

拡散により形成される異方性バイオゲルの放射光 X 線小角散乱による分子配向特性解析

榎 靖幸¹, 古澤和也², 土橋敏明¹, 杉本泰伸³, 若林克三^{4*}

¹群馬大学大学院理工学府 〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1

²北海道大学大学院先端生命科学研究所 〒060-0810 北海道札幌市北区北10条西 8 丁目

³名古屋大学シンクロトロン光研究センター 〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

⁴大阪大学大学院基礎工学研究科 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3

*大阪大学名誉教授

要旨

多糖類や DNA などの生体高分子の水溶液は pH 変化やイオン添加によってゲル化することがある。高分子溶液とゲル化を誘起する物質（ゲル化剤）の溶液を接触させると、濃度勾配による拡散に伴ってゲル化が進行する。このような拡散により形成されるゲルは、分子鎖の配向した異方性ゲルになるということが報告されていた。また近年、多糖類の一種であるカドランを用いて拡散によるゲルを調製すると、得られたゲルは異方性に加えて特徴的な多層構造を持つことが見出された。本稿では、このカドランの異方性多層構造ゲルについて、放射光 X 線小角散乱により多層中の分子配向の特性解析を行った研究を紹介する。

1. はじめに

ゼリーやコンニャク、ソフトコンタクトレンズなど、液体（水）を溶媒として多量に含有・保持する柔らかい固体のことをゲル（ハイドロゲル（hydrogel））と呼ぶ。ゲルは高分子の網目が溶媒で膨潤したものであり、溶液中の線状高分子鎖を架橋したり、多官能性モノマーを溶液中で重合させたりすることで得られる。ハイドロゲルの一般的な解説としては、応用も含めて例えば文献 1-3 を参照されたい。ゲルの調製の際は通常、攪拌操作などにより均一な溶液が初期条件となるように設定するので、網目構造（network structure）の形成は溶液中のいたるところで同様な確率で開始され、巨視的には一様にゲル化が進行する。結果として、網目構造よりも十分大きなスケールでは一般的にゲルは等方的で均一である（ただし、一般的な調製法で得られるゲルの網目構造自体は多くの場合不均一である²⁾）。

これに対して、ゲル化が巨視的なスケールで一様に進行しない場合もある。高分子を壁膜とするカプセル化手法の 1 つに不溶化反応（insolubilization reaction）法というものが、印刷や食品など広い分野で用いられている。不溶化反応法では、架橋剤を含む溶液（凝固浴）中に高分子水溶液を滴下することで、ゲル壁膜を持つ中空粒子（カプセル）またはゲル粒子（ビーズ）を作製することができる。典型例として、アルギン酸（alginate）のゲルカプセル（いわゆる人工イクラ）について考えてみる。アルギン酸は 1,4-β-マンヌロン酸と 1,4-α-グルロン酸が共重合した

直鎖状多糖類で、そのナトリウム塩の水溶液は Ca²⁺ 存在下でゲル化する。不溶化反応法では、Ca²⁺ を含む溶液（凝固浴）中にアルギン酸ナトリウム水溶液を滴下する（Fig. 1a）。液滴と凝固浴の接触界面にアルギン酸カルシウムのゲル膜が生成し、その後 Ca²⁺ の拡散に伴ってゲル化が内側へ一方向的に進行することで壁膜が成長し、反応条件によってゲルカプセルまたはゲルビーズが形成される（Fig. 1b）。このような一方向性ゲル化において生成するアルギン酸ゲルは複屈折（birefringence）を示す異方性ゲル（anisotropic gel）であることが指摘されていた^{4,5)}（Fig. 1c）。

皮膚、血管、軟骨など、生体内のゲルは構成分子が配向した異方性ゲルであることが珍しくない。このようなバイオゲルの形成は、細胞・組織が分泌する高分子（またはゲル化駆動因子（gel-inducing factor））と細胞・組織外のゲル化駆動因子（または高分子）との接触界面から、物質拡散を伴ってゲル化が進行すると考えられている。例えば、深部静脈血栓症（エコノミークラス症候群）の原因となりうる血栓（フィブリンゲル）の形成は、血管表面や赤血球表面で活性化された血栓駆動物質⁶⁾と血液中のタンパク質との接触界面からの拡散によるゲル化と想定することができる。従って、上に述べた不溶化反応法のような拡散による異方性ゲル化は、バイオゲルの形成のミニマルモデルとしての側面を持つ。もちろん、バイオゲル形成は、ゲル化と脱ゲル化（フィブリンゲルの例で言うと、それぞれ凝固過程（血栓の形成）と線溶過程（血栓の溶解）に対応する）の兼ね合いの中で起こるので、実際にはもっと複雑である。

本稿では、多糖類（polysaccharide）の一種であるカー

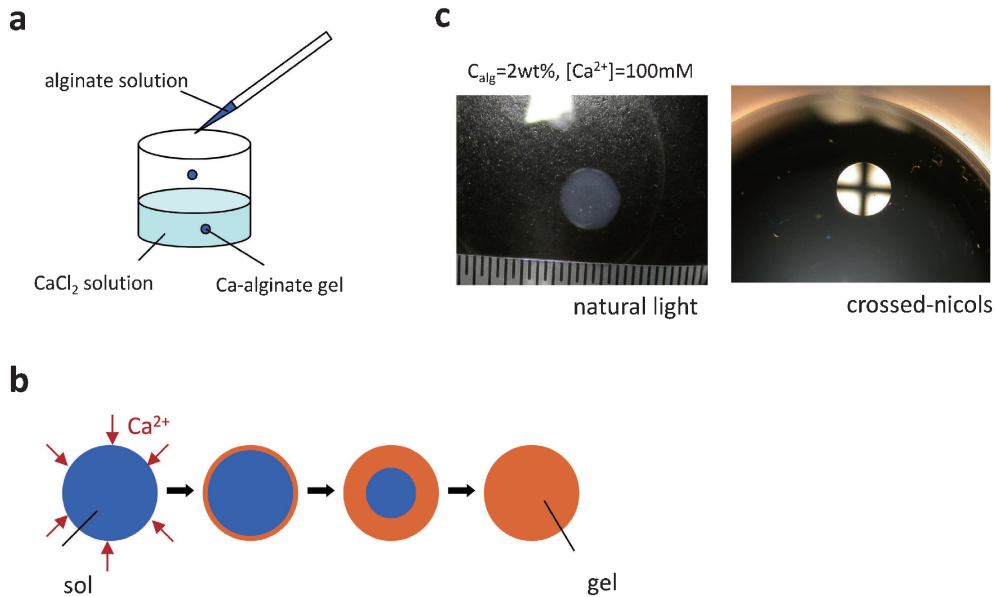


Fig. 1 (Color online) (a) Schematic illustration of the preparation of alginate gel capsules/beads by the insolubilization method. (b) Schematic illustration of the formation of gel capsules/beads in the insolubilization method. (c) Photographs of an alginate gel bead observed under natural light (left) and under crossed-nicols (right).

