

## 2B14

### X線非弾性散乱測定による水和タンパク質の集団ダイナミクス

(福岡大理, 広島工大工\*, 理研・SPring-8/JASRI\*\*) ○吉田亨次, 山口敏男, 細川伸也\*, Baron Alfred Q. R.\*\*

【序】現代の生物物理学において、タンパク質の構造・運動・機能の相関を明らかにすることは急務の課題である。これらの相関関係にタンパク質に水和している水が大きく関与していることが言われており、水和状態でのタンパク質や水和水分子の運動が注目されている。水素原子の非干渉性散乱を利用した中性子非弾性散乱などにより、タンパク質に水和している水分子の単一粒子運動は数多く研究されている[1]。一方、干渉性散乱を利用した水和タンパク質の集団ダイナミクスの測定例は少なく、我々の知るところ、ribonuclease A の中性子 Brillouin 散乱[2]、lysozyme および bovine serum albumin のX線非弾性散乱[3]の測定結果があるだけである。単一粒子運動と集団ダイナミクスの両方の測定は水分子の水素結合に関するより詳細な情報を与えると考えられる。本研究では、水を吸着させた $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG)粉末および $\beta$ -LG水溶液のX線非弾性散乱を室温において行い、集団ダイナミクスを観測した。得られた動的構造因子  $S(Q, \omega)$  を Damped Harmonic Oscillator モデルで解析して、DHO 励起エネルギーと半値半幅(DHO 緩和因子)について、他の水和タンパク質の中性子・X線散乱や計算機実験の結果と比較した。

【実験】  $\beta$ -LG (純度 90%以上)は SIGMA-ALDRICH から購入したものをそのまま用いた。ターボ分子ポンプで一日間、真空乾燥させたものを乾燥試料とした。乾燥 $\beta$ -LG を飽和水蒸気中で放置し、水和率(=吸着水の質量/乾燥 $\beta$ -LG の質量)が 0.5 になった時点で取り出したものを吸着試料とした。一方、水和率が 1.0 になるように乾燥 $\beta$ -LG を水に溶解した試料を溶液試料とした。サファイア棒で同心二重管を作成し(窓厚は 0.15 mm)、光路長が 5 mm になるように外管と内管の間に試料を充填し、エポキシ接着剤でシールした。

高分解能X線非弾性散乱測定は SPring-8 BL35XU で実施した。測定した  $Q$  の範囲は  $2\text{-}17 \text{ nm}^{-1}$  である。エネルギー $\pm 35 \text{ meV}$  の範囲で2から3回の掃引を繰り返した。同一試料では個々のスキャンにおけるスペクトルの有意の変化はなく、X線照射による試料の損傷の可能性は少ないと考えられる。5 mm 厚さの plexiglas の散乱も測定し、装置の分解能関数とした。また、空セルの測定も行った。

#### 【結果および考察】

吸収補正後の試料の散乱から空セルの散乱を差し引いた。乾燥試料の  $S(Q, \omega)$  はほとんど分解能関数と同じであった。水和率 0.5 および 1.0 の両方の試料において、 $S(Q, \omega)$  に非弾性散乱のピークが見られた。乾燥試料ではこのような励起は見られないことから、水和率 0.5 以上では、水和によってタンパク質の集団ダイナミクスが大きく変化することがわかった。これは、水和率 0.38 以上でタンパク質の運動に非調和性が生じる[1]ことと関連していると思われる。水和率 0.5 および 1.0 の試料の  $S(Q, \omega)$  の解析には以下の DHO モデルを使用した。

$$S(Q, \omega) = \frac{\hbar\omega/k_B T}{1 - \exp(-\hbar\omega/k_B T)} \left[ \frac{A_0}{\pi} \frac{\Gamma_0}{\Gamma_0^2 + \omega^2} + \frac{A_Q}{\pi\hbar/k_B T} \frac{4\omega_Q\Gamma_Q}{(\omega^2 - \Omega_Q^2)^2 + 4\omega^2\Gamma_Q^2} \right]$$

ここで、 $\omega_Q = \sqrt{\Omega_Q^2 - \Gamma_Q^2}$  である。 $A_0$  と  $\Gamma_0$  は中心のローレンツ関数の強度と半値半幅で、 $A_Q$ ,  $\Omega_Q$ ,  $\Gamma_Q$  はそれぞれ DHO 成分の強度、励起エネルギー、半値半幅である。

図 1 に水和率 0.5 の試料について、 $\Omega_Q$  の  $Q$  依存性を示した。 $Q$  が  $9 \text{ nm}^{-1}$  付近までは、 $\Omega_Q$  は  $Q$  に対して比例関係にあり、最小自乗法により動的音速を求めると、 $2895 \pm 170 \text{ ms}^{-1}$  であった。また、水和率 1.0 について、動的音速の値はほぼ同じであった。これらはバルクの水の値  $3000 \text{ ms}^{-1}$  と比べるとやや低い値である。一方、中性子 Brillouin 散乱の結果[2]では、タンパク質に水和している水分子の動的音速は  $3200\text{-}3520 \text{ ms}^{-1}$  を示しており、バルク水よりもやや高い。同一の系の MD 計算からも同じ傾向の結果が得られている[4]。これらの報告は本研究の結果とはやや異なっているが、これは、本研究では水和水のみならずタンパク質構成原子からの散乱も含まれているためであると推測される。

図 2 に水和率 0.5 の試料について、DHO 半値半幅  $\Gamma_Q$  の  $Q$  依存性を示した。 $Q$  が  $10 \text{ nm}^{-1}$  付近までは  $\Gamma_Q$  は  $Q$  に対して比例関係にある。水和率を変化させてもその傾向は変わらなかった。中性子 Brillouin 散乱では、水和水の  $\Gamma_Q$  は  $Q$  に対して比例関係にあり、本研究の結果と一致した[2]。一方、バルク水の  $\Gamma_Q$  は  $Q$  について比例関係にある[5]。水和水とバルク水に見られる、 $\Gamma_Q$  の違いは水素結合ネットワークの発達度を反映していると思われる。 $\Gamma_Q$  が  $Q$  とともに増加することから、水和水はバルク水よりも秩序性が減少していると考えられる[2]。三次元ネットワーク構造をとるバルク水と異なり、タンパク質の表面水は部分的にネットワーク構造が壊れており、この違いが  $\Gamma_Q$  に反映されたと思われる。

[1] W. Doster, et al., Nature **337**, 754-756 (1989). [2] A. Orecchini, et al., J. Am. Chem. Soc., **131** (13), 4664-4669 (2009). [3] D. Liu, et al., Phys. Rev. Lett. **101** (13), 135501-1-4 (2009). [4] M. Tarek, et al., Phys. Rev. Lett. **89** (27), 275501-1-4 (2002). [5] F. Sacchetti, et al., Phys. Rev. E **69**, 061203-1-11 (2004).

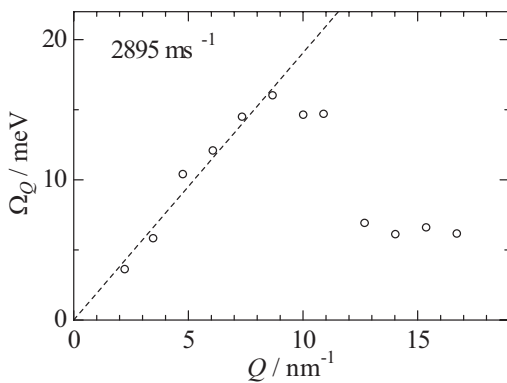


図 1. 水和率 0.5 の試料について DHO 関数の励起エネルギーの  $Q$  依存性。数値は破線から求めた動的音速。

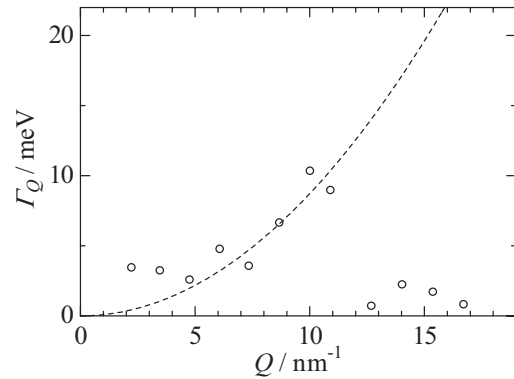


図 2. 水和率 0.5 の試料について DHO 関数の半値半幅の  $Q$  依存性。破線は  $Q$  によるフィッティング結果。