

[展望]

¹³C-NMR の代謝研究への応用

福島 和 貴*

(昭和60年9月19日受付)

Key words: ¹³C nuclear magnetic resonance, topical magnetic resonance, metabolism, ¹³C labeling, glycolysis.

略語一覧: Glc: glucose, Glu: glutamic acid, Gln: glutamine, TCA: tricarboxylic acid, ATP: adenosine triphosphate, AcONa: sodium acetate, NMR: nuclear magnetic resonance, S/N: signal/noise, CoA: Coenzyme A

近年、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) は、超伝導磁石の開発やパルス・フーリエ変換法による種々の新しい測定法の導入により、これまで最も広く利用されてきた天然物などの有機化合物の構造研究に加え、不均一な生体試料を無侵襲的に測定することができる手法として注目されている。核種も従来の ¹H, ¹³C に加え、³¹P, ¹⁵N, ²³Na など利用され、研究対象も細胞、組織、さらには生物そのものへと広がり、NMR は生体系でも有機化合物同様、他の分析法では得られない優れた結果を与えている。超伝導磁石の開発による感度の向上、測定時間の短縮化、また surface coil 法による生体内特定部位 (臓器) の局所磁気共鳴 (Topical Magnetic Resonance, TMR) 法が確立されるなど、NMR は代謝研究でも極めて魅力ある手段である。本小文では生体系 (摘出臓器、灌流臓器、動物そのまま) での ¹³C-NMR による代謝研究について紹介する。

1. 肝臓での応用

肝はスライス、摘出、灌流さらには生きた動物のまま (*in vivo*) といった種々のレベルで用いられている。最初に摘出肝の高分解能 ¹³C-NMR スペクトル (90.5 MHz で測定) から示す。図1はラットから摘出された肝 (A) と副睾丸脂肪褥 (B) の ¹³C-NMR である¹⁾。表1には各シグナルの帰属および化学シフトがまとめられている。両スペクトルには脂肪のアシル鎖に由来する顕著なシグナルが共通に見られる。肝ではそのほか、リン脂質、蛋白質、糖由来のシグナルが認められる。これらスペクトルは摘出臓器の ¹³C-NMR が定性、定量手段として活用できることを示している。図2、3は特殊配

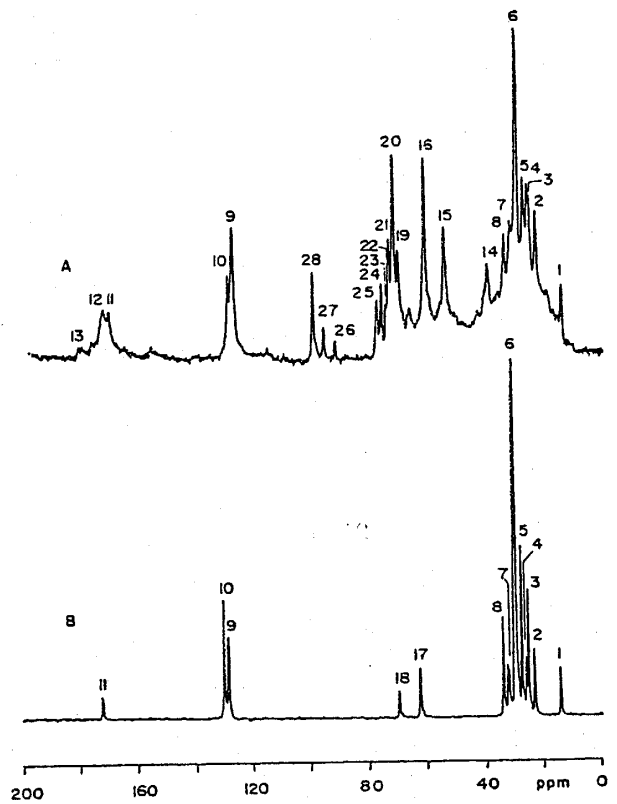


図1. ラット肝 (A) およびラット脂肪組織 (B) の ¹³C-NMR.¹⁾ 各シグナルは表1に帰属されている

合飼料で長期飼育した場合の肝および脂肪組織 (副睾丸脂肪褥) への影響を ¹³C-TMR で調べられたものである。ラットはコントロール (A群)、高炭水化物・無脂肪食 (B群) および高脂肪食 (C群) の3群に分け、16週間飼育された。図2のA, B, Cのスペクトルはそれぞれ

* 千葉大学生物活性研究所抗生物質研究部

Kazutaka FUKUSHIMA: ¹³C-NMR Applications to Metabolic Studies. Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University, Chiba 280. Received for publication, September 19, 1985.

表 1. 図 1 に示したラット肝および脂肪組織の ^{13}C -NMR シグナルの帰属および化学シフト¹⁾
1~5, 7~11 の化学シフトは * 印の炭素の値を示す

Resonance	Assignment	Chemical shift (ppm)
1	**CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -, fatty acyl chain	14.20
2	CH ₃ -*CH ₂ -CH ₂ -, fatty acyl chain	23.05
3	-*CH ₂ -CH ₂ -CO-, fatty acyl chain	25.20
4	-CH=CH-*CH ₂ -CH=CH-, fatty acyl chain	25.05
5	-CH=CH-*CH ₂ -CH ₂ -, fatty acyl chain	27.60
6	-(CH ₂) _n -, fatty acyl chain	30.05
7	CH ₃ -CH ₂ -*CH ₂ -, fatty acyl chain	32.30
8	-CH ₂ -*CH ₂ -CO-, fatty acyl chain	34.15
9	-CH=*CH-CH ₂ -*CH=CH-, fatty acyl chain	128.40
10	-*CH=CH-CH ₂ CH=*CH-, fatty acyl chain	130.00
11	-CH ₂ -CH ₂ -*CO-, fatty acyl chain	172.10
12	-CO-OR, protein, phospholipid	173.80
13	-COO-, Glu, free fatty acid	182.20
14	-CH ₂ -NH ₂ , ethanolamine (protein)	40.00
15	(CH ₃) ₃ N-, choline	54.60
16	C-6, α,β -glucose, glycogen	61.40
17	C-1, C-3 glycerol (ester)	62.20
18	C-2, glycerol (ester)	69.50
19	C-4, α,β -glucose	70.40
20	C-2, C-5, α -glucose; C-5, glycogen	72.10
21	C-3, α -glucose	73.50
22	C-3, glycogen	73.95
23	C-2, β -glucose	79.90
24	C-3, C-5, β -glucose	76.50
25	C-4, glycogen	78.05
26	C-1, α -glucose	92.70
27	C-1, β -glucose	96.60
28	C-1, glycogen	100.50

