

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19740262
 研究課題名（和文） ペプチド両親媒性分子溶液の階層構造転移とその構造解析および粘弾性挙動の研究
 研究課題名（英文） Micro-structural transitions and viscoelastic properties of a newly designed peptide amphiphile
 研究代表者
 堀田 篤 (HOTTA ATSUSHI)
 慶應義塾大学・理工学部・准教授
 研究者番号：30407142

研究成果の概要：

本研究は、計算による現象の基礎的な裏づけ、および実験による現象パラメータの追求の2つの研究視点により成り立っている。計算結果においては、ペプチド両親媒性分子のメソスケールにおける自己集合構造に着目し、構造に影響を及ぼす主要な因子である濃度とせん断それぞれについての依存性を、散逸粒子動力学法を用いて解析した。実験結果においては、ペプチド両親媒性分子溶液 (PA) のゾル-ゲル転移に着目し、動的粘弾性測定により構造転移におよぼす温度の影響を解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学 生物物理・化学物理

キーワード：ソフトマターの物理, 両親媒性分子

1. 研究開始当初の背景

両親媒性分子は親水基と疎水基からなる分子で、その多くは水などの溶液中で自己集合しミセルや相分離構造を形成することから注目を集めている。両親媒性分子のうち、親水基がペプチドで構成されるものを特にペプチド両親媒性分子(PA)という。PAは生体適合性を有し、細胞培養や再生医療などの生物医学分野への応用が期待されている。

本研究グループではプリオン病などの原因と考えられているペプチドのコンフォメーション転移を解析するため、比較的短いペプチド鎖を有する PA (C16-W3K) に着目し

研究を進めてきた。この PA が水溶液に溶解した直後は、ペプチド鎖のコンフォメーションではらせん状の α -helix 構造をとり、10~100 nm オーダーのメソスケールでは複数の PA 分子が自己集合し球状ミセルを形成する。しかし、これらの構造は時間経過により変化し、ペプチド鎖のコンフォメーションは α -helix 構造から β -sheet 構造へ、自己集合構造は球状ミセルからひも状ミセルへと転移することが確認された。このとき、ひも状ミセルは互いに絡まりあい架橋点を形成するため、溶液の性質が液体状のゾルから粘弾性特性を示すゲルへと転移した。また、これらの転移は

不可逆であることも確認された。

さらに、これらの転移には常温では約 10 日間要するのに対し、50°Cでは約 100 分で完了することが最近の研究成果より明らかになった。一般的な両親媒性分子水溶液は温度が低いほどひも状ミセルを形成する傾向があるため、このような PA 水溶液の温度依存性は一般的な両親媒性分子水溶液とは大きく異なっている。しかし、なぜこのような温度依存性を示すのかは十分に理解されていない。これらの未解明な点を解析するには分子レベルでの挙動を追跡する必要がある。

実験を行うことが困難な現象については、コンピュータによるシミュレーションを用いて研究が進めた。特に現代におけるコンピュータの劇的な高性能化は、分子シミュレーションの分野においても急速な発展をもたらしている。分子シミュレーションの古典的な手法のひとつである分子動力学法は、生化学や生物物理における応用のために開発され、たんぱく質や脂質の構造予測など非平衡現象のシミュレーションに用いられている。また、熱力学的平衡状態にある現象をシミュレートする手法としてはモンテカルロ法などが挙げられる。しかし、これらの手法は計算にかかる時間コストの都合上、空間的または時間的に規模の大きな現象である自己集合挙動に適用することは現実的ではない。

メソスケールにおけるシミュレーション手法としては散逸粒子動力学法 (DPD 法) が 1992 年に Hoogerbrugge らによって開発され、それ以来 Groot や Warren らが Flory-Huggins の理論を取り込むなど、多くの研究者によって改良が加えられてきた。今日では理論研究の他にもポリマーブレンド、共重合ポリマー、両親媒性分子などの研究にも適用されている。特に両親媒性分子の自己集合挙動に関しては、Jury らによって非イオン性両親媒性分子の濃度-温度相図が得られている他、Arai らによってひも状ミセルの形成過程が再現されている。しかしながら、DPD 法を用いて両親媒性分子の自己集合挙動における温度の影響を解析した研究は未だに少なく、十分に理解されていないのが現状である。

