

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288099

研究課題名(和文) 高分子の水和と構造転移のダイナミクスに関する基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental study on dynamics of hydration and structural transition of polymers in water

研究代表者

前田 寧 (Maeda, Yasushi)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60242484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の構造形成機構解明のためのモデル系として、温度応答性高分子の相転移挙動に対する水和、特に疎水性水和の効果について総合的に解析した。アルキル基を部分的に重水素置換した温度応答性高分子を用いて、(C-D)バンドが相転移温度で低波数シフトすることを示し、量子化学計算によりエステル基への水素結合とC-H...O水素結合がこのシフトに寄与することを明らかにした。また、温度-圧力相図の解析により熱力学パラメータを算出し、共重合組成や溶媒組成の効果を明らかにした。さらに、回折限界を超える空間分解能を有する探針増強ラマン分光システムを試作して、微小領域での高分子鎖の水和の解析のための足掛かりを築いた。

研究成果の概要(英文)：The effects of hydration, especially hydrophobic hydration, on the phase behaviors of temperature-responsive polymers as a model system for the mechanism of protein foldings have been investigated from both experimental and theoretical points of view. We showed that the (C-D) bands of the polymers possessing deuterated alkyl groups at specific site exhibit red shifts on the phase separation and that the changes in hydrogen bonding to the ester and the alkyl groups are important to the shifts. We revealed the effects of copolymer and solvent compositions on five thermodynamic parameters such as V and S by analyzing temperature-pressure phase diagrams of various polymers. Tip-enhanced Raman spectrometers exhibiting special resolution beyond diffraction limit have also been prepared from atomic force microscopes and Raman spectrometers to investigate hydration of polymer chains in nano spaces.

研究分野：高分子物理化学

キーワード：高分子構造・物性 高分子溶液 応答性高分子 分子分光 一分子計測

1. 研究開始当初の背景

タンパク質や核酸などの生体高分子は、生命活動の多くの場面でその構造に基づいた高度で多様な機能を発現しており、何故そのような構造をとるのかを物理・化学の法則で説明することはポストゲノム研究の重要な課題の一つになっている。そのためには、溶媒である水とそれらの高分子の間の相互作用、あるいは水和が高分子の構造に及ぼす効果を考えることが不可欠である。タンパク質の高次構造形成の駆動力として、水素結合や静電相互作用を挙げることができるが、疎水性相互作用あるいは疎水性水も重要な役割を果たしている。

タンパク質の構造形成の過程を解析するためのモデル系として、温度応答性高分子の示す多様な構造転移が注目を集めている。この系では、それぞれの高分子に固有な転移温度を境にした急激な水和状態の変化が引き金となって、高分子鎖のコンフォメーション変化が起こり、続いて集合状態とメゾスコピックな形態変化が起こる (図 1a)。温度という制御しやすく、理論的に扱い易いパラメータの変化を刺激として一次から高次の構造を変化させるため、この系は詳細な実験的・理論的解析を行うのに適している。しかし、高分子構造と転移温度の関係や転移温度に対する添加物の効果など、単純な事項ですら、理論的に説明できていないのが現状である。これはひとえに高分子の水和が十分に理解できていないことによる。この現象に対して疎水性水和が重要な役割を果たしていると考えられているが、その本質については議論の只中にある。Frank と Evans の提案 (1945 年) に基づき疎水部の周りには **iceberg structure** と呼ばれる構造化された水が存在すると考えられてきているが、最近、アルキル基が関与する水素結合、すなわち **C-H...O** によって表される水素結合の存在が議論され、それに基づいた水和モデルが提案されるようになり、疎水性水和の再検討が必要になってきた。O-H...O や N-H...O などの通常の水素結合において X-H 伸縮振動バンドが低波数側へのシフト (red shift) するのは逆に、C-H...O 水素結合では C-H 伸縮振動バンド($\nu(\text{C-H})$) が高波数側へシフト (blue shift) するのが特徴である。実際に、これまでに本申請者が解析したすべての高分子において水和に伴う $\nu(\text{C-H})$ の高波数シフトが観察されている。例えば、ポリビニルメチルエーテル(PVME)のメチル基の伸縮振動は相分離が起こる際の脱水和により 20 cm^{-1} におよぶ低波数シフト (水和すると高波数シフト) を示す。また、量子化学計算による水和モデルでは、エーテル酸素に水素結合が見られるのに加えて、その水に結合した第二の水分子が C-H 基と水素結合様の相互作用をして

