

タンパク質コロイド分散液から形成する自己凝集ナノ粒子構造の
小角 X 線散乱解析
**SAXS Analyses on the Self-Aggregated Nanoparticle Structure Formed in a
Colloidal Suspension of Protein**

中川 究也, ジャルンラムラート ティーラヤ
Kyuya Nakagawa, Teeraya Jarunglumert

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻
Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

種々の条件にて作製した凍結乾燥カゼイン粉末を水に再水和させて得た分散液中のタンパク質凝集構造を小角および極小角 X 線散乱測定によって解析することを試みた。作製プロセスに依存して変化する構造の評価と、模擬消化液中における微粒子構造の変化の追跡を主たる測定目標に設定した。凍結下におけるエージングは、数百ナノメートルサイズの凝集体形成に大きく寄与することが伺え、溶液の pH に依存して凝集微粒子のフラクタルな構造に差異が生じることが示唆された。消化過程におけるタンパク質凝集体は、分解反応の進行に伴って数十ナノメートル程度のより粗な凝集構造が成長することが伺え、凍結下におけるエージングを経ることによってその凝集構造に変化が生じることがわかった。この差異が凝集微粒子もしくはそれに格納される物質のバイオアベイラビリティと強く関連しているとすれば、機能性の異なるタンパク質ナノ粒子を作り分ける技術として凍結下におけるエージングを利用できると期待できる。

キーワード： タンパク質凝集ナノ粒子, 極小角 X 線散乱, 自己凝集, カゼイン

背景と研究目的：

タンパク質や多糖といった天然高分子をベースとしたナノ・マイクロ微粒子は、食品栄養物質や薬剤をカプセル化し、体内へ適切に運搬・放出するキャリアとして有用である。近年、固体分散体という用語でも広く認知されているように、コア物質をキャリア物質との相互作用によって安定化させることを利用した微粒子製造も特に医薬分野において盛んである。例えば水に難溶性の物質を高分子との疎水性相互作用によって安定化させることで、溶解性(分散性)を向上させることを図ることができる。本研究グループは、特に食品栄養素をカプセル化したタンパク質凝集ナノ粒子をターゲットに、機能性の向上やコントロールリリース技術としての応用を目指した研究を進めている。特に、ナノ粒子を作製するプロセスに凍結プロセスを組み込む事により、特性の異なるナノ粒子を作り分ける事ができる可能性を示してきた[1-5]。その特性のひとつとして、消化特性はコア物質の放出特性と関わる重要な因子であることから、作製したナノ粒子の消化過程における構造変化に関わる情報は大変意義深い。

今回の実験では、種々の条件にて作製した凍結乾燥カゼイン粉末を水に再水和させて得た分散液中のタンパク質凝集構造を測定した。特に異なる凍結条件を経て作製した凍結乾燥試料の構造変化の比較から、凍結過程における構造変化を示唆する結果を得ることを期待した。また、これらの乾燥試料を模擬消化液中にて分解させ、分解過程における微粒子構造の変化を追跡した。

実験：

カゼインナトリウムの分散液を pH=7.0, 6.0, 5.5 に調製しこれらの溶液から凍結乾燥試料(それぞれ FDA70, FDA60, FDA55)を作製した。尚、-40°C における予備凍結後にそのまま凍結乾燥させた試料と、-20°C において 12 時間のエージングを行った後に凍結乾燥させた試料をそれぞれ作製した(エージングを経ない試料：添字-0, 12 時間のエージングを経た試料：添字-12)。乾燥試料はビームラインにて再水和させて測定に供した。また、塩酸緩衝液にて pH を 2.0 に調整した溶液中に再水和させた後、ペプシンを添加することで模擬的な消化分解反応を進行させた。ペプシン添加から継時的にサンプリングし、微粒子構造の測定に供した。

散乱測定は試料溶液を注入した 2 mm 径キャピラリーチューブを試料ステージに設置させることで行った。使用波長は 0.069 nm(エネルギー18 keV)、カメラ長は 40000 mm の USAXS モードと 3000 mm の nSAXS モードの二通りの設定にて実験を実施した。尚、カメラ長較正には USAXS と nSAXS のそれぞれコラーゲンおよびペヘン酸銀の回折周期を用いた。また、ビームサイズはそれぞれ、開口 0.1×0.1 mm² および 0.4×0.4 mm² のスリットにより成形して用いた。露光時間は USAXS, nSAXS モードについてそれぞれ 300 s と 10 s に設定した。検出器は PILATUS3 2M(Dectris Ltd.)(検出面サイズ 253.7×288.8 mm², ピクセルサイズ 172×172 μm²)を使用した。

