



Title	タンパク質水溶液系における水の水素結合ネットワークに関する熱力学的研究
Author(s)	東, 信晃
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69364">https://doi.org/10.18910/69364</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 東 信 晃 )	
論文題名	<p>タンパク質水溶液系における 水の水素結合ネットワークに関する熱力学的研究</p>
<p>本研究では、タンパク質が水の水素結合ネットワークに与える影響を明らかにするために、免疫グロブリンG (IgG) と、IgGの分解物であるFab・Fcの水溶液系、そして不凍タンパク質 (AFP) のI型およびIII型水溶液系を調べた。実験は熱容量測定を主軸に置き、粉末X線回折、誘電緩和測定などを組み合わせることで、水素結合ネットワークを組んだ水分子集合状態に対してタンパク質が及ぼす影響を、熱力学特性および構造、ダイナミクスの三方面から明らかにした。熱容量測定は断熱法を用いて7-300 Kの温度域で行った。IgGおよびFab・Fcは5-95%の濃度域を、AFPは0.001%-5%の濃度域を調べた。粉末X線回折は1%のAFPを含んだ氷 (AFP含有氷) について200-250 Kの温度域で行い、誘電緩和測定はAFP含有氷について、140-240 Kの温度域で行った。</p> <p>IgGおよびFab・Fc水溶液の研究では、融解エンタルピーから、水溶液中の不凍水量を決定した。IgG, Fab・Fcがともに濃度80%以上では含まれている水全てが不凍水になることが示された。一方、50%以下では一部の氷が273 K以下で凍結することが示された。5-50%の濃度域では不凍水量がIgGとFab・Fcとで優位に差が出るようになった。不凍水の熱容量をIgG, Fab・Fcの各濃度について見積もったところ、IgGの不凍水の方がFab・Fcよりも200-270 Kの温度域で小さくなっていることが明らかになった。この熱容量はタンパク質濃度が大きいほど顕著になる傾向も明らかになった。これらの結果からIgG水溶液の不凍水のネットワーク的な分子運動がFab・Fc水溶液の不凍水とは異なることが示され、3個の巨大タンパク質ユニット (Fab・Fc) が結合しているかどうかによって、タンパク質を取り囲む水和構造やダイナミクスが変化することが明らかになった。</p> <p>AFP (I型とIII型) 水溶液の熱容量測定から、六方晶氷のプロトンガラスのガラス転移温度が、AFP添加によって110 Kから140 Kに移動することを明らかにした。粉末X線回折実験からはAFP含有氷の構造が純粋な六方晶氷の結晶構造と一致していることを確認した。温度ジャンプ法及び誘電緩和測定で、プロトンガラスの凍結現象に関連する水分子の再配向運動の緩和時間が遅くなることを見出した。これらの結果から、AFP添加によって小さな氷核が生成されるため、氷中では水素結合ネットワークがむしろ強固になり水分子の再配向運動が阻害された可能性が示唆された。</p> <p>In this study, aqueous solutions of Immunoglobulin G (IgG) and its 3 separated domains (Fab-Fc), antifreezing protein (AFP) were investigated for elucidating the influence of proteins on hydrogen network of water. The combination of adiabatic calorimetry, X-ray powder diffraction (XRPD), and dielectric relaxation was used to obtain thermodynamical, structural and dynamical information of hydrogen bonding system in water with protein.</p> <p>The heat capacities were measured in temperature range of 7-330 K. For concentration dependence on heat capacity for 5-95% (IgG and Fab-Fc) and 0.001%-5% (AFP) was measured. For AFP ices, the XRPD was measured at 200-250 K, and dielectric relaxation was measured at 140-240 K.</p> <p>From the adiabatic calorimetry, IgG and Fab-Fc aq solution was found to have different amount of unfreezable water. Moreover, the heat capacity of the unfreezable water was found to be different between IgG and Fab-Fc aq solutions. When Fab-Fc have larger heat capacity even though their hydration was smaller in amount.</p> <p>From the adiabatic calorimetry for AFP ices, glass transition temperature of reorientational motion of water molecules in the ice lattice was found to be higher temperature than that of pure ice. This phenomenon did not change by changing the types of AFP. From XRPD, the crystal structure of AFP ices were confirmed to be the same with that of pure ice. By the temperature jump method by using adiabatic calorimeter and dielectric relaxation measurements, the relaxation time constant of the reorientational motion of water molecules in AFP ices was found to be slower than that of pure ice. It was indicated that the reorientational motions of water molecules were prevented by the existence of AFP molecules.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 東 信 晃 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	中 野 元 裕
	副 査	教 授	中 澤 康 浩
	副 査	教 授	水 谷 泰 久
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>タンパク質は生体中における生命活動の大部分を司っている生体高分子である。タンパク質の機能発現には、タンパク質分子のもつ特異な立体構造（静的構造）ばかりでなく、非調和的な分子運動（動的構造）や水和が密接に関係している。タンパク質の機能発現の機構を解明することは生物の生命現象の理解にも不可欠であり、タンパク質の静的・動的構造、水和状態の研究は非常に重要である。</p> <p>東信晃氏の学位論文「タンパク質水溶液系における水の水素結合ネットワークに関する熱力学的研究」は、タンパク質の機能発現と密接に関係する、タンパク質と水との相互作用に着目した研究である。論文前半は、免疫グロブリン G (IgG) の水溶液を対象とした熱容量カロリメトリーを取り扱っている。免疫グロブリン G は 2 つの Fab ドメインと 1 つの Fc ドメインがペプチド鎖でつながれた構造を有し、このペプチド鎖を蝶番としたドメイン同士の相対運動が可能である。タンパク質分解酵素パパインを用いると蝶番部分を選択的に切断して 3 つのドメインへと分離することができる。加水分解前後での低温熱容量の比較から、免疫グロブリン G の各ドメインをつなぐ蝶番部分に特異な水和水を検出し、通常の球状タンパク質の周りに見られる水和水とは異なる性質をもつことを見出した。これは現在注目を集めている天然変性タンパク質のような、高次構造をもたないペプチド部位の水和が本質的に異なっていることを示唆しており、極めて興味深い知見といえる。</p> <p>論文後半では、氷晶核形成抑制機能をもつ 2 種類の不凍タンパク質 (AFP) の希薄水溶液の低温熱容量を論じている。一般に球状タンパク質の希薄水溶液の場合、冷却にともない氷を生じ、濃縮された溶液内で水和水の不凍挙動が観測されるが、不凍タンパク質水溶液の低温領域では通常の球状タンパク質では影響を受けることのない、氷内部の水素結合ダイナミクスに起因するガラス転移が顕著に高温側に移動するという結果を初めて発見した。氷結晶への不純物（水酸化アルカリなど）ドーブは一般に水素結合ダイナミクスを促進してガラス転移温度の降下をもたらすが、不凍タンパク質分子は氷結晶の内部へ侵入することなく表面に結合するだけで結晶内部の水素結合ダイナミクスを均一に抑制しガラス転移温度の上昇を示すという結果である。この現象は不凍タンパク質の種類を問わず観測される点でも極めて特異である。さらに、エンタルピー緩和および誘電緩和の温度依存性から氷結晶内部の水素結合ダイナミクスの活性化エネルギーが純粋な水の場合よりも高いこと、粉末 X 線回折から氷の格子定数が不凍タンパク質の表面吸着の影響を受けないことも明らかにできた。</p> <p>以上のように、本論文ではタンパク質と水との相互作用をめぐって、多くの新発見とその物理化学的考察を与えた。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			