

第 17 章 3 次元, 4 次元 NMR とその他

17.1 3 次元 NMR

2 次元 NMR からの当然の延長として 3 次元以上の多次元 NMR が考えられる。たんぱく質等の巨大分子の立体構造を NMR により解明しようという要求が多次元 NMR の発展を促した。同時に、コンピュータの高速化、IC メモリ、ハードディスク等の容量の増大、磁場勾配パルスを用いることによる測定時間の短縮等、ハード、ソフト両面での進展が、3 次元、4 次元 NMR を可能にした。初めに、 ^1H 共鳴のみが関与する等核 3 次元 NMR について述べ、ついで、 ^1H と ^{15}N あるいは ^1H と ^{13}C 等異なる 2 つの核が関与する 2 核 3 次元 NMR、さらに、 ^1H 、 ^{15}N 、 ^{13}C の 3 核 3 次元 NMR について述べる。

(A) 等核 3 次元 NMR

2 つの等核 2 次元 NMR を連続的に組み合わせることによって等核 3 次元 NMR になる [1-3]。最初の 2 次元 NMR の混合期以降を、続く第 2 の 2 次元 NMR で置き換えるので、2 つの発展期ができる。それらの時間変数を t_1 、 t_2 、検出期の時間変数を t_3 とし、対応するフーリエ変数を ω_1 、 ω_2 、 ω_3 とすると、スペクトルは $(\omega_1, \omega_2, \omega_3)$ 空間の中の強度分布になる。図 17.1 に測定の時間経過を示す。

互いに相関を持つ異なる 3 個のスピンの周波数を ω_A 、 ω_B 、 ω_C とすると、3 次元 NMR には次の異なる 5 種類のピークが現れる。ここで 2 つの混合過程を m1、m2 で示す。

	m1	m2
	ω_1	ω_2 ω_3
交差ピーク	ω_A :	ω_B : ω_C
($\omega_1 = \omega_2$) 交差 対角ピーク	ω_A :	ω_A : ω_B
($\omega_2 = \omega_3$) 交差 対角ピーク	ω_A :	ω_B : ω_B
バックトランスファーピーク	ω_A :	ω_B : ω_A
対角ピーク	ω_A :	ω_A : ω_A

交差 対角ピークは異なる核への磁化移動が 1 つの混合過程でのみ起こることによって現れ、バックトランスファーピークは異なる核への磁化移動が 2 つの混合過程のいずれにおいても起こることによって出現する。 $\omega_1 = \omega_2$ の面は m2 混合過程による 2 次

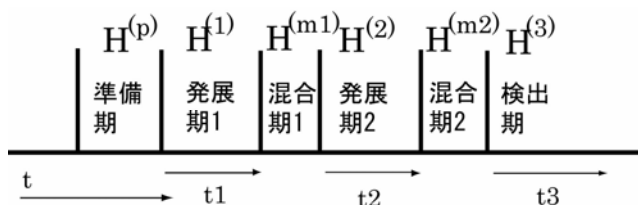


図 17.1 3次元NMR測定の時経過. $H^{(p)}$, $H^{(1)}$, $H^{(m1)}$, $H^{(2)}$, $H^{(m2)}$, および $H^{(3)}$ は, それぞれ, 準備期, 発展期1, 混合期1, 発展期2, 混合期2, および, 検出期におけるハミルトニアンである. t_1 , t_2 , t_3 は, それぞれ, 発展期1, 発展期2, 検出期の時間変数である

元 NMR, $\omega_2 = \omega_3$ の面は $m1$ 混合過程による2次元 NMR, $\omega_1 = \omega_3$ の面は $m1$, $m2$ 混合過程によるバックトランスファー面を表す. 2つの混合過程が異なる場合が等核3次元 NMR で特に重要である.

第1の混合過程 $m1$ が NOESYタイプで第2の混合過程 $m2$ が TOCSY (HOHAHA)タイプの NOE - TOCSY (HOHAHA) 3次元 NMR の場合を考えよう. 図 17.2 にパルス系列を示す. 混合期1の τ_m 間に交差緩和による磁化移動が起こり, 混合期2の MLEV-17で J 結合による等方性混合の磁化移動が起こる. 図 17.3 に示すように, スペ

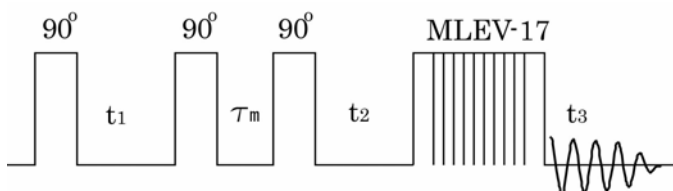


図 17.2 NOE - TOCSY (HOHAHA) 3次元 NMR 測定のパルス系列

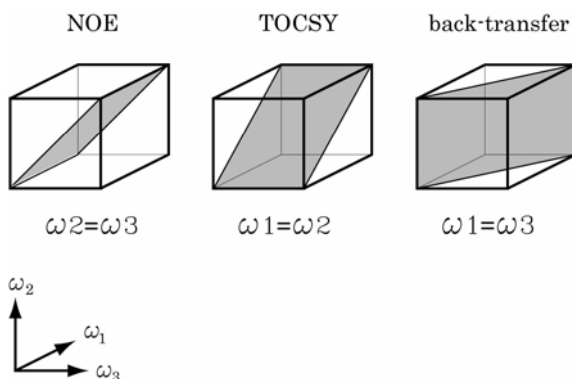


図 17.3 NOE - TOCSY (HOHAHA) 3次元 NMR スペクトルの2次元断面. NOE面, $\omega_2 = \omega_3$; TOCSY面, $\omega_1 = \omega_2$; バックトランスファー面, $\omega_1 = \omega_3$

クトルの $\omega_2 = \omega_3$ の面をNOE面といい, ω_1 と $\omega_2 (= \omega_3)$ の交差ピークはNOE相関を表す. この2次元スペクトルは従来のNOESYと同じである. $\omega_1 = \omega_2$ の面をHOHAHA面といい, $\omega_2 (= \omega_1)$ と ω_3 の交差ピークはJ 結合による相関を表す. これは従来のTOCSYスペクトルと同じである. $\omega_1 = \omega_3$ の面はパクトランスファー面で, ω_2 と $\omega_3 (= \omega_1)$ の交差ピークは2つの共鳴がNOEでもJ 結合でも相関をもつことを示す.

(B) 2核3次元 NMR

^1H と ^{15}N あるいは ^1H と ^{13}C 等の2つの異なる核の共鳴が関与する3次元NMRである. 測定は ^{15}N あるいは ^{13}C でラベルした試料を用いて行われる.

() NOESY - HMQC

NOESYとHMQCを組み合わせたものが, NOESY - HMQC[4-6]と呼ばれる2核3次元NMRである. アミド基が ^{15}N でラベルされたたんぱく質水溶液に適用される. パルス系列を図17.4に示す. 観測帯域をアミド ^1H の共鳴領域にとり, その中心に観測周波数を設定する. 準備期の第1 $^1\text{H}90^\circ$ パルスは磁化の定常状態を作るためのもので, 各 t_1

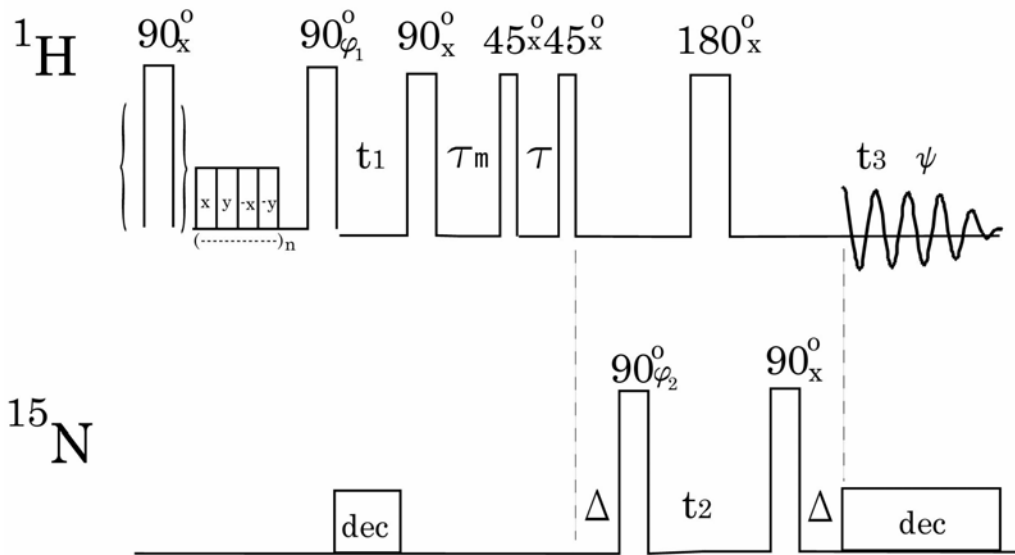


図 17.4 NOESY - HMQCのパルス系列. アミド ^1H 領域を観測周波数帯域とし, 観測周波数をその中心に設定. サイドバンドを利用したオフセット DANTE で水を飽和させる. パルス位相 $\phi_1 = x, y, -x, -y$; $\phi_2 = 4(x), 4(-x)$; 積算 $\phi = 2(x), 4(-x), 2(x)$. データは奇数番目と偶数番目を交互に別々に保存する. ω_2 軸の QD のために t_2 を 90° 増加して繰り返す. 第 1 のパルスは各新しい t_1 の最初のスキャンにのみ適用する. Δ は T_2 緩和を考慮して $2\pi/2^1 J_{\text{NH}}$ より僅かに小さく設定する. $45^\circ - \tau - 45^\circ$ パルスは水の信号を消すための jump-and-return パルス ($\tau \approx 2\pi / (2\delta_{\text{H}_2\text{O}})$). dec は ^{15}N のデカップリングで, WALTZ-16 あるいは GARP が用いられる

の最初にのみ加える。次の弱い $x, y, -x, -y$ パルスはサイドバンドを利用したオフレンジの DANTE パルスで、水の信号を飽和するためのものである。発展期 1 (t_1) で各プロトンの共鳴周波数を記憶する。この間 ^{15}N を WALTZ 等により広帯域デカップルして、 ^{15}N との J 結合による時間発展を除く。発展期 1 直後の $^1\text{H}90^\circ$ パルスで ^1H 縦磁化を作る。混合時間 τ_m 間にこのプロトン ($\omega_1 = \omega_{\text{H}}$) から NH プロトン ($\omega_3 = \omega_{\text{NH}}$) へ NOE による磁化移動を行う。混合時間の中にホモスパイルパルスを加えて、干渉性の磁化移動を阻止する。 $45^\circ - \tau - 45^\circ$ パルスで横磁化を作り、 $\Delta (2\pi/(2J_{\text{NH}}))$ 時間待った後、 $^{15}\text{N}90^\circ$ パルスで NH プロトンからそれに直接結合している ^{15}N へ磁化移動を行う。 $45^\circ - \tau - 45^\circ$ パルス ($\tau \approx 2\pi/(2\delta_{\text{H}_2\text{O}})$, $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ は観測周波数から測った水の共鳴周波数) は水の信号を励起しない jump-and-return パルスである。発展期 2 (t_2) で ^{15}N を時間発展させる。発展期 2 の中央に $^1\text{H}180^\circ$ パルスを印加し、 ^1H との J 結合をデカップルする。最後の $^{15}\text{N}90^\circ$ パルスで、 ^{15}N 周波数 ($\omega_2 = \omega_{\text{N}}$) でラベルされた ^{15}N 磁化をそれに直接結合している ^1H (アミドプロトン) の逆位相横磁化に変換する。さらに Δ 時間待って順位相横磁化になってから、 ^{15}N を GARP 等で広帯域デカップルして、アミド ^1H を検出する ($\omega_3 = \omega_{\text{NH}}$)。ピークは ($\omega_1, \omega_2, \omega_3$) = ($\omega_{\text{H}}, \omega_{\text{N}}, \omega_{\text{NH}}$) に現れる。(ω_1, ω_3) 平面への投影は NH プロトンとの間の通常の NOESY ピークと同じであるが、 ω_2 軸としてアミドの ^{15}N の周波数軸 (ω_{N}) を導入することで分離を良くしている。この 3 次元 NMR は ^{15}N で編集された NOESY (3D ^{15}N -edited NOESY) とも言われる。

NOE と HMQC の順序を入れ替えた HMQC - NOESY の実験も可能である [7]。しかし、たんぱく質水溶液試料のアミド ^1H の NOE を調べる場合には、NOESY - HMQC の方が望ましい。なぜならば、HMQC - NOESY ではすべての ^1H を観測するので、水の大きな信号がたんぱく質からの小さな信号を覆い隠すのに対して、NOESY - HMQC ではアミド ^1H のみを観測するので、水の共鳴を観測域外に排除することができるからである。

() TOCSY (HOHAHA) - HMQC

TOCSY (HOHAHA) と HMQC を組み合わせたものが TOCSY (HOHAHA) - HMQC である [4]。パルス系列を図 17.5 に示す。準備期および発展期 1 は NOESY - HMQC と同じである。TOCSY のための混合期 1 は y 方向のトリムパルスで始まる。横磁化を y 成分のみにして直ちに $90^\circ x$ パルスを加えるので磁化は z 方向を向く。8ms 程度の待ち時間において WALTZ-16 で 30ms 程度等方性混合を行う。再び待ち時間において $90^\circ x$ パルスで y 磁化を作る。WALTZ-16 の前後においた待ち時間は回転系の NOE の効果を補償するためである。HMQC 部分以降は NOESY - HMQC と同じである。

前節と同様、 ^{15}N で一様にラベルされたたんぱく質水溶液試料に適用される。 α プロ

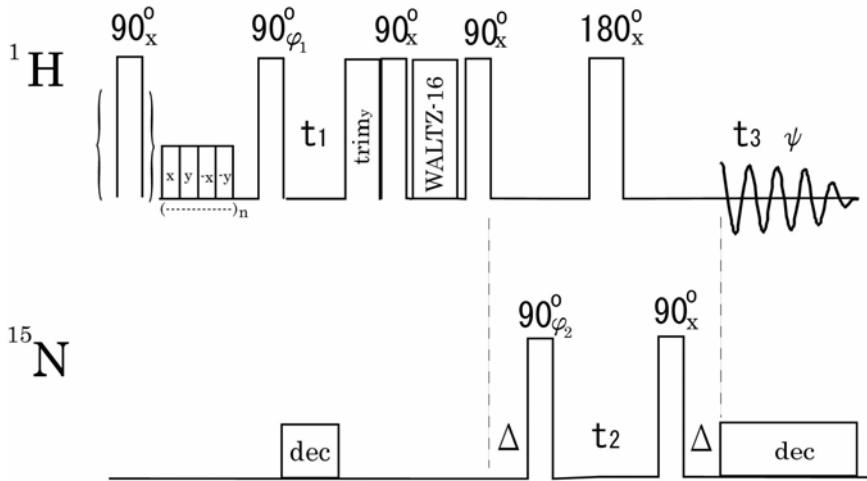


図 17.5 TOCSY (HOHAHA) - HMQCの脉冲系列. ^1H 周波数はアミドプロトン領域の中心に設定. 水をオフセット DANTE で飽和する. 脉冲位相 $\phi_1 = x, y, -x, -y$; $\phi_2 = 4(x), 4(-x)$; 積算 $\varphi = 2(x), 4(-x), 2(x)$. データは奇数番目と偶数番目を交互に別々に保存する. ω_2 軸の QDのために 90° 増加して繰り返す. 第 1 の脉冲は各新しい t_1 の最初のスキャンにのみ適用する. t_1 のあとの 90° パルスの前にトリムパルスをおく. Δ は T_2 緩和を考慮して $2\pi/(2J_{\text{NH}})$ より僅かに小さく設定する. dec は ^{15}N のデカップリング, WALTZ-16 あるいは GARP が用いられる

トンあるいは β プロトンと N 結合のネットワークで結ばれている NHプロトンとの交差ピークをアミド基の ^{15}N 化学シフトで区別するので, 2次元 TOCSY で重なり合っているアミドの交差ピークを分離するのに有効である.

