

誘電分光法によるミオグロビン–グリセロール–水 3成分混合系のガラス転移

疋田由貴, 山本航, 佐々木海渡, 新屋敷直木, 喜多理王, 八木原晋

〒 259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

東海大学 理学部 物理学科

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

(2011 年 9 月 22 日受付 ; 2011 年 11 月 17 日受理)

Glass Transitions in Tertiary Mixture of Myoglobin-Glycerol-Water Studied by Dielectric Spectroscopy

by

Yuki HIKITA, Wataru YAMAMOTO, Kaito SASAKI, Naoki SHINYASHIKI, Rio
KITA and Shin YAGIHARA

Department of Physics, Tokai University,

4-1-1 KitaKaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan

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

(Received on Sept. 22, 2011; accepted on Nov. 17, 2011)

Abstract

Broadband dielectric spectroscopy (BDS) measurements were performed on 1 : 1 : 1 myoglobin–glycerol–water in a frequency range of 10 mHz – 10 MHz at temperatures between 273K and 113K. Three relaxation processes were observed for the

mixture with dialyzed myoglobin and two relaxation processes were observed for the mixture with non - dialyzed myoglobin. The relaxation times of the three processes being 100s at approximately 126K, 160K, and 183K for dialyzed myoglobin mixture, and those of the two processes being 100s at 127K and 164K for non dialyzed myoglobin mixture. The process I at the highest frequency is due to uncrystallized water. The process II, which is an asymmetric relaxation of hydrated glycerol, was observed at frequency lower than the process I. For the relaxation process III at lower frequency side of the process II was observed. The process III can be interpreted to be due to the cooperative motion of hydrated myoglobin, and it is much different from the several small relaxation processes observed by Swenson et. al. [*J. Phys, Condens, Matter*, **19** (2007) 205109]. The process III was not observed for non - dialyzed myoglobin mixture, since the process III seems to be masked by the electrode polarization and contribution of dc conductivity.

1 背景

タンパク質は生命にとって最も重要な物質の一つであり, 生体内で様々な機能や構造を持ち, 生命活動に欠かすことのできないものである。そのため, その機能や構造について様々な研究が行われて理解が深まっている。一方, タンパク質の分子運動に関する研究の報告例は多くはなく, その理解も不十分と言える。植物に水を与えると発芽するようにタンパク質に水を与え適温の状態にすることでその機能が初めて発現する。このことは過去の数々の研究から, 「タンパク質の分子運動は水によって支配されている」[1]と表現されている。タンパク質や水の分子運動は広い時間スケールで起こるため, いくつかの手法を用いて観測を行わなければならない。これはタンパク質の機能や構造よりも, 分子運動に関する理解が不十分な所以である。

2006年, Oguniらは断熱カロリメトリを用いた, 氷結した20 wt % ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液の熱容量とエンタルピー緩和速度の測定によって, いくつかのエンタルピー緩和が観測されたと報告した。急冷後に200K-240KでアニールしたBSA水溶液で, 100K, 135K, 180K以上の温度で3つのエンタルピー緩和が観測された。100Kで観測されたのは第一水和水のガラス転移, 135Kで観測されたのはタンパク質のくぼみに強く束縛された水のガラス転移によるものであると解釈された[3]。180K以上で観測されたのは, タンパク質のポリペプチド鎖の運動によるガラス転移であると解釈された[3]。我々は様々な濃度においてBSA水溶液で周波数域2mHz-1.8GHz, 温度域80K-270Kで複素誘電率測定を行ったところ, 氷結したBSA水溶液で不凍水, 氷, 水和したタンパク質の3つの緩和が観測された[2]。この誘電率測定で観測された3つの緩和時間が100

秒となる温度は、観測できる時間領域が100～1000秒と比較的長い、断熱カロリメトリで観測されたガラス転移温度とほぼ一致した。このように、氷結したタンパク質水溶液で水とタンパク質の分子運動を同時に観測することができた。

低温で氷結しないタンパク質水溶液においては、2007年、Swensonらはミオグロビン、グリセロール、水を混合させた3成分系の複素誘電率測定に関する研究を報告した[4]。Swensonによると、ミオグロビン、グリセロール、水系において複数の緩和が観測され、それぞれの緩和は、溶媒の分子運動に由来する緩和、タンパク質分子の局所的な運動に由来する緩和、タンパク質分子の側鎖の運動に由来する緩和、タンパク質の構造のゆらぎに由来する緩和などと解釈された。Swensonらの解釈では複数の緩和が観測されたが、ミオグロビン-グリセロール-水系において、グリセロールの分子運動に由来する緩和が存在するはずであるが、そのような報告はない。また、タンパク質の分子運動に由来する緩和が複数あり、タンパク質の異なる働きによるものであると解釈されている。

濃厚なグリセロール水溶液は純粋なグリセロールと同様に結晶化することがなく、低温でガラス状態になる。本研究では透析処理を行ったミオグロビンと未透析のミオグロビンを用いて、それぞれグリセロールおよび水と混合させたミオグロビン-グリセロール-水の3成分混合系の複素誘電率測定を行い、氷結しない系で観測されたそれぞれの分子運動とその関係を考察した。また、Swensonらの解釈[4]にはないグリセロールの分子運動に関する評価を行い、タンパク質の分子運動に由来する緩和の解釈をミオグロビン水溶液およびグリセロール水溶液で観測された誘電緩和を踏まえて考察した。

2 実験

本研究では球状タンパク質であるミオグロビンを用いて、誘電分光法により分子運動を観測した。試料は馬心臓由来ミオグロビン (Sigma Aldrich Japan, 重量平均分子量 14700), グリセロール (和光純薬工業株式会社, 分子量 92.09) である。また、直流電気伝導成分を減少させタンパク質の分子運動に由来する緩和過程を観測し易くするため、透析による脱塩処理を行なったあと凍結乾燥を行ったものと、透析の効果を確認するため透析を行っていないものを使用した。透析はタンパク質用セルロースチューブ (Spectrum Laboratories, Inc., 型番 132660, 透過分子量 8000) に 20 wt % ミオグロビン水溶液を入れ、ビーカー内の純水に浸して攪拌し続け、1日1回ビーカー内の水を交換し、5日間透析を行い、透析後は凍結乾燥を行ってミオグロビンを粉末状にした。そして透析・未透析ミオグロビン、グリセロール、Millipore, Milli-Q Lab. によって蒸留および脱イオンした電気抵抗率 $18.3\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ の純水を 1:1:1 の割合で混合し約1日間 4°C に置いた。

疋田由貴, 山本航, 佐々木海渡, 新屋敷直木, 喜多理王, 八木原晋

Novocontrol 社製 Alpha-A analyzer, 円筒型電極 ($C_0=1.333\text{pF}$) を用い, 周波数域 10mHz-10MHz, 温度域 113K-273K (昇温過程) における 1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水の複素誘電率測定を行った。

3 結果および考察

周波数域 10mHz-10MHz, 温度域 113K-298K での 1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水の複素誘電率測定によって, いくつかの緩和が観測された。図 1 に 1:1:1 透析ミオグロビン-グリセロール-水の複素誘電率の周波数依存性, 図 2 に 1:1:1 未透析ミオグロビン-グリセロール-水の複素誘電率の周波数依存性を示す。共に 113K-123K で 10mHz 付近に緩和 (I 緩和) が観測され, 温度が上昇するにつれて緩和は高周波側へシフトした。163K 付近で 10mHz 付近に新たな緩和 (II 緩和) が観測され, 163K 以上の温度で I 緩和と重なった。さらに高温になるにつれて I 緩和, II 緩和は高周波側へシフトし, 1:1:1 透析ミオグロビン-グリセロール-水においては 183K で新たな緩和 (III 緩和) が観測され, 183K 以上の温度で I 緩和, II 緩和と重なった。

図 3 は 1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水の複素誘電率を (1) 式でカーブフィットしたことによって得られた I, II, III 緩和の緩和時間と緩和強度の温度依存性である。I, II, III 緩和は Cole-Cole の式と Kohlrausch-Williams-Watts(KWW) の式で表すことが出来た。Cole-Cole の式は次式で示される。