いるのが認められる (図 1b)。これらの結果は新たな疎水性水和のパラダイムに基づいて、高分子水溶液の相転移現象を理論的に見直す必要があることを示している。

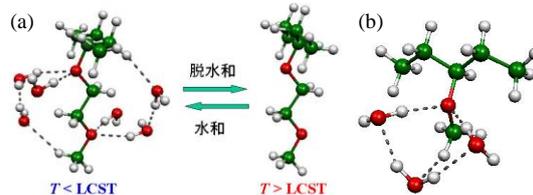


図 1 (a) 温度応答性高分子の相転移、(b) C-H...O 水素結合

2. 研究の目的

- (1) 高分子鎖の位置特異的な水和・脱水和過程の解明: 特定の原子を同位体で置換した高分子を用いた赤外分光測定により位置特異的に水和・脱水和のダイナミクスを解明する。
- (2) 脱水和と相転移・高次構造形成の相関の解明: 振動分光法と量子化学計算により高分子の水和状態、特に **C-H...O₂H** で表されるアルキル基と水との相互作用を解析し、その変化と相転移挙動との関係を明らかにする。
- (3) ナノ空間分解測定による高分子鎖の水和解析: 金や銀でコートした探針にレーザー光を照射することで励起される表面プラズモンのラマン散乱増強効果と近接場効果を利用することで、単一高分子鎖のラマンスペクトルの測定を可能にし、水和の解析に応用する。
- (4) 水和モデルと相転移理論の構築: 極性部と疎水部を持つ高分子の水和モデルを構築し、高分子水溶液の相転移現象を分子間相互作用に基づく理論により説明する。

3. 研究の方法

- (1) 同位体ラベル温度応答性高分子の水和の解析

疎水性水和の本質を明らかにするためには、個々の $\nu(\text{C-H})$ バンドの波数と強度を正確に測定する必要があるが、主鎖と側鎖に存在する異なる C-H 基のピークが重なりあうために個々に解析するのは容易ではない。そこで、重水素置換したポリマーを合成し、 $\nu(\text{C-H})$ バンド ($2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$) と $\nu(\text{C-D})$ バンド ($2100 - 2400 \text{ cm}^{-1}$) を分離して解析した (図 2)。

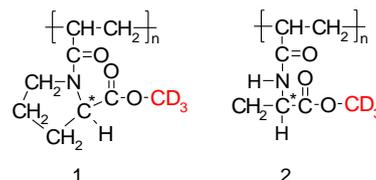


図 2 重水素ラベル温度応答性高分子の構造
1: poly(acryloyl-L-proline methyl-d₃ ester)
2: poly(acryloyl-L-alanine methyl-d₃ ester)

- (2) T-P 相図の測定と解析

温度応答性高分子の相転移間のギブズエネルギー変化 ΔG は温度 (T) と圧力 (p) の関数 ($d\Delta G = -\Delta SdT + \Delta Vdp$) である。高压セル (図 3) を用いて曇点を測定して T - P 相図を作成し、Hawley の楕円型相図モデルに基づいて解析を行って熱力学パラメータ ((体積変化 ΔV_0 , エントロピー変化 ΔS_0 , 圧縮率変化 $\Delta\alpha$, 膨張率変化 $\Delta\beta$, 定圧熱容量変化 ΔC_p) を求めた。

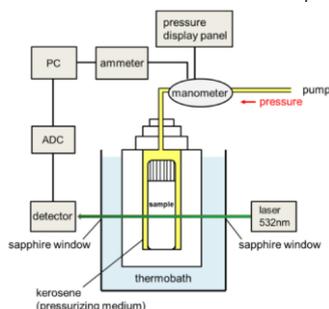


図 3 臨界圧力測定用の高压セル

(3) 赤外ストップフロー装置 (ST-IR) の試作と相転移ダイナミクスの解析

全反射吸収 (ATR) 測定装置とストップフロー装置を組み合わせることで中赤外領域の測定が可能となるセルを試作した (図 4)。温度応答性高分子の水溶液と溶液 B をストップフロー装置で急速に混合して、溶媒組成をジャンプさせることで相転移を誘起し、赤外スペクトルの時間分解測定を行った。