れ, A, B, C各群の ^{13}C -TMR であり, Dは *in vivo* との比較の目的で, スペクトルCを得た同一ラットの肝を摘出後, 高分解能 ^{13}C -NMR を測定したものである。 ^{13}C -TMR スペクトルは観測周波数が20.2 MHz と低い
ため, シグナルの分離は良くない。しかしながら配合成分の影響を示す結果が得られている。すなわち, スペクトルBでは大量の炭水化物, モノ不飽和脂肪酸 (シグナル10) の存在を示すシグナルが, 一方CではBでみられなかったポリ不飽和脂肪酸の存在を示す128.5ppm (9) のシグナルが強くあらわれ, 配合成分の違いによる肝への影響が明らかにされた。また, 配合成分の影響が脂肪組織にあらわれることも図3の ^{13}C -TMR から明らかとなった。A, B両スペクトルではみられなかった128.5ppm のシグナルが, Cでは顕著に観測されたこと

から飼料に配合されたポリ不飽和脂肪酸が脂肪組織に蓄積されたことがわかる。これら ^{13}C -TMR スペクトルは天然存在比で炭水化物, Glc (グルコース), グリコーゲン, リピッド, トリグリセリド, リン脂質といった生体内分子種の同定, 挙動をラットあるいは更に大きい動物で観察できることを示している。

脂質に関する研究例を1つあげると, 肝癌発生物質として知られ, 肝の脂質代謝に顕著な変化を与えるエチオンで誘発させたラット脂肪肝では, トリグリセリドが異常に増加していることが ^{13}C -NMR (スライスした肝で測定) より明らかにされている²⁾。

蛋白質, 核酸などの生体高分子物質は分子運動がないため, 高分解 NMR スペクトルを得ることは通常の手段では非常に困難である。グリコーゲンも分子量が100

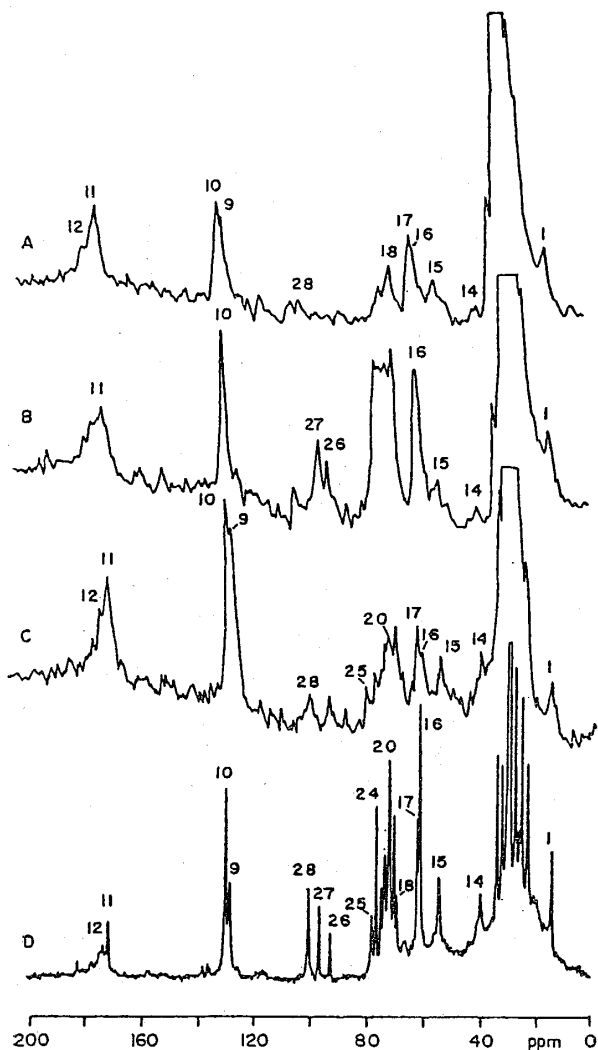


図 2. 特殊配合飼料により飼育したラット肝の ¹³C-NMR.¹⁾
 A: コントロール, B: 無脂肪, 高炭水化物食, C: 高ポリ不飽和脂肪酸含有食, D: Cのラットからの摘出肝

万を越えた高分子であるが、その構造、合成、分解について灌流肝を用い興味ある結果が得られている³⁾。図4に Glc, グリコーゲン, およびラット肝の ¹³C-NMR を示した。肝グリコーゲンのスペクトルはかなり線幅の狭いスペクトルとして得られている。グリコーゲンの三次構造はまだ重要な研究課題であるが、¹³C-NMR によるスピナー格子緩和 (T₁), スピナースピナー緩和 (T₂), 核オーバーハウザー効果 (nuclear overhauser effect, NOE) の知見を総合し、肝グリコーゲンの構造は α (1-4) 結合に対し、α (1-6) 結合が7.4%存在する。即ち、13~14 残基に1個の割合で存在することが示された。更にスペクトル上にあらわれたシグナルは運動性のある α-D-Glc 部に由来するのではないかとの可能性に

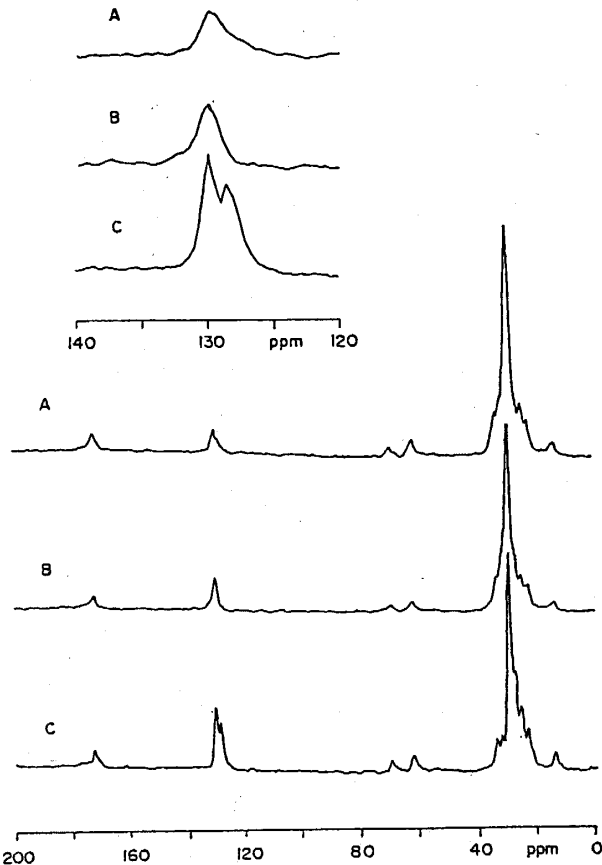


図 3. 副睾丸脂肪組織の ¹³C-TMR スペクトルおよび130 ppm 付近の拡大図¹⁾
 A, B, Cは図2に同じ

対し、グリコーゲン分子の全 ¹³C 核に由来するスペクトルと結論されている。図5は Glc からの肝グリコーゲン合成を ¹³C-NMR でモニターした結果で、[1-¹³C, 26%] Glc (30.6mM) を含む Krebs 緩衝液で灌流し測定したものである。このデータには NMR 法でしか得ることができない特徴がある。平衡関係にある Glc C-1α, C-1β のシグナルが分離して観測できるための、各アノマーの代謝過程の追跡が可能となる。本実験では両アノマーは同等に利用されたが、大腸菌の Glc 代謝では β アノマーが優先的に利用されている⁴⁾。グリコーゲンの C-1 は Glc C-1 に比べ低磁場 (100.5ppm) にシフトする。これら C-1 シグナルを解析することで、両物質の代謝速度を同時に知ることができる。このように ¹³C-NMR の特徴の一つは、各代謝物のシグナル強度をもとに代謝の流れを同時にみることができるところにある。差スペクトル (B) ではグリコーゲン合成を証明するグリコーゲン C-1 (正), Glc C-1α, C-1β (ともに負) のシグナルの他に、61.5ppm にグリコーゲン C-6 のシグナルが認められる。本シグナルは解糖系の酵素 triosephosphate isomerase の作用により基質 [1-¹³C] Glc の分解

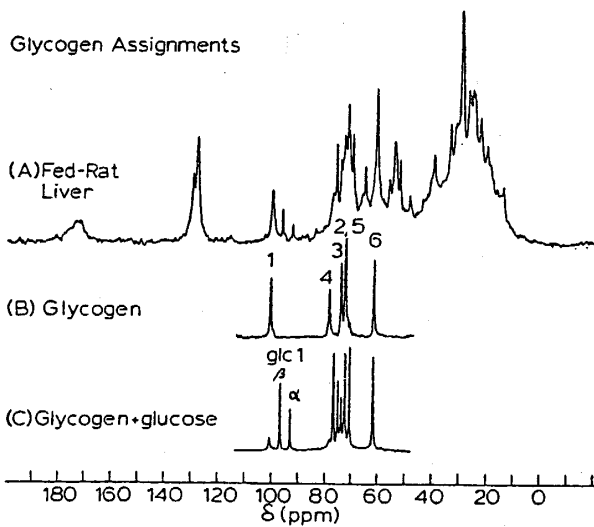


図 4. ラット摘出肝, グリコーゲンおよび Glc の ^{13}C -NMR.³⁾
 A: 通常食で飼育したラット摘出肝の 10,000回積算 (20分) により得られた ^{13}C -NMR
 B: ウサギ肝グリコーゲンの ^{13}C -NMR (1~6はグリコーゲンの各炭素への帰属を示す)
 C: グリコーゲンと α -D-, β -D-Glc 混合物の ^{13}C -NMR.

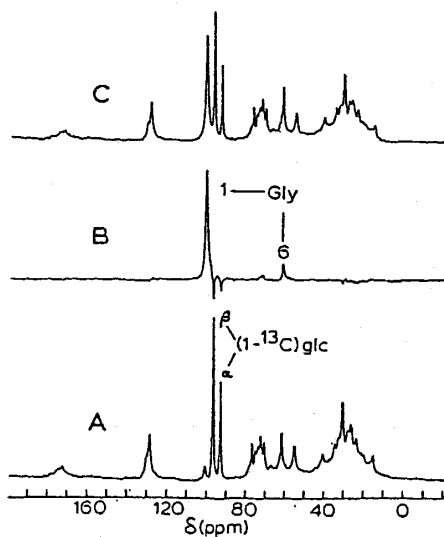


図 5. 灌流ラット肝における $[1-^{13}\text{C}]$ Glc からのグリコーゲン合成³⁾
 A: $[1-^{13}\text{C}]$ Glc (30.6 mM) 含有の Krebs 緩衝液による灌流20分後の ^{13}C -NMR
 B: AとCの差スペクトル
 C: 灌流6.2時間後の ^{13}C -NMR.
 前駆体 $[1-^{13}\text{C}]$ Glc のグリコーゲンにおける $\text{C}_1 \leftrightarrow \text{C}_6$ scrambling がみられる

