクロイメージング法[1]は、生体に多く適応されており、臨床分野で広く活用されているが、実工業材料解析[2]への応用例は非常に少ない。我々は、ＮＭＲマイクロイメージング法を鉄鋼業に実際に用いられている耐火物の空隙解析に応用し、いくつかの知見を得たので報告する。

耐火物，マイクロイメージング，空隙解析

○さいとう　こうじ，しのはら　まさあき，てしま　しほ，たむら　しんいち，
つの　ひさゆき，はさがわ　けんいち

2．実験

装置は、日本電子α－４００WB-NMR装置にイメージングユニットが付設したものを用いた。磁場勾配はｘ，ｙ，ｚ方向の３方向に行えるように設定した。基本となる測定はスピンエコー法で行い、代表的な測定の際のエコー時間は３００msec，また繰り返し時間は０．５secであった。２次元測定の選択励起パルスは、Ｓｉｎｃパルスを用いた。また３次元測定での平均的な測定時間は、１２８＊１２８＊１２８のデータサイズで約１５時間，空間分解能は２０μｍであった。３次元解析に使用したソフトは、日本電子製Lambdaのソフトウェアを使用した。また空隙データ解析には、伊藤忠テクノサイエンス（株）の協力で、VISILOG４を活用した。

使用した耐火物は、SiO_2-Al_2O_3を主成分としたもので、高炉の一部に活用されている。ＮＭＲの試料管（５，１０ ｍｍφ）に入るように適当に砕いた。空隙を観測するために、溶媒を耐火物に含浸させるソルベントイメージング法を採用した。観測に使用した溶媒は、最終的にはＣＨ$_3$ＯＤを主に用いた。効率よく耐火物に溶媒を含浸させるために、脱気や超音波処理等を随時組み合わせて行った。

3．結果

空隙を観測するために使用する溶媒の選択は非常に重要である。我々が検討した結果、下記のような条件を満たす溶媒が、観測に適していることがわかった。①人体に無害であること，②ＮＭＲの吸収線として半値幅が狭く且つ単一吸収を与えること，③耐火物に浸透し易いこと，④安価なこと，⑤耐火物と反応しないこと，⑥全体の取り扱いが楽なことである。特に耐火物に浸透し易いという点は、耐火物の組成等に依存している場合が多く、いわゆる”相性”という項が存在していることがわかった。本論文中で述べた高炉に使用されているSiO_2-Al_2O_3ではＣＨ$_3$ＯＤが浸透し易いが、その他転炉に使用されているMgO-C系やAl_2O_3-C系等では別の溶媒が適していることがわかっている。

従来耐火物の空隙解析に用いられていたのは、水銀厚入法である。この方法は耐火物に対して圧力を掛けて水銀を厚入し、その結果からどの程度の空隙があるか，そのサイズはどうかを推定で求める方法である。その結果をFig.1に示す。この結果は、あくまでも推定方法である。

２次元スピンエコー法での実験結果をFig.2に示す。２次元法は、メモリー等の制約も少なく簡便なため非常に有効であるが、耐火物のように形がいびつで且つ得たい情報が空隙の場合、どの場所を測定しているかなどが不明確であることから不適当と考えられる。また選択パルスで正確に狙い通りのスライス厚を得られているかなどの問題点もある。更に空隙解析という点から考えると、スライス厚が２００μｍ以下が望ましい。しかしスライス厚が薄くなるに連れて感度は低下することから、２次元法の限界が考えられる。

対して３次元法は、２次元法に見られるような問題点はなく、トータルの積算時間でも２次元法を多く適応した場合と大差ない。Fig.3に３次元スピンエコー測定にから得られたすべての断面の空隙の分布状態を示す。白い部分が空隙を示しており、これらを統

計的な処理を行うことで耐火物中の空隙の存在割合を算出することができた。Table 1からわかるように、マイクロイメージング法の結果は空隙率２６．５％であり、水銀圧入法にから得られた結果（２５．９％）と良く一致した。また得られたデータからVISILOG4で画像処理をすることで、空隙の大きさの分布を容易に得ることができた。その結果をFig.4に示す。このようにマイクロイメージング法は非破壊であることから、引き続き別の耐熱性実験をすることができる。様々な解析から、耐熱性には１００μｍ以上の空隙の存在が重要であり、小さな空隙は耐熱性にはあまり関与しないことがわかった。

４．まとめ

ＮＭＲマイクロイメージング法は、耐火物の空隙を解析する上で、従来法では得られない空隙の分布や３次元的な繋がりの情報を与えることがわかった。つまり本手法は耐火物の空隙解析に対して、非常に簡便且つ有効な手法と考えられる。現在、日本鉄鋼協会では「耐火物の基礎研究部会」を中心に、耐火物の空隙測定法の見直しを進めている。すでに述べたように、従来の水銀厚入法には様々な問題点が指摘されている。我々は、マイクロイメージング法が耐火物の空隙解析の標準法となるべく、確立した本手法を活用して協会の標準試料等の測定解析を進めている。

参考文献

1）Callaghan,P.T.(1991) 'Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy' Clarredon Press ,Oxford

2）J.H.Strange et al　Magnetic Resonance Imaging　Vol.12　161 (1994)

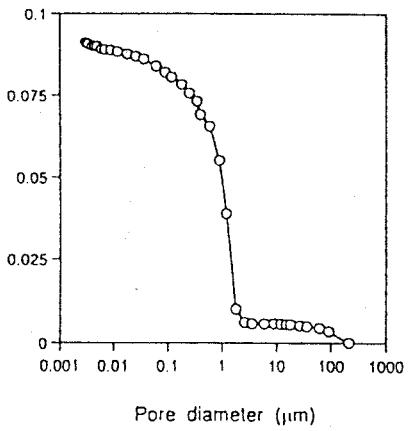


Fig.1　The results of potensiometer

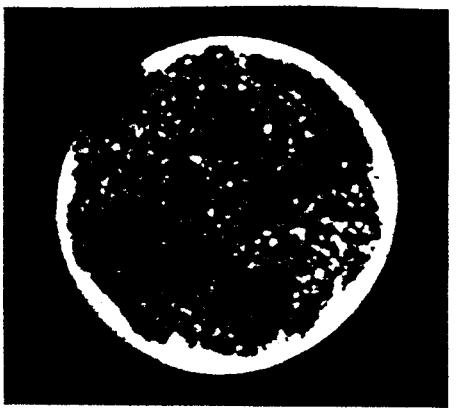


Fig.2　The 1 slice image by 2D spin echo method

Table 1　The comparison between the results of potentiometer and that of micro-imaging method

	MgO-C	SiO2-Al2O3
potensiometer	20.4	26.5
micro-imaging method	21.3	25.9

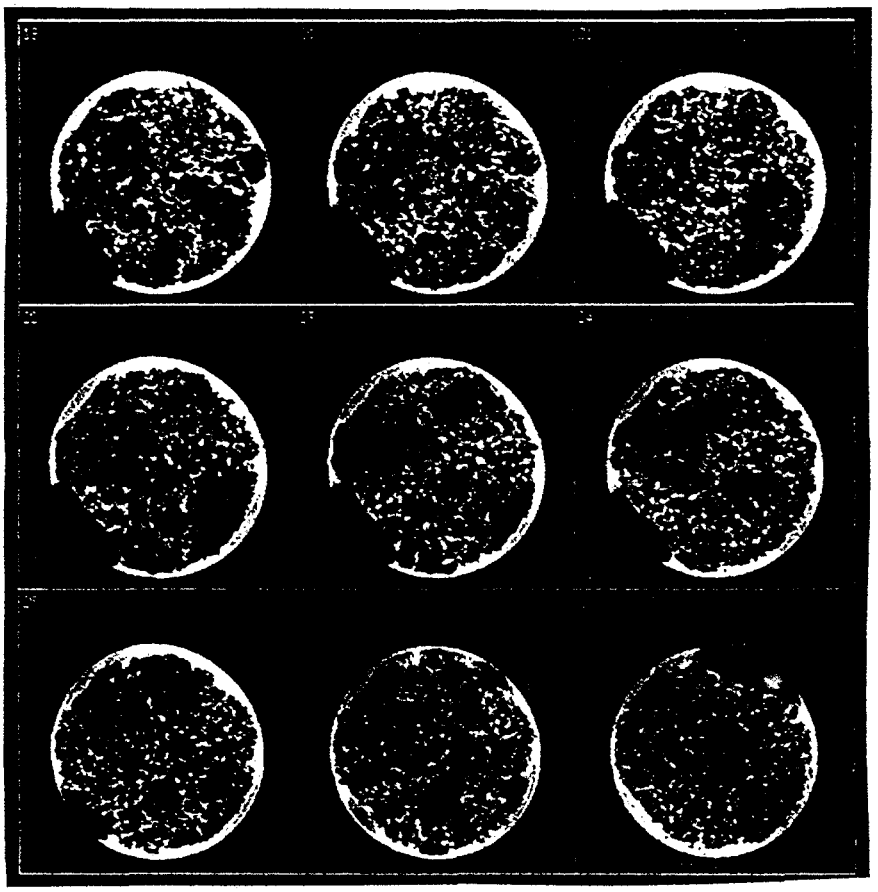


Fig.3 The some slice images of SiO_2-Al_2O_3 refractoreis by 3D spin echo method

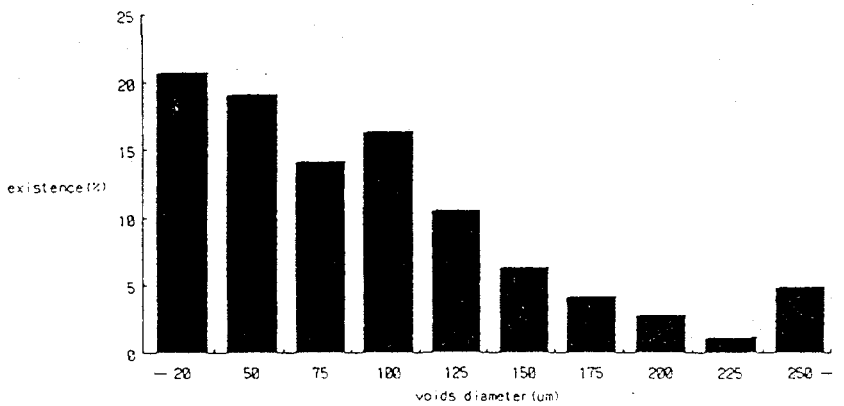


Fig.4 The voids of refractories with diameter(μm) VS the existence rate(%)

第３日

１１月２日（木）

天然物の構造解析
糖質・核酸・生体ＮＭＲ
蛋白質

P77

選択的緩和法の改良とその応用
― Ascidiacyclamide 誘導体の構造とコンフォメーションの相関―

（神戸薬大・大阪薬大*）○杉浦眞喜子，上垣内みよ子，
石田寿昌*，篠崎史義*

A Modificatin of the Selective Relaxation Method and its Applications - *A Correlation between a Structure and a Conformation of Ascidiacyclamide Derivatives*

Makiko Sugiura, Miyoko Kamigauchi, Toshimasa Ishida, and Fumiyoshi Shinozaki
Kobe Pharmaceutical University and Osaka University of Oharmaceutical Sciences

The modified selective relaxation methods in which the selective non-inversion relaxation times (T_1^{sni}) were used to get cross relaxation (σ_{ij}) have been applied to three Ascidiacyclamide derivatives (2) - (4). The dynamical simulated annealing calculations have been done using the obtained r_{ij} valures and the resulting proposed conformations are Type III for (2) and (4) and Type I for (3). These observations suggest that the deviation from *C*2 symmetry leads to the Type III conformation.

【はじめに】

選択的緩和法[1]は，Selective T_1(T_1^S)，Bi-selective T_1(T_1^{BS}) を用いて交差緩和（σ_{ij}）を求め，その σ_{ij} から得られる H-H 間距離（r_{ij}）を用いて立体化学を議論する方法で，溶液中のコンフォメーション解析に有用である。しかし必要な r_{ij} の数に相当する T_1^S と T_1^{BS} の測定を行わなければならないため，少々実験が煩雑になる。その点を改良し，測定の数を減らすため，Lindon ら[2] の Selective non-Inversion T_1(T_1^{sni}) によって交差緩和（σ_{ij}）を得る方法に注目し，選択的緩和法の改良を試みた。

$$1/T_1^{NS} = R^i(all) = \sum_j R^i(ij) = \sum_j N_j\sigma_{ij} + R^i(i) = \sum_j N_j\sigma_{ij} + \sum_j N_j\rho_{ij} + \rho^* \qquad (1)$$

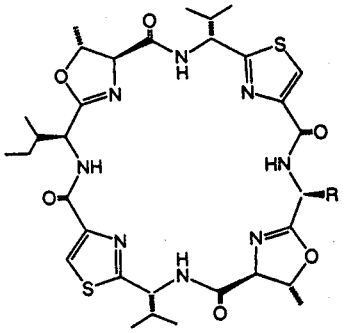
$$1/T_1^{SNI}(j) = R^i(k \neq j) = \sum_{k\neq j} R^i(ik) = \sum_{k\neq j} N_k\sigma_{ik} + R^i(i) = \sum_{k\neq j} N_k\sigma_{ik} + \sum_k N_k\rho_{ik} + \rho^* \qquad (2)$$

$$1/T_1^{NS} - 1/T_1^{SNI}(j) = R^i(all) - R^i(i \neq j) = N_j\sigma_{ij} \qquad (3)$$

T_1^{sni} は選択的に一つの水素核だけを反転させずに他の水素核全てを反転させて得られる T_1 で，T_1^{NS} が (1) 式のように書けるとすると，T_1^{sni} は (2) 式のように書き表される。従って (3)式のように T_1^{NS} と T_1^{sni} の逆数の差から σ_{ij} を得ることが出来，選択的緩和法は，Fig. 1 のフローチャートのようになる。

今回はこの方法を Ascidiacyclamide (1) の誘導体 (2) - (4) に適用した。(1) は海洋生物由来の一連の環状ペプチドの一つで，強い抗腫瘍／殺細胞活性を持つ。これらの環状ペプチドは Fig. 2 に示されるような 3 種のコンフォーマーの存在が考えられ，その化学構造特に *C*2 対称性からのずれの度合いによって優位コンフォーメーションが変化することが示唆されている。そこで *C*2 対称性からのずれの程度の異なるように合成された誘導体 (2) - (4) についてその溶液中でのコンフォメーション解析を Fig. 1 のフローチャートに従って行ない，これら環状ペプチドの構造とコンフォーメーションの相関を議論すると共に，この改良選択的緩和法について検討した。

キーワード：選択的緩和法，交差緩和，Selective non-Inversion T_1，Ascidiacyclamide，コンフォメーション
すぎうら まきこ　かみがうち みよこ　いしだ としまさ　しのざき ふみよし



(1) R = $CH(CH_3)CH_2CH_3$
(2) R = H
(3) R = $CH_2CH(CH_3)_2$
(4) R = CH_2Ph

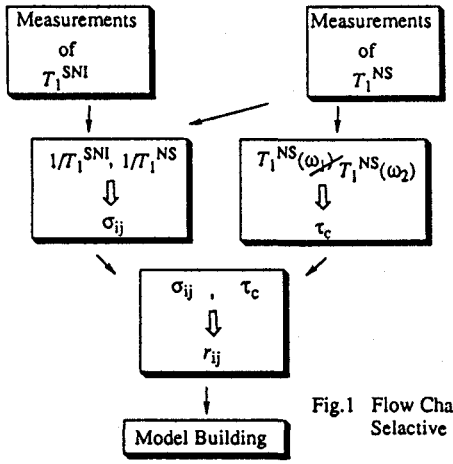
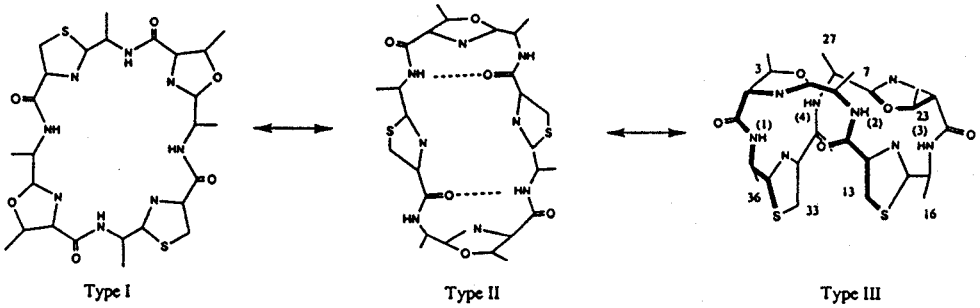


Fig.1 Flow Chart of the Modified Selactive Relaxation Method



Type I　　Type II　　Type III

Fig. 2 Schematic illustration of the conformational equibrium for (1) - (4)

【実験】

NMR の測定には Varian VXR-500 (500 MHz) 及び Gemini-200 (200 MHz) を用いた。T_1^{sni} の測定は Fig. 3 に示すような DANTE pulse を用いるもの (a) と Gaussian-shaped pulse を用いるもの (b) の 2 種類を試したが，いずれのパルスシーケンスを用いても得られた値に大きな差はなかった。

試料 (2) - (4) はそれぞれ$CDCl_3$ に溶解し，脱ガス，溶封して測定サンプルとし，Fig. 1 のフローチャートに従ってそれぞれの T_1 測定を行った。

得られた r_{ij} を束縛条件として MD 計算を行いモデルの構築を行ったが，この計算は graphics QUANTA parameter set を用いた CHARMm program によった。

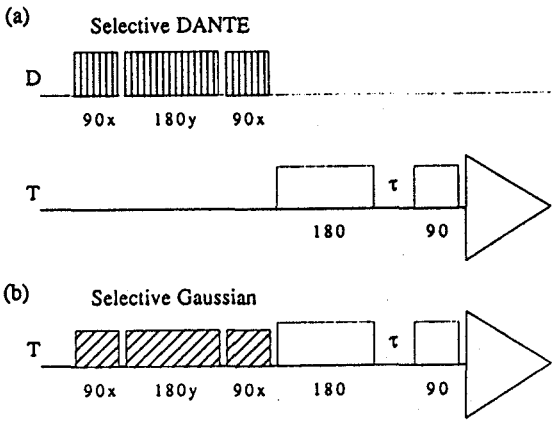


Fig.3 Pulse sequences for T_1^{sni} measurments

【結果と考察】

Table 1, 2 に，(2) 及び (3) の200 MHz 及び 500 MHz での T_1^{NS}，500 MHz での T_1^{sni} の測定値を示した。（紙面の都合で省略するが）(4) についても同様の測定値を得た。これらの測定値を用いて Fig. 1 のフローチャートに従って得られる σ_{ij} の値及び r_{ij} の値を Table 4 にまとめた。この Table から (2) 及び (4) で Type III のコンフォメーションを示唆する空間的に接近したr_{ij} の値が見られる。Table 4 の r_{ij} の値を束縛条件として計算されたモデルを Fig. 4 に示したが，予想通り (2), (4) が Type III の，(3) が Type I のコンフォメーションをとっている。この結果から，構造が $C2$ 対称からずれるとコンフォメーションが Type III に偏ることが示唆された。

Table 1. Observed T_1^{NS} and T_1^{sni} values of (2)

observed	(i)	NH2	NH4	H-33	H-13	NH1	NH3	H-35	H-15	H-26	H-3	H-23	H-6I	H-2	H-22	H-6h	H-36	H-16	H-27	H-28I
T_1^{NS}(200)		0.561	0.518	8.309	8.309	0.541	0.533	1.143	1.155		1.195	1.224	0.390	1.424	1.498	0.294	0.693	0.693		
T_1^{NS}(500)		0.779	0.690	10.743	11.537	0.733	0.707	1.554	1.563	1.341	1.723	1.691	0.510	2.094	2.006	0.439	0.998	0.954	0.822	0.568
	selected (j)																			
T_1^{Sni}	NH2					0.739	0.708	1.553	1.559	1.351	1.813	1.743	0.516	2.092	2.009	0.454	1.004	0.956	0.839	0.574
T_1^{Sni}	NH4					0.718	0.707	1.553	1.570	1.358	1.750	1.704	0.511	2.082	1.976	0.446	1.000	0.959	0.830	0.573
T_1^{Sni}	H-33					0.729	0.694	1.553	1.563	1.341	1.734	1.694	0.510	2.077	1.983	0.439	1.010	0.977	0.806	0.564
T_1^{Sni}	H-13					0.728	0.695	1.555	1.569	1.343	1.739	1.691	0.510	2.084	1.990	0.439	1.011	0.974	0.806	0.571
T_1^{Sni}	NH1	0.787	0.684	11.350	11.980			1.577	1.584	1.325	1.718	1.664	0.511	2.116	2.010	0.438	1.016	0.976	0.809	0.565
T_1^{Sni}	NH3	0.788	0.684	10.750	11.430			1.576	1.582	1.324	1.725	1.665	0.505	2.113	2.010	0.438	1.013	0.970	0.817	0.567
T_1^{Sni}	H-3/-23	0.788	0.698	10.770	11.990	0.731	0.707	1.551	1.545					2.087	2.054	0.466	1.003	0.970	0.906	0.552
T_1^{Sni}	H-2/-22	0.788	0.686	10.730	11.910	0.744	0.710	1.542	1.574	1.316	1.750	1.662	0.518				0.989	0.960	0.829	0.560
T_1^{Sni}	H-6h	0.808	0.704	10.580	11.340	0.733	0.715	1.565	1.592	1.326	1.800	1.690	0.653	2.033	1.969		0.977	0.957	0.815	0.593
T_1^{Sni}	H-16/36	0.786	0.689	11.700	12.950	0.744	0.714	1.667	1.694	1.349	1.735	1.656	0.516	2.100	2.019					0.563

Table 2. Observed T_1^{NS} and T_1^{sni} values of (3)

observed	(i)	NH2	NH4	13/33	33/13	NH1	NH3	H-35	H-15	H-26	H-2	H-22	H-16	H-36	H-27	H-7I
T_1^{NS}(200)		0.479	0.479	4.268	4.268	0.567	0.567	1.059	1.059	0.917	1.441	1.441	0.741	0.741		0.336
T_1^{NS}(500)		0.643	0.627	6.106	5.894	0.739	0.718	1.435	1.451	1.225	1.939	1.954	0.980	0.980	0.696	0.365
	selected (j)															
T_1^{Sni}	NH2/NH4					0.733	0.680	1.430	1.463	1.222	1.943	1.917	0.965	0.973	0.713	0.367
T_1^{Sni}	H-13/33					0.720	0.703	1.444	1.457	1.193	1.925	1.939	0.963	0.960	0.692	0.344
T_1^{Sni}	NH1	0.633	0.610	6.051	5.928			1.497	1.466	1.224	1.978	1.987	1.008	1.003	0.701	0.367
T_1^{Sni}	NH3	0.623	0.617	6.226	6.027			1.461	1.507	1.228	1.956	2.026	1.000	0.994	0.681	0.365
T_1^{Sni}	H-2/22	0.640	0.621	5.295	5.295	0.744	0.725	1.412	1.470	1.208			1.020	1.018	0.692	0.376
T_1^{Sni}	H-16/36	0.632	0.615	6.188	5.937	0.746	0.725	1.564	1.583	1.229	1.928	1.961			0.659	0.361

Table 4 The cross relaxation (σ_{ij}) and the estimated r_{ij} values of several proton pairs for (2) -(4)

		(2)			(3)			(4)		
H-i	H-j	σ_{ij} /10^{-2} s^{-1}	σ_{ii}	r_{ij}/Å	σ_{ij} /10^{-2} s^{-1}	σ_{ii}	r_{ij}/Å	σ_{ij} /10^{-2} s^{-1}	σ_{ii}	r_{ij}/Å
NH1	H-2	2.2		3.10	0.9	1.0	3.52 ~3.59			
	H-35		0.9	3.57		2.9	2.96		1.1	3.49
	H-36	2.1	1.7	3.12 ~3.23	1.4	2.4	3.34 ~3.04		3.7	2.84
NH2	H-6 h	4.5	7.5	2.74 ~2.51				1.2	2.1	3.42 ~3.10
	l		2.2	3.08						
	H-7h							2.3	1.6	3.07 ~3.24
	H-7l					1.2	3.18		2.0	3.14
	H-23	1.4	1.8	3.33 ~3.21				3.5	1.5	2.87 ~3.26
	H-27		2.3	3.06					4.2	2.72
NH3	H-22	0.6		3.87	1.3	1.8	3.39 ~3.19	1.3		3.39
	H-15		0.8	3.69		2.5	3.02		0.9	3.57
	H-16	1.4	1.7	3.32 ~3.22	1.2	2.1	3.39 ~3.13		3.7	2.82
NH4	H-26		0.9	3.57				1.1	1.8	3.47 ~3.17
	H-27		1.1	3.46		3.5	2.87	4.1	4.4	2.76 ~
	2.70									
	H-3	1.6	0.9	3.26 ~3.60				3.2	1.6	2.88 ~3.24
	H-6 h	2.8	3.6	2.97 ~2.84					0.8	3.66
	H-7l								2.1	3.10
H-2	H-3		0.9	3.59				0.9		3.57
H-22	H-23	1.2		3.44				1.6	1.9	3.27 ~3.15
H-6h	H-6l		43.0	1.88						
H-6	H-7h							2.2		3.08
	H-7l							0.8		3.62
H-13	H-36	0.9	1.2	3.56 ~3.42				0.6	2.4	3.84 ~3.05
H-33	H-16	0.8	2.5	3.69 ~3.02				0.6	1.3	3.84 ~3.37
H-15	H-16	4.9		2.70				4.1		2.79
H-35	H-36	4.4		2.76				4.2		2.77
H-26	H-27							1.6		3.22

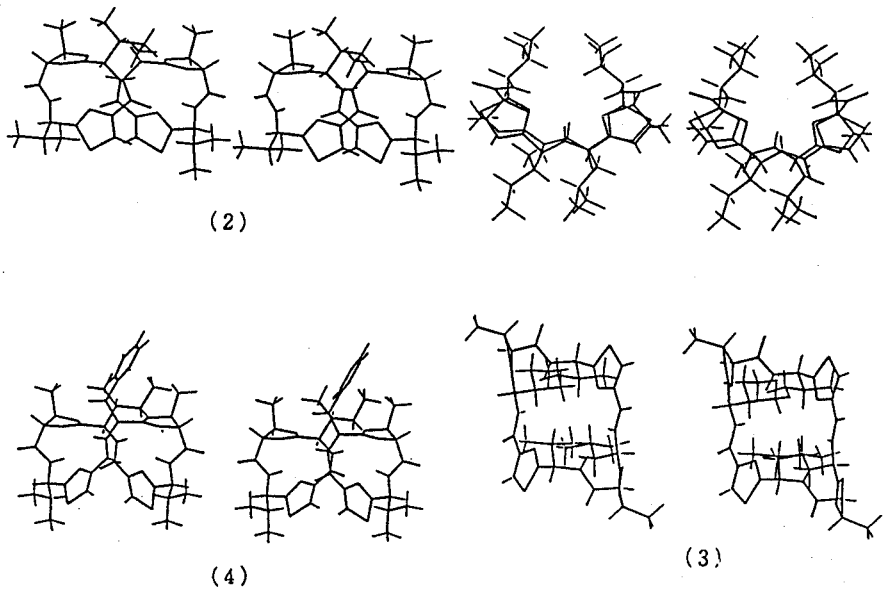


Fig. 4 Stereoscopic drawings of molecular conformations calculated using the r_{ij} values for (2) - (4)

【参考文献】 1) T.Sai, N.Takao and M.Sugiura, *Magn.Resn.Chem.* 30, 1041 (1992)
2) M.Liu, R.D. Farrant and J.Lindon, *Magn.Resn.Chem* 30, 173 (1992)

P78

等価核のNMR的非等価性に着目した対称分子の構造解析(第5報) 1D PASS-ROESY法

(北大・農) 川端 潤、○福士江里

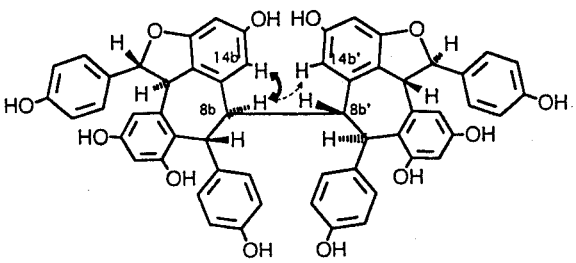
Structure Elucidation of C_2 Molecules from a Viewpoint of Non-equivalency of Equivalent Nuclei in NMR (Part V). 1D PASS-ROESY

Jun Kawabata and Eri Fukushi (Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

In a C_2 symmetric molecule, hopeaphenol (1), discrimination of intra-unit NOE (H-8b/H-14b) and inter-unit NOE (H-8b/H-14b') was achieved by 1D PASS-ROESY. The $^{LR}J_{CH}$ would appear as the displacement of ROE signals in two subspectra of PASS-ROESY. In this experiment, the displacement by ^{3}J(C-8b/H-14b) was observed in the ROE (H-8b/H-14b) signals, indicating the contribution of intra-unit ROE.

(1)概要

昨年の本討論会で，1D PASS-NOESYスペクトルの相関ピークにあらわれる遠隔C-Hカップリング($^{LR}J_{CH}$)の値を利用して対称化合物のユニット内NOEとユニット間NOEの区別に初めて成功したことを報告した[1]．今回は，この方法をさらに分子量の大きな化合物に適用するため，1D PASS-ROESY法について検討した．モデル化合物として天然のテトラスチルベンhopeaphenol(**1**)を選び，H-8b/H-14b(ユニット内ROE:太線矢印)とH-8b/H-14b'(ユニット間ROE:破線矢印)の区別を試みた．このとき，H-8b/H-8b'間のJカップリングを経由するTOCSY-ROESY偽ピークを生じたため，プロトンの中心周波数を遠ざけスピンロックにDANTEパルスを用いた．その結果，得られた2本のサブスペクトルには$^{LR}J_{CH}$のずれがあるユニット内のROEを観測できた(Fig.1)．



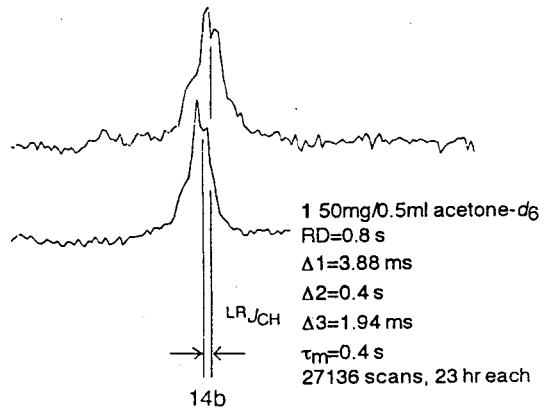


Fig.1 Part of 1D PASS-ROESY spectra of **1**.
Pulse sequence used was Fig.3a

Key Words: C_2 symmetric molecule, isotopomeric asymmetriy, PASS-ROESY, intra-/inter-unit NOE

かわばたじゅん，ふくしえり

(2)方法および結果

C_2対称分子は2つの等価なユニットからなり，通常のNMRスペクトル上では2つ分のシグナルが重なってあらわれるため，たとえば，**1**においてH-8b/H-14b(ユニット内:太線矢印)とH-8b/H-14b'(ユニット間:破線矢印)のROEは通常の方法では区別できない．この分子の等価なカーボンC-8b,C-8b'に着目すると，NMR活性な^{13}Cの天然存在比が1.09%と低いことから，C-8bとC-8b'の両方が^{12}C(Fig.2a, 97.8%)，どちらか一方が^{13}C(Fig.2b, 2.18%)，両方が^{13}C(Fig.2c,0.01%)の3種類のアイソトポマーに分類され，それぞれの存在割合が2桁ずつ異なることからNMRの測定法によって観測し分けることが可能である．ここではC-8bが^{13}C，C-8b'が^{12}Cであるアイソトポマー(b)を観測する．

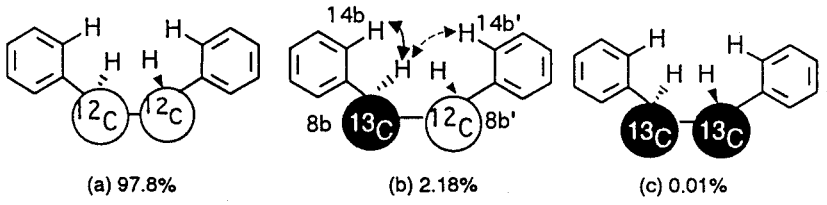
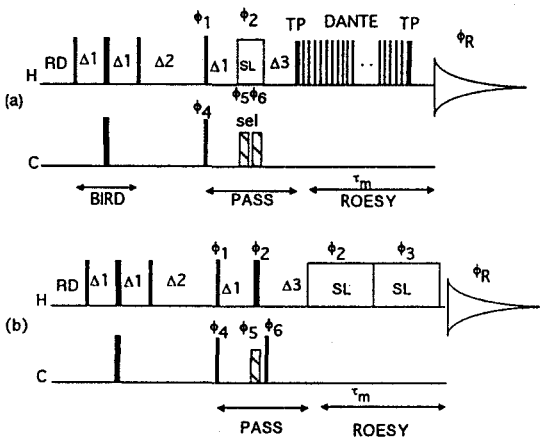


Fig.2 Three isotopomers of **1** in regard to carbon-8 at natural abundance

PASS法では2本の一次元スペクトルを測定する．パルスシーケンス(Fig.3a)中のカーボン選択パルスによりC-8bが^{13}Cであるアイソトポマーだけが選ばれ，H-8bは$^{1}J_{CH}$で分裂して2本のサテライトシグナルを与える．そのそれぞれにプロトンの周波数中心ν_0を置いて一次元スペクトルをひとつずつ測定すると，求めようとするROEがH-8b/H-14b(ユニット内)ROEであれば2本の一次元スペクトルのROESY相関ピークは^{3}J(C-8b/H-14b)でずれてあらわれ，H-8b/H-14b'(ユニット間)ROEであればピークはずれない(^{4}J(C-8b/H-14b')～0)はずである．



RD=repetition delay
Δ1=1/2($^{1}J_{CH}$)
Δ2=BIRD delay
Δ3=1/4($^{1}J_{CH}$)
$\phi_1=0^4 1^4 2^4 3^4$
ϕ_2=13132020
ϕ_3=31310202
$\phi_4=0^{16}2^{16}$
ϕ_5=02
ϕ_6=0022
ϕ_R=02201331
20023113

. Fig.3 Pulse sequences for 1D PASS-ROESY.

すでに報告したPASS-TOCSY[3]と同様に作成したPASS-ROESYシーケンス(Fig.3b)ではROESY部分には比較的弱いパワーで照射するスピンロックを採用した．ところがH-8bとH-8b'の間に強いTOCSYピーク(ROESYピークと逆の位相)が出現し(Fig.4)，TOCSY-ROESY偽ピーク(ROESYピークと同じ位相)があらわれるおそれが生じた．

今，Fig.5aのように，求めようとしているROEがH-8bからH-14bへのユニット内ROEだとするとH-8b'とH-14b'も同じ関係にあり，H-8bからH-8b'へTOCSY磁化移動が起こればH-14b'にはTOCSY-ROESY偽ピークが出る．H-14bとH-14b'はほぼ同じ位置でROEピークとTOCSY-ROESY偽ピークの位相は同じなので，ふたつのピークが重なることになる．また，Fig.5bのように，今，求めようとしているROEがH-8bからH-14b'へのユニット間ROEだとしても同様にH-14bにはTOCSY-ROESY偽ピークが出てしまう．すなわち，H-8bからH-8b'へのTOCSY磁化移動があるとユニット内ROEであるFig.5aとユニット間ROEであるFig.5bとの区別ができない．このため，8bから8b'へのTOCSY磁化移動を抑える必要がある．

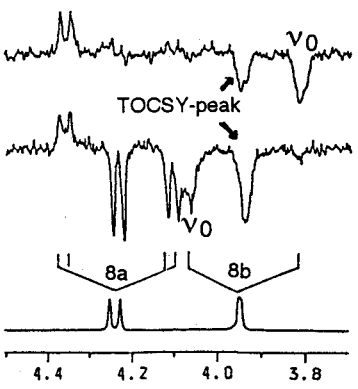


Fig.4 Part of 1D PASS-ROESY spectra of **1**.
Pulse sequence used was Fig.3b

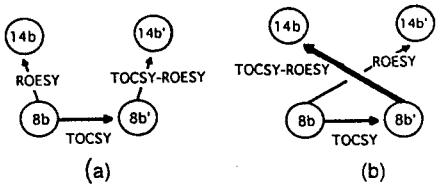


Fig.5 TOCSY-ROESY false peak.

通常のROESYスペクトルではTOCSYピークを抑えるためにプロトンの中心周波数ν_0を遠ざけて測定する[2]．PASS法ではプロトンの中心周波数の設定でサテライトピークの一方を選択しているためにν_0を無秩序に動かすことはできないが，各々のサテライトピーク上から$^1J_{CH}$の2倍ずつなら動かすことができる[3]．ところが，シーケンスを通じてROESYスピンロックにちょうどよい弱いデカップラーパワー($\pi/2$=100 μs)を使用していたため，中心周波数を遠ざけた時にパルスの不完全性のためかPASSの部分がうまく働かなくなった．

そこで，より強いデカップラーパワーが使え，また，TOCSYピークを抑える効果もあるといわれているDANTEパルスによるスピンロック[4](Fig.3a)を試みた($\pi/2$=40 μs)．中心周波数を^1J(C-8b/H-8b)の2倍ずつ低磁場へ動かして行ったところ，その12倍のところでH-8bとH-8b'の間にTOCSY-ピークが出なくなり，H-14bへのTOCSY-ROESY偽ピークの寄与はなくなったと考えた．

またPASSには^{13}Cの選択励起パルスが含まれている．**1**の^{13}C-NMRではC-8bはC-8aと1.5ppm程しか離れていないうえに、H-8bの左側のサテライトピークと、H-8aの右側のサテライトピークがほとんど同じ位置にある(Fig.4)ため，H-8bの左のサテライトを選択励起する時にH-8aの右のサテライトも励起されやすい．ここでは選択パルスの不完全性による不要シグナルを抑えるために^{13}Cパルスを両方とも選択パルスとしこの間の磁化展開を抑えるために^{1}Hスピンロックを使用する選択励起[5]の改良法を用いた．

以上の点を検討・改良し，パルスシーケンスFig.3aを用いて得られた**1**の1D PASS-ROESY法の2本のサブスペクトル中のROEピークには$^{LR}J_{CH}$のずれがあり(Fig.1)，ユニット内のROEが強くあらわれていることがわかった．

(3)おわりに

PASS-NOESYやROESY法に遠隔カップリングがあらわれることを利用して，これまで不可能だった対称化合物のユニット内NOEとユニット間NOEの区別に成功した．

PASS法には求めようとする遠隔カップリングを長い時間展開させる必要がなく，磁化の減衰やプロトン同士のカップリングに悩まされることがない．遠隔カップリングを二つのピークのずれとして読む利点はこれを一次元化したPASS法でより発揮することができ，対称な系に限らず今後使われるものと期待される．

References

1) 川端　潤，福士江里，第33回NMR討論会講演要旨集, p.133-136(1994).

2) D. Neuhaus and J. Keeler, *J. Magn. Reson.*, **68**, 568-574(1986).

3) E. Fukushi and J. Kawabata, *J. Magn. Reson.*, **A108**, 103-105(1994).

4) H. Kessler, C. Griesinger, R. Kerssebaum, K. Wagner, and R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 607-609(1987).

5) J. -M. Bernassau and J. -M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.*, **A104**, 212-221(1993).

P79 ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属とその応用(6)

(神奈川大理) 釜野徳明、○野川俊彦、富岡 靖、張 恵平、小竹文乃
(北陸大薬) 木津治久

Structural Assignment and Application of Toad Poison Bufadienolides by 2D NMR spectra(6)

Yoshiaki Kamano, ○Toshihiko Nogawa, Osamu Tomioka, Hui-ping Zhang, and Ayano Kotake
(Faculty of Science, Kanagawa University)
Haruhisa Kizu
(Faculty of Pharmacy, Hokuriku University)

We wish to present the perfect structural determination of 20(S),21-epoxy-resibufogenin(2), 14β,15β-epoxy-digitoxigenin(4), and 19-oxo-desacetyl-cinobufotalin(6) were isolated from the Chinese drug Ch'an Su. For structural assignment, 2D NMR spectral techniques were used, in addition to 1D NOE difference spectra. In Table 1, structural assignment of bufadienolide(1)—(6) were indicated. Also, in Fig 2, NOE result of 20(S),21-epoxy-resibufogenin was shown. Separation of bufadienolides on the hydrophobic gel carrier HP-Cellulofine, which was usuful for separation of the mixture and minor constituents, were illustrated in Fig 3.

緒言 ガマ毒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17β位にα-pyrone環を有し、A/B cis、C/D cisのユニークな構造を持ち、NMRスペクトルもその特徴を示す。演者らは、今までに漢薬センソCh'an Suの主要bufadienolideの400MHz 2D NMR スペクトルを測定し、化学構造の帰属と立体的考察を行い、[1] ついで側鎖α-pyrone環開裂体、[2,3] A環ラクトン体、[4] および3位と5位のoxime体の構造解析を行っている。[5]

今回、新たに漢薬センソから新しい方法で単離した3種の微量bufadienolides A, B, およびCの詳細な2D NMRスペクトルによる解析により、それぞれ、Aを20(S),21-epoxy-resibufogenin(2)、Bを14β15β-epoxy-digitoxigenin(4)、およびCを19-oxo-desacetyl-cinobufotalin(6)と決定した。そこで、(1)NMRによる構造決定の詳細、(2)従来不明であった20(s),21-epoxy-resibufogeninのNMRによる絶対配置決定について報告する。

なお、今回複雑なmixtureと、微量成分分離に有効であった、疎水性ゲルによる分離法もあわせて報告する。

かまのよしあき、○のがわとしひこ、とみおかおさむ、ちょうけいへい、こたけあやの、きずはるひさ

キーワード　ガマ毒、bufadienolide、2D NMR、NOE、疎水性ゲル

実験

機種：JNM-400スペクトロメーター

サンプル：20(a),21-epoxy-resibufogenin、14β15β-epoxy-digitoxigeninは重クロロホルムに溶解し、19-oxo-desacetyl-cinobifotalinは重クロロホルム／重メタノール（７：１）に溶解した。内部標準としてTMSを用いた。

測定法：^{1}H-NMRは399.65MHzで、^{13}C-NMRは100.40MHzで記録、NOE差スペクトルは20(S),21-epoxy-resibufogeninに対しては照射パワーを 85,90,350,380,400の順に用い、19-oxo-desacetyl-cinobifotalinに対しては 300,350を用いた。

結果

Ⅰ. 20(S),21-epoxy-resibufogenin (2), 14β15β-epoxy-digitoxigenin (4), 19-oxo-desacetyl-cinobufotalin (6) の構造決定

漢薬センソCh'an Suより、主として疎水性ゲル担体HP-Cellulofineを用いるクロマトグラフィーにより、bufadienolides A, B, およびC をそれぞれ単離した。

bufadienolide A は、スペクトルの検討により20,21-epoxy-resibufogeninと推定し、^{1}H, ^{13}C-NMRスペクトルデータを以前報告されているものと比較し、構造(2)を確認した。但し文献では、20,21-epoxy 基の絶対配置は不明であった。[6)]

bufadienolide B も同様に、スペクトルの検討により14β15β-epoxy-digitoxigeninと推定し、^{1}H, ^{13}C-NMR、2D-NMRスペクトルデータをdigitoxigeninのそれと比較することにより、構造(4)を確認した。

bufadienolide C は、^{1}H, ^{13}C-NMRスペクトルデータよりアルデヒドの存在がわかり、構造(6)を推定した。ついで、^{1}H-^{1}H COSY, HMBC, HMQC などの2D NMR やNOE差スペクトルを詳細に検討することにより構造(6)を確認した。

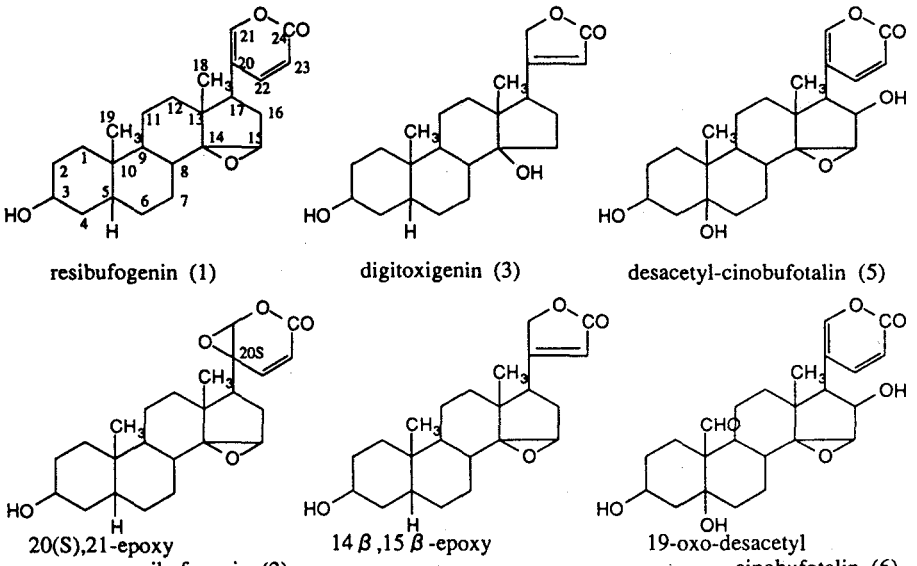


Fig . 1

Table 1. ^{13}C-NMR Chemical Shifts of Bufadienolides (2), (4), (6)

C No.	(2)	(4)	(6)	C No.	(2)	(4)	(6)
1	29.48(t)	29.48(t)	17.35(t)	13	44.05(s)	45.36(s)	44.73(s)
2	27.85(t)	27.86(t)	26.38(t)	14	75.23(s)	74.02(s)	71.85(s)
3	66.71(d)	66.72(d)	66.26(d)	15	59.87(d)	58.75(d)	61.57(d)
4	33.23(t)	33.25(t)	37.00(t)	16	28.60(t)	30.73(t)	71.47(d)
5	35.88(d)	33.16(d)	74.20(s)	17	51.73(d)	46.89(d)	51.72(d)
6	25.73(t)	25.68(t)	35.33(t)	18	16.24(q)	15.83(q)	16.88(q)
7	20.72(t)	20.72(t)	23.13(t)	19	23.72(q)	23.73(q)	208.49(d)
8	39.19(d)	35.93(d)	33.13(d)	20	56.51(s)	173.03(s)	117.63(s)
9	33.17(d)	39.36(d)	42.07(d)	21	84.58(d)	73.71(t)	150.61(d)
10	35.48(s)	35.48(s)	54.54(s)	22	147.91(d)	118.84(d)	149.58(d)
11	20.61(t)	20.82(t)	21.48(t)	23	121.41(d)	174.05(s)	113.21(d)
12	39.70(t)	38.23(t)	39.59(t)	24	159.87(s)		163.01(s)

Ⅱ. 20(S),21-epoxy-resibufogenin の絶対配置決定

従来不明であった α-pyrone環上の20,21-epoxyの絶対配置をNOE差スペクトルの詳細な検討により、20S体であると推定した。その結果を Fig 2 に示す。

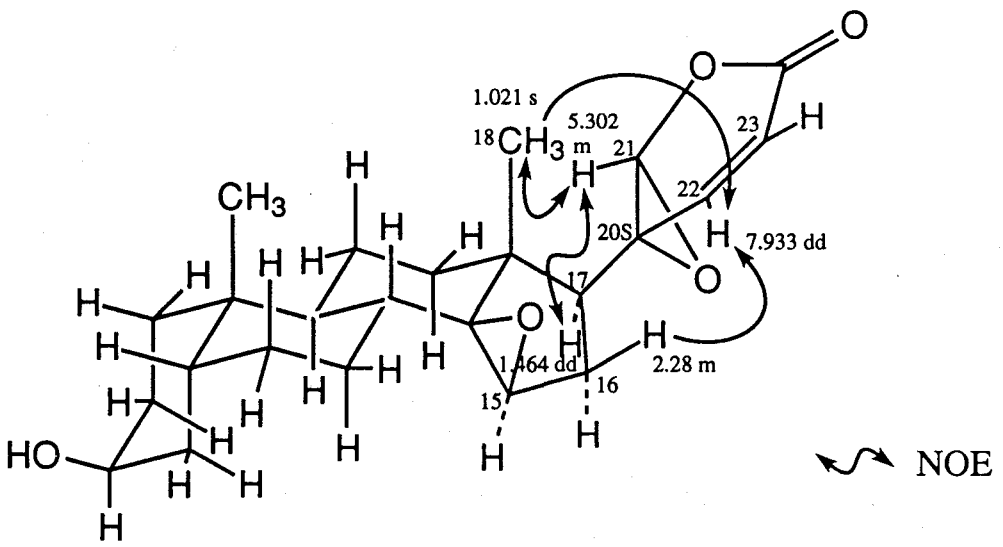
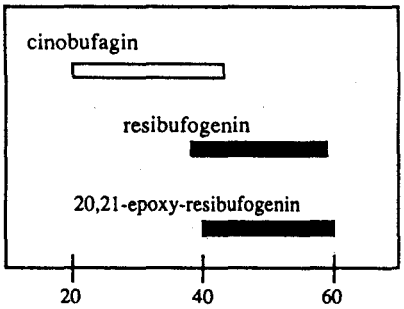


Fig . 2

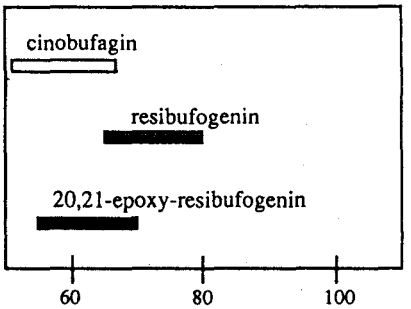
Ⅲ. 疎水性ゲル担体HP-Cellulofineによる分離

従来、ガマ毒bufadienolideの分離にはシリカゲルやアルミナが用いられてきたが、疎水性ゲルSephadex LH-20を用いると、より良い分離が得られることを見い出

し、[7] さらに、日本製の疎水性ゲル担体HP-Cellulofineを用いた分離についても報告している。[8) 9)] 今回、この疎水性ゲル担体HP-Cellulofineが、３種の微量bufadienolideの分離に非常に有効であった。その結果を Fig 3 に示す。



column ; φ 19mm×500mm
solvent ; n-hexane/CH_2Cl_2/MeOH (4:5:1)
sample weight ; 600.0mg
1 fraction ; 100drops



column ; φ 19mm×500mm
solvent ; n-hexane/AcOEt/MeOH (4:5:1)
sample weight ; 189.0mg
1 fraction ; 100drops

Fig. 3

考察　今回、単離した化合物 (2)(4)(6)の13C data をTable 1 に要約したが、1H data の帰属も完了している。20,21-epoxy-resibufogenin の絶対配置をNOE により20S体と推定したが、スペクトル上20R体と思われる小ピークの混在が認められるため、さらに詳細に検討したい。また、疎水性ゲル担体HP-Cellulofine による分離における溶媒による分離の違いなどについて、今後も実験を行う予定である。

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（東京）講演2HI-11　要旨集P.503 (1993)「ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属と応用」
2) 張　恵平、釜野徳明、小竹文乃、木津治久　第32回NMR討論会（東京）講演P45　要旨集P.285 (1993)「ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属と応用(2)・主に側鎖 α -pyrone環開裂化合物の構造について」
3) 釜野徳明、張　恵平、木津治久　日本化学会第67春季年会（東京）講演2E1-31　要旨集P.850 (1994)「ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属と応用(3)・側鎖 α -pyrone環開裂化合物の構造について２」
4) 釜野徳明、張　恵平、羽島宏史、木津治久　日本生薬学会第41回年会（札幌）講演2P-40　要旨集P.280 (1994)「ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属と応用(4)」
5) 釜野徳明、羽島宏史、張　恵平、小竹文乃、木津治久　第33会NMR討論会（神戸）講演P36　要旨集P.141 (1994)　「ガマ毒bufadienolideの二次元NMRによる帰属 と応用(5)」
6) N. Kaneda, T. Kuraisi, K. Yamasaki, *Chem. Pharm. Bull.* 29, 257 (1981)
7) 釜野徳明、足立典子、松岡純子、小竹文乃、張　恵平　日本化学会第65春季年会（東京）講演予稿集 II 3P13 (1993)
8) 釜野徳明、野川俊彦、小竹文乃　日本化学会第67春季年会（東京）講演予稿集 II 2E132 (1994)
9) 釜野徳明、野川俊彦、小竹文乃、羽島宏史　日本生薬学会第41回年会（札幌）講演要旨集 2P-41 P.281 (1994)

P80

セイタカアワダチソウ *Solidago altissima L.* の生物活性ジテルペンの二次元NMR スペクトル

（神奈川大理）釜野徳明、○小竹文乃、中山朋大、山下晃太

2D NMR Spectra of Biological Active Diterpenes Isolated from *Solidago altissima L.*

Yoshiaki Kamano, ○Ayano Kotake, Tomohiro Nakayama, and Kohta Yamashita
(Faculty of Science, Kanagawa University)

As a part of our search for constituents of plants which is overgrown around us, we perviously have reported alleropasy materials which were cis/trans-matricaria ester (A) isolated from roots of *Solidago altissima L.* by use of a new bioassay screening that inhibit cell division of sea urchin egg. In continuation of investigation, we newly isolated two active diterpenes , B and C. Compounds B and C were elucidated to be Kolavenic acid (1) and Solidagonic acid (2) respectively by detailed 1D and 2D $^{1}H/^{13}C$ NMR spectral data. Completed NMR spectral data of Kolavenic acid (1) and Solidagonic acid (2) were firstly presented in this work. Also, the NOESY, solvent effects and changing by temperature in NMR studies were performed. In addition, the biological activities of diterpenes, B and C were discussed.

