

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655063

研究課題名(和文) 衝撃波を用いた分子量分析と質量シフト法の開発

研究課題名(英文) Measurement of Molecular Weight by Shockwave and Development of Mass-shift Method

研究代表者

一ノ瀬 暢之 (Ichinose, Nobuyuki)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・教授

研究者番号：00232405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：顕微鏡下にパルスレーザーを用いて衝撃波を発生させ、水溶液中の高分子を移動させることによる分子量測定を検討した。多糖類、タンパクの移動距離はそれぞれ異なる分子量依存性を示し、分子会合による水溶液中の分子量増加に対応した移動距離が観測された。また、タンパクに対して低分子の界面活性剤を会合させると質量増加が起こるにもかかわらず、移動距離の減少が観測された。これは、タンパクの分子鎖が界面活性剤との会合により伸びた形状になるためであると考えられる。以上の結果から、分子量だけではなく、水溶液中でのこれらの高分子の形状が衝撃波との相互作用の移動距離を支配する因子であると結論された。

研究成果の概要(英文)：Measurement of molecular weight of polymers from the microscopic distance of movement, which is afforded by the action of laser-induced shockwave, has been studied. The distances afforded to polysaccharides and proteins increased with the molecular weight in different manners and association like dimerization of molecules showed a shift in the distance corresponding to their molecular weight. A decrease of the distance was observed when proteins were associated with surfactant molecules although the molecular weights were expected to increase. This has been attributed to a change in their molecular shape which was elongated by the association of the surfactant molecules. It has been concluded from these results that molecular shape in solution is an important factor as well as molecular weight determine the distance afforded by the action of shockwave in solution.

研究分野：光化学

キーワード：レーザー衝撃波 分子量測定 分子形状 生体高分子 会合体

1. 研究開始当初の背景

ナノメートルサイズの粒子や分子集合体、巨大分子（ナノ物質）の工業的な利用が期待されているが、それらの毒性に対する懸念も一方で指摘されている。しかし、ナノ物質の迅速・簡便な分析に関する技術は、未だ不十分であり、それらの迅速な分析は確立していない。一方、天然および合成高分子の分子量やその分布の分析法として、ゲル浸透クロマトグラフィーや電気泳動法などが従来から行われているが、その測定も非常に時間がかかる。簡便なナノ粒子・分子の粒径の評価は、光散乱法に限定されるが、光散乱法は数十ナノメートル以上の粒子についてのみ測定可能であり、それ以下のサイズでは測定できない。分子量測定は、質量分析法が唯一の分析方法と考えられるが、装置が高額であることが難点である。

研究開始当初、顕微鏡下においてレーザーパルス水を水などの液体中に集光して衝撃波を発生させ、生体細胞や細胞の一部分のマニピュレーションや加工を非接触に行うことが盛んに行われていた[1-3]。我々は、レーザー誘起衝撃波がナノメートルサイズの分子・粒子を、サブミリメートルの距離を移動させる現象を見出し、これをクロマトグラフィーの原理とすることを着想した（レーザークロマトグラフィー法）。キャピラリー中で液中の粒子・分子をレーザー誘起衝撃波により加速・移動させ、移動前後の画像計測による粒子・分子の移動距離の測定を行う、簡便、迅速なナノメートルサイズの粒子・分子の分析を可能にする装置のプロトタイプ機を構築し、タンパクや無機ナノ粒子の分子量（質量）と移動距離の相関関係を見出した[4]。しかし、タンパクなどのレーザークロマトグラフィー法では、およそ 10 kDa の分子量以下の分子は衝撃波によって移動しないことが明らかになったため、タンパクの中でもそのような分子量のものでもインシュリンのように生体内で重要な役割を果たすため、それらの分析が可能になる必要性を認識するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、液体中でパルスレーザー光を集光することにより発生する衝撃波を用いて、液中に存在するナノメートルオーダーの微粒子・分子をサイズ・分子量に応じて移動させるレーザークロマトグラフィー法を確立し分析に応用する。その対象のサイズ・分子量には 10 kDa 程度のしきい値があるため、適用範囲を低分子にまで拡張するには、(1) 界面活性剤や錯体形成による分子量増加、(2) 蛍光性ナノ粒子あるいはタンパクを、選択的に結合する（蛍光性質タグ）ことによる分子量増加を図る。さらに、(3) 検出感度を単分子レベルまで向上させ、極微量で分子量を測定することを目的とした。これら

のにより、ナノ粒子や巨大分子のレーザー誘起衝撃波による分離・分析（レーザークロマトグラフィー法）について、実用的なレベルでの分子量範囲の測定を行うこと、それによる生体高分子等の会合や分解反応の追跡できる迅速かつ高感度の分析技術の確立を目指し、対象分子のミセル等の形成や質量既知の分子・粒子との選択的な結合による質量のシフトを行う方法により、対象分子およびその会合体の分子量測定が可能になることを期待した。

3. 研究の方法

実験は、図 1 に示すような装置を用いて行った。実験方法は文献[4]に記載の方法とほぼ同じである。

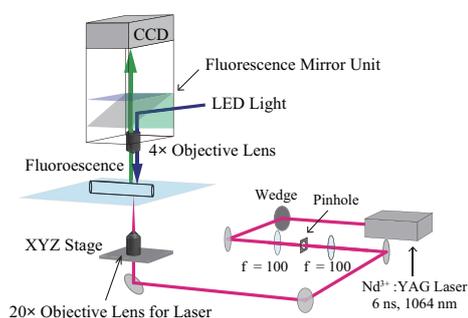


図 1. レーザークロマトグラフィー法の装置の概略図。

装置全体は、蛍光顕微鏡を基本としている。Nd³⁺:YAG レーザー（半値幅 6 ns, 1064 nm）の基本波パルス 1 ショット（約 250 μJ）を衝撃波発生用のレーザー光源として用い顕微鏡の下方からステージ上の試料を含むガラスキャピラリーに集光し、キャピラリー内の液中に衝撃波を発生させるようになっている。試料の蛍光観察は、照明光として後方に配置した青色 LED 光（3W, ピーク波長 458 nm, FWHM 11 nm）をミラーで反射し上方より同軸で試料に入射する。照明光により励起された試料からの蛍光像は、ダイクロイックミラーとバンドパスフィルターを透過し顕微鏡上部に取り付けられた冷却 CCD に結像される。衝撃波発生前後の蛍光画像を CCD カメラにて撮影することで、水相に移動した試料の分布を観測した。レーザー照射前後の蛍光画像の数値化した蛍光強度差を取り、キャピラリー内の単軸方向に積分し、衝撃波による試料の移動距離のクロマトグラムを構築した。

試料の調整、照射は以下の通りに行った。ホウ酸緩衝溶液 10 mL に魚由来のゼラチン（新田ゼラチン, P-5802, 以下 Fish gelatin）0.4 g を加え、40 °C で 30 min 攪拌し 4 wt%ゼラチンゲルを調整しペトリ皿に展開し、厚さ約 170 μm のゲル膜とした。作成したゲル膜上に測定サンプル 2 μL を 1 cm² に塗り伸ばし試料をゲル上に固定した。毛細管現象を利用し

40 %Glycerin/ホウ酸緩衝溶液をガラスキャピラリー (Hirschmann, minicaps, Volume 2 μL , L 30 mm, Inner diameter 280 μm) 中に満たした。キャピラリーを 4 wt%ゼラチンゲル上に固定された試料に突き刺すことでキャピラリー中に試料を導入した。ゼラチンゲルは、測定直前にカバーガラス下に配置したニクロム線に電圧を印加することで、40 $^{\circ}\text{C}$ に加熱し、溶解させた。ゲルの溶解直後、試料-水相界面から試料側に約 50 μm の位置に基本波パルス 1 ショットを集光し、衝撃波を発生させた。

試料として、市販の分子量既知の多糖類 (デキストラン、キトサン)、タンパク (牛血清由来アルブミン、卵由来アルブミン、魚由来コラーゲン) をそれぞれそのまま用いた。

試料分子の蛍光ラベル化は、多糖類では 8-アミノナフタレン-1,3,6-トリスルホン酸 (ANTS) を末端アルドースの還元的アミノ化反応を用いて結合させた。タンパクでは、フルオレッセインイソチオシアナート I (FITC-I) を末端アミノ基と反応させ蛍光ラベル化を行った。

界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた。

4. 研究成果

初めに、種々のタンパクの分子量-移動距離の相関関係を広い分子量領域に拡張することを試みた。二価性のカップリング試料を用いて、牛血清アルブミンと種々のタンパクを結合させることを試みたが、微量試料の透析や電気泳動などの操作による精製や反応などに失敗し、種々の質量カップリングした試料を得ることはできなかった。そこで、アルブミン等に含まれるジスルフィド結合によるタンパク二量体をジチオスレイトールやメルカプトエタノールを用いて還元的に単量体として分解し、レーザークロマトグラフィーを検討した。その結果、これまでに得られた分子量-移動距離の相関関係を再現した。また、単量体の移動距離が減少することを観測し、概念的に質量増加により移動距離増加が期待できることを確認した。

次にタンパク試料に界面活性剤を共存させることを行った。SDS を、卵由来アルブミン (分子量 42.73 kDa) 試料溶液に $[\text{SDS}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$ の濃度で共存させ、衝撃波発生前後の CCD カメラ撮影による蛍光画像、および衝撃波発生前後の蛍光強度差の画像を図 2 に示す。キャピラリー中に泡が発生しているが、クロマトグラム (図 3) を構成するための数値積分は泡の部分を外して行っているため、移動距離に対する泡の影響は無い。このクロマトグラムのピーク位置から卵由来アルブミンの移動距離は、130 μm と見積もることができる。SDS が共存しない場合には移動距離は 162 μm であったことから、SDS の添加により移動距離が減少したことが判った。SDS 濃度をさらに増大させると、移動距離は減少

し、SDS の臨界ミセル濃度 ($\text{CMC} = 7 \times 10^{-3} \text{ M}$) 付近を越えるとさらに移動距離は減少した。種々のタンパクについて、SDS 濃度と移動距離の関係をまとめたものを表 1 および図 4 に示す。

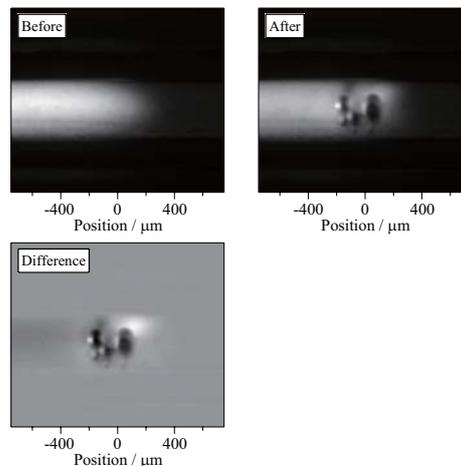


図 2. 卵由来アルブミンの $[\text{SDS}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$ 共存下でのレーザー照射前後、および差を示す蛍光画像。

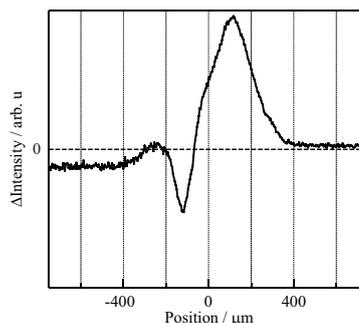


図 3. 図 2 の積分により得られたクロマトグラム。

表 1. 種々のタンパクの移動距離に対する

Protein	Mw / kDa	Distance / μm					
		[SDS] / 10^{-3} M					
		0	0.5	2	4	6	15
Ovalbumin	42.73	162	133	104	58	17	17
BSA	66.31	196	142	130	100	33	33
Collagen monomer	89.13	309	229	165	125	41	42
Collagen dimer	173.78	434	360	278	229	197	175

SDS の添加効果

いずれの場合にも、分子量と移動距離との間にはほぼ直線関係があることが判る。この結果を、さらに SDS を無添加の場合の移動距離に対して規格化し、SDS 濃度との関係を両対数プロットしたものを図 5 に示す。図 5 から、明らかに SDS の CMC 付近での移動距離の減少が著しいことが判り、タンパクと SDS との相互作用が急激に起こることが示唆される。図 5 の曲線は、SDS 溶液の表面張力の濃度依

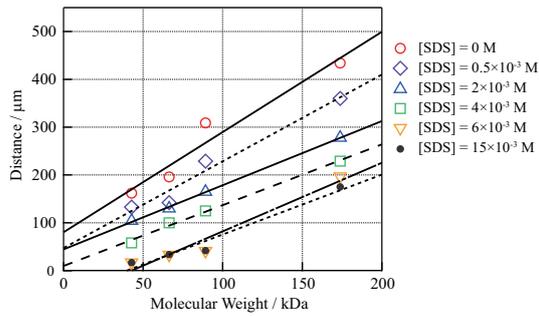


図 4. 種々の濃度の SDS 存在下におけるタンパクの分子量と移動距離の関係.

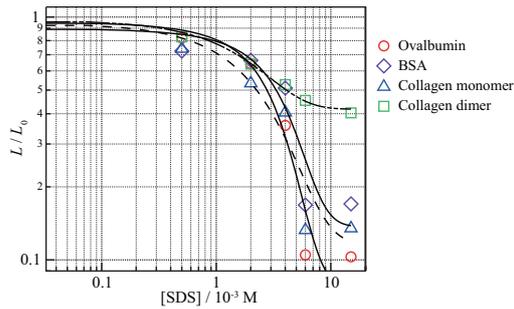


図 5. SDS 無添加の移動距離に対して規格化した移動距離と SDS 濃度との関係.

存性に類似している。また、これまでの結果から、移動距離は、共存する低分子や高分子の影響を受けないことも解っており、共存する SDS 分子による影響は、タンパク主鎖と SDS の疎水相互作用による構造変化と考えられる。タンパク質と SDS の複合ミセル形成に伴い、タンパク質の高次構造が破壊され、タンパク質が線状に形状が変化し、タンパク質の流体力学半径 (Stokes Size) が増加することが報告されている[5]。したがって、今回観測された変化は、衝撃波により加速、粘性抵抗による減速によって決まると考えられる移動距離が、タンパク主鎖が伸びる形状変化によってもとのタンパクと異なる分子量の関数関係に変化したものと思われる。また、コラーゲン二量体では分子がより剛直であるため SDS の効果を受け難いこともこれにより説明できる。

多糖類は、タンパクに比べて溶液中における主鎖の拡がり、分岐が著しくない場合、直線に近いコイル状となっている。しかし、多糖類の蛍光ラベル化はタンパクに比べて難しい。そのため、蛍光法を用いた研究は、その重要性にも関わらず、タンパクほどなされていない。我々は、還元的アミノ化を用いて末端アルドースを、アミノ基を持つ ANTS でラベル化を行った試料を用いてレーザークロマトグラフィー法の適用を検討した。初めに、分子量が定まったデキストランの標準試料 (分子量: 80, 100, 150, 270 kDa) を用いて分子量-移動距離の関係を求め、次に市販の試薬用デキストラン (分子量: 40, 70

kDa) の測定を行った。得られた分子量と移動距離の関係を同条件下で測定したタンパクのものと比較したところ、あきらかにデキストランでは直線の傾きが小さく、タンパク-SDS の系と同様に分子の形状がより線形に近いことによる効果であると考えられる (図 6)。

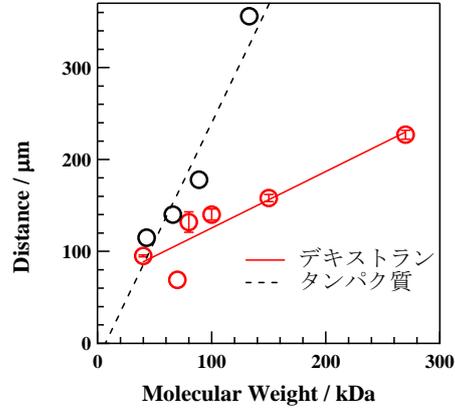


図 6. デキストランおよびタンパクの分子量と移動距離の関係.

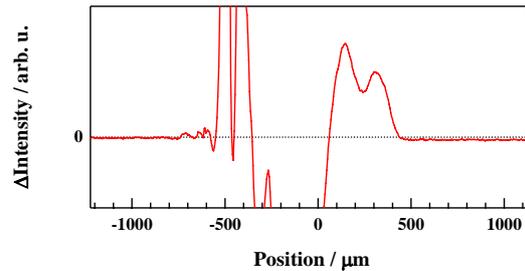


図 7. ANTS により蛍光標識化したキトサン 60-120 のレーザークロマトグラム.

デキストランと同様に塩基性多糖類であるキトサンについてレーザークロマトグラフィーにおける分子量と移動距離の関係を検討した。市販の分子量分画されたキトサン (分子量: 60-120, 110-150, 140-210 kDa) を ANTS によりラベル化し、中性条件では試料は緩衝溶液に溶解しなかったため、酸性条件下 (pH=3) において実験を行った。得ら

表 2. キトサンのレーザークロマトグラムに見られたピークの帰属.

分子量/kDa	移動距離/μm	帰属
60-120	146	monomer
110-150	165	monomer
140-210	169	monomer
220-300	260	dimer
180-360	311	trimer
330-450	321	trimer
520-630	344	trimer

れたピークはいずれの試料においても複数のピークが見られた。図7にクロマトグラムを示す。また、表2に観測されたピークとその帰属を示す。その他に小さいピークも観測されたが、表には載せていない。二量体、三量体の分子量は、単量体の分子量範囲をそのまま2倍、3倍したものである。得られた分子量と移動距離の関係を図6と同様にプロットすると、デキストランと同一線上にあることが判る。このことから、多糖類であるキトサンはデキストランを標準試料としてレーザークロマトグラフィー法により分子量測定を行うことができ、pH=3において、溶解はするが溶液中で二量体や三量体を形成していることが示唆された。

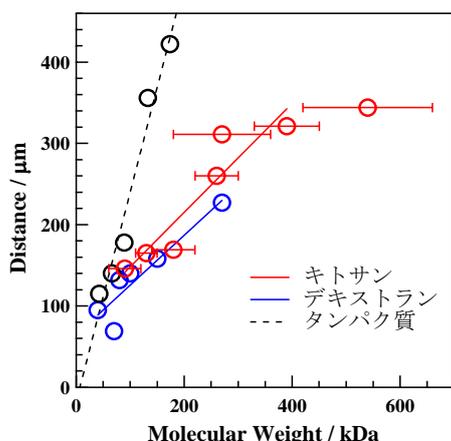


図8. キトサンの分子量と移動距離。赤線、青線、黒点線はそれぞれキトサン、デキストラン、タンパク質に対応する。

以上のように、本研究ではレーザークロマトグラフィー法では、溶液中の高分子の二量体形成などの会合現象を系中で直接検出することに有効な手段であることが解った。また、移動距離と分子量の関係は、高分子の形状にも依存することが解った。会合体形成の相互作用として、水素結合や疎水結合が考えられるが、コラーゲン二量体、キトサン二量体の多点での水素結合による二量体、タンパク質-SDS間の高分子主鎖とミセルのような多点での疎水結合分子集合体は、衝撃波の作用によっても安定で壊れることなく移動させることができるものと結論できる。

本研究期間においては高分子試料を中心に研究を行ったが、無機ナノ粒子に対しても適用可能であることを報告しているが[4]、この研究は、まだ、開始してからの研究例も少なく、他に研究を行っているグループも無くユニークな研究であると考えており、今後もさらにさまざまな試料について研究例を蓄積する方向で進めていく所存である。

<引用文献>

- [1] V. Venugoplan, A. Guerra, III, K. Nahen, A. Vogel, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 078103 (2002).
 [2] K. R. Rau, A. Guerra, III, A. Vogel, V.

- Venugoplan, *Appl. Phys. Lett.* **84**, 2940 (2004).
 [3] Y. Hosokawa, H. Takabayashi, S. Miura, S. Shukunami, Y. Hiraki, H. Masuhara, *Appl. Phys. A*, **79**, 795 (2004).
 [4] T. Nagahara, N. Ichinose, S. Nakamura, *Anal. Chem.*, **83**, 2416 (2011).
 [5] R. E. Tanner, B. Herpigny, S. H. Chen, C. K. Rha, *J. Chem. Phys.*, **76**, 3866 (1982).

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 0件)

[学会発表] (計 2件)

- ①一ノ瀬暢之、芝原慶、永原哲彦、「レーザー衝撃波によるタンパクの液中移動に対する界面活性剤の添加効果」、2015年光化学討論会(大阪市立大学、大阪市、9/11-9/13, 2015)、発表予定。
 ②一ノ瀬暢之、岡田光暁、永原哲彦、「多糖類高分子のレーザー衝撃波クロマトグラフィー」、2015年光化学討論会(大阪市立大学、大阪市、9/11-9/13, 2015)、発表予定。

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一ノ瀬 暢之 (ICHINOSE, Nobuyuki)
 京都工芸繊維大学 工学科学研究科・教授
 研究者番号: 00232405

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: