

学 位 論 文 題 名

Dynamics of Diffusion and Binding to Ionic Gels -on Small Molecules, Proteins and Cells-

（イオン性ゲルにおける拡散・吸着のダイナミクス
－低分子・蛋白質・細胞を対象にして－）

学位論文内容の要旨

高分子ゲルは、高分子網目が溶媒で膨潤した構造を持ち、外部の温度・pH・溶質濃度・イオン強度・電場等の環境の変化に動的に反応し、構造・形・性質を可逆的に変化させる興味深い物質である。生体内にも細胞外マトリックスなどのゲル状態の構造体は存在し、生命活動の場として重要な役割を担っていると考えられる。高分子ゲルはまた、生体医用材料としても期待されており、多くの研究が活発に行われている。生体に存在する低分子・蛋白質・細胞などがどのように高分子ゲルと相互作用するかを理解することは、生体におけるゲルの役割の把握といった学術的観点のみならず、新規材料の開発といった応用面に関しても重要な課題であるといえる。本研究では、高分子ゲルの重要な性質の一つであるゲル内の物質拡散およびゲルへの吸着を、低分子・蛋白質・細胞という生体の階層構造と関連づけて議論した。低分子としてはイオン性ゲルに静電気力・疎水性相互作用により強く相互作用しながら拡散する反対荷電の界面活性剤を選び、ゲルの体積変化・高分子鎖への吸着を伴う拡散を解析した。高分子網目サイズと同程度のサイズを持つ蛋白質の拡散が、網目サイズと静電的反発力によってどのように影響されるかを評価した。また、ゲルの物性をゲル合成時のテンプレートの親水性を変化させることで大きく変化させることができるが（テンプレート効果）、これにより蛋白質の拡散・分配・吸着を制御できることを初めて明らかにした。蛋白質の吸着性の制御は細胞の接着性および細胞膜への相互作用を変化させることを示唆するが、本研究では、細胞のゲル表面への吸着をテンプレート効果で制御できることを明らかにした。

本論文は第1章の序論、第2章から第6章までの本論、および第7章の結論から構成されている。

第2章では、種々のアルキル鎖長のカチオン性界面活性剤が、反対荷電の高分子ゲル中に拡散し、ゲルの体積変化を伴いながら吸着する現象を、界面活性剤の拡散速度・ゲルの収縮速度の測定から速度論的に解析した。界面活性剤の吸着速度は、界面活性剤が静電気力・疎水性相互作用によって高分子に吸着する過程によって増大することを明らかにした。これにより、この系で観察された極めて興味深い以下の現象を統一的に説明することが可能となった：1）ゲルの収縮は界面活性剤の拡散速度を増大する、2）網目密度の大きいゲルでは界面活性剤の拡散速度は大きい。これらの実験結果を、吸着を考慮した拡散方程式の数値計算によりモデリングし、理論的にもこれらの結果を確認することができた。

第3章では、界面活性剤およびゲルの対イオンに注目し、それらが界面活性剤の吸着速度に及ぼす影響

を評価した。第2章で明らかになった、界面活性剤の拡散速度を強く支配するゲル-界面活性剤相互作用にもかかわらず、界面活性剤の拡散速度は、対イオン・副イオン両方の移動度に大きく依存した。界面活性剤の拡散は、ゲル-界面活性剤間の相互作用だけでなく、界面活性剤イオン・対イオン・副イオンの調和的な拡散過程にも支配された複雑な過程であることを明らかにした。

第4章では、本研究で開発された、レーザー光の干渉縞のパターンから、ゲル中の溶質濃度変化を測定・拡散係数を算出するレーザー斑点干渉法を用いて、多糖ゲル中の界面活性剤および蛋白質の拡散を測定し、拡散する分子の半径とゲルの高分子鎖の半径、およびゲルとの間の静電気力が拡散に及ぼす影響を考察した。半径の小さい界面活性剤はゲルの網目サイズの影響をほとんど受けないが、蛋白質では網目密度の増大に伴い拡散係数が大きく低下することが示された。

高分子ゲル表面層の物性は、そのゲルが形成されたときの基盤の疎水性によって大きく変化することが明らかになっている（テンプレート効果）。疎水性基盤で合成されたゲルでは、膨潤度が大きく、摩擦係数が小さく、圧縮弾性率が小さいことがわかっている。第5章では、細胞・蛋白質と高分子ゲルの相互作用について及ぼすテンプレート効果を評価した。カチオン性ゲルによるタバコ葉肉プロトプラスト破壊、およびアニオン性ゲルによるタバコ葉肉プロトプラスト吸着に対するテンプレート効果を検討した。疎水性基盤に対して合成されたカチオン性ゲル上では、細胞膜は瞬時に破壊され、細胞内容物はゲルに吸着された。一方で親水性基盤で合成されたカチオン性ゲルでは、細胞膜の破壊が起こった後も内容物はゲルに固定されなかった。また、親水性基盤で合成されたアニオン性ゲル上では、細胞の吸着が見られないのに対し、疎水性基盤で合成されたゲルでは細胞はよく吸着された。これらの結果は、疎水性基盤で合成されたゲルが柔軟な構造を持っており、カチオン性ゲルではゲルが変形しやすいため、細胞にかかるストレスが小さいこと、アニオン性ゲルでは接触面積が多く、また細胞に存在する正電荷と相互作用できるためと考えられる。テンプレート効果によって、細胞との相互作用が変化することは、本研究によって初めて示された重要な結果である。

