

東京大学 大学院新領域創成科学研究科

基盤科学研究系物質系専攻

平成 19 年度

修士論文

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

2008年1月29日提出

指導教員：柴山 充弘 教授



66102：伊野本 憲浩

目次

第1章 序論.....	3
1.1 はじめに.....	3
1.2 分子シャペロンについて.....	5
1.2.1 概要.....	5
1.2.2 シャペロニンについて.....	6
1.3 ナノゲルについて.....	7
1.3.1 ゲル.....	7
1.3.2 ナノ微粒子.....	9
1.3.3 ナノゲルの設計.....	10
1.4 両親媒性分子と疎水性相互作用について.....	12
1.5 研究の方法.....	13
1.6 本研究の目的.....	13
第2章 実験手法.....	16
2.1 サンプル.....	16
2.1.1 ナノゲル.....	16
2.1.2 CD, BSA, 卵白.....	16
2.2 測定手法.....	17
2.2.1 散乱法の特徴.....	17
2.2.2 小角中性子散乱(SANS).....	17
2.2.3 動的光散乱(DLS).....	23
第3章 ナノゲルのキャラクタリゼーション.....	26
3.1 概要.....	26
3.2 実験.....	26
3.3 実験結果と考察.....	27
3.3.1 DLS 測定.....	27
3.3.2 SANS 測定.....	31
3.4 本章のまとめ.....	37
第4章 ナノゲルによるタンパク質の取り込み.....	38
4.1 概要.....	38
4.2 実験.....	38

4.3 実験結果と考察.....	39
4.3.1 卵白と CHP ナノゲルの相互作用（シャペロン機能の確認）	39
4.3.2 BSA 単体のキャラクタリゼーション (SANS 測定)	40
4.3.3 CHP ナノゲル+BSA (SANS, DLS 測定)	41
4.3.4 ナノゲル+卵白の測定 (DLS 測定).....	44
4.4 本章のまとめ	50
第5章 シクロデキストリンによるナノゲルの崩壊	51
5.1 概要.....	51
5.2 実験.....	53
5.2.1 CHP ナノゲルと CD の濃度比について.....	53
5.2.2 CHP ナノゲル中の疎水基の割合について.....	54
5.3 結果と考察.....	56
5.3.1 SANS 測定 (CHP ナノゲル).....	56
5.3.2 CHCDex ナノゲル.....	58
5.3.3 DLS ,SLS 測定	59
5.3.4 本章のまとめ.....	64
第6章 結論.....	66
謝辞	69
参考文献.....	72
学外発表.....	76

第1章 序論

1.1 はじめに

タンパク質は、アミノ酸が多数連結（重合）してできた高分子化合物であり、生物の重要な構成成分の一つである。タンパク質の機能の発現は、アミノ酸配列（一次構造）のみにより決定される訳ではない。タンパク質が折りたたまれ、正しい立体構造をとることで、初めて正常な機能が発現される。この時、一部のタンパク質は単独では正しい形に折りたたむことができず、他の物質の助けを借りて初めて正しい形に折りたたまれる。この折り畳みを助ける物質が分子シャペロン(molecular chaperone)である。分子シャペロンとは、「タンパク質分子が正しい構造をとり、正常な機能を発現するよう仕向ける物質」と定義されている。元来「シャペロン」とは、若い女性が社交界にデビューする際に連れ添う年上の女性を意味していた。「分子シャペロン」というネーミングは、タンパク質が正常な構造をとるよう手助けする様子を社交界のデビューになぞらえた命名である（下の絵で、少女の付き添いをしている婦人がシャペロンにあたる）。



絵『ムーラン・ドゥ・ラ・ギャレット』 1876年 ルノワール [1]

近年、アルツハイマー病、狂牛病などのプリオン病と呼ばれる難病が、タンパク質が不適切に折りたたまれ、正しい構造を取れないことによって起こる病気であることが分かってきた。これらの難病の治療に、「タンパク質の正しい折りたたみ役」である分子シャペロンが有効ではないかと最近注目されている。

このような分子シャペロンの作用機構と類似のシステムを人工的に構築しようとい

う試みのひとつが、東京医科歯科大の秋吉らによって作られている疎水化多糖ナノゲルシステムである。秋吉らは、親水性の多糖に一部疎水基を導入した疎水化多糖の会合体（ナノゲル）が、水溶液中で自己組織的に会合し、大きさ20-30 nm程度の会合体（ナノゲル）を生成することを見いだした[2, 3]。秋吉らは、

- ・ 疎水化多糖のナノゲルが非天然タンパク質と選択的に相互作用しえることにより、加熱によるタンパク質の凝集や活性低下を防ぐこと（シャペロン機能）[4-11]
- ・ シクロデキストリンを会合制御分子として用いたとき、天然の分子シャペロンと類似の機構により、正常な機能を示すタンパク質をナノゲルから放出すること[12-14]を報告している。ただ、そのナノスコピックな振る舞いはまだ解明されていない部分も多い。

本研究では「ナノゲルがタンパク質を取り込み、シクロデキストリンの添加によってタンパク質を放出する」という分子シャペロン類似システムにおいて、十分に理解されていないメカニズムを解明することを試みた。解析手段としては、動的光散乱法（Dynamic Light Scattering : DLS）・静的光散乱法（Static Light Scattering : SLS）・及び中性子散乱法(Small-Angle Neutron Scattering : SANS)を用いた。

1.2 分子シャペロンについて

1.2.1 概要

球状タンパク質がその高度な機能を発現させるには、ポリペプチド鎖を正しく折りたたんで機能的な立体構造（ネイティブ構造）を取る必要がある。タンパク質は、正常の状態では分子の外側に露出しているアミノ酸残基のほとんどが親水性であるが、フォールディングのほどけた、あるいは異常なフォールディングをしたタンパク質の表面には疎水性アミノ酸残基が露出している。これらのタンパク質は疎水基間に働く引力的相互作用により、凝集しやすい性質がある。凝集したタンパク質はアルツハイマー病の原因となるアミロイドタンパク質の例にあるように、細胞にとって非常に有害なものである[15]。分子シャペロンとはこのようなタンパク質の凝集を防ぎ、正しいフォールディングを進行させるタンパク質群のことをいい、1996年にHartl FUによって「タンパク質のフォールディングを助ける一連のタンパク質群」と定義されている[16]。

分子シャペロンの多くは、熱によってタンパク質が重大な影響（変性）を受けた場合に、そのタンパク質の凝集を防ぐ熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein : HSP)として機能する。他にもアミロイド線維形成の抑制、タンパク質の膜透過補助、抗原ペプチドの運搬など、タンパク質の折り畳み以外にも様々な生体機能に関わっている（図1）。これら分子シャペロンの機能を応用しようという試みとして、ペプチド医薬のドラッグデリバリーシステム(DDS)、タンパク質立体異常構造を原因とする疾患の検査薬や治療薬、遺伝子組み換えタンパク質の生産効率向上などがある[17]。

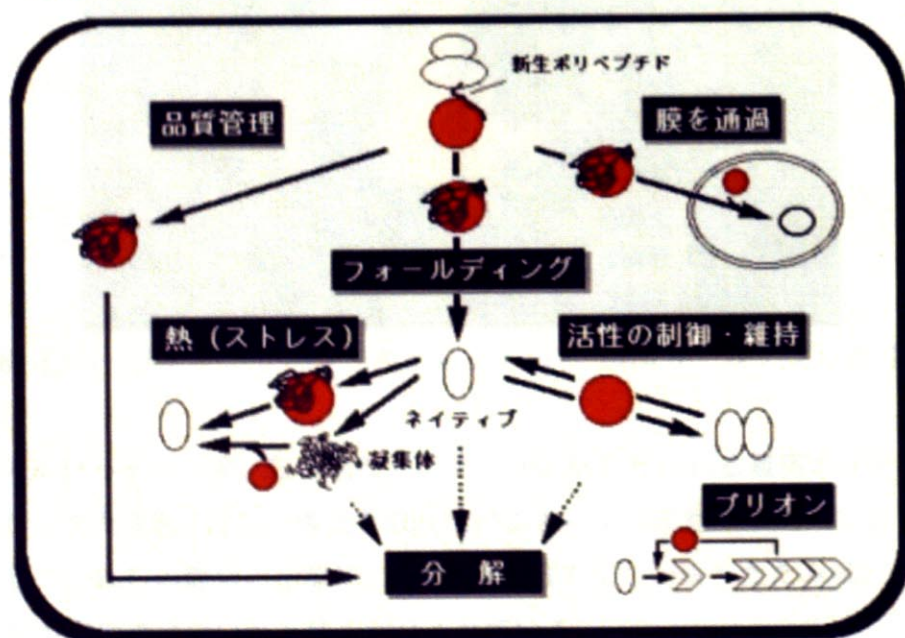


図1.1 タンパク質のフォールディングと凝集[18]

1.2.2 シャペロニンについて

天然の分子シャペロンには下に示すようにHsp60, Hsp70, Hsp104, GroELなど、様々な種類がある。この中でも特に詳細に研究されている分子シャペロンは「シャペロニン」と呼ばれている。シャペロニンはほとんどの細胞中に存在しており、これがないと細胞が死に至ってしまう必須のタンパク質である。これら種々の分子シャペロンは各々タンパク質の折れ畳み（フォールディング）や細胞が熱などのストレスに対処する際に重要な働きをしていると考えられているが、どういう役割分担がなされているのかに関してはまだよくわかってない部分が多い。

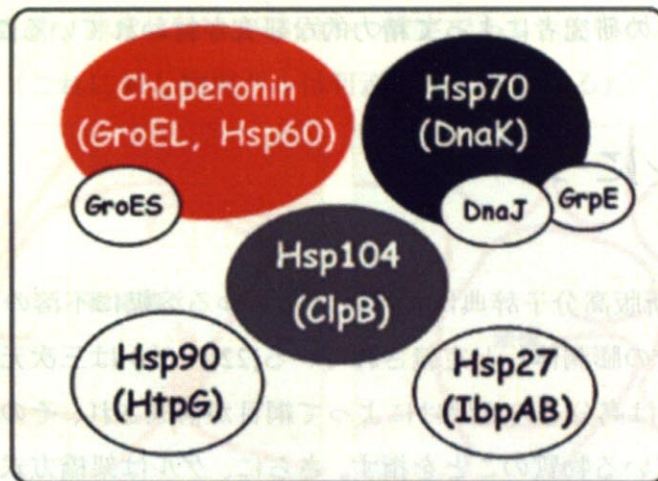


図1.2 様々な分子シャペロン[19]

その中で大腸菌のシャペロニン（GroEL）に関しては、X線結晶解析などの研究により巧妙な分子機械としての振る舞いの詳細がわかってきている。以下にシャペロニンの分子シャペロンとしての作用機構を示す[15]。

