

1. はじめに

脂質膜などの高分子集合体が示す温度相転移を研究する際、複数の手法によって得られた結果を比較検討することにより、単一の手法では得られない情報を得ることができる。多くの測定で、1 K/min 前後で温度走査してデータを取ることが広く行われているため、X線回折においても、同様な温度走査条件でのデータ取得が必要となる。高輝度の放射光を利用した実験では、溶液中に分散した脂質多重層膜に対して秒から分のオーダーの露出時間で回折像が得られ、数分の1度の温度分解能で相転移挙動を追跡することができる。

高分子集合体では、しばしば温度履歴に依存して多様な準安定状態が現れるため、試料の状態を正確にコントロールすることがむずかしい。このため、同一条件下で実験を行うことができる熱測定と時間分解 X線回折の同時測定法は、非常に有用な実験手法である。このような動的な実験により、相転移にともなって過渡的に現れる中間状態を捕らえることもできる。

ここでは、X線回折用試料の温度走査方法や熱測定/時間分解 X線回折同時測定法の概略を説明し、いくつかの測定例について紹介する。

2. 実験方法

○温度コントロール

X線回折実験における温度コントロールでは、試料全体の温度の均一性、X線照射による局所的な温度上昇の制御、ハッチ外からの容易な制御、示差走査熱測定 (DSC) では、さらに温度変化速度の安定性などが求められる。試料セルを温度コントロールした水流に浸漬したり、DSC 測定用の温度コントローラを使用する。

熱測定/時間分解 X線回折同時測定に使用するメトラー社製の加熱ステージ FP84 の外観と断面図を図1に示した。FP84 は、元々光学顕微鏡観察と熱測定の同時測定用に開発されたものであり、X線回折に使用するために、装置の窓をカプトンフィルムに替えてX線強度の低下を軽減するよう改造してある。温度制御

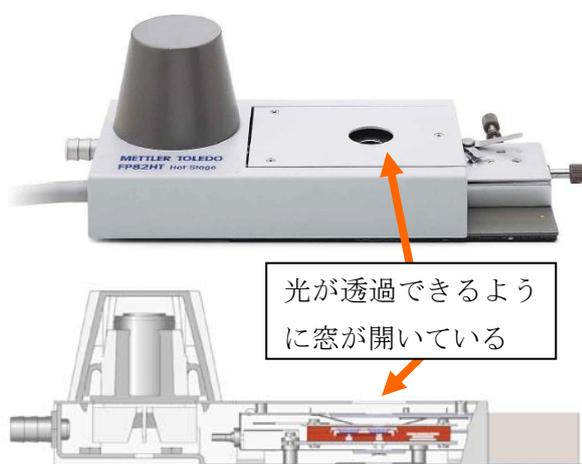


図1 DSC用温度コントローラ FP84

は、低温の気流と試料まわりに設置されたヒーターで行っている（最大温度範囲 -60°C $\sim 375^{\circ}\text{C}$ ）。また、X線ビームは水平方向から入射するため、縦置きで使用する。

○試料セル [1]

試料セルは、熱伝導のよいDSC用アルミパン（ $40\mu\text{l}$ 用）を利用し、試料の片面は、アルミ箔で圧着密封する。また、加熱ステージに密着して装着するために穴を開けたアルミパンを乗せて高さ調整し、さらに加熱ステージのふたと試料セルの間にシリコンゴムリングを挟んで固定する（図2）。これらの工夫により試料セルや装置によるX線強度の低下を軽減し、入射X線の80%程度の強度が利用できる。

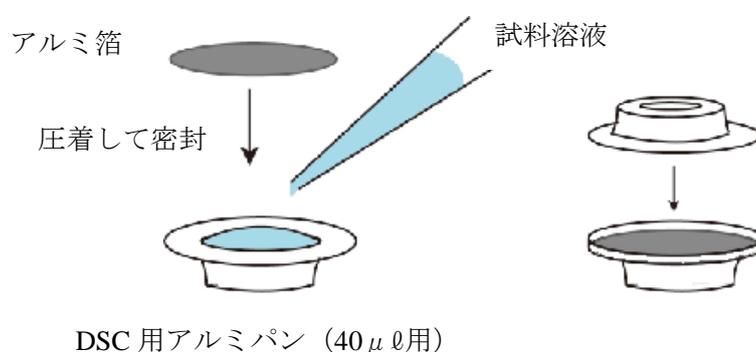


図2 試料セル

○熱測定

熱測定には、いくつかの方法があるが、試料セルとリファレンスセルの温度差を精度よく測ることが基本となる。異種金属の接触によって生じる熱起電力を利用した熱電対を n 回往復させることにより、1往復で得られる起電力の n 倍の電圧出力が得られる。FP84では、サファイヤガラス上に直接5対の熱電対が配線されている。DSC装置は、メトラー製FP9000を用いる。

