

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19510103  
 研究課題名（和文）固体核磁気共鳴シミュレーション解析法によるタンパク質結晶の水和構造の研究  
 研究課題名（英文）Hydration Structure in Protein Crystals Studied by Simulation Analysis of Solid Nuclear Magnetic Resonance  
 研究代表者  
 水野 元博（MIZUNO MOTOHIRO）  
 金沢大学・物質化学系・教授  
 研究者番号：70251915

研究成果の概要：固体重水素の核磁気共鳴（NMR）スペクトルのシミュレーション解析法を開発し、これらを用いて卵白リゾチーム結晶，アルブミン結晶，フェリチン結晶の水和水のダイナミクスの解析を行った。その結果，これらの結晶中には運動性の低い水分子と低温（200K 付近）まで速い運動をしている水分子が存在することが確認された。200K 以下では速い運動をしていた水分子の速度が急激に遅くなり，水分子の構造（H-O-H 角）に分布が生じることが明らかになった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：物質化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ構造科学

キーワード：複合材料・物性，蛋白質，物性実験

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質結晶は，X線や中性子線によるタンパク質の立体構造決定という立場から重要視されてきたが，構造が解析されたタンパク質の結晶においても，その機能性が注目されるようになってきた。タンパク質の構造や特異的な機能を理解するためには，周囲の水和水の挙動を明らかにすることが極めて重要である。水和水のダイナミクスの解析には中性子散乱法，振動分光法，誘電緩和法，磁

気共鳴法，分子動力学計算など様々な方法が用いられている。

このうち，核磁気共鳴（NMR）法は解析したいローカルな環境をダイレクトに観測できることや他の分光法に比べて遅い運動の解析ができることが特徴である。特に固体<sup>2</sup>H NMR 法はスペクトルの線形から分子運動のモードや速さを詳細に調べることができるため，これらを用いたタンパク質中の水和水のダイナミクスの研究はこれまでに数多く行なわれてきた。しかしながら，タンパク質結晶の物性発現のメカニズムを解明す

る上で十分な情報が得られているとは言い難い。それは、タンパク質の水和水のように運動の速さやモードに広い分布がある場合に、これらを詳細に調べることができる固体 NMR の測定法及び解析法の開発が行なわれていないからである。

これらの状況を踏まえ、独自の固体 NMR のシミュレーション解析法を発展させ、タンパク質結晶の水和構造の高精度の解析を行うことにより、これらの特異的物性を利用した機能性材料開発に役立つ情報を得るという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は固体 NMR の解析法を開発し、これらを用いて、タンパク質結晶中の水分子のダイナミクス、及びタンパク質と水分子の相互作用を調べ、タンパク質結晶の構造の制御に役立つ情報を得ることであった。

固体 NMR の解析法の開発に関しては、複雑な構造及びダイナミクスを有するタンパク質結晶中の水和水の挙動を解析できる固体  $^2\text{H}$  NMR の測定法及び得られたスペクトルの線形を解析するコンピューターシミュレーションのプログラムを開発し、新規の固体  $^2\text{H}$  NMR のシミュレーション解析法を開発することを目指した。また、タンパク質結晶の温度や水和量の変化に伴う、構造の変化と水分子のダイナミクスの関係を詳細に調べ、タンパク質結晶のガラス転移などマクロな物性への水分子の影響を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 固体  $^2\text{H}$  NMR の解析法については以下の内容の開発を試みた。

- ① 分子運動の回転角に広い分布がある場合のスペクトルのシミュレーションプログラムの開発
- ② 非常に遅い分子運動（相関時間  $10\sim 10^3$  s）を解析することができる二次元交換スペクトルについて、複数の運動が同時に起こったときのスペクトルの線形変化をシミュレーションできるプログラムの開発
- ③ 非常に遅い分子運動（相関時間  $10\sim 10^3$  s）を解析することができる Stimulated echo のシミュレーションプログラムの開発
- ④ 常磁性試料について、試料のマジック角回転（MAS）を利用した固体  $^2\text{H}$  NMR スペクトルの分子運動による線形変化をシミュレーションできるプログラムの開発

⑤ 常磁性試料について、異なった環境に存在する水分子の固体  $^2\text{H}$  NMR スペクトルを分離解析する測定法及び得られたスペクトルのシミュレーションプログラムの開発

(2) タンパク質結晶の水和水のダイナミクスの解析は以下の方法で行った。

試料：タンパク質結晶には卵白リゾチーム、ウシ血清アルブミン、ウマ脾臓フェリチンを用い、重水で再結晶して、それぞれのタンパク質について水和量の異なった試料を調製した。

