

フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質の ^{19}F NMR シグナルの磁場強度依存性の解析

筑波大院数物¹、長岡高専物質²

○宮崎泰斗¹、太虎林¹、長友重紀¹、山本泰彦¹、鈴木秋弘²

Study of Magnetic Field Dependence of ^{19}F NMR Signals of Hemoproteins Reconstituted with a Ring Fluorinated Hemes

○Taito Miyazaki¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹,
and Akihiro Suzuki²

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹ and Nagaoka Natl. Coll. of Tech.²

The analysis of nuclear relaxation has provided a wealth of information about structural and dynamic properties of molecules. Particularly, in the case of metalloproteins carrying unpaired electron(s), dynamic nature of the molecule is sharply manifested in paramagnetic relaxation. In this study, we have shown that the correlation times of the proteins can be estimated through the analysis of field dependence of the paramagnetic Curie spin relaxation.

序論

本研究では、フッ素原子を側鎖にもつフッ素化ヘム (3,7-DF, 13,17-bis(2-carboxylatoethyl)-3,7-difluoro-2,8,12,18-tetramethyl-7,12,18-porphyrinatoiron(III), **Fig. 1**)をミオグロビン(Mb)、成人ヘモグロビン(Hb A)に組み込み、観測される ^{19}F NMR シグナルの線幅の磁場強度依存性の解析から、タンパク質の回転拡散運動の相関時間を見積もるための解析法の構築を試みた。

結果・考察

3,7-DFを組み込んだ Mb、Hb A の deoxy 体および一連の外部配位子(H_2O , N_3^- , CN^- , O_2 , CO)を結合させた状態の ^{19}F NMR 測定を2つの異なる磁場強度 ($B_0 = 9.4$ T (共鳴周波数 376 MHz), $B_0 = 11.7$ T (470 MHz))で行った。Fig. 2に、Mbの deoxy 体の ^{19}F NMR シグナルの磁場強度依存性を示す。シグナルの線幅が磁場強度の増大に伴い増大することが確認できる (Table 1)。これらのシグナルの線幅 (横緩和速度 (R_{obs})) は、反磁性緩和速度 (R_{dia})、常磁性緩和速度 (R_{para})、双極子-双極子緩和機構 (R^{DD})、化学シフト異方性緩和機構 (R^{CSA})、反磁性緩和機構のその他の寄与 (R^{other})、擬コンタクト相互作用による二種類の緩和機構(中心金属上に局在化した不対電子スピンによる機構 (R^{MC})、および配位子に非局在化した不対電子スピンによる機構 (R^{LC})、コンタクト相互作用による緩和機構 (R^C)、キュリースピン緩和機構 (R^{Curie})により、

Keywords: ^{19}F NMR ヘムタンパク質 常磁性緩和 分子運動 フッ素化ヘム
みやざき たいと、たい くりん、ながとも しげのり、やまもと やすひこ、
すずき あきひろ

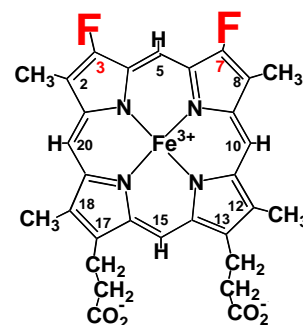


Fig. 1. Molecular structure of 3,7-DF.

$$R_{obs} = R_{dia} + R_{para} \quad (1)$$

$$R_{dia} = R^{DD} + R^{CSA} + R^{other} \quad (2)$$

$$R_{para} = R^{MC} + R^{LC} + R^C + R^{Curie} \quad (3)$$

$$R^{CSA} = \frac{6}{40} \omega_I^2 \Delta_z^2 (3J(\omega_I) + 4J(0)) \quad (4)$$

$$R^{Curie} = \frac{4}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\omega_I^2 g^4 \mu_B^4 S^2 (S+1)^2}{(3kT)^2 r_M^6} \tau_c \quad (5)$$

ω_I : Larmor frequency of ^{19}F , $J(\omega_I)$: Spectral density function, r_M : Distance between ^{19}F nucleus and heme iron(5.62Å), τ_c : Correlation time of overall molecular tumbling. Other parameters represent usual meanings.

