

氏名	犬伏俊郎
学位の種類	工学博士
学位記番号	工博第539号
学位授与の日付	昭和53年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	工学研究科石油化学専攻
学位論文題目	Studies on the Intermolecular Interaction and the Structure of Active Site in Biological Molecules by Using NMR Paramagnetic Probe (常磁性 NMR プローブを用いた分子間相互作用と生体分子の活性中心の構造に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 米澤貞次郎 教授 福井謙一 教授 三枝武夫

論文内容の要旨

本論文は安定有機ラジカル、金属イオンなどの常磁性 NMR プローブを用いて有機分子あるいは生体関連分子における分子間相互作用の諸性質、ヘム蛋白質、酵素の構造と機能の関連についての研究、ならびに NMR 法における常磁性プローブの利用法の開発についての研究結果をまとめたもので、二編14章からなる。

第一編第1章は序論であり、NMR における安定有機ラジカルの利用によって得られる情報と、その利用技術の開発にいたる経過などについて述べている。第2章ではハロゲン化合物 RX と安定有機ラジカルとの分子間相互作用をラジカルによって誘起される¹³C コンタクトシフトによって観測し、ハロゲン原子に直結した炭素の低磁場コンタクトシフトは、ハロゲン原子が F, Cl, Br, I の順に増大すること、R の炭素数の増加に伴い低磁場コンタクトシフトは減少することを見出し、この相互作用がハロゲン化合物のハロゲン原子とラジカルとの間の電荷移動型相互作用に基づくことを結論している。さらに分子軌道法を用いて、そのスピン伝達機構の考察も行なっている。

第3章ではプロテックな官能基をもつ有機分子、ならびに生体関連分子と、安定有機ラジカルとの水素結合を ¹H NMR におけるコンタクトシフトより析討し、これら官能基からジグザグ経路をへたプロトンの特異的な低磁場コンタクトシフトを見出し、構造決定への応用をも試みている。第4章では核酸モデル化合物の相補的塩基対に関する NH プロトンに及ぼすラジカルの緩和効果を調べた結果がまとめられている。

第5章では、有機タリウム化合物とニトロキシドラジカルとのルイス酸—塩基型の相互作用により Tl 核の緩和時間が著しく減少し、¹³C—Tl スピン結合がでカップルされることを見出し、ラジカルのスピンドカップリング試薬としての利用法を確立している。この方法を用いてノルボルネン、ノルボルナジェン、ベンゾノルボルナジェンなどのタリウムアセテート付加物の ¹³C NMR スペクトルを解析し、全ての ¹³C—²⁰⁵Tl スピン結合を決定すると共に、その立体構造依存性とそのスピン結合の機構を検討

している。

第二編第1章での序論にひきつづいて、第2章では測定が困難なため十分な研究が行われていなかったいろいろな酸化型高スピン ($S = \frac{5}{2}$) ヘム蛋白質のヘム側鎖メチル基の常磁性シフトを ^1QPD を付備した超高磁場 NMR により観測し、そのシフトは外来性配位子の配位力が強くなる程小さくなること、および pH の影響と、その機構についての考察も行なっている。

第3章では、ヘム側鎖メチル基を順次エチル基に置換した合成ヘムを用いてミオグロビンを再編成し、酸化型高スピン状態のミオグロビンのヘムメチルのシグナルの帰属、同定を明らかにした。

またこの帰属されたメチルシグナルをもとに、非対称な側鎖置換基をもつ、ヘムのアポ蛋白内での配向を決定し、ヘム側鎖置換基の大きさと蛋白部分の疎水空間との関連について検討している。

第4章では ^{15}N で標識した CN^- イオンを用い酸化型低スピン ($S = \frac{1}{2}$) 状態のヘム蛋白質における配位子 C^{15}N^- の ^{15}N 常磁性シフトをはじめて観測し、その解析から CN^- とヘム鉄の結合の性質を規定する因子としては、 CN^- と H_2O 間の水素結合、および CN^- に対してトランス位に位置する第5配位子 (含チソ化合物) の塩基性との2因子のあることを示した。第5章では C^{15}N^- を用い種々の酸化型低スピンヘム蛋白質の軸配位子 C^{15}N^- の ^{15}N 常磁性シフトを観測し、これらのシフトがペルオキシダーゼ、チトクローム C、ミオグロビン、ヘモグロビンの順に増大することを見出し、これらヘム蛋白質に共通に存在する第5配位子ヒスチジンのイミダゾール基とヘム鉄との結合がこの順に強くなることを明らかにしている。

第6章ではミオグロビンとチトクローム C の軸配位子 C^{15}N^- の ^{15}N 常磁性の pH 依存性を観測し、ミオグロビンの pK 値は遠位ヒスチジンのプロトン化に伴う C^{15}N^- との水素結合の強化によって説明されること、またヘム鉄と軸配位子の結合の性質は、アミノ酸残基の解離に伴う蛋白部分のわずかな構造変化によることを示した。

