

^{14}N の固体高分解能NMRの開発と生体分子への応用

(課題番号 14340181)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))
研究成果報告書

平成16年6月

研究代表者 竹腰 清乃理

(京都大学大学院理学研究科助教授)

京都大学図書



1040941610

附属図書館

はしがき

平成14年度と15年度にわたり、研究課題“ ^{14}N の固体高分解能NMRの開発と生体分子への応用”に対して、科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）が交付された。この小冊子は、その研究成果報告書である。

長距離秩序を持たない粉末試料で分子の立体構造を決定することは長年の構造化学における懸案であり、固体NMR法はそのような試料で構造情報を取得しうる手法として注目されてきた。これまでに炭素、窒素核を ^{13}C , ^{15}N で同位体置換した粉末試料を用いた固体NMR構造情報取得法が数多く提案されているが、本研究では我々が最近開発した粉末試料での ^{14}N の高分解能NMR測定法を一般的に行えるように完成し、さらに、ペプチドの構造研究に応用した。この目的に向かって、(1) 測定に必要なNMR装置の制作を行い、(2) 感度・分解能の最適条件の理論的・実験的検討を行った。さらに、(3) ^{14}N 高分解能NMR測定をペプチドの構造研究に応用するための手法の開発・検討を行った。

研究組織

研究代表者：竹腰 清乃理（京都大学大学院理学研究科助教授）

研究分担者：寺尾 武彦（京都大学大学院理学研究科教授）

交付決定額

平成 14 年度	10,000 千円
平成 15 年度	2,900 千円
計	12,900 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Y. Nishiyama and T. Terao: " γ -Encoding transform NMR for uniaxially oriented samples", Chem. Phys. Lett., **352**(5-6), 479-485 (2002).
2. K. Takegoshi and T. Terao: " ^{13}C nuclear Overhauser polarization nuclear magnetic resonance in rotating solids: Replacement of cross polarization in uniformly ^{13}C labeled molecules with methyl groups", J. Chem. Phys., **117**(4), 1700-1707 (2002).
3. K. Takeda, K. Takegoshi and T. Terao: "Zero-field electron spin resonance and theoretical studies of light penetration into single crystal and polycrystalline material doped with molecules photoexcitable to the triplet state via intersystem crossing", J. Chem. Phys., **117**(10), 4940-4946 (2002).
4. Y. Nishiyama, A. Kubo and T. Terao: " ^{13}C NMR spectral assignments for nematic liquid crystals by 2D chemical shift g -encoding NMR", J. Magn. Reson., **158**(1/2), 60-64 (2002).
5. T. Miyoshi, K. Takegoshi and T. Terao: "Effects of Xe Gas on Segmental Motion in a Polymer Blend As Studied by ^{13}C and ^{129}Xe High-Pressure MAS NMR", Macromolecules, **35**(1), 151-154 (2002).
6. K. Takegoshi, N. Nakamura and T. Terao: " ^{13}C - ^1H dipolar-driven ^{13}C - ^{13}C recoupling without ^{13}C rf irradiation in nuclear magnetic resonance of rotating solids", J. Chem. Phys., **118**(5), 2325-2341 (2003).
7. Y. Nishiyama, A. Kubo and T. Terao: "Chemical-shift g -encoding nuclear magnetic resonance for uniaxially oriented matter under sample spinning", J. Chem. Phys., **119**(6), 3297-3308 (2003).
8. E. Katoh, K. Takegoshi and T. Terao: " ^{13}C Nuclear Overhauser Polarization-Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Uniformly ^{13}C -Labeled Solid Proteins", J. Am. Chem. Soc., **126**(11), 3653-3657 (2004).
9. F. Amita, H. Oka, M. Mukaide, Y. Urasaki, K. Takegoshi, T. Terao and O. Kajimoto: "Development of a high-temperature and high-pressure nuclear magnetic resonance probe for studies of chemical reactions in supercritical water", Rev. Sci. Instrum., **75**(2), 467-471 (2004).

(2) 口頭発表

1. K. Takeda, K. Takegoshi and T. Terao: "NMR sensitivity enhancement by dynamic nuclear polarization using electron spins in the photoexcited triplet state", International Symposium on Quantum Computing (第10回JST国際シンポジウム), Tokyo, Japan, (2002) 3/12-14.
2. T. Terao: "Cross Polarization in Solid-State NMR: Replacement and Reinforcement", An International NMR Symposium (国際NMRシンポジウム), Tokyo, Japan, (2002) 4/11-12.
3. 竹腰清乃理: "固体多スピン系での距離相関測定", Techmagセミナー京都パークホテル, (2002) 5/17.
4. 竹腰清乃理: "Structural determination by solid NMR", 特定領域研究(2)「未解明生物現象を司る鍵化学物質 第4回 公開シンポジウム」, 千里ライフサイエンスセンター(2002) 5/21-22.
5. K. Takegoshi: " ^{13}C - ^1H Dipolar-Assisted ^{13}C - ^{13}C Rotational Resonance under MAS and its Applications", Solid-State NMR Meeting/Midwest Regional ACS Meeting, Ypsilanti, MI, USA, (2002) 6/26-29.
6. 竹腰清乃理: "固体NMRによる構造決定: オングストロームからマイクロンまで", 京都大学大学院工学研究科分子工学コロキウム, 京都, (2002) 7/5.
7. T. Terao: "New Approaches for Dipolar Recoupling and Nuclear Polarization", XXth ICMRBS International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (第20回生体系磁気共鳴国際会議), Canada, (2002) 8/26-30.
8. 竹腰清乃理: "Structural determination of biomolecules by solid NMR", The 856th Biological Symposium, 三島, 国立遺伝学研究所, (2002) 10/7.
9. 竹腰清乃理: "固体NMRによる核間距離測定: 基礎と応用", 第32回 固体NMR・材料研究会, 帝人(株)東京研究センター(2002) 10/24-25.
10. 竹腰清乃理, 大橋竜太郎, 溝上潤, 水野敬, 寺尾武彦: " ^{13}C - ^{13}C 距離相関及び ^1H - ^{15}N / ^{13}C - ^1H 双極子相関固体NMR測定によるペプチドの構造決定", 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
11. 向出政伸, 浦崎洋平, 網田富士嗣, 岡博之, 梶本興亜, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: "超臨界水実験のための流通型NMR測定装置の開発", 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.

12. 松本聖, 中村新治, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: “ ^{13}C 固体MAS NMRを用いたジメドン/ β シクロデキストリン包接体のケト・エノール互変異性の研究”, 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
13. 大橋竜太郎, 水野敬, 加藤悦子, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: “多重 ^{13}C ラベル粉末試料をもちいたDARR法による ^{13}C - ^{13}C 距離測定”, 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
14. 水野敬, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: “高速SASSプローブによる同種核広帯域リカップリング法の開発”, 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
15. 加藤悦子, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: “Nuclear Overhauser Polarization (NOP)-MAS experiments for solid state proteins”, 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
16. 溝上潤, 大橋竜太郎, 水野敬, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: “D H-N/C-H双極子相関固体NMR測定によるペプチド主鎖の構造決定”, 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
17. 大橋竜太郎, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: “MAS下での非ゼーマン熱浴からの交差分極”, 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
18. 久保厚 and 市川真史: “遅延線NMRプローブのシミュレーションおよび製作”, 第41回NMR討論会, 東京, (2002) 11/6-8.
19. 寺尾武彦: “固体NMRの時代を画した発展—MASからCPMASへ—”, NMR2002, 八王子, (2002) 12/14.
20. 寺尾武彦: “構造生物学のための固体NMR法: 概論”, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「構造生物学における固体高分解能NMR: 現状と展望」, 吹田, (2002) 12/16-17.
21. 竹腰清乃理: “固体NMRによる構造研究 オングストロームからマイクロンまで”, 機器分析センター竣工記念学術講演会シリーズ No.1, 福井大学 機器分析センター(2003) 3/10.
22. 竹腰清乃理: “固体高分解能NMRの合成高分子への応用”, 機器分析センター竣工記念学術講演会シリーズ No.1, 福井大学 機器分析センター(2003) 3/10.
23. K. Takegoshi: “Distance geometry by solid NMR”, 44th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Savannah, Georgia, USA, (2003) 3/30-4/4.

24. K. Takegoshi: "¹³C-¹³C Distance geometry in Uniformly ¹³C-labeled molecules by Solid NMR", The 3rd Alpine Conference on Solid-State NMR, Chamonix, France, (2003) 9/14-18.
25. 水野敬, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: "SASS attachmentの開発と高速SASSプローブを用いた固体NMR法の試み", 第34回 固体NMR・材料研究会, 大日本インキ(株)分析センター, (2003) 10/30-31.
26. 水野敬, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: "²H粉末スペクトルにおける¹H-²H CP", 第42回NMR討論会, 吹田, (2003) 11/26-28.
27. 寺尾武彦: "NMRの高感度化", 第42回NMR討論会, 吹田, (2003) 11/26-28.
28. 浦崎洋平, 網田富士嗣, 岡博之, 向出政伸, 梶本興亜, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: "流通式NMR装置を用いた超臨界水中における有機反応の観測", 第42回NMR討論会, 吹田, (2003) 11/26-28.
29. 西山裕介, 山崎俊夫, 寺尾武彦: "強度位相変調rf磁場を用いた試料回転の下での核スピン相互作用のdecoupling/recouplingと化学シフト異方性の決定への応用", 第42回NMR討論会, 吹田, (2003) 11/26-28.
30. 深澤隼, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: "¹⁴Nオーバートーン照射による近接¹³Cの線幅増大を利用したポリペプチド構造解析", 第42回NMR討論会, 吹田, (2003) 11/26-28.
31. 福地将志, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: "新しい強度変調CP法の開発", 第42回NMR討論会, 吹田, (2003) 11/26-28.
32. 大橋竜太郎, 水野敬, 加藤悦子, 竹腰清乃理, 寺尾武彦: "DARR法によるDipolar truncationの抑制効果の検証", 第42回NMR討論会, 吹田, (2003) 11/26-28.
33. 寺尾武彦: "固体NMRの時代を画した発展 (その3) -スピン錬金術-", NMR2003, 八王子, (2003) 12/13.

目 次

1. ^{14}N Overtone NMR 間接測定法の理論と応用 1
2. ^{13}C nuclear Overhauser polarization nuclear magnetic resonance 73
in rotating solids: Replacement of cross polarization in uniformly
 ^{13}C labeled molecules with methyl groups
3. Zero-field electron spin resonance and theoretical studies of light 81
penetration into single crystal and polycrystalline material doped
with molecules photoexcitable to the triplet state via intersystem
crossing
4. Effects of Xe Gas on Segmental Motion in a Polymer Blend As 88
Studied by ^{13}C and ^{129}Xe High-Pressure MAS NMR
5. ^{13}C - ^1H dipolar-driven ^{13}C - ^{13}C recoupling without ^{13}C rf irradiation 92
in nuclear magnetic resonance of rotating solids
6. ^{13}C Nuclear Overhauser Polarization-Magic-Angle Spinning 109
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Uniformly ^{13}C -
Labeled Solid Proteins
7. Development of a high-temperature and high-pressure nuclear 114
magnetic resonance probe for studies of chemical reactions in
supercritical water

1. 始めに

窒素はタンパク質やペプチドの主鎖を構成し、それらの構造や機能を知る上で重要な手がかりを与える元素の一つである。天然に存在する窒素の 99.63%は ^{14}N であるが、窒素の NMR において ^{14}N はほとんど利用されていない。それは、 ^{14}N はスピン量子数 I が 1 の核であり、四重極相互作用と呼ばれる、核の持つ電気四重極モーメントと核の周囲の電荷が作る電場勾配との相互作用が数 MHz と大きいため、共鳴周波数の範囲が非常に広がってしまい、試料分子に複数の ^{14}N が存在する場合に高分解能な NMR 測定が困難なためである。したがって、現状では窒素の NMR 測定には高分解 NMR 測定が可能な $\text{spin}=1/2$ の ^{15}N が利用されている。しかし、 ^{15}N の天然存在比は 0.37%と低いために、固体で NMR 測定を行うためには ^{14}N を ^{15}N に同位体置換した試料を用いなければならないという問題がある。

そこで ^{14}N の高分解能 NMR を測定するために $|m\rangle = | +1\rangle$ と $| -1\rangle$ の状態間の遷移、すなわち overtone 遷移 ($\Delta m = 2$) を観測する手法が開発された[1]。本来、overtone 遷移は禁制遷移であるが、たいていの ^{14}N 核の場合、Zeeman 相互作用に対する四重極相互作用の摂動の影響により許容されている。 ^{14}N の overtone 遷移の共鳴周波数は 1 次のシフトを受けず、2 次のシフトに依存する。したがって四重極相互作用の 1 次のシフトの影響を受ける $\Delta m = 1$ の遷移に比べて高分解能のスペクトルが得られる。Stewart らは、単結晶のペプチドの ^{14}N overtone NMR スペクトルの直接測定によってペプチドの主鎖の二面角に対する知見を得ることを提案している[2]。しかし、overtone の遷移確率は小さいため、

一般に粉末試料の ^{14}N overtone NMR を直接測定することは難しいことが示されている。

本研究では、マジック角試料回転 (Magic Angle Spinning、以下 MAS) のもとで粉末試料の ^{14}N に overtone 照射を行うことによって MAS 下において平均化されている ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用を復活させる手法を開発した。MAS とは静磁場とのなす角が約 54.7 度の回転軸の周りに試料を高速回転させる手法であり、固体 NMR 法において高分解能 NMR 測定を行う際に広く用いられている。Overtone の遷移モーメントの大きさはラジオ波磁場に対する結晶の向きに依存するため、MAS 下において overtone の遷移モーメントは MAS の周波数の 1 倍もしくは 2 倍の周波数で振動する成分を持つ。また、MAS 下では ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用は MAS の周波数の 1 倍もしくは 2 倍の周波数で振動する成分からなっている。したがって、MAS 下において一定強度の ^{14}N overtone 照射をおこなうと遷移モーメントによって変調を受けたラジオ波と ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用との干渉が起こり、MAS 下において平均化されていた ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用が復活する。そこで、 ^{14}N overtone 照射のもとで ^{13}C の高分解能 NMR 測定を行い、 ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用の復活による ^{13}C NMR スペクトルの変化と ^{14}N overtone の照射周波数との関係を調べることにより”間接的”に粉末試料の ^{14}N overtone NMR を観測することに成功した。本研究では、異なる静磁場中で ^{13}C NMR を用いて間接的に測定された 2 種類のアミノ酸の ^{14}N overtone NMR スペクトルを用いて、その静磁場および四重極相互作用に対する依存性を検討する。また、この手法をペプチドに応用し、構造の似ている二つのアミド窒素の ^{14}N overtone NMR スペクトルや 2 次構造の異なるモデルペプチドにおける ^{14}N overtone NMR

スペクトル測定した結果を示す。これらの実験から四重極相互作用の大きさの似た複数の ^{14}N が試料分子に存在する場合に、それぞれの ^{14}N のスペクトルを高分解能に分離して測定できることを示す。また、ab initio 計算 (Gaussian98) による ^{14}N 四極子結合定数の計算結果についても述べる。

2.1.2. 球面テンソル表示による四重極相互作用ハミルトンアン

また、四重極相互作用の大きさを表す関数として $q = \frac{e^2 Qq}{4\pi\epsilon_0 h\nu_N}$ が用いられる。四重極結合定数

$$(1.9) \quad \chi = \frac{e^2 Qq}{4\pi\epsilon_0 h\nu_N} \left[\frac{1}{2} (3I_z^2 - I^2) + \frac{3}{2} I_x^2 - \frac{3}{2} I_y^2 \right]$$

と表すことができる。四重極結合定数と四重極結合係数との関係は $q = \frac{2}{3} \chi \nu_N$ として用いられる。

$$(1.10) \quad \chi = \frac{e^2 Qq}{4\pi\epsilon_0 h\nu_N} \left[\frac{1}{2} (3I_z^2 - I^2) + \frac{3}{2} I_x^2 - \frac{3}{2} I_y^2 \right]$$

球面テンソル表示による四重極相互作用ハミルトンアンは、 q と ν_N を用いて表すことができる。この場合、 q は四重極結合係数、 ν_N は ^{14}N のラジカル周波数である。

$$(1.11) \quad \mathcal{H}_{\text{quad}} = \frac{q\nu_N}{4} \left[\frac{1}{2} (3I_z^2 - I^2) + \frac{3}{2} I_x^2 - \frac{3}{2} I_y^2 \right]$$

ここで、 I_x 、 I_y 、 I_z は核スピンの成分演算子である。このハミルトンアンは、 I_x と I_y の成分演算子を用いて表すことができる。

$$(1.12) \quad \mathcal{H}_{\text{quad}} = \frac{q\nu_N}{4} \left[\frac{1}{2} (3I_z^2 - I^2) + \frac{3}{2} I_x^2 - \frac{3}{2} I_y^2 \right]$$

$$(1.13) \quad \mathcal{H}_{\text{quad}} = \frac{q\nu_N}{4} \left[\frac{1}{2} (3I_z^2 - I^2) + \frac{3}{2} I_x^2 - \frac{3}{2} I_y^2 \right]$$

このハミルトンアンは、 I_x と I_y の成分演算子を用いて表すことができる。この場合、 q は四重極結合係数、 ν_N は ^{14}N のラジカル周波数である。

2. 理論

2.1. 四重極相互作用ハミルトニアン[3,4]

スピン量子数 I が 1 以上 ($I \geq 1$) の原子核は電気四重極モーメント Q を持つ。この電気四重極モーメント Q は周囲の電荷が原子核の位置に作る電場勾配との間に相互作用を持ち、四重極相互作用 (quadrupolar interaction) と呼ばれる。

2.1.1. 直交座標表示による四重極相互作用ハミルトニアン

四重極相互作用のハミルトニアンは直交座標を用いて

$$H_Q = \frac{eQ}{6I(2I-1)\hbar} \sum_{\alpha, \beta=x, y, z} V_{\alpha\beta} \left[\frac{3}{2} (I_\alpha I_\beta + I_\alpha I_\beta) - \delta_{\alpha\beta} I(I+1) \right], \quad (2.1)$$

$$V_{\alpha\beta} = \left. \frac{\partial^2 U}{\partial \alpha \partial \beta} \right|_{r=0} \quad (2.2)$$

と表される。ここで、 $\delta_{\alpha\beta}$ はクロネッカーのデルタ、 U は原子核の周囲の電荷が作る静電ポテンシャルである。また、 $V_{\alpha\beta}$ は直交座標表示による電場勾配テンソル \mathbf{V} の成分である。電場勾配テンソル \mathbf{V} は 2 階の対称テンソルである。一般に実対称テンソルはユニタリー変換によって対角化することができる。このとき、テンソルが対角化されている座標系をそのテンソルの主軸系 (principal axis system, PAS) と呼び、そのときの対角成分の値を主値と呼ぶ。したがって電場勾配テンソルの主軸系において電場勾配テンソル \mathbf{V} は、

$$\mathbf{V} = \begin{pmatrix} V_{xx}^{\text{PAS}} & 0 & 0 \\ 0 & V_{yy}^{\text{PAS}} & 0 \\ 0 & 0 & V_{zz}^{\text{PAS}} \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

となる。慣例上、主軸系は $|V_{zz}| \geq |V_{yy}| \geq |V_{xx}|$ となるように選ぶ。また、Laplace 方程式から

$V_{xx} + V_{yy} + V_{zz} = 0$ が成り立つ。したがって電場勾配テンソルを二つの独立なパラメータを用いて表すことができる。

$$eq = V_{zz}^{\text{PAS}} \quad (2.4)$$

$$\eta = \frac{V_{xx}^{\text{PAS}} - V_{yy}^{\text{PAS}}}{V_{zz}^{\text{PAS}}} \quad (2.5)$$

ここで、 η は非対称パラメータ (asymmetry parameter) と呼ばれ、 $1 \geq \eta \geq 0$ を満たす。

また、四重極相互作用の大きさを表す値として $v_Q = \frac{e^2 q Q}{2I(2I-1)\hbar}$ が用いられ、四重極結合

定数と呼ばれる。四重極結合定数と非対称パラメータは四重極相互作用を特徴づける数値として用いられる。

2.1.2. 球面テンソル表示による四重極相互作用ハミルトニアン

テンソルを表現する方法として直交座標を用いる方法のほかに球面テンソルを用いた方法がある。四重極相互作用ハミルトニアンを球面テンソルを用いて表すと、

$$H_Q = \sum_{m=-2}^2 (-1)^m v_Q A_{2m} T_{2-m}, \quad (2.6)$$

$$v_Q = \frac{e^2 q Q}{2I(2I-1)\hbar} \quad (2.7)$$

となる。ここで A_{2m} と T_{2-m} はそれぞれ、2階の既約球面テンソル演算子の m 番目の成分の空間部分とスピン部分である。 A_{2m} を直交座標表示のテンソルを用いて表すと、

$$A_{\alpha\beta} = \frac{V_{\alpha\beta}}{eq} \quad (\alpha, \beta = x, y, z), \quad (2.8)$$

$$\left. \begin{aligned} A_{20} &= \frac{3}{\sqrt{6}} A_{zz} \\ A_{2\pm 1} &= \mp \frac{1}{2} [A_{xz} + A_{zx} \pm i(A_{yz} + A_{zy})] \\ A_{2\pm 2} &= \frac{1}{2} [A_{xx} - A_{yy} \pm i(A_{xy} + A_{yx})] \end{aligned} \right\} \quad (2.9)$$

