

両双性イオンブロック共重合体濃厚溶液の ライオトロピック秩序構造

檜垣勇次、高橋将也、清水 茜
大分大学

1. はじめに

細胞内においてタンパク質や核酸の液-液相分離により形成される動的な高分子集合体は、細胞内分画化、物質輸送、シグナル伝達といった多様な生体システムにおける重要な非膜オルガネラとして注目されている。そのため、液-液相分離により形成されるオルガネラの構造や動態の分子論的理解が急速に進みつつあり、相分離現象の制御による新たな分子システムへの期待が高まっている^[1]。一方、水溶性高分子が水溶液中で相分離する現象は Aqueous Two-Phase System (ATPS、水性二相系)として知られており、タンパク質の選択的な分配による精製や濃縮に利用されてきた^[2,3]。近年、水溶液が相分離する親水性高分子で構成される両親水性ブロック共重合体^[4]が水溶液中で凝集して形成する分子集合体が提案されており、両親媒性高分子が疎水性相互作用により水圏で形成する分子集合体とは異質な物質透過性の高い新たな分子集積体として注目されている^[4,5]。

我々は、生体適合性に優れる双性イオン高分子で構成されたブロック共重合体が、双性イオン構造の非対称性に起因する双性イオンの水和状態や相互作用の相違により相分離し、双性イオン高分子のみで構築される新たな分子組織体を創成できると着想した。本研究では、双性イオン高分子であるポリ[3-(*N*-2-メタクリロイルオキシエチル-*N*, *N*-ジメチル)アンモネートアセテート] (PCB) とポリ[3-(*N*-2-メタクリロイルオキシエチル-*N*, *N*-ジメチル)アンモネートブタンスルホネート] (PSB) で構成されるブロック共重合体 (PCB-*b*-PSB) 水溶液のメソスケール秩序構造を小角 X 線散乱 (SAXS) 測定により解析し、両親水性ブロック共重合体の相分離により形成される秩序構造とその構造転移の発現機構を探求した (図 1) ^[6]。



図 1 PCB-*b*-PSB の化学構造と水溶液が形成するメソ構造の模式図

2. 実験

2-1 試料

可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、PCB マクロ連鎖移動剤を合成し、PSB を鎖延長することで PCB-*b*-PSB を合成した^[7]。重合生成物を分別沈殿することで、分子量分布が狭い分子量制御されたブロック共重合体群を合成した。GPC 測定 (分離カラム : TSKgel G5000PW_{XL}、TSKgel G3000PW_{XL}、溶離液 : 200 mM NaCl 水溶液) と ¹H-NMR 測定 (重溶媒 : 200 mM NaCl D₂O 溶液) によりブロック共重合体の分子構造を確認した。PCB マクロ連鎖移動剤と PCB-*b*-PSB の数平均分子量と分子量分布はそれぞれ $M_{n,PCB} = 9500$ 、 $M_w/M_{n,PCB} = 1.11$ 、 $M_{n,PCB-b-PSB} = 55800$ 、 $M_w/M_{n,PCB-b-PSB} = 1.08$ であり、PCB 鎖の重合度と PSB 鎖の重合度はそれぞれ 43、158 であった。以降、このブロック共重合体を PCB₄₃-*b*-PSB₁₅₈ と表記する。

2-2 実験方法

SAXS 測定は、九州シンクロトロン光研究センター BL11 にて、X線エネルギー 8000 eV、カメラ長 1618 mm とし、検出器に PILATUS 300K (Dectris Co., Ltd.)を用いて測定した。2 次元散乱強度データより、解析ソフト Fit2D を用いて円環平均した 1 次元散乱強

度プロファイルを得た。溶解性試験は、過酸化水素処理してジチオベンゾエート末端を除去することで無色化した PCB（重合度：34）とジチオベンゾエート末端により淡赤色に着色した PSB（重合度：145）のブレンド溶液の混合状態を目視観察し、それぞれの層の体積をメニスカス位置から計測した。

3. 結果及び考察

PCB₄₃-*b*-PSB₁₅₈水溶液の一次元SAXS強度プロファイルを図2(A)に示す。60wt%水溶液は散漫な散乱ピークを示しており、PCB鎖とPSB鎖は相分離しているものの秩序性の高い周期構造を形成しなかった。50 wt%水溶液は構造因子に起因する複数の高次ピークを示し、一次ピーク (q^*) に対する高次ピークの散乱ベクトルと、ブロック共重合体の体積分率より、PCB相がドメインとなったヘキサゴナルシリンダー構造の形成が認められた。40 wt%水溶液では散乱ピークが先鋭化しており、格子構造の乱れが大幅に低減した。30 wt%水溶液は構造因子に起因する散乱ピーク位置より、ラメラ状秩序構造への構造転移が認められた (2次ピークは消滅則により消失)。20 wt%水溶液では散乱ピークが広幅化しており格子構造の乱れが顕在化し、10 wt%水溶液では散乱ピークが消失しており無秩序化した。バラクリスタル理論に基づく散乱関数で散乱強度プロファイルをフィッティングした結果、高分子濃度の低下と共にPCB鎖の体積分率が増大し、PCBシリンダードメインの六方最密充填構造からシリンダー径の増大を経てラメラ構造への秩序構造転移した。図2(B)にシミュレーションにより算出された理想格子の模式図を示している。すなわち、PCB₄₃-*b*-PSB₁₅₈の濃厚水溶液は水和したPCB鎖と水和したPSB鎖が相分離しており、特定の濃度範囲において高度に秩序化したメソ構造を形成し、濃度に応じてモルフォロジーが変化することが明らかとなった。

高分子濃度に応じた秩序構造転移機構をホモポリマーブレンド水溶液の溶解性試験で検証した(図3)。無色PCBホモポリマーと淡赤色PSBホモポリマーは明確に相分離しており、水溶液濃度によらずPSBゲル状膨潤相の体積は一定で、水が選択的にPCB相に分配された。また、相分離した溶液の体積分率は

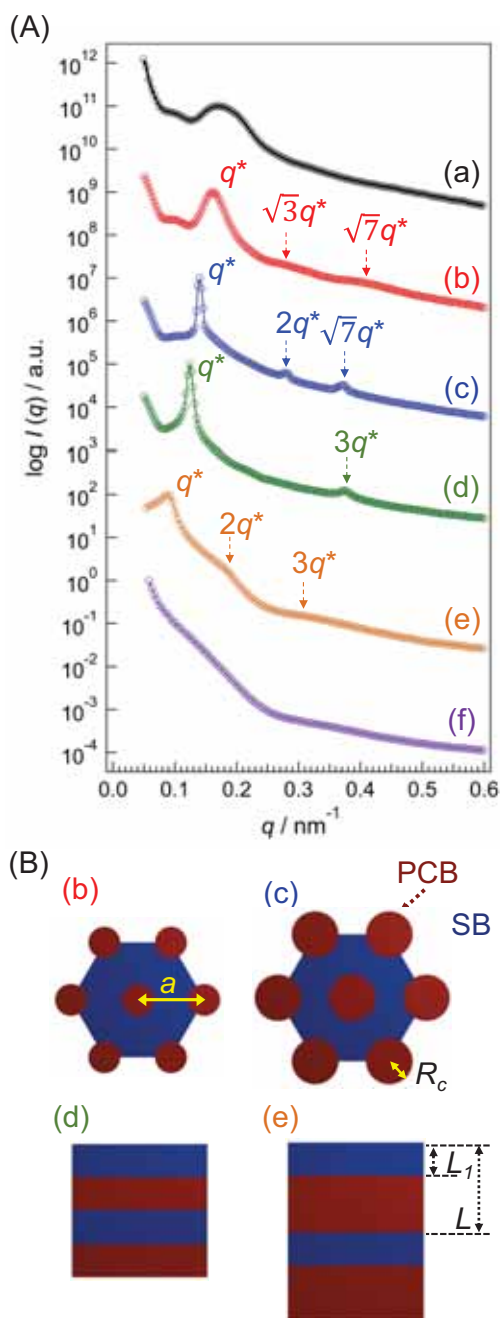


図2 (A) PCB₄₃-*b*-PSB₁₅₈水溶液の円環平均SAXS一次元プロファイル (B) シミュレーションにより計算した理想格子構造の模式図 [水溶液濃度: (a) 60 wt%、(b) 50 wt%、(c) 40 wt%、(d) 30 wt%、(e) 20 wt%、(f) 10 wt%] Reproduced with permission from Wiley-VCH GmbH

SAXS測定で求めた秩序構造から計算される体積分率と一致した。すなわち、浸透圧の要請によるPCB相への水の選択的な分配による体積分率と界面曲率の変化が秩序構造転移の発現機構であることが示された。PSB鎖はスルホベタイン基のスルホン酸アニオ

ンと四級アンモニウムカチオンの電荷密度が対称的であるため静電相互作用により会合しやすい。このため、PSB鎖がスルホベタインの会合によりネットワーク構造を形成することで溶解性が制限され、浸透圧による選択的な水の分配が促されていると考えられる。

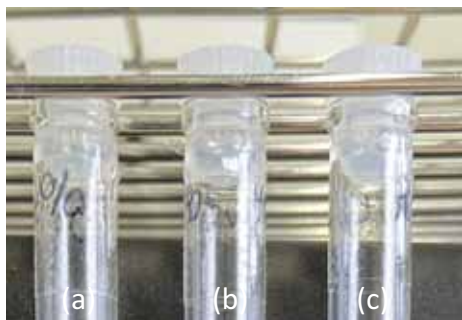


図3 無色PCBホモポリマーと淡赤色PSBホモポリマーの2成分ブレンド水溶液の外観 [水溶液濃度: (a) 50 wt%、(b) 40 wt%、(c) 30 wt%] Reproduced with permission from Wiley-VCH GmbH

4. まとめ

異種双性イオン高分子で構成される両親水性ブロック共重合体が水溶液状態でナノスケールの秩序構造を形成し、高分子濃度に応じて構成双性イオン高分子凝集相の浸透圧に起因して秩序構造転移を示す現象を見出した。生体適合性高分子で構成されるナノスケールの水性二相系構造体であり、環境に応じて分子分画と解放を制御できる新たな医用分子システムへの応用が期待される。

謝辞

本研究は、公益財団法人 徳山科学技術振興財団 2020 年度研究助成を受けて行われました。兵庫県立大 遊佐真一准教授との共同研究であり、カルボキシベタインメタクリレートモノマーは大阪有機化学工業株式会社 猿渡欣幸氏にご提供いただきました。SAXS 測定は SAGA-LS BL11 (課題番号: No.1909074F、1911111F、2003020F)にて SagaLS 河本正秀氏にご支援いただき実施されました。本研究をご支援をいただきました皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] S. F. Banani, H. O. Lee, A. A. Hyman, M. K. Rosen, “Biomolecular Condensates: Organizers of Cellular Biochemistry”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285 (2017).
- [2] C. R. Mace, O. Akbulut, A. A. Kumar, N. D. Shapiro, R. Derda, M. R. Patton, G. M. Whitesides, “Aqueous Multiphase Systems of Polymers and Surfactants Provide Self-Assembling Step-Gradients in Density”, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9094 (2012).
- [3] H. Zhao, V. Ibrahimova, E. Garanger, S. Lecommandoux, “Dynamic Spatial Formation and Distribution of Intrinsically Disordered Protein Droplets in Macromolecularly Crowded Protocells” *Angew. Chem.* **132**, 11121 (2020).
- [4] A. Blanazs, N. J. Warren, A. L. Lewis, S. P. Armes, A. J. Ryan, “Self-assembly of Double Hydrophilic Block Copolymers in Concentrated Aqueous Solution”, *Soft Matter*, **7**, 6399 (2011).
- [5] S. M. Brosnan, H. Schlaad, M. Antonietti, “Aqueous Self-Assembly of Purely Hydrophilic Block Copolymers into Giant Vesicles”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 9715 (2015).
- [6] M. Takahashi, A. Shimizu, S. Yusa, Y. Higaki, “Lyotropic Morphology Transition of Double Zwitterionic Diblock Copolymer Aqueous Solutions”, *Macromol. Chem. Phys.*, **222**, 2000377 (2021).