

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(表面相互作用)が強く関与する。本研究では、材料表面におけるこれら二つの特性がタンパク質吸着挙動に果たす役割を定量的に解析することを目的とする。このような微細な特性を正確に解析するために、構造が明確であると同時に、広範囲にわたり界面科学的特性を制御できる高密度ポリマーブラシ構造を、ポリマー表面のモデルとして一貫して使用する。本年度は、ポリマーブラシ表面近傍の水分子の磁気緩和時間を様々な条件下で測定することで、より正確に表面水和構造を解析する系の確立を目指した。また、原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定により、ポリマーブラシ表面近傍で働く表面相互作用力を解析した。このような解析を通して、タンパク質吸着挙動を正確に理解することで、医療機器開発に関する規制環境の整備に貢献する。

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。つまり、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、水を媒体として作用し、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大きな影響を与える分子間相互作用の観点からは明確にされていない。

そこで本研究では、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(表面相互作用力)が、タンパク質吸着挙動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表面相互作用力は非常に微細である。つまり、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。本研究では、構造が明確であると同時に、広範囲にわたり界面科学的特性を制御できる高密度ポリマーブラシ構造を、ポリマー表面のモデルとして一貫して使用する。

本年度は、ポリマーブラシ表面近傍の水分子の磁気緩和時間を様々な条件下で測定することで、より正確に表面水和構造を解析する系の確立を目指した。また、原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定により、ポリマーブラシ表面近傍で働く表面相互作用力を解析するとともに、タンパク質との相互作用を詳細に解析することで、タンパク質吸着現象に与える分子間相互作用の役割を明らかにした。

B. 研究方法

1. ポリマーブラシ表面の構築

シリコン基板もしくはシリカ粒子(直径：2、10 または 20 μm)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、図 1 に示すポリマーブラシ構造を構築した。ポリマーブラシ構造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 50、100 および 200 とした。ここで、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)、

N-methacryloyloxyethyl *N,N*-dimethyl ammonium- α -*N*-methyl carboxylate (CBMA) (カルボキシベタイン型)および[2-(methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide (SBMA) (スルホベタイン型)を、非電解質親水性モノマーとして 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) (ヒドロキシル基)および oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (mOEGMA) (オリゴエチレングリコール鎖)を、カチオン性モノマーとして、2-trimethylammoniumethyl methacrylate (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を X 線光電子分光(XPS)測定、原子間力顕微鏡(AFM)および分光エリブソメーターにより評価した。代表的な表面特性である動的接触角および表面ゼータ電位(10 mmol/L の NaCl 水溶液中)は、表 1 に示すようにモノマーユニットの特性を強く反映した結果となった。

2. 水和構造解析

様々な膜厚のポリマーブラシ構造を構築したシリカ粒子(直径：2 または 10 μm)を NMR 管に詰めた後、脱気した純水もしくは 10 mmol/L に調製した NaCl 水溶液を加え、ポリマーブラシ層を水和させた。これを 3500 rpm で 10 分間遠心し、シリカ粒子を充填させた。上清を除去した後、NMR 装置

に設置し、37°C に保持した後、サンプルに含まれる水分子のスピン - 格子緩和時間 (T1) を測定した。

3. ポリマーブラシ表面近傍の表面相互作用力測定

図 1 に示したポリマーブラシ層のうち、poly(MPC)、poly(TMAEMA)、poly(SPMA) および poly(BMA) ブラシ表面を構築した直径 20 μm のシリカ粒子をプローブレスカンチレバーの先端に手動で固定化した。カンチレバー先端に存在するポリマーブラシ層と同じポリマーブラシ層をシリコン基板表面に構築し、様々な塩濃度の水環境下において両者の間に生じるフォースカーブ曲線を取得した。

4. タンパク質との直接的 / 間接的な相互作用評価

3 で使用した 4 種類のポリマーブラシ表面に関して、タンパク質との直接的 / 間接的な相互作用を評価した。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、これらのタンパク質を化学的に固定化したカンチレバーを作製した。室温の PBS 中におけるフォースカーブ測定により、各ポリマーブラシ表面に対する接近および離脱時のフォースカーブを取得した。

(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

前年度までに報告してきたように、作製されたポリマーブラシ表面は、5.0 から 20 nm 程度の膜厚で、比較的小さい凹凸構造を有した。表 1 に示すように、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、高密度領域にあった。グラフト密度とポリマー鎖の断面積から概算される表面被覆率から、グラフト鎖で被覆されていない下地表面は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。動的接触角の後退接触角は、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であった。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。

