

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
材料表面近傍の水和状態とタンパク質吸着挙動解析

研究分担者 石原一彦（東京大学大学院工学系研究科 教授）

研究要旨

タンパク質の溶存状態での高次構造の維持、材料表面へのタンパク質吸着や吸着タンパク質のコンフォメーション変化には、静電相互作用、水素結合さらに疎水性相互作用など種々の分子間相互作用が影響を与える。同時に、これらの相互作用は水を媒体として作用する力である。これらのことから、タンパク質吸着現象には、材料表面における水分子のネットワーク構造(水和構造)と材料表面近傍で働く分子間相互作用の両者が強く関与すると考えられる。そこで本研究では、表面特異的な水和構造および表面で働く分子間相互作用が、材料表面とタンパク質との間に働く相互作用に与える影響を定量的に解析することを目的とする。本年度は、原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定を用いることで、タンパク質吸着挙動を分子間相互作用の観点から解析した。構造が明確であると同時に、広範囲にわたる界面科学的特性を有する表面を、種々のモノマーユニットからなる高密度ポリマーブラシ構造を用いて構築した。作製したモデル表面に対するタンパク質および官能基の直接的な相互作用は、ポリマーブラシ表面により大きく異なったが、タンパク質とほとんど相互作用しない双性イオン型ポリマーブラシ表面では、タンパク質に存在している官能基との相互作用がほとんど検出されなかった。また、ポリマーブラシ表面近傍で作用する分子間相互作用の種類、大きさ、伝播範囲を解析することにより、双性イオン型ポリマーブラシ表面では、静電的相互作用および疎水性相互作用が働いていないことが明らかとなった。これまでに確立した表面特異的な水和構造および分子間相互作用の解析手法は、タンパク質吸着挙動の理解につながるとともに、タンパク質から認識されない表面設計を提示することを可能とする。

A. 研究目的

バイオマテリアルが生体環境と接した際に誘起される細胞レベルの初期生体反応の多くに吸着タンパク質層の特性が関連している。このため、材料表面における生体反応を高度に規定し、医療機器開発に関する規制環境を整備するためには、タンパク質吸着過程を正確に把握することが必要不可欠である。材料表面の吸着タンパク質層は、タンパク質が材料表面と直接相互作用して形成される単層吸着層と、単層吸着層を形成するタンパク質の変性等を引き金として起こる多層吸着層から形成される。このようなタンパク質吸着層の成り立ちから、タンパク質吸着過程を正確に理解するためには、材料表面における吸着タンパク質の量、組成、分布、コンフォメーション、配向などの静的な特性評価はもとより、タンパク質の競争的吸着や吸着後の変性過程などに関わる動的な特性の解析が重要である。しかしながら、タンパク質吸着の動的特性は、静的特性の経時的変化として解析されることが多く、その起源は明確にされていない。そこで本研究では、材料表面とタンパク質との間に働く分子間相互作用の観点からタンパク質吸着挙動を解析する方法論を確立する。これは、タンパク質が表面と相互作用す

る際の駆動力を明確にできるため、タンパク質吸着現象の動的特性の起源を明らかにできる。具体的には、現在界面科学の研究分野で大きな発展を遂げているコロイドプローブ科学に着目し、タンパク質を固定化したプローブと材料表面間にナノニュートンオーダーで働く相互作用を原子間力顕微鏡(Atomic force microscopy, AFM)のフォースカーブ測定により定量する方法を利用した。

タンパク質の溶存状態での高次構造の維持、材料表面へのタンパク質吸着や吸着タンパク質のコンフォメーション変化には、静電相互作用、水素結合さらに疎水性相互作用など種々の分子間相互作用が影響を与える。同時に、これらの相互作用は水を媒体として作用する力である。これらのことから、タンパク質吸着現象には、材料表面における水分子のネットワーク構造(水和構造)と材料表面近傍で働く分子間相互作用の両者が強く関与すると考えられる。そこで本研究では、表面特異的な水和構造および表面で働く分子間相互作用が、材料表面とタンパク質との間に働く相互作用に与える影響を定量的に解析することを目的とする。

