

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K03559

研究課題名(和文) 水和水ダイナミクスによって誘起されるタンパク質機能関連モードの観測

研究課題名(英文) Spectroscopic Study on Protein Functionally-Relevant Modes Excited by Dynamics of Hydration Water

研究代表者

山本 直樹 (Yamamoto, Naoki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90580671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではサブTHz (THz = 1012 Hz)領域における水とタンパク質の複素誘電スペクトルを水及び温度依存的に評価した。50 GHz(GHz = 109 Hz)まで測定可能なベクトルネットワークアナライザ、および0.02-0.3 THz領域が測定可能なテラヘルツ時間領域分光計を用いることによって、サブTHz領域の複素誘電率スペクトルを測定することができた。GHzからTHzにわたる広帯域複素誘電率スペクトルを理論式によって解析することでサブTHz領域に緩和と振動の性質を併せ持つようなスペクトル成分が存在することが明らかとなり、タンパク質機能発現に関わる構造揺らぎと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、タンパク質まわりに存在する水、水和水がタンパク質ダイナミクスに果たす役割を理解するためのものであり、今回の結果より水和水とタンパク質の動きが互いに影響を及ぼしあうことでタンパク質の機能発現に必要な動きを活性化することが示唆された。また同時にその活性化が複雑な分子論的メカニズムによってもたらされることもわかり、計算機を用いた分子動力学シミュレーション等により理論的な理解を進める必要性があることもわかった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to quantify the complex dielectric spectra of hydrated protein in the sub-THz region (1 THz = 1012 Hz) in temperature and hydration-dependent manner. We were able to obtain the spectra at the region of 0.02-0.3 THz using a vector network analyzer (up to 50 GHz) and a THz time-domain spectrometer (0.5-0.3 THz), which we did not complete in the previous studies. By analyzing broadband dielectric spectra ranging from GHz to THz, it was suggested that there are spectral components possessing both rotational and vibrational properties in the sub-THz region, which we assume protein and hydration dynamics required for the protein functional expression. We also performed neutron scattering experiment on hydrated proteins, resulting in obtaining evidence of apparent contribution of unfreezable hydration water on the protein surface to protein dynamics.

研究分野：生物物理

キーワード：タンパク質水 広帯域誘電分光 中性子散乱 ダイナミクスと機能の相関

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は溶媒である水の絶え間ない熱揺らぎの中で機能していることから、タンパク質機能発現メカニズムを理解するためには、タンパク質周りの水、すなわち水和水がタンパク質ダイナミクスに及ぼす影響を理解することが重要である。特に、ピコ秒 (10^{-12} 秒) からナノ秒 (10^{-9} 秒) のダイナミクスは、おおよそ熱揺らぎ程度のエネルギーを持ち、水和水の回転緩和やタンパク質低振動運動など、機能発現に重要な役割を果たしていると考えられるダイナミクスが存在する領域である。ここで、タンパク質の低振動運動とは、タンパク質が全体的に大きく振動するモードに対応しており、タンパク質が機能する際、この低振動運動の非調和性をもたらす大きな振幅振動が重要であると理論的に示唆されている (Kitao et al., *Proteins* 33(4), 496-517 (1998))。我々はこれまで、これらの時間領域に相当するギガヘルツ (10^9 Hz, GHz \approx ナノ秒) からテラヘルツ (10^{12} Hz, THz \approx ピコ秒) 周波数帯において、ベクトルネットワークアナライザ (0.5-20 GHz) およびテラヘルツ時間領域分光計 (0.3-1.8 THz) を組み合わせることにより、種々の水とタンパク質における温度依存性複素誘電率スペクトル測定を行ってきた。その結果、温度の上昇に伴い GHz 領域の回転緩和モードが高周波数シフトし、約 230 K で THz 領域にスペクトル成分の高波数側 “すそ” が侵入し始め、THz 領域のタンパク質低振動モードと重なりだすことを明らかにした (図 1; NY et al., *J. Phys. Chem. B* (2016), *J. Phys. Chem. B* (2018))。これらの実験結果とちょうどこの重なり合いが生じるあたりの温度でタンパク質機能が発現しだすという事実より、回転緩和と低振動運動の重なりによってタンパク質の機能に関連するダイナミクスが誘起されるのではと推察した。

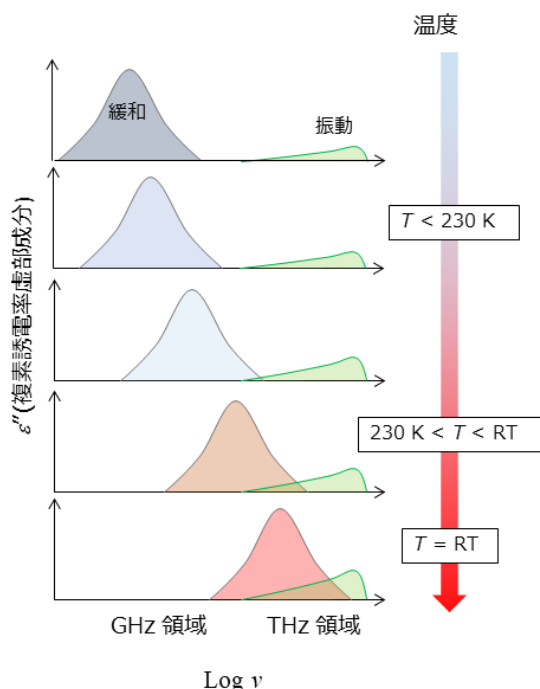


図 1. 広帯域複素誘電率スペクトルにおける、温度上昇にともなう緩和成分と振動成分の重なり の模式図

しかしながら、現状ではこのような重なり合いによって生じるスペクトル成分の抽出には至っていない。そのためには、現存のデータのみでは不十分であり、現在欠如している 20 GHz-0.3 THz 領域 (以後、サブ THz 領域と呼ぶ) の温度依存性複素誘電率スペクトルを測定し、これまでの実験データとあわせて再解析することにより、改めて大きな振幅振動成分に対応するスペクトル成分を抽出し、そのダイナミクスを定量的に評価する必要がある。

2. 研究の目的

1. サブ THz のスペクトルを補完するために、0.5-50 GHz 領域が測定可能なベクトルネットワークアナライザ (VNA) の温度依存性測定系を構築する。用いるタンパク質としては、大量調製が容易であり、かつ申請者がこれまで測定データを蓄積してきた、モデル球状タンパク質リゾチームを用いる。水和量依存的に複素誘電率スペクトル測定を行うことによって、水和の効果を評価する。
2. VNA ではカバーできない 50GHz-0.3THz 領域のデータを補完するために、サブ THz 領域のスペクトル測定が可能なテラヘルツ時間領域分光計を用い、その温度依存性測定を可能にする測定セルの開発、およびそれを用いたサブ THz 領域の水和及び温度依存性複素誘電率スペクトル測定を行う。
3. これらの測定により得られるスペクトルをすでに先行研究で報告済みの THz 領域のスペクトルとつなぎ合わせ、サブ THz 領域の温度依存性を記述するスペクトル成分を導入したモ

デル関数を用いてフィッティングすることによりスペクトル解析を行う。その結果より、スペクトルの重なりにより生じる成分についてその分子論的描像を議論する。

3. 研究の方法

ベクトルネットワークアナライザの温度変化を可能にするための恒温槽を購入し、ベクトルネットワークアナライザ組み合わせることで、0.5-50 GHz 領域の温度変化測定を行うための測定系を構築した (図 2)。また、50GHz-0.3THz のギャップを埋めるために、サブ THz 帯用のテラヘルツ時間領域分光計を用いて水和リゾチームの温度依存性を評価した。良質なスペクトルが測定可能な測定セルの窓財および窓財とサンプルの接触方法等について様々な検討を行った。これらの測定より得られたスペクトルを既に報告した THz 領域のスペクトルをつなぎ合わせることで得られる 0.5 GHz-1.8 THz 領域の複素誘電率スペクトルをモデル式で解析することにより、種々のスペクトル成分の抽出を試みた。

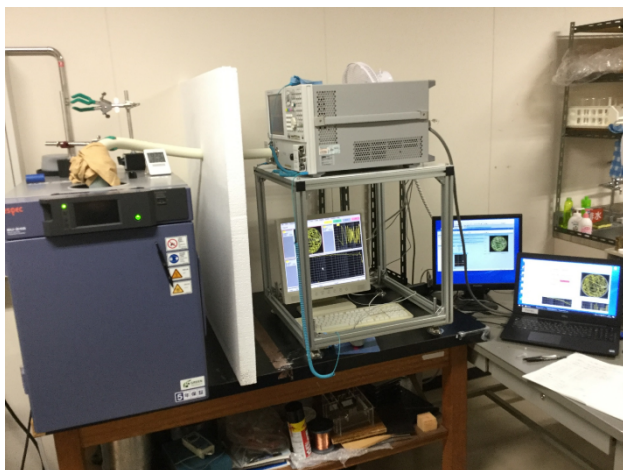


図 2. 恒温槽と組み合わせることにより温度依存性測定が可能となったベクトルネットワークアナライザ

4. 研究成果

ベクトルネットワークアナライザを用いることにより、水和リゾチームを用いて 233 K~293 K において良好な温度依存性スペクトルを測定することができた (図 3A)。なお、水和試料は低水和状態 ($h \sim 0.35$) および高水和状態 ($h \sim 0.54$) を用いた。ここで h は水の質量をタンパク質の質量で割った値であり、 $h \sim 0.3$ 付近がリゾチームの表面およそ 1 層をカバーする水和量である。複素誘電率スペクトルは GHz 領域に大きな緩和成分を含み、その成分が温度上昇とともに高波数シフトする様子が観測された。これは先行研究における報告と矛盾しない結果であった。また、低周波数テラヘルツ帯測定用のテラヘルツ時間領域分光計の測定方法について検討を重ねたところ、2 枚のテフロン板で挟み込み、かつテフロン板とサンプル板の間に空間を設けることで良好なスペクトルを得ることができることが分かった。リゾチームを用いて、253 K~293 K において 60 GHz~0.3 THz における複素誘電率スペクトル測定を行うことができた (図 3B)。これらの結果を先行研究の測定で得られている 300 GHz-2 THz のスペクトルと合わせることで、0.5GHz-2THz の範囲の周波数領域をほぼカバーするという目的を達成した。

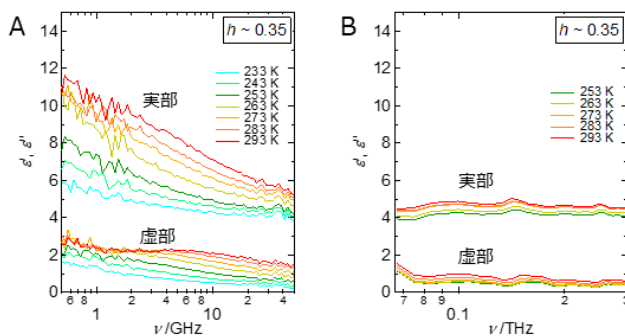
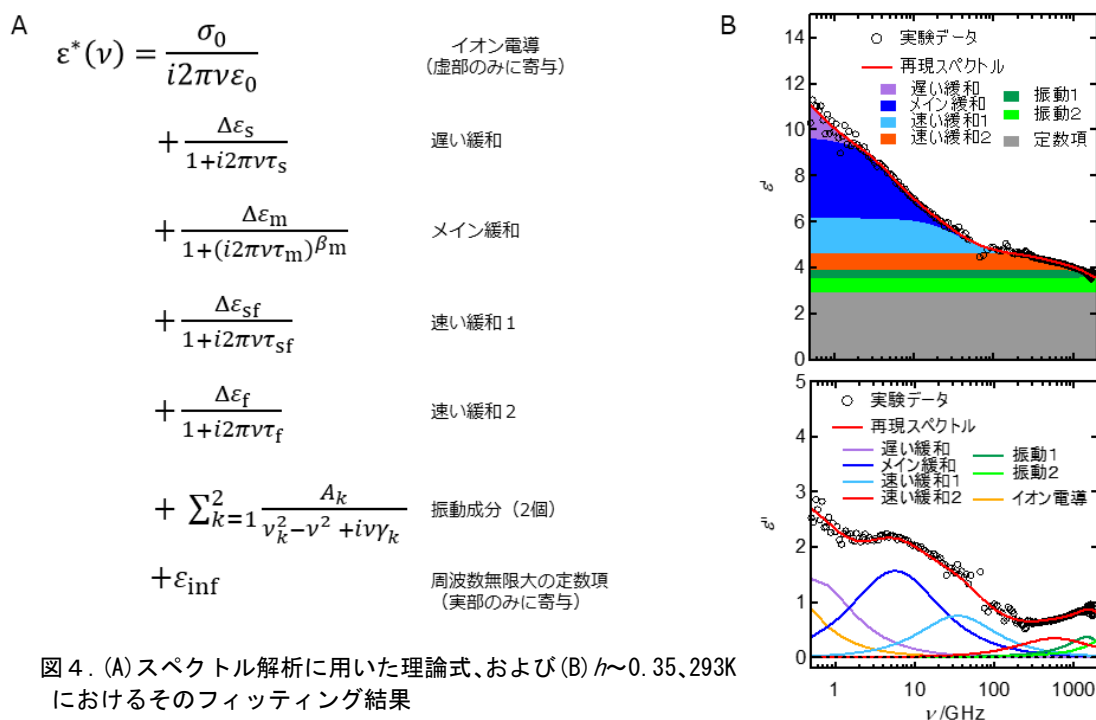


図 3. $h \sim 0.35$ における温度依存性複素誘電率スペクトル。(A) GHz 領域、および (B) サブ THz 領域。

このサブ THz 領域が補完された広帯域複素誘電率スペクトルの温度変化について、モデル関数を用いてスペクトルの解析を行った。いくつかのモデル関数を検討したところ、以下図 4A に示すような 4 個の緩和及び 2 個の振動成分を含むモデル関数でスペクトルを良く再現できることが分かった。この解析により、まず GHz 領域に水と水の緩和由来のメイン成分があることが再確認された (図 4B)。また、2 個の速い緩和はサブ THz 領域のスペクトル形状を再現するのに導

入したが、これらは GHz 領域に存在する緩和成分が温度上昇に伴いサブ THz 領域に入ることに伴って出現することが確認された。これらの成分が緩和成分に特徴的な緩和時間の温度依存性を顕著に示さなかったことより、振動成分の成分も含むハイブリッド的な性質を持つ成分であることが示唆された。

また、これらの成分はタンパク質表面約一層分に相当する低水和状態 ($h = 0.35$) および高水和状態 ($h = 0.54$) のいずれにも見出されたことから、タンパク質表面と直接相互作用し、タンパク質と強くカップルする水和水が関与していることが示唆された。



また本研究では、水和水のダイナミクスとタンパク質ダイナミクスの関連をより明確にするために、中性子散乱を用いた実験も行った。誘電分光やテラヘルツ時間領域分光によって得られる複素誘電率スペクトルは大きな双極子モーメントを持つ水の寄与が著しく、タンパク質のダイナミクスを直接抽出するには困難がともなう。重水で水和したタンパク質試料を用いて中性子散乱測定を行うことによって、軽水素を含むタンパク質からの散乱の寄与が主要な成分となり、タンパク質のダイナミクスを直接評価することが可能である。したがって、中性子散乱は誘電分光の相補的な手法として用いることができる。今回、J-PARC の BL14、AMATERAS を用いて測定を行った。AMATERAS を用いることにより、およそ 10 GHz 以上の周波数に対応するダイナミクスを評価することができる。サンプルは同様に水和水とリゾチームを用いた。非干渉性散乱よりタンパク質のダイナミクスを評価し、また干渉性弾性散乱より水和水の凍結現象をモニターした。その結果、非凍結性の水和水と凍結性の水和水の存在を明らかにすることができ、かつ基本的にはタンパク質のダイナミクス活性化には非凍結性の水和水のみが関与していることを明らかにした (NY et al. *J. Phys. Chem. Lett.* (2021))。

これらの結果より、タンパク質と強く結合している非凍結性の水和水がタンパク質ダイナミクスとカップリングすることによって、タンパク質機能に必要なダイナミクスの活性化を行うことが示唆された。今後は、分子動力学シミュレーションを用いてこの水和水により活性化されるダイナミクスが具体的にどのようなものか、またどのようなメカニズムで活性化が行われるのかを明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Naoki, Kofu Maiko, Nakajima Kenji, Nakagawa Hiroshi, Shibayama Naoya | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Freezable and Unfreezable Hydration Water: Distinct Contributions to Protein Dynamics Revealed by Neutron Scattering | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 2172 ~ 2176 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcllett.0c03786 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件）

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Naoki Yamamoto, Shota Ito, Kaoru Ohta, Masahiro Nakanishi, Atsuo Tamura, Eri Chatani, Hideki Kandori, Keisuke Tominaga |
| 2. 発表標題 Broadband dielectric spectroscopy on hydrated proteins |
| 3. 学会等名 Symposium on Advanced Spectroscopic Techniques, University of the Philippines Los Banos（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Naoki Yamamoto |
| 2. 発表標題 Broadband dielectric spectroscopy on proteins from sub-GHz to THz regions |
| 3. 学会等名 Indo-Japan mini-workshop -Frontiers in Molecular Spectroscopy: From Fundamentals to Applications in Chemistry and Biology-, Kobe University（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名 山本直樹 |
| 2. 発表標題 広帯域誘電分光を用いたタンパク質水和水のダイナミクス観測 |
| 3. 学会等名 テラヘルツ分光で水を研究する会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Naoki Yamamoto |
| 2. 発表標題 Protein hydration water dynamics probed by broadband dielectric spectroscopy |
| 3. 学会等名 International Conference on Chemical and Environmental Sciences 2019, Kolkata (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山本直樹 |
| 2. 発表標題 広帯域誘電分光による水和タンパク質ダイナミクスの評価 |
| 3. 学会等名 東京大学 物性研究所 極限コヒーレント光科学セミナー (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Naoki Yamamoto |
| 2. 発表標題 temperature and hydration dependence of protein dynamics studied by broadband dielectric spectroscopy and neutron scattering |
| 3. 学会等名 Indo-Japan workshop, 2019, Kobe, Japan (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Naoki Yamamoto |
| 2. 発表標題 Protein hydration dynamics probed by broadband dielectric spectroscopy and neutron scattering |
| 3. 学会等名 Dynamics of Chemical and Biological Systems, IIT Kampur (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山本直樹 |
| 2. 発表標題 広帯域誘電分光によるタンパク質水和水ダイナミクスの評価 |
| 3. 学会等名 分子フォト研究会 「誘電応答から見るソフトマターの水和ダイナミクス」(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 富永 圭介 (Tominaga Keisuke) (30202203) | 神戸大学・分子フォトサイエンス研究センター・教授 (14501) | |
| 研究 分担者 | 中西 真大 (Nakanishi Masahiro) (00707763) | 福岡工業大学・工学部・助教 (37112) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|