

固体 NMR によるリゾチーム結晶の水和水のダイナミクスと物性の研究

(金沢大院・自然) 新屋 隆士, 水野 元博

<序>

近年、タンパク質結晶は構造解析のために用いられるだけでなく、新規機能性材料としても注目されており、様々な物性研究が行われている。リゾチーム結晶については、X 線回折法を用いた結晶構造に関する研究が広く行われ、水和量の変化に伴う構造の変化が示されてきた。また、弾性率に関する研究から、200 K 付近にガラス転移点が存在し、ガラス転移による構造変化が水和量によって異なることが示されてきた。このようにタンパク質結晶の構造や機能は、水和水の影響を大きく受けるため、水和水の局所的な構造やダイナミクスの解析はタンパク質結晶の物性の研究において極めて重要である。固体 NMR を用いたリゾチームの研究は、スピン-格子緩和時間(T_1)やスピン-スピン緩和時間(T_2)の測定が行われており、ガラス転移点以上での運動の活性化エネルギーが見積もられてきた。本研究では異なる水和量のリゾチーム結晶について、固体重水素 NMR スペクトル、および T_1 を室温からガラス転移点以下の温度領域について測定を行った。リゾチーム結晶中の水分子の様々な運動を考慮した、スペクトルおよび T_1 のシミュレーション解析によって、異なる水和量のリゾチーム結晶についてそれぞれ水和水の挙動を詳細に調べた。

<実験>

トリ卵白リゾチームを重水で 3 回再結晶することによって水分子を重水素化し、これを試料とした。水和量は、水蒸気を吸着させる時間と乾燥時間によって調節した。 ^2H NMR の測定は Chemagnetics CMX-300 を用い、共鳴周波数 45.818 MHz で行った。 ^2H NMR スペクトルの測定は四極子エコー法、 T_1 の測定には反転回復法を用いた。

<結果>

Fig. 1 に水和量の異なる 2 種類の重水素化リゾチームの T_1 の温度変化を示す。それぞれの温度領域における運動の活性化エネルギーを示す。2 種類の試料とも磁化の回復は nonexponential となり、二成分(short 成分と long 成分)に分離することができた。それぞれの成分をプロットした。両方の試料についても 250 K 付近に T_1 の極小が見られたが、水和量が少ない試料については、short 成分のみに極小が見られた。この極小を持つような運動は水分子

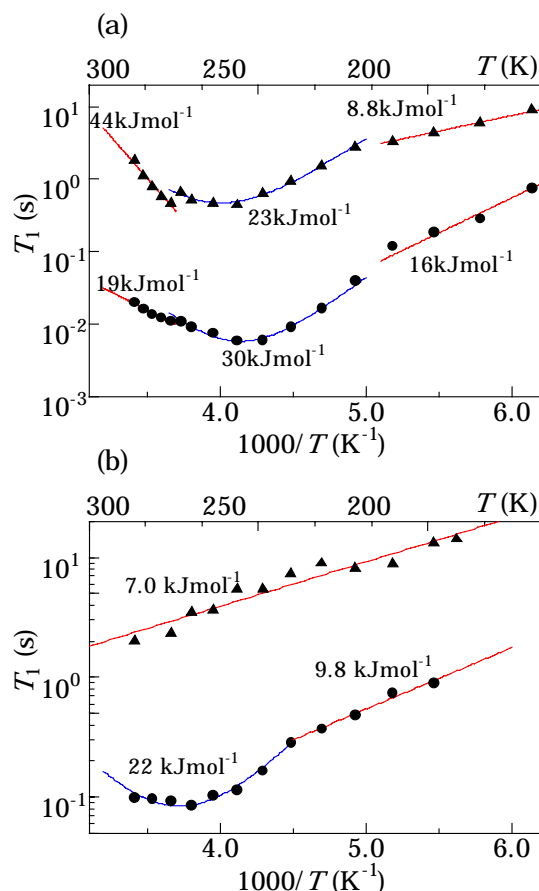


Fig. 1 Temperature dependence of ^2H NMR T_1 for (a) wet sample and (b) dry sample.