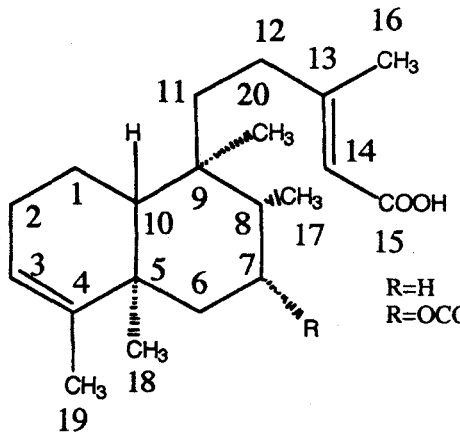
緒言

北アメリカ原産の多年草であるセイタカアワダチソウ *Solidago altissima. L* は、他の植物の成長を抑制するアレロパシー物質を分泌し、範囲を広げ、土手や荒れ地に大群落をつくることで知られている。我々は、簡便なスクリーニング法であるウニ受精卵々割阻害作用やマウス白血病細胞P388に対する細胞毒性を指標に、身近にかつ大量に存在する植物の活性物質を探索し、セイタカアワダチソウ根茎部から、活性物質を単離し、それがアレロパシー物質の cis / trans - dehydromatricaria ester (A) であることを既に報告した[1]。その後、検討を続け、新しく活性物質を単離した。詳細な2D 500MHz NMRスペクトル（HH COSY、HC COSY、HMBCなど）を用いた解析により、いづれもジテルペンカルボン酸の Kolavenic acid (B) と Solidagonic acid (C)であることが分かった。いづれも既知化合物[2),3)] であるが詳細なスペクトルの報告はこれが初めてであり、またこの実験によってNMR帰属の不明な点が明らかとなった。また、NOESY測定を行い興味ある知見を得、さらに、温度変化による影響や各種 solvent（$CDCl_3$、C_5D_5N、CD_3OD、CCl_4など)を用いる溶媒効果を検討した。

一方、ジテルペンBおよびCに対して、上述の活性以外に、ウニ精子酸素呼吸阻害作用を検討し、興味ある知見が得られたので併せて報告する。

キーワード
Solidago altissima L. 、diterpene、2D NMR、NOE、生物活性

かまの よしあき、○こたけ あやの、なかやま ともひろ、やました こうた



R=H Kolavenic acid (1)
R=OCOCH$_3$ Solidagonic acid (2)

Fig. 1

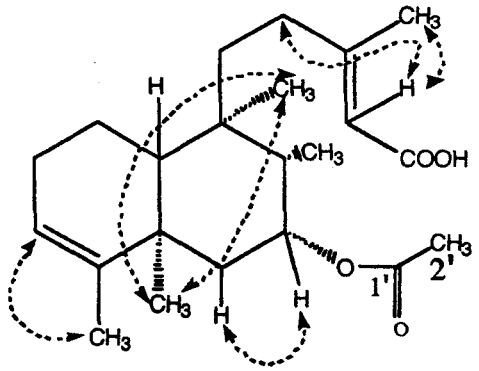


Fig. 2

実験

試料：大学キャンパス周辺で採集したセイタカアワダチソウの根茎部5.16kgを混合有機溶媒で抽出、減圧下で濃縮した。抽出物400gを分配し、Hexane、AcOEt、BuOHおよびMeOH・H_2Oの各可溶部を得た。活性のあるHexane可溶部70gとAcOEt可溶部30gをSiO_2、ODSおよびSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィーにより、Hexane可溶部より活性物質B 460mgを、AcOEt可溶部よりC 180mgを単離した。

NMR測定：機種 JNM-EX40および JNM-A500スペクトロメーター

1．活性物質BおよびC 各20mgを0.5 ml重クロロホルムに溶解、内部標準にTMSを使用、1D（^{1}H、^{13}C、DEPT）および2D NMR（HH COSY、CH COSY、HMBC、NOESY、HOHAHA）を機種JNM-A500で測定した。（^{1}H 500.00MHz、^{13}C 125.65MHzで記録。）

2. solvent効果に対しては、BおよびC 10mgを$CDCl_3$、CD_3OD、$(CD_3)_2CO$、C_5D_5N、C_6D_6およびCCl_4に溶解した。温度変化に対しては、測定温度を50、40、25、10、0、-5℃と変化させ^{1}H NMR(400MHz)を測定した。

3. BおよびCの各重量3、10、20、30mgを$CDCl_3$に溶解させ、^{1}H NMR (400MHz)を測定した。

Table 1 ^{13}C and ^{1}H NMR data of Solidagonic acid (2) in CDCl3.

No.	δ ^{13}C	δ ^{1}H	HMBC	No.	δ ^{13}C	δ ^{1}H	HMBC
1α	17.93 t	Ca 1.58(2H)		11α	37.25 t	1.54 m	
1β				11β		1.45 m	
2α	26.66 t	Ca 2.09(2H)		12α	38.22 t	Ca 1.66(2H)	H14, H16
2β				12β			
3	120.12 d	5.16 s	H19	13	163.69 s		H16
4	144.45 s		H18, H19	14	115.03 d	5.69 d	H16
5	37.35 s			15	171.59 s		H14
6α	39.90 t	2.14 dd	H7, H18	16	19.45 q	2.18 s (3H)	H14
6β		1.14 dd		17	12.04 q	0.92 s (3H)	
7	75.20 d	5.13 q	H17	18	21.41 q	1.19 s (3H)	H6β
8	38.22 d	1.66dq	H8	19	18.00 q	1.58 s (3H)	
9	38.42 s		H17	20	19.59 q	0.99 s (3H)	
10	46.33 d	1.39 dd	H18, H20	1'	170.77 s		H2'
				2'	21.44 q	2.06 s	

結果・考察

1. Kolavenic acid (1)及びSolidagonic acid (2)の構造決定

活性物質BおよびCを、それぞれKolavenic acid (1)、Solidagonic acid (2) (Fig. 1) と決定した。Solidagonic acid (2)の^{1}Hおよび^{13}Cケミカルシフト値とHMBC相関をTable 1に示す。

2. solvent効果

(1) 両化合物の CD_3OD、$(CD_3)_2CO$中での高磁場プロトンシグナルは、他のsolventに比 べ、各位シグナルの重なりが少なく観測された。

(2) 両化合物のビニルメチルプロトンシグナルH16とH19は、C_5D_5NおよびC_6D_6中においてsingletとして観測され、他のsolvent中ではdoubletおよびbroad qurtetとして観測された。この際、H16のC_5D_5N中でのシグナルは他のsolventの場合より、著しく低磁場シフトした。

(3) 両化合物のメチレンプロトンシグナルH6α,β、H2、H12とメチンプロトンシグナルのケミカルシフトは、各solvent中でそれぞれ異なるケミカルシフト値を示した。

(4) 化合物2におけるメチンプロトンシグナルH3とH7 は、$CDCl_3$、CD_3OD、CCl_4、$(CD_3)_2CO$中では、H7はH3よりも高磁場に観測され、C_5D_5N、C_6D_6中では、H7はH3よりも低磁場に観測された。さらに、H7とH3のシグナルは、C_5D_5NとC_6D_6中では良い分離を示したが、他のsolvent中では互いに重なっていた。この違いは、solventの極性および磁気異方性あるいは分極率の違いから生じるものと思われる。

3.温度効果

(1) 両化合物のビニルメチルプロトンシグナルH16、H19は、$CDCl_3$中で温度の上昇によりsingletからdoubletに変化し、CD_3ODではbroad doublet からbroad qurtetに

変化した。

(2) 両化合物のメチレンプロトンシグナルH6 α,β は、$CDCl_3$およびCD_3OD中で温度の上昇により低磁場シフトを示した。

(3) 化合物2のC_5D_5N 中でのアセチルプロトンシグナルは、温度が低下するに伴いsinglet からdoublet に変化し、メチンプロトンシグナルH7は、broad qurtet からsinglet へと変化した。

4. 試料濃度の効果

両化合物とも、大きな変化は観測されなかったが、濃度が高くなるにつれ、シグナル の分裂低下が見られた。

5.NOESY測定

両化合物とも18-CH_3と17-CH_3および18-CH_3と20-CH_3との間にNOEが観測された。化合物2のデータをFig. 2に示す。

生物活性

活性物質B およびC は、ウニ受精卵々割阻害作用 (A)、マウス白血病細胞P388 (B)に対する細胞毒性 およびウニ精子酸素呼吸阻害作用 (C)を示した（Table 2）。アセチル基を有するCはBに比べこれらの生物活性は著しく低下した。

Table 2 Biological activities of Kolavenic acid (1) and Solidagonic acid (2).

Bioassay	Activity IC_{50} (μg/ml)	
	1	2
(A) Inhibition of cell division of sea urchin egg	17.3	28.3
(B) cytotoxicity of P388	4.9	>50
(C) Inhibition of respiration of sea urchin spermatozoon	24.4	50.0

謝辞

マウス白血病細胞P388活性に対するスクリーニングをしていただいた東菱薬品工業(株)の井上直子さんに深謝致します。

文献

1) 「細胞毒性を指標とする植物の生理活性物質の探索（1）」（神奈川大理）釜野徳明、山下晃太、小竹文乃、小峰啓、高野智、山下顕宏、吉田基幸、日野晶也　日本化学会第67会春季年会（東京）講演1P102 要旨集p.1371 (1994)

2) Akio Kobayashi, Shigeo Morimoto, Yoshiari Shibata, Kyohei Yamasita, and Makoto Numata, Journal of Chemical Ecology, 6, 119 (1980).

3) 辻、谷、上田、防菌防微、6、22 (1978).

P81 HMBC法の新しい応用測定---生合成研究への応用

---TANGO-HMBCについて---

東大・農、＊東大・分生研　○降旗一夫、＊渡辺裕之、＊瀬戸治男

New application technique of HMBC -- TANGO-HMBC

K. Frihata, H. Watanabe* and H. Seto*
Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo
*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo

In the biosynthetic studies of natural products, it is sometimes required to observe 1,3-^{13}C-^{13}C couplings to prove rearrangement. However, the small long range couplings (0-3Hz) hamper to detect such long range couplings. In order to overcome this problem, we have developed a new technique named TANGO-HMBC, which consists of a combination of HMBC and TANGO pulse sequences. This method enables to detect HMBC cross peaks from the proton satellite peaks directly bonded to carbon-13. By incorporation of the TANGO sequence, conventional HMBC cross peaks are suppressed or observed with very low intensity. Its application to biosynthetic studies of menaquinone labeled with [U-^{13}C6]-glucose is described.

天然有機化合物の生合成経路の解明の一つの有効な方法は、ダブルラベル実験である。この方法のポイントは、^{13}C-^{13}C結合を有するラベル体を用いて、その^{13}C-^{13}Cスピン結合の観測によって標識位置を決定することであるが、場合によっては転位反応のため^{13}C-^{12}C-^{13}Cという位置関係になる。スクアレンからトリテルペンが生成する過程を図1に示す、^{13}C-^{13}Cラベル体が1,2転位反応により$^{13}CH_3$-^{12}CH-^{13}CH-の1,3の関係をとっている。この1,3の関係において、$^2J_{CC}$は通常数H_z程度になるため、従来法によってはこの関係の証明は不可能であった。この問題を解決するための一つの方法として、^{13}Cに直接結合したプロトンのサテライトピークを利用してHMBCクロスピークを観測する新しい応用測定、TANGO-HMBC法の開発検討を行い、良好結果を得たので報告する。

図2に^{12}Cに直接結合した水素と、^{13}Cに直接結合した水素とのHMBCクロスピークパターンを示す。^{12}Cに直接結合した水素はその水素と^{13}Cの化学シフトの位置に一つのHMBCクロスピークを与えるのに対して、^{13}Cに直接結合した水素は$^1J_{C-H}$結合により大きく分裂し、そのサテライトピークの位置に二個のクロスピークを

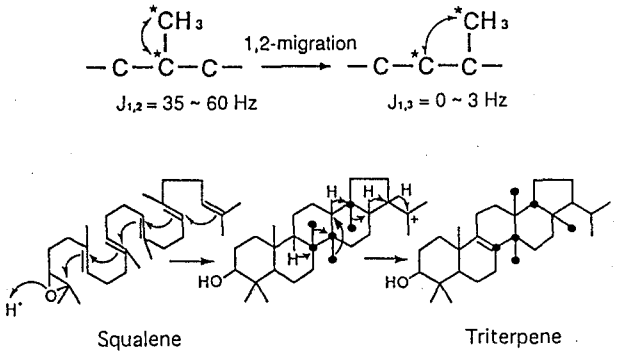


図1．トリテルペンの生合成

TANGO-HMBC

ふりはたかずお、わたなべひろゆき、せとはるお

与える。この^{13}Cに直接結合した水素から三結合離れた炭素とのHMBCクロスピークを観測することにより、転位反応により生じた^{13}C-^{12}C-^{13}Cの1,3の関係を証明することができる。

パルス系列

従来型HMBCでは、^{13}Cに直接結合した水素からのクロスピークを消去するためにlow-pass-J-filterを使用している。このlow-pass-J-filterを取り除いた場合は、従来型HMBCクロスピークに加えて、^{13}Cに直接結合した水素からのクロスピークが混在して観測されるため、スペクトルは非常に複雑となり解析は困難となる。これに対して、^{13}Cに直接結合した水素からのクロスピークのみを観測する目的で考案したのがTANGO-HMBC(図3)である。HMBCの最初の励起パルスをTANGOパルス[1]とspin lockパルスに置き換えている。

TANGOパルスの原理

図4にTANGOパルスのベクトクモデルを示す。X軸方向に135°パルスをかけると、Z磁化はY軸方向に135度回転する。スピン展開時間(τ)の後、direct bond由来の速いスピン(F)と遅いスピン(S)が円錐上のX軸方向に配向する。この時long range由来の磁化(L)はその地点に留まる。この段階で180°パルスを水素と炭素に同時に加えると、long range由来の磁化(L)は180度反転する。また、速いスピン(F)と遅いスピン(S)も同時に反転するが、スピンFとスピンSの入れ替えが起こる。更に同一スピン展開時間(τ)後には、速いスピン(F)と遅いスピン(S)は円錐上の＋Y軸方向に配向する。一方long range由来

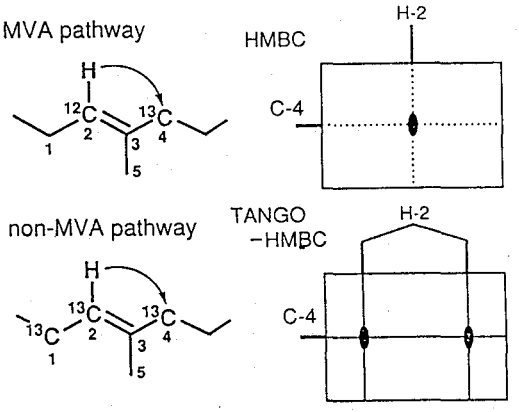


図2．HMBCクロスピーク模式図

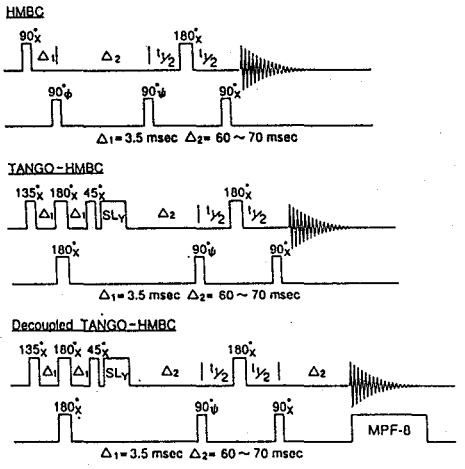


図3. パルス系列
a). HMBC b). TANGO-HMBC
c). Decoupled-TANGO-HMBC

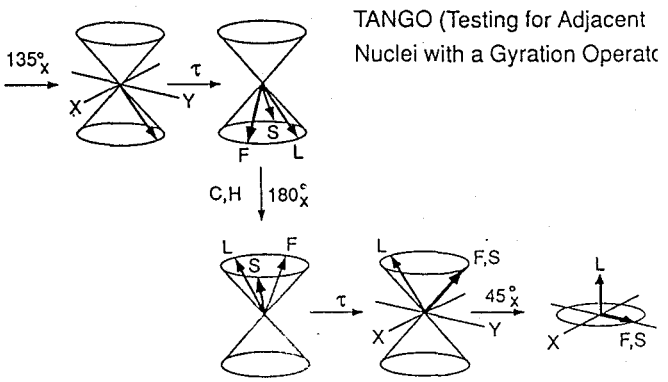


図4. TANGOパルスの原理

の磁化(L)は-Y軸方向のに留まっている。この状態でX軸方向に45° パルスをかけると、long range由来の磁化はZ軸方向に、direct bond由来の速いスピン(F)と遅いスピン(S)はY軸方向に配向する。このY軸方向に配向したスピン(F)とスピン(S)のみをHMBC二次元展開する。long range由来の磁化はZ軸方向に配向しているため観測されない。しかし、TANGOパルスだけでは、このlong range磁化を消去することは困難である。このTANGOパルスの不完全さを補うために、Y軸方向にspin lockパルスを加え、Y軸方向の磁化の位相を揃えると同時にZ軸磁化を消去する。

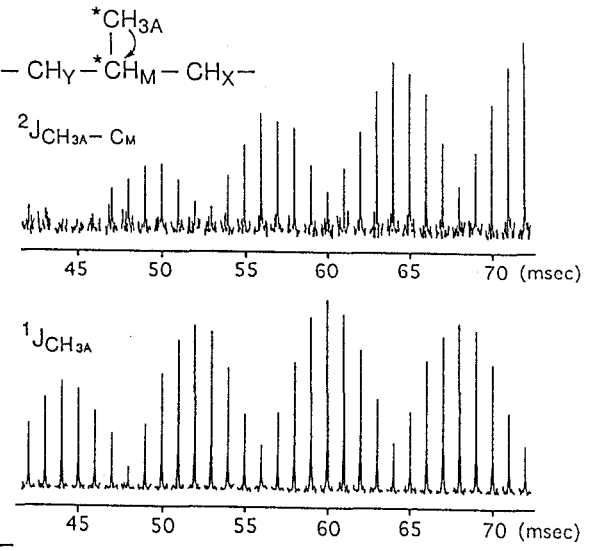


図5. スピン展開時間(△)とクロスピーク強度
二重標識体メナキノン　メチル基(B1,C1)

TANGO-HMBC

TANO-HMBC法にとって重要なパラメータは、適切なスピン展開時間の設定である。図5はTANGO-HMBC法において、ダブルラベルされたスピン系-CH_Y-*CH_M(*CH_{3A})-CH_X-のメチル基プロトンに注目して、一結合、二結合の炭素とのスピン結合によるクロスピーク強度とスピン展開時間の依存性についてプロットしたものである。どちらもdirect bond由来のJ-moduration を受け、sineカーブを描くことがわかる。例えばτ＝60msecのときは一結合の炭素によるシグナルはS/Nよくが観測され、二結合の炭素ではS/Nの低下のため観測ができない。それに対してτ＝64msecでは、一結合の炭素シグナルは低く押さえられ、逆に、二結合の炭素によるシグナルはS/Nを増加していることがわかる。このように、TANGO-HMBC法ではスピン展開時間の設定如何によっては、クロスピークの観測されないことがある。

図6は、モデル化合物として二重標識体でラベルされたメナキノンを用いて、従来型HMBCスペクトル（左）、TANGO-HMBCスペクトル(中)、Decoupled-TANGO-HMBCスペクトル(右)をそれぞれ示す。

従来型HMBCスペクトル（左）では、B1、C1のメチル基のサテライトプロトンからのB1-B2、C1-C2のHMBCクロスピークが観測され、それと同時に、従来型HMBCクロスピークも観測される。このスペクトルでは、サテライトプロトンからのクロスピークと従来型HMBCクロスピークが混在しているため、スペクトルは複雑となり解析が困難となる。一方TANGO-HMBCスペクトル（中）では、従来型HMBCクロスピークが非常に低く押さえられ、サテライトプロトンからのクロスピークA1-A2、B1-B2、C1-C2等が明確に観測され解析が可能となっている。しかし、このスペクトルの一つの問題点は、サテライトプロトンが$^1J_{CH}$により大きく二本に分裂するため、クロスピークも二本に分裂して観測されることである。そのためクロスピークの位置は1Dプロト

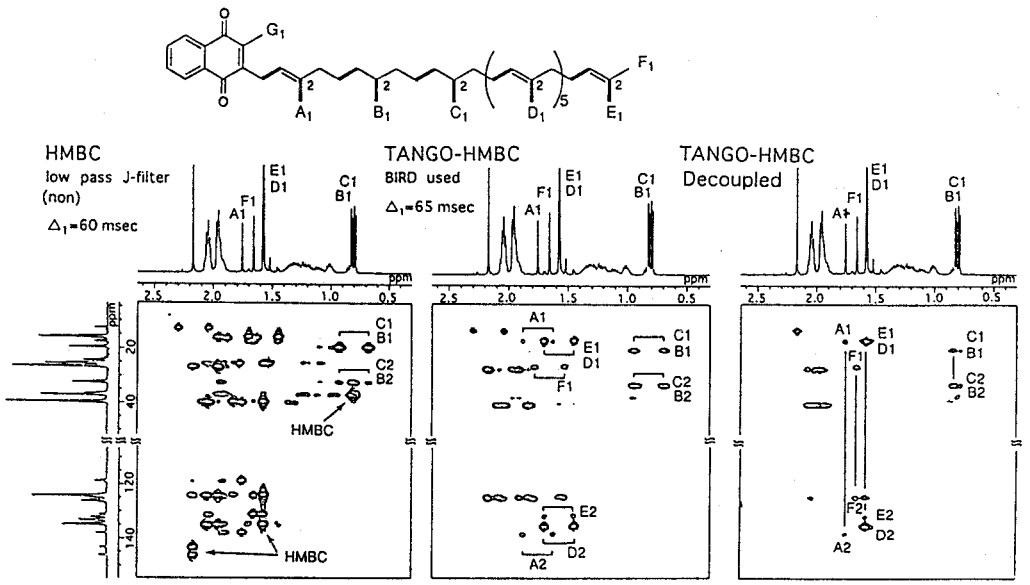


図6. 二重標識体メナキノン
HMBC(左)、TANGO-HMBC(中)、Decoupled TANGO-HMBC(右)
FGパルス、BIRDパルス使用
spin lock =5msec、△=63msec
t1 x t2 = 256 x 512、f1 x f2 = 25300 x 4500 Hz
times = 32、PD = 1.4 sec

ンNMRスペクトルに対応せずに、スペクトルが複雑な場合解析が困難となる。この問題はDecoupled T ANGO-HMBC法により解決される。 Decoupled T ANGO-HMBCスペクトル(右)では、スペクトルは単純化され、二つに分裂したクロスピークは一つになり、クロスピークの解析は従来のHMBCスペクトルと同様、1Dプロトン NMRの化学シフトに対応するため容易になる。このスペクトルを測定する場合は、従来型HMBCクロスピーク強度が低く押さえられ、解析に問題がないことを確認しておく必要がある。

まとめ

TANGO-HMBC法は^{13}Cに直接結合したサテライトプロトンからのHMBCシグナルを観測する方法であり、従来型HMBCクロスピークの強度をいかに低く押さえることができるかがポイントとなる。この方法を使用するに当たっては、励起パルスの前にBIRDパルスを導入し、long rang由来のZ軸磁化を低く押さえてから測定すると効果的である。スペクトルを単純化する方法として、decoupled TANGO-HMBC法は有効であるが、その場合、長い展開時間を二カ所設定しているためにT_2によるS/Nの低下に十分考慮しなければならない。TANGO-HMBC法は、生合成研究における標識位置の帰属に対して非常に有効である。特に、転位反応に伴う1,3位の関係の証明には非常に威力を発揮すると考えられる。また、もう一つの応用として、TANGO-HMBC法をTANG-HMQCとして使用すれば、従来のHMQC法よりは、遥かに良質なデータを得ることが可能である。

1). S.Wimperis and R.Freeman, J.Mag.Reson.58,348-353 (1984)

P82

NMR スペクトルによる植物細胞壁由来キシログルカン糖鎖の構造解析

○山垣亮、三石安、中西洋志　（工技院・生命研）

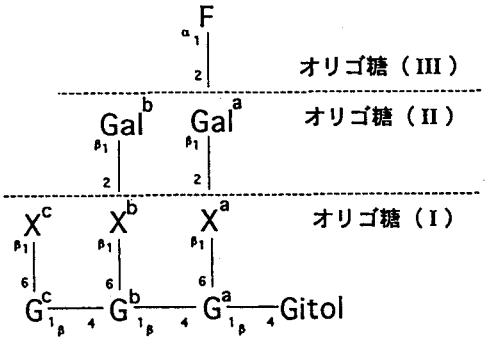
The conformational analyses of xyloglucan oligosaccharides from plant cell wall by NMR spectroscopy

○Toru Yamagaki, Yasushi Mitsuishi, Hiroshi Nakanishi (NIBH)

Three of xyloglucan oligosaccharide subunits from plant cell walls had been characterized by NMR spectroscopy. The conformational analyses of these xyloglucans were made by NOE measurements. The influence of the substitution by galactose or fucose ring on main xyloglucan chains were studied.

1）序：

タマリンドの種子、及び緑種もやし細胞から分離したキシログルカンを微生物由来のキシログルカン分解酵素で分解し、いくつかのオリゴ糖を精製した。これらのキシログルカン及びオリゴ糖は植物の成長に於て重要な役割をはたしていることが明らかにされている。本研究ではセロテトラオースに α-1-6結合で Xyl が３個結合したオリゴ糖（I）、I の２個の Xyl に β-1-2結合で Gal が２個結合したオリゴ糖（II）、及び II の1つの Gal に Fuc が α-1,2 結合したオリゴ糖（III）の立体構造解析をNMR法を用いて試みた。



上記７糖～１０糖までの非常に複雑な1D ^{1}H NMR スペクトルは、すでに Albersheim らによってほぼ全てのシグナルが帰属されている [1]。特に我々は、水溶液中でこれらの糖鎖が取る立体構造に興味を持ち、解析を行った [2]。

2）実験：

[試料]　オリゴ糖 I ～ III はスペクトルの複雑さを少なくするために還元末端をアルジトール化し、α体, β体の区別をなくし単一の分子種にした。

[NMR の測定]　測定には日本電子製 α-500 NMR 分光器（プロトン核で 499.65 MHz ）を使用し、温度を厳密に 25.0 ℃ に設定して測定した。溶媒には 99.96 % 重水を用い、濃度は 7.4 ～ 12.4 mg/0.5ml D_2O に調整した。DQF-COSY, HOHAHA, NOESY などの２次元測定を行い、特に NOESY に関しては mixing time を300 ~ 1000 ms の範囲で種々測定条件をかえて測定を行った。試料の純度はレーザーイオン化 TOF-MS によって検定した。

Keywords: xyloglucan oligosaccharides, plant cell wall, conformational analysis, NOE

やまがき とおる、　みついし やすし、　なかにし ひろし

3）結果と考察：

Ⅰ～Ⅲにおいて同じ糖残基環内プロトン同士のNOEは非常に多数見い出された。ここでは一番注目されている糖残基と糖残基との間の渡環NOEについて述べる。

7糖であるⅠにおいて、Gitol - Glc^a間では、糖と糖との間のエーテル結合をはさんだ付け根のプロトンであるH-1とH-4との間にNOEが確認できた。さらにH-1とH-2との間に渡環NOEが見い出された。骨格構造であるβ-1,4結合をしたグルコース、Glc^a - Glc^b、Glc^b - Glc^c間には同様に、エーテル結合の付け根のプロトンであるH-1とH-4との間にNOEが確認できた。さらにH-1と隣のGlcのH-6のメチレンとの間にも渡環のNOEが確認できた。6位のメチレンの2つのプロトン同士はシグナルの位置が接近しているためにそのNOEシグナルを区別することができなかった。Glcとα-1,6結合しているXylとの間の渡環NOEは見つかっていない。

次に9糖であるⅡは、Ⅰの Xyl^a, Xyl^bとにそれぞれGalが結合している化合物であるが、環と環との間の渡環NOEに注目すると、Gitol - Glc^aとの間、骨格構造である Glc^a - Glc^b、Glc^b - Glc^cとの間にはⅠと同様のNOEが確認できた。しかしながら、Glc - Xyl間の渡環NOEはGal残基がXylに結合したことによって大きく変化した。まず、α-1,6結合している Glc^a - Xyl^a と Glc^b - Xyl^b 間の渡環NOEはエーテル結合をはさんだ H-6 , H-5 と H-1 との間に確認できた。一方、Glc^c - Xyl^c 間のNOEシグナルは、 a や b における Glc－Xyl 間のNOEシグナルとは異なり、 H-6 と H-1 との間の渡環NOEのシグナル強度が非常に弱く、H-5 と H-1 間の NOE は観測できなかった。この結果は 、ⅠとⅡにおいてGlc - Xyl間のコンフォーメーションが異なり、Ⅱに於ては、さらにaとbとではGlc - Xyl 間のコンフォーメーションが非常に似ているが、非還元末端側であるcでは少し異なったコンフォーメションを取ることを示唆している。

β-1,2結合をしているGal - Xyl間のNOEについて、Gal^a - Xyl^a 間にはエーテル結合をまたぐH-1とH-2との間、さらにH-1とH-1との間に渡環NOEが確認できた。Gal^b - Xyl^b 間においても同様の結果が得られた。このことからGlc - Xyl 間と同様に、 Gal^a - Xyl^a 間、Gal^b - Xyl^b 間はよく似たコンフォーメーションをとっていることが推論できる。

さらにⅡの Gal^a 残基の2位にFuc：L-フコースがα-1,2結合した１０糖のⅢを現在解析中であるが、 Gal^a にFucが付くことによって Glc^c - Xyl^c 間のH-6とH-1の間に、Ⅱで観測できたNOEよりも明らかにピーク強度の強いNOEが確認できた。このことはFucが結合することによってFucからは化学結合的にかなり離れている Glc^c - Xyl^c 間のコンフォーメションに大きな影響を与えていることを示唆する結果であり大変興味深い。

[参考]: [1] William S. York, Herman van Halbeek, Alan G. Darvill, and Peter Albersheim, *Carbohydr. Res.*, 200 (1990) 9-31
[2] 三石 安、山垣 亮、根本 直、中西 洋志、
第６８回 日本生化学大会（1995年 9月、仙台）

P83

ダンシルロイシン修飾シクロデキストリンの構造と機能

（東工大・生命理工）○池田　博、伊勢伸之、中村道衛、
戸田不二緒†、上野昭彦

Structure and Property of Dansylleucine-Appended Cyclodextrin

Hiroshi Ikeda, Nobuyuki Ise, Michiei Nakamura, Fujio Toda†, and Akihiko Ueno
(Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology)

The structures of new modified cyclodextrins as fluorescent indicators of molecular recognition were studied. They are consisted of β-CD, an L- or D-leucine moiety, and a dansyl moiety, and their fluorescence intensities are decreased upon addition of a guest. Their three dimensional structures were determined by the combined use of 1 D and 2 D NMR techniques. The difference of their properties could be interpreted by the difference of the self-inclusion depth of their dansyl moieties. Upon addition of the guest, their NMR spectra were changed and these changes suggested that the pendants were excluded by the guest.

1．はじめに

環状オリゴ糖であるシクロデキストリン(CD)は、様々な分子を包接し、その包接のしやすさは、ゲスト分子の形状や疎水性等の様々な要因で決定される。このような性質に着目し、CD は分子認識部位として様々な研究に利用されている。CD 自身は無色なため、ゲスト包接を目で見える現象として観測できない。そこで我々は、CD に色素分子を結合することにより、ゲスト包接に伴い、蛍光強度や色が変化するように改良を行い、分子認識指示薬を構築してきた。このような分子認識指示薬の特性・機能発現機構を理解するためには、構造化学的な検討が不可欠である。今回、蛍光色素であるダンシル残基をロイシンをスペーサーとして CD に結合させた分子認識指示薬の高次構造を NMR を用いて検討したところ興味ある知見が得られたので報告する。

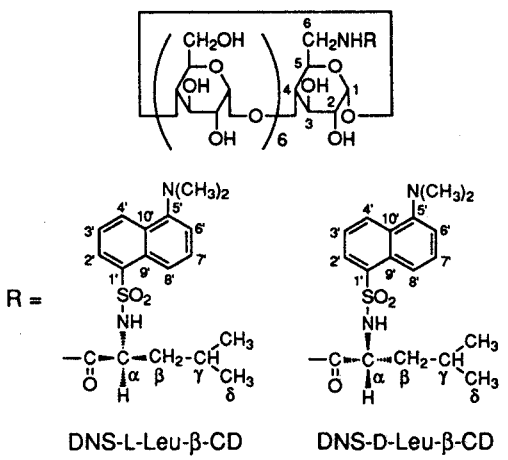


Fig. 1

キーワード：シクロデキストリン、糖質、分子認識、二次元ＮＭＲ、ＮＯＥ

○いけだひろし、いせのぶゆき、なかむらみちえい、とだふじお、うえのあきひこ
† current address: Tokyo Polytechnic College

2．結果および考察

まず、修飾 CD のすべてのプロトンの帰属を行った。長さの異なる複数の mixing time を用いて一次元 TOCSY を測定するとともに、2D TOCSY、COSY スペクトルを測定することにより各グルコース残基内のプロトンの帰属を行い、^{1}H-^{13}C HSQC により CD の修飾残基が結合している炭素上の H-6 の帰属を行った。最後に ROESY を用いて、グルコース残基の配列を決定した。また、ダンシル基のプロトンの帰属は、NOE 差スペクトルおよび COSY により行った。帰属結果から CD 空洞内に存在するプロトンのピークが高磁場にシフトしていることがわかる。これはダンシル基が CD 空洞内に自己包接していることを示唆ている。また、ダンシル基由来のプロトンのピークパターンがダンシルーLーロイシン修飾体とダンシルーDーロイシン修飾体とでは異なっており、ダンシル基の CD 空洞内での位置が両者で異なっていることが予想される。そこで、修飾残基由来のプロトンと CD 由来のプロトンとの間の NOE をROESY により観測し（図２）、NOE データを満足させるような構造を構築した（図３）。

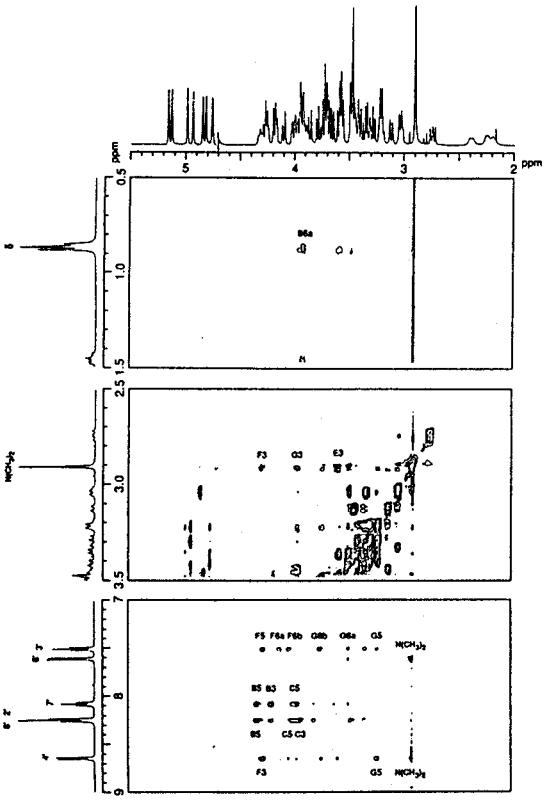
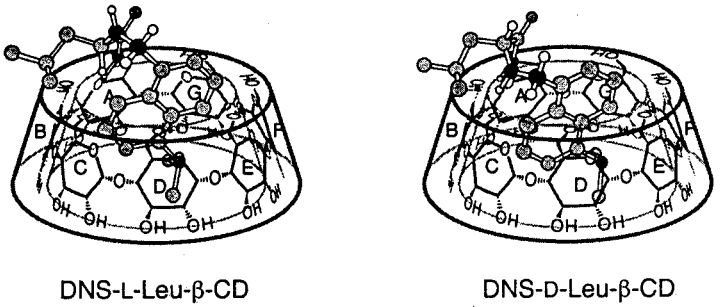


Fig. 2 Portions of the 500 MHz ROESY Spectrum of DNS-D-Leu-β-CD in D_2O at 25 °C with a mixing time of 300 ms, indicating the crosspeaks between the protons of the DNS-D-Leu moiety and the protons of the β-CD moiety.

ダンシルーLーロイシン修飾体とダンシルーDーロイシン修飾体とでは様々な特性が異なっているが、それらはダンシル残基の自己包接の深さの違いによって説明できた。

また、ゲスト分子を包接することにより、分子認識指示薬の^{1}H-NMR スペクトルが大きく変化した。これは、修飾残基が空洞外に追い出されたことによるもので、蛍光スペクトル変化の結果と対応できる。



DNS-L-Leu-β-CD　　DNS-D-Leu-β-CD

Fig. 3 Structures of DNS-L-Leu-β-CD and DNS-D-Leu-β-CD Determined by NMR

P84 安定同位体核利用NMRによるJ-結合定数測定のための問題点と測定の最適化

（都立大・理）○ 楯　真一、栗田順一、久保善大、牧田貴子、小野　明、小野　晶、甲斐荘正恒

Practical Aspects of J-coupling Measurement using Isotope-aided NMR techniques

Shin-ichi Tate, Jun-ichi Kurita, Yoshi-hiro Kubo, Takako Makita, Akira (Mei) Ono, Akira Ono, and Masatsune Kainosho

**Department of Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo Metropolitan University
1-1, Minami-Ohsawa, Hachioji, Tokyo 192-03
Japan**

We have recently shown the isotope NMR technique is also a powerful tool to extract several kinds of structural information, especially torsion angles derived from the vicinal J-couplings and Karplus equation. In spite of the apparent improvement in the J-measurement with isotope NMR, however, there still remains several problems in J-coupling analysis. They include dipolar interference on the observed J-coupling values which lead to the systematic errors in the observed J-values, distorted cross peak shapes caused by passive splitting, inaccuracy of the peak picking which is sensitive to the signal to noise ratio and so on. In our poster presentation, we will discuss these intrinsic and/or practical problems and experimental optimization to overcome them.

Introduction:

Isotope aided NMR techniques in protein research have greatly improved the efficiency of resonance assignment process and quality of the NMR derived structural information. During the last two years, we have been engaged in the development and application of the isotope NMR techniques to the nucleic acids research [1-4]. Our results and several reports by other groups have shown the use of the isotope techniques will give us novel ways to the structural analysis of nucleic acids [1-10]. In contrast to the structure determination of a protein, the nucleic acids structure analysis

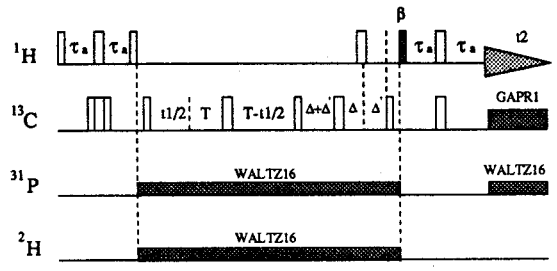


Figure 1: pulse scheme of HCCH-E.COSY [5]

Keywords: stable isotope, DNA, J-coupling, structure analysis

たて　しんいち、くりた　じゅんいち、くぼ　よしひろ、まきた　たかこ、おの　あきら、おの　あきら、かいのしょう　まさつね

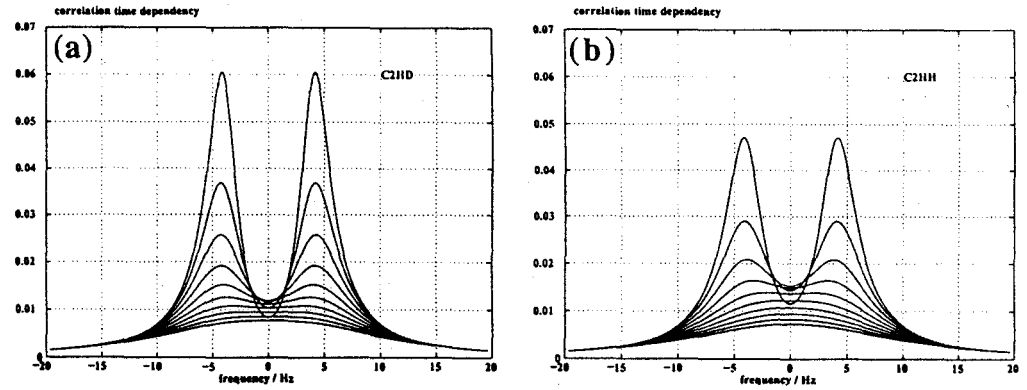


Figure 2 : Simulated H1' signal (a) C2'HD and (b) C2'HH.

has intrinsic difficulty coming from the limited proton density which inevitably leads to the less number of distance constraints. Thus, in the nucleic acids structure determination can not be carried out according to the authorized protocol adopted in protein research. In order to overcome this intrinsic obstacles, James et al. have proposed the relaxation matrix analysis approach to improved the 'accuracy' of the NOE derived distance information [11]. But, so far, the improvement in the J-coupling information of nucleic acids does not seem to be tried extensively. This may be due to reason that the limited chemical shift dispersion in sugar parts of nucleic acids has prohibited the precise analysis of the relating J-couplings in the conventional 2D spectra. Recently, we have shown the several kinds of novel isotope NMR approach can be successfully applied to the 'comprehensive analysis' of the backbone and sugar conformation of DNA. Its detail would be presented in the oral presentation of our group, L12 in this NMR conference. The application of the isotope NMR technique have actually shown to improve the efficiency and accuracy of the J-coupling information, however, there still remains several intrinsic and practical difficulties in the J-coupling analysis even with the use of isotope NMR techniques. In our poster presentation, we will point out these remaining difficulties in J-coupling analysis and discuss our trials and experimental optimization applied to overcome these obstacles. In this abstract, we only focus on the obstacles encountered in the ^{1}H - ^{1}H coupling analysis in labeled nucleic acids and some trials applied.

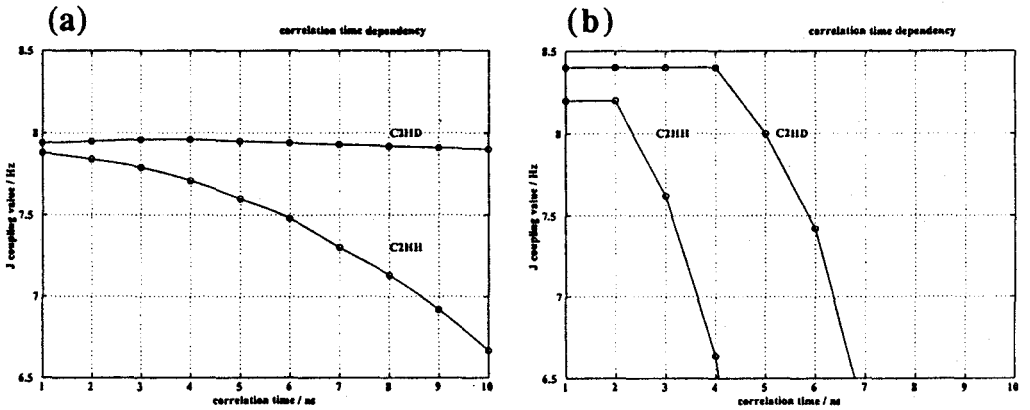


Figure 3: Apparent J-coupling values according to the correlation time.

Obstacles in ^{1}H-^{1}H coupling analysis of sugar parts in DNA:

The sugar conformational analysis of DNA mainly relay on the vicinal ^{1}H-^{1}H coupling analysis. If the sugar carbons are fully labeled with ^{13}C, several NMR experiments are available for the J-coupling analysis. For the full analysis of the vicinal couplings in the sugar part, the use of the HCCH-E.COSY [5] seems to be best with respect to its tolerance to the line broadening and good spectral resolution when the ^{13}C labeling is applied in a residue specific manner. The HCCH-E.COSY pulse scheme is shown in Figure. 1. In the J-coupling measurement with HCCH-E.COSY, we can point out three obstacles; 1) dipolar relaxation interference to the coherent J-interaction, 2) distorted cross peak shape caused by the large passive splitting, especially observed in the cross peaks of C2' protons, and 3) the inaccuracy of the peak picking for the cross peaks of low signal-to-noise ratio. In the followings, we mainly discuss the dipolar relaxation interference to the apparent J-coupling value.

Dipolar relaxation interference to the J-interaction:

It is well know in the apparent J-coupling can be changed by the line broadening, but it has not been considered the same J alteration caused by the interaction between the coherent J-interaction and incoherent spin relaxation, though this problem was pointed firstly in 1960s [12] and recently again by Harbinson [13]. The essence of the dipolar relaxation effect to the apparent J-coupling alteration can be explained by two spin system where they are I and S. During the I magnetization evolution, its amplitude can be modulated by its T_2 relaxation rate and the J-dependent frequency modulation caused by the antiphase coherence between I and S spins as 2IS. During this process, if the T_2 relaxation rate of I transverse magnetization and the relaxation rate of the antiphase coherence 2IS are different, the encoded J frequency modulation can be altered. This relaxation rate difference can occur via T_1 relaxation of the S spin [12].

Effect of the dipolar relaxation on the observation of $J_{H1'H2'}$

- How effective the C2' deuteration for the DNA structure analysis

The above process can be expanded to the multiple spin system by introducing the effect of mutual spin-flip of the S spin with third, fourth and further neighboring protons [13]. This I spin evolution process was numerically solved to evaluate the effect of the dipolar interference on the apparent J-coupling values among DNA sugar protons. Here, we focused on the $J_{H1'H2'}$ coupling constant. In this situation strong dipolar interaction is expected among protons in methylen group at C2' site and it would be effective in apparent J-coupling alteration. In the present simulation, the target H1' proton is assumed to be the A5 H1' in the d(CGCGAATTCGCG)$_2$ oligo-nucleotide having full ^{13}C labeling at A5 deoxyriobse part. The relaxation rate of the involving protons was calculated on the basis of the X-ray coordinate. And the passive coupling interaction is not considered in the present simulation. Figure 2 shows the simulated apparent H1' signal shapes according to the rotational correlation time τc; varying 1.0 to 1.0 ns. Figure 2a is the result obtained in the sample with H2" being replaced with deuterium and Figure 2b is the result for the ordinal deoxyribose moiety. Here, the apparent dependency of the

effect of mutual spin flip among other protons, the expected J-alteration can be derived analytically by solving the differential equation describing the magnetization evolution. Figure 3 shows you the result of the J-alteration of $J_{H1'H2'}$ according to the correlation time; (a) theoretically expected J-value and (b) actually measured from the simulated data in Figure 2. Figure 3 suggests, in the case of methylen at C2' site, the increase in the correlation time leads to about 1.5 Hz difference when τc = 10.0 nsec; this τc corresponds to about 150 amino acid residue protein in solution at room temperature. On the other hand, the replacement of H2" proton with deuterium can drastically suppress this J-coupling alteration where the caused J-alteration is with in 0.1 Hz in this range of correlation time. This theoretical effect of J-alternation, however, is not observed in the simulated 1D spectrum due to the line broadening effect. However, it should be noted that the observed J-value is severely depending on the correlation time but the C2'HD is more tolerate than C2'HH case. In contras to the present result in 1D spectra, in the E.COSY spectrum, this line broadening effect can be alleviated by the displacement with 150 Hz along F_1 dimension. The extensive simulation to evaluate the same effect in E.COSY spectrum is now underway. It should be emphasize here that the present simulation can suggest the dipolar relaxation interference is significant in $J_{H1'H2'}$ of DNA deoxyriobse around the situation of its molecular mass around 20 kDa and this effect can be drastically suppressed by the introduction of the deuterium at C2' site. This 12 mer has 3.0 ns correlation time at 30 ℃. Under this condition, the dipolar effect is not so significant, but under the complex formation with a protein the total size would be greater than 20 kDa (τc = 10.0 ns). Thus the C2' deuteration would essential to the structure analysis based on the 'accurate' NMR structure information.

Further advantages obtained from the C2' deuteration in E.COSY experiment will be presented in our poster. The merits and limitations in other J-coupling analysis isotope aided NMR techniques applied to the backbone torsion angles, which are based on the different principle from the E.COSY type experiment thus involves different error sources, will also be discussed.

References :

1. S. Tate, A. Ono, and M. Kainosho, J.Am.Chem.Soc. (1994) **116**, 5977-5978.
2. A. Ono, S. Tate, S. Ishido, and M. Kainosho, J. Biomol. NMR (1994) **4**, 581-586.
3. S. Tate, A. Ono, and M. Kainosho, J. Magn. Reson. (1995) **B106**, 89-91.
4. S. Tate, Y. Kubo, A. Ono, and M. Kainosho, J. Am. Chem. Soc. (1995) **117**, 7277-7278.
5. H. Schwalbe, J.P. Marino, G.C. King, R. Wechselberger, W. Bermel and C. Griesinger, J. Biomol. NMR (1994) **4**, 631-644.
6. H.A. Heus, S.S. Wijmenga, F.J.M. van de Ven, and C.W. Hilbers, J.Am.Chem.Soc. (1994) **116**, 4983-4984.
7. J.P. Marino, H. Schwalbe, C. Anklink, W. Bermel, D.M. Crothers, and C. Griesinger, J.Am.Chem.Soc. (1994) **116**, 6472-6473.
8. J.V. Hines, G. Varan, S.M. Landry, and I. Tinoco, Jr. J.Am.Chem.Soc. (1993) **115**, 11002-11003.
9. H. Shwalbe, W. Samstag, J.W. Engels, W. Bermel and C. Griesinger, J.Biomol. NMR (1993) **3**, 479-486.
10. P. Legault, F.M Jucker, and A. Pardi, FEBS Lett. (1995) **362**, 156-160.
11. B.A. Borgias and T.L. James, J.Magn.Reson. (1990) **79**, 475-512.
12. R.M. Lynden-Bell, Prog. Nucl. Magn. Reson. (1967) **2**, 163-204.
13. G.S. Harbinson, J.Am.Chem.Soc. (1993) **115**, 3026-3027.

P85　　モノヌクレオシド塩基部分のヘテロ核スピン結合定数

（都立大・理）　○小野　明、　甲斐荘正恒

Hetronuclear Spin Coupling Constants of the Mononucleoside Bases

Akira "Mei" Ono*,　Masatsune Kainosho

Department of Chemistry,Faculty of Science,Tokyo Metropolitan University

ABSTRACT: Most of the heteronuclear spin coupling constatns and their relative signs have been determined for the base moieties of the isotopically labeled ribomononucleosides, by various 2D-NMR methods including P.E.COSY and HMBC. These coupling constants will supply useful data to develop heteronuclear mutidimensional NMR techniques for isotopically labeled DNA and RNA oligomers.

［はじめに］　最近、^{13}C・^{15}N等の安定同位体で標識したＲＮＡ、ＤＮＡオリゴマーの調製技術が発達し、蛋白質に比べて著しく遅れていた核酸への多核種多次元ＮＭＲ技術が盛んに研究されるようになった。しかしながら、多次元ＮＭＲパルス列の開発に不可欠である基本的ＮＭＲパラメーターは、古く我々が報告して以来、系統的に測定されていなかった。[1,2] 本報告では、核酸の基本構成単位であるリボヌクレオシド類の塩基部分の核間スピン結合定数（J_{HN}、J_{HC}、J_{CN}、J_{CC}、J_{NN}）及びそれらの相対符号を測定する事にした。得られた結果に基づき、スピン結合定数（相対符号）と塩基構造との関連等についても議論する。

［実験］

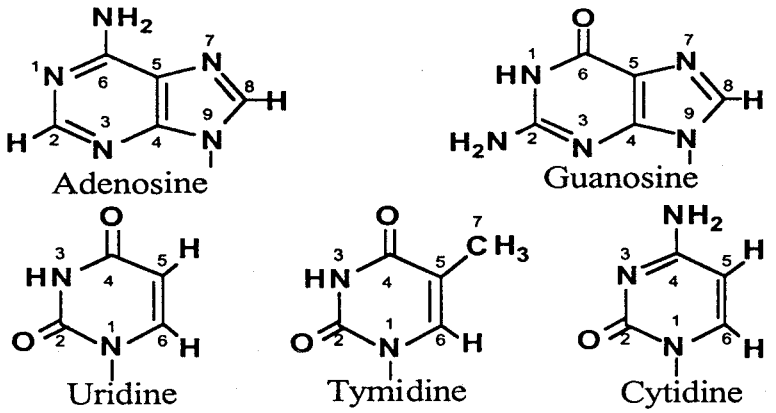


Fig.-1　The Structures of Nucleoside Bases

キーワード：　安定同位体標識ヌクレオシド、スピン結合定数、相対符号

おの　あきら、かいのしょう　まさつね

[ul-^{13}C;^{15}N]-adenosine, -guanosine は [ul-^{13}C]グルコースを炭素源、^{15}N 硫安を窒素源とする微生物発酵法により調製した（微生物発酵に協力して頂いた味の素（株）中央研究所に感謝する）。一方、[ul-^{13}C;^{15}N]- uridine,tymidine, cytidine は糖部分を[^{13}C]グルコース、塩基部分を同位体標識した尿素等の簡単な化合物を前駆体から有機化学的合成法で調製した。用いた標識体は様々な目的にために、窒素、或いは炭素のみを標識したものや、15%均一 ^{13}C 標識したもの等を併用し、スピン結合の測定、相対符号の決定を行った。2D-P.E.COSY、HMBC 等の測定は、UNITY-300（3 RF チャンネル）と Nalorac 製三重共鳴グラジエントプローブ (5mm)を用いて測定した。

［結果］

a） Adenosine におけるアデニン環内の J_{CN} の測定例

[ul-15%^{13}C;98%^{15}N]-adenosine を用い、観測された数多くのスピン結合をヘテロ核間三重共鳴法を用いて帰属した。DMSO-d_6 溶液中の 75.4MHz ^{13}C -NMR スペクトル及び一連の{^{15}N,^{1}H}-^{13}C スペクトルを Fig.-2 に示す。

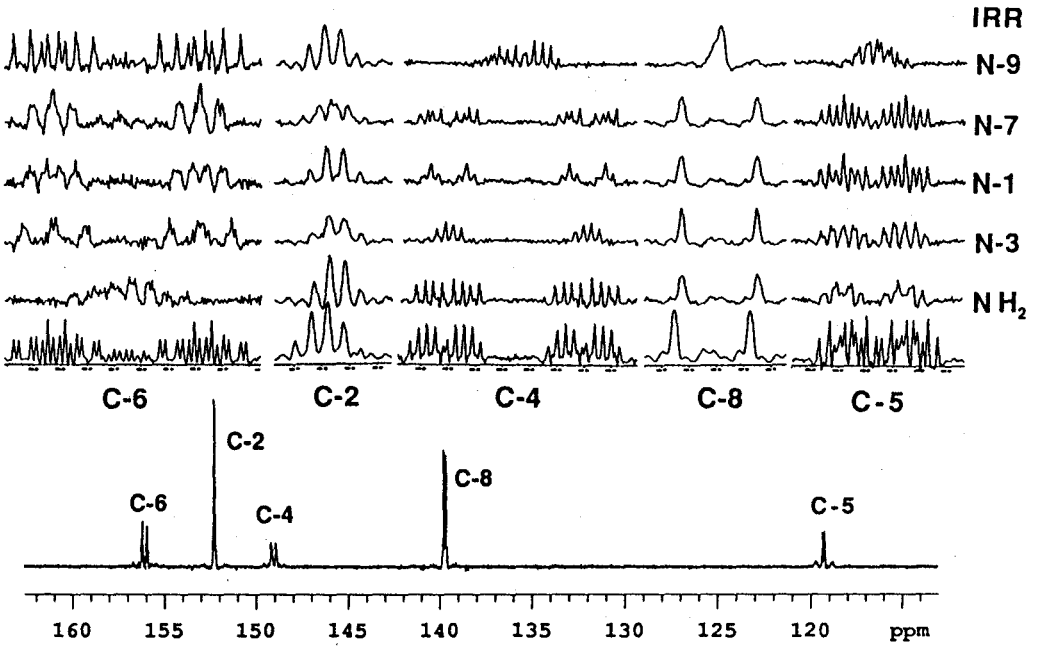


Fig.-2 {^{15}N,^{1}H}-^{13}C Spectra of [ul-15%^{13}C;98%^{15}N]-Adenosine

得られた結果を Table 1 に示す。[ul-15%^{13}C;98%^{15}N]-adenosine を試料として用いることにより、300MHz 級装置によっても解析に耐えうる感度が得る事ができ、且つディジタル分解能の高いスペクトルが得られた。この結果、アデニン環の 1 Hz 以上のスピン結合定数を全て求める事ができた。その他の J 値（J_{HN}, J_{HC}, J_{CC}, J_{NN}）については基本戦略して、まず、高濃度で標識したサンプルの 1 次元測定をし、J 値の総和を求め、次に選択的デカップル測定を行い、総和を考慮し、各 J 値を求めた。さらに、それで求まらないもの、あるいはより測定精度を向上させるため、選択的に標識

した試料も随時用いた。

b）相対符号の測定

相対符号は2D NMR 法（P.E.COSY[3],HC-COSY[4],HMQC,HMBC [5]）を用いて決定した。系統的、一義的に相対符号を求めるため我々が用いた測定法を Fig.3 に示した。図中の“Signs”の欄は実際にその左側に示した測定により求められ結果である。例えば、“(^{1}H-^{13}C)/(^{13}C-^{13}C)”は“J(^{13}C-^{13}C)”の符号に対する“J(^{1}H-^{13}C)”の符号が得られたことを表している。

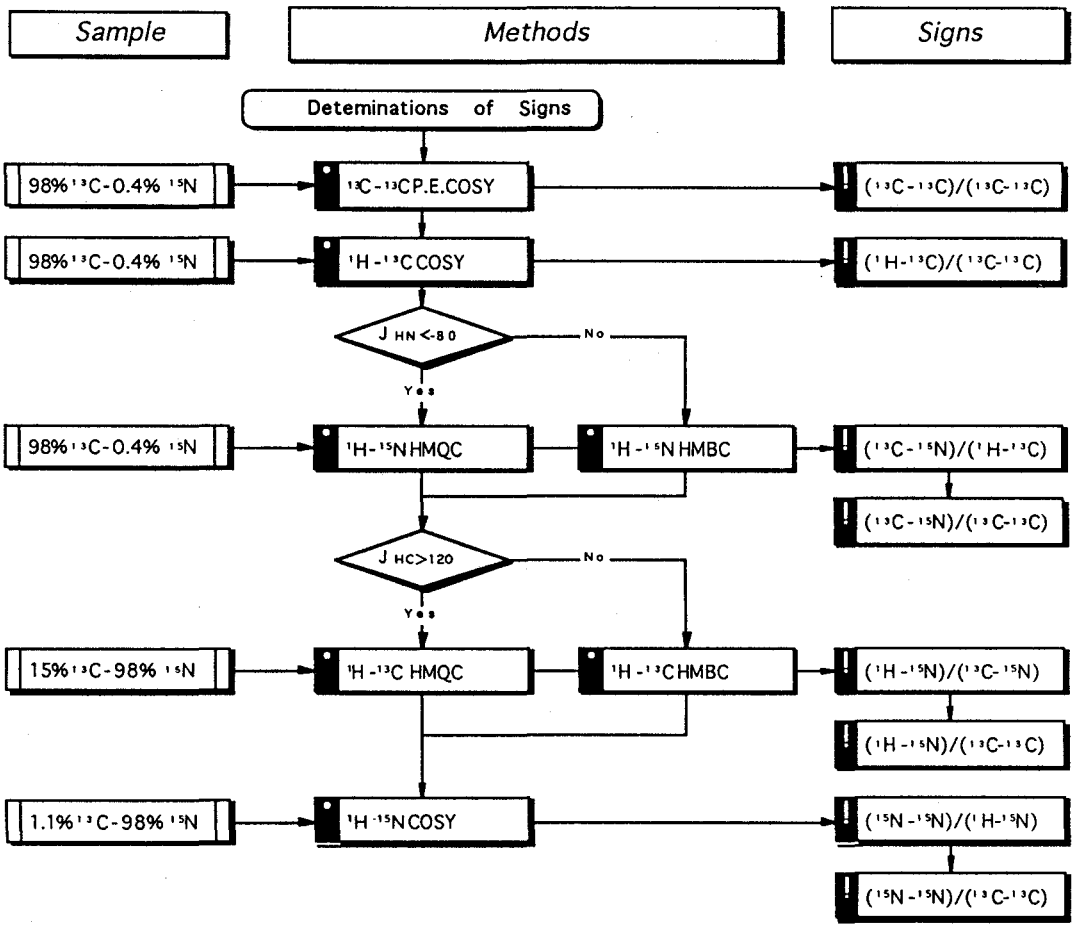


Fig. 3 Flow Chart for the Determination of the Relative Signs of the Heteronuclear Spin Coupling Constants in Nucleoside Bases

このようにして得られた相対符号を Table-1 に示す。数字に () が付いているものは符号が、現在決定できていないものを示している。決定が困難な理由として、我々の方法では理論的に求められない事（スピン結合が AMX の関係にならないため）あるいはＪ値が小さすぎてクロスピークのスプリットの方向が定まらなかった事が挙げられる。

CARBON	J_{CN}					J_{CC}				
	(N-1)	(N-3)	(N-7)	(N-9)	(NH_2)	(C-2)	(C-4)	(C-5)	(C-6)	(C-8)
(C-2)	+2.3	+2.3	0	(2.3)	(2.3)	-	-3.4	+11.1	-3.7	0
(C-4)	-2.3	-5.4	+1.2	-19.4	(2.3)	-	-	+63.1	+5.5	+9.6
(C-5)	(1.5)	(1.4)	+1.5	-8.7	-3.4	-	-	-	+72.6	-2.4
(C-6)	-4.0	-2.3	-4.3	-0.7	(20.6)	-	-	-	-	+7.4
(C-8)	0	0	-10.4	0	0	-	-	-	-	-
PROTON	J_{HN}					J_{HC}				
	(N-1)	(N-3)	(N-7)	(N-9)	(NH_2)	(C-2)	(C-4)	(C-5)	(C-6)	(C-8)
(H-2)	-15.5	-15.5	0	0	-1.0	+199.5	+12.0	-1.5	+11.6	0
(H-8)	0	(0.6)	-12.0	-8.0	0	0	+4.7	+11.4	+0.6	+213.0
NITOGEN	J_{NN}									
	(N-1)	(N-3)	(N-7)	(N-9)	(NH_2)					
(N-1)	-	-1.2	0	0	+5.4					
(N-3)	-	-	0	(3.2)	0					
(N-7)	-	-	-	-1.6	0					
(N-9)	-	-	-	-	0					
(NH_2)	-	-	-	-	-					

Tabel-1 Heteronuclear Spin Coupling Constants of the Adenine Ring in Adenosine

［考察］

アデノシンの測定結果より、アデニンの６員環部分においてはＪ値、符号ともにC2-C5 軸に対して対称性がみられた。これに対して５員環部分においては対称性は認められず、Ｊ値に関しては$J(C_8N_9)$が 10.4Hz、これに対して$J(C_8N_7)$は 0Hz、相対符号に関してはC_8C_4とC_8C_5或いはC_4N_7とC_5N_9の符号が逆になっているといった興味深い結果が得られた。これらは我々がかつて指摘したようにN7 の孤立電子対の影響によるものと思われる。[1),2)]

さらにピリミジンヌクレオシドの測定結果も報告する予定である。

1）甲斐荘正恒、小西博子、第１７回ＮＭＲ討論会要旨集（1978）,P. 89

2）甲斐荘正恒、小西博子、第１８回ＮＭＲ討論会要旨集（1979）,P.109

3）L. Mueller, *J. Magn. Reson.***7 2**,191(1986)

4）A.Bax and R. Freeman, *J. Magn. Reson.***4 5**,177(1981)

5）A.A.Ribeiro and M.J.Glen, *J. Magn. Reson.S.A* **1 0 7**,158(1994)

P86

NMRPipeによる3次元NMR解析（1）

（北工研[1]、北大・理）
○津田　栄[1]、大木進野、三浦和紀、斉藤もよこ、引地邦男

3D-NMR Data Processing on NMRPipe (1)

([1]Hokkaido National Indiustrial Research Institute (HNIRI), Hokkaido University) Sakae Tsuda,[1] Shin-ya Ohki, Kazunori Miura, Moyoko Saito, and Kunio Hikichi.

The variety of signal processing was carried out by using NMRPipe (F. Delaglio, NIH) on the multinuclear multidimensional NMR data acquired on JEOL Alpha NMR spectrometers. Although NMRPipe supplies a conventional macro which shuffles the Rance-mode pulsed field gradient (PFG) · enhanced data, we developped a set of programs to shuffle those data in order to check imperfections of the pulse experiments (e.g. amplitude difference between Real and Imag data sets). The developped programs were then used to process the fids of the 3D ^{15}N-filtered PFG NOESY and ^{15}N-filtered PFG TOCSY, which made us to assign the ^{1}H- and ^{15}N-resonances of the N-terminal half domain of yeast calmodulin (see the succeeding presentation).

［序論］多次元のNMRスペクトルをS/N比良く得る為には、各周波数軸に対するフーリエ変換に伴う信号の変化をきちんとチェックしておく必要がある。NMRPipe（F.Delaglio, NIH）は、そのような目的の為に開発されたUnixベースの信号処理プロトコルである。我々は日本電子アルファNMR装置により得た多次元NMR信号をNMRPipeの環境にのせ、パルス磁場勾配法(PFG)を用いたRanceモードの2次元 enhanced HSQC および3次元 NOESY-enhanced HSQC (Palmer, A. G. et al., J. Magn. Reson. 93, 151 (1991)) の fid を処理することに成功した。本講演ではその実際について紹介する。

［実験］多次元NMRのパルス実験は、磁場勾配パルス発生器と^{13}C、^{15}N核信号増幅器のついた日本電子社製アルファ500（500MHz）とアルファ600（600MHz）NMR装置を用いて行った。試料には^{13}C/^{15}Nダブルラベル化ヒトユービキチンおよび^{15}Nラベル化酵母カルモデュリンN末端側ドメインを用いた。各々の約3mM濃度の軽水水溶液250μlを調製した後に,これらをシゲミ社製二重管に詰めてパルス実験に用いた。アルファの操作端末（DEC）とSGI Indigo2をイーサーネットで結び後者にインストールしたNMRPipe上で信号処理実験を行った。

［結果と考察］NMRPipeはfidデータ配列の先頭につく装置固有のヘッダー部を必要としない。この為にアルファの1次元、多次元NMRfid信号データのヘッダー部（現バージョン（V2.0）では16384バイト、旧バージョン（V1.8）では8704バイト）をカットした。またアルファとNMRPipeでフーリエ変換の際のIMAG側fidの正負の定義が逆であることを補正、更にDECとSGIの数表現を補正することにより、アルファのfid信号をNMRPipeで読める形式に変換することができた。Mark Rance (1), Lewis Kay (2)らが開発したパルス磁場勾配(PFG)2次元 enhanced-HSQCでは、t_1方向に対し(cosωt_1+isinωt_1);Real と (cosωt_1-isinωt_1);Imag が観測成分として得られる。この為、両者を加えることでcosωt_1を、差し引きすることでsinωt_1を得て、これを

Statesフォーマットに変換する必要がある。その際には、RealとImagの強度差に対するチェック等をきちんと行うことが望ましい。仮に両者の強度が等しいとするとフォーマット変換は、

addNMR -in1 Real -in2 Imag -out sum -c1 1 -c2 -1 -add

および

addNMR -in1 Real -in2 Imag -out dif -c1 1 -c2 -1 -sub

を実行し、その後に再びaddNMRコマンドによりsumとdifを張り合わせることにより実行される。こうして$\cos wt_1 \cos wt_2$、$\cos wt_1(i\sin wt_2)$、$-i\sin wt_1 \cos wt_2$、そして$i\sin wt_1(-i\sin wt_2)$を成分に持つfidをNMRpipe環境下で作ることができた。この計算に要した時間は通常2,3秒であった。

3次元NOESY-enhanced HSQCのt_1軸方向に対しても、fidは2次元HSQCと同じ配列になっている為に上述の加減算処理が必要になる。その為に次のステップのデータフォーマット変換をNMRPipe上で実行した。

$$x\_y\_z^* \rightarrow y\_x\_z^* \rightarrow z^*\_x\_y \rightarrow x\_z^*\_y \qquad ①$$

ここで、xはt_3軸（観測アミド基^{1}H周波数軸）のfid、yはt_2軸（ＮＯＥ相関^{1}H周波数軸）のfid、そしてz*は加減算前のt_1軸（Ｊ相関の^{15}N周波数軸）のfidである。こうして得られたx_z*_yのfidデータ配列中のx_z*面は上で述べたと同じ$(\cos wt_1 + i\sin wt_1)$;Realと$(\cos wt_1 - i\sin wt_1)$;Imagの配列になっており、次のマクロプログラムの実行によりこれをStatesフォーマットのx_z面データに直すことができる。

```
@ zcnt = 0  @ na = 0  @ nb = 0  @ nc = 0
while ($zcnt<128)
@ na++  if ($na>9) then   @ na = 0   @ nb++   endif
if ($nb>9) then   @ nb = 0   @ nc++   endif
set z="$nc$nb$na"   echo "temp/noehsqc$z"
rance_st.com testR$z.fid testI$z.fid x_Z_y/test$z.fid
@ zcnt++
end
```

こうして得たx_z_yのfidデータに対して①を逆にたどるフォーマット変換を実行することにより標準的Statesフォーマットのx_y_zの３次元ＮＭＲデータセットが得られることになる。このようなデータ処理プログラムの確立は今後のより複雑なPGFパルスを用いた３次元、４次元ＮＭＲスペクトルのデータ処理の基本になるものと考えられる。

［参考文献］

(1) Palmer III, A.G., Cavanagh, J., Write, P.E., and Rance, M. *J. Magn. Reson.* 93, 151-170 (1991).

(2) Kay, L.E., Keifer, P., and Sarrinen, T. *J.Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665 (1992).

3D-NMR、NMRPipe、ダブルラベル体、Statesフォーマット
つださかえ、おおきしんや、みうらかずのり、さいとうもよこ、ひきちくにお

P87　NMRＰｉｐｅによる３次元NMR解析（２）

（北大・理、1北工研）
○大木進野、1津田栄、斉藤もよこ、三浦和紀、矢沢道生、引地邦男

3D-NMR Data Processing on NMRPipe (2)

Shin-ya Ohki, [1]Sakae Tsuda, Moyoko Saito, Kazunori Miura, Michio Yazawa, and Kunio Hikichi (Hokkaido University and [1]Hokkaido National Industrial Reserch Institute)

The procedure for protein structure analysis employing JEOL NMR machines (A500 and A600) and NMRPipe was established (see the former section by Tsuda *et al.*). This procedure was applied to the uniformly ^{15}N-labeled N-terminal half domain of yeast calmodulin (YCM0-N). YCM0-N has two Ca^{2+}-binding sites. The secondary structures of YCM0-N in the presence of Mg^{2+} and Ca^{2+} are determined. Ca^{2+}-binding of YCM0-N is examined by PFG-HSQC spectrum observed at various Ca^{2+} concentrations.

[序] 先のポスター講演（同名の（１））で報告したとおり、我々は、日本電子社製のNMR装置（Ａ５００，Ａ６００）の３次元ＦＩＤデータをNMRＰｉｐｅで解析する手続きを確立した。本講演では、この手続きを用いた蛋白質の構造解析の実際について報告する。

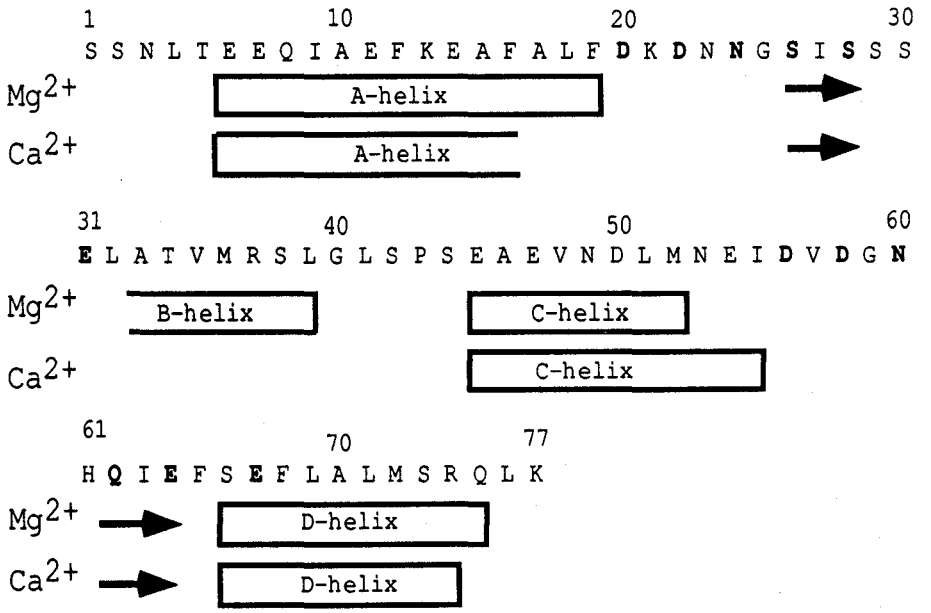
試料として酵母カルモデュリンのN末端側ドメイン（ＹＣＭ０－Ｎ；７７残基）を選んだ。多くの生物のカルモデュリンは１次構造の相同性が９０％以上ある。しかし、酵母のカルモデュリンは他のカルモデュリンとの１次構造の相同性が６０％であり、標的蛋白質を活性化する能力も劣っている。酵母カルモデュリンの構造およびＣａ$^{2+}$結合に伴う構造変化については殆ど知られていない。本研究の目的は、NMRを用いて酵母カルモデュリンの構造と構造変化を調べ、他のカルモデュリンと比較検討することである。

[実験] 一様に^{15}Ｎでラベルされ たＹＣＭ０－Ｎを大量発現系で培養しＴＣＡ法で精製した。Ｍｇ$^{2+}$結合型とＣａ$^{2+}$結合型の２種類のNMR試料を調製した。それぞれの試料について^{15}Ｎ－ｅｄｉｔｅｄ　ＴＯＣＳＹおよびＮＯＥＳＹを測定した（共にＰＦＧ付きパルス・シークエンス）。ＦＩＤデータはワークステーションに転送後NMRＰｉｐｅを用いてフーリエ変換した（詳しくは同題（１）の講演を参照のこと）。得られたスペクトルの個々のシグナルを連鎖帰属法に基づき帰属した。さらに、さまざまなＣａ$^{2+}$濃度で（^{1}Ｈ，^{15}Ｎ）－ＰＦＧ－ＨＳＱＣ測定を行った。ＦＩＤデータをNMRＰｉｐｅで処理し、ＰＩＰＰで個々のシグナルの高さを見積もった。

[結果と考察] Ｍｇ$^{2+}$とＣａ$^{2+}$結合型のＹＣＭ０－Ｎの２次構造をそれぞれ決定した。αヘリックス領域は以下の３つの条件を考慮して決定した。α ^{1}ＨのＣＳＩが正であること、隣接残基間のＮＯＥの強度比$d_{N\alpha}(i,i)/d_{\alpha N}(i-1,i)$が１より大きいこと、および３残基離れた残基間のＮＯＥ$d_{\alpha N}(i,i+3)$が観測されること。βストランド領域は、α ^{1}ＨのＣＳＩが負であること、$d_{N\alpha}(i,i)/d_{\alpha N}(i-1,i)$が１より小さいことを基準に決定した。さらに、それぞれのβストランドの残基間にＮＯＥが見られるかどうかを基準にシート構造の形成を判断した。

結果を図１に示す。　Ｍｇ$^{2+}$とＣａ$^{2+}$結合型のいづれについても、Ｓ２６－Ｓ２８とＱ６２－Ｅ６４の領域が逆平行のβシートを形成していることが明らかになった。これらの結果は、既に報告されているカルモデュリンの構造の特徴と良く一致している（１）。　また、Ｃａ$^{2+}$結合型ではＢヘリックスが形成されていないことが明らかになった。このことは今までに報告されているカルモデュリンとは明らかに異なる。

Figure 1　Schematic representation of secondary structure for YCM0-N in the Mg^{2+}- and Ca^{2+}-forms. Amino acid sequence of YCM0-N is shown by one-letter code. Bold letters indicate ligand residues of Mg^{2+} and Ca^{2+}. Square with helix name represents determined α-helix region. Square of which side is open represents helix of which edge is not determined. β-strand region represents arrow.



さらに、Ｍｇ$^{2+}$とＣａ$^{2+}$結合型のいづれも１次構造上離れた残基であるＩ９，Ｆ１２，Ｆ１６，Ｆ１９，Ｉ２７，Ｆ６５およびＦ６８の側鎖間にＮＯＥが観測された。この結果は、これらの残基が疎水性領域を形成していることを示していると考えられる。この構造上の特徴も一般的なカルモデュリンと一致する。

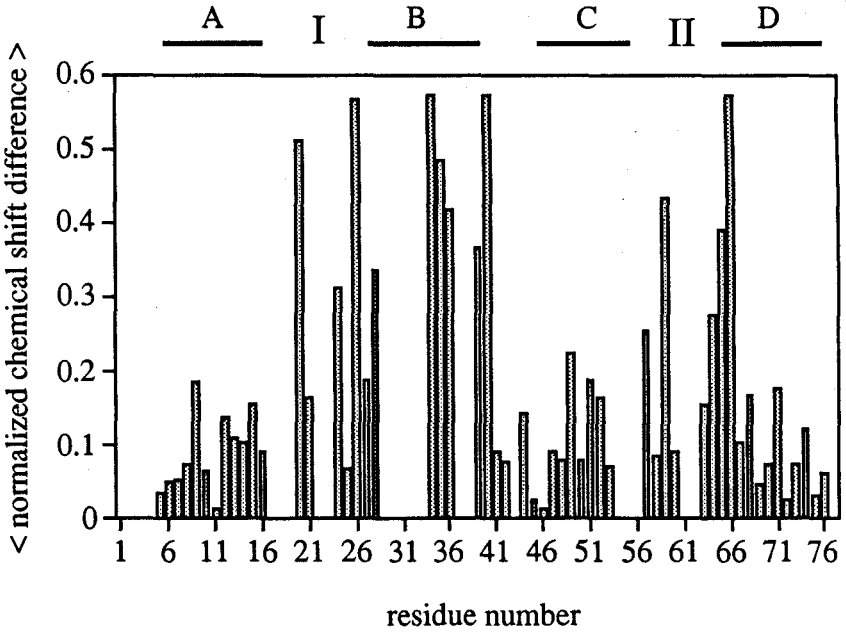
既に報告されている一般的なカルモデュリンと標的ペプチドの複合体の構造では、疎水結合の他にＢヘリックスの残基と標的との間に相互作用があることがわかっている（２）。したがって、酵母カルモデュリンのＣａ$^{2+}$結合型でＢヘリックスがないことと標的蛋白質を活性化する能力が低いことには何か関係があるかも

しれない。

図２にＣａ$^{2+}$結合に伴うケミカルシフトの変化を各残基ごとにプロットしたグラフを示す。ケミカルシフトの変化は、α^{1}Ｈ，^{15}Ｎおよび^{1}ＨＮについて｜$\delta_{Ca}-\delta_{Mg}$｜を求め、それぞれの核について規格化し、値を残基ごとに平均した。

この結果から、Ｃａ$^{2+}$結合ループＩ，ＩＩはＣａ$^{2+}$結合に伴うケミカルシフトの変化が大きいことがわかる。さらに、Ｃａ$^{2+}$結合と共に消失するＢヘリックス領域は他のヘリックス領域と比較してケミカルシフトが大きく変化していることがわかる。

Figure 2　Magnitude of chemical shift difference as a function of residue number.　The value of each residue is obtained by averaging the normalized chemical shift differences of　α ^{1}H, ^{1}HN, and ^{15}N resonances.

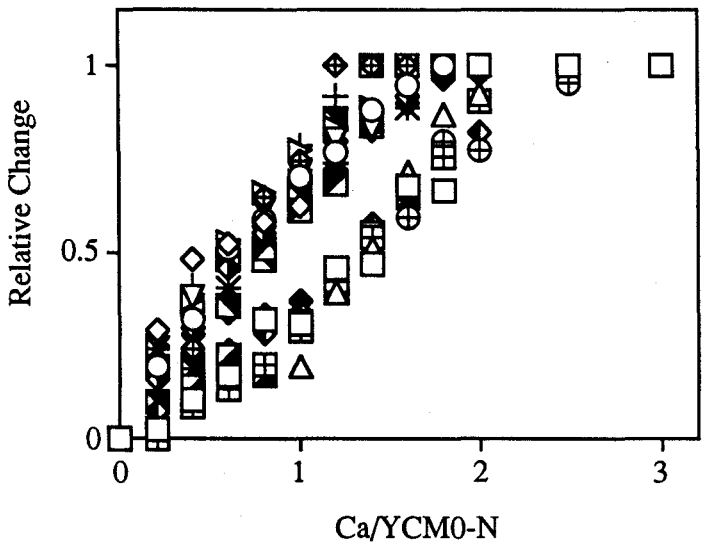


ＨＳＱＣの結果から、Ｂヘリックスが崩れてもＹＣＭ０－ＮはＣａ$^{2+}$を２個結合することが明らかになった。Ｃａ$^{2+}$結合に伴う構造変化の様子は２つのグループに分かれることが明らかになった。結果を図３に示す。この２つのタイプは１次構造上ランダムに現れる。

２つのタイプの曲線がそれぞれのＣａ$^{2+}$結合サイトの残基から成り立っていれば、解釈は簡単である。その場合、どちらかのサイトが高親和性部位であり、一般的な２サイトの平衡を仮定して実験データに結合曲線がフィットするように計算すれば、各サイトのＣａ$^{2+}$解離定数を見積もることが出来る。

立体構造上近い残基がひとつのグループで括れるという仮定も考えられるが、例えば疎水性領域を形成しているのは幾つかの残基の側鎖であり、ＨＳＱＣでモニターしているのは主鎖のアミドであるから、シグナル変化の取り扱いには注意が必要である。今回の結果では、Ｆ１２とＫ１３のように同一ヘリックス内の隣接残基でも別のタイプに分類される場合がある。

Figure 3　Plot of relative change of several resonances against the [Ca^{2+}]/[YCM0-N] ratio. (⊕, E6; ◆, Q8; ⊕, F12; ⊞, K13; ×, A15; ▽, F16; +, D20; ✳, K21; △, S26; ◪, R37; ✙, L39; ◥, L41; □, G59; ◇, S66; ◆, E67; ◆, F68; ◪, L69; ◥, A70; ◆, L71; ○, S73; ◁, R74; ▷, K77)



同様のＣａ$^{2+}$結合蛋白質のトロポニンＣのＮ末端側ドメインでも、似たような結果が報告されている（3）。この場合、Ｃａ$^{2+}$結合に伴う３種のシグナル変化のタイプがあり、それらが１次構造上でランダムに現れる。

これらの２次元データの統一的な解釈は難しい。

[参考文献] (1) Babu, *et. al.* (1988) *J. Mol. Biol.* 204, 191−204 (2) Ikura, *et. al.* (1992) *Science*, 256, 632−638 (3) Li, *et. al.* (1995) *Biochemistry* 34, 8330−8340

^{15}N−edited 3D−NMR, NMRPipe, 酵母カルモデュリン, ２次構造

おおきしんや、つださかえ、さいとうもよこ、みうらかずのり、やざわみちお、ひきちくにお

P88

Transferred NOE法による RecAタンパク質に結合したDNAの構造解析

○西中太郎[1,2], 伊藤隆[2], 矢吹孝[1], 井川粛子[2], 横山茂之[1,3], 柴田武彦[2]
([1]東大・理・生化, [2]理研・遺伝生化学, [3]理研・細胞情報伝達)

Transferred NOE annalysis of the structure of DNA bound to RecA protein

Taro Nishinaka[1,2], Yutaka Ito[2], Takashi Yabuki[1], Shukuko Ikawa[2], Shigeyuki Yokoyama[1,3], Takehiko Shibata[2]
([1]Laboratory of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), [2]Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo, [3]Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN))

Summery

The *Escherichia coli recA* gene was first found to be essential for genetic recombination, and its homologs were detected in many species including humans. In the presence of ATP, its product, RecA protein polymerize on single-stranded DNA to form a helical nucleoprotein filament, which search for homology in other duplex DNAs. After they recognized homology, the identical strand can be exchanged and replaced single-stranded DNA released. In present study, we used transferred NOE analysis to obtain information about the structure of DNA bound to RecA protein, and have found that DNA adopts an extended and unwound structure. The adjacent bases are not stacked, but H2', H2" and H3'of the ribose come in close contact with the base of the next residue.

大腸菌*recA*遺伝子産物（RecA）は相同組換えにおいて中心的役割を果たす分子量38Kのタンパク質である．RecAタンパク質は一本鎖DNA上に協同的に結合し，二本鎖DNAあるいは一本鎖DNAとの間で相同的塩基配列を探索し，対合させる活性を持つ．遺伝的組換えの中間体として重要なRecAフィラメント内のDNA構造については，電子顕微鏡による研究例はあるが，未だ原子配置レベルでの知見は得られていない．RecA蛋白質はRecA蛋白質同士の相互作用は強いが，DNAとの相互作用はそれに比べて弱い．我々はRecA蛋白質のもつこの性質に着目し，小分子と巨大分子が早い速度で結合・解離を行なう条件下においてNOEを測定するtransferred NOE (TRNOE)法が応用できると考え，実際にRecAタンパク質に結合したDNAの構造情報を得ることに成功したので報告する．

RecA, DNA, transferred NOE

○にしなか　たろう，いとう　ゆたか，やぶき　たかし，いかわ　しゅくこ，よこやま　しげゆき，しばた　たけひこ

様々な配列の一本鎖DNA (3～4残基) に，徐々にRecAタンパク質を混合してゆき，1D transferred NOE (TRNOE)スペクトル測定を行った．その結果，RecAタンパク質に結合したDNAに由来するシグナルを観測することができた（Fig.1)．シグナル強度は補助因子に依存的であり，ATPγSを用いた場合には，ADPを用いた場合に比べて，より強いシグナルが得られた．TRNOEシグナルが十分に大きいと判断した条件で2D TRNOESYスペクトルを測定した．ピーク強度を測定し，距離束縛条件を設定し，simulated annealing 法による構造計算を行った．その結果，RecAタンパク質に結合したDNAは，デオキシリボース部分が次の残基の塩基部分に近接することにより，B-form DNAに比べ引き伸ばされ，巻き戻された構造をとっていることが明らかになった（Fig.2）．

Fig.1

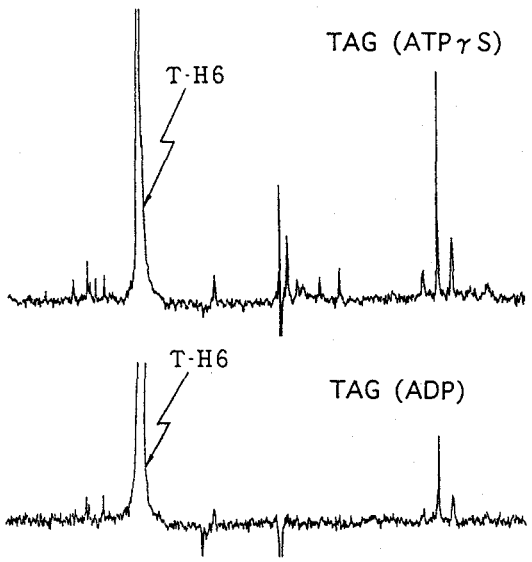


Fig.2

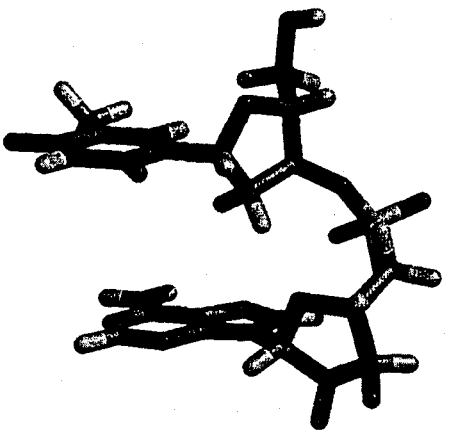


Fig.1 1D NOE difference spectra of the RecA-DNA(TAG) solution at 1:10 ratios.

Fig. 2 A T-A region of the calculated structure of DNA(TAG) bound to RecA protein in the presence of ATPγS

P89 クロモプロテイン系抗腫瘍性抗生物質C-1027の二次元ＮＭＲ解析

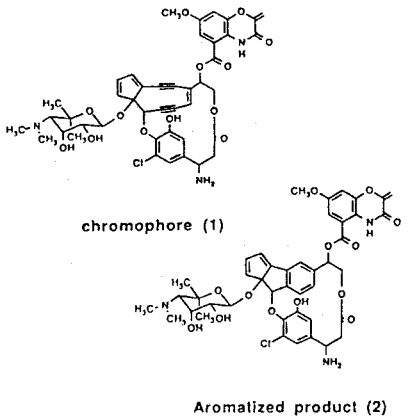
（東北大理[1]・大鵬薬品製薬セ[2]・サントリー生医研[3]）○福田純子[1]・田中俊之[1]・平間正博[1]・大谷敏夫[2]・今城精一[3]・石黒正路[3]

Two-dimensional NMR Study on C-1027, a Chromoprotein Antitumor Antibiotic.

Sumiko Fukuda[1], Toshiyuki Tanaka[1], Masahiro Hirama[1], Toshio Otani[2], Seiichi Imajo[3], Masaji Ishiguro[3] (*[1]Faculty of Science, Tohoku University, [2]Tokushima Research Center, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., [3]Suntory Institute for Biomedical Research*)

Abstract: C-1027, a potent antitumor antibiotic, consists of an unstable chromophore with DNA cleavage activity and an apoprotein which stabilizes the chromophore by tight and specific binding. To reveal the binding structure and stabilizing mechanism, we analyzed the complex composed of the apoprotein and the aromatized chromophore by two-dimensional NMR. The apoprotein has three antiparallel β-sheets, and its tertiary structure is similar to those of neocarzinostatin and actinoxanthin. The computer modeling of the complex was carried out based on the several intermolecular NOEs observed between apoprotein and chromophore.

［序論］C-1027は*Streptomyces globisporus C-1027*が産生する抗腫瘍性抗生物質であり、ＤＮＡ切断活性を示すクロモフォア（**1**）[1]とこれを特異的に結合するアポタンパク（アミノ酸１１０残基）[2]から構成されている（Figure 1）。この複合体の結合様式とクロモフォアの安定化機構は、タンパク質の低分子認識という観点から非常に興味深い。そこで我々は、C-1027複合体の二次元ＮＭＲスペクトルを解析し、クロモフォアの結合様式を明らかにしようと考えた。天然のC-1027はＮＭＲ測定条件下では不安定なため、測定にはコア部が芳香環化したクロモフォア（**2**）[3]を用いた。C-1027クロモフォアコア部はエンジインとパラベンザインビラジカルの平衡にあるため[4]、芳香環化クロモフォアとアポタンパクとの複合体の構造は天然体の構造とほぼ同じと考えられる。



Ala- Pro- Ala- Phe- Ser- Val- Ser- Pro- Ala- Ser- Gly- Leu- Ser- Asp- Gly- Gln- Ser- Val- Ser- Val-
Ser- Val- Ser- Gly- Ala- Ala- Ala- Gly- Glu- Thr- Tyr- Tyr- Ile- Ala- Gln- Cys- Ala- Pro- Val- Gly-
Gly- Gln- Asp- Ala- Cys- Asn- Pro- Ala- Thr- Ala- Thr- Ser- Phe- Thr- Thr- Asp- Ala- Ser- Gly- Ala-
Ala- Ser- Phe- Ser- Phe- Val- Val- Arg- Lys- Ser- Tyr- Thr- Gly- Ser- Thr- Pro- Glu- Gly- Thr- Pro-
Val- Gly- Ser- Val- Asp- Cys- Ala- Thr- Ala- Ala- Cys- Asn- Leu- Gly- Ala- Gly- Asn- Ser- Gly- Leu-
Asp- Leu- Gly- His- Val- Ala- Leu- Thr- Phe- Gly

Figure 1. Structures of the C-1027 chromophore and its aromatized product (left) and the amino-acid sequence of C-1027 apoprotein (right).

C-1027、二次元ＮＭＲ、芳香環化クロモフォア、クロモプロテイン

ふくだ　すみこ・たなか　としゆき・ひらま　まさひろ・おおたに　としお・いまじょう　せいいち・いしぐろ　まさじ

［方法］芳香環化クロモフォアーアポタンパク複合体の７.８ｍＭ溶液（H_2O及びD_2O、ｐＨ５.０）をＮＭＲ試料とし、ＢｒｕｋｅｒＡＭ６００を用いて二次元ＮＭＲスペクトル（ＣＯＳＹ、ＮＯＥＳＹ（２００ｍｓ）、ＨＯＨＡＨＡ）を３０℃で測定した。なお、軽水ピークの除去は通常のｐｒｅ－ｓａｔｕｒａｉｏｎ法を用いた。

［結果と考察］タンパク由来のシグナルのスピン系の帰属、及び連鎖帰属は常法[5]に従って行い、現在約９０％のプロトンの帰属ができている。また、クロモフォア由来のシグナルはすべて帰属した。主鎖プロトン間のＮＯＥパターンと交換の遅いアミドプロトンの存在から、アポタンパクは３枚の逆平行型βシートから構成されていることが明らかになった。さらに、各シート間に観測されるＮＯＥからアポタンパクの立体構造が予想された。これは同じクロモプロテインであるネオカルジノスタチン[6]や、アミノ酸のホモロジーが９０％以上であるアクチノキサンチン[7]のアポタンパクの構造と良い相関を示す。アポタンパク単独の解析結果[8]と比較すると、クロモフォアの結合による大きな構造変化はタンパク主鎖部分に引き起こされていない。また、アポタンパク単独のシグナル帰属[8]と比較すると、Ｔｈｒ３０～Ｐｈｅ５３、Ｇｌｙ７３～Ｖａｌ８１、Ａｌａ９０～Ｐｈｅ１０９の主鎖あるいは側鎖の一部のプロトンの化学シフトが０.１ｐｐｍ以上シフトしており、これらのアミノ酸に囲まれた部分がクロモフォアの結合部位であることが予想された。

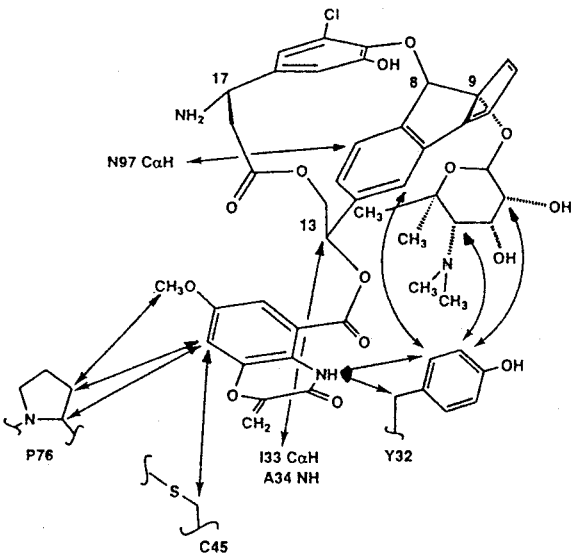


Figure 2. Intermolecular NOEs observed between apoprotein residues and the aromatized chromophore.

芳香環化クロモフォアとアポタンパク間のＮＯＥ（Figure 2）を基にして、クロモフォアーアポタンパク複合体の結合構造をコンピューターモデリングにより予測した。アクチノキサンチンのＸ線構造からモデリングしたアポタンパクの構造の主鎖は固定し、結合部位に向いているアミノ酸残基の側鎖のみを動かした。クロモフォアは、アミノ糖は椅子型に、ベンズオキサジンを平面に固定し、あとはすべて動かして複合体構造を発生させた。クロモフォアにはまだ明らかになっていない不斉点が２ケ所（Ｃ８、Ｃ９）ある。しかし相対構造はトランスであることがわかっているため[1]、Ｃ８、Ｃ９ともにＲ配座であるＲＲ体と、ともにＳ配座であるＳＳ体についてそれぞれ計算を行った。その結果、ＲＲ体でのみＮＯＥを満足させる構造が得られた。従って、Ｃ８、Ｃ９ともにＲ配座である可能性が高い。

［参考文献］

1）Y.Minami, K.Yoshida, R.Azuma, M.Saeki and T.Otani, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 2637 (1993).
2）N.Sakata, S.Ikeno, M.Hori, M.Hamada and T.Otani, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** 1592 (1992).
3）K.Yoshida, Y.Minami, R.Azuma, M.Saeki and T.Otani, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 2634 (1993).
4）K.Iida, Ph.D. Thesis, Tohoku University (1994).
5）K.Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York. 1986.
6）T.Tanaka, M.Hirama, K.Fujita, S.Imajo and M.Ishiguro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1205 (1993).
7）V.Z.Pletnev, A.P.Kuzin, S.D.Trakhanov and P.V.Kostetsky, *Biopolymers*, **21** 287 (1982).
8）T.Tanaka, M.Hirama, unpublished results.

P90 ET_BアンタゴニストRES-701-1の立体構造の再検討
--新たに得られた特異な“投げ縄”構造について--

協和発酵工業（株）東京研究所
○片平律子、柴田健志、山崎基生、松田譲、好田真由美

Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist, RES-701-1

Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
Ritsuko Katahira, Kenji Shibata, Motoo Yamasaki, Yuzuru Matsuda and Mayumi Yoshida

Abstract: The three dimensional structure of the endothelin B receptor (ET_B) selective antagonist RES-701-1 has been determined by ^{1}H NMR in deuterated dimethyl sulphoxide. RES-701-1 consists of 16 amino acid residues with a novel internal linkage between β-carbonyl group of Asp9 and α-amino group of Gly1. The structural calculations were carried out. The result indicates that RES-701-1 adopts an extraordinary folding, i.e., the "tail"(Trp10-Trp16) passes through the "ring"(Gly1-Asp9) region. Several critical NOEs directly support this extraordinary folding. The synthetic RES-701-1was compared with the authentic one. The results revealed why the authentic RES-701-1 exhibits potency and the aynthetic RES-701-1 does not.

＜序＞ RES-701-1は、放線菌より単離されたエンドセリンBレセプター選択的アンタゴニスト活性をもつペプチドである（図１）。RES-701-1は、Asp9のβカルボニル炭素とN末Glyのαアミノ基が結合したリング部分と、10-16残基のテール部分からなる。我々は、このペプチドの立体構造を一昨年度の本学会で報告したが[1]、今回は以前考慮していなかったアミドプロトンの温度因子、H-D交換速度を考慮し、NOEの情報を新たに７個加えて再度計算したところ、前回に報告したものとは異なる、テールがリングを貫通したものが正しい構造であることがわかった。また、RES-701-1を合成したものは、MSより一次構造は同じであることが確かめられたにも拘わらず放線菌由来のauthentic なものが持つ活性を全く示さない。合成物のNMRスペクトルはauthenticなものとまったく異なったNMRスペクトルを与えた。[2),3)] これらのことから、authenticなRES-701-1の特異な構造が活性と関連していることがわかった。

＜実験＞ 実験は全てDMSO-d_6溶媒中で行った。authentic RES-701-1に対して、アミドプロトンの温度依存因子を求めた。また、NOEの個数を増やし、DADAS90及びX-PLORによって再度計算を行った。さらに、得られた構造に対して、NOEの強度に対して緩和行列を用いてdirectにrefinementを行った[4]。合成RES-701-1は、液層合成より得た。合成RES-701-1の一次構造は、MSより確かめられた。^{1}H NMRスペクトルの帰属は定法に従って行った。

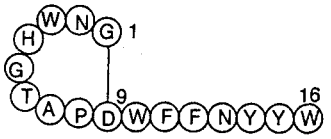


Fig. 1. Amino acid sequence of RES-701-1.

