

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410022

研究課題名(和文) 水和数の精密制御による小さなタンパク質の折れ畳みの観測：真の駆動力は何か

研究課題名(英文) Observation of folding of small proteins with precisely controlled hydration

研究代表者

迫田 憲治 (Sakota, Kenji)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80346767

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)：タンパク質は、水系でその構造を安定化させているので、タンパク質の構造安定性にとって、周りの水和構造は極めて重要である。水和構造形成の主要な駆動力である水素結合は、系が持つ熱エネルギーによって、頻繁に解離と生成を繰り返していると思われる。よって、タンパク質の折れ畳みを理解するには、周囲を取り囲む水和構造の生成と崩壊、及びそれに伴う水和構造の組み替えまで考慮に入れる必要がある。本研究では、水和数を1分子レベルで精密に制御した生体関連分子の水和クラスターを真空中に生成し、このクラスターにレーザー多重共鳴分光法を適用することで、水和構造の動的な組み換えや揺らぎのに関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Hydration structure around proteins is one of the most important factors to characterize the stability of the proteins, because they stabilize their native structures in aqueous solutions. Hydrogen bonds (H-bonds), which is the driving force of the formation of hydration structures, break and re-form frequently due to thermal energy. Accordingly, we must take into account of the rearrangement of H-bonds to understand chemical and biological processes in aqueous solutions such as protein folding. In this research project, we produced hydration clusters where the number of water molecules around a solute molecule (i.e., the hydration number) was precisely controlled. Laser multiple resonance spectroscopy was applied to the hydration cluster cations, and we obtained detailed information on the rearrangement and fluctuation of hydration structures in the cluster cations.

研究分野：物理化学

キーワード：ゆらぎ 水素結合 水和

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、水系でその構造を安定化させているので、タンパク質の構造安定性にとって、周りの水和構造は極めて重要である。水和構造形成の主要な駆動力である水素結合は、系が持つ熱エネルギーによって、頻繁に解離と生成を繰り返していると思われる。よって、タンパク質の折れ畳みを理解するには、タンパク質を取り囲む水和構造の生成と崩壊、及びそれに伴う水和構造の組み替えまで考慮に入れる必要がある。生体分子における水和の重要性は、熱測定、結晶構造解析、誘電緩和測定などの実験研究や、分子動力学計算による理論研究など、多方面から指摘されている。しかし、実際の生体系は、非常に大きな自由度を持った生体分子が、多くの水に取り囲まれた複雑な系であるため、水がタンパク質に与える影響を分子レベルで理解するための情報が極めて不足していた。

気相中における水素結合クラスターの研究では、凝縮相における複雑な水素結合ネットワークを真空中に切り出し、極低温に冷却することで、個々の水素結合を分子レベルで解明してきた。しかし、これまでの研究の殆どは、水素結合の安定構造や結合様式のような静的な側面に焦点を当てたものであった。当時、我々のグループは、ペプチド基に水和した水分子ネットワークがエントロピー効果で大きく組み替わる現象を発見していた。海外のいくつかのグループも、水和クラスターにおける水1分子の水素結合組み替えを報告していた。しかし、水素結合の静的な側面に関する膨大な知見に比べ、水和構造のゆらぎのような動的な側面に関する微視的情報は、ようやく得られ始めたばかりであった。

## 2. 研究の目的

水和数を1分子レベルで精密に制御した生体関連分子の水和クラスターを真空中に生成し、光イオン化法などを持ちいて、水和クラスターを加熱する。このクラスターにレーザー多重共鳴分光法を適用し、クラスター内における水素結合の組み替えや揺らぎを観測する。これによって、タンパク質の折り畳みなどにおいて水分子が果たす役割を理解するための基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

超音速ジェット法を用いて孤立気相中に生成した水和クラスターを光イオン化した。このとき、内部余剰エネルギーをもったクラスターカチオンが生成するが、イオン化に用いるレーザーの波長をコントロールすることで、クラスターカチオンのもつ内部余剰エネルギーを精密に制御した。生成したクラスターカチオンに気相赤外分光法を適用する

ことによって、水和クラスターカチオンの水素結合構造を評価した。

## 4. 研究成果

### 5-ヒドロキシインドール水和クラスターカチオンにおける水和ネットワークの組み換え

5-ヒドロキシインドール(5HI)は分子内にOH基とNH基の2つの水素結合サイトをもつ。5HIの一水和クラスター(5HI-(H<sub>2</sub>O)<sub>1</sub>)では、OH基もしくはNH基に水分子が結合した2種類の異性体(OH isomer および NH isomer)が存在する。これら2つの異性体を光イオン化することによって生成した[5HI-(H<sub>2</sub>O)<sub>1</sub>]<sup>+</sup>の赤外スペクトルを図1に示す。OH isomerをイオン化した場合(図1a)は、主に3本のバンドが観測され、これらは全て[OH isomer]<sup>+</sup>由来のバンドに帰属される。一方、NH isomerをイオン化した場合(図1b)、3500cm<sup>-1</sup>以上の領域に観測される3本のバンドは、[NH isomer]<sup>+</sup>に帰属されるが、最も低波数側に観測されるバンドは[NH isomer]<sup>+</sup>に帰属できない。このバンドは、[OH isomer]<sup>+</sup>が持つNH基の自由伸縮振動(Free NH)バンドとよく一致している。しかし、[NH isomer]<sup>+</sup>は自由なNH基を持たない構造であるため、Free NHバンドの出現は、[NH isomer]<sup>+</sup>の一部が自由なNH基を持つ異性体である[OH isomer]<sup>+</sup>に変化していなければ説明できない。この結果は、[NH isomer]<sup>+</sup>において水和構造の組み換えが生じていることを明確に示している。

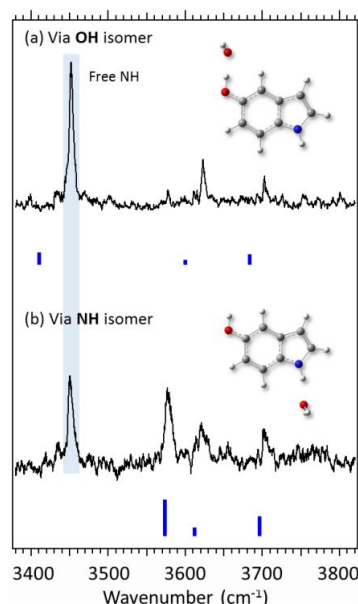


図1. [5HI-(H<sub>2</sub>O)<sub>1</sub>]<sup>+</sup>の赤外スペクトル

### [5HI-(H<sub>2</sub>O)<sub>1</sub>]<sup>+</sup>の水和ネットワーク組み換えにおけるポテンシャル障壁の実験的な決定

図2に示すスキームに従って水和構造組み換えの生成物の出現しきい値を決定できれば、これから各異性体の断熱イオン化エネルギー

ギーの値を差し引くことによって,  $[\text{NH isomer}]^+$  のエネルギーを基準としたときの水和構造組み換えのポテンシャル障壁の上限を実験的に求めることができる. 図3に生成物の出現エネルギーの測定結果を示す. 横軸は  $[\text{NH isomer}]^+$  の内部エネルギーに対応している. 図3では,  $[\text{NH isomer}]^+$  の零点振動準位から約  $2000 \text{ cm}^{-1}$  ほど高いエネルギー領域から, フラグメントイオンである  $5\text{HI}^+$  の信号が立ち上がっている. フィッティングの結果から  $[\text{NH isomer}]^+$  から見た活性化障壁の上限値は  $1987 (\pm 30) \text{ cm}^{-1}$  と求められた.

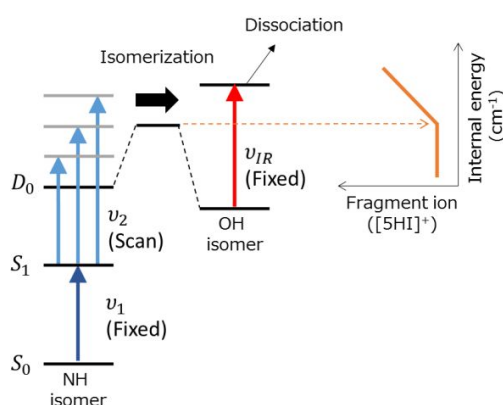


図2. 異性化の障壁に用いた分光スキーム

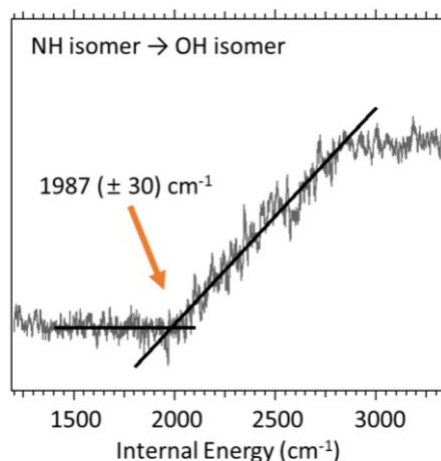


図3. フラグメントイオンの出現しきい値

## 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6件)

(1) Rearrangement of a water molecule in both directions between two hydrogen-bonding sites of 5-hydroxyindole cation: Experimental

determination of the energy threshold for the rearrangement, T. Ikeda, K. Sakota, H. Sekiya, J. Phys. Chem. A, **120**, 1825-1832 (2016). 査読あり

(2) Macromolecular crowding modifies the impact of specific Hofmeister ions on the coil-globule transition of PNIPAM, K. Sakota, D. Tabata, H. Sekiya, J. Phys. Chem. B, **119**, 10334-10340 (2015). 査読あり

(3) Simultaneous interaction of hydrophilic and hydrophobic solvents with ethylamino neurotransmitter radical cations: Infrared spectra of tryptamine<sup>+</sup>-(H<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-(N<sub>2</sub>)<sub>n</sub> clusters (m, n ≤ 3), M. Schuts, K. Sakota, R. Moritz, M. Schmies, T. Ikeda, H. Sekiya, O. Dopfer, J. Phys. Chem. A, **119**, 10035-10051 (2015). 査読あり

(4) 水和クラスターにおける励起状態多重プロトン移動, 関谷博, 迫田憲治, 分光研究, **64**, 346-360 (2015). 査読あり

(5) Weak hydrogen bonding motifs of ethylamino neurotransmitter radical cations in a hydrophobic environment: infrared spectra of tryptamine<sup>+</sup>-(N<sub>2</sub>)<sub>n</sub> clusters (n ≤ 6), K. Sakota, M. Schuts, M. Schmies, R. Moritz, A. Bouchet, T. Ikeda, Y. Kouno, H. Sekiya, O. Dopfer, Phys. Chem. Chem. Phys., **16**, 3798 (2014). 査読あり

(6) DNA モデル塩基対の励起状態二重プロトン移動の協奏的機構と段階的機構の長い論争の始まりから終わりまで, 関谷博, 迫田憲治, Molecular Science, **8**, A0071 (2014). 査読あり

〔学会発表〕(計18件)

(1) K. Sakota, Molecular level inspection of H-bond rearrangement and fluctuation in the gas phase, Pacificchem 2015, 2015年12月, Hawaii (USA).

(2) T. Ikeda, K. Sakota, H. Sekiya, Rearrangement of hydrogen bond network in mono-hydrated 5-hydroxyindole cluster cations, Pacificchem 2015, 2015年12月, Hawaii (USA).

(3) S. Yasutomi, K. Sakota, H. Sekiya, The influence of molecular-weight specific adsorption of polyethylene glycol on two-state transition of myoglobin, Pacificchem 2015, 2015年12月, Hawaii (USA).

(4) K. Yoneyama, K. Sakota, H. Sekiya, IR spectroscopy of 5-hydroxyindole-methanol in the gas phase: Rearrangement of h-bond, Pacificchem 2015, 2015年12月, Hawaii (USA).

(5) 迫田憲治, 関谷博, 「超高感度バイオセンシングを目指した単一微小液滴顕微分光装置の開発」第9回分子科学討論会, 2015年9月, 東京工業大学(東京).

(6) 池田貴将, 迫田憲治, 関谷博, 「5-ヒドロキシインドール水和クラスターカチオンにおける水和構造組み換えの観測」第9回分子科学討論会, 2015年9月, 東京工業大学(東京).

(7) 安富翔太, 迫田憲治, 関谷博, 「ミオグロ

ピンの2状態転移に対するポリエチレングリコールの分子量特異的吸着とその効果」第9回分子科学討論会, 2015年9月, 東京工業大学(東京).

(8) 米山可凜, 迫田憲治, 関谷博, 「ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の相転移に対する Hofmeister イオンおよび巨大分子混み合いの複合効果」第9回分子科学討論会 2015年9月, 東京工業大学(東京).

(9) K. Sakota, "Laser microscopy for a single levitated microdroplet: its application to FRET of simple dyes" Workshop on nanoscale atomic and molecular systems, 2015年8月, Fukuoka (Japan).

(10) K. Sakota, "Water shuttling in hydrated molecular clusters" Recent progress in molecular science of Korea and Japan, 2015年7月, Hiroshima (Japan).

(11) K. Sakota, "Rearrangement and fluctuation of hydrogen-bonded structures in microhydrated molecular clusters" Core-to-Core international symposium, 2014年12月, Berlin (Germany).

(12) 迫田憲治, 田端大樹, 関谷博, 「温度応答性高分子へのアニオン吸着挙動に対する共存巨大分子の混み合い効果: ランダムコイル-グルビュール転移への影響」第8回分子科学討論会, 2014年9月, 広島大学(広島).

(13) K. Sakota, "Combined effects of macromolecular crowding and salt addition on the coil-globule transition of a thermoresponsive polymer" The 8th Mini Symposium on Liquid, 2014年7月, Okayama (Japan).

(14) K. Sakota, H. Sekiya, "Molecular level inspection of structural fluctuation in hydrogen-bonded clusters" Gordon research conference on Molecular and ionic clusters, 2014年5月, Rucca (Italy).

(15) K. Sakota, H. Sekiya, "Rearrangement and fluctuation of hydrogen bond induced by photoionization: Infrared spectroscopy of hydrated indole derivatives" Core-to-Core international symposium, 2013年12月, Manchester (UK).

(16) 迫田憲治, 河野友輝, 関谷博, 「5-ヒドロキシインドール水和クラスターの孤立気相分光: 水和構造ゆらぎの観測」第7回分子科学討論会 2013年9月, 京都テルサ(京都).

(17) K. Sakota, "Ionization-induced fluctuation of hydration structures probed by IR spectroscopy" 15th Asian Chemical Congress, 2013年8月, Resorts World Sentosa (Singapore).

(18) K. Sakota, "Hydrogen-bond fluctuation in microsolvated biomolecule" Japan-Korea Symposium for Molecular Science, 2013年7月, Kobe (Japan).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/Kouzou/str3j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

迫田 憲治 (SAKOTA, KENJI)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 80346767