() NOESY - HSQC と TOCSY - HSQC

前節に述べた NOESY - HMQC 脉冲系列の HMQC 部分に HSQC を用いると NOESY - HSQC になる[8,9]. 図 17.6 は NOE と磁場勾配パルスでコヒーレンス移動経路を選択する感度増強 HSQC を組み合わせた PFG - NOESY - HSQC の脉冲系列である[10]. 発展期 1 でラベルした ^1H と NOE で結ばれた NHプロトンの磁化を ^{15}N に移動し, これを発展期 2 で時間発展させ, 感度増強 HSQC で ^1H 磁化にして観測する. t_1 の QD は States-TPPI で行う. 磁場勾配パルス $G1+G2 = \pm(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}})$ で N タイプ, P タイプを選択する. $(\omega_1, \omega_2, \omega_3) = (\omega_{\text{H}}, \omega_{\text{N}}, \omega_{\text{NH}})$ にピークを示す.

() HCCH

^{13}C で一様にラベルされた試料では, $^1J_{\text{CH}}$ と $^1J_{\text{CC}}$ で次々とならないで 3 結合離れた ^1H を結びつける HCCH (あるいは HCCH - COSY) と呼ばれる 2 核 3 次元 NMR が可能である[11,12]. これを用いると $^3J_{\text{HH}}$ が 0 の場合でもビシナルプロトンを結びつけることが可

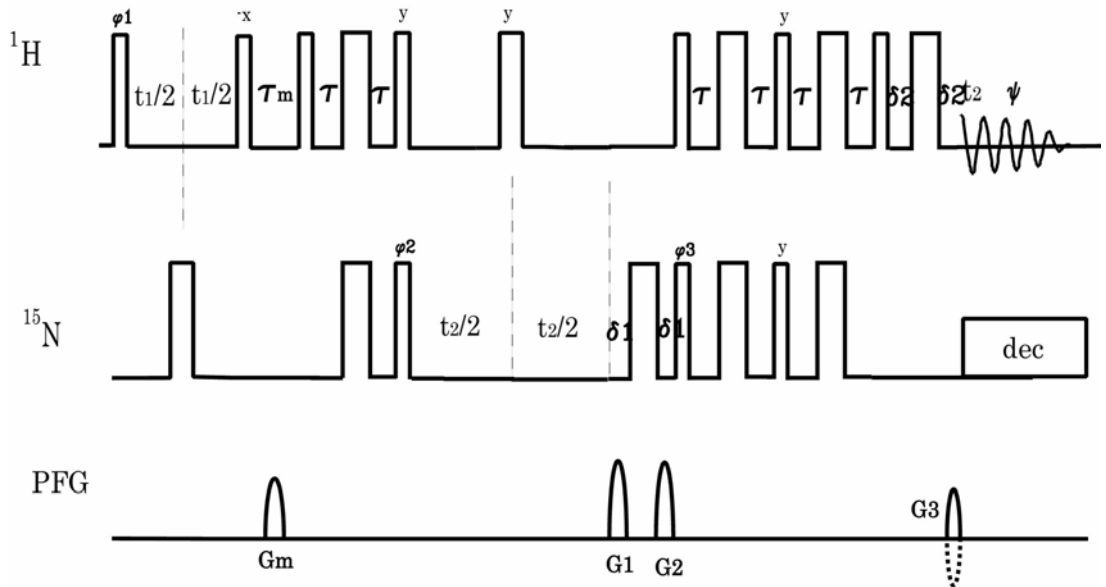


図 17.6 PFG - NOESY - HSQC のパルス系列．感度増強 HSQC を用いている．幅の狭いパルスは 90° パルス，広いパルスは 180° パルス，特に示す以外位相は x である．パルス位相 $\phi_1 = 2(x, y)$; $\phi_2 = 2(y)$, $2(-y)$; 積算 $\phi = y, 2(-y), y$ ． t_1 の QD を States-TPPI で行う．位相 ϕ_1 を t_1 の増加ごとに 180° 変える．磁場勾配パルス $G1 + G2 = \pm(\gamma_H/\gamma_N)G3$ で HSQC 部分の N タイプ, P タイプを選択する．dec は ^{15}N のデカップリング

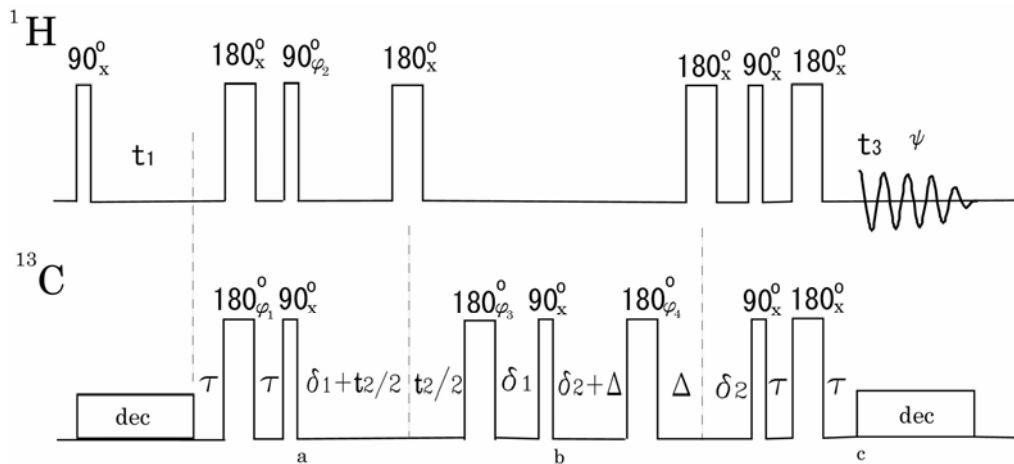


図 17.7 HCCH のパルス系列．待ち時間 $\tau = 2\pi/(4^1J_{\text{CH}})$, $\delta_1 = \delta_2 = 2\pi/(4^1J_{\text{CH}})$, $\Delta + \delta_2 = 2\pi/(8^1J_{\text{CC}})$. パルス位相 $\phi_1 = 16(x), 16(-x)$; $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = 2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y)$; $\phi_4 = 8(x), 8(y)$; 積算 $\phi = 2(x, -x, -x, x), 2(-x, x, x, -x)$. t_1 と t_2 の QD を States-TPPI で行う． ^1H および ^{13}C の最初の 90° パルスの位相をそれぞれ x, y と変え, t_1, t_2 の増加ごとにそれらの位相と積算位相を 180° 変える．dec は ^{13}C のデカップリング

能で、かつビシナルプロトンに直接結合している¹³Cも識別できる。パルス系列を図 17.7 に示す。

H₁ - C₁ - C₂ - H₂のスピンス系について説明しよう。隣接する核間にもみ J 結合があり、H₁ - C₂とH₂ - C₂間の J 結合は同じで $^1J_{CH}$ 、C₁ - C₂間の J 結合を $^1J_{CC}$ とする。また、¹HスピンをIで、¹³CスピンをSで表す。

発展期 1 (t_1) で¹H横磁化を時間発展させ、共鳴周波数を記憶する。この間、¹³Cの広帯域デカップリングで¹³Cとの結合を取り除く。続いてINEPT ($\tau = 2\pi/(4^1J_{CH})$) で¹H (H₁) 横磁化をそれ (H₁) に直接結合している¹³C (C₁) に磁化移動し、H₁に対して逆位相の¹³C (C₁) 横磁化を作る。図 17.7 のa点での密度行列の必要な部分は

$$-\gamma_H \cos(\omega_{H1} t_1) 2I_{1z}S_{1y} - \gamma_H \cos(\omega_{H2} t_1) 2I_{2z}S_{2y}$$

となる。これは発展期 2 (t_2) で¹³Cの化学シフトおよび $^1J_{CC}$ で時間発展する。¹Hとの結合は $t_2 + 2\delta_1$ ($2\delta_1 = 2\pi/(2^1J_{CH})$)の中央に挿入した¹H180°パルスでデカップルされる。 $t_2 + 2\delta_1$ 後の¹³C180°パルスは 2^1 時間間の¹³C化学シフトによる時間発展を再結像する。 $t_2 + 2\delta_1$ 後に加えた¹³C90°パルスにより、 $^1J_{CC}$ で結ばれた隣接¹³Cへ磁化を移す。b点での密度行列の交差ピークに関する部分は

$$\begin{aligned} & -\gamma_H \cos(\omega_{H2} t_1) \cos(\omega_{C2} t_2) \sin[\pi (2\delta_1 + t_2)^1J_{CC}] 2S_{1y}S_{2z} \\ & -\gamma_H \cos(\omega_{H1} t_1) \cos(\omega_{C1} t_2) \sin[\pi (2\delta_1 + t_2)^1J_{CC}] 2S_{1z}S_{2y} \end{aligned}$$

となり、逆位相の¹³C横磁化が現れる。待ち時間を $\delta_2 = 2\pi/(4^1J_{CH})$ 、 $\delta_2 + \Delta = 2\pi/(4^1J_{CC})$ と選んで、 $\delta_2 + \Delta - 180^\circ(^{13}C) - \Delta - 180^\circ(^1H) - \delta_2$ で互いの¹³Cに対して順位相、¹Hに対して逆位相の¹³C横磁化にする。最後に、 $90^\circ(^1H, ^{13}C) - \tau - 180^\circ(^1H, ^{13}C) - \tau$ で¹³C横磁化から¹Hへ磁化移動し、¹³Cに対して順位相の¹H横磁化になってから¹³Cを広帯域デカップルして、¹HのFIDを観測する。FID検出時c点での密度行列は

$$\begin{aligned} & \gamma_H \cos(\omega_{H2} t_1) \cos(\omega_{C2} t_2) \sin[\pi (2\delta_1 + t_2)^1J_{CC}] I_{1x} \\ & + \gamma_H \cos(\omega_{H1} t_1) \cos(\omega_{C1} t_2) \sin[\pi (2\delta_1 + t_2)^1J_{CC}] I_{2x} \end{aligned}$$

となる。 $\delta_2 + \Delta$ を $2\pi/(4^1J_{CC})$ としたが、実際にはC₂にさらにCがつながってC₁ - C₂ - C₃ - となっている場合、 $\delta_2 + \Delta$ の最適値は $2\pi/(8^1J_{CC})$ となる。

要約すると、発展期 1 (t_1) で ω_{H1} の周波数でラベルされたH₁スピンスがC₁スピンスに磁化移動し、これが発展期 2 (t_2) で $\omega_{C1} \pm ^1J_{CC}/2$ の周波数で時間発展したのち、C₂に磁化移動し、さらにH₂に磁化移動して検出期 (t_3) で ω_{H2} の周波数を観測する。

ω_1 軸は¹H軸で、 ω_2 軸はその¹Hに直接結合している¹³Cの軸、そして ω_3 軸はビシナル¹Hの軸である。これはCOSYの2つのプロトン周波数軸にもう1つ¹³C周波数軸を加えたこ

と同じである。 ^1H に直接結合している ^{13}C の周波数で選別することにより, COSYでは重なり合っている交差ピークを分離して観測できる。また, COSYでは2つのプロトンの二面体角が 90° に近いと, $^3J_{\text{HH}}$ が小さいため交差ピークが現れない場合があるが, 1結合の $^1J_{\text{CH}}$ 結合定数はコンホメーションによってほとんど変わらないので, HCCHの ω_1 ω_3 面上の交差ピークは消失することがない。

$t_2+2\delta_1$ 時間後の ^{13}C 混合 180° パルスを等方性混合パルス系列 (DIPSI) で置き換えた HCCH-TOCSYも提案されている[13]。

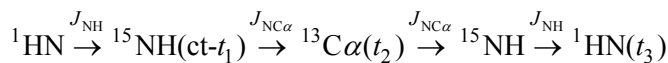
(C) 3核3次元 NMR

全ての窒素と炭素を ^{15}N および ^{13}C でエンリッチしたたんぱく質が得られるようになって, 3つの核 ^1H , ^{15}N , ^{13}C の共鳴が関与する色々な3次元NMRが登場した。伊倉らは HNCO, HNCA, HCA(CO)Nなどと名付けられた3核3次元NMRによるたんぱく質のスペクトル帰属法を示した[14,15]。これらは直接結合している核間の結合, $^1J_{\text{NH}}$, $^1J_{\text{NC}}$, $^1J_{\text{NCO}}$, $^1J_{\text{C-CO}}$, $^1J_{\text{CH}}$, $^1J_{\text{CC}}$, および, 化学結合2結合離れた核間の結合 $^2J_{\text{NC}}$ を利用する。パルス系列の名前は共鳴に関与する核で示す。括弧は直接観測しないが, 磁化移動で中継する核(基)を示す。いくつかの3核3次元NMRについて述べる。

() HNCA

これは同一残基内のアミド水素, アミド窒素と C_α , さらに, 1つ手前の残基の C_α を識別するものである[14,15]。図 17. 8 は t_1 発展に定時間法を用いたHNCAのパルス系列を示したものである[16]。 C_α とCOの共鳴領域は 100ppm以上離れているので, あたかも異なる核種のように2つの異なるチャンネルで励起する。

^1H , $^{13}\text{C}_\alpha$, ^{13}CO , ^{15}N の励起周波数はそれぞれ, 7.5ppm, 48ppm, 175ppm, 116ppm 近傍に設定する。下にコヒーレンスの移動経路を簡単に示す。矢印の上に関与する J 結合を, 括弧の中に発展期の時間変数を示す。ctは発展期が一定時間間隔であることを表す。



INEPTでアミド ^1H の磁化をアミド ^{15}N へ移す。ここで, i 番目の残基のアミド ^1H , アミド ^{15}N , カルボニル ^{13}C , ^1H , ^{13}C 等のスピ演算子を H_i^{N} , N_i , C_i' , H_i^α , C_i^α 等で表すと, 図 17. 8 のa 時点での密度行列は

$$\sigma(a) = \gamma_{\text{H}} H_{iy}^{\text{N}} \cos(^1J_{\text{NH}}\tau) - \gamma_{\text{H}} 2H_{iz}^{\text{N}} N_{iy} \sin(^1J_{\text{NH}}\tau) \quad (17.1.1)$$

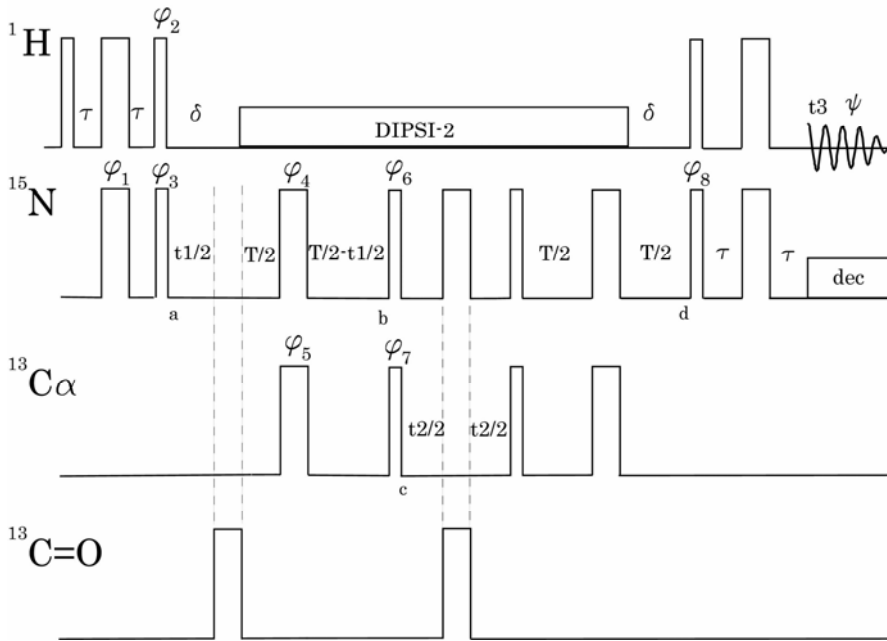


図 17.8 t_1 発展に定時間法を用いたHNCAのパルス系列．幅の狭いパルスは 90° パルス，広いパルスは 180° ，特に示す以外位相は x ． $\tau = 2\pi/(4^1J_{\text{NH}})$ ， 2.25ms ． $\delta = 2\pi/(2^1J_{\text{NH}})$ ， $T = 27\text{ms}$ ．パルス位相 $\phi_1 = x, -x$ ； $\phi_2 = y, -y$ ； $\phi_3 = x$ ； $\phi_4 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y)$ ； $\phi_5 = 16(x), 16(-x)$ ； $\phi_6 = 16(y), 16(-y)$ ； $\phi_7 = x, x, -x, -x$ ； $\phi_8 = y$ ，積算位相 $\phi = 2(x), 4(-x), 2(x)$ ． t_1 と t_2 のQDを行うためにそれぞれ位相 ϕ_3 と位相 ϕ_7 ，および積算位相をStates-TPPIに従って変える．decは ^{15}N のデカップリング

