

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	固体高分解能NMRによるグリシン残基を含む固体ペプチド及びポリペプチドのコンホメーション研究
Title(English)	
著者(和文)	安藤慎治
Author(English)	SHINJI ANDO
出典(和文)	学位:工学博士, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第2023号, 授与年月日:1989年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第2023号, Conferred date:1989/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

「固体高分解能NMRによる
グリシン残基を含む固体ペプチド
及びポリペプチドの
コンホメーション研究」

1988年度

東京工業大学大学院理工学研究科 高分子工学専攻 博士課程

安藤 慎治

目 次

1988年度東京工業大学博士論文
『固体高分解能NMRによるグリシン残基を含む
固体ペプチド及びポリペプチドのコンホメーション研究』

	頁
第1章 『序 論』	
§1-1 「固体のNMR」を固体物質の構造解析に用いることの意義 -----	1
§1-2 「固体のNMR」のスペクトルに現れる相互作用 -----	4
§1-3 「固体のNMR」の観測方法と得られる情報の種類 -----	9
§1-4 コンホメーション研究の対象物質としての オリゴペプチドとポリペプチド -----	28
§1-5 本研究の目的 -----	30
第2章 『固体ポリペプチド鎖中に存在するグリシン残基 カルボニル炭素の ¹³ C化学シフトとコンホメーション』	
§2-1 はじめに -----	35
§2-2 実験と測定 -----	48
§2-3 結果と考察 -----	54
§2-4 まとめ -----	78
第3章 『固体オリゴペプチド中に存在するグリシン残基カルボニル炭素の ¹³ C等方平均化学シフトと水素結合の構造』	
§3-1 はじめに -----	83
§3-2 実験と測定 -----	92
§3-3 結果と考察 -----	96
§3-4 まとめ -----	109
第4章 『固体ポリペプチド鎖中に存在するグリシン残基 メチレン炭素の ¹³ C化学シフトとコンホメーション』	
§4-1 はじめに -----	114
§4-2 実験と測定 -----	118
§4-3 結果と考察 -----	122
§4-4 まとめ -----	136

第5章	『N端保護オリゴペプチドの ¹³ C等方平均化学シフトと結晶中のコンホメーション』	
§5-1	はじめに	138
§5-2	実験と測定	147
§5-3	結果と考察	153
§5-4	まとめ	182
第6章	『グリシン残基におけるコンホメーション依存 化学シフトのFPT-INDO法による理論計算』	
§6-1	はじめに	188
§6-2	理論と計算	200
§6-3	結果と考察	208
§6-4	まとめ	236
第7章	『コンホメーション依存化学シフトの原理を探るための FPT-MNDO法による磁気遮蔽定数計算法の開発』	
§7-1	はじめに	240
§7-2	理論と計算	241
§7-3	結果と考察	275
§7-4	まとめ	302
第8章	『結論』	305

第一章 序 論

§ 1-1 「固体の NMR」を固体物質の 構造解析に用いることの意義

固体高分解能核磁気共鳴 (NMR) スペクトルが市販の NMR 装置で測定できるようになり、そこから得られるパラメーターを解析する手法が確立されるにつれて、この分光法が固体状態における分子の構造と運動性に関する有用な、そして新しい種類の情報を与えるものであることが明らかとなりつつある。

「固体の NMR」は溶液の NMR が手に負えなかった不溶性の試料に適用できるだけでなく、複数の異なった物質からなる複合系、異なった状態が共存する不均一系や、溶解によって分解変性してしまう試料に対しても適用できるという利点をもつ。また、たとえ可溶性の試料であったとしても電気伝導性、強磁性、ゴム状弾性、機械強度や耐熱性といった固体状態におけるマクロな物性は、試料が固体状態で存在する時のみ発現するものであるから、その分析は固体状態のままで行うことが望ましい。

解析の対象となる物性はそれが巨視的なものであっても、原理的にはより微視的な分子の構造や電子状態によって規定されており、これらのマクロな物性を探るためには、その立体化学構造やその動的なふるまいに関する情報を分子あるいは原子レベルで得る必要がある。特に水素結合や疎水的相互作用、バッキングの効果などに代表される分子間の相互作用は、固体物質の物性を決める上で非常に重要な役割を果たしているが、これらの多くは溶解により変化し、あるいは消失してしまうため、分析を固体状態のままで行うことの意義は大きい。固体の NMR は固体状態の試料に対して、原子、分子レベルの詳細な情報を提供しうる新しい分光法のひとつである。

固体状態における分子の立体構造に関しては、現在までのところ単結晶を用いたX線あるいは中性子線による回折法が最も正確で直接的な情報を与える。様々な分光法が発達した今日でも、分子の立体構造の表現としてこれらの回折法から得られる結晶中の分子座標にまさるものはないであろう。ただ残念なことに、その観測のためにはある程度の大きさをもった単結晶を手に入れなければならず、これは本研究で扱ったポリペプチドのような高分子化合物や、複数の安定なコンホメーションをもつオリゴペプチドでは容易なことではない。また、応用化学や生物科学、電子工学など実用的な面で有用な物質はしばしば「結晶状態」ではなく「非晶状態」あるいは「結晶部と非晶部が混在した状態」でその機能を発現するため、非結晶状態の試料から分子の立体化学構造や運動性に関する情報を引き出すことのできる新たな分析手法の開発が待たれている。固体のNMRは多結晶あるいは非晶、液晶などの試料に対してもそのままの状態で観測ができるため、この分光器による構造解析の手法が確立されれば、解析の対象となる物質の範囲もより実用的な方向へ大きく広がることになる。

「固体のNMR」を新たな分光法のひとつとして位置づけるにあたり、次のことを強調しておかなくてはならない。『ここから観測される情報はX線や中性子線回折からのような直接的なものではないため、スペクトルに隠されている情報を正確に取り出すためには、個々の「核スピン相互作用」を理論と実験の両面から予めきちんと把握しておくことが必要となる』つまり、これらの「相互作用」はしばしば混在しあるいは物理的に結合した形で現れるため、まず特定の「相互作用」を選択的に取り出してその性質を調べることが必要となる。そのためには、X線回折や中性子線回折によって結晶構造がすでに知られている試料を用いることにより、個々の「相互作用」の物理的な表現である「NMRパラメーター」を、その分子構

造に対応させて測定することが第一歩となる。ここからは分子の電子状態や核のスピン状態を仲立ちとして「NMRパラメーター」と「分子構造」や「分子運動」の関係を探ることができるだけでなく、「固体のNMR」を未知の構造や運動性をもった試料に適用して有用な知見を得るための基礎的なデータを得ることができる。多結晶試料や非晶状態の試料にあっては、分子がすでにあらゆる方向に配向しているため核同士の相対的な配置や化学結合の方向を特定することができず、結果として方向性に関するより高度な情報を含んだ形として「NMRパラメーター」を観測することは難しい。

このように、多結晶あるいは非晶状態の試料における分子構造の解析を最終的な目標として目指すわけであるが、固体のNMRをこのような分光法のひとつとして確立しここから正確な情報を取り出すための手法を開発してゆく段階では、試料の結晶構造に関する知見が是非とも必要となる。現在、多結晶あるいは非晶状態の試料を解析する場合に、固体のNMRから得られた結果を解析するためのレファレンスとなっているのは、X線回折などによってすでに分子構造との対応がつけられたデータであり、NMRから得られた結果だけで十分な議論をすることは未だ困難な場合が多い。

固体のNMRから得られる「パラメーター」は、X線回折や中性子線回折から得られるものとはその物理的背景を異にするため、今後これらのパラメーターに関する知識を集積してゆくことは、われわれの固体物性に関する知識が広げることになる。こうした意味で単結晶中の分子構造を対象とした分光法と「固体のNMR」は、分子構造を探る上で今後、相補的な役割をはたして行くことになると考えられる。このことは固体のNMRの先駆的な研究がしばしば単結晶を対象としたものであったことから理解することができる。

§ 1-2 固体 NMR のスペクトル に現れる「相互作用」*

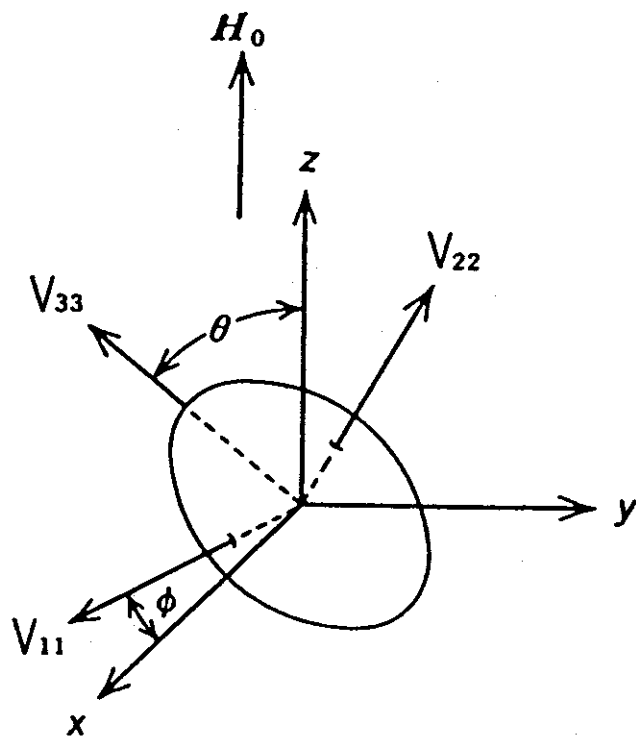
固体の NMR のスペクトルに現れる具体的な「相互作用」として次のようなものがあげられる

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{CSA} + \mathcal{H}_D + \mathcal{H}_Q$$

ここで \mathcal{H}_Z 、 \mathcal{H}_{CSA} 、 \mathcal{H}_D 、 \mathcal{H}_Q は、それぞれゼーマン相互作用、化学シフト異方性、双極子-双極子カップリング、核四重極子相互作用を表している。 \mathcal{H}_{CSA} 、 \mathcal{H}_D 、 \mathcal{H}_Q の大きさは、Hz 単位でそれぞれ、 $10 \sim 10^3$ 、 10^4 、 $10^5 \sim 10^6$ の程度である。固体の NMR において特に重要なことは、ゼーマン相互作用を除いたすべての「相互作用」が異方性を持ち、2階のテンソル量で表現されることである(図 1-1 参照)。そのため分子が完全に固定されている場合にはこれらの「相互作用」の方向依存性を観測することにより分子や化学結合の方向に関する情報を得ることが可能であり、また分子が動きやすい状態にある時にはその平均化の程度から分子の運動性や分子配向の程度を見積ることができる。固体の NMR に見られるこれら「相互作用」の物理的な意味は、Abragam¹⁾、Slichter²⁾、Haeberlin³⁾ の成書に、またその理論的な取扱いについては Mehring⁴⁾、Spiess⁵⁾ の総説に詳しい。

これらの「相互作用」は固体中だけでなく溶液中においてももちろん存在するが、溶液中では分子が速い並進運動や回転運動、コンホメーションのゆらぎ等を経験しているため、ゼーマン相互作用を除くすべての相互作用は平均化され、その結果、 \mathcal{H}_{CSA} は等方的な平均値となり、また \mathcal{H}_D と \mathcal{H}_Q はその平均値が 0 となって観測されない。このことは特別な装置を用い

* ここで「相互作用」と呼んでいるのは、次節で詳しく述べる「核スピン相互作用」のことであり、これらはそれぞれ「NMR パラメーター」と呼ばれるテンソル量で表現される。



$$V_{\text{obs}} = \lambda_{11}^2 V_{11} + \lambda_{22}^2 V_{22} + \lambda_{33}^2 V_{33}$$

$$\begin{cases} \lambda_{11} = \cos \phi \sin \theta \\ \lambda_{22} = \sin \phi \sin \theta \\ \lambda_{33} = \cos \theta \end{cases}$$

[図1-1a] “テンソル量”としてのNMRパラメーター I
 テンソルの主軸が上図のように向いているとき、
 Z軸方向の観測値； V_{obs} は上式で表現される。

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{pmatrix} V_{xx} & V_{xy} & V_{xz} \\ V_{yx} & V_{yy} & V_{yz} \\ V_{zx} & V_{zy} & V_{zz} \end{pmatrix} & \xrightarrow{\text{Diagonalize}} & \begin{pmatrix} V_{11} & 0 & 0 \\ 0 & V_{22} & 0 \\ 0 & 0 & V_{33} \end{pmatrix} \\
 \text{(Arbitrary} & & \text{(Principal} \\
 \text{Axis System)} & & \text{Axis System)}
 \end{array}$$

◦ Chemical Shift Anisotropy:

$$V_{11} = \sigma_{11}, \quad V_{22} = \sigma_{22}, \quad V_{33} = \sigma_{33}$$

$$\frac{1}{3}(V_{11} + V_{22} + V_{33}) = \sigma_{\text{iso}}$$

◦ Dipolar Coupling :

$$V_{11} = d, \quad V_{22} = d, \quad V_{33} = -2d$$

$$\frac{1}{3}(V_{11} + V_{22} + V_{33}) = 0$$

◦ Quadrupolar Coupling :

$$V_{11} = q_1, \quad V_{22} = q_2, \quad V_{33} = q_3$$

$$\frac{1}{3}(V_{11} + V_{22} + V_{33}) = 0$$

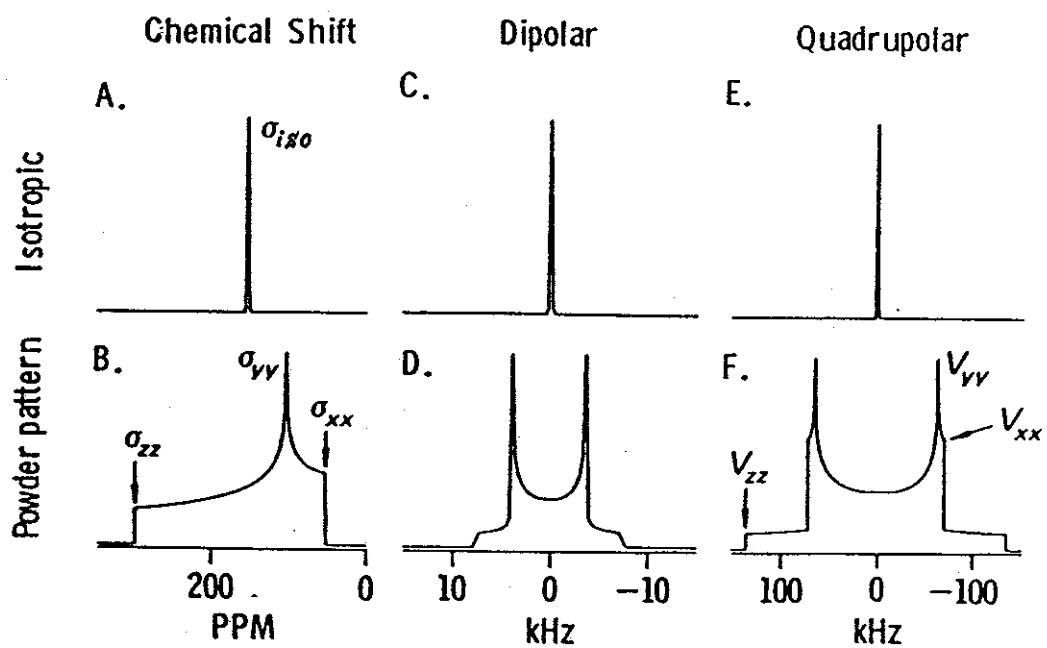
[図1-1b] “テンソル量”としてのNMRパラメーター II
 テンソルは主軸系に座標変換されることにより対角化される。
 「化学シフト」「双極子結合」「核四重極子結合」の
 各テンソル成分

ることなく溶液状態において高分解能のスペクトルを観測することを助けるが、これらの「相互作用」には本来、分子の立体化学構造や電子状態に関係する更に詳しい情報が含まれており、溶液のNMRにおいてはそれらの情報が失われてしまっていることをも意味している。図1-2に溶解による「相互作用」の平均化の様子を、固体の「粉末スペクトル」と比較して模式的に示す⁶⁾。粉末スペクトルとは多結晶状態の試料で観測されるスペクトルで、個々の相互作用は平均化されずに残っており、その線形は単結晶試料から得られるシャープなスペクトルをすべての方向について重ね合わせたものとなっている^{4,5)}。

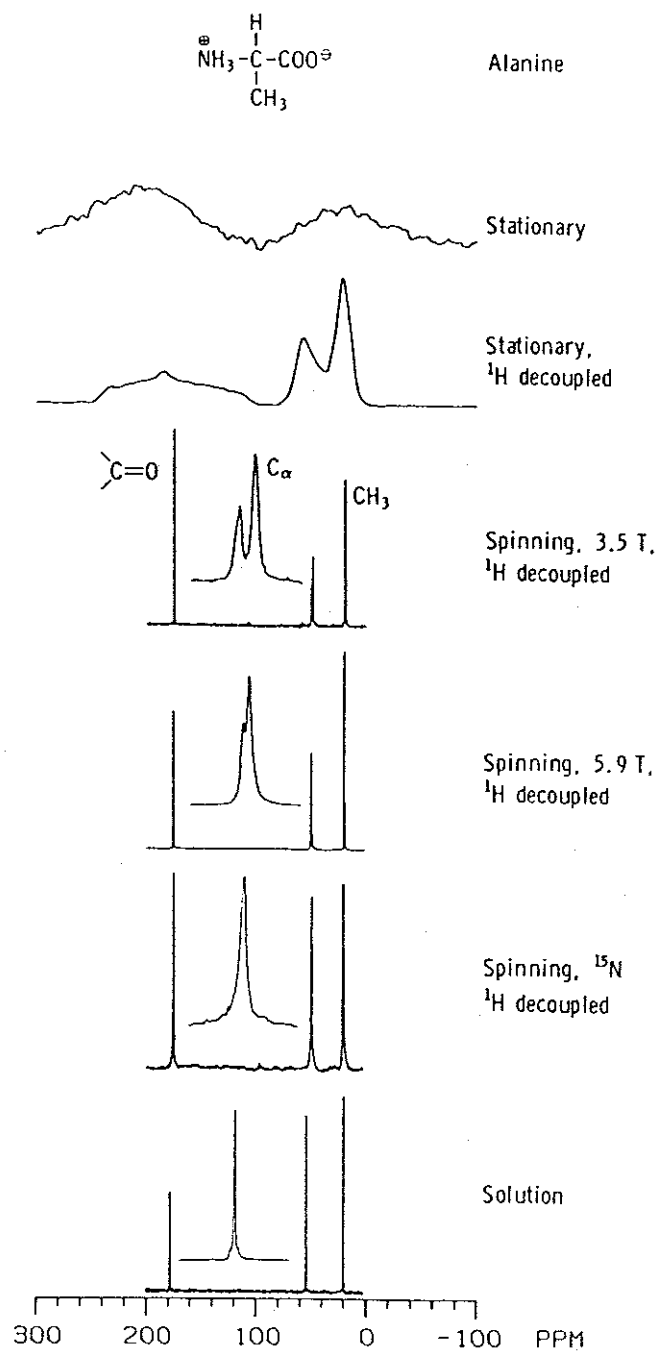
§ 1-3 「固体のNMR」の観測方法と 得られる情報の種類

固体のNMRに関する初期の研究では、観測が比較的容易なことと核種としての重要性から¹³Cが専らその観測対象とされた。そのため現在までに蓄積された「NMRパラメーター」も¹³C核に関連するものがほとんどである。¹³Cの他、¹⁵Nや³¹P,²⁹Siのような1/2の核スピンのもつ核種を観測する場合にスペクトルに影響を及ぼすおもな「相互作用」は \mathcal{H}_{CSA} と \mathcal{H}_D である。この2つの「相互作用」によるスペクトル線の分裂や線幅の広がりを積極的な情報源と見るか、スペクトルの形状を不明瞭にする擾乱要因と見るかで、固体NMRの観測方法が大きく異なってくる。(第1章,章末の表1-1,2を参照)

図1-3にアラニン多結晶の固体NMRの観測例を示す⁷⁾。一番上のスペクトルに見るとおり、 \mathcal{H}_{CSA} , \mathcal{H}_D , \mathcal{H}_Q (双極子-四重極子カップリング)のすべてを残したスペクトルは線幅が非常に広く、かつ細部が失われてし



[図1-2] 固体のNMRに現れる核スピン間の「相互作用」⁶⁾
 上段:それぞれの相互作用が等方的に平均化された時の
 スペクトル
 下段:それぞれの相互作用がすべての方向に向き
 固定されている時のスペクトル



【図 1-3】 多結晶アラニンの固体 ^{13}C NMR スペクトル7)
 最上段のスペクトルを除き, 交差分極(CP)条件下
 で測定したもの

まっで解析することができない。しかしその下のスペクトルに見るように高出力デカップリングにより $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 間の \mathcal{H}_D を消去してやればスペクトルに残るのは \mathcal{H}_{CSA} と \mathcal{H}_Q のみとなり、かつ測定が高磁場下で行われれば \mathcal{H}_Q は無視することができるので、ここから \mathcal{H}_{CSA} の効果(テンソルの主値)を得ることができる。3番目と4番目のスペクトルは上記の高出力デカップリングに加え、Magic Angle Spinningという手法により \mathcal{H}_{CSA} を平均化したものである。低磁場下で観測されたスペクトルでは \mathcal{H}_Q の効果が信号の分裂として残っているが、下から2番目のスペクトルには核四重極をもつ ^{14}N の影響がないため平均化された \mathcal{H}_{CSA} つまり等方平均化学シフトだけが観測される。次章の序論で詳しく述べるが、この化学シフト値は等方的に平均化されたものであるにもかかわらず溶液中での値とは異なっており、ここには固体中での核の回りの電子構造が反映されている。(この一連のスペクトルは多結晶状態の粉末試料について得られたものであるため、個々の「相互作用」をテンソル量として、つまり方向性の情報を含んだものとして観測することはできない。これらの「相互作用」をテンソル量として観測するためには、次節で述べるような測定法が必要である。)

このように固体のNMRにおいては、系に現れる「相互作用」を取捨選択することによって多種多彩なスペクトルを得ることができ、またこれらの「相互作用」のそれぞれが異なった背景をもつ物理量であることから、引き出される情報の種類も多岐にわたる。個々の「相互作用」を表す「NMRパラメーター」をテンソル量として観測することは、十分な大きさの単結晶が用意できさえすれば、既に開発された測定手法を用いることによってそれほど困難ではなくなっているため、今後の研究に残されている課題は“「NMRパラメーター」のそれぞれが、固体状態における分子のどのような構造や物性を反映しているのか”をより詳しく探ることにある。

前述したように物質の固体物性を決定しているのは、おもに分子の立体化学構造と分子間相互作用、そして分子運動であるので、以下に現在まで明らかにされたこれらの物理的な性質と「固体NMRに現れる相互作用」との関係を一説する。固体のNMR実験には、測定試料に単結晶を用いる方法と多結晶を用いる方法があり、それぞれについてNMRの観測方法、スペクトルの解析方法、得られる情報の種類が大きく異なっている。

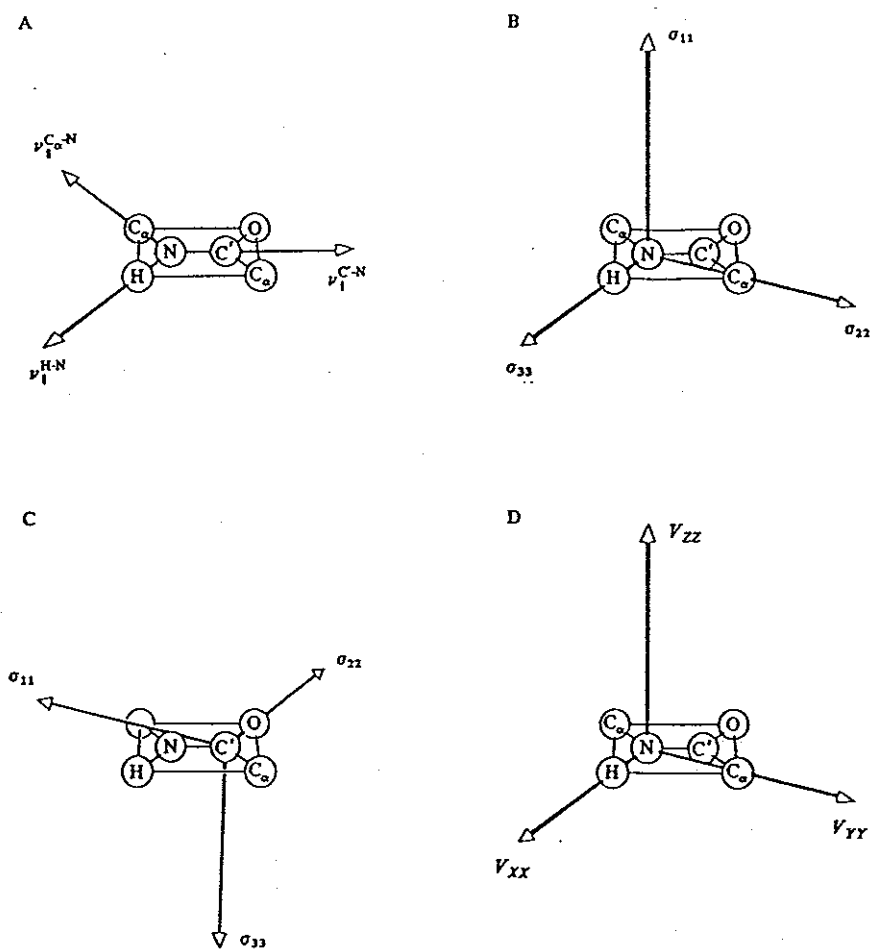
[1-3-1] 固体NMRにおける基礎的な物理量と 単結晶試料を用いたその測定

分子が物質中で固定され分子全体にわたる運動が存在しない場合には、分子の方向性に関連する「相互作用」を選択的に観測することにより、分子の立体化学構造に関する情報、具体的には原子間距離や2つの化学結合がなす角(結合角)、結晶軸と化学結合のなす角などを測定することができる。1/2の核スピンをもち天然存在比の小さな核種に対して観測の対象となる「NMRパラメーター」は、

- 1) 化学シフトテンソル、
- 2) 双極子-双極子カップリングテンソル、
- 3) 双極子-核四重極子カップリングテンソル

などである。例えばアミノ酸やペプチドにおいては、1)として ^{13}C 化学シフトテンソル、 ^{15}N 化学シフトテンソル、2)として $^1\text{H}-^{15}\text{N}$, $^1\text{H}-^{14}\text{N}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ などの双極子-双極子カップリングテンソル、3)として、 $^{13}\text{C}-^{14}\text{N}$ カップリングテンソル $^{13}\text{C}-^2\text{D}$ カップリングテンソルなどが既に観測されている。ペプチドの立体化学構造を探るうえで重要な「NMRパラメーター」のそれぞれのテンソルの様子を図1-4に模式的に示す⁸⁾。

^{13}C や ^{15}N , ^{29}Si など天然存在比の小さな核種は、同じ核種同士の相



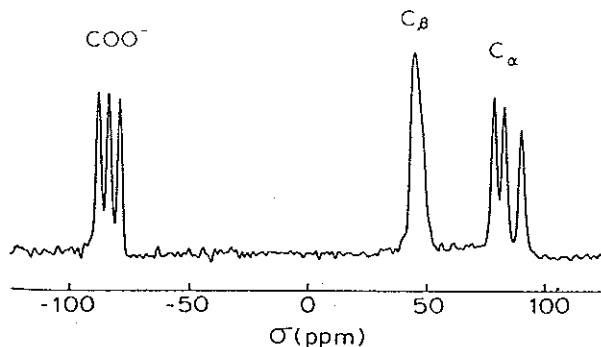
【図1-4】 ペプチド平面における核スピン間「相互作用」の主値
 (a) 異核 双極子-双極子カップリング⁸⁾
 (b) ^{15}N 化学シフトテンソル
 (c) ^{13}C 化学シフトテンソル
 (d) ^{14}N 核四重極子テンソル

相互作用を考える必要がなく、近接する天然存在比の大きな核、通常は ^1H 核や ^{14}N とのみ強く相互作用しているため、観測核や隣接核の選択的なラベルや高周波照射による ^1H 核の双極子磁場の消去などにより、実験系を比較的自由に制御することができる。またこれらの核の化学シフト異方性は通常 $50 \sim 300$ ppmにわたるため、化学シフトテンソルの主値や主軸の方向が比較的容易に観測できるのみならず、わずかな化学的な環境の差異をここから検出することができる。このような方法論に沿った研究は今日まで Waugh、Pines、Griffin⁹⁾らのグループにより精力的に進められ、天然存在比の小さな核種を効率的に観測するための Cross Polarization法 (Proton Enhanced法) や、 ^1H - ^1H 間の双極子-双極子相互作用を平均化する多重パルス法の開発により、これらの「相互作用」をテンソル量として観測できるようになった。(彼らによって開発された数々の手法は現在では多結晶や非晶質試料の観測手段としても広く利用され、固体高分解能 NMR の測定に欠くことのできないものとなっている。)

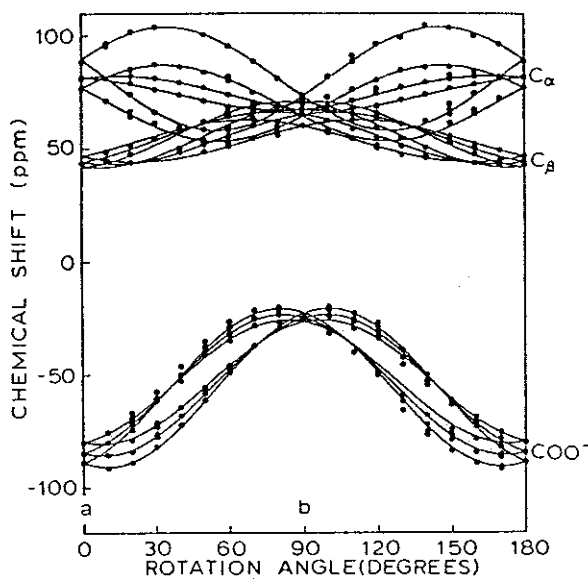
固体の NMR に現れる「相互作用」のうち、1)「化学シフトテンソル」は、後述の CP-MAS NMR あるいは溶液の NMR において重要なパラメーターとなる「化学シフト」の本来の姿と言うべきものである。化学シフトとは、分子が磁場中に置かれた時に核の回りの電子の流れが外部磁場を部分的に遮蔽して核の感じる磁場を変化させる効果のことで、その大きさの程度は核に近い比較的ローカルな電子構造を反映している。核の周囲の電子分布は多く場合 異方的であるため、この効果にも異方性が生じテンソル量で表されることになる。今日では粉末状試料の高分解能スペクトルが測定可能となり、そこから等方平均化学シフトが容易に得られるようになったが、空間的に平均化されていない化学シフトテンソルは角度に対する依存性を持ち、個々の成分が特定の方向の電子構造を反映して変化する

ため、一般に等方平均値よりもはるかに観測核の周囲の電子的な環境に敏感である。図1-5にセリン単結晶について観測された ^{13}C NMRスペクトルと化学シフト値の角度依存性、およびそこから得られた各炭素の ^{13}C 化学シフトテンソルの方向と大きさを示す¹⁰⁾。 ^{13}C 核は通常、周囲に多数存在する ^1H 核によって作られる強い双極子場の中に置かれているが、その影響はここでは高出力デカップリングによって消去されている。しかし ^{13}C 核と核四重極子との相互作用は高周波照射をもってしても消去できないため、 $\text{C}=\text{O}$ と $\text{C}\alpha$ のスペクトル線は ^{14}N とのカップリングによって非対称に分裂している。単結晶の試料を用いた ^{13}C 化学シフトテンソルの測定方法と現在までに蓄積されたデータ、及びそこから得られる知見についてはVeemanによる総説に詳しくまとめられている¹¹⁾。

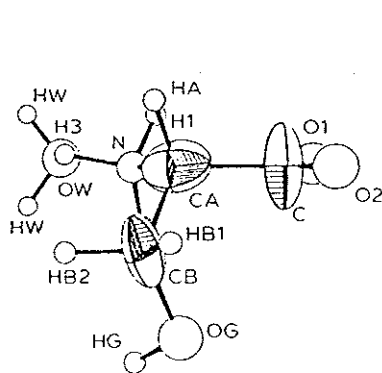
化学シフトテンソルを決定する「分子の電子構造」とは分子の空間中に広がった電子の空間分布のことで、この状態は個々の電子の軌道関数を基底関数としその線形結合をとることによって物理的に記述することができる。化学結合によって相互に固定された原子核とは異なり電子は空間中を自由に動くことができるため、分子の電子構造は原子の核間距離(結合長)や結合角のみならず、分子のコンホメーションや置換基効果、分子間の相互作用などにも敏感に反応して変化する。これは後述する核スピン間の相互作用がそれ自身に固有のパラメーターを除いて、「磁場と核間ベクトルがなす角」および「核間距離」のみに依存して変化的ことと対照的である。分子の電子構造には無数の自由度が存在し、これに影響を及ぼす相互作用も多岐にわたるため、化学シフトテンソルの挙動を理論的に評価し予測することは容易でない。これまでもこの化学シフトテンソルの挙動を理論的に解明しようとする試みは数多くなされてきた¹²⁾が、他の「相互作用」の評価に比して計算の精度は高いといえず、理論的な予測精度も十分なレ



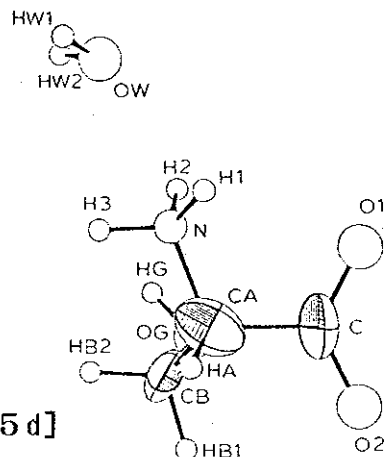
[图 1 - 5 a] Proton-enhanced ^{13}C NMR spectrum of a single crystal of *l*-serine monohydrate with proton decoupling when the static magnetic field is parallel to the *a* axis. The horizontal scale is relative to an external reference of liquid benzene. Benzene is 128.5 ppm down field from TMS.



[图 1 - 5 b] Angular dependence of the ^{13}C NMR lines for the C_α , C_β , and COO^- carbon nuclei of a single crystal of *l*-serine monohydrate when the static magnetic field is rotated in the *ab* plane.



[图 1 - 5 c]



[图 1 - 5 d]

An ORTEP drawing showing the representation of the ^{13}C chemical shielding tensor deduced for *l*-serine monohydrate. The lengths of ellipsoid axes are proportional to the principal values shifted to make all three values positive. Viewing down from the direction perpendicular to the $\text{C}_\alpha\text{-C}$ bond and parallel to the O-C-O plane. Viewing down from the direction perpendicular to the O-C-O plane.

ベルに達しているとは言い難い。得られる情報の「多様性」と「重要性」*
そして「理論的アプローチの困難さ」が、「化学シフト」という相互作用
を特徴づけている。

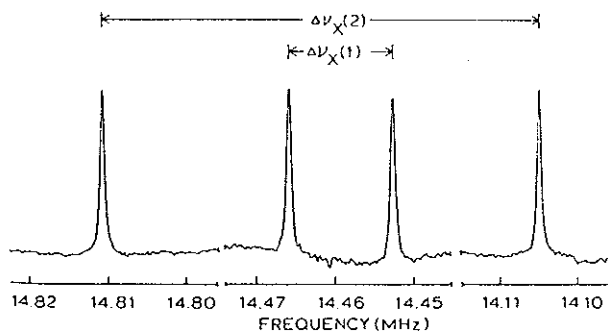
次いで、2)の「双極子-双極子カップリング」とは、スピンを持った隣接核同士がお互いに相手の核の作った双極子磁場の影響を受ける作用のことで、この相互作用は一般に軸対称のテンソル量として表されるため、単結晶の試料を1つの軸のまわりに回転しスペクトル線の角度依存性を観測することによって、その主値と主軸の方向を決定することができる。ここで、最も大きな主値の主軸が常に結合軸の方向を向くことから、結晶軸をNMRのプロープに合わせてセットすることにより、磁場の方向を介して結合軸と結晶軸のなす角を算出することができる。ただし ^1H 間には強力な双極子カップリングが存在するため ^1H と他の核種(^{13}C や ^{15}N)のカップリングの観測には別の実験手法が必要となる。また天然存在比の小さな核同士のカップリングも相互に隣り合う確率が少ないために観測が困難で、その測定には観測核の選択的な同位体ラベルが必要となる場合が多い。実際の測定においてこの相互作用は化学シフトテンソル測定のための結合軸の基準として用いられることが多く、双極子-双極子カップリングそのもののテンソル成分が求められた例は多くないが、最近ではStarkらによりグリシルグリシン塩酸塩のカルボニル炭素-アミド窒素間の双極子カップリングテンソルが明らかにされている¹³⁾。

3)の「双極子-核四重極子カップリング」を表すテンソルは一般に軸対称性を持たないため、その測定のためには直交する2軸のまわりに単結晶を回転させスペクトル線の角度依存性を追う操作が必要となる。核四重

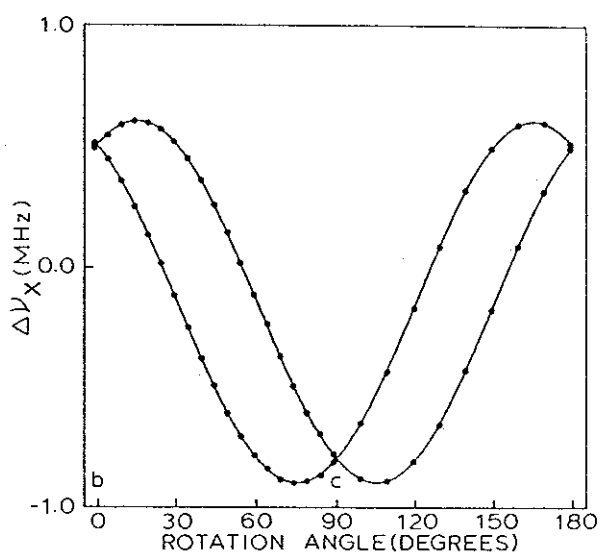
* 分子の構造パラメーターのうち、“コンホメーション”は“結合長”や“結合角”よりも化学的に重要な場合が多いであろう。

極をもつ核種には3つ以上のスピン状態が存在するので双極子カップリングの場合よりもスペクトルの解析は複雑となるが、観測方法に本質的な差異はない。アミノ酸、ペプチドを対象とする場合には ^{14}N 核(スピンは1)が天然存在比99%以上で存在するため ^{14}N のカップリングテンソルは解析された例も多く、ここからC-N結合の核間距離やテンソル主軸の方向などがすでに得られている。双極子-双極子カップリングの場合と異なり、この相互作用テンソルの主軸は結合軸と完全には一致しない。図1-6にセリン単結晶について観測された ^{14}N NMRスペクトル、核四重極カップリングによって生じた分裂幅の角度依存性と、そこから得られた ^{14}N の核四重極カップリングテンソルの様子を示す¹⁰⁾。

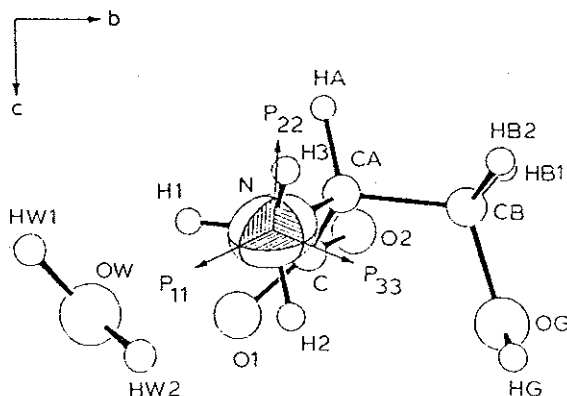
既に述べたように2)や3)にあげたようなカップリングの「相互作用」は核間距離に非常に敏感に反応するため、これを測定することにより中性子線回折に匹敵する精度で核間距離を得ることができる。これらの「相互作用」は化学シフト異方性とは異なり、化学的に結合する2つあるいは3つ以上の核のそれぞれのスピン状態によってのみ決定される物理量であるため、周囲に存在する核スピンをもたない原子や近傍の電子分布とは関係がない。核のスピン状態は電子の空間的な分布と異なり、スピン1/2の核の場合、 α ($s=1/2$)と β ($s=-1/2$)の二状態しか存在せず、スピンを持った核同士が相互作用しあって作る双極子場についても、個々の核スピン状態の線形結合をとることによってそれほど困難を伴わずに系全体の状態を記述することができる。この場合基底関数となるスピン関数系は、相互作用する核の数が少なければ容易に「完全系」とすることができるため、系の状態の十分な記述が可能となる。このことはカップリングを利用した様々な実験における理論曲線と実測スペクトルの非常によい一致として見ることができる。しかし残念なことに、理論とシミュレーション計算を駆使す



[图 1 - 6a] Proton-enhanced ^{14}N NMR spectrum of a single crystal of *l*-serine monohydrate. The static magnetic field (H_0) makes an angle of 56° with the *b* axis in the *bc* plane.



[图 1 - 6b] Angular dependence of the ^{14}N NMR line splittings of a single crystal of *l*-serine monohydrate when the static magnetic field is rotated in the *bc* plane.



[图 1 - 6c] An ORTEP drawing showing the schematic representation of the ^{14}N quadrupole coupling tensor for the NH_3^+ nitrogen of a single crystal of *l*-serine monohydrate. The lengths of the axes of the ellipsoids are proportional to the corresponding principal values shifted to make all three values positive.

ることによって非常に精密な測定ができるにもかかわらず、これらの実験から得られる情報はあまりに局所的で、高次の構造にまではなかなかつながらない。これまでもアミノ酸やペプチドに対してその結合長や双極子テンソルなどが詳細に解析され、 $\pm 0.005 \text{ \AA}$ の精度で核間距離が測定できることが報告されているが¹⁴⁾、これらのデータを組み合わせてもペプチドのコンホメーションを知ることはできない。また水素結合のような分子間の相互作用についても、原理的にはカップリングの程度が測定可能なはずだが、実際には核間距離が 4 \AA 以上となった場合、スペクトル線に明確な分裂は観測されず、これまで2分子間にわたる核間のカップリングテンソルが明らかにされた例はない。Opellaらがペプチド3量体の単結晶試料について、 ^{14}N 核四重極分裂、 ^{14}N 二次化学シフト、 ^{14}N - ^1H 双極子-核四重極子カップリング、 ^{14}N オーバートーンNMR周波数の4つのパラメーターの角度依存性を観測し、それらの結果を組み合わせて2つのペプチド平面のなす角(これはコンホメーションにつながるものである)を探る試みをしたのが、より高度な立体化学的情報を志向した唯一の例となっている¹⁵⁾。

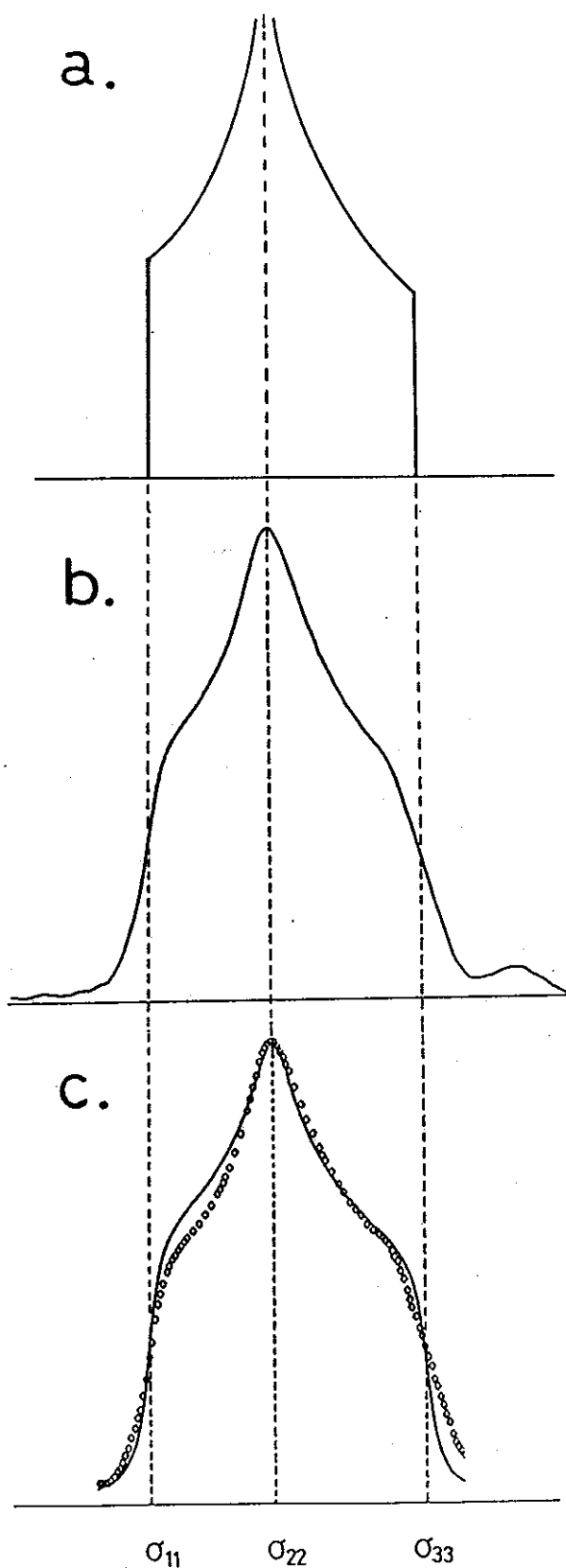
一方、 ^1H - ^1H 間の双極子-双極子カップリングはとても強いもので、固体中においては「スピン拡散」と呼ばれる強力な緩和機構を提供しているため、特定の ^1H 核間の双極子-双極子カップリングの観測は現在のところ困難である。また、 ^1H の化学シフトテンソルは主値の変化する範囲が高々数十ppmであることから詳細な議論を行うことが難しく、現在までの観測例は限られている。また分子の運動性を探る上で ^2H 核の粉末スペクトル(核四重極分裂)の線形はしばしば有用な情報を与えるが、1以上のスピン量子数をもつ核種のNMRは本研究の範囲外としたためここでは言及しない。固体試料における ^2H NMRの詳細はOldfieldの総説に詳しい¹⁶⁾。

[1-3-2] 相互作用テンソルに関連したNMRパラメーターの 多結晶試料を用いた測定

前節までで述べたように、固体NMRのパラメーターをその方向性まで含めたテンソル量として観測するためには単結晶試料を用いた測定が必要であり、またこのようにして得られた主値と主軸の方向が最も正確で情報量も多い。しかし単結晶試料を観測対象とするためにはゴニオメーターを載せたNMRプローブが必要であり、これは自作しなければならない。翻って市販のプローブによる測定を前提条件とするならば、試料は少なくとも多結晶状態のものということになる。前述したようにNMRが観測可能となる大きさ(少なくとも100mg程度)にまで単結晶を成長させられる物質はまれであるため、実際には多結晶試料を用いてできるだけ多くの情報を得ることのできる実験方法が望ましい。(ただし多結晶試料や非晶状態の試料では分子の方向性に関する情報が失われているため、実験の解釈には単結晶の観測から得られた知見がどうしても必要となる。)

詳細は次章で述べるが、すでに図1-3に示したとおり固体のNMRに現れる相互作用は多結晶状態の試料に対して「粉末スペクトル」と呼ばれる特徴的なシグナルを生じさせ、我々はここからテンソル成分に関連した様々なパラメーターを読み取ることができる。図1-7にグリシン残基カルボニル炭素について観測された粉末スペクトルとその理論曲線を示す。すでにアラニン多結晶の例でも見たとおり、ここからは化学シフトテンソルの主値を読み取ることができる。 ^{13}C - ^{14}N 間の双極子-核四重極子カップリングは高出力デカップリングによっても完全に消去することはできないが、ここでは約80MHzの高磁場下で測定を行っているためその効果はほぼ無視することができる。

^{13}C や ^{15}N などスピン1/2の核においては、化学シフトの異方性と



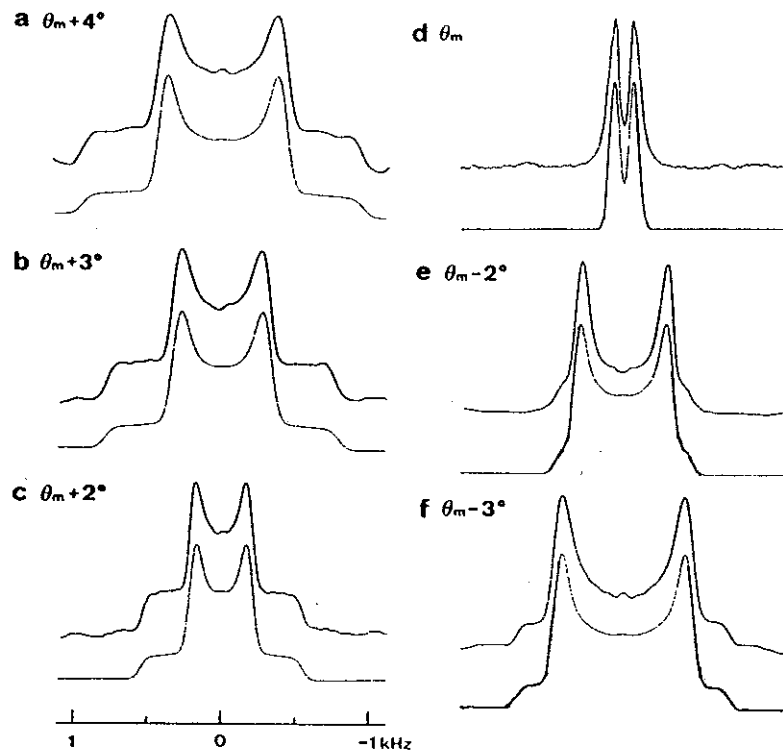
[図 1-7] (a) 化学シフト異方性による粉末スペクトルの理論曲線
 (b) ポリグリシン Form I について観測された粉末スペクトル
 (c) 主値を読み取るためのスペクトルのフィッティング
 実線;ローレンツ曲線で広幅化した理論曲線
 丸線;粉末スペクトル(b)をデジタル化して表したもの

^1H 核との双極子-双極子カップリングの大きさは一般に同程度であり、後者は高出力デカップリングによって消去することができるが、前者のみを選択的に消去することは技術的に困難である。双極子-双極子カップリングの相互作用だけを取り出したスペクトルを観測するためには、寺尾らにより開発された2次元NMRの手法¹⁷⁾、あるいはYannoniらによるCP-nutation NMRの手法¹⁸⁾を用いなければならない。図1-8に寺尾らの方法で観測された蟻酸カルシウムカルボニル炭素の ^{13}C スペクトルとその理論曲線を示す。ここからは $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ の距離や $^1\text{H}-^{13}\text{C}-^1\text{H}$ の角度を非常に正確に測定することができる。

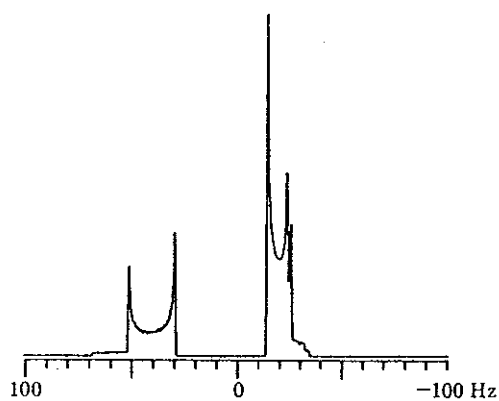
^{13}C に対する ^{14}N のカップリングの効果は、図1-3の上から3番目のスペクトルに示した通り、観測が低磁場下で行われた場合、信号の分裂としてスペクトルの形状に顕著な影響をもたらす。系が複雑で多くの信号が混在した場合や正確な等方平均化学シフトを測定したい場合には、 ^{14}N による分裂は存在しないほうがよいが、この分裂幅はC-N結合の核間距離と ^{14}N カップリングテンソルの非対称パラメーター η 、そして核に固有の定数 e^2qQ/h によって決定されるため、このうち2つが分かれば他の1つを決定することができる。図1-9にOpellaらにより観測された ^{14}N 核によるカルボニル炭素の ^{13}C スペクトル実測のスペクトルとその理論曲線を示す¹⁹⁾。

[1-3-3] 等方平均化学シフトの多結晶試料を用いた測定

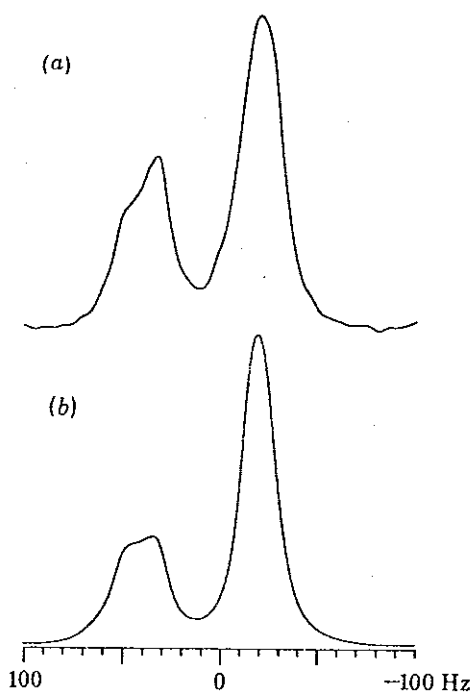
これまでは固体のNMRに固有の「相互作用」のテンソルとしての性質を利用して、基礎的かつより詳細な情報を得るための方法論を概説してきた。これらは固体のNMRにおける“基礎”研究と言うべきものであり、これらの実験の多くが、実際には特殊な測定装置や試料における特定サイ



[図1-8] 蟻酸カルシウムの ^{13}C SASS スペクトル
 上段;実測スペクトル、下段;計算スペクトル



[图 1 - 9 a] Theoretical spectrum of the alanine α carbon, calculated for a C-N bond length of 1.49 Å in a magnetic field of 3.54 T; $e^2qQ/h = -1.11$ MHz; $\eta = 0$; β^d and β^a are collinear; $\alpha^a = \alpha^k = 0$. Dipolar shifts are calculated to ± 0.1 Hz for 10^3 data points.



[图 1 - 9 b] ^{13}C n.m.r. spectra of the α carbon resonance of polycrystalline alanine. (a) Experimental data as in figure 1; (b) theoretical data of figure 1 with 12 Hz line broadening added.

トの同位体ラベルを必要とすることは否めない。これらの方法を複雑な物質系にそのままの形で応用することはスペクトルの分解能の点からいっても困難である。

固体状態での「一般的な試料^{*}」から分子の立体化学的な情報を得るためには、まず分子を構成しているそれぞれの核の信号を分離して観測しなければならない。そのためには溶液NMRのような高分解能のスペクトルを得る必要があるが、すでに多結晶アラニンの例で見たようにこの目的は Schaeferと Stejskalにより開発されたCP-MAS (Cross Polarization-Magic Angle Spinning)と呼ばれる方法によって達成されている²⁰⁾。CP-MAS法では固体中に存する観測核 (^{13}C や ^{15}N , ^{29}Si など) と ^1H との双極子-双極子カップリングや観測核の化学シフト異方性はほぼ完全に平均化されるため、系に残る「相互作用」は溶液中と同じもののはずである。しかし固体中の分子には溶液中に存在するオーバーオール分子運動が存在せず、溶液中では揺らいでいる分子間の相互作用も固体中では固定されているため、これら効果が両者の化学シフトの差として観測されることになる。

CP-MAS NMR から得られる化学シフト値(等方平均化学シフト)は溶液のNMR化学シフトと直接的に比較することができ、ここからは固体中の分子のコンホメーションや分子間相互作用に関する情報を得ることができる。§1-1において固体のNMR研究を進めるにあたっての、X線や中性子線回折による測定データの重要性を指摘したが、固体のNMRから得られる分子構造に関する知見を、すでに溶液中での分子構造解析法と

* ここで「一般的な試料」というのは、多結晶あるいは非晶状態をとり、特定サイトの同位体ラベルなどがされておらず、ある一定以上の分子量をもった分子で、NMRのスペクトル上に複数の信号が混在するものを指す。

して広く用いられている溶液NMRからの結果と比較できれば、これまでは困難であった結晶中と溶液中での分子構造や分子間相互作用の相互比較が可能となる。また一歩進めて、今後そのような知識が蓄積されてゆけば、X線解析にはかからない非晶部を含んだ試料についても解析が可能となるであろう。

固体試料における等方平均化学シフトのコンホメーション依存性および分子間相互作用の依存性については、本研究の中心課題であるため各章の序論で詳しく述べるが、すでにコンホメーション依存化学シフトの分野で先駆的な研究を行ったVanderHartを始めとする研究者により、アルカン、合成高分子、多糖類、ポリペプチド、タンパク質、イオノフォアなどの分子系において、結晶構造や分子のコンホメーションの違いにより ~ 8 ppm、ときに 12 ppmものシフト差が観測されている²¹⁾。CP-MAS NMRから得られる等方平均化学シフトは化学シフトテンソルの3つの主値の平均値であるため、今後、単結晶試料の測定などにより個々の化学シフトテンソルの主値や主軸の方向を変化させる要因が明らかとなっていけば、多結晶や非晶状態の試料に対する知見を得ることができる。

[1-3-4] 多結晶試料または非晶部分を含んだ試料における 運動性と分子配向性の観測

前節まで固体NMRのパラメーターから得られる立体化学構造に関する情報の種類とその観測手法について述べた。一方、固体のNMRからは分子構造に関する情報ばかりではなく、分子の運動性や分子の配向性に関する知見を得ることもできる²²⁾。

溶液中では速い分子運動の存在によって、固体のNMRに現れるすべての「相互作用」が平均化されてしまうことより、固体状態においても局

所的な分子運動が存在すれば、これらの相互作用は部分的に平均化されそれがスペクトル線の変化として検知されることは容易に想像がつく。固体のNMRにおける分子運動の情報源としては、溶液のNMRからも得られるスピン格子緩和時間 $T_{1\rho}$ 、スピン-スピン緩和時間 T_2 、回転系のスピン格子緩和時間 $T_{1\rho}$ などの他、CP-MAS測定に固有の $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 間の交差緩和時間 T_{CH} などがあり、これらは有用な情報を与える。また分子の運動は化学シフト異方性を残した粉末スペクトルにも影響を与えるため、特定の運動形態を仮定したスペクトルのシミュレーションを行うことにより、分子運動の種類や運動の相関時間を測定することもできる⁵⁾。一方、分子運動が存在していなくとも分子に一定の配向が存在する場合には、化学シフト異方性を残した粉末スペクトルに軸対称性が現れるため、ここから分子配向の程度を見積ることができる。ただし分子運動に関する研究および分子の配向状態に関しては本研究の範囲外であるため詳しくは触れない。前者についてはSpiess⁵⁾およびJones²³⁾の総説、後者についてはBrandoliniとDybowskiの総説²⁴⁾に詳しい。

§ 1-4 コンホメーション研究の対象

物質としてのオリゴペプチド とポリペプチド

ペプチドは生体内における様々な物理化学的プロセスの維持や制御に重要な役割を果たしている。これらの機能が発現する機構を知るためにはペプチドの分子構造や分子運動に関する知見が是非とも必要となる。また、ペプチドのコンホメーションや緩和機構を理解することは、より高度で複雑な生体分子であるタンパク質の構造や機能を探る上でも重要である。

一般に、タンパク質は分子量が高いため単離が難しく、不安定なものが多いために取り扱いが困難である。単結晶を用いたX線解析や、距離行列法を用いた溶液NMRによる構造解析のようにタンパク質分子そのものを対象とする“正攻法”による研究がこれまで数多く行われてきた一方で、タンパク質の部分構造としての「低分子量ペプチド」やタンパク質に類似の二次構造をとる「合成ポリペプチド」を“モデル化合物”として利用した研究も幅広く行われてきた。現在までになされた多くの研究から、モデル化合物より得られた構造や機能に関する知見がタンパク質の理解にそのままの形で結びつくことは稀であることがわかっているが、生理的な機能の発現はともかく、その立体化学構造を成り立たせている構造原理は、タンパク質と低分子量ペプチドや合成ポリペプチドで同じもののはずであり、モデル化合物を用いた研究が天然タンパク質の構造の解明に基礎的な知見を与えることが期待できる。

モデルを用いた研究は、ある特定の観点に立ってモデル化合物を選択することにより実験系を比較的自由に制御することができる点で、天然化合物だけを対象とする研究方法よりも有利な立場にある。低分子量のペプ

チドは化学合成が簡単なため特定サイトの安定同位体ラベルが容易であり、分子構造のレファレンスとなる結晶構造も X 線回折等により比較的よく知られている。また合成ポリペプチドは、「二次構造」としてタンパク質中に見られる α -ヘリックスや β -シートなどのよく知られた形態をとるばかりでなく、分子鎖末端の効果や局所的な構造の乱れの少ない理想的なモデル系を提供する。これらモデル化合物の観測を通して、われわれはより高度な生体分子を探索するための基礎的なデータを得ることができるのである。

タンパク質構造の探求という壮大な課題から離れたとしても、コンホメーションを研究する対象物質として低分子量ペプチドやポリペプチドを選んだことの意味は大きい。よく知られるように天然に産するペプチドやタンパク質は 20 種のアミノ酸がまず一次元的な連鎖を作ることによって形成されるが、このアミノ酸残基の組み合わせ方により分子は全く多種多様な構造をとる。本論第 5 章でも紹介するように、比較的 low 分子量のペプチドでは、アミノ酸残基が一つ増えただけで分子全体の構造が全く異なったものに変化する場合があり、それはしばしば固体の NMR で十分に検知が可能なほどの電子構造の変化を伴っている。

本研究は NMR を用いた分子構造解析の新しい方法論の開発を目指しているため、結晶化が困難な試料に対してもそのままの形態で測定ができる固体の NMR は大変に都合が良い。構造のレファレンスとなる単結晶中の分子構造も既に多くのモデルペプチドについて知られており、これまでに行われたコンホメーションエネルギーの理論計算と相まって、低分子量ペプチドやポリペプチドの構造はかなりの程度まで理解されていると言っ
てよい。このように コンホメーション研究の対象物質としてのペプチドは、他の分子群に比べて周辺の研究環境が良く整っていると言することができる。

§ 1-4 本 研 究 の 目 的

これまで、固体のNMRに現れる様々な「相互作用」とそこから得られる情報の種類について概説した。最後に本研究で対象とするNMRの「相互作用」とそれに対応する「NMRパラメーター」、及びそこから得られる情報の種類を明らかにするとともに、本研究の目的について述べることにする。

I. 固体高分解能NMRを用いて「分子の立体化学構造」を探る。

多結晶状態の試料に対して固体高分解能NMRを用いた測定と解析を行い、分子の立体化学構造に関連した情報を得るための新しい方法論を開発することを目的とする。そのためにはまず対象となる「NMRパラメーター」を精度良く観測する手法を開発し、得られた結果を解析することによって、個々の観測量が分子のどのような立体化学構造を反映しているのかを検討してゆくことが必要となる。またその過程でNMRパラメーターの量子化学的な取扱いによる理論的な検討を行うとともに、新たな計算手法の開発も合わせて行う。但し、分子運動や分子配向に関して固体のNMRから得られる情報については本研究の対象としない。

II. 「化学シフトテンソル」および「等方平均化学シフト」を

固体NMRの観測対象パラメーターとする。

固体のNMRに現れる「相互作用」のうち、化学シフト異方性 (σ_{CSA})とそれを空間的に平均化した等方平均化学シフトは、双極子カップリングや核四重極子カップリングよりも分子の立体化学構造に関係したより長距離の相互作用を反映する。化学シフトに影響を及ぼす

分子の立体化学的な要素としては、コンホメーション(分子中の化学結合におけるねじれ角の違い)の他に、水素結合に代表されるような直接的な分子間相互作用、結晶場の効果やパッキングの効果のような間接的な分子間相互作用、核の磁気的不等価性、分子構造の歪みや立体障害などが考えられる。本研究ではこの中でも比較的重要と思われる「コンホメーションの効果」と「水素結合の効果」を中心課題として据え議論を進めてゆく。どちらの効果も分子の電子状態を通じて化学シフトに影響を与え、その程度も他の効果に比べて大きいことが予想される。

III. 「オリゴペプチド」及び「ポリペプチド」を観測の対象物質とする。

観測の対象物質としては、残基の組合せ方によって多彩な分子構造をとり、生体関連物質としても重要度の高いオリゴペプチドおよびポリペプチドを選択した。低分子量のペプチドは合成が比較的簡単なために特定サイトの安定同位体ラベルが容易であり、また分子構造のレファレンスとなる結晶構造もX線回折等により比較的良好に知られている。一方、ポリペプチドは、タンパク質中の二次構造として知られる α -ヘリックスや β -シートなどの典型的なコンホメーションをとるばかりでなく、分子鎖末端の効果や局所的な構造の乱れの少ない理想的なモデルを提供する。本研究で扱うペプチドは炭素、水素、窒素、酸素の4元素からなるため、その電子構造は炭化水素などに比べて複雑であり、理論計算の妥当性を評価する目的にも都合がよいと考えられる。

[固体のNMRで対象となる物理量およびその観測手法、
試料の形態とそこから得られる情報の種類]

これまでに述べてきた固体のNMRに現れる物理量と測定に供される試料の形態、またそこから得られる情報の種類と観測の手法の関係を簡単にまとめたのが、以下の表である。

表1-1 固体のNMRから得られる情報の種類と観測の手法

得られる情報の種類	分子構造に関するもの		運動性	配向状態
分子運動の有無	なし		あり	問わない
観測方法 \ 試料形態	単結晶	多結晶		液晶複合系
スペクトルの角度依存性	○	×	×	○
粉末スペクトル	×	●	○	○
CP/MASスペクトル	×	●	○	×

- . . . 本研究で用いた手法
- . . . 本研究では用いていないが有効な手法
- × . . . 実験が不可能,もしくは意味をなさない

表1-2 分子の立体化学的な情報を得るために観測される
NMRのパラメーターと試料の形態

観測するパラメーター \ 試料の形態	単結晶	多結晶
化学シフト(等方平均値と異方性)	○	●
双極子カップリング	○	○
四重極子カップリング	○	○

- . . . 本研究で用いた手法
- . . . 本研究では用いていないが有効な手法

参考文献 》

- 1) Abragam, A. "The Principles of Nuclear Magnetism"
Oxford Univ. Press, London (1961)
- 2) Slichter, C.P. "Principles of Magnetic Resonance" 2nd. Rev.
Springer, Berlin (1978)
- 3) Haeberlen, U. "High Resolution NMR in Solids" Academic Press,
New York (1976)
- 4) Mehling, M. "High Resolution NMR in Solids" Springer, Berlin (1983)
- 5) Spiess, H.W. "Dynamic NMR Spectroscopy" Springer, Berlin (1982)
- 6) Frey, M.H. "Solids State NMR of Peptides"
A Dissertation in Chemistry, University of Pennsylvania (1984)
- 7) O'pella, S.J. "Solid State NMR of Biological Systems"
Ann.Rev.Phys.Chem. 33, 533-62 (1982)
- 8) O'pella, S.J.; Stewart, P.L.; Valentine, K.G.
Quat.Rev.of Biophysics, 19, 7-49 (1987)
- 9) 結晶性固体試料のNMRは、この3人に代表されるMITのグループによって
先導されてきたといっても過言でない。これまで広範囲にわたる研究が報告
されているが、中でも ^{13}C 核の測定感度を飛躍的に高めたCross Polariza
tion法は固体高分解能NMRを実用的な測定法とするのに大きな貢献をした。
Pines, A.; Gibby, G.; Waugh, J.S. J.Chem.Phys. 59, 569 (1973)
- 10) Naito, A.; Ganapathy, S.; Raghunathan, P.; McDowell, C.A.
J.Chem.Phys., 79, 4173 (1983)
- 11) Veeman, W.S. " ^{13}C Chemical Shift Tensors in Organic Single Crystals"
Phil.Trans.R.Soc.London 299, 629 (1981)
- 12) 「NMR化学シフト」は、物理的には核の「磁気遮蔽定数」であり、系の状
態に対する磁場と核磁気モーメントの双一次の摂動項として定義される。現
在のところPopleらにより導出された有限摂動法が、磁気遮蔽定数の理論的
な評価方法として広く受け入れられており、物理的な定式化には問題はない。
一定以上の大きさをもった分子に対して「磁気遮蔽定数」を定量的な精度で
計算できないことの原因は、ひとえに「分子の電子状態」を完全に評価する
ことの困難さに負っている。
Pople, J.A.; McIver, J.W.; Ostlund, N.S. J.Chem.Phys., 49, 2960 (1968)
- 13) Stark, R.E.; Jelinski, L.W.; Ruben, D.J.; Torchia, D.A.; Griffin, R.G.
J.Mag.Res. 55, 266 (1983)

- 14) Roberts, J.E.; Harbison, G.S.; Munowitz, M.G.; Herzfeld, J.; Griffin, R.G. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 4163 (1987)
- 15) Stewart, P.L.; Valentine, K.G.; O'Pella, S.J. *J. Mag. Res.* 71, 45 (1987)
- 16) Oldfield, E.; Kirkpatrick, R.J. *Science* 227, 1537 (1985)
- 17) Terao, T.; Miura, H.; Saika, A. *J. Chem. Phys.* 85, 3816 (1986)
- 18) Yannoni, C.S.; Kendrick, R.D. *J. Chem. Phys.* 74, 747 (1982)
- 19) Hexem, J.G.; Frey, M.H.; O'Pella, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 224 (1981)
- 20) Schaefer, J.; Stejskal, E.O. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 1031 (1976)
- 21) Saito, H. *Mag. Res. in Chem.* 24, 835 (1986)
- 22) Komoroski, R.A. "High Resolution NMR Spectroscopy of Synthetic Polymers in Bulk" VCH Publishers, Florida (1986)
- 23) Jones, A.A. "Polymer Motion in the Solid State" p.247 in ref.22
- 24) Brandolini, A.J.; Dybowski, C. "High Resolution NMR Studies of Oriented Polymers" p.283 in ref.22

第二章 固体ポリペプチド鎖中に存在 するグリシン残基カルボニル 炭素の¹³C NMR化学シフト とコンホメーション

§ 2-1 はじめに

[2-1-1] ペプチドで観測された化学シフトのコンホメーション依存性

固体状態では分子の内部回転が制限されるため、「化学シフトの相互作用」に分子の立体化学構造に関する情報が含まれることを前章で指摘した。CP-MAS法を用いた固体高分解能NMRによる実験からは、すでにいくつかの核種で「化学シフトのコンホメーション依存性^{*1}」が観測されており、中でも ^{13}C や ^{15}N は化学シフトの異方性がもともと大きいことも手伝って、「コンホメーション化学シフト」は十分検知できる大きさとなる¹⁾。

齊藤ら¹⁾およびKricheldorfら²⁾はそれぞれ独立に、固体状態における各種ホモポリペプチドの ^{13}C 化学シフトが、そのコンホメーションに依存して変化することを発見し、ペプチド中に存在する炭素核のほとんどが「化学シフトのコンホメーション依存性」を示すことを現在までに確認し

*1 ここで「化学シフト」と称しているのは、CP-MAS NMRから得られる「等方平均化学シフト」のことであり、本研究で考察の対象とする「化学シフトテンソルの主値」はここに含まれていない。また「コンホメーション依存性」における「コンホメーションの効果」とは、“結合の回転”によって生じた核の周囲の電子構造の変化を原因とする化学シフトの変化（これを「狭義のコンホメーション効果」と呼ぶ）のことではなく、分子間相互作用や水素結合の形態など主鎖結合の回転にともなって変化するすべての相互作用の効果を含んだ広義のもの（これを「広義のコンホメーション効果」と呼ぶ）である。

現在までに実験からその存在が確認されたのは等方平均化学シフトにおける“広義のコンホメーション”依存性であって、それがどのような化学的環境の変化により引き起こされたものであるかを具体的に検討した例はほとんどない。理論計算からは、安藤ら²²⁾がアラニン²量子モデルを用いた量子化学計算を行い、「狭義のコンホメーション依存性」の存在を裏づけた。

ている。(表 2 - 1 参照)

観測される化学シフト値は残基の種類によって異なるが、一般に C α 炭素と C=O 炭素の化学シフトは α -ヘリックスが β -シートよりも約 3 ~ 5 ppm 低磁場に、C β 炭素は約 5 ppm 高磁場側に現れる。このほか β_1 -ヘリックスや ω -ヘリックスなどのコンホメーションについても固有の ^{13}C 化学シフト値が観測されているため²⁾、これらを参照値(リファレンス)として用いることにより構造がいまだ明らかでないポリペプチドのコンホメーションを探ることができる。現在では、天然に存在するほとんどのアミノ酸のホモポリペプチドについてその ^{13}C CP-MAS NMR が測定され、リファレンスデータとして用いられている。また、固体高分解能 NMR の応用範囲はコポリペプチドやシーケンシャルペプチドにも広げられ、これらは絹フィブロイン³⁾、コラーゲン⁴⁾、エラスチン⁵⁾、ケラチン⁶⁾ のようなより複雑な系のスペクトルを解析するためのモデル化合物として重要な役割を果たしている。

固体高分解能 NMR が開発されるまで、固体ポリペプチドのコンホメーションの同定には赤外吸収スペクトル(IR)が専ら使われてきたが⁷⁾、現在では CP-MAS NMR を観測することにより、アミノ酸残基ごとの“より局所的な”コンホメーションを知ることができ、試料中に混在する複数のコンホメーションを検知することも可能となりつつある。^{*2}

*2. ポリペプチドの IR 測定では測定ペレットの作製時に、試料を臭化カリウムの結晶とともに粉碎し摺りつぶす操作が必要であったが、この段階でコンホメーションが β -シートへ転移する危険性があった。固体高分解能 NMR では測定のための試料調製を必要とせず、そのまま測定ができるため、試料が変性してしまう心配がない。

[表 2 - 1] Carbon-13 Chemical Shifts of Homopolypeptides in α -Helical and β -Sheet Forms^a

Polypeptide	C ^o			C ^u			C=O			Reference
	α	β	Δ^b	α	β	Δ^b	α	β	Δ^b	
(Ala) _n	52.4	48.2	4.2	14.9	19.9	-5.0	176.4	171.8	4.6	Saitō <i>et al.</i> (1983b) Kricheldorf <i>et al.</i> (1983a)
	52.3	48.7	3.6	14.8	20.0	-5.2	176.2	171.6	4.6	
(Leu) _n	52.8	49.3	3.5	15.5	20.3	-4.8	176.8	172.2	4.6	Kricheldorf and Müller (1983)
	55.7	50.5	5.2	39.5	43.3	-3.8	175.7	170.5	5.2	
[(Glu(OBzl)) _n	55.8	51.2	4.6	43.7 ^c	39.6 ^c	-4.1	175.8	171.3	4.5	Taki <i>et al.</i> (1981); Saitō <i>et al.</i> (1983b) Kricheldorf and Müller (1983)
	56.4	51.2	5.2	25.6	29.0	-3.4	175.6	171.0	4.6	
[(Glu(OBzl)) _n	56.8	51.1	5.7	25.9	29.7	-3.8	175.4	172.2	3.2	Shoji <i>et al.</i> (1984) Kricheldorf and Müller (1983)
	53.4	49.2	4.2	33.8	38.1	-4.3	174.9	169.8	5.1	
[(Asp(OBzl)) _n (Val) _n	65.5	58.4	7.1	28.7	32.4	-3.7	174.9	171.8	3.1	Saitō <i>et al.</i> (1983c) Taki <i>et al.</i> (1981)
	—	58.2	—	—	32.4	—	—	171.5	—	
(Ile) _n	63.9	57.8	6.1	34.8	39.4	-4.6	174.9	172.7	2.2	Taki <i>et al.</i> (1981) Kricheldorf and Müller (1983)
	—	57.1	—	—	33.1	—	—	171.0	—	
[(Lys(Z)) _n	57.6	51.4	6.2	29.3	28.5	-0.8	175.7	170.4	5.3	Kricheldorf and Müller (1983)
	61.3	53.2	8.1	35.0	39.3	-4.3	175.2	169.0	6.2	
(Met) _n	57.2	52.2	5.0	30.2	34.8	-4.6	175.1	170.6	4.5	Kricheldorf and Müller (1983)
	—	—	5.1	—	—	-4.1	175.8	170.9	4.5	
(Gly) _n	—	43.2	—	—	—	—	—	168.4	—	Saitō <i>et al.</i> (1983a) Kricheldorf and Müller (1983)
	—	44.3	—	—	—	—	—	169.2	—	
	—	—	(±1.0) ^d	—	—	(±0.7) ^d	(±0.8) ^d	(±1.2) ^d	(±1.1) ^d	

^a ±0.5 ppm; from tetramethylsilane. Adapted from a table in Shoji *et al.* (1984).
^b Difference of the ¹³C chemical shifts of the α helix relative to those of the β -sheet form.
^c These two values were listed incorrectly in the original paper.
^d Average values.

^{13}C 以外の核種については、Kricheldorfら⁸⁾ および荘司ら⁸⁾ がは各種ポリペプチドの ^{15}N CP-MAS NMRを測定して、 ^{15}N 等方平均化学シフトがコンホメーションに依存し最大15 ppmシフトすること、 α -ヘリックスが β -シートよりも8~10 ppm高磁場に出現すること(ポリグリシンでは 3_1 -ヘリックスが β -シートより4.5 ppm低磁場シフト)、 ^{15}N の化学シフトには隣接残基の効果がかなり顕著であることを報告している。

固体試料における化学シフトのコンホメーション依存性は、分子量の小さいオリゴペプチドでも観測されており、例えばOpellaら⁹⁾ は環状ペプチドCyclo(D-Phe-Pro-Gly-D-Ala-Pro), Cyclo(Gly-Pro-Gly)₂, Cyclo(D-Phe-Gly-Ala-Gly-Pro)の固体と溶液でのコンホメーションの差異を ^{13}C CP-MAS NMRから検討している。Pro残基のC β とC γ の化学シフト差($\Delta\delta$)は溶液中の場合と同様、固体においてもX-Pro間ペプチド結合のcis-trans異性を反映して変化することを見出し、ピークのシフト差から構造が未知のCyclo(D-Phe-Gly-Ala-Gly-Pro)に異なった2つのターン(β -ターンと γ -ターン)が存在することを予測している。Sarkarら¹⁰⁾ は同様にCyclo(Val-Pro-Gly)₂, Cyclo(Phe-Pro-D-Ala)₂, Cyclo(Gly-Pro-D-Ala)₂の ^{13}C CP-MAS NMRを測定して、 $\Delta\delta$ からVal-Pro, Phe-Pro結合がcis、Gly-Pro結合がtransをとること、Cyclo(Gly-Pro-D-Ala)₂は固体状態においてC₂対称が崩れ、環の中に運動性の異なる2つの領域が存在することを報告している。また荘司ら¹¹⁾ は2種の環状ジペプチドCyclo(L-Ala-D-Ala)とCyclo(L-Ala-L-Ala)のC β とC=O炭素が両者のコンホメーションの違いを反映

して4～5 ppmの化学シフト差を示すことを報告している。

固体高分解能NMRを用いたポリペプチドのコンホメーション研究については既に詳しい総説が刊行されている¹¹⁾。

Kricheldorfら⁸⁾および荘司ら⁹⁾によるポリペプチドの溶液NMRおよび固体高分解能¹⁵N NMR、Fiatら¹²⁾によるペプチドの溶液¹⁷O NMRの結果より、¹⁵Nと¹⁷Oのどちらの核も隣接残基の効果や末端基のイオン化状態(pH)が、二面角(ϕ, ψ)の変化と同程度、あるいはそれ以上の化学シフト変化を引き起こすことが明らかとなっている。そのため分子の立体化学構造に関連した情報を選択的に取り出す手段としては、現在のところ¹³C NMRが最も適当であると考えられる。

[2-1-2] ペプチドにおける化学シフトの コンホメーション依存性とは何か

溶液のNMRを用いた研究により、ペプチドやタンパク質におけるアミノ酸残基の¹³C化学シフトは、少なくともランダムコイルでプロリン残基を含まなければ隣接残基の影響を受けないことが知られている¹³⁾。そのため固体状態のペプチドで立体化学構造の変化にともない観測されるシフト差は、まず第一に主鎖構造のねじれ(ペプチド主鎖の二面角(ϕ, ψ)の変化にともなう電子構造の変化)を反映したものである^{*3}。

Tonelli¹⁴⁾はこの観点に立ち、ペプチドのコンホメーション依存化学シフトを説明する方途として「ゴージュ効果」¹⁵⁾を提案した。これは γ 位に位置する2つの炭素がゴージュ位置を占めた場合、互いに高磁場シフ

*3 これは「狭義のコンホメーション効果」に他ならない。

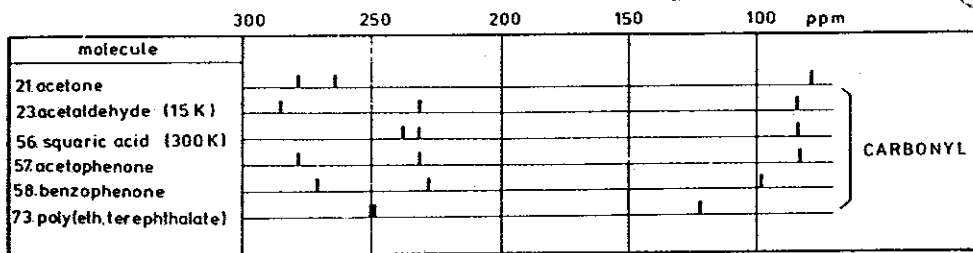
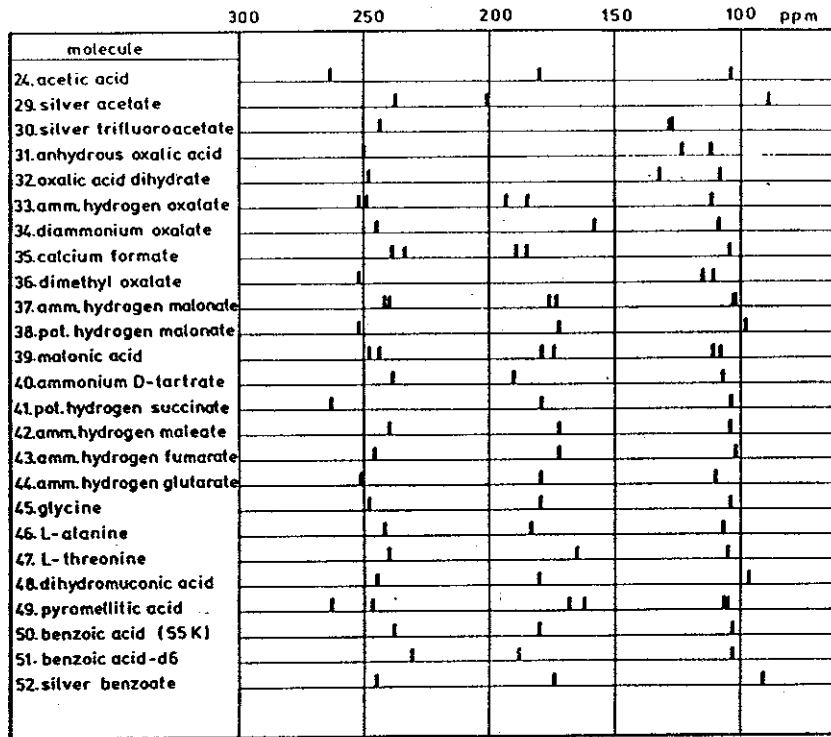
トを引き起こすという経験則で、パラフィンやポリオレフィンにおいては実測傾向を良く再現することが知られている。Tonelliが指摘するようにペプチドにおいてもプロリン残基によって引き起こされる隣接残基への影響や C β 炭素における α -ヘリックスと β -シートの化学シフト差はこの概念を援用することにより説明できる。しかし、原理的にこの効果が現れるはずのない C α 炭素にも顕著な化学シフトのコンホメーション依存性が見られること²⁾、 α -ヘリックスのカルボニル炭素(隣接残基のカルボニル炭素とゴースユになる)が β -シート(ほぼトランスに近い)よりも常に低磁場に出ることなど、化学シフトのコンホメーション依存性に対する一般的な説明としては問題が残る。この効果の存在が受け入れられているのは今のところ炭化水素系の化合物だけであり、「高磁場シフト」を引き起こす電子論的な原因も明らかでない。^{*4}

[2-1-3] 化学シフトテンソルと分子の構造

固体のNMRに現れる「化学シフトの相互作用」は2階のテンソル量で表現される物理量であり、これは3つの主値($\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$)とそれぞれの主軸の方向によって記述される。このテンソルの主値や主軸は核の回りの電子構造、特に外殻電子の電子状態に敏感に反応して変化する。分子の内部座標に対する化学シフトテンソルの方向は分子の対称性からある程度予測することができるが、厳密には単結晶試料について2軸の回りのNMRスペクトルを測定し、それをX線回折の結果とあわせて解析しなければならない。

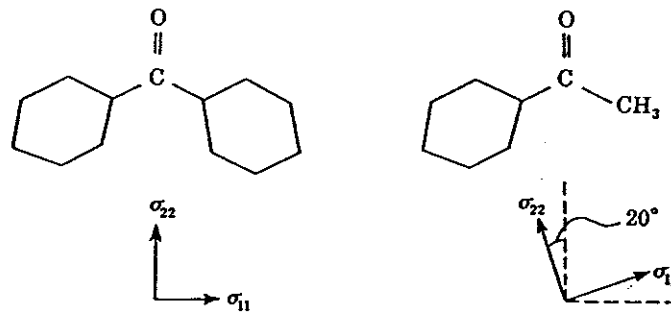
図 2 - 1 は種々の化合物中のカルボキシル炭素の化学シフトテンソルの主値をまとめたもの¹⁶⁾で、その平均値（及び標準偏差）は $\sigma_{11}; 245(7)$ $\sigma_{22}; 168(24)$, $\sigma_{33}; 105(7)$ [ppm]である。標準偏差の大きさから 3 つの主

*4. 「コンホメーション依存の化学シフト」をとりまくこのような状況の中に、今後「化学シフトによる固体構造の分析手法」を開発して行く上で重要となるであろういくつかの問題点を見ることが出来る。その一つは「序論」でも述べたように、われわれが固体高分解能 NMR のスペクトルから通常得ることのできる観測値はスカラー量としての「等方平均化学シフト」だけであり、化学シフトテンソルの主値や主軸方向については測定が難しい。得られる情報量はそのため十分に多いとは言えず、等方平均化学シフトだけからでは詳細な知見が得られにくいこと。二つめは、これまでに集積された「化学シフトの実測値」と「結晶構造」を比較することにより導かれた「化学シフトと立体化学構造との対応」が経験的にしか把握されず、また新たな試料の解析においてもそれまでに得られた研究成果が「経験則」として利用されるに留まっていることである。一つめの問題点はより高度な測定方法の開発によって克服される見通しがあり²³⁾、また本研究で試みたように観測核の選択的な同位体ラベルを行えばかなりの程度解決される。しかし二つめの問題はより本質的であるように思われる。固体の NMR を用いて分析対象の本質にせまるためには、この分光器を分析の手段として経験的に利用するだけでなくそこから得られる「化学シフト」の電子論的な意味を正しく把握することが必要となる。そうすることによってこれまで“ただの数値”としてしか認識されてこなかった観測値のもつ深い意味が理解され、より化学的な本質に根ざした分析手法の開発が可能になるのである。今後は、これまでに得られた固体状態の化学シフトに関する研究成果を理論的に解釈しなおしてゆくことが是非とも必要であり、その過程では、すでに知られた「経験則」が、十分な予測精度をもった理論計算によって合理的に説明されてゆくことが期待される。「化学シフト」の挙動を理論的に解明してゆくことにとともなう実際的な困難は既に述べたが、現在までに行われた理論的なアプローチの数はあまりに少なく、またこれまでは NMR 研究者の間に理論的な解釈の必要性があまり認識されてこなかったように思われる。本研究では磁気遮蔽定数の量子化学計算を用いて測定から得られた化学シフトの挙動を考察するとともに、新たな計算手法を開発することによって二つめの問題点の克服をも目指している。特にこれまで「経験則」として知られてきた「ゴージュ効果」¹⁵⁾や「陰性原子による δ 効果」²⁴⁾などについても、理論計算による再現と理論に基づいた解釈が可能ならずであり、本研究ではこれらの経験則に理論的な基礎を与えることを試みる。



[図2-1, 2] 各種化合物におけるカルボキシル炭素(上図)とカルボニル炭素(下図)の化学シフトテンソルの主値

[図2-3] ベンゾフェノンとアセトフェノンの化学シフトテンソル主軸



	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	σ_1	$\sigma_{solution}$
benzoic acid	-102	-59	26	-45	-44
acetic acid	-136	-52	24	-55	-49
oxalic acid dihydrate	-120	-3	20	-34	-33
anhydrous oxalic acid	-122	6	17	-33	-33

[表2-2] カルボニル炭素の化学シフトテンソルの主値

値の中でも σ_{22} がローカルな構造に一番敏感であることがわかる。図 2-2 は同様に カルボニル炭素の化学シフトテンソルの主値 をまとめたもの¹⁶⁾ で、平均値 (及び標準偏差) は $\sigma_{11}; 271(12)$, $\sigma_{22}; 234(16)$, $\sigma_{33}; 94(16)$ [ppm] である。主値のばらつきはどの成分も同程度であるが、 σ_{22} の平均値はカルボキシル炭素より 66 ppm も低磁場にシフトしている。化学シフトテンソルは分子の対称性に非常に敏感で、図 2-3 に示す通りベンゾフェノンとアセトフェノンではカルボニル炭素の σ_{11} と σ_{22} の方向が大きく異なっている。また表 2-2 に見るとおり酢酸だけはテンソル主値の平均値が溶液のシフト値と異なっているが、これは酢酸が溶液状態において分子間水素結合の生成や切断が不断に起こり 1 量体, 2 量体, オリゴマーなどの混在する複雑な構造をとっているためである (固体状態では分子間水素結合によりすべて 2 量体となっている)。このように化学シフトテンソルは分子の局所的な電子状態に敏感であり、特にカルボニル、カルボキシル炭素の化学シフトテンソルは 水素結合まわりの電子的な構造とかなり密接な関係があるもの と考えられる。

固体状態の試料をスピニングせずに NMR スペクトルを測定すると、図 1-7 に示したような「粉末スペクトル」が得られ、系に分子運動が存在しない場合には、ここから化学シフトテンソルの 3 つの主値を得ることができる。しかしこれまでの研究では「粉末スペクトル」は専ら 分子の運動性 や 分子配向 の研究に用いられてきた。Torchia ら¹⁷⁾ はコラーゲン中の各炭素を ^{13}C でラベルしてそれぞれの粉末スペクトルを測定し、その線幅から運動性を議論している。また白リンの回転運動の相関時間¹⁸⁾ や、シリ

カゲルに結合したフェニル環の回転軸の決定¹⁹⁾、DNA中の燐酸ジエステル基の配向状態²⁰⁾、タバコモザイクウィルスのRNAと外殻タンパクの結合サイトの配向状態²¹⁾などを粉末スペクトルの線形から検討した例なども報告されている。しかし化学シフトの異方性は核の回りの電子分布の非対称性から生ずるものであるから、これらの研究はテンソルの広がり理由を本質的に扱ったものとは言い難い。化学シフトの異方性を核のまわりの電子状態を反映したものとして生体分子の構造研究に応用した例はほとんど報告されていない。

[2-1-4] 本章の目的

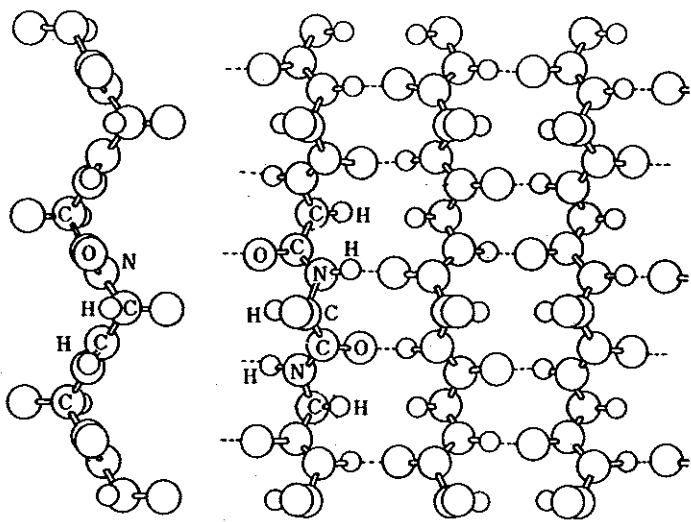
以上のような研究成果をふまえて、本章ではポリグリシン及び数種のホモポリペプチド鎖中に巻き込まれたグリシン残基カルボニル炭素の¹³C等方平均化学シフト、化学シフトテンソルのコンホメーション依存性を議論する。結晶性の高いポリペプチド中では、メチル基やフェニル基の回転、プロリン側鎖のバックリング等を除いて分子運動がほとんど凍結されていると考えられるため、化学シフトテンソル主値のコンホメーション依存性を考察することは「化学シフトの相互作用」を核の回りの電子構造の非対称性を直接反映したものとして認識し、これを主鎖の構造や水素結合などに関する内在的なプローブとして利用することを意味している。グリシン残基は20数種あるアミノ酸残基のなかでタンパク質中に最も見出されやすいものであり、また側鎖を持たない単純な構造のために、様々な相互作用の主鎖に対する効果のみを取り出したものと考えることができる。

以下に本章で扱う試料とその測定方法、実験のねらいと考察の要点についてまとめる。

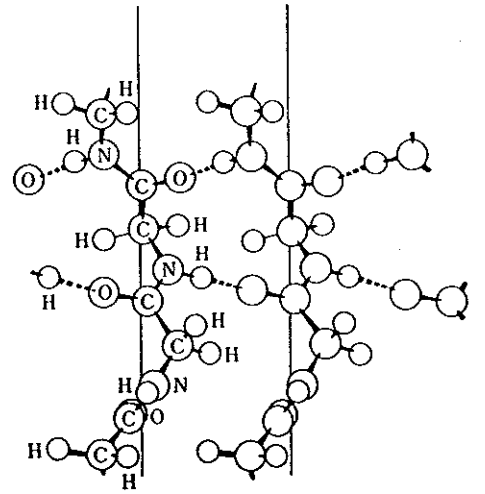
- 1) ポリグリシンには β -シートをとるForm Iと 3_1 -ヘリックスをとるForm IIが知られている³⁹⁾が(図2-4)、新たにグリシン残基をポリ-L-アラニン;[Ala]_n、ポリ-L-ロイシン;[Leu]_n、ポリ- β -ベンジル-L-アスパルテート;[Asp(OBzl)]_n、ポリ- γ -ベンジル-L-グルタメート;[Glu(OBzl)]_nに巻き込ませることにより α -ヘリックスを、ポリ- β -ベンジル-L-アスパルテート;[Asp(OBzl)]_nに巻き込ませた試料を熱処理することにより ω -ヘリックスを、ポリ-L-バリン;[Val]_nに巻き込ませることにより β -シートをとる試料を調製し、それぞれの試料のC α 炭素、カルボニル炭素の等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの主値を測定する。
- 2) これらの試料の等方平均化学シフト、化学シフトテンソル主値のコンホメーション変化を考察することにより、¹³C等方平均化学シフト、化学シフトテンソルの
 - ① 主鎖のねじれ角の変化による効果
(「狭義のコンホメーション効果」)
 - ② 隣接するアミノ酸残基の種類とその側鎖がおよぼす効果
 - ③ 水素結合を代表とする「分子間相互作用」による効果を評価する。
- 3) 溶液のNMR化学シフトを固体の等方平均化学シフトと比較することにより、固体のNMRのデータが溶液中での構造を推定するための

リファレンスとしてどの程度有効であるかを評価する。

このアプローチにより、分子の立体化学構造と「化学シフトの相互作用」の関連性の議論を、従来の「等方平均化学シフト」から「化学シフトテンソルの3つの主値」に拡張することができ、分子の立体化学構造や電子構造に関するより詳細な知見が得られるようになると考える。またテンソル主値のコンホメーション依存性を議論することにより、すでに多くのポリペプチドで観測された「化学シフトのコンホメーション依存性」の原理を解明するための基礎的な知見を与えることができる。



Form I (β -sheet)



Form II (3_1 -helix)

Poly glycine

[図2-4] ホリグリシンが固体中で形成する2つのコンホメーション

§ 2 - 2 実 験 と 測 定

試料として用いたグリシン残基を含むポリペプチドは、「粉末スペクトル」を測定するためにグリシン残基カルボニル炭素(GlyC=O)を ^{13}C でラベルした。以後簡単のために、カルボニル炭素をラベルしたグリシン残基 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ を Gly^* と略記する。

[2-2-1] $[1-^{13}\text{C}]$ ポリグリシン($[\text{Gly}^*]_n$)の合成²⁵⁾

NCA化;十分に粉碎し乾燥したグリシン(日本理化学);2.0gと $[1-^{13}\text{C}]$ グリシン(MSD ISOTOPES of Merck Frosst Canada Inc. Lot No.1442-G;Code No.MS-1389;Isotope Purity:90 Atom%);1.03gをTHF 120mlに懸濁させ、45~55°ホスゲンガス(トリクロロメチルクロロホルム;TCFを活性炭上で分解させると発生)を通じ、2時間後に反応溶液が透明になったところでガスを止め、減圧下でTHFを留去する。結晶性残渣にn-ヘキサンを加えて冷凍庫に一晩放置したのち、析出した結晶をろ取して乾燥。酢酸/n-ヘキサン系で再結晶し、真空下で乾燥する。収量2.90g

重合I;グリシンNCA($1-^{13}\text{C}$;30%):0.37g[0.0036mol]をアセトニトリル(ACN);20mlに溶解し、n-ブチルアミン;0.053g(0.00072mol)を加え、35°で98時間40分反応させた。反応終了後、沈澱物をろ取し、アセトニトリル、エーテルで数回洗浄した後、乾燥。収量;0.230g

重合II;グリシンNCA($1-^{13}\text{C}$;30%):1.829g[0.0180mol]をアセトニトリル;80mlに溶解し、n-ブチルアミン;0.132g(0.00018mol)を加え、35°Cで98時間40分反応させた。反応終了後、沈澱物をろ取し、アセトニトリル、エーテルで良く洗浄、乾燥。収量;0.513g

Form IIへの転化;臭化リチウムの飽和水溶液;20mlに合成したポリグリシン;0.20gを溶解させ1時間攪はん。その後100mlの水中注ぎ込んで白色沈澱を得、これに遠心分離機による沈降と水による洗浄を繰り返した後、真空凍結乾燥。収量;0.185g

[2-2-2] [1-¹³C]グリシン含有コポリペプチド([X, Gly*]_n)の合成

グリシン残基のカルボニル炭素をラベルしたコポリペプチドは[1-¹³C]グリシン NCA (90atom%)とそれぞれのアミノ酸 NCA (L-アラニン、L-ロイシン、 γ -ベンジル-L-グルタメート、 β -ベンジル-L-アスパルテート、L-バリンの NCA)を混合し、通常の液相法により重合反応を行った。反応の手順はポリグリシンの場合と全く同様である。

[1-¹³C]グリシンの含量は、[Ala, Gly*]_nのみ5%とし、残りの試料については8%とした。重合溶媒、開始剤は巻き込ませるペプチドを重合させる時に通常用いるものとし、合成されるコポリペプチドの重合度のおよその目安となる[モノマー/開始剤]比(A/I比)は、低分子量ポリグリシン(A/I=5)を除いて、すべて100とした。これらの重合条件は表2-3にまとめた。

[Asp(OBzl), Gly*]_nの ω ヘリックスについては、上記の重合によって得られた α ヘリックスの試料を真空下、ガラス管に封入し、123°Cで10分間加熱することによって得た。転移温度についてはDSCにより予め α ヘリックス \rightarrow ω ヘリックスの転移が97.3°Cで始まり122.3°Cで終了することを確認して決定した。

調製したすべての試料の赤外吸収スペクトル(IR)を測定し、目的のコンホメーションをとっていることを確認した。

[2-2-3] 固体高分解能¹³C-NMRの測定

¹³C CP-MAS NMRは(株)日本電子製GX-270スペクトロメータを用い、67.80MHz、室温にて測定を行った。実験条件は、プロトンデカップルのための磁場強度1.2mT、コンタクトタイム2ms、繰り返し時間5sec、スペクトル幅27kHz、データポイント8Kである。試料はバレットタイプのローターにつめ3~4KHzで回転させた。また粉末スペクトルは、スペクトル幅を40KHzとした以外はCP-MASと同じ測定条件で、回転をせずに測定した。スペクトルは通常十分なS/N比が得られるまで100~3000回積

[表 2-3] Synthesis and characterization of poly[1-¹³C]glycine and [1-¹³C]glycine-containing polypeptides

Sample ^{a)}	Gly content	Initiator	Solvent	A/I ratio ^{b)}	Conformation ^{c)}
[Gly*] _n form I	100 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	100	β-sheet
[Gly*] _n form II	100 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	100	3 ₁ -helix
[Gly*] ₅	100 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	5	—
[Ala, Gly*] _n	5 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	100	α-helix
[Leu, Gly*] _n	8 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	100	α-helix
[Glu(OBzl), Gly*] _n	8 %	Et ₃ N	CICH ₂ CH ₂ Cl	100	α-helix
[Asp(OBzl), Gly*] _n	8 %	Et ₃ N	CICH ₂ CH ₂ Cl	100	α-helix
[Asp(OBzl), Gly*] _n	8 %	Et ₃ N	CICH ₂ CH ₂ Cl	100	ω-helix
[Val, Gly*] _n	8 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	100	β-sheet

a) Symbol * indicates carbonyl carbon enriched by ¹³C.

b) Theoretical number-averaged degree of polymerization.

c) Determined by the conformation-dependent ¹³C NMR chemical shifts of host residues and partly by the characteristic bands in IR spectra.

