

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007~2008  
 課題番号： 19750100  
 研究課題名 (和文) 外場として温度勾配を与えられた高分子溶液における分子特性解析  
 研究課題名 (英文) Characterization of polymer solution under a temperature gradient condition as an external field for the solution  
 研究代表者  
 喜多 理王 (KITA RIO)  
 東海大学・理学部・准教授  
 研究者番号： 90322700

研究成果の概要： 高分子溶液に温度勾配を与えるとルードビッヒ・ソレー効果により濃度勾配が形成される。一般に重い成分である高分子が温度勾配の低温側に移動するが、生体高分子では高温側へ移動するという異常な振る舞いが見いだされた。しかしそのメカニズムは不明であり、ルードビッヒ・ソレー効果をはじめとする不可逆的な輸送現象は研究すべき事柄が数多く残されたままである。本研究は、外場として温度勾配を作用させた高分子溶液において輸送係数に影響を与える高分子の分子物性を詳細に調べた。これによりいくつかの重要な知見が得られたので以下に述べる。

#### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,800,000	150,000	1,950,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学・高分子化学

キーワード： 高分子物性 ルードビッヒ・ソレー効果 温度勾配 輸送現象 分子特性解析

#### 1. 研究開始当初の背景

高分子溶液のキャラクタリゼーションは、高分子科学の基礎を担う重要な研究活動であり、様々な手法やアプローチにより大きな成果を上げてきた。しかし、これまでの研究の多くは、系が熱力学的に平衡であるという前提がほとんどである。一方、非平衡状態では、物質の拡散や熱伝導などといった物質流やエネルギー流などの不可逆的な輸送現象を伴う。このような非平衡系における高分子溶液の物性研究は、考慮すべきパラメータが増えるために実験・理論ともに取り扱いが複雑になる。

日常生活において経験するほとんどの現象は不可逆な輸送を伴う非平衡現象であ

るので、非平衡系における分子物性研究が重要である。実際、非平衡状態の物性研究は散逸構造形成などの観点から近年盛んに行われている。ただし、系の成分分布が空間的に非一様であり時間的にも変化している現象を調べる事は、温度や濃度などの変数が一定な場合に比べ実験そのものが格段に難しく、実験結果の報告は少ない。また、生体は絶えず温度勾配や物質流、エネルギー流などにさらされていることを考えると、タンパク質などの生体高分子の構造や機能を調べる際には、非平衡熱力学に立脚した物性研究が必要であるが、このような観点からの研究は十分ではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、合成高分子および多糖類やタンパク質といった生体高分子のルードビッチ・ソレー効果 (図1) を、国内では唯一の装置である熱拡散型強制レイリー散乱法 (TDFRS 法、図2) を用いて測定を行う。これにより、外場として温度勾配を与えられた高分子の分子物性を解析する。具体的には、(1) 熱的平衡状態から離れた高分子溶液のマクロな濃度勾配形成の時間発展を調べ、(2) このような構造形成に影響をもたらす非平衡状態に特有な物質流を、分子レベルの相互作用を基に理解することと、そして(3) 非平衡状態における高分子溶液の分子論的な特性を明らかにすることで、(4) 上述(1)~(3)の研究を通じてTDFRS法が相互作用やエントロピーの寄与などの特性解析のための実験手法と成り得ることを立証し、高分子特性解析の新たな実験ツールとして提供することを目的としている。

