

渦のねじれ流によるコラーゲンナノファイバーの形成制御と形態変換

神戸大学大学院理学研究科¹、滋賀医科大学医学部²、内蒙古医科大学薬学院³

津田 明彦

Natural nanofibers attract much attentions in the field of nanocosmetics. In this study, we have studied formation controls and structural transformations of the bionanofibers such as collagen and amyloid fibrils by torsional flows of vortex. Linear dichroism (LD) spectroscopy allowed spectroscopic visualization of the flow-induced alignment of the nanofibers in the solution. Although collagen showed poor LD response, insulin amyloid fibril provided strong LD response upon stirring of the solutions. We found that insulin molecules self-assemble to form a nanofiber that enables flow-induced alignment in the vortex flows, but form fibrous aggregates that show no alignment without stirring of the solution. The results obtained in this study suggest the importance of fluid flows in the process of protein fibrillations.

1. 緒言

植物のパルプから抽出されるセルロースナノファイバーは、高い粘性と大きなチキソトロピーインデックスを有しているため、流動性のないゲル状であってもスプレー噴霧でき、タレ止めに応用できる。肌の上でしっかり定着する化粧下地や、振って液状にしたものを顔に吹きかけ固まる美容パックなどへの応用が可能である。さらに水中での乳化・分散安定効果に優れるため、各種オイルの乳化安定化や、金属箔、金属酸化物など高比重の粒子の沈降防止、分散安定化など、リキッドファンデーションや日焼け止めなどへの応用が期待されている。化粧品にナノファイバーが配合された「ナノコスメ」関連商品が社会で広がりを見せようとしている。

ナノコスメにおいて植物性ナノファイバーに期待と関心が集まる一方で、コラーゲンなど動物性線維への関心が薄れつつある。コラーゲンは、美容や健康を目的としたサプリメントやドリンク、様々なコスメアイテムに配合され、現在も数多くの商品が存在する。しかし、分子化学的な視点から、コラーゲン線維からマイクロフィブリル（ナノファイバー）を取り出し、その構造や形態をナノレベルで修飾・制御して、機能を引き出している例は数少ない。これまでに商品化されているコラーゲン配合化粧品の多くは、その効用として肌の保水効果をうたっている。しかし、コラーゲンナノファイバーには、上記セルロースナノファイバーと同様の機能に加え、その高い柔軟性や伸縮性、人体とのより高い親和性などを活かした様々な新機能が期待される。



Formation control and morphology conversion of collagen nanofibers by torsional flows of vortex

Akihiko Tsuda

Graduate School of Science, Kobe University¹/
Department of Chemistry, Shiga University of
Medical Science²/School of Pharmaceutical
Sciences, Inner Mongolia Medical University³

本研究課題において我々は、「コラーゲンナノコスメ」への展開を目標に、メカニカル攪拌によって生じる渦のねじれ流を用いることによるコラーゲンナノファイバーの形成制御と形態変換を企てた。

我々の研究グループでは、これまでに生体高分子を模倣した様々な超分子ナノファイバーを創製し、分子化学的な視点からそれらの構造解析と機能開拓を行ってきた。それらの超分子ナノファイバーは溶液の流れに沿って配向し、直線二色性(LD)を誘起する¹⁻⁵⁾。一方向にねじれた構造を持つナノファイバーは、攪拌によって生じる渦の流れに沿ってねじれ配向して、ファイバーと渦のねじれ方向が一致する時、より効率的に配向することができる。またその時、形成するナノファイバーのサイズも大きくなる。そのような現象を見出し、我々は、動物体内に大量に存在するバイオ線維として知られているコラーゲンと、渦の流れの不斉流体力学的相互作用に着目した。体内におけるコラーゲン線維の形成や分解には、血液、リンパ液、および組織液などの体液の流れ(体内流)が深く関わっている。したがって、コラーゲンによる体内流刺激のメカノセンシングと体組織による体内流統制のメカノバイオロジー機構の研究が、コラーゲンナノコスメにおける全く新たな技術と概念を生み出す可能性を秘めている。