となる。また、 T_{2m} をスピン演算子を用いて表すと、

$$\left. \begin{aligned} T_{20} &= \frac{1}{\sqrt{6}} (3I_z^2 - I(I+1)) \\ T_{2\pm 1} &= \mp \frac{1}{2} (3I_z I_{\pm} + I_{\pm} I_z) \\ T_{2\pm 2} &= \frac{1}{2} I_{\pm} I_{\pm} \end{aligned} \right\} \quad (2.10)$$

となる。これらの関係は任意の直交座標系において成り立つ。主軸系における球面テンソルの空間部分は、式(2.4)、(2.5)、(2.8)、(2.9)、(2.10)および $V_{xx} + V_{yy} + V_{zz} = 0$ を用いると、

$$\left. \begin{aligned} A_{20}^{\text{PAS}} &= \frac{3}{\sqrt{6}} \\ A_{21}^{\text{PAS}} &= A_{2-1}^{\text{PAS}} = 0 \\ A_{22}^{\text{PAS}} &= A_{2-2}^{\text{PAS}} = \frac{1}{2} \eta \end{aligned} \right\} \quad (2.11)$$

となる。

2.1.3. 球面テンソルの座標変換

実験室系における四重極相互作用ハミルトニアンを四重極結合定数 v_Q や非対称パラメータ η (すなわち電場勾配テンソルの主値) を用いて表すためには主軸系における電場勾

配テンソルを実験室系におけるテンソルへと変換しなければならない。また、MASを行っている場合には、実験室系における電場勾配テンソルがMASによって時間依存するため、試料管を基準とした座標系（ローター系、rotor frame）を仲立ちとして主軸系から実験室系へのテンソルの変換を行う。それぞれの座標系におけるテンソルは Euler 角で表される回転のユニタリー変換によって関係づけられる。すなわち以下のような座標変換を行う。

$$\text{主軸系} \xrightarrow{R(\alpha, \beta, \gamma)} \text{ローター系} \xrightarrow{R(2\pi\nu_r t, \theta_M, 0)} \text{実験室系}$$

(α, β, γ) は主軸系とローター系を関係づける Euler 角を、 $(2\pi\nu_r t, \theta_M, 0)$ はローター系と実験室系を関係づける Euler 角をそれぞれ表す。また、 R は、それぞれの Euler 角による回転を表す。 ν_r は MAS の回転周波数、 θ_M は静磁場と MAS の回転軸とのなす角(約 54.7 度)である。テンソルに対して回転による座標変換を行うときには、テンソルを 2 階の既約球面テンソルで表すほうが便利である。実験室系における四重極相互作用のハミルトニアンとして、式(2.6)、(2.7)をそのまま用いることにする。

$$H_Q = \sum_{m=-2}^2 (-1)^m \nu_Q A_{2m} T_{2-m}, \quad (2.12)$$

$$\nu_Q = \frac{e^2 q Q}{2I(2I-1)\hbar} \quad (2.13)$$

NMR の観測は、実験室系で行うのでスピン部分 T_{2-m} はそのままよい。したがってわれわれが知りたいのは実験室系における空間部分 A_{2m} と主軸系における空間部分 A_{2k}^{PAS} との関係である。まず、主軸系における空間部分 A_{2k}^{PAS} からローター系における空間部分 A_{2l}^{RF} への回転によるユニタリー変換を Wigner 回転行列 $D_{kl}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma)$ を用いて表す。

$$A_{2l}^{\text{RF}} = \sum_{k=-2}^2 A_{2k}^{\text{PAS}} D_{kl}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma) \quad (2.14)$$

同様にしてローター系における空間部分 A_{2l}^{RF} から実験室系における空間部分 A_{2m} は以下のようになる。

$$A_{2m} = \sum_{l=-2}^2 A_{2l}^{\text{RF}} D_{lm}^{(2)}(2\pi\nu_r t, \theta_M, 0) \quad (2.15)$$

したがって式(2.14)、(2.15)から A_{2m} は A_{2k}^{PAS} を用いて以下のように表される。

$$A_{2m} = \sum_{k=-2}^2 \sum_{l=-2}^2 A_{2k}^{\text{PAS}} D_{kl}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma) D_{lm}^{(2)}(2\pi\nu_r t, \theta_M, 0) \quad (2.16)$$

ここで A_{2k}^{PAS} は式(2.11)で与えられる。次に Wigner 回転行列 $D_{kl}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma)$ を具体的な形で表すと以下ようになる。

$$D_{kl}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma) = e^{-ik\alpha} d_{kl}^{(2)}(\beta) e^{-il\gamma} \quad (2.17)$$

ここで $d_{kl}^{(2)}(\beta)$ は次のように与えられる。

$$\left. \begin{aligned}
 d_{22}^{(2)} &= d_{-2-2}^{(2)} = \cos^4 \frac{\beta}{2} \\
 d_{21}^{(2)} &= -d_{12}^{(2)} = -d_{-2-1}^{(2)} = d_{-1-2}^{(2)} = -\frac{1}{2} \sin \beta (1 + \cos \beta) \\
 d_{20}^{(2)} &= d_{02}^{(2)} = d_{-20}^{(2)} = d_{0-2}^{(2)} = \sqrt{\frac{3}{8}} \sin^2 \beta \\
 d_{2-1}^{(2)} &= d_{1-2}^{(2)} = -d_{-21}^{(2)} = -d_{-12}^{(2)} = \frac{1}{2} \sin \beta (\cos \beta - 1) \\
 d_{2-2}^{(2)} &= d_{-22}^{(2)} = \sin^4 \frac{\beta}{2} \\
 d_{11}^{(2)} &= d_{-1-1}^{(2)} = \frac{1}{2} (2 \cos \beta - 1) (\cos \beta + 1) \\
 d_{1-1}^{(2)} &= d_{-11}^{(2)} = \frac{1}{2} (2 \cos \beta + 1) (1 - \cos \beta) \\
 d_{10}^{(2)} &= d_{0-1}^{(2)} = -d_{01}^{(2)} = -d_{-10}^{(2)} = -\sqrt{\frac{3}{2}} \sin \beta \cos \beta \\
 d_{00}^{(2)} &= \frac{1}{2} (3 \cos^2 \beta - 1)
 \end{aligned} \right\} \quad (2.18)$$

式(2.16)、(2.17)より、MAS 下において四重極相互作用の球面テンソルの空間部分は MAS

と同じ周波数、およびその2倍の周波数で振動する成分を持っている。

2.2. 双極子相互作用ハミルトニアン[3,5]

二つの磁気モーメント μ_I 、 μ_S の間には磁氣的相互作用が働く。この相互作用のエネルギーは次の式で与えられる。

$$U(\mathbf{r}) = -\frac{3(\mu_I \cdot \mathbf{r})(\mu_S \cdot \mathbf{r}) - r^2 \mu_I \cdot \mu_S}{r^5} \quad (2.19)$$

ここで \mathbf{r} は磁気モーメント間のベクトル、 r は磁気モーメント間の距離を表す。これらの磁気モーメントが二つの核スピン I および S によるものであるとき、磁気モーメントは次のように表される。

$$\mu_I = \gamma_I \hbar \mathbf{I} \quad (2.20)$$

$$\mu_S = \gamma_S \hbar \mathbf{S} \quad (2.21)$$

ここで、 γ_I 、 γ_S はそれぞれスピン I および S の磁気回転比である。式(2.19)、(2.20)、(2.21)を用いると核スピン間の磁氣的相互作用を表すハミルトニアンは

$$H_d = -\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{2\pi} \frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) - r^2 \mathbf{I} \cdot \mathbf{S}}{r^5} \quad (2.22)$$

となり、双極子相互作用ハミルトニアンと呼ばれる。

2.2.1. 直交座標表示による双極子相互作用ハミルトニアン

直交座標系における双極子相互作用テンソル \mathbf{D} は次の式で与えられる。

$$H_d = \nu_d \mathbf{I} \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{S} \quad (2.23)$$

$$\nu_d = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{2\pi^3} \quad (2.24)$$

双極子相互作用テンソル \mathbf{D} の成分 $D_{\alpha\beta}$ ($\alpha, \beta = x, y, z$) は

$$D_{\alpha\beta} = (\delta_{\alpha\beta} - e_\alpha e_\beta) \quad (\alpha, \beta = x, y, z) \quad (2.25)$$

である。 $\delta_{\alpha\beta}$ はクロネッカーのデルタ、 e_α ($\alpha = x, y, z$) は核間方向の単位ベクトルの成分を表す。双極子相互作用テンソル \mathbf{D} は対称 ($D_{\alpha\beta} = D_{\beta\alpha}$) かつトレースレス ($\text{Tr}\{\mathbf{D}\} = 0$) のテンソルである。

次に、主軸系における双極子相互作用テンソルについて考える。座標軸のひとつが核間ベクトルの方向に一致したとき、双極子相互作用テンソルは対角成分のみ0でない値を持つようになる。慣例により、 z -軸が核間ベクトルと同じ方向となるような座標系を主軸系と定める。このとき、双極子相互作用テンソルの成分は

$$\left. \begin{aligned} D_{xx}^{\text{PAS}} = D_{yy}^{\text{PAS}} = 1 \\ D_{zz}^{\text{PAS}} = -2 \end{aligned} \right\} \quad (2.26)$$

となる。

2.2.2. 球面テンソル表示による双極子相互作用ハミルトニアン

球面テンソルを用いて双極子相互作用ハミルトニアンを表すと、

$$H_d = \sum_{m=-2}^2 (-1)^m v_d Y_{2m} T_{2-m} \quad (2.27)$$

となる。ここで Y_{2m} 、 T_{2-m} はそれぞれ2階の既約球面テンソル演算子の空間部分とスピン部分である。空間部分 Y_{2m} は直交座標表示の双極子相互作用テンソルの成分 $D_{\alpha\beta}$ を用いて表すと、

$$\left. \begin{aligned} Y_{20} &= \frac{3}{\sqrt{6}} D_{zz} \\ Y_{2\pm 1} &= \mp \frac{1}{2} [D_{xz} + D_{zx} \pm i(D_{yz} + D_{zy})] \\ Y_{2\pm 2} &= \frac{1}{2} [D_{xx} - D_{yy} \pm i(D_{xy} + D_{yx})] \end{aligned} \right\} \quad (2.28)$$

となる。また、スピン部分 T_{2m} はスピン演算子を用いて表すと、

$$\left. \begin{aligned} T_{20} &= \frac{1}{\sqrt{6}} (3I_z S_z - \mathbf{I} \cdot \mathbf{S}) \\ T_{2\pm 1} &= \mp \frac{1}{2} (I_z S_{\pm} + I_{\pm} S_z) \\ T_{2\pm 2} &= \frac{1}{2} I_{\pm} S_{\pm} \end{aligned} \right\} \quad (2.29)$$

となる。主軸系における球面テンソルの空間部分は式(2.26)、(2.28)より、

$$\left. \begin{aligned} Y_{20}^{\text{PAS}} &= -\sqrt{6} \\ Y_{2\pm 1}^{\text{PAS}} &= 0 \\ Y_{2\pm 2}^{\text{PAS}} &= 0 \end{aligned} \right\} \quad (2.30)$$

となる。

2.3. ^{14}N の overtone 遷移[1,6,7]

簡単のために化学シフト異方性を無視すると静磁場中での ^{14}N のハミルトニアンは Zeeman 相互作用 H_Z と四重極相互作用 H_Q から成り立つ。

$$H = H_Z + H_Q, \quad (2.31)$$

$$H_Z = -\nu_N I_z, \quad (2.32)$$

$$H_Q = \sum_{p=-2}^2 (-1)^p \nu_Q A_{2p} T_{2-p}. \quad (2.33)$$

ここで ν_N は ^{14}N の Larmor 周波数、 $\nu_Q = e^2 q Q / 2h$ は $^{14}\text{N}(I=1)$ の四重極結合定数、 A_{2p} 、 T_{2-p} はそれぞれ 2 階の球面テンソル演算子の空間部分とスピン部分である。多くの場合、 ^{14}N の四重極結合定数 ν_Q は数 MHz のオーダーであるのに対して、通常、固体 NMR の測定に用いられる磁場において ν_N は数十 MHz のオーダーである。したがって ν_Q は ν_N に比べて十分小さいため、四重極相互作用を Zeeman 相互作用に対する摂動とみなすことができる。

摂動法を用いて ^{14}N の固有エネルギー ν_m を二次まで求めると、

$$\nu_{+1} = -\nu_N + \frac{\nu_Q}{\sqrt{6}} A_{20} - \frac{\nu_Q^2}{2\nu_N} (A_{22} A_{2-2} - A_{21} A_{2-1}), \quad (2.34)$$

$$\nu_0 = -\frac{\nu_Q}{\sqrt{6}} A_{20}, \quad (2.35)$$

$$\nu_{-1} = \nu_N + \frac{\nu_Q}{\sqrt{6}} A_{20} + \frac{\nu_Q^2}{2\nu_N} (A_{22} A_{2-2} - A_{21} A_{2-1}) \quad (2.36)$$

となる。これらから $\Delta m = 1$ の遷移の共鳴周波数を求めると、

$$\begin{aligned}
 \nu_{10} &= \nu_0 - \nu_{+1} \\
 &= \nu_N - \frac{3\nu_Q}{\sqrt{6}} A_{20} + \frac{\nu_Q^2}{2\nu_N} (A_{22}A_{2-2} - A_{21}A_{2-1}) \\
 &= \nu_N - \nu_Q^{(1)} + \nu_Q^{(2)} , \tag{2.37}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \nu_{0-1} &= \nu_{-1} - \nu_0 \\
 &= \nu_N + \frac{3\nu_Q}{\sqrt{6}} A_{20} + \frac{\nu_Q^2}{2\nu_N} (A_{22}A_{2-2} - A_{21}A_{2-1}) \\
 &= \nu_N + \nu_Q^{(1)} + \nu_Q^{(2)} \tag{2.38}
 \end{aligned}$$

となる。ここで

$$\nu_Q^{(1)} = \frac{3\nu_Q}{\sqrt{6}} A_{20} , \tag{2.39}$$

$$\nu_Q^{(2)} = \frac{\nu_Q^2}{2\nu_N} (A_{22}A_{2-2} - A_{21}A_{2-1}) \tag{2.40}$$

は、それぞれ四重極相互作用による一次および二次のシフトである。 $A_{21}^* = -A_{2-1}$ および

$A_{22}^* = A_{2-2}$ なので二次のシフトは常に正である。ここで A_{21}^* は A_{21} の複素共役を表す。次に、

overtone 遷移の共鳴周波数は式(2.34)、(2.36)から、

$$\begin{aligned}
 \nu_{1-1} &= \nu_{-1} - \nu_{+1} \\
 &= 2\nu_N + \frac{\nu_Q^2}{\nu_N} (A_{22}A_{2-2} - A_{21}A_{2-1})
 \end{aligned}$$

$$= 2\nu_N + 2\nu_Q^{(2)} \quad (2.41)$$

となる。 $\Delta m = 1$ の遷移の共鳴周波数は一次と二次の両方のシフトを受けるのに対して、overtone 遷移の共鳴周波数は一次のシフトの影響を受けず、二次のシフトのみを受ける。

したがって overtone 遷移のスペクトルの範囲は $\Delta m = 1$ の遷移のスペクトルの範囲に比べて小さくなる。 ^{14}N のエネルギー準位と、それぞれの遷移の共鳴周波数を図 2-1 に示す。

次に、overtone の遷移モーメントを求める。MAS 用のプローブでは NMR 観測用のサンプルコイルが zx -平面内で z -軸に対して角度 $\theta_M (= 54.7^\circ)$ だけ傾いた方向をむいている。このとき overtone の遷移モーメント M_{1-1} は以下のように与えられる。

$$M_{1-1} = \langle \phi_1 | I_x \sin \theta_M + I_z \cos \theta_M | \phi_{-1} \rangle \quad (2.42)$$

ここで ϕ_i は Zeeman 相互作用と四重極相互作用をあわせた全体のハミルトニアン(式(2.31))の i 番目の固有関数である。四重極相互作用を Zeeman 相互作用に対する摂動として固有関数を求めると、

$$|\phi_1\rangle = |1\rangle + \frac{\nu_Q}{\sqrt{2\nu_N}} A_{21} |0\rangle - \frac{\nu_Q}{2\nu_N} A_{22} |-1\rangle, \quad (2.43)$$

$$|\phi_0\rangle = |0\rangle + \frac{\nu_Q}{\sqrt{2\nu_N}} A_{2-1} |1\rangle + \frac{\nu_Q}{\sqrt{2\nu_N}} A_{21} |-1\rangle, \quad (2.44)$$

$$|\phi_{-1}\rangle = |-1\rangle - \frac{\nu_Q}{\sqrt{2\nu_N}} A_{2-1} |0\rangle + \frac{\nu_Q}{2\nu_N} A_{2-2} |1\rangle, \quad (2.45)$$

となる。ここで $|i\rangle$ は I_z の i 番目の固有関数である。これらの固有関数から overtone の遷移モーメントを求めると以下ようになる。

$$M_{1-1} = \frac{V_Q}{V_N} (A_{21}^* \sin \theta_M + A_{22}^* \cos \theta_M) \quad (2.46)$$

Zeeman 相互作用に対して四重極相互作用による摂動が働くとき、overtone の遷移モーメントは 0 でない値を持つ。ここで仮に四重極相互作用による摂動がないとすると overtone 遷移のモーメント M'_{1-1} は

$$\begin{aligned} M'_{1-1} &= \langle 1 | I_x \sin \theta_M + I_z \cos \theta_M | -1 \rangle \\ &= \left\langle 1 \left| \frac{1}{2} (I_+ + I_-) \sin \theta_M + I_z \cos \theta_M \right| -1 \right\rangle \\ &= 0 \end{aligned} \quad (2.47)$$

となる。したがって overtone 遷移は本来、禁制遷移であるが四重極相互作用による摂動の影響で許容されることがわかる。式(2.46)において A_{21}^* および A_{22}^* は式(2.16)によって与えられ、主軸系における球面テンソルの空間部分 A_{2k}^{PAS} (式(2.11)) を用いて表すことができる。さらに式(2.17)および $A_{21}^* = -A_{2-1}$ 、 $A_{21}^* = A_{2-2}$ が成り立つことを用いると遷移モーメント M_{1-1} は次のような形に表すことができる。

$$M_{1-1} = \frac{V_Q}{V_N} \sum_{l=-2}^2 a_l \exp(-2l\pi\nu_r it) \quad (2.48)$$

$$a_l = \sum_{k=-2}^2 A_{2k}^{\text{PAS}} D_k^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma) [-d_{l-1}^{(2)}(\theta_M) \sin \theta_M + d_{l-2}^{(2)}(\theta_M) \cos \theta_M] \quad (2.49)$$

したがって、MAS 下において overtone の遷移モーメント M_{1-1} は MAS の回転に等しい周波数およびその 2 倍の周波数で振動する成分を持つ。

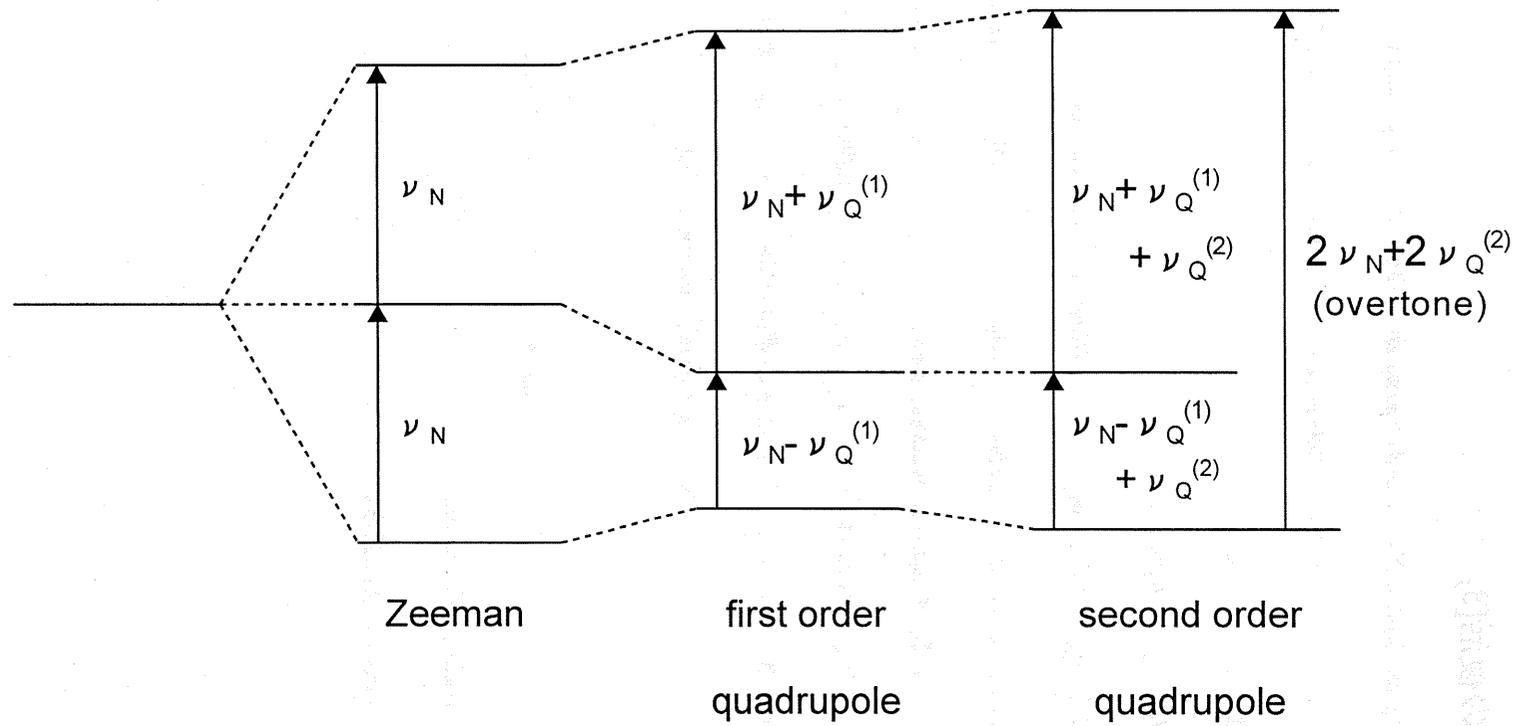


図 2-1: 静磁場中における ^{14}N のエネルギー準位

2.4. MAS 下における ^{14}N overtone 照射による ^{13}C - ^{14}N 双極子相相互作用の復活[3]

実験室系における zx -平面において z -軸 (静磁場の方向) から magic angle θ_M だけ傾けたコイルを考える。このコイルを用いて照射強度 ν_1 、周波数 ν のラジオ波を照射したときのハミルトニアンは次のように表される。

$$H_{\text{rf}} = 2\nu_1(I_x \sin \theta_M + I_z \cos \theta_M) \cos 2\pi\nu t \quad (2.50)$$

