

広帯域誘電分光法による氷結した ウシ血清アルブミン水溶液の氷の分子運動

塚原達也¹, 佐々木海渡^{2,3}, 喜多理王^{2,3}, 新屋敷直木^{*2,3}

¹東海大学大学院 理学研究科 物理学専攻
〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

²東海大学 理学部 物理学科

³東海大学 マイクロ・ナノ研究開発センター

(2020年9月24日受付；2020年12月7日受理)

Dynamics of Ice in Frozen Bovine Serum Albumin-Water Mixtures Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy

by

Tatsuya TSUKAHARA¹, Kaito SASAKI^{2,3}, Rio KITA^{2,3} and Naoki SHINYASHIKI^{*2,3}

¹*Course of Physics, Graduate School of Science, Tokai University
4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka-shi, Kanagawa, 259-1292, Japan*

²*Department of Physics, School of Science, Tokai University*

³*Micro/Nano Technology Center, Tokai University*

^{*}Corresponding author: E-mail: naoki-ko@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

(Received on Sept. 24, 2020; accepted on Dec. 7, 2020)

Abstract

To study the dynamics of ice, broadband dielectric spectroscopy measurements were performed on partially crystallized bovine serum albumin (BSA)-water mixtures with BSA concentrations of 2–10 wt.% at temperatures between 123 and 298 K. Three dielectric relaxation processes I, II, and H were observed. The process I originate from ice and, the process II seems to originates from two factors of hydrated BSA and interfacial polarization. The process H has extremely low activation energy and it cannot be identified. The relaxation process of ice is composed of three processes in 5 wt.% and 10 wt.% BSA-water mixtures and that composed of four processes in 2 wt.% BSA-water mixture. The activation energy of the ice process at the lowest frequency side did not change at temperatures below 233 K in 2 wt.% BSA-water mixture. However, the activation energies of other ice processes at higher frequency side change at a temperature lower than 233 K. The variation of water BSA interactions bring about a variety of ice mobility and different temperature dependence of relaxation times.

Keywords: broadband dielectric spectroscopy; bovine serum albumin; relaxation; ice

1 緒言

地表に最も多く存在する液体である水は、私たちの身体では非常に重要な役割を果たしている。私たちの身体の構成は約 60 % の水と生体高分子であるタンパク質が約 15 % であり、水とタンパク質で 3/4 を占めていることが一般的に知られている。水は生体高分子が三次元構造を保つのに重要な役割を担っていると同時に、液体の水の中に存在することによって生体高分子の構造は熱運動による構造揺らぎを伴ってその機能が発現することができる。そのため、生体高分子の 1 つであるタンパク質は脱水された状態では生理的な機能を発現しない。生体高分子の構造と機能の関係は多く解明されているが、水分子運動、タンパク質の構造揺らぎ、および機能発現の関係は未解明な点が多い。

高分子水溶液の分子運動の観測手法は中性子散乱法や核磁気共鳴法、熱力学的手法、光散乱法など様々なものがある。これらの観測手法の中で我々が用いた広帯域誘電分光法 (broadband dielectric spectroscopy: BDS) は最も広い範囲の周波数域、時間領域を測定することができる。BDS は、 μHz から THz の広い周波数範囲の誘電率を測定することが可能であり、緩和時間としてはおよそ 10^6 秒から 10^{-12} 秒までの広い時間領域で誘電緩和を観測することができる [1]。この観測時間域は高分子水溶液では緩和時間が大きい高分子の分子運動と緩和時間が小さい水の分子運動の両方を、同時に広い温度範囲で観測することができる唯一の方法である。

純水の氷の誘電緩和に関する研究は広く行われている。純水の氷の誘電緩和は誘電損失ピークが 1 つ観測される。氷の緩和の緩和時間はその温度依存性が全く異なる代表的な観測例が 2 つある。1 つは Auty らが観測した氷の緩和である。Auty らが観測した氷の緩和の緩和時間は観測された 273 K–208 K の温度範囲でみかけの活性化エネルギー、 E_a が一定の Arrhenius 型の温度依存性を示す [2]。一方、Johari らが観測した氷の緩和の緩和時間は、240 K 以上、240–170 K、および 170 K 以下の 3 つの温度域で異なった E_a を示した [3]。240 K 以上の最も高温域の E_a は 53.2 kJ/mol, 240–170 K の中間の温度域では 18.8 kJ/mol, 170 K 以下の低温域では 46.4 kJ/mol と報告された [3]。本論文では E_a が変化しない氷の緩和の緩和時間の温度依存性を Auty 型、 E_a が変化する氷の緩和の緩和時間の温度依存性を Johari 型と述べる。我々は氷の緩和の緩和時間の温度依存性が氷の調整方法に依存することを報告した [4]。電極に純水を詰めた状態で温度を 5 K/min で下げ氷結させた氷の緩和の緩和時間の温度依存

性は Johari 型であった。一方、純水を 265 K で攪拌しながら氷結させた氷の緩和の緩和時間の温度依存性は Auty 型を示した。これらの緩和時間の温度依存性の違いは、氷の中の配向欠陥と水中に混在するイオンなどの不純物による格子欠陥の違いが原因であると考えられている [4]。Bjerrum は氷の配向欠陥として隣り合った 2 つの水分子の酸素間に 2 個の水素が存在する D 欠陥と、水素が存在しない L 欠陥による格子欠陥が誘電緩和機構に関係していると説明した [5]。氷の中の水分子の回転による D, L 欠陥の生成消滅の E_a は 54.4–56.1 kJ/mol と見積もられており、Auty が報告した E_a や Johari 型の氷の 240 K 以上における E_a とよく一致する。一方、KOH や HCl がドープされた氷の誘電緩和に関する研究では、氷の緩和の緩和時間の E_a は 31 kJ/mol であることが報告された [6]。これらの考えに基づき、水を攪拌すると結晶化が時間をかけて進行することで不純物が氷の結晶の成長過程で排除され、氷の結晶に含まれる不純物が少なくなることで Auty 型の緩和時間の温度依存性を示す氷が生成されると考えた [4]。一方、急速な結晶化により不純物が氷の結晶中から排除されにくい場合、イオンによる格子欠陥が氷に多く含まれ、中間の温度域で E_a が小さくなる Johari 型の緩和時間の温度依存性を示す氷が生成されたと考えられた [4, 7]。

