

平成22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19750010
 研究課題名(和文) 水の第2臨界点仮説から見たタンパク質のフォールディング機構の解明
 研究課題名(英文) Hypothesis of the second critical point of water and protein folding mechanism
 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

研究成果の概要(和文)：

水は 220 K 以下では高密度水と低密度水が存在するという第2臨界点仮説がある。一方、水和タンパク質の動的性質が 220 K 付近で大きく変化する。この両者の関連を調べるために、水和タンパク質粉末やタンパク質水溶液、および、タンパク質表面水のモデルとなる、多孔性シリカやデキストランゲルに閉じ込められた水の中性子散乱やX線散乱を測定し、室温から低温状態に至る水の運動を調べた。水中でのみタンパク質がユニークな構造に自発的に折りたたまれる現象を溶媒である水の性質の観点から議論した。

研究成果の概要(英文)：

Dynamics of hydration water around proteins and confined water in nano-porous materials (silica and dextran gel) was measured with X-ray and neutron scattering experiments. The temperature behaviors in the relaxation time of confined water molecules in the porous silica change from the Arrhenius type to the non-Arrhenius one at around 220 K (fragile-strong transition) where the atomic motion of hydrated proteins changes from a harmonic to anharmonic behavior. From these results, the role of water in protein folding was discussed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	0
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	720,000	3,120,000

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・水和

1. 研究開始当初の背景

水は 4℃で密度が最大になることをはじめ、

他の液体に比べて異常性を示すことはよく知られているが、異常性の決定的な分子論的説明は今のところない。近年、氷のポリアモ

ルフィズム研究の蓄積により、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、この二種類の水の平衡により水の異常性を説明しようとする試みがなされている。(水の第二臨界点仮説)最近、中性子散乱測定によりリゾチーム表面水のHDL/LDL転移が225 K付近であることが明らかにされた。一方、水を吸着させたタンパク質のダイナミクスを観測すると225 Kまでは、乾燥状態のタンパク質と同じ挙動(調和振動)を示すのに対し、225 K以上では水和タンパク質のダイナミクスに非調和性を生じる(動的転移)ことが示されている。このことはHDL/LDL転移とタンパク質のダイナミクスとの関連を暗示している。

2. 研究の目的

タンパク質のフォールディングを溶媒分子の役割の観点から明らかにするために、本研究では、上述の水のHDL/LDL転移とタンパク質のダイナミクスとの関連に着目した。具体的には、多孔性シリカガラスおよびデキストランゲル中に閉じ込められた水(生体中の水のよいモデルとなることが近年明らかにされた)について、高密度水(HDL)/低密度水(LDL)の液-液転移を中性子散乱によって観測する。一方、非弾性X線・中性子散乱により、水を吸着させたタンパク質(β -ラクトグロブリン)について、広い温度範囲でダイナミクスを測定し、動的転移および液-液転移を観測する。以上の結果から、「タンパク質の折りたたみに何故、水が必要か」という生命科学の根源的な問いに分子・原子の相互作用といった物理化学の言葉で答えることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 多孔性シリカガラスに閉じ込められた水のダイナミクスの測定を行った。フランスのラウエ・ランジュバン研究所にて水(重水)を吸着させたMCM-41(多孔性シリカガラス)の中性子非弾性散乱を370-180 Kの温度範囲で測定した。50 Kにおける同じ試料の散乱により、装置の分解能補正を行った。拡張指数関数により、水分子の緩和時間、緩和時間の分布 β 、弾性散乱項を求め、これらの温度依存性を調べた。

(2) デキストランゲル中に閉じ込められた水のダイナミクスの測定を行った。ドイツのハーン・マイトナー研究所にて、水(重水)を吸着させたデキストランゲルの中性子準弾性散乱を370-180 Kの温度範囲で測定した。バナジウム板の散乱により、装置の分解能補正を行った。ローレンツ関数とデルタ関

数による解析を行い、得られた中間散乱関数から水分子の平均自乗変位(RMSD)、緩和時間および緩和時間の分布 β などの動力学パラメータを求めた。そして、準弾性散乱項の線幅と弾性非干渉性散乱因子について調べた。

(3) タンパク質に水和した水のダイナミクスの測定を行った。ハーン・マイトナー研究所ならびにSPring-8にて、水を吸着させた β -ラクトグロブリンについて、広い温度範囲で非弾性X線・中性子散乱によりダイナミクスを測定した。X線散乱については緩和化された調和振動子モデルを使用し、励起エネルギーならびにその線幅を調べた。中性子散乱については、(1)と同様の解析を行った。

(4) 多孔性シリカガラスに閉じ込められた水の液体構造を明らかにした。多孔性シリカガラスに軽水、重水、軽水と重水の1:1の混合物を吸着させ、同位体置換法による中性子回折実験を296 Kと173 Kで行った。測定はラザフォード・アップルトン研究所にて実施した。得られた構造関数の解析のためにEPSRモデリングを適用した。

4. 研究成果

(1) 細孔中に閉じ込められた水は低温でも結晶化せず、安定な過冷却状態に到達できることがわかった。そして、水の緩和時間の温度依存性は225 K前後で非アレニウス型からアレニウス型に変化し、高密度水(HDL)/低密度水(LDL)の液-液転移が存在することの一つの証拠として示された。さらに多孔性シリカガラス中に閉じ込められた水は生体中の水のよいモデルとなることが明らかにされた。単層吸着水はstrong液体の挙動を示す一方、図1に示されるように毛管凝縮水は220 K以上の温度ではfragile液体であった。したがって、細孔水のダイナミクスは不均一であり、中心部に近い水はよりバルク水(fragile液体)に近いと思われる。さらに、タンパク質表面水で観測される220 K付近でのfragile-strong転移は細孔水の中心部に近い水の性質を反映しているものと推測された。

(2) 多孔性シリカガラス、およびデキストランゲル中に閉じ込められた水、および生体分子に水和している水、これら三種類の水について、動力学パラメータの温度依存性を比較したところ、非常に良く似た挙動をとることが示された。シリカガラスは硬い細孔障壁を持つが、デキストランゲルは柔らかい細孔

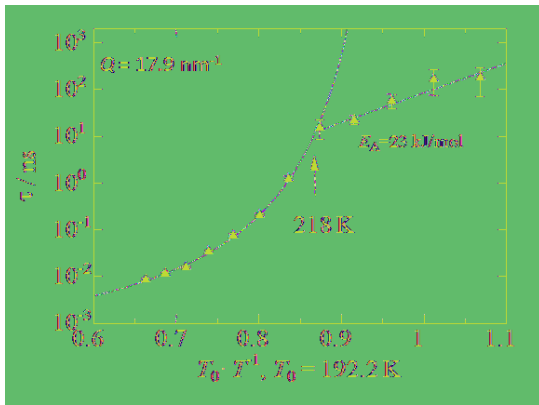


図1. 水の fragile-strong 転移

障壁を持つ。細孔障壁の硬軟にかかわらず、細孔に閉じ込められた水はともに生体中の水のよいモデルとなることが明らかにされた。そして、過冷却条件下で存在すると言われている水の高密度水—低密度水転移（液—液転移）と220 K付近でタンパク質の運動に非調和性が生じる動的転移との関連性を考察した。

(3) 中性子スピネコー法により調べられた、水和したタンパク質の中間散乱関数は200K では時間に対してほとんど減衰しないが、225Kを超えると緩和現象が観測され、本研究の系についても動的転移が起こることが見出された。また、観測スケールのサイズが大きくなると動的転移がより明瞭になり、大きな振幅をもつ原子運動が動的転移を支配していることが示された。

また、図2に示した、X線非弾性散乱の結果では、水和率0.5および1.0の両方の試料において、 $S(Q, \omega)$ に非弾性散乱のピークが見られた。乾燥試料ではこのような励起は見られないことから、水和率0.5以上では、水和によってタンパク質の集団ダイナミクスが大きく変化することがわかった。これは、水和率0.38以上でタンパク質の運動に非調和性が生じることと関連していると思われる。バルク水では水素結合ネットワーク構造に起因する動的音速が観測されるが、タンパク質に水和した水についても同様の現象が見られることを示した。

(4) 細孔水の部分動径分布関数(RDF)について、298 Kの細孔水はバルク水の結果とよく似ているが、178 Kの細孔水では、各部分RDFの第1ピーク（隣接分子との相互作用を示す）が大きく増加し、水素結合が強化されていることが分かった。さらに、0-0の4.4 Å

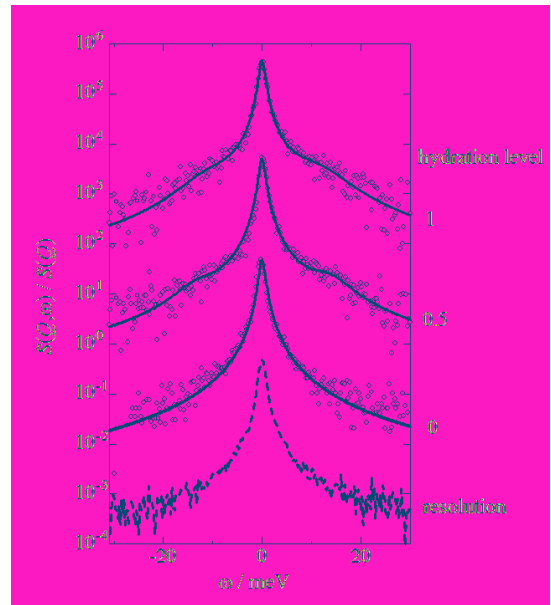


図2. IXS測定により得られた水和タンパク質の動的構造因子

のピーク、0-Hの5 Å付近のピーク、H-Hの4.5 Å付近のショルダーが増加し、水の正四面体類似構造（氷類似構造）が発達していることが示された。水分子同士の空間分布関数についても、178 Kでは、第二配位圈における水分子の分布が秩序化した。細孔中の水では水の均一核形成が起らないにもかかわらず、低温では正四面体類似構造が発達していることが示された。本研究で得られた静的構造情報を、中性子スピネコー法で得られた動的情報（fragile-strong転移）とを合わせて、MCM-41細孔水の性質を考察した。

