総説と解説

Cross-Polarization/Magic-Angle Spinning (CP/MAS)

核磁気共鳴分光法

野澤 庸 則

東北大学非水溶液化学研究所 仙台市片平 2-1-1 (〒980)

(1985年2月20日受理)

Cross-Polarization/Magic-Angle Spinning (CP/MAS)
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Tsunenori NOZAWA

Chemical Research Institute of Non-aqueous Solutions,
Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai 980.

(Received February 22, 1985)

1. 序

1.1 固体高分解能核磁気共鳴

1.1.1 CP/MAS NMR

固体試料の高分解能核磁気共鳴が、交差分極 (Cross-Polarization (CP)) とマジック角度回転 (Magic-Angle-Spinning (MAS)) によって得られることが示されてから 10 年が経とうとしている。固体試料の ^{13}C NMR を通常の溶液の NMR 法で測定すると、 ^1H - ^{13}C の双極子-双極子相互作用と ^{13}C の化学シフトの異方性および ^{13}C の長いスピン-格子緩和時間のために、強度が弱く幅の広いスペクトルになってしまう。1973 年, Pines, Gibby そして Waugh は ^1H - ^{13}C の双極子相互作用による広幅化を高出力の ^1H 照射によって抑え、 ^{13}C の緩和時間による制約を ^{13}C - ^1H の交差緩和によってとり除いた¹⁾。Schaefer と Stejskal はその後、 ^{13}C 化学シフトの異方性を平均化するためにマジック角度回転²⁾ をとり入れ、CP/MAS の組合せによって固体試料の ^{13}C -NMR が高分解能で測定できることを示した³⁾。

その後 10 年が経とうとしているのに CP/MAS 核磁気共鳴法の普及度は予想外に低い。その主たる原因は装

置の普及度の低さもあげられるが、一方において苦労した努力に値するだけのデータが出ないことにもよろう。潜在需要としては大きなものがあり、近年は装置の進歩も著しいことから、この機会に CP/MAS をいかに利用できるかを述べることは時宜を得たものと言えよう。

この総説においては、われわれの研究を中心として、この方面の進歩の状況、現状などを述べてみたい。

1.1.2 CP

表 1 に、同じ静磁場のもとでそれぞれ異なった天然存在比を有する核種について、一定の観測時間のもとで得られる S/N 値と、一定の S/N 値を得るのに必要な時間 T_N を示した。天然存在比の低い ^{13}C 核等の観測がいに困難かがわかる。天然存在比の低い核種の測定の際に、天然存在比の高い核種との相互作用をおこしてやると、その S/N 値は 2 つの効果により飛躍的に向上する。その 1 つは両核種間の熱的接触による共鳴シグナル強度の上昇であり、もう 1 つは後者の短いスピン-格子緩和時間 (T_1) によって繰返し測定に必要な待ち時間を短縮することができることによる積算効率の向上による効果である。

天然存在比の高いスピン I とそれが低い S は格子と、

Table I 種々の天然存在比をもった核種の ^1H に対する規格化された S/N 値と測定時間 (T_N)

Spin		Natural abundance %	S/N	Measuring time T_N
^1H	($I=1/2$)	100	1	1
^{19}F	($I=1/2$)	100	0.858	1.36
^{31}P	($I=1/2$)	100	0.104	92
^{89}K	($I=3/2$)	93.08	2.2×10^{-3}	2.1×10^3
^{13}C	($I=1/2$)	1.108	3.5×10^{-4}	8.1×10^6
^{109}Ag	($I=1/2$)	48.65	2.27×10^{-4}	2.0×10^7
^{43}Ca	($I=7/2$)	0.13	3.2×10^{-5}	9.7×10^8
^{15}N	($I=1/2$)	0.373	1.2×10^{-5}	7.0×10^9
^2H	($I=1$)	0.0156	5.8×10^{-6}	3.0×10^{10}

それぞれ、スピン-格子緩和時間 T_{1I} と T_{1S} で相互作用している。そのほかに、スピン I とスピン S をある条件のもとで、 T_{1S} の緩和時間をもって相互作用させることが可能である (Fig. 1)。実験室系では、それぞれのスピンの感じる有効磁場は静磁場 B_0 であるから、磁場による分裂のエネルギー (角周波数) はそれぞれ $\gamma_I B_0$ と

Fig. 1 天然存在比の高いスピン I と低いスピン S の熱溜間およびそれらと格子との相互作用の模式図。記号および略号は本文参照。

Fig. 2 I スピンと S スピンの実験室系および回転系での有効磁場による分裂の様子。

なる (Fig. 2)。ここで γ は各原子核に固有の定数 (磁気回転比) である。 $\gamma_I B_0$, $\gamma_S B_0$ はそれぞれの原子核の共鳴周波数 ν_I , ν_S の 2π 倍に等しいから、核種の異なる I スピンと S スピンとは大きく異なっている。一方、それぞれのスピンの共鳴角周波数 ω_{0I} , ω_{0S} でまわる回転系においては、スピンの感じる有効磁場はそれぞれの照射磁場の強さ B_{1I} , B_{1S} となるから、この有効磁場による分裂のエネルギー $\gamma_I B_{1I}$ と $\gamma_S B_{1S}$ とは、 B_{1I} , B_{1S} の大きさをえることにより等しくすることができる。このような時には、I スピンと S スピンとの相互作用が起り、I スピンの大きい磁化は S スピンへ移る。言葉を変えると S スピンの磁化が I スピンから誘起される。または、S スピンと I スピンの交差分極が生じたということになる。交差分極によって到達し得る磁化は、 $\gamma_I B_{1I} = \gamma_S B_{1S}$ という Hartmann-Hahn の条件が満たされるときには、静磁場のもとでの平衡磁化 M_{0S} の (γ_I/γ_S) 倍となる。