このように、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. 水和構造解析

図 2 に重合度が 100 の各ポリマーブラシ構造を構築したシリカ粒子 (直径 : 2 または 10 μm) 内に封入された水分子の T1 値を示す。図 2 から分かるように、双性イオン性

およびカチオン性ポリマーブラシ層で覆われたシリカ粒子間に存在する水分子の T1 値は低い値となった。一方、非電解質親水性および疎水性ポリマーブラシ層で覆われたシリカ粒子間に存在する水分子の T1 値は比較的大きな値となった。間隙に封入された水は、ポリマーブラシ層内部の水、ポリマーブラシ層最表面付近の水、およびポリマーブラシ層と相互作用していない水からなると考えられる。重合度 100 で作製したポリマーブラシ層の厚さは 10 nm 程度であるが、直径が 10 μm のシリカ粒子が形成する間隙のサイズは最大で 800 nm である。これは、間隙内に封入された水分子の大部分が表面に存在するポリマー鎖と相互作用しない自由水であることを意味する。

Poly(HEMA)や poly(BMA)鎖は非水溶性であるため、そのポリマーブラシ層内部に水を含むことができない。このため、これらの表面では、3500 ms 程度の T1 値を有する純水の影響を強く受け、T1 値が大きく見積もられたと考えられる。このような事態を解決するため、シリカ粒子の直径を変化させる(図 2)、遠心を利用しシリカ粒子のパッキングを密にする(図 2)、またはブラシ層の厚さを変化させる(図 3)などの改変を試みたが、現時点ではそれぞれの T1 値に大きな変化は見られなかった。表面特異的な水和構造をより正確に定量するためには、より小さいシリカ粒子を使用する、より厚いポリマーブラシ層を構築する、などのさらなる工夫が必要であると考えられる。

3. ポリマーブラシ表面近傍の表面相互作用力測定

前年度で報告したように、同種のポリマ

ーブラシ層を用いた接近時のフォースカーブは、カチオン性またはアニオン性ポリマーブラシ層の場合、塩強度により大きさや及ぶ範囲が異なることが示された。また、疎水性または双性イオン性ポリマーブラシ層では、接近時のフォースカーブに、特別な相互作用が検出されなかった。図 4 に各ポリマーブラシ層を用いた場合の、離脱時のフォースカーブを示す。疎水性ポリマーブラシ層では離脱時の強い引力が検出されたのに対し、カチオン性、アニオン性および双性イオン性ポリマーブラシ層ではこのような引力がほとんど検出されなかった。これらの結果から、カチオン性およびアニオン性ポリマーブラシ表面には、静電的相互作用のみが、疎水性ポリマーブラシ表面には疎水性相互作用のみが働き、双性イオン性ポリマーブラシ表面にはこのような相互作用が全く働いていないことが明らかとなった。

4. タンパク質との直接的 / 間接的な相互作用評価

図 5 に各ポリマーブラシ表面と生理条件下で正味電荷の異なるタンパク質(BSA および Lys)との代表的なフォースカーブを示す。前年度までに、離脱時のフォースカーブから、タンパク質と各ポリマーブラシ表面との直接的相互作用が、これらの電荷の組み合わせやポリマーブラシ表面の疎水性に強く影響を受けることを定量的に示した。ここでは、接近時のフォースカーブに着目した。つまり、ほとんどの組み合わせで、接近時にタンパク質とポリマーブラシ表面との間に引力を観測することはなかった。すなわち、これらの表面における静電的あるいは疎水的な相互作用はタンパク質を引

き付ける駆動力としてではなく、接触後の離脱を妨げる力として働いていることが明らかとなった。

E . 結論

シリカ粒子の粒径やポリマーブラシ層の化学構造や膜厚を様々に変化させ、表面特異的な水和構造を測定したことにより、より厳密な測定系が必要であることがわかった。また、ポリマーブラシ表面は、表面相互作用力を明確に区別できる新しいモデル表面であることがわかった。さらに、その表面で生じる静電的および疎水的な相互作用は、表面からのタンパク質の離脱を妨げる力としての役割を果たすことがわかった。以上より、タンパク質の離脱時の分子間相互作用を誘起しない表面の設計がタンパク質吸着の抑制に重要であると結論づけた。

F . 研究発表

1. 論文発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Nano-scale Molecular Interaction Force Measurement for Analysis of Protein Adsorption on the Surfaces", *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* 39[2] 185-188 (2014).

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Molecular Interaction Forces Generated during the Protein Adsorption to Well-defined Polymer Brush Surfaces", *Langmuir*, in press (2015) ([dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00351](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00351)).

2. 学会発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Surface Interaction Forces

Governing Protein Adsorption Analyzed by Direct Force Measurement", *The Society For Biomaterials 2014 Annual Meeting and Exposition: Pioneering the Future of Biomaterials*, Denver, USA, 2014/4/16-19.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「表面で観測される力の解析に基づくタンパク質非吸着表面の創製」、第63回高分子学会年次大会、名古屋、2014/5/28-30.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着における分子間相互作用力の役割」、第43回医用高分子シンポジウム、東京、2014/7/28-29.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「ポリマー表面における分子間相互作用力の精密解析とタンパク質吸着プロセスの理解」、第63回高分子討論会、長崎、2014/9/24-26.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「種々の分子間相互作用力に基づくタンパク質吸着プロセスの理解」、第36回バイオマテリアル学会大会、東京、2014/11/17-18.

○井上祐貴、石原一彦、「マテリアル表面近傍の水和構造がタンパク質との相互作用に与える影響」、第36回バイオマテリアル学会大会、東京、2014/11/17-18.

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Analysis of protein adsorption force generated at polymer surfaces for designing non-biofouling surfaces", *The 10th International Polymer Conference*, Tsukuba, Japan, 2014/12/2-5.

○Kazuhiko Ishihara, Sho Sakata, Yuuki Inoue, "Nanoforce measurements for understanding protein adsorption at the

biocompatible surface", 8th International
Symposium on Nanomedicine,
Matsuyama, Japan, 2014/12/4-6.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパ
ク質吸着プロセスの理解を目指した分子
間相互作用力の解析」、第 24 回日本 MRS
年次大会、横浜、2014/12/10-12.

G . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

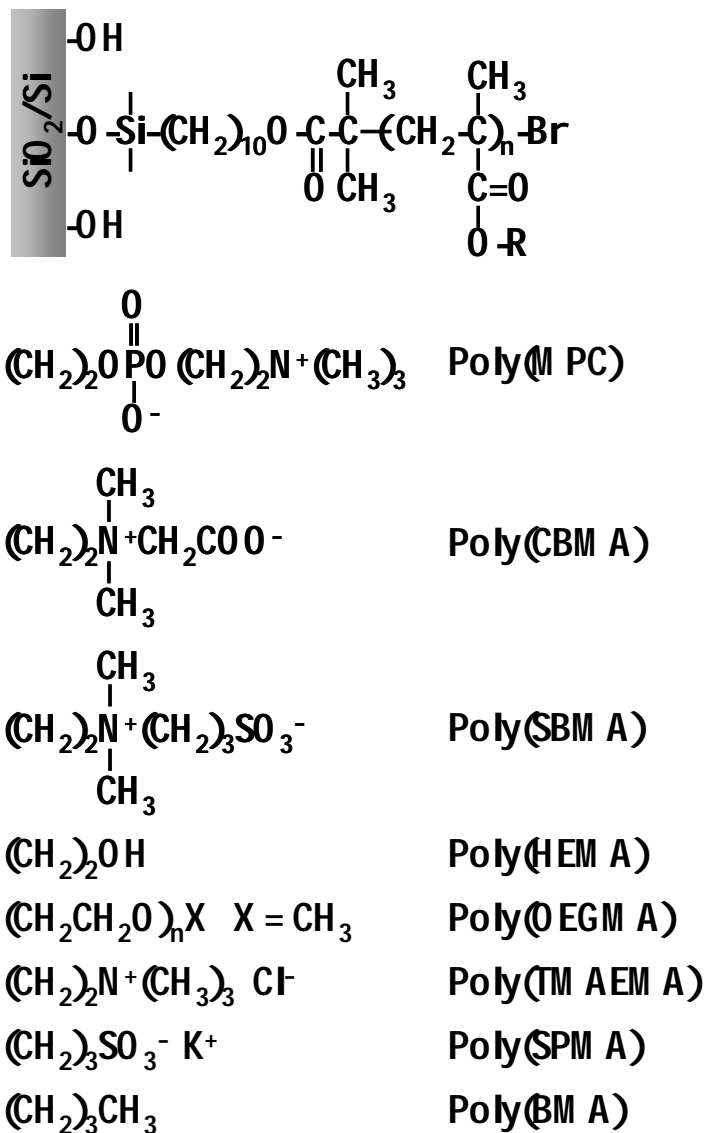


図1. ポリマーブラシ層の化学構造.