ゲルのテンプレート効果をさらに検討するために、血管内皮細胞のゲルへの接着性のテンプレート効果について検討した。血管内皮細胞が、ガラスに対して合成したポリスチレンスルホン酸ナトリウムゲル（pNaSSゲル）上でよく吸着し、紡錘状に伸展するが、同じ条件でアクリル板に対して合成した pNaSS ゲルにはほとんど接着しないことを明らかにした。ゲル表面ゲル表面の性質をテンプレート効果によって変化させることで、同じ化学種で異なる細胞接着性を実現させることに成功した。接着性の異なるメカニズムは正確には明らかではないが、血管内皮細胞は、吸着した表面に対して接着タンパク質を吸着させ、細胞骨格で張力を働かせることによって扁平で伸展した形態を保持しているため、1) 疎水性基盤で合成したゲル表面は柔軟であるため、力学的に形態を維持できない、2) 接着タンパク質の吸着量が異なる、といった理由が考えられる。実際、ウシ血清アルブミン（BSA）の pNaSS ゲルへの濃度分配量、ゲル中の拡散係数を蛍光相関分光法で測定したところ、親水性基盤で合成したゲル中には吸着した成分と思われる拡散速度の極めて遅い成分が確認されたが、疎水性基盤で合成したゲルでは見られなかった。

第6章では、懸濁液中で混合された、酵母プロトプラストと種々の荷電状態・疎水性の高分子の相互作用について、細胞の生存率および細胞へのポリマーの吸着量の測定から検討した。ノニオン性・アニオン性高分子は細胞の生存率を変化させなかったが、カチオン性の高分子の多くは電荷濃度 10^{-5} M という低濃度から細胞を破壊した。この結果はゲル上のタバコプロトプラストの挙動と対応している。破壊速度は高分子の濃度・荷電密度・疎水性の増大に伴い増大した。電荷密度の高い主鎖荷電型カチオン性高分子では、低濃度か

ら吸着し始めるが細胞の破壊は高濃度までみられなかった。一方で、電荷密度の低いものは、吸着が始まると協同的に細胞の破壊が起こることがわかった。このことから、カチオン性高分子は負に帯電した細胞に、静電気力で吸着するが、細胞膜を破壊し、分散するには脂質を可溶化する十分な疎水性が必要であることを明らかにした。

第7章では、以上の内容を総括して結論とした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	長田	義仁
副査	教授	山岸	皓彦
副査	教授	中田	允夫
副査	助教授	龔	劍萍

学位論文題名

Dynamics of Diffusion and Binding to Ionic Gels -on Small Molecules, Proteins and Cells-

(イオン性ゲルにおける拡散・吸着のダイナミックス
-低分子・蛋白質・細胞を対象にして-)

学位論文は第1章の序論、第2章から第6章までの本論、および第7章の結論から構成されている。本論について以下にその要旨を述べる。

第2章では、種々のアルキル鎖長のカチオン性界面活性剤が、反対荷電の高分子ゲル中に拡散し、ゲルの体積変化を伴いながら吸着する現象を、界面活性剤の拡散速度・ゲルの収縮速度の測定から速度論的に解析した。界面活性剤の吸着速度は、界面活性剤が静電気力・疎水性相互作用によって高分子に吸着する過程によって増大することを明らかにした。これにより、この系で観察された極めて興味深い以下の現象を統一的に説明することが可能となった：1) ゲルの収縮は界面活性剤の拡散速度を増大する、2) 網目密度の大きいゲルでは界面活性剤の拡散速度は大きい。これらの実験結果を、吸着を考慮した拡散方程式の数値計算によりモデリングし、理論的にもこれらの結果を確認することができた。

第3章では、界面活性剤およびゲルの対イオンに注目し、それらが界面活性剤の吸着速度に及ぼす影響を評価した。第2章で明らかになった、界面活性剤の拡散速度を強く支配するゲル-界面活性剤相互作用にもかかわらず、界面活性剤の拡散速度は、対イオン・副イオン両方の移動度に大きく依存した。界面活性剤の拡散は、ゲル-界面活性剤間の相互作用だけでなく、界面活性剤イオン・対イオン・副イオンの調和的な拡散過程にも支配された複雑な過程であることを明らかにした。