ドランを例として、ゲル化駆動因子の拡散による生体高分子の異方性ゲル形成と、放射光 X 線を利用した小角散乱による異方性ゲル多層中の分子配向特性の解析研究について述べる。

2. 透析による光学異方性カードランゲルの発見

カードラン (curdlan) (Fig. 2a) は微生物によって生合成される直鎖状1,3-β-グルカンであり、安定化剤・増粘剤・ゲル化剤といった添加剤として、食品からコンクリートまで幅広い分野で用いられており、加えて環境材料や医薬分野への応用についても研究が進められている^{7,8)}。カードランは pH や熱、水和等の処理によりゲル化する特性を示すことが以前から知られている^{7,8)}。熱処理によるカードランのゲル化は、カードランの水懸濁液を加熱することで生じ、80℃以上の熱処理では温度により不可逆な高温形成ゲル (high-set gel) が得られ、55℃から80℃の間の熱処理では温度により可逆な低温形成ゲル (low-set gel) が得られる^{7,8)}。低温形成ゲルは80℃以上の熱処理によって高温形成ゲルに変化する⁹⁾。カードランは水に不溶であるが、アルカリ水溶液には可溶である。この性質を利用して、カードランのアルカリ水溶液を室温下で中和して不溶化してもカードランゲルを調製することができる¹⁰⁻¹²⁾。中和は、カードランのアルカリ水溶液を水や酸の中で透析したり^{10,11)}、二酸化炭素雰囲気中で静置したり¹²⁾することによって行うことができる。

Konno らは、カードランの用途開発を行う中で、NaOH 水溶液で溶解したカードランの溶液を透析チュー

ブに入れ、塩化カルシウム水溶液に浸漬すると、カードランのイオン架橋ゲル (ionotropic gel) が生成することを発見した^{13,14)} (Fig. 2b)。アルギン酸のようなイオン基を持つ多糖類では、多価イオン存在下でゲル化することは珍しくない。一方、カードランは中性多糖類なので、Ca²⁺ でゲル化するのは少し不思議に思われるが、アミロース (1,4-α-グルコース、澱粉の主成分の1つ) で報告されているように¹⁵⁾、高濃度の NaOH 下ではグルコース残基のヒドロキシル基の一部がイオン化することにより、Ca²⁺ で分子鎖が架橋されてゲル化すると考えられている^{13,14)}。

興味深いことに、Ca²⁺ 溶液中で透析して作製した円柱状のカードランゲルを円柱軸に垂直にスライスした断面を観察すると、ゲルの中に白濁したリング状のパターンが形成されていた^{14,16)} (Fig. 2c)。カードランは、Ca²⁺ 以外にも様々な多価イオン中で透析することでイオン架橋ゲルを形成した¹⁰⁾が、このパターンの形成は Ca²⁺ に特徴的なものであった。この透析によるカードランゲルでは、Ca²⁺ の拡散によってゲル化が誘起される。イオンの拡散によってゲル中に環状のパターンが生じる現象としてはリーゼガング現象 (Liesegang phenomenon)^{17,18)}が古くから有名であるが、Ca²⁺ 架橋カードランゲルではリーゼガング環のような周期的な縞ができる条件は見つかっていない。

さらに、Ca²⁺ 架橋カードランゲルの断面のクロスニコル (crossed-nicols) 下観察から、上述の拡散によるアルギン酸ゲルと同様に、光学異方性を持つこともわかった (Fig. 2c)。実際、不溶化反応法では、液滴と凝固浴の接触界面に生じるゲル膜が、液滴内の高分子の拡散を抑制する一方で架橋剤の拡散は妨げない一種の透析膜として機能する。そのため、透析によるゲル化と不溶化反応法は本質的

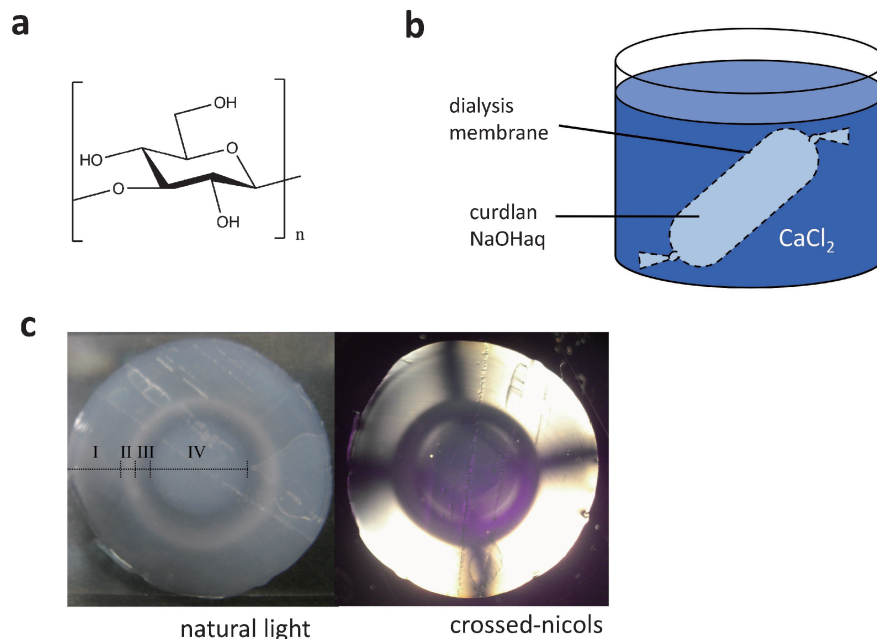


Fig. 2 (Color online) (a) Chemical structure of curdlan. (b) Schematic illustration of the preparation method for the diffusion-set curdlan gels. (c) Left: Photographs of the cross-section of the diffusion-set curdlan gel observed under natural light (left) and under crossed-nicols (right). As shown in the left one, the gel consists of four layers: the outer translucent layer (I), the outer turbid layer (II), the inner translucent layer (III), and the inner turbid layer (IV). Reproduced with permission from Carbohydr Polym 108, 118 (2014).

に同じものである。近年、拡散による異方性カードランゲルに関する Dobashi らの一連の研究^{10,16,19-21})をきっかけとして、種々の多糖類^{5,22-24})や繊維状タンパク質^{25,26})、DNA²⁷)、棒状高分子電解質²⁸)についても、拡散により形成されるゲル (diffusion-set gel) は分子鎖が特異的に配向した異方性ゲルとなることが報告され、拡散によって誘起される異方性ゲル形成の普遍性が明らかとなった²⁹)。

3. カードランゲルにおける多層構造の形成過程と複屈折特性

Fig. 2c の Ca^{2+} 架橋カードランゲルを詳しく見ると、濁度 (turbidity) の異なる 4 つの層から構成された同心円状の多層構造 (multi-layered structure) を持ったゲルであることがわかる。ゲルの表面から中心に向かって、それぞれ、外側透明層 (I)、外側白濁層 (II)、内側透明層 (III)、中心白濁層 (IV) と呼ぶことにする。上述の白濁リング状のパターンは II 層に対応する。これらの層の相対的な厚さはカードランと CaCl_2 の濃度やカードランの分子量に依存したが²⁰)、異なる径の透析膜を用いて得られたゲルについて、層の数は変わらず、各層の厚さはゲルの径に比例した。すなわち、相対的な層の厚さはゲルの径によらず一定であった^{16,19})。例として、カードランの分子量 5.9×10^5 、カードラン濃度 5.0 wt%, NaOH 濃度 0.3 M、 CaCl_2 濃度 8.0 g/dL として調製されたゲルの場合、ゲルの中心からの距離を ρ 、ゲルの半径を R としたときの各層の相対

位置はそれぞれ、 $0.5 < \rho/R \leq 1$ (I 層)、 $\rho/R \sim 0.5$ (II 層)、 $\rho/R \sim 0.4$ (III 層)、 $0 \leq \rho/R < 0.4$ (IV 層) のように表される (**Table 1**)。このようなゲル中の多層構造の制御は、ドラッグデリバリーシステムへの応用において、急激な薬物の初期放出を低減し、望ましいゼロ次放出曲線を得るために利用できる可能性がある^{30,31})。

