

# 生体分子の構造化学

生体分子の構造化学（課題番号：147003）

研究期間：平成 26 年 7 月 29 日～平成 29 年 3 月 31 日

研究代表者：弟子丸正伸 研究員：安東勢津子（平成 28 年 3 月 31 日まで）、吉田亨次

## 研究概要

水は生命にとって不可欠の物質であり、タンパク質を始めとする生体分子が機能を発揮するためにはタンパク質分子の周囲が水分子によって取り囲まれている必要がある。一方、水は最もありふれた物質であるが、4℃で密度が最大になるなど、他の液体に比べて異常な性質を持つことはよく知られている。我々は水の異常性が生体分子の機能発現と密接に関連していると考え、X線などを用いてタンパク質の水和構造の静的および動的な側面に関する研究を行った。X線は波長が原子間距離に相当するため、原子レベルでのタンパク質の水和構造が明らかにすることができる。近年、大型放射光施設による高強度のX線ビームを利用することにより、高いエネルギー分解能での非弾性散乱測定が可能になり、水和タンパク質の原子の運動を明らかにすることが可能になった。本研究では、X線散乱等により、水和タンパク質やタンパク質水和水の構造とダイナミクスを明らかにした。その結果から生体分子の機能発現に対する水の役割について考察した。

## 1. タンパク質水和水の液体構造

### 1-1. 序論

水の異常性を説明する一つの仮説として、水の液体-液体相転移仮説が提唱されている[1]。これはある温度・圧力条件下で高密度水と低密度水の1次相転移が生じるというものであるが、転移温度と予想される温度(220 K付近)では、水が液体状態として存在できないため、実験的な検証は不可能である。一方、タンパク質周囲の水は0℃以下でも凍らない不凍水であるため、タンパク質水和水の構造が液体-液体相転移温度付近でどのように変化するのかを調べることは興味深い。対象にしたタン

パク質はポリペプチド (polyglycine, polyalanine, poly-L-lysineの3種類)、β-ラクトグロブリン、リゾチーム、アクチンフィラメント、不凍タンパク質である。ポリペプチドとタンパク質はどちらもアミノ酸が一次元でつながった高分子であるが、前者はランダム構造(アンフォールド状態)、後者はフォールド状態にある。また、アクチンフィラメントはアクチンが重合してできた繊維状高分子である。不凍タンパク質は氷核に吸着し、氷の成長を阻害するという機能を有する[2]。これら様々な特徴を持つ生体高分子の水和水の構造を調べるために、タンパク質に水を吸着させた試料を調製し、示差走査熱量計(DSC)によりタンパク質水和水の熱力学的性質およびX線回折測定によりタンパク質の水和構造を調べた。

### 1-2. 実験方法

タンパク質粉末を減圧下(10<sup>-2</sup> Pa)で乾燥させた後に電解質飽和水溶液とともにデシケーター中に入れ、水の飽和水蒸気圧下で水和させた。このようにして得られた水和タンパク質粉末をアルミ製円筒管に封入し、DSC6100 (Seiko Instruments Inc)を用いて、298~373 Kの温度範囲でDSC測定を行った。昇温・降温速度は5 K/minで行った。

X線回折はリガク製イメージングプレートX線回折装置(Rapid-II)を使用した。水和ペプチドおよび水和タンパク質粉末を2 mmφの石英毛細管に封入し、298 Kから180 Kまでの温度範囲で回折を測定した。空の毛細管の散乱を差し引き、既報の方法[3]により構造関数を求め、そのフーリエ変換により水和ペプチドおよびタンパク質の動径分布関数を得た。比較のために乾燥タンパク質の測定も行った。

1-3. 結果および考察

1-3-1. DSC測定

Table 1 に代表的な水和タンパク質の凍結温度、溶解温度ならびに不凍水の量（乾燥タンパク質 1 g に対する不凍水の g 量）を示した。poly-L-lysine の凍結温度は polyglycine や lysozyme よりも低い。poly-L-lysine は側鎖に電荷を持っているため、水分子との静電相互作用が強く、水構造に対してより大きな影響を与えているためだと考察した。また、いずれの試料についても不凍水の割合は 0.38 程度であり、これはタンパク質の表面を幾何学的に水分子が覆う量に相当する。すなわち、タンパク質の第 1 層の水和水は不凍水であると考えられる。

1-3-2. X線回折測定

まず、純水の構造について述べたい。Fig. 1 に氷 Ih の構造を示した。氷は水分子が正四面体構造を作るように水素結合で結びついており、隙間の多い構造をしている。一方、水では氷のような長距離秩序は存在しないが、短距離では氷は氷類似構造を示す。X線回折測定で得られる動径分布関数では、2.8Å、4.5Å、7Å にピークが見られ、それぞれ第 1、2、3 配位圏の水分子（酸素

原子）に相当する。タンパク質分子との相互作用および温度によって、これらのピークがどのように変化するかを明らかにすることにより、水の構造について考察することができる。

Fig. 2(a) に水和 polyglycine の動径分布関数を示す。比較のために乾燥状態の結果も黒線で示している。水和状態では、3.8Å、4.5Å および 7Å 付近のピークが増加し、これらは polyglycine と水和水の相互作用であることがわかる。温度の低下に伴い、これらのピークはやや増加した。poly-L-lysine では polyglycine、polyalanine に比べて、親水性が高いため、水和率の高い ( $h=0.82$ ) の試料が作成できた。この試料は 240K 以下で、水和水が凍結し、氷由来のブラッグピークが出現するため、それ以下の温度での測定は行わなかった。一方、 $h=0.54$  の試料では、低温でも氷形成は生じなかった。poly-L-lysine でも温度の低下に伴い、3.8Å、4.5Å および 7Å 付近のピークが増加した。これらは水和水の構造性が高まっていることを示している。polyglycine、polyalanine の結果と比べると、これらのピークの温度変化は大きい。親水性アミノ酸の周囲では水和水の構造形成が容易であることが分かった。

Table 1. 各種水和タンパク質の凍結温度、溶解温度ならびに不凍水の量

	Hydration level of samples	Freezing temperature / K	Melting temperature / K	Amount of unfrozen water
lysozyme	0.81	252	261, 265	0.37
polyglycine	0.57	258	269	0.38
poly-L-lysine	0.57	220	230, 240	0.38

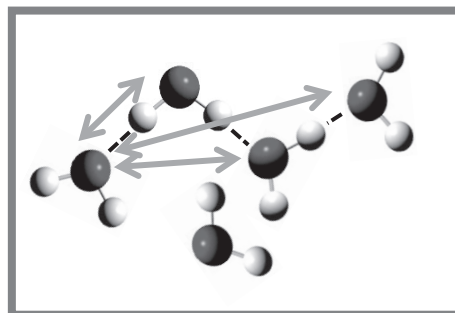
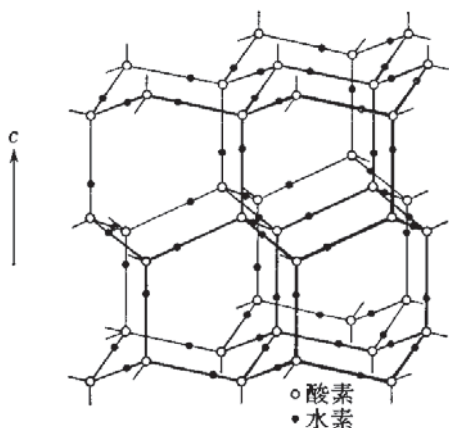


Fig. 1 氷Ihの構造と水の第1、第2、第3配位圏

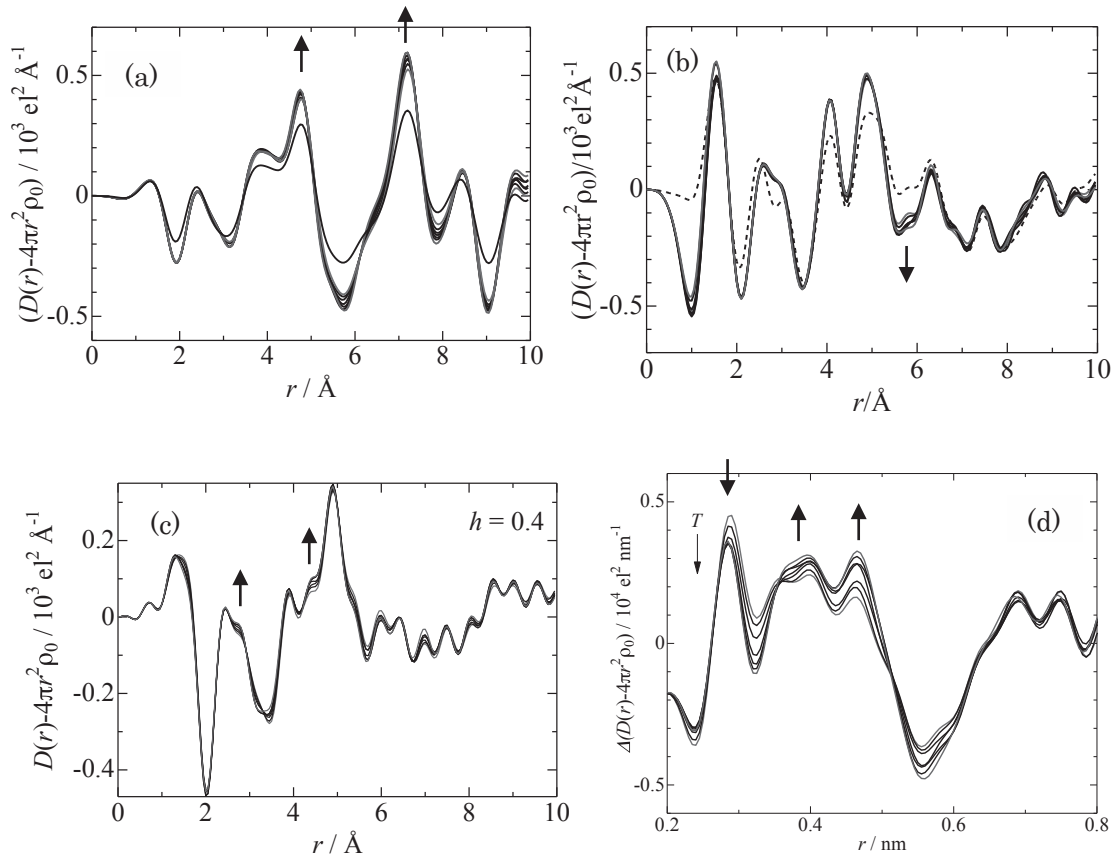


Fig. 2 X線回折測定から得られた水和タンパク質の動径分布関数 (a) polyglycine  $h=0.28$  (b)  $\beta$ -lactoglobulin  $h=0.4$  (c) actin filament  $h=0.4$  (d) anti-freezing protein  $h=0.4$ 。温度は298Kから180Kまで変化させた。↓は温度の低下によりピークが変化する方向を示す。

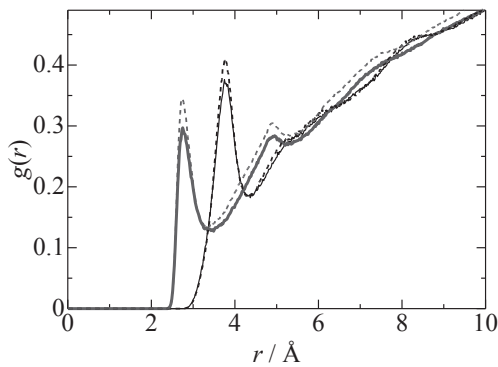


Fig. 3 MD計算によるアクチンフィラメントと水分子との動径分布関数。太線はタンパク質の酸素原子と水分子の酸素原子、細線はタンパク質の炭素原子と水の酸素原子の相互作用を表す。実線は300K、破線は260Kの計算結果である。右の図はMD計算のスナップショットを表す。

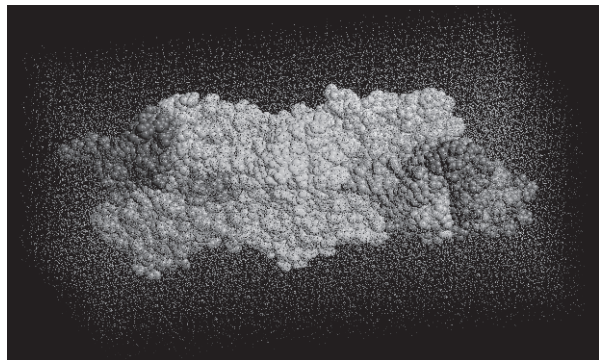


Fig. 2(b)に $\beta$ -ラクトグロブリン (点線は乾燥状態)の動径分布関数を示す。水和状態では2.8Å、4Å、4.8Åのピークが増加していることが見られる。これらはタンパク質の親水基と水素結合している水、あるいは水-水相互作用 (第1水和圏) (2.8Å)、タンパク質の疎水基周囲の水 (4Å)、タンパク質の親水基の第2水和圏の水 (4.8Å) にそれぞれ帰属される。温度が低下してもこれらのピークはほとんど変化しなかった。

Fig. 2(c)にアクチンフィラメントの結果を示す。乾燥状態では5Å付近のピークが大きい、これはヘリックス構造を反映していると思われる。このピークは温度が変化してもほとんど変化しなかった。2.8Åと4.5Å付近のピークは温度の低下とともにやや増加した。これらのピークは $\beta$ -ラクトグロブリンの場合と同様に水和構造に帰属される。しかし、 $\beta$ -ラクトグロブリンとは異なり、温度低下による水構造の強化が示唆された。

Fig. 2(d)に不凍タンパク質の動径分布関数を示す。温度の低下とともに2.8Å、付近のショルダーが成長し、4Å、4.8Å、のピークが増大した。低温でも水の形成は見られないが、水和構造は強化されていることを示す。また、室温付近では2.8Åのピークの裾が長距離側に伸びており、水素結合していない水分子の数が増加していることを示している。

### 1-3-3. MDによる動径分布関数の帰属

X線回折実験で得られた動径分布関数のピークの帰属を行うため、水中の不凍タンパク質の分子動力学(MD)計算を行った。Fig. 3にタンパク質の酸素原子と水分子の酸素原子、タンパク質の炭素原子と水の酸素原子の動径分布関数を示す。前者では2.8Å、4.7Åにピークが見られ、タンパク質の酸素原子と水素結合している第1配位圏および第2配位圏の水分子に相当する。温度の低下とともにこれらのピークは増大し、水素結合が強化されていることを示している。一方、後者に見られる3.8Åのピークはタンパク質の炭素原子と水分子の酸素原子の距離で、これらは直接に水素結合していない。しかし、温度の低下とともにこのピークも増大しており、親水性相互作用を通じてピークの高さが増加したと思われる。これら温度の低下に対するタンパク質と水分子の相互作用ピークの増大はX線回折の結果と一致している。

### 1-4. 結論

タンパク質分子の第1層に吸着している水は不凍水であることがわかった。この水は温度の低下とともに水素結合が強化され、バルク水で見られる正四面体類似構造が強化された。親水性アミノ酸の水和水と比べて、温度に対する疎水性アミノ酸の水和水の構造変化は小さい。 $\beta$ -ラクトグロブリンでは、ポリペプチドの場合と同様の位置に水和水の存在が確認されたが、温度に対する構造の変化は小さい。アクチンフィラメントや不凍タンパク質では、第1層に水和している水分子が低温では主にタンパク質と水素結合しているのに対し、室温付近では水素結合していない水分子の数が増加した。これら水構造の変化は機能との関連が示唆される。

## 2. 水和タンパク質のダイナミクス

### 2-1. 序論

タンパク質の運動は階層性を持つことが知られており、タンパク質の機能と直接関係があるドメイン運動(ナノ秒からマイクロ秒の時間スケール)から分子間相互作用に基づくタンパク質の側鎖および水和水分子の振動、回転運動(ピコ、フェムト秒の時間スケール)まで幅広い。これら両者のダイナミクスを結び付けるモデルが提唱されており[4]、タンパク質の機能発現を構造化

学的に説明するためには後者のダイナミクスの観測が重要であると考えられる。近年、中性子散乱[5, 6]、NMR[7]、テラヘルツ分光[8]などにより、水和タンパク質のダイナミクスが測定され、タンパク質のガラス転移に代表される動的転移が見出されている。この現象は約220 Kで起こり、前述の水の液体-液体相転移との関連が示唆されている。

本研究では、X線非弾性散乱および中性子準弾性散乱により、水和ポリペプチド、アクチンフィラメント、不凍タンパク質のダイナミクスを測定した。

### 2-2. 実験

ポリペプチド試料はpolyglycineならびにpoly-L-lysine粉末を用いた。poly-L-lysineは水溶液中でランダム構造(中性溶液)、あるいはヘリックス構造(塩基性溶液)をとる。poly-L-lysine粉末を純水に溶解し、pH=12に調整したのちに、凍結乾燥させた試料をヘリックス状態のpoly-L-lysine粉末とした。一方、pH=7で調整したpoly-L-lysine粉末をランダム状態の試料とした。水の飽和蒸気圧下で乾燥ポリペプチド粉末を放置することにより水和ポリペプチドを得た。水和率(乾燥ポリペプチド1gに対する水のグラム量)は0.4である。

