連載講座

中性子散乱による原子・分子のダイナミクスの観測

IV-2 蛋白質の水和とダイナミクス

中川 洋, 片岡幹雄^{*,†}

日本原子力研究開発機構

319-1195 茨城県那珂郡東海村白方字白根 2 番地の 4

^{*}奈良先端科学技術大学院大学

630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

[†]kataoka@ms.naist.jp

中性子非弾性散乱法では、生理的条件の水溶液環境で機能する蛋白質構造の熱揺らぎを計測することができる。特に、理論研究により溶媒効果の重要性が指摘されてきた THz 領域に観測される低エネルギーダイナミクスの研究には、中性子非弾性散乱実験が威力を発揮する。また、重水素化による蛋白質と水和水の運動の選択的な観測や、分子動力学シミュレーションを援用した水和構造とダイナミクスの解析は、蛋白質の水和研究に有効である。蛋白質機能の分子機構の理解に貢献している最近の研究事例を紹介する。

Key Words : inelastic neutron scattering, incoherent scattering, protein dynamics, hydration, dynamical transition, boson peak, molecular dynamics simulation

1. はじめに

生物が生きるために、水は必要不可欠である。生物細胞の組成の約 80% は水であるといわれており、細胞内の様々な生体分子は水に満たされた環境の下で機能している。生体中の蛋白質の表面には、水和水と呼ばれる通常の水と異なり、水和水と呼ばれる水分子が存在する。蛋白質は、 $k_B T$ で特徴付けられる熱揺らぎによって水和水と一体となって揺らいでいる。水環境中で機能する蛋白質にとって、水は単に溶質を溶かす溶媒として存在するだけでなく、水和することで蛋白質の安定性や酵素反応などに影響を与えている。

中性子非弾性散乱は、水素原子の大きな非干渉性散乱能を利用した水のダイナミクスの研究や、THz 周波数領域に特徴的なガラスの分子ダイナミクスなど、物質科学研究で広く活用されている¹⁾。物質中の原子の熱揺らぎと同程度のエネルギーを持つ中性子は、蛋白質や水和水

のダイナミクスを直接観測するプローブとしても有効である。多自由度複雑系である蛋白質は、水素結合や分子間力などの相互作用により構造が形成されており、その構造は複雑なエネルギー地形を持つ^{2),3)}。水和は蛋白質を構成する原子の集団的な揺らぎに影響を与え、エネルギー地形を変化させる⁴⁾。このような水和とカップルした蛋白質ダイナミクスの変化は、非晶質やガラス物質に共通して見られるガラス転移（蛋白質の場合、動力学転移ともいう）や Boson ピークとして中性子非弾性散乱スペクトルに観測される。蛋白質の物性は非生体物質の物性と共通しているのか、それとも蛋白質に固有の物性があるのか。蛋白質の物性は生理機能の制御とどのように関係しているのか。これらの解明は、物質からなぜ生命が生まれるのかを理解する基礎となるだろう。

蛋白質の中性子非弾性散乱は 1982 年に初めて報告された⁵⁾。その後、1989 年に Doster らが蛋白質の動力学転移に関する論文を発表して

以来⁶⁾, 生体分子の中性子非弾性散乱の論文は年々増えている。蛋白質, DNA, 脂質など様々な生体物質のほか, 最近では細胞内の水分子のダイナミクスを観測するなど⁷⁾, 生物物理学研究において中性子非弾性散乱法の適用範囲は内容的にも広がりを見せている。ここでは, 中性子非弾性散乱による蛋白質の水和に関連した研究についての基礎から応用までを, 具体的な研究例を交えて解説する。

2. 蛋白質の中性子非弾性散乱

2.1 動的構造因子¹⁾

中性子非弾性散乱実験では, 試料との相互作用による中性子の運動量変化とエネルギー変化に対する散乱強度 (2重微分散乱断面積: $d^2\sigma/d\Omega dE$) を測定する。ここで中性子の全散乱断面積 σ は,

$$\sigma = 4\pi \langle b^2 \rangle \quad (1)$$

と定義される。 b は原子の中性子散乱長である。全散乱断面積は, 散乱長の異なる原子がランダムに分布しているときに, 散乱波の位相がそろった干渉性散乱部分 (各原子の散乱長の平均値) と, 位相がランダムな非干渉性散乱部分 (各原子の散乱長の平均値からのずれ) に分けることができる。

$$\sigma = \sigma_{coh} + \sigma_{inc} \quad (2)$$

$$\sigma_{coh} = 4\pi \langle b \rangle^2 \quad (3)$$

$$\sigma_{inc} = 4\pi (\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2) \quad (4)$$

σ_{coh} は干渉性散乱断面積, σ_{inc} は非干渉性散乱断面積である。van Hove の理論によると, 単一の原子種で構成された系の場合, 2重微分散乱断面積は, 試料による散乱の前後における中性子の運動量ベクトルの大きさ k_i, k_f を用いて下記のように書ける。