CP/MAS 法で ^{13}C の観測を行なう通常の場合、I は ^1H , S は ^{13}C であるから γ_I/γ_S は約 4 となる。さらに交差分極の際には、S スピンの磁化は I スピンの磁化から誘起されるから、繰返し測定のための時間は I スピンのスピン-格子緩和時間 T_{1I} によって決められる。 ^1H の緩和時間は ^{13}C の緩和時間に比較し通常ずっと短いため積算効率の向上がもたらされる。

1.1.2 MAS

NMR のシグナルは、双極子-双極子相互作用で広幅化する。これは 1 kHz あるいはそれ以上の広がりを持つ。Fig. 3 に共鳴核 ^{13}C にその近傍にある核 ^1H が及

Fig. 3 双極子-双極子相互作用している ^{13}C - ^1H 系で ^1H スピンが ^{13}C スピンの所に作る局所磁場の様子とその角度および距離依存性の式。

Fig. 4 双極子-双極子相互作用ベクトル (①と②, および③-④を結ぶベクトル) がマジック角度のまわりの高速回転によりマジック角度に時間平均される様子。

ばす局所磁場 (h_{loc}) の様子を示した。注目されることは h_{loc} が ^{13}C と ^1H とを結ぶ直線と静磁場 H_0 とのなす角 (θ_{12}) に $(3 \cos^2 \theta_{12} - 1)$ の依存性を示すことである。NMR の共鳴線はまた化学シフトの異方性によっても広幅化する。外部磁場は原子あるいは結合に付随する電子の回転をひき起し、これにより分子中の原子の局所磁場を変化させ、したがって化学シフトに対する寄与をする。この効果は結合軸、例えば C-C 軸と静磁場のなす角度 θ に対し $(3 \cos^2 \theta - 1)$ の角度依存性を示す。これらの非等方性相互作用は、液体状態においても存在するが、速いミクロブラウン運動により平均化されて 0 となっている。固体状態においても、試料を静磁場に対し $\theta = \cos^{-1}(1/\sqrt{3}) = 54^\circ 44'$ の角度で高速回転できれば、時間平均として上述の 2 つの原因による広幅化を減少することができる。Fig. 4 に示すようにこの回転により $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ あるいは $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ の軸は静磁場 H_0 に対し時間平均として $\cos \theta = 1/\sqrt{3}$ を満たす角 θ となり、 $3 \cos^2 \theta - 1$ の角度依存性を示す上述の 2 つの相互作用が 0 となるからである。

2. 実験・装置

2.1 分光計

本章においては実際の測定に際し必要となる種々の点について述べる。

まず、CP/MAS NMR 測定のための分光計は高出力の固体用のものが必要である。あらわには書いていないが、CP/MAS NMR という場合 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ の双極子相互作用による広幅化を減少するために高出力の ^1H 照射を

行うことが普通である。このために高出力の ^1H 送信器が必要であるが、それとともに、かなり広い測定領域をとれるように、また、後に述べる Hartmann-Hahn の条件に調整できるように観測核の送信器も高出力である必要がある。

分光計の磁場は高分解能の研究をする上には高い方が望ましい。磁場が高くなると MAS によるスピニングサイドバンドが避けられないが、後に述べるように多重パルス法によってこれを消すことができる。

2.1 プロープ

測定用のプロープは、われわれが用いている Bruker 社の分光計の場合 Z32 CP/MAS プロープが従来使われてきたが、最近になって新しい CP/MAS プロープが開発され市販されるようになった。もっとも大きな違いはスピニングシステムで、前者では Andrew-Beams 型であるが、後者ではダブルベアリング型になったことである。このため後者では温度変化の実験が可能となり、またマジック角度の精度が向上した。また、試料を交換するときにプロープ全体を出し入れする必要がなくなり、使いがってが飛躍的に向上した。

2.3 調整

2.3.1 Hartmann-Hahn の条件

CP/MAS 法による固体高分解能 NMR の S/N 値は、CP の効率によって大きく支配される。そのため Hartmann-Hahn の条件が常に成立しているように調整する必要がある。これにはアダマンタンの CP/MAS の測定をして調整する。 ^1H , ^{13}C の送信器とも低いゲインの位置から始め、 ^1H の 90° パルスが $5 \mu\text{s}$ 以下になるまでゲインを上げてゆく。特に結晶性の試料の場合 ^1H の 90° パルスは短かい方がよいが、非晶質の試料の場合には $5 \mu\text{s}$ 以上でも充分である。

2.3.2 マジック角度

マジック角度への微調整は、グリシンの測定によって行える。176 ppm に観測されるグリシンのカルボニル炭素のシグナルは、化学シフトの異方性が大きく、マジック角度から回転軸がずれていると著しく広幅化する。実際に測定する試料にグリシンを混入させてもよい場合には、測定中のマジック角度調整の様子がわかるが、シグナルの重なり等によりそれが不可能の場合には KBr を用いる方法も提案されている⁵⁾。 ^{13}C と比較的共鳴周波数の近い ^{79}Br のシグナルを観測することによって、マジック角度の調整を行うのである。

2.4 パルスプログラムとコンタクトタイム

Fig. 5 (a) に、もっとも基本的な CP/MAS NMR 測定のためのパルスプログラムを用いた時のパルストレイ

Fig. 5 CP/MAS ^{13}C -NMR 測定のための基本的パルストレイン (a) と観測される ^{13}C 磁化の強度の接触時間依存性 (b). (a) において横軸は時間、縦軸の高低はプロトン ($\text{H}-1$) および炭素 ($\text{C}-13$) の照射磁場の ON, OFF を示す. 接触時間 (CT (Contact Time)) の間に点線のように $\text{C}-13$ 磁化が生成し、破線のように $\text{H}-1$ 磁化が減少する. 点 b で、生成した $\text{C}-13$ の磁化を破線で示す FID (Free Induction Decay) の形で取り込み (AQ (Acquisition)) 測定する.

