

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

分子集合性生体物質の分子会合・分解性の分光学的解析

神野 英毅 (応用分子化学科) 長谷川 健 (東工大院)

1. 緒言

温度によって水への溶解性を变化させる水溶性高分子は、上限臨界溶解温度(UCST)以上でのみ溶解性を示す UCST 型水溶性高分子と、下限臨界溶解温度(LCST)以下でのみ溶解性を示す LCST 型水溶性高分子に大別される。

LCST 型水溶性高分子は、ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)を代表として数多く報告されており、その水溶性機構は、高分子主鎖の脱水和に支配されて起こる転移現象であることが知られている。

一方、UCST 型水溶性高分子の報告例は、LCST 型に比べて極めて少なく、これまでその水溶性機構は理論的・実験的ともに解明されていない。UCST 型の水溶性機構を理論的に解明するために、UCST 型についても LCST 型と同様の水の挙動が転移現象を支配しているのではないかと考えると、LCST 型とは、全く逆の転移現象を説明できない。そこで、水溶液系における UCST と高分子の融点がほぼ一致すること²⁾を考へて、高分子の融解が引き金となって起こる転移現象ではないかと考へた。この場合、非水環境における UCST 型水溶性高分子自身の構造変化を解析することが重要と言へる。

本研究グループでは、UCST 型水溶性高分子である直鎖ポリエチレンイミン(LPED)の非水環境下での温度依存性を、官能基レベルの情報を高感度かつ情報量豊かに得ることができるフーリエ変換型赤外分光法を用いて研究し、直鎖ポリエチレンイミン薄膜が融解する際の分子のコンフォメーション変化を解析した²⁾。しかし、融解する際の結晶性の変化は

十分捉えることができなかった。そこで本研究では、結晶構造の相転移現象を議論するのに適した X 線回析(XRD)法を用いて解析した。

さらに、生体関連分子として広く会合現象とその毒性を示すものにプリオン病やアルツハイマー病などがあり、ここでは、アルツハイマーに関して取り上げる。

人間の脳内での β -アミロイドペプチド(A β)の凝集は、アルツハイマー病の原因のひとつであると考えられているが、A β の凝集沈着のメカニズムは解明されていない。そこで、A β の凝集沈着のメカニズムを詳細に検討するため、A β 中の主要なペプチドセグメントを含むモデル化合物を用いて単分子膜を作製し、分光学的手法やトポグラフィ解析を試みている。

これまで、A β 中の主要なペプチドセグメント(II GLM)と同じ構造をもつモデル化合物 C₁₈ II GLM-X(X=-NH₂ と -OH)を用いてそれぞれ純水表面上に作製した 2 種類の単分子膜の凝集構造を解析した。その結果、C₁₈ II GLM-NH₂ 単分子膜は、逆平行 β -シート構造を形成し、C₁₈ II GLM-OH 単分子膜は、平行 β -シート構造を形成している¹⁾ことがわかり、末端基が異なるだけで大きく構造が異なることが明らかになった。

一方、Leblanc らは、希薄な Congo Red 溶液を下層溶液として C₁₈ II GLM-OH 単分子膜を作製すると、II GLM 間での β -シート構造の形成が抑制されることをエピ蛍光画像解析から示したが、その分子論的な機構はわかっていない。

本研究では、C₁₈ II GLM-NH₂ 単分子膜の圧縮に伴う表面圧および表面双極子モーメントの変化の測定および Brewster 角顕微鏡(BAM)観察により、C₁₈ II GLM-NH₂ 凝集体の成長過程の検討をした。また、既にわかっている下層溶液を純水として作製し単分子膜の凝集体と比較を行った。

2. 実験方法

2-1. X 線回折法を用いた直鎖ポリエチレンイミン薄膜の転移挙動の解析

LPEI 水酸化ナトリウム水溶液(pH11.0, 1.00 wt%)を、5mm 角のアルミニウム板上に滴下して加熱乾燥した後、乾燥キャスト膜とした。このキャスト膜を空气中で1日保存した後、XRD パターンを昇温過程(昇温速度: 1°Cmin⁻¹、温度範囲: 24-80°C)で測定した。XRD パターン測定には、Rigaku 社製の熱流束型示差走査熱量測定装置を取り付けたビルドアップ型多機能 X 線回折装置 RINT-UltimaIIIを用いた。X 線の管球として CuKα(λ=1.54Å)、電圧 40kV、電流 20mA の条件下で、スキャンスピード 2θ=5° min⁻¹、サンプリング幅 0.02°、走査範囲 10-35° で測定を行った。

2-2. Brewster 角顕微鏡による繊維状のペプチド単分子膜の分子凝集過程の検討

本研究で用いた両親媒性分子 C₁₈ II GLM-NH₂ (分子量 779.17g mol⁻¹)は Leblanc グループにより提供された (図 1(a))、C₁₈ II GLM-NH₂ をクロロホルム-メタノール (体積比 5:1) 混合溶液 (0.375mg mL⁻¹) とし、1.00×10⁻⁷M の Congo Red(図 1(b))水溶液上(18°C)に展開して単分子膜を作製した。その後、BAM により、この単分子膜の凝集体の成長を観察すると同時に、表面圧(π)-表面積(A)および表面双極子モーメント(Δμ_⊥)-表面積曲線を測定した。

3. 結果と考察

3-1. X 線回折法を用いた直鎖ポリエチレンイミン薄膜の転移挙動の解析

常温における LPEI キャスト膜の XRD パターンには、2θ角 18.3、20.4、23.7、25.1、27.6 に 5 本

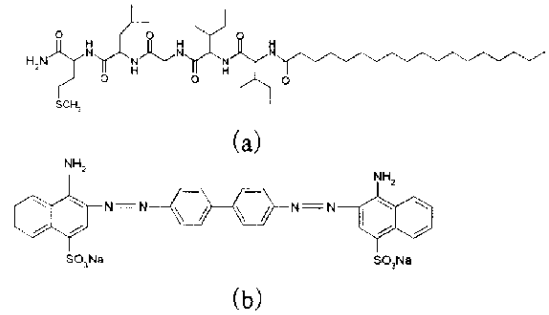


図 1. (a)C₁₈II GLM-NH₂ と(b)Congo Red の化学構造

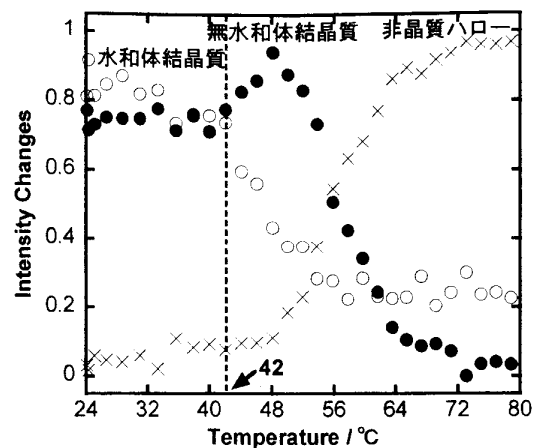


図 2. 昇温過程における LPEI 薄膜の XRD パターンの ALS 回帰分析

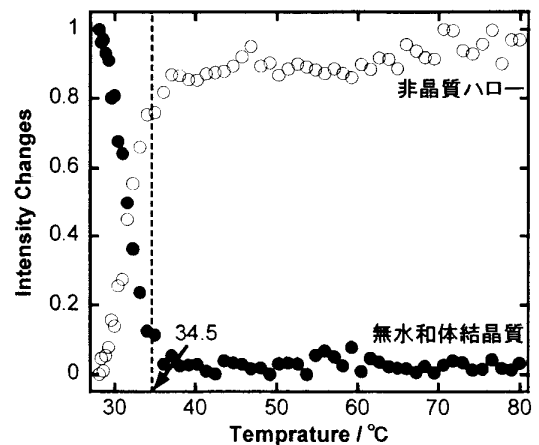


図 3. 降温過程における LPEI 薄膜の XRD パターンの ALS 回帰分析

の回析ピークが現われた。既報によると、LPEI には水和体と無水和体の2種類の結晶状態が存在することが知られている^{3,4}、このことから、5本のピークは、水和体と無水和体の結晶構造に由来すると考えられる。また、これらの5本のピークとともにハローも弱く現われ、2つの結晶相に加えて非結晶が存在していることを示唆した。続けて、キャスト膜の温度を上昇させると、50°付近で2θ角23.7, 25.1°の2本の回析ピークが完全に消失した。このことは、加熱によりキャスト膜が乾燥することを考えると、2θ角23.7, 25.1°の2本のピークは水和体結晶相に対応し、過熱によってLPEI鎖にわずかに水和していた水分子が脱離して、水和体結晶が消失したためと考えられる。したがって、残り3本の回析ピークは、無水和体結晶に対応すると考えられる。さらに続けて昇温すると、60°付近の残り3本のピークも消失し、これに伴ってハローのピーク強度が増大した。このことは、LPEIキャスト膜が60°付近で融解し、結晶質から非結晶に相転移が起こったことを反映している。このことは、LPEIの融点測定の結果⁵とよく一致している。

次に、非晶質から結晶質に戻る過程でのLPEI凝集体の構造変化も観測するために、降温過程での測定も行った。すると、35°付近でハローの強度が弱まり、2θ角18.3, 20.4, 27.6, の3本の回析ピークが再び現われた。この3本の回析ピークは、昇温過程で観測した無水和体結晶相のピークに対応し、35°付近でLPEIキャスト膜が乾燥状態で再結晶化したことを示唆する。

ここで、昇温過程と降温過程のXRDパターンから各温度における成分変化を追うために、あらかじめ主成分分析法の固有値解析により決定した成分数(昇温過程: 3成分、降温過程: 2成分)を用いてAlternating Least Squares(ALS)回帰分析を行った。すると、昇温過程におけるLPEI薄膜のXRDパタ

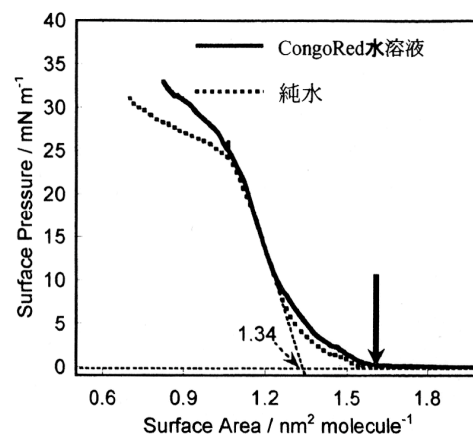


図4. Congo Red水溶液および純水上でのC₁₈IGLM-NH₂単分子膜のπ-A曲線

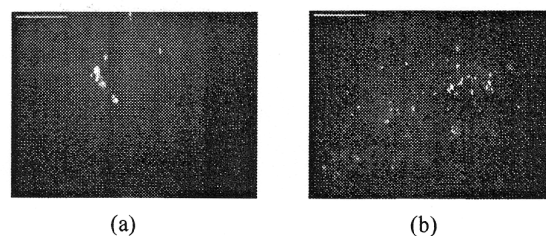


図5. 図4の矢印位置でのC₁₈IGLM-NH₂単分子膜のBAM画像(a)Congo Red水溶液および(b)純水上の結果

ALS回帰分析(図2)の結果から、水和体が42°付近から単調に減少し始め、その減少分が無水和体へ変化した様子をはっきりと捉えた。また、降温過程におけるLPEI薄膜のXRDパターンのALS回帰分析(図3)の結果から、非結晶-結晶質転移の開始温度34.5°Cが、降温過程における水溶液系の転移温度と一致した。

3.2. Brewster角顕微鏡による繊維状のペプチド単分子膜の分子凝集過程の検討

純水およびCongo Red水溶液(1.00×10⁻⁷M)上で測定したC₁₈IGLM-NH₂単分子膜のπ-A曲線を図4に示し、C₁₈IGLM-NH₂単分子膜を展開した直後(図4の矢印位置)でのBAMの観察結果を図5に示す。BAMの観察結果から、Congo Red水溶液上では分子自己凝集がほとんど見られないのに対し、純水上ではすでに自己凝集が進んでドメイン構造が

点正在している。これは、Leblanc らのエピ蛍光顕微鏡画像解析による予想と一致する。

一方、同時に測定した $\pi-A$ 曲線を見ると、圧縮に伴って表面積 $1.52\text{nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$ 付近でいずれも表面圧の上昇およびそれに続く短い表面圧緩和（プラトー）領域が現われており、BAM で大きな違いが見られたほどには $\pi-A$ 曲線には顕著な差が見られない。

表面圧が上昇を始める面積が、Congo Red 水溶液に較べて純水上で小さな値を示しているのは、ドメイン構造が単純なものではないことを意味している。すなわち、固い単分子膜ドメインが海一島構造を持つのであれば、膜に覆われていない水面領域が見かけの膜表面積を大きくし、結果として表面圧の上昇位置が大きくなるはずである。このことから、ドメインが単分子膜構造ではなく、すでに繊維化⁹などの3次元化を起こし、予想以上に大きな面積の減少を引き起こしていると考えられる。

続くプラトー領域では、BAM 観察結果によると、純水上で顕著にドメイン構造が増加するのに対し、Congo Red 水溶液上では多少のドメインが生ずるものの、純水上に較べると有意にその増加は抑制されていた。

ところで、表面双極子モーメントの変化 ($\Delta \mu_{\perp}$) は、大きな双極子モーメントを有する基の配向変化を反映する。表面双極子モーメントが大きく変化するとき、配向変化に伴って分子占有面積が減少するため、 $\Delta \mu_{\perp}-A$ 曲線と関連づけて議論することが可能である。Congo Red 水溶液上では、表面積 $1.6\sim 2.0\text{nm}^2\text{molecule}^{-1}$ 付近で $\Delta \mu_{\perp}$ は大きな増減を繰り返す不安定な動きを見せた（データ省略）。一方、純水上では、同じ表面積領域で $\Delta \mu_{\perp}$ は小さな変動を示した。不安定な変化は、点在するドメインが電位センサーを横切ることに対応すると考えれば理解できる。また、増幅の振幅が水面上のときに小さかった

のは、全体にドメインが大きく広がって、マクロに見れば均一に近いことを示す。

また、Congo Red 水溶液上と水面で、表面積 1.6 および $1.4\text{nm}^2\text{molecule}^{-1}$ 付近で $\Delta \mu_{\perp}$ の値が急激に増加した。 $\Delta \mu_{\perp}$ 増加の終了位置と $\pi-A$ 曲線のプラトー終了位置が、いずれの場合も一致したことから、プラトーは極性基の配向変化に対応する領域と考えられる。

4. 参考文献

- 1) H. G. Schild: *Prog. Polym. Sci.* **17** 163 (1992)
- 2) 岩永和之, 角田洋幸, 須田将史, 高橋大輔, 和泉剛, 長谷川健: 第 67 回分析化学討論会講演要旨集 p.111(2006)
- 3) Y. Chatani; T.Kobatake; T. Saegusa; H. Ikeda: *Macromolecules* **14** 315 (1981)
- 4) Y. Chatani; T. Kobatake; H. Tadokoro; R. Tanaka: *Macromolecules* **15** 170 (1982)
- 5) R. Tanaka; I. Ueoka; Y. Takaki; K. Kataoka; S. Saito: *Macromolecules* **16** 849 (1983)
- 6) T. Hasegawa, et al., *J. Phys. Chem. B*, **109**, 12856 (2005)