2. 研究の目的

計算においては、特定の構造のペプチド両親媒性分子 (C16-W3K) において見られた階層構造転移の中でも自己集合構造に着目し、濃度と温度が自己集合構造およびダイナミクスに与える影響を、散逸粒子動力学法を用いて解明することを目的とした。

実験においては、PA のゾル-ゲル転移に着

目し、PA 溶液の希薄溶液において構造転移におよぼす温度と濃度の影響および構造転移のメカニズム、更にはゾル-ゲル転移前後での PA 溶液の機械物性を解析した。具体的には、温度と濃度をパラメータにとり、動的粘弾性測定によりゾル-ゲル転移およびゾル-ゲル転移前後での PA 溶液の機械物性をみた。さらに原子間力顕微鏡観察によりミセル構造転移を確認し、ゾル-ゲル転移の解析結果と各構造転移でのメカニズムを解析した。

3. 研究の方法

(1) 散逸粒子動力学法理論

本研究で用いた DPD 法は分子シミュレーションの一種であり、分子動力学法 (MD 法) と同様に分子の運動をニュートン方程式で規定し、多数の分子間で相互作用しながら運動していく様子を数学的に解くことで分子の挙動をシミュレートする手法である。MD 法は 1 つ 1 つの原子の挙動を追跡するのに対し、DPD 法では複数個の分子を一つの粒子とみなす、すなわち粗視化して計算を行うことで、計算に要する時間的コストを削減している。DPD 法においても各粒子の運動はニュートンの運動方程式で記述され、粒子に作用する力が 3 項よりなる点で分子動力学法と異なる。

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = m_i \frac{d\mathbf{v}_i}{dt} = \mathbf{f}_i = \sum_{j \neq i} (\mathbf{F}_{ij}^C + \mathbf{F}_{ij}^D + \mathbf{F}_{ij}^R)$$

ここで \mathbf{F}_{ij}^C は粒子間の相互作用による保存力であり、 \mathbf{F}_{ij}^D と \mathbf{F}_{ij}^R はそれぞれ散逸力とランダム力と呼ばれる力である。散逸力は他の粒子との運動量交換に起因し、粒子の運動量が緩和するよう作用する力で、ランダム力は粒子の熱運動を引き起こすものである。DPD 法では分子を粗視化する際これら 2 つの力の影響を運動方程式に組み込むことで、物理的な妥当性が得られている。

粒子間の相互作用による保存力 \mathbf{F}_{ij}^C は、次のように表される。

$$\mathbf{F}_{ij}^C = \begin{cases} a_{ij} \left(1 - \frac{r_{ij}}{r_c} \right) \mathbf{e}_{ij} & (r_{ij} \leq r_c) \\ 0 & (r_{ij} > r_c) \end{cases}$$

なお、 a_{ij} は斥力の大きさを表す係数であり、DPD 法において物質の物性を再現するための実質的なパラメータである。なお、 r_c はカットオフ距離、 \mathbf{e}_{ij} は \mathbf{r}_{ij} 方向の単位ベクトルである。Groot らの研究から、 a_{ij} は Flory-Huggins 理論と次式のように関連付けられている。

$$a_{ij} = a_{ii} + 3.27\chi_{ij}$$

$$a_{ii} = \frac{75k_B T}{\rho}$$

(2) 計算モデル

本研究では PA の分子構造を図 1 のようにモデル化した。

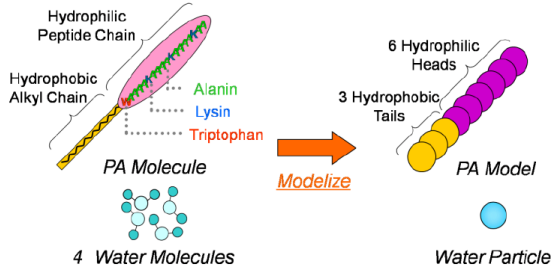


図 1 シミュレーションモデル

右側が粗視化した PA モデルで、6 個の親水性粒子と 3 つの疎水性粒子で構成されている。これは小角中性子散乱実験から PA の親水基と疎水基の長さの比が 2 対 1 であることがわかったため、それを再現したものである。また、溶媒の水粒子は水分子 4 つ分の粗視化がなされたものと想定している。