$\tau = 2\pi/(4^1J_{\text{NH}})$ に選ぶと（実際には緩和を考慮して理論値よりわずかに小さく設定する）第1項は消え， ^1H に対して逆位相の ^{15}N 横磁化が残る．待ち時間 $\delta = 2\pi/(2^1J_{\text{NH}})$ 後， ^{15}N 横磁化が ^1H に対して順位相になってから ^1H をデカップルする．カルボニル炭素との結合も $\text{CO}180^\circ$ パルスでデカップルする．磁化移動したアミド ^{15}N の横磁化は発展期1で時間発展する． ^1H デカップル中の ^{15}N 横磁化はa時点では x 磁化のように振舞う．簡単のために， $^2J_{\text{NC}}$ を無視すると，b時点において，C スピンが $1/2$ の ^{15}N 横磁化の位相は

$$\phi_+ = -\omega_{\text{N}}t_1 - ^1J_{\text{NC}\alpha}T/2$$

となり，C スピンが $-1/2$ の位相は

$$\phi_- = -\omega_{\text{N}}t_1 + ^1J_{\text{NC}\alpha}T/2$$

となるので， ^{15}N の化学シフトのみで時間発展 (t_1) して， $\omega_1 = \omega_{\text{N}}$ が識別される． J 結合による時間発展は時間 T に依存する一定の位相を与える． $T = 2\pi/^1J_{\text{NC}\alpha}$ で再結像がおり， $T = \pi/^1J_{\text{NC}\alpha}$ で逆位相磁化になる．

積演算子法による計算を行うと，b 時点における密度行列は

$$\begin{aligned}
\sigma(b) = & N_{ix} \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& + N_{iy} \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1) \\
& - 2N_{ix} C_{iz}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1) \\
& + 2N_{iy} C_{iz}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& - 2N_{ix} C_{i-1z}^\alpha \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1) \\
& + 2N_{iy} C_{i-1z}^\alpha \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& - 4N_{ix} C_{iz}^\alpha C_{i-1z}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& - 4N_{iy} C_{iz}^\alpha C_{i-1z}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1)
\end{aligned}
\tag{17.1.2}$$

となり, ^{15}N 横磁化には同一残基と1つ手前の残基のC に対して逆位相の成分が現れる. ここで $^{15}\text{N}90^\circ_y$ パルスとC 90°_x パルスを加え, これらを ^{15}N に対して逆位相のC 横磁化に変換する. 最適な変換は $\sin(^1J_{NC\alpha}T/2)\cos(^2J_{NC\alpha}T/2)$ および $\cos(^1J_{NC\alpha}T/2)\sin(^2J_{NC\alpha}T/2)$ を最大にする T で起こる. $^1J_{NC} / 2\pi = 11\text{Hz}$, $^2J_{NC} / 2\pi = -7\text{Hz}$ 程度なので, 実際には T を20-30msに選ぶと同一残基のC と同時に1つ手前の残基のC も励起される.

^{15}N の発展期に定時間法を用いた理由は, (1) C に対して逆位相の横磁化を作るための待ち時間 (T) の中に t_1 の時間発展をおくことによって, ^{15}N の横磁化の時間発展が短縮され, 緩和による減衰が軽減し感度が向上する, (2) 定時間法では ^{15}N の横磁化は t_1 とともに減衰しないので, t_1 に対して鏡映線形予測 (mirror image linear prediction) が適用できて, ω_1 軸方向の分解能が向上するためである.

c 時点における密度行列は

$$\begin{aligned}
\sigma(c) = & N_{ix} \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& + N_{iz} \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1) \\
& + 2N_{ix} C_{iy}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1) \\
& - 2N_{iz} C_{iy}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \cos(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& + 2N_{ix} C_{i-1y}^\alpha \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1) \\
& - 2N_{iz} C_{i-1y}^\alpha \cos(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& - 4N_{ix} C_{iy}^\alpha C_{i-1y}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \sin(\omega_N t_1) \\
& - 4N_{iz} C_{iy}^\alpha C_{i-1y}^\alpha \sin(^1J_{NC\alpha}T/2) \sin(^2J_{NC\alpha}T/2) \cos(\omega_N t_1)
\end{aligned}
\tag{17.1.3}$$

となり, 第4項と第6項がそれぞれ同一残基と1つ手前の残基の ^{15}N に対して逆位相のC 横磁化である. 発展期2 (t_2) でこれを時間発展させる. 発展期の中央に ^{15}N とCOに

180°パルスを加えデカップルしているので, C の化学シフトが $\omega_2 = \omega_{C\alpha}$ と識別される. ただし, C との J 結合による分裂が起らないように, t_2 の最大値を $2\pi/(2^1J_{CC})$ 以下に制限する.

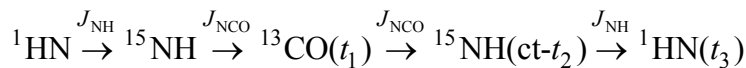
発展期2の後, C と ^{15}N に逆INEPTパルスを加え, d時点でC に対して順位相の ^{15}N 横磁化にする. $\delta = 2\pi/(2^1J_{\text{NH}})$ 時間前に ^1H デカップルを停止するので, ^1H に対して逆位相の ^{15}N 横磁化になる. ついで ^{15}N と ^1H に逆INEPTパルスを加え, ^{15}N に対して順位相の ^1H 横磁化にし, ^{15}N をデカップルして観測する ($\omega_1 = \omega_{\text{H}^1\text{N}}$). t_1 と t_2 のQDを行うためにそれぞれ位相 ϕ_3 と位相 ϕ_7 をStates-TPPI法に従って変える. 不要な水の信号は積算位相を $\varphi=2(x), 4(-x), 2(x)$ と変えることによって消去している.

スペクトルは $(\omega_1, \omega_2, \omega_3) = (\omega_{\text{N}}, \omega_{C\alpha}, \omega_{\text{H}^1\text{N}})$ に相関ピークを示す. ω_2 軸に現れる C_α は着目するアミドと同一残基の C_α の他に1つ手前の残基の C_α も含まれる. このパルス系列では, 磁化は最初アミド ^1H から出発してアミド ^{15}N に移り, 続いて C_α に移動した後, 逆転してアミド ^{15}N からアミド ^1H に戻る. これを出戻り型(out-and-back)のパルス系列と言う.

最初に報告されたHNCAのパルス系列はここで述べたパルス系列といくつかの点で異なる.(1) 発展期1が通常的时间発展で, 逆位相の横磁化を作るために別に待ち時間が必要である. そのために磁化の減衰が大きくなる.(2) 発展期2ではアミド ^1H , アミド ^{15}N , および $^{13}\text{C}_\alpha$ の3スピンコヒーレンスが時間発展する.(3) ^1H の広帯域デカップルが行われない.

() HNCO

これは1つの残基のアミド水素, アミド窒素, および, 1つ手前の残基のCOを識別するものである[14-17].()で述べたHNCAのパルス系列の C_α とCOを入れ替えることで, HNCOのパルス系列が得られる. ここでは図 17.9 に示した磁場勾配パルスを利用する感度増強のHNCOのパルス系列について述べる[17]. 下にコヒーレンスの移動経路を示す.



^1H 磁化をINEPTで ^{15}N に移す. さらに $T (= 2\pi/(2^1J_{\text{NCO}}))$, 実際には緩和による減衰を考慮して $= 2\pi/(3^1J_{\text{NCO}})$ 程度)時間待つて ^{15}N 横磁化がCOに対して逆位相にな

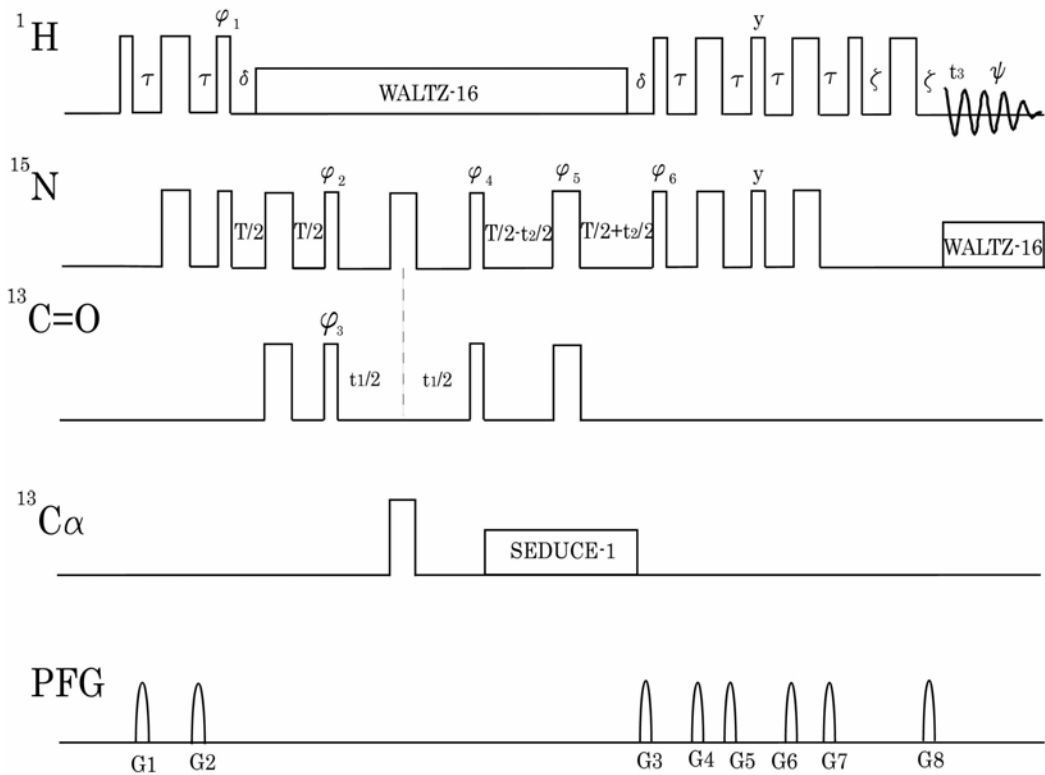


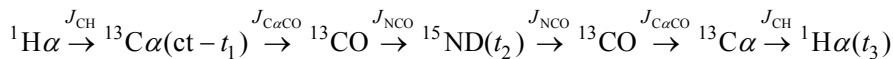
図 17. 9 磁場勾配パルスを用いた感度増強HNCOのパルス系列．幅の狭いパルスは 90° パルス，広いパルスは 180° ，特に示す以外位相は x ． $\tau = 2\pi/(4^1J_{\text{HN}})$ ， 2.25ms ． $\delta = 2\pi/(2^1J_{\text{NH}})$ ， $T = 24.8\text{ms}$ ．パルス位相 $\phi_1 = y, -y$ ； $\phi_2 = x, -x$ ； $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$ ； $\phi_4 = x$ ； $\phi_5 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y)$ ； $\phi_6 = x, -x$ ；積算位相 $\varphi = 2(x), 4(-x), 2(x)$ ． $G1 = G2 = G4 = G5 = G6 = G7 = 500\mu\text{s}, 0.05\text{T/m}$ ． $G3 = 0.3\text{T/m}, 2.5\text{ms}$ ， $G8 = \pm 0.291\text{T/m}, 0.25\text{ms}$ ． ζ は $G8$ の作動時間程度．各 t_2 に対して $G8$ と ϕ_6 の符号を \pm にして FID を取得し，別々のメモリーに保存する． t_2 の増加ごとに ϕ_4 の符号と積算位相を逆転する

ってから， ^{15}N ， CO に 90° パルスを印加して ^{15}N から CO へ磁化を移す．発展期 1 (t_1) で CO 横磁化を時間発展させる ($\omega_1 = \omega_{\text{CO}}$)．発展期 1 の中央に ^{15}N と $\text{C}\alpha$ に 180° パルスを加え，これらとの結合をデカップルしている．発展期 1 の後に ^{15}N と CO に 90° パルスを加えて， CO 磁化を ^{15}N へ戻し，発展期 2 (t_2) で時間発展させる ($\omega_2 = \omega_{\text{N}}$)．発展期 2 は時間間隔 $T (= 2\pi/(2^1J_{\text{NCO}}))$ の定時間で，発展期 2 の最後には ^{15}N 横磁化は CO に対して順位相になる．この間， SEDUCE-1 で $\text{C}\alpha$ 領域のみを選択的にデカップルする． ^1H は WALTZ-16 でデカップルされるが，前述の HNCA と同様，逆 INEPT 前

$\delta = 2\pi/(2^1J_{NH})$ 時間にデカップルを停止するので, 1H に対して逆位相の ^{15}N 横磁化になる. これを 1H および $^{15}N90^\circ$ パルスで 1H 横磁化にする. それ以降は感度増強モードのHSQCと同じである. G1 とG2, G4 とG5, およびG6 とG7 はパルスの不完全性から生ずる不要なコヒーレンスを消去する磁場勾配パルスである. コヒーレンス移動経路の選択はG3 とG8 で行われる. $G3/G8 = \gamma_H/\gamma_N$ とすることで, 必要なコヒーレンスのみが再結像され, 不要な水の信号は再結像されないで消える. 磁場勾配パルスによるコヒーレンス移動経路選択は検出器に大きな水の信号が入らないので, 水の信号消去に極めて有効である. 各 t_2 でG8 および ϕ_6 の符号を+ - にして, NタイプおよびPタイプのデータを取得する. スペクトルは $(\omega_1, \omega_2, \omega_3) = (\omega_{CO}, \omega_N, \omega_{HN})$ に相関ピークを示す.

() HCA(CO)N

HCA(CO)Nはたんぱく質の同じ残基の H_α, C_α , および, CO炭素を介してつながる次の残基のアミド窒素を関連づけるものである[14,15,18,19]. 図 17. 10 にHCA(CO)Nのパルス系列を示す[20]. この実験はアミド 1H の共鳴に関係しないので, D_2O 溶液で行われる. 1H の励起周波数を 4.7ppmに設定する. 下にコヒーレンスの移動経路を示す.