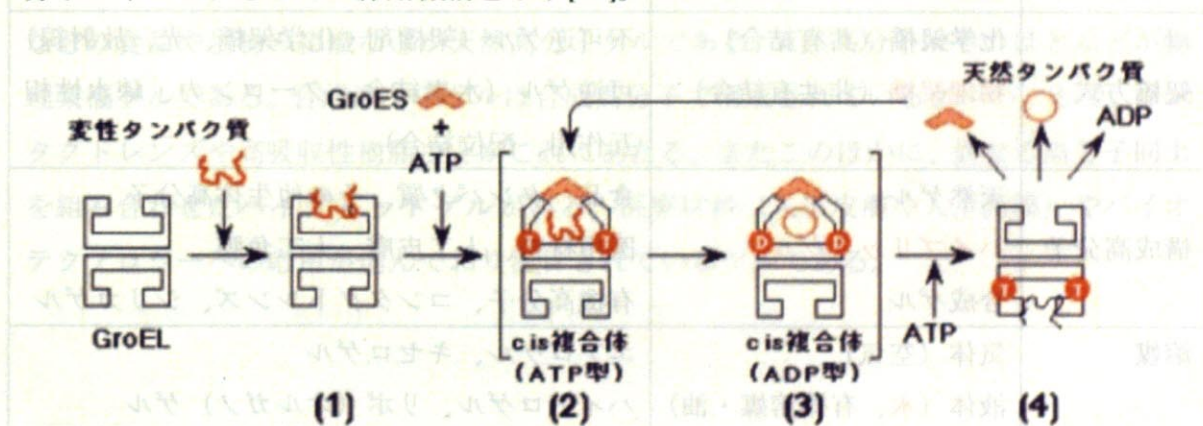


図 1.3 シャペロニンの作用機構

まず、変性タンパクの表面に露出した疎水基を GroEL の疎水部が認識し、GroEL の

空いたケージに変性タンパクが結合する (1)。次にシャペロニンである GroEL/GroES と ATP の働きによって、変性したタンパクが再び正しく折りたたむための環境が提供される (2) (3)。最後に、リフォールディングされた (正しく折りたたまれた) タンパクが放出される (4)。この機構において、シャペロニンはポリペプチドが安全に折れたたむのに必要な空間を提供していることがわかる。この巨大な「空洞」は、分子シャペロンの概念そのもの、すなわち凝集しやすい変性タンパクを保護する役割を視覚化した初めての例である。

現在、GroEL 以外のシャペロニンが分子レベルでどのように働いているのかを明らかにするために、多くの研究者によって精力的な研究が行われている[20, 21]。

1.3 ナノゲルについて

1.3.1 ゲル

ゲル (gel) とは新版高分子辞典によれば「あらゆる溶媒に不溶の三次元網目構造を持つ高分子およびその膨潤体」と定義されている[22]。ゲルは三次元網目構造と媒体から成っており、通常は高分子の橋架けによって網目が構成され、その網目の中に媒体として液体が膨潤している物質のことを指す。さらに、ゲルは架橋方式やゲルを構成する高分子、溶媒などによって以下のように分類できる[23]。(赤字：本研究で用いるナノゲルに相当)

各構成要素 の分類	種類	例
架橋方式	化学架橋 (共有結合) 物理架橋 (非共有結合)	不可逆ゲル (架橋剤・化学架橋、光、放射線) 可逆ゲル (水素結合、クーロン力、疎水性相互作用、配位結合)
構成高分子	天然ゲル ハイブリッドゲル 合成ゲル	食品、タンパク質、その他生体高分子 医用材料、人工皮膚、人工角膜 有機高分子、コンタクトレンズ、シリカゲル
溶媒	気体 (空気) 液体 (水、有機溶媒・油)	エアロゲル、キセロゲル ハイドロゲル、リポ (オルガノ) ゲル

表1 ゲルの分類

・架橋方式

高分子を一本の鎖に例えると、ゲルの構造は網目で表される。ここで高分子と高分子の接合部分（架橋）は**物理架橋方式**と**化学架橋方式**の二つの方式に大きく分類することができる。物理架橋方式とは、水素結合やクーロン力、疎水性相互作用のような比較的弱い相互作用（非共有結合）によって架橋されたもので、ゼラチンや寒天など「物理ゲル」と呼ばれるものに用いられている。一方、化学架橋方式は架橋剤や光などによって高分子を共有結合によって直接架橋したものであり、高吸水性ゲルやソフトコンタクトレンズなどの「化学ゲル」に用いられている。一般に化学ゲルは共有結合による架橋方式を用いているため、非常に結合が強固かつ安定であり、化学ゲルを特に不可逆ゲルと呼ぶこともある（これに対し物理ゲルは可逆ゲルと呼ばれる）。



図 1.4 物理ゲル（左）と化学ゲル（右）

(<http://www.asmi.jp/j/tech01.html>)

・構成高分子

ゲルを構成している高分子は、**天然高分子**、**合成高分子**の2種類がある。天然高分子については、タンパク質や多糖類がこれに相当する。古くからある豆腐やこんにやくなどの食品や生物の組織などが天然高分子ゲルである。天然高分子はそのほとんどが物理架橋ゲルである。合成高分子ゲルは合成高分子で構成されているゲルのことで、コンタクトレンズや高吸収性樹脂などがこれにあたる。またこのほかに、異なる高分子同士を組み合わせた**ハイブリッドゲル**がある。医療材料（人工皮膚や人工角膜）やバイオテクノロジーへの応用が進んでおり注目されているゲルである。

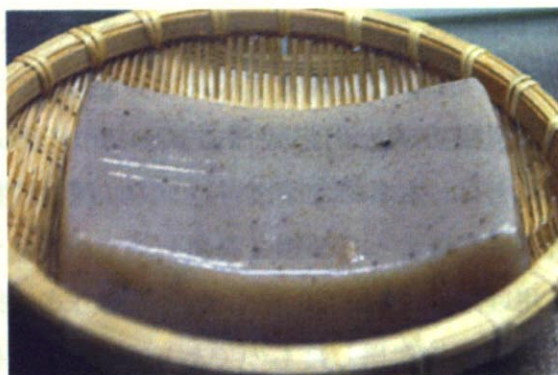


図 1.5 こんにゃく（天然高分子）

(<http://allabout.co.jp/health/healthfood/closeup/CU20060219A/konyaku.jpg>)

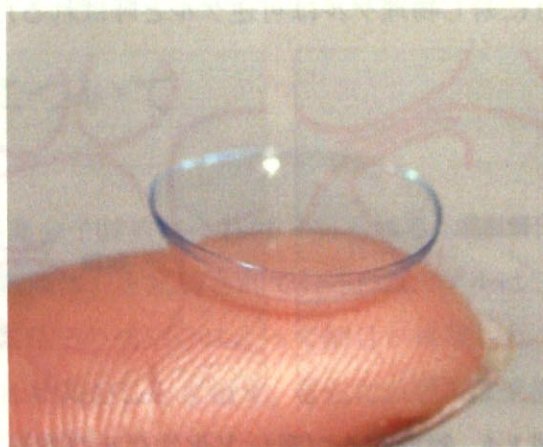


図 1.6 ソフトコンタクト（合成高分子）

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b8/Contact_lens.jpg)

・溶媒

ゲルを構成している媒体が水の場合は特にハイドロゲルと呼ばれる。こんにゃくやゼリー、吸水性の紙おむつ、化粧品など、一般的にゲルといえばハイドロゲルのことを指す場合が多い。生体適合性の観点から考えると、ハイドロゲル表面は異物反応のきっかけとなるタンパク質の吸着が効果的に抑制されるため、生体となじみやすいという特徴がある[24]。ハイドロゲルの他には、シリコンオイルなど油性媒体の場合はオルガノゲル（リポゲル）、特にアルコールを媒体とするアルコゲルや、他に気体を媒体とするエアロゲルがある。エアロゲルの例としてはケイ酸ナトリウムを中和してゲル化した後、脱水してできた多孔に蒸気を吸収させてできたシリカゲルなどが知られている。

1.3.2 ナノ微粒子

ナノ微粒子とは一般に、数 nm から数十 nm の大きさを有する微粒子のことである。バルク材料は大きさが半分になってもその物性は元の状態と大きく変わることは少な

いが、大きさがナノサイズになるとその物性はバルク材料を全く異なるものになる。ナノ微粒子の物性はバルク状態とは異なる原理に支配される。すなわち、バルク状態では無視できた小さな効果がしばしばナノ微粒子の物性を決定づけることが知られている。

具体的には

- ・ 表面に存在する原子の割合が非常に大きく、**表面の効果が大きい**。体積に対する表面積の比（比表面積）が、粒径の -1 乗に比例するために、サイズが小さい系で支配的となる。
- ・ ナノ微粒子の大きさが、物性を支配する特徴的な長さ程度である

などの「サイズ効果」から、ナノ微粒子は新しい機能を発現する新物質として期待を集めている[25-31]。

1.3.3 ナノゲルの設計

近年数多くの高分子微粒子の合成法が報告されているが、多くはミクロスフィアと呼ばれるいわゆる内部の詰まった堅い構造を有する微粒子がほとんどであり、ナノメートルサイズで**ゲル構造**を有するナノ微粒子の報告例は少ない。さらにその中でも、高分子重合などの化学的架橋法によるマイクロゲルやナノゲルの合成に比べて、物理架橋によるナノサイズのゲルの報告は非常に少ない状況である[32]。

秋吉らは、水溶性高分子にコレステリル基のような比較的疎水性の高い分子をわずかに（5 wt%程度）導入した疎水化高分子が、希薄水溶液中で疎水性相互作用により自己組織的に会合して粒径 20-30 nm のサイズの揃ったナノ微粒子（ナノゲル）が形成することを見出した。疎水基が糊の役割を果たし、それらが疎水性相互作用（物理架橋）によって自己組織的に集合したゲルである。

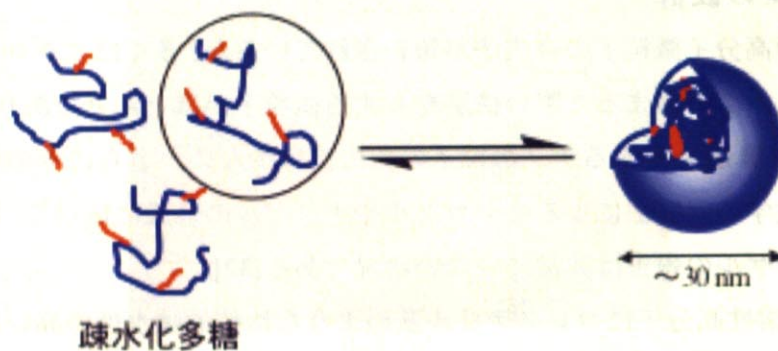
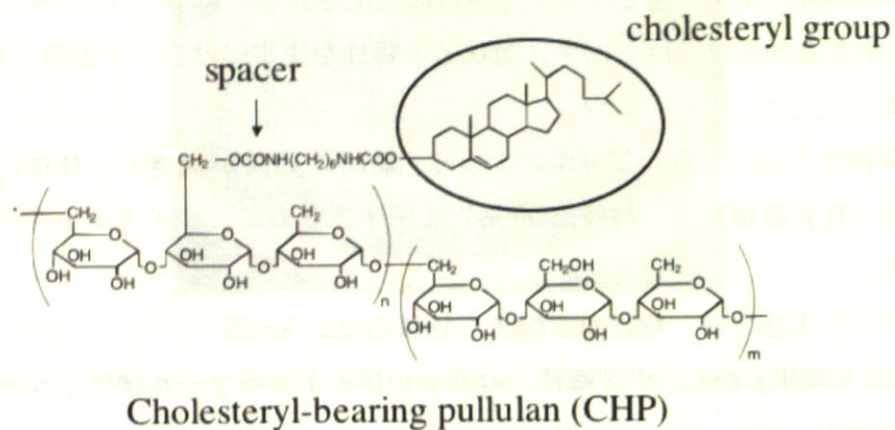


図 1.7 疎水化多糖 (CHP: コレステロール置換プルラン) の構造と疎水化多糖と自己組織化ナノゲルの生成

本研究で用いられるナノゲルは、表 1 のゲルの分類に基づく「ハイブリッド高分子を物理架橋して出来るナノサイズのハイドロゲル」である。それぞれの分類のゲルが持つ一般的特徴を合わせると、本研究で用いるナノゲルは「架橋点が動的に動き (=物理ゲル)、医用材料や人工角膜といった機能性材料への応用が期待できる (=ハイブリッドゲル) ゲル」と言える。実際、疎水化多糖ナノゲルは生体によくなじむ化粧品材料として大手企業によって商品化されており、人工ガンワクチンとして有効に作用することから臨床応用も検討されている[33-36]。

1.4 両親媒性分子と疎水性相互作用について

両親媒性分子 (amphiphilic molecule) とは、分子内に親水部と疎水部を持つ分子のことである。このような高分子は、水溶液中においてミセルや膜など様々な会合状態を形成し多様な性質を示す (図 1.8)。

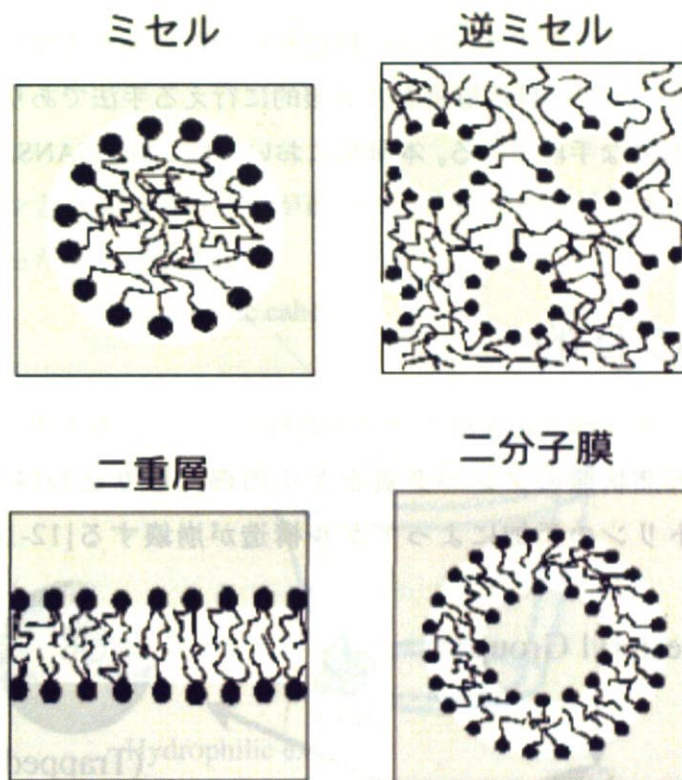


図 1.8 両親媒性分子の様々な会合状態

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/physik/severin-nikolai/HTML/object78.gif>)

多くの場合、両親媒性高分子はナノ〜ミクロスケールの大きさからなる会合体を自発的に形成する。ここで、両親媒性分子間の相互作用は「疎水効果」に支配されている。

これは疎水基が水分子との接触を避けるという性質から生じる効果であり、これにより疎水性分子は水との接触面積を最小にするよう振る舞った結果、疎水性分子同士での凝集が起こる (疎水性相互作用) [37]。疎水性相互作用は脂質のミセルの形成や、タンパク質の高次構造の形成 (フォールディング) において重要な役割を果たしている。

1.5 研究の方法

高分子、高分子ゲルのミクロスコピックな構造を調べる代表的な方法として、小角中性子散乱(SANS) と動的光散乱(DLS) が挙げられる。SANS は 1 ~ 100 nmの静的構造を調べるのに用いられる方法である。またその特徴的なサイズスケールからソフトナノ微粒子研究において非常に重要である。一方、DLS はゲル中の高分子鎖のダイナミクスについての情報を得ることができ、ゲルの構造解析のための有効な手法である。これらの散乱法は、分子レベルでの構造解析を非破壊的に行える手法であり、ゲルの構造解析を行うための最も有効な手段である。本研究においてはこれらSANS, DLSを用いてナノゲルの構造を解析した。

1.6 本研究の目的

秋吉らの報告によると疎水化多糖ナノゲルの特徴として、次のようなものがある。

1. 加熱された非天然状態のタンパク質をゲル内部に取り込む[4-9]
2. シクロデキストリンの添加によってゲル構造が崩壊する[12-14]

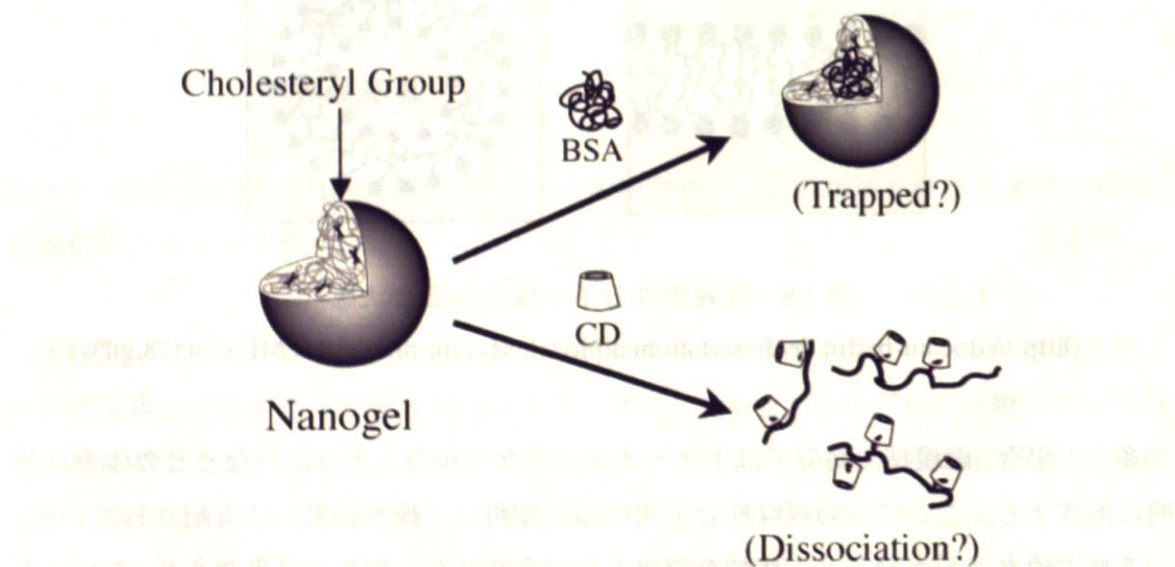


図1.9 ナノゲルとタンパク質 (BSA: Bovine Serum Albumin(ウシ血清アルブミン))、ナノゲルとシクロデキストリン (CD) との相互作用

1. について

代表的な分子シャペロンであるシャペロニン GroEL は、GroEL の疎水基が変性タンパクの疎水部位を認識し、疎水性相互作用によって結合することが知られている[18]。

変性タンパク質は多くの疎水性残基が表面に露出しており、GroEL のポリペプチド結合部位にも疎水性アミノ酸残基が多く存在しているためである。本研究の疎水化多糖ナノゲルにおいても、これと類似の機構で変性タンパクの取り込みが進むと考えられている。すなわち CHP ナノゲルの持つ疎水性の官能基が、ほどけたタンパク質の疎水基と相互作用し、ゲルの伸びた編み目を通して内部に取り込み、凝集を防ぐと言われている。この様子は蛍光プローブ測定や、円二色性スペクトル測定等の手法によって観測されている[38]。

2. について

シクロデキストリンという物質は外側が疎水性、内部が親水性であり、図 1.10 のような「桶」構造を持った分子である。

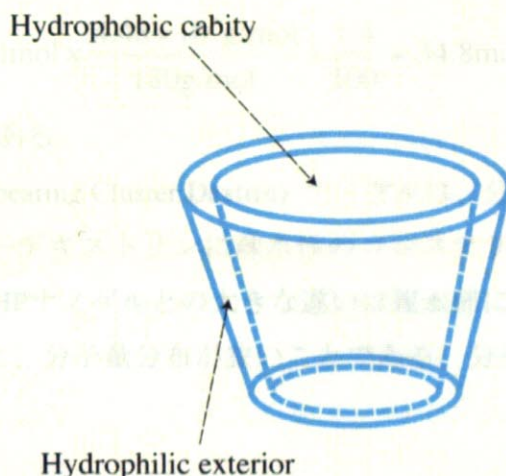


図 1.10 シクロデキストリンの概念図

シクロデキストリンはその疎水性の空孔内部に疎水分子を取り込むことが出来る（詳細は 5 章で述べる）。秋吉らは先ほどのナノゲルに CD を加えることによって、コレステロール基と CD との間で錯体を形成し、ナノゲルが崩壊する様子を HPSEC(サイズ排除カラムクロマトグラフィー)で観察している[12]。しかし、細かいメカニズムなど未知の部分も多い。

シクロデキストリンによりナノゲルを崩壊させ、取り込んでいたタンパクの放出と巻き戻りを制御出来れば、天然の分子シャペロンシステムと類似の人工分子シャペロンシステムができる。もし、GroELのようなシャペロンシステムが人工系で構築できれば、将来ドラッグデリバリーシステム (DDS) やガンなどの難病への治療法など、様々な応用の可能性が広がる。このような観点から、人工分子シャペロンシステムの研究は非常に興味深い。本研究の目的はこれらの現象、すなわちナノゲルとタンパク質、およびナ

ノゲルとシクロデキストリンの相互作用をSANS、DLSという手法を用いてナノスケールで明らかにしようというものである。

第2章 実験手法

2.1 サンプル

2.1.1 ナノゲル

ナノゲルは、東京医科歯科大学秋吉研究室から提供されたサンプルを使用して行った。CHP (CHolesterol-bearing Pullulan) ナノゲルは、分子量 1.0×10^5 g/mol程度の直鎖状の親水性多糖プルランに疎水基（コレステリル基）を100単糖あたり1.4個つけたものである（合成は東京医科歯科大の秋吉氏らによる）。分子量 M_w は約 4.48×10^5 g/molで[39]、例えばCHPナノゲル1 mol 中に存在するコレステリル基のモル数は、繰り返し単位の分子量を180とすると

$$1\text{mol} \times \frac{4.48 \times 10^5 \text{ g/mol}}{180 \text{ g/mol}} \times \frac{1.4}{100} \approx 34.8 \text{ mol}$$

から、およそ34.8 molである。

CHCDex (CHolesterol-bearing Cluster Dextrin) ナノゲルは、分子量10万程度の分岐を持つ親水性多糖クラスターデキストリンに疎水性のコレステリル基を100単糖あたり2.4個つけたものである。CHPナノゲルとの大きな違いは親水部に枝分かれのあるデンドリックな構造を持つ。また、分子量分布が狭いことである。分子量 M_w は約 8.17×10^5 である。（表2.1参照）