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\beta} + \Delta\varepsilon_m \int_0^\infty \left[-\frac{d\phi_m}{dt} \right] \exp(-j\omega t) dt + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\beta} + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\beta} - j \frac{\sigma}{\varepsilon_0\omega}$$
$$\phi(t) = \exp \left[-\left(\frac{t}{\tau} \right)^{\beta_K} \right] \quad (1)$$
$$(0 < \beta \leq 1)$$

ここで $\Delta\varepsilon = \varepsilon'(0) - \varepsilon'(\infty)$ は緩和強度, τ は緩和時間, β は緩和の広がり性を示すパラメータである。Cole-Cole の式で β は緩和時間の対称的な広がり, β_K は非対称な緩和の広がり性を示す。図 3 のプロットで三角は不凍水 (I 緩和), 丸は水和グリセロール (II 緩和), 四角は水和ミオグロビン (III 緩和), 点線の 175K-205K はミオグロビンの熱測定で得られたガラス転移温度の範囲 [6] を示している。

図 4 に 35 wt % ミオグロビン水溶液の複素誘電率の周波数依存性を示す。35 wt % ミオグロビン水溶液ではおよそ 113K から 10mHz 付近で II' 緩和が観測されて温度の上昇とともに高周波側へシフトした。163K-173K で III 緩和が観測され, 173K 以上の温度で II' 緩和と III 緩和は重なった。また, 図 5 は 35 wt % ミオグロビン水溶液の複素誘電率を Cole-Cole の式でカーブ

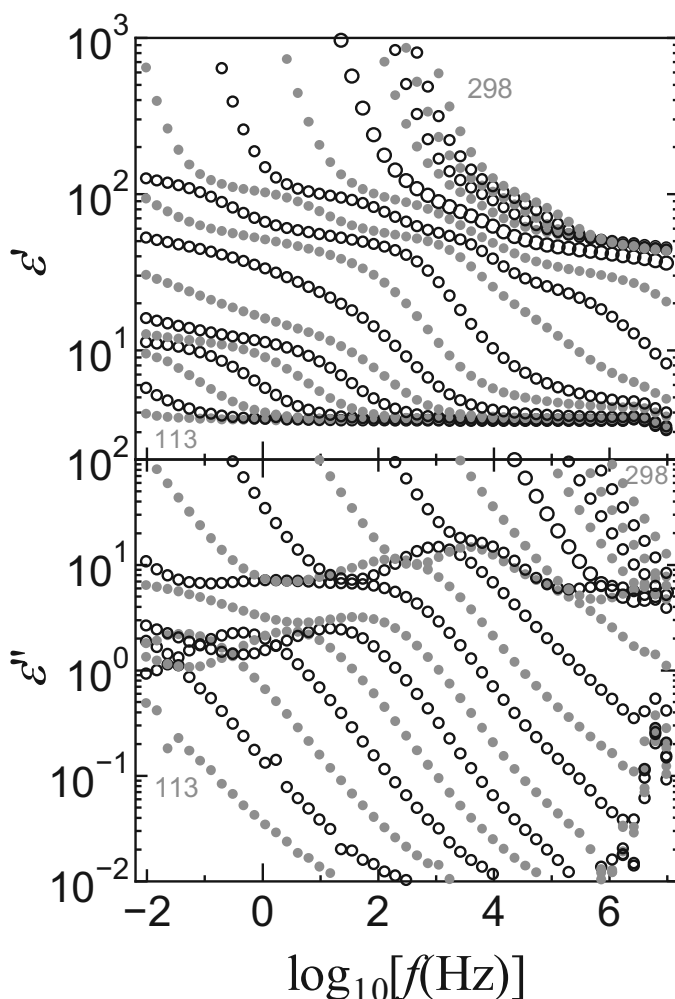


図 1: 様々な温度における 1:1:1 透析ミオグロビン-グリセロール-水の複素誘電率の実数部 ϵ' と虚数部 ϵ'' の周波数依存性。温度範囲は 113K-283K (10K 毎), 298K である。

フィットしたことによって得られた緩和時間と緩和強度の温度依存性である。図 5 のプロットで丸は水 (II' 緩和), 四角は水和ミオグロビン (III 緩和), 点線の 175K-205K はミオグロビンの熱測定で得られたガラス転移温度の範囲 [6], 緩和時間が 100 秒であることを示す。183K 以上の温度では実数部の高周波側の誘電率から不凍水の緩和の存在が確認できるが, 不凍水の緩和は測定周波数域よりも高周波側に存在するため今回の実験では緩和パラメータを決定できない。

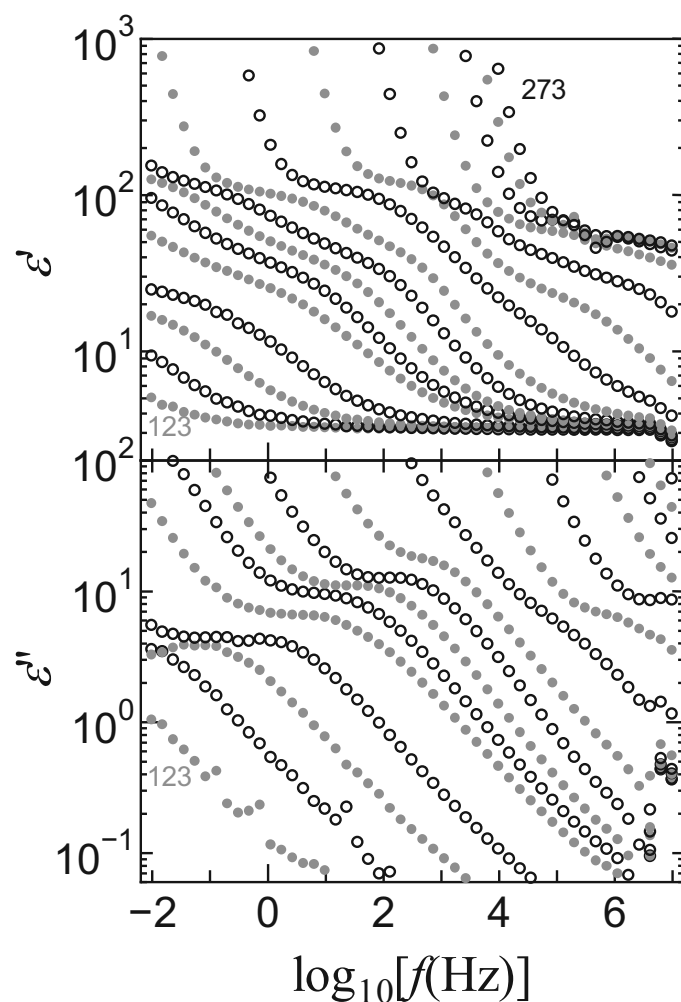


図 2: 様々な温度における 1:1:1 未透析ミオグロビン-グリセロール-水の複素誘電率の実数部 ϵ' と虚数部 ϵ'' の周波数依存性。温度範囲は 113K-273K (10K 毎) である。

図 3 より緩和時間が 100 秒になる温度は 1:1:1 透析ミオグロビン-グリセロール-水では 126K (I 緩和), 160K (II 緩和), 183K (III 緩和) である。また, 1:1:1 未透析ミオグロビン-グリセロール-水では 127K (I 緩和), 164K (II 緩和) である。35 wt % ミオグロビン水溶液では 98K (II' 緩和), 166K (III 緩和) である。(表 1)

誘電分光法によるミオグロビン-グリセロール-水 3 成分混合系のガラス転移

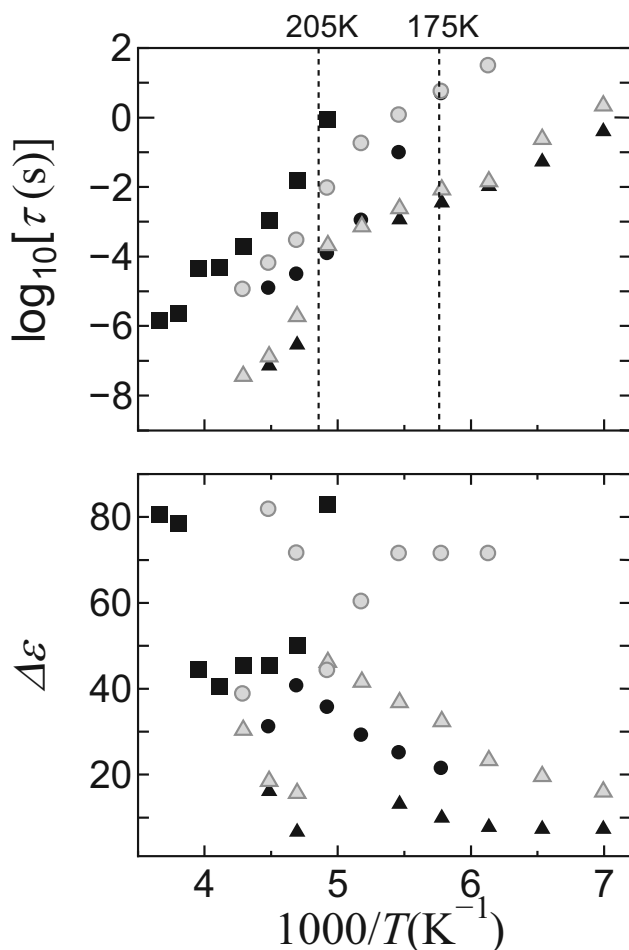


図 3: 1:1:1 透析ミオグロビン-グリセロール-水 (黒), 1:1:1 未透析ミオグロビン-グリセロール-水 (灰色) の緩和時間 τ と緩和強度 $\Delta\epsilon$ の温度依存性。プロットはそれぞれ, 三角は I 緩和, 丸は II 緩和, 四角は III 緩和のものである。点線で示した 175K および 205K は, 含水率 30% および 50 % 含水ミオグロビンの熱測定で得られたガラス転移温度の範囲を示す。[6]

I 緩和

タンパク質濃度が約 80wt% よりも高いタンパク質水溶液では, タンパク質のガラス転移温度が溶液中の水が凍結する温度よりも高くなりタンパク質水溶液は凍らない。一方, タンパク質濃度が低い水溶液ではタンパク質水溶液の温度を下げるとタンパク質水溶液は凍結し, 氷とそれ以外

