

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620002

研究課題名(和文) 分子集合体を取り囲む水のレオロジーを計測する - 水が介在する生命現象の理解に向けて

研究課題名(英文) Measurement of rheology of water surrounding molecular assembly toward revealing the water-cooperated chemical phenomena in life

研究代表者

景山 義之 (KAGEYAMA, YOSHIYUKI)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90447326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の主成分は水であり、その細胞で生命現象は発現しています。細胞膜の周りやたんぱく質は、水で取り囲まれています。この水の性質は、一般的な水とは異なります。そのことが、生体機能発現に関係しており、この特徴的な水の性質を分析・検討していく手法の開拓とデータの蓄積が求められます。一方、水の中で、特異な水の性質のみを選択的に分析するのは困難です。その一手法として動的核分極核磁気共鳴が注目されています。本研究では、その装置の製作を行いました。また、有機合成化学の技術により、人工の分子集合体を取り囲む水の信号を選択的に計測しました。今後、理論との融合により、分子集合体の水の運動性が定量化されていきます。

研究成果の概要(英文)：As the main component of living cells is water, life phenomena are presented in water. Water surrounds cellular membranes, peptides, and other biomolecules. The surrounding water has different characteristics than general water, and the characteristics are related to the brilliant functions of biomolecules. Therefore, a development of a characteristic water analysis is required to reveal the biological phenomena. Selective analysis of specific water in bulk water is difficult. One potent method is the Overhauser dynamic nuclear polarization nuclear magnetic resonance (DNP-NMR). For our project, we equipped an instrument to measure the water molecules using DNP-NMR. We also used organic synthetic techniques to prepare artificial molecular assemblies, and measured the water surrounding the assemblies. In perspective, it is required to improve the accuracy of quantitative discussions for rheology of water by merging the theoretical approach with further measurements.

研究分野：物理有機化学

キーワード：水 分子集合体 核磁気共鳴 緩和測定 分子運動

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 学術的意義と背景

生命は、現在の化学的技術では実現できないような高度な機能を発現している。生命の中で進行する化学的現象の解析は、新たな高機能分子システムの設計指針を与えるほか、病症の惹起機構理解や薬理への展開にもつながりうる。生命現象は、水を媒体としており、分子集合体や巨大分子が反応を触媒している。この分子集合体や巨大分子に取り囲まれた水や、それを取り囲む水の性質は、バルクの水の性質とは大きく異なることが容易に予想される。しかし、その性質を実験的に調べていく手法は、十分に整っているとは言えない。

### (2) 技術背景

昨今、オーバーハウザー効果を利用したプロトン核の局所核磁気共鳴(NMR)分析が技術的に可能になり、2005年頃からは、水中での分子集合体を取り囲む水の流動性を半定量的に調べる研究が欧米で進み始めた。この測定法は、動的核分極核磁気共鳴(DNP-NMR)と呼ばれる。物理化学、特に磁気共鳴を専門とする研究者によるDNP-NMR研究の成果は、たんぱく質のフォールディングなど、水の振る舞いが強く関与する基礎的生命現象の理解につながるのではないかと、強い関心を集めている。

### (3) 技術原理と将来展望

DNP-NMRでは、磁場中でのマイクロ波照射などによって生じたラジカル分子の大きなスピン分極により、その分子と接する核スピンの分極を偏極させ、NMRのシグナル増強を起こさせる。核スピンの偏極が起こるのは、ラジカル分子近傍のみであることから、軽水中であっても、局所のプロトン核のNMRシグナルのみが選択的に増強され、検出される。すなわち、装置改良によるNMR増強技術の向上(物理学的研究)と、機能的なラジカル分子の有機合成(有機化学・超分子化学的研究)とにより、水中の分子集合体や高分子を取り囲む水の性質を深く調べることが可能になってくる。

## 2. 研究の目的

### (1) 研究の目的

本研究では、有機超分子科学の観点に立脚し、特徴的な構造を有する分子集合体を取り囲む水のNMR信号を、動的核分極NMRによって増強することにより計測し、その緩和時間測定から水分子の運動を調べることが目指した。そのために、下記二つの項目を実施した。

① 14 MHz帯 *in-situ* DNP-NMR装置の構築

② 人工分子集合体を取り囲む水のDNP-NMR計測

### 3. 研究の方法

(一部、研究計画調書提出後から採択決定前までの内容を含む)

