

生体高分子溶液の動的ナノ構造：拡散係数の距離依存性によるスケーリング

Dynamical nanostructures in solution of biopolymers : Scaling by distance-dependence of diffusion constants

(理研¹・北大電子研²) 益田 晶子¹, ○丑田 公規¹, 西村 吾朗², 金城 政孝²,
田村 守², 越野 広雪¹, 山下 宏一¹, Thomas Kluge¹

はじめに：溶液中の分子などが、その大きさに対して 10-1000 倍程度(nm スケールになる)の編み目障害を持つ空間を拡散する場合には、Observable な拡散係数は、編み目のスケールに対して空間相関を持って変化することが予測できる。すなわち、この現象は「拡散係数の距離依存性」としてとらえることができる。最近拡散係数を実験的に直接測定する様々な分光測定が可能になっているが、空間相関は拡散係数を仲立ちに時間相関へ結びつくので、実験的には分光測定のサンプリング時間についての時間相関を持つことになる。われわれは、ヒアルロン酸(HA)水溶液中の分子の拡散係数について、サンプリング時間の異なった 2 種類の分光測定 (a) Photochemical Bimolecular Reaction (PCBR)法、(b) Pulsed Field Gradient (PFG)-NMR 法を比較した結果を最近発表した¹が、今回第三の測定手段である(c) 蛍光相関分光(Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS)法を用いて 2 つの測定を補完し、拡散係数の距離依存性がHAの編み目構造のスケールに対応していることを捉えることに成功したので報告する。

ソフトマターとしてのヒアルロン酸と移動現象の重要性：HAは N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸からなる 2 糖を単位とした高分子多糖類で、脊椎動物の細胞外マトリックスとして広く存在するほか、骨関節液、眼球の硝子体、表皮の保湿成分として存在する。さらに、癌の転移や発生や再生、組織の生成、血液凝固など細胞レベルの活動に影響を与える物質として他に代用できる物質はないと考えられている。最近ではバイオテクノロジーの発達で医薬品として使えるクオリティの物質が生産されるにいたり、ドラッグデリバリーや関節液の補充物質として注目されてもいる。この物質は、しなやかながら直線性のよい高分子なので、わずか 1 wt% 程度の水溶液でも、疎水結合により溶液中に広がったネットワーク構造を効果的に生成し、数万 cP 程度の高粘度水溶液を実現することでも興味深い。我々は、上記の様々な特徴ある重要な性質において、生体反応、細胞の移動、水分や栄養分の供給など、輸送現象を詳細に調べることが重要であるとの立場から、研究を行ってきた。¹⁾

測定と解析の原理：PCBR 法では光励起した分子の 2 分子反応速度（拡散律速反応であることは既知）を用いて拡散係数を決定する。この場合励起状態の寿命 τ が 400ns 程度なので、測定のサンプリング

時間もこれによって定義され、拡散する物質の平均移動距離 $\sqrt{\langle x^2 \rangle}$ （平均 2 乗変位： $\langle x^2 \rangle$ ）は

$$\sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{6D\tau} \quad (1)$$

となり、おおよそ 10nm 程度になる。(ここで D 自体も定数でなく平均移動距離の関数である事に注意する。)PFG-NMR は磁場勾配の印加パルス間隔 Δt で、しかも 1 次元成分を捉える方法であるので

$$\sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{2D\Delta t} \quad (2)$$

となる。一方 FCS では、逆に顕微鏡の視野領域の大きさが $\sqrt{\langle x^2 \rangle}$ を定義し、時間相関関数を実験的

に求めることになる点が異なる。FCS では $\sqrt{\langle x^2 \rangle}$ はおおよそ 200 nm 程度であると考えられる。

結果と考察：3 つの実験に同一の分子（シトクロム c、但し FCS では蛍光ラベル済み）を用いて拡散

係数を独立に測定した。それぞれの測定方法での

$\sqrt{\langle x^2 \rangle}$ のアンサンブルの仕方の違い、測定誤差な

ども考慮して拡散距離 ($\sqrt{\langle x^2 \rangle}$ と同一視) に対する D の依存性を log-log スケールで表したものを図 1 に示す。

ここで大きく 2 つの領域に別れることがわかる。

PCBR 法の示す拡散係数は、HA の存在しない水溶液そのものと変わりがなく、HA を加えていっても変化しない。これは 400ns という短い時間では、分子が HA と相互作用する機会がなく、拡散係数の平均値に HA の効果が現れないためと考えられる。これを便宜上短距離拡散と呼ぶことにする。

一方 FCS と PFG-NMR 法では観測される拡散係数がそれぞれ 40%, 35% 減少し、しかも HA の濃度 C_{HA} に対して a を定数として、指数関数的に減少する (D_0 は HA がいないときの拡散係数)。すなわち

$$D = D_0 \exp(-aC_{HA}^{0.5}) \quad (3)$$

である。通常のゲル系などでよく見られる編み目の影響を受けた拡散現象であると考えられる。これを長距離拡散と呼ぶことにする。よく使われる編み目の大きさ ξ を用いたスケーリング則

$$\xi = (b/a)C_{HA}^{-0.5} \quad (4)$$

(b は拡散するシトクロムの直径 3.4 nm) を用いると、HA=1.4 wt% で編み目の大きさ ξ は FCS と PFG-NMR でそれぞれ 6 nm, 9 nm となった。

図 1 のプロットは、およそ 10nm と 100nm の間の比較的狭い領域で短距離拡散から長距離拡散への変化が起こることを示しており、これがおおよそ 1.4wt% で 10nm 程度 (測定方法で幅がある。FRAP 13 nm, ESR 11 nm) と言われる HA 水溶液の平均的な編み目の大きさを反映しているものと思われる。

一方、測定時間内に HA の編み目構造が動的に変化すると仮定すると、拡散する分子が感じる編み目に変化して、拡散係数の大きさもわずかに変化するとともに、(3) 式の指数関数の形状も変化する事が予想される。FCS の拡散係数がわずかに小さく、しかも ξ も小さいことは、この動的効果が幾分現れているものと今のところ考えている。まだ測定に誤差も大きいので、今後検討していく必要がある。

HA 水溶液内の輸送現象が 100 nm 付近を境にして 2 つの様式に別れることは、細胞にとって都合のよい環境を作るのに役立っていることの 1 側面である。100 nm より近距離の速い拡散は物質スケール、遠距離の遅い拡散は細胞スケールの移動と捉えることができる。細胞スケールの拡散は高粘度流体中の細胞自体の移動にかかわるが、物質スケールの拡散は細胞表面の反応や膜透過などを支配すると思われる。HA が細胞表面を潤すと同時に、表面付近の物質移動を余り阻害しない好都合なマトリックスであることを定性的に表している。コラーゲンや他の繊維質との共存でこれらがどのように変化するのも興味深い問題である。

参考文献: 1) A. Masuda et al J. Am. Chem. Soc. 123, 11468 (2001).

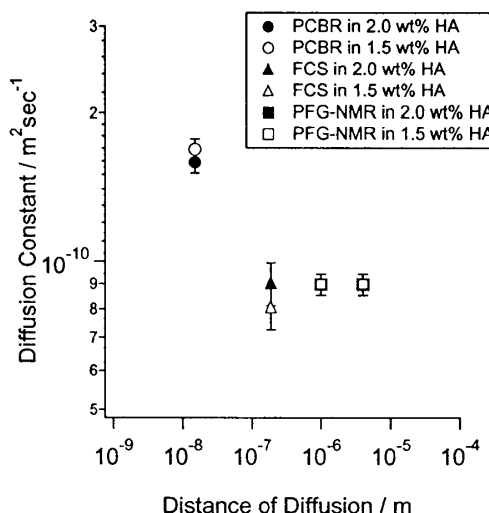


図 1 拡散距離に対してプロットした HA 水溶液中のシトクロム c の拡散係数