ンを示した. ^1H の磁化は初めの x 方向の 90° パルスによって y 軸方向に倒され、引き続き、 y 軸方向に大きな磁場ベクトルをもつラジオ波の照射により y 軸方向にロックされたまま回転系に移行する. ^{13}C にもラジオ波を照射して回転系に移し、Hartmann-Hahn の条件下で熱接触させ、 ^1H 磁化により ^{13}C の y 軸方向の磁化を誘起する. 誘起された ^{13}C の磁化を、 ^{13}C のラジオ波の照射を止めて観測する. この際、 ^1H のラジオ波照射は高出力デカップリングのためにそのまま続ける. これがもっとも基本的なパルストレインであるが、 ^1H と ^{13}C を熱接触させている時間 τ をコンタクトタイムと言い、その時間のとり方が CP/MAS NMR 測定の際に重要になってくる. 観測される ^{13}C 磁化の大きさ ($M(\tau)$) のコンタクトタイム依存性は Fig. 5(b) に示すようになるが、定量的には Fig. 1 に示した熱接触を規定する緩和時間 T_{1S} と回転系での磁化の縦緩和時間 $T_{1\rho}^I$ および $T_{1\rho}^S$ で記述される. 熱接触によるスピン温度 β の時間変化が次の 2 式で表わされることから^{4,6)},

$$d\beta_S/dt = -(1/T_{1S})(\beta_S - \beta_I) - (1/T_{1\rho}^S)\beta_S, \quad (1)$$

$$d\beta_I/dt = -(\varepsilon'/T_{1S})(\beta_I - \beta_S) - (1/T_{1\rho}^I)\beta_I. \quad (2)$$

$\varepsilon' = 0$ すなわち S スピンの熱容量と I スピンの熱容量の

比が 0 になる (S スピンの熱容量が I スピンの熱容量に比較し無視できる) という条件のもとでは、次式となる^{4,6)},

$$M(\tau) = M_0 \lambda^{-1} \{1 - \exp(-\lambda \cdot \tau / T_{1S})\} \exp(-\tau / T_{1\rho}^I). \quad (3)$$

ここで、

$$\lambda = \{1 + (T_{1S}/T_{1\rho}^S) - (T_{1S}/T_{1\rho}^I)\} \quad (4)$$

である. 一般に λ は 1 に近いので (3) 式は磁化 M がコンタクトタイム τ の増加とともに T_{1S} の緩和時間で増大し $T_{1\rho}^I$ の緩和時間で減少することを示している.

CP/MAS NMR で得られたシグナル間の相対的な強度比はしたがって、 T_{1S} ならびに $T_{1\rho}^I$, $T_{1\rho}^S$ に依存し統一的には議論できないので、厳密には各シグナルの T_{1S} , $T_{1\rho}^I$, $T_{1\rho}^S$ を求めてから議論すべきであろう.

2.5 スピニングサイドバンドの除去

高磁場の分光計を用いて CP/MAS NMR を測定すると、MAS を最大限の回転数で行ってもまだスピニングサイドバンドは残ってしまう場合が多い. そのような時も、Dixon によって考案されたパルスプログラムを用いると、スピニングサイドバンドを除去できる⁷⁾. このパルストレインとタイミングの一例を Fig. 6 に示した. ここで A, B, C, D, およびデータ取得開始 (AQ) の時間は O 点を基準とすると、回転数の逆数を単位にして、それぞれ 0.1226, 0.1999, 0.4235, 1.4668, 2.2412 となる⁷⁾.

Fig. 6 スピニングサイドバンド除去のため、Dixon が開発した TOSS (Total Elimination of Spinning Side Bands) パルスのトレイン. 4 つの 180° (π) パルスをかける時間、A, B, C, D, および AQ の時間については本文参照.

3. 応 用 例

以下 CP/MAS NMR の応用例をわれわれの研究室の結果を中心に紹介する.

3.1 石 炭

CP/MAS NMR の応用が活発な試料の 1 つとして石炭の研究がある. これは石炭の構造化学的研究がその溶解性の悪さから制限されていたからであろう. 最近にな

って, CP/MAS NMR による直接的な構造研究が行なわれるようになってきたが, そのほとんどは比較的低磁場 (^{13}C の共鳴周波数として 15~25 MHz) のものであり, 個々のシグナルの分離が悪く, 各炭素のシグナルの帰属が明確でなかった. われわれは高磁場 (75 MHz) 下の高分解能 ^{13}C -NMR の測定により, 個々の炭素シグナルの帰属を明確にし, その有用性を熱処理による石炭の構造変化を追跡することによって示した⁸⁾. Fig. 7 に Yallourn 炭に対する CP/MAS ^{13}C -NMR の結果を示した. このスペクトルは従来の低磁場のものに比較し分解能が著しく向上している. 標準の化学シフトの値との比較により行った各シグナルの帰属を図に与えた. この NMR スペクトルのシミュレーションから, 平均としての Yallourn 炭の構造が推定できる. その結果による

Fig. 7 石炭 (Yallourn 炭) の CP/MAS ^{13}C -NMR スペクトル (a) とその 500°C (b) および 800°C (c) での熱処理炭のスペクトルと帰属. + はスピナー由来のシグナル, ‡ はスピニングサイドバンドを示す.