我々は Poly-vinylpyrrolidone (PVP) をはじめとする合成高分子 [8–10]、氷結点以下で液体のまま存在する水（不凍水）の保有量が多いゼラチンや免疫染色など生化学の分野で多く応用されているウシ血清アルブミン（bovine serum albumin: BSA）などの生体高分子 [11–16] の水溶液の 273 K 以下で観測された誘電緩和に関する研究を行ってきた。ウシ血清アルブミンは球状タンパク質の中で、比較的、構造が単純で、安価に精製された試料を入手できることから、球状タンパク質の分子運動の研究に用いられてきた代表的な球状タンパク質の 1 つである。273 K 以下の温度の水溶液は溶質濃度が低く氷結する系と溶質濃度が高い氷結しない系に分けることが出来る。氷結した水溶液中では水が氷結した氷相と、氷結していない濃縮溶液相の 2 つの相に分離する。氷結した高分子水溶液の誘電率を BDS で測定すると主に高分子の緩和、氷の緩和、不凍水の緩和の 3 種類の緩和が観測される。氷の緩和は氷の相で起こり、高分子と不凍水の緩和は氷結していない濃縮溶液相に含まれる高分子と水に起因する [7–16]。さらに電極分極および氷相と濃縮溶液相の 2 相が存在することによる界面分極や、直流電気伝導 (dc) 成分などの影響も同時に観測される。氷結した BSA 濃度 40 および 20 wt.% の BSA 水溶液 [13]、ゼラチン濃度 10–50 wt.% のゼラチン水溶液 [11] においても、同様に氷、溶質である BSA やゼラチン、および不凍水の分子運動に起因する 3 種類の緩和が観測された。BSA 水溶液において氷の緩和の緩和時間は Johari 型の温度依存性を示した。またゼラチン濃度が 10 wt.% 以上のゼラチン水溶液で観測された氷の緩和は、単一の緩和で明確な誘電損失ピークが 1 つ観測され、Auty 型の緩和時間の温度依存性を示した。純水の氷、もしくは水溶液中の氷の緩和の緩和時間の温度依存性は Johari 型になる場合が多いが、ゼラチン濃度 10 wt.% 以上のゼラチン水溶液の氷の緩和時間は Auty 型であるため、ゼラチン濃度 10 wt.% 以下の低ゼラチン濃度水溶液を用い氷の緩和の緩和時間の温度依存性が Auty 型から Johari 型に変化する過程を調べた。1–5 wt.% ゼラチン水溶液の BDS 測定を行ったところ、氷の緩和が 4 つ観測された [12]。4 つの氷の緩和の中で、最も低周波側の氷の緩和の緩和時間の温度依存性は Auty 型を示し、他は Johari 型を示した。これらの研究により 10 wt.% 以上のゼラチン濃度のゼラチン水溶液で氷の緩和の緩和時間の温度依存性が Auty 型を示す原因として、ゼラチンのゲルネットワークが水の拡散を阻害するため氷がゆっくりと成長し、不純物の少ない氷が生成されたと解釈された [11, 12]。

以前観測した 20 および 40 wt.% BSA 水溶液では、明確な氷の緩和のピークは 1 つしか観測されていないが、複数の緩和を仮定しないと氷の緩和をうまく再現することができなかった [13]。また、低温で氷結しない PVP 濃度 60 wt.% 以上、および氷結した 50 wt.% 以下の PVP 水溶液の氷の緩和と不凍水の緩和を比較し、180 K 以上の氷結した PVP 水溶液では氷の緩和と不凍水の緩和が異なる周波数域に観測されるが、180 K 以下では不凍水の緩和は氷の緩和に隠れて見えなくなることが明らかにさ

れた [8]. さらに前述のゼラチン濃度 5 wt.% 以下のゼラチン水溶液では水の緩和が複数観測されている [12]. この結果をふまえると以前報告された氷結した BSA 水溶液で不凍水に起因すると解釈された緩和 [13] が水の緩和である可能性があると考えることができる. また 1–5 wt.% ゼラチン水溶液と同様に BSA 水溶液にも低濃度で水の緩和が複数観測されることが予想される. 本研究では BSA 水溶液の BDS 測定を行い, 複数の水の緩和を観測し, この複数の水の緩和の特徴を明らかにする.

2 実験方法

BSA 水溶液は, 溶質に Sigma Aldrich 社製の分子量が約 66,000 の BSA, 溶媒に Merck Millipore 社製の超純水製造装置 Simplicity UV によって精製された比抵抗 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ の純水を用いた. BSA は入手したものをそのまま純水と混合し, 2, 5, 10 wt.% BSA 水溶液を調製した. 電極は同軸円筒型の電極を使用した. 誘電率が既知の Air, Acetone, Methanol, 純水を用い, 電極の幾何容量 $C_0 = 4.80 \pm 0.05 \text{ pF}$ と, 浮遊容量 $C_{stray} = 2.73 \pm 0.07 \text{ pF}$ を求めた. BDS 測定装置は Novocontrol 社製の Alpha-A Analyzer を用い, 周波数域 10 mHz–10 MHz で BSA 水溶液の複素誘電率を測定した. 試料が充填された電極を 10 K degree/min の冷却速度で温度を下げ, BDS 測定を行う温度に達し, $\pm 0.01 \text{ K}$ 以下の温度範囲の変動で約 20 分間放置した後, BDS 測定を開始した. 298 K–123 K の範囲において 5 K 刻みで純水および BSA 水溶液の BDS 測定を行った.

3 結果と考察

図 1 に 10 wt.% BSA 水溶液の 298 K–123 K の温度範囲の 5 K 毎の複素誘電率の周波数依存性を示す. 測定した温度域で最も高温で得られた 298 K の複素誘電率が高周波側で水の誘電率の大きな値を示し, 1 MHz 以下の周波数域で電極分極が観測され, 温度の低下とともに低周波側にシフトする. 特に大きな変化が 263 K と 258 K の間で観測される. 263 K において, 40 mHz から 30 mHz の間で誘電率が大きく低下した. これは降温過程で BDS 測定を行っているため, BSA 水溶液が過冷却になり, 263 K において 40 mHz から 30 mHz の誘電率測定中に氷結したと考えられる. また BSA 水溶液が氷結した 258 K 以下の各温度では誘電率の周波数依存性は連続的であり, また各温度の誘電率の間に大きな差はなく連続的に変化しているため, さらなる急激な氷結は起こっていない. BSA 水溶液が氷結した状態の 258 K において 10 kHz 付近と 300 Hz 付近に 2 つの緩和が観測され, 高周波側から I 緩和, II 緩和とする. 実部において II 緩和の低周波側は周波数の低下とともにさらに誘電率が大きくなるがこれは電極分極である. I 緩和と II 緩和は温度の低下とともに低周波側にシフトする. さらに 168 K において特に虚数部で認識しやすいが I 緩和の高周波側に観測された小さな緩和を H 緩和とする. H 緩和は I, II 緩和と異なり, 温度の低下にともなう低周波側への移動が非常に小さい. 2 wt.% および 5 wt.% BSA 水溶液の複素誘電率においても I, II, H 緩和を観測した. 実部では II 緩和と電極分極はそれぞれが確認できるが, 虚数部の低周波側は dc 成分と電極分極の影響が大きく II 緩和の誘電損失ピークはこれらに隠れて確認することができない. 200 K 以下の温度では I 緩和の誘電損失ピークを確認できるが, 200 K から 258 K では大きな dc 成分や電極分極などの影響により, I 緩和の誘電損失ピークを確認することが出来ない.

次に, 173 K 以下で明確に観測される I 緩和に注目する. 図 2 に BDS 測定を行ったすべての濃度の BSA 水溶液および純水の氷の 168 K, 158 K, 148 K の複素誘電率の虚数部の周波数依存性を示す. 純水の氷の緩和は温度の低下とともに分布の広がりが見られる. 一方, BSA 水溶液で観測される緩和は 168 K では分布が狭く 1 つの誘電損失ピークが観測されるが, 158 K では緩和の分布が広がり, 148 K

