

水溶液中におけるグリコーゲンのナノ構造解析 Nano-Structure of Glycogen in Aqueous Solutions

湯口 宜明^a, 蔭山 茜^a, 柳瀬 美千代^b, 鷹羽 武史^b
Yoshiaki Yuguchi^a, Akane Kageyama^a, Michiyo Yanase^b, Takeshi Takaha^b

^a大阪電気通信大学, ^b(株)江崎グリコ 健康科学研究所
^aOsaka Electro-Communication University, ^bInstitute of Health Sciences, Ezaki Glico Co. Ltd.

グリコーゲンは α -1,4 結合したグルコースがつながったアミロース鎖が高度に分岐した多糖類であり、数十 nm 程度の径の天然のデンドリマー様粒子である。近年、グリコーゲン様多糖のサイズを制御して酵素合成することが可能となってきている。本研究ではサイズの異なるグリコーゲン様酵素合成多糖(グルカンデンドリマー)数種の水溶液中からの小角 X 線散乱及び超小角 X 線散乱測定を行った。散乱曲線をギニエプロットすることにより慣性半径を評価することができた。

使用したグルカンデンドリマー試料については 4.2–14.6 nm のサイズと評価できた。球状の散乱パターンと類似しており、2 次のピークも観測できた。超小角 X 線散乱からは凝集、相互作用の様子が推察された。

キーワード： グリコーゲン、グルカンデンドリマー、小角 X 線散乱、超小角 X 線散乱

背景と研究目的：

グリコーゲンは α -1,4 結合したグルコースがつながったアミロース鎖が高度に分岐した多糖類であり、数十 nm 程度の径の天然のデンドリマー様粒子である。これは動物の肝臓や筋肉に含まれており、エネルギー源として代謝する機能を有している。食品には牡蠣やレバーなどに含まれ、免疫賦活などの効果が期待されている。保湿機能を有していることから化粧品としての利用も行われている。また菓子として 江崎グリコのキャラメルに含まれていることは有名である。これらの機能はグリコーゲンが高度に分岐した構造に由来していることが予想されるが、その相関は未解明である。これまで粒子の形態などは電子顕微鏡や光散乱法[1]などによって検討され、球状の形状をしており、その径も 10–60 nm 程度の定量的な結果が報告されている。本実験では、江崎グリコ社の多糖酵素合成技術により粒子径を制御して製造したグリコーゲン様多糖(グルカンデンドリマー)に対し、X 線散乱法を用いて、粒子全体を観察でき、かつ内部構造に相当する散乱角度領域もカバーできるような角度領域で散乱関数を計測することを目的とする。

実験：

超小角 X 線散乱測定および小角 X 線散乱測定はビームライン BL19B2 で行った。X 線ビームのエネルギーは 18 keV で、超小角の場合、カメラ距離は 41.5 m で、通常小角の場合、3.1 m とし、検出器には PILATUS を用いた。露光時間はそれぞれ 300 s と 30 s とした。カメラ長の較正はコーゲンの長周期構造からの回折を利用した。セルはステンレス製の光路長 3 mm の平面型のものを使用し、窓剤には厚さ 20 μ m の石英ガラスを使用した。

各種サイズのグルカンデンドリマーを酵素合成し試料として用いた。それぞれ 2% の水溶液に調製し、測定に供した。溶液の散乱から溶媒の散乱を差し引く事で過剰散乱強度を評価し、グルカンデンドリマーの散乱とした。

結果および考察：

グルカンデンドリマーは反応条件を調整することによって、サイズを制御することができる。

本研究において、表 1 のような 4 種のサイズの異なるグルカンデンドリマーを準備した。あらかじめ動的散乱法により評価した粒子径を示した。7.7–18.7 nm の各種サイズとなっている。

表 1. グルカンデンドリマーの試料情報および SAXS により評価した慣性半径

コード名	光散乱法により評価した粒子半径 /nm	R_g /nm (in water)	均質球を仮定したときの粒子半径 /nm
GD10	7.9	4.2	5.4
GD20	10.1	6.6	8.5
GD30	14.2	10.2	13.2
GD40	18.7	14.6	18.9

図 1 は各種グルカンデンドリマーからの小角 X 線散乱曲線($I(q)$ vs q)である。ここで $I(q)$ は散乱強度、 q は散乱ベクトルの大きさを、散乱角を 2θ 、入射 X 線の波長を λ とすると、 $(4\pi/\lambda)\sin\theta$ で定義される。さらに参考のために、球体からの理論散乱関数を実線で示した。各グルカンデンドリマー試料は小角領域で球体に近い散乱曲線を示しており、粒状であることがわかる。散乱の減少の仕方はサイズに依存するが、系統的な結果がでていいる。この領域をギニエプロットすることによって慣性半径 R_g を求めると表 1 のようになった。光散乱法によって得られている結果と比べると、傾向は一致している。値はやや小さめにでているが、これは慣性半径であって、実半径とは異なるからである。例えば得られた慣性半径を、均質な球体と仮定してその半径に換算した結果も表 1 に示した。この値は光散乱法で評価した値に近いものとなった。さらに散乱結果をみていくと、 q の値の大きな領域で高次のピークが観測されている。これは球体の散乱関数に見られる複数の高次のピークと同等のものであると考えられる。球体からの理論散乱曲線と比べると 2 次以降のピークは明確ではなく、なだらかに減少する形をとっている。これはグルカンデンドリマーの表面がなめらかではないこと等によるものと考えられる。

