

氏名(本籍)	ひら い ゆう き 平井 佑紀 (神奈川県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第3388号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	化学研究科
学位論文題目	^{19}F NMR Study of Heme Electronic Structure in Reconstituted Hemoproteins (^{19}F NMRによるヘムタンパク質活性部位の電子構造解析)
主査	筑波大学教授 Ph. D. 山本 泰彦
副査	筑波大学教授 理学博士 池田 龍一
副査	筑波大学教授 理学博士 岡本 健一
副査	筑波大学教授 理学博士 木越 英夫

論文の内容の要旨

本論文は、生体系でのエネルギー変換、物質変換、エネルギー代謝、情報伝達などの重要な生体反応に関与するヘムタンパク質の機能と構造との相関関係の解明に役立つ ^{19}F NMR によるヘムタンパク質活性部位の電子構造の新規な解析法の構築および新規解析法によるヘムタンパク質の生物無機化学研究から得られた成果をまとめたものである。生体内に存在する一連のヘムタンパク質の構成要素はすべて同じであり、活性中心として補欠分子族であるヘムが存在する。したがって、それらヘムタンパク質が示す多様な機能の発現は、ヘムの反応性がヘムとタンパク質との相互作用により調節されることに基づいている。したがって、ヘムタンパク質の機能と構造との相関関係を解き明かすためには、活性部位におけるヘムとその周辺のアミノ酸残基との相互作用を原子レベルで明らかにすることが不可欠であると言える。本論文は、ヘムタンパク質の活性部位の電子構造を、 ^{19}F NMR の利用により、従来の手法よりもはるかに高い時間分解能および空間分解能で解析できることを初めて実証した。

天然のヘムタンパク質はフッ素を含まないため、 ^{19}F NMR を利用する解析を行うためには、フッ素を導入する必要がある。そこで、側鎖にフッ素原子を含むフッ素化ヘムを有機合成し、天然のヘムの代わりにフッ素化ヘムをタンパク質に組み込んだ再構成ヘムタンパク質を調製し、解析に用いた。なお、ヘム側鎖へのフッ素の導入は、フルオロ基 (F)、パーフルオロメチル基 (CF_3) の2つの様式で行った。それらフッ素化ヘムを解析に用いる前に、それぞれのフッ素導入様式がヘムの電子構造および再構成ヘムタンパク質の機能に与える影響を検討した。その結果、 CF_3 基の導入はヘムのポルフィリン環の π 電子系に顕著な影響を与えることが明らかとなったが、F 基導入の場合は、ヘムの電子構造に対する影響はほとんど無いことが示された。ただし、これら2つの導入様式で調製されたフッ素化ヘムを酸素貯蔵ヘムタンパク質ミオグロビンに組み込んだところ、それらの酸素親和性は天然のミオグロビンのものと大差ないことが示された。したがって、これらのフッ素化ヘムをもつ再構成ヘムタンパク質で得られる知見は、天然のヘムタンパク質における機能と構造との相関関係の解明に有用であることが示された。

F 基をもつフッ素化ヘムと再構成したミオグロビンの ^{19}F NMR シグナルの化学シフトおよび線幅は、ヘムの電子構造、ヘム鉄の酸化状態、スピン状態、配位状態を鋭敏に反映することが明らかとなった。また、

天然のヘムタンパク質に含まれるヘムは非対称な分子構造をもつため、タンパク質との相互作用がヘムの電子構造に与える影響を評価することは困難であったが、2回転対称な分子構造をもつフッ素化ヘムをヘムタンパク質に組み込むことにより、タンパク質との相互作用によるヘムの電子構造の対称性の低下を ^{19}F NMRシグナルの化学シフトから定量的に評価できることを初めて示した。そして、 ^{19}F シグナルの化学シフトの電子構造に対する鋭敏さにより、生理学的に重要なミオグロビンの酸素あるいは一酸化炭素に結合した状態における活性部位の電子構造の解析に初めて成功した。また、フッ素化ヘムと再構成したヘムタンパク質では、ヘムのフッ素とアミノ酸残基のプロトンの間での核オーバーハウザー効果の検出が、立体構造決定に有用であることが示された。さらに、ヘモグロビンやセイヨウワサビペルオキシダーゼなど、高分子量のヘムタンパク質にもフッ素化ヘムを導入して ^{19}F NMRにより解析し、それらの機能と構造との相関関係を解明するために有用な知見を得た。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、ヘムタンパク質の機能と構造との相関関係の解明に不可欠である活性部位の電子構造決定に有用な ^{19}F NMRによる新規解析法を構築すると共に、その解析法を種々のヘムタンパク質の活性部位の電子構造の研究に適用して有用な多くの知見を得ることに成功した。 ^{19}F NMRを利用した解析法の構築は、ヘムタンパク質の補欠分子族であるヘムにフッ素を導入するための有機合成化学、常磁性分子のNMR分光学、金属タンパク質の生物無機化学の3つの異なる専門分野が統合することによって初めて可能になったものである。この解析法の利用により、従来の手法よりもはるかに高い時間分解能および空間分解能でヘムタンパク質の活性部位の構造化学的研究が行えることが、ミオグロビン、ヘモグロビン、セイヨウワサビペルオキシダーゼなど一連のヘムタンパク質の研究で実証された。これらの研究成果は大きな学術的貢献であり、生物無機化学分野の新しい可能性を切り開いた極めて価値の高い論文である。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。