(3) 計算条件

一般的な両親媒性分子は高温になるにつれ分散する傾向にあるのに対し、本研究対象である PA においては逆に自己集合が促進される傾向にあることが、実験で明らかになっている。このような温度依存性は NIPAM などの感熱性ヒドロゲルにおいても確認されており、Zhou らによれば、これらの挙動には親水基と水との水素結合が大きく関与していると説明されている。DPD 法の理論上、温度の影響を考慮したパラメータとしては散逸力と a_{ij} が挙げられるが、散逸力では分子の熱運動のみを考慮するため、上記のような水素結合の影響を考慮できない。また、 a_{ij} と関連付けられている Flory-Huggins 理論は非極性の系に対する理論のため、従来の理論を適用しても PA のような極性分子の挙動を精度良く再現することは難しい。本研究では PA の自己集合挙動における温度依存性の支配的要因が親水基-水間の水素結合能の変化であるとし、親水基と水粒子との間に働く斥力を低温の場合には小さく、高温の場合には大きくすることで、実験における自己集合構造転移の温度依存性を再現できないかと考えた。具体的には、親水基-水間の斥力パラメータ a_{HW} を低温側で 10、高温側で 30 の間で変化させ自己集合構造を解析した。さらに、ひも状ミセルが形成されるまでに経過した時間も計測した。このとき、その他の粒子間に働く斥力パラメータおよび計算条件はそれぞれ表 1、表 2 の通りとした。

(H:親水基, T:疎水基, W:水)

	H	T	W
H	25	40	10~30
T		25	80
W			25

表 1 斥力パラメータ a_{ij}

濃度 (体積分率)	1 ~ 50%
粒子数	18,000
計算ステップ数	5,000,000
単位時間 Δt	0.05
境界条件	周期境界条件

表 2 計算条件

(4) PA の合成

用いた PA はペプチド固相合成法を応用することによって合成を行った。具体的には保護基によって保護されたペプチドの C 末端に、炭素数が 16 である飽和脂肪酸のパルミチン酸のカルボキシル基をアミド結合により結合させることで合成した。

(5) PA 溶液の作製

実験で用いた PA 溶液は、PA を Buffer (純水に塩化ナトリウム 10mM、リン酸二水素ナトリウム 1 mM を純水に溶かした溶液) に溶かしたものをを用いた。Buffer は生理食塩水に近いものであり、pH を調整する緩衝液に塩化ナトリウムを添加した溶液で、生体内を模擬した溶液として使用される。本研究で用いた Buffer は pH が 7.3 であった。

(6) 温度変化による動的粘弾性測定

温度を変化した際の PA 溶液の経時変化を動的粘弾性測定により貯蔵弾性率 (G')、損失弾性率 (G'') を測定することで、ゾル-ゲル転移および機械物性を解析した。測定治具は直径 50mm の円錐円盤型の治具を用い、治具間の距離を 0.05mm とした。濃度は $80\mu\text{M}$ 一定、保持温度は 25°C 、 37°C 、 50°C とした。以下に具体的な手順を示す。

- ① Buffer 溶媒に PA を濃度が $80\mu\text{M}$ となるように溶かし、 25°C 、 37°C および 50°C に保ったオープン中で保持した。
- ② ①で作製した試料をせん断周波数 = $0.1 \sim 100\text{rad/s}$ として G' 、 G'' を測定した (25°C で保持した試料は 1 日おき、 37°C で保持した溶液は 12 時間おき、 50°C で保持した試料は 30 分おきに測定した)。

(7) 濃度変化による動的粘弾性測定

濃度を変化した際の PA 溶液では、階層構造転移の転移速度が変化することが考えられる。そこで、球状ミセルを形成する希薄溶液において溶質濃度を変化させた際のゾル-ゲル転移を粘度測定により解析した。また、濃度の違いが PA 溶液の機械物性に与える影

響も解析した。以下に具体的な手順を示す。

- ① Buffer 溶媒に PA を 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 μM となるように溶かし、試料を作製した。
- ② ①で作製した試料をせん断速度 = 1 ~ 1000 1/s として溶液の粘度を測定した。
- ③ ②の測定終了後、同様の条件で再度試料を測定した。

(8) 原子間力顕微鏡によるミセル構造の観察

動的粘弾性測定や粘度測定により直接的に解析できないミセル構造転移を解析するため、原子間力顕微鏡を用いて溶液中のミセル構造の形状を観察した。用いた試料は動的粘弾性測定によりゲル状の性質を示した PA 分子溶液を用いた。以下に実験手順を示す。

