

第4章 ナノゲルによるタンパク質の取り込み

4.1 概要

秋吉らによって設計された疎水化多糖ナノゲルは、親水性の多糖に一部疎水基を導入し、それらが疎水性相互作用により会合してできた物理ゲルである。天然の分子シャペロンであるシャペロニン GroEL は、GroEL 中の疎水部が選択的にタンパク質の表面に露出した疎水基を認識し、疎水的な相互作用により非天然のタンパクと結合する。CHP ナノゲルにおいても同様に、このナノゲルの疎水性の部分がほどけたタンパク質の疎水基と相互作用してタンパク質を内部に取り込み、その凝集を防ぐと考えられている。

本章の目的は、疎水化多糖ナノゲルとタンパクとの相互作用を DLS, SANS を用いてその場(*in situ*)観察し、ナノスケールで解析することである。

用いたタンパク質は、ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: BSA)と、卵白（鶏卵から卵白を取り出し PBS で希釀したもの）である。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 6.40×10^4 g/mol 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質の混合物であるため、分子量は後述(4.3.3)の方法に従って求めた。

4.2 実験

- **DLS実験**…CHPナノゲルに対し、加えるタンパク質濃度を変化させた。測定は全て室温 (25°C) で行った。
 - CHPナノゲル (0.5~1 mg/mL (= 1.12~2.24 μM)) PBS溶液
 - BSA (1.12~28.0 μM PBS溶液) 濃度はナノゲルに対して 1, 2.5, 5, 10, 25 の条件で行った。また加熱実験は CHPナノゲルに添加した後 75°C で 5 分間加熱して変性させ、室温になるまで静置して測定した。)
 - 卵白（鶏卵：成城石井特選「くりこま高原 滋養卵M」、40~4000倍希釀。CHPナノゲルに添加した後 75°C で 5 分間加熱して変性させ、室温になるまで静置した。）
- を用いた。

- SANS測定…CHPナノゲルに対し、加えるタンパクの濃度を変化させた。測定は全て室温(25°C)で行った。
 - ・ CHPナノゲル PBS溶液(D₂O溶媒) : CHPナノゲルの濃度は5~20 mg/mL (= 11.2~44.8 μM)。
 - ・ BSA 11.2~280 μM (濃度はモル比でBSA / ナノゲル = 1, 2.5, 5, 10, 25)

4.3 実験結果と考察

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）

卵白（鶏卵）を 300 倍に希釈して、75°Cで 5 分間保温すると、図 4.1 の左の試験管のように白く濁る。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(ゆで卵の自身の状態)。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。この現象を DLS により詳細に調べた結果を、後に(4.3.3)述べる。

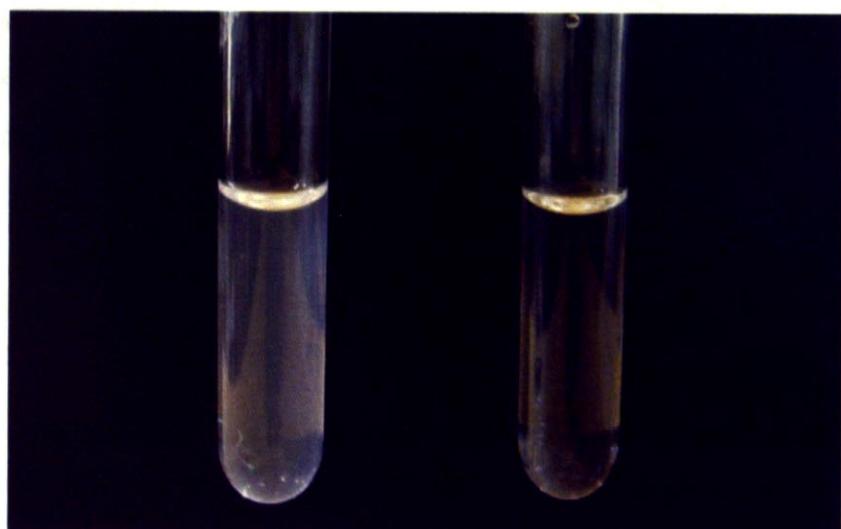


図 4.1 卵白溶液を 75°Cで 5 分加熱したもの（300 倍希釈・左）と
卵白に CHP ナノゲル (1.0mg/mL) を加え加熱したもの（右）

まず初めに、モデルタンパクとして BSA (ウシ血清アルブミン) を用いた実験を行った。

4.3.2 BSA 単体のキャラクタリゼーション (SANS 測定)

まず初めに、BSA を SANS 測定した結果を示す。

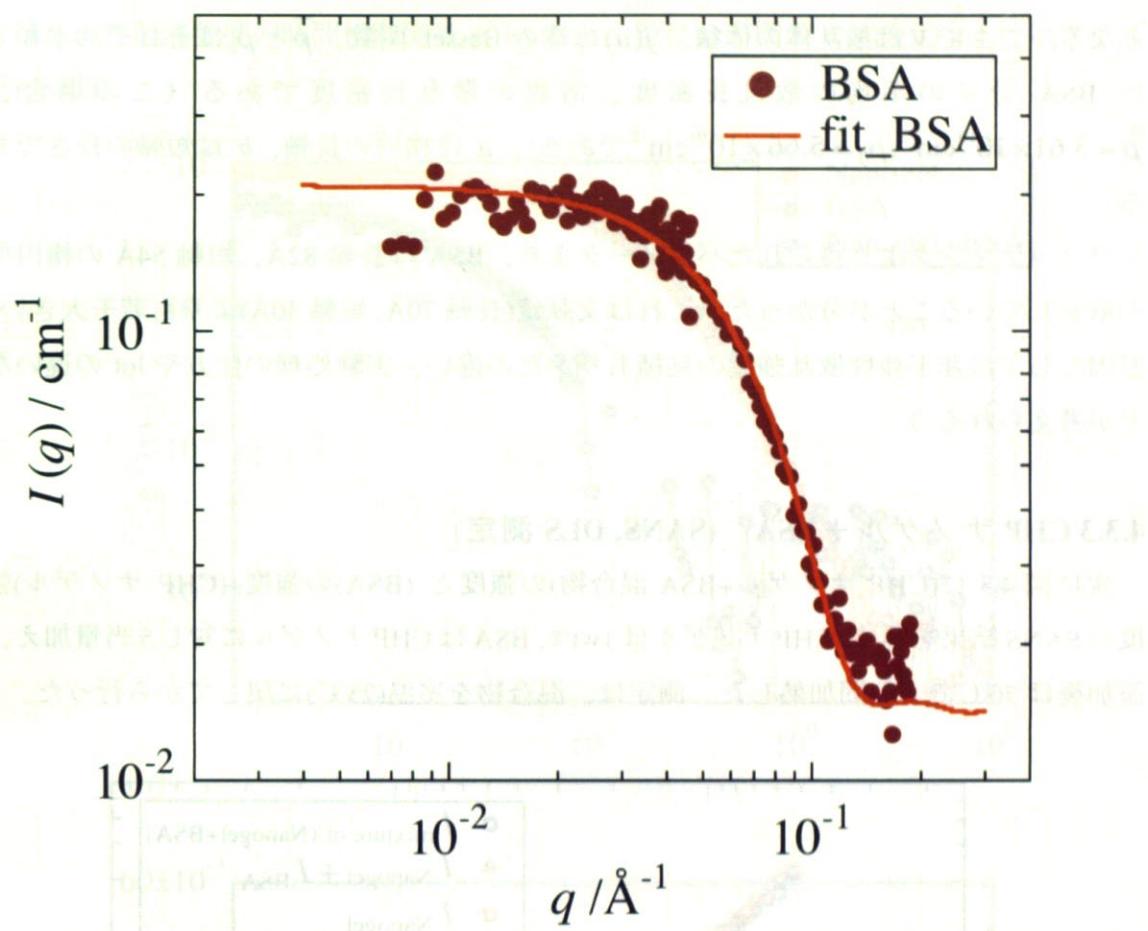


図 4.2 BSA (0.65wt%) の散乱曲線とフィッティングの結果

文献[49]に従い、橢円関数を用いてモデルフィッティングを行った。

$$I(q) = nP(q)S(q)$$

n は溶液中の分子の数密度、 $P(q)$ は橢円の形状因子、 $S(q)$ は分子間相互作用に関する構造因子である。BSA の濃度は 0.65 wt%(希薄)であり、ほぼ分子間相互作用のない系と考えることができるため構造因子 $S(q) \sim 1$ とみなせ[49]、上式は

$$I(q) \approx nP(q)$$

となり

$$P(q) = \int_0^1 F^2(\mu) d\mu$$

$$F(q, \mu) = (\bar{\rho} - \rho_0)V \frac{3j(u)}{u}$$

$$u = q \left[a^2 \mu^2 + b^2 (1 - \mu^2) \right]^{1/2}$$

$$\mu = \cos w$$

となる。ここで V は散乱体の体積、 $j(u)$ は球の Bessel 関数、 $\bar{\rho}$ と ρ_0 はそれぞれ水和した BSA 分子の平均の散乱長密度、溶媒の散乱長密度である（この場合、 $\bar{\rho} = 3.61 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$, $\rho_0 = 5.66 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ である）。 a は楕円の長軸、 b は短軸の長さである。

フィッティングより得られたパラメータより、BSA は長軸 82\AA 、短軸 54\AA の楕円型の形をしていることが分かった。（これは文献値（長軸 70\AA 、短軸 30\AA ）よりも若干大きい。原因としては非干渉性散乱強度の見積もりかたの違い、実験処理の仕方や lot の違いなどが考えられる。）

4.3.3 CHP ナノゲル+BSA (SANS, DLS 測定)

次に図 4.3 に(CHP ナノゲル+BSA 混合物)の強度と (BSA)の強度+(CHP ナノゲル)強度の SANS 結果を示す。CHP ナノゲルは 1wt%, BSA は CHP ナノゲルに対し 5 当量加え、添加後は 70°C で 5 分間加熱した。測定は、混合物を室温(25°C)に戻してから行った。

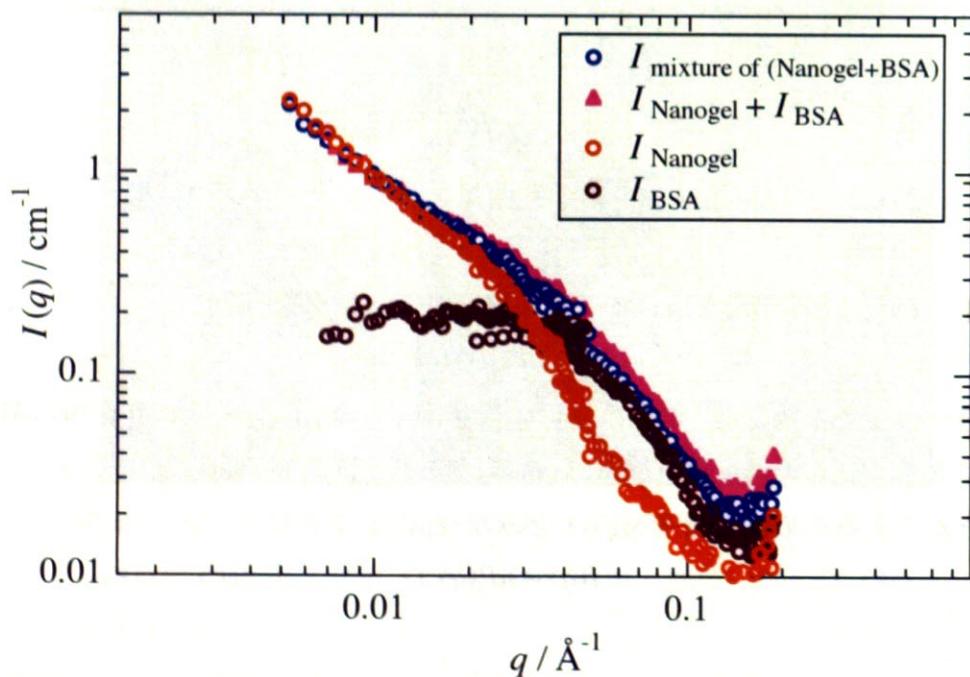


図 4.3 $I_{\text{CHP ナノゲル}}$ および I_{BSA} の散乱曲線と $I_{(\text{CHP ナノゲル+BSA})\text{混合物}}$, $I_{\text{CHP ナノゲル}}+I_{\text{BSA}}$

図から、 $I_{(CHP\text{ ナノゲル}+BSA)\text{ 混合物}}$ の散乱強度、曲線の形状は $I_{CHP\text{ ナノゲル}}+I_{BSA}$ に非常に近いことがわかる。この結果からは、大きな構造変化は確認できない。

さらに、BSA、CHP ナノゲル、および CHP ナノゲル+BSA の DLS 測定($\theta = 90^\circ$)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 $G(\Gamma)$ を図 4.4 に示す(Γ は緩和時間)。