高感度の溶液用DSC測定では、ベースラインが安定していることが必要であるが、そのためには、両セルの熱容量のバランス、試料と熱測定用の基板との熱接触や温度変化速度の安定性などが要求される。試料で起こった発熱や吸熱を温度差として検出するため、両セル間を適度に断熱するように設計されている。得られた温度差データには、試料内で起こった発熱や吸熱を直接反映するものではなく、両セル間の熱のやりとりにもなう緩和現象を含むため、プログラムによって補正する。

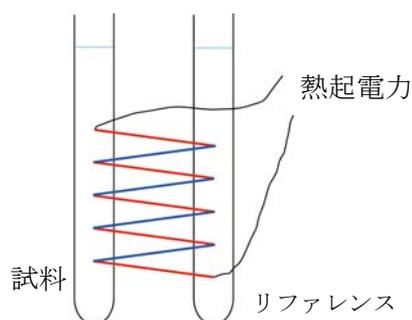


図3 熱電対による温度差測定

○X 線回折

温度走査と組み合わせた X 線回折実験では、高輝度の X 線源が必要であり、放射光を利用する。露出時間は、試料濃度、結晶性、吸収、温度走査側でなどの因子に依存するが、溶液中に分散した脂質膜試料では、一般に秒から分のオーダーである。高時間分解能が必要な場合は 1 次元の検出器 (PSPC) やイメージ・インテンシファイヤー付 CCD カメラ、試料が異方性を持つ場合や S/N のよいデータが必要な場合は、イメージング・プレートなどの 2 次元の検出器を用いる。

熱測定との同期は、温度情報を随時 X 線データの中に書き込むか、時計を合わせて測定時間を記録して行う。得られた一連のデータは、鳥瞰図や等高線図で表示して、熱測定データと比較検討する。

3. 実験例の紹介

○中性リン脂質 DPPC の温度相転移

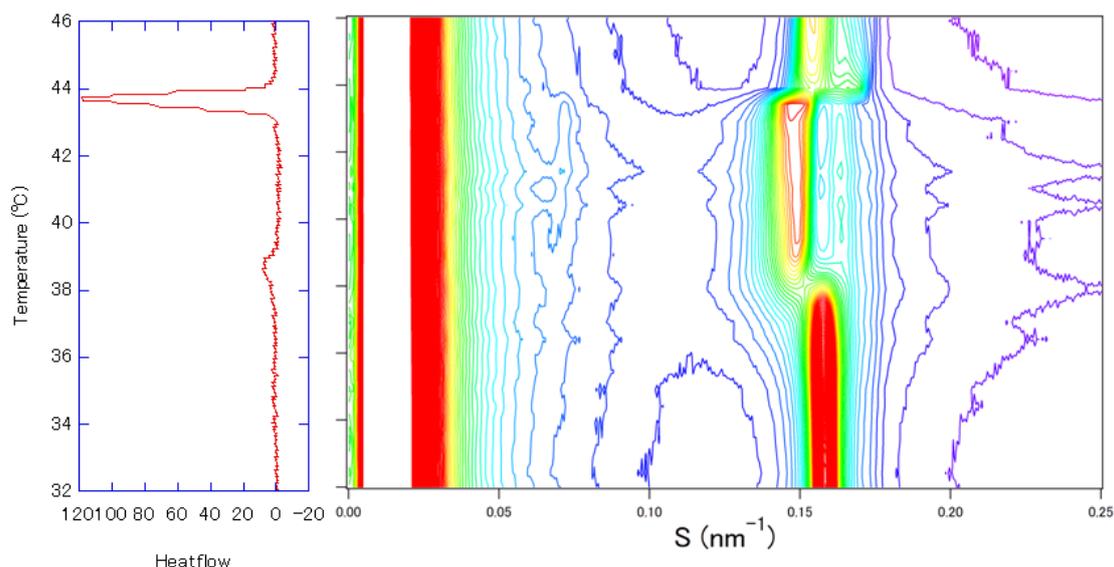


図 4 DPPC 多重層ベシクルの熱測定/時間分解 X 線回折同時測定

DSC のデータ (左) と反射強度を等高線表示した小角 X 線回折データ (右) を温度軸を合わせて示している。X 線回折像は、イメージ・インテンシファイヤー付 CCD カメラで取得し、デバイゼラーリングに沿って積算して一次元化した。低温側から順番に、吸熱をともなってゲル (L_{β}') 相からリップル相 (P_{β}') 相、液晶 (L_{α}) 相へと相転移しているのがわかる。散乱ベクトル $S=0.15 \text{ nm}^{-1}$ 付近に現れる多重 2 分子層膜の層周期に関する 1 次のピークは、熱異常と相関して変化している。

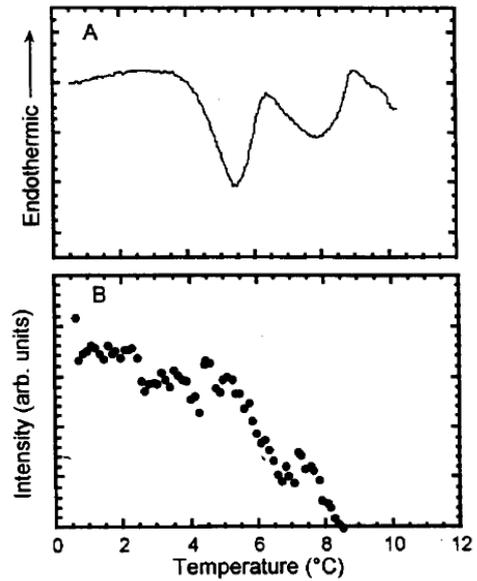
(SPring-8 ビームライン 40B2 温度軸は補正していない)

○C16C10PC（鎖長の異なる炭化水素鎖をもつPC）の温度相転移挙動 [2]

降温、昇温、再降温して実験。1回目と2回目の降温過程で相転移挙動が異なる。高温の流動相に放置しても、構造がメモリーされている。炭化水素鎖のインターディジテイションとの関係を詳細に解析している。

図5は、2回目の降温におけるサーモグラムと炭化水素鎖の充填に由来する反射の積分強度の温度依存性を示す。エンタルピー変化に相関して、積分強度が変化しているのがわかる。

図5 C16C10PC の降温サーモグラムと広角X線回折で現れたピークの積分強度変化



○DHPC/Trehalose 混合系の温度相転移 [3]

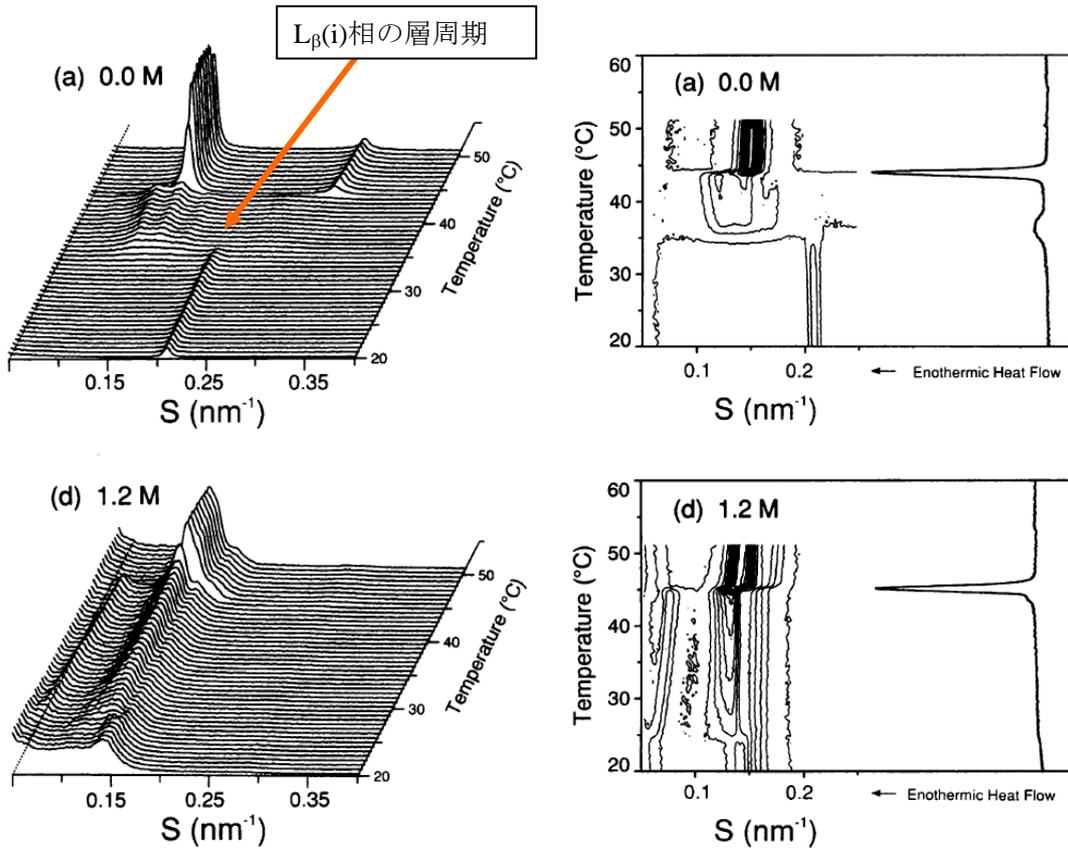


図6 DHPC/Trehalose 混合系の熱測定/時間分解 X 線回折同時測定

PCの頭部に炭化水素鎖がエーテル結合したDHPCは、低温でモノレイヤーが互いに入り組んだインターディジテイトド・ゲル ($L_{\beta}(i)$) 相を取ることが知られている。これに凍結防止機能を持つ糖トレハロースを加えて、相転移挙動を解析した。1M以上のトレハロース存在下では、 $L_{\beta}(i)$ 相が形成されていない。

References

1. I. Hatta, H. Takahashi, S. Matuoka and Y. Amemiya, Simultaneous X-ray diffraction and differential scanning calorimetry in the study of phase transitions. *Thermochimica Acta* 253 (1995) 149-154
2. C. Wolf, C. Chachaty, H. Takahashi, I. Hatta, P. J. Quinn, Phase transition sequence between fluid liquid-crystalline and interdigitated lamellar gel phases in mixed-chain diacyl phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* (1997) 111-124
3. H. Takahashi, H. Ohmae, I. Hatta, Trehalose-induced Destabilization of Interdigitated Gel Phase in Dihexadecylphosphatidylcholine. *Biophys. J.* 73 (1997), 3030-3038
4. H. Takahashi, S. Matuoka, Y. Amemiya and I. Hatta, Simultaneous differential scanning calorimetry and time-resolved X-ray diffraction of lipid-water system. I. Relationship between chain melting and endothermic heat at the main transition of a dipalmitoylphosphatidylcholine-water system. *Chem. Phys. Lipids* 76 (1995) 115-121
5. M. F. Mina, T. Asano, H. Takahashi, I. Hatta, K. Ito and Y. Amemiya, Dynamic Investigation of the Solid-Solid Phase Transition of Normal-Alkane (Hexatriacontane) by Simultaneous Measurements with Differential Scanning Calorimetry, Small-Angle X-ray Scattering and X-ray Television Detector. *Jpn. J. Appl. Phys.* 36 (1997) 5616-5622
6. H. Takahashi, Y. Okumura and J. Sunamoto, Structure and thermal history dependent phase behavior of hydrated synthetic sphingomyelin analogue: 1,2-dimyristamido-1,2-deoxyphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1713 (2005) 40-50
7. H. Takahashi, H. Aoki, M. Kodama and I. Hatta, On exothermic transformation from metastable gel phase to stable crystalline phase of fully hydrated dimyristoylphosphatidylethanolamine in heating scan. *Chem. Phys. Lipids* 89 (1997) 83-89
8. H. Chung and M. Caffrey, Direct correlation of structure changes and thermal events in hydrated lipid established by simultaneous calorimetry and time-resolved x-ray diffraction. *Biophys. J.* 63, 1992, 438-447
9. W. Chuang, P. Hong, C. Chen, H. Sheu and U. Jeng, Melting behavior of polymorphic crystals of poly(trimethylene 2,6-naphthalate) studied by simultaneous synchrotron X-ray scattering and thermal analysis. *J. Appl. Cryst.* (2007) 40, s637-s641