照射周波数がおおよそ $2\nu_N$ のとき、 $|\phi_1\rangle$ と $|\phi_{-1}\rangle$ の状態間に overtone 遷移が生じる。Overtone 遷移を考える際にはこれらの2つの状態のみが関わるので、二準位系の問題として系の問題を取り扱うことにする。すなわち、overtone 遷移を考えるときには、静磁場による Zeeman 相互作用の大きさが $2\nu_N$ 、その固有関数が $|\phi_1\rangle$ 、 $|\phi_{-1}\rangle$ である「仮想的な」スピン 1/2 (fictitious spin-1/2) の系を考えることにする。このとき、周波数 $2\nu_N$ のラジオ波照射によって MAS 下において平均化されている ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用が復活することを ν_0/ν_N の1次の範囲で示す。

「仮想的な」スピン 1/2 の空間において、周波数 $2\nu_N$ のラジオ波を照射したときの ^{14}N のハミルトニアンは静磁場との Zeeman 相互作用ハミルトニアン H_0 とラジオ波との Zeeman 相互作用 H_{rf} により次のように表される。

$$H = H_0 + H_{\text{rf}} \quad (2.51)$$

$$H_0 = -2\nu_N L_z \quad (2.52)$$

$$\begin{aligned}
H_{\text{rf}} &= 2\nu_1 \begin{pmatrix} \cos\theta_M + \frac{1}{2}\varepsilon(A_{21} + A_{21}^*)\sin\theta_M & \varepsilon A_{21}^*\sin\theta_M + \varepsilon A_{22}^*\cos\theta_M \\ \varepsilon A_{21}\sin\theta_M + \varepsilon A_{22}\cos\theta_M & -\cos\theta_M + \frac{1}{2}\varepsilon(A_{21} + A_{21}^*)\sin\theta_M \end{pmatrix} \cos 4\pi\nu_N t \\
&= 2\nu_1 [2L_z \cos\theta_M + L_+ (\varepsilon A_{21}^*\sin\theta_M + \varepsilon A_{22}^*\cos\theta_M) + L_- (\varepsilon A_{21}\sin\theta_M + \varepsilon A_{22}\cos\theta_M) \\
&\quad + \frac{1}{2}\varepsilon(A_{21} + A_{21}^*)\sin\theta_M] \cos 4\pi\nu_N t \tag{2.53}
\end{aligned}$$

となる。ここで、式中の行列は $|\phi_1\rangle$ 、 $|\phi_{-1}\rangle$ を基底としており、 L_z 、 L_{\pm} は「仮想的な」スピン1/2の空間におけるスピン演算子である。また、 $\varepsilon = \nu_0/\nu_N$ である。 H_{rf} において ε の2次以上の項は無視した。

系の密度演算子の運動は Liouville von Neumann 方程式に従う。

$$\frac{d}{dt}\rho = -i[H, \rho] = -i[H_0 + H_{\text{rf}}, \rho] \tag{2.54}$$

ここでラジオ波による Zeeman 相互作用を静磁場による Zeeman 相互作用に対する摂動とみ

なして相互作用表示を用いると上の方程式は、

$$\frac{d}{dt}\tilde{\rho} = -i[\tilde{H}_{\text{rf}}, \tilde{\rho}] \tag{2.55}$$

$$\tilde{\rho} = e^{iH_0 t} \rho e^{-iH_0 t} \tag{2.56}$$

$$\tilde{H}_{\text{rf}} = e^{iH_0 t} H_{\text{rf}} e^{-iH_0 t} \tag{2.57}$$

となる。ラジオ波による Zeeman 相互作用に比べて静磁場による Zeeman 相互作用の大き

が非常に大きいとき、系の時間発展演算子 $U(t)$ は0次の average Hamiltonian $\bar{H}_{\text{rf}}^{(0)}$ によ

次のように近似される。(高磁場近似)

$$U(t) = \exp(-2\pi i t \bar{H}_{\text{rf}}^{(0)}) \tag{2.58}$$

$$\begin{aligned}
\bar{H}_{\text{rf}}^{(0)} &= 2\nu_N \int_0^{1/2\nu_N} dt \tilde{H}_{\text{rf}} \\
&= \varepsilon \nu_1 \left[L_+ (A_{21}^* \sin \theta_M + A_{22}^* \cos \theta_M) + L_- (A_{21} \sin \theta_M + A_{22} \cos \theta_M) \right] \\
&= \nu_1 (L_+ M_{1-1} + L_- M_{1-1}^*) \quad (2.59)
\end{aligned}$$

式(2.48)、(2.49)を用いると式(2.47)のハミルトニアンは

$$H_{\text{rf}}(t) = \varepsilon \nu_1 \sum_{l=-2}^2 [a_l L_+ \exp(-2l\pi i \nu_1 t) + a_l^* L_- \exp(2l\pi i \nu_1 t)] \quad (2.60)$$

$$a_l = \sum_{k=-2}^2 A_{2k}^{\text{PAS}} D_{kl}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma) [-d_{l-1}^{(2)}(\theta_M) \sin \theta_M + d_{l-2}^{(2)}(\theta_M) \cos \theta_M] \quad (2.61)$$

となり、MASによって時間依存していることがわかる。

次に ^{13}C のスピン系 S を含めて考える。簡単のために化学シフトを無視する。 ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用のハミルトニアン H_d は次のように与えられる。

$$H_d = \sum_{q=-2}^2 (-1)^q \nu_d Y_{2q} T_{2-q} \quad (2.62)$$

$$\nu_d = \frac{\hbar \gamma_I \gamma_S}{2\pi r^3} \quad (2.63)$$

ここで、 γ_I 、 γ_S はそれぞれ I スピンおよび S スピンの磁気回転比、 r はスピン間の距離を表す。また、 Y_{2q} 、 T_{2-q} はそれぞれ 2 階の既約球面テンソル演算子の空間部分およびスピン部分である。まず、 I スピン系のみに着目する。 ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用を I スピン、すなわち ^{13}C の静磁場による Zeeman 相互作用に対する摂動とみなし、0 次の average Hamiltonian を求めると、

$$\bar{H}_d^{(0)} = \nu_d (Y_{20} I_z + Y_{2-1} I_+ - Y_{21} I_-) S_z \quad (2.64)$$

となる。ここで、 $|\phi_1\rangle$ 、 $|\phi_{-1}\rangle$ を基底としてこのハミルトニアンを ε の1次まで計算すると、

$$\begin{aligned} \bar{H}_d^{(0)} &= \nu_d \begin{pmatrix} Y_{20} + \varepsilon(Y_{2-1} A_{21} - Y_{21} A_{21}^*) & \varepsilon(2Y_{2-1} A_{21}^* + Y_{20} A_{22}^*) \\ \varepsilon(-2Y_{21} A_{21} + Y_{20} A_{22}) & -Y_{20} + \varepsilon(Y_{2-1} A_{21} - Y_{21} A_{21}^*) \end{pmatrix} S_z \\ &= \nu_d [2Y_{20} L_z + \varepsilon(2Y_{2-1} A_{21}^* + Y_{20} A_{22}^*) L_+ + \varepsilon(-2Y_{21} A_{21} + Y_{20} A_{22}) L_- + \varepsilon(Y_{2-1} A_{21} - Y_{21} A_{21}^*)] S_z \end{aligned} \quad (2.65)$$

となる。この双極子相互作用ハミルトニアンを、「仮想的な」スピン 1/2 空間における ^{14}N の静磁場による Zeeman 相互作用 (式(2.52)) に対する摂動とみなして 0 次の average Hamiltonian を求めると、

$$\bar{H}_d^{(0)} = 2\nu_d Y_{20} L_z S_z \quad (2.66)$$

となる。 Y_{20} は MAS によって時間依存するようになり、MAS のもとでの双極子相互作用ハミルトニアン $H_d(t)$ は次の式で与えられる。

$$H_d(t) = 2\nu_d [G_1 \cos(2\pi\nu_r t + \gamma_d) + G_2 \cos(4\pi\nu_r t + 2\gamma_d)] L_z S_z \quad (2.67)$$

$$G_1 = \sqrt{2} \sin(2\beta_d) \quad (2.68)$$

$$G_2 = \sin^2 \beta_d \quad (2.69)$$

ここで β_d と γ_d はローター系において核間ベクトルの方向を表す角度である。 ^{14}N overtone 照射を行っていないとき、双極子相互作用 $H_d(t)$ の 0 次の average Hamiltonian を MAS の周期を用いて求めると $\bar{H}_d^{(0)} = 0$ となる。これは、MAS によって双極子相互作用が消去されたことを表す。

ここで、 ^{14}N overtone 照射を行ったときに ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用が復活することを secular

average Hamiltonian theory を用いて示す。Secular average Hamiltonian theory によると、時間依存しているハミルトニアン $H(t)$ をフーリエ級数によって表現することができるとき、すなわち、

$$H(t) = \sum_n H_n \exp(2\pi i \nu_n t) \quad (2.70)$$

という形で表すことができるとき、0次および1次の average Hamiltonian は以下のように与えられる。

$$H^{(0)} = H_0 \quad (2.71)$$

$$H^{(1)} = -\sum_{k>0} \frac{1}{2\pi \nu_k} [H_k, H_{-k}] \quad (2.72)$$

したがって、もし共通のフーリエ成分を持っている可換でないハミルトニアンがぞんざいするならば、それらのハミルトニアンは時間依存しない1次の secular average Hamiltonian を与えることになる。ここで考えている系では、 $H_{rf}(t)$ と $H_d(t)$ が共通のフーリエ成分を持っている可換でないハミルトニアンであることが式(2.60)と式(2.67)からわかる。

実際に系のハミルトニアンを

$$H(t) = H_{rf}(t) + H_d(t) \quad (2.73)$$

として、secular average Hamiltonian を ε について1次まで求めると式(2.60)、式(2.67)および式(2.71)、式(2.72)から、

$$\bar{H}^{(0)} = \varepsilon \nu_1 (a_0 L_+ + a_0^* L_-) \quad (2.74)$$

$$\bar{H}^{(1)} = -\frac{\varepsilon \nu_1 \nu_d}{2\pi \nu_r} (P L_+ + P^* L_-) S_z \quad (2.75)$$

となる。ここで、

$$P = G_1(a_1 e^{i\gamma_d} - a_{-1} e^{-i\gamma_d}) + G_2(a_2 e^{2i\gamma_d} - a_{-2} e^{-2i\gamma_d}) \quad (2.76)$$

であり、Euler 角の関数となっている。 $\bar{H}^{(1)}$ は MAS によって消去されていた ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用が ^{14}N overtone 照射によって復活(recouple)したことを示している。しかし、 $|\bar{H}^{(0)}| \gg |\bar{H}^{(1)}|$ が成り立つときは、 $\bar{H}^{(1)}$ が $\bar{H}^{(0)}$ によって平均化されてしまう。すなわちラジオ波による双極子相互作用の消去(decouple)が生じる。これは $\bar{H}^{(1)}$ と $\bar{H}^{(0)}$ がかかんではないので、 $\bar{H}^{(1)}$ を $\bar{H}^{(0)}$ に対する摂動とみなしたときの 0 次の average Hamiltonian が 0 になってしまうためである。したがって ^{14}N overtone 照射による ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用の復活の効率は Euler 角に依存する。

3. 実験

3.1. 実験装置

3.1.1. 4.7 T の静磁場における実験装置

4.7 T の静磁場における実験では自作の NMR 装置および自作のプローブを用いた。プローブは自作の ^1H - ^{13}C - ^{15}N 三重共鳴プローブを ^1H - ^{13}C - ^{14}N overtone 三重共鳴プローブに改造した。プローブの回路図を図 3-1 に示す。

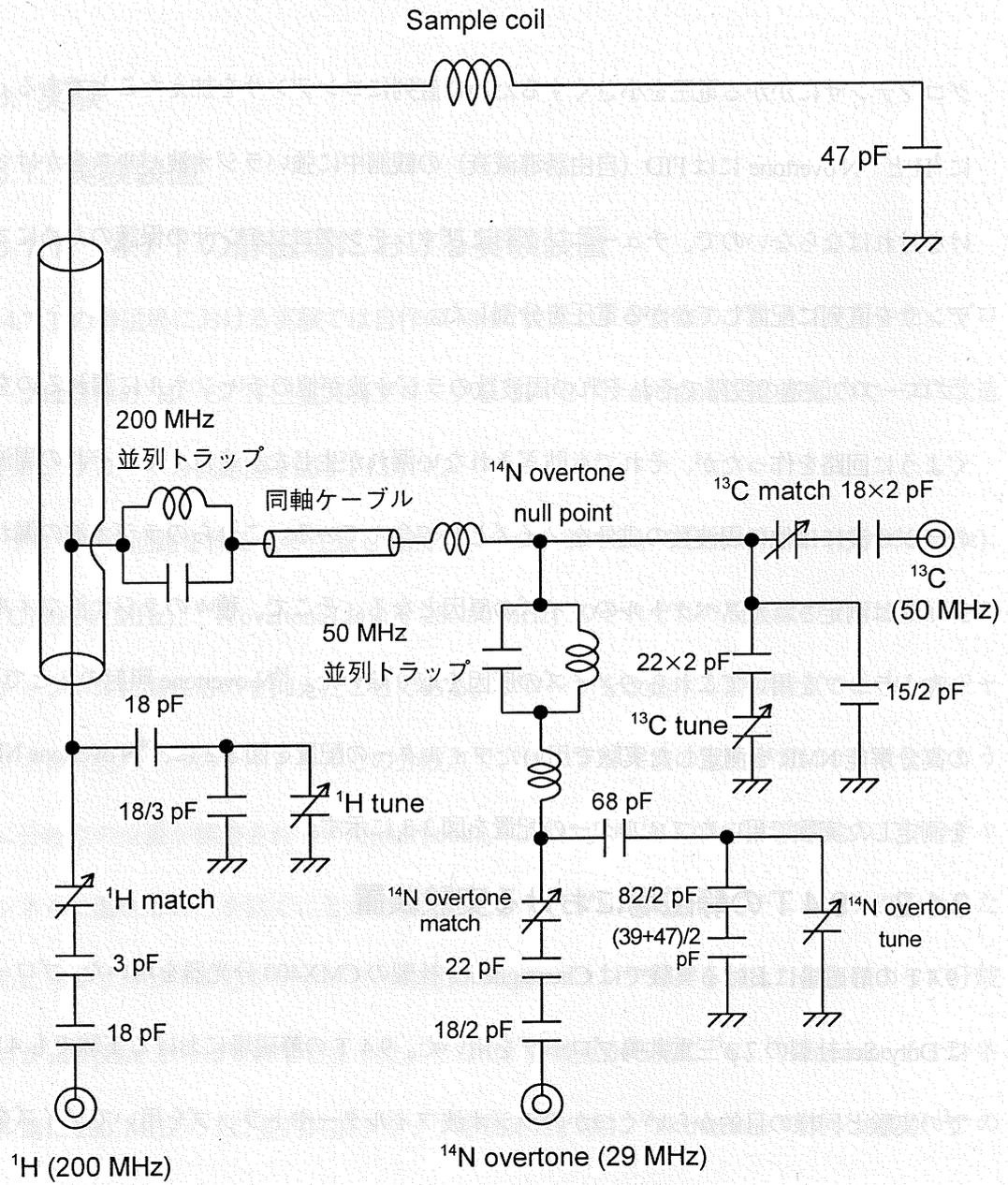
プローブの回路を作る上で注意した点をいくつか挙げる。ひとつめは ^1H (199.805 MHz)、 ^{13}C (50.246 MHz)、 ^{14}N overtone (およそ 28.950 MHz) のそれぞれの周波数のラジオ波が他のチャンネルに漏れるのを抑えたことである。プローブを改造する前の時点では ^1H のチャンネルと他の二つのチャンネルとの分岐点で、 ^1H のラジオ波の電圧が常に 0 V となるように分岐点の位置が調整されていた(null point)。これにより ^1H のラジオ波が他の二つのチャンネルに漏れることを防ぐことができた。しかし、 ^{14}N overtone にチューニングをとるためにサンプルコイルとグラウンドとの間に 47 pF のコンデンサを加えたことによって分岐点が null point からはずれてしまった。そこで、分岐点から見て ^{13}C 、 ^{14}N overtone チャンネル側に 200 MHz の LC 並列共振トラップを加えた。次に ^{14}N overtone のラジオ波が ^{13}C のチャンネルに漏れるのを防ぐために、 ^{13}C のチャンネルと ^{14}N overtone のチャンネルとの分岐点が ^{14}N overtone の null point となるように同軸ケーブルの長さを調整した。逆に ^{13}C のラジオ波が ^{14}N overtone のチャンネルに漏れるのを防ぐために、 ^{13}C のチャンネルと ^{14}N overtone のチャンネルとの分岐点から見て ^{14}N overtone のチャンネル側に 50 MHz の LC 並列共振トラップをとりつけた。ふたつめは、各チャンネルのチューニングおよびマッ

グコンデンサにかかる電圧を小さくするために直列にコンデンサを加えたことである。特に ^1H と ^{14}N overtone には FID (自由誘導減衰) の観測中に強いラジオ波パルスをかけつづければならぬので、チューニングおよびマッチングコンデンサの保護のためにコンデンサを直列に配置してかかる電圧を分割した。

プローブの改造の段階でそれぞれの周波数のラジオ波が他のチャンネルに漏れるのを防ぐように回路を作ったが、それでも防ぎきれない漏れが生じた。また、それぞれの周波数のラジオ波には他の周波数の成分をノイズとして含んでいる。これらのラジオ波の漏れやノイズは測定されたスペクトルのノイズの原因となる。そこで、種々のラジオ波フィルターやトラップを用いてこれらのノイズの原因を取り除いた。 ^{14}N overtone 照射のもとで ^{13}C の高分解能 NMR を測定した実験で用いたフィルターの配置を図 3-2 に、 ^{14}N overtone NMR を測定した実験で用いたフィルターの配置を図 3-3 に示す。

3.1.2. 9.4 T の静磁場における実験装置

9.4 T の静磁場における実験では Chemagnetics 社製の CMX400 分光器を用いた。プローブは Doty Sci.社製の 7ϕ 三重共鳴プローブを用いた。9.4 T の静磁場における実験でも 4.7 T での実験と同様の目的からいくつかのラジオ波フィルターやトラップを用いてノイズを抑えた。その配置を図 3-4 に示す。



- (39+47)/2 pF は 39 pF と 47 pF のコンデンサを並列につないだものを 2 組、直列に配置したことを表す。
- 18/2 pF は 18 pF のコンデンサを 2 個、直列につないだことを表す。
- 22x2 pF は 22 pF のコンデンサを 2 個、並列につないだことを表す。

