

凝集性蛋白質溶液のゲル化現象の解明

京都工芸繊維大学 繊維学部

柴山 充弘

The aggregation mechanism and aggregated structure of globular protein, β -lactoglobulin (β -LG), have been studied by dynamic light scattering (DLS) and small angle neutron scattering (SANS). DLS shows that time intensity correlation functions for β -LG solutions prepared at pH 2 and 7 indicated a power law behavior around gelation threshold. The critical exponent related to the relaxation time, n , was 0.5 at pH2 and 0.7 at 7, which can be explained by percolation theory without and with excluded volume effect, respectively. It is known that the value $n \cong 0.66$ suggests a highly branched percolated cluster. On the other hand, a lower value of n is expected for a chain-like structure where the excluded volume is screened. SANS results show that the scattered intensity for β -LG at pH 2 increased with heat-induced aggregation, while that at pH 7 exhibits a distinct maximum at the scattering vector, $q = 0.025\text{\AA}^{-1}$. This is due to microphase separation, which was well reproduced by the Borue-Erukhimovich theory of weakly charged polyelectrolyte solutions.

1. 緒言

高分子ゲルは、従来から食品工学や高分子加工において重要な位置を占めてきたが、最近ではその保湿性、薬剤保持性、形状安定性など、ゲル特有の機能を生かした化粧品や医薬品などが次々に開発されてきている。しかしながら、ゲル化のメカニズムや構造といったゲルの本質にかかわるような重要な問題の多くは未解明なままである。これまで我々は動的光散乱法 (DLS) によるゲルの多面的解析法を提唱し、その有用性を合成高分子を用いて検証してきた¹⁻⁵⁾。この手法をコスメトロジーにとって興味ある蛋白質のゲル化現象の研究に応用し、熱変性過程にある蛋白質の構造変化を実時間で観察することで、凝集およびゲル化機構の研究を行った。試料として用いた乳清蛋白質の主成分である β -ラクトグロブリン (β -LG) は pH 変化に対して可逆的な monomer-dimer 転移を示す球状タンパク質である。pH を変化させるとアミノ酸側鎖のイオン状態が変化し、電荷分布や水素結合性に影響するため、蛋白質の変性機構ならびに凝集機構に大きな影響を及ぼす。本研究では、異なる pH の β -LG 水溶液を加熱し、ゲル化するまでの構造変化ならびにダイナミクス変化を DLS によるゲル化点の決定やゲル化点近傍のフラクタル構造解析法⁶⁾ を用いて解析した。また小角中性子散乱測定 (SANS) を行うことにより、ナノメートル領域の微視的構造変化についても検討した。

2. 実験

DLS 測定: SIGMA 社製の β -LG (L0130, Lot114H7055) 水溶液 (0.05, 0.1g/mL) を HCl を用いて pH2 及び pH7 に調整した。その各試料を約 75°C に温度制御されたサンプルホルダーの中に入れ、熱凝集する過程を動的散乱装置 (ALV 社製) を用いて測定した。光源には 22mW の He-Ne レーザー (波長 632.8nm) を用い、散乱角 90° で測定を行なった。

SANS 測定: DCI により pH2 及び pH7 に調整した β -LG 重水溶液 (0.09g/mL) を約 75°C で加熱し、その凝集過程を時系列的に測定した。測定には SANS-U (東大物性研究所; 茨城県東海村) を用い、波長 7 Å、散乱ベクトル $0.01 < q < 0.08\text{\AA}^{-1}$ の条件で行った。

3. 結果と考察

まず動的散乱から得られた結果を Fig.1 に示す。上の段に pH2 および pH7 の時間に対する散乱強度の変化を示しており、下の段には相関関数の時間ゼロに対応する初期振幅 (σ_1^2) の変化を示したものである。