- ① 1 cm 角の Si 基板に測定により粘弾性特性の変化した溶液を 20 μl 滴下した。
- ② Si 基板上的溶液を、Buffer 中に含まれる塩化ナトリウムの析出を防ぐため、エアダスタにより余分な液体を吹き飛ばした。

試料のついた Si 基板を原子間力顕微鏡上にセットし、原子間力顕微鏡のタッピングモードにて観察を行なった。

4. 研究成果

(1) 計算結果

一定時間シミュレーションを行った結果のスナップショットを図 2 に示す。図中では親水基を紫、疎水基を黄色の粒子で表示しており、水粒子は非表示としている。なお、下段は疎水基の集合部分にのみ注目して表示した。これより a_{HW} が比較的小さいときは球状ミセルが形成されるが、 a_{HW} が増加するにつれミセルの会合・融合が促進され、27 以上でひも状ミセルを形成することがわかった。ここで、 a_{HW} が大きいほどひも状ミセルが形成されやすいという関係は、過去の実験で観察された自己集合構造転移の温度依存性と定性的に一致するため、本研究において a_{HW} を温度のパラメータとみなすことは妥当であることが示された。

図 3 に濃度—温度相図を示す。これより、それぞれの濃度において a_{HW} が低いと球状ミセルが、高いとひも状ミセルが形成され、濃度が上昇するにつれより低い a_{HW} でもひも状ミセルが形成されることがわかった。

また、ひも状ミセルが形成されるまでに要した時間は a_{HW} が上昇するにつれ 100 分の 1 程度に短縮されることがわかった(図 4)。本研究に先立って行った実験でも、球状ミセルからひも状ミセルに転移するまでに常温では

約 10 日要したのに対し 50°C では約 100 分で転移が完了したことから、今回のシミュレーションから得られた傾向は過去の実験で確認された温度依存性と定性的に一致し、本研究で用いたモデルが PA の特性を再現できたことが示された。 a_{HW} は水—親水基間の親和性を示すパラメータなので、PA の自己集合における温度依存性の本質はペプチド部の親水性の変化によるものであることが示唆された。すなわち、低温ではペプチド部が周囲に水分子を引き寄せ、水和層を形成することで球状ミセルのまま安定して存在し、高温では分子の熱運動が大きくなることで水素結合能が失われ、ペプチド部同士が相対的に引き寄せあうようになるため球状ミセルが会合・融合し、ひも状ミセルを形成するものと考えられる。

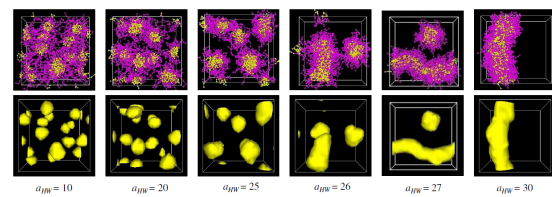


図 2 各 a_{HW} における自己集合構造

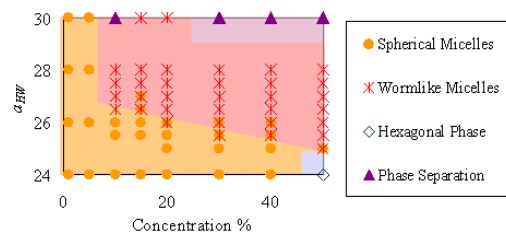


図 3 濃度—温度相図

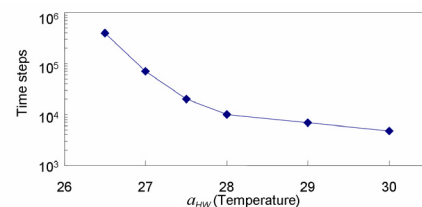


図 4 ひも状ミセル形成までの時間

(2) 温度変化による PA 溶液の粘弾性挙動変化

図 5 は保持温度が 25, 37, 50°C における $\tan\delta$ と保持時間の関係を表す。 $\tan\delta$ は G' と G'' の比を表し、 $\tan\delta$ が 1 以上ではゾル状であり、1 以下ではゲル状とみなせる。本研究では $\tan\delta$ が 1 以下となる時間からゾル—ゲル転移点を特定した。図 5a) より 9 日まで $\tan\delta > 1$ でありゾル状の性質を示すが、9 日から 10 日にかけて $\tan\delta$ は急激に変化しており、10 日以降は $\tan\delta < 1$ となりゲル状の性質を示した。これより保持温度 25°C では PA 溶液は約 10 日でゾル—ゲル転移することがわかった。同様に図 5b) より保持温度 37°C では 60 時間まで