我々は、上記の目標を掲げてコラーゲンナノファイバーの開発を行った。コラーゲン水溶液の加熱による変性コラーゲン(ゼラチン)の形成過程、および、その溶液の冷却による変性コラーゲンの再凝集過程において、溶液の攪拌を行うことにより渦の流れを生み出し、その流れとの流体力学的相互作用による変性コラーゲンの凝集形態の制御を企てた。本研究期間において我々は、流体力学的な相互作用によってコラーゲンが渦の流れに沿って配向することを見出したが、コラーゲンナノファイバーの構築までには至らなかった。しかし一方で、タンパク質のインスリンを用いることによって当該目標を達成することができた。

インスリンは熱変性によってアミロイド線維を形成する

ことが知られている。アミロイド線維は、タンパク質のミスフォールディングにより形成されるタンパク質の集合体であり、アルツハイマー病やパーキンソン病などの疾病に関わる物質として高い関心を集めている。アミロイド線維の形成プロセスは、モノマーから部分的に構造変化した中間体を経て核を形成し、さらには集合化による線維化が起きる経路が最も支持されている(図1)^{6,7)}。我々は、渦の流れによるマクロな流体力学的相互作用がミクロなアミロイド線維の核形成に寄与し、その線維の形態を大きく変化させることを見出した。

2. 方法

加熱・攪拌条件下におけるコラーゲンやインスリンの線維化に伴う配向現象を観測するために、それらの水溶液中での加熱・攪拌前後の紫外-可視光吸収スペクトルとLDスペクトルを測定した。インスリンの配向挙動はLDスペクトルを用いて測定することができる。LDの強度は $LD=A_{\parallel}-A_{\perp}$ で表される。 A_{\parallel} は縦方向の直線偏光の吸収強度、 A_{\perp} は横方向の直線偏光の吸収強度を示す。LDの測定には $\phi 8 \times 11$ mmの円柱状のネック部分がある $10 \times 10 \times 40$ mmの光学セル(1mmの厚さの石英ガラス製)を使用した。攪拌子はテフロン製の $\phi 3 \times 8$ mmを使用した。

①コラーゲンと液体の流れによる流体力学的相互作用を期待し、左右の攪拌によって生じる不斉な渦の流れにおけるコラーゲン分子(三重鎖および一重鎖)のねじれ配向挙動をフロー誘起LDスペクトル法で調査し⁸⁾、コラーゲンと渦の流れの流体力学的相互作用およびキラルセンシング機構を明らかにした。石英セルに0.05 mg/mLのコラーゲンもしくはゼラチン水溶液を3 mL加え、 $\phi 2 \times 5$ mmのスターラーバーで溶液を1300 rpmの回転速度で攪拌し、LDスペクトルを測定した。

②インスリン0.4 μ mol (2.5 mg) を25 mM塩酸0.2 mLに溶かし、超純水2.6 mLに希釈した。その後、14 mM塩

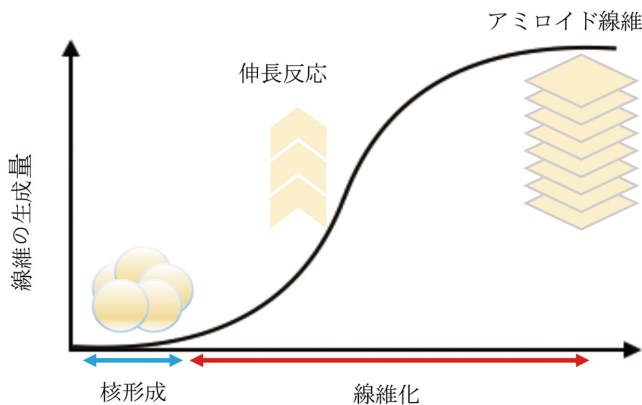


図1 アミロイド線維形成プロセスの概略図

化ナトリウム水溶液0.2 mLを添加し、0.14 mMのインスリン濃度、3 mL, pH3, [NaCl] = 0.28 mMのサンプルを調製した。また、加熱・攪拌の測定は温度: 75°C, 攪拌子の回転速度: 1400 rpmの条件下で行った。

