

論文の内容の要旨

論文題目 X線・可視光を用いた過飽和ナノスケール構造ダイナミクス観察
(Observations of Supersaturated Nano-scale Dynamical
Structures by X-rays and Visible-light)

氏名 松下 祐福

溶液の重要現象の一つとして、熱力学的に準安定な結晶化前駆状態である過飽和溶液が挙げられる。過飽和現象は、通常の溶解度よりも多くの溶質を含んだ溶液群であり、無機、有機、高分子、そしてタンパク質分子など様々な溶液で起こり、最終生成物のモルフォロジーや結晶性¹との深い関係や、生体内タンパク質の異常凝集機構²、さらには、潜熱蓄熱材料³などの産業応用と、過飽和研究は幅広い分野で多くの注目を集めている。

現在、過飽和溶液中に含まれる溶質の準安定構造の解明が目覚ましく、実験的なアプローチ^{4,5}や理論研究⁴において、無機材料⁶ (1-10 nm)やタンパク質分子⁷ (数十-数百 nm)の過飽和条件下でのネットワーク構造が確認されている。特に、これらネットワーク構造は、過飽和溶液からの核形成メカニズムに深く関与していると考えられ、ネットワーク構造の物性研究が過飽和研究において大きな課題となっている。ネットワーク構造の研究において、理論研究は、ナノ秒スケールのネットワークダイナミクス研究が盛んに行われ大きく先行している⁵。その一方で、実験的なアプローチ法では、ネットワーク構造のダイナミクスを高速で、かつ高精度に計測する手法が強く望まれていた。

本研究では、過飽和溶液に共存させた単一金ナノ結晶の回転動態を計測することで、マイクロ秒時間スケールで、ナノメートルレベルの溶液ダイナミクスを観察できる X線 1分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT)⁸ と、過飽和溶液中に共存させた単一金ナノ粒子のミリ秒領域におけるナノメートルレベルの並進動態を検出可能な暗視野顕微鏡 (Dark-Field Microscopy: DFM)⁹ を用いて、無機材料(酢酸ナトリウム)とタンパク質分子(リゾチーム) 過飽和水溶液のナノスケールダイナミクス観察を試みた。さらに、DXT と DFM より得られた結果に基づいた追加実験として、X線散乱法や円二色性偏光法(Circular Dichroism: CD)、DLS(Dynamic Light Scattering: DLS)による過飽和溶液中の分子内構造研究を行った。

本論文の構成は、まず、第一章で、本研究を行うための導入部分として、時分割 1分子計測とブラウン運動、さらには現在までの過飽和溶液研究についての先行研究紹介を行い、本研究の目的について述べている。第二章では、本研究で用いた各種計測手法の原理説明や周辺技術について紹介している。特に、過飽和溶液研究における物性評価としての実験例や、その検出原理について紹介している。第三章“DXTによる酢酸ナトリウム過飽和水溶液ダイナミクス観察”では DXT, X線散乱による酢酸ナトリウム過飽和溶液の実験結果を示し、その考察を行った。第四章“DXTによるリゾチーム過飽和水溶液ダイナミクス観察”では DXT, CD, DLSによるリゾチーム過飽和溶液の実験結果を示し、その考察について述べている。第五章“DFMを用いた過飽和溶液におけるダイナミクス観察”では酢酸ナトリウム、リゾチーム過飽和溶液 n DFMによる実験結果を示し、DXTによる結果との比較・定量を通して考察した。第六章では本研究のまとめとして、各種実験より得られた無機、タンパク質材料の局所ナノスケール構造モデルと、今後

の展望についてまとめている。ここでは本研究で行った三章から五章の各実験の概要と、本研究のまとめについて要約する。

DXT による酢酸ナトリウム過飽和水溶液ダイナミクス観察

DXT による無機材料系過飽和溶液中における金ナノ結晶の回転動態観察実験を行った。本結果より、300 μs スケールにおける酢酸ナトリウム過飽和溶液 (6.4 M) において、飽和溶液では見られない 1.60 fN (6.4 M) の極微小力場の存在が確認された。さらに、X 線散乱実験より、3.0 M 程度から小角領域 ($q^2: 0.001 - 0.004 \text{ nm}^{-2}$) における散乱強度の上昇や、広角領域 ($q^2: 0.004 - 0.154 \text{ nm}^{-2}$) において、水分子間由来の X 線散乱強度が減少する傾向が見えたことから、溶質分子密な領域としてネットワーク形成が示唆された。

このことから、本研究で観察した酢酸ナトリウム溶液では未飽和条件においても、そのネットワークは形成されているものの、過飽和領域においてのみ、その特徴的な局所力場が観察された。このことは、ネットワークの揺らぎの増加は過飽和条件においてのみ、活発になっていることが明らかとなった。これは、パッキングされたネットワークが時間変化に応じて、ナノメートルの空間スケールで密度揺らぎを生じているためであり、酢酸ナトリウム溶液の潜熱の保存メカニズムに帰属される重要な溶液現象であると考えられる³。

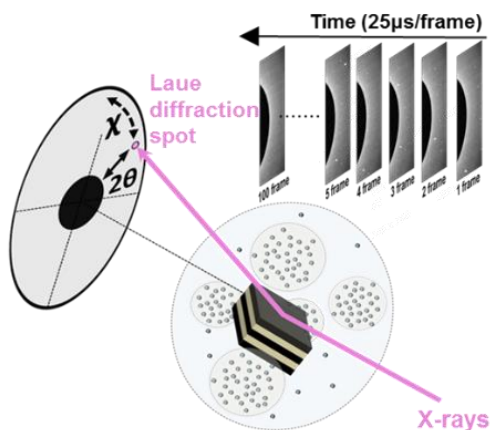


図 1 酢酸ナトリウム過飽和水溶液中に共存した金ナノ結晶(直径 100 nm)の DXT 測定

DXT によるリゾチーム過飽和水溶液ダイナミクス観察

DXT によるリゾチーム過飽和溶液 (10 – 30 mg/mL, 3-9 w/v NaCl 酢酸バッファー) の実験では、単一分散させた金ナノ結晶(分散型)と、リゾチームを介して金ナノ結晶を基板に固定した条件(固定型)での DXT 測定を用いた局所ダイナミクス測定を行った(図 2)。時間スケールはそれぞれ、1000 μs と 800 ミリ秒での時間スケールの観察を行った。本結果より、無機材料系同様に、それぞれ 0.11fN(分散型)と 0.11 aN (基板固定型)の局所的に存在する微小力場の存在が確認された。

さらに、CD 実験より、過飽和条件下でのリゾチーム分子は、芳香族アミノ酸が異方的な構造形成を生じさせることや、DLS 実験より核形成を伴う過飽和条件下におけるリゾチームの 2 量体や 3 量体に帰属される粒径分布と散乱強度の増大が確認された。このことは、先行研究で報告されているトリマー分子における TRP62 や TRP63 の分子間相互作用に帰属された結果と一致する¹⁰。

このことから、リゾチーム過飽和溶液において、時間変化に伴うリゾチーム分子間の局所的なネットワーク形成やクラスターの存在が、局所的な密度揺らぎを生成させ、DXT で観測される aN – fN 程度の微小な力場を生成していると考えられる。

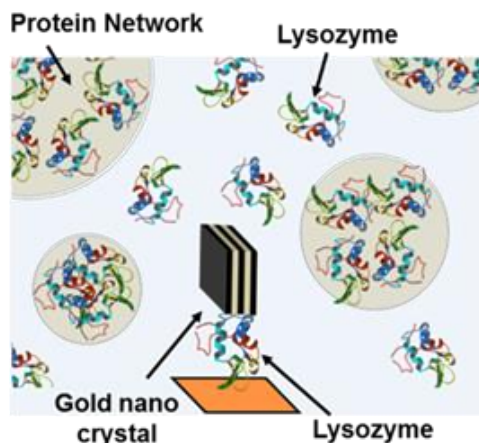


図 2 基板に固定され、リゾチーム過飽和溶液で満たされた金ナノ結晶(直径 100 nm)の DXT 測定。

DFM を用いた過飽和溶液におけるダイナミクス観察

DXT より得られた金ナノ結晶の回転由来の局所力場を並進由来の力場として観察するため、DFM による金コロイドの並進観察実験を行った。

本結果より、DFM でも過飽和条件下における無機材料、タンパク質材料溶液において、それぞれ 5.4 fN(7.4 M), 2.1 fN (20 mg/mL)の局所的な金コロイドの並進ダイナミクスに基づく力場生成が確認された。このことは DXT で得られた結果の考察同様、それぞれのサンプルにおいて、溶液中のネットワーク構造の局所的な密度揺らぎによる構造変化が確認されていると考えられる。

本研究のまとめ

本研究より、DXT と DFM を用いた無機、およびタンパク質過飽和溶液のナノスケール溶液ダイナミクス観察を行った。本実験結果より、2 種類の異なる材料系の過飽和溶液中において、非常に小さい局所力場 (fN · aN スケール) が存在することを示すことに成功した。この動的特性は、過飽和溶液中に含まれるネットワーク構造のゆらぎに基づく動的過程を反映した溶液特性であると考えられ、得られた局所力場は、過飽和溶液からの結晶化現象の理解やその制御研究、さらには過飽和溶液中に保存される潜熱メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。

さらに、我々は、X 線散乱による酢酸ナトリウム過飽和溶液中に含まれる構造体ネットワーク構造示唆や、CD 測定や DLS 測定を用いることで、リゾチーム過飽和溶液中のリゾチーム分子内構造を計測することで、過飽和領域での密度揺らぎが存在すると考えられているリゾチームクラスターや、ダイマーの分子内構造を反映する重要な構造変化を取得することに成功した。これらの結果は、DXT と DFM が明らかにしたネットワーク構造による力場生成プロセスを強く支持すると共に、過飽和溶液のダイナミクス理解をさらに推し進めることができたと考えている。

また、本研究で用いた溶液中のナノスケール局所ダイナミクス構造観察手法は、水クラスター形成¹¹や、イオン液体中の局所構造¹²、リチウムイオン電池中での電解液におけるネットワークダイナミクス¹³など、現在までとりわけ検出が困難な溶液系構造研究に新規計測技術として利用応用できると期待している。

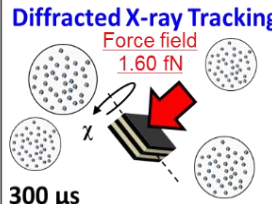
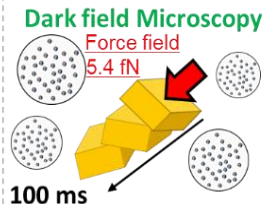


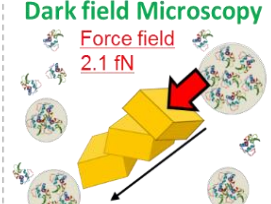
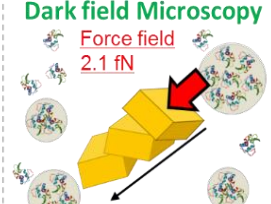
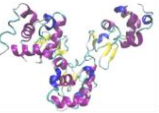
Sample \ Exp.	Local-scale dynamics observations		Additional exp.
	Rotation	Transition	
Inorganic (Sodium Acetate)	<p>Diffracted X-ray Tracking</p> <p>Force field 1.60 fN</p>  <p>300 μs</p>	<p>Dark field Microscopy</p> <p>Force field 5.4 fN</p>  <p>100 ms</p>	 <p>Network formation (SAXS)</p>
Protein (Lysozyme)	<p>Diffracted X-ray Tracking</p> <p>Force field 0.11 fN</p>  <p>1000 μs</p> <p>Force field 0.11 aN</p>  <p>720 ms</p>	<p>Dark field Microscopy</p> <p>Force field 2.1 fN</p>  <p>100 ms</p>	 <p>Network formation and secondary structure change (CD Spectra, DLS)</p>

表 1 本研究より得られた DXT, DFM 実験より得られた過飽和溶液中局所力場と X 線散乱, CD, DLS 実験による溶液中分子構造計測結果。

参考文献

1. Parimaladevi, P. & Srinivasan, K. Influence of supersaturation level on the morphology of β -lactose monohydrate crystals. *Int. Dairy J.* **39**, 301–311 (2014).
2. Muta, H. *et al.* Supersaturation-limited Amyloid fibrillation of Insulin revealed by ultrasonication. *J. Biol. Chem.* **289**, 18228–18238 (2014).
3. Wei, L. & Ohsasa, K. Supercooling and Solidification Behavior of Phase Change. *ISIJ Int.* **50**, 1265–1269 (2010).
4. Wallace, A. F. *et al.* Microscopic evidence for liquid-liquid separation in supersaturated CaCO₃ solutions. *Science* **341**, 885–9 (2013).
5. Gebauer, D., Kellermeier, M., Gale, J. D., Bergström, L. & Cölfen, H. Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 2348–2371 (2014).
6. Larson, M. A. & Garside, J. Solute clustering and interfacial tension. *J. Cryst. Growth* **76**, 88–92 (1986).
7. Vekilov, P. G. Nucleation. *Cryst. Growth Des.* **10**, 5007–5019 (2011).
8. Sasaki, Y. C. *et al.* Picometer-scale dynamical X-ray, imaging of single DNA molecules. *Phys Rev Lett* **87**, 248102 (2001).
9. Hu, M. *et al.* Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. *J. Mater. Chem.* **18**, 1949–1960 (2008).
10. Sharma, P. *et al.* Characterization of heat induced spherulites of lysozyme reveals new insight on amyloid initiation. *Sci. Rep.* **6**, 22475 (2016).
11. Xie, Y., Ludwig, K. F., Morales, G., Hare, D. E. & Sorensen, C. M. Noncritical behavior of density fluctuations in supercooled water. *Phys. Rev. Lett.* **71**, 2050–2053 (1993).
12. Haskins, J. B., Bauschlicher, C. W. & Lawson, J. W. Ab Initio Simulations and Electronic Structure of Lithium-Doped Ionic Liquids: Structure, Transport, and Electrochemical Stability. *J. Phys. Chem. B* **119**, 14705–14719 (2015).
13. Yamada, Y. *et al.* Unusual stability of acetonitrile-based superconcentrated electrolytes for fast-charging lithium-ion batteries. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5039–5046 (2014).