結果および考察：

FDA70, FDA60, FDA55 を再水和させた分散液から得た小角散乱プロファイルを図 1 に比較する。ここに示すのは USAXS と nSAXS モードの双方から得たプロファイルをマージしたものである。まずこれらのプロファイルから明確に判別できるのは試料溶液の pH の違いに依存した構造の差異であり、これは pH に依存した凝集構造の違いを示唆している。凍結乾燥過程におけるエージングの影響は簡単に見て取ることはできない。

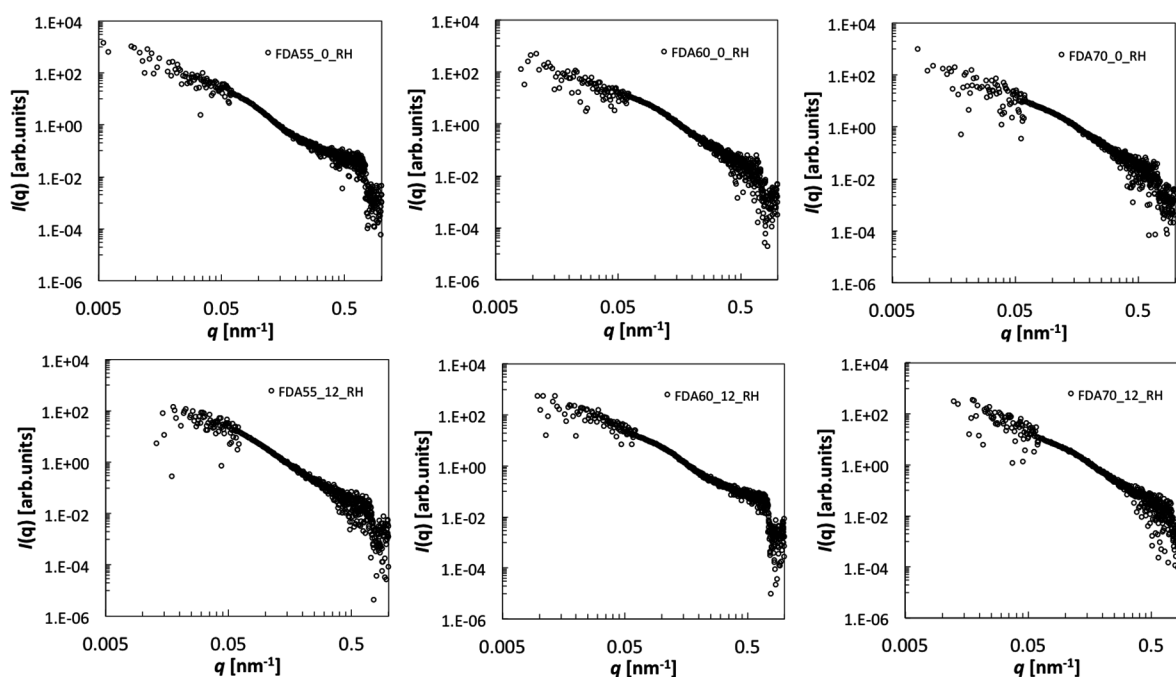


図 1. 再水和させた乾燥試料から得た散乱プロファイル

これらの散乱プロファイルを詳細に検討するために、微粒子凝集を表現できる下記の散乱モデルを適用してフィッティングパラメータを得た。

$$I(q) = \frac{\sin[(D-1) \arctan(q\xi)]}{(D-1)q\xi(1+q^2\xi^2)^{(D-1)/2}} \quad (1)$$

