

【 64 】

|               |                                                                                                   |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 前 田 豊<br>まえ だ ゆたか                                                                                 |
| 学 位 の 種 類     | 理 学 博 士                                                                                           |
| 学 位 記 番 号     | 論 理 博 第 232 号                                                                                     |
| 学 位 授 与 の 日 付 | 昭 和 43 年 1 月 23 日                                                                                 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当                                                                           |
| 学 位 論 文 題 目   | <b>Mössbauer Spectroscopy of Peroxidase and Its Derivatives</b><br>(ペルオキシダーゼとその誘導体のメスバウアー効果による研究) |
| 論文調査委員        | (主 査)<br>教 授 四手井綱彦 教 授 清 水 栄 教 授 寺 本 英                                                            |

論 文 内 容 の 要 旨

主論文は、ヘム蛋白の一種である Peroxidase とその誘導体の Mössbauer スペクトルを測定して、その鉄原子の電子状態を明らかにしたものである。

Mössbauer 効果を利用するこの種の研究は、 $^{57}\text{Fe}$  における  $\gamma$  線の共鳴吸収を利用するものであるが、ヘム蛋白は鉄原子の含有量がきわめて低く、さらに同位体  $^{57}\text{Fe}$  の自然存在量もまたきわめて低く、 $^{57}\text{Fe}$  の共鳴吸収を観測するにはヘム鉄中の  $^{57}\text{Fe}$  を濃縮する必要がある。申請者は化学的方法によって、生物活性を失うことなく、同位体置換を行ない能率よく  $^{57}\text{Fe}$  を濃縮した試料を準備した。また測定装置としては安定性と高い計数率を得ることに意をもちいて、微弱なヘム鉄の吸収スペクトルを正確にとらえることができた。

この研究に取り扱われた試料は大根より単離された Peroxidase と、そのヘム鉄の第6配位に F, OH,  $\text{N}_3$ , および CN をもった誘導体である。またこれら三価鉄のヘム蛋白の外、二価鉄をもつ還元型 Peroxidase とその CO 誘導体についても測定を行なった。Mössbauer 効果のパラメーターとして Isomer shift, Electric quadrupole splitting および Magnetic hyperfine splitting について観測し、各試料について次のような結果をえた。

1) Peroxidase (JRP-a) 帯磁率の測定では5個の不对電子をもち、3価の高スピン ( $S=5/2$ ) 状態にあると考えられていたが、この測定では  $77^\circ\text{K}\sim 243^\circ\text{K}$  で大きい Quadrupole splitting を示した。またその splitting の大きさには温度変化 ( $2.20\text{ mm/sec}$  ( $77^\circ\text{K}$ )  $\sim 1.67\text{ mm/sec}$  ( $243^\circ\text{K}$ )) が見られた。この低温での大きい splitting は一様な荷電分布をもつ3価の高スピン状態に帰属させることはできず、Peroxidase は低温では低スピン状態 ( $S=1/2$ ) にあると結論される。このことは Isomer shift の実測値からも支持され、また、 $d_{\pi}$  電子軌道の一つの空位に起因する電場勾配によるものとして  $2.20\text{ mm/sec}$  の Quadrupole splitting は妥当といえる。しかしその大きな温度依存性は低スピン状態だけで説明することは不可能で、高スピン状態との温度平衡の可能性が考えられる。

2) Peroxidase fluoride (JRP-a-F) この化合物は典型的な 3 価高スピン状態であることが知られている。このスペクトルの実測では  $195^{\circ}\text{K} \sim 4.2^{\circ}\text{K}$  の範囲で Magnetic hyperfine splitting を示した。これは Fe イオンが高スピン状態にあるため実効スピンによる磁気モーメントをもつため、この種の分子のように常磁性イオンの濃度が稀薄で、かつ、高スピン状態で軌道角運動量をもたないときには、緩和時間は長くなり比較的高い温度でも Magnetic hyperfine が観測されると考えられる。

3) Peroxidase hydroxide (JRP-a-OH) この分子については三価低スピン状態に固有の Quadrupole splitting と Isomer shift が得られた。Quadrupole splitting の実測値は、ESR 測定によって得られた anisotropic g-value をつかって得た d $\epsilon$  軌道の分裂値から予想されるものとよく一致する。また  $77^{\circ}\text{K}$  で Magnetic hyperfine splitting が観測された。これは d $\epsilon$  軌道の縮退をといている配位子場の対称性の低下が軌道角運動量の消失をまねき、スピン格子緩和時間が長くなったためと考えられる。

4) Peroxidase azide (JRP-a-N<sub>3</sub>) この化合物は JRP-a-OH と同じく典型的な低スピン状態のスペクトルパラメーターを示した。しかし、スピン-格子緩和時間は、ESR の結果に反して JRP-a-OH より長いことがみとめられた。

5) Peroxidase cyanide (JRP-a-CN) この化合物は他の低スピン状態の化合物とちがって、比較的小さな Isomer shift と Quadrupole splitting とを示した。これは、CN<sup>-</sup> 配位子の  $\pi$  反結合軌道に空位があるため、Fe<sup>3+</sup> より配位子への電子の移動がおり、その結果 3d 電子の数が減少することに原因する。このことは、Isomer shift を小さくするのみでなく、Quadrupole splitting の減少をも導くものと考えられる。しかし、その温度依存性は JRP-a と同じで、高スピン状態との熱平衡を考える必要がある。

6) Reduced peroxidase (Red-JRP-a) この状態でのスペクトルパラメーターは 2 価の高スピン状態 ( $S=2$ ) 固有の値を示し、Quadrupole splitting の温度依存性より、配位子場とスピン軌道相互作用で分裂した d $\epsilon$  軌道の間隔を求めることができた。

7) Reduced peroxidase carbon monoxide (Red-JRP-a-CO) この化合物は、帯磁率測定より反磁性で 2 価の低スピン状態 ( $S=0$ ) であることが知られていたが、Mössbauer スペクトルも小さな Quadrupole splitting を示し、(d $\epsilon$ )<sup>6</sup> の電子配位を支持した。

以上の各試料についての結果を総合すると、Peroxidase は高スピン状態と低スピン状態との間の転換が容易に起こるような条件にあり、配位子の性質に強く影響される。

また、酸化型 Peroxidase では fluoride は典型的な高スピン状態にあり、hydroxide および azide は低スピン状態にある。一方 free peroxide と cyanide はその中間の配位子場にあり、二つのスピン状態の熱平衡が保たれていると推論できる。

還元型 Peroxidase は 2 価の高スピン状態にあり、CO が結合することによって低スピン状態になることが確認された。

参考論文その 1 は、Peroxidase の Mössbauer スペクトルに関する予備的研究であり、主論文の前提である。

参考論文その 2 は、過酸化分解の酵素反応過程における Peroxidase の電子状態を、Mössbauer スペクトルの観測によって明らかにしたものである。

参考論文その3は、Iron-Carbon Martensite における Mössbauer 効果を測定し、その tempering による効果を観測したものである。

参考論文その4は、その3と同じく Iron-Carbon Martensite の Mössbauer 効果による研究で、鉄原子の電子状態を論じたものである。

### 論文審査の結果の要旨

この主論文の対象となっている酵素 Peroxidase は、Hemoglobin, Myoglobin などとともにヘム蛋白とよばれる鉄蛋白で、これら蛋白の生物活性はヘムの構造に負うところが多く、その電子状態とくに鉄イオンの電子状態の研究がその生理作用の解明に重要な役割をもつものと考えられる。

このような観点より、今まで多くの物理的手段がその研究に導入されており、特に帯磁率の測定と ESR による研究など鉄原子の 3d 軌道の不対電子を対象とした磁気測定が利用されている。しかしこれらの方法はその適用範囲に制限があるため、さらに情報を得るため、X 線解析および Mössbauer 効果の実験が必要とされる。主論文はこの問題に解答をあたえたものである。

Mössbauer 効果は、 $^{57}\text{Fe}$  における  $\gamma$  線の共鳴吸収を利用するものであるが、ヘム蛋白は鉄原子の含有量がきわめて低く、さらに同位体  $^{57}\text{Fe}$  の自然存在量もきわめて低い。ヘム鉄の共鳴吸収を観測するためには、その  $^{57}\text{Fe}$  を濃縮する必要がある。申請者は化学的方法によって生物活性を失うことなく同位体を置換濃縮し、測定にたえる良好な試料を準備した。また測定装置についてとくにその安定性に留意し、信頼できる測定結果を得ている。

測定試料としては、Peroxidase とその4つの誘導体ならびに還元型 Peroxidase とその CO 誘導体を取り、配位子の変化によるスペクトルパラメーターの差異を系統的にしらべている。この実験により得られた鉄原子に関する情報は、Isomer shift, Quadrupole splitting, Magnetic hyperfine splitting などであり、それらの結果を Ligand field theory の基礎に立って解析し、次のような結論を得た。

Peroxidase の鉄原子は高スピン状態と低スピン状態との間の転換が容易に起こり得る条件下にあり、その第6配位座につくものの性質によって強く影響される。酸化型 Peroxidase においては弗素化合物が典型的な高スピン状態にあり、OH および  $\text{N}_3$  化合物は低スピン状態である。free peroxidase および CN 化合物はその中間で、高スピン状態と低スピン状態とが熱平衡にあると推論できる。また、CN 化合物では鉄イオンの 3d 軌道と  $\pi$  反応結合軌道との間に大きな mixing がみとめられた。還元型 Peroxidase は二価鉄の高スピン状態にあり、CO が結合することにより低スピン状態になることが確認された。

以上のように、申請者はヘム蛋白について Mössbauer 効果を利用して系統的な研究をはじめて行ない、その鉄原子のスピン状態について新しい知見を加え、生物物理学の分野の進歩に貢献するところが大きい。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。