The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マジック角試料回転を利用した液晶二次元NMR法の開発と応用に関する研究
Author(s)	木村, 敦臣
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3110017
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

マジック角試料回転を利用した

液晶二次元NMR法の開発と応用に関する研究

1996年

木村　敦臣

①

マジック角試料回転を利用した
液晶二次元NMR法の開発と応用に関する研究

1996年

木村　敦臣

目　次

緒　論 …… 1

本　論 …… 4

第一章　^{23}Na-NMRによる天然イオノホアのリポソーム二分子膜を通した
　　イオン輸送能に関する研究 …… 4

第一節　序 …… 4

第二節　実験:　他核NMRによるNa^{+}の膜透過速度の測定 …… 6

第一項　二次元法を利用した速い膜透過速度の測定 …… 6

第二項　一次元スペクトルの時間変化を追跡した
　　遅い膜透過速度の測定 …… 6

第三節　結果と考察 …… 8

第一項　^{23}Na-NMRのEXSY二次元スペクトルの測定結果 …… 8

第二項　^{23}Na-NMRの一次元スペクトルの時間変化の解析による
　　遅い膜透過速度の測定結果 …… 9

第三項　膜透過速度の温度可変実験の結果 …… 10

第四項　Na^{+}の膜透過の熱力学的パラメータに関する考察 …… 12

第四節　第一章のまとめ …… 12

第二章　マジック角試料回転液晶二次元NMR法(MAS液晶二次元NMR法)の
　　開発とlasalocid Aの構造解析への応用 …… 13

第一節　序 …… 13

第二節　液晶NMR法へのMASの導入 …… 15

第一項　NMR測定のための溶媒としての液晶の特徴 …… 15

第二項　MASの原理 …… 17

第三節　MAS液晶二次元NMR法の開発 ・・・・・・・・・・・・ 20
第一項　二次元NMR法の特徴とCOSY/MAS及び
ROESY/MASパルス系列 ・・・・・・・・・・・・ 20
第二項　COSY/MAS及びROESY/MAS実験によるスペクトルの
帰属と構造情報の導出 ・・・・・・・・・・・・ 22
第四節　MAS液晶二次元NMR法の適用による液晶中に配向した
lasalocid Aの構造決定 ・・・・・・・・・・・・ 27
第一項　ディスタンスジオメトリー法の概要 ・・・・・・・・・・・・ 27
第二項　ディスタンスジオメトリー法によるlasalocid Aの
構造計算 ・・・・・・・・・・・・ 28
第五節　液晶中に配向したlasalocid Aの構造の考察 ・・・・・・・・・・・・ 32
第六節　第二章のまとめ ・・・・・・・・・・・・ 34

第三章　マジック角近くでの試料回転による新しい液晶二次元NMR法
(NMAS液晶二次元NMR法)の開発とenkephalinの構造と配向の
研究への応用 ・・・・・・・・・・・・ 35
第一節　序 ・・・・・・・・・・・・ 35
第二節　MAS液晶二次元NMR法による構造情報の導出 ・・・・・・・・・・・・ 37
第一項　MAS液晶二次元NMR法におけるパルス系列の考察 ・・・・・・・・・・・・ 37
第二項　ROESY/MAS及びNOESY/MASスペクトルの
測定結果 ・・・・・・・・・・・・ 40
第三節　NMAS液晶二次元NMR法による配向情報の導出 ・・・・・・・・・・・・ 42
第一項　COSY/NMASスペクトルの測定 ・・・・・・・・・・・・ 42
第二項　homo 2DJ/NMASスペクトルの測定 ・・・・・・・・・・・・ 44
第四節　enkephalinの液晶中における配向および構造 ・・・・・・・・・・・・ 47
第一項　直接結合定数を利用した配向および構造の計算の
基礎 ・・・・・・・・・・・・ 48
第二項　配向と構造の計算 ・・・・・・・・・・・・ 49
第三項　Met-enkephalin及びLeu-enkephalinの
配向と構造に関する考察 ・・・・・・・・・・・・ 54
第五節　第三章のまとめ ・・・・・・・・・・・・ 58
結論 ・・・・・・・・・・・・ 59
謝辞 ・・・・・・・・・・・・ 60
実験の部 ・・・・・・・・・・・・ 61
引用文献 ・・・・・・・・・・・・ 67

緒　論

生体膜を標的とする生理活性物質には、膜との非特異的な相互作用が活性発現に重要な鍵を握る場合がある。そのような物質として、イオンの膜透過に関与する天然イオノホアと総称される一群の抗生物質が挙げられる[1]。膜系において特定のゲストイオンのみを選択的に認識し、輸送するという機能を持つイオノホアは、ホスト-ゲストの化学において興味の対象とされているばかりでなく、医学、薬学あるいは生物学への応用が期待されている。イオノホアは膜と直接相互作用して、そのコンホメーションを変えることにより、あるいは独特の集合状態(超分子系)を構成することにより機能を発現することから、その機能と膜中の構造との相関、あるいはそれに与える膜物性の影響を探ることは非常に興味深い。

近年、ペプチド性のホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質の中にも、膜と強く相互作用して特定のコンホメーションをとる例が見出されている[2]。このような例としてenkephalinが挙げられる[3]。これらの生理活性ペプチドが受容体と結合し活性発現に至る過程として、現在２つのモデルが提唱されている。一方は三次元拡散的に直接受容体と結合するもの(one-stage capture)であり、他方は膜と相互作用して活性コンホメーションをとり、二次元拡散的に膜中から受容体との結合に至るもの(two-stage capture)である[4]。生理活性ペプチドが受容体と結合するまでに要する時間は、理論的にはtwo-stage captureモデルのほうが短いことが明らかとされており[5]、膜との相互作用が果たす役割について考える必要がある。さらに生理活性ペプチドが膜中でどんなコンホメーションをとっているかを知ることも重要な課題となっている。

NMR(Nuclear Magnetic Resonance)は半世紀前に発見された核の磁気モーメントの挙動を観察する方法であるが、最近では生化学の領域、あるいは医学の画像診断や画像機能学の分野で急速に発達し注目されている。このNMR法は、リポソームあるいはミセルなどの生体膜モデルと呼ばれる系を用いた研究にも有効に適用でき、上記のような生理活性物質の膜における機能の発現機構や膜中のコンホメーションを解明する上でも強力な手法として期待されている。

1982年に他核NMR法によって、リポソームの内側と外側のNa^+イオンをNMR信号として区別できることが報告されて以来[6]、膜系におけるイオン輸送機能についての議論へ向けてNMR法の発展が始まった。その結果、この方法により広範なイオンの膜透過を取り扱える可能性が示唆されたが、担体輸送機能を包括的に解明しようとする研究は、まだ

端緒についたばかりである。そこで、筆者はリポソーム系におけるNMRを用いたイオンの膜透過測定手法を包括的に検証し、確立することにより、担体輸送機能に関してエネルギー的側面から幅広く議論することを試みた。その結果、その機能の発現には膜物性が関与していることを明らかとすることができた(第一章)。

NMR法による構造解析は、当初は溶液を対象として発達したが最近では固体でも広く応用できるようになった。また、現在では膜のような非晶質媒体中の分子レベルでの構造を解明するためにも有効な手法となっている。NMRを用いた構造解析は主として溶液中の分子の立体構造を研究するために、二次元NMR法に代表されるような測定法の進歩などによって近年飛躍的な発展を遂げた。ごく最近になって、この手法は生理活性物質の膜中の構造を議論しようとする研究においても注目され、ミセルやリポソームなどの生体膜モデル系を用いた構造解析例がいくつか見られるようになった[7]。しかし、ミセルは曲率が非常に大きいため、膜という高度に構造化された環境における分子構造を議論するモデルとしては適さず、しかも、適用する分子の分子量が大きくなると、情報量の低下などにより構造決定が極端に困難になることが指摘されている[8]。その他、ミセルを用いた実験では配向に関する情報が乏しいことも問題点の一つとなっている。このため、ミセルの代わりにリポソームを用いた構造決定法の模索が行われているが、現在のところ一般的に適用できる有用な手法はなく、膜中の構造に関して知見を集積するには、基本的な測定法を開発することが、測定系の考察も含めて緊急の課題となっている。

このような背景のもと、膜中の分子の構造を議論するために溶媒として液晶を用いる液晶NMR法が近年注目されている[8]。液晶は一定の方向に配向するためミセルのように曲率が問題となることはなく、また液晶中の分子の配向に関する情報もNMR法により豊富に得られ、かつ液晶中の構造は膜のような配向場が関与する効果について重要な知見を与える。液晶のNMRスペクトルには、溶液あるいはミセルにおけるスペクトルには見られない双極子-双極子相互作用にもとづく直接結合による分裂が現れる。この直接結合定数の実験的測定による構造の決定は、正確さにおいて電子線あるいはX線などの回折法に匹敵することが分かっているが、これらを含めた種々の分光法により求められた構造が互いに著しく異なる結果を与える場合がある。例えば、ビフェニル系化合物である2,2'-bipyrimidineの2つの芳香環がなす二面角について結晶データでは完全な平面を示すのに対し、液晶中では折れ曲がっておりその構造は量子化学計算と良く一致する[9]。2つの環は立体効果により同一平面とはなり難いと考えられ、液晶膜中の構造の重要性が認識される。しかし、直接結合を含む液晶のNMRスペクトルを一般的に幅広く適用するためには、従来の液晶NMR法の抜本的な改良が必要であり、これまでのところ、その適用範囲

は通常9スピン程度の小分子に限られていた[10]。そこで、筆者は上述の生理活性物質の液晶中の構造と配向を決定するため、液晶NMR法の改良を行うこととした。

液晶NMR法の適用性を高めるためには直接結合を含むスペクトルを簡略化する必要がある。一方、固体NMR法においてそのスペクトルを簡略化するために、近年マジック角試料回転(Magic-Angle-Spinning: MAS)法が開発された[11]。筆者はこのMAS法を液晶NMR法に応用し、二次元NMR法を導入したMAS液晶二次元NMR法を開発し構造解析への応用を試みた。その結果、上述のイオノホアであるlasalocid Aの液晶中の構造を決定し、その構造には配向場の変化に感応してヒンジとなる結合が存在することを明らかとすることができた(第二章)。

MAS法を導入した上述の方法は、配向に関する情報を消去してしまうので、この情報を復活させるべく、MAS法をヒントとしてマジック角近くでの試料回転(Near-Magic-Angle-Spinning: NMAS)を利用することとした。こうして、NMAS液晶二次元NMR法を新しく開発し、液晶NMR法の適用範囲を限定している直接結合情報を選択的かつ積極的に利用することを可能とした。その結果、生理活性ペプチドであるMet-enkephalin及びLeu-enkephalinの液晶中における構造と配向を決定することができ、両者の差異を明らかとすることができた(第三章)[12]。

本　論

第　一　章

^{23}Na-NMRによる天然イオノホアのリポソーム二分子膜を通したイオン輸送能に関する研究

第一節　序

天然イオノホアと呼ばれる一群の抗生物質は、イオンの選択的な生体膜輸送を仲介する生体機能分子であり、その機能により活性発現に至る。これらのイオン担体物質はその膜透過機構の面から、移動担体(キャリヤー)として働くキャリヤー型とチャンネルを形成するチャンネル型とに分類される[1]。キャリヤー型ではイオンと結合した分子が移動担体として膜中に溶解し、拡散することによりイオンの輸送が行われ、チャンネル型では膜中で分子が凝集し筒状構造を形成し、イオンはこの筒の内部の親水性部分を通過する。これらの担体輸送機能を解明することは、単にそれら薬物の作用機序を明らかにするだけでなく、複雑な生体内の物質輸送機能に対し有用な示唆を与えるものと考えられ、これまで液膜や黒膜、あるいはリポソーム二分子膜を用いて担体が促進するイオンの膜透過速度を測定し、その機能を考察する研究が盛んに行われてきた[13]。しかし、その熱力学的側面の考察や膜流動性といった膜物性の関与などを包括的に取り扱った研究は、その実験的方法の困難さから殆どされていないのが実情である。

一方、NMR法をmonensin(Fig.1)によるNa+イオンのリポソーム膜輸送速度に関する研究に応用することにより、この方法が従来の手法では測定不可能であるような速い膜透過速度をも求めることを可能とすることが1985年にRiddellらにより報告された[14]。より詳細な担体輸送機能についての議論へ向けて、その後もこの手法は改良され続け数多くの方法が発表されているが[15]、ここでこれまでの知見をまとめ総合的に取り扱う必要があると思われる。そこで、筆者はリポソーム系におけるNMR を用いたイオンの膜透過測定手法を包括的に検証し確立することにより、担体輸送機能に関してエネルギー的側面から詳細に議論することを試みることとした。本研究の対象としたイオノホアはキャリヤー型に分類されるmonensin及びlasalocid Aとチャンネル型に分類されるgramicidin A、amphotericin B及びnystatinである(Fig.1)。

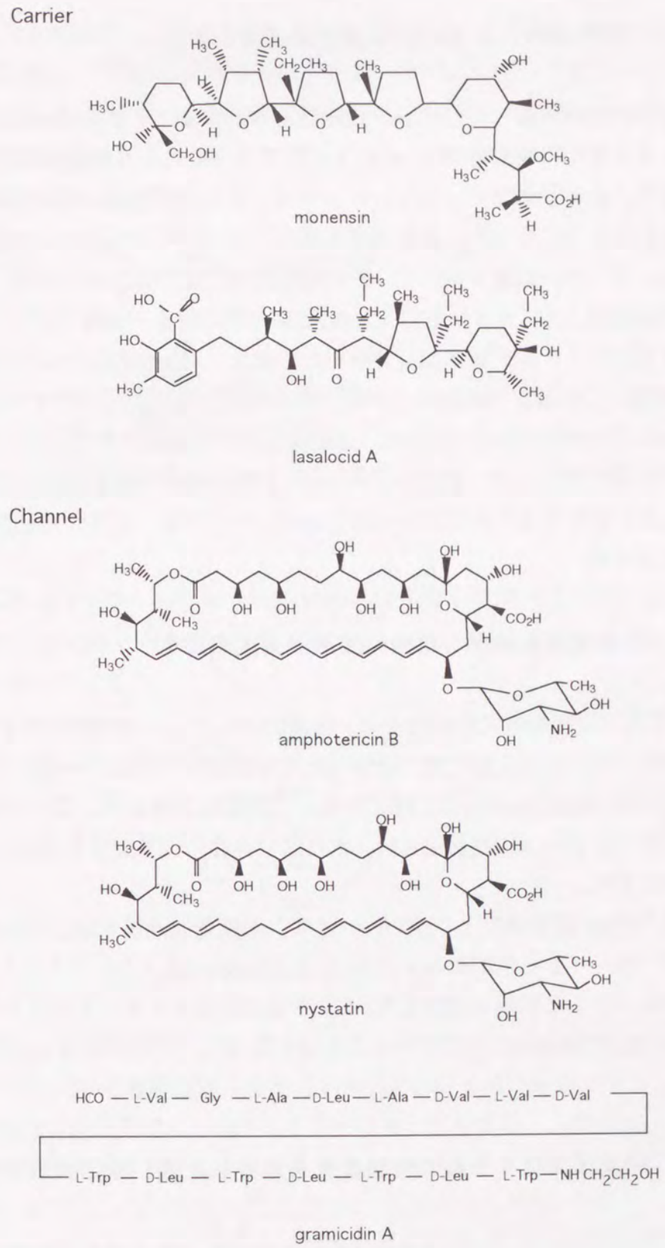


Fig.1. Chemical structures of ionophores promoting transmembrane permeability of Na^+ ions.

第二節　実験：他核NMRによるNa^+の膜透過速度の測定

ランタニドシフト試薬によってリポソーム内側と外側のNa^+イオンのNMR信号を分離できることが１９８２年に報告され[6]、それを利用することにより他核NMR法 は非常に有用な手法として、近年リポソーム系における金属イオンの膜透過に関する研究において重要な地位を占めるようになった。本研究でも他核NMR を用いたイオンの膜透過速度測定にこのランタニドシフト試薬を使用し、その適用性を評価することとした。

膜透過速度の測定は、Na^+イオンを封入したREVと呼ばれる一枚膜リポソームを作製し、このサンプルにイオノホアを添加して行った。また、用いたランタニドシフト試薬は$Dy(PPP)_2^{7-}$である。このシフト試薬はリポソームの内側と外側のNa^+イオンの信号を大きくシフトさせることが報告されており[6]、本研究において適用することとした。

種々のイオノホアによるNa^+イオンのリポソーム膜輸送速度は広範囲に及ぶので、そのような膜輸送速度を測定するためには特別の工夫が必要である。以下、その測定手法の原理および特徴を述べる。

第一項　二次元法を利用した速い膜透過速度の測定

NMR を用いて化学交換を研究する際には、古典的手法として線型解析あるいは磁化移動法などが一般的に用いられてきたが、近年二次元NMR法の発達に伴い2D-EXSY (2D Exchange NMR Spectroscopy)と呼ばれる手法が提唱された[16]。この方法は他と比べ、交換過程がスペクトル上に視覚化され、また広い範囲の交換速度を求めることができるなどの利点を有する。

2D-EXSYは、^{23}Naの緩和速度より速いNa^+イオンの膜透過速度を求めることができる。本研究では、キャリヤー型であるmonensin及びlasalocid Aと、チャンネル型に分類されるgramicidin Aによる膜輸送速度を2D-EXSYにより決定することができた。2D-EXSYの測定および解析はNOESYパルス系列を使用し、その詳細はAbelらの方法に従い行った[17]。

第二項　一次元スペクトルの時間変化を追跡した遅い膜透過速度の測定

一方、2D EXSYはNa^+イオンの膜透過速度が^{23}Naの緩和速度よりも遅い場合には適用することはできない。本研究では、amphotericin B及びnystatinによる膜輸送速度を

2D EXSYにより求めることは不可能であった。そこで、このような場合の測定法として一次反応速度論による解析法に関する検討を行った[18]。即ち、リポソーム内側のNa^+イオンの濃度($[Na^+]_{in}$)がリポソーム外側の濃度($[Na^+]_{out}$)よりも大過剰の条件下で、(1)および(2)式を仮定した。

$$Na^+_{in} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Na^+_{out} \qquad (1)$$

$$\frac{d[Na^+]_{out}}{dt} = k_1[Na^+]_{in} - k_2[Na^+]_{out}$$
$$V_{in}[Na^+]_{in} + V_{out}[Na^+]_{out} = C(\text{const.}) \qquad (2)$$

ここで、Cは定数であり、リポソーム内側および外側の容積(それぞれV_{in}及びV_{out})は、光散乱光度測定から得たリポソームの粒子径(200nm)より評価した。以上の式を解くことにより(3)式を得た。

$$[Na^+]_{in} = \frac{C/V_{in} + b(1 - e^{at})/a}{e^{at}} \qquad (3)$$

$$a = k_1 + \frac{V_{in}}{V_{out}} k_2$$

$$b = -\frac{k_2}{V_{out}} C$$

この(3)式により^{23}Naの緩和速度よりも遅い場合のNa^+イオンのリポソーム膜透過速度を解析した。膜透過速度測定は、Na^+イオンを封入したリポソーム溶液を、大過剰のKClイ溶液に対して透析することにより、リポソーム外側のNa^+イオンのみをK^+イオンと置換し、このサンプルにamphotericin B及びnystatinを添加して行った。

第三節　結果と考察

第一項　^{23}Na-NMRのEXSY二次元スペクトルの測定結果

monensinによるNa+イオンのリポソーム膜輸送速度を、25℃において^{23}Na-NMRを用いて2D-EXSYにより測定した結果をFig.2のスペクトルに示す。

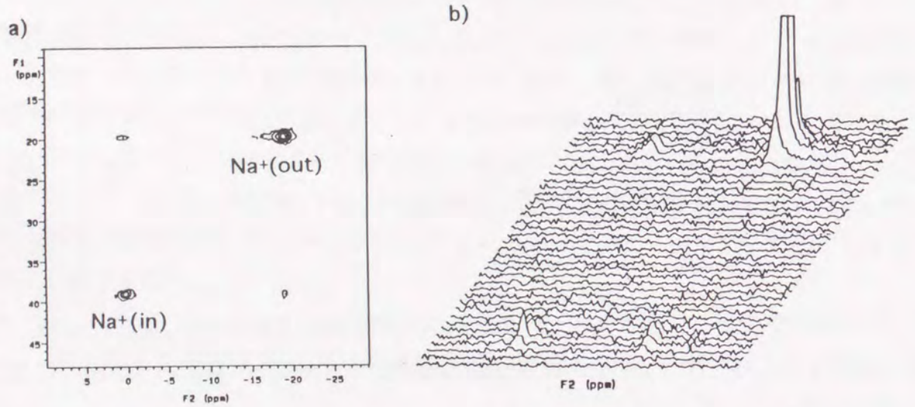


Fig.2. ^{23}Na 2D-EXSY spectra of sodium ions inside and outside liposome in the presence of monensin(pH 8.1): a) contour plot, b) stack plot. The internal and external cation resonances have been resolved using the $Dy(PPP)_2^{7-}$ shift reagent. The final concentrations were: egg lecithin, 27mM; NaCl, 100mM; $Dy(PPP)_2^{7-}$, 3.6mM; and monensin, 0.2mM.

