The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	タンパク質水溶液系における水の水素結合ネットワークに関する熱力学的研究
Author(s)	東, 信晃
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69364
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士論文

タンパク質水溶液系における
水の水素結合ネットワークに関する
熱力学的研究

東　信晃

大阪大学大学院

理学研究科

化学専攻

構造熱科学研究センター

2017

Acknowledgments

本研究における仕事は，稲葉章名誉教授と中野元裕教授の指導の下で行った．両教授の元で多くの価値あるご指導と議論を重ねた結果，この度の博士号取得にこぎつけることができましたことをこの場で感謝いたします．

また，筆者の実験指導や議論をしていただいた宮﨑裕司准教授や，論文執筆にかけて多大なるご迷惑をおかけした鈴木晴博士，同じ分野でご活躍されており，筆者の研究についても多くのアドバイスをしてくださった名越篤史博士にもお礼を申し上げます．研究における指導や議論，学生生活についてのアドバイスまでもいただき，学部 1 年生からお世話になった中澤康浩教授に深謝いたします．

学生生活を支えてくださった恋人，両親，家族，友人や，構造熱科学研究センターの同僚がいなければ，ここまでたどり着くことは出来なかったと思います．本当にありがとうございます．

皆様にわずかでもお返しができるよう，今後とも頑張っていく所存です．

Abstract

本研究では，タンパク質が水の水素結合ネットワークに与える影響を明らかにするために，免疫グロブリン G（IgG），IgG の分解物である Fab・Fc，そして不凍タンパク質（AFP）の I 型および III 型水溶液系を調査した．実験手法は熱容量測定，粉末 X 線回折，誘電緩和測定の組み合わせによって，構造とダイナミクスの両面からタンパク質水溶液系の水素結合ネットワークについての情報を得た．

それぞれのタンパク質について，熱容量測定は 7-300 K の温度域で行った．さらに，IgG，Fab・Fc が 5-95%の濃度変化について，AFP は 0.001%-5%の濃度変化について行った．熱容量測定からは相転移のような，相互作用に由来する協同現象を理解できる．相転移における転移エンタルピーや，ガラス転移におけるエンタルピー緩和からタンパク質と相互作用している水の量や氷中の水分子の分子運動に関する知見が得られる．粉末 X 線回折は 1%の AFPI 型および 1%の AFPIII 型を含んだ氷（含有氷）について 200-250 K の温度域について行った．粉末 X 線回折からは水溶液の固相における結晶構造の情報を得られる．誘電緩和測定は 1%の AFPI 型含有氷を，0.1%の AFPIII 型含有水について，140-240 K の温度域で行った．誘電緩和からは水分子の配向緩和に関する情報が得られ，それをもとに緩和の速度論的パラメータである緩和時間が得られる．

IgG および Fab・Fc 水溶液の熱容量測定結果から，タンパク質水溶液中の不凍水量を明らかにした．不凍水量は IgG 水溶液の方が Fab・Fc 水溶液よりも 0.04 g/(protein g)ほど多かった．また，90%のような濃い濃度では IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液とで熱容量差が観測されたが，濃度を低くすると熱容量差が見出せなかった．これらの結果から IgG 水溶液では Fab・Fc 水溶液にはない種類の不凍水が存在しており，その不凍水の有無が熱容量差に表れていることを明らかにした．

AFP の I 型と III 型の水溶液の熱容量測定から，六方晶氷のプロトンガラスのガラス転移温度が，AFP 添加によって高温側に移動することを明らかにした．また，粉末 X 線回折からは AFPI 含有氷および AFPIII 型含有氷の両方が純粋な六方晶氷の結晶構造と一致した．誘電緩和測定では両方の AFP 含有氷中の水分子の再配向運動の緩和時間が遅くなっていることを見出した．これらの結果から，AFP 含有氷では水素結合ネットワークが強固であるが故に水分子の再配向運動が阻害されて遅くなっていることが明らかになった．

Contents

Acknowledgments i
Abstract ii
General Introduction v
1. 水の特異な性質 v
2. 水の熱力学的な特性 v
2－1. 液体の水の構造と相転移 v
2－2. 氷内の水分子の分子運動とガラス転移 vii
3. 水と生体高分子の相互作用 x
4. 本研究の目的 xi
5. Reference xii
Part 1 免疫グロブリン G 分子の分解による 水和水のネットワーク構造の変化 1
1. Introduction 2
1-1. 水と生体高分子の相関 2
1–2. 免疫グロブリン G 4
2. Experimental 7
2–1. 試料分離・精製 7
2–2. 熱容量測定 13
3. Results 20
3–1. IgG 水溶液の熱容量，d*T*/d*t*，不凍水量 20
3–2. Fab・Fc 水溶液の熱容量，自発的温度ドリフト，水和水量 30
4. Discussion 41
4-1. IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水量の比較 41
4-2. 水和水の熱容量の比較 43
4-3. 水和水量と過剰熱容量からの考察 45
5. Conclusion 51
6. Reference 52
Part 2 不凍タンパク質による水分子の再配向運動の抑制 54
1. Introduction 55
1. 不凍タンパク質水溶液の低温物性 55
1-1. 不凍タンパク質 55
1-2. 氷内の水分子の配向運動 57
1-3. 研究目的 61
2. Experimental 62

2-1. 溶液調製 62
2-2. 熱容量測定および温度ジャンプ法 62
2-3. 粉末 X 線回折（XRPD） 65
2-4. 誘電緩和測定 68
3. Results 71
3-1. AFP-I 含有氷の熱容量および結晶構造 71
3-2. AFP-I 含有氷のプロトンガラスの解析 73
3-3. AFP-I 含有氷の誘電緩和測定 79
3-4. AFP-III 含有氷の熱容量と結晶構造 84
3-5. AFP-III 含有氷のプロトンガラスの解析 86
3-6. AFP-III 含有氷の誘電緩和測定 90
4. Discussion 96
4-1. AFP の氷核成長抑制機構とプロトンガラスのガラス転移温度との関係性 96
4-2. AFP 含有氷のプロトンガラスの T_g から考えられる AFP が水分子の再配向運動に及ぼす影響 98
4-3. AFP 分子による Bjerrum 欠陥の移動の抑制 99
5. Conclusion 104
6. Reference 105

General Introduction

1. 水の特異な性質

水は我々の身の回りで最もありふれた物質である[1]．しかし，水の物性は他の物質と異なる点がある．例えば，氷（固体）の密度が水（液体）よりも小さく，またその誘電率も同じ分子性結晶の中でも際立って高い．これは氷中の水分子間の水素結合が三次元のネットワークを形成したために現れた性質と考えられている．また，水（液体）は負の膨張率や大きな熱容量といった物性を示すが，これらもまた水の水素結合ネットワークに由来するものである．したがって，氷や水の物理化学的特性の解明は精力的に行われてきただが，未だにわかっていないことも多い[2-4].

2. 水の熱力学的な特性

水分子は水素結合のネットワーク構造を形成するため，物質としての水の性質を理解する上で個々の分子についての議論のみでは不十分である．分光学的研究が分子の個々の性質を扱う科学であるならば，全体を扱う科学として熱力学的研究が欠かせないものとなる．熱力学的物性を議論する上で，エネルギー，体積，エントロピーなどの定量が必要であり，実験的にはこれらの微分量である熱容量，圧縮率，膨張率などを精密に決定することが重要である．以下では水の特徴的な性質を熱力学的に明らかにした液体（水）と固体（氷）の 2 つの先行研究を例として述べる．

2－1. 液体の水の構造と相転移

一般的に，液体ではそれを構成している原子または分子は結晶のような長距離秩序を形成しないが，完全な無秩序状態でもなく，様々な配置構造が存在する．熱力学的に安定な配置構造は温度ごとに存在しており，分子性の液体の場合は構成分子の配置構造を連続的に変えることができる．これが可能なのは，分子間相互作用が共有結合と比較して弱く異方性も小さいからである．しかし，水は一般的な分子間相互作用と比べて強く異方性がある水素結合によってネットワークを形成しているため，分子性液体よりも共有結合に近い性質の液体となっていると考えられる．この水の性質をよく表していると考えられるのが，過冷却水の熱容量の大きさが冷却とともに増大する現象である[5]．図 1 はエマルション内の水の融点近傍の熱容量を示している．エマルション内の水は，エマルション内の空間（数μm）に閉じ込められたことで結晶核生成が抑えられているため，過冷却している[6]．○が過冷却水の熱容量，破線が液体および固体の水の熱容量である．236 K 以下のデータがないのは，この温度域以下では過冷却水が結晶化し，液体状態を保てなくなったからである．

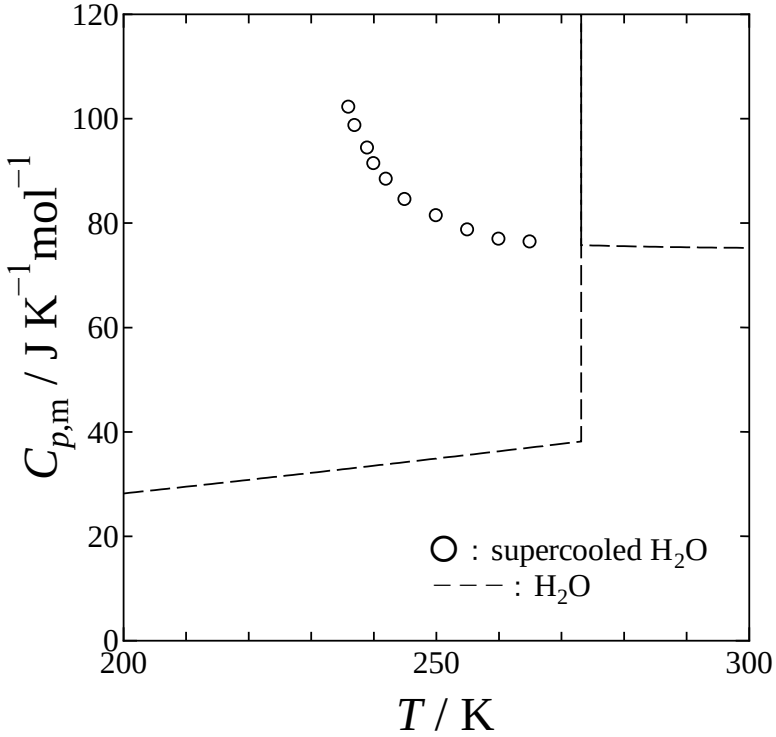


図 1　H_2O の熱容量．○：過冷却水の熱容量[5]，破線：平衡状態の H_2O の熱容量.

まず，水および氷の熱容量の温度依存性を見ると，273.15 K で熱容量が発散し，ピーク状になっている．これは一次相転移が起こった場合に熱容量において観測される現象であり，この場合は氷の融解が観測されている．過冷却水については，熱容量が温度の低下したがい大きくなっている．Angell[5]らはこの低温での熱容量の増大が液体から液体への相転移を観測していると考えており，いわゆる水の液－液相転移として現在でもその存在を巡って議論が続いている[2]．過冷却水が結晶化しないようにさらに小さな空間に水を閉じ込めた研究として，細孔内の水の物性も調べられている[4, 7, 8]．図 2 に細孔水の熱容量の細孔サイズ依存性を示す（180 K < T < 300 K）．比較のために過冷却水の熱容量（◇）と液－液相転移が起こったと仮定した場合に予想される熱容量（破線）を示す．細孔水の熱容量は温度の上昇に伴い増大し，228 K 付近で最大になったのちに減少する．この熱容量の凸状の温度依存性は液－液相転移のシナリオに合致しているが，これらの系の水は通常の水とは異なる環境にあることがネックとなるため，未だに液－液相転移の有無は議論されている段階である．いずれにせよ，液体の水でも水素結合ネットワークの長距離秩序を乱されるとバルクの水とは異なる挙動を示すことが熱容量から見出すことができる．

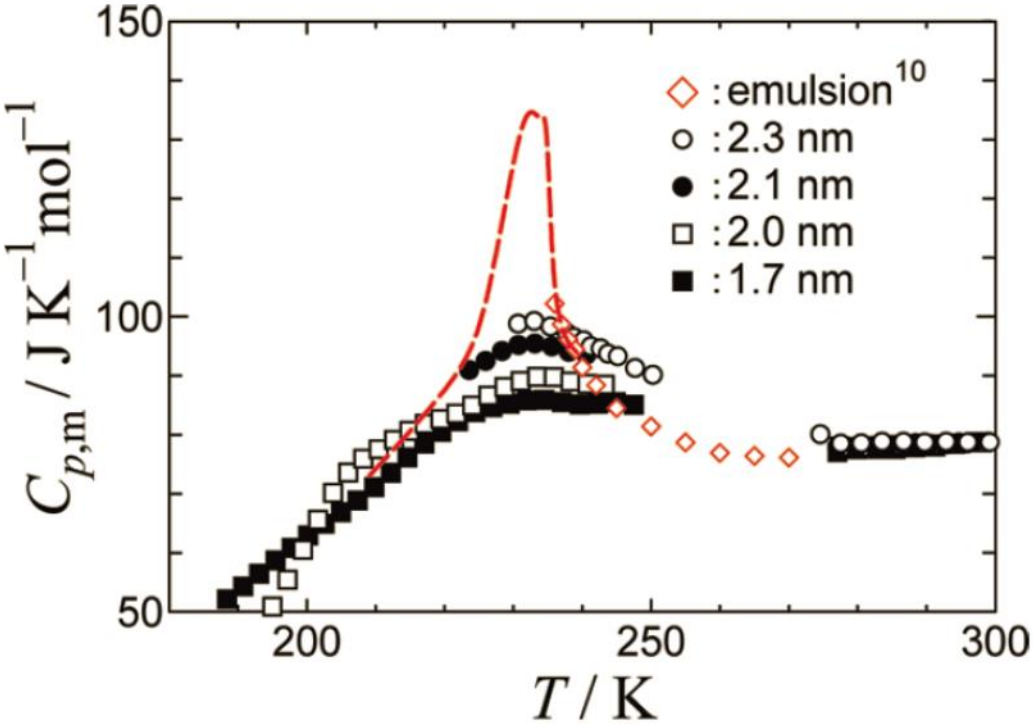


図 2　細孔内の H_2O の熱容量の細孔サイズ依存性（180 K < T < 300 K）．○：2.2 nm，●：2.1 nm，□：2.0 nm，1.7 nm の細孔サイズにおける熱容量[4, 8]．◇：エマルション内の水の熱容量[2]，破線：液－液相転移を仮定した熱容量．

2－2．氷内の水分子の分子運動とガラス転移

標準状態で水を冷却すると 273.15 K で六方晶氷と呼ばれる氷に相転移する．図 3 に六方晶氷の結晶構造[9, 10]（左）と，六方晶氷および水の熱容量（右）を示す．挿入図は氷の熱容量を 80 K < T <160 K の温度域に拡大したものである．ただし，熱容量の段を見やすくするために熱容量を温度で割った値で示している．図 3 左より，六方晶系の平衡配置にあるのは酸素原子であり，水素原子は 100 K 以上の温度ではランダムな配置をとっている．言い換えると，六方晶氷の結晶内の水分子は配向が無秩序になっている．これが見出されたきっかけは，Giauque ら[11, 12]による水の熱容量測定であった．熱容量から算出した水蒸気のエントロピーと，分光学的なデータから算出されていた水蒸気のエントロピー[11]との差から，0 K における残余エントロピー3.43 J K^{-1} mol^{-1} が見積もられた．この値は Pauling[13]が氷の規則に従って計算した六方晶氷の水分子の配向の場合の数（配向のエントロピー：3.37 J K^{-1} mol^{-1}）に対応していたため，六方晶氷中の水分子の配向が極低温まで無秩序な状態にある

ことが明らかになった．熱力学第三法則より，この配向の無秩序状態は相転移により秩序化する必要があるが，熱容量ではそのような相転移は見出せなかった．Giauque らの時代から 40 年後，Haida ら[14]が断熱法による精密熱容量測定から 110 K にガラス転移による熱容量の段差を見出したことで，氷内の水素原子の配置がガラス化していることが示唆された（図 3 右挿入図）．水素原子の配置が秩序化する温度よりも高温で凍結する理由として，水分子間の強い水素結合ネットワークが関係していると考えられている．

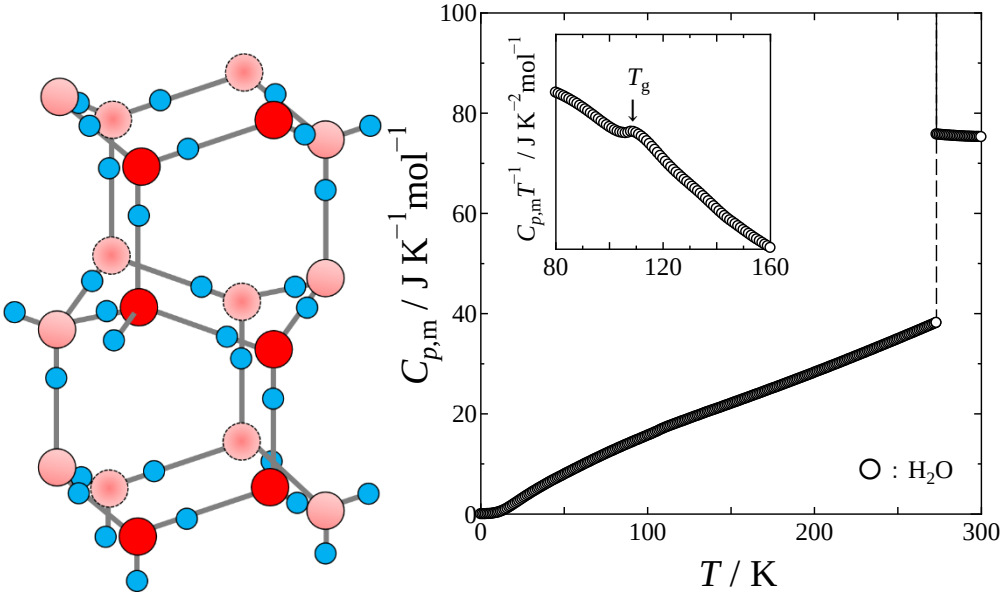


図 3　左）六方晶氷の結晶構造（$P6_3/mmc$）．図中の青丸（●）はプロトン，他の丸（●，●）は酸素原子，灰実線は結合を表している．右）水および氷の熱容量[14]．図中の挿入図に 80 K < T <160 K の温度域の熱容量を拡大して示している．熱容量の段差をガラス転移温度（T_g）として示している．

このような水素結合の配置の乱れの原因となるメカニズムとして，Bjerrum ら[15]は結晶中に生成する水分子間の水素結合欠陥が結晶中で生成・移動・消滅するモデルを提唱した．このモデルは現在でも氷の高い誘電率やガラス転移のメカニズムについて主流の説となっている．図 4 に Bjerrum の提唱したモデルの模式図を示す．簡単に説明すると，①四方を水素結合でつながれた水分子が再配向運動を行ったことで，4 本の水素結合のうち 2 本の水素結合に欠陥が生じる，②水素結合の数が減少したことで周囲の水分子が再配向運動を容易に行うことができ，結果として水素の配置が無秩序になる．

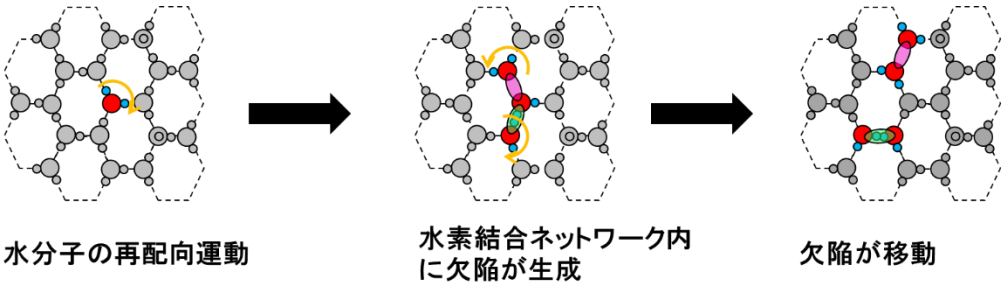


図 4　Bjerrum が提唱した水素結合欠陥の生成および移動プロセス[15]．見やすくするために再配向運動する水分子のみを色付けして示す．

ガラス化している純粋な六方晶氷が秩序化するためには長い時間が必要であるため，実際に実験系では純粋な六方晶氷の水素原子秩序相は氷の研究において確認されなかった．しかし，不純物を氷に微量混合し，固溶体を形成させることで水分子の配向秩序化を促進させる系が報告された．最も配向を秩序化させる系として KOH と氷の固溶体（KOH 含有氷）が熱容量測定[16]および誘電緩和測定[17]から報告された．図 5 に KOH 含有氷の熱容量（□）を示す．図中のインセットは 80 K < T <160 K の温度域の熱容量を示している．比較のために，純粋な H_2O の熱容量（○）も示している．

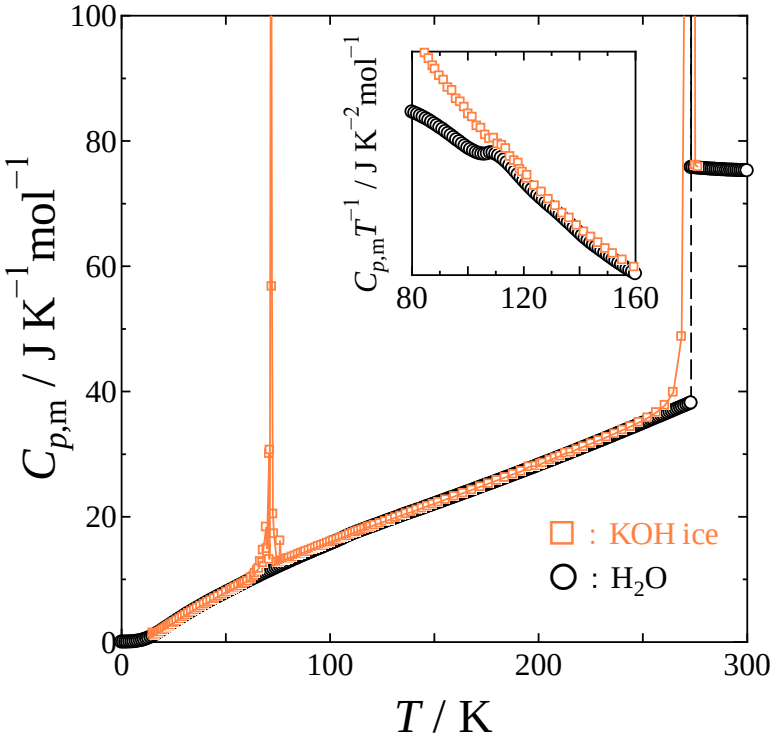


図 5　KOH 含有氷の熱容量（□）[16]．比較のために純粋な H_2O の熱容量（○）[14]を示している．図中の挿入図は 80 K < T <160 K における各試料の熱容量を示している．

KOH 含有氷の熱容量は 72 K で発散しており，この温度で一次相転移が起こっていることを意味している．72 K 以下の温度域が強誘電相，すなわち水分子の配向が秩序化した相になっていたため，この相転移が純粋な六方晶氷で観測できなかった秩序相であることが熱容量から明らかになった．このように熱容量から水によって形成される水素結合ネットワークに関する重要な知見を得ることができる．

3．水と生体高分子の相互作用

生体高分子の多くは水中で機能を発現している．水中に溶解しているため，生体高分子と水は相互作用しており，生体高分子の構造決定や分子運動に影響を及ぼしている．しかし，この相互作用によって具体的に生体高分子の機能にどのように関係しているか，という問いは未だに解決していない．その理由として，生体高分子表面と相互作用（水和）する水は生体高分子の表面の多種多様な側鎖と複雑な相互作用ネットワークを形成していると考えられるからである．いずれにしても，現象論として水は生体高分子に対して高次構造に影響を及ぼすもの（水→生体高分子）もあれば，生体高分子と相互作用した水において，純粋な水とは異なる物性が現れる（生体高分子→水）ケースも考えられる．前者の例として，タンパク質の高次構造が pH や温度の変化によって水との相互作用を介して変化し，folding-unfolding 転移が起こることなどが挙げられる[18]．また，後者の例としてタンパク質水溶液は氷点以下で凍結しない水が存在することが知られている[19-22]．他にも，シゾフィランと呼ばれる三重らせんを構成する多糖類では，280 K 近傍に相転移が存在することが熱容量測定から見出された[21, 22]．シゾフィランは高温でも主鎖の三重らせんを保つことが知られているので，その側鎖周辺の水が相転移に関係していると考えられている．図 6 にシゾフィラン水溶液の熱容量（左）と，熱容量測定から予想されたシゾフィラン水溶液中の水和構造のモデルである．

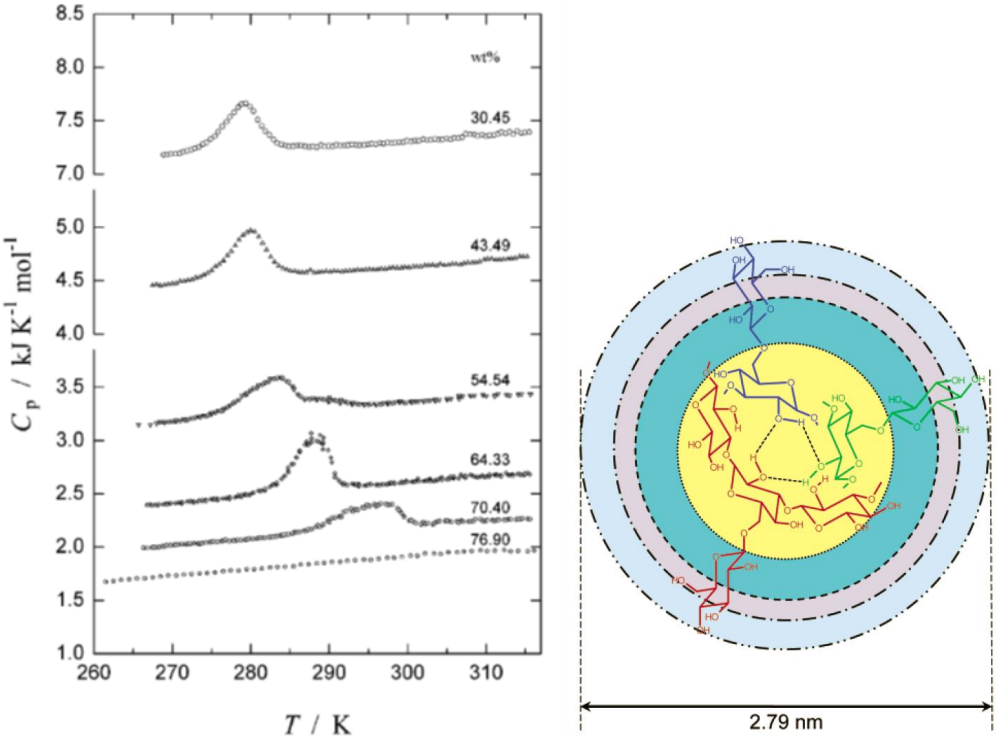


図 6　（左）シゾフィラン水溶液系の熱容量の濃度依存性.
（右）熱容量測定から予想されたシゾフィランとの水の水和構造モデル[21, 22].

4. 本研究の目的

水が生体高分子に影響を及ぼしているように，生体高分子が水に及ぼす影響を及ぼすことも考えられる．生体高分子が水に及ぼす影響を調べるために，2 つの特徴的なタンパク質に注目した．一つは免疫グロブリン G（IgG）と呼ばれる抗体タンパク質[23, 24]で，もう一つは不凍タンパク質（AFP）と呼ばれるタンパク質[25, 26]である．

IgG は巨大なタンパク質ユニット（Fab・Fc）が 3 つ，ペプチド鎖によってつながれている．IgG は酵素パパインを用いることで 3 つのユニットをつないでいるペプチド鎖を分解し，各ユニットを分離することができる．各ユニットの水和構造はこのペプチド鎖の有無によって変化するのかを調べたのが本研究の前半の主題である．

研究の後半では AFP 水溶液を取り扱う．AFP は寒冷地に生息する魚が保有しており，AFP によって寒冷地でも生体活動を行うことができる．AFP の水溶液は他のタンパク質水溶液系とは異なり低温まで過冷却することが知られており，この過冷却させる性質が寒冷地での体液の凍結防止に役立っていると考えられている．AFP 水溶液の過冷却がしやすいとい

うことは，AFP が水の凝固に大きな影響を与えていることを示唆している．このような性質を持つ AFP が水や氷にどのような影響を及ぼしているかを調べた.

5. Reference

[1] W. J Kauzmann, D. Eisenberg 著，関集三，松尾隆祐 訳，みすず書房, (1975)

[2] O.Mishima, L. D. Calvert, E. Whalley, *Nature*, **310**, 393, (1984)

[3] W. Doster, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**, 3, (2010)

[4] A. Nagoe, M. Oguni, *Netsu Sokutei*, **42**, 54, (2015)

[5] C. A. Angell, M. Oguni, W. J. Sichina, *J. Phys. Chem.*, **86**, 998, (1982)

[6] H. Kanno, R. J. Speedy, C. A. Angell, *Science*, **189**, 880, (1975)

[7] F. Mallamace, M. Broccio, C. Corsaro, A. Faraone, D. Majolino, V. Venuti, L. Liu, C. Mou, S. Chen, *PNAS*, **104**, 424, (2007)

[8] A. Nagoe, Y. Kanke, M. Oguni, S. Namba, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 13940, (2010)

[9] W. H. Barnes, *Proc. Phys. Soc. A*, **125**, (1929)

[10] W. F. Kuhs, M. S. Lehmann, *J. Phys. Chem.*, **87**, 4312, (1983)

[11] W. F. Giauque, M. F. Ashley, *Phys. Rev.*, **43**, 81, (1933)

[12] W. F. Giauque, J. W. Stout, *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 1144, (1936)

[13] L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 2680, (1935)

[14] O. Haida, T. Matsuo, H. Suga, S. Seki, *J. Chem. Thermodynamics*, **6**, 56, (1974)

[15] N. Bjerrum, *Science*, **115**, 385, (1952)

[16] Y. Tajima, T. Matsuo, H. Suga, *Nature*, **299**, 810, (1982)

[17] S. Kawada, *J. Phys. Chem. Solids*, **50**, 1177, (1989)

[18] 永山国昭編集，水と生命－熱力学から生理学へ，日本生物物理学会，(2000)，ISBN 978-4-320-05541-4

[19] G. M. Mrevlishvili 著，上平恒，上平初穂訳，生体高分子の低温カロリメトリー，北海道大学図書刊行会，(1992)，ISBN4-8329-9371-2

[20] Y. Miyazaki, T. Matsuo, H. Suga, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 8044, (2000)

[21] K. Yoshiba, A. Teramoto, N. Nakamura, *Biomacromolecules*, **4**, 1348, (2003)

[22] K. Yoshiba, A. Teramoto, Y. Miyazaki, T. Sato, *Netsu Sokutei*, **37**, 198, (2010)

[23] L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, A. McPherson, *Biochemistry*, **36**, 1581, (1997)

[24] L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, J. Day, A. Greenwood, A. McPherson, *Nature*, **360**, 369, (1992)

[25] Y. Yeh, R. E. Feeney, *Chemical Review*, **96**, 601, (1996)

[26] H. Kondo, Y. Hanada, H. Sugimoto, T. Hoshino, C. P. Garnham, P. L. Davies, S. Tsuda, *PNAS*, **109**, (2012)

Part 1

免疫グロブリン G 分子の分解による
水和水のネットワーク構造の変化

1. Introduction

1-1．水と生体高分子の相関

生物が生体活動を行う上で，水は重要な役割を果たしている．生物が生体活動を行う上で機能している生体高分子は，水が相互作用していない乾燥した状態においては剛直な分子であり，乾燥したままでは生体活動を行うことができない．実際に水には，生体高分子の立体構造を決定する，生体高分子の構造揺らぎに影響を与える，生体反応の場を提供するなどの役割があることが知られている[1]．このように生体高分子の機能発現は水と高分子の間の相互作用が原因であるため，水と生体高分子の間の相互作用（水和）を調査することは重要である．生体高分子に水和した水分子（水和水）が生体高分子の機能に及ぼす影響を調べた研究は NMR[2, 3]やカロリメトリー[4-9]，赤外分光[9, 10]，誘電緩和[11-14]，構造解析[15, 16]，計算科学[16-18]など多くの分野と対象物質で行われている．

著者は生体高分子の中でも，分子の種類によって固有の機能をもつタンパク質に注目し，その機能において水和水がどのような役割を持っているかに興味を持った．タンパク質の分子運動はタンパク質表面に水和水が相互作用した結果，乾燥した状態よりも多くの分子運動を行うことができるようになる（可塑化） [18, 19].

1–1–1．生体高分子における水和構造と水和水の分子運動

タンパク質水溶液系における水和水の水和構造は大きく分けて以下の 4 段階の階層構造になっていることが知られている[1, 7, 20]（図 1–1）.

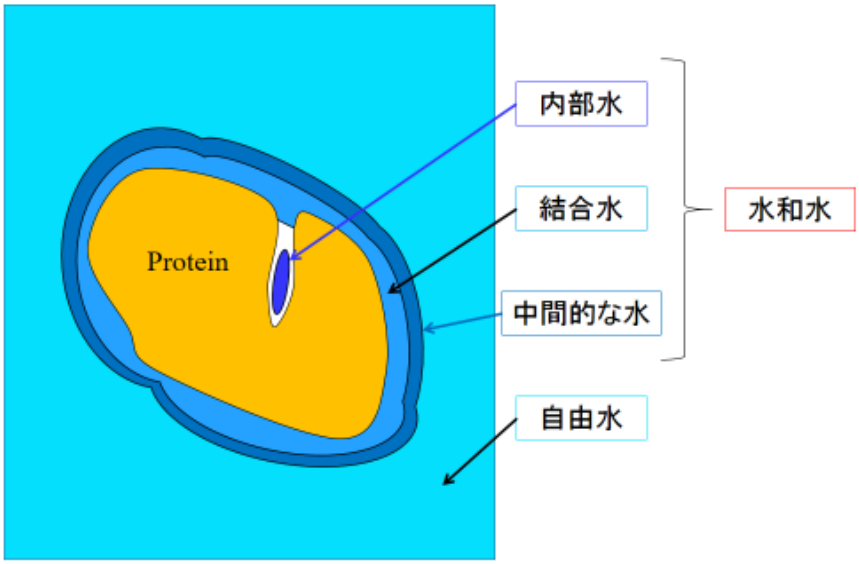


図 1–1　タンパク質水溶液系の水和構造の模式図.

・内部水：タンパク質分子の立体構造の内部に取り込まれた水分子．内部の親水性基と強く結合しているため，氷点以下の温度でも水分子は運動している．内部水の分子運動の緩和時間（τ）は，タンパク質と相互作用しているため大きく，室温で$\tau > 1$ s である．
・結合水：タンパク質表面に露出した側鎖と相互作用している水分子．内部水よりもタンパク質と弱く結合しており，周囲の水分子（中間水）とも相互作用している．内部水と同様，氷点以下でも分子運動をしているが，内部水よりも弱く相互作用しているため，その分子運動の緩和時間は小さい（$\tau \sim 10^{-6}$ s）．
・中間的な水（中間水）：タンパク質表面とは直接相互作用せず，結合水と自由水の形成する層の境界に存在する水分子．タンパク質表面と相互作用していないため，結合水よりもさらに緩和時間が短い（$\tau \sim 10^{-10}$ s）．本研究では内部水から中間水までを総称して水和水と呼ぶ．
・自由水：上記以外の水．その一部は中間水と相互作用しているが，大部分は自由水間で相互作用しているため，純水と同様の物性を示す．緩和時間は純水と同じである（$\tau \sim 10^{-12}$ s）．

1–1–2．タンパク質の構造[21]

タンパク質の基本構造は 20 種のアミノ酸がアミド結合（ペプチド結合）により 1 次元的に結合した鎖状構造（1 次構造）である．20 種のアミノ酸には親水性または疎水性の側鎖が存在しており，溶解させた溶媒との相互作用の結果，特異的な立体構造をとることができる．

タンパク質分子を水に溶解させた場合，鎖状分子内の親水性側鎖が外側に突出し，疎水性側鎖が内側に集積することで，タンパク質はその系における自由エネルギー的に安定な立体構造をとる（2 次構造，3 次構造）．2 次構造とは，タンパク質分子内側鎖間または主鎖間の水素結合によって形成される構造であり，いわゆるα–ヘリックス構造やβ–シート構造と呼ばれるタンパク質の局所的な構造である．3 次構造は 2 次構造のような分子内構造が主鎖の各箇所で生成した時の分子全体の構造を指す．さらに，タンパク質同士の分子間相互作用の結果，多量体を形成するものも存在する（4 次構造）．タンパク質水溶液系での機能が発現できる安定状態（3 次，4 次構造）を天然状態と呼ぶ．天然状態であるための条件はシビアであり, pH の変化, アルコールの存在や温度域によっては天然状態の構造を保てなくなり，機能を失った変性状態に陥る．完全な変性状態では特異的な立体構造ではなく，ランダムコイル構造となって溶媒の水にさらされる面積が増加するため，変性状態の水和構造は天然状態と異なっている．

1–1–3．天然状態と変性状態における水和構造

天然状態と変性状態では，溶媒の水に晒されている親水性基の面積（露出表面積）の違いから，水和構造も異なっている．例えば，熱量測定によって導出された水和水量は，多くのタンパク質で変性状態のほうが天然状態よりも 0.006 mol（タンパク質 1 g あたり）程度増加する傾向があった[8, 21]．この結果から，変性状態になることで水と相互作用する露出表面積が増加し，水和水量が増加したと考えられている．このように，変性状態になると水和水の水素結合ネットワークが変化していると考えられる．一部のタンパク質の立体構造のみを変性させた場合，水和水の水素結合ネットワークにどのような影響が現れるだろうか．そのような一部の水和構造の変化を調査するために，局所的な変性状態を作ることができるタンパク質を用いた．次節にそのタンパク質について詳細を述べる．

1–2．免疫グロブリン G

免疫グロブリン G（Immunoglobulin G；以下 IgG）と呼ばれるタンパク質は，生体内の免疫系で働く抗体タンパク質である．生体内に侵入した細菌や毒物などの異分子（抗原）と結合して凝集して無力化することや，抗原の情報収集に使用される．IgG は酵素を用いて，3 次構造の大部分を保ちながら分解することができるので，局所的な変性状態を実現できる物質として選択した．

1–2–1．IgG の三次構造

図 1–2 に X 線構造解析から決定されたヒトの IgG の立体構造[15, 22]を示す．IgG は 3 つ

の大きなドメインが中央のペプチド鎖（ヒンジ部）によってつながれた Y 字構造をしている．上の 2 つのドメインが抗原と結合する Fab（Fragment antigen binding）領域，下のドメインが抗原の情報収集に関係する Fc（Fragment crystallizable）領域である．IgG は全体で分子量 150,000 程度で，Fab と Fc はそれぞれ分子量 50,000 程度である．IgG は生体内で抗原と結合する際に，ヒンジ部の柔らかさを利用して 2 分子の Fab 領域を動かすことが知られている[23, 24].

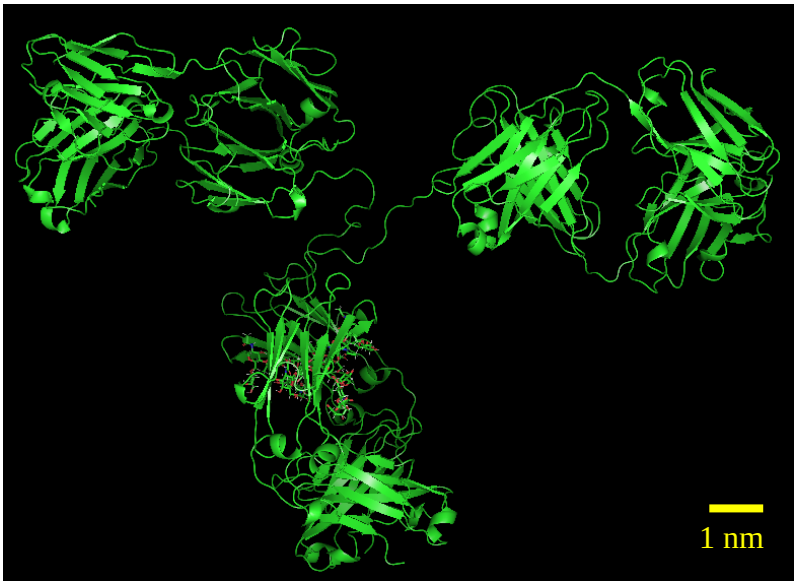


図 1–2　IgG の水溶液系における立体構造．上部 2 つの領域が Fab，下部が Fc 領域．中央の 2 本のペプチド鎖をちょうつがい部と呼ぶ.

1–2–2．IgG の Fab，Fc への分解（局所的変性）

IgG は，パパインと呼ばれる加水分解酵素を用いると，ヒンジ部の加水分解により 2 分子の Fab と 1 分子の Fc に分解できる[25]．加水分解した際に，Fab と Fc は IgG の時と同じ立体構造を保つことが知られている．そのため，Fab と Fc はヒンジ部のみの構造が変化した局所的な変性状態にあると考えられる．以後，本論文では Fab と Fc の混合物を Fab・Fc と表記する．

天然状態と変性状態では，水和構造が異なることが知られているが，同様に IgG と Fab・Fc の水溶液系でも，ヒンジ部の有無により水和構造やダイナミクスが変化することが予想される．異なるのは，ヒンジ部のみが切断され，それ以外の大部分の立体構造は保持されている点である．Hayashi らは，IgG と Fab・Fc の水溶液系の誘電緩和測定から，IgG の 10 MHz オーダーの分子運動モードが消失していることを報告した[26, 27]．彼らはこの運動が IgG のヒンジ部の構造揺らぎの消失を検出したと解釈している．もしちょうつがい運動が消失

したのであれば，付随してタンパク質周囲の水和構造にも何らかの変化があったと予想される．そこで本研究では，IgG が Fab・Fc に分解されるのに伴って，水和構造および水和水の水分子の運動がどのように変化するかという点に注目した．

1–2–3. タンパク質水溶液系の熱容量測定

本研究では水和構造やダイナミクスの変化を検出する実験方法として熱容量測定を選択した．採用したのは断熱法[28]と呼ばれる熱容量測定手法であり，5 K - 400 K の広い温度域で精度のよいデータが得られるという特徴がある．また，水素結合などの低エネルギーの相互作用に由来する協同現象の検出を得意としており，水和構造の変化を知るうえで重要なツールとなる．

タンパク質水溶液の熱容量測定では水溶液を氷点下の温度から加熱して融解させて，融解熱を定量することで水和水量が得られる．さらに，タンパク質水溶液系の熱容量から純粋なタンパク質と水の熱容量を差し引くことで，水和水の熱容量を求めた．

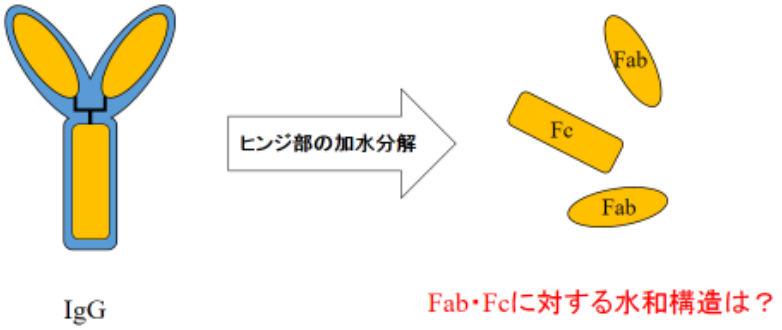


図 1-3　本研究の目的の模式図．IgG を Fab・Fc に分解したときの水和構造と水和水の水分子のダイナミクスを熱容量測定によって調査する．

2. Experimental

2–1. 試料分離・精製

IgG は，Rockland 社の Bovine IgG whole molecule（001-0102）を 1 g 購入した．限外ろ過により IgG 粉末試料の脱塩を行い，得られた IgG 水溶液の凍結乾燥によって乾燥 IgG 粉末試料を精製した．

Fab・Fc は，前述の Bovine IgG whole molecule の水溶液にパパインと反応促進剤（L–システイン）を加えて 2 時間加水分解し，VIVASPIN を用いた遠心分離により未反応物と分離した．その後，VIVASPIN で 4 回遠心分離して脱塩し，得られた Fab・Fc 濃縮水溶液を凍結乾燥して乾燥 Fab・Fc 試料を精製した．

以下に脱塩手順の詳細を記す．

2–1–1. 限外ろ過による IgG 脱塩

購入した IgG 粉末試料に含まれている塩を除去するため，限外ろ過を行った．図 2–1 に限外ろ過装置の概略図を示す．加圧管から導入された N_2 ガスで加圧することでろ過を行った．

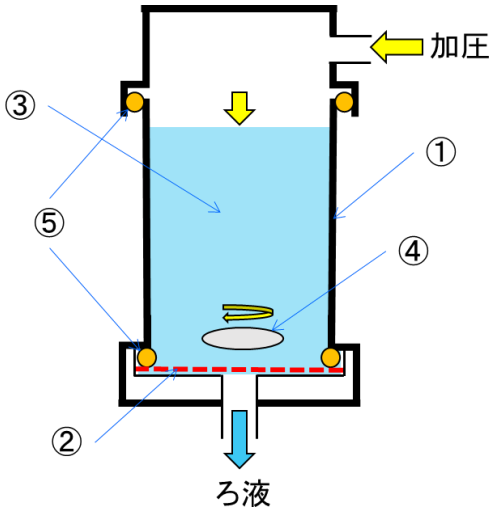


図 2–1　限外ろ過法の概略図．①：ろ過容器，②：ろ過膜，③：試料溶液，④：撹拌子，⑤：ゴムパッキン．上部の穴より N_2 ガスを導入することで加圧し，溶液を下部にあるろ過膜を透過させることで試料に含まれる残留塩などの不純物を除去する．

購入した 50 mg の IgG 粉末試料を蒸留水 150 mL に溶解させた．ろ過容器に IgG 水溶液を入れ，ゴムパッキンで密封したのち，N_2 ガスによる加圧でろ過をした．ろ過の際の水溶液の濃度勾配による IgG の変性を防ぐため，溶液を撹拌しながらろ過した．残液が約 50 mL になるまでろ過したのち，残液に再び蒸留水を加えて繰り返しろ過した．IgG 粉末試料中の残留塩をなるべく除去するため，最低 4 回限外ろ過を行った．ろ過を終えた残液を回収し，ナスフラスコに入れて凍結乾燥した．測定に用いられた乾燥 IgG 試料は全てこの作業を行ったものを用いた．

2–1–2．パパインによる IgG の加水分解反応

IgG の分解は Utsumi の手法[25]で行った．購入した IgG 粉末試料を 0.1 mmol L^{-1} のリン酸緩衝溶液 50 mL に溶解させ，IgG 溶液を 37 ℃の定温に保った．IgG 溶液に 0.1 mmol L^{-1} のパパイン溶液（溶媒：リン酸緩衝溶液）1 mL と，0.1 mol L^{-1} の L–システイン水溶液（反応活性化剤）1 mL を混合し，攪拌しながら 2 時間反応させ，Fab・Fc を得た．反応後，0.1 mol L^{-1} の 2–ヨウ化アセトアミド水溶液 1 mL を加えて Fab の二量体化を抑制した．

2–1–3．遠心分離による Fab・Fc の分離・脱塩

得られた Fab・Fc を未反応物や他の溶解物から分離するために，遠心分離による透析を行った．分離容器として，Sartorius Stedim 社の VIVASPIN シリーズを用いた．初めに，Fab・Fc と未反応 IgG を分離するため，分子量 100,000 までの分子を透過する膜（MWCO100,000）を有する VIVASPIN を使用した．反応後の溶液を MWCO100,000 の VIVASPIN に入れ，遠心分離機にかけた．得られたろ液（溶液①）内の Fab・Fc とほかの溶解物を分離するため，分子量 30,000 までの分子を透過する膜（MWCO30,000）を有する VIVASPIN を使用して遠心分離にかけた．得られた残液（溶液②）を回収し，蒸留水で希釈後，分子量 10,000 までを透過する膜の VIVASPIN を用いて遠心分離することで脱塩した．脱塩は残液に蒸留水を再度加えて繰り返し最低 4 回行った．得られた試料を凍結乾燥することで Fab・Fc 乾燥試料を得た．

Fab・Fc を同定するために，電気泳動と質量分析を行って試料の同定を行った．電気泳動では分子量の多分散や過分解による線が多数観測され，質量分析でも過分解による試料が多量に含まれていることが見出された．したがって Fab・Fc 試料の純度の信頼性は低いが，さらなる試料損失を避けるため，それらの試料で熱容量測定を行った．

2–1–4．電気泳動

20 種のアミノ酸は，それぞれ異なる等電点を持つため，その重合体であるタンパク質に

も，種類によって電荷の偏りがある．この性質を利用し，タンパク質の同定を行う簡単な手法として電気泳動法がある．電気泳動法は，ゲル内に注入されたタンパク質のゲル内における移動度の差によって分離する手法である．ゲル内の移動度はタンパク質の質量（または構造）に依存するので，単分散な試料の混合物であれば，うまく分離できる．今回用いたのは，質量に加えてタンパク質の高次構造についても移動度に差ができる Native PAGE 法によって Fab・Fc をふるいにかけた．

WAKO 社の 10x Tris-Glysin buffer を蒸留水で 10 倍希釈し，泳動用 buffer とした．得られた Fab・Fc および IgG 試料を BIO-RAD 社の Native Sample Buffer（161-0738）に 10 μL に 1 mg ずつ溶解させ，試料用 buffer とした．Native Sample Buffer の成分は 62.5 mmol L^{-1} Tris-HCl（pH 6.8），40%グリセロール，0.01%ブロモフェノールブルーであった．ATTO 社の e・パジェル（AE-6000）を泳動ゲル，同社の PageRun-R を泳動装置とし，電気泳動を行った．対象試料は遠心分離によって得た 2 つの溶液（①，②）と，参照試料のための IgG 溶液（③）を電気泳動にかけて比較した．

溶液①~③に対する電気泳動の結果を図 2–2 に示す．溶液③はゲルの上部にブロードなバンドが見えるのに対し，溶液①と②ではゲルの下部にはっきりとしたバンドが確認された．溶液③は IgG が含まれているが，Fab・Fc それぞれの分子量よりも大きく，また立体構造がかさ高かったために電気泳動にかけてもゲルの上部にとどまったと考えられる．一方，①と②ははっきりとしたバンドがゲルの下部に最低 4 本確認できた．Native PAGE 法では電気泳動にかける分子の分子量だけでなく，立体構造も反映されるため，IgG と比較して小さい分解物がゲルの下部まで到達したと考えられる．この分解物が Fab・Fc であるかを確認するために，質量分析を行った．

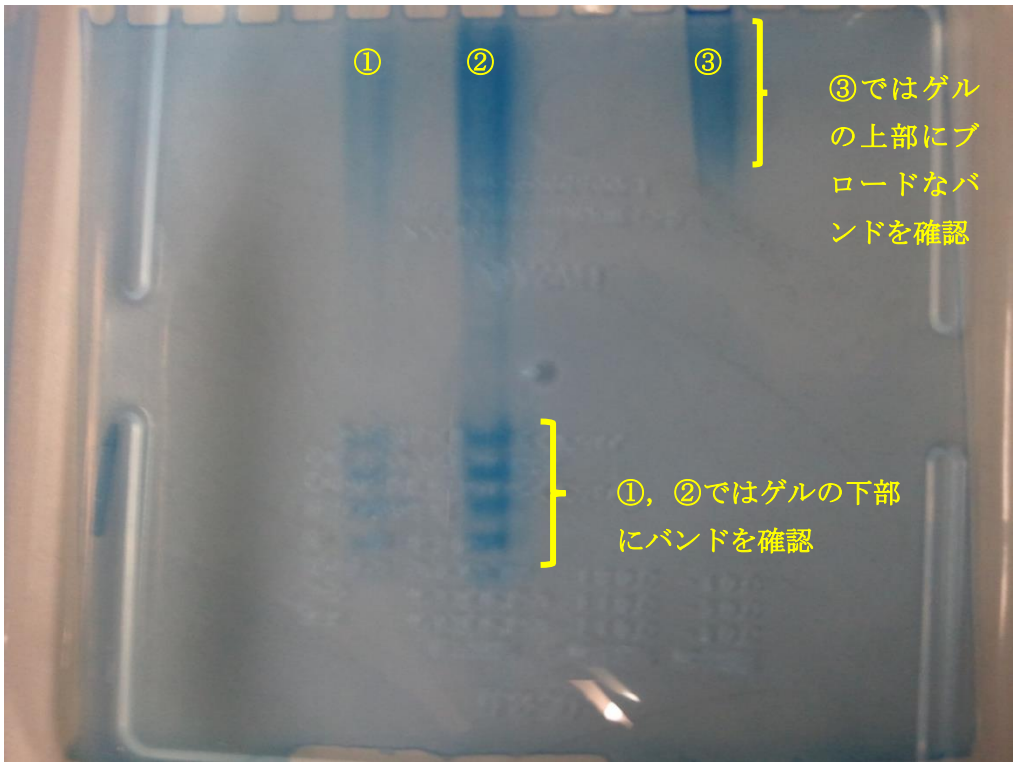


図 2–2　IgG および Fab・Fc の電気泳動結果．①：パパイン分解直後の遠心分離で得られたろ液，②：MWCO30,000 の VIVASIPN で遠心振りした直後の残液，③：IgG 溶液．

2–1–5．質量分析

質量分析法（Mass Spectrometry; MS）は対象試料をイオン化し，その質量を測定することで試料の構造解析や同定を行える分析法である．分析部分は飛行時間型（Time-of-flight; TOF）質量分析計を用い，試料のイオン化はマトリックス支援レーザー脱離イオン法（Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; MALDI）によって行った．精製した IgG と Fab・Fc 試料の質量分析を行った．

2–1–5–1．原理

生体高分子の質量分析において，試料をイオン化させるには MALDI 法が主流である．生体高分子などの分子量の大きい物質を，レーザーを照射することで安定にイオン化させることができるためである．イオン化された試料をパルス的に加速させ，検出器までの到達時間の差で質量ごとに分離する装置が TOF である．TOF は原理上いかなる質量でも測定が高感度で可能なことが特徴である．図 2–3 に MALDI-TOF-MS 装置の模式図を示す．図左にセットした試料にレーザー照射によってイオン化（M^+）する．イオン化した試料を図右の検

出器で検出する．

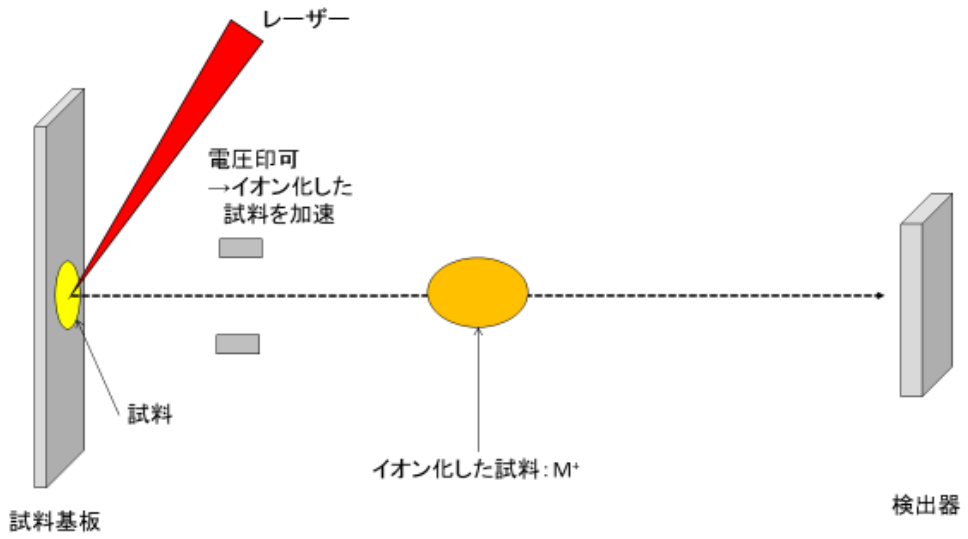


図 2-3　TOF 測定の模式図．基板上にセットされた試料にレーザーを当ててイオン化させ，電圧印可によって加速させた試料が検出器に到達した時間から質量を決定する．

2–1–5–2．イオン化法：MALDI 法[29, 30]

質量分析法では，イオン化の際，レーザー光よって試料にダメージを与える場合があるため，試料にダメージを与えない工夫がなされる．特に，生体高分子のような巨大分子を対象とした場合，レーザーから直接エネルギーを受け取り励起させずに，イオン化されやすい物質（マトリックス）を介在させて穏やかにエネルギーを供給する工夫がなされる（MALDI 法）．試料とマトリックスを混合し，レーザーパルスを照射するとマトリックスが先に励起され，その余剰エネルギーによる発熱によって試料をイオン化させている．

2–1–5–3．分析装置：TOF-MS[31]

TOF-MS では，イオン化させた試料に電場をかけて加速させ，検出器までの到達時間差によって質量を分離する．

荷電粒子のポテンシャルエネルギー（V_p）は，電荷（q）と電場（E）によって以下のよう定義される．

$$V_\mathrm{p} = qE$$

TOF-MS では電場を荷電粒子にかけて加速させるので，V_p は運動エネルギー（K）に変換される．

$$K = \frac{1}{2}mv^2 = qE$$

ここで，m は荷電粒子の質量，v は荷電粒子の速度である．加速された荷電粒子は，TOF-MS 内部の加速管を，検知器に到達するまで飛行する．加速管内部に電場をかけなければ速度は変化しないので，

$$v = \frac{d}{t},$$

ここで d は加速管の長さ，t は検知器に到達するまでの時間である．したがって，

$$\frac{1}{2}m\left(\frac{d}{t}\right)^2 = qE$$

$$t^2 = \frac{d^2}{2E}\frac{m}{q}.$$

d および E は既知なので，装置定数を k (= $\frac{d}{\sqrt{2E}}$)とすると，

$$t = k\sqrt{\frac{m}{q}}.$$

したがって，検知器に到達するまでの時間から質量と電荷の比が求まる．MALDI 法では主に 1 価または 2 価の荷電粒子が発生するので，質量と同値または半値で検出される．

2–1–5–4．測定手順

2–1–5–4-1．試料溶液およびマトリックス溶液の調製

試料を溶解させる溶媒として，蒸留水：アセトニトリル＝1：1 を溶媒とした 0.1%トリフルオロ酢酸（CF_3COOH；TFA）を調製した．IgG または Fab・Fc の乾燥粉末 4 mg を 40 mL の 0.1%TFA 溶液に溶解させ，10 倍希釈して 1 mg / 100 μL 溶液を調製した．

また，MALDI 法で用いるマトリックス溶液として，1 mg / mL の 2,5-ジヒドロキシ安息香酸（DHBA）のメタノール溶液を調製した．

2-1-5-4-2．試料台への溶液のセット

IgG または Fab・Fc の試料入り溶液を試料台上に 1 μL 滴下した（キャスティング）．滴下した試料の上に 1 mg / mL の DHBA メタノール溶液を 1 μL キャスティングした．キャスティング後は試料台上の溶液が完全に蒸発するまで，N_2 ガス（不活性ガス）雰囲気下で放置した．乾燥を終えた試料台を TOF-MS 装置にセットし，質量分析を行った．

2–1–5–5．測定結果

図 2–4 に質量分析の結果を示す．a)は IgG の，b)は Fab・Fc についての結果を示す．縦軸を Intensity，横軸をイオンの質量とした．IgG は分子量 100,000 以上の質量域で 3 つの主なピークが観測された．IgG の分子量が 150,000 であることから，（a）では多分散の分子量を持った IgG が観測されたと解釈した．また，分子量 73,000 にもピークが観測された．これは分子量 150,000 の約半分の値であることから，価数が+2 のイオンが観測されたと考えることができる．分子量 11,000 にもピークが観測されたが，これは分子量 10,000 以下をカットオフしたために検出された残留塩などの不純物によるものと考えられる．（b）の Fab・Fc については，分子量 47,000 でピークが観測された．また，その半値である 23,000 でもピークが観測された．Fab・Fc の分子量が 50,000 であること，分子量 100,000 以上の質量域でピークが観測されなかったことを考慮して，実験で得られた乾燥 Fab・Fc 試料は加水分解に成功したと判断した．なお，分子量 10,000 近傍のピークは IgG の場合と同様に，残留塩や過剰反応物などの不純物によるものと考えられる．

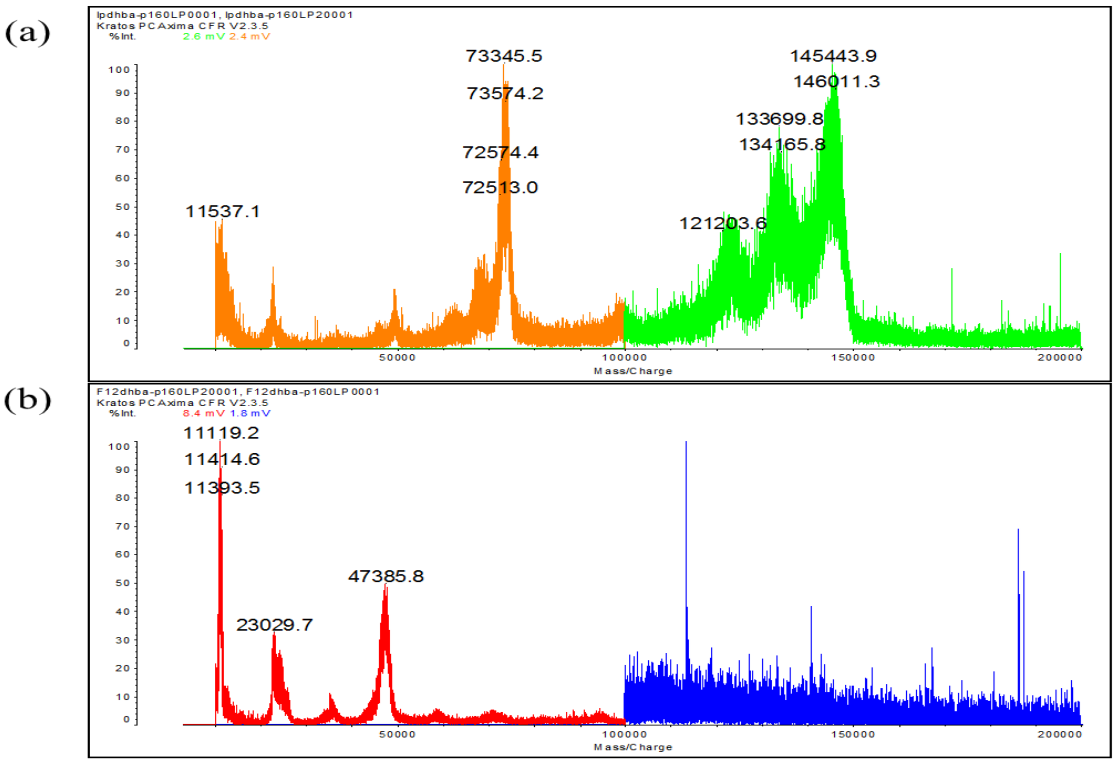


図 2–4　精製した IgG（a）および Fab・Fc（b）の質量分析結果.

2–2．熱容量測定

2–2–1．断熱法原理

熱容量測定は断熱法を用いて，5 K < T < 300 K の温度域について行った．熱量計は研究室既設のミクロ断熱型熱量計[32]を用いた．実験的に測定される熱容量は定圧熱容量，C_p であり，熱力学的に以下の式で表される．

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_p$$

ここで，H は系のエンタルピー，T は系の温度，p は系の圧力である．実際に実験で熱容量を求める場合は，以下の式に基づいて導出される．

$$C_p = \frac{\Delta E}{\Delta T}$$

ここで，ΔE は系に与えられたエネルギー，ΔT は系が与えられたエネルギーによって変化した温度である．

断熱法では，ΔE を系に印加した電気エネルギーに等しくなるように，測定試料を限りなく断熱条件に近づける．また，高精確度の温度測定からΔT を決定できるため，精密な C_p 測定が可能となる．測定試料を断熱条件下に置くためにクライオスタットに測定容器をセットし，輻射熱の寄与を減らすために銅製の筒（断熱シールド）を測定試料の周りに配置する．また，ヒーター線や熱電対線からの熱漏れも線を細くする（ϕ < 0.1 mm）ことで軽減させる．

図 2–5 に断熱法の測定概念図を示す．縦軸が測定された温度，横軸が測定時間となっている．T_i，T_f，t_i，t_f はそれぞれ試料の初期温度，終温度，加熱開始時間，加熱終了時間とする．（a）に測定容器からの熱漏れがない理想的な断熱条件下での測定，（b）に実際の測定を示す．（a）の加熱開始前では熱漏れがないので，温度は T_i で一定である．時間 t_i からヒーター線に電流を流した際のジュール熱ΔE によって試料の温度が上昇する．加熱後，試料の温度は加熱終了直後の試料の緩和（例えば試料内の熱拡散）によって減衰するが，温度測定時間内（t_f から次の t_i までの時間）には一定温度 T_f となる．ここで$\Delta T = T_f - T_i$ とすると，C_p が導出される．しかし，実際には完全な断熱条件を実現することは困難なので，熱漏れにより測定は（b）のようになる．この場合，T_f と T_i は熱漏れによる温度変化を直線近似して，加熱時間の中点まで補外したときの値として決定される．（a）と同様にΔE とΔT が決まるため，C_p が導出される．

断熱法を用いるもう一つの重要なメリットは，試料の自発的な発吸熱量を検出（定量）することができる点にある．発吸熱の指標は自発的温度ドリフト（dT/dt）で敏感に検出することができる．ここで，自発的温度ドリフト（dT/dt）とは，温度測定の際に温度の時間変化を直線近似した時の傾き（図 E-3）とする．したがって，dT/dt は試料が熱平衡状態にある場合は装置由来の熱漏れを，非平衡状態にある場合は試料の熱的緩和を表している．

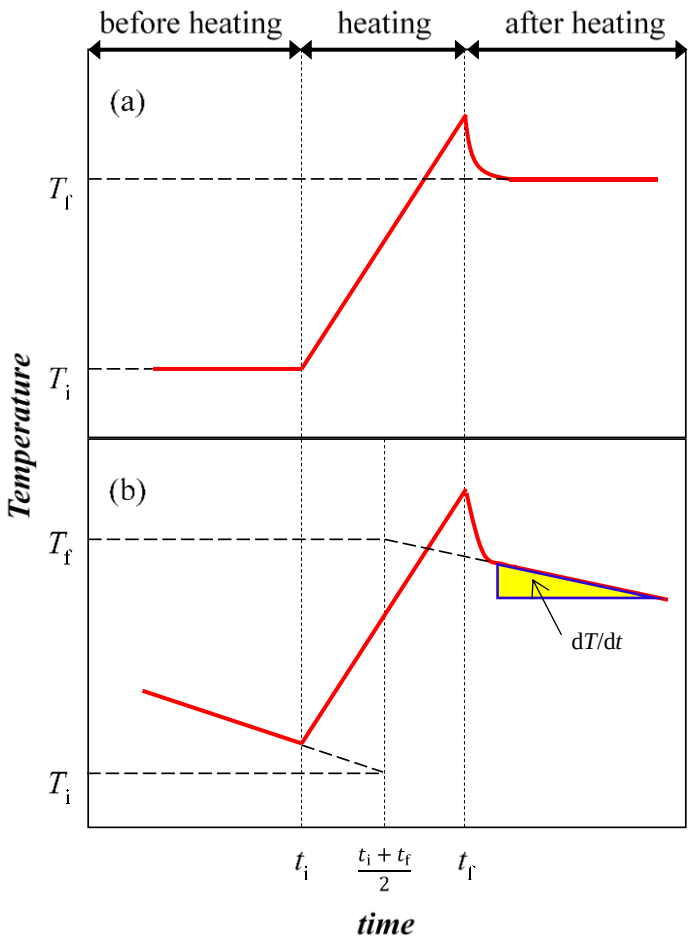


図 2–5　断熱法における温度測定の概念図．縦軸を測定温度，横軸を時間として示す．(a) 完全な断熱条件における温度測定，(b) 実際の擬断熱条件下での温度測定．図中の黄色で表した領域における温度の時間変化は自発的温度ドリフトを表している．

2–2–2.　ミクロ断熱型熱量計

測定試料が少量（< 10 g）の場合，測定容器を小さくして空セルの熱容量への寄与を小さくする必要がある．しかし，測定容器を小さくすると，輻射熱や熱漏れなどの影響が増大する上に，測定容器に付属している抵抗温度計の熱容量やヒーターによる自己加熱の寄与が無視できない．

研究室既設のミクロ断熱型熱量計と従来の断熱型熱量計の大きな違いは，抵抗温度計と測定容器を分離し，熱電対で抵抗温度計と測定容器の温度差を測定することで，上記の困難

を克服している点である[33]．本装置により，測定試料量を 100 mg ~ 1 g に減らすことに成功した．図 2–6 に装置の熱量計部分の概念図を示す．図中のアルファベットおよび色付きの実線は，A：測定試料，B：抵抗温度計＋温度ブロック，C，D：それぞれの断熱シールド，I：内部真空缶容器，赤線：ヒーター線，青線：試料－抵抗温度計間の熱電対，オレンジ線：断熱条件を保つためのフィードバック機構を表している．

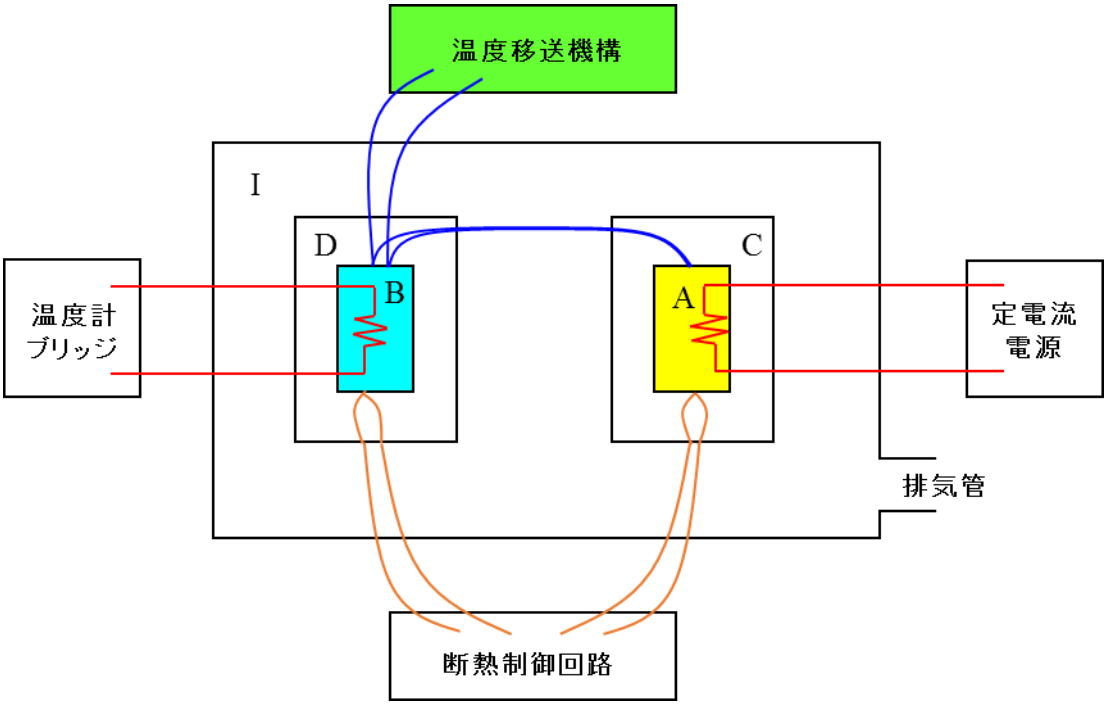


図 2–6　ミクロ断熱型熱量計の概念図．A：測定容器，B：抵抗温度計＋銅ブロック，C：測定容器側の断熱シールド，D：温度計側の測定シールド，I：内部真空容器，赤実線：ヒーター線，青実線：抵抗温度計 - 測定試料間熱電対，オレンジ実線：温度制御用のフィードバック機構．

2–2–3．試料調製

試料の濃度によって調製方法が異なる．

20%以下：試料調製は乾燥 IgG または乾燥 Fab・Fc 粉末を水に溶解させたものを用いた．試料調製に用いた乾燥 IgG および乾燥 Fab・Fc 試料は，3 日間真空乾燥したものを用いた．溶媒は Milli-Q®水を最低 4 回脱気したものを用いた．

試料の濃度調整は大気中で，使用した乾燥試料と脱気済みの水の質量を測定することで行った．最終的な水溶液の質量は，He 雰囲気下で測定容器を封じ，測定容器の重量を測定することで得られた．

50%以上：20%の試料が入った測定容器を He 雰囲気下で開封し，溶媒を自然乾燥させることで濃度を調節した．過剰に乾燥させた場合は，Milli-Q®水を He 雰囲気下で注入してやり直した．最終的な水溶液の質量は 20%以下の濃度と同様に決定した．

以上の方法で調製した測定試料は，IgG および Fab・Fc の水溶液で 5，10，20，50，80，90，95，100%であった．ここで，乾燥 IgG および乾燥 Fab・Fc 試料を濃度 100%とした．表 2–1 に試料の組成比を示す．

表 2–1　IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液の組成比．

IgG	**質量分率 w**	**溶液質量 m_{sol} / g**	**溶質質量 m_{AFP} / g**	**溶媒質量 m_{H2O} / g**
5%	0.049982	2.09795	0.10486	1.99309
10%	0.10025	1.37710	0.13806	1.23904
20%	0.19974	0.68470	0.13676	0.54794
50%	0.49931	0.27390	0.13676	0.13714
80%	0.80532	0.16982	0.13676	0.03306
90%	0.90247	0.15154	0.13676	0.01478
95%	0.95303	0.14350	0.13676	0.00674
100%	1	0.23498	0.23498	0
Fab・Fc	**質量分率 w**	**溶液質量 m_{sol} / g**	**溶質質量 m_{AFP} / g**	**溶媒質量 m_{H2O} / g**
5%	0.049923	2.16173	0.10792	2.05381
10%	0.099648	1.26967	0.12652	1.14315
20%	0.20049	0.61820	0.12394	0.49426
50%	0.50083	0.24747	0.12394	0.12353
80%	0.80090	0.15475	0.12394	0.03081
90%	0.89870	0.13791	0.12394	0.01397
95%	0.94980	0.13049	0.12394	0.00655
100%	1	0.12892	0.12892	0

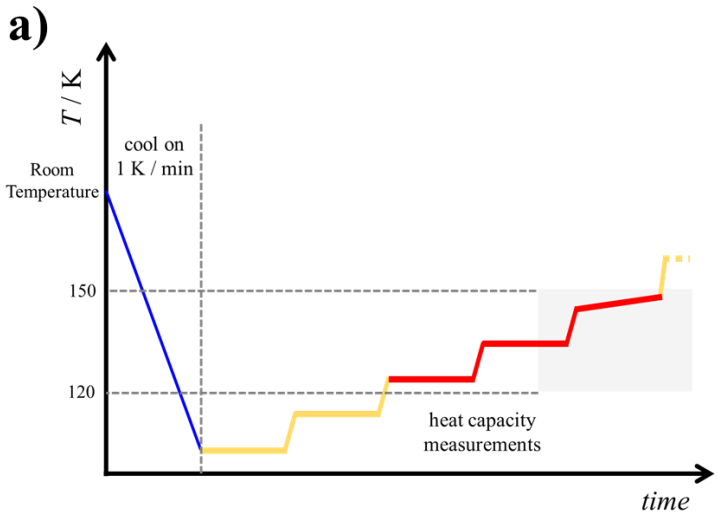
2–2–4．測定スキーム

測定の基本手順は，試料を目的温度まで冷却してから，電気エネルギーを加えて昇温させ，昇温に要したエネルギー量から熱容量を得る．本研究の IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液の熱容量測定は冷却方法の異なる 2 種類の試料について行った．これは，急冷（1 K min^{-1}）した試料の場合には，200 K < T < 240 K の温度域で発熱が観測されたためである．この発熱は準安定状態にある試料の自発的な安定化によるものと考えられる．準安定状態だけでなく，安定状態にある試料を得るために，アニール処理と呼ばれる手法を行った．アニール処

理とは，発熱が観測された温度で準安定な試料を断熱状態に保ち，発熱が収まるまで放置することで安定状態の試料を得る手法である．ここでは急冷によって得た準安定状態の試料（急冷試料）と，アニール処理によって得た安定状態の試料（アニール処理試料）の熱容量測定を行った．以下に具体的な測定手順を記す．

・急冷試料：クライオスタットの内部真空容器と外部真空容器に気体 He を伝導ガスとして導入し，液体 N_2 に浸されたクライオスタットからの熱伝導によって試料を冷却した．80 K まで冷却後，気体 He を回転ポンプと拡散ポンプでクライオスタット内の圧力が 1 mPa になるまで排気した．排気後に液体 He を導入し，気体 He を熱伝導ガスとして内部真空容器にのみ導入することで，5 K 近傍まで試料を冷却した．再び熱伝導ガスをクライオスタット内が 1 mPa になるまで排気し，温度制御が安定してから測定を開始した．

アニール処理試料：急冷試料と同様の手順で 80 K 以下の温度まで試料を冷却した．80 K まで冷却した後，ポンプで気体 He を排気し，クライオスタット内の温度制御を行った．急冷試料で最大の発熱が観測された温度まで昇温し，発熱が収まるまで温度をモニターした（発熱が収まるまで 6 h 以上）．発熱が収まった後，再度急冷試料と同じ手順で 5 K まで冷却し，測定を開始した（図 2–7）．



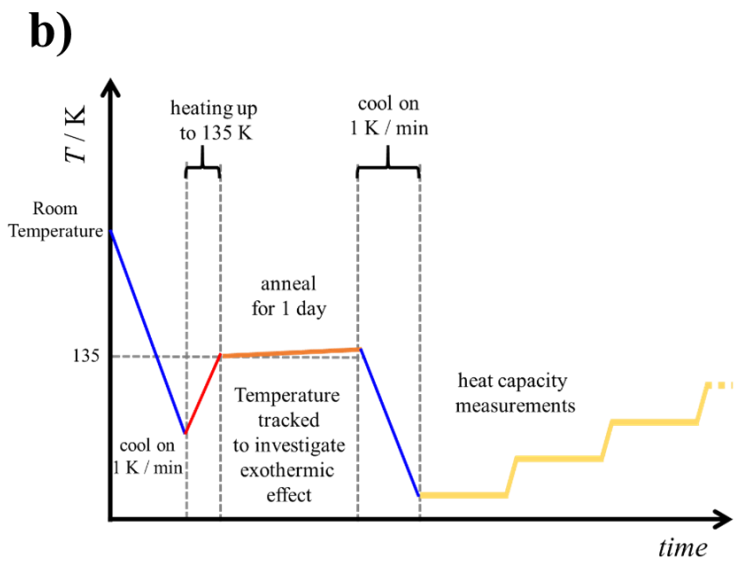


図 2–7　急冷試料（a）とアニール処理試料（b）の測定スキーム．縦軸を温度，横軸を時間で示す．青実線：冷却過程，赤実線：加熱過程，オレンジ実線：アニール処理，黄実線：測定過程．

3. Results

3–1．IgG 水溶液の熱容量，d*T*/d*t*，不凍水量

3-1-1．IgG 水溶液の熱容量

図 3－1 に 5，10，20，50，80，90，95，100%の溶質濃度の IgG 水溶液の熱容量結果を示す（5 < *T* < 300 K）．熱容量は IgG 水溶液 1 g 当たりに規格化した．50%以下の濃度について，○はアニール処理をしてから冷却した試料の熱容量，▲が 80%以上の濃度における試料の熱容量である．比較のために，図中に乾燥 IgG 試料 1 g 当たりの熱容量を実線で，純粋な H_2O の 1 g 当たりの熱容量を破線で示した．

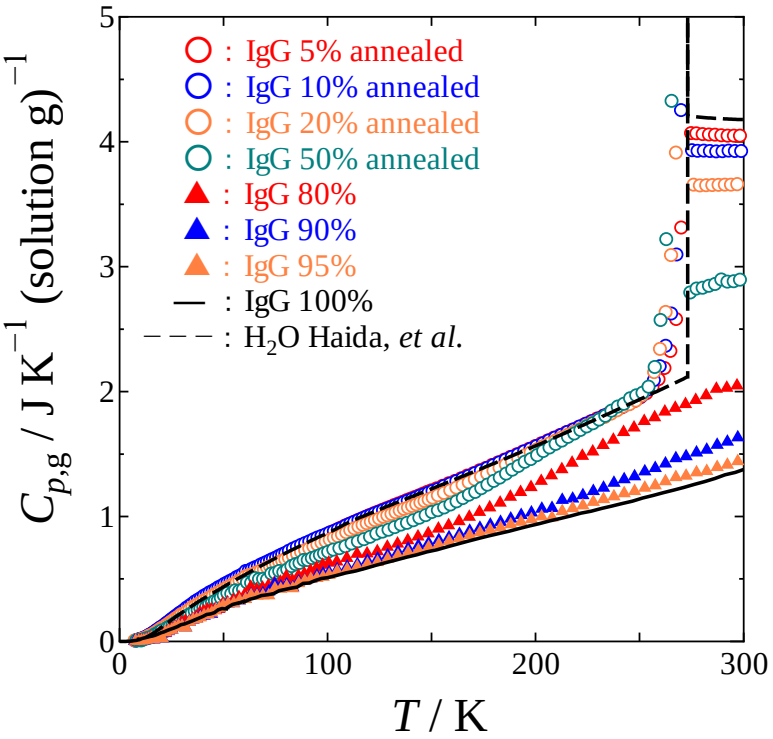


図 3–1　IgG 水溶液 1 g 当たりの熱容量．○：5，10，20，50%の IgG 水溶液におけるアニール処理試料，▲：80%以上の濃度における急冷試料．実線：乾燥 IgG 試料（100%），破線：純粋な H_2O.

IgG 水溶液の熱容量についての結果を，温度域ごとに説明する：①*T* < 150 K，②150 K < *T* < 250 K，③250 K < *T* < 300 K.

①T < 150 K

図 3–2 に，T < 150 K における各濃度の IgG 水溶液 1 g 当たりの熱容量を示す．IgG 水溶液の熱容量は, IgG の濃度上昇に伴って六方晶氷の熱容量から乾燥 IgG 試料の熱容量に近づいている．この温度域では，六方晶氷と乾燥 IgG 試料との間に熱容量の加成性が成り立っていた．言い換えると，IgG 分子と水分子との間の相互作用による熱容量への寄与は，この温度域では観測できるほど大きくないと考えられる．

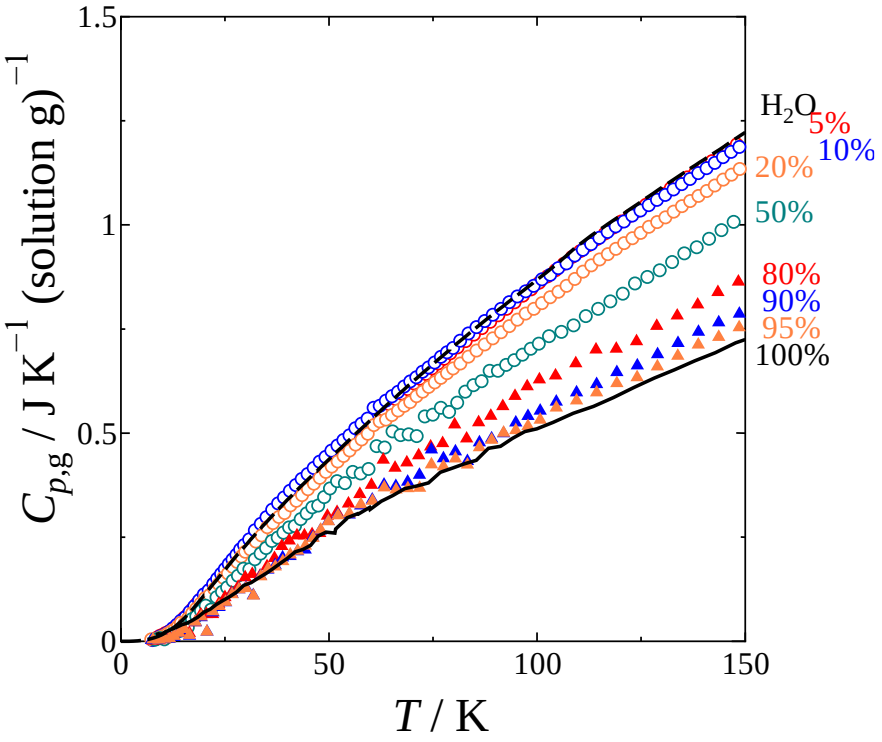


図 3–2　T < 150 K における IgG 水溶液 1 g 当たりの熱容量．○：5-50%の濃度におけるアニール処理試料，▲：80-95%の濃度における急冷試料．実線 : IgG 乾燥試料，破線 : 純粋な H_2O.

②150 K < T < 250 K

図 3–3 に，150 K < T < 250 K における各濃度の IgG 水溶液の熱容量を示す．5–80%の IgG 水溶液の熱容量は温度の上昇とともに六方晶氷の熱容量の値に向かって緩やかに近づいた．また，90%，95%についても，T < 150 K における熱容量の挙動とは異なり，単純な六方晶氷と乾燥 IgG 試料の加成性から外れた熱容量の増加が観測された．この温度域における IgG 水溶液の熱容量は濃度に対して非線形であるため， IgG 分子と水分子の相互作用に由来する過剰熱容量が寄与していると考えられる．

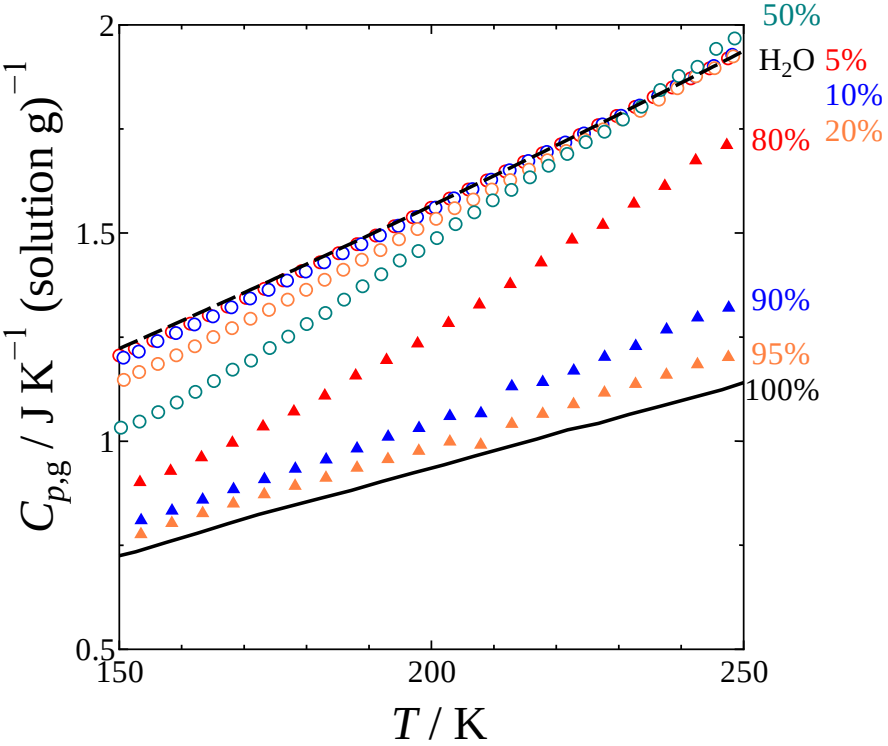


図 3–3　150 K < T < 250 K における IgG 水溶液 1 g 当たりの熱容量．○：5–50%の濃度におけるアニール処理試料，▲：80–95%の濃度における急冷試料．実線：IgG 乾燥試料，破線：純粋な H_2O.

③250 K < T < 300 K

図 3–4 に図 3–1 の 250 K < T < 300 K の温度域におけるすべての濃度についての IgG 水溶液の熱容量測定結果を抽出して示す．濃度毎に熱容量の挙動に差が見られたので，各濃度について説明する．

・5，10，20，50%

図 3–4 の 5-50%の濃度について，273 K 近傍で IgG 水溶液の熱容量が発散する一次相転移が観測された．系の成分に含まれている水の量と相転移温度から，この一次相転移は過剰に存在する六方晶氷の融解と考えられる．融解の温度域では熱容量は再び濃度に対して線形的に変化していることから， IgG 分子と水分子の相互作用は，融解後では相対的に小さくなっていると考えられる．

・80，90，95%

80–95%の濃度の IgG 水溶液について，他の濃度のような一次相転移は観測されず，熱容

量は連続的に増加した．融解による相転移が観測されていないことから，80–95%の IgG 水溶液に含まれている水は，不凍水になっていると考えられる．

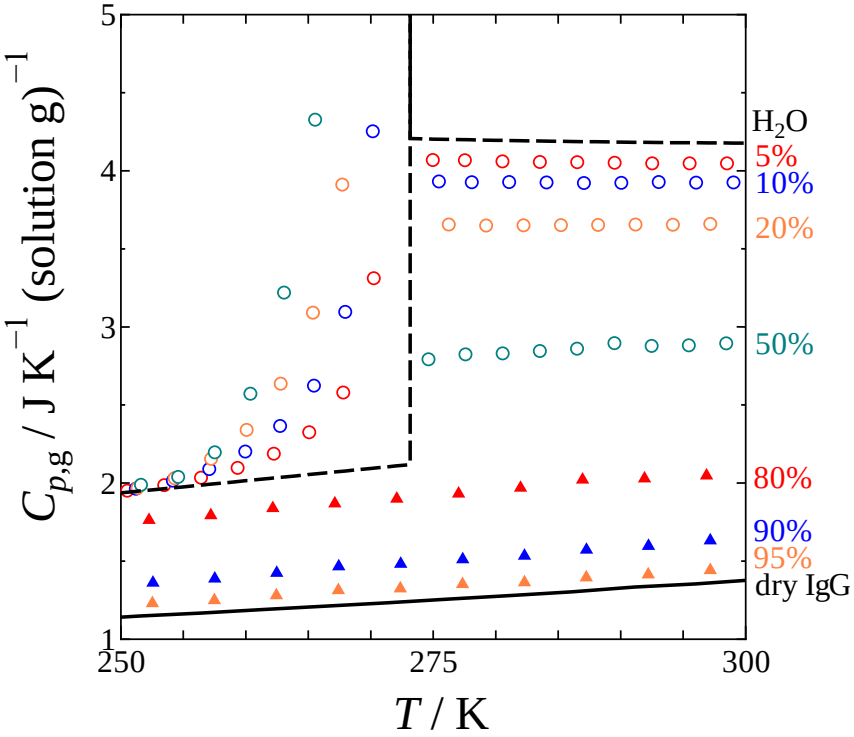


図 3–4　250 K < T < 300 K における IgG 水溶液 1 g あたりの熱容量．○：5–50%の濃度におけるアニール処理試料，▲：80–95%の濃度における急冷試料．実線：IgG 乾燥試料，破線：純粋な H_2O.

断熱法による熱容量測定では自発的温度ドリフト（dT/dt）から得られるデータにも情報が含まれていることを Experimental で述べた．dT/dt は断熱法のタイムスケール（100 s < t < 10000 s）において，非平衡状態または相転移の途上にある状態を検知できるからである．IgG 水溶液系における非平衡状態や相転移機構を調べるために，温度域ごとの dT/dt について説明する．

図 3–5 に 5%IgG 水溶液における dT/dt の温度依存性，図 3–6 に 5–95%の各濃度について，IgG 水溶液における dT/dt の温度依存性を示す．図 3–6 の各濃度の dT/dt は見やすくするために値を 20 μK s^{-1} ずつ上方へシフトさせている．dT/dt が単調に変化している温度域の dT/dt のゼロからのズレは，測定条件に由来するものと考えることができる，試料固有の発吸熱現象は dT/dt の不連続な変化として現れる．60 K 以下の温度における dT/dt は，議論に関係のない領域なので除いた．

①80 K < *T* < 110 K：プロトンガラス

図 3–5 の 5%IgG 水溶液の d*T*/d*t* について説明する．急冷試料とアニール処理試料の両試料について，80 K < *T* < 110 K の温度域で，昇温中に試料が発熱した後，さらなる昇温で吸熱に転じる現象が観測された．この d*T*/d*t* の発吸熱のふるまいはガラス転移のエンタルピー緩和に特有のものであるため，この温度域ではガラス転移が起こっていることを意味している．図 3–6 における濃度毎の d*T*/d*t* の結果を比較すると，このガラス転移は IgG の濃度が増加するにしたがい観測されなくなる．d*T*/d*t* の濃度依存性から，試料中の六方晶氷の量がガラス転移に関係していると考えられる．純粋な六方晶氷はこの温度域においてプロトンガラスと呼ばれるガラス化現象が起こることが知られている[34]ため，この測定で観測されたガラス転移は六方晶氷におけるプロトンガラスであったことが示唆された．

②220 K < *T* < 255 K：中間水の結晶化

図 3–5 の 5% IgG 水溶液の急冷試料において，220 K < *T* < 255 K の温度域で発熱が観測された．また，同図のアニール処理試料については同じ温度域で発熱は観測されなかった．この温度域では，急冷試料では準安定状態にあった系がこの温度域で発熱を伴って安定化したのに対し，アニール処理試料では系が安定状態にあるために急冷試料のような発熱が起こらなかったと考えられる．図 3–6 でこの温度域における IgG 水溶液の d*T*/d*t* を各濃度について調べると，5–50%の濃度では図 3–5 と同じ傾向の d*T*/d*t* 挙動が観測された．しかし，80–95%の濃度では発熱が観測されなかった（不凍水によるものではない）こと，また六方晶氷や乾燥 IgG 試料にもこのような発熱は観測されないことは, 5–50%の急冷試料で観測された発熱現象は IgG 分子, 六方晶氷, 不凍水以外の寄与によるものであることを意味している．この温度域で準安定な相として考えられるのは，過冷却した水の存在が考えられる．

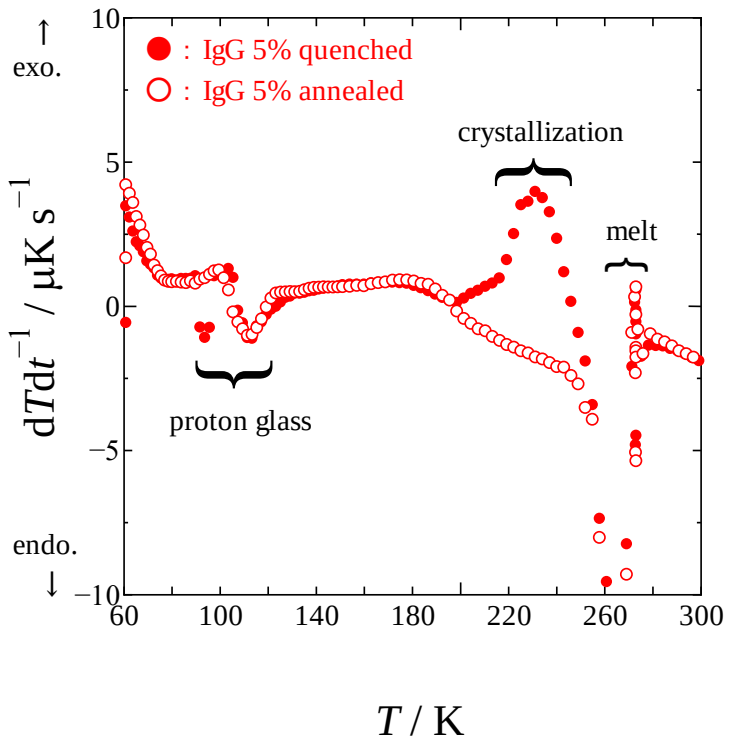


図 3–5　5%IgG 水溶液についての自発的温度ドリフト（60 K < T < 300 K）．●：急冷試料，○：アニール処理試料．

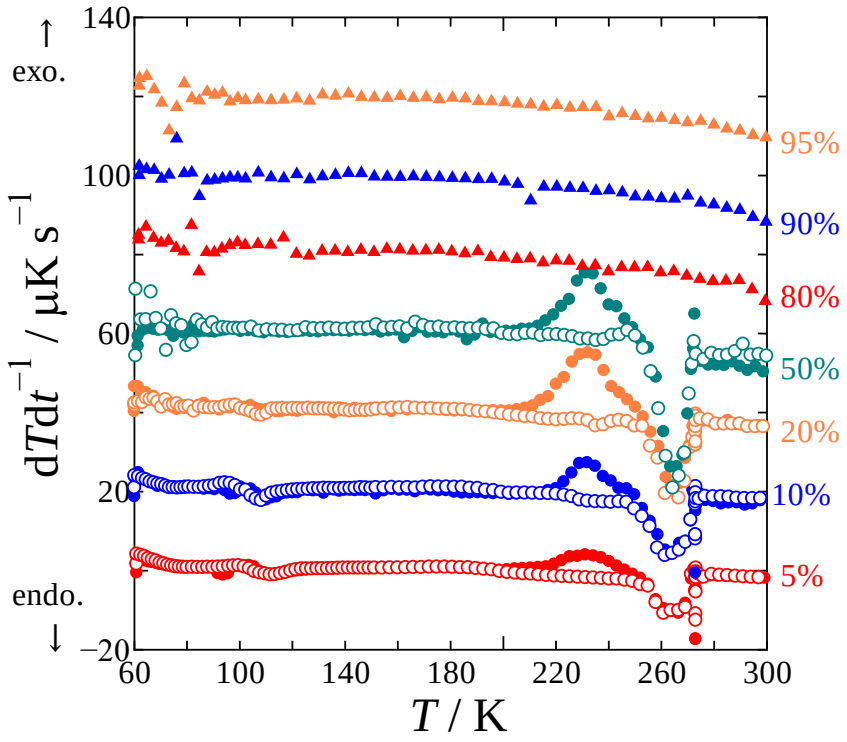


図 3–6　各濃度における IgG 水溶液の自発的温度ドリフト（60 K < T < 300 K）．●：5–50%における急冷試料，○：5–50%におけるアニール処理試料，▲：80–95%における急冷試料．

3-1-2. IgG 水溶液の不凍水量

タンパク質水溶液系は，低温では氷の六方晶相と濃縮タンパク質水溶液相とに相分離していると考えられる．試料調製で水の全量は既知なので，六方晶相の融解に由来する融解エンタルピーを算出すれば，濃縮相に存在する水の量（＝不凍水量）を導出できる．この方法に則り，以下で IgG 水溶液における不凍水量を，低濃度試料のアニール処理試料について算出した．急冷試料を用いなかったのは，準安定相が存在している分，不凍水量が変化するためである．

不凍水量の導出例として，図 3–7 に 5%IgG 水溶液のアニール処理試料（○）の融点近傍の熱容量を示す．熱容量は試料とセルの熱容量の和を用いた．図中の破線は，融解中の試料とセルの熱容量（融解以外の寄与）を補外したベースラインである．試料の融点を熱容量が最大になる温度に定義した（5%は T_{trs} = 273.12 K）．試料+セルのエンタルピーの測定値から，試料+セルの熱容量のベースラインから求めた融解以外の寄与を差し引くことで求められた．さらに，補正として計算に使われた温度域における dT/dt と熱容量の値から，試料+セルから流入または流出する熱量を計算した．

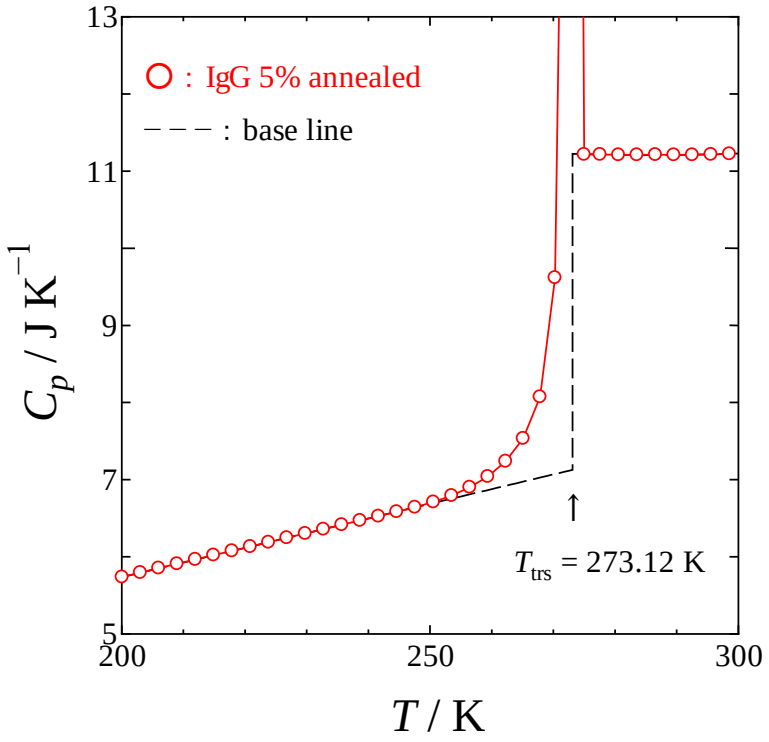


図 3–7　IgG5%水溶液の徐冷試料＋セルの熱容量．試料の融点（T_{trs}）と試料とセルの熱容量の補外値（ベースライン；点線）を図中に示した．

5-50%試料における六方晶相の融解エンタルピーは，以下の式で算出した．単位は全てジュールである．

$$\Delta H_{\mathrm{fus}} = \sum_{T}\left(\Delta E + C_p^{\mathrm{assume}} \times \frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}t}\right) - \int_{T_{\mathrm{i}}}^{T_{\mathrm{f}}} C_p^{\mathrm{base}}\mathrm{d}T \qquad \cdots (3\text{–}1)$$

ここで，ΔH_{fus} は I_h 相の融解エンタルピー，$\Delta E\ (T)$は各温度において試料セルに加えられた電気エネルギー，C_p^{assume} は融解中の試料＋セルの仮想的な熱容量，$\mathrm{d}T/\mathrm{d}t$ は自発的温度ドリフト，C_p^{base} はベースラインの熱容量である．ΔH_{fus} は融解が開始した温度（T_i）から融解が終了した温度（T_f）まで，試料とセルに加えられた電気エネルギーを積算した量から，融解以外の寄与（C_p^{base}，C_p^{assume}）によるエンタルピーを減じて計算した．

決定したΔH_{fus} から融解した六方晶相における水の量が求められるので，濃縮相にある不凍水量（$n_{hydration}$）が以下の式で導出される．

$$n_{\mathrm{hydration}}\ /\mathrm{mol} = n_{\mathrm{solvent}}\ /\mathrm{mol} - \frac{\Delta H_{\mathrm{fus}}\ /\ \mathrm{J}}{\Delta H_{\mathrm{m}}^{\mathrm{fus}}/\ \mathrm{J\ mol^{-1}}} \qquad \cdots (3\text{–}2)$$

ここで，$n_{solvent}$ は試料調製の時に使用した水の全量，ΔH_m^{fus} は氷のモル融解エンタルピーである．一般的に，不凍水量は溶質 1 g 当たりの質量（m_{hyd}）で議論されるので，

$$m_{\mathrm{hyd}}\ /\ \mathrm{g\ (solute\ g)^{-1}} = \frac{n_{\mathrm{hydration}}\ /\ \mathrm{mol} \times M_{\mathrm{water}}\ /\ \mathrm{g\ mol^{-1}}}{m_{\mathrm{solute}}\ /\ \mathrm{g}}. \qquad \cdots (3\text{–}3)$$

M_{water} は水の分子量，m_{solute} は溶質の質量である．全ての濃度に対して得られた不凍水量を図 3-8 および表 3–1 にまとめて示す．80%以上の試料については，融解が起こらないので，不凍水量と溶媒の水の量が等しいとした．また，比較として Lysozyme 水溶液の熱容量測定[5]から得られた不凍水量の濃度依存性も載せた．

表 3–1　IgG 水溶液の不凍水量（1 g の溶質当たりの質量）．

濃度	**m_{hyd} / g (IgG g)$^{-1}$**
0.049982 (5%)	0.324±0.002
0.10025 (10%)	0.347±0.005
0.19974 (20%)	0.36±0.01
0.49931 (50%)	0.379±0.002
0.80532 (80%)	0.242
0.90247 (90%)	0.108
0.95303 (95%)	0.049

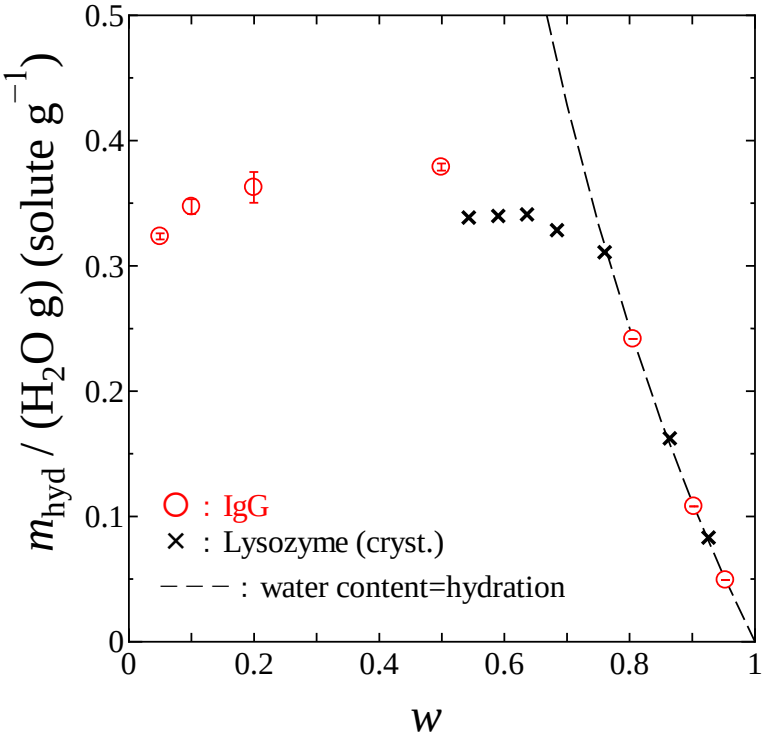


図 3-8　IgG 水溶液の不凍水量の濃度依存性．○ : IgG，× : Lysozyme[5]，破線 : 含水量が不凍水量と等しい場合の理論曲線．

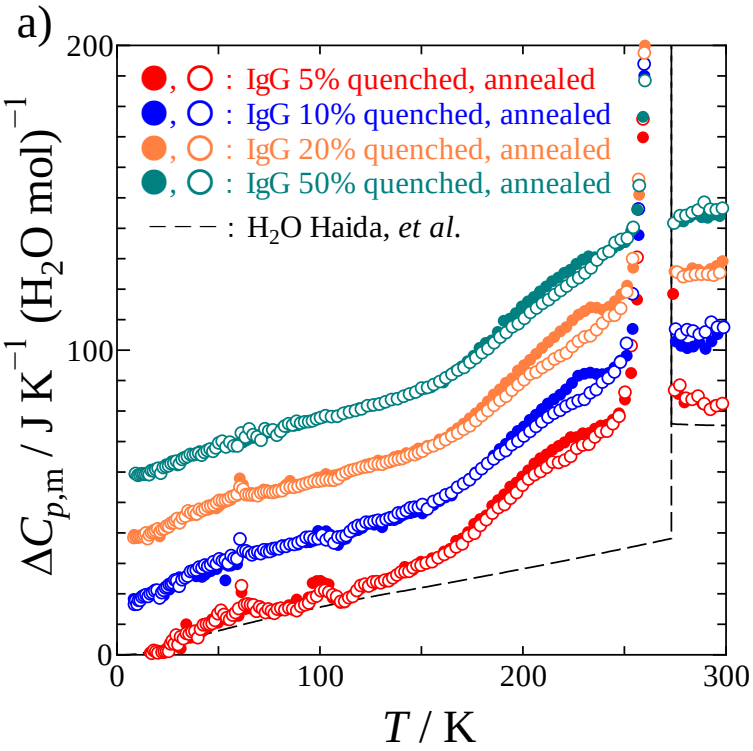
IgG 水溶液の濃度が高い領域（80-95%）では，含水量と不凍水量は等しいため，不凍水量の濃度依存性は破線上にのる．IgG 濃度が低くなるにつれて不凍水量は理論線から外れ，50%試料で最大になった後に少しずつ減少した．Lysozyme 水溶液の不凍水量の濃度依存性と比較すると，20，50%の IgG 水溶液のほうが Lysozyme 水溶液よりも大きな値だが，濃度がさらに薄くなるとほぼ同程度の値になった．IgG 水溶液の不凍水量は，ほかのタンパク質水溶液[5, 8, 20]から決定した水和水量（0.3 ~ 0.5 g per protein g）と同程度の値となっているため，濃縮相に存在する不凍水は水和水であると考えられる．以後，氷の融解から導出した不凍水は全て水和水と呼ぶ．

3-1-3. IgG 水溶液に含まれる水和水の熱容量

IgG 水溶液の各濃度の水和水量を決定したので，試料の熱容量（図 3–1）から乾燥 IgG と純粋な水の熱容量を減じて，水和水 1 mol 当たりの熱容量（$\Delta C_{p,\mathrm{m}}$）を導出した（図 3–9a, b）．見やすさのために，図 3–9a の熱容量は，20 J K^{-1} (H_2O mol)$^{-1}$ ずつずらして示した．また，80-95%試料の図内には比較のために 50%試料を示しす（図 3–7b）．さらに比較のために

純粋な水および六方晶氷の熱容量を破線で示した．

全ての試料について，水和水の熱容量は 150 K 以下の低温では純粋な六方晶氷に近い値を示し，150 K 以上で緩やかに立ち上がりながら，300 K 近傍の室温域では 90，95%試料以外の試料で液体の水に近い値に達した．270 K 近傍における水和水の熱容量の発散は，計算において六方晶氷の融解の寄与を除去できなかったためのものである．急冷試料とアニール処理試料と比較すると，過冷却水の存在による急冷試料の水和水の熱容量の増加が確認された（190 K < T < 250 K）．90%以上の高濃度試料は，水和水量の減少に従い水和水の熱容量が減少し，純粋な六方晶氷の熱容量に近づいた．



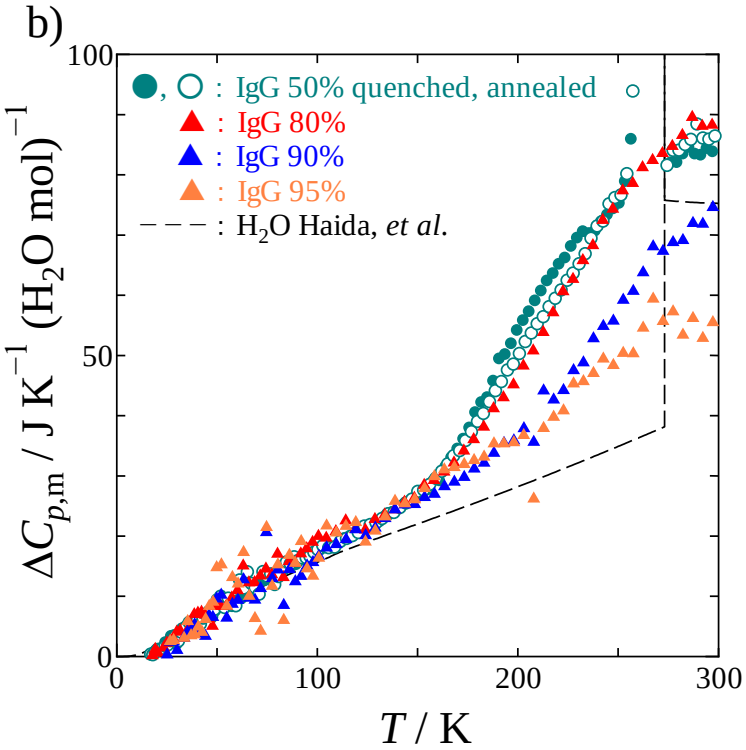


図 3–9　IgG 水溶液に含まれる水和水の熱容量．比較のために，純粋な水の熱容量を点線で示した．a)5－50%の低濃度試料における水和水の熱容量．各濃度の熱容量は，20 J K^{-1} $(H_2O\ mol)^{-1}$ ずつずらして示した．b)50－95%の試料における水和水の熱容量．

3–2．Fab・Fc 水溶液の熱容量，自発的温度ドリフト，水和水量

3-2-1．Fab・Fc 水溶液の熱容量

図 3-10 に Fab・Fc 水溶液系について，5，10，20，50，80，90，95%の各濃度の熱容量測定結果を示す（$5 < T < 300$ K）．熱容量は Fab・Fc 水溶液 1 g 当たりに規格化して示す．○は 5%–50%の濃度におけるアニール処理試料の熱容量，△は 80%の濃度におけるアニール処理試料の熱容量，▲は 90，95%の濃度における試料の熱容量とする．比較のために，図中に乾燥 Fab・Fc 試料 1 g 当たりの熱容量を実線で，純粋な H_2O 1 g 当たりの熱容量を破線で示す．

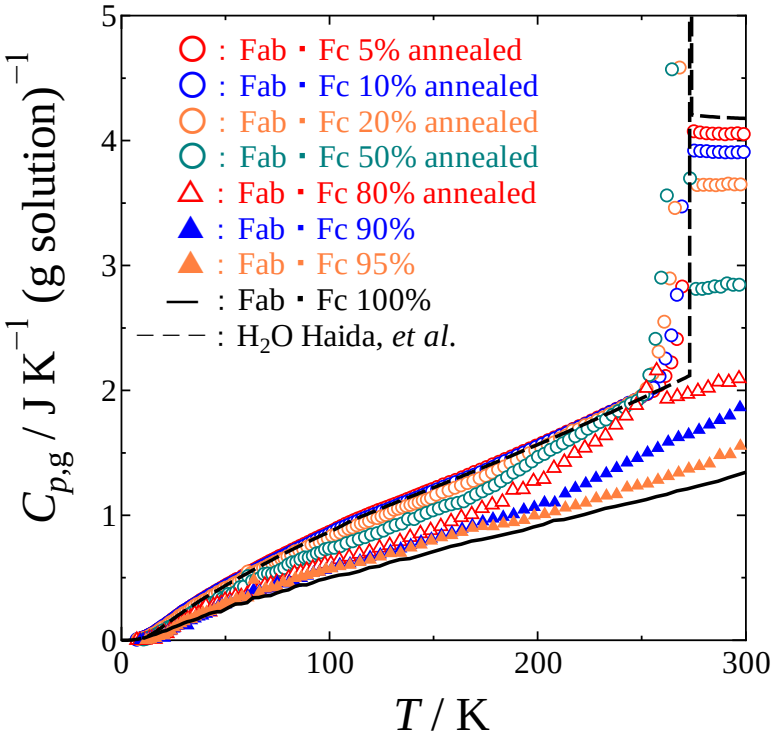


図 3–10　Fab・Fc 水溶液 1 g 当たりの熱容量．○：5–50%の濃度におけるアニール処理試料，△：80%の濃度におけるアニール処理試料，▲：90，95%の濃度における試料．実線：乾燥 Fab・Fc 試料，破線：純粋な H_2O.

Fab・Fc 水溶液の熱容量について 3 つの温度域（①T < 150 K，②150 K < T < 250 K，③250 K < T < 300 K）に分けて結果をまとめる．

①T < 150 K

図 3–11 に，T < 150 K における各濃度の Fab・Fc 水溶液 1 g 当たりの熱容量を示す．同じ温度域における IgG 水溶液の結果と同様に，この温度域では六方晶氷と Fab・Fc 分子以外の熱容量への寄与は小さいと考えられる．

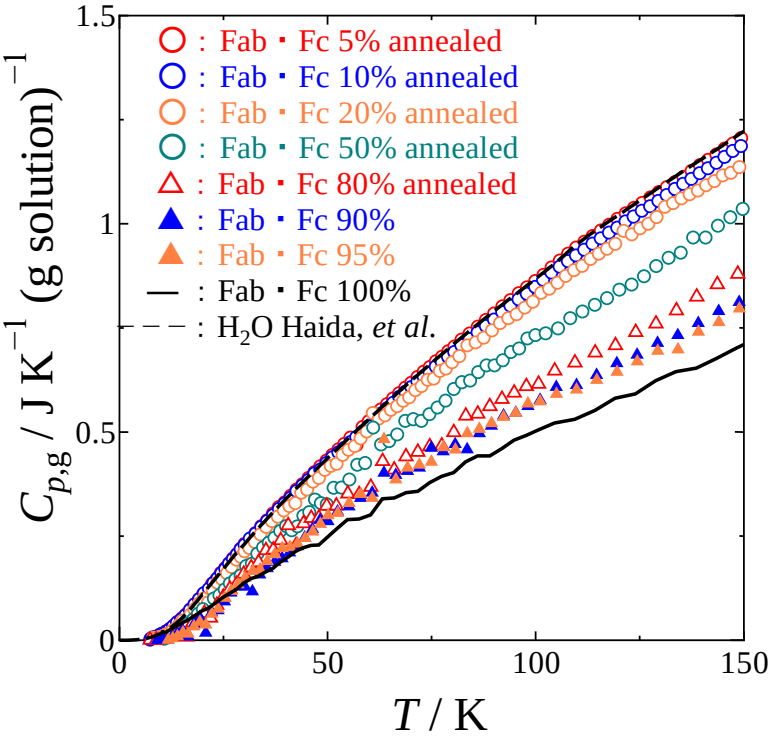


図 3–11　T < 150 K における，Fab・Fc 水溶液 1 g 当たりの熱容量．○：5～50%の濃度におけるアニール処理試料，△：80%の濃度におけるアニール処理試料，▲：90，95%の濃度における試料．実線：乾燥 Fab・Fc 試料，破線：純粋な H_2O.

②150 K < T < 250 K

図 3–12 に各濃度の Fab・Fc 水溶液の熱容量を示す（150 K < T < 250 K）．Fab・Fc 水溶液の熱容量は, 温度の上昇とともに純粋な六方晶氷の熱容量に連続的に近づいた. また, 90%, 95%についても，T < 150 K における熱容量の挙動とは異なり，単純な六方晶氷と乾燥 Fab・Fc 試料の加成性から外れた熱容量の増加が観測された．したがって，IgG 水溶液と同様に，この温度域では純粋な六方晶氷や Fab・Fc 乾燥試料に由来する寄与以外の熱容量が観測されたと考えられる．

この温度域で大きく変化する熱容量成分は，主に結晶化していない水和水によるものと考えられる．図 3–12 の 5%から 20%の低濃度では六方晶氷の成分が多いため熱容量の増大が顕著には現れず，50%，80%の中濃度では水和水の成分が相対的に多いため熱容量の増大が明確に見出せる．一方で，高濃度の 90%，95%試料では水和水が少ないため熱容量の増大が見出せてないと考えられる．

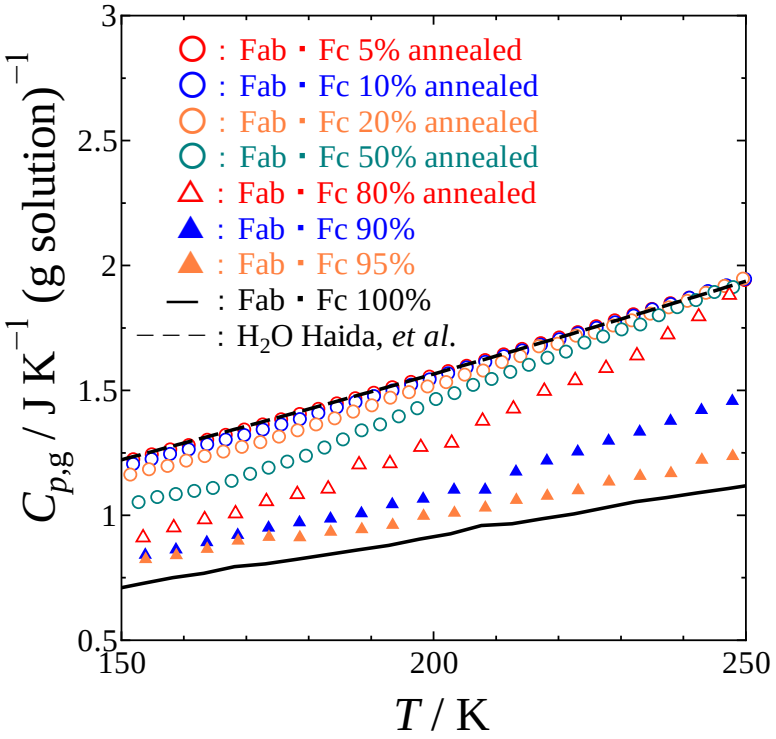


図 3–12　150 < T < 250 K における，Fab・Fc 水溶液 1 g 当たりの熱容量．○：5～50%の濃度におけるアニール処理試料，△：80%の濃度におけるアニール処理試料，▲：90, 95%の濃度における試料．実線：乾燥 Fab・Fc 試料，破線：純粋な H_2O.

③250 K < T < 300 K

図 3–13 に，250 K < T < 300 K における各濃度の Fab・Fc 水溶液 1 g 当たりの熱容量を示す．

・5，10，20，50，80%

図 3–13 の 5-50%の濃度について，273 K 近傍で Fab・Fc 水溶液の熱容量が発散する一次相転移が観測された．IgG 水溶液と同様に，この一次相転移は試料中の六方晶氷の融解によるものと考えられる．なお，IgG 水溶液と異なり，80%の Fab・Fc 水溶液の熱容量についても 260 K 付近に小さなピークが観測された．このピークは系にわずかに存在していた六方晶氷の融解と考えられる．

・90，95%

90，95%の Fab・Fc 水溶液の熱容量は温度を高くすると連続的に増加した．5–80%の試料で観測されたような六方晶氷の融解は観測されなかったことから，90，95%の試料に含まれ

る水は，すべて水和水と考えられる．

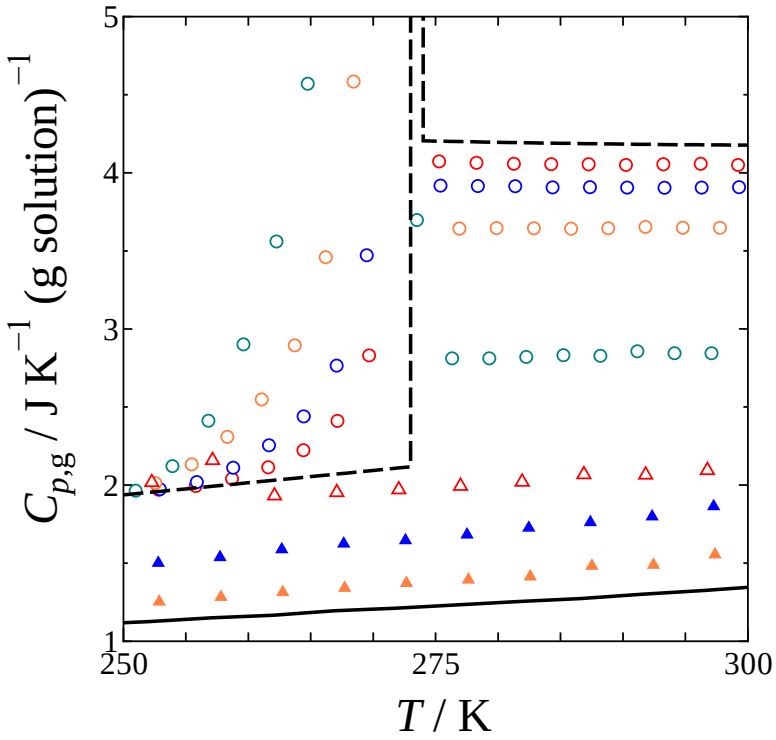


図 3–13　250 < T < 300 K における，Fab・Fc 水溶液 1 g 当たりの熱容量．○：5–50%の濃度におけるアニール処理試料，△：80%の濃度におけるアニール処理試料，▲：90, 95%の濃度における試料．実線：乾燥 Fab・Fc 試料，点線：純粋な H_2O.

3-2-2.　Fab・Fc 水溶液の不凍水量

Fab・Fc 水溶液の融解熱から，IgG 試料と同様の計算で Fab・Fc 1 g あたりの不凍水量，m_{hyd} を導出し，結果を表 3–2 にまとめた．また，Fab・Fc 水溶液における m_{hyd} を図 3–14 に示す．Fab・Fc 水溶液の m_{hyd} は 10%で最大となったが，5，20，50%濃度には濃度依存性が見出せなかった．　IgG および Lysozyme 水溶液の不凍水量と比較して，Fab・Fc 水溶液の不凍水量が少ないが，Fab・Fc 水溶液の不凍水量は他のタンパク質水溶液と近い値（0.3 ~ 0.5 g per protein g）になっている．

表 3–2　Fab・Fc 水溶液の水和水量（Fab・Fc 1 g 当たり）．

濃度	m_{hyd} / g (Fab・Fc g)$^{-1}$
0.049923 (5%)	0.30±0.01

0.099648 (10%)	0.35±0.01
0.20049 (20%)	0.304±0.005
0.50083 (50%)	0.294±0.003
0.80090 (80%)	0.235
0.89870 (90%)	0.113
0.94980 (95%)	0.053

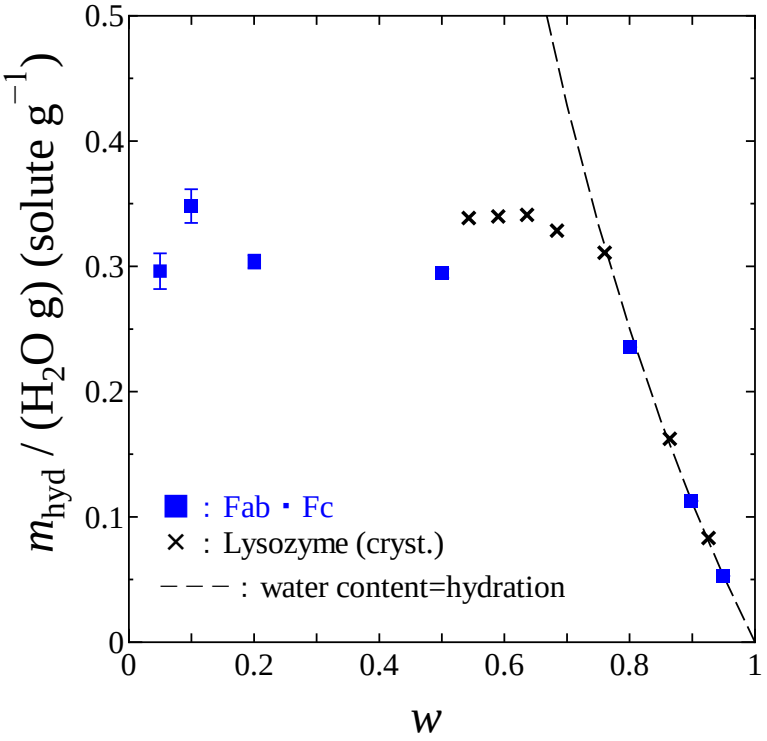


図 3–14　IgG 水溶液（○）または Fab・Fc 水溶液（■）の濃度別の水和水量（溶質 1 g 当たり）．破線は含水量＝水和水量とした場合の理論曲線．

3-2-3. Fab・Fc 水溶液の自発的温度ドリフト

図 3–15 に 10%Fab・Fc 水溶液の急冷試料（●，▲）とアニール処理試料（○，△）についての，自発的温度ドリフト d*T*/d*t* の測定結果を示す（60 K < *T* < 300 K）．図 3–16 に d*T*/d*t* の結果を各濃度について示す．図 3–16 の結果は，見やすくするために濃度毎に値を 20 μK s^{-1} シフトしている．d*T*/d*t* が単調に変化している温度域は，測定条件に由来するもので，特殊な現象は d*T*/d*t* のゼロからのずれに現れる．

Fab・Fc 水溶液の d*T*/d*t* について 3 つの温度域（①80 K < *T* < 110 K，②220 K < *T* < 255 K，

③260 K < T < 275 K）に分けて結果を詳細に述べる．

①80 K < T < 110 K：プロトンガラス

図 3–15 の 10%Fab・Fc 水溶液における急冷試料とアニール処理試料の両試料について，80 K < T < 110 K の温度域で，高温側に吸熱を伴う発熱が観測された．IgG 水溶液の場合と同様に，この現象はプロトンガラスによるものと考えられる．図 3–16 の dT/dt は IgG 水溶液の結果と同様の傾向であり，六方晶氷のプロトンガラスであることを示している．

②220 K < T < 255 K：過冷却水の結晶化

図 3–15 より，この温度域における 5-80%の急冷試料では発熱が観測された．一方で，アニール処理試料で発熱は観測されなかった．IgG 水溶液の場合と同様に，この温度域では Fab・Fc 水溶液の過冷却水が結晶化したために発熱が観測されたと考えられる．

③260 K < T < 275 K：六方晶氷の融解

図 3–16 より 5–80%の濃度で吸熱現象が観測された．この温度域における Fab・Fc 水溶液の熱容量が発散していたことから，IgG 水溶液と同様に六方晶氷の融解が観測されたと考えられる．

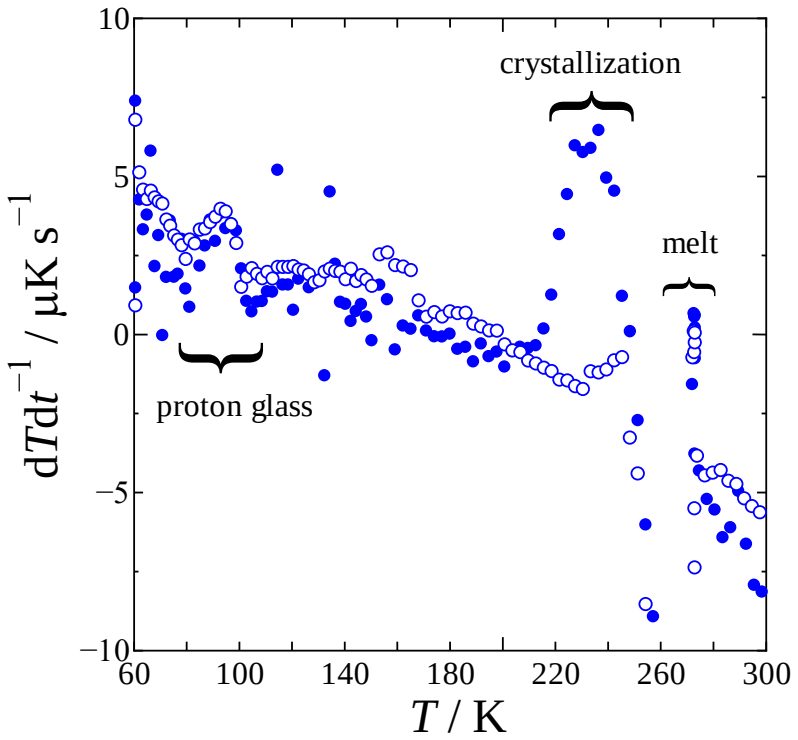


図 3–15　10%Fab・Fc 水溶液の急冷試料（●）とアニール処理試料（○）についての自発的温度ドリフト（60 K < T < 300 K）.

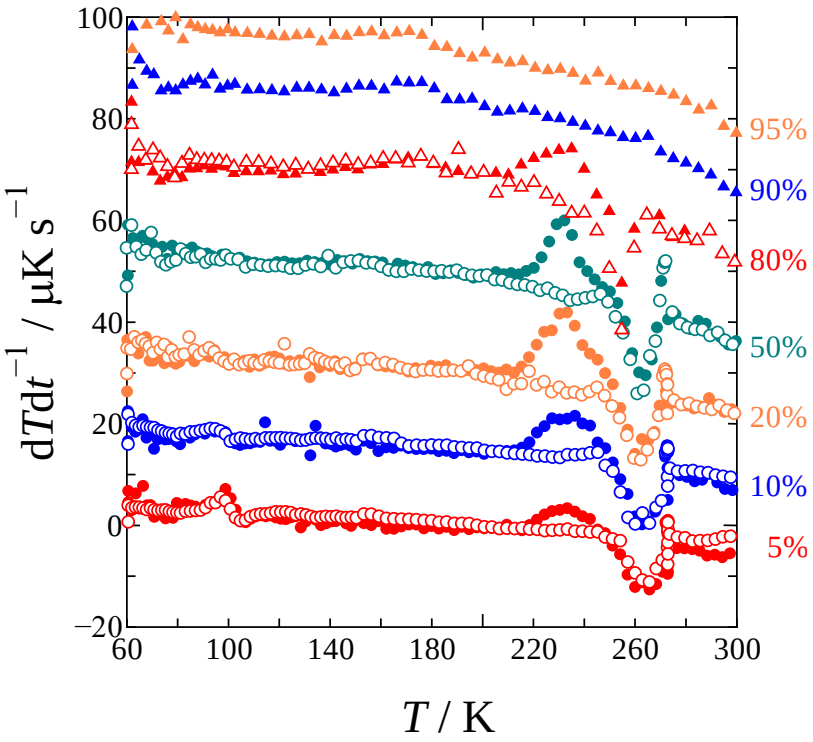


図 3–16　5，10，20，50，80，90，95%の Fab・Fc 水溶液の自発的温度ドリフト（60 K < T <300 K）．●，▲：各濃度における急冷試料，○，△：各濃度におけるアニール処理試料.

3-2-4.　Fab・Fc 水溶液に含まれる水和水の熱容量

各濃度の水和水量を導出したので，IgG で行った計算と同様に Fab・Fc 水溶液における水和水の熱容量（$\Delta C_{p,\mathrm{m}}$）を導出した．図 3–17 に 5-90%の急冷試料とアニール処理試料における Fab・Fc 水溶液の水和水の熱容量を示す．比較のために純水の熱容量を破線で示した．95%試料は系統誤差が大きかったために本研究では触れない.

Fab・Fc 水溶液の水和水量は，150 K 以下の温度域では IgG 水溶液同様に，濃度によらず六方晶氷に近い値であった．IgG 水溶液の水和水の熱容量に濃度依存性があるのに対し，Fab・Fc 水溶液の水和水の熱容量には濃度依存性が見出せなかった．90%試料の

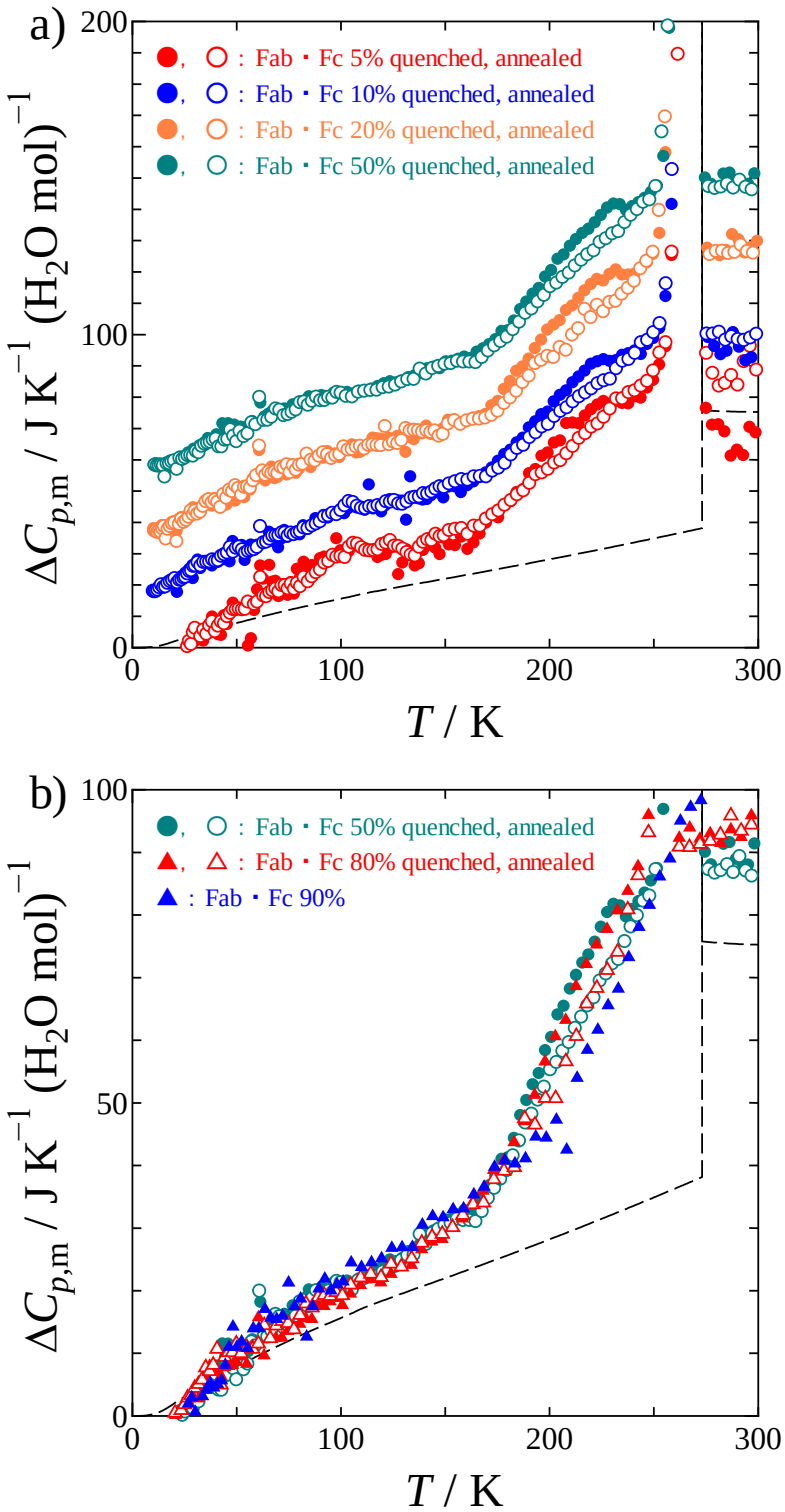

a)
●, ○ : Fab・Fc 5% quenched, annealed
●, ○ : Fab・Fc 10% quenched, annealed
●, ○ : Fab・Fc 20% quenched, annealed
●, ○ : Fab・Fc 50% quenched, annealed
ΔCp,m / J K−1 (H2O mol)−1
T / K
0
100
200
300
b)
●, ○ : Fab・Fc 50% quenched, annealed
▲, △ : Fab・Fc 80% quenched, annealed
▲ : Fab・Fc 90%
ΔCp,m / J K−1 (H2O mol)−1
T / K
0
50
100
200
300

図 3–17　Fab・Fc 水溶液に含まれる水和水の熱容量．(a) 5-50%の Fab・Fc 水溶液における水和水の熱容量．●，▲：急冷試料，○：アニール処理試料．比較のために純水の熱容量を破線で示した．

①T < 150 K

まず，50%と 90%について比較する．この温度域では，モル熱容量の値が 50%と 90%でほぼ一致した．前述した dT/dt の結果から，90%には中間水からの寄与がないことが確認されているため，この領域では水和水と Fab・Fc 分子からの熱容量への寄与しかないと結論付けた．

次に，H_2O と Fab・Fc 水溶液濃縮相のモル熱容量を比較する．50%と 90%の Fab・Fc 水溶液濃縮相のモル熱容量は，六方晶氷のモル熱容量と比較して大きい値であった．この温度域では中間水は水和水と同質であるため，モル熱容量の増加が水和水と Fab・Fc 分子からの寄与によるものであると考えられる．

②150 K < T < 250 K

1）50%または 90%の濃縮相と六方晶氷を比較する．この温度域では，50%，90%の Fab・Fc 水溶液濃縮相の熱容量が六方晶と比べて急激かつ連続的に増加し，純水の液相よりも大きな値に達した．この結果は水和水や中間水の状態が，固体に近い状態から液体に近い状態に連続的に変化したことを示唆している．また，それに伴う Fab・Fc 分子と水和水の協同的運動からの寄与も含まれていると考えられる．

2）50%の急冷試料とアニール処理試料のモル熱容量について比較する．200 K から急冷試料ではモル熱容量の増加が見出された．さらに高温では，急冷試料におけるモル熱容量が 235 K をピークとして減少してアニール処理試料と同じ値になった．同じ温度域において，急冷試料における dT/dt の結果から，中間水の結晶化が起こっている．したがって，この温度域における急冷試料とアニール処理試料の熱容量差は中間水に由来する熱容量と考えられる．

3）50%と 90%試料のモル熱容量について比較する．50%のアニール試料と 90%試料では，同じ水和水と Fab・Fc 分子からの寄与にもかかわらず，値が少し異なっている．この熱容量差は IgG 水溶液系で見られた差と比べるとわずかであり，IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水に違いがあると考えられる．

③250 K < T < 300 K

1）50%試料について，融点より低い温度域（250 K < T < 273 K）では急冷試料とアニール処理試料において熱容量に鋭いピークが見出せる．これは濃縮相の熱容量の導出過程で，六方晶氷の pre-melting による熱容量の増大を計算に含めていないため現れている見かけ上の

ものである．

2）50%試料について，融点より高い温度域（$T > 274$ K）では水和水の熱容量が純水の熱容量と比較して大きな値になる．また，熱容量の温度に対する傾きも融点より低い温度域と比較して緩やかである．

3）この温度域における 50%試料と 90%試料の熱容量を比較する．50%試料では六方晶氷の融解に伴って熱容量が温度上昇に対して変化しないことに比べ, 90%試料の熱容量は温度上昇に伴って増大し続ける．

自由水が存在する 50%試料において，$T > 274$ K では，Fab・Fc 分子と水分子が均質に混合している．$T < 273$ K における濃縮相と異なり，Fab・Fc 分子間の距離が広いため，Fab・Fc 分子は孤立していると考えられる．したがって，Fab・Fc 分子と結合した水和水は他の Fab・Fc 分子と結合した水和水と相互作用していないと考えられる．一方，90%試料では濃縮相のままなので，Fab・Fc 分子間の距離が短く，$T > 274$ K でも濃縮相としての熱容量が観測されていると考えられる．

4. Discussion

4-1. IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水量の比較

図 4-1 および表 4-1 に IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液に存在する水和水量の濃度依存性を示す．自由水が存在する 50%以下の濃度では，Fab・Fc 水溶液の水和水量が減少する傾向が見出された．また，IgG 水溶液の水和水量は 50%で最大値をとるが，Fab・Fc 水溶液の水和水量は 10%を除いて 50%まで大きく変化しなかった．80%以上の高濃度域で，IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の両方で，濃度増加に伴う水和水量の減少を見出した．また，80%以上の濃度では，水和水量は IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液で一致した．

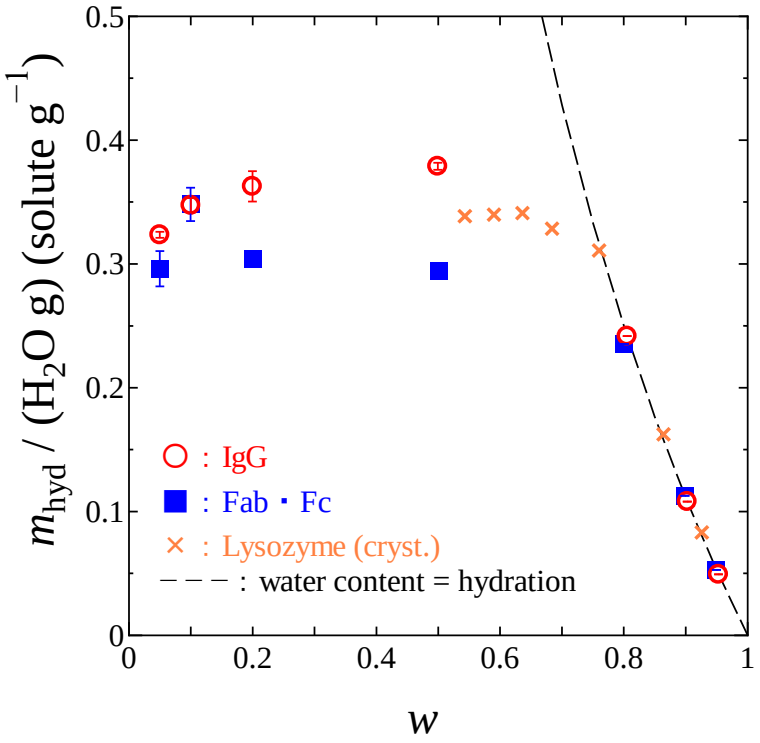


図 4-1　IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水量の濃度依存性（溶質 1 g 当たりの水和水の質量）．○：IgG 水溶液，■：Fab・Fc 水溶液，×：Lysozyme 水溶液[5]，破線：試料中の水の成分がすべて水和水で構成されている場合の理論線．

表 4-1　IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液に存在する水和水量．

IgG 濃度	m_{hyd} / g (IgG g)$^{-1}$

0.049982 (5%)	0.324
0.10025 (10%)	0.347
0.19974 (20%)	0.363
0.49931 (50%)	0.379
0.80532 (80%)	0.242
0.90247 (90%)	0.108
0.95303 (95%)	0.049
Fab・Fc 濃度	**m_{hyd} / g (Fab・Fc g)$^{-1}$**
0.049923 (5%)	0.296
0.099648 (10%)	0.348
0.20049 (20%)	0.304
0.50083 (50%)	0.294
0.80090 (80%)	0.235
0.89870 (90%)	0.113
0.94980 (95%)	0.053

これまで研究されてきたタンパク質水溶液系において，最大の水和水量は変性によって増加することが知られている[1, 2]．これはタンパク質分子が変性した結果，水に対して露出する表面積が増えるためと考えられてきた．本研究で取り扱った局所的な変性でも，変性に伴って水和水量が増加すると予想されていたが，実験結果は逆に減少する傾向を示した．したがって，IgG 分子の局所的な変性による水和水量の変化は，よく知られているタンパク質分子の folding-unfolding の構造転移による水和水量の変化と異なる機構を考える必要がある．以下で，IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水量の差がどのような機構に由来するものか考察する．

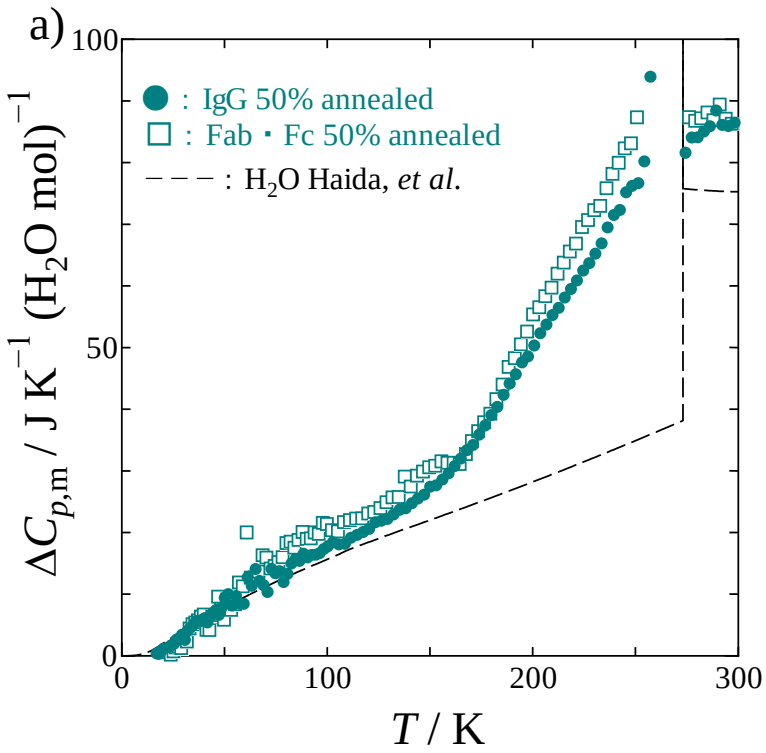
表 4-2 に水和水量の差（Δm_{hyd}），Δm_{hyd} の水が占める溶質 1 分子当たりの体積（ΔV_{hyd}），そしてΔV_{hyd} と同じ体積の円の半径（R_{hyd}）を示す．IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液における水和水量の差は，0.028–0.084 (H_2O g) / (solute g)であり，これは水和水の密度を純水と同じ（1 g cm^{-3}）と仮定すると，1 溶質分子あたり 7.0 ~ 21 nm^3 の体積を占める計算になる．この体積は半径 1.2–1.7 nm の球に相当する． Introduction の図 1–1 における空間スケールを参照すると，この半径は IgG 分子のヒンジ部周辺の体積に相当している．この結果と IgG 分子と Fab・Fc 分子の違いはヒンジ部の有無であることとの関係から，Fab・Fc 分子では IgG のヒンジ部にある水和水がいないと考えられる．

表 4-2　IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液の水和水量の差（Δm_{hyd}）から導出した体積変化（ΔV_{hyd}）と，同じ体積の球の半径（R_{hyd}）

IgG および Fab・Fc 濃度	Δm_{hyd} / g (solute g)$^{-1}$	ΔV_{hyd} / nm^3	R_{hyd} / nm
5%	0.028	7.0	1.2
10%	-0.001	-0.25	-
20%	0.059	15	1.5
50%	0.085	21	1.7
80%	0.007	1.7	0.74
90%	-0.005	-1.2	-
95%	-0.004	-1.0	-

4-2. 水和水の熱容量の比較

図 4-2 に IgG と Fab・Fc それぞれの水溶液系の水和水の熱容量を示す（5 K < T < 300 K）. 水和水の熱容量は水和水 1 mol あたりの値として示す. 代表的な濃度として, a) 50%, b) 80%, c) 90%における水和水の熱容量を比較した．点線は H_2O のモル熱容量である．以下で各濃度における IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の熱容量の違いを議論する.



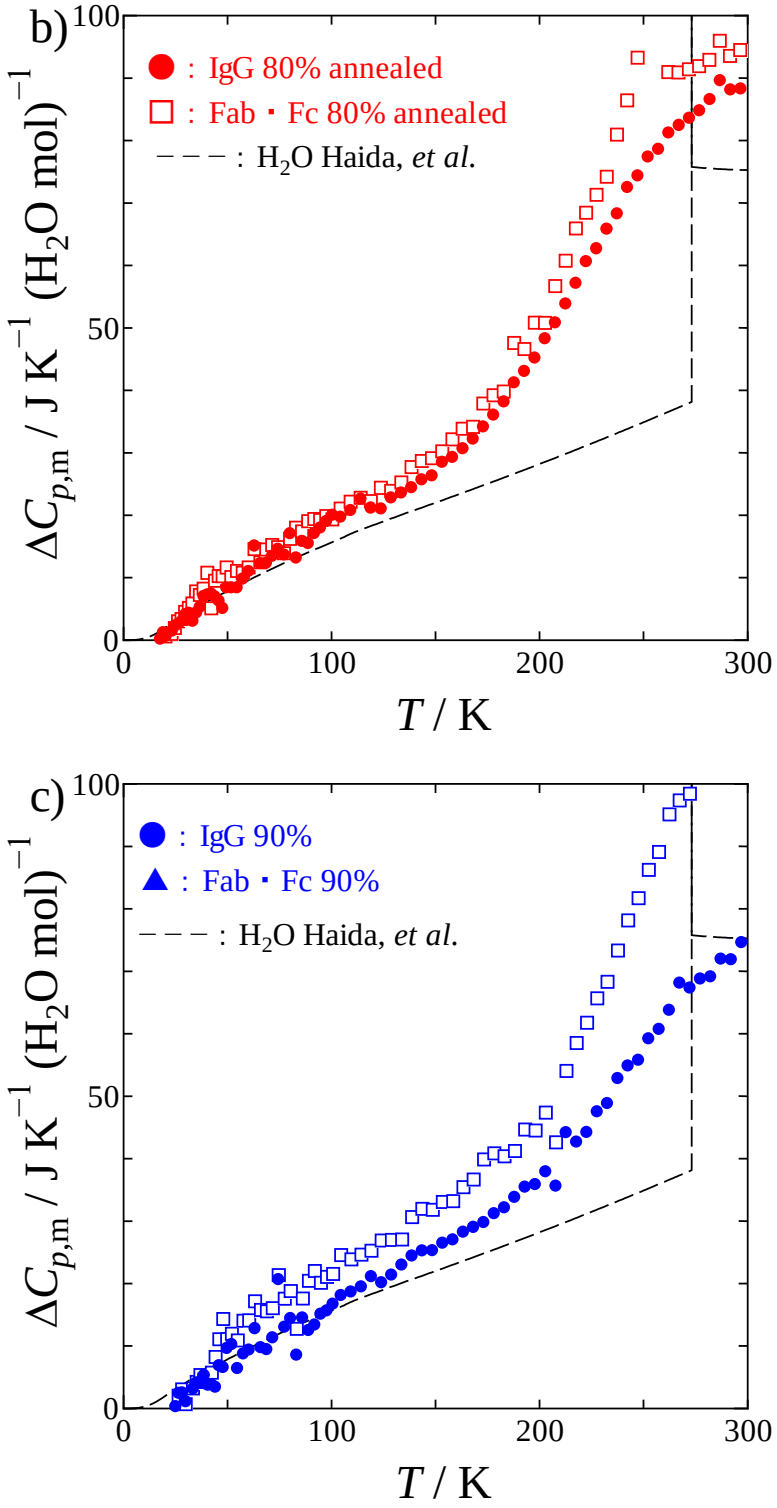


図 4-2　IgG 水溶液（●）と Fab・Fc 水溶液（□）における水和水の熱容量．a)50%，b)80%，c)90%.

・50%

IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の 50%試料の水和水の熱容量は，熱容量の値が異なるものの，温度依存性は同じ傾向になっている．200 K < T < 260 K の温度域で Fab・Fc 水溶液の水和水の熱容量が IgG の熱容量よりも大きくなっているが，融点より高い温度域（液相）では同程度の熱容量になっている．

80%試料の水和水の熱容量は，200 K 以下の温度域では IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の間で過剰熱容量に差は見出せなかったが，200 K 以上の温度域は Fab・Fc 水溶液の過剰熱容量が IgG 水溶液よりも大きい値となった．この結果は 80%の試料では 200 K 以上の温度域で Fab・Fc 水溶液系の方がより多くの状態をとり得ることが示唆している．

90%試料の過剰熱容量は，どの温度域でも Fab・Fc 水溶液の過剰熱容量が大きく，特に 200 K よりも高温で差が大きく広がった．

4-3. 水和水量と過剰熱容量からの考察

水和水量と水和水の熱容量の結果を表 4-1 にまとめる．大きく分けて 3 つの濃度域に分けることができた．以下でそれぞれの濃度域について考察する．

表 4-1　IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水量と過剰熱容量の違い．

濃度	水和水量	水和水の熱容量
50%	・IgG 水溶液 > Fab・Fc 水溶液 ・IgG 水溶液は濃度が増加すると単調増加 ・Fab・Fc 水溶液は IgG 水溶液と比べて水和水量の濃度依存性が小さい	・T < 200 K： IgG 水溶液 ≒ Fab・Fc 水溶液 ≧ バルク氷 ・200 K < T < 250 K： バルク氷 < IgG 水溶液 < Fab・Fc 水溶液 ・T > 275 K（液相）： IgG 水溶液 ≒Fab・Fc 水溶液 > バルク氷
80%	・IgG 水溶液 ≒ Fab・Fc 水溶液 ・氷は IgG 水溶液には存在しないが，Fab・Fc 水溶液にはわずかに存在する	・T < 200 K： IgG 水溶液 ≒ Fab・Fc 水溶液 ≧ バルク氷 ・T > 200 K：

		バルク氷 ＜IgG 水溶液 ＜Fab・Fc 水溶液
90%	・IgG 水溶液 ≒ Fab・Fc 水溶液 ・水は全て水和水	・T > 100 K で IgG 水溶液 ＜Fab・Fc 水溶液 ・Fab・Fc 水溶液の熱容量の濃度依存性は小さい.

・90%

50%以上の IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液における水和水量の違いから，IgG 水溶液の水和水には Fab・Fc 水溶液に存在しない水和水があること 4-1 で述べた．4-1 では IgG 分子と Fab・Fc 分子とでヒンジ部以外の三次構造は変化していないと考えられるため，減少した水和水はヒンジ部周辺と相互作用していると考えた．水和水の熱容量差から，水和水の熱容量は水和水が相互作用する部位によって異なることを 4-2 で述べた．IgG 水溶液における水和水は部位によって異なる熱容量であるため，90%のように充分に水和していない濃度においては，小さい熱容量の水和水の寄与が大きくなり，水和水の熱容量に差ができると考えられる．

以上の議論を総合すると，90%の IgG または Fab・Fc 水溶液は，図 4-3 のような濃縮溶液になっていると考えられる．図中に示した A は IgG 分子に水和水が充分存在している状態の IgG 分子を，B は水和水が不足している状態の IgG 分子をそれぞれ示している．IgG や Fab・Fc の表面を覆っている水和水を水和水 1 とし，IgG のヒンジ部周辺の水和水を水和水 2 とした．図中右にそれぞれの水和水の熱容量（C_p^{hyd1}，C_p^{hyd2}）と，それらから得られる平均の水和水の熱容量（$C_p^{\mathrm{hyd\,ave.}}$）を示す．IgG 水溶液における水和水の熱容量は，水和水 1 と水和水 2 の平均の値であるが，充分に水和していないため水和水 1 の組成が相対的に少なくなり，水和水 2 の寄与が大きく反映されている．一方で Fab・Fc 水溶液における水和水は水和水 1 しか存在しないため，観測された水和水の熱容量は水和水 1 の熱容量のみであると考えられる．

まとめると，90%試料における水和水量と水和水の熱容量差から，IgG 水溶液における水和水は IgG 分子のヒンジ部には熱容量の異なる水和水が存在していると考えられる．

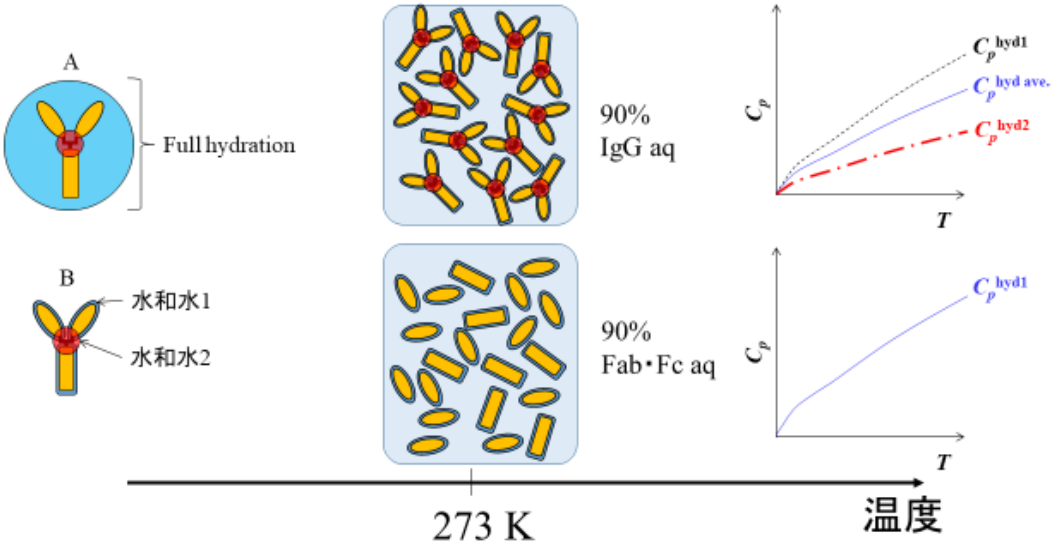


図 4-3　90%試料における IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液の微視的描像．図左の A は充分に水和している状態の IgG 分子，B は水和が不充分な状態の IgG 分子である．図中央は濃縮溶液の微視的描像とその温度依存性を示す. 図右には水和水 1 および 2 の熱容量（C_p^{hyd1}，C_p^{hyd2} : 黒破線，赤破線）と，観測された熱容量（$C_p^{hyd\ ave.}$: 青実線）を示す.

・80%

90%試料と同様に，80%試料にも IgG 水溶液のヒンジ部周辺に存在する水和水があると考えられる．また，50%以上の試料ほどではないが，90%試料よりも水和水量は多い．90%試料における水和水 1 および 2 の量は増えていると考えられる．熱容量については，90%試料と比較すると IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液における水和水の熱容量差は小さい．また，80%試料と 90%試料の Fab・Fc 水溶液の水和水（水和水 1）の熱容量を 3-2 で比較した際に，濃度依存性が見られなかった．90%試料についての議論から，Fab・Fc 水溶液の水和水の熱容量は水和水 1 によるものと考えられる．したがって，80%試料の IgG 水溶液の水和水の熱容量が Fab・Fc 水溶液の値に近づいたのは，水和水 1 の寄与が増加したためと考えられえる．

図 4-4 に，80%試料の水和水量と水和水の熱容量差から考えられる，IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の微視的描像と水和水の熱容量を示す．図中の表現は図 4-3 に準拠する．80%試料では氷の融解はほとんど観測されなかったため，試料は全温度域にわたって濃縮溶液になっていると考えられる．また 80%試料は，90%試料と比較して水和水 1 の量が多いことから，相対的に水和水 1 の熱容量の寄与が大きくなっていると考えられる．　したがって，観測された 80%試料の IgG 水溶液の水和水の熱容量（$C_p^{hyd\ ave.}$）は，90%試料よりも大きくな

り Fab・Fc 水溶液の水和水の熱容量に近づいたと考えられる.

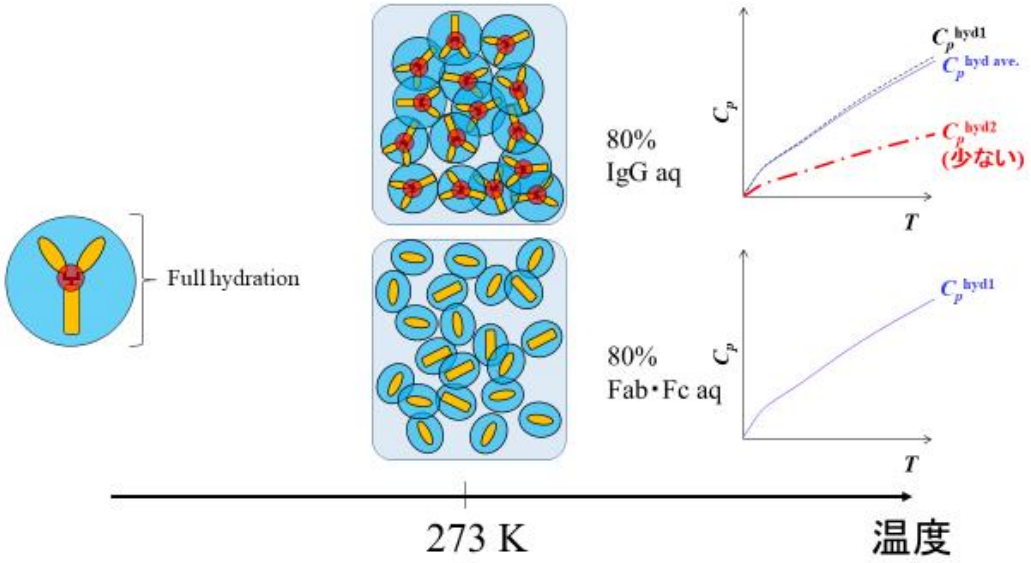


図 4-4　80%試料における IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液の微視的描像. 図左は充分に水和している状態の IgG 分子を示す. 図中央は濃縮溶液の微視的描像とその温度依存性を示す．図右には水和水 1 および 2 の熱容量（C_p^{hyd1}, C_p^{hyd2} : 黒破線，赤破線）と，観測された熱容量（$C_p^{hyd\ ave.}$: 青実線）を示す.

・5 - 50%

50%以下の濃度の試料では，IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水量が異なっており，その差はヒンジ部周辺の水和水の有無であると考えられる. 50%以下の試料では凍結する水が存在するため，IgG 分子または Fab・Fc 分子には充分な量の水和水が結合している．IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の水和水の熱容量を比較すると，水和水量が異なるにもかかわらず，80%以下の試料と比較して熱容量の違いが小さくなっている．これについて，2 つの事柄が考えられる．①80%試料と同様に考えると，さらに増えた水和水 1 の寄与が増えたため，水和水 2 による熱容量差がほとんど観測されなかったことを意味する．また，②水和水の熱容量が水和水量に依存しないため，濃度の減少によって増加した水和水量の大部分が水和水 1 で構成されていることを意味する．仮に水和水 2 のように熱容量が小さい種類の水和水が存在していたとしても，非常に少ないと考えられる.

図 4-5 に，50%以下の試料における IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液の微視的描像を，温度を変化させて示す．273 K 以上の温度域では均質な水溶液系になっている．273 K 以下の

温度域では水の結晶化により，相分離して濃縮溶液になる．IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液における水和水の熱容量は，水和水 1 の組成が大きいため，大部分が水和水 1 の熱容量になっている．

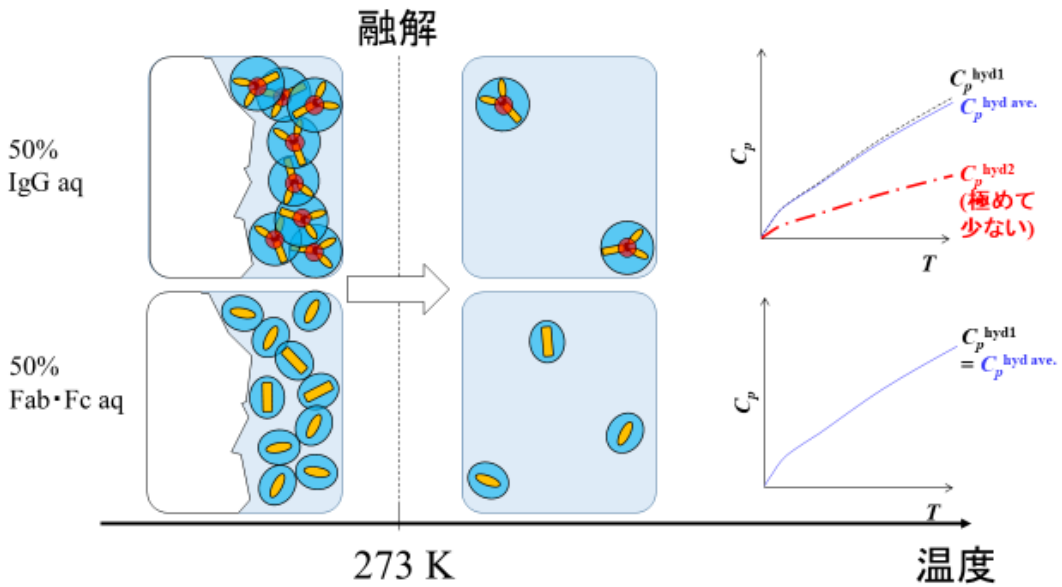


図 4-5　50%試料における IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液の微視的描像．図左は氷点以下で相分離した試料を示す．図中央は融解後の均質な水溶液を示す．図右には水和水 1 および 2 の熱容量（C_p^{hyd1}，C_p^{hyd2}：黒破線，赤破線）と，観測された熱容量（$C_p^{hyd\ ave.}$：青実線）を示す．

本研究で，IgG 水溶液には Fab・Fc 水溶液にも存在する水和水 1 以外にも，熱容量が小さい水和水 2 が存在していることを見出した．同じ水分子であるにもかかわらず，水和水 1 と水和水 2 で熱容量に差ができる理由を以下で議論する．

生体高分子の水溶液系の水和構造は，X 線構造解析[---]や熱容量測定[---]から Introduction で述べたようなものになっていると考えられている．水和水は生体高分子の内部や表面上の一層だけでなく，さらに幾層かの階層構造になっているため，水和水間の相互作用は層内，層間を考慮すると複雑な水素結合ネットワークを形成していると考えられる．しかし，本研究の IgG 水溶液における水和水の熱容量の濃度依存性から示したように，水和水の大部分は水和水 1 のような熱容量が大きいもので構成されている．水和水の熱容量の濃度依存性から，水和水 1 は，試料の濃度が高くなるにつれて減少していった，タンパク質表面にいる水和水だと考えられる．

熱容量の大きさは定性的には構成される分子の相互作用ネットワークの「柔らかさ」の度合いである．水和水 1 の熱容量は 273 K の温度域で液体の水よりも大きいため，液体以上に柔らかく相互作用した水素結合ネットワークを構成していると考えられる．一方で小さい熱容量の水和水 2 は，水和水 1 と比較して「固い」水素結合ネットワークをしていると考えられる．したがって，水和水 2 は Fab・Fc によって囲まれたことで空間的にトラップされた状態にあると著者は予想している．これは confined-water 系[---]のように空間的制限を設けられた水と似た状況にあるが，confined-water で見られるようなガラス転移などの現象が観測されていないため，confined-water 系とはまた異なる空間的制限になっていると期待される．

5. Conclusion

本研究では，タンパク質分子の局所的な立体構造の変化によって引き起こされる水和構造の変化を熱力学的な観点から調べた．タンパク質の一種である IgG とその局所的な分解物である Fab・Fc に注目し，それぞれ異なる濃度（5，10，20，50，80，90，95，100%）の水溶液についての熱容量測定を行った（5 K< T < 300 K）.

IgG 水溶液および Fab・Fc 水溶液に共通して，氷の融解（5-50%），中間水の結晶化（5-50%），そして水和水に由来する熱容量を見出した．また，IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液の相違点として，氷の融解から決定した水和水量から，IgG から Fab・Fc に分解されたことで水和水量が減少することを見出した．さらに，水和水の熱容量が IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液とで異なっていることが明らかになった.

IgG 水溶液と Fab・Fc 水溶液について，それぞれの水和水量と水和水の熱容量の違いを考察し，IgG のヒンジ部と相互作用している水和水同士が，固い水素結合ネットワークを形成していることが明らかになった. IgG のヒンジ部のような空間的なポケットがあるタンパク質では，このような水和水が分子内にトラップされることでそのような運動ができることが示唆された.

6. Reference

[1] 永山国昭編集，水と生命ー熱力学から生理学へ，日本生物物理学会，(2000)，ISBN 978-4-320-05541-4

[2] I. D. Kuntz, T. S. Brassfield, G. D. Law, G. V. Purcell, *Science*, **163**, 1329, (1969)

[3] I. D. Kuntz, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 514, (1971)

[4] Y. Miyazaki, T. Matsuo, H. Suga, *Chem. Phys. Lett.*, **213**, 303, (1993)

[5] Y. Miyazaki, T. Matsuo, H. Suga, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 8044, (2000)

[6] K. Yoshiba, A. Teramoto, N. Nakamura, K. Kikuchi, Y. Miyazaki, M. Sorai, *Biomacromolecules.*, **4**, 1348, (2003)

[7] P. L. Privalov, G. M. Mrevlishvili, *Biofisika*, **12**, 22, (1967)

[8] G. M. Mrevlishvili 著，上平恒，上平初穂訳，生体高分子の低温カロリメトリー，北海道大学図書刊行会，(1992)，ISBN4-8329-9371-2

[9] W. Doster, A. Bachelitner, R. Dunau, M. Hiebl, E. Luscher, *Biophys. J.*, **50**, 213, (1986)

[10] J. L. Skinner, P. A. Pieniazek, S. M. Gruenbaum, *Accounts of Chemical Research*, **45**, 93, (2012)

[11] N. Miura, Y. Hayashi, N. Shinyashiki, S. Mashimo, *Biopolymers*, **36**, 9, (1995)

[12] S. Kuwabara, T. Umehara, S. Mashimo, *J. Phys. Chem.*, **92**, 4839, (1988)

[13] N. Miura, N. Asaka, N. Shinyashiki, S. Mashimo, *Biopolymers*, **34**, 357, (1994)

[14] A. Panagopoulou, A. Kyritsis, N. Shinyashiki, P. Pissis, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 4593, (2012)

[15] L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, A. McPherson, *Biochemistry*, **36**, 1581, (1997)

[16] P. Bernado, D. I. Svergun, *Mol. BioSyst.*, **8**, 151, (2012)

[17] D. Shaw, P. Maragakis, K. Lindorff-Larsen, S. Piana, R. O. Dror, M. P. Eastwood, J. A. Bank, J. M. Jumper, J. K. Salmon, Y. Shan, W. Wriggers, *Science*, **330**, 341, (2010)

[18] A. Hospital, M. Candotti, J. L. Gelpi, M. Orozco, *J. Phys. Chem. B*, **121**, 3636, (2017)

[19] Y. I. Matveev, V. Y. Grinberg, V. B. Tolstoguzov, *Food Hydrocolloids*, **14**, 425, (2000)

[20] I. D. Kuntz, W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, **28**, 239, (1974)

[21] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology third edition*, (2010), ISBN 978-0-8153-4130-7

[22] L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, J. Day, A. Greenwood, A. McPherson, *Nature*, **360**, 369, (1992)

[23] K. H. Roux, L. Strelets, T. E. Michaelsen, *J. Immunol.*, **159**, 3372, (1997)

[24] A. Feinstein, J. Rowe, *Nature*, **205**, 147, (1965)

[25] S. Utsumi, *Biochem. J.*, **112**, 343, (1969)

[26] Y. Hayashi, N. Miura, J. Isobe, N. Shinyashiki, S. Yagihara, *Biophys. J.*, **79**, 1023, (2000)

[27] Y. Hayashi, S. Yagihara, *Biopolymers*, **105**, 626, (2016)

[28] 熱量測定・熱分析ハンドブック，日本熱測定学会，(2011)

[29] M. Karas, D. Backmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **78**, 53, (1987)

[30] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2**, 151, (1988)

[31] T. J. Cornish, R. J. Cotter, *Anal. Chem.*, **65**, 1043, (1993)

[32] Y. Kume, Y. Miyazaki, T. Matsuo, H. Suga, *J. Phys. Chem. Solids*, **53**, 1297, (1992)

[33] Y. Ogata, K. Kobayashi, T. Matsuo, H. Suga, *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, **17**, 1054, (1984)

[34] O. Haida, T. Matsuo, H. Suga, S. Seki, *J. Chem. Thermodynamics*, **6**, 56, (1974)

Part 2

不凍タンパク質による水分子の再配向運動の抑制

1. Introduction

1．不凍タンパク質水溶液の低温物性

1-1．不凍タンパク質

不凍タンパク質（Antifreeze Protein; AFP）は寒冷地に生息する生物が保有する生体高分子で，氷点以下の環境下で生物が生存する原因物質とされている．AFP は 1969 年 DeVries によって，南極に生息する魚類に存在していることが最初に報告された[1]．最初に発見された AFP は実際には糖タンパク質であったため，Antifreeze Glycoprotein（AFGP）と呼ばれた．のちに寒冷地の他の魚類や昆虫類，植物でもタンパク質の形で保有していることが報告され，これまで多種多様な AFP についての研究が行われた[2].

AFP 研究が盛んになった発端は，AFP を保有している生物が氷点以下の環境下でも生存できる理由として，AFP による水の非束一的凝固点降下現象が報告されたことである[1, 2]．一般的に，溶媒に少量の溶質を溶解させると，溶質濃度に比例して溶媒の凝固点が低温側にシフトする（凝固点降下）．しかし，AFP 水溶液では濃度に対して非線形的に凝固点降下が起こったと報告された．実際は熱力学的に平衡な状況での凝固点降下ではなく，非平衡状態である過冷却状態をより低温まで保てる，いわゆる熱ヒステリシス（凝固点と最低過冷却温度の差）が大きいと現在では考えられている．AFP 水溶液の大きな熱ヒステリシスの機構として，核生成の分野から結晶核成長抑制モデル[3, 4]が提唱され，現在では主流の見解となっている．

図 1-1 に AFP 水溶液の結晶核成長抑制モデルの概略図を示す．標準状態において水が凝固すると六方晶系の結晶構造をした，いわゆる六方晶氷が生成する．このモデルでは，AFP 分子は六方晶氷の結晶核の特定の平面（この場合は[20$\bar{2}$1]平面）に吸着することで結晶核成長を抑制している．吸着によって結晶核の表面の曲率が大きくなることで表面エネルギーが増大し，それ以上の結晶成長が不安定になるため，[20$\bar{2}$1]平面の成長が抑制される[2]．結果として得られる微結晶は，六方晶氷のような六角柱型の形ではなく，六方両錐型やレモン型のような結晶核として実験的に観測された[5-7]．また，AFP 分子に蛍光物質を結合させた AFP 水溶液から生成した単結晶の UV 写真から，AFP 分子が特定の平面に選択的に結合していることが見出された[8].

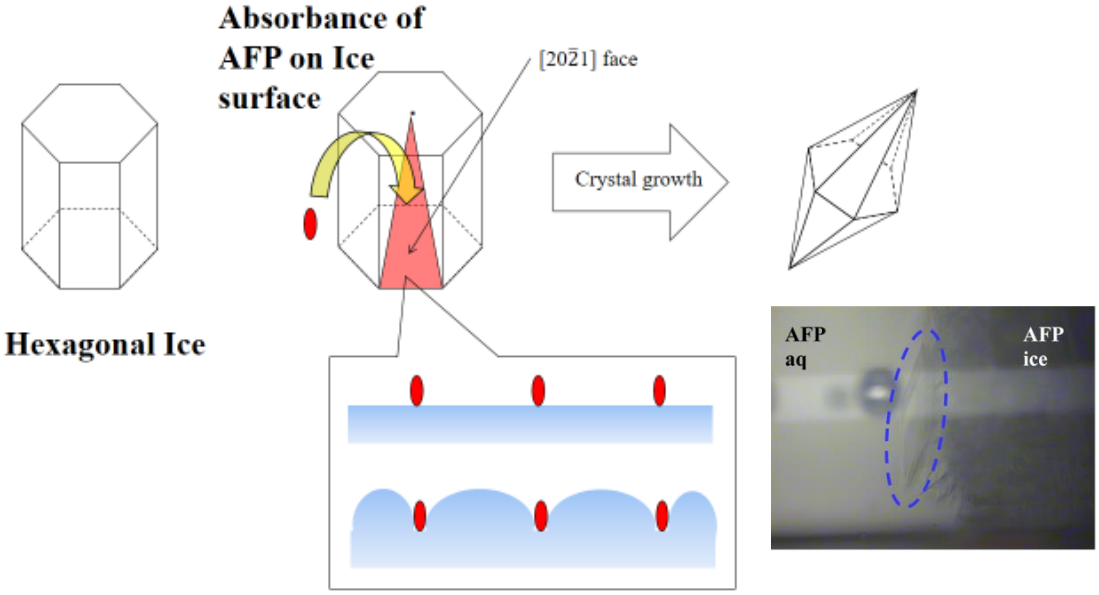


図 1-1　AFP のよる氷の結晶核成長抑制機構のモデル．[20$\bar{2}$1]面に吸着した AFP 分子（●）により吸着面の表面エネルギーが増大する．図右下は AFP 水溶液と AFP 含有氷の界面の顕微鏡観察で確認された六方両錐形の氷核．

AFP 分子の三次構造は保有する生物によって異なっており，現在は便宜上 6 つの分類（AFGP，AFP の I，II，III，IV 型，Hyper-active 型）がなされている[2, 9]．その中で最も研究の対象として選ばれているのが AFP の I 型（図 1-2 左）と III 型（図 1-2 右）である．ヘリックス構造のみの I 型（AFP-I）と球状タンパク質である III 型（AFP-III）は，三次構造が異なるにも関わらず，どちらも同じように氷点を降下させることが知られている[10]．

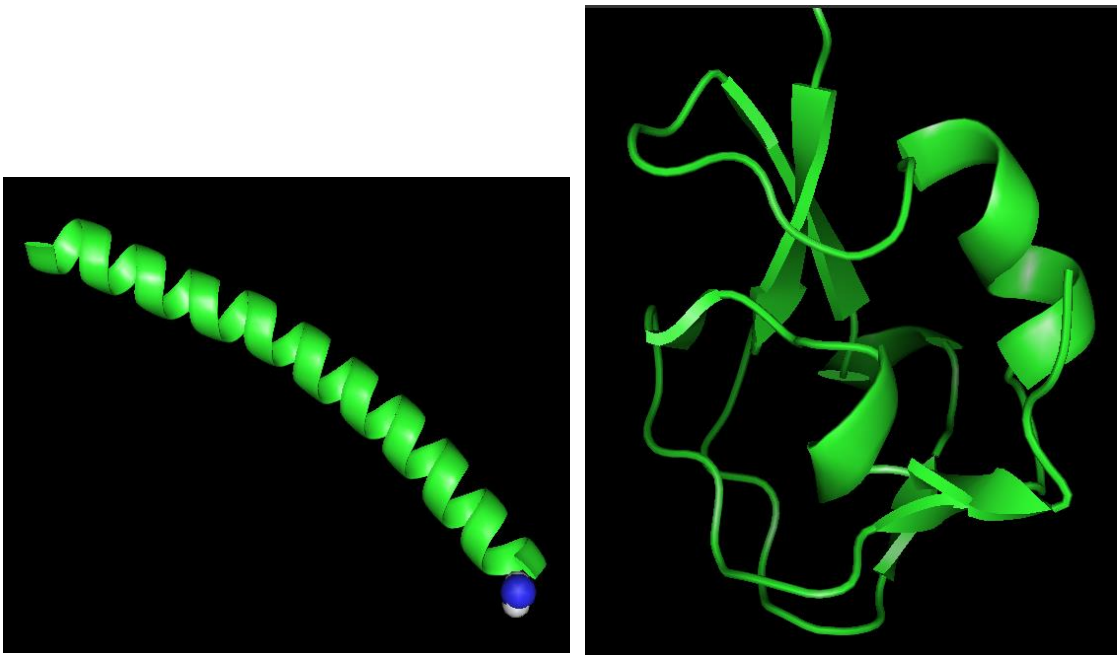


図 1-2　AFP の I 型（左）と III 型（右）の分子構造．図中のらせんがα - ヘリックス構造，矢印がβ - シート構造を表している．

1-2．氷内の水分子の配向運動

AFP が水分子のネットワーク構造に及ぼす影響を調べる本研究では，六方晶氷においてよく知られている水分子の再配向運動の凍結現象であるプロトンガラスに注目した．General Introduction で概観を述べたが，以下ではプロトンガラスについてさらに詳細に説明する．

プロトンガラスとは，H_2O のように水素結合ネットワークを形成する物質において，プロトンの配置が無秩序のまま凍結する現象である[11]. 本研究で注目した H_2O は固相で六方晶系の結晶構造（六方晶氷）をとる（図 1-3 左）が，六方晶系の平衡配置にあるのは酸素原子であり，水素原子は 100 K 以上の温度ではエネルギー的に安定になるような，いわゆる「氷の規則」[12]に従う範囲でランダムな配置をとる．言い換えると，六方晶氷の結晶内の水分子は配向が無秩序になっている．熱力学第三法則により，理論上はこの配向の無秩序性は相転移を経て秩序化するはずであるが，実際の実験系でそのような相転移は観測されない[13]. Giauque ら[13]は六方晶氷の理論上の常誘電－強誘電相転移を観測するために熱容量測定を行い，相転移を見出せなかったが，残余エントロピーとして 3.43 J K^{-1} mol^{-1} が見積もられた．この値は Pauling[14]が氷の規則に従って計算した六方晶氷の水分子の配向の場合の数（配向のエントロピー：3.37 J K^{-1} mol^{-1}）に対応していたため，六方晶氷中の水分子の配向

が極低温まで無秩序な状態にあることが示唆された．Haida ら[15]は断熱法による精密熱容量測定から 110 K にガラス転移による熱容量の段差を見出し（図 1-3 右），そのガラス転移の熱緩和の緩和時間から活性化エネルギーを導出した（E_a = 22±4 kJ mol^{-1}）．

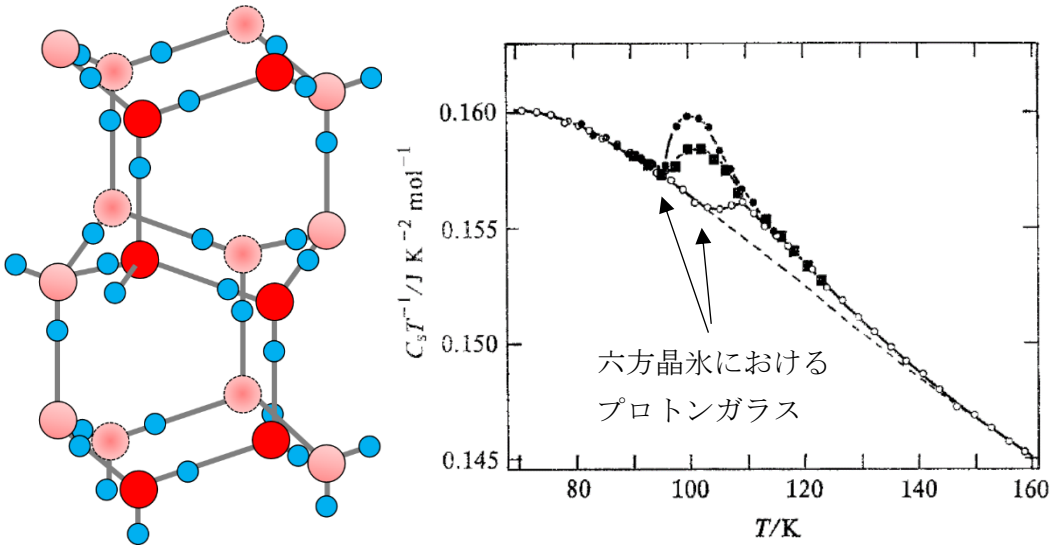


図 1-3　左）六方晶氷の結晶構造（$P6_3/mmc$）．図中の青丸（●）はプロトン，他の丸（●，●）は酸素原子，灰実線は結合を表している．右）Haida らによる純粋な六方晶氷の熱容量（70 K < T < 160 K）．熱容量の段差を見やすくするために熱容量は温度で割った値で示している．○：六方晶氷の熱容量，■：94.4 K で 71 h アニール処理した六方晶氷の熱容量，●：89.4K で 624 h アニール処理した六方晶氷の熱容量. 図中の破線は六方晶氷の配向秩序化以外の熱容量の寄与（格子熱容量）．

六方晶氷のプロトンガラスの正体は結晶内の水分子の配向運動の凍結であった．水分子はガラス転移点（T_g = 110 K）より高温では熱励起により周りの水素結合を切断することで再配向運動をしており，系全体では常誘電体として振る舞っている．そのような高温域（160 K < T < 273 K）における六方晶氷の水分子の再配向運動を，Auty[16]，Kawada[17]，Johari[18]はそれぞれ誘電緩和測定によって調べた．結果として，緩和時間の温度依存性が非アレニウス的であること，緩和時間には結晶の異方性がないことが見出された．

以上のような実験的事実を説明する水分子の再配向運動の機構として，Bjerrum が提唱した結晶中の水素結合の欠陥を原因とした説が主流である[19]．氷の規則は熱力学的に安定なプロトン配置を考慮した規則であるが，実際の系では水素結合の欠陥によって一部の水分子間に水素結合がない状態が存在し得る（図 1-4）．このような水素結合が不在の欠陥には，

水分子の再配向による欠陥（Bjerrum 欠陥）や水分子のイオン化による欠陥（イオン欠陥）がある．このような欠陥が生成した場合，水分子の周りにある水素結合が一本少なくなるため，速度論的に再配向運動を引き起こしやすくなる．Bjerrum 欠陥がある水分子が再配向運動することで，Bjerrum 欠陥は隣の水分子へと移動する．イオン欠陥の場合は，プロトンのホッピングにより直接移動している．氷の高い誘電率はこのような Bjerrum 欠陥やイオン欠陥による電荷移動プロセスが原因となっていると現在では考えられている．

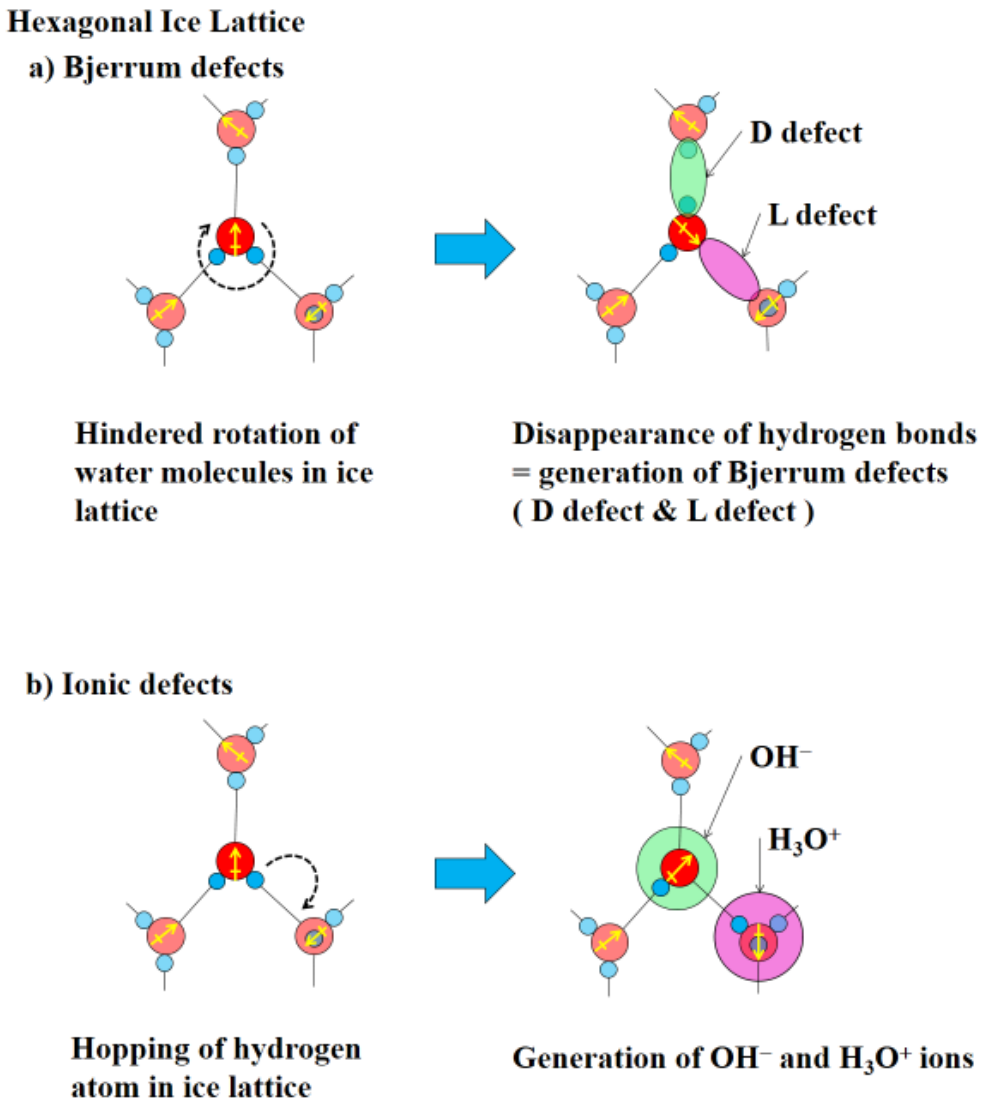


図 1-4　氷結晶中の欠陥の種類．a)水分子の再配向運動による Bjerrum 欠陥の生成．b)水素のホッピング運動によるイオン欠陥の生成．

Bjerrum の説を補強する実験結果として，熱容量測定から Ueda ら[20]が，誘電緩和測定から Kawada ら[21, 22]と Takei ら[23]がそれぞれ氷結晶内に不純物をドープした氷における水分子の再配向運動の緩和時間が速くなることを報告した．不純物として採用されたハロゲン化水素の低濃度水溶液系は，固相で置換型固溶体を形成する．ハロゲン化水素の構造は，水分子からプロトンを一つ抜き取ったものと似ているため，氷結晶中のハロゲン化水素には水素結合が一つ欠落した水分子とみなされる（図 1-5a）．不純物を介してドープされた Bjerrum 欠陥によって欠陥の濃度が増加するため，再配向運動の発生確率が上がり，緩和時間は速くなる．実際に熱容量測定ではガラス転移点が 10 K ~ 15 K ほど低温で観測され，誘電緩和測定では緩和時間が減少した．

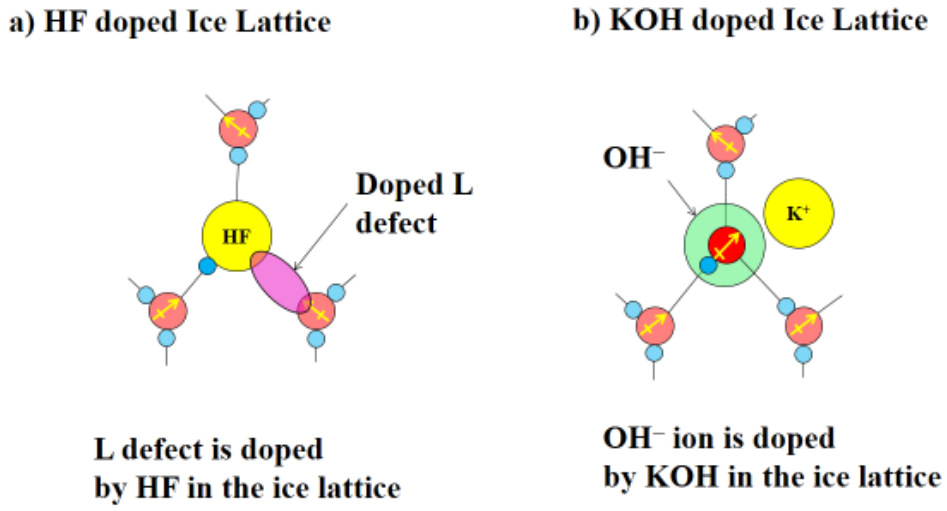


図 1-5　不純物のドープによる Bjerrum 欠陥またはイオン欠陥の導入．a) HF ドープによる Bjerrum 欠陥の導入，b) KOH ドープによるイオン欠陥の導入．

また，Tajima ら[24]によって，KOH 含有氷（図 1-5b）の熱容量測定では，六方晶氷では観測されなかった常誘電－強誘電転移が 72 K で観測されることが報告された（図 1-6）．その転移エントロピーは配向の秩序無秩序から予想されたエントロピー値の 70%に相当し，不

完全ながらも大部分が秩序化していることが明らかになった．誘電緩和測定でも水酸化アルカリ金属の水溶液系における研究が報告されたが，緩和時間の温度依存性が他の不純物系と比較して大きく異なっているため，異なる機構によることが示唆されている．

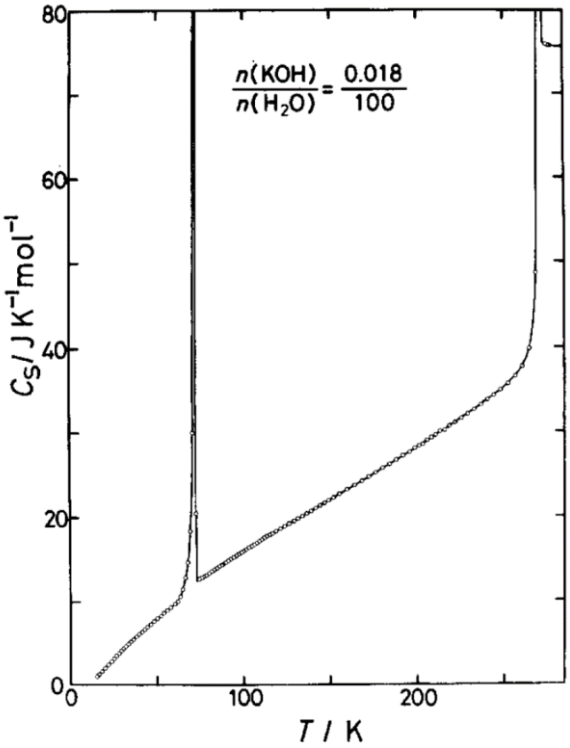


図 1-6　KOH 含有氷の熱容量[24]．72 K の熱容量のピークは水分子の配向秩序化による一次相転移を示している．273 K の熱容量のピークは六方晶氷の融解を示している．

1-3．研究目的

本研究では，水の結晶化に大きな影響を及ぼす AFP が，六方晶氷中の水分子のネットワーク構造に対してどのような変化を与えるかを明らかにする目的で，六方晶氷に特有のプロトンガラス転移現象についての熱容量測定，X 線回折実験，誘電緩和測定を行って詳細に調べた．熱容量測定では，プロトンガラスに由来するガラス転移の検出，ガラス状態の緩和挙動を，誘電緩和測定では同じ緩和挙動のより高い温度域における振る舞いを，X 線回折実験では AFP 添加による六方晶氷の構造変化をそれぞれ調べた．

2. Experimental

実験には I 型（ヘリックス型）と III 型（球状）の AFP を Milli-Q®水に溶解させた試料を用いた．以下に溶液の調製手順を示す．以後 I 型と III 型の AFP をそれぞれ AFP-I と AFP-III と呼ぶ.

2-1. 溶液調製

AFP-I はニチレイ株式会社より提供された脱塩済みの乾燥試料を用いた．試料の分子量は多分散であった. 溶液濃度の決定に当たっては, 代表的な分子量として 3285.53 を採用した.

AFP-III は国立研究開発法人産業技術総合研究所の津田栄教授から提供された脱塩済み乾燥試料を用いた. 試料の分子量は多分散であった. AFP-I 同様に, 代表的な分子量として 6500 を採用した.

溶液調製の前に，乾燥 AFP 試料を室温で 3 日間真空乾燥した．溶媒は直前に脱ガスした Milli-Q®水を用いた．濃度調整は使用した乾燥 AFP 試料と Milli-Q®水の質量比から決定した.

2-2. 熱容量測定および温度ジャンプ法

2-2-1. サンプリング

調製した AFP 水溶液をヘリウム雰囲気下で熱容量測定用セルに封入した．セルは Part 1 で用いたものと同じものを用いた．セルはインジウム線（$\phi = 0.3$ mm）をパッキンとして密封した．AFP 水溶液の質量（m_{sol}）と使用した乾燥 AFP 試料の質量（m_{AFP}）から水溶液濃度を決定した．表 2-1 に熱容量測定に用いた AFP 水溶液の組成をまとめる．質量分率（w）は乾燥 AFP 試料と AFP 水溶液の質量分率である. AFP 水溶液の濃度は, AFP-I 水溶液を 0.001%, 0.01%，0.1%，1%，5%，AFP-III 水溶液を 0.001%，0.1%，1%を調製した.

表 2-1　熱容量測定に用いた試料の組成.

AFP-I	**質量分率 w**	**溶液質量 m_{sol} / g**	**溶質質量 m_{AFP} / g**	**溶媒質量 m_{H2O} / g**
5%	0.04985	2.34207	0.11676	2.22531
1%	0.00994	2.13331	0.02121	2.11210
0.1%	0.00099	2.21483	0.00220	2.21263
0.01%	0.00010	2.08870	0.00021	2.08849
0.001%	0.000010	2.42407	0.00002	2.42405
AFP-III				

1%	0.01000	1.88392	0.01884	1.86508
0.1%	0.001000	2.12880	0.00213	2.12667
0.001%	0.000010	2.33893	0.00002	2.33891

2-2-2. 熱容量測定

AFP-I 水溶液（0.001%，0.01%，0.1%，1%，5%）と AFP-III 水溶液（0.001%，0.1%，1%）の熱容量測定を断熱法によって行った．断熱法の詳細は Part 1 の Experimental で既に述べた．

2-2-2-1. 測定条件

試料の冷却は室温から 80 K までを液体窒素，80 K 以下の温度は液体ヘリウムを使用し，伝導ガス（気体ヘリウム）を介して行った．冷却速度は，液体窒素で冷却した温度域において温度と時間をモニターした際の，平均の温度下降速度（~1 K min^{-1}）を採用した．5%AFP-I 水溶液は急冷試料と 235 K でアニール処理した試料について測定した．また，1%AFP-I 水溶液および 1%AFP-III 水溶液は冷却速度が異なるシリーズについて測定した．表 2-2 に熱容量測定における測定条件をまとめた．

表 2-2　熱容量測定した試料の測定条件

AFP-I	冷却条件	熱容量の測定温度域
5%	1 K min^{-1} 急冷 アニール処理	5 K < T < 300 K
1%	2 K min^{-1} 1 K min^{-1} 0.5 K min^{-1}	5 K < T < 300 K
0.1%	1 K min^{-1}	5 K < T < 300 K
0.01%	1 K min^{-1}	5 K < T < 300 K
0.001%	1 K min^{-1}	5 K < T < 300 K
AFP-III		
1%	2 K min^{-1} 1 K min^{-1} 0.5 K min^{-1}	5 K < T < 300 K
0.1%	1 K min^{-1}	5 K < T < 300 K
0.001%	1 K min^{-1}	5 K < T < 300 K

2-2-3. 温度ジャンプ法

2-2-3-1. 温度ジャンプ法とは

断熱型熱量計の断熱性能を利用し，非平衡状態の系の温度変化を測定することでエンタルピー緩和を観測できる．ここでは，この手法のことを「温度ジャンプ法」と呼ぶ．図 2-1a)に温度ジャンプ法の手順を模式化したものを示す．手順としては，①試料をガラス転移温度以下まで急冷し，②ある温度で熱量計の断熱コントロールをして温度測定を行う．図 2-1a)では①試料を冷却した場合のエンタルピー変化と②試料の冷却を止めた直後から，試料が非平衡状態から安定化するときのエンタルピー変化と温度変化を示している．非平衡状態から安定化する際に試料は発熱するので，エンタルピー緩和は試料温度の緩和として観測される．図 2-1b)は②における温度の時間変化を，断熱型熱量計を用いて測定した結果を示している．○が実験値，実線が実験値のフィッティング曲線である．フィッティング関数はこの温度緩和がデバイ型緩和と仮定したものを用いた．

$$T = c \times \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + at + b$$

ここで，a, b, c, τはパラメータである．指数関数項は試料の温度緩和項，$at + b$は系が平衡状態に達した時に，試料以外（たとえば装置自身の温度）の熱漏れによる寄与の項である．パラメータの一つのτが解析で導出した緩和時間である．

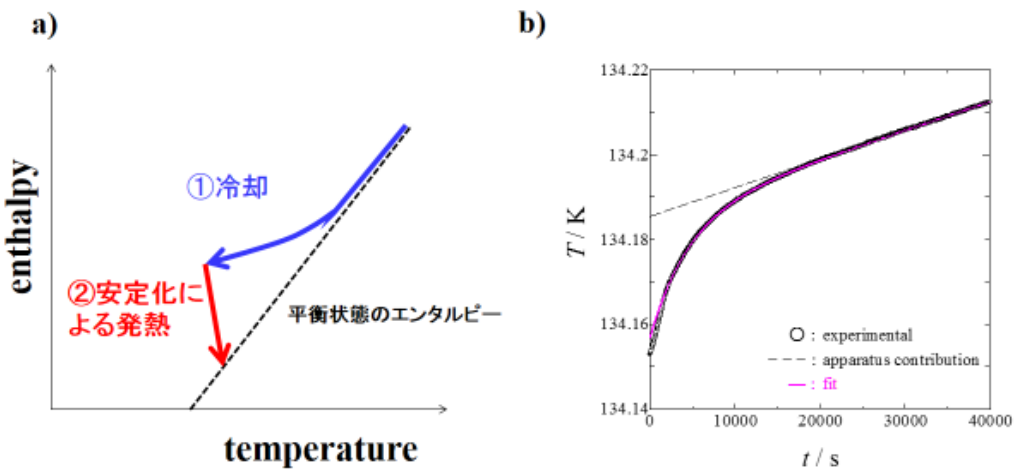


図 2-1 温度ジャンプ法の a)測定手順の模式図と b)温度測定結果および解析. 図 a 中の破線は平衡状態におけるエンタルピーを表す. 図 b 中の破線は測定装置固有の温度変化である.

2-2-3-2. 測定条件

AFP-I 水溶液（0.001%，0.01%，0.1%，1%）と AFP-III 水溶液（1%）の熱容量測定を断熱法によって行った．温度ジャンプ法で使用した試料は熱容量測定で用いた試料と同じものである．冷却は熱容量測定と同様の手順で行った．測定した温度と冷却条件を表 2-3 にまとめて示す.

表 2-3　温度ジャンプ法の測定条件

AFP-I	冷却条件	温度ジャンプ法で測定された温度
1%	1 K min^{-1}	T = 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 K
0.1%	1 K min^{-1}	T = 134 K
0.01%	1 K min^{-1}	T = 132, 133, 134, 135, 136 K
0.001%	1 K min^{-1}	T = 106, 108, 109, 110, 111 K
AFP-III		
1%	1 K min^{-1}	T = 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 K

2-3. 粉末 X 線回折（XRPD）

2-3-1. サンプリング

AFP 水溶液の調製は熱容量測定の溶液調製と同様の手順で行った．調製した試料はキャピラリー（hilgenberg 社製，ϕ = 0.3 mm）内に 3 μL 程度封入した.

2-3-2. 測定

封入された試料はリガク社製，VariMax RAPID FR-E を用いて XRPD を行った．測定試料の条件は表 2-4 にまとめて示す.

表 2-4　XRPD 測定条件

AFP-I	測定温度	X 線源（波長）
1%	T = 250 K	Mo（λ = 0.71 Å）
AFP-III		
1%	T = 110, 140, 150, 170, 200, 250 K	Mo（λ = 0.71 Å）
H_2O		
	T = 200, 250 K	Mo（λ = 0.71 Å）

2-3-3. 解析

図 2-2 に 250 K で測定された H_2O の XRPD 結果を示す．リング上の黒点が X 線の散乱の結果である．一つのリングが X 線の散乱角（2θ）に対応しており，各リングの Intensity から粉末結晶の回折パターンを得られる．しかし，キャピラリーに封入された氷は多結晶であったため，リングに切れ目が生じた．この測定結果を粉末試料相当として扱うために，リングの円周上の Intensity を散乱角ごとに積算した．図 2-3 に図 2-2 の結果に対する積算結果を示す（図中ピンク線）．比較のために Goto ら[25]による六方晶氷の単結晶 XRD から算出された XRPD 結果を黒線で示す．六方晶氷の XRPD の結果は，キャピラリーのガラスなどの試料以外の散乱の寄与から，全体的に右肩上がりの Intensity となっている．また，Intensity は文献値と異なっているが，これはリングの切れ目による積算の損ないによる影響であると考えられる．しかし，同じ温度におけるピーク位置の 2θ は，温度による違いを考慮しても今回の実験値と文献値とで充分対応している（表 2-5）．ピーク位置の 2θ は結晶の格子定数と関係する量であるから，ピーク位置の 2θ の違いによる，AFP 含有氷と六方晶氷との格子定数の定性的な比較は可能であるとする．

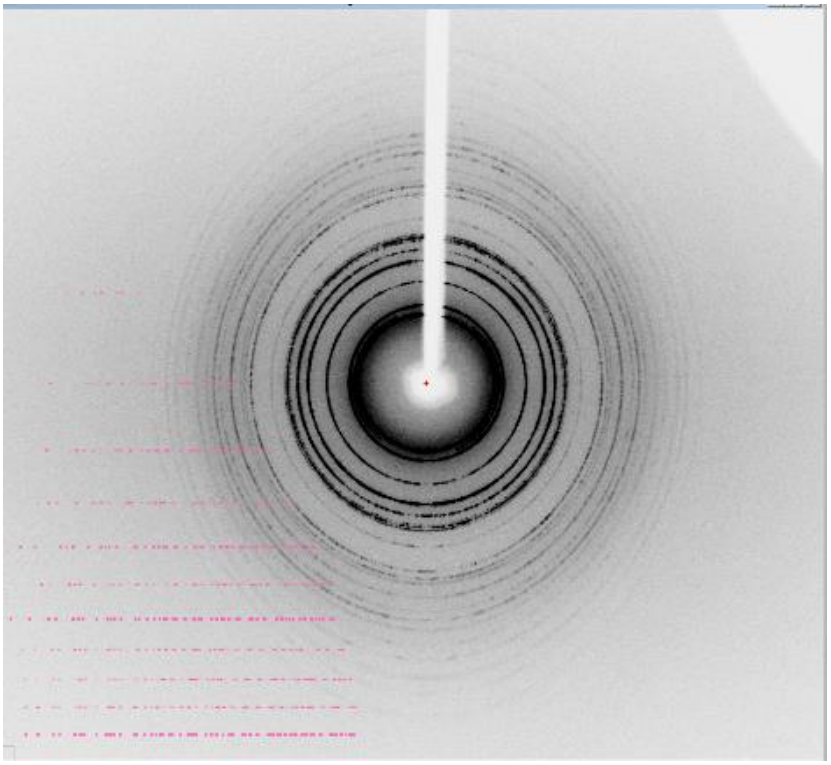


図 2-2　イメージングプレートに反映された T = 250 K における六方晶氷の XRPD 結果.

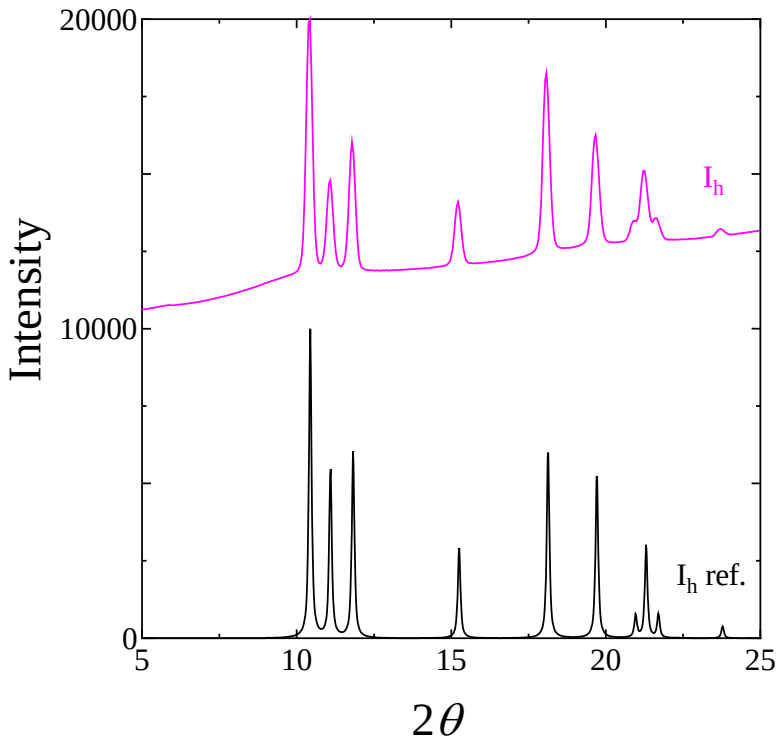


図 2-3　T = 250 K における六方晶氷の XRPD 測定結果.
比較のために Goto ら[25]による六方晶氷の単結晶 XRD から算出された XRPD 結果（T = 223 K）を黒線で示す.

表 2-5　六方晶氷の XRPD 結果におけるピーク位置の比較. 括弧内の数字の並びは各ピーク位置に対応したミラー指数である.

H_2O at T = 250 K	**H_2O at T = 223 K by Goto, *et al.* (crystal face)**
10.43	10.44　(1 0 0)
11.09	11.10　(0 0 2)
11.79	11.82　(1 0 1)
15.22	15.26　(1 0 2)
18.08	18.14　(1 1 0)
19.67	19.70　(1 0 3)
20.90	20.96　(2 0 0)
21.25	21.30　(1 1 2)
21.60	21.70　(2 0 1)
23.72	23.78　(2 0 2)

2-4. 誘電緩和測定

2-4-1. 実験理論

物質に直流電場を印加すると，導電性の物質には電流が流れるが，絶縁性の物質（誘電体）には電流が流れずに，電場が印加された試料の両端に電荷が集まり分極する．誘電体に直流電場 E を印加した時の分極 P は以下の式で表される．

$$P = \varepsilon E$$

ここでε は誘電率である．誘電率は物質固有の値をもつため，誘電率を測定することで物質内部の電気双極子モーメントの大きさや，その配向が秩序化する度合いに関する情報を得られる．実験的に誘電率を測定する場合，物質のキャパシタンス（C），電気抵抗（R），電気伝導度（σ）といった物理量から求めることができる．誘電率はキャパシタンスからは以下の式により導出される．

$$C = \varepsilon C_0$$

ここで C_0 は測定セルのキャパシタンスを表す.

本研究で用いた誘電緩和測定は，物質の交流電場に対する誘電応答を複素誘電率として観測する実験であり，電気双極子モーメントをもつ粒子（分子，イオン，電子）の運動を調査するために用いられる．本研究で調査する運動は水分子の再配向運動なので配向分極を検出した時の複素誘電率についてのみ記述する．

複素誘電率，ε^*は以下の式で表される．

$$\varepsilon^* = \varepsilon' + i\varepsilon''$$

ここでε'は複素誘電率の実部，ε''は虚部を表している．単一の緩和時間を持つ配向緩和過程（デバイ緩和）のε'とε''の周波数（f ）依存性は，角周波数（$\omega = 2\pi f$ ）で表すと以下のようになる．

$$\varepsilon' = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + (\omega\tau)^2}$$

$$\varepsilon'' = \frac{\Delta\varepsilon \times \omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}$$

ここで，ε_∞は周波数無限大における誘電率，$\Delta\varepsilon$は周波数ゼロの誘電率ε_0からε_∞の間の差，τは配向運動の緩和時間である．これらε'とε''の式のグラフを図 2-4 に示す.

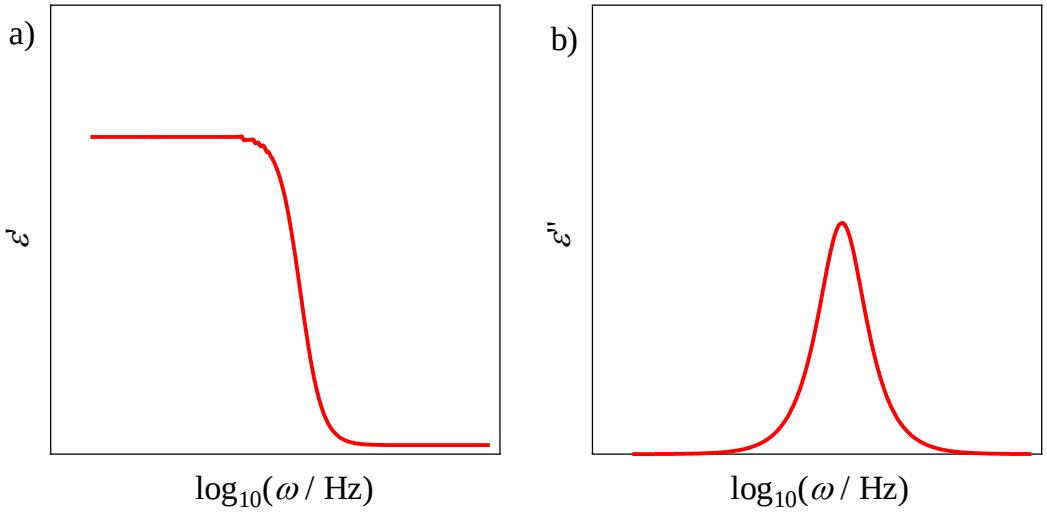


図 2-4　配向分極から得られる複素誘電率の周波数依存性．a)実部，b)虚部．

実部ε'は周波数が高くなると急激に減衰し，階段状の挙動を示している．周波数が低い領域では分子の配向運動が交流電場に対して追従できているため，ε'が大きな値をもつが，高周波数域では配向運動が追従できなくなったため電気双極子モーメントが整列できず，ε'が小さくなる．虚部ε''は配向運動が交流電場に追従できなくなった周波数でピークをもつ．

氷の誘電緩和測定から氷中の水分子の再配向運動を検出できる[16, 18]．AFP による氷中の水分子の分子運動に対する影響を調べるために，1%の AFP-I 含有氷および 0.1%の AFP-III 含有氷について誘電緩和測定を行った．

2-4-2．装置，サンプリング

誘電緩和測定用セルは円筒型を採用した（図 2-5）．試料スペースの幾何学的な形状から算出されるセル定数は 3.02×10^{-12} F であり，浮遊容量は 4.00×10^{-13} F であった．1%AFP-I 水溶液と 0.1%AFP-III 水溶液を，熱容量測定と同様の手法で調製した．調製した水溶液を誘電緩和測定用のセルに封入した．セルを Soratron 社製のインピーダンス測定装置に二端子法でセットした．二端子法にしたのは，四端子法よりもノイズが少なく，測定精度が高かったためである．

1%AFP-I 水溶液, 0.1%AFP-III 水溶液の誘電緩和における測定周波数域は 10 mHz – 10 MHz であり，各温度で定温に保って測定を行った．表 2-6 に誘電緩和測定における測定条件を示す．

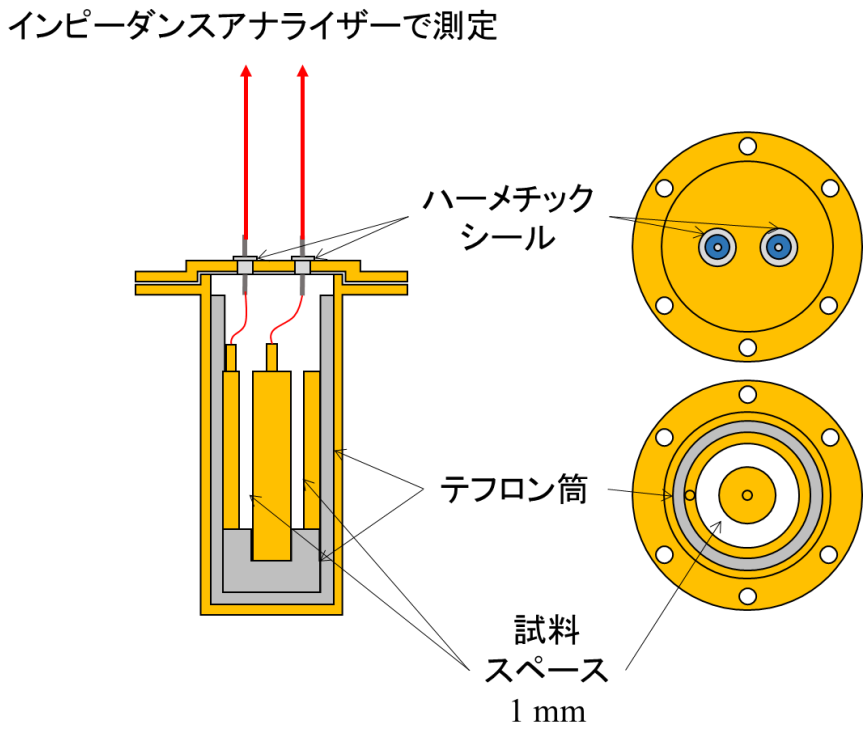


図 2-5　誘電緩和測定用セルの模式図．試料スペースに液体を満たしてからセルを封じた. 赤実線は絶縁被覆された銅線.

表 2-6　各種 AFP-I 水溶液についての誘電緩和の測定条件

AFP-I	測定周波数域	測定温度域
1%	1 Hz < f < 10 MHz	173 K < T < 206 K
AFP-III		
0.1%	0.01 Hz < f < 10 MHz	140 K < T < 235 K

3. Results

3-1. AFP-I 含有氷の熱容量および結晶構造

図 3-1 に各測定濃度における AFP-I 水溶液の熱容量を示す（5 K < T < 300 K）．熱容量は水溶液 1 g 当たりに換算した．各濃度は見やすくするために濃度の増加に対して 0.5 J K^{-1} (solution g)$^{-1}$ ずつ上方にシフトさせて示す．比較のために，破線で H_2O の熱容量，実線で乾燥 AFP-I の熱容量を示す．Inset には T > 270 K における熱容量を示す．Inset 内の熱容量は上方にシフトさせずに示している．

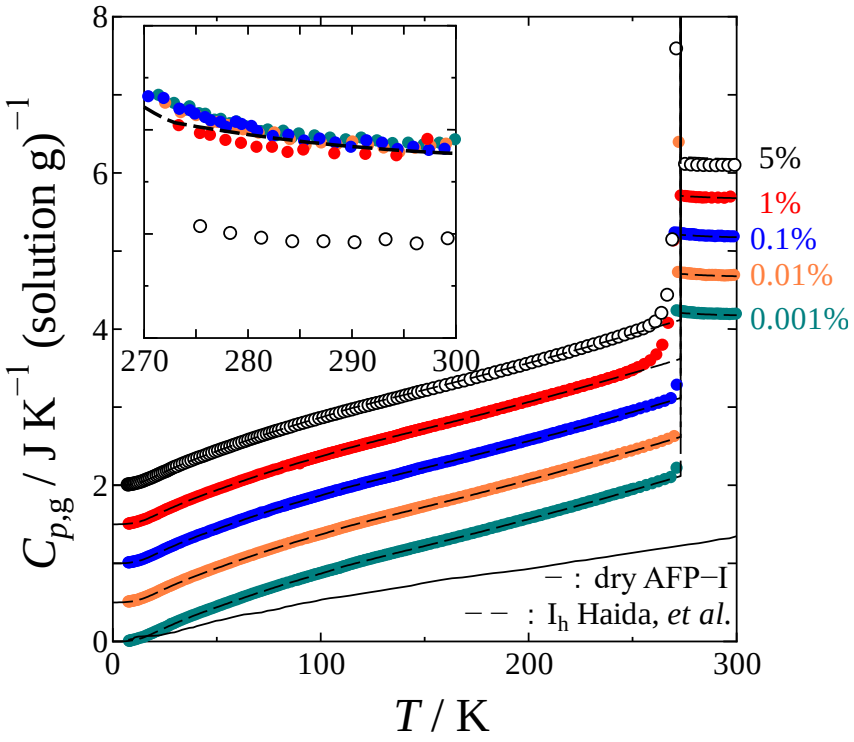


図 3-1　各濃度の AFP-I 水溶液の熱容量の温度依存性．熱容量は水溶液 1 g 当たりの熱容量で規格化している．見やすくするため，濃度毎に熱容量の値を 0.5 J K^{-1} (solution g)$^{-1}$ ずつ上方にシフトさせて示す．●，○：AFP-I 水溶液の熱容量，- - - : H_2O の熱容量，－：乾燥 AFP-I の熱容量．

測定した各濃度において，AFP-I 水溶液の熱容量は 273 K 近傍の温度で発散した（一次相転移）．したがって，1%よりも薄い濃度における AFP-I 水溶液の熱容量は，系の大部分を占める六方晶氷の熱容量が測定されていると考えられる．低温相の熱容量が六方晶氷のものであることは以下の XRPD 測定から確かめられた．

図 3-2 に 250 K における 1%の AFP-I 含有氷の XRPD 測定結果を散乱角（2θ）の関数として示す（図中赤実線）．比較のために同じ手順と温度で測定した純粋な六方晶氷の XRPD 測定結果を黒実線で示す．散乱強度は最大のピークの値を 10000 として規格化している．見やすさのために，1%の AFP-I 含有氷の測定結果を上方にシフトさせて示す．

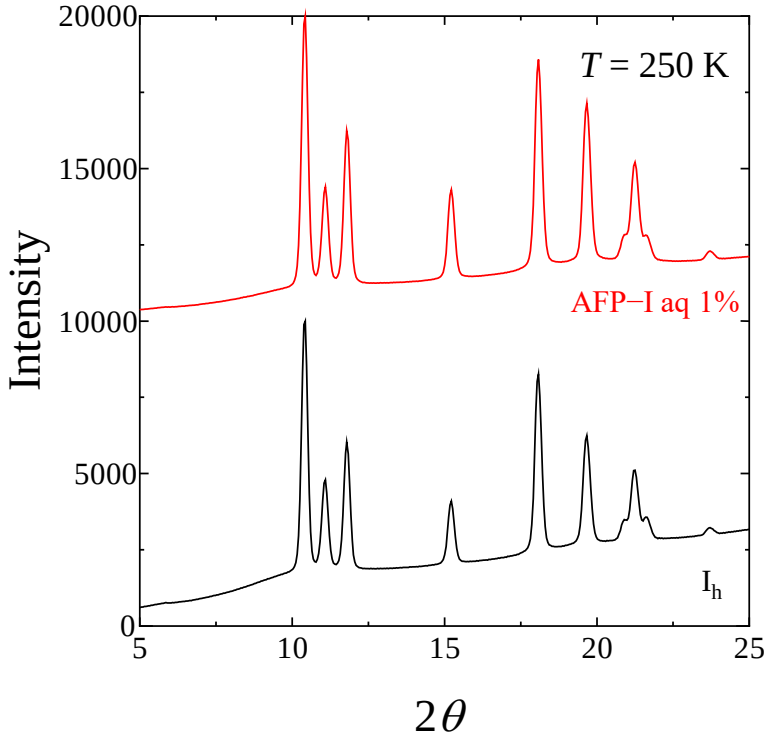


図 3-2　1%の AFP-I 含有氷と純粋な六方晶氷の PXRD の散乱角依存性（T = 250 K）．赤実線：1%AFP-I 含有氷の回折パターン，黒実線：純粋な六方晶氷の回折パターン．

PXRD から得られた 1%の AFP-I 含有氷のピークの位置は六方晶氷のピーク位置と比較して同じ位置で観測された．ピークの中でも，最も低い 2 つの 2θに対応するミラー指数はそれぞれ（1 0 0）と（0 0 2）であることと六方晶系であることを考慮して格子定数を導出した．　AFP-I 含有氷の構造は六方晶氷の構造と同じものであることが考えられる（表 3-1）．熱容量測定の結果と総合すると，一次相転移は六方晶氷の融解であることが確かめられた．

表 3-1　1%AFP-I 含有氷と純粋な六方晶氷における格子定数の比較．

格子定数	1%AFP-I 含有氷	H_2O at T = 250 K
a, b	4.5±0.1 Å	4.5±0.1 Å
c	7.3±0.3 Å	7.3±0.3 Å

3-2. AFP-I 含有氷のプロトンガラスの解析

XRPD 測定の結果からは，当初予想していた AFP-I と氷との相互作用による構造の変化は見出せなかった．熱容量からは氷の融解以外では相転移は見出せなかったが，精細に調査したところ，氷のプロトンガラスが六方晶氷で観測される温度（110 K）では観測されなかった．代わりに，140 K で熱容量の段差が観測された．図 3-3 に 1%の AFP-I 含有氷の熱容量を示す（80 K < T < 200 K）．熱容量の段差を見やすくするために，熱容量を温度で割った値を縦軸に取った．比較のために六方晶氷の熱容量（破線）を，1%AFP-I 含有氷の熱容量に重ねて示す．また，1%AFP-I 含有氷の自発的温度ドリフト，dT/dt の温度依存性を図 3-4 に示す．発熱現象と吸熱現象を明確にするために，測定結果から装置に由来する dT/dt 成分を差し引いた値が図示されている．図 3-4 中で正の値は試料が発熱したことを，負の値は吸熱したことを表している．

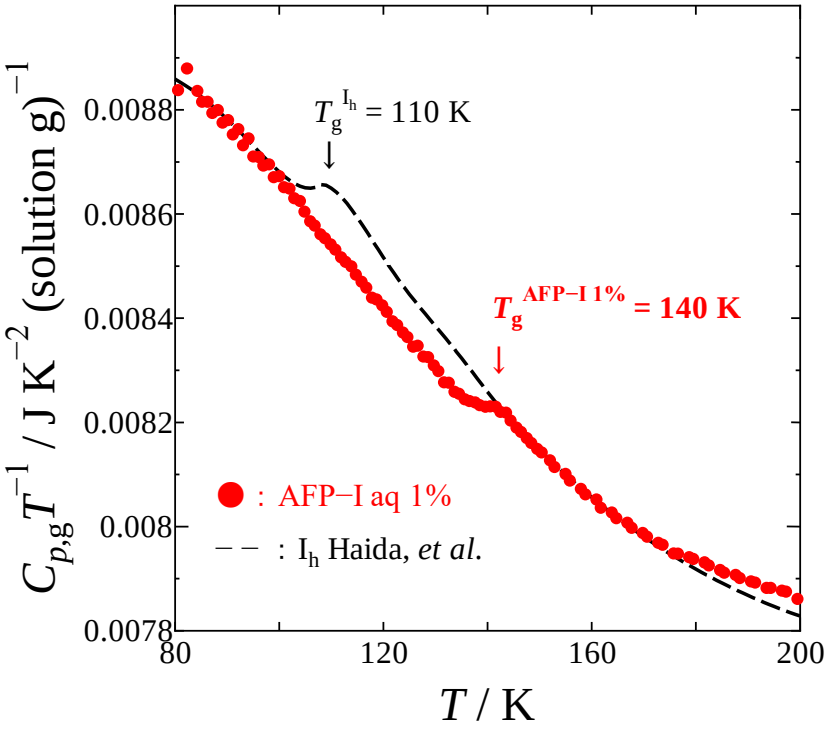


図 3-3　1%AFP-I 含有氷の熱容量の温度依存性（80 K < T < 200 K）．熱容量は水溶液 1 g 当たりの値として示す．熱容量の変化を見やすくするために熱容量を温度で割った値を示す．●：1%AFP-I 含有氷の熱容量，破線：純粋な六方晶氷の熱容量．

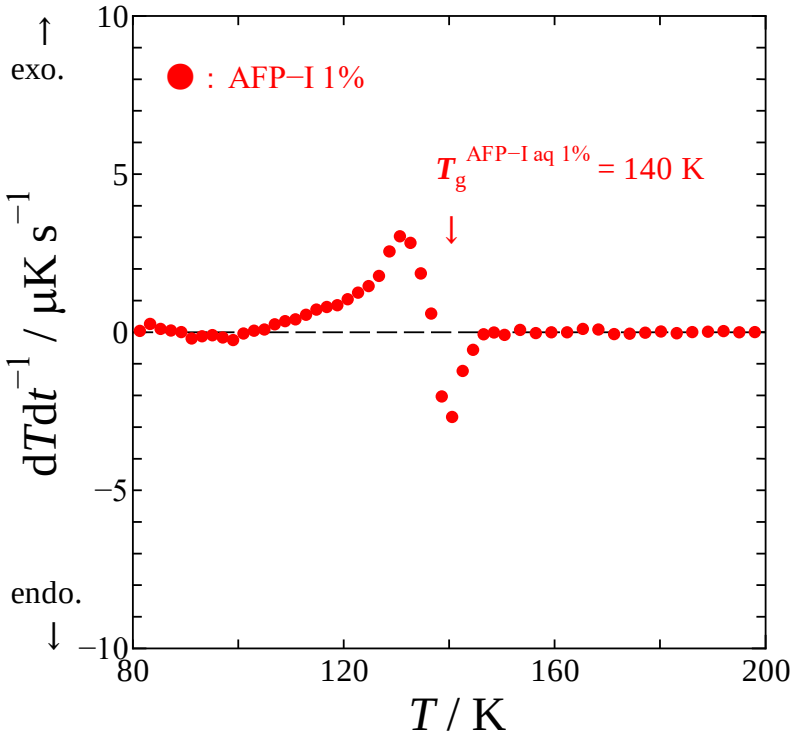


図 3-4　1%AFP-I 含有氷の自発的温度ドリフト（80 K < T < 200 K）．正の値を発熱，負の値を吸熱とした．

Introduction で，プロトンガラスに限らずガラス転移が起こる温度域では，高温側に吸熱現象を伴う発熱現象が観測されることを述べた．実際に 1%AFP-I 含有氷の dT/dt において，120 K－150 K にかけてガラス転移でよく観測される発吸熱現象が観測された．1%AFP-I 含有氷の dT/dt で観測されたガラス転移の温度域が 1%AFP-I 含有氷の熱容量で観測された段差と同じ温度域であるので，熱容量と dT/dt で観測された現象は同一のものに由来するものと考えられる．XRPD の結果から，1%AFP-I 含有氷の大部分は純粋な六方晶氷と同じ結晶構造になっているため，1%AFP-I 含有氷のガラス転移はプロトンガラスによるものであり，AFP-I 分子の存在によりプロトンガラスが高温側にシフトしたと考えられる．

1%の AFP-I 含有氷についての温度ジャンプ法から得られた緩和時間の温度依存性を図 3-5 に示す．縦軸は常対数で示している．比較のために，純粋な六方晶氷の熱容量測定から得られた，氷結晶内の水分子の再配向運動の緩和時間を示す（図中×）[15]．また，得られた緩和時間に対して Arrhenius 式（$\tau = \tau_0 \exp(E_a / RT)$）を用いて，図中の緩和時間の傾きから活性化エネルギーE_aを得た．

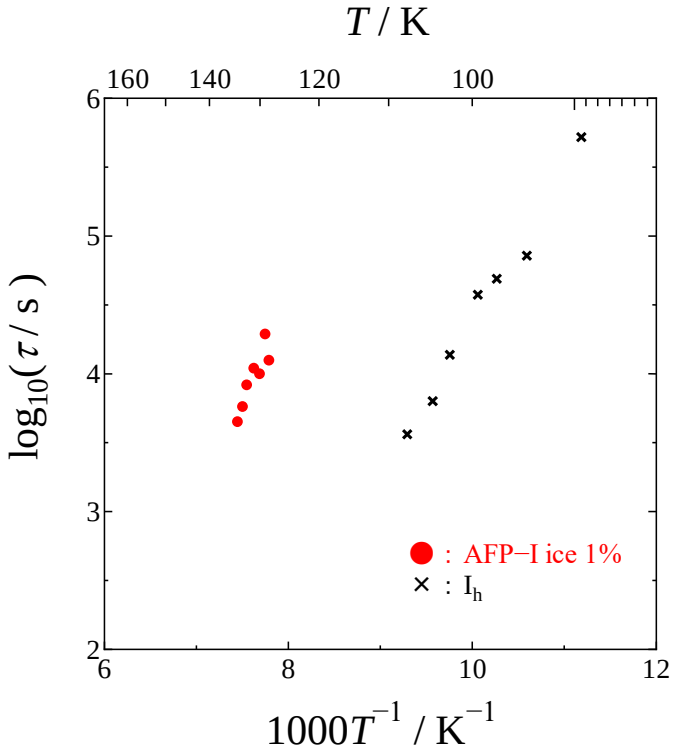


図 3-5　1%の AFP-I 含有氷のプロトンガラスにおける緩和時間の温度依存性. ●: 1%AFP-I 含有氷の緩和時間, ×: 純粋な六方晶氷の緩和時間.

1%AFP-I 含有氷の緩和時間は，純粋な六方晶氷の緩和時間と比較して高温側で観測された．1%の AFP-I 含有氷における水分子の再配向運動のΔE_a は，緩和時間の温度依存性から 29±5 kJ mol^{-1} と導出された. 1%の AFP-I 含有氷のΔE_a は純粋な六方晶氷のΔE_a = 21.2 kJ mol^{-1} と比較して大きい値であった.

図 3-6，7 に AFP-I 含有氷の熱容量と dT/dt の濃度依存性を示す（80 K < T < 200 K）．見やすくするために濃度毎に熱容量を 0.0002 J K^{-2} (solution g)$^{-1}$，dT/dt を 5 μK s^{-1} ずつ上方にシフトさせて示す．また，AFP-I 含有氷と純粋な六方晶氷のガラス転移温度の違いを判別しやすくするために，破線で純粋な六方晶氷の熱容量を各濃度の AFP-I 含有氷の熱容量に重ねて示した.

また, 図 3-8 に温度ジャンプ法から決定した各濃度における AFP-I 含有氷中の水分子の再配向運動の緩和時間を示す. 比較のために, 純粋な六方晶氷における水分子の再配向運動の緩和時間を示す．緩和時間から求めた各濃度のΔE_a を表 3-2 にまとめる.

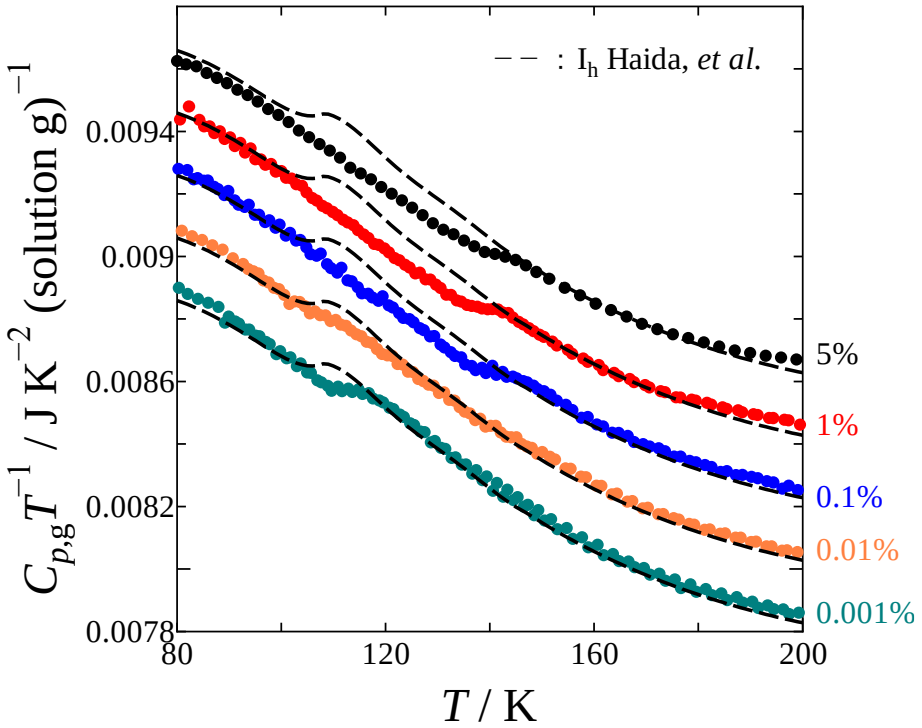


図 3-6　AFP-I 含有氷の熱容量の濃度依存性（80 K < T < 200 K）. 見やすくするために濃度が増加するごとに熱容量を 0.0002 J K^{-2} (solution g)$^{-1}$ 上方にシフトさせて示す．また, 比較のために各濃度の AFP-I 含有氷の熱容量に純粋な六方晶氷の熱容量を重ねて示す.

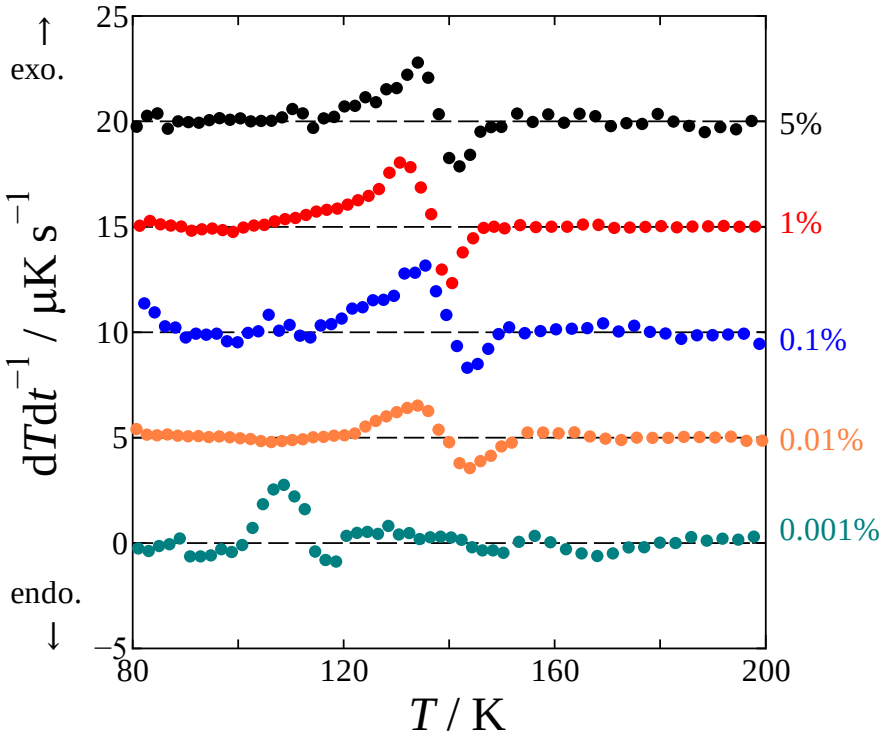


図 3-7　AFP-I 含有氷の d*T*/d*t* の濃度依存性（80 K < *T* < 200 K）．正の値を発熱，負の値を吸熱とする．また，見やすさのために濃度毎に値を 5 μK s^{-1}ずつ上方にシフトさせて示す．

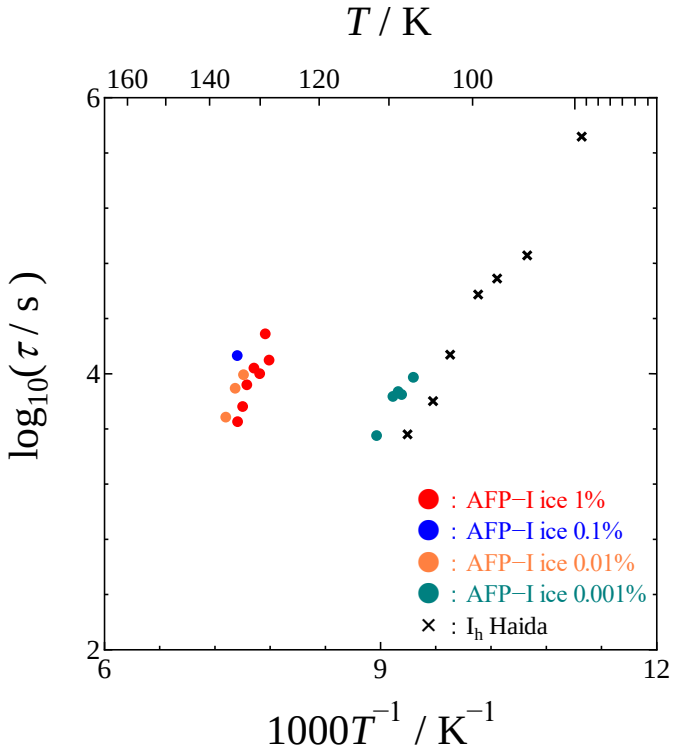


図 3-8　各濃度の AFP-I 含有氷内の水分子の再配向運動の緩和時間．●：各濃度の AFP-I 含有氷の緩和時間，×：純粋な六方晶氷の緩和時間．図中の表記 I_h は六方晶氷であることを示している．

表 3-2　AFP-I 含有氷のプロトンガラス現象におけるΔE_a.

AFP-I 濃度	**ΔE_a / kJ mol^{-1}**
5%	-
1%	**29±5**
0.1%	-
0.01%	**31±5**
0.001%	**19±3**
純粋な六方晶氷（0%）[15]	21±1

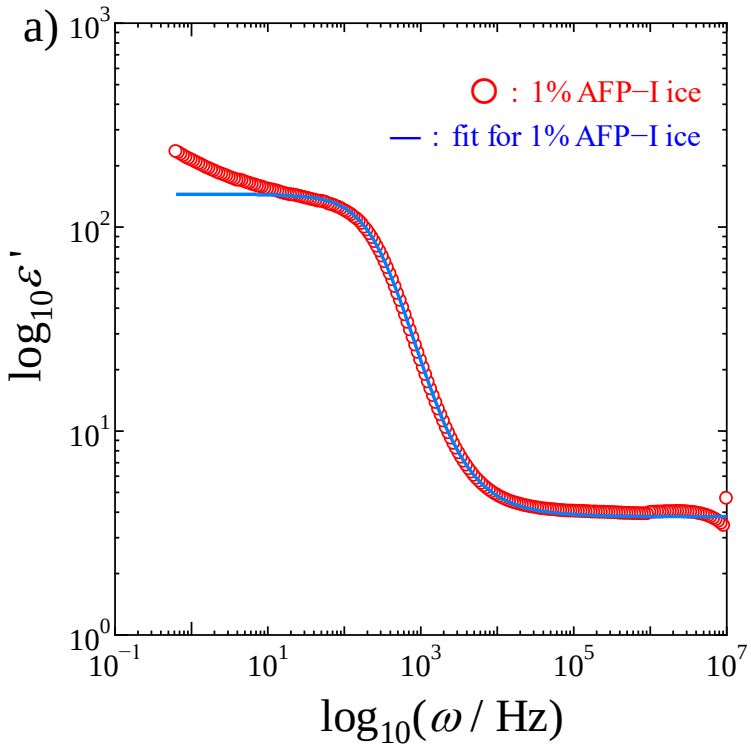
AFP-I 含有氷におけるプロトンガラスのガラス転移点の濃度依存性について調べる．図 3-6 では，AFP-I の濃度が 0.01%まで希釈されてもプロトンガラスによる熱容量の段差は純粋な六方晶氷よりも高温において観測された．図 3-7 の d*T*/d*t* の濃度依存性でも 0.001%までガラス転移が純粋な六方晶氷よりも高温で観測された．0.001%の濃度では，熱容量も d*T*/d*t* も 115 K 近傍の温度域でガラス転移が観測された．図 3-8 から，AFP-I 含有氷のプロトンガラスに由来する緩和時間は 5%から 0.01%の濃度まではほぼ同じ温度域で導出された．また，

表 3-2 よりΔE_aは 0.001%と 0.01%の濃度を境にわずかに減少した．より広い温度域でプロトンガラスの素過程，すなわち氷中の水分子の再配向運動の情報を得られる誘電緩和測定の結果を次節で述べる．

3-3. AFP-I 含有氷の誘電緩和測定

図 3-9 に 1%AFP-I 含有氷の誘電緩和測定の結果を示す（T = 201 K，1 Hz < ω < 10 MHz）．図 3-9a)では複素誘電率の実部を，図 3-9b)では虚部を両対数プロットで表示している．また，緩和時間を求めるために用いたフィッティング関数を青実線で示す．フィッティングはデバイ緩和で上手く回帰しなかったが，以下の Cole-Cole の式でよく回帰した．Cole-Cole の式で回帰したため，AFP-I 含有氷の素過程の緩和時間には分布があることを意味している．

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + (i\omega\tau)^\alpha}$$



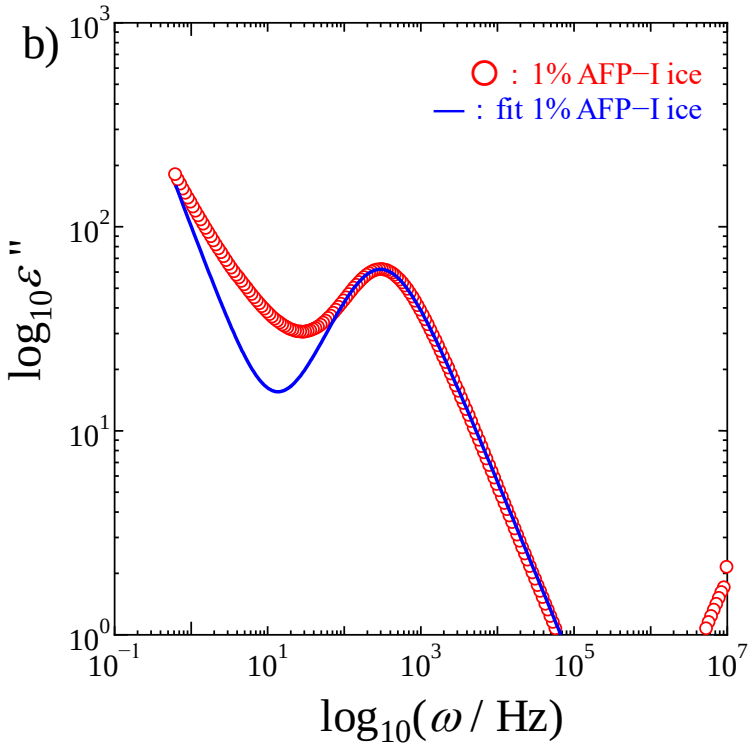


図 3-9　1%AFP 含有氷の誘電緩和の周波数依存性（$T = 201$ K，1 Hz < ω < 10 MHz）．フィッティング曲線（Cole-Cole 式）を青実線で示す．

図 3-9 より，1%AFP-I 含有氷では異なる周波数域で 2 つの緩和過程が観測された．低周波数側の緩和モードは AFP 分子に由来するものか，電極分極による緩和モードであると考えられるが，本研究の注目する分子運動ではないのでここでは議論しない．高周波数側の緩和モードの$\Delta\varepsilon$は，純粋な六方晶氷の$\Delta\varepsilon$[16]よりも大きい値（表 3-3）であるものの，純粋な六方晶氷の誘電緩和測定で観測される，氷中の水分子の再配向運動と対応している．$\Delta\varepsilon$の増加は不純物を導入した系でも$\Delta\varepsilon$見出されている[21]ため，本研究でも AFP-I 分子の存在によって$\Delta\varepsilon$が増加したと考えられる．

表 3-3　1%AFP-I 含有氷の複素誘電率から導出した緩和時間（τ）と緩和強度（$\Delta\varepsilon$）．

試料	τ / s	$\Delta\varepsilon$
1%AFP ice (201.9 K)	0.0033	141.5
Hexagonal ice (207.4 K)[16]	0.045	130

図 3-10 に 1%AFP-I 含有氷の複素誘電率の温度依存性を示す（1 Hz < ω < 10 MHz，173 K < T < 206 K）．（a）は実部を，（b）は虚部を示す．

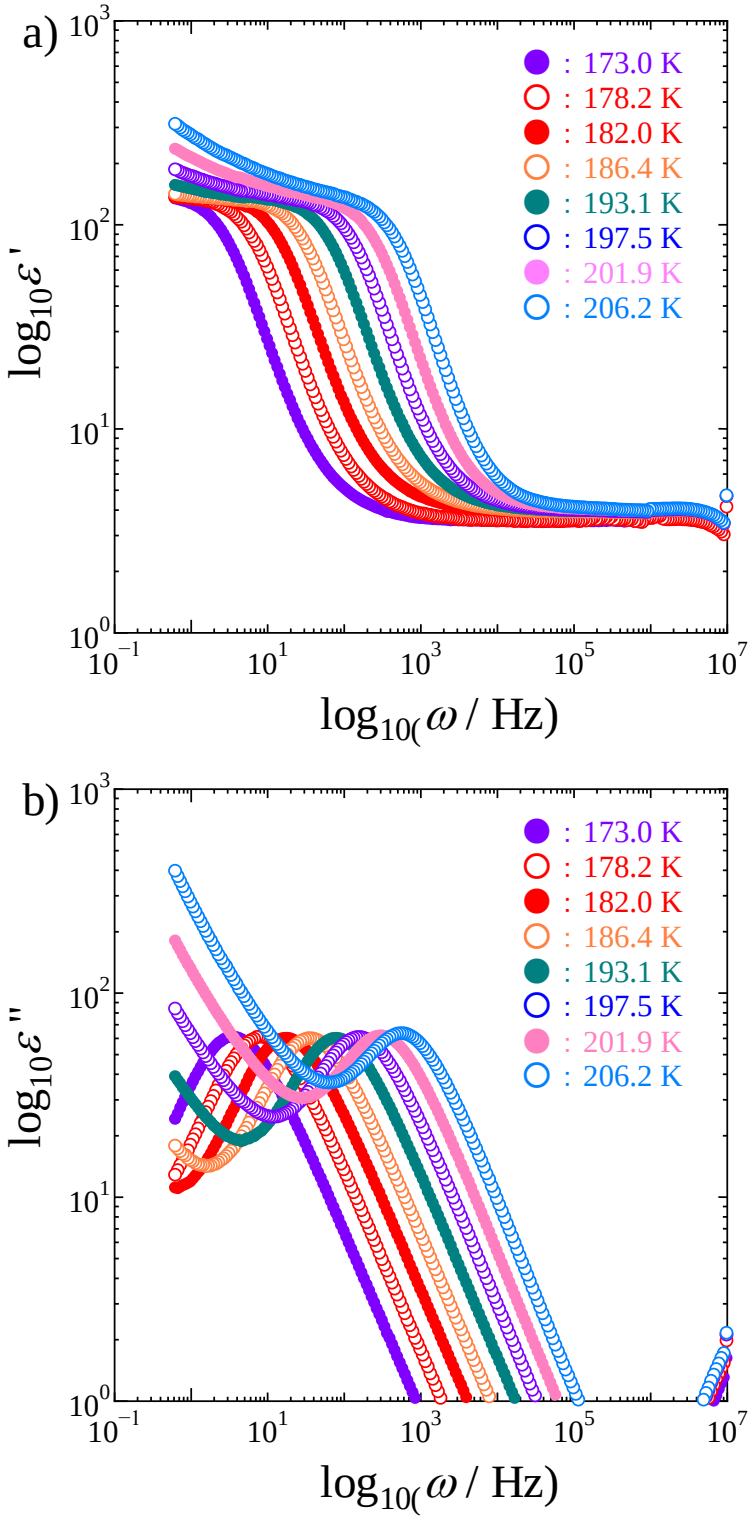


図 3-10　1%AFP-I 含有氷の複素誘電率の温度依存性．（a）実部，（b）虚部（173 K < T < 206 K）．縦軸と横軸は両対数プロットで表示している．

各温度の複素誘電率は Cole-Cole 型関数でよく回帰した．得られたフィッティングパラメータを表 3-4 にまとめた．ここで特徴的なのは，$\Delta\varepsilon$の温度依存性が常誘電体における$\Delta\varepsilon$の温度依存性（キュリー・ワイス則）に従っていない点である．本研究ではこの$\Delta\varepsilon$の挙動がどのような意味を持つかは論じないが，AFP の性質を知るうえで重要な手掛かりになる可能性がある．

表 3-4　1%AFP-I 含有氷の複素誘電率から導出した緩和時間, 緩和強度, 緩和時間の分布（α）

T / K	τ / s	$\Delta\varepsilon$	α
173.0	0.272	137.5	0.919
178.2	0.120	136.3	0.923
182.0	0.0543	133.1	0.931
186.4	0.0266	133.2	0.924
193.1	0.0127	138.0	0.895
197.5	0.00656	141.1	0.903
201.9	0.00334	141.5	0.912
206.2	0.00194	139.3	0.869

図 3-11 に熱容量測定と誘電緩和測定で得られた AFP-I 含有氷の緩和時間の温度依存性をまとめて示す. また, 緩和時間の温度依存性から得られた活性化エネルギーを表 3-5 に示す.

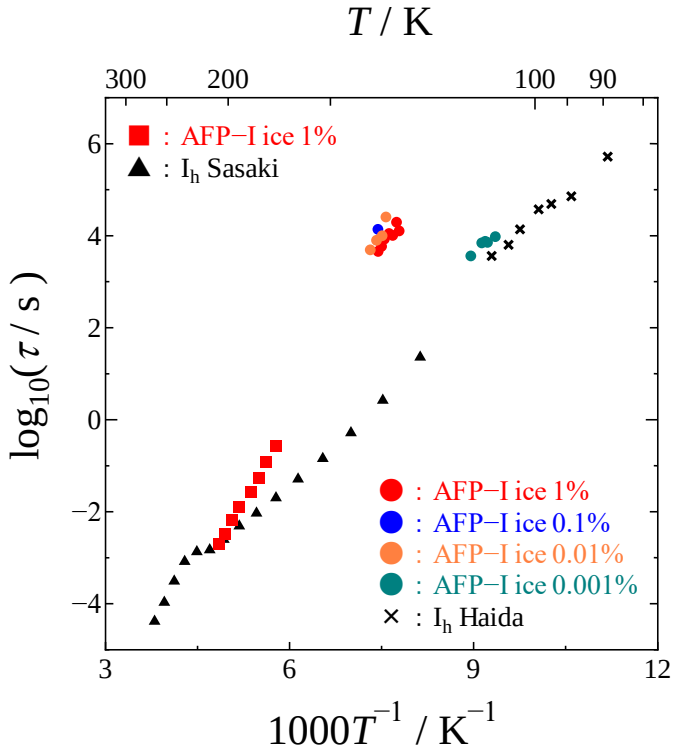


図 3-11　AFP-I 含有氷の緩和時間の温度依存性. 比較として純粋な六方晶氷における緩和時間の温度依存性も示す. ●：温度ジャンプ法で導出した AFP-I 含有氷の緩和時間, ■：誘電緩和測定から得られた 1%AFP-I 含有氷の緩和時間, ×：温度ジャンプ法で導出した純粋な六方晶氷の緩和時間, ▲:誘電緩和測定から得られた六方晶氷の緩和時間.

表 3-5　1%AFP-I 含有氷の緩和時間から導出した活性化エネルギー.

温度ジャンプ法	ΔE_a / kJ mol^{-1}
5%	-
1%	29±5
0.1%	-
0.01%	31±5
0.001%	19±3
純粋な六方晶氷（0%）　[15]	21±1
誘電緩和測定	**ΔE_a / kJ mol^{-1}**
1%	**43.9±0.8**

純粋な六方晶氷（0%） [17, 18]	55.4 (230 K < T < 273 K) 23 (150 K < T < 230 K)

誘電緩和測定から得られた 1%AFP-I 含有氷の高温度域における緩和時間の温度依存性と活性化エネルギーは，同じ温度域における純粋な六方晶氷のものとは異なる値になった．純粋な六方晶氷は 230 K を境に素過程の活性化エネルギーが半分まで変化するが，AFP-I 含有氷は 230 K 以下の温度域でも活性化エネルギーは変化しなかった．1%AFP-I 含有氷の活性化エネルギーは純粋な六方晶氷の 230 K を境に変化する活性化エネルギーの間の値となった．

温度ジャンプ法から得られた 1%AFP-I 含有氷の活性化エネルギーと誘電緩和測定から得られた活性化エネルギー比較すると，温度ジャンプ法で導出した活性化エネルギーよりも，誘電緩和測定からで得られた活性化エネルギーの方が大きかった．すなわち，活性化エネルギーにも温度依存性が観測された．

3-4. AFP-III 含有氷の熱容量と結晶構造

図 3-12 に 1%，0.1%，0.001%の濃度における，AFP-III 水溶液の熱容量測定結果を示す（5 < T < 300 K）．熱容量は水溶液 1 g 当たりの値で示す．各濃度は見やすくするために 0.5 J K^{-1} (solution g)$^{-1}$ ずつ上方にシフトして示す．また，比較のために純粋な H_2O の熱容量を破線で示す．Inset には T > 270 K の温度域の AFP-III 水溶液の熱容量を示す．

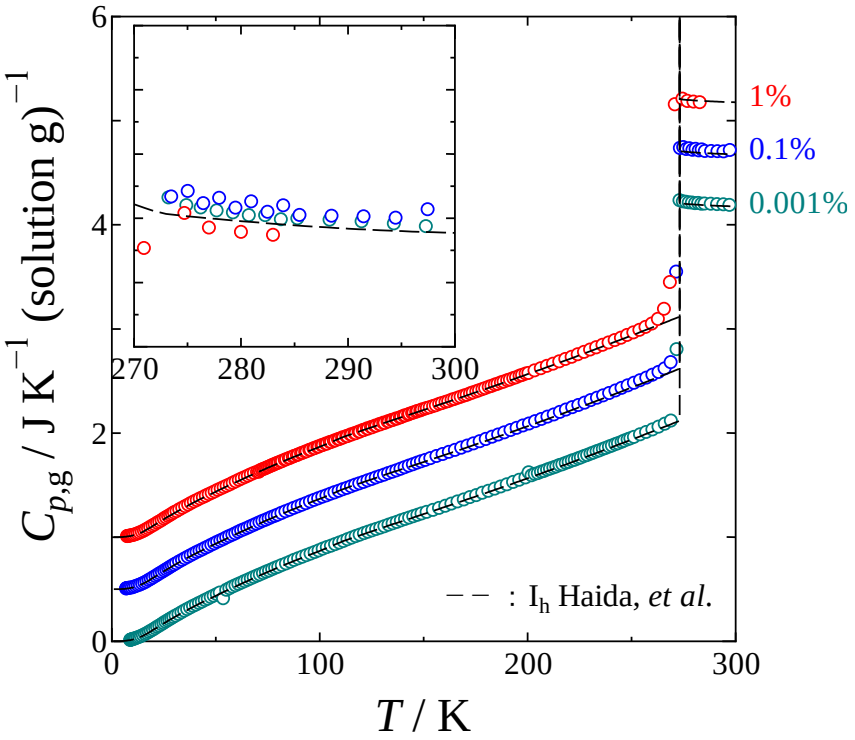


図 3-12　1%，0.1%，0.001%の濃度の AFP-III 水溶液の熱容量の温度依存性．熱容量は水溶液 1 g あたりの熱容量に規格化している．見やすくするために，濃度毎に熱容量の値を.5 J K^{-1} (solution g)$^{-1}$ ずつ上方にシフトして示す．○：AFP-III 水溶液の熱容量，破線：純粋な H_2O の熱容量.

1%，0.1%，0.001%の各試料において，AFP-I 水溶液と同様に，AFP-III 水溶液に氷の融解が見出された（T ~ 273 K）. 融点が純粋な六方晶氷のものと対応しているため, 各濃度の AFP-III 水溶液は氷点以下の温度域では六方晶氷が存在していると考えられる．六方晶氷の相が存在していることを確かめるため, 以下の XRPD の結果から AFP-III 含有氷の結晶構造を確認する.

図 3-13 に 250 K における 1%の AFP-III 含有氷の XRPD 測定結果を青実線で示す（5° < 2θ < 25°）. 比較のために, 1%の AFP-I 含有氷（赤実線）と純粋な六方晶氷（黒実線）の XRPD 測定結果を示す．散乱強度は最大ピークの値を 10,000 として規格化している．見やすくするために，1%の AFP-I 含有氷と 1%AFP-III 含有氷の結果を 10,000 ずつ上方にシフトして示す.

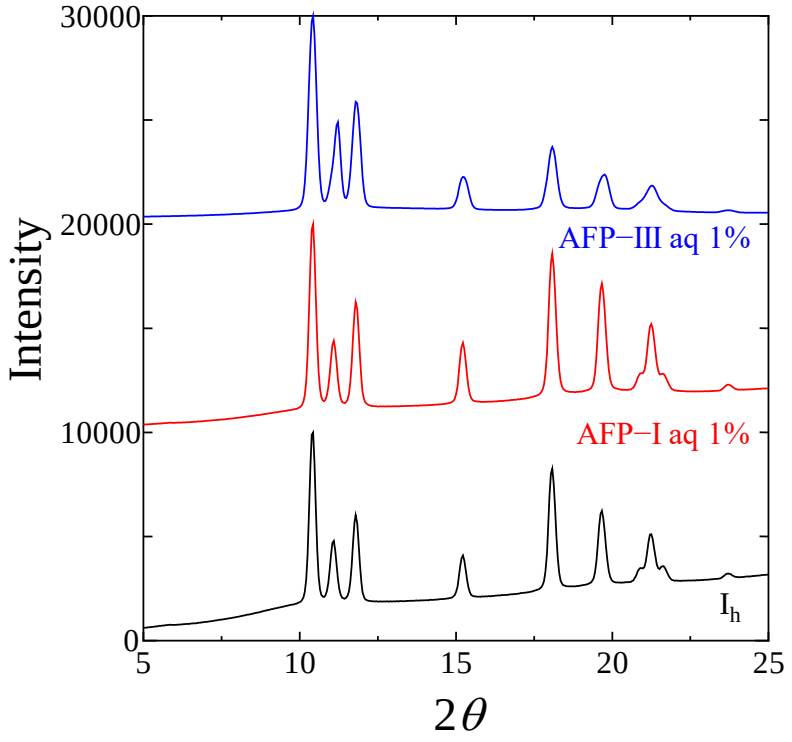


図 3-13　1%の AFP-III 含有氷（青実線），1%AFP-I 含有氷（赤実線），純粋な六方晶氷（黒実線）の XRPD の回折パターン（T = 250 K）．見やすくするためにそれぞれの値を 10,000 ずつ上方にシフトさせて示す．

1%AFP-III 含有氷の XRPD の回折ピークは，純粋な六方晶氷や AFP-I 含有氷と同じ値で得られた．AFP-I 含有氷と同様に，AFP-III 含有氷の大部分は六方晶氷が存在していることを確認した．

3-5. AFP-III 含有氷のプロトンガラスの解析

図 3-14 に 1%AFP-III 含有氷の熱容量を，図 3-15 に同じ温度域における 1%AFP-III 含有氷の dT/dt を示す（80 K < T < 200 K）．熱容量の段差を見やすくするために，縦軸は熱容量を温度で割った値で示している．また，dT/dt は測定装置由来の dT/dt の寄与を差し引いた値を示す．

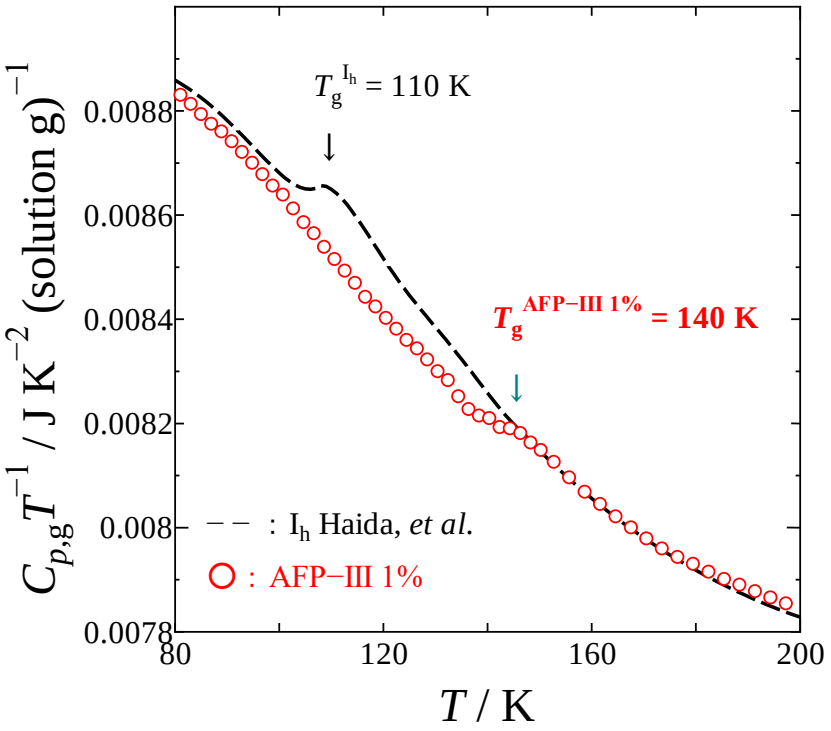


図 3-14　1%AFP-III 含有氷の熱容量の温度依存性（80 K < T < 200 K）．熱容量は水溶液 1 g 当たりの値として示す．熱容量の変化を見やすくするために熱容量を温度で割った値を示す．●：1%AFP-III 含有氷の熱容量，破線：純粋な六方晶氷の熱容量．

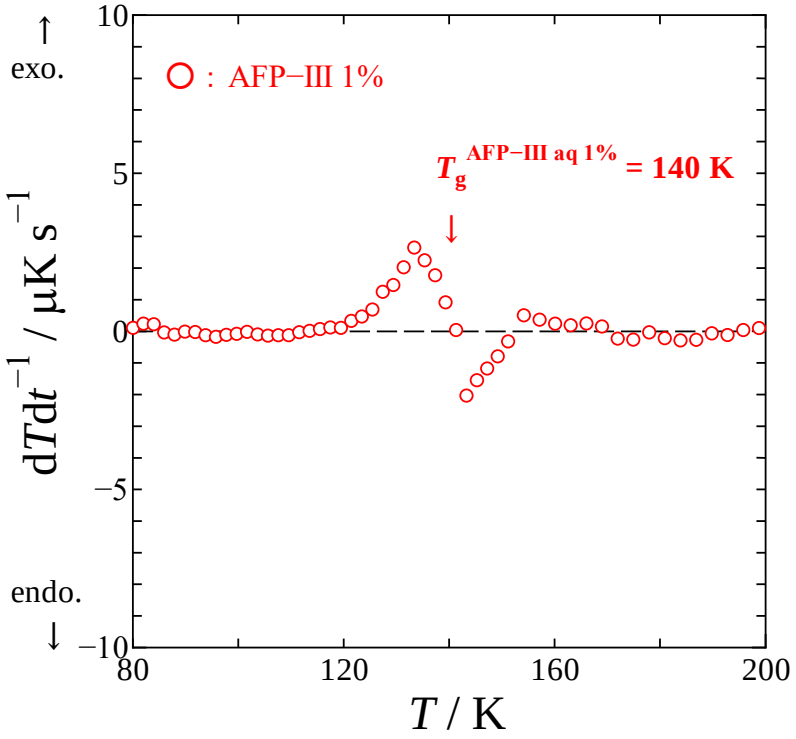


図 3-15　1%AFP-III 含有氷の自発的温度ドリフトの温度依存性（80 K < T < 200 K）．正の値を発熱，負の値を吸熱とした．

1%AFP-III 含有氷の熱容量からは熱容量の段差で，dT/dt からは高温側に吸熱を伴う発熱によってガラス転移が観測された．2 種類の測定結果から 1%AFP-III 含有氷では，溶質の高次構造が異なる AFP-I 含有氷と同じ現象（プロトンガラスの高温へのシフト）が起こっていることが見出された．

図 3-16 に 1%AFP-III 含有氷のガラス転移の緩和時間の温度依存性を示す．比較のために図中に純粋な六方晶氷のプロトンガラスの緩和時間と AFP-I 含有氷のガラス転移の緩和時間も示す．また，表 3-6 に 1%AFP-III 含有氷の緩和時間の温度依存性から導出した活性化エ

ネルギーを示す．1%AFP-III 含有氷のΔE_aは AFP-I 含有氷と純粋な六方晶氷のΔE_aの中間の値になった．

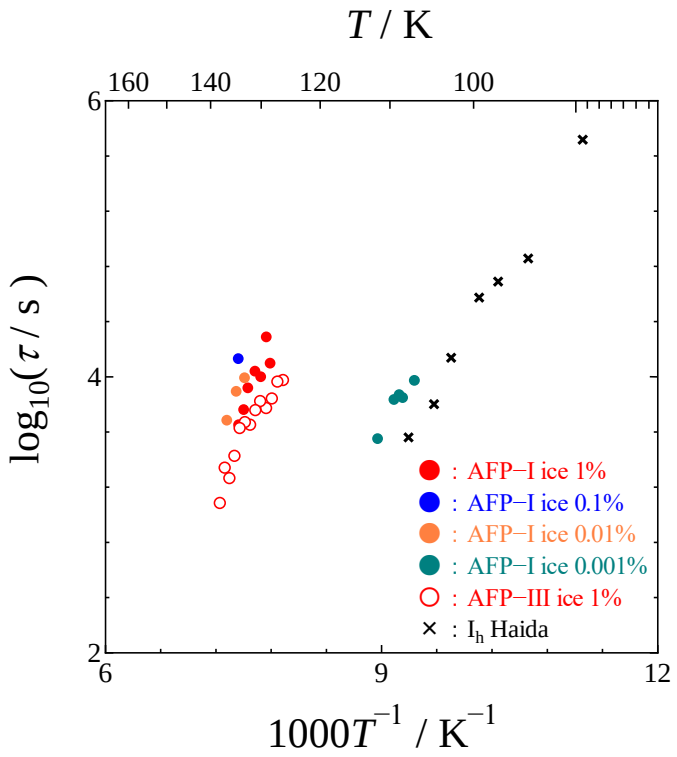


図 3-16　1%の AFP-III 含有氷のプロトンガラスにおける緩和時間の温度依存性．○：1%AFP-III 含有氷の緩和時間，●：各濃度における AFP-I 含有氷の緩和時間，×：純粋な六方晶氷の緩和時間．

表 3-6　AFP 含有氷の各試料における水分子の再配向運動のΔE_a.

試料	濃度	ΔE_a / kJ mol^{-1}
AFP-I（温度ジャンプ法）	5%	-
	1%	29±5
	0.1%	-
	0.01%	31±5
	0.001%	19±3
AFP-III（温度ジャンプ法）	**1%**	**24±2**
純粋な六方晶氷[15]	-	21±1
試料	濃度	ΔE_a / kJ mol^{-1}

AFP-I（誘電緩和測定）	1%	43.9±0.8
純粋な六方晶氷 [17, 18]		55.4 (230 K < T < 273 K) 23 (150 K < T < 230 K)

図 3-17 に AFP-III 含有氷についての熱容量の濃度依存性を示す（80 K < T < 200 K）．見やすくするためにそれぞれの濃度における熱容量を 0.0002 J K^{-2} (solution g)$^{-1}$ ずつ上方にシフトしている．また，純粋な六方晶氷の熱容量を破線で示している．図 3-18 に AFP-III 含有氷の dT/dt の濃度依存性を示す（80 K < T < 200 K）．見やすくするために各濃度の dT/dt を 5 μK s^{-1} ずつ上方にずらして示す．

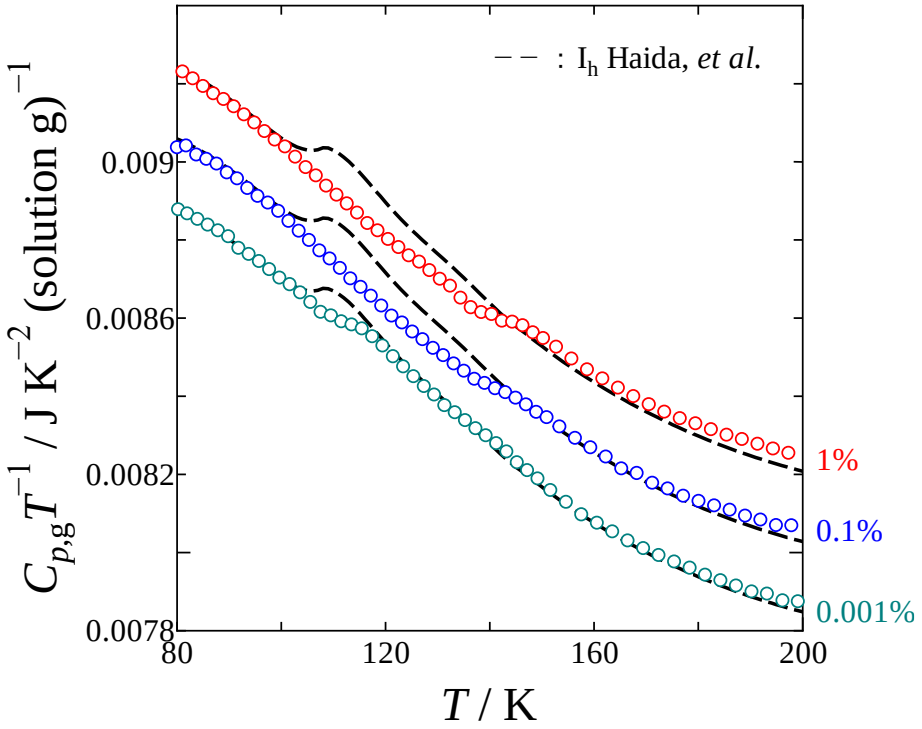


図 3-17　AFP-III 含有氷の熱容量の濃度依存性（80 K < T < 200 K）. 見やすくするために各濃度で熱容量を 0.0002 J K^{-2} (solution g)$^{-1}$ ずつ上方にシフトさせて示す．また，比較のために各濃度の AFP-III 含有氷の熱容量に純粋な六方晶氷の熱容量（破線）を重ねて示す．

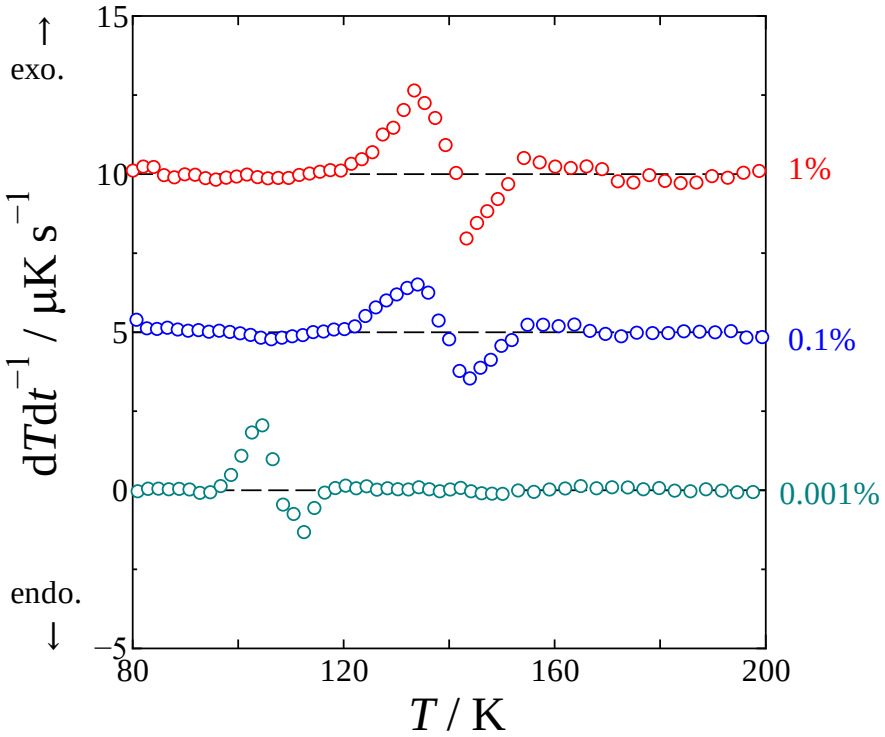


図 3-18　AFP-III 含有氷の d*T*/d*t* の濃度依存性（80 K < *T* < 200 K）．正の値を発熱，負の値を吸熱とした．また，見やすさのために濃度毎に値を 5 μK s^{-1}ずつ上方にシフトさせて示す．

AFP-III 含有氷の熱容量の段差は 1%と 0.1%が 140 K，0.001%が 115 K で観測された．d*T*/d*t* も同様の濃度依存性が観測された．これらの結果は AFP-I 含有氷と同様の濃度依存性であった．したがって，AFP の三次構造が異なっていても，六方晶氷のプロトンガラスが高温で観測される現象は共通していることが明らかになった．

3-6. AFP-III 含有氷の誘電緩和測定

図 3-19 に 233 K における 0.1%AFP-III 含有氷の誘電緩和測定結果を示す（0.1 Hz < ω < 10 MHz）．図 3-19a)では複素誘電率の実部を，図 3-19b)では虚部を示す．結果は両対数プロットで示している．また，観測された緩和過程の緩和時間を導出するためのフィッティング曲線も同図で示す．フィッティング関数は Cole-Cole の式を用いた．

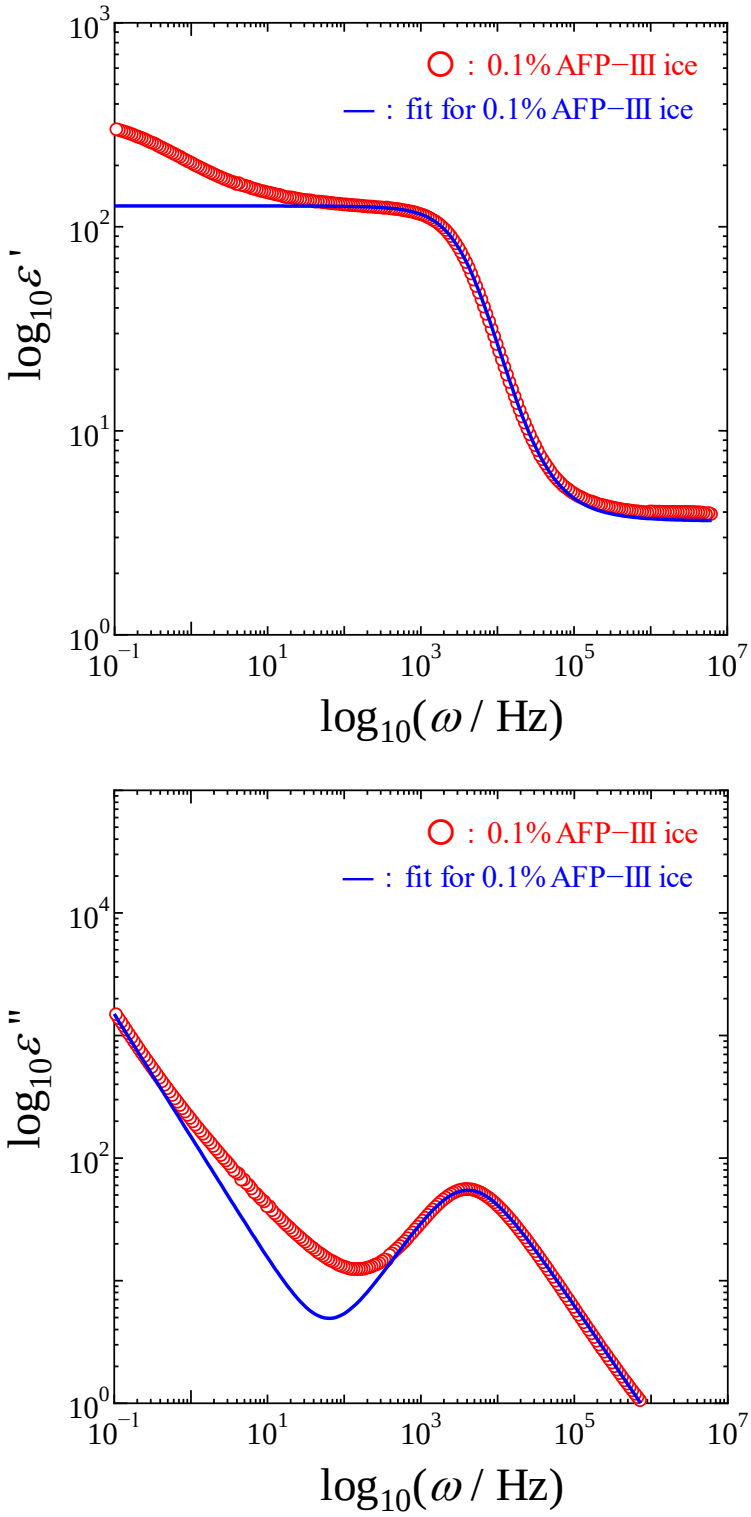


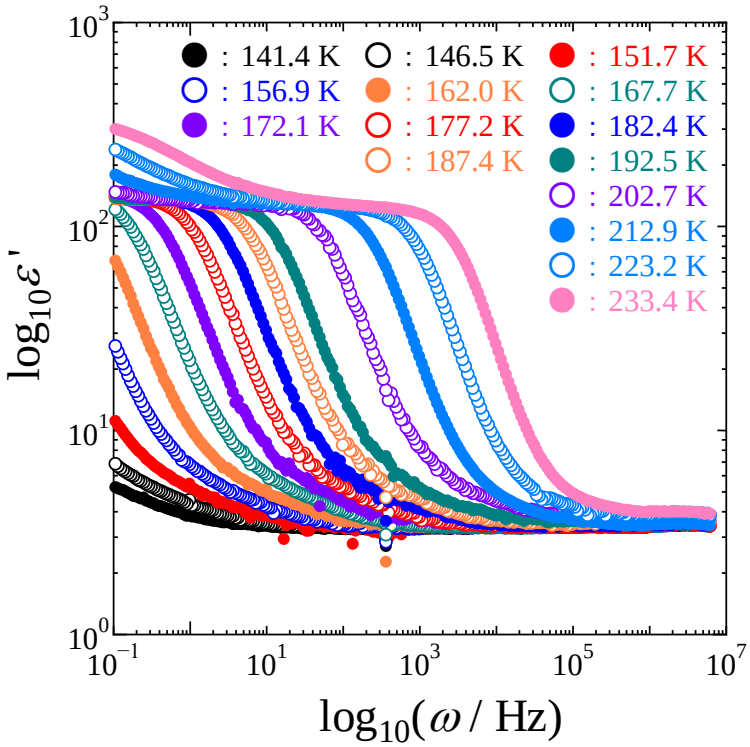
図 3-19　233 K における 0.1%の AFP-III 含有氷の誘電緩和測定の角周波数依存性．a)実部，b)虚部．

図 3-19 から，0.1%AFP-III 含有氷には低周波数側と高周波数側に 2 つの緩和モードが存在した．AFP-I 含有氷と同様に，低周波数側は電極分極などの影響と考えられるので，ここでは触れない．高周波数で見出された緩和モードについて，Cole-Cole の式から導出した 0.1%AFP-III 含有氷の緩和時間と緩和強度を表 3-7 に示す（T = 233 K）．比較のために純粋な六方晶氷の緩和時間と緩和強度も示す（T = 228 K）．AFP-I 含有氷と同様に，緩和強度のオーダーから高周波数側の緩和モードが氷中の水分子の再配向運動を検出していたことを確かめた．

表 3-7　1%AFP-I 含有氷の複素誘電率から導出した緩和時間（τ）と緩和強度（$\Delta\varepsilon$）．

試料	τ / s	$\Delta\varepsilon$
1%AFP ice (233.4 K)	0.00027	126.4
Hexagonal ice (228.5 K)[16]	0.00252	101

図 3-20 に 1%の AFP-III 含有氷の誘電緩和測定の温度依存性を示す（140 K < T < 233 K）．見やくするために，結果は両対数プロットで示す．図 3-20a)は複素誘電率の実部を，図 3-20b)は虚部を示す．また，Cole-Cole の式から導出した各測定温度の緩和時間，緩和強度，緩和時間の分布をそれぞれ表 3-8 にまとめた．141 K < T < 165 K は緩和の高周波数側しかフィッティングに使用できないため，得られたデータは誤差の大きいものとなる．したがってこの温度域の値は表 3-8 には載せていない．0.1%AFP-III 含有氷の$\Delta\varepsilon$の温度依存性は，1%AFP-I 含有氷とは異なり，温度の低下に伴い増加する傾向があった．



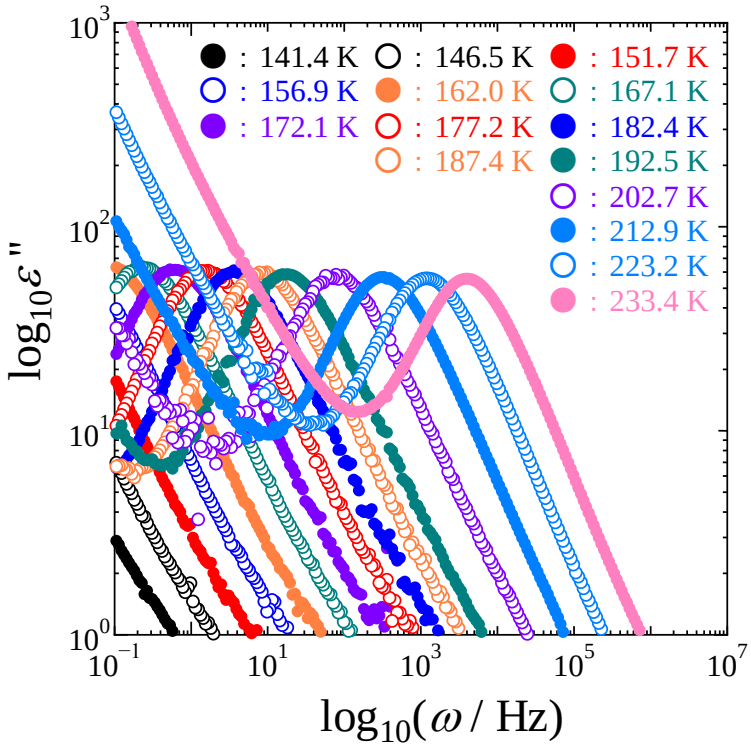


図 3-20　0.1%の AFP-III 含有氷の複素誘電率の温度依存性
（140 K < T < 233 K）．a)実部，b)虚部．

表 3-8　各測定温度における 0.1%AFP-III 含有氷の緩和時間，緩和強度，緩和時間の分布．

T / K	τ / s	$\Delta\varepsilon$	α
167.1	4.35	147.1	0.89
172.1	1.60	141.5	0.91
177.2	0.638	138.0	0.91
182.0	0.263	134.5	0.92
187.4	0.117	131.7	0.93
192.5	0.0541	130.4	0.93
202.7	0.0129	130.9	0.90
212.9	0.003268	129.9	0.90
212.2	0.000845	124.3	0.93
233.4	0.000266	126.4	0.93

図 3-21 に 0.1%AFP-III 含有氷の緩和過程の緩和時間の温度依存性（□）を示す．比較のためにこれまで導出した緩和時間も同図に示す．○：温度ジャンプ法から得られた 1%の AFP-III 含有氷の緩和時間，●：温度ジャンプ法から得られた各濃度の AFP-I 含有氷の緩和

時間，温度ジャンプ法（×）および誘電緩和測定（▲）から得られた純粋な六方晶氷の緩和時間とした．また，Arrhenius の式から算出した 0.1%AFP-III 含有氷の活性化エネルギーと，これまで算出した活性化エネルギーを表 3-9 にまとめた．

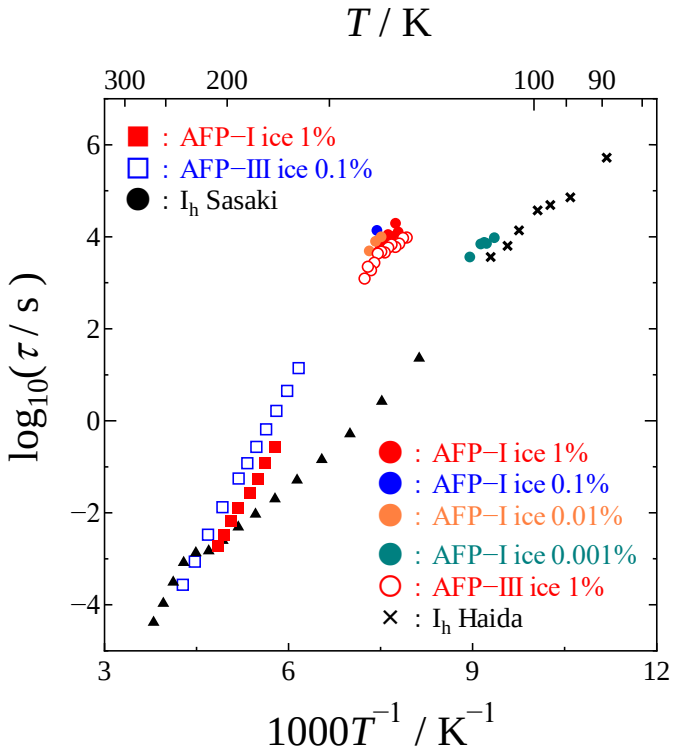


図 3-21　AFP 含有氷の水分子の再配向運動の緩和時間．●：温度ジャンプ法より決定した AFP-I 含有氷の緩和時間，○：温度ジャンプ法より決定した AFP-III 含有氷の緩和時間，×：温度ジャンプ法より決定した純粋な六方晶氷の緩和時間，■：誘電緩和測定から決定した AFP-I 含有氷の緩和時間，□：誘電緩和測定から決定した AFP-III 含有氷の緩和時間，▲：誘電緩和測定から決定した純粋な六方晶氷の緩和時間．

表 3-9　AFP 含有氷の水分子の再配向運動の活性化エネルギー．

試料	濃度	ΔE_a / kJ mol^{-1}
AFP-I（熱容量測定）	5%	-
	1%	29±5
	0.1%	-
	0.01%	31±5
	0.001%	19±3
AFP-III（熱容量測定）	1%	24±2

純粋な六方晶氷[15]	-	21±1
試料	**濃度**	**ΔE_a / kJ mol^{-1}**
AFP-I（誘電緩和測定）	1%	43.9±0.8
AFP-III（誘電緩和測定）	**0.1%**	**47.2±0.3**
純粋な六方晶氷 [17, 18]		55.4 (230 K < T < 273 K) 23 (150 K < T < 230 K)

0.1%AFP-III 含有氷の緩和時間の温度依存性は直線的であった．0.1%AFP 含有氷の活性化エネルギー（ΔE_a）を求めたところ，47.2±0.3 kJ mol^{-1} となった．

4. Discussion

AFP-I 含有氷および AFP-III 含有氷について，以下の結果を得た．

・熱容量測定から 140 K 近傍の温度域にプロトンガラスに由来するガラス転移が観測された．ガラス転移温度の濃度（c）依存性を調査した結果，$c = 0.001\%$の濃度では純粋な六方晶氷のガラス転移温度（T_g = 110 K）と同じ温度でプロトンガラスが観測された．AFP-I 含有氷では $c > 0.01\%$，AFP-III 含有氷では $c > 0.1\%$の濃度でガラス転移温度が 140 K で見出された．いずれの AFP 含有氷も，$c > 0.1\%$ではガラス転移温度に濃度依存性はなかった．また，AFP-I 含有氷と AFP-III 含有氷のガラス転移温度を比較しても差がなかったことから，ガラス転移温度に AFP の三次構造の違いは影響していないことが明らかになった．

・温度ジャンプ法を用いて，ガラス転移温度近傍のエンタルピー緩和の緩和時間（τ）を決定した．AFP 含有氷の緩和時間（$\tau = 5742$ s，$T = 133.2$ K）は同じ温度の純粋な六方晶氷の緩和時間（$\tau = 2.642$ s，$T = 133.0$ K[26]）よりも 1000 倍程度大きくなっていた．

・XRPD から AFP 含有氷の結晶構造が純粋な六方晶氷と同じであることが確認された．また，AFP 含有氷の格子定数（$a = b = 4.5 \pm 0.1$ Å，$c = 7.3 \pm 0.3$ Å，$T = 250$ K）は純粋な六方晶氷（$a = b = 4.5 \pm 0.1$ Å，$c = 7.3 \pm 0.6$ Å，$T = 250$ K）と一致していたため，AFP によって結晶形は変化しないことが明らかになった．

・誘電緩和測定によって，AFP 含有氷結晶内の水分子の再配向運動の緩和時間を決定した（$T > 170$ K）．AFP 含有氷における水分子の再配向運動の緩和時間（$\tau = 0.263$ s，$T = 182.4$ K）は純粋な六方晶氷（$\tau = 0.00933$ s，$T = 183.2$ K）よりも遅くなっていた．誘電緩和測定から得られた緩和時間の温度依存性は低温まで補外すると温度ジャンプ法で得られたプロトンガラスの緩和時間に対応していた．したがって，誘電緩和測定で観測した氷内の電気双極子モーメントの運動とプロトンガラスで凍結する運動モードが対応することが示唆された．

それぞれの結果について以下で詳しく議論する．

4-1. AFP の氷核成長抑制機構とプロトンガラスのガラス転移温度との関係性

熱容量測定から得られた，プロトンガラスに由来するガラス転移温度の濃度依存性から，

AFP 分子が影響を及ぼすことができる水分子の数を以下で導出する．図 4-1 に AFP-I および AFP-III 含有氷におけるプロトンガラスのガラス転移温度の濃度依存性を示す．比較のために破線で純粋な六方晶氷におけるガラス転移温度（$T_g^{Ih} = 110$ K）を示す．AFP 含有氷のガラス転移温度の濃度依存性が AFP の立体構造に依存していないことが分かる．また，AFP-I 含有氷のガラス転移温度は 0.001% ~ 0.01%を境に急激に T_g^{Ih} に近づいている．この傾向は AFP-III 含有氷でも同じである．したがって，この濃度域（図中黄色の領域）に AFP がガラス転移温度に影響を及ぼせる閾値があると考えられる．

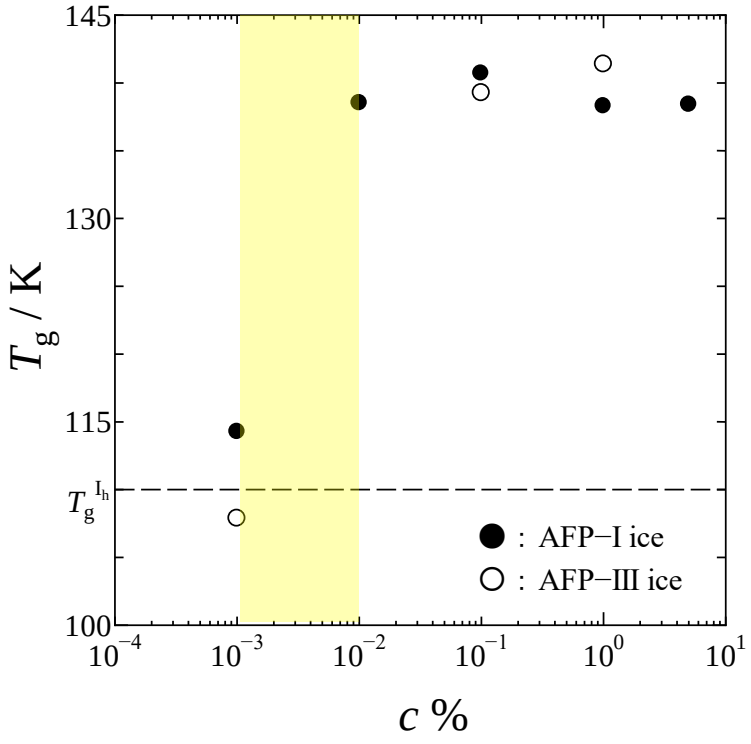


図 4-1　AFP 含有氷のプロトンガラスのガラス転移温度の濃度依存性．●: AFP-I 含有氷，○: AFP-III 含有氷，T_g^{Ih}: 純粋な六方晶氷のガラス転移温度. AFP 分子が氷のガラス転移温度に影響を与えられる濃度域を黄色の領域で示した．

プロトンガラスは氷中の水分子の再配向運動の凍結現象であり，水素結合によってつながったネットワーク構造に由来する協同現象として理解できる．T_g 変化に AFP 濃度の閾値があるということは，この閾値濃度以上の AFP 分子が存在すると，水分子の協同的な再配向運動が著しく変化することを意味する．はじめに，この閾値における AFP 分子と水分子の比率と AFP に特有な氷核の大きさおよび，その大きさから見積もられる AFP と水分子の

比率とを比較する．

より詳細に濃度依存性を調べたAFP-I含有氷について述べると，0.01%AFP-I水溶液では，AFP と水の質量比は 1：9999 になっている．これは，1 分子の AFP-I あたり 5.9×10^4 nm^3 の氷（1.8×10^6 個の水分子）に相当する．同様に 0.001%は 1 分子の AFP-I あたりに 5.9×10^5 nm^3 の氷（1.8×10^7 個の水分子）に対応している．一方，顕微鏡観察から確認された六方両錐形の氷核のサイズ（長軸長：10 ~ 100 μm）[10]と，氷核表面の単位面積当たりの AFP 含有量（2400 ~ 15000 / μm^2）[6, 27]から導出される 1 分子の AFP 当たりの氷の体積は 10^4 ~ 10^6 nm^3 程度であり，ガラス転移の閾値濃度から導出した値とよく一致している（図 4-2）．したがって，プロトンガラスの T_g が高温側に移動するような AFP 含有氷には，氷核成長抑制機構によって生成するような六方両錐形の微結晶が存在していると考えられる．

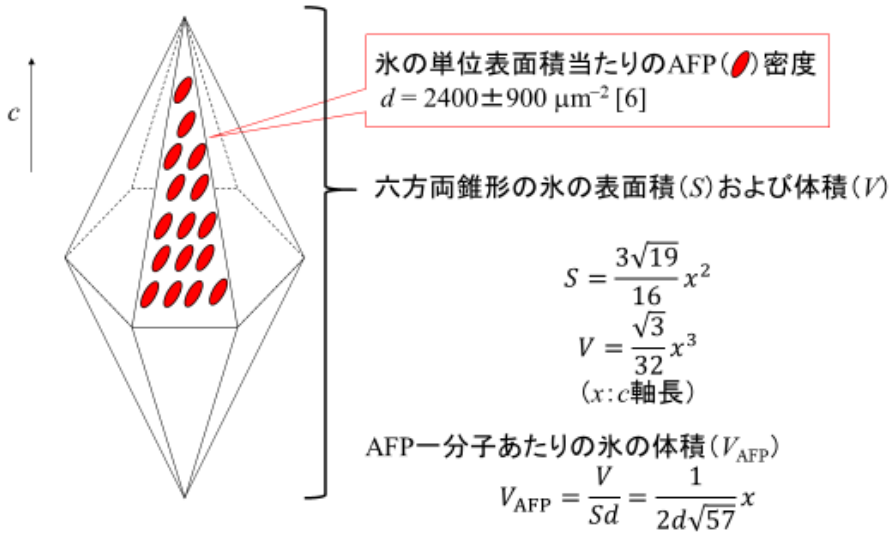


図 4-2　六方両錐形の氷の表面積および体積から導出される AFP 一分子当たりの氷の体積.

4-2. AFP 含有氷のプロトンガラスの T_g から考えられる AFP が水分子の再配向運動に及ぼす影響

プロトンガラスは水分子の協同的な再配向運動の凍結現象のことであるが，水分子の再配向運動は水素結合ネットワークの欠陥（Bjerrum 欠陥）の生成・移動に由来すると理解されている[19]（詳細は Introduction を参照）．AFP 含有氷のプロトンガラスが純粋な六方晶氷よりも高温で観測されたということは，Bjerrum 欠陥の生成・移動プロセスに変化があった

ことを意味している．AFP 含有氷におけるプロトンガラスの T_g の変化を議論するために，プロトンガラスのガラス転移温度が変化する HF[20]および KOH[28]の含有氷系の熱容量と比較する．

図 4-3 に 1%AFP 含有氷，0.0052%HF 含有氷，0.056%KOH 含有氷と純粋な六方晶氷の熱容量を示す．見やすさのために熱容量を温度で割った値で示している．HF 含有氷ではガラス転移点が純粋な六方晶氷よりも低温側に移動しており，KOH 含有氷では 80 K より低温でもプロトンガラスは起こっていない．図には示していないが，KOH 含有氷は 72 K で 70%の水分子が配向秩序化する一次相転移を起こすことが知られている．HF 含有氷の T_g の低下および KOH 含有氷の相転移の出現は，氷中で HF や KOH が Bjerrum 欠陥として機能したために欠陥の移動（＝水分子の協同的な再配向運動）の凍結が抑制されたことを示唆している．これを踏まえると，AFP 含有氷の T_g が高温側に移動したことは AFP 分子の添加によって Bjerrum 欠陥の移動の凍結がしやすくなったことを示唆する．

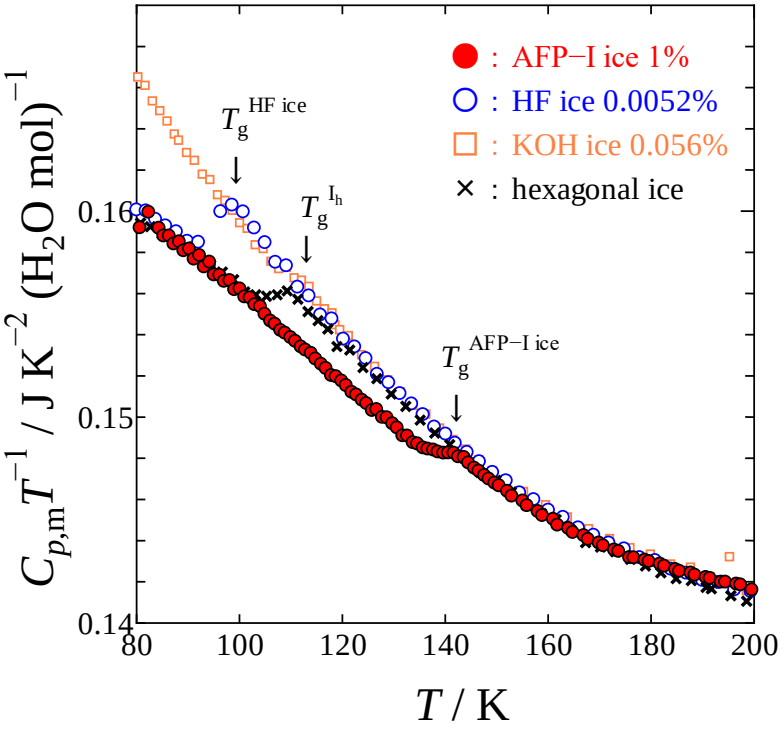


図 4-3　1%AFP 含有氷（●），0.0052%HF 含有氷（○），0.056%KOH 含有氷（□），純粋な六方晶氷（×）の熱容量（80 K < T < 200 K）．

4-3. AFP 分子による Bjerrum 欠陥の移動の抑制

誘電緩和測定では純粋な六方晶氷の Bjerrum 欠陥の移動は 230 K 以下の温度域において

観測される．230 K より高温では欠陥の生成プロセスがより明確に観測されるため，緩和プロセスは見えにくくなると考えられている．230 K 以下の AFP 含有氷における緩和時間を純粋な六方晶氷と比較することで AFP 添加による Bjerrum 欠陥の移動の変化を考察する．図 4-4 に AFP 含有氷および純粋な六方晶氷の緩和時間の温度依存性を示す．緩和時間 $\tau >$ 1000 s の領域（プロトンガラス）を黄色で示した．また，温度ジャンプ法と誘電緩和測定の中間の温度域の緩和時間が直線的に補間できると仮定し，補外線（図中破線）を引いた．

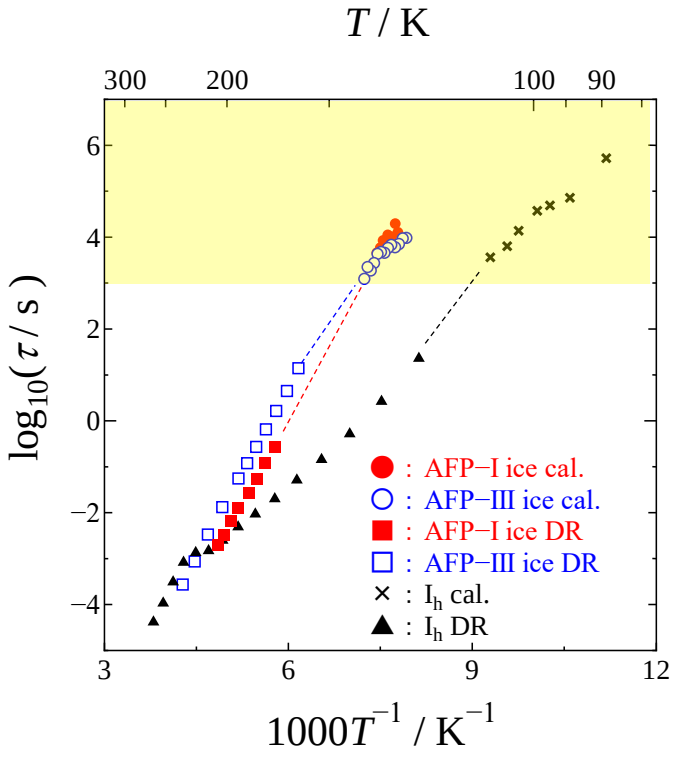


図 4-4　AFP 含有氷の水分子の再配向運動の緩和時間. ●: 温度ジャンプ法（cal.）より決定した AFP-I 含有氷の緩和時間，○ : 温度ジャンプ法より決定した AFP-III 含有氷の緩和時間，× : 温度ジャンプ法より決定した純粋な六方晶氷の緩和時間，■ : 誘電緩和測定（DR）から決定した AFP-I 含有氷の緩和時間，□ : 誘電緩和測定から決定した AFP-III 含有氷の緩和時間，▲ : 誘電緩和測定から決定した純粋な六方晶氷の緩和時間. プロトンガラスの緩和時間領域を黄色の領域で示した. 破線で温度ジャンプ法と誘電緩和測定の間の温度域の緩和時間を補外した.

純粋な六方晶氷（▲）の緩和時間の温度依存性は，230 K を境に異なる傾向を示していることが分かる．これは水分子の再配向運動が温度域によって異なる 2 種類のプロセスを経

て起こることを意味しており，その微視的な解釈として以下のモデルが提唱される：①結晶内の水分子が再配向した際に Bjerrum 欠陥が生成するプロセス（T > 230 K の高温度域），②：不純物によって生成した Bjerrum 欠陥が移動することで，水分子が再配向するプロセス（T < 230 K の低温度域）である[18]（図 4-5）．なお，図中の表記で“HB”は水素結合，“D”は水分子間に水素が 2 つ並ぶために水素結合が形成されない Bjerrum 欠陥，“L”は水分子間に水素が存在しないために水素結合が形成されない Bjerrum 欠陥をそれぞれ指す．また，②の模式図内の黄色の領域は結晶格子内の不純物（例えば HF）を表している．

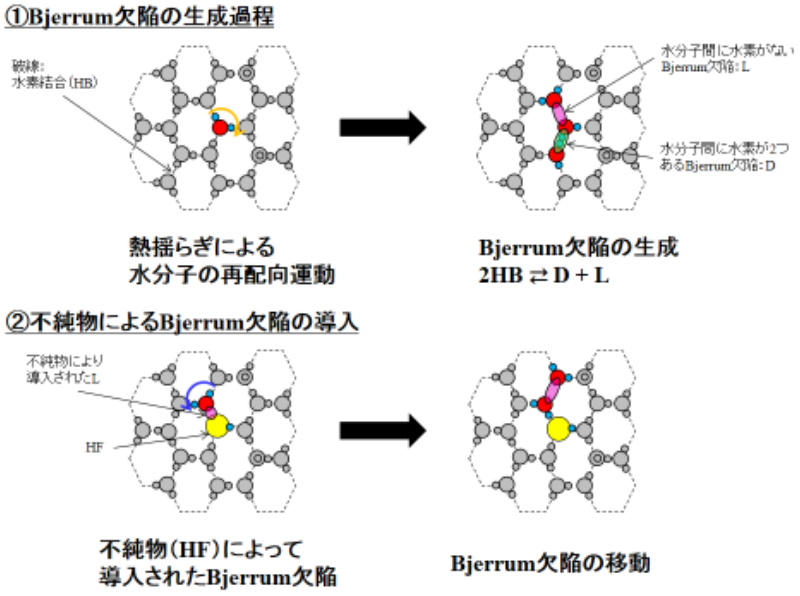


図 4-5　氷中の水分子の再配向運動の微視的描像．HB：水素結合，D：水分子間に水素が 2 つ存在する Bjerrum 欠陥，L：水分子間に水素が存在しない Bjerrum 欠陥．①熱揺らぎによる Bjerrum 欠陥の生成，②不純物による Bjerrum 欠陥の導入．

AFP 含有氷と純粋な六方晶氷における水分子の再配向運動の緩和時間を比較すると，230 K 以下で AFP 含有氷の緩和時間の方が遅くなっていることが分かる．この傾向は，温度ジャンプ法から得られた緩和時間の違いにも反映されている．つまり，熱容量測定で観測されたプロトンガラスの T_g が高温側に移動したことの主な要因が 230 K 以下の水の配向緩和の違いに起因することが分かる．また，この傾向は AFP の三次構造の違いに依存していないため，AFP のアミノ酸配列や立体構造に依らない AFP 固有の性質であると考えられる．

誘電緩和測定から得られた AFP 含有氷の緩和時間の温度依存性から，水分子の再配向運動の活性化エネルギーを導出した（AFP-I 含有氷：E_a = 43.9±0.8 kJ mol^{-1}，AFP-III 含有氷：E_a = 47.2±0.3 kJ mol^{-1}）．誘電緩和測定から導出された純粋な六方晶氷の活性化エネルギー

はプロセス①は E_a = 55.4 kJ mol^{-1}[17]であり，プロセス②は E_a = 23 kJ mol^{-1} [17]である．AFP 含有氷で決定した活性化エネルギーは，2 つのプロセスの間の値となっている．この結果より，AFP 添加が氷中の水分子の再配向緩和に及ぼす効果として 2 つの可能性が考えられる（図 4-6）．（a）AFP-III 含有氷の緩和時間は純粋な六方晶氷のプロセス①が 230 K 以下の温度域でも観測されている可能性と．(b) 純粋な六方晶氷におけるプロセス②の活性化エネルギーが増加した可能性である．

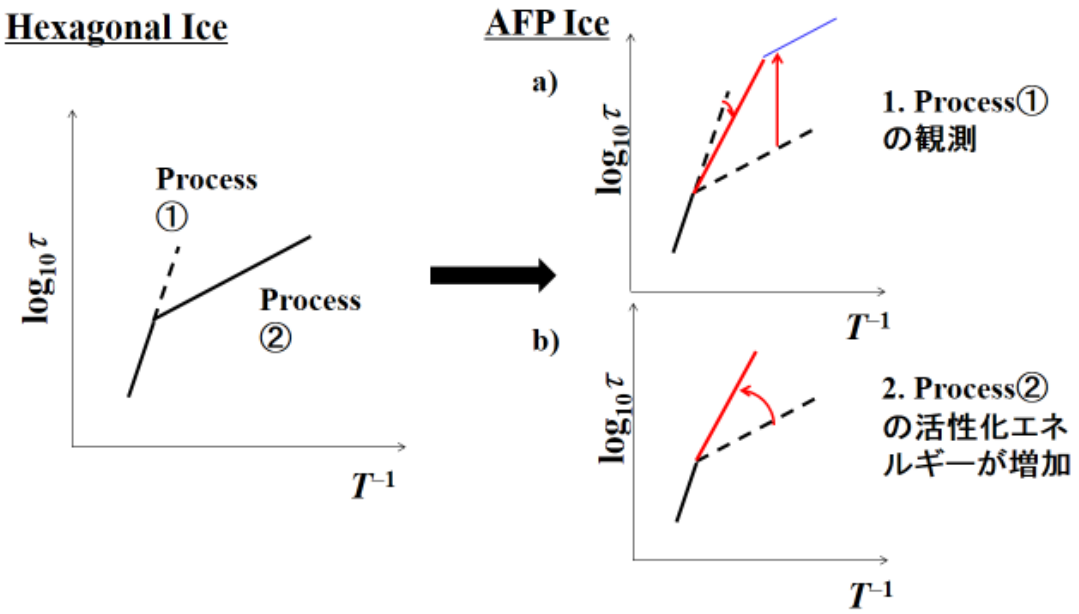


図 4-6　純粋な六方晶氷の緩和時間から類推される AFP 含有氷の水分子の再配向運動の緩和プロセス．(a) プロセス①の活性化エネルギーの減少かつプロセス②の濃度減少（b）プロセス②の活性化エネルギーの増加.

（a）が起こるためには，プロセス②の緩和時間が実験系のタイムスケールよりも大きくなるまたはプロセス②そのものが消失する必要がある．プロセス②は不純物によって導入された Bjerrum 欠陥によるものなので，欠陥の濃度を小さくすれば欠陥移動の素過程が起こる確率が減少し，プロセス②がほとんど観測されなくなると考えられる．実在する系で不純物による欠陥がない結晶は存在しないが，AFP の氷核成長抑制機構によって生成した微結晶のサイズ内に不純物が少なければ，（a）が起こる系を実現できると考えられる．しかし，AFP の微結晶のサイズがμm 以上の巨視的なオーダーであることを考えると，欠陥の密度が少なくなることは考えにくい．

（b）はプロセス②の活性化エネルギーが増加する必要がある．活性化エネルギーが増加する理由として考えられるのは，水分子間の距離の変化によって，水素結合から形成される

配向運動の活性化障壁が大きくなることが挙げられる．この場合，XRPD では見出せなかったような小さな水分子間距離の変化が活性化エネルギーを大きくした可能性がある．

本研究で注目した AFP 含有氷のプロトンガラスは，以下の点から他の氷のプロトンガラス系と異なる．

・結晶構造が純粋な六方晶氷と同じ（水素結合ネットワークが同じ）にもかかわらず，プロトンガラスの T_g が高温側に移動した点．

・AFP 含有氷は KOH 含有氷系と異なり，結晶格子内の水分子と置換されることなく，微結晶形成による空間的な制限によって Bjerrum 欠陥の移動を制限していると考えられる点．

前者について，AFP 含有氷は結晶構造が異なる氷の他の固相[---]や包接水和物[---]における水分子の再配向運動と異なり，結晶構造や水分子間の長さが同じであるが，プロトンガラスのガラス転移温度が異なっていた．同様に結晶構造が同じでもプロトンガラスの T_g に影響を及ぼす系として，HF 含有氷や KOH 含有氷の系を紹介した．しかし，HF 含有氷や KOH 含有氷の系では低分子が結晶格子内に取り込まれることによる Bjerrum 欠陥濃度の増加が肝であるため，2 点目について異なっている．HF 含有氷や KOH 含有氷は水素結合ネットワーク内に取り込まれることでプロトンガラスに影響を与えている．AFP 含有氷は水素結合ネットワーク内に取り込まれず，粒界を制御することガラス転移点を高温側に移していると考えられる．

5. Conclusion

AFP-I および AFP-III を含有した氷について，熱容量，誘電緩和，X 線回折を測定し，プロトンガラス，水分子の再配向運動，結晶構造について調べた．熱容量では，AFP-I 含有氷と AFP-III 含有氷は 0.001%の濃度では純粋な六方晶氷（T_g = 110 K）と同程度のプロトンガラスの T_g であったが，0.1%以上の濃度ではプロトンガラスの T_g が高温側（140 K）に移動した．誘電緩和測定では，1%AFP-I 含有氷および 0.1%AFP-III 含有氷の両試料で水分子の再配向運動が遅くなっていることが見出された（170 K < T < 230 K）．X 線回折では AFP 含有氷が六方晶氷と同じ結晶構造をとっていることが確認された．

それぞれの結果から，AFP 含有氷では Bjerrum 欠陥の移動が制限されていることが明らかになった．Bjerrum 欠陥の移動が制限されるのは，①AFP と氷核表面との直接的な相互作用によって Bjerrum 欠陥の移動の活性化エネルギーが増加したため，②AFP によって粒界が制御された結果，結晶内部に欠陥が生成しなかったため，の 2 つの原因が示唆された．

6. Reference

[1] L. DeVries, D. E. Wohlschlag, *Science*, **163**, 1073, (1969)

[2] Y. Yeh, R. E. Feeney, *Chemical Review*, **96**, 601, (1996)

[3] C. A. Knight, C.C. Cheng, A. L. DeVries, *Biophys. J.*, **59**, 409, (1991)

[4] D. Wen, R. A. Laursen, *Biophys. J.*, **63**, 1659, (1992)

[5] D. S. C. Yang, M. Sax, A. Chakrabartty, C. L. Hew, *Nature*, **333**, 232, (1988)

[6] N. Pertaya, C. B. Marshall, C. L. DiPrinzio, L. Wilen, E. S. Thomson, J. S. Wettlaufer, P. L. Davies, I. Braslavsky, *Biophys. J.*, **92**, 3663, (2007)

[7] M. Takamichi, Y. Nishimiya, A. Miura, S. Tsuda, *FEBS J.*, **274**, 6469, (2007)

[8] K. Basu, C. P. Garnham, Y. Nishimiya, S. Tsuda, I. Braslavsky, *J. Vis. Exp.*, **83**, (2014)

[9] H. Kondo, Y. Hanada, H. Sugimoto, T. Hoshino, C. P. Garnham, P. L. Davies, S. Tsuda, *PNAS*, **109**, (2012)

[10] S. Mahatabuddin, Y. Nishimiya, A. Miura, H. Kondo, S. Tsuda, *Cryobiol. Cryotech.*, **62**, (2016)

[11] V. F. Petrenko, R. W. Whitworth, *Physics of Ice*, (2002) ISBN-13: 9780198518945

[12] J. D. Bernal, R. H. Fowler, *J. Chem. Phys.*, **1**, 515, (1933)

[13] W. F. Giauque, J. W. Stout, *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 1144, (1936)

[14] L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 2680, (1935)

[15] O. Haida, T. Matsuo, H. Suga, S. Seki, *J. Chem. Thermodynamics*, **6**, 56, (1974)

[16] R. P. Auty, R. H. Cole, *J. Chem. Phys.*, **20**, 1309, (1952)

[17] S. Kawada, *J. Phys. Soc. Jpn*, **44**, 1881, (1978)

[18] G. P. Johari, E. Walley, *J. Chem. Phys*, **75**, 1333, (1981)

[19] N. Bjerrum, *Science*, **115**, 385, (1952)

[20] M. Ueda, T. Matsuo, H. Suga, *J. Phys. Chem. Solids*, **43**, 1165, (1982)

[21] S. Kawada, *J. Phys. Chem. Solids*, **50**, 1177, (1989)

[22] S. Kawada, R. G. Jin, M. Abo, *J. Chem. B*, **101**, 6223, (1997)

[23] I. Takei, *J. Chem. B*, **101**, 6234, (1997)

[24] Y. Tajima, T. Matsuo, H. Suga, *Nature*, **299**, 810, (1982)

[25] A. Goto, T. Hondoh, S. Mae, *J. Chem. Phys*, **93**, 1412, (1990)

[26] K. Sasaki, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 3950, (2016)

[27] S. Grandum, A. Yabe, K. Nakagomi, M. Tanaka, F. Takemura, Y. Kobayashi, P. Frivik, *J. Cryst. Growth*, **205**, 382, (1999)

[28] Y. Tajima, T. Matsuo, H. Suga, *J. Phys. Chem. Solids*, **45**, 1135, (1984)