Eqs. (1) ~ (3)で表わされる。これら緩和機構で R^{CSA} と R^{Curie} のみ、磁場強度依存性を示すので(Eqs. (4) & (5))、 R_{obs} の磁場強度依存性から、 R^{CSA} の磁場強度依存性の寄与を差し引くことにより、 R^{Curie} を分離することができる。反磁性($S=0$)のCO体のシグナルの線幅の磁場強度依存性の解析から R^{CSA} を見積り、常磁性($S=2$)のdeoxy体のシグナルの線幅への R^{Curie} の寄与を分離した結果を**Table 1**にまとめて示す。

本研究で用いた3,7-DFでは、フッ素原子はポルフィリン環に固定されており、またこれらのタンパク質に導入されたヘムのポルフィリン環はタンパク質と同一の τ_c をもつことが示されている(La Mar *et al.* (1989)) ことから、3,7-DFのフッ素原子の運動の解析を通して、タンパク質全体の τ_c を見積もることが可能となる。

R^{Curie} をEq. (5)に基づいて解析することにより、 $\tau_c \sim 30$ ns が得られた。Mbの τ_c としては ~ 10 ns が報告されていることから(Marshall *et al.* (1980))、本研究で提唱した方法で τ_c を高精度で見積るためには、より多くの異なる磁場強度での測定が必要であると思われる。

Table 1. Line widths of ^{19}F NMR signals, relaxation rates of deoxy Mb, reconstituted with 3,7-DF, in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0, at 25°C. R^{CSA} values are estimated through the analysis of the signals of CO form of Mb.

signal	$B_0=9.4\text{T}$		$B_0=11.7\text{T}$				$B_0=9.4\text{T}$		$\tau_c(\text{ns})$
	$\Delta\nu_{obs}(\text{Hz})$	$R_{obs}(\text{s}^{-1})$	$\Delta\nu_{obs}(\text{z})$	$R_2^{obs}(\text{s}^{-1})$	$\Delta R_2^{obs}(\text{s}^{-1})$	$\Delta R^{CSA}(\text{s}^{-1})$	$\Delta R^{Curie}(\text{s}^{-1})$	$R^{Curie}(\text{s}^{-1})$	
3-F	710±71	2230±220	910±91	2890±290	630±290	54±31	580±290	1320±520	27±13
7-F	660±66	2070±210	950±95	2980±300	910±300	69±41	840±300	1490±530	37±14

結論

フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質で観測される ^{19}F NMRシグナルの線幅の磁場強度依存性の解析により、シグナルの線幅への化学シフト異方性、キュリースピン緩和の寄与をそれぞれ分離しヘムタンパク質の相関時間を見積もる手法を提唱した。

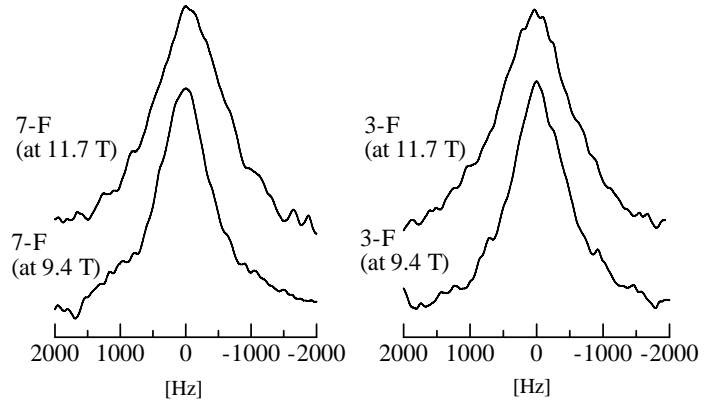


Fig. 2. ^{19}F NMR spectra of deoxy Mb reconstituted with 3,7-DF, at 9.4 T and 11.7 T