Dobashi と Yamamoto ら²¹)はカードランゲル形成過程について詳しい研究を行い、ゲル化過程において、ゲル相と溶液相の間に明確な境界が形成されること、ゲル化はカードラン溶液と CaCl_2 溶液の接触する透析膜において開始し、ゲル相と溶液相の境界が中心に向かって移動するように進行することを見出した。さらに、ゲル相内部での Ca^{2+} の化学ポテンシャル勾配により駆動される Ca^{2+} の拡散によってゲル化ダイナミクスを記述する理論を提案した。この理論によると、ゲル相の成長は次式で表現される。

$$\frac{1}{2} (1-\tilde{x})^2 \ln(1-\tilde{x}) - \frac{1}{4} \tilde{x}^2 + \frac{1}{2} \tilde{x} = K\tilde{t} \quad (1)$$

ここで、 $\tilde{x} = x/R$ 、 $\tilde{t} = t/R^2$ はそれぞれゲル相の厚さ x と時間 t を透析膜の半径 (=ゲルの半径) R で規格化したものであり、 K は Ca^{2+} の拡散係数に關係した定数である。ゲル化ダイナミクスの実験結果は、I 層の領域においては (1) 式で表現されたが、II-IV 層の領域では理論式からのずれがあった。このことは、II-IV 層では Ca^{2+} によるゲル化以外の要素がゲル化ダイナミクスに影響を及ぼしていることを示している。 Ca^{2+} 溶液中のカードランアルカリ

Table 1 Characteristics of layers I–IV of multi-layered gel of curdlan with a molecular weight of 5.9×10^5 prepared at 5.0 wt% curdlan, 0.3 M NaOH, and 8.0 g/dL CaCl_2 .

layer	I	II	III	IV
relative position from the center	$0.5 < \rho/R \leq 1$	$\rho/R \sim 0.5$	$\rho/R \sim 0.4$	$0 \leq \rho/R < 0.4$
turbidity	translucent	turbid	translucent	turbid
birefringence	large	—	small	—
direction of molecular orientation	circumferential (circumferential*)	isotropic	not detected (radial*)	isotropic
average diameter of fibrils \bar{d}	9.4 nm			
average size of fibril aggregates ξ_{DB}				
contribution of scattering from aggregates A_{DB}/A_C				
alignment factor A_f				
suggested gelation mechanism	CL**	CL**	NT(+CL)**	NT**
gelation (GL) and phase separation (PS)	no PS	simultaneous GL and PS	no PS	PS after GL

* Determined from birefringence
 ** CL = crosslink by Ca^{2+} , NT = neutralization

水溶液の透析においては、二種類のゲル化機構が共存していると考えられる。第一のゲル化機構は、 Ca^{2+} の流入とそれに続く Ca^{2+} による架橋であり、(1)式はこれに対応する。第二のゲル化機構は、 OH^- の流出による pH の低下（アルカリの中和）に伴うカードランの不溶化である。透析膜の近傍では Ca^{2+} の流入と OH^- の流出が同時に開始するが、透析膜から離れた点では OH^- 濃度の減少した後 Ca^{2+} が到達するため、I 層を含むゲルの外側（透析膜側）では Ca^{2+} 架橋によるゲル化が、ゲルの中心に近い側では中和によるゲル化が生じていると考えられる。中和によるゲル化が支配的になるのが II–IV 層のどの層であるかを明らかにするためには、ゲルの網目構造を調べる必要がある。

(1)式の表すもう一つの重要な結論は、ゲル化のダイナミクスにおいて、ゲルの半径 R はスケールされた量である \bar{x} と \bar{t} のみに含まれることである。実験的には、異なる半径の透析膜におけるゲル化ダイナミクスは全ての領域において、 \bar{x} と \bar{t} の関係は R に依存しなかった²¹⁾。このことは、ゲル化機構の詳細によらず、ゲル化のダイナミクスは R に対して同様にスケールされていることを意味しており、ゲル中の層の相対的厚さがゲルの径に依存しないことも考慮すると、カードランゲルにおける多層構造形成がゲル化のダイナミクスによって支配されていることを示唆する。

カードランゲル断面のクロスニコル下観察においては、

透明な I 層と III 層は複屈折を示したが、白濁した II 層と IV 層は複屈折を示さなかった (Fig. 2c)。複屈折を示す層においては、偏光板の軸方向に十字の暗い縞パターンが観察されたが、これは動径方向または円周方向への分子配向を意味している。初期の研究¹⁶⁾では、円柱形というゲル形状の対称性から、分子配向は動径方向（ゲル化界面に垂直）であると予想されたが、一対の円偏光板を用いた観察により、I 層では分子配向は円周方向（ゲル化界面に平行）で、III 層では分子配向は動径方向であることが最近の研究で示された²⁹⁾。イオン拡散により形成される他の様々な異方性ゲルにおいても、鋭敏色板 (sensitive-tint plate) または円偏光板を用いた観察が行われ、どの場合もゲル化界面に平行方向の分子配向であることが示されている^{26,28,29)}。従って、イオン拡散によるゲル形成においては、少なくともゲルの外寄りの領域（初期接触界面近傍）では、ゲル化界面に平行方向の分子配向が誘起されているといえる。分子配向の機構についてはいくつかの可能性が考えられる。溶液相中の高分子鎖がゲル化界面に接触すると、ゲル相中の高分子鎖と架橋を形成することによりゲルに取り込まれる³²⁾。これは、溶液中の高分子電解質が反対符号の荷電表面に吸着する状況に類似している。この場合、屈曲性鎖では表面に垂直に接触した分子が押しつぶされるように吸着され、半屈曲性鎖では表面に沿って平らに吸着する³³⁾が、どちらの場合もゲル化界面に平行方向の分子配向が誘起されるであろう。これとは別に、ゲル化と

同時にゲルが溶媒を吐き出して収縮（離漿, syneresis）して変形し、それに伴った分子配向が誘起されるという描像も提案されている²⁶⁾。これらの機構では、ゲル化と分子配向がほぼ同時に生じることになり、それはゲルの外寄りの領域（カードランゲルのI層）において実験的に確認されている²⁹⁾。これに対して、カードランゲルのIII層での分子配向は、ゲル化当初は円周方向であるが、より内側にIV層が形成された後に、IV層がわずかに収縮することに伴って、III層における動径方向の分子配向が誘起されることが報告された²⁹⁾。

4. 放射光 X 線小角散乱によるカードランゲル多層構造の分子配向特性解析

拡散により形成された Ca^{2+} 架橋カードランゲルの特徴的な多層構造と異方性について、ゲルの網目構造の観点で考察するため、放射光（SR）を利用した X 線小角散乱（small-angle X-ray scattering, SAXS）による分子配向特性の解析を行った³⁴⁾。SAXS では、散乱角 2θ が数度以下の散乱 X 線を測定することで（Fig. 3a）、一般的には 1–100 nm のサイズの構造を調べることができる³⁵⁾。これは

高分子ゲルの場合、小さい方から順に、高分子鎖の局所的な構造、架橋領域の構造、および網目構造のスケールに相当する。SAXS の利点の一つは試料の処理の必要がないことであり、弱い分子間力で構築されているゲルの構造を、乾燥や染色といった操作で影響を与えることなく調べることができる。多くの場合、ゲルを構成している分子は明確な規則構造をとらないが、SAXS では比較的規則性の低い物質に対して大まかではあるが階層的構造情報を得ることができる。また、高感度二次元検出器を用いることで低コントラスト構造の異方性を測定することも可能である。ゲルや溶液では一般に X 線の散乱強度が微弱であるが、強力な放射光を X 線源として高感度二次元検出器を併用することにより精度の良いデータを短時間に得ることができる。本研究の測定は、Photon Factory の小角散乱ビームライン（BL15A, BL10C, BL6A）の収束回折計とイメージ増倍+CCD やイメージングプレート（IP）を使って行ったもので、実験には波長 1.5 \AA の単色 X 線を用いた。試料として、分子量 5.9×10^5 のカードランを用い、カードラン濃度 5.0 wt%, NaOH 濃度 0.3 M で調製されたカードラン溶液を、8.0 g/dL の CaCl_2 で透析することで調製されたゲルを用いた。