材料表面における水和構造や分子間相互作用は非常に微細であるため、これらを定量的に分析

するためには構造明確な表面が必要不可欠である。そこで本研究では、様々なモノマーユニットを用いて構築したポリマーブラシ構造をモデル表面として利用した。

これまで、マイクロオーダーのシリカ粒子を用いてナノオーダーの微小空間を構築し、そこに封入された水分子の特性を核磁気共鳴法により高い時間分解能で評価する方法論を確立した。これにより、シリカ粒子表面を覆ったポリマーブラシ層の特性に強く影響されたナノ間隙水の磁気緩和時間や自己拡散係数を定量的に評価することで、ポリマーブラシ層の化学構造に対応した表面特異的な水和構造を解析してきた。

本年度は、タンパク質や材料表面に存在する官能基同士の相互作用や材料表面で作用する分子間相互作用に着目した。つまり、様々な分子により修飾された AFM プローブを用いてフォースカーブ測定を行うことで、プローブと材料表面間に働く種々の相互作用を定量的に評価するとともに、これらが、タンパク質との相互作用に与える影響について議論した。

B. 研究方法

1. ポリマーブラシ表面の構築

シリコン基板に原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始基を固定した後、表面開始型 ATRP (SI-ATRP)法を用いて、下記に示すポリマーブラシ層を構築した(図 1)。ポリマーブラシ層を構築する際のモノマー濃度とフリー重合開始剤の比は 100 とした。双性イオン性モノマーとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) (ホスホベタイン型)を、カチオン性モノマーとして、trimethylammoniummethyl methacrylate

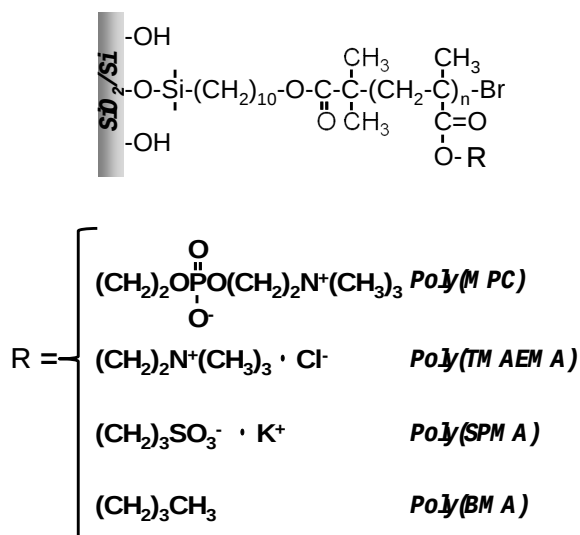


図 1. 作製されたポリマーブラシ層の化学構造.

(TMAEMA) (トリメチルアンモニウム基)を、アニオン性モノマーとして、3-sulfopropyl methacrylate (SPMA) (スルホプロピル基)を、疎水性モノマーとして、*n*-butyl methacrylate (BMA) (ブチル基)をそれぞれ用いた。

作製したポリマーブラシ表面の物理化学的な構造および表面特性を X 線光電子分光(XPS)測定、原子間力顕微鏡(AFM)、分光エリプソメーター、動的接触角測定、および表面ゼータ電位測定(10 mmol/L の NaCl 水溶液中)により評価した。

2. 二表面間の相互作用測定

図 2 に示すような AFM のフォースカーブ測定により、様々な表面間に働く相互作用を測定した。本研究では、タンパク質、種々の官能基を有する SAM 膜および同化学種のポリマーブラシ層をカンチレバーに固定化した。直接的な相互作用を定量する際には、接近/接触したカンチレバーを表面

