

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390130

研究課題名(和文) 集団ダイナミクスと液体構造解析によるタンパク質水和水の液体-液体相転移の研究

研究課題名(英文) Study on liquid-liquid transition of protein hydration water by collective dynamics and liquid structure analysis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：構造とダイナミクスの両方の情報が得られるX線・中性子散乱の利点を活かして、水とタンパク質、水とポリペプチドについて、298 Kから180 Kまでの水と構造と集団ダイナミクスを明らかにした。さらに、細孔内に閉じ込めた水やイオン液体が作るナノドメイン領域に溶解しているタンパク質・アミノ酸の水和状態について調べた。タンパク質のダイナミクスと水の構造との関連を明らかにし、生体分子の機能発現における水の役割について考察した。

研究成果の概要(英文)：Collective dynamics and structure of hydration water for hydrated proteins and polypeptides were investigated by neutron and X-ray scatterings in the temperature range of 298 - 180 K. Hydration structure of proteins and amino acids confined in mesoporous silica and nano-water domain formed in ionic liquid-water mixture. The relation between protein dynamics and water was clarified and the water role in protein function was discussed.

研究分野：溶液化学

キーワード：タンパク質 水と X線回折 中性子散乱

### 1. 研究開始当初の背景

水は 4 で密度が最大になるなど、他の液体に比べて異常な性質をもつことはよく知られている。この水の異常を液体構造の観点から説明するモデルとして、水の液-液臨界点(第2臨界点)仮説が注目されている。タンパク質水和水は 0 以下でも凍結しないため、水の液-液転移が生じると考えられる温度付近での性質が調べられている。水とタンパク質ではある温度で動的転移が生じることが様々な分光法から明らかにされており、生体分子と水の関わりを解明する糸口として、この両者の関連が注目されている。

### 2. 研究の目的

構造とダイナミクスの両方の情報が得られる X 線・中性子散乱の利点を活かして、水とタンパク質について、室温から 180 K までの水と構造と集団ダイナミクスを明らかにする。

さらに、示差走査熱量(DSC)測定を行い、タンパク質水和水の不凍水の割合や凍結温度を調べる。水とタンパク質の動的転移や水の液-液臨界点の観点から議論する。

また、細孔内に閉じ込めた水やイオン液体が作るナノドメイン領域に溶解しているタンパク質・アミノ酸の水和状態について、X 線回折、小角散乱などにより明らかにする。タンパク質の構造と水の構造との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) X 線・中性子回折によるタンパク質水和水の構造解析

ミオグロビン、リゾチーム、牛血清アルブミン、不凍タンパク質に水を蒸気吸着させ、水とタンパク質試料を作成した。水率は全ての水和水が不凍水である約 0.4 に調整した。この水率はタンパク質の動的力学転移の閾値である。室温から 180 K までの温度範囲で、X 線・中性子回折を行った。水とタンパク質の結果から乾燥タンパク質の散乱を差し引くことにより、水和水の構造情報を得た。また、同じ試料について DSC 測定を行った。凍結水の量ならびに凍結温度を明らかにした。

(2) X 線・中性子散乱による水とタンパク質・ポリペプチドの動的構造解析

水化したラクトグロブリン、不凍タンパク質、ポリグリシン、ポリリシンについて、室温から 180 K までの温度範囲で非弾性 X 線・中性子散乱を測定し、水とタンパク質の集団ダイナミクスを明らかにした。

(3) 細孔内に閉じ込めたアミノ酸水溶液の構造解析

メソ多孔性シリカ MCM-41 を合成し、グリシン、アルギニン分子の水溶液を細孔に導入した。X 線回折および DSC 測定を行い、溶液の構造、凍結温度や不凍水の量を明らかにした。

(4) タンパク質の構造安定性に対するイオン液体の効果

アルキルアンモニウム系イオン液体(MAN, EAN, PAN)と水の混合物はナノドメイン構造を持つことはよく知られている。ナノドメイン構造とタンパク質の構造の相関を明らかにするために、X 線小角散乱などによりイオン液体と水の混合溶液中のタンパク質の構造を調べた。