Fig.2より、リポソームの内側と外側のNa+イオンの信号がシフト試薬により分離され、輸送された^{23}Naの磁化がそれぞれの信号の間の交叉ピーク(クロスピーク)として明瞭に観測されることが分かる。これらの対角ピークおよびクロスピークの強度は交換速度と定量的に関係付けられることが知られているので[17]、これに従いFig.2のスペクトルを解析することにより、monensinにより促進されたNa+イオンの輸送速度を求めることができた。この場合、リポソーム内側から外側への輸送速度は16.0±2.3(s^{-1})であった。また、この手法では^{23}Naのスピン-格子緩和速度($1/T_1$)の1/10程度から、およそリポソーム内側と外側のNa+イオンの化学シフトの差までの膜透過速度を評価できる。今回の系ではスピン-格子緩和速度は21s^{-1}であり、また化学シフトの差は1000s^{-1}であったので、2D-EXSYにより1～10^3(s^{-1})程度の膜透過速度を測定することが可能であると考えられる。

第二項　^{23}Na-NMRの一次元スペクトルの時間変化の解析による遅い膜透過速度の測定結果

リポソーム溶液にnystatinを添加した後、時間経過毎に^{23}Na-NMRを測定し、その信号強度の変化からNa+イオンのリポソーム内側からの流出の追跡を行った結果をFig.3に示す。

Fig.3に示したリポソーム内側のNa+イオンの濃度の経時変化について(3)式を用いて非線形最小自乗解析を行った結果、Fig.4に示すように精度良く膜透過速度を求めることができた。

この方法により求められる膜透過速度の測定可能範囲は、下限に関してはイオノホアの存在しないときの自然流出速度であると考えられるが、本研究ではその速度は7.0(±0.7)×10^{-4}(s^{-1})であった。また上限はFig.4に示した速度の10倍程度、即ち～1s^{-1}であった。したがって、本手法と2D EXSYとを組み合わせることにより10^{-4}～$10^3$$s^{-1}$と非常に広範囲の膜透過速度を求めることが可能であった。

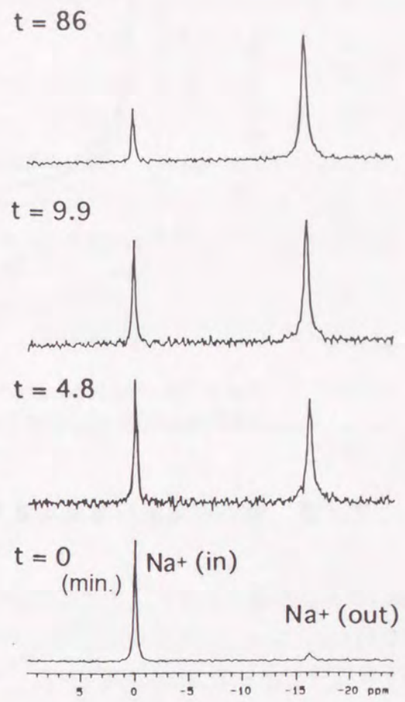


Fig. 3. ^{23}Na-NMR spectra at the same conditions as in Fig. 2 except that the transport of Na^+ ions were pomoted by nystatin. The times recorded are also shown.

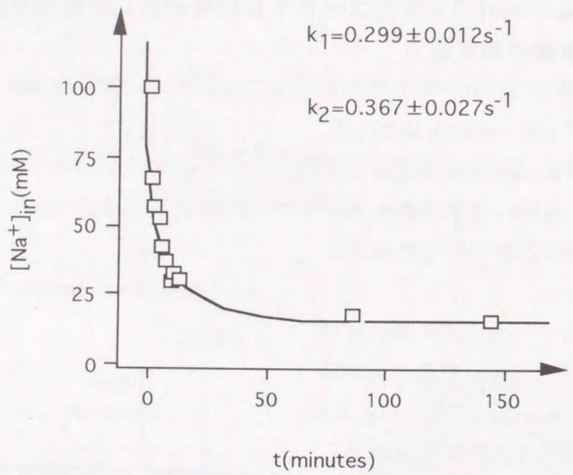


Fig. 4. The time dependence of the concentration of Na^+ inside liposome obtained from Fig.3.

第三項　膜透過速度の温度可変実験の結果

Fig.1に示した種々のイオノホアについて、Na+イオンのリポソーム膜輸送の温度可変実験を行い、Table 1に示す活性化パラメータを得ることができた。ここで用いた基本式は以下の通りである(Eyringの式)[15b]。

$$\ln\frac{k}{T} = -\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT} + \ln\left(\frac{k}{h}\right) = -\frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT} + \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} + \ln\left(\frac{k}{h}\right) \qquad (4)$$

ここで、kはNa+イオンの膜透過速度でありTは絶対温度を表す。また、Rは気体定数であり、k及びhはそれぞれボルツマン定数およびプランク定数である。この式から、ln(k/T)を1/Tに対してプロットし(Fig.5)、その直線の傾きと切片から$\Delta H^{\ddagger}$及び$\Delta S^{\ddagger}$を求めることができる。

Table 1 Thermodynamic properties of Na^+ ion transport across the liposome bimolecular membrane promoted by several ionophores

Promotor	$\Delta H^{\ddagger}$/kJ mol^{-1}	$T\Delta S^{\ddagger}$/kJ mol^{-1} *	$\Delta G^{\ddagger}$/kJ mol^{-1}
Carrier type			
monensin	40±9	-25±9	66±13
lasalocid A	33±5	-41±4	74±6
Channel type			
gramicidin A	28±4	-39±4	67±6
nystatin	-98±3	-185±27	87±6
amphotericin B	-94±15	-183±15	89±21
(+benzyl alc.)	33±8	-61±8	94±11

* 298.15K

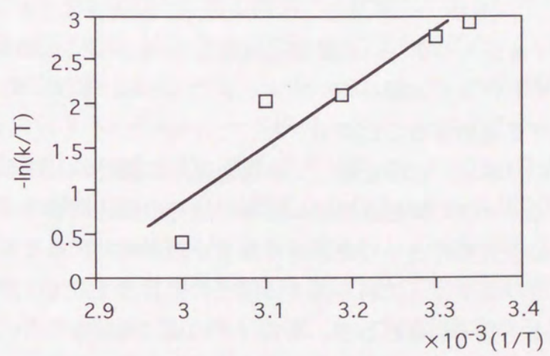


Fig. 5. Eyring plot showing the temperature dependence of the Na^+ transmembrane excange rate constants promoted by monensin.

第四項　Na+の膜透過の熱力学的パラメータに関する考察

Table 1においてキャリヤー型であるmonensin及びlasalocid Aでは膜透過の活性化エンタルピーは正の値を示しているが、これは温度の上昇に伴い分子運動が激しくなり膜中の拡散速度が速くなったことに起因すると考えられる。これに対し、チャンネルを形成するポリエン系のイオノホアであるamphotericin B及びnystatinでは、透過の活性化エンタルピーは負の値を示しており、温度の上昇とともに透過速度が抑制されることが明らかとなった。これは温度が上がり、コレステロールを含むチャンネル周囲の膜構成分子が熱運動により摂動され、チャンネルが撹乱されたことに起因するものと思われる。しかし、これらポリエン系抗生物質と同様にチャンネル型に分類されるgramicidin Aでは、透過のエンタルピーは正となり、この分子がそれ自身で強い自己会合体を形成しチャンネルが膜流動性の影響を受けないことが示唆された。そこで、膜流動性を高める効果を持つ麻酔剤であるbenzyl alcoholを、amphotericin Bの共存するリポソーム系に添加したところ、活性化エンタルピーは再び正となった。これはbenzyl alcoholの添加により、温度上昇の効果と同様、膜流動性が高まりamphotericin Bのチャンネル形成能が阻害されたことによるものと考えられる。

第四節　第一章のまとめ

イオノホアによるNa+イオンのリポソーム膜輸送速度を^{23}Na-NMR法を用いて広範囲で求める手法を確立した。それにより、種々のイオノホアによるNa+イオンのリポソーム膜輸送の熱力学的パラメータを導出することができた。

前節までのNa+イオンのリポソーム膜を通しての透過速度の測定およびその熱力学的考察から、イオノホアによるイオンの膜輸送機能の発現にはその輸送機構のタイプや膜との相互作用の強度、あるいは膜流動性といった膜物性などが総合的に関与していることが示された。膜中に溶けたイオノホアは、これら種々の因子の影響を受けて、そのコンホメーションを変えていることも当然予想されるが、筆者はその点に興味を持ち、以下の章に述べるように構造解析の研究に発展させることとした。

第　二　章

マジック角試料回転液晶二次元NMR法(MAS液晶二次元NMR法)の開発と lasalocid Aの構造解析への応用

第一節　序

前章において筆者は、イオノホアによるNa+イオンの膜輸送機能についてリポソームを用いてエネルギー的側面からアプローチを試み、その機能の発現には膜との相互作用の強度あるいは膜流動性といった膜物性など、膜が影響を及ぼしていることを明らかとしたが、このような膜環境下での構造を解析し機能との相関を探ることは非常に興味深い問題である。生体膜の基本構造は両親媒性分子である脂質分子が集合して形成されていると考えられるが、そのような高度に構造化された非晶質媒体中の分子レベルでの構造を解明するにはNMR法が有効な手法となり得る。但し、既存のNMR法では、膜中の構造解析を有効に行うことは困難が多いので、最新の技術を取り入れた新しい測定法と解析法を検討することとした。

NMRは主として溶液中の分子の立体構造を研究するための手法として、分光計の感度の向上、コンピュータおよびその周辺機器の高性能化、あるいは二次元NMR法に代表される測定法の進化などによって、近年飛躍的な発展を遂げた。二次元NMRを用いた構造解析法の中で、著名な例としてNOESY-distance geometry法が挙げられ、この方法により、現在分子量約30000程度の分子の構造決定が可能である[19]。この方法は非晶質媒体中の分子の構造を議論するために、ミセルやリポソームといった生体膜モデルと呼ばれる系にも直ちに応用され、２９アミノ酸残基からなる分子量３５００のホルモンであるglucagonの全重水素化リン脂質ミセル中の構造が１９８３年Wüthrichらによって決定された[20]。ミセルは粒子径が小さくその運動の異方性はNMR的には平均化されてみえなくなるため、ミセルに溶解した分子の信号がシャープに観測されるという利点を持つ。そのため現在、ミセル系はNMRを用いた構造研究において新分野として興味が持たれている。

しかし、ミセルはその粒子径が小さいため曲率が非常に大きくなり、膜という高度に構造化された環境における分子構造を議論するには適さず、しかも適用する分子の分子量が大きくなると分子/ミセルのサイズ比の増加に伴い、その構造決定が極端に困難になると

指摘されている[8]。そこで、ミセルに代わりリポソームを用いた構造決定法の模索が1980年代に行われ、NOESYを改良したTransferred NOE(TRNOE)法が開発されたが、この方法は本質的に膜中の分子の信号を観測するものではなく、また粒子径の大きいリポソームの運動の異方性による信号の広幅化をさけることは困難であるため一般的手法とはなっていない[21]。

一方、これらに代わる系として溶媒として液晶を用いる液晶NMR法が近年注目されている[8]。液晶は外部静磁場中に置かれると磁場に対して一定の方向に配向するためミセルのように曲率が問題となることはなく、また液晶中の分子の構造は生体膜のような配向場が関与する効果について重要な知見を与えるものと考えられる。そこで、前章においてその機能の発現に膜環境の効果の寄与が示唆されたイオノホアの中からlasalocid Aを選び、液晶中における構造解析を試みることとした。

lasalocid A(Fig.6)はポリエーテル系抗生物質であり、天然イオノホアの中でも最も有名なものの一つである。1970年代にlasalocid Aに関して精力的に研究が行われた結果、特定のイオンのみの選択的な生体膜輸送を仲介するという興味ある機能を持つことが明らかとされたが[22]、それに加え近年、不斉なコバルト錯体に対し不斉認識機能を持つ事が報告され、このものが持つ多様な機能と構造との相関を明らかにし、それを模倣しようとする動きが現在高まっている[23]。ところが、lasalocid AはK^+、Na^+或いはCa^{2+}などの多彩なホストイオンを包接できることから柔軟な構造をとり得ると考えられ[13c), 24]、事実これまで精力的に結晶構造解析が行われた結果、その構造は包接する金属イオンの種類、あるいは結晶化溶媒などの結晶化条件により多様性を示すことが報告されている[25]。但し、その結晶の多くにおいて包接錯体は二量体を形成しているが、生体膜中においてはイオン輸送速度の化学量論から単量体であると考えられており[26]、lasalocid Aの液晶中の構造研究はその機能について多くの知見を与えるものと期待される。

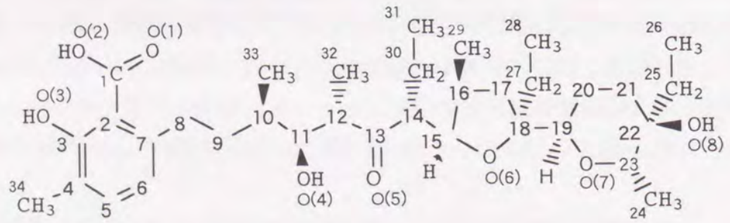


Fig. 6. The chemical structure of Lasalocid A

第二節　液晶NMR法へのMASの導入

第一項　NMR測定のための溶媒としての液晶の特徴

液晶とは分子の重心の位置に関する長距離的な秩序は失われているが、分子の配向に関する長距離的な秩序は保たれているような、固体と液体の中間的な性質を持った状態のことをいい、中間相(mesophase)とも呼ばれる。液晶には加熱融解することにより生ずるサーモトロピック液晶と、溶媒と共存することにより生ずるリオトロピック液晶とがあり、またその相状態は配向の度合いや方向によってネマティック相、スメクティック相あるいはコレステリック相などに分けられる(Fig.7)。この中で特に、リオトロピックネマティック液晶はその配向状態が生体膜に類似していると考えられており[27]、この媒質が分子構造に与える効果について議論することは興味深い。

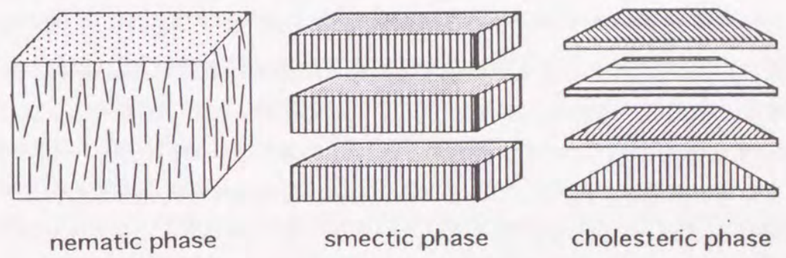


Fig.7. Schematic drawings of the various phases of liquid crystal.

液晶は外部静磁場中に置かれると磁場に対して一定の方向に配向するため、液晶に溶解した分子の運動は異方的になり、その結果液晶NMRのスペクトルには、空間を介した直接的な磁気双極子-双極子相互作用に由来する直接結合による分裂が観測される。直接結合は、等方溶液中では非常に早い分子運動によりゼロに平均化され観測されないため、液晶試料のNMR スペクトルには有用な情報が含まれているといえるが、そのためスペクトルパターンは通常、非常に複雑なものとなる。p-chlorobenzaldehydeの液晶NMRスペクトル(Fig.8)を一例として示したが、このように対称性が良く小さいスピン系でも複雑なスペクトルを示すため、液晶NMR法の適用範囲とされるスピン系は通常9スピン程度と小分子に限られてきた[10]。したがって、本研究で構造解析の対象としたlasalocid Aは50

スピン系であるので通常の液晶NMR法では解析を行うことは不可能である。

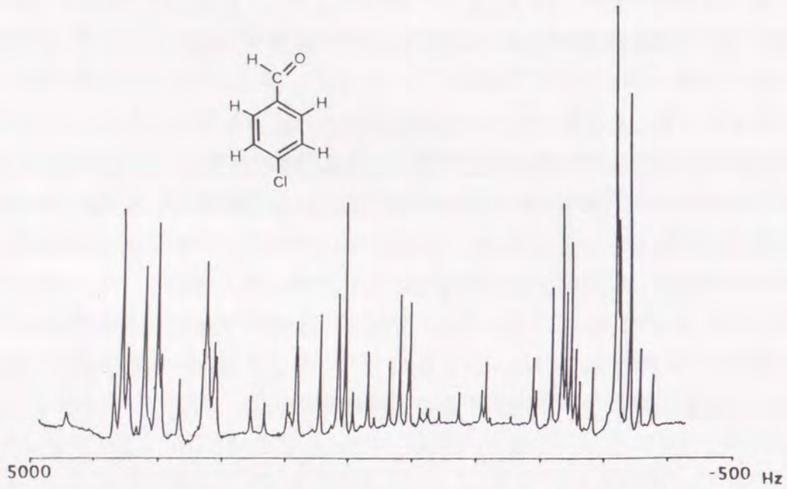


Fig. 8. NMR spectrum of p-chlorobenzaldehyde dissolved in the ZLI1167 liquid crystal.

一方、液晶のNMRスペクトルを簡略化するため、固体や粉末試料のNMRにおいて異方性を消去するため開発され発展してきたマジック角試料回転(MAS)法を導入しようとする試みが1981年にGrantらによって報告された[28]。この報告は、単純な分子を用いたテストケースとして、液晶中に配向したtrifluorobromoethyleneの^{19}F-NMRスペクトルがMAS法を併用することにより簡略化されることを示した。その後、このMAS法の導入の試みが1980年代前半から散見されるようになった[29]。また、構造解析を目的としたものではないが、リポソーム系においてもMAS法の導入が1985年にOldfieldらによって報告された[30]。これらの研究ではスペクトルの簡略化という点ではまずまずの成果を報告しているものの、基本的な分解能の不足といった問題点が見られる。このため、これまでのMAS法導入の試みは精密な構造解析への応用に耐えるものではなく、従来の液晶NMR法の範疇を越える研究は未だ報告されていない。

そこで、筆者はMAS法を液晶NMR法に導入し、構造および配向を研究する新しい方法論を開発することを目的とし、最新の二次元NMR法の応用などによりスペクトルの分解能の低下を補いつつスペクトルの簡略化を検討することとし、以下の研究を行った。その結果、液晶中のlasalocid Aの構造解析を首尾良く実行することができた。

以下、筆者が本研究において開発を目的としたマジック角試料回転(MAS)液晶二次元NMR法の原理と結果を述べる。

第二項　MASの原理

NMRスペクトルを解析するためには、核スピンのスピン状態とエネルギー状態のみが考慮の対象となる。核スピンはいくつかの型の相互作用を受けているが、このようなエネルギー状態はエネルギーに相当する量子力学的演算子であるハミルトニアンにより記述することができる。液晶の様な配向層や固体の様な粉末試料において、^{1}H核のようなスピン量子数I=1/2のスピン集団を記述するハミルトニアンは(5)式で表される[30]。

$$H = H_{ZI} + H_{D} \qquad (5)$$

H_{ZI} ; zeeman interaction term

H_{D} ; dipole-dipole interaction term

試料を静磁場からある角度βだけ傾けて高速で回転させた場合、双極子相互作用はハミルトニアンとして平均化され寄与がなくなり、結果として(5)式の双極子-双極子相互作用項H_{D}が$(3\cos^2\beta-1)/2$のスケーリング因子がかかった形で残ることになる。マジック角とは、このスケーリング因子をゼロにする角度β=54.7° のことであり、したがって測定試料を外部磁場の方向に対してマジック角をなす軸の回りに高速回転させることにより、双極子-双極子相互作用はスペクトルから消失する(Fig.9)[11]。

粉末試料とは異なり液晶の様な配向層には配向軸が存在するが、液晶試料を静磁場に対しβの角だけ傾けて回転させると液晶の配向軸は回転軸の方向に向き、この場合も上記の双極子-双極子相互作用項H_{D}には$(3\cos^2\beta-1)/2$だけ係数が掛かることとなる[29]。したがって、液晶試料の場合も試料回転軸の傾斜角をマジック角とすると双極子-双極子相互作用は消失させることができる。また第三章で述べるように、液晶の配向軸が試料回転軸の方向に配列することを利用し、試料回転軸をマジック角から適度にずらすことにより、双極子-双極子相互作用の大きさを任意の大きさに調節してNMR測定を行うことができると期待される。

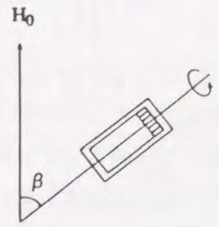


Fig. 9. Schematic drawing of magic-angle-spinning(MAS).

第三項　MAS液晶一次元NMR測定

液晶NMRにおける液晶自身の信号は、それが多スピンを含むことと配向性が一般に溶質分子よりも高いために、非常に多数のピークに分裂し、結果的に非常にブロードなバックグランドとなり、ピークとして観測されないのが普通である[27]。これは溶質ピークの確認を容易とし、液晶NMR法のメリットであるが、MASを液晶試料に適用した場合、液晶自身のスピン間の双極子-双極子相互作用も抑えられるため、ブロードで殆ど観察できなかったピークがシャープな信号として復活する。これは本研究の目的には望ましくないため種々検討を行い、その結果CsPFO(Cesium PerFluoroOctanoate)とD_2Oを40:60の重量比で混合した液晶相を用いることとした[31]。CsPFO液晶はフッ素化界面活性剤を主成分としており、他のリオトロピック液晶がヘキサゴナル相が多いのとは異なり、ディスク様ネマティック相を形成するため配向状態が生体膜と類似しているとみなせる。また、中性付近(約pH 7)でこの液晶相を形成することも生体膜モデルとして好都合である。この液晶は温度を上げると液晶相からミセル相に変化することも分かっている。加えて、プロトンを含まないためスペクトルに液晶溶媒自身の信号が現れない利点を有し、本研究の目的に適した系である[32]。

CsPFO液晶に溶解したlasalocid Aの配向試料について、測定温度35℃(液晶相)において通常条件およびMAS条件下で一次元^{1}H-NMR測定を行った結果をFig.10に示す。同様の試料について測定温度を上げ、50℃(ミセル相)とした時のスペクトルも併せて示した。CsPFO液晶はその組成にCs^+を含むため溶質であるlasalocid AをCs塩に変換し用いた。

第四項　MAS液晶NMR法の一次元スペクトルにおける検討

Fig.10から分かるように通常条件の測定ではスペクトルは広幅化し、溶質の信号を明瞭に観測することは困難である。溶媒が液晶相を形成している35℃の場合、そのような配向層中では溶質分子は特有の異方的分子運動を行っているため、この異方性にもとづく無数の双極子－双極子相互作用によって溶質の信号がバックグラウンドとなっている。この液晶相のスペクトルはMAS条件下での測定では、試料回転速度を300Hz程度とした時点でスペクトルの広幅化を抑える事ができ、さらに試料回転速度を上げ2.0kHzとした時ミセル相とほぼ同程度の高分解能スペクトルを得ることができた。したがって液晶試料の場合、数百Hz程度の試料回転速度で試料の異方性に起因する双極子-双極子相互作用をほぼ消失させることができると分かった。

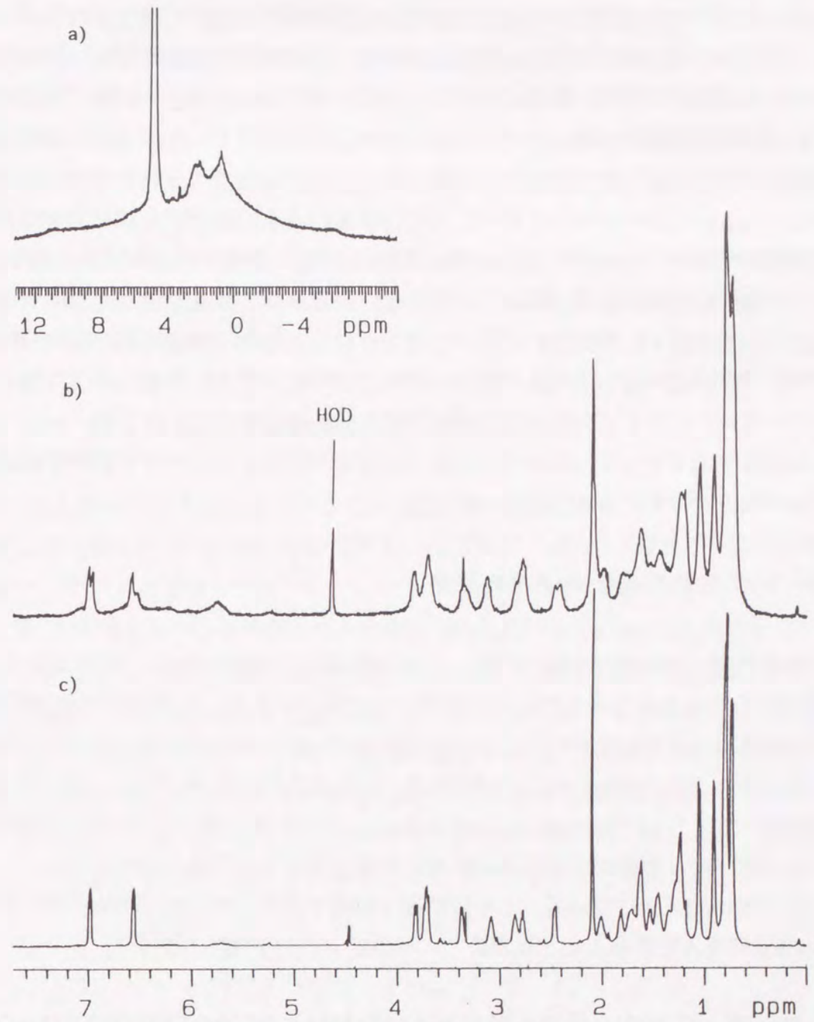


Fig. 10. One-dimensional NMR spectra(500MHz) of lasalocid A-Cs salt dissolved in the CsPFO/D_2O(40:60 w.t.%) liquid crystal.

a) ^{1}H-NMR spectrum at the conventional condition(35℃) with the nematic sample
b) 〃 the MAS condition(35℃) with the nematic sample
c) 〃 the conventional condition(50℃) with the isotropic micellar sample

一般に固体のMAS-NMR測定では、スペクトルの異方性を除き信号を先鋭化させるために、試料をマジック角において8-10kHz程度で高速回転させなければならないが、固体と異なり液晶系では双極子－双極子相互作用は同一分子内でのみ観測され、分子間ではランダムな運動により平均化されて消失する。また、分子内の双極子－双極子相互作用も分子の速い側方拡散運動の影響を受けて固体に比べて縮小されている。これらの理由により300Hz程度の試料回転速度で異方性を消失させることが可能であったと考えられる。

しかし、Fig.10のスペクトルにおいて信号の線幅が若干広幅化しており、また芳香族プロトンの共鳴領域(6～7ppm)にミセル相では観測されない信号の分裂が認められる。この分裂はミセルの様な等方相では観測されていないことから、双極子相互作用にもとづく分裂が完全には消失せずに観測されたものと考えられる。これは測定の際、試料回転軸が完全にはマジック角と一致しておらず若干ずれたことに起因すると思われる。このことは逆に、マジック角から少しずれた角度で試料回転を行い測定することにより、lasalocid Aのように複雑な分子であっても双極子－双極子相互作用のネットワークを簡略化させ、直接結合定数の観測が可能であることを示唆する。

第三節　MAS液晶二次元NMR法の開発

前章ではマジック角試料回転を応用したMAS液晶NMR法について、基本となる一次元NMR実験からの検討を行ったが、その結果、この手法によりこれまでの液晶NMR法では適用不可能であるとされてきた50スピンを持つlasalocid Aのような大きな分子でも、良好な分解能のスペクトルを得ることができた。このようなMASのメリットは、本章第二節冒頭で述べたようにtrifluorobromoethyleneという単純な分子についての実験から示唆されていたが[28]、複雑な分子の構造解析に実際に応用した例は見当たらない。

そこで、lasalocid Aについて、さらに精密な情報を得るためにMAS液晶NMR法への二次元NMR法の導入を計ることとした。

第一項　二次元NMR法の特徴とCOSY/MAS及びROESY/MASパルス系列

二次元NMR法は大別して３つのカテゴリーに分類される。第１は分解型二次元NMR法、第２は相関型二次元NMR法であり、第３は多量子型二次元NMR法である。今回導入を検討した二次元NMR法は、^{1}H-^{1}H COSY実験およびROESYと呼ばれるNOESYから派生した実験であり、相関型二次元NMR法に区分されるものである。ここで、

^{1}H-^{1}H COSYは間接結合定数Jにもとづく、結合を介した磁化移動による核間のつながりを得るための手法であり、多くの場合この実験のみでピークの帰属を行うことができる。

NOESYは核間の空間的な近接情報を得るための代表的な実験である。NOESYスペクトルにおけるクロスピークは、核スピン間で起こった交差緩和(NOE)の程度を表し核間距離と関係付けられるため、NOESYはタンパク質などの生体高分子の立体構造解析に不可欠で重要な方法となっている[33]。しかし、このNOESY実験は次のような特性があり、適用することが難しい系も見られる。

1）200～500MHzの測定条件下では、相関時間τ_cが10^{-9}(s/rad)程度の分子運動を示す分子についてNOEがゼロに近くなるために、NOESYスペクトルにおいてクロスピークが観測されない。

2）液晶のように通常、T_2(スピン-スピン緩和時間)<<T_1(スピン-格子緩和時間)が成立する系では、スピン拡散由来の相関が現れ易い。

筆者が本研究で取り上げたlasalocid Aのようなキャリヤー型イオノホアに対して、NOESYでは相関を得ることが殆どできないという報告がある[34]。これはキャリヤー型イオノホアの分子量程度の大きさの分子の運動の相関時間τ_cが10^{-9}(s/rad)程度であることに起因する。この欠点を補う実験として、ROESYと呼ばれる実験が近年開発された[35]。ここで、ROESY及びNOESY実験において用いられる典型的なパルス系列をFig.11に示す。Fig.11に示したパルス系列の混合時間t_mにおいて、ROESYは回転座標系にスピンロックした磁化の間に交差緩和を観測するという点でNOESYとは明確に異なる。得られる2Dスペクトル上のクロスピークは、回転座標系における交差緩和(ROE)と呼ばれ、このROEはNOEとは異なりどのような相関時間に対しても常に観測されるという利点を持つ。したがって液晶あるいはミセルやリポソームなどのように、多くの場合溶質のT_2が短くなる生体膜モデル系に対して、非常に有用な手法であると考えられる。

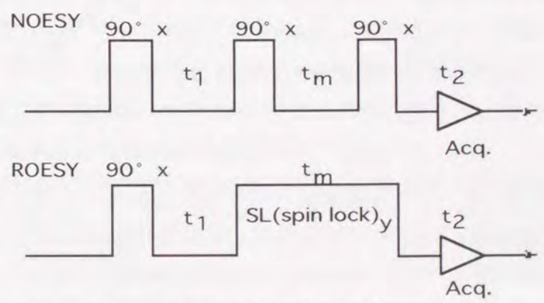


Fig. 11. Pulse sequences of NOESY and ROESY.

しかし、ROESYはNOESYに比べて実験条件の設定が難しく、またROEはNOEよりも相関が現れる距離が若干短くなる、といった難点を有するため現在まで生体膜モデル系のみならず溶液においても、構造研究に適用された例は非常に少ない[36]。この^{1}H-^{1}H COSY及びROESYは構造解析を行う上で最も基本となる実験と考えられるため、MAS液晶NMR法へ導入することができれば非常に有効である。そこで、これら二次元NMR法のMAS液晶NMR法への導入について検討を行うこととした。

lasalocid AのCs塩の液晶試料について、本章第一節で述べたMAS一次元NMR測定と同様の測定条件で^{1}H-^{1}H COSY(COSY/MAS)、及びROESY(ROESY/MAS)実験を行った結果をFig.12(次ページ)に示す。ROESY/MAS実験では回転座標系におけるスピンロック効率を高めるため混合時間の前後に補償パルスを印加した(Fig.13)[37]。

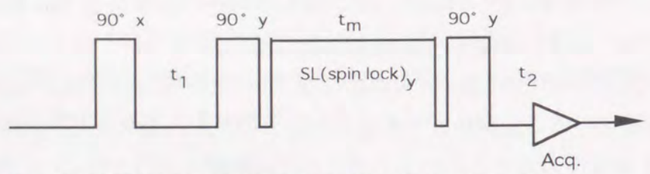


Fig. 13. ROESY pulse sequence adopted in the present study.

第二項　COSY/MAS及びROESY/MAS実験によるスペクトルの帰属と構造情報の導出

液晶中のCOSY/MAS及びROESY/MAS両スペクトルにおいて、等方相であるミセル相に匹敵する多数のクロスピークが明瞭に観測され(Fig.12, 次ページ)、MAS条件下での二次元NMR実験は一次元NMR実験と同様、有用であることが分かる。COSY/MASスペクトルにおいてミセル相では溶質の分子運動の異方性は消失するため、観測されているクロスピークは間接結合Jによる核間のつながりによるものである(Fig.12a)。ミセル相のスペクトルと液晶相とは類似しているため、MAS条件下でのスペクトルに観測されている核間の相関は等方的間接結合情報と同様であるといえる。そこで、このCOSY/MASスペクトルから核間の結合を解析したところ、これらのスペクトルのみで自己完結的な帰属が可能であった(Table 2)。これから、COSY/MAS実験は液晶のような配向試料に対しても溶液のNMRと同様、結合および角度情報を得るために有効な手法であることが分かる。また、さらに詳細にlasalocid AのCs塩のミセル相と液晶相のCOSY/MASスペクトルを比較した場合、液晶相におけるスペクトルにはミセル相には観測されていない相関が、H(19)-H(24)及びH(14)-H(29)のプロトン間にクロスピークとして認められる。

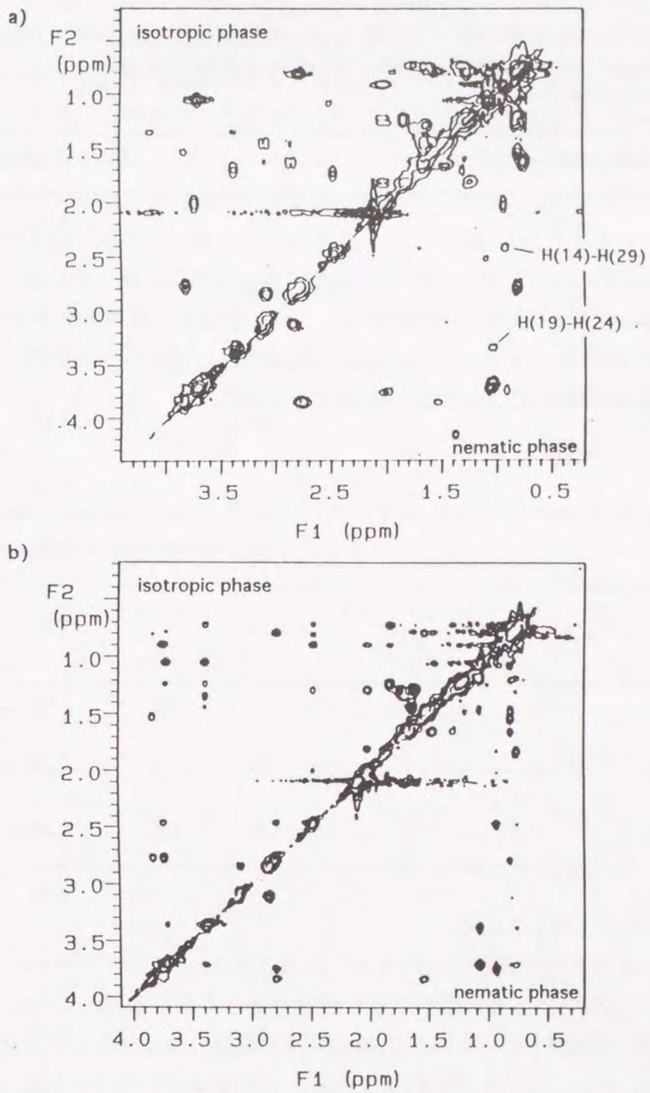


Fig. 12. Two-dimensional NMR spectra of lasalocid A dissolved in the CsPFO liquid crystal at the same conditions as in Fig.9: a)COSY/MAS spectra, b)ROESY/MAS spectra. Upper left regions of these spectra were obtained with the isotropic phase(50℃) and lower right regions with the nematic phase(35℃). The crosspeaks indicated by solid lines in COSY/MAS spectra were originating through dipolar interactions.

Table 2 Observed mean ^{1}H chemical shifts for lasalocid A-cesium salt dissolved in the CsPFO liquid crystal at 35 ℃

Proton	Chemical shift(ppm)	Proton	Chemical shift(ppm)
5	6.98	21A	1.62
6	6.53	21B	1.45
8A	3.10	23	3.69
8B	2.84	24	1.06
9A	1.62	25	1.24
9B	1.46	26	0.78
10	1.52	27A	1.61
11	3.81	27B	1.29
12	2.77	28	0.76
14	2.45	29	0.90
15	3.72	31	0.79
16	2.00	32	0.81
17A	1.81	33	0.75
17B	1.23	34	2.09
19	3.37		
20A	1.70		
20B	1.36		

上述のようにミセル相のスペクトルにおいて観測されているクロスピークは、間接結合Jを介した磁化移動によるものである。したがって、液晶相においてのみ観測されているクロスピークは、本章第二節第四項で示唆されたように試料回転軸がマジック角からずれていたことによる、空間を介した直接結合にもとづく磁化移動によるものと帰属することができる。即ち、マジック角近くでの試料回転(NMAS)条件下でのCOSY(COSY/NMAS)実験によって、核間の結合情報だけではなく空間的な近接情報をも、分解能を失うことなく得ることが可能であると示唆される。また、COSY/MASと併せて一次元NMRスペクトルを解析した結果、液晶に溶解したlasalocid AのCs塩について、Table 3に示す間接結合定数Jを首尾良く求めることができた。この間接結合定数Jの大きさはKarplusの式によって二面角と関係付けられることが経験的に知られており[38]、構造解析において有用な情報を提供する。そこで、この間接結合定数J値を解析し二面角の束縛条件を得た(Table 3)。

Table 3 Dihedral angle constraints (C—C—C—C) from H—C—C—H coupling constants using the Karplus equation

^{1}H-^{1}H	(H—C—C—H) J(Hz)	C—C—C—C	Constraint(°) Lower	Constraint(°) Upper
H-11 — H-12	9.8	C-10 — C-11 — C-12 — C-13	168.0	178.0
H-14 — H-15	0.0	C-13 — C-14 — C-15 — C-16	-165.0	-155.0
H-14 — H-30A	7.4	C-13 — C-14 — C-30 — C-31	142.0	152.0

このように、COSY/MAS実験によりピークの完全帰属を終えることができたので、それによりROESY/MASスペクトルを解析することが可能となった。そこで、Fig.12bから距離情報を取得するために、観測されたROEクロスピークの強度を次に示す核間距離(r)の上限値と関連付けクラス分類することとした(Table 4)[3b]。

強いROE　r≦2.5Å
中位のROE　r≦3.0Å
弱いROE　r≦4.0Å

Table 4 *The ROE effects of lasalocid A dissolved in the CsPFO liquid crystal at 35℃*
Qualitative evaluation; strong +++, medium ++, and weak +

1st. atom	2nd. atom	ROE	1st. atom	2nd. atom	ROE
5	6	+++	14	15	+
	8B	+		29	++
	34	+++		31	+
6	8A	++		32	+
	8B	+++	15	29	++
	10	+	16	17A	+
	34	+		29	+
8A	8B	++	17A	28	++
	11	+		29	+
	33	+	19	24	++
8B	9A	+		28	+
	9B	+		23	+
	10	+	20	23	+
9A	9B	++	21A	26	+
	11	+	21B	24	+
9B	11	+	23	24	+++
	33	+		25	+
10	11	+++		26	+
	33	++		28	+
11	12	++	24	26	++
	15	+	25	26	++
12	29	+	27A	27B	+
	33	++		28	+
	15	+			

Fig.12bにおいて観測されたクロスピークをこのクラス分類により解析した結果、lasalocid Aに関してミセル相において６１個、液晶相においてTable 4に示すように４7個の距離情報を得ることができた。

第四節　MAS液晶二次元NMR法の適用による液晶中に配向したlasalocid Aの構造決定

本研究において開発したMAS二次元NMR法により、液晶中に配向したlasalocid Aについて、ROEからの原子間距離の上限値およびスピン-スピン結合定数から二面角の束縛条件という構造情報を得ることができた。このような情報から構造を計算する手法としてディスタンスジオメトリー法がある。この方法は大きく分けてCrippenらの開発した多次元尺度構成法[39]と、Braun-郷らの開発した可変目的関数法[40]の２つに分類されるが、後者は高速に構造を計算でき、またスピン-スピン結合定数から得られる二面角の束縛条件を容易に計算に取り入れることができるという利点を持つ。可変目的関数法は主としてタンパク質などの生体高分子に適用され成功を収めている方法であるが[41]、このように種々の利点を持ち、さらに第三章で述べる双極子-双極子相互作用を取り入れた構造解析への応用もスムーズに行える。したがって、この可変目的関数法をlasalocid Aの構造解析に応用することとした。以下では計算手法の原理と、液晶あるいはミセル中で得られたlasalocid Aの構造について検討した結果を述べる。

第一項　ディスタンスジオメトリー法の概要

分子の化学式とNMRからの原子間距離情報が与えられている場合、化学式から立体構造を試行的に作り上げ、その結果計算される原子間距離情報から構成される目的関数の値を少なくする方向に立体構造を修正していきながら、最適な構造を作り出そうとする方法が目的関数最小化法である。目的関数最小化に当たり、結合長と結合角を平均的な値に固定し、二面角のみで立体構造を表すと高速に構造を計算できる。この方法の特徴は、目的関数が多重極小値に落ち込み(多重極小値の問題)正しい構造に至らないことを防ぐため、分子の構造を計算上有意と考えられる二面角に関して単位構造(ユニット)に分割することで、そのためbuild-up法とも呼ばれる[42]。このbuild-up法では、NMRから得られる距離情報を長距離情報と短距離情報に分けて、最小化のステップを短距離情報のみを含む目的関数の最小化から徐々に長距離情報を含む目的関数の最小化へと変化させる。NMRデー

タからのi,j核間に関する距離の上限値u_{ij}と下限値l_{ij}、および先験的に与えられる原子核特有の半径s_i[40]ごとに目的関数の中に取り入れる情報の範囲をU_k、L_k、S_kとする。ここで、原子対(i,j)が属する構造ユニットの化学構造上でのユニット番号の差がk以下であれば、その原子対は集合U_kやL_k、及びS_kに属すると定める。目的関数$E^{k,l}_{ROE}$は三つの制約値(u_{ij}とl_{ij}及びs_i+s_j)と所与の分子構造から計算された原子間距離d_{ij}の差の二乗和が最小であるとし、

$$E^{k,l}_{ROE}=\frac{1}{4}\sum_{(\alpha,\beta)}\rho_k(\alpha,\beta)\theta(d_{\alpha\beta}-\mu_{\alpha\beta})(d^2_{\alpha\beta}-\mu^2_{\alpha\beta})^2/\mu^2_{\alpha\beta} \qquad (6)$$

$$+\frac{1}{4}\sum_{(\alpha,\beta)}\sigma_k(\alpha,\beta)\theta(l_{\alpha\beta}-d_{\alpha\beta})(l^2_{\alpha\beta}-d^2_{\alpha\beta})^2/l^2_{\alpha\beta}$$

$$+\frac{w}{4}\sum_{(\alpha,\beta)}\tau_l(\alpha,\beta)\theta(s_\alpha+s_\beta-d_{\alpha\beta})\{(s_\alpha+s_\beta)^2-d^2_{\alpha\beta}\}^2$$

と定める。ここで、wはNMRデータから得られた情報u_{ij}、l_{ij}と原子核半径の情報との相対的重みを与える定数であり、$\rho_m(i,j)$と$\sigma_m(i,j)$、$\tau_n(i,j)$は(i,j)対がそれぞれ集合U_m、L_m、S_nに属していれば1、他の場合にはゼロとなる階段関数である。最小化のステップは最初は隣り合った構造ユニット間の距離の制限のみを取り入れた目的関数$E^{1,1}_{ROE}$で始め、徐々に広い範囲の制限を取り入れていく。そして、最適な構造は、目的関数$E^{\infty,\infty}_{ROE}$の最小化の結果として得られることとなる。

第二項　ディスタンスジオメトリー法によるlasalocid Aの構造計算

可変目的関数法によるlasalocid Aの構造計算を行う際、まず５０℃のミセル相において得られた束縛条件を用いて計算を行うこととした。１２８個の初期構造をランダムに発生させ、その中からミセル中のlasalocid Aの構造に関して２１個の収束構造を得た。目的関数最小化に際しては関数の数値微分を計算し、得られる微係数の勾配から最小化を行うPowellの共役傾斜勾配法を用い自作プログラムにより行った[43]。距離束縛条件としてはROEから与えられた距離の上限値を用い、下限値はプロトン核のvan der Waals半径の和(2.0Å)とした。この２１個の収束構造について、平均r.m.s.d(root-mean-square distance)値は0.15Åであり収束性は良好であった。したがって、lasalocid Aは液晶中で単一の構造で存在することが裏付けられた。ここでr.m.s.d値とは２つの構造間の平均的

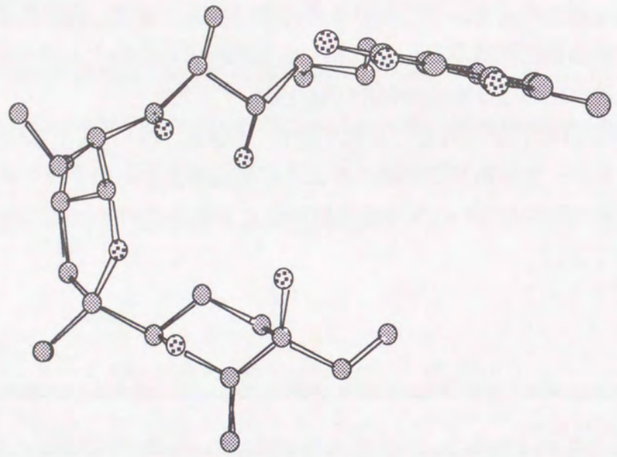
なずれの尺度を示すものであり、Mclachlanの方法に従い求めた[44]。平均r.m.s.d値は２１個の収束構造のそれぞれについてr.m.s.d値を求め平均したものである。このようにして得られたlasalocid Aのミセル中における構造をFig.14に示す。続いてこのミセル中で得られた２１個の構造を初期構造として　35℃の液晶相で得られた束縛条件を用いて構造計算を行い、液晶中における構造を得た(Fig.15)。

Table 5に構造計算において可変とした主鎖の二面角について、ミセル相と液晶相とで得た値を示す。また、本章第五節で述べるように結晶構造と比較するため、lasalocid AのNa塩の水和結晶(二量体)についてX線構造解析により報告されている二面角[25a]をTable 5に併せて示す。

Table 5 Backbone torsion angles of lasalocid A of this study and lasalocid A-sodium-H_2O(2:2:2) crystal structure

	media		lasalocid A-sodium-H_2O crystal
	micellar	liquid crystal	
C(2)-C(7)-C(8)-C(9)	-156.	-156.	-86.
C(7)C(8)-C(9)-C(10)	174.	170.	174.
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-71.	-76.	-74.
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	137.	162.	172.
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	178.	163.	170.
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-110.	-110.	-137.
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	76.	86.	82.
C(13)-C(14)-C(15)-O(6)	84.	78.	63.
O(6)-C(18)-C(19)-O(7)	47.	48.	62.

a)



b)

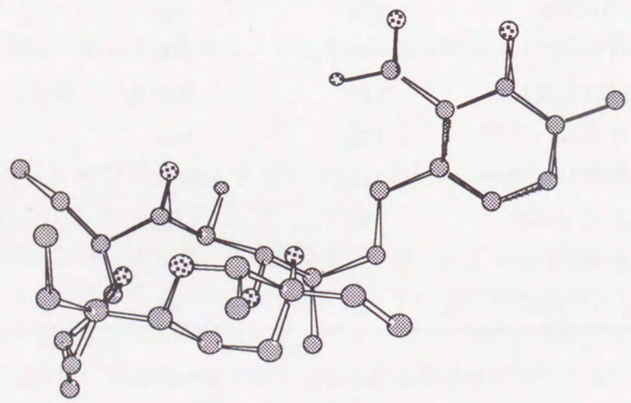
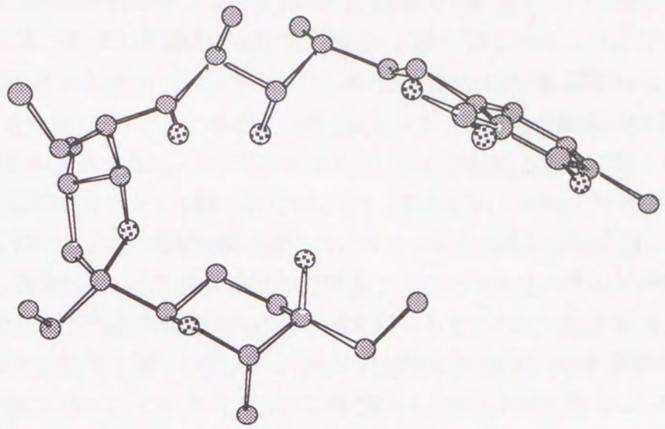


Fig.14. The structure of lasalocid A dissolved in the CsPFO micellar solution.
These drawings of a) and b) are viwed from different angles.
(◎) Carbon atoms, (✪) oxygen atoms.

a)



b)

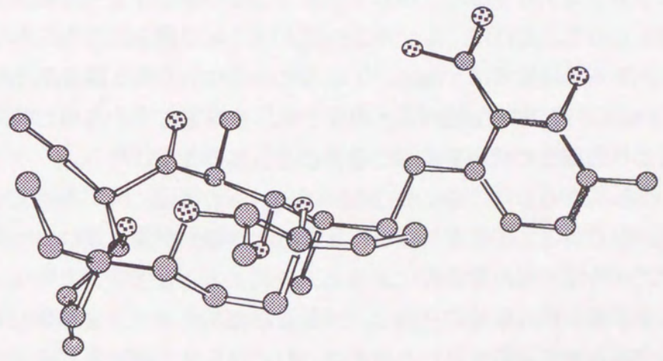


Fig.15. The structure of lasalocid A dissolved in the CsPFO nematic solution.
These drawings of a) and b) are viwed from different angles.
(◎) Carbon atoms, (✪) oxygen atoms.

第五節　液晶中に配向したlasalocid Aの構造の考察

Fig.14及びFig.15に示した様にlasalocid Aはミセル中あるいは液晶中においても擬似環状構造をとっており、両相においてCs^+との包接錯体を形成していることを表す。ミセル中と液晶中における構造とを比較するため、エチル基を除いた全ての重原子(炭素および酸素原子)について両者の構造のr.m.s.d値を算出したところその値は2.0Åと、両者の主鎖構造は大きく異なることが分かった。この差異はTable 5に示した二面角の検討から分かるが、主にC(9)-C(10)-C(11)-C(12)、C(10)-C(11)-C(12)-C(13)及びC(12)-C(13)-C(14)-C(15)の結合の二面角に依存しており、特にC(9)-C(10)-C(11)-C(12)の二面角の変化が大きく効いている。したがって、この結合が配向場の変化に感応するヒンジ結合であるといえ、これはリガンドのサリチル酸末端基の構造が変化することを意味する。
lasalocid Aの金属イオン包接錯体の構造安定化は、主として酸素原子との静電相互作用の寄与によるが、ミセル中と液晶中における構造とを比較すると、両相においてともにlasalocid A分子のO(5)、O(6)、O(7)及びO(8)位の酸素原子が平面を形成しており、これらの酸素原子とサリチル酸末端基のO(1)の酸素原子がCs^+イオンとの相互作用に関与していると考えられる。しかし、ミセル中における構造を検討すると、上記の酸素原子が形成する平面の上部にサリチル酸末端基のO(1)位が位置していることから、これらの酸素原子が球状に近い構造を形成していると考えられるのに対し、液晶中ではサリチル酸末端基は上記の酸素原子が形成する平面に近接して位置し、その結果分子全体としてより平面性の高い構造となっている。これは、ミセルと液晶という場の構造特性の差異に起因するものと考えられる。即ち、液晶では、溶媒分子はミセルよりも高度に構造化されパッキングが密である。そのように異方的な配向場との相互作用を安定化するため、液晶中においてlasalocid Aはより対称性の低い平面的な構造となるものと思われる。

生体膜のような異方的不均一場におけるlasalocid Aの構造に関する研究は遅々として進展しておらず、わずかにエネルギー極小化計算による結果が報告されているのみである[26]。そのエネルギー極小化計算によると、金属イオンを配位していないlasalocid Aは、主として生体膜の極性領域に存在し、伸長したコンホメーションをとることが示唆されているが、今回のモデル膜を用いた結果はこれとは異なり擬似環状構造であるため、lasalocid A はCs^+と包接錯体を形成して膜の非極性部位に存在しているものと考えられる。このことは、先の平面構造をとることにより液晶のような配向場との相互作用が安定化されるとの考察とも整合している。また、先のエネルギー極小化計算では、生体膜の非極性領域において伸長したコンホメーションから擬似環状構造へと移行し、その際O(1)とO(4)及びO(1)とO(8)との酸素原子間で水素結合が形成されることにより、その擬似環状構造が安定化されることが報告されている。しかし、本研究の結果ではO(1)-O(4)間距離($r_{O(1)-O(4)}$)、およびO(1)-O(8)間距離($r_{O(1)-O(8)}$)は、ミセル相において$r_{O(1)-O(4)}$=7.1Å及び$r_{O(1)-O(8)}$=6.6Åであり、また液晶相においては$r_{O(1)-O(4)}$=7.4Å及び$r_{O(1)-O(8)}$=7.1Åとなり、いずれの場合も水素結合を形成しているとは考えられない距離にあった。

本章第一節で述べたように、lasalocid Aと一価カチオンとの包接錯体の結晶は二量体を形成しているものが多いが、唯一メタノールから得られたlasalocid AのNaとの複合体結晶において単量体の構造データが得られている[25b]。その構造を検討すると、リガンドのO(4)、(5)、(6)、(7)及びO(8)の酸素原子がNa^+イオンとの錯形成に関与しており、先のエネルギー極小化計算の結果と同様O(1)とO(8)、及びO(1)とO(4)位の酸素原子間で水素結合が存在する。これに対し、Table 5に示した水和錯体の結晶構造では、リガンドのO(1)、(5)、(6)、(7)及びO(8)の酸素原子がNa^+イオンとの錯形成に関与しており、分子内での水素結合は確認されていない。これはNa^+イオンに水分子が配位し有効イオン半径が大きくなった結果、分子内水素結合をとり得なくなったものと考えられる。この水和錯体は二量体であり単純な比較はできないが、各々類似した擬似環状環状構造をとることが報告されており、また一水和のNa^+イオンの有効イオン半径は2.4ÅとCs^+イオンのvan der Waals半径(2.0Å)と近いため[45]、その構造を議論する価値があるものと思われる。Fig.15から液晶中では、lasalocid AとCs^+イオンとの相互作用はリガンドのO(1)、(5)、(6)、(7)及びO(8)位の酸素原子によって主に安定化されているようであり、リガンド分子内の水素結合は見られない。したがって、カチオンのサイズに対応して空孔のサイズが大きくなると分子内の水素結合はもはや構造安定化に寄与せず、またカチオンと相互作用する酸素原子はO(4)からO(1)に置換されると考えられる。また、Table 5において水和結晶構造と今回得られた構造データとを比較すると、結晶構造と配向場における構造との差異は、上述のヒンジ結合とC(2)-C(7)-C(8)-C(9)、及びO(6)-C(18)-C(19)-O(7)の二面角にもとづくことが分かる。これらの二面角の変化はカチオンサイズの変化、あるいは結晶の場合、それ特有のパッキングの効果によるものと思われるが、特にC(10)-C(11)のヒンジ結合を見た場合、液晶中の値はミセル中と結晶のほぼ中間の値を示しており、この結果は構造に対する配向場の効果を示した興味あるものといえる。このヒンジ結合を液晶中の構造とともにFig.16に示す。

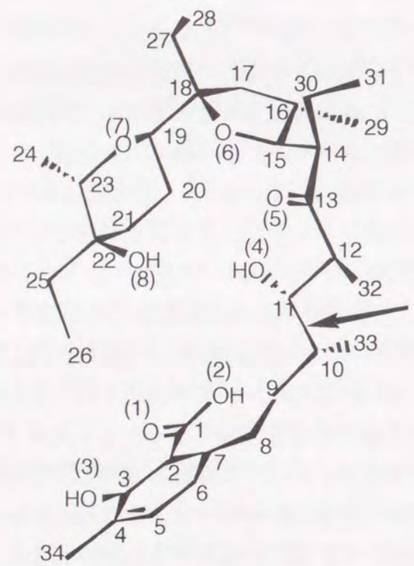


Fig.16. The hinge bond regarding the transformation of lasalocid A structure. The solid arrow line indicates the hinge bond among micellar and nematic phase and crystal.