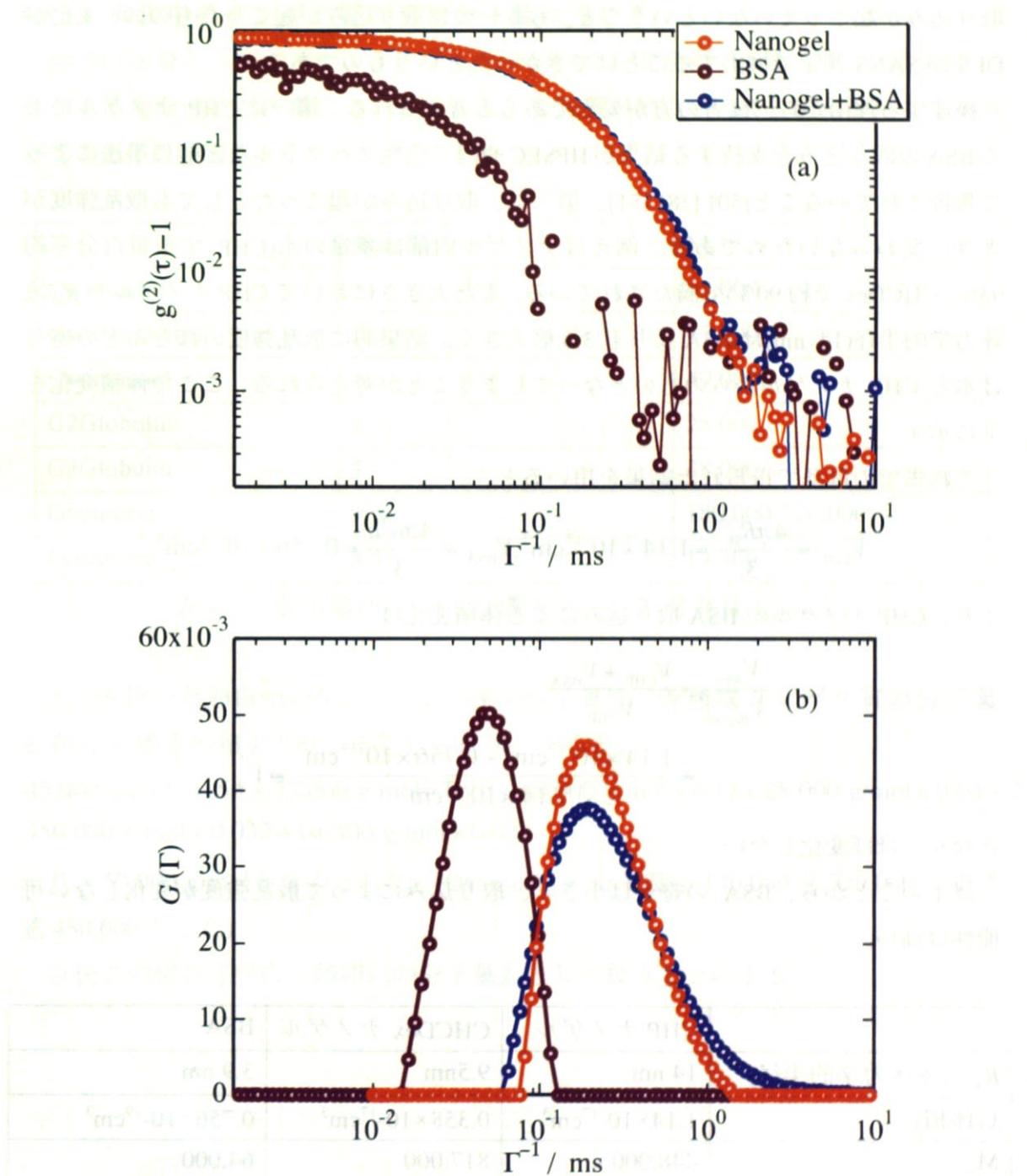


図 4.4 BSA、CHP ナノゲル、BSA+CHP ナノゲルの (a)散乱強度の時間相関関数と (b)粒径分布関数

図 4.4(b)に示されるように、CHP ナノゲル+BSA のピーク位置は CHP ナノゲル自身のピーク位置とほとんど重なった($R_h = 14 \text{ nm}$)。この結果より、CHP ナノゲルと BSA の相互作用（加熱、24 時間の静置）によって大きな構造変化は起きていないことが示唆される。

これらの実験データからは 2 通りの解釈が可能である。1 つは CHP ナノゲルによる取り込みが起こっていないということ。もう一つは取り込みが起こったものの、変化が DLS か SANS 測定で検出することはできなかったというものである。

後述する理由から、後者の方が妥当であると考えられる。第一に CHP ナノゲルによる BSA の取り込みを支持する結果が HPSEC や円二色性スペクトルなど他の手法によって報告されていること[50] [38] [51]、第二に、取り込みが起こったとしても散乱強度が大きく変わらないためである。例えばナノゲル内部は多量の水(CHP で重量百分率約 93%，CHCDex で約 90%)で満たされている。また大きさにおいて CHP ナノゲルの R_h (流体力学的半径(14 nm)は BSA よりも 3.6 倍大きく、結果的に散乱強度のほとんどの寄与は水と CHP ナノゲルからのものとなってしまうことが考えられる。ここで体積変化を下に示す。

これまでの散乱で得られた結果を用いると、

$$V_{\text{CHP}} = \frac{4\pi R_h^3}{3} = 1.14 \times 10^{-17} \text{ cm}^3, V_{\text{BSA}} = \frac{4\pi a^2 b}{3} = 0.756 \times 10^{-19} \text{ cm}^3$$

より、CHP ナノゲルの BSA 取り込みによる体積変化は

$$\begin{aligned} \frac{V_{\text{After}}}{V_{\text{Before}}} &= \frac{V_{\text{CHP}} + V_{\text{BSA}}}{V_{\text{CHP}}} \\ &\approx \frac{1.14 \times 10^{-17} \text{ cm}^3 + 0.756 \times 10^{-19} \text{ cm}^3}{1.14 \times 10^{-17} \text{ cm}^3} \approx 1 \end{aligned}$$

となり、ほぼ変化しない。

以上のことから、BSA の寄与は小さく、取り込みによって散乱強度が変化しない可能性は高い。

	CHP ナノゲル	CHCDex ナノゲル	BSA
R_h (流体力学的半径)	14 nm	9.5 nm	3.9 nm
V(体積)	$1.14 \times 10^{-17} \text{ cm}^3$	$0.358 \times 10^{-17} \text{ cm}^3$	$0.756 \times 10^{-19} \text{ cm}^3$
M_w	448,000	817,000	64,000

表 4.1 ナノゲルと BSA

4.3.4 ナノゲル+卵白の測定 (DLS 測定)

図 4.1において、巨視的に変化の見られたナノゲルと卵白の系(写真で説明済み)を、様々に条件を変え DLS 測定を行った。具体的には図 4.1(写真)での卵白濃度(PBS にて 300 倍に希釈)を変え、40~4000 倍希釈の範囲で DLS 実験を行った。

4.3.3.1 卵白中のタンパク質の平均分子量について

卵白は水分と、次に示すように様々なタンパクの混合物である。下に、卵白中に存在する主なタンパク質について示した。含有量が卵白中 3%を越えるもののみ挙げてある[52] [53]。

	Amount (%)	M.W.
Ovalbumin	54	45,000
Ovotransferrin	12	77,000
Ovomucoid	11	49,000
G2Globulin	4	28,000
G3Globulin	4	28,000
Ovomucin	3.5	180,000-720,000
Lysozyme	3.4	14,300

表 4.2 卵白(鶏卵)中の主な構成タンパク(含有量 3%以上)

水分を除いた卵白中のタンパク質の平均分子量は、各構成タンパク質の分子量と存在分率との積をとり、それらの総和とすると、

$$45,000 \text{ g/mol} \times 0.54 + 77,000 \text{ g/mol} \times 0.12 + 49,000 \text{ g/mol} \times 0.11 + 28,000 \text{ g/mol} \times 0.04 \times 2 + \\ 450,000 \text{ g/mol} \times 0.032 + 14,300 \text{ g/mol} \times 0.034$$

より、57,000 g/molと求められた。(Ovomucin の分子量は 180,000 と 720,000 の中間値 450,000 とした)

以後この値を『卵白(鶏卵)の分子量』として扱うこととする。

4.3.3.2 卵白中のタンパク質のモル濃度について(200倍希釈の場合)

卵白原液 1.70 mL を採取、秤量したところ質量は 1.92g であった。また卵白(鶏卵)の組成は一般に約 88%が水で約 10%がタンパク質であること、さらにこれを PBS(リン酸緩衝溶液)で 200 倍希釈したことより、タンパク質濃度はおよそ

$$\frac{1.92 \text{ g}}{1.70 \text{ mL}} \times 0.100 \div 200 = 0.565 \text{ mg/mL}$$

となり、卵白中のタンパク質の平均分子量を 57,000 g/mol とすれば、タンパク質のモル濃度は

$$0.565 \text{ mg/mL} \div 57000 \text{ g/mol} = 9.91 \text{ mmol/l}$$

となる。

他方、CHP ナノゲル(0.500 mg/mL)のモル濃度は、

$$0.500 \text{ mg/mL} \div 4.48 \times 10^6 \text{ g/mol} = 1.12 \text{ mmol/l}$$

となる。よってこの時の量論比(卵白中のタンパク)/ナノゲルは = 9.91/1.12 ~ 9 と求められる。

● 実験

加熱する際は 75°C で 5 分加熱し、室温(25°C)に戻してから測定を行った。図 4.5 に卵白(加熱なし)、CHP ナノゲル+卵白(加熱)、CHP ナノゲル(加熱)の粒径分布関数を示す(卵白はリン酸緩衝溶液で 350 倍に希釈した)。

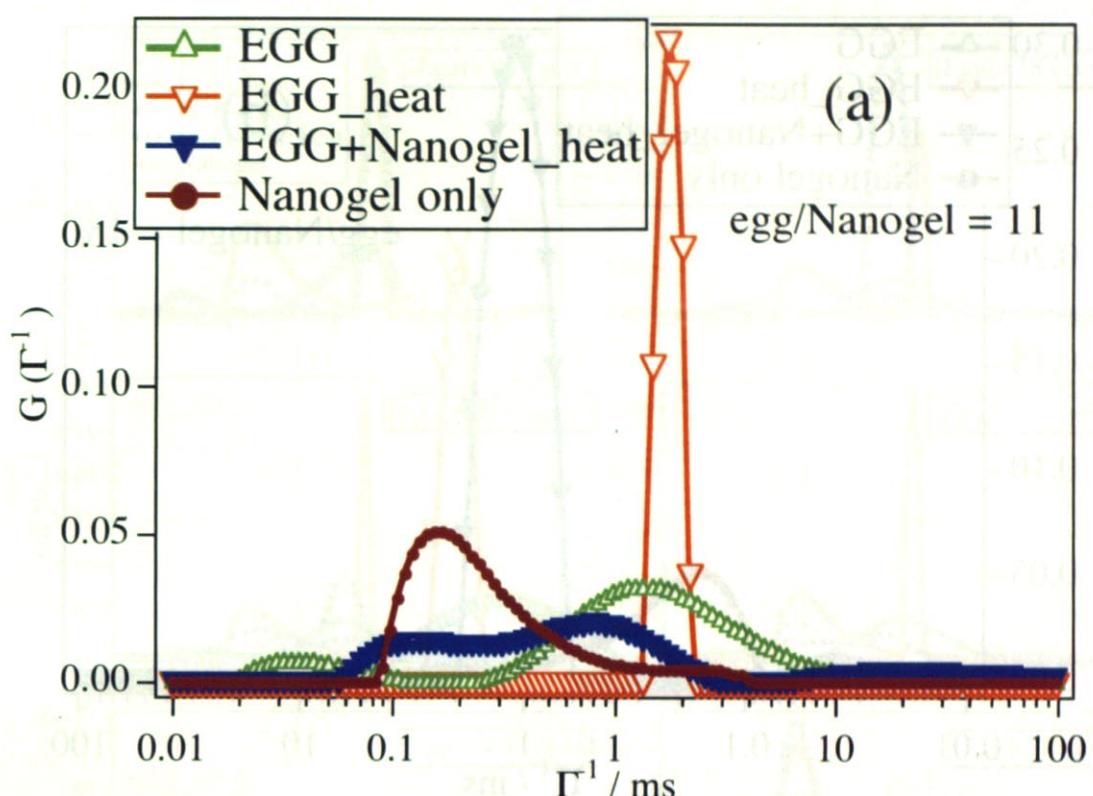


図 4.5 卵白 (室温△ or 加熱▽)、卵白+CHP ナノゲル (加熱▼)、CHP ナノゲル (加熱●) の粒径分布関数。横軸は緩和時間。卵白中のタンパクとナノゲルのモル比は卵白がナノゲルの約 11 倍 ($[タンパク] = 11.2 \mu\text{M}$, $[ナノゲル] = 1.12 \mu\text{M}$ 。算出方法は 4.3.3.1 および 4.3.3.2 を参照)

この濃度において、4つのサンプルの試験管はどれもほぼ透明で見た目に大きな差はない。しかし、図 4.5 の DLS 結果を見ると違いは明確である。まず、卵白を室温において測定したところ、上図 (△) のようなプロードな分布関数となった。75°Cで 5 分間加熱し、室温にしてから測定したところ、緩和の遅い領域に大きなピーク ($R_h = 145 \text{ nm}$) が現れた (▽)。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る。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 (▼, $R_h = 14 \text{ nm}$)。この結果から、CHP ナノゲルの存在が卵白(タンパク)の熱変性による凝集を妨げていることがわかる。また、ナノゲルに対する卵白の濃度を何点か変えて測定したところ、上で述べたような、卵白の凝集が抑えられる傾向は、卵白の濃度がナノゲルに対しある一定量 (卵白中のタンパク / CHP ナノゲル = 11) までしか見られなかった。すなわち、ナノゲルのシャペロン機能が働くのは卵白濃度がナノゲルに対しおよそ 11 当量までであり、これよりも卵白の濃度が高いと、図 4.6 のように巨大なピークが現れてしまう。(図 4.6 では卵白をリン酸緩衝溶液で 200 倍に希釈している)。

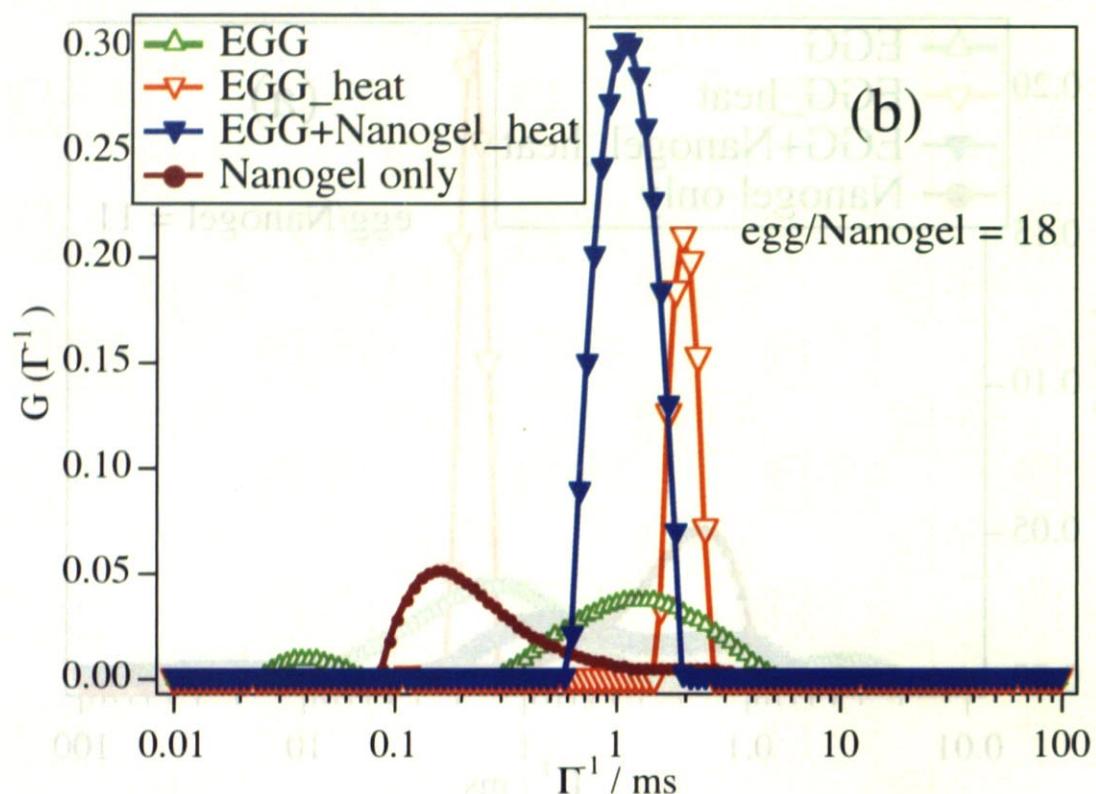


図 4.6 卵白（室温△ or 加熱▽）、卵白+CHP ナノゲル（加熱▼）、CHP ナノゲル（加熱●）の粒径分布関数。横軸は緩和時間。卵白中のタンパクとナノゲルのモル比は卵白がナノゲルに対し約 18 倍。([タンパク] = 19.8 μM, [ナノゲル] = 1.12 μM。算出方法は※1, 2 を参照)

次に、卵白の濃度をナノゲルに対し 1 ~ 90 当量まで変えて測った時の結果を図 4.7 に示す。

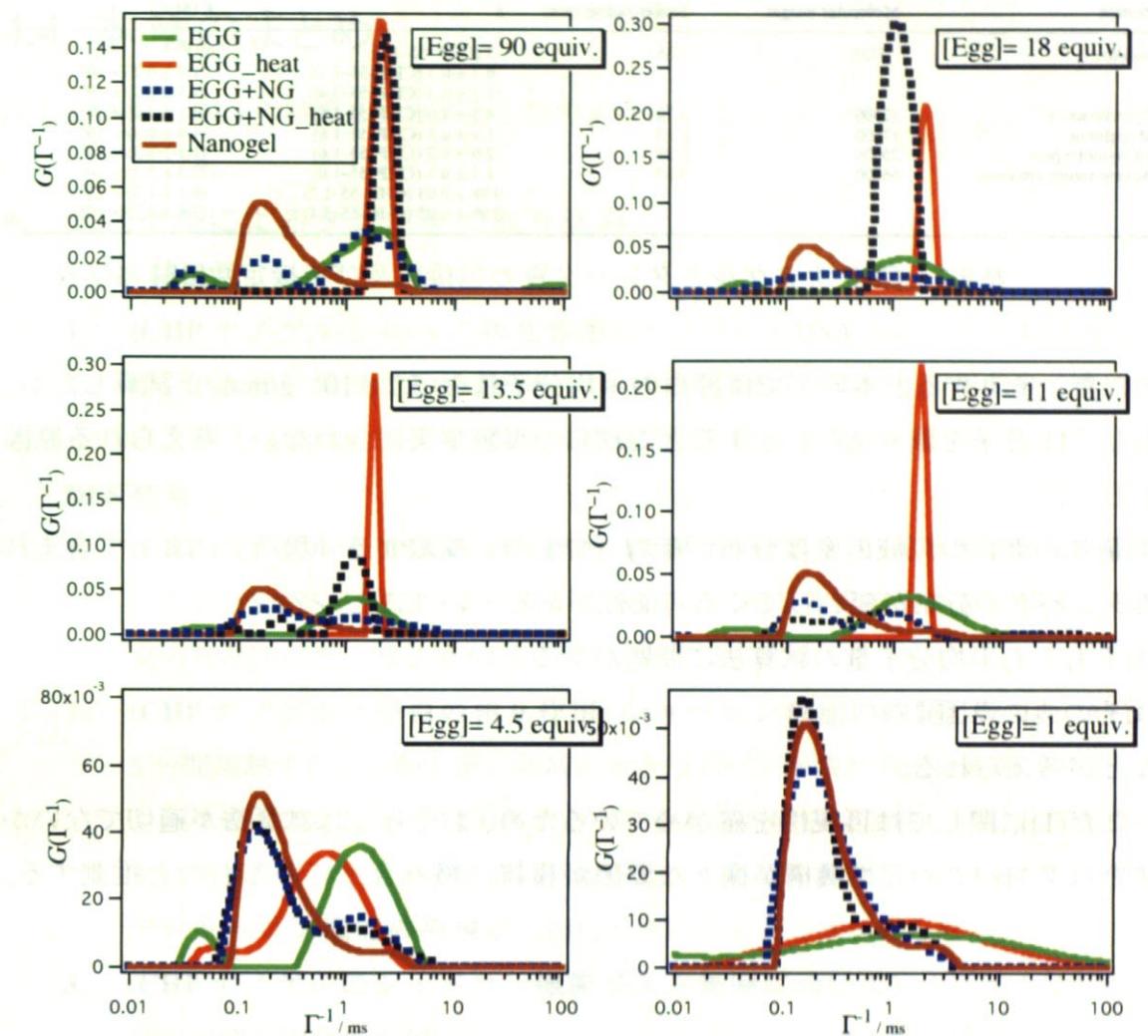


図 4.7 卵白（室温）、卵白（加熱）、卵白+CHP ナノゲル（室温）、卵白+CHP ナノゲル（加熱）の粒径分布関数。卵白の濃度をナノゲルに対し 1~90 当量まで変化させた。

この結果から、卵白はナノゲルに対し 1~11 当量までの範囲では加熱しても凝集体のピークは現れないが、13.5~90 当量では加熱によって凝集体（赤）が生成していることが考えられる。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る。また、この傾向は「ナノゲルは、タンパクによって取り込む事の出来る数が決まっている」という文献の記述とも矛盾しない[38]。過去の報告によると、CHP ナノゲルは分子量が小さいものほど、数多く内部に取り込むようである。例えば分子量 5.7×10^3 g/mol のインスリンでは 5~11 分子、分子量 2.5×10^4 g/mol のキモトリプシンでは 2 分子、分子量 6.4×10^4 g/mol の BSA では 1 分子といった具合である（表 4.2）。

Protein	Molecular weight	Stokes radius (nm)	<i>n</i>	<i>K</i> (M ⁻¹)
Insulin	5735	1.36	5 (CHP-55-1.0) 9.3 ± 0.3 (CHP-55-1.7) 11.3 ± 0.3 (CHP-55-3.4)	ND ^a (1.8 ± 0.2) × 10 ⁶ (1.5 ± 0.1) × 10 ⁶
Cytochrome c	12400	1.70	4.3 ± 1.0 (CHP-55-1.6)	(8.1 ± 3.0) × 10 ⁵
Myoglobin	17800	2.13	1.9 ± 0.3 (CHP-55-1.6)	(1.9 ± 0.8) × 10 ⁵
α -Chymotrypsin	25000	2.39	2.0 ± 0.2 (CHP-55-1.6)	(1.9 ± 0.3) × 10 ⁵
Bovine serum albumin	66000	3.35	1.1 ± 0.1 (CHP-55-1.0) 0.98 ± 0.03 (CHP-55-1.7) 0.98 ± 0.02 (CHP-55-3.4)	(22.3 ± 3.2) × 10 ⁶ (8.1 ± 1.3) × 10 ⁶ (2.6 ± 0.2) × 10 ⁶

表 4.2 CHP ナノゲルとタンパク質の包接数及び包接定数[38]

ただ、そうすると本研究では卵白の平均分子量を 5.7×10^4 g/mol と試算したが、もし「11 分子を取り込む」とするとこれらの実験事実に合わない。考えられる原因としては

- (1)最初の卵白の原液の密度分布が不均一であり、採取する「場所」によって含まれるタンパクの分布が変わってくる可能性があるということ
 - (2)そもそも平均分子量の試算法に問題があるということ
 - (3)その他の原因
- などが考えられる。

ただ(1)に関しては再現性を確かめているため、おそらくは試算法が適切でないか、またはタンパクの変性機構が様々な要因が複雑に絡み合っているものと推測する。

4.4 本章のまとめ

以上 SANS と DLS の結果をまとめると次のようになる。

- ナノゲルによるタンパクの取り込み

SANS 結果

1. (CHP ナノゲルと BSA の相互作用) ナノゲルと BSA の相互作用を評価したが、BSA の散乱強度が弱いため、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。

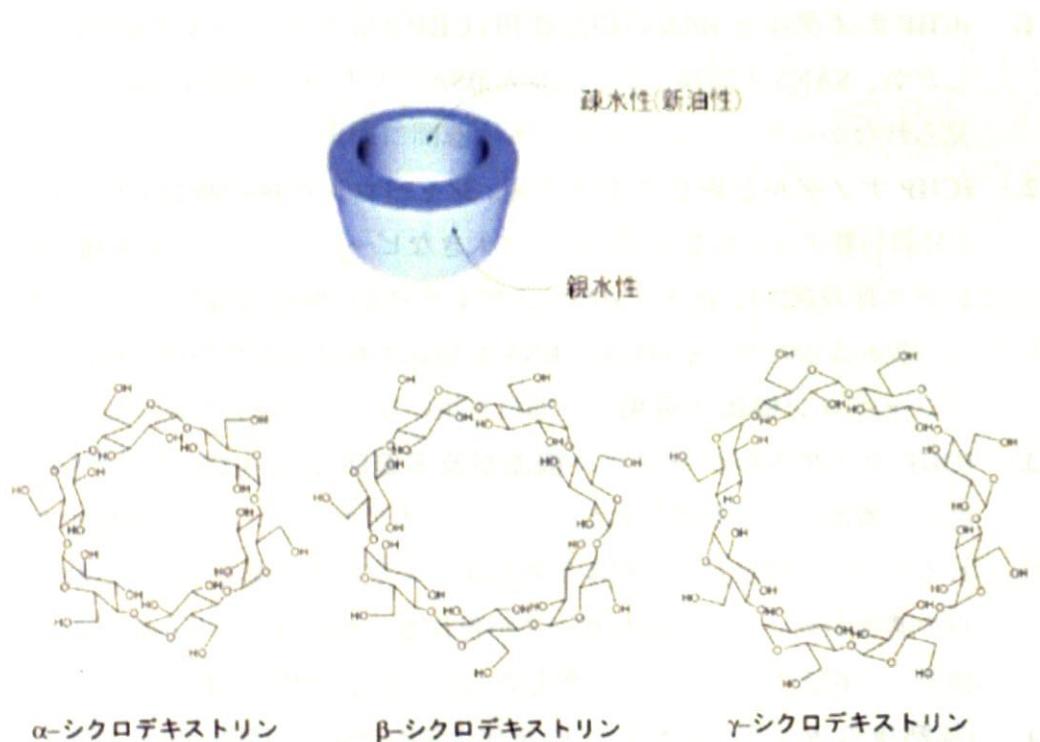
DLS 結果

1. (CHP ナノゲルと BSA の相互作用) CHP ナノゲルと BSA の相互作用を評価したが、SANS と同様、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。
2. (CHP ナノゲルと卵白の相互作用: シャペロン機能の確認) 卵白を 75°C で 5 分間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を確かめた(タンパク質の変性)。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。そのため、BSA を用いても見られなかった CHP ナノゲルのシャペロン機能の発現が、卵白を用いることで確かめられた。
3. (CHP ナノゲルのシャペロン機能が及ぶ範囲について) ナノゲルに対する卵白の濃度依存性を測定したところ、ナノゲルがタンパクを捕捉すると思われるに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、巨大なピークが現れる。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る。
4. (加熱後の R_h) 卵白加熱後の R_h (流体力学的半径)は 170~180nm であった。他方、卵白 + CHP ナノゲル(卵白が 11 当量未満)を加熱したものは 14nm となり、ナノゲルの R_h とほぼ同一であった。

