

誘電分光と相補的手法による タンパク質－水系の水構造ダイナミクスの特徴付け

丸山裕子^{*1}, 斉藤宏伸^{*1}, 喜多理王^{*1}, 新屋敷直木^{*1}, 八木原晋^{*1}, 福崎稔^{*2}

^{*1} 〒 259-1292 平塚市北金目 4 丁目 1-1

東海大学 理学研究科 物理学専攻

E-mail: yagihara@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

^{*2} 〒 108-8619 港区高輪 2 丁目 3-23

東海大学 情報通信学部 高輪教養教育センター

(2011 年 9 月 22 日受付；2011 年 11 月 23 日受理)

Characterization of Water Structure in Protein-Water Mixtures by Dielectric Spectroscopy and Complementary Approaches

by

Yuko MARUYAMA^{*1}, Hironobu SAITO^{*1}, Rio KITA^{*1}, Naoki SHINYASHIKI^{*1},
Shin YAGIHARA^{*1} and Minoru FUKUZAKI^{*2}

^{*1}*Department of Physics, School of Science, Tokai University*

Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan

E-mail: yagihara@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

^{*2}*School of Information and Telecommunication Engineering,*

Liberal Arts Education Center, Takanawa campus, Tokai University

Minato-ku, Tokyo, 108-8619, Japan

(Received on Sept. 22, 2011; accepted on Nov. 23, 2011)

Abstract

Time Domain Reflectometry (TDR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), and Molecular Dynamics (MD) simulation were introduced for the characterization of water dynamics in protein-water mixtures. Dielectric relaxation of water in protein solution detected by TDR shows broad distribution of relaxation time and which reflects the water structure of dispersed system. Translational diffusion of water molecules by NMR is restricted more in the water mixture with higher molecular weight of protein. Although the time and length scales of the rotational motion of water detected by TDR are different from those of the translational motion of water detected by NMR, the experimental data can be interpreted compatibly. We found the optimal condition for the simulation of water molecules by the MD simulation. The combination of these techniques will bring us a comprehensive understanding of the dynamics and structure of water in protein solutions.

1 はじめに

低分子から高分子までの液体構造や, それらの溶液系や分散系などの混合系, さらに生体系などの複雑系物質の構造や物性・機能の分子機構を理解するには, 分子ダイナミクスの知見が最も重要である。

水分子は水酸基 (OH 基) をもつことから水素結合のドナー・アクセプターを共にもつ水素結合性液体であることが知られている。水分子は水素結合の崩壊と再結合を繰り返しながらブラウン運動を行っている。この水素結合の崩壊・再結合は, 5~6 個の水分子による動的なクラスター構造を形成しているというモデルによる解釈 [1] は現在も用いられることが多い。このような水分子の動的クラスターの生成・消滅は, 誘電分光によって Debye 型の単一緩和として観測され, 水の示す特異的な性質の由縁である。この水分子の緩和過程は, 分子の回転拡散の特性時間である緩和時間 τ が 8.27ps(25°C) という値を示す一方で, 1 桁以上高周波数域にさらに小さな緩和過程の存在も報告 [2-5] されている。このような分子のダイナミクスで識別される水分子の動的な凝集構造を水構造と呼んでいる。最近では水構造の解釈に水素結合ネットワークの扱いを積極的に取り入れることの重要性が指摘されている [6] が, 決定的な解釈は依然としてなされていない。

近年, 高分子と水分子が相互作用することによって, 様々な水構造を形成する分子メカニズムの研究が進んできている。混合系における分子の動的挙動のダイナミックレンジは極めて広く,

従来の観測の時間尺度が不足していたためにその理解は遅れていた。特に水分子の動的挙動に着目した解釈は、基礎研究だけでなく幅広い分野での応用研究にも用いることが可能である [6]。

高分子水溶液中の水分子は、高分子に束縛されることで緩和時間 τ が大きくなり、さらに緩和時間に分布をもつようになる。これはスローダイナミクスと呼ばれ、液体構造研究における重要な概念である。また、高分子、生体系であればタンパク質や核酸、さらに脂質分子などは、溶媒中で階層的な構造を形成している。階層構造には特徴的な構造が様々なスケールで現れていると考えれば、その特徴付けのためにはフラクタルによる表現 [7,8] が有用となるはずである。これらの高分子溶液や分散系の構造が示すフラクタル性は、溶媒分子である水分子のダイナミクスにも影響を与えるため、多様な水構造の特徴付けにはフラクタル表現を用いた議論が適切である。

近年、誘電分光により得られる水分子の緩和をフラクタル表現で表して評価する議論 [9,10] が行われてきた。この議論では周波数応答関数としての Cole-Cole 式 [11]

$$\epsilon^* - \epsilon_\infty = \frac{\Delta\epsilon}{1 + (j\omega\tau)^\beta} \quad (0 < \beta \leq 1) \quad (1)$$

に相当する時間応答関数として非単一指数関数的な双曲線型双極子相関関数と、記憶相関関数を比べることで Cole-Cole 型の指数と時空間的なフラクタル次元が対応することが示された。これらの議論から、緩和構造単位の体積区分サイズをスケールする空間フラクタル次元と、Cole-Cole 式より得られる緩和時間および Cole-Cole 型の指数（以下では緩和時間分布パラメータと呼ぶ）との関係を表すことができた。