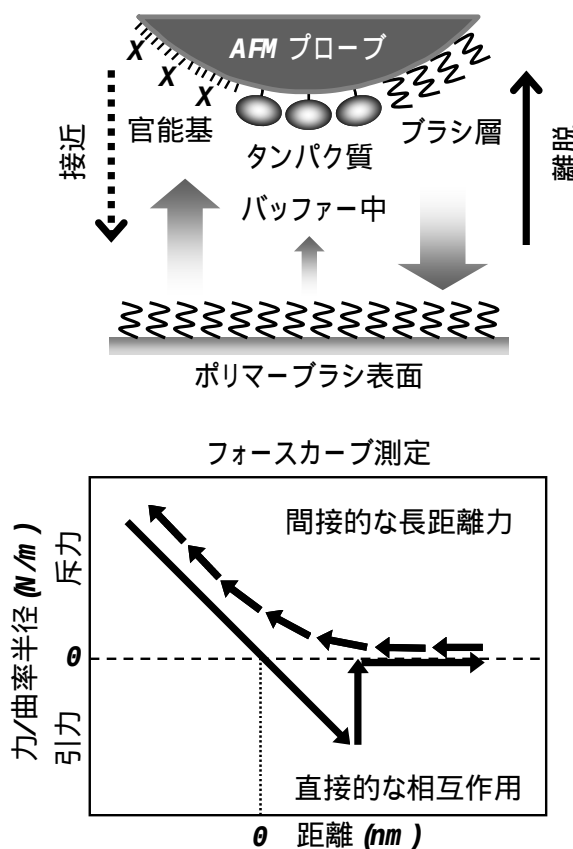


図 2. 原子間力顕微鏡を利用した分子間力相互作用の解析方法.

から引き離す際に引力側へ変位する力を相互作用と定義した。また、間接的に働く遠距離力を評価する際には、カンチレバー表面とポリマーブラシ表面とが接近する際に変位する力を評価した。

タンパク質との直接的な相互作用

タンパク質として、ウシ血清アルブミン(BSA)およびニワトリ卵白由来リゾチーム(Lys)を使用し、各ポリマーブラシ表面との間に働く直接的な相互作用を、下記に従い定量した。

金薄膜をスパッタした Si_3N_4 製カンチレバー(曲率半径: 45 nm)を作製し、表面にカルボキシル基末端自己組織化単分子(SAM)膜を形成させた。同カンチレバーを 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide hydrochloride (0.10 mol/L)と *N*-hydroxy succinimide (0.05 mol/L)の水溶液に 30 分間浸漬した。純水による洗浄後、直ちに各タンパク質のリン酸緩衝液(PBS)に浸漬し、37°C で 1 時間静置した(BSA: 1.0 mg/mL, Lys: 0.3 mg/mL)。表面を PBS により洗浄した後、得られたタンパク質固定化カンチレバーを、室温の PBS 中におけるフォースカーブ測定に使用した。各ポリマーブラシ表面に対し、アプローチカーブとリトラクトカーブの最大変位差を 100 箇所程度測定し、その平均値を直接的な相互作用と定義した。

官能基との直接的な相互作用

プローブレスカンチレバーの先端に直径が 20 μm のシリカ粒子を手動で固定化し、そこに接着層としてクロムを 3.0 nm、続いて金薄膜を 27 nm スパッタした。同カンチレバー表面に、11-mercapto-undecanoic acid、11-amino-1-undecanethiol (hydrochloride)、および 1-dodecanethiol のエタノール溶液(1.0 mmol/L)を用いて、それぞれカルボキシル基、アミノ基およびメチル基末端の SAM 膜を形成した。作製したカンチレバーを用いて、室温の PBS 中における各ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用を定量した。

ポリマーブラシ層同士の間接的長距離力

前述の直径 20 μm のシリカ粒子を用いて、1 と同様の手法により、図 1 に示したポリマーブラシ層を構築し、プローブレスカンチレバー先端にこれを固定した。作製したカンチレバーを用いて、様々な塩濃度の水環境下にて、同種のポリマーブラシ表面間に働く遠距離力を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、合成高分子やタンパク質を使用するものであるため、倫理面に関して特段の配慮は不要であると判断した。