3. 結果

①無攪拌条件下、10°Cあるいは20°Cでコラーゲン水溶液のLDスペクトルを測定しても、LDシグナルを観察することはできなかった。しかし、攪拌条件下において測定を行ったところ、コラーゲンの吸収帯に相当する200 nm付近に誘起LDを確認することができた。攪拌のON-OFFに応じて、LDスペクトルも即座に変化した。温度を一旦75°Cまで上昇させて、再度20°Cにまで冷却し、LDを測定したところ、攪拌条件下において誘起LD強度の著しい減少が確認された。一方、ゼラチン水溶液を用いて同様の実験を行っても、攪拌による誘起LDを確認することはできなかった。

②加熱攪拌条件下におけるインスリンの線維化に伴う配向現象を観測するために、水溶液中におけるヒトインスリンの加熱・攪拌の前後における紫外-可視吸収スペクトルとLDスペクトルを測定した(図2)。276 nmと283 nmに極大吸収波長が得られ、LDスペクトルでは吸収スペクトルに対応した負の誘起LDが得られた。次に攪拌が線維の配向挙動にどのように寄与しているのか調べるために、加熱攪拌により生成したアミロイド線維に対して攪拌状態を切り替えながらLD強度の経時変化を測定

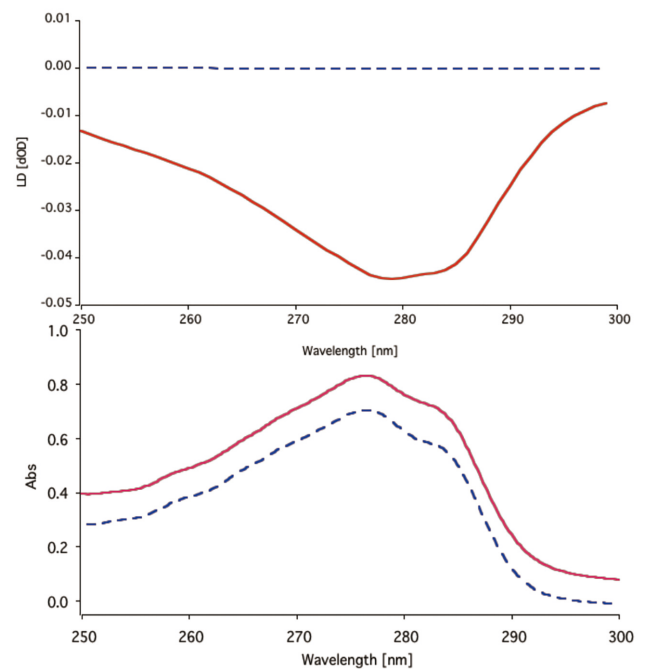


図2 加熱・攪拌によるインスリン水溶液のLDスペクトルおよび紫外-可視吸収スペクトルの変化。加熱・攪拌前(---), 加熱・攪拌後(—)。

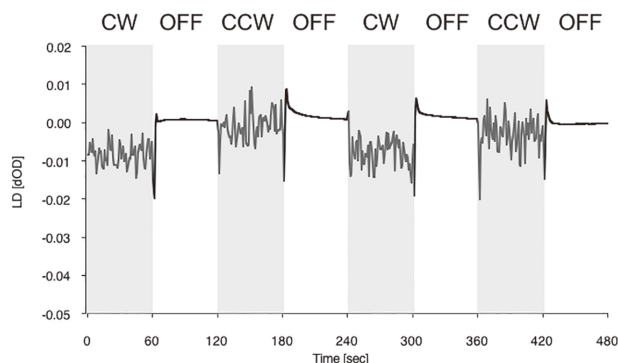


図3 攪拌のスイッチングによる波長固定(276nm) LD スペクトルの変化

した(図3)。無攪拌状態ではLD不活性だったが、攪拌状態では負のLDシグナルが現れ、左右の攪拌で異なった強度のLDが現れた。次に攪拌が線維形成のどの過程に作用しているのかを明らかにするためにインスリン水溶液の加熱初期に一定時間だけ攪拌をONにし、その後OFFにして、LD強度の経時変化スペクトルを測定した(図4)。成長の初期に攪拌を行うと溶液の流れに配向する線維が形成していることが明らかになった。