の等方回転運動によるものと考えられ、水和量が多いほど、この寄与が顕著に現れた。また、水和量の多い試料は、 T_1 を3つの温度領域に分割することができた。273 K 付近での T_1 が不連続に変化しているのは、自由度の高い水分子の凍結と考えられる。200 K 付近ではガラス転移による T_1 の不連続な温度変化が観測された。それぞれの温度領域で T_1 の温度変化から分子運動の活性化エネルギーを見積もった(Fig. 1)。

Fig. 2 に水和量の多い試料の ^2H NMR スペクトルの温度変化とシミュレーションを示す。シミュレーションは水分子の等方回転運動、 180° フリップ、水分子の2回軸周りの小角運動、(約 45°) を考慮して行った。室温から、230 K 付近までは、水分子の非常に速い等方回転運動による、中心付近のシャープな成分が支配的であることがわかる(Fig. 2(a),(e))。220 K ~ 200 K の温度領域では、温度が下がるにつれて、等方回転運動が徐々に遅くなり、ブロードな成分が現れた(Fig. 2(b))。このような温度領域では、等方回転運動だけでなく、水分子の 180° フリップもスペクトルの線形に寄与する。また、 ± 70 kHz 付近にピークを持つ成分は水分子の小角の運動の寄与が含まれている(Fig. 2(f))。ガラス転移点以下では、等方回転運動をしている水分子の寄与がほとんどなくなり、 180° フリップと小角の運動の寄与が支配的となる。しかし、ガラス転移点以下では、単純な 180° フリップと小角運動だけでは説明することができなかった。これらの運動に角度分布を考慮しシミュレーションを行ったところ、実測スペクトルとの一致を見ることができた(Fig. 2(g),(h))。

また、水和量の少ない試料の ^2H NMR スペクトルの線形の変化についてもシミュレーション解析を行い、水和量の違いによる分子運動について考察した。

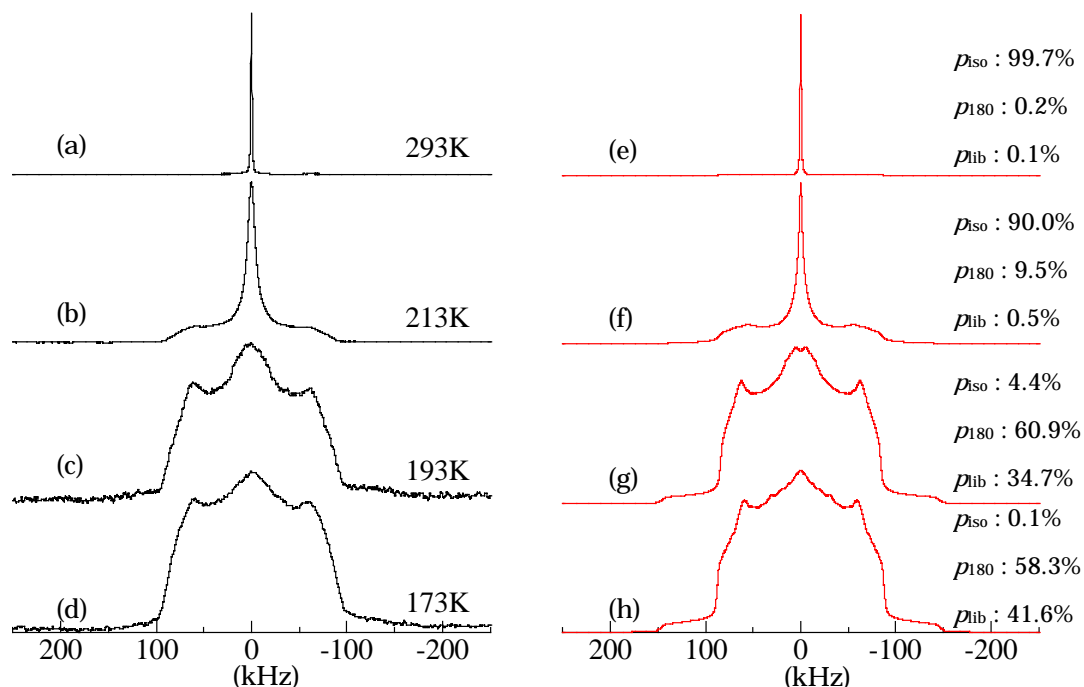


Fig. 2 Temperature dependence of ^2H NMR spectra for wet hen egg white lysozyme. (a)-(d) and (e)-(h) are observed and simulated spectra, respectively. The ratio of three molecular motion, isotropic rotation(p_{iso}), 180° flip(p_{180}), and small angle rotation of water(p_{lib}), are shown.