算し、化学シフトはアダマンタンの高磁場側ピークを外部基準(29.5ppm)としてTMS基準の値に換算した。

[2-2-4] 溶液¹³C NMRの測定

溶液¹³C NMRは(株)日本電子製GX-500スペクトロメータを用い、125.775MHz、繰り返し時間2sで測定した。スペクトルは通常、十分なS/N比が得られるまで1000~3000回積算した。化学シフトの外部基準としては、ガラス管に封入したTMSを用い、測定後に体積磁化率の補正を行った。測定溶媒が重クロロホルムの場合、真のシフト値 δ は測定値 δ_{obs} と次のような関係にある²⁶⁾。

$$\delta = \delta_{obs} + \Delta\delta$$

$$\Delta\delta = (2/3)\pi(\chi_{CDCl_3} - \chi_{TMS}) = -0.392(\text{ppm})$$

[2-2-5] 粉末スペクトルの解析

化学シフトは2階のテンソル量であるため、その主軸系と磁場の方向(実験室系)のなす角に依存して、シフト位置が変化する。われわれが通常扱うことのできる多結晶や粉末の試料では、核があらゆる方向に平均して向いているため、得られるスペクトルはそれぞれの方向に相当する単一線の重ね合わせ(包絡線)となり、これは粉末スペクトルと呼ばれる。核の化学シフトテンソルの主値を $(\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33})$ とし、主軸系と実験室系が図1-1のような関係にあるとき、実験室系において観測される化学シフト σ_{zz} は

$$\sigma_{zz} = \sigma_{11}\sin^2\theta\cos^2\phi + \sigma_{22}\sin^2\theta\sin^2\phi + \sigma_{33}\cos^2\theta$$

となる。

化学シフトテンソルが軸対称性を有しない時、粉末スペクトルの理論曲線は次のような式で表すことができる²⁷⁾。

$$(i) \quad I(\sigma) \propto \frac{K(m)}{(\sigma_{33} - \sigma)(\sigma_{22} - \sigma_{11})}$$

$$m = \frac{(\sigma - \sigma_{11})(\sigma_{33} - \sigma_{22})}{(\sigma_{33} - \sigma)(\sigma_{22} - \sigma_{11})} \quad \text{for } \sigma_{11} \leq \sigma < \sigma_{22}$$

$$(ii) \quad I(\sigma) \propto \frac{K(m)}{(\sigma - \sigma_{11})(\sigma_{33} - \sigma_{22})}$$

$$m = \frac{(\sigma_{33} - \sigma)(\sigma_{22} - \sigma_{11})}{(\sigma - \sigma_{11})(\sigma_{33} - \sigma_{22})} \quad \text{for } \sigma_{22} < \sigma \leq \sigma_{33}$$

$$K(m) = \int_0^{\pi/2} (1 - m^2 \sin^2 \phi)^{1/2} d\phi$$

しかし、実際に得られるスペクトルは化学シフト異方性以外の効果による広幅化のため、図 1-7 b のようなものとなる。ここから 3 つの主値を読み取るため、理論曲線に広幅化関数のひとつであるローレンツ曲線をたたみこみ積分した曲線を、実測のスペクトル線にフィッティングした。理論曲線 $I(\omega)$ に対し、ローレンツ曲線 $G(\sigma - \sigma')$ を

$$\begin{aligned} G(\sigma) &= \frac{T}{\pi} \frac{1}{1 + T(\sigma - \sigma')} \\ &= \frac{2/b\pi}{1 + 4/b(\sigma - \sigma')} \quad b = \frac{2}{T} ; \text{ half width} \end{aligned}$$

とするとフィッティングのための曲線は

$$H(\sigma) = \int_{-\infty}^{\infty} I(\sigma) G(\sigma - \sigma') d\sigma$$

となる。

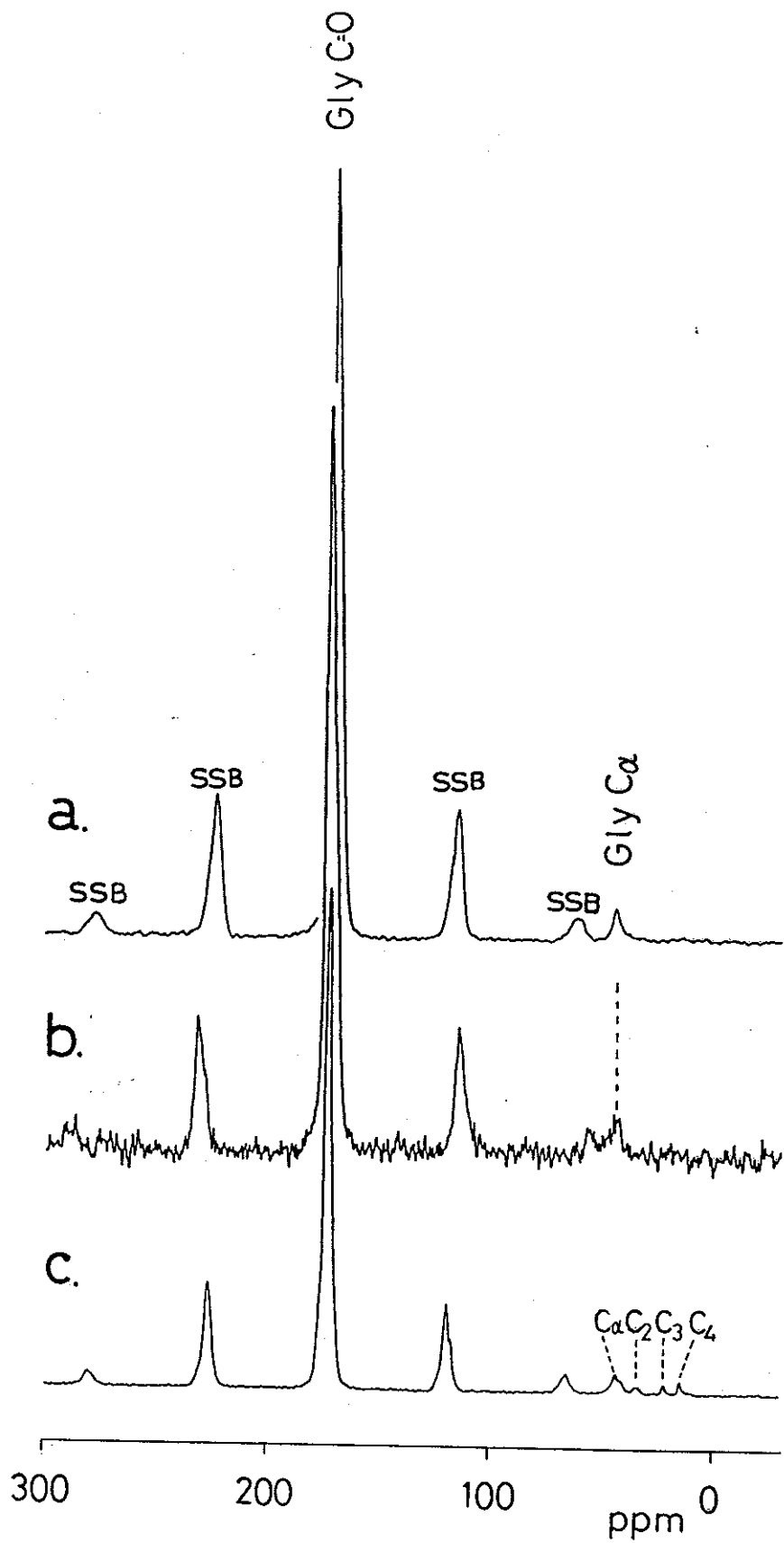
実際のフィッティングは、まず観測されたスペクトルの70ppm から 270ppm まで (TMS 基準) の約 150 点をデジタイザーで読み取り、パーソナルコンピュータに入力し、ベースラインの傾きの補正、シフト値の補正、強度の規格化などの処理後、CRT 上で理論曲線との重ね合わせを行った (図 1-7c)。テンソルの主値の読み取りは、理論曲線のそれを変えることによりトライ&エラーで十分にフィットするまで行った。NEC PC-9801F(8MHz) で1回のフィッティング曲線生成にかかった時間は約6分である。

§ 2-3 結 果 と 考 察

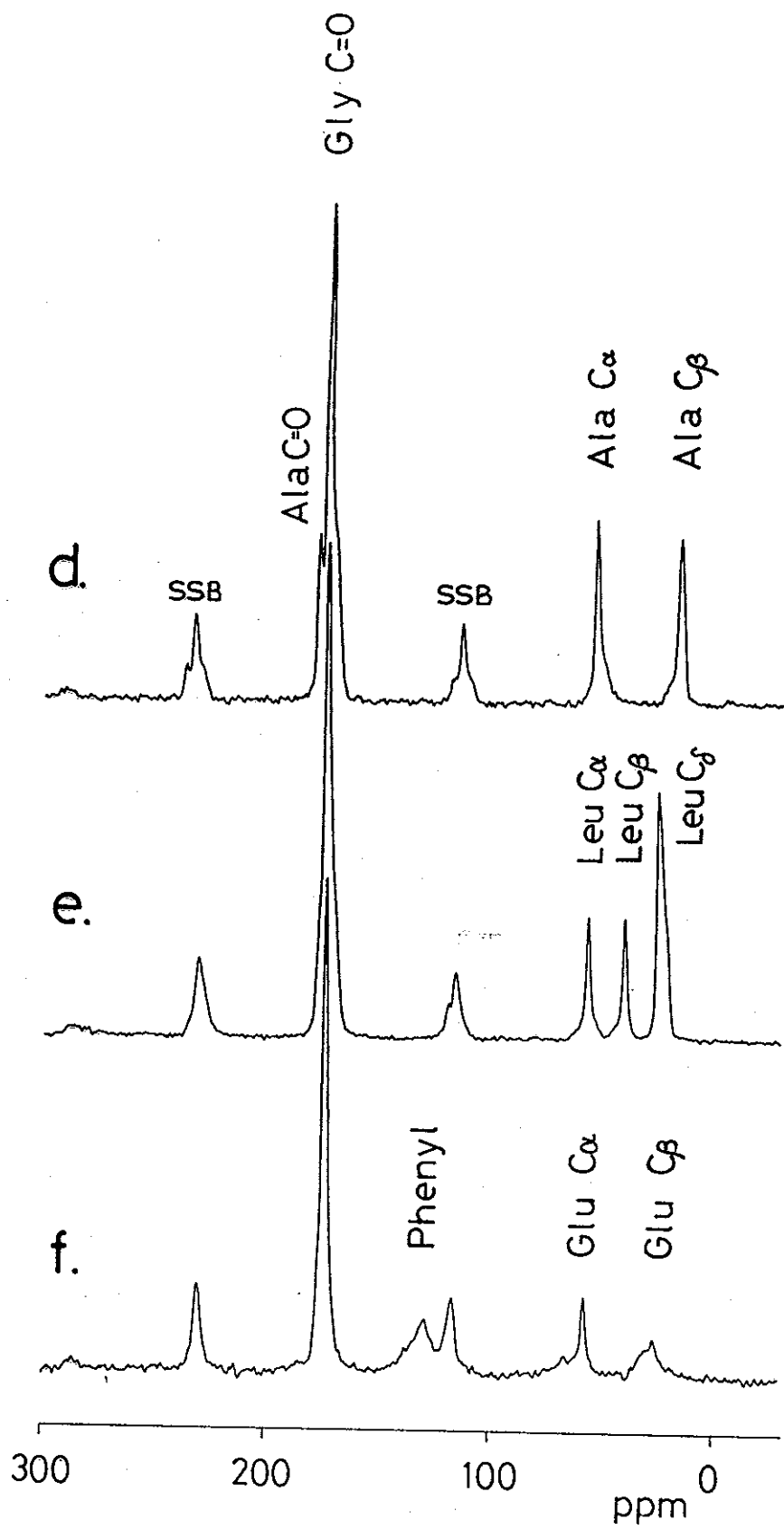
図 2-5 は表 2-3 に掲げた GlyC=O を ^{13}C でラベルした各種ポリペプチドの ^{13}C CP-MAS NMR の観測スペクトルであり、また図 2-6 は同じ試料の粉末スペクトルである。ここから得られた等方平均化学シフトを表 2-4 に、化学シフトテンソルの 3 つの主値を表 2-5 と図 2-7 にまとめる。ここで表中に引用した齊藤ら¹⁻⁴⁾ および Kricheldorf ら²⁾ の等方平均化学シフトは、どちらも Bruker 社製 CXP-300 で測定し液体ベンゼンで TMS 基準に換算したもので、本研究とは測定条件 (日本電子製 GX-270 で測定しアダマンタンで TMS 基準に換算) が異なるため、両者の間には約 1.0 ppm の差がある。よって表 2-4 には齊藤らおよび Kricheldorf らの報文の値に 1.0 ppm 加えたものを引用し、本研究での観測値と直接の比較ができるよう補正した。これ以後、引用するシフト値はすべて同様の補正を行ったものとする。

[2-3-1] ポリグリシン ([Gly, Gly*]_n)

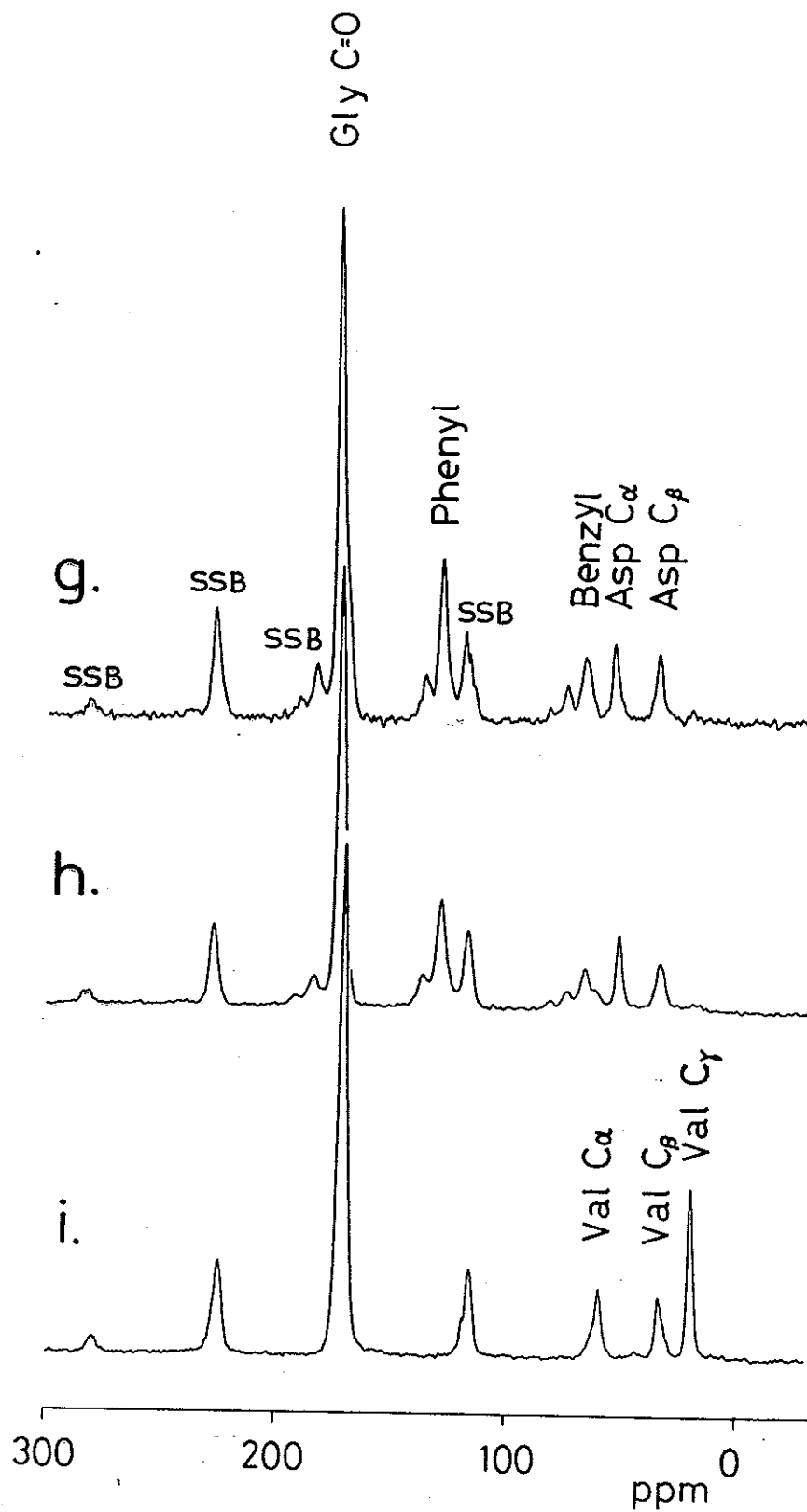
^{13}C CP-MAS NMR における [Gly, Gly*]_n Form II (3₁-ヘリックス) の C=O ピークは [Gly, Gly*]_n Form I (逆平行 β シート) に比べ 3.3 ppm 低磁場シフトしている。この 3.3 ppm という値は齊藤ら²⁸⁾ らが以前発表した 3.9 ppm よりも若干小さいが、測定誤差によるものであろう。また彼らは ^{13}C CP-MAS NMR の測定誤差を ± 0.5 ppm と評価したが、本研究の測定ではピークの尖鋭さから判断して測定誤差を ± 0.2 ppm 以内と判断した。GlyC α は 2 つのコンホメーションで全く同じシフト位置を与え



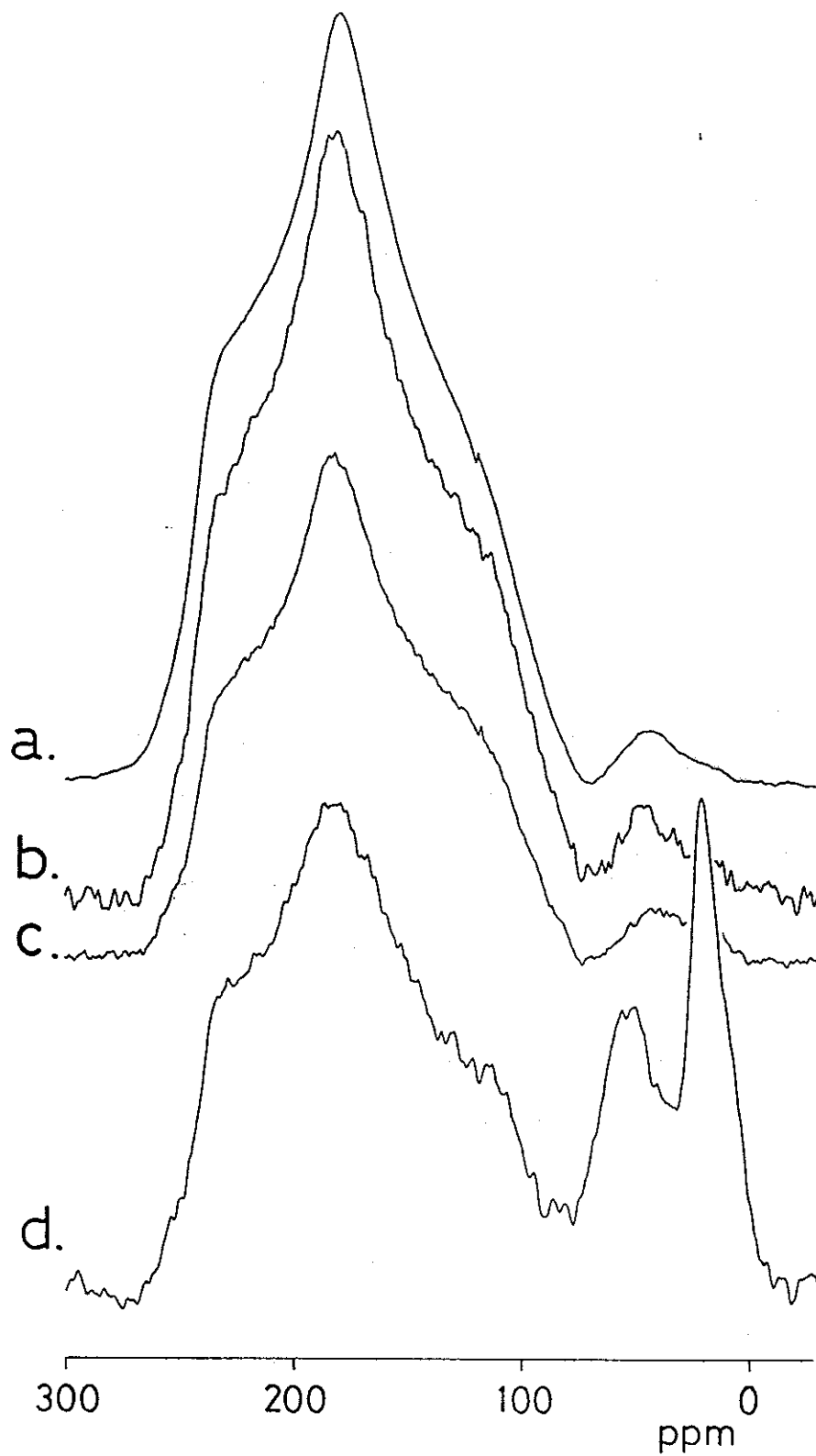
[図2-5] ポリグリシンおよびグリシン含有ポリペプチドの 68.5MHz CP/MASスペクトル 1
 a) $[\text{Gly}, \text{Gly}^*]_n$ I、b) $[\text{Gly}, \text{Gly}^*]_n$ II、c) $[\text{Gly}^*]_5$



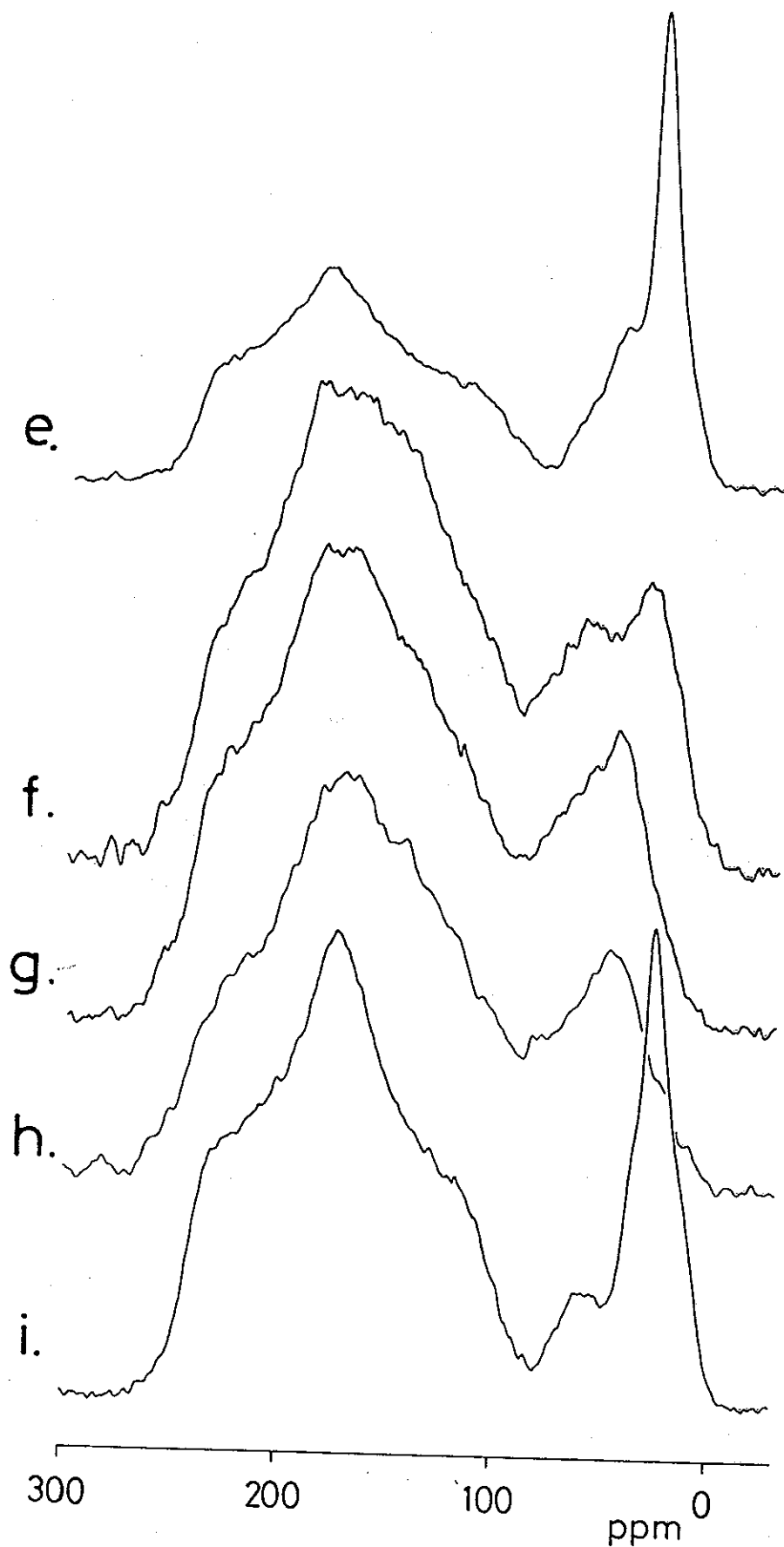
[図2-5] ポリグリシンおよびグリシン含有ポリペプチドの 68.5MHz
 CP/MASスペクトル 2
 d) [Ala, Gly]_n、e) [Leu, Gly]_n、f) [Glu(OBzl), Gly]_n



【図2-5】ポリグリシンおよびグリシン含有ポリペプチドの 68.5MHz CP/MASスペクトル 3
 g) [Asp(OBzl), Gly] $_n$ α 、h) [Asp(OBzl), Gly] $_n$ ω 、i) [Val, Gly] $_n$



[図2-6] ポリグリシンおよびグリシン含有ポリペプチドの 68.5MHz
 粉末スペクトル 1
 a) $[\text{Gly, Gly}^-]_n$ I、b) $[\text{Gly, Gly}^-]_n$ II、c) $[\text{Gly}^-]_5$ 、d) $[\text{Ala, Gly}^-]_n$



[図2-6] ポリグリシンおよびグリシン含有ポリペプチドの 68.5MHz
 粉末スペクトル 2
 e) [Leu, Gly]_n, f) [Glu(OBzl), Gly]_n, g) [Asp(OBzl), Gly]_n α
 h) [Asp(OBzl), Gly]_n ω、i) [Val, Gly]_n

[表 2-4] ^{13}C Chemical Shifts of Polypeptides Containing Glycine Residues
Characteristic of 3_1 -helix, α -helix, β -sheet and ω -helix Forms
(± 0.2 ppm from TMS)

Sample ^{a)}	Confor- mation ^{b)}	Carbonyl ^{c)}	^{13}C chemical shift				ref.
			C α	C β	phenyl	benzyl	
[Gly*] _n	β	169.5 ⁺	44.2				this work
[Gly*] _n	3_1	172.8 ⁺	44.2				this work
[Gly*] ₅		172.4 ⁺	42.7				this work
[Gly] _n	β	169.4	44.2				46
		170.2	45.3				49
[Gly] _n	3_1	173.3	44.2				48
		173.1	43.0				49

[Ala,Gly*] _n	α	177.7	53.2	15.6			this work
		172.7 ⁺					
[Ala] _n	α	177.4	53.4	15.9			44
		177.8	53.8	16.5			49
	β	172.8	49.2	20.9			44
		173.2	50.3	21.3			49

[Leu,Gly*] _n	α	172.4 ⁺	56.4	40.0			this work
[Leu] _n	α	176.7	56.7	40.5			43
	β	171.5	51.5	44.3			43

[Glu(OBzl),Gly*] _n	α	173.1 ⁺	57.5	26.3	128.5	66.2	this work
[Glu(OBzl)] _n	α	176.6	57.4	26.6	~129.5	67.0	47
		176.4	57.8	26.9			49
	β	172.0	52.2	30.0			47
		173.2	52.1	30.7			49

[Asp(OBzl),Gly*] _n	α	173.0 ⁺	54.2	34.8	128.8	66.9	this work
[Asp(OBzl),Gly*] _n	ω	172.1 ⁺	51.8	34.2	128.7	66.3	this work
[Asp(OBzl)] _n	α	175.9	54.4	34.8	130.8	66.7	45
		175.9	54.6	35.2	129.2	67.1	49
	α_L	172.1	51.9	34.8	130.2	67.1	45
	ω	172.3	51.5	33.9	130.0	66.3	45
	β	170.6	50.2	36.1	130.2	66.9	45

[Val,Gly*] _n	β	169.5 ⁺	59.0	33.0			this work
[Val] _n	α	175.9	66.5	29.7			43
	β	172.8	59.4	33.4			43
		172.5	59.2	33.4			49

a) Symbol * indicates carbonyl carbon enriched by ^{13}C .

b) α -helix is right-handed unless otherwise specified.

c) Symbol + indicates chemical shift for glycine residue.

[表2-5] ^{13}C chemical shift tensor components of glycine carbonyl carbons (ppm from TMS)

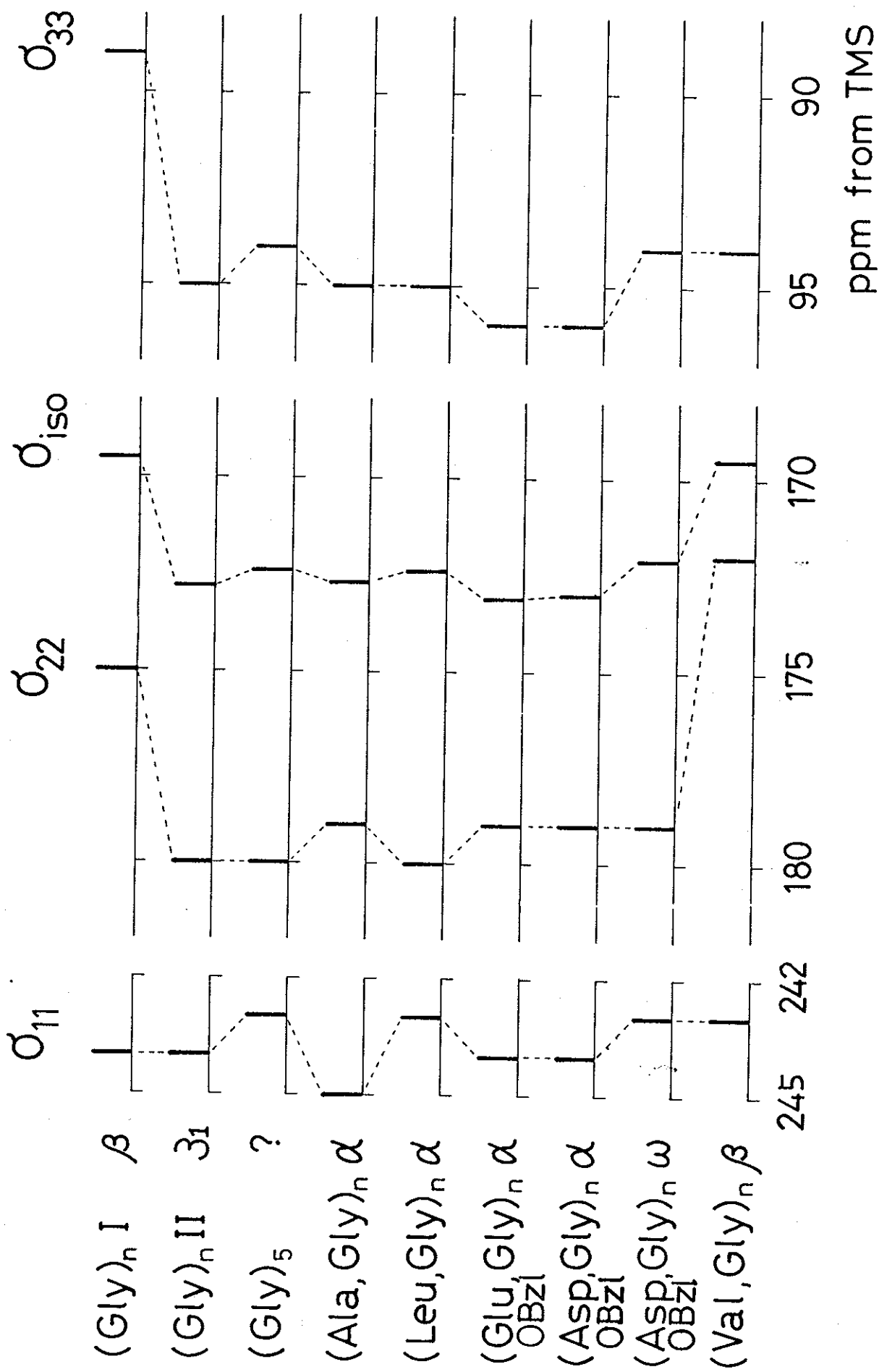
Sample ^{a)}	Conformation	tensor component ^{b)}			anisotropy breadth	
		σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	$\Delta\sigma$ ^{c)}	$\sigma_{11} - \sigma_{33}$
[Gly*] _n I	β -sheet	244	175	89	-121	155
[Gly*] _n II	β_1 helix	244	180	95	-117	149
[Gly*] _s	?	243	180	94	-118	149
[Ala,Gly*] _n	α_R helix	245	179	95	-116	150
[Leu,Gly*] _n	α_R helix	243	180	95	-117	148
[Glu(OBzl),Gly*] _n	α_R helix	244	179	96 ^{d)}	-116	148
[Asp(OBzl),Gly*] _n	α_R helix	244	179	96 ^{d)}	-116	148
[Asp(OBzl),Gly*] _n	ω_L helix	243	179	94 ^{d)}	-117	149
[Val,Gly*] _n	β -sheet	243	172	94	-114	149

a) Symbol * indicates carbonyl carbon enriched by ^{13}C

b) Uncertainty ± 1 ppm, unless otherwise specified.

c) $\Delta\sigma = \sigma_{33} - 1/2 \cdot (\sigma_{11} + \sigma_{22})$

d) The line shape of glycine residue is obscure and the value of tensor component is tentative (uncertainty: $\pm 2 \sim 3$ ppm) because of the overlap with the C α signal of the host residue.



[図2-7] 粉末スペクトルから得たグリシンカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフト値の主値の棒スペクトル

ておりこれは斉藤らの結果と一致するが、どちらの場合も信号強度が弱く、細かな議論には堪える精度はない。このGlyC α については選択的な ^{13}C ラベルによりコンホメーション依存性を検出することができる。このことについては§3-3で詳述する。

GlyC=Oのテンソル成分を見てもと、 σ_{22} と σ_{33} が[Gly, Gly*] $_n$ Iから[Gly, Gly*] $_n$ IIで4~5 ppm低磁場シフトしており、この値は等方平均化学シフトの差より大きい。特に σ_{22} はスペクトルからの直読が可能であるために測定誤差の最も少ない成分であり、データとしての信頼性は高いといえる。これに対し σ_{11} はコンホメーションの変化にほとんど影響を受けていない。また[Gly, Gly*] $_n$ Iの化学シフト異方性; $(\sigma_{11} - \sigma_{33})$ が[Gly, Gly*] $_n$ IIよりも6 ppm大きいことは、前者の電子分布が後者のそれよりも異方的であることを示している。

[Gly*] $_5$ の ^{13}C CP-MAS NMRスペクトルでは、まず重合開始剤に由来する末端n-ブチルアミド基を容易に識別することができる。斉藤ら²⁾によるL-アラニンのオリゴペプチドの観測結果に従って、図2-4cに示すような帰属を行った。ただしC $_1$ のピークはC α のピークに重なってしまい観測することができない。前述のように高分子量のポリグリシンにおけるGlyC α の化学シフトはコンホメーションの変化に敏感でないが、[Gly*] $_5$ のGlyC α ピークはポリグリシンのそれより1.5 ppm高磁場シフトしており有意差の可能性がある。一方、[Gly*] $_5$ のC=Oピークは[Gly, Gly*] $_n$ IIの近くに現れており、3つのテンソルの主値も誤差範囲内で[Gly, Gly*] $_n$ IIと一致している。これは[Gly, Gly*] $_n$ Iとは明らかに

異なる値である。A vignonら²⁹⁾は、Ac-(Gly)_n-NHMe(n=1-4)が[Gly]_n II に類似の β_1 -ヘリックスをとっていることを報告し、また Tonioloら³⁰⁾は t-Boc-(Gly)₃-OMeが[Gly]_n II に似た IR スペクトルを示したと述べている。グリシン残基は一般に α -ヘリックスの形成を阻害する傾向が強く、ポリグリシンが単独で α -ヘリックスを形成した可能性ことは考えにくい。これらの事実は[Gly*]₅が[Gly]_n II 様の β_1 -ヘリックスをとっていることを支持しており、本研究で測定した IR スペクトルも同様の結論を裏づけている。一般にグリシン以外のアミノ酸では、低分子量のオリゴペプチドは β -シート構造を形成することが知られているが、[Gly*]₅がヘリックス様のコンホメーションをとっているとすると、グリシン残基は構造的に特異的なアミノ酸残基であると考えることができる。

[2-3-2] コポリペプチド ([X, Gly*]_n)

まず初めに、[Ala, Gly*]_n (Gly*; 5%) について考察する。強度の大きな Gly C=O ピークの低磁場側に Ala C=O が観測される。Ala 残基の各ピークをすでに報告されているポリ-L-アラニン右巻き α -ヘリックス ([Ala]_n; α_R) の C=O, C α , C β のシフト値と比較することにより、この試料が同じ右巻き α -ヘリックスを形成していることを確認することができる。このコポリペプチド中にグリシン残基が分散して存在していることを確認することは困難だが、ここで観測された Ala 残基各炭素のシグナルおよび Gly C=O のシグナルが完全な単一成分からなること、同様の重合方法により D-, L-アラニンと β -ベンジル-L-アスパルテート残基のほぼランダム

なコポリマーが合成できたことなどから、この中に巻き込まれたグリシン残基も α -ヘリックスと同じコンホメーション（二面角）をとっているものと考えてよいであろう。グリシン α -ヘリックスのC=Oシグナル(172.7ppm)は、[Gly, Gly*]_n II (172.8ppm)に近い値を示し、これは齊藤らの結果⁴⁾ (DCA処理した[Ala-Ala-Gly]_n α -ヘリックス中のGlyC=O化学シフト; 173.5ppm)、およびKricheldorfらの結果³⁾ ([Ala]_n中に巻き込ませたGlyC=Oは[Gly]_n Iよりも約3ppm低磁場に出現)と一致している。等方平均値のみならずテンソルの主値も[Gly, Gly*]_n IIと[Ala, Gly*]_nでは非常に近く、ここから両者を区別することは難しい。 α -ヘリックスと β_1 -ヘリックスの主鎖構造(ϕ , ψ)が大きく異なるにもかかわらず、両者のGlyC=O周辺の電子状態がかなり近いものであることがここから推測できる。

つぎに α -ヘリックスをとっている他のコポリペプチドについて考察する。まずこれらの試料のホストペプチド(巻き込んだ方のペプチド; Leu Asp(OBzl), Glu(OBzl))のC α および側鎖の各炭素の等方平均化学シフトを、すでに報告されているホモポリペプチド([Leu]_n, [Asp(OBzl)]_n, [Glu(OBzl)]_n)の化学シフト値と比較することにより、これらの試料が[Ala, Gly*]_nと同じ右巻き α -ヘリックスをとっていることが確認される。グリシン残基を巻き込ませたことによるホストペプチドの化学シフト変化はほとんど見られないため、隣接残基の影響は無視できる程度であると考えてよい。ただし[Asp(OBzl), Gly*]_nと[Glu(OBzl), Gly*]_nのフェニル基のピークが、ホモポリペプチドの値よりも1.3~2.0ppm高磁場シフト

しており、これは Gly 残基を巻き込ませたためにベンゼン環のスタッキングにわずかな影響が出たものと解釈できる。辻ら³¹⁾による研究でも、[Asp(OBzl), Ala]_nのフェニル基が[Asp(OBzl)]_nに比して一様に高磁場シフトすることが観測されており、フェニル基の化学シフトがかなり長距離の相互作用に敏感であることを示唆している。他の側鎖炭素の化学シフトは宿主残基のホモポリペプチドとほぼ一致し、グリシン残基を巻き込ませたことにより側鎖構造の大きな変化は起こらなかったと考えられる。

一方、[Ala, Gly*]_nの GlyC=O に比して、[Leu, Gly*]_nの GlyC=O は 0.3 ppm 高磁場、[Asp(OBzl), Gly*]_n、[Glu(OBzl), Gly*]_nの GlyC=O はそれぞれ 0.4, 0.3 ppm 低磁場シフトしている。後者については側鎖ベンゼン環の環電流効果が化学シフト異方性の大きなカルボニル炭素に影響を与えたことによると考えることができる³²⁾が、前者の理由は明らかでない。[Ala, Gly*]_nと[Leu, Gly*]_nのコンホメーションのわずかな違いを反映したものであろう。[Asp(OBzl), Gly*]_n、[Glu(OBzl), Gly*]_nの粉末スペクトルは、他の試料に比べてその形状が典型的なテント状のものから離れた崩れた形となっている。これは Asp(OBzl), Glu(OBzl)のフェニル基のピークが GlyC=O のシグナルに重なったため、 σ_{22} の高磁場側にそれが現れている。また σ_{33} 領域では同じく C α のピークが GlyC=O のすそに重なり σ_{33} の読み取りが困難となっている。この2つの試料の σ_{33} の値は σ_{iso} 、 σ_{11} 、 σ_{22} から逆算したものであり ($\sigma_{33} = (3 \times \sigma_{iso}) - \sigma_{11} - \sigma_{22}$)、粉末スペクトルから読み取った値ではない。そのため測定誤差は他の試料に比べてやや大きいと考えられる。

上述の[Asp(0Bz1), Gly*]_nを熱処理して得た ω -ヘリックスの試料のCP-MASスペクトルより、Asp(0Bz1)のC α 、C β 、ベンジルのピークは α -ヘリックスからそれぞれ2.4, 0.6, 0.6 ppm 高磁場シフトし、[Asp(0Bz1)]_n左巻き ω -ヘリックスの値と良く一致している。またこのGlyC=Oの化学シフト値は α -ヘリックスの値より0.8 ppm高磁場シフトした ω -ヘリックスに特徴的なものであり、 α -ヘリックス、 3_1 -ヘリックスとの判別が可能である。 ω -ヘリックスはその主鎖構造が α -ヘリックスに近いにもかかわらず、GlyC=O近傍の電子的な環境は両者でかなり異なっていると推測される。この粉末スペクトルも上述の理由で線形が乱れており、テンソル主値の読み取り誤差が大きいため、ここから α -ヘリックスと ω -ヘリックスを判別することはできない。

表2-4から明らかのように[Val, Gly*]_nのGlyC=O化学シフトは[Gly, Gly*]_nIの値と等しく、またVal C α 、C γ 、C β のピークも[Val]_nと一致して、この試料のコンホメーションが β -シートであることを裏づけている。しかし[Val, Gly*]_nのGlyC=O化学シフトテンソルは[Gly, Gly*]_nIと異なって、 σ_{22} は3 ppm高磁場シフト、 σ_{33} は5 ppm低磁場シフトしている。この試料の粉末スペクトルは図2-6 iに見るように典型的なスペクトル形に近く、 σ_{22} の読み取り誤差は ± 0.5 ppm以内のはずである。Val残基はタンパク質中で“平行 β -シート”の領域に見いだされ易いこと³³⁾、[Val]_nの β -シートは[Gly]_nIの典型的な逆平行 β -シートとは異なる結晶系をもつこと³⁴⁾などが報告されており、また山下ら³⁵⁾は[Val]_n、[Ile]_n β -シートのC軸(繊維軸)の長さ(それぞれ6.59, 6.60Å

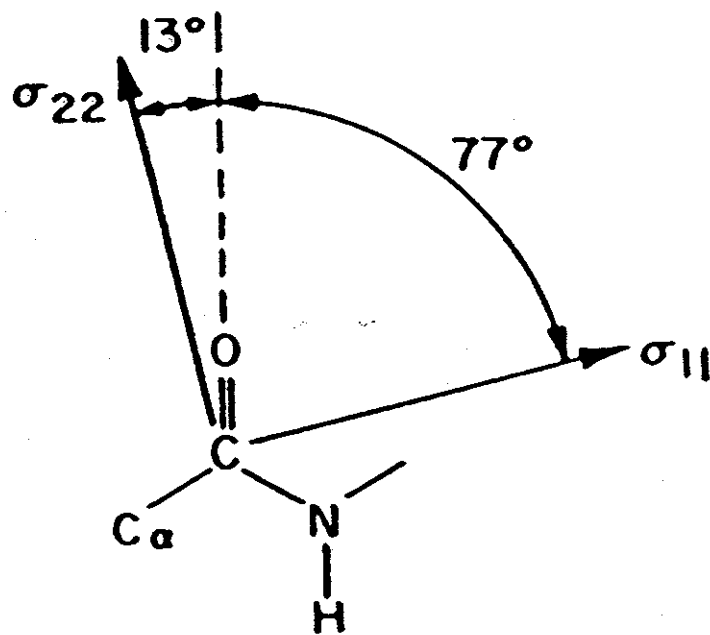
)が、 $[Ala]_n\beta$ -シート(6.89A)に比べて短いことを見出している。これらの報告から $[Val, Gly^*]_n$ 中の $GlyC=O$ は $[Gly, Gly^*]_nI$ とは異なる環境にあると考えるのが妥当であり、このことは等方平均化学シフトが等しくとも化学シフトテンソルには構造の差がでる系の存在することを示している。これは化学シフトテンソルが等方平均化学シフトよりも核の周りの電子状態により敏感であることを意味しており、化学シフトテンソルがより情報量の多い観測手段であることを裏づけている。

[2-3-3] $GlyC=O$ 化学シフトテンソルのコンホメーション依存性

上述したように $GlyC=O$ 化学シフトテンソルの一番低磁場側の主値; σ_{11} は、他のピークの重なりによる読み取りの困難がないにもかかわらず、すべてのコンホメーションについて測定誤差($\pm 1ppm$)内で同じシフト値を示している。高磁場側の成分; σ_{33} は $[Gly^*, Gly]_nI$ においては高磁場シフトを示すが、他のすべての試料について測定誤差内で一定である。

Starkら³⁶⁾が $[1-^{13}C]glycyl[^{15}N]glycine \cdot HCl \cdot H_2O$ のグリシン残基カルボニル炭素の化学シフトテンソルが単結晶から決定されており(図2-8)、 σ_{22} はおよそ $C'=O$ の方向、 σ_{33} はアミド結合 $N-C'$ と $C'=O$ により作られる平面に垂直の方向、そして σ_{11} は σ_{22} と σ_{33} に垂直の方向を向いている。

ポリグリシンや他のホモポリペプチドに巻き込まれた $GlyC=O$ のテンソル主値の方向もこれからあまり離れていない考えると、コンホメーションの変化に一番敏感な σ_{22} は水素結合の方向を向いた成分であることが

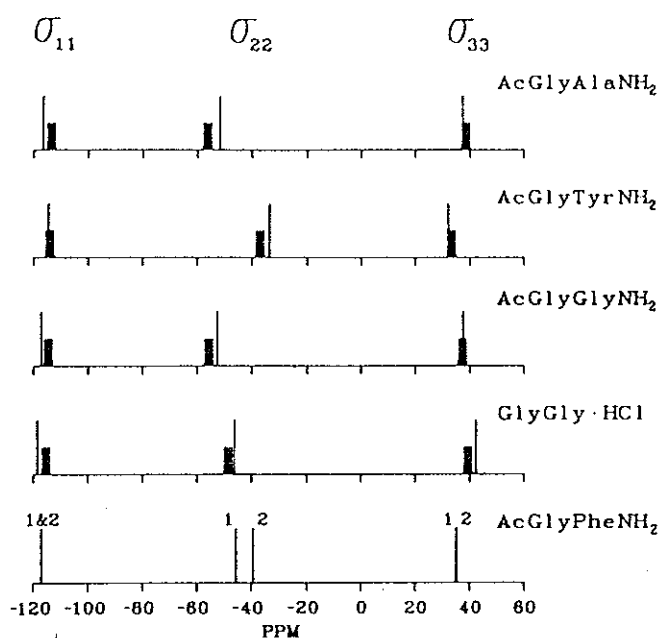


[図 2 - 8]

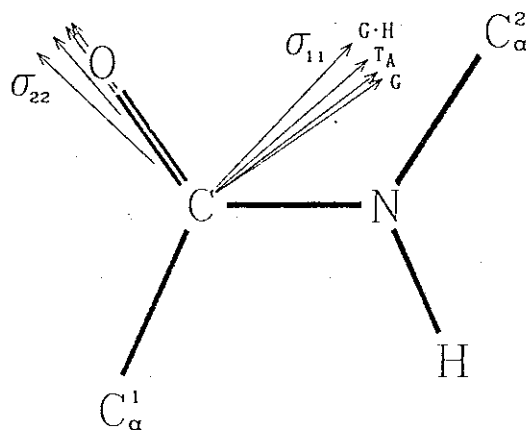
[1- ^{13}C]Glycyl[^{15}N]Glycine $\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ における
カルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトテンソル 主軸系

わかる。特に[Gly*, Val]_nにおける σ_{22} の高磁場シフトは、化学シフトテンソルの主軸の方向が[Gly, Gly*]_n I から大きくずれたことによる可能性が高いが、これはGlyC=Oの関与する水素結合の形態が両者で異なるためではないだろうか。一般に粉末スペクトルから主軸の方向に関する情報を得ることはできないが、主軸の方向はテンソルの主値よりも更に核の周りの電子的な環境に敏感であり、その変化が同時に主値の変化をともなうことも十分に考えられる。

Oasら³⁷⁾はN-アセチル-[1-¹³C]グリシル-X-アミド (X=[¹⁵N]グリシン, DL-[¹⁵N]チロシン, L-[¹⁵N]フェニルアラニン, DL-[¹⁵N]アラニン) において観測された、¹⁵N核と双極子カップルしている¹³C核の粉末スペクトルを解析することにより、多結晶状態の試料からでもその方向まで含めて化学シフトテンソルが決められることを示した。得られた結果はカルボニル炭素のテンソル主値について ± 2 ppm、主軸方向について $\pm 2^\circ$ と実用上十分な測定精度を持っている。彼らは ① 主値 σ_{22} 成分の変化が等方平均値 σ_{iso} の変化を引き起こす原因となっている。② σ_{22} の主軸方向は 20° 近くも変化するが、主値の大きさとの間に明確な相関はない。③ σ_{22} に最も大きな影響を与えるのは“残基周囲の効果”(lattice environment)であろう、と述べており、GlyC=Oの化学シフトテンソルの挙動について、本章の考察とほぼ同じ見解を示している(図2-9)。



[**2-9a**] Summary of the principal values of the ^{13}C chemical shift tensors of peptides 1-5 as determined by (1) iterative fitting of the powder patterns (thick bars) and by (2) analysis of sideband intensities in slow-spinning MAS spectra (thin bars). The uncertainty in the fitting results is indicated by the width of the bars (± 1.5 ppm). The uncertainty in the MAS results is ca. ± 2 ppm. Chemical shifts are given relative to liquid benzene (low ppm is downfield).



[**2-9b**] The orientations of σ_{11} and σ_{22} in the peptide plane, assuming σ_{33} is perpendicular to the plane, for peptides 1-4. The abbreviations refer to the following: A = AcGlyAlaNH₂ (1), T = AcGlyTyrNH₂ (2), G = AcGlyGlyNH₂ (3), G-H = GlyGly-HCl (4).

[2-3-4] 水素結合と Gly C=O 等方平均化学シフト

および化学シフトテンソル

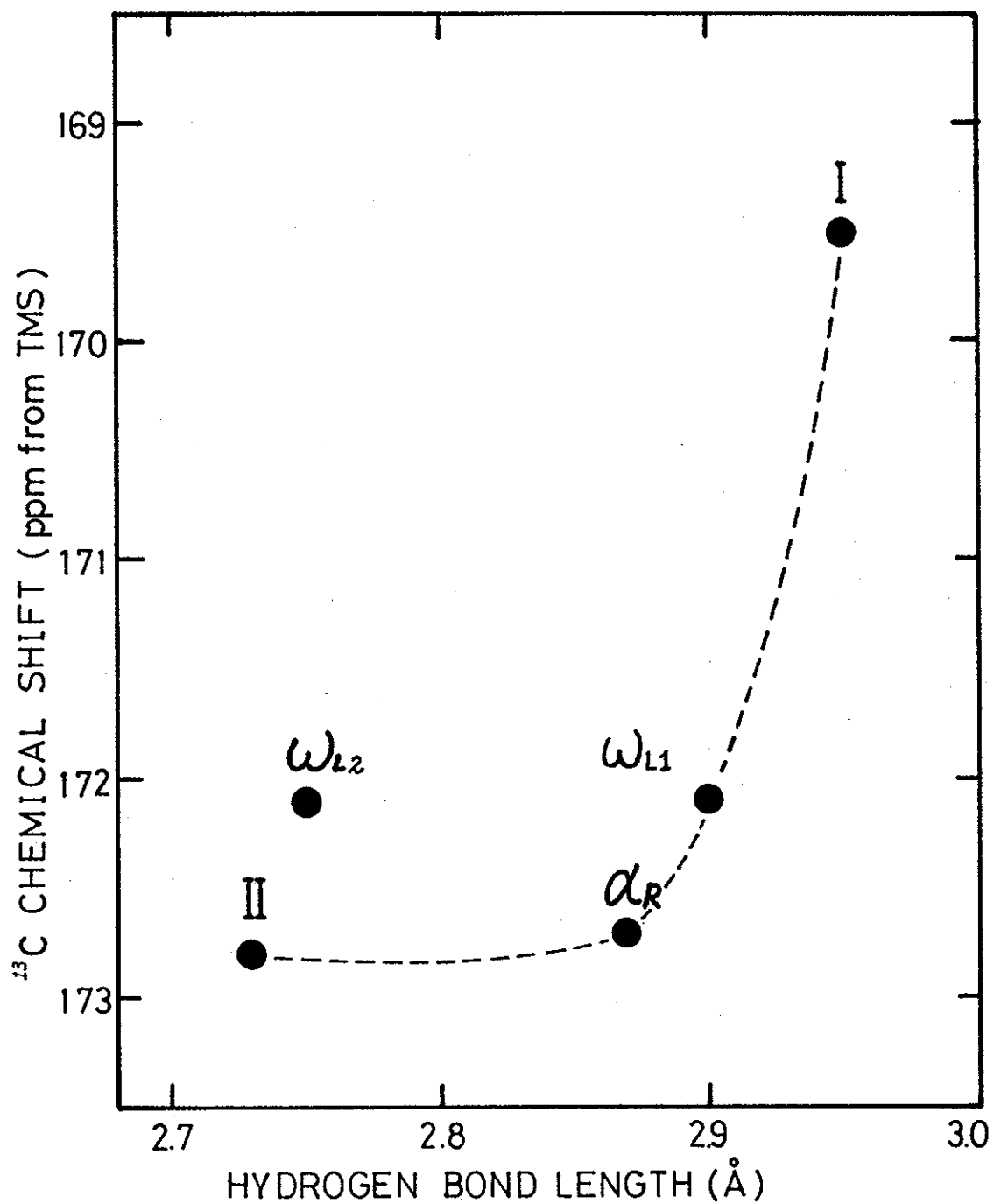
序論および前節でも述べたとおり、水素結合はカルボニル炭素の化学シフトに大きな影響を及ぼす。齊藤ら⁴¹⁾はコラーゲン様の3重ヘリックスをとるシーケンシャルコポリペプチド; [Ala-Gly-Pro]_n、[Pro-Gly-Pro]_nの GlyC=O 化学シフトが [Gly]_n II よりも 4.1 ~ 5.1 ppm 高磁場側にできることを報告し、これが水素結合の不在によるものとしている。これらのコポリペプチドの二面角 (ϕ , ψ) は [Gly]_n II とほぼ同じであるにもかかわらず、分子鎖間の水素結合が Gly N-H...O=C Pro 間にのみ形成されており、GlyC=O は水素結合に関与していないためである³⁸⁾。

X線回折の結果より、[Gly]_n II においては強い分子間の水素結合が形成されているが、[Gly]_n I では水素結合の距離が [Gly]_n II よりも長く (N...O 間 Form I; 2.95 Å、Form II; 2.73 Å) かつ直線形から離れている (NH>NO角; 33°) ことが報告されている³⁹⁾。またグリシン残基は単独では α -ヘリックスを形成しないためその水素結合距離は観測できないが、[Ala]_n の α -ヘリックス形成能からして [Gly]_n II と同程度の強さであると考えられる。 ω -ヘリックスについては、単独鎖では α -ヘリックスに比べてエネルギーが高いため、形成されにくいことを McGuireら⁴⁰⁾ が経験的ポテンシャル計算から示しているので、 ω -ヘリックスの水素結合は α -ヘリックスに比べて弱いと推測される。Bamfordら⁴¹⁾ は IR の吸収バンドから [Asp(OBzl)]_n α -ヘリックスの水素結合距離を 2.90 Å、 ω -ヘリックスのそれを 2.92 Å と推定しており、これは上記の予測を支持している。

ω -ヘリックスにはこれまで2つのコンホメーション (ω_1 および ω_2) が提案され、それぞれの水素結合距離は2.90 Å, 2.75 Åと算出されている。水素結合の距離が短いほど水素結合が強いとすれば、Arnottら⁴²⁾により出された[Ala]_nの α -ヘリックスのN··O間距離; 2.87 Åに比べて、Scheragaら⁴⁰⁾の ω_2 ヘリックスの値; 2.75 Åは短く不都合であるように思われる。またこの値は他のペプチドの水素結合と比較しても短か過ぎる嫌いがある。試みにGlyC=Oのカルボニル炭素の等方平均化学シフトをX線回折から得られたN··O間距離に対してプロットしたのが図2-10である。ここから直ちにGlyC=O化学シフトと水素結合距離の間に相関がある、ということとはできないが、 ω_2 -ヘリックスを無視して曲線を引いてみると「水素結合距離が短いほど低磁場シフトする」ことだけは確かなようである。上述したように ω -ヘリックスの水素結合距離は α -ヘリックスより長いと考えられ、また ω -ヘリックス[Asp(OBzl), Gly*]_nのGlyC=Oが α -ヘリックスよりも0.8 ppm 高磁場側に出ていることを考え合わせると、 ω_1 -ヘリックスは ω_2 -ヘリックスよりも妥当な構造ではないだろうか。いずれにせよGlyC=Oの化学シフトがテンソルの主値を含めて、水素結合の状態に少なからず依存していることは確かなようである。

[2-3-5] 溶液 ¹³C NMR 化学シフトの観測

表2-6に[Gly, Gly*]_n、[Ala, Gly*]_n、[Leu, Gly*]_n、[Asp(OBzl), Gly*]_n、[Glu(OBzl), Gly*]_nの溶液 ¹³C NMR 化学シフトの観測結果を示す。また比較のためCP-MAS NMRによる同試料の等方



[図2-10] ポリグリシンおよびグリシン残基を含むホモポリペプチドの Gly C=O 等方平均化学シフトと水素結合距離

平均化学シフトも掲げた。[Gly, Gly*]_nは水に溶けないためLiBr水溶液とし、また[A1a, Gly*]_nと[Leu, Gly*]_nもそのままではCHCl₃に溶解しないために微量のトリフルオロ酢酸(TFA)に溶かしたのちCHCl₃を加えた。5M LiBrに溶かした[Gly, Gly*]_nおよび[Gly*]₅のGly C=Oは、固体の化学シフト値よりも1 ppm以上低磁場シフトしているが、これは固体状態で形成していた分子内水素結合が切れてカルボニル炭素がLi⁺イオンとより強く水素結合したためであり、コンホメーションが溶液中で大きく変化したためではない。なぜならば1M LiBrに溶かした[Gly*]₅のGly C=O化学シフトが固体と5M溶液の中間の値をとっており、これは強い水素結合が更なる低磁場シフトを引き起こしたと解釈することができるためである。

また[A1a, Gly*]_nと[Leu, Gly*]_nのGly C=Oは溶液中でそれぞれ0.5 ppm, 1.8 ppm低磁場シフトしているが、[Asp(OBzl), Gly*]_nのそれは誤差範囲内で溶液と固体のシフト値が一致し、[Glu(OBzl), Gly*]_nでは溶液中でわずかに高磁場シフトしている。[A1a, Gly*]_nと[Leu, Gly*]_nにおけるGly C=Oの低磁場シフトは、コンホメーション変化よりも、CHCl₃に溶解させるために少量入れたTFAが溶解後もGly C=Oから離れず、その影響が現れた可能性が強い。しかしどちらもホストペプチドのC α 炭素が溶液中で高磁場シフトしていることから、溶解によってヘリックスがわずかにゆるみコンホメーションが β -シートに近づいたと考えることができる。殊に溶液中での[Asp(OBzl), Gly*]_n C α 炭素は ω -ヘリックスと等しい値であるため、 α -ヘリックスよりも ω -ヘリックスに近いコンホメ

ーションをとっていると考えられる。

固体高分解能 NMR から得られたコンホメーション依存の化学シフトは、このようにカルボニル以外の炭素についてはその立体構造と対応したリファレンスデータとして利用することができるが、カルボニル炭素の化学シフトは核の周囲の影響を受けやすく、溶液中での化学シフト変化が溶媒効果によるものか、それともコンホメーション変化によるものかをここから見きわめることは難しい。

[表 2 - 6] ^{13}C Chemical Shifts of Polypeptides Containing Glycine Residues
in Solution and in Solid State ($\pm 0.2\text{ppm}$ from TMS)

Sample ^{a)}	Solvent	Carbonyl ^{b)}	C α	^{13}C chemical shift		
				C β	phenyl	benzyl
(Solution)						
[Gly*] _n	5M LiBr	173.7 ⁺	45.0			
[Gly*] ₅	5M LiBr	173.6 ⁺	45.0			
	1M LiBr	173.2 ⁺	—			
[Ala,Gly*] _n	CHCl ₃ ^{c)}	177.1	51.7	15.0		
		173.2 ⁺				
[Ala] _n	CHCl ₃ ^{c)}	177.2	52.1	15.3		
[Leu,Gly*] _n	CHCl ₃ ^{c)}	176.8	55.0	38.6		
		174.2 ⁺				
[Glu(OBzl),Gly*] _n	CHCl ₃	172.1 ⁺	—	31.0	128.5	66.3
[Asp(OBzl),Gly*] _n	CHCl ₃	172.2 ⁺	51.4	33.7	128.3	66.4
(Solid State)						
[Gly,Gly*] _n	β	169.5 ⁺	44.2			
[Gly,Gly#] _n	β	169.7 ⁺	44.3			
[Gly,Gly*] _n	β_1	172.8 ⁺	44.2			
[Gly,Gly#] _n	β_1	172.8 ⁺	43.7			
[Gly*] ₅		172.4 ⁺	42.7			
[Ala,Gly*] _n	α	177.7	53.2	15.6		
		172.7 ⁺				
[Leu,Gly*] _n	α	172.4 ⁺	56.4	40.0		
[Glu(OBzl),Gly*] _n	α	173.1 ⁺	57.5	26.3	128.5	66.2
[Asp(OBzl),Gly*] _n	α	173.0 ⁺	54.2	34.8	128.8	66.9
[Asp(OBzl),Gly*] _n	ω	172.1 ⁺	51.8	34.2	128.7	66.3

a) Symbol * indicates carbonyl carbon enriched by ^{13}C .

Symbol # indicates methylene carbon enriched by ^{13}C

b) Symbol + indicates chemical shift for glycine residue.

c) Containing several percent of Trifluoroacetic acid to solve samples.

§ 2-4 ま と め

1. グリシン残基カルボニル炭素の化学シフトにおよぼすコンホメーションの効果を観測するため、 ^{13}C でラベルされたグリシン残基をホモポリペプチドに巻き込ませた試料を調製し、 3_1 -ヘリックス、 β -シート、 α -ヘリックス、 ω -ヘリックスの各コンホメーションについて 等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの3つの主値(σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})を固体高分解能NMRにより測定した。
2. 化学シフトテンソルの3つの主値は、CP-MASスペクトルから得られる等方平均化学シフトよりもコンホメーションの変化に対してより敏感に反応し、そこからはポリペプチドの立体化学構造に関する詳しい情報を得ることができた。また、等方平均化学シフトだけでは困難であったコンホメーションの推定がテンソルの主値を用いることにより可能となることが示された。
3. グリシン残基カルボニル炭素の化学シフトは、その主鎖構造よりも自身の関与する水素結合の状態に大きく依存して変化するものと考えられ、水素結合の方向を向いたテンソル成分; σ_{22} にその影響が大きく出ることがわかった。

なお、本章で述べた研究内容は以下の報文として発表いたしました。

Ando, S.; Yamanobe, T.; Ando, I.; Shoji, A.; Ozaki, T.;
Tabeta, R.; Saito, H.

J. Am. Chem. Soc. 107, 7648 (1985)

参考文献》

- 1) 「コンホメーション依存化学シフト」の総説は以下の文献を見られたい。
 - a. Saito, H. 'Conformation-dependent ^{13}C Chemical Shifts: A New Means of Conformational Characterization as Obtained by High-resolution Solid-state NMR' *Mag. Res. in Chem.* **24**, 835 (1986)
 - b. Saito, H.; Ando, I. 'High-resolution Solid-state NMR Studies of Synthetic and Biological Macromolecules' *Ann. Rep. on NMR Spectr.*, Vol. 21 Academic Press (1989)
 - c. Opella, S. J.; Gierasch, L. M. 'Solid State Nuclear Magnetic Resonance of Peptides', "The Peptides" Vol. 7 Academic Press (1985)
 - d. 神藤平三郎, 藤戸輝昭 '固体高分解能NMR' "NMR - 総説と実験ガイド II", 南江堂(1983) に所収
 - e. 寺尾武彦 '固体高分解能NMR' "新しい磁気共鳴と化学への応用", 学会出版センター(1986)に所収
 - f. 齊藤肇 '固体高分解能NMR' および内藤晶, 神藤平三郎, 安藤勲, 渡辺徳子 '高分解能NMRの固体への展開' "高分解能NMR - 基礎と新しい展開" 東京化学同人(1987)に所収
- 2) 齊藤らおよびKricheldorfらの初期の文献をあげる。以後の研究については文献1)-bを参照されたい。
 - Taki, T.; Yamashita, S.; Shibata, M.; Yamashita, T.; Tabeta, R.; Saito, H. *Chem. Lett.* 1803 (1981)
 - Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I., *Macromolecules*, **16**, 1050 (1984)
 - Kricheldorf, H. R.; Müller, D. *Macromolecules*, **16**, 615, (1983)
- 3) • Saito, H.; Tabeta, R.; Asakura, T.; Iwanaga, Y.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I. *Macromolecules*, **17**, 1405 (1984)
 - Kricheldorf, H. R.; Müller, D.; Ziegler, K. *Polymer Bull.*, **9**, 284, (1983)
 - Asakura, T.; Kuzuhara, A.; Tabeta, R.; Saito, H. *Macromolecules*, **18**, 1841 (1985)
- 4) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. *Biopolymers*, **23**, 2279 (1984)
- 5) Kricheldorf, H. R.; Müller, D. *Coll. Polymer Sci.*, **262**, 856 (1984)
- 6) Kricheldorf, H. R.; Müller, D. *Int. J. Biol. Macromol.*, **6**, 81, (1984)

- 7) Miyazawa, T. 'Infrared Spectra and Helical Conformations' in "Poly- α -amino acids", Marcel Dekker, New York (1967)
- 8) • Foerster, H.G.; Mueller, D.; Kricheldorf, H.R. *Int.J.Biol.Macromol.* 5, 101 (1983)
 • Shoji, A.; Ozaki, T.; Fujito, T.; Deguchi, K.; Ando, I. *Macromolecules* 20, 2441 (1987)
- 9) • Pease, L.G.; Frey, M.H.; O'pella, S.J. *J.Am.Chem.Soc.* 103, 467, (1981)
 • Frey, M.H.; O'pella, S.J.; Pockwell, A.L.; Gierasch, L.M. *J.Am.Chem.Soc.* 107, 1946 (1985)
- 10) Sarker, S.K.; Torchia, D.A.; Kopple, K.D.; VanderHart, D.L. *J.Am.Chem.Soc.*, 106, 3328 (1984)
- 11) Shoji, A.; Ozaki, T.; Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I. *Makromol.Chem.Rapid Comm.* 5, 799 (1984)
- 12) Valentine, B.; Steinsneider, A.; Dhawan, D.; Burger, M.I.; Amour, T.S.; Fiat, D. *Int.J.Peptide Protein Res.*, 25, 56 (1985)
- 13) Howarth, O.W.; Lilly, D.M.J. *Prog.Nucl.Mag.Res.Spectr.* 12, 1 (1978)
- 14) Tonelli, A.E. *J.Am.Chem.Soc.*, 102, 7635 (1980)
 Tonelli, A.E. *Biopolymers*, 23, 819 (1984)
- 15) Grant, D.M.; Paul, E.G. *J.Am.Chem.Soc.*, 86, 2984 (1964)
- 16) Veeman, W.S. *Prog.Nucl.Mag.Res.Spectr.* 16, 193 (1984)
- 17) Jelinski, L.W.; Torchia, D.A. *J.Mol.Biol.* 133, 45, (1979)
 Jelinski, L.W.; Torchia, D.A. *J.Mol.Biol.* 138, 255, (1980)
- 18) Spiess, H.W. *Chem.Phys.* 6, 226 (1974)
- 19) Ellingsen, D.S.; Resing, H.A. *J.Phys.Chem.*, 84, 2204 (1980)
- 20) Shindo, H.; Wooten, J.B.; Pfeiffer, S.B.; Zimmerman, S.B. *Biochemistry* 19, 518 (1980)
 Shindo, H.; Wooten, J.B.; Zimmerman, S.B. *Biochemistry* 20, 745 (1981)
- 21) Cross, T.A.; O'pella, S.J.; Stubbs, G.; Casper, D.L.D. *J.Mag.Res.* 170, 1037 (1983)
- 22) Ando, I.; Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T. *Macromolecules* 17, 457 (1984)
- 23) 寺尾らによる SAS-NMR、Baxらによる Magic Angle Hopping NMRなどの方法を用いると、粉末試料から直接 化学シフトテンソルの主値を得ることができる。
 Terao, T.; Fujii, T.; Saika, A. *Chem.Phys.Lett.* 107, 145 (1984)

- Bax, A.; Szeverenyi, N.M.; Maciel, G.E. *J. Mag. Res.* 51, 400 (1983)
- 24) Grover, S.H.; Guthrie, J.P.; Stothers, J.B. *J. Mag. Res.* 10, 227 (1973)
- 25) Oya, M. *Chem. Lett.* 1143 (1973)
- 26) 額田健吉 "核磁気共鳴法" オーム社 p106 (1964)
- 27) Bloembergen, N.; Rowland, J.A. *Acta Metall.* 1, 731 (1953)
- 28) Saito, H.; Iwanaga, Y.; Tabet, R.; Asakura, T. *Chem. Lett.* 427 (1983)
- 29) Avignon, M.; Garrigou-Lagrange, C. *Spectro. Chim. Acta* 27A, 297 (1971)
- 30) • Borona, G.N.; Toniolo, C. *Gazz. Chim. Ital.* 110, 503 (1980)
 • Toniolo, C.; Borona, G.N.; Rajasekharan; Pillai, V.N.; Mutter, M. *Macromolecules* 13, 772 (1980)
- 31) Tuzi, S.; Komoto, T.; Ando, I.; Saito, H.; Shoji, A.; Ozaki, T. *Biopolymers* 26, 1983 (1987)
- 32) Johnson, C.E.; Bovey, F.A. *J. Chem. Phys.* 29, 1012 (1958)
- 33) • Toniolo, C. *Macromolecules*, 11, 437 (1978)
 • Lifson, S.; Sander, C. *Nature (London)*, 282, 109 (1979)
- 34) Kubota, S.; Fasman, G.D. *Biopolymers* 14, 605 (1975)
- 35) Yamashita, O.; Yamane, T.; Ashida, T.; Yamashita, S.; Yamashita, T. *Polymer J.* 11, 763 (1979)
- 36) Stark, R.E.; Jelinski, L.W.; Rubin, D.J.; Torchia, D.A.; Griffin, R.G. *J. Mag. Res.* 55, 266 (1983)
- 37) Oas, T.G.; Hartzell, C.J.; McMahon, T.J.; Drobný, G.P.; Dahlquist, F.W. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5956 (1987)
- 38) Okuyama, K.; Arnott, S.; Takayanagi, M.; Kakudo, M. *J. Mol. Biol.* 152, 427 (1981)
- 39) • Lotz, B. *J. Mol. Biol.* 87, 169 (1974)
 • Crick, F.C.H.; Rich, A. *Nature (London)* 176, 780 (1955)
 • Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V.; Rana Krishna, C. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 168 (1966)
- 40) McGuire, R.F.; Vanderkooi, G.; Momany, F.A.; Ingwall, R.T.; Crippen, G.M.; Lotan, N.; Tuttle, R.W.; Kashuba, K.L.; Scheraga, H.A. *Macromolecules* 4, 112 (1971)
- 41) Bamford, C.H.; Elliot, A.; Hanby, W.E. "Synthetic Polypeptides" Academic Press, New York (1956)
- 42) Arnott, S.; Wonacott, A.J. *J. Mol. Biol.* 21, 371 (1966)

- 43) Taki, T.; Yamashita, S.; Shibata, M.; Yamashita, T.; Tabeta, R.; Saito, H. Chem. Lett. 1803 (1981)
- 44) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I., Macromolecules, 16, 1050 (1984)
- 45) Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I.; Ozaki, T.; Shoji, A. Chem. Lett. 1437 (1983)
- 46) Saito, H.; Tabeta, R.; Asakura, T.; Iwanaga, Y.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I. Macromolecules 17, 1405 (1984)
- 47) Shoji, A.; Ozaki, T.; Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I.; Macromolecules 17, 1472
- 48) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. Biopolymers, 23, 2279 (1984)
- 49) Kricheldorf, H.R.; Muller, D. Macromolecules 16, 615, (1983)

第三章 固体オリゴペプチド中に存在
するグリシン残基カルボニル
炭素の ^{13}C 等方平均化学シフ
トと水素結合の構造

§ 3-1 はじめに

[3-1-1] ^{13}C NMR化学シフトと水素結合

水素結合は、ペプチドやタンパク質が安定なコンホメーションを形成する上で非常に重要な役割を果たしている¹⁾。ペプチドの結晶中ではすべてのアミノ基とカルボニル基が水素結合に関与しているといっても過言ではない。前章で観測の対象としたポリペプチドにおいても、 α -ヘリックスと ω -ヘリックスは分子内の、 β -シートと 3_1 -ヘリックスは分子間の水素結合を形成して、それぞれのコンホメーションを安定化させている。

水素結合の性質はこれまでも様々な分光法により研究されてきた²⁾。

「赤外吸収スペクトル」では水素結合の形成によりO-HやN-Hの特性振動数が変化し³⁾、「電子スペクトル」では $n-\pi^*$ 遷移が顕著なブルーシフトを示す²⁾。「NMRの化学シフト」も溶液中の水素結合を検出するための有用な手段として広く利用されてきた⁴⁾。

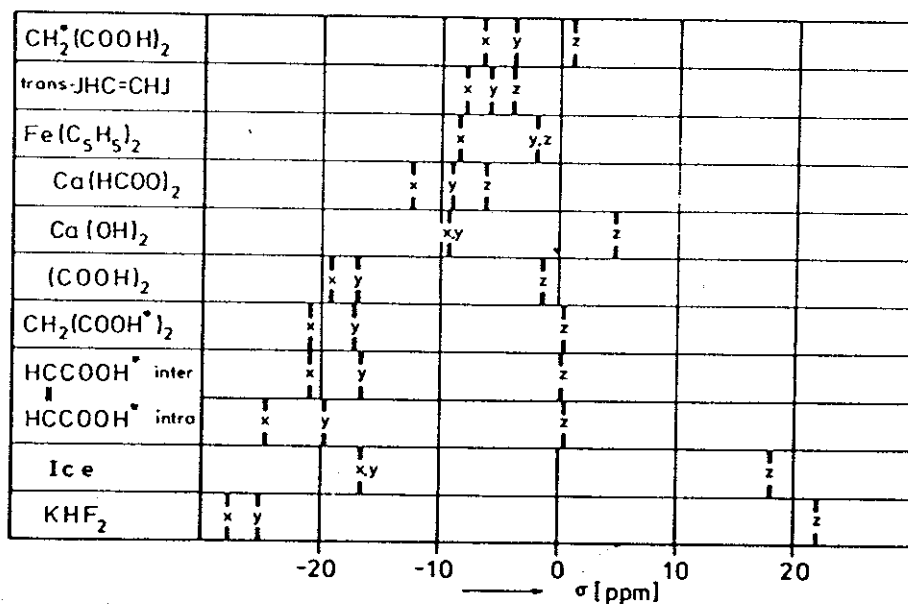
水素結合の化学的な性質と水素結合を形成している核の化学シフトとの関係は、これまでおもに ^1H 核に関して実験と理論の両面から研究されてきた。タンパク質や生理活性ペプチドなどの生体関連物質を研究する上で、溶液中での水素結合の検出はそのコンホメーションとの関連において重要であるため、すでに“重水素による置換速度”、“化学シフトの温度変化と溶媒変化”、“ラジカル添加による線幅の増大”など様々な実験法が開発され、方法論として確立されている⁵⁾。

多くのNMR実験からペプチドにおけるアミノ基の ^1H 化学シフトは水

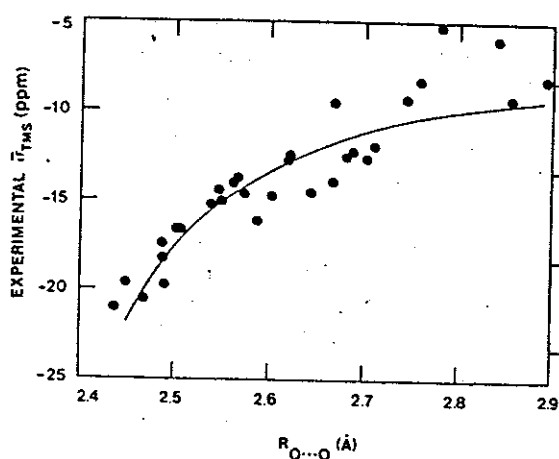
水素結合の形成により低磁場シフトを引き起こすことが知られており、またカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトも同様に低磁場へシフトすることが報告されている^{5,6)}。しかし、溶液中では分子全体にわたる様々なモードの分子運動が存在し、分子の構造や原子間距離が大きく揺らいでいるため、溶液のNMRを用いて「水素結合近傍の立体化学構造」と「NMR化学シフト」の関係を定量的に探ることは困難である。^{*1} また水素結合の多くが溶液中では、「平衡状態」として存在していることも、「構造」を定義することを困難にしている。

近年、多重パルス法の発達により固体中での ^1H 化学シフトおよび化学シフトテンソルの測定が可能となった⁷⁾。 ^1H の化学シフトは異方性がもともと小さいために ^{13}C や ^{15}N に比べて主値の変化する範囲が小さい。しかし、図3-1に示すように単結晶から求めた ^1H 化学シフトテンソルの異方性; $(\sigma_{33}-\sigma_{11})$ は、水素結合中にあるもの(表中下方の化合物)が水素結合に関与していないもの(表中の上方)よりも明らかに大きいことがわかる⁸⁾。水素結合距離($\text{O}\cdots\text{O}$ 間距離)に対する ^1H の等方平均化学シフト、テンソルの異方性を表すパラメーター; $\Delta\sigma(=\sigma_{33}-(\sigma_{11}+\sigma_{22}))$ および重水素の核四重極カップリング定数の関係がBerglundら⁹⁾によりまとめられ、これらは比較的よい相関にあることがわかっている(図3-2~図3-4)

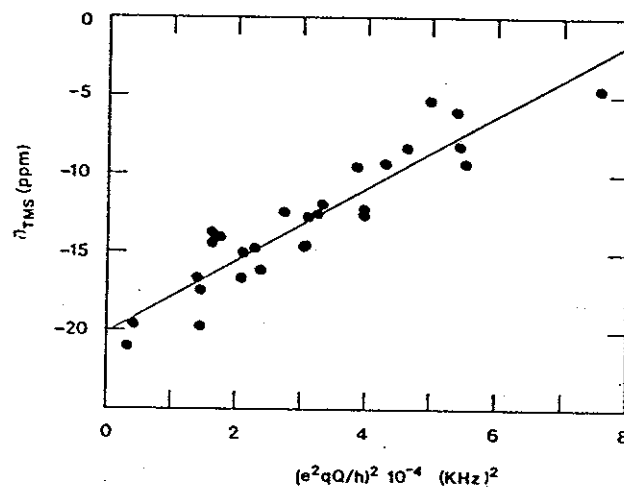
*1. 水素結合の形成が ^1H 化学シフトの低磁場シフトを引き起こすことより、「水素結合距離」と「 ^1H 化学シフト」の間になんらかの関係が存在することは容易に想像できる。事実、溶液のNMR(距離行列法)と単結晶のX線回折から、類似の構造を溶液中と結晶中でとっていることが知られている球状タンパク質のひとつ(BPTI)について、結晶構造から算出された水素結合距離とN-Hプロトンおよび $\text{C}\alpha$ プロトンの化学シフトの間にある程度の相関が存在することが報告されている¹⁰⁾。



【図3-1】 各種化合物の¹H化学シフトテンソルの主値⁸⁾

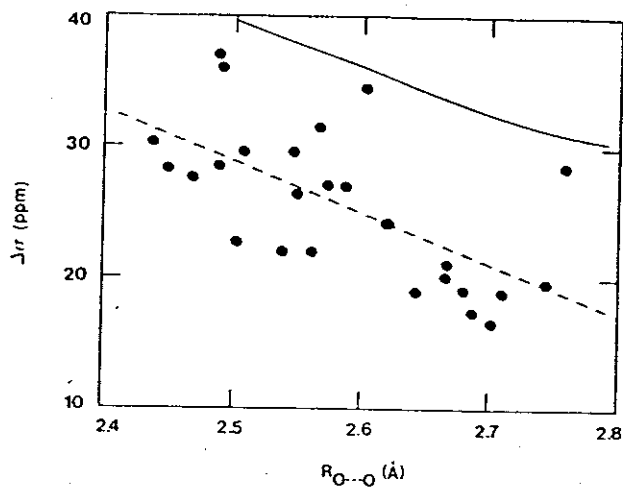


【図3-2】 水素結合距離; $R_{\text{O}\cdots\text{O}}$ と¹H等方平均化学シフト⁹⁾



【図3-3】 ¹H等方平均化学シフト⁹⁾
²D核四重極結合定数⁹⁾

【実線はab-initio法
による計算結果】

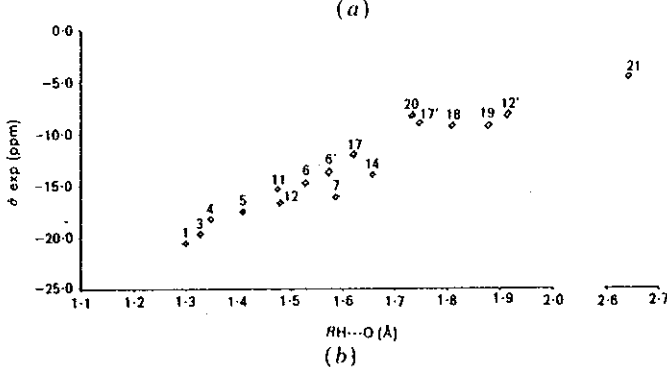
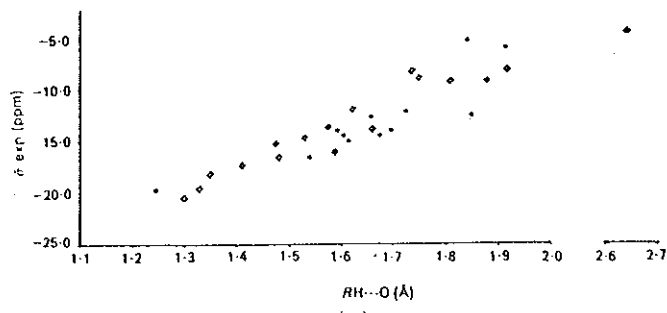


【図3-4】 水素結合距離; $R_{\text{O}\cdots\text{O}}$ と¹H化学シフトテンソル異方性⁹⁾

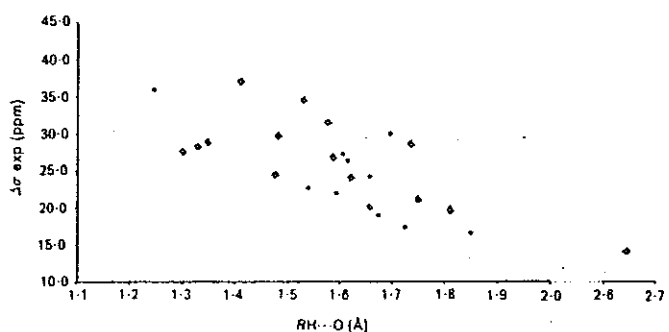
ここで得られた相関は Ditchfieldら¹⁰⁾による非経験的分子軌道法の結果ともよい一致を示している。加えて Jeffreyら¹¹⁾は、Berglundらの測定結果を結晶構造とともに検討しなおした結果、¹Hの等方平均化学シフトと化学シフト異方性は、O··O間よりもH··O間の水素結合距離により強い相関があり、特に中性子線回折による結晶構造のデータを用いた場合には、両者の関係がばらつきの少ないゆるやかな曲線上にのることを明らかにした(図3-5, 3-6)。

一方、固体¹³C化学シフトは、水素結合よりも分子の立体化学構造(コンホメーション)に敏感であると考えられ、水素結合との関係は¹Hに比してあまり議論されてこなかった。Griffinら¹²⁾やKempfら¹³⁾により水素結合を形成しているカルボキシル炭素の化学シフトテンソルが単結晶から決定され、主軸の方向が水素結合の有無、その方向性や対称性に敏感であることはすでに明らかになっていたが、単結晶のNMRは実用的な方法と言えないため、複雑な系に適用されることはなかった。

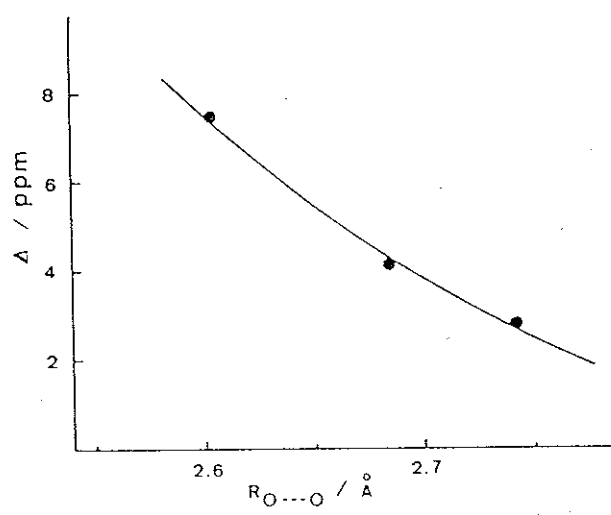
しかし近年、交差分極(CP)や高出力デカップリング、マジック角回転(MAS)などの測定技術の発達によって固体高分解能NMRが容易に測定できるようになり、固体状態においても化学シフト(化学シフトテンソル)を用いて水素結合の化学的環境をさぐる研究が可能となった。今城ら¹⁴⁾はまず3種のジケトンの¹³C CP-MAS NMRを測定して、強い分子間水素結合を結晶中で形成するジメドンのカルボニル及びエノール炭素が溶液状態に比べ約10ppm低磁場シフトすることを報告し、次いで置換基を変えた3つのヒドロキシベンズアルデヒドのカルボニル炭素化学シフトが結晶



[図3-5] 水素結合距離; $R_{H\cdots O}$ と 1H 等方平均化学シフト
 上段; 全データ, 下段; 中性子線回折のデータのみ¹¹⁾



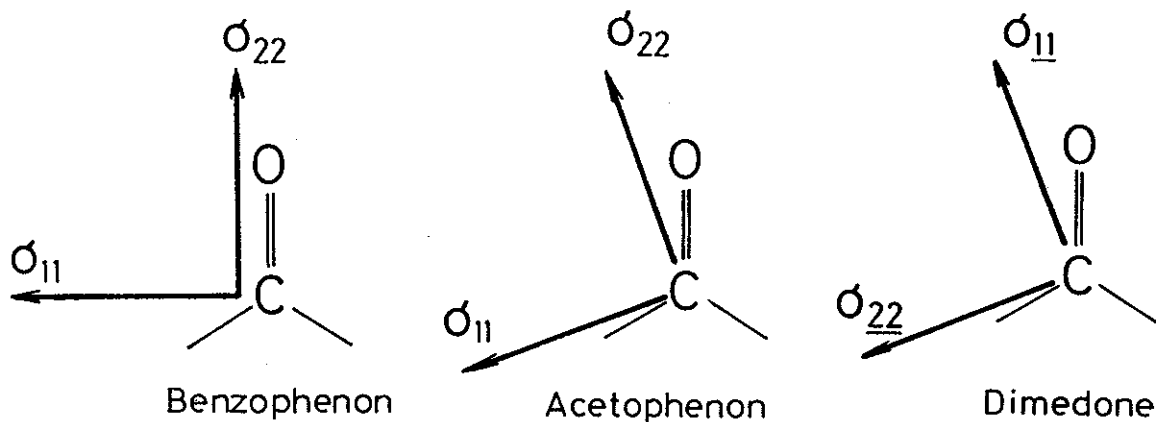
[図3-6] 水素結合距離; $R_{H\cdots O}$ と 1H 化学シフト異方性¹¹⁾
 ◇; 中性子線, *; X線



[図3-7] アルデヒド炭素における水素結合距離; $R_{O\cdots O}$ と
 Δ (=固体化学シフト - DMSO溶液中化学シフト) の関係¹⁴⁾

中の水素結合距離と強い相関にある(水素結合距離の減少にともない低磁場にシフト)ことを見いだした(図3-7)。竹腰ら¹⁶⁾はこれを受けて、ジメドン単結晶のNMR測定を行い、①通常のカルボニル炭素と異なりC=O軸方向のテンソル成分が σ_{11} であること(図3-8)、②類似の化合物であるアセトフェノンに比べC=O軸方向の主値が50 ppmも低磁場シフトすること、③ σ_{33} に隣接炭素の影響が出る可能性のあることを報告している。強い分子間水素結合の形成がC=O方向に主軸をもつ成分だけを大きく低磁場シフトさせたことは、Oasらの報告にあるように主値の大きさとその主軸方向の間に直接の相関がないことと符合している。つまり化学シフトテンソルのそれぞれの主値は、その方向に固有の相互作用を反映しており、主値の変化はかなりの程度独立である。カルボニル炭素においては、「必ずしも σ_{22} (中央の主値)というわけではなく、C=O軸方向のテンソル成分が水素結合の環境を反映している」と考えれば、強い水素結合の形成によってC=O軸方向の主値が、通常最も低磁場側に現れるC-N軸方向の主値を上回ってより低磁場へシフトしたと解釈することにより、ジメドンで見られた「テンソル成分の入れ替わり」を説明することができる。このように、化学シフトテンソルのC=O軸方向の成分に水素結合の効果が特異的に現れることは、本研究の第2章で得られた結果と一致する。

Schroeterら¹⁵⁾は多重パルス-MAS法により ^1H の、CP-MAS法により ^{13}C の化学シフトを観測し、 ^1H 化学シフトは水素結合の強さに、 ^{13}C 化学シフトは水素結合の対称性に敏感であると報告している。安藤ら¹⁷⁾のFP T-INDO法による理論計算においても、アラニン残基カル



[図3-8] カルボニル炭素における化学シフトテンソルの主軸方向
ジメドンでは”テンソル成分の入れ替わり”が起こっている。

カルボニル炭素における化学シフトテンソルの主値¹⁶⁾

	σ_{xx}	σ_{yy}	σ_{zz}
Benzophenone	271.8	228.8	98.8
Acetophenone	278.5	231.5	83.5
Dimedone	254.9	284.1	79.0

↑
└ C=O direction

ボニル炭素の化学シフトは、水素結合距離の差異を考慮することにより初めて実測を再現しており、水素結合が化学シフトにおよぼす影響の大きいことを示唆している。

[3-1-2] 本章の目的

第2章の結果は、ポリペプチド中に巻き込まれたグリシン残基カルボニル炭素の等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの主値； σ_{22} に見られる変化が、水素結合環境の違いによって引き起こされたものであることを示唆している。しかし、これまでの研究により主鎖結合まわりの回転にともなう電子状態の変化（「狭義のコンホメーション効果」）も水素結合と同程度の化学シフト変化を引き起こすことが知られている¹⁸⁾。

ポリペプチドのカルボニル炭素に化学シフト変化を引き起こす要因として、どのような相互作用が支配的であるかを知るためには、モデル化合物を用いることにより特定の効果を選択的に取り出して評価する方法が有効と思われる。固体ポリペプチド中では「狭義のコンホメーションの効果」に「水素結合」や「分子鎖間のパッキング」の効果が加わり、相互にからみあうて、化学シフトの「広義のコンホメーション依存性」を特定の相互作用に帰すことが容易でない。またX線回折により得られたポリペプチドの主鎖構造や水素結合距離には測定誤差が大きいため、これらの効果を定量的に評価することも難しい。ポリペプチドにおける「狭義のコンホメーション依存性」を選択的に取り出すためには、結晶構造が明らかとなっており、かつ水素結合を形成していない残基をもったポリペプチドを複数個、

必要となるが、このような型のポリペプチドはコラーゲン様3重ヘリックスをとるシーケシャルペプチドにしか見つかっていない。

そこで本章では、 ^{13}C 核の化学シフトにおよぼす水素結合の影響を評価するため、すでにX線あるいは中性子線回折から正確な結晶構造が知られている低分子量のペプチドを選んでCP-MAS NMRの測定を行い、等方平均化学シフトにおよぼす「水素結合の効果」を探ることにする。低分子量の試料であってもここから「コンホメーション効果」をここから完全に排除することはできないが、2つないし3つのアミノ酸残基からなるペプチドは結晶解析の結果から一般に似通ったコンホメーションをとることが知られており、またこれらの系には長距離にわたる分子内や分子間の相互作用が存在しないため、水素結合効果を選択的に評価するための良いモデル系を提供できると考える。グリシン残基を含んだオリゴペプチドの中には結晶構造がすでに知られているものが多く、構造の精度もポリペプチドよりはるかに高い。またオリゴペプチド中で形成される水素結合には固体ポリペプチドと同じ型のもの他に、プロトンドナーであるアミノ基がイオン化したものも存在し、水素結合の型の違いによる水素結合効果の差異を検出できる可能性がある。このようにオリゴペプチドをモデル化合物として用いることにより、ポリペプチドでは困難であったより精密な考察ができると考える

§ 3-2 実験と測定

[3-2-1] 試料の調製

測定に用いたグリシン残基を含むオリゴペプチドを表3-1に示す。ここで、クロロアセチルグリシルグリシン(CIAc-Gly-Gly), サルコシルグリシルグリシン(Sar-Gly-Gly), グリシル-L-フェニルアラニルグリシン(Gly-L-Phe-Gly)を除くすべてのペプチドは(株)東京化成またはSIGMA社から購入した。これらのペプチドはすべてX線回折の論文にある方法に従って再結晶を行い、メノウ乳鉢で粉砕することにより多結晶状態の試料とした。

CIAc-Gly-Glyはグリシルグリシンを塩化クロロアセチルにより室温下、NaOH水溶液中でクロロアセチル化することにより得た²⁰⁾。Sar-Gly-GlyとGly-L-Phe-GlyはN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルとアミノ酸のフラグメント縮合法により合成した²¹⁾。アミノ酸とのカップリングの過程ではラセミ化を防ぐため、活性エステルのN端をo-ニトロフェニルスルフェニル基(Nps-基)により保護した。Gly-L-Phe-Glyを例にとりその合成スキームを図3-10に示す。図中、[A-1]などと示した個々の合成操作は第5章 実験と測定([5-2-1])を見られたい。

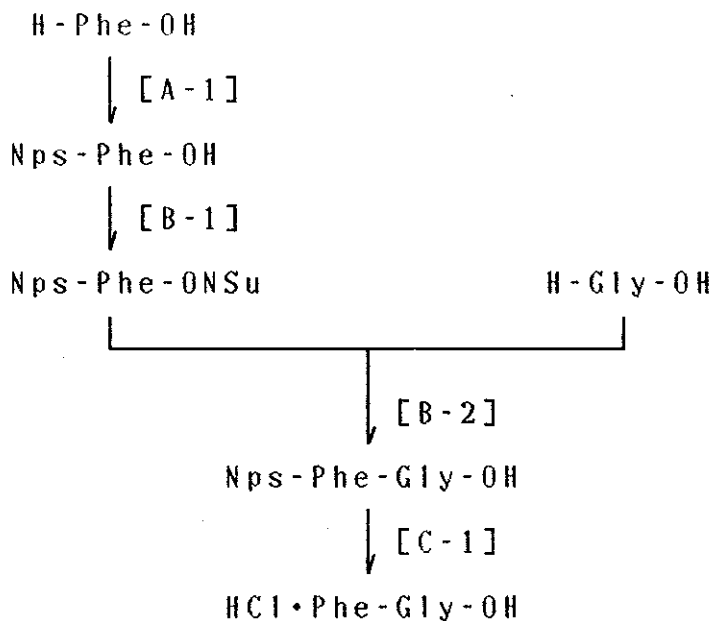
グリシルグリシン塩酸塩(Gly-Gly·HCl)結晶は(株)東京化成から購入したグリシルグリシンを等モルの塩酸水溶液に溶かし、空气中で水分をゆっくりと蒸発させることにより得た。グリシル-L-フェニルアラニン-pトルエンスルホン酸塩(Gly-Phe·TsOH)結晶は等モルのグリシル-L-フェニルアラニンとp-トルエンスルホン酸を少量の氷酢酸に溶解し、酢酸エチル雰囲気下に放置することによって得た(蒸気拡散法)。

[表3-1] ポリグリシン及びびグリシン残基を含むオリゴペプチドの
¹³C CP-MAS NMR 化学シフト(±0.2ppm)と構造パラメーター

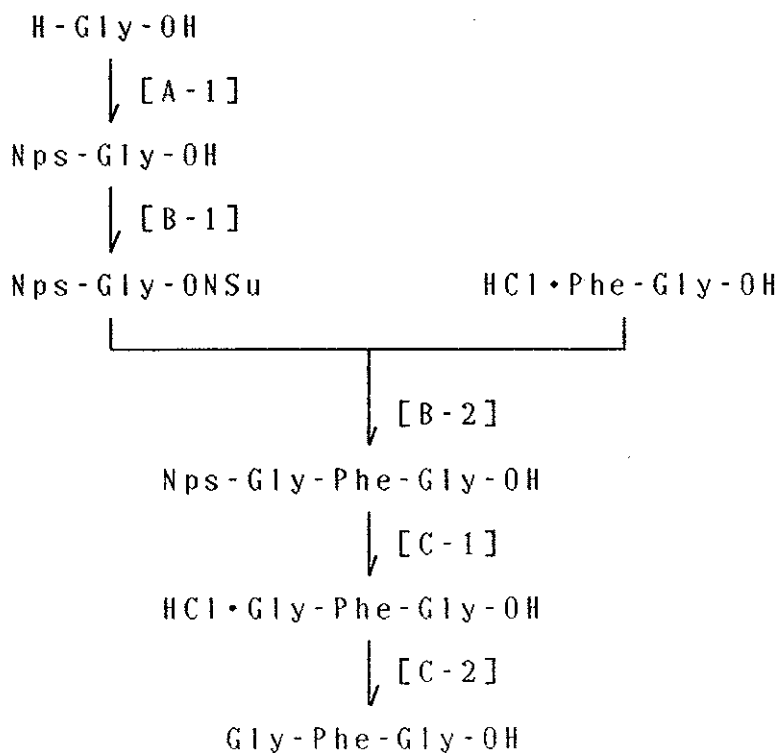
sample ^a	type ^b	¹³ C chemical shift, δ/ppm	H bond length/Å			H bond angle/deg		dihedral angle ^d /deg		ref
			N··O	H··O	C=O··N	N-H··O	φ	ψ		
			N··O	H··O	C=O··N	N-H··O	φ	ψ		
(Gly*) _n II	1	172.8 ^c	2.73	1.84	158.6	146.2	-78.0	145.8		
Gly-Gly*-L-Val	1	171.1	2.78	1.72	138.3	173.7	-77.1	-22.3		
ClAc-Gly*-Gly	1	170.5	2.82	2.13	160.2	147.4	-74.5	154.1		
L-Pro-Gly*-Gly	1	170.0	2.84	2.21	157.0	151.9	-71.3	167.1		
L-Ala-Gly*-Gly	1	170.2	2.93	2.09	152.3	165.8	-83.2	169.4		
(Gly*) _n I	1	169.5 ^c	2.95	2.16	149.2	132.8	146.5	-149.9		
Gly*-Gly	1	168.5	2.97		157.2			152.8		
Gly*-L-Phe-Gly	1	168.1	3.00	2.21	161.8	163.7		127.6		
Gly*-DL-Thr	1	167.8	3.02	2.11	161.2	157.8		-175.0		
Gly*-L-Thr-2H ₂ O	1	168.3	3.05		147.4			-168.7		
L-Val-Gly*-Gly	1	169.1	3.05	2.19	156.6	152.4	-155.1	154.7		
Sar-Gly*-Gly	1	168.6	3.06	2.23	135.0	167.1	72.1	-17.4		
Gly*-Gly·HNO ₃	1	166.5	3.12	2.38	161.8	164.6		148.9		
DL-Leu-Gly*-Gly	2	167.0	2.74		170.5		-167.5	-172.3		
Gly*-DL-Phe	2	167.5	2.83	2.28	172.8	115.3		-160.3		
Gly*-L-Phe·HCl·H ₂ O	2	168.4	2.83	1.93	161.7	152.8		-162.2		
Gly*-Phe·TsOH	2	169.8	2.92		139.5			-179.0		
Gly*-Gly-Val	2	170.9	2.99	2.62	109.9	100.9		-155.8		

[図 3 - 10] [Gly-L-Phe-Gly-OHの合成スキーム]

☆ HCl・Phe-Gly-OHの合成



☆ Gly-Phe-Gly-OHの合成



[3-2-2] 固体高分解能¹³C-NMRの測定

¹³C CP-MAS NMRは(株)日本電子製GX-270(67.80MHz)およびBruker社製MSL-400スペクトロメーター(100.63MHz)を用い、室温にて測定を行った。スピニングサイドバンドによる信号の重なりを防ぐため必要に応じてTOS(Suppression of Side Bands)のパルスシーケンスを用いた。実験条件はそれぞれ、プロトンデカップルのための磁場強度;1.2mT,1.5mT、コンタクトタイム;2ms,1ms、繰り返し時間;5s,4s、スペクトル幅;27.0KHz,31.3KHz、データポイントはともに8Kである。試料はパレットタイプ(GX-270)またはシリンダータイプ(MSL-400)のローターにつめ3~4KHzで回転させた。スペクトルは通常、十分なS/N比が得られるまで100~3000回積算し、化学シフトはアダマンタンの高磁場側ピークを外部基準(29.5ppm)としてTMS基準の値に換算した。

§ 3 - 3 結 果 と 考 察

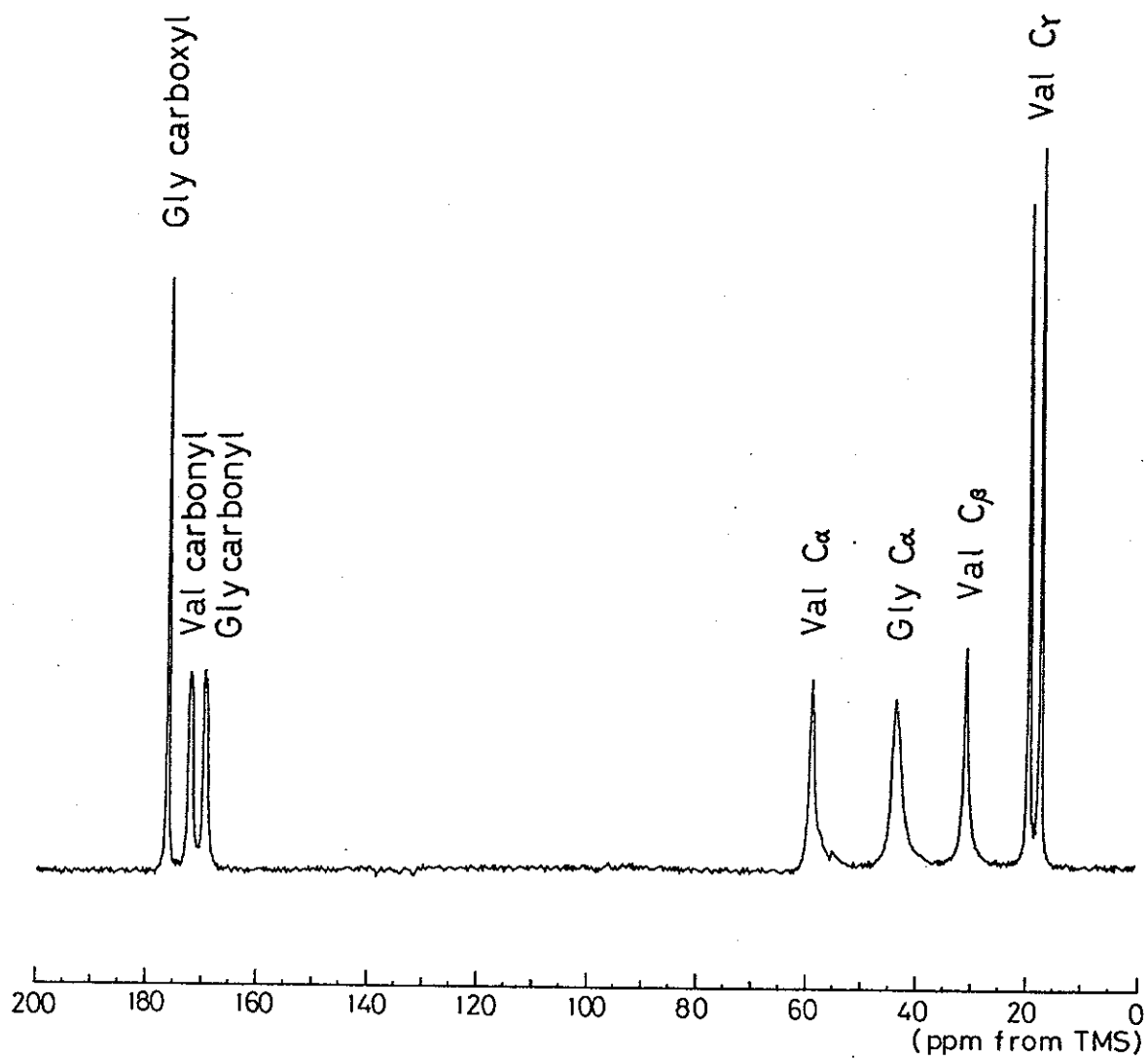
[3-3-1] 低分子量ペプチドにおける

グリシン残基カルボニル炭素の ^{13}C 等方平均化学シフト^{*2}

図 3 - 9 に 100.63MHz で測定された L・バリルグリシルグリシン(L・Val-Gly-Gly)の ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを示す。TOSSパルスシーケンスを併用しているためスペクトル中にスピニングサイドバンドは見られない。その他の試料のスペクトルについてもほぼ同等の分解能で測定することができた。それぞれの試料におけるグリシン残基カルボニル炭素(GlyC=O)の信号は、他の残基のカルボニル炭素よりも常に高磁場側に観測されるため³⁹⁾容易に帰属することができる。またペプチド鎖C末端のカルボキシル炭素の信号も、カルボニル炭素の低磁場側 数 ppm のところに相対的に鋭いピークとして観測されるため判別が容易である。

^{13}C CP-MAS NMR の観測によって得られたすべての GlyC=O の等方平均化学シフトを、その水素結合まわりの結晶構造パラメーターとともに表 3 - 1 に示す。ここにまとめた「構造パラメーター」は研究者による定義の違いや論文中での計算の誤りを正すため、原報にある結晶格子と原子座標に基づいて再度計算したものである⁴⁰⁾。表中にある水素結合角の定義は図 3 - 11 に示す。序論でも述べたように、本章のねらいはポリペプチドで観測された「化学シフトのコンホメーション依存性」の原理を探る

*2. 本章(第3章)では第2章で観測の対象とした「化学シフトテンソルの主値」は測定の性質上扱っていない。そのため特に断わらない限り、この「結果と考察」で「化学シフト」と称しているのは CP-MAS NMR から得られる「等方平均化学シフト」のことである。

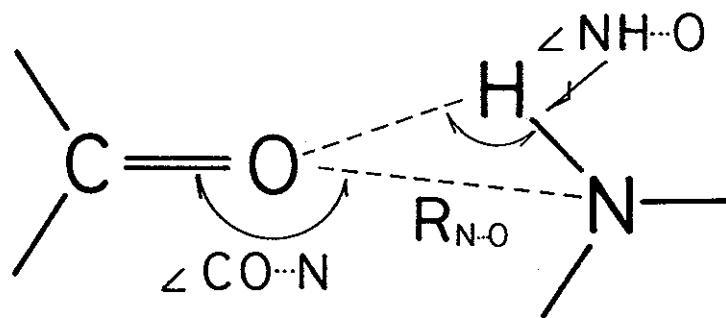


[図3-9] Val-Gly-Gly-OHの100.63MHz ^{13}C CP-MAS NMRスペクトル

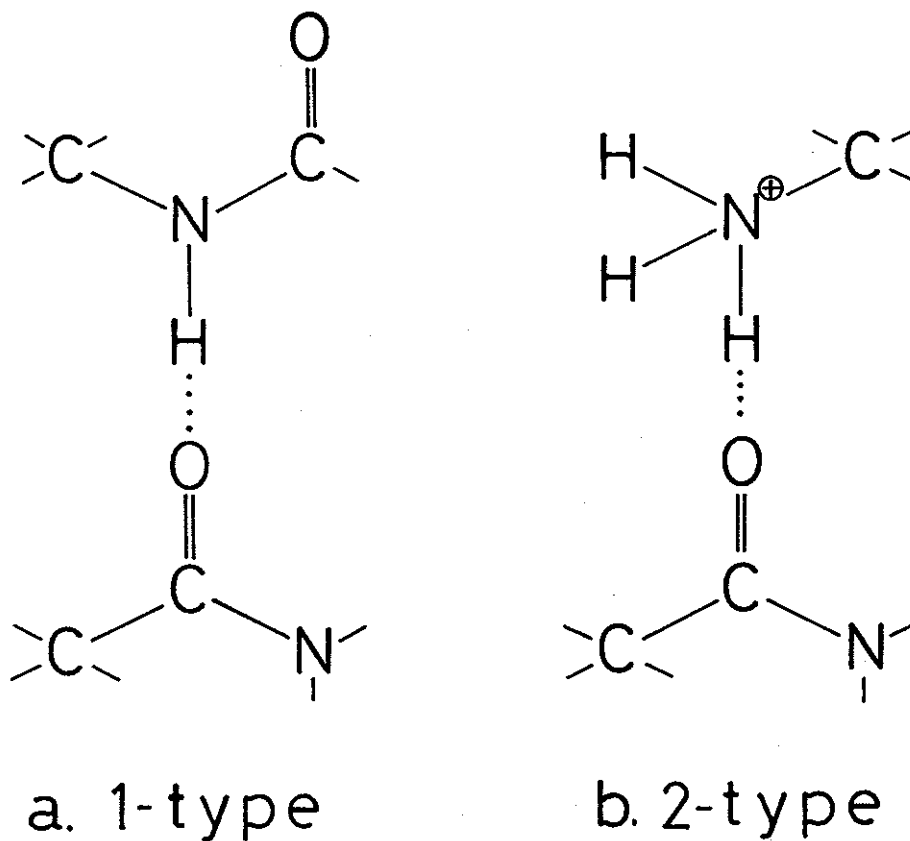
ことにあるので、観測対象としたペプチドは、その GlyC=O がポリペプチドと同じ $\text{>C=O}\cdots\text{H-N}<$ 型の分子間水素結合を結晶中で形成しているものとした。ポリペプチドでは C 末端にあるカルボキシル基の存在は無視しうるため、ここでもペプチドのカルボキシル C=O は観測の対象としない。また、ポリペプチド結晶中に見られる水素結合には、分子間のもの (β -シート, 3_1 -ヘリックス) のほかに、分子内のもの (α -ヘリックス, ω -ヘリックス) も存在するが、低分子量ペプチドの結晶中に見られる分子内の水素結合には構造的に歪んだものが多いため、ここでは 分子間で水素結合を形成し、かつ構造的に歪んでいないもの (水素結合角が比較的大きく、直線性の良いもの) を試料として選択した。

ここで使用した結晶構造のデータはその一部を除いて単結晶の X 線回折より得られたものであるため、水素原子の位置にはかなりの測定誤差が含まれているものと考えられる。よって本研究では今後、「水素結合距離」 の定義として 「 $\text{N}\cdots\text{O}$ 間距離」 ($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$) を、「水素結合角」 の定義として $\angle\text{CO}\cdots\text{N}$ を採用することにする。

図 3-12 に低分子量ペプチドの結晶中に存在する 2 種類の水素結合の様子を模式的に示す。ポリペプチドの結晶中で形成される水素結合はアミド C=O 基とアミド N-H 基の間に限られるが、低分子量ペプチドの結晶中にはアミド基 >C=O が水素結合する相手の“プロトドナー”として、アミド基 >N-H のほかアミノ基 $\text{>N}^+-\text{H}$ とカルボキシル基 $-\text{O}-\text{H}$ が存在し、それぞれの水素結合が互いに異なった電子構造をもっていると考えられる。



[図3-11] $>C=O \cdots H-N<$ 型水素結合系における
水素結合長; R_{N-O} , 水素結合角 $\angle CO \cdots N$ と $\angle N-H \cdots O$

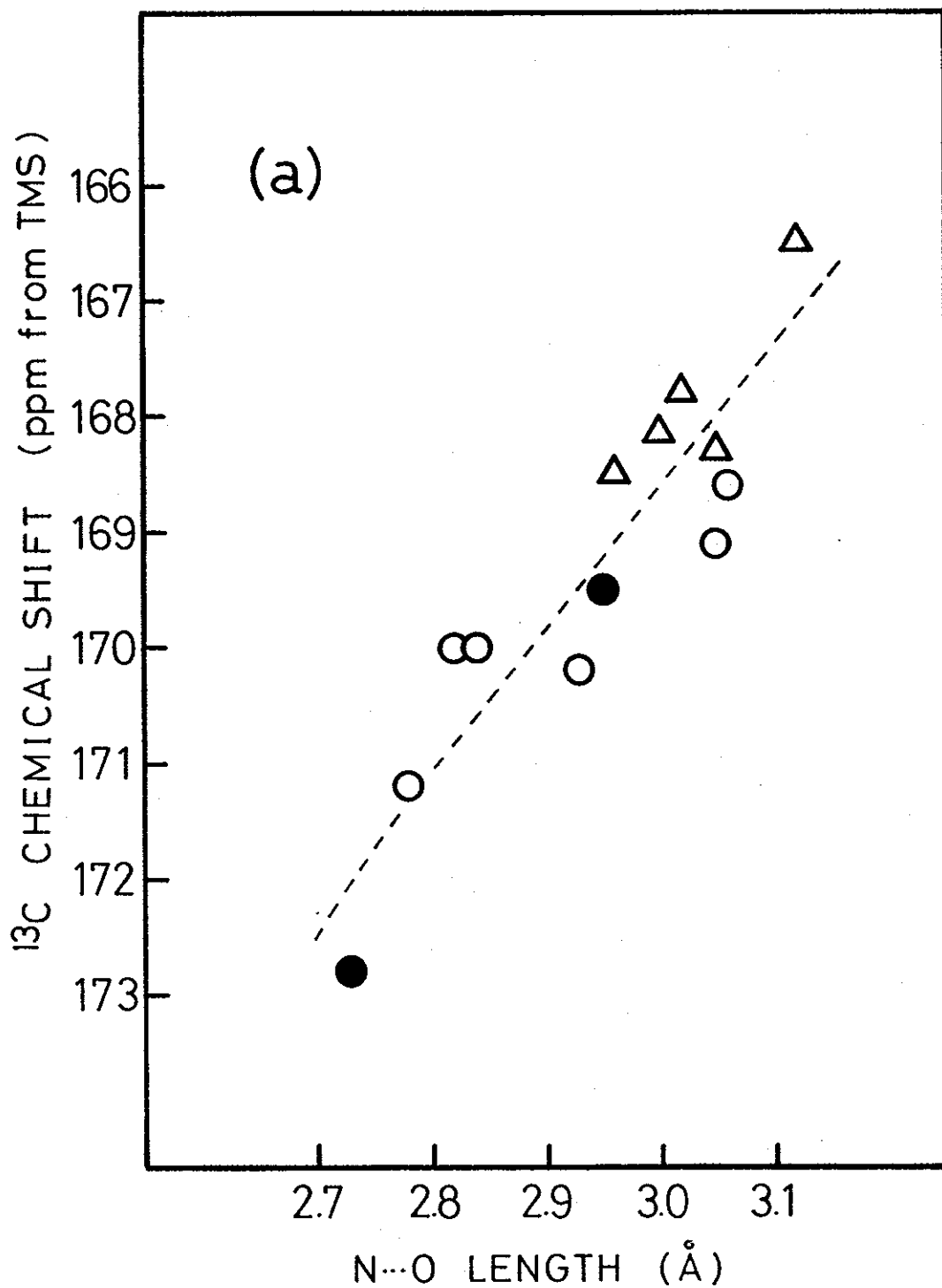


[図3-12] オリゴペプチド結晶中に見られる2種の水素結合
(a) 「1型」 ($>C=O \cdots H-N<$)
(b) 「2型」 ($>C=O \cdots H-N^+<$)

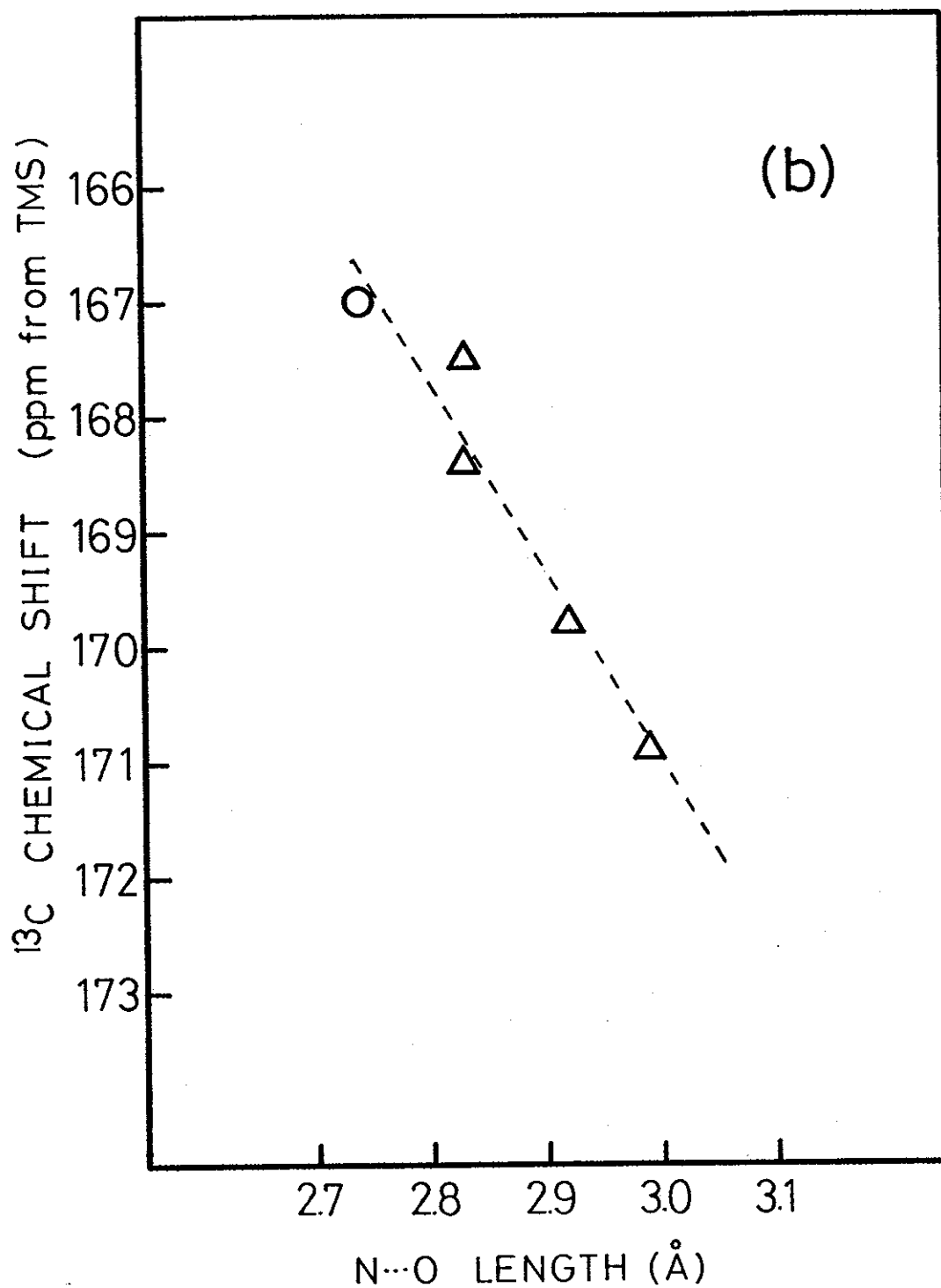
まず「1型」と名付けたのが、固体ポリペプチド中に見られるものと同じアミドC=O,アミドN-H間の水素結合で、これはポリペプチドの水素結合と局所的に等しい電子構造をもっていると予想される。一方、「2型」はアミドC=OがペプチドN末端のアミノ基-NH₃⁺と水素結合したものである。N端やC端が保護されていないペプチドは結晶中で「両性イオン」として存在するため、N端アミノ基は-NH₃⁺に、C端カルボキシル基は-COO⁻にイオン化している。そのため「2型」はオリゴペプチド中のみ見られ、ポリペプチド中には見られない。

図3-13,14 に¹³C CP-MAS NMRにより観測されたGlyC=Oの等方平均化学シフトと結晶中の水素結合距離(R_{N...O})との関係を、水素結合の「1型」と「2型」に分けて示す。ここに見るように水素結合のプロトンドナー(>N-H)の電荷の状態によってGlyC=Oの化学シフト挙動は全く異なった傾向を示す。(図中、△はN端にあるグリシン残基のGlyC=O、○はN端から2番目のグリシン残基のGlyC=O、●はポリグリシンのGlyC=Oを指している。)

「1型」ではR_{N...O}の減少がGlyC=O化学シフトの低磁場シフトを引き起こし、R_{N...O}と等方平均化学シフトの間には直線に近い関係が成立している。ここでGlyC=Oの化学シフト変化は6ppmにわたり、固体ポリペプチド中でこれまでに観測されたGlyC=O化学シフトのすべての範囲をカバーしている。このことはGlyC=Oの化学シフトが、「狭義のコンホメーション効果」ではなく、水素結合距離に代表される「水素結合効果」によって決定されていることを意味している。更に重要なことは、ポリペプチ



【図3-13】 「1型」水素結合系における水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ とグリシン残基カルボニル炭素の ^{13}C CP-MAS NMR 化学シフト (●ポリグリシン, ○第2残基, △第1残基のGlyC=O)



[図3-14] 「2型」水素結合系における水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ とグリシン残基カルボニル炭素の ^{13}C CP-MAS NMR 化学シフト (O第2残基, Δ第1残基のGlyC=0)

ド(ポリグリシン Form I と Form II)の GlyC=O 化学シフトがペプチド 2 量体や 3 量体の GlyC=O とほぼ同様の水素結合距離依存性を示していること(どちらも同一の直線上にのっている)で、これは GlyC=O が「1 型」の水素結合を形成している場合、その化学シフトが「分子量」にはあまり影響されないことを意味している。水素結合の形成が GlyC=O 化学シフトを低磁場側へシフトさせ、かつこの効果が支配的であるという事実は、前章の「結果と考察」で議論したポリペプチド中に巻き込まれたグリシン残基の化学シフト挙動に関する考察の結果と結びつく。

また、このことは序論で紹介した「ゴージュ効果」による「コンホメーション依存化学シフト」の説明が、GlyC=O に対して有効でないことを意味している。ポリグリシン Form I と Form II の二面角 ϕ はそれぞれ -150° と -78° であり、Form II においては、カルボニル炭素同士はゴージュと言えないまでも Form I に比べて近接した位置にある。ゴージュ効果に依ればこれは Form II の相対的な高磁場シフトを意味するはずだが、結果は 3.3 ppm の相対的な低磁場シフトである。オリゴペプチドにおいても同様に、 $\phi = -70^\circ$ 近傍の GlyC=O は総じて低磁場側に現れている。

また、オリゴペプチドとポリペプチドの間、ペプチド 2 量体と 3 量体の間で、GlyC=O 化学シフトの水素結合距離依存性に大きな差が見られず、「高分子性」や「分子量依存性」が現れなかったことは、「NMR 化学シフト」という物理量が比較的ローカルな電子構造を反映し、分子量が問題となるような長距離の相互作用には敏感でないことを示している。このことより「化学シフト」は、「双極子-双極子相互作用」や「双極子-四重極

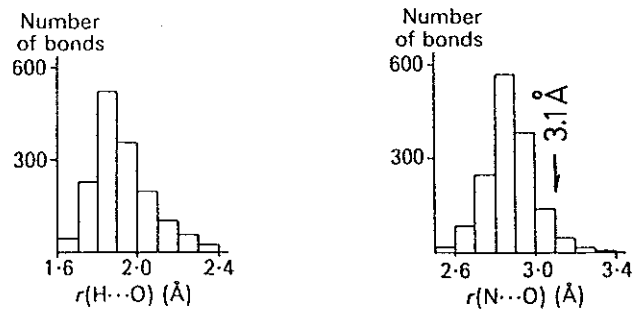
子相互作用」ほどは局所的でなく、しかし全エネルギーやイオン化ポテンシャルのようには広範でない「中程度にローカルな」分子の電子構造を反映していることが理解される。

表3-1中の水素結合角($\angle C=O \cdots N$ と $\angle N-H \cdots O$)を見れば明らかのように、「1型」の水素結合の多くは直線形からやや外れた形をとっており、 $>N-H$ 基はまっすぐに $>C=O$ の方向を向くのではなく酸素原子の非共有電子対に沿った向きに傾いている。Taylorら⁴¹⁾は1357種の $>C=O \cdots H-N<$ 型水素結合についてその結晶構造をまとめ、どちらの角も $120 \sim 130^\circ$ にその平均があると報告しているが、本章で対象とした試料では約 150° に $\angle C=O \cdots N$ の平均があり、データは比較的狭い範囲に分布している。そのためここで観測された等方平均化学シフトの挙動には水素結合の「角度の効果」は現れておらず、「距離の効果」が大きく効いていると考えることができる。またN端にあるグリシン残基のGlyC=Oは、2番目の残基のGlyC=Oよりも相対的に高磁場側に出現しているが、両者がほぼ同一の直線上に乗っていることから、この化学シフト差はシーケンスの効果ではなく、水素結合の距離の差によるものであると考えることができる。

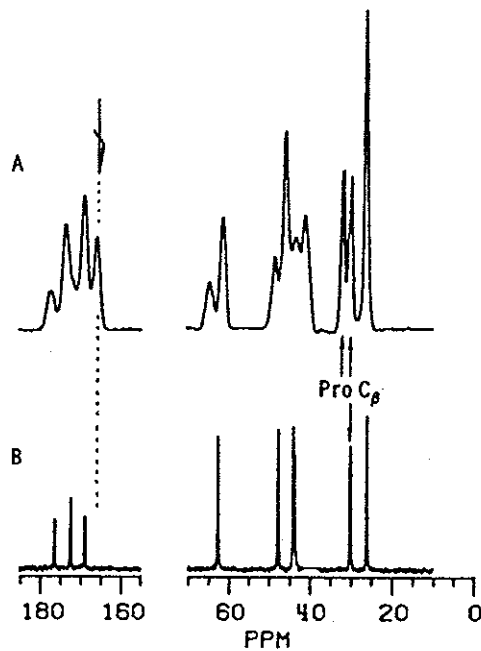
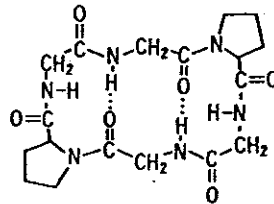
前述のように今城ら¹⁴⁾は、分子内および分子間の $>C=O \cdots H-O<$ 型水素結合がカルボニル炭素の低磁場シフトを引き起こすことを報告している。ここでの結果は、水素結合の形成とその距離の短縮が、 $>C=O \cdots H-O<$ 型の水素結合と $>C=O \cdots H-N<$ 型の水素結合で同一の効果(カルボニル炭素の低磁場シフト)をもたらすことを明らかにしている。

また前章の考察で触れたように、齊藤ら⁴²⁾は水素結合の不在によって $[Ala-Gly-Pro]_n$ と $[Pro-Gly-Pro]_n$ の $GlyC=O$ が $[Gly]_n$ II よりも 4.1 ~ 5.1 ppm 高磁場へシフトすることを報告しているが、図 3-11 に示した結果はこの実験事実を良く説明している。齊藤らの報告によれば水素結合に全く関与していないと考えられる $[Pro-Gly-Pro]_n$ の $GlyC=O$ が 167 ppm (from TMS) の化学シフトを示すことから、同じく 166.5 ppm を示す $Gly-Gly \cdot HNO_3$ 第 1 残基の $GlyC=O$ も事実上水素結合は形成しておらず、このペプチドにおける $R_{N \cdots O} = 3.12 \text{ \AA}$ は水素結合効果がほとんど消える距離と考えることができる。Kennard ら⁴¹⁾ の集計によれば、 $R_{N \cdots O} = 3.1 \text{ \AA}$ 以上の水素結合は全体の 5% 程度であり (図 3-15)、この型の水素結合距離の限界とはほぼ一致している。また、Opella らは、²⁰⁹⁾ $Cyclo(Gly-Pro-Gly)_2$ の NMR を溶液と固体で測定し、固体のカルボニル領域 (高磁場側) に新たなピークが出現したことを報告している (図 3-16)。この環状ペプチドは、溶液中では 2 つの分子内水素結合を形成し、ほぼ対称形の構造をとっているが、結晶中では一方の分子内水素結合が切れて非対称の構造となることから、溶液の NMR および X 線回折より確認されている。結晶化にともなうコンホメーション変化は $ProC\beta$ の信号が固体で 2 本に分裂していることにも現れている。Opella らは言及していないが、溶液中と結晶中でのグリシン残基の ϕ には大きな違いが見られないため、この新しいピークは水素結合から自由になった $GlyC=O$ のシグナルであると考えられる。

一方、「2型」の水素結合では $R_{N \cdots O}$ の減少が $GlyC=O$ 化学シフトを高磁場側へシフトさせており、「1型」の水素結合とはまったく反対の



[図3-15] 1509個の $>C=O \cdots H-N<$ 型水素結合系における水素結合距離; $R_{H \cdots O}$ と $R_{N \cdots O}$ の分布 (41)



[図3-16] cyclo[Gly-Pro-Gly]₂ の
 (A) 38MHz ¹³C CP-MAS NMR スペクトル
 (B) DMSO/d₂O 溶液スペクトル

傾向となっている。「1型」と「2型」の間に立体構造の大きな違いは見られないので、この差はやはりプロトドナーのイオン化状態に起因する水素結合近傍の電子構造の違いに帰せられるものであろう。水素結合に関与する官能基の種類によって、水素結合効果の現れる方向が逆転する現象は、溶液の ^{15}N NMR化学シフトですでに報告されているが、 ^{15}N の例は観測される窒素核そのものの化学的性質を反映したものであり、“水素結合の相手”の電子状態を反映してまったく反対の挙動を示す系は、これが初めてである。

イオン化したアミノ基 $>\text{N}^+-\text{H}$ とアミド基 $>\text{N}-\text{H}$ はどちらも水素結合のプロトドナーとなりうるが、アミノ基の窒素が正に帯電しているのに対し、アミド基の窒素には隣接するカルボニル基の π 電子が大きく流れ込んで核上の電荷分布が負に片寄っている(よく知られるようにペプチド結合が自由に回転できず、cisあるいはtransだけが許されるのはこの理由による)。「1型」の水素結合がアミド-アミド系に形成されると、一般に次のような分極が現れる。



 *3. ^{15}N の化学シフトは、溶液中で水素結合を形成することにより、様々な挙動を示すことが知られている⁴⁵⁾。

1. N核がプロトンアクセプターとなる場合、

• Nが2重あるいは3重結合をし、非共有電子対が π 電子系に関与していない時(例:ニトリル)、また芳香環に隣接し、非共有電子対が局在化している時(例:アニリン) ……高磁場シフト

• Nが飽和結合状態の時(例:トリメチルアミン) ……低磁場シフト

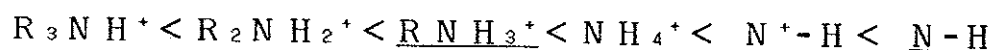
2. N核がプロトドナーとなる場合(例:メチルアミン)

……低磁場シフト

3. 分子内に酸素があり、その酸素が水素結合した場合、

アニリン型窒素は低磁場シフト、ピリジン型窒素は高磁場シフト

一方、「2型」の水素結合ではすでにN核上に正電荷があるので、H-N < に分極は現れず、水素結合の形成にともなって正電荷がH原子上に流れ込み、結果としてアクセプターの >C=O には「1型」に比べてより強い分極が現れると考えられる。この点に関して梅山ら⁴³⁾は、非経験的分子軌道法をもちいた理論計算により、カルボニル酸素上の部分的な負電荷が水素結合の強さを決める上で重要であると指摘している。水素結合の形成には静電相互作用や分極相互作用のほかに交換斥力や電荷の非局在化も重要な役割を果たしている⁴⁴⁾が、単純な電子論による定性的な議論だけからでも「2型」の水素結合が「1型」より強いことは予想される。このことは前述のTaylorら⁴¹⁾による統計的研究で、水素結合距離(H...O間距離)が、次の順序で長くなってゆく(つまり水素結合は弱くなって行く)ことと一致している。



「1型」と「2型」の2つの水素結合系における電子構造の差を単純化して示すと以上のようになるが、¹³Cの化学シフトを構成する成分のうち、電荷分布に依存する「反磁性項」の変化は常に小さな寄与しか持たないため、このような電子論的な考えで「¹³C化学シフトの水素結合効果」の差異を議論することは困難である。従って本章で観測された測定結果の意味を理解するためには、やはり量子化学的な手法による化学シフトの考察を行う必要がある。分子軌道法を用いた磁気遮蔽定数の計算による水素結合系の電子構造に関する議論は第6章で行う。

図3-11に見られるように「1型」の水素結合では、データ点のばらつ

きがやや大きい。これはグリシン残基の「狭義のコンホメーション効果」およびX線回折とCP-MAS NMRの測定誤差を反映しているものと思われる。また、より大きな分布が角 $\angle C=O \cdots N$ に存在するにもかかわらず、図3-12に見る「2型」の水素結合は「1型」に比べてデータのばらつきが少ない。グリシン残基のねじれ角 ψ の分布が「1型」よりも「2型」ではるかに小さいことは、GlyC=O化学シフトにおよぼす水素結合の効果において、ペプチド主鎖の「狭義のコンホメーションの効果」が「水素結合の角度の効果」よりいくらか重要であることを示唆している。このことは第2章で、ポリペプチドに巻き込まれたGlyC=Oの等方平均化学シフトが単純な水素結合距離の依存性を示さなかったことに対応している可能性がある。「2型」において水素結合の角度依存性が小さいことは、プロトンドナーであるアミノ基がイオン化して窒素原子上の非共有電子対が非局在化し、電子分布の異方性(つまりは水素結合の方向依存性)が大きく減少したためと解釈することができる。

§ 3 - 4 ま と め

1. 様々な水素結合距離をもつオリゴペプチドの等方平均化学シフトを観測することにより、グリシン残基カルボニル炭素(GlyC=O)に対する水素結合の効果をはば選択的に評価することができた。 $>C=O$
 $H-N<$ 型の水素結合を形成しているGlyC=Oの化学シフトに対する水素結合距離の効果は、結合の相手であるプロトンドナーのイオン化

状態によりまったく反対の挙動を示す。「1型」と名付けた通常のポリペプチドに見られる水素結合では、水素結合距離の減少は低磁場シフトを引き起こすが、正にイオン化したアミノ基をプロトドナーとする「2型」では、距離の減少が高磁場シフトを引き起こす。

2. 水素結合が GlyC=O の化学シフトにおよぼす効果は、水素結合の「距離の効果」が大きく、「コンホメーションの効果」や「角度の効果」は相対的に小さい。特に「2型」の水素結合において、水素結合の角度は GlyC=O 化学シフトにほとんど影響を与えない。
3. NMRのパラメーターの一つである「化学シフト」は、「カップリングの相互作用」と異なり、「水素結合」や「コンホメーション」の効果が見れる程度の広い範囲の電子構造を反映している。しかし、ここには「高分子性」や「分子量依存性」は見られず、分子全体から見ればローカルな電子構造を反映している。このことは ^{13}C の化学シフトによって分子の局所的な立体化学構造を探ることの妥当性を支持している。

なお、本章で述べた研究内容は以下の報文として発表いたしました。

Ando, S.; Ando, I.; Shoji, A.; Ozaki, T.

J. Am. Chem. Soc. 110, 3380 (1988)

参考文献 >

- 1) Fraser, R.D.B.; MacRae, T.P. "Conformation in Fibrous Proteins"
Academic Press, New York (1973) Chap.9-17
- 2) Murthy; A.S.N.; Rao, C.N.R. Appl.Spectr.Rev. 2, 69 (1968)
- 3) Hadzi, D. Pure.Appl.Chem. 11, 435 (1965)
Zeegers-Huyskens, T. Ind.Chim.Bel. 33, 4018 (1968)
- 4) Pople, J.A.; Schneider, W.G.; Bernstein, H.J. "High Resolution Nuclear
Magnetic Resonance", McGraw-Hill New-York (1959)
- 5) Wuthrich, K. "NMR in Biological Research; Peptides and Proteins",
North-Holland (1976)
- 6) • Maciel, G.E.; Ruben, G.C. J.Am.Chem.Soc. 85, 3903 (1963)
• Urry, D.W.; Mitchell, L.W.; Ohnishi, T. Proc.Matl.Acad.Sci.U.S.A.
71, 3265 (1974)
• Bartmann, B.; Debar, C.M.; Blout, E.R. J.Am.Chem.Soc. 99, 1028 (1977)
• London, R.E.; Stewart, J.M.; Cann, R.E.; Matwiyoff, N.A. Biochemistry
17, 2271 (1978)
• Asakura, T.; Kamio, M.; Nishioka, A. Biopolymers 18, 467 (1979)
• Khaled, M.A.; Sugano, H.; Urry, D.A. Biochim,Biophys.Acta
577, 273 (1979)
- 7) Haeberlen, U. "Multiple Pulse Techniques in Solid State NMR"
Mag.Res.Rev. 10, 81 (1985)
- 8) Spiess, H.W. "Rotation of Molecules and Nuclear Spin Relaxation"
Springer-Verlag, Berlin (1976)
- 9) Bergund, B.; Vaughan, R.W. J.Chem.Phys. 73, 2037 (1980)
- 10) • Ditchfield, R. J.Chem.Phys. 65, 3123 (1976)
• Rohlfing, C.M.; Allen, L.C.; Ditchfield, R. J.Chem.Phys.
79, 4958 (1983)
- 11) Jeffrey, G.A.; Yeon, Y. Acta.Cryst. B42, 410 (1986)
- 12) Griffin, R.G.; Pines, A.; Pausak, P.; Waugh, J.S. J.Chem.Phys.
63, 1267 (1975)
- 13) Kempf, J.; Spiess, H.W.; Haeberlen, U.; Zimmermann, H.
Chem.Phys. 4, 269 (1974)
- 14) • Imashiro, F.; Maeda, S.; Takegoshi, K.; Terao, T.; Saika, A
Chem.Phys.Lett. 92, 642 (1982)

- Imashiro, F.; Maeda, S.; Takegoshi, K.; Terao, T.; Saika, A
Chem. Phys. Lett. 99, 189 (1983)
- 15) Schroeter, B.; Rosenberger, H.; Hadzi, D. J. Mol. Struct. 96, 301 (1983)
- 16) Takegoshi, K.; Naito, A.; McDowell, C. A. J. Mag. Res. 65, 34 (1985)
- 17) Ando, I., Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T. Macromolecules
17, 457 (1984)
- 18) 第2章 ref. 1)を見られたい。
- 19) Wagner, G.; Pardi, A.; Wuethrich, K. J. Am. Chem. Soc. 105, 5948 (1983)
- 20) Fisher, E. Chem. Bull. 37, 2486 (1964)
- 21) • Zervas, L.; Borovas, D.; Gazis, E. J. Am. Chem. Soc. 85, 3660 (1963)
• Wuensch, E. "Synthese von Peptiden" Georg Thieme, Stuttgart (1974)
• 泉屋信夫, 加藤哲夫 他 "ペプチド合成の基礎と実験" 丸善(東京) (1985)
- 22) Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V.; Ramakrishnan, C.
Biochim. Biophys. Acta 112, 168 (1966)
- 23) Lalitha, V.; Subramanian, E.; Border, J. Int. J. Peptide Protein Res.
24, 437 (1984)
- 24) Rao, S. T. Cryst. Struct. Commun. 2, 257 (1973)
- 25) Lalitha, V.; Subramanian, E.; Parthasarathy, R. Int. J. Peptide Protein
Res. 27, 223 (1986)
- 26) Lalitha, V.; Subramanian, E.; Parthasarathy, R. Ind. J. Pure Appl. Phys.
23, 506 (1985)
- 27) Lotz, B. J. Mol. Biol. 87, 169 (1974)
- 28) Biswas, A. B.; Hughes, E. D.; Sharma, B. D.; Wilson, J. N. Acta Cryst. B24,
40 (1968)
- 29) Marsch, R. E.; Gluster, J. P. Acta Cryst. 14, 1110 (1961)
- 30) Swaminathan, P. Acta Cryst. B31, 1608 (1975)
- 31) Yadaba, V. S.; Padmanabhan, V. M. Acta Cryst. B29 (1973)
- 32) Lalitha, V.; Murali, R.; Subramanian, E. Int. J. Peptide Protein Res.
27, 472 (1986)
- 33) Gluster, J. P.; Carrel, H. L.; Berman, M.; Gallen, B.; Peck, R. M.
J. Am. Chem. Soc. 99, 595 (1977)
- 34) Rao, S. N.; Parthasarathy, R. Acta Cryst. B29, 2379 (1973)
- 35) Goswami, K. N.; Yadaba, V. S.; Padmanabhan, V. M. Acta Cryst. B33,
1280 (1977)
- 36) Marsh, R. E. Acta Cryst. B32, 66 (1976)

- 37) Cotrait, P.M.; Barrans, Y. Acta Cryst. B30, 1018 (1974)
- 38) VanderVeen, J.M.; Low, B.W. Acta Cryst. B28, 3548 (1972)
- 39) Howarth, O.W.; Lilley, D.M. Prog.NMR Spect. 12, 1 (1977)
- 40) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 1969
"Abbreviation and symbols for the description of the conformation of polypeptides chains" Biochemistry 9, 3471 (1970)
- 41) Taylorらは1500以上におよぶX線と中性子線回折による分子の結晶構造を検討しなおし、 $>C=O \cdots H-N<$ 型水素結合の立体配置を統計的に整理した。
• Taylor, R.; Kennard. Acc.Chem.Res. 17, 320 (1984)
• Taylor, R.; Kennard.; Versichel, W. J.Am.Chem.Soc. 105, 5761 (1983)
• Taylor, R.; Kennard.; Versichel, W. J.Am.Chem.Soc. 106, 244 (1984)
• Taylor, R.; Kennard.; Versichel, W. Acta Cryst. B40, 280 (1984)
- 42) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T.
Biopolymers 23, 2279 (1984)
- 43) Umeyama, H.; Morokuma, K. J.Am.Chem.Soc. 99, 1316 (1977)
- 44) Morokuma, K. Acc.Chem.Res. 10, 294 (1977)
- 45) Webb, G.A.; Witanowski, M. Proc.Indian Acad.Sci. 94, 241 (1985)

第四章 固体ポリペプチド鎖中に存在
するグリシン残基メチレン
炭素の ^{13}C NMR化学シフト
とコンホメーション

§ 4 - 1 はじめに

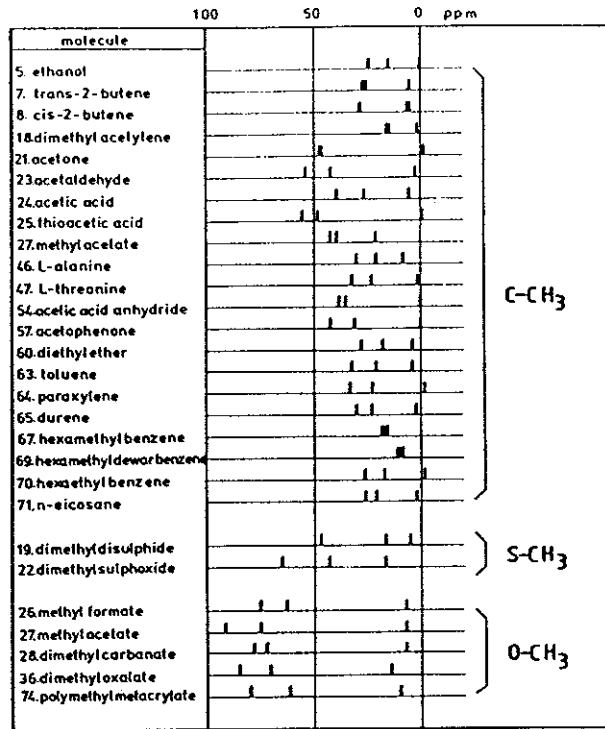
[4-1-1] メチルおよびメチレン炭素の ^{13}C NMR化学シフトテンソル

第2,第3章ではアミノ酸残基の炭素中で最も大きな化学シフト異方性を示すカルボニル炭素に注目し、グリシン残基($\text{GlyC}=\text{O}$)の等方平均化学シフトと化学シフトテンソルの挙動を観測して、そこにコンホメーション依存性を生じさせる原因を考察した。本章ではグリシン残基のもう一方の炭素であるメチレン炭素($\text{GlyC}\alpha$)に注目し、そのコンホメーション依存性について考察する。

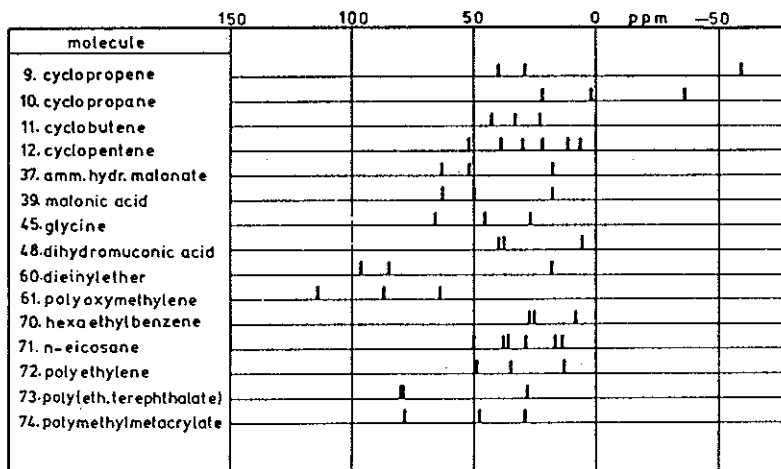
図4-1,2に各種化合物におけるメチルおよびメチレン炭素の化学シフトテンソル主値を棒スペクトルで示す¹⁾。どちらの炭素も化学シフト異方性; $(\sigma_{11} - \sigma_{33})$ がカルボキシル炭素(図2-1),カルボニル炭素(図2-2)に比べて $1/3 \sim 1/5$ とかなり小さい。

メチル炭素の化学シフトテンソルには、化合物によって σ_{11} と σ_{22} が同一のシフト値を示すものとそうでないものがある。一般にメチル炭素の最大遮蔽軸 σ_{33} は $\text{C}-\text{CH}_3$ 結合方向を向いており、メチル基は室温付近で $\text{C}-\text{C}$ 軸回りの速い回転をしているため、観測される化学シフトテンソルは軸対称($\sigma_{11} = \sigma_{22}$)であることが期待される。しかし、実際には軸対称性を示さない場合が多く、メチル基以外の分子の環境が化学シフトテンソルに影響を与えたものと考えられる。また σ_{33} の主軸がしばしば $\text{C}-\text{C}$ 方向から外れるのも、遠距離の摂動による効果である。

一方、メチレン炭素の化学シフトテンソルはメチル炭素に比べてわず



[図4-1] 各種化合物におけるメチル炭素の ^{13}C 化学シフトテンソルの主値¹⁾



[図4-2] 各種化合物におけるメチレン炭素の ^{13}C 化学シフトテンソルの主値¹⁾

かに大きな異方性を示すものの、エーテルやポリオキシメチレンのように直接酸素に結合しているものを除けば、その異方性は約35 ppm程度とやはり小さい。メチル炭素と異なりメチレン炭素には特定の軸まわりの回転運動が存在しないため、テンソルには顕著な対称性が見られないものの、 σ_{33} はやはり C_{2v} の対称軸方向(H C H平面に垂直な方向)を向いている。化学シフトの異方性が小さい割にテンソル主値の変化する幅が分子間で大きいことは、メチル炭素と同様、メチレン炭素も長距離の相互作用を受けやすいことを示している。

[4-1-2] 本章の目的

これまでのCP-MAS NMRを用いた研究により、グリシン残基の $C\alpha$ 炭素はメチレン炭素であるにもかかわらず、その化学シフトは(広義の)コンホメーション変化にほとんど影響されないことが知られている²⁾。第2章で行った測定でも、低分子量のオリゴグリシン[Gly]₅においてGly $C\alpha$ のわずかな高磁場シフト($\Delta\delta = 1.5$ ppm)が見られたものの、ポリグリシンForm I(β -シート)とForm II(3_1 -シート)のGly $C\alpha$ 化学シフトは誤差範囲内で一致した。しかしこれまでに得られたデータからのみでは、Gly $C\alpha$ があらゆるコンホメーションに対して化学シフト変化を示さない珍しい核種なのか、それともグリシン残基が通常とりうるコンホメーション(Form IとForm II)で偶然同じ化学シフト値を示したのかは、必ずしも明らかでない。

そこで本章では

- 1) 第2章と同様に、メチレン炭素を ^{13}C でラベルしたグリシン残基を、ポリグリシン Form I と Form II に巻き込ませ、また ポリ- β -ベンジル-L-アスパルテート; $[\text{Asp}(\text{OBzl})]_n$ と共重合させることにより α -ヘリックスを、その試料を熱処理することにより ω -ヘリックスをとる試料を調製して、それぞれのコンホメーションにおける GlyC α の等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの3つの主値を測定する。
- 2) それぞれの試料における等方平均化学シフト、化学シフトテンソル主値のコンホメーション変化を考察し、その結果を GlyC = 0 における変化と比較することによって、GlyC α の化学シフトがどのような相互作用を反映しているのかを検証する。また、GlyC α の化学シフトにコンホメーション依存性がまったく見られなかった場合は、その原因について考察する。

§ 4-2 実 験 と 測 定

[4-2-1] ポリ[2-¹³C]グリシン([Gly, Gly[#]]_n)および [2-¹³C]グリシン含有コポリペプチド([X, Gly[#]]_n)の合成

試料として用いたグリシン残基を含むポリペプチドは、等方平均化学シフトを高精度で測定し、また「粉末スペクトル」を観測するため、グリシン残基のメチレン炭素(GlyC α)を¹³Cで8%ラベルした。以後簡単のためにC α 炭素をラベルしたグリシン残基を[2-¹³C]Gly (Gly[#])と略記する。

GlyC α をラベルしたポリグリシンおよびコポリペプチドは、[2-¹³C]グリシンNCA(90atom%)とアミノ酸NCA(グリシンおよび β -ベンジル-L-アスパルテートのNCA)を混合し、重合反応を行った。重合方法、試料の処理方法はグリシン残基のカルボニル炭素をラベルしたポリ[1-¹³C]グリシンおよび[1-¹³C]グリシン含有コポリペプチドの場合と全く同様である。どちらも[2-¹³C]グリシンの含量は8%とし、[モノマー/開始剤]比(A/I比)を100とした。これらの重合条件は表4-1にまとめた。

上記の条件で重合した[Gly, Gly[#]]_nは β -シート(Form I)となるため、その半量をLiBr飽和水溶液に溶解し、水中で沈澱させた後、遠心分離して β -ヘリックス(Form II)の試料を得た。また α -ヘリックスをとっている[Asp(OBzl), Gly[#]]_nは、熱処理により ω -ヘリックスに転化させた。調製したすべての試料について赤外吸収スペクトルを測定し、目的のコンホーメーションをとっていることを確認した。

[4-2-2] 固体高分解能¹³C-NMRの測定

¹³C CP-MAS NMRは(株)日本電子製GX-270スペクトロメータを用い、67.80MHz、室温にて測定を行った。実験条件は第2章のカルボニル炭素をラベルしたポリペプチドの場合と同じである。

[表4-1] Synthesis and characterization of poly[2-¹³C]glycine and [2-¹³C]glycine-containing polypeptides

Sample ^{a)}	Gly content	Initiator	Solvent	A/I ratio ^{b)}	Conformation ^{c)}
[Gly,Gly*] _n	100 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	100	β-sheet
[Gly,Gly*] _n	100 %	n-BuNH ₂	CH ₃ CN	100	3 ₁ -helix
[Asp(OBzl),Gly*] _n	8 %	Et ₃ N	CICH ₂ CH ₂ Cl	100	α-helix
[Asp(OBzl),Gly*] _n	8 %	Et ₃ N	CICH ₂ CH ₂ Cl	100	ω-helix

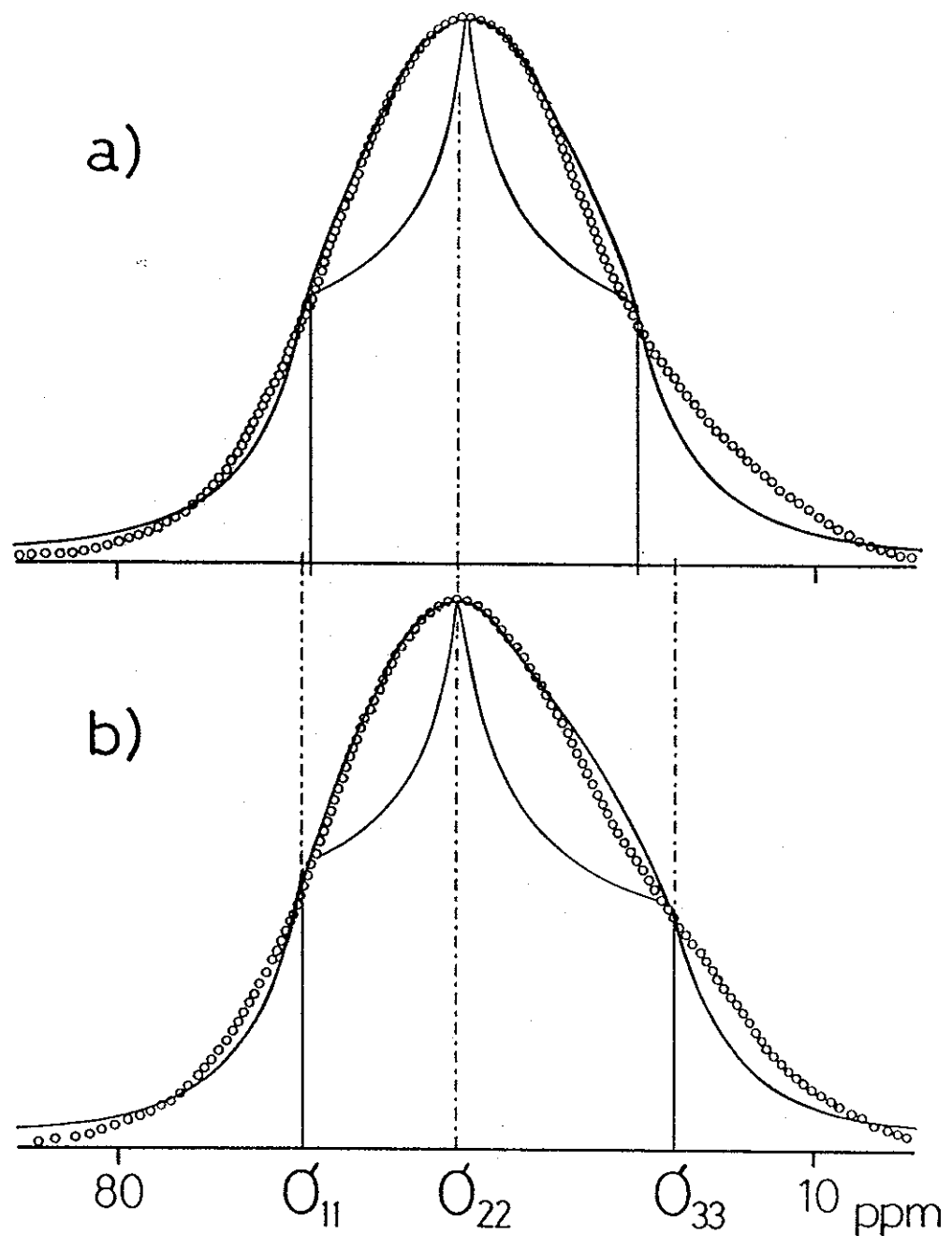
a) Symbol # indicates methylene carbon enriched by ¹³C.

b) Theoretical number-averaged degree of polymerization.

c) Determined by the conformation-dependent ¹³C NMR chemical shifts of host residues and partly by the characteristic bands in IR spectra.

[4-2-3] 粉末スペクトルの解析

化学シフトテンソルの主値を読み取るための「粉末スペクトル」の解析方法も第2章と同じである(図4-3)。実際のフィッティングでは、観測されたスペクトルの0ppmから100ppmまで(TMS基準)の約150点をデジタイザーで読み取り、パーソナルコンピュータに入力して、ベースラインの傾きの補正、シフト値の補正、強度の規格化などの処理後、CRT上で理論曲線との重ね合わせを行った。テンソルの主値の読み取りは、理論曲線の主値を変えることによりトライ&エラーで十分フィットするまで行った。NEC PC-9801F(8MHz)で1回のフィッティング曲線生成にかかった時間は約3分である。



[図4-3] 主値を読み取るための粉末スペクトルのフィッティング
 実線;ローレンツ曲線で広幅化した理論曲線
 丸線;粉末スペクトルをデジタル化して表したもの
 (a) ポリグリシン Form I, (b) Form II

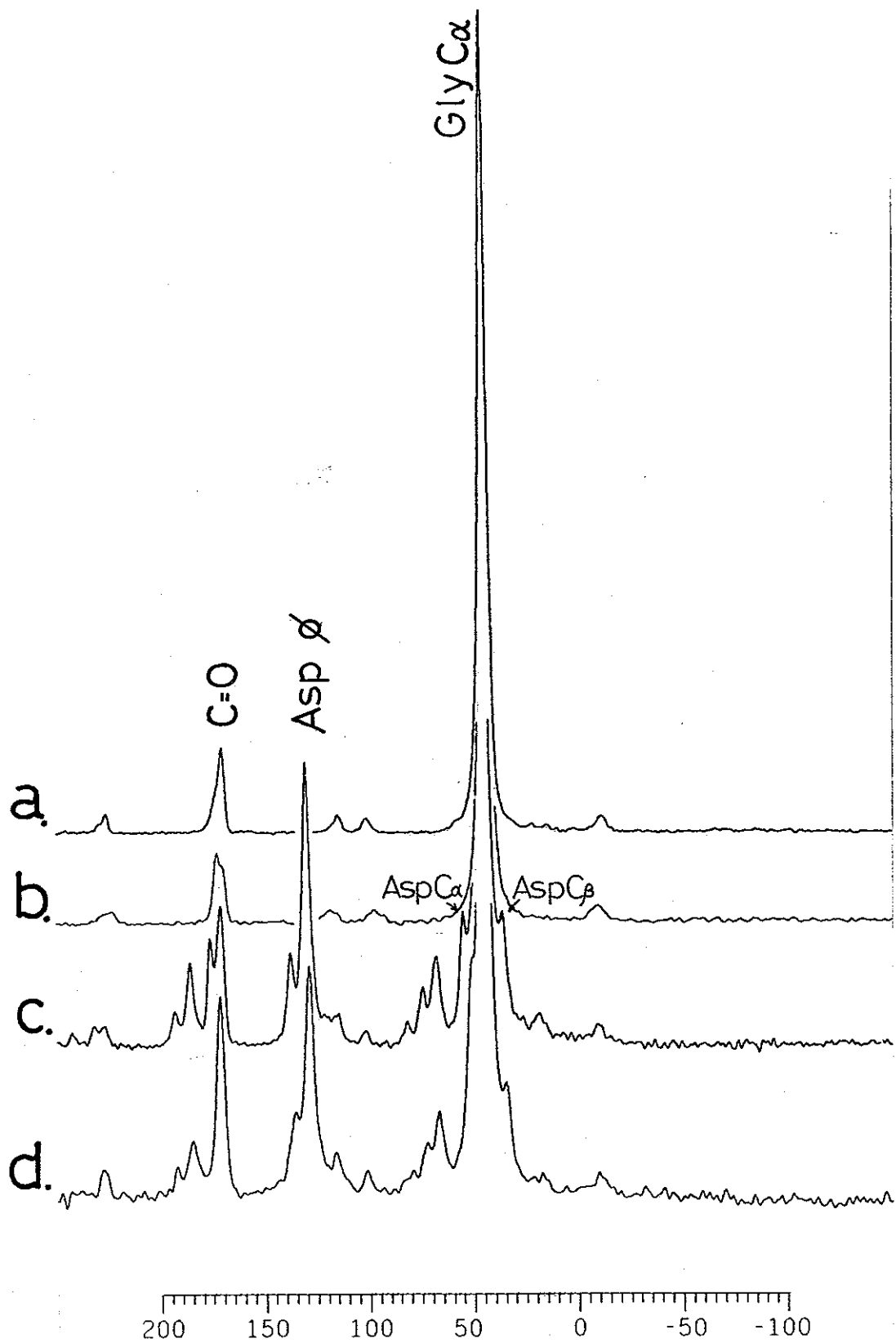
§ 4-3 結 果 と 考 察

[4-3-1] グリシン C α 炭素等方平均化学シフトのコンホメーション依存性

図 4-4 は表 4-1 で示した C α 炭素を ^{13}C でラベルしたグリシン残基を含む各種ポリペプチドの ^{13}C CP-MAS NMRの観測スペクトルであり、図 4-5 は同じ試料の粉末スペクトルである。ここから得られた等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの主値を表 4-2, 4-3、図 4-6 に示す。第 2 章で観測したグリシン残基カルボニル炭素(GlyC=O)に比べ、グリシン残基メチレン炭素(GlyC α)の化学シフト異方性; $(\sigma_{11} - \sigma_{33})$

は約 1/4 とかなり小さいが、図 4-3 に示すように、 α -ヘリックスと ω -ヘリックスの主値の差はスペクトルのフィッティングによりかなり正確に検知することができる。

GlyC=Oをラベルした[Gly, Gly*] $_n$ I (β -シート)と[Gly, Gly*] $_n$ II (3_1 -ヘリックス)の CP-MAS スペクトルでは、GlyC α が全く同じシフト位置を与えたが、信号強度が相対的に弱く十分な測定精度を得るには至らなかった。しかし、GlyC α を ^{13}C でラベルした[Gly, Gly $^{\#}$] $_n$ I と[Gly, Gly $^{\#}$] $_n$ II の測定結果では、Form II が Form I よりも 0.6 ppm 高磁場シフトし、明らかな有意差が存在する。スペクトルの線形は図 4-4 に見るように非常にシャープな対称線であり、アミド窒素による双極子カップリングの影響はほとんどないと判断した。Kricheldorfら²⁾は、GlyC α の化学シフトが Form I ; 44.3 ppm、Form II ; 42.0 ppm と報告したが、本研究での測定はこれを裏づける結果となった。加えて、§ 2-3 では



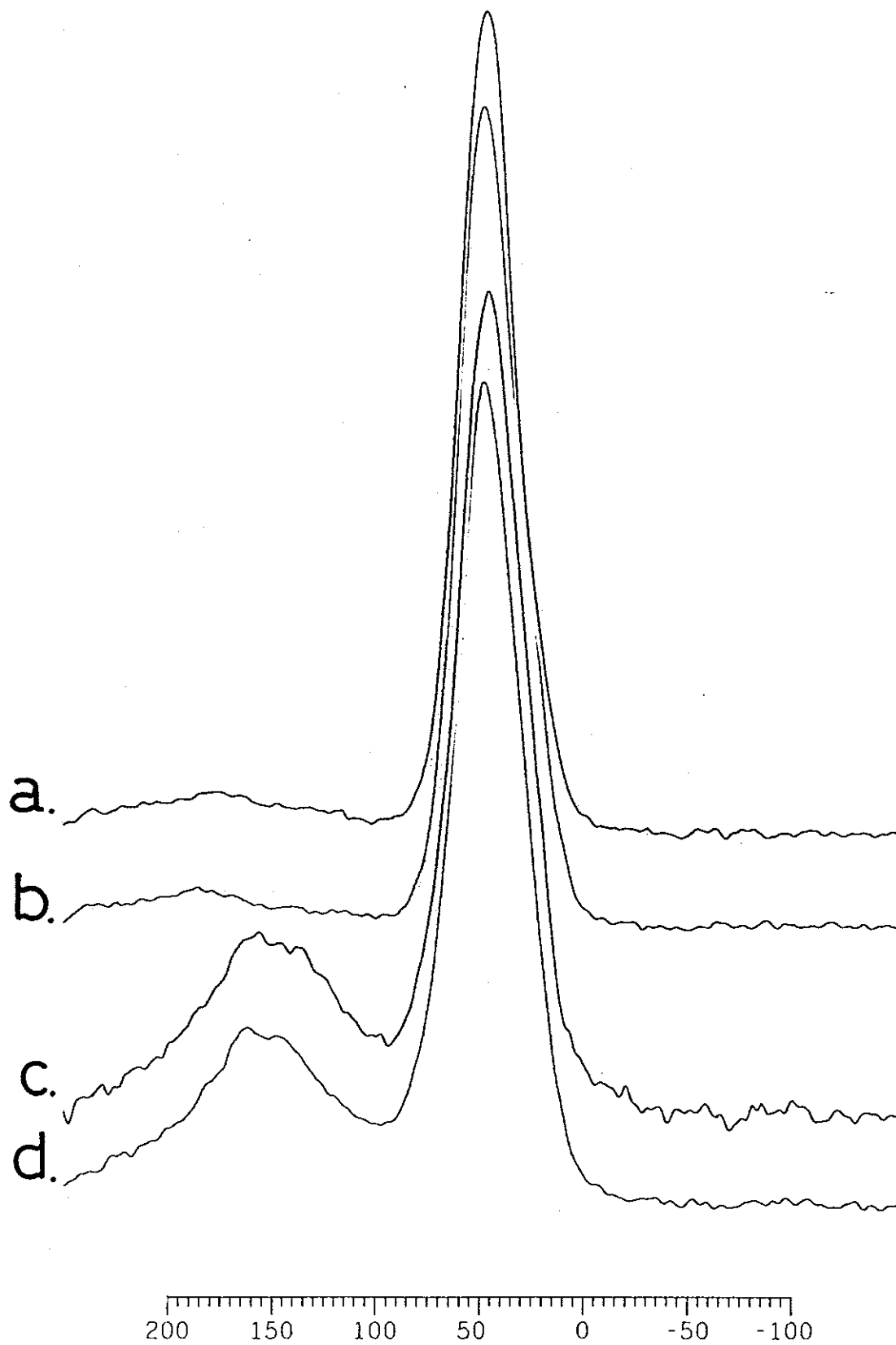
【図4-4】ポリグリシンおよびグリシン含有ポリペプチドの 68.5MHz
 ^{13}C CP/MASスペクトル
 a) $[\text{Gly}, \text{Gly}^{\alpha}]_n$ I、b) $[\text{Gly}, \text{Gly}^{\alpha}]_n$ II
 c) $[\text{Asp}(\text{OBzl}), \text{Gly}^{\alpha}]_n$ α 、d) $[\text{Asp}(\text{OBzl}), \text{Gly}^{\alpha}]_n$ ω

[表4-2] ^{13}C Chemical Shifts of Polypeptides Containing Glycine Residues
 Characteristic of 3_1 -helix, α -helix, β -sheet and ω -helix Forms
 (± 0.2 ppm from TMS)

Sample ^{a)}	Confor- mation ^{b)}	^{13}C chemical shift					ref.
		C α	Carbonyl	C β	Phenyl	Benzyl	
[Gly,Gly*] _n	β	44.3	169.7				this work
[Gly,Gly*] _n	β	44.2	169.5				this work
[Gly,Gly#] _n	3_1	43.7	172.8				this work
[Gly,Gly*] _n	3_1	44.2	172.8				this work
[Gly] _n	β	44.2	169.4				12
		45.3	170.2				14
[Gly] _n	3_1	44.2	173.3				13
		43.0	173.1				15

[Asp(OBzl),Gly*] _n	α	53.9 44.8 ⁺	175.0	35.2	—	—	this work
[Asp(OBzl),Gly*] _n	ω	~ 51.0 45.1 ⁺	171.8	~ 34.0	—	—	this work
[Asp(OBzl)] _n	α	54.4 54.6	175.9 175.9	34.8 35.2	130.8 129.2	66.7 67.1	11 14
	αL	51.9	172.1	34.8	130.2	67.1	11
	ω	51.5	172.3	33.9	130.0	66.3	11
	β	50.2	170.6	36.1	130.2	66.9	11

- a) Symbol # indicates methylene carbon enriched by ^{13}C .
 Symbol * indicates carbonyl carbon enriched by ^{13}C .
 b) α -helix is right-handed unless otherwise specified.
 c) Symbol + indicates chemical shift for glycine residue.



[図4-5] ポリグリシンおよびグリシン含有ポリペプチドの 68.5MHz
 ^{13}C 粉末スペクトル
 a) $[\text{Gly}, \text{Gly}^{\alpha}]_n$ I、b) $[\text{Gly}, \text{Gly}^{\alpha}]_n$ II
 c) $[\text{Asp}(\text{OBzl}), \text{Gly}^{\alpha}]_n$ α 、d) $[\text{Asp}(\text{OBzl}), \text{Gly}^{\alpha}]_n$ ω

[表 4-3] ^{13}C chemical shift tensor components of glycine methylene carbons (ppm from TMS)

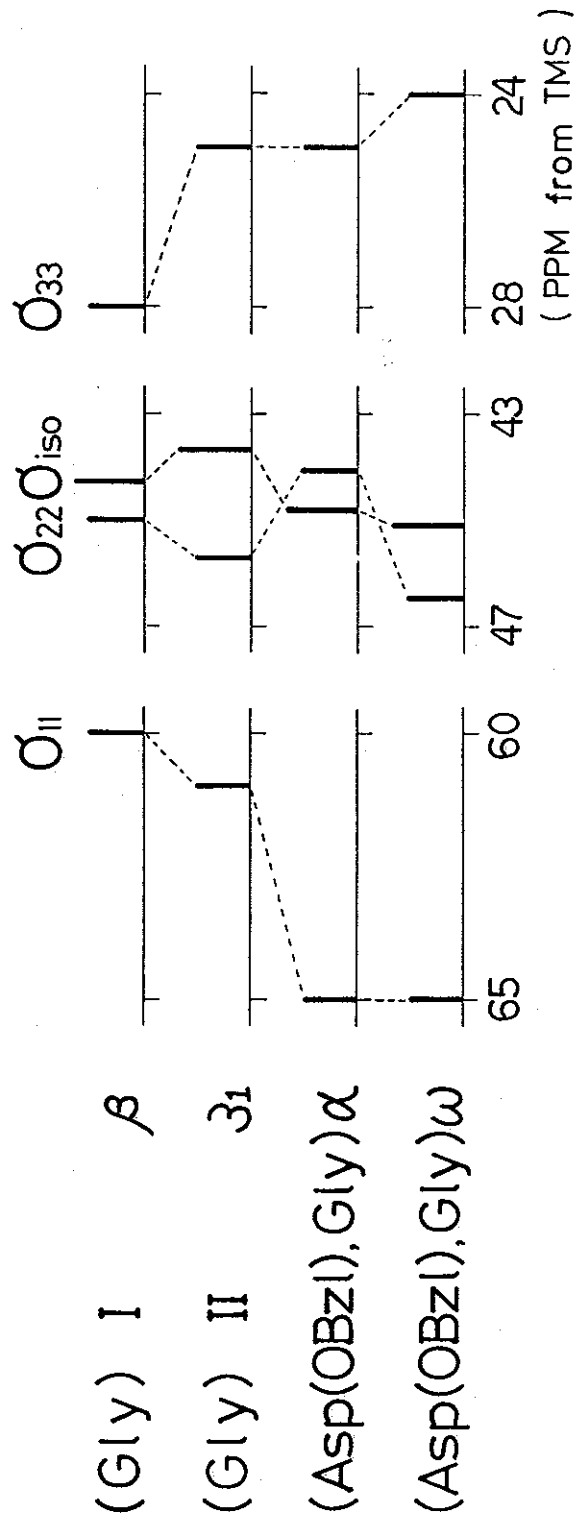
Sample ^{a)}	Conformation	tensor component ^{b)}			anisotropy breadth	
		σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	$\Delta\sigma$ ^{c)}	$\sigma_{11} - \sigma_{33}$
[Gly,Gly*] _n I	β -sheet	60	45.0	28	-25	32
[Gly,Gly*] _n II	3_1 helix	61	45.7	25	-28	36
[Asp(OBzl),Gly*] _n	α_R helix	65 ^{d)}	44.1	25 ^{d)}	-30	40
[Asp(OBzl),Gly*] _n	ω_L helix	65 ^{d)}	46.5	24 ^{d)}	-32	41

a) Symbol # indicates methylene carbon enriched by ^{13}C

b) Uncertainty ± 1 ppm, unless otherwise specified.

c) $\Delta\sigma = \sigma_{33} - 1/2 \cdot (\sigma_{11} + \sigma_{22})$

d) The line shape of glycine residue is obscure and the value of tensor component is tentative (uncertainty: $\pm 2 \sim 3$ ppm) because of the overlap with the $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\beta$ signal of the host residue.



[図4-6] 粉末スペクトルから得たグリシン残基 C α 炭素の
 ^{13}C 化学シフト値の主値の棒スペクトル

GlyC=Oの等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルより、低分子量ポリグリシン; [Gly*]₅が3₁-ヘリックスに似たコンホメーションをとっていることが示唆された。2章における測定では、[Gly*]₅のC α 炭素の等方平均化学シフトがForm I, Form IIよりも1.5 ppm高磁場へシフトしたが、本章での測定により[Gly, Gly[#]]_n IIのGlyC α も[Gly, Gly[#]]_n Iより0.6 ppm高磁場シフトすることが明らかとなり、また反対に α -および ω -ヘリックスのGlyC α はForm Iよりも低磁場側に現れることが判明したため、[Gly*]₅が3₁-ヘリックスに近い構造をとっていることが、GlyC α の化学シフトからも支持される。また、GlyC=Oの化学シフトによっては α -ヘリックスと3₁-ヘリックスを判別することができず、[Gly*]₅のコンホメーションから α -ヘリックスの可能性を排除することが困難であったが、GlyC α 炭素の化学シフトによりそれが可能となった。

[2-¹³C]Glyを[Asp(OBzl)]_nに巻き込ませた[Asp(OBzl), Gly[#]]_nの2つの試料は、そのAsp(OBzl)のカルボニルおよびC β 炭素のシフト値がすでに報告されている[Asp(OBzl)]_nの値³⁾と誤差範囲内で一致するため、それぞれ α -および ω -ヘリックスをとっていることが確認できる。GlyC α の α -ヘリックスおよび ω -ヘリックスのピークは、それぞれForm Iより0.5 ppm、0.8 ppm低磁場に現れ、この4種のコンホメーションすべてがGlyC α の化学シフト値により判別が可能であることが明らかとなった。従来、グリシン残基C α 炭素の化学シフトはコンホメーション変化に対して全く不敏感であり、ポリペプチドのコンホメーションの同定には利用できないとされていたが、¹³Cで選択的にラベルすることによりそれが可能であ

ることが示された。

しかし、GlyC α の化学シフトが他の炭素核に比べて小さな変化しか示さないことは事実であり、表4-4に示すとおり α -ヘリックスと β -シート間の等方平均化学シフト(σ_{iso})の差は、他のポリペプチドに比べてかなり小さい。

また、 α -ヘリックスが β -シートよりも低磁場に出ることは他のポリペプチドと同様であるが、 ω -ヘリックスを形成する[A sp(OBzl)] $_n$ のA spC α 炭素について見ると、低磁場側から

$$\alpha_R\text{-ヘリックス} > \omega_L\text{-ヘリックス} > \beta\text{-シート}$$

の順であり、[Gly, Gly $^\#$] $_n$ の

$$\omega_L\text{-ヘリックス} > \alpha_R\text{-ヘリックス} > \beta\text{-シート} > \beta_1\text{-ヘリックス}$$

と比較すると、 α -ヘリックスと ω -ヘリックスの順序が入れ替わっている。

なお、[A sp(OBzl)] $_n$ では α_R -ヘリックスと ω_L -ヘリックスの差は約3 ppmであるが、[Gly, Gly $^\#$] $_n$ では0.3 ppmとなっている。

表4-4 ポリペプチドC α 炭素の ^{13}C 化学シフト (ppm from TMS)
([Gly, Gly $^\#$] $_n$ 以外はすべて斉藤らの論文より引用)^(1~4)

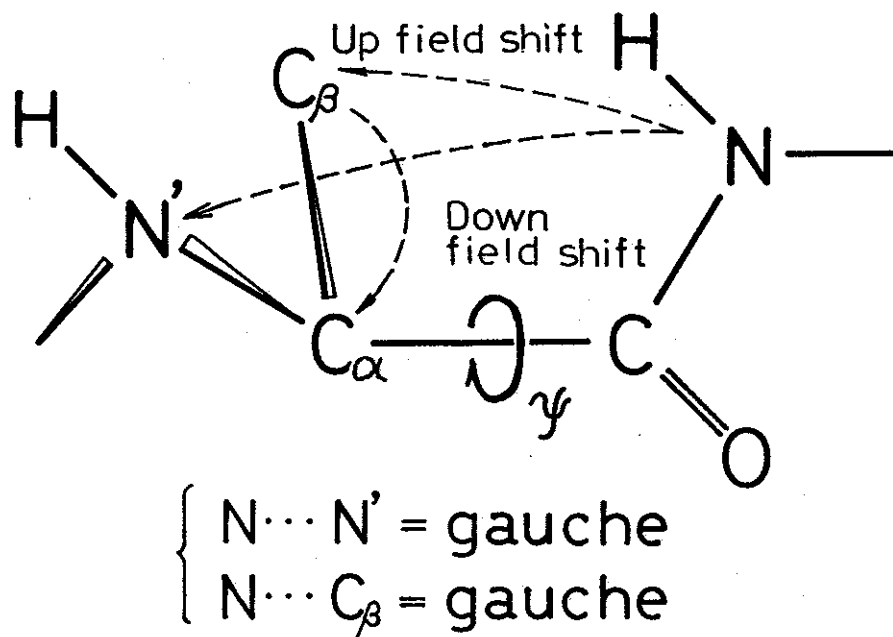
試料	α -helix	β -sheet	その差
[Gly, Gly $^\#$] $_n$	44.8ppm	44.3ppm	0.5ppm
[Ala] $_n$	53.4	49.2	4.2
[Phe] $_n$	60.6	54.9	5.7
[Leu] $_n$	56.7	51.5	5.2
[A sp(OBzl)] $_n$	54.4	50.2	4.2
[Glu(OBzl)] $_n$	57.4	52.2	5.2
[Glu(OMe)] $_n$	58.0	52.4	5.6
[Val] $_n$	66.5	59.4	7.1
[Ile] $_n$	64.9	58.8	6.1

これらはすべてグリシン残基が側鎖(C β 炭素)を持たず、C α 炭素が不斉炭素でないことによると考えられるが、具体的な原因は明らかでない。類似の現象はポリアミド(ナイロン4,6,66)においても観測されており⁴⁾、カルボニル基に隣接するメチレン炭素では、非晶部のピークが結晶部のピークに重なってコンホメーション変化によるシフト差が現れない。第3章で指摘した通り、Tonelliら⁵⁾の提案した「ゴージュ効果」の考えに従えば、C α 炭素は本来化学シフト変化を示さないはずであるが、これはC β 炭素を持たないグリシン残基については、ほぼ該当している(グリシン以外のアミノ酸残基については該当せず、有効な説明方法は提示されていない)。

C β 炭素の存在がC α 炭素の化学シフト変化に重要であるという推論から、次のような仮説を立てることができる。ほとんどすべての残基において α -ヘリックスの「C β 炭素」と「アミド窒素」の等方平均化学シフトが
 β -シートに比べて高磁場側に出現するのに対し、「C α 炭素」では α -ヘリックスが低磁場側に出現する。 α -ヘリックスと β -シートの二面角 ψ はそれぞれ -60° と 150° であり、 α -ヘリックスにおいては”NとN”, ”NとC β ”がともにゴージュに位置している一方、 β -シートではどちらもトランス位置に近い。NとC,あるいはNとNが近接する場合には高磁場シフトが起こ

るとすれば、^{*1}まず、 α -ヘリックスにおけるアミド窒素とC β 炭素の相対的な高磁場シフトは説明することができる(図4-7)。

*1 これは「ゴージュ効果」を同義であるが、以後に述べる仮説が「ゴージュ効果」の範疇のものではないため、ここではこのように表現した。



[図4-7] ペプチドにおいて、 C_{β} 炭素、N窒素に高磁場シフトを、 C_{α} 炭素に低磁場シフトを引き起こす機構(仮説)。
 $N-N$ 、 $N-C_{\beta}$ 間は核間の近接による非結合相互作用
 C_{α} は $N-C_{\beta}$ 間の非結合相互作用の二次的な誘起効果

次に、グリシン残基とアラニン残基の構造の違いがC β 炭素(メチル基)の有無であることより、C β 炭素をもつアミノ酸残基が α -ヘリックスを形成した時に惹起される“N-C β 間の相互作用”が、C α 炭素に2次的な効果(低磁場シフト)を引き起こすと仮定すれば、GlyC α の等方平均化学シフトにコンホメーション依存性が小さいことを説明することができる(図4-7)。

しかし「この2次的な効果」の存在を実験的に裏づけることは本研究の実験からは不可能である。この問題に対する理論的なアプローチは第6章で試みるが、実験的な解明は今後の課題として残される。グリシン残基C α 炭素がコンホメーション変化に対して不敏感であり、その他の残基のC α 炭素が敏感であるということは、「コンホメーション依存化学シフト」の原理を探る上で本質的な問題を含んでいるように思われる。

[4-3-2] グリシンC α 炭素化学シフトテンソルのコンホメーション依存性

つぎにGlyC α の化学シフトテンソルの各成分について考察する。表4-3より、[Asp(OBzl), Gly n] $_n$ の α -ヘリックス、 ω -ヘリックスの化学シフト異方性; $(\sigma_{11}-\sigma_{33})$ は[Gly, Gly n] $_n$ のそれよりも大きくなっている。

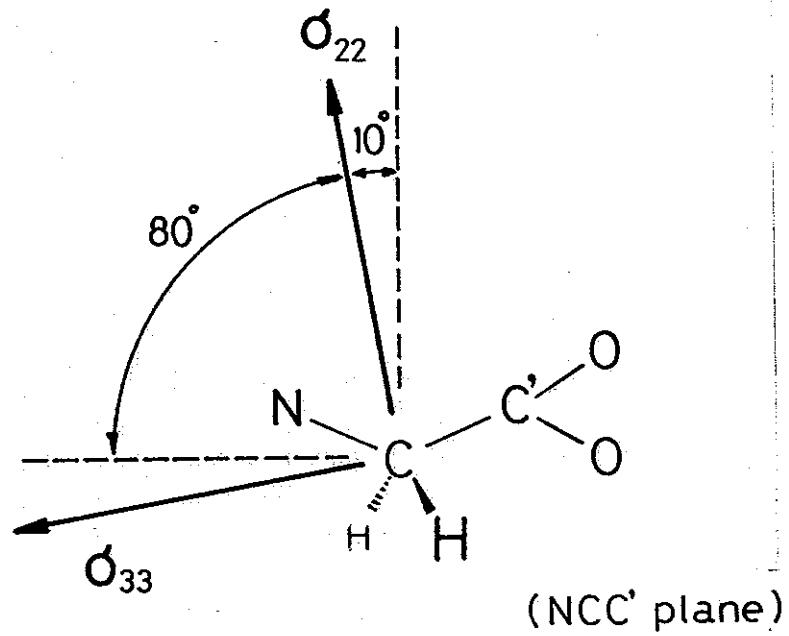
しかしこれはCP-MASスペクトルでGlyC α の両脇に見られるAspC α およびAspC β の粉末スペクトルがGlyC α に重なったことによる可能性があり、直ちにコンホメーションの差に帰すことはできない。CP-MASスペクトルにおけるピークの強度比をそのまま成分比とすることは一般にできないが、[Asp(OBzl), Gly n] $_n$ 中では、Asp(OBzl) $^{13}\text{C}\alpha$ とGly $^{13}\text{C}\alpha$ の比率は1:7.8であり、Asp(OBzl)が粉末スペクトルの“すそ”に影響を与え

ることも考えられる。そこで[Asp(OBzl), Glyⁿ]_nの σ_{11} と σ_{33} は、測定誤差を $\pm 2 \sim 3$ ppmとした。 σ_{22} についてはその影響はないものと判断し、スペクトルの頂点を測定値とした。

Form IとForm IIのテンソル成分を比較すると、等方平均化学シフトはForm IがForm IIより低磁場であるにもかかわらず、 σ_{22} はForm Iがより高磁場であり、それがForm II σ_{33} の高磁場シフトによって補償されている。GlyC=Oの化学シフトテンソルでは σ_{22} が σ_{iso} とほぼ同様の傾向を示したが、GlyC α では両者の間に顕著な相関は見られない。測定誤差の問題は残るが、 σ_{11} と σ_{iso} にわずかな相関がみられる程度であり、これについてもその主たる原因は明らかでない。

グリシン(アミノ酸)C α 炭素の化学シフトテンソルの方向はHaberkornら⁶⁾によって報告され、最大15°のずれはあるものの σ_{11} はH-H、 σ_{22} は $\angle HCH$ の二等分線、 σ_{33} はHCH平面に垂直の方向に沿っている(図4-8)。主値はそれぞれ66 ppm、46 ppm、27 ppmであり、ポリグリシンの値よりもやや低磁場側に寄っているが、これはカルボキシル基の反しゃへい効果によるものと考えられる。各種メチレン炭素の化学シフトテンソル主値(σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})の分布の標準偏差がVeeman¹⁾らによってまとめられ、それぞれ15 ppm、10 ppm、17 ppmとされているから、 σ_{11} と σ_{33} がコンホメーションの違いに敏感であるとする本研究の観測結果は妥当なものといえる。

数種のアミノ酸の化学シフトテンソルが内藤らによって決定されており⁶⁻¹⁰⁾(表4-5)、どの場合もテンソルの主軸の方向がほぼC α 炭素の対



[図4-8] グリシン(アミノ酸)メチレン炭素の ^{13}C 化学シフトテンソル主軸系⁶⁾
 (σ_{22}, σ_{33} はNCC'平面内、 σ_{11} はH-H方向で紙面に垂直)

称軸に沿っており、結合の方向にはあまり関係がないことが明らかとなっている。これは、化学結合の方向性に非常に敏感に反応するカルボニル炭素やカルボキシル炭素の化学シフトテンソルとは異なっており、C α 炭素の化学シフトが局所的なコンホメーション変化に対してあまり敏感でないことと一致する結果である。

表4-5 アミノ酸C α 炭素の ^{13}C 化学シフトテンソルの主値

アミノ酸	σ_{iso}	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	$\Delta\sigma$	$\sigma_{11}-\sigma_{33}$	ref.
グリシン	46.0	65.3	46.2	26.6	-29.2	38.7	(6)
	46.0	66.8	44.7	26.7	-29.1	40.1	
L-アラニン	51.0	65.1	56.5	31.3	-29.5	33.8	(7)
L-アスパラギン	51.8	71.8	53.5	30.1	-32.6	41.7	(8)
L-セリン	58.3	70.0	60.6	44.2	-21.2	25.8	(9)
L-スレオニン	60.2	69.0	58.9	52.6	-11.4	16.4	(10)

(ppm from TMS)

以上のように、GlyC α の化学シフトもコンホメーション依存であることが確認できたが、等方平均化学シフトの挙動を支配するようなテンソルの主値は見あたらない。また化学シフトの異方性が小さく、変化幅も狭いため、分子の立体構造と直接結びつけて議論することは困難である。カルボニル炭素で見られた水素結合距離との相関は、C α 炭素の化学シフトには見られない。

§ 4-4 ま と め

1. ^{13}C でC α 炭素をラベルしたグリシン残基をポリペプチドに巻き込ませることにより、これまでは明確なコンホメーション依存性が確認されていなかった GlyC α 炭素の化学シフトにコンホメーション依存性が存在し、これを用いてコンホメーションの同定ができることが確かめられた。
2. GlyC α の化学シフトテンソルの主値は、等方平均化学シフトに比べてより敏感にコンホメーションを反映して変化するが、等方平均化学シフトとテンソル成分の主値は明らかでなく、またある成分が等方平均化学シフトの変化に支配的であるといった現象もみられない。そのため化学シフトテンソルの主値を特定の相互作用との関連で議論することは難しい。ここに現れたコンホメーション依存性は主鎖まわりの二面角の回転にともなう核の周囲の電子状態の変化(「狭義のコンホメーション効果」)がその主原因と考えられるが、カルボニル炭素に比べより遠距離にある分子環境が効いている可能性がある。

なお、本章で述べた研究内容は以下の報文として発表いたしました。

Ando, S.; Ando, I.; Shoji, A.; Ozaki, T.

J. Mol. Struct. 192 153 (1989)

参考文献》

- 1) Veeman, W.S. "Carbon-13 Chemical Shift Anisotropy" Prog.NMR.Spectr. 16, 193 (1984)
- 2) Saito, H.; Iwanaga, Y.; Tabeta, R.; Narita, M.; Asakura, T. Chem.Lett. p.427 (1983)
• Kricheldorf, H.R.; Mueller, D. Macromolecules 16, 615 (1983)
- 3) Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I.; Ozaki, T.; Shoji, A. Chem.Lett. p.1437 (1983)
- 4) 久保公弘 東京工業大学修士論文 (1989)
- 5) Tonelli, A.E. J.Am.Chem.Soc., 102, 7635 (1980)
Tonelli, A.E. Biopolymers, 23, 819 (1984)
- 6) Haberkorn, R.A.; Stark, E.R.; Willigen, H.; Griffin, R.G. J.Am.Chem.Soc. 103, 2534 (1981)
- 7) Naito, A.; Ganapathy, S.; Akasaka, K.; McDowell, C.A. J.Chem.Phys. 74, 3190 (1981)
- 8) 内藤 晶; C.A.マクダウェル、第23回NMR討論会講演要旨集 (1984)
- 9) Naito, A.; Ganapathy, S.; Raghuanthan, P.; McDowell, C.A. J.Chem.Phys. 79, 4173 (1983)
- 10) Janes, C.; Ganapathy, S.; Oldfield, E.J. J.Mag.Res. 54, 111 (1983)
- 11) Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I.; Ozaki, T.; Shoji, A. Chem.Lett. 1437 (1983)
- 12) Saito, H.; Tabeta, R.; Asakura, T.; Iwanaga, Y.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I. Macromolecules 17, 1405 (1984)
- 13) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. Biopolymers, 23, 2279 (1984)
- 14) Kricheldorf, H.R.; Muller, D. Macromolecules 16, 615, (1983)

第五章 N 端保護オリゴペプチドの
 ^{13}C 等方平均化学シフトと
結晶中のコンホメーション

§ 5 - 1 は じ め に

[5-1-1] コンホメーション依存化学シフトの 低分子量ペプチド固体構造研究への応用

数残基あるいは十数残基のペプチド鎖からなる低分子量のペプチドは、生体内における生理学的なプロセスの維持や管理に重要な役割を果たしている。ペプチドのコンホメーションや運動性がその生理活性とどのようにかわっているかを知ることは、生体内でのより複雑な現象を解明して行く上で重要である。近年、生体由来のペプチドが次々と発見されるとともに、そのホルモンとしての機能や脳内での麻薬活性などが注目され、ペプチドの生理活性の研究は多方面から精力的に行われるようになった。

一方、低分子量のペプチドはタンパク質の局所的な構造を探るための「モデル化合物」として古くから研究され、^{*1} ^1H NMRを用いた測定により溶液中でのコンホメーションに関する膨大な研究成果がすでに蓄積されている。ペプチドは一般に生体内では溶液状態として存在するが、受容器(リセプター)やタンパク質、リン脂質と結合した際には特定のコンホメーションをとっているものと考えられる。このような状態では分子の運動が大きく束縛されているために、溶液のNMRにはシグナルとして現れてこない可能性が高い。また、タンパク質内部においてもその疎水的な環境のためにそれぞれのアミノ酸残基は自由に動くことができず、構造はかなりの程度

*1. 研究の方法として生体物質のような非常に複雑な系を解析対象とする場合に、モデル化合物を用いた研究を避けて通ることはできない。ある仮説に沿った理想的なモデルを選択することにより、その問題に対するより明確な答えが得られるよう 実験を計画することができるからである。

固定されていて結晶中の状態に近いと考えることができる。

このように低分子量のペプチドのコンホメーション研究は、それ自身の活性のため、そしてより複雑な系を理解するためのモデル化合物として、今日でも重要であり、今後は分子運動が束縛されている状態つまりコンホメーションの交換が起こっていない状態での分子構造を知ることが重要となってくるであろう。これまではX線、中性子線回折による単結晶の構造解析がその中心的な役割を果たしてきたが、アミノ酸単体と異なり低分子量のペプチドには結晶化しづらいものも多く、また大きな分子との複合体は結晶構造の解析も難しい。そこで対象物質の結晶化を必ずしも必要とせず目的分子のコンホメーションを探ることのできる分析手法の開発が待たれている。

本研究においてこれまで述べてきたポリペプチドの「コンホメーション依存化学シフト」を、低分子量ペプチドの立体化学構造の解明に応用することは、この目的に合致しているように思われる。その理由として、

1. タンパク質や生理活性ペプチドにおいても個々のアミノ酸残基の局所的な構造は、 α -ヘリックスや β -シートのような固体ポリペプチド中に見られる二次構造に近いものが多く¹⁾、すでにポリペプチドより得られたデータと直接比較することができる。
2. 低分子量ペプチドには β -ターンや γ -ターンのような、合成ポリペプチド中には見られない特異なコンホメーションをとるものも存在し²⁾、ここから新たな「コンホメーション依存化学シフト」を得ることのできる可能性がある。
3. 安定同位体による選択的なラベルによって、特定サイトの検出感度を飛躍的に向上させることができる。(X線や中性子線回折ではこのようなことは難しい)

4. 試料の結晶化を必ずしも必要としない。(しかし現状では多結晶状態であることが望ましい)
5. 低分子量ペプチドにおいては、結晶構造の解析が比較的多くなされており、固体高分解能NMRによる解析法の有用性を検証するために、都合がよい。
6. 多くのペプチドの溶液中での平均的な構造が、溶液のNMRにより既に明らかになっている。固体のNMRと溶液のNMRは「化学シフト」を共有しているためにデータ相互の比較が可能である。固体のNMRにより「化学シフト」と「結晶構造」の関係が明らかになれば、将来的に「固体構造」と「溶液構造」との関連性を探ることが可能になる。

などが挙げられる。

ポリペプチドで見いだされた「コンホメーション依存の化学シフト」

が、低分子量ペプチドの構造解析にも応用可能であるかどうかは、

- ① 「化学シフトの相互作用」が“どの程度局所的な”あるいは“どの程度広範な”電子構造を反映しているか、
 - ② ^{13}C 等方平均化学シフトに“どの程度隣接残基の影響が現れるか”、
- という2点にかかっている。

まず、観測結果が整理されている“ホモポリペプチド”は、分子鎖末端の効果を無視することができ、注目残基と隣接残基の間に区別のない純粹なモデル系であったため、①と②はどちらも問題とならなかった。その後行われた種々のシーケンシャルコポリマーの固体高分解能NMRの観測³⁾

や注目残基を他のホモポリペプチドに巻き込ませて観測する方法(本論文第2,第4章を参照)により、 ^{13}C の化学シフトにおいては「① 隣接残基の影響」が無視しうる程度であることは明らかとなっている。しかし「② 分子鎖末端の効果」つまり分子量依存性については、いまだ十分な検討が

なされていない。第3章で観測した GlyC=O の化学シフトでは、その水素結合距離依存性に分子量による差は見られなかったが、水素結合以外の効果(「狭義のコンホメーション効果」と思われる)によって変化する C α や C β 炭素については、分子量の及ぼす効果が明らかにされていない。これまで主に観測が行われてきたポリペプチドでは、分子量の減少が不可避免的にコンホメーションの変化を引き起こし、分子量の影響を効果的に評価することが困難であった。そこで、本章では、オリゴペプチドの局所的な構造を評価する上で、ポリペプチドから得られた「コンホメーション依存化学シフト」がどの程度有効であるかを検証するとともに、固体高分解能 NMR を用いて、コンホメーションが固定された条件下でのペプチドの構造を探るための方法論の開発を目的とする。

[5-1-2] Z-Gly-Proシーケンスとエンケファリン関連ペプチド

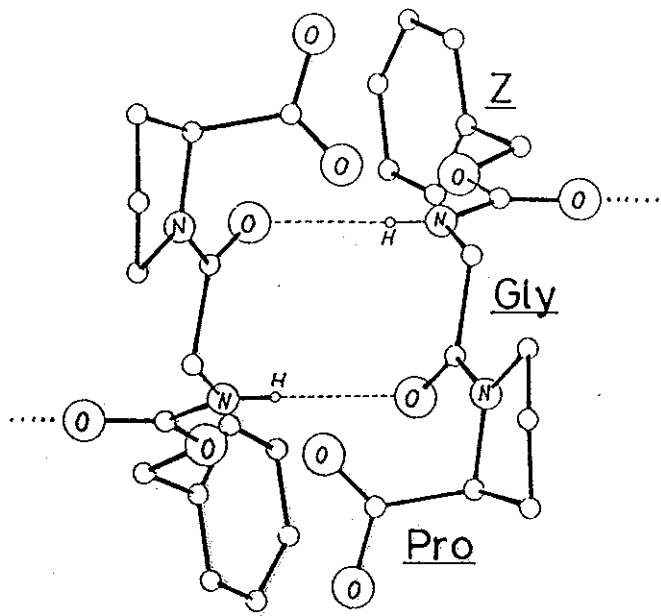
本章で主に扱うのは Z-Gly-Pro のシーケンスを N 端にもつオリゴペプチドで、このうちの4種は既に X 線回折により結晶構造が知られている。今日まで X 線回折による鎖状ペプチドの構造解析は広範に行われたものの、それらは散発的かつ相互の関連なく行われてきたと言わざるを得ず、この一連のペプチドは体系的に結晶構造が解析された珍しい例である。加えてこれらのペプチドでは、アミノ酸残基 2 つ(Z-GP⁴⁾)で逆平行 β -シート、3 つ(Z-GPL⁵⁾)で 3₁-ヘリックス、4 つ(Z-GPLG⁶⁾)と 5 つ(Z-GPLGP⁷⁾)で β -ターンと、オリゴペプチドに頻出する 3 つの構造がその中にすべて観測されており、ペプチドのコンホメーションを決める要因を

探る上で、理想的な系と考えられる。図5-1にX線回折より明らかとなったこれらのペプチドの構造を示す。

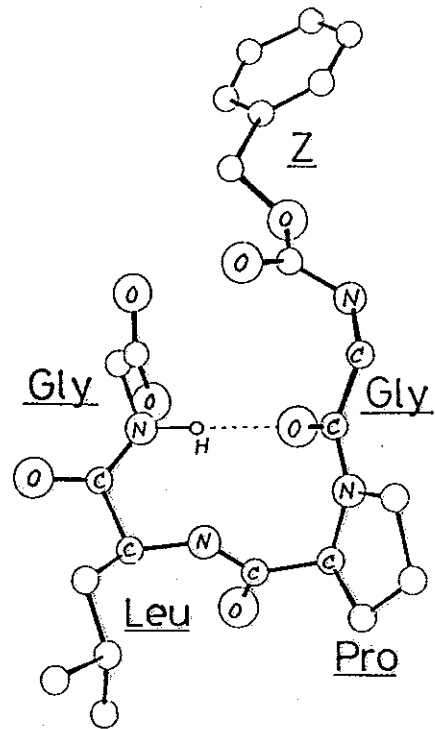
結晶中の Z-Gly-Pro-Leu-Gly と Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro に見られる構造は“ β -ターン”の典型的なものとなっている。 β -ターンはアミノ酸4残基からなる折り返し構造で、第1残基のC=Oと第4残基のN-Hの間の分子内水素結合がその構造安定化に寄与している。 3_1 -ヘリックスや β -シートはポリペプチドに多く見られる構造のため、オリゴペプチドに見られるこれらの構造はポリペプチドの部分構造と見なすこともできるが、 β -ターンはポリペプチドには見られない構造であり、その局所的なコンホメーションはポリペプチドの二次構造のどれとも異なっている。(図5-2のRamachandran Mapを参照)。以上の点からZ-Gly-ProのシーケンスをもつオリゴペプチドはX線回折による「分子構造」と固体NMRによる「化学シフト」の相関を探る上で、大変都合が良い。

固体高分解能NMRを用いた環状ペプチドの β -ターンおよび γ -ターンに関する研究は、すでにOpellaら⁸⁾およびTorchiaら⁹⁾によって報告され、環状ペプチドの局所的な構造に関する議論がPro残基のC β とC γ の化学シフト差($\Delta\delta$)を用いてなされている。また鎖状ペプチドの β -ターンについては、齊藤らによりPro-Leu-Gly-NH₂¹⁰⁾とエンケファリン¹¹⁾の¹³C CP-MAS NMRが観測され、Pro ψ が $\Delta\delta$ から予測できること、PheやTyrのような芳香族環をもった残基に β -シートと β -ターンの差や局所的な分子運動の効果が見られること、などが報告されている。

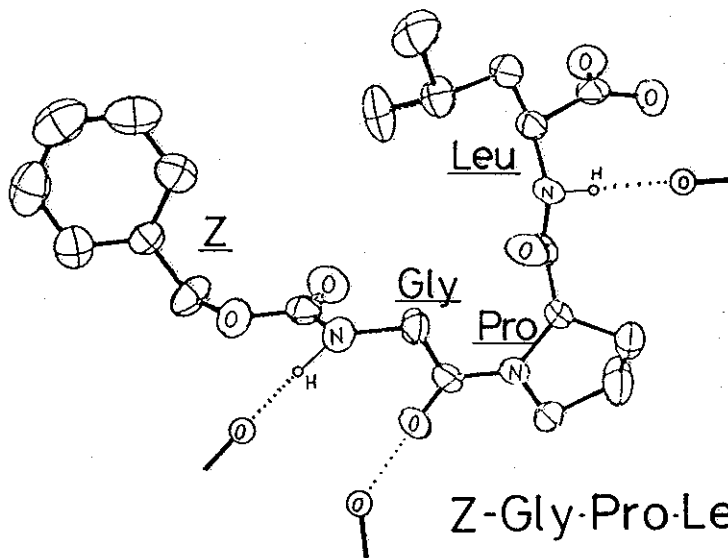
加えて、本研究ではZ-Gly-Proシーケンスをもった化合物の他に、



Z-Gly-Pro : β -sheet

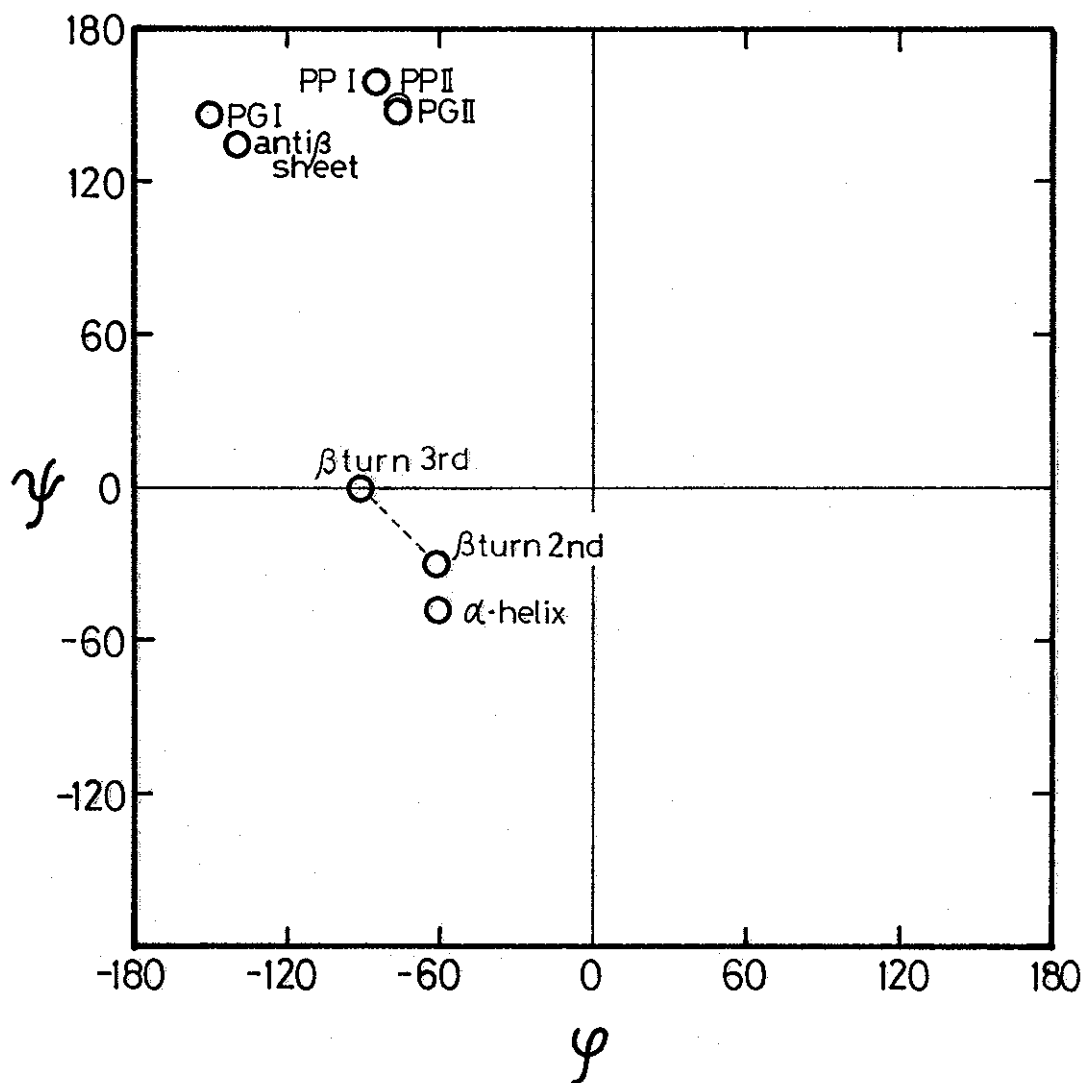


Z-Gly-Pro-Leu-Gly : β -turn



Z-Gly-Pro-Leu : 3_1 -helix

【図5-1】 Z-Gly-Proシーケンスを含むオリゴペプチドの結晶中のコンホメーション



PG I... Polyglycine I (anti para. β sheet)
 PG II... Polyglycine II (3_1 -helix)
 PP I... Polyproline I (10_3 -helix, cis)
 PP II... Polyproline II (3_1 -helix, trans)

[図5-2] ポリペプチド,オリゴペプチドに現れるコンホメーションの二面角 (ϕ, ψ) ; Ramachandranプロット

エンケファリン関連のオリゴペプチドも考察の対象とする。エンケファリンは Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu(Met)のシーケンスをもつ内因性オピオイドペプチドであり、モルヒネ相当の鎮痛作用をもっている。この化合物と関連物質に対しては膨大な数の研究がなされたが、機能発現の本質的な要因については未だ明らかにされていない。この事実は、フレキシブルな主鎖構造をもつ天然ペプチドにおいて、構造と機能の相関を探ることの難しさを示している。これらのペプチドは、当初DMSO中での ^{13}C NMRから Gly²C=OとMet⁵N-Hの間の分子内水素結合による β -ターン(GlyPheターン)の存在が提案されたが¹²⁾、エタノールより結晶化させた試料がX線回折から GlyGlyターン(Tyr¹C=OとPhe⁴N-Hの間の分子内水素結合)をとっていることが示され¹³⁾、更に溶液中での詳細な研究によって、Extended型とFolded型の平衡状態にあることが明らかとなった¹⁴⁾。エンケファリンのアナログペプチドについてもすでにX線回折による解析の結果がいくつか報告されており、それらを利用することにより、Z-Gly-Proシーケンスのペプチドと同様の手法で、固体中の分子の構造を議論できるものとする。

[5-1-3] 本章の目的

1. 既に X 線回折により結晶構造が知られている低分子量ペプチドの CP-MAS NMR を測定することにより、ペプチド分子の立体化学構造と ^{13}C NMR 化学シフトの相関を明らかにし、各アミノ酸残基の化学シフトがどの程度局所的なコンホメーションを反映して変化するのかを検証する。具体的には、ポリペプチドの CP-MAS NMR から得られた $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ 炭素における「コンホメーション依存化学シフト」と、本研究で得られた「GlyC=O 化学シフトの水素結合距離依存性」が、低分子ペプチドのコンホメーションを探るためのプローブとしてどの程度、有効であるかを評価する。
2. ^{13}C CP-MAS NMR の化学シフトから以下に掲げるようなオリゴペプチドの局所的な構造に関する情報が得られるかどうかを検証する。
 - ① 水素結合形成の有無と水素結合距離
 - ② Gly-Pro シーケンスにおける cis-trans 異性の判別と Pro の二面角 ϕ に関する知見。
 - ③ 低分子量ペプチドにおけるコンホメーションとポリペプチドのコンホメーションの相同性
 - ④ ターン構造に固有の化学シフトは存在するか
3. これまでに蓄積された「コンホメーション依存化学シフト」のデータと知識を使い、固体状態の構造が未だ知られていないペプチドのコンホメーション予測を行う。その過程においてどの程度矛盾のない予測が立てられるかを検討する。

§ 5 - 2 実 験 と 測 定

[5-2-1] オリゴペプチドの合成法

本章で扱った試料は、液相中におけるペプチド合成法のひとつである「活性エステル法」を用いて合成した¹⁵⁾。一般にオリゴペプチドの合成はその残基の種類によらず同様の方法で行うことができるため、以下に基本的操作を概説し、それぞれの試料については合成スキームを添付した(図5-3, 4)。なおPro-Leu-Gly-NH₂についてはSIGMA社から購入したものをを用いた。また、Z-Gly-Proペプチドの第二残基Glyおよびエンケファリン関連ペプチドの第二残基Glyは、そのカルボニル炭素の帰属を容易にし化学シフトを正確に観測するため、¹³Cでラベルを行った。[1-¹³C]グリシンはMSD社製(99atom%¹³C Lot No.2321-K)を用い、グリシン(日本理化学)に5%混ぜて合成を行った。

A: N末端の保護

[A-1] o-ニトロフェニルスルフェニル化物(Nps-X-OH)の合成。

アミノ酸(H-X-OH):0.05molを等量の2N NaOH水溶液に溶解し、THFに溶解したNps-Cl:0.05molと等量の2N NaOH水溶液を氷冷しながら数回に分けて加え、約1時間攪はんする。水で十分に希釈してろ過し、ろ液を1N H₂SO₄でpH 2まで酸性化した後、酢酸エチルで抽出する。抽出液が中性になるまで水で洗浄し、無水Na₂SO₄で一晩乾燥。乾燥剤をろ過した後、ヘキサンを加えて結晶化する。再結晶は酢酸エチル/ヘキサン系より行う。

[A-2] ベンジルオキシカルボニル化物(Z-X-OH)の合成

アミノ酸(H-X-OH):0.05molを等量の2N NaOH水溶液に溶解し、氷冷しながら激しく攪はんする。Z-Cl:0.05molと等量の2N NaOH水溶液を数回に分けて加え、更に1時間攪はんする。エーテルで未反応のZ-Clを抽出し、2N HCl水溶液で酸性化した後、1晩冷凍庫に放置する。少量の冷水で生成したHClを洗浄した後、乾燥する。再結晶はクロロホルム/ヘキサン系より行う。

B: 活性エステル法によるペプチド結合の生成

[B-1] 活性エステル化 (Nps-X-OHの合成)

Nps-X-OH または Z-X-OH:0.05molをTHFに溶解し、N-ヒドロキシコハク酸イミド(HO-NSu):0.06molを加える。0℃以下に冷却後、数度に分けてジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC):0.05molを加え、0℃以下で4時間以上攪はんする。反応後氷酢酸を1滴加えて1時間攪はんし、残ったDCCを不活性化する。生成したジシクロヘキシルウレア(DCU)をろ過により除去し、反応液を蒸発乾固した後、酢酸エチルに溶解、再度ろ過する。ろ液を3%NaHCO₃および3%クエン酸で洗浄後、無水Na₂SO₄を加えて一晩乾燥。乾燥剤をろ過後、ヘキサンを加えて結晶化する。再結晶は酢酸エチル/ヘキサン系より行う。

[B-2] カップリング (Nps-X-Y-OHの合成)

Nps-X-ONSu:0.05molをTHFに溶解し、カップリングさせるアミノ酸(H-Y-OH):0.05molをTHFと等量の水に溶解し、NaHCO₃:0.05molを加えたものと混合して一晩以上攪はんする。溶液が透明になったところでろ過し、有機層を減圧留去する。残った水層を酢酸エチルで洗浄し、未反応のNps-X-ONSuを除去する。溶液を氷冷し、氷冷5%クエン酸で酸性化した後、酢酸エチルで抽出を行う。抽出液を氷冷3%クエン酸および水で洗浄した後、無水Na₂SO₄で一晩乾燥。乾燥剤をろ過した後、ヘキサンを加えて結晶化する。再結晶は酢酸エチル/ヘキサン系より行う。

C: N末端保護基の除去

[C-1] Nps基の除去 (HCl·H-X-Y-OHの生成)

Nps-X-Y-OH(またはBoc-X-Y-OH)をTHFまたはアセトンに溶解し、塩化水素の2Nジオキサン溶液を約3当量(Bocの場合は脱離しにくいので20当量以上)加えて30分攪はんする。反応液を約1/3量まで減圧濃縮してエーテル洗浄を行い(Bocの場合この処理は不要)、その後蒸発乾固する。再結晶はメタノール/エーテル系より行う。

[5-2-2] 試料の結晶化

以上の方法で合成あるいは購入した試料のうち、既にその結晶構造がX線回折により報告されているものは、単結晶を析出させたと同じ方法で、またその結晶構造が報告されていないもののうちZ-GlyProシーケンスを含むものはクロロホルム/ヘキサン系、Nps-Tyr-Gly-Glyシーケンスを含むものはTHF/ヘキサン系で、再度結晶化を行った。

[5-2-3] 固体高分解能 ^{13}C -NMRの測定

固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルは、日本電子製GX-270(67.80MHz)NMRスペクトロメーターにおいてCP-MASアクセサリを用い、室温で測定を行った。サンプル約200mgをバレット型ローターに入れ、マジックアングルにおいて3~4kHzで回転させた。スペクトル幅は27kHz、データポイントは8Kである。測定は標準のCP法、およびスピニングサイドバンドを消去するTOSS法を用いた。

測定で用いたコンタクトタイムは2ms、繰り返し時間は5s.で、十分なS/N比が得られるまで200~1000回積算した。なお、化学シフトは外部基準として固体アダマンタンの高磁場側ピークを29.5ppmとして用い、TMS基準に換算した。

[5-2-4] 溶液 ^{13}C NMRの測定

溶液の ^{13}C NMRスペクトルは日本電子製GX-270(^{13}C :67.80MHz)NMRスペクトロメーターで測定した。スペクトル幅16kHz、データポイントは32Kである。繰り返し時間5s.で300~1000回、十分なS/N比が得られるまで積算した。化学シフトの基準には外部基準TMSおよび内部基準HMDS(^{13}C :2.0ppm)を用い、外部基準を用いた場合には体積磁化率の補正を行った。

[表 5 - 1] 本章で考察の対象とした試料とペプチド保護基の略記

本論文で扱うオリゴペプチド化合物の保護基については、次のような略記を用いた。ベンジルオキシカルボニル基は Z、*t*-ブトキシカルボニル基は Boc、*o*-ニトロフェニルスルフェニル基は Nps で表す。

化 合 物	コンホメーションと文献	
Z - Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-OH	β -ターン	(7)
Z - Gly-Pro-Leu-Gly-OH	β -ターン	(6)
Z - Gly-Pro-Leu-OH	β_1 -ヘリックス	(5)
Z - Gly-Pro-Gly-Gly-OH	X	
Z - Gly-Pro-Ala-Gly-OH	X	
Z - Gly-Pro-Val-Gly-OH	X	
Z - Gly-Pro-OH	β -シート	(4)
Pro-Leu-Gly-NH ₂	β -ターン	(8)
Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	X	
Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe-OH	X	
Nps-Tyr-Gly-Gly-OH	X	

但し、 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH (β -ターン) (19)
 Tyr-Gly-Gly-Phe-OH (β -ターン) (20)
 Tyr-Gly-Gly-OH (21)

の結晶構造は既に得られている。

また、Pro Δ 所とPro ψ の相関を探るため、以下のペプチドについても、合成と¹³C CP-MAS NMRの測定を行った。

化 合 物	コンホメーションと文献	
Boc-Gly-Pro-OH	β -シート	(16)
Boc-Pro-Leu-Gly-OH	β -ターン	(17)
Boc-Pro-Val-Gly-OH	β -シート	(18)

§ 5 - 3 結 果 と 考 察

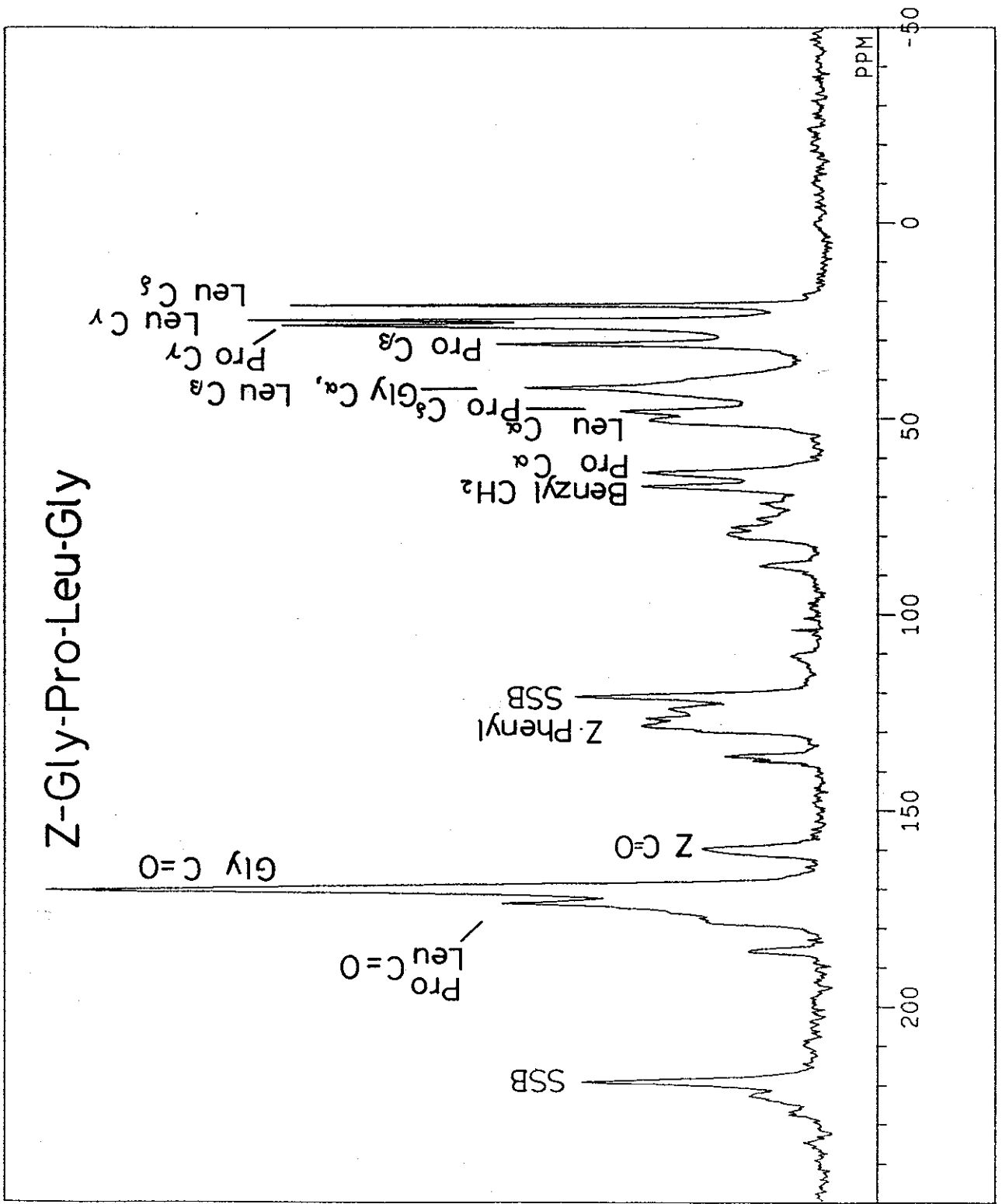
[5-3-1] ^{13}C CP-MAS NMR 化学シフトと分子のコンホメーション

1) 構造が既知のペプチドに対する固体 NMR からの議論

図 5 - 5 に 68.5MHz で測定した Z - Gly - Pro - Leu - Gly の ^{13}C CP - MAS NMR スペクトルを示す。シグナルの分離は良好で、帰属は既に得られている固体ポリペプチドの化学シフト²²⁾ および溶液オリゴペプチドの化学シフト²³⁾ を用いて行った。表 5 - 2 に本研究で測定した全ての試料の ^{13}C 等方平均化学シフトの結果を示す。表中、試料のコンホメーションは X 線回折より得られたもの、および固体の NMR から推定されたもの(括弧で示した。以下の考察を参照)である。

・ GlyC=O 化学シフトと水素結合距離

第 3 章での研究により、ポリグリシン及びグリシン残基を含むオリゴペプチドにおいて、グリシン残基のカルボニル炭素(GlyC=O)が $>\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}<$ 型(アミド-アミド型)の水素結合をした場合、その ^{13}C 化学シフトと水素結合距離の間に明確な相関のあることが明らかにされた(図 5 - 6 中、○で示した)。この図に結晶構造がわかっている Z - Gly - Pro⁴⁾、Z - Gly - Pro - Leu - Gly⁶⁾、Z - Gly - Pro - Leu - Gly - Pro⁷⁾ の GlyC=O 化学シフトと水素結合距離を書き入れてみると、Z - Gly - Pro - Leu - Gly と Z - Gly - Pro - Leu - Gly - Pro(●で示した)は直線からやや外れるが、Z - Gly - Pro は直線上にあり、第 3 章の結果を支持している。ここで、Z - Gly - Pro - Leu⁵⁾ も X 線回折により結晶構造が知られているが、GlyC=O



【5-5】 Z-Gly-Pro-Leu-Gly-0Hの
68.5MHz ¹³C CP-MAS NMRスペクトル

[表5-2] Z-Gly-Proシーケンスをもつオリゴペプチドの¹³C CP-MAS NMR 測定結果(ppm from TMS)

Sample	Confor- -mation	Gly		Pro Δβ	Ala		Leu		Val	
		C=O	Cα		Cα	Cβ	Cα	Cβ	Cα	Cβ
Z-GlyPro	β sheet	168.5	45.1	3.3						
Z-GlyProLeu	3 ₁ helix	172.2	43.2	9.1			53.3	38.5		
Z-GlyProLeuGly	β turn	170.1	42.0	4.7			50.4	41.6		
Z-GlyProLeuGlyPro	β turn	170.3	43.0	4.7			51.1	41.6		

Z-GlyProGlyGly	(3 ₁ helix)	172.7	43.6	4.0						
Z-GlyProAlaGly	(3 ₁ helix)	172.1	43.3	7.6 9.9	48.7	16.7				
Z-GlyProAlaAla	(Triple)	167.6	43.1	4.9	47.5	16.4 19.3				
Z-GlyProValGly	(β sheet)	169.7	42.4	4.9 10.1					59.1	33.5

が隣の分子のC端カルボキシル酸素と $>C=O \cdots H-O<$ 型の水素結合をしているため、ここでは区別して表示した(▼)。また Nps-Tyr-Gly-Gly-Pheと Nps-Tyr-Gly-GlyについてはX線回折の結果が出ていないが、保護基を持たない Tyr-Gly-Gly-Phe²⁰⁾, Tyr-Gly-Gly¹⁹⁾の結晶構造は報告されており、その水素結合距離を用いてプロットを行った。Z-Gly-Pro-Leu、Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe、Nps-Tyr-Gly-Glyにおける $>C=O \cdots H-O<$ 型水素結合についても、カルボニル炭素化学シフトの水素結合距離依存性は存在し、その相関は $>C=O \cdots H-N<$ 型とはわずかに異なるようであるが、両者に本質的な違いはないものと思われる。この結果は第3章で紹介した今城らの結果と一致する。

Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Proと Z-Gly-Pro-Leu-Glyはともに結晶中で「type-1のβ-ターン」²⁾をとっており、Gly¹C=OはC端のGly⁴N-Hと分子内の水素結合を形成している。両者のコンホメーションは重なり合うほど似ているため、水素結合距離もほとんど等しい。β-ターンは、かなりコンパクトな折れ曲がり構造で、原子間は“ファンデルワールス半径の和”程度しか離れていない。そのため骨格となる構造のフレキシビリティは高くなく、芦田ら²⁴⁾は解析したオリゴペプチドの5つのβ-ターンで、その環状部分に最大0.1 Åのずれしか見いだせないことを報告している。β-ターン構造における分子内水素結合に特徴的なことは、図5-7に示すように角 $\angle C=O \cdots N$ が 117° と分子間の水素結合に比べ屈曲した形となっていることで、そのためにプロトドナーであるアミド基の窒素がカルボニル基上のπ電子方向に位置することになる。第3章で解析したグ

¹³C NMR Chemical Shifts of Glycine Residue Carbonyl Carbons for
Oligopeptides Containing Glycine Residues as Determined by ¹³C
CP-MAS NMR (±0.2ppm from TMS) and Their Geometrical Parameters

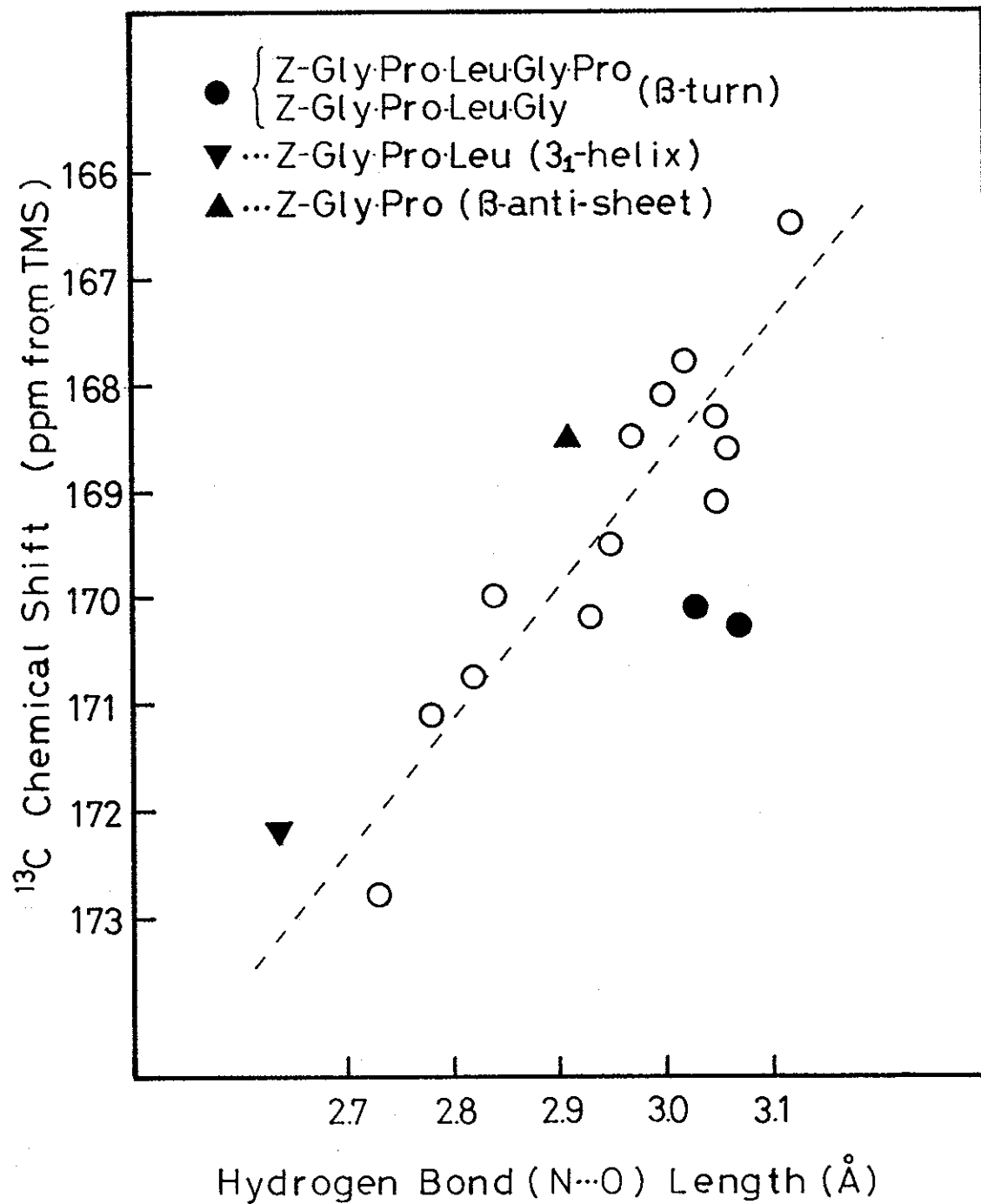
Sample ^{a)}	¹³ C Chemical shift, δ /ppm	Geometrical parameters					
		Hydrogen bond length /Å		Hydrogen bond angle /degree		Dihedral ^{b)} angle/degree	
		N···O	H···O	C=O···N	N-H···O	φ	ψ
(Gly [*]) _n II	172.8	2.73	1.84	159	146	-78	146
Gly-Gly [*] -L-Val	171.1	2.78	1.72	138	174	-77	-22
ClAc-Gly [*] -Gly	170.5	2.82	2.13	160	147	-75	154
L-Pro-Gly [*] -Gly	170.0	2.84	2.21	157	152	-71	167
L-Ala-Gly [*] -Gly	170.2	2.93	2.09	152	166	-83	169
(Gly [*]) _n I	169.5	2.95	2.16	149	133	147	-150
Gly [*] -Gly	168.5	2.97	-	157	-	-	153
Gly [*] -L-Phe-Gly	168.1	3.00	2.21	162	164	-	128
Gly [*] -DL-Thr	167.8	3.02	2.11	161	158	-	-175
Gly [*] -L-Thr·2H ₂ O	168.3	3.05	-	147	-	-	-169
L-Val-Gly [*] -Gly	169.1	3.05	2.19	157	152	-155	155
Sar-Gly [*] -Gly	168.6	3.06	2.23	135	167	72	-17
Gly [*] -Gly·HNO ₃	166.5	3.12	2.38	162	165	-	149
Z-Gly [*] -Pro	168.5	2.91	2.16	131	167	-108	176
Z-Gly [*] -Pro-Leu	172.2	2.64 ^{c)}				-79	174
Z-Gly [*] -Pro-Leu-Gly	170.1	3.03	2.35 ^{d)}	117 ^{d)}	161 ^{d)}	91 ^{d)}	171 ^{d)}
Z-Gly [*] -Pro-Leu-Gly-Pro	170.3	3.07	2.31	116	169	-87	-175
Tyr-Gly [*] -Gly-Phe-Leu	172.7					59	25
Tyr-Gly [*] -Gly-Phe	172.3	2.74	1.76			74	11
Tyr-Gly [*] -Gly	173.2	2.76	1.83			81	12

a) Symbol * indicates the glycine residue whose carbonyl carbon was measured.

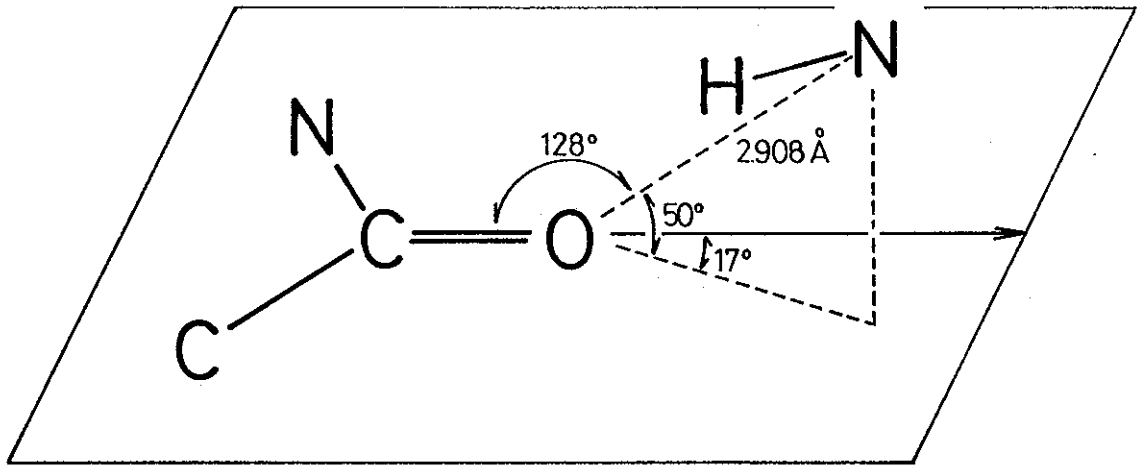
b) For glycine residue

c) This glycine residue participates in O···O type hydrogen bond.

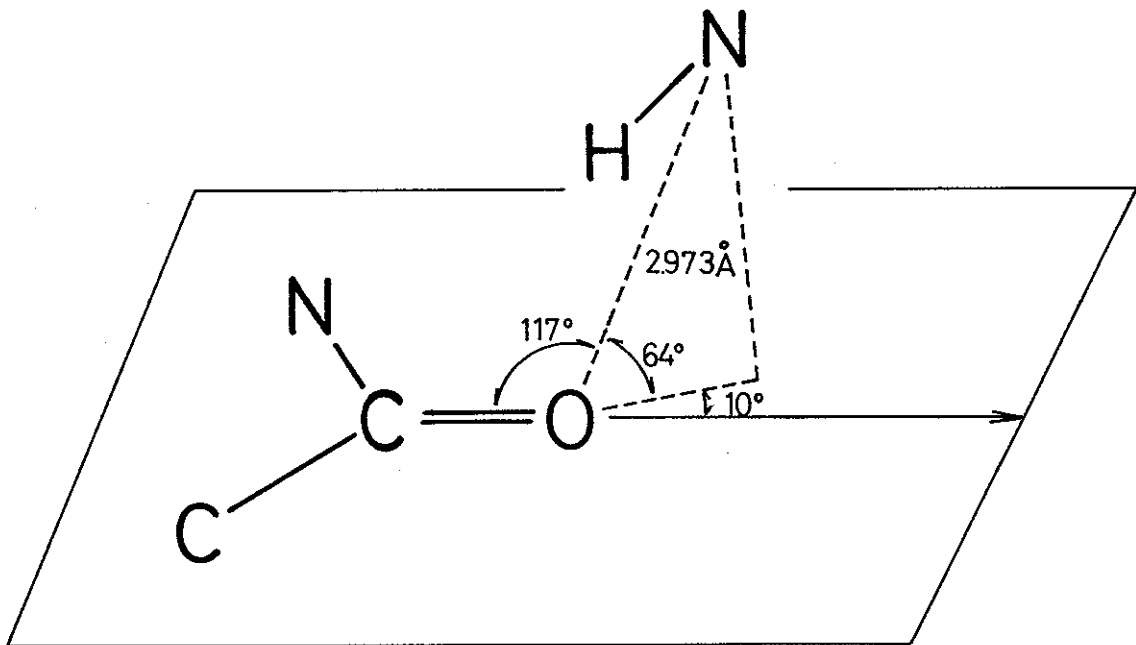
d) These values are those of o-bromobenzyl-Gly-Pro-Leu-Gly.



[図5-6] グリシン残基カルボニル炭素が結晶中で形成する
 水素結合距離; $R_{N \cdots O}$ と ^{13}C CP-MAS NMR 化学シフトの相関



Z-Gly-Pro-OH (β -sheet)



Z-Gly-Pro-Leu-Gly-OH (β -turn)

[図5-7] Z-Gly-Pro(β -シート)とZ-Gly-Pro-Leu-Gly(β -ターン)が結晶中で形成する水素結合の空間的な配置。

リシン残基を含むオリゴペプチド13種の試料における角 $\angle C=O \cdots N$ がほぼ 150° 付近であったことと比較しても、 β -ターンにおける水素結合の屈曲は明らかである。これが図5-2における相関直線からの乖離を引き起こした原因であると思われる。

また、逆平行 β -シートに非常に近い構造をもつZ-Gly-Pro(図5-1)のGlyC=O化学シフトは168.5ppmを示して、同じ β -シートをとるポリグリシンForm I ($[Gly]_n I$)の169.5ppmに近い値となっている。水素結合距離($R_{N \cdots O}$)はZ-Gly-Proの $2.91 \text{ \AA}^{4)}$ に対して $[Gly]_n I$ は $2.95 \text{ \AA}^{25)}$ であり、GlyC=Oの化学シフトが水素結合距離に依存して決まっていることがここからも理解される。

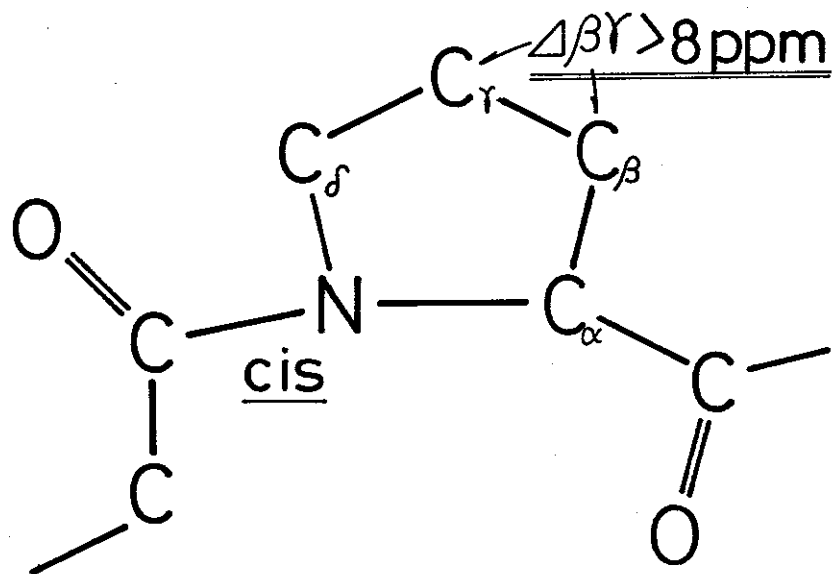
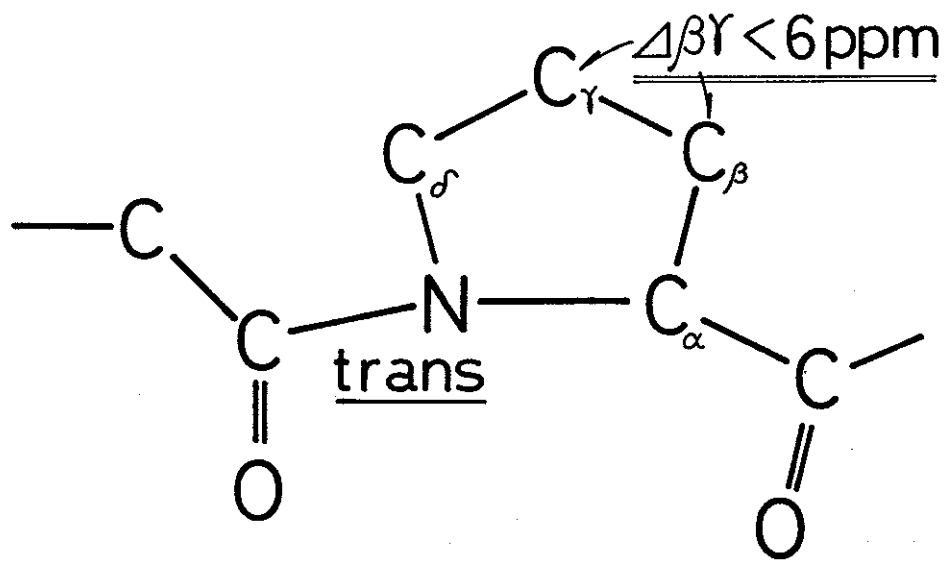
以上のことに加え、カルボニル炭素のコンホメーション依存性を理解する際には、水素結合距離とコンホメーションが相関関係にあることが重要である。これは分子鎖間のパッキングにその原因があると考えられるが、オリゴペプチド、ポリペプチドを問わず一般に β -シートの水素結合距離は 3_1 -ヘリックスよりも長く、かつどちらの結合距離も一定の範囲内に分布している。GlyC=Oの水素結合に限ってもZ-Gly-Pro(β -シート)に近い結晶構造を持つZ-Gly-DL-Pro²⁶⁾では $R_{N \cdots O} = 3.05 \text{ \AA}$ 、Boc-Gly-Pro¹⁶⁾では $R_{N \cdots O} = 3.09 \text{ \AA}$ である一方、Z-Gly-Pro-Leu(3_1 -ヘリックスで $R_{O \cdots O} = 2.64 \text{ \AA}$)に近い結晶構造を持つAc-Gly-NHMe²⁷⁾では $R_{N \cdots O} = 2.83 \text{ \AA}$ 、ClAc-Gly-Gly²⁸⁾では 2.82 \AA 、Boc-Gly-Ala²⁹⁾では $R_{O \cdots O} = 2.62 \text{ \AA}$ と、両者の間には明らかな差が存在する。結果として、GlyC=Oの化学シフトは本来、水素結合距離に依存しているが、その水素結合距離が

ペプチドのコンホメーションによって大きく規定されているため、今日まで GlyC=O の化学シフトが「狭義のコンホメーション依存」であると考えられてきたと結論できる。

・ Pro Δ 所とPro残基周辺のコンホメーション

Pro残基のC β とC γ の化学シフト差(Δ 所)が、X-Pro間のアミド結合におけるCis/Trans異性を反映することはMadisonら³⁰⁾によって初めて指摘され、このパラメータの信頼性はその後、多くの研究者により裏づけられてきた(図5-8)。しかし、従来の測定の多くは溶液中のものであり、コンホメーションが固定された固体中のものではない。 Δ 所とCis/Trans異性の相関をより詳しく検討するためには固体中での測定が是非とも必要である。ポリペプチド²²⁾、環状ペプチド^{8,9)}、鎖状オリゴペプチド¹⁰⁾について既に¹³C CP-MAS NMRによる報告がなされており、固体中においても溶液中とほぼ同様の傾向を示すことが示唆されているが、これらをまとめて整理した例は未だ報告されていない。

本研究で測定した試料を含めて、構造が既知の試料におけるPro残基の幾何パラメータと Δ 所を表5-3に示す。一般に Δ 所が6 ppm以下の時、X-Pro結合はTrans、8 ppm以上の時はCisと考えられているが、ポリプロリンについて見ると、アミド結合がCisで右巻き10₃ヘリックスを形成する[P.ro]_nForm I³¹⁾は9.3/9.9 ppm²²⁾、アミド結合がTransで左巻き3₁-ヘリックスをとる[P.ro]_nForm II³²⁾は2.4/2.9 ppm²²⁾となって、従来の結果と一致している。またオリゴペプチドや環状ペプチドについても、 Δ 所による判断はX-Pro結合のCis/Trans異性に関してX線の結果と



[図5-8] X-Pro間アミド結合のCis/Trans異性と
Pro残基の $\Delta\beta\gamma$ (C β とC γ の化学シフト差)について知られた経験則

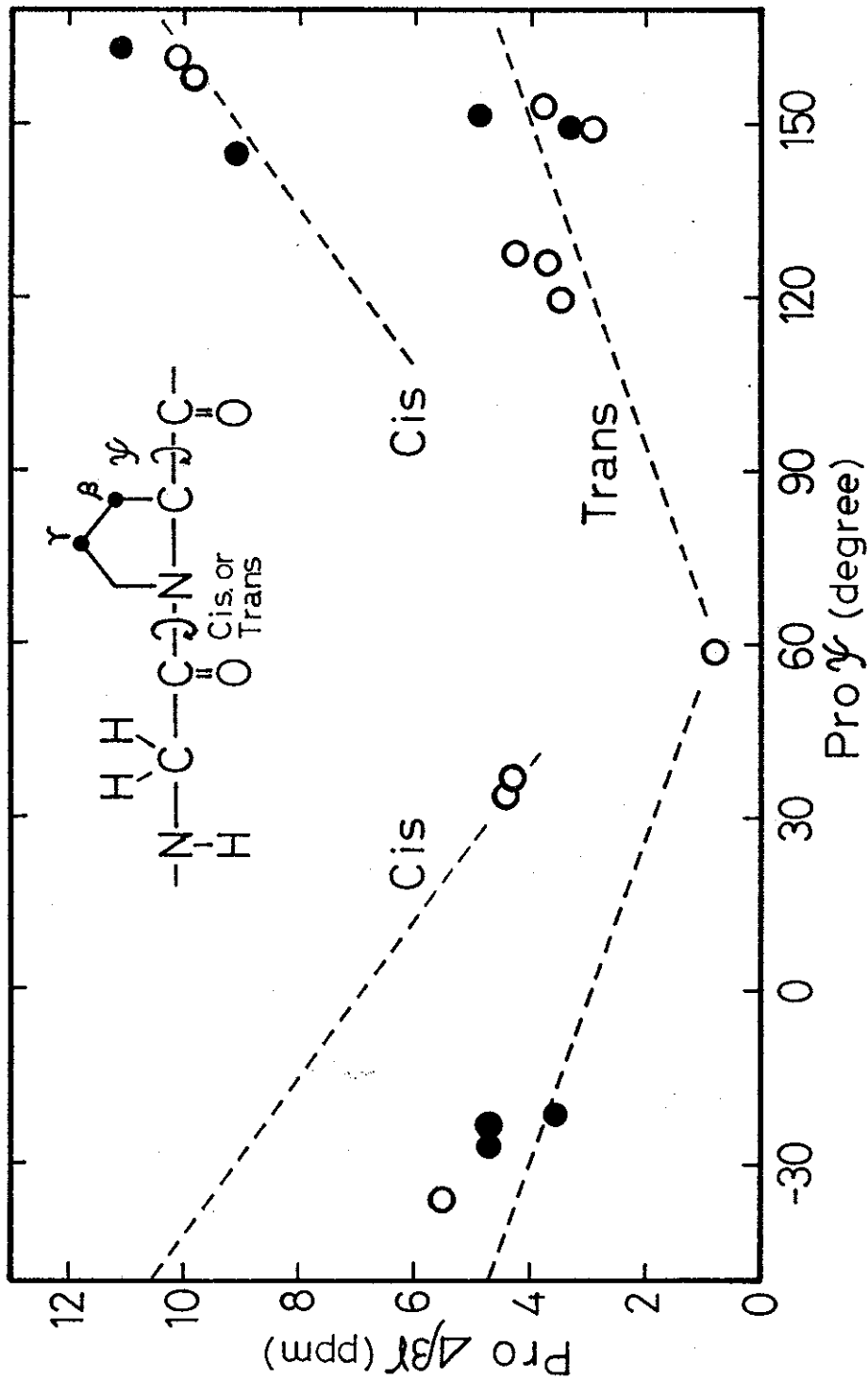
[表5-3] Pro残基を含むペプチドの構造パラメータとPro $\Delta\beta$

Sample	X-Pro	Pro(ϕ, ψ)	$\Delta\beta$	ref.
Z-Gly-Pro	Trans	(-70,150)	3.3	this work
Z-Gly-Pro-Leu	Cis	(-72,145)	9.2	this work
Z-Gly-ProLeu-Gly	Trans	(-63,-27)	4.7	this work
Z-Gly-ProLeu-Gly-Pro	Trans	(-63,-23)	4.7	this work
Boc-Gly-Pro	Trans	(-76,152)	4.9	this work
Boc-Pro-Val-Gly	Cis	(-81,163)	11.1	this work
Boc-Pro-Leu-Gly	Trans	(-65,-21)	3.6	this work
[Pro] _n I	Cis	(-83,158)	9.3 9.9	(22a) (22b)
[Pro] _n II	Trans	(-78,149)	2.4 2.9	(22a) (22b)
cyclo(DPhe-Pro-Gly-DAla-Pro)	Trans	(-82, 59)	0.7	(8)
	Trans	(-64,128)	4.3	
cyclo(Gly-Pro-Gly) ₂	Trans	(-53,126)	3.7	(8)
	Trans	(-66,-36)	5.5	
cyclo(Phe-Pro-DAla) ₂	Cis	(-83,157) (-70,165)	10.1	(9)
cyclo(Gly-Pro-DAla) ₂	Trans	(-54,125) (-70,116)	3.5	(9)
Pro-Leu-Gly-NH ₂	Trans	(,153)	3.8	(10)

完全に一致しており、 $\Delta\delta$ をCis/Trans異性の評価基準とすることの信頼性が裏づけられた。Pro残基はその特異なピロリジン環により二面角; ϕ (N-C α 結合回りのねじれ角)が $-65^\circ(\pm 10^\circ)$ に固定され、また立体障害などによってその二面角; ψ (C α -C'結合回りのねじれ角)も 150° と -30° 付近の値しかとらないことが、オリゴペプチドやタンパク質のX線回折の結果³³⁾、およびコンホメーションエネルギーの計算³⁴⁾から指摘されている。Siemionら³⁵⁾はこの $\Delta\delta$ がCis/Trans異性のみならずPro残基の ψ にも依存して変化することを見だし、図5-9の点線で示すような関係を提案した。すでに構造のわかっているPro残基を含むオリゴペプチドについて、その $\Delta\delta$ とPro ψ の関係を図中に書き込んでみると、多少のバラツキはあるもののSiemionらの関係をほぼ再現していると言ってよい。特にOpellaら⁸⁾により環状ペプチドの γ -ターン部分で観測された $\Delta\delta=0.7\text{ppm}$ は、 $\Delta\delta$ のPro ψ に対する依存性を強く裏づけている。(ここで、本研究で新たに測定したデータは●、Opella, Torchiaらによって報告されてデータは○で示した^{8, 9)})。

以上のように、固体中においても $\Delta\delta$ はPro残基のコンホメーションを知るよいパラメーターであることが確認されたが、「ゴースユア効果」と同様この相関も“経験則”のひとつであり、化学シフトの差が何を具体的に反映しているのかは明らかでない。X-Pro周辺の分子構造を考えてみると、 $\Delta\delta$ のPro ψ 依存性はProC β とProC=Oが空間的に近接すること

*2. 環状ペプチドにおける歪みのかかった折り返し構造部分(γ -ターン)にのみ 60° と 120° の ψ が観測されている

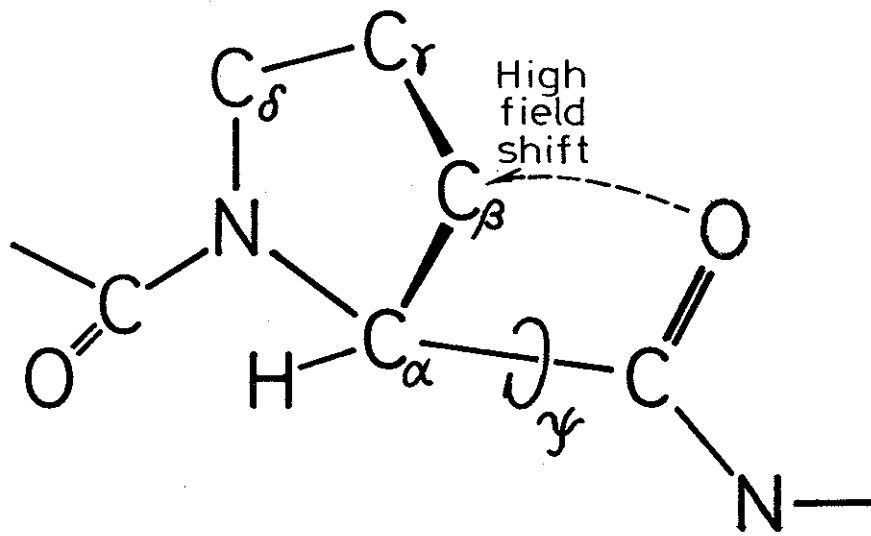


[图5-9] X-Pro間アミド結合のCis/Trans異性, 二面角Pro ψ と¹³C CP-MAS NMRで観測されたPro残基の $\Delta\beta_r$ の相関

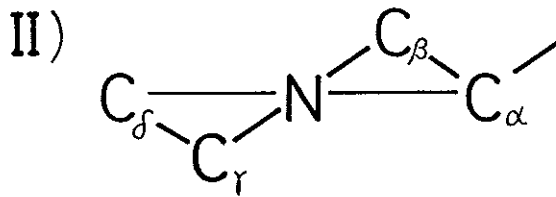
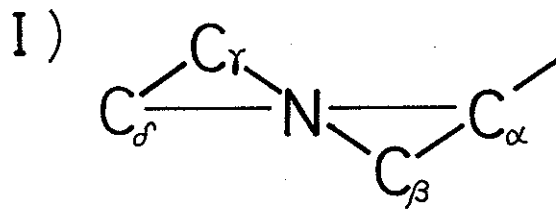
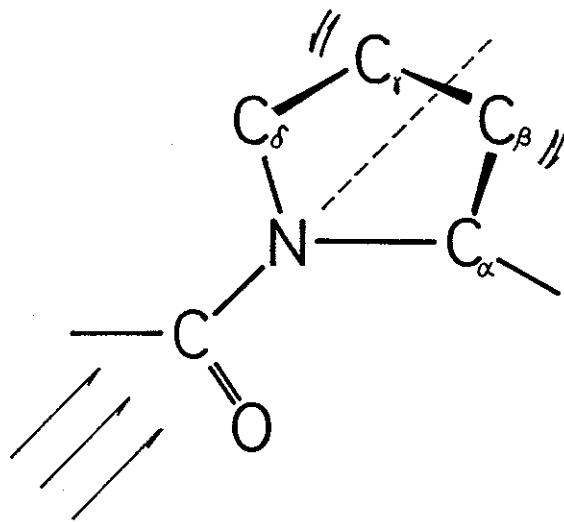
による $\text{ProC}\beta$ の高磁場シフト (図 5-10) と解釈できるが、 $\Delta\beta$ の $X\text{-Pro}$ 結合 Cis/Trans 異性に対する依存性については、結合で 3 つあるいは 4 つ離れた Pro の $\text{C}\beta, \text{C}\gamma$ にアミド結合の Cis/Trans 異性が直接影響を及ぼすとは考えにくい。例えば、 $X\text{-Pro}$ 結合の Cis/Trans 異性がプロリン残基ピペリジン環のパッカーリングと連動しており、 $\text{ProC}\beta$ と $\text{C}\gamma$ はこの環のコンホメーションを反映してシフト変化を起こす、と考えればこの現象を説明することができるが、この仮説の是非を実験的に確認することはまだ行っていない。

・ グリシン以外のアミノ酸残基 $\text{C}\alpha, \text{C}\beta$ 炭素の化学シフト
とコンホメーション

$Z\text{-Gly-Pro}$ 関連ペプチドの中で、もう一つ構造に関する情報を与えると期待されるのは、第 3 残基の $\text{C}\alpha, \text{C}\beta$ 炭素の化学シフトである。第 2 残基の Gly には側鎖がなく、 $\text{C}\alpha$ 炭素近傍の電子分布が C_{2v} の対称性を持つため、その化学シフトはコンホメーション変化に対して敏感でない。第 4 章で明らかにしたように、 ^{13}C でラベルすることによって $\text{GlyC}\alpha$ も α -ヘリックス、 ω -ヘリックス、 β -シート、 3_1 -ヘリックスのそれぞれに固有の化学シフトを持つことが明らかとなったが、変化の幅は 1.4 ppm 程度と小さく他の残基の 1/3 以下である。そのため $\text{GlyC}\alpha$ の化学シフトは、ペプチドのコンホメーションを探る目的には適当でない。一方、 $\text{Ala}, \text{Leu}, \text{Val}$ 等の $\text{C}\alpha, \text{C}\beta$ 炭素化学シフトは、ポリペプチドの 2 次構造に依存して大きく変化することが、齊藤ら²²⁾ および Kricheldorfら²²⁾ の研究によってすでに明らかとなっている (表 5-4 にこれまで得られたポリペプチドのコンホメ



[図5-10] Pro残基の ψ が $30^\circ \sim 90^\circ$ の範囲にくると、
ProC β とProC=Oが近接して、ProC β が高磁場シフトする



[図5-11] Pro残基ピペリジン環のパッカーリングにともなう
2つのコンホメーション

ーション依存化学シフトの参照データを示す)。 ^{13}C の化学シフトが核の周囲の局所的な電子構造に依存して変化するのであれば、ポリペプチドの二次構造に固有の化学シフトは、オリゴペプチドの局所的なコンホメーションを探る目的にも有効なはずである。

β -ターンをとる Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro と Z-Gly-Pro-Leu-Gly において、Leu 残基の化学シフトは $\text{C}\alpha$ 炭素が β -シートのそれに近く、 $\text{C}\beta$ 炭素は α -ヘリックスと β -シートのちょうど中間の値となっている。Ramachandran Map (図 5-2) によれば、 β -ターン第 3 残基の (ϕ, ψ) はポリペプチドのどの二次構造とも異なる位置にあるので、この Leu 残基の $\text{C}\alpha$ や $\text{C}\beta$ の化学シフトは、 β -ターンに固有の値であると考えられる。この仮定が正しいかどうかは他のターン構造をとるペプチドの観測により更に検討しなければならないが、Leu $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ の化学シフトは Z-Gly-Pro-Leu や Pro-Leu-Gly-NH₂ のそれとは明らかに異なり、ここにコンホメーションの違いが現れていると解釈できる。

2) 構造が未知の化合物に対する固体 NMR からの議論

★ Z-Gly-Pro 関連ペプチド

Z-Gly-Pro シーケンスをもち、その構造がまだ X 線回折より知られていない 4 種のオリゴペプチドの ^{13}C 化学シフトを、既にポリペプチドから得られている「コンホメーション依存化学シフト」と比較し、「Gly $\text{C}=\text{O}$ 化学シフトと水素結合距離の相関」を考え合わせることによって、それらの固体中でのコンホメーションを考察した。

[表 5-4] ポリペプチドにおけるコンホメーション依存¹³C化学シフト (ppm from TMS)

Sample	Conformation	Gly		Pro		Ala		Leu		Val	
		C=O	C α	$\Delta\beta$	C α	C β	C α	C β	C α	C β	C α
[Gly] _n	β -sheet	169.5	44.2								
	3 ₁ -helix	172.8	44.2								
[Pro] _n	10 ₃ -helix(cis)			9.3							
	3 ₁ -helix(trans)			2.4							
[Ala] _n	α -helix				53.4	15.9					
	β -sheet				49.2	20.9					
[Leu] _n	α -helix							56.7	40.5		
	β -sheet							51.5	44.3		
[Val] _n	α -helix									66.5	29.7
	β -sheet									59.4	33.4
[Ala, Gly] _n	α -helix	172.7						53.2	15.6		
[Leu, Gly] _n	α -helix	172.4						56.4	40.0		
[Val, Gly] _n	β -sheet	169.5								59.0	33.0
[Ala-Gly-Gly] _n	3 ₁ -helix	172.1	43.0		48.7	17.4					
[Pro-Ala-Gly] _n	Triple	168.2	43.5	4.6	48.3	17.6					
[Pro-Gly-Pro] _n	Triple	167.2	43.0	4.0							

[Z-Gly-Pro-Gly-Gly]

このペプチドの GlyC=O の化学シフトをポリグリシンの実測値(表 5-4)と比較すると、 3_1 -ヘリックスをとる [Gly]_n II の値とほぼ等しくなっている。図 5-6 に示す水素結合距離との相関から この GlyC=O の化学シフト(172.7ppm)は 2.7 Å 程度の R_{N...O} をもつ水素結合に相当し、2.73 Å で分子間の水素結合をとる [Gly]_n Form II の値;172.8ppm とよく一致している。またこのペプチドの C 端部分からなるペプチド; Pro-Gly-Gly-OH³⁶⁾ の主鎖構造は [Pro]_n Form II や [Gly]_n Form II の 3_1 -ヘリックスに近いもので、Z-Gly-基が N 端に付加しても基本的な構造に変化を及ぼさないと考えられる。また、この試料の Pro Δ が 4.0ppm であることから、Gly-Pro 間のアミド結合は Trans である。(Z-Gly-Pro-Leu は 3_1 -ヘリックスをとるが、その Gly-Pro 結合は Cis である)。

このペプチドが結晶中で β -ターン をとる可能性について考えてみると、 β -ターンは前述のように柔軟性の少ない固定された構造のため、水素結合距離が変動する余地は少なく、もしこのペプチドの GlyC=O が β -ターンの分子内水素結合に関与しているならば、その化学シフトは 170ppm 近辺の値をとらなければならない。この Z-Gly-Pro-Gly-Gly のように、GlyC=O の化学シフトが 172ppm より低磁場にある場合には、 β -ターン形成の可能性はほとんどないと考えてよいであろう。同様に、この GlyC=O の化学シフトは、 β -シート構造にとって低磁場すぎる値であり、グリシン残基、プロリン残基は 3 量体程度のオリゴマーでどちらも 3_1 -ヘリックスによく似たコンホメーションをとることが IR¹⁶⁾ から示唆されていることから、

このペプチドが β -シートを形成している可能性はほとんどないと思われる。

[Z-Gly-Pro-Ala-Gly]

GlyC=Oの化学シフト値は172.1ppmであり、約2.75 Åの $R_{N\cdots O}$ をもつ水素結合を形成していると推定される。またProの Δ は7.6と9.9の2つの値が存在し、ここから固体試料中に2種のコンホマーが存在していることが予想され、どちらもその Δ の値からみてGly-Pro結合はCisである。Freyら³⁷⁾はPro-Ala-OHの ^{13}C CP-MAS NMRを観測して、溶液と固体状態でともにCisとTransの2種のコンホマーが存在し、両異性体の比が溶液と固体で逆転することを報告している。これは固体状態においても2種以上のコンホマーの混在が可能であることを示しており、Pro-Ala-OHの結晶構造が報告されていないことの原因もここにあると考えられる。固体高分解能NMRはX線回折のように分子の直接の構造を与えることはできないが、単結晶試料が得られない試料にも適用できる点で優位である。また、Kricheldorfら³⁸⁾は、エラスチンのモデル化合物として3種のオリゴペプチドと4種のプロリン含有コポリペプチドのCP-MAS NMRを観測し、GlyとProのランダム共重合体を除いて、X-Pro結合はすべてTransであったと報告しているが、本研究ではCisのGly-Pro結合をもつオリゴペプチドが3種(Z-Gly-Pro-Leu, Z-Gly-Pro-Ala-Gly, Z-Gly-Pro-Val-Gly)観測されている。

Ala残基が β -ターン構造の第3位となる確率は、統計上Leu残基とほぼ同じであり³⁹⁾、またZ-Gly-Pro-Leu-Glyが β -ターンをとっていることから、このペプチドも β -ターンを形成している可能性がある。しかし

第1残基と第2残基の間のアミド結合がCisとなるような β -ターンは未だ報告されておらず、モデル的にも立体障害が生ずるため、ターン構造の形成は考えにくい。

一方、Ala残基の化学シフトを 3_1 -ヘリックスをとる[Ala-Gly-Gly] $_n$ ⁴⁰⁾と比較すると、AlaC β がわずかに低磁場であることを除いてほぼ一致している。この構造は既に議論したZ-Gly-Pro-Gly-Glyと基本的に同じであると考えられるが、Gly-Pro結合がCisである点が異なっている。しかし、この結合がCisであっても 3_1 -ヘリックスによく似た構造をとりうることはZ-Gly-Pro-Leuの例より明らかであり、 β -ターンの場合を除けば、Gly-Pro結合のCis/Trans異性がペプチドの主鎖構造を拘束することはないようである。

[Z-Gly-Pro-Ala-Ala]

GlyC=Oの化学シフトが他の試料に比べて大きく高磁場シフトしており(167.6 ppm)、水素結合距離との相関からみて、このGlyC=Oは水素結合に関与していないと思われる。そのため β -シートや 3_1 -ヘリックス(どちらのGlyC=Oも分子間水素結合を形成)を形成している可能性は低い。すでにCP-MAS NMRが観測されたポリペプチドでGly残基が水素結合を形成していない構造は、コラーゲン様の3重ヘリックスをとる[Pro-Ala-Gly] $_n$ ⁴⁰⁾と[Pro-Gly-Pro] $_n$ ⁴⁰⁾にだけ見ることができる。Z-Gly-Pro-Ala-Alaと[Pro-Ala-Gly] $_n$ の化学シフトを比較するとProC β ,C γ を除いてほとんど一致している。Pro Δ 所は両者で0.4ppmの差があるもののGly-Pro結合はどちらもTransであり、この点も上記のシーケン

シャルポリペプチドと同じである。これより Z-Gly-Pro-Ala-Ala はコラーゲン様 3 重ヘリックスに似た構造をとっており、Gly 残基を除いた各残基の分子間水素結合により全体の構造が安定化されているものと考えられる。但し、コラーゲン様 3 重ヘリックスの主鎖構造は 3₁-ヘリックスとほとんど見分けがつかないほど似ており、GlyC=O が水素結合に関与していないことを除いて両者に大きな差異はない。4 残基からなる短いペプチドが“3 重ヘリックス”をとるとは考えづらいので、実際には GlyC=O が構造上水素結合できないような 3₁-ヘリックス類似のコンホメーションをとっているものと考えられる。このペプチドの AlaC α , C β の化学シフトは Z-Gly-Pro-Ala-Gly(3₁-ヘリックス)のそれとほとんど同じであり、この事実も Ala 残基周辺の構造が両者で似ていることを示している。

[Z-Gly-Pro-Val-Gly]

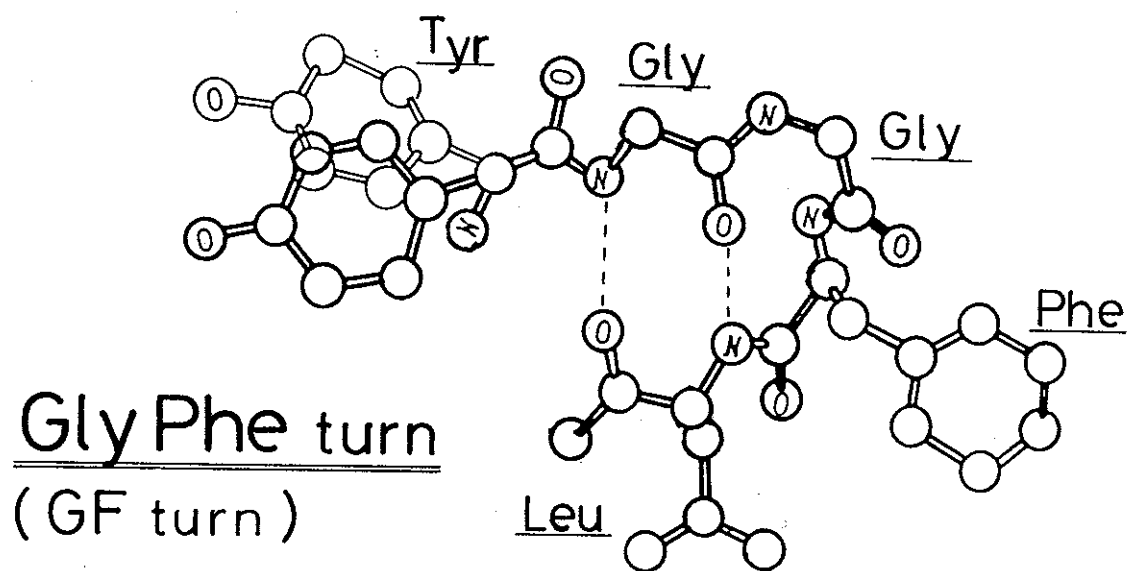
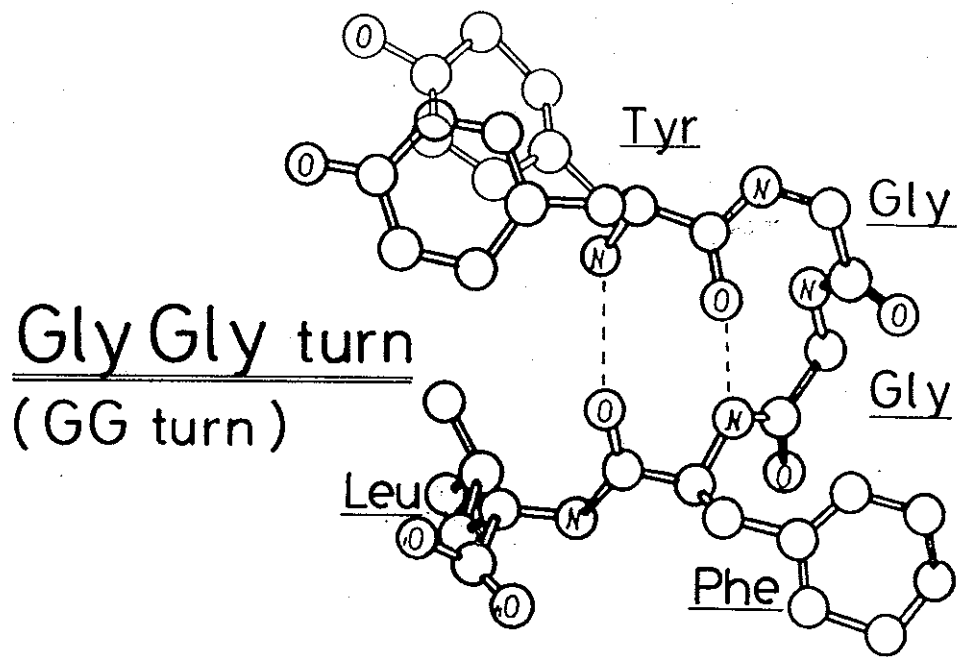
この試料では Pro 残基の C β と C γ のシグナルがそれぞれ 2 つずつ観測されることから ($\Delta\delta$ は 4.9ppm と 10.1ppm)、固体中には 2 つの異なったコンホマーが混在し、一方の Gly-Pro 結合は Cis、他方は Trans であることがわかる。GlyC=O の化学シフト (169.7ppm) より、GlyC=O は 3.0 Å 程度の水素結合をしていると推測され、ここからは β -ターンあるいは β -シート形成の可能性が考えられる。ここで逆平行 β -シートを形成する [Val, Gly]_n や [Gly]_n Form I における GlyC=O が 169.5ppm 付近の値を示し (表 5-4)、またこのペプチドの ValC α , C β の化学シフトがポリ L-バリンの β -シートにほぼ一致していることから、このペプチドは逆平行 β -シートをとっている可能性が高いと考えられる。 β -ターンの可能性も排除するこ

とはできないが、 β -ターンをとる Z-Gly-Pro-Leu-Gly の第 3 残基、Leu の $C\alpha$, $C\beta$ が α -ヘリックスとも β -シートとも異なる固有の化学シフトを示したこと、Val 残基は 20 種のアミノ酸中で最も β -シート部分に見いだされやすく³⁹⁾、また X 線回折よりこの試料と C 端部分を共有する Boc-Pro-Val-Gly-OH⁴¹⁾ とその類似ペプチド Boc-Pro-Val-Gly-NH₂⁴²⁾ がともに典型的な逆平行 β -シート構造をとることから、このペプチドも β -シート構造をとっている可能性が強いと考えられる。

★ エンケファリン関連ペプチド

エンケファリン関連ペプチドの GlyC=O 化学シフトはいずれも 172 ppm より低磁場にあり、前述の水素結合距離と化学シフトの相関から、かなり短い距離の水素結合をしているものと考えられる。N 端に保護基をもたない Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu²¹⁾, Tyr-Gly-Gly-Phe²⁰⁾, Tyr-Gly-Gly¹⁹⁾ についても、X 線回折より第 2 残基の GlyC=O が結晶中で 分子間水素結合 をしていることが示されている。このことから Nps 基の存在は第 2 残基の Gly 周辺の電子的な環境にさほど影響を及ぼさず、ペプチド鎖のコンホメーションもそれほど大きな変化をしていないと考えることができる。

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu と Tyr-Gly-Gly-Phe は結晶中で Tyr¹C=O と Phe⁴N-H が分子内水素結合をした β -ターン (GG ターン, 図 5-12 参照) をとっており (図 5-4 参照)、GlyC=O は隣りの分子及び結晶中の水分子と 分子間 の水素結合をしている。このことから Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe についても同様の構造が期待で



【図5-12】 Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leuに考えられる2つのターン構造

きるが、固体のNMRではターン構造の有無まで検知することはできない。ただしNps-Tyr-Gly-Gly-Phe-LeuにはGly²C=OとLeu⁵N-Hが分子内水素結合をしGly³とPhe⁴が第2,第3残基となる“GFターン”(図5-12参照)の可能性も考えられるが、β-ターンは柔軟性の少ない構造のため、このペプチドのGlyC=O化学シフトから推定されるような短かい水素結合をとる可能性は少なく、これは排除される。

GlyC=Oの化学シフトと水素結合距離の相関において、Nps-Tyr-Gly-Gly-Pheは得られた相関直線とよく一致するが、Nps-Tyr-Gly-Glyはやや外れている。Tyr-Gly-GlyのGlyC=Oは、結晶中でTyrN-Hと同時にH₂OのO-Hとも水素結合しており¹⁹⁾、GlyC=O周辺の電子的な環境が水素結合が一つだけ形成されている場合とは異なっていると考えられる。また>C=O...H-N<系と>C=O...H-O<系の電子構造の違いも直線から外れたことの原因であると考えられる。

以上のように、構造が未知の化合物についてその固体構造をその¹³C CP-MAS NMRの化学シフトから推測した。現状ではX線回折による結晶解析以外にここでの結果を検証することはできないが、各試料の化学シフト値を総合的に判断するとほぼ1通りの構造を指し示しており、ここで推定した構造はある程度妥当なものと考えられる。ポリペプチドと類似のコンホメーションがオリゴペプチド中でも見い出されるということは、ポリペプチドの主鎖構造の安定化に、アミノ酸残基の局所的な2次構造に対する選好性が大きく影響しているためと理解される。

3) NMR化学シフトによる固体構造と溶液中の構造の比較

★ 溶液 ^{13}C NMR化学シフト

- ・ DMSO 溶液中における Gly 残基の C=O 炭素

Z-Gly-Pro 関連ペプチドおよびエンケファリン関連ペプチドにおける固体状態と DMSO 溶液中での GlyC=O 化学シフトを表 5-5 に示す。溶液中での化学シフトは試料によらずほぼ一定であり、DMSO 溶液中では GlyC=O に及ぼす水素結合の影響が均等であることがわかる。ここで観測されたわずかなシフト差は、溶液中でのコンホマーの存在確率の違いにより現れたものと考えられる。固体と溶液中での化学シフトの差($\Delta\delta$)をとると、Z-GlyPro 関連ペプチドの $\Delta\delta$ には大きく分けて 3 種類あることがわかる。

まず、Z-Gly-Pro-Gly-Gly, Z-Gly-Pro-Ala-Gly, Z-Gly-Pro-Leu の 3 つは $\Delta\delta = 5.0$ ppm 前後の値を示し、固体状態で形成される GlyC=O の水素結合が強いものであることを示している。ポリペプチドの二次構造で強い水素結合が形成されるのは、 3_1 -ヘリックスや α -ヘリックスなどのヘリックス構造であり、 β -シートは一般に結合距離が長く水素結合が弱い。 α -ヘリックスは分子軸方向に分子内水素結合を作るため最低でも 8 残基程度は必要であり、オリゴペプチドでは形成が困難である。本研究で用いたペプチドは Pro 残基と Gly 残基を多く含むが、どちらの残基も 3 量体程度のオリゴマーからすでに 3_1 ヘリックスを形成する⁴³⁾。このことはこれらのペプチドが 3_1 ヘリックスをとることを支持している。

次に Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro, Z-Gly-Pro-Leu-Gly, Z-Gly

[表5-5] 固体状態とDMSO溶液中でのカルボニル炭素
¹³C化学シフト値 (ppm from TMS)

Sample	Obs	Solid	DMSO(25°C)	$\Delta\delta$
Z-Gly-Pro	Gly ¹	168.5	<u>167.3</u>	1.2
Z-Gly-Pro-Leu	Gly ¹	172.2	<u>167.0</u>	5.2
Z-Gly-Pro-Leu-Gly	Gly ¹	170.1	<u>167.7</u>	2.4
Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro	Gly ¹	170.3	<u>167.7</u>	2.6
Z-Gly-Pro-Gly-Gly	Gly ¹	172.7	<u>167.8</u>	4.9
Z-Gly-Pro-Ala-Gly	Gly ¹	172.1	<u>167.6</u>	4.5
Z-Gly-Pro-Ala-Ala	Gly ¹	167.6	<u>167.5</u>	0.1
Z-Gly-Pro-Val-Gly	Gly ¹	169.7	<u>167.3</u>	2.4
Pro-Leu-Gly-NH ₂	Pro ¹	175.0	170.8	4.2
	Leu ²	179.3	174.3	5.0
	Gly ³	176.6	172.1	4.5

Nps-Tyr-Gly-Gly	Gly ²	173.2	169.1	4.1
Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe	Gly ²	172.3	169.0	3.3
Nps-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Gly ²	172.7	168.9	3.8

-P ro-V al-G lyでは、 $\Delta\delta = 2.5$ ppm前後の値が観測され、これは既に示したように β -シートまたは β -ターンをとるものに固有の値のようである。結晶中で β -ターンをとる2つのペプチドの $\Delta\delta$ がこのように大きいことは、 β -ターンを安定化させていた分子内水素結合が溶解によって壊され、溶液中では速い分子運動をともなうランダムな構造をとっていることを示している。

Z-G ly-P ro-A la-A laの $\Delta\delta$ は0 ppmで、これは溶解によってもG lyC=Oの化学的な環境が変化しなかったことを示している。これは、このG lyC=Oが固体状態にあるときすでに水素結合には関与していなかったとするCP-MAS NMRの推測と一致する。

またP ro-L eu-G ly-N H₂ について斉藤ら¹⁰⁾は、固体状態において安定である β -ターン構造(P roC=OとC端のN H₂が分子内水素結合)がDMSO溶液中においてもほぼ保持されていると報告しているが、本研究での測定によれば、固体中で分子内水素結合をするP roC=Oについても $\Delta\delta = 4$ ppmが観測され、DMSO中では β -ターン以外のコンホマーあるいはランダムな構造が優位であると考えたほうが妥当である。

T yr-G ly-G ly関連ペプチドのG lyC=O化学シフトは、溶液中で固体よりも一様に高磁場にある。もしN ps-T yr-G ly-G ly-P he-L euが溶液中でGFターンをとっているならば、G lyC=Oの $\Delta\delta$ は他の2つのペプチドに比べて特異な値となるはずであり、それが観測されないことはN ps-T yrG ly-G ly-P he-L euが溶液中でこのターン構造をとっていないことを示している。固体試料においてG lyC=O以外のカルボニル炭素の化学シフ

トを正確に読み取ることは不可能なので、GGターン形成の根拠をなる TyrC=Oの化学シフト変化については情報を得ることはできず、そのためターン構造の有無は確認できない。

DMSO/TFEによる溶媒組成依存性

溶媒をプロトン供与性のもの(D₂Oやトリフルオロエタノール;TFE)から非供与性のもの(DMSOやCDCl₃)へと変化させてゆくと、化学シフトは溶媒組成に依存して変化する。この変化の様子はカルボニル基を分子内水素結合にあずかっているものとそうでないものとの識別する手段となる。前者の化学シフトは溶媒組成依存性を示さないが、後者は示す。

表5-6にDMSO 100%、DMSO;TFE=2:1、DMSO;TFE=1:1の3点で測定した化学シフトの変化率(ppm/TFE%)を示す。ここに見るように、すべての試料のすべての残基が溶媒組成依存性を示した。特にZ-Gly-Pro-Leu-Gly-ProとZ-Gly-Pro-Leu-GlyのGlyC=Oが溶媒依存性を示したことは、たとえ結晶中で分子内水素結合をとっていてもDMSO溶液中では分子内水素結合が切れており、β-ターンは保持されていないことを示している。

DMSO溶液中でのProCβ,Cγシグナルの挙動について

固体のNMRにより、固体状態ではZ-Gly-Pro-Ala-Gly,Z-Gly-Pro-Val-Glyの2つの試料を除いて一組のProCβ,Cγのみが観測され、Gly-Pro結合がTransあるいはCisのどちらか一方が存在することが示された。しかし溶液中ではCis/Trans異性の2種のみならず、数本のProCβ,Cγが出現することもあり、溶液中における複数のコンホメーションの存在を示している。Z-Gly-ProペプチドのProCβ,Cγ領域における棒ス

[表5-6] カルボニル炭素化学シフトの溶媒組成依存性 (DMSO/TFE)

(TFEの%濃度に対して化学シフトをプロットしたときの傾き(ppm/%)で示した)

1) Z-GlyProベプチド

Sample	第1, 2残基			第3残基			第4残基			第5残基	
	Gly(t)	Gly(c)	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Gly(t)	Gly(c)	Ala	Pro
Z-GlyProLeuGlyPro	5.78	5.26	3.82	4.44				5.52	3.66		3.55
Z-GlyProLeuGly	5.18	4.48	3.92	4.21				2.93			
Z-GlyProGlyGly	4.78	4.68	4.64		4.61				3.14		
Z-GlyProAlaGly	4.92	4.26	3.69			3.94		2.73			
Z-GlyProAlaAla	4.46	4.04				3.66				2.73	
Z-GlyProValGly	5.47	5.32	4.50				4.30				
Z-GlyProLeu	4.27	4.27	4.01	2.97							
Z-GlyPro	3.93	3.71	3.26								
ProLeuGly-NH ₂			5.39	4.41						4.41	

Gly(t), Gly(c)はそれぞれGly-Pro結合Cis, Trans異性に相当するGlyC=0炭素のシグナルを指す

2) エンケファリン関連ベプチド

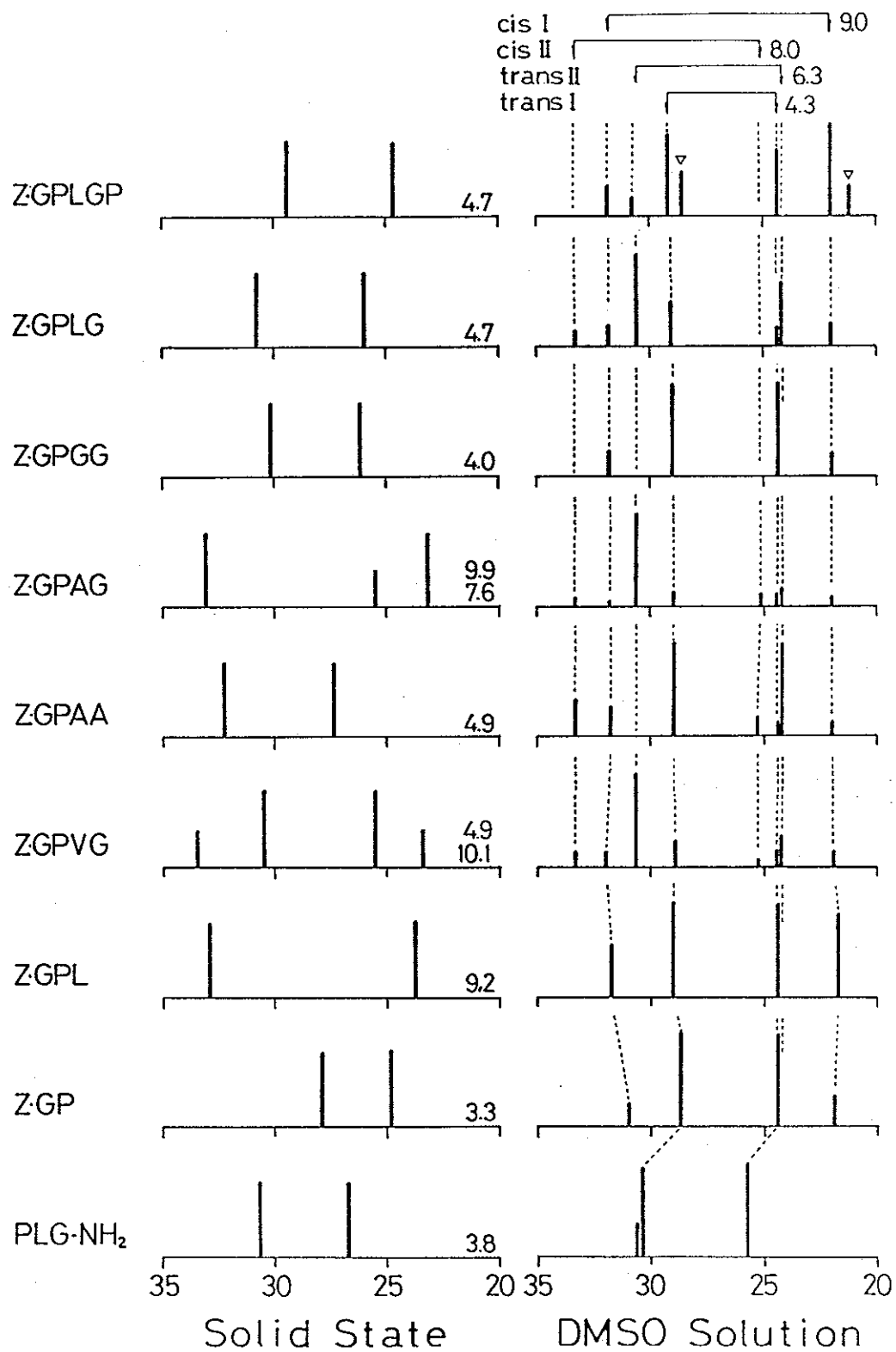
Sample	Tyr	Gly(t)	Gly	Phe	Leu
Nps-TyrGlyGlyPheLeu	3.40	4.61	5.19	4.63	3.74, 4.28
Nps-TyrGlyGlyPhe	3.18	4.12	4.12	3.24	
Nps-TyrGlyGly	2.95	3.78	4.17		

ペプチルを固体、溶液の双方についてまとめたのが、図5-13である。この溶液部分を詳細に検討すると、溶液中ではほぼ4組のProC β ,C γ が存在し、これら4種のコンホマーの存在比が試料によって変化していることがわかる。それらはTrans2種($\Delta\delta$ =4.3, 6.3)とCis2種($\Delta\delta$ =8.0, 9.0)で、Z-Gly-Pro-Gly-GlyやZ-Gly-Pro-LeuではTrans1($\Delta\delta$ =4.3)とCis1($\Delta\delta$ =9.0)が支配的であるが、Z-Gly-Pro-Leu-GlyやZ-Gly-Pro-Ala-GlyではTrans2($\Delta\delta$ =6.3)の分率が高いと思われる。Z-Gly-Pro-Leu-Gly-ProとZ-Gly-Pro-Leu-Glyは固体中のコンホメーションが全くと言っていいほど似ているにもかかわらず、溶液中のコンホマーの分率は異なる様子である。この4種のコンホマーそれぞれの具体的な構造を知ることは困難であるが、Trans1とCis1の $\Delta\delta$ が固体中で見られるTransとCisの値に近いことから、これらのコンホメーションの相同性が推測され、Trans2とCis2は、Trans1とCis1の中間的な構造であると考えられる。

§5-3 ま と め

1. すでに得られている「GlyC=O化学シフトと水素結合距離の相関」および「プロリン残基の $\Delta\delta$ (C β とC γ の化学シフトの差)」を用いることにより、固体高分解能NMRから鎖状ペプチドのコンホメーションについても有意な情報が得られることがわかった。

GlyC=Oの分子内水素結合によりコンホメーションが安定化してい



[図5-13] 固体およびDMSO溶液中におけるProCBCr炭素のシグナル

る Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro, Z-Gly-Pro-Leu-Gly の場合、
GlyC=O の化学シフトはその水素結合距離から予測される値よりも若干低磁場シフトするが、これは水素結合が大きく屈曲しているためと思われる。またこの2つのペプチドの Leu 残基の化学シフトは、C α 炭素が β シートのそれに近く、C β 炭素は α -ヘリックスと β -シートのちょうど中間の値となって、これはポリペプチド中には見られない β -ターン構造の第3残基に特徴的な化学シフトであると考えられる。

2. 結晶構造が未だ知られていないオリゴペプチドの CP-MAS NMR を観測し、各種アミノ酸残基の等方平均化学シフトを、結晶構造が既に知られているオリゴペプチドおよびポリペプチドの ^{13}C 化学シフトと比較することにより、未知のコンホメーションを探る試みをしたところ、概ね一通りの構造を推測することができた。CP-MAS NMR から得られるコンホメーション依存の化学シフトは、観測核周辺のかかなり局所的な電子構造を反映して変化し、オリゴペプチドの構造解析にも有用であることが示された。固体高分解能 NMR は今後、結晶化の困難なペプチドあるいは結晶化していないペプチドの、固体中の分子構造を探る有力な手法となってゆくものと思われる。

なお、本章で述べた研究内容は以下の報文として発表いたしました。

Ando, S.; Matsumoto, K.; Ando, I.; Shoji, A.; Ozaki, T.

J. Mol. Struct. (1989) (in press)

参考文献>

- 1) • Karle, I.L. "X-Ray Analysis: Conformation of Peptides in the Crystalline State" in 'Peptides' Vol.4 Academic Press (1981)
• Benedetti, E. "Structure and Conformation of Peptides as determined by X-ray crystallography" in 'Chem. and Biochem. of amino acids, peptides, proteins' Marcel-dekker, New York (1974)
- 2) • Rose, G.D.; Gierasch, L.M.; Smith, J.A. "Turns in Peptides and Proteins" in 'Adv. in Protein Chem.' Vol.37 Academic Press (1985)
• Smith, J.A.; Pease, L.A. "Reverse Turns in Peptides and Proteins" CRC critical Rev. in Biochemistry (1980, oct.)
- 3) • Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. Biopolymers 23, 2279 (1984)
• Shoji, A.; Ozaki, T.; Amiya, S.; Ando, I. Macromolecules 18, 148 (1985)
- 4) Tanaka, I.; Kozima, T.; Ashida, T., Tanaka, N.; Kakudo, M., Acta Cryst. B33, 116 (1977)
- 5) Yamane, T.; Ashida, T.; Shimonishi, K.; Kakudo, M.; Sasada, Y., Acta Cryst. B32, 2071 (1976)
- 6) Ueki, T.; Ashida, T.; Kakudo, M.; Sasada, Y.; Katsube, Y. Acta Cryst. B25, 1840 (1969)
- 7) Bando, S.; Tanaka, N.; Ashida, T.; Kakudo, M. Acta Cryst. B34, 3447 (1978)
- 8) • Pease, L.G.; Frey, M.H.; O'Pella, S.J., J. Am. Chem. Soc. 103, 467 (1981)
• Frey, M.H.; O'Pella, S.J.; Rockwell, A.L.; Gierasch, L.M. J. Am. Chem. Soc. 107, 1946 (1985)
- 9) • Sarker, S.K.; Torchia, D.A.; Kopple, K.D.; VanderHart, D.L., J. Am. Chem. Soc 106, 3328 (1984)
- 10) Saito, H.; Tabeta, R. Chem Lett. 83 (1985)
- 11) Saito, H.; Tabeta, R. Peptide Chem. 1987 Protein Res. Foundation (1987)
- 12) Khaled, M.A.; Long, M.M.; Thompson, W.D.; Bradley, R.J.; Brown, G.B.; Urry, D.W. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 224 (1977)
- 13) Smith, G.D.; Griffin, J.F. Science, 199, 1214 (1978)
- 14) Higashijima, T.; Kobayashi, J.; Nagai, U.; Miyazawa, T. Eur. J. Biochem. 97, 43 (1979)

- 15) Zervas, L.; Borovas, D.; Gazis, E. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3660 (1963)
 • Wuensch, E. "Synthese von Peptiden" Georg Thieme, Stuttgart (1974)
 • 泉屋信夫, 加藤哲夫 他 "ペプチド合成の基礎と実験" 丸善(東京) (1985)
- 16) Benedetti, E.; Palumbo, M.; Borona, G.M.; Toniolo, C. *Macromolecules* 9, 417 (1976)
 • Marsh, R.E.; Murthy, M.R.N.; Venkatesan, K. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 1251 (1977)
- 17) Ashida, T.; Tanaka, I.; Shimonishi, Y.; Kakudo, M. *Acta Cryst.* B33, 3054 (1977)
- 18) Tanaka, I.; Ashida, T. *Acta Cryst.* B36, 2164 (1980)
- 19) Carson, W.M.; Hackert, M.L. *Acta Cryst.* B34, 1275 (1978)
- 20) Prange, P.; Pascard, C. *Acta Cryst.* B35, 1812 (1979)
 • Zaluski, F.; Prange, T.; Pascard, C.; Roques, P.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 79, 1199 (1977)
- 21) Smith, G.D.; Griffin, J.F. *Science*, 199, 1214 (1978)
- 22) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I. *Macromolecules*, 16, 1050 (1983)
 Mueller, D.; Stutz, J.; Kricheldorf, H.R., *Makromol. Chem.*, 185, 1739 (1984)
- 23) Howarth, O.W.; Lilley, D.M. *Prog. NMR Spect.* 12, 1 (1977)
- 24) 芦田玉一, 山根隆, 田中勲 "オリゴペプチド結晶中の2次構造",
 日本結晶学会誌 22, 187 (1980)
- 25) Lotz, B. *J. Mol. Biol.* 87, 169 (1974)
- 26) Kojima, T.; Yamane, T.; Ashida, T. *Acta Cryst.* B34, 2896 (1978)
- 27) Iwasaki, F. *Acta Cryst.* B30, 2503 (1974)
- 28) Rao, S.T.; Mallikarjunan, M. *Cryst. Struct. Comm.* 2, 257 (1973)
- 29) Smith, G.D.; Pletnev, V.Z.; Duax, W.L.; Balasubramanian, T.M. et al.
J. Am. Chem. Soc. 103, 1493 (1981)
- 30) Madison, V.; Treyi, N.; Deber, C.M.; Blout, E.R. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 6725 (1974)
- 31) Traub, W.; Shmueli, U. In "Aspects of Protein Struct." Academic Press New York (1963)
- 32) Sasisekharan, V. *Acta Cryst.* 12, 897 (1959)
- 33) Karle, I.L. "Peptides" vol.4 Academic Press, New York (1981)
- 34) Maignet, B.; Perahia, D.; Pullman, B. *J. Theor. Biol.* 29, 275 (1970)

- 35) Siemion, I.Z.; Wieland, T.; Pook, K.H., *Angew. Chem.*, 19, 712 (1975)
- 36) • Avignon, M.; Garrigou-Lagrange, C., *Spectrochim. Acta* 27A, 297 (1971)
• Borona, G.N.; Toniolo, C. *Gazz. Chim. Ita.* 110, 503 (1980)
• Toniolo, C.; Borona, G.N.; Tajasekhran, V.M.; Mutter, N.,
Macromolecules, 13, 772 (1980)
- 37) Frey, M.H. A Dissertation in Chemistry, Univ. of Pennsylvania (1984)
- 38) Kricheldorf, H.R.; Mueller, D., *Int. J. Biol. Macromol.*, 6, 145 (1984)
- 39) Chou, P.Y.; Fasman, G.D. *Adv. Enzymol.* 47, 45 (1978)
- 40) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T.
Biopolymers 23, 2279 (1984)
- 41) Tanaka, I.; Ashida, T., *Acta Cryst.*, 1980, B36, 2164
- 42) Ashida, T.; Kojima, T.; Tanaka, I.; Yamane, T., *Int. J. Pept. Prot. Res.*,
27, 61 (1986)
- 43) • Kartha, G.; Ashida, T.; Kakudo, M. *Acta Cryst.* B30, 1861 (1974)
• Matsuzaki, T. *Acta Cryst.* B30, 1029 (1974)

第六章 グリシン残基における
コンホメーション依存化学
シフトのFPT-INDO法
による理論計算

§ 6-1 はじめに

[6-1-1] 実験的に得られた「化学シフト」の挙動を
理論的に説明することの意義

NMRは、IRやUVなど他の分光法に比べて観測のために外部から加える摂動がきわめて小さく、分子の電子状態をほとんど攪乱することなしに情報が取り出せることをその特徴としている。この分光器からは分子を構成する各々の原子の情報を個別に得ることが可能であるのみならず、観測できる核種の数もきわめて多いため、分子内の局所的な電子状態をそれぞれ独立に知ることができる。しかし、NMRを単に分析の手段として経験的に利用してゆくだけでは、対象を本質的に理解することは難しい。つまり化学シフトやカップリング定数など得られるNMRパラメータの電子論的な意味を正しく把握し、実験事実を理論に即して解釈してゆくことが、対象の本質を引き出してゆくためには重要である。^{*1}

前章までの測定から得られた「実測結果」の意味を理論的に明らかにするため、本研究では化学シフトの量子化学計算による解釈を考察に取り入れた。このようなアプローチは実験結果のもつ規則性や多様性を統一的

*1. NMRが開発された当初から「化学シフト」が観測核の周囲の電子状態と密接な関係にあることは認識されていた。そのため実験から経験的に引き出された「化学シフト」の傾向を、価電子密度や π 電子密度などに関連づけて説明することがこれまで多く行われてきた。 ^1H 核のようなs電子のみを持つ核種の場合には「磁気遮蔽定数」の評価のうち「反磁性項」が優位となるため、電子密度に部分電荷と環電流の効果を検討すれば化学シフトの挙動をある程度説明することができる。しかし、p電子やd電子が外殻電子となるLi以上の核種においては反対に「常磁性項」が優位となるため、「化学シフト」の挙動を電子密度等によって説明することはできず、両者の直接的な相関も理論的に言っておりえない。

に理解し、予測してゆく上で有用であるばかりでなく、分子の電子構造を「化学シフト」という物理量を通して理解するための有用な手段を提供すると考える。本研究で観測の対象とした ^{13}C に代表される $1/2$ の核スピンを持った核種の化学シフトについては、すでに膨大な実験データが蓄積されているにもかかわらず、重要な実験事実が磁気遮蔽定数の量子化学計算によって理論的に解明された例はそれほど多くない。

[6-1-2] 磁気遮蔽定数の計算方法とその問題点

次節の「理論」でも述べるとおり、現在までに開発された磁気遮蔽定数の量子化学計算は、

☆ 用いる分子軌道法の種類によって

- ①. 非経験的分子軌道法によるもの と
- ②. 半経験的分子軌道法によるもの、

☆ 磁気遮蔽定数の評価定式によって

- I. FPT (Finite Perturbation Theory)法によるもの、
- II. CHF (Coupled Hartree Fock)法によるもの と
- III. SOS (Sum Over State)法によるもの

に分類することができる。一般に②よりも①が、またIIIよりもI, IIによる計算がより高い精度を示すことが知られている。本節では、本研究で採用した半経験的分子軌道法を用いたFPT法による磁気遮蔽定数の計算について現在までの研究成果を概説し、非経験的分子軌道法を用いた研究については、福井¹⁾あるいはSchastnev²⁾による総説を参照されたい。

1972年、Ellisら³⁾はFPT-INDO法を用いることにより、「半経験的分子軌道法による磁気遮蔽定数の計算」が実用的な精度をもちうることを初めて示した。まず炭化水素における ^{13}C の計算結果と実測値の比較

が出された後、引き続いてMacielらのグループにより含フッ素化合物⁴⁾、含窒素化合物⁵⁾、含酸素化合物(カルボニル基をもつ化合物)⁶⁾の¹³C磁気遮蔽定数の評価と発展させられ、またその過程で「局所的な電場の効果」や「ゴージュア効果」⁸⁾についても考察された。半経験的分子軌道法による含フッ素,含窒素,含酸素化合物についての計算は、彼らによる報告が現在まで唯一のものであり、また化学シフトのコンホメーション依存性、分子間相互作用の効果についても、彼らの計算が初めての例であった。表6-1に見るように、化学シフトの定量的な評価や予測を行うレベルには達していないが、その挙動を定性的に説明することに成功している。

表6-2に現在までに報告された半経験的分子軌道法による炭化水素の¹³C化学シフトの計算結果⁹⁻¹³⁾を示す。計算性能の評価は表中に見るように、Ellisらに始まる「炭化水素を用いる方法」により行われてきた。理論計算による実測化学シフトの再現性は年を追うごとにゆっくりと向上しているが、どの方法にも一長一短があり「決定版」と呼べるようなシステムは未だ開発されていない。

実測結果を完全な精度で再現できないことの具体的な原因として、次のようなことが考えられる。

- ① 磁気遮蔽定数の計算に用いる理論上の取扱い(近似レベル)が十分でないことに起因する“計算方法の不完全性”・・・これは次章で詳しく述べるように、「分子軌道法計算」と「磁気遮蔽定数計算」の双方で採用している理論の近似レベルに依存している。
- ② 計算に用いる分子の構造パラメーターを一意的に決めることができない“分子構造の非決定性”・・・分子の構造パラメーターの選択には、
 1. X線回折や中性子線回折から得られた単結晶での値を用いる方法、
 2. 分子軌道法計算によりエネルギーを最小化させた構造を用いる方法、
 3. 原子価や化学種に応じた標準値を用いる方法

表 6-1 FPT-INDO法による ^{13}C 化学シフトの計算結果^{a)}(Ellisら)

モデル化合物	計 算 値		実測値 δ (ppm)	差 ($\delta - \sigma$)
	σ^b (ppm)	σ^c (ppm)		
CH_4	0.0	0.0	0.0	
C_2H_6	0.3	3.0	8.0	5.0
C_2H_4	119.2	115.0	125.4	10.4
C_2H_2	80.0	80.6	76.0	-4.6
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$	4.7	6.5	17.7	11.2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$	-2.3	2.8	18.2	15.4
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$	120.6	112.1	118.6	6.5
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$	120.4	126.2	137.9	11.7
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$	4.5	6.1	22.6	16.5
$\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	83.3	78.6	72.1	-6.5
$\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	84.2	92.4	87.8	-4.6
$\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	2.2	4.6	-	-
$\text{CH}_2=\text{CH}=\text{CH}_2$	97.9	88.7	76.8	-11.9
$\text{CH}_2=\text{CH}=\text{CH}_2$	167.2	182.7	214.8	32.1
C_6H_6	118.5	120.6	130.8	10.2
cyclo- C_3H_6	8.8	12.4	0.1	-12.3
cyclo- C_6H_{12}	5.6	9.7	29.9	20.2
CH_3F	50.5	59.7	77.5	17.8
CH_2F_2	88.9	121.6	111.3	-10.3
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{F}$	8.1	6.4	16.7	10.3
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{F}$	53.7	65.0	81.4	16.4
$\text{CH}_2=\text{CHF}$	106.1	100.8	91.3	-9.5
$\text{CH}_2=\text{CHF}$	130.7	161.1	150.5	-10.6
$\text{CH}\equiv\text{CF}$	67.7	63.6	18.4	-45.2
$\text{CH}\equiv\text{CF}$	63.1	82.6	92.9	10.3
$\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$	6.2	5.4	2.6	-2.8
$\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$	93.5	140.6	120.6	-20.0
$\text{CH}_2=\text{CH}\equiv\text{CN}$	116.8	111.4	111.3	-0.1
$\text{CH}_2=\text{CH}\equiv\text{CN}$	125.6	127.5	131.1	3.6
$\text{CH}_2=\text{CH}\equiv\text{CN}$	86.6	130.6	140.0	9.4
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$	5.1	5.7	21.1	15.4
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$	2.9	13.8	39.0	25.2
CH_3OH	-	19.5	51.4	31.9
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	-	21.3	59.4	38.1
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	-	4.6	20.0	15.4
CH_3CHO	-	192.4	201.7	9.3
CH_3CHO	-	9.7	33.3	23.6
HCOOH	-	193.1	168.8	-24.6
CH_3COOH	-	190.3	179.4	-10.9
CH_3COOH	-	8.2	23.2	15.0
CH_3COCH_3	-	186.7	207.2	20.5
CH_3COCH_3	-	10.0	32.3	22.2

a) 基準はすべて CH_4 b) スレーター則による $\langle r^{-3} \rangle$ と $\langle r^{-1} \rangle$ の項の補正を行わないものc) スレーター則による $\langle r^{-3} \rangle$ と $\langle r^{-1} \rangle$ の項の補正を行ったもの

[表6-2]

有限摂動法(FPT法)と半経験的分子軌道法を用いた¹³C化学シフトの理論計算

化合物における観測核	制作者 分子軌道 発表年度	Ellis ³⁾ INDO (1972)	Garber ⁹⁾ INDO (1979)	Chesnut ¹⁰⁾ INDO (1980)	Chesnut ¹¹⁾ MINDO/3 (1988)	Wu&You ¹²⁾ MNDO (1987)	S. Ando ¹³⁾ MNDO (1988)	Exptl.
CH ₄		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C ₂ H ₆		3.0	12.25	5.5	7.6	8.41	19.40	14.07
C ₂ H ₄		115.04	124.87	123.9	101.2	130.64	117.91	129.79
C ₂ H ₂		80.55	74.58	75.6	54.2	80.67	70.57	76.6
CH ₃ [*] CH ₂ CH ₃		6.48	13.41	8.6	9.3	9.96	19.27	24.16
CH ₃ CH ₂ [*] CH ₃		2.75	23.61	5.3	12.4	16.67	38.45	25.83
CH ₂ [*] =CHCH ₃		112.11	120.03	116.4	107.4	123.62	115.82	123.22
CH ₂ =C [*] HCH ₃		126.22	149.56	136.2	120.1	132.09	130.15	142.48
CH ₂ =CHC [*] H ₃		6.21	16.57	12.2	5.9	12.83	24.87	26.21
C [*] H=C-CH ₃		78.62	86.76	70.3	65.9	79.58	80.86	72.4
CH=C [*] -CH ₃		92.38	102.43	86.6	69.7	83.53	76.99	84.7
CH=C-C [*] H ₃		4.64	11.77	3.0	-0.7	6.07	27.64	7.3
CH ₂ [*] =CH=CH ₂		88.70	96.37	87.5	91.7	94.40	72.59	77.43
CH ₂ =C [*] H=CH ₂		182.69	240.17	192.3	203.5	198.43	231.84	215.39
cis-CH ₃ [*] CH=CHCH ₃			13.23	13.4	5.9	6.86	22.18	14.0
cis-CH ₃ C [*] H=CHCH ₃			146.69	132.4	128.0	129.25	128.07	127.2
trans-CH ₃ [*] CH=CHCH ₃			14.25	11.2	6.3	7.92	25.99	20.7
trans-CH ₃ C [*] H=CHCH ₃			147.48	132.3	128.6	130.89	127.68	128.5
C [*] H=C-C=CH			64.64			79.42	66.90	69.27
CH=C [*] -C=CH			99.15			70.26	70.18	70.98
cyclo-C ₃ H ₆		12.37	18.63	16.6	25.2	13.95	26.44	0.2
C ₆ H ₆		120.62	148.06	131.9	142.7	131.45	129.39	131.5
cyclo-C ₆ H ₁₂		9.68	25.49			20.47	42.74	30.6
CH ₃ C ₆ H ₅ (methyl)		6.47	17.35			15.18	25.72	24.3
CH ₃ C ₆ H ₅ (C-1)		129.72	172.76			137.83	142.22	140.8
CH ₃ C ₆ H ₅ (C-2)		120.74	146.77			129.88	128.54	131.4
CH ₃ C ₆ H ₅ (C-3)		122.38	150.03			132.01	130.01	132.2
CH ₃ C ₆ H ₅ (C-4)		120.37	145.59			130.07	128.34	128.5
平均誤差 (p p m)		12.7	11.8	7.8	13.0	6.3	6.6	
最大誤差 (p p m)		32.7	32.0	20.5	28.6	13.8	26.2	

などがあり、研究者によってその選択はまちまちである。また実際にはどの方法がよいのかは必ずしも明らかではない。

- ③ 「溶媒効果」、「分子間相互作用」、「コンホメーションの効果」を実測値から排除できないことに起因する“実測値の不確定性”・・・計算方法の性能は、実測の化学シフト値と計算値を比較することによって評価されるが、以下にあげるような理由でこの「実測値」も一意的には決まらない。まず、有機化合物の「化学シフト」としては、一般に非極性溶媒に溶けた状態で観測された値を用いるが、非極性と言っても系から「溶媒効果」を完全に排除することができない。また「気相のNMR」が観測できるようになって低分子量炭化水素の化学シフトが精度良く得られるようになったが、信号を観測するためにある程度の圧力が必要であり、気相中であっても「分子間相互作用」は避けられない。また溶液NMRによる測定値と比較する際には、化学シフトの基準物質として何を採用するかといった問題も生ずる。加えて、計算される分子は真空中で孤立し、ただ一つのコンホメーションをとっているものとして取り扱われるが、溶液中や気相中で分子は速い運動をしており、その分子構造も大きく揺らいでいる。化学シフトが分子のコンホメーションに依存して数ppm変化することはこれまでも述べてきた通りであり、このことも「計算値」と「実測値」の比較を困難にしている。

つまり、計算の理論、用いる分子の構造パラメーター、比較の基準となる実測値のどれをとっても、計算結果と実測結果の直接的な比較には問題があり、そのため現在の計算方法がどの程度優れているかを絶対的な尺度で評価することは難しい。本研究ではそのため、誤差数ppm程度の実測結果の再現性で定性的な議論には十分であると考え、磁気遮蔽定数(化学シフト)の計算方法としてFPT-INDO法およびFPT-MND法を採用することとした。次章でも述べる通り ab-initio法と呼ばれる理論的に近似の高い分子軌道法を使えば¹⁴⁾、計算精度は更に±1~2ppm程度良くなることが期待されるが、計算に必要な計算機の数と記憶容量が半経験的分子軌道法による場合に比べて2ケタほど大きく、実用的なモデル化合物に適用することは現状では難しい。

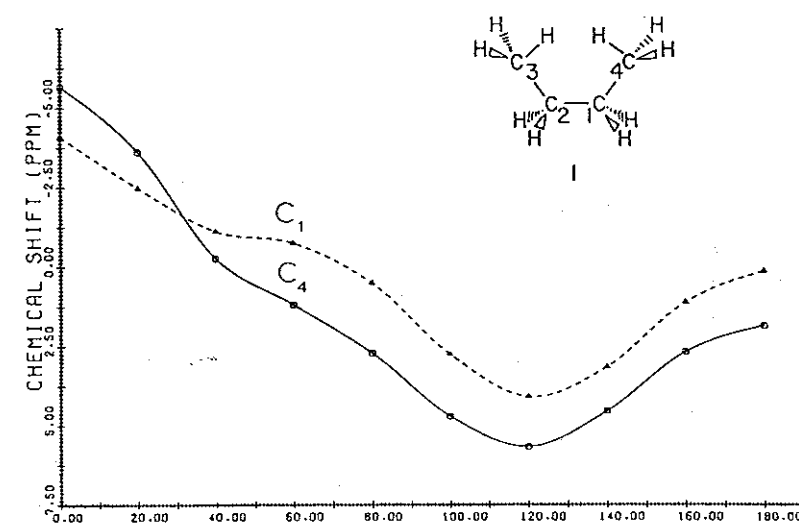
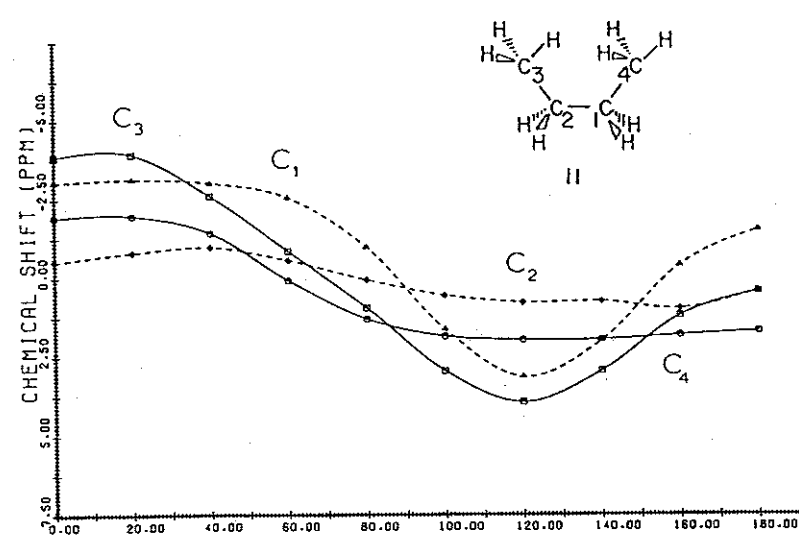
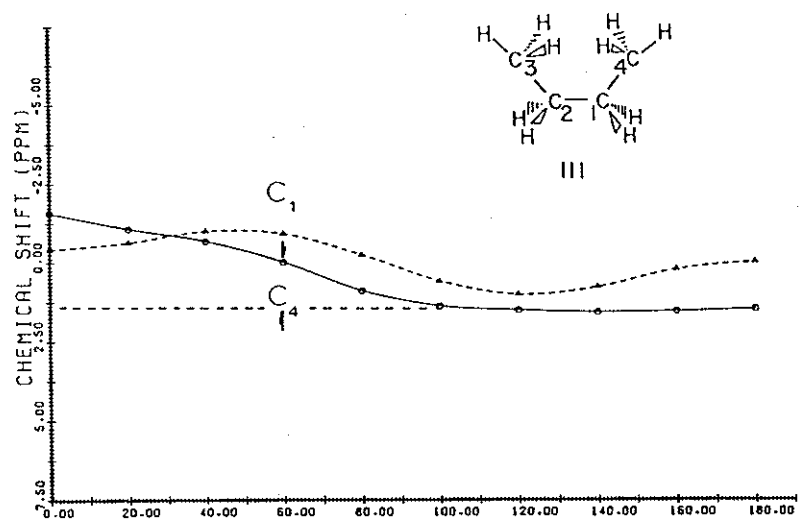
[6-1-3] 固体高分解能NMRと磁気遮蔽定数の理論計算

溶液NMRの分野では近年、高度なパルステクニックを使った種々の観測手法が開発され、シグナルの帰属はもとより複雑な化合物の化学構造の決定や核間距離を仲介としたタンパク質の三次構造の推定までが可能となってきた。溶液のNMRでは測定対象となる分子が溶媒中に均質に分布し、分子のコンホメーションは平均化され、観測されるパラメーターも空間的、時間的に平均化された値である。そのためシグナルの分解能と検出感度はともに高く、議論の対象となる化学シフトの変化も固体のNMRに比べてはるかに小さい。つまり、溶液のNMRでは系を平均化することによって必然的に小さくなってしまふ観測量の差を、分光器の分解能と検出感度の向上によって補っている

溶液NMRによる精度の高い観測値に対して、磁気遮蔽定数の理論計算はその評価方法に問題が残るとは言え、現在でも数ppm程度の計算精度しか持ちえておらず、将来にわたっても100分の1ppmを議論することは難しい。溶液NMRの測定感度が高かったために、これまで磁気遮蔽定数の計算は実験事実の解釈や研究指針の探索といった積極的な目的にほとんど使われてこなかった。しかし、固体のNMRが開発され、種々のNMRパラメーターがテンソル量としての性質を残した形で観測されるようになるにつれて、磁気遮蔽定数の理論計算が現実的な有効性を持つようになってきている。前章まで繰り返し述べたように、化学シフトテンソルの主値は等方平均化学シフトよりも電子構造の変化に敏感であり、観測値が変動する幅も等方平均値に比してはるかに大きい。理論計算からは完全なテンソル量と

して“化学シフト”が得られるため、実測値との比較も2階のテンソル量にできるだけ近い形で行った方が比較の信頼性は高いと言える。加えて固体状態では、観測される系が計算される分子の状態に近く、分子のコンホメーションが固定されているために計算によって「化学シフトのコンホメーション依存性」を評価することができる。また、CP-MAS法の開発により固体でも高分解能のスペクトルが観測できるようになったが、溶液のスペクトルに比較すると分解能が悪く測定手法も限られているため、複雑な系ではシグナルの帰属さえもが容易でない。溶液のNMRが「それだけで複雑な系についてもかなり詳細な情報が得られる」分光器として発展しつつあるのに対し、固体のNMRは、スペクトルのシミュレーションや磁気遮蔽定数の理論計算といった「副次的な技術やテクニックを用いなければ詳細な情報を得ることが難しい」分光器である、という違いがこの2つの間には存在している。得られる情報の種類、分光器としての特徴を考えると、「磁気遮蔽定数の理論計算」は固体のNMRにおいて、より効果的にその有効性を発揮できると考えられる。

溶液のNMRが唯一の「化学シフト」の測定手段であった頃から、コンホメーションが完全には平均化されない系で「コンホメーション依存の化学シフト」はしばしば観測され、それらの知見は“経験則”として蓄積されてきた。「ゴースユア効果」¹⁵⁾はその代表格であり、Macielらのグループ⁸⁾によって最初の理論計算の俎上にのぼせられたのもこの効果であった。図6-1にn-ブタンのメチル炭素について計算された結果を示す。二面角 $\phi=180^\circ$ (トランス)と $\phi=60^\circ$ (ゴースユ)を比較すると、Type 1のモ



[図6-1] FPT-INDO法によるn-ブタン分子における「ゴースユア効果」⁸⁾
 水素分子の向き合い方でC₄炭素に現れる効果が大きく異なる。

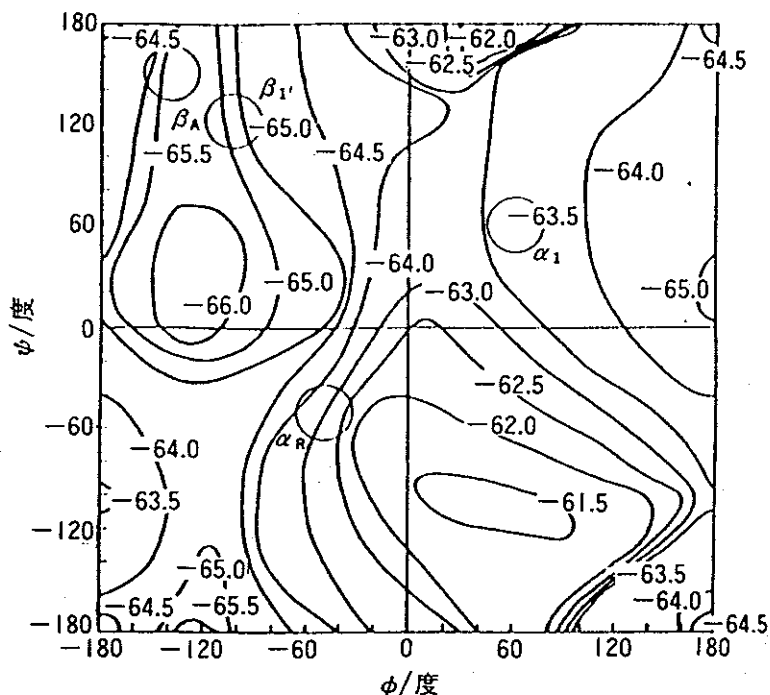
デルにおいてゴースユ位が約 1.3 ppm の高磁場シフトと定性的に実測の結果を再現している。しかし、実測値の 5.3 ppm に比べると計算値のシフト差はその 1/4 程度で、この効果を定量的に評価できる域には達していない。

「化学シフトのコンホメーション依存性」の理論計算による評価には、「化合物による化学シフト差」の計算による評価とは違った難しさがあるようである。

1984年、安藤ら¹⁶⁾は F P T - I N D O 法をアラニンのモデル化合物に適用することにより、その数年前に固体状態のポリペプチドで見い出された「コンホメーション依存の化学シフト」が、「狭義のコンホメーション効果」と「水素結合の効果」により引き起こされるものであることを明らかにした。特に水素結合の影響をほとんど受けない A1a 残基 C β 炭素の化学シフトは、局所的な分子構造だけを取り出したモデル化合物を計算するだけで、実測傾向を定性的に再現することができる(図 6-2)。これは、

「コンホメーション依存化学シフト」が核の周囲の局所的な電子構造に依存している、とした前章までの実験からの考察の結果を支持している。カルボニル炭素についてはその化学シフトに水素結合の効果が現れるため、ホルムアミドを疑似的なプロトンドナーとしてモデルの分子系に取り込むことにより、等方平均化学シフトの挙動を再現することに成功した。

安藤らの計算はアラニン残基について行われたものであったが、既にポリアラニン以外のほとんどのポリペプチドにおいて「等方平均化学シフトの(広義の)コンホメーション依存性」が観測されている¹⁷⁾。これらの系に対しても彼らと同様の方法論に従うことによって、化学シフトの挙動の



等高線の数字は遮へい定数である。負符号は低磁場シフトを意味する。

【図6-2】 FPT INDO法により計算したポリ(L-アラニン)のモデル化合物、*N*-アセチル-*N*-メチル-L-アラニンアミドの C_{β} 炭素 ^{13}C NMR化学シフトマップ¹⁶⁾

ポリペプチドにおいて種々のコンホメーションをとったアラニン残基の ^{13}C 化学シフトの計算値と実験値の比較

コンホメーション	(ϕ, ψ) /度	^{13}C 化学シフト	
		計算値 ^{a)} σ^{calc} /ppm	実験値 ^{b)} δ^{exp} /ppm
α_R -ヘリックス	-48, -57	-63.0	14.9
α_L -ヘリックス	48, 57	-63.7	14.9
β -シート	-142, 145	-65.7	19.9
3_1 -ヘリックス	-80, 150	-64.7	17.5
Silk I	-25.5, 134.5	-64.0	16.5

a) 図9-11の ^{13}C 化学シフト・マップからの ^{13}C 化学シフト値。負符号は低磁場シフトを意味する。
 b) ^{13}C CP-MAS NMR実験からの ^{13}C 化学シフト値。TMS基準。正符号は低磁場シフトを意味する。

再現とその電子論的な理解が可能となるはずである。

[6-1-4] 本章の目的

そこで本章ではまず、彼らと同レベルのFPT-INDO法をグリシン残基のDipeptideモデルに適用することにより、ポリグリシンおよび数種のコホモポリペプチドに巻き込ませたグリシン残基カルボニル炭素(GlyC=O)の、等方平均化学シフトと化学シフトテンソル主値の挙動を理論的に説明することを試みた。

GlyC=Oの化学シフトについては、第2,3章で行った実験により、次のようなことがすでに明らかとなっている。

1. 「1型」($>C=O \cdots H-N<$)の水素結合を形成しているポリグリシンおよびグリシン残基を含むオリゴペプチドの場合、GlyC=Oの等方平均化学シフトは水素結合距離が短くなるに従って直線的な低磁場シフトを示す。「狭義のコホモーション効果」は2次的な効果しか持っていない。水素結合による低磁場シフトの傾向は、水素結合方向の主値である σ_{22} に選択的に現れる。
2. 数種のコホモポリペプチドに巻き込まれたGlyC=Oの化学シフトは、それぞれのコホモーション中で $>C=O \cdots H-N<$ 型の水素結合を形成していると考えられるが、水素結合距離だけではその化学シフト挙動を説明することはできず、ホストポリペプチド側の「狭義のコホモーション効果」が化学シフトに影響を与えている。
3. 「2型」($>C=O \cdots H-N^+<$)の水素結合を形成しているオリゴペプチドのGlyC=Oは、水素結合距離の減少とともに等方平均化学シフトが高磁場シフトを引き起こす。しかし「粉末スペクトル」による化学シフトテンソル主値の観測は行っていないため、どの成分にこの効果が現れるのかは明らかでない。

本章では、以上の実測結果をモデル化合物を用いた「磁気遮蔽定数」の理論計算によって再現し、さらに、実験からは得られなかった化学シフトテンソルの主値に関するより深い情報を計算結果から引き出すことを目的とする。

§ 6 - 2 理 論 と 計 算

[6-2-1] F P T - I N D O 法による化学シフトの評価¹⁸⁾

本研究では、化学シフト(磁気遮蔽定数)計算の理論としてF P T法(有限摂動法)を採用した。

F P T法の枠内では、核Aの磁気遮蔽定数; σ_A は次のように定義される。

$$\sigma_A = \sigma^{d_{AA}} + \sigma^{p_{AA}} + \sum_{A \neq B} \sigma_{AB} + \sum_{\substack{A \neq B \\ A \neq C}} \sigma_{BC}$$

ここで $\sigma^{d_{AA}}$ は反磁性項、 $\sigma^{p_{AA}}$ は常磁性項と呼ばれる項であり、 $\sum \sigma_{AB}$ 、 $\sum \sigma_{BC}$ は他の核からの寄与である。¹³C核の σ_A を大きく支配するのは $\sigma^{p_{AA}}$ であり、 $\sigma^{d_{AA}}$ 、 σ_{AB} 、 σ_{BC} による寄与は比較的小さいのでここでは無視する。F P T - I N D O法に従う各定式の導出については、第7章の「理論」を見られたい。

F P T法では、常磁性項の定式中に励起状態の波動関数をあらわな形では含まないため、電子相関の効果や2中心の2電子積分を考慮しない半経験的分子軌道法によっても、¹³C化学シフトの再現にかなりの程度成功している。励起状態の波動関数を正しく求めることは、ab-initio法を用いたとしても一般に困難であり、実用的なモデル化合物に対してはほとんど不可能に近い。

F P Tの理論によれば $\sigma^{d_{AA}}$ および $\sigma^{p_{AA}}$ は次のように表わされる。

$$\sigma_A^d = \frac{1}{2c^2} \sum_{\mu}^A P_{\mu\mu} \langle \varphi_{\mu} | \frac{\mathbf{r}_{\mu} \mathbf{r}_A \delta_{\alpha\beta} - (r_{\mu})_{\alpha} (r_A)_{\beta}}{r_A^3} | \varphi_{\mu} \rangle$$

$$\sigma_{A\alpha\beta}^p = \frac{1}{c} \sum_{\mu\nu}^A \left[\frac{\partial P_{\mu\nu}^L(H_{\alpha})}{\partial H_{\alpha}} \right] \langle \varphi_{\mu} | \frac{L_{A\beta}}{r_A^3} | \varphi_{\nu} \rangle$$

ベクトルポテンシャルの基準は核Aにとってあり、 r_{μ} と r_A はそれぞれ原子軌道 χ_{μ} を含む原子からおよび核Aから、電子までの距離である。

$P_{\mu\nu}(H_\alpha)$ および $P_{\mu\nu}(0)$ は磁場による摂動がある場合と無い場合の密度行列である。これらは次のような摂動のかかったハートリー・フォック方程式、 $F_{\nu\lambda}(H_\alpha)$ を I N D O 法を用いて解くことにより得ることができる。

$$F_{\nu\lambda}(H, \mu_N) = H_{\nu\lambda}(H, \mu_N) + G_{\nu\lambda}(H, \mu_N)$$

$$H_{\nu\lambda}(H, \mu_N) = \langle \chi_\nu(H) | \left[\frac{1}{2} \left[-i\nabla + \left(\frac{1}{c} \right) \mathbf{A}(\mathbf{r}) \right]^2 - \sum_N \frac{Z_N}{r_N} \right] | \chi_\lambda(H) \rangle$$

$$G_{\nu\lambda}(H, \mu_N) = \sum_{\rho\sigma} P_{\rho\sigma}(H, \mu_N) (\langle \chi_\nu(H) \chi_\lambda(H) | \chi_\rho(H) \chi_\sigma(H) \rangle) - \frac{1}{2} \{ \chi_\nu(H) \chi_\sigma(H) | \chi_\rho(H) \chi_\lambda(H) \}$$

この式で実数部は通常のフォック行列、虚数部が磁場による摂動の入った項である。H は非摂動のコアハミルトニアン、 $(\nu\lambda | \rho\sigma)$, $(\nu\sigma | \rho\lambda)$ はそれぞれクーロン積分、交換積分である。

I N D O 法では異なる原子に属する原子軌道間の core 積分を次式で近似する。

$$H_{\mu\nu} = (\kappa/2)(\beta_A + \beta_B) S_{\mu\nu}$$

ここで β は各元素に割り当てられた定数で Bonding Parameter と呼ばれ、また κ は π - π 相互作用の補正因子である。 $S_{\mu\nu}$ は重なり積分を表す。半経験的分子軌道法により分子の電子状態を評価する場合、 κ および β の選択は重要である。そこで具体的な計算に入る前に、まずグリシン Dipeptide モデルに使用して κ および β のパラメトリゼーションを行った結果、水素、炭素については安藤らのパラメータ¹⁶⁾ ($\beta_H = -13\text{eV}$, $\beta_C = -15\text{eV}$) を、窒素、酸素については Pople のパラメータ¹⁹⁾ ($\beta_N = -25\text{eV}$, $\beta_O = -31\text{eV}$) を採用することとした。これは安藤らがアラニン Dipeptide モデルに適用したものと同一である。また実際の数値計算においては、上式の微分項は以下のような差分で置き換える。

$$\begin{aligned} \left[\frac{\partial P_{\mu\nu}(H_\alpha)}{\partial H_\alpha} \right]_{H_\alpha=0} &= \frac{P_{\mu\nu}^i(H_\alpha) - P_{\mu\nu}^i(-H_\alpha)}{2H_\alpha} i \\ &= \frac{P_{\mu\nu}^i(H_\alpha)}{H_\alpha} i \end{aligned}$$

ここで $P_{\mu\nu}^i(H_\alpha)$ は密度行列の虚数部である。

[6-2-2] モデル化合物を用いた計算

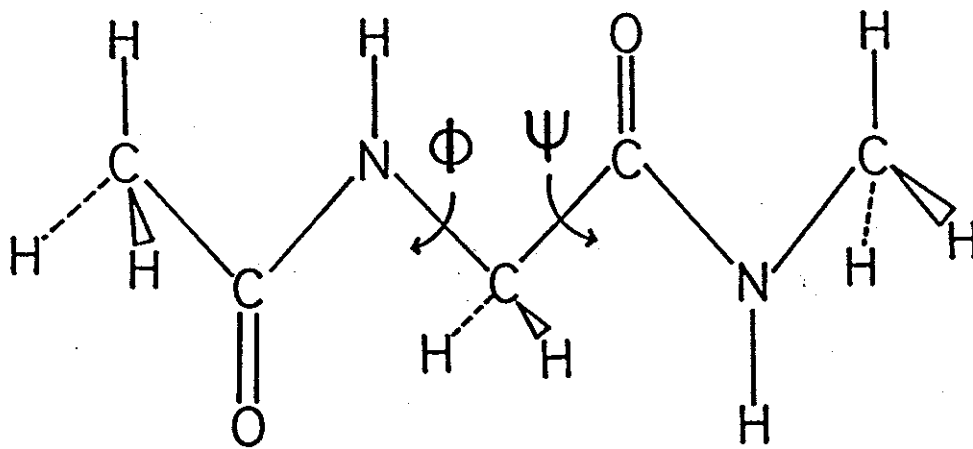
I) Case I (「狭義のコンホメーション効果」のみを評価する)

グリシン残基の2つの炭素に現れる等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの「コンホメーション変化」を理論計算により評価する場合、まず第一にペプチド主鎖の2つの二面角(ϕ, ψ)の回転による核近傍の電子状態の変化(「狭義のコンホメーション効果」)を評価する必要がある。

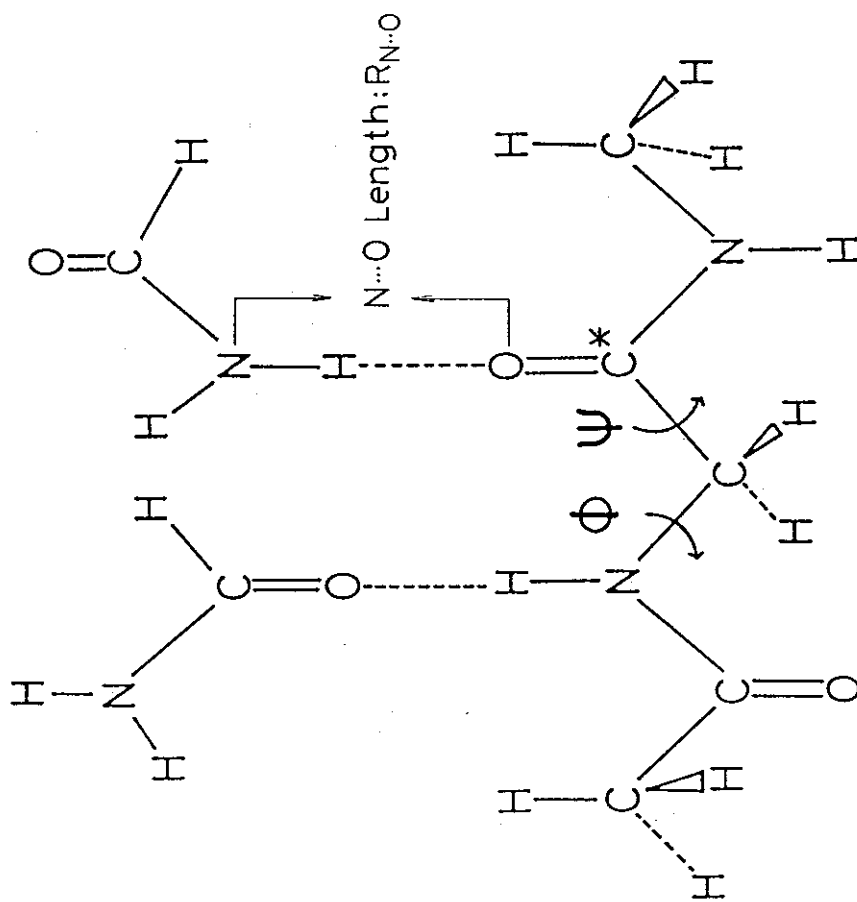
「化学シフト」は、分子の電子状態に起因する他の物理量(生成エネルギーやイオン化ポテンシャルなど)に比べて、局所的な電子状態に依存し変化することがこれまでの実験から示唆されているので、水素結合のような直接的な分子間相互作用に関与しない核(ここではGlyC α)の化学シフトは、図6-3aに示すようなDipeptideモデル(N-アセチル-N'-メチルグリシンアミド)により評価できるはずである。この分子をこれから「モデルI」と呼ぶことにする。このモデルはペプチド主鎖の電子構造を評価するために必要な最小限の構造を取り出したもので、分子中央の二面角; ϕ と ψ を変化させることにより、実験的には得られない不安定なコンホマーについてもその電子構造を計算することができる。このモデルは電子数が低く抑えられているので計算にかかる時間が比較的短くて済み、そのため全ての範囲にわたるコンホメーションの計算が可能となる。

II) Case II (「1型の水素結合効果」と「狭義のコンホメーション効果」を合わせて評価する)

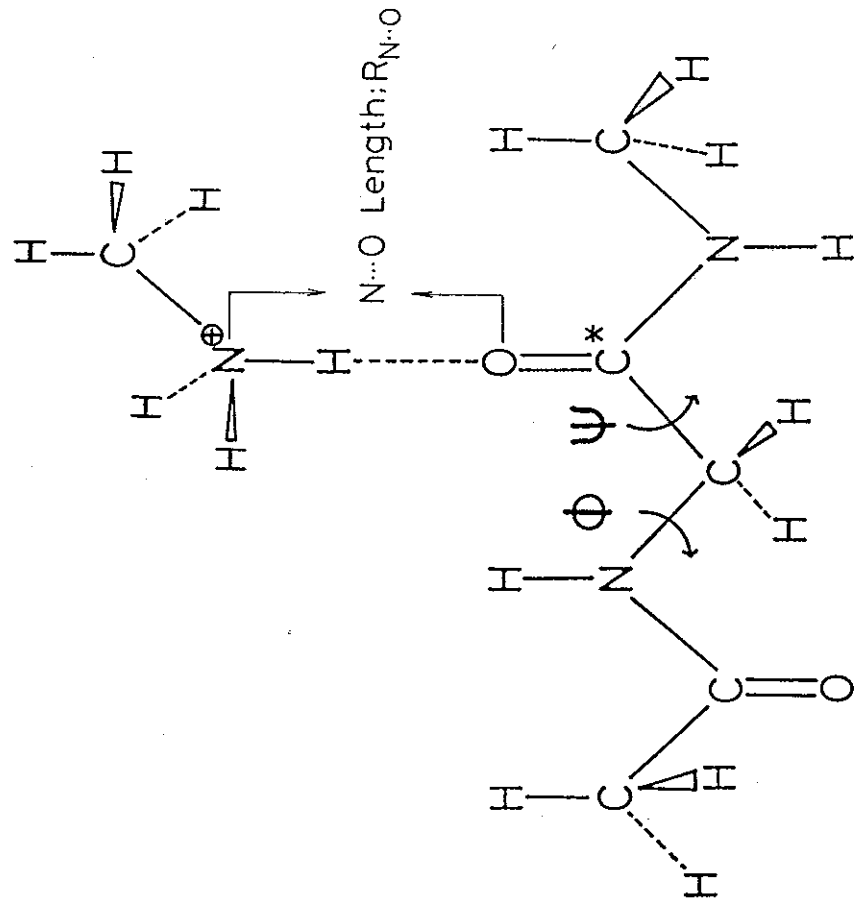
Case Iでは「狭義のコンホメーション効果」を選択的に評価するため水素結合の効果を無視したが、水素結合に直接関与する核(ここではGlyC=O)の化学シフトがその影響をあらわに受けることは第3章で明らかにした通りである。そこで、ポリペプチドに見られる「1型(>C=O \cdots H-N<)の水素結合効果」をモデル系に導入するため、モデルIにホルムアミド2分子を結合させた超分子(図6-3b)を考え、これに対して二面角(ϕ, ψ)および水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ を変化させ、GlyC=OとGlyC α の磁気



[図6-3a] 「モデル I」(グリシン Dipeptideモデル):
 Case I(「狭義のコンホメーション効果」のみを評価)用のモデル



【図6-3b】
「モデル II」(グリシンDipeptideモデル+2ホルムアミド):
Case II(「狭義のコンホメーション+1型水素結合」の効果の評価)
用のモデル



【図6-3c】
「モデル III」(グリシンDipeptideモデル+メチルアミンイオン):
Case III(「狭義のコンホメーション+2型水素結合」の効果の評価)
用のモデル

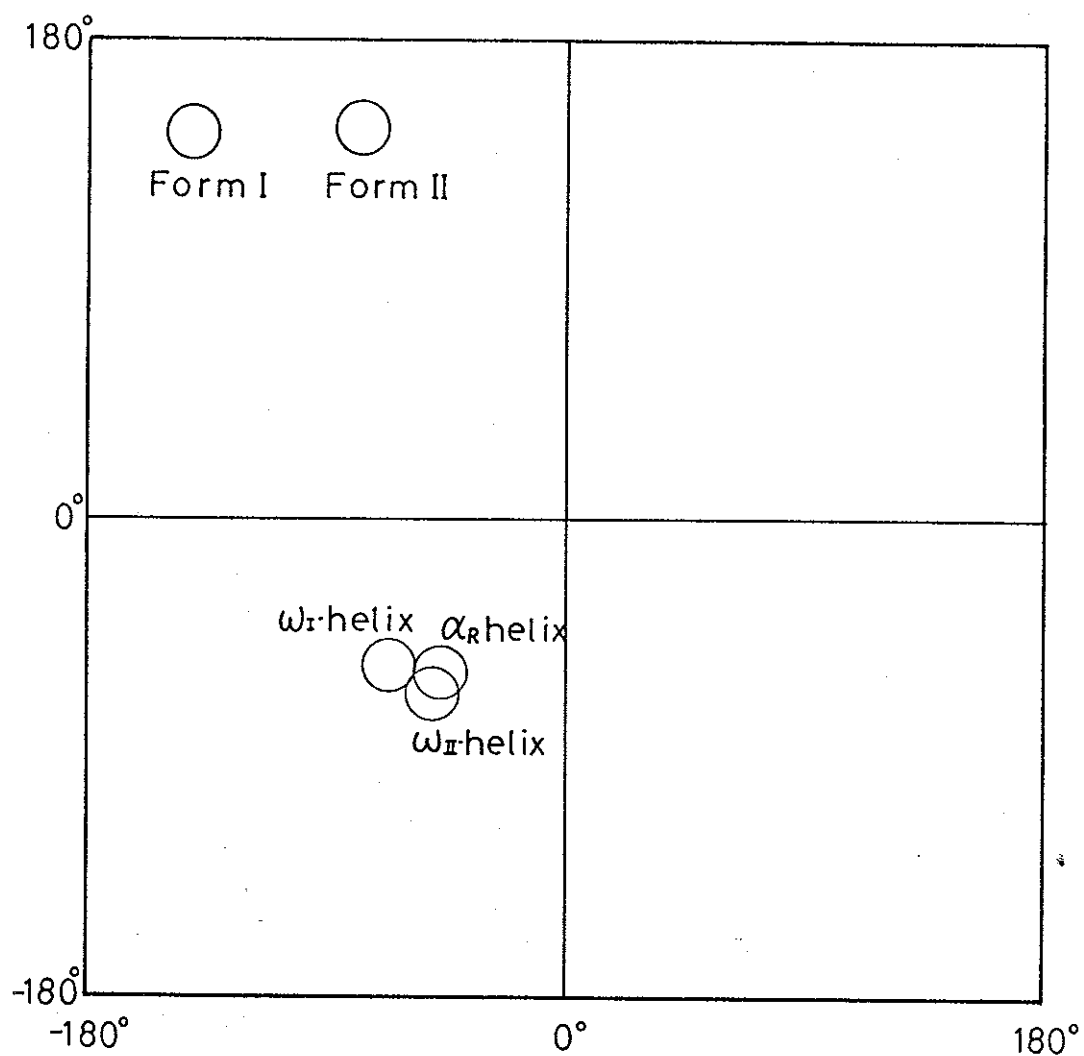
遮蔽定数を計算した。このモデルによる計算は、すでに第2章で観測した数種のホモポリペプチドに巻き込まれた GlyC=O、第3章で観測した「1型の水素結合」を形成しているオリゴペプチドでの GlyC=O の、化学シフト、化学シフトテンソル主値の理論的な評価を目的としている。以後このモデル分子を「モデルⅡ」と呼ぶことにする。

Ⅲ) Case Ⅲ (「2型の水素結合効果」と「狭義のコンホメーション効果」を合わせて評価する)

Case Ⅱとは異なり、ポリペプチド中には見らない「2型($>C=O \cdots H-N^+<$)の水素結合効果」をグリシン残基の磁気遮蔽定数の計算に導入するため、モデルⅠにメチルアミンイオン1分子を結合させた超分子(図6-3c)を考え、これに対して二面角(ϕ, ψ)と水素結合距離 $R_{N \cdots O}$ を変化させて、GlyC=OとGlyC α の磁気遮蔽定数を計算した。このモデルによる計算は、すでに第3章で観測した「2型の水素結合」を形成するオリゴペプチドでの GlyC=O の化学シフトと化学シフトテンソル主値の理論的な評価を目的としている。以後これを「モデルⅢ」と呼ぶことにする。

[6-2-3] 分子の幾何学パラメータ

計算で用いた分子の幾何パラメータを以下に示す。結合長、結合角については Monamy²⁰⁾により提案された「ペプチドの標準値」を用いた。なおアミド結合はすべてトランス($\omega=180^\circ$)を仮定し、それぞれのコンホメーションの二面角(ϕ, ψ)については図6-4に示す値を用いた。ここでポリグリシン Form I および Form II は、Lotz²¹⁾ および Crick ら²²⁾ の X 線回折による値、 α -ヘリックスはポリアラニンについての Bamford ら²³⁾ の値とした。 ω -ヘリックスについては、Bradbury ら²⁴⁾ が $[Asp(OBzI)]_n$ の X 線回折から (66.4, 55.4) (左巻き) を提案したが、Scheraga ら²⁵⁾ はパッキングを考慮した $[Asp(OBzI)]_n$ の経験的コンホメーション計算を行い、Bradbury らの $\omega=175^\circ$ はアミド結合のねじれが大きすぎるとして、 $\omega=178^\circ$ をエネルギーの最小値とした。本研究では Bradbury らの値 (66.4, 55.4) を ω_1



構造	ϕ	ψ	文献
Form I	-149.9	146.5	(21)
Form II	-78.0	145.8	(22)
α -helix	-47.0	-57.2	(23)
ω_1 -helix	-66.4	-55.4	(24)
ω_2 -helix	-50.7	-66.1	(25)

[図6-4] 計算で用いたそれぞれのコンホメーションに対応する二面角

-ヘリックス、Scheragaらの値;(50.7,66.1)を ω_2 -ヘリックスと呼び、この双方について理論計算を行うことにする。ただしGly残基は側鎖を持たずメチレン炭素が不斉でないため、右巻きヘリックスと左巻きヘリックスは磁氣的に全く等価であり、NMRで区別されない。そこで本研究ではGly残基に対する計算はすべて $-180^\circ \leq \phi \leq 0^\circ$ 、 $-180^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$ の範囲で行うこととした。特に[A_{sp}(OBzl), Gly^{*}]_nの ω -ヘリックスは本来左巻きであるが、計算では右巻きとして取り扱う。