と, 芳香環には多くの置換基がつき, 縮合環数が少ないこと, 側鎖のアルキル鎖はかなり長いこと, そして含酸素官能基を多く含むことなどが特徴的である. これを Wender が提出している褐炭の構造モデルと比較すると, $-\text{CH}_2-$ の鎖長が Wender のモデルでは 1~2 と非常に短いのにに対し, 実際にはその数倍程度に長いと推定される. Fig. 7 には 500 と 800°C で熱処理 (N_2 中で 3 時間) したあとの石炭の CP/MAS ^{13}C -NMR スペクトルを示した. 図には示さなかったが, 300°C で処理をした時のスペクトルは原炭のもの (Fig. 7) とほとんど変わらなかった. 熱処理温度を 500°C にするとスペクトルは大きく変わり, $-\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_3$ のピークが消え, エーテル, アルコール型の炭素のシグナルもなくなり, スピニングサイドバンドの出現から異方性が高くなっていることが判明した. さらに, 800°C では Ar-H および Ar-C 型の炭素のみのシグナルとなった.

石炭の CP/MAS ^{13}C -NMR の分析的应用ならびにそのスピン動力学については Sullivan & Maciel の論文に詳しい⁹⁾.

3.2 生体組織

研究目的によっては可溶化できる試料でも, もとのままで研究したい場合もある. そのような例として貝のタンパク質とセルロースと光合成系の膜タンパク質についての研究例を紹介する.

3.2.1 ウバ貝内靱帯タンパク質—アブダクチン

二枚貝の靱帯は不溶性である. ペプチド結合を切断しないような条件では, 各種の変性剤, 還元剤, 酸などを用いてもそのタンパク質を抽出できない. 靱帯をそのまま加水分解して分析してみると, 内靱帯はきわめて特異なタンパク質であることがわかった¹⁰⁾. すなわち約 50 mol% のグリシンを含み, 疎水性アミノ酸 (Phe, Leu, Ile, Met, Val, Ala, Pro) を約 35 mol% も含む. さらに注目されることとして, 疎水性アミノ酸の大部分がメチオニンで全アミノ酸の約 17mol% を占める. しかも, アルカリ加水分解のアミノ酸分析の結果によると, メチオニンのうち約 90% がメチオニンスルホキシドに酸化されている. 自然に存在するままのタンパク質のメチオニン残基がスルホン酸に酸化されているという例は知られていなかった. 少量のメチオニンスルホキシドが検出されても, それは実験操作中にメチオニンの一部が酸化されたものと解釈された. そこで, 化学的操作を全く行なわない状態でもメチオニンスルホキシドが存在することを確かめるために CP/MAS NMR が測定された¹¹⁾. Fig. 8 (A), (B) は標準のメチオニンスルホキシドとメチオニンの CP/MAS ^{13}C -NMR である. 図に与えた帰属

Fig. 8 L-メチオニンスルホキシド (A) と L-メチオニン (B) の CP/MAS ^{13}C -NMR スペクトル. * はスピニングサイドバンドを示す. C_0 はカルボニル炭素を示す.

Fig. 9 ウバガイの内靱帯 (A) およびその還元処理後 (B) の CP/MAS ^{13}C -NMR スペクトル. * はスピニングサイドバンドを示す.

Table II 種々のセルロースに対する C-1 の ^{13}C -NMR のケミカルシフトと半値幅

	Type	δ/ppm	$\Delta\nu_{1/2}/\text{Hz}$
1. ワットマン セルロース パウダー	I	104.9	250
2. ラミー	I	104.7	250
3. マーセル化ワットマン	II	104.9	330
4. ホルチザン	II	104.5	315
5. レーヨン加水分解残渣	II	105.0	315
6. ホルチザン加水分解残渣	II	106.3, 104.5	295
7. ラミーアンモニアセルロース処理	III _I	104.3	250
8. 7. の加水分解残渣	III _I	104.5	250
9. ラミーグリセリン処理	IV _I	104.7	250
10. 9. の加水分解残渣	IV _I	104.5	250
11. ホルチザンからの III _{II}	III _{II}	104.7	330
12. 11. からの IV _{II}	IV _{II}	104.3	280

Table III 種々のセルロースの C-4, C-6 の ^{13}C -NMR のケミカルシフト

	Type	δ/ppm	
		C-4	C-6
1. ワットマン セルロース パウダー	I	87.9	64.7
2. ラミー	I	88.2 (83.0)	64.7 (62.5)
3. マーセル化ワットマン	II	(86.7)	(61.5)
4. ホルチザン	II	(86.9)	(61.9)
5. レーヨン加水分解残渣	II	(87.0)	(62.0)
6. ホルチザン加水分解残渣	II	86.9	62.1
7. ラミー アンモニアセルロース処理	III _I	(86.5 83.0)	(61.6)
8. 7. の加水分解残渣	III _I	87.3 (83.5)	(62.0)
9. ラミーグリセリン処理	IV _I	(87.5 83.1)	(64.1)
10. 9. の加水分解残渣	IV _I	87.9 (83.5)	(93.9)
11. ホルチザンからの III _{II}	III _{II}	(83.1)	(61.3)
12. 11. からの IV _{II}	IV _{II}	(82.5)	(62.5)

は対応する溶液の NMR との比較からなされた。Fig. 9 (A) はウバカイ内靱帯のそのままの粉末の CP/MAS ^{13}C -NMR である。38.2 ppm のシグナルがメチオニンスルホキシドの C_β に帰属される。メチオニンスルホキシドの C_β のシグナルは 24~26 ppm のピークに、 C_α と C_γ のシグナルは 51.8 ppm のピークに含まれる。43.9 ppm のシグナルはアミノ酸の 50% を占めるグリシンの C_α によるものである。このように化学的実験操作を全くしないウバカイ内靱帯中に確かにメチオニンスルホキシドの存在することが CP/MAS ^{13}C -NMR によって実証された。タンパク質中のメチオニンスルホキシドを N-メチルメルカプトアセトアミドを作用させておだやかな条件でメチオニンに還元した内靱帯粉末の CP/MAS ^{13}C -NMR を Fig. 9 (B) に示した。メチオニンの C_β シグナルが 15.4 ppm にみられ、Fig. 9 (A) でメチオニンスルホキシドの C_β に帰属された 38.2 ppm のシグナルがなくなっていることが注目される。メチオニンの C_α シグナルは 51.6 ppm のピークに、 C_β と C_γ のシグナルは 30.5 ppm のピークに含まれる。この結果は上述の結論が正しかったことを再確認するものである。

3.2.2 セルロース

溶解して測定することのできない試料 1 のつとしてセルロースの結晶形に関する研究がある。セルロースの CP/MAS ^{13}C -NMR に関しては国内¹²⁾をはじめ国外の研究^{13,14)}もある。われわれも NMR による結晶形態の分類を試みたので紹介する。セルロースには I 型、II 型のほかに III および IV 型の結晶変態が知られている¹⁵⁾。このうち III および IV はセルロース I および II のどちらの型から誘導されたかによって III_I、III_{II}、IV_I、IV_{II} と区別すべき結晶変態であることが知られている。われわれは各種のセルロースの CP/MAS ^{13}C -NMR の測定を行い興味ある結果を得た。Table II, Table III に特徴的シグナルの半値幅およびケミカルシフト値を、また、Fig. 10 に代表的スペクトルと帰属を示した。この結果 C-1 に帰属される約 105 ppm のシグナルは I 型と II 型とで特にそのバンド幅に差がみられることが明らかとなった。すなわち、I 型では約 250 Hz であるのに対し II 型では 280~330 Hz と幅広くなっている。また、C-4 C-6 に帰属されるシグナルは規則性の高い環境にあるそれぞれ約 88 と 65 ppm にあるシャープなシグナルと、より規則性の低い環境にある約 83 と 62 ppm にあるブロードなシグナルが出現することが明らかとなった。

3.2.3 光合成系の膜タンパク質

生体系では多くの膜タンパク質が重要な役割りを果た

Fig. 10 III型セルロース (ホルチザン) の CP/MAS ^{13}C -NMR スペクトルと帰属。

している。そのような膜タンパク系でのタンパク質膜の動的構造は生きたままの系で研究することが望ましい。しかし、通常の溶液の NMR で膜タンパク質系の NMR を測定しても動きの速い脂質の NMR しか測定できない。CP/MAS NMR によってはじめてタンパク質および補欠分子族の ^{13}C -NMR が測定され、その動的構造が議論された¹⁶⁾。

光合成膜タンパク系 (ICM, Intracytoplasmic-Membrane) を通常の溶液 NMR の方法で測定した ^{13}C -NMR を Fig. 11 に示した。デタージェントを添加すると線幅は著しく先鋭化するが、この場合にも観測されるシグナルは脂質由来のものだけである。同じ試料の CP/MAS ^{13}C -NMR を Fig. 12 に示した。序の所に述べた接触時間を変えると、スペクトルパターンが大きく変化していることが認められる。5 ms という比較的長い接触時間では脂質のシグナルが支配的であるが、短い接触時間の場合にはタンパクのシグナルが多く出現している様子がみられる。一方、ICM から精製した BChl (バクテリオクロフィル) とタンパク質の結合体 LH 2 (Light-

Fig. 11 光合成細菌 (*Chromatium vinosum*) の ICM の溶液状態での ^{13}C -NMR スペクトル。観測されるシグナルは脂質 PE (Phosphatidylethanolamine), PG (Phosphatidylglycerol) と GA (Galactolipid) 由来のシグナルに帰属された。

Fig. 12 光合成細菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) の ICM の CP/MAS ^{13}C -NMR スペクトルの接触時間依存性。

Fig. 13 光合成細菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) の LH2 の CP/MAS ^{13}C -NMR の接触時間依存性。