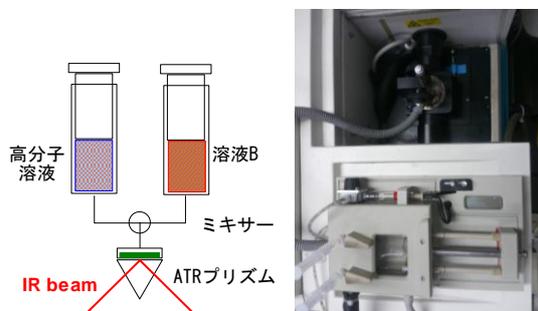


図 4 探針増強ラマン分光法の原理と試作した装置

(4) 探針増強ラマン分光光度計 (AFM-Raman) の試作

微小領域の高分子の水和の解析を行うために原子間力顕微鏡 (AFM) とラマン分光光度計を組み合わせた装置を試作した。AFM の探針の先端に蒸着した金または銀の近傍に誘起される表面プラズモンにラマン散乱の増強効果と近接場効果を発現させる。表面プラズモンの伝播範囲は数 nm 程度であり、ラマン散乱光の強度は 100 万倍程度にまで増強されるため、レーザ光が広い範囲にあたっていても、観察されるラマン散乱光の大部分は探針先端のごく狭い範囲から放出されたものであるため、回折限界を超える空間分解能を実現できる (図 5)。

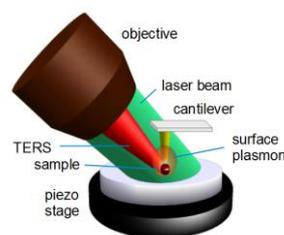


図 5 探針増強ラマン分光法の原理と試作した装置

4. 研究成果

(1) 同位体ラベル温度応答性高分子の水和の解析

プロリンおよびアラニンの重水素化メチルエステルから温度応答性高分子である poly(acryloyl-*L*-proline methyl- d_3 ester, PProMd₃) と poly(acryloyl-*L*-alanine methyl- d_3 ester, PAlaMd₃) を誘導し、 H_2O または D_2O 中で温度を変化させながら赤外およびラマンスペクトルを測定した。2050~2200 cm^{-1} に対称 $\nu(C-D)$ バンドが 1 本と逆対称 $\nu(C-D)$ バンドが 2 本観察され、相転移温度でそれぞれ低波数シフトすることが確認された (図 6)。さらに、密度汎関数理論 (DFT) を用いる振動解析により、エステル基への水素結合と C-H...O 水素結合のこの低波数シフトへの寄与を検証した。

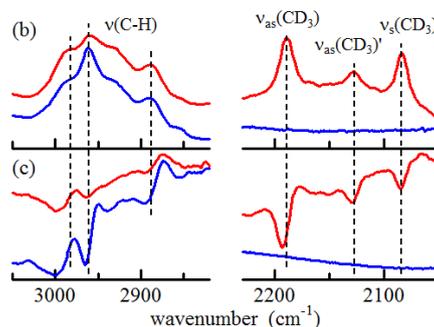


図 6 重水素ラベル (赤) および非ラベル (青) poly(acryloyl-*L*-proline methyl ester) の (a) D_2O 中の赤外スペクトルと (b) 転移誘起差スペクトル

(2) T - P 相図の測定と解析

共重合組成や溶媒組成が相転移現象に及ぼす効果を理解するために、ポリ(*N*-置換アクリルアミド)、ポリ(*N,N*-二置換アクリルアミド)、およびそれらの共重合体の温度および圧力応答性を水/有機溶媒混合溶媒中で系統的に解析した。組成比が 1:1 のときに転移温度 (T_p) が最低になることが知られている *N*-isopropylacrylamide (NiPAm) と *N,N*-diethylacrylamide (dEA) の共重合体 (P(NiPAm-dEA)) を解析して、 ΔV と ΔS の絶対値がこの組成で最小になることを明らかにした (図 7)。また、アルコール/水混合溶媒中で測定した T - P 相図はアルコールの疎水性が増すにしたがって、楕円の径が増し、高压側