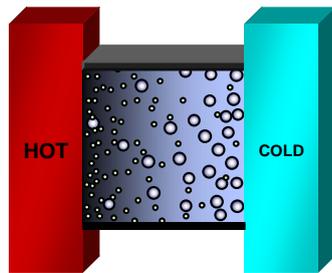


図1. ルードビッチ・ソレー効果の模式図。混合流体に温度勾配を与えると、濃度勾配が形成される様子を示している。

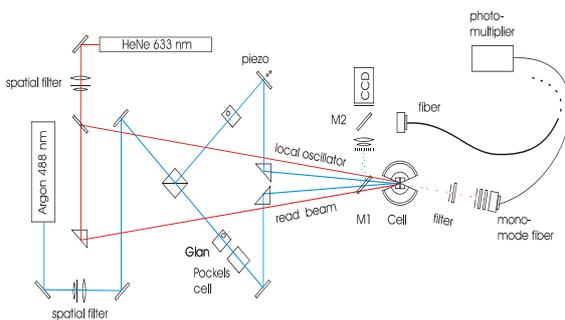


図2. 熱拡散型強制レイリー散乱法 (TDFRS 法) の概略図。Ar レーザーで溶液中に干渉縞を形成させ温度勾配を作ると同時に、温度勾配によって誘起される分子拡散と濃度勾配過程を He-Ne レーザーの回折光強度の時間発展として読み取る。

## 3. 研究の方法

研究対象とする系は、キャラクタリゼーションが良くなされているスタンダードな高分子を用いた。合成高分子としてはポリイソプロピルアクリルアミド (PNIPAM) とポリメタクリル酸メチル (PMMA) である。多糖類として選んだのはこれも平衡状態での分子物性が良く調べられているプルランを用いた。同様にタンパク質として牛血清アルブミンと鶏卵白リゾチームを用いた。

これらサンプルのルードビッチ・ソレー効果は、図2に示したTDFRS法を用いて測定した。また、非平衡状態の分子物性を解釈するためには、熱的平衡状態の物性を調べ理解しておくことが重要であるとの観点から、光散乱法や誘電分光法による溶液物性の研究を並行して行った。

## 4. 研究成果

### (1) 合成高分子のソレー効果と溶液物性

2成分からなる溶液に図1のような温度勾配与えた際に、成分1の流束 $J_1$ は濃度勾配 $\nabla w_1$ と温度勾配 $\nabla T$ のカップリングにより現象論的により次式で表される。

$$J_1 = -\rho D \nabla w_1 - \rho w_1 (1 - w_1) D_T \nabla T$$

ここで $w_1$ は成分1の重量分率、 $\rho$ は溶液密度、 $D$ は濃度勾配を駆動力とする成分1の並進の拡散係数、 $D_T$ は温度勾配により誘起される成分1の拡散係数である。安定な温度勾配の下で十分な時間が経過すると、見かけの流束はゼロ( $J_1=0$ )となるので、ソレー係数 $S_T$ は次式となる。

$$S_T \equiv \frac{D_T}{D} = -\frac{1}{w_1(1-w_1)} \frac{\nabla w_1}{\nabla T}$$

これよりソレー係数 $S_T$ は、温度勾配によって形成した濃度勾配の大きさと向きを表すパラメータである。ソレー係数の符号は、着目する成分 (高分子溶液の場合は高分子) が温度勾配の低温側に移動する向きを正と定義する 경우가多く本研究もこれにしたがう。

図3にポリイソプロピルアクリルアミド (PNIPAM) 溶液を様々な溶媒を用いて作成し、測定により得られたソレー係数 $S_T$ の温度依存性を示した。図3(a)の水溶液ではテータ温度 ( $\Theta$  温度) にてPNIPAMの $S_T$ がピークを示し、温度勾配下における分子の輸送現象が非摂動鎖状態では良溶媒中とは大きく異なるという結果を示した。つまり、濃度勾配の大きさはセグメントと溶媒分子との相互作用に依存して変化するのである。 $\Theta$  温度を含む温度依存性の測定は他に例がなく、このふるまいのさらなる解釈はこれからの系