F-アクチン(actin filament)はウサギ筋肉アセトンパウダーより抽出・精製したG-アクチンを重合させることにより調製した。また、不凍タンパク質Ⅲ型(AFP-Ⅲ)はA/F protein社から購入し、そのまま用いた。これらタンパク質はポリペプチドと同様の方法でH<sub>2</sub>O蒸気を吸着させ、水和タンパク質を調製した。

中性子準弾性散乱測定では、FRM-II(ミュンヘン)に設置の飛行時間型分光器(TOFTOF)を用いた。アルミ平板セルに水和タンパク質粉末を充填し、インジウムシールにより封入した。装置の分解能関数はバナジウム板の散乱から求めた。測定温度は283Kから240Kまでである。

高分解能X線非弾性散乱測定はBL35XU(SPring-8)で実施した。測定した波数ベクトル $Q$ の範囲は20-28 nm<sup>-1</sup>である。エネルギーの範囲は±30 meVで2から3回の掃引を繰り返した。測定温度は室温から180 Kまでである。セルは単結晶サファイアを用いた。サファイア棒で同心二重管を作成し(窓厚は0.15 mm)、光路長が5 mmになるように外管と内管の間に試料を充填し、エポキシ接着剤でシールした。同一試料では個々のスキャンにおけるスペクトルの有意の変化はなく、X線照射による試料の損傷の可能性は少ないと考えられる。plexiglasの散乱も測定し、装置の分解能関数とした。

### 2-3. 結果および考察

#### 2-3-1. 水和タンパク質の中性子準弾性散乱

Fig. 4に、中性子準弾性散乱測定から得られたElastic

intermediate scattering function (EISF) を示した。ここで  $Q$  は散乱による運動量遷移の大きさである。EISF は散乱強度における弾性成分 + 非弾性成分に対する弾性成分の比であり、装置の時間分解能に相当する時間にプロトンが運動する領域の form factor と解釈できる。温度の低下とともに EISF は減少し、水和水のプロトン（タンパク質のプロトンも含む）の運動性は低下した。特徴的なことは、263 K と 250 K の間で EISF の減少の割合が大きく、この温度付近で、水和水の運動の急激な低下が起こっている。

AFP の氷核認識機能の原因として、氷構造にマッチするように AFP の側鎖が立体的に配列していることが考えられている。室温付近では水和水は乱れた構造を取っているが、温度が低下すると、氷類似構造を取ろうとする。この時に上述の AFP の側鎖配置は共同的に水和水の氷類似構造（正四面体類構造）を発達させる。そのため、260 K 付近で水和水のダイナミクスに大きな変

化が生じたと考えられる。

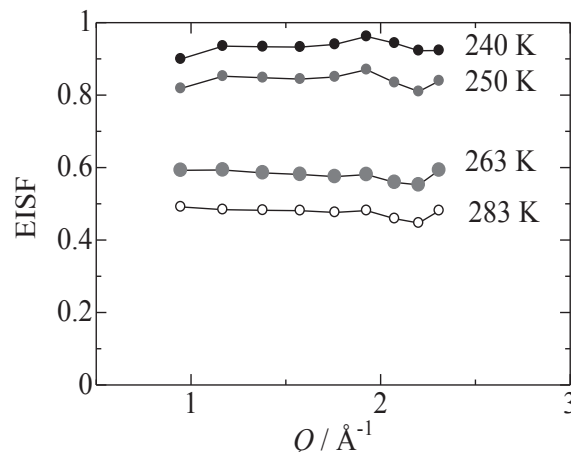


Fig. 4 水和不凍タンパク質Ⅲ型の中性子準弾性散乱から得られた EISF

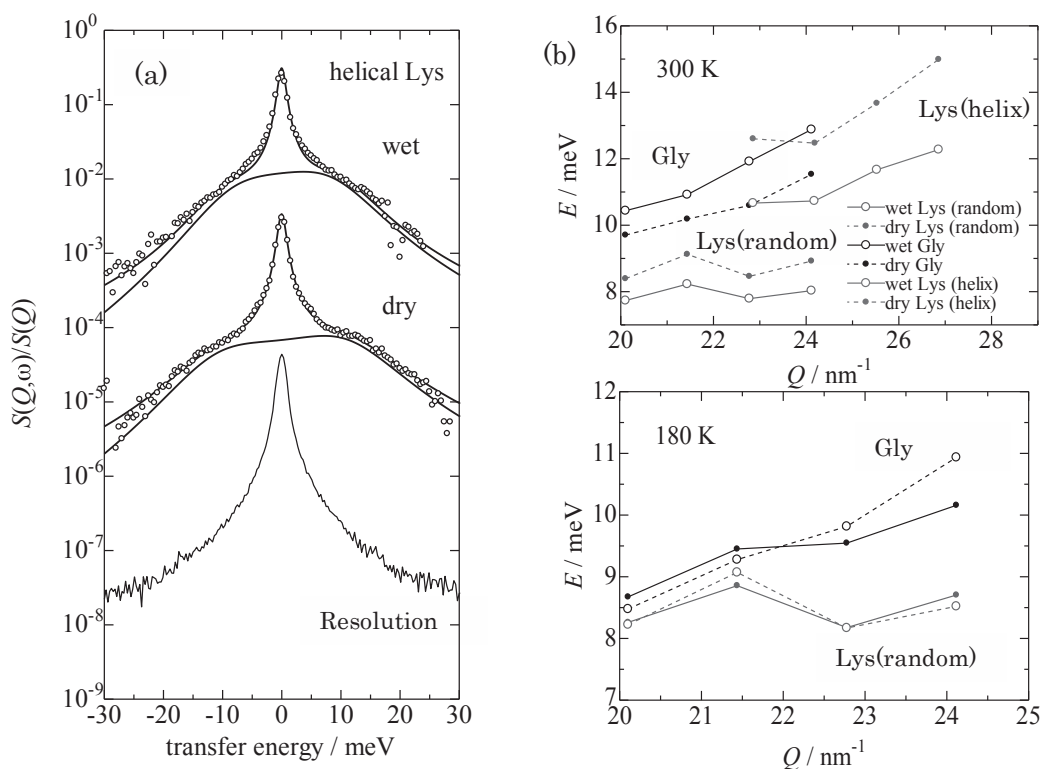


Fig. 5 (a) 水および乾燥状態の poly-L-lysine (helical) の X 線非弾性散乱スペクトル  $Q=24.1\text{nm}^{-1}$  および温度は 300K (b) 水とポリペプチドの励起エネルギーの  $Q$  依存性

### 2-3-2. 水とポリペプチドの X 線非弾性散乱測定

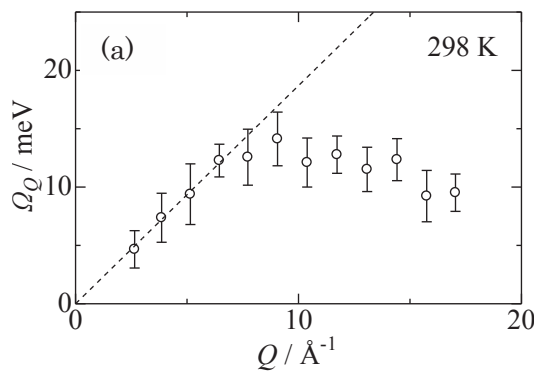
吸収補正後の試料の散乱から空セルの散乱を差し引いた。Fig. 5(a) に乾燥ならびに水和水状態の poly-L-lysine (ヘリックス) 粉末の X 線非弾性散乱スペクトル  $S(Q, \omega)$

を示した。一番下は分解能関数である。  $S(Q, \omega)$  の解析には以下の Damped Harmonic Oscillator (DHO) モデルを使用した。

$$S(Q, \omega) = \frac{\hbar\omega/k_B T}{1 - \exp(-\hbar\omega/k_B T)} \left[ \frac{A_0}{\pi} \frac{\Gamma_0}{\Gamma_0^2 + \omega^2} + \frac{A_Q}{\pi\hbar/k_B T} \frac{4\omega_Q\Gamma_Q}{(\omega^2 - \Omega_Q^2)^2 + 4\omega^2\Gamma_Q^2} \right]$$

ここで、 $\omega_Q = \sqrt{\Omega_Q^2 - \Gamma_Q^2}$  である。 $A_0$ と $\omega_0$ は中心のローレンツ関数の強度と半値半幅で、 $A_Q$ ,  $\Omega_Q$ ,  $\Gamma_Q$ はそれぞれDHO成分の強度、励起エネルギー、半値半幅である。