第4章では、本研究で開発された、レーザー光の干渉縞のパターンから、ゲル中の溶質濃度変化を測定・拡散係数を算出するレーザー斑点干渉法を用いて、多糖ゲル中の界面活性剤および蛋白質の拡散を測定し、拡散する分子の半径とゲルの高分子鎖の半径、およびゲルとの間の静電気力が拡散に及ぼす影響を考察した。半径の小さい界面活性剤はゲルの網目サイズの影響をほとんど受けないが、蛋白質では網目密度の増大に伴い拡散係数が大きく低下することが示された。

高分子ゲル表面層の物性は、そのゲルが形成されたときの基盤の疎水性によって大きく変化することが明らかになっている（テンプレート効果）。疎水性基盤で合成されたゲルでは、膨潤度が大きく、摩擦係数が小さく、圧縮弾性率が小さい。第5章では、細胞・蛋白質と高分子ゲルの相互作用について及ぼすテンプレート効果を評価した。カチオン性ゲルによるタバコ葉肉プロトプラスト破壊、およびアニオン性ゲルによるタバコ葉肉プロトプラスト吸着に対するテンプレート効果を検討した。疎水性基盤に対して合成されたカチオン性ゲル上では、細胞膜は瞬時に破壊され、細胞内容物はゲルに吸着された。一方で親水性基盤で合成されたカチオン性ゲルでは、細胞膜の破壊が起こった後も内容物はゲルに固定されなかった。また、親水性基盤で合成されたアニオン性ゲル上では、細胞の吸着が見られないのに対し、疎水性基盤で合成されたゲルでは細胞はよく吸着された。これらの結果は、疎水性基盤で合成されたゲルが柔軟な構造を持っており、カチオン性ゲルではゲルが変形しやすいため、細胞にかかるストレスが小さいこと、アニオン性ゲルでは接触面積が多く、また細胞に存在する正電荷と相互作用できるためと考えられる。テンプレート効果によって、細胞との相互作用が変化することは、本研究によって初めて示された重要な結果である。

ゲルのテンプレート効果をさらに検討するために、血管内皮細胞のゲルへの接着性のテンプレート効果について検討した。血管内皮細胞が、ガラスに対して合成したポリスチレンスルホン酸ナトリウムゲル（pNaSS ゲル）上でよく吸着し、紡錘状に伸展するが、同じ条件でアクリル板に対して合成した pNaSS ゲルにはほとんど接着しないことを明らかにした。ゲル表面ゲル表面の性質をテンプレート効果によって変化させることで、同じ化学種で異なる細胞接着性を実現させることに成功した。血管内皮細胞は、吸着した表面に対して接着タンパク質を吸着させ、細胞骨格で張力を働かせることによって扁平で伸展した形態を保持しているため、1) 疎水性基盤で合成したゲル表面は柔軟であるため、力学的に形態を維持できない、2) 接着タンパク質の吸着量が異なる、という理由が考えられる。

テンプレート効果によって、疎水性表面に対して形成されたゲル表面は、柔軟で、架橋度の低い構造をとると考えられていたが、その直接的な証明はなかった。本研究では、さらに、タンパク質のゲルへの濃度分配量、ゲル中の拡散係数を測定することでその網目の構造を評価することを試みた。空間的分解能を有し、拡散係数と濃度を同時に測定可能な蛍光相関分光法をゲル系にはじめて応用した。血清アルブミンの PNaSS ゲル中の拡散係数・分配係数はゲルの濃度の増加に伴い減少したが、アクリル板で合成されたゲルではガラスに対して合成されたゲルよりも大きい値を示した。このことから、疎水性基盤に対して合成されたゲルは、架橋密度が小さく、自由末端鎖の存在する柔軟な構造であることが確認された。

第6章では、懸濁液中で混合された、酵母プロトプラストと種々の荷電状態・疎水性の高分子の相互作用について、細胞の生存率および細胞へのポリマーの吸着量の測定から検討した。ノニオン性・アニオン性高分子は細胞の生存率を変化させなかったが、カチオン性の高分子の多くは電荷濃度 10^{-5} M という低濃度から細胞を破壊した。この結果はゲル上のタバコプロトプラストの挙動と対応している。破壊速度は高分子の濃度・荷電密度・疎水性の増大に伴い増大した。電荷密度の高い主鎖荷電型カチオン性高分子では、低濃度から吸着し始めるが細胞の破壊は高濃度までみられなかった。一方で、電荷密度の低いものは、吸着が始まると協同的に細胞の破壊が起こることがわかった。このことから、カチオ

ン性高分子は負に帯電した細胞に、静電気力で吸着するが、細胞膜を破壊し、分散するには脂質を可溶化する十分な疎水性が必要であることを明らかにした。

著者は高分子電解質ゲル中の拡散と吸着について、低分子・高分子・細胞を対象にして系統的な解析を行い、高分子ゲル中の拡散現象について広範囲にわたる学術的・応用的に価値のある独創的な知見を得ている。よって著者は北海道大学博士（理学）の学位を在学期間短縮による申請で授与される資格があるものと認める。