第六節　第二章のまとめ

以上のように、本研究において筆者が確立したMAS液晶二次元NMR法により、これまでの液晶NMR法では適用不可能とされるスピン系を持つlasalocid Aの液晶中の構造を明らかとし、ミセル中あるいは結晶構造と比較検討することができた。またその結果、lasalocid Aの構造には金属イオンの配位効果および配向場の効果が関与することが明らかとなった。今後この手法を用いることにより、種々のイオノホアの配向場における構造と機能に関する議論が進展できると期待される。

第　三　章

マジック角近くでの試料回転による新しい液晶二次元NMR法(NMAS液晶二次元NMR法)の開発とenkephalinの構造と配向の研究への応用

第一節　序

液晶のNMRスペクトルを特徴付ける直接結合定数を利用した従来の液晶NMR法は、対象となる分子が限られるものの液晶中の分子の構造と配向を非常に精密に決定できるという利点を有する。このような液晶NMR法により解析された液晶中のthianthreneの構造について興味ある知見が得られている[46]。即ち、thianthreneはFig.17に示すように典型的な３環系化合物で、S-S軸で折りたたまれたバタフライ構造をとることが知られているが、この折りたたみを表現する２つのベンゼン環のなす二面角について、結晶では128°、あるいは気相では131.4°とそれぞれX線構造解析および電子線回折の結果報告されているのに対し、液晶中では141.6°と開いており、またFig.17に示した１位と２位のプロトン間距離r_{12}が２位と３位の距離r_{23}よりも0.05Å長く、ベンゼン環の構造が乱されていることが明らかとされた。このように、液晶において特異な構造を示す分子について液晶NMR法により詳細に議論することが可能である。

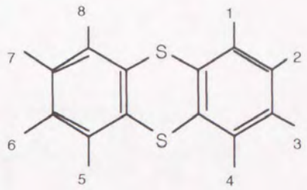


Fig.17. Chemical structure of thianthrene

筆者は、通常の液晶NMR法では解析不可能とされるスピン系を持つlasalocid Aの構造を、本研究において開発したMAS液晶二次元NMR法により決定することができた。しかし、MAS条件下での液晶のNMRスペクトルには直接結合が観測されないため、これを利用することはできない。これに対し、マジック角近くでの試料回転(NMAS)条件下での測定を行うことにより、lasalocid Aのようなスピン系においても直接結合定数を得ることが可能であることが示唆された。そこで、液晶中の溶質の構造と配向をさらに幅広く議論するため、NMAS液晶二次元NMR法の開発に関する研究に着手することとした。

本研究において対象とした溶質はenkephalinである。enkephalinは(H-Tyr^{1}-Gly^{2}-Gly^{3}-Phe^{4}-A.A.^{5}-OH)のアミノ酸配列を有するペンタペプチドであり、1975年に

Hughesらによってブタ脳より単離されたモルヒネ様鎮痛作用を持つ内因性ペプチドで、Met-enkephalin(H-Tyr1-Gly2-Gly3-Phe4-Met5-OH, Fig.18)及びLeu-enkephalin(H-Tyr1-Gly2-Gly3-Phe4-Leu5-OH, Fig.19)の二種類が知られている[47]。脳内のμ及びδタイプのオピオイドレセプターとの結合により活性を発現するが、その結合の過程は従来考えられていたように三次元的な拡散によるもの(one-stage capture)ではなく、前段階における生体膜との相互作用により活性型コンホメーションを形成した後の二次元的な拡散によるもの(two-stage capture)と考えられている[4]。したがって、その作用を考える上で、enkephalinの液晶中における構造と配向に関する知見を得ることは興味深い。

本章ではNMAS液晶二次元NMR法を開発し、enkephalinに適用した結果を述べる。

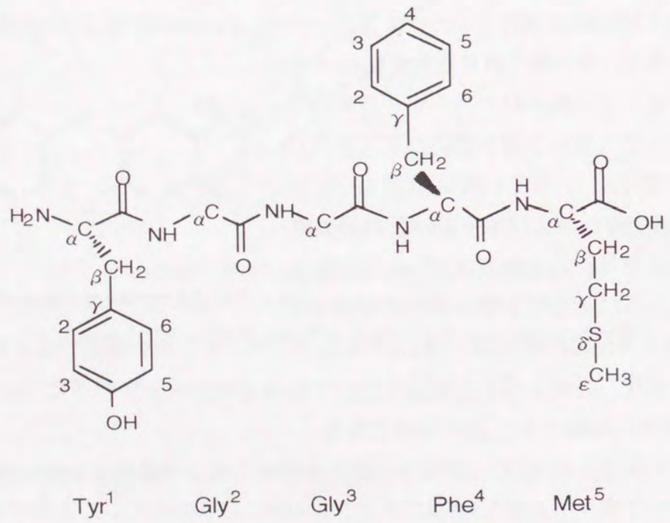


Fig. 18. The chemical structure of Met-enkephalin.

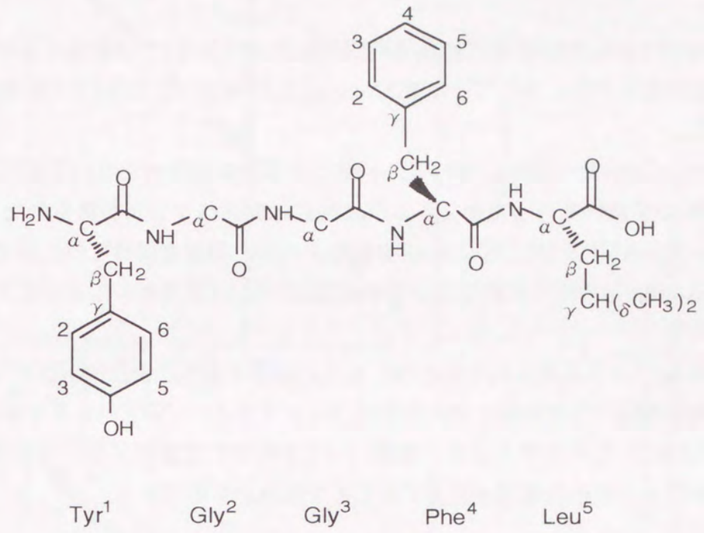


Fig. 19. The chemical structure of Leu-enkephalin.

第二節　MAS液晶二次元NMR法による構造情報の導出

前章で述べたMAS液晶一次元NMR法はCsPFO液晶に溶解したLeu-enkephalin及びMet-enkephalinの配向試料についても同様に適用可能であった。しかし、enkephalinのようなペプチドのNMR測定において特有の問題であるアミドプロトンの観測が問題点としてあった。アミドプロトンを観測するためには、液晶溶媒の組成として軽水を用いなければならないが、巨大な溶媒のピークはダイナミックレンジの低下を引き起こす。このダイナミックレンジの問題を解決するためには、選択的励起パルスであるDANTEパルス[48]、あるいはspin lockパルスなどが有効な手法として考えられる。本節では、これらの溶媒消去の検討を行い、MAS液晶二次元NMR法により液晶中のenkephalinの距離情報を導出した結果を述べる。

第一項　MAS液晶二次元NMR法におけるパルス系列の考察

enkephalinはlasalocid Aと同様に相関時間の関係でNOESYでは相関データを得ることができないと予想された。そこで、ROESY/MAS及びNOESY/MASの実験を行い両者の比較を行った。

Leu-enkephalinの配向試料についてFig.20に示すパルス系列を用いてROESY/MAS及びNOESY/MAS実験[49]を行ったところ、Fig.21に示すスペクトルが得られた。MAS条件下での液晶一次元NMR及びCOSY/MAS実験により得た帰属を併せてFig.21に示す。また、Met-enkephalinの配向試料についてのROESY/MASスペクトルのクロスピーク領域をFig.22に示す。

ROESY/MASパルス系列は前章で述べたものと同様であり、またNOESY/MASパルス系列は、最後の観測パルスの前に選択的励起パルスであるDANTEパルスを挿入し、水の信号を選択的に90°位相シフトさせ、観測パルスを印加した後のスピンロックパルスにより水の磁化のみの位相をほぼ消去することを試みたものである。

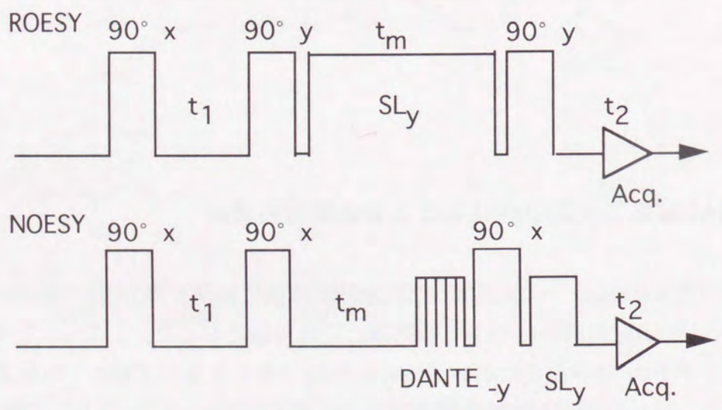


Fig. 20. Pulse sequences of ROESY and NOESY adopted in the present study.

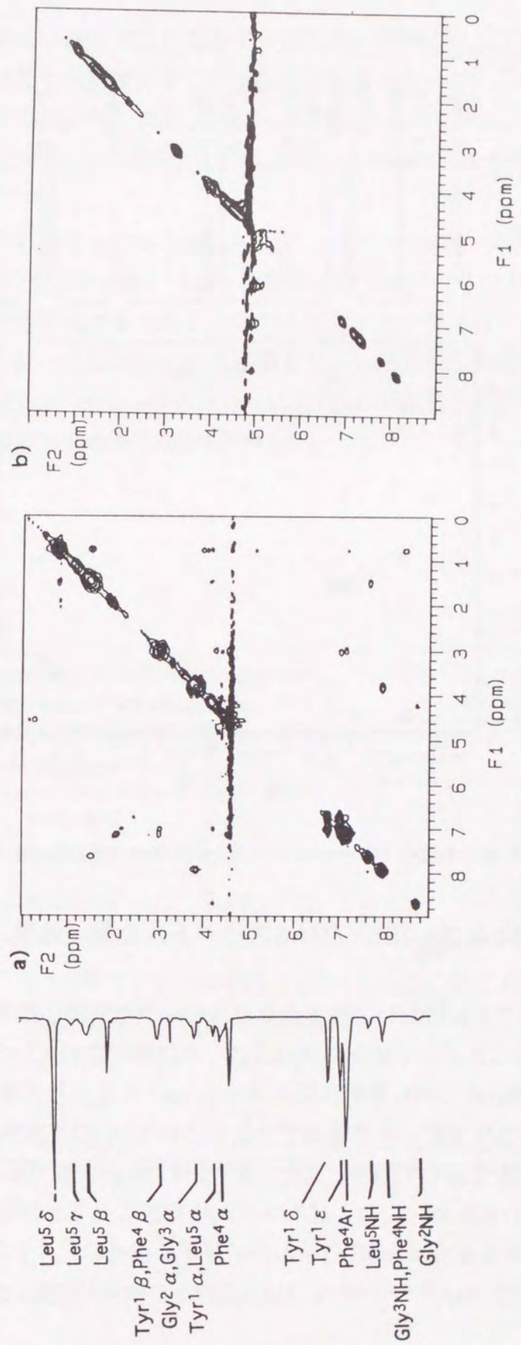


Fig. 21. Two-dimensional NMR spectra(200MHz) of Leu-enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal: a) ROESY/MAS(t_m=100ms), b) NOESY/MAS(t_m=100ms).

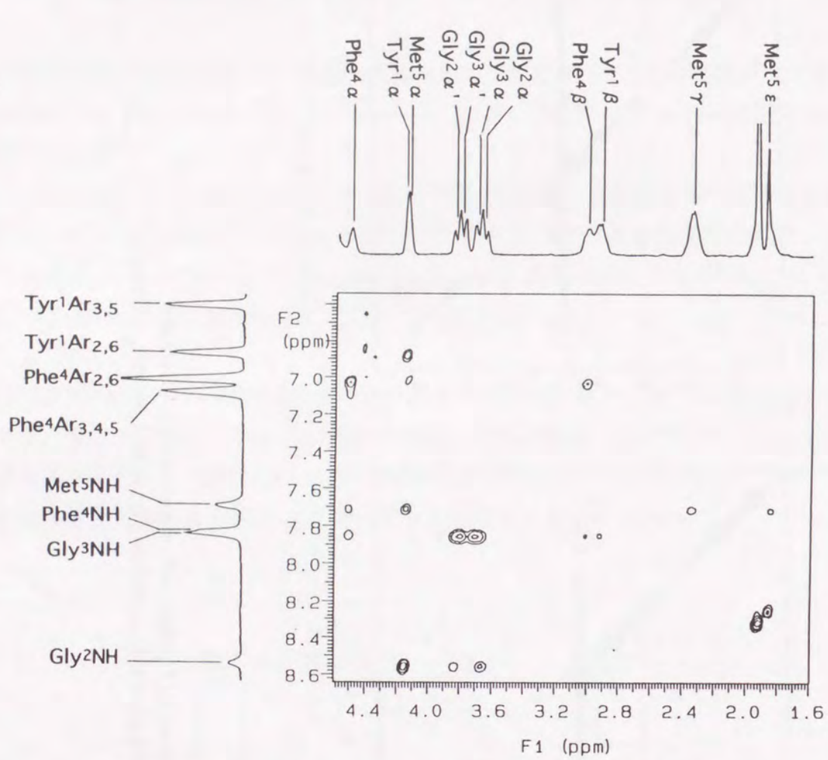


Fig. 22. Partial ROESY/MAS spectra at 100ms mixing time of Met-enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal.

第二項　ROESY/MAS及びNOESY/MASスペクトルの測定結果

Fig.21のROESY/MASスペクトルにおいて多数のクロスピークが明瞭に観測されているのに対し、NOESY/MASスペクトルでは全くクロスピークは検出されていない。このことはNOESY実験における問題点、即ち相関時間が10^{-9}(s/rad)程度の分子運動を示す溶質ではNOEが殆どゼロとなりクロスピークが観測できないというNOESY実験の欠点をROESY実験が克服していることを示している。また、ROESY/MAS実験では混合時間の間にスピンロックパルスを用いるため、このスピンロックパルスにより水の信号が減弱され、そのスペクトルからも分かるようにNOESY/MASより水の信号のt_1ノイズは抑制されている。したがって、ROESY/MASはNOESY/MAS実験より核間の空間的近接情報を

得るために非常に適した方法であるといえる。同時に、ペプチドのアミドプロトンを観測するためには軽水を溶媒として用いなければならないが、このようなサンプルに対し有用であることが分かった。また、Fig.22からMet-enkephalinの配向試料についてもLeu-enkephalinと同様にROESY/MAS実験が核間距離情報を得るために有用な手法であることが分かる。

以上のようにMet-enkephalin及びLeu-enkephalinの配向試料についてピークが良く分離されたROESY/MASスペクトルを得ることができたので、これらのスペクトルのクロスピークの体積強度を定量し、Gly^2 αのジェミナルプロトン間を基準の距離(1.77Å)として、クロスピーク強度の比から距離を算出した[37]。その結果、Met-enkephalinについて35個、またLeu-enkephalinについて37個の距離情報を得ることができた。それらの中で主鎖に関するものをTable 6及びTable 7に示す。

Table 6 Experimental backbone interproton distances of Met-enkephalin

residue	ROE type	interproton distance(Å)
Tyr^1	αH1-NH2	2.03
Gly^2	αH2-NH2	2.21
	α'H2-NH2	2.29
Gly^3	αH3-NH3	2.00
	α'H3-NH3	2.09
Phe^4	αH4-NH4	2.23
	αH4-NH5	2.48
Met^5	αH5-NH5	2.18
	NH2-NH3	3.11

Table 7 Experimental backbone interproton distances of Leu-enkephalin

residue	ROE type	interproton distance(Å)
Tyr^1	αH1-NH2	2.30
Gly^2	αH2-NH2	2.12
	α'H2-NH3	2.65
Gly^3	αH3-NH3	2.03
Phe^4	αH4-NH4	2.74
Leu^5	αH5-NH5	2.49
	NH2-NH3	2.60
	NH4-NH5	2.71

第三節　NMAS液晶二次元NMR法による配向情報の導出

enkephalinの配向試料についてもMAS液晶二次元NMR法は有効な手法であり、ROEから距離情報を得ることができた。そこで、液晶中のenkephalinについて直接結合定数の導出を計り、さらに精密な構造情報を得ることとした。第二章の第二節第二項で述べたように、NMAS条件下ではNMRスペクトルに現れる直接結合によるカップリングは一次のオーダーになると期待される。しかし、MAS液晶一次元NMRスペクトルから直接結合定数を読みとるには線幅が広いことと、ピークの重なりなどのために十分な精度を得ることはできない。NMRスペクトルのカップリングを読みとるためには、高いデジタル分解能での測定が肝要となる。そのような測定には、homo 2DJ実験が適していると考えられる[50]。homo 2DJ実験では、カップリングによる分裂がF_2軸に現れ、F_1軸においてはデカップルされたスペクトルが得られるため、たとえ一次元スペクトルでピークが重なっていても、個々のシフトに対して分裂幅を別々に観測することができる。また、スピン結合の現れるF_1軸はスピンエコースペクトルであるので、磁場の不均一性や非共鳴核(フッ素など)とのスピン結合の影響が除かれ、それに起因していた線幅の広がりなどがなくなり、線幅の狭いシグナルが得られる。そこで、まずNMAS条件下でのCOSY(COSY/NMAS)実験を行いNMAS液晶二次元NMR法を検証し、次いでNMAS条件下でのhomo 2DJ(homo 2DJ/NMAS)実験を行うことにより、CsPFO液晶中に配向したenkephalinの直接結合定数を定量的に評価することができた。以下にその手法の原理と結果について述べる。

第一項　COSY/NMASスペクトルの測定

試料回転軸をマジック角と等しくした場合、およびそれをマジック角から+1.0°ずらせた場合(即ち、外部静磁場に対して55.7°とした場合)、およびマジック角から+1.5°ずらせた場合(即ち、外部静磁場に対し56.2°とした場合)のそれぞれについてCOSY/NMAS実験を行った。その結果をFig.23にまとめて示す。

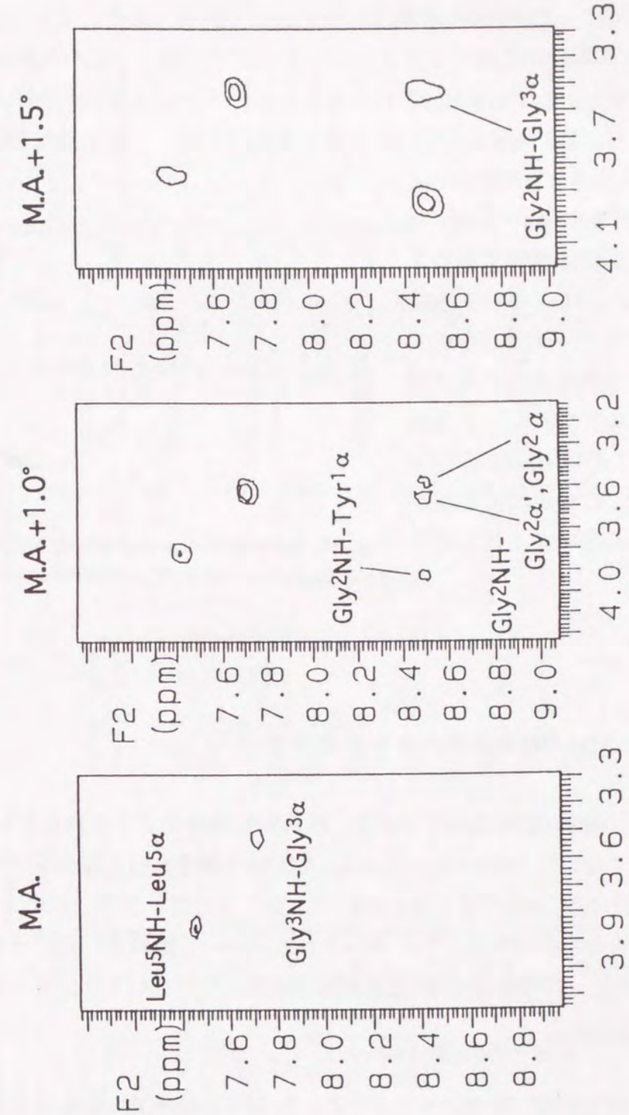


Fig. 23. Partial COSY/NMAS spectra of Leu-enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal. Deviations of the angles from the magic angle(M.A.) were indicated on these spectra.

Fig23から、試料回転軸をマジック角から1.0°傾けた時のCOSY/NMASスペクトルには、Gly²NHアミドプロトンとTyr¹αプロトンとの間に、試料回転軸をマジック角とした時では見られないクロスピークが明瞭に観測されることが分かる。また、マジック角から1.5°傾けた時のスペクトルではこのアミドプロトンとGly³αプロトンとの間にクロスピークが現れていることも分かる(Fig.24)。これらのクロスピークの出現はともにカルボニル基で隔てられたプロトン間に遠隔結合が存在することを示すが、このような相関は等方溶液の¹H-¹H COSYスペクトルには現れておらず、これらはいずれも双極子-双極子相互作用由来の空間を通しての相関であることが示された。またFig.23のスペクトルにおいて、試料回転軸のマジック角からのずれが大きくなるに従い、残基内のアミドプロトンとαプロトンとのクロスピーク強度が全て増大している。これは間接結合定数Jに加えて直接結合定数Dにもとづく相関が現れたために磁化移動の効率が上昇したことによると考えられる。

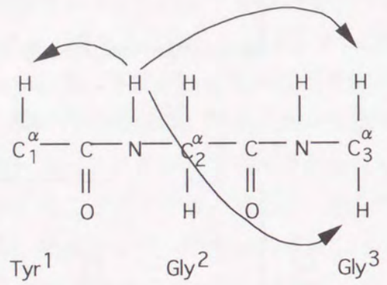


Fig. 24. Schematic drawing of long range direct couplings observed in COSY/NMAS spectra.

第二項　homo 2DJ/NMASスペクトルの測定

Fig.25にMet-enkephalinの配向試料について、試料回転軸をマジック角から+2.0°(即ち、外部静磁場に対し56.7°)傾けてhomo 2DJ/NMAS実験を行った結果を示す。

Fig.25からhomo 2DJ/NMASスペクトルにおいて、ピークのカップリングによる分裂が明瞭に観測されていることが分かる。このスペクトルにおいて観測されたピークの分裂幅△υ(Hz)は次式のように、間接結合定数Jと直接結合定数Dの和として記述される[29]。

$$\Delta\nu = (3\cos^2\beta - 1)D + J \qquad (6)$$

ここで、βは第二章の第二節第二項で述べたように、外部静磁場と試料回転軸とのなす角である。このようにhomo 2DJ/NMASスペクトルにおいて観測される分裂幅は$(3\cos^2\beta-1)$に依存する関数として解析することができる。

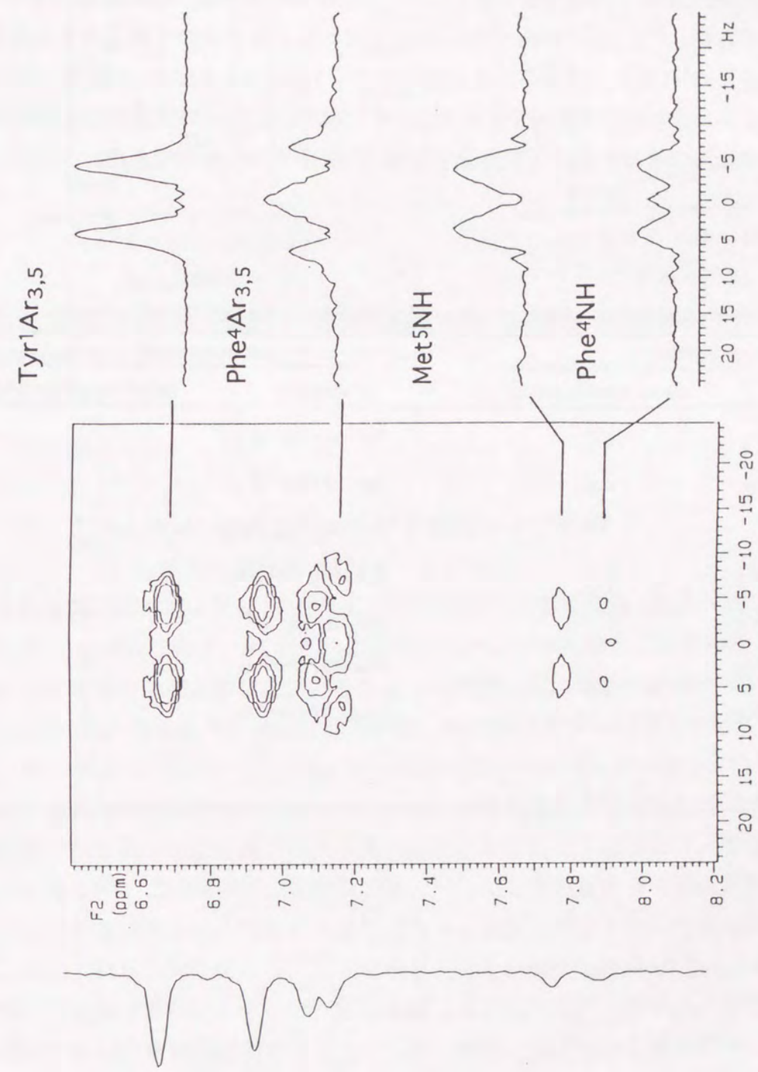


Fig. 25. Partial Homo 2DJ/ NMAS spectra of Met-enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal.

そこで、さらにMet-enkephalinの配向試料について、試料回転軸をマジック角から+1.0°、0.0°(マジック角)、-1.0°および-2.0°(即ち、それぞれ外部静磁場に対し56.7°、54.7、53.7および52.7°)傾けてhomo 2DJ/NMAS実験を行い、観測されたピークの分裂幅を(6)式を用いて回帰することにより、Table 8に示すように直接結合定数を導出することができた。Fig.26にHomo 2DJ/NMASスペクトルにおいて観測された分裂幅の変化を($3\cos^2\beta-1$)に対しプロットした結果を示す。Leu-enkephalinの配向試料について同様にして得た直接結合定数をTable 8に併せて示す。これらの直接結合定数の符号はFig.26のプロットの直線の傾きと間接結合定数Jの符号[51]から決定できた。

Table 8 Observed direct coupling constants of enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal

Met-enkephalin		Leu-enkephalin	
vectors	direct couplings(Hz)	vectors	direct couplings(Hz)
Tyr^1Ar_2-Tyr^1Ar_3	2.2	$Tyr^1\alpha$-$Tyr^1\beta_1$ }	8.5
Tyr^1Ar_5-Tyr^1Ar_6	2.2	$Tyr^1\alpha$-$Tyr^1\beta_2$	
$Gly^2\alpha$-$Gly^2\alpha'$	3.9	Tyr^1Ar_2-Tyr^1Ar_3 }	8.7
Phe^4Ar_2-Phe^1Ar_3 }	-5.0	Tyr^1Ar_5-Tyr^1Ar_6	
Phe^4Ar_3-Phe^2Ar_4		$Gly^2\alpha$-$Gly^2\alpha'$	5.7
Phe^4Ar_4-Phe^2Ar_5 }	-5.0	Phe^4NH-$Phe^4\alpha$	-4.2
Phe^4Ar_5-Phe^2Ar_6		Leu^5NH-$Leu^5\alpha$	-4.2
Phe^4NH-$Phe^4\alpha$	1.6		
Met^5NH-$Met^5\alpha$	1.2		

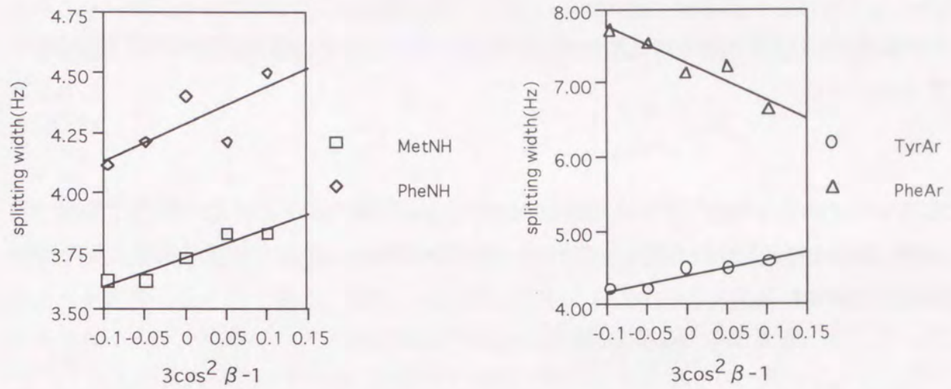


Fig. 26. The dependence of splittings observed in homo 2DJ/NMAS spectra upon β, the angle between spinning axis and external magnetic field direction.

第四節　Enkephalinの液晶中における配向および構造

これまでに述べたように、MAS及びNMAS条件下での液晶二次元NMR法により液晶中のenkephalinについて、ROEからの距離情報および直接結合定数を得ることができた。これらの情報から構造解析を試みることとしたが、これまでの直接結合定数を利用したSHAPEに見られるような構造計算手法は、各構成分子のx,y,z座標と分子全体の配向パラメータ(これにはSxx,Syy,Szz,Sxy,Sxz,Syzの6つのパラメータがあり、分子の対称性により独立変数として扱うべき可変のパラメータの組み合わせは変わる)を未知数とし、実験で観測された直接結合定数の値から線形近似の解析的な手法により、構造と配向を求めるものである[52]。この場合は、未知数の数に対して2倍程度の多くの直接結合定数データが必要である。さらに、比較的小分子でないと未知数が多くなり行列式の解法上の制限も加わる。これらの理由により、ここで取り上げたenkephalinのように大きな分子の構造計算には適用できない。そこで、第二章第三節で述べたディスタンスジオメトリー法を直接結合定数の計算にも応用することとした。即ち、直接結合定数を利用した目的関数法を構築し、液晶中のenkephalinの配向と構造を得た。以下に、その計算手法の原理と得られた液晶中のenkephalinの構造と配向について述べる。

第一項　直接結合定数を利用した配向および構造の計算の基礎

配向試料のNMRスペクトルに現れるi,j核間の直接結合定数D_{ij}は次式で表現することができる[53]。

$$D_{ij} = -\frac{h\gamma_i\gamma_j}{4\pi^2 r_{ij}^3} S_{ij} \qquad (7)$$

ここでγはプロトンの磁気回転比であり、r_{ij}はi,j核間距離を表す。また、配向パラメータS_{ij}は核i,jを結ぶ軸の配向性を表し、この軸と外部静磁場H_0とのなす角度の関数として(8)式のように表される。

$$S_{ij} = \frac{3\cos^2\theta_{ij} - 1}{2} \qquad (8)$$

したがって、直接結合定数を解析することにより配向パラメータという角度に関する情報を導出することが可能である。上式において、核iとjの組み合わせは一般に多数存在するので、全てのS_{ij}について考慮するのはあまりに繁雑である。しかし、S_{ij}は分子上に固定された座標軸x、y、zに関する配向パラメータS_{pq}(p,q=x,y,z)を用いると(9)式のように表すことができる。

$$S_{ij} = \sum_{p,q} \cos\alpha_p^{ij} \cdot \cos\alpha_q^{ij} \cdot S_{pq} \qquad p,q=x,y,z \qquad (9)$$

ここで、α_p及びα_qはp,q軸と核i,jを結ぶ軸とのなす角であり、またS_{pq}は(10)式で表される。

$$S_{pq} = \frac{1}{2} \langle 3\cos\theta_p \cos\theta_q - \delta_{pq} \rangle \qquad p,q=x,y,z \qquad (10)$$

ここで、θ_p及びθ_qはp,q軸と外部静磁場とのなす角である。Kroneckerのデルタはp=qの時1であり。それ以外ではゼロと定義される。また、配向パラメータは二階の対称テンソル量($S_{pq}=S_{qp}$)であり、その対角項の和はゼロとなる($S_{xx}+S_{yy}+S_{zz}=0$)。このため、S_{pq}の独立な要素はS_{xx}、S_{zz}、S_{xy}、S_{xz}及びS_{yz}の５個となる。

このように表される直接結合定数を構造解析に応用するために(11)式で表される目的関数を定義した[54]。

$$E_{DD} = \{(D_{calc})^2 - (D_{exp})^2\}^2 \qquad (11)$$

ここで、E_{DD}は直接結合定数で構成される目的関数であり、$D_{calc.}$及び$D_{exp.}$はそれぞれ実

験的に得られた直接結合定数およびその計算値のことである。(10)式のように表される配向パラメータにより直接結合定数を表現すれば、(11)式の目的関数は次式に表すように外部静磁場と分子座標軸とのなす角($\theta_x, \theta_y, \theta_z$)を内部変数とする関数であるとみなすことができる。

$$E_{DD} = f(\theta_x, \theta_y, \theta_z) \qquad (12)$$

したがって、実験的に得られた直接結合定数を束縛条件として、内部変数($\theta_x, \theta_y, \theta_z$)に関して(11)式の目的関数を最適化すれば、液晶中の分子の配向に関する情報である配向パラメータを得ることができる。また、本計算手法をディスタンスジオメトリー法と組み合わすことにより、配向パラメータと同時に構造を最適化することができる。そこで、(5)式で表される距離束縛条件から構成される目的関数との和をとり、次式で表される目的関数を定義した。

$$E_{total} = W_{ROE} \cdot E_{ROE}^{\infty,\infty} + W_{DD} \cdot E_{DD} \qquad (13)$$

ここで、W_{roe}及びW_{DD}はそれぞれの相互作用項が同程度の寄与をするように定める重みである。

第二項　配向と構造の計算

以上の基本式にしたがいFig.27に示す手順で計算するプログラムを作製した。(11)式の目的関数最小化はPowellの共役傾斜勾配法[43]を用いて自作プログラムにより行った。その結果、得られた液晶中におけるMet-enkephalin及びLeu-enkephalinの構造をそれぞれFig.28及びFig.29に、また直接結合定数の実測値と計算値をTable 9に示す。Fig.28及びFig.29の図中においてx,y,z軸は分子座標系を意味し、ベクトルz_0はその分子座標系における外部静磁場の方向を示す。

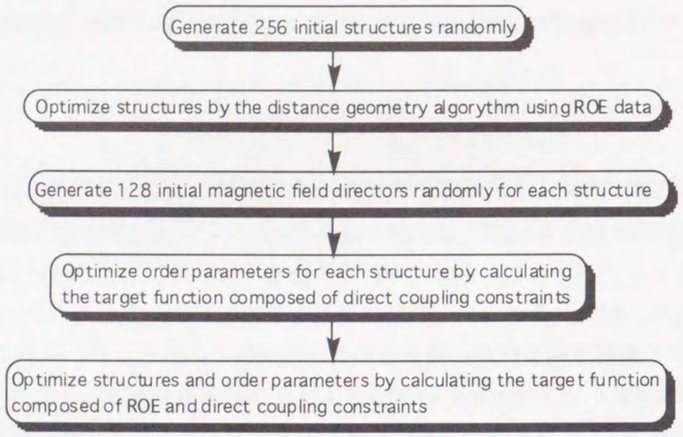


Fig. 27. Flowchart of the analysis of direct coupling and ROE data.

