

Effects of Urea and Its Derivatives on the Dielectric Relaxation Property of Water and Protein Functions

著者	BATNASAN ALTANSUKH
号	56
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	工博第4546号
URL	http://hdl.handle.net/10097/61668

バトナサン アルタンスック

氏名	Batnasan Altansukh
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成23年9月14日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科(博士課程) 材料システム工学専攻
学位論文題目	Effects of Urea and Its Derivatives on the Dielectric Relaxation Property of Water and Protein Functions
指導教員	東北大学教授 鈴木 誠
論文審査委員	主査 東北大学教授 鈴木 誠 東北大学教授 小山 裕 東北大学教授 原 信義 東北大学教授 和沢 鉄一

論文内容要旨

It is generally accepted that urea in polar environments like water plays a vital role in denaturing of proteins [1-3], increasing of the solubility of hydrocarbons [4] and regulating to inhibit micelle aggregation [5], however the behavior of urea-water interaction and mechanism of the denaturation by urea are not yet clearly understood [1-7]. Major focus of this thesis was to reveal effects of aqueous solutions of urea and its some derivatives such as thiourea (TU), 1-methylurea (MMU), 1-ethylurea (MEU) and *N,N*-dimethylurea (DMU), *N,N*-diethylurea (DEU) on the dielectric relaxation (DR) property of surrounding water. The next attention of this thesis was to the effect of urea and its derivatives on the interaction between myosin S1 and ADP, and myosin S1 ATPase reaction rate. In detail, this thesis is divided into six chapters. *Chapter 1* cited a general overview of urea, water and hydration dynamics of aqueous urea solution. *Chapter 2* provided a principle, general description of theory of DRS and experimental methods of DRS with regard to study this study. *Chapters 3* and *4* exhibited the DRS measurement and results of the hydration analysis of the low concentration of aqueous solutions of urea, thiourea and alkyl derivatives of urea. *Chapter 5* showed the results as the effect of urea on the binding heat of ADP on myosin S1, and on the myosin S1 ATPase reaction rate. *In Chapter 6* gave a conclusion of this study.

The complex dielectric permittivity (ϵ' , ϵ'') of aqueous solutions of urea (0.1-0.5 M), TU (0.04-0.2 M) and alkyl derivatives of urea (0.1-0.3 M) were measured by a high precision dielectric relaxation spectroscopy (DRS). Experimental DR spectra measured by the DRS were interpreted using the combination of both Hanai's mixture

theory and least squares Debye decomposition method. The analysis of the DR spectra between 3-26 GHz has disclosed the hydration properties of urea and its derivatives, whereas the analysis between 0.2-5 GHz has revealed the dynamics of the solute molecules. In this study, three DR components were found for urea and thiourea with f_{c1} , f_{c2} and f_{c3} of 18.5-19.8 GHz, 7.3-10 GHz and 2.8-3.9 GHz, respectively, whereas two DR components had been observed for alkyl urea derivatives with f_{c2} , f_{c3} of 7.3-8.4 GHz and 0.9-1.8 GHz, respectively (Table 1 and Fig. 1).

Table 1. DR parameters of the hydrated molecules of thiourea and alkyl urea derivatives in water

<i>Solutions</i>	f_{c3} (GHz)	δ_3	f_{c2} (GHz)	δ_2	f_{c1} (GHz)	δ_1	ϕ_B/c (M^{-1})
Urea	3.9	1.4	9.8	28.6	19.2	49.4	0.596
Thiourea	2.8	1.0	7.3	19.8	18.6	59.0	0.687
MMU	1.8	1.0	8.4	18.5	16.8	58.5	1.21
MEU	1.0	1.2	7.5	20.1	16.5	55.4	1.19
DMU	1.2	1.8	7.5	23.0	16.0	52.7	1.09
DEU	0.9	4.4	7.3	12.0	16.2	62.0	2.8
#error			± 0.1	± 0.2			

Our results indicate that the DR behavior of the solutions of urea and thiourea can be described by the combination of the bulk water and two Debye relaxation functions, which are assigned to be the constrained water and hyper-mobile water (HMW) components which has a higher DR frequency than bulk water. The solutions of the alkyl urea derivatives can be represented by the bulk water and a single Debye relaxation component. The surrounding water molecules around urea and thiourea are more mobile than bulk water, but the HMW is eliminated by alkyl groups of the alkyl urea derivatives. The HMW with DR frequency of 18.5- 19.8 GHz was first observed around urea and thiourea. Our results concluded that urea and thiourea has both effects on surrounding water network structure as a structure breaker [2, 3] and a structure maker [6, 7].