散乱強度は熱凝集が進むにつれて上昇し、やがて pH7、0.05g/mL の試料を除いて強度が急激に揺らぎ始める。この点がゲル化点であり、図中の矢印で示している。また下段を見てみるとゲル化点に対応する時間で初期振幅が減少し始めている。この現象はエルゴード性を保持する溶液から制限エルゴード性を示すゲルが形成したことを意味するものである。次に pH2 と pH7 の初期の凝集過程を比較してみると、pH2 は数時間かけて散乱強度が徐々に上昇しているに対して、pH7 は最初の数十分の間に急激に散乱強度が上昇するという結果が得られた。次にゲル化時間に注目すると、pH2 の 0.1g/mL 試料は約 2 時間後にゲル化し、0.05g/mL の試料は約 4 時間後にゲル化した。すなわち濃度が半減するとゲル化時間が倍となっている。pH7 の場



Study on the gelation process of aggregative protein solutions

Mitsuhiro Shibayama

Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

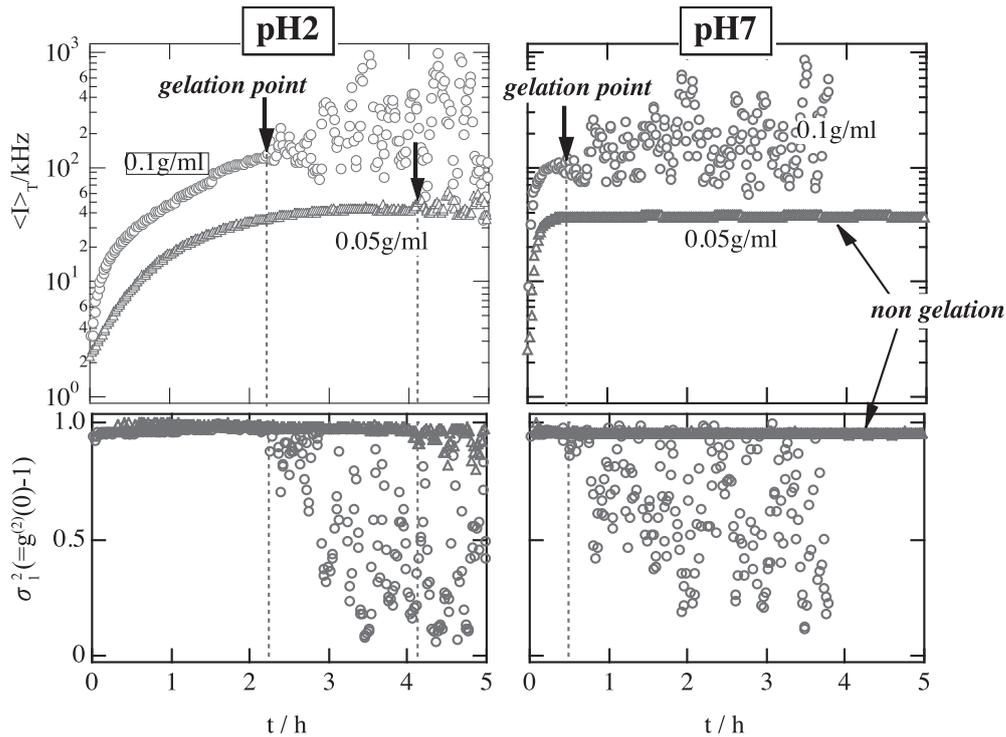


Fig.1 Variation of the scattered intensity, $\langle I \rangle_t$, and the initial amplitude of the intensity correlation function, σ_1^2 .

合、0.1g/mLの試料は約30分であり同濃度のpH2試料に比べて早くゲル化したが、0.05g/mLの試料はゲル化せず、散乱強度はすぐに定常値になり、初期振幅にも変化は見られなかった。こういったことから、pH2とpH7では凝集機構が異なることが考えられる。これらの結果はシリカゲルの酸性触媒と塩基性触媒下での重合方法の違いで観察された散乱強度の挙動変化⁷⁾と大変よく合致しており、pH2の場合が酸性触媒系に、pH7の場合が塩基性触媒系に挙動に酷似している。

次にFig.2(a), (b)に強度相関関数の時間変化を示す。pH2及びpH7ともに凝集が進むにつれ相関関数は長時間側にシフトし、Fig.1のゲル化点に対応する時間で相関関数がPower law decayを示した。このPower law decayを示した相関関数を以下のMartinらによる式⁸⁾でフィッティングした結果をFig.3に示す。

$$g^{(2)}(q, \tau) - 1 = \sigma_1^2 [A \exp(-\Gamma \tau) + (1-A) (1 + \tau/\tau^*)^{-(n-1)/2}]^2$$

この臨界指数 n はゲル化点において粘弾性測定から得られる臨界指数 $|G'(\omega)| = G'(\omega) \propto \omega^n$ と等価なものである。pH 2の臨界指数 n は二種類の濃度によらず約 $n \approx 0.5$ という値が得られた。この値はWinterら⁹⁾が粘弾性測定によって報告した値とほぼ一致しており、クラスターの成長過程において分岐が少ないものであることを示唆している。一方pH7で得られた約 $n \approx 0.7$ という値はパーコレーション理論から予測される値に大変近いものであり、クラスターの成長が多分岐であることを示唆する結果である。

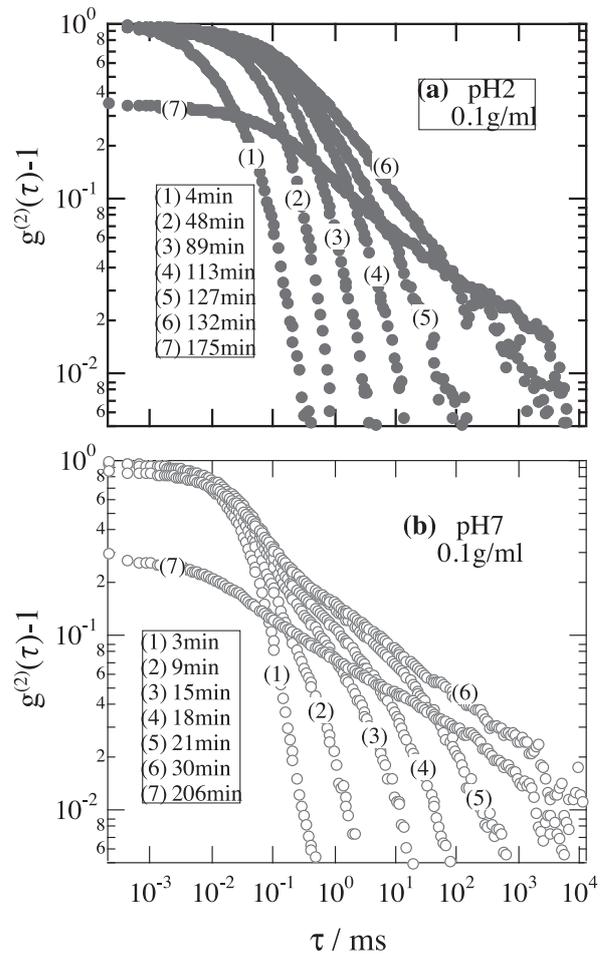


Fig.2 Intensity correlation function of β -LG during gelation. (a) pH2, (b) pH7.

このような pH2 及び pH7 での凝集構造の成長の違いは、変性温度 T_d とチオール基 (-SH) の反応性の違いが要因であると考えられる。pH2 の T_d は約 78°C¹⁰⁾、pH7 の T_d は約 67°C¹¹⁾ であるため、本測定温度 (75°C) では pH7 の方がより unfolding している。そのために pH7 では β -LG 分子に存在するフリーのチオール基 (-SH) とジスルフィド基 (R-SS-R') の交換反応などが生じやすくなり、さらにチオール基 (-SH) の反応性は弱アルカリ性側で高いことが要因であると考えられる。そのために pH7 の臨界指数 n が pH2 の場合より多分岐を示す値になると考えられる。

次に Fig.4 に SANS 測定から得られた pH2 および pH7 の β -LG の凝集機構の変化を示す。散乱関数を比較すると pH2 の場合、加熱時間が増すにつれて、散乱関数が小角側で徐々に立ち上がっているのがわかる。ところが

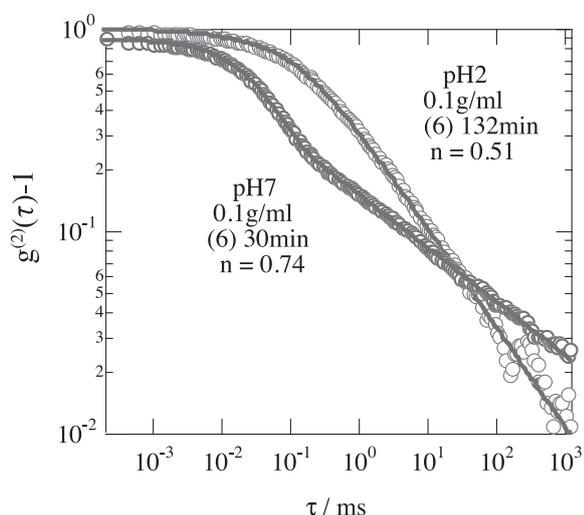


Fig.3 Power law analysis of intensity correlation function under pH2 and pH7.

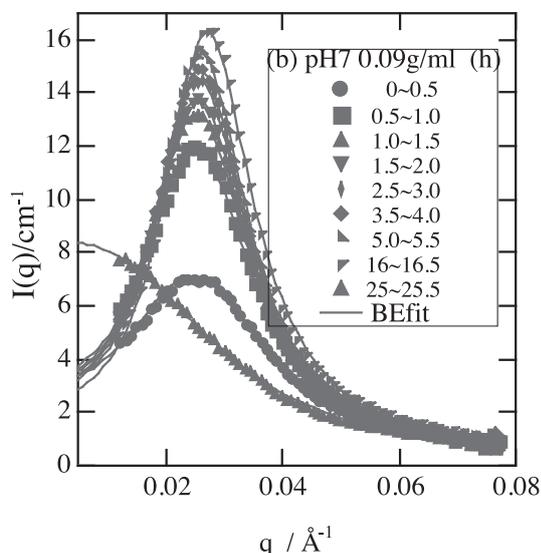
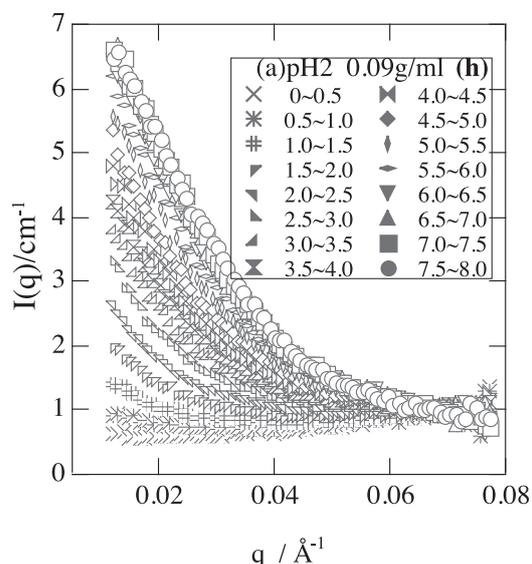


Fig.4 SANS results of β -LG of (a)pH2, (b)pH7

pH7 の場合、ゲル化後の試料 (\blacktriangle) を除いて散乱ベクトル約 0.025 \AA^{-1} 付近に顕著なピークが発現し、時間とともにピークが成長するという興味ある結果を得た。このピークは蛋白質が熱変性過程において荷電化 (三次構造が変化しイオン基を外に向ける形態変化) することを示すものであり、弱荷電系高分子が貧溶媒に置かれたときに発現するマイクロ相分離構造 (ナノメートルオーダーでの相分離) と同等と考えられる^{12,13)}。そこで貧溶媒中での高分子電解質の散乱関数 (構造因子) を平均場理論により導出した以下の式の様な Borue-Erukhimovich (BE) 散乱理論¹⁴⁾ を用いて解析を試みた。

$$S(x) = \frac{x+s}{(x^2+t)(x^2+s)+1}$$

ここで x 、 t 、 s 、はそれぞれ還元散乱ベクトル、還元温度、還元塩濃度である。

この BE 理論によると良溶媒系 (還元温度 $t > 0$) であれば還元塩濃度 s に依存せず散乱極大は出現しないが、貧溶媒 (還元温度 $t < 0$) でなおかつ還元塩濃度 ($0 < s < 1$) が低い場合に散乱極大が現れる。図のように pH7 の場合、後者の条件でうまく再現することができた。すなわち pH2 の場合は静電相互作用が溶媒中の電荷によって遮蔽されるが、pH7 の場合は遮蔽されないため静電反発力が作用し、凝集力と拮抗することによってマイクロ相分離構造が発現すると考えられる。

4. 総括

これまで我々が提唱してきた動的光散乱法によるゲル化点の決定法やフラクタル解析法などの多面的解析法が天然高分子である球状タンパク質のゲル化現象の測定においても有効であることがわかった。その結果、pH2 および

pH7 水溶液の凝集及びゲル化機構に違いがあることが明らかとなり、pH2 の場合は分岐が少ないクラスター成長であり、pH7 の場合はクラスターの成長が多分岐でありパーコレーション的であることがわかった。また小角中性子散乱測定においても pH2 と pH7 の凝集機構に顕著な違いが観察され、特に pH7 の試料では貧溶媒中における弱電解質系高分子のミクロ相分離構造と類似の構造を持つ凝集体が形成されることがわかった。本研究で明らかになったように、蛋白質の凝集およびゲル化現象において普遍的に見られる現象や球状タンパク質の凝集機構の特殊性の解明に、静的・動的散乱法が非常に有効であることが示された。今後、さらに温度、pH、塩濃度などの様々な因子と凝集機構の相関関係を明確にしていく予定である。

5. 総括

本研究をご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に対しまして、厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、ご助力をいただきました田中直毅博士、高田慎一氏に深謝いたします。

(参考文献)

- 1) M. Shibayama, S. Takata, and T. Norisuye, : Static inhomogeneities and dynamic fluctuations of temperature sensitive polymer gels : *Physica A* **249**, 245 (1998).
- 2) M. Shibayama, : Spatial inhomogeneity and dynamic fluctuations of polymer gels : *Macromol. Chem. Phys.* **199**, 1 (1998).
- 3) T. Norisuye, M. Shibayama, and R. Tamaki, et. al., : Time-resolved dynamic light scattering studies on gelation process of organic-inorganic polymer hybrid : *Macromolecules* **32**, 1528 (1999).
- 4) S. Takata, T. Norisuye, and M. Shibayama, : Preparation temperature dependence and effects of hydrolysis on static inhomogeneities of poly(acrylamide) gels : *Macromolecules* **32**, 3989 (1999).
- 5) F. Ikkai, and M. Shibayama, : Static Inhomogeneities in thermoreversible physical gels : *Phys. Rev. Lett.*, **82**, 4946 (1999)
- 6) 柴山充弘, : ゲルのフラクタル解析 : *高分子*, **48**, 78 (1999).
- 7) T. Norisuye, M. Inoue, M. Shibayama, et. al., : Dynamics of silica gels during gelation under acidic and basic conditions : *Macromolecules*, **33**, 900. (2000).
- 8) J. E. Martin, J. Wilcoxon, and J. Odinek, : Decay of density fluctuations in gels : *Phys. Rev. A*, **43**, 858 (1991).
- 9) H. H. Winter and F. Chambon, : Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point : *J. Rheology*, **30**, 367 (1986).
- 10) Y. V. Griko, and P. L. Privalov, : Calorimetric study of the heat and cold denaturation of β -lactoglobulin : *Biochemistry*, **31**, 8810, (1992)
- 11) W. G. Griffin, M. C. A. Griffin, and S. R. Martin, et. al., : Molecular Basis of thermal aggregation of bovine β -lactoglobulin A : *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**, 18 (1993)
- 12) F. Schosseler, F. Ilmain, and S. J. Candau, : Structure and properties of partially neutralized poly(acrylic acid) gels : *Macromolecules*, **24**, 225 (1991).
- 13) M. Shibayama, and T. Tanaka, : Small-angle neutron scattering study on weakly charged poly(N-isopropyl acrylamide-co-acrylic acid) copolymer solutions : *J. Chem. Phys.*, **102**, 9392 (1995)
- 14) V. Y. Borue, and I. Ya. Erukhimovich, : A statistical theory of weakly charged polyelectrolytes : fluctuations, equation of state, and microphase separation : *Macromolecules*, **21**, 3240 (1988).