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} = \frac{k_f}{k_i} \left\{ \frac{\sigma_{coh}}{4\pi} S_{coh}(Q, \omega) + \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} S_{inc}(Q, \omega) \right\} \quad (5)$$

$$S_{coh}(Q, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt \exp(-i\omega t)$$

$$\sum_{\alpha, \beta} \langle \exp(-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_\alpha(0)) \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{R}_\beta(t)) \rangle \quad (6)$$

$$S_{inc}(Q, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt \exp(-i\omega t)$$

$$\sum_{\alpha} \langle \exp(-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_\alpha(0)) \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{R}_\alpha(t)) \rangle \quad (7)$$

$S_{coh}(Q, \omega)$ を干渉性動的構造因子, $S_{inc}(Q, \omega)$ を非干渉性動的構造因子という。ここで, $R_\alpha(t)$ は時間 t における原子 α の位置を表す。干渉性散乱は, 異なる原子の二体時空相関から原子の相対的な位置関係 (構造) や運動に関する情報を与えるのに対して, 非干渉性散乱では構造に関する情報は失われ, それぞれの原子の自己時空相関から運動に関する情報を得ることができる。

2.2 蛋白質の原子組成と非干渉性散乱

蛋白質はアミノ酸を構成要素とする生体高分子である。その原子組成を見ると約半分は水素原子である。表1にあるように, 水素原子の非干渉性散乱断面積は他の元素の散乱断面積に比べて非常に大きい。そのため蛋白質からの中性子散乱は, 水素原子からの非干渉性散乱の寄与が圧倒的となる。また図1のように, 蛋白質中の水素原子は立体構造中にほぼ均一に分布しているため, 中性子非弾性散乱では水素原子の非干渉性散乱を通じて蛋白質の揺らぎを観測することになる。

式(7)のように非干渉性散乱関数は自己相関の項のみで記述されるため, 蛋白質の会合やそれによる蛋白質自身の形状変化そのものは中性子非弾性散乱スペクトルに影響しない。また, 測定のために試料中の蛋白質の向きをそろえる必要がなく, 粉末や溶液などどのような状態でも測定対象となる。さらに, 中性子の高い透過性のために, ペレット状態の生体組織, 細胞や生物個体であっても, それら内部の分子の熱揺

表1 中性子の散乱断面積 (干渉性散乱断面積 σ_{coh} , 非干渉性散乱断面積 σ_{inc} , 全散乱断面積 σ_{tot})

元素	$\sigma_{coh} (10^{-24} \text{cm}^2)$	$\sigma_{inc} (10^{-24} \text{cm}^2)$	$\sigma_{tot} (10^{-24} \text{cm}^2)$
H	1.76	80.27	82.03
D	5.59	2.05	7.64
C	5.55	0.001	5.55
N	11.01	0.50	11.51
O	4.23	0.00	4.23

図1 黄色ブドウ球菌の核酸分解酵素 (SNase) の構造。水素原子を黒で, 他の原子を灰色で示している。

らぎをその場観測することができる。実験試料の形状や状態を問わないという点は, 他の分光学的手法と比較してユニークな点である。

2・3 中性子非弾性散乱スペクトル

図2に蛋白質の中性子散乱スペクトルの模式図を示す^{8), 9)}。熱揺らぎのない0 Kでは, 弾性

散乱ピークのみが観測される。温度上昇に伴い分子振動が生じると, 非弾性散乱スペクトルが観測され, 数百 meV までの広いエネルギー領域において揺らぎの振動数分布がわかる¹⁰⁾。特に, 数 meV 付近に見られる蛋白質の低振動ダイナミクスが生物機能に重要であるといわれているが, この領域を精度良くしかも定量的に測定できることは中性子の特徴の一つである¹¹⁾。さらに温度を上げていくと, 緩和や拡散的な運動由来の準弾性散乱が現れる。非弾性散乱が振動周波数に対応するピークとして観測されるのに対し, 準弾性散乱は弾性散乱ピークの広がりとして観測される。

弾性散乱ピーク強度 $I_{el}(Q)$ は, ガウス近似により,

$$\frac{I_{el}(Q)}{I_{el}(Q=0)} = \exp\left(-\frac{1}{3}Q^2\langle u^2 \rangle\right) \quad (8)$$

と書ける¹²⁾。この式を用いて, 弾性散乱強度の Q 依存性から原子の平均自乗変位 $\langle u^2 \rangle$ を求めることができる。ガウス近似から得られる平均自乗変位の値は, 装置のエネルギー分解能に対応する時間スケールでの位置相関を表す¹³⁾。異なるエネルギー分解能での測定結果からは, 時間スケールによって揺らぎの見かけの振幅がどのように変化するかを調べることができる^{14), 15)}。