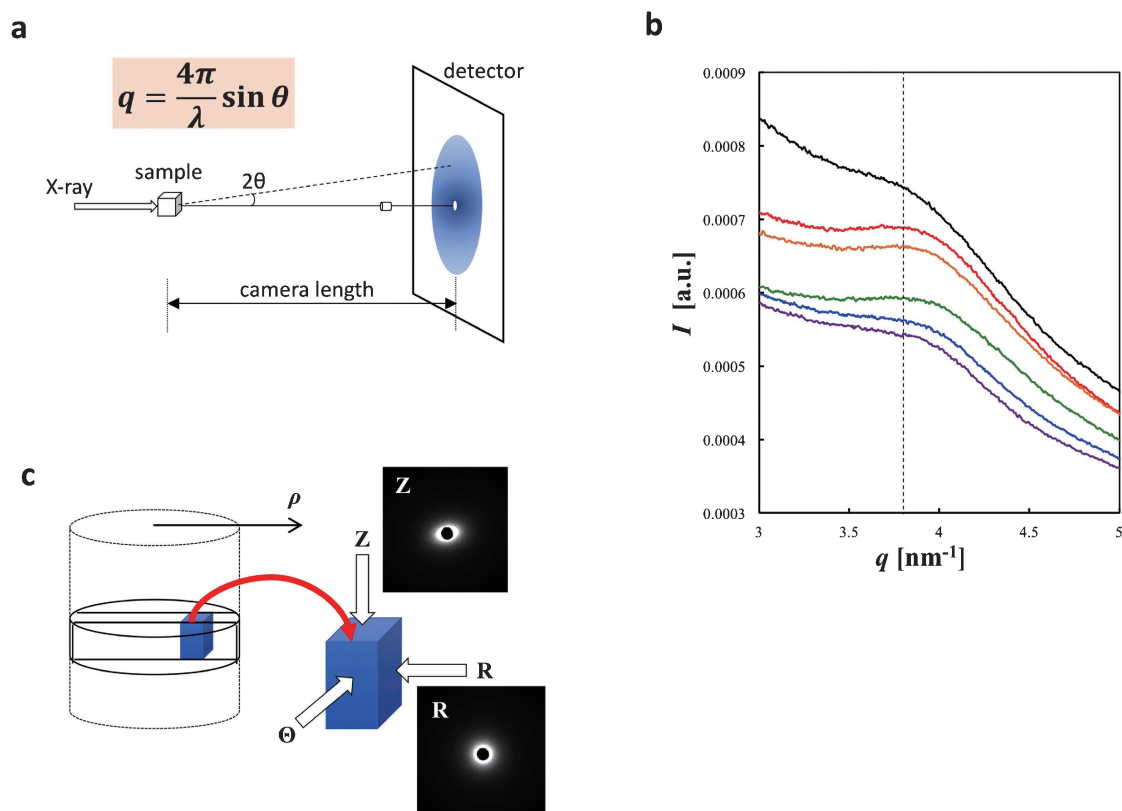


Fig. 3 (Color online) (a) Schematic illustration of the experimental setup for the SAXS measurements. (b) Circularly averaged SAXS intensity profiles obtained at different positions ρ from the center of gel. From top to bottom, $\rho/R = 0.81, 0.59, 0.52, 0.44, 0.22$ and 0 , where R is the gel radius. (c) Directions of the beam incident on the sample in the SAXS measurements and 2D-SAXS patterns from the curdlan gel ($R = 8 \text{ mm}$) at $\rho = 6 \text{ mm}$ for the incident X-ray directions of Z and R. Reproduced with permission from Carbohydr Polym 155, 136 (2017).

カードラン分子は NaOH 濃度が約 0.2 M の領域においてコンフォメーション変化を示し、低 pH 側では秩序構造（らせん状構造）を、高 pH 側ではランダムコイルをとっていることが、希薄溶液の旋光度、粘度、NMR 等の測定から報告されている^{36,37}。Ca²⁺ 架橋カードランゲルでは、最初は高濃度の NaOH でカードラン溶液を調製するが、透析の過程で OH⁻ の流出により透析膜内の pH は次第に減少する²¹。そこで、短いカメラ長（1 m）で SAXS 測定を行い、カードランゲル中のカードラン分子のコンフォメーションについて調べた^{29,34}。Fig. 3b はゲルの断面に中心からの距離 ρ の異なる位置に X 線を入射させたときの等方的パターンに対して、円周平均された SAXS プロファイルである。ゲルの中心からの観測位置によらず、散乱ベクトル長 $q = 3.8 \text{ nm}^{-1}$ にブロードなピークが観察された。これは、Bragg 面間隔 $d (= 2\pi/q) = 1.7 \text{ nm}$ に対応する。

熱処理や中和によって調製されたカードランゲル中のカードラン分子のコンフォメーションは X 線繊維回折により研究され、熱処理や水和の条件により、三種類の異なる構造が特定された³⁸。高湿度下 100°C 以上で熱処理された繊維中において得られた水和型構造は、1.8 nm の繊維周期の三本鎖 6/1 らせんのパッキングからなる⁴⁰⁻⁴²。同様の熱処理後に乾燥された繊維中において得られた無水型構造は、三本鎖 6/1 らせん構造からなるが、繊維周期が 0.58 nm であった³⁹⁻⁴¹。この繊維周期は、水和型の周期の約 1/3 で、乾燥により三本鎖 6/1 らせんが 3 回回転軸を持つようにパッキングしたことによると思われる。低い温度（70°C）で調製、または、室温での中和によるゲル繊維中の構造については、いくつかのモデル（一本鎖 7/1 らせんと三本鎖 7/1 らせんの混合⁴¹、三本鎖 7/1 らせん⁴⁰、一本鎖 6/1 らせん³⁸）が提案されているが、これらのモデルにおいて繊維周期は長く、約 2.3 nm であった。一方、アルカリ溶液から室温で中和して得られたゲルの粉末試料の X 線回折では、 $d \sim 1.7 \text{ nm}$ の反射が観察された¹²。この反射は、低温で調製されたゲルの繊維回折³⁸において観察された、 $d = 1.84 \text{ nm}$ および $d = 1.54 \text{ nm}$ の反射に対応すると考えられる。本研究で観察された $d \sim 1.7 \text{ nm}$ は、中和または低温の熱処理によるゲルからの $d \sim 1.7 \text{ nm}$ や水和型構造の繊維周期の値に近い。従って、拡散による Ca²⁺ 架橋ゲル中のカードラン分子のコンフォメーションは、ゲル中の位置によらず、らせん状の秩序構造をとっていることが結論できる。透析の開始と同時に溶液の pH は速やかに低下し、ゲル化の開始前にカードランのコイル-ヘリックス転移のしきい値を超えてしまうため、ゲル中では位置によらず秩序構造をとっていたと考えられる。

次に、ゲルの網目構造に関わるカードラン分子の分子集合状態を明らかにするため、長いカメラ長（ $\sim 2.4 \text{ m}$ ）で、より小角領域における SAXS 測定を行った。Fig. 3c に示

すようにゲル試料に対する X 線の入射方向によって散乱パターンのプロファイルが異なっていた。R 方向から入射させた場合には、中心からの距離 ρ によらず対称的（symmetric）な散乱パターンが得られたが、Z、 θ 方向から入射させた場合には、ゲルの中心では対称的な散乱パターンが、ゲルの外寄りの位置ではゲルの異方的構造を反映してゲルの動径方向に伸びた非対称（asymmetric）な散乱パターンが得られた。この結果は、分子集合体のスケールでも配向が生じており、その配向方向は動径方向に垂直（ゲル化界面に平行）で、配向の対称軸が動径方向に平行（ゲル化界面に垂直）であることを表している⁴³。このことは、上述の複屈折の結果と合わせると、分子集合体の配向とカードラン分子の配向が一致していることを意味している。

分子集合体の構造について詳しく考察するため、R 方向から X 線を入射させてとった対称的な散乱パターンを円周平均し、得られた散乱曲線を解析した（Fig. 4a）。アルカリ溶液からの中和によるカードランゲルでは、ゲル中にカードラン分子が集合したフィブリル（fibril）が形成されていることが報告されており^{12,41}、Ca²⁺ 架橋カードランゲルでも類似のフィブリル構造が形成されると想定した。一定サイズのフィブリル状分子集合体による散乱は、円柱状散乱体の形状因子⁴⁴

$$P_C(q) = 4 \int_0^{\pi/2} \frac{\sin^2[q(L/2)\cos\alpha]}{[q(L/2)\cos\alpha]^2} \times \frac{J_1^2(qr\sin\alpha)}{(qr\sin\alpha)^2} \sin\alpha d\alpha \quad (2)$$

によって表現されると考えられる。ここで、 $J_1(qr\sin\alpha)$ は $qr\sin\alpha$ を変数とする第 1 種の 1 次ベッセル関数、 L は円柱の長さ、 r は円柱の半径で、 α は q と円柱軸との角度である。(2)式は、 $1/L < q < 1/r$ のとき次のように近似される。

$$P_C(q) = \frac{\pi}{qL} \exp\left[-\frac{q^2 r_C^2}{2}\right] \quad (3)$$

(3)式において r_C は円柱の断面の慣性半径で、 $r = 2^{1/2} r_C$ である。さらに、フィブリルがランダムな凝集体（aggregate）を形成するとき、散乱強度は Debye-Bueche 型関数

$$I_{DB}(q) = \frac{I_0}{(1 + q^2 \xi_{DB}^2)^2} \quad (4)$$

によって表現されると考えられる⁴⁵。ここで、 I_0 と ξ_{DB} は q によらない定数で、 ξ_{DB} は凝集構造に特徴的なサイズに関係する。(4)式はもともと、ランダムな二相分離構造において、電子密度揺らぎの自己相関関数が相関長 ξ_{DB} で指数関数的に減衰すると仮定した場合の散乱強度として導

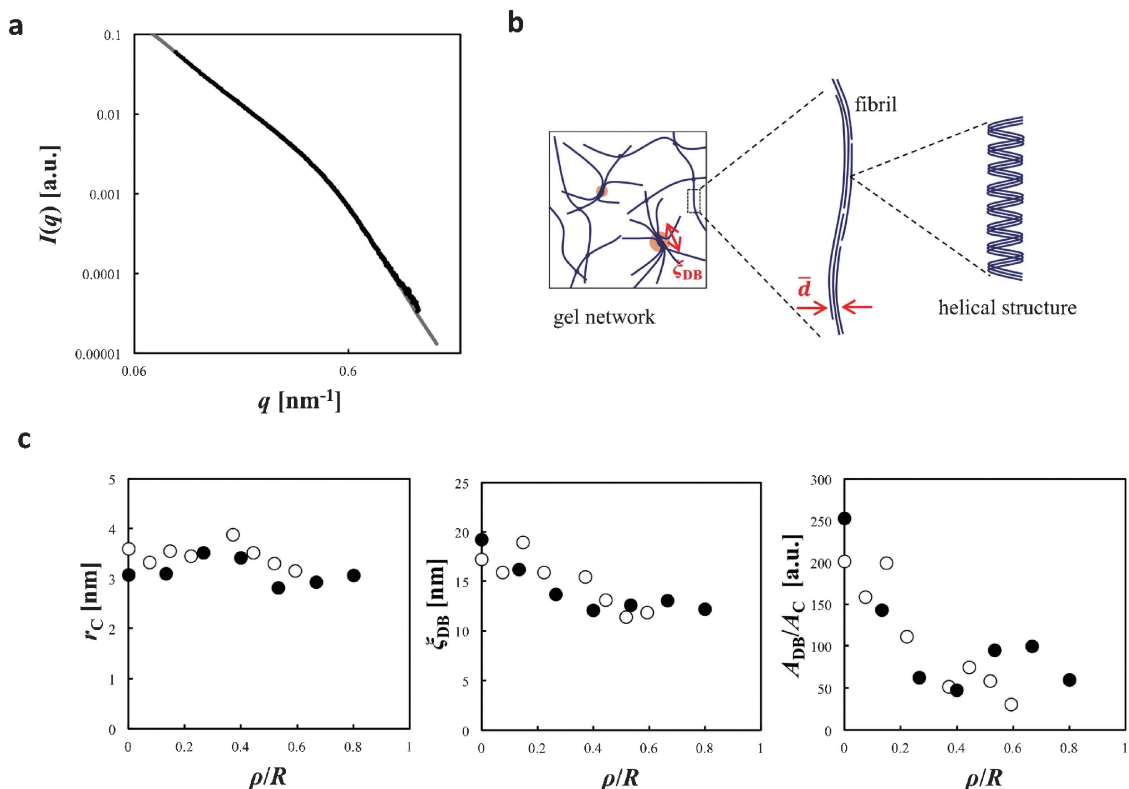


Fig. 4 (Color online) (a) A typical SAXS intensity profile of the curdlan gel. The gray curve is given by Eq. (5) to fit the data. (b) The curdlan gel consists of fibrils (the average diameter \bar{d}) and aggregates of fibrils (the average size ξ_{DB}), represented by blue lines and red circles, respectively. The fibrils are formed by the association of curdlan chains which assume a helical ordered conformation. (c) The plots of r_c , ξ_{DB} , and A_{DB}/A_C in Eq. (5) versus ρ/R for the gels with $R=8$ mm (\circ) and 14 mm (\bullet), respectively. Reproduced with permission from Carbohydr Polym 155, 136 (2017).

かれたものであるが、ゲルの小角散乱の研究においては、ゲルの構造の不均一性やゲル中に形成される凝集構造の特性を定量的に表現するために、本来の物理的意味を越えて経験式としてよく用いられる。その際の描像としては、(A)架橋の不均一性により生じる高分子濃度の静的な不均一性による散乱^{2,46)}、(B)微結晶など架橋領域を形成する

凝集構造の空間分布の不均一性による散乱^{47,48)}、(C)多分散性を示し、散乱曲線が広角側でPorod則 ($I(q) \propto q^{-4}$) に従うような凝集体の形状因子の近似表現^{49,50)}、などが挙げられる。

実験で得られた散乱曲線は、半径の分布を考慮した(3)式と(4)式の和

$$I(q) = A_C \int_0^\infty \frac{\exp[-q^2 s^2 / 2]}{q} \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left[-\frac{(s-r_c)^2}{2\sigma^2}\right] \right) ds + \frac{A_{DB}}{(1+q^2 \xi_{DB}^2)^2} \quad (5)$$

で表現された³⁴⁾ (Fig. 4a)。(5)式において、 r_c と σ^2 はフィブリル断面の慣性半径の平均と分散、 A_C と A_{DB} は各項の寄与の大きさを表す定数である。試料を作製する際にゲルを一定の厚みで正確に切り出すのは非常に困難であり、それによる散乱強度の絶対値への影響を考慮して、以下では A_{DB}/A_C 、すなわちフィブリルによる散乱の寄与に対するフィブリル凝集体による散乱の寄与の比をゲルの構造特性の指標として用いる。半径 $R=8$ mmと 14 mmのカードランゲルについて、中心からの距離 ρ の位置におけるSAXS曲線を(5)式でフィッティングし、 r_c 、 ξ_{DB} 、 $A_{DB}/$