エンドセリン、アンタゴニスト、distance geometry、simulated annealing

かたひら りつこ、しばた けんじ、やまさき もとお、まつだ ゆずる、よしだ まゆみ

＜結果及び考察＞authenticなRES-701-1の構造を計算したところ、図２に示すような構造を得た。この構造は、テールがリングを貫通している（"lasso"構造）という極めて特異な構造である。図２の平均構造に対してNOE強度に対して完全緩和行列を用いてrefinemenetした構造を図３に示した。図３を用いてこの"lasso"構造を検証した。図３では、紙面に対してPhe12-Asn13の部分がGly1-Trp3の部分の手前にあり、Gly5-Ala7の部分がTyr14-Tyr15の部分の手前にあるのでリングをテールが通り抜けた構造となっている。この二つのセグメント間の相対配置がなぜこのように決定されているかを検討した。

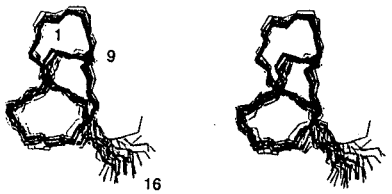


Fig. 2. Stereoviews of the superimposed backbone structures of RES-701-1.

まず、二次構造として7-9,12-14にβ－シートがある。このシートではPro8とAsn13のCαHが向かいあっている。アミノ酸はすべてL体であるのでPro8の側鎖はシートの骨格原子対して紙面手前に出、その隣のAsp9の側 鎖は、紙面奥にでる。Gly1とAsp9側鎖は結合しているのでPhe12-Asn13の部分は Gly1-Trp3の部分より必ず紙面手前になる。また、このような条件下で、図３に示したAsn13の側鎖からHis4-Gly5の骨格原子へのNOEを満たす為には、立体障害を避けるためにTyr14-Tyr15の部分がGly5-Ala7より紙面奥になる。このようにしてAsn13側鎖からのNOEが"lasso"構造構築に非常に大きく寄与していることがわかった。また、H-D交換速度を調べたところβ－シートの水素結合部分以外ではAsn13が非常に遅いことがわかったが得られた構造よりこのAsn13 のNHはAsn2のCOと水素結合していることがわかり、この水素結合が"lasso"構造をより安定化しているものと考えられた。

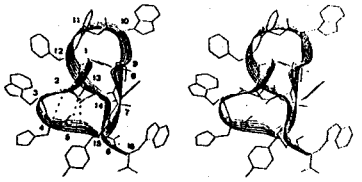


Fig.3. Heavy atom structure of the refined RES-701-1.

次に、化学合成したRES-701-1をDMSO-d_6中で解析した。一次構造は、authentic なものと一致しているのに帰属したケミカルシフトはauthenticなものとは全く異なった。さらに、authentic RES-701-1では、リングとテールの間に多数のNOEが観測されたが、化学合成されたRES-701-1には、それらの間に全くNOEが観測されず、骨格原子はテールがリングを通り抜けたauthentic RES-701-1のような構造をとっていないことがわかった。化学合成されたRES-701-1にはauthenticのものが持つ活性を示さない。従って、RES-701-1の活性は、テールがリングを通り抜けた"lasso"構造に由来し、化学合成されたRES-701-1のような“お玉杓子型”の構造に由来するものではないことがわかった。

＜参考文献＞

1) 片平律子等　第32回NMR討論会講演要旨集 p.237-238.

2) Katahira R., et al., (1995) Bioorg. and Med. Chem. Lett. 5, 1595-1600.

3) Katahira R., et al, (1995) Bioorg. and Med. Chem. in printing.

4) Yip, P and Case, D.A. (1989) J. Magn. Reson. 83, 643-648.

P91

Solution structure of human Endothelin-2, as determined by ^{1}H-NMR

National Institute of Bioscience and Human-Technology: ○Klas Arvidsson, Tadashi Nemoto, Youji Mitsui, Shinichi Ohashi, and Hiroshi Nakanishi

Abstract: The solution structure of human Endothelin-2 in a mixed solvent of water and hexafluoroisopropanol was studied by 2D ^{1}H NMR and by CD. Proton resonance assignments were made and from NOE data, J-coupling constants and two disulfide bridges, distance geometry structures of the 21 amino acid residue peptide were calculated. These structures show a helical conformation from Lys9 to His16/Leu17. This C-terminal helix is joined to an N-terminal extended section via a wide turn or bulge at residues Ser4-Asp8. The overall relative orientation of the N- and C-termini, of importance for the biological function, is determined by the two disulfide bridges linking the side chains of residues 1 and 15, and 3 and 11, respectively.

Introduction

Endothelin is a vasoactive polypeptide which has been isolated from aortic endothelial cells. There are numerous reported activities of Endothelin in the vascular, and in the central and peripheral nervous systems, including Endothelin being the most potent vasoconstrictor yet isolated. It is likely to play an important role in the regulation of blood flow, in hypertension and in vasospasm.

Endothelin-2 belongs to the family of Endothelin peptides, comprising the human ET-1, ET-2 and ET-3. These 21 amino acid residue peptides are characterized by having a disulfide bridge between residues 1 and 15, and 3 and 11, respectively, linking the hydrophobic C-terminal part to the N-terminal region.

The solution structure of Endothelin has focused much interest and a number of studies have resulted. NMR techniques and subsequent structural calculations have been applied in various solvents and recently an X-ray structure investigation of ET-1 was published. Despite all these studies there is little of consensus on the Endothelin 3D structure. Some regions seem to adopt a solvent independent secondary structure, whereas other parts are shown to conform differently from one solvent to another. Surprisingly, studies on the same peptide in the same solvent show results in contradiction with each other.

Endothelin-2, NMR, distance geometry, structure, helix

○アーヴィドソン クロス、 ねもと ただし、みつい ようじ、おおはし しんいち、なかにし ひろし

In the light of these findings and the fact that the X-ray structure shows features that are not present in any of the published NMR structures, further structural investigations are required in order to understand the nature of the Endothelin structure.

In this study we have performed an NMR structural investigation of Endothelin-2, the only member of which no 3D structure has been presented, dissolved in a mixed solvent of water and hexafluoroisopropanol (HFIP).

Materials and Methods

A sample containing 0.5 mM Endothelin-2 in 100 mM acetic acid and 25% HFIP in aqueous solution was prepared. Standard 2D NMR experiments were recorded at 25 °C and assignments of proton resonances were made. More than 350 NOE intensities were detected and sorted into proton pair dependent classes applying NMR2/Distance. The intensities were converted into interproton distance restraints by using calibration curves, i.e. relationships between NOE intensities and interproton distances. Spin-spin coupling constants were measured and transformed into dihedral angle restraints. Distance geometry structures have been calculated in dihedral angle space using DADAS90.

Results and Discussion

Endothelin-2 was found to severely aggregate in aqueous solution and not to be suitable for conformational analysis in DMSO-d_6. Fluorinated alcohols in aqueous solution are known to interact with and solvate hydrophobic regions.

CD experiments show that Endothelin-2 solvates upon addition of HFIP. The ellipticity at 222 nm as a function of HFIP, reaches a plateau at 20-25% co-solvent consistent with a stabilized and developed helical conformation.

The distance geometry structures of Endothelin-2 show a helix stretching from Lys9 to His16/Leu17, whereas the C-terminus, residues Asp18-Trp21, show only a tendency to adopt a helical conformation. The C-terminal helix is joined to an N-terminal extended section of residues Cys1-Ser3, via a wide turn or bulge at residues Ser4-Asp8. The relative orientation of the N- and C-termini is in major part determined by the two disulfide bridges linking the side chains of residues 1 and 15, and 3 and 11, respectively.

A set of distance geometry ET-2 structures, having low target function values, will be presented and a comparison between them and the crystal structure of ET-1 will be discussed.

P92

NMR による Raf と Ras の相互作用の解析

○寺田　透[1]，伊藤　隆[2]，柴田武彦[2]，Ernest D. Laue[3]，横山茂之[1]
([1]理研・細胞情報伝達，東大大学院理・生物化学，[2]理研・遺伝生化学，[3]Department of Biochem., Univ. of Cambridge)

NMR study of the interaction between Raf and Ras

Tohru Terada[1], Yutaka Ito[2], Takehiko Shibata[2], Ernest D. Laue[3], Shigeyuki Yokoyama[1]
([1]Cellular Signaling Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo, [2]Laboratory of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), [3]Department of Biochemistry, University of Cambridge)

The backbone and the side-chain resonances of the Ras-binding domain (RBD) of Raf were assigned using triple resonance 3D NMR spectroscopy, and its solution structure was determined. Next, we analyzed the interaction between RBD and Ras·GMPPNP. Since the molecular weight of RBD is about 12kDa and the total molecular weight of the complex exceeds 30kDa, we employed the protein deuteration technique in order to lengthen the transverse relaxation time of $^{13}C^{\alpha}$ and improve the sensitivity and the resolution of the spectra. ^{2}H decoupling versions of 3D HNCA and 3D HN(CO)CA were measured and the backbone resonances of RBD in the complex with Ras·GMPPNP were sequence-specifically assigned. From the chemical shift differences of H^{N} and ^{15}N, we have identified the residues which are involved in complex formation.

c-Raf-1 タンパク質は細胞内情報伝達系で細胞の増殖や分化に重要な機能を担っている分子量約 72kDa の serine/threonine kinase である．Raf は Ras と直接相互作用し下流にシグナルを伝える働きをしていることが知られている．また，Raf の N 端付近に存在する保存領域（CR1）の一部（51-131 残基）が単独で GTP 結合型の Ras と結合することが明らかになっている[1]．私達は rat の c-Raf-1 の Ras 結合ドメイン（Ras-binding domain, RBD）を用いて，このドメインと Ras との相互作用のメカニズムを解明するために NMR による解析を行った．

はじめは 51-131 残基のみをコードする発現系を用いていたが，恐らく末端がプロテアーゼによって分解され易かったために，構造が一形に定まらず，解析には適さなかった．そこで，N 末端側に 14 残基，C 末端側に His-tag 配列として 13 残基を付加したところ，プロテアーゼから保護され，なおかつ一形に折り畳まれたサンプルを得ることができた．このサンプルを用いて 3D HNCA，3D HCCH-TOCSY スペクトルなどを測定し，主鎖および側鎖の帰

Raf-RBD，構造決定，Ras，重水素化，主鎖の帰属

てらだ　とおる，いとう　ゆたか，しばた　たけひこ，あーねすと　でぃー　らうえ，よこやま　しげゆき

属を行った．次いで，NOE の距離情報，および主鎖の２面角の情報を集め，X-PLOR 3.1 を用いて構造計算を行った（Figure）．最近になって，human c-Raf-1 の RBD（55-132 残基）について，NMR による構造が報告されているが[2]，本研究で得られた構造もほぼこれと同様であった．

次に，GTP 結合型の Ras との結合によって引き起こされる RBD 側の構造変化を解析するために，GTP の非水解アナログ GMPPNP を結合した Ras と RBD の複合体について，NMR による解析を行った．この複合体の分子量は合計で 30kDa を越えており，緩和の影響によるシグナルのブロードニングが顕著であるため，従来のままの方法で，^{15}N-edited TOCSY，NOESY や，HNCA などの測定を行い，そのスペクトルを用いて主鎖の帰属を行うことは困難であった．そこで私達は山崎らの方法[3]に従って，^{13}C に結合しているプロトンを重水素に部分的に（~60%）置換し，$^{13}C^{\alpha}$ の横磁化の緩和による感度の低化の軽減を図った．ここでは，^{2}H/^{13}C/^{15}N 標識された RBD を用いて，3D HNCA および 3D HN(CO)CA スペクトルを測定し，複合体中における RBD の主鎖の帰属を行った．最近 Raf を活性化することのできない Ras のホモログである Rap1A と RBD の複合体の結晶構造が報告されたが[4]，ここから予想される変化と，今回 Ras との複合体の解析から明らかになった，複合体形成によるケミカルシフトの変化との差異について，検討を行った．

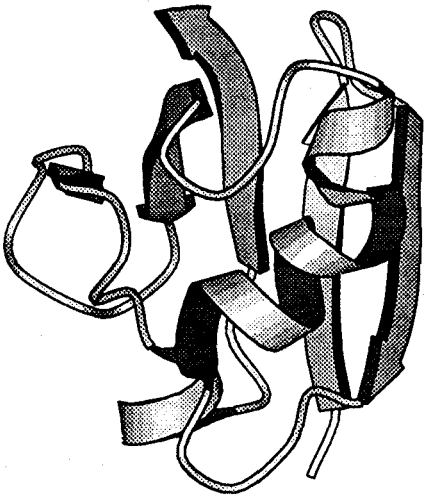


Figure : Ribbon representation of the solution structure of RBD in the free form

References

1) Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., & Cooper, J. A. (1993) *Cell 74*, 205-214

2) Emerson, S. D., Madison, V. S., Palermo, R. E., Waugh, D. S., Scheffler, J. E., Tsao, K., Keifer, S. E., Lui, S. P., & Fry, D. C. (1995) *Biochemistry 34*, 6911-6918

3) Yamazaki, T., Lee, W., Arrowsmith, C. H., Muhandiram, D. R., & Kay, L. E. (1994) *J. Am. Chem. Soc. 116*, 11655-11666

4) Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F., & Wittinghofer, A. (1995) *Nature 375*, 554-560

P93

O-ROESY法による核酸及び蛋白質分子内部運動の解析

(岐阜大・医・第二生理[1]、Dept. Chem. Biochem. UCSC[2])
○桑田一夫[1]、Thomas Schleich[2]

O-ROESY analysis of the internal motional dynamics of nucleic acid and protein.

Dept. Physiol., Sch. Med., Gifu Univ.,[1] Dept. Chem. Biochem., UCSC[2]
Kazuo Kuwata[1] and Thomas Schleich[2]

Internal motional dynamics of all the observed interproton vectors in the DNA and protein were assessed using the O-ROESY technique. Using the corrected distance constraints incorporating the internal motions of the internuclear vectors, new structures were generated by a standard simulated annealing schedule (including the restrained molecular dynamics simulation). These structures were significantly different than those generated using the ordinary NOESY derived distance constraints.

はじめに

2次元スペクトルにおいて、混合時間に、オフ・レゾナンスでスピン・ロックを行うことにより、交差ピークはROESYとNOESYとの中間の性質を持つようになる。オフ・レゾナンス照射周波数を系統的に変化させることにより、交差ピーク強度の分散曲線が得られるが、これに理論曲線を当てはめることにより、平均核間距離や核間距離の揺らぎ（動径部分に関する情報）とは独立に核間ベクトルの回転運動に関する情報が得られる。

他方、NOESYスペクトルから得られる距離情報は、平均核間距離と核間ベクトルの回転運動の両者の寄与を含んでいる。その距離情報を基に、Distance GeometryやRestrained Molecular Dynamicsを使用して得られたタンパク質や核酸の3次元立体構造と、実際のNOESYスペクトル強度との差異から、核間ベクトルの回転運動（スペクトル密度関数）に関する情報を抽出することが出来る。しかし、シミュレーションから得られた構造は、ポテンシャル関数に明らかに依存している。つまり、その差異は、ポテンシャル関数が悪いためなのか、スペクトル密度関数の差のためなのか、区別出来ないことになる。

いままで、実験的に核間ベクトルの回転運動に関する情報を、核間距離情報とは独立に取り出す事は出来なかったが、上述のO-ROESY法を用いることにより、これが可能になって来た。スペクトル密度関数を、核間距離とは独立に評価できれば、Distance ConstraintsをRefine出来、さらに構造のRefinementにつながる。

O-ROESY, simulated annealing, internal motion, nucleic acid, protein
くわた かずお、Thomas Schleich

一方、特定の高分子鎖のピークのT_1やT_2はもちろん、それに相当したスピンの回転運動に関する情報を含んでいるが、近傍の平均構造にも依存している。T_1やT_2は緩和行列でいえば、対角項に相当し、そのスピンの関与する交差緩和項を全て含んでいるためである。つまりスピン・ネットワークの影響を無視できない。XHベクトルの場合も2スピン系で解析されているが、H部分のネットワーク効果を無視できないと考えられる。

これらの点を改良するため、完全緩和行列法を用い、純粋に特定の核間ベクトルに関するスペクトル密度関数を評価した。

結果と考察

試料はミス・マッチを有するDNA、d(GCTGTCGAAAGC)を固相法で合成し、NOESY、DQF-COSY、及びO-ROESYスペクトルを13点のオフ・レゾナンス周波数で測定した。O-ROESY法により補正されたDistance Constraints（すべての観測された核間ベクトルに関して異なる回転緩和時間を使用）とNOESY法のみから得られたDistance Constraints（すべての核間ベクトルに対し、同じ回転緩和時間を仮定）との差は最大で約25 %あった。これらのDistance Constraintsを用いて、Simulated Annealing Schedule（100 steps:steepest descent minimization; 500 steps: conjugate gradient minimization; 2 ps rMD at 100 K; 3 ps rMD at 100→900K; 5 ps rMD at 900K; 2 ps rMD at 900→300K; 12 ps rMD at 300K)によりそれぞれ10個の構造を生成した。大きな差異は終末部分とミス・マッチ部分にあり、O-ROESY補正を行った方が内部運動を取り入れた分だけ、構造がコンパクトになっていることが分かった。

このようにO-ROESY法は分子内部運動に関する情報が取り出す事が出来、同時にそれを用いて構造がRefine出来るという特徴がある。

一方、問題点としては、1) 測定時間を要する。2) 1種類の周波数（例えば500 MHz）では、1個の核間ベクトルの回転運動に関して、せいぜい2個のパラメーター(例えばオーダー・パラメーターと内部回転緩和時間）しかユニークには決定出来ない。もちろん測定周波数が増えれば、それに比例して、決定出来る独立なパラメーターの数も増加する。3) 量子化軸がマジック・アングルに近づくと、交差ピークが消失するため、S/Nが悪くなる。一方、O-ROESY分散曲線の解析には、交差ピークが消失するオフ・レゾナンス周波数部分の情報が重要である。---等がある。

また今後は、より長距離の核間ベクトルを観測するために、固体ＮＭＲを使用することも可能である。

P94　タンパク質及びペプチド構造解析のためのNMR化学シフトの利用

東京農工大工学部　朝倉哲郎、○伊達健、出村誠
University of Sheffield　M.P.Williamson

Use of NMR Chemical Shift for the Structural Analysis of Proteins and Peptides

Tetsuo Asakura[1], Takeshi Date[1], Makoto Demura[1], and M.P.Williamson[2]

1 Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo
2 Krebs Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield, U.K.

The parameters for the HN chemical shift calculation of proteins have been determined with the experimental data of the chemical shifts of hydrogen-bonded HN protons and co-ordinates by X-ray diffraction analysis of 15 proteins. From the HN chemical shift calculation, the main reason for the difference in the HN chemical shift in helices and sheets is considered to arise from an additional upfield shifts predicted in helices . The HN chemical shifts of the distorted amphipathic helices of the GCN4 leucine zipper are calculated according to the NMR structure. The periodicity in the HN chemical shifts could be reproduced. The chain conformation of Silk I form was discussed according to the contour plots of the conformation-dependent ^{13}C and ^{15}N chemical shifts of the Ala and Ser residues.

緒言　近年、NMRによるタンパク質の構造解析の分野は著しい発展を遂げてきた。我々は、NMRの最も基本的なパラメーターである化学シフトを積極的に、その構造解析に用いることを試みている。既に、タンパク質のHα化学シフトは、化学シフト評価式中のパラメーターを実験データに基づいて最適化することによって、十分に構造解析に利用できることを報告してきた[1,2]。

ここでは、さらにタンパク質のHNプロトン化学シフトを評価するためのパラメーターを新たに決定するとともに、HNプロトン化学シフトの二次構造依存性の起源や両親媒性ヘリックスにおけるHN化学シフトの周期性について検討した[3]。

続いて^{13}C及び^{15}N NMR化学シフトに着目し、タンパク質の構造解析への積極的利用を検討した。SperaとBax[4]らの^{13}C NMR化学シフトの（ϕ、ψ）マップ化が成功をおさ

ｷｰﾜｰﾄﾞ：　NMR化学ｼﾌﾄ　ｱﾐﾄﾞﾌﾟﾛﾄﾝ　磁気異方性　ｼﾙｸ構造　化学ｼﾌﾄ等高線表示

あさくらてつお　だてたけし　でむらまこと　M.P.ウイリアムソン

めていることから、化学シフトの実験データをより多く用い、各アミノ酸残基毎に、Cα、Cβ化学シフトの（ϕ、ψ）マップを作製することを試みた。この（ϕ、ψ）マップを絹のSilkⅠ型構造の解析に用いた。さらに、絹の^{15}N同位体ラベル試料について、得られたSilkⅠ、SilkⅡ型の固体^{15}N NMR化学シフトを、^{15}N化学シフトの（ϕ_i、ϕ_{i-1}）マップ[5]に基づいて、同様にSilkⅠ型解析に用いた。

HN化学シフトの評価

HN化学シフトは次のような遮蔽効果の和とした[1]。

$$\sigma^{obs}-\sigma^{random\ coil}=\sigma^{ring}+\sigma^{ani}+\sigma^{E}$$

ここでσ^{obs}は実測HN化学シフト、$\sigma^{random\ coil}$はWuthrich[6]の報告によるランダムコイルHN化学シフト、σ^{ring}は環電流効果、σ^{ani}はカルボニル結合とアミド基のC-N結合からの磁気異方性効果、σ^{E}は電場効果である。σ^{ring}は他の効果と独立するものと考え、以前にHαプロトンの環電流効果の計算に用いたHaigh-Mallionモデルを用いて計算した[1]。

C=O結合の磁気異方性$\Delta\chi_{1CO}$と$\Delta\chi_{2CO}$、C-N結合の磁気異方性$\Delta\chi_{1CN}$と$\Delta\chi_{2CN}$、σ^{E}項の係数ε_1をパラメーターとし、X線回折の分解能が2Å以下で、HNプロトンの帰属された15個のタンパク質のPDBについて、水素結合に関与したHNプロトンの化学シフトの実測値981個を用いて、最適化を行った。その際、水素結合対の決定は、KabschとSander[7]の計算方法に従った。最適化されたC=O結合の磁気異方性$\Delta\chi_{1CO}$（in $cm^3 \times 10^{-30}$）と$\Delta\chi_{2CO}$はそれぞれ、-11と-5、C-N結合の磁気異方性$\Delta\chi_{1CN}$と$\Delta\chi_{2CN}$はそれぞれ、-7と+1であった。電場効果の係数は0.06と小さく、以下のHN化学シフト評価では電場効果の寄与は考慮しないこととした。実測値と計算値の標準偏差は0.492ppm、相関係数は0.715であった。

つづいて、HN化学シフトの二次構造依存性について検討した。

リボヌクレアーゼHのαヘリックス領域とβシート領域についてHN化学シフトを計算し、残基毎の寄与の平均をFig.1にプロットした[8]。αヘリックス領域の計算では（Fig.1a）、直接分子内水素結合しているi-4残基のカルボニル基から低磁場シフト（約0.25ppm）を受けるが、手前のi-2残基（約0.25ppm、主にC-N結合）とi-3残基（約0.25ppm、主にC=O結合）からは逆に、高磁場シフトの寄与があることが分かった。それらの寄与の和として、αヘリックスのHN化学シフトはランダムコイル化学シフトに比較して、最終

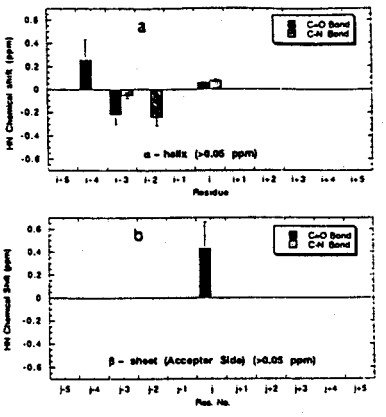


Fig.1 Histograms giving the calculated magnetic anisotropy contributions to the i-th HN proton chemical shifts within (a) helical and (b) β-sheet regions in ribonuclease H. The averaged values and their standard deviations were calculated using the hydrogen bonded HN protons in helical regions. The contributions are divided into the bond magnetic anisotropy effects from the C=O and C-N bonds. In the β-sheet regions, the residue to which residue i is hydrogen bonded is denoted j. The positive value means low-field shift.

的に、高磁場シフトすることが分かった。一方、βシート領域では、αヘリックス領域と異なり、着目したHNプロトンに、高磁場シフトを及ぼす残基はなく、直接水素結合したカルボニル基から低磁場シフトを受けるのみである（Fig.1b）。その結果、βシートのHN化学シフトは、ランダムコイル化学シフトに比較して、低磁場シフトすることになる。以上のように、HNプロトンのαヘリックスとβシート間の化学シフト差は、αヘリックス状態で、主に、i-3残基のC=O結合とi-2残基のC-N結合の磁気異方性効果（高磁場シフト）に起因することがわかった。

次に、HNプロトン化学シフトに規則的な周期性があることが確かめられている2本鎖両親媒性αヘリックスコイルドーコイルGCN4ロイシンジッパーのHN化学シフト計算を行った（Fig.2）。これまで、X線回折に基づく1.8Åの固体構造とNMR法に基づく溶液構造が報告されている（それぞれPDBでは、2ZTA[9]、1ZTA[10]である）。X線回折に基づく構造では、化学シフトの再現性は極めて悪かった。一方、20個のNMR溶液構造について実測値（実線）と計算値（破線）の比較を行ったところ、注目すべき周期性が見られた（Fig.2）。総じて、その一致は15残基から28残基まではきわめて良いが、28残基以降では良くないことが分かる。この領域では、実測値と計算値ともに、その周期性が欠如している。一方、ロイシンジッパーのN末端の半分では、実測と計算の両方が明確な周期性を示しているが、同位相ではなかった。

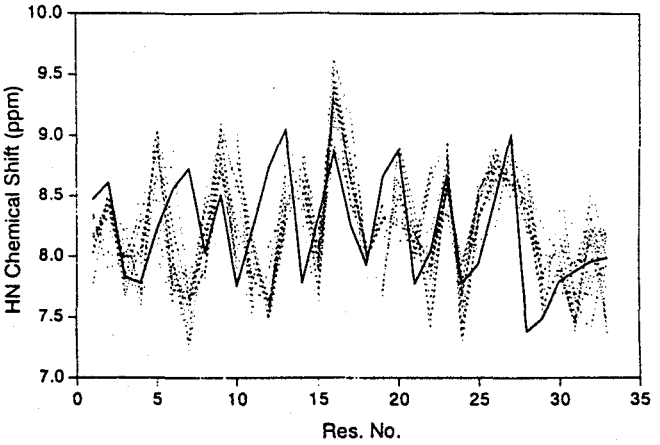


Fig.2 Plot of sequence dependence of the calculated and observed amide proton chemical shifts in GCN4 leucine zipper. The calculated values for the20 NMR solution structures are shown. The co-ordinates are taken from PDB structure 1ZTA, and were calculatedusing distance geometry followed by restrained energy minimization (DISMAN and GROMOS respectively).

SilkⅠ構造の検討

絹の結晶形態には、SilkⅠ型とSilkⅡ型が報告されている。そのうちSilkⅡ型は逆平行βシート構造として良く知られているが、特に、配向試料の作成が難しいSilkⅠ型については、十分な構造解析がなされていない[11]。ここでは、固体^{13}C及び^{15}N NMR化学シフトの（φ、φ）マップを用いて、SilkⅠ型構造の検討を行った。

各アミノ酸毎のCα、Cβ化学シフトの（φ、φ）マップは12種類のタンパク質のX線座標とNMR化学シフトデータを使用し、SperaとBax[4]らの方法によって平均化を行い、作製した。AlaとSerについて、化学シフトマップ上で、SilkⅡ型の（φ、φ）値に対応するCα、Cβ化学シフトを求めた。続いて、SilkⅠ型とSilkⅡ型の化学シフト差（Table 1）を考慮し、SilkⅠ型について等高線図を作成した（残基密度関数1.0以上の領域）[12]。マップ自身のばらつき度を考慮して、化学シフトの誤差を0.5（実線）、

1.0（一点鎖線）、1.5（破線）ppmとするとともに、CαとCβ化学シフトの重なる領域を等高線表示した。AlaとSerについて種々検討を加えた結果、B領域の（ϕ、ψ）の組み合わせが妥当であることがわかった。この範囲はFosseyらの提案するSilk I 型の二面体角値を含んでいる[11]。さらに、^{15}N化学シフトマップを加えて、Silk I 型の構造解析を行っている。

Table 1. The ^{13}C and ^{15}N chemical shifts observed for Ala and Ser residues of B.moli silk fibroin with Silk I and Silk II forms.

		^{13}C chemical shifts(ppm)		^{15}N chemical shifts(ppm)	
		Silk I	SilkII	Silk I	SilkII
Ala	Cα	51.4	49.4	102.7	100.9
	Cβ	16.5	20.2		
Ser	Cα	58.0	55.4	96.4	94.1
	Cβ	60.7	63.6		

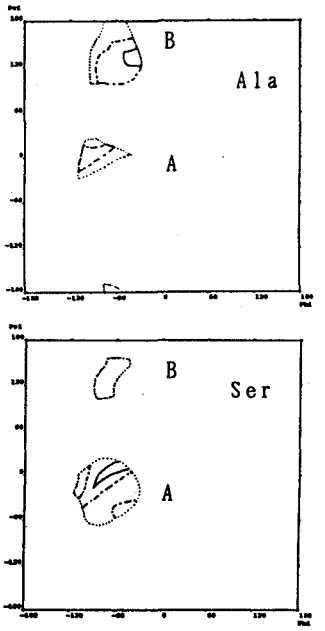


Fig. 3 The chemical shift ranges of Ala and Ser residues of Silk I form in the ^{13}C chemical shift contour plots.

参考文献

1 M.P.Williamson, T.Asakura, J.Magn.Reson., Ser.B, 101, 63(1993)
2 M.P.Williamson, J.Kikuchi, T.Asakura, J.Mol.Biol., 247, 541(1995)
3 T.Asakura, K.Taoka, M.Demura, M.P.Williamson, J.Biomol.NMR, in press
4 S.Spera and A.Bax, J.Am.Chem.Soc., 113, 5490(1991)
5 H.Le and E.Oldfield, J.Biomol.NMR, 4, 341(1994)
6 K.Wuthrich, NMR of proteins and nucleic acids, Wiley, New York(1986)
7 W.Kabsch and C.Sander, Biopolymers., 22, 2577(1983)
8 T.Yamazaki, M.Yoshida, K.Nagayama, Biochemistry, 32, 5656(1993)
9 T.G.Oas, L.P.McIntosh, E.K.O'Shea, F.W.Dahlquist, P.S.Kim, Biochemistry, 29, 2891(1990)
10 V.Saudek, A.Pastore, M.A.C.Morelli, R.Frank, H.Gausepohl, T.Gibson, Prot.Eng., 4, 519(1991)
11 T.Asakura and D.L.Kaplan, "Silk Production and Processing" Encyclopedia of Agricultural Science, 4, 1(1994), Academic Press
12 H.Saito, M.Ishida, M.Yokoi and T.Asakura, Macromolecules, 23, 83(1990)

P95 NMRによる天然型及び[Abu^{B7}]型モネリンの立体構造比較と構造活性相関研究

(味の素中央研究所) ○水越利巳、香村正徳、鈴木榮一郎、有吉安男

NMR Studies of Structure Comparison between Native and [Abu^{B7}] Monellin and Structure-Activity Relationship

Central Research Laboratories , Ajinomoto Co., Inc.
○Toshimi Mizukoshi, Masanori Kohmura, Ei-ichiro Suzuki, Yasuo Ariyoshi

An intensely sweet protein monellin, isolated from African berries, is several thousand times sweeter than sugar on a weight basis. Monellin consists of two polypeptide chains, the A chain with 44 amino acids residues and B chain with 50 residues. The crystal structure of monellin has been determined, and the native conformation is important for the sweet taste. For the purpose of locating the active site of monellin, analogs, replaced amino acid residues within potentional active site, were synthesized by solid-phase method. As a result, we supposed the carboxyl group of Asp^{B7} was essential for the eliciting a sweet taste.An analog [Abu(L-2-aminobutylic acid)^{B7}]monellin was devoide of any sweetness. Here, we compared chemical shift and NOE information of native monellin and those of [Abu^{B7}]monellin,and prove this tasteless originates from the disappearance of the carboxyl group of Asp^{B7},not from the three dimentional structural changes for the replacement.

【序論】

モネリンは1972年に西アフリカ原産のつる植物*Dioscoreophyllum cumminsii*の果実から単離された呈味物質であり、ショ糖と比べ重量比で数千倍の甘味を有する[1]。その一次構造は、アミノ酸44残基からなるA鎖と50残基からなるB鎖が非共有結合で結合したポリペプチドであり[2]、X線結晶構造解析によりその3次構造は決定されている[3]。我々の固相合成を用いた類縁体による研究から、Asp^{B7}のカルボキシル基が甘味レセプターとの親和力に重要な役割を持つと推測した。そこでAsp^{B7}の側鎖のカルボキシル基をメチル基にしたAbu(L-2-aminobutylic acid)^{B7}モネリンを合成したところ（Fig.2）、予想通り無味であった。この甘味の消失が単にカルボキシル基の消失による為であり、アミノ酸置換による分子全体の高次構造変化の為ではない事を確認できれば、Asp^{B7}が甘味発現のための活性残基であることが証明できる。そこで両者のプロトンNMRの帰属を行い、その化学シフト、NOE情報の比較をおこなった。

【実験】

天然型及びAbu(L-2-aminobutylic acid)^{B7}モネリンはFmoc法を用いた既知の方法により合成した。軽水中及び重水中サンプル濃度は、各々1.5mMとし、pHは3.5、測定温度は300Kとした。NMRはBruker社製AMX600を用い、DQF-COSY、NOESY(150ms)、TOCSY(40ms, 70ms)を測定した。

キーワード：モネリン、固相合成、活性残基、Asp^{B7}、Abu(L-2-aminobutylic acid)^{B7}

○みずこし としみ、こうむら まさのり、すずき えいいちろう、ありよし やすお

【結果と考察】

アミドプロトンとα-プロトンの化学シフト比較

天然型及びAbu^{B7}モネリンの化学シフトを2D ^{1}H-NMRにより帰属し、両者の比較を行ったところ、アミノ酸置換を行った残基周辺以外では大きな化学シフトの変化はなかった。

隣接残基間、A鎖B鎖間のNOE情報、重水中でのアミドプロトン交換速度比較

NOE情報から、両モネリンの二次構造（5本のβ-ストランド、α-ヘリックス）の残基は等しく、結晶構造からの二次構造とほぼ一致した。またβ-シート間NOE、A鎖（のβ-シート）とB鎖（のα-ヘリックス）間のNOE情報も両モネリンで一致し、アミドプロトン交換速度実験結果も同様な結果を得た（Fig.3）。

以上の結果より、天然型モネリンと、そのAsp^{B7}をAbu^{B7}に置換して甘味が全く消失したAbu^{B7}モネリンでは、NMRによる構造研究からその全体構造はほぼ一致している事が示された。この事からAbu^{B7}モネリンの甘味の消失は、単にAsp^{B7}のカルボキシル基の消失の為であり、即ちAsp^{B7}が甘味活性発現に必須である事が証明された。

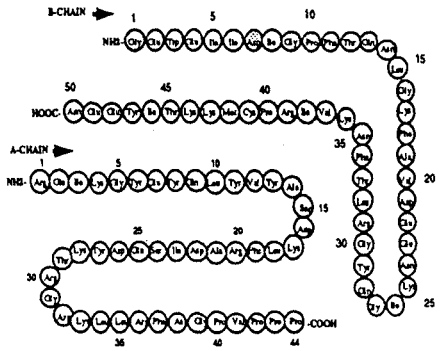


Fig.1 Primary Structure of Monellin

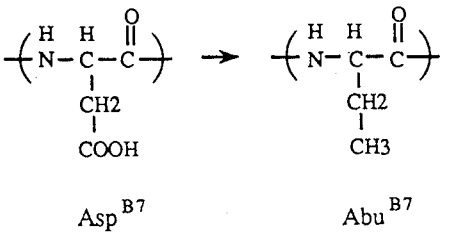


Fig.2 Amino acid Replacement

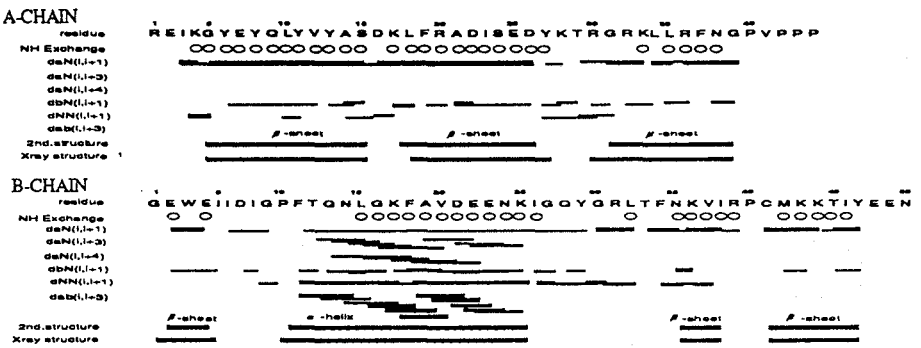


Fig.3 Summary of the NOE connectivities of Native Monellin

(References)

1) J. A. Morris, R. H. Cagan, Biochim. Biophys. Acta, 261, 114 (1972)

2) G. Fank, H. Zuber, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 585 (1976)

3) C. Ogata, M. Hatada, G. Tomlinson, W. -C. Shin, S. -H. Kim, Nature, 328, 739 (1987)

P96

プリンリプレッサーのDNA結合ドメインの高次構造

(横浜市大・大学院総合理[1]、蛋工研[2]、神奈川大・理[3]、電通大・電子物性[4]、Oregon Health Sciences Univ.[5])
○長土居有隆[1]、守川壮一[2]、中村春木[2]、江成政人[1]、小林邦子[1]、山本晴彦[3]、三瓶嚴一[4]、溝渕潔[4]、Maria A. Schumacher[5]、Richard G. Brennan[5]、西村善文[1]

Solution Structure of the DNA Binding Domain of Purine Repressor

○ Aritaka Nagadoi [1], Souichi Morikawa [2], Haruki Nakamura [2], Masato Enari [1], Kuniko Kobayashi [1], Haruhiko Yamamoto [3], Genichi Sampei [4], Kiyoshi Mizobuchi [4], Maria A.Schumacher [5], Richard G. Brennan [5], Yoshifumi Nishimura [1]

1. Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Seto, Kanazawa-ku, Yokohama, 236 Japan 2. Protein Engineering Research Institute, Furuedai, Suita, Osaka, 565 Japan 3. Faculty of Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, 251-19 Japan 4. Department of Applied Physics & Chemistry, The University of Electro-Communications, 1-5-1 Chofugaoka, Chofu-Shi, Tokyo, 182 Japan 5. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Health Sciences University, Portland, OR 97201-3098, U.S.A.

The purine repressor (PurR) consists of two functional domains : an N-terminal DNA-binding domain and a C-terminal corepressor-binding domain. Recently, the structure of PurR-corepressor-operator ternary complex was determined by X-ray crystallography. In the complex the DNA-binding domain, consisting of 56 amino acids, was composed of four helices. Here, we have determined the solution structure of the DNA-binding domain in its DNA free state by NMR. It consists of three helices and the fourth helix region is disordered. The architecture of the first three helices of its DNA free state is very similar to that of its DNA-bound form. The fourth helix is induced by the specific DNA binding and by the dimerization of PurR which is provided by the corepressor-binding domain.

[序] プリンリプレッサー（PurR）は大腸菌のプリン生合成に関与する１３個の遺伝子の発現を制御している。PurRは３４１アミノ酸残基からなるDNA結合タンパク質であり、そのDNA結合能はコリプレッサーであるヒポキサンチンあるいはグアニンの結合によって活性化される。PurRはN末端に小さなDNA結合ドメイン（DBD）とC末端に大きなコリプレッサー結合／二量化ドメイン（CBD）を持っている。最近、PurR二量体・特異的DNA・ヒポキサンチンの複合体の構造がX線で決定された（１）。複合体中のDNA結合ドメインは４本のα-ヘリックスを持ち、１番目と２番目のヘリックスはHTH構造をとってDNAの大きな溝に結合していた。さらに、４番目のヘリックスがDNAの小さな溝で特異的に塩基を認識していた。

キーワード：プリンリプレッサー、ＤＮＡ結合ドメイン、ＮＭＲ、高次構造

ながどいありたか、もりかわそういち、なかむらはるき、えなりまさと、こばやしくにこ、やまもとはるひこ、さんぺいげんいち、みぞぶちきよし、
まりあしゅーまっは、りちゃーどぶれなん、にしむらよしふみ

今回、PurRのDBDのDNAに結合していない状態の構造を明らかにするために、N末端５６アミノ酸残基からなるPurRN56の立体構造をNMRにより決定し、複合体中の構造と比較した結果を報告する。

［実験］ PurRN56をT7プロモーターの制御下で大腸菌内で大量発現させ、CM cellulose column (CM, Whatman)とSuperdex 75pg column (Pharmacia)を用いて精製した。NMRの測定は10mM KPB pH6.3，200mM KCl，0.5mM NaN_3の緩衝液中で、Bruker AMX500, DMX600 NMR分光計により温度300Kで行った。DQF-COSY，TOCSY（τ m = 100ms），NOESY（τ m = 50、150ms）による各２次元NMRスペクトルを90% H_2O / 10% D_2O と99% D_2O 中でそれぞれ測定してシグナルの帰属を行った。さらに、^{15}NでラベルしたPurR-DBDを用いて、HSQC，NOESY-HMQC，TOCSY-HMQCを測定した。NOESYのピーク強度は強、中、弱の三段階に分け、それぞれに対応する距離を３、４、５Åとして上限値を与えた。また、２つの水素原子のファンデルワールス半径の和を２Åとして下限値とした。この距離制限をタンパク質の立体構造計算プログラムEMBOSSに入力し、Distance Geometry の計算を行った。

［結果 と考察 ］ 距離情報として得られたNOEの数はトータルで４１２個で、その内訳は１次配列上の隣接する残基間のNOEが１８７個、２残基以上５残基以内の中位のNOEが１７４個、６残基以上隔てた間で観測されたNOEが５１個であった。Distance Geometry による構造計算の結果、収束した２０個の構造を得ることができた。主鎖原子について、そのRMSDは0.84±0.28Åで、全ての重原子については1.53±0.45Åであった。フリーのDNA結合ドメインは３本のヘリックスから成ることがわかった（Ile 4-Ala 11，Thr 15-Asn 23，Glu 30-Leu 42）（Figure 1）。複合体中と同じく１番目と２番目のヘリックスはHTH構造を取っていたが４番目のヘリックスの領域（Tyr 45-Val 56）はフリーの状態で完全に不規則な構造であった。１番目から３番目のヘリックスの領域の立体構造は複合体中とフリーの状態で有為な差はなかった（主鎖原子についてRMSDは1.03Å）。今回の解析から４番目のヘリックスは特異的なDNAとの結合によって誘起されることがわかった。PurRはコリプレッサーと結合して二量体で特異的なDNAを認識し、４番目のヘリックスの領域はDNA上でお互いに相互作用をしている。DNAと特異的に結合するときには４番目のヘリックスの形成が誘起され、このヘリックスのお互いの相互作用によって協同的にDNAを認識していることが示唆された。

REFERENCES 1. Schumacher, M. A., Choi, K. Y., Zalkin, H. and Brennan, R.G. (1994) *Science*, 266 , 763-770

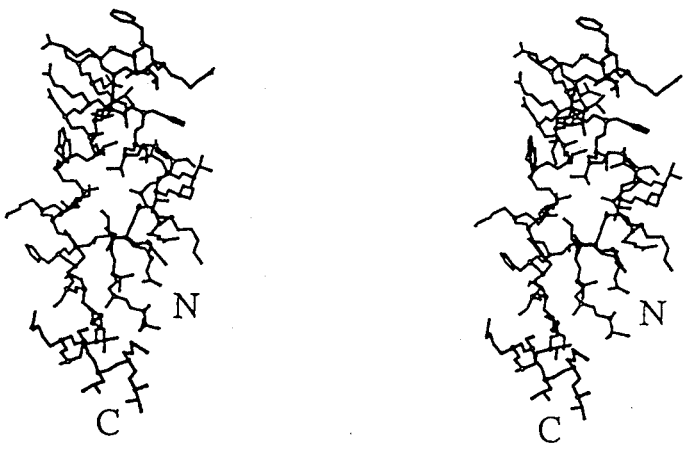


Figure 1. The structure of the PurR DNA-binding domain

P97　　がん原遺伝子産物ｃ－ＭｙｂとＤＮＡとの複合体の動的構造

（横浜市大・大学院総合理[1]，理研・筑波ＬＳ[2]，都臨床研[3]）
○佐々木元子[1]，緒方一博[1,2]，畠中秀樹[3]，中沢賢一[1]，黒田仁志[1]，
皿井明倫[2]，石井俊輔[2]，西村善文[1]

Backbone dynamics of a specific DNA complex of the DNA-binding domain of a protooncogene product, c-Myb

([1]Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, [2]Tsukuba Life Science Center･Institute of Physical and Chemical Research, [3]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)　○ Motoko Sasaki[1], Kazuhiro Ogata[1,2], Hideki Hatanaka[3], Kenichi Nakazawa[1], Hitosi Kuroda[1], Akinori Sarai[2], Shunsuke Ishii[2], Yoshifumi Nishimura[1]

A protooncogene product, c-Myb, which is a transcription regulator in the myeloid lineage, can bind specifically to DNA with the consensus sequence of AACxG. The DNA-binding domain of c-Myb consists of three imperfect tandem repeats of 52 residues, referred as R1, R2, and R3 from N-terminus. R2R3 is known to be essential for the specific DNA binding of c-Myb. The solution structures of the free and DNA bound forms of R2R3 have been well established. Here, we have examined the backbone dynamics of R2R3 in its free and DNA bound states. The backbone of R2 region is much more flexible than that of R3 in the free state, however, upon the complexation with DNA, the flexibility of R2 region is greatly supressed.

［はじめに］ｃ－*ｍｙｂ*遺伝子はがん原遺伝子の一種である．その遺伝子産物（ｃ－Ｍｙｂタンパク質）は核内タンパク質で，特定の配列を持つＤＮＡに特異的に結合し，転写を調節する．ｃ－Ｍｙｂタンパク質は未分化の造血系細胞で発現しており，分化に伴いその発現がなくなることから，造血系細胞の未分化状態の維持に関与している．

ｃ－Ｍｙｂタンパク質は６３６個のアミノ酸からなり，Ｎ端側にＤＮＡ結合領域を，

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

ささきもとこ，おがたかずひろ，はたなかひでき，なかざわけんいち，くろだひとし，
さらいあきのり，いしいしゅんすけ，にしむらよしふみ

C端側に転写調節領域を持っている．ＤＮＡ結合領域は５２アミノ酸残基からなる配列の良く類似した３個のリピートで構成されている（Ｒ１，Ｒ２，Ｒ３）．各リピートには３個のトリプトファンが一定の間隔をおいて保存されている．

ｃ－Ｍｙｂタンパク質のＤＮＡ結合領域に関して，これまでの研究により次のことが明らかになっている．（１）各リピートの立体構造は互いに良く似ており，３本のヘリックスを持つ．この３本のヘリックスの立体的な配置は疎水的なコアにより維持されている[1,2]．（２）Ｒ２とＲ３の両方がＤＮＡの特異的認識に必要である．（３）フリーのときは　Ｒ２の領域が熱的に不安定で[4]，常温では構造的に揺らいでいる．そしてこの揺らぎは，Ｒ２領域の構造変化をＤＮＡとの複合体の形成のために必要としていることを示唆した[3]．特に，Ｒ２の疎水的なコアにはギャップが存在し，ＤＮＡとの複合体では，このギャップを埋めるようにトリプトファンの側鎖が変位していた．

［実験］Ｔ７プロモーター支配下にＲ２Ｒ３をコードする遺伝子を組み込み，ＢＬ２１細胞で発現させ，$^{15}NH_4Cl$を唯一の窒素源とした最少培地で培養を行ない精製した．ＤＮＡは合成器で合成し，精製した．ＮＭＲ測定は２９０Ｋ（Ｒ２Ｒ３）・３１０Ｋ（Complex），ｐＨ６.８，サンプル濃度　２.３ｍＭで行ない^{15}Ｎ核T_1，T_2，ＮＯＥを測定し，動的構造を解析した．

［結果・考察］Ｒ２Ｒ３の^{15}Ｎ核のT_1，T_2を調べたところ，T_1はＲ２とＲ３では差がないのに対し，T_2ではＲ２がＲ３より全体的に小さい値を示した．このことからＲ２にマイクロ秒～ミリ秒オーダーの構造的揺らぎがあると確認できた．一方，^{15}Ｎ－^{1}Ｈ間のＮＯＥの値からナノ秒以下の速い運動はＲ２とＲ３の間で大きな差は見られなかった．Ｒ２がＲ３より熱的に不安定な要因の１つに，第１ヘリックスと第３ヘリックスの交差部位での残基の疎水性の程度の差が考えられていた．熱安定化したＲ２の点突然変位体Ｒ２Ｒ３Ｖ１０３Ｌでは，そのＲ２の疎水性コアの中心に位置する残基側鎖そ疎水性を増加させている．このＲ２Ｒ３Ｖ１０３Ｌの^{15}Ｎ核のT_2はＲ２で大きくなっており，マイクロ秒～ミリ秒オーダーの構造変換を伴う揺らぎがＲ２で抑えられていた．このことは変異体でＲ２の熱安定性が増大したという結果と対応する．

また，ＤＮＡとの複合体での動的構造は，^{15}Ｎ－^{1}Ｈ間のＮＯＥの測定から，ＤＮＡ非存在下では各リピートのＮ端，Ｃ端ループで速い揺らぎが見られたが，複合体を形成するとこのループはＤＮＡのリン酸骨格と結合することにより速い揺らぎが抑えられていた．また，ＤＮＡ非存在下でＲ２に見られた^{15}Ｎ核のT_2の減少はＤＮＡとの複合体ではなくなり，Ｒ２とＲ３の間でT_2の明らかな差はなくなった．つまり，構造変換を伴う（マイクロ秒～ミリ秒オーダーの）揺らぎはＤＮＡとの複合体形成によって抑えられた．

［文献］

(1)Ogata, K. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89 , 6428-6432 (1992).

(2)Ogata, K. et al., Nature Struc.Biol., 2 , 309-320 (1995).

(3)Ogata, K. et al., Cell, 79 , 639-648 (1994).

(4)Sarai, A. et al., Biochemistry, 32 ,7759-7764(1993).