図 3-1: 4.7 T の静磁場における測定で用いた ^1H - ^{13}C - ^{14}N overtone 三重共鳴プローブの回路図

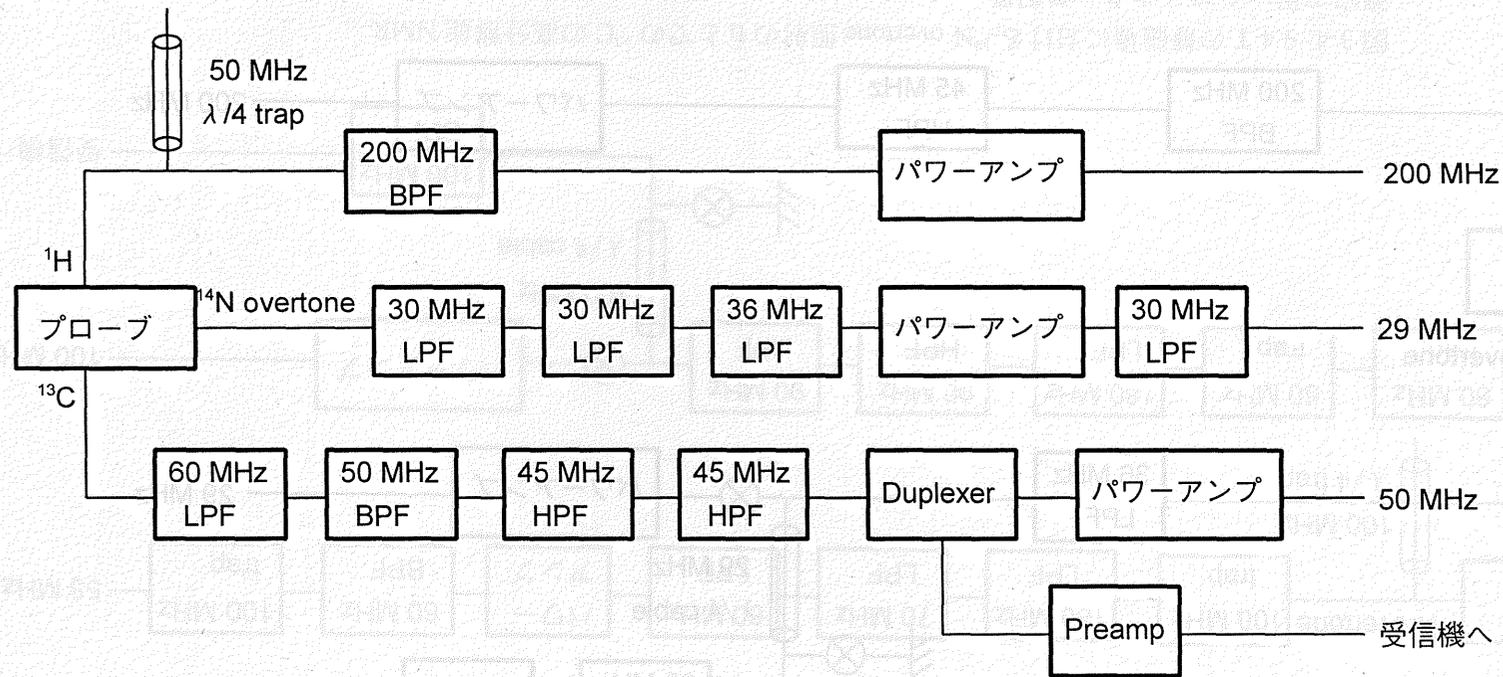


図 3-2: 4.7 T の静磁場における ¹⁴N overtone 照射のもとでの ¹³C の高分解能 NMR 測定で用いたフィルターの配置

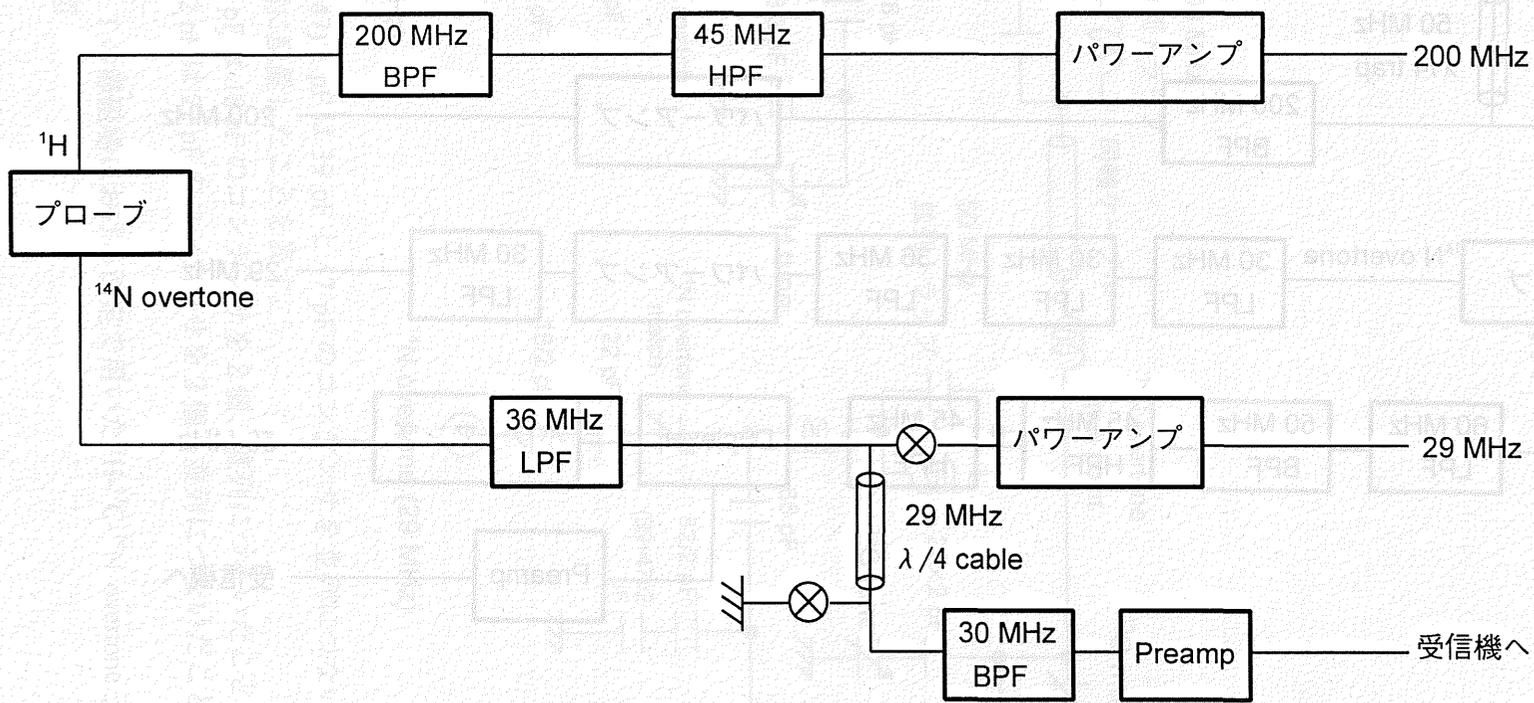


図 3-3: 4.7 T の静磁場において直接 ^{14}N overtone NMR を測定した実験で用いたフィルター配置

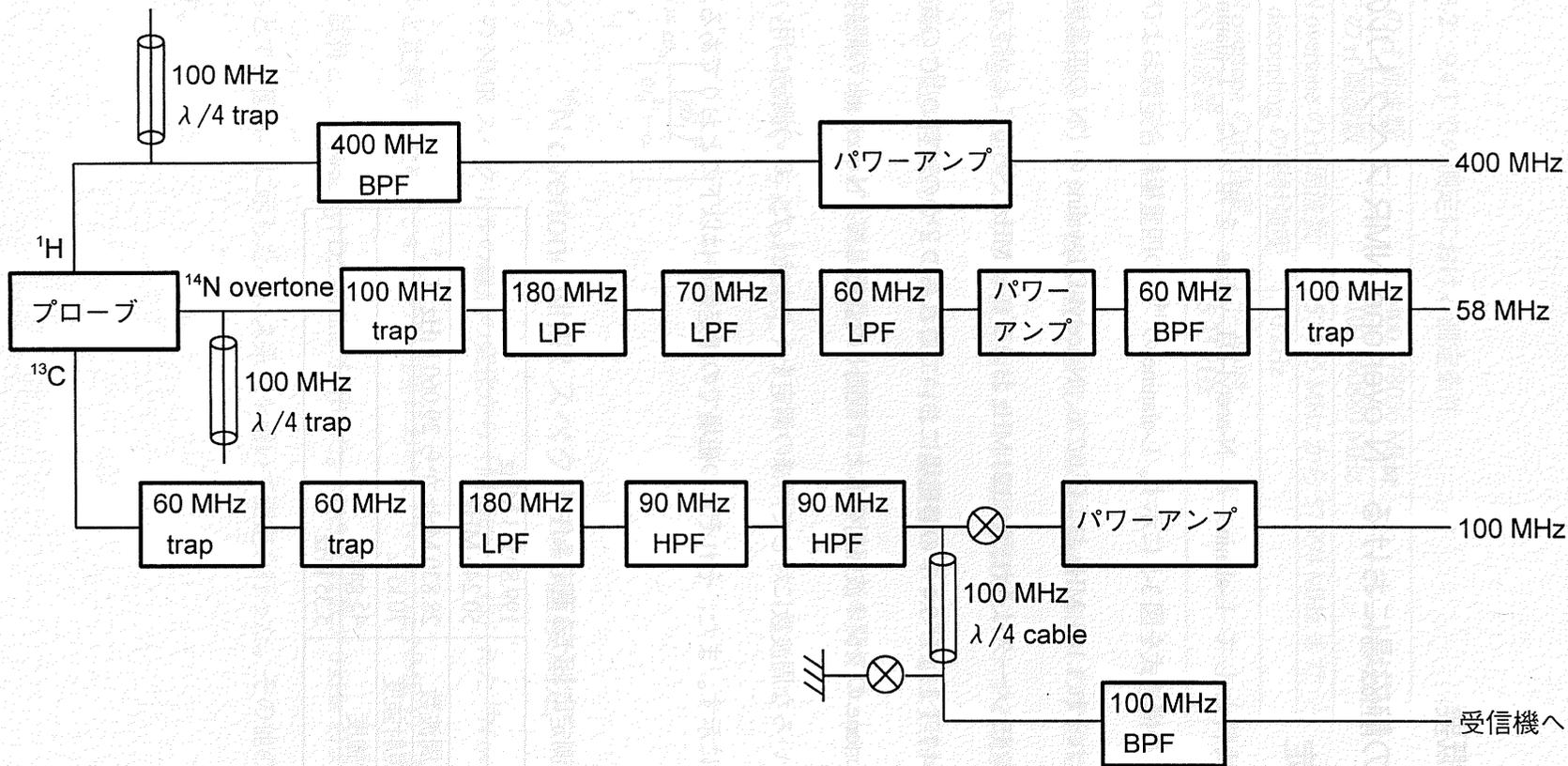


図 3-4: 9.4 T の静磁場における ^{14}N overtone 照射のもとでの ^{13}C の高分解能 NMR 測定で用いたフィルターの配置

3.2. 実験の概要

3.2.1. 2つの静磁場における ^{14}N overtone NMR スペクトルの間接測定

この実験では試料として L-alanine と N-acetyl-D,L-valine を用いた。L-alanine と N-acetyl-D,L-valine の構造式を図 3-5 に示す。L-alanine の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータはそれぞれ 1.148 MHz および 0.276、N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータはそれぞれ 3.21 MHz および 0.31 MHz であることがすでに知られている[1,8]。4.7 T および 9.4 T の静磁場においてこれらの2つの試料の ^{13}C の高分解能 NMR を ^{14}N overtone のラジオ波照射のもとで観測した。そして ^{14}N overtone の照射周波数を変えて、いろいろな周波数に対して同様の測定をくりかえした。この測定に用いたパルス系列を図 3-6 に示す。また、それぞれの磁場での測定条件は以下のとおりである。

表 3-1 4.7 T での測定における測定条件

^1H の rf 周波数	199.80583 MHz
^{13}C の rf 周波数	50.246 MHz
^{14}N overtone の rf 周波数	28.830 MHz から 29.060 MHz まで
^1H decoupling の照射強度	70 kHz
^{14}N overtone の rf 強度	45 gauss
MAS 周波数	5.35 kHz

表 3-2 9.4 T での測定における測定条件

^1H の rf 周波数	400.278036 MHz
^{13}C の rf 周波数	100.660880 MHz
^{14}N overtone の rf 周波数	57.795 MHz から 57.994 MHz まで
^1H decoupling の照射強度	70 kHz
^{14}N overtone の rf 強度	45 gauss
MAS 周波数	5.35 kHz

^{14}N overtone のラジオ波の照射強度は Bloch-Siegert Shift の大きさから決定した。

Bloch-Siegert Shift とはラジオ波照射により共鳴周波数がシフトする現象である。共鳴周波数が ω_0 で磁気回転比が γ である核に対して周波数 ω のラジオ波を照射したとき、そのラジオ波磁場の強さ B_1 と共鳴周波数のシフトの大きさ $\Delta\omega$ との関係は、 $|\omega_0 - \omega| \gg \gamma B_1$ の条件のもとで次の式で与えられる[3]。

$$\Delta\omega = \omega_0 \left[\frac{(\gamma B_1)^2}{\omega_0^2 - \omega^2} \right]$$

3.2.2. ^{14}N overtone NMR スペクトルの直接測定

^{13}C の NMR スペクトルの線形の変化から「間接的に」得られた ^{14}N overtone NMR スペクトルと比較するために、4.7 T の静磁場において ^{14}N overtone NMR の「直接」の測定を行った。試料として N-acetyl-D,L-valine を用いた。MAS 周波数が 0 kHz および 5.35 kHz の条件のもとで、図 3-7 に示したパルス系列を用いて測定を行った。その他の測定条件を以下に示す。

MAS 周波数	0 kHz
^{14}N overtone の rf 強度	45 gauss
^1H decoupling の照射強度	70 kHz
^{14}N overtone の rf 周波数	57.795 MHz から 57.994 MHz まで
^{13}C の rf 周波数	100.660880 MHz
^1H の rf 周波数	400.278036 MHz

表 3-3 ^{14}N overtone NMR の直接測定における測定条件

^1H の rf 周波数	199.80583 MHz
^{14}N overtone の rf 周波数	28.980 MHz
^1H decoupling の照射強度	50 kHz
^{14}N overtone の rf 強度	45 gauss
^{14}N overtone のパルス幅	100 μ sec
繰り返し時間	1 sec
積算回数	25000 回

3.2.3. ^{14}N overtone NMR 間接測定法のペプチドへの応用

この実験では分子内に複数の ^{14}N を持つ試料の ^{14}N overtone NMR スペクトルを間接的に測定した。試料として L-alanylglycylglycine (AG_1G_2) を用いた。L-alanylglycylglycine の構造式を図 3-5 に示す。 G_1 の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータはそれぞれ 3.29 MHz および 0.70、 G_2 の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータはそれぞれ 3.15 MHz および 0.68 MHz であることがすでに知られている[2]。図 3-6 のパルス系列により ^{14}N overtone 照射のもとで ^{13}C の高分解能 NMR 測定をおこなった。そして ^{14}N overtone の照射周波数を変えて、いろいろな周波数に対して同様の測定をくりかえした。この実験は 9.4 T の静磁場で行った。測定条件を以下に示す。

表 3-4 L-alanylglycylglycine の測定における測定条件

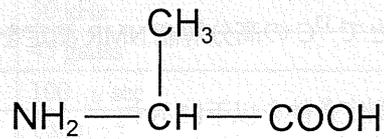
^1H の rf 周波数	400.278080 MHz
^{13}C の rf 周波数	100.660648 MHz
^{14}N overtone の rf 周波数	57.786 MHz から 57.960 MHz まで
^1H decoupling の照射強度	70 kHz
^{14}N overtone の rf 強度	50 gauss
MAS 周波数	5.35 kHz

さらに試料としてβシート構造を取る(Ala)₃-Ala*-(Ala)₃とαヘリックス構造を取るポリアラニン(Ala*,Ala)=50:50を群馬大学の莊司先生に提供していただき、図3-6のパルス系列により¹⁴N overtone 照射のもとで¹³Cの高分解能NMR測定をおこない解析した。この実験は7.0Tの静磁場で行った。測定条件を以下に示す。

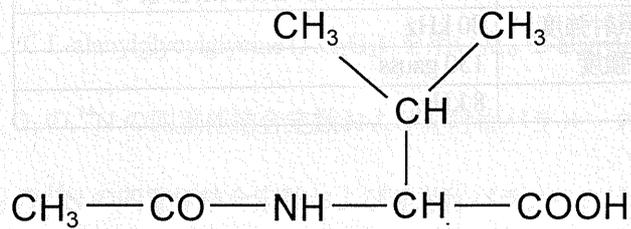
表 3-5 測定条件

¹ H の rf 周波数	300.456 MHz
¹³ C の rf 周波数	75.556 MHz
¹⁴ N overtone の rf 周波数	43.46 MHz から 43.52 MHz まで
¹ H decoupling の照射強度	80 kHz
¹⁴ N overtone の rf 強度	130 gauss
MAS 周波数	8 kHz

(a) L-alanine



(b) N-acetyl-D,L-valine



(c) L-alanylglycylglycine (AG₁G₂)

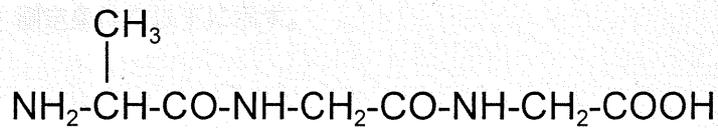


図 3-5: L-alanine、N-acetyl-D,L-valine および L-alanylglycylglycine (AG₁G₂)の構造式

4. 結果および考察

4.1. 2つの共振場における ^{14}N overtone NMR スペクトルの相移

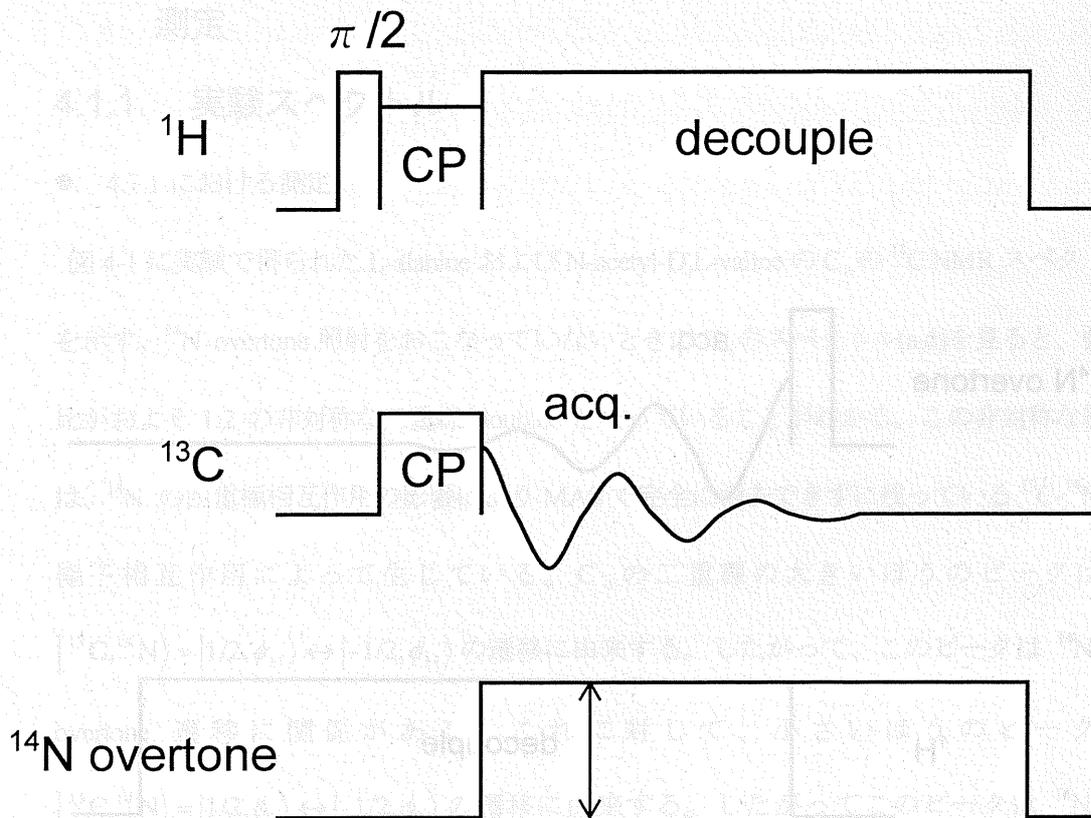


図 3-6: ^{14}N overtone 照射のもとで ^{13}C の高分解能 NMR 測定をおこなうためのパルス系列

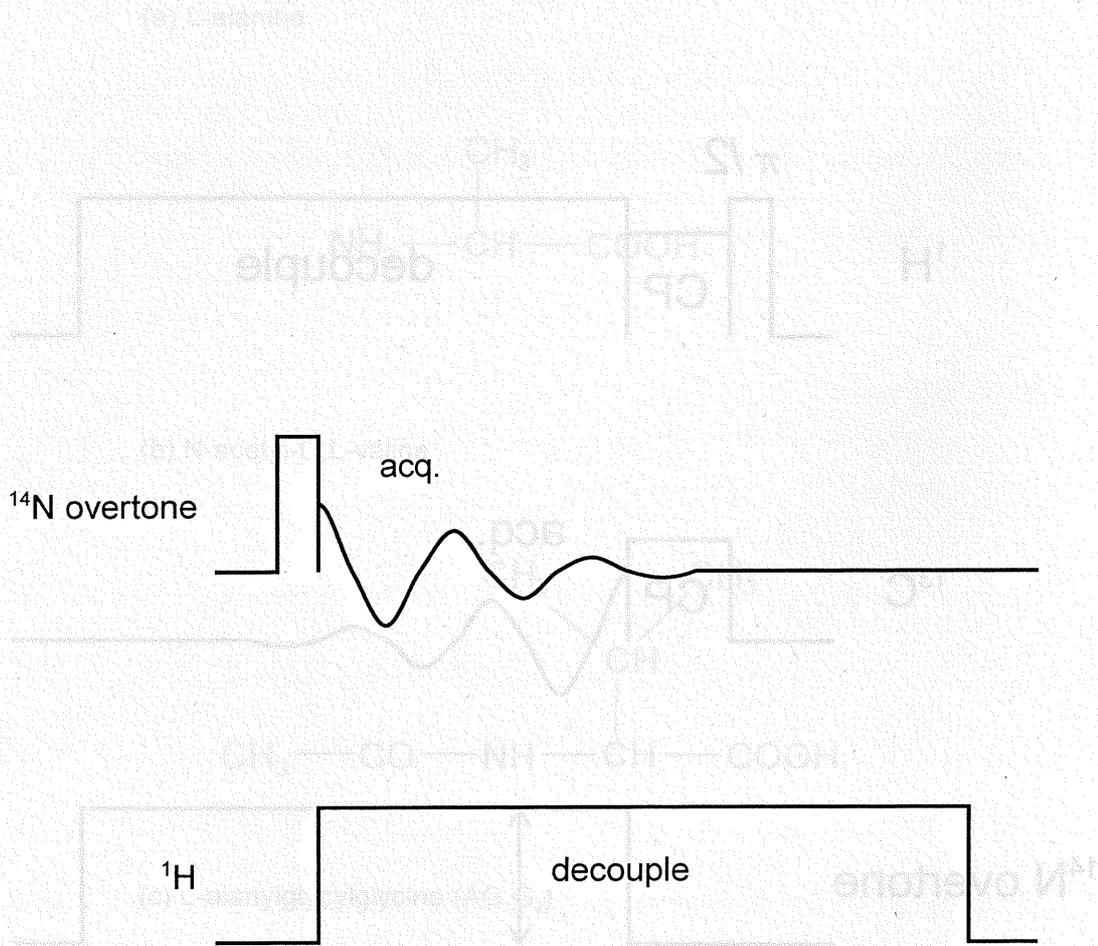


図 3-7: 直接 ^{14}N overtone NMR を測定するためのパルス系列

4. 結果および考察

4.1. 2つの静磁場における ^{14}N overtone NMR スペクトルの間接測定

4.1.1. 実験スペクトル

- 4.7 T における測定

図 4-1 に実験で得られた L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の C_α の ^{13}C NMR スペクトルを示す。 ^{14}N overtone 照射をおこなっていないときの C_α のスペクトル(a,d)を見ると、強度比がおおよそ 1:2 の非対称な二重線(doublet)となっていることがわかる。この非対称な線形は、 ^{14}N の四重極相互作用の影響により MAS で完全に消去できずに残っている ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用によって生じている。 C_α の二重線の大きいほうのピークは、 $|\text{}^{13}\text{C}, \text{}^{14}\text{N}\rangle = |1/2, \phi_{\pm 1}\rangle \leftrightarrow |-1/2, \phi_{\pm 1}\rangle$ の遷移に由来する。したがって、このピークは ^{14}N の overtone 遷移に関係がある。これに対して、小さいほうのピークは $|\text{}^{13}\text{C}, \text{}^{14}\text{N}\rangle = |1/2, \phi_0\rangle \leftrightarrow |-1/2, \phi_0\rangle$ の遷移に由来する。したがってこのピークは ^{14}N の overtone 遷移と無関係である。 ^{14}N overtone 照射をおこなっていないときのスペクトルと ^{14}N overtone 照射をおこなったときのスペクトルを比較すると、28.875 MHz のラジオ波照射をおこなったときに L-alanine の大きいほうのピークの線幅が、28.990 MHz のラジオ波照射をおこなったときに N-acetyl-D,L-valine の大きいほうのピークの線幅がそれぞれ増大していることがわかる(b,f)。これは、 ^{14}N overtone 遷移の共鳴周波数のラジオ波を照射することにより $|\phi_{+1}\rangle$ または $|\phi_{-1}\rangle$ の状態の ^{14}N と ^{13}C との間の双極子相互作用が復活した結果、 $|\text{}^{13}\text{C}, \text{}^{14}\text{N}\rangle = |1/2, \phi_{\pm 1}\rangle \leftrightarrow |-1/2, \phi_{\pm 1}\rangle$ に対応するピークの線幅のみが増大したものと考えられ

る。これに対して、 ^{14}N overtone 遷移の共鳴周波数とは異なる周波数のラジオ波を照射してもピークの線幅の増大は見られない(c,e)。N-acetyl-D,L-valine と L-alanine の ^{14}N overtone 共鳴周波数を比較すると N-acetyl-D,L-valine のほうが高い。これは N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N の四重極結合定数(3.21 MHz)が L-alanine の結合定数(1.148 MHz)に比べて大きいために四重極相互作用の二次のシフトが大きくなったことによると考えられる。

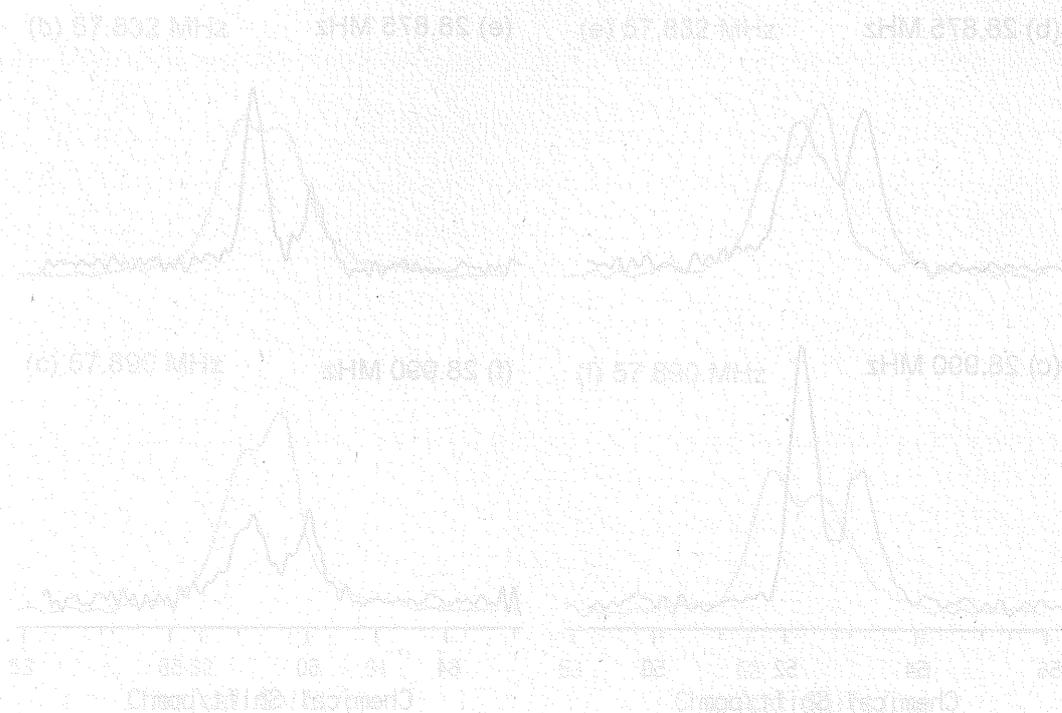
^{14}N overtone 照射による影響をもうひとつ挙げると、 ^{14}N overtone 照射をおこなっていないときの C_α のピーク(b,c,e,f)が照射をおこなっていないときのピーク(a,d)からおよそ 1.3 ppm ほど高周波数側にシフトしていることである。このシフトは観測核である ^{13}C に対して off-resonance (共鳴周波数からはずれている) のラジオ波照射による Bloch-Siegert shift である(Appendix 参照)。これは ^{14}N overtone 遷移とは無関係の現象なのでラジオ波照射したときのピークはすべてシフトしている。

● 9.4 T における測定

図 4-2 に実験で得られた L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の C_α の ^{13}C NMR スペクトルを示す。 ^{14}N overtone 照射をおこなっていないときの C_α のスペクトル(a,d)を見ると、4.7 T のスペクトルと比較して二重線の 2 つのピークの位置が近づいている。特に L-alanine のスペクトルは肩(shoulder)を持った一本のピークの形となっている。また、二重線の個々のピークの強度比が 1:2 から 1:1 に近づいている。これは、静磁場の強さが強いほど ^{14}N の四重極相互作用による摂動の影響が小さくなるため MAS で完全に消去できずに残っている ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用の大きさも小さくなることによる。 ^{14}N overtone 照射をおこなっていないときのスペクトルと ^{14}N overtone 照射をおこなったときのスペクトルを比較すると、

57.832 MHz のラジオ波照射をおこなったときに L-alanine の大きいほうのピークの線幅が、57.890 MHz のラジオ波照射をおこなったときに N-acetyl-D,L-valine の大きいほうのピークの線幅がそれぞれ増大していることがわかる(b,f)。9.4 T における測定でも 4.7 T における測定のとおり同様に ^{14}N の四重極結合定数の大きい N-acetyl-D,L-valine のほうが ^{14}N overtone の共鳴周波数が高いことがわかる。

また、 ^{14}N overtone 照射を行っていないときの C_α のピーク(b,c,e,f)が照射を行っていないときのピーク(a,d)からおよそ 0.3 ppm ほどシフトしている。(Bloch-Siegert shift)



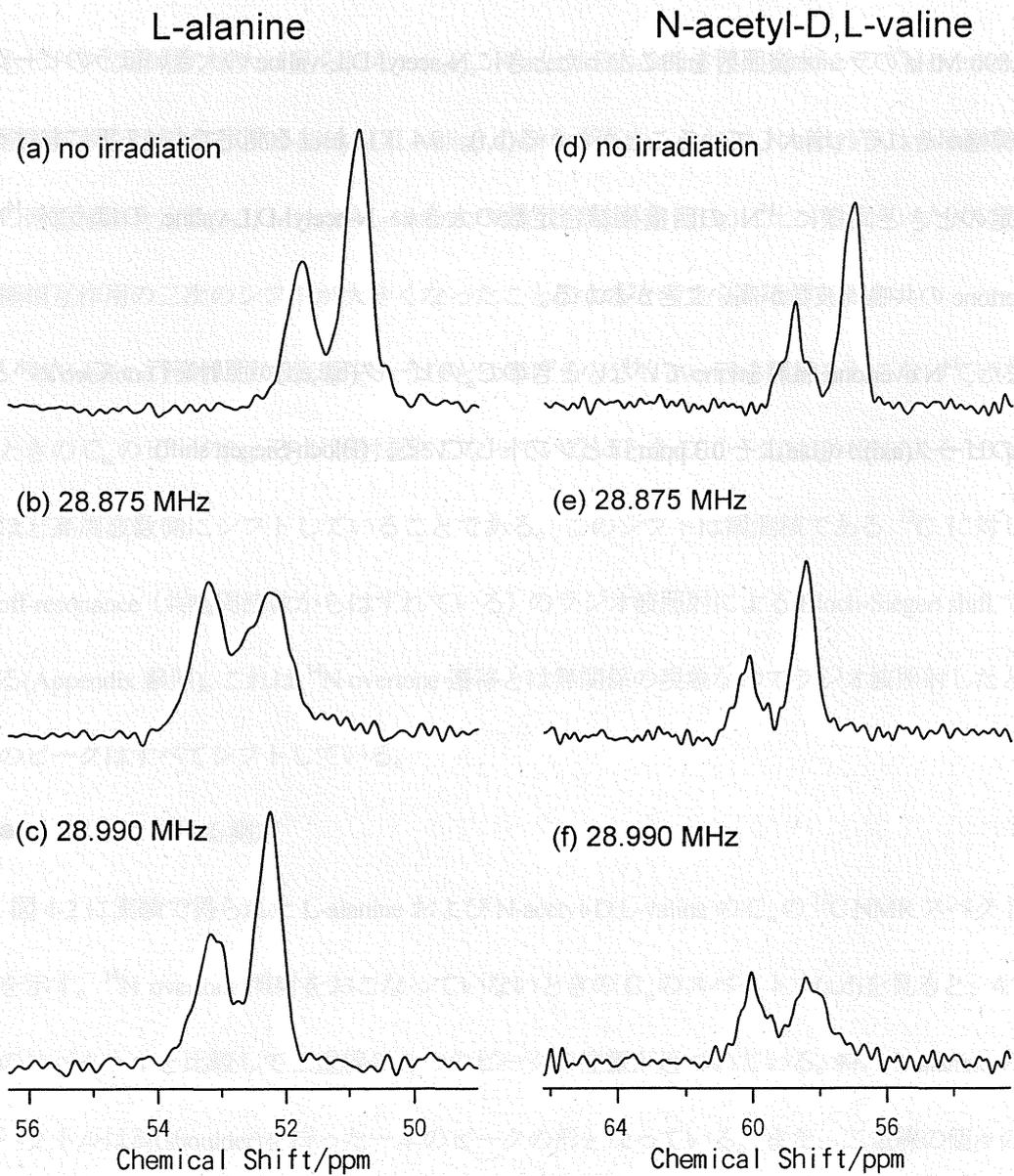


図 4-1: 4.7 T の静磁場中で測定された L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の C_{α} のスペクトル。(a-c)は L-alanine のスペクトル。(d-f)は N-acetyl-D,L-valine のスペクトル。(a),(d)は ^{14}N overtone 照射しないときの、(b,c,e,f)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射を行ったときのスペクトル。

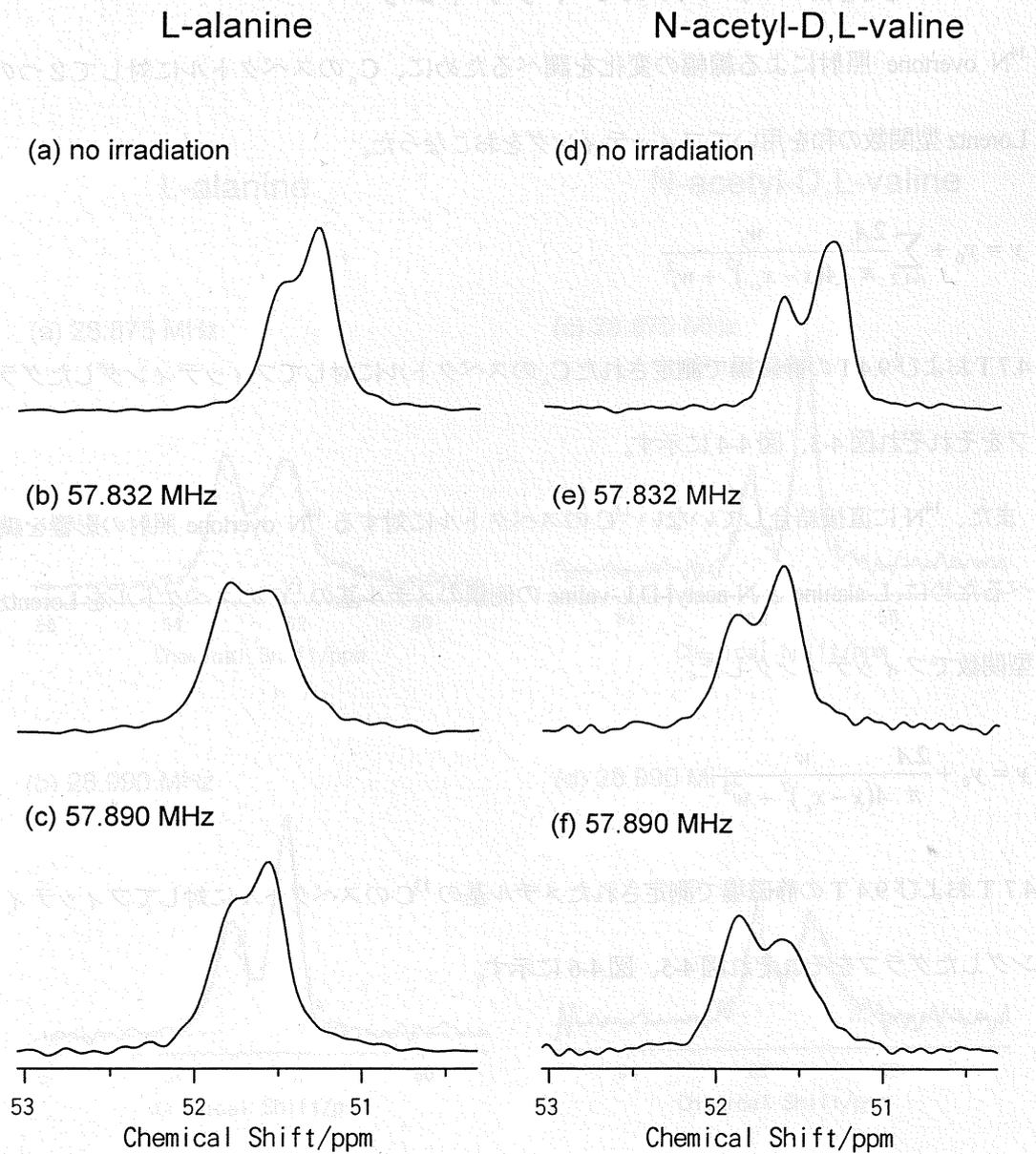


図 4-2: 9.4 T の静磁場中で測定された L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の C_α のスペクトル。(a-c)は L-alanine のスペクトル。(d-f)は N-acetyl-D,L-valine のスペクトル。(a),(d)は ^{14}N overtone 照射しないときの、(b,c,e,f)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射を行ったときのスペクトル。

4.1.2. 実験スペクトルのフィッティング

^{14}N overtone 照射による線幅の変化を調べるために、 C_α のスペクトルに対して2つの Lorentz 型関数の和を用いてフィッティングをおこなった。

$$y = y_0 + \sum_{i=1,2} \frac{2A_i}{\pi} \frac{w_i}{4(x - x_{ci})^2 + w_i^2}$$

4.7 T および 9.4 T の静磁場で測定された C_α のスペクトルに対してフィッティングしたグラフをそれぞれ図 4-3、図 4-4 に示す。

また、 ^{14}N に直接結合していない ^{13}C のスペクトルに対する ^{14}N overtone 照射の影響を調べるために、L-alanine と N-acetyl-D,L-valine の側鎖のメチル基の ^{13}C のスペクトルを Lorentz 型関数でフィッティングした。

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2}$$

4.7 T および 9.4 T の静磁場で測定されたメチル基の ^{13}C のスペクトルに対してフィッティングしたグラフをそれぞれ図 4-5、図 4-6 に示す。

4.1.2 実験スペクトルのフィッティング

Figure 4-4 shows the ^{14}N overtone spectra of L-alanine and N-acetyl-D,L-valine. The x-axis is Chemical Shift/ppm and the y-axis is intensity. The spectra are shown for two different frequencies: 57.832 MHz and 57.890 MHz. The spectra are fitted with Lorentzian functions (dotted lines) and their sum (dashed lines).

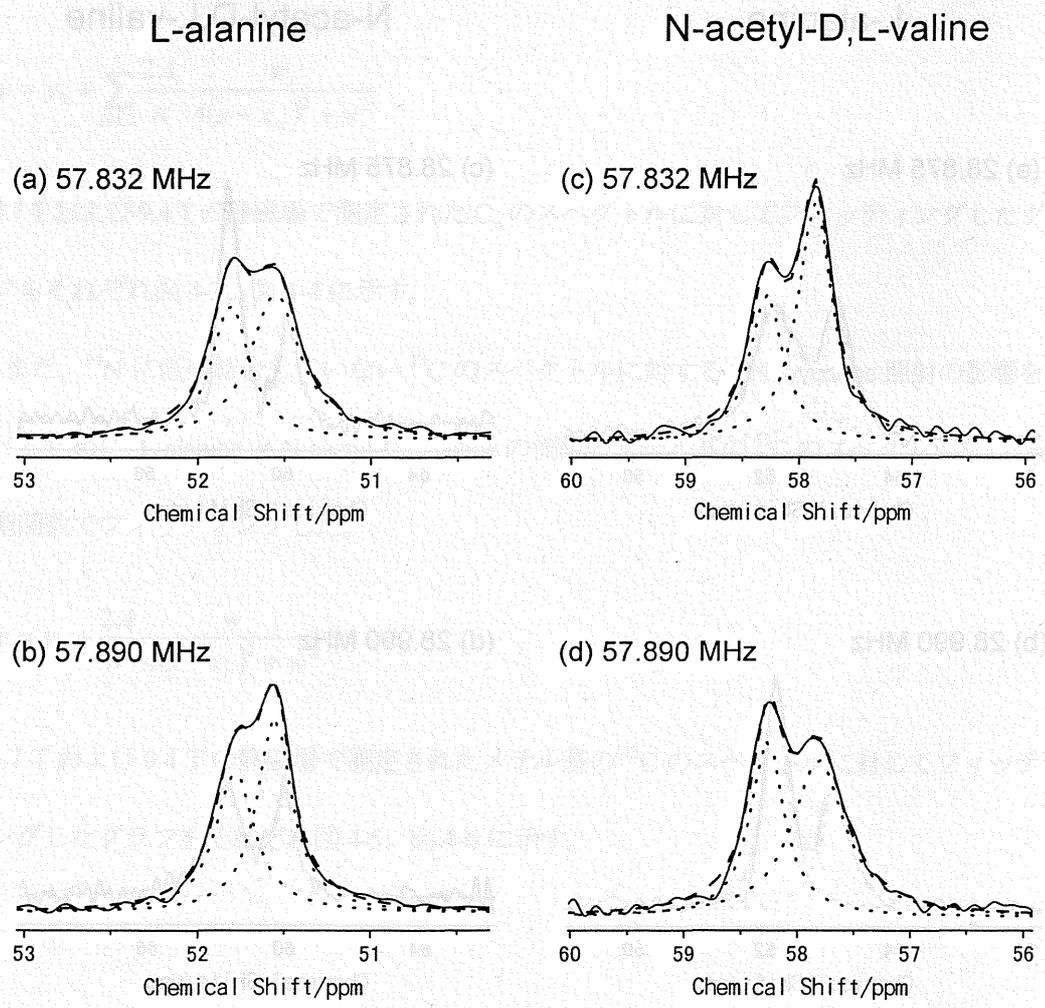


図 4-4: 9.4 T の静磁場で測定された L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の C_α のスペクトルのフィッティング。(a),(b)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射をおこなったときの L-alanine のスペクトル。(c),(d)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射をおこなったときの N-acetyl-D,L-valine のスペクトル。点線は個々の Lorentz 型関数を、破線はそれらの和を表す。

4.1.5. ^{14}N overtone 照射周波数と ^{13}C のピークの強度との関係

● 4.7 Tにおける測定

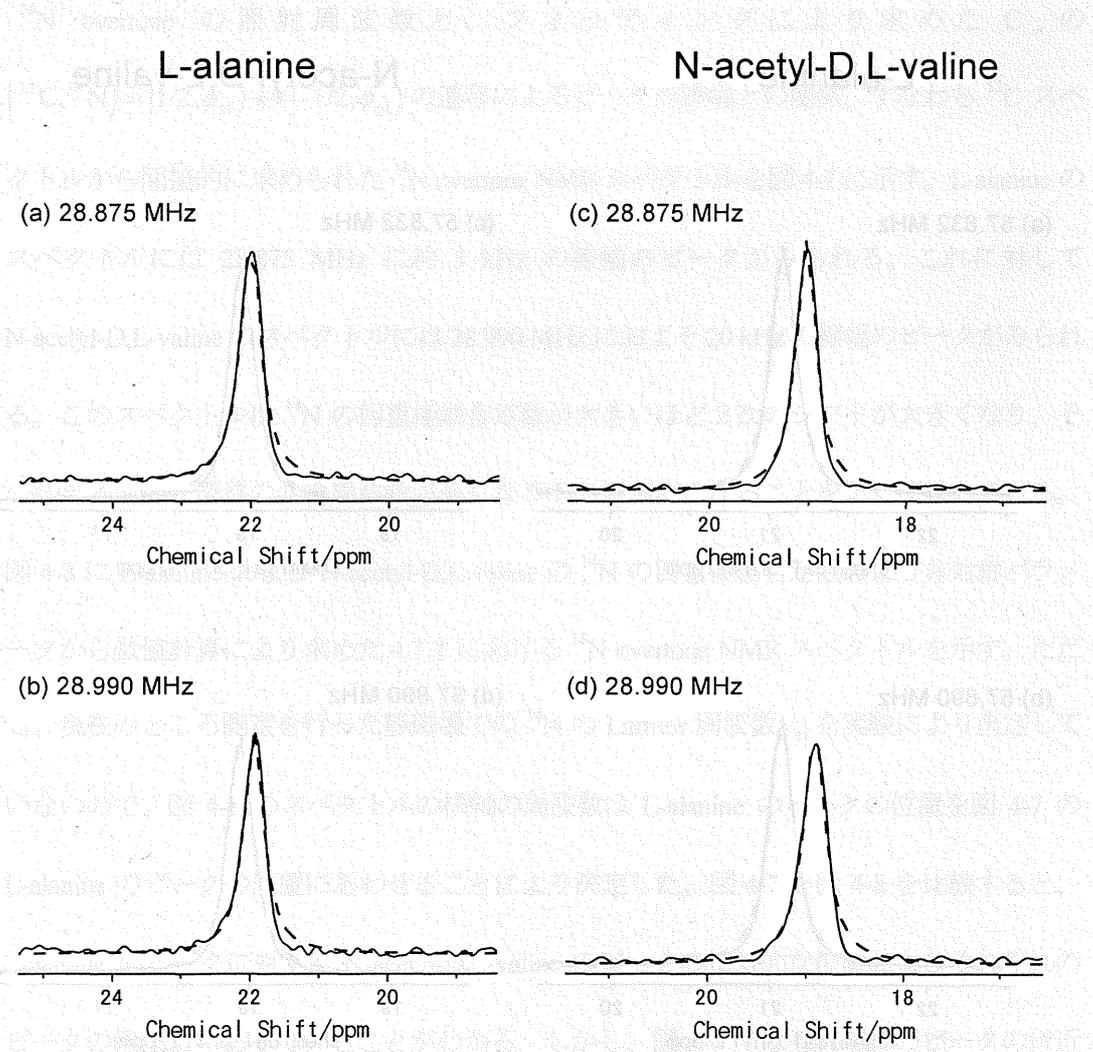


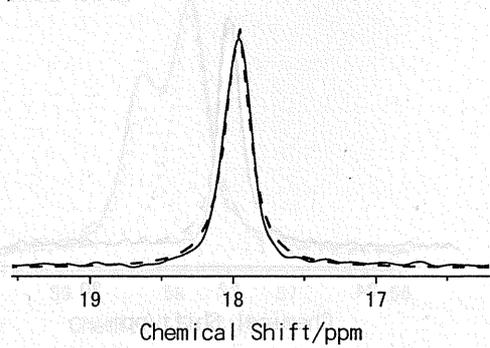
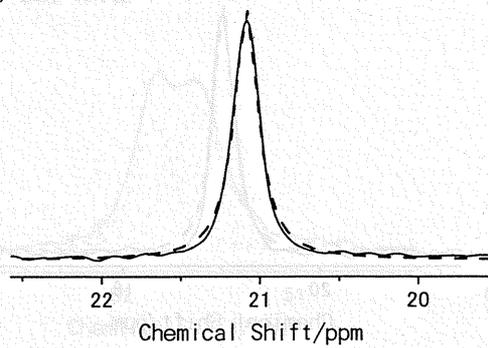
図 4-5: 4.7 T の静磁場で測定された L-alanine および N-acetyl-D,L-valine のメチル基の ^{13}C のスペクトルのフィッティング。(a),(b)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射をおこなったときの L-alanine のスペクトル。(c),(d)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射をおこなったときの N-acetyl-D,L-valine のスペクトル。破線はフィットした Lorentz 型関数。

L-alanine

N-acetyl-D,L-valine

(a) 57.832 MHz

(c) 57.832 MHz



(b) 57.890 MHz

(d) 57.890 MHz

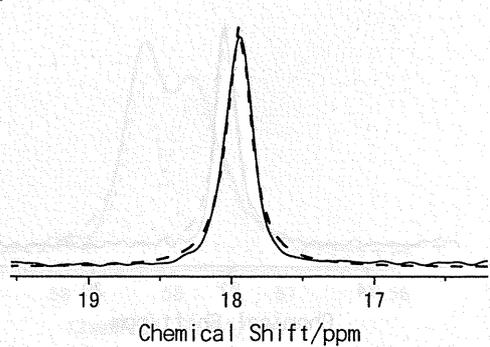
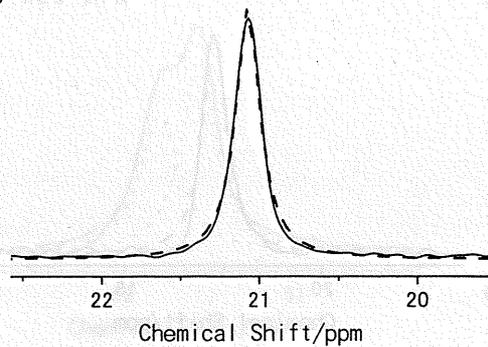


図 4-6: 9.4 T の静磁場で測定された L-alanine および N-acetyl-D,L-valine のメチル基の ^{13}C のスペクトルのフィッティング。(a),(b)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射をおこなったときの L-alanine のスペクトル。(c),(d)はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射をおこなったときの N-acetyl-D,L-valine のスペクトル。破線はフィットした Lorentz 型関数。

4.1.3. ^{14}N overtone 照射周波数と C_α のピークの線幅との関係

- 4.7 T における測定

^{14}N overtone の照射周波数と、フィッティングにより求めた C_α の $|^{13}\text{C}, ^{14}\text{N}\rangle = |1/2, \phi_{\pm 1}\rangle \leftrightarrow |-1/2, \phi_{\pm 1}\rangle$ の遷移によるピークの線幅との関係、すなわち ^{13}C スペクトルから間接的に求められた ^{14}N overtone NMR スペクトルを図 4-7 に示す。L-alanine のスペクトルには 28.875 MHz に約 5 kHz の線幅のピークがみられる。これに対して N-acetyl-D,L-valine のスペクトルには 28.990 MHz におよそ 20 kHz の線幅のピークがみられる。このスペクトルは ^{14}N の四重極結合定数が大きいほど 2 次のシフトが大きくなり、その結果 overtone 遷移の共鳴周波数が高くなりその幅が広くなることをよく反映している。

図 4-8 に L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータから数値計算により求めた 4.7 T における ^{14}N overtone NMR スペクトルを示す。ただし、現在のところ測定を行った静磁場での ^{14}N の Larmor 周波数 ν_N を実験により決定していないので、図 4-8 のスペクトルの横軸の周波数は L-alanine のピークの位置を図 4-7 の L-alanine のピークの位置にあわせることにより決定した。図 4-7 と図 4-8 を比較すると、L-alanine のピークに対する N-acetyl-D,L-valine のピークの相対的な位置およびそれぞれのピークの幅はよくあっていることがわかる。しかし、図 4-7 ではそれぞれのピークの付近に小さなピークが見られるのに対して図 4-8 のスペクトルでは見られないという相違点もみられた。この相違の原因については今後検討する。

- 9.4 T における測定

C_α の $|^{13}\text{C}, ^{14}\text{N}\rangle = |1/2, \phi_{\pm 1}\rangle \leftrightarrow |-1/2, \phi_{\pm 1}\rangle$ の遷移によるピークの線幅とから間接的に求めら

れた ^{14}N overtone NMR スペクトルを図 4-9 示す。4.7 T における測定の結果とは大きく異なり、L-alanine のスペクトルには 2 本の鋭いピークがみられる。N-acetyl-D,L-valine の C_α の線幅はおよそ 57.890 MHz を中心としておよそ 10 kHz の線幅のピークがみられる。9.4 T における測定でも 4.7 T における測定と同様に、 ^{14}N の四重極結合定数の大きい N-acetyl-D,L-valine の共鳴周波数は L-alanine に比べて高く、その幅も広がっている。図 4-10 に L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータから数値計算により求めた 9.4 T における ^{14}N overtone NMR スペクトルを示す。ただし、現在のところ測定を行った静磁場での ^{14}N の Larmor 周波数 ν_N を実験により決定していないので、図 4-10 のスペクトルの横軸の周波数は L-alanine のピークの位置を図 4-9 の L-alanine の 2 本のピークの中心の位置にあわせることにより決定した。図 4-9 と図 4-10 を比較すると、L-alanine のピークに対する N-acetyl-D,L-valine のピークの相対的な位置および N-acetyl-D,L-valine のピークの幅はよくあっていることがわかる。しかし、図 4-10 の L-alanine のピークは 1 本であるのに対して図 4-9 の L-alanine のピークは 2 本現れているという相違点がみられる。この原因については今後検討する必要があると考えている。

2 つの静磁場における測定によって得られた ^{14}N overtone の照射周波数と C_α の線幅との関係を比較する。図 4-7 および図 4-9 から L-alanine と N-acetyl-D,L-valine のピークの現れる周波数の差をそれぞれの磁場について求めると、4.7 T ではおよそ 115 kHz であるのに対して 9.4 T ではおよそ 60 kHz である。すなわち静磁場が強いほど差が小さくなっている。これは、静磁場が強くなるにつれて ^{14}N の四重極相互作用による 2 次のシフトの大きさが小

さくなっているためである。また、図 4-9 をみると C_{α} の線幅の増大の起きていない周波数での C_{α} の線幅のばらつきがいずれの試料についても図 4-7 に比べて大きくなっている。この原因は二つ考えられる。ひとつは静磁場が強いほど ^{14}N overtone 照射による線幅の増大が小さくなるためと考えられる。これは、 ^{14}N overtone の遷移モーメントの大きさが静磁場の強さに反比例するために静磁場が強いほど overtone の遷移モーメントが小さくなり、 ^{14}N overtone による双極子相互作用の復活の効率が下がることが原因である。もう一つは静磁場が強いほど C_{α} の二重線が分離できなくなり、個々のピークの線幅を精度よく決定するのが困難となったためと考えられる。

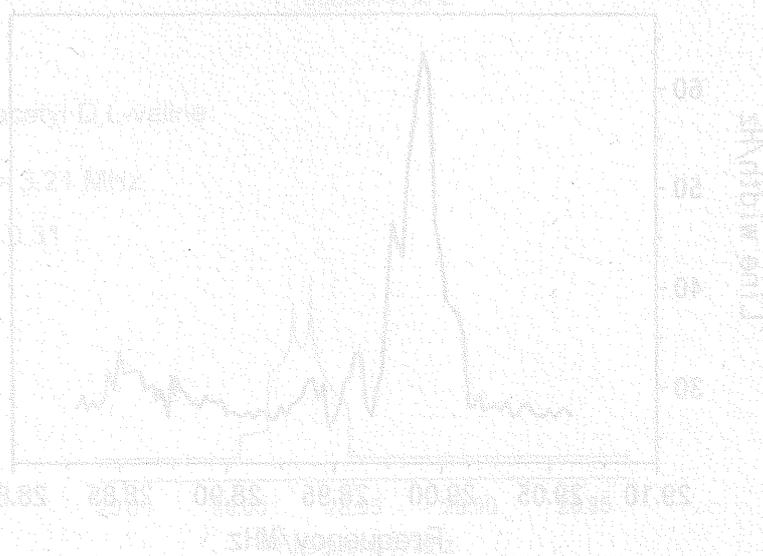
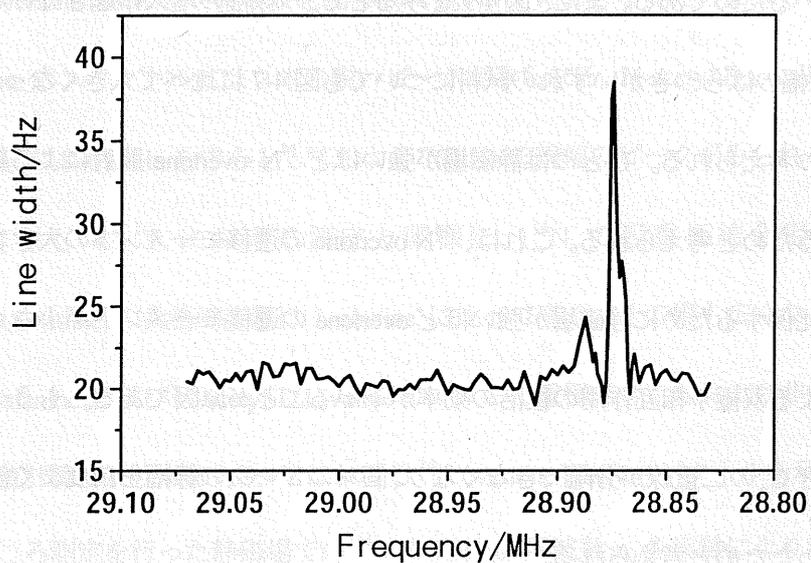


図 4-9 N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N overtone 照射による線幅の増大の様子

(a) L-alanine



(b) N-acetyl-D,L-valine

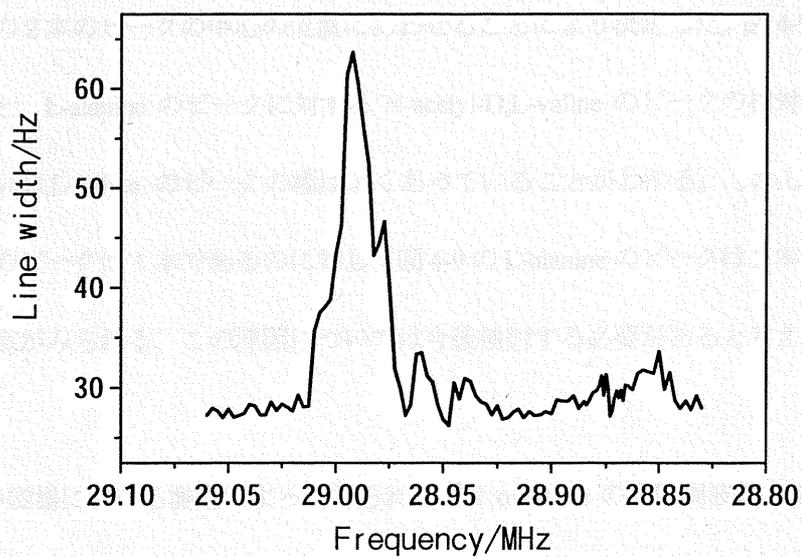
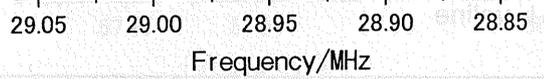


図 4-7: 4.7 T の静磁場における ^{14}N overtone 照射周波数と C_α の線幅との関係。

(a) L-alanine

$$\nu_Q = 1.148 \text{ MHz}$$

$$\eta = 0.276$$



(b) N-acetyl-D,L-valine

$$\nu_Q = 3.21 \text{ MHz}$$

$$\eta = 0.31$$

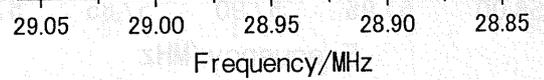
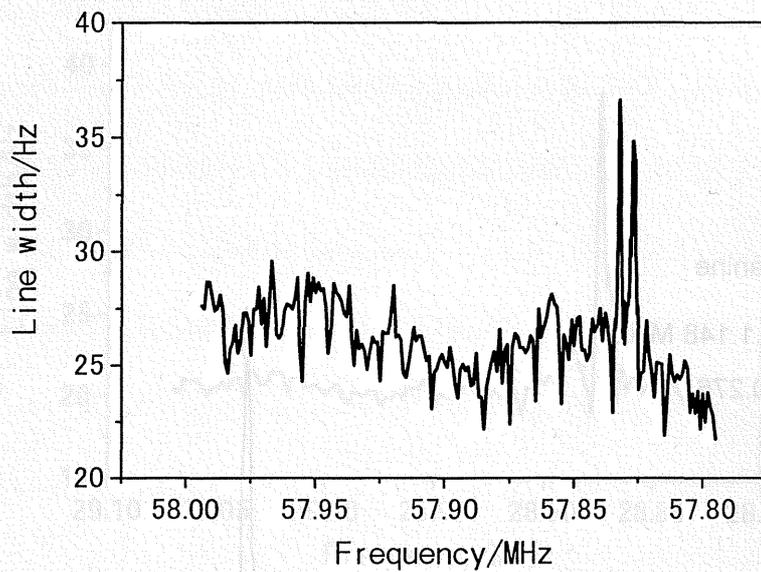


図 4-8: 数値計算によって求めた 4.7 T における ^{14}N overtone NMR スペクトル

(a) L-alanine



(b) N-acetyl-D,L-valine

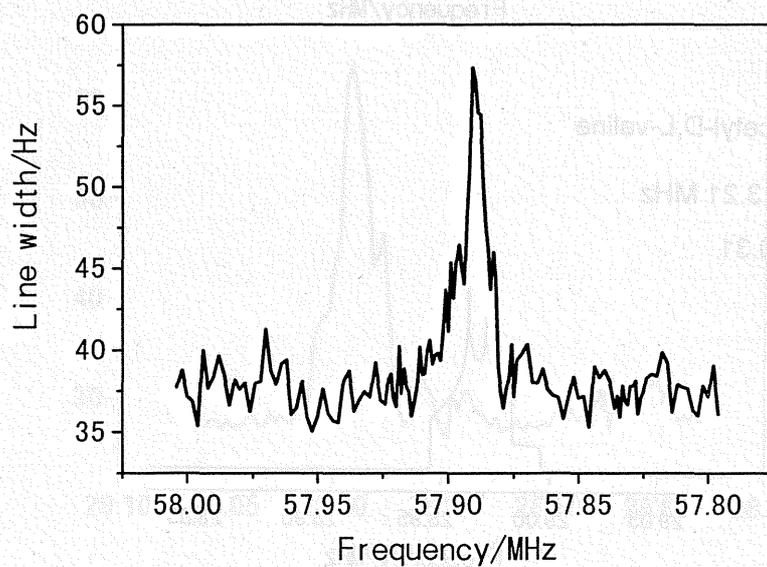
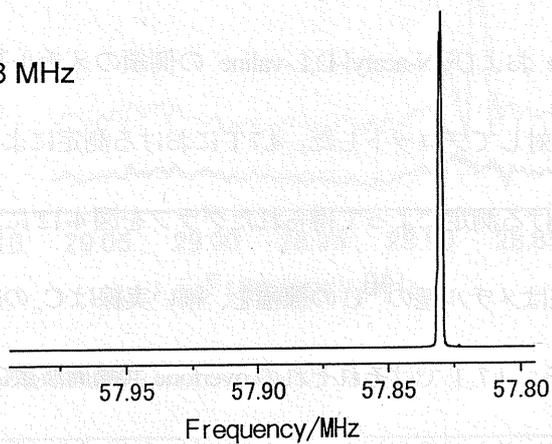