INEPTで 1H の磁化をこの 1H と直接結合している ^{13}C に移す ($\tau = 2\pi/(4^1J_{CH})$). この時点では H_α から C_α への磁化移動のほかに, H_β から C_β への磁化移動も起こる. しかし, さらにCOを経てNDへ磁化移動するものを選択するので, H_α から C_α への磁化移動のみを考える. 図 17. 10 のa 時点での密度行列は

$$\sigma(a) = -2H_{iz}^N C_{iy}^\alpha$$

である. 一定時間間隔 T の発展期 1 (t_1) で $^{13}C\alpha$ 横磁化を時間発展させて周波数を識別する ($\omega_1 = \omega_{C\alpha}$). $^{13}C_\alpha$ は $^1H_\alpha, ^{13}C_\beta, ^{13}CO, ^{15}N$ と結合しているが, それぞれに 180° パルスを加え, デカップルする. b 時点での密度行列は

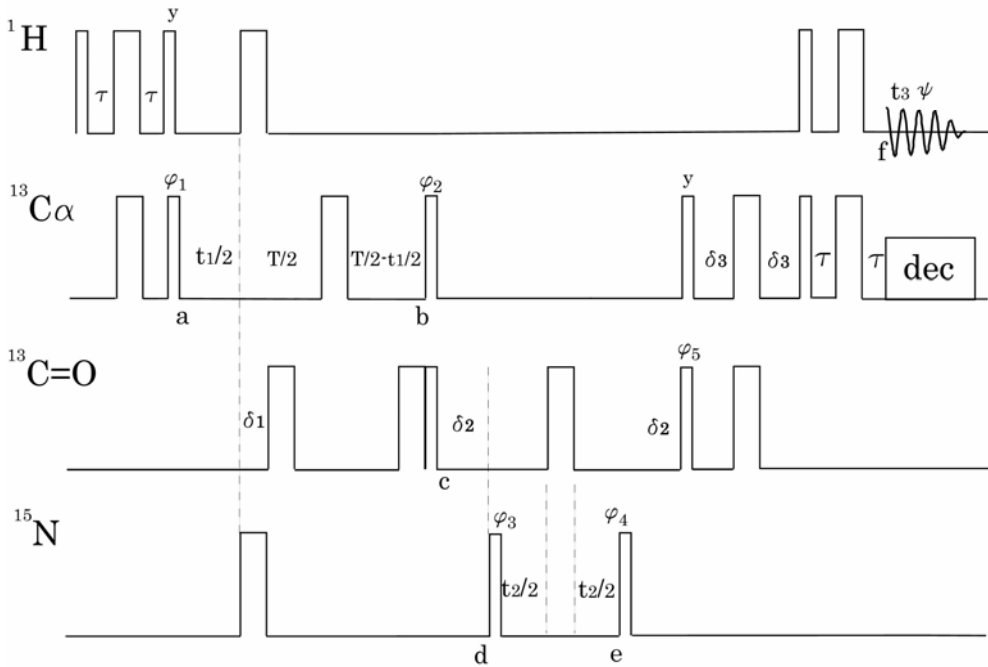


図 17.10 HCA(CO)N のパルス系列。幅の狭いパルスは 90° パルス, 広いパルスは 180° , 特に示す以外位相は x . $\tau = 2\pi/(4^1J_{CH})$, $\delta_1 = 2\pi/(4^1J_{C\alpha C'})$, $\delta_2 = 2\pi/(3^1J_{NC'})$, $\delta_3 = 2\pi/(3^1J_{C\alpha C'})$, $T = 2\pi/{}^1J_{C\alpha C\beta}$. パルス位相 $\phi_1 = x$; $\phi_2 = 4(y), 4(-y)$; $\phi_3 = x, -x$; $\phi_4 = 8(x), 8(-x)$; $\phi_5 = 2(x), 2(-x)$; 積算位相 $\varphi = x, -x, -x, x, 2(-x, x, x, -x), x, -x, -x, x$. t_1 と t_2 の QD を行うために, 位相 ϕ_1 , ϕ_3 と積算位相を States-TPPI に従って変える

$$\begin{aligned}
 \sigma(b) = & -2H_{iz}^\alpha C_{ix}^\alpha \cos({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \cos({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \sin(\omega_{C\alpha}t_1) \\
 & -2H_{iz}^\alpha C_{iy}^\alpha \cos({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \cos({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \cos(\omega_{C\alpha}t_1) \\
 & +4H_{iz}^\alpha C_{ix}^\alpha C'_{iz} \sin({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \cos({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \cos(\omega_{C\alpha}t_1) \\
 & -4H_{iz}^\alpha C_{iy}^\alpha C'_{iz} \sin({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \cos({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \sin(\omega_{C\alpha}t_1) \\
 & +4H_{iz}^\alpha C_{ix}^\alpha C_{iz}^\beta \cos({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \sin({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \cos(\omega_{C\alpha}t_1) \\
 & -4H_{iz}^\alpha C_{iy}^\alpha C_{iz}^\beta \cos({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \sin({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \sin(\omega_{C\alpha}t_1) \\
 & +8H_{iz}^\alpha C_{ix}^\alpha C'_{iz} C_{iz}^\beta \sin({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \sin({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \sin(\omega_{C\alpha}t_1) \\
 & +8H_{iz}^\alpha C_{iy}^\alpha C'_{iz} C_{iz}^\beta \sin({}^1J_{C\alpha C'}\delta_1) \sin({}^1J_{C\alpha C\beta}T/2) \cos(\omega_{C\alpha}t_1)
 \end{aligned}$$

(17.1.4)

となる. $T = 2\pi/{}^1J_{C\alpha C\beta}$ とすると, ${}^{13}C_\alpha$ 横磁化は C_β に対して順位相になる. また, $\delta_1 = \pi/(2^1J_{C\alpha C'})$ として, ${}^{13}C_\alpha$ 横磁化を CO に対して逆位相にそろえ, CO への磁化移動の

準備をする．したがって，b時点での密度行列は

$$\sigma(b) = -4 H_{iz}^{\alpha} C_{ix}^{\alpha} C'_{iz} \cos(\omega_{C\alpha} t_1) + 4 H_{iz}^{\alpha} C_{iy}^{\alpha} C'_{iz} \sin(\omega_{C\alpha} t_1)$$

となる．

COの共鳴は C_{α} 共鳴から 100ppm程度離れているので，CO180°パルスは， C_{α} を励起しない．しかし，このCO180°パルスは C_{α} 共鳴にプロッホジージェルト効果をもたらし， C_{α} 共鳴の位相のずれとなって現れる．これはCO180°パルスの間， C_{α} 共鳴がわずかなプロッホジージェルトシフトを起こすためである．b時点直前に加えたCO180°パルスはこの位相ずれを補償するものである．

ここで $^{13}C_{\alpha}$ 横磁化を C_{α} およびCOに加えた 90°パルスでCO炭素に移す．c時点での密度行列は

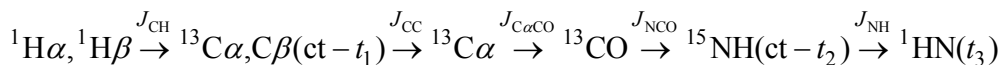
$$\sigma(c) = 4 H_{iz}^{\alpha} C_{iz}^{\alpha} C'_{ix} \cos(\omega_{C\alpha} t_1) - 4 H_{iz}^{\alpha} C_{iy}^{\alpha} C'_{ix} \sin(\omega_{C\alpha} t_1) \quad (17.1.5)$$

となり，第1項が C_{α} に対して逆位相のCO横磁化である．待ち時間 $\delta 2$ 待って， ^{15}N に対しても逆位相のCO横磁化を作ってから ^{15}N に 90°パルスを加えて，COと ^{15}N の2スピノヒーレンスをつくり，これを時間発展させる．発展期2 (t_2)の中央にCO180°パルスを加えて，2量子コヒーレンスと0量子コヒーレンスを入れ替える．これはHMQCタイプの時間発展である． $\omega_2 = \omega_N$ がラベルされる．発展期2の直後の ^{15}N 90°パルスでCO横磁化 ($^1H_{\alpha}$ ， $^{13}C_{\alpha}$ ， ^{15}N に対して逆位相)に戻し， $\delta 2$ 時間待って， ^{15}N に対して順位相にしてから，COと C_{α} に逆INEPTパルスを加え，さらに， 1H と $^{13}C_{\alpha}$ に逆INEPTパルスを加えて 1H 磁化に戻して観測する

スペクトルは $(\omega_1, \omega_2, \omega_3) = (\omega_{C\alpha}, \omega_N, \omega_{H\alpha})$ に相関ピークを示す．多数の H_{α} が1つの周波数近傍に重なっていても， $^{13}C_{\alpha}$ 周波数と隣接残基のアミド ^{15}N 周波数で区別することができる．このパルス系列も出戻り型のパルス系列である．

() CBCA(CO)NH

これはアミドの水素および窒素とその1つ手前の残基のC およびC を結びつけるものである[17,21]．図 17. 11 は磁場勾配パルスを用いたCBCA(CO)NHのパルス系列である[17]．COパルスの中で特にCO領域を選択的に励起する必要がある場合には，sinc関数型のパルスを用いる．コヒーレンスの移動経路を示す．



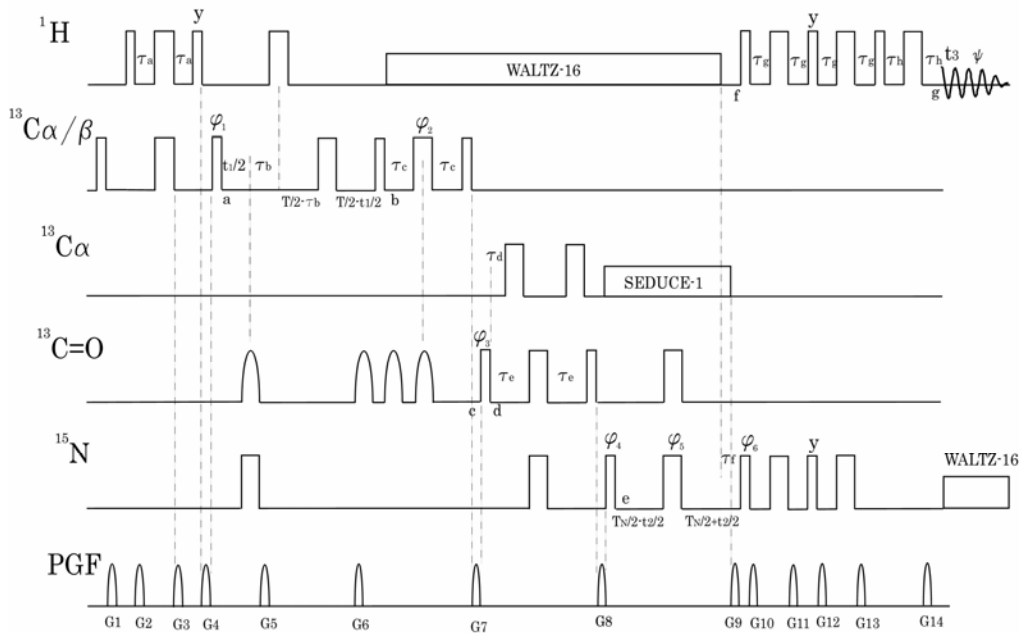


図 17. 11 磁場勾配パルスを用いたCBCA(CO)NHのパルス系列. 幅の狭いパルスは 90° パルス, 広いパルスは 180° .特に示す以外位相は x .COに加える余弦型のパルスは帯域選択的 180° パルス. パルス位相 $\phi_1 = x; \phi_2 = x, -x; \phi_3 = x, -x; \phi_4 = x; \phi_5 = 2(x), 2(-x)$; 積算位相 $\varphi = x, -x$. t_1 の QDは t_1 についてStates-TPPIで行う.磁場勾配パルスの幅と強度は, $G1 = G2 = G3 = G10 = G11 = G12 = G13 = (500\mu\text{s}, 0.08\text{T/m})$; $G4 = (1\text{ms}, 0.2\text{T/m})$; $G5 = G6 = (250\mu\text{s}, 0.2\text{T/m})$; $G7 = (1\text{ms}, 0.15\text{T/m})$; $G8 = (1.5\text{ms}, 0.2\text{T/m})$; $G9 = (1.25\text{ms}, 0.3\text{T/m})$; $G14 = (125\mu\text{s}, \pm 0.2904\text{T/m})$ である

INEPTで ^1H 磁化を $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ に移す前に, 1番目の $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}90^\circ$ パルスと磁場勾配パルスG1で $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ の平衡磁化を消去しておく. INEPTでCおよびC炭素に, それぞれ, HおよびHの ^1H 磁化を移す($\tau_a = 2\pi/(4^1J_{\text{CH}})$, 緩和を考慮して1.5msに設定). ここでCおよびC炭素のみを考えたのは, 後にCからCOへ磁化移動するためである. INEPTのHおよび $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ の 180° パルスの両側においた2つの等しい磁場勾配パルスG2, G3でパルスの不完全性から生ずる横磁化(たとえば, 180° パルス前後で I_z から I_x へ変わるもの)を消去する. また, 第3の $^1\text{H}90^\circ_y$ パルスの直後密度行列は $I_z S_z$ の形になるが, 残る不必要なコヒーレンスを磁場勾配パルスG4で消去してから $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}90^\circ$ パルスで ^1H に対して逆位相の $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta}$ 横磁化にする.

図 17. 11 の a 時点における密度行列は

$$\sigma(a) = -2H_z^\alpha C_{iy}^\alpha - 2H_z^\beta C_{iy}^\beta$$

である.

発展期 1 (t_1) は定時間間隔 T である。発展期 1 において ^1H , ^{13}CO および ^{15}N との J 結合による時間発展を取り除くために, ^{13}CO と ^{15}N には $t_1/2$ 秒後, ^1H に対してはさらに τ_b 秒遅れて 180° パルスを加える。発展期 1 の最後で CH , CH_2 , CH_3 のすべてを順位相にするすることは不可能であるが, $\tau_b = 2\pi \times 0.3 / (2^1 J_{\text{CH}})$ とすると, これらをほぼ等しい大きさの順位相にすることができる ($^1 J_{\text{CH}}/2\pi = 140\text{Hz}$ とすると, $\tau_b = 1.1\text{ms}$ である)。

b 時点での密度行列の必要な部分は C_α 横磁化であるので, C_β 炭素が 1 個, C_γ が 1 個ある場合,

$$\begin{aligned} \sigma(\text{b}) = & C_{\text{ix}}^\alpha \cos(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} T/2) \sin(^1 J_{\text{CH}} \tau_b) \cos(\omega_{\text{C}_\alpha} t_1) \\ & - 2C_{\text{iy}}^\alpha C_{\text{iz}}^\beta \cos(^1 J_{\text{C}_\beta \text{C}_\gamma} T/2) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} T/2) \sin(^1 J_{\text{CH}} \tau_b) \cos(\omega_{\text{C}_\beta} t_1) \end{aligned} \quad (17.1.6)$$

となる。第 1 項は C_α 磁化がそのまま残る割合, 第 2 項は C_β から C_α に磁化移動する割合である。 C_β から C_γ への磁化移動もあるので, C_β 磁化が減少していくことも考慮されている。磁場勾配パルス $G5, G6$ は, 前述の $G2, G3$ 同様 $^{13}\text{C}_\alpha/\beta 180^\circ$ パルスの不完全性から生ずる横磁化を消去する。第 2 $\text{CO} 180^\circ$ パルスは第 1 $\text{CO} 180^\circ$ パルスによって生じた $^{13}\text{C}_\alpha/\beta$ コヒーレンスのプロトホジージェルトシフトによる位相ずれを補正するものである。

次に INEPT でコヒーレンスを $^{13}\text{C}_\alpha$ から CO へ移す。第 3 $\text{CO} 180^\circ$ パルスは第 4 $\text{CO} 180^\circ$ パルスによって生ずるプロトホジージェルトシフトによる位相ずれを補正するものである。 $\text{CO} 90^\circ$ パルス直前 c 時点で, 磁場勾配パルス $G7$ により, 磁場勾配パルス $G4$ と同様すべてのコヒーレンスが消去されて,

$$\begin{aligned} \sigma(\text{c}) = & 2 C_{\text{iz}}^\alpha C_{\text{iz}}^\beta \{ \cos(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} T/2) \sin(^1 J_{\text{CH}} \tau_b) \cos(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} \tau_c) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}'} \tau_c) \cos(\omega_{\text{C}_\alpha} t_1) \\ & + \cos(^1 J_{\text{C}_\beta \text{C}_\gamma} T/2) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} T/2) \sin(^1 J_{\text{CH}} \tau_b) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} \tau_c) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}'} \tau_c) \cos(\omega_{\text{C}_\beta} t_1) \} \end{aligned}$$

が残る。d 時点における密度行列は

$$\begin{aligned} \sigma(\text{d}) = & -2 C_{\text{iz}}^\alpha C_{\text{iy}}^\beta \{ \cos(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} T/2) \sin(^1 J_{\text{CH}} \tau_b) \cos(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} \tau_c) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}'} \tau_c) \cos(\omega_{\text{C}_\alpha} t_1) \\ & + \cos(^1 J_{\text{C}_\beta \text{C}_\gamma} T/2) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} T/2) \sin(^1 J_{\text{CH}} \tau_b) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} \tau_c) \sin(^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}'} \tau_c) \cos(\omega_{\text{C}_\beta} t_1) \} \end{aligned}$$

となり, $^{13}\text{C}_\alpha$ に対して逆位相の ^{13}CO 横磁化に移動する。最適な T は, $^1 J_{\text{C}_\alpha \text{C}_\beta} =$

$$^1 J_{\text{C}_\beta \text{C}_\gamma} = ^1 J_{\text{CC}} \text{ とすると, } T = 2\pi / (4^1 J_{\text{CC}}) \approx 7.1\text{ms 程度, および } \tau_c = 2\pi / (8^1 J_{\text{CC}}) \approx 3.6\text{ms 程}$$

度である。

続いて ^{13}C とアミド ^{15}N に対するINEPTで, コヒーレンスを隣の残基のアミド ^{15}N に移す. 磁場勾配パルスG8はG4, G7と同様な働きをする. e時点における密度行列は

$$\begin{aligned} \sigma(e) = & -2 N_{i+1y} C'_{iz} \sin(^1J_{C\alpha C'} \tau_d) \sin(^1J_{NC'} \tau_e) \\ & \{ \cos(^1J_{C\alpha C\beta} T/2) \sin(^1J_{CH} \tau_b) \cos(^1J_{C\alpha C\beta} \tau_c) \sin(^1J_{C\alpha C'} \tau_c) \cos(\omega_{C\alpha} t_1) \\ & + \cos(^1J_{C\beta C\gamma} T/2) \sin(^1J_{C\alpha C\beta} T/2) \sin(^1J_{CH} \tau_b) \sin(^1J_{C\alpha C\beta} \tau_c) \sin(^1J_{C\alpha C'} \tau_c) \cos(\omega_{C\beta} t_1) \} \end{aligned}$$

待ち時間 τ_d および τ_e は $\tau_d = 2\pi/(4^1J_{C\alpha C'}) \approx 4.4\text{ms}$, $\tau_e = 2\pi/(4^1J_{NC'}) \approx 12.4\text{ms}$ に選ぶ.