[Dipeptide モデル]

結合長	C-H; 1.09 Å	C-C; 1.53 Å
	C=O; 1.24 Å	C'-N; 1.32 Å
	N-H; 1.00 Å	C α N; 1.47 Å

結合角	$\angle C\alpha C'O = 121^\circ$
	$\angle N C'O = 125^\circ$
	$\angle C\alpha NH = 114^\circ$
	$\angle CNC\alpha = 123^\circ$
	C α 炭素の回りはすべて Tetrahedral (109.5°)

[ホルムアミド,メチルアミンイオン]

結合長	C=O; 1.24 Å	C-H; 1.08 Å
	C-N; 1.32 Å	N-H; 1.00 Å

結合角はすべて 120° とした。

§ 6-3 結果と考察

[6-3-1] FPT-INDO法によるカルボニル炭素の化学シフト

☆ Case I

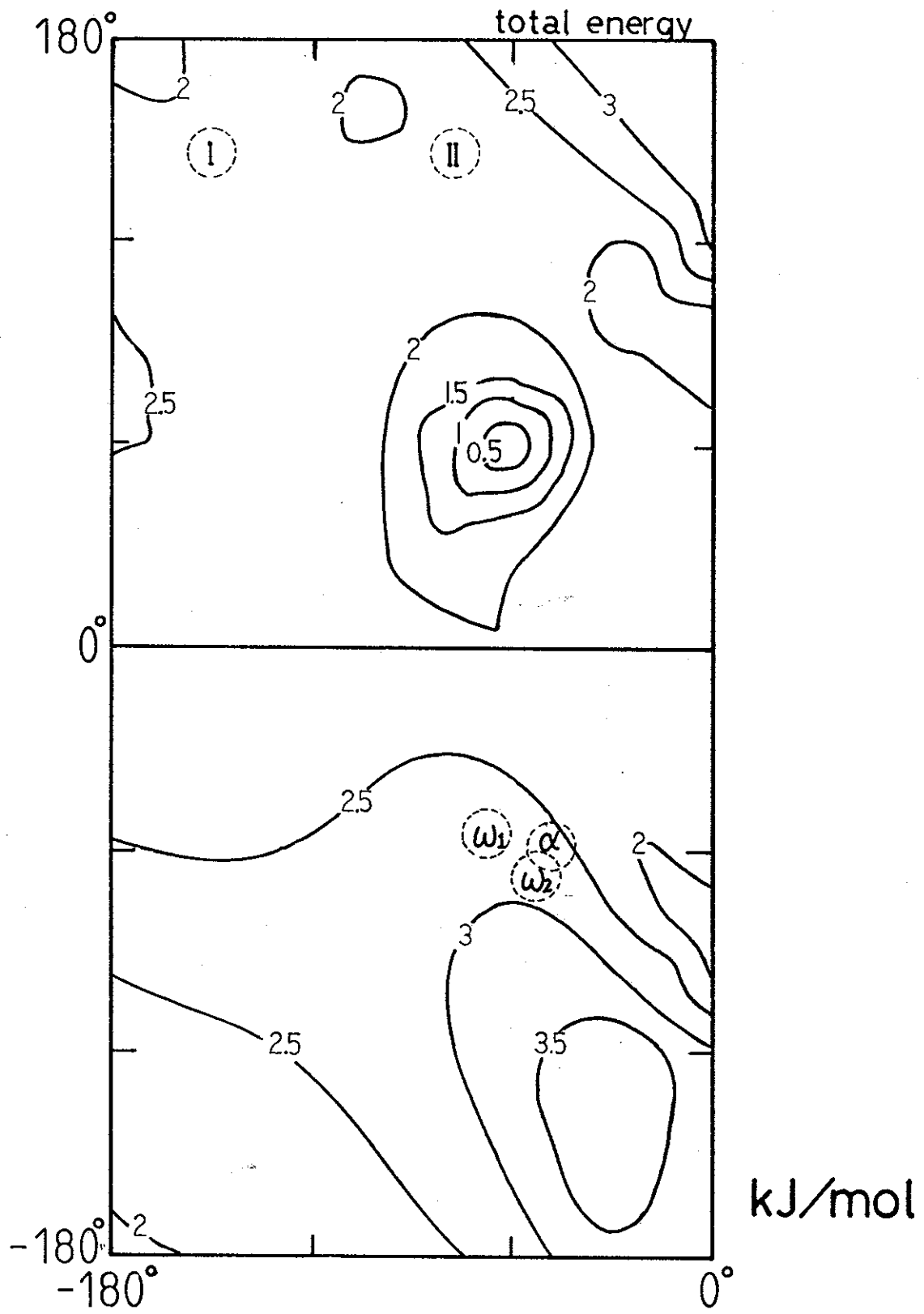
グリシン Dipeptideモデル(モデル I)を用い、それぞれのコンホメーションにおける GlyC=O の等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの主値を FPT-INDO 法により計算した結果が表 6-3 である。^{*2}

表 6-3 Case I における GlyC=O の¹³C NMR 化学シフト計算結果 (ppm)

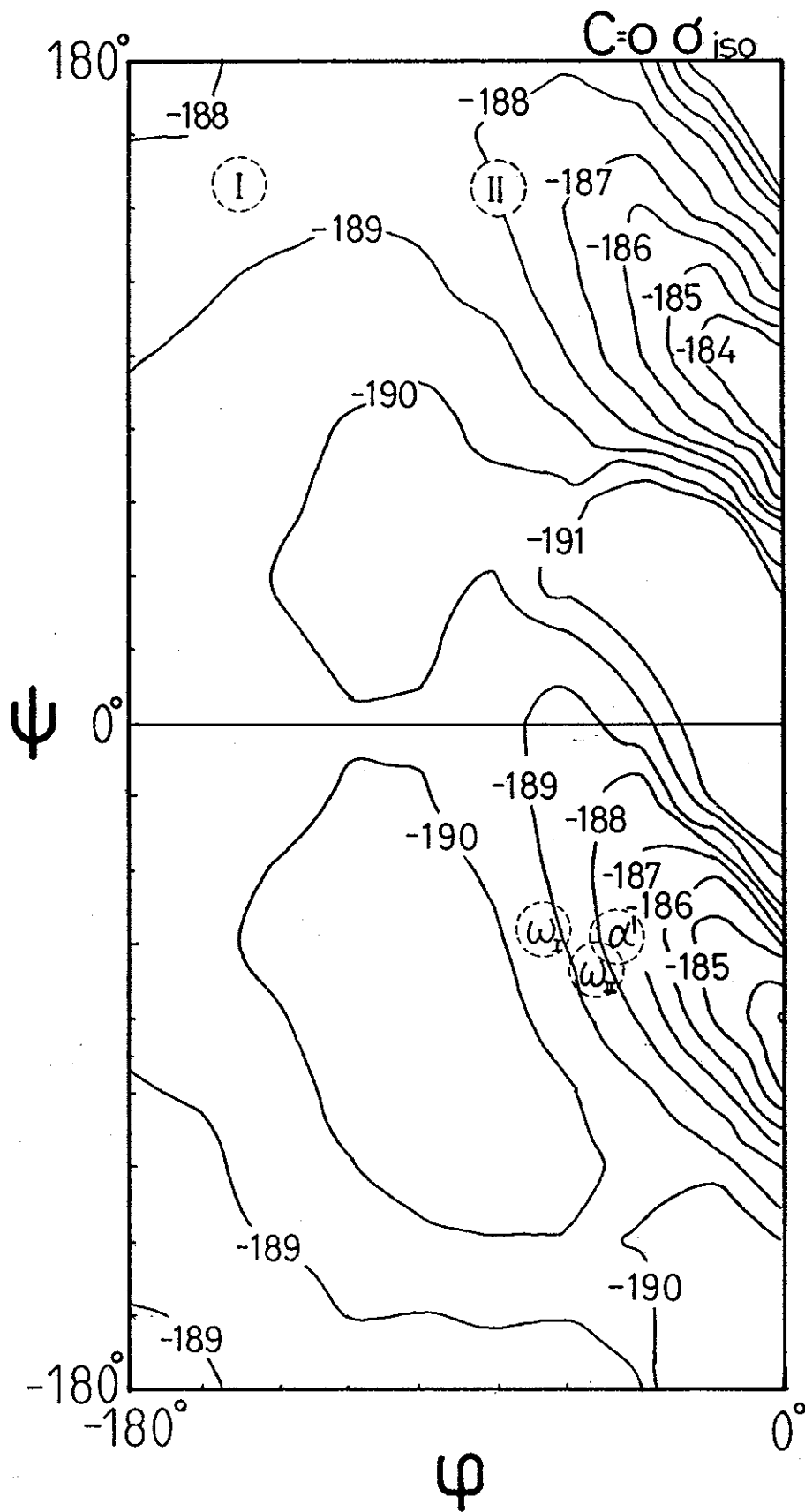
構造	(σ_{11}	σ_{22}	σ_{33})	σ_{iso}
Form I	-398.11	-193.67	-136.18	-188.48
Form II	-398.05	-191.19	-137.00	-187.96
α -helix	-403.79	-184.88	-136.65	-187.72
ω_1 -helix	-405.80	-188.17	-136.43	-189.34
ω_2 -helix	-405.15	-185.41	-136.53	-188.28

σ_{iso} は等方平均化学シフト、 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} はそれぞれ低磁場側からの化学シフトテンソルの主値である。ここでテンソルの 3 つの主値は異方性を持つ常磁性項のみの値であるため、その平均値は σ_{iso} と一致しない。¹³C の化学シフトは常磁性項によって支配されるため、テンソル主値についての比較は常磁性項のみで行うことにする。

またモデル I の (ϕ , ψ) を $-180^\circ \leq \phi \leq 0^\circ$, $-180^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$ の範囲で 20° おきに変化させて計算した全エネルギー、GlyC=O の σ_{iso} , σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} の等高線図を図 6-5 ~ 図 6-6 に示す。^{*3} 全エネルギーについて見てみると、最小値は (ϕ , ψ) = (60° , 60°) にあり、これは分子内水素結合



[図6-5] FPT-INDO法によるCase I グリシン Dipeptide モデル
全エネルギー 等高線図 (最小値 = 0kJ/mol)



[図6-6]

FPT-INDO法によるCase I グリシン残基
カルボニル炭素の ^{13}C NMR 等方平均化学シフトの等高線図

の形成によって安定化された C^7 と呼ばれる構造に相当する。モデル I、つまり N-アセチル-N'-メチルグリシンアミドが水溶液中でこの構造をとっていることはレイリー散乱とラマン分光²⁶⁾ から確かめられており、経験的ポテンシャル計算²⁷⁾ や他の分子軌道法計算²⁸⁾ もこの観測結果を支持している。この C^7 構造が連鎖になると 2₇-Ribbon と呼ばれるヘリックスとなるが、実際にこのらせんをとるポリペプチドは稀であり、モデル化合物のエネルギー値からは高分子の安定なコンホメーションを探ることは一般に困難であることがわかる。次に安定なのが $(\phi, \psi) = (180^\circ, 180^\circ)$ 近傍の C^5 構造と呼ばれる伸びきり鎖で、これは β -シートに比較的近くこれも分子内で弱い水素結合を形成している。この等高線図によると Form I と Form II は準安定領域、 α -ヘリックスと ω -ヘリックスはやや不安定な領域に属しており、固体状態におけるポリペプチドのコンホメーションが分子内あるいは分子間の水素結合による構造の安定化なしには存在しえないことがここからわかる。

*2. ここで化学シフトの理論計算より得られる計算値は、基準物質の共鳴位置から低磁場側にとった「化学シフト; δ 」ではなく、「磁気遮蔽定数; σ 」であるため、負の値が大きいほど低磁場であることを示している。単位はどちらも ppm である。

*3. このようなプロットは Ramachandran Map と呼ばれ、通常 $-180^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$, $-180^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$ の範囲を描くものであるが、「計算」の章でも述べたとおりグリシン残基は不斉炭素を持たないため、このマップ上で原点に対して点対称にある構造は互いに鏡像体であり磁氣的に等価である。そこでグリシン残基に関する計算結果は今後、Ramachandran Map の“左半分”だけを表示するものとする。

次に、 $GlyC=0$ の磁気遮蔽定数(等方平均値)の計算結果について考察する。表6-3の結果を単純化すると、低磁場側から

ω_1 ヘリックス > Form I = ω_2 ヘリックス > Form II = α ヘリックス
となり、実測の結果

α ヘリックス = Form II > ω ヘリックス > Form I

と傾向が一致していない。 α -ヘリックスとForm IIが等しい化学シフトを示すことは再現されているが、 σ_{iso} の等高線に見るとおり α -ヘリックスと ω -ヘリックスは計算値がコンホメーション変化に非常に敏感に反応する領域に存在し、またポリペプチドの二面角(ϕ, ψ)は、結晶軸の長さとならせんピッチがわずかに変化しただけでも大きな影響を受けることから、この実測との一致をそのまま受け入れることはできないであろう。一方、Form IおよびForm IIの領域は、化学シフトがコンホメーション変化にあまり敏感でなく、X線回折から得られた二面角もヘリックス構造に比べて信頼性が高いと考えられるため、モデルIの計算で、Form IがForm IIよりも低磁場側に出たことは、このモデルによる計算が $GlyC=0$ 化学シフトの評価に适当でないことを示している。第3章で行った測定から水素結合の効果が考慮されていないことがその原因の第一であることは明らかである。テンソル成分 σ_{22} についてもForm IがForm IIよりも高磁場シフトし、また α -、 ω -ヘリックスが更に高磁場シフトと実験結果を再現していない。 σ_{33} はシフト値の変化が少なく評価が困難だが、本来はコンホメーション変化を示さない主値である可能性がある。

このようにモデル I によって GlyC=O の化学シフトを評価することは困難であるが、水素結合に関与していないグリシン残基については、この計算が化学シフト値を正しく評価している可能性がある。事実、FPT-INDO 法によるアラニン残基 C β 炭素(これは水素結合の影響がほとんどないと思われる)の計算結果は実測傾向をよく再現している。この章の序論で述べたように、タンパク質内部や脂質に結合したペプチドには、水素結合していないカルボニル炭素も存在するため、より複雑な生体系の化学シフトが観測対象とされた時にこの等高線図が有用となる可能性もある。齊藤ら²⁹⁾はコラーゲン様の 3 重ヘリックスをとる二種のモデルペプチド; [Pro-Gly-Pro]_n、[Pro-Ala-Gly]_n の GlyC=O がどちらも水素結合に関与していないにもかかわらず、両者の間に 1.0ppm のシフト差があることを報告している。この 2 つのペプチドの二面角(ϕ , ψ)が明らかでないため、計算結果と直接対比することはできないが、プロリン残基の C β と C γ の化学シフト差 ($\Delta\delta$; これは Pro の ψ と相関関係にある)には 0.6ppm の違いが見られ、これは 2 つの試料のコンホメーションがわずかに異なっていることを示唆している。GlyC=O に見られる化学シフトの差はこのコンホメーションの違いによる電子状態のわずかな変化を反映したものであろう。

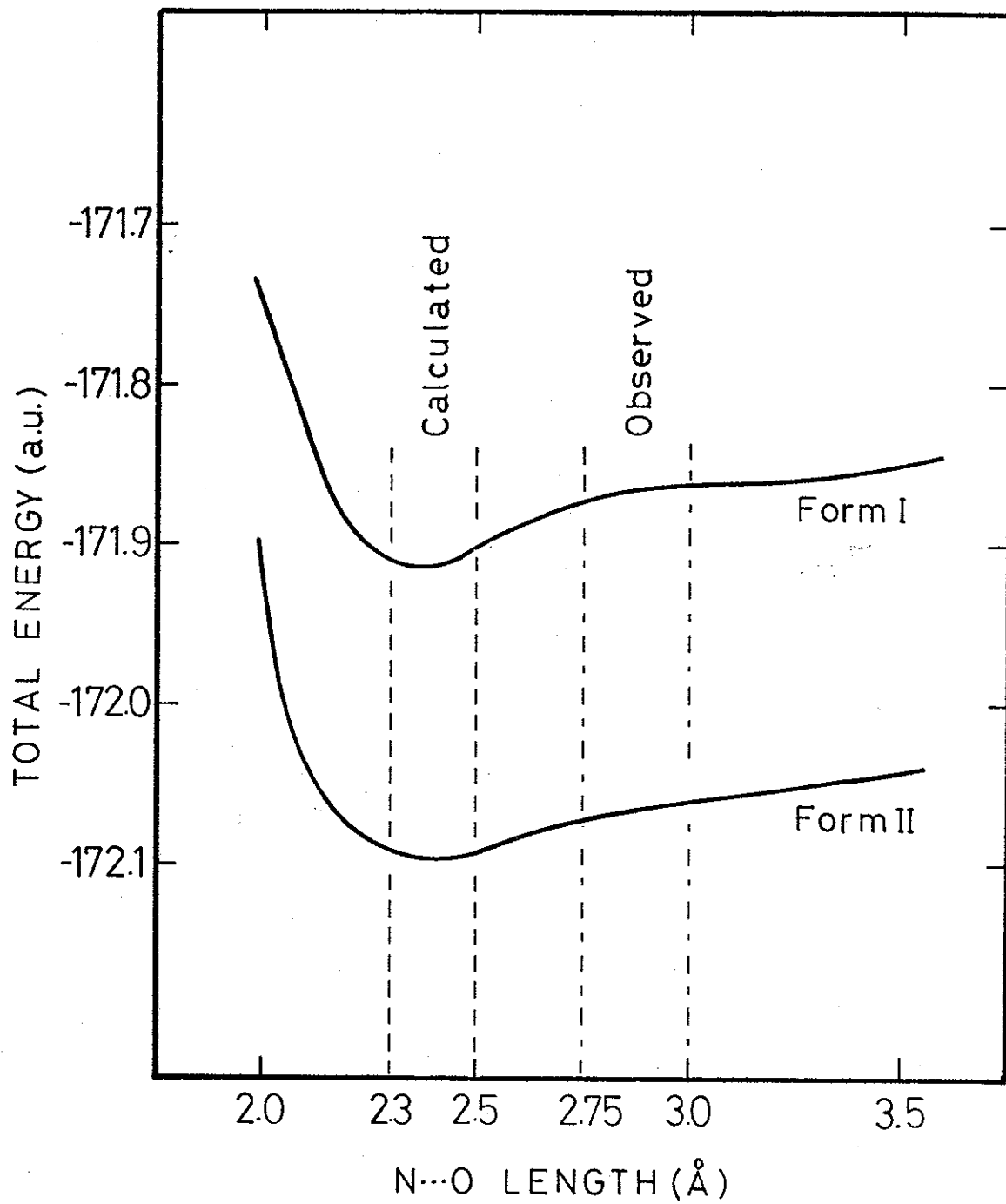
☆ C a s e I I

グリシン Dipeptide モデル(モデル I)に 疑似的な「1 型の水素結合」を導入した「モデル II」を用い、ポリグリシン Form I および Form II についての全エネルギー、カルボニル炭素の等方平均化学シフトおよび化学

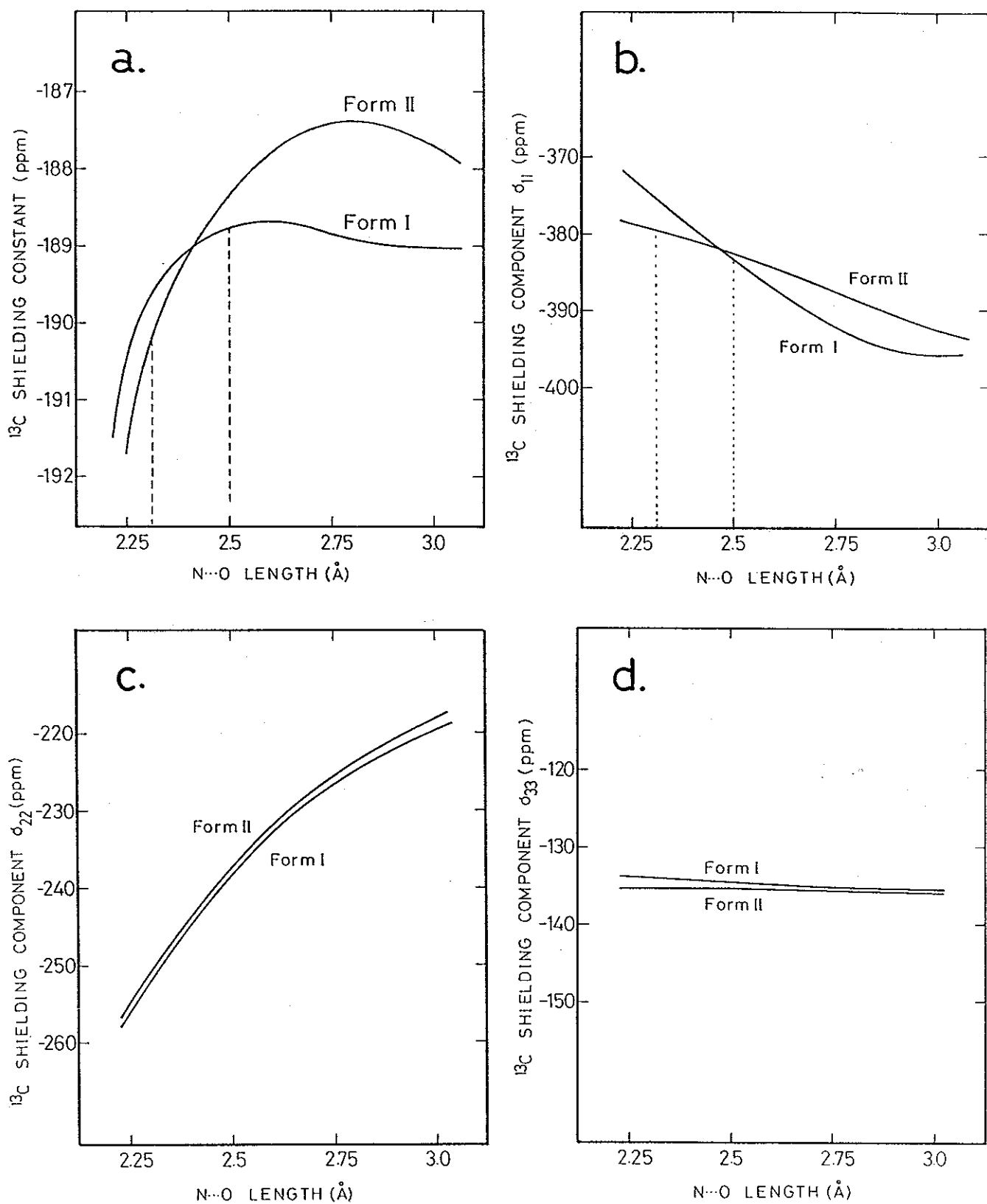
シフトテンソルの主値を、水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ に対して計算した結果が図 6-7~図 6-8 である。

図 6-8 a に見るように、X 線回折による一般的な水素結合距離 ($R_{N\cdots O}$); 2.6~3.0 Å においては、どのコンホメーションもその磁気遮蔽定数が水素結合に対して顕著な距離依存性を示していない。その代わりに Form I と Form II の間には 2 ppm 弱の定常的な差が見られ、これは水素結合効果が存在しない場合に現れる「狭義のコンホメーション効果」であると考えられる。X 線回折の結果が正しいとすれば、Form I は 2.95 Å、Form II は 2.73 Å、 α -ヘリックスは 2.87 Å の水素結合距離 ($R_{N\cdots O}$) を持つため、全エネルギーの距離依存性(図 6-7)も本来 2.7~3.0 Å 付近に最小値を持つはずであるが、諸熊ら³³⁾ が指摘したとおりここで用いた INDO 法は 2 中心積分の一部を無視するため、安定な水素結合距離が短かめに評価されている。この計算では Form I と Form II とともに 2.3~2.5 Å の区間で全エネルギーが緩やかなカーブを描いており、明確な最小値は存在しない。また、これに対応して磁気遮蔽定数は $R_{N\cdots O} < 2.6$ Å の領域で、顕著な水素結合距離依存性を示している。そこでこのモデル I においては 水素結合の効果が $R_{N\cdots O} = 2.3 \sim 2.6$ Å で正しく評価されているものと判断し、この範囲で計算値の読み取りを行うものとした。

$R_{N\cdots O} = 2.3 \sim 2.6$ Å では、水素結合距離の減少が GlyC=O の磁気遮蔽定数に低磁場シフトを引き起こす(図 6-8 a)ことは、第 3 章で明らかとなったポリグリシン及びグリシン残基を含むオリゴペプチドにおける「1 型の水素結合距離」と ^{13}C 等方平均化学シフトの関係(図 3-13)に等し



【図6-7】 Case IIにおける水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ と全エネルギー(Form IとII)
 (エネルギーの最小値は $R_{N\cdots O}=2.3\sim 2.5\text{Å}$ に出現)



〔図6-8〕 Case IIにおける水素結合距離 $R_{\text{N}\cdots\text{O}}$ と磁気遮蔽テンソルの
(a) 等方平均値, (b) σ_{11} , (c) σ_{22} , (d) σ_{33} の変化

く、計算は実測の結果を再現している。特にポリグリシン Form I と Form II については、「狭義のコンホメーション効果」が実測に現れず、その化学シフトの挙動を水素結合距離の効果だけで説明することができたが、計算においても図 6-8a に見られるように $R_{N\cdots O} = 2.3 \sim 2.5 \text{ \AA}$ の領域で Form I と Form II の曲線はかなり近づきコンホメーションによる差が見られない。X線回折から得られた Form I と Form II の水素結合距離に 0.22 \AA の差があることから、Form I の化学シフトは $R_{N\cdots O} = 2.5 \text{ \AA}$ で、Form II の化学シフトは $R_{N\cdots O} = 2.3 \text{ \AA}$ で計算値の読み取りを行うと、Form II の等方平均値は Form I より 1.9 ppm 低磁場シフトし実測の結果 (3.3 ppm) を定性的に再現している。磁気遮蔽テンソルの主値を見ると、中でも σ_{22} に顕著な水素結合距離の依存性が現れ、距離の減少にともなって大きく低磁場シフトしている。Form II の σ_{22} は Form I よりも約 9 ppm 低磁場へシフトして、この領域における等方平均値の低磁場シフトが σ_{22} によって引き起こされたものであることを明瞭に示している。 σ_{22} に比べると変化の絶対値は小さいものの σ_{11} も σ_{22} と反対方向の水素結合距離依存性(距離の短縮が高磁場シフト)を示しているが、読み取りを実際に行うと Form I と Form II の間には 4 ppm の差があるだけで、これは σ_{22} の低磁場シフトによって補償されている。 σ_{11} の計算結果で重要なことは、この主値が σ_{22}, σ_{33} とは異なり、 $R_{N\cdots O} > 2.6 \text{ \AA}$ の領域で 5 ppm ほどの「コンホメーションによるシフト差」を示していることで、これが $R_{N\cdots O} > 2.6 \text{ \AA}$ での Form I と Form II の等方平均値の差として現れている。このことは水素結合が形成されていない場合には「狭義のコンホメーション効

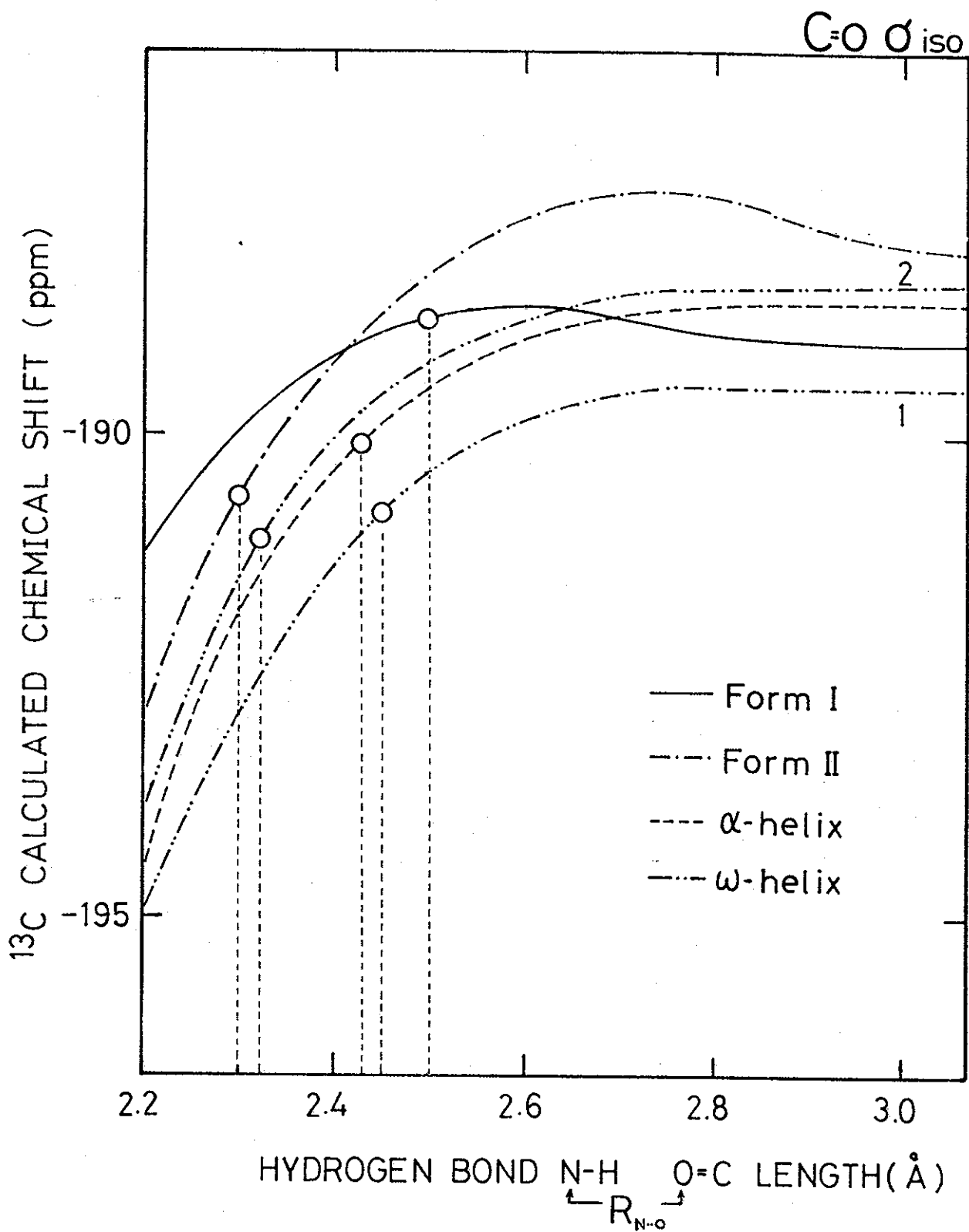
果」が σ_{11} に現れることを示している。一方、計算における σ_{33} は、 $R_{N\cdots O}$ の全範囲を通じて水素結合距離の依存性を示さず、またコンホメーションによる差も非常に小さい。第2章で行ったポリグリシンの粉末スペクトルの観測では、Form I において σ_{33} の高磁場シフトが観測されたが、粉末スペクトルにおける σ_{33} の領域には $C\alpha$ 炭素のシグナルが隠れて重なっていた可能性があり、事実 σ_{33} には大きめの測定誤差が見積られていた。この計算結果から、 σ_{33} は水素結合の効果のみならずコンホメーションの依存性も示さない性質の主値であると考えられる。

ポリグリシンだけをとりみると、第2章での化学シフトテンソル主値の観測結果および上述の磁気遮蔽テンソルの計算結果とも、その化学シフト挙動において水素結合効果が完全に支配的であり、そのため明解な説明をすることが可能である。しかし第2章(図2-10)で示した通り、他のホモポリペプチドにグリシン残基を巻き込ませた試料では、「水素結合距離」の他に「狭義のコンホメーション効果」が $GlyC=O$ の化学シフトに影響を与えるため、水素結合距離と等方平均化学シフトの関係は単純な線形関係とはならなかった。次に、このことを理論的に裏づけるため、磁気遮蔽定数の読み取りにコンホメーションによる主鎖構造の違いと水素結合距離の違いの双方を考慮するべく、コンホメーションによる水素結合距離の違いを考慮して読み取り値を決定した。

コンホメーション	X線の値	読み取り値	X線 ref.
Form I (β -シート)	2.95 Å	2.50 Å	(21)
Form II (3_1 ヘリックス)	2.73	2.30	(22)
α -ヘリックス	2.87	2.43	(23)
ω_1 -ヘリックス	2.90	2.45	(24)
ω_2 -ヘリックス	2.75	2.32	(25)

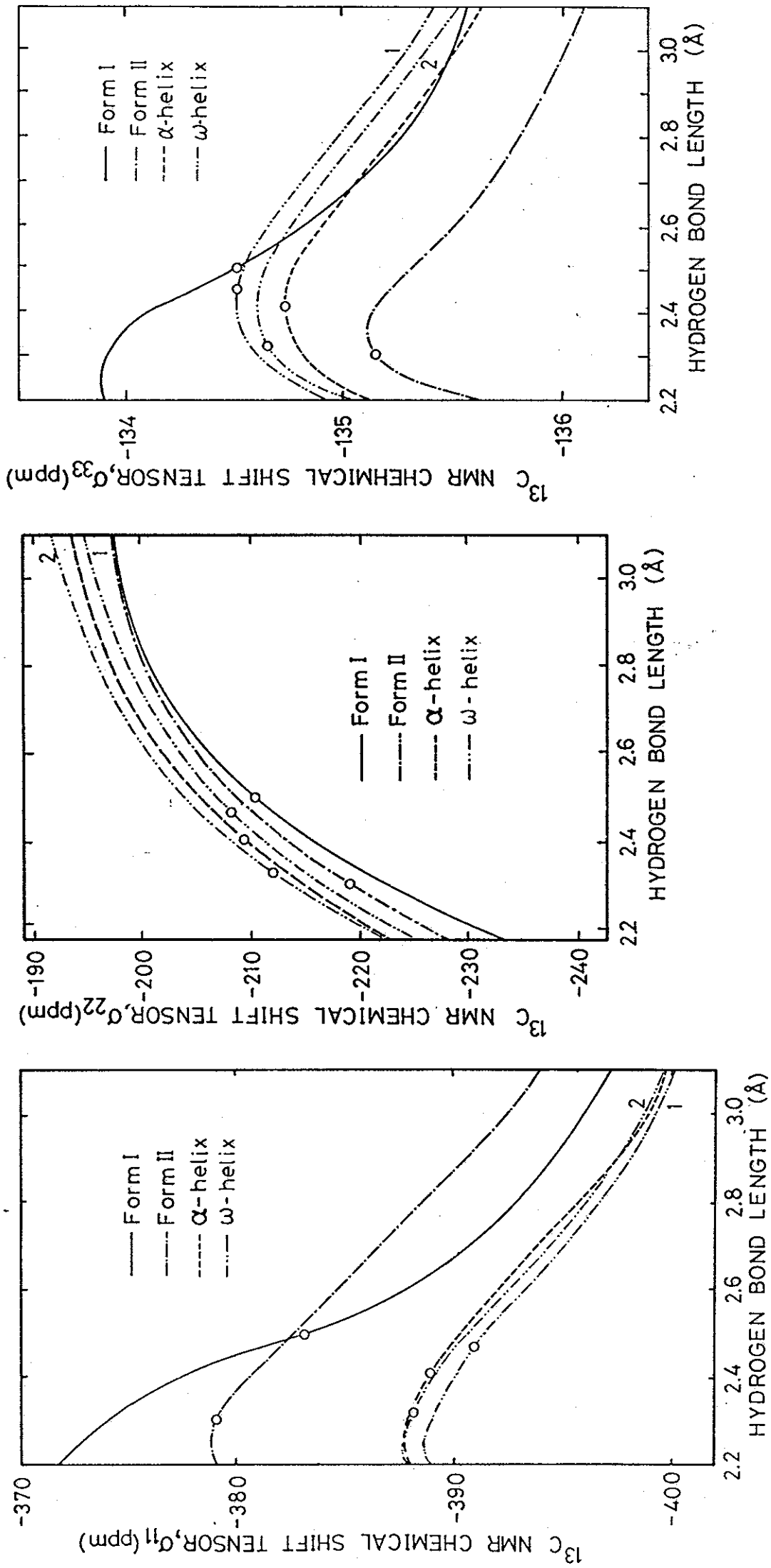
図6-9は、GlyC=Oが α -ヘリックスや ω -ヘリックスに巻き込まれた場合も含めて、GlyC=Oの等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの主値を、水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ に対して計算した結果である。図中では見やすいように、読み取ったの点を○印で示した。このような操作を行うことによりポリグリシンの場合と同様、「狭義のコンホメーション効果」と「水素結合効果」をあわせて評価できるものと考え、Case Iの結果と併せて、Case IIの計算結果を表6-3に示す。

まず等方平均値であるが、Form II、 α -ヘリックス、 ω -ヘリックスがともに近い値を示し、実験事実(図2-4)と定性的に一致している。Form IIと α -、 ω_1 -ヘリックスの σ_{11} に約10 ppmもの差が出るのは不都合であるが、それは σ_{22} に約11 ppmの差が生じて補償されている。磁気遮蔽定数の等方平均値は実測と同様の傾向を示したものの、 α -ヘリックスと ω_1 -ヘリックスの σ_{22} がForm Iに近く実測の傾向を再現しなかったことは、狭義のコンホメーション効果が加わった系に対し、計算が磁気遮蔽テンソルの挙動をすべて再現できるわけでないことを示している。 σ_{33} はCase Iの場合と同様、計算値の変化幅が非常に小さく、この成分はやはり核の周囲の電子的な環境をほとんど反映しない可能性が高い。



[図6-9]

FPT-INDO法によるCase II グリシン残基カルボニル炭素
 ^{13}C NMR 等方平均化学シフトの水素結合距離依存性



[図6-9] FPT-INDO法によるCase II グリシン残基カルボニル炭素
 ^{13}C NMR 化学シフトテンソルの水素結合距離依存性

[表6-4] FPT-INDO法によるグリシン残基
カルボニル炭素の ^{13}C 化学シフト計算結果

コンホメーション	σ_{iso}	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}
[Case I]				
Form I	-188.48	-398.11	-193.67	-136.18
Form II	-187.96	-398.05	-191.19	-137.00
α - helix	-187.72	-403.79	-184.88	-136.65
ω_1 - helix	-189.34	-405.80	-188.17	-136.43
ω_2 - helix	-188.28	-405.15	-185.41	-136.53
[Case II]				
Form I	-188.8	-383.3	-210.8	-134.5
Form II	-190.7	-379.1	-219.4	-135.1
α - helix	-190.1	-389.1	-208.4	-134.7
ω_1 - helix	-190.8	-390.9	-208.2	-134.5
ω_2 - helix	-191.0	-388.9	-212.0	-134.6

この Case II のアプローチは、本研究での測定から得られた GlyC=O 化学シフトの特徴をかなり良く再現している。まず、ポリグリシン (Form I と Form II) およびグリシン残基を含むオリゴペプチドにおいて観測された「水素結合距離と GlyC=O 化学シフトの線形関係」が、どのコンホメーションについても (Form I, Form II, α -ヘリックス, ω -ヘリックスの全てで) 再現されている。「狭義のコンホメーション効果」は化学シフトに 2 次的な影響を与えると考えられるが、 α -ヘリックスおよび ω -ヘリックスのポリペプチド中にある GlyC=O 化学シフトについては、その効果を決して無視することができない。

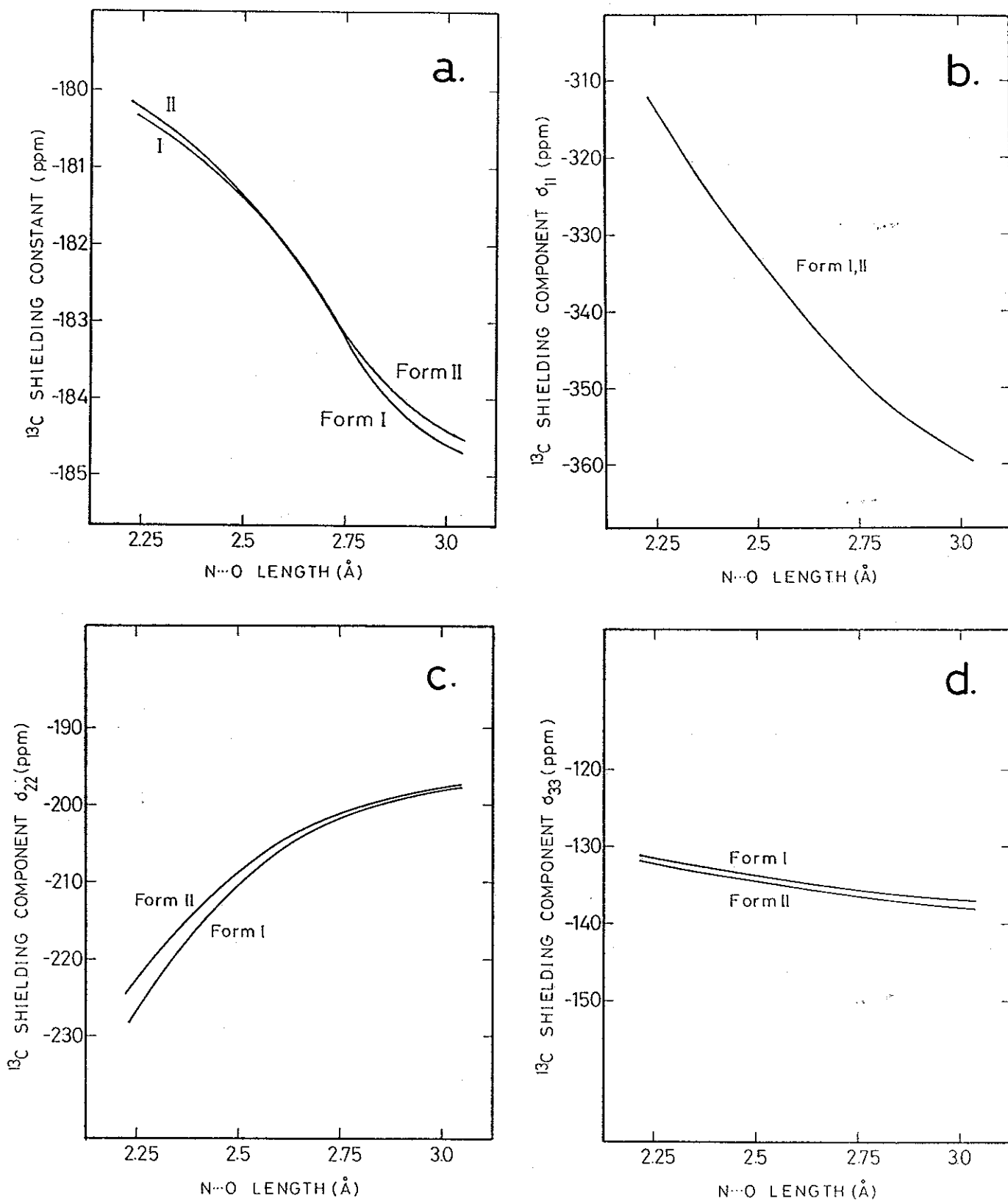
等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの「広義のコンホメーション依存性」は、このように主鎖構造の違いと水素結合距離の違いを計算に考慮することによって定性的に再現することができる。その結果ポリペプチドにおいては水素結合距離と化学シフトの関係が、オリゴペプチドで見られたような単純な線形関係とはならず、図 2-10 の○印が示すような右上がりの曲線になったと考えられる。

この計算によって、実際のポリペプチドにおいては GlyC=O の化学シフトの決定に、この 2 つの効果が必要な因子となって働いていることが理論的に裏づけられた。 ω_1 -と ω_2 -ヘリックスでは、 σ_{iso} がどちらもほぼ同じ値を示しているため、どちらが本当のコンホメーションに近いのかは判断できないが、 ω_1 -ヘリックスの σ_{22} が α -ヘリックスの値に等しいことから、 ω_1 -ヘリックスがより妥当な構造であると考えられる。

☆ Case III

グリシン Dipeptideモデル(モデル I)に「2型の水素結合」を疑似的に導入した「モデル III」を用いて、ポリグリシン Form I および Form II のコンホメーションに対し、カルボニル炭素の等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの主値を水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ に対して計算した結果が図 6-10 である。ここでポリグリシンは Form I, Form II ともにこの型の水素結合を形成しないが、Case II の計算と水素結合効果を比較するために、この2つのコンホメーションについて計算を行った。

図 6-10a に見るように、計算されたすべての $R_{N\cdots O}$ の領域で、水素結合距離の短縮にともなって等方平均値が高磁場へシフトしており、第3章で観測された「2型の水素結合」を形成する GlyC=O 化学シフトの水素結合距離依存性(図 3-14)をよく再現している。Case II で水素結合効果があらわとなる $R_{N\cdots O}$ の領域の結果と比べても、コンホメーションによる差は小さく、これは実測におけるデータの直線性の良さ(データのばらつきの少なさ)と一致している。 σ_{11} の変化の大きさは σ_{22} や σ_{33} と比べて相対的に大きく、水素結合距離の短縮にともない高磁場へ単調にシフトしている。Case II において水素結合効果が消え「狭義のコンホメーション効果」が顕在化する $R_{N\cdots O} > 2.6 \text{ \AA}$ の領域においてもこの傾向に変化はなく、 σ_{11} が等方平均値の傾向をすべての領域で決定していることは明らかである。Case II と比べ σ_{22} の変化幅がいくらか小さいことを除けば、 σ_{22} と σ_{33} は Case II と同様のシフト変化を示しており、ここから「1型」と「2型」の水素結合効果の違いを生じさせている主な原因は σ_{11} の挙動の違いにあ



[図6-10] Case IIIにおける水素結合距離 $R_{N\cdots O}$ と磁気遮蔽テンソルの
(a) 等方平均値, (b) σ_{11} , (c) σ_{22} , (d) σ_{33} の変化

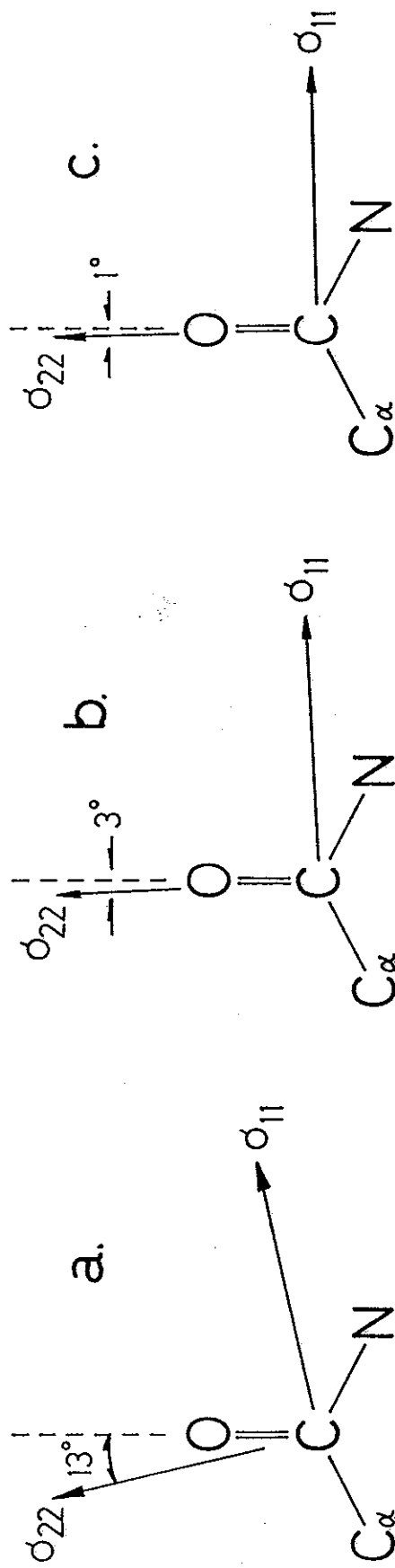
ると言えそうである。

☆ 磁気遮蔽テンソルの主軸方向と GlyC=O の電子状態

図 6-11 に $R_{N\cdots O} = 2.5 \text{ \AA}$ における Case II と Case III の GlyC=O 磁気遮蔽テンソルの主軸の方向を、グリシルグリシン塩酸塩による実験値³⁰⁾と併せて示す。計算と実測の一致はかなり良いが、図 6-11a で σ_{22} の方向が C=O 軸から外れて C α 側に傾いているのは、この分子が結晶中で GlyC=O と GlyNH⁺ の間に 2.69 \AA の屈曲した分子内水素結合を形成しているため³¹⁾ であり、一般に見られる分子間の水素結合系では、 σ_{22} は計算で得られたように C=O 軸に沿っている場合が多い。図中に見るように σ_{11} はアミド結合平面内において σ_{22} と直交する方向、 σ_{33} はアミド結合平面と直交する方向を向いている。

Kempfら³²⁾ が指摘したように、 σ_{11} と σ_{22} はそれぞれ一重項→一重項の $\sigma-\pi^*$ 遷移と $n-\pi^*$ 遷移によって支配されている。「1型」と「2型」それぞれの水素結合系における σ_{11} と σ_{22} の挙動の違いを観察すると、プロトンドナーとしての「アミド基」と「プロトン化アミノ基」の違いが、GlyC=O の σ 結合の電子状態 に大きな影響を与え、それが両者の水素結合における σ_{11} の挙動の違いとして現れたものと理解することができる。 σ_{22} の挙動には「1型」と「2型」で大きな違いが見られなかったことから、プロトンドナーのイオン化状態は、カルボニル酸素の n 軌道(非共有電子対)には、大きな影響を与えなかったものと考えられる。

FPT-INDO法による磁気遮蔽定数の計算では、それぞれの成分が



Experimental

Calculated 1-type

Calculated 2-type

[図6-11] グリシン残基カルボニル炭素の磁気遮蔽テンソルの主軸
 (a) 実測 (Gly-Gly-0H \cdot H₂O \cdot HCl単結晶)³⁰⁾
 (b) 計算 (Case II ; 1型水素結合系)
 (c) 計算 (Case III ; 2型水素結合系)

磁場に対する密度行列の勾配として表現されるため、計算値を個々の遷移成分からの寄与に分割して評価することができない。しかし、カルボニル炭素のように化学シフトの異方性の大きな核では、以上のようにそれぞれの主値を特定の電子遷移と結び付けて議論することが可能である。そのため個々の磁気遮蔽テンソル主値の水素結合距離依存性を分けて考察することにより、水素結合の効果と狭義のコンホメーション効果を分割して評価することが可能となった。

[6-3-2] FPT-INDO法によるGlyC α 炭素の化学シフト

☆ Case I

モデル I を用いてそれぞれのコンホメーションにおける GlyC α 炭素の等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの主値を FPT-INDO 法により計算した結果が表 6-4 である。またモデル I の (ϕ, ψ) を、 $-180^\circ \leq \phi \leq 0^\circ$ 、 $-180^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$ の範囲で 20° おきに変化させて計算した全エネルギー、GlyC α の σ_{iso} 、 σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} の等高線図を図 6-12, 13 に示す。

等方平均化学シフトの計算結果を単純化して表すと、低磁場側から

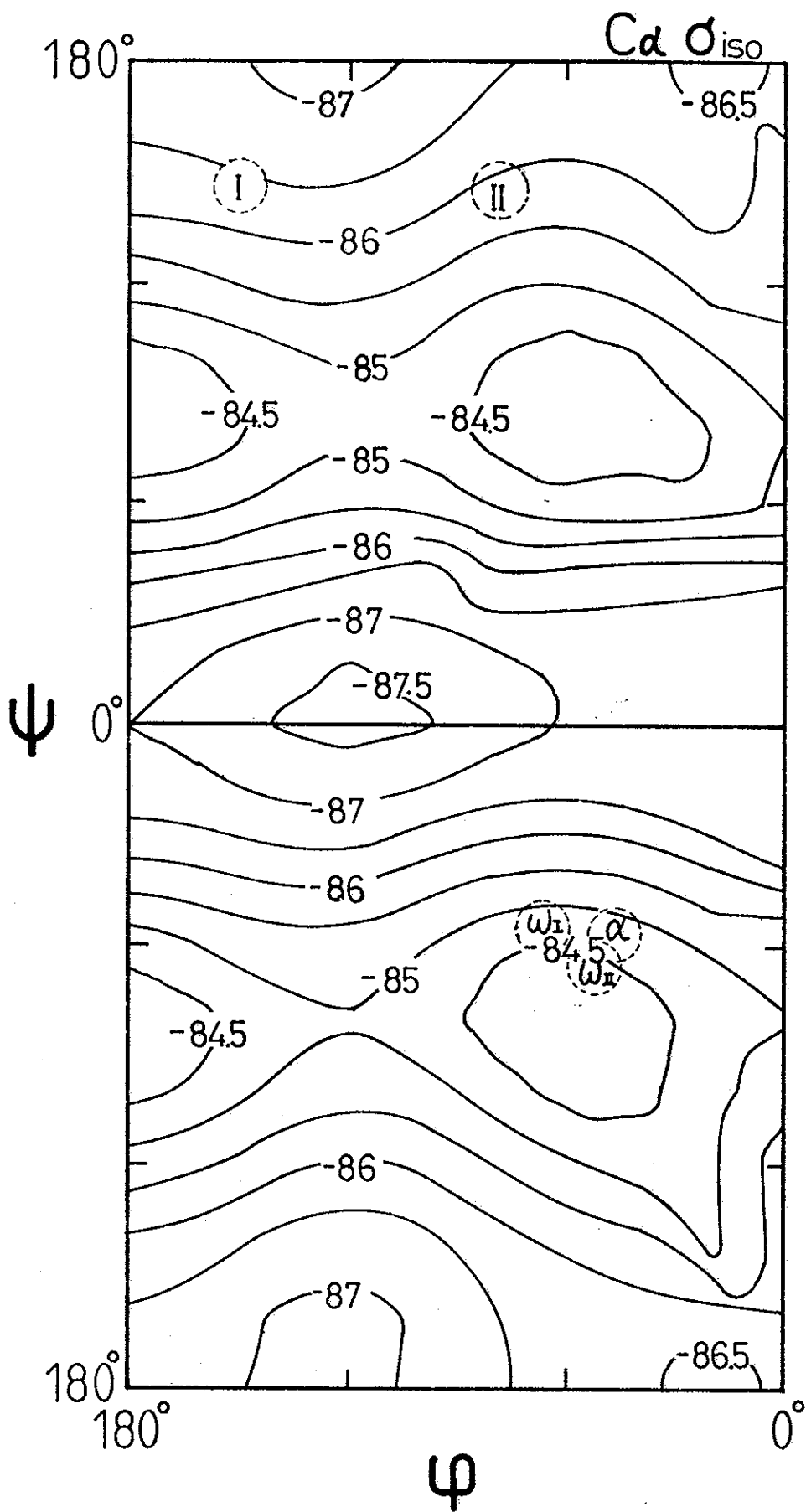
Form I > Form II > α -ヘリックス = ω_1 -ヘリックス > ω_2 -ヘリックス
となり、これを実測の結果

ω -ヘリックス > α -ヘリックス > Form I > Form II

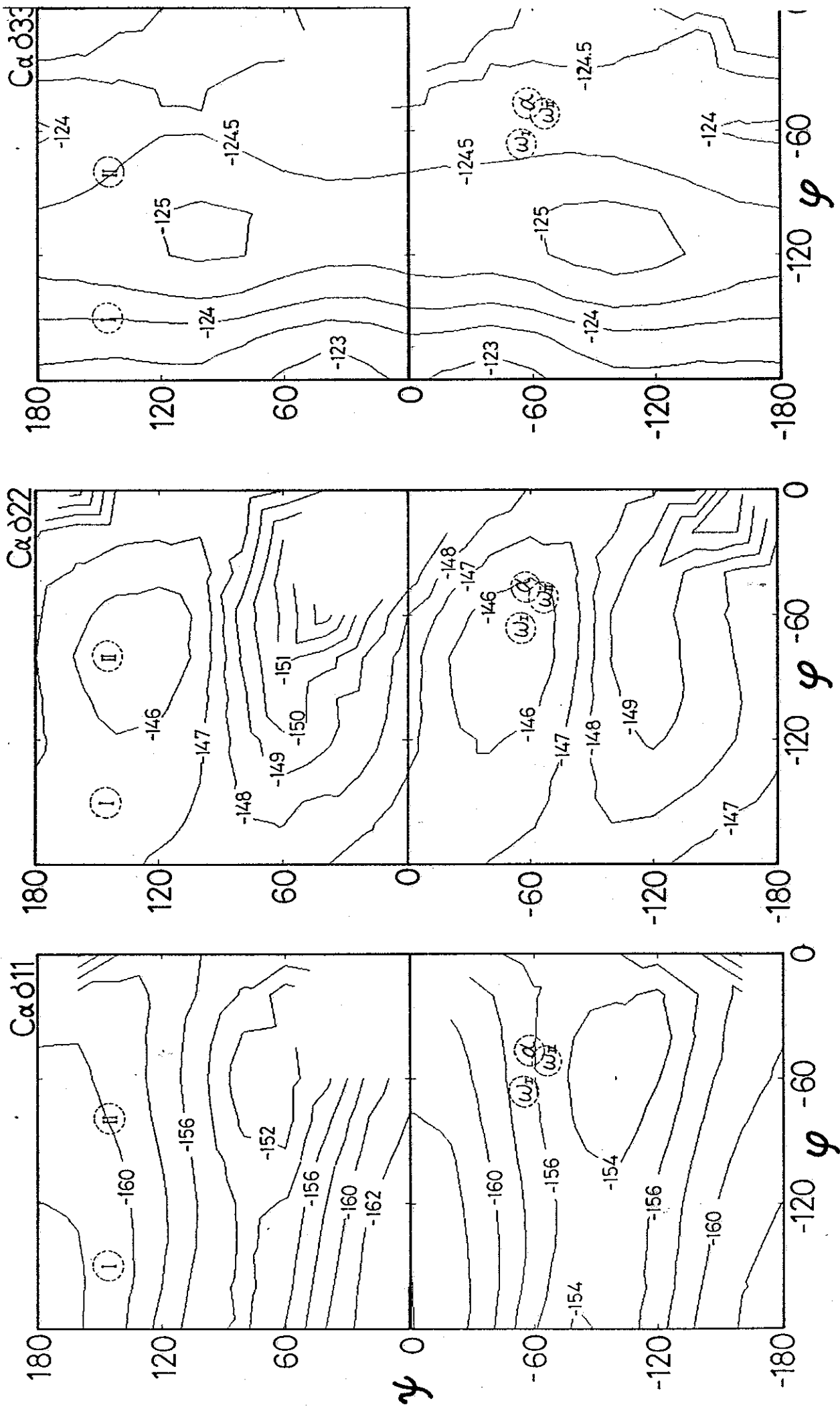
と比較すると、Form I が Form II よりも低磁場に出ることは一致しているものの、Form I、Form II と ω -ヘリックス、 α -ヘリックスの上下関係

[表6-5] FPT-INDO法によるグリシン残基
C α 炭素の ^{13}C 化学シフト計算結果 (ppm)

コンホメーション	σ_{iso}	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}
[Case I]				
Form I	-86.48	-161.24	-146.24	-124.29
Form II	-85.86	-160.06	-145.40	-124.43
α - helix	-84.67	-156.46	-145.69	-124.24
ω_1 - helix	-84.62	-156.83	-145.01	-124.35
ω_2 - helix	-84.30	-155.28	-145.71	-124.26
[Case II]				
Form I	-87.4	-159.8	-146.2	-124.9
Form II	-87.5	-162.6	-146.6	-125.4
α - helix	-86.0	-163.4	-145.4	-124.7
ω_1 - helix	-85.7	-159.4	-145.2	-124.7
ω_2 - helix	-86.1	-159.3	-145.8	-125.0



【図6-12】
 FPT-INDO法によるCase I グリシン残基
 メチレン (C α) 炭素の ^{13}C NMR 等方平均化学シフトの等高線図



[图6-13] FPT-INDO法によるCase I グリシン残基
メチレン(Cα)炭素の¹³C NMR 化学シフトテンソルの等高線図

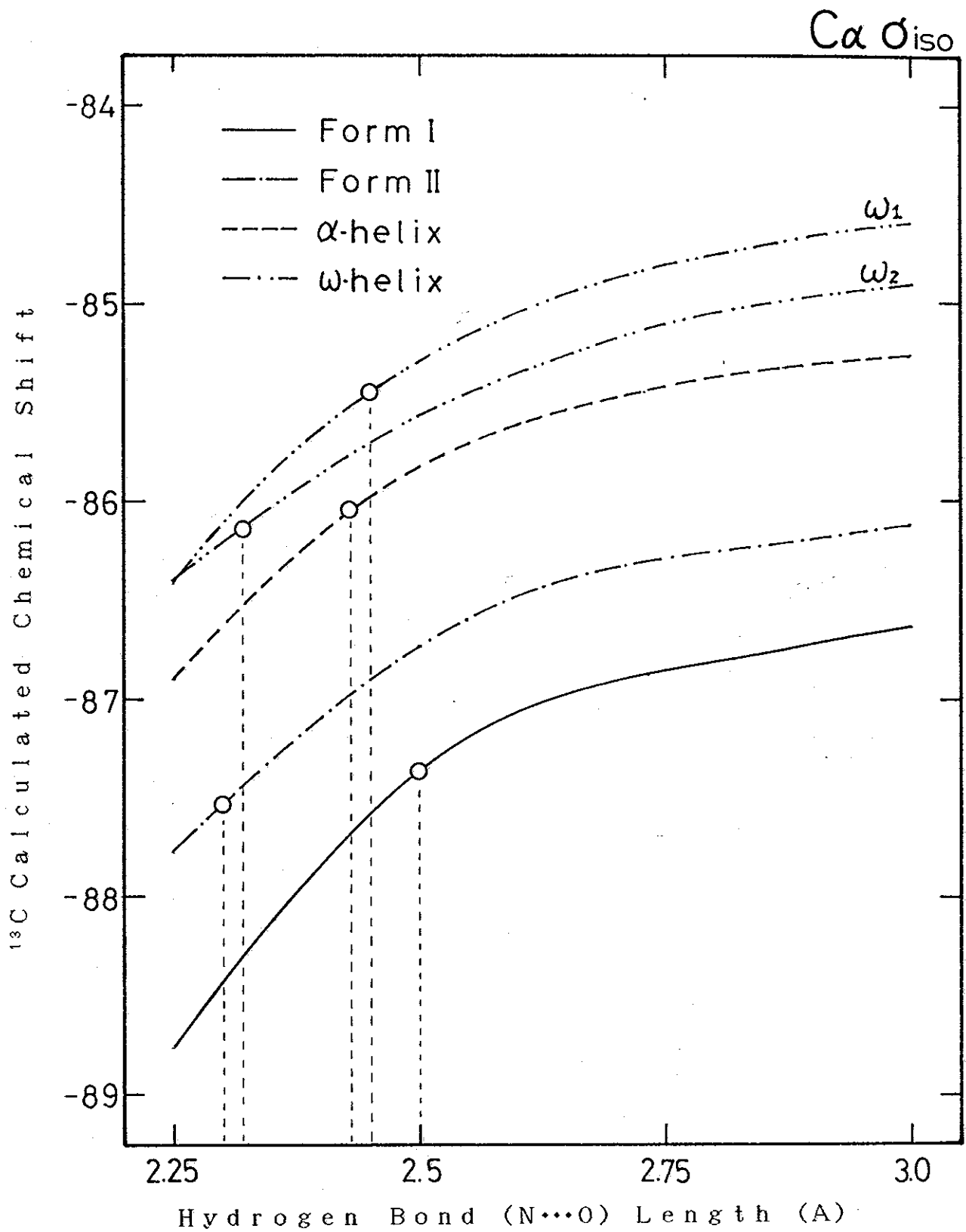
が逆転している。また各テンソル成分の傾向は Form I と Form II でほぼ実測と相反する結果であり、このアプローチでは C α 炭素の化学シフトを評価することが困難である。

☆ Case II

そこでカルボニル炭素の場合と同様、疑似的な水素結合の効果を導入した Case II の計算を行った。その結果を図 6-14, 表 6-4 に掲げる。GlyC=O の計算で行ったのと同様の方法で計算結果の読み取りを行った。等方平均化学シフトの結果を単純化して表すと、次のようになる。

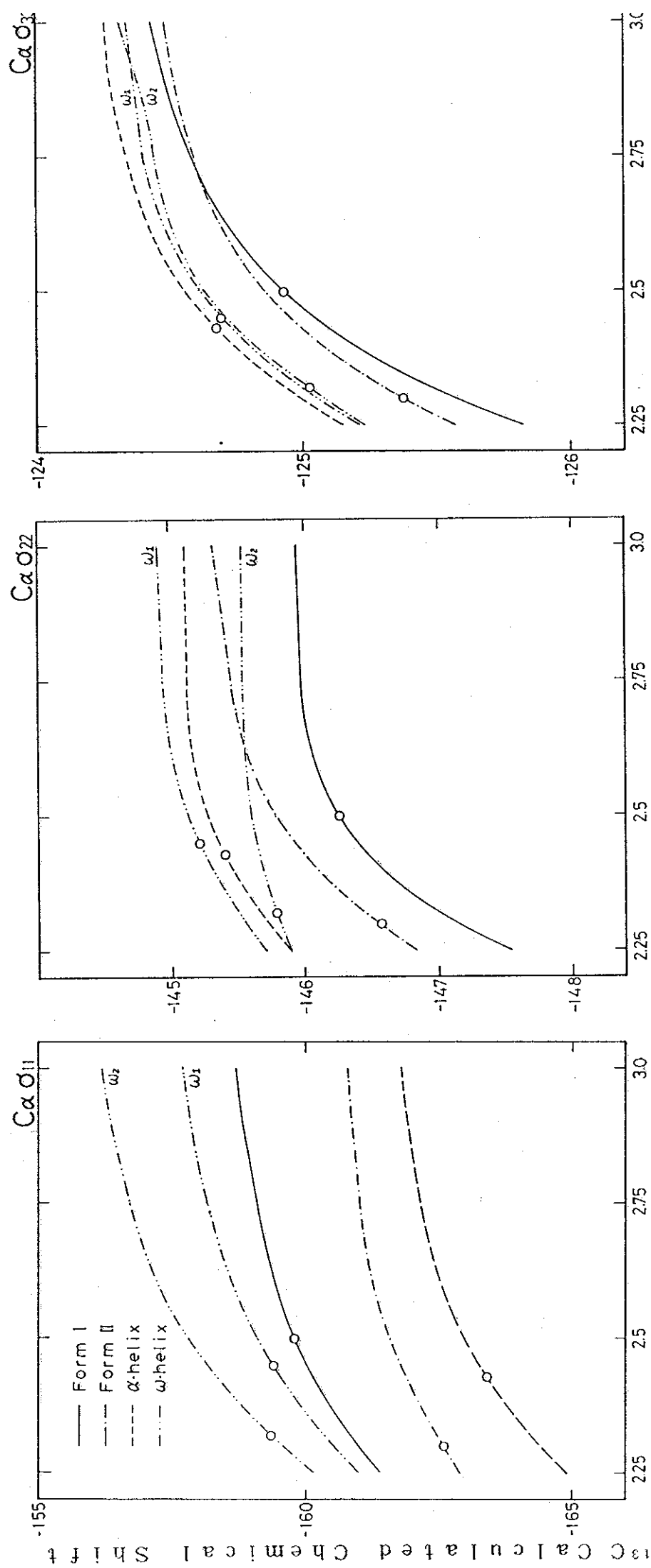
Form I > Form II > α -ヘリックス = ω_2 -ヘリックス > ω_1 ヘリックス
化学シフトの上下関係は、このように Case I の場合とほとんど変わりが無い。図 6-14a に示すとおり、ひとつのコンホメーションについて見ると、水素結合距離の依存性がわずかに見られるものの、主鎖構造の変化に起因するシフト変化のほうはるかに大きく、化学シフト変化の原因として水素結合距離の違いは重要でない。Case I と Case II が定性的に等しい計算結果を与えたのはこの理由による。この結果は、水素結合距離と GlyC α の等方平均化学シフトの間に実験的に検知できるほどの相関はないとした、実測結果の考察と一致している。

結果として、どちらのアプローチ(モデル I とモデル II)を用いても、GlyC α の等方平均化学シフトの実測傾向を理論計算によって再現することは難しい。第 4 章で明らかにした通り、GlyC α は本研究によって初めて化学シフトのコンホメーション依存性が確認されたものであり、そのシフト



【図6-14】

FPT-INDO法によるCase II グリシン残基メチレン(C α)炭素
 ^{13}C NMR 等方平均化学シフトの水素結合距離依存性



Hydrogen Bond (N...O) Length (Å)

[圖6-14] FPT-INDO法によるCase II グリシン残基メチレン(Cα)炭素 ¹³C NMR 化学シフトテンソルの水素結合距離依存性

変化は α -ヘリックスと β -シートで0.5 ppm、最大で1.4 ppmと理論計算で評価できる範囲よりはるかに小さい。C α 炭素の化学シフト異方性はカルボニル炭素に比べて小さいために、化学シフトは周囲の局所的な電子構造に依存して変化するのではなく、遠距離の電子的な環境を相対的に強く受けているものと考えられる。FPT-INDO法による磁気遮蔽定数の理論計算では、大きな化学シフト異方性を持ち、局所的な電子構造が化学シフトの決定に支配的であるカルボニル炭素のような核種ではその定性的な評価が可能であるが、メチレン炭素のように対称性がよく遠距離の効果を受ける核種については十分な評価をすることができない。

§ 6 - 4 ま と め

1. グリシン残基カルボニル炭素(GlyC=O)の ^{13}C 化学シフトに対する

- ① 水素結合系におけるプロトドナーのイオン化状態、
- ② 水素結合の距離の違い
- ③ 主鎖構造の変化(「狭義のコンホメーション効果」)

の3つの効果を考慮した、モデル化合物による磁気遮蔽定数の理論計算は実測傾向を比較的よく再現し、実際の系においてもこれらの効果が化学シフトを変化させる主要因であることが理論的に裏づけられた。

特に①と③の効果は σ_{11} (C-N軸方向の主値)の挙動に、②の効果は σ_{22} (C=O軸方向の主値)の挙動に特徴的に現れる。 ^{13}C の化学シフトは水素結合を含む分子の局所的な電子構造を反映しており、影響を及

ぼす個々の相互作用は、特定のテンソル成分(主値)に現れることが示された。また GlyC=O の化学シフトには隣接残基の影響が極めて少ないことも理論的に裏付けられた。

2. グリシン残基メチレン炭素(GlyC α)の ^{13}C 化学シフトは実測値の変化する幅があまりにも小さく、本研究で扱った理論計算の範囲内でこの挙動を評価することは困難である。これは C α 炭素の電子的な環境が長距離の相互作用を含んだ複雑な系であることに起因し、磁気遮蔽定数の理論計算は、このような系に対して実験結果の解釈に応用できるほど十分な精度をまだ持ちえていない。

なお、本章で述べた研究内容は、第3章で述べた研究と併せ
以下の報文として発表いたしました。

Ando, S.; Ando, I.; Shoji, A.; Ozaki, T.

J. Am. Chem. Soc. 110, 3380 (1988)

参考文献 >

- 1) Fukui, H. *Mag. Res. Rev.* 11, 205 (1987)
- 2) Schastnev, P.V. *Zh. Struk. Khim.* 23, 139 (1982)
- 3) Ellis, P.D.; Maciel, G.E.; McIver, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4069 (1972)
- 4) Maciel, G.E.; Dallas, J.L.; Elliot, R.L.; Dorn, H.C. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 5857 (1973)
- 5) Maciel, G.E.; Dorn, H.C. *J. Mag. Res.* 24, 251 (1976)
- 6) Maciel, G.E.; Dallas, J.L.; Miller, D.P. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 5074 (1976)
- 7) Seidman, K.; Maciel, G.E. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 3254 (1977)
- 8) Seidman, K.; Maciel, G.E. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 659 (1977)
- 9) Garber, A.R.; Ellis, P.D.; Seidman, K.D. Schade, K. *J. Mag. Res.* 34, 1 (1979)
- 10) Chesnut, D.B.; Whitehurst, F.W. *J. Compu. Chem.* 1, 36 (1980)
- 11) Chesnut, D.B.; Zhang, C. *J. Compu. Chem.* 9, 416 (1988)
- 12) Wu, W.X.; You, X.Z.; Dai, A.B. *Acta Chim. Sinica* 44, 1077 (1986)
- 13) unpublished data
- 14) Rohlfing, C.M.; Allen, L.C.; Ditchfield, R. *Chem. Phys.* 87, 9 (1984)
- 15) Grant, D.M.; Cheney, C.V. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5315 (1967)
- 16) Ando, I.; Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T. *Macromolecules* 14, 457 (1984)
- 17) 第2章 ref.1 を参照
- 18) Pople, J.A.; McIver, J.W.; Ostlund, N.S. *J. Chem. Phys.* 49, 2960 (1968)
- 19) Pople, J.A.; Beveridge, D.L.; Dobosh, P.A. *J. Chem. Phys.* 47, 2026 (1967)
- 20) Momany, F.A.; McGuire, R.F.; Yan, J.F.; Scheraga, H.A. *J. Phys. Chem.* 75, 2286 (1971)
- 21) Lotz, B. *J. Mol. Biol.* 87, 169 (1974)
- 22) Crick, F.C.H.; Rich, A. *Nature* 176, 780 (1955)
- 23) Bamford, C.H.; Elliot, A.; Hanby, W.E. "Synthetic Polypeptides" Academic Press, New York (1956)
- 24) Brudbury, E.M.; Brown, L.; Downie, A.R.; Elliot, A.; Fraser, R.D.B.; Hanby, W.E. *J. Mol. Biol.* 5, 23 (1962)
- 25) McGuire, R.F.; Vanderekooi, G.; Momany, F.A.; Ingwall, R.T.; Crippen, G.M.; Latan, N.; Tuttle, R.W.; Kashuba, K.L.; Scheraga, H.A. *Macromolecules* 4, 112 (1971)

- 26) Avignon, C.; Garrigou-Lagrange, C.; Bothorel, P. *Biopolymers* 12, 1651 (1973)
- 27) Scheraga, H.A. "Calculation of Conformation of Polypeptides" in "Adv. Phys. Org. Chem." Vol. 6
- 28) Pullman, B. "Protein, Nucleic Acids and their constituents" in "Quantum Mechanics of Molecular Conformations" Wiley publ.
- 29) Saito, H.; Tabeta, R. Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. *Biopolymers* 22, 1375 (1983)
- 30) Stark, R.E.; Jelinski, L.W.; Ruben, D.J.; Torchia, D.A.; Griffin, R.G. *J. Mag. Res.* 55, 266 (1983)
- 31) Parthasarathy, R. *Acta Cryst.* B25, 509 (1969)
- 32) Kempf, J.; Spiess, H.W.; Haebleren, U.; Zimmermann *Chem. Phys. Lett.* 17, 39 (1972)
- 33) Morokuma, K. *Chem. Phys. Lett.* 19, 129 (1971)

第七章 コンホメーション依存化学
シフトの原理を探るための
FPT-MNDO法による
磁気遮蔽定数計算法の開発

§ 7-1 はじめに

[7-1-1] コンホメーション依存化学シフトを理論的に
評価するためのFPT-MNDO法による
磁気遮蔽定数の新しい計算手法の開発

前章の序論において、現在までに開発された半経験的分子軌道法に基づく磁気遮蔽定数の計算手法について紹介するとともに、それらの性能比較を行った。炭化水素の ^{13}C 化学シフトに対し現在最も良いパフォーマンスを示すWuらのFPT-MNDO近似によっても、実験値の再現性は平均誤差6.3 ppmと、まだ“定量的な評価が可能”と呼べる性能ではない。また、前章で示した通りFPT-INDO近似によっても化学シフト異方性の大きなカルボニル炭素の化学シフトテンソルの挙動を定性的に探ることは可能であったが、「化学シフトのコンホメーション依存性」を評価することは、一般に「化合物による化学シフト差」を評価することよりも難しく、将来的には化学シフトのコンホメーション依存性を定量的に評価できるような計算手法を開発してゆくことが望まれる。

そこで本研究では、前章で用いたFPT-INDO法とは異なる近似方法を用いたFPT-MNDO法による磁気遮蔽定数(テンソル)の計算手法を開発した。本章ではその理論的な背景と定式化について述べるとともに、正確な積分値を得るために開発した「各種1電子積分のガウス軌道を用いた展開法」について解説する。また「化学シフトのコンホメーション依存性」の存在が知られているメチレン鎖およびペプチドの基礎的な系について計算を行い、実測傾向の再現性について評価を行う。

§ 7-2 理論と計算

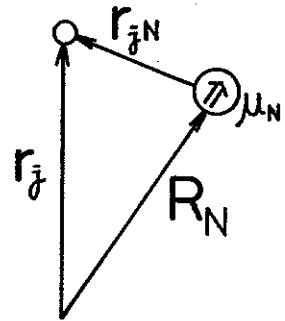
[7-2-1] 核磁気遮蔽の一般的な理論

本研究で開発した核磁気遮蔽定数（NMR化学シフト）の計算手法の解説に入る前に、核磁気遮蔽の基本的な理論および最近のSCF法（self consistent field）に基づいた計算方法の概略を述べる。

一般に、均一な磁場(H)中に置かれた閉核構造をもつ分子のハミルトニアンは、(A-1)式で表現される。ここで、良く知られるように磁場が存在する場合のハミルトニアンは、磁場のベクトルポテンシャルをAとすると、磁場が存在しない場合のハミルトニアン中の運動量演算子; pを $\pi = p + (1/c)A$ により置き換えることにより得ることができる。

$$\mathcal{H}(H,\mu) = \frac{1}{2} \sum_j \left[\left(p_j + \left(\frac{1}{c} \right) A(\mathbf{r}_j) \right)^2 - 2 \sum_N \frac{Z_N}{r_{jN}} \right] + \sum_{j \neq l} \sum \frac{1}{r_{jl}} + \sum_{N \neq N'} \frac{Z_N Z_{N'}}{R_{NN'}} \quad (\text{A-1})$$

ここで r_j は電子の座標、 R_N, R_N は分子中の核の座標でそれぞれ Z_N, Z_N の電荷、 μ_N, μ_N の核磁気モーメントをもっている。cは光速で、今後断わらない限り式中に現れる物理量はすべて原子単位 ($m=1, e=1, \hbar=1$) で記述することとする。(A-1)式における後ろの3項はそれぞれ核と電子、電子と電子、核と核との相互作用を表しており、これらには外部磁場を加えた効果が現れてこない。



空間内の位置jにおける磁場のベクトルポテンシャルは、外部磁場Hに、分子内の原子がもつ核磁気モーメントにより誘起された局所磁場が加わるため、次式で与えられる。

$$\begin{aligned} A(\mathbf{r}_j) &= \frac{1}{2} H \otimes \mathbf{r}_j + \sum_N \frac{\mu_N \otimes \mathbf{r}_{jN}}{r_{jN}^3} \\ &= A(\mathbf{r}_j) + \sum_N \frac{\mu_N \otimes \mathbf{r}_{jN}}{r_{jN}^3} \end{aligned} \quad (\text{A-2})$$

ここで r_j は任意の原点(ゲージ中心と呼ぶ) から位置 j までのベクトル、 r_{jN} , R_{NN} はそれぞれ $(r_j - r_N)$, $(R_N - R_N)$ である。 \otimes は外積を示す。

(A-2) を (A-1) に代入し、簡単のために位置 j に誘起磁場を引き起こす核磁気モーメントが μ_N だけだとすると、(A-1) は展開することができて、

$$\begin{aligned} \mathcal{H}(H, \mu) = & \mathcal{H}^{(0)} + \sum_{\alpha} H_{\alpha} \mathcal{H}_{\alpha}^{(1,0)} + \sum_{\alpha} \mu_{N\alpha} \mathcal{H}_{N\alpha}^{(0,1)} \\ & + \frac{1}{2} \sum_{\alpha} \sum_{\beta} H_{\alpha} \mathcal{H}_{\alpha\beta}^{(2,0)} H_{\beta} + \sum_{\alpha} \sum_{\beta} H_{\alpha} \mathcal{H}_{N\alpha\beta}^{(1,1)} \mu_{N\beta} \end{aligned} \quad (\text{A-3})$$

ここで p_j を量子力学的角運動量; $-i\nabla_j$ で置き換え、かつ $\nabla \cdot A = 0$ ($\text{Div} A = 0$) の関係を使った。 H_{α} , H_{β} は外部磁場の要素で、 α, β は x, y, z のいずれかをとる。

$$\mathcal{H}^{(0)} = \sum_j \left(-\frac{1}{2} \nabla_j^2 - \sum_N \frac{Z_N}{r_{jN}} \right) + \sum_{j \neq l} \sum \frac{1}{r_{jl}} + \sum_{N \neq N'} \frac{Z_N Z_{N'}}{R_{NN'}} \quad (\text{A-4})$$

$$\mathcal{H}_{\alpha}^{(1,0)} = -\frac{i}{2c} \sum_j L_{j\alpha} \quad (\text{A-5})$$

$$\mathcal{H}_{\alpha\beta}^{(2,0)} = \frac{1}{4c^2} \sum_j (r_j^2 \delta_{\alpha\beta} - r_{j\alpha} r_{j\beta}) \quad (\text{A-6})$$

$$\mathcal{H}_{N\alpha}^{(0,1)} = -\frac{i}{c} \sum_j \frac{L_{jN\alpha}}{r_{jN}^3} \quad (\text{A-7})$$

$$\mathcal{H}_{N\alpha\beta}^{(1,1)} = \frac{1}{2c^2} \sum_j \frac{r_j r_{jN} \delta_{\alpha\beta} - r_{j\alpha} r_{jN\beta}}{r_{jN}^3} \quad (\text{A-8})$$

$$L_{j\alpha} = \left(r_j \otimes \nabla \right)_{\alpha} \quad (\text{A-9})$$

$$L_{jN\alpha} = \left(r_{jN} \otimes \nabla \right)_{\alpha}, \quad \nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right) \quad (\text{A-10})$$

$\delta_{\alpha\beta}$ はクロネッカーの記号である。 $H^{(0)}$ は磁場(摂動)が存在しない時のハミルトニアンで、これを用いてシュレディンガーの波動方程式を解くことにより摂動を受けていない波動関数 $\Psi_0, \Psi_1, \Psi_2, \dots, \Psi_n$ (エネルギーはそれぞれ $E_0, E_1, E_2, \dots, E_n$) を得ることができる。ここで Ψ_0 は基底状態の波動関数である。

磁場 H と核磁気モーメント μ_N が存在する場合には、基底関数 Ψ_0 は摂動を受けて $\Psi(H, \mu_N)$ となり、そのエネルギーも E_0 から $E(H, \mu_N)$ に変化する。これは磁

場による分子の反磁性分極に由来している。Hと μ_N が小さい場合、 $E(H, \mu_N)$ は次のように書くことができ、現れてくる係数(実際にはベクトルあるいはテンソル量)には以下のような物理的意味と名称が与えられている。

$$E(H, \mu) = E_0 - \sum_{\alpha} \gamma_{\alpha} H_{\alpha} - \sum_{\alpha} \mu_{N\alpha} H_{\alpha} - \frac{1}{2} \sum_{\alpha} \sum_{\beta} H_{\alpha} \chi_{\alpha\beta} H_{\beta} + \sum_{\alpha} \sum_{\beta} H_{\alpha} \sigma_{N\alpha\beta} \mu_{N\beta} + \dots \quad (\text{A-11})$$

第2項における γ は分子のもつ永久磁気モーメントであり閉殻分子では0となる。第3項は核磁気モーメントと磁場の直接の相互作用である。第4項は分子の反磁性分極を表しており、磁場によって誘起された分子内電流により生じた全磁気モーメント($\sum_{\beta} \chi_{\alpha\beta} H_{\beta}$; $\chi_{\alpha\beta}$ は反磁性磁化率と呼ばれるテンソル量)と磁場 H_{α} の相互作用を示している。第5項は同様に分子内電流によって核Nの地点に生じた2次の磁場($\sum_{\beta} \sigma_{\alpha\beta} H_{\beta}$; $\sigma_{\alpha\beta}$ は磁気遮蔽定数と呼ばれるテンソル量)と核Nの磁気モーメント $\mu_{N\alpha}$ の相互作用を表している。

一方、 $E(H, \mu_N)$ は、Hと μ_N が小さい場合、Hと μ_N の回りでテイラー展開することができて、

$$E(H, \mu) = E_0 + \sum_{\alpha} E_{\alpha}^{(1,0)} H_{\alpha} + \sum_{\alpha} E_{N\alpha}^{(0,1)} \mu_{N\alpha} + \frac{1}{2} \sum_{\alpha} \sum_{\beta} H_{\alpha} E_{\alpha\beta}^{(2,0)} H_{\beta} + \sum_{\alpha} \sum_{\beta} H_{\alpha} E_{N\alpha\beta}^{(1,1)} \mu_{N\beta} + \frac{1}{2} \sum_{\alpha} \sum_{\beta} \mu_{N\alpha} E_{N\alpha\beta}^{(0,2)} \mu_{N\beta} + \dots \quad (\text{A-12})$$

(A-11)式と(A-12)式を比べることにより、 $\sigma_{\alpha\beta}$ を評価することと $E_{N\alpha\beta}^{(1,1)}$ を求めることが同義であることがわかる。ここから以下のように $\sigma_{\alpha\beta}$ を定式化することができ、 $\sigma_{\alpha\beta}$ を計算することが摂動によって生じた2次の項の評価であることが明らかとなる。

$$\sigma_{\alpha\beta} = [E_{N\alpha\beta\mu_{N\beta}}^{(1,1)}]_{H-\mu=0} = \left[\frac{\partial^2 E(H, \mu)}{\partial H_{\alpha} \partial \mu_{N\beta}} \right]_{H-\mu=0} \quad (\text{A-13})$$

一般に、ハミルトニアンが以下のように書かれる場合(ここで $\lambda_1, \lambda_2, \dots$ は外部からの摂動、 $\mathcal{H}_1, \mathcal{H}_2$ はそれぞれの摂動に対応するハミルトニアンである)、

$$\mathcal{H}(\lambda) = \mathcal{H}^0 + \lambda_1 \mathcal{H}^1 + \lambda_2 \mathcal{H}^2 + \dots \quad (\text{A-14})$$

摂動のかかったエネルギー $E(\lambda)$ に Hellmann Feynman の定理を用いると、

$$\begin{aligned} \frac{\partial E(\lambda)}{\partial \lambda_1} &= \langle \Psi(\lambda) | \frac{\partial \mathcal{H}(H, \mu)}{\partial \lambda_1} | \Psi(\lambda) \rangle \\ &= \langle \Psi(\lambda) | \mathcal{H}_1 | \Psi(\lambda) \rangle \end{aligned} \quad (\text{A-15})$$

ここで問題とされているのは 2 次の摂動項であるから

$$\begin{aligned} \left[\frac{\partial E(\lambda)}{\partial \lambda_1 \partial \lambda_2} \right] &= \left[\frac{\partial}{\partial \lambda_2} \langle \Psi(\lambda) | \mathcal{H}_1 | \Psi(\lambda) \rangle \right]_{\lambda=0} \\ &= \left[\frac{\partial}{\partial \lambda_2} \langle \Psi(\lambda_2) | \mathcal{H}_1 | \Psi(\lambda_2) \rangle \right]_{\lambda_2=0} \end{aligned} \quad (\text{A-16})$$

(λ_2 についての偏微分をとるので考慮するのは $\Psi(\lambda_2)$ だけでよい)

つまり、 λ_1, λ_2 による 2 次の摂動項を計算することは、摂動ハミルトニアン \mathcal{H}_1 の $\Psi(\lambda_2)$ による期待値を、 $\lambda_2=0$ の地点で微分する (その微係数を求める) ことに相当する。波動関数 $\Psi(\lambda_2)$ は次のようなハミルトニアン $\mathcal{H}(\lambda_2)$ によって生成される。

$$\mathcal{H}(\lambda_2) = \mathcal{H}^0 + \lambda_2 \mathcal{H}_2 \quad (\text{A-17})$$

磁気遮蔽テンソル $\sigma_{\alpha\beta}$ の計算においては、 $\lambda_1 = \mu_{N\alpha}$ 、 $\lambda_2 = H_\beta$ であるから、(A-3)式より

$$\mathcal{H}_1 = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mu_{N\alpha}} = \mathcal{H}_{N\alpha}^{(0,1)} + H_\beta \mathcal{H}_{N\alpha\beta}^{(1,1)} \quad (\text{A-18})$$

であるので

$$\sigma_{N\alpha\beta} = \left[\frac{\partial}{\partial H_\beta} \langle \Psi(H_\beta) | \mathcal{H}_{N\alpha}^{(0,1)} + H_\beta \mathcal{H}_{N\alpha\beta}^{(1,1)} | \Psi(H_\beta) \rangle \right]_{H=0} \quad (\text{A-19})$$

これは次のように分けることができ、

$$\begin{aligned} \sigma_{N\alpha\beta} &= \langle \Psi_0 | \mathcal{H}_{N\alpha\beta}^{(1,1)} | \Psi_0 \rangle \\ &\quad + \left[\frac{\partial}{\partial H_\beta} \langle \Psi(H_\beta) | \mathcal{H}_{N\alpha}^{(0,1)} | \Psi(H_\beta) \rangle \right]_{H=0} \end{aligned} \quad (\text{A-20})$$

この式中に現れる2つの項はそれぞれ磁気遮蔽テンソルの反磁性項および常磁性項に対応している。ここで反磁性項 σ^a は摂動の存在しない時の波動関数にのみ依存し、また常磁性項 σ^p は摂動Hが存在するときのハミルトニアンにだけ依存している。この式で $\sigma_{N\alpha\beta}$ の評価に必要なのは2次の摂動関数である $\Psi(H, \mu_N)$ ではなく、磁場 H_α の1次の摂動関数 $\Psi(H_\alpha, 0)$ であるので、用いるハミルトニアンも(A-17)式に従い、以下のようなになる