A_C を求めて ρ/R に対してプロットしたところ、異なる R のデータが重なることがわかった (Fig. 4c)。ゲルのマイクロな構造形成が、多層構造の位置と同様にゲルのサイズでスケールされることから、各層のマイクロな構造はゲルのサイズに依存しないと言える。 r_c はゲルの位置によらずほぼ一定で、約 3.3 nmであった。円柱の平均直径 \bar{d} は $\bar{d} = 2^{3/2} r_c$ より、約 9.4 nmに対応した。一方、 ξ_{DB} と A_{DB}/A_C はゲル位置に依存しており、I層とII層では $\xi_{DB} \sim 11$ nm、 $A_{DB}/A_C \sim 50$ でほぼ一定であったが、III層とIV層ではゲルの中心方向に向かって ξ_{DB} と A_{DB}/A_C は次第に増加し、

ゲルの中心では $\xi_{DB} \sim 20$ nm, $A_{DB}/A_C \sim 200$ となった。得られた円柱の直径 (~ 9.4 nm) は、中和によるカードランゲルの SAXS で得られたフィブリルの直径 (~ 8 nm)⁴¹⁾ や TEM で観察されたフィブリルの幅 (10–20 nm)¹²⁾ の下限に近く、0.1 M NaOH 中の希薄水溶液の SAXS で得られたカードラン分子の直径 1.3 nm⁵¹⁾ や三重らせん構造をとる分岐型 β -1,3 グルカンであるシゾフィラン (schizophyllan) の直径 2.6 nm⁵²⁾ よりもずっと大きかった。このことから、円柱の直径はカードラン分子の会合によるフィブリルの平均直径に対応している。また、 ξ_{DB} の値がフィブリルの直径と同じオーダーであることを考慮すると、(4) 式の描像としては上記 (C) の場合にあたり、 ξ_{DB} は大きさに分布をもったフィブリルの凝集体 (Fig. 4b) の平均的なサイズを表していると考えられる。III 層と IV 層で ξ_{DB} , A_{DB}/A_C が増加することは、この領域でフィブリル同士のランダムな凝集体が増加することを示している。中和に伴ってフィブリルの凝集体が形成され、これを架橋領域としたゲル化が進行したと考えられる。以上の結果は Table 1 にまとめられた。上述したように、ゲルの外側 (透析膜側) では Ca^{2+} 架橋によるゲル化が、内側では中和によるゲル化が生じている。SAXS で測定された分子集合体の構造は I 層と II 層ではほとんど違いがなかったことから、I 層と II 層は主にカードラン分子の会合によるフィブリルの Ca^{2+} 架橋によるゲルであり、III 層と IV 層は中和に伴うフィブリル同士の凝集によるゲルであるとされる。ただし III 層はちょうど境界領域であり、両方のゲル化機構が共存している可能性がある。I 層と II 層は濁度が異なっていることから、ゲルの構造が異なることが期待されるが、SAXS で観察される分子集合体構造の観点ではほとんど違いがなかった。I 層では、pH の減少によりフィブリルの凝集が進む前に Ca^{2+} による架橋が起こるため、透明なゲルが生じたと考えられる。これに対し、II 層では、pH がやや減少した状態で Ca^{2+} 濃度の増加が起こり、このような状況ではカードラン溶液の相分離による沈殿が生じる¹³⁾。従って、II 層では相分離が起こった直後に Ca^{2+} による架橋が起こり、白濁したゲルとなったと考えられる。III 層と IV 層では、 Ca^{2+} 濃度の増加が起こる前に pH が大きく減少して中和によるゲルができたと考えられる。ゲル化前にカードラン溶液の相分離を伴わなかったため、当初は透明なゲルが形成され²⁹⁾、III 層ではゲルは透明のままであったが、IV 層では時間経過とともに徐々に相分離が起き白濁したものと思われる²⁹⁾。ゲル化時点でのゲルの網目構造が III 層と IV 層とで異なるためであると考えられるが、その本質的なことは今のところ不明である。II 層や IV 層において相分離によって形成される構造体の特徴的なサイズはさらに大きく、その特性解析は小角光散乱 (SALS) で有効に調べられた³⁵⁾。

SAXS による分子集合体構造の解析から、Z, Θ 方向から X 線を入射させたときの SAXS パターンの非対称性は、

カードラン分子の会合により形成されたフィブリルの異方的配向によるものである。複屈折によっても透明なゲル中の高分子鎖の平均的な配向を調べることは可能であるが、このように SAXS 法を用いることにより、濁度に無関係にゲル中にどのような空間スケールの構造体として高分子鎖の配向が生じているのかを明らかにすることができる。また異方性を定量化する際に、複屈折の大きさは、配向度だけでなく高分子濃度や高分子と溶媒の屈折率差などに依存するが、SAXS 法では濃度や屈折率コントラストとは独立に配向度を調べることが可能である。二次元 SAXS パターンから分子配向の異方性を定量化する方法は幾つかある。結晶性高分子繊維の回折のように、方位角 φ に対して強度分布を持ったリング状の Bragg ピークが観察される場合には、Bragg ピークの散乱ベクトル長 q_m における散乱強度 $I(q_m, \varphi)$ から求められる配向秩序パラメータ

$$S = \frac{3\langle \cos^2 \varphi \rangle - 1}{2} \quad (6)$$

が用いられる^{53,54)}。ここで、

$$\langle \cos^2 \varphi \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} I(q_m, \varphi) \cos^2 \varphi |\sin \varphi| d\varphi}{\int_0^{2\pi} I(q_m, \varphi) |\sin \varphi| d\varphi} \quad (7)$$

である。しかし、本研究の場合では非対称だが散漫な散乱パターンが観察された。このような場合、配向した棒状散乱体に対する配向度因子 (alignment factor, A_f)^{55,56)} を求めることによりゲル構造の異方性を定量化することができる。 A_f は次のように定義されている。

$$A_f(q) = \frac{\int_0^{\pi/2} I(q, \varphi) \cos(2\varphi) d\varphi}{\int_0^{\pi/2} I(q, \varphi) d\varphi} \quad (8)$$

ここで、 $I(q, \varphi)$ は二次元散乱パターンにおける散乱ベクトル長 q 、方位角 φ (主配向方向を $\varphi = 0$ とする) における散乱強度である。 $A_f = 0$ は等方的構造を、 $A_f = -1$ は円柱形ゲルの円周方向への完全配向構造を表す。一般に A_f は q に依存するが、 $qL > 1$ では一定値を取ることが知られている⁵⁵⁾。ゲルに Z 方向から X 線を入射させたときの散乱パターンについて $1/L < q < 1/r$ の条件を満たす $q = 0.1$ nm⁻¹ で方位角プロットを行い、(8) 式によりフィブリルの配向度を表す A_f を計算した。その A_f をゲル中の位置 ρ/R に対してプロットしたものを Fig. 5 に示した。ゲルのサイズによらず、 ρ/R に対する A_f は 1 つの曲線で表現され、フィブリル同士の配向もゲルサイズでスケールされている。I 層では A_f はほぼ一定の負値 ($A_f \sim -0.2$) をとることから、I 層ではフィブリルは円周方向に配向していることが明らかとなった。I 層と II 層の境界付近の領域で

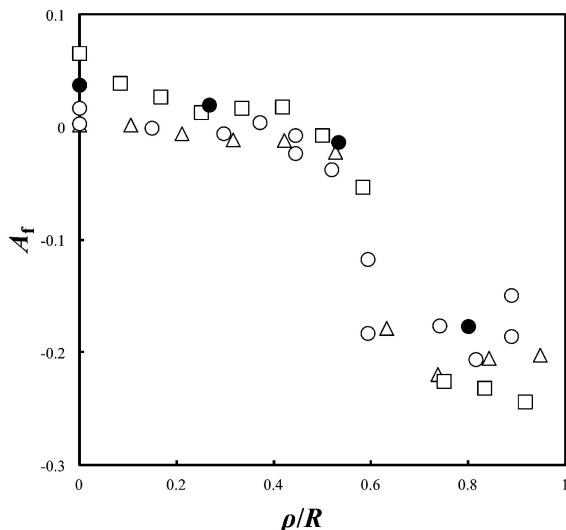


Fig. 5 The plot of A_f (alignment factor) versus ρ/R for the curdlan gel with $R = 14$ mm (\circ), 12.5 mm (\triangle), 10 mm (\square), and 8 mm (\bullet), respectively. Reproduced with permission from Carbohydr Polym 155, 136 (2017).

A_f は急激に変化し、II-IV層では A_f はほぼ0であった。すなわち、フィブリル配向の異方性はI層で顕著であり、I層とII層の境界付近で異方性は顕著に減少し、II層よりも内側ではゲル中のフィブリル配向は等方的だった。以前の複屈折による研究ではIII層で動径方向の分子配向が示唆されたが、SAXSではこれに対応する挙動（正の A_f ）をはっきりと確認することができなかった。III層における光学異方性はI層に比べてずっと小さく、SAXSの測定精度では配向を検出することができなかった。透析による異方性アルギン酸ゲルにおいてもSAXSデータから A_f が求められており⁵⁾、ゲルの中心部でのフィブリル配向は等方で、外寄りでは配向性が高いという点では同じであったが、カードランゲルの場合と異なり、ゲルの位置に対するフィブリル配向度の変化は連続的であった。アルギン酸ゲルは、カードランゲルと同様にフィブリル配向の異方性を有しながら多層構造を形成しないことから、カードランゲルでの A_f の不連続的な変化は、多層構造形成を反映していると考えられる。拡散による異方性ゲルの形成において、ゲル化の条件や機構に依存して異方性を誘起する駆動力に大小がある場合が報告されている^{11,27)}。上述の通り、I-IVの各層ではゲル化の条件や機構が異なっており、I層におけるフィブリルの Ca^{2+} 架橋においてフィブリル配向の駆動力が特に大きかったため、I層とII層の境界領域で配向度の不連続的な変化が起こったと考えられる。

5. おわりに

放射光 SAXS を利用した構造解析により、拡散により形成されるカードラン異方性多層ゲル中の分子コンフォ

メーションや分子集合体構造、分子配向特性の空間分布を明らかにすることができた。このような特性の評価は、ゲルの形成機構について検討する際に必要であるだけではなく、ゲルの特徴的な構造を材料として利用する際にも重要であると考えられる。このように、放射光 SAXS によるアプローチは、拡散によって形成される多糖類異方性ゲルの分子配向特性解析において極めて有効であることが示された。同様のプロセスによって形成されるバイオゲルの異方性構造の特性解析やゲル形成機構の解明においても、放射光 SAXS は有効な手段であると考えられる。

謝辞

本研究においてさまざまなご教示を頂いた紺野昭氏（金蘭女子大学名誉教授）に深く感謝いたします。また執筆に当たってご意見を頂いた八木直人氏（SPRING-8）にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) T. Tanaka: Sci. Am. **244**, 110 (1981).
- 2) M. Shibayama: Macromol. Chem. Phys. **199**, 1 (1998).
- 3) A. S. Hoffman: Adv. Drug Deliv. Rev. **64**, 18 (2012).
- 4) H. Thiele: Discuss. Farad. Soc. **18**, 294 (1954).
- 5) Y. Maki, K. Ito, N. Hosoya, C. Yoneyama, K. Furusawa, T. Yamamoto, T. Dobashi, Y. Sugimoto and K. Wakabayashi: Biomacromolecules **12**, 2145 (2011).
- 6) M. Kaibara and H. Iwata: In *Ischemic Blood Flow in the Brain*, edited by Y. Fukuuuchi, M. Tomita and A. Koto (Springer, Tokyo, 2001), p. 401.
- 7) B. C. Lehtovaara and F. X. Gu: J. Agric. Food Chem. **59**, 6813 (2011).
- 8) M. McIntosh, B. A. Stone and V. A. Stanisich: Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**, 163 (2005).
- 9) H. Zhang, K. Nishinari, M. A. K. Williams, T. J. Foster and I. T. Norton: Int. J. Biol. Macromol. **30**, 7 (2002).
- 10) M. Sato, M. Nobe, T. Dobashi, T. Yamamoto and A. Konno: Colloid Polym. Sci. **284**, 293 (2005).
- 11) Y. Maki, H. Okamura and T. Dobashi: J. Soc. Rheol. Japan **45**, 65 (2017).
- 12) Y. Kanzawa, T. Harada, A. Koreeda, A. Harada and K. Okuyama: Carbohydr. Polym. **10**, 299 (1989).
- 13) A. Konno and H. Kimura: 金蘭短期大学研究誌 **23**, 173 (1992).
- 14) 紺野昭, 坪内真有子: 金蘭短期大学研究誌 **29**, 89 (1998).
- 15) V. S. Rao and J. F. Foster: Biopolymers **1**, 527 (1963).
- 16) T. Dobashi, M. Nobe, H. Yoshihara, T. Yamamoto and A. Konno: Langmuir **20**, 6530 (2004).
- 17) R. E. Liesegang: Naturwiss. Wochenschr. **11**, 353 (1896).
- 18) J. George and G. Varghese: Chem. Phys. Lett. **362**, 8 (2002).
- 19) T. Dobashi, H. Yoshihara, M. Nobe, M. Koike, T. Yamamoto and A. Konno: Langmuir **21**, 2 (2005).
- 20) M. Nobe, N. Kuroda, T. Dobashi, T. Yamamoto, A. Konno and M. Nakata: Biomacromolecules **6**, 3373 (2005).
- 21) M. Nobe, T. Dobashi and T. Yamamoto: Langmuir **21**, 8155 (2005).
- 22) T. Narita and M. Tokita: Langmuir **22**, 349 (2006).
- 23) S. C. Lin, Y. Minamisawa, K. Furusawa, Y. Maki, H. Take-no, T. Yamamoto and T. Dobashi: Colloid Polym. Sci. **299**,