熱測定：各試料について、示差走査型熱量計（DSC）を用いて、ガラス転移温度や水和水の凍結温度を調べた。

固体 NMR：固体  $^2\text{H}$  NMR を用いたタンパク質結晶の研究においては広幅スペクトル、QCPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) スペクトル、試料をマジック角回転させて得られる MAS スペクトル、スピナー格子緩和時間 ( $T_1$ ) の温度変化を測定した。広幅スペクトルについては多重パルスによって運動性の低い水和水のスペクトルを消去し、運動性の高い水和水のスペクトルだけを選択的に取り出すことも行なった。測定したスペクトルは(1)で開発したシミュレーションプログラムによって解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 固体  $^2\text{H}$  NMR の解析法の開発

- ① 本研究で開発した分子運動の構造や運動性に広い分布がある場合のスペクトルのシミュレーションプログラムをタンパク質結晶の水和水のダイナミクスの解析に応用した [研究成果 (2) 参照]。
- ② 二次元交換スペクトルのシミュレーションプログラムを開発し、水和物イオンの回転と水分子の  $180^\circ$  フリップが同時に起こる複雑な運動を解析することに成功した。
- ③ Stimulated echo のシミュレーションプログラムを開発し、タンパク質結晶でも起こることが予想される、結晶中の水分子など小分子の遅い拡散の解析に有効であることを示した。
- ④ 常磁性相互作用を考慮した  $^2\text{H}$  NMR の MAS スペクトルの分子運動による線形変化をシミュレーションできるプログラムを開発し、分子運動の解析が困難な常磁性物質においても広い速度領域で、水分子のダイナミクスの解析を行うことができるようになった。
- ⑤ 常磁性シフトを利用した二次元スペクトルの測定法及び解析法を開発し、常磁性イオンと直接結合した結晶水と結合していない

配位水を分離し、それぞれの水分子の運動モードや速さの解析に成功した。

これらの内容は、The Journal of Physical Chemistry A などの欧文誌に掲載された。

## (2) タンパク質結晶の水和水のダイナミクスの解析

### リゾチーム結晶・アルブミン結晶

リゾチーム結晶及びアルブミン結晶について、固体  $^2\text{H}$  NMR の広幅スペクトルを室温から 173 K までの温度範囲で測定し、スペクトルのシミュレーション解析を行った。図 1 にリゾチーム結晶の広幅スペクトルの温度変化を示す。図 2 に水分子の運動と得られるスペクトルの線形を示す。これらのシミュレーションから、リゾチーム結晶の  $^2\text{H}$  NMR 広幅スペクトルの温度変化は図 2 に示す水分子の運動で説明できることがわかった。

273 K ではほとんどの水分子が速い等方回転を起しシャープなスペクトルを示しているが、223 K 付近から温度が下がるにつれて、ブロードな成分の割合が増大していった。低温では回転的振動だけが起きている運動性の低い水分子と回転的振動と  $180^\circ$  フリップが起きている運動性の高い水分子が存在することが明らかになった。

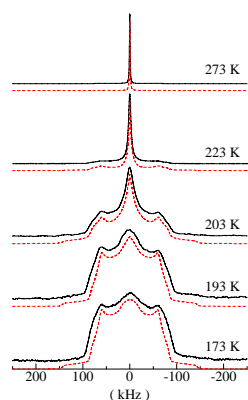


図 1 リゾチーム結晶の  $^2\text{H}$  NMR 広幅スペクトルの温度変化。赤点線はシミュレーション

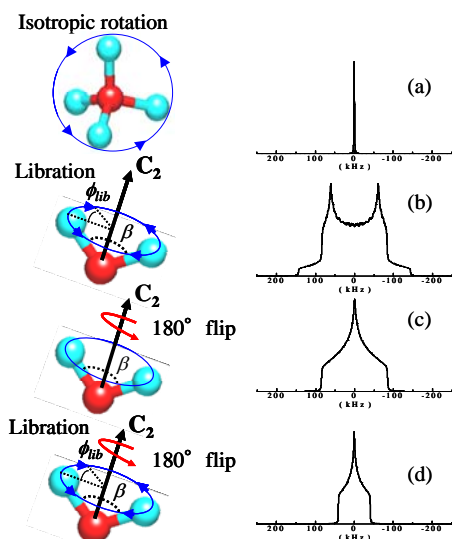


図 2 速い水分子の運動が起こったときの  $^2\text{H}$  NMR 広幅スペクトルのシミュレーション。(a)等方回転、(b) $\text{C}_2$  軸周りの回転的振動、(c) $180^\circ$  フリップ、(d)  $\text{C}_2$  軸周りの回転的振動を伴った  $180^\circ$  フリップ

スペクトルのシミュレーション解析により、運動性の高い水分子の回転的振動の振幅及び H-O-H 角には分布が存在することが明らかになった。

図 3 に水分子の回転的振動の振幅  $\phi_{\text{lib}}$ 、図 4 に H-O-H 角  $\beta$  の分布を示す。200 K 以下で  $\phi_{\text{lib}}$  の分布の中心が低角度側にシフトし、 $\beta$  の分布が著しく大きくなることがわかった。同様の結果はアルブミン結晶においても得られた。

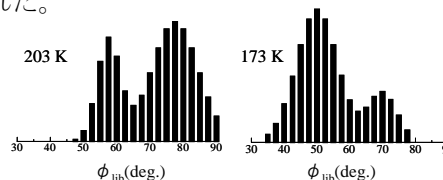


図 3  $\text{C}_2$  軸周りの回転的振動を伴った  $180^\circ$  フリップにおける回転的振動の角度分布

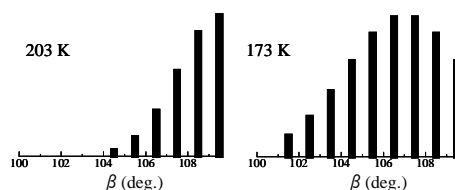


図 4 水分子の H-O-H 角 ( $\beta$ ) の分布

また、QCPMG スペクトルの温度変化の測定及びシミュレーション解析により 200 K 付近で凍結する水和水の存在を明らかにした。リゾチーム結晶及びアルブミン結晶では 200 K 付近にガラスが報告されているが、このガラス転移は本研究で明らかになった水分子の構造変化及び運動の凍結と密接に関係していることが予想される。

### フェリチン結晶

#### フェリチン結晶

フェリチン結晶においては、室温から 243 K までの温度領域において  $^2\text{H}$  NMR の広幅スペクトルに顕著な温度変化は観測されなかった。これに対し、 $^2\text{H}$  NMR の MAS スペクトルには図 5 に示すように、温度低下に伴うピークの線幅の増大が観測された。本研究(1)④で開発したシミュレーションプログラムにより解析した結果、水分子の  $180^\circ$  フリップの活性化エネルギーが  $19\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  と見積もることができた。

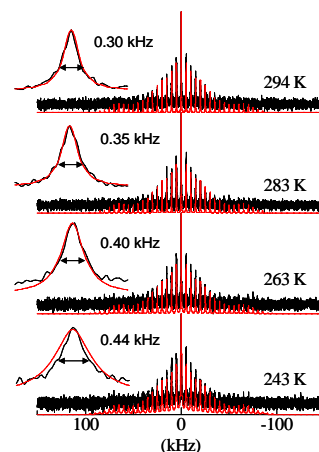


図 5 フェリチン結晶における  $^2\text{H}$  NMR MAS スペクトルの温度変化。赤線はシミュレーション

プログラムにより解析した結果、水分子の  $180^\circ$  フリップの活性化エネルギーが  $19\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  と見積もることができた。

本研究では、 $^2\text{H}$  NMR スペクトルのシミ

ュレーション解析法を開発し、従来よりも広いダイナミックレンジでより複雑な水和水の運動や構造を解析することができた。開発した解析法により、タンパク質結晶中の様々な水和水のダイナミクスについてモードや速さを明らかにすることができた。また、これらの水和水のダイナミクスや構造とガラス転移との関係を見出すことができた。

今後は本研究で開発した  $^2\text{H}$  NMR スペクトルの分離解析法や  $^{17}\text{O}$  NMR を用いてタンパク質結晶の水和水の解析を行うことにより、タンパク質結晶の機能と直接結び付いた水和水の構造やダイナミクスを明らかにしたい。また、水分子の  $^2\text{H}$  とタンパク質の  $^{13}\text{C}$  や  $^1\text{H}$  の相関を解析できる二次元 NMR 法を進展させ、タンパク質と水和水との相互作用を明らかにしたい。