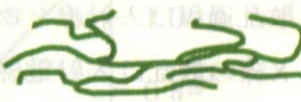
	CHPナノゲル	CHCDexナノゲル
糖鎖の構造	Pullulan  (直鎖状)	Cluster Dextrin  (デンドリック)
分岐の割合	0%	6%
分子量 (g / mol)	4.48×10^5	8.17×10^5
単糖	Glucose	Glucose

表2.1 CHPナノゲルとCHCDexナノゲル

2.1.2 CD, BSA, 卵白

Methyl- β -Cyclodextrin（以下CD）とタンパク質のウシ血清アルブミン(Bovine Serum

Albumin: BSA)は東京化成工業とSIGMAからそれぞれ購入した。BSAはウシの血清中に存在するタンパク質で、熱により変性し立体構造が変化する。分子量はそれぞれ 1.31×10^5 、 6.40×10^4 である。また、卵白は鶏卵: 成城石井特選「くりこま高原 滋養卵M」を使用した。卵白は複数のタンパクの混合物であり、分子量は第4章の方法に従って求めた。

- ・ 緩衝溶液

また、全ての実験をより生体内に近い条件で実験を行うため、水溶液としてPBS溶液(PBS: Phosphate buffered saline, リン酸緩衝溶液、pH ~ 7.4)を用いて行った。

2.2 測定手法

2.2.1 散乱法の特徴

散乱(scattering)とは、光などの波や粒子がターゲットと衝突あるいは相互作用して方向を変えられることをいう。光源から放たれた光が、ある試料に当たって角度 θ の方向へ散乱され、散乱角 θ の方向に設置した検出器で、やってきた光の粒子、光子の数をカウントする。散乱法の特徴は、温度・圧力・歪みなどの外部刺激を与えながらの構造変化や相転移などの時間発展を比較的容易にその場 (*in-situ*) で測定でき、得られる情報がアンサンブル平均化されたものであることにある。

2.2.2 小角中性子散乱(SANS)

- ・ 概要

電磁波や粒子線が物質に衝突するとその方向やエネルギーが変わる。この現象を散乱と呼ぶ。散乱過程は入射線と物質の相互作用に依存しており、それぞれに特有の情報を与える。X線の散乱は入射電磁波と物質中の電子の静電的な相互作用であるのに対し、中性子による散乱に寄与するのは主として入射中性子と原子核との間の核力である。したがってX線の散乱能は原子の電子数に依存するのに対し、中性子では原子核の種類のみに依存しその電子数には依らない。中性子線では最も電子数の少ない水素からの散乱能でさえ他の原子核と同程度であり、中性子結晶構造解析を用いることでX線では直接観測することが困難な水素の原子位置を正確に測定することが出来る。

- ・ 中性子について

中性子は1932年に英国のジェームス・チャドウィックによって発見され、その静止質

量は陽子と同程度 $1.6747 \times 10^{-24} \text{g}$ であり、電荷を持たず、スピン角運動量は $1/2$ で、磁気モーメントとしては $-1.91 \mu_n$ を持つのが特徴である。

図2.1 に中性子とX線に対する散乱長(それぞれ b_n , f_a とする)の原子番号 Z に対する依存性を示す。

散乱長は長さの次元をもつ量であり、散乱のコントラストに対応する重要な物理量である。X線は電磁波の一種で波動性が強いため、原子核の周りに存在する電子雲により散乱される。そのため、散乱長 f_a は一つの電子あたりの散乱に比例して、であり、一般に原子番号の大きな原子に強い影響を受けるため、系に存在する原子番号のより小さい原子を観測するのは難しいことが多い。一方、中性子は粒子性が強いため、原子核により散乱される(核散乱)。中性子に対する散乱長 b_n は、擬フェルミポテンシャルを用いて、

$$V(r) = \frac{h^2}{2\pi m_n} b_n \delta(r)$$

によって実験的に決められており、理論的には算出はなされていない。ここで、 h, m_n はそれぞれプランク定数、中性子の質量である。図2.1 に示したように原子番号に対して系統的に依存しないため、原子番号の小さな原子でも見分けることが可能である。また、同じ元素であっても散乱長は同位体間で異なり、特に軽水素 H ($0.374 \times 10^{-12} \text{cm}$) と重水素 D ($0.667 \times 10^{-12} \text{cm}$) では値に大きな差がある。(散乱長の値はホームページ[40]でも調べることができる。)

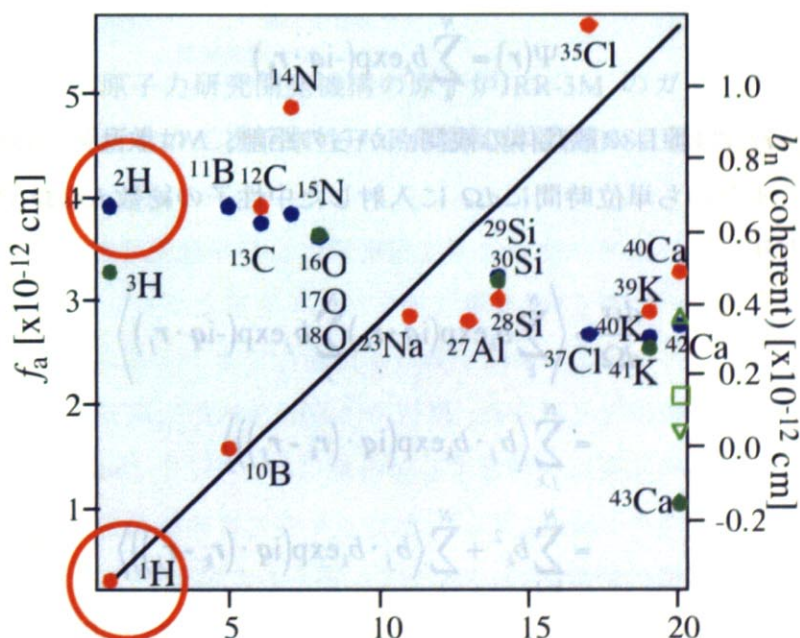


図2.1 中性子(点) とX 線(直線) に対する散乱長と物質の原子番号の関係

X線では小さい原子番号の原子同士では散乱長密度に差が出にくいいため、高分子ゲルの場合、溶媒である水と高分子鎖のコントラストが得にくい。しかし、中性子を用いると、溶媒に重水を加えることで、高分子鎖と溶媒のコントラストを自由に変えることができる。このようにソフトマターの研究で扱う物質は水素を含むものが多いため、研究方法としてよく利用される。また、X線散乱と中性子散乱では用いる波長は近いが、そのエネルギーは大きく異なる。今回用いた冷中性子はエネルギーが低い(数meV)、高分子などの大きな構造をもった物質の構造や、ゆっくりした運動の研究に適している。これらの理由から中性子散乱はソフトマターの研究において非常に重要な手法であるが、ソフトマターの特徴として、そのサイズの大きさと階層構造が挙げられる。そのため特に小角中性子散乱(SANS) が用いられる。本研究でも小角中性子散乱の手法を用いた。

・ 散乱の原理

中性子散乱の基本となる散乱理論をここでは述べる[41]。波長 λ 、散乱角 θ に対して散乱ベクトルは

$$|\mathbf{q}| = q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

で表される。各々の散乱体は散乱長 b_k を持つとすると、試料の散乱はすべての散乱振幅の重ね合わせで生じる。散乱振幅 $\Psi(\mathbf{r})$ は

$$\Psi(\mathbf{r}) = \sum_k^N b_k \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_k)$$

で与えられる。 \mathbf{r}_k は k 番目の散乱体の観測点からの距離、 N は散乱体の総数である。微分散乱断面積、すなわち単位時間に $d\Omega$ に入射した中性子の総数 $d\sigma/d\Omega$ は $\Psi\Psi^*$ を平均化することにより

$$\begin{aligned} \frac{d\sigma}{d\Omega} &= \left\langle \sum_k^N b_k \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_k) \sum_j^N b_j \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) \right\rangle \\ &= \sum_{j,k}^N \left\langle b_j \cdot b_k \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j)) \right\rangle \\ &= \sum_{k=1}^N b_k^2 + \sum_j^N \left\langle b_j \cdot b_k \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j)) \right\rangle \end{aligned}$$

第二項中の b_j と b_k は位置依存性がなく独立なので、 $b_j b_k$ は $\langle b_j \rangle \langle b_k \rangle = \langle b \rangle^2$ と置き換えることができる。これにより式は

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N \langle b^2 \rangle + \sum_{j \neq k}^N \langle \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j)) \rangle$$

と書き換えられる。ここで $\overline{\Delta b^2}$ を次のように定義する。

$$\overline{\Delta b^2} = \langle (b - \bar{b})^2 \rangle = \langle b^2 - 2b\langle b \rangle + \langle b \rangle^2 \rangle = \langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2$$

このとき、式() は

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N \overline{\Delta b^2} + \sum_{j,k}^N \langle \exp(i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j)) \rangle$$

と書き換えられる。第一項は b の揺らぎにのみ依存した値であり、非干渉性散乱を与える。実際の測定においては非干渉性散乱は主に水素原子からもたらされ、 q 依存性のないフラットな散乱を与える。このため計算あるいは試料と同じ水素原子濃度を含む溶液などを用いて非干渉性散乱の寄与を差し引いて評価する。第二項の干渉性散乱が試料の微視的な構造に関する情報を持った重要な項である。

また導出の詳細は省略するが、 $d\sigma/d\Omega$ は散乱体密度の揺らぎの相関関数を表す量 $G(r)$ とFourier 変換の関係にあり、同種の散乱体のみから成る系では

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = b^2 \left[V \int_V \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}) G(r) d\mathbf{r} + N \right]$$

と表される。 V は試料の体積である。

・ SANS 測定

SANS 測定は日本原子力研究開発機構の原子炉JRR-3M のガイドホールに設置された、東大物性研究所所有の二次元中性子小角散乱装置SANS-U(図2.2) を用いて行った[42]。



