

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18684

研究課題名(和文)水分子ダイナミクス測定と分子計算によるタンパク質劣化と最適保護物質特性の予測

研究課題名(英文) Prediction of protein deterioration and optimal bio-protectants by measuring and computing water molecular dynamics

研究代表者

白樫 了 (Shirakashi, Ryo)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：80292754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質や生体保護物質の溶媒である水は、タンパク質の保存・安定性を大きく左右し、タンパク質の劣化を支配することが知られている。本研究では、劣化反応の緩和時間と1対1の関係にある水分子の回転緩和時間を支配する現象を明らかにすることで、これを制御する保護物質の物性を調べることが目指した。リゾチームと複数の糖類の水溶液について、誘電分光や分子動力学計算より水分子の誘電緩和時間(回転緩和時間)を求め、水分子の回転緩和時間は、1)水和殻内の電場の回転緩和時間、2)一つの溶質分子の水和殻内にある水分子の平均的滞留時間、3)水和殻の体積分率の3点を、溶質濃度や溶質の特性で制御すればよいことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ薬剤の多くは、薬効分子が水溶液中に存在している。液体中の薬剤は、劣化が進みやすいため、経験的に選択した保護物質を添加して有効期間を延ばしている。本研究の成果は、薬剤劣化の鍵となる溶媒である水分子の分子運動(回転緩和時間)を制御する指針を見出した点で保護物質の選択・設計に資する。また、含水材料のマクロ特性を左右する水分子の回転緩和時間に焦点を当て、分子計算と測定が一致することを示し、分子スケールの現象との関係を明らかにした。その成果は、保護物質分子に限らず、水の介在で特性が変化する材料の選択や評価を高い信頼性で可能にする点で学術的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Water as general solvent of protein and bio-protectants solutions dominates the stability of protein. Especially molecular rotational relaxation time of water directly corresponds to the relaxation time of protein deterioration. In this study, to control the water relaxation time by solutes, saccharides or proteins, the mechanism that defines the water relaxation time in such solutions was studied. The water relaxation time in lysozyme or saccharides solutions calculated by molecular dynamics simulation (MD), which is in good agreement with the relaxation time measured by dielectric spectroscopy, revealed that the water relaxation time is ruled by; 1) the rotational relaxation time of electric field in solute hydration layer, 2) residence time of water in hydration layer, and 3) the volume ratio of solute hydration layer, and that these phenomena could be controlled by solute properties and its concentration.

研究分野：熱工学

キーワード：生体系の水 分子回転緩和時間 分子動力学 誘電分光 生体保護物質 水和殻 保護物質水溶液

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに保護物質等の親水性分子の水溶液を対象とした誘電分光や赤外分光により、水分子の回転緩和時間や水分子の水素結合数比を測定・解析する技術を取得してきた。その成果として、保存対象分子の劣化速度が、保護物質の種類に依存することなく、共存する水分子の回転緩和時間(数 psec-数百 psec)から予測できることを見出した¹⁾。一方で、近年の HPC の発達と分子動力学(MD)計算ソフトの汎用化に伴い、水を多く含む有機物について数 nsec より長い現象が研究室の PC レベルで比較的容易にできるようになってきた。実験で測定される水分子の回転緩和時間は、測定系の水全体の時間・空間平均であることから、測定された緩和時間と由来する水分子の空間分布の関連は、想像の域を超えることがなかったが、高速化した MD 計算と緩和時間測定を組み合わせることで、親水性分子と干渉する水分子のダイナミクスをより定量的に予測できることに思い至った。さらに、測定値より実用上必要な劣化速度を予測できることから、親水性分子自体の情報と干渉する水分子のダイナミクスの関係を抽出することで、材料設計の指針も得られるとの構想にいたった。

2. 研究の目的

ワクチンやタンパク質薬剤の多くは、液体であり薬効のある分子が水溶液中に存在している。このような液体状の薬剤は、劣化が進みやすく、数日で失活するものも多いため、経験的に選択した保護物質を添加して有効期間を延ばしている。即ち、保護物質分子の性質・構造から薬剤の有効期間(劣化速度)を予測し、保護物質をスクリーニング・設計をする指針がない。本研究では、タンパク質薬剤の溶媒である保護物質水溶液中の水の分子回転緩和時間を誘電分光により測定し、タンパク質薬剤の失活速度を予測する手法を開発する。さらに、保護物質分子の周囲にある水分子の回転緩和時間の空間分布を分子動力学計算により算出することで、保護物質の特性と水分子の回転緩和時間の相関を調べる。以上の2点に基づき、保護物質分子に関する情報から、その保護効果(失活速度の予測)を実現し、保護物質の分子設計の基盤技術を提供する。

