

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22550024

研究課題名（和文） 不凍タンパク質の機能発現と水の動的クロスオーバーの関係

研究課題名（英文） Function of antifreeze protein and dynamic crossover of hydration water

研究代表者

吉田 亨次 (KOJI YOSHIDA)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：00309890

研究成果の概要（和文）：

魚類の血液に含まれる不凍タンパク質 antifreeze protein (AFP) の水の結晶成長制御機能と過冷却水の高密度水(HDL)と低密度水(LDL)転移の関連を調べるために、タンパク質水和水やタンパク質自身の構造とダイナミクスを中性子・X線散乱で観測した。AFPでもタンパク質のガラス転移(動的クロスオーバー)が観測されたが、水和水の液体構造には明確な変化はなかった。他のタンパク質水和水や多孔性無機材料に閉じ込められた水との比較により、水の HDL/LDL 転移について議論した。

研究成果の概要（英文）：

The correlation between the antifreeze effect of AFP and the structure and dynamics of hydration water of the protein was studied by X-ray and neutron scatterings (quasi-elastic neutron scattering, inelastic X-ray scattering, and X-ray diffraction) and MD simulation. Although the dynamic transition of the hydrated protein was observed, water structure of hydration water changed insignificantly. Compared with the result of hydration water of the other proteins and confined water in mesoporous materials, the transition between high density water and low density water was discussed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：生物物理・中性子散乱・タンパク質・水

1. 研究開始当初の背景

寒冷地に生息する魚類は体温が氷点下以下になっても、体液が凍結することなく、生命を維持することが可能である。これは血液

中に含まれる不凍タンパク質 antifreeze protein (AFP) のためである。AFP は氷/水成長界面に吸着し、水の結晶成長制御機能を発現すると考えられている。一方、氷のポリモルフィズム研究の蓄積により、三島

(物材機構)らは過冷却条件下で二種類の水(高密度水(HDL)と低密度水(LDL))が存在することを主張した。

申請者らは、多孔性シリカガラス(タンパク質親水表面のモデル系)に閉じ込められた水のダイナミクスに225K付近でHDL/LDL転移が生じることを見出した。さらに、中性子散乱測定によりリゾチーム表面水のダイナミクス測定において動的クロスオーバー(タンパク質のガラス転移)が225K付近であることが明らかにされた。以上の実験事実をもとに、申請者はタンパク質の機能発現に対する水の役割を考える上では、水のHDL/LDL転移を考慮することが不可欠であり、そのためには水やタンパク質分子の構造とダイナミクスの両方を観測することが最も適切であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

本研究は、魚類の血液に含まれる不凍タンパク質 antifreeze protein (AFP)の水の結晶成長制御機能を水和水の性質から議論することを目的としている。そのために、過冷却水の高密度水(HDL)と低密度水(LDL)転移の観点からタンパク質水和水やタンパク質自身の構造やダイナミクスを中性子・X線散乱で観測する。

不凍タンパク質 antifreeze protein (AFP)に水を吸着させた試料について、室温から180Kまでの温度範囲で、非弾性中性子散乱および非弾性X線散乱、X線回折を測定する。AFP水和水やAFP自身のダイナミクスや構造を明らかにする。比較対照のために、広く研究されているタンパク質(リゾチームなど)やバイオゲル(Sephadexなど)の水和水も測定する。以上の結果から、水とタンパク質において観測されているタンパク質のガラス転移、動的クロスオーバー、ならびに水のHDL/LDL転移の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 不凍タンパク質の中性子非干渉性準弾性散乱

FRM-II(独ミュンヘン)に設置されている飛行時間型中性子非弾性散乱分光器 TOFTOFを使用して、水を吸着させた不凍タンパク質の中性子非干渉性準弾性散乱を測定した。主に水素原子の単一粒子運動を観測した。不凍タンパク質はA/F protein社から購入し、水和率は0.4に調整した。試料粉末はアルミニウム製の平板状容器に封入し、分光器に設置されているクライオスタットに取り付けた。測定温度は290Kから50Kまでの範囲である。また、これまでに測定したバイオゲル中の水

や水とβ-ラクトグロブリンの再解析を行い、本研究の結果と比較した。

(2) 不凍タンパク質のX線回折測定

タンパク質のガラス転移が不凍タンパク質の水和水の構造変化によるものかどうか調べるために、(1)と同一の試料について、室温~140Kまでの温度範囲でX線回折測定を行った。比較のためにβ-lactoglobulinなどのタンパク質についても同様の測定を行った。試料は石英製の毛細管に封入し、低温窒素の吹きつけにより温度制御した。

(3) 高分解能X線非弾性散乱

X線散乱では中性子散乱と異なり、干渉性散乱の観測が可能であるため、水とタンパク質の集団ダイナミクスを明らかにすることができる。(1)と同一の試料について、SPRING-8にて、水を吸着させた不凍タンパク質の高分解能X線非弾性散乱を298Kから180Kで測定した。試料は石英製の毛細管に封入し、装置既設のクライオスタットに取り付けた。クライオスタットの内部は真空で、窓はベリリウムである。

(4) MDシミュレーション

上記の実験結果の詳細な解析と妥当性の確認のため、(1)から(3)と同一の系でMDシミュレーションを行った。PCクラスター計算機を購入し、ソフトはAmber11を使用した。

4. 研究成果

(1) 測定で得られた動的構造因子をローレンツ関数でフィッティングすることにより、準弾性散乱エネルギーを波数の関数として表わした。ローレンツ関数の半値幅は温度の低下とともに狭くなり、水和水分子の運動性が低下することを示した。220 K付近で分光器の測定分解能以下となった。つまり、他のタンパク質で観測されている水とタンパク質のガラス転移が不凍タンパク質においても観測された。

(2) 水とタンパク質の動径分布関数を図1に示した。乾燥状態のタンパク質からの散乱を差し引き、水和水の動径分布関数を得た。2.8Åと4.5Å付近にピークが見られ、水和水は水分子が二次元平面上に六員環を形成するように配置された構造を取っていることが示唆された。温度が低下すると、これらのピークはシャープになり、水の構造化が進行することがわかった。しかし、室温~140Kまでの温度範囲で水和水の動径分布関数に大

きな変化は見られなかった。これは、多孔性シリカに閉じ込められた水が 220K で HDL/LDL の転移を起こすことと異なっている。したがって、タンパク質のガラス転移は水和水の構造転移に起因するものではないとの結論を得た。さらに、比較のために β -lactoglobulin などのタンパク質の水和粉末についても同様の測定を行ったところ、タンパク質の違いにより水和水の構造に対する温度の影響が異なることも分かった。しかし、測定したいずれもタンパク質においても水和水の HDL/LDL 転移は見られなかった。

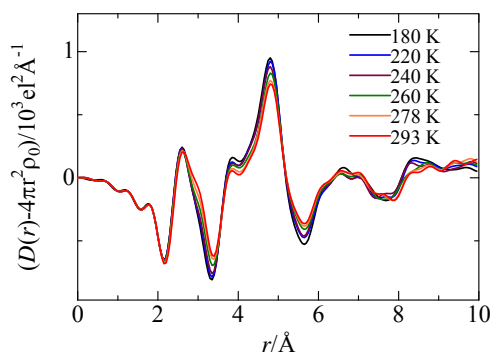


図 1. 水と AFP における動径分布関数の温度依存性

(3) 得られた動的構造因子に damped harmonic oscillator モデルを適用することにより、非弾性散乱エネルギーを求めた。そして、その波数依存性(図 2)から高周波音速を求めた。高周波音速はほとんど温度依存性がなく、不凍タンパク質の水和水の集団ダイナミクスは温度の影響を受けないと思われる。これは、中性子による非干渉性非弾性散乱実験で観測される単一粒子運動の温度依存性と大きく異なっていた。つまり、(2)の結果と同様に、タンパク質のガラス転移は水和水の構造転移に起因するものではないと考えられる。

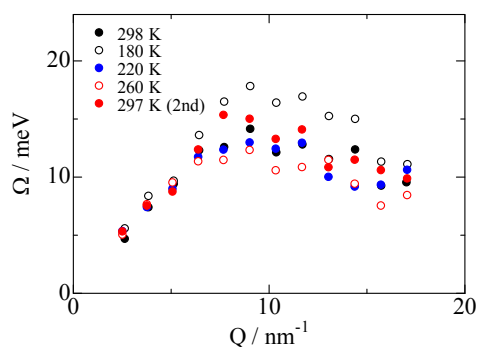


図 2. 水と AFP における波数と励起エネルギー

一の関係

(4) 計算により得られたトラジェクトリーの解析から、動径分布関数の温度依存性を求めた。その結果、温度の低下に伴い、水和水の液体構造は強化されたが、タンパク質の構造はほとんど温度変化しなかった。このことから、(1)から(3)で実験的に得られた水とタンパク質の構造とダイナミクスに対する温度依存性はほとんど水和水からの寄与によるものであると考えた。

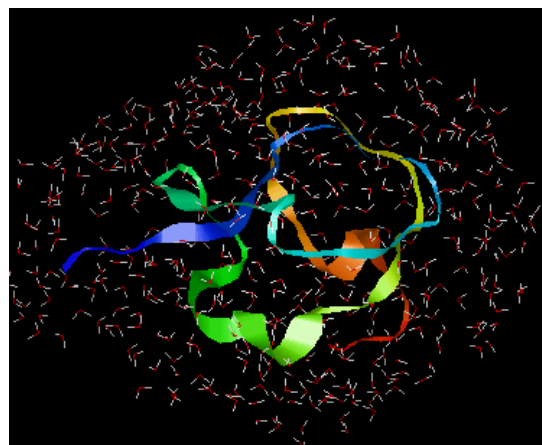


図 3. 水中の不凍タンパク質の MD シミュレーション

以上の結果から、(1)同じ不凍水ではあるが、タンパク質水和水は多孔性物質に閉じ込められた水とは性質が大きく異なる、(2)タンパク質水和水では、温度の低下とともに水構造の強化は見られるが HDL/LDL 転移は見られない、ことがわかった。また、(3)単一粒子運動の観測で見られた水とタンパク質のガラス転移は集団ダイナミクスの観測では現れず、生体分子の水和水のダイナミクスに関する新たな知見を与えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

[1] M. Aso, K. Ito, H. Sugino, K. Yoshida, T. Yamada, O. Yamamuro, S. Inagaki, T. Yamaguchi, “Thermal behavior, structure, and dynamics of low-temperature water confined in mesoporous organosilica by differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, and quasi-elastic neutron scattering”, *Pure Appl. Chem.*, 査読有, **85**, 289-305 (2013).

DOI: 10.1351/PAC-CON-12-06-02

[2] K. Ito, K. Yoshida, K. Ujimoto, T. Yamaguchi, “Thermal behavior and structure of low-temperature water confined in Sephadex G15 Gel by differential scanning calorimetry and large-angle X-ray diffraction measurements”, *Anal. Sci.*, 査読有, 29, 353-359 (2013).

DOI:10.2116/analsci.29.353

[3] K. Yoshida, K. Vogtt, Z. Izaola, M. Russina, T. Yamaguchi, M.-C. Bellissent-Funel, “Alcohol Induced Structural and Dynamic Changes in β -Lactoglobulin in Aqueous Solution: A Neutron Scattering Study”, *BBA - Proteins and Proteomics*, 査読有, 1824, 502-510 (2012).

DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.12.011

[4] T. Yamaguchi, S. Imura T. Kai, K. Yoshida, “Structure of Hexafluoroisopropanol-Water Mixtures by Molecular Dynamics Simulations”, *Z. Naturforsch.*, 査読有, 68a, 145-151 (2012).

DOI: 10.5560/ZNA.2012-0100

[5] 吉田亨次・早田 葵・麻生真以・伊藤華苗・橘高茂治・稲垣伸二・山口敏男, “メソポーラスシリカならびに規則性メソポーラス有機シリカ内に閉じ込められた水の構造とダイナミクス”, *分析化学*, 査読有, 61 (12), 989-998 (2012).

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.61.989

[6] K. Yoshida, T. Yamaguchi, S. Kittaka, M.-C. Bellissent-Funel, P. Fouquet, “Neutron spin echo measurements of monolayer and capillary condensed water in MCM-41 at low temperatures”, *J. Phys.: Condens. Matter*, 査読有, 24, 064101 (9pp) (2012).

DOI:10.1088/0953-8984/24/6/064101

[7] T. Yamaguchi, H. Sugino, K. Ito, K. Yoshida, S. Kittaka, “X-ray diffraction study on monolayer and capillary-condensed acetonitrile in mesoporous MCM-41 at low temperatures”, *J. Mol. Liq.*, 査読有, 164, 53-58 (2011).

DOI:10.4153/CMB-2011-148-0

[8] 山口 敏男, 吉田 亨次, 伊藤 華苗, 橘高 茂治, 高原 周一, “メソポーラス物質 MCM-41 中に閉じ込められた低温水の熱挙動, 構造とダイナミクス”, *分析化学*, 査読有, 60, 115-130 (2011).

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.60.115

[9] K. Yoshida, T. Yamaguchi, N. Osaka, H. Endo, M. Shibayama, “A Study of alcohol-induced gelation of beta-lactoglobulin with small-angle neutron scattering, neutron spin echo, and dynamic light scattering measurements”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 査読有, 12, 3260 - 3269 (2010).

DOI: 10.1039/b920187d

[10] K. Yoshida, S. Hosokawa, A. Q. R. Baron, T. Yamaguchi, “Collective dynamics of hydrated β -lactoglobulin by inelastic x-ray scattering”, *J. Chem. Phys.*, 査読有, 133(13), 134501 (7pp) (2010).

DOI: 10.1063/1.3484238

[学会発表] (計 8 件)

[1] 吉田亨次, 吉田絵里, 伊藤華苗, 山口敏男, “低温における β -ラクトグロブリンの水和水の構造”, 日本化学会第 93 春季年会, 草津, 3 月 23 日, 2013.

[2] 吉田亨次, 山口敏男, A. Q. R. Baron, “X線非弾性散乱による水とタンパク質の集団ダイナミクス”, 第 35 回溶液化学シンポジウム, 東京, 11 月 13 日, 2012.

[3] 吉田亨次, 山口敏男, “ β -ラクトグロブリンの会合状態に対するアルコールの影響”, 分子科学討論会 2012, 東京, 9 月 20 日, 2012.

[4] K. Yoshida, T. Yamaguchi, “Alcohol effect on structure, dynamics, and aggregation of peptide and protein”, EMLG/JMLG annual meeting, Eger (Hungary), 7 September, 2012.

[5] 吉田亨次, “メソ多孔体中の水の状態分析”, 第 72 回分析化学討論会「分析化学における現代の溶液反応化学」, 鹿児島, 5 月 20 日, 2012.

[6] 吉田亨次, 山口敏男, “水とタンパク質の X線非弾性散乱”, 第 25 回日本放射光学会年会, 佐賀, 1 月 7 日, 2012 年.

[7] K. Yoshida, T. Yamaguchi, S. Kittaka, M.-C. Bellissent-Funel, P. Fouquet, D. Bowron, “Structure and dynamics of low-temperature water confined in porous silica”, 8th Liquid Matter Conference, Wien (Austria), 8 September, 2011.

[8] K. Yoshida, T. Yamaguchi, S. Kittaka,
M.-C. Bellissent-Funel, P. Fouquet,
“Dynamics of Nano-confined Water”, 5th
European Conference on Neutron Scattering,
Prague (Czech), 20 July, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 亨次 (YOSHIDA KOJI)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：00309890

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

山口 敏男 (YAMAGUCHI TOSHIO)

福岡大学・理学部・教授

研究者番号：70158111