

生体高分子ゲル中の分子拡散：時間に依存した拡散係数の測定

(理研) 益田晶子、丑田公規、岡本隆之、越野広雪、山下宏一、
(北大電子研) 西村吾朗、金城政孝、田村守

【序】生体高分子（多糖）のヒアルロン酸（HA）は細胞外マトリクスの主要成分として、脊椎動物の体内のいたるところに存在する。HA分子自体は直鎖の多糖で、分子量は数十万から数百万、ゆるいランダムコイル構造をとっており、水溶液中では糖鎖同士の疎水性相互作用によって3次元網目構造を形成し、一種の生体高分子ゲルとなる。¹生体内では、細胞膜タンパクから細胞外に伸びるHA受容体などによって細胞周囲に固定され、コラーゲンやその他の多糖類とともに細胞外マトリクスとして、細胞の「足場」として存在する。細胞はこのような足場なしには分化も成長もできないため、特に再生医療の分野において、最適なマトリクス選定のために様々なマトリクス成分の性質が研究されている。このようにHAが細胞外マトリクス内に発見されたという経緯、糖類に関する関心が例えばDNAやタンパクに比べて低かったことで、従来は単なる細胞のための構造材としての認識にとどまっていた。しかし近年、細胞がHA濃度をコントロールし、細胞分化・融合や細胞自身の移動、細胞周囲での物質輸送を調整していることが報告されるようになった。²つまり例えばシグナル伝達物質などの細胞周囲での輸送を理解するためには、細胞表面にあるレセプターを研究するだけではなく、どのようにそこまで物質が移動するのか、HA内での物質輸送を研究することが重要であることがわかる。

HAは1 wt%以下で水溶液全体に網目構造を広げ水を保持するゲルになり、粘性率も数万 cP という非常に高い値を示す。しかし化学ゲルのような架橋がないため、非常「柔らかい」ゲルであるともいえる。このような生体高分子ゲル中での物質拡散はソフトマターの物理学という観点からは、時間とともに揺らぐナノスケールの3次元構造内での拡散現象といえる。本研究ではHA内の物質拡散現象のパラメータとして拡散係数 (D) に注目し、ソフトマトリクスの階層構造の時間的、空間的相関から生じる拡散係数の時間・空間依存性を、(空間的な) 観測範囲を変化させて実験的手法で測定した。³

【物質と方法】ヒアルロン酸：生合成による分子量30万のサンプル。拡散物質：シトクロム c (Cyt c: 直径 3.4nm)、トリスビピリジンルテニウム (II) 錯体 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$: 直径 1.0nm)、アレキサ 488 色素 (直径 0.97nm)、メチルビオローゲン (MV^{2+} : 短軸 0.5nm)。測定方法は、拡散律速の光励起2分子間反応から求める方法 (Photo-Chemical Bimolecular Reaction: PCBR)、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS)、パルス磁場勾配 NMR 法 (Pulsed-Field Gradient NMR: PFG-NMR) の3種類を用いた。FCS 法では、レーザー顕微鏡を使用しているため観測視野の範囲 (拡散距離) は光学系によって規定される。一方、PCBR 法、PFG-NMR 法においては観測時間 (前者は励起状態の寿命 τ 、後

者は磁場勾配パルス間隔 Δ)が実験上のパラメータとなるので、拡散係数の変化を3種の手法で比較するために、平均拡散距離に換算を行う必要がある。平均二乗変位 $\langle x^2 \rangle$ を用いて、

平均拡散距離 L を $\sqrt{\langle x^2 \rangle}$ と定義すると、PCBR法では $L = \sqrt{6D\tau}$ 、PFG-NMR法では

$L = \sqrt{2D\Delta}$ となる。その結果、3種の測定法でカバーする範囲はPCBR(数十nm)、FCS(数百nm)、PFG-NMR(数 μ m)にわたる。

【結果と考察】FCS法とPFG-NMR法では、HA水溶液中でのCytcの D はHAの濃度増加につれて減少し、Fig.1に示すようにHA濃度に対して指数関数的振る舞いをした。

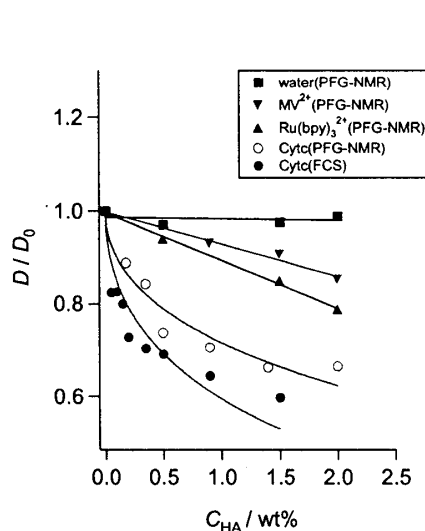


Fig.1 拡散係数のHA濃度(C_{HA})依存性

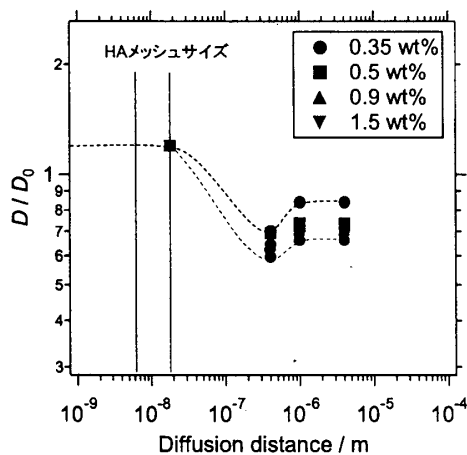


Fig.2 HA水溶液中でのシクロムcの拡散係数の拡散距離依存性

($D/D_0 = \exp(-aC_{HA}^{0.5})$)。この濃度依存性からHA水溶液の平均的なメッシュサイズが1.4wt%で6-9nmであることがわかった。また拡散係数の(HAフリーの溶液に対する)減少率(D/D_0)は、拡散分子が大きくなるほど高くなった。一方、三種類の方法で測定したCytcの D は、平均的なメッシュサイズ近傍の拡散距離ではHAを含まない溶液中の値とほとんど変わらないが、拡散距離が200nm以上では大きく減少することが明らかになった。

(Fig.2) これら2つの結果は、HAゲルの中においては、物質拡散は空間相関をもち、拡散係数がもはや定数ではなく時間に依存した物理量になっていることを示している。また、 D の距離依存性においてメッシュサイズより一桁程度大きな領域に拡散係数が大きく落ち込む領域があるが、この急激な拡散係数の減少曲線はHAゲルの不規則な構造およびその時間的な揺らぎ、拡散物質の大きさに依存している。生体内でも、このような拡散係数の距離依存性とHA濃度依存性により物質拡散がコントロールされているものと考えられる。

【参考文献】

1. Scott, J. E. in "The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives (Laurent, T. C., eds.)", Wenner-Gren International Series Vol. 72, (1998), pp.7-15, Portland Press, London.
2. Brecht, M. *et al.*, Biochem. J., 239, (1986), 445-450.
3. Masuda, A., Ushida, K., *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 123, (2001), 11468-11471.