$\tan\delta > 1$ であるのに対し、72 時間以降は $\tan\delta < 1$ となることから、25°C よりも早くゾル-ゲル転移を起こし、PA 溶液は約 70 時間で転移することがわかった。さらに図 5c) より保持温度 50°C では 90 分まで $\tan\delta > 1$ であるのに対し、120 分以降は $\tan\delta < 1$ となることから、PA 溶液は約 100 分で転移することがわかった。以上の結果から PA 溶液のゾル-ゲル転移は温度増加に伴い、短時間で生じることが明らかとなった。

(3) 濃度変化による PA 溶液の粘弾性挙動変化

図 6a) は濃度とゾル-ゲル転移点のせん断速度の関係を表している。図 6a) より 40~120 μM までは濃度の増加に伴い、ゾル-ゲル転移点のせん断速度は右肩下がりに減少するが、その後 120 μM 以降の濃度ではゾル-ゲル転移点のせん断速度は一定値となることがわかった。また濃度と粘度の関係を表した図 6b) より、濃度の増加に伴い、粘度は上昇していることがわかった。ここでミセル構造における両親媒性分子の会合数は濃度によって変化しないことが知られている。よって濃度の増加に伴い、形成されるひも状ミセル構造の数は増加する。溶液中のひも状ミセル構造の増加により、溶液中でひも状ミセル構造の絡まりの数が増加し、抵抗が増す。このような要因によって粘度が増加したと考えられる。以上の結果からペプチド両親媒性分子溶液の機械物性におよぼす濃度の影響が明らかとなった。

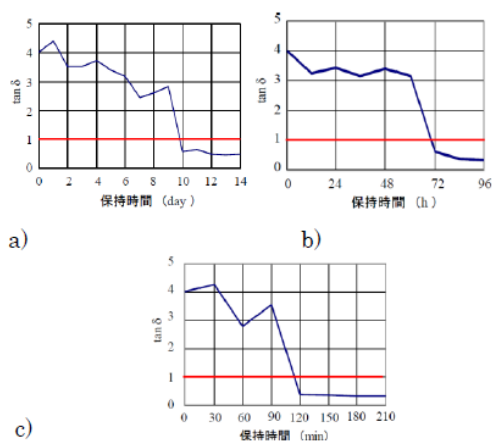


図 5 各温度における $\tan\delta$ と保持時間の関係
a) 25°C b) 37°C c) 50°C

(4) 原子間力顕微鏡によるひも状ミセル構造の観察

PA ペプチド両親媒性溶液においてゾル-ゲル転移を起こしたときに、溶液中の PA ミセル構造がどのように変化するかを原子間力顕微鏡により観察した。転移後にゲル状の性質を示した試料を用いて観察した様子を図 7 に示す。図 7 からわかるようにゲル状の性質に

転移した溶液では PA ミセル構造がひも状ミセル構造として存在していることが確認された。観察結果からひも状ミセル構造の直径は約 20nm 程度であることがわかった。また中央に存在する糸まり状のものから、ひも状ミセル構造の一本一本が絡まっていることが観察された。これが PA 溶液における架橋点となることで、動的粘弾性測定の結果でゲル状の性質を示したと考えられる。また一般的な両親媒性分子ではミセル構造は溶液中でのみ形成される構造であり、溶媒が存在しない環境ではミセル構造は維持されない。しかし本実験において測定に用いた試料は Si 基板上にディップした後に溶媒を飛ばしていることから、溶媒はほとんど存在していない。このような環境下においてもひも状ミセル構造が観察されたことから、溶液の存在しない乾燥状態でも PA はひも状ミセル構造を維持できることが確認された。ここで球状ミセル構造ではペプチド鎖が分子内で水素結合 (α ヘリックス構造) しており、PA 同士の結合する力はお互いの分子間力のみである。これに対しひも状ミセル構造ではペプチド鎖が分子間で水素結合 (β シート構造) しているため、球状ミセル構造より強固な構造が形成される。この分子間水素結合のため、ひも状ミセル構造は乾燥環境下においても維持される強固な構造であることが明らかとなった。

