

分子シャペロン機能を持つナノゲルの構造とダイナミクス

物質系専攻 66102 伊野本 憲浩

指導教員：柴山 充弘（教授）

キーワード：中性子散乱、光散乱、ナノゲル、シャペロン、ダイナミクス

【1.緒言】

ナノ微粒子とゲルの特性を持つナノゲル微粒子は、新しい機能性材料として注目されつつある。秋吉らはプルランなどの水溶性高分子にコレステロール基など疎水性の高い分子をわずかに導入した Fig.1 のような疎水化高分子(コレステロール置換プルラン(CHP: CHolesterol-bearing Pullulan))が、疎水基による疎水性相互作用により水溶液中で自己組織的に会合し、粒径 20-30 nm のサイズのそろった微粒子(ナノゲル)を形成することを見出した¹⁾。また秋吉らはこのナノゲルに Methyl- β -cyclodextrin (CD)を加えるとコレステリル基と CD との間で錯体を形成しナノゲルが水に可溶となること、さらにこのナノゲルはインスリン、BSA (Bovine Serum Albumin: ウシ血清アルブミン) などの水溶性タンパク質を包み込むように相互作用し、タンパクの熱変性による凝集を防ぐ分子シャペロンのような振る舞いをするを見出している^{2), 3)}(Fig.2)。

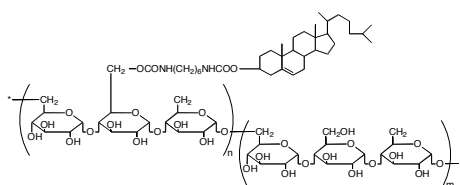


Fig.1 Structure of CHP (CHolesterol bearing Pullulan).

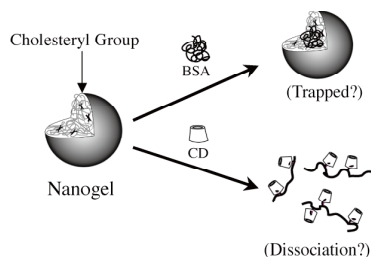


Fig.2 Schematic representation of interaction between hydrogel and BSA and CD.

我々はこれらの現象をナノスケールで観測するべく、動的光散乱 (DLS) および小角中性子散乱 (SANS) による構造解析を行った。まず卵白および卵白+ナノゲルの加熱実験においてナノゲルがシャペロンとして機能していることを視覚的に確認した後、ナノゲル単体の構造を解析し、続いてナノゲルとタンパク質の相互作用、及びナノゲルへの CD 添加による効果について検証した。

【2.実験】

小角中性子散乱測定は日本原子力研究開発機構内に設置されている東大物性研の小角中性子散乱装置 SANA-U を、動的光散乱測定は ALV 社製光散乱装置 ALV-5000 を用いて行った。実験はリン酸緩衝溶液中で CHP に BSA または CD を作用させて行った。

【3.結果・考察】

(A) ナノゲルの分子シャペロン機能

卵白(鶏卵)を 300 倍に希釈して、75°Cで 5 分間保温すると、Fig.3 の左のように白く濁る。一方、事前に CHP ナノゲルを加えておくと右のように加熱しても透明のままである。

左が白濁しているのは、熱ストレスを受けた卵白のタンパク質成分が変性し、凝集したことによる(ゆで卵の白身の状態)。それに対し右が白濁しなかったのは、CHP ナノゲルが変性しかかったタンパク質を捕らえ、凝集するのを防いだ(=分子シャペロン機能が働いた)ためと考えられる。

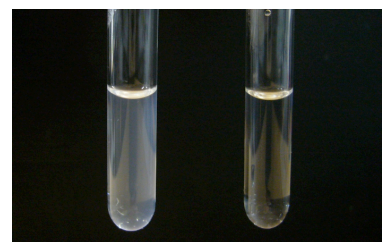


Fig.3 Egg white with (left) or without (right) CHP nanogel. Egg white was diluted 300-fold by adding buffer. Both samples were incubated at 75°C for 5 min.

(B) ナノゲルの測定

Fig.4 に、SANS 測定により得られた CHP ナノゲル、及び疎水基のない直鎖状多糖(プルラン)の弾性散乱強度を示す。CHP からの散乱は、プルランからのものより一桁以上強い強度を示し、CHP がプルランの会合体である事を明確に示している。また散乱強度を理論散乱関数でモデルフィッティングすることにより、半径(R)が 70 Å 程度の会合体を形成していることも分かった。

(C) ナノゲル+CD の測定

・ SANS 結果

Fig.5 は CHP、CHP+CD、及びプルランの SANS 結果である (図中の比は、ナノゲル中の疎水基 1mol に対する CD の mol 比を表す)。CD 添加量の増加に伴い CHP の散乱強度が減少しているが、これは CHP ナノゲルが崩壊し、散乱強度が下がったためと考えられる。また、Low q 側において CHP+CD の強度が プルランに比べ立ち上がりを保っているのは、CD 添加によって CHP ナノゲルは崩壊しつつあるものの、部分的な会合構造を未だ保っていることを示唆している。文献値と比較して CD をナノゲルの疎水基に対し大過剰(50 当量)加えた場合でも、この傾向は同様であった。

・ DLS 結果

次に DLS 測定によりナノゲルと CD との相互作用を評価した。Fig.6 に CHP、CHP+CD の粒径分布関数 $G(\Gamma^{-1})$ を示す。横軸 Γ^{-1} は緩和時間で、右に行くほど大きい構造に対応する。 $G(\Gamma^{-1})$ は、どの緩和モードがどの程度存在しているかを相対的に表したものである。この結果から、CD 添加量の増加に伴って CHP のピークが減少していくことが分かる (この変化は速やかに進行し、時間変化は少ない)。これは CD によってナノゲルが崩壊したためと考えられる。また CD 添加後、新たに現れた右側のピークは、CD 添加によって何らかの大きな構造が形成されたことを示唆する。考えられる一つの可能性としては、CD によって部分的に CHP 内の疎水基が露出し、それらがナノゲル分子間で疎水性相互作用によって会合し、より大きな会合体が形成した、などの可能性が考えられる (Fig.7)。

(D) ナノゲル+タンパク質の測定

最後に、ナノゲルとタンパク質の相互作用を

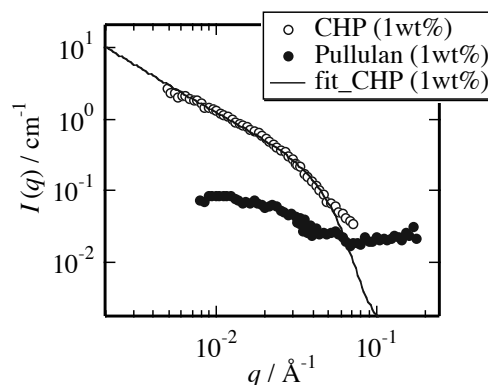


Fig.4 SANS results of CHP nanogel and pullulan. A fitting curve calculated with a form factor of sphere is also shown.

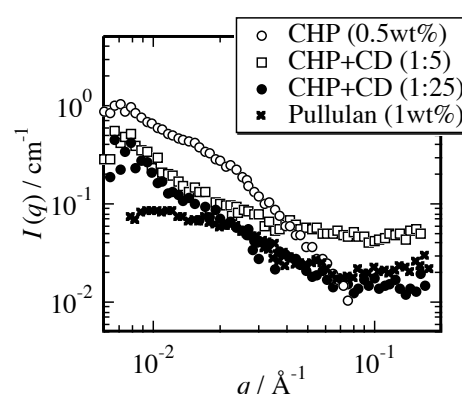


Fig.5 SANS intensity curves for CHP nanogel, CHP+CD (5equiv., and 25 equiv.) and pullulan.

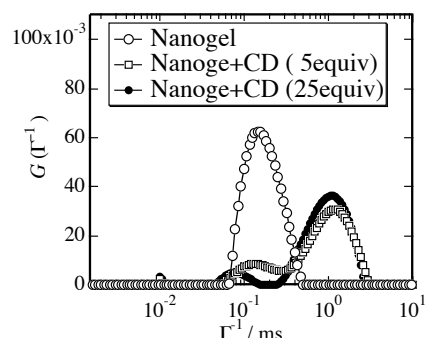


Fig.6 Time distribution functions obtained by CONTIN analyses. DLS measurements were performed at scattering angle 90°. The samples were CHP nanogel (○), mixture of CHP and 5 equiv. β -CD (□), and mixture of CHP and 25 equiv. β -CD (●).

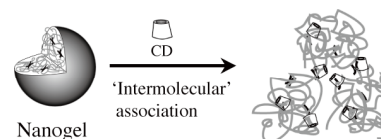


Fig.7 Schematic representation of intermolecular association.

評価した。最初にナノゲルと BSA の相互作用を DLS、SANS で評価したが、ナノゲルと BSA との相互作用前後で違いがほとんど見られなかった（よって、構造的な変化は小さいと思われる）。だがここで、Fig.3 において変化の見られたナノゲルと卵白を希釈した系において DLS 測定を試みたところ、興味深い結果が得られた。

Fig.8(a)に卵白、CHP ナノゲル+卵白の加熱前後の粒径分布関数を示す(卵白はリン酸緩衝溶液で 350 倍に希釈してある)。この濃度では試験管の見た目に大きな区別は付かないが、DLS 結果から卵白を加熱すると緩和の遅い領域に大きなピークが現れることがわかった。このピークは卵白の熱変性による凝集を表していると考えられ、他方 CHP ナノゲルを加えた卵白は加熱しても大きなピークは現れなかった。これらから、CHP ナノゲルの存在が卵白(タンパク)の熱変性を妨げていることが強く示唆される。また、ナノゲルに対する卵白の濃度依存性を測定したところ、ナノゲルのシャペロン機能が働くと思われるのは卵白濃度がナノゲルに対しある一定量までであった。これよりも卵白の濃度が高いと、Fig.8b のように巨大なピークが現れてしまう。これはナノゲルの「シャペロン機能」を超えた分の卵白が凝集したためであると考えられ、DLS 結果より、これらの R_h (流体力学的半径)は加熱後の巨大ピークで 170~180nm、卵白+CHP ナノゲルを加熱したものは 14nm と求められた。

【4.まとめ】

以上により、本研究では

- ・ CHPナノゲルが、タンパクの熱変性による凝集を妨げていること
- ・ CHPナノゲルにCDを添加すると、ナノゲルの会合構造が分解すること

をDLS、SANSにより確認することができた。今後はシクロデキストリンにより崩壊したナノゲルの構造や、ナノゲルによるタンパク質取り込みのより詳しいメカニズムの解明を進めていく必要がある。

【5.参考文献】

- 1) K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi, and J. Sunamoto, *Macromolecules*; **1993**, 26, 3062-3068.
- 2) K. Akiyoshi, Y. Sasaki, K. Kuroda, and J. Sunamoto, *Chem lett.*, **1998**, 93.
- 3) T. Nishikawa, K. Akiyoshi, and J. Sunamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6110-6115.

【6.学外発表】

学会発表

ポスター発表 (5件)

- ・ 第54 回高分子討論会 (2006/9/20-22, 富山大学, ポスター)

「分子シャペロン機能を持つナノゲルの構造とダイナミクス」伊野本憲浩, 遠藤仁, 長谷川麗, 秋吉一成, 柴山充弘 他4件

口頭発表 (1件)

- ・ 第55回高分子討論会 (2007/9/19-21, 名古屋工業大学, 口頭) 「分子シャペロン機能を持つナノゲルの構造とダイナミクス」伊野本憲浩, 遠藤仁, 小澤弥生, 長谷川麗, 秋吉一成, 柴山充弘

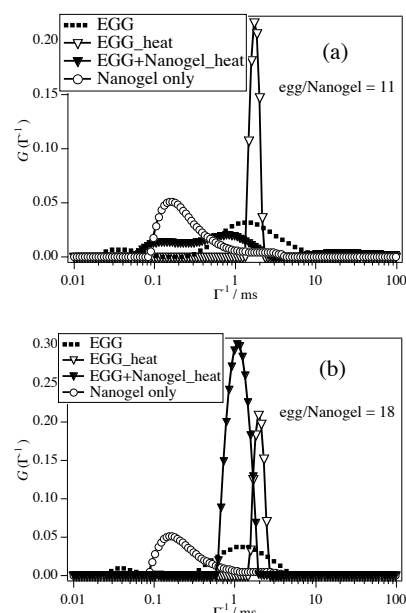


Fig.8 Time distribution functions obtained by CONTIN analyses. DLS measurements were performed at scattering angle 90°. The samples were egg white (dotted line), heated egg white (∇), heated mixture of egg white and CHP nanogel (\blacktriangledown), and CHP nanogel (\circ). (a) the molar ratio to nanogel of egg white is 11.(b) the molar ratio of egg white is 18.