にシフトした。 ΔV に対して混合溶媒中のアルキル基の分率が重要であることが明らかになった。

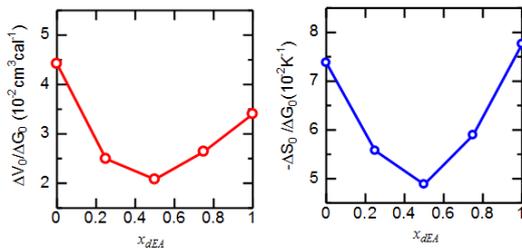


図7 P(NiPAm-dEA)の $\Delta V_0/\Delta G_0$ と $\Delta S_0/\Delta G_0$ のdEA含量依存性

(3) 赤外ストップフロー装置 (ST-IR) の試作と相転移ダイナミクス解析

PNiPAmマイクロゲル分散液にNaCl水溶液やアルコール水溶液を混合して相転移を誘起して、 $\nu(\text{C-H})$ 、アミド、エステル、エーテルバンドの変化を解析した。

(4) 探針増強ラマン分光光度計 (AFM-Raman) の試作

正立型と倒立型、2台の装置を試作した。正立型 AFM-Raman 装置は島津製作所製の走査プローブ顕微鏡 (SPM-9700) をベースに、試料面に対して斜上方に対物レンズを置くサイドイルミネーションの光学配置とし、試料面に対する対物レンズの光軸の角度を変更できるようにした(図8,9)。励起光(532nmのNd-YAGレーザーまたは633nmのHe-Neレーザー)をダイクロイックミラーで反射させて長作動距離対物レンズを通して探針先端の試料に照射し、散乱光を同じ対物レンズで集光してダイクロイックミラーとロングパスフィルターを通してレーザ光を除去した後、光ファイバーを通して分光器に導入し、電子冷却型 CCD 検出器で検出する構成とした。

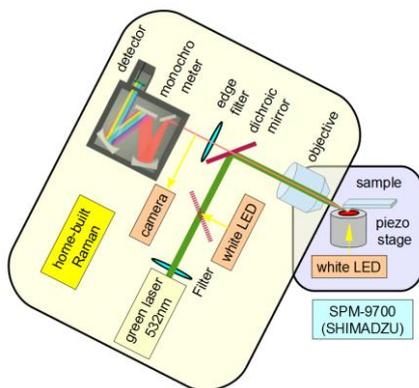


図8 正立型 AFM-Raman 装置の構成

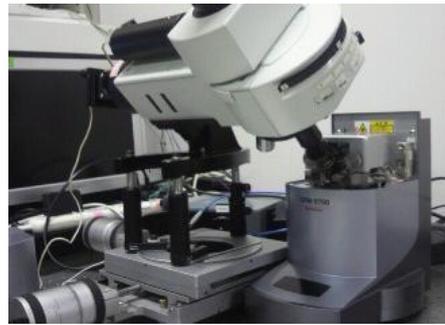


図9 正立型 AFM-Raman 装置の写真

倒立型 AFM-Raman 装置は Thorlabs 社製の AFM (TKAFM) をベースに、試料面の下方に対物レンズを置くボトムイルミネーションの光学配置とした(図10,11)。

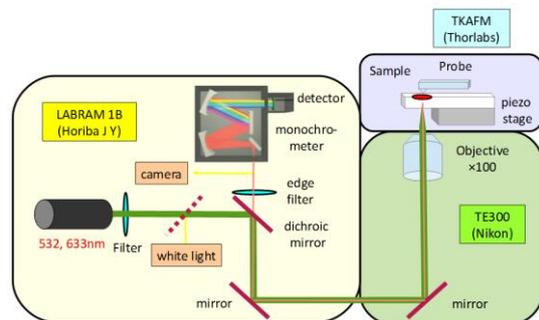


図10 倒立型 AFM-Raman 装置の構成

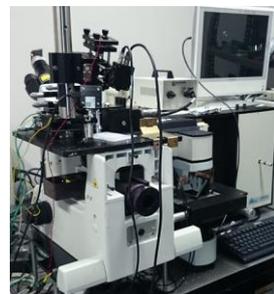


図11 倒立型 AFM-Raman 装置の写真

プローブ顕微鏡のピエゾステージで試料を走査しながら対物レンズでラマン光を集光することで、AFM 観察を行った同じ位置で、サブミクロンの空間分解能でのラマンスペクトルのマッピング測定を行うことが可能になった(図12)。さらに、倒立型 AFM-Raman 装置では電解研磨した銀探針を用いることで高分子薄膜の探針増強ラマンスペクトルを測定することができた(図13)。また、正立型 AFM-Raman 装置では、金または銀ナノプレート上の高分子試料に金または銀で修飾した探針を接近させ、そこにレーザー光を照射し、その間隙に励起される局在プラズモンの効果でラマン散乱を増強(ギャップ増強)させることで、スペクトルを測定することができた。

別途、試料を走査することなく短時間で C-H 伸縮バンドなどの特定のラマンバンドの

強度分布によるラマン散乱イメージを観測することができる装置をライカ社製の正立型顕微鏡をベースにしてバンドパスフィルターと冷却 CCD カメラを用いて試作した。

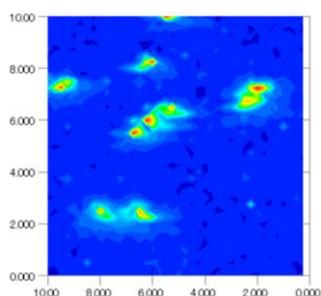


図 12 高分子微粒子のラマンマッピング測定(10×10 μm)

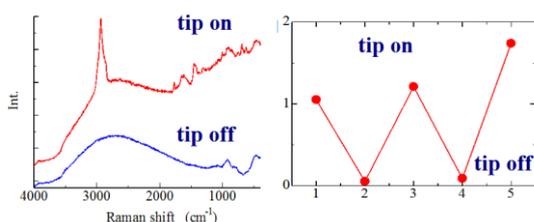


図 13 (a) ポリメタクリル酸薄膜の探針増強ラマンスペクトル、(b) 探針接触時と退避時の強度変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

① Direct Radical Polymerization of Vinyl Ethers: Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization of Hydroxy-Functional Vinyl Ethers, Shinji Sugihara, Yuki Kawamoto, Yasushi Maeda *Macromolecules*, **2016**, 49 (5), 1563-1574, 査読有

DOI: 10.1021/acs.macromol.6b00145

② In situ nano-objects via RAFT aqueous dispersion polymerization of 2-methoxyethyl acrylate using poly(ethylene oxide) macromolecular chain transfer agent as steric stabilizer, Sugihara, Shinji; Ma'Radzi, Akmal Hadi; Ida, Shota; Irie, Satoshi; Kikukawa, Takamaru; Maeda, Yasushi *Polymer*, **2015**, 76,17-24, 査読有

DOI:10.1016/j.polymer.2015.08.051

③ HCl-Et₂O-Catalyzed Metal-Free RAFT Cationic Polymerization: One-Pot Transformation from Metal-Free Living Cationic Polymerization to RAFT Radical Polymerization, Sugihara, Shinji; Konegawa, Naoto; Maeda, Yasushi *Macromolecules*, **2015**, 48 (15), 5120-5131, 査読有, DOI:10.1021/acs.macromol.5b01071

④ Synthesis of thermoresponsive block and graft copolymers via the combination of living cationic polymerization and RAFT polymerization using a vinyl ether-type RAFT agent, A. H. Ma'Radzi, S.

Sugihara, S. Miura, N. Konegawa, Y.Maeda, *Polymer*, **2014**, 55, 1920-1930, 査読有
DOI:10.1016/j.polymer.2014.02.053

⑤ Synthesis of polyvinyl alcohol stereoblock copolymer via the combination of living cationic polymerization and RAFT/MADIX polymerization using xanthate with vinyl ether moiety, A. H. Ma'Radzi, S. Sugihara, T. Toida, Y.Maeda, *Polymer*, **2014**, 55, 5332-5345, 査読有
DOI:10.1016/j.polymer.2014.08.037

⑥ Infrared Spectroscopic Study on LCST Behavior of Poly(*N,N*-bis(2-methoxyethyl)acrylamide), Hidaka, T.; Sugihara, S.; Maeda Y. *Eur. Polym. J.* **2013**, 49, 675-681, 査読有
DOI:10.1016/j.eurpolymj.2013.01.002

⑦ Thermo-chromic Microgels and Core-Shell Microgels Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer, Okada, K.; Maeda, Y. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 130, 201-205, 査読有
doi: 10.1002/app.39161

⑧ Infrared Spectroscopic Study on Hydration and Chiral Interaction of Temperature-Responsive Polymer with *L*-Proline Moieties, Hirano, T.; Sugihara, S.; Maeda, Y. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 163556-16362, 査読有

DOI: 10.1021/jp409631s

⑨ Effect of composition and stereoregularity on phase-transition behavior of aqueous *N*-ethylacrylamide/*N*-n-propylacrylamide copolymer solutions, Hirano, T.; Ono, A.; Yamamoto, H.; Mori, T.; Maeda, Y.; Oshimura, M.; Ute, K. *Polymer*, **2013**, 54, 5601-5608, 査読有, doi:10.1016/j.polymer.2013.08.006

⑩ Synthesis of dual thermoresponsive ABA triblock copolymers by both living cationic vinyl polymerization and RAFT polymerization using a dicarboxylic RAFT agent, Sugihara, S.; Iwata, K. Miura, S.; Akmal Hadi Ma'Radzi; Maeda Y. *Polymer*, **2013**, 54, 1043-1052, 査読有
DOI:10.1016/j.polymer.2012.12.039

[学会発表] (計 29 件)

① 顕微ラマン分光法による高分子微細構造の解析、前田 寧・松木 一真・藤村 和久・杉原 伸治、第 46 回高分子討論会、2015.9.17、東北大学 (宮城・仙台)

② *N*-置換アクリルアミド-*N,N*-二置換アクリルアミド共重合体溶液の温度・圧力応答性の解析、片川 成美・前田 寧・杉原 伸治、第 46 回高分子討論会、2015.9.17、東北大学 (宮城・仙台)

③ 水酸基含有ビニルエーテル類のRAFT重合、杉原 伸治・川本 裕紀・前田 寧、第46回高分子討論会、2015.9.16、東北大学 (宮城・仙台)

④ *N*-置換アクリルアミドと *N,N*-二置換アクリルアミド

リルアミドの各種共重合体の水溶液中での温度・圧力応答性、片川 成美・前田 寧・杉原 伸治、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

⑤ 金属探針による表面プラズモン効果を利用したラマン分析装置の開発、松木 一真・前田 寧・杉原 伸治・藤村 和久・矢田 直人、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

⑥ 原子間力顕微鏡と組み合わせた高空間分解能ラマン分光システムの開発、藤村 和久・松木 一真・矢田 直人・前田 寧・杉原 伸治、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

⑦ 重合誘起自己組織化による有機溶媒分散ナノ組織の合成、菊川 雄丸・杉原 伸治・前田 寧、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

⑧ 電気化学分光法によるレドックス高分子の構造解析、真鍋 遼、前田 寧、杉原 伸治、第 62 回高分子討論会、(2013.9.12)、金沢大学（石川・金沢）

⑨ 温度応答性マイクロゲルを分離媒体とするキャピラリー電気泳動、代継 昂大、前田 寧、杉原 伸治、第 62 回高分子討論会、(2013.9.12)、金沢大学（石川・金沢）

〔図書〕（計 1 件）

① Temperature-responsive polymers: Chemistry, Properties and Applications
Chapter 12: Infrared and Raman spectroscopy
Yasushi Maeda
John Wiley & Sons

〔その他〕

ホームページ：

<http://acbio2.acbio.u-fukui.ac.jp/koubun/maeda/indexJP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 寧 (Maeda Yasushi)

福井大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60242484

(2) 連携研究者

杉原 伸治 (Sugihara Shinji)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70377472