Table 9 Observed and calculated direct coupling constants of enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal

Met-enkephalin			Leu-enkephalin		
vectors	Obsd.(Hz)	Calcd.(Hz)	vectors	Obsd.(Hz)	Calcd.(Hz)
$Tyr^1 Ar_2$-$Tyr^1 Ar_3$	2.2	2.2	$Tyr^1 \alpha$-$Tyr^1 \beta_1$	} 8.5	8.5
$Tyr^1 Ar_5$-$Tyr^1 Ar_6$	2.2	2.2	$Tyr^1 \alpha$-$Tyr^1 \beta_2$		
$Gly^2 \alpha$-$Gly^2 \alpha'$	3.9	4.1	$Tyr^1 Ar_2$-$Tyr^1 Ar_3$	} 8.7	8.7
$Phe^4 Ar_2$-$Phe^1 Ar_3$	} -5.0	-4.9	$Tyr^1 Ar_5$-$Tyr^1 Ar_6$		
$Phe^4 Ar_3$-$Phe^2 Ar_4$			$Gly^2 \alpha$-$Gly^2 \alpha'$	5.7	5.7
$Phe^4 Ar_4$-$Phe^2 Ar_5$	} -5.0	-4.9	Phe^4NH-$Phe^4 \alpha$	-4.2	-4.4
$Phe^4 Ar_5$-$Phe^2 Ar_6$			Leu^5NH-$Leu^5 \alpha$	-4.2	-4.3
Phe^4NH-$Phe^4 \alpha$	1.6	1.6			
Leu^5NH-$Leu^5 \alpha$	1.2	1.2			

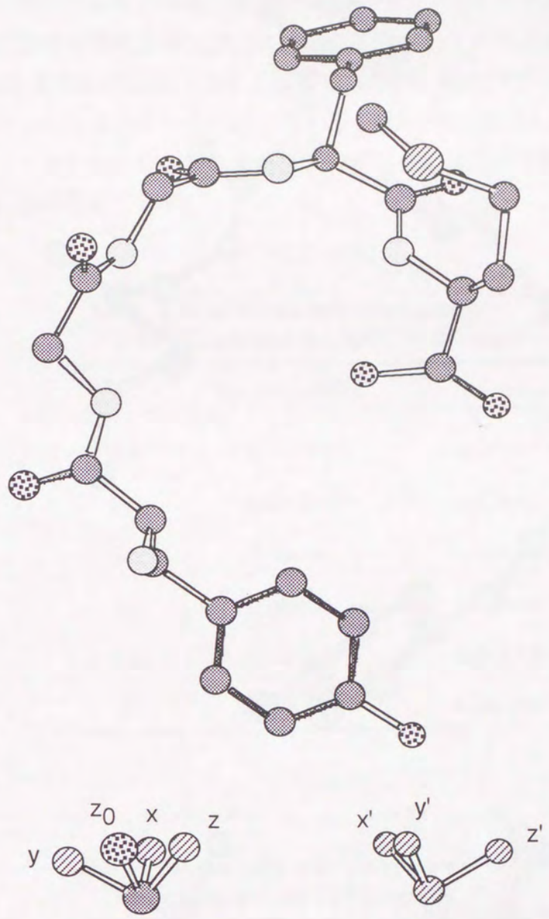


Fig. 28. Preferred orientation and structure of Met-enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal. (●) Carbon atoms, (⊗) oxygen atoms, (○) nitrogen atoms, (⊘) sulfur atom. The molecular frame(x, y and z) and principal order frame(x', y' and z') are also included. The direction of z_0 in the molecular frame indicates the external magnetic field director.

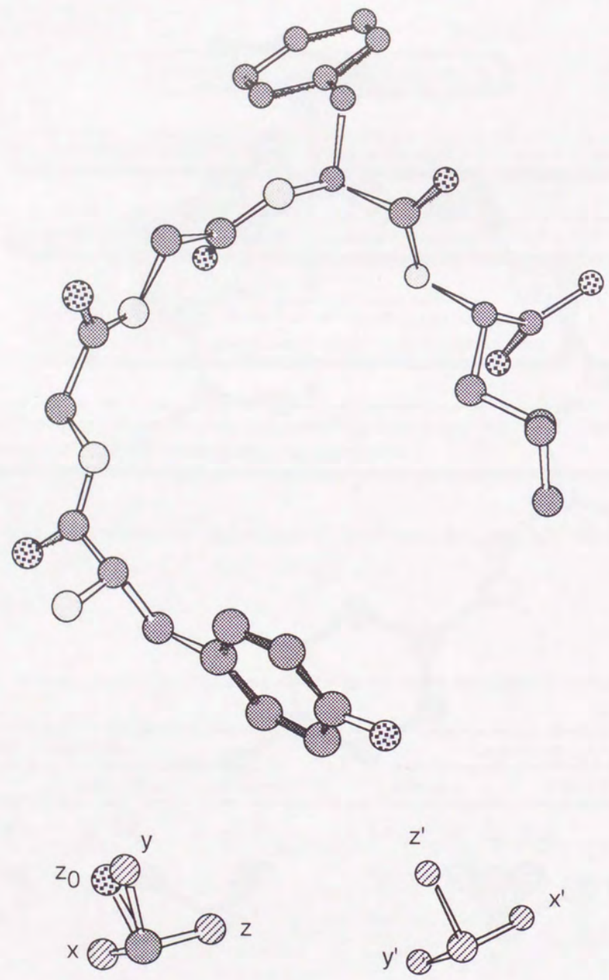


Fig. 29. Preferred orientation and structure of Leu-enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal. (●) Carbon atoms, (⊗) oxygen atoms, (○) nitrogen atoms. The molecular frame (x, y and z) and principal order frame (x', y' and z') are also included. The direction of z_0 in the molecular frame indicates the external magnetic field director.

Table 9において実験値とよく一致した直接結合定数の計算値が得られており、本計算手法の妥当性が裏付けられている。得られた配向パラメータをTable 10に示す。この配向パラメータは任意の分子座標系(x,y,z)に関して計算されているため、Leu-enkephalinとMet-enkephalinを単純に比較することはできないが、配向パラメータから構成される行列を対角化することにより３つの主値に減じると比較検討が容易となる。そこで、得られた配向パラメータを対角化して得た主値をTbale 11に、またその配向主軸系(x',y',z')をFig.28及びFig.29に併せて示す。

Table 10 Order parameters of enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal

	Met-enkephalin	Leu-enkephalin
Sxx	0.00012	0.00041
Syy	-0.00055	-0.00018
Szz	-0.00064	-0.00023
Sxy	0.00088	0.00010
Sxz	0.00090	0.00010
Syz	-0.00022	-0.00063

Table 11 Principal axes order parameters of enkephalin dissolved in the CsPFO liquid crystal

	Met-enkephalin	Leu-enkephalin
Sx'x'	0.0016	0.00043
Sy'y'	-0.0032	0.00043
Sz'z'	0.0016	-0.00086

第三項　Met-enkephalin及びLeu-enkephalinの配向と構造に関する考察

Fig.28及びFig.29より液晶膜中ではMet-及びLeu-enkephalinともにβターン構造をとっていることが分かる。また、Fig.28及びFig.29において液晶中の配向についても理解することができる。即ち、CsPFO分子は多数が集合してディスク形の分子集合体を形成し、それが水の中に溶解した状態でネマティック液晶となるが、この分子集合体は表面の法線が外部静磁場の方向(z_0)と一致するように配向する[31]。したがって、enkephalinはベクトルz_0の方向に配向していると考えることができる。このことから、Fig.28及びFig.29において配向について考えると、Tyr、Phe及びMetあるいはLeu残基の側鎖が液晶の非極性領域と相互作用しているものと思われる。また、Gly残基はいずれも非極性領域に位置しており、全てのアミド結合においてアミドプロトンを分子の疎水面に、またカルボニル基の酸素原子を親水面に向けているためenkephalinは液晶の比較的極性の高い膜/水界面に溶解していると考えられる。CsPFO液晶は中性付近で液晶を形成するため、enkephalinは双性イオン型で膜中に存在していると考えられる。したがって、上記の疎水性相互作用に加えて、N末端側の$-NH_3^+$基およびC末端側の解離した$-COO^-$基と液晶の極性基との静電相互作用が、膜中においてenkephalinがとるβターン構造の安定化に寄与していると思われる。

これまでenkephalinに関してはNMRによりlysophosphatidylcholine[3a]あるいはSDSミセル[55]中での構造が推定されているが、膜中における構造としてC末端アミノ酸残基のアミド基とGly^{2}残基のカルボニル基が水素結合した(5→2)βターン構造が提案されている。しかし、本研究では、C末端アミノ酸残基のアミド基の窒素原子とGly^{2}残基のカルボニル基の酸素原子との距離は、Met-enkephalinでは7.7Åであり、またLeu-enkephalinでは8.3Åといずれもそのような分子内水素結合が可能な位置関係にないことが分かった。lysophosphatidylcholineミセル中のenkephalinについての報告では、溶質と常磁性シフト試薬との結合実験を行い、アミドプロトンの化学シフトのシフト量からその構造を類推しているため構造に結びつく情報を直接的に得たものではなく、またSDSミセルを用いた実験ではいくつかの分子内NOEの観測に成功しているが、構造を得るには至っていない。したがって、これまでに提案されている膜中のenkephalinの構造における分子内水素結合の存在は否定できるものと思われる。膜中においてenkephalinがとるβターン構造は、先に述べたように膜との相互作用により安定化されているものと考えるのが妥当であろう。

Met-enkephalinの液晶中における配向をFig.30及びFig.31に示す。Fig.30は配向主軸

系のy'軸から見たものであり、Fig.31はz'軸から見たものである。また、Leu-enkephalinの配向を同様にFig.32及びFig.33に示す。これらの図とTable 11に示した配向パラメータの主値を比較検討すると、両者の配向には大きな差異が存在することが分かる。Leu-enkephalinは、Table 11に示したように$S_{z'z'}$値が負で絶対値が最も大きいことから、配向主軸系のz'軸を中心として配向性が高いことが示されるが、このz'軸方向への分子の投影はFig.31から分かるようにコンパクトな形をしている。CsPFO液晶の表面の法線方向が外部静磁場に平行に配向することを考えると、z'軸は$S_{z'z'}$値が負で絶対値が最も大きいことから外部静磁場に垂直に配向しやすいこととなる。即ち、z'軸はディスク状の液晶を構成する分子集合体の法線方向をとり易いこととなる。こうして、Leu-enkephalinは、その分子表面がディスク状のCsPFO液晶の法線方向に垂直になる形で溶け込み、配向し易いと考えられる。これに対し、Met-enkephalinは$S_{y'y'}$値が負で絶対値が最も大きいことから、y'軸を中心として配向性が高く、このy'軸はディスク状のCsPFO液晶の表面の法線方向に垂直な方向に配向し易いことが分かる。Met-enkephalinの場合は、2つの芳香環を含めて、この分子全体がCsPFO液晶に楔のように溶け込んでいる様子がうかがわれる(Fig.31)。Met-enkephalinの方がLeu-enkephalinよりも数倍の大きな配向パラメータを示すことも、液晶構成分子との相互作用が強く分子全体として液晶中に溶け込んでいることが理解できよう。

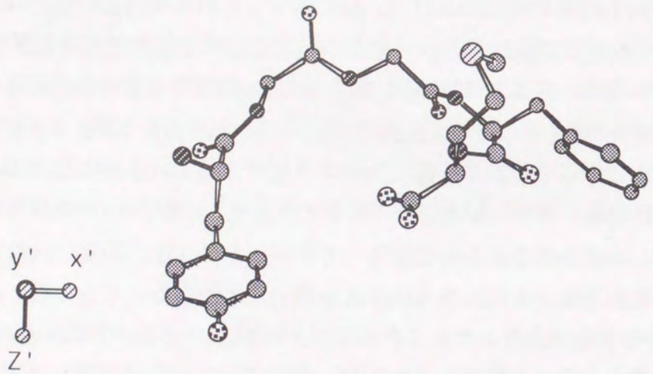


Fig. 30. Structure and orientation of Met-enkephalin dissolved in the CsPFO nematic phase.

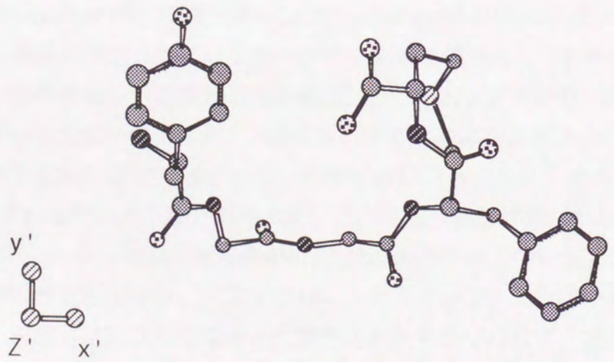


Fig. 31. Structure and orientation of Met-enkephalin dissolved in the CsPFO nematic phase.

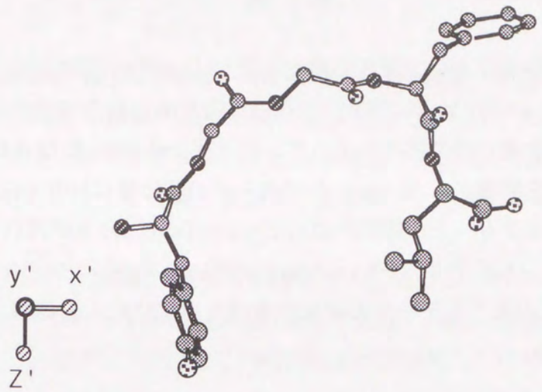


Fig. 32. Structure and orientation of Leu-enkephalin dissolved in the CsPFO nematic phase.

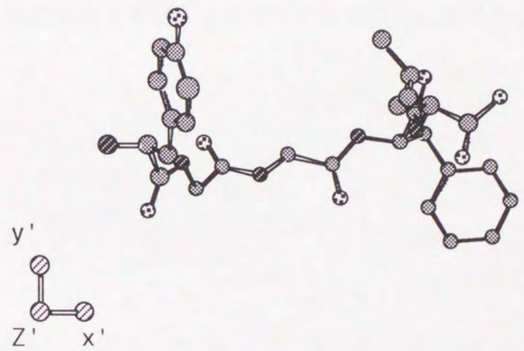


Fig. 33. Structure and orientation of Leu-enkephalin dissolved in the CsPFO nematic phase.

第五節　第三章のまとめ

以上のように、本研究において筆者が開発したNMAS液晶二次元NMR法によりMet-enkephalin及びLeu-enkephalinのCsPFO液晶中の配向と構造を決定し、それらの相違点を明らかとした。本章冒頭で述べたように、enkephalinはμ及びδレセプターと結合することにより活性を発現するが、μレセプターとの親和性はMet-enkephalinの方が強く、これに対しδレセプターとの親和性はLeu-enkephalinの方が強いことが報告されている[56]。この差異は、本章で導いた配向と構造の違いを反映しているとも考えられ、液晶NMR法の適用はこのようなテーマの解決に有効な方法になると期待される。

結　論

1. マジック角試料回転(Magic-Angle-Spinning: MAS)液晶二次元NMR法を開発することにより、従来の液晶NMR法では取り扱えなかった大きな分子の構造解析を可能とした。その結果、イオノホアであるlasalocid Aの液晶中の構造を決定し、その構造には配向場の変化に感応してヒンジとなる結合が存在することを明らかとすることができた。

2. 単純なMAS法の導入は配向に関する情報を消去してしまうので、この情報を復活させるべく、マジック角近くでの試料回転(Near-Magic-Angle-Spinning: NMAS)を利用することにより、上記のMAS液晶二次元NMR法と相補的なNMAS液晶二次元NMR法を開発した。これにより液晶NMR法の適用範囲を限定している直接結合情報を選択的かつ積極的に利用することを可能とした。その結果、生理活性ペプチドであるMet-enkephalin及びLeu-enkephalinの液晶中における構造と配向を決定することができ、両者の差異を明らかとすることができた。

3. 本論文では種々の天然イオノホアによる金属イオンの膜透過の研究を端緒とし、生体膜モデルとしての液晶系を用いて新しいNMR測定法を開発することにより、この液晶系における分子の構造と配向が汎用的に一般の生理活性物質についても求められることを示すことができた。この方法は、生体膜を反応場とする生理活性物質の機能と構造、あるいは配向との相関関係を考察する上で重要な情報を提供すると期待される。

謝　辞

本研究の遂行に当たり、ご指導と御鞭撻を賜りました藤原英明教授(現大阪大学医学部保健学科医用工学講座教授)に謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うに当たり、有益な御助言とご指導を賜りました大阪大学薬学部　大森秀信教授に感謝致します。

研究途上有益な御助言を多数頂きました大阪大学薬学部　藤井敏助教授、山縣ゆり子助手、高井均助手、遺伝情報実験施設高木達也講師に感謝致します。

本研究の500MHz NMR測定に際し、御便宜賜りましたバリアンジャパンリミテッドの串田克彦博士に感謝致します。

本研究をまとめるに当たり、御協力頂きました　鹿野哲司修士、國直人氏、直原高広氏、甲斐順子氏、益田隆史氏をはじめ大阪大学薬学部薬品物理化学講座の皆様に感謝致します。

実験の部

NMR測定はVarian VXR-200及びVarian UNITY-500を用いて行った。MAS条件下での測定は、Varian VXR-200については固体プローブを用いて行い、Varian UNITY-500についてはナノプローブを用いて行った。ここで、ナノプローブとは微量サンプルの測定を行うために開発されたプローブのことを指すが、高分解能を得るためにMASの技術を用いたものである。

試薬は特に記さない限り、市販品をそのまま用いた。

第一章の実験

第三節の実験

NMRサンプルの作成

100mMのNaClを含む10mMのリン酸緩衝液(pH8.1)中で、卵黄レシチン(Merck製)を用いてREVリポソーム(60mM)を逆相蒸発法[57]により作成し、8mMのランタニドシフト試薬($Dy(PPP)_2^{7-}\cdot 7Na^+$)を等量、およびロック信号用に10%の$D_2O$を加え、これをサンプルとした。ランタニドシフト試薬($Dy(PPP)_2^{7-}\cdot 7Na^+$)は、トリポリリン酸ナトリウム($Na_5P_3O_{10}$)および塩化ジスプロシウム($DyCl_3$)を市販品(和光純薬製)として入手し、次の反応により調製した[58]。

$$DyCl_3 + 2Na_5(PPP) \rightleftarrows Dy(PPP)_2^{7-}\cdot 7Na^+ + 3NaCl$$

^{23}Na-NMR測定

^{23}Na-NMR測定はVarian VXR-200を用いて測定周波数52.9MHzにて行った。化学シフト値は外部標準として3MのNaClのD_2O溶液を作成し、これに対して記録した。温度はNMR装置付属のメータで読みとり、その精度は±0.1℃であった。25℃において測定条件は、典型的にはパルスサイクルは0.6sであり、90°パルス幅は11.5μsであった。25℃における^{23}Naの緩和速度は反転回復法により測定した。リポソーム内側の^{23}Naの緩和速度は21.1s^{-1}であり、リポソーム外側の^{23}Naの緩和速度は59.1s^{-1}であった。

Na^+イオンのリポソーム膜透過速度測定

monensin(和光純薬製)、lasalocid A(Aldrich製)及びgramicidin A(和光純薬製)による

Na^+イオンの膜輸送速度を2D-EXSYにより測定した。monensin及びlasalocid AはNa塩として入手したものを用いた。これらのイオノホアのメタノール溶液を調製し、透過速度測定の際にはNMRサンプルに0.2mMの濃度となるように、1～10μlのメタノール溶液を添加した。コレステロールはメタノール溶媒から再結晶したものを用いた。2D-EXSY測定条件はphase sensitive modeでNOESYパルスを用いて、積算回数を64～128回、インクリメント数を64～512回で行った。2D-EXSYスペクトルは、128×128～512×512 data matrixで解析した。また、透過速度解析はAbelらの方法[17]に従い、プログラムを自作して行った。

nystatin及びamphotericin Bによる膜輸送速度の測定は、^{23}Na-NMRの一次元スペクトルの時間変化を追跡することにより行った。サンプルは、コレステロール(和光純薬製)をリン脂質に対し25%の重量比で含むリポソームを上述の方法により作成し、これを大過剰の100mMのKCl溶液に対して10～24時間透析を行いリポソーム外側のNa^+のみをK^+と置換することにより作成した。透析はCellulose透析膜(三光純薬製)を用いて行った。また、ランタニドシフト試薬はトリポリリン酸ナトリウム($Na_3P_3O_{10}$)から、DOWEX(50 X 8)を用いて$K_3P_3O_{10}$とし、これから$Dy(PPP)_2^{7-}\cdot 7K^+$を調製したものを用いた。透過速度測定の際にはイオノホアのDMSO溶液を調製し、nystatinは0.2mM、amphotericin Bは0.02mMとなるようにサンプルに添加した。また、benzyl alcohol(東京化成製)は蒸留精製したものを、0.02mMの濃度となるようにamphotericin Bの共存するサンプルに添加した。^{23}Na-NMR測定の積算回数は64～256回であった。非線形最小自乗解析による透過速度の計算には、大阪大学計算機センターライブラリープログラムSALSを用いて行った[59]。

温度可変実験

上記の透過速度測定の温度可変実験を行ったデータをTable 12、及びTable 13に示す。

Table 12 Temperature dependence of Na^+ transmembrane exchange rate constants(s^{-1}) promoted by carrier-type ionophore

carrier \ T/K	298	303	308	313	323	333	343
monensin	16.0	18.9		38.9	42.8	139	
lasalocid A			1.1	1.4	1.8	2.6	5.0
gramicidin A	7.0	14.3		17.4	26.6	42.1	

Table 13 Temperature dependence of Na^+ transmembrane exchange rate constants($\times 10^{-4}s^{-1}$) promoted by channel-type ionophore

channel \ T/K	298	303	308	313	318	328
nystatin	49.8		7.4		2.7	1.4
amphotericin B	22.8	7.9	5.9	3.1		
+benzyl alc.	2.1		2.8	4.4		

第二章の実験

第二節の実験

CsPFO(cesium perfluorooctanoate)液晶サンプルの作成

perfluorooctanoic acid(東京化成製)を次の方法によりCs塩に変換した[32]。perfluorooctanoic acidの水溶液に水酸化セシウム(ナカライテスク製)の水溶液を加えて中和し、溶媒を留去した後、エタノール溶媒から再結晶してCsPFOを得た。これを40:60の重量比でD_2Oと混合してCsPFO液晶を作成した。lasaslocid A(Aldrich製)は文献記載の方法に従いNa塩からCs塩に変換した[13c]。CsPFO液晶に1.5%の重量比でlasaslocid AのCs塩を溶解し、NMRサンプルとした。このサンプルについて、^{2}D-NMR測定をVarian VXR-200(30.7MHz)により行い、D_2Oの^{2}D信号の分裂から液晶相を形成していることを確認した。

MAS液晶一次元NMR測定

MAS条件下での^{1}H-NMR測定はVarian UNITY-500(500MHz)により行った。MASを行うために、NMRプローブとしてナノプローブを用いた。35℃におけるNMR測定条件は、遅延時間(1.0s)、90°パルス幅(8.0μs)、観測幅(4980Hz)、積算回数(24回)であり、0.5sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入した。ミセル相における測定は溶液プローブを用いて、測定温度50℃にて同様の測定条件で行った。

第三節の実験

MAS液晶二次元NMR測定

COSY/MAS実験: 35℃におけるCOSY/MAS実験は、積算回数(80回)、観測幅(4980Hz)、90°パルス幅(8.0μs)、遅延時間(0.5s)、検出時間(0.1s)、インクリメント数(512回)の測定条件で行った。また、0.5sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入した。データ解析は2048×2048 data matrixにて、F_1及びF_2軸にshifted sinebellの窓関数をかけて行った。ミセル相でのCOSY測定は溶液プローブを用いて、測定温度50℃にて同様の測定条件で行った。

ROESY/MAS実験: 35℃におけるROESY/MAS実験は、積算回数(128回)、観測幅(4980Hz)、90°パルス幅(8.0μs)、遅延時間(0.5s)、検出時間(0.1s)、混合時間(0.1s)、インクリメント数(256回)の測定条件で行った。また、COSY/MAS実験と同様に0.5sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入し、データ解析は2048×2048 data matrixにて、F_1及びF_2軸にshifted Gaussianの窓関数をかけて行った。スピンロック周波数は3.0kHzの強度であった。ミセル相での測定はROESY溶液プローブを用いて、測定温度50℃にて同様の測定条件で行った。

第四節の実験

lasaslocid Aの構造解析に用いたディスタンスジオメトリーおよびr.m.s.d値の計算は、使用言語Fortranにて自作プログラムにより、富士通S-4/IPを用いて行った。

第三章の実験

NMRサンプル

CsPFO液晶はCsPFO:H_2O:D_2Oを40:48:12の重量比で混合して作成した。Met-及びLeu-enkephalin(Sigma製)をCsPFO液晶に0.8%の重量比で溶解したものをNMRサンプルとした。このサンプルについて、^{2}D-NMR測定をVarian VXR-200(30.7MHz)により行い、D_2Oの^{2}D信号の分裂から液晶相を形成していることを確認した。

^{1}H-NMR測定

NMR測定は特に記述のない限り、Varian VXR-200(200MHz)により固体プローブを用いて、1500～2500Hzの試料回転速度で行った。

第二節の実験

ROESY/MAS実験: ROESY/MAS実験は、Leu-enkephalinについて30℃において行った。測定条件は、積算回数(256回)、観測幅(4700MH)、90°パルス幅(12.0μs)、遅延時間(0.5s)、検出時間(0.2s)、混合時間(0.1s)、インクリメント数(256回)の測定条件で行った。また、0.5sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入し、データ解析は2048×2048 data matrixにて、F_1及びF_2軸にshifted Gaussianの窓関数をかけて行った。スピンロック周波数は2.0kHzの強度であった。

Met-enkephalinについては、25℃においてVarian UNITY-500(500MHz)によりナノプローブを用いて行った。測定条件は、積算回数(256回)、観測幅(4800Hz)、90°パルス幅(8.0μs)、遅延時間(0.5s)、検出時間(0.1s)、混合時間(0.1s)、インクリメント数(192回)の測定条件で行った。スピンロック周波数は3.0kHzの強度であった。また、試料回転速度は3.5kHzに設定した。また、0.5sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入し、データ解析は2048×2048 data matrixにて、F_1及びF_2軸にshifted Gaussian及びsine bellの窓関数をかけて行った。

NOESY/MAS実験: NOESY実験は、Leu-enkephalinについて30℃において行った。測定は既存のパルスプログラムを一部変更し、DANTE及びspin lockパルスを挿入したものを用いて行った。DANTEパルスは90°のパルス幅で、またspin lockパルスは2msのパルス幅で印加した。測定は、積算回数(128回)、観測幅(3000Hz)、90°パルス幅(12.0μs)、遅延時間(0.5s)、検出時間(0.2s)、混合時間(0.1s)、インクリメント数(192回)の測定条件で行った。また、0.5sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入し、データ解析は2048×2048 data matrixにて、F_1及びF_2軸にshifted Gaussianの窓関数をかけて行った。

第三節の実験

COSY/NMAS実験: COSY/NMAS実験は、Leu-enkephalinについて30℃において行った。測定は、積算回数(256回)、観測幅(3000Hz)、90°パルス幅(12.0μs)、遅延時間(0.5s)、検出時間(0.2s)、インクリメント数(256回)の測定条件で行った。また、DANTEおよび0.4sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入し、データ解析は2048×2048 data matrixにて、F_1及びF_2軸にshifted sine bellの窓関数をかけて行った。

homo 2DJ/NMAS実験: homo 2DJ/NMAS実験は、Met-及びLeu-enkephalinについて、30℃において、積算回数(256～432回)、観測幅(3000Hz)、90°パルス幅(12.0μs)、遅延時間(0.6s)、検出時間(0.3s)、の測定条件で行った。また、F_1軸に関しては観測幅を50Hzに設定し、0.1～0.2sの間でデータを取り込んだ。DANTEおよび0.4sのpresaturationパルスを遅延時間に挿入し、データ解析は2048×1024 data matrixにて、F_1軸にsine bellの窓関数を、またF_2軸にshifted sine bellの窓関数をかけて行った。

第四節の実験

enkephalinの構造計算は使用言語Fortranにて自作プログラムにより、富士通S-4/IPを用いて行った。構造計算に際しては、Tyr1及びPhe4残基の芳香環の運動を180°フリップフロップと仮定した[60]。また、擬原子をWutrich則に従って置いた[61]。配向行列の対角化は自作プログラムにより、富士通S-4/IPを用いて行った。

引用文献

1) P. Lauger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 905 (1985).

2) a) B. Gysin, R. Schwyzer, *FEBS Lett.*, **158**, 12 (1983). b) W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, G. L. Stahl, and R. M. Epand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7028 (1987). c) S. Y. Chong, T. Kobayashi, I. Inoue, K. Takemoto, H. Ishitsuka, and K. Inoue, *Biochem. Biophys. Acta*, **940**, 180 (1988).

3) a) B. A. Behnam, C. M. Deber, *J. Biol. Chem.*, **259**, 14935 (1984). b) W. H. Graham, E. S. Carter, and R. P. Hicks, *Biopolymers*, **32**, 1755 (1992).

4) R. Schwyzer, *Biochemistry*, **25**, 6335 (1986).

5) H. C. Berg and E. M. Purcell, *Biophys. J.*, **20**, 193 (1977).

6) R. K. Gupta and P. Gupta, *J. Magn. Reson.*, **47**, 344 (1982).

7) a) B. Imperiali, S. L. Fisher, R. A. Moats, and T. J. Prins, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3182(1992). b) J. W. Brown and W. H. Huestics, *J. Phys. Chem.*, **97**, 2967 (1993). c) R. R. Ketchem, W. Hu, and T. A. Cross, *Science*, **261** (1993). d) K. J. Shon, Y. K. Luiz, and S. J. Opella, *ibid*, **252**, 1303 (1993). e) N. A. Manan and J. F. Hinton, *Biochemistry*, **33**, 6773 (1994).

8) C. R. Sanders, B. J. Hare, K. P. Howard, and J. H. Prestegard, *Prog. NMR spectrosc.*, 26, 421 (1994).

9) a) L. D. Field, S. Sternbell, and A. S. Tracey, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5249 (1977). b) L. D. Field and S. Sternbell, *ibid.*, **103**, 738 (1981).

10) a) K. S. Rohr, D. Nantz, and A. Pines, *J. Phys. Chem.*, **98**, (1994). b) P. Lesot, Y. Gounelle, D. Merlet, A. Loewenstein, and J. Courtieu, *ibid.*, **99**, 14871 (1995).

11) A. Pines, H. G. Gibby, and J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.*, **59**, 569 (1973).

12) A. Kimura, N. Kuni, T. Jikihara, and H. Fujiwara, *Bull. Magn. Reson.*, in press (1995).

13) a) S. C. Hartsel, S. K. Benz, R. P. Peterson, and B.S. Whyte, *Biochemistry*, **30**, 77 (1991). b) V. Fonseca, P. Daumas, L. R. Rasoloarijao, F. Heiz, R. Lazaro, Y. Trudelle, and O. S. Andersen, *ibid.*, **31**, 5340 (1992). c) R. Lyazghi, Y. Pointud, G. Dauphin, and J. Juillard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2, 1681 (1993).

14) F. G. Riddell and M. K. Hayer, *Biochem. Biophys. Acta*, **817**, 313 (1985).

15) a) D. C. Shung and R. W. Briggs, *J. Magn. Reson.*, **77**, 491 (1988). b) D. C. Shung, D. C. Buster, and R. W. Briggs, *ibid.*, **89**, 102 (1990).

16) C. L. Perrin and T. J. Dwyer, *Chem. Rev.*, **90**, 935 (1990).

17) E. W. Abel, T. P. J. Coston, K. G. Orrell, V. Sik, and D. Stephenson, *J. Magn. Reson.*, **70**, 34 (1986).

18) M. M. Pike, S. R. Simon, J. A. Balschi, and C. S. Springer Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 810 (1982).
19) L. E. Key, G. M. Clore, A. Bax, and A. M. Gronenborn, *Science*, **249**, 411 (1990).
20) W. Braun, G. Wider, K. H. Lee, and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **169**, 921 (1983).
21) K. Wakamatsu, A. Okada, M. Suzuki, T. Higashijima, Y. Masui, S. Sakakibara, and T. Miyazawa, *Eur. J. Biochem.*, **154**, 607 (1986).
22) a) H. Degani and H. L. Friedman, *Biochemistry*, **24**, 5022 (1974). b) D. J. Patel, C. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1786(1976). c) H. Degani, *Biochem. Biophys. Acta*, **509**, 364 (1978).
23) a) L. F. Lindoy, G. W. Walker, and G. W. Everett, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3659 (1990). b) P. S. K. Chia, L. F. Lindoy, G. W. Walker, and G. W. Everett, *ibid.*, **113**, 3659 (1991).
24) R. Lyazghi, A. Cuer, G. Dauphin, and J. Juillard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2, 35 (1992).
25) a) G. D. Smith, W. L. Duax, and S. Fortier, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6725 (1974). b) C. C. Chiang and I. C. Paul, *Science*, **196**, 1441 (1977).
26) G. R. Painter, R. Pollack, and B. C. Pressman, *Biochemistry*, **21**, 5613 (1982).
27) J. W. Emsley and J. C. Lindon, "*NMR Spectroscopy Using Liquid Crystal Solvents*", Pergamon, Oxford (1975).
28) J. Courtieu, D. W. Alderman, and D. M. Grant, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6783 (1981).
29) J. Courtieu, J. P. Bayle, and B. M. Fung, *Prog. NMR spectrosc.*, 26, 141 (1994).
30) J. Forbes, J. Bowers, X. Shan, L. Moran, and E. Oldfield, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1, **84**. 3821 (1988).
31) N. Boden, P. H. Jackson, and K. Mcmullen. *Chem. Phys. Lett.*, **65**, 476 (1979).
32) P. Ram, L. Mazzola, and J. H. Prestegard, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3176 (1989).
33) C. Weber, G. Wider, B. V. Freyberg, R. Traber, W. Braun, H. Widmer, and K. Wüthrich, *Biochemistry*, **30**, 6563 (1991).
34) J. C. Beloil, V. Biou, G. Dauphin, J. Garnier, N. Morellet, and F. Vaufrey, *Magn. Reson. Chem.*, **32**, 83 (1994).
35) A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, and J. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811 (1984).
36) a) H. Kessler, J. W. Bats, C. Griesinger, S. Koll, and K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1033 (1988). b) D .L. Turner, *J. Magn. Reson.*, A **107**, 239 (1994).
37) C. Griesinger and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **75**, 261(1987).
38) C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. D. Leew, and C. Altona, *Tetrahedron*, **36**, 2783(1980).
39) G. M. Crippen, *J. Comp. Phys.*, **24**, 96 (1977).
40) W. Braun and N. Go, *J. Mol. Biol.*, **186**, 611 (1985).
41) A. D. Kline, W. Braun, and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **189**, 377 (1986).

42) M. Vasquez, G. Nemethy, and H. A. Scheraga, *Chem. Rev.*, **94**, 2183 (1994).
43) M. J. D. Powell, *Computer J.*, **7**, 155 (1964).
44) A. D. MacLachlan, *J. Mol. Biol.*, **128**, 49 (1979).
45) 大瀧仁志、田中元治、舟橋重信、"溶液反応の化学"、学会出版センター、1989、p 31.
46) H. Fujiwara, A. Kawamura, T. Takagi, and Y. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 125 (1983).
47) J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, and H. R. Morris, *Nature*, **258**, 577 (1975).
48) D. Boudot, D. Canet, J. Brondeau, and J. C. Boubel, *J. Magn. Reson.*, **83**, 428 (1989).
49) V. Sklenar and A. Bax, *J. Magn. Reson.*, **75**, 378 (1987).
50) G. Bodenhausen, R. Freeman, G. A. Morris, and D. L. Turner, *J. Magn. Reson.*, **31**, 75 (1978).
51) E. D. Becker 著、斎藤肇、神藤平三郎 訳、"高分解能NMR"、東京化学同人、1983、p82.
52) P. Diehl, P. M. Henrichs, and W. Niederberger, *Mol. Phys.*, **1**, 139 (1971).
53) C. L. Khetrapal, A. C. Kunwar, A. S. Tracey, and P. Diehl, *Nuclear Magnetic Resonance Studies in Lyotropic Liquid Crystals*, in "*NMR Basic Principles and Progress*" ed by P. Diehl, E. Fluck, and R. Kosfeld, **9**, Springer, Heidelberg (1975).
54) P. Ram, L. Mazzola, and J. H. Prestegard, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3176 (1989).
55) D. Picone, A. Dursi, A. Motta, T. Tancredi, and P. A. Temussi, *Eur. J. Biochem.*, **192**, 433 (1990).
56) R. R. Goodman, S. H. Snyder, M. J. Kuhar, and S. Y. Young III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6239 (1980).
57) F. Szoka, F. Olson, T. Heath, W. Vail, E. Wayhew, and D. Papahadjopoulos, *Biochem. Biophys. Acta*, **601**, 559 (1980).
58) S. C. Chu, M. M. Pike, E. T. Fossel, T. W. Smith, J. A. Balshi, and C. S. Springer, *J. Magn. Reson.*, **56**, 33 (1984).
59) 中川徹、小柳義夫、"最小二乗法による実験データ解析"、東京大学出版会、1981.
60) A. Naito, M. Kamihara, S. Tuzi, and H. Saito, J. *Phys. Chem.*, **99**, 12041 (1995).
61) K. Wutrich, M. Billeter, and W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **169**, 949 (1983).