

(金沢大院・自然) ○大橋 竜太郎、梶川 敬雄、水野 元博

## 【序】

近年、タンパク質結晶は新規機能性材料として期待されている。タンパク質結晶中には多くの水和水が存在しており、その物性に大きな影響を及ぼしている。よって、水和水の局所的な動的構造解析はタンパク質の構造と物性の関係を知る上で非常に重要である。

これまで当研究室ではトリ卵白リゾチーム結晶中の水和水の動的構造解析を行ってきており、2つの異なる運動モードを持つ水分子が存在することがわかっている。しかし、リゾチームと水和水の局所的な関係は明らかにされていない。そこで本研究では、水和量の異なる3種のトリ卵白リゾチーム結晶について、通常四極子エコー法と<sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H磁化移動を利用した四極子エコー法の、2つの測定法によって室温における<sup>2</sup>H NMRスペクトルを測定し、シミュレーション解析によって水分子の運動モードを解析した。また2つの測定法におけるスペクトルの違いから水分子とリゾチームの位置関係について考察した。

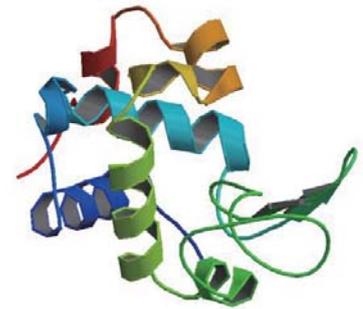


Fig. 1: トリ卵白リゾチームの結晶構造

## 【実験】

測定試料には、トリ卵白リゾチーム結晶を重水で3回再結晶し、乾燥時間を調節して水和量を変化させた3種の試料を用いた。<sup>2</sup>H NMR測定にはChemagnetics CMX-300を用いた。各試料に対し、磁化の励起に通常1pulse法と<sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H磁化移動を利用するVACP法[1]を用いて<sup>2</sup>H NMRスペクトルを得た。<sup>2</sup>H NMR観測には四極子エコー法[2]を用い、共鳴周波数は45.29 MHzで行った。

## 【シミュレーション】

Fig.2にスペクトル解析で用いた水分子の運動モードを示す。(a)は静止状態、(b)は振動運動、(c)は等方回転運動である。<sup>2</sup>H NMRスペクトルの線形はD-O-D結合角( $\beta$ )、振動角( $\phi$ )、運動の速さ( $k$ )、四極子パラメータ( $e^2Qq/h$ )、非対称因子( $\eta$ )に依存する。ここでTable.1のパラメータを用いると静止状態、振動運動、等方回転運動のシミュレーションスペクトルはそれぞれFig.2の(d), (e), (f)のよう

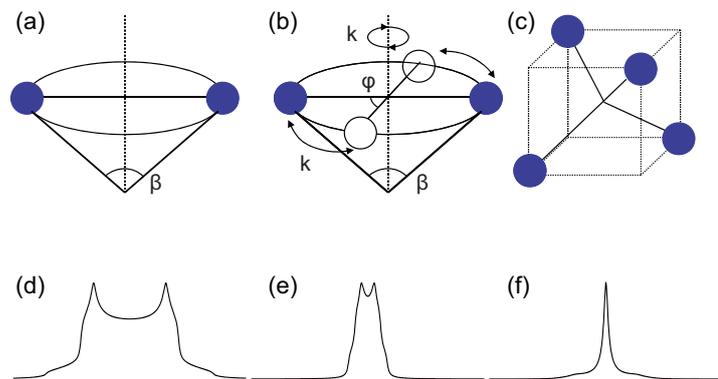


Fig. 2: 水分子の運動モードのモデルとそのモデルによるシミュレーションスペクトル。(a), (d)は静止状態の、(b), (e)は振動角 $\phi$ で振動する180度フリップの、(c), (f)は等方回転運動の、それぞれ運動のモデルとシミュレーションスペクトル

になる。上記5つのパラメータを変化させ、1pulse法とVACP法で得られたスペクトルを解析した。

## 【結果と考察】

Fig.3 に 3 つの試料のうち水和量が中間の試料の実測スペクトルとシミュレーションスペクトルを示す。(a) が single pulse 法 (1pulse 法)、(b) が VACP 法のスペクトルである。Table.1 に示したスペクトル強度比で静止状態、振動運動、等方回転運動のスペクトルを足し合わせると、実測と良い一致が見られた。

ここで 2 つの測定法の静止状態と振動運動の比の変化に注目すると、1pulse 法では約 8 : 2 であるのに対し VACP 法では約 7 : 3 である。VACP 法は  $^1\text{H}$  と  $^2\text{H}$  の双極子-双極子相互作用による磁化移動を利用しているため、VACP 法によって割合が増加した振動運動をする水分子は、 $^1\text{H}$  が多い、または  $^1\text{H}$  に近接する位置に存在すると考えられる。よって、リゾチーム内部の  $^1\text{H}$  が密な空間には振動運動をする水分子が、リゾチーム外側の  $^1\text{H}$  が少ない空間には運動性の小さい水分子が存在する事が示唆された。また 1pulse 法で大きな割合を占めた等方回転運動をする水分子は VACP 法では観測されなかった。これは回転運動のために VACP 法による磁化移動がほとんど起こらないためと考えられる。このため VACP 法による等方回転運動をする水分子の位置の推定は出来ないが、束縛の少ない領域にあると考えられることから、リゾチームから離れていると考えられる。

以上のように、VACP 法によりリゾチーム内部の情報を選択的に取り出し、運動モードとリゾチーム分子との大まかな位置関係を知ることができた。当日は、他の水和量のリゾチームの測定結果も発表する。

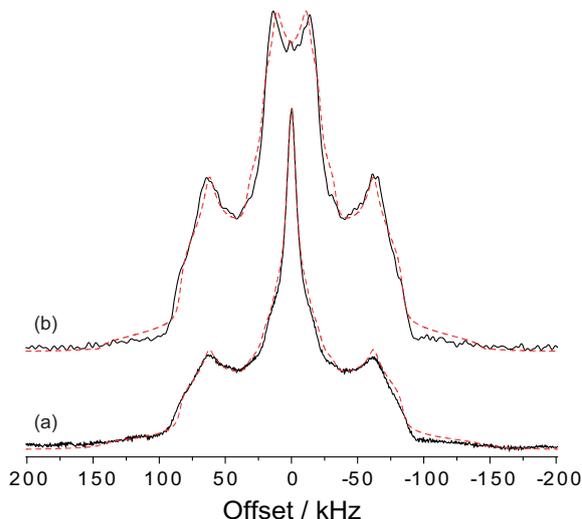


Fig. 3: (a) 1pulse 法と (b) VACP 法を用いて測定した重水と水和したトリ卵白リゾチームの  $^2\text{H}$  NMR スペクトルと、Table 1 のパラメーターを用いて計算したシミュレーションスペクトル。実線は実測スペクトル、点線はシミュレーションスペクトルを表す。

Table.1 シミュレーションに用いたパラメータとスペクトル強度比

運動モード	計算に用いたパラメーター					スペクトル強度比	
	$\beta$	$\phi$	$k$	$e^2Qq/h$	$\eta$	1pulse	VACP
静止状態	—	—	0 Hz	195 kHz	0.15	3.5 %	68.0 %
振動運動	104.0 °	70.0 °	$1.0 \times 10^7$ Hz	230 kHz	0.00	0.8 %	32.0 %
等方回転運動	—	—	$6.0 \times 10^4$ Hz	230 kHz	0.00	95.7 %	—

## 引用文献

- [1] "Variable-Amplitude Cross-Polarization MAS NMR",  
O.B.Peersen, X.Wu, I.Kustanovich, S.O.Smith, J. Magn. Reson., A104, 334 (1993).
- [2] "DOUBLE-PULSE NUCLEAR-RESONANCE TRANSIENTS IN SOLIDS",  
J.G.POWLES and P.MANSFIELD, Queen Mary College, London (1962).