

2B09

固体重水素NMRによるトリ卵白リゾチーム結晶中の 水和水のダイナミクス解析

(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。

また、 ^1H から ^2H への磁化移動を用いた測定によりタンパク質の ^1H 原子と近接した ^2H のみの信号を観測し、

タンパク質周辺の振動運動、準静止状態の水分子のNMR信号を得ることができた。

さらにこの測定により振動運動が準静止状態よりも ^1H が多い場所にあることが示唆された。本研究ではリゾチーム結晶水和水の解析をより詳細にするため、温度変化に対するタンパク質周辺の水分子の挙動を試料を冷やしながらか ^1H - ^2H 磁化移動実験を行った。

【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含量を変化させた3種の試料を用いた。リゾチームは交換可能な ^1H は重水置換によってほぼ ^2H に置き換わることが知られており[1]、交換する可能性のあるタンパク質の ^1H はほとんど ^2H と交換したものと考えられる。 ^2H NMR 測定には JEOL ECA-300 を用いた。各試料に対し、磁化の励起に通常の single pulse 法と ^1H - ^2H 磁化移動を利用する VACP 法[2] を用いて ^2H NMR スペクトルを得た。 ^2H NMR 観測には四極子エコー法[3] を用い、共鳴周波数は 45.29 MHz で行った。

【結果と考察】

Fig. 2 に 149 K から 301 K まで温度を変えて測定したリゾチーム結晶の、 ^1H - ^2H 磁化移動実験のスペクトルを、Fig. 3 に磁化の励起に磁化移動を行わずに直接観測を行う single pulse 法によるスペクトルを示す。VACP 法では ^1H と近接した ^2H が見られるのに対し、single pulse 法では試料内のすべての磁化を励起して観測する。また、それぞれ図の左に水含量が 0.08 h (水 g/タンパク g) の試料 (以下、Dry) のスペクトルを、右に水含量が 0.26 h の試料 (以下、Wet) のスペクトルを示した。Fig. 2 のスペクトルはどれも中心に振動運動に特徴的な線形、外側に ^2H NMR に関わる相互作用に対してほぼ静止とみなせる状態

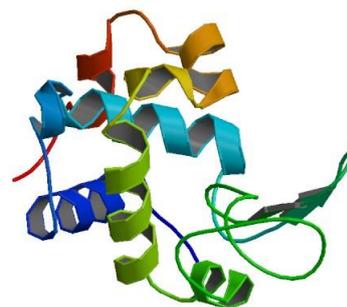


Fig. 1 トリ卵白リゾチーム
の結晶構造

(準静止状態)に特徴的な線形が見られた。振動運動と準静止状態の信号強度比は温度に対する変化が乏しく、リゾチームタンパク質周辺は 273 K でのバルクな水の凝固点の影響が小さいことが示された。また中心付近のピークに注目すると、徐々に線幅が太くなっており、振動運動が徐々に遅くなっていることが考えられる。

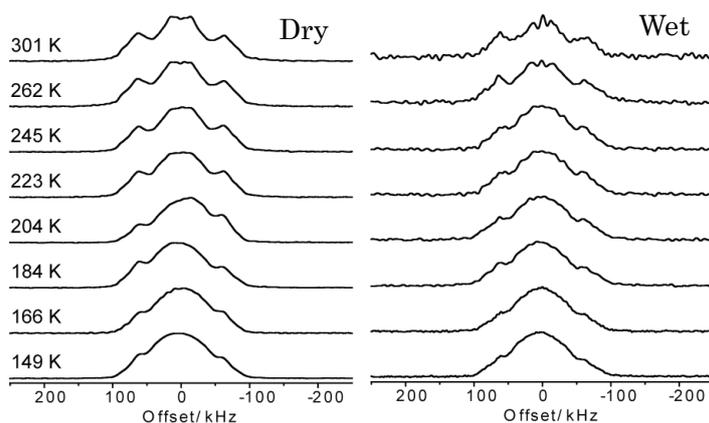


Fig. 2 温度変化に対するリゾチームの ^1H - ^2H 磁化移動実験

を用いた測定では、Wet の試料

でも Dry と同様の変化が見られたが、Dry よりも振動運動の割合が高い。これは、結晶中の水分子が Dry よりも多いため、振動運動の水分子が増えたと考えられる。

次に磁化移動によって得られたスペクトルと single pulse 法によるスペクトルとを比べると、single pulse 法の Wet と磁化移動実験とのスペクトルには大きな違いが見られた。また、対照的に Dry 試料の single pulse 測定では ± 60 kHz にみられる準静止状態の信号が

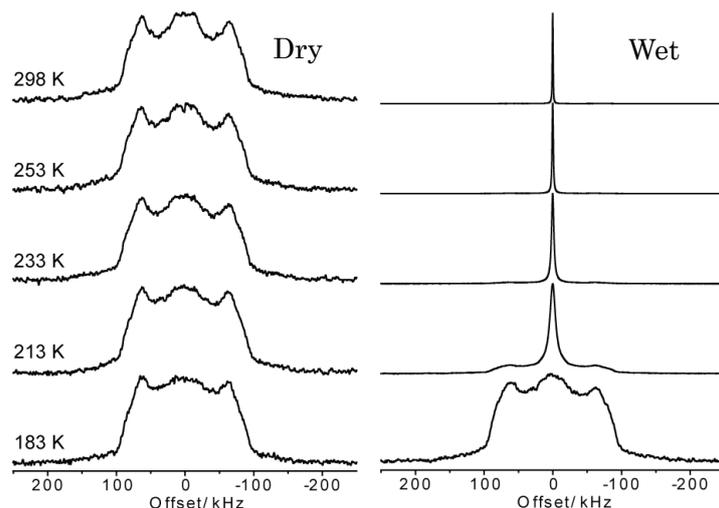


Fig. 3 温度変化に対するリゾチームの ^2H single pulse 実験

VACP 法よりも高いが、線形が温度に対して大きく変わらない、準静止状態と振動運動の比率に大きな変化がない、振動運動の線幅が温度低下とともに徐々に

増えていること、など VACP 法と共通する挙動が多く観測された。これは、Dry 試料では大部分の水分子がタンパク質と近接していることを示唆している。

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、温度変化に対するタンパク質周辺の水分子の挙動を知ることができた。当日は、運動モードによるスペクトル解析を行った結果も合わせて発表したいと考えている。

- [1] O.B.Peersen, X. Wu, I. Kustanovich, S.O.Smith, J. Magn. Reson., A104, 334 (1993).
- [2] J.G.POWLES and P.MANSFIELD, Queen Mary College, London (1962).
- [3] Wasył S. Hnojewyj and Lloyd H. Reyerson, J, J. Phys. Chem. B, 65, 1694 (1961)