最近我々は、誘電分光によって観測された水構造のスローダイナミクスについて、(1) 式に基づいたフラクタル解析を行ってきた。高分子を含む水混合系で得られる水の緩和過程は Cole-Cole 式によってうまく表すことができるので、Cole-Cole 式によるフィッティング解析で得た緩和時間とその分布を用いて水構造を表現し、水混合系の水構造を特徴づける物理量として空間フラクタル次元に注目してきた。

本研究では、球状タンパク質－水系における水構造について、誘電分光法の一つである時間領域反射法 (Time Domain Reflectometry method : TDR) [12-16] や核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance : NMR) による観測と、分子動力学 (Molecular Dynamics : MD) による分子シミュレーションを用いた相補的なアプローチによって、特徴付ける手法を検討した。ここで、TDR では誘電緩和測定、NMR では拡散測定、MD では水の分子シミュレーションを行い、これらによって得られる知見を関連づけていくことを考えた。

2 実験

2.1 試料

実験で使用したサンプルは Albumin from bovine serum(BSA, Fraction V, A3294 Sigma-Aldrich $M_w=66000$), Lysozyme from Chicken egg white (CEWL, L6876 Sigma-Aldrich $M_w=14300$), タンパク質水溶液の調製には脱イオン水 (Milli-Q Simplicity(MILLIPORE)) を使用した。

2.2 誘電分光

2.2.1 時間領域反射法

時間領域反射法は広帯域誘電分光法の一つであり, 30GHz~1kHz までの超高周波数領域の複素誘電率を測定することができる手法である。試料にステップパルスを入射させると, 試料の誘電率の情報を反映した反射波が観測される。そこで反射波を測定し, フーリエ変換を行うことによって複素誘電率の周波数依存性を得ることが出来る。

サンプルの複素誘電率は入射波と反射波の測定により TDR 法の基本式 [12-14]

$$\epsilon^* = \frac{c'}{j\omega\gamma d} \frac{v_0 - r}{v_0 + r} X \cot X \quad (2)$$

から得ることが出来る。さらに, ここでは複素誘電率が既知の標準試料の反射波と未知試料の反射波との差を用いる Reference 法 [12-14] の方が精度が良いので, 文献に従って使用した。

実験装置には DIGITIZING OSCILLOSCOPE (HP54120B: Hewlett-Packard), FOUR CHANNEL SET (HP54124A: Hewlett-Packard) を用い, 試料はタンパク質濃度 5~40wt% で誘電緩和測定を行った。測定はセミリジッド (同軸円筒) 型の電極を使用した標準試料法を用い, 測定試料の温度は $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で行った。

2.2.2 フラクタル解析

誘電分光測定により得られる緩和時間 τ および緩和時間分布を表わす Cole-Cole パラメータ β の濃度依存性から $\tau - \beta$ ダイアグラムが得られる。 $\tau - \beta$ ダイアグラムは水混合系における高分子構造やダイナミクスを反映した水構造を表現し, 水溶液系やゲル分散系といった高分子の種類や構造によってプロットされる領域が分かれる。

Ryabov らは Cole-Cole 式で用いられる緩和時間分布パラメータ β を次の Ryabov の式 [9]

$$\beta = \frac{d_G}{2} \frac{\ln(\tau\omega_s)}{\ln(\tau/\tau_0)} \quad (3)$$

で表現した。ここで, τ は緩和時間, τ_0 は時間スケールのカットオフ時間である。 $d_G(>0)$ は緩

誘電分光と相補的手法によるタンパク質－水系の水構造ダイナミクスの特徴付け

和したユニットが周囲と相互作用している点集合の空間的なフラクタル次元である。また、自己拡散過程の特性周波数は

$$\omega_s = 2d_E G^{2/d_G} D_s / R_0^2 \quad (4)$$

である。ここで、 d_E はユークリッド次元、 D_s は自己拡散係数、 R_0 は空間中のスケーリングのカットオフサイズまたは、協同領域のサイズであり、 G は 1 程度の幾何学的係数である。

2.3 NMR

2.3.1 NMR 装置

核磁気共鳴とは核スピンのエネルギー吸収・放出現象のことである。原子核は核スピンとそれによって生じる核磁気モーメントを持つ。静磁場と垂直な高周波磁場を加えると磁気モーメントが励起され、エネルギーを放出する。この現象が核磁気共鳴 (NMR) 現象である [17]。

実験装置には NMR 計測システム (JNM-EX90: 日本電子) を使い、 $g=85\text{gauss cm}^{-1}$ 、 $\delta=0.1 \sim 2.0\text{ms}$ 、 $\Delta=20\text{ms}$ で測定を行った。また、今回使用した FT-NMR 装置のプロトン共鳴周波数は 90MHz である。測定試料は TDR と同様である。温度は $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で測定を行った。

2.3.2 パルス磁場勾配スピンエコー法

NMR 横緩和時間測定法として使用されるスピンエコーパルス系列に、空間的に線形な傾斜磁場を 2 回加えると、分子の並進拡散による運動を反映して信号が減衰していく。その信号の減衰パターンから分子の自己拡散係数を知ることができる [18]。この原理を用いた NMR 法をパルス磁場勾配 (Pulse-Field Gradient Spin-Echo; PGSE) 法という。

