両親媒性多糖のヒドロゲルナノ微粒子形成と蛋白質の包接・安定化

秋 吉 一 成
京都大学大学院工学研究科
砂 本 順 三

1. はじめに

酵素、蛋白質間の複合体および核酸-蛋白質複合体など、種々の生体高分子は自己組織化して超分子集合体を形成し、高度な機能を発現している。このような巨大分子の自己組織化とその構築原理の解明に向けて、近年活発に研究が行われている¹⁾。また、バイオエレクトロニクスなどの工学分野やドラッグデリバリーなどの薬学、医療分野でも、材料としてのナノスケール領域での構造・機能制御は最近のトピックのひとつである^{1), 2)}。

生体ではこのナノスケール領域の機能集団を水素結合、疎水性相互作用などの比較的弱い相互作用をうまく利用して構築している。ここでは、水溶液中での自己組織化を両親媒性に着目して論じる。親水性部位と疎水性部位を同分子内に有するいわゆる両親媒性化合物を水溶液中に分散させると、主として疎水性相互作用により分子が会合し、様々な集合体を形成する。例えば、SDS などの比較的低分子の界面活性剤が水溶液ミセルを形成すること、また天然由来脂質が2分子膜を基本とした集合体を形成することはよく知られている。では、両親媒性物質が高分子である場合はどうであろうか。生体高分子の多くはその構造的特徴から両親媒性とみなせる。例えば、蛋白質のように疎水性と親水性のモノマー（アミノ酸）が交互またはブロック的に重合したもの、核酸のようにモノマー単位に親水性部位（糖と磷酸）と疎水性部位（核酸塩基）両方を有したもの、また細胞壁を形成するリボ多糖のように水溶性の高分子（多糖）に部分的に疎水性の長鎖ア

ルキル基が結合したもの（疎水化高分子）などが挙げられる。このような両親媒性高分子が自己組織化により高次構造を形成することで、様々な生体機能が司られている。しかし、これら両親媒性高分子間でのコミュニケーションのしくみは、近年分子レベルで活発に研究されているものの、まだよくわかっていない。低分子の両親媒性化合物と比べて、簡単な構造の両親媒性高分子の溶液特性解析すら随分と遅れている。

我々は、リボ多糖類似の疎水性高分子に着目しその特性について検討してきた。最近、天然多糖に部分的に疎水基を導入した疎水化多糖類が、水溶液中で自己会合して単分散なナノサイズ（20nm 程度）のヒドロゲル微粒子を形成することを見いだした^{3), 4)}。また、この微粒子が、球状蛋白質を自発的に包接することを明らかにした⁵⁾。クラウンエーテルが種々のイオンを捕獲すること、またシクロデキストリンが種々の疎水性物質を取り込む現象はよく知られているが、蛋白質を包接するような人工高分子ホスト系はほとんど知られていなかった。生体系では、細胞外マトリックスである多糖ヒドロゲル中に生理活性蛋白質が取り込まれ、その機能制御が行われている⁶⁾。また、最近シャペロニンが蛋白質の変成中間体を包接し、その巻き戻りを制御していることも報告されている⁷⁾。しかし、それとても分子レベルでの詳細は明らかではない。ここでは、疎水化多糖の自己組織化によるヒドロゲルナノ微粒子の形成と蛋白質の包接・安定化について我々の最近の研究結果を紹介する。

2. 疎水化多糖のヒドロゲルナノ微粒子形成

天然多糖（ブルラン、デキストラン、アミロース、アミロペクチンおよびマンナン）に疎水基として1本鎖および2本鎖のアルキル基あるいはコレステロール基を100単糖当たり1～5個（重量比で5%以下）導入することによって、疎水化多糖類を合成した。図1には分子量約5万の直鎖状多糖であるブルランに100単糖あたり2個のコレステロール基を導入した疎水化多糖（CHP）の構造を示す。この疎水化多糖（0.1-0.5wt%）を水に分散させ超音波照射すると透明な溶液が得られる。会合状態をゲルクロマトグラフ法により調べたところ、サイズ分布が非常に狭く、均一サイズの単分散集合体を形成していることがわかった。特に、疎水性が高くそれ自身会合しやすいコレステロール基を有するCHPの集合体では、90℃以上の加熱条件下でも凝集、沈殿はほとんどみられず、非常に安定であった。静的、動的光散乱法および透過型電子顕微鏡観察により、CHPの約10分子が会合し、直

Characteristics of hydrogel nanoparticle of amphiphilic polysaccharides: Complexation with globular proteins and their stabilization.

Kazunari AKIYOSHI, Junzo SUNAMOTO

Division of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University.

図1. 疎水化多糖（プルラン）の構造

径が約20nmの非常にサイズの揃った球状微粒子を形成することが確認された³⁾. CHP中のコレステロール置換度を100単糖当たり1から4に変え、粒径も23nmから16nmに減少した. それでも、会合数は10前後とほとんど変化しなかった.

低分子界面活性剤が水中で単分散な会合体ミセルを形成するのはよく知られている. しかし、低分子の界面活性剤と違って疎水化高分子は親水性部位が高分子鎖でつながっているため、主鎖の絡み合いのような高分子特性が現れる. しかし、なぜ、我々の疎水化多糖が単分散でこのようなサイズに収束するのかはまだよくわからない. 疎水基の会合にともない糖鎖がかなりコンパクトに折り畳まれるので、糖鎖間での水素結合が可能になり、きわめて安定な集合体が形成されるものと考えられる.

微粒子中の糖鎖密度をその粒径と会合体の分子量から計算すると置換度の増加とともに10wt%から50wt%と増加した. この値は通常のマクロなアルギン酸ゲルやアガロースゲルの場合とほぼ等しい. また、疎水性蛍光プローブを用いた蛍光消光実験により、コレステロール基の会合数は、その置換度に依存せず約4~5であることがわかった⁸⁾. これらのデータからCHP集合体は、コレステロール会合領域を非共有結合的な架橋点としたナノサイズのヒドロゲル微粒子であるといえる(図2). CHPの会合数からひとつの微粒子中の全コレステロール基の数は40~140と見積られるので、架橋領域が微粒子中にランダムに分布していると仮定すると、架橋領域間つまりヒドロゲル網目の距離が計算される. コレステロール置換度が1.1のCHPでは約11nm, 3.4のCHPでは約5nmと計算された. つまり、CHPの疎水基の置換度を変えるこ

図2. 疎水化多糖ヒドロゲルナノ微粒子の模式図

とで、ヒドロゲルナノ微粒子のポアサイズと微粒子内部の糖密度、疎水性を制御しえることになる.

これまでも種々の方法で高分子ナノ微粒子がつくられ、種々の工学分野で幅広く応用されているが、50nm以下の単分散なヒドロゲル微粒子で、しかも内部構造が比較的良好に解析された例はいままでほとんど報告されていない. 両親媒性高分子としての特性を利用することではじめて可能になったものといえる.

3. 球状蛋白質の包接と安定化

種々の球状蛋白質とCHP集合体微粒子を室温で混合した後にゲルクロマトグラフ法で処理すると、蛋白質が結合した複合体微粒子が単離された⁵⁾. CHP集合体は過剰の蛋白質の存在下でさえその構造を変化せずに安定に保ち、蛋白質の分子量に応じて決まった数の蛋白質としか結合しなかった. 具体的には、分子量の大きな順にヘモグロビン(1), アルブミン (BSA) (1), ペルオキシダーゼ(1), α -キモトリプシン (Chy) (2), ミオグロビン(2), チトクローム c(4)およびインスリン (Ins) (10)などの複合体を形成した. 括弧内の数字はそれぞれひとつの微粒子に取り込まれた蛋白質の最大数を示している. CHP集合体は、球状蛋白質の安定なホストとして機能している. 例えば、BSAは微粒子と1:1のホスト-ゲスト型の取り込み挙動を示し(結合定数は $10^7 M^{-1}$ 程度), その際、 $4 \times 14 \text{ nm}$ のBSAを結合した複合体のサイズ(35nm)が取り込み前の微粒子のサイズ(33nm)とほとんど違わなかった⁹⁾. この事は、BSAがヒドロゲル微粒子のマトリックス内部に包接されていることを示唆している. 包接挙動は、蛋白質の分子容、疎水性等に大きく依存する. 例えば、分子量が小さく疎水性の高いIns (MW6000)では、混合後数分以内で取り込みが平衡に達するが、BSA (MW67000)などの比較的大きな蛋白質は、平衡に到達するのに数時間以上も要する. また、コレステロール置換度を下げるによりヒドロゲルの網目を大きくすると平衡到達は速くなり、結合定数も増加する. このように、ホストとしてのヒドロゲル微粒子のポアサイズ、疎水性を変えることでゲストとしての蛋白質の取り込みを制御しうることがわかった.

それでは、蛋白質包接の駆動力は何か。球状蛋白質表面は一般に親水性および疎水性両領域がパッチ状に存在しており、その蛋白質固有の両親媒性の顔を有している。一方、ヒドロゲル微粒子内部は疎水性のコレステロール架橋領域と親水性の糖鎖領域で形成され、そのポア内部は多くの水で満たされている。この両親媒性の特性が蛋白質の包接に適した環境を提供していると思われる。高感度滴定型カロリメーターを用いて、CHP-BSA 複合体形成における熱力学パラメーターを求めたところ、複合体形成はエンタルピー支配である事がわかった⁹⁾。つまり、水溶液中のホスト・ゲスト会合現象でよくみられる疎水性相互作用の寄与は少ない。多糖自体は電荷をもたない中性であることを考えると、静電的相互作用よりはむしろ蛋白質と CHP の糖鎖間の直接あるいは水分子を介した水素結合の形成が複合体形成の主因子であると考えられる。

包接により蛋白質はある程度構造変化を受ける。その構造変化は蛋白質自身の特性に由来すると思える。CD スペクトル測定により包接蛋白質の構造変化を調べた。BSA はもともとヘリックス構造を60%程度有するが、包接化によりそれが44~55%まで減少した。一方、Chy のヘリックス含量は9%であるが、包接後は29%に増加した⁵⁾。Ins のような小さな蛋白質は包接後もあまり構造変化を受けない。また、Chy は見かけ上大きな構造変化を受けるにもかかわらず、包接後もわずかながら酵素活性を保持していた。包接後の蛋白質の構造変化の要因はまだよくわからない。糖鎖ヒドロゲル中の特異なマイクロ環境が包接後の蛋白質の構造変化を誘起しているのかもしれない¹⁰⁾。あるいは、モルテン・グロビュール様の状態¹¹⁾をトラップしているとも考えられる。

一般に蛋白質は化学的変性や熱変性をおこし、それに続いてしばしば不可逆的な凝集をおこす¹²⁾。包接された蛋白質では当然この蛋白質分子間凝集が抑制されると期待される。事実、非常に凝集しやすい Ins でさえ、包接されると PBS 中37℃で1ヶ月以上放置しても安定で、凝集も認められなかった。また一般に CHP-蛋白質複合体を90℃以上で数時間処理しても、複合体はもとより蛋白質の会合および遊離はほとんど見られなかった。Chy との複合体について、その蛋白質の CD スペクトルおよびトリプトファン残基の蛍光の温度依存性を調べた (図3)⁵⁾。遊離の Chy では50℃付近に相転移がみられ、ヘリックス含量が約半分に減少し、不可逆的な構造変化が観測された。しかし、包接された Chy ではその転移点が消失し、90℃付近

図3. キモトリプシン(a)およびその CHP 包接体(b)の蛍光波長の温度依存性

までヘリックス含量および蛍光波長の変化もごくわずかであった。また CHP-Chy 複合体の DSC 測定でも、100℃まで熱構造転移は全く観測されなかった。包接により、蛋白質分子間での凝集が抑制されるのみならず蛋白質自身の2次構造も熱に対して非常に安定化されていることがわかった。

それではこのように強く包接された蛋白質を再び解離させることが可能であろうか。特別な方法によっては可能である。即ち、Chy 包接体に、BSA を添加すると Chy がバルク水相に放出される⁵⁾。おそらく、BSA と Chy との交換反応が生じるものと考えられる。CHP 集合体の糖鎖部分を酵素ブルナーゼで分解することでも Chy は複合体から遊離してくる。しかもこの遊離した Chy は、複合体形成前の酵素活性をほぼ100%回復していた。つまり、包接によりいったんコンフォメーション変化を受けたにも拘わらず、微粒子からの放出過程で再びネイティブな状態に完全に戻ったことになる。さらに、92℃で1時間加熱処理後でも BSA 添加により Chy の解離と活性回復 (74%) が認められた。このような2次構造を保持した状態での蛋白質の捕捉とその安定化、さらに複合体からの解離による活性回復という現象は、生体におけるシャペロンの機能¹³⁾と類似しており興味深い。

疎水化多糖の自己組織化により形成されるヒドロゲルナノ微粒子は、糖鎖部分に種々の機能性因子 (細胞特異性、熱、pH などの刺激に対する応答性) を導入することが可能で^{14), 15)}、酵素の機能変換や生体活性蛋白質とのハイブリット化剤としての新たな利用が期待される。近年、蛋白質の合成高分子との複合化により、新しい機能を発現させる試みが活発に進められている。従来は、主に蛋白質の修飾には、化学的共有結合による手法がとられてきた。我々のように高分子間

での超分子形成 (非共有結合相互作用) にも基づく方法も今後更に研究されるべきであろう。

最後に熱測定に関して御協力いただきました岡山理科大学児玉美智子先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 猪飼篤, 樋口富彦, 吉村哲郎, 田中敬二 (1993) 蛋白質核酸酵素, **38**, 1023-1360.
- 2) Whitesides, G. M., Mathias, J. P., Seto, C. T. (1991) *Science*, **254**, 1312-1319.
- 3) Akiyoshi, K., Deguchi, S., Moriguchi, N., Yamaguchi, S., Sunamoto, J. (1993) *Macromolecules*, **26**, 3062-3068.
- 4) Akiyoshi, K., Sunamoto, J. (1992) *Organized Solutions Surfactants in Science and Technology* (Friberg, S. E., Lindman, B. eds) **44**, 289-304, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 5) Nishikawa, T., Akiyoshi, K., Sunamoto, J. (1994) *Macromolecules*, **27**, 7654-7659.
- 6) Nathan, C., Sporn, M. (1991) *J. Cell. Biol.* **113**, 981-986.
- 7) Chen, S., Roseman, A. M., Hunter, A. S., Wood, S. P., Burston, S. G., Ranson, N. A., Clarke, A. R., Saibil, H. R. (1994) *Nature*, **371**, 261-264.
- 8) Akiyoshi, K., Deguchi, S., Tajima, H., Nishikawa, T., Sunamoto, J. (1995) *Proc. Japan Acad.*, **71**, Ser. B, 15-19.
- 9) Akiyoshi, K., Nishikawa, T., Sunamoto, J., Mitsui, Y., Miyata, T., Kodama, M. *Colloid and Surface, A*, in press
- 10) 月向邦彦 (1985) 蛋白質核酸酵素, **30**, 1115-1126.
- 11) 桑島邦博, 伊倉貞吉 (1994) 蛋白質核酸酵素, **39**, 1011-1016.
- 12) 高橋克忠 (1993) 生物物理, **33**, 2-6.
- 13) 田口英樹, 吉田賢右 (1993) 生物物理, **33**, 11-14.
- 14) Akiyoshi, K., Takanabe, H., Sato, T., Sato, T., Kondo, H., Sunamoto, J. (1990) *Chem. Lett.* **1990**, 473-476.
- 15) Deguchi, S., Akiyoshi, K., Sunamoto, J. (1994) *Macromol. Rapid Commun.* **15**, 705-711.

編集後記

◇二度目の編集実行委員の任期が終りになりホットしている。あまり働かず、従ってあまり役にも立たない状態で編集後記も無いと思うがこれも役目の一つらしい。

◇「生物物理」誌の特徴の一つは、学会員の多様な構成とその関心を反映して、そのカバーする分野が広範に渡ることであろう。編集する側では、その多方面の話題に対応できる態勢を整えなければならない。解説、総説その他記事の大部分は依頼原稿であるから、編集実行委員の責任はそれだけ重くなる。専門家以外の人にも読みやすく役に立つ内容をあまり片寄り無く提供することはエネルギーを要する仕事である。

◇編集実行委員会でのこの間の議論を聞いていても、学会が「生物物理」誌に大きな期待を寄せ、その改革に力を入れられているのがよく解る。エネルギーを要するところにはマンパワーを配置する。すでに一部実施されているように、編集実行委員以外の学会員にも種々の編集作業に加わって頂くことが必要となる。

◇「生物物理」誌の特徴の一つと私が感じていたことは「手作り」の良さがあることであった。組織や態勢が整うと、粒のそろった規格品が並ぶことになるだろうし、それはそれで悪くも無いのだろうが、一読者としては、昔が懐かしい気もする。

(Y. K.)