第7章では人、犬、ラット、ウサギの intact な赤血球においても、ヘモグロビンの軸配位子の CN^- の ^{15}N 常磁性シフトが検出されることを明らかにし、 ^{15}N NMR の手法が電子状態、構造解析、さらにこれらの病理学的な観点からも有用であることを指摘している。

第8章では ^{15}N で標識したイミダゾールをヘム鉄に対する軸配位子として用い、種々の酸化型低スピンヘムモデル化合物でこの ^{15}N 常磁性シフトが高磁場コンタクトシフトであることを見出し、さらにそのスピン伝達機構についての考察を行なっている。

第9章では、 ^{15}N 、 ^{57}Fe で標識したメゾーテトラフェニルポルフィリン鉄錯体を合成し、 ^{15}N シフト、 ^{15}N — ^{57}Fe スピン結合定数を測定し、構造との関連を考察した結果がまとめられている。

最後に結論の項では、これらの総括が述べられている。

論文審査の結果の要旨

近時 NMR を用いる研究は、超伝導磁場、パルスフーリエ変換法などハードウェアの著しい進歩によって、 ^1H 、 ^{13}C のみならず多種にわたる原子核も測定が可能となり、低分子から生体高分子までの分子構造、電子状態に関する精密な知見がえられるようになってきている。本論文はこれらの装置を用い、さ

らに有機ラジカル，常磁性金属イオンなどを常磁性プローブとして利用する技術を組合せ， ^{15}N などの異核 NMR の測定を併せ行うことにより分子間相互作用，ヘム蛋白質，ヘム酵素およびそのモデル化合物の構造と機能について研究を行なった結果をまとめたもので，二編14章からなっている。その主な成果は次のごとくである。

(1) ニトロキシドラジカルなどの安定有機ラジカルと有機分子との相互作用を，NMR による ^1H ， ^{13}C コンタクトシフトおよび緩和現象の測定から検討し，有機分子に誘起されたスピン密度，ならびにスピン伝達機構の解析から，水素結合のほかに，電荷移動型，ルイス酸一塩基型相互作用の様式が存在することを示した。

(2) さらに安定有機ラジカルをシフト試薬，緩和試薬，デカップリング試薬として用いる NMR の核利用技術を開発し，溶液中における有機分子の OH，NH 基の配向，互変異性体の構造決定，分子内および分子間水素結合の検索ならびにその強さの決定など多くの応用を見出した。

(3) それぞれ酸素の運搬，貯蔵，または過酸化水素の分解など，固有の生理機能を発現するヘム蛋白質の構造と機能の関連について検討し，その要因となる四つの因子として，(i)ヘム鉄と軸配位子との結合の性質，(ii)ヘム側鎖置換基による誘起効果，(iii)外部配位子とヘム近傍アミノ酸残基との相互作用 (iv)ヘム側鎖の蛋白部分との相互作用があげられることを結論した。

(4) 種々の外来性配位子の存在下で，酸化型高スピン状態のヘム側鎖プロトンの常磁性シフトを調べ配位力の強い配位子ほど常磁性シフトが小さく，ヘム鉄の電子密度が高くなることを見出し，生理活性の中心的役割を担うヘム鉄の電子状態は主に軸配位子のヘム鉄に対する配位力によって規定されることを示した。

(5) ヘム鉄に配位した C^{15}N^- ，イミダゾール- $^{15}\text{N}_2$ などの標識化合物の ^{15}N NMR 常磁性シフトを調べ，酸化型低スピン状態のモデルシアノ錯体における配位子 C^{15}N^- のシフトは配位子と H_2O との水素結合やトランス位の含窒素化合物の塩基性の減少に伴い， C^{15}N^- のヘム鉄に対する配位力が低下し，減少することを見出した。またミオグロビン-シアノ誘導体における C^{15}N^- シフトの pH 依存性から，タンパク部分のアミノ酸残基と配位子との間の相互作用が存在することが指摘された。

(6) 軸配位子 C^{15}N^- ，イミダゾール- $^{15}\text{N}_2$ の ^{15}N 常磁性シフトの測定から，ヘム側鎖置換基による誘起効果は，ヘム鉄と軸配位子との結合に影響を与えないこと，またヘム側鎖プロトンの常磁性シフトの解析より，蛋白部分とヘム側鎖とのファンデルワールス相互作用がヘムの配向をきめる第一の要因であることなどが結論された。

以上要するに本論文は安定有機ラジカル，金属イオンなどの常磁性 NMR プローブを用いて有機分子との相互作用系について検討し，このスピン伝達機構の解析から相互作用型式の決定，立体構造解析に有用な多くの知見を加え，さらにヘム蛋白質，酵素の構造と機能の関連を明らかにしたものであって学術上，實際上寄与するところが少なくない。

よって，本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。