Harvesting Protein 2) でもその CP/MAS ^{13}C -NMR に接触時間依存性がみられる (Fig. 13). Fig. 14 に示したように短い接触時間の場合には主としてタンパク由来のシグナルが現われていることがわかる。ここで Fig. 14 の線グラフはタンパク質のシミュレーションスペクトルである。一方、接触時間の長い場合には BChl 由来のシグナルが多く出現していることが Fig. 15 に与えたシミュレーションスペクトルとの比較からわかる。ICM と LH2 について観測される磁化 $M(\tau)$ の接触時間 (σ) 依存性を Fig. 16 と 17 に示した。この結果を式 (3) によりシミュレーションし、 $T_{1\rho}$ (ここでは $S=^{13}\text{C}$, $I=^1\text{H}$ のため T_{CH} と記す) と $T_{1\rho}^{\text{I}}$ ($T_{1\rho}^{\text{H}}$ と記す) を求めた。それらの値を Fig. 18 と 19 に図示した。 T_{CH} は ^{13}C に結合している ^1H の個数およびその ^{13}C の運動性に依存する。 $-\text{CH}=\text{CH}-$, $>\text{C}=\text{O}$ タイプの ^{13}C の長い T_{CH} は、脂質の脂肪酸鎖の速い運動性を示す。これに比較し、タンパクの C_α 炭素の遅い運動性に対応した短い T_{CH} が注目されるが、この値は ICM 中でも LH2 中でもあまり変化がない。 $T_{1\rho}^{\text{H}}$ は運動性のほかにスピン拡散によっても支配されるが、 T_{CH} から予想される運動性が $T_{1\rho}^{\text{H}}$ にもよく対応していることから、これらの系の $T_{1\rho}^{\text{H}}$ は運動性と強く相関していることがわかる。また高い運動性を示す ^{13}C が長い $T_{1\rho}^{\text{H}}$ を示すことは今問題としている脂質、タンパク質、BChl の分子内局所運動性の相関時間が $T_{1\rho}^{\text{H}}$ の極小値を与える相

Fig. 14 LH2 タンパクシミュレーションスペクトル (線グラフと図 13 の接触時間で 0.5 ms のスペクトルとの比較。

関時間よりも短い相関時間の領域にあることを示す。今回測定した条件で $T_{1\rho}^{\text{H}}$ の極小値を与える τ_c は $2 \times 10^{-5} \text{ s}$ であることを考えるとこれらの系の運動が溶液中での局所運動とほぼ同じ時間領域にあることを示すもので非常に興味深い。

3.2.4 タンパク質の2次構造

CP/MAS NMR の生体系の応用として特筆されることの1つにそのケミカルシフトを利用した固体状態でのタンパク質の2次構造の決定の研究がある。CP/MAS ^{13}C -NMR で測定される固体状態のポリペプチド、タンパク質のケミカルシフトが α -ヘリックス、 β -シートにより異なることが実験的に示され、また理論的な計算の

Fig. 15 バクテリオクロフィル *a* (BChl *a*) のシミュレーションスペクトル (線グラフ) と接触時間 5 ms (図 13) のスペクトルとの比較.

Fig. 16 図 12 から得られる ICM の CP/MAS ^{13}C -NMR により観測される磁化の強度と接触時間の関係. 図の数値は各シグナルのケミカルシフトの値であり, 考えられる帰属とともに示してある.

Fig. 17 図 13 から得られる LH2 の CP/MAS ^{13}C -NMR により観測される磁化の強度と接触時間との関係. 図の数値と帰属は図 16 と同様.

Fig. 18 Fig. 16, 17 を式 (3) (本文) でシミュレーションすることにより得られる T_{IS} (T_{CH}) の値。数値と帰属は Fig. 16, 17 と同様。

Fig. 19 Fig. 18 と同様に得られる $T_{1\rho H}$ の値, 数値と帰属は Fig. 16, 17 と同様。

結果からも裏付けられている。この点に関しては斉藤らの解説があるのでここでは文献引用にとどめたい^{17,19)}。

3.2.5 生体色素

天然で重要な役割をはたしている酵素, タンパク質には補欠分子団として, ポルフィリンやクロリンといった

生体色素を含むものが多くある。そのような酵素, タンパク質の構造と機能の解明をめざして CP/MAS 法による研究が始まっている。ここで非常に興味深いことはむしろ構造が複雑なクロロフィルの方がポルフィリンあるいは金属ポルフィリンより格段に高分解能の ^{13}C -NMR

を与えていることがあげられる^{20,21)}。溶液状態において、変異異性、局所運動などで動的構造変化があると、溶液状態と固体状態とではケミカルシフトが大きく異なることがある。さらに、ポルフィリンの場合には分子間の環電流効果のケミカルシフトに与える効果も見積られている²²⁾。

4. 結 び

以上、CP/MAS ^{13}C -NMR による固体高分解能 NMR についてわれわれの研究を主に述べてきた。CP/MAS NMR の分解能は液体 NMR に比較すると格段に悪いが、それでもケミカルシフトによる議論も充分できる^{28~30)}。また、種々の緩和時間を用いた動的構造に関する議論もできる^{31~36)}。さらには、2次元 NMR を用いた構造に関する研究もできる^{37~40)}。固体状態あるいはゲル状態での生の測定が意味のある系も多く存在することを考えても今後の CP/MAS NMR の発展が望まれる。特に、温度変化による研究はいくつかの試作装置で行なわれているが^{41~46)}、装置的にも市販品が入手できるようになり、今後の研究が期待される。

ここでは触れなかったが ^{13}C 以外の核の CP/MAS NMR も多く測定されるようになってきた。特に ^{31}P ^{45~91)}、 ^{15}N ^{52~55)}、 ^{29}Si ^{56~72)} について多くの報告がある。