図2.2 中性子小角散乱装置SANS-U

図2.3 にSANS-U のレイアウトを示す。

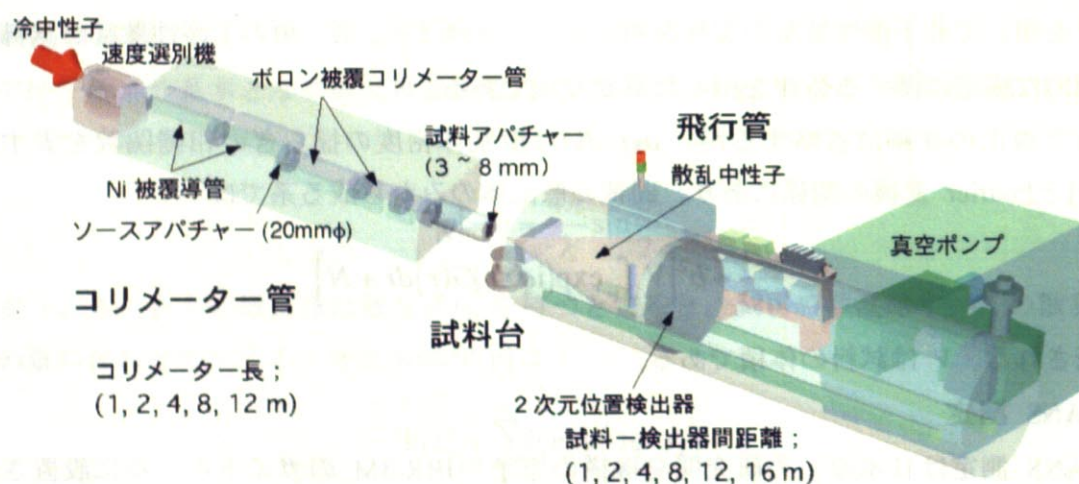


図2.3 SANS-U のレイアウト

原子炉から取り出された冷中性子は速度選別機により単色化され、コリメーター管では中性子を減衰させないで導くNi 被覆導管とビームを絞るボロン被覆コリメーター管の組み合わせによって、分解能と中性子強度を最適化できる仕組みになっている。試料で散乱された中性子は飛行管に導かれ、真空中に設置された二次元検出器によって計数される。二次元検出器の位置は必要とする分解能に応じて、1~16m で可変となっている。本研究では入射中性子の波長は 7.0 \AA とし、そのときの波長分解能は約 $\pm 10\%$ であった。サンプル-検出器間の距離を2m, 8m とし、得られた波数ベクトル q の範囲は $0.005 \text{ \AA}^{-1} \sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ であった。試料の温度は水循環恒温槽(NESLAB, RTE111) を用いて $\pm 0.1^\circ\text{C}$

の精度で制御した。散乱強度は透過率、空気散乱の影響を修正し、標準試料ルポレンの非干渉性散乱を用いて絶対強度化を行った[43]。

・中性子散乱理論

ここでは小角中性子散乱(SANS)の基本的なことを簡単に述べる。試料に中性子が当たると検出器で散乱強度 $I_m(q)$ [cps]が計測される。この強度は単位時間あたりの散乱中性子数であるが、装置に依存しない絶対中性子散乱強度としての単位は微分散乱断面積

$$\left(\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right)(q) = \frac{1}{\varepsilon A t T \Delta\Omega} \frac{I_m(q)}{I_0}$$

である。ここで、 ε は検出器の計数効率、 $A[\text{cm}^2]$ は被照射面積、 $t[\text{cm}]$ は試料厚み、 $I_0[\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}]$ は入射強度、 $\Delta\Omega$ は検出器のピクセルあたりのカバーする立体角である。 $d\Sigma/d\Omega$ は物質内のナノ構造情報をあたえ、

$$\left(\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right)(q) = (\rho_A - \rho_B)^2 + \left(\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right)_{\text{inc}}$$

のような形式で与えられる。ここで、 ρ_i は成分 i ($i = A, B$)の散乱長密度であり、成分 i を構成する各原子 j の散乱長 $b_j[\text{cm}]$ (図2.1)と数密度 $d_j[\text{cm}^{-3}]$ を用いて、

$$\rho_i = \sum_j \frac{b_j}{d_j}$$

と表される。 $(\rho_A - \rho_B)^2$ の項が中性子散乱の際のコントラストを決定する。 $S(q)$ は散乱体の構造を示す構造因子である。右辺第一項が干渉性散乱の項である。先ほども述べたように中性子散乱では散乱長が同位体間で異なることから、コントラストを自由に変化させたり、X線ではコントラストのつきにくい系など対して非常に有効である。一方、右辺第二項は非干渉性散乱の項で、構造に関係のないバックグラウンドを与える。水素原子は非常に大きな非干渉性散乱断面積をもつため、中性子散乱実験では一般に背景となる成分の水素を重水素に置換することが必要となる。以下の節および章では散乱強度

$\left(\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right)(q)$ を $I(q)$ と記述する。

2.2.3 動的光散乱(DLS)

・ DLS について

有限の温度の下ではすべての粒子は熱運動しており、系を記述する物理量は程度の差はあれ平均値のまわりで揺らいでいる。光散乱は、この揺らぎに基づく光の散乱現象であり、完全な均一系では散乱は起こらない。入射光と散乱光の振動数がほとんど変化しない散乱を弾性散乱(静的光散乱)とよぶ。この弾性散乱からは、重量平均分子量、回転半径、第二ビリアル係数といったいわゆる静的物性が得られる。これに対し、動的光散乱法(DLS)は分子のブラウン運動によるわずかな、入射光と散乱光のわずかな振動数の変化から散乱体の運動に関する知見を得るものである。この実験には微小な振動数の変化を検知するために、光源に非常に振動数分布の少ない単色光が必要であり、レーザー技術の発展により可能となった測定法である。実際の測定では散乱光からの干渉信号は光電子増倍管などにより増幅され、光電変換により光子パルス信号として光子パルス信号として光子相関計で相関関数が得られる。

・ DLS 測定

DLS 測定にはHe-Ne レーザー(出力; 22mW、波長; 632.8 nm)を光源とする動的/静的光散乱装置ALV-5000E(ALV 社製)を用いた。装置の概略図を図2.3に示す。レーザー発生装置から出力された光をアテニュエーターにより適当な強度に調節し、サンプルに入射する。特定の散乱角で検知された光散乱強度に対して、その時間相関関数が得られる。試料の温度調節には水循環恒温槽(NESLAB, RTE111)を使用した。

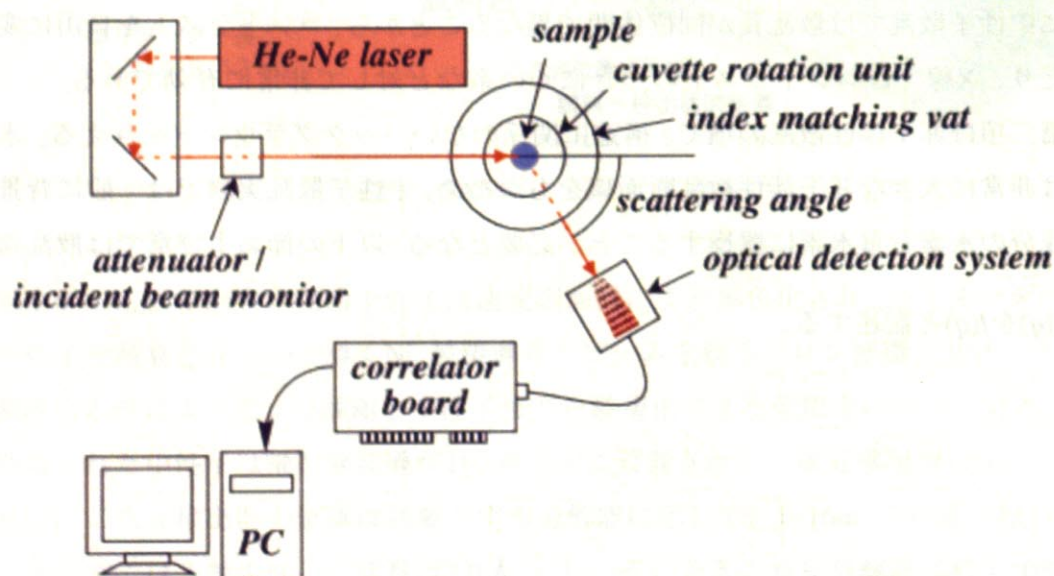


図2.3 DLS 装置の概略図

高分子鎖のDLS 測定

時間相関関数

動的光散乱で直接測定されるのは散乱光強度のゆらぎである。散乱光強度は散乱電場の2乗なので、散乱光強度の自己相関関数は通常、散乱電場の2次の（2乗の）相関関数という意味で、 $g^{(2)}(q, t)$ と書かれる。測定の際、理論的には観測時間 T は $T \rightarrow \infty$ であるのが望ましいが実験上では不可能であるので、 T をなるべく長くにとってより正確な相関関数を期する。

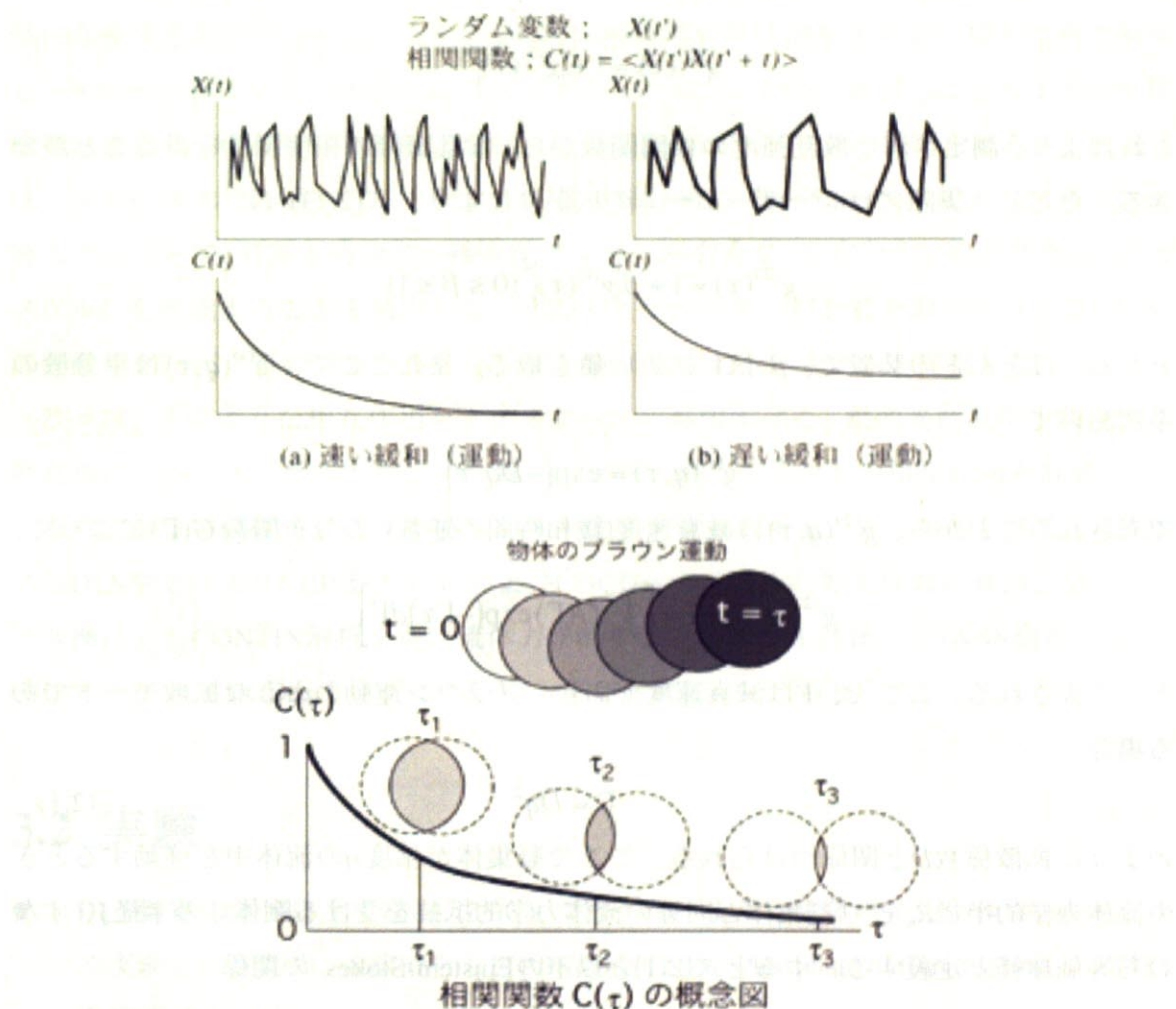


図2.4 時間相関関数の変化

観測されるのは散乱強度 $I(q, t)$ で、これは散乱振幅 $E(q, t)$ の絶対値の二乗である。即ち、

$$I(q, t) = E(q, t)E^*(q, t)$$

である。従って、散乱強度から得られる相関関数は、

$$G^{(2)}(\tau) \equiv \langle I(\mathbf{q}, 0) I(\mathbf{q}, \tau) \rangle = \langle E(\mathbf{q}, 0) E^*(\mathbf{q}, 0) E(\mathbf{q}, \tau) E^*(\mathbf{q}, \tau) \rangle$$

となる。一方、散乱振幅の相関関数は

$$G^{(1)}(\tau) \equiv \langle E(\mathbf{q}, 0) E^*(\mathbf{q}, \tau) \rangle$$

である。このとき、初期値で規格化された相関関数

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) \equiv G^{(1)}(\tau) / G^{(1)}(0)$$

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) \equiv \langle I(\mathbf{q}, 0) I(\mathbf{q}, \tau) \rangle / \langle I(\mathbf{q}, 0) \rangle^2 = G^{(2)}(\tau) / |G^{(1)}(0)|^2$$

について、次のSiegert の関係式が成り立つ。

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + |g^{(1)}(\tau)|^2$$

これにより、測定された散乱強度の相関関数から、散乱振幅の相関関数を得ることができる。ただし、実際にはレーザービームの広がりにより、式(2.23) は

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta |g^{(1)}(\tau)|^2 \quad (0 \leq \beta \leq 1)$$

となる。ほとんどの装置で、 β は1に近い値を取る。またここで、 $g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$ は単分散の系において

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) = \exp(-Dq^2\tau)$$

で表されることから、 $g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau)$ は減衰速度(緩和時間の逆数)の分布関数 $G(\Gamma)$ によって、

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) + 1 = \left[\int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \right]^2$$

として表される。ここで、 Γ は減衰速度であり、ブラウン運動のような拡散モードである場合、

$$\Gamma = Dq^2 \quad (2.1)$$

のように拡散係数 D と関係づけられる。ここで凝集体が粘度 η の流体中を移動するときの流体力学的半径 R_h を、「凝集体と同等の流体力学的抵抗を受ける剛体球の半径」、すなわち等価球径と定義する。すると式(2.1)と以下のEinstein-Stokes の関係

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}$$

から、流体力学的半径 R_h が求まる。ここで、 k_B はボルツマン定数である。

第3章 ナノゲルのキャラクターゼーション

3.1 概要

生体系では、静電相互作用、水素結合、Van der Waals 相互作用、疎水性相互作用など弱い相互作用を利用し、巧みに生体分子間の会合をコントロールしている。例えば天然に存在する分子シャペロンという物質は、疎水性相互作用などの弱い相互作用を利用し、タンパク質のフォールディングをコントロールしている。秋吉らはこのような生体機能に着目し、疎水性相互作用に注目した人工分子シャペロンの構築を試みた。秋吉らは、非常に疎水性の高いコレステロール基を部分的に (1~5 mol%) 親水性プルランに導入することで、希薄水溶液中で疎水化プルランが会合し、安定なナノ会合体微粒子 (ナノゲル) を形成することを見出した。そのナノゲルがタンパク質を取り込み、さらに外部刺激でタンパク質のフォールディングと放出を行えるシステムを提案した。

我々は、そのような相互作用をナノスケールで解明すべく、動的光散乱や小角中性子散乱法によってナノゲルとタンパク質、シクロデキストリンとの相互作用を評価した。

本章ではまずCHPナノゲルの構造をキャラクタライズすることを目的とする。具体的にはDLS測定によりCHPナノゲル,およびCHCDexナノゲルの拡散係数の算出、逆ラプラス変換によるCONTIN解析を行い流体力学的半径と分散性を評価し、SANS測定により、CHPナノゲル, CHCDexナノゲルの粒径、及び形状について評価した。

3.2 実験

- **DLS測定**…測定は全て室温 (25°C) で行った。また、生体内に近い条件(pH ~ 7.4) で実験を行うため、水溶液としてPBS溶液 (PBS: Phosphate buffered saline, リン酸緩衝溶液)を用いた。
 - ・ CHPナノゲル (0.5~1 mg/mL PBS溶液)
 - ・ CHCDexナノゲル (0.5~1 mg/mL PBS溶液)
- **SANS測定**……測定は全て室温 (25°C) で行った。
 - ・ CHPナノゲル (5~20 mg/mL PBS溶液(D₂O溶媒))

- ・ CHCDexナノゲル (5~20 mg/mL PBS溶液(D₂O溶媒))

3.3 実験結果と考察

3.3.1 DLS 測定

図3.1にDLS($\theta = 90^\circ$)により得られた散乱強度の時間相関関数 $g^{(2)}(\tau)-1$ と、粒径分布関数 $G(\Gamma)$ を示す(Γ は緩和時間)。DLS測定の結果、CHPナノゲルは一つの緩和モードで表される場合と、図3.1(b)で明らかなように $\Gamma^{-1} \approx 0.1$ ms付近に現れる**早いモード**と、 $\Gamma^{-1} \approx 1.0$ ms付近に現れる**遅いモード**の和で表される場合があることが分かった (図3.1に典型的な二つのモードを示している)。これは、単一分散しているCHPナノゲルと、それら同士が集合し巨大な会合体を形成していることを示唆する。ただ、この遅いモードの存在量は早いモードに比べて相対的に少ないと考えられる。それは図3.1(a)ではほぼ相関関数が重なっており遅いモードの寄与が少ないこと、また、図3.1(b)において遅い方のモードがしばしば出現しないことから分かる。またこれらの粒径分布関数のピーク位置から流体力学的半径(R_h)を求めると、それぞれ $R_h = 14$ nm, 170 nmと求められ、 $R_h = 14$ nmの値はCHPナノゲルの R_h の文献値と近い値となった[44]。

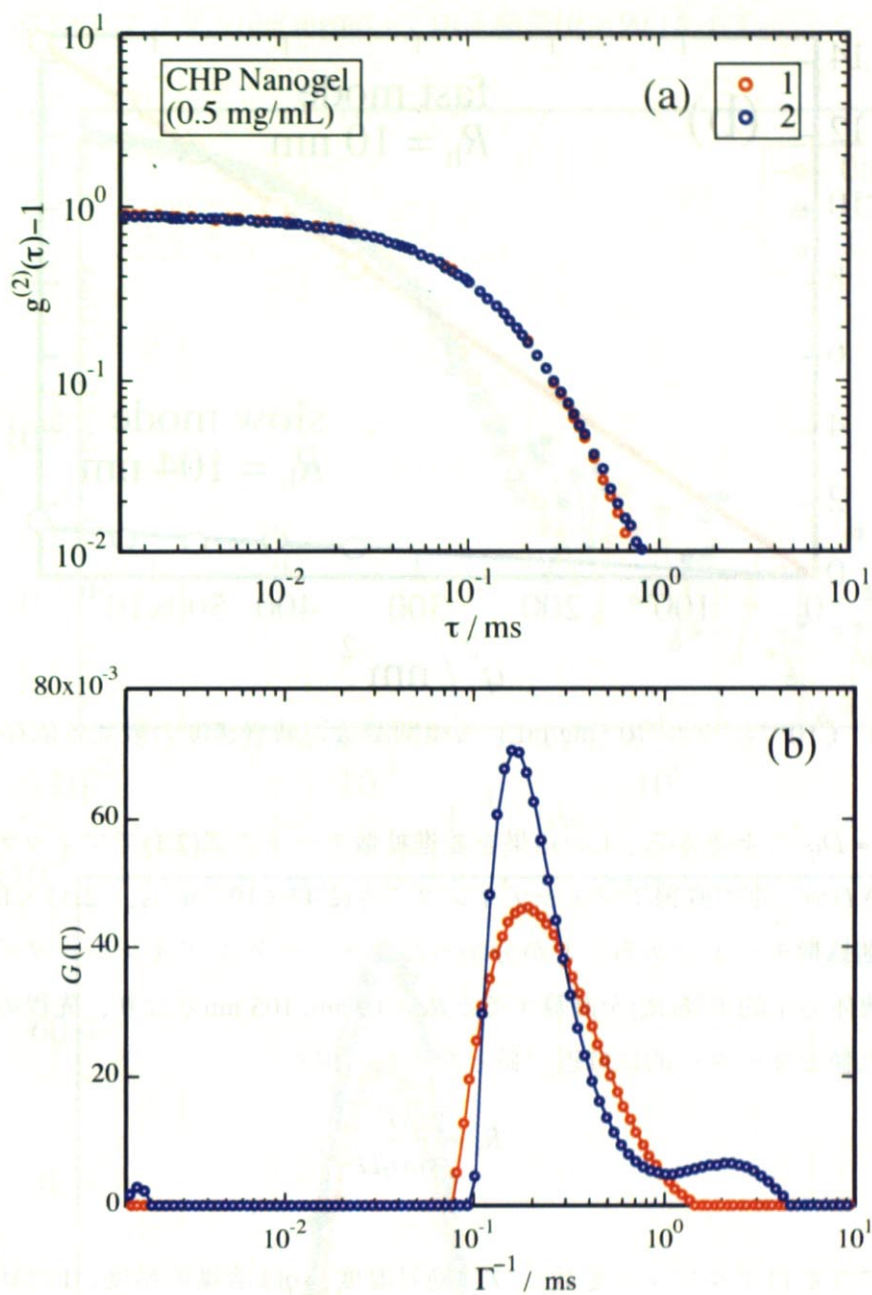


図3.1 CHPナノゲル (0.5mg/mL) の(a)散乱強度の時間相関関数と (b)粒径分布関数
1(○)は早いモードのみ, 2(○)は早いモードと遅いモードの二つが現れた結果を示す。

次にそれぞれのモードの緩和速度 Γ に対し、散乱ベクトルの大きさの2乗 q^2 依存性をプロットした図を図3.2に示す。

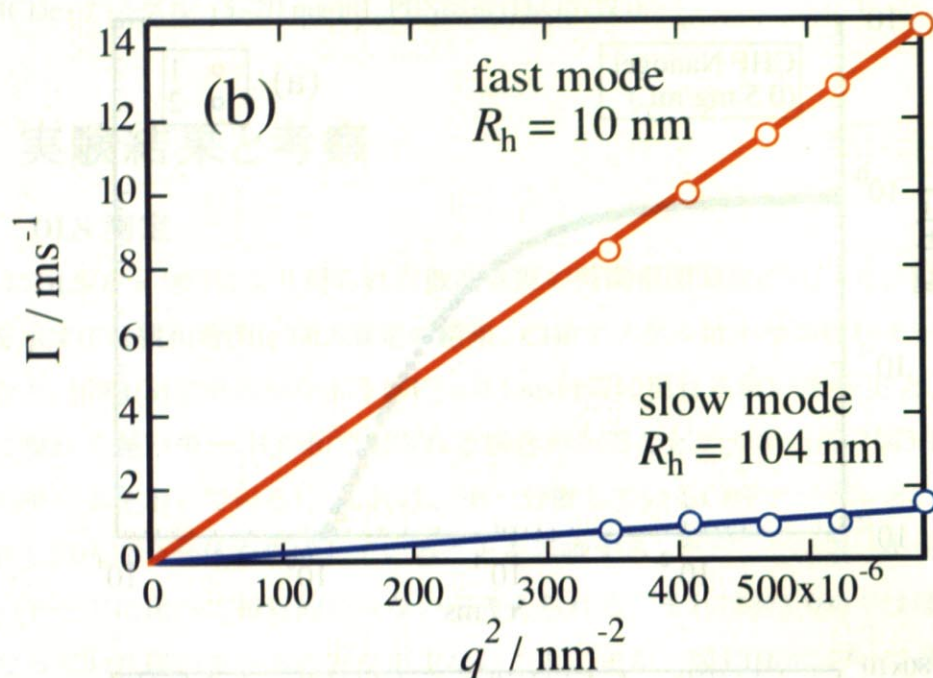


図3.2 CHPナノゲル (0.5mg/mL) の相関関数の減衰速度の散乱各依存性

(2.1)より $\Gamma = Dq^2$ であるから、上の結果を並進拡散モードの式(2.1)でフィッティングしたところ傾き D が一定の直線でフィッティングでき ($2.47 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $2.33 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$)、この系が並進拡散モードであることが分かった。ストークス-アインシュタインの関係式(3.1)から流体力学的半径(R_h)を計算すると $R_h = 10 \text{ nm}$ 、 105 nm となり、先程のピーク位置から求めた値とオーダー的には近い値となった。但し

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (3.1)$$

である。ここで k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度、 Γ は緩和時間を表す。

次に、CHCDex ナノゲル(0.5 mg/mL)の DLS 結果($\theta = 90^\circ$)を示す。

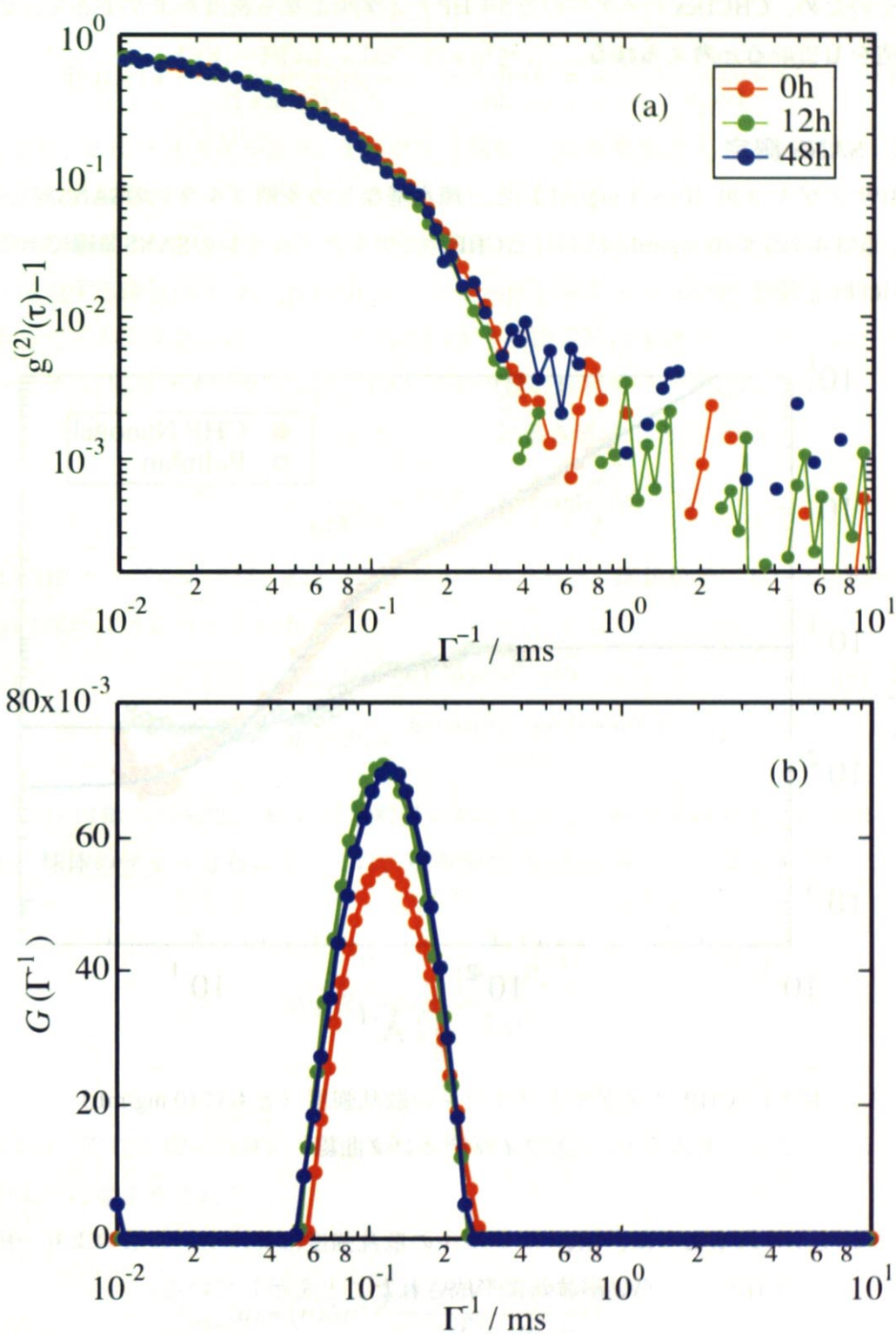


図 3.3 CHCDex ナノゲルの(a)散乱強度の時間相関関数と (b)粒径分布関数

図3.3(b)のピーク位置から R_h をもとめると、 $R_h = 9.5 \text{ nm}$ が得られた。CHPナノゲルに比

分子量が大きいにも関わらず、CHPナノゲルの R_h (14 nm)よりも小さい値となっている。そのため、CHCDexナノゲルの方がCHPナノゲルよりも密度がより小さく、詰まった構造をしていると考えられる。

3.3.2 SANS 測定

CHPナノゲル (20, 10, 5, 1 mg/mL) と、疎水基なしの多糖プルランのSANS測定を行った。図3.4は濃度10 mg/mL におけるCHPナノゲルとプルランのSANS曲線である。縦軸 $I(q)$ は散乱強度である。

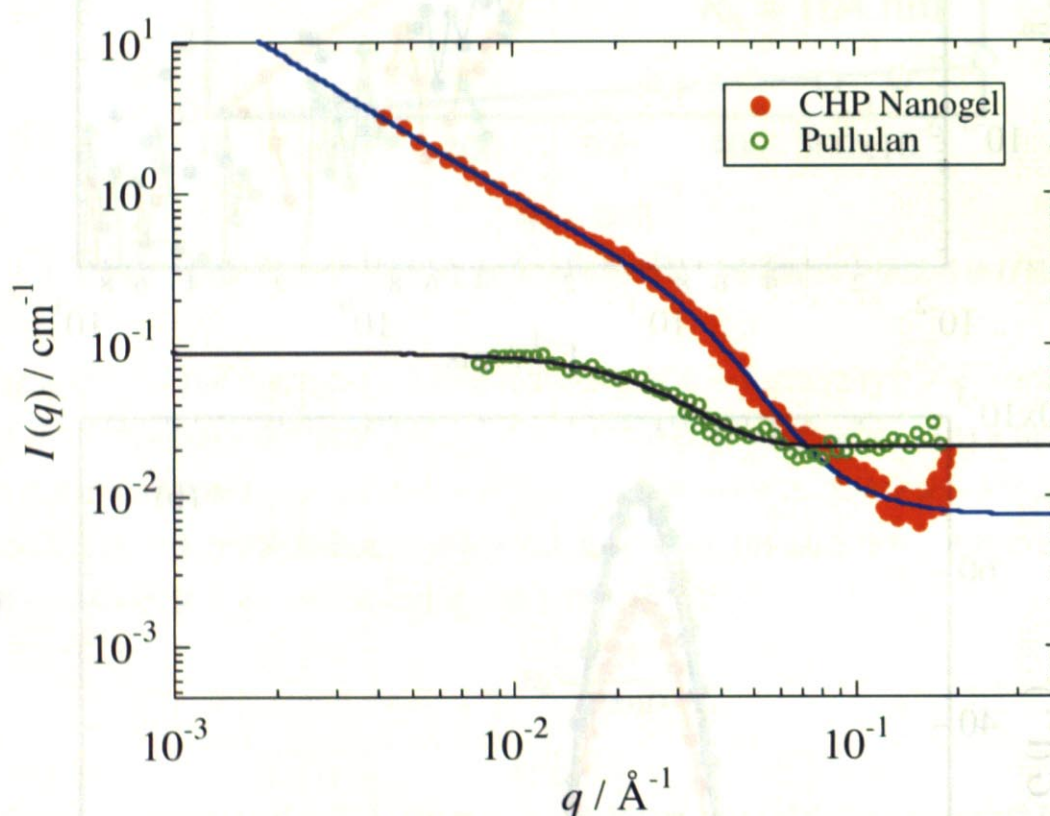


図3.4 CHP ナノゲルとプルランの散乱強度 (ともに10 mg/mL) とフィッティング曲線

図 3.4 で示されるように、CHP ナノゲルの散乱強度はプルランのものより一桁近く強く、会合体(CHP ナノゲル)が確かに形成されたことを示している。

● CHP ナノゲル (10 mg/mL) のフィッティング

CHP ナノゲル (1 mg/mL) をモデル関数(3.1)でフィッティングした。この関数は凝集体の効果を表す構造因子 $S(q)$ と、形状因子 $P_{mono}(q)$ の積に比例する関数である。

$$I(q) \propto S(q)P_{mono}(q) \quad (3.1)$$

ここで $S(q)$ は以下のように書ける[45]。

$$S(q) = 1 + \frac{C(d_f - 1)\Gamma(d_f - 1)\xi^{d_f}}{(1 + q^2\xi^2)^{d_f/2}} \frac{(1 + q^2\xi^2)^{1/2}}{q\xi} \times \frac{\sin[(d_f - 1)\arctan(q\xi)]}{d_f - 1} \quad (3.2)$$

C は定数、 d_f はフラクタル次元、 Γ はガンマ関数、 ξ は凝集体のサイズを表す。ここで (3.2) をそのまま用いてフィッティングを行うと、 ξ はベクトル q のスケール (数十~数百 nm) よりも極めて大きい値となったため、対応策として $\xi \gg 1/q$ と近似し評価を行った。これと後述する球状因子 $P_{mono}(q)$ を用いてフィッティングを行ったところ、上手くフィットすることが出来た。よってここではこのような限定的な条件でフィッティングを行うことにする (凝集体の効果 $S(q)$ は、DLS 結果の遅い緩和モードに対応する)。

パラメータ $\xi \gg 1/q$ とおくと、 $S(q)$ は次のように書き直すことができる。

$$S(q) = 1 + \frac{1}{(qR)^{d_f}} d_f \Gamma(d_f - 1) \times \sin\left[\frac{\pi}{2}(d_f - 1)\right] \quad (3.3)$$

R は CHP ナノゲルの半径、 d_f はフラクタル次元である。球状粒子において、形状因子 $P_{mono}(q)$ は次のように与えられる。

$$P_{mono}(q) = nV^2\Delta\rho^2\Phi^2(qR) \quad (3.4)$$

$$\Phi(qR) = \frac{3[\sin(qR) - qR\cos(qR)]}{(qR)^3} \quad (3.5)$$

ここで n は球の数密度、 $\Delta\rho$ は球状粒子の散乱長密度、 R は球の半径、 V は球の体積である。球体のサイズ分布については、重み関数 $W_R(R)$ が導入されガウス関数であると仮定された。

$$W_R(R) \approx \exp\left[-\frac{(R - \langle R \rangle)^2}{2\Delta R^2}\right] \quad (3.6)$$

ここに、 $\langle R \rangle$ は平均した球の半径、 ΔR は平均からの揺らぎを表す。したがって、(3.4) は次のように書き直される。

$$P_{mono}(q) = \langle n \rangle \Delta\rho^2 \frac{\int W(R)V^2(R)\Phi^2(qR)dR}{\int W(R)dR} \quad (3.7)$$

$\langle n \rangle$ は単位体積中における球の平均の個数である [46]。

ここで分子間の凝集の効果を表す構造因子 $S(q)$ は low q の領域で支配的で、形状因子

$P_{\text{mono}}(q)$ は High q の範囲で支配的であった。フィッティング結果から、パラメータを求めると CHP ナノゲル の半径 R は 7.0 nm となり、文献値と矛盾しない結果となった[39]。

● プルラン (疎水基なし : 10 mg/mL) のフィッティング

続いて、図3.4における疎水化多糖のプルランに対しフィッティングを行った。疎水基なしのプルランの分子構造は「ロッド」状であることが報告されている[47]。ここで(3.7)の棒状関数[48]でフィッティングを行ったところ、図3.4のようにうまくフィッティングすることができた。

$$\Phi(q) = 2\text{Si}(qL)/(qL) - 4\sin^2(qL/2)/(q^2L^2) \quad (3.7)$$

$$\text{Si}(x) = \int_0^x t^{-1} \sin t dt$$

ここで q は散乱ベクトルの大きさ、 L はロッド長である。結果よりパラメータを求めるとロッド長は $L \approx 12$ nm と見積もられた。

● CHP ナノゲルの構造の濃度依存性

図 3.5 に、各濃度によって規格化された CHP ナノゲルの散乱曲線を示す。

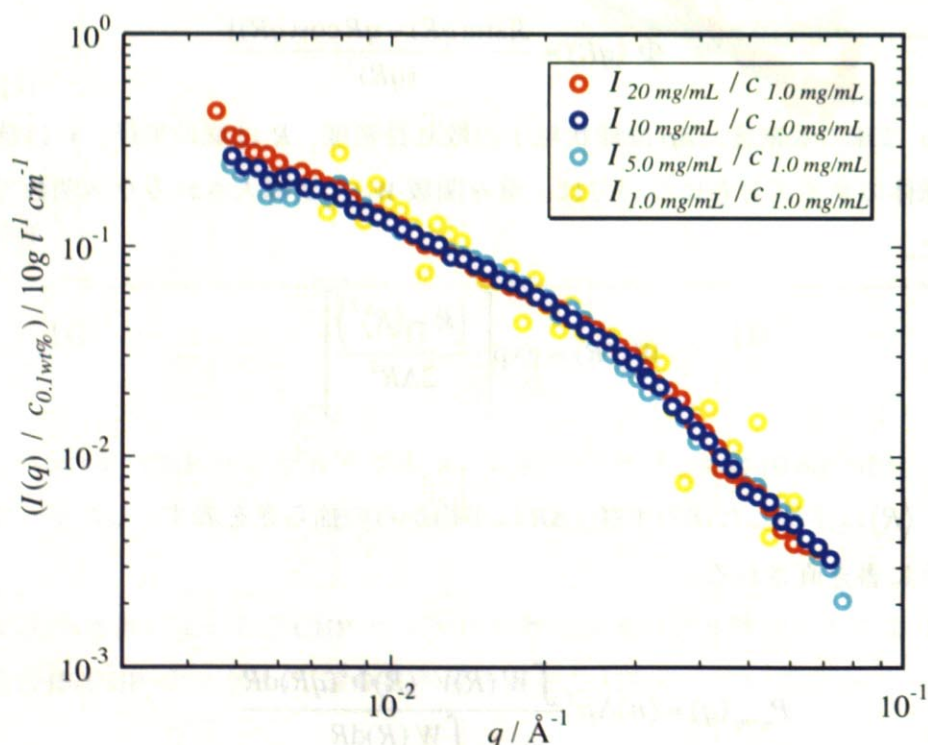


図 3.5 CHP ナノゲル(20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL)の散乱強度を濃度で規格化したもの

結果より、CHP ナノゲルの散乱曲線は、図 3.5 のように濃度で規格化するとほとんど重なることがわかる。これは、CHP ナノゲルが濃度(1.0 mg/mL~20 mg/mL)にかかわらず、ほとんど同じ構造をとっていることを意味する。

● CHCDex ナノゲルの構造の濃度依存性

続いて、糖鎖の形状がCHPと異なるCHCDexナノゲル (20, 10, 5, 1 mg/mL)と、疎水基なしの多糖クラスターデキストリンのSANS結果を示す。なお、CHPナノゲルとCHCDexナノゲルの主な違いは表2.1に示した通りである。主な違いは分子量と親水性多糖の構造の違い (プルランは直鎖状の構造、クラスターデキストリンはデンドリックな構造) である。



	CHPナノゲル	CHCDexナノゲル
糖鎖の構造	Pullulan  (直鎖状)	Cluster Dextrin  (デンドリック)
分岐の割合	0%	6%
分子量 (g / mol)	4.48×10^5	8.17×10^5
単糖	Glucose	Glucose

表 2.1 CHP ナノゲルと CHCDex ナノゲル

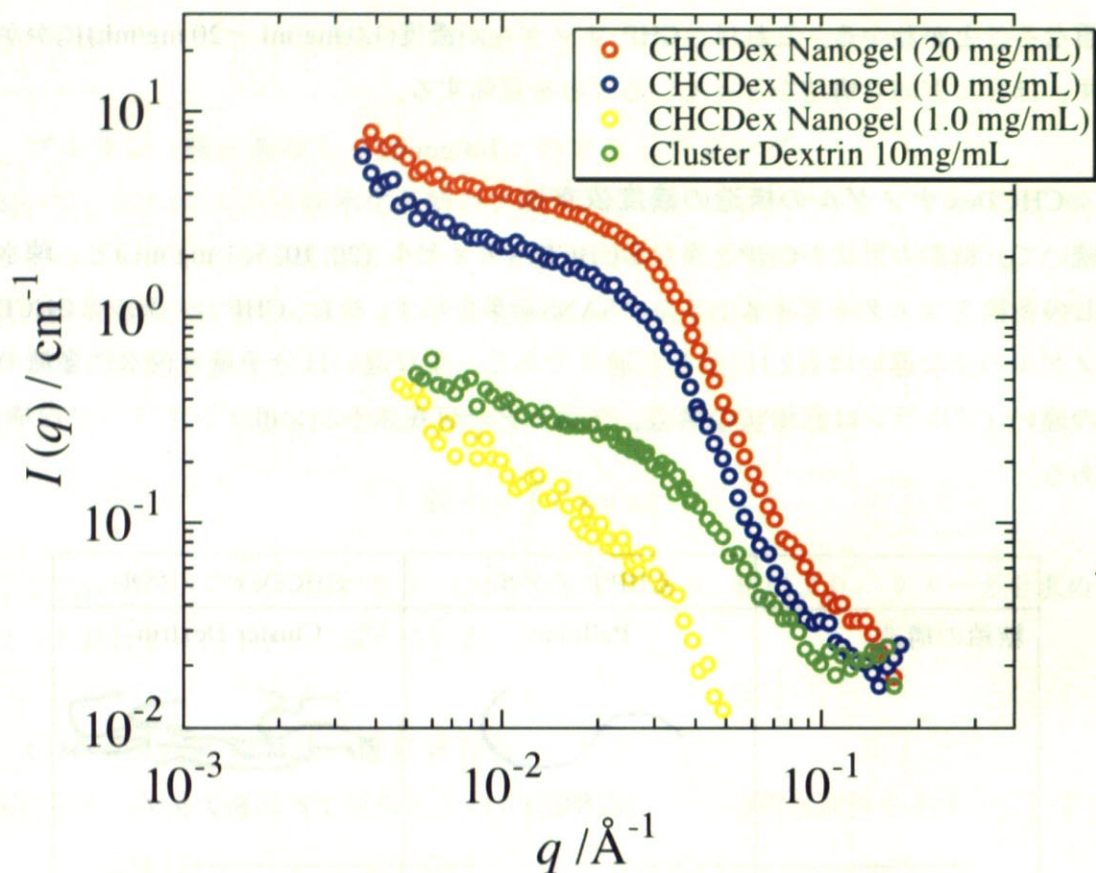


図 3.6 CHCDex ナノゲル(20 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL) の散乱曲線

図 3.6 より、CHP ナノゲルの場合と同様、 $I(q)$ はプルランのものより一桁以上高く、自己集合体(CHCDex ナノゲル)が確かに形成されたことを示している。

次に、図 3.7 に各濃度によって規格化された CHCDex ナノゲルの散乱曲線を示す。これも CHP ナノゲルと同様、濃度によらずほぼ重なった。このことからこの範囲では CHCDex ナノゲルが濃度 (1.0 mg/mL～20 mg/mL) にかかわらず、ほとんど同じ構造をとっていることを意味する。

3.4 本章のまとめ

以上 SANS と DLS の結果をまとめると以下ようになる。

- SANS 結果

1. (会合体の生成) CHP ナノゲルからの散乱は、プルランからのものより一桁以上強い強度を示し、疎水化プルランの会合体を形成している事が分かった。
2. (会合体の大きさ) 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 7 nm 程度の会合体を形成していることが分かった。
3. (CHP ナノゲルと CHCDex ナノゲルの構造比較) CHP と糖鎖の構造が異なる CHCDex ナノゲルを用いて構造の比較を行ったが、糖鎖の構造の違いによる大きな違いは見られなかった

- DLS 結果

1. (Diffusive Mode) CHP ナノゲルの系 (0.5 mg/mL) が、並進拡散モードであることを確認した。
2. (ナノゲルの R_h) DLS 測定により、CHP ナノゲルの R_h (流体力学的半径) ~ 14 nm、CHCDex ナノゲルの R_h (流体力学的半径) ~ 9.5 nm と求まった。