4. 考察

- ①上記の結果より、三重鎖構造を持つコラーゲンは、比較的剛直で硬い構造を持つため、溶液の流れに沿って配向することができ、誘起LDを与えたと考えられる。一方、ゼラチンは、コラーゲンの三重鎖がほどけた構造を持ち、剛直性が低く柔らかい構造のため、溶液の流れに沿って配向することができなかったと考えられる。実際にそれを支持する結果として、三重鎖構造を持つコラーゲンを加熱すると、三重鎖が解離してゼラチンと同じ状態となり、誘起LDの強度が弱まることが確認できている。
- ②上記の結果より、攪拌によってアミロイド線維の成長が線維の伸長方向に促進され、線維が渦の流れに沿って配向しているものと考えられる。また、図3の結果から、アミロイド線維の高次のねじれ構造が渦の流れの方向に対して非等価な流体力学的相互作用を生じているのではないかと考えられる。図4において、成長の初期(~17分)に攪拌を行うと溶液の流れに配向する線維が形成していることがわかる。加熱攪拌によって生じる溶液の流れとインスリンの流体力学的相互作用が線維状に成長する核形成段階に関与していると考えられる。

5. 総括

- ①本研究から、三重鎖構造を持つコラーゲンが溶液の流れに沿って配向することが明らかになった。一方、それが

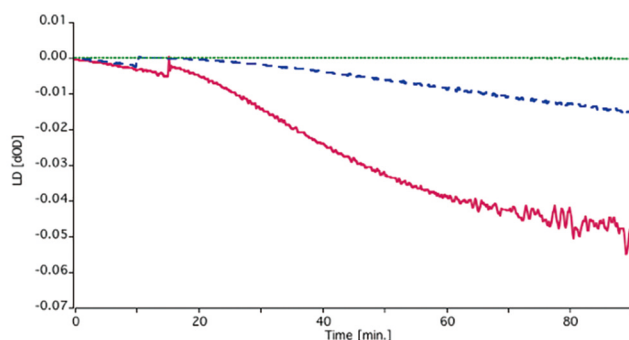


図4 加熱開始から10分間(---)および15分間(—)の攪拌、加熱開始後75-90分(---)に攪拌を行った際に得られた経時変化LDプロファイル

解離したゼラチン状態では配向現象を与えないこともわかった。

- ②インスリン水溶液に加熱・攪拌を行うと、線維化を生じ、形成した線維が渦の流れに反応して配向することが明らかとなった。攪拌を行わずに加熱するだけでもインスリンの集合化が生じるが、攪拌を行うことで線維形態のアミロイド線維への成長が促進された。また興味深いことに、攪拌による渦の流れの物理刺激が核形成過程において関与しているという可能性が得られた。

上記の研究結果は、タンパク質の線維化プロセスにおける溶液の流れの重要性を示している。今後、変性コラーゲンの再凝集過程を溶液の流れで制御することによる変性コラーゲンの凝集形態の制御をさらに検討したい。

(引用文献)

- 1) Tsuda A, Alam M A, Harada T, Yamaguchi T, Ishii N, Aida T. Spectroscopic visualization of dynamic vortex flows using a dye-containing nanofiber. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 8198-8202. (2007)
- 2) Ando Y, Sugihara T, Kimura K, Tsuda A. A self-assembled helical anthracene nanofiber whose *P*- and *M*-isomers show unequal linear dichroism in a vortex. *Chem. Commun.* 47: 11748-11750. (2011)
- 3) Tsujimoto Y, Ie M, Ando Y, Yamamoto T, Tsuda A. Spectroscopic visualization of right- and left-handed helical alignments of DNA in chiral vortex flows. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 84: 1031-1038. (2011)
- 4) Yamamoto T, Tsuda A. Vortex-induced alignment of a water soluble supramolecular nanofiber composed of an amphiphilic dendrimer. *Molecules* 18: 7071-7080. (2013)
- 5) Tsuda A. Hydrodynamic helical orientations of

- nanofibers in a vortex. *Symmetry* 6: 383-395. (2014)
- 6) Ahmad A, Uversky V N, Hong D, Fink A L. Early events in the fibrillation of monomeric insulin. *J. Biol. Chem.* 280: 42669-42675. (2005)
- 7) Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky V N, Fink A L. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry* 40: 8397-8409. (2001)
- 8) Adachi R, Yamaguchi K, Yagi H, Sakurai K, Naiki H, Goto Y. Flow-induced alignment of amyloid protofilaments revealed by linear dichroism. *J. Biol. Chem.* 282: 8978-8983. (2007)