また、詳しい理論やその他の応用については他の優れた総説を参考にして頂きたい。^{73~79)}

終りにあたり、本稿の内容が東北大学非水溶液化学研究所、旗野研究室において多くの共同研究者との協力研究として行なわれたものであることを記し、旗野昌弘教授をはじめ多くの共同研究者に感謝の意を表します。

文 献

- 1) A. Pines, M.G. Gibby, and J.S. Waugh: J. Chem. Phys. **58**, 569 (1973).
- 2) E.R. Andrew: Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **8**, 1 (1971).
- 3) J. Schafer and E.O. Stejskal: J. Am. Chem. Soc. **98**, 1031 (1976).
- 4) M. Mehring: *Principles of High Resolution NMR in Solid* (Springer, Berlin, 1983) pp. 129-185.
- 5) J.S. Frye and G.E. Maciel: J. Mag. Reson. **48**, 125 (1982).
- 6) A.N. Garroway, W.B. Moniz, and H.A. Resing: 1978 ACS Symposium Series, **103**, 67 (1979).
- 7) W.T. Dixon: J. Chem. Phys. **77**, 1800 (1982).
- 8) Y. Ohtsuka, T. Nozawa, A. Tomita, Y. Tamai, and M. Hatano: Fuel **63**, 1363 (1984).
- 9) M.A. Sullivan and G.E. Maciel: Anal. Chem. **54**, 1606, 1615 (1982).
- 10) 菊池康夫, 田宮信雄: 蛋白質 核酸 酵素 **27**, 250 (1982).
- 11) Y. Kikuchi, N. Tamiya, T. Nozawa, and M. Hatano: Eur. J. Biochem. **125**, 575 (1982).
- 12) F. Horii, A. Hirai and R. Kitamura: Polymer Preprint, Japan **33**, 1995 (1984) とその引用文献.
- 13) D.W. Sindorf, V.J. Bartuska, and G.E. Maciel: J. Am. Chem. Soc. **102**, 3249 (1980).
- 14) W.L. Earl and D.L. VanderHart: J. Am. Chem. Soc. **102**, 3251 (1980).
- 15) 林 治助: 繊維と工業 **32**, 37 (1976).
- 16) T. Nozawa, M. Nishimura, M. Hatano, H. Hayashi, and K. Shimada: Biochemistry, in press.
- 17) H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, and I. Ando: Macromol. **16**, 1050 (1983).
- 18) I. Ando, H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, and T. Ozaki: Macromol. **17**, 457 (1983).
- 19) H.R. Kricheldorf, M. Mutter, F. Maser, D. Müller, and H. Föster: Biopoly. **22**, 1357 (1983).
- 20) 野澤庸則, 西村充司, 太田 克, 旗野昌弘, 佐藤三男: 第23回 NMR 討論会講演要旨集 p.188 (1984).
- 21) C.E. Brown, R.B. Spencer, V.T. Verger, J.T. Katz: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 641 (1984).
- 22) M. Okazaki and C.A. McDowell: J. Am. Chem. Soc. **106**, 3185 (1984).
- 23) H. Saito, Y. Iwanaga, R. Tabeta, M. Narita, and T. Asakura: Chem. Lett., 427 (1983).
- 24) H. Saito, R. Tabeta, T. Ozaki, and A. Shoji: Chem. Lett., 1437 (1983).
- 25) T.C. Clark, J.C. Scott, and G.B. Street: IBM J. Res. Develop. **27**, 313 (1983).
- 26) T. Terao, S. Maeda, T. Yamabe, K. Akagi, and H. Shirakawa: Chem. Phys. Lett. **103**, 347 (1984).
- 27) A. Manenschijn, M.J. Duijvestijn, J. Smidt, R.A. Wind, C.S. Yannoni, and T.C. Clarke: Chem. Phys. Lett. **112**, 99 (1984).
- 28) F. Imashiro, S. Maeda, K. Takegoshi, T. Terao, and A. Saika: Chem. Phys. Lett. **92**, 642 (1982).
- 29) M. Okazaki, A. Naito, and C.A. McDowell: Chem. Phys. Lett. **100**, 15 (1983).
- 30) F. Imashiro, S. Maeda, K. Takegoshi, T. Terao, and A. Saika: Chem. Phys. Lett. **99**, 189 (1983).
- 31) J.A. Ripmeester, J.S. Tse, and D.W. Davidson: Chem. Phys. Lett. **86**, 428 (1982).
- 32) N. Zumbulyadis and H.J. Gysling: J. Am. Chem. Soc. **104**, 3246 (1982).
- 33) C.A. Mims, K.D. Rose, and M.T. Melchior: J. Am. Chem. Soc. **104**, 6886 (1982).
- 34) V.P. Chacho, S. Ganapathy, and R.G. Bryant: J. Am. Chem. Soc. **105**, 5491 (1983).
- 35) G.E. Maciel, J.F. Haw, I.-S. Chung, B.L. Hawkins, T.A. Early, D.R. McKay, and L. Petrakis: J. Am. Chem. Soc. **105**, 5530 (1983).
- 36) D.W. Sindorf and G.F. Maciel: J. Am. Chem.

- Soc. **105**, 1848 (1983).
- 37) T. Terao, H. Miura, and A. Saika: J. Am. Chem. Soc. **104**, 5228 (1982).
- 38) N.M. Szeverenyi, A. Bax, and G.E. Maciel: J. Am. Chem. Soc. **105**, 2579 (1983).
- 39) A. F. Dejong, A.P.M. Kentgens, and W. S. Veeman: Chem. Phys. Lett. **109**, 337 (1983).
- 40) H. T. Edzes and J.P.C. Bernards: J. Am. Chem. Soc. **106**, 1515 (1984).
- 41) H. Strub, A. J. Beeler, D. Grant, J. Michl, P. W. Cutts, and K. W. Zilm: J. Am. Chem. Soc. **105**, 3333 (1983).
- 42) C. S. Yannoni, V. Macho, and P. C. Myhre: J. Am. Chem. Soc. **104**, 907 (1982).
- 43) C. S. Yannoni, H. P. Reisenauer, and G. Maier: J. Am. Chem. Soc. **105**, 6181 (1983).
- 44) R. Poupko, H. Zimmermann, and Z. Luz: J. Am. Chem. Soc. **106**, 5391 (1984).
- 45) P. C. Myhre, J. D. Druger, B. L. Hammond, S. M. Lok, C. S. Yannoni, V. Macho, H. H. Limbach, and H. M. Vieth: J. Am. Chem. Soc. **106**, 6079 (1984).
- 46) M. Moller, W. Gronski, H.-J. Cantow, and H. Hocker: J. Am. Chem. Soc. **106**, 5093 (1984).
- 47) J. Tropp, N. C. Blumenthal, and J. S. Waugh: J. Am. Chem. Soc. **105**, 22 (1983).
- 48) C. A. Fyfe, H. C. Clark, J. A. Davies, P. J. Hayes, and R. E. Wasylshen: J. Am. Chem. Soc. **105**, 6577 (1983).
- 49) W. P. Aue, A. H. Roufosse, M. J. Glimcher, and R. G. Griffin: Biochemistry. **23**, 6110 (1984).
- 50) A. H. Roufosse, W. P. Aue, J. E. Robers, M. J. Glimcher, and R. G. Griffin: Biochemistry **23**, 6115 (1984).
- 51) D. Muller, E. Jahn, G. Ladwig, and U. Haubenreisser: Chem. Phys. Lett. **109**, 24 (1984).
- 52) T. A. Cross and S. J. Opella: J. Am. Chem. Soc. **105**, 306 (1983).
- 53) J. A. Ripmeester: J. Am. Chem. Soc. **105**, 2925 (1983).
- 54) G. S. Harbison, J. Herbfeld, and R. G. Griffin: Biochemistry. **22**, 1 (1983).
- 55) T.-H. Huang, W. W. Bachovchin, R. G. Griffin: and C. M. Dobson: Biochemistry **23**, 5933 (1984).
- 56) J. B. Nagy, Z. Gabelica, E. C. Derouane, and P. A. Jacobs: Chem. Lett., 2003 (1982).
- 57) D. W. Sindorf and G. E. Maciel: J. Am. Chem. Soc. **105**, 3767 (1983).
- 58) J. M. Thomas, J. Klinowski, S. Ramdas, B. K. Hunter, and D. T. B. Tennakoon: Chem. Phys. Lett. **102**, 158 (1983).
- 59) G. Debras, J. C. Nagy, Z. Gabelica, P. Bodart, and P. A. Jacobs: Chem. Lett., 199 (1983).
- 60) T. Watanabe, H. Shimizu, A. Masuda, and H. Saito: Chem. Lett., 1293 (1983).
- 61) C. A. Fyfe, G. C. Gobbi, W. J. Murdhy, R. S. Ozubko, and D. A. Slack: Chem. Lett., 1547 (1983).
- 62) C. A. Fyfe, G. C. Gobbi, and G. J. Kennedy: Chem. Lett., 1551 (1983).
- 63) J. M. Thomas, J. Klinowski, and M. W. Anderson: Chem. Lett., 1555 (1983).
- 64) C. M. Schramm, B. H. W. S. De Jong, and V. E. Parziale: J. Am. Chem. Soc. **106**, 4396 (1984).
- 65) C. A. Fyfe, G. C. Gobbi, W. J. Murphy, R. S. Ozubko, and D. A. Slack: J. Am. Chem. Soc. **106**, 4435 (1984).
- 66) J. Sanz and J. M. Serratos: J. Am. Chem. Soc. **106**, 4790 (1984).
- 67) A. R. Grimmer and R. Radeaglia: Chem. Phys. Lett. **106**, 262 (1984).
- 68) S. Hayashi, K. Suzuki, S. Shin, K. Hayamizu, and O. Yamamoto: Chem. Phys. Lett. **110**, 54 (1984).
- 69) C. A. Fyfe, G. C. Gobbi, G. J. Kennedy, C. T. De Schutter, W. J. Murphy, R. S. Ozubko, and D. A. Slack: Chem. Lett. 163 (1984).
- 70) U. Selvaray, K. J. Rao, C. N. R. Rao, J. Klinowski, and J. M. Thomas: Chem. Phys. Lett. **114**, 24 (1985).
- 72) R. Radeaglia and G. Engelhardt: Chem. Phys. Lett. **114**, 28 (1985).
- 73) 寺尾武彦: 化学の領域 **32**, 686 (1978).
- 74) 北丸竜三, 堀井文敬: 高分子加工 **11** (1979).
- 75) 中條利一郎: 化学の領域 **35**, 166 (1981).
- 76) C. S. Yannoni: Acc. Chem. Res. **15**, 201 (1982).
- 77) 旗野昌弘: 化学 **37**, 703 (1982).
- 78) 斎藤 肇: ファルマシア **18**, 273 (1983).
- 79) 神藤平三郎, 藤戸輝昭: 化学の領域増刊 **142**, 29 (1983).