P98 NMRによるショウジョウバエSxl蛋白質のRNA結合ドメインとRNA分子との相互作用の解析

○武藤 裕[1]、井上 真[1]、木川隆則[1]、武田佳宏[1]、坂本 博[2]、志村令郎[3]、横山茂之[1] ([1]東大・理、[2]神戸大・理、[3]京大・理)

NMR Analysis of the interaction between an RNA binding domain of the Sxl protein and target RNA molecules

Yutaka Muto[1], Makoto Inoue[1], Takanori Kigawa[1], Yoshihiro Takeda[1], Hiroshi Saskamoto[2], Yoshiro Shimura[3] & Shigeyuki Yokoyama[1]

[1]Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo, [2]Faculty of Science, Kobe University, [3]Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University

The *Sex-lethal*(*Sxl*) gene product is a crucial molecule to accomplish the sexeual differentiation of *Drosophila melanogaster* and is involved in alternative splicing of its own pre-mRNA and that of the *tra* gene. The Sxl protein binds RNAwith two tandemly-linked RNA-binding domains (RBDs) of 90-100 amino acid residues. It was suggested that the Sxl preoteins bind the RNA molecule of GUUUUUUUUCUAGUG. In order to identify the NOEs between RBD II and the RNA molecule, we synthesized five RNA sequences containing one deoxythymidine instead of uridine, for example, GUUUUUUUdTCUAGUG. By utilizing these RNA molecules, we could determine the important amino acid residues in RBD II involving the interaction with RNA molecules.

【序】 ショウジョウバエのSxl蛋白質は、自分自身のmRNA前駆体およびtra mRNA前駆体の性特異的なスプライシングを調節し、体細胞の性分化を決定する．Sxl蛋白質は、RNA結合蛋白質であり、96アミノ酸残基からなるRNA結合ドメインをタンデムに二つ持っている．Sxl蛋白質のRNA結合ドメイン(RBD)は、ポリピリミジンを含む(GUUUUUUUUCUAGUG)というRNA分子に結合することがわれわれによって明らかにされている．われわれは，二番目のRNA結合ドメイ(RBD II)において、RNAと直接相互作用しているアミノ酸残基を同定するため，NOEの情報の同定することを試みた．この場合問題となるのは、ポリピリミジンを含む(GUUUUUUUUCUAGUG)というRNA分子の配列である．そこでこのRNA分子のウリジン残基を部位特異的にチミジンに置換したRNA分子を合成し、二番目のRNA結合ドメインとの相互作用を解析した．

【材料および方法】T7 RNA polymeraseを利用した発現系により，IPTGによるinductionによって蛋白質の大量発現をおこなった．通常のプロトン測定のための試料は、LB培地で培養したものを用いた．また、ユニフォームに^{15}N,^{13}C標識をした試料の作成には、最小培地を用い、唯一の窒素源、炭素源として$^{15}NH_4Cl$,および [U-^{13}C]グルコースを用いた．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(10 mMシュウ酸ナトリウム緩衝液 pH6.0)へと置換した．RNA分子の合成は、合成機による化学合成によって作成した．分子中にdTを含む核酸配列は、RNAのモノマーユニットとしてdT-amidite ユニットを用いて、合成をおこなった．

Sxl蛋白質　合成RNA　多次元NMR　RNA結合蛋白質

むとう ゆたか、いのうえ まこと、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

【結果および考察】RBDIIは、いままでのNMRによる構造解析から４本のβストランドからなるβシート構造をもち、この部分がRNA分子との認識に関わっていることがわかっている．RNA分子(GUUUUUUUUCUAGUG) 3 mM,RBDII 1 mMの共存下でNOESYの測定を行ったところウリジンの5位、6位のプロトンからこのβシート上を構成する一番目のβストランドにあるY16,T18,二番目のβストランド部分のあるL45,および三番目のβストランドにあるV56,F58などの残基との間にNOEを観測することができた．また、AあるいはGの８位のリングプロトンからF58のリングプロトンにNOEが生じていることがわかった.しかし、このRNA配列は、ウリジンを多く含むためシグナルの重なりが激しく、さらに、シングルストランドのRNA配列のため、このままではシグナルの帰属を行いNOEの同定を行うことが困難である．そこで配列中の2,6,8,10,14位のウリジンを一残基づつチミジンに置換した核酸配列を合成して、同様なNOESYの測定を行った．RBD分子は、シングルストランドのDNA配列にも結合する性質をもつことが知られている．さらにd(GTTTTTTTTCTAGTG)を加えた場合にもRBDIIと同様な相互作用を行うことから、UをTに置換した場合の、相互作用への影響は小さいと考えられる．この置換の利点は、Tの6位プロトンや5位メチルプロトンからのNOE情報を選択的に抽出できることと、デオキシ体を用いているために、一残基後ろのヌクレオチドのリングプロトンの同定を2′の位置のプロトンに生じているNOEから同定することができる二点である．Fig. 1にGUUUUUUUUCUAGUGとGUUUUUUUdTCUAGUGを加えた場合のスペクトルを比較してある．ここで示したのは、UおよびTの6位のプロトンとF58のリングプロトンへのNOEが現れる領域を示している．GUUUUTUUUCUAGUGのdTの6位プロトンは、Uの6位プロトンとは、異なる化学シフトをもつため、NOEを明瞭に同定することができるのがわかる．このようなNOEの測定からAG配列の前後にあるUは、RBDIIによって認識されていないこと、U6は、RBDIIのF58の近傍に存在すること．また、U2は、４本目のβストランドの近傍に存在していることがわかった．

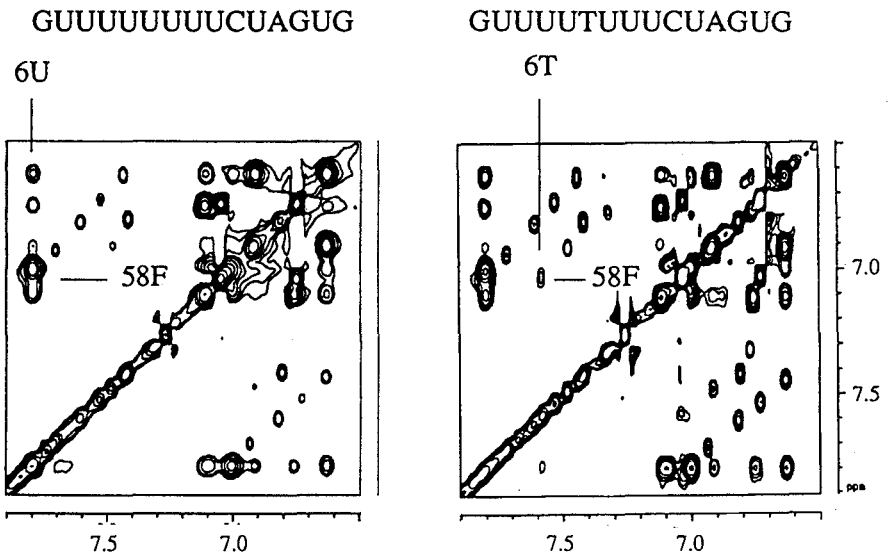


Figure 1. NOESY Spectra of the RBD II and RNA colecules

P99

負の転写調節因子 H-NS の欠損変異体の溶液構造と相互作用

○銀羽 洋行[1]、神藤 平三郎[1]、佐久間 千勢子[1]、上口 智治[2]、
水野　猛[2]、中村 春木[3]、久保庭　均[4]、山崎 俊正[5]
（東京薬大[1]、名大　農[2]、BERI[3]、中外製薬[4]、農水生物研[5]）

Solution structure of deletion mutants of negative transcription factor H-NS and their interaction with DNA

○H. Ginba[1], H. Shindo[1], C. Sakuma[1], C. Ueguchi[2], T. Mizuno[2], H. Nakamura[3], H. Kuboniwa[4], T. Yamazaki[5]
[1] Tokyo University of Pharmacy and Life Science, [2] Nagoya Univ., [3] Moleculer Bio-Engeneering Research Institute (BERI), [4] Chugai Pharmaceutical Co.Ltd., [5] National Institute of agrobiological Resources

H-NS is generally believed to function as a general negative transcription regulator as well as a major component in nucleoid formation. It is also reported to have high affinity for bent DNA. Deletion mutant of H-NS, HNS68C(70-137), and trypsin-digested fragment, HNS47C(91-137), were obtained. We measured hetero-nuclear multi-dimensional NMR, and discussed the three-dimensional structure of HNS68C and its binding site to DNA. We will also present the 3D-structure of HNS47C previously reported.

H-NS は大腸菌内に比較的豊富に存在するアミノ酸 137 残基よりなる中性のヒストン様蛋白質である．この蛋白質は今まで原核生物の核様体の形成に関与すると考えられていたが，最近，転写調節を行うことが明らかにされ注目を集めている．また，この蛋白質は湾曲した DNA に対し高い親和性を示すことから，新しい DNA 結合モチーフを提供する可能性があり，その高次構造に興味がもたれている．

演者らは，NMR によって H-NS の構造解析を行ってきたが，H-NS の多量体形成のため，NMR の解析は困難であった．そこで H-NS の断片化，および欠失変異体の構築を試みた．そのうち，部分消化によって得られた C 端側 47 残基の断片（HNS47C）の立体構造については，既に前回の本討論会で発表した[1]．大量発現系より得られた C 端側 68 残基の欠失変異体（HNS68C）について，その溶液構造および HNS68C-DNA 複合体の NMR スペクトルの解析から H-NS の DNA との結合部位についても検討した．また，詳細な構造計算に基づいた HNS47C の構造についても合せて言及する．

キーワード：H-NS，NMR，欠失変異体，立体構造，H-NS-DNA 複合体

○ぎんば ひろゆき，しんどう へいさぶろう，さくま ちせこ，うえぐち ちはる，
みずの たけし，なかむら はるき，くぼにわ ひとし，やまざき としまさ

＜試料および実験＞HNS47C に関しては，大量発現より得られた H-NS をトリプシンで部分消化後，Heparin-Sepharose カラムを用いて単離した．HNS68C に関しては，hns の欠失断片をベクター pT7-7 に挿入し，BL21(DE-3) に transform した．この大量発現系を用い ^{15}N 均一標識したものおよび ^{15}N，^{13}C 均一二重標識した HNS68C を精製単離した．HNS68C と DNA との複合体には，DNA として 17mer：CAAAAATATATAAAAAC・GTTTTTATATATTTTTG を用いた．スペクトルの測定には，HNS47C では日本電子製 GX-500 を，HNS68C では Brucker 製 DMX750 および AM-500 を用いた．構造計算はディスタンスジオメトリープログラム EMBOSS を用いて行った．

＜結果および考察＞HNS47C に関しては，DQF-COSY および NOESY スペクトルに基づいて，常法に従い，^{1}H シグナルの連鎖帰属を行い，257 個の NOE ピークを帰属した．NOE 強度から得られる距離情報に基づき，EMBOSS を用いて構造計算を行い，HNS47C の立体構造を決定した．この構造は，N 端側より逆平行 β シート，ループ，α-helix，ループ，3_{10}-helix よりなっていることがわかった．

DNA に対して天然 H-NS と同程度の親和性を有する HNS68C に関して，^{13}C，^{15}N，で均一にラベルし，異核多次元 NMR を用いて主鎖プロトンスペクトルの帰属を行った．また，DNA との結合部位を明かにするために，HNS68C および HNS68C-DNA 複合体の ^{15}N-^{1}H HMQC スペクトルを測定し，複合体形成によって誘起されるアミドプロトンおよびアミド ^{15}N の化学シフト変化を調べた結果を図 1 に示す．ここで，シフトの大きさは棒グラフで示され，白ぬきの丸は消失または大きな化学シフトの変化を示す．この図より明らかなように Glu102 と Thr108 ～ Lys120 領域のピークが大きなシフトを示した．特にループ領域内に帰属されるピークの殆どが大きなシフトを示した．この結果は逆平行 β シートとα-helix の間のループとその隣接領域が DNA を認識していることを示し，水野らの部位特異的変異体を用いた実験結果を支持した．現在，HNS68C の立体構造解析をすすめている．

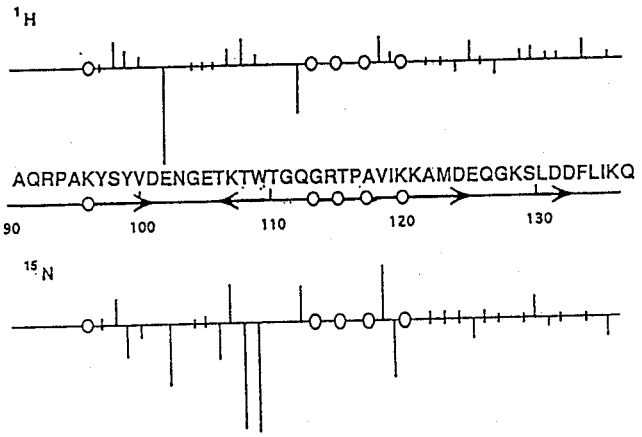


図1 :Induced chemical shifts of amide ^{1}H and ^{15}N of HNS68C by complex formation with DNA.

1） H.Shindo, et al. (1994) FEBS Lett. 360 , 125-131

P100　デストリンの立体構造決定

（都臨床研）○畠中秀樹、小椋賢治、森山賢治、市川さおり、矢原一郎、稲垣冬彦

Tertiary Structure Determination of Destrin

○Hideki Hatanaka, Kenji Ogura, Kenji Moriyama, Saori Ichikawa, Ichiro Yahara and Fuyuhiko Inagaki
The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Destrin is an actin binding protein with a molecular weight of 20K, and a member of cofilin family. We determined the tertiary structure of destrin, using triple-resonance 3D NMR techniques and several laboratory-made software tools for spectral analysis. The structure explains clearly the calcium-independent phosphorylation-dependent phosphoinositide-competitive actin-binding, and will propose a basis for undestanding the pH-dependent filament-severing and the nuclear localization signal recognition. Here we also report a few of our software tools, including HyperDry, a hyperbolic solvent signal dryer, and ShoPP, a shoulder/peak picker.

【序】　デストリンはアクチン結合タンパク質コフィリンのファミリーの一員である。pH 依存的にアクチン繊維を切断し、PIP_2と結合し、リン酸化による制御を受け、またストレス条件下でアクチンと共に核に移行するなど、細胞内情報伝達系と細胞骨格系を結ぶ鍵と考えられる分子である。

我々は、このファミリーの関わる諸現象のメカニズムを解明するため、デストリン（残基数 165、アミノ基末端での延長ペプチドも加えて分子量約２万）の立体構造決定を行った。

【方法】^{13}C,^{15}N ラベルしたデストリンを大腸菌で大量発現・精製した。10mM KH_2PO_4(pH7.0), 50mM KCl, 10mM DTT の存在下、28℃で、HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, CBCANH, HBHA(CO)NH, HN(CA)HA, C(CO)NH, HC(C)H-TOCSY, HC(C)H-COSY, N-edit NOESY-HSQC, C-edit NOESY-HSQC など十数種の三重共鳴３次元スペクトルを測定した。立体構造が全く未知であったことや、観測されないアミドプロトンが存在したことなどから、解析は困難を極めたが、解析過程全体にわたり様々なソフトウェアツールを作成するなどして、ようやく立体構造が得られた。構造計算は X-PLOR v3.1 の上で simulated annealing 法で行った。

【結果と考察】平均座標からの RMSD 値は 0.77Åであった。得られた構造（図）

キーワード：立体構造決定　三重共鳴３次元ＮＭＲ　アクチン結合タンパク質　ベースライン補正　ピークピッキング

はたなかひでき、おぐらけんじ、もりやまけんじ、いちかわさおり、やはらいちろう、いながきふゆひこ

は大きなβシートの両側に複数のαヘリックスが配置される形となった。アクチン結合への関与が推定されていた幾つかのセグメントは、協同して一つの面を構成していた。面に含まれる最長のヘリックスにはアクチン認識・PIP_2認識の双方に重要と考えられる2つのリジン残基が並んでいた。さらにその隣にはN端のリン酸化部位が接しており、脱リン酸化による複合体形成能の活性化機構が直接示されている。一方、核移行シグナルと推定されている配列はこの面の反対側に位置し、アクチンを伴って核に移行する様が容易に想像される。

その他、ゲルゾリンファミリーやプロフィリンとの構造比較、アクチンとの複合体のモデリング、アクチン繊維切断のメカニズムとその pH 依存性、核移行のストレス刺激との関連性、などについても述べる予定である。

【ソフトウェア】我々はタンパク質の立体構造解析過程全般にわたり、様々なソフトウェアツールを作成している。ここではそれらの中から、HyperDry と ShoPP を紹介する。HyperDry (Hyperbolic Solvent Signal Dryer)はベースライン補正プログラムの1つであるが、溶媒シグナルの長い裾を消去できるように補正関数として双曲線を用いており、4次元までのスペクトルに対し速くかつ非常に安定な補正が行える。一方 ShoPP (Shoulder/Peak Picker)は、既存のピークピッカーと異なり、ピークの肩も拾うことができる。重なりの大きいスペクトルからも多くの距離制限を抽出することができる。なお ShoPP の Varian version は現在唯一の Varian 用3次元ピークピッカーとしても利用可能である。

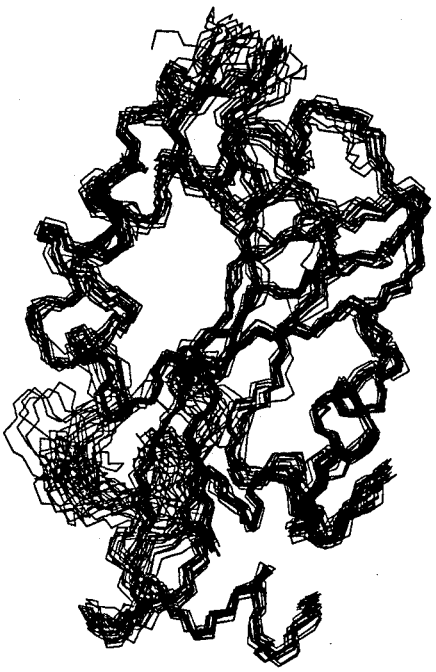


Figure.
Tertiary Structure of Destrin.

P101 同位体フィルター法を利用したGRB2のN端側SH3とSos由来ペプチドの相互作用の解析

（都臨床研[1]，第一製薬[2]）○小椋賢治[1]，寺沢宏明[1,2]，稲垣冬彦[1]

Isotope Filter Technique and Structural Analysis of N-terminal SH3 Domain of GRB2 complexed with Sos-derived Peptide

Kenji Ogura[1], Hiroaki Terasawa[1,2], and Fuyuhiko Inagaki[1]
[1]The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science
[2]Daiichi Pharmaceutical Co.,Ltd.

Three isotope filter methods (cos^2 filter, double tuned filter and half filter) were evaluated.The half filter method which used hyperbolic secant and iburp-2 inversion pulses gave a better result than other methods. We modified some 2D pulse sequences incorporating the half filter method, which were subsequently applied to analyze interaction between the $^{13}C/^{15}N$ uniformly enriched N-terminal SH3 domain of GRB2 and the synthesized Sos-derived proline-rich peptide. The intermolecular NOESY spectrum showed that there were more NOE signals than those of our previous report.

［序］同位体フィルター法は，^{13}C または^{15}NとのあいだにJ結合をもつ^{1}H由来の信号を消去し，それ以外の^{1}Hを選択的に観測するための手法である．この手法により，同位体ラベルされた分子とラベルされていない分子との間の相互作用を観測することが可能となる．今までに，いくつかの基本的な同位体フィルター法が提案されている．われわれはこれらの手法の比較，検討をおこない，パルス系列を最適化した．さらに，GRB2のN端側SH3ドメイン（NSH3，57残基）とSos由来ペプチドの複合体における分子間の相互作用を解析した．

［試料］Sos由来ペプチドVPPPVPPRRR（以下VPP）は固相法により合成した．$^{13}C/^{15}N$均一ラベル体NSH3とVPPの1:1複合体を作成し，90%H2O/10%D2O溶媒および99%D2O溶媒に溶解し，濃度2mMのNMR試料とした．NMR測定にはバリアンUNITYplus600およびUNITY500分光計，Z軸磁場勾配コイル付き(H/C/N)三重共鳴プローブを使用した．

［実験］これまでに発表されている主な同位体フィルター法にはcos^2 filter(1), double tuned filter(2), half filter(3,4)が挙げられる（図1）．これらのパルス系列による，NSH3+VPP複合体の重水溶媒試料の測定結果を図2に示す．cos^2 filterのfiltering効率は他の2つ

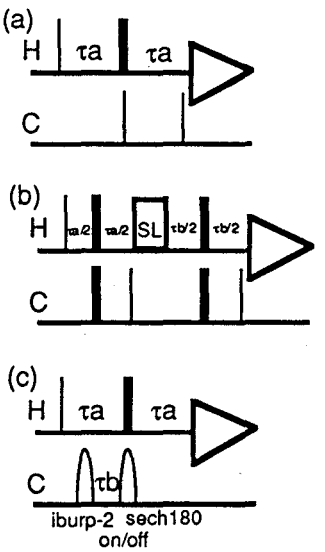


Fig.1 Isotope filter experiments. τa=1/2JCH (aliphatic), τb=1/2JCH (aromatic).
(a) cos^2 filter, (b) double tuned filter, (c) half filter.

同位体フィルター／GRB2／SH3／Sos

おぐらけんじ，てらさわひろあき，いながきふゆひこ

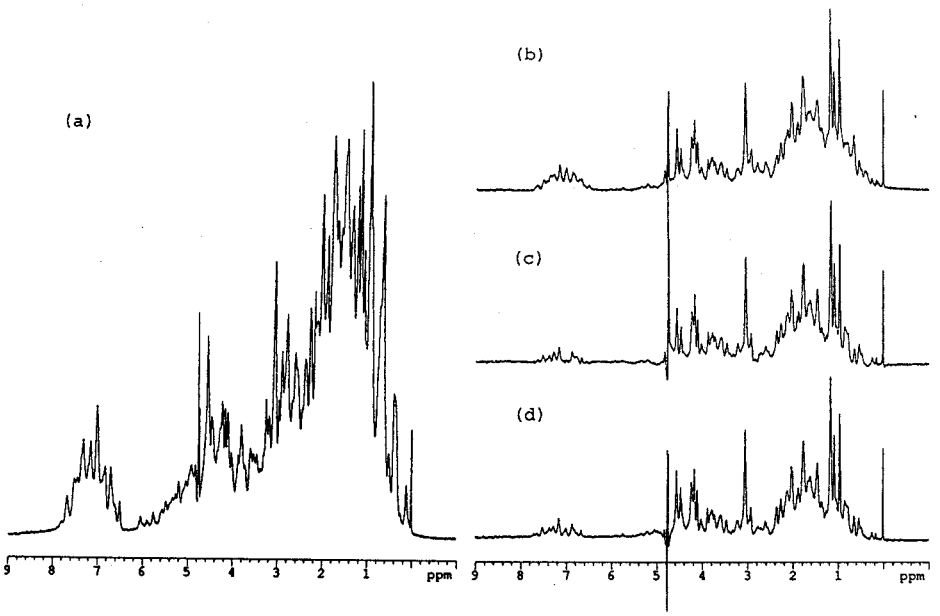


Fig.2 ($^{13}C/^{15}N$)NSH3+VPP/D2O 1D spectra; (a) normal, (b) cos^2 filter, (c) double tuned filter, (d) half filter.

の技法と比べて良くなかった．double tuned filterとhalf fiterではfiltering効率には差はなかった．ただし，double tuned filterは他の２つの技法と比べてパルス総数が多いため，望ましくない．今回，half fiterの効率が優れていた理由は，^{13}Cの全帯域180度パルスとして特性の優れたhyperbolic secant pulseを，またaromatic carbonの選択的180度パルスとしてiburp-2パルス系列を使用しているためである．

^{13}C half filterを組み込んだDQFCOSY（図３）およびTOCSYスペクトルを測定した．$^{13}C/^{15}N$ half filterを組み込んだ測定も同様におこなった．NOESYの場合は，VPP分子内NOEのみを選択的に検出するパルス系列（図４）およびNSH3とVPPの分子間NOEのみを選択的に検出するパルス系列[4]を使用し

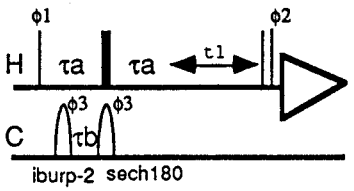


Fig.3 Pulse sequence of ^{13}C half filtered DQF COSY experiment. ϕ1=8(x),8(-x), ϕ2=2(x),2(y),2(-x),2(-y), ϕ3=x,-x, rec=2(-x),2(y),2(x),2(-y),2(x),2(-y),2(-x),2(y).

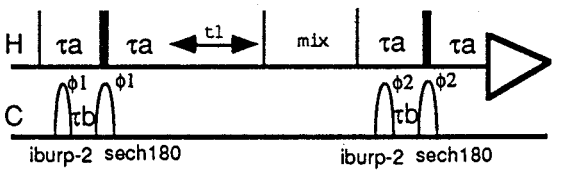


Fig.4 Pulse sequence of ^{13}C double half filtered intramolecular NOESY experiment. ϕ1=2(x),2(-x), ϕ2=x,-x.

た．^{13}C half filtered DQFCOSYおよびTOCSYスペクトルにより，VPPのスピン系を解析した（図５）．^{13}C double half filtered NOESY(intramolecular)スペクトルにより，VPPの連鎖帰属をおこなった．^{13}C

double half filtered NOESY(intermolecular)スペクトルにより，NSH3とVPP間のNOEを帰属した（図6）．以前のデータ[5]に加えて，新たな分子間NOE信号が帰属された．これらのNOEに基づくNSH3-VPP複合体の構造を図7に示す．

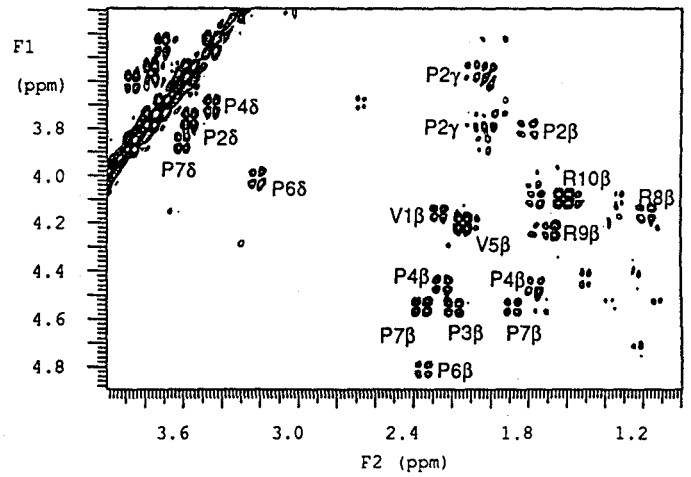


Fig.5 ^{13}C half filtered DQFCOSY spectrum of ($^{13}C/^{15}N$)NSH3+VPP/D_2O. Assignment of VPP spin system is shown.

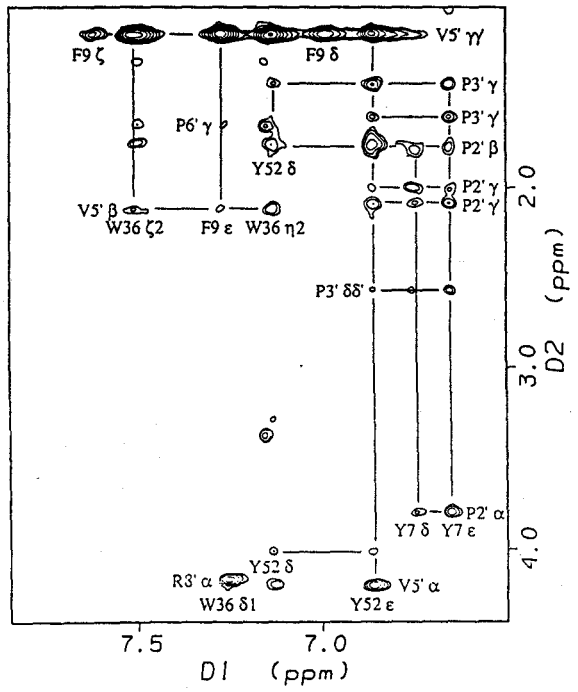


Fig.6 ^{13}C double half filtered intermolecular NOESY spectrum. Intermolecular NOE signals are shown.

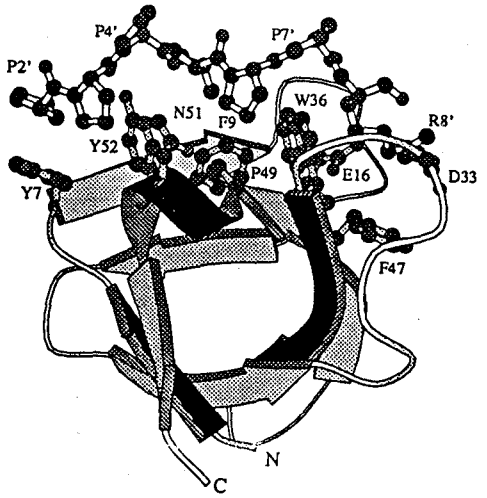


Fig.7 Schematic structure of NSH3 complexed with VPP.

［まとめ］種々のisotope filter法のうち，shaped pulseを併用したhalf filter法がもっともfiltering効率が良く，それに基づき各種２次元パルス系列が最適化された．分子間NOEを観測することにより，NSH3-VPP複合体構造の精密化がなされた．

［文献］

(1)M.Ikura et al., J.Am.Chem.Soc. 114,2433(1992).
(2)G.Gemmecker et al., J.Magn.Reson. 96,199(1992).
(3)G.Otting et al., J.Magn.Reson. 85,586(1989).
(4)R.H.A.Folmer et al., J.Biomol.NMR 5,427(1995).
(5)H.Terasawa et al., Nature Struct. Biol. 1,891(1994).

P102 クロコウジカビ非ペプシン型酸性プロテアーゼAの高次構造解析

（東大・理・生化[1]，現東京薬大・生命科学[2]，東大・生物工学セ[3]，
味の素・中研[4]，明治製菓・生科研[5]，工技院・生命研[6]，日本ブルカー[7]）
○小島正樹[1,2]，田之倉　優[3]，大竹亮子[4]，鈴木榮一郎[4]，浜谷　徹[5]，
河野敏明[5]，曽良達生[6]，M.Wälchli[7]，高橋健治[1,2]

Conformation Analysis of *Aspergillus niger* Non-Pepsin-Type Acid Proteinase A

Masaki Kojima[1,2], Masaru Tanokura[3], Ryoko Ootake[4], Ei-ichiro Suzuki[4], Toru Hamaya[5], Toshiaki Kono[5], Tatsuo Katsura[6], Markus Wälchli[7], and Kenji Takahashi[1,2]
[1]Faculty of Science, University of Tokyo, [2]Present Address:Faculty of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, [3]Biotechnology Research Center, University of Tokyo, [4]Central Research Laboratories, Ajinomoto Co.,Inc., [5]Bioscience Laboratories, Meiji Seika Kaisha,Ltd., [6]National Institute of Bioscience and Human Technology, [7]Bruker Japan Co.,Ltd.

Proteinase A secreted by the fungus *Aspergillus niger* var. *macrosporus* is a non-pepsin-type acid proteinase. It consists of two polypeptide chains, a light chain of 39 residues and a heavy chain of 173 residues. They are bound non-covalently to each other. In order study higher-order structure of the enzyme by NMR, the isotope-labelled samples were prepared and heteronuclear multi-dimensional NMR spectra were measured. In isotope-labelling, genetic method was not used. *A.niger* was grown directly in the culture media including stable isotope, and the labelled sample was purified from the culture filtrate. Distribution pattern of cross peaks in SQC spectra was identical with that in HMQC spectra measured using natural abundance, which suggests that the sample was labelled successfully. In each slice of 3D-NMR spectra, signals were observed separately. The assignments of these signals are now in progress.

【序】クロコウジカビ（*Aspergillus niger* var. *macrosporus*）が産生するプロテアーゼAは，一次構造や基質特異性などが，従来のペプシン型アスパラギン酸プロテアーゼとは異なる酸性プロテアーゼであり，一次構造上他の蛋白質と相同性が殆どない．1本鎖の前駆体として合成され，その後のプロセシングにより，軽鎖（39残基）と重鎖（173残基）の2本鎖が非共有結合的に結合した天然型（native form）となる．NMRによる高次構造解析を行うため本酵素を同位体標識し，多次元NMRの測定を行った．

現在 NMR 試料の安定同位体標識は，遺伝子工学の手法により大腸菌等の外来発現系を用いて行われる場合が多い．但しこの手法には以下の問題点がある．
1)プロテアーゼ等の加水分解酵素は宿主にとって有害であることが多く，発現量が少なかったり封入体を形成しやすい．この際 refolding 等により活性体を得る必要がある．2)外来の発現系を用いた場合，糖鎖付加やリン酸化等の翻訳後修飾が行われないことがあり，これらが活性に必須である場合問題となる．3)多くのプロテアーゼは前駆体として合成され，ペプチド鎖の切断を受けて活性型となるが，上記方法で前駆体の遺伝子を組み込んだ場合，正しく活性化が行われないことがある．

本酵素に関しては，大腸菌を用いた発現系が既に構築されているが，収率や活性化等上述の点において同位体標識を行うには不十分であった．また *Bacillus brevis* 等他の系においても同様であった．このため *A.niger* の菌体から直接（*in vivo*）同位体標識することを試み，種々の培地で菌体の培養条件と本酵素の収率を検討した．検討結果に基づき，プロテアーゼ A を同位体置換し，2重共鳴，3重共鳴多次元 NMR スペクトルを測定した．

【方法】*A.niger* の通常の培地を全て同位体標識することは不可能であった．また最少培地は不明

Aspergillus niger，非ペプシン型酸性プロテアーゼ，3D-NMR，同位体ラベル

こじままさき　たのくらまさる　おおたけりょうこ　すずきえいいちろう　はまやとおる
こうのとしあき　かつらたつお　まるくすべるひりー　たかはしけんじ

なため，生理的に考えられる種々の培地を検討した（硫安培地，カザミノ酸培地，硝安培地（アカパンカビ最少培地），クロレラ培地）．培養は30℃，220rpm で旋回培養機にて行った．収量を上げるため，培養を数段階に分け，前段階培養の一部を本培養の培地にシードした．培養液の経時変化を pH，活性測定，顕微鏡による菌体観察および抗体染色(Western Blotting)によりモニターし，最適の時期に bloth out した．培養液からの酵素精製は，ゲル濾過とイオン交換クロマトグラフィーを用いた．精製および培養液の活性測定は，培養液中に多量に存在するプロテアーゼ B（ペプシン型酵素）の影響を排除するため特異的阻害剤ペプスタチンを添加して行った．

同位体標識した試料の NMR 測定は Bruker AMX500および AMX600分光計を用い，pH4.6, 30℃で行った．一部の測定にはグラジエント分光法を用いて，溶媒シグナルを消去した．また測定後 SDS-PAGE を行い，自己分解が起こっていないことを確認した．3D スペクトルのフーリエ変換は，IRIS Indigo^{2}ワークステーション(SGI)上で Felix ソフトウェア(Biosym)を用いて行い，データ処理用のマクロは自作した．

【結果・考察】硫安培地では，菌体は生育したが，培養液中に酵素は検出されなかった．また硝安培地，カザミノ酸培地ではいずれも菌体の生育が悪く，培養途中でペレットを形成し以降の生育が阻害された．培地にグラスビーズを入れて胞子を砕きながら培養することにより，ペレット形成は阻止できたが，酵素は分泌されなかった．また菌体のプロトプラスト化後浸透圧破壊により，菌体内の蛋白質を調べたが，プロテアーゼ A およびその前駆体は発現されていなかった．以上から培地が無機物やアミノ酸のみから成り，蛋白性の抽出物（プロテアーゼの基質となりうるもの）が含まれていない場合，カビは生育するが，本酵素は産生も分泌もされないことがわかった（培地中に本酵素の阻害剤を加えて誘導を試みたが，結果は同じであった）．

そこで同位体標識した蛋白性抽出物を培地に用いて培養を行った．通常は酵母，麦芽等の抽出物あるいはその加水分解物が培地成分として用いられるが，本研究では同位体標識可能なクロレラを使用した．また培地として加水分解産物を用いることが多いが，プロテアーゼの分泌を促すため，むしろ加水分解は行わずにクロレラを物理的に破砕するに止めた．培養の結果，上清中にプロテアーゼ A が検出され，比活性が一致した．最終標品を大腸菌の発現系の場合と比較すると，培地中の窒素源（または炭素源）1g 当たり，1.5～2倍の収量が得られた．なお経時観察の結果，本酵素は培養中ある時期にのみ分泌され，その後速やかに失活ないしは分解されることが分ったが，このことは，本酵素がカビの生育時にある特定の役割を果たしていることを示唆している．

得られた標品を用いて，2重共鳴，3重共鳴 NMR スペクトル（NOESY-HMQC, TOCSY-HMQC, HN(CO)CA, HCACO 等）を測定した．HSQC スペクトル(Fig. 1)は，natural abundance による HMQC スペクトルと同一のシグナル分布を与え，正しく標識が行われたことが確認された．特に^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルにおいては，200個以上の N-H 交差ピークが観測された(Fig. 1)．また3D スペクトルにおいても各スライスに個々のシグナルが分離して観測され，異種核による展開が有効であることがわかった．現在シグナルの系統的帰属を進めている．

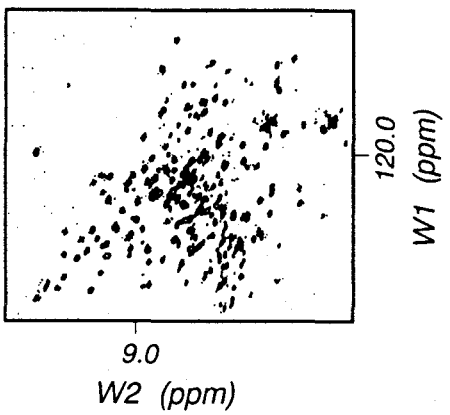


Fig. 1 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of Proteinase A

P103

^{1}H-NMRによる好熱性水素細菌由来チトクロームc552の構造解析

（第一製薬[1]　阪大・蛋白研[2]　農水省・生物資源研[3]　東大・農[4]）
○長谷川淳[1]　吉田卓也[2]　山崎俊正[3]　三本木至宏[4]　Yu Yihua[2]　児玉　徹[4]
山崎憲一[1]　伯水英夫[1]　京極好正[2]　小林祐次[2]

Structural analysis of cytochrome c552 from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* by ^{1}H-NMR

Jun Hasegawa[1]　Takuya Yoshida[2]　Toshimasa Yamazaki[3]　Yoshihiro Sambongi[4]　Yihua Yu[2]
Tohru Kodama[4]　Ken-ichi Yamazaki[1]　Hideo Hakusui[1]　Yoshimasa Kyogoku[2]　Yuji Kobayashi[2]

1. Daiichi Pharmaceutical Co.,Ltd.　2. Institute for Protein Research, Osaka University
3. National Institute of Agribiological Resources　4. Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo

Cytochrome c552 from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* is a small protein with c-type heme covalently attached to the polypeptide chain. It consists of 80 amino acid residues and its amino acid sequence closely resembles that of cytochrome c551 from *Pseudomonas aeruginosa*. However, cytochrome c552 is more stable to heat than cytochrome c551. In order to elucidate the relationship between the structure of cytochrome c552 and the high thermostability, we examined the solution structure of it by 1H-NMR spectroscopy. Sequence-specific assignments were obtained for almost all of the backbone protons and the side-chain protons. From a preliminary analysis of sequential and medium-range NOE patterns, it is shown that the four helices were identified in the regions which correspond to those of cytochrom c551. Furthermore, several NOEs observed between the heme and the polypeptide chain indicated that hydrophobic core, in which the heme was located, of cytochrome c552 was more tightly packed than that of cytochrome c551.

（緒言）

好熱性水素細菌の生産するチトクロームc552は80残基のアミノ酸よりなる蛋白質であり、緑膿菌由来のチトクロームc551と一次構造上約56%のアミノ酸が一致する[1]。チトクロームC551に関しては既にX線およびNMRで立体構造が決定されており[2]、チトクロームc552の立体構造もそれにかなり近いことが予想されている。しかしながら熱安定性に関しては、CDを用いたTm測定によって15℃以上の差があることが分かっており、チトクロームc552はチトクロームc551よりもかなり安定な蛋白質である[3]。この熱安定性の差異が立体構造上のどこに起因するのかを明らかにするために、1H-NMRによりチトクロームc552の立体構造解析を行った。

（実験）

好熱性水素細菌より得られたチトクロームc552を濃度2mM、pH4.8となるように調製して、軽水もしくは重水に溶解した後に、還元剤としてハイドロサルファイトナトリウムを加えアルゴンガスによるパージと脱気の操作を繰り返して完全に還元状態が保たれるようにした。測定温度は４５℃として、Bruker社製AMX-500およびARX-500を用いてDQF-COSY、NOESY(混合時間75msec、150msec)、TOCSY（混合時間30、60、90msec)の測定を行った。

1H-NMR　cytochrome　thermostability　heme

はせがわじゅん、よしだたくや、やまざきとしまさ、さんぼんぎよしひろ、よういーはー、
こだまとおる、やまざきけんいち、はくすいひでお、きょうごくよしまさ、こばやしゆうじ

（結果と考察）

チトクロームc551との相同性の高さからヘリックスリッチな蛋白質であることが予想されたが、シグナルはヘム鉄による効果で全体的に分散していて、分離のよいものであった。特に、特徴的なシフトを示すシグナルはチトクロームc551においても全く同様に観測されており、この点からも両者の高次構造が類似していることが予想された。ペプチドの各プロトンのシグナルの帰属はWuthrichらの配列特異的連鎖帰属法を用いて行った。現在までにほぼ全てのプロトンのシグナルを帰属することができ、近接残基間に観測されるNOEのパターンから二次構造についての情報を得ることができた。Fig.1に近接残基間に観測されるNOEをまとめたものを示す。おおよその位置として2-8,25-33,38-47,66-79の4ヶ所にαヘリックス構造が存在し、二次構造に関してはチトクロームc551と極めてよく似ていることが分かった。

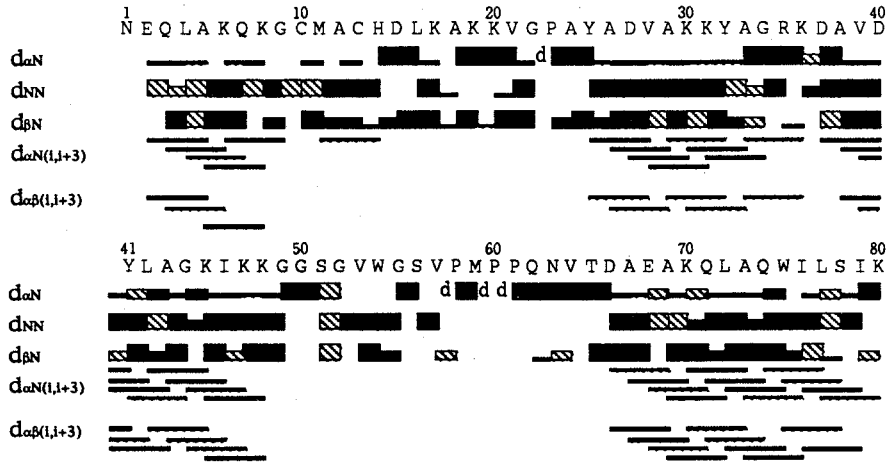


Fig.1 Summary of the sequential NOE connectivities of cytochrome c552

また、ヘムのプロトンも完全に帰属することができ、帰属の過程でヘムとペプチドとの間には多くのNOEが観測されていることが分かった。現在までにヘムとペプチド鎖との間に観測されるNOEのうちで明確に帰属されたものをFig.2に示した。ヘムの疎水性部分とペプチドの疎水性の側鎖との間に多くのNOEが観測されていることが分かる。この結果より、ヘム部分は蛋白質の中心部分で疎水性のコアを形成するのに大きな役割を果たしていることが分かる。これらのNOEはチトクロームc551においてもほぼ同様に観測されているNOEであり、ヘムをとりまくチトクロームc552のペプチド鎖のフォールディングのトポロジーはチトクロームc551とほぼ同様であることが予想される。一方で、Gln62のγプロトンとヘムのα位のメソプロトン間およびIle76のδプロトンとヘムのδ位のメソプロトンとの間に観測されているNOEはチトクロームc551との微妙な差異を示していた。これらの残基ではチトクロームc551では各々AsnとValであり、炭素原子一つだけ短い側鎖である。このため、チトクロームc551ではヘムとの間に小さなキャビティがあるが、チトクロームc552ではこれらの置換によってより密に充填されている可能性があると思われる。

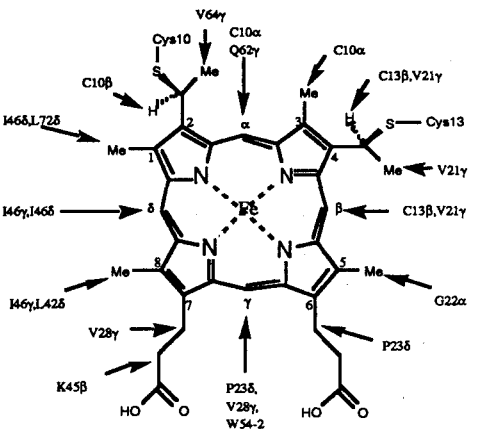


Fig.2 Schematic summary of the nuclear Overhauser effect(NOE) interactions between the heme and the peptide in cytochrome c552

今後は三次元構造解析を進めることにより、上述した側鎖のパッキング等についてより精密な解析を行って、熱安定性との関連について考察する予定である。

（参考文献）

1. Sanbongi, Y., Ihsii, M., Igarashi, Y., and Tohru Kodama, T., J. Bacteriol. 1989 171(1), p65-69
2. Matsuura, Y., Takano, T., and Dickerson, R.E., J.Mol.Biol. 1982 156, p389-409
3. Sanbongi Y., Igarashi, Y., and Tohru Kodama, T., Biochemistry 1989 28, p9574-9578

P104

^{1}H-NMRによる局所麻酔剤ジブカインとNa$^+$-チャンネル不活性化ゲートペプチドとの相互作用研究

（京大　薬）　○黒田　義弘、小川　雅弘、石川　順也、藤井　信孝、中川　照眞

Interaction between local anesthetic dibucaine and a Na$^+$-channel inactivating gate peptide as studied by ^{1}H-NMR spectroscopy

Faculty of Pharmaceutical Sciences,Kyoto University,Kyoto,606-01

○Yoshihiro Kuroda,Masahiro Ogawa,Junya Ishikawa,Nobutaka Fuji and Terumichi Nakagawa

Interaction between dibucaine and a peptide relating to the mechanism for Na$^+$-channel inactivation has been studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. We synthesized a model peptide including a cluster of hydrophobic amino acids (Ile-Phe-Met),the amino acid sequence of which corresponds to the linker of domains Ⅲ and Ⅳ of rat brain type Ⅱ A Na$^+$-channel (named MP-1),and the one in which Phe has been substituted by Gln (MP-2),and measured ^{1}H-NMR spectra in both phosphate buffer and phosphatidylserine liposomes. MP-1 caused lower frequency shift for the proton resonances of dibucaine quinoline ring than did MP-2.The low frequency shift accounts of π-stacking interaction between the quinoline ring of dibucaine and benzene ring of Phe. We concluded that dibucaine interacts with the Phe in the linker and prolongs the inactivated state of the Na$^+$-channel.

【目的】局所麻酔薬の分子レベルでの作用機序については不明な点が多い。最近、Na$^+$チャンネルの不活性化はドメインⅢとⅣとの間のリンカー部分の三つの疎水性アミノ酸Ile-Phe-MetがNa$^+$イオンの通過する孔を塞ぐことに帰因しているという報告が行われた。我々は局所麻酔薬がNa$^+$チャンネルの不活性化状態を修飾して安定化させるという事実に着目し、局所麻酔薬と不活性化ゲート部位のアミノ酸残基との間に何らかの相互作用があるかどうかを調べるため、これらの疎水性アミノ酸を含む１２残基のペプチドを合成し（Fig.1）、局所麻酔薬ジブカイン（Fig.2）との相互作用を検討した。

【方法】①ペプチド合成：Na$^+$チャンネルの不活性化機構に関与するアミノ酸１２残基 (rat brain Ⅱ A, Gly-1484-Lys-1495）のペプチド（MP-1）、およびそのうちのPhe-1489をGlnに置換したペプチド（MP-2）をFmoc固相法により合成した。これらのN末端をアセチル化した後、HPLCによって分離、精製し、大気圧イオン化法マススペクトロメーターで分子量の確認を行った。②サンプル調整：リン酸緩衝液中（pH 7.4, 310mOsm）および重水を用いて調製したリン酸緩衝液で超音波処理したPS (Phosphatidyl-

（キーワード）：^{1}H-NMR、ジブカイン、Na$^+$チャンネル、スタッキング相互作用

○くろだ　よしひろ、おがわ　まさひろ、いしかわ　じゅんや、ふじい　のぶたか、
なかがわ　てるみち

serine) リポソーム中 (15mM) で上記のペプチドを溶解させ、それらにジブカイン3mMを添加する前後における ^{1}H-NMRの測定をBruker AM-600で行った。

【結果】リン酸緩衝液中及びPSリポソーム中において、ペプチド添加によるジブカインの各プロトンの化学シフト変化を検討した（Fig.3）。リン酸緩衝液中では、MP-1を加えた時キノリン環およびブトキシ基のO-CH_2-のプロトンは高磁場シフトを、また、極性基側鎖のプロトンは低磁場シフトを示した。一方MP-2を加えた場合、極性基側鎖のプロトンについてのみ低磁場シフトが観測されキノリン環のプロトンは変化しなかった。PSリポソーム中ではキノリン環のプロトンはMP-1、MP-2のいずれの場合にも高磁場シフトを示したが、MP-1を加えたときの方がより大きくシフトした。以上より、キノリン環はMP-1のPheの芳香環と、また極性基側鎖はAspまたはGluのマイナスチャージと相互作用していると結論されるとともに、これらの相互作用は脂質存在下において強くなることが分かった。

【考察】局所麻酔薬は、Na^+チャンネルのIIIS6、IVS1の細胞質側周辺に存在する脂質の極性基部位に結合し、その芳香環はIIIS6-IVS1間のリンカー部分のアミノ酸、Phe-1489のフェニル基とスタッキング相互作用を、また同時に三級アミンはAsp-1487あるいはGlu-1492、Glu-1493の酸性アミノ酸と静電相互作用することによりNa^+チャンネルの不活性化状態を安定化させ、麻酔作用を発現すると考えられる。現在、ペプチドのC末端をアミドに変えて負電荷を無くしたもの（MP-1A、MP-2A）を合成してスタッキング相互作用および静電相互作用などをより詳細に検討中である。

MP-1

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Phe-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-OH

MP-2

Ac-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Glu-Glu-Gln-Lys-OH

Fig.1) Amino acid sequences of synthesized Peptides

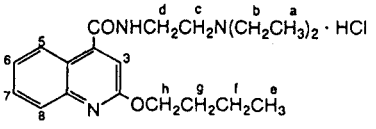


Fig.2) Chemical Structure of Dibucaine · HCl

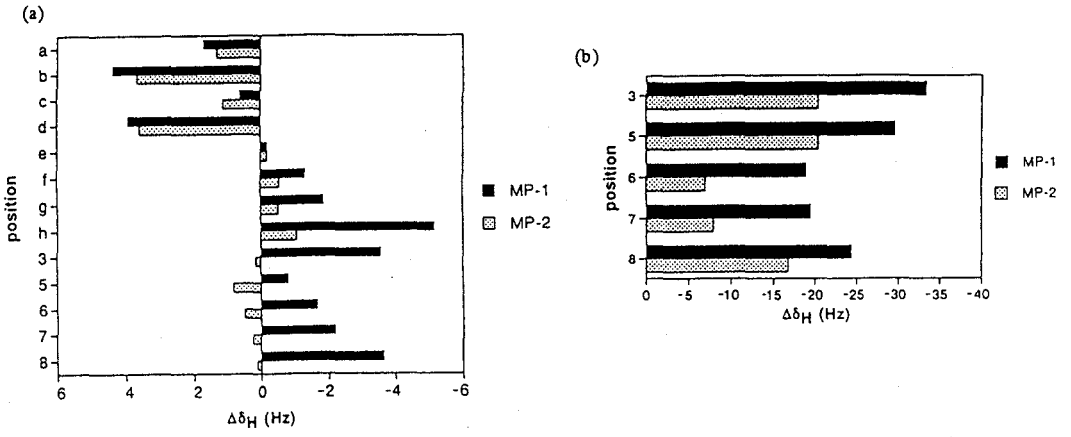


Fig.3)Changes in chemical shifts (in units of Hz at 600MHz) of dibucaine as a result of the interaction with MP-1 and MP-2:(a)in phosphate buffer, (b)in PS liposomes

P105 DNA2本鎖中にDNA·RNA二本鎖部位を含む二種の核酸の構造解析

○西崎 知子[1]、岩井 成憲[1]、大久保 忠恭[2,3]、大塚 栄子[1]
([1]北海道大学、薬、[2]蛋白工学研究所、[3]北陸先端大)

The solution structures of DNA duplexes containing a DNA · RNA hybrid region, d(GG)r(AGAU)d(GAC) ·d(GTCATCTCC) and d(GGAGA)r(UGAC) · d(GTCATCTCC).

○Tomoko Nishizaki,[1] Shigenori Iwai,[1] Tadayasu Ohkubo[2,3] and Eiko Ohtuska,[1]
[1]Hokkaido University, [2]Protein Engineering Research Institute, [3]Japan Advanced Institute of Science and Technology, Hokuriku

The solution structures of two DNA duplexes containing a DNA · RNA hybrid region at different sites, d(GG)r(AGAU)d(GAC) · d(GTCATCTCC), (DHD, where D and H represent the DNA and DNA·RNA hybrid segments, respectively), and d(GGAGA)r(UGAC) · d(GTCATCTCC) (DDH), were determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy to clarify the structural feature of the D-H and H-D junction. In the case of the D-H junction, where the ribonucleotide was linked to the 3'-end of DNA, the H2' and H2" signals of the deoxynucleotide overlapped completely, and the ribonucleotide had a H1'-H2' coupling constant larger than that of the normal C3'-endo sugar pucker. The dihedral angles, the pseudorotation phase angles, and the helical parameters changed at the H-D junction but not at the D-H junction. A detailed comparison of these two duplexes revealed a structural heterogeneity between the DNA segment and the DNA·RNA hybrid region and transitions at the junctions.

[序論] RNAとDNAの相補的2本鎖はhybrid duplexと呼ばれ、このヘテロな2本鎖を特異的に認識し、RNA鎖側を切断するRNase Hという酵素が存在する。この基質認識機構については現在でも不明であるが、hybrid duplexの持つ特殊な構造を認識しているのではないかと言われており、基質となる核酸が溶液中でどのような構造をとっているかを解析することはこの酵素の基質認識機構に重要な示唆を与えるものと思われる。現在までに当研究室では、Fig.1の様なDNAの2本鎖の間にhybrid duplexを挿入した9塩基対の核酸DHDでRNase Hによる切断反応を行ない、この基質は1箇所のみで切断を受けることを確認した。また、比較として、DDHをデザインし、hybrid duplex部分の分子内の相対的位置により、どの様な構造的変化が生じるかを調べた。

↓D-H junction ↓H–D junction

```
5'd(GG)r(AGAU)d(GAC)3'
3'd(CC    TCTC    CTG)5'
```

(DHD)

↓D-H junction

```
5'd(GGAGA)r(UGAC)3'
3'd(CCTCT    CCTG)5'
```

(DDH)

Fig.1.Two DNA duplexes containing a DNA·RNA hybrid region at different sites, (DHD, where D and H represent the DNA and DNA·RNA hybrid segments, respectively) ,and (DDH).

Key words: DNA·RNA hybrid duplex, ^{1}H-NMR, relaxation matrix refinement

○にしざき ともこ、いわい しげのり、おおくぼ ただやす、おおつか えいこ

[実験] 1) 上記DHD, DDHの核酸を各4 mM の溶液(100 mM NaCl, 50 mM Na phosphate, 3 mM EDTA, pH 7.0 90 % H_2O/10 % D_2O) に調整し、交換性^{1}Hの観測を行ない、残基ごとの塩基部イミノ、アミノ^{1}Hの帰属を行なった。 2) 各サンプルを重水(D_2O)置換し、NOESY, DQF-COSY, TOCSY, E-COSYをそれぞれ測定し、各残基の塩基(H6, H8, H2, H5, CH_3), 糖部分(H1'-H4')の^{1}Hシグナルの帰属を行い、各45 msec, 90 msec, 150 msecの mixing timeのNOESYより、交差ピークのボリュームを見積ることにより、各^{1}H間の距離を算出し、後述の構造計算に用いる距離の拘束条件とした。3) 2)より得た拘束条件に、リン酸骨格の2面角、水素結合による塩基対間の距離の拘束条件も加え、構造計算に供した。計算プログラムは、汎用のX-PLORを用いた。4) 3)より得た構造をスピン拡散の項を加味するため、完全緩和行列によるリファインメントを行った。

[結果と考察] DHDに関しては、初期構造を典型的A型、及びB型の2本鎖より構造計算を行なったものが、水素以外の全ての原子で0.9Åのrmsdで収束した。DDHに関しては、同様に2つの初期構造より0.6Åのrmsdで収束した構造を得た(Fig.2)。このDHD, DDHの構造は、共通してそのhybrid duplex部分がDNAの2本鎖の部分よりも、広い副溝幅を示し、分子内でヘテロな構造を有していることが観察された。かつ、hybrid duplex部分とDNAの2本鎖の部分の接合部では DHD, DDH共にD-H junctionのRNA1残基のみ糖部の$J_{H1'-H2'}$が通常のRNAよりも大きく、またH2', H2"のケミカルシフト値が重なるという共通した特徴が観察された。またH-D junctionに於いて観察される急激な構造変化がD-H junctionでは観察されず、D-H junctionとH-D junctionでは異なる性質を持つことが示唆された。

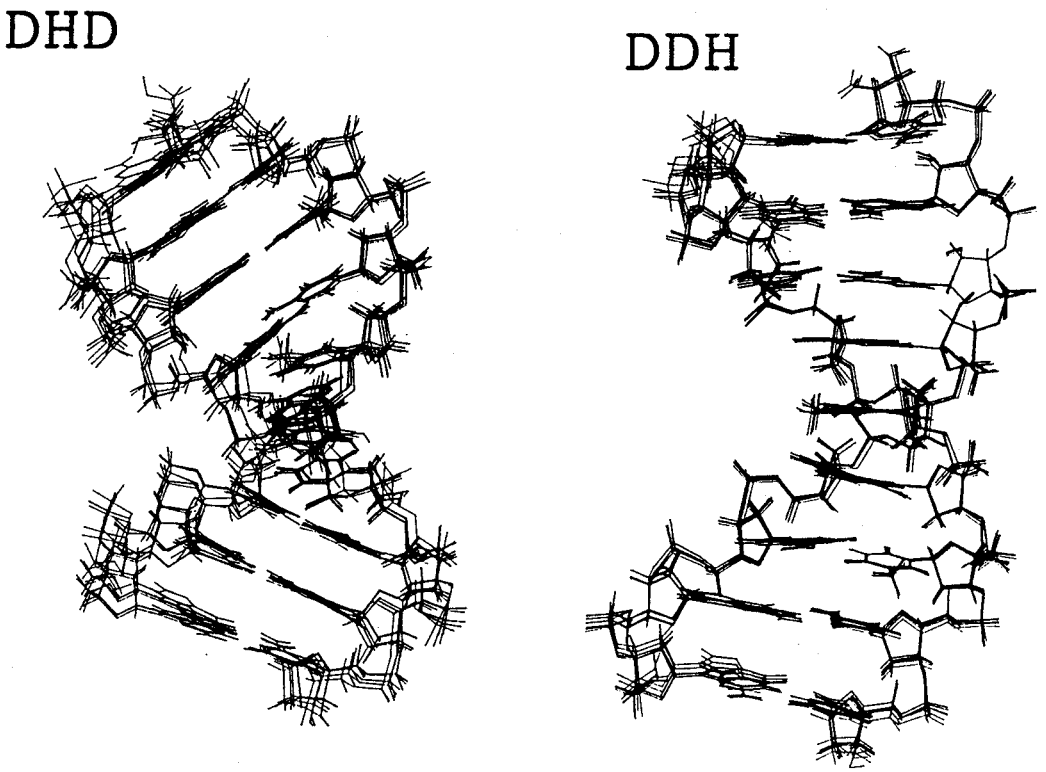


Fig.2. The best fit superposition of the six final structures of DHD (left), and DDH (right).

P106　エンドセリンの分子内、および、分子間相互作用の光-CIDNP法による解析

（日本チバガイギー国際科学研究所）　○高島浩幸、　野坂篤子

Inter and Intramolecular Interactions of Endothelin Investigated by Photo-CIDNP NMR

(International Research Laboratories, Ciba-Geigy Japan Ltd.) Takashima,H. and Nosaka,A.

We performed the photochemically induced dynamic-nuclear-polarization (photo-CIDNP) studies on Endothelin-1 and Endothelin-3 to examine the conformational features of peptide surfaces and accessibility to the solvent. At relatively high peptide concentrations the photo-CIDNP signals of C-terminal residue of Trp21 were strongly suppressed but recovered on addition of urea. This indicates that the C-terminus is involved in intermolecular interactions at high concentrations of peptides and is not exposed to the solvent. We could not observe any significant conformational difference between Endothelin-1 and Endothelin-3. On the other hand, the intensities of photo-CIDNP signals of tyrosines and histidins were significantly small and showed little concentration dependence at relatively low peptide concentrations. These residues would be buried in the intramolecular hydrophobic core and would not be readily accessible to the solvent.

はじめに

エンドセリン－１（ＥＴ－１）とエンドセリン－３（ＥＴ－３）は、強力な血管収縮作用などを及ぼす生理活性ペプチドである。これまで、ＮＭＲとＸ線解析を用いて数多くの研究が報告されており、Ｎ末端側のターン構造と２本のジスルフィド結合によって安定化されているα－ヘリックス構造をとることが知られている。しかし、レセプターとの結合に必須な役割を果たすと考えられているＣ端側については、統一的な構造が未だに得られていない現状にある。本研究では、このＣ端側の立体構造決定上の問題点を解明し、ＥＴ－１、ＥＴ－３両ペプチド間でのＣ端側残基の構造的相違に関する知見を得ることを目的として、光-CIDNP (photochemically induced dynamic-nuclear-polarization)法ＮＭＲの測定を行った。

試料調製と測定

ＥＴ－１、ＥＴ－３共に0.04mMから1mMまでの濃度で重水に溶解させた。ｐＨは重酢酸を用いて調製し、最終濃度が0.1mMになるようにルミフラビンを加え、Bruker AMX-600ＮＭＲ装置を用いて、とアルゴンイオンレーザー (NEC-GLG3460)で照射しながら測定を行った。

エンドセリンの分子間会合

Fig.１にＥＴ－１の光-CIDNP NMRスペクトルを示す。未照射 (Fig.1a) と照射 (Fig.1b) のNMRスペクトルの差をとって、光-CIDNP NMR 差スペクトル (Fig.1c) を得た。ペプチド濃度0.16mM、ｐＨ３で、Ｃ末端の残基Trp21のプロトンの光-CIDNPシグナルがはっきりと観測された。ペプチド濃度をさらに下げてゆくと、光-CIDNPシグナル強度が濃度に比例して減少して行くことから、このｐＨと濃度の溶液条件下ではＥＴ－１は、単分子の状態で存在すると考えられる。一方、同じｐＨのもとでペプチド濃度を0.64mMまで上げると、Fig.2bに示す

光-CIDNP法、エンドセリン

たかしま　ひろゆき、　のさか　あつこ

ように光-CIDNPシグナル強度が著しく抑制された。そして、溶液に尿素を加えると、この光-CIDNPシグナル強度が回復する（Fig.2c）。これらは、0.64mMという高濃度では、分子間の相互作用のためC端が溶媒に露出していない状態にあることを意味している。ＥＴ－１のC端側は、水素結合に起因する分子間の会合によって溶媒から保護されていると考えられる。

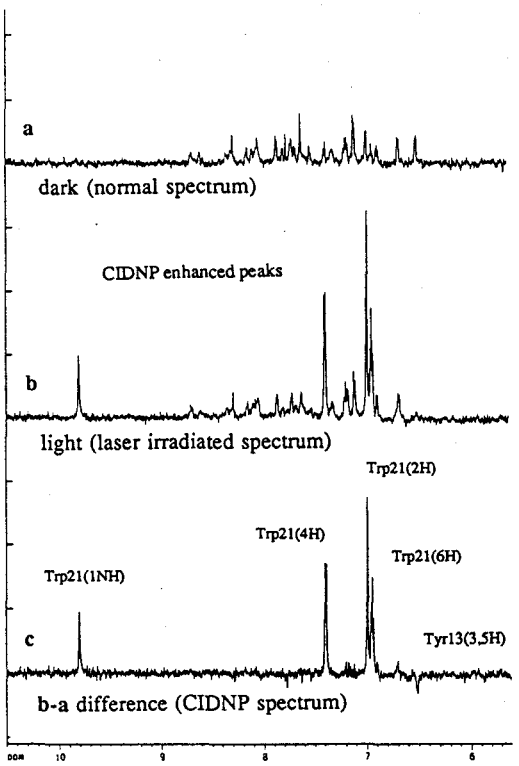


Fig.1 Photo-CIDNP spectra of ET-1
0.16mM pH 3 in H_2O 24C

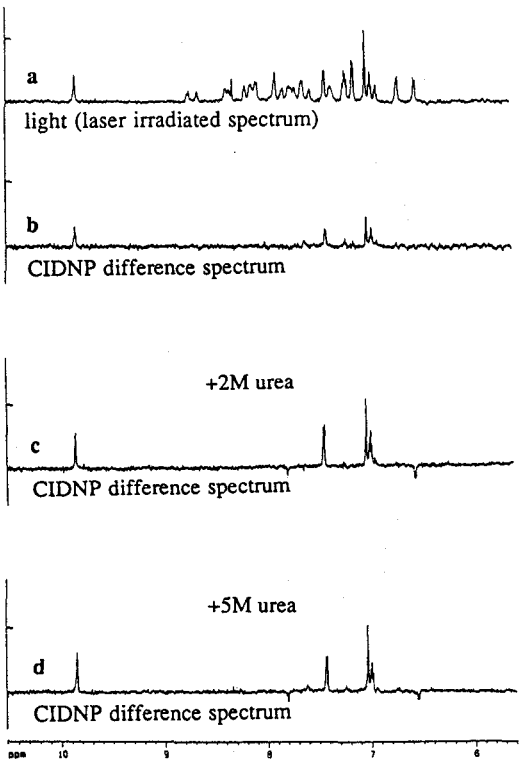


Fig.2 Photo-CIDNP spectra of ET-1
0.64mM pH 3 in H_2O 24C

ＥＴ－３についても、同様の結果が得られた。このように高濃度ではC端が分子間相互作用に関与しているため、ＮＭＲによる立体構造決定の研究で使用されてきたさらに高い濃度（１mM－４mM）においては、分子間ＮＯＥが生じ、C端側の構造決定を困難にする要因の一つになっていると考えられる。

疎水性核構造（hydrophobic core）

エンドセリンのTyrとHis残基の光-CIDNPシグナル強度はｐＨ３、濃度0.16mMの条件でも著しく抑制されている。このシグナル強度の抑制は濃度非依存的であり、また、尿素の添加によっても回復しない。これは、これらの残基がC端側の疎水性残基を中心とする疎水性核構造の中に埋もれていて溶媒から保護されているためであると考えられる。この疎水性核構造は、これまで、幾つかのＮＭＲやＸ線を使った構造決定の研究でも確認されている。ＥＴ－１とＥＴ－３は、この疎水性核構造に起因すると見られる光-CIDNPシグナルの挙動の点でも一致しており、相互に差は認められなかった。我々は、両ペプチドのC端側の立体構造の相違を調べるために、さらに、リポソーム中での光-CIDNP ＮＭＲの測定を行う予定である。

P107　尿素溶液中でのヒトカルシトニンの^{1}H NMR

（日本チバガイギー，国際科学研究所）○金折賢二，　野坂篤子

Kenji Kanaori and Atsuko Y. Nosaka
International Research Laboratories, Ciba-Geigy Japan Ltd.

ABSTRACT: Human calcitonin (hCT) easily associates and precipitates as insoluble fibrils upon storing in an aqueous solution. We report here that hCT does not aggregate in a 6 M urea solution. The α-protons of the residues in the N-terminal (Cys1-Cys7) and central (Met8-Pro23) regions showed downfield shifts in the urea solution, as compared to those in the aqueous solution. It indicates that hCT in the urea solution takes a more extended conformation than that in the aqueous solution. Upon heating the urea solution of hCT, the amino group at the N-terminus was promptly carbamylated. The carbamylated hCT easily precipitated even in the urea solution. The loss of the positive charge at the N-terminus would promote the aggregation.

カルシトニン（ＣＴ）は32残基からなるペプチドホルモンである。Cys1とCys7の間にジスルフィド結合があり、Ｃ末端はアミド化されている。ＣＴはカルシウムーリン代謝に重要な役割を果たしており、骨粗鬆症の薬剤として用いられている。ヒトカルシトニン（ｈＣＴ）は水溶液中で容易に会合し、不溶性の繊維として沈殿する[1]。その会合は、Ｎ末端部分の疎水性残基間の相互作用によって開始し、Ｃ末端部分がそれに続く。この会合分子は水素結合によって安定化されており、これが核となって繊維が成長していくと考えられる[2]。尿素はペプチド基と相互作用して水素結合を切断し、タンパク質を変性させることが知られている。本研究では高濃度の尿素溶液中でｈＣＴのNMRスペクトルを測定し、会合が進まないことを見いだし、ｈＣＴの自己会合のメカニズムを検討した。

＜実験＞

ｈＣＴは化学合成したものを用いた．ＮＭＲ測定は全てBruker AMX-600を用いて300 K (pH 2.9) にて行った．尿素溶液中のｈＣＴのシグナルの同定にはDQFCOSY、HOHAHA、NOESY等のパルス系列（TPPI法）を用いた。２Ｄスペクトルの経時変化の実験にはStates-TPPI法を用いて位相まわしなしでHOHAHAとROESYを測定した。256 (t1) X 512 (t2) のデータを測定するのに約５分を要した。

＜結果と考察＞

水溶液中と６Ｍ尿素溶液中でのｈＣＴの^{1}H NMRのシグナルの強度変化をFigure 1に示す。水溶液中では繊維化に伴い、ｈＣＴのシグナルは徐々に広くなり、約１時間で消失するが、尿素溶液中でのシグナル強度の減少は非常に遅いことがわかる。これらの結果は、分子間もしくは、分子内の水素結合の形成が尿素によって阻害され、自己会合が

妨げられていることを示している。また、尿素溶液中では、アミド及び、Cα-プロトンは共に低磁場にシフトし、N末端及び、中央部分の残基のシフトの方が、C末端部分の残基のシフトより大きい (Figure 2)。このように、水素結合の形成が阻害されることにより、ペプチド分子が、よりランダムな構造をとることがわかる。

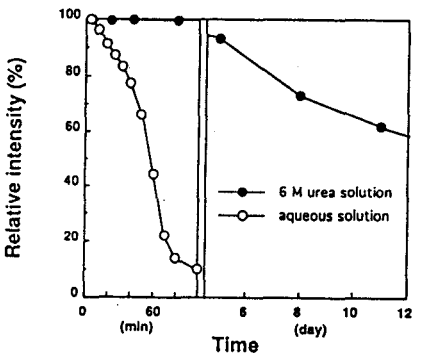


Figure 1: Change in time of relative intensities of hCT in aqueous (open circle) and 6 M urea (closed circle) solution.

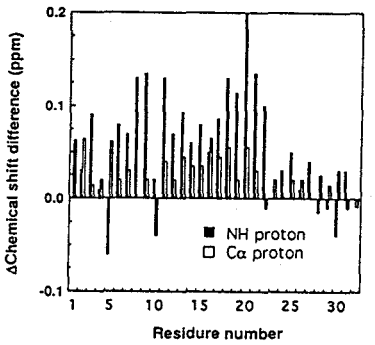


Figure 2: Differences in the chemical shifts of the NH and Cα–protons of hCT in the urea solution from the values in the aqueous solution.

しかしながら、Figure 1 に示したように、尿素溶液中でもｈＣＴの会合は完全に阻害されるわけではなく、ペプチドのピークは徐々にではあるが減少していく。ｈＣＴの尿素溶液を 343 K で 15 分加熱した後、常温で放置すると、ｈＣＴ は速やかに会合し、その会合過程におけるシグナルの変化は、尿素が存在しない水溶液中のｈＣＴの繊維化と同じであった。即ち、N末端部分及び、中央部分の残基は速く消失し、C末端部分は遅れて消失した。その過程においてCys1 からLeu9 の残基について新しいNH-α クロスピークが現れた。これは尿素溶液中において次のような反応によりペプチドのN末端がカルバミド化したことを示している[3]。

$$NH_2CONH_2 \rightleftharpoons CNO^- + NH_4^+, \qquad CNO^- + NH_3^+\text{-peptide} \longrightarrow H_2NCONH\text{-peptide}$$

このようにカルバミド化すると、正電荷が失われN末端部分の疎水性が増す．そのために，尿素存在下でも分子会合が急速に進行したものと考えられる。このことは、N末端部の疎水性がｈＣＴの繊維化に重要な役割を果たしていることを意味している。

以上のように、ｈＣＴの繊維化には、疎水相互作用と水素結合が関与しているが、繊維化の進行はN末端の疎水性に特に大きく依存していることが明らかになった。

＜文献＞

1) Arvinte, T., Cudd, A., and Drake, A. F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6415-6422.

2) Kanaori, K., and Nosaka, Y. A. *Biochemistry* in press.

3) Stark, G. R., Stein, W. H., and Moore, S. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3177-3181.

L10　遠位グルタミンを持つミオグロビンでの配位子親和性調節の分子機構

（筑波大・化学系）山　本　泰　彦

Molecular mechanism for controlling ligand affinity in myoglobins possessing distal Gln residue

Yasuhiko Yamamoto
Department of Chemistry, University of Tsukuba

The myoglobins from sharks, *Galeorhinus japonicus* and *Mustelus japonicus*, possess distal Gln E7 in stead of usual His E7. Met-cyano and -imidazole forms of these shark myoglobins have been characterized by ^{1}H-NMR in order to gain insights into functional properties of Gln E7. The analysis of paramagnetic relaxation rate and hyperfine shifts, together with the observation of dipolar connectivities, have provided the assignments for the resonances arising from Gln E7 and bound-imidazole. Hydrogen-bonding interaction between Gln E7 and the Fe-bound ligands has been clearly manifested in the hyperfine shifts for the Gln E7 resonances as well as the chemical exchange behavior of their labile protons. The conformation of the Gln E7 side-chain in both ligation states has been inferred from the dipolar connectivities among the side-chain protons of Gln E7 and the iron-proton distance determined from the paramagnetic relaxation rate.

［はじめに］常磁性蛋白質のＮＭＲで観測される超微細シフトしたシグナルは、蛋白質に由来するシグナルから分離して観測されるため、検出が容易である。さらに、これらのシグナルのシフト値、緩和速度は、金属イオン近傍の分子構造と電子構造を敏感に反映しているため、

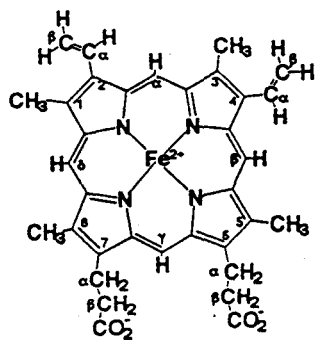


Fig.1. Structure and numbering system of heme.

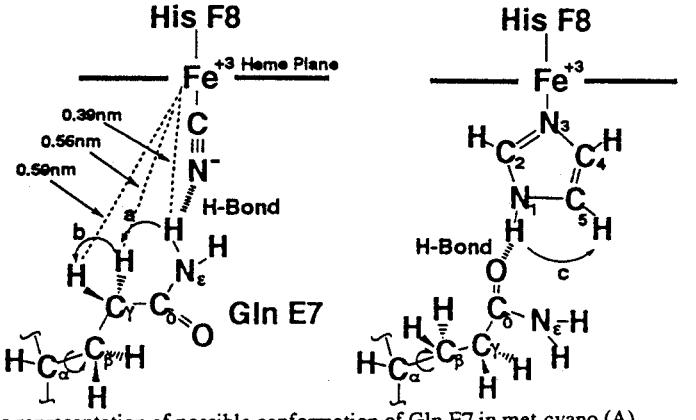


Fig.2. Schematic representation of possible conformation of Gln E7 in met-cyano (A) and met-imidazole(B) forms of shark Mb. a-c in the figure indicate the NOE's observed in Figs. 4, 6 and 10, respectively. The numbers in A are iron-proton distances estimated from paramagnetic relaxation rates.

ミオグロビン、超微細シフト、常磁性緩和、配位子親和性、水素結合

やまもとやすひこ

金属酵素の構造化学的研究に幅広く用いられている("Nuclear Magnetic Resonance of Paramegnetic Macromolecules", G. N. La Mar, ed. Kluwer Academic (1995))。ただし、その検出の容易さの反面、シグナル帰属は困難な場合が多い。それは、主に、超微細シフトを示すシグナルの緩和速度が、効率的な常磁性緩和により、^{1}H-^{1}H間交差緩和速度やスピン-スピン結合定数より一般的に大きく、帰属に必要な相関ピークの強度が小さくなってしまうことに起因する。たとえば、フェリ型高スピン状態と低スピン状態の常磁性ヘム蛋白質では、ヘム（ヘムの分子構造はFig.1に示す）のメチルプロトン（鉄からの距離(R)=0.62nm）の緩和速度($1/T_1$)は、それぞれ約200S^{-1}、約10S^{-1}である。常磁性緩和速度はRの六乗に反比例するので、これらの値から、高スピン状態の場合にはR<0.9nm、低スピン状態の場合にはR<0.6nmの領域に存在する^{1}Hに由来するＮＭＲシグナル間での相関ピークの検出は、困難であることがわかる。

さて、ヘム蛋白質の機能と構造との相関関係で、解明されなければならない問題の一つは、ヘム鉄の反応場がどのような構造化学的因子によって制御されているかということである。そのためには、たとえば酸素結合ヘム蛋白質のミオグロビン(Mb)では、ヘム鉄の外部配位子結合部位の構造化学的研究が必要になる。ヘム鉄に配位した酸素分子の鉄から遠い方の酸素原子はR=0.28nmである。したがって、この配位子がどのような相互作用によって、その配位状態が安定化されているのかを調べるためには、R=0.3-0.5nmの範囲の立体構造を解析する必要がある。先ほどのヘムメチルプロトンの緩和速度から、この領域に存在する^{1}Hの緩和速度は、フェリ型低スピン状態でも30-600S^{-1}、高スピン状態では700-1500S^{-1}となる。本研究では、ヘム鉄に結合した配位子と相互作用できる位置に存在する遠位アミノ酸残基としてGlnを持つMbでの、プロトン受容性および供与性の両方のタイプの配位子に対する配位子安定化における遠位Gln(Gln E7)の役割を、R<0.6nmの領域の^{1}Hに由来するシグナルの帰属を基に解析した(Fig.2)。超微細シフトしたシグナルの帰属の一助として、常磁性緩和速度より見積もったRを利用することができるが、立体構造が未知な分子でのシグナル帰属には、スピンースピン結合やNOEによる相関を観測する必要がある。分子量約1.5万のMbでは、ジェミナルプロトン間で最大20s^{-1}程度の交差緩和速度が期待できる。フェリ型低スピン状態のMb(CN^-体:Mb(CN^-))のR<0.6nm領域での、遠位Glnの$N_\varepsilon H$と$C_\gamma H$間の約-3%のNOEの観測も可能であることがわかった。

[実験方法] ^{1}H-NMR測定はBruker社製AC-400PSで行った。遠位Glnを持つミオグロビンは、ホシザメ（*Mustelus japonicus*）、エイラクブカ（*Galeorhinus japonicus*）の赤筋より分離精製した。ＮＭＲ試料の蛋白質濃度は約0.5mM、溶媒は100%D_2Oまたは90%H_2O/10%D_2Oである。配位子は、プロトン受容性のCN^-とプロトン供与性のイミダゾール(Im)（シグナル帰属用に重水素化されたIm-d_4も用いた）を使用した。90%H_2O/10%D_2O試料での測定には、Jump & Returnパルスを用いた。一次元NOEの測定では、飽和させたいシグナルへの照射のパワーを共鳴周波数の近いシグナルへの影響を見ながら微調整するが、場合によっては、注目しているシグナルを飽和させることを第一に考え、off-resonanceの影響は、照射パルスの周波数をoff-resonanceの影響が大きいシグナルの共鳴周波数に関して対称の位置に設定して得られたスペクトルとの差をとるなどの工夫をして極力抑えた。化学シフトはDSS基準で示してある。

[結果と考察] Mb(CN^-)：ホシザメMb(CN^-)の低磁場に超微細シフトした領域のスペクトルをFig.3にシグナル帰属とともに示す。化学交換性プロトンシグナルW,X,Yのそれぞれの緩和速度より、プロトンXではR=0.39nmであることがわかり、ヘム鉄に配位したCN^-と直接相互作用して

いるプロトン、すなわちGln E7 $N_\varepsilon H$(Fig.2)に由来することがわかる。このシグナル帰属、さらにはこのプロトンがヘム鉄に結合した配位子との水素結合形成に関与していることは、このシグナルの超微細シフトや飽和移動法による化学交換速度の解析結果からも確認できた。シグナルXを照射すると、化学交換性ではないプロトンシグナル(9.5ppm)にNOE(約-3%)が観測され、Gln E7 γ-Hに由来するものと考えられる(Fig.4)。このNOE相関が、2-αまたは1-Meへの照射パルスのoff-resonanceの影響では無いことは、100%D_2O試料での測定により確認している。Gln E7 γ-Hプロトンの緩和速度は、15.3s^{-1}であるので、観測されるNOEの強度とMbの分子運動の相関時間(τ_C～10ns)を考慮すると両プロトン間距離は<0.33nmであることがわかる。Gln E7 γ-Hプロトンは、γ'-Hとβ-Hのそれぞれのプロトンシグナルと COSY相関ピーク(e,f)を示している(Fig.5A)。Gln E7 γ'-HプロトンのRおよびγ-Hとγ'-Hを結ぶ核間ベクトルの内部運動の相関時間は、NOEの照射時間依存性より決めることができる(Figs.6&7)。γ-Hを照射することにより、

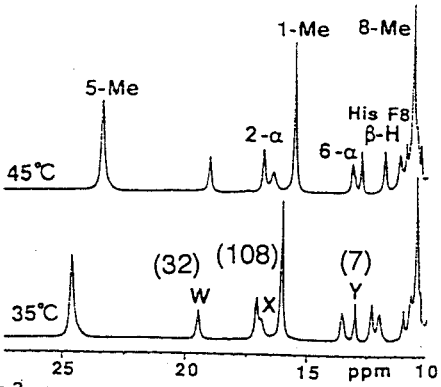


Fig.3. Spectra of *M. japonicus* Mb(CN⁻) in 90%H_2O/10%D_2O, pH 7.13. W-Y arise from exchangeable protons and the numbers in parentheses are relaxation rates given in S^{-1}.

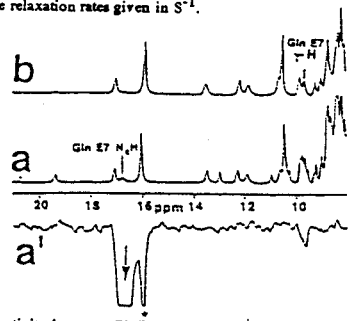


Fig.4. NOE connectivity between GlnE7 $N_\varepsilon H$ and γ-H' protons. (a)in 90%H_2O/10%D_2O,(a') NOE difference spectrum. peak labeled by o is due to the off-resonance effect of decoupler. (b)in 100%D_2O.

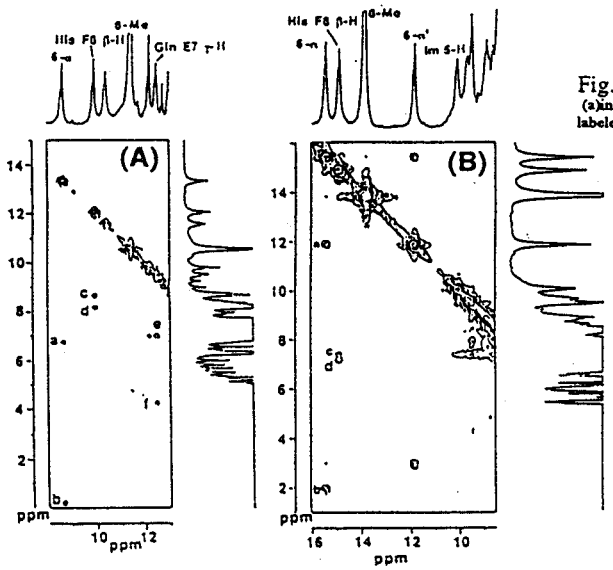


Fig.5. COSY spectra of *M. japonicus* Mb(CN⁻) (A) and Mb(Im) (B). The cross-peaks, e and f, are missing in (B).

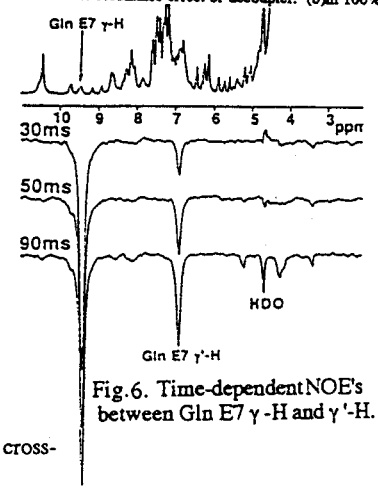


Fig.6. Time-dependent NOE's between Gln E7 γ-H and γ'-H.

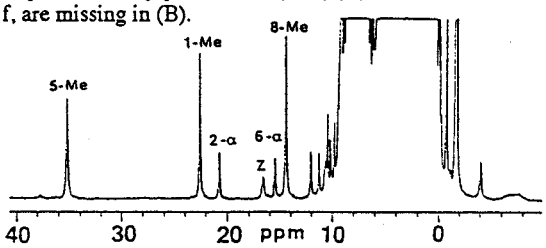


Fig.8. Spectrum of *M. japonicus* Mb(Im) in 90%H_2O/10%D_2O, pH 7.23, at 45°C.

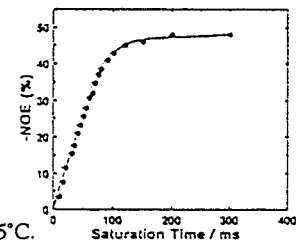


Fig.7. Saturation time for γ-H vs. NOE observed on γ'-H.

最大-48%のNOEがγ'-Hに観測され、Fig.7の照射時間vs. NOEのプロットより、交差緩和速度(σ)が-5.4±0.2s^{-1}、緩和速度(ρ)が11.3±0.4s^{-1}であることがわかる。σから$C_\gamma H_2$の内部運動ではτ_c～3nsとなり、ヘム鉄に結合した配位子と$N_\varepsilon H$プロトンが水素結合していても、Gln E7側鎖には、ある程度の運動の自由度の存在が確認された。また、ρよりγ'-HではR=0.59nmとなり、ヘムに対するGln E7側鎖の配向としては、$C_\delta O$の酸素原子をヘムから遠避けるようなコンフォメーションになっていると推測される(Fig.2A)。

Mb(Im)：ホシザメMb(Im)のスペクトルをFig.8にシグナル帰属とともに示す。Mb(Im)のシグナル帰属は、帰属が既知であるフェリ型高スピン状態で観測されるシグナルとの、配位子交換反応を介した飽和移動を利用して行った(Fig.9)。化学交換性プロトンシグナルZは、25℃では二つのシグナルに分かれる。シフト値と線幅からこれらのシグナルは、His F8のイミダゾール環のNHか、外部配位子ImのN$_1$Hプロトンに由来するものであることがわかる(両プロトンともにR<0.52nm)。それぞれの帰属は、NOEにより行った(Fig.10)。低磁場側のNHシグナルを照射すると7.1ppmのシグナルにNOEが観測され、このNOEはIm-d_4を配位させたMbでは観測されないことから、このNHシグナルをImのN$_1$H、7.1ppmのシグナルを5-Hプロトンに帰属した。一方、高磁場側のNHプロトンは化学交換性プロトンシグナル(11.8ppm)にNOEを生じるので、それぞれ、His F8のイミダゾール環のNHとアミドNHに帰属した。ところで、蛋白質のシグナルから分離して観測されるアミノ酸残基の側鎖プロトンに由来するシグナルに関して、Mb(CN$^-$)とMb(Im)のスペクトルでの対応するシグナルのシフト値の比較から、両錯体での不対電子による双極子磁場にはそれ程差がないことがわかった。そこで、Mb(CN$^-$)のスペクトルでGln E7γ-Hプロトンシグナルが観測された領域のCOSYスペクトルをMb(Im)で測定した(Fig.5B)が、Gln E7γ-Hプロトンに対応するシグナルが9.5ppmくの領域で観測されず、Gln E7γ-Hのヘム鉄に対する配向が、Mb(CN$^-$)でのものから変化したことがわかる。CPKモデルを基にした考察からMb(Im)でのGln E7側鎖の配向は、Fig.2Bに示したようなものであると推測され、Mb(CN$^-$)とMb(Im)でのGln側鎖については、C_α-C_β結合のまわりのコンフォメーションに関して大きく異なるものと推測される。Gln E7を持つMbは、His E7を持つMbよりImに対する親和性が大きく、Gln側鎖の屈曲性がImのようなサイズの大きな配位子の安定化には適していると考えられる。

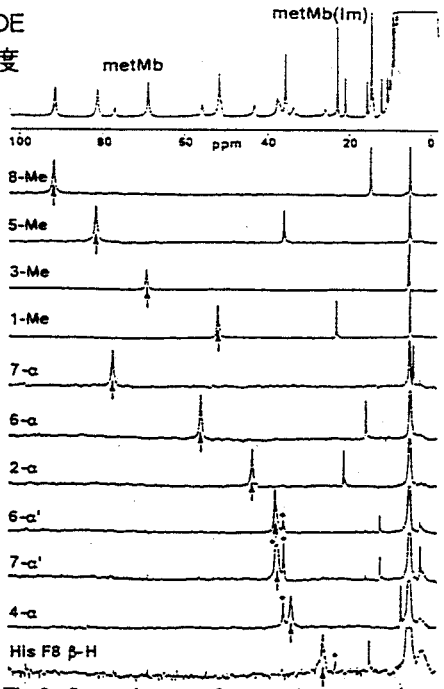


Fig.9. Saturation transfer experiments on the mixture of *M. japonicus* met-Mb and Mb(Im).

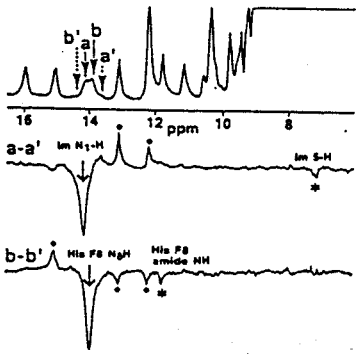


Fig.10. Assignments of exchangeable proton resonances using NOE.

［謝辞］本研究に用いたMbは、高知大学理学部生物学科鈴木知彦先生に御提供戴いた。本研究は、筑波大学学内プロジェクト研究(University of Tsukuba, Research Projects)からの助成に基づくものである。

L11

3重 (^{13}C, ^{15}N, ^{2}H) ラベルによる高分子量蛋白質の核磁気共鳴の帰属法 - 構造研究に向けて

(大阪大学蛋白質研究所[1], Univ. of Toronto[2])
O山崎俊夫[1,2], Lewis E. Kay[2]

Methods for NMR Assignment of Larger Proteins Using Triple Labeling

(Osaka Univ.[1], Unv. of Toronto[2]) Toshio Yamazaki[1,2], Lewis E. Kay[2]

Methods for assignment of backbone resonances for larger proteins are newly developed. Deuteration of a ^{13}C,^{15}N labeled sample produces very long transverse relaxation times for magnetization on ^{13}C nuclei. The new methods make use of the long relaxation times. CT-HNCA and CT-HN(CO)CA provide us high resolution for the Cα chemical shift axis. HN(CA)CB and HN(COCA)CB provide us high sensitivity. Using these method we successfully obtained assignments of backbone resonancees of a 37 kDa protein-DNA complex.

3重核共鳴 NMR の開発によって、水溶液中の蛋白質の構造決定は現実のものとなり、現在、多くの重要な蛋白質の構造決定がなされている。2重ラベルを利用した3重核共鳴法は、直接化学結合した原子 (^{1}H,^{13}C,^{15}N) 間のカップリングを利用して磁化を移動させ、化学構造との対応からそれぞれの NMR シグナルを帰属する方法である。構造に依存しないので信頼性の高い帰属が得られる。ところが分子量が大きくなるに従って、核磁気の横緩和が速くなり、磁化移動の効率が次第に悪くなってくる。その適用限界はパルスシーケンスに、つまり磁化の移動経路に依存する。帰属のためのより強力な情報を与える、より多段階に磁化を移すタイプの実験法ほど、分子量の依存性が高い。例えばHNCACBは分子量2万5千程度で限界である。

我々は核磁気緩和の主な要因である ^{1}H 核を ^{2}H 核に置き換えることによって、3重共鳴 NMR をさらに大きな分子量の蛋白質に適用可能にすることに成功した。核磁気緩和の主な機構は双極子間の相互作用である。特に大きな磁気双極子である、^{1}H 核によるものが大きい。例えば ^{1}H を1つ共有結合している ^{13}C 核の横磁化緩和時間は、分子量3万で 20 ms とかなり短くなる。緩和速度は磁気双極子の大きさの2乗に比例している。 2H 核に置き換えることによって、大幅に緩和時間を延ばすことができる。分子量3万7千の Trp repressor 蛋白質 - operator DNA 複合体で実測した結果、^{1}H を付けた ^{13}C 核の緩和時間は 16 ms, ^{2}H を付けたものは 120 ms であった。この差は大きい。

アイデア1 - Cα 化学シフト軸の高分解能化

HNCA と HN(CO)CA 法は主鎖アミドの ^{1}H と ^{15}N を $^{13}C\alpha$ につなぐ方法である。それぞれ、アミノ酸残基内、及び、隣り合った残基間の核をつなぐ。従来の方法では Cα 核が Cβ 核とカップリングにより分裂したシグナルを与えること、Cα 核の緩和が速いことのため Cα 化学シフト軸の分解能のかなり悪いスペクトルしか得られなかった。同種核間のカップリングを取り除く Constant Time 法と ^{2}H ラベルによる長い緩和時間により、Cα 化学シフトを高分解能に得ることに成功した。パルスシーケンスは従来のものを部分的に改良したものである。HSQC を多段に組み合わせて

triple resonance NMR, deuteration, multidimensional NMR

やまざき　としお、るいす　けい

HNCA: HN_i -> N_i -> $C\alpha_i$(t1) -> N_i(t2) -> HN_i(t3)

HN(CO)CA: HN_i -> N_i -> CO_{i-1} -> $C\alpha_{i-1}$(t1) -> CO_{i-1} -> N_i(t2) -> HN_i(t3)

のように磁化を移しながら、化学シフトを記録していく。磁化が Cα に移った時点で Constant Time 法を用いる。同時に ^2H 核を照射して ^2H-^{13}C のカップリングを消す。これを CT-HNCA, CT-HN(CO)CA と呼ぶ。これにより、従来のものと比べて 3 倍以上の分解能になる。 $^{13}C\alpha$ 核の化学シフトが高分解能で記録されるために、^1H の付いた Cα と ^2H の付いたものでは同位体効果として化学シフトに 0.3 ppm 程度の差をもって分裂して見えてくる。部分ラベルのため ^1H と ^2H が混じっているためである。1H の付いたもののシグナルを消すための工夫もしてある。より高い分解能でより多くのシグナルを区別することができるこの方法は大きな蛋白質の帰属に有用である。

アイデア 2 - Cα-Cβ 磁化移動の効率化

HNCACB と HN(CO)CACB 法は主鎖アミドの ^1H と ^{15}N を $^{13}C\alpha$ と $^{13}C\beta$ につなぐ方法である。それぞれ、アミノ酸残基内、及び、隣り合った残基間の核をつなぐ。従来の方法では部分的に Cα の磁化を Cβ に移し、Cα と Cβ の両方のシグナルを同時に、しかし半分の強度で、得るものである。この時 Cα の 核磁化の緩和のため、ある程度シグナル強度を失う。重水素化によって Cα の緩和を抑え、効率的な磁化移動を行うことができる。さらに磁化移動時間を長くして、全ての磁化を Cβ に移すことが可能である。^1H の付いた Cα の緩和が速いため、従来の方法では長い磁化移動時間中に緩和してしまい、Cβ のシグナルを強めることはできない。 Cβ のシグナルを強く得るための方法を HN(CA)CB, HN(COCA)CB と呼ぶ。磁化を

HN(CA)CB: HN_i -> N_i -> $C\alpha_i$ -> $C\beta_i$(t1) -> $C\alpha_i$ -> N_i(t2) -> HN_i(t3)

HN(COCA)CB: HN_i->N_i->CO_{i-1}->$C\alpha_{i-1}$->$C\beta_{i-1}$(t1)->$C\alpha_{i-1}$->CO_{i-1}->N_i(t2)->HN_i(t3)

のように移しながら化学シフトを記録していく。磁化が Cα に移った時点で ^2H 核を照射して ^2H-^{13}C のカップリングを消す。t1 期では全ての磁化が Cβ に移っているので Cα の化学シフトは記録されない (Gly を除く)。 Cα のシグナルを犠牲にしてでも Cβ のシグナルの強度を 2 倍にすることに価値がある。Cα のシグナルは上記の方法で高分解能で得られる。ここで低分解能のものはさらには必要ない。HNCACB は主鎖の帰属のために極めて強力な情報を与える。というのは、Cβ の化学シフトはアミノ酸残基の種類の情報をあたえるからだ。しかし、高分子の蛋白質には急激に感度を失う。 Cβ のシグナル強度を最大化することは重要である。Cα の化学シフトは Cβ と同時に記録されないが 独立に記録することができる。HN, N, Cα, Cβ 合わせて 4 次元になる。HNCA を 4 次元に拡張すれば、

4D HNCA: HN -> N -> Cα(t1) -> Cβ(t2) -> Cα -> N(t3) -> HN(t4)

のように磁化を移動しながらそれぞれの化学シフトを記録することができる。これら全て、磁化移動の経路上で最も緩和の速い Cα 核の緩和を重水素化によって、克服することだできた。かなり高分子量の蛋白質に適用できると期待できる。

これらの新しく開発した実験法を用いて、37 kDa の大きさの Trp repressor - operator DNA 複合体の主鎖の帰属が容易に得られた。

References

Toshio Yamazaki, et al. (1994) J. Am. Chem. Soc 116, 6464-6465

Toshio Yamazaki, et al. (1994) J. Am. Chem. Soc 116, 11655-11666

L12 安定同位体標識ＤＮＡを利用した新しいＮＭＲ測定技術

（都立大・理）○甲斐荘正恒、小野　晶、楯　真一、小野　明、
栗田順一、牧田貴子、久保喜大

Newer NMR Methods for Isotopically Labeled DNA Oligomers

*** Masatsune Kainosho, Akira Ono, Shin-ichi Tate, Jun-ichi Kurita, and Takako Makita**

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

A precise determination of the torsion angle β for nucleic acids in solution is described for a DNA dodecamer. The method relies on the dihedral angle dependence of the vicinal ^{1}H-^{31}P coupling constants between the diastereotopic C5' methylene protons and the phosphorus in the phosphodiester linkage. Stereoselectively $^{13}C/^{2}H$-double labeling at the C5' allows us to measure both of the vicinal ^{1}H-^{31}P coupling constants accurately by the {^{31}P} spin-echo difference in the ^{1}H-^{13}C CT HSQC. These coupling constants uniquely defined the angle β of the labeled residue. A similar method, which utilizes the vicinal $^{1}H(3')$-$^{31}P(3')$ and $^{31}P(3')$-$^{13}C(2')$ coupling constants simultaneously, has also been developed to determine the torsion angle ε.