これを定時間 T_N の発展期2(t_2)で時間発展させる. 発展期の最後, f時点で ^{15}N 横磁化はCOに対して順位相, ^1H に対して逆位相になるように, T_N および待ち時間 τ_f を選ぶ ($T_N = 2\pi/(2^1J_{NCO}) \approx 33\text{ms}$, $\tau_f = 2\pi/(2^1J_{NH}) \approx 5.5\text{ms}$). f時点での密度行列は

$$\begin{aligned} \sigma(f) = & \{ 2 N_{i+1x} H_{i+1z}^\alpha \cos(\omega_N t_2 + \theta_1) - 2 N_{i+1y} H_{i+1z}^\alpha \sin(\omega_N t_2 + \theta_1) \} \times \\ & \sin(^1J_{NCO} T_N/2) \sin(^1J_{NH} \tau_f/2) \sin(^1J_{C\alpha CO} \tau_d) \sin(^1J_{NCO} \tau_e) \times \\ & \{ \cos(^1J_{C\alpha C\beta} T/2) \sin(^1J_{CH} \tau_b) \cos(^1J_{C\alpha C\beta} \tau_c) \sin(^1J_{C\alpha C'} \tau_c) \cos(\omega_{C\alpha} t_1) \\ & + \cos(^1J_{C\beta C\gamma} T/2) \sin(^1J_{C\alpha C\beta} T/2) \sin(^1J_{CH} \tau_b) \sin(^1J_{C\alpha C\beta} \tau_c) \sin(^1J_{C\alpha C'} \tau_c) \cos(\omega_{C\beta} t_1) \} \end{aligned}$$

となる. ここで, $\theta_1 = \gamma_N B_{z9}(z) \tau_9 z$ は磁場勾配パルスG9による ^{15}N コヒーレンスの位相のずれである. ここで $\omega_2 = \omega_N$ がラベルされる.

^{15}N と ^1H に 90° パルスを加え, コヒーレンスを ^{15}N からアミド ^1H へ移す. 以後は感度増強HSQCタイプでアミド ^1H を観測する ($\omega_3 = \omega_{HN}$). g時点における密度行列は $\phi_6 = \pm x$ にしたがって,

$$\sigma(g) = \sin(^1J_{NH} \tau_g) \{ \cos(\omega_N t_2 + \theta_1 \mp \theta_2) H_{i+1x}^N \mp \sin(\omega_N t_2 + \theta_1 \mp \theta_2) H_{i+1y}^N \} \quad (17.1.7)$$

となる. ここで, $\theta_2 = \gamma_H B_{z14}(z) \tau_{14} z$ は磁場勾配パルスG14による ^1H コヒーレンスの位相のずれである. また,

$$\begin{aligned} \tau_g = & 2\pi/(4^1J_{NH}) \approx 2.3\text{ms} \\ \gamma_N B_{z9}(z) \tau_9 z = & \pm \gamma_H B_{z14}(z) \tau_{14} \end{aligned} \quad (17.1.8)$$

のとき, 再結像して

$$\sigma(g) = \sin(^1J_{NH} \tau_g) \{ \cos(\omega_N t_2) H_{i+1x}^N \mp \sin(\omega_N t_2) H_{i+1y}^N \} \quad (17.1.9)$$

がえられる. すなわち, G9とG14でコヒーレンス移動選択を行う. t_2 ごとに ϕ_6 パルス

の位相の反転と同期してG14の符号を反転したFIDをそれぞれ取得する。それらはNタイプおよびPタイプのデータであるので、別々のメモリーに保存してStatesの方法で処理すると、純吸収型のスペクトルが得られる。 t_1 のQDは ϕ_1 の位相を x, y にしてStates-TPPIの方法で行う。

この実験では最初 $^1\text{H}_\beta$ の磁化から出発して最後に隣の残基のアミド $^1\text{H}_{\beta+\text{N}}$ で終わるので、始点と終点が異なる。行きっぱなし型 (straight-throughあるいはout-and-stay) の実験と呼ばれることがある。

G10, G11 ペアおよび G12, G13 ペアは G2, G3 ペアと同様な働きをする。不要な水の信号は G9 と G14 の磁場勾配パルスで消去する。

() 同時測定 ^{15}N , ^{13}C 編集NOESY - HSQC

これは ^{15}N のNOESY - HSQCと ^{13}C のNOESY - HSQCを同時に測定するもので、 ^{15}N ,

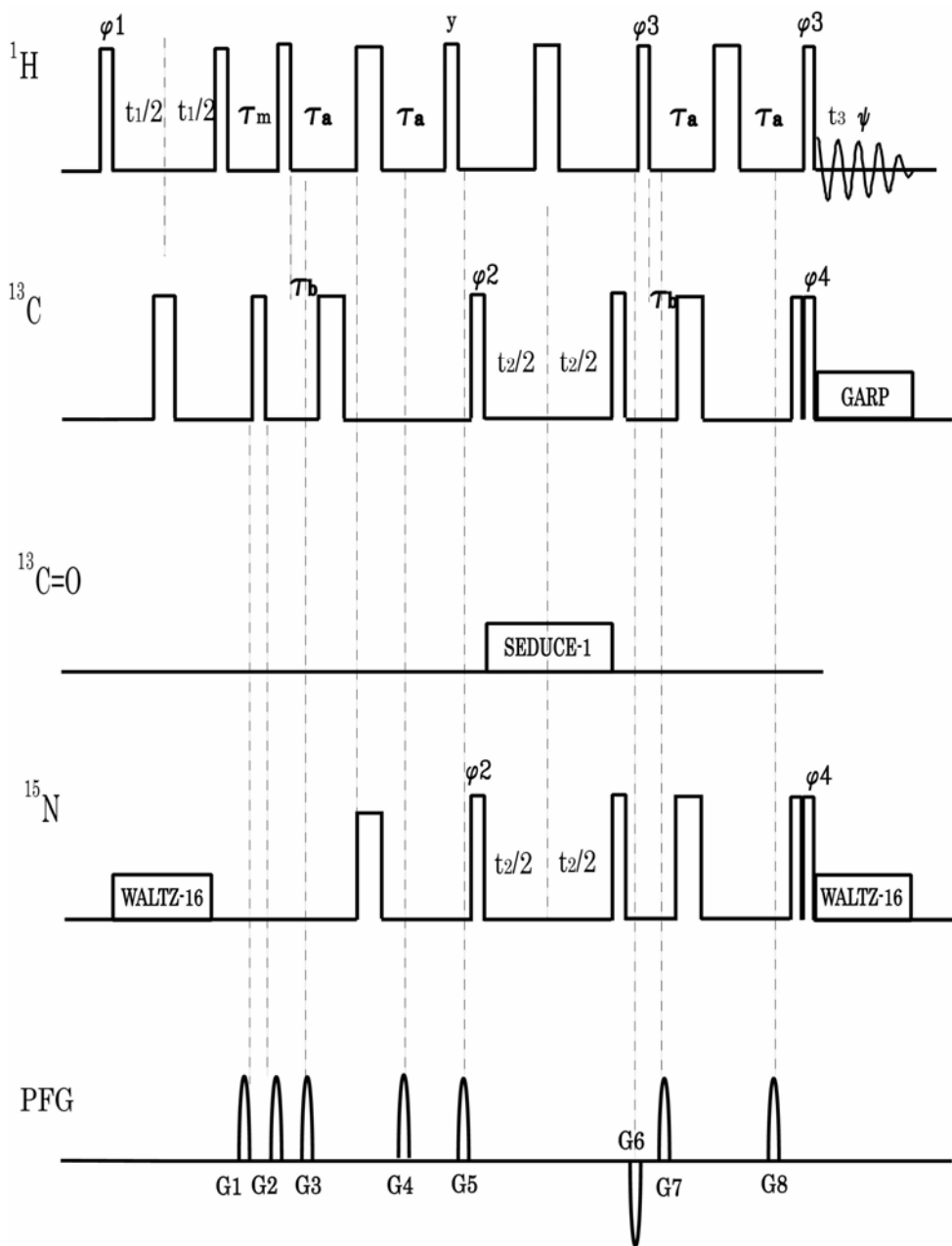
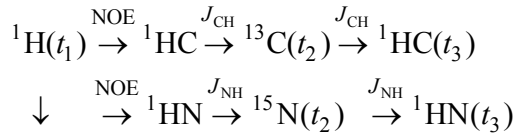


図 17. 12 ^{15}N , ^{13}C 同時編集 NOESY - HSQCの脉冲系列．幅の狭い脉冲は 90° 脉冲, 広い脉冲は 180° .特に示す以外位相は x . 脉冲位相 $\phi_1=4(x), 4(-x)$; $\phi_2=8(x), 8(-x)$; $\phi_3=(x, y, -x, -y)$; $\phi_4=4(x), 4(-x)$; 積算位相 $\varphi=x, -y, -x, y, 2(-x, -y, x, y), x, -y, -x, y \cdot t_1, t_2$ の QD は ϕ_1, ϕ_2 について States-TPPI で行う . 磁場勾配脉冲の幅と強度は , $G1=(3\text{ms}, 0.15\text{T/m})$; $G2=(1\text{ms}, 0.2\text{T/m})$; $G3=G4=(1\text{ms}, 0.08\text{T/m})$; $G5=(4\text{ms}, 0.3\text{T/m})$; $G6=(3\text{ms}, -0.18\text{T/m})$; $G7=G8=(1\text{ms}, 0.08\text{T/m})$ である

^{13}C で一様にラベルされたたんぱく質に適用される[22] . 磁場勾配脉冲を利用して不要な信号を消去する脉冲系列を図 17. 12 に示す . コヒーレンスの移動経路は以下のような

になる．



最初に ${}^1\text{H}$ を励起し，発展期 1 (t_1) で時間発展させる ($\omega_1 = \omega_{\text{H}}$)．この間， ${}^{13}\text{C}$ との結合は発展期の中央に挿入した 180° パルスで， ${}^{15}\text{N}$ との結合はWALTZ-16 でデカップルする．発展期 1 でラベルされた ${}^1\text{H}$ 磁化が混合時間 τ_m の間にNOEで結ばれた ${}^1\text{H}$ へ磁化移動する． ${}^{13}\text{C}180^\circ$ パルスの不完全性のために混合期に残る 2 スピンオーダ HzCz の影響を取り除くために，G1, G2 の磁場勾配パルスではさまれた ${}^{13}\text{C}90^\circ$ パルスで消去する．

次に， ${}^{15}\text{N}$ あるいは ${}^{13}\text{C}$ と結合している ${}^1\text{H}$ の横磁化をそれぞれに対して逆位相にする． τ_a および τ_b を $\tau_a = 2\pi / (4^1J_{\text{NH}})$ ， $\tau_b = 2\pi / (4^1J_{\text{CH}})$ に選ぶと， ${}^1\text{H}90^\circ$ パルスの直前で磁化は HxNz および HxCz になる．ここで ${}^1\text{H}90^\circ$ パルス， ${}^{13}\text{C}90^\circ$ パルス， ${}^{15}\text{N}90^\circ$ パルスを加えると， ${}^1\text{H}$ に対して逆位相の ${}^{13}\text{C}$ 横磁化 (HzCy)，および， ${}^1\text{H}$ に対して逆位相の ${}^{15}\text{N}$ 横磁化 (HzNy)になる．これを発展期 2 (t_2) で時間発展させる．G3 とG4 は ${}^1\text{H}$ ， ${}^{13}\text{C}$ ， ${}^{15}\text{N}$ の 180° パルスの不完全性によって生ずる不要なコヒーレンスを消去する． ${}^1\text{H}90^\circ$ パルスと ${}^{13}\text{C}90^\circ$ パルスおよび ${}^{15}\text{N}90^\circ$ パルスの間に磁場勾配パルスG5 を挿入して，2 スピンオーダ以外のコヒーレンスを消去する．発展期 2 の中央に ${}^1\text{H}180^\circ$ パルスを印加し， ${}^1\text{H}$ との結合をデカップルする．カルボニル炭素はSEDUCE-1 でデカップルする．

最後に， ${}^{13}\text{C}$ 横磁化および ${}^{15}\text{N}$ 横磁化を ${}^1\text{H}$ 磁化に変換する．G5 と同様，G6 で不要な横磁化を消去する．水の磁化を消去するために，G5 とG6 は互いに逆位相にする．最終 ${}^1\text{H}90^\circ$ パルスは，発展期 2 の最後に僅かに残った水のz磁化を，検出期にz磁化にして，FIDに寄与しないようにするものである．しかし，このパルスは ${}^{13}\text{C}$ および ${}^{15}\text{N}$ に結合した ${}^1\text{H}$ の横磁化と同位相であるので，何らの影響も与えない．

不完全な ${}^{13}\text{C}$ および ${}^{15}\text{N}$ デカップリングのために HxCz タイプの磁化が残る場合がある．これはスペクトルに ${}^1\text{H}$ 信号のサイドバンドとして現れる． ${}^{13}\text{C}$ および ${}^{15}\text{N}$ に最後に加える $90^\circ_x - 90^\circ_{\pm x}$ パルスはこれを消去するものである．

ここで用いられている磁場勾配パルスは不要な磁化，水の磁化を消すために用いられている． t_1 ， t_2 のQDは ϕ_1 ， ϕ_2 についてStates-TTPIで行う．

スペクトルは $(\omega_1, \omega_2, \omega_3) = (\omega_{\text{H}}, \omega_{\text{CN}}, \omega_{\text{H}})$ に現れる． ω_2 軸は ${}^{13}\text{C}$ ， ${}^{15}\text{N}$ 両方の化学シフト軸になる．

() その他の 3 次元 NMR

a) HCACO

これは 1 つの残基内の $C\alpha$, $H\alpha$ とペプチド結合の CO 炭素を関連づけるものである [14,23]. 磁場勾配パルスを利用した測定パルス系列を図 17.13 に示す. スペクトルは