Fig. 5(b)にDHOエネルギーの分散関係を示した。180 Kでは、乾燥試料と水和試料のDHOエネルギーの差は小さいが、300 Kでは、poly-L-lysine (ランダム状態、ヘリックス状態とも) について、水和試料のほうが乾燥試料よりもDHOエネルギーが小さい結果が得られた。これはリゾチームなどで見られる phonon energy softening (生理学的温度で水和タンパク質の柔軟性が増大すること) と同一の現象である [11]。一方、polyglycine では、300Kにおいて乾燥試料よりも水和試料のほうがDHOエネルギーが高くなった。このことから、phonon energy softeningはタンパク質の主鎖よりも側鎖が原因となっ



ていることが示された。

また、DHOエネルギーに対する水和の効果は180 Kよりも300 Kにおいて顕著になることは、中性子準弾性散乱などで見られるタンパク質のガラス転移と同様に動的転移の一種であると考えられる。

Fig. 6 に水和AFPの励起エネルギーと  $Q$  の関係 (分散関係) を示した。 $Q$  が  $9 \text{ nm}^{-1}$  付近までは、励起エネルギー  $\Omega_Q$  は  $Q$  に対して比例関係にあり、高周波音速を求めると、約  $2700 \text{ ms}^{-1}$  であった (バルク水では約  $3200 \text{ ms}^{-1}$ )。また、DHO半値半幅  $\Gamma_Q$  は  $Q^2$  に対して比例関係にある。これは  $\Gamma_Q$  が  $Q$  に対して比例関係にあるバルク水の場合とは対照的である。

AFPでは高周波音速は増加した。水和タンパク質が220 K付近を境に“硬く”なっていることを示し、水の液体-液体相転移との関連が示唆された。

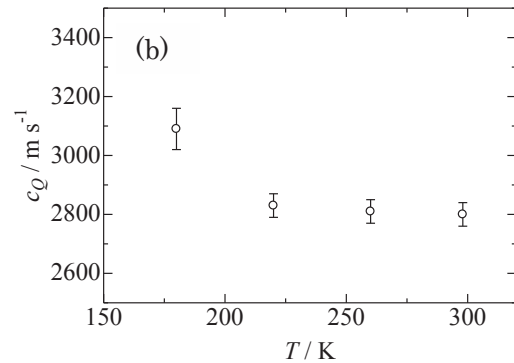


Fig. 6 X線非弾性散乱測定によって得られた水和不凍タンパク質の(a)分散関係と(b)高周波音速

### 2-4. 結論

水和タンパク質などのダイナミクスがX線非弾性散乱および中性子準弾性散乱により測定された。タンパク質周囲の水は不凍水であるが、低温では運動は遅い。室温付近で運動が容易になり、高周波音速が低下する(=“柔らかくなる”)ことがわかった。水の存在により、タンパク質分子が動きやすくなり、その結果、タンパク質は機能を発揮することができるというシナリオを裏付ける結果が得られた。

### 3. 結言

X線や中性子散乱測定などを用いて、タンパク質周囲の水の静的および動的構造を明らかにした。水和タンパク質分子の第1層の水は低温状態でも氷は形成しないが、低温では水素結合が強くなり、水構造が強化される。この水構造の強化は親水性残基の周囲で顕著である。温度の上昇とともに水和水の運動性が上昇し、水和タンパク質自身の運動性も上がる。タンパク質が機能を発揮するためには分子が柔軟である必要があるが、周囲の水の存在によってその柔軟性を獲得していると考

えられる。タンパク質周囲の水がその柔軟性を失うのは220 K以下である。この温度は水の異常性を説明する液体-液体相転移仮説の相転移温度と似通っている。このことは、タンパク質の柔軟性を与えるものがなぜ水でなければならないかという問いに解答を与えるのではないだろうか。

上善は水の如し——古来、水は全ての生物を活かすものと言われてきた。シンクロトロン放射光や大強度中性子源など最新のテクノロジーによって、分子スケールにおける水と生体分子との関わりが明らかになりつつある。

