4P047

固体 ^{2}H NMR によるタンパク質結晶中の水和水のダイナミクスの研究

（金沢大院・自然） ○宮東達也、神戸康行、新屋隆士、大橋竜太郎、井田朋智、水野元博

【序】

近年、タンパク質結晶は新規の機能性材料として注目されており、様々な物性研究が行われている。タンパク質結晶は多くの水分子を取り込むことができ、水分子の局所構造やダイナミクスはタンパク質結晶の物性に大きく影響を与える。本研究では固体 ^{2}H NMR 法を用い、ウシ血清アルブミン(BSA)結晶中の水和水のダイナミクスについて調べた。

BSA は分子量約 66000 であり、血清中に最も多く含まれるタンパク質である。生体内では血液の浸透圧保持や脂肪酸、金属イオンなどの保持・運搬の機能を持つ。BSA は熱測定によって複数のガラス転移の存在が確認されている[1]。190 K 付近では不定形のペプチド鎖の局所的な運動の凍結によるガラス転移が存在する。また 110 K ではタンパク質に直接水素結合した水分子の運動の凍結によるガラス転移が、120-160 K の温度範囲ではタンパク質内部に取り込まれた水分子の運動の凍結によるガラス転移が存在する。

本研究ではガラス転移前後での水和水の運動モード、運動の速さの変化について調べ、タンパク質結晶のガラス転移と水和水のダイナミクスの関係を明らかにすることを目的とした。

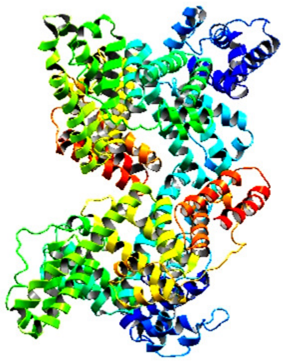

Fig. 1 Structure of serum albumin. (Protein Data Bank Japan (PDBj))

【実験】

測定試料は、BSA 結晶を重水から再結晶し、さらに重水蒸気を吸着させることで水和量を調整したものを用いた。^{2}H NMR の測定には Chemagnetics CMX-300 を用い、共鳴周波数 45.282 MHz で行った。スペクトルの測定には四極子エコー法及び QCPMG(quadrupolar Carr-Purcell Meiboom-Gill)法[2]を用いた。スピン-格子緩和時間(T_1)の測定には反転回復法及び飽和回復法を用いた。

【結果と考察】

Fig. 2 に ^{2}H NMR スペクトルの温度変化を示す。293 K では中心付近のシャープな成分が支配的である。室温付近では水分子の多くは速い等方回転運動をしていることが分かった。温度低下に伴い±60 kHz 付近にピークを持つブロードな成分の増加がみられ運動性が低い水分子の割合が増加していることが分かった。これはタンパク質内部に取り込まれた水分子によるものと考えられる。温度低下に伴い中心のシャープな成分の線幅は増大しており、低温では水分子の運動が束縛されていることが分かった。しかし中心のピークがブロードになりつつも消えないことから一部の水分子はかなりの低温まで速い運動をしていることが分かった。これはタンパク質と直接水素結合した不凍水であると考えられる。

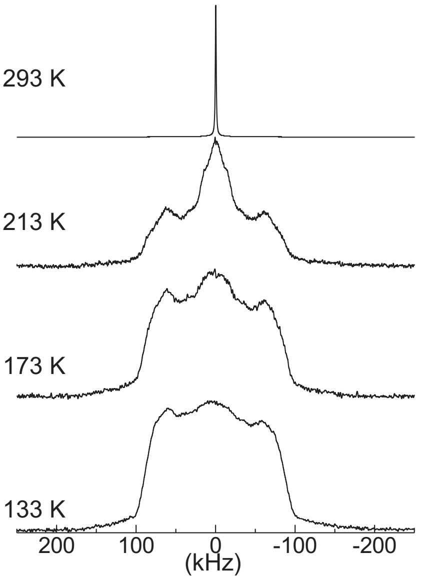

Fig. 2 Temperature dependence of ^{2}H NMR spectra .

Fig. 3 にスピン-格子緩和時間(T_1)の温度変化を示す。磁化の回復は単一の指数関数とならず、Short と Long の二成分に分けることができた。

Short 成分は 190 K 以上ではスペクトルの中心付近のシャープな成分に対応し、T_1 は 250 K 付近で極小を示した。Short 成分の T_1 はこの温度領域では水分子の速い等方回転によって支配されている。T_1 の温度変化より水分子の等方回転運動の活性化エネルギーは 17 kJmol^{-1} と求められた。190 K 以下では Short 成分の T_1 の温度変化は指数関数の温度依存性へと変化した。これは水分子の等方回転が凍結し 2 回軸周りの 180º フリップに変化したためと考えられる。180º フリップの活性化エネルギーは 12 kJmol^{-1} と求められた。190 K 以上での Long 成分の T_1 の温度変化は指数関数の温度依存性を示した。190 K 以下では指数関数の温度変化からのずれが見られた。

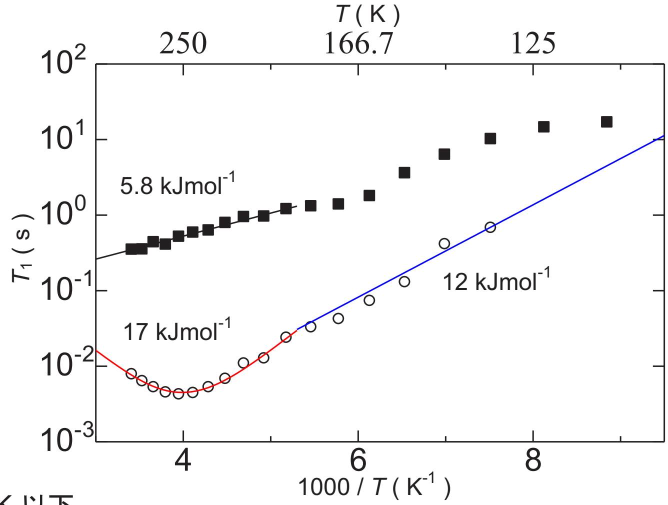

Fig. 3 Temperature dependence of ^{2}H NMR T_1 .

Fig. 4 に飽和回復法による部分緩和スペクトルを示す。短い回復時間を用いることで T_1 の Long 成分を飽和させ Short 成分のみのスペクトルを得た。実線と破線はそれぞれ実測スペクトルとシミュレーションスペクトルを示す。

173 K 以下では Short 成分の実測スペクトルは速い 180º フリップのみのシミュレーションで再現された。また、水分子の H-O-H 角には分布が存在していることが分かった。173 K より高温では 180º フリップに加えて水分子の 2 回軸周りの揺らぎ運動を伴った 180º フリップを考慮することで実測スペクトルを再現できた。また室温付近では等方回転をしている水分子の割合が増加することが分かった。

スペクトルと T_1 から 170 K 以下では水分子の等方回転や 2 回軸周りの揺動運動のような大きな運動が凍結することが分かった。このためにペプチド鎖の運動も束縛され、ガラス転移を示すものと考えられる。さらに 110 K では速い 180º フリップをしている水分子の割合の顕著な減少が見られた。このことより 110 K でのガラス転移が不凍水の 180º フリップの凍結によるものであることが分かった。

当日は QCPMG スペクトルの測定結果も合わせより詳細を報告する。

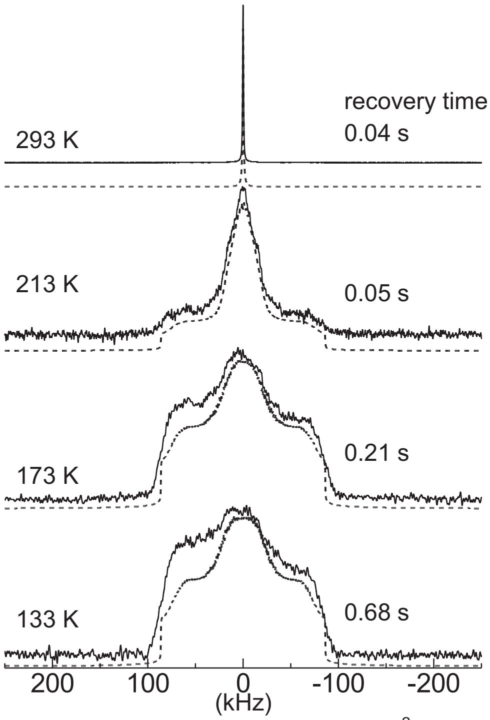

Fig. 4 Temperature dependence of ^{2}H NMR partially relaxed spectra of saturation-recovery experiment. The solid and broken lines show observed and simulated spectra, respectively.

【参照文献】

[1] K. Kawai, T. Suzuki, and M. Oguni, *Biophys. J.* **90**, 3732(2006).

[2] F. H. Larsen, H. J. Jakobsen, P. D. Ellis, and N. C. Nielsen, *Chem. Phys. Lett.* **292**, 467(1998).