#### 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 Y. Suzuki, M. Sato, K. Takanohashi, T. Ida, M. Mizuno\*  
Deuterium NMR Study of Molecular Dynamics and Phase Transition in Acetonitrile Crystal  
*J. Phys. Chem. A*, **112**, 13481-13486 (2008), 査読有
- ② T. Araya, A. Niwa, M. Mizuno\*, K. Endo  
Dynamics of  $[\text{Zn}(\text{D}_2\text{O})_6]^{2+}$  in  $[\text{Zn}(\text{D}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$  Crystal as Studied by 1D, 2D Spectra and Spin-Lattice Relaxation Time of  $^2\text{H}$  NMR  
*Chem. Phys.*, **344**, 291-298 (2008), 査読有
- ③ T. Uemura, S. Horike, K. Kitagawa, M. Mizuno, K. Endo, S. Bracco, A. Comotti, M. Nagaoka, S. Kitagawa  
Conformation and Molecular Dynamics of Single Polystyrene Chain Confined in Coordination Nanospace  
*J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 6781-6788 (2008), 査読有
- ④ H. Nakai, T. Nonaka, Y. Miyano, M. Mizuno, Y. Ozawa, K. Toriumi, N. Koga, T. Nishioka, M. Irie, K. Isobe  
Photochromism of an Organorhodium Dithionite Complex in the Crystalline-State: Molecular Motion of Pentamethylcyclopentadienyl Ligands Coupled to Atom Rearrangement in a Dithionite Ligand  
*J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 17836-17845 (2008), 査読有
- ⑤ Y. Miyano, H. Nakai, M. Mizuno, K. Isobe  
Substitution Effects of Cp Ring Benzyl Groups

on Photoisomerization of a Rhodium Dithionite Complex in the Crystalline State

*Chem. Lett.*, **37**, 826-827 (2008), 査読有

⑥ M. Mizuno\*, Y. Suzuki, K. Endo, M. Murakami, M. Tansho, T. Shimizu  
Molecular Dynamics in Paramagnetic Materials as Studied by Magic-Angle Spinning  $^2\text{H}$  NMR Spectra

*J. Phys. Chem. A*, **111**, 12954-12960 (2007), 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 新屋隆士, 宮東達也, 水野元博  
固体 NMR によるリゾチーム結晶中の水和水のダイナミクスと構造の研究  
日本化学会第 89 春季年会 2009. 3. 30, 船橋
- ② M. Mizuno, T. Araya, T. Miyato  
Hydration Water Dynamics in Biomaterials Studied by Simulation Analysis of Deuterium Solid-State NMR  
Joint International Open Symposium for Molecular Science and Fluctuations toward Biological Functions 2009.3.17 Okazaki, Japan
- ③ 宮東達也, 新屋隆士, 水野元博  
固体  $^2\text{H}$  NMR によるウシ血清アルブミン結晶中の水和水のダイナミクスの研究  
平成 20 年度日本化学会近畿支部北陸地区講演会と研究発表会 2008. 11. 15, 福井
- ④ 新屋隆士, 宮東達也, 水野元博  
固体 NMR によるフェリチン結晶の水和水のダイナミクスの研究  
第 47 回 NMR 討論会 2008. 11. 12, つくば
- ⑤ 新屋隆士, 水野元博  
固体 NMR によるリゾチーム結晶の水和水のダイナミクスと物性の研究  
分子科学討論会 2008 2008. 9. 25, 福岡
- ⑥ 新屋隆士, 水野元博, 遠藤一央  
固体 NMR によるリゾチーム結晶の水和水のダイナミクスと局所構造の研究  
日本化学会第 88 春季年会 2008. 3. 28, 東京
- ⑦ M. Mizuno, Y. Suzuki, K. Endo, M. Murakami, M. Tansho, and T. Shimizu  
Development of Solid-State NMR Simulation for Analysis of Coordination Space  
2007. 12. 9 Awaji, Japan.
- ⑧ M. Mizuno, Y. Suzuki, K. Endo, M. Murakami, M. Tansho, and T. Shimizu  
Separation of  $^2\text{H}$  MAS NMR Spectra in Paramagnetic Compounds by Two-Dimensional Spectroscopy  
16<sup>th</sup> Triennial Conference for the International Society of Magnetic Resonance 2007. 10. 13 Kenting, Taiwan.

〔図書〕（計 1 件）

① 北川進, 水野元博, 前川雅彦  
多核種の溶液および固体NMR  
錯体化学会選書 4 三共出版, 349 ページ  
(2008).

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://chem.s.kanazawa-u.ac.jp/theo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 元博 (MIZUNO MOTOHIRO)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：70251915