### 参考文献

- [1] P.H. Poole, et al., *Nature* **360**, 324-328 (1992).
- [2] Z. Jia, et al., *Trends Biochem. Sci.* **27**, 101-106 (2002).
- [3] K. Yoshida, et al., *J. Mol. Liquids* **217** 57-61 (2016).
- [4] H. Frauenfelder, et al., *IUBMB Life* **59**, 506-512 (2007).
- [5] W. Doster, et al., *Nature* **337**, 754-756 (1989).
- [6] H. Nakagawa et al., *J. Phys. Soc. Jpn.* **79**(8), 083801-1-4 (2010).
- [7] A. Mittermaier, et al., *Science* **312** 224-228

(2006). [8] S. Kawaguchi, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 10255-10262 (2010). [9] D. Liu, et al., *Phys. Rev. Lett.* **101**, 135501-1-4 (2008). [10] K. Yoshida, et al., *J. Chem. Phys.* **133**, 134501-1-7 (2010). [11] Z. Wang, et al., *J. Phys. Chem. B* **117**, 1186-1195 (2013).

## 研究業績

- [1] T. Takekiyo, K. Yoshida, Y. Funahashi, S. Nagata, H. Abe, T. Yamaguchi, Y. Yoshimura, *J. Mol. Liquids* **243**, 584-590 (2017); doi: 10.1016/j.molliq.2017.08.066
- [2] K. Yoshida, N. Fukuyama, T. Yamaguchi, S. Hosokawa, H. Uchiyama, S. Tsutsui, A.Q.R. Baron, Inelastic X-ray scattering on liquid benzene analyzed using a generalized Langevin equation, *Chem. Phys. Lett.* **680**, 1-5 (2017); doi: 10.1016/j.cplett.2017.05.005
- [3] S. Kittaka, K. Yoshida, T. Yamaguchi, M-C Bellissent Funel, P. Foquet, A neutron spin echo study of low-temperature water confined in the spherical silica pores of SBA-16, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 10502-10510 (2017); doi: 10.1039/C6CP08047B
- [4] 竹清貴浩, 吉村幸浩, 吉田亨次, 山口敏男, 濃厚イオン液体条件下におけるタンパク質の立体構造 (分担), 材料表面の親水・親油の評価と制御設計, 石井淑夫 (監修), テクノシステム, 2016, 545-548.
- [5] K. Yoshida, A. Tashiro, T. Yamaguchi, Thermal properties and hydration structure of poly-L-lysine, polyglycine, and lysozyme, *J. Mol. Liquids* **217**, 57-61 (2016); doi: 10.1016/j.molliq.2015.08.048
- [6] K. Yoshida, A. Q. R. Baron, H. Uchiyama, S. Tsutsui, T. Yamaguchi, Structure and collective dynamics of hydrated anti-freeze protein type III from 180 K to 298 K by X-ray diffraction and inelastic X-ray scattering, *J. Chem. Phys.* **144**, 134505 (2016); doi: 10.1063/1.4944987
- [7] 吉田亨次, 鳥越基克, 山口敏男, メソ細孔性シリカ MCM-41中のグリシンの水和構造, 福岡大学理学集報 **45**(2), 99-106 (2015).
- [8] T. Takekiyo, E. Yamaguchi, K. Yoshida, M. Kato, T. Yamaguchi, Y. Yoshimura, Interaction Site between the Protein Aggregates and Thiocyanate Ion in Aqueous Solution: A Case Study of 1-Butyl-3-methylimidazolium Thiocyanate, *J. Phys. Chem. B* **119** (22), 6536-6544 (2015); doi: 10.1021/acs.jpcc.5b01650
- [9] K. Yoshida, T. Yamaguchi, D. Kawana, T. Yokoo, S. Itoh, Neutron Brillouin scattering of hydrated  $\beta$ -lactoglobulin, MLF Annual report 2013, 33-34 (2014).
- [10] 吉田亨次, 山口敏男 「量子ビームで見るタンパク質の水和現象」, 分析化学, **64**, 283-293 (2015); doi:10.1063/1.4944987
- [11] K. Ito, K. Yoshida, M.-C. Bellissent-Funel, T. Yamaguchi, “Dynamic Properties of Water Confined in Sephadex G15 Gel by Neutron Scattering and Neutron Spin Echo Measurements”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **87**(5), 603-608 (2014); doi: 10.3136/nskkk.62.604
- [12] K. Yoshida, Y. Fukushima, T. Yamaguchi, “A study of alcohol and temperature effects on aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin by viscosity and small-angle X-ray scattering measurements”, *J. Mol. Liquids* **189**, 1-8 (2014); doi: 10.1016/j.molliq.2013.06.022