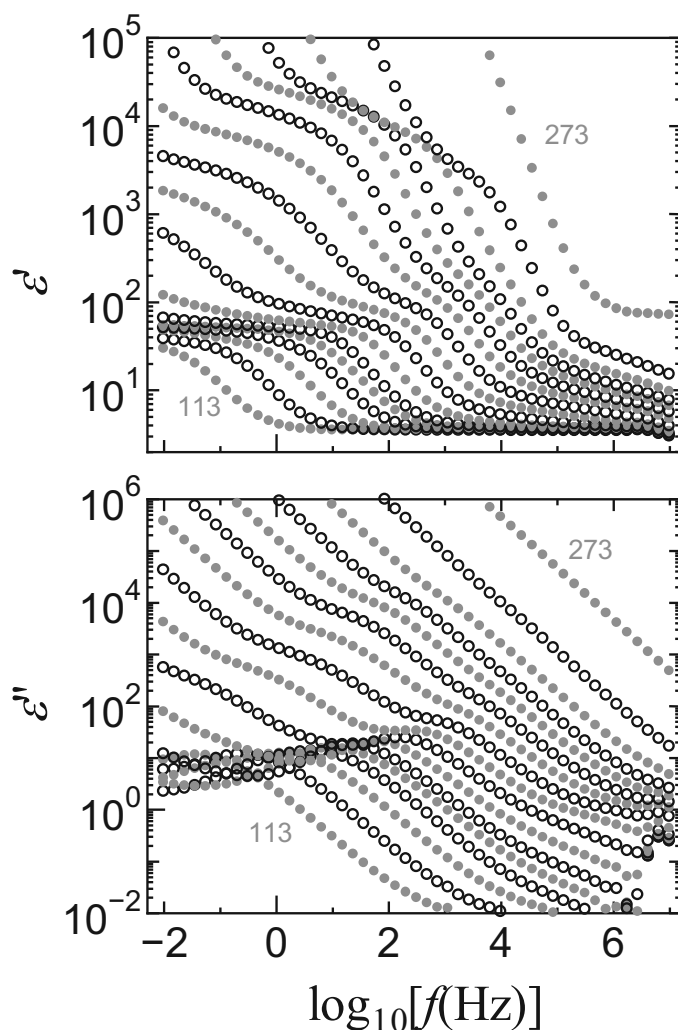


図 4: 様々な温度における 35 wt% ミオグロビン水溶液の複素誘電率の実数部 ϵ' と虚数部 ϵ'' の周波数依存性。温度範囲は 113K-273K (10K 毎)。

の相に分かれる。この現象を凍結濃縮と呼び、タンパク質水溶液の一部の水が結晶化し、残ったそれ以外の部分、つまりタンパク質と結晶化しなかった水は融点以下でも液体の状態を保つ [7]。このとき、タンパク質水溶液において結晶化して氷になった水があるにも関わらず、液体の状態を保ってタンパク質分子の周りに存在している水がある。我々はこの水を不凍水と呼んでいる。

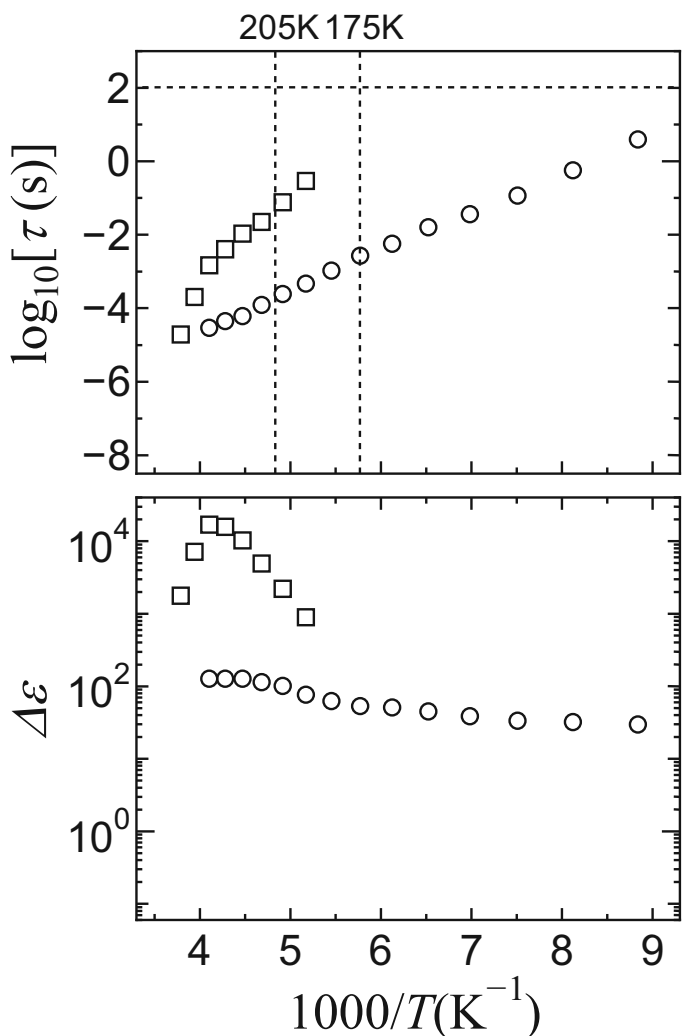


図 5: 35 wt% ミオグロビン水溶液の緩和時間 τ , 緩和強度 $\Delta\epsilon$ の温度依存性。(○) 氷, (□) 水とミオグロビン, 縦の点線で示した 175K および 205K は含水率 30% および 50% 含水ミオグロビンの熱測定で得られたガラス転移温度の範囲 [5] である。 $\log_{10}[\tau(\text{s})] = 2$ の点線はガラス転移温度の緩和時間 ($\tau = 100\text{s}$) を示す。

1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水において, 図 3 より, それぞれ緩和時間が 100 秒となる 126K, 127K から観測された最も速い緩和は, 低温でも液体状態で存在する不凍水の緩

和である。

II 緩和

グリセロールなどの低分子量分子の水溶液では損失ピークに対して非対称に広がった緩和が観測される。[5] これは小さな溶媒分子が水分子と協同的な運動をすることによって非対称な広がりになると考えられる。2002 年に Sudo の報告によると [5], グリセロール水溶液において様々な濃度と温度で損失ピークに対して非対称に広がった緩和が観測され, それらはグリセロール分子と水分子が協同的に運動している緩和であると解釈された。この水和したグリセロールの緩和の緩和時間が 100 秒になる温度は 160K であり, 1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水の II 緩和の緩和時間が 100 秒となる温度と一致した。透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水においても, この II 緩和は損失ピークに対して非対称に広がった緩和が観測された。これは Sudo らの報告のグリセロール水溶液と同じように, グリセロール分子が水分子と協同的な運動をすることによって非対称に広がった緩和になると考えられる。I 緩和の緩和時間が 100 秒となる温度がタンパク質水溶液 [2] に比べて 126K, 127K とやや高いのは, この II 緩和が影響しているためだと考えられる。

III 緩和

35 wt % ミオグロビン水溶液で 166K, 1:1:1 透析ミオグロビン-グリセロール-水では 183K から III 緩和が観測された。III 緩和の緩和時間が 100 秒になる温度が観測された緩和の中で最も高いことから, この緩和はミオグロビン分子の局所的な分子運動とミオグロビン分子近傍の水分子の協同的な運動による緩和であると考えられる。表 1 より, III 緩和の水和ミオグロビンの緩和時間が 100 秒になる温度は, ミオグロビン水溶液, 透析ミオグロビン-グリセロール-水ではほぼ一致した。また, Giorgio らの含水率 30 % および 50 % 含水ミオグロビンの熱測定の結果 [6] よりミオグロビンのガラス転移温度は 175K から 205K であるため, 本研究で求められた水和ミオグロビンの緩和時間が 100 秒の温度と一致した。また, 図 3 より水和ミオグロビンの緩和時間が 100 秒になる温度付近で不凍水の緩和時間の温度依存性が変化していることは, 水和ミオグロビンの緩和と不凍水の緩和が互いに影響しているためである。このことは, 様々な水溶液で観測された「水の局所的な運動」と「水和した水と溶質分子の協同的な運動」との関係と一致している。

Swenson らは 160K 以上の高温で観測された緩和に関して, タンパク質分子の局所的な運動に由来する緩和, タンパク質分子の側鎖の運動に由来する緩和, タンパク質の構造のゆらぎに由来する緩和などと複数のタンパク質の異なる働きによるものであると解釈した。[4] 低周波側で観測された水和したタンパク質の緩和と高周波側で観測された水の局所的な運動による緩和の関係に関する解釈は我々と一致した。

表 1: 1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水, および 35 wt% ミオグロビン水溶液で観測された緩和の緩和時間が 100 秒になる温度。

Sample	T _τ =100s (K)		
	Process I	Process II	Process III
35 wt% Myoglobin water mixture		98	166
1:1:1 dialyzed Myoglobin-glycerol-water	126	160	183
1:1:1 non - dialysis Myoglobin-glycerol-water	127	164	

また, 1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水において, 水和したミオグロビンの緩和が観測されたのは透析処理を行った方のみである。これはタンパク質の分子運動に由来する緩和過程をより詳しく観測するため, 直流電気伝導成分を減少させ透析による脱塩処理を行なったことによって, 電極分極の寄与が小さくなったためだと考えられる。