C. 研究結果および D. 考察

1. ポリマーブラシ表面の構造および特性

作製されたポリマーブラシ表面は、エリブソメトリーから乾燥膜厚が 10 nm 程度であり、原子間力顕微鏡(AFM)による高さ観察から、乾燥状態で比較的小さい凹凸構造を有し、表面粗さの指標である二乗平均平方根(RMS)値は 1.0 nm 以下であった。表 1 より、各ポリマーブラシ表面のグラフト密度はすべて 0.10 chains/nm² を超えており、作製されたポリマーブラシ層が高密度領域にあることがわかった。グラフト密度とポリマー鎖の断面積から表面被覆率を概算した結果、グラフト鎖で被覆されていない下地表面は 1.0 nm 以下のオーダーであり、数ナノメートルのオーダーを有するタンパク質と比べて十分小さかった。つまり、作製されたポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着において、タンパク質の下地表面への直接的な吸着(一次吸着)やグラフトポリマー鎖間への吸着(三次吸着)は回避され、ポリマーブラシ層最表面への吸着が支配的であることが示唆された。

生体応答が誘起される水環境下での表面特性を示す水中の気泡の接触角は、疎水性の側鎖を有する poly(BMA)ブラシ表面を除いて一様に小さい値となった。また、10 mmol/L の塩化ナトリウム水溶液における表面電位は、ポリマー自体が有する荷電特性と同様の傾向であった。ただし、poly(BMA)は側鎖に電荷を持たないにも関わらず、負の電荷を有する表面であった。これは疎水性表面に観測される現象であり、表面への電解質イオンの吸着に由来すると考えられる。このように、

表 1. ポリマーブラシ表面の特性.

Polymer	Graft density (chains/nm ²)	Water contact angle (deg)		ζ -potential* (mV)
		In air	In water	
Poly(MPC)	0.33	10	9	-5.9
Poly(TMAEMA)	0.45	17	17	64.9
Poly(SPMA)	0.55	11	13	-74.0
Poly(BMA)	0.75	86	73	-37.2

重合度 100. * 10 mmol/L NaCl aqueous solution.

高密度ポリマーブラシ層により、均一な構造を有し、ポリマー鎖の配置がナノメートルオーダーで明確である表面を構築した。また、様々な化学構造を有するグラフト鎖を配置することで、濡れ性や表面電位などに代表される界面科学的な表面特性を広範囲に制御した。

2. ポリマーブラシ表面とタンパク質との直接的相互作用

本研究では、生理条件下でそれぞれ全体として、負および正の正味電荷を有するタンパク質である BSA および Lys を用いた。図 3 に示すように、ポリマーブラシ表面とタンパク質との相互作用は、その組み合わせにより大きく異なった。BSA