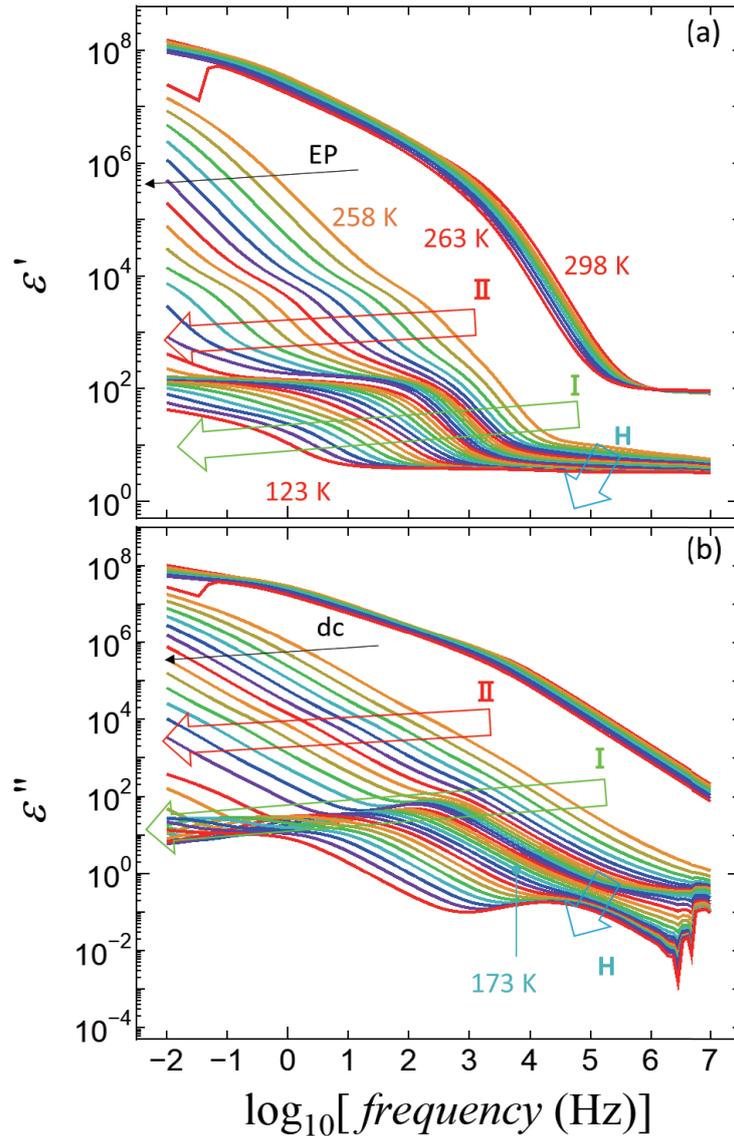


図 1 298 K–123 K (5 K 刻み) の 10 wt.% BSA 水溶液の複素誘電率の (a) 実数部および (b) 虚数部の周波数依存性. 誘電率測定は高温から温度を下げる過程で行った. 緑, 赤, 青の矢印はそれぞれ I 緩和, II 緩和, H 緩和が観測される領域を示す.

ではさらに分布が広がるとともに複数の誘電損失ピークが観測された. この複数の誘電損失ピークは, 10 wt.% と 5 wt.% では低周波側が高く, 2 wt.% では高周波側が高い.

このように複数に分離する I 緩和を特徴づけるため, 観測された複素誘電率に対して式 (1) に示すように複数の Cole-Cole の式 [17] と dc 成分の寄与の足し合わせを仮定し, カーブフィットを行った.

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \sum_k \frac{\Delta\epsilon_k}{1 + (i\omega\tau_k)^\beta} + \frac{\sigma}{i\omega\epsilon_0} \quad (1)$$

ω は角周波数, i は $i^2 = -1$ で定義する虚数単位, ϵ_0 は真空の誘電率, ϵ_∞ は緩和の高周波側の誘電率, $\Delta\epsilon$ は緩和強度, τ は緩和時間, β は緩和の対称な広がりを表すパラメータ ($0 < \beta \leq 1$), σ は直流電気伝導度, k は仮定した緩和を示す.

式 (1) を用いることで全ての濃度および温度で観測された BSA 水溶液の複素誘電率を再現すること

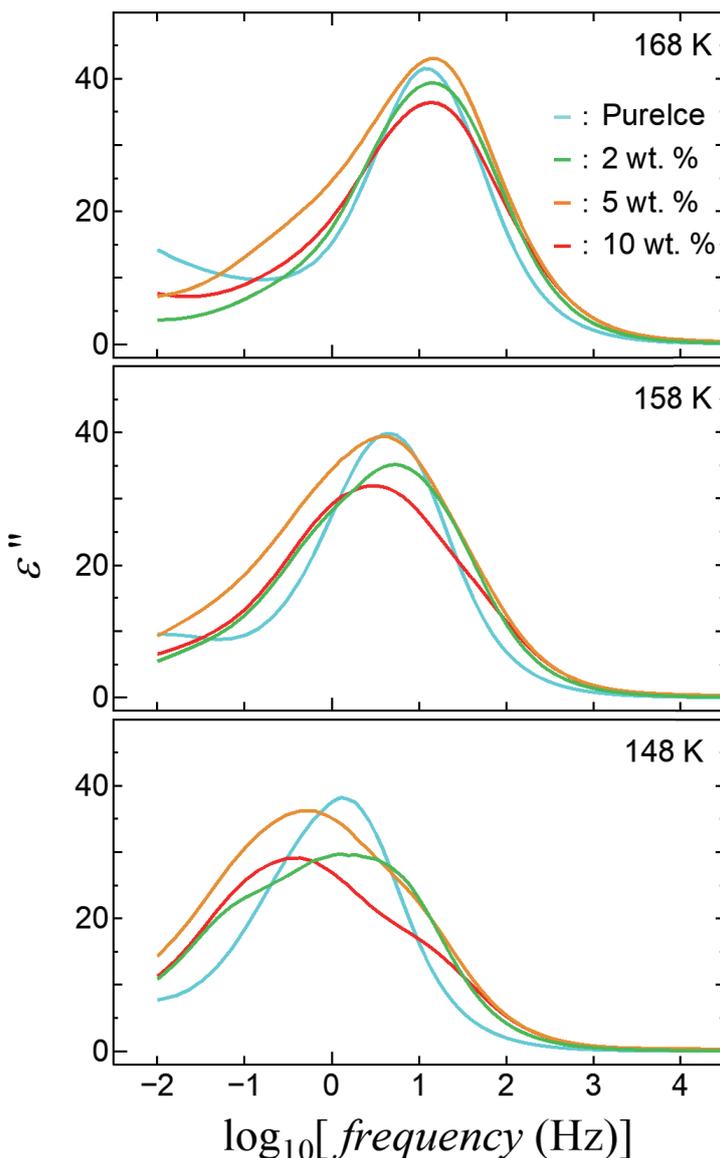


図 2 BSA 水溶液の I 緩和および純水の 168 K, 158 K, 148 K における複素誘電率の虚数部の周波数依存性。曲線の色はそれぞれ純水 (水色) および, 2 wt.% (緑), 5 wt.% (橙), 10 wt.% (赤) BSA 水溶液である。

ができた。約 170 K 以下の温度域で I 緩和を再現するためには複数の緩和を仮定する必要がある。5 および 10 wt.% BSA 水溶液では 3 つ, 2 wt.% BSA 水溶液では 4 つの緩和を仮定することで I 緩和を再現した。この I 緩和を構成する複数の緩和を高周波側から I_A, I_B, I_C, I_D と称する。図 3 にカーブフィットの例を示す。I 緩和と II 緩和の観測例として 258 K を, また低温域で I 緩和に複数の緩和を仮定した例として 148 K を示した。10 および 2 wt.% BSA 水溶液で観測された複素誘電率をプロットで, 式 (1) で得られた複数の緩和および dc 成分の寄与を曲線で示した。258 K において II 緩和の低周波側に存在する緩和を灰色で示した曲線は電極分極である。148 K においては 10 および 5 wt.% BSA 水溶液では I_A, I_B, I_C の 3 つ, 2 wt.% BSA 水溶液では I_A, I_B, I_C, I_D の 4 つを I 緩和を構成する緩和とみなした。詳しくは以下で説明するが, これらの緩和の強度の合計からこのように解釈し, その低周波側の灰色の曲線は I 緩和に起因するものではなく界面分極に起因する緩和であると解釈した。