3. 研究の方法

リゾチームと複数の糖類水溶液を例にとり、それらの誘電スペクトルを測定して水分子の誘電緩和時間を求め、同水溶液の分子動力学シミュレーション(MD 計算)より算出される水分子の回転運動の自己相関関数より得た回転緩和時間を比較し、MD 計算の妥当性を検証した。ついで、MD 計算により、水分子の回転緩和時間の空間分布を算出しつつ、水分子の回転緩和時間を支配する素現象を、電場の回転緩和時間等より調べ、溶質分子の双極子モーメントとの関係を調べた。

4. 研究成果

1) リゾチーム、糖水溶液中の水分子の誘電緩和時間と MD 計算から算出される回転緩和時間

リゾチームと複数の糖類の水溶液について誘電スペクトルを測定し、水分子の誘電緩和に相当する γ -緩和から得られる誘電緩和時間は、MD 計算で算出された 1 水分子の回転運動の自己相関関数より得た回転緩和時間のアンサンブル平均と極めて良好に一致することがわかった。このことから、MD 計算が水分子の回転緩和時間を推定する妥当な手法であることがわかり、その結果を用いた分子スケールの現象の解析が可能となった。(Fig.1^{2),3)})

2) 水分子の回転緩和時間を支配する素現象の解明

タンパク質等の親水性分子の周囲の水分子は、複数の水和殻層にわけて解析することが一般的であるが、1 水分子の回転緩和時間とその溶質分子表面からの距離の確率分布を計算し、計算系内全ての水分子について確率論的統計処理する手法を提案することで、層モデルを用いることなく、回転緩和時間を溶質分子表面からの距離の関数として算出することができるようになった。算出された分布より、回転緩和時間が急激に長くなる領域が、既存の実験で推定されている第

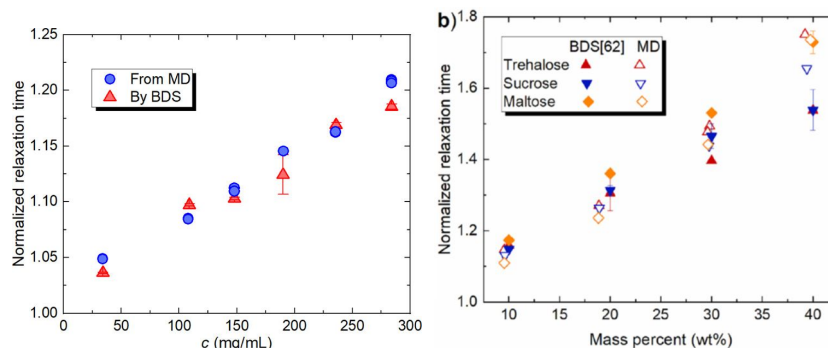


Fig.1: Normalized relaxation time of various concentrations of lysozyme (left²⁾) and saccharide(right³⁾) solutions

一水和殻と一致することがわかり、同手法が分子スケールの空間分布の解析にも適用できることがわかった。(Fig.2²⁾)

さらに、水分子の回転は、本質的には分子に作用する最も大きい力である電場によって決まると考えられることから、移動する水分子の位置における電場の回転緩和時間を算出し、水分子の回転緩和

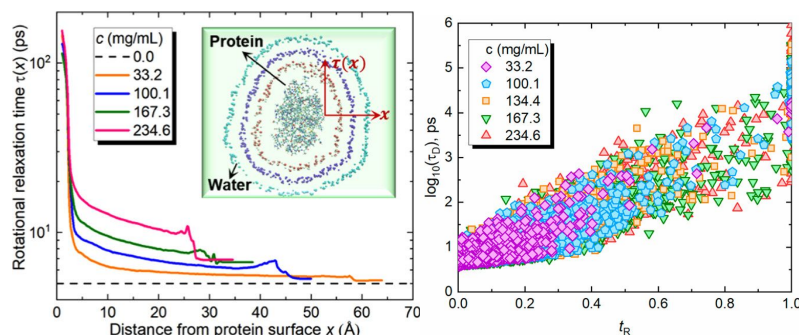


Fig.2²⁾ Relaxation time of water rotations (left)

Fig.3⁴⁾ Correlation between rotation relaxation time and residence time for individual water molecule (right)

時間と比較したところ、良好に一致することがわかった。さらに、電場の回転緩和時間の空間分布を溶質分子表面からの距離の関数として算出したところ、水和殻外は極めて短く(<1psec)純水の値に等しく、水和殻内では極端に長い値となる2分化された分布となることがわかった。この結果は、水分子の回転緩和時間は、水分子と水和殻の干渉が支配することを示唆している。そこで、1水分子が水和殻内に滞在する確率(規格化した時間 t_R)と回転緩和時間 τ の関係を調べたところ、指数関数で記述できることが判明し($\tau = \tau_{pw} 10^{t_R/\xi}$; τ_{pw} は純水の回転緩和時間)、水溶液内の水の緩和時間は、水和殻内の滞在確率に大きく左右されることがわかった (Fig.3⁴⁾)。また、タンパク質水溶液では、水和殻外に移動しない水分子($t_R=1$)と水和殻内に入っていない水分子($t_R=0$)、水和殻内に入り出す水分子($0 < t_R < 1$)の3種類が、水溶液の濃度に関わりなく存在していることがわかった。

3) 糖水溶液中の水分子の回転緩和時間と溶質分子特性

保護物質として代表的な糖類(3糖類以下)について、2)と同様の解析をしたところ、タンパク質水溶液と同様の水和殻内に滞在する確率(規格化した時間 t_R)と回転緩和時間 τ の関係があることがわかった。但し、タンパク質水溶液と異なり、計算した濃度の範囲では、全ての水分子がほぼ同じ頻度で水和殻内を出入りしていることがわかった。このことは、水分子が溶質分子に拘束されることなくランダムに移動していることを示しており、その結果として水和殻内に滞在する確率は、水和殻領域の体積分率と等しいことがわかった。

また、水和殻内に滞在する確率が等しくても、溶質分子の双極子モーメントが大きいほど、指数関数の係数 ξ の値が小さくなることもわかった。(Fig.4³⁾)

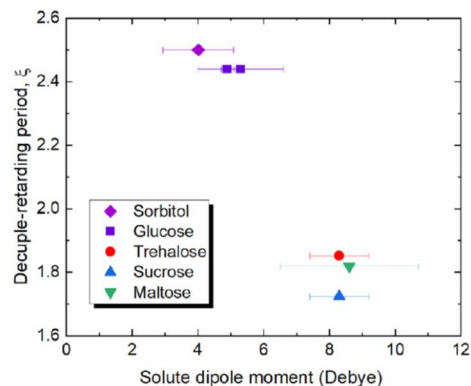


Fig.4³⁾ Correlation between the decuple-retarding period ξ and the dipole moment of various solute molecules.

< 引用文献 >

- 1) Lin Wei, Ryo Shirakashi, Effect of Relaxation Times in a Preservative Solution on Protein Deterioration Rate, Journal of Physical Chemistry B, 124, 8741-8749(2020)
- 2) Kang Hu, Hiroaki Matsuura, Ryo Shirakashi, Stochastic Analysis of Molecular Dynamics Reveals the Rotation Dynamics Distribution of Water around Lysozyme, The Journal of Physical Chemistry PartB SectionB, 126, 24, 4520-4530 (2022)
- 3) Kang Hu, Ryo Shirakashi, Molecular dynamics study of water rotational relaxation in saccharide solution for the development of bioprotective agent, Journal of Molecular Liquids, 380,121707 (2023)
- 4) Kang Hu, Ryo Shirakashi, Dynamic Electric Field Alignment Determines the Water Rotational Motion around Protein, The Journal of Physical Chemistry PartB SectionB, 127, 6, 1376-1384 (2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kang Hu, Hiroaki Matsuura, Ryo Shirakashi	4. 巻 126, 24
2. 論文標題 Stochastic Analysis of Molecular Dynamics Reveals the Rotation Dynamics Distribution of Water around Lysozyme	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry PartB SectionB	6. 最初と最後の頁 4520, 4530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpccb.2c00970	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 -

1. 著者名 Kang Hu, Ryo Shirakashi	4. 巻 127, 6
2. 論文標題 Dynamic Electric Field Alignment Determines the Water Rotational Motion around Protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry PartB SectionB	6. 最初と最後の頁 1376, 1384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpccb.2c07405	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 -

1. 著者名 Kang Hu, Ryo Shirakashi	4. 巻 380, 121707
2. 論文標題 Molecular dynamics study of water rotational relaxation in saccharide solution for the development of bioprotective agent	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molliq.2023.121707	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kang Hu
2. 発表標題 Characterizing water molecular rotational relaxation in lysozyme aqueous solution by MD Simulation
3. 学会等名 第58回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kang Hu
2. 発表標題 Relationship between the internal electric field and the water rotational relaxation time in lysozyme solution
3. 学会等名 第59回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kang Hu, Ryo Shirakashi
2. 発表標題 Electric field alignment dominates the water rotation dynamics in protein solutions
3. 学会等名 the 13th Asian Thermophysical Properties Conference, ATPC2022 September 26-30, 2022, Onlin (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kang Hu, Ryo Shirakashi
2. 発表標題 Effect of local electric field on the rotational dynamics of water dipole in protein solution
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会誌
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kang Hu, Ryo Shirakashi
2. 発表標題 coupling Between the Rotational and Translational Dynamics of Water in Lysozyme Solutions
3. 学会等名 Nineteenth International Conference on Flow Dynamics, November 9 - 11, 2022, Sendai, Miyagi, OS8-4 (国際学会)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------