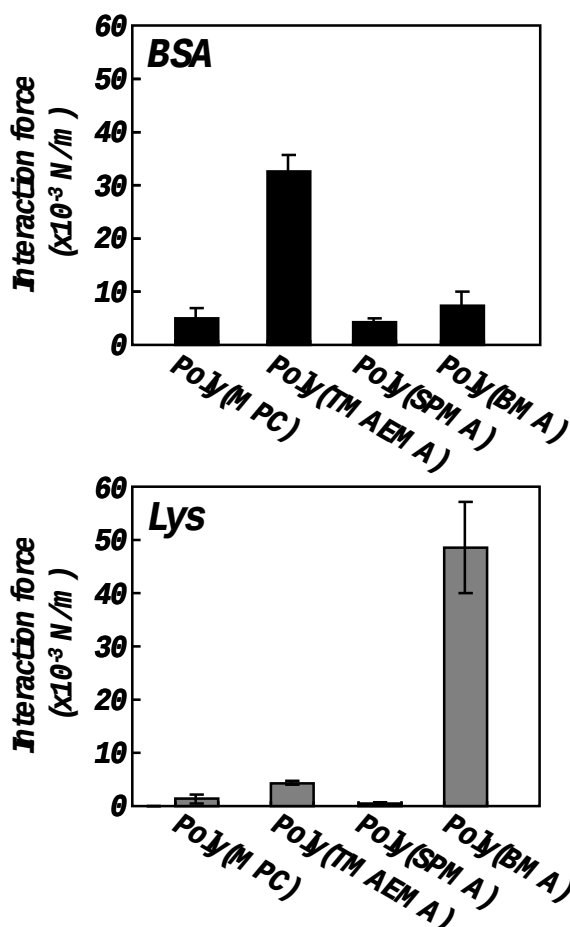


図 3. ポリマーブラシ表面に対するタンパク質の相互作用。

との相互作用はカチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA) ブラシ表面で最大であった。これは、poly(TMAEMA) 表面の正電荷と BSA の有する負電荷との間の静電的な引力に起因すると考えられる。また、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA) ブラシ表面に対する BSA の相互作用は小さかった。これは、負電荷同士の斥力に起因すると考えられる。一方、正の正味電荷を有する Lys は、疎水性の側鎖およびアニオン性の電位を有する poly(BMA) ブラシ表面と強く相互作用した。しかしながら、Lys と poly(SPMA) との相互作用は非常に小さかった。この理由は現時点では明らかではないが、塩強度の強い PBS 中にて、溶液中に存在するイオンにより静電的な相互作用が遮蔽されていることが考えられる。タンパク質の正味電荷に関わらず、双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC) ブラシ表面はタンパク質との相互作用が非常に小さかった。

3. ポリマーブラシ表面と官能基との直接的相互作用

様々な官能基により修飾したプローブを用いてフォースカーブ測定を行い、ポリマーブラシ表

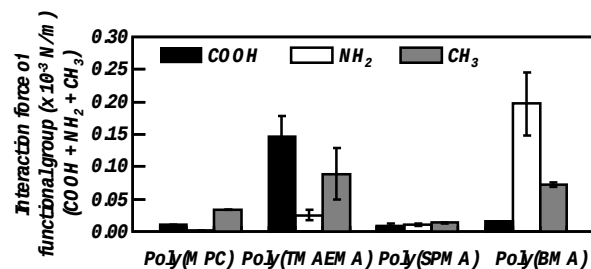


図 4. ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用。

面と官能基との間に働く相互作用を定量的に評価した(図 4)。選択した官能基はカルボキシル(COOH)基、アミノ(NH₂)基およびメチル(CH₃)基であり、これらはタンパク質中に多く存在する代表的な官能基であると同時に、それぞれアニオン性、カチオン性および疎水性の特性を有するため、静電的相互作用や疎水性相互作用の指標になると考えられる。双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC) ブラシ表面はいずれの官能基との相互作用も極めて小さかった。この結果から、poly(MPC) ブラシ表面では静電的相互作用や疎水性相互作用に由来する力がほとんど働かないことが示唆される。また、水中の気泡の接触角および表面電位から、これらの表面が水環境下において高い親水性かつ電氣的に中性を有する表面であったこととも一致する。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA) ブラシ表面はカルボキシル基との特に強い相互作用を示した。これは、poly(TMAEMA) の側鎖に存在する正電荷と、解離したカルボキシル基(COO⁻)の負電荷との間に強い静電的引力が働いていることを示す。疎水性の側鎖を有する poly(BMA) ブラシ表面はメチル基およびアミノ基との強い相互作用を示した。メチル基との強い相互作用は、水中において働く疎水性相互作用に由来すると考えられる。同時に上述のように、poly(BMA) ブラシ表面はアニオン性であったため、プロトン化したアミノ基(NH₃⁺)の正の電荷との間の静電的相互作用に由来する力が働いたと考えられる。一方で、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA) ブラシ表面は PBS 中ではいずれの官能基との相互作用も示さなかった。しかしながら、純水中においては poly(SPMA) ブラシ表面とアミノ基との強い相互作用が観測された。このため、poly(SPMA) 表面では、塩強度の強い PBS 中において、静電的相互作用が静電遮蔽の効果を受けているものと考えられる。以上のように、様々な官能基で修飾されたプローブを用いたフォースカーブ測定により、ポリマーブラシ表面に働く分子間相互作用の一部を定量的に明らかとした。

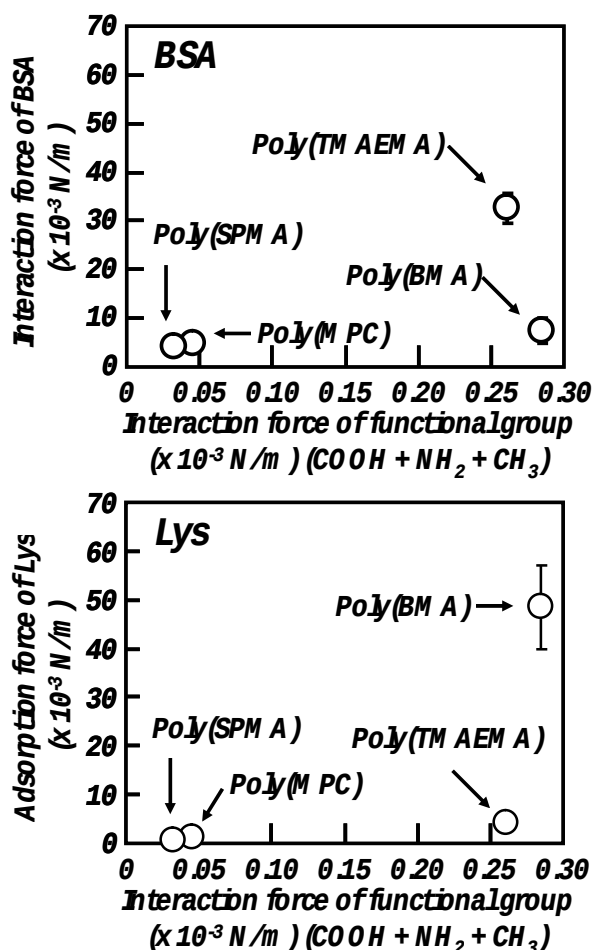


図 5. 各ポリマーブラシ表面におけるタンパク質との相互作用と官能基との相互作用の関係。

バイオマテリアル表面における官能基レベルの相互作用が、タンパク質との相互作用に与える影響を定量的に評価することは、タンパク質吸着挙動のさらなる理解へと繋がる。図 5 に、ポリマーブラシ表面におけるタンパク質の相互作用と官能基との相互作用の総和との関係を示す。図 5 より、官能基との相互作用の総和が小さいポリマーブラシ表面と大きいポリマーブラシ表面に分けることができる。官能基との相互作用の総和が小さいポリマーブラシ表面は、タンパク質の正味電荷によらず、タンパク質との相互作用が小さいことが示された。一方、官能基との相互作用の総和が大きいポリマーブラシ表面では、同等の総和であってもポリマーブラシ表面とタンパク質との組み合わせにより、その関係が大きく変化した。つまり、負電荷の乖離カルボキシル(COO^-)基と強く相互作用する poly(TMAEMA) ブラシ表面は、負の正味電荷を有する BSA と強く相互作用し、疎水性のメチル基および正電荷のプロトン化アミノ(NH_3^+)基と強く相互作用する poly(BMA) ブラシ表面は、正の正味電荷を有する Lys と相互作用し

た。これは、突出した相互作用を有する官能基との相互作用が、タンパク質との相互作用を決定することを示唆する結果である。このような結果から、タンパク質との非特異的な相互作用を排除するためには、官能基レベルの相互作用を回避する必要があることが示された。

4. 同種のポリマーブラシ表面間で働く長距離力

図 6 に、純水およびイオン強度が異なる PBS (1.5 mmol/L および 150 mmol/L) 中において、同種のポリマーブラシ表面間に働く遠距離相互作用の表面間距離依存性を示す。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA) ブラシ表面およびアニオン性の側鎖を有する poly(SPMA) ブラシ表面では、純水中において 100 nm 以上の距離から強い斥力が観測され、溶液のイオン強度の増加に伴い斥力の強さと伝播距離が低下した。これは、これらの斥力が主として静電的な力に由来するものであることを示している。つまり、これらの表面近傍では静電的相互作用が支配的に働いていると考えられる。また、疎水性の側鎖を有する poly(BMA) ブラシ表面では、純水中において二表面の接近時には力が観測されなかったが、接触後、離脱時のみに強い引力が観測された。この引力は水中で疎水性表面間に働く疎水性相互作用に起因するものであると考えられる。これらに対し、双性イオン型の側鎖を有する poly(MPC) ブラシ表面では、溶液のイオン強度に依らない弱い斥力のみが観測された。力の働き始める距離が poly(MPC) ブラシ層の膜厚の 2 倍程度の距離であったことから、この力はポリマー鎖の圧縮によるものと考えられる。すなわち、他の表面で観測されたような静電的・疎水的な相互作用に由来する力は全く観測されなかった。

同種の表面間のフォースカーブ測定により、各ポリマーブラシ表面で固有に働く相互作用の種類、大きさおよび伝播距離を評価する方法論が確立された。これらのパラメータは、今後タンパク質吸着挙動を理解する上で、有益な情報を与えると考えられる。

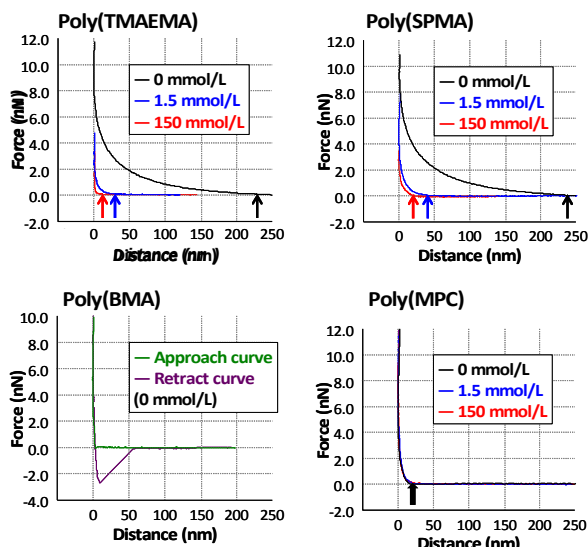


図 6. 様々なポリマーブラシ表面に働く力と表面間距離の関係。

E. 結論

原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定により、材料表面に対する種々の相互作用を定量的に分析する手法を確立した。特に、タンパク質との直接的な相互作用が回避される双性イオン型ポリマーブラシ表面では、官能基との相互作用が検出されなかった。つまり、タンパク質吸着を誘起させないためには、官能基との微細な相互作用を排除することが重要であることがわかった。さらに、双性イオン型ポリマーブラシ表面では、静電的相互作用および疎水性相互作用が働いていなかった。つまり、タンパク質吸着を高度に抑制するためには、官能基との相互作用を引き起こす分子間相互作用を排除する表面設計が必要不可欠であることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Quantitative Evaluation of Interaction Force between Functional Groups in Protein and Polymer Brush Surfaces", Langmuir, in press (2014) (dx.doi.org/10.1021/la404981k).

2. 学会発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Interaction forces related to protein adsorption on polymer brush surfaces", The Society For Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition: Biomaterials Revolution, Boston, USA, 2013/4/10-13.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「種々の力が作用するポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着挙動」、第 62 回高分子学会年次大会、京都、2013/5/29-31.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質非吸着を実現する表面相互作用力の定量解析」、第 62 回高分子討論会、金沢、2013/9/11-13.

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Nano-force Analysis for Understanding Protein-Materials Interactions", 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013, Tokyo, Japan, 2013/10/8-10.

○井上祐貴、坂田翔、石原一彦、「タンパク質吸着の AFM ナノフォース解析」、第 35 回バイオマテリアル学会大会、東京、2013/11/25-26.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着の理解を目指したナノスケールの相互作用力解析手法の確立」、第 23 回日本 MRS 年次大会、横浜、2013/12/9-11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし