

^1H - ^2H 相関 NMR を用いたアルブミン結晶中の 水和水の局所的なダイナミクス解析

(金沢大院・自然) ○金子 亮, 宮東 達也, 大橋 竜太郎, 水野 元博

【序】

近年、タンパク質は食品の分野だけでなく、様々な機能を持つことから医療や新規機能性材料開発など幅広い分野で活用されている。タンパク質の構造や機能には水和水している水分子が大きく影響しており、タンパク質を解析するためには水和水の状態を知る必要がある。しかし、軽水では水分子の運動性の解析が困難であるため、当研究室では ^2H NMR を用いてタンパク質結晶中の水分子の運動状態や温度による運動性の変化を調べてきた。

その1つに、牛血清アルブミン結晶中に運動状態の異なる水分子があることを明らかにしてきた。

そこで本研究では、タンパク質分子に近接している水分子の運動だけを選択的に見るため、タンパク質内の軽水素と水分子の重水素との双極子相互作用を利用する交差分極法によって ^1H - ^2H 間の磁化移動を利用した ^2H NMR 測定法の温度変化測定を行った。この手法で得られたスペクトルを用いて、アルブミン分子と近接した局所的な水分子の各温度におけるダイナミクスのシミュレーション解析を行った。

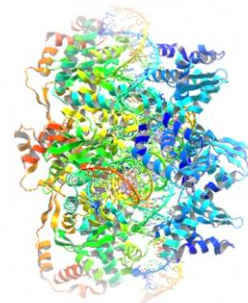


図1 アルブミンの結晶構造

(Protein Data Bank より)

【実験】

測定試料は水和水を重水置換した牛血清アルブミン結晶で行った。固体 NMR の測定には JEOL ECA-300 を用いた。 ^2H の共鳴周波数は 45.28 MHz、 ^1H の共鳴周波数は 294.98 MHz で測定した。磁化の励起には ^1H - ^2H 間の磁化移動を利用した交差分極法^[1]を用いた。また、前述の方法で得られた NMR スペクトルの線形を比較するため、磁化の励起に 90° パルス法を用いた場合の ^2H NMR 測定を行った。なお、 ^2H の観測のために四極子エコー法^[2]を両方の励起法に対して用いた。

【結果と考察】

解析にあたって、タンパク質結晶中の水分子の運動状態を、静止状態、2 回軸回りの振動を伴った 180° フリップ、回転運動の 3 種類を用いてスペクトル解析を行った。(図 2 参照)

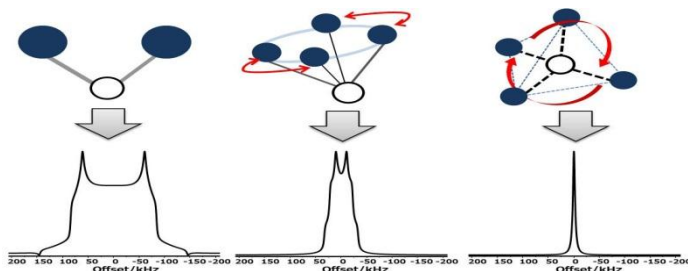


図 2 水分子の運動状態のモデルとその状態のシミュレーションスペクトル。左から順に静止状態、 180° フリップ、回転運動をそれぞれ図示している。

図 3 に 90° パルス法を用いた場合を、また図 4 では交差分極法を用いた時の各温度に対する実測スペクトル(実線)とシミュレーションスペクトル(破線)の解析結果を示した。実測スペクトルは 3 種の運動状態のスペクトルの足し合わせにより、シミュレーション解析ができた。

90°パルス法は直接全ての ^2H を励起させる方法である。一方で交差分極法は ^1H 核と ^2H 核の双極子-双極子相互作用を利用して ^1H の磁化を ^2H に移し換え、間接的に ^2H の磁化を励起させる方法である。つまり、前者ではアルブミン結晶中の全ての ^2H の運動状態を見ていることに対し、今回用いた後者ではアルブミン分子内の ^1H に近接した ^2H の運動性を抜き出して観測している。

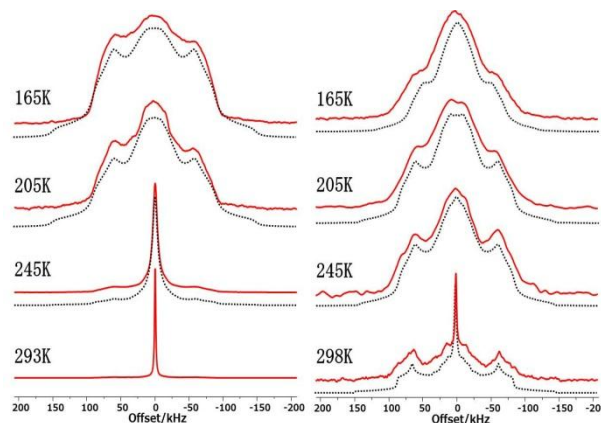


図3 90°パルス法の NMR スペクトル

図4 交差分極法の NMR スペクトル

図5, 図6に2つの測定法におけるシミュレーションで得られた各運動状態の面積強度比の温度変化を示した。

まず図5から、温度低下により回転運動の強度比は大幅に減少し、対照的に、より低温ほど静止状態の強度比は増加した。これより90°パルス法では、降温に伴って回転運動の大部分が静止状態に移ったと考えられる。次に図6では、低温においても3種の状態の強度比に大きな変化が見られなかった。このことから、90°パルス法で強度比が増加した静止状態は、交差分極法からはその増加が見られなかったため、増加した静止状態は ^1H から遠いところにあると考えられる。一般に、互いに静止している ^1H と ^2H の方が双極子相互作用が大きいので、運動性の低い ^2H の方が交差分極法で ^1H からの磁化が移動しやすい。しかし、温度低下にも関わらず3種の強度比の変化がほとんどないことから、 ^1H の周りには水分子の状態の割合は変化しないことが考えられる。以上の点から、回転運動から静止状態への凍結の多くがアルブミン分子から遠いところで起こっており、またアルブミン分子の ^1H の周囲では、温度低下に伴った運動状態の割合の変化が起こりにくい。その原因を、タンパク質の周りに不凍水があるため、 ^1H の周囲にある速い回転運動が静止状態へ凍結しにくいからではないかと考察した。このように、アルブミン分子内の ^1H に近接した ^2H の運動性だけを抜き出して解析することができた。

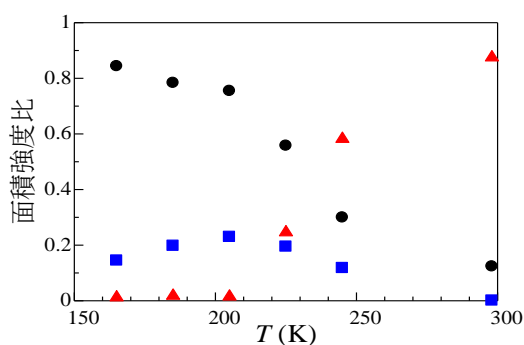


図5 90°パルス法の面積強度比の温度変化

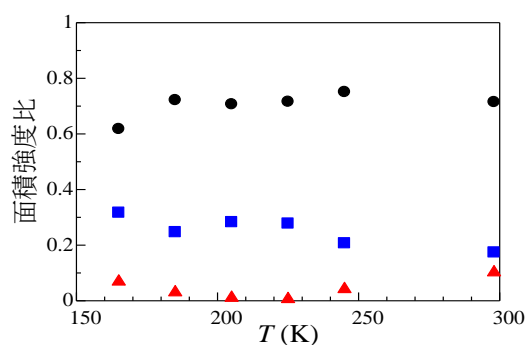


図6 交差分極法の面積強度比の温度変化

(●=静止状態、■=180°フリップ、▲=回転運動) 面積強度比は2つの測定法とも、その温度における3種の運動状態の面積強度の総和を1とした。

【参考文献】

[1] 第5版 実験化学講座 8巻 NMR・ESR 丸善株式会社

[2] T.M.Barbara, M.S.Greenfield, R.L.Vold and R.R.Vold, *J.Magn.Reson.* **69**, 311 (1986)