【はじめに】

核酸（DNA, RNA）の溶液内における立体構造は、主として近接残基間のNOE を実験的な構造情報として利用することにより決定されてきた。しかしながら、蛋白質とくらべ核酸における単位空間当たりのﾌﾟﾛﾄﾝ密度が低いこと、及び核酸の立体構造的特性上、遠隔残基間の距離制限情報に乏しいこともあり、立体構造を蛋白質と同程度の精度で決定することは困難であった。核酸の生物学的機能が単なる情報の蓄積を遙に越えるものであることが明らかとなった現在、核酸の立体構造及びそのﾀﾞｲﾅﾐｯｸｽ の解明はますます重要となっている。構造情報を含む様々なNMR ﾊﾟﾗﾒｰﾀ の、より精度の高い測定技術の開発が盛んに試みられるようになってきた背景がここにある。このような技術開発の中心となる手法は、蛋白質の場合と同様、同位体利用NMR 技術である。我々は、より経済的、且つより汎用性のある同位体標識核酸の調製技術の確立に努力してきた。このような独自路線を基盤とすることにより、NOE を用いる従来の方法とは本質的に異なる、構造決定のための新しい ｱﾌﾟﾛｰﾁ が確立できると考える。また、生化学的手段により調製可能な”均一標識体”を用いる限り、対象になりえない高分子量試料（蛋白質・核酸複合体等）についても応用できる手法の開発も又重要である。固相合成法を用いれば、望みの位置に、望みの標識ﾊﾟﾀｰﾝを持つ残基を導入することができる。選択的標識法の利用は、様々な構造情報の選択を、試料調製の段階において実施することに相当する。本報告において述べる、DNA 主鎖構造に関する二面角情報β、εの高精度測定法はそのような技術の一つである。

ｷｰﾜｰﾄﾞ: 安定同位体標識 DNA、立体選択的 $^{13}C;^{2}H$-二重標識法、核酸の主鎖構造、[^{31}P]-ｽﾋﾟﾝｴｺｰ差ｽﾍﾟｸﾄﾙ 、CT ^{1}H-^{13}C HSQC

○かいのしょう　まさつね、おの　あきら、たて　しんいち、おの　あきら、くりた　じゅんいち、まきた　たかこ、くぼ　よしひろ

【実　験】

本研究において利用したDNA ｵﾘｺﾞﾏｰ は Dickerson ﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ d(CGCGAATTCGCG)$_2$ である。このｵﾘｺﾞﾏｰ に関しては多くの結晶構造解析、NMR ﾃﾞｰﾀ が集積しており手法開発のﾓﾃﾞﾙ としては適当であると考えられる。β- 角の測定に利用したﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ においては、７番目のﾁﾐｼﾞﾝ残基（T7）のみを選択的に標識体に置換してある。用いた標識ﾁﾐｼﾞﾝは、ﾃﾞｵｷｼﾘﾎﾞｰｽ環のみが高濃度（98%）に ^{13}C- 均一標識してあるもの、さらには^{13}C-標識に加え、5' 位ﾒﾁﾚﾝを川島・石戸等の方法[1]に従って立体選択的に重水素化した二重標識体ものである。後者はβ- 角の一義的決定に必須の試料である。一方、ε- 角の測定は６番目のﾃﾞｵｷｼｱﾃﾞﾉｼﾝ 残基(A6)に関して行った。この為の試料は[ul-98%^{13}C;98%^{15}N]- ﾃﾞｵｷｼｱﾃﾞﾉｼﾝ 、及びこの標識ｱﾃﾞﾉｼﾝ の 2'- 位ﾒﾁﾚﾝの一方を重水素化したものをA6に組み込んだものである。

NMR ｽﾍﾟｸﾄﾙ はBruker AMX-500（4-RF ﾁｬﾝﾈﾙ; ﾊﾟﾙｽ 磁場勾配付属装置付）を用い、５Φ３重共鳴ﾌﾟﾛｰﾌﾞ ^{1}H-[^{13}C,^{31}P] を用いて行った。NMR ﾃﾞｰﾀ はnmrPipe で処理し、ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ PIPPによりｸﾛｽﾋﾟｰｸ強度を正確に見積もった。

【結　果】

DNA 主鎖は各ﾇｸﾚｵｼﾄﾞ残基の3'- 、及び5'- 水酸基が隣接残基とﾘﾝ酸ｼﾞｴｽﾃﾙ 結合により結ばれた構造をしている。従って、DNA 主鎖構造のNMR による情報は糖ﾘﾝ酸結合に関与する核間のﾋﾞｼﾅﾙｽﾋﾟﾝ 結合定数に含まれている。ﾃﾞｵｷｼﾘﾎﾞｰｽ環内のﾌﾟﾛﾄﾝ間のﾋﾞｼﾅﾙｽﾋﾟﾝ 結合定数としては C3'-C4' 間（δ- 角）、C4'-C5' 間（γ- 角）が主鎖構造に関係する情報を与える。これらの値は通常は測定困難であるが、前者に関してはﾃﾞｵｷｼﾘﾎﾞｰｽ環を^{13}C-標識することにより、正確な測定が可能となる。[2]後者に関しては、C5' 位のﾒﾁﾚﾝﾌﾟﾛﾄﾝの立体特異的帰属が必要である。児島等はC5' ﾒﾁﾚﾝを立体選択的に重水素化したﾃﾞｶﾏｰを用いてこれらの値が測定できることを明らかにしている。[3]一方、C5' や C3' とﾘﾝ酸基の間の二面角（β- 、及びε- 角; 図-1）に関しては、核酸構造解析におけるこれらの角度情報の重要性にも関わらず適当な方法がなかった。特に、β- 角に関する精度の良い構造情報は、溶液内においては全く得られていなかった。坪井等は1969年において、早くも核酸主鎖構造の決定に^{1}H-^{31}P ﾋﾞｼﾅﾙｽﾋﾟﾝ 結合定数、$^{3}J_{HP}$、が極めて重要な情報を担っていることを認識していたが、[4]これらの値が比較的小さいこと、またﾒﾁﾚﾝﾌﾟﾛﾄﾝの立体特異的帰属が必要なこと等の難点が克服できず現在に至った。

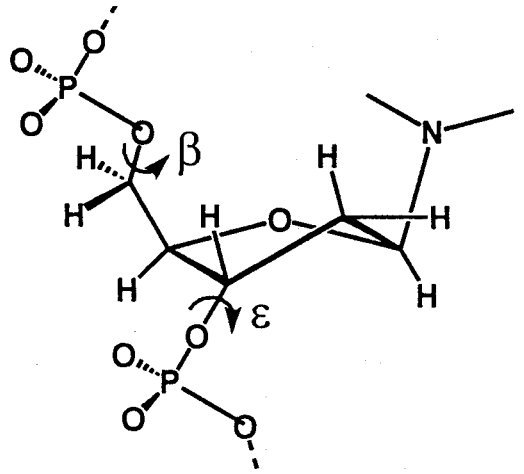


Fig-1　β、ε-angle in the DNA backbone

(1) <u>β－角の一義的決定手法</u>：[5]　ﾈｼﾞﾙ 角βに関係するﾋﾞｼﾅﾙｽﾋﾟﾝ 結合定数は３つある。即ち、C5'-位のﾒﾁﾚﾝﾌﾟﾛﾄﾝとﾘﾝとの二つの$^{3}J_{HP}$と、C4' とﾘﾝとの$^{3}J_{CP}$である。この内、C4' は3'- 水酸基側のﾘﾝともﾋﾞｼﾅﾙ位の関係にあるために、独立なﾊﾟﾗﾒｰﾀ として測定することが困難である。従って、β- 角の決定は二つの$^{3}J_{HP}$の正確な値の測定と、それらの立体化学的区別を同時に行えば良いことになる。C5' ﾒﾁﾚﾝの選択的重水素化方法は幾つか報告があるが、どちらか一方が必ず重水素化され、また両ﾌﾟﾛﾄﾝを立体化学的に区別し、しかもより重水素化された方のｼｸﾞﾅﾙを観測するには十分な程度の残余ﾌﾟﾛﾄﾝがあるというような条件を満足する手法として、川島・石戸等[1]の方法を利用した。ﾃﾞｵｷｼﾘﾎﾞｰｽ環のみを高濃度 ^{13}C-標識したﾁﾐｼﾞﾝに本法を適用し、得られたC5'-位ﾓﾉ重水素化体を得た。この^{13}C/^{2}H- 二重標

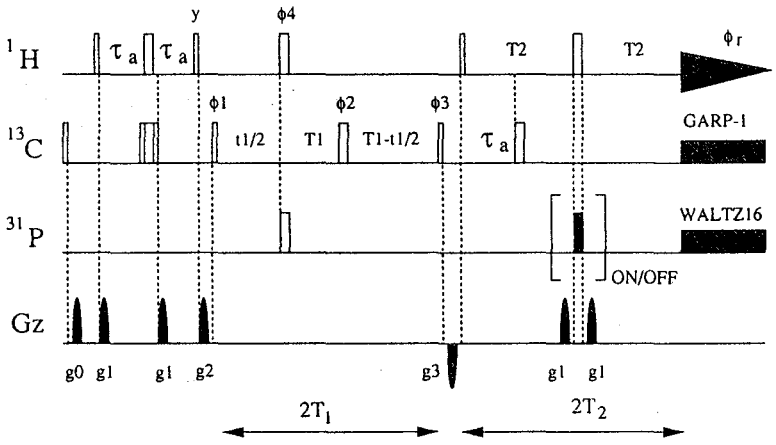


Fig-2 Pulse scheme for the {^{31}P} Spin-echo difference ^{1}H-^{13}C dual CT-HSQC experiment

識ﾁﾐｼﾞﾝをﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ のT7に組み入れたものを試料として、図-2のﾊﾟﾙｽ 列を用いて J_{HP} の値を測定した。このﾊﾟﾙｽ 列は基本的には^{1}H-^{13}C CT HSQCの二番目のINEPT ｽﾃｯﾌﾟにおいて^{1}H-^{31}Pｽﾋﾟﾝ 結合による強度変調を付け加えたものである。即ち、第二のCT内において^{31}P-π- ﾊﾟﾙｽ を加えることにより、^{1}H- 磁化とにより、^{1}H- 磁化は $\cos(2\pi J_{HP}T_2)$ だけ減衰する。一方、^{31}P-ﾊﾟﾙｽ を加えなければそのような強度の減衰は生じない。^{31}P- ｶｯﾌﾟﾙ した条件でのｸﾛｽﾋﾟｰｸ強度をSa、ｶｯﾌﾟﾙ条件での強度 Sb を実測すれは、$(Sa-Sb)/Sa=2\sin^2(\pi J_{HP}T_2)$ となり、従って J_{HP}を測定できることになる。

実際のｽﾍﾟｸﾄﾙ は見たところは普通のCT HSQC と変わらない。図-3に示した領域に^{13}C-標識した7-位のﾁﾐｼﾞﾝ(T7)に由来するC3'-、C4'-、C5',5"-^{1}Hによる4個のｸﾛｽﾋﾟｰｸが観測された。用いた標識ﾁﾐｼﾞﾝではC5'-上のｼﾞｱｽﾃﾚｵﾄﾋﾟｯｸ ﾌﾟﾛﾄﾝ の内でpro-S (H5') が、より高い比率で重水素化されているために、残余ﾌﾟﾛﾄﾝｼｸﾞﾅﾙは明瞭に小さい。従って、高磁場側が pro-R、低磁場側がpro-S に帰属される。これら4個のｸﾛｽﾋﾟｰｸは何れもﾘﾝとのｽﾋﾟﾝ 結合をしており、$2T_2$ 時間内の ^{31}P-π ﾊﾟﾙｽ によるﾋﾟｰｸ 強度の減衰からそれらの値が正確に求まる。

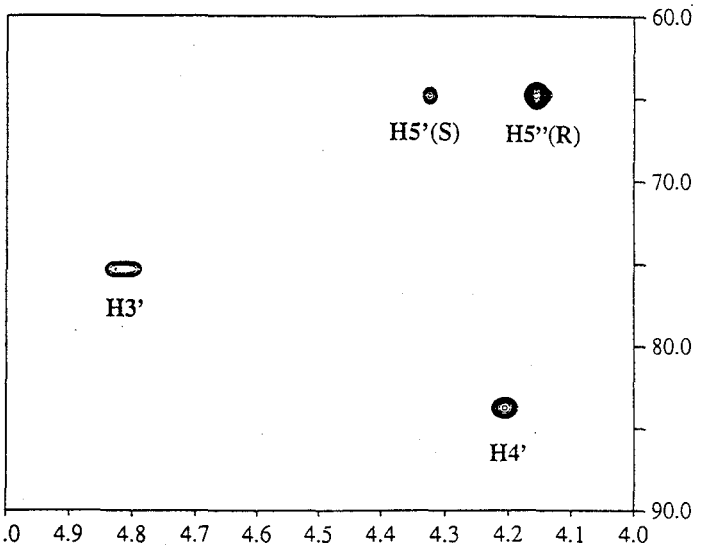


Fig-3 d(CGCGAATTCGCG)$_2$の {^{31}P} Spin-echo dual CT-HSQC spectrum. ^{31}P-π pulse "ON"

先に示した簡単な関係式から計算すると、T7残基に属する4 つの^{1}Hと^{31}P とのｶｯﾌﾟﾘﾝｸﾞ定数の値は2.5 ±0.2 Hz ($^3J_{H5'P}$)、3.6 ±0.3 Hz ($^3J_{H5''P}$)、2.8 ±0.3 Hz ($^4J_{H4'P}$)、及び2.9 ±0.5 Hz ($^3J_{H3'P}$) が一つの実験から同時に得られる。$^3J_{HP}$についてのKarplus-型の二面角依存性、$J_{HCOP} = 15.3\cos^2\phi - 6.2\cos\phi + 1.5$ 、を利用して求められる。この値をもとに、β- 角を正確に決定することができる。Karplus 型の角度依存性は周期性を持つために、ｽﾋﾟﾝ 結合定数一つに対して最大4個の二面角が対応する。従って、C5' のﾒﾁﾚﾝﾌﾟﾛﾄﾝから合計8ケの二面角が、対応する角度として得られる。しかしながら、これらが重なる領域は只一か所の狭い範囲に定まる。この結果、ﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ のT7残基のβ- 角の値は

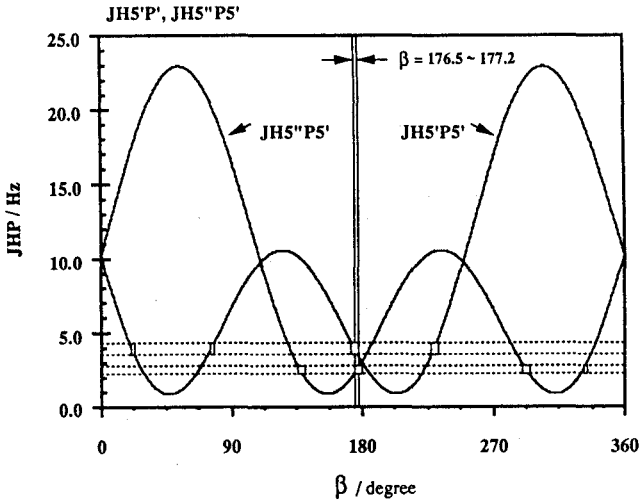


Fig-4 Graphical determination of the β-angle of the T7 residue of the labeled dodecamer

176.5 5 ± 0.7° となる。この範囲はﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ の単結晶のX線解析により求められた値177.5 ±3.5 °（T7 と対応する相補鎖のT19 のβ - 角の平均値）と一致する。

(2) ε - 角の決定方法：先に示したように、核酸におけるもう一つのﾘﾝ酸ｼﾞｴｽﾃﾙ 結合周囲の内部回転角がε - 角である。この場合にはC5' に相当する位置にﾌﾟﾛﾄﾝを一つだけ持つC3' がある。従って、$^{3}J_{HP}$の測定のみからでは一義的にε - 角を定められない。その代わり、C3' の隣接炭素、C2' と C4' は P3' とﾋﾞｼﾅﾙ位の関係にあり、これら二つの$^{3}J_{CP}$の値の一方が測定できれば、ε - 角は定まる。あいかしながら、先に指摘したようにC4' はP5' からもﾋﾞｼﾅﾙ位にあり、どちらか一方を選択的にﾃﾞｶｯﾌﾟﾘﾝｸﾞ でもしない限り、P3' と C4' 間の$^{3}J_{CP}$を独立に測定することはできない。このような選択的照射実験はﾘﾝの化学ｼﾌﾄ が一般的に小さいことから実用的ではない。DNA の標準的な構造であるB-型 ﾍﾘｯｸｽ では、P3'-C2' 間のｽﾋﾟﾝ 結合は小さく、一方P3'-C4' 間のそれは遙に大きな値であると推定される。従って、ε - 角の測定精度を向上させるには、H3' とP3' 、C2' とP3' のｽﾋﾟﾝ結合定数をできるだけ正確に測定することが必要となる。前者に関しては既に述べた通りにｽﾋﾟﾝｴｺｰ差ｽﾍﾟｸﾄﾙ 法が有効である。一方、C2' とP3' の間のｽﾋﾟﾝ 結合定数の測定精度の向上は容易ではない。一つの試みは1 Hz程度の小さいｽﾋﾟﾝ 結合定数を精度良く測定するためには、C2' の緩和時間が十分長い必要がある。DNA の分子量が大きくなるにつれ、ﾌﾟﾛﾄﾝ2ケを持つC2' の緩和時間は急速に短くなり、ｽﾋﾟﾝｴｺｰ差ｽﾍﾟｸﾄﾙ によるｼｸﾞﾅﾙ強度変化を正確に読み取ることは困難になる。本報告では、同じﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ の6番目のｱﾃﾞﾉｼﾝ を対象にして、2-位のﾒﾁﾚﾝの一方を重水素化し、磁化が^{13}C-上に移動している期間には重水素照射を行い、ｼｸﾞﾅﾙ強度の低下を少なくする等、精度向上に向けての検討結果を述べる。

【おわりに】

^{13}C、^{2}H- 二重標識したDNA ﾓﾉﾏｰを特定位置にのみ組み込んだﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ を用い、主鎖糖ﾘﾝ酸ｴｽﾃﾙ部分の回転二面角β、ε 等、従来は入手が困難であった構造情報の取得手段を開発した。ﾄﾞﾃﾞｶﾏｰ の中央部分の解析をここで述べた手法で行った結果と、X 線解析結果を対比させることにより、興味ある事実も明らかとなってきている。今後はDNA 主鎖、糖鎖部分のﾀﾞｲﾅﾐｯｸｽ を含めてより詳細な解析を進めて行く予定である。

【文　献】(1) Kawashima, E., Toyama, K., Sekine, T., Ohshima, K., Kainosho, M., Ono, A., Kyogoku, Y., Ishido, Y. Nucleic Acids Symposium Ser. 31, 1994, 41-42.
(2) Ono, A., Tate, S., Ishido, Y., Kainosho, M. J. Biomol. NMR, 1994, 4, 581-586.
(3) 児島長次郎等、投稿準備中
(4) Tsuboi, M., Takahashi, S., Kyogoku, M., Hayatsu, H., Ukita, T., Kainosho, M. Science, 1969, 166, 1504-1506.
(5) Tate, S., Kubo, Y., Ono, A., Kainosho, M. J. Am. Chem. Soc., 1995, 27, 7277-7278.

L13　異種核多次元NMRを用いたRNAポリメラーゼαサブユニットの構造と相互作用の研究

[1]阪大蛋白研、[2]奈良先端大、[3]国立遺伝研
[1]田栄浩、[2]白川昌宏、[1]山崎俊夫、○[1]京極好正、[3]根岸智史、[3]藤田信之、[3]石浜　明

Solution Structure and Interaction of the C-terminal Domain of the RNA Polymerase α Subunit as Determined by Heteronuclear Multidmensional NMR

[1]Young Ho Jeon, [2]Masahiro Shirakawa, [1]Toshio Yamazaki, ○[1]Yoshimasa Kyogoku, [3]Tomofumi Negishi, [3]Nobuyuki Fujita & [3]Akira Ishihama
[1]Institute for Protein Research, Osaka University, [2]Nara Institute of Science and Tecnology, [3]National Institute of Genetics

Abstract

The C-terminal one third of the α subunit of RNA polymerase is known to interact with a group of transcription activator proteins and promoter UP elements. The three dimensional structure of the C-terminal domain of the α subunit, consisting of 98 amino acid residues, was determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. The average root mean square deviation for the backbone atoms of the structured part (from Phe249 to Ile326) was 0.67 Å. The domain consists of four helices with two long arms at its N and C terminals. As far as we know, there are no other protens or domains with the same folding topology. The selective exchange broadening of the amide NMR signals indicated that the contact with the UP element DNA is mediated by helix 1, the N-terminal end of helix 4, and the loop between helices 3 and 4. The proposed contact sites for CRP (cyclic AMP binding protein) and OxyR (an activator for the oxidative response genes) by mutation experiment are found in the same region as those for the UP element.

1。はじめに

大腸菌 RNA polymerase は $\alpha_2\beta\beta'$ のコア酵素といくつかの σ サブユニットのうちの 1 個からなりたっている。そのうち、α サブユニットに関しては、N 末端の約 200 残基がコア酵素の会合に、C 末端の約 100 残基のドメインが転写活性の調節に関与することが知られている。すなわち、この C 末端ドメインを切断してもコア酵素の構成能を維持するが、CRP などの Class I activator による転写活性化能は消失される。部位特異的変異実験により、その Class I activator との相互作用部位が C 末端ドメインのいくつかの残基にあることが認められた。一方、大腸菌 ribosomal RNA 遺伝子、*rrnB* P1 において、UP element と呼ばれる promoter の上流伸張部位に、この C 末端ドメイン単独で塩基配列特異的に結合することが報告された。これらのことは、この C 末端ドメイ

キーワード： RNA polymerase、 UP element、多重共鳴多次元 NMR

でんよんほう、しらかわまさひろ、やまざきとしお、きょうごくよしまさ、
ねぎしともふみ、ふじたのぶゆき、いしはまあきら

ンが転写因子蛋白質と UP element DNA の両方に結合できることを示している。我々は、このドメインはどのような構造をとるのか、また、どのように蛋白質や DNA と相互作用しているかに興味を持った。トリプシン等のプロテアーゼによる消化実験により、C 末端 90 残基程度の部分は安定なドメイン構造を持つことが分かっており、これを大量発現して、多重共鳴多次元 NMR による構造解析を行った。

2。実験方法

a) C 末端ドメインの発現と精製

α サブユニットの C 末端 97 残基と頭にメチオニンを持つのフラグメントに対応する遺伝子 DNA を T7 promoter の下流につなぎ、大腸菌 BL21(DE3)の中で発現させた。$^{15}N/^{13}C$ で均一ラベルした αCTD は、窒素及び、炭素源として $^{15}NH_4Cl$(0.5g/l)と[$^{13}C_6$]-D-glucose(1g/l)を含む M9 培地で生産した。超音波処理で菌体を破砕した後、$(NH_4)_2SO_4$ で塩析して、DEAE イオン交換及び、ゲル濾過クロマトグラフィを行った。精製したサンプルを N 末端分析した結果メチオニン残基が残っていることが示された。超遠心分析の結果、分子量約 12K で、単量体であることが示された。

b) NMR 測定及びスペクトル解析

NMR 測定は上記の蛋白質 2mM 溶液に、30mM KCl、20mM リン酸 buffer、1mM dithiothreitol、pH 6.0 の buffer 条件で行った。Bruker AMX500 と DMX500 を使用し、30℃で測定した。主鎖の帰属のために、^{15}N-edited TOCSY-HSQC, CBCA(CO)NH, CBCANH, HBHA(CBCACO)NH, HBHA(CBCA)NH, HNCO, HN(CA)CO などの三次元測定[A. Bax and S.Gresick, in *NMR of Proteins*, G.M. Clore and A.M. Gronenborn eds. (The Macmillan Press, London, 1993), pp.33-52]を行い、側鎖の帰属には HEHOHEHAHA [A.Majumdar, H. Wang, R.C. Morshauser and E.R.P. Zuiderweg, *J. Biomol. NMR* 3, 387 (1993)]を用いた。距離情報は、mixing time 100ms の 2D homonuclear NOESY 及び 3D $^1H/^{13}C$-、$^1H/^{15}N$-NOESY-HSQC スペクトルから、二面角の情報は 2D HMQC-J スペクトル[L.E. Kay and A. Bax, *J. Magn. Reson.* 86, 110 (1990)]から得られた。スペクトルの processing と解析には、NMRPipe, NMRpipp, Felix, NMRcompass 等を用いた。

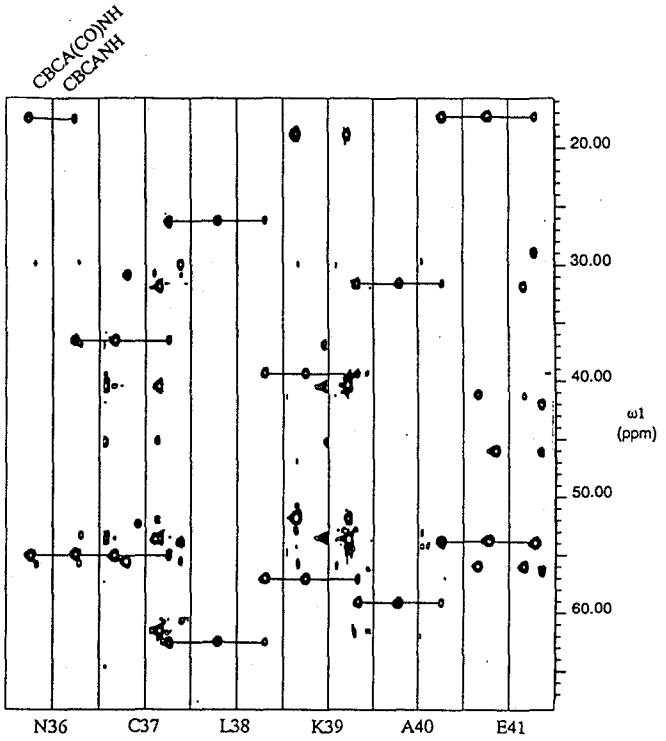
c) 構造計算

強、中、弱の NOE 交差ピークに対して、それぞれ 3.0, 4.0, 4.7A の ^1H-^1H 距離制限を適用し、methyl と methylene proton の場合は適切な pseudo-atom correction を行った。H-D 交換速度が遅い amide proton に対して N-O の距離制限 3.0 から 2.7A、H-O の距離制限 2.0 から 1.8A の水素結合 constraint を適用した。二面角の constraint は、5.5Hz 以下、8.0 から 10Hz、10Hz 以上の $^3J_{HN\alpha}$ 値を示す残基に対して(-90 ~ -40), (-160 ~ -80), (-140 ~ -100)の ϕ angle 制限を適用した。全部で、822 個の NOE constraint、52 個の二面角 constraint、19 セットの水素結合 constraint を計算に用いた。Simulated annealing 計算 [M. Nilges, G.M. Clore and A.M. Gronenborn, *FEBS Lett.* 229, 317 (1988)]を Silicon Graphics 計算機で、X-PLOR version 3.1 program [A.T. Brunger, *X-PLOR Version 3.1* (Yale Univ. Press, New Haven, 1992)]を用いて行った。

d) DNA 結合部位の同定

上記の NMR 測定用 buffer 条件で、蛋白質濃度 0.5mM に対して、25 塩基配列の *rrnB P1* UP element DNA, d(TCAGAAAATTATTTTAAATTTCCTC),50uM を添加して、(^{15}N, ^1H) HSQC 信号の消失又は、変化を観測した。次に、塩濃度を初期 50mM から、100mM, 200mM...800mM まで増加させながら、DNA が解離した時の信号の回復を観測し、また、透析した時の再現性を確かめた。DNA を入れてない時の control 実験と、対照として 22 塩基配列の CRP 結合部位 DNA、 d(TAATGTGAGTTAACTCACATTA)、を

Fig.1



Sequential Assignment using CBCA(CO)NH and CBCANH

Table.1 **NMR Constraints**

Distance Constraints	821	2D, 3D NOESY spectra
Intraresidue	215	
Sequential (| i-j | = 1)	263	
Medium range (| i-j | = < 4)	169	
Long range	174	
Dihedral Angle Constraints	52	HMQC-J Spectrum
Hydrogen Bond Constraints	19 sets	H-D exchange in HSQC exp.

入れた実験も行った。

3。結果と考察

全体 300 個の構造計算で 0.3A 以下の distance violation と 5° 以下の angle violation を満足する 50 個の構造が得られた。その平均構造の folding topology を示したのが、Fig.2 である。 全部で 4 本の helix と、その両端にある 2 つの長い loop でコンパクトな構造を取っている。 N 末端側 loop の Phe249, Leu253, Leu254 と C 末端側 loop の Leu318, Trp321, Ile326 が、Helix 2 の N 末端側 Tyr267, Gly279 と共に hydrophobic core を形成している。また、N 末端側 loop の Pro256 を中心に両側 4 つずつの残基が、それぞれ α-helix 様の turn 構造を取っている。 C 末端側 loop の Trp321 から Ile326 の間も、*cis* proline を含む 2 つの proline 残基を中心にシャープな turn 構造になっている。これらの

Fig.2

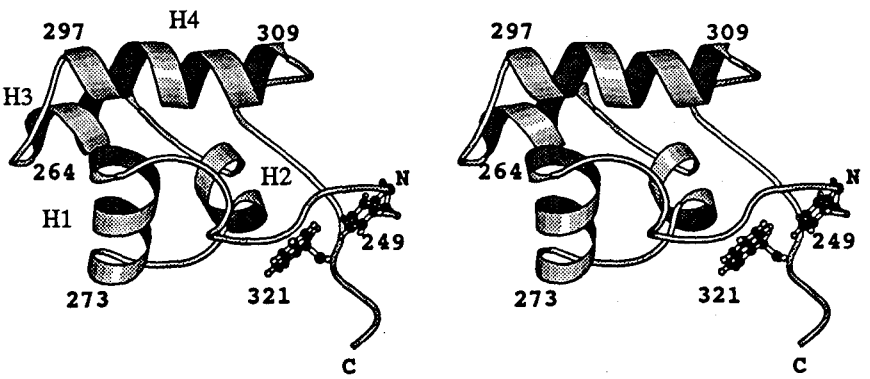
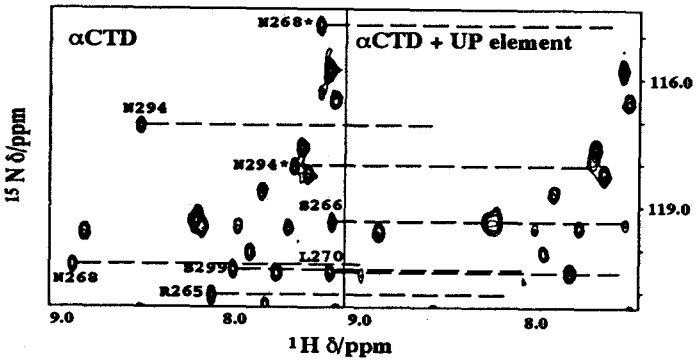


Fig.3



ことは、このドメインがloopの多い構造を取っているにも関わらず、このloop部分まで構造がよく決まった理由になると考えられる。Phe249からIle326まで、主鎖のRMSDは0.67Åで、Val264からSer309のhelical regionのRMSDは0.57Åだった。Phe249より更にN末端側にある16残基からはlong range NOEが出てなく、この部分は高次構造を取ってないと見られ、これは、N,C末端それぞれの独立的なドメインをつなげる長いflexibleなloopが存在すると言う報告を支持している。

DNA添加によるchemical shift perturbation実験からDNAとの結合に関与する残基はGlu261からIle275とThr292からIle303に集中していて、これはhelix 1、helix 4のN末端側半分、helix 4とhelix 3の間のloop regionに相当する。　つまり、helix 1と、その周辺がDNAに直接結合すると考えられる。Mutation実験によって、転写因子CRP, OxyRとの結合に関与すると提案されている残基をこの構造上にmappingしてみると、これもheilix 1とhelix 4のN末端部分に乗っている。これは、C末端ドメインのこの同じの領域が、転写因子蛋白質とUP element DNAの両者に結合でき、そのことがRNA polymeraseの転写活性の増強につながることを示している。

L14

NMRによる抗体の親和力獲得機構の解明

東京大学・薬学部　今里真実，坂倉正義，加藤晃一，高橋栄夫，
○嶋田一夫
機能水研究所　荒田洋治

Immunoglobulin G (IgG) is an important member of the group of proteins that functions as antibodies. One of the most important functions of IgG is the specific recognition of the antigen. Antigen recognition is carried by the Fab fragment with a molecular weight of 50K, which consists of the light chain and the N-terminal half of the heavy chain. It is known that the average affinity of the serum generally increases with time after immunization. This phenomenon is called affinity maturation of immune response. It has been demonstrated that the variable regions of the primary response anti-NP antibody, N1G9 carry none somatic mutations, and those of the secondary response anti-NP antibody, B2 are somatically mutated and B2 has a higher affinity for NP. In the present paper, we study the antibody-combining sites of N1G9 and B2 by using stable isotope aided nuclear magnetic resonance and Fab analogues selectively labeled with ^{15}N. On the basis of the NMR data obtained, we discuss the structures of the antibody-combining sites of N1G9 and B2 .

免疫グロブリン分子すなわち抗体は，外来からの異物を認識し排除する免疫反応の中核を担った糖タンパク質である．代表的な抗体であるIgGは，２本づつ対を成すH鎖とL鎖から構成されている．抗体の機能的特徴の１つである多様かつ厳密な抗原認識はH鎖およびL鎖N末端のV_H，V_Lのドメインで行われ，それぞれのドメインには相補性決定領域（CDR）と呼ばれる３本づつのポリペプチドループが存在している．

抗体は免疫経過とともに，胚細胞由来遺伝子の組み換えや，CDRループを中心とした体細胞突然変異によるアミノ酸の置換により，免疫原に対して親和性を増大させる．この現象はaffinity maturationと総称される．Affinity maturationの機構を解明するために，(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-acetyl (NP), 2-phenyloxazoloneなどのさまざまなハプテンに対する抗体の一次構造の解析が行われている．Rajewskyのグループは，抗NP抗体H鎖33番のTrp→Leuの変異が起こる事により，免疫後期の抗体のNPに対する親和性が約10倍増大することを明らかにした．

本研究では，抗NP抗体群から免疫初期における抗体：N1G9とH鎖33番がTrp→Leuの変異を含む免疫後期における抗体：B2のFabフラグメント（分子量５０K）を対象として，NMR法による高次構造解析および抗原結合過程の速度論的解析を行い，抗原結合部位の動的構造変化が親和性増大に果たす寄与を考察した．

１．主鎖アミド基NMRシグナルの部位特異的帰属

N1G9およびB2の抗原結合部位には，両親媒性を有するTyr およびTrp 残基が豊富に存在する．そこで，TyrおよびTrp残基の主鎖アミド窒素を^{15}N標識したFabフラグメントを用いて，抗原結合部位の構造解析を行った．主鎖アミド基に由来するNMRシグナルの部位特異的帰属は$^{13}C-^{15}N$二重標識法により行った．

２．TyrおよびTrp残基の主鎖アミド基をプローブとする抗原結合部位の同定

スピンラベル化抗原アナログであるNP-AmTEMPOを化学合成し，このアナログの添加実験により抗原結合部位の同定を行った．N1G9 とB2のそれぞれのTyr およびTrp 残基に対して同様のスピンラベル添加実験を行った結果，いずれの場合にも，Y32(L1 ループ），W91, Y92, W96 (L3ループ），および H3 ループの残基にシグナル強度の減少が観測された．また，N1G9においては，W33(H1 ループ）のシグナルも消失し，この変異の起こる部位が抗原結合部位近傍に存在する事もわかる．以上により，H鎖33番のTrp→Leuの変異が存在しても抗原結合部位は基本的に同一であることが推察できる．

免疫グロブリン，抗原－抗体相互作用，分子認識，動的構造

いまざと　まみ，さかくら　まさよし，かとう　こういち，たかはし　ひでお，しまだ　いちお，あらた　ようじ

3．抗原結合部位の動的ミクロ環境

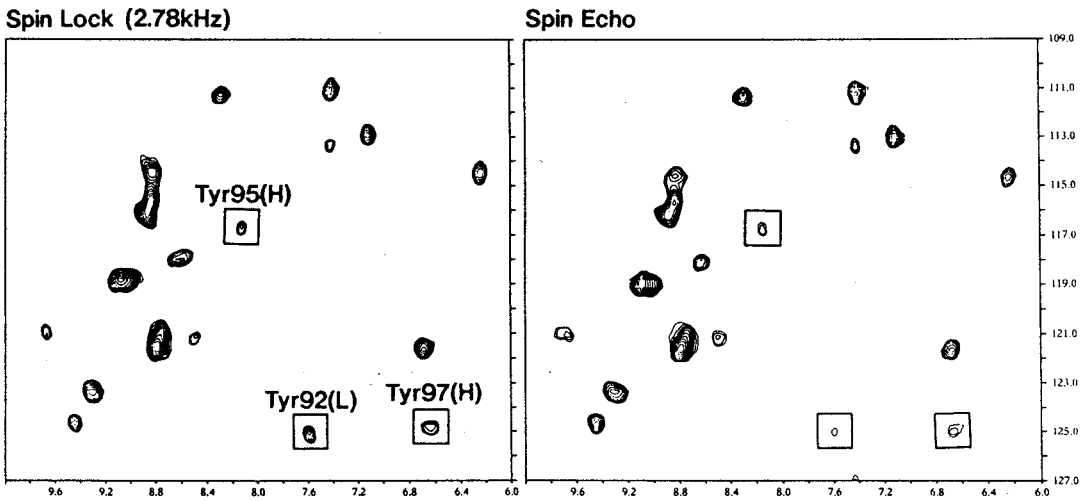
抗原結合過程の速度論的解析：抗原－抗体結合反応などの相互作用系においてその結合定数（K_a）は，$K_a = k_{on}/k_{off}$ (M^{-1})のように表せる．ここでk_{on}は結合速度定数，k_{off}は解離速度定数である．表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したN1G9，B2抗体の結合反応の速度論的解析を行った結果，k_{off}は両者で同一のオーダーであったが，k_{on}に関しては，N1G9では 3.93×10^3 [$M^{-1}\cdot s^{-1}$] であるのに対し，B2では 1.04×10^5 [$M^{-1}\cdot s^{-1}$] であった．すなわち，H鎖 33 番のTrp→Leu の変異は，抗原の抗体への結合しやすさに影響を与えるものであると結論できる．

水素交換速度測定：抗原非存在下のN1G9, B2 の両抗体において，既に帰属のついている主鎖アミドプロトンの水素交換速度を，1) 水素－重水素交換速度，2) 飽和移動法により解析した．その結果，抗原結合部位近傍に存在するいくつかのTyr，Trp残基（Y95(H), Y97(H), Y102(H), W103(H), Y92(L)）に関しては，B2の主鎖アミド水素の交換速度はN1G9に比べ，いずれも速くなっている事が明らかとなった．

横緩和時間測定：N1G9, B2 両抗体の抗原結合部位の動的性質を探るために主鎖アミド窒素の横緩和時間（T_2）測定を行った．特にB2 においては，抗原結合部位の残基で他の部位に比べ緩和時間の短い残基が存在が存在していた（Y95(H), Y97(H), Y92(L)）．スピンエコー（SE）法，及びスピンロック（SL）法の2種類のT_2測定を行った結果，これらのシグナルのT_2にB_1磁場依存性が見られ，化学交換が存在している事が明らかとなった．これは，抗原結合部位にコンホメーション多形が存在している事を示唆するものである．

以上の結果から，H鎖 33 番のTrp→Leu の変異を有するB2の抗原結合部位では，化学交換項に寄与するような，ミリ秒程度の揺らぎが存在している．すなわち，B2 の抗原結合部位は，N1G9 に比べ，より柔軟性をもち，外部からの抗原をより受け入れやすく構築されていると考えられる．

謝辞：SPR測定に便宜をはかっていただいた学習院大学生命分子科学研究所三浦謹一郎博士，小島修一博士に感謝します．また，B2 の cell line を供与していただいた，東京理科大学東隆親博士に感謝します．



^{1}H-^{15}N shift correlation spectra for the Fab fragment of B2

L15

Three-dimensional Solution Structure of Recoverin

Division of Molecular and Structural Biology, Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto[1] and Department of Neurobiology, Stanford University School of Medicine[2]
○Toshiyuki Tanaka[1], James B. Ames[2], Lubert Stryer[2] & Mitsuhiko Ikura[1]

Recoverin, a retinal 23-kDa calcium-binding protein, serves as a calcium sensor in vision. The three-dimensional solution structure of calcium-free, myristoylated recoverin has been determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. The amino-terminal myristoyl group, critical for calcium-dependent membrane targeting, is sequestered in a deep hydrophobic pocket in the amino-terminal domain. The binding pocket is formed by a cluster of aromatic and other hydrophobic residues that are contributed by five flanking helices.

Recoverin participates in the recovery phase of visual excitation and in adaptation to background light. The Ca^{2+}-bound form of recoverin prolongs the photoresponse, most likely by blocking phosphorylation of photoexcited rhodopsin. Retinal recoverin contains a covalently attached myristoyl group or related acyl group at its N-terminus[1] and two Ca^{2+}-binding sites[2]. Ca^{2+} binding to myristoylated, but not unmyristoylated, recoverin induces its translocation to bilayer membranes, indicating that the myristoyl group plays an essential role in the read-out of calcium signals (calcium-myristoyl switch)[3]. Here we present the solution structure of Ca^{2+}-free, myristoylated recombinant recoverin obtained by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy[4].

The expression and purification of recombinant myristoylated recoverin and the detail of backbone NMR assignments have been described elsewhere[5]. Uniformly ^{15}N- or $^{13}C/^{15}N$-labeled (except for the myristoyl group), or unlabeled protein was dissolved to 1.0-1.5 mM in either 95% H_2O/5% ^2H_2O or 99.996% ^2H_2O containing 100 mM KCl, 10 mM [$^2H_{10}$]-dithiothreitol, and 1 mM [$^2H_{12}$]-ethylenediaminetetraacetic acid. Sample pH was adjusted to 6.8-7.0. Most of the NMR observable ^1H (93%), ^{13}C (82%), and ^{15}N (97%) atoms of the protein were assigned. Well resolved ^1H and ^{13}C resonances at the positions 2, 3, and 11-14 of the myristoyl group were unambiguously assigned by 3D HCCH-COSY experiment on ^{15}N-labeled recoverin with a ^{13}C-labeled myristoyl group. The other resonances were assigned by careful inspection of the NOE patterns observed in the 3D NOESY spectra and the NMR-derived structures calculated using the distance restraints associated with unambiguously assigned myristoyl signals. Approximate interproton distance restraints were obtained from 3D ^{13}C- and ^{15}N-edited NOE spectra, 3D simultaneous $^{15}N/^{13}C$-edited NOE spectra, and 2D homonuclear NOESY spectra. Distance restraints between the myristoyl group and the protein were mainly obtained by ^{13}C-edited NOE spectra recorded on the sample whose N-terminal myristoyl group and protein are uniformly labeled with ^{13}C, and by [$^{13}C/F_1$]-edited [$^{13}C/F_3$]-filtered HMQC-NOESY experiment on the sample whose protein portion is labeled with ^{15}N and myristoyl group with ^{13}C. Stereospecific assignments of Leu and Val methyl groups were

Key Words: *Recoverin, Calcium-Myristoyl Switch, Solution Structure, Multidimensional Heteronuclear Magnetic Resonance.*

accomplished using the samples whose Leu or Val methyl groups were stereospecifically labeled with ^{13}C (M. Kainosho, personal communication). Structure calculations were performed with the YASAP protocol within X-PLOR. Calculations employed 2710 interproton distance restraints (comprising 798 intraresidue, 636 sequential, 460 short-range, 668 long-range, and 148 protein-myristate). These data were supplemented by 140 distance restraints for 70 hydrogen bonds and 238 dihedral angle restraints.

The NMR-derived structure contains eleven α-helices (denoted as A to K in Fig. 1) and two pairs of short antiparallel β-sheets. Four pairs of helices constitute four EF-hand type helix-loop-helix structural motifs (EF-1 and EF-2 in the N-terminal domain, and EF-3 and EF-4 in the C-terminal domain). A sharply bent linker (residues 92-97) between the two domains allows the four EF-hands to form a compact linear array. The myristoyl group attached to the N-terminal glycine adopts an extended conformation that projects into a deep, hydrophobic pocket located in the N-terminal domain. The binding pocket is formed by a cluster of aromatic and other hydrophobic residues. In this Ca^{2+}-free state, the methylene protons at positions 2, 3, 11, and 12 of the myristoyl group exhibit clearly doublet peaks in ^{1}H-^{13}C HMQC spectrum because of the anisotropic chemical shift environment of the highly sequestered myristoyl group. Interestingly, these splittings are disappeared by Ca^{2+} binding to the protein, suggesting that the myristoyl group become solvent exposed in the Ca^{2+}-bound state.

The crystal structure of unmyristoylated recoverin with one Ca^{2+} bound[6] is quite different from the NMR solution structure of myristoylated recoverin with no Ca^{2+} bound. The most profound structural difference is found in the relative orientation between the N-terminal and C-terminal domains. In essence, EF-2 is rotated approximately 45° with respect to EF-3. Another significant structural differences are observed in the helix packing in the N-terminal domain. The differences between the solution and crystal structures provide key clues to understand the molecular mechanism of the Ca^{2+}-myristoyl switch.

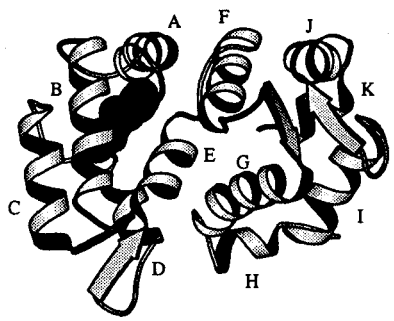


Fig. 1 Schematic ribbon drawing of the energy-minimized average structure of Ca^{2+}-free, myristoylated recoverin. Heavy atoms of the N-terminal myristoyl group are shown as a space filling model. The helices (A, residues 4-16; B, 25-38; C, 46-56; D, 66-73; E, 83-91; F, 98-109; G, 119-132; H, 135-140; I, 148-159; J, 169-178; K, 180-186) are labeled. The figure was generated using MOLSCRIPT.

References

1. Dizhoor, A. M. *et al. J. biol. Chem.* **267**, 16033-16036 (1992).
2. Ames, J. B. *et al. J. biol. Chem.* **270**, 4526-4533 (1995).
3. Zozulya, S. & Stryer, L. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 11569-11573 (1992).
4. Tanaka, T. *et al. Nature* **376**, 444-447 (1995).
5. Ames, J. B. *et al. Biochemistry* **33**, 10743-10753 (1994).
6. Flaherty, K. M. *et al. Cell* **75**, 709-716 (1993).