拡散係数は Stejskal-Tanner の式 [19] を用いた次式によって求めることが出来る。

$$\ln \left[\frac{A(\delta)}{A(0)} \right] = -\gamma^2 \delta^2 g^2 D (\Delta - \frac{\delta}{3}) \quad (5)$$

ここで、 $A(\delta)$ は磁場勾配をかけた時の信号強度、 $A(0)$ は磁場勾配をかけない時の信号強度、核スピンの磁気回転比 γ 、磁場勾配強度 $g / \text{gauss cm}^{-1}$ 、磁場勾配の印加時間 δ / ms 、磁場勾配の印加時間間隔を Δ / ms とする。自己拡散係数 D の実験値は、(5) 式で左辺を縦軸に、そして右辺の D 以外の因子である積 (b-Value) を横軸にとったプロットを作成し、得られた直線の傾きによって求められる。

2.4 MD シミュレーション

分子動力学シミュレーションを用いて測定結果と比較するための水混合系のシミュレーションの前段階として、水のみをシミュレートし、水の最適なシミュレーション条件を確認した。Accelrys 社の分子シミュレーションソフト “Discovery Studio” (東海大学総合情報センター) を

用いて、水分子1つを描いたあと、水分子のBOXを重ね合わせた系を300Kでシミュレートし、得られた結果の水素結合数について調べた。水分子のBOXのサイズを、一辺の半分の長さを7.0～16.5 Åの範囲で変え、総水分子数を121～1377まで変化させた。シミュレーションを行うにあたっては、周期境界条件を使用し、作成した水の系よりも大きな系を想定して行った。静電作用としてParticle Mesh Ewald法を用い、拘束条件としてSHAKE法を用いた。シミュレーション結果として得られるアニメーションは1コマ1ps毎のものを300コマ、つまり300psのアニメーションを得られる条件で統一した。

3 結果・考察

TDR法によるタンパク質水溶液の誘電緩和測定から観測されたそれぞれの誘電緩和曲線を図1に示す。ここで、横軸は対数をとった周波数 $\log(f/\text{Hz})$ 、縦軸は複素誘電率の実部 ϵ' および虚部 ϵ'' である。タンパク質濃度の増加とともに、誘電率および水の緩和が小さくなっていることが分かる。図1から得られた緩和パラメータの濃度依存性を図2に示す。濃度の増加とともに緩和時間 τ は増加、緩和時間分布パラメータ β および緩和強度 $\Delta\epsilon$ は減少した。緩和強度 $\Delta\epsilon$ は水分子がもつ双極子モーメントによる配向分極の大きさを示すため、タンパク質濃度の増加に伴う $\Delta\epsilon$ の減少は、水混合系内で水分子の数密度が減少したことを反映している。緩和時間分布パラメータ β の減少は、バルクな水の場合にDebye式で記述されるような単一の緩和過程から、タンパク質(高分子)の導入による水分子ダイナミクスのゆらぎの増大が引き起こす緩和時間分布の広がりを出している。また緩和時間 τ の増加は、水分子と高分子の相互作用により、水分子の運動に遅延が起こったことを示す。この相互作用によって水分子の運動が制限され、そのダイナミクスの平均特性時間として与えられる緩和時間 τ が増加したと考えられる。さらに図2では、緩和時間 τ はCEWL水溶液に比べ、BSA水溶液の方がより大きな値を示し、分子量の大きい方がより水分子の運動が制限され、緩和に時間を要することが分かった。

緩和時間 τ 及び緩和時間分布パラメータ β それぞれの濃度依存性は様々な水溶液によって異なり、普遍的な関係を求めることは困難である。そこでこれらの緩和パラメータの両方を用いて、 τ - β ダイアグラム(高分子の種類による特徴的なスローダイナミクスを反映した曲線で表現される:図3)を作成した。これまでの我々の研究から、 τ - β ダイアグラムにプロットされる軌跡が示す領域により、溶液系と分散系とを分類して特徴付けることが可能であることが分かっている[20,21]。水溶液系と分散系とを共通の尺度で議論することができるような解析手法は従来無かったことである。本研究で得られたタンパク質水溶液のプロットは溶液系から大きく離れ、分散系と同じ領域に現れた。 τ - β ダイアグラムのプロットをフラクタル構造表現式:式(3)による最小二乗法フィットを行い、空間フラクタル次元 d_G 、自己拡散過程における特性周波数 ω_s 、カットオフ時間

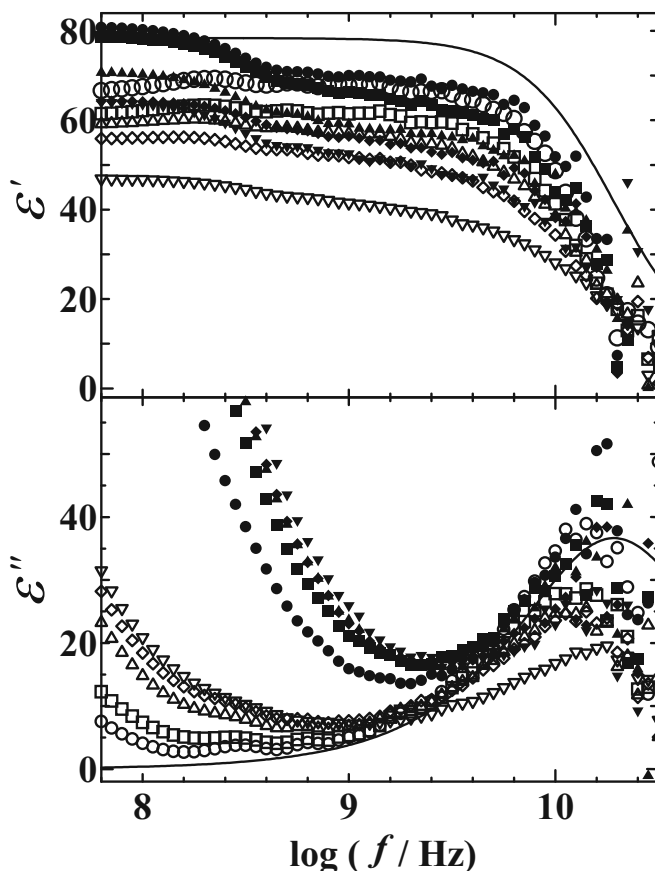


図 1: 25°C におけるタンパク質水溶液の誘電緩和曲線を示す。実線は水、プロットはそれぞれ BSA (5wt%(○), 10wt%(□), 20wt%(△), 30wt%(◇), 40wt%(▽)), CEWL (5wt%(●), 10wt%(■), 20wt%(▲), 30wt%(◆), 40wt%(▼)) を表す。

τ_0 を得たところ、表 1 に示すように得られた。フラクタル次元の値は BSA で 0.03 ± 2.45 , CEWL で 0.03 ± 1.70 , また過去の研究から得られた球状タンパク質 Ovalbumin(OVA) では 0.22 ± 0.89 と、フラクタル次元による解釈においても通常の溶液系とは異なり、とても小さな値になり、誤差も大きいことが確認された。フラクタル次元が小さな水系では濃度増加によるスローダイナミクスの効果が少ないため、 $\tau-\beta$ ダイアグラムからフラクタル次元を求めるためには十分高濃度の領域の測定が必要だが、現実的に 50wt% 以上の高濃度の試料調整が困難のためになされておらず、 $\tau-\beta$ プロットの全体像が見えていないため、分散系の幾何学的条件では誤差が大きくなる

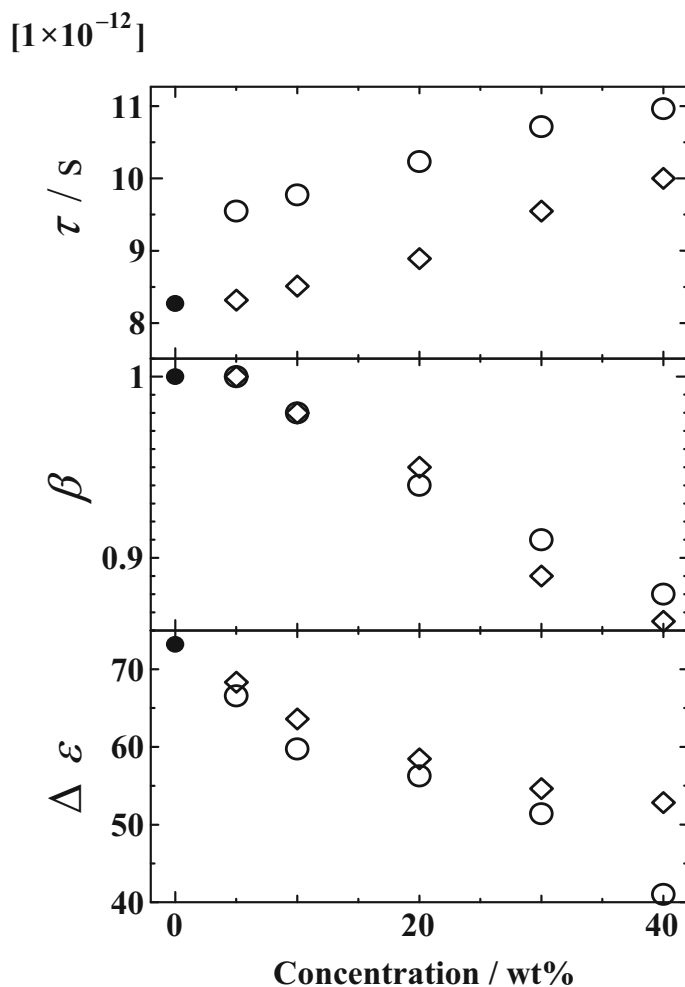


図 2: 25°C におけるタンパク質の重量濃度に対する緩和時間 τ , 緩和時間分布パラメータ β , 緩和強度 $\Delta\epsilon$ を示す。プロットはそれぞれ水 (●), BSA(○), CEWL(◇) を表す。

ことは不可避である [22]。この様にフラクタル次元と誤差の大きさには相関があり, フラクタル次元が小さいほど誤差が大きくなることが分かっている。しかし, 最近の我々の幾何学的モデル計算の知見から, フラクタル次元が 1 以下の数値の物理的な意味が分散系の凝集構造に由来するということが判ってきており, このような小さなフラクタル次元の値は非現実的ではなく, むしろその解析法の時空間スケールに強く依存している [23]。スローダイナミクスの過程は, 高分子

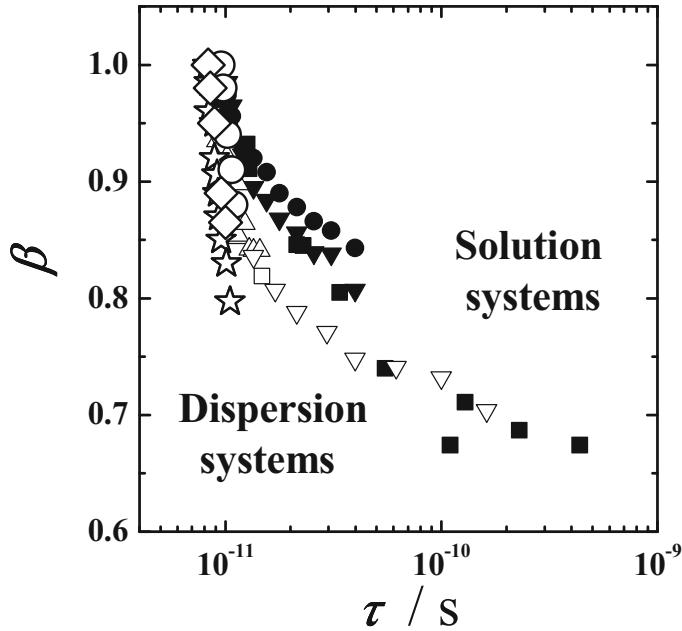


図 3: タンパク質水溶液の τ - β ダイアグラムを示す。プロットはそれぞれ BSA(○), CEWL(◇), OVA(☆), PEG(●), PVME(▼), PVP(■), PVA(△), PEI(▽), PAIA(□) を表す。

の立体構造や凝集構造，さらに水素結合能の違いを反映しており， τ - β ダイアグラムでプロットの軌跡が現われる領域によって特徴付けられる。従って必ずしもフラクタル次元の絶対値のみによるスローダイナミクスの特徴付けではなく，ダイアグラム全体の幾何学的特性を利用した特徴付けが重要である。以上のことから，水構造の見地から言えば，タンパク質水溶液は分散系の特徴を強く反映する液体構造を有していることが分かった。

タンパク質の重量濃度に対してタンパク質水溶液の水分子の拡散係数 D を示したものが図 4 である。純水の拡散係数は $2.32 \times 10^{-5} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ で，BSA, CEWL 共にタンパク質濃度が高くなるにつれ拡散係数が小さくなっていることが分かる。タンパク質濃度 5wt% での拡散係数は BSA では $2.19 \times 10^{-5} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ，CEWL では $2.21 \times 10^{-5} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ と近い値をとっていたが，タンパク質濃度が 40wt% になると拡散係数は BSA では $1.10 \times 10^{-5} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ，CEWL では $1.31 \times 10^{-5} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ と両者の差が大きくなった。また，今回測定した 5～40wt% の間では CEWL に比べ BSA の方が小さな値を示していることから，分子量の大きい方がより水の並進運動を妨げることが分かる。

表 1: $\tau - \beta$ ダイアグラムのフィッティングパラメータ

Sample	dimension	Error	frequency	Error	cut off time	Error
	d_G	$\pm e_{dG}$	$\omega_s(\text{Hz})$	$\pm e_{\omega^s}$	$\tau_0 \text{ (s)}$	$\pm e_{\tau^0}$
BSA	0.03	2.45	1.92×10^{40}	1.04×10^{44}	3.36×10^{-12}	4.91×10^{-12}
CEWL	0.03	1.6	4.88×10^{39}	1.52×10^{43}	2.67×10^{-12}	2.87×10^{-12}
OVA	0.22	0.89	1.93×10^{14}	6.71×10^{15}	3.66×10^{-12}	1.88×10^{-12}

また, 図 2 で示した TDR の緩和時間 τ はピコ秒域, NMR による拡散係数 D はミリ秒域と, 観測している時間域が大きく異なるが, どちらも分子量の大きい方がより水分子の運動が制限されるという結果を示し, 対応している。これは誘電分光で観測している水分子の回転拡散が平均的には水 5,6 分子の動的な凝集構造であるとしても, そのゆらぎの幅はさらに広く及んで, 特徴的な長さが消失しているフラクタルな構造を示したことを意味している。特徴的な長さとは被測定物の特徴ではなく, 観測手法に含まれる制限によって決まることも多いと思われる。

ある水分子数について, MD シミュレーションで得られた平衡状態のアニメーションから 1 コマ (1ps) 毎の全水素結合数を求め, 300ps にわたる平均値を, その水分子数での水素結合数とする解析を行った。図 5 から, 水分子が増えるごとに水素結合数もほぼ同じように増えているので, 水分子が増えた分だけ同じように周りの水分子と水素結合していくことがよく分かる。図 5 の総水素結合数を 1 つの水分子あたりの水素結合数にしたものを図 6 に示す。エラーバーは 1 コマ毎に求めた 1 つの水分子あたりの水素結合数の標準偏差を示している。水分子が増加していくとともに 1 つの水分子あたりの水素結合数がある値に収束していき, エラーバーも小さくなった。このことから, シミュレーションを行うにあたって分子数は 800 程度あれば充分ではないかと考えられる。実際に 1 つの水分子が関わる水素結合数は図 6 の縦軸の数値の倍になるので, およそ 3.4 から 3.6 程度になることを示しているが, 近赤外吸収スペクトルのバンド分解から得られた 25°C での水素結合数はおよそ 2.4 である [24]。TIP4P モデルや TIP5P モデルを使用したシミュレーション [25] では 2.4 や 2.1 と近赤外吸収で得られた値と近い値をとる。今回と同じ TIP3P モデルを使用したシミュレーション [26] での水素結合数は, 水素結合数を分子数で割った値, つまり図 6 の縦軸と同じものが 1.6 程度であり, 今回の実験と同程度の値を示した。従って本研究では水分子を 3 つの部分電荷でモデル化した場合の典型的な水素結合が得られている。また, 図 5 の総水素結合数を単位体積 ($1\text{\AA}^3$) あたりの水素結合数にしたものを図 7 に示す。エラーバーは同様に標準偏差を示している。これも水分子数が増加していくとともにエラーバーが小さくなっている。また, 縦軸を水の密度 (g cm^{-3}) にしたものを図 8 に示す。図 7 と図 8 を見比べると, どの

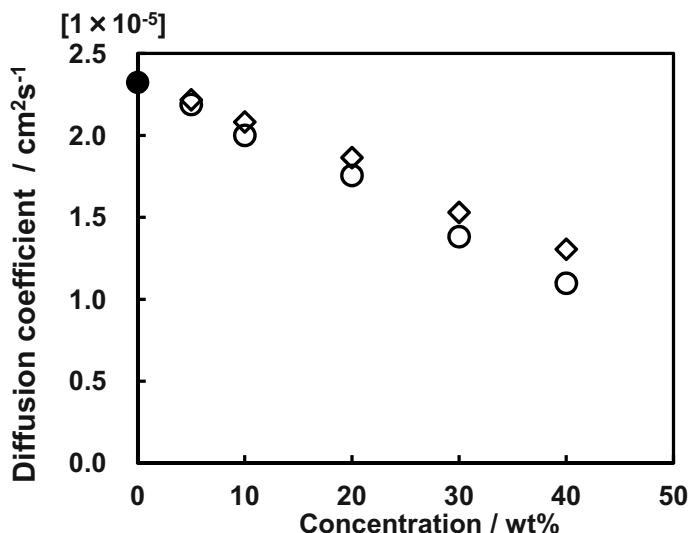


図 4: 25°C におけるタンパク質の重量濃度に対するタンパク質水溶液中の水分子の拡散係数 D を示す。プロットはそれぞれ水 (●), BSA(○), CEWL(◇) を表す。

らの図でも同じ水分子数でプロットが対応したゆらぎを示していることから、水の密度のゆらぎが水素結合数と関係していることが分かる。以上のことから、水分子ダイナミクスのシミュレーションでは、分子数が 800 個程度あると、その系は小さすぎることもなく、得られる結果の信用性が高いと考えられる。すでに TDR や NMR で測定結果を取得している水混合系のシミュレーションを行い、これらの結果を比較・対応させていくことが出来れば、未知試料の測定前に分子シミュレーションによる測定結果の予測も可能になっていくだろう。

水素結合密度は MD シミュレーションによって求めることも出来る。TDR 測定によって得られる緩和時間は水素結合密度と密接な関係があることが我々の最近の研究から分かってきた [23]。MD シミュレーションの結果を解析すればさらに拡散係数も求められるので、NMR 測定によって得られる拡散係数と比較することも出来る。これらの比較の際に注意すべきことは、それぞれの観測の時空間スケールに大きな違いがあることである。たとえば TDR 測定による緩和過程の観測からは、分子の回転拡散の特性時間の平均値である緩和時間 τ とその分布をピコ秒域で知ることができる。一方、NMR 測定で得られる並進運動の拡散係数 D はミリ秒域で観測され、空間的にも比較的広範囲 (ミリ秒で拡散する程度) で水分子の動きを観測している。これらの方法を利用することによって、回転拡散や並進拡散の運動モードの違いを考慮した解析が可能で、それぞれの測定手法の観測時間域に依存したダイナミクスの特徴を明示できるだろう。本報告では触れ

丸山裕子, 齊藤宏伸, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 福崎稔

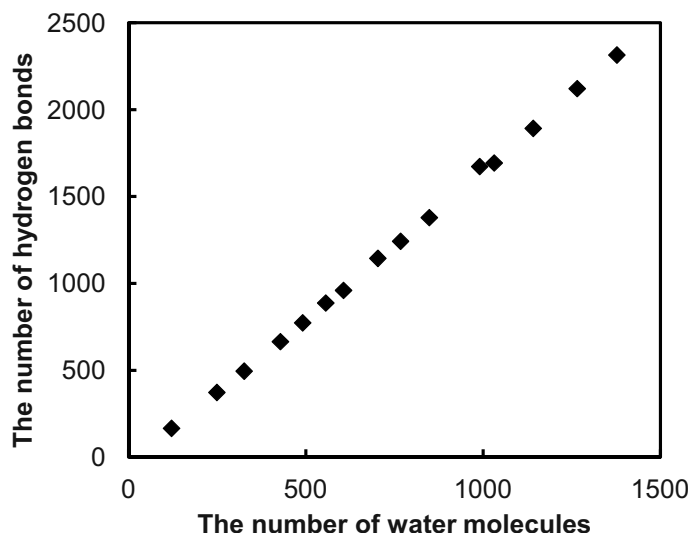


図 5: 300K における総水分子数に対する総水素結合数のプロット。

ていないが, NMR 緩和時間によって回転相関時間を求めることで, TDR の回転拡散と対比して, 分子運動を解析することが可能になる。NMR 緩和時間測定もミリ秒域での観測であるので, TDR 回転拡散 (ピコ秒域) との比較は「ゆらぎ」の解釈に有用であることが期待される。さらにこれらの特性時間の分布が構造ゆらぎを反映していると解釈すれば, これらの時空間ゆらぎをフラクタル次元に帰着させて特徴付けることが可能である。従って, 本研究で扱われている TDR, NMR, MD によるダイナミクスの観測, 解析手法による知見の関連を正しく理解し, 相補的に議論していくことが可能である。分子複雑系の広いダイナミックレンジにおよぶ時空間構造を解析して正しく理解するためには, 本研究で試みた相補的解析が必要不可欠であり, 将来的には極めて有効な解析手法として定着していくことが期待される。

4 まとめ

TDR 測定からタンパク質水溶液は分散系の特徴を強く反映する水構造を有していると考えられる。さらに NMR による拡散測定の結果からは, 分子量の大きいタンパク質の方がより水分子の並進拡散を制限することを示した。TDR の緩和時間 τ と NMR の拡散係数 D は, 観ている時間域も運動も異なるが, どちらも分子量の大きい方がより水分子の運動が制限される結果を示しており, 水構造が水素結合ネットワークの広がりを持つ特徴を意味していることが分かった。

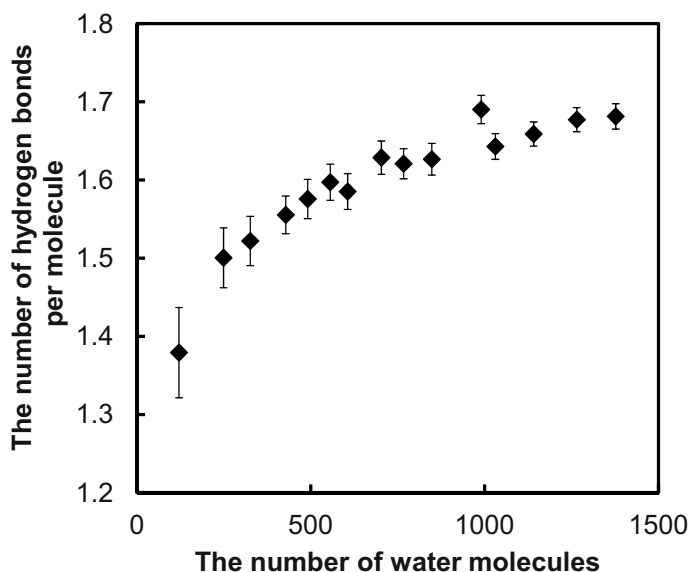


図 6: 300K における総水分子数に対する 1 つの水分子あたりの水素結合数のプロット。

MD シミュレーションでは、各種観測手法による測定結果と比較するために必要な、シミュレーションに最適な条件を確認した。以上のことから、TDR、NMR、MD の各実験手法の関連性から、相補的解析による水構造ダイナミクスの分子論的解釈の有効な道筋を示すことが出来た。

謝辞

本研究は東海大学プロジェクト研究「水構造プロジェクト」として、また一部科学技術振興機構研究成果展開事業・先端計測分析技術プログラムの支援を得て遂行された。関係各位に深謝する。また、本研究で行われた MD シミュレーションにおいて、事前の予備的計算結果を得るために、東海大学理学部物理学科の佐々木海渡氏から得た助力に感謝する。

参考文献

- [1] S. Mashimo, N. Miura, and T. Umehara: J. Chem. Phys. **96** (1992) 6358-6361.
- [2] U. Kaatz: J. Chem. Eng. Data. **34** (1989) 371-374.
- [3] R. Buchner, J. Barthel, J. Stauber: Chem. Phys. Lett. **306** (1999) 57-63.
- [4] T. Fukasawa, T. Sato, J. Watanabe, Y. Hama, W. Kunz, and R. Buchner: Phys. Rev. Lett.

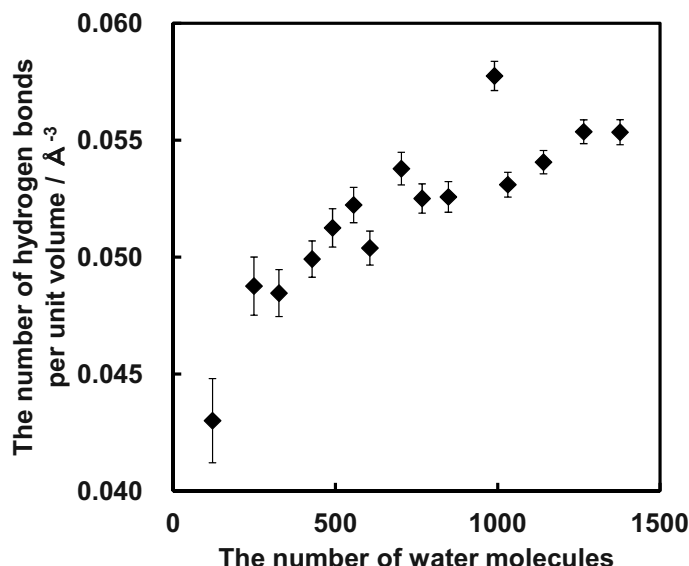


図 7: 300K における総水分子数に対する単位体積あたりの水素結合数のプロット。

- 95 (2005) 1-4.
- [5] S. Schrodle, G. Hefter, and R. Buchner: J. Phys. Chem. **111** (2007) 5946-5955.
 - [6] 八木原 晋, 新屋敷 直木, 喜多 理王: J. Jpn. Soc. Biorheol. **25** (2011) 2-11.
 - [7] 八木原 晋, 新屋敷 直木: 生物物理 **44** (2004) 4-9.
 - [8] 八木原 晋: Nestle Science Promotion Committee Annual Report (2005) 89-99.
 - [9] Y. E. Ryabov, Y. Feldman, N. Shinyashiki, and S. Yagihara: J. Chem. Phys. **19** (2002) 116 8610-8615.
 - [10] Y. E. Ryabov, Y. Feldman: Fractals **11** (2003) 173-183.
 - [11] K. S. Cole, R. H. Cole: J. Chem. Phys. **9** (1941) 341-351.
 - [12] R. H. Cole: J. Phys. Chem. **79** (1975) 1459-1469.
 - [13] R. H. Cole: J. Phys. Chem. **79** (1975) 1469-1474.
 - [14] R. H. Cole: S. Mashimo, Paul Winsor IV: J. Phys. Chem. **84** (1980) 786-793.
 - [15] H. Nakamura, S. Mashimo, A. Wada: J. App. Phys. **21** (1982) 467-474.
 - [16] H. Nakamura, S. Mashimo, A. Wada: J. App. Phys. **21** (1982) 1022-1024.
 - [17] 引地 邦男: J. Jpn. Soc. Biorheol. **13** (1999) 22-28.
 - [18] ファラー・ベッカー: “パルスおよびフーリエ変換 NMR”(1976).
 - [19] E. O. Stejskal, and J. E. Tanner: J. Chem. Phys. **42** (1965) 288-292.
 - [20] Y. Hayashi, N. Shinyashiki, and S. Yagihara: J. Non-Cryst. Solids. **305** (2002) 328-332.
 - [21] S. Yagihara, M. oyama, A. Inoue, M. Asano: Meas. Sci. Technol. **17** (2006) 1-8.
 - [22] 松本 佳祐, 嶋崎 香, 北村 和也, 喜多 理王, 新屋敷 直木, 八木原 晋: 東海大学紀要理学部 **43** (2008)

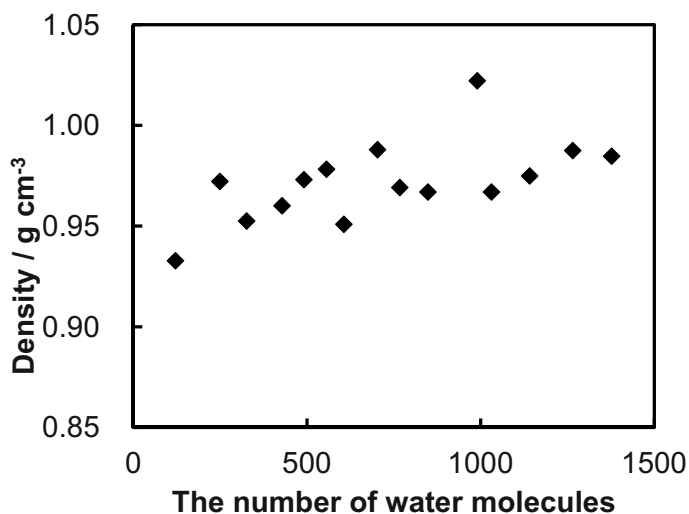


図 8: 300K における総水分子数に対する水の密度のプロット。

127-143.

- [23] 嶋崎 香, 松本 佳祐, 喜多 理王, 新屋敷 直木, 八木原 晋:東海大学紀要理学部 **45** (2010) 113-129.
- [24] 阿部 英幸, 草間 豊子, 河野 澄夫, 岩元 陸夫:分光研究第 44 巻第 5 号 (1995) 247-253.
- [25] J. Zielkiewicz: J. Chem. Phys. **123** (2005) 104501-104506.
- [26] H. Kabrede, and R. Hentschke: J. Phys. Chem. **107** (2003) 3914-3920.