但し、 $\xi^2 = \frac{2R_g^2}{D(D+1)}$ であり、 R_g は凝集体の慣性半径、 D はフラクタル次元である。散乱実験への

フィッティングにより得たパラメータを表 1 にまとめる。 q 値を 0 に外挿して得られる散乱強度 $I(0)$ は散乱体の質量を反映するため、これを慣性半径の 3 乗で除することで散乱体の密度の指標として考えることができるため、これも併せて表に掲載した。極小角領域(q 値: 0.004–0.06)から得た数値を比較すると、エージング処理はすべての試料において R_g 値の減少を導いており、 $I(0)$ 値も減少する傾向が見られた。エージング前後における D 値は FDA70 にて増加、FDA60 にて不変、FDA55 にて減少という試料溶液の pH によって傾向は異なった。凍結下におけるエージング

過程において数百ナノメートルサイズの凝集体はさらに凝集が進行することが伺え、この時に凝集微粒子の枝分かれ構造が失われるように進行する場合(D 値の増加), その構造が維持される場合, 促進される場合(D 値の減少)などのパターンがあると考えられた. しかし, 小角領域(q 値: 0.06–0.1)から得た数値に見られる傾向はこれと異なり, エージングを経ることによる顕著な R_g 値, $I(0)$ 値の変化は見られなかった. δ 値(粒子密度の指標)はエージングによって増加する傾向が FDA70 と FDA60 にて見られたが, FDA55 においては見られていない. 極小角および小角領域から得たそれぞれの分析結果は注目している構造サイズが異なる. 従ってここで得たエージング前後によるパラメータ変化の傾向の差異は, 構造サイズに依存して構造変化の進行のパターンが異なることを意味している.

図 2 に模擬消化過程における構造パラメータの変化を示す. ここでは顕著な変化が見られた FDA55 のデータのみ掲載する. まず, pH=2.0 の環境においていずれの試料もさらに凝集形成が進行し, R_g 値は水中のそれよりも大きく増加する(FDA70, FDA60 においても同様). その後, ペプシンによるタンパク質分解反応が進行するに従い, R_g 値はさらに増加する傾向を示した. 一方, δ 値は減少する傾向を示すことから, カゼインが形成する凝集体は, 消化に伴ってより大きく粗な構造を有する凝集体を形成していくことが伺える. 極小角領域(q 値: 0.004–0.06)と小角領域(q 値: 0.06–0.1)から得られる値が示す傾向の違いは, 着目する変化がその構造スケールにおいて進行しているかどうかの違いと理解できよう. とすれば, FDA55-0h において極小角領域から推算される R_g 値は消化反応初期 60 分にて大きく変化しないのに対し, 小角領域から推算される R_g 値は増加している. すなわちこの変化は数十ナノメートル程度の構造スケールにおける変化であり, マイクロメートルスケールの凝集構造変化ではないと考えられる. 一方, FDA55-12h においては, 小さな構造スケールにおける変化と共に, 大きな構造変化も起きていることが伺える. これら試料間の差異は極小角領域から推算される δ 値にもみることができ, FDA55-12h は FDA55-0h よりも消化過程における密度が小さく推移することが推測される. すなわち, いずれのタンパク質凝集体も消化に伴って数十ナノメートル程度のより粗な凝集構造が成長することが伺えるが, エージングを経ることによってマイクロメートルスケールの凝集の進行に変化が生じることがわかる.

データはここに掲載しないが, 脂溶性物質を疎水性相互作用によって安定化させた場合, 今回と同様のエージング期間によって微粒子表面に呈示される脂溶性物質の量が増えることを確認している. これらの試料に格納される脂溶性物質は消化過程を経て体内へと吸収されるメカニズムに組み込まれる. もし今回判明したようなマイクロメートルスケールのタンパク質凝集構造の差異が, 生体への取込み能(バイオアベイラビリティ)と強く関連しているとするれば, 凍結下におけるエージングという簡易な操作を利用してバイオアベイラビリティの異なるタンパク質ナノ粒子を作り分けることができるかもしれない.

今後の課題:

再現性のさらなる確認や, より精緻な検証が今後求められる. 模擬消化過程の実験法も, より生体内環境に近づけるための改良が必要かもしれない. 今回使用したカゼイン凝集体はペプシンによる分解率が約 25%程度である. 他のタンパク質凝集体などを使用した同様の検討も興味深い.