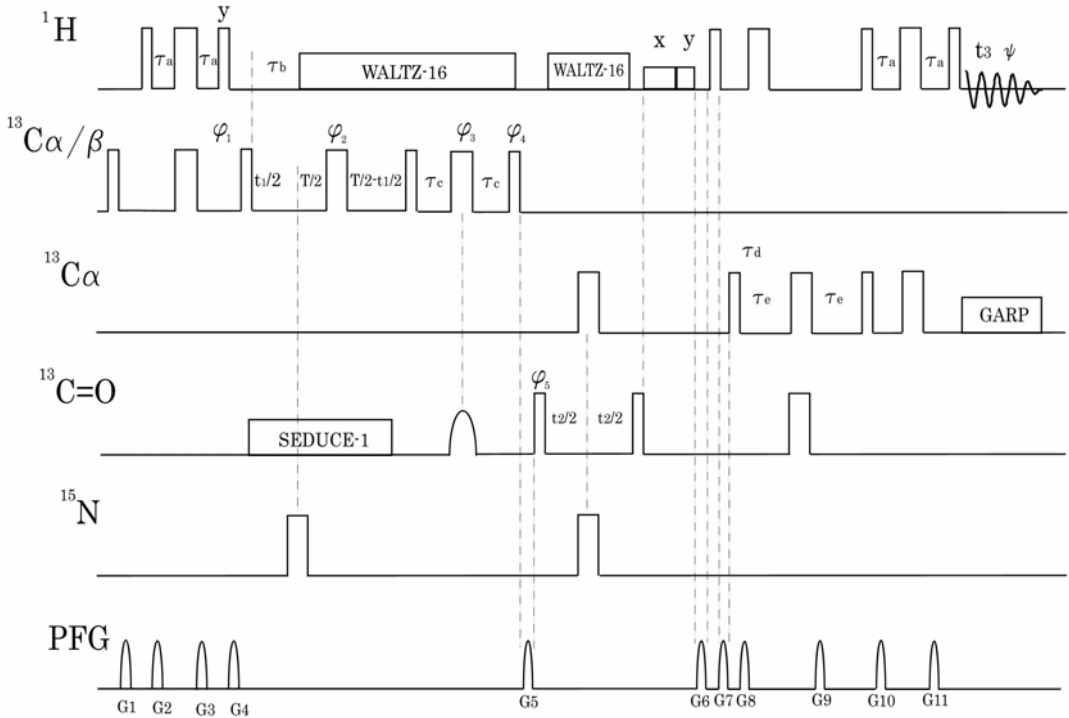
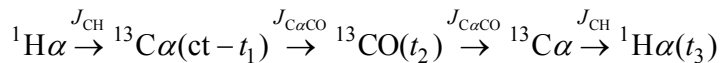


図 17.13 磁場勾配パルスを用いた定時間HCACOのパルス系列. 幅の狭いパルスは 90° パルス, 広いパルスは 180° , 特に示す以外位相は x . パルス位相 $\phi_1=x$; $\phi_2=x, y, -x, -y$; $\phi_3=\phi_4=4(x), 4(-x)$; $\phi_5=8(x), 8(-x)$; 積算位相 $\varphi=2(x, -x), 2(-x, x), 2(-x, x), 2(x, -x)$. t_1, t_2 の QD は ϕ_1, ϕ_5 について States-TPPI で行う

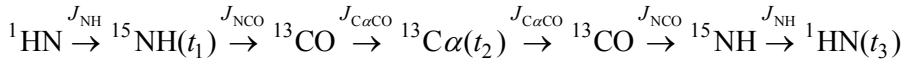
($\omega_1, \omega_2, \omega_3$) = ($\omega_{C\alpha}, \omega_{CO}, \omega_{H\alpha}$) にピークを示す. これは HCA(CO)N に類似しており, コヒーレンス移動を CO までで止めて, CO を発展期 2 で時間発展させたものである. 下にコヒーレンス移動経路を示す.



b) HN(CO)CA

これはアミド 1H (ω_3), アミド ${}^{15}N$ (ω_1), および, 1 つ手前の残基の ${}^{13}Ca$ (ω_2) を関係づけるものである [24]. 図 17.14 に測定パルス系列を示す. コヒーレンスの移動経

路は



である .

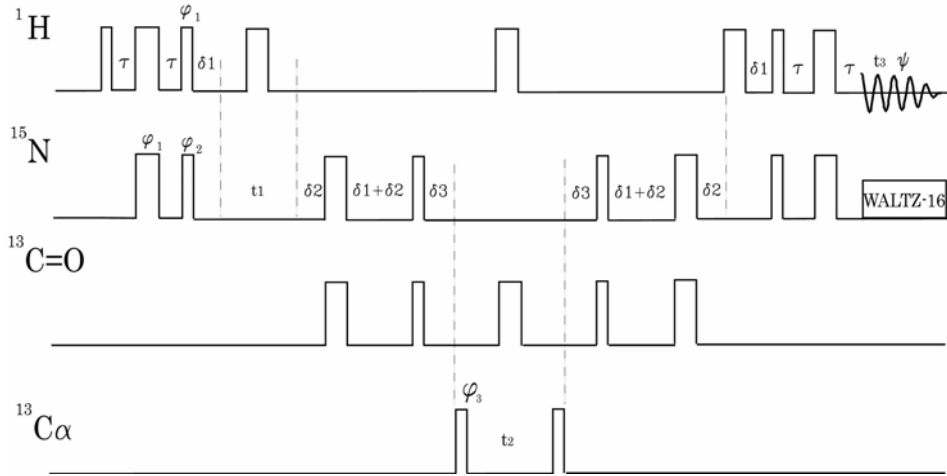
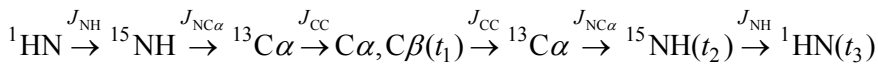


図 17.14 HN(CO)CA のパルス系列 . 幅の狭いパルスは 90° パルス , 広いパルスは 180° , 特に示す以外位相は x . パルス位相 $\phi_1=2(y), 2(-y)$; $\phi_2=x, -x$; $\phi_3=4(x), 4(-x)$; 積算位相 $\varphi=x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$. t_1, t_2 の QDI は ϕ_2, ϕ_3 について States-TPPI で行う . $\tau = 2\pi / (4^1 J_{\text{HN}})$, 2.25ms ; $\delta_1 = 2\pi / (4^1 J_{\text{NH}})$, 2.75ms ; $\delta_2 = 2\pi / (6^1 J_{\text{NCO}}) - \delta_1$, 8ms ; $\delta_3 = 2\pi / (2^1 J_{\text{C}\alpha\text{CO}})$, 7ms

c) HNCACB

これは残基内の $\text{C}_\alpha, \text{C}_\beta (\omega_1)$, $\text{NH} (\omega_2)$, $\text{H}^{\text{N}} (\omega_3)$ を関係づけるものである[17] . 図 17.15 に測定パルス系列を示す . 下にコヒーレンスの移動経路を示す .



17.2 4次元 NMR

3次元 NMR にもう 1 つ周波数軸を加えると 4次元 NMR になる[25] . HCA(CO)N で CO の部分も時間発展させると , HCACON という 4次元 NMR になる . スペクトルは残基内の ${}^{13}\text{C}_\alpha(\omega_1)$, ${}^{13}\text{CO}(\omega_2)$, ${}^1\text{H}_\alpha(\omega_4)$, および隣の残基の ${}^{15}\text{N}(\omega_3)$ を関連付ける . コヒーレンス移動経路を示す .

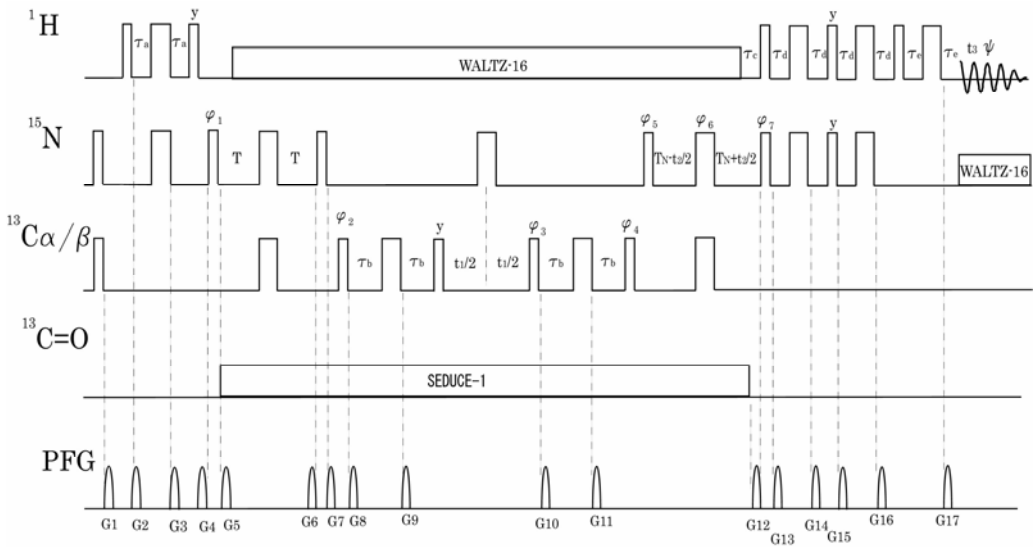
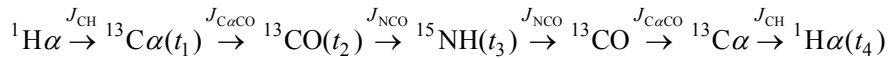
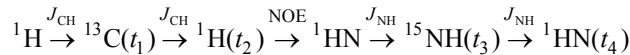


図 17. 15 HNCACB のパルス系列．幅の狭いパルスは 90° パルス，広いパルスは 180° ，特に示す以外位相は x ．パルス位相 $\phi_1 = x, -x; \phi_2 = 2(x), 2(-x); \phi_3 = y; \phi_4 = x; \phi_5 = x; \phi_6 = 4(x), 4(-x); \phi_7 = x$; 積算位相 $\varphi = x, -x, -x, x$



${}^{13}\text{C}$ 編集 HMQC-NOESY 3 次元 NMR と ${}^{15}\text{N}$ 編集 NOESY-HMQC 3 次元 NMR の NOESY 部分で貼り合わせることによって， ${}^{13}\text{C}$ ， ${}^{15}\text{N}$ 編集 HMQC-NOESY- HMQC の 4 次元 NMR になる [26]．このときのコヒーレンス移動経路は



である．スペクトルは， ${}^{13}\text{C}(\omega_1)$ ，その C に J_{CH} 結合している ${}^1\text{HC}(\omega_2)$ ，その ${}^1\text{H}$ と ${}^1\text{H} - {}^1\text{H}$ の NOE を持つ ${}^{15}\text{NH}(\omega_3)$ ，およびその ${}^1\text{HN}(\omega_4)$ を関連付ける．

測定には膨大な時間がかかるので，測定ポイント数を少なくして時間を短縮し，後処理で線形予測を用いて S/N の向上を図る等の工夫がある．

17.3 TROSY

たんぱく質等の巨大分子では多数の共鳴が現れるため，スペクトルが重なりあって分離が悪くなる．さらに，分子量の増大とともに線幅が増大するため，スペクトルの分離が悪くなる．スペクトルをより分散させるためにはより高磁場を必要とするが，現状では 1000MHz 程度が限界である．線幅の原因の大きな部分は ${}^1\text{H}$ との双極子-双極子相互

作用であるので、これを小さくするために、 ^1H を ^2H に置換する試みがなされている。

双極子 双極子相互作用と化学シフト異方性の両方が線幅の原因に寄与する場合、干渉効果が現れることを第9章7節で述べた。NHの ^{15}N および ^1H の線幅には、直接結合している ^1H あるいは ^{15}N との双極子 双極子相互作用による局所磁場と ^{15}N および ^1H 自身の化学シフト異方性による局所磁場が大きく寄与する。

^{15}N と ^1H の間の J 結合によって、 ^{15}N の共鳴は ^1H の2つの状態(α, β)に対応して2本に分裂する。 ^{15}N 核の位置における ^{15}N の化学シフト異方性による局所磁場は ^1H の状態によらないが、双極子 双極子相互作用による局所磁場は正負に異なる。したがって、全局所磁場は ^1H の状態によって、一方は、加算的、他方は減算的に作用する。しかも、化学シフトの異方性による局所磁場は外部磁場に比例するので、高磁場では双極子 双極子相互作用による局所磁場と同程度にもなり、二重線の一方は鋭くなり、他方は広がる。 ^1H についても同様なことが成り立つので、 ^1H および ^{15}N をデカップルしないでHSQCを測定すると、NHの交差ピークは4個現れるはずであるが、そのうちの1個は非常に幅広く、他の2個も中間の幅で、結局、 ^1H および ^{15}N の両方の線幅が狭い1個のピークのみ鋭く観測される。

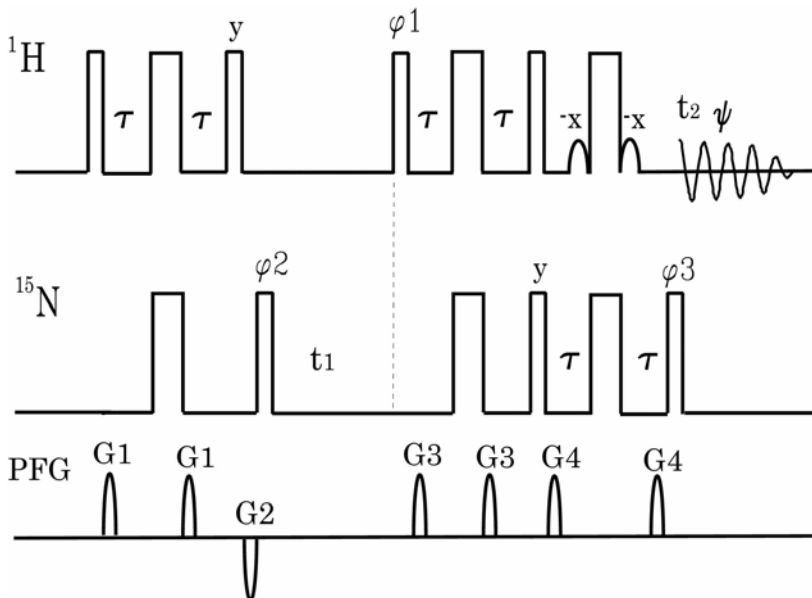


図 17.16 TROSY-HSQC 2次元NMRのパルス系列。幅の狭いパルスは 90° パルス，広いパルスは 180° ，特に示す以外位相は x 。パルス位相 $\phi_1=4(y), 4(-y)$; $\phi_2=2(y, -y, -x, x)$; $\phi_3=4(x), 4(-x)$; 積算位相 $\psi=x, -x, -y, y, x, -x, y, -y$ 。 t_1 のQDは ϕ_2 についてStates-TPPIで行う。 $\tau = 2\pi/(4^1J_{\text{HN}})$

このように線幅が双極子 双極子相互作用と化学シフトの異方性の両方に関わって

いる場合, 高磁場では二重線の片方の線幅が小さくなることを利用して, 巨大分子のスペクトルを観測することができる. この方法を TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) という[27].

図 17. 16 はTROSY-HSQC 2次元NMRの測定パルス系列である. INEPTで磁化を ^1H から ^{15}N へ移し, 発展期で ^{15}N 磁化を時間発展させ, 逆INEPTで磁化を ^1H に移し, WATERGATEで水を消去する. 多重線を観測するために ^1H および ^{15}N をデカップルしない. 共鳴はデカップルしたスペクトルより, 結合定数の半分ずれた位置に現れる.

17.4 2次元 NMR の磁場勾配パルスを利用した 1次元版

2次元 NMR は有用ではあるが, 測定に長時間かかるため, 時として非効率的な測定法である. ある特定の共鳴との相関を知りたい場合には, 1次元 NMR の方が効率的である. 例えば, NOE で結ばれた共鳴を調べたい場合には, 特定の共鳴を照射して飽和させた時と, そうでないときの差スペクトルを測定する差 NOE の測定法がある. 2つのスペクトルの差を取るために, 通常のスぺクトルに比べて, S/N が極めて悪くなる. 磁場勾配パルスを利用した 2次元 NMR の 1次元 NMR 版がある.

(A) GOESY

GOESY (gradient enhanced nuclear Overhauser effect spectroscopy) は磁場勾配パルスを利用してコヒーレンス選択をおこなう NOESY の 1次元版である[28].

図 17. 17 にGOESYのパルス系列を示す. (a) は単一線のみのもに適用されるパルス系列である. 第1の 90° パルスで注目する共鳴を選択的に励起し, 横磁化を作る. 磁場勾配パルス G_1 で位置に比例した位相をこの横磁化に付与する. 第2の 90° パルスでこの横磁化のy成分を-z方向に向ける. 混合時間 τ_m の間に交差緩和によって, 近傍の核にNOEが生ずる. 最後の 90° パルスでNOEによる磁化を横磁化にする. この磁化は G_1 で付与した位相を持っているので, 磁場勾配パルス G_2 を $G_2=G_1$ (Nタイプ)として, 位相のずれを解消し再結像する. 180° パルスは G_2 間の化学シフトのよる発展を取り除く. τ_2 は G_2 の持続時間である. 磁場勾配パルス G_m は第2 90° パルス後に存在するすべての横磁化を消去する.

このパルス系列の利点は, 第1の磁場勾配パルスで発散した磁化のみが観測される点である. 差スペクトルではないので, 差をとることによる誤差を含まない. しかし, P, N 2つのコヒーレンスのNタイプのみを選択しているため, 感度は差 NOE に比べて 1/2 になる.

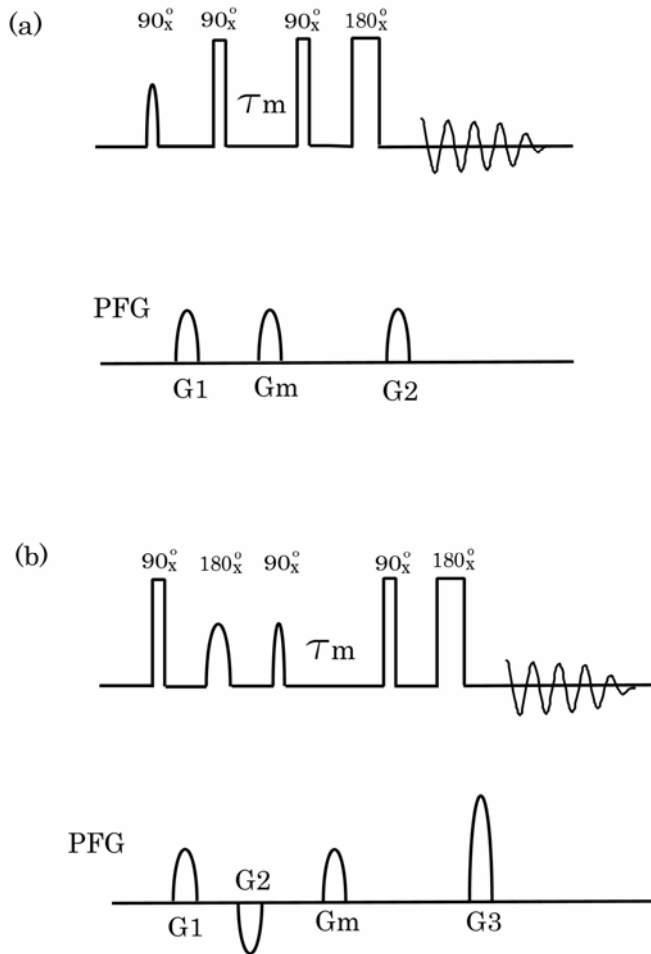


図 17.17 GOESYのパルス系列．山型のパルスは選択パルス． τ_m はNOEのための混合時間． G_m は横磁化を消去するための磁場勾配パルス．(a)磁場勾配パルスでコヒーレンスを選択する1次元NOESY． $G1=G2$ ．第1選択 90° パルスと第2 90° パルスの間隔は、磁場勾配パルスの時間と装置の応答時間の和． 180° パルスの前後にも同様の待ち時間をおく．(b) J 結合をデカップリングした1次元NOESY． $G1$ 、 $G2$ は大きさ同じで逆符号の磁場勾配パルス． $G3=2 \times G1$

J 結合がある場合、(a)では選択的 90° パルスの後 J 結合による時間発展が起こり(J 結合による時間発展は磁場勾配パルスに依存しないことに注意)、第2の 90° パルスによって、0量子コヒーレンスが生成される．これはスペクトに逆位相の分散型の共鳴を示す．(b)は J 結合による時間発展を取り除くパルス系列である．着目する共鳴に選択的 180° パルスを印加し、 $G1$ 期間に発展した J 結合による位相の発展を $G2$ 期間で取り戻す．これを選択的 90° パルスで z 磁化にする．選択的 90° パルスの直前までに選択的 180°

の不完全性によって生じた逆位相横磁化は、選択的 90° パルスで 2 スピンオーダになる。これは最終的に観測されない。最後の再結像の条件は $G_3 = G_1 - G_2$ である。

(B) GROESY

磁場勾配パルスを用いた ROESY の 1 次元版 GROESY (gradient enhanced ROESY) も可能である [29]。図 17.18 に GROESY のパルス系列を示す。 90° パルスで横磁化を作り、選択的 180° パルスで結合をデカップルする。この間に、磁場勾配パルス G_1, G_2 で位相をラベルする。ついで、スピロックパルスで回転系の磁化移動を行う。最後の磁場勾配パルス G_3 で位相情報をエンコードする。 180° パルスは磁場勾配パルス中の化学シフトによる発展を再結像する。

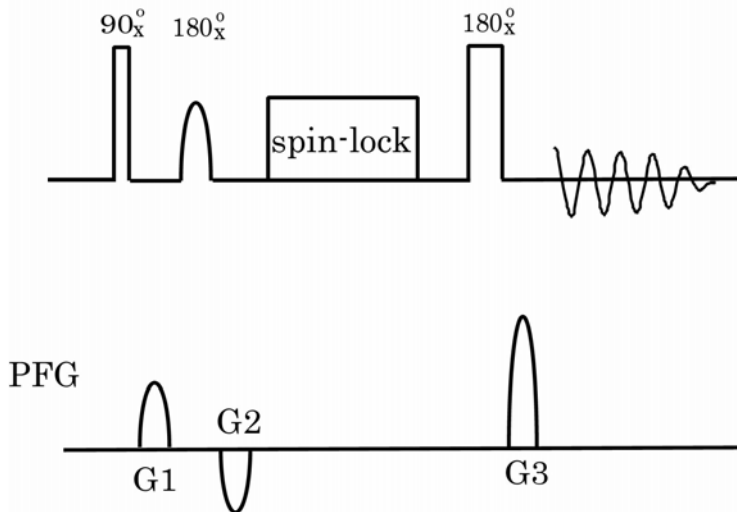


図 17.18 GROESY のパルス系列。山型のパルスは選択パルス。スピロックには $180^\circ_x - 180^\circ_{-x}$ の繰り返しを用いる。 G_1, G_2 は大きさが同じで逆符号の磁場勾配パルス。 $G_3 = 2 \times G_1$

(C) 1D TOCSY

磁場勾配パルスを用いた 1 次元 TOCSY (1D TOCSY) も可能である。パルス系列は GROESY と同じである。ただし、スピロックのところに、MLEV-16, あるいは DIPSI を用いる。

(D) DPFGE

励起信号の選択性を向上させるための方法が、DPFGSE (double pulse field gradient spin echo) である [30]。図 17.19 に DPFGE を利用した 1D NOESY の測定パルス系列である。第 1 の 90° パルスで作られた横磁化は、両側を磁場勾配

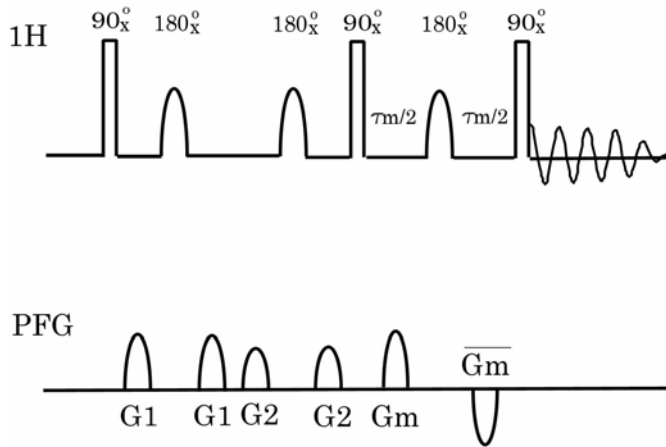


図 17.19 DPFGE を用いた 1D NOESY のパルス系列．山型のパルスは選択パルス

パルスG1 ではさまれた選択的 180°パルスで注目する共鳴のみが再結像する．さらに，PFGEを繰り返すことによって，選択性を高めている．第2の 90°パルスまでがDPFGEである．この共鳴を 90°パルスでz磁化にした後，交差緩和による混合を行う．混合期の不要な横磁化を消去するために選択的 180°パルスの両側に符号が異なる2つのGmをおく．最後の 90°パルスで観測する．磁場勾配パルスはコヒーレンス選択に用いられていないので，GOESYに比べてS/Nが2倍よい．

17.5 選択励起，選択非励起

(A) 弱く，長いパルス

スペクトルの特定のピークを励起したくない場合がある．たとえば，水溶液中のたんぱく質のスペクトルを観測する場合，巨大な水の信号を消去して，たんぱく質のアミド¹Hのみを観測したい場合である．このようなとき，最も望ましい方法は水の信号を励起しないことである．最も簡単な方法は，弱く，長いパルスを用いることである[31]．

励起周波数を観測したい信号にあわせ，その高周波磁場の強さを B_1 ，水までのオフセット磁場を ΔB とすると，水の¹H磁化は有効磁場のまわりに $\gamma\sqrt{B_1^2 + \Delta B^2}$ の周波数で回転する．水の信号に対して360°パルス，観測する信号に対しては90°パルスになるような長いパルスを用いると，水の信号は励起されない．この条件は

$$\gamma\sqrt{B_1^2 + \Delta B^2}\tau = 2\pi, \quad \gamma B_1\tau = \pi/2$$

となるので, パルス幅 は

$$\tau = \sqrt{15}\pi / (2\gamma\Delta B) = 0.968(2\pi/\Delta\omega)$$

水を励起しないで水から 500Hz 離れたところを観測する場合には, 1.9ms の長いパルスになる. 矩形波パルスのフーリエ変換は sinc 関数になるので, 励起周波数以外の信号も励起されるが, 強度, 位相が一様でない. また, $\Delta\omega = 0.968(2\pi/\tau)$ 近傍の狭い周波数範囲でしかスペクトル強度が 0 にならないので, 水の信号に広がりがある場合には水の裾の部分が励起されてしまう.

(B) 2 1 4 パルス

水の裾の部分が励起されてしまう長いパルスの欠点を矯正する方法である[32]. 長いパルスを 2:1:4:1:2 にわけて 1 の部分の位相を逆転したパルスを作る. 最終的に 0.6 だけ順方向に進む. 図 17. 20 に $\tau = 100\text{ms}$ の 2 1 4 パルス (a) と長いパルス (b) を z 磁化に作用した後の横磁化の大きさを励起周波数からのオフセット周波数の関数として示

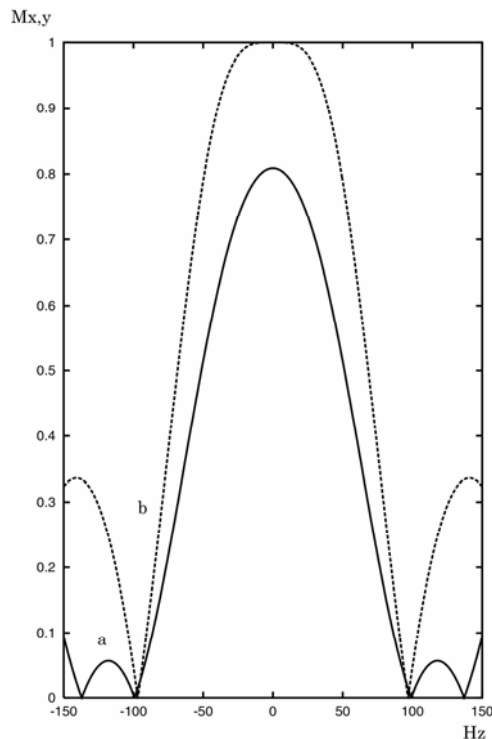


図 17.20 2 1 4 パルス (a) と長いパルス (b) を z 磁化に作用した時の横磁化の大きさのオフセット周波数依存性. $\tau = 100\text{ms}$. 長いパルスがオフセット周波数 0 で 90° パルスになるように高周波磁場強度を調節している

す．長いパルスがオフセット周波数 0 で 90° パルスになるように高周波の強度を調節している． $\omega/2\pi = 100\text{Hz}$ 近傍における強度が単純な矩形波による励起に比べて広い範囲にわたって 0 に近い．

(C) 二項パルス

高周波磁場周波数の近傍にラーモア周波数を持つ共鳴を励起しないようなパルスの周波数特性を $\sin^n(\omega\tau/2)$ と近似する．このフーリエ変換は二項係数を強度分布にもち，交互に符号が反転した時間間隔 τ で等間隔に並んだ $n+1$ 個のデルタ関数である．Hore は $1 \bar{1}$, $1 \bar{2} 1$, $1 \bar{3} 3 \bar{1}$ 等のパルス系列を考えた (33) . それぞれ , $\beta_x - \tau - \beta_{-x}$, $\beta_x - \tau - 2\beta_{-x} - \tau - \beta_x$, $\beta_x - \tau - 3\beta_{-x} - \tau - 3\beta_x - \tau - \beta_{-x}$ のパルス系列である . $\omega=0$ の共鳴は , 最終的に 0° パルスになるので , 励起されない . $\omega = \pi/\tau$ の共鳴は , 最終的に 2β , 4β , 8β パルスになるので , $1 \bar{1}$ では 45° パルス , $1 \bar{2} 1$ では 22.5° パルス , $1 \bar{3} 3 \bar{1}$ では 11.25° パルスにすると , 90° パルスになる . 図 17.21 にそれぞれのパル

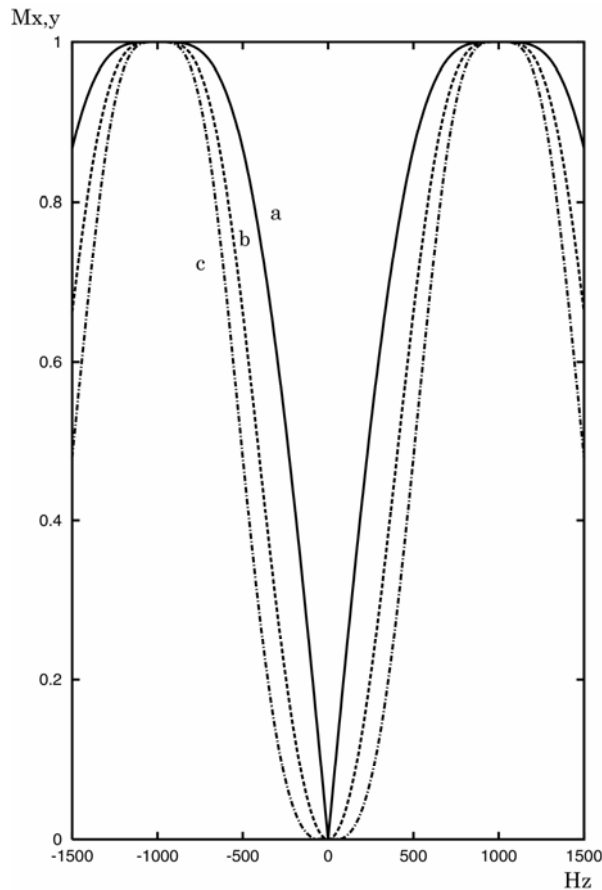


図 17.21 二項パルスで励起された磁化の xy 成分の大きさの周波数依存性 . $\tau = 500\mu\text{s}$. (a) $1 \bar{1}$ ($\beta = 45^\circ$); (b) $1 \bar{2} 1$ ($\beta = 22.5^\circ$); (c) $1 \bar{3} 3 \bar{1}$ ($\beta = 11.25^\circ$)

スによる励起の様子を示す。 $\tau = 500\mu\text{s}$ である。 $1\bar{3}3\bar{1}$ の方が $1\bar{1}$ に比べて $\omega=0$ 近傍の励起されない範囲が広い一方、 $\omega = \pi/\tau$ 近傍の励起される範囲が狭くなる。 図 17. 22 に示すように、励起された磁化の位相はほぼ周波数に比例するので、1 次の位相補正で吸収型にすることができる。しかし、中心に対して左右で位相が逆転する。 $1\bar{2}1$ ではパルスの不完全性が大きく影響するので、 $1\bar{3}3\bar{1}$ がよく用いられる。 $1\bar{1}$ と同じようなものに jump-and-return パルスがある[34]。これは $90^\circ_x 90^\circ_{-x}$ パルスである。

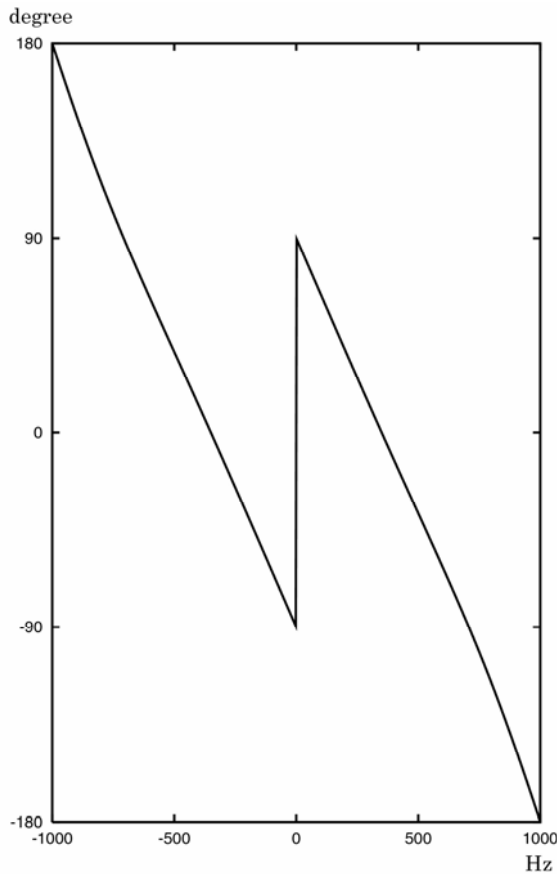


図 17. 22 $1\bar{3}3\bar{1}$ パルスによる励起。 $\tau = 500\mu\text{s}$, $\beta = 11.25^\circ$. (a) y 磁化の周波数依存性 ; (b) y 磁化に対する位相の周波数依存性

(D) ガウスパルス

ガウス関数のフーリエ変換はガウス関数であるので、矩形パルスに比べて、中心から離れたところでリップルがなく単調に減衰していく。したがって、限られた周波数範囲で励起されるが、励起周波数からはずれると分散成分が増大する[35]。

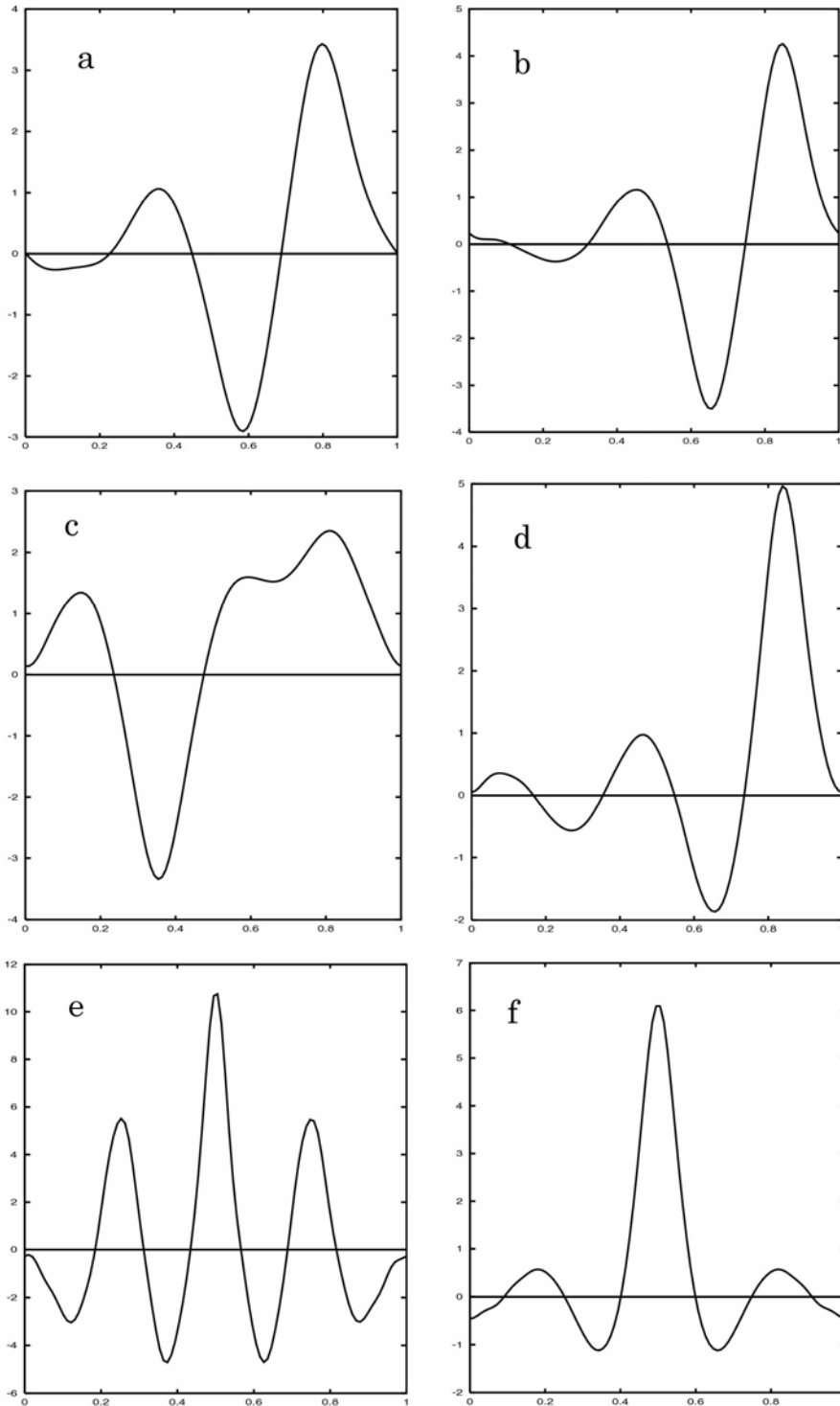


図 17.23 BURP パルス．横軸（時間軸）はパルス持続時間 τ を単位にして示す．
 (a) E-BURP-1 ; (b) E-BURP-2 ; (c) I-BURP-1 ; (d) I-BURP-2 ; (e) U-BURP ; (f) RE-BURP

(E) BURP

ある指定された領域にわたって一定の強度および位相を持った応答を返し,その領域外では応答が0であるパルスをBURP(band-selective, uniform response, pure-phase)という. Freemanらはこのような性質をもつ振幅変調パルスを,最大20次(n_{\max})までの高調波からなるフーリエ級数で近似し,その係数を最適化することによって作った[36].図17.23にいくつかのBURPパルスを示す.横軸(時間軸)はパルス持続時間 τ を単位にして示す.このような複雑な形状のパルスをシェープドパルス(shaped pulse)という.帯域は $4/\tau$ 程度で, $\tau=10\text{ms}$ とすると,400Hzの帯域である.図17.24と図17.25にそれぞれE-BURPパルスとRE-BURPパルスによる励起の様子を示す.

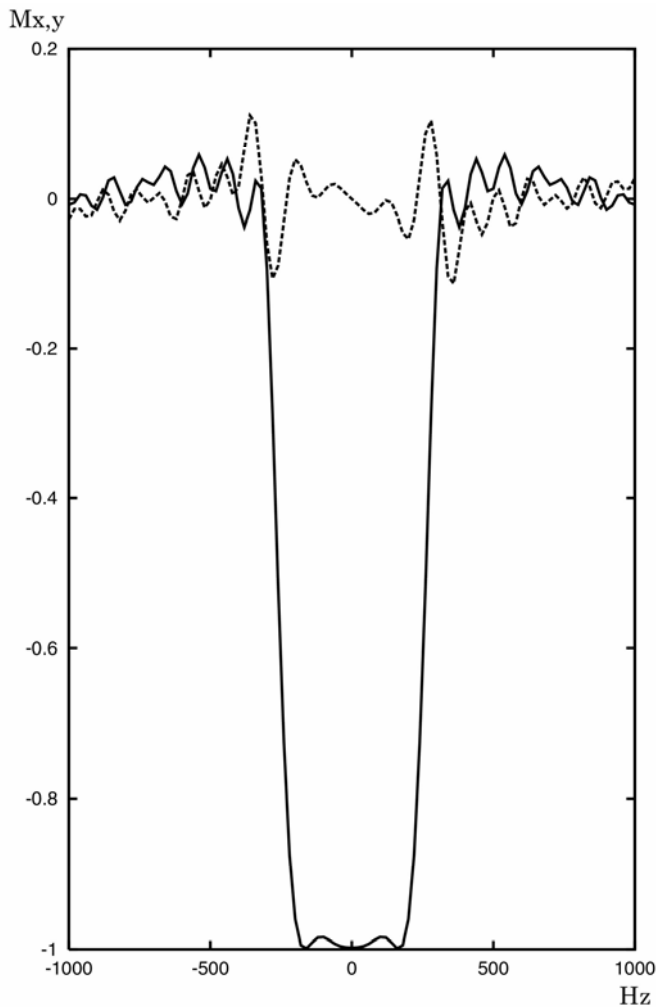


図 17.24 E-BURP2 パルスを z 磁化に作用させたときの励起特性. パルス持続時間 $\tau=100\text{ms}$. (a) y 磁化; (b) x 磁化

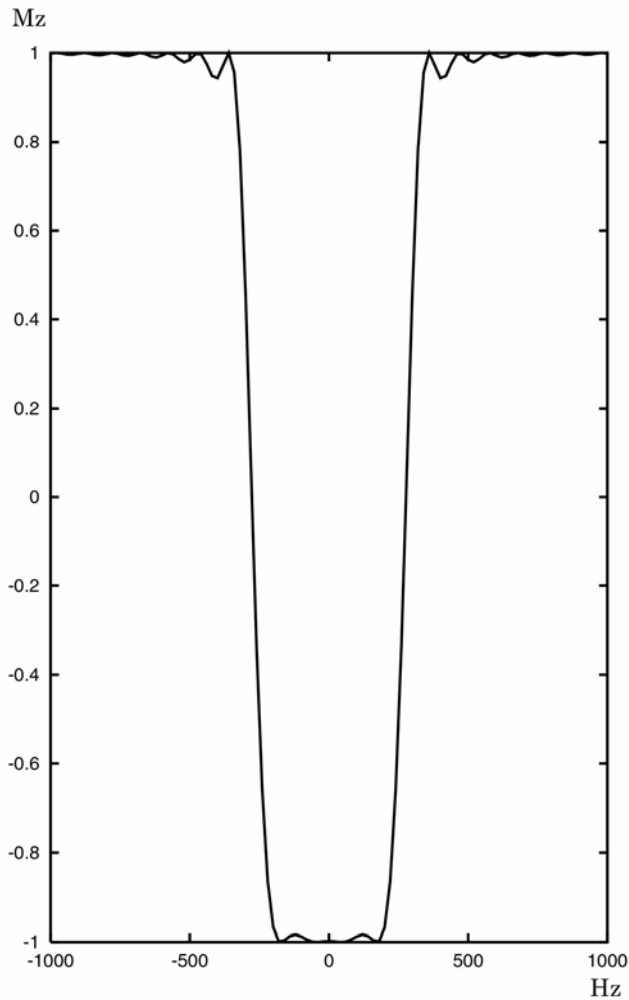


図 17.25 RE-BURP パルスを z 磁化に作用させたときの反転特性．パルス持続時間 $t = 100\text{ms}$

() E-BURP (excitation pulse)

z 磁化に作用して横磁化を生成する帯域選択的 90° パルスである．E-BURP-1 ($n_{\text{max}}=8$) (a), E-BURP-2 ($n_{\text{max}}=10$) (b) がある．

() I-BURP (spin-inversion pulse)

z 磁化に作用して反転する帯域選択的 180° パルス．I-BURP-1 ($n_{\text{max}}=9$) (c), I-BURP-2 ($n_{\text{max}}=11$) (d) がある．

() U-BURP (“universal” $\pi/2$ rotation)

任意の磁化に作用して帯域選択的に 90° 回転するパルス ($n_{\text{max}}=20$) (e)．

() RE-BURP (π refocussing pulse)

任意の磁化に作用して帯域選択的に 180° 回転するパルス ($n_{\max}=15$)(f). スピンエコーの帯域選択的な再結像のために用いられる.

文献

- 1) C. Griesinger, O. W. Sørensen, and R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7227(1987).
- 2) C. Griesinger, O. W. Sørensen, and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **84**, 14(1989).
- 3) G. W. Vuister, P. de Waard, R. Boelens, J. F. G. Vliegthart, and R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 772(1989)
- 4) D. Marion, P. C. Driscoll, L. E. Kay, P. T. Wingfield, A. Bax, A. M. Gronenborn, and G. M. Clore, *Biochemistry* **28**, 6150(1989).
- 5) L. E. Key, D. Marion, and A. Bax, *J. Magn. Reson.* **84**, 72(1989).
- 6) D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1515(1989).
- 7) S. W. Fesik and E. R. P. Zuiderweg, *J. Magn. Reson.* **78**, 588(1988).
- 8) L. E. Kay, P. Keifer, and T. Saarinen, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663(1992).
- 9) D. R. Muhandiram, N. A. Farrow, G-Yi Xu, S. H. Smallcombe, and L. E. Kay, *J. Magn. Reson. B* **102**, 317(1993).
- 10) JEOL—A600 のパルス系列 .
- 11) L. E. Kay, M. Ikura, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 888(1990).
- 12) A. Bax, G. M. Clore, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn, M. Ikura, and L. E. Kay, *J. Magn. Reson.* **87**, 620(1990).
- 13) A. Bax, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **88**, 425(1990).
- 14) M. Ikura, L. E. Kay, and A. Bax, *Biochemistry* **29**, 4659(1990).
- 15) L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, and A. Bax, *J. Magn. Reson.* **89**, 496(1990).
- 16) S. Grzesiek and A. Bax, *J. Mag. Reson.* **96**, 432(1992).
- 17) D. R. Muhandiram and Lewis E. Kay, *J. Magn. Reson. B* **103**, 203(1994).
- 18) R. Powers, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, and A. Bax, *J. Magn. Reson.* **94**, 209(1991).
- 19) A. G. Palmer, W. J. Fairbrother, J. Cavanagh, , P. E. Wright, and M. Rance, *J. Biomol. NMR* **2**, 103(1992).
- 20) J.Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, and N. J. Skelton, "Protein NMR Spectroscopy", Academic Press, San Diego, 1996, pp504-507.
- 21) S. Gresiek and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6291(1992).

- 22) S. M. Pascal, D. R. Muhandiram, T. Yamazaki, J. D. Forman-Kay, and L. E. Kay, *J. Magn. Reson. B* **103**, 197(1994).
- 23) L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2055(1993).
- 24) A. Bax and M. Ikura, *J. Biomol. NMR* **1**, 99(1991).
- 25) L. E. Key, M. Ikura, G. Zhu, and A. Bax, *J. Magn. Reson.* **91**, 422(1991).
- 26) L. E. Kay, G. M. Clore, A. Bax, and A. M. Gronenborn, *Science* **249**, 411(1990).
- 27) K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12366(1997).
- 28) J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, and A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6037(1994).
- 29) P. Adell, T. Parella, F. Sánchez-Ferrando, and A. Virgili, *J. Magn. Reson. B* **108**, 77(1995).
- 30) K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T-L. Hwang, and A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 4199(1995).
- 31) S. Alexander, *Rev. Sci. Instr.* **32**, 1066(1966).
- 32) A. G. Redfield, S. D. Kunz, and E. K. Ralph, *J. Magn. Reson.* **19**, 114(1975).
- 33) P. J. Hore, *J. Magn. Reson.* **55**, 283(1983).
- 34) P. Plateau and M. Guéron, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7310(1983).
- 35) C. Bauer, R. Freeman, T. Frenkiel, J. Keeler, and A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **58**, 442(1984).
- 36) H. Geen and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **93**, 93(1991).