

氏名(本籍)	なが お さとし (東京都)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4235号		
学位授与年月日	平成19年3月23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	数理物質科学研究科		
学位論文題目	<b><math>^{19}\text{F}</math> NMR Studies of Active Site Structure and Functional Properties of Hemoproteins</b> (ヘムタンパク質の活性部位構造と機能に関する $^{19}\text{F}$ NMR 研究)		
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	岡本健一
副査	筑波大学教授	理学博士	大塩寛紀
副査	筑波大学教授	理学博士	斉藤一弥

## 論文の内容の要旨

本論文では、金属タンパク質の溶液構造を NMR により詳細に解析するため、タンパク質に新規フッ素化合物を組み込んで、 $^{19}\text{F}$  NMR により解析する手法が提案されている。NMR は原子レベルの情報を得るために有用であることから、タンパク質など生体高分子の構造及び機能の解析に利用されている。しかし、最も一般的な NMR である  $^1\text{H}$  NMR スペクトルでは、狭い共鳴周波数の範囲にシグナルが観測されるため、生体高分子の分子量が数万以上に及ぶ場合、シグナルのオーバーラップによりスペクトルの解析が困難になる。この問題を解決するために、 $^{19}\text{F}$  NMR の利用が提案されている。 $^{19}\text{F}$  NMR の主な利点は、 $^1\text{H}$  NMR に匹敵するシグナル観測感度をもつこと、共鳴周波数の範囲が広いこと、高感度での解析が可能であること、ほとんどの生体高分子はフッ素原子をもたないためシグナルのオーバーラップに煩わされずに解析が可能であることなどである。

本研究では、ミオグロビン (Mb) 及び Mb と立体構造が類似したサブユニットの四量体から成るヘモグロビン (Hb) の活性部位の構造解析に  $^{19}\text{F}$  NMR が利用された。Mb, Hb へのフッ素原子の導入は、補欠分子族であるヘムを除去した後、フッ素原子を側鎖にもつ人工ヘムを再構成することにより行われた。観測された  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルは、ヘムと外部配位子、及びヘムとポリペプチド鎖との間の相互作用を鋭敏に反映することが示された。また、フッ素を  $\text{CF}_3$  基としてヘムに導入する場合と、F 基として導入する場合の2つの導入様式の利用法が詳細に比較されている。

生理的に重要なデオキシ Mb のヘム鉄の  $3d$  電子配置は、 $^5E((d_{xz})^2(d_{yz})(d_{xy})(d_z^2)(d_x^2-y^2))$  または  $(d_{yz})^2(d_{xz})(d_{xy})(d_z^2)(d_x^2-y^2)$  と  $^5B_2((d_{xy})^2(d_{xz})(d_{yz})(d_z^2)(d_x^2-y^2))$  の2種類が考えられていたが、従来の研究ではまだどちらかは明らかにされていなかった。 $^{19}\text{F}$  NMR により、ヘム鉄からポルフィリンの  $\pi$  電子系へ非局在化する不対電子スピンの分布を詳細に解析することにより、デオキシ Mb のヘム鉄の電子配置は  $^5B_2$  であることが初めて明らかにされた。また、酸化型 Mb のヘム鉄は低 pH で  $\text{H}_2\text{O}$ 、一方、高 pH では  $\text{OH}^-$  を軸配位子としてもつ。この pH に依存する軸配位子の交換反応は酸塩基平衡として知られている。 $^{19}\text{F}$  NMR による解析の結果、酸化型 Mb に存在する2種類のヘム配向異性体由来するシグナルが別々に観測され、これらの

シグナルの化学シフト値の pH 依存性からそれぞれの状態の酸塩基平衡を別々に解析することが可能であることが示された。従来の研究では、2つの状態を区別して解析することは不可能であり、平均値のみが得られていた。また、 $^{19}\text{F}$  NMR シグナルの線幅の解析から、酸塩基平衡の動力学に関する知見も得られることが示された。さらに、Hb の研究では、サブユニットを区別した解析が可能であることも示された。このように、本論文で提案されている  $^{19}\text{F}$  NMR 研究の手法は、ヘムタンパク質の構造と機能の相関関係の解明に有用であることが示された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、フッ素化ヘムを組み込んだヘムタンパク質の  $^{19}\text{F}$  NMR による研究は、ヘムタンパク質の構造と機能の相関関係の解明に有用であることが示されている。フッ素を  $\text{CF}_3$  基としてヘムに導入した場合は、 $\text{CF}_3$  基の強い電子求引性がヘムの電子構造を少なからず歪めるものの、 $\text{CF}_3$  基のシグナルは先鋭化して観測されるため高分子量のタンパク質の解析に有効であることが示された。一方、フッ素を F 基として導入した場合は、フッ素がヘムの電子構造に与える影響が小さく、天然に近い状態でヘムタンパク質の解析が可能であることが明らかとなった。本研究では、フッ素導入様式の異なる 2 種類のヘムを研究目的に応じて使い分け、Mb 及び Hb の  $^{19}\text{F}$  NMR 解析を行った結果、デオキシ Mb におけるヘム鉄  $3d$  軌道の電子配置がヘムの電子構造の非対称性と相関があることが示された。さらに、 $^{19}\text{F}$  NMR による酸化型 Mb, Hb の酸塩基平衡の熱力学的及び動力学的解析では、Hb のサブユニットを区別した機能解析が可能であることが実証されている。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発展に寄与する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。