表 1. 散乱モデルから得た各種パラメータ

	USAXS ($q = 0.004\text{--}0.06$)				SAXS ($q = 0.06\text{--}0.1$)			
	R_g	D	$I(0)$	$\delta=I(0)/R_g^3$	R_g	D	$I(0)$	$\delta=I(0)/R_g^3$
FDA70-0-RH	190	1.30	0.65	9.5E-08	6.28	2.96	23.11	0.09
FDA60-0-RH	196	1.73	2.98	3.9E-07	7.12	3.05	37.78	0.10
FDA55-0-RH	266	1.55	3.34	1.8E-07	8.42	3.18	73.10	0.12
FDA70-12-RH	141	1.59	0.96	3.4E-07	6.01	3.08	26.88	0.12
FDA60-12-RH	138	1.75	2.04	7.8E-07	7.23	3.06	52.67	0.14
FDA55-12-RH	199	1.27	1.38	1.7E-07	9.35	3.03	80.16	0.10

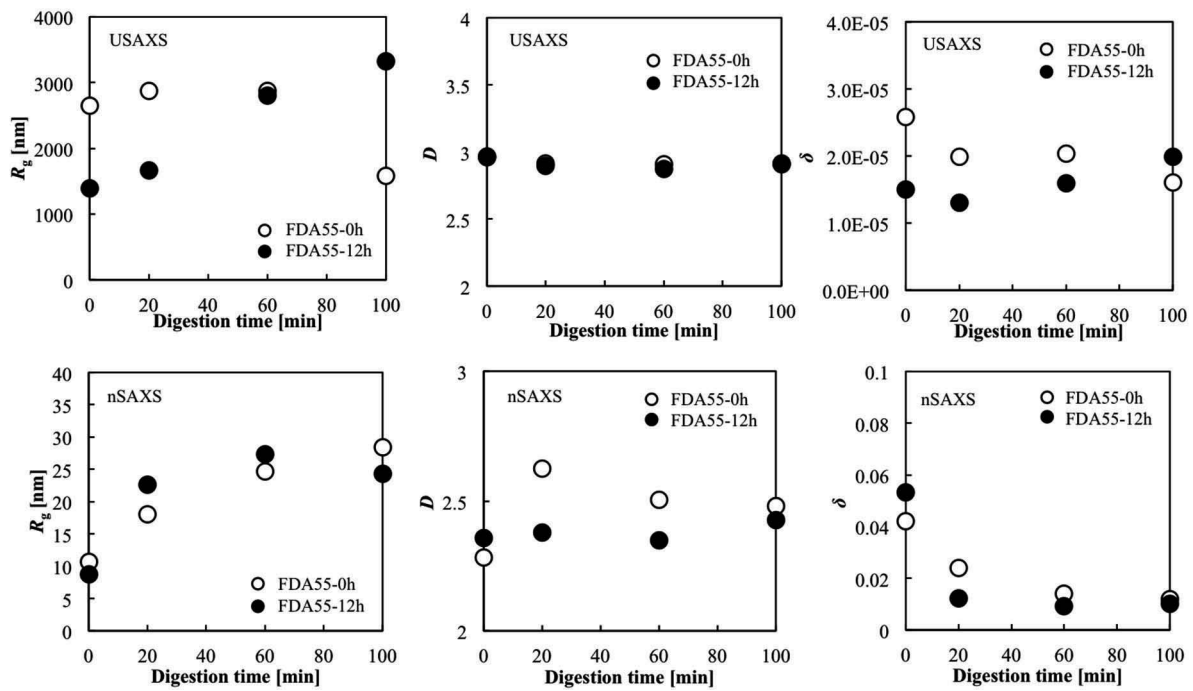


図 2. 模擬消化過程における構造パラメータの推移

参考文献：

- [1] K. Nakagawa, H. Nagao, *Colloids and Surfaces A*, **411**, 129 (2012).
- [2] K. Nakagawa, M. Kagemoto, *Colloids and Surfaces B*, **103**, 366 (2013).
- [3] K. Nakagawa, *Drying Technology*, **31**, 1466 (2013).
- [4] T. Jarungrumlert, K. Nakagawa, *Drying Technology*, **31**, 1459 (2013).
- [5] K. Nakagawa et al., *LWT Journal of Food Science and Technology*, **54**, 600 (2013).
- [6] K. Nakagawa, T. Jarungrumlert, S. Adachi, *Japan Journal of Food Engineering*, **15**, 51 (2014).