

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659018

 研究課題名（和文） 自己組織的につくられる規則的ナノ構造によるナノ物質の選択的な捕
 捉・濃縮・分離

 研究課題名（英文） Selective recognition, condensation and separation of nanomaterials
 using regularly arrayed nanostructure prepared by self-assembly

研究代表者

加藤 大 (KATO MASARU)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任准教授

研究者番号：30332943

研究成果の概要（和文）：ナノテクノロジーの発展によりナノサイズの細孔（ナノポア）の簡単な調製法が開発されている。本研究では、界面活性剤（ポリオキシエチレンラウリルエーテル、C12EO50）を利用して規則的なナノ構造であるキュービック構造を有するゲルを作製し、生理活性物質の分離を電気泳動法で試みた。その結果、ペプチド、アミノ酸、鎖長の短い DNA 等の小さい分子は良好に泳動されたのに対し、タンパク質や鎖長の長い DNA などは原点に留まったままだった。したがってナノポアの大きさ（約 5nm）より小さい、低分子化合物の分離に本ゲルは利用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The preparation of nanometer-scale pores, or nanopores, has become easy because of the progress in nanotechnology. Surfactants are promising materials for the preparation of nanostructures containing nanopores, because surfactants form many different phase structures, including cubic, micellar, and lamellar structures. We prepared a gel matrix with a cubic structure from a commercially available surfactant, polyoxyethylene(50) lauryl ether (C12EO50). This gel matrix had regularly arrayed nanopores between the packed spherical micelles. We used the gel to separate biomolecules by means of slab gel electrophoresis. The gel was applicable to migration of amino acids and peptides; however, larger molecules, such as proteins and single-walled carbon nanotubes, did not migrate through the gel. We concluded that the pore size was too small for the penetration of large molecules, and that only small molecules could penetrate the gel matrix. The migration mechanism of small molecules was similar to that observed in conventional gel electrophoresis. We concluded that the gel matrix prepared from surfactant is a promising matrix for migration and purification of small molecules. We also expect that the gel can be used as a nanoscale filter to trap large molecules, allowing only small molecules to pass.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：タンパク質、ナノ構造、アミノ酸、ペプチド、ゲル電気泳動

1. 研究開始当初の背景

ポリアクリルアミドやアガロースなどのゲルは、タンパク質やDNA等の高分子化合物の分離精製に多用されている。ゲルによって高分子が分離されるメカニズムは、ゲルが形成する空隙の通り易さの違いで分離されると考えられており、大きな物質ほど隙間を通り抜けるのが困難なため速度が遅く、小さい物質ほど隙間を簡単に通り抜けることから速い速度で移動する。そしてゲルの調製条件を変化させることで、隙間の大きさを変化させることができ標的としている高分子に適した隙間の構造を調製し、分離に用いられてきた。しかし汎用されているポリアクリルアミドやアガロースゲルの隙間の大きさは透過したタンパク質やDNAの大きさ、電子顕微鏡による観察などによってその大きさは、20-100nm程度だと考えられている。

ポリオキシエチレンラウリルエーテルである界面活性剤は、分子のもつ親水部と疎水部がそれぞれ集合することで自己組織的に規則的なナノ構造を形成することが知られている。いろいろな規則的なナノ構造を形成することから、新しいスラブゲル電気泳動の担体としての利用が期待された。ポリオキシエチレンラウリルエーテルが形成する隙間の大きさは、シングル nm であり、これまでのアクリルアミドゲルやアガロースゲルと比較してその隙間の大きさは非常に小さい。

2. 研究の目的

本研究では、ポリオキシエチレンラウリルエーテルを用いてゲルを調製し、そのゲルが有する規則的なナノ構造を物質の分離に利用した。

3. 研究の方法

(1) ゲルの調製

ポリオキシエチレンラウリルエーテル (C12EO50) と水との等量混合物を 70℃ に加熱し、ゲル板に流し込み、室温に冷やすことでゲル (幅 60mm, 高さ 60mm, 厚さ 0.75mm) を調製した。

(2) X線回折

X線回折の測定には、M03X-HF22 powder diffractometer (Bruker AXS K.K.)を用いた。

(3) 試料の誘導体化

試料の FITC I 及び DNS-Cl による蛍光標識反応は、0.5M 炭酸緩衝液 (pH9) を用いた。FITC I の場合には室温で3時間、DNS-Cl の場合には 75 度で 45 分間反応を行った。NBD-F による蛍光標識反応は、0.1M ホウ酸緩衝液 (pH8) を用い、60 度で5分間反応させた。

(4) 電気泳動

電気泳動には、Tris-Gly 緩衝液を用い、500V の電圧を1時間引加した。

4. 研究成果

(1) ゲルの構造解析

ゲルの調製には、ポリオキシエチレンラウリルエーテルと水を用い、加温操作のみが必要なため、調製は極めて容易であると言える。またアクリルアミドなどの毒性が疑われている試薬を使用せず、ゲル化によって新たな化学結合が形成されず、ゲル化と水溶液への変換が可逆反応であるため、泳動後に加熱や水の添加によってゲルを水溶液に戻すことができるため、泳動後の試料バンドの回収も容易であると期待される。さらにゲルは無色透明であり蛍光も有さないことから、試料バンドの観察に障害はなかった。以上より、本ゲルは、スラブゲル用の担体として利用できると考えた。

X線回折を測定することで、本ゲルが形成する規則的構造の解析を行った。その結果を図1に示した。このように明瞭なピークが、 $2\theta=1.37^\circ$ に検出された。また類似構造を有する界面活性剤が形成するゲル構造の結果も参考にし、本ゲルは図2に示す規則的な構造を形成していると考えた。まず C12EO50 が、直径 8nm の球状ミセルを形成し、さらにそのミセル同士が一辺が 9.2nm の立方体に体心立方の形で充填されている。その場合、ミセル間に、約 5nm の隙間が存在することから、本ゲルには、多数の 5nm の空隙が規則的に配列していると考えられた。

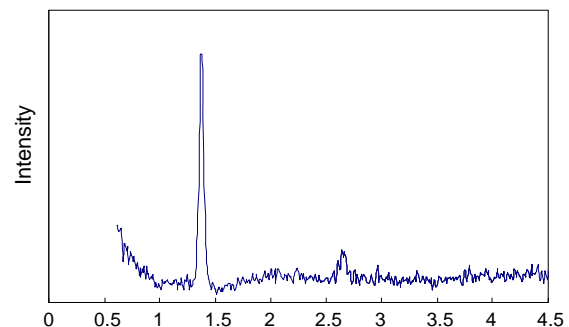


図1 調製したゲルの X線回折パターン

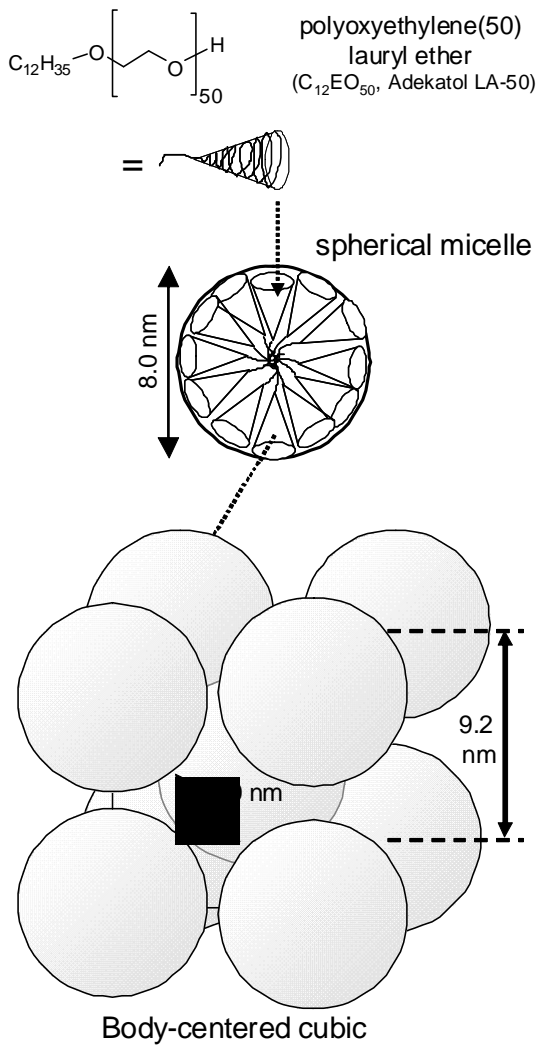


図2 ゲル構造の模式図

(2) ペプチドの泳動

始めに7種類のペプチド (GSH, GSSG, β-casomorphin-5, neurokinin A, [Val⁵]-angiotensin I, insulin, Des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin) の FITC 誘導体の泳動を行った。各物質の泳動距離は、蛍光試薬由来のバンドの泳動距離を1とし、その相対的な泳動距離で評価した。各ペプチド試料は、分子量が小さいため試料には SDS を添加せず、その配列から分子量と電荷を求め、m/z の値を計算した。図3に相対泳動距離と m/z との関係を示した。一般的なゲル電気泳動と同様に、各ペプチドは陽極側に泳動され、m/z の値が小さい物質ほど泳動距離は大きくなり、逆に m/z が大きくなると物質の泳動距離は小さくなった。これは負電荷が試料を陽極側に引き寄せ、ゲルが形成している網目構造が移動の障害となり、試料の移動速度を決定していると考えられる。m/z が 400

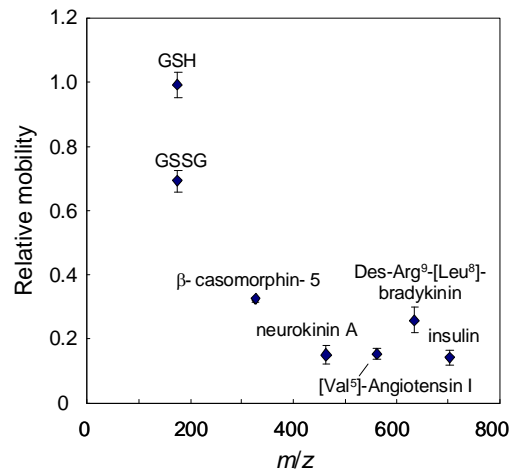


図3 ペプチドの泳動結果

を越えるとペプチドの相対泳動距離は 0.2 となり、m/z の値がより大きくなっても泳動距離はほぼ一定のままであった。以上の結果より、m/z が 100-700 の範囲では、主に m/z の順番で泳動されていると考えられる。

(3) タンパク質・カーボンナノチューブの泳動

次に分子量がさらに大きな物質としてアルブミンとカーボンナノチューブの泳動を試みた。これらの物質は、試料に負電荷を帯電させる目的で、アルブミンは SDS を、カーボンナノチューブはトリフェニレン誘導体を付加させた後、電気泳動を行った。上記の m/z が 400-700 のペプチドは泳動されたのに対して、タンパク質やナノチューブは原点から動かず、留まっていた。したがって本ゲルでは、試料の大きさが非常に大きくなるとほとんど泳動されなくなると考えられる。これは分子が大きくなりすぎて物質がゲルの隙間を通過できず泳動できなかったと考えられる。したがって本ゲルはある一定の分子量以上の物質を透過させないフィルターとしての利用も可能であると考えられる。

(4) アミノ酸の泳動

今度は、小さい分子量範囲についてより詳細に検討を行うことにした。そこでアミノ酸の蛍光標識体を試料に用いることにした。蛍光誘導体化試薬として、これまでの FITC I に加えて、DNS-Cl および NBD-F を用いた。3種類の蛍光誘導体化試薬について、大きさを比較すると FITC はキサンチン、DNS はナフタレン、NBD はベンゾフラザン骨格を有しており、それぞれの大きさは約 1.3nm、0.9nm、0.9nm であり、FITC が少し大きく、DNS と NBD の大きさはほぼ同じである。試薬の電荷を比較すると、FITC はカルボン酸とフェノール性水酸基を有しているため2個の負電荷を有しているが、他の蛍光試薬は

電荷がない。図4に泳動結果をまとめた。アミノ酸についても、相対泳動距離と m/z との間には、ペプチドの時に観察された相関が観察された。酸性アミノ酸である Asp の NBD 及び DNS 標識体の相対泳動距離が 1.6 と 1.2 となり非常に大きかった。これは Asp が酸性アミノ酸であり、カルボン酸を2個持っていることと共に、分子量が小さいため泳動され易かったと考えられる。3つの蛍光試薬を比較した結果、FITC で標識化されたアミノ酸の相対泳動距離の最少値が 0.5 であり、他の標識アミノ酸と比較して大きな値を示した。これは FITC が2個の負電荷を有するため陽極側に引き寄せられる力が強いと考えられる。また2個の負電荷によって z の値が大きくなるため、 m/z の値は小さくなることから、FITC 標識体はグラフの左上の部分に固まっている。一方、DNS 及び NBD-アミノ酸はグラフ全体の広い範囲にちらばっており、2つの蛍光試薬の間では泳動に大きな違いは見られなかった。以上のことから、本ゲルはアミノ酸のような低分子化合物の分離精製に利用できると期待される。FITC で標識すると m/z の値が小さくなり、その値が近似する傾向があるので試料間の分離が悪くなるが、比較的長い距離泳動される傾向がある。一方、NBD や DNS で標識すると、試料の相対泳動距離が散らばり、それぞれが分離されるが、 m/z の値が大きい試料 (Lys 等) は、殆ど泳動されず、分離することが難しかった。

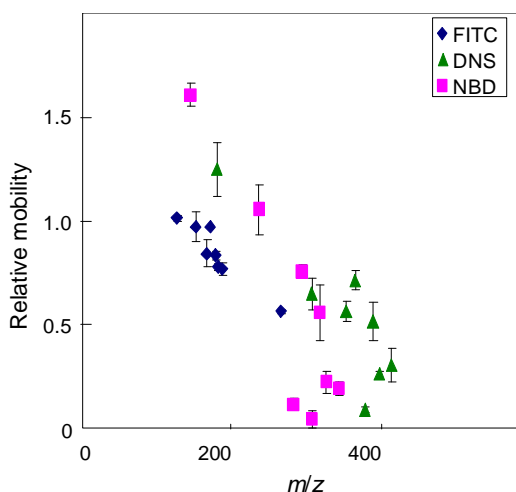


図4 アミノ酸の泳動結果

(5) DNA の泳動

本ゲルは、アミノ酸やペプチドを m/z に基づいて泳動する性質を有していた。スラブゲル電気泳動は DNA 分離に頻用されていることから、本ゲルを DNA 分離に利用した。DNA については、10bp や 16bp の DNA は泳動さ

れた。30bp の DNA は、僅かに泳動され、50bp より長い DNA は泳動されなかった。このように bp が大きくなるほど、DNA の移動速度が減少した。したがって DNA もアミノ酸やペプチドと同様に m/z で分離がされていると考えられる。しかし DNA の分離に利用されている、アガロースやアクリルアミドゲル電気泳動と比較して、泳動可能な DNA の鎖長が非常に短かかった。以上から、30bp より長い DNA は、キュービック構造を有する本ゲルの隙間を通り抜けるには大きすぎ、原点に留まっていると考えられる。

X線回折の結果から本ゲルはキュービック構造を形成しており、孔径が 5nm のナノポアが規則的に配列していると計算できる。今回分離した試料の大きさと孔径を比較すると、泳動されたアミノ酸やペプチドは孔径より小さく、泳動されなかったタンパク質や SWNTs は孔径より大きい。つまりゲルに存在する孔径が、試料が泳動されるか、原点に留まるかを決定する重要な因子になっていると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) Masaru Kato, Yusuke Suwanai, Atsushi Shimojima, Tomofumi Santa: A surfactant-based, regularly arrayed nanostructure gel matrix for migration of small molecules Electrophoresis. 33, 3339-3342 (2012). 査読有
DOI: 10.1002/elps.201200235.

[学会発表] (計2件)

(1) 加藤 大、ナノ空間を利用した生体物質の分析、第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム、鶴岡、2011年11月10日

(2) 加藤 大、規則的なナノ構造を利用した生体物質の分離、日本分析化学会第61年会、金沢、2012年9月19日

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/CNBI/kato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 大 (KATO MASARU)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任准教授

研究者番号: 30332943