### 4. 研究成果

(1) Fig. 1 は X 線回折から得られた各温度におけるリゾチーム水和水の動径分布関数を示している。水とタンパク質から乾燥タンパク質の結果を差し引いて得られた。2.9 および 4.0 付近のピークは水の第 1 および第 2 配位圏にある水分子に相当する。温度が下がるにつれてこれらのピークは鋭くなり、ピーク位置は両者ともやや短距離側にシフトした。タンパク質水和水は不凍水であるが、温度の低下とともに水の構造性が強化されている。

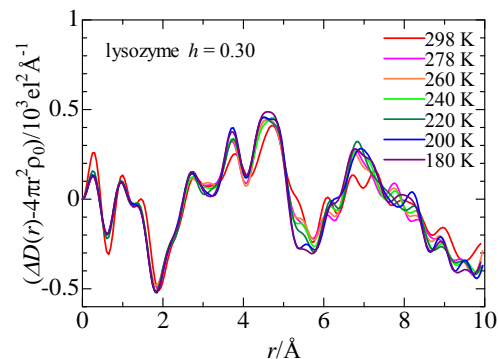


Fig. 1. X 線回折測定から得られたリゾチームの水和水の動径分布関数の温度依存性

一方、中性子回折については、装置ならび解析方法の検証のために、常圧や高圧下の重水や電解質重水溶液の構造解析を行ったところ、妥当な結果が得られた。しかし、軽水素原子を多量に含む本研究の試料については非弾性散乱効果の補正が確立できず、構造関数の導出までには至らなかった。継続して、補正方法の検討を行っている。

水化したミオグロビン、リゾチーム、牛血清アルブミンの DSC 測定より、水率約 0.8 では 240 ~ 260 K 付近で氷形成による発熱ピークが観測された。また、X 線回折では Bragg ピークの成長が見られた。一方、水率約 0.4 では発熱ピークならびに Bragg ピークは見られず、測定温度領域では水和水は凍結しないことが分かった。タンパク質の種類

によらずタンパク質第1層に存在する水和水は不凍水であると結論できる

(2) 水化した不等タンパク質ならびにポリリシンについて X 線非弾性散乱測定し、集団励起エネルギーを観測した。Fig. 2 に水化ポリペプチドの集団励起エネルギーを示した。

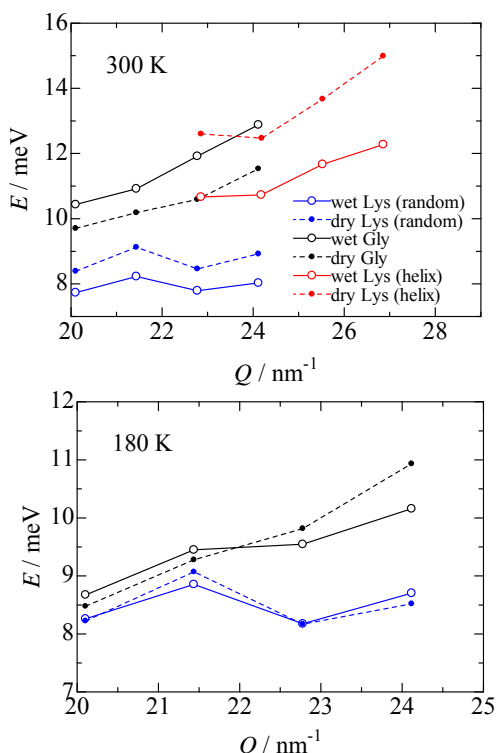


Fig. 2. 水化ポリペプチドの集団励起エネルギー

ポリペプチド試料について 180 K では、乾燥試料と水化試料の励起エネルギーの差は小さいが、300 K では、ポリリシン(ランダム状態、ヘリックス状態とも)について、水化試料のほうが乾燥試料よりも励起エネルギーが小さい結果が得られた。これはリゾチームなどで見られる phonon energy softening(生理学的温度で水とタンパク質の柔軟性が増大すること)と同一の現象である。一方、ポリグリシンでは、300 K において乾燥試料よりも水化試料のほうが励起エネルギーが高くなった。このことから、phonon energy softening はタンパク質の主鎖よりも側鎖が原因となっていることが示された。

また、励起エネルギーに対する水化の効果は 180 K よりも 300 K において顕著になることは、中性子準弾性散乱などで見られるタンパク質のガラス転移と同様に動的転移の一種であると考えられる。

さらに、水不凍タンパク質では、励起エネルギーは 180 K で 10%程度増加した。これも動的転移の一種だと考えられる。集団励起エネルギーの分散関係から、高周波音速の増加を示しており、フォノン領域のダイナミク

スにおいても動的転移がみられることがわかった。

同様に中性子非弾性散乱においても集団励起エネルギーを測定した。同位置換等により中性子散乱ではタンパク質の一部のダイナミクスの観測が可能になることが示唆された。

(3) メソ多孔性シリカ MCM-41 に閉じ込めたグリシン溶液について、DSC 測定と X 線回折測定を行った。グリシン濃度の増加に伴い、凝固点・融解点は下がり、固液相転移に起因する DSC ピークはブロードになった。細孔内に閉じ込めたグリシン溶液ではグリシン分子と細孔壁との相互作用に起因するピークが見られ、グリシン分子は細孔壁付近に位置していると考えられる。その結果、水分子は細孔中心部に位置しているとみられ、細孔内では溶液の相分離現象が生じていることが示唆された (Fig. 3)。グリシン濃度の増加にともない、温度低下による構造変化は小さくなる傾向にあった。グリシン濃度が増加すると、中心部に存在する水の量は低下し、細孔径のより小さな多孔性シリカに閉じ込められた水と類似した状態になっていると考えられる。そのため、凍結温度が減少し、凍結水の減少が見られたと思われる

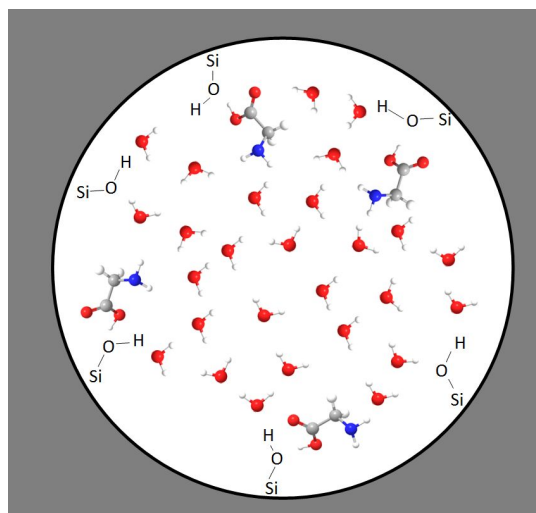


Fig. 3. 細孔中における水分子およびグリシン分子の分布状態

(4) Fig. 4 にリボヌクレアーゼ A の Guinier 半径( $R_g$ )のイオン液体の組成依存性を示す。SAXS プロファイルからは会合体を形成している傾向は見られなかった。 $R_g$  は MAN では 25 mol%、EAN では 15 mol%、PAN では 10 mol% で急激に増加し、イオン液体のアルキル鎖長と関連が見られた。イオン液体の濃度がさらに増加しても  $R_g$  は約 20 Å より増加しなかった。完全にアンフォールドした場合の  $R_g$  は 24 Å であり、タンパク質はモルテングロビウ

ール状態であると考えられる。Kratky プロットから、イオン液体が高濃度でもコンパクトな構造を保っていることを示している。

-ラクトグロブリン(100 mg/mL)の純水中での変性温度は 78 であったが、5 mol% MAN では 76、5 mol% EAN では 68 となり、アルキル鎖が長くなるに従い、変性温度が低下した。また、熱変性に伴う発熱ピークがブロードになった。X 線小角散乱の結果では、EAN と PAN 中でフラクタル次元が 1.8 程度の会合体が形成されることを示した。一方、MAN では NaCl 溶液の結果と類似していた。イオン液体と水の混合溶液では、アルキル鎖が長くなるとナノドメイン構造を形成しており、タンパク質の構造安定性と溶媒構造との関連が示唆される。

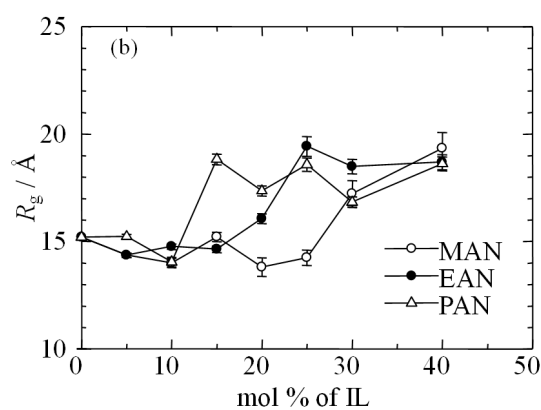


Fig. 4. アルキルアンモニウム系イオン液体水中のリボヌレアーゼ A の慣性半径

## 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 16 件)

[1] K. Yoshida, A. Q. R. Baron, H. Uchiyama, S. Tsutsui, T. Yamaguchi, "Structure and collective dynamics of hydrated anti-freeze protein type III from 180 K to 298 K by X-ray diffraction and inelastic X-ray scattering", *J. Chem. Phys.* (査読有) **144**, 134505 (2016).  
DOI: 10.1063/1.4944987

[2] K. Yoshida, A. Tashiro, T. Yamaguchi, "Thermal properties and hydration structure of poly-L-lysine, polyglycine, and lysozyme", *J. Mol. Liquids* (査読有), **217**, 57-61 (2016).  
DOI: 10.1016/j.molliq.2015.08.048

[3] T. Yamaguchi, T. Yonezawa, K. Yoshida, T. Yamaguchi, M. Nagao, A. Faraone, S. Seki, Relationship between Structural Relaxation, Shear Viscosity, and Ionic Conduction of LiPF<sub>6</sub>/Propylene Carbonate Solutions", *J. Phys.*

*Chem. B* (査読有), **119**(51), 15675-15682 (2016).

DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b08701

[4] 吉田 亨次, 鳥越 基克, 山口 敏男, 「メソ細孔性シリカ MCM-41 中のグリシンの水和構造」, 福岡大学理学集報 (査読有) **45**(2), 99-106 (2015).

[5] T. Takekiyo, E. Yamaguchi, K. Yoshida, M. Kato, T. Yamaguchi, Y. Yoshimura, "Interaction Site between the Protein Aggregates and Thiocyanate Ion in Aqueous Solution: A Case Study of 1-Butyl-3-methylimidazolium Thiocyanate", *J. Phys. Chem. B* (査読有), **119** (22), 6536-6544 (2015).

DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01650

[6] K. Yoshida, T. Yamaguchi, "Investigation of Protein Hydration with Quantum Beams", *BUNSEKI KAGAKU* (査読有) **64**(4), 283-293 (2015).

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.283

[7] T. Yamaguchi, K. Lee, M. Yamauchi, N. Fukuyama, K. Yoshida, "Visualization of 3D Structure of a Subcritical Aqueous Magnesium Nitrate Solution as Revealed by Raman Scattering, X-ray Diffraction and Empirical Potential Structure Refinement Modeling", *BUNSEKI KAGAKU* (査読有) **64** (4) 295-308 (2015).

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.295

[8] K. Ito, K. Yoshida, M.-C. Bellissent-Funel, T. Yamaguchi, Dynamic Properties of Water Confined in Sephadex G15 Gel by Quasi-elastic Neutron Scattering and Neutron Spin Echo Measurements, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (査読有) **87**(5), 603-608 (2014).

DOI: 10.1246/bcsj.20130328

[9] 山口敏男, 吉田亨次, 「中性子散乱による原子・分子のダイナミクスの観測 1 細孔中の水のダイナミクス 過冷却水の相転移」, *RADIOISOTOPES* (査読有) **63**(6), 331-342 (2014).

DOI: 10.3769/radioisotopes.63.331

[10] K. Yoshida, Y. Fukushima, T. Yamaguchi, "A study of alcohol and temperature effects on aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin by viscosity and small-angle X-ray scattering measurements", *J. Mol. Liquids* (査読有) **189**, 1-8 (2014).

DOI: 10.1016/j.molliq.2013.06.022

[11] K. Yoshida, T. Yamaguchi, D. Kawana, T. Yokoo, S. Itoh, "Neutron Brillouin scattering of hydrated  $\beta$ -lactoglobulin, *MLF Annual Report 2013*, (査読無) **3**, 33-34 (2014).

[12] K. Fujii, M. Shibayama, T. Yamaguchi, K. Yoshida, T. Yamaguchi, S. Seki, H. Uchiyama, A. Q. R. Baron, Y. Umebayashi, “Collective dynamics of room-temperature ionic liquids and their Li ion solutions studied by high-resolution inelastic X-ray scattering”, *J. Chem. Phys.* (査読有) **138**, 151101-1-4 (2013).

DOI: 10.1063/1.4946998

[13] S. Kittaka, S. Takahara, H. Matsumoto, Y. Wada, T. Satoh, T. Yamaguchi, “Low temperature phase properties of water confined in mesoporous silica MCM-41: Thermodynamic and neutron scattering study”, *J. Chem. Phys.* (査読有) **138**, 204714 (9 pages) (2013).

DOI: 10.1063/1.4807593

[14] 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**(3), 353-359 (2013).

DOI: 10.1063/1.4946998

[15] M. Aso, K. Ito, H. Sugino, K. Yoshida, T. Yamada, O. Yamamuro, 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**(1), 289-305 (2013).

DOI: 10.1063/1.4946998

[16] T. Yamaguchi, S. Imura T. Kai, and K. Yoshida, “Structure of Hexafluoroisopropanol-Water Mixtures by Molecular Dynamics Simulations”, *Z. Naturforsch.* (査読有) **68a**, 145-151 (2013).

DOI: 10.5560/ZNA.2012-0100

〔学会発表〕(計 8 件)

[1] K. Yoshida, T. Yamaguchi, S. Hosokawa, A. Q. R. Baron, “Collective dynamics of hydrated protein and polypeptides by Inelastic X-ray Scattering”, EMLG-JMLG annual meeting 2015, Rostock, September, 2015.

[2] K. Yoshida, T. Yamaguchi, T. Takekiyo, Y. Yoshimura, “Stabilization of  $\alpha$ -Helix structure of Ribonuclease A induced by Alkylammonium Nitrates”, EMLG-JMLG annual meeting 2015, Rostock, September, 2015.

[3] K. Yoshida, Y. Fukushima, T. Urabe, K. Ito, S. Kittaka, S. Inagaki, P. Fouquet, M.-C. Bellissent-Funel, J. Swenson, K. Elamin, T.

Yamaguchi, “Dynamics of low-temperature water confined in periodic mesoporous organosilica”, Workshop on Neutron Spin Echo, Oak Ridge, TN, May, 2015.

[4] K. Yoshida, T. Yamaguchi, “Thermal property, structure, and dynamics of hydrated proteins”, International Meeting on Applications of Statistical Mechanics of Molecular Liquids on Soft Matter, Bangkok (Thailand), September 2014 (invited)

[5] 吉田亨次、山口敏男、G. Simeoni, M.C. Bellissent-Funel, 「不凍タンパク質 III 型の水和水の構造とダイナミクス」, 第 37 回溶液化学シンポジウム, 佐賀県立男女共同参画センター・佐賀県立生涯学習センター (佐賀県・佐賀市), 2014 年 11 月

[6] K. Yoshida, T. Yamaguchi, “Structure and dynamics of hydrated proteins revealed by X-ray scattering”, EMLG/JMLG annual meeting, Lille (France), September, 2013.

[7] K. Yoshida, N. Fukuyama, T. Yamaguchi, S. Hosokawa, H. Uchiyama, S. Tsutsui, A. Q. R. Baron, “Collective dynamics of liquid benzene”, EMLG/JMLG annual meeting, Lille (France), September, 2013.

[8] K. Yoshida, T. Yamaguchi, “Terahertz dynamics and structure of hydrated protein studied by X-ray scattering”, 33rd International Conference on Solution Chemistry, Kyoto, July, 2013.

〔図書〕(計 1 件)

[1] 竹清貴浩, 吉村幸浩, 吉田亨次, 山口敏男, 「濃厚イオン液体条件下における蛋白質の立体構造」, 材料表面の親水・親油設計と制御, 第 10 章・分散系の自己組織化と階層構造, テクノシステム, 東京, 出版準備中

## 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