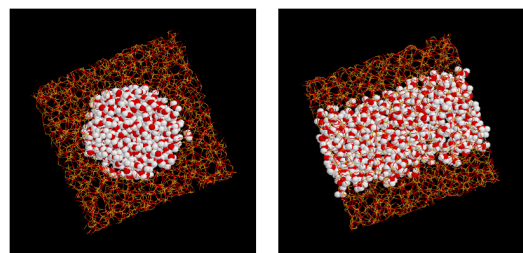


図3. EPSRモデリングにより計算されたMCM-41中の水もスナップショット

以上の結果から、水の構造とダイナミクス、タンパク質の構造や運動と溶媒分子の運動との関連についても考察した。そして、水中でのみタンパク質がユニークな構造に自発的に折りたたまれる現象を溶媒である水の性質の観点から議論した。

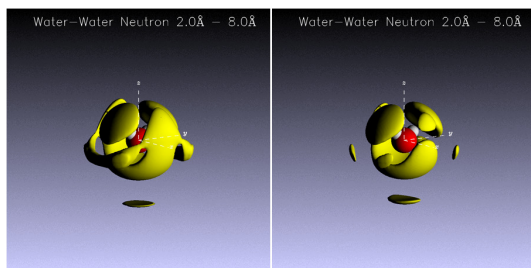


図4. 細孔水の水の空間分布関数 (左が 296 K、右が 173 Kの結果)

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 7 件)

(1) 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 (2010) 3260-3269.

(2) T. Yamaguchi, H. Ohzono, M. Yamagami, K. Yamanaka, K. Yoshida, H. Wakita, “Ion hydration in aqueous solutions of lithium chloride, nickel chloride, and cesium chloride in ambient to supercritical water”, *Journal of Molecular Liquids*, 査読有, 201 (2010), in press.

(3) K. Yoshida, T. Yamaguchi, S. Kittaka, M.-C. Bellissent-Funel, P. Fouquet, “Thermodynamic, structural and dynamic properties of supercooled water confined in mesoporous MCM-41 studied with calorimetric, neutron diffraction, and neutron spin echo measurements”, *J. Chem. Phys.*, 査読有, 129 (2009), 54702-1-11

(4) K. Yoshida, J. Kawaguchi, S. Lee, T. Yamaguchi, “On the solvent role in alcohol-induced α -helix formation of chymotrypsin inhibitor-2”, *Pure Appl. Chem.*, 査読有 80 (2009), 1337-1347.

(5) 吉田亨次, “中性子スピネコー法による過冷却状態における細孔水の動的挙動”, *福岡大学理学集報*, 査読有, 39 (2008), 55-62.

(6) K. Yoshida, T. Yamaguchi, M.-C. Bellissent-Funel, S. Longeville, “Hydration water in dynamics of a hydrated β -lactoglobulin”, *Eur. Phys. J. Special Topics*, 査読有, 141 (2007), 223-226.

(7) T. Yamaguchi, K. Yoshida, P. Smirnov, T. Takamuku, S. Kittaka, S. Takahara, Y. Kuroda, M.-C. Bellissent-Funel, “Structure and dynamic properties of liquids confined in MCM-41 mesopores”, *Eur. Phys. J. Special Topics*, 査読有, 141 (2007), 19-27.

[学会発表] (計 5 件)

(1) 吉田亨次, 山口, 橋高, M.C. Bellissent-Funel, P. Fouquet, “中性子スピネコー法による多孔性シリカ中の低温水のダイナミクス”, 第32回溶液化学シンポジウム, 2009年11月18日, 新潟市.

(2) K. Yoshida, T. Yamaguchi, S. Hosokawa, A. Q. R. Baron, “Collective Dynamics of Hydrated Protein by Inelastic X-ray Scattering”, *European Molecular Liquid Group Meeting 2009*, 2009年9月8日, Salzburg (Austria).

(3) 吉田亨次・山口敏男・遠藤 仁・柴山充弘, “中性子散乱および動的散乱による β -ラクトグロブリンの構造と運動に対するアルコールの影響”, 第2回分子科学討論会, 2008年9月24日, 福岡市.

(4) 吉田亨次、KRISHTAL、藤永、李、根本、金澤、山口, “二次元 NMR およびレプリカ交換 MD によるモデルペプチドのアルコール変性機構の研究”, 第1回分子科学討論会, 2007年9月19日, 仙台市.

(5) 吉田亨次, “中性子散乱法によるナノ細孔中の水の構造とダイナミクス”, “第68回分析化学討論会 若手企画シンポジウム”, 2007年5月20日, 宇都宮市.

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 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :