

## 1P064

Sephadex G-15 ゲル制限空間における過冷却水の DSC, X 線および中性子散乱測定  
(福岡大理\*, Helmholtz-Zentrum Berlin ME\*\*, Laboratoire Leon Brillouin\*\*\*) ○伊藤華苗\*, 吉田亨次\*, 山口敏男\*, Moskvina Evgeny\*\*, Bellissent-Funel Marie-Claire\*\*\*

【序】制限空間内に閉じ込められた水は、生体膜中で重要な役割を果たしている水の機能を理解するためのモデルとして注目されている。特に、界面の水は極めて低温まで安定に存在することが報告されている。一方、蛋白質が第一水和層分の水を含むと、220 K 付近で機能が発現する（動的転移）ことが知られている[1]。したがって、制限空間における過冷却水の構造とダイナミクスを明らかにすることは、生体機能発現における水の役割を理解する上で極めて重要である。本研究では、細孔性物質として柔軟性界面をもち、生体膜に近いデキストラン高分子ゲル Sephadex G-15 に注目した。DSC 測定から求めた、細孔水が過冷却状態であると考えられる水和レベルでの低温 X 線測定、および中性子スピネコー測定から、細孔内の過冷却水の構造とダイナミクスを調べた。

【実験】試料：市販の Sephadex G-15 (Amersham Biosciences) を真空乾燥後、水和率  $h$  (=吸着水の質量 g / 乾燥ゲルの質量 g) が 0.24 と 0.46 まで水を加えて密封し、353 K で 3 時間放置した。DSC 測定は、冷却装置を備えた Exter 6000-DSC6100, Seiko Instruments を用いた。試料の水和率は  $h = 0.24 - 1.38$ 、測定温度範囲は 173 - 298 K である。冷却速度は  $2 \text{ K min}^{-1}$ 、昇温速度は  $1 \text{ K min}^{-1}$  で測定した。X 線回折測定は、イメージングプレート検出器を用いた迅速 X 線回折装置 (Bruker AXS, DIP301) と X 線源 MoK $\alpha$  (波長 0.7107 Å) を用いた。電圧は 50 kV、電流は 200 mA、露光時間は 1 時間である。水和および乾燥試料は、それぞれガラスキャピラリー 2.0 mm $\phi$  に封入し、173 - 298 K で測定した。また、クライオスタットを用いて低温度調節を行った。水和試料と乾燥試料の構造関数をフーリエ変換し、それぞれの動径分布関数を得た。細孔中の水の散乱強度を導出するために、水和試料の動径分布関数から乾燥試料の動径分布関数を差し引くことにより、差動径分布関数を得た。中性子スピネコー測定は Hahn-Meitner 研究所(独)の SPAN 分光器を用いた。測定温度は 320-200 K および 50 K である。フーリエ時間の範囲は 0.01-0.5 ns、散乱ベクトル  $Q$  の範囲は  $0.38-2.37 \text{ \AA}^{-1}$  である。分解能関数として 50 K のデータを用いた。

【結果と考察】様々な水和レベル  $h$  において氷結に伴う DSC 発熱ピークを最小二乗法により解析した結果、Sephadex G-15 ゲル中の水は、バルク水(Peak I)、融点の異なる 3 種類の凍結水(Peaks II, III, IV)、不凍水に分けられることが明らかになった(図 1)。 $h = 0.28$  以下では、融解ピークは観測されず、不凍水のみが存在すると考えられる。Sephadex G-15 細孔水の X 線差動径分布関数(図 2)では、水の第一近傍 O-O 結合のピーク(2.82 Å)と第二近傍 O-O 相互作用のピーク(4.5 Å)はバルク水に比べてより小さくブロードになった。ま

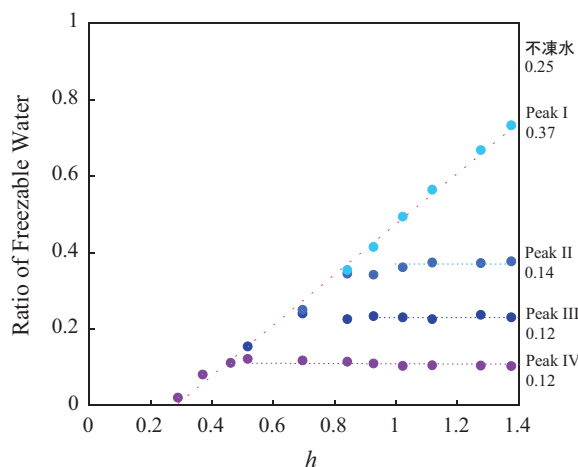


図 1 DSC 融解曲線ピーク分割の成分分布表

た、第三ピーク(8 Å)はバルク水に比べて1 Å 長く観測された。これは、空間的制限やゲル界面との相互作用により、水分子間の水素結合が歪んでいるためと考えられる。また、低温になるにつれて、第一近傍の O-O 原子間距離は  $h=0.46$  では 2.85 Å(278 K)~2.80 Å(213 K),  $h=0.24$  では 2.87 Å(273 K)~2.83 Å(213 K)それぞれ 0.05 Å, 0.04 Å 短くなり、細孔水の水素結合性が高まった。中性子スピンエコー測定では、低温になるにつれて中間散乱関数の緩和は小さくなり、細孔水の運動性が低下することが確認された(図3)。

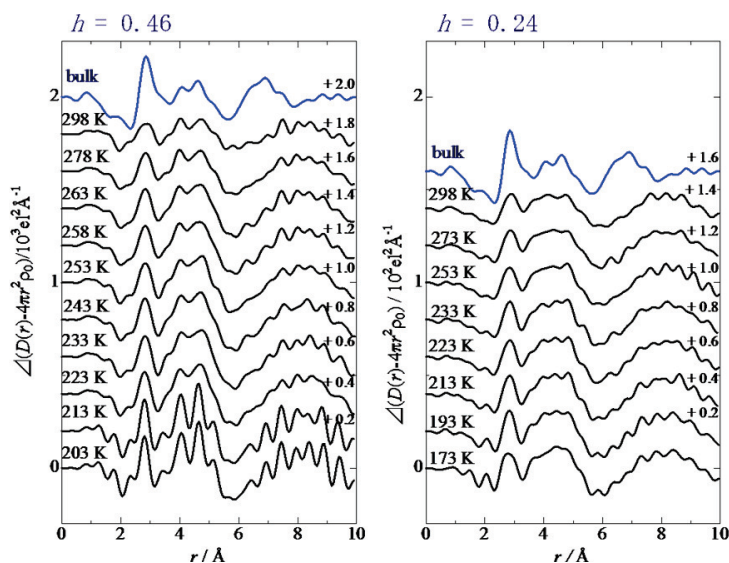


図2 Sephadex G-15 細孔水の X線差動径分布関数

中間散乱関数は式(1)で解析した。

$$I(Q,t)/I(Q,0) = (1 - p(Q))A(Q) \exp\left\{-\left(\frac{t}{\tau(Q)}\right)^{\beta(Q)}\right\} + p(Q) \quad \dots (1)$$

ここで、 $A(Q)$ は Debye-Waller 因子、 $\tau(Q)$  は緩和時間、 $\beta(Q)$  は指数である。 $p(Q)$  は弾性散乱項で、主に Sephadex G-15 からの寄与である。

320 Kにおける自己拡散係数  $D$  は、式(2)より求めた。

$$\frac{1}{\tau} = DQ^2 \quad \dots (2)$$

その結果、細孔水の自己拡散係数 ( $1.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) はバルク水 ( $3.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ , 323 K) に比べて約 30 倍遅くなることが明らかになった。また、320 K より低温では緩和時間に対する  $Q$  依存性はなく、測定空間内では水分子の並進運動は束縛されている。G15 ゲル細孔水 (水和率 0.38) は 220 K まで不凍水であり、緩和時間の温度依存性から非アレニウス型の Fragile 液体の挙動を示した。本研究で得られた自己拡散係数の値は、タンパク質であるウシの血清アルブミンの水和水の自己拡散係数の値  $2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  (298 K) [2]に相当し、G15 ゲル細孔水の運動は生体水に類似している。

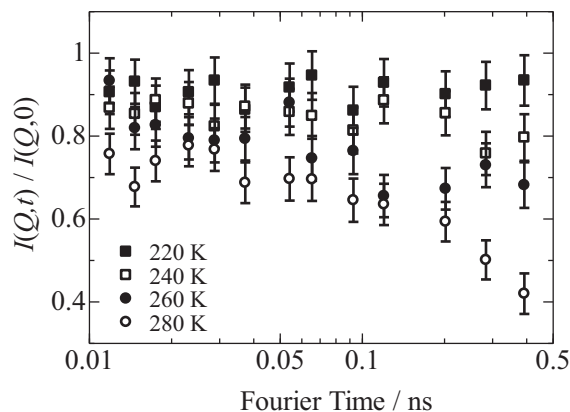


図3 種々の温度で測定された Sephadex G-15 細孔水( $h=0.38$ )の中間散乱関数

【文献】 [1] S.-H. Chen, et al. *PNAS*, **103**, 9012 (2006). [2] 上平恒、多田羅恒雄 著、水の分子生理、メディカル・サイエンス・インターナショナル,1998, p.80.