図 4-9: 9.4 T の静磁場における ^{14}N overtone 照射周波数と C_α の線幅との関係。

(a) L-alanine

$$\nu_Q = 1.148 \text{ MHz}$$

$$\eta = 0.276$$



(b) N-acetyl-D,L-valine

$$\nu_Q = 3.21 \text{ MHz}$$

$$\eta = 0.31$$

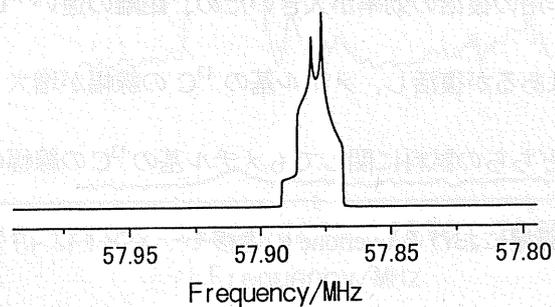
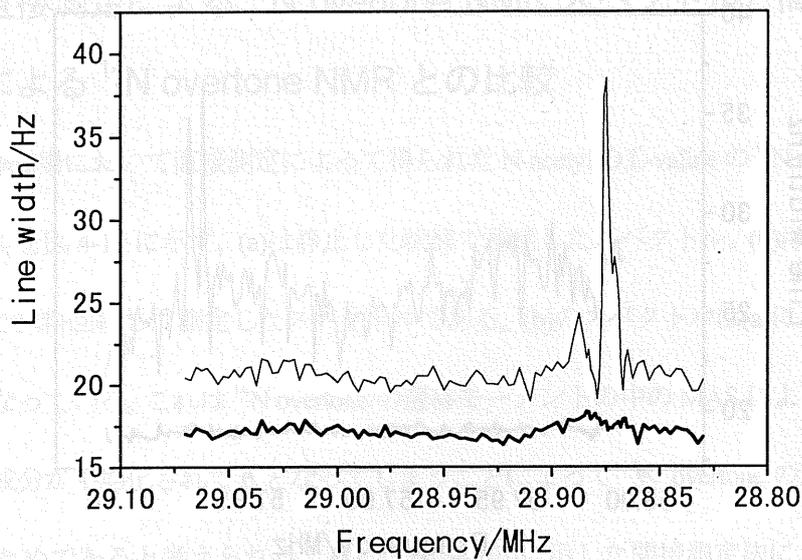


図 4-10: 数値計算によって求めた 9.4 T における ^{14}N overtone NMR スペクトル

4.1.4 ^{14}N overtone 照射による ^{14}N に直接結合していない ^{13}C の線幅の変化

二つの核の間の双極子相互作用の大きさは核間距離の3乗に反比例する。そこで距離の遠い ^{13}C と ^{14}N の間の双極子相互作用が ^{14}N overtone 照射によってどのくらい復活するかを調べるために、L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の側鎖のメチル基の ^{13}C の線幅を ^{14}N overtone 照射周波数に対してプロットした。4.7 T における測定によって得られたグラフを図 4-11 に、9.4 T における測定によって得られたグラフを図 4-12 に示す。それぞれのグラフにおいて、太い実線はメチル基の ^{13}C の線幅を、細い実線は C_α の線幅をプロットしたものである。図 4-11 から、4.7 T ではそれぞれの overtone 共鳴周波数において L-alanine のメチル基の ^{13}C には線幅の増大が見られなかったが、N-acetyl-D,L-valine では線幅の増大がわずかにみられることがわかる。N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N は四重極結合定数が L-alanine に比べて大きいので overtone の遷移モーメントの大きさが大きい。したがって ^{14}N overtone 照射による双極子相互作用の復活の効率が大きいため、距離の遠い ^{13}C と ^{14}N の間の双極子相互作用がわずかではあるが復活し、メチル基の ^{13}C の線幅が増大したと考えられる。これに対して 9.4 T ではどちらの試料に関してもメチル基の ^{13}C の線幅の増大が見られなかった。これは 9.4 T の静磁場における overtone の遷移モーメントは 4.7 T の静磁場における遷移モーメントに比べて小さくなるためと考えられる。

(a) L-alanine



(b) N-acetyl-D,L-valine

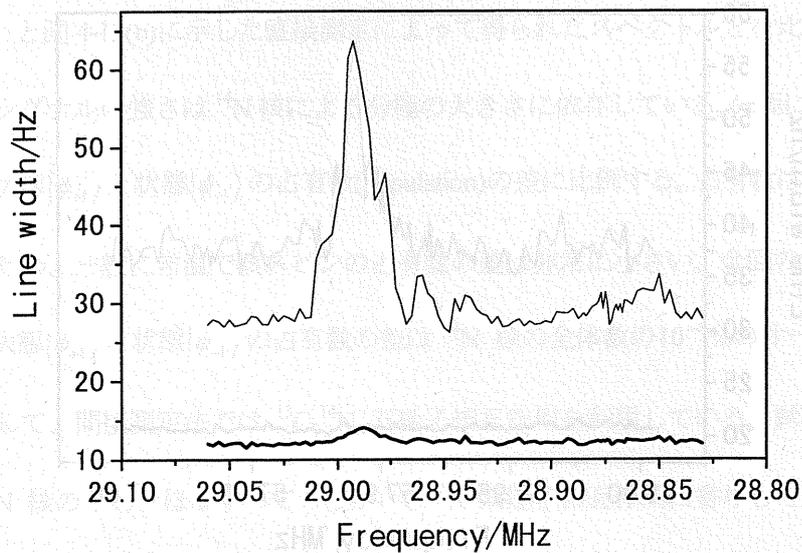
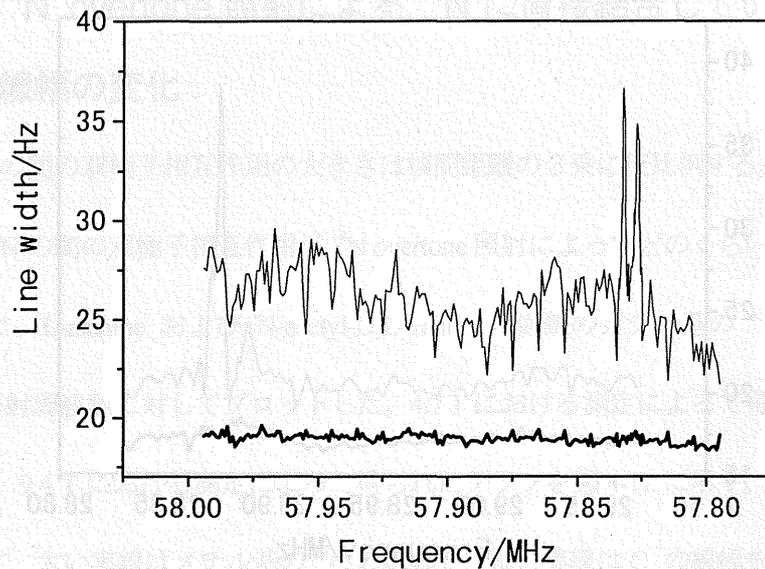


図 4-11: 4.7 T の静磁場における ^{14}N overtone 照射周波数とメチル基の ^{13}C の線幅との関係。

(a) L-alanine



(b) N-acetyl-D,L-valine

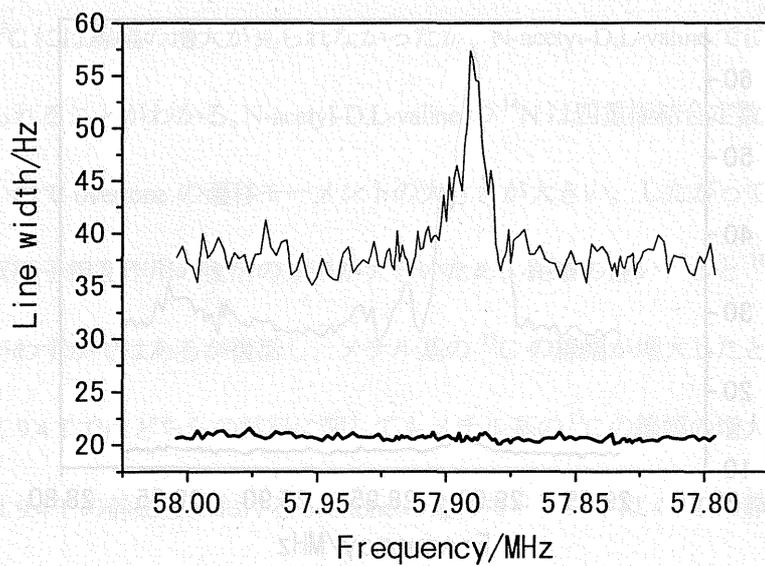


図 4-12: 9.4 T の静磁場における ^{14}N overtone 照射周波数とメチル基の ^{13}C の線幅との関係。

4.2. 直接測定による ^{14}N overtone NMR スペクトルと間接測定法による ^{14}N overtone NMR との比較

4.7 Tの静磁場において直接測定によって得られた N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N overtone NMR スペクトルを図 4-13 に示す。(a)は静止した状態で測定したスペクトル、(b)は MAS 周波数 5.35 kHz で試料回転して測定したスペクトルである。(b)のスペクトルは(a)に比べて S/N 比が小さくなっている。これは ^{14}N overtone の遷移モーメントの中の MAS によって時間依存している成分が平均化されて 0 となってしまうことによって ^{14}N overtone の遷移確率が小さくなるためであると考えられる。次に、図 4-7(b)に示した間接測定法によって求めた N-acetyl-D,L-valine の ^{14}N overtone NMR スペクトル (C_α の線幅と ^{14}N overtone の照射周波数との関係) と図 4-13(b)に示した直接測定によって得られたスペクトルとを比較する。直接測定ではシグナルの強さは ^{14}N 核による分極の大きさに依存している。分極に寄与する ^{14}N 核の数は状態 $|\phi_{+1}\rangle$ と状態 $|\phi_{-1}\rangle$ の占有数(population)の差に比例する。占有数は Boltzmann 分布に従うため、一般に常温で核スピンの占有数の差は非常に小さい。今回の測定条件での ^{14}N 核の状態 $|\phi_{+1}\rangle$ と状態 $|\phi_{-1}\rangle$ の占有数の差は ^{14}N 核の全体数の $10^{-4}\%$ のオーダーとなる。これに対して、間接測定法では ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用を利用している。試料中に存在している ^{14}N 核のうち、ほぼすべての核が ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用に寄与している。したがって間接測定法によるスペクトルは直接測定で得られるスペクトルに比べて S/N 比が高いことが予想されていた。しかし、予想に反して直接測定によるスペクトルと間接測定法によるスペクトルの間で、S/N 比に大きな違いは見られていない。これは、直接測定においてサンプルコイルのリングングによりパルスの影響がシグナルに現れたために正確なスペ

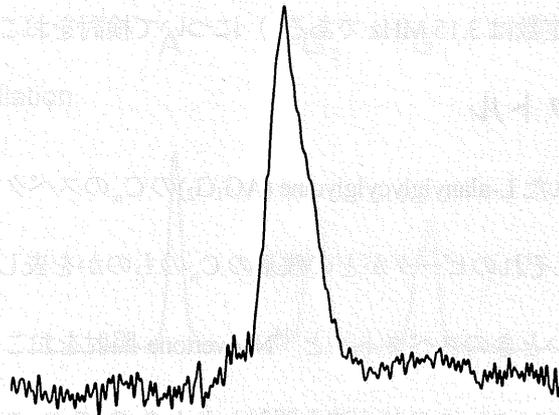
クトルが得られなかったことによるものと考えている。今後、測定条件を適切にあわせて ¹⁴N overtone NMR の直接観測をおこない、直接測定によるスペクトルと間接測定法によるスペクトルの違いを検討していくことを考えている。

4.3. ^{14}N overtone NMR 間接測定法のベクタレの応用

この実験では *N*-acetyl-L-valine (AG) の ^{14}N の β 結合位置の ^{14}N の化学シフトを測定した。この測定は ^{14}N の overtone NMR を用いて行われた。

図 4-13 は ^{14}N overtone NMR スペクトルを示している。図 (a) は試料を静止して測定したもので、図 (b) は MAS 周波数を 5.35 kHz としたものである。

(a) MAS 0 kHz



(b) MAS 5.35 kHz

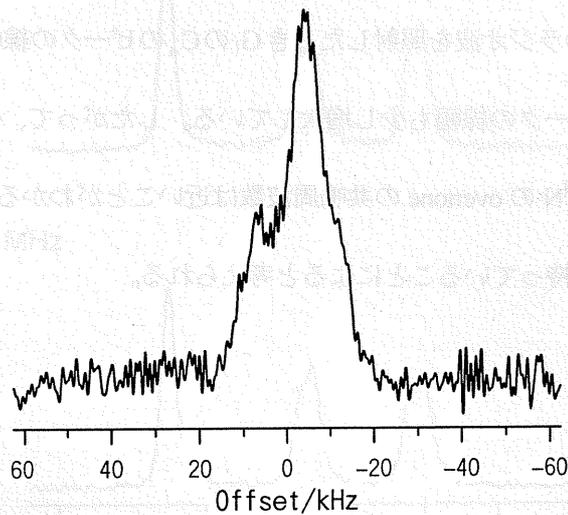


図 4-13: 4.7 T において直接測定によって得られた *N*-acetyl-D,L-valine の ^{14}N overtone NMR スペクトル。(a)は試料を静止して測定したもの。(b)は MAS 周波数を 5.35 kHz とした測定したものの。

4.3. ^{14}N overtone NMR 間接測定法のペプチドへの応用

この実験では L-alanylglycylglycine (AG_1G_2) の 3 つの ^{14}N のうち、構造が似ていることにより四重極結合定数の値の近い 2 つのアミド窒素 (G_1 の ^{14}N の四重極結合定数は 3.29 MHz、 G_2 の ^{14}N の四重極結合定数は 3.15 MHz である。) について検討をおこなうことにする。

4.3.1. 実験スペクトル

図 4-14 に実験で得られた L-alanylglycylglycine (AG_1G_2) の C_α のスペクトルを示す。図の上の方の A、 G_1 、 G_2 はそれぞれのピークがどの残基の C_α のものかを表している。 ^{14}N overtone 照射をおこなっていないときのスペクトルと ^{14}N overtone 照射をおこなったときのスペクトルを比較すると、57.890 MHz のラジオ波を照射したとき G_2 の C_α のピークの線幅が増大している。また、このとき G_1 の C_α のピークの線幅も少しではあるが増大している。これに対して 57.900 MHz のラジオ波を照射したとき G_1 の C_α のピークの線幅が増大している。このとき G_2 の C_α のピークの線幅も少し増大している。したがって、 G_1 の ^{14}N の overtone の共鳴周波数と G_2 の ^{14}N の overtone の共鳴周波数は近いことがわかる。これは両者の四重極結合定数が似た値を持っていることによると考えられる。

4.3.2 間接測定法による L-alanyl-glycine の ^{14}N NMR スペクトル

L-alanine 系 N-acyl-LDL values の測定と同様に、L-alanyl-glycine の ^{14}N NMR スペクトルは、 ^{14}N overtone 照射を行って測定された。図 4-14 に示すように、 ^{14}N overtone 照射を行わないとき (a) と、 ^{14}N overtone 照射を行ったとき (b) と (c) のスペクトルが得られた。

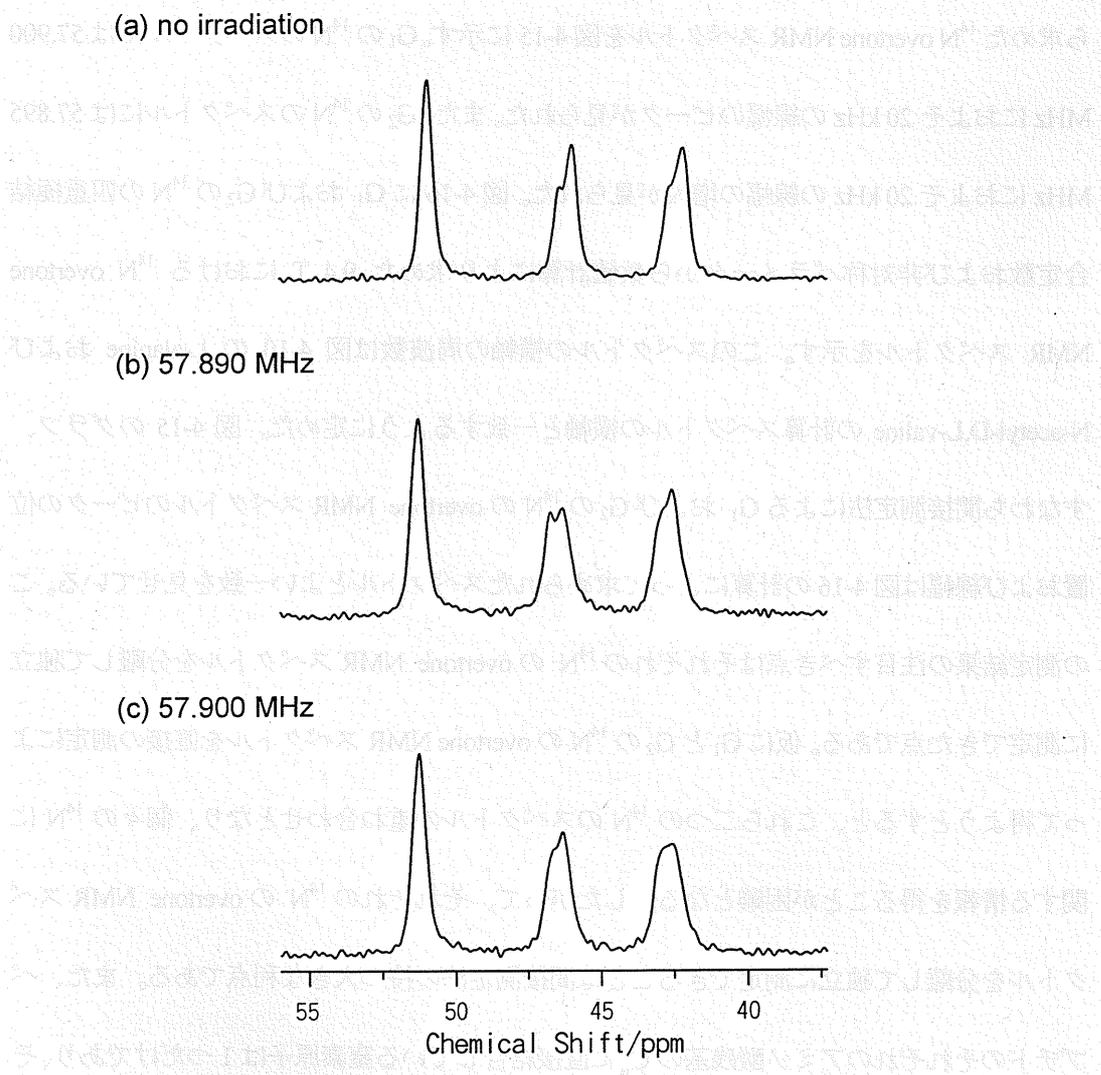


図 4-14: 9.4 T の静磁場中で測定された L-alanyl-glycylglycine (AG_1G_2) の C_α のスペクトル。(a) は ^{14}N overtone 照射しないときの、(b) と (c) はそれぞれの周波数で ^{14}N overtone 照射を行ったときのスペクトル。

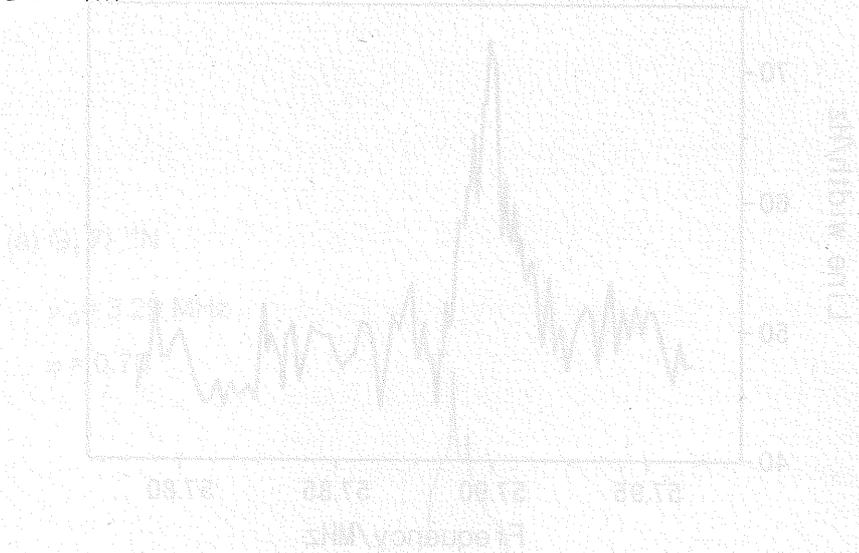
4.3.2. 間接測定法による L-alanylglycylglycine の ^{14}N overtone