図 4 に 148 K で観測された純水の氷の緩和と, この緩和を再現したカーブフィットの例を示す。純

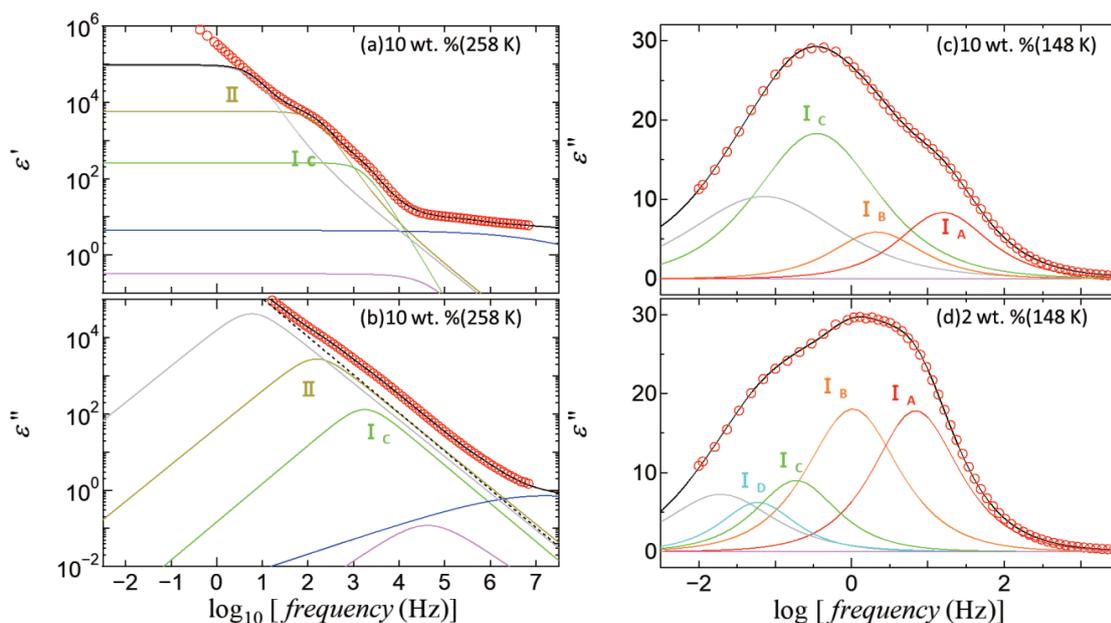


図 3 10 wt.% および 2 wt.% BSA 水溶液の 258 K および 148 K で得られた複素誘電率 (赤いプロット) と、複素誘電率に対し Cole-Cole の式を仮定したカーブフィットで得られた曲線。黄色、桃色の曲線はそれぞれ II 緩和、H 緩和である。258 K では高周波側に不凍水 (青) を仮定した。赤、橙、緑、水色の曲線は I 緩和である。黒色の破線は直流電気伝導成分、灰色の曲線は界面分極である。黒の曲線は仮定した全ての要素の合計である。各パネルの BSA 濃度と温度は (a) 10 wt.% (258 K), (b) 10 wt.% (258 K), (c) 10 wt.% (148 K), (d) 2 wt.% (148 K) である。

水では明確な誘電損失ピークは 1 つのみだが、複素誘電率の周波数依存性を再現するためには 3 つの緩和を仮定する必要がある。高周波側から緩和 h, m, l と称する。しかし、高周波側と低周波側の 2 つの緩和 l と緩和 h は緩和 m の近傍に存在し、緩和 h と l の誘電損失ピークは確認することができない。BDS 測定で得られた複素誘電率を再現するために 3 つの緩和を仮定したが、これらの 3 つの緩和は 1 つの緩和で分布が広がったものとみなすことが妥当であると考えられる。

また図 5 に純水の氷で観測された 3 つの緩和の緩和時間、緩和強度、対称的な広がりを表すパラメータ β の温度依存性を示す。以前 Sasaki ら [4] が観測した、攪拌しながら純水を氷結させて得られた活性化エネルギーの変化を含まない Auty 型の緩和時間の温度依存性を持つ氷 I_{hc} と、攪拌なしで純水を氷結させて得られた活性化エネルギーの変化を含む Johari 型の緩和時間の温度依存性を持つ氷 I_{ha} の緩和時間を比較のために図 5 に示す。本研究で観測した純水の氷のピークを示す緩和の緩和時間の温度依存性は Johari 型を示し、Sasaki らの氷 I_{ha} の緩和時間の温度依存性を再現した。緩和 m の緩和強度は温度の低下とともに減少し、h と l の緩和強度が上昇している。これは氷の緩和の分布が温度の低下とともに広がっていることを示している。青のプロットは h, m, l の緩和強度の合計を示し、温度の低下とともに緩和強度の合計は上昇している。

図 6 に 10 wt.% BSA 水溶液の緩和時間、緩和強度、対称的な広がりを表すパラメータ β の温度依存性を示す。実部でのステップが明確でなく、また誘電損失ピークも観測されていないが、複素誘電率を再現するために仮定した緩和を白抜きのプロットで示す。II 緩和の緩和時間が 100 s になる温度が 200 K であった。この温度は熱測定で観測された BSA のガラス転移温度 [18] とほぼ一致し、また多くのガラス形成物質の構造緩和においても緩和時間が 100 s から 1000 s になる温度が熱測定で決定したガラス転移温度と一致する [12–18]。20 および 40 wt.% BSA 水溶液 [13] でも本研究の II 緩和に相当する

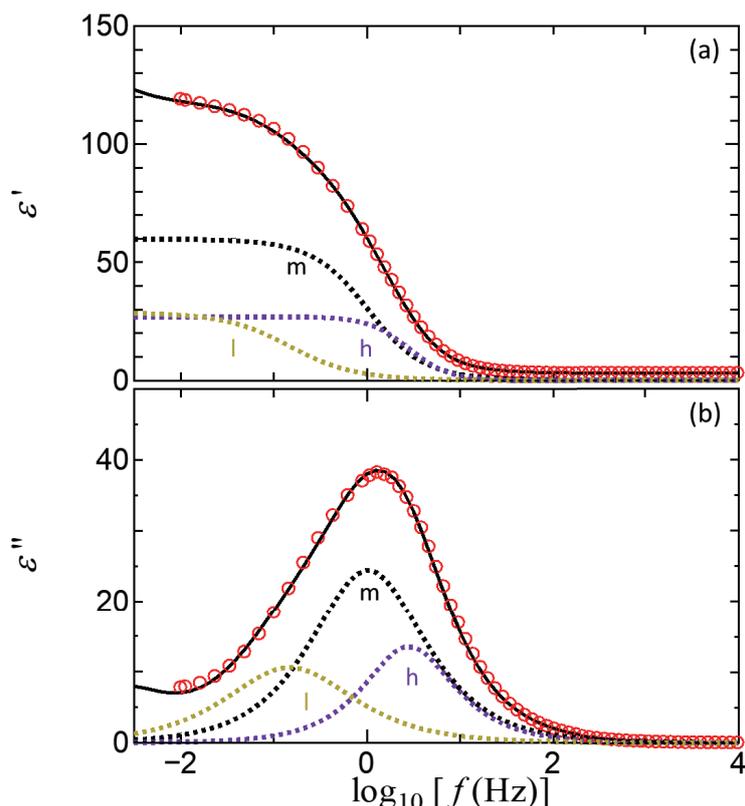


図 4 148 K で観測された純水の複素誘電率の (a) 実数部および (b) 虚数部 (赤いプロット) に対し複数の Cole-Cole の式を仮定しカーブフィットで得られた曲線。黒・紫・黄色の破線は仮定した緩和過程である。また黒の曲線は仮定した緩和の合計である。