2・4 蛋白質と水和水のダイナミクスの分離

蛋白質ダイナミクスに対する水和水効果を調べるときに, 蛋白質と水和水のダイナミクスを分

図2 蛋白質の中性子散乱スペクトルの温度依存性。

図3 軽水と重水の水和蛋白質の中性子散乱の差から、水和水由来の中性子散乱を見積もることができる。

離して観測できれば便利である。中性子非干渉性散乱では、水素原子と重水素原子の散乱長のコントラストを利用することで、蛋白質と水和水を分離して観測することができる。表1のように、重水素に比べて軽水素の非干渉性散乱断面積は圧倒的に大きい。したがって、図3のように軽水水和と重水水和の蛋白質からの散乱の差を取ることで、水和水からの散乱を得ることができる¹⁶⁾。このとき重水素化した蛋白質を用いれば、蛋白質からの散乱を最小限に抑えられるため、より精度良く水和水のダイナミクスを解析できる¹⁷⁾。また通常の軽水素を含む蛋白質を重水で水和させれば、水和水からの散乱は無視できるため、蛋白質のダイナミクスのみを観測できる。

このように単純な方法で蛋白質と水和水の散乱を分離できるのは、自己相関のみを観測する非干渉性散乱の特徴を活かした方法といえる。例えば、干渉性散乱による小角散乱でも重水と軽水の散乱長の差を利用した蛋白質の水和に関する研究は行われている¹⁸⁾。しかし、水と蛋白質の干渉性散乱関数には、蛋白質と水和水のカップリング項が存在するため、それぞれの構造やダイナミクスを分離して解析することはそれほど単純ではない¹⁹⁾。

2.5 分子動力学計算の援用

前述のように、非干渉性非弾性散乱では原子の自己相関を見ているために、構造に関する情報は得ることができない。蛋白質の機能にとって構造は重要であるため、構造情報を与える他の手法を相補的に利用できれば、非干渉性散乱

のデータを最大限に活かすことができる。結晶構造解析を相補的に利用した研究例などがあるが²⁰⁾、最も良く利用されているのが原子の動きをコンピューター上で追跡できる分子動力学 (Molecular Dynamics) シミュレーションである^{8), 21)}。MD シミュレーションでは原子レベルでの分子構造やダイナミクスを可視化できるほか、時々刻々と変化する原子の位置座標の時間変化から動的構造因子を容易に計算できる。式(7)の $R_\alpha(t)$ に、蛋白質や水和水の水素原子の位置座標を入力すれば、動的構造因子 $S_{inc}^{MD}(Q, \omega)$ を計算できる。さらに、次式のように装置のエネルギー分解能 $R(\omega)$ を考慮することで、実験データ $S_{inc}^{exp}(Q, \omega)$ を定量的に再現できる。

$$S_{inc}^{exp}(Q, \omega) = R(\omega) \otimes S_{inc}^{MD}(Q, \omega) \quad (9)$$

ここで、 $\otimes$ は畳み込み積分を表す。

近年、コンピューターのハード面での技術の進展は著しい。MD シミュレーションを利用した生体分子の構造やダイナミクスの研究は盛んに行われており、中性子に限らず様々な実験手法の開発や実験データの解析にも積極的に取り入れられている^{19), 22)}。原子レベルで分子のピコ～ナノ秒のダイナミクスを調べることのできる MD シミュレーションは、中性子散乱実験と非常に相性が良い。非干渉性中性子散乱に MD シミュレーションを援用した解析手法は、相補的・相乗的に実験データをサポートするため、生体分子の構造やダイナミクスの解析に有効な研究手段になりつつある。

3. 蛋白質ダイナミクスと水和

蛋白質の構造は様々な相互作用が絡み合っており、エネルギー的にフラストレートしている^{2),3)}。このため蛋白質は多くの準安定構造を持ち、この準安定構造間の遷移に伴う構造変化が機能に結びついていると考えられている²³⁾。蛋白質表面に配位している水和水は、水素結合によって蛋白質の立体構造を安定化している一方で、水和水の揺動によって水素結合の解離・生成が繰り返され蛋白質の準安定構造間の遷移を促している。では、水和は実際に蛋白質のどのような揺らぎに影響を与えるのであろうか。また、水和は機能に関係する蛋白質の揺らぎをどのように変化させるのであろうか。ここでは、蛋白質ダイナミクス研究のモデル蛋白質である黄色ブドウ球菌の核酸分解酵素 Staphylococcal nuclease (SNase) を用いた、中性子非弾性散乱による蛋白質の水和に関する研究を紹介する。

3・1 中性子非弾性散乱による振動スペクトルの測定

基準振動解析によると、蛋白質の調和的な運動は振動モードの重ね合わせで表現できる²⁴⁾。一般に蛋白質の分子量は比較的小さなものであるため、構造揺らぎを記述するモード数は非常に多くなる。では、どのような振動モードが水和によって影響を受けるのであろうか。低温での中性子非弾性散乱実験では、数百 meV にわたる広い周波数領域での振動スペクトル分布を測定することができる。中性子非弾性散乱スペクトルには赤外吸収スペクトルやラマン散乱にみられる禁制則がない。また水和水として D₂O を用いることで水和水の動きをマスクし、蛋白質のみを選択的に観測できる。そのため、蛋白質の振動モードに対する水和効果の全体像をつかむのに適している。

図 4 は、凍結乾燥処理によって可能な限り脱水和した SNase (水和率: $h=0.12$ gD₂O/g protein) と蛋白質表面に約 1 層の水和水を吸

図 4 20 K における脱水和及び水和 SNase の高エネルギー領域の中性子非弾性散乱スペクトル。挿入図は両者のスペクトルの比を取ったものである。水和蛋白質のスペクトルは縦方向に 0.02 シフトしている。

着させた水和試料 ($h=0.44$) の中性子非弾性散乱スペクトルである。このエネルギー領域では、メチル基の回転や C-H の伸縮振動など、主として蛋白質の分子基由来の振動モードが観測される。図 4 をみると、脱水和と水和試料の振動スペクトルの形状にほとんど違いがなく、分子基由来の局所的な振動運動はほとんど水和の影響を受けないことがわかる。両者のスペクトルの比を取ったものを挿入図に示しているが、この図からも高エネルギー領域の振動スペクトルがほぼ同一であることを確認できる。一方で挿入図は、THz (1 THz = 4.1 meV) 周波数領域の低振動成分が水和で変化することを示している。この低振動領域には、蛋白質全体やドメイン構造などのある程度まとまった原子集団が協調的に動く振動モードがみられる²⁴⁾。このことから、水和は蛋白質全体に広がる動きとカップルしていることがわかる²⁵⁾。

3・2 低エネルギーダイナミクス

低エネルギー領域では、振動運動が非弾性散乱スペクトルとして観測されるだけでなく、緩和や拡散などの非調和的な運動が準弾性散乱として現れる (図 2)。図 5 は低エネルギー領域

図5 (a) 100 K 及び (b) 300 K における脱水和、部分水和、完全水和の SNase の低エネルギー領域における中性子非弾性散乱スペクトル。点線は分解関数。(a) の縦線は Boson ピークの位置を示している。

を精度良く測定した低温 (100 K) と室温 (300 K) での中性子非弾性散乱スペクトルである。水和効果をより詳細に調べるため、ここでは脱水和蛋白質と水和蛋白質に加え、両者の中間的な水和量となる試料 ($h=0.29$: 水和水が蛋白質表面の約半分程度を覆っている) の中性子非弾性散乱スペクトルの結果も示している。

蛋白質のエネルギー地形は、蛋白質間相互作用や水和などの周囲の環境要因との相互作用によって微細構造ができる。100 K では、3 ~ 4 meV に Boson ピークと呼ばれる非晶質やガラス物質にも見られるブロードなピークが観測される。これは蛋白質の揺らぎが微細構造の極小にトラップされ、低エネルギーの振動運動がより高振動領域の振動運動に取って代わることで生じると考えられている⁴⁾。図 5(a) では、水和量が多いほど、~5 meV より低い領域の振動スペクトル強度が減少し、Boson ピークの位置は高エネルギー側へシフトしている。これは、水和水との水素結合数が増えるほど、より多くの蛋白質の低振動モードがエネルギー極小にトラップされ、構造全体が硬くなることを示している。またこのような蛋白質の低振動の揺らぎへの水和効果、すなわち構造のハードニングは、水分量に関して加算的であることがわかる。

室温における蛋白質の低エネルギーダイナミクスへの水和効果は、準安定構造間を遷移する非調和な運動として現れる。図 5(b) の 300 K

のデータを見ると、水和量が $h=0.44$ では分解関数に対して $\omega=0$ の弾性散乱ピークに広がりが見られる。これは非調和運動由来の準弾性散乱で、水和によって蛋白質の構造が柔らかくなることがわかる。これに対して、部分水和と脱水和状態では準弾性散乱は小さく、非調和な運動が抑制されていることがわかる。興味深いのは、低温では部分水和でも蛋白質の低振動運動に水和効果が現れているのに対し、室温での非調和な揺らぎに対してはほとんど水和の影響がないことである。

以上の結果から、低温では蛋白質は水和によって硬くなるが、室温では柔らかくなることがわかる。しかしその水和の作用は、前者に対しては低水和量から効果が現れるのに対し、後者には、ある一定量以上の水和量がないと効果が現れない²⁵⁾。振動成分と非調和成分への水和効果の違いは、単純には水和量だけでは説明できず、水和構造やその揺らぎなどの水和水の状態をより詳細に調べる必要がある。これは 4 章で説明する。

蛋白質ダイナミクスに対する水の影響は、ランジュバン方程式で表現される水の粘性効果も重要であることが理論的に指摘されている。水和の影響は摩擦項として記述され、低振動モードの過減衰として現れる²³⁾。これは数 meV のエネルギー領域の中性子散乱スペクトルに現れる⁴⁾。室温での低エネルギースペクトルには、

振動成分に重なるように緩和や拡散的な運動由来の準弾性散乱が現れる^{26), 27)}。蛋白質の低エネルギーダイナミクスは機能発現とも密接にかかわるため、様々な運動成分をうまく分離して解析する方法の開発が重要な課題となっている。

3・3 動力学転移

温度上昇に伴い振動運動から非調和運動に変化すると、蛋白質の揺らぎの振幅は大きくなる。図6は式(8)より求めた平均自乗変位の温度変化である。温度上昇に伴い、約150 Kと約240 Kで段階的に揺らぎの増大が観測される。約150 Kの転移はメチル基の回転運動に由来し、この運動は水和によらない^{28), 29)}。一方、約240 Kの転移は水和することで生じ、動力学転移と呼ばれる⁶⁾。動力学転移は多くの蛋白質で普遍的に観測され、蛋白質の共通の物性である。転移温度以下では蛋白質の生理活性が失われるといった実験報告もあり³⁰⁾、転移温度以上で現れる非調和な構造揺らぎが機能発現に重要であると考えられている。

転移温度以下に温度を下げると非調和な揺らぎが凍結し、低エネルギースペクトルにBosonピークが現れる。また転移温度で蛋白質に不連続な構造変化は観測されず、低温でも室温での立体構造を保ったまま揺らぎが凍結される^{30), 31)}。このような一般的なガラス物性との類似性から、動力学転移はガラス転移と呼ばれることもある。ガラス転移は、凝縮系の物理学でも重要な研究テーマであり、蛋白質はそのモデル系として捉えられる場合もある³²⁾。また最近の研究では、砂漠などに棲息する生物が、この蛋白質のガラス化を、極限環境下で生き延びる手段として利用していることがわかってきた³³⁾。一見、生命現象と無関係に見える生体分子のガラス化や分子ダイナミクスが、生命活動をどのように支えているかを解き明かすことは、次世代の中性子生物学研究の課題である。また蛋白質のガラス化は、食品工学や生体組織・臓器の保存技術の応用科学分野でも重要なテーマであり、中性子

図6 脱水と蛋白質と水和蛋白質の平均自乗変位の温度依存性。

非弾性散乱法が産業利用に役立つ可能性のある研究テーマの一つである。

4. 動力学転移と水和構造の揺らぎ

蛋白質が水和環境下で揺らぐとき、同時に水和水も熱的に揺らいでいるはずである。蛋白質が構造変化する際、周囲の水和構造も同時に変化することが結晶構造解析などで示されており、蛋白質と水和水の揺らぎはカップルしている³¹⁾。ここでは、水和することで生じる蛋白質の動力学転移が、水和構造や水和水ダイナミクスとどのように関係しているかをMDシミュレーションと中性子散乱実験で調べた研究について紹介する¹⁶⁾。

4・1 動力学転移の水和量依存性

まず様々な水分量での蛋白質 SNase の動力学転移を調べた。図7の挿入図は、蛋白質表面全体を十分に覆う程度に水和した状態での動力学転移である。240 K 前後での平均自乗変位の温度依存性の傾きを slope a (高温側), slope b (低温側) として、様々な水分量での結果を示したものが図7である。これより、動力学転移の存在には水分量の閾値 ($h=0.37$) が存在することがわかった。また低温側では、水分量にほぼ比例して傾きが小さくなっており、水和量が多いほど蛋白質の構造が硬くなる。これらの

図7 蛋白質の動力学転移の水和量依存性。挿入図は、完全水和蛋白質の平均自乗変位の温度依存性を示しており、動力学転移が約 240 K で観測される。転移温度の高温と低温での揺らぎの大きさの温度に対する傾きを水和量に対してプロットした。

図8 蛋白質と水和構造。(a) SNase の立体構造 (灰色) と水和水 (黒色)。(b) 水素結合によってつながった水和水のネットワーク構造。

結果は、図5の低エネルギースペクトルで見られた、低温と高温での水和効果の違いと一致する。この水分量の閾値がどういう意味を持つのか、またなぜ閾値以上の水和量で動力学転移が生じるのかを明らかにするために、水和構造とそのダイナミクスを調べることにした。

4.2 水和構造～分子動力学計算の援用～

蛋白質と水和水の動的挙動がカップルしているとすれば、 $h=0.37$ の閾値を境に水和構造やその動的特性などが変化すると推察される。

MD 計算では様々な水分量の蛋白質を計算機の中で再現し、水和構造とダイナミクスを調べられる。そこでまず、水分量を変化させたときに、この閾値付近で蛋白質の水和構造がどのように変化するかを、MD シミュレーションによって調べた。図8(a)は $h=0.45$ における SNase の分子構造と水和構造を示している。結晶構造解析による水和構造の研究では、水和水は互いに水素結合によってつながり、クラスターを形成していることが知られている³¹⁾。図8(b)は、MD シミュレーションによって調べた水和水ク

図9 動力学転移と水和水のクラスターサイズの水和量依存性。

ラスターを可視化したものである。低い水分量のときは、多くの水和水は蛋白質表面に孤立した状態、あるいは蛋白質表面の一部を覆う小さな水和水のクラスターとして存在する。しかし水分量が多くなると、それぞれのクラスターが合体し、一つの大きな水和水のネットワークが蛋白質全体を覆うようになる。蛋白質表面を覆う最大の水和水クラスターのサイズを計算したところ、 $h=0.37$ 以上で水和水のネットワークが蛋白質表面全体を覆うようになることを見出した。この値は、動力学転移が生じるための水分量と一致する。図9を見れば、蛋白質の動力学転移と蛋白質を覆う水和水のネットワーク形成に良い相関があることがわかる。ネットワークサイズの変化はパーコレーション(percolation) 確率の変化と対応しており、水和量の増加に伴う水和構造のパーコレーション転移が動力学転移と関連している。

4.3 水和水ダイナミクス

次に、パーコレーション転移に伴い、水和水の動的挙動がどのように変化するかを中性子散乱実験によって調べた。図10は、 $h=0.30$ と 0.44 の水分量のときの、蛋白質と水和水の平均自乗変位の温度変化である。動力学転移温度以下では、水和量にかかわらず水和水と蛋白質の平均自乗変位はほとんど同じで、水和水が蛋

図10 (a)部分水和と(b)完全水和での蛋白質と水和水の揺らぎの温度依存性。○：蛋白質，●：水和水。

白質表面の水和サイトに強く吸着していることがわかる。水和水と蛋白質との水素結合の数は水和量に比例し、低温での安定した水素結合は蛋白質の揺らぎを抑制することから、低エネルギースペクトルの加算的な水和効果は、水素結合の数で説明できる。

動力学転移温度以上では、部分水和では蛋白質と水和水の揺らぎの大きさはほぼ同じであった。しかし完全水和では、約 240 K 以上で水和

水の揺らぎは蛋白質に比べて大きな振幅を持つ。水和水の揺らぎが、蛋白質との水素結合の解離・生成の揺らぎを介して、動力学転移を引き起こしているのである。MD シミュレーションで示したように、水と構造は水と量変化に対してパーコレーション転移する。蛋白質表面全体に張り巡らされた集団的な水和水のネットワーク構造の揺らぎが、蛋白質の動力学転移が生じる原因であるといえる。

5. 中性子で見る生体系の水のダイナミクス

蛋白質の水和水など生体系の水のダイナミクスを調べる物理化学的測定法には様々な方法がある。例えば、誘電分光では外部電場に対する水分子の双極子モーメントの応答から、回転運動がわかる³⁴⁾。赤外吸収スペクトルからは、生体分子と水との水素結合の O-H 伸縮振動から、水との相互作用を観測できる³⁵⁾。これまで生体中の水の研究で最も広く用いられているのが NMR である³⁶⁾。水のプロトンシグナルの線幅や緩和時間の測定から、回転緩和など水の動的情報が得られる。

中性子非弾性散乱スペクトルには、水の O-H 伸縮振動や秤動運動の振動ピークが現れる³⁷⁾。また数十 meV の比較的低エネルギー領域には、水の並進運動に帰属されるピークが見られる^{37), 38)}。水の拡散運動は、ローレンツ関数

$$L(\Gamma, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(Q)}{\Gamma(Q)^2 + \omega^2} \quad (10)$$

で記述できる準弾性散乱として現れる¹⁾。ここで $\Gamma(Q)$ はローレンツ関数の半値幅である。小さい Q 領域では、

$$\Gamma(Q) = D_T Q^2 \quad (11)$$

より、並進拡散係数 D_T を求めることができる¹⁾。およそ 10 nm^{-1} 以上の Q 領域になると観測する距離相関が短くなることから、ジャンプ拡散の振る舞いが見えてくる。そのため半値幅の Q 依存性は、以下のようになる。

$$\Gamma(Q) = \frac{D_T Q^2}{1 + D_T Q^2 \tau} \quad (12)$$

ここで τ はジャンプ前の水の滞在時間を表し、半値幅は高い Q で $\tau = 1/\Gamma(Q)$ に漸近する¹⁾。

中性子による生体系の水の研究では、蛋白質や DNA 表面の水和水^{39) - 41)}、大腸菌や酵母中の水のダイナミクスが^{37), 37)}、非弾性散乱スペクトルと準弾性散乱によって調べられている。最近の研究では、好塩菌中の水のダイナミクスが、通常環境に棲息する微生物のものとは異なることが示されている⁴²⁾。現在、医療現場でがん診断に用いられている MRI は、がん組織中に含まれる水の動態が正常組織と異なることを利用したものである⁴³⁾。生体組織中の水分子の存在状態や量は、臓器や病態によって異なる。中性子線は NMR と同様、生体組織に対して非破壊的に水分子のその場観測を行うことができるが、水の動態について得られる情報は両者で異なる。中性子非弾性散乱による水の動態観測が病態細胞の新たな病理解析・診断手法となるかもしれない。

6. おわりに

蛋白質の準弾性散乱の解析法は未だ確立していない部分も多い。また生体中の水の解析についても、実際には生体物質からのバックグラウンドを除去するためには、試料調製や解析段階でそれなりの努力と工夫が必要である。例えば、大腸菌中の水の測定では、 D_2O で飼育慣らすことで大腸菌そのものを重水素化している⁴⁴⁾。蛋白質や生体系の水の中性子非弾性散乱法による研究は、まだまだ発展途上にあるといえる。蛋白質ダイナミクスや水とがかわる様々な生理現象の分子メカニズムの解明や、生体システムの中での水の役割を調べることでできる非干渉性中性子非弾性散乱法は、これから期待される中性子の活用法の一つである。

文 献

- 1) Bee, M., Quasielastic Neutron Scattering: Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science, Adam Hilger, Bristol and Philadelphia (1988)
- 2) Go, N., Theoretical studies of protein folding, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **12**, 183-210 (1983)
- 3) Bryngelson, J. D. and Wolynes, P. G., Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 7524-7528 (1987)
- 4) Joti, Y., Kitao, A. and Go, N., Protein boson peak originated from hydration-related multiple minima energy landscape, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 8705-8709 (2005)
- 5) Jacrot, B., Cusack, S., Dianoux, A. J. and Engelman, D. M., Inelastic neutron scattering analysis of hexokinase dynamics and its modification on binding of glucose, *Nature*, **300**, 84-86 (1982)
- 6) Doster, W., Cusack, S. and Petry, W., Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering, *Nature*, **337**, 754-756 (1989)
- 7) Jasnin, M., Stadler, A., Tehei, M. and Zaccai, G., Specific cellular water dynamics observed *in vivo* by neutron scattering and NMR, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 10154-10160 (2010)
- 8) Smith, J. C., Protein dynamics: comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments, *Q. Rev. Biophys.*, **24**, 227-291 (1991)
- 9) Cusack, S., Low frequency dynamics of proteins studied by inelastic neutron scattering, In *The Enzyme Catalysis Process. Energetics, Mechanism and Dynamics*, pp.103-122, Plenum Press, New York and London (1988)
- 10) Goupil-Lamy, A. V., Smith, J. C., Yunoki, J., Parker, S. F. and Kataoka, M., High-resolution vibrational inelastic neutron scattering: a new spectroscopic tool for globular proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9268-9273 (1997)
- 11) Kataoka, M., Kamikubo, H., Yunoki, J., Tokunaga, F., Kanaya, T., Izumi, Y. and Shibata, K., Low energy dynamics of globular proteins studied by inelastic neutron scattering, *J. Phys. Chem. Solids.*, **60**, 1285-1289 (1999)
- 12) Doster, W., The dynamical transition of proteins, concepts and misconceptions, *Eur. Biophys. J.*, **37**, 591-602 (2008)
- 13) Becker, T. and Smith, J. C., Energy resolution and dynamical heterogeneity effects on elastic incoherent neutron scattering from molecular systems, *Phys. Rev. E.*, **67**, 021904 (2003)
- 14) Daniel, R. M., Finney, J. L., Reat, V., Dunn, R., Ferrand, M. and Smith, J. C., Enzyme dynamics and activity: time-scale dependence of dynamical transitions in glutamate dehydrogenase solution, *Biophys. J.*, **77**, 2184-2190 (1999)
- 15) Nakagawa, H., Kamimubo, H. and Kataoka, M., Effect of conformational states on protein dynamical transition, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1804**, 27-33 (2010)
- 16) Nakagawa, H. and Kataoka, M., Percolation of hydration water as a control of protein dynamics, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **79**, 083801 (2010)
- 17) Wood, K., Frolich, A., Paciaroni, A., Moulin, M., Hartlein, M., Zaccai, G., Tobias, D. J. and Weik, M., Coincidence of dynamical transitions in a soluble protein and its hydration water: direct measurements by neutron scattering and MS simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4586-4587 (2008)
- 18) Svergun, D. I., Richard, S., Koch, M. H. H., Sayers, Z., Kuprin, S. and Zaccai, G., Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 2267-2272 (1998)
- 19) Oroguchi, T., Hashimoto, H., Shimizu, T., Sato, M. and Ikeguchi, M., Intrinsic dynamics of restriction endonuclease EcoO109I studied by molecular dynamics simulations and X-Ray scattering data analysis, *Biophys. J.*, **96**, 2808-2822 (2009)
- 20) Bon, C., Dianoux, A. J., Ferrand, M. and Lehmann, M. S., A model for water motion in crystals of lysozyme based on an incoherent quasielastic neutron-scattering study, *Biophys. J.*, **83**, 1578-1588 (2002)
- 21) Tarek, M. and Tobias, D. J., The dynamics of protein hydration water: a quantitative comparison of molecular dynamics simulations and neutron-scattering experiments, *Biophys. J.*, **79**, 3244-3257 (2000)
- 22) Kitao, A. and Wagner, G., A space-time structure

- determination of human CD2 reveals the CD58-binding mode, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 2064-2068 (2000)
- 23) Kitao, A., Hirata, F. and Go, N., The effects of solvent on the conformation and the collective motions of protein : normal mode analysis and molecular dynamics simulations of melittin in water and in vacuum, *Chem. Phys.*, **158**, 447-472 (1991)
 - 24) Go, N., Noguchi, T. and Nishikawa, T., Dynamics of a small globular protein in terms of low-frequency vibrational modes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 3696-3700 (1983)
 - 25) Nakgawa, H., Joti, Y., Kitao, A. and Kataoka, M., Hydration affects both harmonic and anharmonic nature of protein dynamics, *Biophys. J.*, **95**, 2916-2923 (2008)
 - 26) Diehl, M., Doster, W., Petry, W. and Schober, H., Water-coupled low-frequency modes of myoglobin and lysozyme observed by inelastic neutron scattering, *Biophys. J.*, **73**, 2726-2732 (1997)
 - 27) Cusack, S. and Doster, W., Temperature dependence of the low frequency dynamics of myoglobin, *Biophys. J.*, **58**, 243-251 (1990)
 - 28) Roh, J. H., Novikov, V. N., Gregory, R. B., Curtis, J. E., Chowdhuri, Z. and Sokolov, A. P., Onsets of anharmonicity in protein dynamics, *Phys. Rev. Lett.*, **95**, 038101 (2005)
 - 29) Doster, W. and Settles, M., Protein-water displacement distributions, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1749**, 173-186 (2005)
 - 30) Rasmussen, B. F., Stock, A. M., Ringe, D. and Petsko, G. A., Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K, *Nature*, **357**, 423-424 (1992)
 - 31) Nakasako, M., Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **359**, 1191-1206 (2004)
 - 32) Green, J. L., Fan, J. and Angell, C. A., The protein-glass analogy : some insights from homopeptide comparisons, *J. Phys. Chem.*, **98**, 13780-13790 (1994)
 - 33) Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Watanabe, M. and Okuda, T., Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedium vanderplanki*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 5093-5098 (2008)
 - 34) Kabir, S. R., Yokoyama, K., Mihashi, K., Kodama, T. and Suzuki, M., Hyper-mobile water is induced around actin filaments, *Biophys. J.*, **85**, 3154-3161 (2003)
 - 35) Demmel, F., Doster, W., Petry, W. and Schulte, A., Vibrational frequency shifts as a probe of hydrogen bonds : thermal expansion and glass transition of myoglobin in mixed solvents, *Eur. Biophys. J.*, **26**, 327-335 (1997)
 - 36) Bokor, M., Csizmok, V., Kovacs, D., Banki, P., Friedrich, P., Tompa, P. and Tompa, K., NMR relaxation studies on the hydrate layer of intrinsically unstructured proteins, *Biophys. J.*, **88**, 2030-2037 (2005)
 - 37) Beta, I. A., Michalarias, I., Ford, R. C., Li, J. C. and Bellissent-Funel, M.-C., Quasi-elastic neutron scattering study of hydrated DNA, *Chem. Phys.*, **292**, 451-454 (2003)
 - 38) Settle, M. and Doster, W., Anomalous diffusion adsorbed water : a neutron scattering study of hydrated myoglobin, *Faraday Discuss.*, **103**, 269-279 (1996)
 - 39) Chen, S.-H., Liu, L., Baglioni, P., Faraone, A. and Mamontov, E., Observation of fragile-to-strong dynamic crossover in protein hydration water, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 9012-9016 (2008)
 - 40) Doster, W., Busch, S., Gaspar, A. M., Appavou, M.-S., Wuttke, J. and Scheer, H., Dynamical transition of protein-hydration water, *Phys. Rev. Lett.*, **104**, 098101 (2010)
 - 41) Michalarias, I., Beta, I., Ford, R., Ruffle, S. and Li, J.-C., Inelastic neutron scattering studies of water in DNA, *Appl. Phys. A.*, **74**, S1242-S1244 (2002)
 - 42) Tehei, M., Franzetti, B., Wood, K., Gabel, F., Fabiani, E., Jasnin, M., Zamponi, M., Oesterheld, D., Zaccai, G., Ginzburg, M. and Ginzburg, B.-Z., Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 766-771 (2007)
 - 43) Damadian, R., Tumor detection by nuclear magnetic resonance, *Science*, **171**, 1151-1153 (1971)
 - 44) Jasnin, M., Moulin, M., Haertlein, M., Zaccai, G.

and Tehei, M., Down to atomic-scale intracellular water dynamics, *EMBO reports*, **9**, 543-547 (2008)

Abstract

Neutron Scattering Study on Dynamics of Atomic and Molecular Motions

IV-2 Protein Hydration and Dynamics

Hiroshi NAKAGAWA and Mikio KATAOKA*: Japan Atomic Energy Agency, 2-4 Shirane, Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki Pref. 319-1195, Japan,

*Nara Institute of Science and Technology, 8916-5

Takayama-cho, Ikoma-shi, Nara Pref. 630-0192, Japan

Inelastic neutron scattering can measure the protein thermal fluctuations under the physiological aqueous environment, especially it is powerful to observe the low-energy protein dynamics in THz region, which are revealed theoretically to be coupled with solvations. Neutron enables the selective observation of protein and hydration water by deuteration. The complementary analysis with molecular dynamics simulation is also effective for the study of protein hydration. Some examples of the application toward the understanding of molecular basis of protein functions will be introduced.