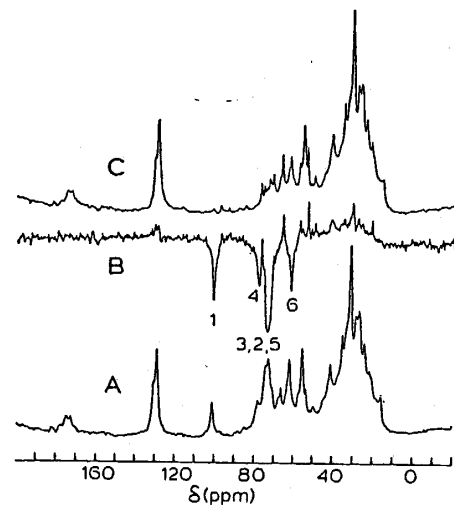


図 6. 灌流ラット肝におけるグルカゴン刺激によるグリコーゲン分解³⁾
 A: 通常食で飼育した灌流ラット肝の ^{13}C -NMR
 B: AとCの差スペクトル。加水分解で生じた glc のシグナルを示す
 C: 20 nM グルカゴン処理5時間後の灌流ラット肝の ^{13}C -NMR.

で生じた三糖類は、C-1とC-6が等価となるため、これら三糖類が糖新生の方向に利用されるとC-6ラベルのGlcが合成されグリコーゲンに取り込まれていく糖代謝を立証している。図6はグルカゴンによるグリコーゲン分解をみたもので、グルカゴン (20nM) を含む灌流液で5時間灌流後の ^{13}C -NMR である。差スペクトル (B) から明らかなように他の肝成分には変化がみられないのに対し、グリコーゲンの分解のみが顕著にみられた。 ^{13}C -NMR はグリコーゲンの分析に利用されており、糖原病ラットの肝グリコーゲンの ^{13}C -TMR (surface coil 使用) の結果、本ラットの肝グリコーゲン量は常ラットの3倍あることがわかり、酵素法で得られた結果と一致した。また本ラットは断食してもグリコーゲン量は減少しないと報告されている⁵⁾。

次いで薬物代謝酵素活性の ^{13}C -NMR による測定例を示す⁶⁾。薬物としては $[N-^{13}\text{C}$ -メチル] アミノピリン (構造は図7に挿入) を灌流液40ml に対し20mg の濃度に調製し用いられ、肝はマウスから摘出し、NMR は灌流しながら測定された。図7はコントロールマウス肝でのアミノピリン脱メチル反応 (N-demethylase 活性) を経時的にみたものである。判定はメチルシグナル (44 ppm) の高さが $1/2$ になる時間 ($t_{1/2}$) で行われた。実験前2日間フェノバルビトン (80mg/kg) で処理したマウスの肝での $t_{1/2}$ は 64 ± 6 分で、コントロールマウス

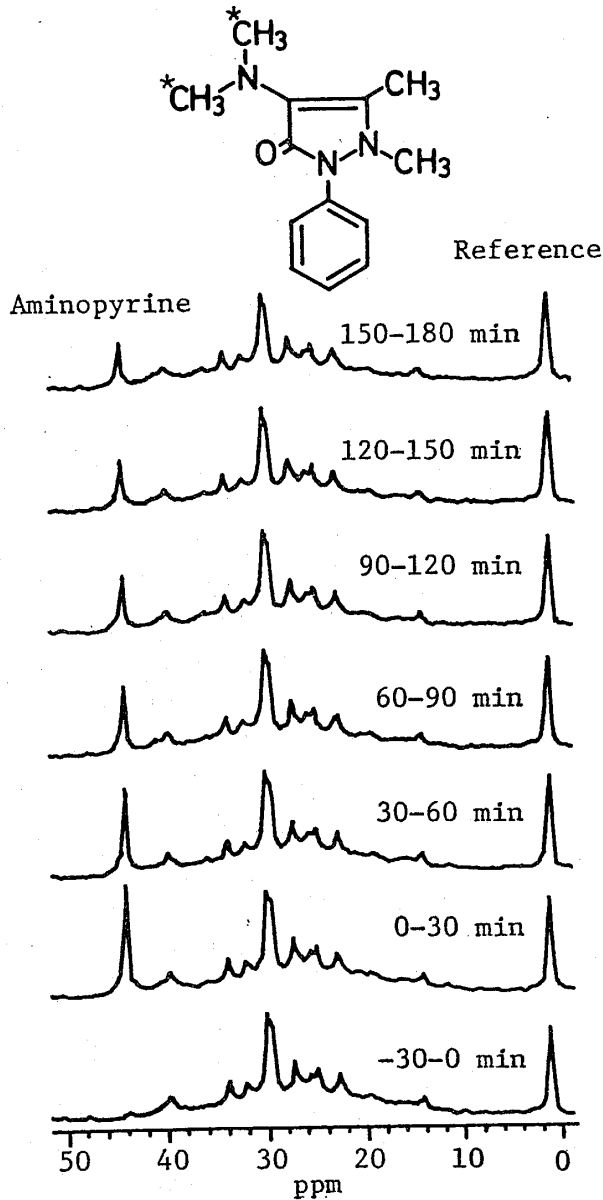


図 7. ¹³C-アミノピリンの灌流マウス肝での経時変化⁶⁾
 最下段はアミノピリン添加前のスペクトル

(174±26分) に比べ3倍の代謝活性を示し、フェノバルビトンの N-demethylase 活性促進作用が立証された。一方マラリアを感染させた動物では、肝の肥大、褪色、血流速度の減少、ミトコンドリアの機能損傷などを起すことが知られている。ここではマラリア感染マウスの肝についてもアミノピリン代謝活性を NMR を用い同様の方法で調べられたが、コントロールマウス肝と同等の t_{1/2} (167±28分) が得られ、活性に差がないことも示されている。

この他、甲状腺機能を亢進させたラットの肝実質細胞レベルで、¹³C ラベルしたグリセロール⁷⁾、アラニン⁸⁾が

らの糖新生経路を追跡した研究もあり、¹³C-NMR の代謝研究への有用性が示されている。

2. 筋肉での応用

筋肉の最初の高分解 ¹³C-NMR (90.5MHz) はひな鳥の摘出胸筋で測定され、リン脂質、蛋白質におけるアミノ酸側鎖の一部及びカルボキシル、脂肪酸のメチレン及びオレフィン炭素、コリンのメチル基、クレアチン(クレアチンリン酸)のメチル基及びグアニジノ炭素、乳酸などが同定されている⁹⁾。

温度、薬物は筋肉にどのような影響を与えるのか、¹³C-NMR による研究例を示す¹⁰⁾。損傷なく摘出できるカエルの腓腹筋を対象に保存(図8)及びカフェイン瘵

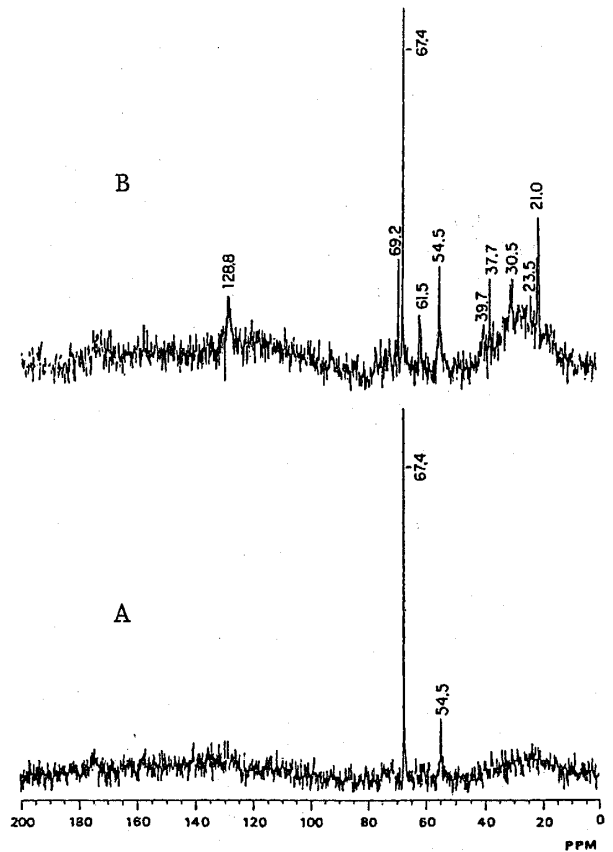


図 8. カエル腓腹筋の¹³C-NMR.¹⁰⁾
 A: 氷冷した腓腹筋の¹³C-NMR (2,400回)。測定終了後の筋の温度は15°C
 B: Aの筋を室温で一晩貯蔵後氷冷し、測定した¹³C-NMR (2,400回積算)
 67.4ppm は外部標準に用いたジオキサンのシグナル

縮(図9)による筋肉の変化が¹³C-NMR で調べられた¹⁰⁾。図8の(A)は代謝を最小限に抑えるため摘出前数時間カエルを氷冷しておいた後得られた腓腹筋の¹³C-NMR (118.2MHz, 10°Cで測定)である。54.5ppm

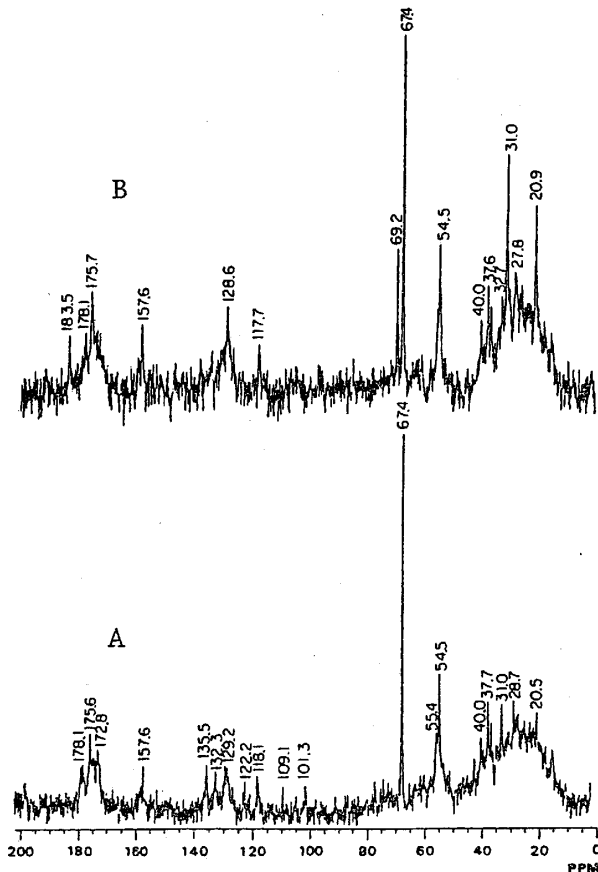


図 9. カエル腓腹筋の ^{13}C -NMR.¹⁰⁾

B: 腓腹筋をカフェイン (10 mM) を含むリンゲル液に室温で10分間浸漬後氷冷し, 10°C , 6,000回積算した ^{13}C -NMR.

A: Bと同様に, カフェインを含まないリンゲル液に浸漬し, 測定した ^{13}C -NMR. 本スペクトルにみられる多くの小さなシグナルは, 浸漬が原因であらわれたと思われる

にクレアチンリン酸のメチル基のシグナルが観測されただけで, 他のシグナルは全く観測されていない。ところが同筋肉を室温で一晩保存した後の ^{13}C -NMR (図8のB) では次に示す多くのシグナルが観測されている。乳酸由来のメチル基 (21.0ppm) とC-2 (69.2ppm) が顕著な他, コリンの3個のメチル基が前出のクレアチンのメチル基と重なり54.5ppm に, リン脂質脂肪酸のメチレン及びオレフィン炭素が各々30.5ppm, 128.8ppm に出現している。またリン脂質のグリセロールC-1, C-3は共に61.5ppm に, C-2は71.0ppm に出現している。図9は強力な筋痙縮剤であるカフェインによる処理(B) 及び未処理(A) の ^{13}C -NMR (90.5MHz で測定) である。両スペクトルには大きな相違点が指摘できる。それらはカフェイン処理したスペクトルで乳酸由来のシグナル (20.9ppm) と69.2ppm) と脂肪酸のメチレン基由

来のシグナル (31.0ppm) が特に強く観測されたことで, これらは未処理筋のスペクトルではほとんど検出されないか, 非常に弱いシグナルである。

これら図8, 9より intact な筋の膜に結合したリン脂質の運動性について興味ある知見が与えられた。図8(B), 9(B) のスペクトルに観測されたリピッドのシグナルは, 筋膜と結合したリン脂質に帰属され, 細胞内組織間に存在する中性リピッド由来のものではないことが次の事実より明らかとなった。細胞内の脂肪滴に存在する中性リピッド由来のシグナルであれば, 筋肉の状態にかかわらず, 新鮮筋でも処理筋 (貯蔵及びカフェイン処理筋) でも観測されるべきであり, また中性リピッド由来のシグナルは非常に鋭いピークとして観測されることが既に実証されている。しかるに鋭さに欠け, 処理筋においてのみ観測されたリピッドのシグナルは中性リピッド由来のものではないと結論される。

一方, 同時に行われたガスクロマトグラフィーによる分析の結果, 新鮮筋と処理筋間で, 遊離脂肪酸とエステル化脂肪酸に量的差が認められていない。この結果より, 貯蔵あるいはカフェイン処理といった操作によるリン脂質からの遊離脂肪酸生成は否定できる。

以上の事実から, 膜結合のリン脂質は新鮮 (生きている) 筋では相対的に運動性はないが, 貯蔵, カフェイン処理により一部運動性をもつようになると結論できる。

また貯蔵およびカフェイン処理筋のスペクトルでのみ乳酸由来のシグナルが観測されている。腓腹筋のクレアチンリン酸及び ATP は室温貯蔵では10時間で, カフェイン処理では即座に水解されることが ^{31}P -NMR により明らかとなっている。クレアチン分解後の ATP の再合成は乳酸の生成を伴う解糖作用で主に行われている。従って貯蔵及びカフェイン処理筋における乳酸蓄積は高エネルギーリン酸の消失を意味し, 筋中での同物質の消失が膜結合したリン脂質の運動性を惹起する。即ち筋におけるリン脂質の運動性と高エネルギーリン酸化合物の間に相関性のあることが示され, 他組織の膜の構造と機能に関する研究に ^{13}C -NMR を利用できる可能性を示唆している。

3. 心臓での応用

モルモット心臓における Glc, 酢酸ナトリウムの in vivo での代謝研究例を示す¹¹⁾。心臓の ^{13}C -TMR (20.18MHz) も6分ほどの短時間で S/N 比の良いスペクトルが得られ, 肝臓のスペクトル (図2のA参照) などに類似している。脂肪酸由来のシグナルが顕著にみら

れ、グリコーゲンのシグナルは認められない。しかし D-[1-¹³C] Glc 0.75g とインシュリン 50単位の静脈内同時注入 (0.1ml/min で 6 ml) により心筋グリコーゲンが経時的に増加、蓄積されることが、グリコーゲン C-1 のシグナル強度より明らかとなった。注入開始 6 分以内で Glc のアノマー炭素 (図 2 の 26.27 に相当), 15 分でグリコーゲンの C-1 (101ppm, 図 2 の 28 に相当) があらわれる。1 時間の注入が終了するとアノマー炭素のシグナルは減少するが、グリコーゲン C-1 はその後 2 時間一定の強度で保持される結果が得られている。さらに本実験では注入速度とグリコーゲン合成速度の関係、また NMR 測定時のくり返し時間がグリコーゲン C-1 のシグナル強度に与える影響についても検討されている。

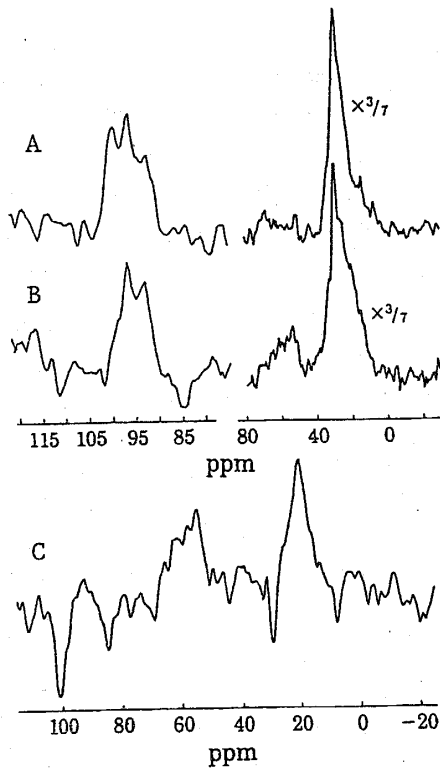


図 10. ¹³C-グリコーゲンへの酸素欠乏 (anoxia) の影響¹¹⁾

- A : 頸静脈より D-[1-¹³C] Glc 0.75 g とインシュリン 50 単位の注入終了時における ¹³C-TMR.
- B : 呼吸装置停止、酸素欠乏 3.5 分後から 6 分間の ¹³C-TMR.
- C : A と B の差スペクトル

グリコーゲン合成は Glc 注入終了と同時に一定に達し、また短いくり返し時間 (0.3秒) でも C-1シグナルは飽和をうけないという結論を得、本実験条件で TMR が定量的分析に十分利用できる。更に一つのデータが 6 分以内で得られるため、グリコーゲン分解などの代謝速度

の早い反応、及びグリコーゲン蓄積などの遅い反応のいずれに対しても in vivo で追跡できることを示唆している。

酸素欠乏の心筋グリコーゲンに与える効果を in vivo でみたのが図 10 である。前出の D-[1-¹³C] Glc とインシュリン同時注入終了直後から先ず 6 分間 ¹³C-TMR を測定し(A), 次いで呼吸装置を停止し急速に低酸素症 (hypoxia) から酸素欠乏症 (anoxia) へと導く。B は呼吸装置停止 3.5 分後から 6 分間の積算で得たスペクトルである。B より酸素欠乏がグリコーゲンの急速な分解を起し、同時に乳酸の生成が C の差スペクトルで出現した 21.0ppm (乳酸の C-3) のシグナルから証明されている。

次に [2-¹³C] 酢酸ナトリウム (AcONa) 1.2g の注入前後におけるモルモット心臓の ¹³C-TMR を図 11 に示す。

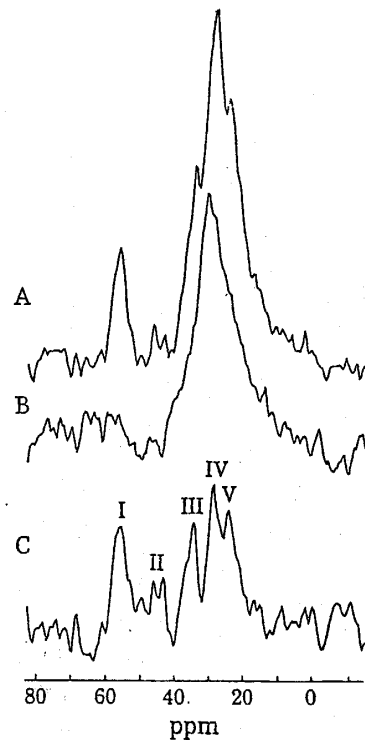


図 11. [2-¹³C] 酢酸ナトリウム 1.2g の注入前 (B), 後 (A) におけるモルモット心臓の ¹³C-TMR.¹¹⁾

- C は A と B の差スペクトル
- I : Glu C-2, II : クエン酸 C-2, III : Glu C-4, IV : Glu C-3, V : 酢酸 C-2

スペクトルは 800 回積算 (10.7 分) により得られた。A は注入開始から 10.7 分間のスペクトルで、注入前 (B) に比べ 55.2 および 34.2ppm に新たなシグナルがみられる。これらはグルタミン酸 (Glu) およびグルタミン (Gln) の C-2, C-4 に ¹³C が取り込まれたことを示し、

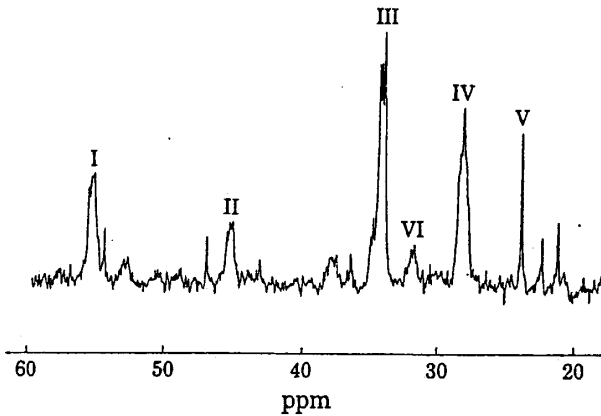


図 12. [2- ^{13}C] AcONa 1.2 g を60分注入後、抽出したモルモット心臓からの過塩素酸抽出物の ^{13}C -NMR (90.55 MHz, 3,080回積算)¹²⁾
I, II, III, IV, Vは図11と同じでVIは Gln C-4のシグナルを示す

差スペクトル (C) をとることでこの他 Glu の C-3, クエン酸の C-2, 酢酸の C-2 のラベル化も明らかとされた。本結果は [2- ^{13}C] AcONa がアセチル-CoA, さらに TCA サイクルを経て Glu あるいは Gln に代謝される経路を *in vivo* で実証したことになる。

図12は [2- ^{13}C] AcONa を60分注入後抽出したモルモット心臓から、過塩素酸によって抽出されたフラクションの高分解 ^{13}C -NMR である。本スペクトルでは図11と同様 Glu, Gln のシグナルが主となっているが、各シグナルは隣接の ^{13}C 間のスピンカップリングにより多重線に分裂しているのが特徴である。両アミノ酸の C-2 (三重線), C-3 (五重線) は互いに重なっているが、C-4 (三重線) は離れて観測され、そのシグナル強度より本実験では ^{13}C は Glu に優位に取り込まれたことが明らかとなった。

NMR で、シグナル強度が ^{13}C のラベル量を示すのに対し、 ^{13}C - ^{13}C の分裂パターンは隣接炭素のラベル化の有無を示し、代謝研究上また重要な情報となる。Shulman ら¹⁵⁾ は本研究に先だて、[2- ^{13}C] AcONa の酵母による代謝研究を行なっているが、その中で Glu をはじめとした種々の代謝物のシグナル強度と分裂パターンの経時変化をもとに、見事な解析を行なっている。特に Glu C-4シグナルの一重線と二重線の強度比は、TCA サイクルプールのラベル状態及び活性をはかる指標となる。心臓を用いた本研究を考察する上で、前記報文¹⁵⁾ の結果は有用となり併せ参照されたい。