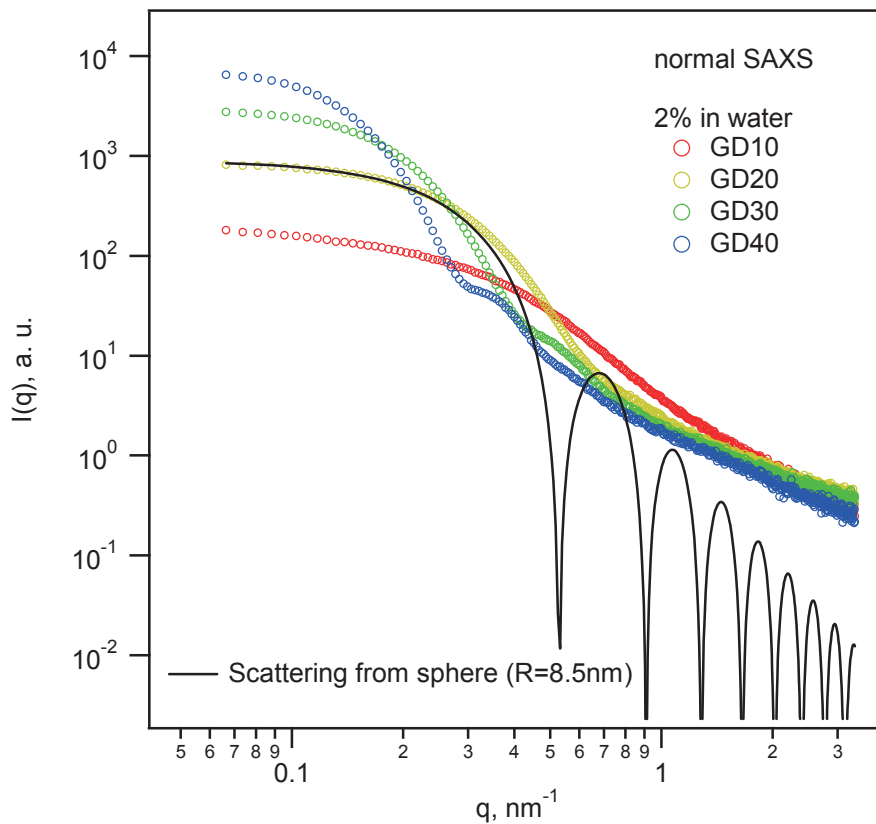


図 1. 各種グルカンデンドリマーからの小角 X 線散乱曲線及び均質球からの理論散乱関数

図 2 は各種グルカンデンドリマーからの超小角 X 線散乱曲線である。極小角領域を観測することにより、より大きなスケールの情報を得ることができる。これを見ると最も小さいサイズの

GD10はGD20よりも少し立ち上がる傾向を示した。これはおそらく凝集体を形成しているか一部鎖が広がった構造をとっていると推察できる。さらに最も大きいサイズのGD40は球体単独から仮定される散乱よりも、 q が小さくなるにつれて立ち上がる傾向が低い形となった。これは排除体積効果のような相互作用の影響などが現れている可能性が示唆される。

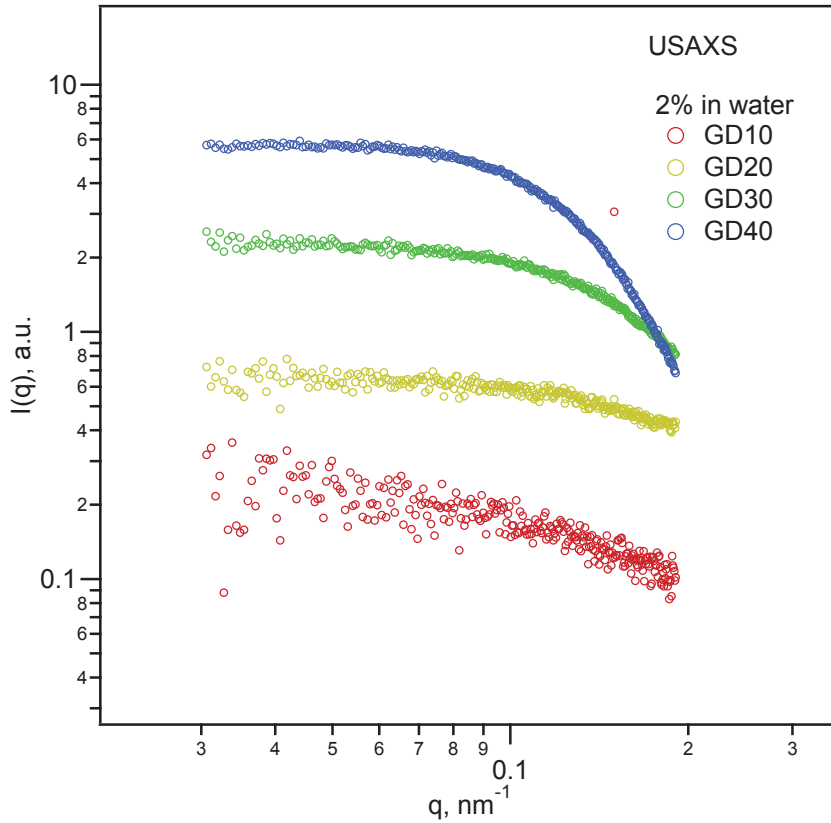


図2. 各種グルカンデンドリマーからの超小角 X 線散乱曲線

今後の課題：

グルカンデンドリマーの詳細構造を検討するために分子モデリングや分岐鎖の理論式を適用した解析を進めていく必要がある。また相互作用については、各試料の濃度依存性や温度依存性の詳細な実験が必要である。

参考文献：

[1] C. E. Ioan, T. Aberle, W. Burchard, *Macromolecules*, **32**, 7444 (1999).