(1) 14 MHz帯 *in-situ* DNP-NMR装置の構築

① 高強度マイクロ波照射部位

XバンドESR市販装置に、高出力アンプを備えたマイクロ波発振器を接続した。図1に装置全体図を示す。



図1 14 MHz帯 *in-situ* DNP-NMR装置全体図

② NMR検出部位

空冷式のサンプルホルダーとラジオ周波数コイルをハンドメイドで作製した。容積10  $\mu\text{L}$ 以下の微量試料の計測も可能とした。ラジカルを含む水系分散液を対象にした、*in-situ*計測が可能になった。

(2) 人工分子集合体を取り囲む水のDNP-NMR計測

① オレイン酸分子集合体を取り囲む水の選択的NMR計測

オレイン酸を弱アルカリ性の水に分散させると中空球状のベシクル型集合体が生じる。顕微鏡で観察すると、時間経過と共にベシクルの大きさが大きくなっていく挙動が観察されることから、この大きくなっていく挙動に伴う水の流動性変化を追跡することを当初は計画した。顕微鏡観察ではベシクルが大きくなっていくことが観察されるものの、動的散乱粒径分布計測の結果、実際には、時間経過と共にミセルの数が増大し、平均的な粒径は小さくなっていくことが判明した。

16-ドキシルスチアールラジカルを用いてオレイン酸分子集合体の周りの水の流動性を計測したところ、調製直後と一週間後でカップリング値\*は、0.05から0.10へと変化した。これは、粒径の大きなベシクル周りの水よりも、粒径の小さなミセル周りの水の方が高い流動性を持つことを示している。(\*カッ

プリング値：核スピンの緩和における、交差緩和定数と自己緩和定数の比として定義した値)

### ②リン脂質ベシクルを取り囲む水の選択的 NMR 計測

リン脂質も、水中で中空球状の脂質二分子膜 (ベシクル) を生じる。調製法の制御により、粒径  $0.4 \mu\text{m}$  と  $10 \mu\text{m}$  のベシクルを調製し、その周囲の水の DNP-NMR 計測を行った。なお、ラジカル分子は合成した直鎖状分子を用いた。結果、カップリング値は、それぞれ、 $0.03$ - $0.04$ 、 $0.06$  と求まった。一般的に、ミセルやたんぱく質などの分子集合体において、粒径の小さな集合体の方がカップリング定数は大きくなる・流動性は高くなる傾向にある。本実験で逆の傾向を示した理由として、内水相を有するベシクルでは、流動性の下がった水を内包することにあるのではないかと考えている。

### ③リン脂質ミエリン形 (マルチラメラチューブ) を取り囲む水の選択的 NMR 計測

より強く拘束された水を対象にした計測を、リン脂質でできたマルチラメラチューブ (ミエリン) を用いて実践した。マルチラメラチューブの層間には、水の層が存在する。結果、その常磁性緩和の強さから、水分子の流動性が著しく落ちていることは自明であった。得られた緩和測定実験結果から、流動性を議論するためには、水分子の回転運動の異方性を推定した上での、電子スピン-核スピン間相互作用についての数理モデルを打ち立てる必要がある。

なお、「人工分子集合体を取り囲む水の DNP-NMR 計測」の実測例として、図 2 に、マイクロ波照射下で増強された、リン脂質ミエリン形を取り囲む水・取り囲まれた水のシグナルを示す。

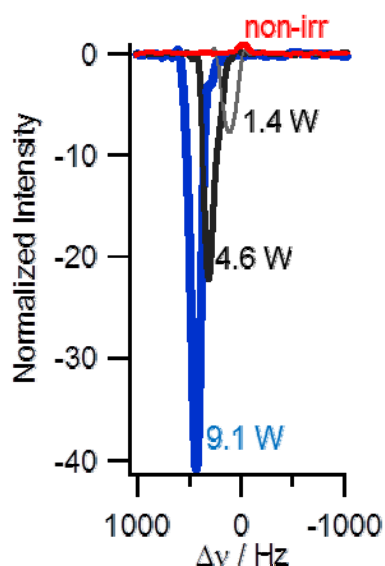


図 2 ラジカル包含リン脂質ミエリン形を取り囲む水・取り囲まれた水の NMR シグナ

ル (赤色) とマイクロ波照射によるシグナル増強 (灰色・黒色・青色)。灰色・黒色・青色の順に、照射したマイクロ波の強度が大きくなり、得られた NMR シグナル強度も強くなっていることが分かる。