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}^{(0)} - \frac{H}{2C} i \sum_{\vec{j}} L_{\vec{j}} \quad (\text{A-21})$$

実際にはこのハミルトニアンを用いた分子軌道法により(A-20)式を評価することによって $\sigma_{\alpha\beta}$ を計算することができる。

§ 2 分子軌道法に沿った磁気遮蔽テンソルの定式化

☆ 実関数の原子軌道を用いる場合

閉殻分子の基底状態の波動関数 Ψ_0 を記述するのに通常用いられる近似法は、 α スピンと β スピンで占有された分子軌道のスレーター型行列式をとることである。摂動が存在しない場合、 $2n$ 個の電子をもつ分子の Ψ_0 は次式によって与えられる。

$$\Psi_0 = |\psi_1 \bar{\psi}_1 \psi_2 \bar{\psi}_2 \dots \psi_n \bar{\psi}_n| \quad (\text{B-1})$$

ここで $\bar{\psi}_j$ は分子軌道が β スピンを持つことを示している。個々の分子軌道 ψ_j は次のような実関数の原子軌道 ϕ_λ の線形結合(LCAOと呼ばれる)で表される。

$$\psi_j = \sum_{\nu} c_{\nu j} \phi_{\nu} \quad (\text{B-2})$$

何らかの方法で分子軌道(つまり軌道の係数 $c_{\nu j}$)を決めることができれば、次のようにして電荷密度; ρ を求めることができる。

$$\rho = 2 \sum_j^{\text{occ}} \psi_j^2 = \sum_{\nu} \sum_{\lambda} P_{\nu\lambda} \phi_{\nu} \phi_{\lambda} \quad (\text{B-3})$$

ここで

$$P_{\nu\lambda} = 2 \sum_j^{\text{occ}} c_{\nu j} c_{\lambda j} \quad (\text{B-4})$$

$P_{\nu\lambda}$ は密度行列と呼ばれ、電荷の分布に関する全ての情報が含まれている。

一方、ハミルトニアンに摂動項が存在する場合には、摂動の虚数的な性質により分子軌道が複素数になることが要請される。展開に用いる原子軌道を(B-2)と同じものとする

$$\psi_j(\mathbf{H}, \mu) = \sum_{\nu} c_{\nu j}(\mathbf{H}, \mu) \varphi_{\nu} \quad (\text{B-5})$$

と書くことができる。ここでは摂動の効果が分子軌道の係数を通してのみ現れるものとしている。 $c_{\nu j}$ と $P_{\nu\lambda}$ は以前と同様に \mathbf{H} と μ_N の回りで展開することができる。

$$c_{\nu j}(\mathbf{H}_{\alpha\beta}, \mu_{N\alpha}) = c_{\nu j}^{(0)} + iH_{\alpha} (c_j^{(1,0)})_{\alpha} + i\mu_{N\alpha} (c_{N\nu j}^{(0,1)})_{\alpha} + \quad (\text{B-6})$$

$$P_{\nu\lambda}(\mathbf{H}_{\alpha\beta}, \mu_{N\alpha}) = P_{\nu\lambda}^{(0)} + iH_{\alpha} (P_{\nu\lambda}^{(1,0)})_{\alpha} + i\mu_{N\alpha} (P_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\alpha} + \quad (\text{B-7})$$

この2式を比べることにより、以下の関係を導くことができる

$$P_{\nu\lambda}^{(0)} = 2 \sum_j^{occ} c_{\nu j}^{(0)} \cdot c_{\lambda j}^{(0)} \quad (\text{B-8})$$

$$(P_{\nu\lambda}^{(1,0)})_{\alpha} = 2 \sum_j^{occ} [c_{\nu j}^{(0)} \cdot (c_{\lambda j}^{(1,0)})_{\alpha} - (c_{\nu j}^{(1,0)})_{\alpha} c_{\lambda j}^{(0)}] \quad (\text{B-9})$$

この複素密度行列を用いることにより、磁気遮蔽テンソルの定式(A-20)は以下のように書き換えられる。(A-7)(A-8)参照)

$$\sigma_{N\alpha\beta} = \sum_{\nu\lambda} [P_{\nu\lambda}^{(0)} (H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta} + (P_{\nu\lambda}^{(1,0)})_{\alpha} (H_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta}] \quad (\text{B-10})$$

ここで

$$(H_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta} = -\frac{1}{c} \langle \varphi_{\nu} | \frac{L_{N\beta}}{r_N^3} | \varphi_{\lambda} \rangle \quad (\text{B-11})$$

$$(H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta} = \frac{1}{2c^2} \langle \varphi_{\nu} | \frac{\mathbf{r} \mathbf{r}_N \delta_{\alpha\beta} - (r)_{\alpha} (r_N)_{\beta}}{r_N^3} | \varphi_{\lambda} \rangle \quad (\text{B-12})$$

この(B-10)がLCAOによって波動関数を表現した場合の磁気遮蔽テンソルの定式である。

☆ ゲージ依存の原子軌道を用いた場合

前節までで述べた、磁気遮蔽テンソルを反磁性項と常磁性項に分けて評価する方法を比較的大きな分子に適用すると、実際はこれら2つの項が共に大きくなり、かつお互いの符号が異なるためキャンセルしあって、計算結果は大きな誤差を生じやすい。実原子軌道を用いた場合、基底関数系が完全(Complete)なときには計算結果がベクトルポテンシャルの原点(ゲージ)に依存しないが、通常用いられる基底関数系(原子軌道の組)は完全系とは言えないため、その結果はしばしば大きなゲージ依存性を示すことになる。

これを避けるための方法として、分子軌道を実原子軌道ではなく、以下のようなゲージ依存の原子軌道で展開することを考える。

$$\psi_j(\mathbf{H}, \mu) = \sum_{\nu} c_{\nu j}(\mathbf{H}, \mu) \chi_{\nu}(\mathbf{H}) \quad (\text{B-13})$$

$$\begin{aligned} \chi_{\nu}(\mathbf{H}) &= \exp\left[-\left(\frac{i}{c}\right) \mathbf{A}_{\nu} \times \mathbf{r}\right] \phi_{\nu} \\ &= f_{\nu} \phi_{\nu} \end{aligned} \quad (\text{B-14})$$

ここで、新たな原子軌道 χ_{ν} は、実原子軌道 ϕ_{ν} にゲージに依存する複素関数 f をかけたものになっている。 $\mathbf{A}_{\nu} = \frac{1}{2} \mathbf{H} \otimes \mathbf{R}_{\nu}$ は核の位置 \mathbf{R}_{ν} におけるベクトルポテンシャルである。この原子軌道は(A-20 第2項)に沿って磁場 \mathbf{H} にのみ依存する。この方法によると、分子の分子軌道は次のようなスレーター行列式で表され、

$$\begin{aligned} \Psi(\mathbf{H}, \mu) &= |\psi_1(\mathbf{H}, \mu) \overline{\psi_1(\mathbf{H}, \mu)} \psi_2(\mathbf{H}, \mu) \overline{\psi_2(\mathbf{H}, \mu)} \cdots \\ &\quad \psi_n(\mathbf{H}, \mu) \overline{\psi_n(\mathbf{H}, \mu)}| \end{aligned} \quad (\text{B-15})$$

個々の分子軌道は新たなゲージ依存の原子軌道で展開されることになる。

この波動関数によって表式化される $E(\mathbf{H}, \mu)$ に対し変分原理を適用することにより、修正された形のRoothaan方程式を得ることができる。

$$\sum_{\lambda} [F_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) - \varepsilon_{\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) S_{\nu\lambda}(\mathbf{H})] c_{\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) = 0 \quad (\text{B-16})$$

ここで $F_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N)$ は Fock 行列と呼ばれ次式で与えられる。

$$F_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) = H_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) + G_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) \quad (\text{B-17})$$

$$H_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) = \langle \chi_{\nu}(\mathbf{H}) | \left[\frac{1}{2} \left[-i \nabla + \left(\frac{1}{c} \right) \mathbf{A}(\mathbf{r}) \right]^2 - \sum_N \frac{Z_N}{r_N} \right] | \chi_{\lambda}(\mathbf{H}) \rangle \quad (\text{B-18})$$

$$G_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) = \sum_{\rho\sigma} P_{\rho\sigma}(\mathbf{H}, \mu_N) \langle (\chi_{\nu}(\mathbf{H}) \chi_{\lambda}(\mathbf{H}) | \chi_{\rho}(\mathbf{H}) \chi_{\sigma}(\mathbf{H})) \rangle - \frac{1}{2} \{ \chi_{\nu}(\mathbf{H}) \chi_{\sigma}(\mathbf{H}) | \chi_{\rho}(\mathbf{H}) \chi_{\lambda}(\mathbf{H}) \} = \sum_{\rho\sigma} P_{\rho\sigma}(\mathbf{H}, \mu_N) G_{\nu\lambda\rho\sigma} \quad (\text{B-19})$$

重なり積分; $S_{\nu\lambda}(\mathbf{H})$ 、密度行列 $P_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu)$ 、二電子積分 $(\chi_{\nu} \chi_{\lambda} | \chi_{\rho} \chi_{\sigma})$ はそれぞれ、

$$S_{\nu\lambda} = \int \chi_{\nu}(\mathbf{H}) \chi_{\lambda}(\mathbf{H}) d\tau \quad (\text{B-20})$$

$$P_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) = 2 \sum_j^{\text{occ}} c_{\nu j}(\mathbf{H}, \mu_N) c_{\lambda j}(\mathbf{H}, \mu_N) \quad (\text{B-22})$$

$$\langle \chi_{\nu}(\mathbf{H}) \chi_{\lambda}(\mathbf{H}) | \chi_{\rho}(\mathbf{H}) \chi_{\sigma}(\mathbf{H}) \rangle = \iint \chi_{\nu}(\mathbf{H})(1) \chi_{\lambda}(\mathbf{H})(1) \frac{1}{r_{12}} \chi_{\rho}(\mathbf{H})(2) \chi_{\sigma}(\mathbf{H})(2) d\tau_1 d\tau_2 \quad (\text{B-23})$$

分子軌道 $\psi_i(\mathbf{H}, \mu)$ の軌道エネルギーは $\varepsilon_i(\mathbf{H}, \mu)$ である。この式より明らかのように原子軌道をゲージ依存とすると重なり積分、密度行列、二電子積分の全てがゲージ依存となる。分子の電子エネルギー $E(\mathbf{H}, \mu)$ は以下のようになり、

$$E(\mathbf{H}, \mu_N) = \sum_{\nu\lambda} P_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) \left[H_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) + \frac{1}{2} G_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N) \right] \quad (\text{B-24})$$

この式を μ について微分して、(B-8)(B-9)を用いることにより次式が導かれる。ここで原子軌道は核磁気モーメントには依存しないことを利用している。

$$\left. \frac{\partial E_{\nu\lambda}(\mathbf{H}, \mu_N)}{\partial \mu_{N\beta}} \right|_0 = E_{N\beta}^{(0,1)} = i \sum_{\nu\lambda} [(P_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta} (H_{\nu\lambda}^{(0)} + G_{\nu\lambda}^{(0)}) + P_{N\nu\lambda}^{(0)} (H_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta}] \quad (\text{B-25})$$

修正 Roothaan 方程式(B-16)の解はHと μ のすべての成分に対して規格直交化されていなくてはならないので、

$$\sum_{\nu\lambda} c_{\nu j}(\mathbf{H}, \mu_N) c_{\mu}(\mathbf{H}, \mu_N) S_{\nu\lambda}(\mathbf{H}) = \delta_{j\mu} \quad (\text{B-26})$$

これを μ について微分し、(B-6)の関係を用いると

$$i \sum_{\nu\lambda} (c_{\nu j}^{(0)} (c_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta} S_{\nu\lambda}^{(0)} - (c_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta} c_{\nu j}^{(0)} S_{\nu\lambda}^{(0)}) = 0 \quad (\text{B-27})$$

この結果を使うと(B-24)は簡単化することができて、

$$E_{N\beta}^{(0,1)} = i \sum_{\nu\lambda} [P_{N\nu\lambda}^{(0)} (H_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta}] \quad (\text{B-28})$$

ここで注意すべきなのは、分子軌道がゲージ依存の原子軌道で展開されている場合でも、 $E^{(0,1)}$ は摂動を受けていない時の0次の波動関数 $c_{\nu j}^{(0)}$ にのみ依存することである。従ってこれをHで偏微分して得られる磁気遮蔽テンソル $\sigma_{\alpha\beta}$ を計算するためには、外部磁場Hによる1次の摂動を受けた $c^{(1,0)}(\mathbf{H}_\alpha, 0)$ のみが必要となる。

(B-10)式をゲージ依存の波動関数を用いた場合に書き換えると、

$$\sigma_{N\alpha\beta} = \sum_{\nu\lambda} [P_{\nu\lambda}^{(0)} (H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta} + (P_{\nu\lambda}^{(1,0)})_{\alpha} (H_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta}] \quad (\text{B-29})$$

ここで

$$(H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta} = (H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta}^d + (H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta}^p \quad (\text{B-30})$$

$$(H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta}^d = \frac{1}{2c^2} \langle \varphi_{\nu} | \frac{\mathbf{r}_{\lambda} \mathbf{r}_N \delta_{\alpha\beta} - (r_{\lambda})_{\alpha} (r_N)_{\beta}}{r_N^3} | \varphi_{\lambda} \rangle \quad (\text{B-31})$$

$$(H_{N\nu\lambda}^{(1,1)})_{\alpha\beta}^p = \frac{1}{2c^2} \left\{ (Q_{\nu\lambda})_{\alpha} \langle \varphi_{\nu} | \frac{L_{N\beta}}{r_N^3} | \varphi_{\lambda} \rangle + \langle (T_{\nu\lambda})_{\alpha} \varphi_{\nu} | \frac{L_{N\beta}}{r_N^3} | \varphi_{\lambda} \rangle \right\} \quad (\text{B-32})$$

$$\mathbf{r}_{\lambda} = \mathbf{r} - \mathbf{R}_{\lambda} \quad (\text{B-33})$$

$$Q_{\nu\lambda} = \mathbf{R}_{\nu} \otimes \mathbf{R}_{\lambda} \quad (\text{B-34})$$

$$T_{\nu\lambda} = \mathbf{R}_{\nu\lambda} \otimes \mathbf{r}_{\nu}, \quad \mathbf{R}_{\nu\lambda} = \mathbf{R}_{\nu} - \mathbf{R}_{\lambda} \quad (\text{B-35})$$

$$(H_{N\nu\lambda}^{(0,1)})_{\beta} = -\frac{i}{c} \langle \varphi_{\nu} | \frac{L_{N\beta}}{r_N^3} | \varphi_{\lambda} \rangle \quad (\text{B-36})$$

これがゲージ依存の原子軌道を用いた場合の磁気遮蔽テンソル $\sigma_{\alpha\beta}^N$ の定式である。
(B-32)を導くにあたり、次のような関係を用いた。

$$\begin{aligned} \langle \chi_{\nu}(H) | \frac{1}{2} \left[-i\nabla + \left(\frac{1}{c} \right) \mathbf{A}(\mathbf{r}) \right]^2 | \chi_{\lambda}(H) \rangle \\ = \langle f_{\nu} f_{\lambda} \varphi_{\nu} | \frac{1}{2} \left[-i\nabla + \left(\frac{1}{c} \right) \mathbf{A}(\mathbf{r}_{\lambda}) \right]^2 | \varphi_{\lambda} \rangle \end{aligned} \quad (\text{B-37})$$

f_{ν} はゲージ因子と呼ばれ、それらの積は、

$$f_{\nu} f_{\lambda} = \exp \left[\frac{i}{c} (\mathbf{A}_{\nu} - \mathbf{A}_{\lambda}) \cdot \mathbf{r} \right] \quad (\text{B-38})$$

$$= \exp \left[\frac{i}{2c} \mathbf{H} \otimes (\mathbf{R}_{\nu} - \mathbf{R}_{\lambda}) \cdot \mathbf{r} \right] \quad (\text{B-39})$$

$$= \exp \left[\frac{i}{2c} \mathbf{H} \cdot (\mathbf{R}_{\nu\lambda} \otimes \mathbf{r}) \right] \quad (\text{B-40})$$

$$\doteq 1 + \frac{iH}{2c} (\mathbf{R}_{\nu\lambda} \otimes \mathbf{r}) \quad (\text{B-41})$$

$$= 1 + \frac{iH}{2c} (\mathbf{R}_{\nu\lambda} \otimes \mathbf{r}_{\nu} + \mathbf{R}_{\nu} \otimes \mathbf{R}_{\lambda}) \quad (\text{B-42})$$

となる。

(B-27)に見るようなHに対する1次の摂動のかかった分子軌道係数 $c^{(1,0)}$ は、修正Roothaan方程式(B-16)の要素を、Hの次数により次のように分けて解くことによって得ることができる。

$$\sum [(F_{\nu\lambda}^{(0)} - \varepsilon_j^{(0)} S_{\nu\lambda}^{(0)}) c_{\lambda j}^{(1,0)} + (F_{\nu\lambda}^{(1,0)} - \varepsilon_j^{(0)} S_{\nu\lambda}^{(1,0)}) c_{\lambda j}^{(0)}] = 0 \quad (\text{B-43})$$

ここで $F^{(1,0)}$ の要素は

$$F_{\nu\lambda}^{(1,0)} = H_{\nu\lambda}^{(1,0)} + \sum_{\rho\sigma} (P_{\rho\sigma}^{(0)} G_{\nu\lambda\rho\sigma}^{(1,0)} + P_{\rho\sigma}^{(1,0)} G_{\nu\lambda\rho\sigma}^{(0)}) \quad (\text{B-44})$$

$$(H_{\nu\lambda}^{(1,0)})_{\alpha} = -\frac{1}{2c} \left\{ \langle \varphi_{\nu} | L_{\beta}^{\lambda} | \varphi_{\lambda} \rangle - \langle (R_{\nu\lambda} \otimes \mathbf{r}) \varphi_{\nu} | H^{core} | \varphi_{\lambda} \rangle \right\} \quad (\text{B-45})$$

$$= -\frac{1}{2c} \left\{ \langle \varphi_{\nu} | L_{\beta}^{\lambda} | \varphi_{\lambda} \rangle - (Q_{\nu\lambda})_{\alpha} S_{\nu\lambda}^{(0)} - \langle (T_{\nu\lambda})_{\alpha} \varphi_{\nu} | H^{core} | \varphi_{\lambda} \rangle \right\} \quad (\text{B-46})$$

$$H^{core} = -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_N \frac{Z_N}{r_N} \quad (\text{B-47})$$

$$R_{\nu\lambda} \otimes \mathbf{r} = R_{\nu\lambda} \otimes \mathbf{r}_{\nu} + \mathbf{R}_{\nu} \otimes \mathbf{R}_{\lambda} \quad (\text{B-48})$$

ここで(B-45)(B-46)に見るように、 $H_{\nu\lambda}^{(1,0)}$ には $\alpha = x, y, z$ の方向性が存在するため、このそれぞれについて修正Roothaan方程式を立て、SCF計算を行う必要がある。

§ 3 半経験的分子軌道法による磁気遮蔽定数の計算

具体的な分子についてその磁気遮蔽定数を計算するためには、摂動のかかった修正Roothaan方程式;(B-43)を解いて磁場依存の分子軌道係数 $c_{\lambda_j}^{(1,0)}$ を求め、それを磁気遮蔽定数の定式;(B-29)に代入してやればよい。この方法はDitchfieldら¹⁾により開発され、すでに分子軌道法としてab-initio法を採用することにより、低分子化合物に対してかなりよい精度で実測値を再現しうることが確認されている。

分子軌道法には大きく分けて非経験的なもの(ab-initio法)と半経験的なものがあり、ab-initio法がいくつかの理論的な仮定(Roothaan方程式をSCF法で解く、原子軌道としてスレーター関数を使う、等)を除いて、量子力学の原理に従いすべての積分値を数値計算するのに対し、半経験的分子軌道法は経験的なパラメータを導入して必要な積分計算の多くを省略する。磁気遮蔽定数の計算に限らず、大きな基底関数系を用いたab-initio計算は、一般にかなりの精度で実験値を再現し、その信頼性は高いと言ってよい。しかし実行には高速の演算素子と大きな記憶容量を持った計算機が必要であり、プログラミングも容易でなく、計算機の能力が向上した現在でも実用的な分子に適用することは難しい。

以下にDitchfieldら²⁾による計算値と実測値の比較を与える。基底関数系として4-31Gを用いた場合に、計算は実測を平均誤差5.6 ppmで再現し、理論計算が定量的にも十分実用にたえうることを示している。しかし残念ながらこの方法によって計算された化合物はここに掲げたものがすべてであり、ab-initio法による磁気遮蔽定数の計算が実験結果の解釈などに対して有効な知見を与えた例は未だ見られない。

[表7-1] GIAOを用いた非経験的分子軌道法(ab-initio法)による¹³C NMR化学シフトの計算結果(CH₄基準)

Molecule	DZ ^{a)}	3-21G	4-31G	3-21G*	6-31G*	Experimental
CH ₄	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CH ₃ NH ₂	-	-25.2	-26.5 ^{b)}	-25.5	-28.0	-30.4
CH ₃ OH	-42.8	-41.5	-45.5 ^{b)}	-41.4	-46.7	-51.4
CH ₃ F	-55.6	-57.0	-65.4 ^{c)}	-56.8	-65.5	-78.9
CH ₂ F ₂	-89.3	-88.9	-98.3 ^{d)}	-85.4	-96.6	-117.6
CHF ₃	-103.5	-100.5	-115.5 ^{d)}	-92.0	-103.3	-126.7
CF ₄	-112.6	-105.2	-126.2 ^{d)}	-	-	-130.7
HCN	-	-110.6	-123.5 ^{e)}	-96.5	-107.1	-120 ± 10
H ₂ CO	-199.6	-178.2	-199.6 ^{e)}	-162.8	-184.7	-197
C ₂ H ₆	-5.7	-6.0	-7.4 ^{e)}	-6.7	-8.1	-14.3
C ₂ H ₄	-129.6	-118.9	-130.8 ^{e)}	-112.5	-122.5	-130.6
C ₂ H ₂	-82.0	-69.0	-75.2 ^{e)}	-61.5	-66.5	-76
CH ₃ CHO	-25.1	-23.4	-27.8 ^{e)}	-21.2	-25.4	-33.3
CH ₂ CHO	-203.7	-185.6	-210.1 ^{e)}	-170.8	-193.3	-201.7
CH ₃ CH ₂ CH ₃	-12.6	-12.2	-14.6 ^{e)}	-12.2	-14.6	-24.3
CH ₃ CH ₂ CH ₂	-7.6	-10.9	-13.6 ^{e)}	-12.1	-14.5	-25.8
CH ₂ CH=CH ₂	-19.4	-17.4	-19.9 ^{e)}	-16.6	-18.9	-26.2
CH ₃ CH=CH ₂	-136.1	-126.6	-140.5 ^{e)}	-120.6	-132.7	-142.5
CH ₃ CH=C ₂ H ₅	-125.5	-112.3	-123.2 ^{e)}	-106.1	-115.1	-123.2
CH ₂ =C=CH ₂	-77.7	-71.2	-76.8 ^{e)}	-68.4	-73.1	-77.1
CH ₂ =C=CH ₂	-214.1	-201.7	-225.0 ^{e)}	-194.7	-213.9	-215.8
CH ₃ C≡CH	-	-4.6	-5.2 ^{e)}	-3.9	-4.7	-7.3
CH ₃ C≡CH	-	-72.1	-79.7 ^{e)}	-64.8	-71.3	-84.7
CH ₃ C≡CH	-	-69.3	-74.5 ^{e)}	-63.0	-67.0	-72.4

[表7-2] 上記計算結果の実測値からの偏差

		DZ ^{a)}	3-21G	4-31G	3-21G*	6-31G*
mean absolute deviation	¹ H	0.89	0.36	0.30	0.40	0.29
	¹³ C	9.3	12.5	5.6	16.6	8.9
mean deviation	¹ H	-0.17	-0.29	-0.21	-0.40	-0.26
	¹³ C	-7.9	-12.5	-3.5	-16.6	-8.9
largest deviation	¹ H	2.64	-1.04	-0.81	-0.95	-0.74
	¹³ C	-28.3	-28.7	-19.3	-34.7	-23.4
percent deviation ^{d)}	¹ H	16.9%	6.8%	5.7%	7.6%	5.5%
	¹³ C	4.3%	5.8%	2.6%	7.7%	4.1%

^{a)} Total number of comparisons for ¹H: DZ - 10; 3-21G, 4-31G, 3-21G*, and 6-31G* - 14; for ¹³C: DZ - 19; 3-21G and 4-31G - 24; 3-21G* and 6-31G* - 23.

一方、半経験的分子軌道法は、ab-initio法に比べると計算精度が低く、特に電子相関が重要となる励起状態や遷移状態においての分子の電子状態の評価は不得手であるが、計算に際して高速大容量の計算機を必要としないばかりか、実用的な大きさをもつ分子に対してもパーソナルコンピュータで計算を行うことが可能である。これまでも分子の電子構造に関する本質的な知見を得るというよりは、実用的な計算手段を求める応用化学者によって広く利用され、多種のプログラムが普及してきた。本研究においても化学シフトのコンホメーション依存性や水素結合距離の依存性を評価するためには、ある程度の大きさをもった分子をモデル化合物として使用せざるをえず、大量の繰り返し計算を行う必要も生じたため、分子軌道法として半経験的なものを採用した。

☆ FPT-INDO/GIAO近似

半経験的分子軌道法を用いることにより磁気遮蔽定数の実用的な計算に端緒を開いたのが、Ellisら³⁾により開発されたFPT-INDO/GIAO近似である。これ以前にも半経験的分子軌道法を用いたSum-Over-State法による計算は行われていたが⁴⁾計算精度の点でやや問題があった。ここではFPT-INDO/GIAO近似とそれに基づく磁気遮蔽定数の定式化について解説する。

INDO近似⁵⁾はCND0近似⁶⁾と並んで、分子の原子価電子を対象としたSCF分子軌道法としては最もポピュラーなものであり、次にあげるような近似を導入することによって、電子構造の定量的評価を大きく損なうことなく、積分の計算量を大幅に減少させる。

《近似 1-1》：分子軌道 ψ_j は原子価殻の原子軌道の線形結合(LCAO)で表す。炭素、窒素、酸素など2s, 2p軌道を持つ原子においては1s軌道を考慮しない。また各原子軌道 ϕ_j は互いに規格直交化されており、 $S_{\mu\nu} = \delta_{\mu\nu}$ が成り立つこととする。(ここで $S_{\mu\nu}$ は重なり積分)

《近似 1-2》：二電子積分 $(\nu\lambda | \rho\sigma)$ に関しては、その全ての原子軌道が同一原子上に存在する場合に限り、次にあげる型の積分を評価し、それ以外についてはこれを無視する。(これが“中間的な微分重なるの無視”に相当する)

$$(s s | s s) = (s s | x x) = F^0 = \gamma_{AA} \quad (C-1)$$

$$\langle x x | x x \rangle = F^0 + (4/25)F^2 \quad (C-2)$$

$$\langle x x | y y \rangle = F^0 - (2/25)F^2 \quad (C-3)$$

$$\langle x s | x s \rangle = (1/3)G^1 \quad (C-4)$$

$$\langle x y | x y \rangle = (3/25)F^2 \quad (C-5)$$

ここで、s は 1s または 2s、x, y, z はそれぞれ 2p_x, 2p_y, 2p_z に相当する。F⁰ はスレーター軌道を用いて数値計算し、G¹, F² は経験的なパラメーターとして a priori に与える。

《近似 1-3》：一中心コア積分； $\langle \phi_\nu | \mathcal{H}^{\text{core}} | \phi_\mu \rangle$ についても経験式を導入し、次のように評価する。

$$U_{1s} = -(1/2)(I + A)_{1s} - (1/2)\gamma_{HH} \quad (C-6)$$

$$U_{2s} = -(1/2)(I + A)_{2s} - (Z_A - 1/2)F^0 + (1/6)(Z_A - 3/2)G^1 \quad (C-7)$$

$$U_{2p} = -(1/2)(I + A)_{2p} - (Z_A - 1/2)F^0 + (1/3)G^1 + (2/25)(Z_A - 5/2)F^2 \quad (C-8)$$

《近似 1-4》：異なる原子上に存在する原子軌道間のコア積分については次式で近似する。

$$H_{\mu\nu} = \frac{1}{2}(\beta_\mu + \beta_\nu)S_{\mu\nu} \quad (C-9)$$

ここで β_μ, β_ν は軌道 μ, ν が存在する各原子に与えられるパラメーターである。

以上が INDO 近似の分子軌道法に対して導入される近似であるが、この他に修正 Roothaan 方程式のハミルトニアンについても、全ての項を評価するわけではなく、次のような項の省略を導入する。

《近似 2-1》：ハミルトニアン；(B-45)の第1項において、 ϕ_μ, ϕ_ν が異なる原子上に存在する場合、

$$\langle \phi_\mu | L_\nu | \phi_\nu \rangle = 0 \quad (C-10)$$

これにより、磁気遮蔽定数の計算に用いる以下の項も、 ϕ_μ, ϕ_ν が異なる原子上に存在する場合には、

$$\langle \phi_\mu | \frac{L_{N\alpha}}{r_N^3} | \phi_\nu \rangle = 0 \quad (C-11)$$

《近似 2-2》：ハミルトニアン;(B-45)の第2項は無視する。

これらの近似に従い、解くべき修正 Roothaan方程式の Fock行列要素を書き下すと

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + G_{\mu\nu} = (H_{\mu\nu}^r + G_{\mu\nu}^r) + i(H_{\mu\nu}^i + G_{\mu\nu}^i) \quad (\text{C-12})$$

☆原子軌道 μ について

$$H_{\mu\mu}^r = U_{\mu\mu} \quad (\text{C-13})$$

$$H_{\mu\mu}^i = 0 \quad (\text{C-14})$$

☆原子軌道 μ, ν が同一原子上に存在する場合、

$$H_{\mu\nu}^r = 0 \quad (\text{C-15})$$

$$H_{\mu\nu}^i = -\frac{H}{2c} \langle \varphi_\mu | \mathbf{L}_\nu | \varphi_\nu \rangle \quad (\text{C-16})$$

☆原子軌道 μ, ν が異なる原子上に存在する場合、

$$H_{\mu\nu}^r = \frac{1}{2}(\beta_\mu + \beta_\nu) S_{\mu\nu} \quad (\text{C-17})$$

$$H_{\mu\nu}^i = 0 \quad (\text{C-18})$$

◇原子軌道 μ について

$$G_{\mu\mu}^r = \frac{1}{2} P_{\mu\mu}^r (\mu\mu|\mu\mu) + \sum_{\nu}^A P_{\mu\nu}^r \left[(\mu\mu|\nu\nu) - \frac{1}{2} (\mu\nu|\mu\nu) \right] + \sum_{\lambda}^{B(\neq A)} (P_{\lambda\lambda}^r - Z_B) \gamma_{AB} \quad (\text{C-19})$$

$$G_{\mu\mu}^i = 0 \quad (\text{C-20})$$

◇原子軌道 μ, ν が同一原子上に存在する場合、

$$G_{\mu\nu}^r = \frac{P_{\mu\nu}^r}{2} [3(\mu\nu|\mu\nu) - (\mu\mu|\nu\nu)] \quad (\text{C-21})$$

$$G_{\mu\nu}^i = -\frac{P_{\mu\nu}^r}{2} [(\mu\nu|\mu\nu) - (\mu\mu|\nu\nu)] \quad (\text{C-22})$$

◇原子軌道 μ, ν が異なる原子上に存在する場合、

$$G_{\mu\nu}^r = -\frac{1}{2}P_{\mu\nu}^r \gamma_{AB} \quad (\text{C-23})$$

$$G_{\mu\nu}^l = \frac{1}{2}P_{\mu\nu}^l \gamma_{AB} \quad (\text{C-24})$$

このFock行列要素をもつ修正Roothaan方程式を解くことにより得られる磁場依存の分子軌道係数 $c_{\mu\nu}^{(1,0)}$ (密度行列は $P_{\mu\nu}^{(1,0)}$) を用いて、磁気遮蔽定数を計算するわけであるが、ここにおいても必要な一電子積分の評価を回避するため、以下のような近似を導入する。

《近似 3-1》: $P_{\mu\nu}^{(1,0)}$ については、まず磁場による摂動が十分に小さいとして微分を差分で置き換え、かつ $P_{\mu\nu}^l$ は $H=0$ の近傍で H に対し直線的に変化する奇関数であることを利用して、

$$\begin{aligned} (P_{\mu\nu}^{(1,0)})_{\alpha} &= \left[\frac{\partial P_{\mu\nu}(H_{\alpha})}{\partial H_{\alpha}} \right]_{H_{\alpha}=0} = \frac{P_{\mu\nu}^l(H_{\alpha}) - P_{\mu\nu}^l(-H_{\alpha})}{2H_{\alpha}} \mathbf{i} \\ &= \frac{P_{\mu\nu}^l(H_{\alpha})}{H_{\alpha}} \mathbf{i} \end{aligned} \quad (\text{C-25})$$

《近似 3-2》: ゲージ因子に由来する項 $(H_{A\mu\nu}^{(1,1)})^p$; (B-32) は無視する。

《近似 3-3》: $(H_{A\mu\nu}^{(1,1)})$ は、 μ と ν が異なる場合は無視し、 $\mu = \nu$ の場合に限り以下の近似を用いて評価する。

$$\langle \varphi_{\mu} | \frac{\mathbf{r}_{\mu} \mathbf{r}_A \delta_{\alpha\beta} - (r_{\mu})_{\alpha} (r_A)_{\beta}}{r_A^3} | \varphi_{\mu} \rangle = \langle \varphi_{\mu} | \frac{1}{r_A} | \varphi_{\mu} \rangle = \frac{1}{3} \left(\frac{Z_A}{n} \right) \quad (\text{C-26})$$

n は価電子の主量子数、 Z_A は有効核荷電で、スレーター則を用い以下のように評価する。 Z_0 は自由原子の有効核荷電であり、経験的パラメーターとして与えられている。

$$Z_A = Z_0 + 0.35 \rho \quad (\text{C-27})$$

《近似 3-4》: $H_{A\mu\nu}^{(0,1)}$ の積分についても同様に、以下のような近似式を導入し、

$$\langle \varphi_{\mu} | \frac{1}{r_A^3} | \varphi_{\nu} \rangle = \frac{1}{3} \left(\frac{Z_A}{n} \right)^3 \quad (\text{C-28})$$

よって

$$\begin{aligned} \langle \varphi_\mu | \frac{L_{AB}}{r_A^3} | \varphi_\nu \rangle &\doteq \langle \varphi_\mu | \frac{1}{r_A^3} | \varphi_\nu \rangle \langle \varphi_\mu | L_{AB} | \varphi_\nu \rangle \\ &= \frac{1}{3} \left(\frac{Z_A}{n} \right)^3 \langle \varphi_\mu | L_{AB} | \varphi_\nu \rangle \end{aligned} \quad (C-29)$$

結局、FPT-INDO/GIAO近似に基づく磁気遮蔽定数の定式は、2s, 2p軌道を価電子として持つ炭素、窒素、酸素、フッ素 (n=2)の核に対しては、

$$\begin{aligned} \sigma_A^d &= \frac{1}{2c^2} \sum_\mu^A P_{\mu\mu} \langle \varphi_\mu | \frac{\mathbf{r}_\mu \mathbf{r}_A \delta_{\alpha\beta} - (r_\mu)_\alpha (r_A)_\beta}{r_A^3} | \varphi_\mu \rangle \\ &= 4.4374 \times 10^{-6} Z_A \rho_A \end{aligned} \quad (C-30)$$

$$\begin{aligned} \sigma_{A\alpha\beta}^p &= +\frac{1}{c} \sum_{\mu\nu}^A \left[\frac{P_{\mu\nu}^i(H_\alpha)}{H_\alpha} \right] \langle \varphi_\mu | \frac{L_{AB}}{r_A^3} | \varphi_\nu \rangle \\ &= +2.2187 \times 10^{-6} (Z_A)^3 \sum_{\mu\nu}^A \left[\frac{P_{\mu\nu}^i(H_\alpha)}{H_\alpha} \right] \langle \varphi_\mu | L_{AB} | \varphi_\nu \rangle \end{aligned} \quad (C-31)$$

ここで、 Z_A は次の式で求められる。 ρ_A はSCF計算から得られる核Aの価電子密度である。

$$Z_A = a - 0.35 (\rho_A - b) \quad (C-32)$$

a, bは原子の種類によって決められた定数であり、

元 素	a	b	[表7-3] スレーター則で 用いる定数 a, b
炭 素	4.65	4.00	
窒 素	5.65	5.00	
酸 素	6.65	6.00	
フッ素	7.65	7.00	

また、 $\langle \phi_\nu | L_\alpha | \phi_\mu \rangle$ は μ, ν が同一原子上にある場合、簡単に書き下すことができ、

[表7-4] μ, ν が同一原子上に存在する時の一電子角運動量積分

	$L_x p_x \rangle$	$L_y p_x \rangle$	$L_z p_x \rangle$	$L_x p_y \rangle$	$L_y p_y \rangle$	$L_z p_y \rangle$	$L_x p_z \rangle$	$L_y p_z \rangle$	$L_z p_z \rangle$
$\langle p_x$	0	0	0	0	0	1	0	-1	0
$\langle p_y$	0	0	-1	0	0	0	1	0	0
$\langle p_z$	0	1	0	-1	0	0	0	0	0

☆ FPT-MNDO/GIAO近似

後に述べるように、INDO近似を用いた磁気遮蔽定数の計算は、その定式化においてかなり大胆な近似を行うにもかかわらず、 ^{13}C 化学シフトの実測傾向をよく再現し、Ellisらによる第一報が出た後もMacielらのグループにより計算方法は少しずつ改良を加えられた。⁷⁾ 本研究でのFPT-INDO/GIAO近似による磁気遮蔽定数の計算もこの第一報の方法に拠ったものである。彼らは七年後の最終報において、前節の解説では無視することにしたFock行列要素虚数部の二中心項;(B-45第2項)および磁気遮蔽定数おけるゲージ因子に由来する項;(B-32)の一部を評価することにより、28種の炭化水素における ^{13}C 磁気遮蔽定数の平均計算誤差が12.2 ppmと、それまでの半経験的分子軌道法計算の中で最も高い精度を示すことを報告している。

しかし、計算により高い信頼性を持たせるためには、過度の計算を必要としない範囲で、できるだけ高い近似方法を用いることが好ましい。前述したように磁気遮蔽定数の計算において、近似を導入する段階は3つある。

- ① 分子軌道法 (Fock行列要素の実数部)
- ② 摂動項 (Fock行列要素の虚数部)
- ③ 磁気遮蔽定数の計算

前節における解説で、《 》内に示した最初の数字がこれらの各段階に対応している。

本研究ではこのすべての段階で、FPT-INDO法では無視した小さな寄与の項を計算し、そのために必要となる一電子積分を近似式を用いずに数値計算する方法を開発した。

まず、① 分子軌道法レベルでの高精度化であるが、採用する分子軌道法をINDO法からMNDO法にした。MNDO法はDewarとThiel⁸⁾により開発されたNDDO近似(2原子にまたがる微分重なる無視)にもとづく分子軌道法の一つであり、生成熱やイオン化ポテンシャルに関しては現在のところ最も再現性の高い方法となっている。従来の半経験的分子軌道法(主にMINDO/3)が評価できなかった分子の電子構造に関する問題のいくつかをこのMNDOが再現することは、Clarkの成書⁹⁾に詳しく述べられている。

INDOとMNDOの間の最も大きな違いは電子反発積分($\mu\nu|\lambda\rho$)の評価で

ある。どちらも軌道関数の多中心積分を計算するわけではないが、INDOでは同一原子上に存在する軌道間に関してのみその方向性を考慮して反発積分を評価するのに対し、MND0では異なる2原子上に存在する軌道間まで含めて最大4中心項までを評価する。

以下、MND0法で導入される近似について解説する。

《近似 1-1》：INDOと同様、分子軌道 ψ_i は原子価殻の原子軌道の線形結合(LCAO)で表す。炭素、窒素、酸素など2s, 2p軌道を持つ原子においては1s軌道を考慮しない。また各原子軌道 ϕ_j は互いに規格直交化されており、 $S_{\mu\nu} = \delta_{\mu\nu}$ が成り立つこととする。

《近似 1-2》： μ, ν が同一原子上に存在する場合、コア積分の中の運動エネルギー積分は原子により決められたパラメーターで記述する。

$$\langle \phi_\mu | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \phi_\nu \rangle = U_{\mu\mu} \quad (D-1)$$

《近似 1-3》： μ, ν が同一原子上に存在する場合、コア積分の中の核電子吸引積分は次式で近似する。

$$\begin{aligned} \langle \phi_\mu | -\frac{Z_B}{r_B} | \phi_\nu \rangle &= V_{\mu\nu,B} \\ &= -Z_B(\mu\nu | s^B s^B) \end{aligned} \quad (D-2)$$

ここで Z_B は核Bの電荷、 s^B は原子Bに属するs軌道である。

《近似 1-4》：異なる原子上に存在する原子軌道間のコア積分についてはINDOと同様、次式で近似する。

$$H_{\mu\nu} = \frac{1}{2}(\beta_\mu + \beta_\nu)S_{\mu\nu} \quad (D-3)$$

ただし、 β は軌道が属する原子だけでなく、その軌道がs軌道かp軌道かによっても異なるパラメーターとする。

《近似 1-5》：電子反発積分 $(\mu\nu | \lambda\rho)$ は、 $e\phi_\mu\phi_\nu$ と $e\phi_\lambda\phi_\rho$ の電荷分布間の反発であるから、多極子-多極子間の相互作用と考え、次式で近似する。

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = \sum_{i_1} \sum_{i_2} \sum_m [M_{i_1,m}^A, M_{i_2,m}^B] \quad (D-4)$$

$$[M_{i_1,m}^A, M_{i_2,m}^B] = \frac{1}{2^{i_1+i_2}} \sum_{l=1}^{2i_1} \sum_{j=1}^{2i_2} f_1(R_{lj}) \quad (D-5)$$

$$f_1(R_{lj}) = \frac{1}{\sqrt{R_{lj}^2 + (\rho_{i_1}^A + \rho_{i_2}^B)^2}} \quad (D-6)$$

ここで、 M_{im} は多極子を表し、 R_{ij} は多極子を構成する点電荷間の距離、 ρ は単極子、双極子、三重極子、四重極子のそれぞれに与えられるパラメーターである。

以上がMND0法に導入される近似の概略であるが、磁気遮蔽定数は磁場と核磁気モーメントの二次の摂動項であるため、② 摂動項の評価(Fock行列要素における虚数部)および ③ 磁気遮蔽定数計算の2つの段階において、通常の分子軌道法には現れてこない次のような型の一電子積分が必要となる。

$$\langle \varphi_\mu | L_\alpha | \varphi_\nu \rangle \quad (D-7)$$

$$\langle \varphi_\mu | \mathbf{r}_\nu | \varphi_\nu \rangle \quad (D-8)$$

$$\langle \varphi_\mu | \frac{\mathbf{r}_\nu \mathbf{r}_A \delta_{\alpha\beta} - (r_\nu)_\alpha (r_A)_\beta}{r_A^3} | \varphi_\nu \rangle \quad (D-9)$$

$$\langle \varphi_\mu | \frac{L_{A\alpha}}{r_A^3} | \varphi_\nu \rangle \quad (D-10)$$

$$\langle (\mathbf{R}_{\mu\nu} \otimes \mathbf{r}_\mu) \varphi_\mu | \frac{L_{A\alpha}}{r_A^3} | \varphi_\nu \rangle \quad (D-11)$$

$$\mathbf{L}_\alpha = (\mathbf{r}_\nu \otimes \nabla)_\alpha \quad (D-12)$$

$$\mathbf{L}_{A\alpha} = (\mathbf{r}_A \otimes \nabla)_\alpha \quad (D-13)$$

$$\mathbf{r}_A = \mathbf{r}_\nu - \mathbf{R}_A \quad (D-14)$$

これまでになされたFPT/GIAO理論に基づく磁気遮蔽定数の計算に対して導入された様々な近似は、そのほとんどがこれらの一電子積分をどう評価するかにかかるといったものであった。Macielらのグループによる論文を順を追って見て行くと、

彼らが第1報で無視したFock行列要素を少しずつ評価に加えて行く過程がわかる。第1報においては、前述の一電子積分に対する数値計算を全て放棄してしまい、 ϕ_μ と ϕ_ν が同一原子上にある場合の積分値のみを評価したため、まず(D-7)は表7-4に沿って計算し、(B-45)第2項の無視により(D-8)が、(B-32)の無視によって(D-11)の計算が不要となった。(D-9)(D-10)の評価に対する近似はすでに述べた通りである。最終的に、第7報において彼らは原子軌道としてスレーター関数を用いたまま、これらの積分の数値計算を実行している。しかし、残念なことに展開された数式群は非常に複雑な形をしており、そのまま計算機言語に翻訳することが困難であるばかりか、数値計算になじまない形をもつ外部関数を使っているため、実際の計算にはかなりの時間がかかると考えられる。

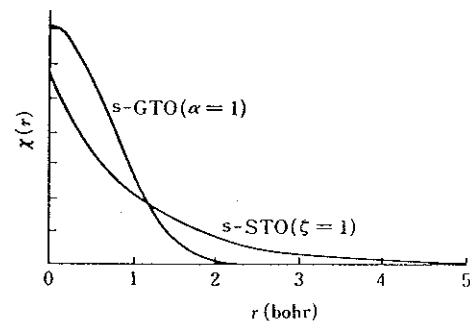
これらの積分計算の困難は、ひとえに半経験的分子軌道法がスレーター関数により原子軌道を記述してきたことに起因している。スレーター関数は次のような形をもった関数で、H原子の基底状態については正しい原子軌道となっている。

$$\varphi_{STO}(n,l,m) = R_{nl}^s(r,\zeta) Y_{lm}(\theta,\varphi) \quad (D-15)$$

$$R_{nl}^s(r,\zeta) = \frac{(2\zeta)^{n+\frac{1}{2}}}{\sqrt{(2n)!}} r^{n-1} \exp(-\zeta r) \quad (D-16)$$

このようにこの軌道関数は $\exp(-r)$ に比例している。($Y_{lm}(\theta, \phi)$ は球面調和関数を表す) 通常半経験的分子軌道法で必要となる一電子積分は重なり積分だけであり、これはすでにMullikenら¹⁰⁾によって定式化がなれているため問題はない。しかし重なり積分以外のスレーター関数を用いた多中心積分は数値計算が非常に困難であり、その事情に関しては藤永の成書¹¹⁾に詳しく論じられている。

本研究で開発した方法はこれらの一電子積分を容易に展開するため、原子軌道を一つのスレーター関数ではなく、複数のガウス関数で展開する。ガウス関数は次のような形をもつ関数であり、スレーター関数とは図7-1に示すように $r = 0$ と $r > 2$ で異なる形状を示す。



【図7-1】 STOとGTOの比較(各軌道は規格化されている)

$$\varphi_{GTO}(n,l,m) = R_{nl}^G(r,\alpha) Y_{lm}(\theta,\varphi) \quad (D-17)$$

$$R_{nl}^G(r,\alpha) = \frac{2^{n+1} \alpha^{n+\frac{1}{2}}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{(2n-1)!!}} r^{n-1} \exp(-\alpha r^2) \quad (D-18)$$

しかしこのガウス関数を3つ以上組み合わせると、スレーター関数とほぼ同等の関数を作ることができる。この方法は'50年にFosterとBoys¹²⁾により提案されて以来、多中心積分がスレーター関数に比べてはるかに容易であることから量子化学者に広く受け入れられ、現在 ab-initio法ではほとんどのプログラムがこのガウス型軌道を採用している。「基底関数系」(Basis Set)と呼ばれるガウス関数の組合せの仕方についても様々な方法が開発され、既に膨大な量の研究成果が蓄積されている。ab-initio法でガウス関数系が用いられたのは、おもに二電子積分の計算を高速化が目的であったが、(D-7)~(D-11)で示したような特殊な一電子積分もこのガウス関数系を用いることにより、スレーター関数の場合に比べてはるかに容易に展開することができる。

ガウス関数を用いた場合の一電子積分の展開方法とその取扱いについては[次節]で詳述するが、本研究ではこの方法を用いて ② 摂動項の評価(Fock行列要素の虚数部)と ③ 磁気遮蔽定数の計算に際し、FPT-INDO法で行ったような近似を入れることなく、全ての項を数値計算することができるようになった。

そのため、解くべき修正Roothaan方程式のFock行列要素虚数部は、FPT/GIAOの理論より導かれる(B-45)と同じものとなる。ここにMINDO近似に基づくFock行列要素を書き下すと、¹³⁾

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + G_{\mu\nu} = (H_{\mu\nu}^r + G_{\mu\nu}^r) + i(H_{\mu\nu}^i + G_{\mu\nu}^i) \quad (D-19)$$

☆原子軌道 μ について

$$H_{\mu\mu}^r = U_{\mu\mu} + \sum_{B \neq A} V_{\mu\mu B} \quad (D-20)$$

$$H_{\mu\mu}^i = 0 \quad (D-21)$$

☆原子軌道 μ, ν が同一原子上に存在する場合、

$$H_{\mu\nu}^r = \sum_{B \neq A} V_{\mu\nu, B} \quad (D-22)$$

$$H_{\mu\nu}^i = -\frac{H}{2c} \langle \varphi_\mu | L_\nu | \varphi_\nu \rangle \quad (D-23)$$

☆原子軌道 μ, ν が異なる原子上に存在する場合、

$$H_{\mu\nu}^r = \frac{1}{2} (\beta_\mu + \beta_\nu) S_{\mu\nu} \quad (D-24)$$

$$H_{\mu\nu}^i = \frac{H}{2c} \left\{ \frac{1}{2} (\beta_\mu + \beta_\nu) (\mathbf{R}_{\mu\nu} \otimes \langle \varphi_\mu | \mathbf{r} | \varphi_\nu \rangle) - \frac{1}{2} \langle \varphi_\mu | L_\mu + L_\nu | \varphi_\nu \rangle \right\} \quad (D-25)$$

◇原子軌道 μ について

$$G_{\mu\mu}^r = \sum_{\nu}^A P_{\nu\nu}^r \left[(\mu\mu|\nu\nu) - \frac{1}{2} (\mu\nu|\mu\nu) \right] + \sum_{\lambda\sigma}^{B(\neq A)} P_{\lambda\sigma}^r (\mu\mu|\lambda\sigma) \quad (D-26)$$

$$G_{\mu\mu}^i = 0 \quad (D-27)$$

◇原子軌道 μ, ν が同一原子上に存在する場合、

$$G_{\mu\nu}^r = \frac{P_{\mu\nu}^r}{2} [3 (\mu\nu|\mu\nu) - (\mu\mu|\nu\nu)] + \sum_{\lambda\sigma}^{B(\neq A)} P_{\lambda\sigma}^r (\mu\nu|\lambda\sigma) \quad (D-28)$$

$$G_{\mu\nu}^i = -\frac{P_{\mu\nu}^i}{2} [(\mu\nu|\mu\nu) - (\mu\mu|\nu\nu)] \quad (D-29)$$

◇原子軌道 μ, λ が異なる原子上に存在する場合、

$$G_{\mu\lambda}^r = -\frac{1}{2} \sum_{\nu}^A \sum_{\sigma}^B P_{\nu\sigma}^r (\mu\nu|\lambda\sigma) \quad (D-30)$$

$$G_{\mu\lambda}^i = \frac{1}{2} \sum_{\nu}^A \sum_{\sigma}^B P_{\nu\sigma}^i (\mu\nu|\lambda\sigma) \quad (D-31)$$

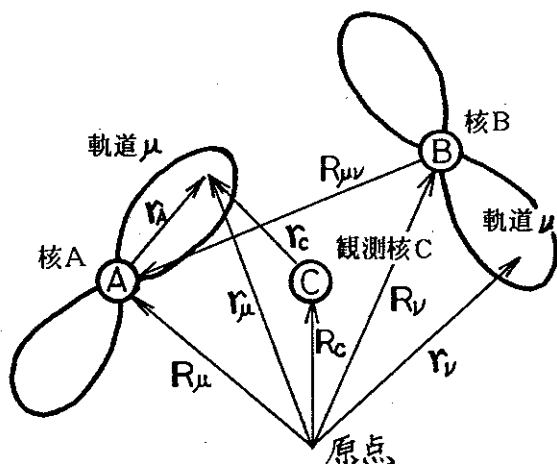
(D-23)(D-25)において c は光速で 137.0388 a.u.、 H は磁場の大きさに実際には $10^{-3} \sim 10^{-5}$ の値を用いる。磁場の大きさとして具体的な有限値を用いることが、この理論が F P T (Finite Perturbation Theory) と呼ばれる由縁である。

以上のFock行列要素をもつ修正Roothaan方程式を解き、得られた複素密度行列を用いて、次式により核Cの磁気遮蔽定数を計算する。実際に得られるのは $\alpha, \beta = x, y, z$ の組合せによって出来る9つの独立成分を持ったテンソル量である。

$$\sigma_{\alpha\beta}(C) = \sigma_{\alpha\beta}^d(C) + \sigma_{\alpha\beta}^p(C) \quad (D-32)$$

$$\sigma_{\alpha\beta}^d(C) = \frac{1}{2c^2} \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu}^r \langle \varphi_\mu | \frac{\mathbf{r}_c \mathbf{r}_\nu \delta_{\alpha\beta} - (r_c)_\alpha (r_\nu)_\beta}{r_c^3} | \varphi_\nu \rangle \quad (D-33)$$

$$\begin{aligned} \sigma_{\alpha\beta}^p(C) = & \frac{1}{c} \sum_{\mu\nu} \left[\frac{P_{\mu\nu}^l(H_\alpha)}{H_\alpha} \right] \langle \varphi_\mu | \frac{L_{CB}}{r_c^3} | \varphi_\nu \rangle \\ & + \frac{1}{2c^2} \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu}^r \left[(Q_{\mu\nu})_\alpha \langle \varphi_\mu | \frac{L_{CB}}{r_c^3} | \varphi_\nu \rangle + \langle (T_{\mu\nu})_\alpha \varphi_\mu | \frac{L_{CB}}{r_c^3} | \varphi_\nu \rangle \right] \quad (D-34) \end{aligned}$$



$$\mathbf{r}_c = \mathbf{r}_\nu - \mathbf{R}_C \quad (D-35)$$

$$Q_{\mu\nu} = \mathbf{R}_\mu \otimes \mathbf{R}_\nu \quad (D-36)$$

$$\left. \begin{aligned} T_{\mu\nu} &= \mathbf{R}_{\mu\nu} \otimes \mathbf{r}_\mu \\ \mathbf{R}_{\mu\nu} &= \mathbf{R}_\mu - \mathbf{R}_\nu \end{aligned} \right\} \quad (D-37)$$

$$L_{CB} = (\mathbf{r}_c \otimes \nabla)_\beta \quad (D-38)$$

核Cの磁気遮蔽テンソルを計算するためには、(D-33)(D-34)式のとおり σ^d と σ^p を構成する成分を、全ての原子軌道の組合せについて計算する必要がある。 $\sigma(C)$ は次のように分割することができて、

$$\begin{aligned} \sigma_{\alpha\beta}(C) = & [\sigma_{C\alpha\beta}^{dCC} + \sigma_{C\alpha\beta}^{pCC}] \\ & + \sum_{C \neq A} [(\sigma_{C\alpha\beta}^{dCA} + \sigma_{C\alpha\beta}^{pCA}) + (\sigma_{C\alpha\beta}^{dAC} + \sigma_{C\alpha\beta}^{pAC}) + (\sigma_{C\alpha\beta}^{dAA} + \sigma_{C\alpha\beta}^{pAA})] \\ & + \sum_{B \neq C \neq A} [\sigma_{C\alpha\beta}^{dAB} + \sigma_{C\alpha\beta}^{pAB}] \quad (D-38) \end{aligned}$$

3中心項は寄与が小さく、かつ非常に多くのメモリーを必要とするため、実際の計算においては2中心項までに限って計算することにする。

[7-2-2] ガウス軌道を用いた一電子積分の評価

[7-2-1] で述べたように、磁気遮蔽定数の計算に際しては 260頁で式 [D-7]~[D-11]に示したような特殊な形の一電子積分が必要となる。本研究では、原子軌道にガウス型関数を使うことにより、これらの積分を解析的に正しく評価する方法を開発した。以下その詳細について解説する。

一般に、ガウス関数は以下のような式で表される

$$\varphi_{\text{GTO}}(n,l,m) = R_{nl}^{\alpha}(r,\alpha) Y_{lm}(\theta,\varphi) \quad (\text{F-1})$$

$$R_{nl}^{\alpha}(r,\alpha) = \frac{2^{n+1}\alpha^{n+\frac{1}{2}}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{(2n-1)!!}} r^{n-1} \exp(-\alpha r^2) \quad (\text{F-2})$$

ここで $(2n-1)!! = 1 \cdot 3 \cdot 5 \cdot 7 \cdots (2n-1)$ を意味し、 $Y_{lm}(\theta, \phi)$ は球面調和関数である。この定式は数値計算をするには扱いつらいので、一般に次のような式が用いられている。

$$\varphi_{\text{GTO}}(n,l,m) = N(\alpha,l,m,n) x^l y^m z^n \exp(-\alpha r^2) \quad (\text{F-3})$$

$$N(\alpha,l,m,n) = \left(\frac{2}{\pi}\right)^{\frac{3}{4}} \sqrt{\frac{\alpha^{l+m+n+\frac{3}{2}}}{(2l-1)!!(2m-1)!!(2n-1)!!}} \quad (\text{F-4})$$

これは(F-1)に対して $n=l+1$ の制限をつけたことに相当している。よってガウス基底関数系で使われる軌道関数は次のようになる。

$$\text{s 関数: } e^{-\alpha r^2} \quad (\text{F-5})$$

$$\text{p 関数: } (x,y,z) e^{-\alpha r^2} \quad (\text{F-6})$$

$$\text{d 関数: } (x^2,y^2,z^2,xy,yz,zx) e^{-\alpha r^2} \quad (\text{F-7})$$

$$\text{f 関数: } (x^3,y^3,z^3,x^2y,x^2z,xy^2,y^2z,yz^2,xz^2,xyz) e^{-\alpha r^2} \quad (\text{F-8})$$

ここで扱う2つのガウス型軌道関数をこれから次のように書くことにする。

$$\begin{aligned}\varphi_A &= x_A^{l_A} y_A^{m_A} z_A^{n_A} \exp(-\alpha_A r_A^2) \\ \varphi_B &= x_B^{l_B} y_B^{m_B} z_B^{n_B} \exp(-\alpha_B r_B^2)\end{aligned}\tag{F-9}$$

ここで $\mathbf{A}=(A_x, A_y, A_z)$ 、 $\mathbf{B}=(B_x, B_y, B_z)$ は、軌道 φ_A, φ_B が存在する核AおよびBの座標であり、 (x_A, y_A, z_A) 、 (x_B, y_B, z_B) はそれぞれ核A, 核Bを原点とした時の電子の座標である。

ガウス関数を用いた場合、重なり積分は次のように X, Y, Z の各成分に分けて計算することができる。

$$\begin{aligned}\langle \varphi_A | \varphi_B \rangle &= \langle \varphi_A | \varphi_B \rangle_x \langle \varphi_A | \varphi_B \rangle_y \langle \varphi_A | \varphi_B \rangle_z \\ &= S_x(l_A, l_B) S_y(m_A, m_B) S_z(n_A, n_B)\end{aligned}\tag{F-10}$$

重なり積分以外の一電子積分を計算するには、 x, y, z の各成分について l, m, n の次数が1あるいは2だけ高いものや低いものが必要となる。そこで次のような記法を導入する。

$$\begin{aligned}\langle \varphi_A | \varphi_B \rangle_x &= S_x^{00} \\ \langle \varphi_A | \varphi_B \rangle_y &= S_y^{00} \\ \langle \varphi_A | \varphi_B \rangle_z &= S_z^{00}\end{aligned}\tag{F-11}$$

$$\begin{aligned}\langle x_A \varphi_A | \varphi_B \rangle_x &= S_x(l_A+1, l_B) = S_x^{10} \\ \langle y_A \varphi_A | \varphi_B \rangle_y &= S_y(m_A+1, m_B) = S_y^{10} \\ \langle z_A \varphi_A | \varphi_B \rangle_z &= S_z(n_A+1, n_B) = S_z^{10}\end{aligned}\tag{F-12}$$

$$\begin{aligned}\langle \varphi_A | x_B \varphi_B \rangle_x &= S_x(l_A, l_B+1) = S_x^{01} \\ \langle \varphi_A | y_B \varphi_B \rangle_y &= S_y(m_A, m_B+1) = S_y^{01} \\ \langle \varphi_A | z_B \varphi_B \rangle_z &= S_z(n_A, n_B+1) = S_z^{01}\end{aligned}\tag{F-13}$$

$$\begin{aligned}\langle \varphi_A | \frac{\varphi_B}{x_B} \rangle_x &= S_x(l_A, l_B-1) = S_x^{0-1} \\ \langle \varphi_A | \frac{\varphi_B}{y_B} \rangle_y &= S_y(m_A, m_B-1) = S_y^{0-1}\end{aligned}\tag{F-14}$$

$$\langle \varphi_A | \frac{\varphi_B}{z_B} \rangle_z = S_z(n_A, n_B-1) = S_z^{0-1}$$

★ $\langle \varphi_A | \mathbf{r} | \varphi_B \rangle$

$\mathbf{r} = (x, y, z)$ は原点からの座標であるので、これを $\mathbf{r} = \mathbf{r}_A + \mathbf{A}$ と書きかえることにより、この積分は次のように展開することができる。

$$\begin{aligned} \langle \varphi_A | x | \varphi_B \rangle &= \langle \varphi_A | x_A + A_x | \varphi_B \rangle \\ &= \langle x_A \varphi_A | \varphi_B \rangle + A_x \langle \varphi_A | \varphi_B \rangle \\ &= (S_X^{10} + A_x S_X^{00}) S_Y^{00} S_Z^{00} \end{aligned} \quad (\text{F-15})$$

よって

$$\left\{ \begin{aligned} \langle \varphi_A | x | \varphi_B \rangle &= (S_X^{10} + A_x S_X^{00}) S_Y^{00} S_Z^{00} & (\text{F-16}) \\ \langle \varphi_A | y | \varphi_B \rangle &= S_X^{00} (S_Y^{10} + A_y S_Y^{00}) S_Z^{00} & (\text{F-17}) \\ \langle \varphi_A | z | \varphi_B \rangle &= S_X^{00} S_Y^{00} (S_Z^{10} + A_z S_Z^{00}) & (\text{F-18}) \end{aligned} \right.$$

★ $\langle \varphi_A | \mathbf{L} | \varphi_B \rangle$

$L_A = (\mathbf{r}_A \otimes \nabla)$ の要素は、

$$L_A = \left[\left(y_A \frac{\partial}{\partial z} - z_A \frac{\partial}{\partial y} \right), \left(z_A \frac{\partial}{\partial x} - x_A \frac{\partial}{\partial z} \right), \left(x_A \frac{\partial}{\partial y} - y_A \frac{\partial}{\partial x} \right) \right] \quad (\text{F-19})$$

ガウス関数を微分すると次のようになる

$$\begin{aligned} \frac{\partial \varphi_A}{\partial x} &= \left(\frac{l_A}{x_A} - 2\alpha_A x_A \right) \varphi_A \\ \frac{\partial \varphi_A}{\partial y} &= \left(\frac{m_A}{y_A} - 2\alpha_A y_A \right) \varphi_A \\ \frac{\partial \varphi_A}{\partial z} &= \left(\frac{n_A}{z_A} - 2\alpha_A z_A \right) \varphi_A \end{aligned} \quad (\text{F-20})$$

$\langle \phi_A | L_A | \phi_B \rangle$ $\langle \phi_A | L_B | \phi_B \rangle$ は、それぞれ次のように計算することができる。

$$\begin{aligned}
 \langle \varphi_A | L_{AX} | \varphi_B \rangle &= \langle \varphi_A | \left(y_A \frac{\partial}{\partial z} - z_A \frac{\partial}{\partial y} \right) | \varphi_B \rangle \\
 &= \langle y_A \varphi_A | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle - \langle z_A \varphi_A | \frac{\partial \varphi_B}{\partial y} \rangle \\
 &= \langle y_A \varphi_A | \left(\frac{n_B}{z_B} - 2\alpha_B z_B \right) \varphi_B \rangle - \langle z_A \varphi_A | \left(\frac{m_B}{y_B} - 2\alpha_B y_B \right) \varphi_B \rangle \\
 &= S_X^{00} S_Y^{10} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01}) - S_X^{00} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01}) S_Z^{10} \\
 &= S_X^{00} [S_Y^{10} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01}) - S_Z^{10} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01})] \quad (F-21)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \langle \varphi_A | L_{BX} | \varphi_B \rangle &= \langle \varphi_A | \left(y_B \frac{\partial}{\partial z} - z_B \frac{\partial}{\partial y} \right) | \varphi_B \rangle \\
 &= \langle \varphi_A | y_B \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle - \langle \varphi_A | z_B \frac{\partial \varphi_B}{\partial y} \rangle \\
 &= \langle \varphi_A | y_B \left(\frac{n_B}{z_B} - 2\alpha_B z_B \right) \varphi_B \rangle - \langle \varphi_A | z_B \left(\frac{m_B}{y_B} - 2\alpha_B y_B \right) \varphi_B \rangle \\
 &= S_X^{00} S_Y^{01} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01}) - S_X^{00} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01}) S_Z^{01} \\
 &= S_X^{00} [S_Y^{01} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01}) - S_Z^{01} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01})] \quad (F-22)
 \end{aligned}$$

まとめると

$$\left[\begin{aligned}
 \langle \varphi_A | L_{AX} | \varphi_B \rangle &= S_X^{00} [S_Y^{10} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01}) - S_Z^{10} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01})] \\
 \langle \varphi_A | L_{AY} | \varphi_B \rangle &= S_Y^{00} [S_Z^{10} (l_B S_X^{0-1} - 2\alpha_B S_X^{01}) - S_X^{10} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01})] \\
 \langle \varphi_A | L_{AZ} | \varphi_B \rangle &= S_Z^{00} [S_X^{10} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01}) - S_Y^{10} (l_B S_X^{0-1} - 2\alpha_B S_X^{01})] \\
 \langle \varphi_A | L_{BX} | \varphi_B \rangle &= S_X^{00} [S_Y^{01} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01}) - S_Z^{01} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01})] \\
 \langle \varphi_A | L_{BY} | \varphi_B \rangle &= S_Y^{00} [S_Z^{01} (l_B S_X^{0-1} - 2\alpha_B S_X^{01}) - S_X^{01} (n_B S_Z^{0-1} - 2\alpha_B S_Z^{01})] \\
 \langle \varphi_A | L_{BZ} | \varphi_B \rangle &= S_Z^{00} [S_X^{01} (m_B S_Y^{0-1} - 2\alpha_B S_Y^{01}) - S_Y^{01} (l_B S_X^{0-1} - 2\alpha_B S_X^{01})]
 \end{aligned} \right] \quad (F-23)$$

以上の一電子積分は重なり積分を利用して展開することができたが、残りの一電子積分も、すべて次のような「3中心吸引積分」を使って展開することができる。

$$\langle \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \varphi_B \rangle \quad (\text{F-24})$$

軌道関数にガウス関数を用いた場合、重なり積分と同様、吸引積分はX, Y, Zの各成分に分けて計算することができて、

$$\begin{aligned} \langle \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \varphi_B \rangle &= \langle \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \varphi_B \rangle_x \langle \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \varphi_B \rangle_y \langle \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \varphi_B \rangle_z \\ &= V_x(l_A, l_B) V_y(m_A, m_B) V_z(n_A, n_B) \end{aligned} \quad (\text{F-25})$$

これを用いて、次の基本的な積分を展開することができる。
松岡ら¹⁴⁾の取り扱いに従い、次の関係を利用して、

$$\frac{x_c}{r_c^3} = -\frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{1}{r_c} \right) \quad (\text{F-26})$$

$$\begin{aligned} \langle \varphi_A | \frac{x_c}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &\equiv \int \frac{x_c}{r_c^3} \Omega_{AB} d\tau = \int \frac{1}{r_c} \frac{\partial}{\partial x} \Omega_{AB} d\tau \\ &= \langle \frac{\partial \varphi_A}{\partial x} | \frac{1}{r_c} | \varphi_B \rangle + \langle \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial x} \rangle \\ &= (l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) V_Y^{00} V_Z^{00} + (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01}) V_Y^{00} V_Z^{00} \\ &= [(l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) + (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01})] V_Y^{00} V_Z^{00} \end{aligned} \quad (\text{F-27})$$

まとめると

$$\left[\begin{aligned} \langle \varphi_A | \frac{x_c}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &= [(l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) + (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01})] V_Y^{00} V_Z^{00} \\ \langle \varphi_A | \frac{y_c}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &= [(m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) + (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01})] V_X^{00} V_Z^{00} \\ \langle \varphi_A | \frac{z_c}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &= [(n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) + (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01})] V_X^{00} V_Y^{00} \end{aligned} \right. \quad (\text{F-28})$$

$$\star \langle \varphi_A | \frac{L_C}{r_c^3} | \varphi_B \rangle$$

L_C/r_c^3 の成分は以下のように表せるので、

$$\frac{L_C}{r_c^3} = \left[\left(\frac{y_c}{r_c^3} \frac{\partial}{\partial z} - \frac{z_c}{r_c^3} \frac{\partial}{\partial y} \right), \left(\frac{z_c}{r_c^3} \frac{\partial}{\partial x} - \frac{x_c}{r_c^3} \frac{\partial}{\partial z} \right), \left(\frac{x_c}{r_c^3} \frac{\partial}{\partial y} - \frac{y_c}{r_c^3} \frac{\partial}{\partial x} \right) \right]$$

(F-29)

ガウス関数の微分式(F-20)を使って、この積分は以下のように展開することができる。

$$\begin{aligned} \langle \varphi_A | \frac{L_{Cx}}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &= \langle \varphi_A | \frac{y_c}{r_c^3} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle - \langle \varphi_A | \frac{z_c}{r_c^3} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial y} \rangle \\ &= \langle \frac{\partial \varphi_A}{\partial y} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle - \langle \frac{\partial \varphi_A}{\partial z} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial y} \rangle \\ &= \langle \left(\frac{m_A}{y_A} - 2\alpha y_A \right) \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \left(\frac{n_B}{z_B} - 2\alpha z_B \right) \varphi_B \rangle \\ &\quad - \langle \left(\frac{n_A}{z_A} - 2\alpha z_A \right) \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \left(\frac{m_B}{y_B} - 2\alpha y_B \right) \varphi_B \rangle \end{aligned} \quad (\text{F-30})$$

まとめると

$$\left[\begin{aligned} \langle \varphi_A | \frac{L_{Cx}}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &= V_X^{00} [(m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01}) \\ &\quad - (n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01})] \\ \langle \varphi_A | \frac{L_{Cy}}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &= V_Y^{00} [(n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01}) \\ &\quad - (l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01})] \\ \langle \varphi_A | \frac{L_{Cz}}{r_c^3} | \varphi_B \rangle &= V_Z^{00} [(l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01}) \\ &\quad - (m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01})] \end{aligned} \right] \quad (\text{F-31})$$

$$\star \langle \varphi_A | \frac{r_C r \delta_{\alpha\beta} - (r_C)_\alpha (r)_\beta}{r_C^3} | \varphi_B \rangle$$

この積分の9つの要素を $P_{\alpha\beta}$ で表し、また次のような積分を $p_{\alpha\beta}$ で表すと、

$$p_{\alpha\beta} = \langle \varphi_A | \frac{\alpha_C \beta_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle \quad \alpha, \beta = x, y, z \quad (\text{F-32})$$

$P_{\alpha\beta}$ の成分は以下のように表せるので、必要となるのは $p_{\alpha\beta}$ の評価であることがわかる。

$$\begin{aligned} P_{XX} &= \langle \varphi_A | \frac{y_C y_B + z_C z_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = p_{YY} + p_{ZZ} \\ P_{YY} &= \langle \varphi_A | \frac{z_C z_B + x_C x_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = p_{ZZ} + p_{XX} \\ P_{ZZ} &= \langle \varphi_A | \frac{x_C x_B + y_C y_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = p_{XX} + p_{YY} \end{aligned}$$

$$P_{XY} = \langle \varphi_A | -\frac{x_C y_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = -p_{XY}$$

$$P_{YX} = \langle \varphi_A | -\frac{y_C x_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = -p_{YX}$$

$$P_{XZ} = \langle \varphi_A | -\frac{x_C z_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = -p_{XZ}$$

$$P_{ZX} = \langle \varphi_A | -\frac{z_C x_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = -p_{ZX}$$

$$P_{YZ} = \langle \varphi_A | -\frac{y_C z_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = -p_{YZ}$$

$$P_{ZY} = \langle \varphi_A | -\frac{z_C y_B}{r_C^3} | \varphi_B \rangle = -p_{ZY}$$

(F-33)

$p_{\alpha\beta}$ の各要素は次のように展開することができる。

$$\begin{aligned} p_{XX} &= \langle \varphi_A | \frac{x_C}{r_C^3} | x_B \varphi_B \rangle = \langle \frac{\partial \varphi_A}{\partial x} | \frac{1}{r_C} | x_B \varphi_B \rangle + \langle \varphi_A | \frac{1}{r_C} | \partial \frac{x_B \varphi_B}{\partial x} \rangle \\ &= \langle \frac{\partial \varphi_A}{\partial x} | \frac{1}{r_C} | x_B \varphi_B \rangle + \langle \varphi_A | \frac{1}{r_C} | \varphi_B \rangle + \langle \varphi_A | \frac{1}{r_C} | x_B \frac{\partial \varphi_B}{\partial x} \rangle \\ &= [(l_A V_X^{-11} - 2\alpha_A V_X^{11}) + \{(l_B + 1) V_X^{00} - 2\alpha_B V_X^{02}\}] V_Y^{00} V_Z^{00} \end{aligned}$$

$$p_{YY} = [(m_A V_Y^{-11} - 2\alpha_A V_Y^{11}) + \{(m_B + 1) V_Y^{00} - 2\alpha_B V_Y^{02}\}] V_Z^{00} V_X^{00}$$

$$p_{ZZ} = [(n_A V_Z^{-11} - 2\alpha_A V_Z^{11}) + \{(n_B + 1) V_Z^{00} - 2\alpha_B V_Z^{02}\}] V_X^{00} V_Y^{00}$$

$$\begin{aligned}
p_{XY} &= \langle \varphi_A | \frac{x_C}{r_C^3} | \varphi_B \varphi_B \rangle = \langle \frac{\partial \varphi_A}{\partial x} | \frac{1}{r_C} | \varphi_B \varphi_B \rangle + \langle \varphi_A | \frac{1}{r_C} | \partial \frac{\varphi_B \varphi_B}{\partial x} \rangle \\
&= [(l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) + (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01})] V_Y^{01} V_Z^{00} \\
p_{YX} &= [(m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) + (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01})] V_X^{01} V_Z^{00} \\
p_{YZ} &= [(m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) + (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01})] V_Z^{01} V_X^{00} \\
p_{ZY} &= [(n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) + (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01})] V_Y^{01} V_X^{00} \\
p_{ZX} &= [(n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) + (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01})] V_X^{01} V_Y^{00} \\
p_{XZ} &= [(l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) + (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01})] V_Z^{01} V_Y^{00}
\end{aligned}
\tag{F-35}$$

$$\star \quad \langle (R_{AB} \otimes r_A) \varphi_A | \frac{L_C}{r_C^3} | \varphi_B \rangle$$

この積分の9つの要素を $Q_{\alpha\beta}$ で表し、 $R_{AB} = A - B$ の要素を (R_x, R_y, R_z) とする。また次のような積分を $q_{\alpha\beta}, w_{\alpha\beta\gamma}, u_\alpha$ と定義すると、

$$q_{\alpha\beta} = \langle \alpha_A \varphi_A | \frac{L_{CB}}{r_C^3} | \varphi_B \rangle \tag{F-36}$$

$$w_{\alpha\beta\gamma} = \langle \alpha_A \frac{\partial \varphi_A}{\partial \beta} | \frac{1}{r_C} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial \gamma} \rangle \tag{F-37}$$

$$u_\alpha = \langle \varphi_A | \frac{1}{r_C} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial \alpha} \rangle \tag{F-38}$$

$$(\alpha, \beta, \gamma = x, y, z)$$

$Q_{\alpha\beta}$ の成分は以下のように展開することができて、

$$\begin{aligned}
Q_{XX} &= \langle (R_{AB} \otimes r_A)_X \varphi_A | \frac{L_{CX}}{r_C^3} | \varphi_B \rangle \\
&= \langle (R_Y Z_A - R_Z Y_A) \varphi_A | \frac{L_{CX}}{r_C^3} | \varphi_B \rangle \\
&= R_Y \langle Z_A \varphi_A | \frac{L_{CX}}{r_C^3} | \varphi_B \rangle - R_Z \langle Y_A \varphi_A | \frac{L_{CX}}{r_C^3} | \varphi_B \rangle \\
&= R_Y q_{ZX} - R_Z q_{YX}
\end{aligned}
\tag{F-39}$$

$$\begin{aligned}
Q_{XY} &= R_Y q_{ZY} - R_Z q_{YY} \\
Q_{XZ} &= R_Y q_{ZZ} - R_Z q_{YZ} \\
Q_{YX} &= R_Z q_{XX} - R_X q_{ZX} \\
Q_{YY} &= R_Z q_{XY} - R_X q_{ZY} \\
Q_{YZ} &= R_Z q_{XZ} - R_X q_{ZZ} \\
Q_{ZX} &= R_X q_{YX} - R_Y q_{XX} \\
Q_{ZY} &= R_X q_{YY} - R_Y q_{XY} \\
Q_{ZZ} &= R_X q_{YZ} - R_Y q_{XZ}
\end{aligned} \tag{F-40}$$

次いで、 $q_{\alpha\beta}$ の成分も次のように展開することができる。

$$\begin{aligned}
q_{XX} &= \langle x_A \varphi_A | \frac{L_{CX}}{r_c^3} | \varphi_B \rangle \\
&= \langle \partial \frac{x_A \varphi_A}{\partial y} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle - \langle \partial \frac{x_A \varphi_A}{\partial z} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial y} \rangle \\
&= \langle x_A \frac{\partial \varphi_A}{\partial y} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle - \langle x_A \frac{\partial \varphi_A}{\partial z} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial y} \rangle \\
&= w_{XYZ} - w_{XZY} \\
q_{YY} &= w_{YZX} - w_{YXZ} \\
q_{ZZ} &= w_{ZXY} - w_{ZYX} \\
q_{XY} &= \langle x_A \varphi_A | \frac{L_{CY}}{r_c^3} | \varphi_B \rangle \\
&= \langle \partial \frac{x_A \varphi_A}{\partial z} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial x} \rangle - \langle \partial \frac{x_A \varphi_A}{\partial x} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle \\
&= \langle x_A \frac{\partial \varphi_A}{\partial z} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial x} \rangle - \langle \varphi_A | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle - \langle x_A \frac{\partial \varphi_A}{\partial x} | \frac{1}{r_c} | \frac{\partial \varphi_B}{\partial z} \rangle \\
&= w_{XZX} - w_{XXZ} - u_Z \\
q_{YX} &= w_{YYZ} - w_{YZY} + u_Z \\
q_{YZ} &= w_{YXY} - w_{YYX} - u_X \\
q_{ZY} &= w_{ZZX} - w_{ZXX} + u_X \\
q_{ZX} &= w_{ZYZ} - w_{ZZY} - u_Y \\
q_{XZ} &= w_{XXY} - w_{XYX} + u_Y
\end{aligned} \tag{F-41}$$

最終的に u_α および $w_{\alpha\beta\gamma}$ は次のように展開される。

$$\begin{aligned}
u_X &= (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01}) V_Y^{00} V_Z^{00} \\
u_Y &= (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01}) V_X^{00} V_Z^{00} \\
u_Z &= (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01}) V_X^{00} V_Y^{00}
\end{aligned} \tag{F-42}$$

$$\begin{aligned}
w_{XYZ} &= V_X^{10} (m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01}) \\
w_{XZY} &= V_X^{10} (n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01}) \\
w_{XZX} &= V_Y^{00} (n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) (l_B V_X^{1-1} - 2\alpha_B V_X^{11}) \\
w_{XXZ} &= V_Y^{00} (l_A V_X^{00} - 2\alpha_A V_X^{20}) (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01}) \\
w_{XXY} &= V_Z^{00} (l_A V_X^{00} - 2\alpha_A V_X^{20}) (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01}) \\
w_{XYX} &= V_Z^{00} (m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) (l_B V_X^{1-1} - 2\alpha_B V_X^{11}) \\
\\
w_{YYZ} &= V_X^{00} (m_A V_Y^{00} - 2\alpha_A V_Y^{20}) (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01}) \\
w_{YZY} &= V_X^{00} (n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) (m_B V_Y^{1-1} - 2\alpha_B V_Y^{11}) \\
w_{YZX} &= V_Y^{10} (n_A V_Z^{-10} - 2\alpha_A V_Z^{10}) (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01}) \\
w_{YXZ} &= V_Y^{10} (l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) (n_B V_Z^{0-1} - 2\alpha_B V_Z^{01}) \\
w_{YXY} &= V_Z^{00} (l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) (m_B V_Y^{1-1} - 2\alpha_B V_Y^{11}) \\
w_{YYX} &= V_Z^{00} (m_A V_Y^{00} - 2\alpha_A V_Y^{20}) (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01}) \\
\\
w_{ZYZ} &= V_X^{00} (m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) (n_B V_Z^{1-1} - 2\alpha_B V_Z^{11}) \\
w_{ZZY} &= V_X^{00} (n_A V_Z^{00} - 2\alpha_A V_Z^{20}) (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01}) \\
w_{ZZX} &= V_Y^{00} (n_A V_Z^{00} - 2\alpha_A V_Z^{20}) (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01}) \\
w_{ZXX} &= V_Y^{00} (l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) (n_B V_Z^{1-1} - 2\alpha_B V_Z^{11}) \\
w_{ZXY} &= V_Z^{10} (l_A V_X^{-10} - 2\alpha_A V_X^{10}) (m_B V_Y^{0-1} - 2\alpha_B V_Y^{01}) \\
w_{ZYX} &= V_Z^{10} (m_A V_Y^{-10} - 2\alpha_A V_Y^{10}) (l_B V_X^{0-1} - 2\alpha_B V_X^{01}) \quad (F-43)
\end{aligned}$$

本研究におけるFPT/MNDO-GIAO近似の磁気遮蔽定数の計算では、以上の展開式に従い、(D-7)~(D-11)で示される一電子積分全てを計算した。

この中で必要となる

重なり積分とそれに伴う S^{10}, S^{01}, S^{0-1}

吸引積分とそれに伴う $V^{10}, V^{01}, V^{-10}, V^{0-1}, V^{20}, V^{02}, V^{11}, V^{1-1}$

は、Popleらが開発したab-initio法プログラムの一つである「Gaussian-76」のLink3部分を改造して計算した。彼らが採用した積分計算は、Dupuis, Rys, King¹⁵⁾により開発されたもので、現在入手可能な積分計算プログラムの中では最高速のものの一つである。Fortran言語で書かれたGaussian-76のソースプログラムは、QCPE(Quantum Chemical Program Exchange)を通じて入手できる。

計算に用いる基底関数系として、実際の計算ではガウス関数を用いた最小STO基底の中で、項数が多く記述性の高い「STO-6G」基底を採用した。

§ 7-3 結 果 と 考 察

[7-3-1] 炭化水素における ^{13}C NMR 化学シフトの評価

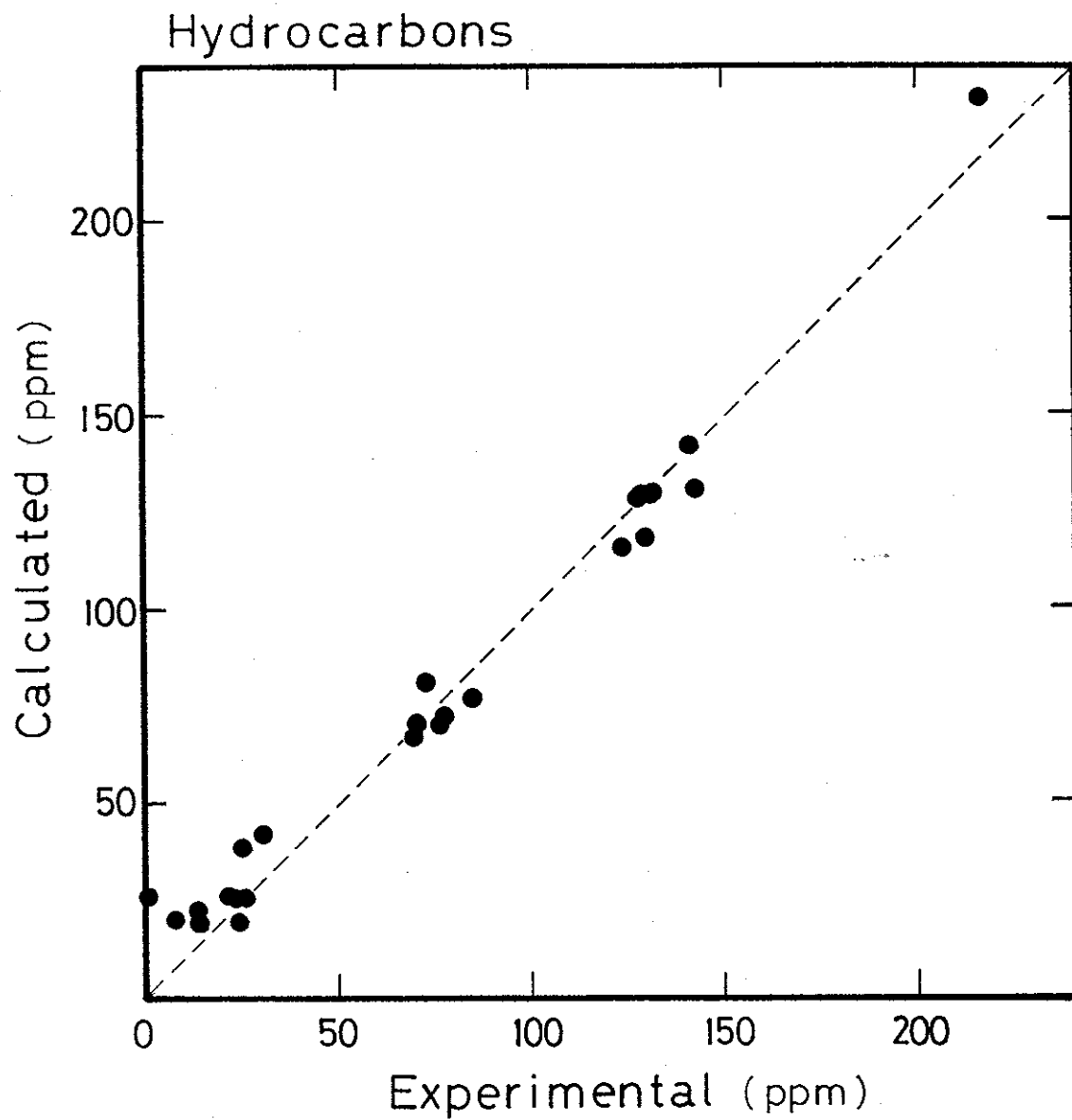
表 7-5 と図 7-2 に、FPT-MNDO 法のプログラムを用いて計算した各種炭化水素の ^{13}C 磁気遮蔽定数、および磁気遮蔽テンソルの主値を実測値とともに示す。この結果についてはすでに第 6 章の序論(表 6-2)で紹介したが、前章でグリシン残基の磁気遮蔽テンソルの計算に用いた FPT-INDO 法(Ellisら³¹)の炭化水素に対する平均誤差が 12.7 ppmであったのに比べ、この FPT-MNDO 法は平均誤差 6.6 ppm と約 2 倍の計算精度をもっている。この中で比較的大きな計算誤差を示すものは、メチルアセチレン、シクロプロパン、プロジエンなどやや特殊な化合物であり、一般的な炭化水素に対してはかなり良い計算精度を持っている。この表からすぐに考えられる応用は“計算による NMR シグナルの帰属”であるが、例えば、この計算できちんと再現されているトルエンの環状部炭素の帰属が Wuらのプログラム¹³⁾では失敗しており、一方 彼らの計算では正しく評価されているシス/トランス-ブテンのメチン炭素が、この計算では再現されていない。実測の化学シフトに 5 ppm 以上の差が見られない場合には、計算によって帰属を決めることに危険がともなう。

表 6-2 に見るとおり、1 電子積分の評価に近似式を使用している Wuらの FPT-MNDO 法が、本研究のプログラムよりわずかに優れた計算精度を示している。つまり本研究では積分計算の精度を上げたにもかかわらず、結果として性能がわずかに劣るといった現象が起こった。この原因

[表7-5] FPT-MND0法による¹³C化学シフトの計算結果^{a)} (本研究で開発したもの)