緩和が観測されており、その緩和の緩和時間が 100 s になる温度が 200 K 付近であった。また II 緩和の強度は低温で氷結しない PVP 水溶液で観測された PVP の構造緩和の緩和強度 [8] より非常に大きい。部分的に氷結した PVP 水溶液では氷結した氷相と氷結していない濃縮溶液相が存在し、PVP 濃度が低いほど氷相の割合が高く、濃縮溶液相の割合は低いことが確認された [8]。また PVP 濃度が 40 wt.% 未満の PVP 水溶液中では、氷の相の割合が高く、小さな濃縮溶液相が氷相の間に分散し、その界面で生じる界面分極が高分子の構造緩和と同様の周波数域に現れることが明らかにされた [8]。氷結した 2-10 wt.% BSA 水溶液でも氷相が占める割合が大きいため、界面分極が水和した BSA の緩和と同様な周波数域に存在し、この 2 つの緩和が重なり大きな強度を示すと考えられる。以上の理由により II 緩和は水和した BSA の構造緩和と界面分極の 2 つの要因に関係する緩和であると考えている。

10 wt.% BSA 水溶液では、約 180 K より高温では Cole-Cole 型の緩和を 1 つ仮定することで I 緩和を再現することができた。しかし、この温度域では I 緩和と II 緩和や界面分極の現れる周波数域が近く、I 緩和を構成する複数の緩和を確認することができない。180 K より低温では I 緩和を再現するために 3 つの緩和を仮定する必要がある。この I 緩和を構成する複数の緩和の強度に注目すると、高温で仮定した緩和 I_C の強度が温度の低下とともに減少し、緩和 I_A と I_B の強度が増加した。この 3 つの緩和の緩和強度を足し合わせた値を青のプロットで示す。高温から存在する緩和 I_C の緩和時間は純水で観測された氷の緩和時間に非常に近いことから I 緩和は氷に起因する緩和であると考えられる。また、低濃度の 1-5 wt.% ゼラチン水溶液 [12] と同様に、10 wt.% BSA 水溶液においても氷の緩和は低温で複数観測された。ゼラチン水溶液や PVP 水溶液では II 緩和に相当する高分子の構造緩和と I 緩和

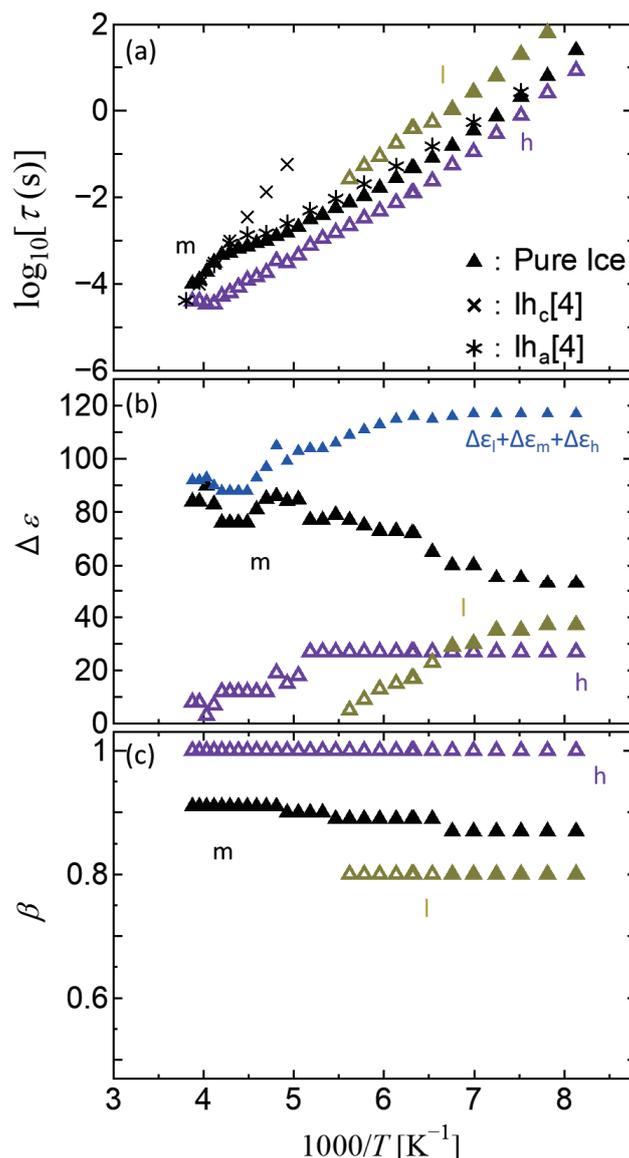


図 5 純水で観測された氷の (a) 緩和時間, (b) 緩和強度, (c) 緩和の広がりを表すパラメータの温度依存性 [4]. ▲は今回の実験で観測された緩和のプロットである. $\Delta\epsilon$ の青のプロットは複数観測された緩和の合計を示す. 白抜きプロットはピークが見えていないが誘電率を再現するために仮定した緩和である. ×と*は Ref [4] で報告された氷の緩和時間のプロットである.

に相当する氷の緩和が観測され, 氷の緩和の高周波側に不凍水の緩和が観測されている. 本研究では 2–10 wt.% BSA 水溶液で H 緩和が観測された周波数域は 200 K 以上の比較的高温側では他の水溶液で不凍水の緩和が観測された周波数と一致するが, 低温側では H 緩和の緩和時間は不凍水と比べ非常に小さい. また, 不凍水の緩和は温度の低下に伴い低周波側へ大きくシフトし E_a も H 緩和に比べて大きい [8, 11]. 今回観測された H 緩和の緩和時間の温度依存性は不凍水の緩和時間に比べて非常に小さく, E_a が非常に小さい. そのため従来観測されてきた不凍水とは全く異なる温度依存性であることから, 不凍水に起因する緩和であるとは考えにくい. H 緩和の起源を明らかにするためには, 本研究の観測条件では不十分であり, H 緩和の濃度や温度依存性をより詳しく調べるとともに, 同様な緩和が存在するか他の球状タンパク質水溶液や高分子水溶液でも確認する必要がある.

図 7 に 2, 5, 10 wt.% BSA 水溶液で観測された I 緩和の緩和時間の温度依存性を示す. 全ての BSA

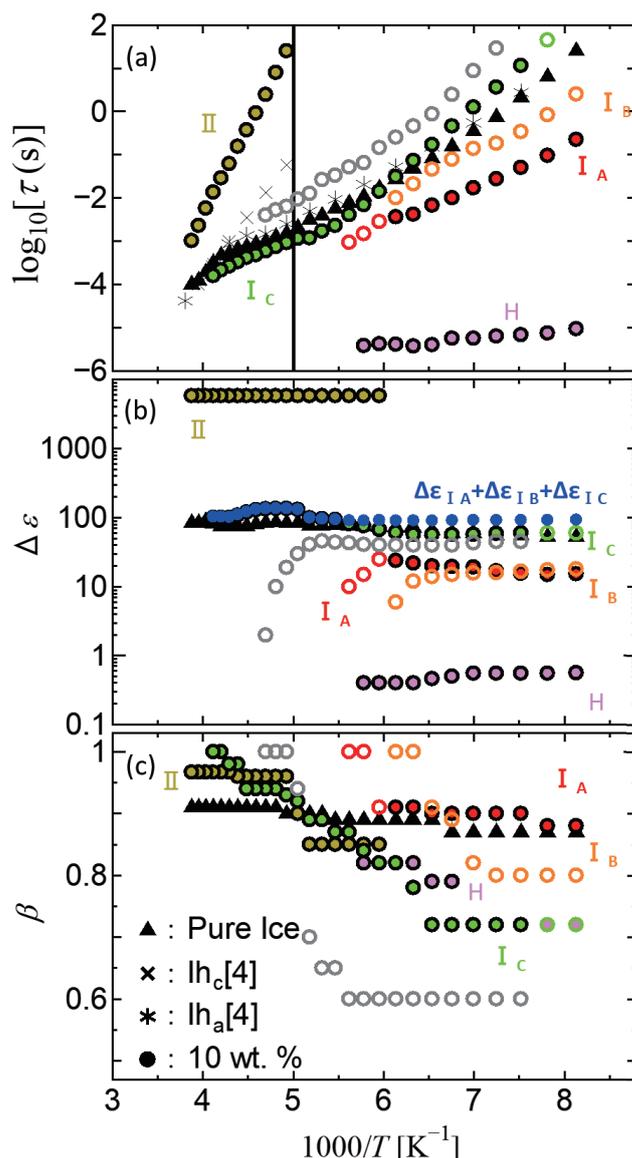


図 6 10 wt.% BSA 水溶液 (●) で観測された (a) 緩和時間, (b) 緩和強度, (c) 緩和の広がりを出すパラメータの温度依存性. 灰色の白抜きプロットは界面分極である. 白抜きのプロットはピークが見えていないが誘電率を再現するために仮定した緩和. 黒の実線は II 緩和の緩和時間が 100 s に達した温度を示す. 青のプロットは I 緩和を構成する緩和の強度の合計を示す. \blacktriangle は今回の実験で観測された純水の緩和のプロットである. \times と $*$ は Ref [4] で報告された氷の緩和時間のプロットである.

水溶液で約 170 K 以下の低温域で I 緩和を再現するためには複数の緩和を仮定する必要がある. 5 および 10 wt.% BSA 水溶液では 3 つ, 2 wt.% BSA 水溶液では 4 つの緩和を仮定した. 複数観測された氷の緩和時間の温度依存性は E_a の変化を含む多様な温度依存性を示した. また 1-4 wt.% ゼラチン水溶液 [12] において低温域で複数観測された氷の緩和の最も低周波側で観測された緩和は, 240 K 以上の E_a の大きな温度域の緩和時間を低温側に外挿した延長線上に存在する. この最も低周波側の氷の緩和は, 高温側から E_a が大きな値を維持し緩和時間の温度依存性が変化しない Auty 型の緩和時間の温度依存性の氷が存在することを意味している. このような氷の緩和は BSA 水溶液の I 緩和では確認されなかった. ゼラチン水溶液においてはゲルネットワーク形成の影響で Auty 型の緩和時間の温度依存性を示すと解釈された [11, 12]. それに対して BSA 水溶液はゲルネットワーク形成は存在しないため,

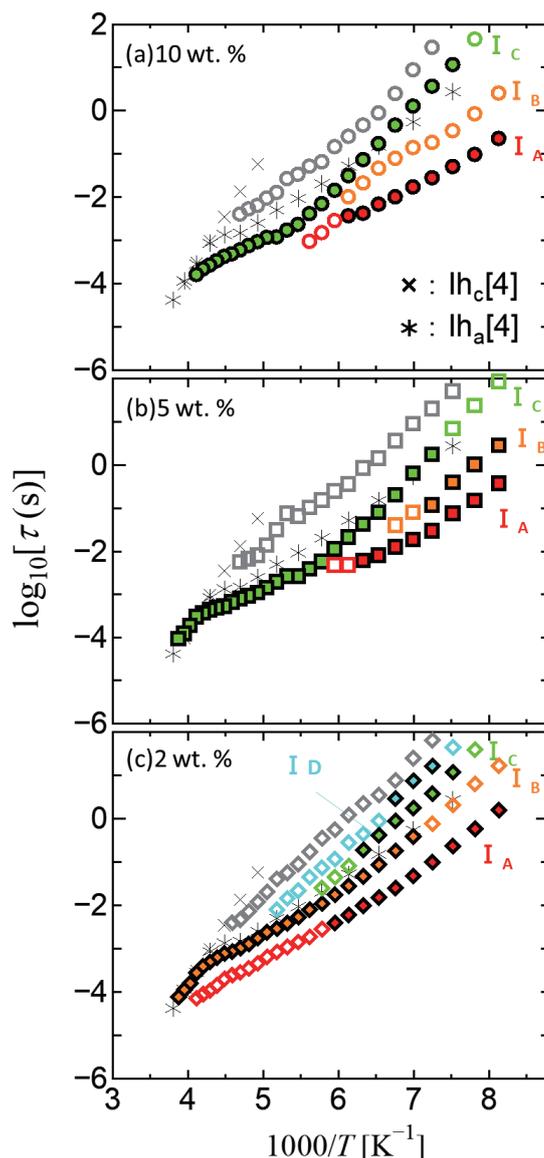


図 7 (a) 10 wt.%, (b) 5 wt.%, (c) 2 wt.% BSA 水溶液で観測された I 緩和を構成する緩和の緩和時間の温度依存性. 灰色の白抜きプロットは I 緩和に隣接する界面分極である. 白抜きのプロットはピークが見えていないが誘電率を再現するために仮定した緩和である. ×と*は Ref[4] で報告された氷の緩和時間のプロットである.

ゆっくりと結晶化する氷が存在せず Auty 型の緩和時間の温度依存性を持つ氷が生成しないと考えた. 氷の緩和 I_A , I_B , I_C , I_D の緩和時間が BSA 水溶液はゼラチン水溶液に比べ狭い緩和時間の範囲に存在する. また氷の緩和 I_C , I_D は BSA 水溶液で観測されたものに比べゼラチン水溶液の方が緩和時間が大きい. これは BSA よりもゼラチンの方が水に与える影響が大きく, ゼラチンのゲルネットワークによる水の拡散の障害が氷の成長に対して強い影響を与え緩和時間の大きい氷が生成されたと考えている. これらの結果から低周波側に存在する氷の緩和 I_C , I_D においては特に溶質の影響を強く受けて生成した氷であると考え. また, BSA 水溶液で観測された氷の緩和 I_A , I_B はゼラチン水溶液で観測されたものと緩和時間の値が近い. このように高周波側に存在する氷の緩和 I_A , I_B は BSA 水溶液とゼラチン水溶液の比較から溶質の分子構造や形態の影響が少ない氷であると考えられる.

図 8 に 2, 5, 10 wt.% BSA 水溶液の I 緩和の緩和強度の温度依存性を示す. 10 wt.% と同様に高温

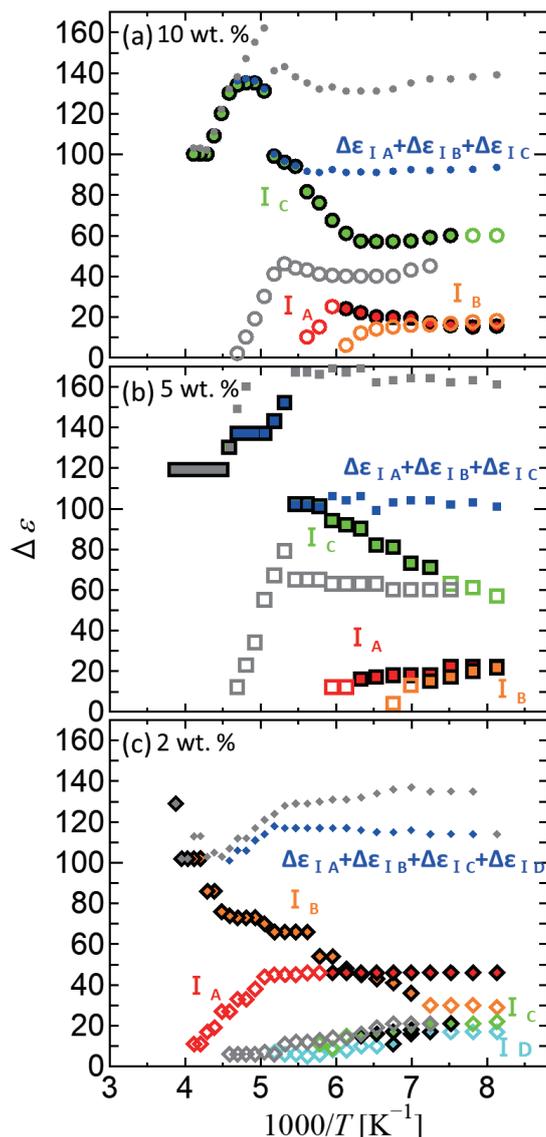


図 8 (a) 10 wt.%, (b) 5 wt.%, (c) 2 wt.% BSA 水溶液で観測された I 緩和を構成する緩和の緩和強度の温度依存性. 白抜きのプロットはピークが見えていないが誘電率を再現するために仮定した緩和である. 灰色の白抜きプロットは I 緩和に隣接する界面分極である. 青のプロットは I 緩和を構成する緩和の強度の合計を示し, 灰色のプロットは I 緩和を構成する緩和と界面分極の和を示す.

から存在する 2 wt.% の緩和 I_B と 5 および 10 wt.% の緩和 I_C においてもその緩和強度が減少する温度域で, 低温側で他の I 緩和を構成する緩和が現れ, その強度が増加した. 青色のプロットは図 6 と同様に複数仮定した I 緩和の強度の合計を示した. I 緩和の強度の合計を見ると 200 K 以下では温度に依存せず一定になっている. 2 wt.% BSA 水溶液の緩和 I_D の低周波側と, 5 および 10 wt.% BSA 水溶液の緩和 I_C の低周波側に図 7 および図 8 に灰色の白抜きプロットで示した緩和を仮定している. この緩和はいずれの濃度の BSA 水溶液でも 210 K 以下の温度で観測されている. この緩和は 200 K 付近では明らかに I 緩和の低周波側に存在しているが, 170 K 以下では緩和 I_D または I_C に近い周波数で観測されている.

図 9 に I 緩和の緩和強度, 緩和時間の濃度依存性を示す. 図 3 に示したように I 緩和の低周波側に緩和を仮定しこの緩和の緩和強度と緩和時間を図 9 でも灰色の白抜きプロットで示した. この灰色の白抜

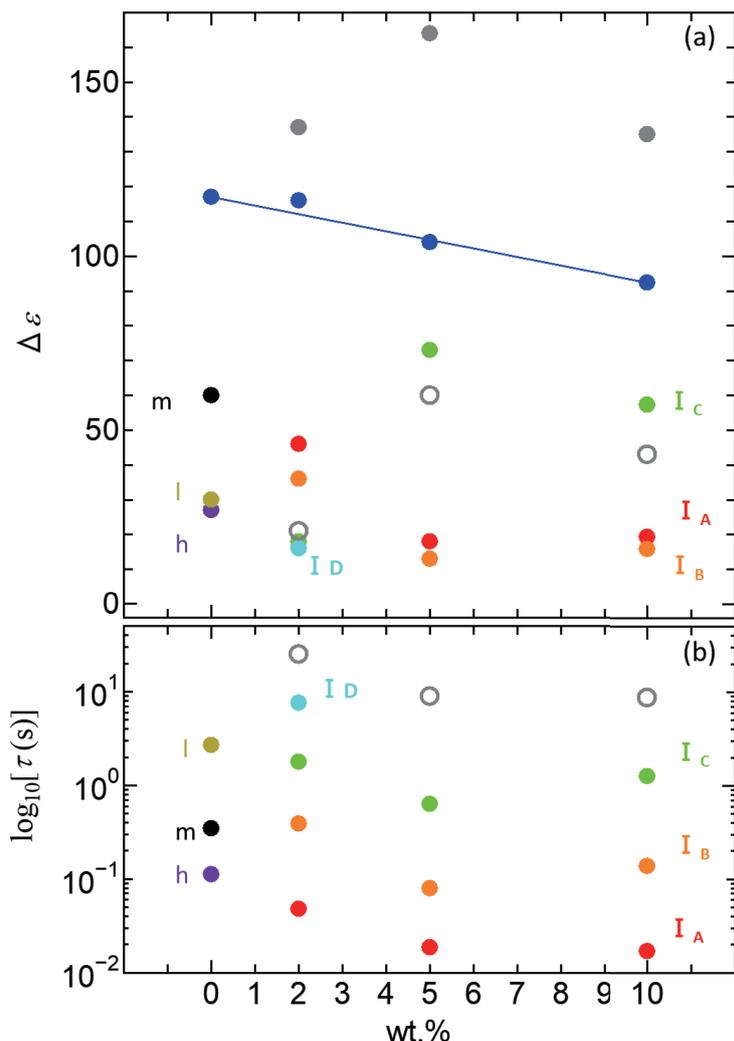


図9 143 Kで観測されたBSA水溶液のI緩和を構成する緩和の(a)緩和強度, (b)各緩和時間の濃度依存性. 灰色の白抜きプロットはI緩和に隣接する界面分極である. 青のプロットはI緩和を構成する緩和の強度の合計を示し, 灰色のプロットはI緩和を構成する緩和と界面分極の和を示す.

きプロットで示した緩和が観測される周波数域はI緩和が観測される周波数に近いことからこの緩和も氷に起因する可能性があると考えられる. しかし, この緩和の強度をI緩和の強度に加えると灰色のプロットのとおりI緩和の強度の和が純水の強度より大きくなる. BSA濃度の増加とともに水溶液中の水の割合が減少することを考慮し, BSA水溶液中の水の強度が純粋な氷の強度を超えることはないと仮定すると, このI緩和の低周波側に仮定した緩和は氷ではなく界面分極の寄与であると考えられる. 緩和 $I_A \sim I_C$ ないし I_D の緩和強度の合計は純水から10 wt.%にかけてほぼ直線的に減少した. これはBSA濃度の増加とともに水溶液中の水の割合が減少していることが氷に起因するI緩和の合計強度に現れている. この結果から緩和 $I_A \sim I_C$ ないし I_D が氷に起因する緩和であると解釈している. このようにI緩和を構成する緩和 I_A, I_B, I_C, I_D は氷に起因し, 10 wt.%以下の濃度のBSA水溶液でも低温域で水の緩和が複数存在することを確認した.

図9に示すように氷の緩和 I_A, I_B, I_C の緩和時間は2 wt.%から5 wt.%にかけて小さくなっている. これはより低濃度な水溶液中の水の緩和の方が塩濃度の影響を受けやすく, 急速な氷結により氷の結晶中にイオンが残存し緩和時間が小さい氷が生成されると推測している. また, 氷の高周波側の緩和 $I_A,$

I_B の強度は BSA 濃度が 2 wt.% から 5 wt.% になると減少する。一方、低周波側の氷の緩和 I_C は BSA 濃度が 2 wt.% から 5 wt.% の間に急激に強度が増加する。このことから、2 wt.% と 5 wt.% の間の氷の緩和強度の濃度依存性の変化は BSA が氷に与える影響が変化しているためと考えられるが、この濃度依存性については、より細かく濃度を変化させて氷の緩和を調べる必要がある。また比較的高周波側に存在する溶質の影響が少ないと推測した氷の緩和 I_A , I_B , 低周波側に存在する溶質の影響を大きく受けると推測した氷の緩和 I_C , I_D の緩和時間や緩和強度から氷の緩和の特徴をさらに詳しく調査するためには溶質に他の球状タンパク質や生体高分子を用いることで各氷の緩和に与える溶質の影響の違いを確認できると考える。また重なり濃度でない濃度 1 wt.% 以下の希薄溶液や濃度 40 wt.% 以上から溶解限界までの濃度の濃厚溶液など幅広い濃度で誘電緩和測定を行うことで、界面分極が氷の緩和に与える影響や、氷の緩和時間や緩和強度の変化が濃度依存性から得られると考える。

水溶液の氷の誘電緩和は氷の結晶のわずかな違いが緩和の特徴に大きく影響し、特に氷の結晶の成長過程で氷の緩和の特徴に影響を与える要因を特定しそれを再現しないことには、氷の緩和を十分に再現するのは困難である。また界面分極および氷の緩和の特徴を決定する要因が十分に解明されていないため、現段階で両者を明確に区別できているわけではない。

4 まとめ

298 K–123 K の温度範囲の降温過程における氷結した純水および 2, 5, 10 wt.% BSA 水溶液の誘電緩和を 10 mHz–10 MHz の周波数範囲で観測し氷に起因する I 緩和、水和した BSA の分子運動と界面分極が重なった II 緩和、および I 緩和の高周波側に強度が小さく緩和時間の温度依存性が非常に小さい H 緩和を観測した。この 3 つの緩和の中で氷に起因する I 緩和に注目して議論を行った。

1. BSA 水溶液において 180 K 以上の温度域で 1 つの誘電損失ピークで観測された氷の緩和は、180 K 以下の低温域で 5 および 10 wt.% BSA 水溶液では 3 つ、2 wt.% BSA 水溶液では 4 つの氷の緩和が観測された。
2. 観測された氷の緩和は緩和時間の温度依存性が 170 K 付近で変化する（見かけの活性化エネルギー、 E_a が変化する）緩和時間の温度依存性を示した。
3. 複数観測された I 緩和の近傍の緩和は、その強度の和を純水のものと比較し、緩和 I_A , I_B , I_C , I_D は氷に起因しその低周波側に界面分極が存在すると解釈した。
4. 水溶液中の氷は BSA との位置関係や相互作用の影響が多様であるため、緩和時間およびその温度依存性が異なる多様な氷が形成され複数の緩和が観測されたと考えられる。

参考文献

- [1] 八木原 晋, 新屋敷 直木, “生体内水構造のダイナミクスと広帯域誘電分光”, 生物物理 **44** (1), 4–9 (2004).
- [2] R. P. Auty and R. H Cole, *Dielectric Properties of Ice and Solid D₂O*, J. Chem. Phys. **20**, 1309–1314 (1952).
- [3] G. P. Johari and E. Whalley, *The dielectric properties of ice Ih in the range 272–133 K*, J. Chem. Phys. **75**, 1333–1340 (1981).
- [4] K. Sasaki, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Dielectric Relaxation Time of Ice-Ih with Different Preparation*, J. Phys. Chem. B **120**, 3950–3953 (2016).
- [5] Niels Bjerrum, *Structure and Properties of Ice*, Science **115** (2989), 385–390 (1952).
- [6] Shuji kawada, Ru, and Mituru Abo, *Dielectric Properties and 110 K Anomalies in KOH- and HCl-Doped Ice Single Crystals*, J. Phys. Chem. B **101**, 6223–6225 (1997).

- [7] 佐々木海渡, 新屋敷直木, “純水および部分的に氷結した水溶液中の氷の誘電緩和”, *Netsu Sokutei* **45** (3), 124–128 (2018).
- [8] M. Fujii, K. Sasaki, Y. Matui, S. Inoue, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Dynamics of Uncrystallized Water, Ice, and Hydrated Polymer in Partially Crystallized Poly(vinylpyrrolidone)-Water Mixtures*, *J. Phys. Chem. B* **124**, 1521–1530 (2020).
- [9] N. Shinyashiki, M. Shimoura, T. Ushiyama, T. Miyagawa, and S. Yagihara, *Dynamics of Water in Partially Crystallized Polymer/Water Mixtures Studied by Dielectric Spectroscopy*, *J. Phys. Chem. B* **111**, 10079–10087 (2007).
- [10] K. Sasaki, Y. Matsui, M. Miyara, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Glass Transition and Dynamics of the Polymer and Water in the Poly(vinylpyrrolidone)-Water Mixtures Studied by Dielectric Relaxation Spectroscopy*, *J. Phys. Chem. B* **120**, 6882–6889 (2016).
- [11] K. Sasaki, A. Panagopoulou, R. Kita, N. Shinyashiki, S. Yagihara, A. Kyritsis, and P. Pissis, *Dynamics of Uncrystallized Water, Ice, and Hydrated Protein in Partially Crystallized Gelatin-Water Mixtures Studied by Broadband Dielectric Spectroscopy*, *J. Phys. Chem. B* **121**, 265–272 (2017).
- [12] T. Yasuda, K. Sasaki, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Dielectric Relaxation of Ice in Gelatin-Water Mixtures*, *J. Phys. Chem. B* **121**, 2896–2901 (2017).
- [13] N. Shinyashiki, W. Yamamoto, A. Yokoyama, T. Yoshinari, S. Yagihara, R. Kita, K. L. Ngai, and S. Capaccioli, *Glass Transitions in Aqueous Solutions of Protein (Bovine Serum Albumin)*, *J. Phys. Chem. B* **113**, 14448–14456 (2009).
- [14] A. Panagopoulou, A. Kyritsis, N. Shinyashiki, and P. Pissis, *Protein and Water Dynamics in Bovine Serum Albumin-Water Mixtures over Wide Ranges of Composition*, *J. Phys. Chem. B* **116**, 1593–4602 (2012).
- [15] 佐々木海渡, 宮本陽介, 宮良政彦, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋, “誘電分光法による部分的に氷結したゼラチン水溶液の水のダイナミクス”, *Proc. Sch. Sci. Tokai UNIV.* **48**, 119–131 (2013).
- [16] K. Sasaki, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *Glass transition of partially crystallized gelatin-water mixtures studied by broadband dielectric spectroscopy*, *J. Chem. Phys.* **140**, 124506 (2014).
- [17] K. S. Cole, and R. H. Cole, *Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics*, *J. Chem. Phys.* **9**, 341–351 (1941).
- [18] K. Kawai, T. Suzuki, M. Oguni, *Low-Temperature Glass Transitions of Quenched and Annealed Bovine Serum Albumin Aqueous Solutions*, *Biophys.* **90**, 3732 (2006).
- [19] 八木原晋, 新屋敷直木, 喜多理王, “高分子中で水はどのように振舞うか?”, *高分子*, Vol.58 2月号, 65–69 (2009).