NMR スペクトル

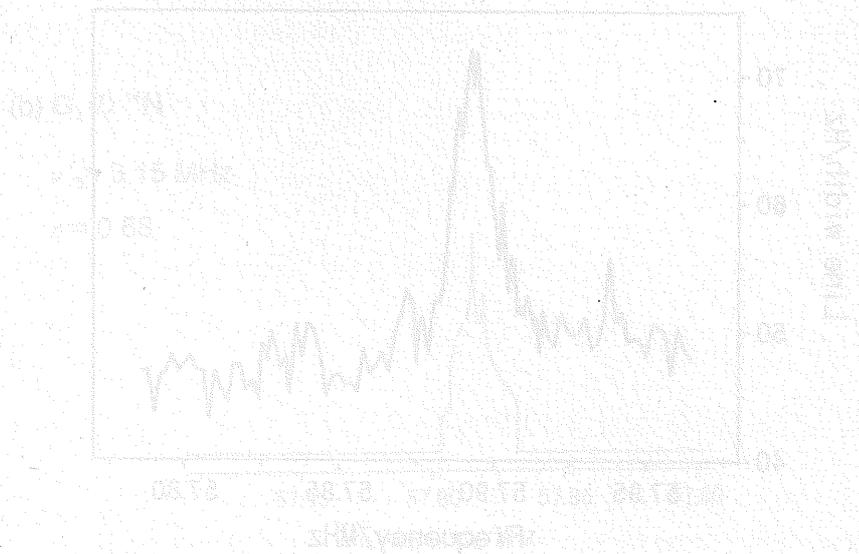
L-alanine や N-acetyl-D,L-valine の測定と同様に、L-alanylglycylglycine のそれぞれの C_α のピークを2つの Lorentz 型関数の和でフィットして線幅を求めた。それぞれの C_α の線幅から求めた ^{14}N overtone NMR スペクトルを図 4-15 に示す。 G_1 の ^{14}N のスペクトルには 57.900 MHz におよそ 20 kHz の線幅のピークが見られた。また、 G_2 の ^{14}N のスペクトルには 57.895 MHz におよそ 20 kHz の線幅の増大が見られた。図 4-16 に G_1 および G_2 の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータから数値計算により求めた 9.4 T における ^{14}N overtone NMR スペクトルを示す。このスペクトルの横軸の周波数は図 4-10 の L-alanine および N-acetyl-D,L-valine の計算スペクトルの横軸と一致するように定めた。図 4-15 のグラフ、すなわち間接測定法による G_1 および G_2 の ^{14}N の overtone NMR スペクトルのピーク的位置および線幅は図 4-16 の計算によって求められたスペクトルとよい一致を見せている。この測定結果の注目すべき点はそれぞれの ^{14}N の overtone NMR スペクトルを分離して独立に測定できた点である。仮に G_1 と G_2 の ^{14}N の overtone NMR スペクトルを直接の測定によって得ようとする、これら二つの ^{14}N のスペクトルの重ね合わせとなり、個々の ^{14}N に関する情報を得ることが困難となる。したがって、それぞれの ^{14}N の overtone NMR スペクトルを分離して独立に測定できることは間接測定法の持つ大きな利点である。また、ペプチドのそれぞれのアミノ酸残基の C_α に直接結合している窒素原子は1つだけであり、その窒素原子は主鎖を構成しているので複数の ^{14}N を持つ分子に対してそれらの overtone NMR スペクトルを分離して測定することのできるこの間接測定法はペプチドの主鎖構造

を調べる上で有効な手段になると考えられる。

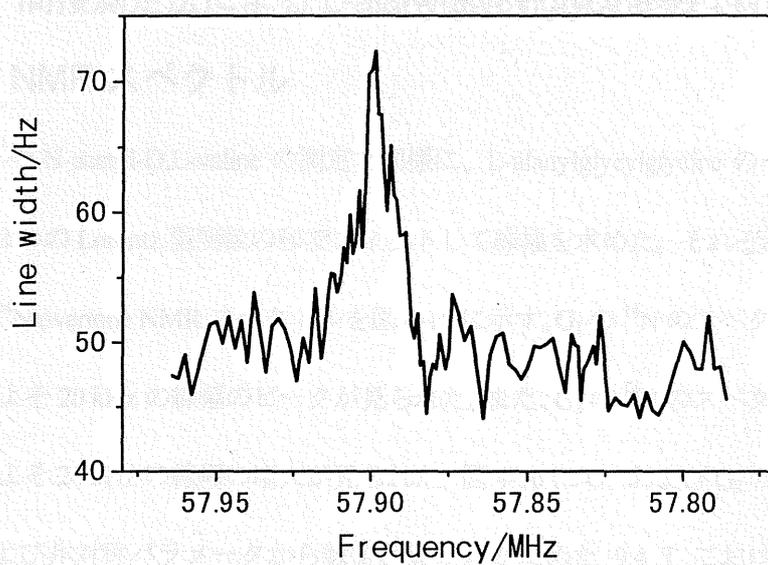
(a) 0.0°Cの共振



(b) 0.0°Cの共振



(a) G_1 の C_α の線幅



(b) G_2 の C_α の線幅

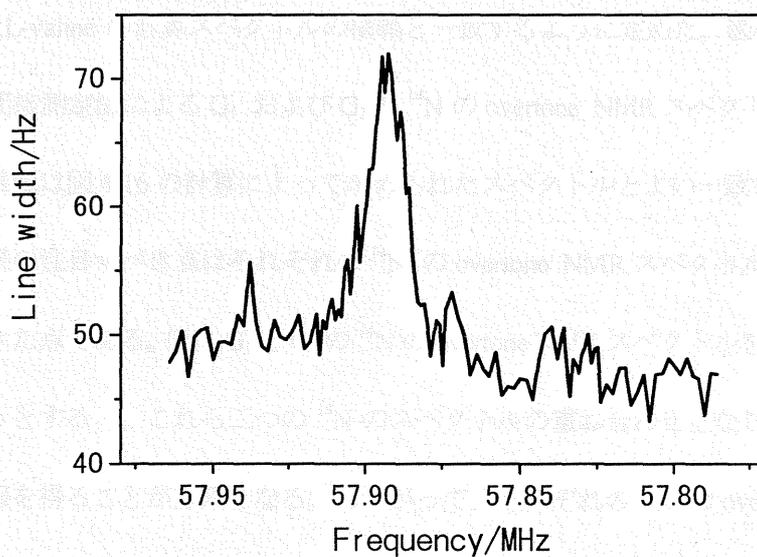
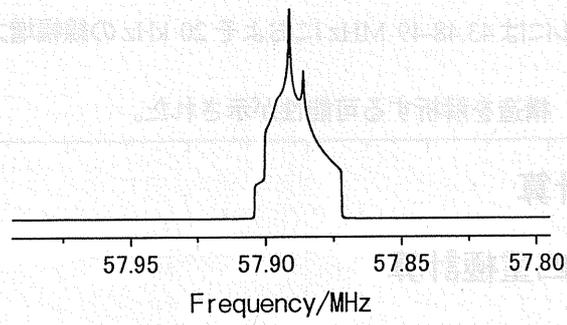


図 4-15: ^{14}N overtone 照射周波数と L-alanylglycylglycine の C_α の線幅との関係。(a) は G_1 の C_α の線幅を、(b) は G_2 の C_α の線幅をプロットしたもの。

4.1.1. 間接測定法による¹⁴N overtoneの精度の向上
 間接測定法による¹⁴N overtoneの精度の向上は、ヘリックス構造を有するポリアラニン(Ala)_n(Ala)の¹⁴N NMRスペクトルを解析することによって行われる。この場合、ヘリックス構造を有するポリアラニンの¹⁴N NMRスペクトルは、ヘリックス構造を有するポリアラニンの¹⁴N NMRスペクトルを解析することによって行われる。

(a) G₁の¹⁴N

$\nu_0 = 3.29 \text{ MHz}$
 $\eta = 0.70$



(b) G₂の¹⁴N

$\nu_0 = 3.15 \text{ MHz}$
 $\eta = 0.68$

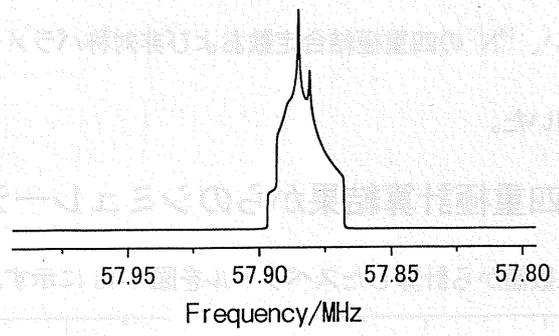


図 4-16: 数値計算によって求めた L-alanylglycylglycine (AG₁G₂)の¹⁴N overtone NMR スペクトル。(a)および(b)はそれぞれG₁とG₂の¹⁴N スペクトル。

図 4-17. 間接測定法によるヘリックス構造を有するポリアラニン(Ala)_n(Ala)の¹⁴N NMRスペクトルを解析することによって行われる。この場合、ヘリックス構造を有するポリアラニンの¹⁴N NMRスペクトルは、ヘリックス構造を有するポリアラニンの¹⁴N NMRスペクトルを解析することによって行われる。

4.1.1. 間接測定法による二次構造の ^{14}N overtone NMR スペクトル

間接測定法を α ヘリックス構造を取るポリアラニン(Ala*,Ala)=50:50 と β シート構造を取る(Ala)₃-Ala*-(Ala)₃適用して得た ^{14}N のスペクトルを図 4-17 に示す。 α -helix 中の ^{14}N のスペクトルには 43.49-50 MHz におよそ 20 kHz の線幅増大が見られた。また、 β -sheet 中の ^{14}N のスペクトルには 43.48-49 MHz におよそ 20 kHz の線幅増大が見られた。このピーク位置の違いから、構造を解析する可能性が示された。

4.2. ab initio 計算

4.2.1. ab initio 四重極計算

図 4-17 のスペクトルをシミュレーションと比較するには対象となる ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータを知る必要があるが、対象サンプルでのそれらの値は知られていない。そこで、一般的な α -helix および β -sheet の構造を用いて ab initio 計算(Gaussian98[9]を用いる)をおこない、 ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータを求めた。基底には B3LYP/6-31G*を用いた。

4.2.2. ab initio 四重極計算結果からのシミュレーション

前述の方法で求めた数値から計算したスペクトルを図 4-18 に示す。これによると、両スペクトルにはおよそ 20kHz 程度、ピーク位置に差がみられた。しかしながらその位置関係は実際に得られたものとまったく逆であった。これはシミュレーションに用いた座標がモデル系のものであるためと考えられる。

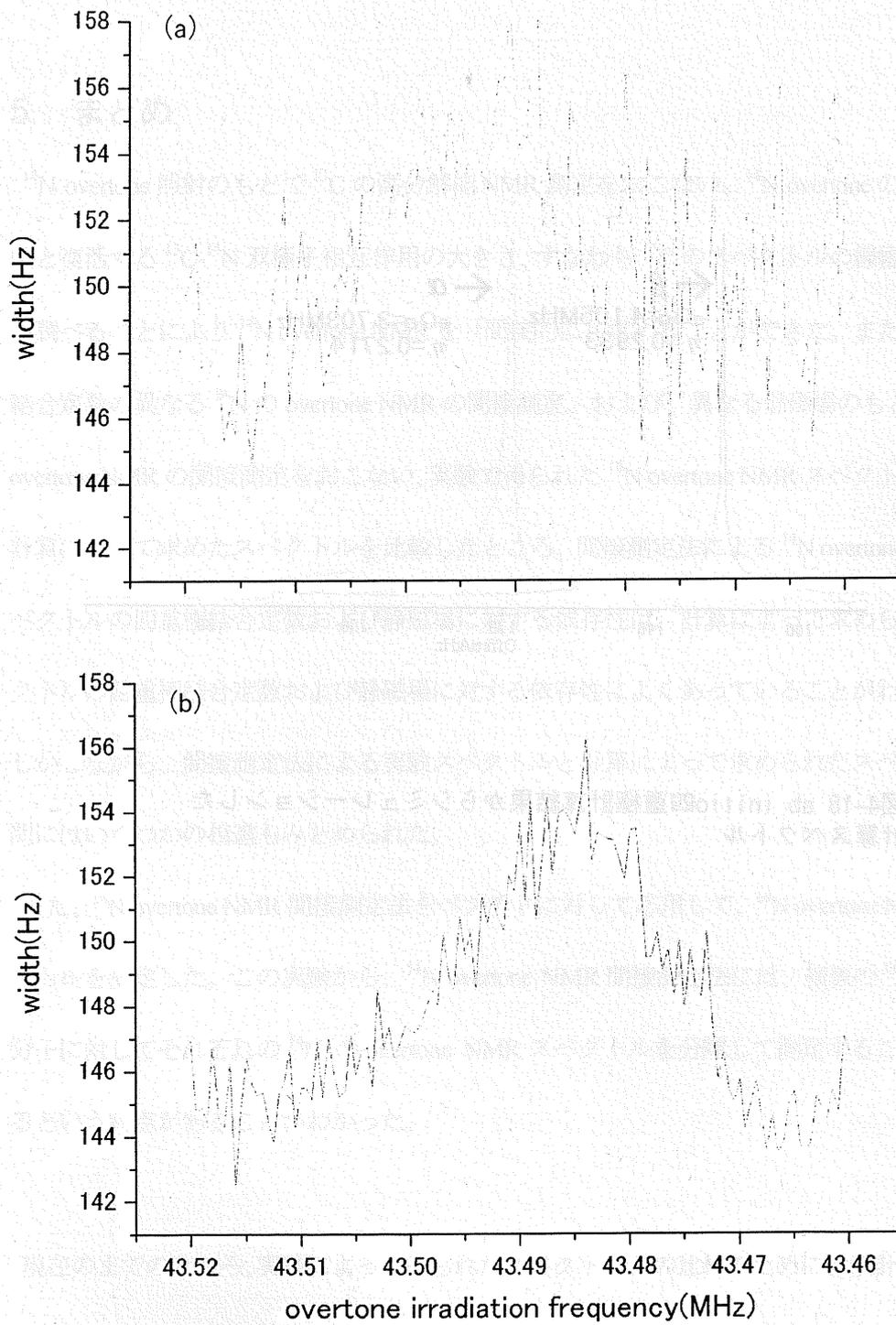


図4-17 間接測定法を α ヘリックス構造を取るポリアラニン
 $(\text{Ala}^*, \text{Ala})=50:50$ (a) と β シート構造を取る $(\text{Ala})_3\text{-Ala}^*\text{-(Ala)}_3$ (b) に
 適用して得た ^{14}N のスペクトル

4.1.1. 間接測定法による二次構造の ^{13}C overtone NMR スペクトル

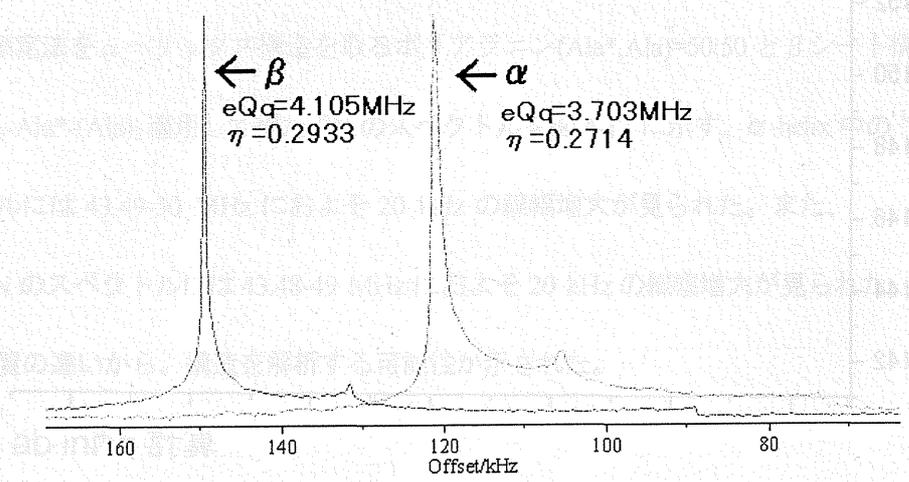


図4-18 ab initio四重極計算結果からシミュレーションした計算スペクトル

図4-17のスペクトルをシミュレーションと比較するには対象となる ^{13}C の位置座標を決定する必要があるが、対象サンプルでのそれらの値は知られていない。そこで一般的に eQq および η の値を用いて ab initio 計算 (Gaussian 94) を用いる。またこの際、計算の精度を向上させるために、通常は ^{13}C の位置座標は ^{13}C の位置座標から計算したスペクトルを図4-18に示す。これによる、両スペクトルの比較より、 ^{13}C の位置座標を決定することが可能である。

4.2.2. ab initio 四重極計算結果からのシミュレーション

前述の方法で求めた数値から計算したスペクトルを図4-18に示す。これによる、両スペクトルの比較より、 ^{13}C の位置座標を決定することが可能である。図4-18のスペクトルをシミュレーションと比較するには対象となる ^{13}C の位置座標を決定する必要があるが、対象サンプルでのそれらの値は知られていない。そこで一般的に eQq および η の値を用いて ab initio 計算 (Gaussian 94) を用いる。またこの際、計算の精度を向上させるために、通常は ^{13}C の位置座標は ^{13}C の位置座標から計算したスペクトルを図4-18に示す。これによる、両スペクトルの比較より、 ^{13}C の位置座標を決定することが可能である。

5. まとめ

^{14}N overtone 照射のもとで ^{13}C の高分解能 NMR 測定をおこない、 ^{14}N overtone の照射周波数と復活する ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用の大きさ、すなわち ^{13}C のスペクトルの線幅との関係を調べることにより ^{14}N overtone NMR を「間接的に」求めることができた。また、四重極結合定数の異なる ^{14}N の overtone NMR の間接測定、および、異なる静磁場のもとでの ^{14}N overtone NMR の間接測定をおこない、実験で得られた ^{14}N overtone NMR スペクトルと数値計算によって求めたスペクトルを比較したところ、間接測定法による ^{14}N overtone NMR スペクトルの四重極結合定数および静磁場に対する依存性は、計算によって求められたスペクトルの四重極結合定数および静磁場に対する依存性によくあっていることがわかった。しかしながら、間接測定法による実験スペクトルと計算によって求められたスペクトルの間にはいくつかの相違もみとめられた。

また、 ^{14}N overtone NMR 間接測定法をペプチドに対して応用して、 ^{14}N overtone NMR スペクトルを測定した。この実験から、 ^{14}N overtone NMR 間接測定法には、複数の ^{14}N を持つ分子に対してそれぞれの ^{14}N の overtone NMR スペクトルを分離して測定することができるという利点があることがわかった。

現在のまでのところ、実験によって得られたスペクトルとの比較のために数値計算によって求めたスペクトルは ^{14}N overtone NMR を直接観測したときに得られるスペクトルを理論的に計算したものであった。したがって、この計算で考慮していない相互作用、たとえば ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用の影響により実験スペクトルと計算スペクトルとの相違が生じた

と考えられる。今後は MAS 下において ^{14}N overtone 照射をおこなったときに復活する ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用の大きさを計算して、間接測定法による ^{14}N overtone NMR スペクトルを理論的に求めることが課題である。そして計算スペクトルを実験スペクトルにフィットすることにより未知の ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータを決定することを目指す。さらには、この間接測定法によりペプチドの主鎖を構成している ^{14}N の四重極結合定数および非対称パラメータを決定し、*ab initio* 法による計算から求めた値と比較することによりペプチドの二次構造を推定しようと考えている。

また本研究において、MAS 下における ^{14}N overtone 照射により、 ^{14}N と直接結合している ^{13}C だけでなく、直接結合していない ^{14}N からの距離の遠い ^{13}C との間の双極子相互作用が復活し、 ^{13}C のピークの線幅が増大していることが観測された。双極子相互作用の大きさは核間距離に依存するので ^{14}N overtone 照射によって復活する双極子相互作用の大きさを調べることにより核間距離に関する情報が得られると考えられる。今後、その方法を具体的に検討し、分子の構造に関する情報、特にペプチド分子の構造に関する情報の取得に役立てようと考えている。

参考文献

- [1] R. Tycko and S. J. Opella, *J. Chem. Phys.* **86**, 1761 (1987).
- [2] P. L. Stewart, R. Tycko, and S. J. Opella, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **84**(11), 3803 (1988).
- [3] M. Mehring, *High resolution NMR in solids*, 2nd Ed. (Springer, Berlin, 1983).
- [4] Pascal P. Man, "Quadrupolar Interactions," in *Encyclopedia of NMR*, Vol.6, (Wiley, New York, 1996)
- [5] バーガー、オルソン著、小林、土佐訳、電磁気学 I [新しい視点にたつて] (培風館)
- [6] K. Takegoshi and Kunio Hikichi, *Chem. Phys. Lett.* **194**, 359 (1992).
- [7] J. J. Sakurai, 桜井明夫訳、現代の量子力学(下) (吉岡書店)
- [8] K. Takegoshi and Kunio Hikichi, *Chem. Phys. Lett.* **206**, 450 (1992).
- [9] Gaussian 98, Revision A.11.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, P. Salvador, J. J. Dannenberg, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L.

Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2001.