NMR50周年を迎えて

NMR の仲間達

青野茂行

量子化学者は量子力学とは Schrödinger 方程式を解くことだと言っているが、spin の Schrödinger 方程式なんて意味あるのだろうか。私は早い時期に磁気共鳴にめぐりあったのは幸いであった。量子力学によりよい理解が得られたと思うからである。と同時に素敵な仲間を得た。思い出すままに書いてみたい。

仙台の羽里研に NMR が入ったというので見にいった。VARIAN の 40 メガが立派な御堂のなかに鎮座していて、(柏手を打って) 近づくと、磯部先生がうやうやしく操作されて、エタノールの 4 本と 3 本のシグナルを見せてくださった。この世のものとは思えなかった。私は実験を生で見たのは後にも前にもこれだけである。二高の同級生で柿内研の小松八郎も NMR をやっていた。物性研が駒場にあった頃、彼の部屋を訪ねたら、片隅に鉄の塊がおいてあった。" これなんだ"、" NMR だ"。" 誰が作ったんだ"、" 俺だ"。私はギャフンとまいった。

1962 年に分子分光の国際会議が東京であった。めぼしいのを箱根に集めて理論の satellite symposium をやった。女性の speaker も、というわけで私は広池英子さんを口説いた。彼女のだしものは言うまでもなく I-I coupling。私は Longuet-Higgins と chairman をやった。初めの speaker は Karplus だった。会場はホテルの宴会場で演壇は舞台になっていたから、彼は吊り下がった提灯を仰いで、" I have to sing." さて、広池さんの話が終わると、(彼女は前の晩に和服で登場しようか言っていたが実現しなかった) Gutowsky がやにわに発言して、" sign is negative !" 最新の実測だそうだ。広池さんの計算でも誰の計算でも当時の I-I coupling の符号はプラスと決まっていた。私と Longuet-Higgins がいくら広池さん予稿をのぞきこんでもサインはマイナスにならない。それから暫くして、広池さんは電子相関を考慮にいれてマイナスにしてしまった。

そのうちに私のいた千葉大に清水博さんがきた。彼にはずいぶん教えてもらった。「高分解核磁気共鳴」なる本も頂いて繰り返し読んだ。彼は、自分の頭で考えて書いているので実に迫力がある。誤植についての批判もあるが、独創と間違いはきわどく隣合わせている、と知るべきである。彼が生物物理に去ったのはこの世界のためにまことに惜しまれる。共著者の一人である中川直哉さんも独創性ゆたかな人物であった。

名古屋での討論会のおり、" 水素の 1s 電子が円運動してるなんて嘘だろう、直線運動ではないか、" " YES"。核をぐるぐる廻っていたんでは, indirect I-I coupling も proton hyperfine もありはしない。世の秀才どもの頭には、1s 電子の角運動量ゼロと円運動が平和共存している。まともな量子力学の本の何処を探しても、1s 電子は円運動するとは書いてないが、直線運動するとも書いてない、それらしきことを Bohm の本で見たような気がすると答えたら、彼は水素原子のいが栗モデルなるものを提案した。私はほとほと感心した。彼はまた YADARAF 効果 (逆に読んでみよ) なるものを言い出した。彼のことを知らぬ人は inverse Faraday 効果と呼んでいる。

私の磁気共鳴の仕事に KUBO-TOMITA の焼きなおしがある。進んだ揺動論と cumulant expansion によるこの恐ろしい仕事も、近ごろの多体論を使えば少しは楽になるだろうとの発想である。同じことを ESR で富田さんが早くから考えておられた。富田さんとは何回かお話できたが、久保さんとは藤原先生の赤坂プリンスホテルでの国際会議の折に一言交わして終ってしまった。久保さんは、緩和を viscosity に関連して説明されたと思うが、質問に立った人が、very impressive といいながら内容を更に問うと、viscosity は何処にもある、と答えておられた。神話時代の英雄も何人か鬼籍にはいった。心からご冥福を祈る。

このたびの第34回NMR討論会にあたり日本のNMRの草創期の事柄からの年表をまとめられますこと誠に大慶に存じます。

戦後渡米された諸先生や最尖端科学の情報を提供された諸先生のアドバイス、協力により日本電子は昭和30年(1955)にNMRの商品化に着手することが出来、電波分光学、量子化学の分野の所指導のもとで国産化への歩みを進めることが出来ました。

頭初はオートダイン検出器でロックインアンプで雑音の中から水の信号を検出出来たときは宇宙の新星を見た様な感動を覚えたこと。CW法時代のウィーグルのDecayの美しさに魅惑させられたことなど遠い思い出となりました。

1960年代はバリヤンネルのA-60が市場を席巻していましたがC-60HLがやっと世界から評価される状態でありました。その後FT時代に入り海外製品との厳しい競合が続き製品の機能性能に貢献した面もあると思います。

理科学機器の中でも特にNMRは攻術革新の激しい分析機であると云へますが、それだけ新攻術、応用攻術などメーカーもユーザーもその挑戦に満喫出来ることを幸いに感じます。これからの完極の分析手法として高度化に関係する皆様の益々のご活躍とそのご成果を祈念しております。

1995年8月

小中敏康

縦軸情報を求めて三十有余年

西東京科学大学理工学部　中條利一郎

1　ブロードラインNMRの時代（静岡大学文理学部）

京大大学院を終えて1958年に最初に就職した静岡大学では、NMRの装置もなく、三宅彰先生（当時助教授）のご指導のもと、ブロードラインの高分子への応用について、専ら理論的取扱いを行っていました。京大では寺本英先生（当時講師）のご指導のもと、排除体積効果の計算[1]をやり、物理学会で発表した時、当時の高分子物理学者は皆統計力学を基礎にした研究をしていることを知りました。教養課程を終えて物理学科に配属になった時、小林稔先生（教授、小林祐次博士の御尊父）から、物理学科のカリキュラムでは、量子力学、統計力学、電気力学が三本柱だと教わったのを想い出し、量子力学的高分子物理学を目指したのが動機です。ブロードラインNMRで最も思い出深いのは動的結晶化度の論文[2]で、今でも、特に旧共産圏の人が引用してくれます。

2　HR60の時代（呉羽紡績高槻研究所、その後合併で東洋紡績繊維研究所）

1961年呉羽紡績高槻研究所にHR60が入ることになり、同社に就職しました。同僚に佐藤至朗博士がいます。長井栄一博士（当時部長）のご指導のもと、いくつかの論文を公表しました。塩化ビニリデン(D)と塩化ビニル(C)の共重合体でD-D,C-Cのほかに D-C二連子のピークが観測にかかり[3]、これが共重合体の高分解能NMRの誕生になりました。汎用高分子の中で立体規則性が重要な役割を演ずる、つまり高分解能NMRが出番となるポリプロピレンについても、私どもが世界にさきがけて測定、解析に成功しました[4]。ここでは不十分ながら、後の二中心モデルによる解析の萌芽がみられます。これらの論文で重要な情報は、化学シフトやスピン結合定数のような横軸情報ではなく、各構造異性体の分率に対応する縦軸情報です。標題はそのことを書いたものです。

3　PS100の時代（東京工業大学工学部）

1968年東工大に移りました。ようやくスペクトロメーターにコンピューターが内蔵される時代になり、西岡篤夫先生（当時教授）ご指導のもと^{13}CのNMRを用いて、高分子だけでなく、生体に関連した分子についても研究しました。前者については、シアン化ビニリデン系の圧電性高分子を共重合連鎖、立体規則性、コンホメーション、分子運動とあらゆる方面からNMR（溶液、固体）を用いて研究[5]したのが印象に残っています。後者については、一例として、脊椎動物の視覚を司るレチナールの論文[6]だけを挙げておきます。この頃、研究室にいた安藤勲、井上義夫、朝倉哲郎の各博士も皆さん教授になられ、活躍されていることはご案内のとおりです。

4　GSX500の時代（東京工業大学生命理工学部）

3の時代はかなり長く続きました。超伝導の装置が欲しくて毎年概算要求を出していたのに通らなかったためです。私より前にNMRを始めた先生方は退官されており（年長者でも後から始めて現役の人はいました）、ある席で事務局長に私が現役最古参ですと言ったところ、何故それをもっと早く言わなかったと言われました。その効果でしょうか、その次の年、科研費で270、大学院最先端設備費で500が入り、盆と正月が一度にやって来ました。その頃、生命理工学部が新設され、そちらに移りました。その頃も、私の名前の入った論文は毎年10報以上は出ていますが、私自身は学内では技術職員の組織化のための技術部長という仕事をしており、学外では国大協でやはり技術職員の組織化、高分子学会の編集委員長、関東支部長、副会長、さらには化研連の委員などに専念しており、自分の仕事として論文を紹介するのは面映ゆいので、次に進みます。

5　α500の時代（西東京科学大学理工学部）

1992年に東工大を定年退官し、現在の西東京科学大学で第二の人生に入りました。α500を殆ど独占的に使える恵まれた環境にいます。昔からの因縁で、私の理論に他人様のデータを入れて解析すること[7]と、考古学的試料の測定[8]の二足の草鞋を履いています。後者は重点領域研究「遺跡探査」の一部として行っているもので、平泉の中尊寺の藤原三代のミイラに用いられている絹を対象に、絹の高次構造が気温によって異なることを明らかにしました。

以上、駆け足で過ぎ来し方を見て来ましたが、解析が粗っぽくてもそれを理由にrejectされるような研究だけはして来なかったつもりです。研究室の若い人にも同じことを要求して来ました。創造的な仕事であれば、粗っぽいことを理由にrejectされることはないからです。後から振り返って見ると、随分粗っぽい仕事もしました。でも、創造性に免じて、いずれも、掲載になったものと感謝しています。

1) E. Teramoto, M. Kurata, R. Chûjô, C. Suzuki, K. Tani, and T. Kajikawa, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **10**, 953 (1955)
2) R. Chûjô, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **18**, 124 (1963)
3) R. Chûjô, S. Satoh, T. Ozeki, and E. Nagai, *J. Polym. Sci.*, **61**, S12 (1962)
4) S. Satoh, R. Chûjô, T. Ozeki, and E. Nagai, *J. Polym. Sci.*, **62**, S101 (1962)
5) Y. S. Jo, Y. Inoue, R. Chûjô, K. Saito, and S. Miyata, *Macromolecules*, **18**, 1850 (1985)ほか
6) Y. Inoue, A. Takahashi, Y. Tokitô, R. Chûjô, and Y. Miyoshi, *Org. Magn. Reson.*, **6**, 487 (1974)ほか
7) 例えば、R. Chûjô, M. Härkönen, and J. V. Seppälä, *Macromol. Symp.*, **89**, 173 (1995)
8) 例えば、R. Chûjô, *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, 印刷中

ＮＭＲを始めた頃

東京工業大学名誉教授
西岡　篤夫

何分古いことで、手元の資料も不十分な上、記憶も確かでありませんが、できるだけ思い出して自分の周辺の二三について述べることにします。

電電公社になる前の電気通信研究所の物理研究室で、私は１９５０年頃から高分子物理グループの数人とともに、主にポリエチレンやフッ素樹脂等の結晶性高分子の研究をしていました。結晶化度を定量することと、ガラス転移を中心とする緩和現象の研究が重要な項目でした。’５３年にJ. Polymer Scienceの速報にＮＭＲで結晶化の研究が可能というWilsonとPakeの短い報告がでたのが、この道に入る契機でした。

その前から物理学会ではＮＭＲの研究発表や講演などが活発で、この年にはAnderson博士の講義が東大の物理教室で行われたり、’５４年には久保－富田の理論が出て、日本のＮＭＲの研究活動も日増しに盛んになっていました。高分子の分野でも小田島晟、故相馬純吉、三宅彰、中条利一郎、野原繁三の諸氏が既に研究発表をしていました。

私も講演会などには出かけていましたが、物理研究室で電磁石を作ることを計画したのは’５４年になってからです。ＮＭＲの基礎の勉強はそれ以前から駒場の理工研で故柿内賢信先生のお世話になりましたが、当時同研には小松八郎、南雲道彦、久米潔の諸氏がおられまして、小松氏には実験も指導して戴き、ＰＥ等の測定もしました。電磁石の設計はサイクロトロンの製作をされた熊谷寛夫先生から教わりました。均一度を上げるための磁極のテーパーのつけ方が問題でした。磁極直径２０ｃｍ、空隙４ｃｍ、１００００－１３０００ガウス程度まで使えるように設計し、総重量は３トンでした。研究所の試作工場で製作したのですが、ガントリークレーンまで購入しました。この磁石ができる頃当時の日本電子の故関利正氏が見にこられて「私の方にも一台作ってくれませんか」と言われたのを覚えています。ＮＭＲとしての検出系の設計は研究室の小池康博氏が担当し、完成まで４年かかりました。分解能はエタノールの場合スピナーなしで分裂寸前のスペクトルを与え、７０００Ｇの磁場で数ｍＧでした。もともと固体高分子用に設計したので、液体の高分解能を目的とはしていませんが、当時としてはかなり性能がよかったと思います。

１９５８年にこの装置の完成後間もなく私は高分子材料研究室で、合成、物性、加工、試験全般の研究を見るようになりました。合成高分子では既にナッタの研究以来、立体規則性の問題が焦点となっており、当研究室でも渡辺治昭氏がＰＭＭＡについて各種重合条件の試料を研究中でした。小生はその前から藤原先生その他の方々と東大の駒場で輪講などをともにしていましたが、山口一郎、清水博、荒田洋治の諸氏も当時の仲間です。山口氏がその後東海村の原研でＮＭＲを研究しておられるのを知り、ＰＭＭＡの測定をお願いしました。はじめは溶媒のCHCL3 中の微量の安定剤エタノールの信号に妨げられましたが、それを除いて、アイソとシンジオの混合物をステレオブロックの試料と比較した結果、後者には前者の二つのピークの中間に新しい信号を見つけることができて、高分子の立体規則性をトリアドで分析する端緒となりました。シフトと分裂の識別については、清水氏のほか、故伊藤一夫氏や中川直哉氏のご意見も伺いました。私は新しいピークにつきditacticとしましたが、Bovey はトリアドの単位の観点からheterotacticを用いました。１９６０年６月モスクワでの発表後ミラノでナッタに会って意見を聞きましたが、彼は私のつけた名前にはあまり賛成でなかったようで、やはりBovey の考え方が妥当だったと思います。今当時のサンボーンでとったスペクトルを見直しますと、SBやノイズも結構ありましたので、５枚とも違うスペクトルで比較できたから結論が出せたのだと思います。

磁石のことですが、国際会議のあと、英国のMullard 社の40MHz の永久磁石の装置を見ました。分解能はバリアンほどではありませんが、ルーチンの分析に使えると考えて、買うことにしました。永久磁石の分光器の輸入は多分これが最初でないかと思います。これを横浜からトラックで運ぶときは大分神経を使いました。これにＣＡＴをつけたらＳＮが格段に上るので重宝しました。スイスのＥＴＨに立ち寄ったついでにTrueb-Teuberの磁石も見たかったのですが、買う意思がないと分ると途中から断られました。このパルス技術は優秀でBrukerに引き継がれました。Ｃ１３固体Imaging の実現が楽しみです。

廃虚からの遍歴

祢宜田　久男

１９４９年春、私達の化学教室は疎開先の倉敷市から広島市に復帰した。原爆によって、大学の建物は残ったが、内部は焼け落ち、無残な姿であった。ここに床を張り、電線やガス管、水道管を敷設して、実験室を復旧した。実験机は海軍の衛生学校から、学習机は兵学校から貰い受けた。

このころ、陸海軍の多量の真空管を入手した。これを活用するため、超短波領域での誘電率の測定を企図した。測定方法については、東工大の西巻正郎助教授（森田研究室、のち教授）の有益な助言を受けた。これからの化学の研究にはエレクトロニクスの知識や技術が必要であることを痛感した。

１９４９年夏、原爆による災害調査のため、広島市にABCCが開設された。ここで米国の学術文献が閲覧できた。それは大戦勃発の１９４１年以来はじめてのことであった。こうして、米国では１９４６年、Harvard 大学とStanford 大学で、それぞれＮＭＲの実験に成功した報文に接することができた。

広島大、工学部の平原栄治教授（のち東北大教授）は関係文献をタイプで複写し、輪講を開始した。理学部では櫛田利基助教授（のち教授、Harvard 大を経て Ford 研究所）が、戦前、分光学のゼーマン効果用に使っていた磁石を利用して、実験にとりかかった。そしてノイズの多い中に、やっとプロトンの信号を見い出した。

１９５０年代になると、海外の文献が購入できるようになった。こうして、西ドイツで核四極共鳴の実験に成功したことを知った。櫛田氏は徳島医大の厚井義隆教授（のち東北大教授）や下村健次助教授（のち広島大教授）らとともに臭素やヨウ素化合物の核四極共鳴を研究した。同じころ、東京教育大の小島昌治教授らも、この分野の研究を推進した。

１９５４年、筆者も核四極共鳴の実験に着手し、おもに塩素化合物について研究した。その結果、Hammett の σ の検討、化学結合におけるイオン性や二重結合性の比較、結晶中の相転移などについて新しい知見を得た。１９５８年、米国 東部の Brown 大学の Bray 教授に招かれて、２年間、窒素化合物の核四極共鳴の実験に従事した。この共鳴吸収の検出には、一般にゼーマン変調法が用いられていたが、その吸収線の線形について理論的計算の結果、その特異性を解明することができた。

１９６０年、帰国後は奥田勉氏（広島大教授）らとともに電荷移動型錯体などについて核四極共鳴の研究を続行した。また、下村健次教授、児玉皓雄氏（大工技研所長）らとアンモニウム塩などの結晶について核磁気緩和の研究を実施した。さらに、関連分野のメスバウアー効果の実験に着手、前田豊氏（京大原子炉所長）、酒井宏氏（甲南大教授）、片田元己氏（都立大教授）らとともに鉄、スズ、ヨウ素などの化合物について、その電子状態や化学結合の性質を解明した。

思えば、多難な道のりであったが、多くの人達の力添えによって難所を乗り越え、前進することができた。改めて深謝する次第である。　　（広島大学名誉教授）

Ａ－６０と共に歩いた１５年

九州大学工学部　松尾　拓

１９６３年に発表されて間もない Varian 社のＡ－６０ＮＭＲ分光器が筆者の勤務する九州大学合成化学科に導入されたのがご縁の始まりである。幸いにしてＡ－６０は本当によくできた実用機であった。電磁石冷却水の循環系は筆者らの手作りでもあったので、この高価な装置の運転開始当日は測定室で夜を明かした。それから１５年間、当学科の教職員と卒業研究以上の学生合わせて１２０人余のＮＭＲ測定を一手に引き受けて休まず稼働し続ける事となった。

研究課題としてまず取り上げたのは「化学シフトと溶媒の関係」である。当時は有機化学で機器分析が大活躍を始めた時代で、赤外吸収の位置から化合物中の部分構造を割り出すのが典型的例である。その延長線上でみると ^{1}ＨＮＭＲの化学シフトは画期的な情報源ではあるが、溶媒を換えれば敏感に変動する特長もあった。分子構造解析の立場からのみならず、溶液中での分子間相互作用解明の上でも重要な情報が含まれていた訳である。構造解析のためには、実用的溶媒として重クロロホルムを用いて測定する事に落ち着き、Varianのスペクトルデーター集などが重宝がられた。分子間相互作用の方では、ベンゼンを溶媒として測定するとカルボニル基のα位の ^{1}Ｈシグナルが顕著なシフトを起こすのを始めとして、数多くの例が見つかっていた。これらのデーターから溶液内の分子の相互配置に関する情報を得られる筈であると言う訳で、第４回以来参加させて戴いたＮＭＲ討論会では藤原鎮男先生をはじめ多くの先達と活発な意見交換を行なわせて戴いた。

分子間相互作用を考える場合、空間配置の問題もさることながら、ダイナミックスがより重要でＮＭＲ分光学の最も得意とする分野であることを認識したのは１９６０年代の末である。ＮＭＲスペクトルの温度変化と線形解析の実験に明け暮れ、「化学交換とくに束縛回転の動力学」について様々な体験を通して多くの事を学んだ。大木道則先生の研究室の方々とお知り合いになれたのもこの頃である。１９７０年代に入るとＡ－６０も時々故障を起こした。電源回路の一部を除いて、殆どが真空管で組み立てられた装置であったが,非常によく書かれたマニュアルがあったので、業者と電話で打合せるだけで何とか修理できた。本当に隅々まで知り尽くし、自分の子供のような存在になった。分子の形と動きについて、構造式を見ただけで直ちにおおよその見当がつくようになったのも、全くこのＡ－６０と組んで仕事をしたおかげである。電磁石だけはまだ健在で、学部の一隅に蹲踞している。

永久磁石開発の記

宮島　剛

「草創期」の思い出は沢山ありますが、日立の高分解能ＮＭＲは、永久磁石方式でスタートしましたので、この開発の涙ぐましい昔話を一席、物語ることと致します。

日立磁気共鳴装置は、後輩の青木氏が（株）日立電子で、昭３３年から、ＥＳＲ装置に着手、筆者入社の昭３５年には日立内部で広幅ＮＭＲを開発しました。昭３６年パーキンエルマ（ＰＥ）社と技術提携し高分解能ＮＭＲは開発のスピードアップのため技術導入することになり、内海氏（故人）と筆者が昭３７年英国ＰＥ社に派遣され、筆者は主に、物理，化学関連を分担しましたが、一番の問題点はＮＭＲ用磁石でした。ＰＥ社はムラード社（英）から、４０ＭＨｚ用の永久磁石［１．０Ｔ（ｍａｘ）］を購入しており、これの技術導入は不可、ムラード社の見学も不可であることが分かり、途方にくれた事を昨日のように思い出します。一方、ＰＥ社ＮＭＲを技術指導していたオックスフォード大学の高名なＲ．Ｅ．Ｒｉｃｈａｒｄｓ教授（のちＳｉｒ．）と面談時、ＮＭＲは化学者が使うから、操作性の悪い電磁石より永久磁石が良い。そして、現行は４０ＭＨｚであるがこれからは６０ＭＨｚだと話された。帰国後、牧野部長（後、事業部長、理事、故人）から、６０ＭＨｚ用永久磁石は、「お前がやれ」の一言で、開発担当することになり、大変なことになったと思いました。当時、こんな大物の設計資料はなく、科学文献情報誌を片端から調べ、ＵｇｒｉｎーＳｐａｒａｃのＷーＥ形永久磁石設計法の文献を見つけ出し、これで設計する事に決心しましたが、当時は、別名「タイガー計算機」（手動）および計算尺しかなく、双曲線関数を含む計算は長時間を要しました。１０時に帰寮して、徹夜で計算をして作図を終わり、気が付いたら朝の６時で、部長出席の会議に間に合わせた事を覚えています。今なら楽々スマートなソフトで、１０分もあれば、磁場，均一度の分布，図形付のＣＰＵ計算ができますが。設計目標は１．５トン以内で、このための永久磁石（ＰＭ）材のエネルギ積≧７×１０^{6} Ｇ・Ｏｅが必須条件でした。当時（株）住友特殊金属のＰＭ材は世界でトップレベルでしたが、ペレット状サイズで５～５．５で、７は市販品には無く、且つＰＭ材が不均一ではＮＭＲ用として使えない、ペレット集積では、端面を砥石で研磨要で、すごく高価になる等約４０ｃｍの均質な円板であることが必要であることが分かり、まわりから不可能の失笑すら聞こえてきました。上記、仕特に仕様を提示して、１００トンの回答を頂きました。この様な状況下で、（株）日立金属，磁材研の原田英樹氏（後、常務）が「やりましょう」とＰＭ材開発を引き受けて頂き、一様にきれいな柱状晶が立つアルニコ円板を磁場中冷却法で開発され、スタートより１年内に、１号永久磁石装置が完成しました。この時、「成せば成る」を確信しました。この間、Ｊａｃｋｍａｎ（清水博訳）「核磁気共鳴」に永久磁石は、ＮＭＲ実用には４０ＭＨｚが限度とあり、眠れない夜もありました。磁石完成後、均一度調整法の確立が又、大変でした。筆者設計の調整機構が役立たず、加えて苦労しました。この時、東北大学，池上恒男先生に調整法を教授して頂き，今も感謝しています。次に、永久磁石装置に重要なのは、ポールピースです。高均質，高透磁率材の外部からの入手は不可であることを知り、日立内部で開発，製作することに決し、日立研究所の富田研究員（後、主管研究員）に多種多様の有用な材料を継続的に開発して頂きました。

この様にして６０ＭＨｚでは世界で最初の永久磁石方式ＮＭＲ装置が、日立から誕生したわけです。

例えば高橋憲助先生とのＣ－１３ＮＭＲ第１回発表や、小形ＮＭＲ（Ｒ－２４形）開発時の裏話、そして多くの先生、諸先輩にお世話になった話は多々ありますが、紙面制限で言及できず残念です。改めて、お礼を申し上げ、筆を置くことに致します。

1995年7 月15日

物質工学工業技術研究所
早水　紀久子　様

日本のＮＭＲについての記録作業の件、御苦労様です。
初期の事柄で私が関与し、覚えている事項を御報告致します。ただし思違いがあるかもしれませんので、関連の先生方の情報と照合して訂正をなさって下さい。

私が電気通信大学の藤原　鎮男教授のもとに弟子入りしたのは1956年のことで、当時藤原研では手作りの固体用広幅ＮＭＲでの測定が進んで居りました。確か1957年には、藤原教授が高分解用に、Illinois大学で使って居られたものと同型（たぶん）の永久磁石を輸入され、教授自ら磁石の調整を行って居られました。

私が原子力研究所に入所の決まった1957年にＮＭＲ機器の購入に当たり、最初Varian社のHR-40 を予定していたところ、HR-60 が新たに販売されるということで、急遽HR-60 の発注に切り替えられました。測定開始は1959年です。

当時、国内の高分解能ＮＭＲ機は東北大学、非水研の羽里源二郎教授研究室のHR-40 と，阪大、産業科学研の湯川泰秀教授研究室のHR-40 （いずれもVarian社製）の２台のみでした。後者は原子力研での発注直前の輸入だったと思います。

原子力研でのＮＭＲ設置計画に当たり、東北大、非水研の池上恒夫氏から設備上の数々の御忠告を受けたことはいまでも忘れがたい思出です。この頃のVarian社ＮＭＲは電磁石を用いて居るため、高分解能スペクトルを測定するには磁場の安定化が最も重要な問題でありました。このためHR-60 ではsuperstabilizer により磁束を制御しておりましたが充分でなく、これに加えて温度制御された冷却水による電磁石の温度制御がきわめて重要であることがわかってきました。

原子力研のHR-60 で我々が測定を始めた頃、東大物性研の柿内賢信教授のもとで、国産の大型永久磁石を用いた高分解能ＮＭＲ機の試作を進めて居られました。磁石のPole Pieceは確かいくつかの部分からなっており、一部に多少の不均一があったようです。測定がどのようにはかどったのか、よく存じません。

原子力研の我々には多数の測定依頼が舞いこみ、副次的な効果として多くの研究者とお知り合になれたことは大変幸でした。

山口一郎（元上智大学理工学部）

ウィグルに魅せられて

山本　修

ここ２０年ばかりの間に私が所属していた東工試も化技研から物質研へと名前を変えたが、その東工試時代、東レに移られた額田健吉氏（現在、神奈川科学技術アカデミー）から私がＮＭＲを引き継いだのは昭和３６年の終わり頃であった。それまで全く違った分野でトグロを巻いていた私は、非常に面食らいつつも嬉々として、残された唯一人のスタッフでありＮＭＲに関してはほぼ１年先輩に当たる鈴木昭夫氏（後日本電子に移られ、現在は鈴木システム研究所を主宰）に教わりながらにわか勉強を始めたものである。装置は Varian 社の DP-60 である。この装置は最高磁場強度 14,000 ガウス（現在はテスラー単位だが、当時はガウスであった）で、磁場は任意に変えることができ、高分解能および広幅の両方が測定できる当時としては大変贅沢な装置であった（DP とは double-purpose の意味である）。なにしろ機器分析の黎明時代であった。今ほど豊かではないのに高価な装置が買えた代わりに、それは東工試の分析センターの目玉でもあった。明日からお前が責任者だと言われ、一寸ばかり待って下さいとは言えないのである。それでもあまり辛いとは思わなかったのは、それまでの仕事に比べて余程性が合っていたのと、これだけの贅沢な装置が使用できると言う研究者なら誰でもが感じる喜びがあったためであろう。その意味では当時私などよりも余程ＮＭＲについて勉強され、それでも予算の関係で思うような測定が侭ならなかった諸先輩に比べ、私は大変な幸運に恵まれたといえるであろう。

その頃の東工試では種々の情勢を考慮し、一群の研究者を対象にし午後５時以降 DP-60 を開放する方針を打ち出していた。その線に沿って時々東工試に来て測定をされた方々には当時東大理学部の荒田洋治氏、山本毅雄氏、岩村秀氏、薬学部の川添豊氏、電通大の中川直哉氏等がおられた。これらの方々は私にとっては誠に得難い教師であった。また隣の部屋には何故か日本電子の 40MHz の装置が置かれていた。そのお守り役として竹内誠氏と大西柾子氏が頻繁に出入りされていた。これらの人々に支えられ何とかＮＭＲへの出発をすることが出来たのである。それにしても当時は Varian 社の独走時代であった。今から見ると DP-60 もかなり無骨な装置ではあるが、それでも日本電子の装置と比較すると３ナンバーの乗用車と軽トラのようなものである。額田氏の考えによるものであろうが、今振り返ってみると、自社の装置を Varian の装置の横に置くことにより、なりふり構わず新しい技術を吸収しようとした当時の日本を代表する熱気を感じるのである。

このように当時 DP-60 は誠に素晴らしい装置ではあったが、今から考えると大変厄介で、見方によっては誠に頼りない装置であった。最近の人は驚くかも知れないが、NMR シグナルを使って磁場を固定するいわゆるロック方式はまだ開発されていなかった。外部ロック・システムを備えた名機 A-60 が Varian 社から発表されるまでにはまだ１、２年の時間が必要であった頃である。ロック・システムがないことは例えて言えば、小舟に乗って入江に浮かび、そのどこか一箇所に錨も使わずに静止しようと試みるようなものである。磁石に仕掛けられた色々な装置のおかげで大きな波や急激な潮の流れが起こることは何とか抑えられているものの、あとは潮の流れをどうにか検知し、それに逆らうように手で漕いで舟を静止状態に保つしか方法がないのである。

分解能も大きな問題の一つであった。これは今でも大問題には違いないが、超伝導磁石の場合にはその優れた安定性のために、一度念入りに調整すればあとは剰り問題なく日常的な測定が出来るはずである。カレント・シムによる分解能を向上させる方法は今と原理的には同じであったが、何しろ磁場のご機嫌がその日その日によって違うのである。測定を始める前にはサイクリングと言うことをやった。これは短時間磁場を少し高くした後、元の共鳴磁場に戻し、履歴特性を利用して磁場の均一性を向上させる手段である。一種のおまじないのようにも見えるが、やれば必ず効果があるように思えた。（23,000 ガウス (100MHz) の装置では鉄芯の磁石は既に飽和しているからこの方法は使えない）。後はひたすらシムを動かして最適の磁場を得るようにするのである。いよいよの場合には、磁石の横についているジャッキのレバーのようなもの（この前鈴木氏に思い出して戴いたらトリマーと言う名前であった）を動かして磁石の両極面の平行度を変えるという荒っぽいこともやった。

この様に毎日苦心して磁石のご機嫌をとった後、素晴らしい分解能が得られた場合には、名工が良い作品を作った時のような満足感があった。当時分解能の目安としてはシグナルのウィグルが最も良く利用された。これはシグナルを横切って掃引を行う場合に生じる過渡現象である。シグナルの線幅が狭い（分解能が高い）ほど、また掃引速度が速いほど盛んにウィグルが生じる。苦労した後のウィグルは私にはこの世に並びものの無いような芸術品であった。チャート上にシグナルを描かせる時、ウィグルに合わせて首を振っている自分を発見して苦笑したことも再三ではなかった。FT 装置が開発されてウィグルが見られなくなった時は、何とも言えぬ味気なさを感じたものである。

シグナルによるロック・システムが無いので、磁場は常にゆっくりとではあるが変動している。従って低磁場側から高磁場側へ掃引してスペクトルをとった後、今度は反対側へ掃引を行ってスペクトルをとる。実際にはこの操作を少なくとも３回は繰り返し、それぞれのスペクトルから得たシフト値の平均をとる。これは一見簡単ではあるが、シグナルの本数が多い場合、実際には大変な作業である。物差しを持って奮闘した後、簡単な比例計算を繰り返す作業は退屈を極める。それに当時は今のような電卓は全く存在しなかったことを思い出して戴きたい。電動式の計算機さえ高嶺の花であった。

書き出したらきりがないし、紙面は残り少くなった。ともかく、今の FT-NMR 測定装置を大量生産型の精密なロボット式工場に例えるならば、当時の装置はまさに手作り職人の道具であったように思われる。苦労はしたが、測定されたそれぞれのスペクトルには職人芸を感じさせる風格があったと自負している。いずれにしてもこのようにして私のＮＭＲとの付き合いは始まったわけである。現在の物質研の早水紀久子氏が入所してきたのはそれから１年と少しばかり経った昭和３８年春であった。

著者索引

（あ）
青野茂行 389
赤坂一之 215
赤坂一之 217
阿久津秀雄 47
阿久津秀雄 109
浅川直紀 23
浅川直紀 73
朝倉哲郎 123
朝倉哲郎 339
芦川幹也 119
阿曽幸男 231
安達隆二 145
阿知波洋次 153
安部明廣 63
安部明廣 121
荒田洋治 385
有吉安男 343
安藤　勲 51
安藤　勲 63
安藤　勲 73
安藤　勲 89
安藤慎治 51
安藤慎治 89

（い）
井川粛子 327
伊倉光彦 387
池田　博 311
池田龍一 221
石井俊輔 347
石井佳誉 43
石川順也 363
石川彦成 191
石黒正路 329
石田寿昌 289
石田信昭 279
石田宏之 167
石田正登 167
石橋善弘 127
石浜　明 381
石丸臣一 221
伊勢伸之 311
板井悠二 265
市川さおり 189
市川さおり 353
伊藤　満 7
伊藤　隆 327
伊藤　隆 335
稲垣冬彦 189
稲垣冬彦 353
稲垣冬彦 355
井上多門 271
井上　真 349
井上義夫 23
井上義夫 73
今里真実 385
今城精一 329
今城文雄 65
入山恭彦 139
岩井成憲 365
岩田　真 127

（う）
上口智治 351
上坂伸宏 239
上坂伸宏 249
上田貴洋 157
上野昭彦 311
鵜澤　洵 163
鵜澤　洵 207
内田健一 43
内海博明 199
内海博明 203
内海博明 211
馬屋原慶子 179
裏岡昭博 271

（え）
江口太郎 9
江口太郎 135
餌取英樹 105
江成政人 345
恵良聖一 239
恵良聖一 241
恵良聖一 245
恵良聖一 249
遠藤一央 159

（お）
大内田調 133
大石　修 67
大石　修 69
大木進野 321
大木進野 323
大久保忠恭 365
太田善夫 267
大竹亮子 359
大谷敏夫 329
大塚栄子 365
大坪　隆 55
大西忠博 239
大箸信一 333
大橋祐二 51
大橋祐二 89
緒方一博 347
岡林博文 101
岡林博文 105
岡本　敏 121
小川誠二 183
小川秀次郎 279
小川雅弘 363
荻野孝史 259
小椋賢治 353
小椋賢治 355
尾崎拓男 1
尾崎拓男 119
小野　明 109
小野　明 313
小野　明 317
小野　明 377
小野　晶 109
小野　晶 313
小野　晶 377

（か）
甲斐荘正恒 43
甲斐荘正恒 109
甲斐荘正恒 153
甲斐荘正恒 313
甲斐荘正恒 317
甲斐荘正恒 377
梶　弘典 93
梶　弘典 167
梶原孝彦 241
梶原孝彦 245
梶原孝彦 249
片平律子 331
曽良達生 359
加藤一夫 239
加藤一夫 249
加藤晃一 385
金折賢二 369
金沢洋子 179
金子広明 17
狩野広美 279
鎌足雄司 215
釜野徳明 297
釜野徳明 301
上垣内みよ子 289
神谷昌岳 149
上平美弥 81
神村耕二 217
亀田恒徳 51
亀田恒徳 89
鴨　修 199
鴨　修 203

川上　勝　215
川端　潤　293
河村智行　119

（き）
木川隆則　349
菊地耕一　153
木津治久　297
木田　惇　191
北川　進　159
北澤　聡　121
木下隆利　237
木村敦臣　227
京極好正　361
京極好正　381
銀羽洋行　351

（く）
日下義章　255
串田克彦　189
工藤修士　191
國　直人　227
久保　厚　65
久保善大　313
久保喜大　377
久保庭　均　351
熊木康裕　203
栗田順一　313
栗田順一　377
栗原範明　195
黒木重樹　89
黒子弘道　51
黒子弘道　63
黒子弘道　89
黒田仁志　347
黒田義弘　363
桑田一夫　241
桑田一夫　249
桑田一夫　337
桑原和弘　93

（け）
釼持基子　159

（こ）
小池芳雄　133
小泉美香　279
河野静江　211
河野敏明　359
香村正徳　343
越野広雪　163
越野広雪　207
小嶋茂雄　231
小島正樹　359
小島康彦　153
巨瀬勝美　269
小関泰平　245
小竹文乃　297
小竹文乃　301
児玉　徹　361
小中敏康　390
小林邦子　345
小林祐次　361
五味雄一郎　283

（さ）
斉藤一功　275
斎藤公児　285
斉藤　肇　3
斉藤　肇　77
斉藤　肇　81
斉藤　肇　85
斉藤　肇　113
斎藤もよこ　321
斎藤もよこ　323
坂倉正義　385
坂本　博　349
佐久間千勢子　351
櫻井　実　23
櫻井　実　73
佐々木健一　27
佐々木元子　347
佐藤和則　55
佐藤三男　25
皿井明倫　347
三瓶厳一　345
三本木至宏　361

（し）
志野英雄　191
篠崎史義　289
篠原正昭　285
柴田健志　331
柴田武彦　327
柴田武彦　335
嶋田一夫　385
清水レナット宣男　63
志村令郎　349
下村泰次　47
荘司　顯　1
荘司　顯　119
白川昌宏　381
白木弘之　139
神藤平三郎　351
新村俊幸　179

（す）
末松浩人　195
菅瀬謙治　109
杉浦伸裕　275
杉浦眞喜子　289
杉沢寿志　1
杉田陸海　189
杉原秀樹　143
鈴木榮一郎　343
鈴木榮一郎　359
鈴木信三　153
鈴木基文　275
鈴木康彦　237
須藤　誠　191

（せ）
瀬尾芳輝　255
瀬戸治男　305

（そ）
曽我部啓介　237
曽我美　勝　239
曽我美　勝　241
曽我美　勝　245
曽我美　勝　249

（た）
髙島　一　13
髙島　一　15
髙島　一　17
髙島浩幸　367
髙橋健治　359
髙橋征三　259
髙橋栄夫　385
髙山俊夫　133
竹内繁樹　283
竹腰清乃理　7
竹腰清乃里　35
竹腰清乃理　39
竹腰清乃理　117
竹腰清乃里　129
武田和行　117
武田　定　53
武田　定　55
武田　定　127
武田直登　51
武田佳宏　349
楯　真一　313
楯　真一　377
伊達　健　339
田中俊之　329
田中俊之　387
田中真司　13

田中　晋 221
田之倉優 359
田村信一 285
田村亘弘 139
田村　充 253
田村祐介 23

（ち）
秩父志行 267
千葉　惇 267
中條利一郎 391
張　恵平 297

（つ）
辻　暁 3
辻　暁 77
辻　暁 81
辻　暁 85
辻　暁 113
辻田義治 149
辻田義治 237
津田　栄 321
津田　栄 323
堤　耀廣 121
堤　耀廣 123
堤　耀広 171
津野久幸 285
津波古充朝 9

（て）
出口健三 1
出口健三 159
手島志帆 285
手島孝人 17
出村　誠 123
出村　誠 339
寺尾武彦 7
寺尾武彦 35
寺尾武彦 39
寺尾武彦 43
寺尾武彦 65
寺尾武彦 117
寺尾武彦 129
寺沢宏明 355
寺田　透 335
田　栄浩 381

（と）
土井悦四郎 245
徳永幸夫 145
戸田不二緒 311
戸原　明 25
富岡　靖 297

（な）
内藤　晶 3
内藤　晶 77
内藤　晶 81
内藤　晶 85
内藤　晶 113
中井利仁 223
中上　寧 249
中川照眞 363
永阪文惣 97
中沢賢一 347
中嶋隆人 15
中辻　博 13
中辻　博 15
中辻　博 17
長土居有隆 345
中西洋志 309
中西洋司 333
中野龍俊 149
中原　勝 235
中村亘男 9
中村亘男 97
中村亘男 135
中村春木 345
中村春木 351
中村道衛 311
中山朋大 301
中山尋量 9
中山尋量 135
鳴海純一 19

（に）
西岡篤夫 392
西崎知子 365
西澤　節 275
西中太郎 327
西村勝之 3
西村善文 345
西村善文 347
西山裕介 65
新田勝三 149

（ね）
根岸智史 381
祢宜田久男 393
根本　直 333

（の）
野川俊彦 297
野坂篤子 367
野坂篤子 369
野尻洋一 55
野村　薫 39

（は）
伯水英夫 361
橋爪大輔 51
橋爪大輔 89
橋本知孝 139
長谷川憲一 285
長谷川 淳 361
長谷川節夫 239
波田雅彦 13
波田雅彦 15
波田雅彦 17
畠中秀樹 347
畠中秀樹 353
服部憲和 101
馬場雄久 19
馬場雄久 27
浜谷　徹 359
林　繁信 157
林　宗一 43
林　征治 275
早野尚志 261
早水紀久子 143
早水紀久子 175
原園としえ 145
原田義則 253
引地邦男 321
引地邦男 323

（ひ）
日元　徹 199
日元　徹 203
日元　徹 211
平沖敏文 121
平沖敏文 123
平沖敏文 171
平川和文 261
平谷和久 143
平間正博 329

（ふ）
福井洋之 19
福井洋之 27
福岡美香 283
福士江里 293
福田純子 329
福田茂一 55
福田光順 55
福谷　章 113
藤井直之 199
藤井信孝 363
藤田信之 381
藤原健一郎 215
藤原鎭男 185

藤原敏道 47
藤原敏道 109
藤原英明 227
降旗一夫 305
古屋秀峰 63
古屋秀峰 121

（ほ）
北條博彦 23
堀井文敬 93
堀井文敬 167
本田憲治 159

（ま）
前田満雄 283
牧田貴子 313
牧田貴子 377
松井　茂 31
松井　茂 271
松尾　拓 397
松多健策 55
松田弘喜 19
松田弘喜 27
松田裕生 97
松田　譲 331
真庭　豊 153
丸田悟朗 53

（み）
三浦和紀 321
三浦和紀 323
三浦宏一 19
三浦宏一 27
三浦　等 31
三木孝史 275
水越利巳 343
水谷高彰 51
水野　猛 351
溝淵　潔 345
三井洋司 333
三石　安 309
三森文行 265
南　雅史 123
南園忠則 55
宮城　慧 135
三宅洋子 153
宮島　剛 394
宮島清一 67
宮島清一 69
宮島清一 223
宮林延良 199
宮林延良 211
三好利一 129

（む）
武藤　裕 349
村上政隆 255
村上政隆 261

（も）
森　吉彦 139
守川壮一 345
森田康司 255
森山賢治 353

（や）
八木達也 171
矢沢道生 323
安岡弘志 57
柳沢　勝 143
矢原一郎 353
矢吹　孝 327
山垣　亮 309
山口一郎 395
山口　兆 53
山口　兆 55
山口　兆 127
山口　悟 77
山口　徹 217
山崎憲一 361
山崎　悟 139
山崎俊夫 375
山崎俊夫 381
山崎俊正 351
山崎俊正 361
山崎基生 331
山下晃太 301
山田博昭 217
山室憲子 221
山本　修 396
山本春彦 345
山本泰彦 371

（よ）
横山茂之 327
横山茂之 335
横山茂之 349
吉岡澄江 231
吉岡　大 265
吉崎和男 261
吉田卓也 361
好田真由美 331
吉野明広 101
吉野明広 105
吉水広明 149
吉水広明 237

（わ）
若井千尋 235
和田光人 23
渡辺和哉 105
渡部徳子 145
渡辺尚彦 283
渡辺裕之 305
渡辺庸一 23
亘　弘 241
亘　弘4 261

（A～Z）
Ames JB 387
Arvidsson K 333
Barzykin AV 175
Brennan RG 345
Cross TA 123
James F 159
Griffin RG 61
Heaton BT 135
Kay LE 375
Laue ED 335
Longoni G 135
Nähring J 135
Price WS 175
Schechter AN 239
Schleich T 337
Shumacher MA 345
Stryer L 387
Wälchli M 359
Williamson MP 339
Yu Yihua 361

キーワード索引

2次元固体NMR	P29
2次構造	P87
2D exchange NMR	L3
2D NMR	P79
2D NMR	P80
3D	P71
3D-NMR	P86
3D-NMR	P87
3D-NMR	P102
(A)	
ab initio UHF/有限摂動法	P2
Abu(L-2-aminobutylic acid)B7	P95
Alイオン	P7
^{27}Al MAS NMR	P42
^{27}Al STATIC NMR	P41
Aluminosilicate	P42
Ascidiacyclamide	P77
Asp^{B7}	P95
Aspergillus niger	P102
(B)	
bond angle	L3
Borneol	L5
bubble	P71
bufadienolide	P79
(C)	
c-Myb	P97
^{13}C	P20
^{13}C NMR	P17
^{13}C スピン拡散	P25
^{13}C-^{13}C coupling constant	L5
^{13}C-CP/MAS	P26
^{13}C-^{13}C, ^{13}C-^{15}N双極子相互作用	P29
^{13}C NMR	P16
^{13}C NMR	P56
^{13}C NMR	P60
C_2symmetric molecule	P78
cadmium	P69
^{113}Cd NMR化学シフト	P37
cerebrovascular lesion	P70
$(CH_3NH_3)_5Bi_2Br_{11}$	P35
chemical shift	P20
Chemical Shift	P4
cold denaturation	P54
conformational analysis	P82
CRAMPS	L1
Cross polarization	P9
Cross-relaxation times	P61
cross-relaxation	P62
CT ^{1}H-^{13}C HSQC	L12
cytochrome	P103
(D)	
deuteration	L11
deuteron NMR	L3
Diffusion	L8
diffusion	P66
dihedral angle	L3
dipolar interaction	P10
dipolar interaction	P31
distance geometry	P90
distance geometry	P91
diterpene	P80
DMF	P7
DNA	P84
DNA	P88
DNA•RNA hybrid duplex	P105
DNA結合ドメイン	P96
DNA結合領域	P97
Dodecylammonium Chloride	P55
(E)	
Electron Correlation	P4
Endothelin-2	P91
(F)	
F標識糖	L9
Fermi contact項	P1
Fermi contact項	P3
foam	P71
FOBF	P1
free volume	P36
(G)	
gel	P64
GRB2	P101
(H)	
H-NS	P99
H-NS-DNA複合体	P99
^{1}H,^{2}H,^{17}O and ^{35}Cl NMR Spectra	P55
^{1}H双極子結合^{15}N粉末スペクトル	P30
^{1}H-^{13}C NOE	P25
^{1}H-NMR	P62
^{1}H-NMR	P103
^{1}H-NMR	P104
^{1}H-NMR	P105
^{2}H核安定同位体ラベル	P34
helix	P91
heme	P103
Hemolytic Anemia	P61

high pressure NMR P54
HMQC P65
HMQC P67
homo spin decoupling P51
HSQC P48

(I)
IHD P3
in vivo P67
in vivo ^{31}P NMR P69
IN-VIVO P73
INADEQUATE L5
internal motion P93
intra-/inter-unit NOE P78
isotopomeric asymmetry P78

(J)
J-coupling P84

(K)
^{39}K and ^{89}Rb MASNMR P45
Kaolinite P42

(L)
^{7}Li-NMR P39
Liquid Crystal P55

(M)
M-SHRSP P70
Magic-Angle-Spinning P57
magnetic field homogeneity P47
magnetization transfer P64
MAS P10
MAS P31
Met-enkephalin P57
MHPOBC P56
mixed $K_xR_{b1-x}X$(X=Br,I) crystals P45
molecular structure P20
molten globule-like state P62
MRI P70
MRI P71
MRI score P70
multidimensional NMR L11

(N)
N-H•••O=C水素結合 P30
N-H原子間距離 P30
^{15}N化学シフト P32
^{15}N-CP/MAS NMR P35
^{15}N-edited P87
Na^+チャンネル P104
Near-Magic-Angle-Spinning P57
NHD P1
NHD P3
NMR P6
NMR P46
NMR P67
NMR P91
NMR P96
NMR P99
NMR化学シフト P94
NMR画像 L9
NMR緩和時間 P58
NMR顕微鏡 P74
NMR imaging P71
NMRPipe P86
NMRPipe P87
NOE L6
NOE P79
NOE P80
NOE P82
NOE P83
Nuclear magnetic resonance(NMR) P61
nucleic acid P93

(O)
O-ROESY P93
off-resonance irradiation P64
oxidative phosphorylation P69

(P)
[^{31}P]-スピンエコー差スペクトル L12
^{31}P-NMR P68
^{31}P NMR L4
PASS-ROESY P78
peptide P20
peripheral nerve P66
PETフィルム P26
PFG P51
phase-separation P36
Pi visibility P69
plant cell wall P82
Poly(acrylate) L7
Poly(β-phenethyl L-aspartate) P33
poly(styrene) P36
poly(vinyl methyl ether) P36
polymer blend P36
pressure denaturation P54
protein P93
protein stability P54
pulse P67
Pulsed Field Gradient L5
Pulsed Field Gradient L8
pulsed-field NMR P66

(R)
Raf-RBD P92
Ras P92
rat liver P69
RecA P88
Red blood Cells(RBC) P61
REDOR L2
relaxation matrix refinement P105
resolution P47
resolution P72
restricted diffusion P66
Restriction L8
RFインホモジニティ P48
ribonuclease A P53
ribonuclease A P54
RNA polymerase L13
RNA結合蛋白質 P98
ROESY P51
rotary resonance P31
Rotator Phase P55

(S)
^{45}Sc-NMR P15
SCF P4
Selective non-Inversion T1 P77
Selective 2D experiment P51
semi-empirical MO method P45
serum albumin P62
SH3 P101
shim P47
Si NMR化学シフト P2
^{29}Si CP/MAS NMR P42
^{29}Si MAS NMR P42
simulated annealing P90
simulated annealing P93
SLDF法 P30
Solid State NMR P55
solid state NMR P10
solid state NMR P20
solid state NMR P31
Solidago altissima L P80
solid imaging P72
Sos P101
spacerの効果 P27
stable isotope P84
Statesフォーマット P86
structural transition P62
structure P91
structure analysis P84
Sx1蛋白質 P98

(T)
T_1 L6
T_2 L6
TANGO-HMBC P81
tetrahedral magic echo P72
thermostability P103
Ti(0.3%Sc)O_2 P15
TOCSY P51
transferred NOE P88
Transport L8
triple resonance NMR L11
Tunneling P14

(U)
Unstable hemoglobin P61
UP element L13

(V)
vascular cast P70

(W)
water P66
water-polymer interaction P64

(X)
X-ray diffraction P45
XCS P20
^{129}Xe-NMR P36
xyloglucan oligosaccharides P82

(Z)
ZnS:Ag,Al P41

(α～ω)
ε-カルボベンゾキシL-リシン P32
πパルスの有限長効果 L2

(あ)
アクチン結合タンパク質 P100
アミドプロトン P94
アンタゴニスト P90
安定性 P58
安定同位体標識 P12
安定同位体標識 P29
安定同位体標識 DNA L12
安定同位体標識ヌクレオシド P85

(い)
イオン会合体 P60
異種核間双極子相互作用 P11
一次元NMR P52
イノシトール P46
異方的拡散 P18

（う）
運動性 P58

（え）
液晶 P18
液晶NMR P17
液体ﾍﾘｳﾑ温度多核広幅NMRﾌﾟﾛｰﾌﾞ P14
エチレンアイオノマー P60
エンケファリン P22
延伸効果 P26
エンドセリン P90
エンドセリン P106

（お）
オーダーパラメーター P16
オフレゾナンス効果 P48
温度ジャンプNMR P53

（か）
回転異性状態近似 P16
回転相関時間 P59
化学シフト L1
化学シフト画像 L9
化学シフト等高線表示 P94
化学シフトの異方性 P15
化学シフトの異方性 P44
拡散係数 P75
核酸の主鎖構造 L12
核磁気緩和 L6
核磁気緩和 L7
核磁気緩和 S1
核四極子結合定数 P15
核四極相互作用 P44
果実 P73
活性残基 P95
門松ローター P13
ガマ毒 P79
がん原遺伝子産物 P97
がん診断 L9
環電流効果 P6
緩和 P43
緩和時間 P73

（き）
消え残り(subtraction artifacts) P50
基底関数依存性 P1
絹 P34
強誘電性相転移 P35

（く）
空隙解析 P76
グリシルグリシン P24
グリシン含有ペプチド P30
クレアチン・キナーゼ P68

（け）
欠失変異体 P99
結晶-非晶構造 P25
結晶化度 P60
結晶構造 P22
ケミカルシフトパウダーパターン P17

（こ）
高圧 P59
高温超伝導体 S1
抗原-抗体相互作用 L14
交差緩和 P77
交差緩和時間 P63
交差分極 P8
高次構造 P21
高次構造 P23
高次構造 P96
合成RNA P98
構造解析 P37
構造決定 P92
構造転移 P24
広幅^{2}H-NMR P28
酵母カルモデュリン P87
糊化 P75
固相合成 P95
固体^{13}C CP/MAS NMR P38
固体^{13}C-NMR P11
固体NMR P24
固体NMR P44
固体高分解能NMR P23
固体高分解NMR P21
固体高分解能13C-NMR P27
固体高分解能13C-NMR P28
固体高分解能1H NMR L1
固体高分解能NMR P22
固体高分解能NMR P32
固体重水素NMR P33
固体重水素NMR P34
骨格筋 P68
米 P75
コレステリック液晶 P17
コンフォメーション P77
コンホメーション L1
コンホメーション P32
コンホメーション変化 P27

（さ）
細胞の水 P74
サクランボ P74
三重共鳴３次元NMR P100
酸素17 P65

（し）
磁化移動 P68
磁気異方性 P94
四極核 P44
シクロデキストリン P83
自己拡散 P19
脂質 P23
自動位相補正 P52
磁場勾配 P18
ジブカイン P104
重水素NMR P14
重水素化 P92
重水素化メチル基 P14
主鎖の帰属 P92
常磁性緩和 L10
シルク構造 P94
信号帰属 P29

（す）
水素結合 L10
水素結合 P13
炊飯 P75
水和 P27
スタッキング相互作用 P104
スピン-格子緩和時間 P22
スピン軌道相互作用 P1
スピン-軌道相互作用 P2
スピン-軌道相互作用 P3
スピンギャップ S1
スピン結合定数 P85
スピンロッキング P8
スペーサー P16

（せ）
制限拡散 P74
青色蛍光体 P41
生物活性 P80
精密距離測定 P11
遷移金属カルボニルクラスター P38
選択観測 P65
選択的緩和法 P77
選択的磁場勾配エコー P50
選択励起 P74

（そ）
層状リン酸塩化合物 L4
相対符号 P85
装置 P19
側鎖型液晶性高分子 L7
疎水性ゲル P79

（た）
耐火物 P76
ダイナミックス P21
ダイナミックス P23
多次元NMR P98
多次元固体NMR P12
多重共鳴多次元NMR L13
多相関時間モデル L6
ダブルラベル体 P86
単結晶 P13
単結晶 P24
単結晶回転装置 P15

（ち）
超伝導ギャップ S1
超伝導対称性 S1
超微細シフト L10
直接結合定数 P57

（て）
低温焼成炭素 P39
転写調節因子 P97
澱粉 P75

（と）
同位体フィルター P101
同位体ラベル P102
糖脂質 P46
糖質 P83
動的構造 L14
動的性質 P97
糖度 P73

（な）
内部運動 L7
内部回転角 P34
ナノプローブ P46
難黒鉛化性炭素 P39

（に）
二次元NMR P52
二次元NMR P83
二次元液晶NMR P57
二面角 P11
二面角 P12
二量体液晶 P16

（ね）
熱変性 P53

（は）
配位子親和性 L10
パウダーパタン P37
バクテリオロドプシン P21
バクテリオロドプシン P23

パルス磁場勾配NMR P19
反強誘電性液晶 P56

（ひ）
ピークピッキング P100
光-CIDNP法 P106
ヒト P68
非破壊 P73
非ペプシン型酸性プロテアーゼ P102

（ふ）
負極炭素 P39
複合体 P97
物質移動 P25
プリンリプレッサー P96
分子運動 L6
分子運動 P22
分子運動 P26
分子運動 P34
分子拡散 P17
分子拡散 P50
分子認識 L14
分子認識 P83

（へ）
ベースライン補正 P100
ペプチド P24
ペプチド-Cd錯体 P37
ペプチド主鎖の三次元構造決定 L2
ヘリックスセンス反転 P33

（ほ）
ポリエチレン P25
ポリグリシンⅠ型 P28
ポリグリシンⅡ型 P28
ポリペプチド L1
ポルフィリン P6

（ま）
マイクロイメージング P76
マジックエコー P8
マジック角回転 P44
マジック角試料回転 P12
マジック角試料回転 P29

（み）
ミオグロビン L10
水 P7
水 P58
水 P59

（め）
メソーゲン基 L7
メタフラーレン P43
メチルアンモニウム P35
免疫グロブリン L14

（も）
モデルフリー解析 L6
モネリン P95
モルテン・グロビュール状態 P63

（ゆ）
誘電体強振器 P53

（よ）
溶液^{45}Sc-NMR P43
溶媒和 P7

（ら）
卵白アルブミン P63

（り）
リチウムイオン２次電池 P39
立体構造 P99
立体構造決定 P100
立体選択的^{13}C;^{2}H-二重標識法 L12
リン31 P65
リン酸ジルコニウム L4

（れ）
レチナール P21