## 4. 研究成果

分子集合体にラジカル部位を修飾ことによって、軽水中での分子集合体周りの水を選択的かつ *in-situ* で計測することができる動的核分極 NMR 装置を構築した。おそらく、国内初の装置であると思われる。また、人工の分子集合体を囲む水・集合体に囲まれる水の NMR 緩和時間測定にも成功した。今後、より機能的なラジカル分子を用いた計測、および、有機合成的に調製した特徴的人工分子集合体を対象にした計測を行っていくことで、分子集合体を取り囲む水の動的性質が明確化されていくことが期待される。

## 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)

[雑誌論文] (計 4 件)

[1] Yoshiyuki Kageyama, Tomonori Ikegami, Natsuko Hiramatsu, Sadamu Takeda, Tadashi Sugawara, "Structure and Growth Behavior of Centimeter-Sized Helical Oleate Assemblies Formed with Assistance of Medium-Length Carboxylic Acids" *Soft Matter*, 査読有、11 巻、2015、3550-3558 DOI: 10.1039/C5SM00370A

[2] Yasar Akdogan, Wei Wei, Kuo-Ying Huang, Yoshiyuki Kageyama, Eric W. Danner, Dusty R. Miller, Nadine R. Martinez Rodriguez, J. Herbert Waite, and Songi Han, "Intrinsic Surface-Drying Properties of Bio-adhesive Proteins" *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有、53 巻、2014、11253-11256. DOI: 10.1002/anie.201406858

[3] Yoshiyuki Kageyama, Naruho Tanigake, Yuta Kurokome, Sachiko Iwaki, Sadamu Takeda, Kentaro Suzuki, and Tadashi Sugawara, "Macroscopic Motion of Supramolecular Assemblies Actuated by Photoisomerization of Azobenzene Derivatives" *Chem. Commun.*, 査読有、49 巻、2013、9386-9388 DOI: 10.1039/C3CC43488E

[学会発表] (計 36 件)

①景山義之・近藤僚太・武田定  
「*in-situ* 14.3 MHz ODNP-NMR 分光計による分子集合体を取り囲む水の NMR 測定」  
第 95 日本化学会春季年会、2015 年 3 月 27 日-30 日、日本大学船橋キャンパス（千葉県・船橋市）

②近藤僚太・景山義之・武田定  
「X バンド ESR を用いた動的核分極 NMR 測定装置の作成と信号観測」  
化学系学協会北海道支部 2015 年冬季研究発表会、2015 年 1 月 27 日-28 日、北海道大学札幌キャンパス（北海道・札幌市）

③景山義之（依頼講演）  
「複雑系の中の化学-生命の仕組みを模倣した協同現象の化学への挑戦-」  
第 13 回北海道大学若手研究者交流会、2015 年 1 月 23 日、北海道大学札幌キャンパス（北海道・札幌市）

④景山義之・池上智則・梶優太・武田定  
「アゾベンゼン内包オレイン酸集合体の光応答型巨視的ダイナミクスの発現機構の検討」  
2014 年光化学討論会、2014 年 10 月 11 日-13 日、北海道大学札幌キャンパス（北海道・札幌市）

⑤Yoshiyuki Kageyama (Invited Lecture)  
“Macroscopic Motion of Soft Non-covalent Molecular Assembly in Water Actuated by Chemically synthesized Molecular Machine”  
第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日-27 日、札幌コンベンションセンター SORA（北海道・札幌市）

⑥景山義之・池上智則・梶優太・宮崎篤・武田定（依頼講演）  
「オレイン酸・アゾベンゼン誘導体混合自己集合体の酸解離挙動が協同した巨視的な光誘起ダイナミクス」  
第 36 回溶液化学シンポジウムプレシンポジウム、2013 年 10 月 8 日、北海道大学札幌キャンパス（北海道・札幌市）

⑦景山義之・梶優太・池上智則・谷掛成歩・武田定  
「酸解離現象が協同するオレイン酸自己集合体の巨視的な光誘起ダイナミクス」  
第 64 回コロイドおよび界面化学討論会、2013 年 9 月 18 日-20 日、名古屋工業大学御器所キャンパス（愛知県・名古屋市）

[その他]

①非研究者・非専門家向けの研究発表 5 回  
（北海道大学理学部 Science Globe など）

②本研究テーマについての情報公開

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~y.kageyama/public/research/MolWater.html>

③構造有機化学若手研究者 研究会および公開ミニシンポジウム 2013 主催

④構造有機化学若手研究者 研究会・ミニシンポジウム 2014 主催

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

景山 義之 (YOSHIYUKI KAGEYAMA)  
北海道大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：90447326

### (2) 研究協力者

武田 定 (SADAMU TAKEDA)  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：00155011