この他、ラットの頭、腹、後肢、ヒトの腕など ^{13}C -NMR としての *in vivo* での測定例がある¹²⁾。また紙面

の都合で紹介できなかつたが、微生物の代謝研究領域でも ^{13}C -NMR は利用され、大腸菌を用いた Glu の代謝⁴⁾、細胞内補酵素 (ピリジヌクレオチド) の酸化還元と代謝制御との相関性¹³⁾、酵母を用いた嫌気性解糖¹⁴⁾、トランスアミネーション¹⁵⁾、胞子中に高濃度に存在するトレハロースの役割¹⁶⁾などについての研究があり、 ^{13}C -NMR の有用性が示されている。さらに原生動物アメーバでも炭水化物及びエネルギー源としてのトレハロースの生理的意義が検討されている¹⁷⁾。

以上 ^{13}C -NMR の代謝研究へのいくつかの応用例を紹介した。歴史的に NMR の生体系への応用をみたとき、リン化合物の生体内反応で果す役割の重要性、測定面での ^{31}P 核の感度の高さから、 ^{31}P -NMR の研究例は ^{13}C -NMR を遙かにしのいでいる。しかしながら、 ^{31}P -NMR では ATP, クレアチンリン酸, 無機リン酸, リン酸ジエステル, 糖リン酸といったリン化合物しか対象に出来ない制約がある。この点 ^{13}C -NMR は、対象となる物質に制約がない上に、化学シフトが広く、同時に種々の代謝物質や、代謝物間の相互変換をみることのできる他にない利点を有する。

また、原理的には surface coil に類似する solenoid transmit/receiver coil¹⁸⁾ では、感度の著しい向上が認められるなど、今後装置の改良、開発による感度、分解能の向上も期待できるため、 ^{13}C -NMR は無侵襲的分析法として一層広い範囲で応用されるであろう。

Summary

Nuclear magnetic resonance (NMR) studies have been extended to intact cells, organelles, and organs. Topical magnetic resonance (TMR) allows noninvasive investigation of the metabolism of whole animals. It is now possible to obtain *in vivo* the kinds of detailed information about structure, motion, and reaction rates that have been obtained by NMR studies of purified biomolecules in solution. In this article recent metabolic investigations of intact systems by means of ^{13}C -NMR are described.

文 献

- 1) Canioni, P., Alger, J. R. and Shulman, R. G.: Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver and adipose tissue of the living rat. *Biochemistry* 22, 4974-4980, 1983.
- 2) Block, R. E.: Direct proton and natural abundance carbon-13 NMR observation of liver changes induced by ethionine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108, 940-947, 1982.

- 3) Sillerud, L. O. and Shulman, R. G.: Structure and metabolism of mammalian liver glycogen monitored by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **22**, 1087-1094, 1983.
- 4) Ugurbil, K., Brown, T. R., den Hollander, J. A., Glynn, P. and Shulman, R. G.: High-resolution ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3742-3746, 1978.
- 5) Stevens, A. N., Iles, R. A., Morris, P. G. and Griffiths, J. R.: Detection of glycogen in a glycogen storage disease by ^{13}C nuclear magnetic resonance. *FEBS Lett.* **150**, 489-493, 1983.
- 6) Pass, M. A., Geoffrion, Y., Deslauriers, R., Butler, K. W. and Smith, I. C. P.: Use of ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the evaluation of hepatic drug-metabolizing enzyme activity in perfused mouse liver. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 135-142, 1984.
- 7) Cohen, S. M., Ogawa, S. and Shulman, R. G.: ^{13}C NMR studies of gluconeogenesis in rat liver cells: Utilization of labeled glycerol by cells from euthyroid and hyperthyroid rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1603-1607, 1979.
- 8) Cohen, S. M., Glynn, P. and Shulman, R. G.: ^{13}C NMR study of gluconeogenesis from labeled alanine in hepatocytes from euthyroid and hyperthyroid rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 60-64, 1981.
- 9) Doyle, D. D., Chalovich, J. M. and Barany, M.: Natural abundance ^{13}C NMR spectra of intact muscle. *FEBS Lett.* **137**, 147-150, 1981.
- 10) Barany, M., Doyle, D. D., Graff, G., Westler, W. M. and Markley, J. L.: Changes in the natural abundance ^{13}C NMR spectra of intact frog muscle upon storage and caffeine contracture. *J. Biol. Chem.* **257**, 2741-2743, 1982.
- 11) Neurohr, K. J., Barrett, E. J. and Shulman, R. G.: *In vivo* carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of heart metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1603-1607, 1983.
- 12) Alger, J. R., Sillerud, L. O., Behar, K. L., Gillies, R. J., Shulman, R. G., Gordon, R. E., Shaw, D. and Hanley, P. E.: *In vivo* carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of mammals. *Science* **214**, 660-662, 1981.
- 13) Unkeuer, C. J., Blazer, R. M. and London, R. E.: *In vivo* determination of the pyridine nucleotide reduction charge by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* **222**, 62-65, 1983.
- 14) den Hollander, J. A., Brown, T. R., Ugurbil, K. and Shulman, R. G.: ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of anaerobic glycolysis in suspensions of yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6096-6100, 1979.
- 15) den Hollander, J. A., Behar, K. L. and Shulman, R. G.: ^{13}C NMR study of transamination during acetate utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2693-2697, 1981.
- 16) Barton, J. K., den Hollander, J. A., Hopfield, J. J. and Shulman, R. G.: ^{13}C Nuclear magnetic resonance study of trehalose mobilization in yeast spores. *J. Bacteriol.* **151**, 177-185, 1982.
- 17) Deslauriers, R., Jarrell, H. C., Byrd, R. A. and Smith, I.C.P.: Observation by ^{13}C NMR of metabolites in differentiating amoeba, *FEBS Lett.* **118**, 185-190, 1980.
- 18) Field, J., Irving, M. G., Brooks, W. M. and Doddrell, D.M.: *In vivo* ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy using a solenoid transmit/receiver coil. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**, 882-887, 1984.