第5章 シクロデキストリンによる ナノゲルの崩壊

5.1 概要

シクロデキストリンはグルコース分子が α -1,4グリコシド結合で結合した環状分子であり、図5.1のようなバケツの底が抜けたような構造をしている。グルコース分子が6個環状に結合したものが α -シクロデキストリン、7個および8個が環状に結合したものを β -および γ -シクロデキストリンと呼んでいる。



以下にシクロデキストリンの基本的な物理的性質を示す[54]。

5. シクロデキストリンの物理的性質と包接化合物の形成

Cyclodextrin	No. of glucose	Molecular weight	Cavity diameter(nm)	Water solubility (g/100mL at 25°C)
α -シクロデキストリン	6	972	~4.5	14.5
β -シクロデキストリン	7	1135	~7.0	1.85
γ -シクロデキストリン	8	1297	~8.5	23.2

表5.1 シクロデキストリンの物理的性質

包接化合物の形成

シクロデキストリンの最も重要な特性の一つに、空洞に包接化合物を形成するという特性がある。シクロデキストリンのヒドロキシ基は全て空孔の外側に向いているため、環の外部は親水性で内部は疎水性という性質を持つ。このような性質から、シクロデキストリンは疎水性の化合物を空洞内部に取り込む事ができる。特に、グルコース分子が7つ繋がった β -シクロデキストリンは、コレステロールやコール酸などのステロイド骨格を持つ化合物と包接錯体を形成することが知られている[55-58]。

近年、秋吉らは β -シクロデキストリンの水酸基を疎水化したMethyl- β -シクロデキストリン（以下CDと略す）が、水中でコレステリル基を側鎖として導入したプルラン(CHP)の会合を解離させることを報告した。それによれば、CHPナノゲルにCDを添加すると、疎水基がCDにより包接されて疎水基の会合が解け、架橋点が崩壊してナノゲルが解離する。つまり、疎水基の会合領域を架橋点とするナノゲルは、CDとのホスト-ゲスト相互作用を利用して会合が制御される[12, 14]。

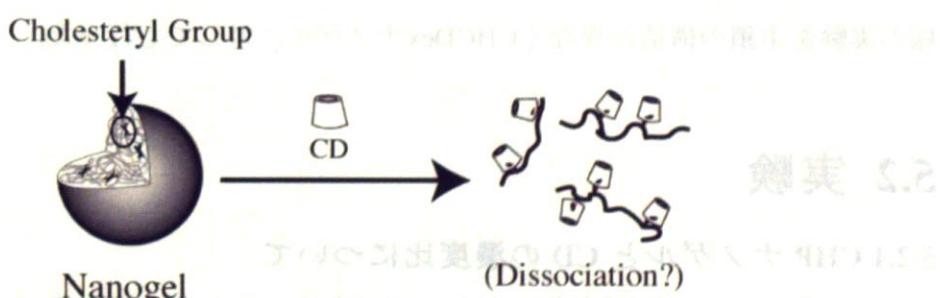


図5.2 CHPナノゲルとCDとの相互作用[12]

秋吉らはCHPナノゲルとCDとの相互作用をHPSEC(High Performance Size Exclusion Chromatography)によって評価している。結果を図5.3に示す。その結果によると、まず、CHPナノゲル単独ではシングルピークを示す(図5.3a)。次にCHPナノゲル溶液(2μM)と

CD溶液(10 mM)を混合すると、CHPナノゲルのピークは減少する(図5.3b)。しかしCHPナノゲルとCDからなる錯体に起因するピークが観測されなかつたため(カラムへのCHP-CD錯体の吸着が原因と思われる)、吸着を避ける目的で50 mMのTris-sulfateバッファを溶離液として用いCD溶液(10 mM)と共に流したところ、ブロードなピークが現れた(図5.3c)。このピークはプルランのピーク(図5.3d)と似ているため、この結果はCHPナノゲルがCDによって崩壊したことを示唆している[12]。

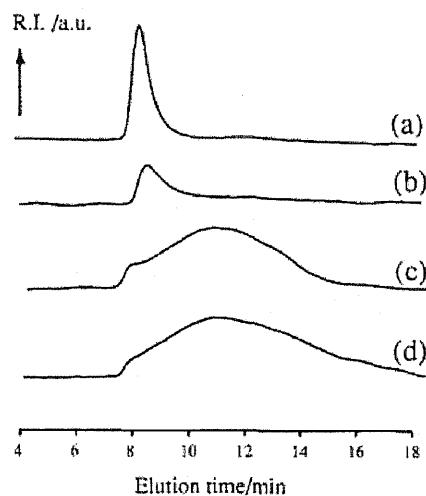


図5.3 CHPナノゲル+CDのHPSEC結果[12]

(a) CHPナノゲル, (b) 2 μ M CHPナノゲル+10 mM CD, (c) 2 μ M CHPナノゲル+10 mM CD, (b) の状態にTris-sulfateバッファを溶離液として流した (d) 疎水基を持たないプルラン

本研究ではこれらの現象を *in situ*、かつナノスケールで精密に観測するため、CHPナノゲルとCDとの相互作用をDLSおよびSANSにより測定した。また、CHPナノゲルと同様の実験を主鎖の構造が異なるCHC�exナノゲルに対しても行った。

5.2 実験

5.2.1 CHP ナノゲルと CD の濃度比について

CDは“CHPナノゲル全体”に対してではなく、その中の疏水基(コレステリル基)との間で相互作用するので、CDの濃度はCHPナノゲル中に存在する疏水基に対する割合として考える方が解釈しやすい。またCD自体の散乱強度はCHPナノゲルに対し非常に弱く、濃度による変化が小さい。そのため、以下本論文でもCDの濃度は「CHPナノゲル中に存在する疏水基の割合に対して〇当量」と示すことにする。

5.2.2 CHP ナノゲル中の疎水基の割合について

CHPナノゲルは、疎水化多糖CHP(コレステロール置換プルラン)の会合体である。CHPの分子構造は図5.4に示す構造、つまりグルコース($C_6H_{12}O_6$)からなる親水性多糖(プルラン:青い部分)の一部を疎水基のコレステリル基(赤い部分)で一部置換した構造をしている(プルランに対するコレステリル基の導入率は、グルコース100分子あたり1.4個)。

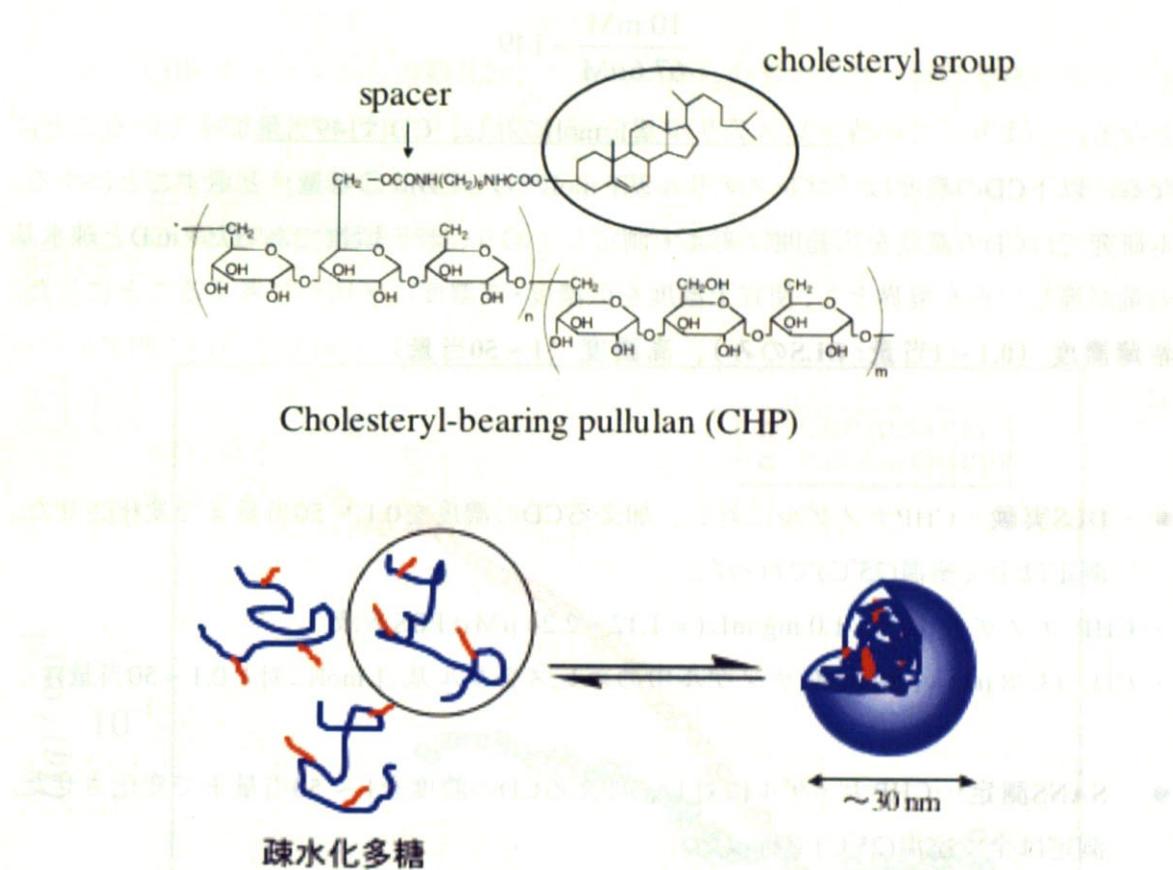


図 5.4 疎水化多糖 (CHP: コレステロール置換プルラン) の構造と自己組織化ナノゲルの生成

ここでCHPナノゲル1mol中に含まれる疎水基(コレステリル基)の割合について考える。CHPナノゲル、グルコース、コレステロール($C_{27}H_{46}O$)の分子量はそれぞれ 4.48×10^5 g/mol、180 g/mol、324 g/mol で、CHP中のコレステロールの導入率はグルコース100分子に付き1.4個であるから、CHPの繰り返し単位の分子量(=グルコースの分子量+平均化された疎水基の分子量)は $180 \times 100 + 324 \times 1.4 = 185$ g/molである。つまりCHPナノゲル1つの中に存在する繰り返し単位の数は $(4.48 \times 10^5 \div 185) \approx 2420$ 個、よってCHPナノゲル1個中に存在する疎水基の個数は

$$2420 \times \frac{1.4}{100} \approx 33.8\text{個}$$

となる。

以上により、例えば上の文献の「CHPナノゲルの濃度2μM」とは、コレステリル基濃度に換算すると $2\mu\text{M} \times 33.8 = 67.6\mu\text{M}$ と求められ、それに対するCDの濃度が10 mMであるから、この時疎水基（コレステリル基）1molに対するCDの割合は

$$\frac{10\text{ mM}}{67.6\mu\text{M}} \approx 149$$

となる。つまり、この時コレステリル基1 molに対し、CDは149当量加えていることになる。以下CDの濃度は「コレステリル基1 molに対しCDは○当量」と示すことにする。本研究ではCDの濃度を広範囲に変えて測定しており、若干煩雑であるためCDと疎水基の量が等しい点を境界とし、便宜上濃度を低濃度・高濃度に区切って考えることにした。**希薄濃度（0.1～1当量:DLSのみ）、高濃度（1～50当量）** の両方について測定を行った。

- **DLS実験**…CHPナノゲルに対し、加えるCDの濃度を0.1～50当量まで変化させた。
 - 測定は全て室温(25°C)で行った。
 - CHP ナノゲル (0.5～1.0 mg/mL (= 1.12～2.24 μM)) PBS溶液
 - CD (3.78 μM～1.80 mM (ナノゲル中のコレステリル基 1 molに対し0.1～50当量))

- **SANS測定**…CHPナノゲルに対し、加えるCDの濃度を1～50当量まで変化させた。
 - 測定は全て室温(25°C)で行った。
 - CHPナノゲル (5～20 mg/mL (= 11.2～44.8 μM)) PBS溶液 (D₂O溶媒)
 - CHCDEXナノゲル (5～20 mg/mL (= 6.12～24.4 μM)) PBS溶液 (D₂O溶媒)
 - CD (3.78 μM～18.9 mM (ナノゲル中のコレステリル基 1 molに対し1～50当量))

5.3 結果と考察

5.3.1 SANS 測定 (CHP ナノゲル)

まず初めに、CHP ナノゲルとプルランのそれぞれの小角中性子散乱結果を図 5.5 に示す。CHP ナノゲル、及びプルランのキャラクタリゼーションは 3 章にて行ったため、ここでは散乱曲線のみ記した。3 章の SANS 結果より分かっていることは次の通り。

- CHP ナノゲルからの散乱は、プルランからのものよりも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。
- 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)7 nm 程度の会合体を形成していることが分かった。

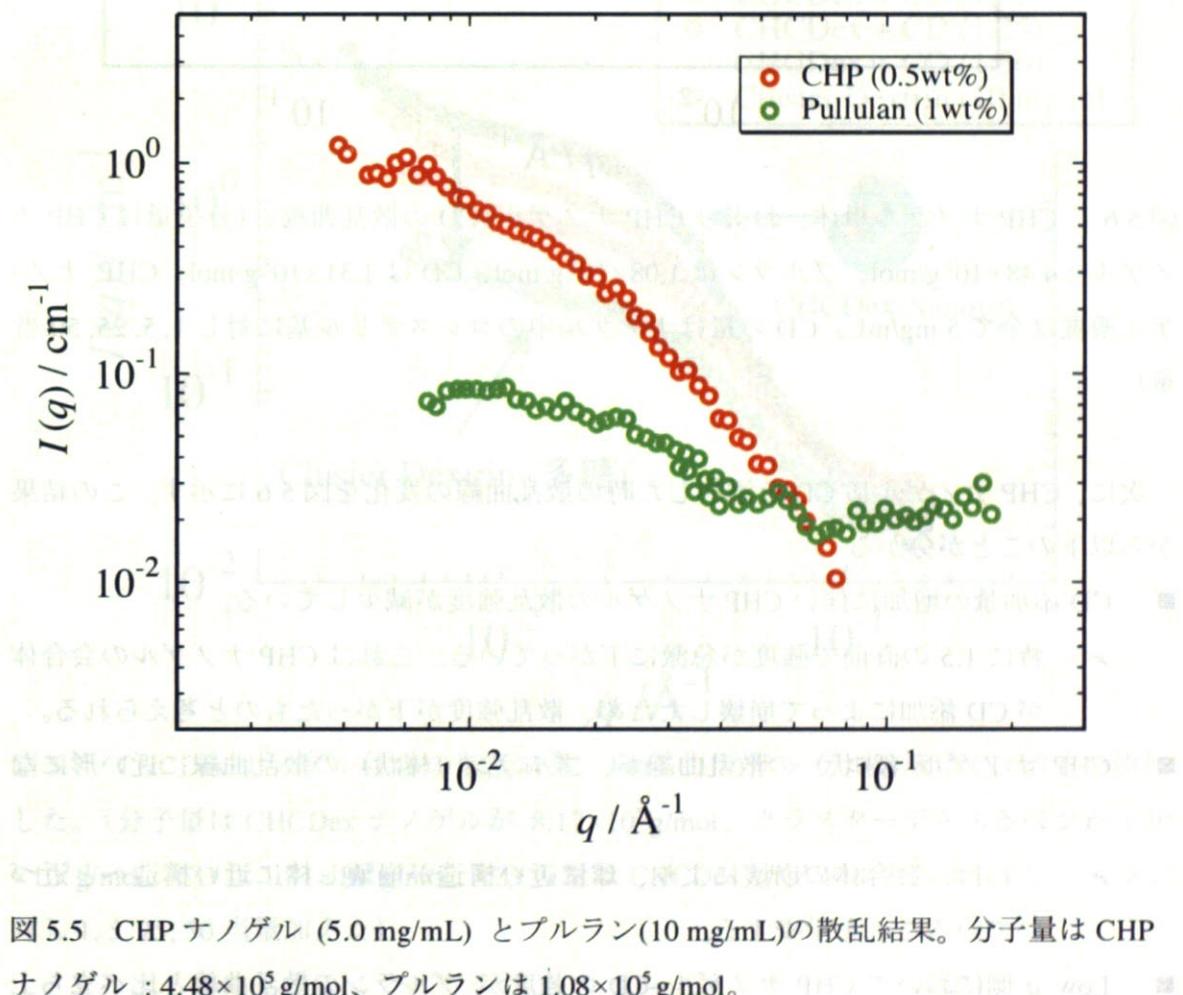


図 5.5 CHP ナノゲル (5.0 mg/mL) とプルラン (10 mg/mL) の散乱結果。分子量は CHP ナノゲル : $4.48 \times 10^5 \text{ g/mol}$ 、プルランは $1.08 \times 10^5 \text{ g/mol}$ 。
この結果も CHP を同様、CD 添加量を増加させた場合の結果と一致してい

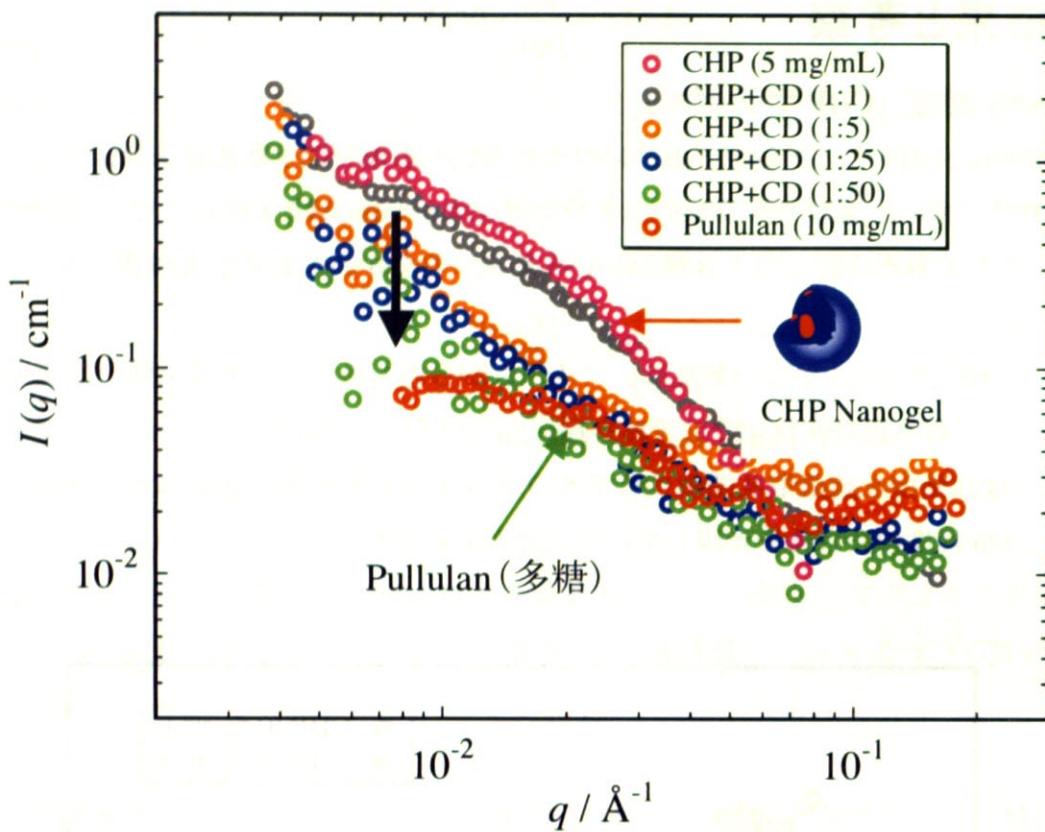


図 5.6 CHP ナノゲル単体、および CHP ナノゲル+CD の散乱曲線。(分子量は CHP ナノゲル : 4.48×10^5 g/mol、プルランは 1.08×10^5 g/mol、CD は 1.31×10^3 g/mol。CHP ナノゲル濃度は全て 5 mg/mL、CD の量はナノゲル中のコレステリル基に対し 1, 5, 25, 50 当量)

次に、CHP ナノゲルに CD を添加した時の散乱曲線の変化を図 5.6 に示す。この結果から以下のことが分かる：

- CD 添加量の増加に伴い CHP ナノゲルの散乱強度が減少している。
 - 特に 1:5 の直前で強度が急激に下がっている。これは CHP ナノゲルの会合体が CD 添加によって崩壊したため、散乱強度が下がったものと考えられる。
- CHP ナノゲル（球状）の散乱曲線が、プルラン（棒状）の散乱曲線に近い形になっている。
 - これは、会合体の崩壊により、球に近い構造が崩壊し棒に近い構造へと近づいていることを示唆する。
- Low q 側において CHP ナノゲル+CD の強度が プルランの散乱曲線と比べ立ち上がっている。
 - これは、CD 添加によってゲル構造が崩壊しつつあるものの、ゲル同士の凝集

構造が出現したことを示唆する。(Low q での立ち上がりは大きい構造(数十~100 nm)に対応するため) 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、この傾向は見られた。また、ナノゲル(○)よりも Low q の領域 (大きい構造) に立ち上がりが見られるが、これは CHP よりも大きな構造の生成が考えられる。この詳細については 5.3.3 の DLS 測定にて議論する。

5.3.2 CHCDex ナノゲル

次に、糖鎖の構造が CHP と異なる CHCDex を用いた。CHCDex ナノゲルに CD を加えた結果を示す。図 5.7 は CHCDex ナノゲル+CD、及び疎水基なしの糖鎖クラスター δ キストリンの SANS 結果である。

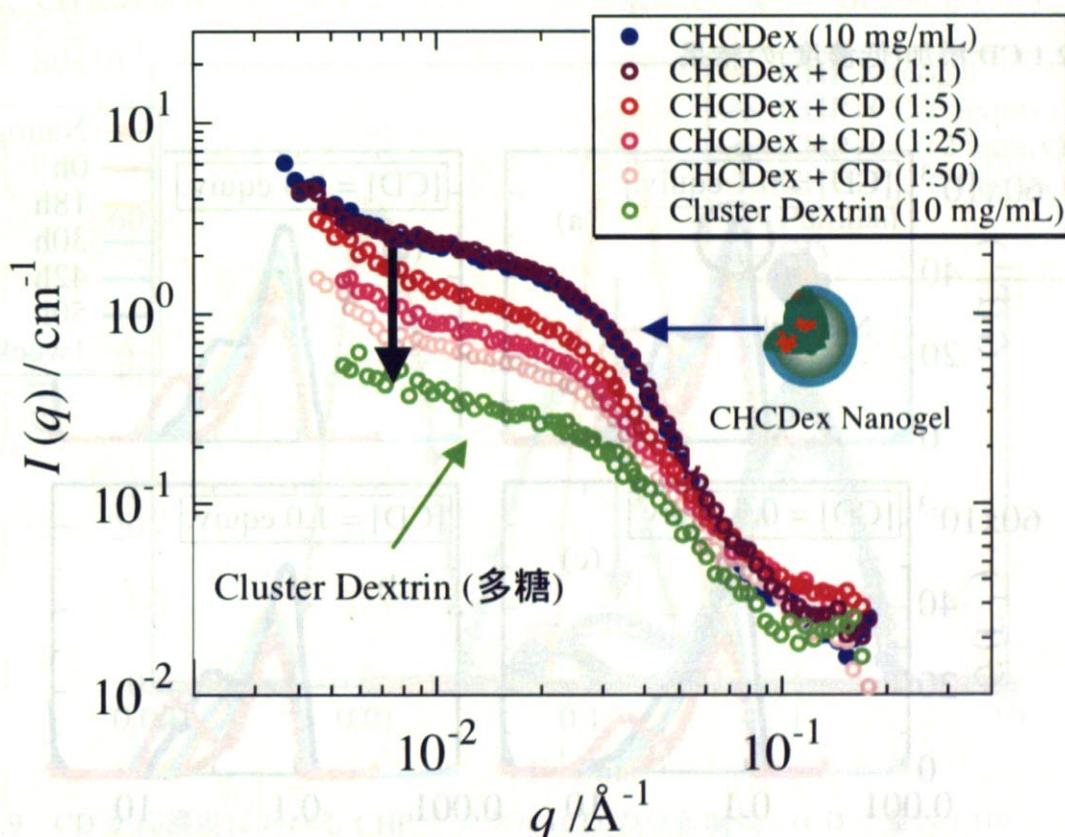


図 5.7 CHCDex ナノゲル+CD の散乱結果。1wt%CHP ナノゲル溶液に CD 溶液を添加した。(分子量は CHCDex ナノゲルが $8.17 \times 10^5 \text{ g/mol}$ 、クラスター δ キストリンが $1.40 \times 10^5 \text{ g/mol}$ 、CD は $1.31 \times 10^3 \text{ g/mol}$) CD の量は CHCDex ナノゲル中のコレステリル基に対し 1, 5, 25, 50 当量加えた)

この結果も CHP と同様、CD 添加量の増加に伴い連続的に散乱強度が下がっており、ナノゲルが崩壊したことを示唆している。ただ、1:1 ではほとんど変化は見られないこ

とや、1:50 でも強度がクラスターデキストリン(糖鎖)に近い強度まで落ちきっていない事から、CHP ナノゲルと比較して CHP ナノゲルはより崩壊しにくいものと考えられる。また、Low q 側において CHP+CD の強度がクラスターデキストリンに比べ立ち上がりを保っているのも、CHP と同様である。

5.3.3 DLS ,SLS 測定

次に、CHP ナノゲルと CD の相互作用を光散乱を用いて調べた結果を示す。秋吉らは CD を CHP ナノゲル中のコレステリル基に対し大過剰 (~ 25 当量) 加えているが[14]、本実験においては、まず CHP ナノゲル中のコレステリル基に対し少量の CD を添加しその経時変化を確かめることにした。

5.3.2.1 CD 添加(低濃度)の結果

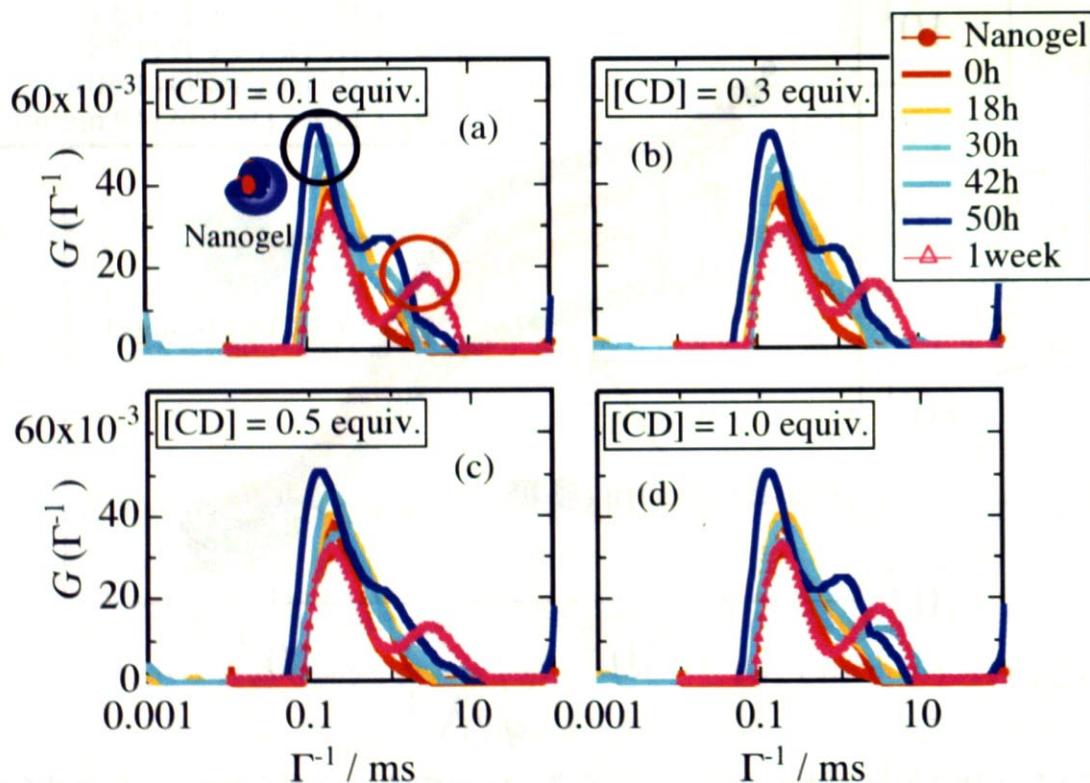


図 5.8 低濃度における CHP ナノゲル+CD の分布関数。(CHP ナノゲル中のコレステリル基 1 モルに対する CD の量は 0.1 当量(a), 0.3 当量(b), 0.5 当量(c), 1.0 当量(d))

例えば図 5.8(a)は、CD をナノゲル中のコレステリル基 1 モルに対し 0.1 当量加え、経時変化を示したものである。(b), (c), (d)は加えた CD のモル数のみが異なり、それぞれ 0.3, 0.5, 1.0 当量を加えている。図 5.8(a)に着目すると、黒丸で示した背の高いピークが

CHP ナノゲル由来のピーク($R_h = 14 \text{ nm}$)である。このピークが経時変化によって徐々に減少し、50 時間を越える辺りから大きい構造に由来するピークが右側に現れるようになる。1 週間経つと、ピンク▲で示すピークとなる。(このピークは流体力学的半径 $R_h \sim 250 \text{ nm}$ に相当する) これらの結果から、

CD の添加後 1 週間経つと

- ・ 低濃度(0.1 当量)でも CHP ナノゲルの崩壊は起こっている
- ・ 二次ピークの緩和に相当する構造は、巨大な構造 ($R_h \sim 250 \text{ nm}$) であることがわかる。

5.3.2.2 CD 添加(高濃度)の結果

次に、CD をコレステリル基 1 モルに対し 5~50 当量加えた場合の DLS 結果を示す。

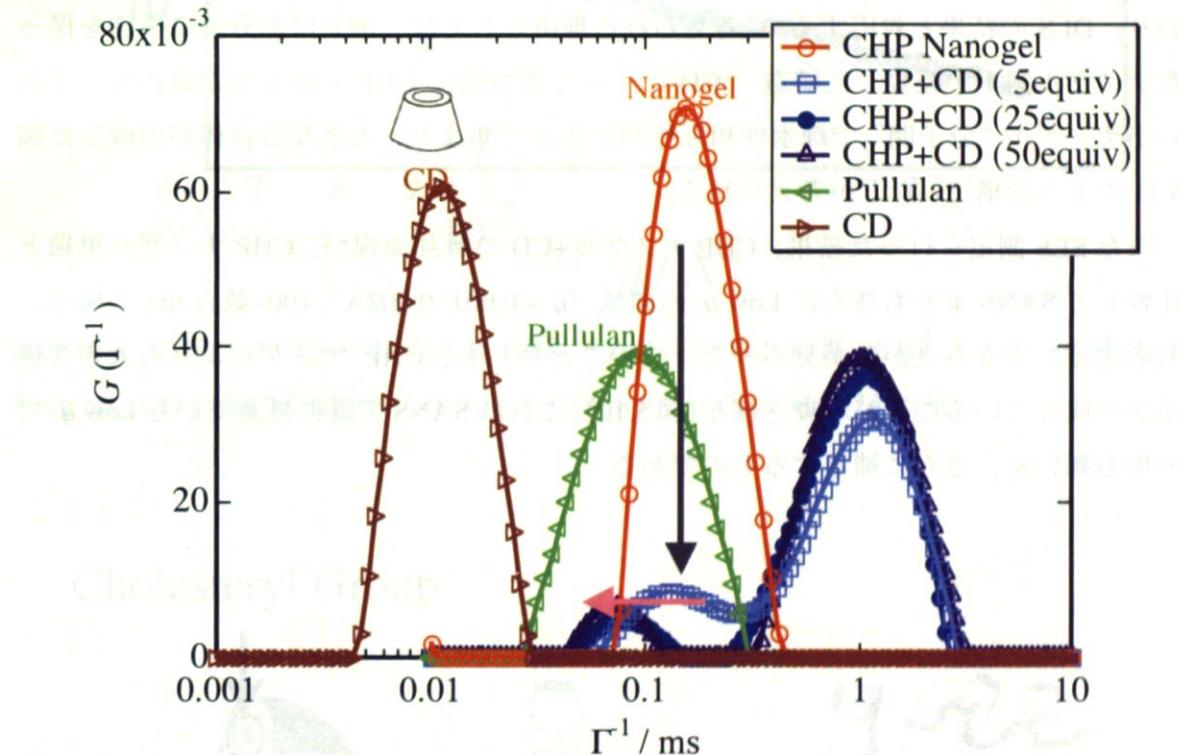


図 5.9 CD が高濃度における CHP ナノゲル+CD の分布関数。(CD の量は CHP ナノゲル中のコレステリル基に対し 5, 25, 50 当量。それぞれのピークに対応する R_h は、CD が 0.95 nm, プルランが 8.2 nm, CHP ナノゲルが 14 nm, CD 添加後に現れたピークがおよそ 100 nm)

高濃度において変化は速やかに進行し(数分程度)、経時変化はほぼ見られなかった。この結果から、CD の添加量が増大するにつれ、

1. CHP ナノゲルのピークが減少し、同時に遅いレンジにピークが出現している

2. CHPナノゲルの元あったピーク位置が徐々に左ヘシフト (\leftarrow) している事が分かる（これらの変化は速やかに進行し、時間変化は少ない）。

1.について

ピークの減少より、ナノゲルの会合構造はCD添加によって（部分的に）崩壊したと考えられる。また新たに現れた右側のピークは、低濃度の時と同様、CD添加によって何らかの大きな構造 ($R_h \sim 100\text{ nm}$) が形成されたことを意味する。CD添加後のCHPナノゲルの構造は、過去の文献によると図5.11のように親水性多糖（フルラン）に近いものと考えられていたようであるが[12]、DLS結果からはフルラン($R_h = 8.2\text{ nm}$)とも、ナノゲル ($R_h = 14\text{ nm}$)とも全く異なる大きさの広がりを持つ構造も生成していることが示唆される。（図5.6のSANS結果でもLow q 側において強度の立ち上がりが見えており、DLSの結果と対応する。）考えられる理由としては、例えば部分的に構造を保ったナノゲル同士が凝集した構造 - CDによって部分的にCHP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集まり、大きな会合体が形成した図5.11のような構造-などが考えられる。

またSLS測定を行った結果、CHPナノゲル+CDの散乱曲線が、CHPナノゲル単独と比較してSANSよりもさらにLow q の領域 ($q = 0.001\text{--}0.002\text{\AA}^{-1}$, 100~数百nmの構造に対応する) で立ち上がりが見られた。このことからも、CHPナノゲルよりも大きな構造が生成していることが示唆される（図5.10）。これはSANSで既に見ているLow q での振る舞いを、さらに補足するものである。

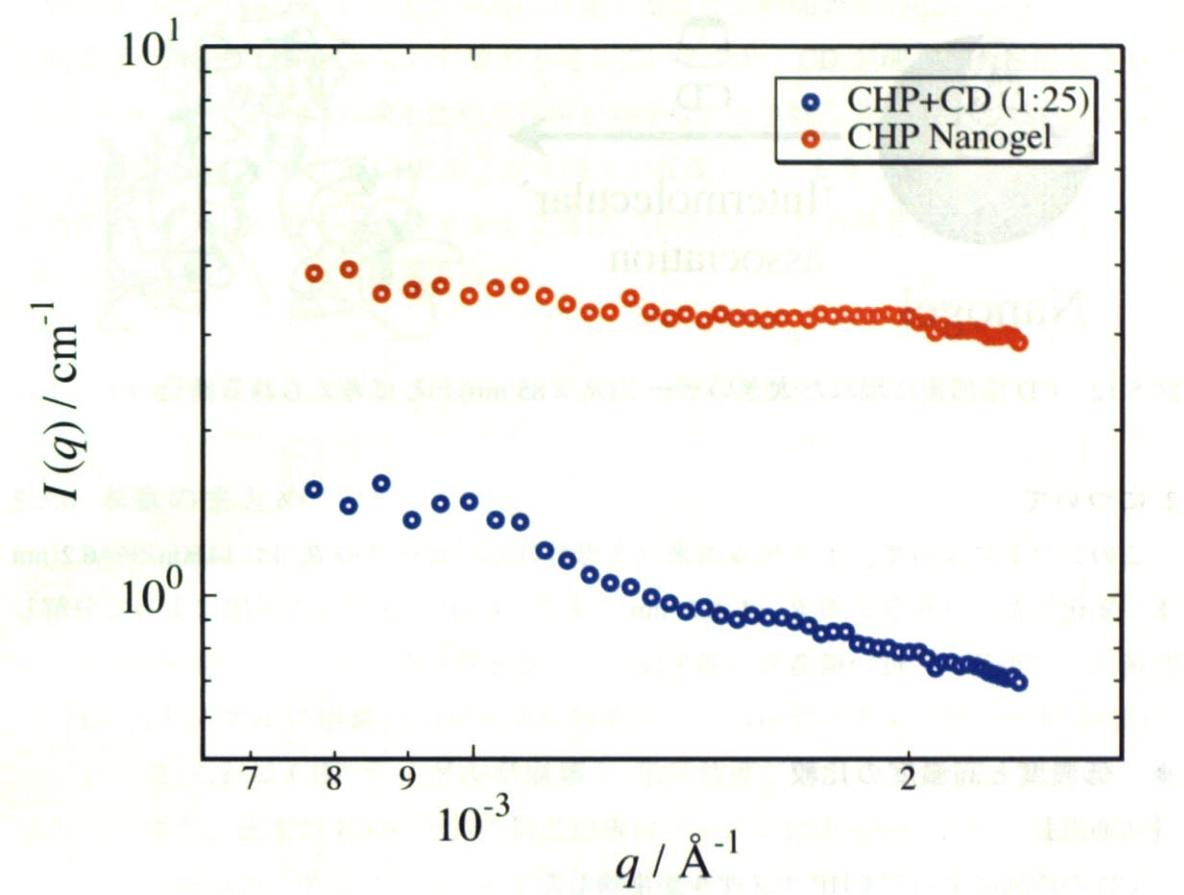


図 5.10 CHP ナノゲル+CD および CHP ナノゲルの SLS 結果。(CHP ナノゲルの濃度は 5 mg/mL, CD の量は CHP ナノゲル中のコレステリル基に対し 25 当量)

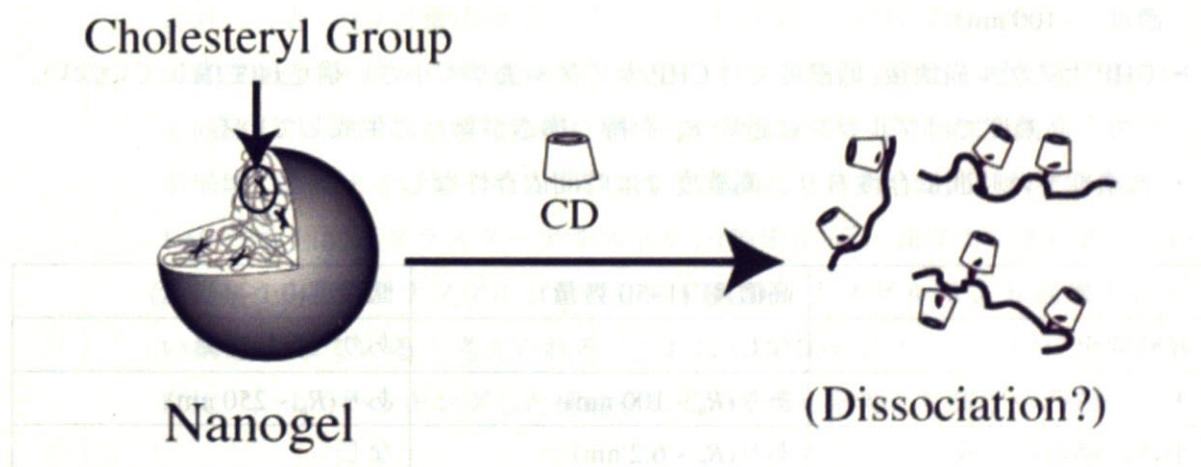


図 5.11 これまで考えられていた構造[12]

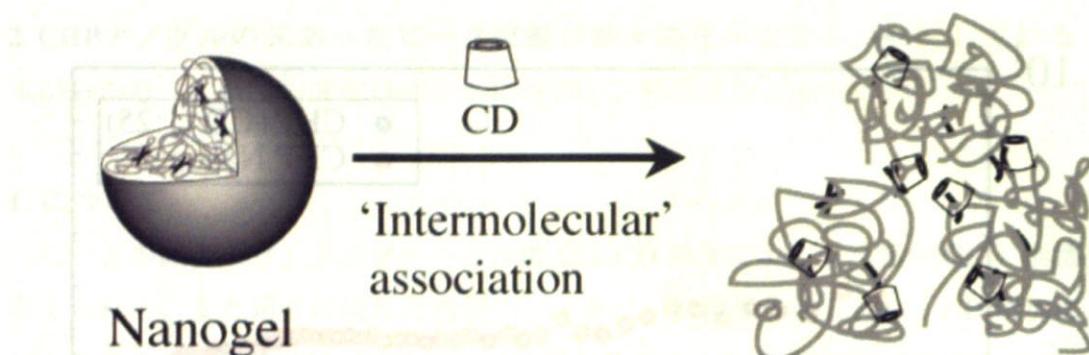


図 5.12 CD 添加後に現れた大きいピーク($R_h = 85 \text{ nm}$)として考えられる構造

2.について

このシフトによって、ナノゲル由来（と思われる）ピークの R_h は $14 \text{ nm} \rightarrow 6.2 \text{ nm}$ まで変化した。プルランの R_h は 8.2 nm であり、CHP ナノゲルの崩壊によって分解した後は、プルランに近い構造も一部生成していると考えられる。

◆ 低濃度と高濃度の比較

【共通点】

- CD の添加によって CHP ナノゲルが崩壊した
- CHP ナノゲル崩壊後、CHP ナノゲルよりも大きいピークが出現している

【相違点】

- CHP ナノゲル崩壊後、出現した大きいピークの R_h が異なる（低濃度： $\sim 250 \text{ nm}$ 、高濃度： $\sim 100 \text{ nm}$ ）
- CHP ナノゲル崩壊後、低濃度では CHP ナノゲルよりも小さい構造は生成していない。
一方、高濃度ではプルランに近い R_h を持つ構造が新たに生成している
- 低濃度では時間依存性有り、高濃度では時間依存性なし

	高濃度 (1~50 当量)	低濃度(0.1~1 当量)
経時変化	なし	あり
大きい構造の生成	あり($R_h \sim 100 \text{ nm}$)	あり($R_h \sim 250 \text{ nm}$)
小さい構造の生成	あり($R_h \sim 6.2 \text{ nm}$)	なし

表 5.1 CHP ナノゲル+CD の濃度による比較

これらの結果から、次のことが推測される：

1. 低濃度では、CD がコレステリル基に到達するまでに時間がかかる。
2. 低濃度では CD が疎水基に対し数が不足しているため、CD が疎水基を包接しきることが出来ない。そのため疎水性相互作用を完全には取り除くことができない。よって中途半端に構造の壊れた CHP ナノゲル同士で凝集してしまう
3. 高濃度では CD が速やかに疎水基まで到達。部分的には会合構造を崩壊させるが、一部は 2. のようにして凝集構造を作る

以上、SANS と光散乱 (DLD, SLS) の結果をまとめると次のようになる。

5.3.4 本章のまとめ

以上 SANS, DLS の結果をまとめると以下のようなになる。

● SANS 結果

1. (ナノゲルの崩壊) CD 添加量の増加に伴い CHP ナノゲルの散乱強度が減少した。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、強度が下がった後の散乱曲線はプルランに近づいており、会合体から棒状に近い構造へとシフトする傾向も見られた。
2. (大きな会合体の生成) 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示していた。これは CD 添加によって CHP ナノゲルは崩壊しているものの、部分的な会合構造が残っており、さらにそれが大きな会合体を作っていることを示唆している。文献値[12]と同様に 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。
3. (CHCDex ナノゲルの構造) CHCDex ナノゲルに CD を添加した実験でも CHP と同様、CD 添加量の増加に伴い連続的に散乱強度が下がっており、ナノゲルが崩壊したことを示唆した。ただ、1:1 ではほとんど変化は見られないことや、1:50 でも強度がクラスター・デキストリン(糖鎖)に近い強度まで落ちきっていない事から、CHP ナノゲルと比較して CHCDex ナノゲルはより崩壊しにくい構造をしていると考えられる。これは CHCDex ナノゲルが CHP ナノゲルに比べ、よりパッキングした構造をしているためと考えられる。

● DLS 結果

1. (ナノゲル構造の崩壊) CD 添加量の増加に伴って CHP ナノゲル由来のピーク (分布関数) 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。

2. (大きな構造の生成) CD 添加後、新たに現れた右側のピーク(=遅い緩和を示す)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。
3. (小さな構造の生成) CD 添加後、早い緩和の方にシフトした左側のピークは、CD 添加によって CHP ナノゲルが、より小さい構造まで分解されたことを示唆する。
4. (大きな構造として考えられる可能性) SANS, DLS により示された会合体として考えられる一つの可能性としては、図 6.1 のように、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た構造などが考えられる。

CD により崩壊した後の構造の特定が、今後の課題である。

第6章 結論

本研究で得られた主要な結果を以下に示す。

- ナノゲルのキャラクタリゼーション

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

3. (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。
4. (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。

- ナノゲルによるタンパクの取り込み

SANS 結果

2. (CHP ナノゲルと BSA の相互作用) ナノゲルと BSA の相互作用を評価したが、BSA の散乱強度が弱いため、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。

DLS 結果

5. (CHP ナノゲルと BSA の相互作用) CHP ナノゲルと BSA の相互作用を評価したが、SANS と同様、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。
6. (CHP ナノゲルと卵白の相互作用: シャペロン機能の確認) 卵白を 75°C で 5 分間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を確かめた(タンパク質の変性)。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。そのため、BSA を用いても見られなかった CHP ナノゲルのシャペロン機能の発現が、卵白を用いることで確かめられた。

7. (CHP ナノゲルのシャペロン機能が及ぶ範囲について) ナノゲルに対する卵白の濃度依存性を測定したところ、ナノゲルがタンパクを捕捉すると思われる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、巨大なピークが現れる。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る。
8. (加熱後の R_h) 卵白加熱後の R_h (流体力学的半径)は 170~180nm であった。他方、卵白+CHP ナノゲル(卵白が 11 当量未満)を加熱したものは 14nm となり、ナノゲルの R_h とほぼ同一であった。

● シクロデキストリンによるナノゲルの崩壊

SANS 結果

4. (ナノゲルの崩壊) CD 添加量の増加に伴い CHP ナノゲルの散乱強度が減少した。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、強度が下がった後の散乱曲線はプルランに近づいており、会合体から棒状に近い構造へとシフトする傾向も見られた。
5. (大きな会合体の生成) 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示していた。これは CD 添加によって CHP ナノゲルは崩壊しているものの、部分的な会合構造が残っており、さらにそれが大きな会合体を作っていることを示唆している。文献値[12]と同様に 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。
6. (CHCDex ナノゲルの構造) CHCDex ナノゲルに CD を添加した実験でも CHP と同様、CD 添加量の増加に伴い連続的に散乱強度が下がっており、ナノゲルが崩壊したことを見た。ただ、1:1 ではほとんど変化は見られないことや、1:50 でも強度がクラスター・デキストリン(糖鎖)に近い強度まで落ちきっていない事から、CHP ナノゲルと比較して CHCDex ナノゲルはより崩壊しにくい構造をしていると考えられる。これは CHCDex ナノゲルが CHP ナノゲルに比べ、よりパッキングした構造をしているためと考えられる。

DLS 結果

5. (ナノゲル構造の崩壊) CD 添加量の増加に伴って CHP ナノゲル由来のピーク(分布関数)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。

6. (大きな構造の生成) CD 添加後、新たに現れた右側のピーク(=遅い緩和を示す)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。
7. (小さな構造の生成) CD 添加後、早い緩和の方にシフトした左側のピークは、CD 添加によって CHP ナノゲルが、より小さい構造まで分解されたことを示唆する。
8. (大きな構造として考えられる可能性) SANS, DLS により示された会合体として考えられる一つの可能性としては、図 6.1 のように、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た構造などが考えられる。

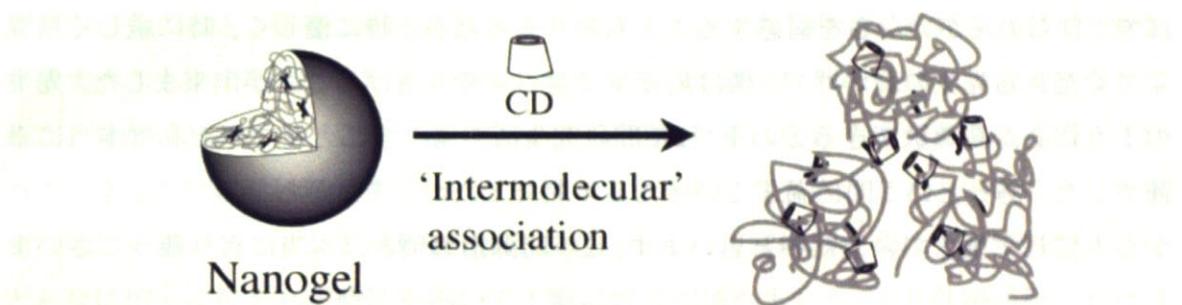


図 6.1 CD 添加後に現れた大きいピーク($R_h = 85 \text{ nm}$)として考えられる構造

この章では、まず、CD による多孔性高分子の複合化による構造変化について述べた。次に、複合化によって生じる構造変化の原因として、疎水性相互作用による会合によるとされる構造変化について述べた。最後に、複合化による構造変化の原因として、疎水性相互作用による会合によるとされる構造変化について述べた。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、大変多くの方にお世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

指導教員の柴山充弘教授には、2年間本当にお世話になりました。先生は常に仕事をテキパキとこなされる方で、まさに僕にとって仕事のお手本の様な方でした。また一方で先生は非常にユーモア豊かな方で、僕は先生のジョークを聞くのが本当に大好きでした。一緒にテニスに誘って下さったり、車で東海村まで連れていって頂いたり、研究以外の面でもお世話になりました。研究において先生の要求に応えられないこともしばしばで、自らのふがいなさを痛感することもありましたが、時に優しく、時に厳しく指導してくださる先生のおかげで、僕は最後まで腐らずやり遂げることが出来ました。先生のように心から尊敬できる方の下で2年間研究生活を過ごすことができた私は本当に幸運でした。あっという間に過ぎていった2年間でしたが、先生から学んだことを、これからも忘れず生きていきたいと思います。2年間御指導頂き、本当に有り難うございました。

共同研究者であり、ナノゲルのサンプルを提供してくださった東京医科歯科大の秋吉一成教授、長谷川麗博士、小澤弥生氏には大変お世話になりました。お忙しい中、いつもサンプル調製に関する私の無理を聞いて頂き、質の高いサンプルを提供して下さいました。心より感謝申し上げます。

柴山研究室の以下の方々には、特にお世話になりました。三井化学に就職なさった狩野武志博士には、実験についての助言から実験室の管理、日常生活全てに至るまで、研究室生活全般にわたってサポートしていただき、快適な研究環境を提供して下さいました。遠藤仁助教には何も分からぬ私に散乱法について一から丁寧に教えて頂きました。遠藤さんに頂いた「理論とは数学である」という金言は、今でも実験ノートに残っています。僕が1年生の時の東海村の実験では、私が測定に手間取ってしまったため実験が深夜3,4時まで及んだ時がありました。その時も、遠藤さんは徹夜に近い状態で文句一つ言わず私に付き添って下さいました。あのとき私は、遠藤さんがいてくださって本当に心強い思いがしました。2年間有り難うございました。NIST の長尾道弘博士にも、お会いする機会があるといつも助言をして頂きました。岡部哲士博士には、散乱についての私のどんなつたない疑問にも丁寧に答えてくださいり、またパソコンや研究室での生活全般にわたって面倒を見てくださいり、とても頼りになる存在でした。有り難うございました。大坂昇先輩には本当にお世話になりっぱなしで、僕にとって兄のような存在でした。研究において頻繁にアドバイスを頂いたり、積極的に議論の機会を設けて頂きました。

した。何より本修士論文は大坂さんの全面的なお力添え無しには到底完成し得ないものでした。また、研究以外の面でもお世話になりました。私が落ち込んでいる時に気さくに声をかけて下さったり、ご飯や深夜のドライブに連れて行って頂いたり、徹夜が続いたときは銭湯まで連れて行っていたり、柴山研でのいい思い出が一杯です。温かい先輩の御支援がなかったら大学院での研究を纏めることもできませんでしたし、2年間がここまで充実することはありえませんでした。研究の、そして人生の先輩として多くのことを大坂さんに学ばせて頂きました。本当に有り難うございました。鈴木拓也先輩は、解析や散乱に関する私の質問にいつも一から丁寧に教えて頂きました。論文の執筆をはじめ、鈴木先輩は最もお世話になった先輩の一人です。散乱に関する深い知識や洞察力はもちろんのこと、研究に対する鈴木さんのストイックな姿勢は、研究者として非常に尊敬すべきものでした。また、一学年上の先輩として研究以外の面でもお世話になりました。先輩のおかげで学会や、新年会など、研究室行事はどれも本当に楽しく盛り上がっていました。先輩と僕だけがマイクの持ち方で先生に注意されたこともありましたが、今ではいい思い出です。2年間有り難うございました。宮崎翔先輩は、私が質問するどんなに忙しくても必ず時間を割いて丁寧に教えて頂きました。また就職活動における先輩としても、有益かつ適切なアドバイスをして頂きました。同級生の松永拓郎君には、研究における全面的なサポート、アドバイスを数多く頂きました。また同期としてテニスやご飯にも一緒に行けて本当に楽しかったです。彼のおかげでいつも学生室の雰囲気は和やかでしたし、また、研究に対し熱心に取り組む彼の姿は、同級生である僕にとって大変よい刺激になりました。2年間一緒にいてくれて、どうも有り難う。中性子の同級生のみんなからもお世話になりました。与那嶺亮君には1年間隣の席の友としてお世話になりました。彼のおかげで学生室は常に楽しいムードでした。染谷武紀君は天性の持ち味で学生室の雰囲気を和ませて頂き、また研究についても大変有益なアドバイスを頂きました。鈴木尊雅君はいつも心癒される笑顔と笑い声で、研究生活を大いに盛り上げてくれました。森永礼君の研究に励むストイックな姿勢は、私にとって大変良い刺激になりました。増田健一郎君は飲み会などでいつも楽しく場を盛り上げてくれました。飯田裕之君は豊かなアルバイト経験など、研究面以外からも刺激を与えて下さいました。後輩の西田理彦君はいつも研究室の雰囲気を良くしてくれ、また抜群の情報収集力で多くの資料を私たちに提供して下さり、本当に助かりました。有り難うございました。秘書の宮崎京子さんには事務手続きから宿泊手続き、さらには実験室の清掃などでお世話になりました。研究生活を支えて頂きました。有り難うございました。秘書の井上直美さんは事務的サポートから学会等での宿泊手配でいつもお世話になり、また何よりも明るい笑顔とキャラクターで研究室全体の雰囲気を明るくして頂きました。本当に楽しかった

です。有り難うございました。

他にも中性子の先輩及び後輩、先生、秘書さんその他の方々にも大変お世話になりました。皆様の御協力を抜きにしてこのように充実した研究生活は送り得なかつたと思います。改めて、心よりお礼申し上げます。2年間どうも有り難うございました。

参考文献

1. Galette, M.d.l., <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/97/Renoir21.jpg>.
2. Akiyoshi, K., et al., *Self-Aggregates of Hydrophobized Polysaccharides in Water. Formation and Characteristics of Nanoparticles.* Macromolecules, 1993. **26:** p. 3062-3068.
3. Kuroda, K., et al., *Hierarchical Self-Assembly of Hydrophobically Modified Pullulan in Water: Gelation by Networks of Nanoparticles.* Langmuir, 2002. **18:** p. 10320-10325.
4. Nishikawa, T., K. Akiyoshi, and J. Sunamoto, *Supramolecular Assembly between Nanoparticles of Hydrophobized Polysaccharide and Soluble Protein Complexation between the Self-Aggregate of Cholesterol-Bearing Pullulan and α -Chymotrypsin.* Macromolecules, 1994. **27:** p. 7654-7659.
5. Nishikawa, T., K. Akiyoshi, and J. Sunamoto, *Macromolecular Complexation between Bovine Serum Albumin and the Self-Assembled Hydrogel Nanoparticle of Hydrophobized Polysaccharides.* J. Am. Chem. Soc., 1996. **118:** p. 6110-6115.
6. Akiyoshi, K., et al., *Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin.* Journal of Controlled Release, 1998. **54:** p. 313-320.
7. Akiyoshi, K. and J. Sunamoto, *Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides.* Supramolecular Science, 1996. **3:** p. 157-163.
8. Akiyoshi, K., Y. Sasaki, and J. Sunamoto, *Molecular Chaperone-Like Activity of Hydrogel Nanoparticles of Hydrophobized Pullulan: Thermal Stabilization with Refolding of Carbonic Anhydrase B.* Bioconjugate Chem., 1999. **10:** p. 101-106.
9. Nomura, Y., et al., *Protein refolding assisted by self-assembled nanogels as novel artificial chaperones.* *Designing the biocompatibility and function of self-assembled molecular chaperone.* FEBS Letters, 2003. **553**: p. 271-276.
10. Morimoto, N., et al., *Design of Hybrid Hydrogels with Self-Assembled Nanogels as Cross-Linkers: Interaction with Proteins and Chaperone-Like Activity.* Small, Biomacromolecules, 2005. **6:** p. 1829-1834.
11. Sawada, S., et al., *Heat Shock Protein-like Activity of a Nanogel Artificial Chaperone for Citrate Synthase.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2006. **21:** p. 487-501.

12. Akiyoshi, K., et al., *Controlled Association of Hydrophobized Polysaccharide by Cyclodextrin*. Chemistry Letters, 1998. **27**: p. 93-94.
13. Akiyoshi, K., et al., *Self-Association of Cholestryl-Bearing Poly(L-lysine) in Water and Control of Its Secondary Structure by Host-Guest Interaction with Cyclodextrin*. Macromolecules, 2000. **33**: p. 6752-6756.
14. Nomura, Y., et al., *Thermoresponsive Controlled Association of Protein with a Dynamic Nanogel of Hydrophobized Polysaccharide and Cyclodextrin: Heat Shock Protein-Like Activity of Artificial Molecular Chaperone*. Biomacromolecules, 2005. **6**: p. 447-452.
15. 永田和宏, 吉田賢右, and 森正敬, 分子シャペロンによる細胞機能制御 (Springer reviews) 2001.
16. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **38**: p. 571-580.
17. TANAKA, N., シャペロンペプチドの開発と応用. 高分子, 2007. **56**: p. 178-181.
18. 小池あゆみ and 田口英樹, 分子シャペロン. タンパク質科学, 2005: p. 291-302.
19. D. Renard, J.L., *Ordered Structure in Solutions and Gels of a Globular Protein as Studied by Small Angle Neutron Scattering*. Biopolymers, 1996. **39**.
20. 田口英樹 and 吉田賢右, 分子シャペロンによる細胞機能制御. 2003.
21. Young, J.C., et al., nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2004. **5**.
22. 高分子学会, 新版高分子辞典. 1988: p. 129.
23. エヌ・ティー・エス, ゲルハンドブック. 1997.
24. 青柳隆夫, 医用におけるゲル・医用, DDS 応用. 高分子の最新動向, 2004: p. 129-139.
25. Choi, M.-S., et al., *Chemistry*. A Europ. J., 2002. **8**: p. 2667-2678.
26. 小石真純, 機能性微粒子とナノマテリアルの開発—材料設計のためのナノテクノロジー. 2004.
27. Yamamoto, K., et al., Nature, 2002: p. 509-511.
28. S. Yusa, A.S., T. Yamamoto, Y. Morishima, Macromolecules, 2002. **35**.
29. Kawaguchi, H., Prog. Polym. Sci., 2000. **25**.
30. M.Liu, K.K., J.M.J.Frechet, J. Controlled Rel., 2000. **65**.
31. Kataoka, K., A. Harada, and Y. Nagasaki, Adv. Drug Rev., 2001. **47**.
32. 秋吉一成, 高分子ナノゲルの設計とバイオ機能. ナノバイオテクノロジーの最前線 2003.

33. X. G. Gu et al., *Cancer Res.*, 1998. **58**: p. 11203-11207.
34. Shiku, H., *cancer Chemoth. Pharm.*, 2000. **46**: p. 121-126.
35. al., Y.I.e., *Blood*, 2002. **99**: p. 112-118.
36. 秋吉ほか, *日本 DDS 学会誌*, 2002. **17**: p. 11-16.
37. Kauzmann, W., *Adv. Protein Chem.*, 1959. **14**: p. 1.
38. Akiyoshi, K. and J. Sunamoto, *Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides*. *Supramolecular Science*, 1996. **3**: p. 157-163.
39. Akiyoshi, K., et al., *Self-Aggregates of Hydrophobized Polysaccharides in Water Formation and Characteristics of Nanoparticles*. *Macromolecules*, 1993. **26**: p. 3062.
40. 散乱長のホームページ, <http://www.ill.fr/YellowBook/D4/n-lengths.html>.
41. Higgins, J.S. and H.C. Benoit, *Polymers and Neutron Scattering*. 1994, Oxford: Clarendon Press.
42. Okabe, S., et al., *Upgrade of the 32 m Small-angle Neutron Scattering Instrument, SANS-U*. *J. Appl. Cryst.*, 2005. **38**: p. 1035-1037.
43. Shibayama, M., et al., *Evaluation of Incoherent Neutron Scattering from Softmatter*. *J. Phy. Soc. Jpn.*, 2005. **74**: p. 2728-2736.
44. Kuroda, K., et al., *Hierarchical Self-Assembly of Hydrophobically Modified Pullulan in Water: Gelation by Networks of Nanoparticles*. *Langmuir*, 2002. **18**: p. 1120-1125.
45. Freloft, T., J.K. Kjems, and S.K. Sinha, *Power-law correlations and finite-size effects in silica particle aggregates studied by small-angle neutron scattering*. *Phys. Rev. B*, 1986. **33**: p. 269-275.
46. Fuse, C., et al., *Water-Induced Self-Assembling of Solvent-Sensitive Block Copolymer*. *Macromolecules*, 2004. **37**(20): p. 7791-7798.
47. Muroga, Y., et al., *Local Conformation of Polysaccharides in Solution Investigated by Small-Angle X-ray Scattering*. *Macromolecules*, 1987. **20**: p. 3003-3006.
48. Neugebauer, T., *Berechnung der Lichtzerstreuung von Fadenkettenlösungen*. *Annalen der Physik*, 1943. **434**(7-8): p. 509-533.
49. Bendedouch, D. and S.H. Chen, *Structure and Interparticle Interactions of Bovine Serum Albumin in Solution Studied by Small-Angle Neutron Scattering*. *J. Phys. Chem.*, 1983. **87**: p. 1473-1477.
50. Nishikawa, K., K. Akiyoshi, and J. Sunamoto, *Macromolecular Complexation between Bovine Serum Albumin and the Self-Assembled Hydrogel Nanoparticle of*

Hydrophobized Polysaccharides. J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**: p. 6110-6115.

51. Akiyoshi, K., et al., *Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin.* Journal of Controlled Release, 1998. **54**: p. 313-320.
52. Stadelman, W.J. and O.J. Cotterill, Egg Science and Technology, AVI Publishing Co., 1986.
53. Burley, R.W. and D.V. Vadhera, The AVIAN EGG Chemistry and Biology. Wiley-Interscience Publication, 1989.
54. 小宮山 真 (翻訳) and 平 英史, シクロデキストリンの化学. 1979.
55. Shiotani, K., et al., *Differential Effects of Sulfate and Sulfobutyl Ether of β -Cyclodextrin on Erythrocyte Membranes in Vitro.* Pharm. Res., 1995. **12**: p. 78-84.
56. Yang, Z. and R. Breslow, *Very Strong Binding of Lithocholic Acid to β -Cyclodextrin.* Tetrahedron Lett., 1997. **38**: p. 6171-6172.
57. Mucci, A., et al., *Complexation of bile acids with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: A ^{13}C -NMR study.* Supramol. Chem., 1996. **7**: p. 125.
58. Breslow, R. and B. Zhang, *Cholesterol Recognition and Binding by Cyclodextrin Dimers.* J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**: p. 8495-8496.

学外発表

学会発表

● 口頭発表

1. 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

● ポスター発表

1. 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
2. 第 18 回高分子ゲル研究討論会 (2007/1/17-18, 本郷, 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
3. 日本化学会第 87 春季年会 (2007/3/25-28, 関西大学 千里山キャンパス, 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
4. 日本中性子科学会 第 7 回年会 (2007/11/27-28, 九州大学, 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, 小澤弥生, 長谷川麗, 秋吉一成, 柴山充弘
5. 第 19 回高分子ゲル研究討論会 (2008/1/16-17, 本郷, 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, 小澤弥生, 長谷川麗, 秋吉一成, 柴山充弘