4 まとめ

誘電分光法により透析処理を行ったミオグロビンと未透析のミオグロビンを用いて, それぞれグリセロール, 水と混合させ, ミオグロビン-グリセロール-水の 3 成分系で観測されたそれぞれの分子運動とその関係を考察した。それぞれ複素誘電率測定によって, 不凍水, 水和グリセロール, 水和ミオグロビンの 3 つの緩和が観測された。126K, 127K から観測された最も速い緩和は, 低温でも液体状態で存在する不凍水の緩和 (I 緩和) であり, 温度が上昇するにつれて緩和は高周波側へした。160K 付近で損失ピークに対して非対称に広がった緩和が観測され, それはグリセロール分子と水分子が協同的に運動している緩和 (II 緩和) である。この II 緩和も温度の上昇とともに高周波側へシフトした。また 183K 付近から観測された緩和は, ミオグロビン分子の局所的な分子運動とその近傍に存在する水分子の協同的な運動による緩和 (III 緩和) であると考えられる。1:1:1 透析・未透析ミオグロビン-グリセロール-水において, 水和したミオグロビンの緩和が観測されたのは透析処理を行った方のみで, 未透析では電極分極に隠れて III 緩和が確認できない。これは透析による脱塩処理を行ない, 直流電気伝導成分を減少させたことが理由であると考えられる。II 緩和, III 緩和の緩和時間が 100 秒になる温度は 2002 年に Sudo らによって報告されたグリセロール水溶液の α 緩和の緩和時間が 100 秒になる温度 [5], および含水率 30 % および 50 % 含水ミオグロビンの熱測定で得られたガラス転移温度 [6] とそれぞれ一致した。また 35 wt % ミオグロビン水溶液の複素誘電率では氷の緩和 (II' 緩和), 水和したミオグロビンの緩和

疋田由貴, 山本航, 佐々木海渡, 新屋敷直木, 喜多理王, 八木原晋

(III 緩和) が観測された。ミオグロビン水溶液での III 緩和に関しても, 緩和時間が 100 秒になる温度は含水率 30 %および 50 %含水ミオグロビンの熱測定で得られたガラス転移温度 [6] と一致し, それは局所的なミオグロビン分子運動とミオグロビン分子近傍に存在する水分子の協同的な運動による緩和と考えられた。

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。

参考文献

- [1] Beece, D. Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Good, M., Marden,., Reinisch, L. Reynolds, A. H. Sorensen, L. B. *Solvent viscosity and protein dynamics*, **19** 5147 (1980)
- [2] N. Shinyashiki, W. Yamamoto, A. Yokoyama, T. Yoshinari, S. Yagihara, R. Kita, K. L. Ngai, and S. Capaccioli *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14448 (2009)
- [3] K. Kawai, T. Suzuki and M. Oguni, *Biophys. J* **90**, 3732 (2006)
- [4] J. Swenson, H. Jansson, J. Hedstrom, R. Bergman, *J. Phys, Condens, Matter* **19** (2007) 205109
- [5] S. Sudo, M. Shimomura, N. Shinyashiki, S. Yagihara, *J. Non - Cryst. Solids* **307** 356 (2002)
- [6] Giorgio Schiro, Antonio Cupane, Eugenio Vitrano, and Fabio Bruni, *J.Phys.Chem.B* **113**, 9606 (2009)
- [7] 田中直樹, “冷凍”, **81**, 949, 11 (2006)
- [8] Y. Miyazaki, T. Matsuo, and H. Suga *J.Phys.Chem.B*, **104**, 8044 (2000)
- [9] G. P. Johari and E. Whalley, *J. Chem. Phys* **75**, 1333 (1981)
- [10] S. Capaccioli, K. L. Ngai, N. Shinyashiki, *J. Phys. Chem. B* **111** (2007), 8197-8209.
- [11] K. L. Ngai, S. Capaccioli, S. Ancherbak, N. Shinyashiki, *non-Crystalline Solids* **356**, 535 (2010)
- [12] K. L. Ngai, S. Capaccioli, N. Shinyashiki, *J.Pys.ChemB* **112**, 38262008)
- [13] K. L. Ngai, S. Capaccioli, M. Shahin Thayyil, N. Shinyashiki, *J Therm Anal Calorim* **99**, 123 (2010)