- 695 (2010).
- 24) T. Dobashi, N. Tomita, Y. Maki, C. P. Chang and T. Yamamoto: *Carbohydr. Polym.* **84**, 709 (2011).
- 25) K. Furusawa, S. Sato, J. Masumoto, Y. Hanazaki, Y. Maki, T. Dobashi, T. Yamamoto, A. Fukui and N. Sasaki: *Biomacromolecules* **13**, 29 (2012).
- 26) M. T. I. Mredha, X. Zhang, T. Nonoyama, T. Nakajima, T. Kurokawa, Y. Takagi and J. P. Gong: *J. Mater. Chem. B* **3**, 7658 (2015).
- 27) K. Furusawa, Y. Narazaki, N. Tomita, T. Dobashi, N. Sasaki and T. Yamamoto: *J. Phys. Chem. B* **114**, 13923 (2010).
- 28) Z. Wu, T. Kurokawa, D. Sawada, J. Hu, H. Furukawa and J. P. Gong: *Macromolecules* **44**, 3535 (2011).
- 29) Y. Maki, K. Furusawa, S. Yasuraoka, H. Okamura, N. Hosoya, M. Sunaga, T. Dobashi, Y. Sugimoto and K. Wakabayashi: *Carbohydr. Polym.* **108**, 118 (2014).
- 30) C.-C. Lin and A. T. Metters: *Adv. Drug Deriv. Rev.* **58**, 1379 (2006).
- 31) R. Yu, H. Chen, T. Chen and X. Zhou: *Simul. Model. Pract. Th.* **16**, 15 (2008).
- 32) S. Woelki and H.-H. Kohler: *Chem. Phys.* **293**, 323 (2003).
- 33) M. Schönhoff: *J. Phys. Condens. Matter* **15**, R1781 (2003).
- 34) Y. Maki, K. Furusawa, T. Dobashi, Y. Sugimoto and K. Wakabayashi: *Carbohydr. Polym.* **155**, 136 (2017).
- 35) 土井健治, 若林克三, 植木龍夫, 三井利夫: *実験物理学講座 第20巻「X線回折」*(高良和武編, 共立出版, 1988), 12章 X線小角散乱.
- 36) K. Ogawa, T. Watanabe, J. Tsurugi and S. Ono: *Carbohydr. Res.* **23**, 399 (1972).
- 37) H. Saito, T. Ohki and T. Sasaki: *Biochemistry* **16**, 908 (1977).
- 38) K. Okuyama, A. Otsubo, Y. Fukuzawa, M. Ozawa, T. Harada and N. Kasai: *J. Carbohydr. Chem.* **10**, 645 (1991).
- 39) Y. Deslandes, R. H. Marchessault and A. Sarko: *Macromolecules* **13**, 1466 (1980).
- 40) W. S. Fulton and E. D. T. Atkins: In *Fiber Diffraction Method*, edited by A. D. French and K. H. Gardner (American Chemical Society, Washington, D. C, 1980), p. 385.
- 41) H. Takeda, N. Yasuoka, N. Kasai and T. Harada: *Polym. J.* **10**, 365 (1978).
- 42) C. T. Chuah, A. Sarko, Y. Deslandes and R. H. Marchessault: *Macromolecules* **16**, 1375 (1983).
- 43) A. Guinier: *X-ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals, and Amorphous Bodies* (W. H. Freeman and Company, San Francisco and London, 1963), Chapt. 10.
- 44) O. Glatter: In *Small Angle X-Ray Scattering*, edited by O. Glatter and O. Kratky. (Academic Press, New York, 1982). Part II. Chapt. 4.
- 45) K. I. Draget, B. Stokke, Y. Yaguchi, H. Urakawa and K. Kajiwara: *Biomacromolecules* **4**, 1661 (2003).
- 46) F. Horkay, G. B. McKenna, P. Deschamps and E. Geissler: *Macromolecules* **33**, 5215 (2000).
- 47) L. Rubatat, G. Gebel and O. Diat: *Macromolecules* **37**, 7772 (2004).
- 48) P. Terech, A. Coutin and A. M. Giroud-Godquin: *J. Phys. Chem. B* **101**, 6810 (1997).
- 49) I. Krakovský, H. Urakawa, K. Kajiwara and S. Kohjiya: *J. Non-Cryst. Solids* **231**, 31 (1998).
- 50) G. Beaucage, H. K. Kammler and S. E. Pratsinis: *J. Appl. Cryst.* **37**, 523 (2004).
- 51) T. Tada, T. Matsumoto and T. Masuda: *Chem. Phys.* **228**, 157 (1998).
- 52) T. Yanaki, T. Norisuye and H. Fujita: *Macromolecules* **13**, 1462 (1980).
- 53) L. E. Alexander: *X-ray Diffraction Methods in Polymer Science* (Wiley-Interscience, New York, 1970), Chapt. 4.
- 54) D. Kawakami, C. Burger, S. Ran, C. Avila-Orta, I. Sics, B. Chu, S.-M. Chiao, B. S. Hsiao and T. Kikutani: *Macromolecules* **41**, 2859 (2008).
- 55) L. M. Walker and N. J. Wagner: *Macromolecules* **29**, 2298 (1996).
- 56) K. Hongladarom, V. M. Ugaz, D. K. Cinader, W. R. Burghardt, J. P. Quintana, B. S. Hsiao, M. D. Dadmun, W. A. Hamilton and P. D. Butler: *Macromolecules* **29**, 5346 (1996).

著者紹介



榎 靖幸

群馬大学大学院理工学府 助教

E-mail: maki@gunma-u.ac.jp

専門：高分子溶液・ゲル物性，バイオレオロジー

【略歴】

2005年3月北海道大学大学院理学研究科博士課程修了，博士（理学）。2005年5月群馬大学工学部助手，改組により群馬大学大学院工学研究科助教，群馬大学大学院理工学府助教，現在に至る。



杉本泰伸

名古屋大学シンクロtron光研究センター 准教授

E-mail: y.sugimoto@nusr.nagoya-u.ac.jp

専門：生物物理学，小角散乱

【略歴】

1997年3月大阪大学大学院基礎工学研究科物理系専攻博士課程修了，博士（理学）。2004年7月大阪大学大学院基礎工学研究科助手，2012年4月より現職。



古澤和也

北海道大学先端生命科学研究院 助教

E-mail: kfurusawa@sci.hokudai.ac.jp

専門：組織工学，生体材料学，高分子物理学

【略歴】

2008年3月群馬大学大学院工学研究科生産工学専攻修了。2005年4月-2008年3月日本学術振興会特別研究員（DC1），2008年4月-2008年7月関西学院大学大学院理工学研究科・博士研究員，2008年8月北海道大学先端生命科学研究院助教，現在に至る。



若林克三

大阪大学名誉教授（元大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学科 教授）

E-mail: waka@bpe.es.osaka-u.ac.jp & waka@ss.ij4u.or.jp

専門：構造生物物理学（X線・中性子回折/散乱；筋収縮）

【略歴】

1971年3月北海道大学理学部物理学科博士課程修了，博士（理学）。1971年-1990年大阪大学基礎工学部生物工学科助手，1990年-2000年同学大学院基礎工学研究科助教授，2000年-2006年同教授。2006年4月大阪大学名誉教授。1977年-1978年カナダダゲルフ大物理科学科客員研究員，2005年-2006年KEK物質構造科学研究所客員教授，2011年-2013年RIKEN播磨研究所客員主管研究員。



土橋敏明

群馬大学大学院理工学府 教授

E-mail: dobashi@gunma-u.ac.jp

専門：高分子溶液物性，バイオレオロジー

【略歴】

1982年3月北海道大学大学院理学研究科高分子学専攻博士後期過程修了，理学博士。1982年4月群馬大学工学部助手，1988年4月群馬大学工学部助教授，2000年2月群馬大学工学部教授，群馬大学大学院理工学府に改組，現在に至る。1994-1995年ニューヨーク州立大学ストーニーブルック校文部省在外研究員。

Diffusion-induced anisotropic biological gels studied by synchrotron radiation small-angle X-ray scattering

Yasuyuki MAKI¹, Kazuya FURUSAWA², Toshiaki DOBASHI¹,
Yasunobu SUGIMOTO³, Katsuzo WAKABAYASHI^{4*}

¹Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, Kiryu 376-8515, Japan

²Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan

³Nagoya University Synchrotron Radiation Research Center, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan

⁴Division of Biophysical Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-8531, Japan

*Professor Emeritus, Osaka University

Abstract Aqueous solutions of biopolymers (e.g., polysaccharides, proteins and DNA) can be transformed into gels by various treatments such as pH change, addition of ions and temperature change. When a biopolymer solution is placed in contact with a solution of gel-inducing molecules, the biopolymer undergoes gradual gelation as the gel-inducing molecules diffuse into the biopolymer solutions. The biological gels induced by the diffusion process show a specific structure in which polymer chains are anisotropically aligned. Here we introduce a series of studies on anisotropic multi-layered gels of curdlan, a microbial polysaccharide as an example, where synchrotron radiation small-angle X-ray scattering was used to characterize the chain alignment in the multi-layered structure.