統的な研究によってなされるべき興味深い現象である。図3 (b) のアルコール溶液での特徴は、アルコールの炭素数の増加および温度の上昇にしたがいPNIPAMのソレー係数が負になることである（ただしtert-ブタノールは除く）。負のソレー係数とは、高分子鎖が温度勾配の高温側へ移動することを意味する異常なふるまいである。この成果は、2成分からなる高分子溶液で温度変化により符号の反転が見いだされた最初の報告である。次に非プロトン性極性溶媒では、図3 (c) に示したようにソレー係数は正の値となり、ポリスチレンなどの合成高分子と同様の結果となった。また、重く大きい成分が温度勾配の低温側へ拡散するという経験則に則った結果である。このように $\Theta$ 溶媒と水素結合性極性溶媒および非水素結合性溶媒との比較から、水溶性高分子のロードビヒ・ソレー効果は溶媒分子とセグメント間の相互作用に強く依存し、また濃度勾配の方向が逆転することが見いだされた。

図4はポリメチルメタクリレート (PMMA) の3-オクタノン溶液における誘電分光法によって得られた複素誘電率の周波数依存性である。PMMAは分子量分布が狭いスタンダードサンプルが入手可能であり分子量依存性の研究に適している。また、室温付近に相分離温度を持つ貧溶媒があり、そ

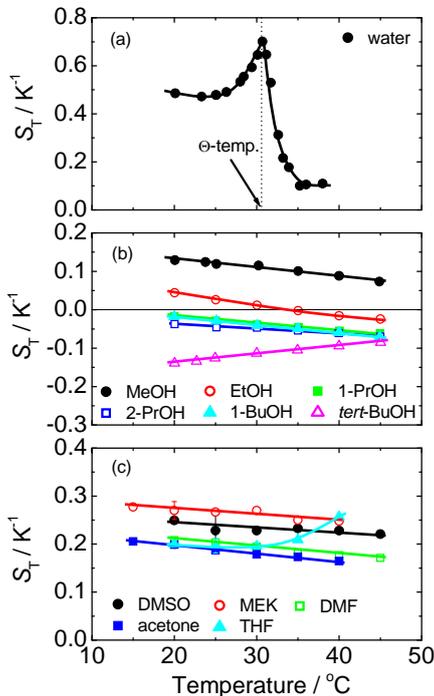


図3. PNIPAM溶液におけるソレー係数 $S_T$ の温度依存性。高分子濃度と溶媒は(a) 1 g/L水溶液、(b) 10 g/Lアルコール溶液、(c) は5 g/L非プロトン性極性溶媒。

の共存曲線測定から臨界点を決定することが可能である。実際、用いたPMMA (分子量  $M_w = 26.3$  kg/mol, 分子量分布指数  $M_w/M_n = 1.04$ ) の臨界点は、共存曲線と曇点測定から臨界濃度  $\phi_c = 0.1584$ , 臨界温度  $T_c = 289.51$  Kと得られた。さらに相関長や圧縮率の測定からこの系は3次元イジングモデルの臨界普遍性に属することが分かった。臨界濃度における複素誘電スペクトルの温度依存性の測定から、溶媒分子の運動および高分子のセグメント運動は臨界濃度ゆらぎとは独立に分子運動することが明らかとなった。今後、同条件にてソレー係数を測定する事で、臨界濃度ゆらぎが系のマクロな物性を支配する条件でのロードビヒ・ソレー効果を明らかにしていく予定であり、熱力学そして高分子溶液物性の研究分野に新たな知見をもたらすものと考えている。

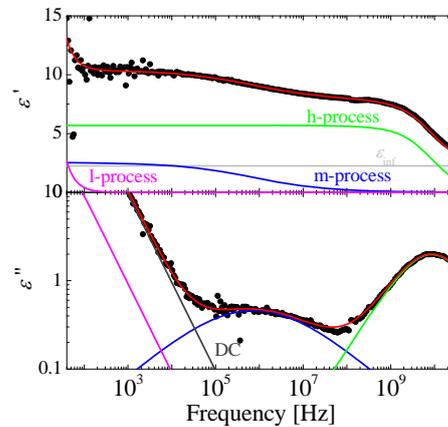


図4. PMMA / 3-オクタノンの複素誘電スペクトル。実線はフィッティングによって得られた緩和過程である。高周波側のh-プロセスは溶媒分子由来、それより約4桁低い周波数にピークを持つm-プロセスは高分子由来の緩和である。

## (2) 多糖類のソレー効果と溶液物性

図5にプルランのソレー係数の温度依存性を水溶液およびDMSO溶液で測定した結果を示す。水中では室温で負のソレー係数を示した。これはプルランが温度勾配の高温側へ移動するという異常なふるまいである。温度に対してソレー係数は正の傾きを示し、40°C付近で負から正へと符号が反転した。成分が高分子と水から成る2成分水溶液において符号の反転が観察されたのは、我々の多糖類のデキストランを用いた研究に続き2例目である【Sugaya et al, *Biomacromolecules* 7, 435-440 (2006)】。一方、非イオン性極性溶媒であるDMSOを使った時、ソレー係数は

正の値を持ち温度に対して平坦なふるまいを示した。室温におけるソレー係数の大きさを比べると、DMSO溶液の方が水溶液よりも約10倍大きな値となり、形成された濃度勾配の大きさが10倍大きいことがわかった。溶媒と温度によってソレー係数が桁違いに変わることが見いだされ、この結果はロードビヒ・ソレー効果を分離技術として応用するための重要な知見を与えている。水とDMSOの両者はプルランにとって良溶媒であり溶解度に大きな違いはない。したがって溶媒中での高分子鎖の広がりにも大きな違いは無いと考えられる。しかし、水とDMSOでソレー係数の値が大きく異なることは興味深い。水が高分子と溶媒和した状態で、いわゆる結合水が存在していると考え、溶媒和した高分子がバルクな溶媒に溶けている事を考慮したモデルが必要であり、高分子と溶媒分子の相互作用の理解がロードビヒ・ソレー効果の分子論的な解釈を深めるための重要な要因と考えられる。ここまでみてきたように、ロードビヒ・ソレー効果の符号や温度依存性の傾きを支配する因子は、分子のサイズや質量そして溶媒-セグメント間の相互作用など多岐にわたる。現在、溶液の熱膨張率に着目した解析をすすめており、様々な視点からの解析により統合的にこの複雑な現象を理解していく必要がある。

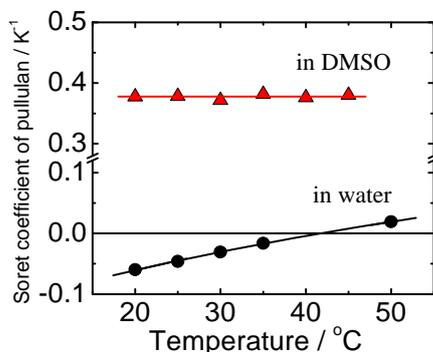


図5. プルランのソレー係数の温度依存性。水溶液ではソレー係数が正の傾きを持ち符号の反転を示したが、DMSO溶液では符号が正で温度依存性はなかった。

### (3) タンパク質のソレー効果と溶液物性

タンパク質のロードビヒ・ソレー効果はイタリアのグループからのリゾチームについての報告【Piazza et al, *Europhys. Lett.* **62**, 247-253 (2003)】があるが、それ以外のタンパク質については報告が為されていない。これは、温度勾配下でのタンパク質水溶液の拡散係数と濃度勾配を測定することの

技術的な困難さのためであろう。

本研究では、計画通りに熱的に平衡な状態におけるタンパク質の分子サイズや凝集能などの基本的な分子物性解析の研究に着手した。選んだタンパク質は、ウシ血清アルブミン(BSA)と鶏卵白リゾチーム(HEL)である。図6にBSA水溶液を用いたレーザー光散乱法によって得られた散乱光強度の時間相関関数を示した。室温で調製し25°Cで測定した*native*サンプルでは緩和時間がおよそ1ms程度の緩和時間が得られ、BSA希薄溶液で観察される重心移動の拡散係数と同じ緩和時間が得られた。このサンプルを80°Cで10分または60分熱処理することで変性させたサンプルを25°Cにて測定した時間相関関数は、10秒から100秒という非常に大きな緩和時間を示した。目視による観察では熱処理する事で透明なゲルを形成していることから、BSAは熱処理により変性し凝集能を獲得する事で3次元網目構造を形成したと言える。このときの時間相関関数のふるまいは、ゲルの網目構造に関する情報を含んでいる。よってゲル構造に関する粘弾性体理論との比較を行い、網目構造を特徴付けるフラクタル解析から熱変性BSAゲルの3次元網目構造の特徴づけがなされた。今後、BSAの高次構造や凝集構造などの階層性に着目したソレー係数の測定から、タンパク質のロードビヒ・ソレー効果を調べていく予定であり、現在進行中である。

図7は鶏卵白リゾチームを水/エタノール混合溶媒に溶かしたときのリゾチームの変性および凝集過程を調べるために散乱光強度の経時変化を測定した結果である。リゾチーム水溶液はエタノールが入る事でアミロイド線維を形成することが知られており、散乱光強度の変化はアミロイド様凝集体形成

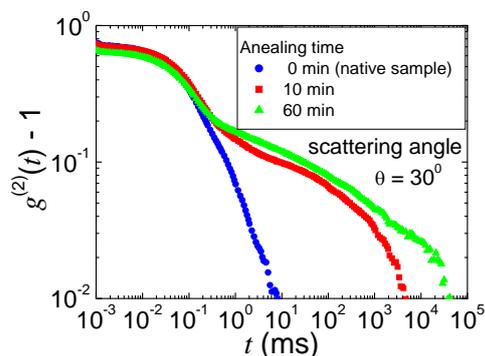


図6. ウシ血清アルブミン水溶液におけるレーザー散乱光強度の時間相関関数。熱変性前の*native*サンプルと80°Cで10分および60分間熱変性させたサンプルについて示した。

のメカニズムを知る手がかりを与えている。ここで、アミロイド繊維とはアルツハイマー病などのアミロイド病の原因と関係があると言われていることから、アミロイド繊維形成過程のメカニズムを調べることは重要である。図7に示したように最も特徴的な結果としてアミロイド形成過程が大きく3つの領域に分けられたことが挙げられる。領域Iはすべての濃度のサンプルにおいて1時間程度で散乱光強度が減少した。CD測定などからリゾチームのアルコール変性によりベータシート構造を多く獲得した領域であった。領域IIでは、散乱光強度がゆっくりと増加しその範囲は低濃度ほど広がった。散乱光強度の角度依存性の詳細な解析から棒状凝集体が軸方向に成長している過程であり、最終的にはサブミクロン程度の長さを持つ棒状凝集体(アミロイド線維)が形成された。領域IIIではマクロにゲル化が起り、高濃度のサンプル(15 g/L)では領域IIを持たずにゲル化した。このようにタンパク質の変性とアミロイド線維形成そして3次元網目構造(ゲル)を形成するといった段階的な構造形成のメカニズムが明らかになりつつある。引き続きアミロイド繊維形成のメカニズムを調べる事で、アミロイド病との関連を明らかにしていく予定である。また、温度勾配を与えた条件でのアミロイド繊維形成過程を調べることで、温度勾配がタンパク質の変性と凝集現象に与える影響を明らかにしていく予定である。

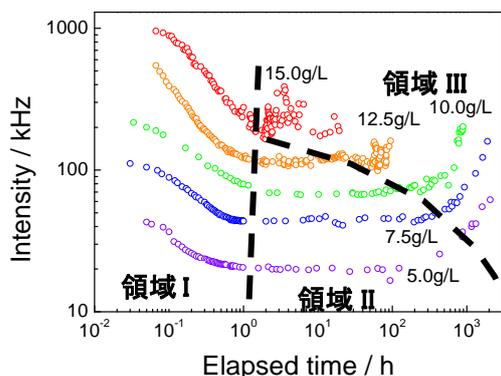


図7. 鶏卵白リゾチーム水溶液にエタノールを添加した際のレーザー散乱光強度の経時変化。

## 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9件)

- ① 八木原晋, 新屋敷直木, 喜多理王: 高分子中で水はどのように振る舞うか?, *高分子* 58, 65-69 (2009). 依頼総説
- ② Y. Kishikawa, R. Kita, H. Krieger, and S. Wiegand: Ludwig-Soret Effect for Aqueous and Non-aqueous Solutions of Polysaccharide, *Thermal Nonequilibrium, Key Technologies* 3, 97-102 (2008). 査読有り
- ③ R. Kita, P. Polyakov, and S. Wiegand: Ludwig-Soret Effect of Poly(N-isopropylacrylamide): Temperature Dependence Study in Monohydric Alcohols, *Macromolecules* 40, 1638-1642 (2007). 査読有り
- ④ 八木原晋, 新屋敷直木, 喜多理王: さまざまな時空間領域におけるタンパク質と水のダイナミクス, *生物物理* 47, 302-308 (2007). 依頼総説
- ⑤ S. Wiegand, H. Ning, and R. Kita: Universal Concentration Dependence of the Soret Coefficient in Aqueous Systems, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* 32, 193-201 (2007). 査読有り

## 〔学会発表〕(計49件)

- ① 岸川友貴, 佐藤康弘, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 米山賢, S. Wiegand, 水溶性高分子におけるルードビッヒ・ソレー効果の温度依存性, 日本物理学会 第64回年次大会, 2009年3月 東京.
- ② 佐藤康弘, 岸川友貴, 中野慎也, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 米山賢, S. Wiegand, ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)溶液の屈折率測定とソレー効果測定, 第57回高分子討論会, 2008年9月 大阪.
- ③ 田村雅生, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 土橋敏明, PMMA/3-octanoneの共存曲線測定および臨界点近傍における誘電緩和測定, 第57回高分子討論会, 大阪, 2008年9月.
- ④ 中野慎也, 佐藤康弘, 須藤誠一, 米山賢, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 誘電分光法によるPNiPAM溶液の分子ダイナミクスと溶媒和解析, 第57回高分子討論会, 大阪, 2008年9月.
- ⑤ 鏡健太郎, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 光散乱法によるBSAの溶液物性に与えるDMSO添加の効果, 第57回高分子討論会, 大阪, 2008年9月.
- ⑥ 新貝興, 田村雅生, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 誘電分光法による多糖類水溶液の分子ダイナミクスの解析, 第57回高分子討論会, 大阪, 2008年9月.
- ⑦ 福澤慎吾, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 卵白リゾチーム-エタノール水溶液

におけるアミロイド様凝集体系成ダイナミクス, 第 57 回高分子討論会, 大阪, 2008 年 9 月.

- ⑧ Y. Kishikawa, R. Kita, H. Kriegs, S. Wiegand, **Ludwig-Soret effect of aqueous solutions of polysaccharides**, 8th International Meeting on Thermodiffusion (IMT8), June 2008, Bonn / Germany.
- ⑨ Y. Sato, R. Kita, M. Yoneyama, S. Wiegand, **Ludwig-Soret effect of poly(N-isopropylacrylamide) in organic solvents**, 8th International Meeting on Thermodiffusion (IMT8), June 2008, Bonn / Germany.
- ⑩ 岸川友貴, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, **糖水溶液におけるルードヴィッヒ・ソレー効果**, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月, 横浜.
- ⑪ 佐藤康弘, 岸川友貴, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, 米山賢, S. Wiegand, **PNiPAM 溶液の Ludwig-Soret 効果と光散乱法による分子特性解析**, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月, 横浜.

[その他]

ホームページ等

<http://pubweb.cc.u-tokai.ac.jp/rkita/Index.html>

<http://www.sp.u-tokai.ac.jp/%7Ergms/indj01.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

喜多 理王 (KITA RIO)  
東海大学・理学部・准教授  
研究者番号 : 90322700