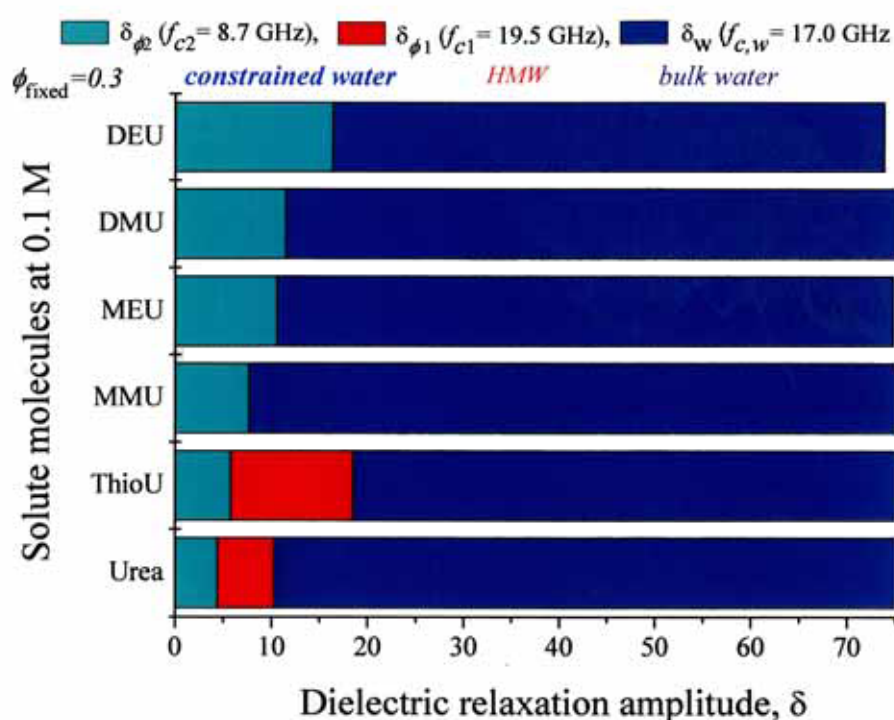


Fig. 1. Dependence of DR parameters from the nature of solute molecule

Several experimental investigations have been performed to examine the effects of the low concentration of urea and its derivatives on the protein-nucleotide binding, and the ATPase reaction rate by isothermal titration calorimetry (ITC) and by enzymatic assay. Using ITC, the measurement of binding heat between ADP and myosin S1 revealed that the binding constant, K_B , in the presence of urea was about twice larger than that in the absence of urea. The thermodynamic parameters of binding heat of ADP on myosin S1 in the presence of 0.1 M urea, the ΔH , ΔS and ΔG were 6.5 %, 8.0 % and 4.5 % higher than the binding in the absence of urea. The activity of myosin S1 ATPase reaction was measured by a Malachite-Green method [10]. The rate of ATPase reaction was not affected by the presence of 0.2 M urea, whereas the same concentration (0.2 M) of thiourea (TU) and diethylurea (DEU), respectively, induced an obvious increase of the rate of myosin S1 ATPase reaction. Thus, in such a low concentration range of urea and its derivatives do affect protein-ligand binding and enzymatic activity. So it suggests that the modified water structure affect some of protein functions.

References

1. G. C. Kresheck, H. A. Scheraga. *J. Phys. Chem.*, 1965, 69 (5), 1704.
2. H. S. Frank, F. Franks. *J. Chem. Phys.*, 1968, 48, 10, 4746
3. A. Idriss, M. Gerald, P. Damay. *J. Phys. Chem. B.*, 2010, 114, 4731
4. J. A. Schellman. *Biophys. Chem.*, 1990, 37 (1-3), 121
5. W. Bruning, A. Holtzer. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83 (23), 4865
6. F. Vanzi, B. Madan, K. Sharp. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120 (41), 10748.
7. Y. Hayashi, Y. Katsumoto, S. Omori, N. Kishii, A. Yasuda. *J. Phys. Chem. B.*, 2007, 111, 1076.
8. T. Kouyama, K. Mihashi. *Eur. J. Biochem.*, 1981, 114, 33

論文審査結果の要旨

バトナサン・アルタンスク君の論文は、ライフサイエンスやバイオテクノロジー、メディカルテクノロジーの研究開発で重要な分子である尿素およびその誘導体の水和特性を実験的に調べ、分子内の官能基の水和特性上の作用を含めて研究した内容を記述している。本論文は6章から構成される。

第1章では、水溶液において尿素がおよぼす水のダイナミクスへの影響についてこれまでになされた実験的・理論的研究をレビューし、とくに誘電緩和分光法による研究から明らかにされた点についてまとめている。現状では尿素の水のダイナミクスへの影響についてまだ統一的理解が得られていないことを踏まえ、本論文の主たる目的として、高分解誘電緩和分光法により、尿素、チオ尿素、アルキル化尿素誘導体を対象に、周囲の水の誘電緩和特性を明らかにすることを掲げている。とくにこれまで、タンパク質分子の変性を引き起こす濃度よりずっと低い、尿素分子が単分散状態における水への影響を調べることを目的としている。あわせて、タンパク質とリガンドの結合反応やミオシンのATP分解活性におよぼす尿素とその誘導体の影響を単分散状態を保証する低濃度条件下で明らかにすることを含んでいる。

第2章では、本研究で使用する高分解誘電緩和分光法による水と解析方法について、その原理とデータ解析手法について述べている。

第3章では、尿素水溶液の誘電緩和分光法による水和測定の結果について述べている。この実験では、従来の誘電緩和分光測定では測定不能だった尿素の単分散状態を保証する低濃度測定を行い、再現性よく水和特性を明らかにすることができた。その結果、尿素には誘電緩和周波数が約10 GHzの拘束水をおよそ水1層分もつほか、同じく約20 GHzの成分(ハイパーモバイル水)を1~2層分有していることを見出したものである。この発見は、尿素のもつ周りの水に対する構造形成性と構造破壊性の両面の存在を統一的に説明できるものであり価値が高い。

第4章では、チオ尿素とアルキル化尿素誘導体の水溶液の誘電緩和分光法による水和測定の結果について述べている。その結果、チオ尿素は尿素と同様に、拘束水層のほかに、尿素よりも多量のハイパーモバイル水層をもつことが明らかとなった。このことは、尿素とチオ尿素の中央原子が酸素とイオウの違いによるもので、イオウ原子が比較的大きいことがハイパーモバイル水形成に重要であることを示唆している。アルキル化尿素では、アミノ基の水素を1つでもメチル基やエチル基に置換したものは、拘束水層だけで、ハイパーモバイル水層を持たなくなることを明らかにした。これは新たな発見で、アルキル基の水の構造形成作用とカルボニル基の構造破壊作用が干渉した結果であることを示唆している。

第5章では、等温滴定熱量測定によるATP分解酵素であるミオシン頭部へのADPの結合熱測定と、ミオシン頭部によるATP加水分解速度におよぼす、尿素、チオ尿素、アルキル化尿素の影響を調べたものである。その結果、AミオシンとADPの結合熱は0.1M尿素存在下で約7%増大し、また、ATP分解速度は、0.2M尿素では変化は見られず、チオ尿素では明瞭に上昇し、アルキル化尿素では顕著な増大が起こることを明らかにした。

第6章では、これらの総括と結論を述べている。

以上のように、本論文は、これまで測定が困難だった低濃度の尿素およびその誘導体の水溶液における水和特性を高分解誘電分光測定をしたことで、尿素を構成する官能基の周囲の水のダイナミクスにおよぼす影響を定量的に明らかにしたもので、生理機能、生体分子機能を解明し、工学的応用を図る上で重要な基礎を作ったといえる。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。