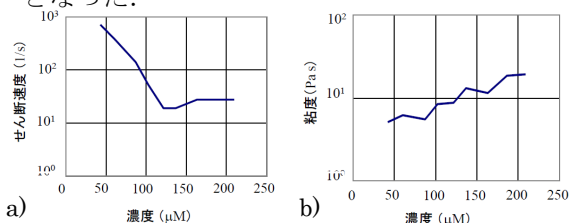


図 6 a) 濃度とせん断速度, b) 濃度と粘度

(5) 階層構造転移メカニズムの解析

今回の動的粘弾性測定および原子間力顕微鏡観察より、図 8 のような階層構造転移メカニズムを推察し、以下に詳細を記す。

- ① PA を溶解させると最初にペプチド鎖のコンフォメーションが α ヘリックス構造の球状ミセル構造が形成される。
- ② 球状ミセル構造の形成後、溶液内の球状ミセル構造は熱運動して互いに衝突する。
- ③ 球状ミセル構造の衝突に伴う運動エネルギーが転移エネルギーとなり、ペプチド鎖のコンフォメーションが α ヘリックス構造から β シート構造へと転移する。
- ④ コンフォメーション転移に伴い、PA の親水基断面積が減少する。
- ⑤ コンフォメーション転移とほぼ同時に球状ミセル構造同士が結合することにより、短いひも状ミセル構造の集合体が形成さ

れる。

- ⑥ β シート構造の形成が更に進むと同時に、短いひも状ミセル構造は延長されていく。
- ⑦ 系全体のひも状ミセル構造が結合することにより、ひも状ミセル構造の絡まりを架橋点とした3次元網目構造が形成され、PA溶液はゲル状の性質を示すようになる。

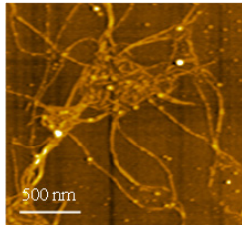


図7 ゼル-ゲル転移時のPAミセル構造

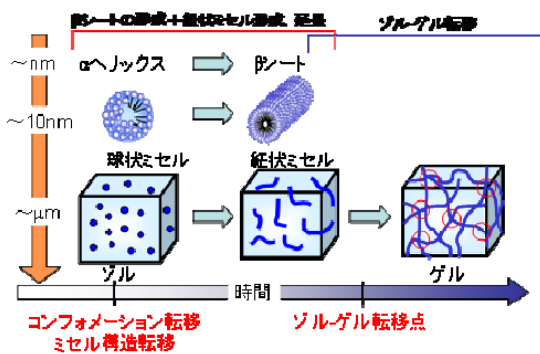


図8 PAの階層構造転移メカニズム

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

1. A. Hotta, Multi-Scale Transitions Observed in the Solution of a Newly Designed Peptide Amphiphile, Japan-America Frontiers of Engineering Symposium (JAFOE), 平成20年11月17日 (神戸)
2. 高田堅介, 島田智子, 堀田篤, 両親媒性ペプチド分子の溶液中での動的粘弾性測定によるミセル化の解析, 第57回高分子学会年次大会, 平成20年5月28日 (横浜)
3. 関大河, 荒井規允, 小沢拓, 泰岡顕治, 堀田篤, 自己集合する両親媒性分子の散逸粒子動力学法によるダイナミクスの研究, 第57回高分子学会年次大会, 平成20年5月28日 (横浜)
4. A. Hotta, T. Shimada, M. Tirrell, Structural transitions caused by mechanical shear observed in designed peptide- amphiphile solution, Malaysia-Japan International Symposium on Advanced Technology, 平成19年11月12日
5. 堀田篤, 第2回J-OCTAユーザー会議, 両親媒性分子溶液の粘弾性, 平成19年10月30日 (名古屋)

6. 松尾亜児, 荒井規允, 泰岡顕治, 小沢拓, 島田智子, 堀田篤, 散逸粒子動力学法による両親媒性分子の歪みによる球状-ひも状ミセル転移の解析, 第56回高分子学会年次大会, 平成19年5月29日 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀田 篤 (Hotta Atsushi)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 30407142

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし