

$^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}/^2\text{H}$  相関NMRによる

リゾチーム結晶水和水のダイナミクス解析

(金沢大院・自然) 大橋 竜太郎、高畑 宏章、金子 亮、井田 朋智、水野 元博

Dynamical Analysis of Hydration Water in Lysozyme Crystal  
using  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}/^2\text{H}$  correlation NMR

(Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University)

Ryutaro Ohashi, Hiroaki Takahata, Ryo Kaneko, Tomonori Ida, and Motohiro Mizuno

【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、水和水の局所的なダイナミクス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となる。

これまで当研究室では固体NMRを用いた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、4サイト間の角振動運動（以下、振動運動）と等方的な回転運動の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、試料中のすべての $^2\text{H}$ を観測する測定法（Q-echo法）と $^1\text{H}$ からの磁化移動を用いてタンパク質中の $^1\text{H}$ の近傍の $^2\text{H}$ を観測する測定法（CP法）とを結晶水の水和量に対する変化(Fig. 1)と、CP法を用いた温度変化測定 (Fig. 2)

により、準静止状態よりも振動運動の水分子の方が、タンパク質近傍に多く存在することが示唆された。本研究では、 $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ を分離した解析を行うため、MQ-MAS法による $^2\text{H}$ の化学シフトと $^2\text{H}$ の四極子相互作用による線形との相関実験、及びCP法を用いた $^1\text{H}$ の $T_1/\rho$ の緩和時間による異種核2次元相関実験を行った結果について発表する。

【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、乾燥時間により水和量を調節した。リゾチームは交換可能な $^1\text{H}$ は重水置換によってほぼ $^2\text{H}$ に置き換わる

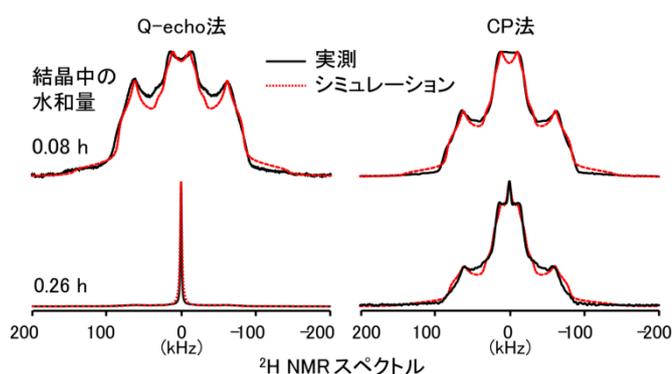


Fig. 1. 重水で結晶化したリゾチームの $^2\text{H}$  NMR スペクトル。測定法は、左がQ-echo法、右がCP法、水和量は上が0.08h (g 重水/g タンパク質)、下が0.26 h。

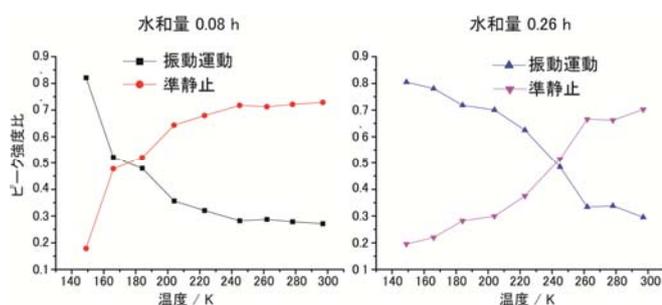


Fig. 2. 各運動状態のCP測定による強度比の温度変化。水和量は左が0.08h、右が0.26 h。

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 $^1\text{H}$ はほとんど $^2\text{H}$ と交換したものと考えられる。異種核相関測定には、ガラス管に封管した水和量0.08 h (g 重水/g タンパク質)の試料を用いた。MQ-MAS 測定には0.21 h とした粉末を JEOL-4mm MAS 用ローターに封じた試料を用いた。固体 NMR 測定はすべて JEOL ECA-300 により、7.4 T ( $^1\text{H}$  295 MHz,  $^2\text{H}$  45.3 MHz)の磁場中で、室温で行われた。

【結果と考察】Fig. 3 に重水で結晶化したリゾチーム結晶の $^2\text{H}$  MQ-MAS スペクトルを示す。MQ-MAS を用いると、F 1 観測 (図の縦方向) には、1 次の四極子相互作用を除いたスペクトルが現れるため、他の弱い相互作用 (化学シフト等方値など) による分離が可能となる。まず F 1 観測 (縦方向) の射影スペクトル (図の右側) に着目すると、Fig. 3 のように、6 ppm 付近と 8 ppm 付近にピークが観測された。また、8 ppm のピークの方が、6 ppm のピークよりもかなり広幅となっている。化学シフトと線幅から考察すると、6 ppm のピークは重水由来であり、水和の影響によってバルクな水の化学シフト 5 ppm から 1 ppm だけ低磁場シフトしていると考えられる。また、8 ppm 付近のピークは再結晶時にタンパク質中に取り込まれた $^2\text{H-N}$ 、及び $^2\text{H-O-C}$ 由来で、リゾチーム分子内の構造の違いにより広幅なピークを示していると考えられる。

次に F 2 観測 (図の横方向) の射影スペクトル (図の上側) に着目すると、大きく分けて線幅の異なる 2 つの粉末線形が重なった形となっている (線幅の小さい方を点線で示した)。F 1 観測と合わせると、線幅の小さい粉末線形はリゾチーム結晶中の水和水由来であり、水分子の運動により粉末線形の線幅が小さくなっていると考えられる。この運動としては、これまでの線形解析で得られた振動運動が該当すると思われる。また、F 1 観測 8 ppm、F 2 観測で広幅な粉末線形を示すピークから、タンパク質中に取り込まれた $^2\text{H}$ 原子核は、 $^2\text{H}$  NMR の線形を変化させるような運動をしていない準静止状態にあると考えられる。これまで結晶水和水とタンパク質中の $^2\text{H}$ の分離が困難であったが、Fig. 3 に示した化学シフトと四極子による粉末線形との相関により、室温では、振動運動している $^2\text{H}$ 原子核は重水中に、準静止状態にある $^2\text{H}$ 原子核はタンパク質中にある、と分離できた。 $^1\text{H}$ の $T_1$ / $^2\text{H}$ の $T_1$ の緩和時間による異種核 2 次元相関実験については、講演当日に説明する。

[1] Wasyl S. Hnojewyj and Lloyd H. Reyerson, J, J. Phys. Chem. B, 65, 1694 (1961).

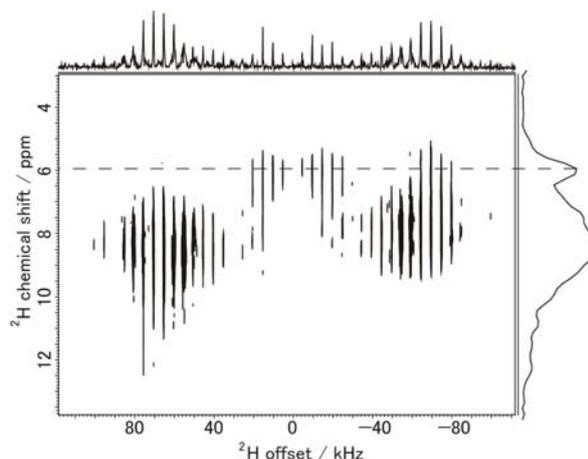


Fig. 3. 重水で結晶化したリゾチーム結晶の $^2\text{H}$  MQ-MAS の2次元スペクトルと射影スペクトル。横方向が $^2\text{H}$ のMAS下での主に四極子相互作用による粉末線形(横軸はオフセット周波数)、縦方向が $^2\text{H}$ の化学シフトによるスペクトルを示す。