

氏 名	いし い よし たか 石 井 佳 誉
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1818 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Developments and Applications of solid-state NMR techniques to obtain structural information (固体 NMR による構造情報の取得法の開発と応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 寺 尾 武 彦 助 教 授 竹 腰 清 乃 理 教 授 郷 信 広

論 文 内 容 の 要 旨

固体 NMR 法では溶液の場合と異なり、きわめて有用な情報源である双極子相互作用や化学シフト異方性が直接スペクトルに反映される。そこで、固体 NMR 法を用いてこれらの大きさを測定し、分子の構造情報を得ようという試みが近年行われている。このアプローチは単結晶、液晶、アモルファス、粉末試料など広い範囲の化学物質に適用可能であること、試料を溶解・融解することなく測定が可能であることなどの特徴を有し、とくに同位体ラベルした局所構造の測定に威力を発揮する。本研究では新たに異種核間の距離を高精度に測定する方法を開発し、それを生成高分子に応用した。さらに二面角の測定法を開発するとともに、距離や二面角の測定値に分子振動が与える影響を調べた。

双極子相互作用の大きさはスピン間の距離の 3 乗に反比例することから、この大きさを測ることにより核間距離を決定することができる。双極子相互作用のみを選択的に測定するには化学シフト異方性を消去するためのパルス系列を照射する必要がある。本研究では、パルス系列の様々な非理想性の影響を消去し、正確な ^{13}C - ^{15}N 間距離の測定を可能にする MLEV8 / 8^{R} パルス系列と呼ぶ方法を考案した。このパルス系列は、エコー系列に複合パルスと循環列および逆循環列を用いることにより非理想性に鈍感にしたもので、この方法を二重標識した 2- ^{13}C - ^{15}N グリシンに適用し、誤差 0.001Å 程度という高精度で ^{13}C - ^{15}N 間距離を測定し得ることを示した。

MLEV8 / 8^{R} パルス系列の応用の一つとして、セリンプロテアーゼの一種であるズブチリシンとその放線菌由来の蛋白性プロテアーゼ阻害剤 (SSI) の複合体における SSI の反応部位の構造研究を行った。この複合体に対し、X 線結晶構造解析などを用いて多くの研究がなされているが、十分な精度の測定手段が現存しないために反応部位にあたる阻害剤の切断結合とズブチリシンの活性セリンがどのような構造を形成しているか未だ定説がなかった。本研究では SSI の切断結合の ^{13}C - ^{15}N 距離を SSI と複合体で測定し、距離が両者の間で高精度で一致することを見いだした。このことにより切断結合のカルボニル炭素は複合体でも完全な SP2 混成軌道を有しており、複合体はズブチリシンの活性セリン酸素がカルボニル炭

素に接近し単結合を形成しようとする過程の前段階で凍結されている、と結論した。

さらに、固体 NMR におけるスピン相互作用が一般にテンソル情報であり、方向に敏感なパラメータであることを利用して、分子の二面角などの情報を得るための Relayed Anisotropy Correlation NMR と呼ぶ方法を開発した。この方法は 2 次元混合 NMR 法の混合区間に選択的磁化移動を用いて異なる核の相互作用テンソルを相関させることにより、固体中の分子の二面角情報を得るものである。1,2- ^{13}C , D, L-アラニン分子に対してこの方法を適用し、 ± 7 度の精度で二面角を決定することに成功した。

また、固体における分子内の核間距離の測定値に分子振動が及ぼす影響を理論的に検討した。その結果、基準振動のみならず分子全体の回転的な振動により、固体 NMR で測定される距離は時間平均距離よりも長くなり、X 線結晶構造解析による測定値は同程度短くなることを示した。常温の結晶におけるグリシン分子に対する分子動力学計算により、NMR による距離は理論通りに時間平均距離より 1~4% 長くなることを示した。また、Relayed Anisotropy Correlation NMR によって得られる結合角や二面角などには分子運動の影響はほとんどないこともあわせて示した。

論文審査の結果の要旨

現在、生体高分子の立体構造決定のための主要な方法論である X 線結晶構造解析と溶液 NMR はいずれも分子のおおよその全体構造を決定するための強力な手段であるが、活性部位などの局所構造のみを高精度で得ることは原理的に不可能である。しかしながら、活性部位などの局所的な構造情報の精密化は構造と機能の関連を究明するうえできわめて重要である。

固体 NMR は、X 線や溶液 NMR のように全体構造を決めることはできないが、局所構造に関しては両者よりも精密な構造情報を与える可能性があり、しかも X 線測定に比べて単結晶を必要としない、溶液 NMR と比べると分子量の制限を受けないという利点を有する。しかし、これまでの固体 NMR 法では避けがたい実験上の不完全性に敏感なため、信頼性の高い結果を得ることは困難であった。申請者はラジオ波の不均一性、非共鳴量、パルス幅などの非理想的な実験条件の効果を補償し得るパルス系列を開発することにより、 ^{13}C , ^{15}N を二重標識した試料において ^{13}C - ^{15}N 間距離を高精度に測定することを可能にした。

申請者がこの方法を適用して研究を行ったズブチリシン SSI 複合体においては既に X 線結晶構造解析などを用いて多くの研究がなされているが、十分な精度の測定手段がないため反応部位にあたる阻害剤の切断結合とズブチリシンの活性セリンがどのような構造を形成しているか定説がなかった。申請者が本研究で得た複合体の構造情報は SSI の阻害機構の解明に糸口を与えるものと思われる。

固体 NMR が与え得るもう一つの構造情報である角度情報に関しては、一つの核に関する異なるスピン相互作用テンソルを 2 次元法で関係づける方法が Ernst らによって 1980 年代前半に示されていたが、この手法では構造化学的にはあまり重要でない結合角しか決めることができなかった。申請者の開発による Relayed Anisotropy Correlation NMR は異なる核の相互作用テンソルを相関させるもので固体中の二面角決定の手法としては初めてのものであり、さまざまなバリエーションが可能である。今後、ペプチドなどの立体構造に関する情報取得に応用ができるものと期待できる。

分子の精密な構造を議論するためには測定値に分子振動が及ぼす影響を検討する必要がある。従来は直接結合した水素・炭素核間の距離についてのみ理論的研究がなされていたが、申請者は直接結合していない場合を含めて水素，炭素，窒素などの核間距離に関して議論し，分子全体の回転的振動が固体 NMR および X 線結晶構造解析法で測定された核間距離に無視できない影響を及ぼすことや二面角に関しては影響は無視できることなどを初めて示した。

以上，申請者の研究は，固体内の分子の精密な構造情報を取得するための新たな固体 NMR 法を開発するとともに，生体高分子などに応用し，その有用性を示したものである。本研究の方法では粉末試料を用いるので結晶化しない場合や結晶化しても X 線測定が十分可能な大きさの良い結晶が得られない場合においても構造情報が取得し得るため，構造生物学に留まらず，広く構造化学全般にも貢献できるものと思われる。したがって，本申請論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。

なお，主論文に報告されている研究業績を中心とし，これに関連した研究分野について諮問した結果，合格と認めた。