炭化水素	計 算 値					実測値	差
	(σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})	$\sigma - \sigma$	σ_{iso}	δ	$\delta - \sigma_{iso}$		
CH ₄	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.0
C ₂ H ₆	31.86	31.86	-4.00	35.86	19.91	14.07	-5.8
C ₂ H ₄	228.87	95.59	29.26	199.61	117.91	129.79	11.9
C ₂ H ₂	148.16	148.16	-84.61	232.77	70.57	76.6	6.0
$\overset{*}{C}H_3CH_2CH_3$	31.87	30.89	-4.88	36.75	19.29	24.16	4.9
CH ₃ $\overset{*}{C}H_2CH_3$	61.45	37.04	16.87	44.58	38.45	25.83	-12.6
$\overset{*}{C}H_2=CHCH_3$	227.74	86.83	32.90	194.84	115.82	123.22	7.4
CH ₂ = $\overset{*}{C}HCH_3$	236.77	102.42	51.26	185.51	130.15	142.48	12.3
CH ₂ =CH $\overset{*}{C}H_3$	42.28	35.75	-3.43	45.70	24.87	26.21	1.3
$\overset{*}{C}H=C-CH_3$	152.54	152.54	-62.50	215.05	80.86	72.4	-8.5
CH= $\overset{*}{C}-CH_3$	165.70	165.70	-100.43	266.13	76.99	84.7	7.7
CH=C- $\overset{*}{C}H_3$	45.67	45.67	-8.42	54.10	27.64	7.3	-20.3
$\overset{*}{C}H_2=C=CH_2$	209.16	52.47	-43.86	253.02	72.59	77.43	4.8
CH ₂ = $\overset{*}{C}=CH_2$	408.91	208.95	77.66	331.26	231.84	215.39	-16.5
cis $\overset{*}{C}H_3CH=CHCH_3$	36.55	33.57	-3.59	40.15	22.18	14.0	-8.2
cisCH ₃ $\overset{*}{C}H=CHCH_3$	225.28	105.18	53.75	171.53	128.07	127.2	-0.9
tra $\overset{*}{C}H_3CH=CHCH_3$	40.66	39.07	-1.77	42.43	25.99	20.7	-5.3
traCH ₃ $\overset{*}{C}H=CHCH_3$	227.63	100.80	54.61	173.02	127.68	128.5	0.8
H $\overset{*}{C}\equiv C-C\equiv CH$	141.65	141.65	-82.58	224.22	66.90	69.27	2.4
H $C\equiv\overset{*}{C}-C\equiv CH$	152.75	152.75	-94.97	247.71	70.18	70.98	0.8
Cyclo-C ₃ H ₆	45.72	19.55	14.04	31.67	26.44	0.2	-26.2
C ₆ H ₆	211.45	125.57	51.15	160.30	129.39	131.51	2.1
Cyclo-C ₆ H ₁₂	62.44	42.42	23.36	39.08	42.74	30.61	-12.1
C ₆ H ₅ CH ₃ (CH ₃)	41.53	39.13	-3.48	45.01	25.73	24.3	-1.4
C ₆ H ₅ CH ₃ (C-1)	202.65	149.86	74.16	128.49	142.22	140.8	-1.4
C ₆ H ₅ CH ₃ (C-2)	211.42	120.27	53.93	157.49	128.54	131.4	2.8
C ₆ H ₅ CH ₃ (C-3)	211.66	125.69	52.67	158.99	130.01	132.2	2.2
C ₆ H ₅ CH ₃ (C-4)	209.40	124.68	50.96	158.44	128.34	128.5	0.2

a) 基準は計算値、実測値ともにCH₄、単位はppm



[図7-2] FPT-MND0法による炭化水素の¹³C磁気遮蔽定数の等方平均値(計算結果)と実測¹³C化学シフト(CH₄基準)

として考えられるのは、3中心項の寄与(264頁参照)を計算に含めるか否かという判断である。Wuらが3中心項の計算を近似式に基づいて導入したのに対し、本研究では「積分評価に近似式を用いない」という当初の開発方針に従い、3中心項の計算を省略した。近似式によらない3中心項の評価は、定式化あるいはプログラミングの面で特別の困難を伴うものではないが、磁気遮蔽定数にわずかな寄与しか持たないにもかかわらず、これらの項を実際に計算、記憶しておくために必要な記憶容量は膨大である。3中心項までの評価に必要な計算機の記憶容量は、ベンゼン程度の分子においてさえ2中心項までに必要な量の約6倍であり、実際の計算において実用的でない。また、本研究でのFPT-MNDO法による磁気遮蔽定数の計算は、すべて(株)日本電気のパーソナルコンピュータPC-9801(作動クロック数10MHz)上で行ったため、補助記憶装置の性能も考慮し2中心項までの計算が装置的、時間的に能率的であると判断した。

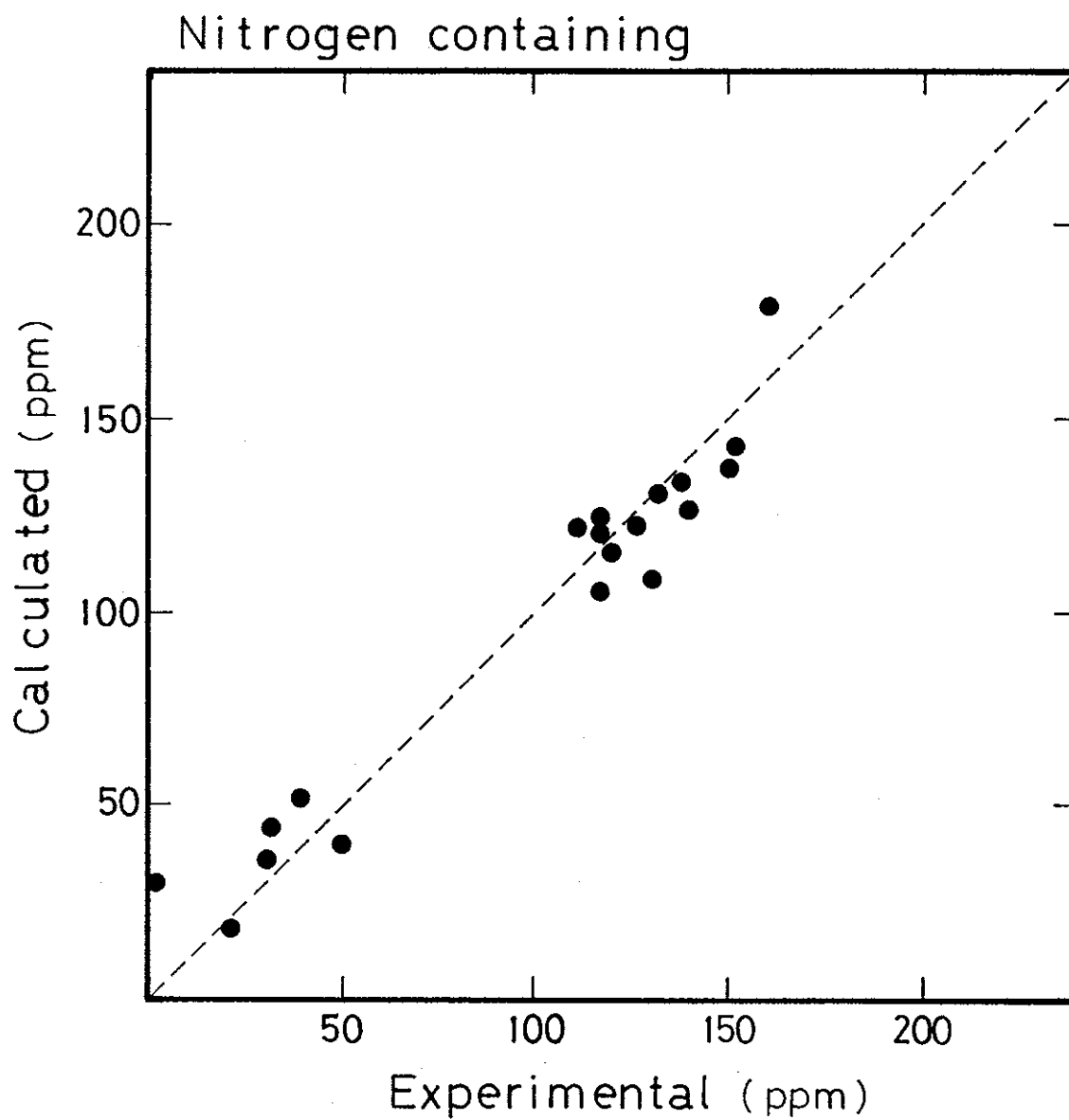
[7-3-2] 含窒素,含酸素化合物における ^{13}C NMR 化学シフトの評価

表7-6と図7-3,4には、FPT-MNDO法により計算した含窒素および含酸素化合物の ^{13}C 磁気遮蔽定数と磁気遮蔽テンソルの主値を実測値とともに示す。ここに示すような化合物のFPT法による ^{13}C 磁気遮蔽定数の計算は、Maciel⁷⁾らによる報告がすでに知られている。表6-1に示したように、彼らの計算によれば、含窒素化合物(7種)について平均誤差が10.9 ppm、含酸素化合物(10種)について平均誤差が21.2 ppmと、辛うじて化合物間の違いが定性的に評価できているに過ぎない。一方、

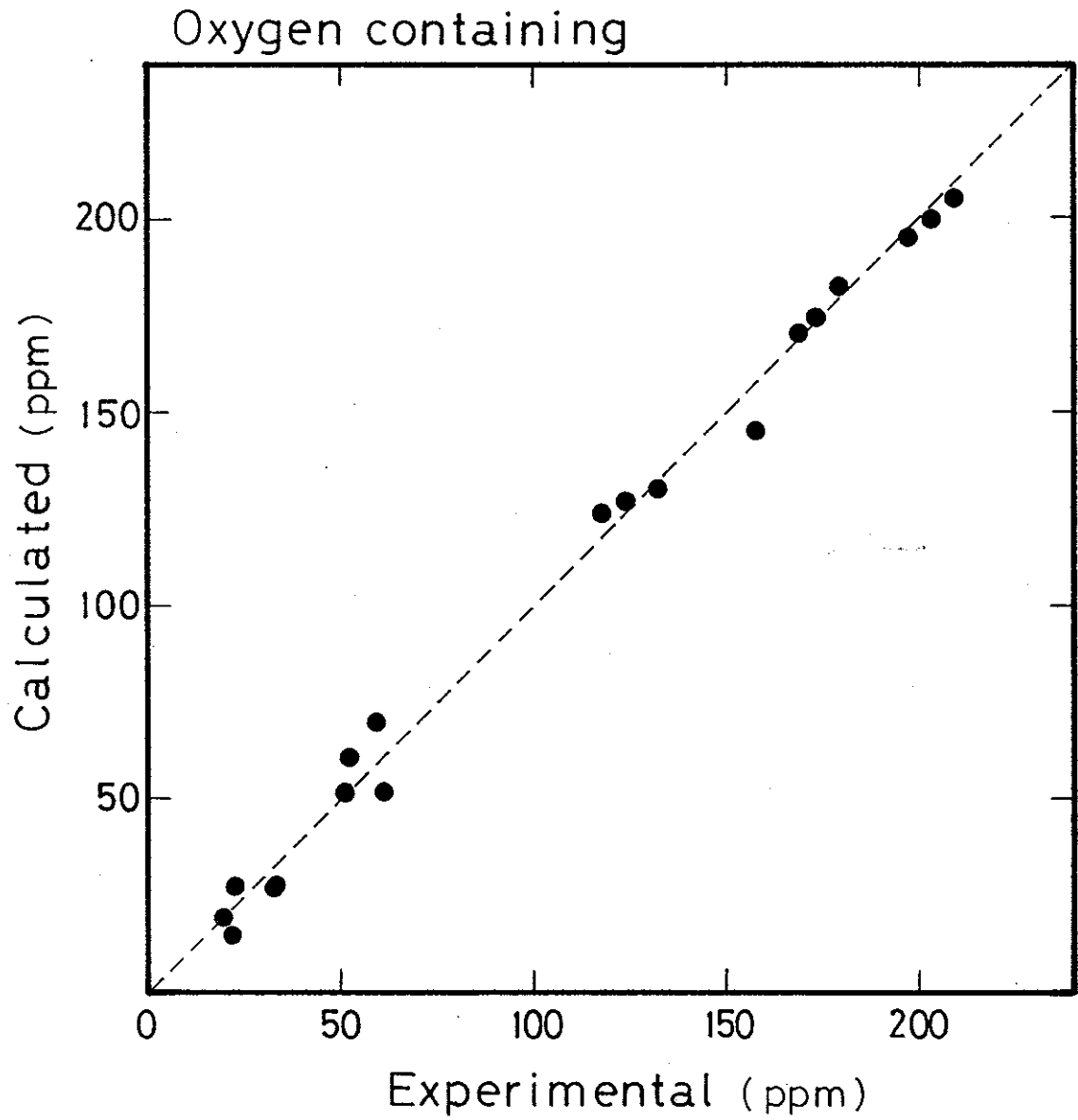
[表7-6] FPT-MNDO法による¹³C化学シフトの計算結果^{a)} (本研究で開発したもの)

含窒素化合物 含酸素化合物	計 算 値					実測値	差
	(σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})	$\sigma - \sigma$	σ_{iso}	δ	$\delta - \sigma_{iso}$		
CH ₃ NH ₂	50.91	50.35	1.93	48.98	34.40	30.6	-3.8
C [*] H ₃ CH ₂ NH ₂	30.54	29.65	-4.84	35.38	18.45	21.3	2.9
CH ₃ C [*] H ₂ NH ₂	77.52	53.90	24.70	52.82	52.04	39.2	-12.8
(CH ₃) ₃ NH ₂	65.09	55.73	-1.13	66.22	39.90	49.9	10.0
C [*] H ₃ C≡N	51.82	50.82	-13.34	65.15	29.77	2.6	-27.2
CH ₃ C [*] ≡N	216.09	215.82	-85.57	301.66	115.45	120.0	4.6
C [*] H ₂ =CHC≡N	241.19	107.68	30.55	210.64	126.47	140.0	13.5
CH ₂ =C [*] HC≡N	205.97	91.43	67.18	138.79	121.53	131.1	9.6
CH ₂ =CHC [*] ≡N	212.89	206.09	-92.97	305.85	108.67	111.3	2.6
C [*] H ₃ N=C	68.75	68.75	-4.22	72.96	44.43	31.6	-12.8
CH ₃ N=C [*]	275.74	275.74	-13.15	288.89	179.44	160.8	-18.6
C ₆ H ₅ NH ₂ (C-1)	194.30	140.88	75.85	118.45	137.01	151.0	14.0
C ₆ H ₅ NH ₂ (C-2)	197.57	111.78	50.99	146.58	120.12	116.7	-3.4
C ₆ H ₅ NH ₂ (C-3)	211.12	125.42	53.37	157.74	129.97	131.4	1.4
C ₆ H ₅ NH ₂ (C-4)	202.43	119.70	50.16	152.28	124.10	118.6	-5.5
C ₅ H ₅ N (C-1)	247.25	133.80	51.84	195.41	144.29	151.9	7.6
C ₅ H ₅ N (C-2)	203.19	120.28	44.34	158.85	122.60	126.5	3.9
C ₅ H ₅ N (C-3)	217.70	135.13	49.78	167.91	134.20	138.5	4.3
CH ₃ OH	76.81	74.17	5.22	71.59	52.07	51.3	-0.8
C ₂ H ₅ OH	31.91	30.46	-5.10	37.01	19.09	19.9	0.8
C ₂ H ₅ OH	104.20	75.95	29.46	74.74	69.87	59.3	-10.6
CH ₃ OCH ₃	77.64	74.77	3.31	74.33	51.91	62.0	10.1
HCHO	320.55	215.80	47.91	272.64	194.75	197.0	2.3
C [*] H ₃ CHO	50.81	33.54	-1.91	52.72	27.48	33.5	6.0
CH ₃ C [*] HO	321.09	207.99	70.17	250.92	199.75	202.8	3.1
(C [*] H ₃) ₂ CO	49.52	32.08	-3.18	52.70	26.14	33.0	6.9
(CH ₃) ₂ C [*] O	312.02	209.24	91.86	220.16	204.37	209.0	4.4
HCOOH	285.96	137.50	88.35	197.61	170.60	168.3	-2.3
C [*] H ₃ COOH	50.50	36.86	-5.32	55.81	27.35	23.1	-4.3
CH ₃ C [*] OOH	291.64	142.36	110.91	180.73	181.63	179.2	-2.4
C [*] H ₃ COOCH ₃	48.69	36.39	-5.69	54.38	26.46	21.9	-4.6
CH ₃ C [*] OOCH ₃	286.01	132.14	107.47	178.54	175.21	173.0	-2.2
CH ₃ COOC [*] H ₃	88.10	87.52	6.85	81.25	60.83	53.0	-7.8
C ₆ H ₅ OH (C-1)	204.24	131.62	98.96	105.27	144.94	157.4	12.5
C ₆ H ₅ OH (C-2)	197.91	122.31	49.69	148.22	123.30	118.0	-5.3
C ₆ H ₅ OH (C-3)	210.29	124.32	54.82	155.47	129.81	132.4	2.6
C ₆ H ₅ OH (C-4)	206.50	123.52	50.07	156.43	126.70	123.7	-3.0

a) 基準は計算値, 実測値ともにCH₄, 単位はppm



[図7-3] FPT-MND0法による含窒素化合物の¹³C磁気遮蔽定数の等方平均値(計算結果)と実測¹³C化学シフト(CH₄基準)

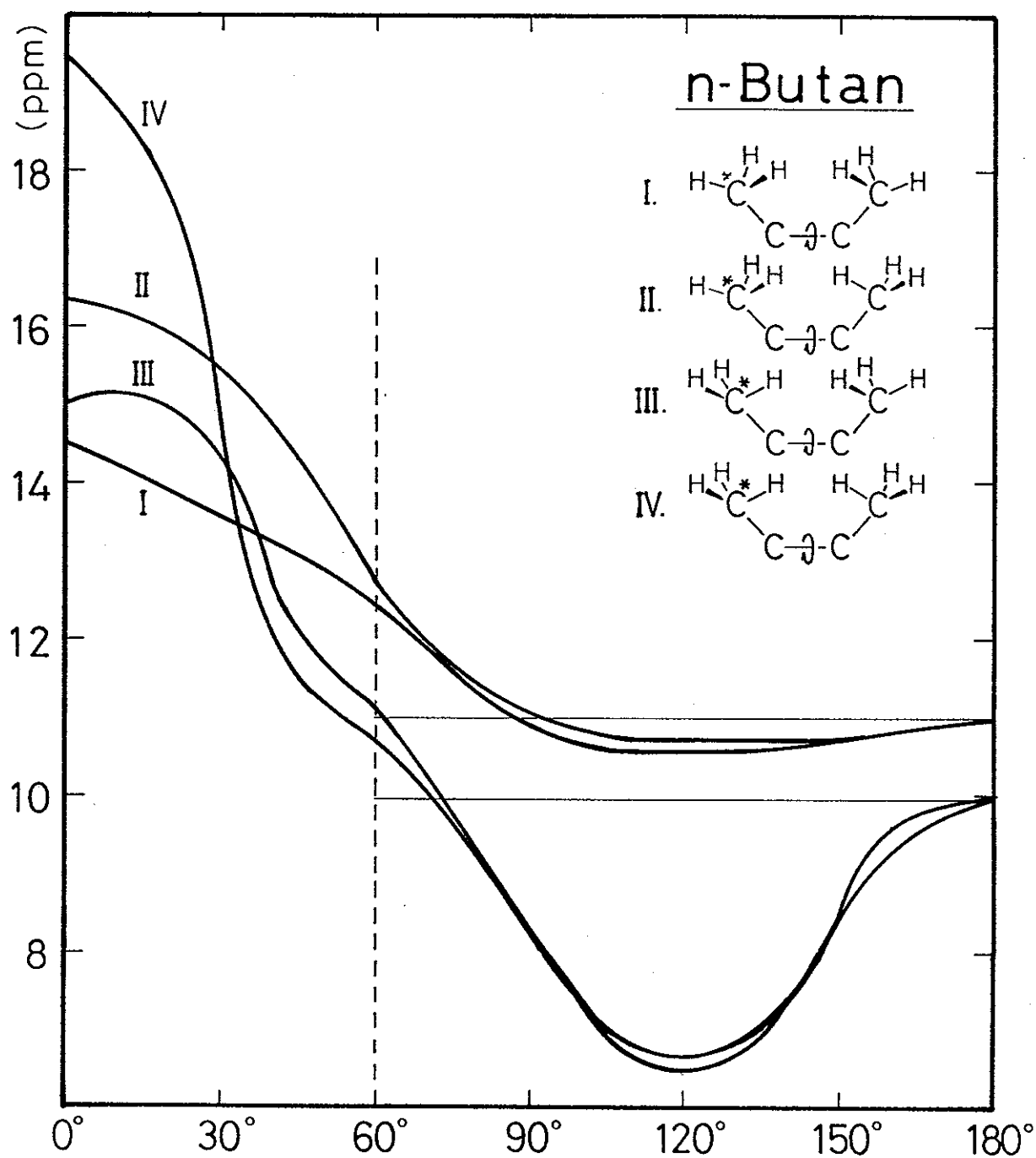


[図7-4] FPT-MNDO法による含酸素化合物の¹³C磁気遮蔽定数の等方平均値(計算結果)と実測¹³C化学シフト(CH₄基準)

本研究の計算では、含窒素化合物(18種)について平均誤差8.8 ppm、含酸素化合物(19種)について平均誤差4.8 ppmと大きな計算精度の向上が見られている。含酸素化合物に比べて含窒素化合物の再現性が劣ることの原因として、含窒素化合物では窒素原子上に存在する非共有電子対(n軌道)の非局在化が ^{13}C の化学シフトに影響を及ぼすにもかかわらず、ここで用いた半経験的分子軌道法ではn軌道のように大きく広がった軌道をうまく記述できないということが考えられる。しかし、アニリン、ピリジン、フェノールとも芳香環内の炭素の帰属は正しく評価されており、芳香族に関しては高い精度をもっている。

[7-3-3] 基礎的な「コンホメーション依存化学シフト」の評価 その I “炭化水素におけるゴージュ効果”

「ゴージュ効果」¹⁶⁾とは、 γ 位に位置する2つの炭素核がゴージュ位を占めた場合、互いに高磁場へシフトするという経験則で、パラフィンやポリオレフィンにおける相対的なシフト差を再現できることが知られている。前章の序論で紹介したように、MacielらはFPT-INDO法をn-ブタンに適用することにより、メチル基同士の「ゴージュ効果」を計算して、定性的に実測を再現する結果を得た⁷⁾。図7-5は同様に、FPT-MND法によりn-ブタンの4つの構造(水素の向き合い方が異なる)を中央の二面角の回りで回転させ、メチル炭素の磁気遮蔽定数をプロットしたものである。 $\theta = 60^\circ$ (ゴージュ)は、 $\theta = 180^\circ$ (トランス)より約1.4 ppmの高磁場シフトと、傾向、数値ともにMacielらと同等の結果が得られた。しかし、 $0^\circ \sim 60^\circ$ の区間における高磁場シフトは彼らの計算よりも大き



【図7-5】 FPT-MND O法による n-ブタン分子における「ゴースユ γ 効果」
水素分子の向き合い方で C_4 炭素に現れる効果が大きく異なる。

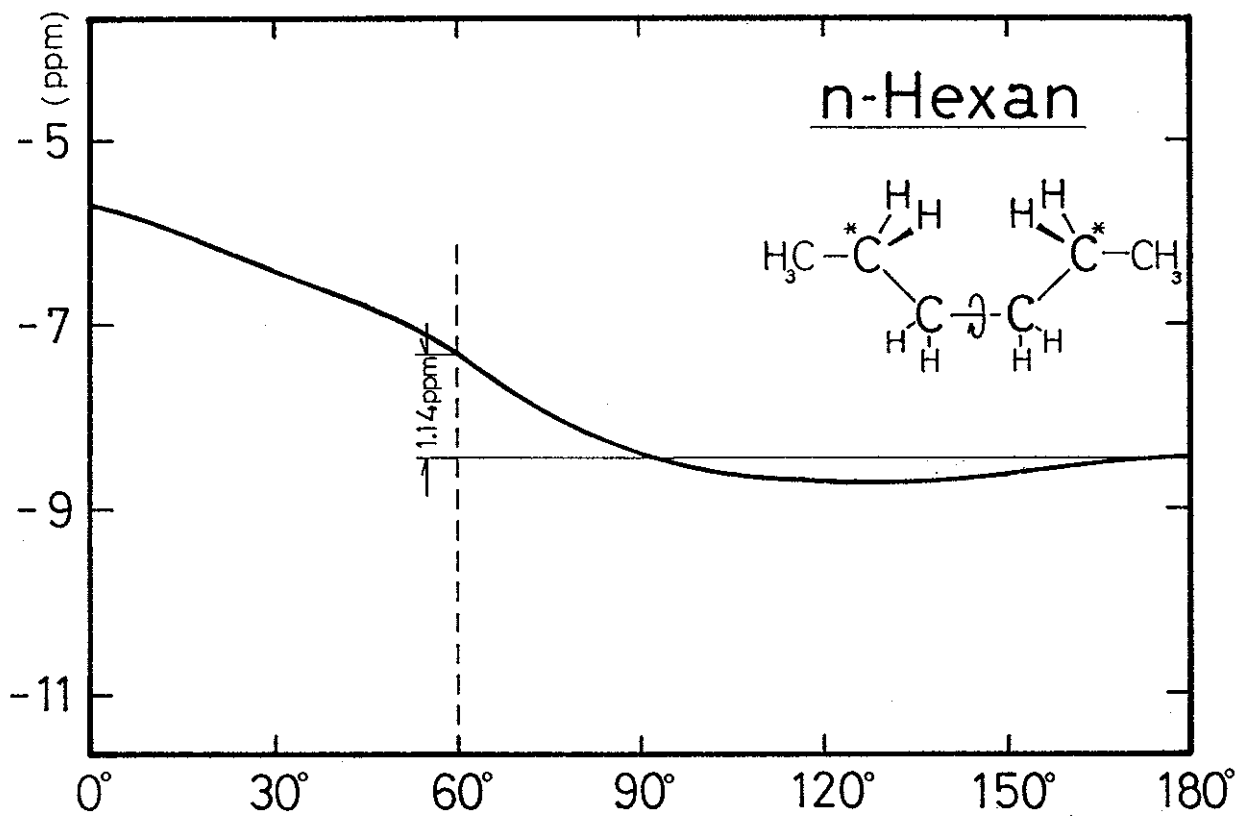
く、シス($\theta = 0^\circ$)に近いコンホメーションがゴーシュに混ざってくれば更に高磁場へシフトしてゆくことが期待される。

実際のメチレン鎖に近い *n*-ヘキサンについて、同様の効果を計算したのが図7-6である。トランスを基準としたゴーシュ位の高磁場シフトは1.14 ppmで *n*-ブタンの場合より小さく、シスであってもそのシフト差は2.7 ppmと、実測値(5.3 ppm)の約半分である。

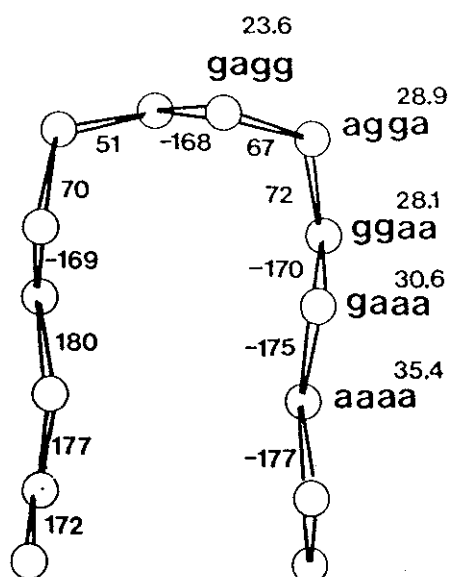
このようにFPT-MND0法を用いたとしても「ゴーシュ γ 効果」の定量的な評価は困難である。この原因は明らかでないが、可能性として、

1. 計算で無視した3中心項が非結合相互作用には大きな寄与をしている、
2. 化合物によるシフト差を定量的に評価するようパラメータを決めたのでは、コンホメーション効果を再現できないなどが考えられる。

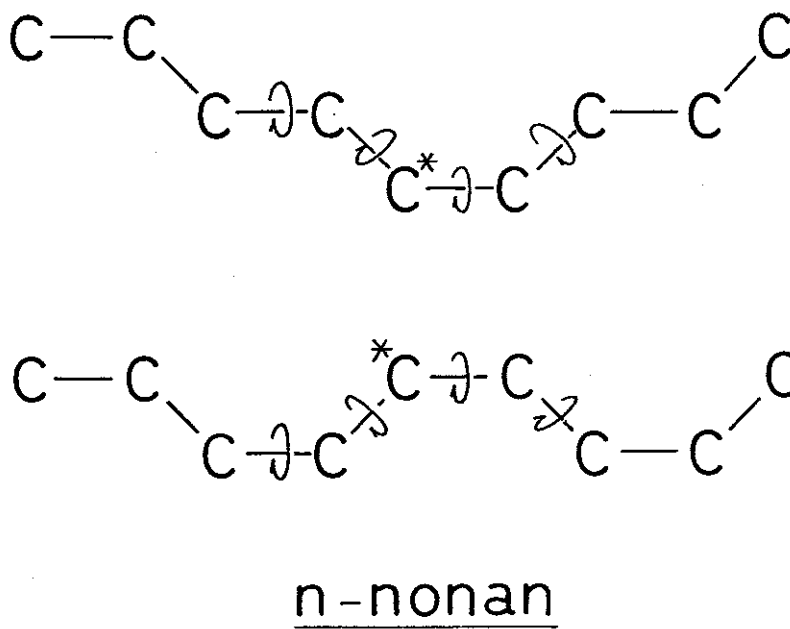
次に複数の「ゴーシュ γ 効果」が絡みあった系について計算を試みる。図7-7は反田ら¹⁷⁾およびMoller¹⁷⁾らによって報告された環状パラフィンの折り返し部分で、¹³C CP-MAS NMRのシグナルは、観測核の両隣りにある計4つの結合のコンホメーション(トランスとゴーシュ)を反映して分裂する。ここにゴーシュ γ 効果だけが存在するのであれば、シグナルは「 γ 効果を受けない」「 γ 効果を1つ受ける」「 γ 効果を2つ受ける」の3本に分裂するはずであるが、実際には「2次的な効果」が現れるため計5本に分裂する。この観測結果をFPT-MND0法でどこまで再現できるか検証するため、*n*-ノナン(図7-8)をモデル化合物として用い、磁気遮蔽定数の計算を行った。その結果を図7-9に示す。上の4つは炭素数の異なる環状パラフィンで観測された棒スペクトルであり、一番下が計算



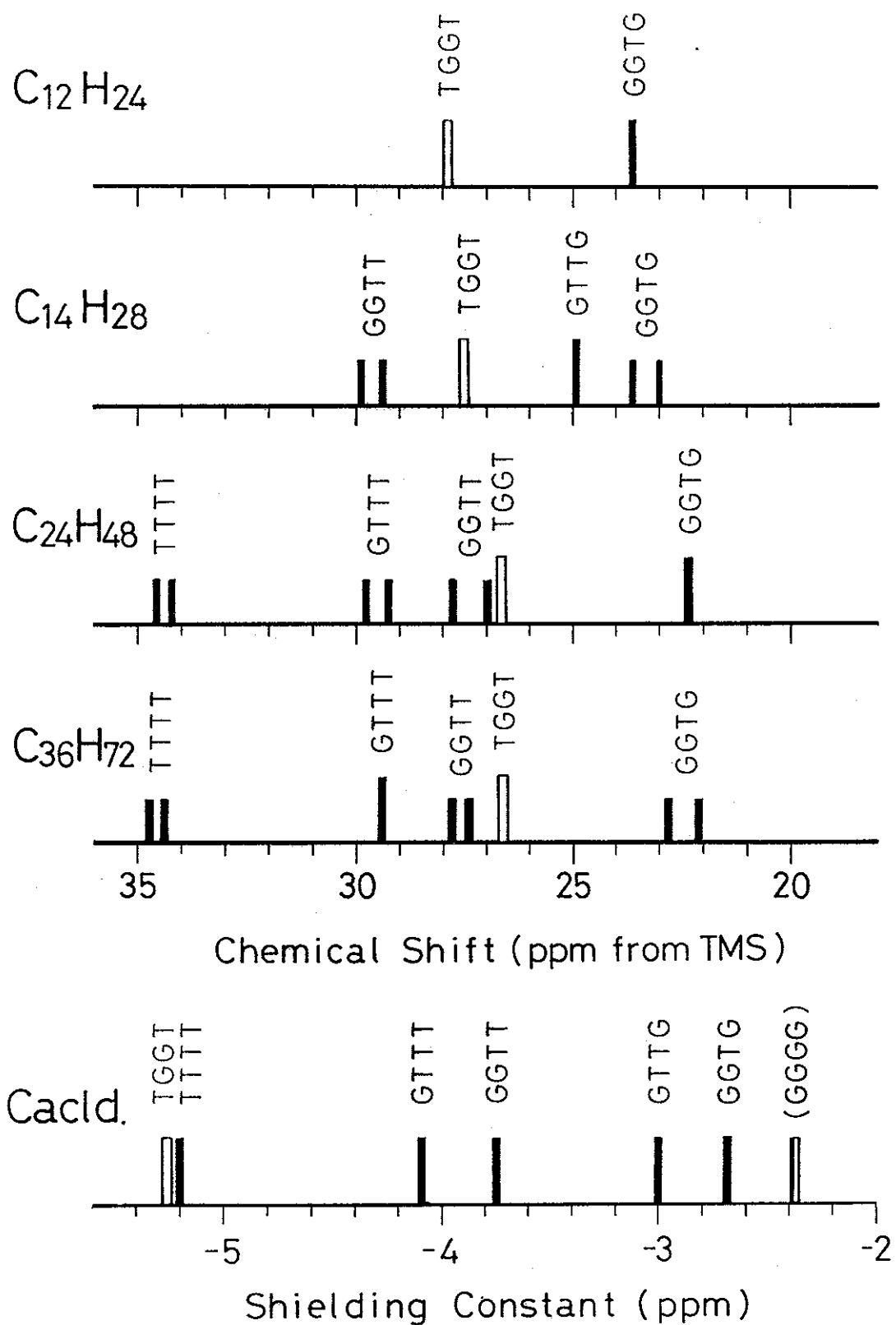
[図7-6] FPT-MND0法による n-ヘキサン分子における「ゴージュ効果」



【図7-7】 X線回折から得られたシクロテトラエイコサン環状部の
コンホメーションと二面角、および低温CP-MAS NMRから
得られた¹³C化学シフト(TMS基準)



【図7-8】 メチレン鎖環状部のコンホメーション依存¹³C NMR化学シフトを
理論計算によって評価するためのモデル化合物；n-ノナン



[図7-9] 4種の環状パラフィンで観測された ^{13}C NMR化学シフトの帰属とn-ノナンをモデル化合物として用いたFPT-MNDO法の計算結果(実測はTMS基準の化学シフト,計算値は磁気遮蔽定数で基準は任意)

結果である。n-ブタン, n-ヘキサンの場合と同じくシフト値の変化する幅は実測値の1/4程度であるが、TGGTのコンホメーションを除き計算は実測傾向をよく再現している。TGGTの実測値が計算値より高磁場へシフトしたのは、すぐ隣りのゴージュがともに約70°, その向こうのトランスが-170°とどちらも典型的な値から10°ずつずれているためであり、計算でも周囲の二面角に同様の補正を行うと、計算値が高磁場側へシフトしてGTTTに近いシフト値を示すようになる。

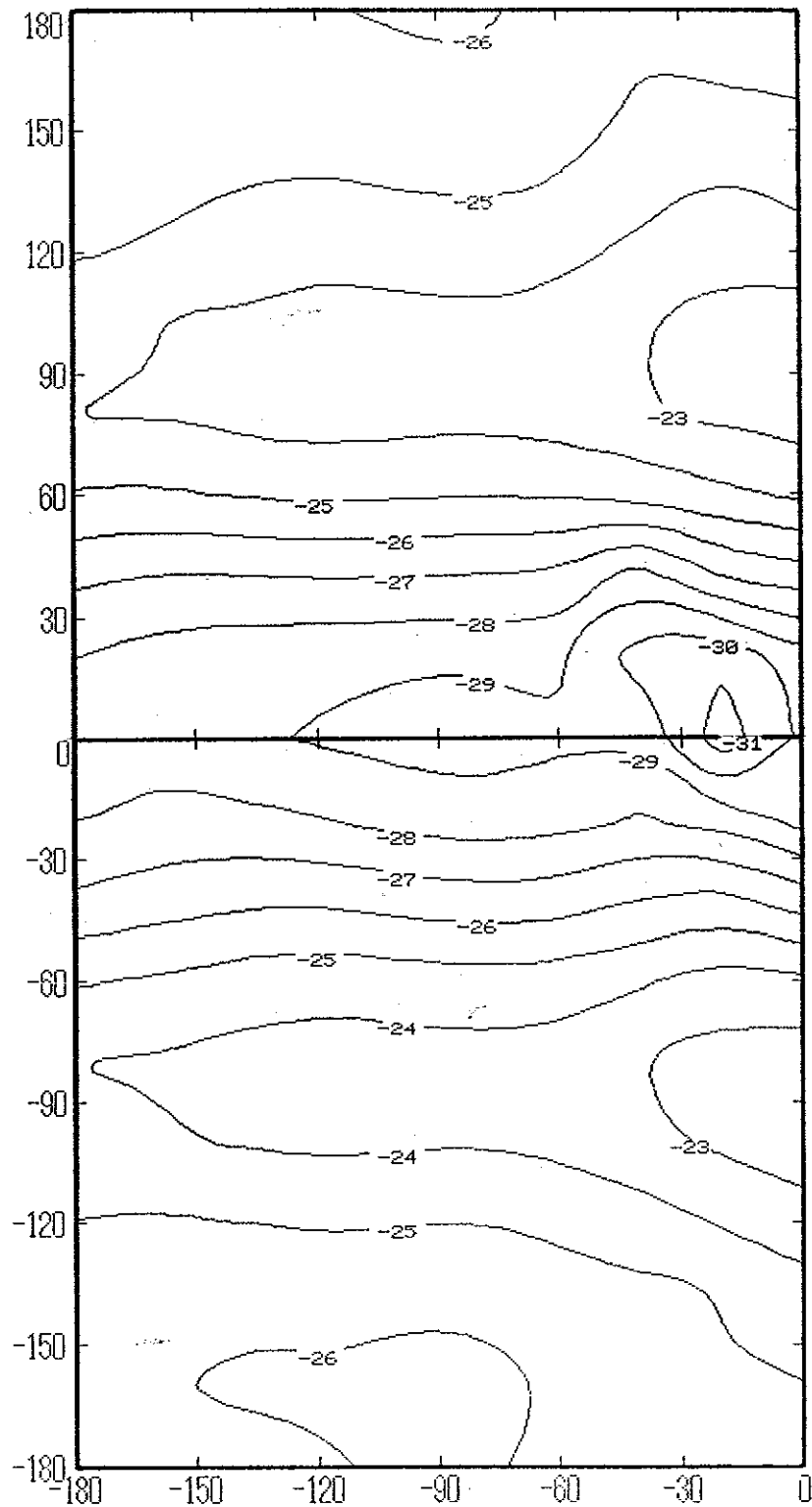
以上のように、FPT-MND O法は「化学シフトのコンホメーション依存性」の中で最も代表的な「ゴージュ効果」に対しては、定性的に信頼性の高い計算結果を与えることが明らかとなった。

[7-3-4] 基礎的な「コンホメーション依存化学シフト」の評価 そのII “ペプチドにおけるコンホメーション効果”

FPT-MND O法が、本研究の中心課題である「ペプチドにおけるコンホメーション依存化学シフトの原理を探る」という目的に、どの程度有効な手段となりうるかを評価するため、グリシンとアラニンのDipeptideモデルを用い、グリシン残基のC α 炭素(GlyC α)、アラニン残基のC α 炭素(AlaC α)、C β 炭素(C β)の磁気遮蔽定数の計算を行った。グリシン残基のカルボニル炭素(GlyC=O)については、「狭義のコンホメーション効果」よりも「水素結合効果」が支配的であるためここでは取り扱わない。モデル分子の構造パラメーターは前章で用いたものと同じである。

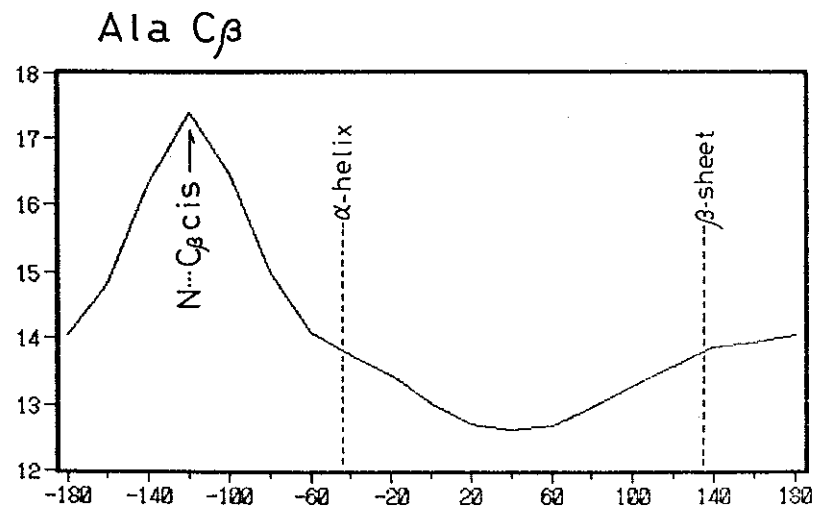
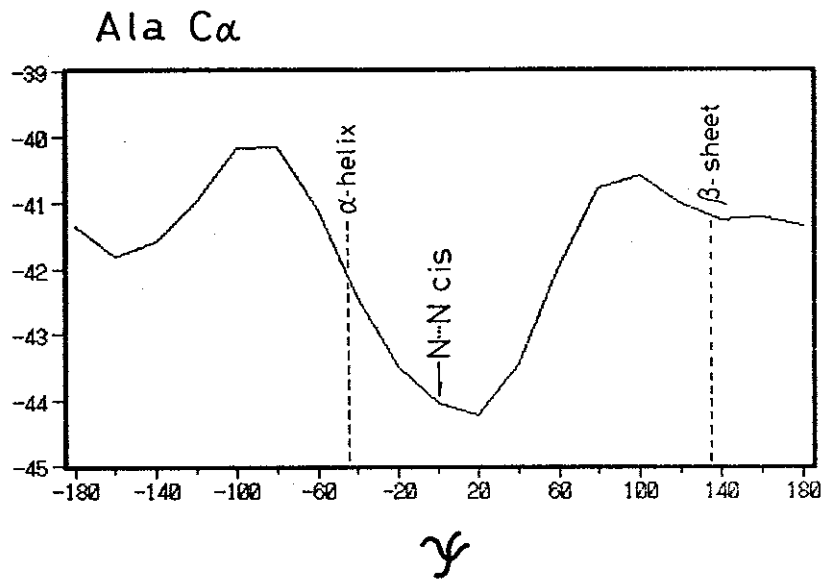
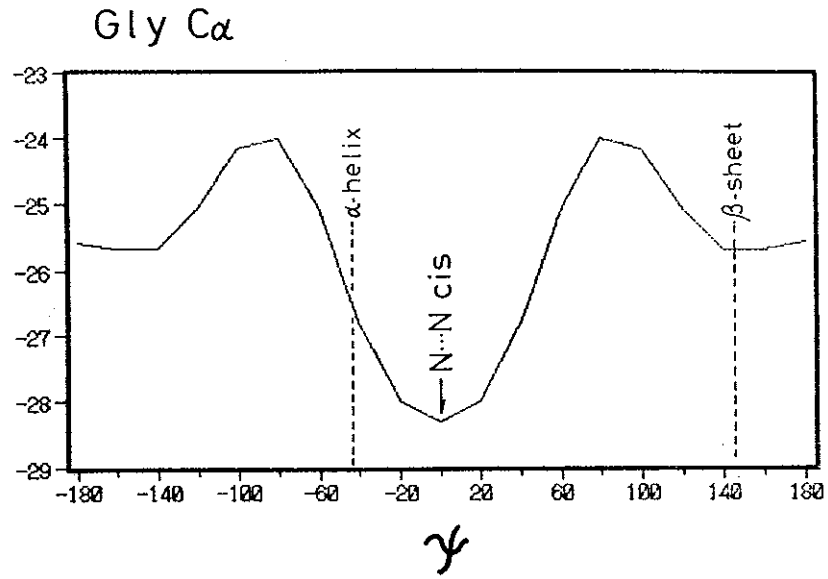
図7-10は、第6章Case Iで取り扱ったグリシン残基のモデルIにつき、FPT-MND O法により計算したGlyC α 磁気遮蔽定数の等方平均

Gly C α

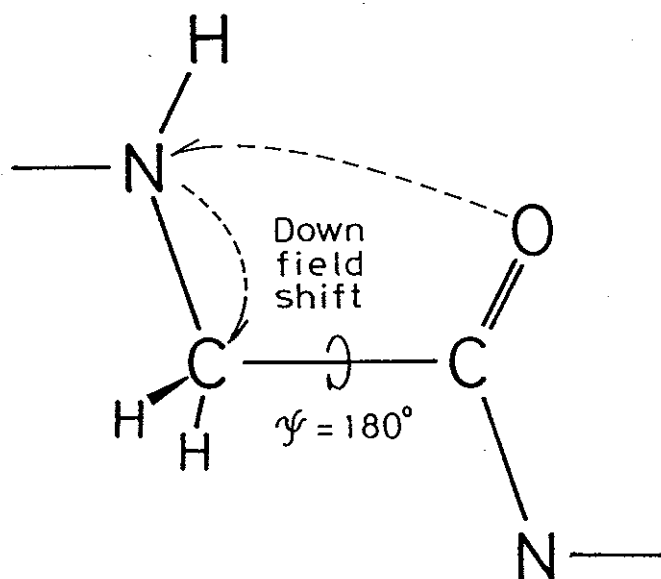
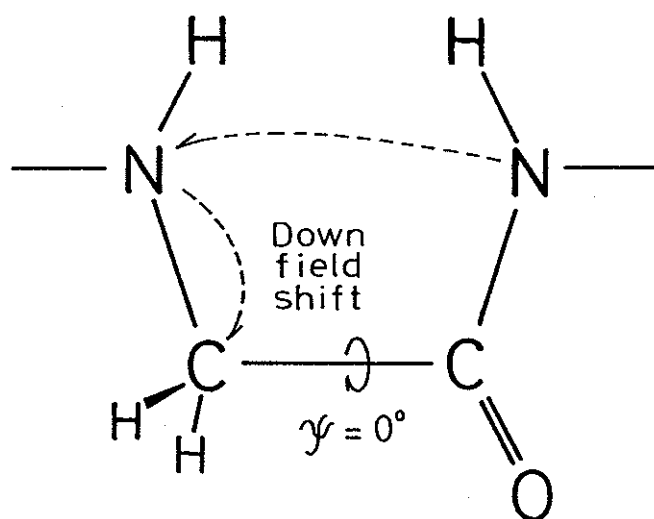


[図7-10] モデル I (図6-3)についてFPT-MNDO法により計算されたグリシン残基C α 炭素の ^{13}C 磁気遮蔽定数(等方平均値)等高線図(図6-12に示したFPT-INDO法の計算結果を参照)

値の等高線である。FPT-INDO法による結果(図6-12)と比べるとその傾向は良く似ており、GlyC α の化学シフトが二面角の ϕ ではなく ψ によって支配されていることがわかる。 ϕ の回転による効果を一定にするため、この二面角を180°に固定して計算したのが図7-11aである。 ψ が0°になってアミド基のNと隣接残基のNがシス位に来ると、図7-12aに示すような二次的な誘起効果が生じてGlyC α は低磁場へシフトする。 ϕ を無視し α -ヘリックスと β -シートのそれぞれの ψ で計算値の読み取りを行うと、 α -ヘリックスがわずかに低磁場へシフトしており、実測の傾向と一致する。曲線の形状から見て α -ヘリックスの低磁場シフトがこの効果(N-N間の非結合相互作用にともなう二次的な誘起効果)により生じていることは確かなようである。しかし、第4章の考察で、アラニン残基C α 炭素(AlaC α)に比べGlyC α のシフト差が小さいことに対し、「 ψ が-120°をとった時に生じるアミドNとC β 間の非結合相互作用にともなう二次的な誘起効果」(図4-7)を提案したが、AlaC α についての同様の計算結果(図7-11b)と比較しても両者の基本的な形状には違いが見られず、FPT-MNDO法の計算結果はそのような効果の存在を支持していない。また、 $\psi = \pm 90^\circ$ 付近でGlyC α の磁気遮蔽定数が極大を示すのはアミドNに空間的に近接する核がなくなるからで、 $\psi = \pm 150^\circ$ 付近に見られる第2の極小は、反対にアミドNとカルボニルOが近接するために生じたものと考えられる(図7-12b)。空間的な近接にともなう核間の相互作用(これをゴースユ γ 効果と呼んでも差し支えない)がC α 炭素の磁気遮蔽定数に二次的に及ぼす効果については、まずN-N間が一番大きく、ついでN-O間、最後にN-C β 間の



[図7-11] Gly残基, Ala残基のDipeptideモデルにおいて ϕ を 180° に固定した時の各炭素 ^{13}C 磁気遮蔽定数の二面角 ψ に対する依存性
(a) Gly C α , (b) Ala C α , (c) Ala C β



[図7-12] 計算結果に現れたAlaC α 炭素の相対的な低磁場シフトを説明するための考え方

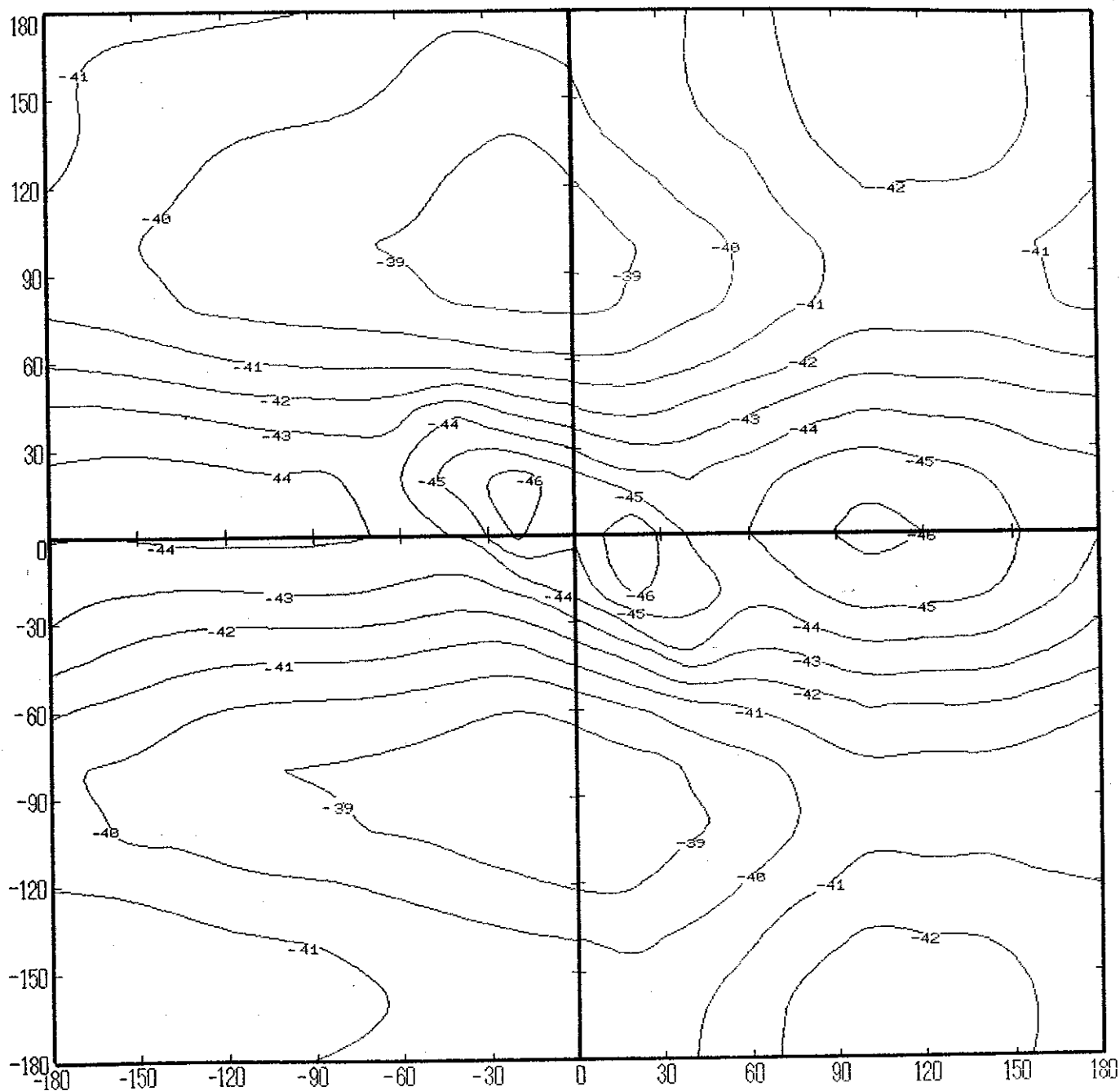
- (a) アミド基のNが隣接残基のNと空間的に近接するとC α 炭素には二次的な誘起効果が生ずる(相対的に大きい)。
- (b) アミド基のNがカルボニル基のOと空間的に近接するとC α 炭素には二次的な誘起効果が生ずる(相対的に小さい)。

順で小さくなってゆく。

図7-13は同様に、アラニン残基のモデル I について、FPT-MND O法により計算した $\text{AlaC}\alpha$ の磁気遮蔽定数の等方平均値の等高線である。前述のように計算結果の傾向は $\text{GlyC}\alpha$ とよく似ており、 $\text{C}\beta$ 炭素の存在は $\text{C}\alpha$ の磁気遮蔽定数にほとんど影響を及ぼさないように見える。しかし、実測の $\text{GlyC}\alpha$ 化学シフトのコンホメーション依存性が非常に小さいのに対し、 $\text{AlaC}\alpha$ は変化幅数 ppm に及ぶ顕著な依存性を示す。FPT-MND O法の計算からシフト変化を起こす主要因と見られた「N-N間の非結合相互作用」は、 α -ヘリックスに巻き込まれた Gly 残基においても存在するはずであり、これでは $\text{GlyC}\alpha$ と $\text{AlaC}\alpha$ の挙動の違いを説明することができない。考えられる原因としては、図7-13に見るとおり、 α -ヘリックスは β -シートに比べて ψ のわずかな変化に対しても計算値が敏感に動く領域にあり、現実にはポリアラニンに巻き込まれた $\text{GlyC}=\text{O}$ が、ポリL-アラニンとは異なる二面角をとっている可能性が考えられる。

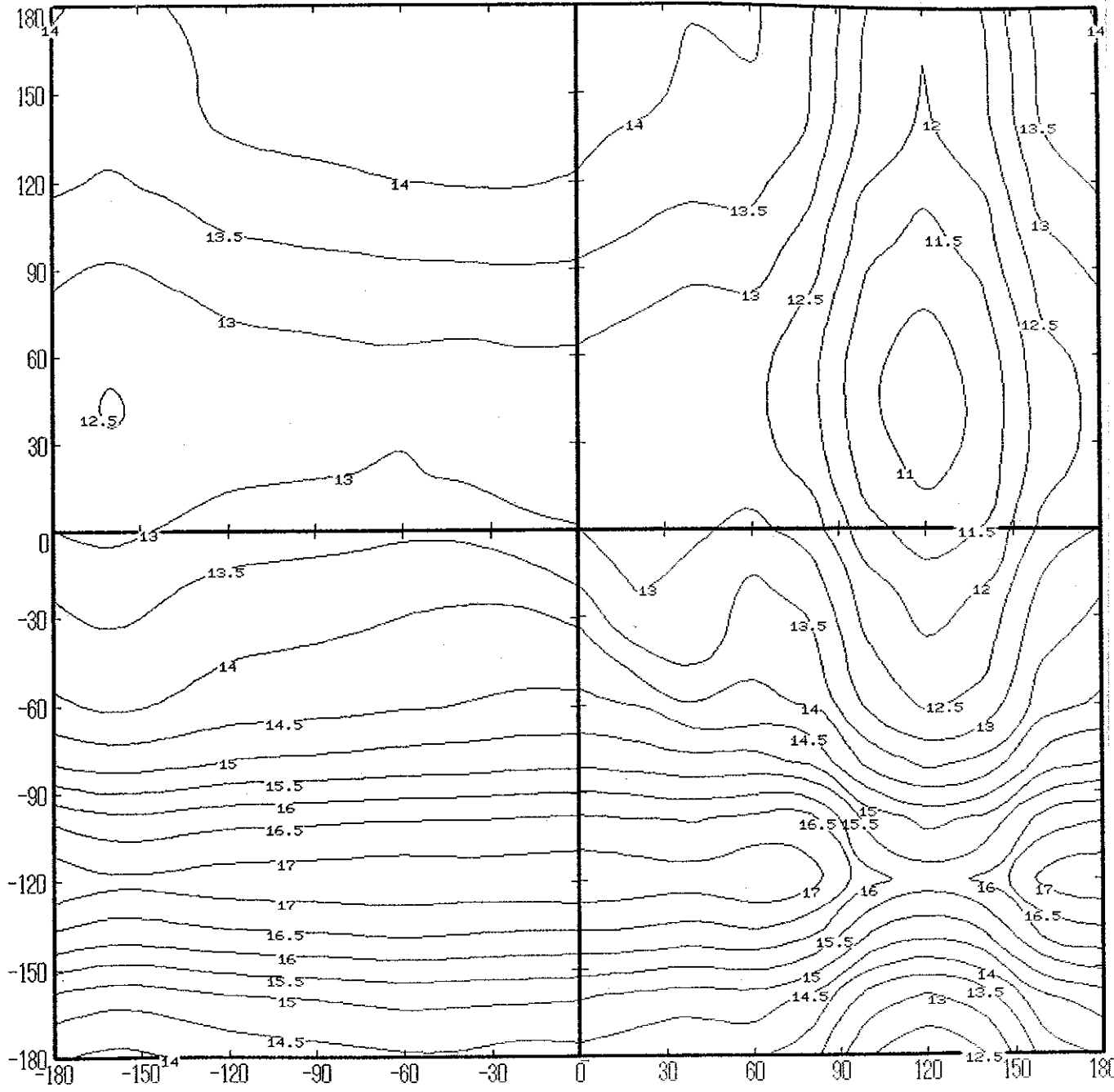
図7-14は、FPT-MND O法により計算した $\text{AlaC}\beta$ の磁気遮蔽定数の等方平均値の等高線である。 $\text{AlaC}\alpha$ の場合と異なり、その形状は FPT-IND O法による結果(図6-2)と大きく異なっているが、原因は明らかでない。FPT-MND O法による計算結果は $\text{C}\alpha$ 炭素の場合と同様、次のように定性的な解釈が可能である。図7-15はこの等高線を簡略化したもので、基本的には、1) $\psi = -120^\circ$ で高磁場シフト、2) $\psi = 120^\circ$ で低磁場シフトしている。1)の高磁場シフトは図7-16aに示すように、結合 ψ を挟んで N と $\text{C}\beta$ が近接したことによる直接の「非結合相互作用」であり、これは

Ala C α

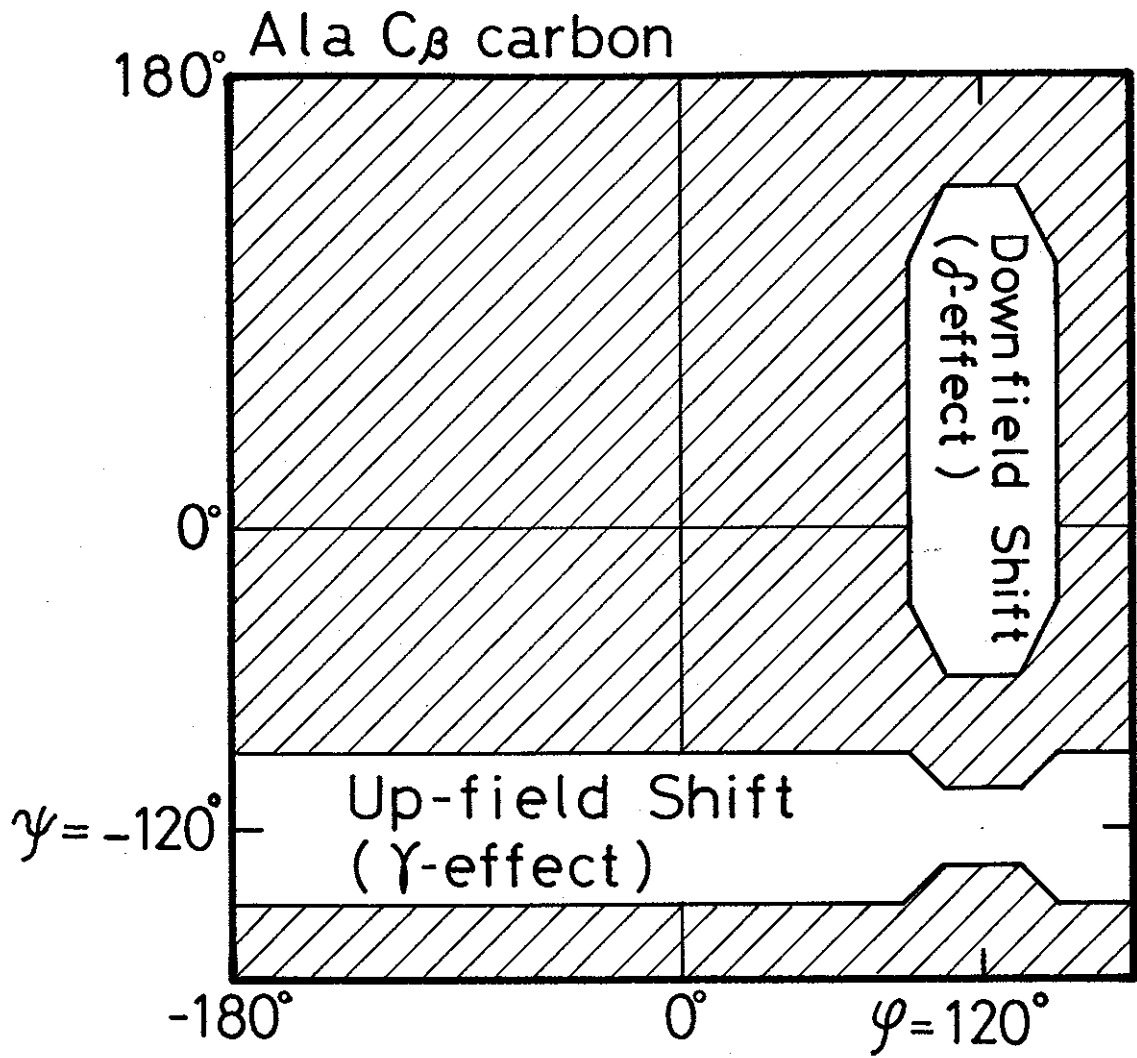


[図7-13] アラニンDipeptideモデルにおいてFPT-MNDO法により
計算されたAlaC α 炭素の ^{13}C 磁気遮蔽定数(等方平均値)等高線図

Ala C β



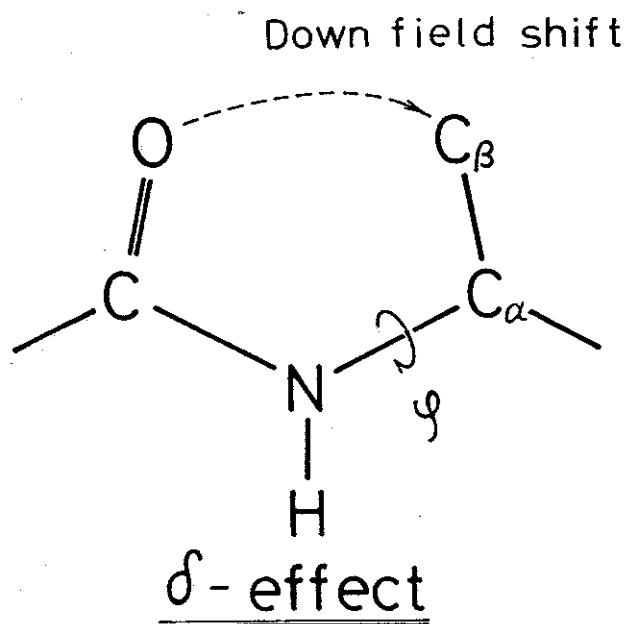
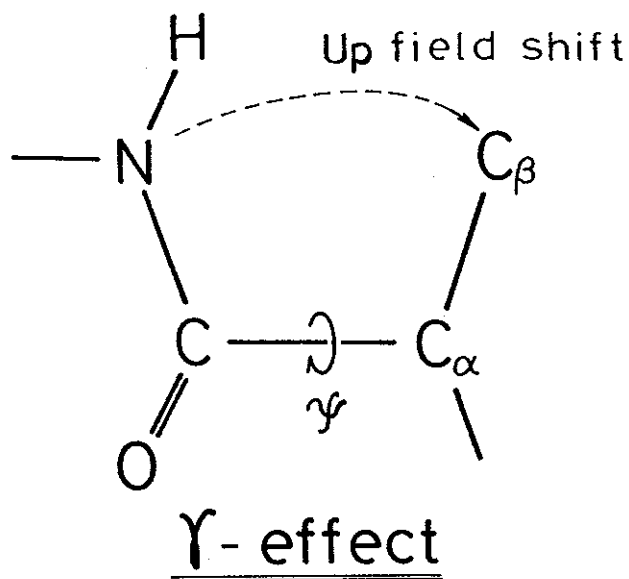
[図7-14] アラニン DipeptideモデルにおいてFPT-MNDO法により
計算されたAla C β 炭素の ^{13}C 磁気遮蔽定数(等方平均値)等高線図



[図7-15] AlaC β 炭素の ^{13}C 磁気遮蔽定数等高線図(図7-14)に見られる特徴を簡略化したもの

Tonelliが提案した「ゴージュ効果」¹⁸⁾と同じものである。2)の低磁場シフトは図7-16bに示すように共有結合で4つ離れたカルボニル基の酸素がAlaC β に近接したことによるもので、このような効果は「 δ -効果」¹⁹⁾と呼ばれることがある。図7-11cに示したように ϕ を180°で固定すると、AlaC β の磁気遮蔽定数には $\psi = -120^\circ$ における大きな高磁場シフトを除いて「コンホメーション効果」と呼べるものは存在しない。ここから計算値の読み取りを行うと α -ヘリックスが β -シートより高磁場へ出て実測傾向を再現しているが、その差はわずかであり、ここでも計算の定量性には問題が残る。これまでに観測されたほぼすべてのホモポリペプチド(ポリグリシンは除く)で、C β 炭素の化学シフトは α -ヘリックスが β -シートよりも約5 ppm高磁場に出現していることから、実際の系におけるN-C β 間の相互作用は、図7-11c中の計算結果よりも広い ψ の範囲に広がっており、 α -ヘリックスの領域はそのすその部分により深く取り込まれているものと推定される。

最後に表7-7に、FPT-MNDOで計算されたGlyC α , AlaC α , AlaC β の磁気遮蔽テンソルの等方平均値と主値を、実測値とともに示す。ここで、計算値は負の向きが低磁場方向、実測値は絶対値の大きい向きが低磁場方向である。「コンホメーション依存化学シフト」を定量的に評価することはこのFPT-MNDO法によっても困難であるため、ここでは化学シフトの順序(低磁場側から高磁場側へシグナルが出現する順番)のみを考察の対象とする。実測の結果と計算結果をまとめると次のようになる。



- [図7-16] 計算結果に現れたAla C β 炭素の挙動を説明するための考え方
- (a) C β 炭素がアミド基のNと空間的に近接するとC β 炭素には「 γ -効果」(高磁場シフト)が生ずる。
 - (b) C β 炭素がカルボニル基のOと空間的に近接するとC α 炭素には「 δ -効果」(低磁場シフト)が生ずる。

表 7-7 GlyC α の ^{13}C NMR 化学シフト計算結果 (ppm)

構造	(σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}) σ_{iso}	δ_{obs}
Form I	-45.70	-34.19	3.78	-25.37	(44.3)
Form II	-49.30	-28.59	1.61	-25.42	(43.7)
α -helix	-50.30	-33.22	5.06	-26.15	(44.8)
ω_1 -helix	-48.39	-31.60	5.11	-24.96	(45.1)
ω_2 -helix	-45.40	-31.08	4.81	-23.89	(45.1)

AlaC α の ^{13}C NMR 化学シフト計算結果 (ppm)

構造	(σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}) σ_{iso}	δ_{obs}
α_R -helix	-64.86	-38.44	-19.26	-40.85	(52.4)
α_L -helix	-67.08	-39.81	-22.06	-42.98	(49.1)
β -sheet	-64.29	-33.65	-23.07	-40.34	(48.2)
3_1 -helix	-61.56	-35.58	-22.91	-40.02	(48.7)

AlaC β の ^{13}C NMR 化学シフト計算結果 (ppm)

構造	(σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}) σ_{iso}	δ_{obs}
α_R -helix	-0.60	2.54	40.51	14.15	(14.9)
α_L -helix	-3.44	1.09	40.14	12.60	(~14)
β -sheet	-0.13	1.09	40.52	13.83	(19.9)
3_1 -helix	0.18	1.70	40.86	14.25	(17.4)

← 低磁場方向 高磁場方向 →

☆ GlyC α
 [実測]²⁰⁾ ω -helix > α_R -helix > Form I > Form II
 [計算] α_R -helix > Form II > Form I > ω_1 -, ω_2 -helix

☆ AlaC α
 [実測]²¹⁾ α_R -helix > α_L -helix > β -sheet > β -sheet
 [計算] α_L -helix > α_R -helix > β -sheet > β -sheet

☆ AlaC β
 [実測]²¹⁾ β -sheet > β -sheet > α_R -helix > α_L -helix
 [計算] α_L -helix > β -sheet > α_R -helix > β -sheet

α -ヘリックスと β -シートの関係だけに関して言えば、すべての炭素核で実測と計算の傾向は一致している。しかし β -ヘリックスや ω -ヘリックスまで含めると、必ずしも実測の傾向を再現しているとは言えない。実測の化学シフトがコンホメーションの違いによってわずかしき変化しないGlyC α は別としても、Ala残基のC α とC β で β -ヘリックスと α_L -ヘリックスの評価に失敗していることは問題である。その原因として考えられるのは、理論的な近似レベルが不十分であることを除くと、やはり固体ポリペプチド中で実際にとっているAla残基の二面角(ϕ , ψ)が計算で用いたものとはわずかに異なっているということである。 β -ヘリックスと α_L -ヘリックスはどちらもAla残基単独ではとることができないため、Gly残基との共重合体を処理するか²¹⁾、あるいはポリ(β -ベンジル-L-アスパルテート) ([Asp(ObzI)]_n)に巻き込ませる²¹⁾ことによって試料を得ている。しかし、計算に用いた二面角(ϕ , ψ)は β -ヘリックスがポリグリジン²²⁾のもの、 α_L -ヘリックスはポリL-アラニン α_R -ヘリックス²³⁾の(ϕ , ψ)を正負逆転させたものであり、実際の系では巻き込まれたAla残基の二面角がこれら

ホモポリペプチド中のものからずれていることが十分に考えられる。Ala残基がとりうる安定なコンホメーション領域はGly残基に比べると非常に狭く、特に α _L-ヘリックスに相当する二面角を持ったAla残基はタンパク質中にほとんど見い出されていない²⁴⁾。今後細かい議論をしてゆくためには、計算結果が示す「コンホメーション依存化学シフト」の内容について更に検討してゆくとともに、 β ₁-ヘリックスや α _L-ヘリックスをとる他の試料が、同様の実験結果を示すかどうか確認する必要がある。

以上のように、磁気遮蔽定数の理論計算は現在のところ「コンホメーション依存の化学シフト」を定量的に評価し、それが実験事実の解釈に直接応用できるようなレベルには達していない。しかし、定性的には実験結果を再現できる場合が多く、実測の傾向をいくつかの重要な相互作用に分けて解釈することを助ける。理論計算に依れば実験的に得られないコンホマーについても検討することができるため、実験データの集積に頼ることなく「分子のコンホメーションと磁気遮蔽定数の因果関係」を探ることができる。そのため現在でも理論計算の存在意義は大きい。

今後、「化学シフトのコンホメーション依存性を定量的に評価できるような計算手法」を開発してゆくためには、理論の精緻化と更なる計算技術の向上が必要である。本研究で開発したFPT-MND法では、「コンホメーション依存化学シフト」の再現性に顕著な改善は見られなかったが、「磁気遮蔽定数」という物理量をできるだけ正確に計算するための方法論の開発という点で、今後の理論的な研究の発展に貢献できるものとする。

1. 半経験的分子軌道法で用いられるスレーター型原子軌道をガウス関数で展開することにより、磁気遮蔽定数の計算に必要な一電子積分を解析的に評価する方法を考案し、これをFPT-MNDO法に組み込むことによって、実測の「化学シフト」を高い精度で再現する磁気遮蔽定数の計算手法を開発した。このプログラムは、65種の炭化水素、含窒素化合物、含酸素化合物の ^{13}C 化学シフトを6.6ppmの平均誤差で再現することができ、同様の化合物に対する半経験的分子軌道法を用いたこれまでの報告に比べ、その計算誤差は $1/2 \sim 1/3$ にまで改善されている。

2. FPT-MNDO法による磁気遮蔽定数の計算法は、「化学シフトのコンホメーション依存性」の中で最も代表的な「ゴースユ γ 効果」に対し、定性的にはかなり信頼性の高い結果を与えることができる。しかし計算から得られる磁気遮蔽定数の「コンホメーション変化」の幅は実測値の約 $1/4$ であり、定量性には問題が残る。

3. 同様に、この計算法を「ペプチドのコンホメーション依存化学シフト」の評価に適用したところ、GlyC α , AlaC α は主に二面角 ψ に依存して変化し、FPT-INDO法と類似の傾向を示すこと。AlaC β はFPT-INDOとは異なる傾向を示すもののその挙動は近接する核との非結合相互作用で説明できること、が明らかとなった。また、AlaC α の β -シートに対する α -ヘリックスの低磁場シフトは、隣接する2つのアミド基窒素間の非結合相互作用にともなう二次的な誘起効果で説明できること、AlaC β の β -シートに対する α -ヘリックスの高磁場シフトは、隣接するAlaC β がアミド基窒素と近づくことによる非結合相互作用で説明できることが示された。
 α -ヘリックスと β -シートに関しては、Gly残基とAla残基の炭素核すべてで実測と計算の傾向は一致した。しかし β_1 -ヘリックスや ω -ヘリックスまで含めて考えると、必ずしも実測傾向を再現していない。また、AlaC α の実測の化学シフトは変化する幅が大きくGlyC α のそれが小さいという現象を、理論計算によって説明することはできなかった。
「コンホメーション依存の化学シフト」を定量的に評価できるような理論計算の手法を今後開発してゆくためには、分子軌道の生成に用いる基底関数系を中心にして理論的な近似を上げてゆくとともに、計算から有用な情報を取り出すための「結果の解釈方法」についても検討を進めて行く必要がある。

参考文献 》

- 1) この「理論と計算」は2つのパートからなっている。前半部がFPT法による「磁気遮蔽定数」の一般的な定式化とINDO法およびMNDO法を用いたその具体的な計算法、後半部は「ガウス基底関数系」で「スレーター軌道」を展開した場合の、各種1電子積分の評価定式である。前半部は以下の論文に沿って説明を行った。
 - Ditchfield, R. Mol. Phys. 27, 789 (1974)
 - Ditchfield, R.; Ellis, P. D. "Theory of ^{13}C Chemical Shifts" in "Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy" pp.1 Eds. by Levy, G. C. John-Wiley & Sons New York (1974)
 - Rohlfing, C. M.; Allen, L. C.; Ditchfield, R. Chem. Phys. 87, 9 (1984)
- 2) この軌道はLondonにより初めて導入されたもので、今日まで“GIAO”(Gauge Invariant Atomic Orbital) = 「ゲージ不変の原子軌道」と呼ばれてきた。しかし本文中にもある通りこの原子軌道はゲージの中心から軌道が存在する核までのベクトルを含んでおり、“ゲージ不変”ではなく“ゲージ依存”である。Hansenらはこの命名を“残念なこと”と述べ、今後この軌道を、“ゲージを含んだ原子軌道”(Gauge Including Atomic Orbital) = “GIAO”と呼ぶよう提案した。本章では彼らの意を汲み、この軌道を“ゲージ依存の原子軌道”と呼ぶことにする。

Hansen, A. E.; Bouman, T. D. J. Chem. Phys. 82, 5035 (1985)
- 3) Ellis, P. D.; Maciel, G. E.; McIver, J. M. J. Am. Chem. Soc. 94, 4069 (1972)
- 4) Ebraheem, K. A. K.; Webb, G. A. Prog. in NMR Spectr. 11, 149 (1977)
- 5) Pople, J. A.; Beveridge, D. L.; Dobosh, P. A. J. Chem. Phys. 47, 2026 (1967)
- 6) Pople, J. A.; Segal, G. A. J. Chem. Phys. 43, S136 (1965)
- 7) 第6章 ref. 3 ~ 9を参照
- 8) Dewar, M. J. S.; Thiel, W. J. Am. Chem. Soc. 99, 4889 (1977)
- 9) Clark, T. "A Handbook of Computational Chemistry" John Wiley & Sons New York (1985)
- 10) Mulliken, R. S.; Rieke, C. A.; Orloff, D.; Orloff, H. J. Chem. Phys. 17, 1248 (1949)
- 11) 藤永 茂 "分子軌道法" 岩波書店 (1980)
- 12) Boys, S. F. Proc. Roy. Soc. (London) A200, 542 (1950)

- 13) FPT-MND O法による磁気遮蔽定数の理論計算を最初に手掛けたのは、
 南京大学のWuらのグループである。しかし計算方法の詳細については発表さ
 れておらず、1電子積分の評価方法等についても不明である。
 Wu, W.X.; You, X.Z.; Dai, A.B. *Acta Chim. Sinica* 44, 1077 (1986)
- 14) Matsuoka, O. *Int. J. Quant. Chem.* 5, 1 (1971)
 • Ito, H.; Iihaya, Y. *Mol. Phys.* 24, 1103 (1972)
- 15) Dupuis, M.; Rys, J.; King, F. *J. Chem. Phys.* 65, 111 (1976)
- 16) Grant, D.M.; Cheney, C.V. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5315 (1967)
- 17) Ando, I.; Yamanobe, T.; Sorita, T.; Komoto, T.; Sato, H.; Deguchi, K.;
 Imanari, M. *Macromolecules* 17, 1955 (1984)
 • Moller, M.; Gronski, W.; Cantow, H.J.; Hoehner, H. *J. Am. Chem. Soc.* 106,
 5093 (1984)
- 18) Tonelli, A.E. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 7635 (1980)
 • Tonelli, A.E. *Biopolymers*, 23, 819 (1984)
- 19) Grover, S.H.; Guthrie, J.P.; Stothers, J.B.; Tan, T. *J. Mag. Res.* 10, 227
 (1973)
- 20) 本論文 第4章を参照
- 21) Saito, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T.
Biopolymers 22, 1375 (1983)
 • Saito, H.; Tabeta, R.; Ozaki, T.; Shoji, A.; Ando, I. *Macromolecules*
16, 1050 (1983)
 • Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I.; Ozaki, T.; Shoji, A. *Chem Lett.* 1437
 (1983)
- 22) Crick, F.C.H.; Rich, A. *Nature* 176, 780 (1955)
- 23) Bamford, C.H.; Elliot, A.; Hanby, W.E. "Synthetic Polypeptides"
 Academic Press, New York (1956)
- 24) Pullman, B. "Protein, Nucleic Acids and their constituents" in
 "Quantum Mechanics of Molecular Conformations" Wiley publ.
 • Scheraga, H.A. "Calculation of Conformation of Polypeptides"
 in "Adv. Phys. Org. Chem." Vol. 6

第八章 結 論

最後に、本研究で行った研究の内容を総括するとともに、得られた結果をまとめて「結論」とする。

第一章では、本研究を行うにあたっての問題意識を明確に提示するため、「固体のNMR化学シフト」に関するこれまでの研究例を紹介し、その物理的な描像に遡ることによって、この物理量をとりまく現在の状況を解題した。

固体状態におけるアルカン,多糖類,ポリペプチド,イオノフォアなど多くの系で「NMR化学シフトのコンホメーション依存性」が観測され、「化学シフト」というパラメーターが分子の立体化学構造に関する様々な知見を与えることが明らかになりつつある。しかし固体高分解能NMRの測定によってその存在が確認されたのは「等方平均化学シフトにおける広義のコンホメーション依存性」であり、観測された個々の化学シフト変化が“直接的にはどのような化学的環境を反映しているのか”について具体的に検討した例はほとんど報告されていない。「コンホメーション依存」という言葉からはすぐに「狭義のコンホメーション依存性」が連想されるが、これまでに行われたポリペプチドにおける研究報告からも、化学シフトは「狭義のコンホメーション」のほか「水素結合効果」や「結晶系の違い」,「近接する分子間の非結合相互作用(パッキング)効果」などの影響を受けることが示唆されている。

固体NMRにおける「化学シフト相互作用」を用いることによって、分子の立体化学構造に関する更に詳しい情報を得るためには、「化学シフト相互作用」をとりまく現在の“混沌とした状況”を少しずつ、はっきりとした見通しのきくものにしてゆかなくてはならない。

そのため本研究では、以下のようなアプローチが有効であると考えた。

1. 分子の立体化学構造を反映する NMR パラメーターとして、等方平均化学シフトよりも変化の幅が大きく、核の周囲の電子構造の異方性をより強く反映する「化学シフトテンソルの主値」を観測対象とする。
2. “広義のコンホメーション依存性”を腑分けし、化学シフトに影響を及ぼしている個々の相互作用を選択的に評価するため、低分子化合物のモデル系を用いた測定を行う。
3. 高分子化合物で観測された「コンホメーション依存の化学シフト」が低分子化合物にも存在するかどうか、また低分子化合物で検知された「化学シフトに影響を及ぼす相互作用」が高分子化合物の中にあってもそのままの形で存在するかを検証する。
4. 磁気遮蔽定数の理論計算により、化学シフトが変化することの原理的な意味を明らかにし、観測された化学シフト挙動を理論的に解明する。

ここにあげた研究の方法論はすべて、「固体高分解能 NMR」を、未知の構造をもつ試料から“立体化学的な情報”を引き出すことのできるより精密な分光計にするための、基礎的な知見を得るためのものである。

これらの問題はすべて

“固体の NMR における「化学シフト相互作用」とは何か”

という更に基礎的な問いへ戻ってくる。上記のアプローチが対象としているそれぞれの問題は次のように書き換えることができる。

- 1 …「化学シフト相互作用」は、それ自体どのような存在か
- 2 …「化学シフト相互作用」に外から働きかけるものは何か
- 3 …「化学シフト相互作用」は、外からの働きかけに対してどのように(どの程度柔軟に)対応するか
- 4 …「化学シフト相互作用」の動きを理論によりどこまで捉えることができるか

本研究はこれらの「問い」に対して、以下に述べるように接近した。

第二章では、 ^{13}C でラベルしたグリシン残基カルボニル炭素(Gly C=O)をホモポリペプチドに巻き込ませることによって、 β -ヘリックス、 β -シート、 α -ヘリックス、 ω -ヘリックスの各コンホメーションにおける等方平均化学シフトおよび化学シフトテンソルの3つの主値(σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})を測定した。化学シフトテンソルの主値は、試料のコンホメーション変化に対して等方平均値より敏感に反応し、特にペプチドの水素結合の状態に大きく依存すること、水素結合の方向を向いたテンソル成分; σ_{22} にその影響が大きく出ることを明らかにした。

第三章では、様々な水素結合距離をもつオリゴペプチドの ^{13}C 等方平均化学シフトを観測することにより、「水素結合の効果」を選択的に評価することを試みた。その結果、 $>\text{C=O}\cdots\text{H}-\text{N}<$ 型の水素結合を形成する Gly C=O 化学シフトに対する水素結合距離の効果は、結合の相手であるプロトドナーのイオン化状態により反対の挙動を示すことが明らかとなった。通常のポリペプチドに見られる水素結合では、結合距離の減少は低磁場シフトを引き起こすが、正にイオン化したアミノ基をドナーとする水素結合では、距離の減少が高磁場シフトを引き起こす。水素結合が Gly C=O 化学シフトにおよぼす効果には「距離の効果」が大きく、「コンホメーション」や「水素結合の角度」の効果は相対的に小さいことが示された。第二,三章で行った考察により、 Gly C=O の化学シフトは水素結合を中心とした電子構造に大きく依存しており、「狭義のコンホメーション効果」は二次的な影響を及ぼすに留まっていることを明らかにした。

第四章では、 ^{13}C でラベルしたグリシン残基 $\text{C}\alpha$ 炭素 ($\text{GlyC}\alpha$)を、ポリペプチドに巻き込ませることによって、これまでは明確なコンホメーション依存性が観測されていなかった $\text{GlyC}\alpha$ 炭素の化学シフトにもコンホメーション依存性が存在し、これを用いてコンホメーションの同定ができることを確認した。 $\text{GlyC}\alpha$ の化学シフトテンソル主値は、コンホメーションを反映して等方平均化学シフトより敏感に変化するが、等方平均化学シフトとの相関は明らかでなく、 $\text{C}\alpha$ 炭素の化学シフトは比較的遠距離の化学的な環境を反映していることが示唆された。

第五章では、結晶中でポリペプチドの二次構造によく似たコンホメーションをとる Z-Gly-Pro シーケンスを含むオリゴペプチドの ^{13}C CP-MAS NMRを観測し、ポリペプチドから既に得られた「コンホメーション依存の化学シフト」と本研究で得られた「 GlyC=O 化学シフトと水素結合距離の相関」および「 $\text{Pro}\Delta\text{H}$ と Pro 残基のコンホメーションの相関」を用いることにより、固体高分解能NMRが低分子量の鎖状ペプチドのコンホメーションについても、有意な情報を与えることを述べた。結晶構造が未だ知られていないオリゴペプチドに同様の方法論を適用してコンホメーションを探る試みをしたところ、NMRの結果は概ね一通りの構造を示し、この方法は低分子ペプチドのコンホメーションの同定にも使用できることが示された。また「狭義のコンホメーション効果」は4残基程度のオリゴペプチドでも現れることを明らかにした。

第六章では、①水素結合でのプロトンドナーのイオン化状態、②水素結合距離の違い、③主鎖構造の変化(「狭義のコンホメーション効果」)の3つを考慮した、モデル化合物による磁気遮蔽定数の理論計算を行ったところ、計算結果は実測傾向を定性的に再現し、これらの効果が実際の系に

においても化学シフト変化を生じさせる主要因であることが理論的に裏づけられた。特に①と③の効果は σ_{11} (C-N軸方向の主値)の挙動に、②の効果は σ_{22} (C=O軸方向の主値)の挙動に特徴的に現れ、化学シフトに影響を及ぼす個々の相互作用は、特定のテンソル成分(主値)に特徴的に現れることが示された。グリシン残基メチレン炭素(GlyC α)の ^{13}C 化学シフトは実測値の変化する幅が小さく、理論計算によりこの挙動を評価することは困難であることがわかった。

第七章では、FPT-MND0法を用いた化学シフトの実測値を精度よく再現する磁気遮蔽定数の計算手法を開発した。この計算法は「ゴージュ効果」に対して定性的に信頼できる結果を与える。しかし計算による「コンホメーション変化」の大きさは実測値の約1/4であり、定量性には問題が残る。また、この計算法を「ペプチドのコンホメーション依存化学シフト」の評価に適用することにより、 α -ヘリックスと β -シートの関係について、AlaC β の挙動は「隣接残基のアミド基窒素との非結合相互作用」によって、またGlyC α , AlaC α の挙動は「隣接する2つのアミド基窒素間の非結合相互作用にともなう二次的な誘起効果」で定性的に説明できることを示した。Gly残基とAla残基のすべての炭素核で実測と計算の傾向は一致したが、 β_1 -ヘリックスや ω -ヘリックスまで含めて考えると、計算結果は実測傾向を再現していない。また、AlaC α の実測の化学シフトは変化する幅が大きくGlyC α のそれが小さいという現象は「コンホメーション依存化学シフト」の原理を探る上で重要であるにもかかわらず、FPT-IND0同様、理論計算によって説明することは困難であった。更に本章ではこれらの結果に基づき、理論計算の限界と今後の展開について議論した。

「化学シフト相互作用」は、それぞれの系において「狭義のコンホメーション」や「水素結合」などの効果が特徴的に現れる程度の、分子全体から見れば“局所的な電子構造”を反映しており、このことは「化学シフトの相互作用」を利用して分子の局所的な立体化学構造を探ることの妥当性を支持している。今後、「コンホメーション依存の化学シフト」を赤外スペクトルの特性吸収帯のような「分子の固体構造を知るための完成された道具」にまで育ててゆくためには、ここで述べた1から4の問題にひとつずつ答えを見いだしてゆかなくてはならない。本研究はそのための第一歩となることを目指したものである。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始適切なご指導、ご助言を賜りました本学高分子工学科 安藤 勲 教授に深く感謝いたします。オリゴペプチドの合成法を親身に指導していただき、またポリペプチドの試料を調製いただきました群馬大学工業短期大学の荘司 顯 助教授、同 尾崎拓男 博士に感謝いたします。NMRの測定に加えペプチド研究の方法論に関して有益な助言をいただきました国立がんセンター研究所の斉藤 肇 博士、固体高分解能NMRの測定に便宜を計って下さいました(株)日本電子の出口健三氏、本学資源化学研究所の中村義之 博士、(株)クラレの 網屋繁俊 博士に感謝いたします。

本学高分子工学科に昨年まで在職され、試料の調製を含め研究全般にわたる御指導をいただきました群馬大学 甲本忠史 助教授、また磁気遮蔽定数の理論計算につき適切な助言をして下さいました東京工芸大学 山延 健 博士に感謝いたします。

最後になりましたが、本研究を進めるにあたり多大なご協力をいただきました安藤研究室の皆様にご心より感謝致します。

1989年(平成元年)
3月27日.

安藤 慎治