

氏名	柴田進 しば た すずむ
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第470号
学位授与の日付	昭和52年5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	理学研究科化学専攻
学位論文題目	プロトン核磁気緩和を用いた溶液中の生体分子の構造決定

論文調査委員 (主査) 教授 波多野博行 教授 雑賀亜幌 教授 広田 襄

### 論文内容の要旨

プロトンの核磁気緩和時間,  $T_1$ , を測定することによって溶液中の分子の構造解析を行う  $T_1$  シミュレーション法, および DESERT 法を, 生体分子, とくに核酸単量体およびその誘導体に適用し, 生化学的に重要な意味をもつこれらの分子の溶液中の分子構造を明らかにした。

プロトンの核磁気緩和時間,  $T_1$ , は最も簡単な式を用いれば次のように表わされる。

$$(1/T_1)_i = (3/2) r_H^4 \bar{h}^2 \tau_r \sum_{j \neq i}^n (1/r_{ij})^6 \quad (1)$$

$$(i=1, 2, \dots, n)$$

ここで  $r_{ij}$  はプロトン  $i$  および  $j$  の間の距離であり,  $n$  はプロトンの個数,  $r_H$ ,  $\bar{h}$  は既知の定数,  $\tau_r$  は分子全体の回転の相関時間である。この  $\tau_r$  は  $^{13}\text{C}$  核の  $T_1$  測定により別に決められる。 $r_{ij}$  は2プロトン系および3プロトン系の場合には(1)式を  $r_{ij}$  を未知数とした連立方程式として直接求めることができる。しかし, 4プロトン系以上では未知数  $r_{ij}$  の数が式の数を越えるから  $T_1$  シミュレーション法および DESERT 法によって求める。

$T_1$  シミュレーション法とは分子の可能なすべての構造について  $T_1$  を計算し, 実測の  $T_1$  と比較して, すべてのプロトンに対する平均誤差が  $T_1$  の測定精度内におさまる  $T_1$  を与える構造をえらび出す方法である。

本論文では多スピン系の効果を入れるために, プロトンの熱平衡時の磁化  $I_0$  と, 共鳴角速度  $\omega_H$  を用いて, プロトン  $i$  の縦磁化  $\langle I_i(t) \rangle$  の時間変化を与える連立微分方程式を解いて緩和曲線を求め, それから  $T_1$  を計算した。

この方法を DMSO- $d_6$  中の2', 3'-イソプロピリデン-3, 5'-シクログワノシン (IPCG) に適用した結果, リボース糖の構造が IPCG のアデニン類似体について X線回折によって求められている結晶中の構造とは異なった構造をとっていることが見出された。これによって  $T_1$  シミュレーション法で求

めている分子内プロトン間の双極子相互作用による緩和でプロトンの  $T_1$  が決まっているという仮定が正しいことが確認された。

次に、さらに分子内自由度の大きいアデノシン-5'-リン酸 (5'-AMP) に  $T_1$  シミュレーション法を適用し、グリコシド結合の回りの構造、リボース糖の構造、および  $C_4'$ - $C_5'$  結合の回りの構造、のそれぞれにいくつかの構造を考え、これらの構造の組合せから成る構造や種々の平衡状態における  $T_1$  を計算し、それと実測の  $T_1$  とを比較して、0.1M の 5'-AMP の重水溶液中の構造および平衡を明らかにした。

DESERT 法とは分子内のあるプロトン  $k$  を選択的に重水素化し、その前後で、他のプロトン  $i$  の  $T_1$  を測定し、緩和速度の差  $(DRR)_i$  からプロトン  $i$  および  $k$  の間の距離、 $r_{ik}$  を求める方法である。

この方法では  $r_{ik}$  は次式で与えられる。

$$r_{ik} = \left\{ \frac{1}{3} \left( \frac{2}{3} \right) r_H^4 \hbar^2 \tau_r \left( 1 - \left( \frac{16}{9} \right) \left( \frac{r_D}{r_H} \right)^2 \right) / (DRR)_i \right\}^{1/16} \quad (2)$$

ここで  $r_H$  および  $r_D$  はそれぞれ水素核および重水素核の磁気回転比である。

この方法をプリン塩基をもったヌクレオシドおよびその誘導体について適用した結果、プリン環の 8 位のプロトンを選択的に重水素化し、その前後でリボース糖の 1', 2' および 3' 位のプロトンの  $T_1$  を測定し、 $r_{1'8}$ ,  $r_{2'8}$  および  $r_{3'8}$  を求めることができた。求めた  $r_{1'8}$  および  $r_{2'8}$  は Dreiding の分子模型からえられる距離と妥当な一致を示した。このことからこの方法が  $r_{ik}$  を求めるのに有効な方法であることを確めた。

次に、アデノシンおよびその誘導体である 2', 3'-イソプロピリデン-3, 5'-シクロアデノシン (IPCA) および 5'-AMP についてこの方法を適用した。

その結果求められたプロトン間距離は安定構造である anti および syn のいずれにも一致せず、少なくとも 2 つ以上の間の平衡を考えねばならないことがわかった。

また、アデノシンおよび IPCA は DMSO- $d_6$  中でも重水中でも同じプロトン間距離を示すが 5'-AMP は異ったプロトン間距離を示し前の 2 者と異った構造をとっていることが明らかになった。

### 論文審査の結果の要旨

近年、フーリエ変換核磁気共鳴法の発達によって、核磁気緩和時間、 $T_1$  の測定精度が  $\pm 5\%$  以上に向上し定量的に取扱うことが可能になってきた。とくにプロトンの  $T_1$  は測定しやすく、また、プロトンが広く生体分子中に存在しているため、プロトンの  $T_1$  を測定することによって溶液中の生体分子の構造解析を行うのに、この  $T_1$  の測定法は極めて汎用性のあるものとなった。しかも、分子量が 100~300 程度の比較的小さい生体分子の場合は、分子内のプロトン間の双極子相互作用によってプロトンの  $T_1$  がほぼ決まるので、構造に関する情報が取り出しやすい。また核磁気共鳴法を用いているために生体中でとっている構造に近い溶液中の分子構造を決めることができる。

本論文ではこのような目的を達するために  $T_1$  シミュレーション法と DESERT 法とが用いられている。プロトンの核磁気緩和時間  $T_1$  はプロトンと他のプロトンとの間の距離、プロトンの個数、プロトンを含む分子全体の回転の相関時間などを変数とする比較的簡単な式で求めることができるが、それ

が直接求めうるのはせいぜい2プロトン系か3プロトン系であって、多プロトン系については何らかそれを求める工夫、すなわち、本論文に用いられた  $T_1$  シミュレーション法とか、DESERT法が必要である。

$T_1$  シミュレーション法とは分子のとりうる種々の構造についてそれぞれ  $T_1$  を計算し実測の  $T_1$  との平均誤差が  $T_1$  の測定精度内にある  $T_1$  を与える構造を選び出す方法であるが、分子全体の回転の相関時間が知られておれば、プロトンの  $T_1$  を測定するだけの至って簡便な方法であり、しかも汎用性の広い方法である。

この方法を用いて2', 3'-イソプロピリデン-3, 5'-シクログアノシンの構造を解析し、X線回折によって求められた結晶中の構造とは異った構造を溶液内ではとっていることを見出している。この結果から、また、プロトンの  $T_1$  が  $T_1$  シミュレーション法で求めている分子内プロトン内の双極子相互作用による緩和で決まっているという仮定が正しいことが認められる。

次に、DESERT法とは Deuterium Substitution Effect on Relaxation Times 法の略で、分子内の一つのプロトンを選択的に重水素化し、その結果による他のプロトンとの緩和速度の差からプロトン間の距離を求める方法である。

この方法を用いて、プリン塩基をもったヌクレオシドとその誘導体の構造を解析し、この方法の有効性を明らかにすると共に、アデノシンとその誘導体について求めたプロトン間の距離は安定な構造である anti および syn のいずれとも異なる構造すなわちこれらの構造間の平衡を溶液内では考えねばならないことを明らかにしている。

さらにアデノシンとアデノシンリン酸とが溶液内では異った構造をとっていることも、それらのプロトン間の距離の測定から指摘されている。

以上この論文は自ら開発した新しい方法論を駆使して溶液中の生体分子の構造を決定し、生体分子の役割を考える上に重要な示唆を与えている。

参考論文はいずれも新しい方法論の開発とそれを用いた成果である。これらの成果から申請者がこの分野に広い学識を備え、かつこの分野の発展に著しい貢献をもたらしていることがわかる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。