表1. ポリマーブラシ層の特性.

Polym er	Graft density (chains/nm ²)	Surface coverage	DCA (°)			ζ -potential (m V)
			θ_{adv}	θ_{rec}	θ_{hys}	
Poly(M PC)	0.26	39%	21	17	4	-3.6
Poly(CBM A)	0.67	74%	22	16	6	-1.8
Poly(SBM A)	0.48	69%	23	17	6	-7.8
Poly(HEM A)	0.79	59%	65	24	41	-4.4
Poly(m O EGM A)	0.36	65%	50	37	13	-3.5
Poly(TM AEM A)	0.31	37%	62	19	43	45
Poly(SPM A)	0.47	70%	30	28	2	-74
Poly(BM A)	0.75	62%	90	70	20	-37

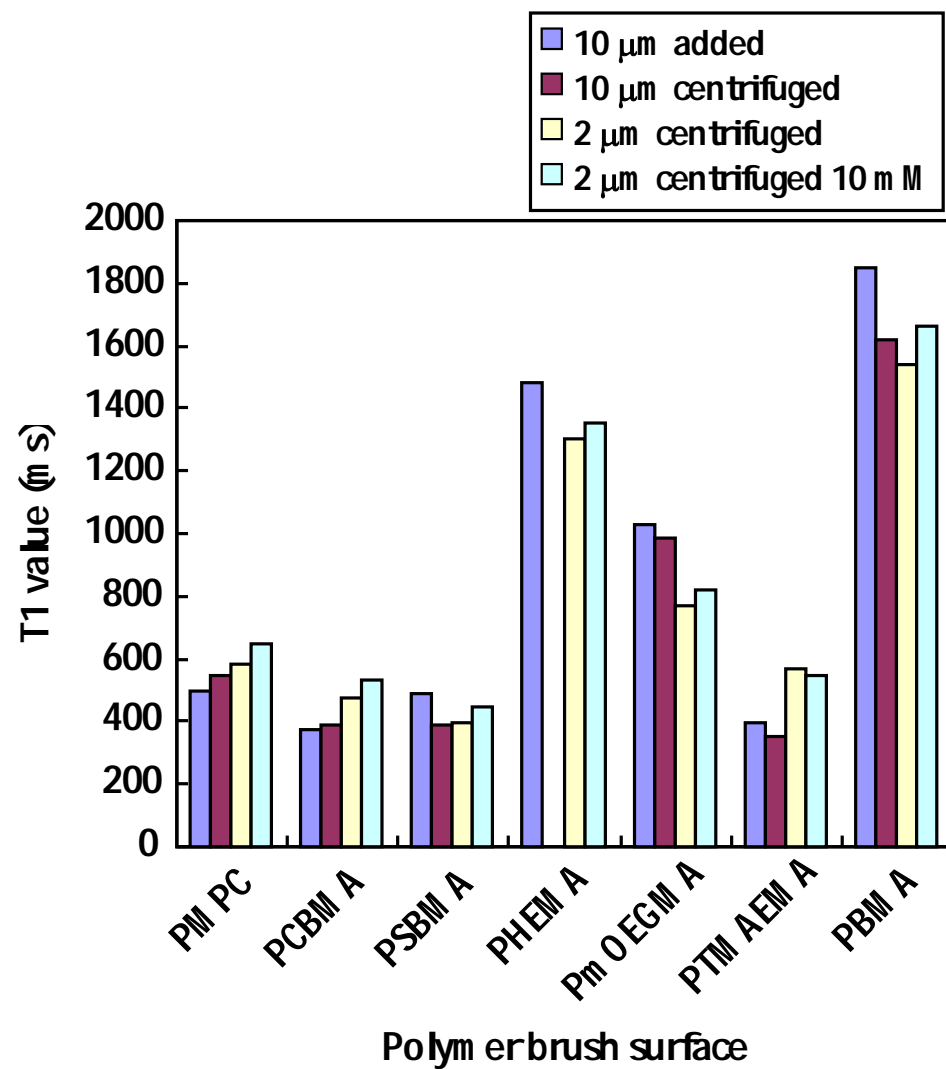


図2. 各ポリマーブラシ層で覆われたシリカ粒子間の水分子のT1値.

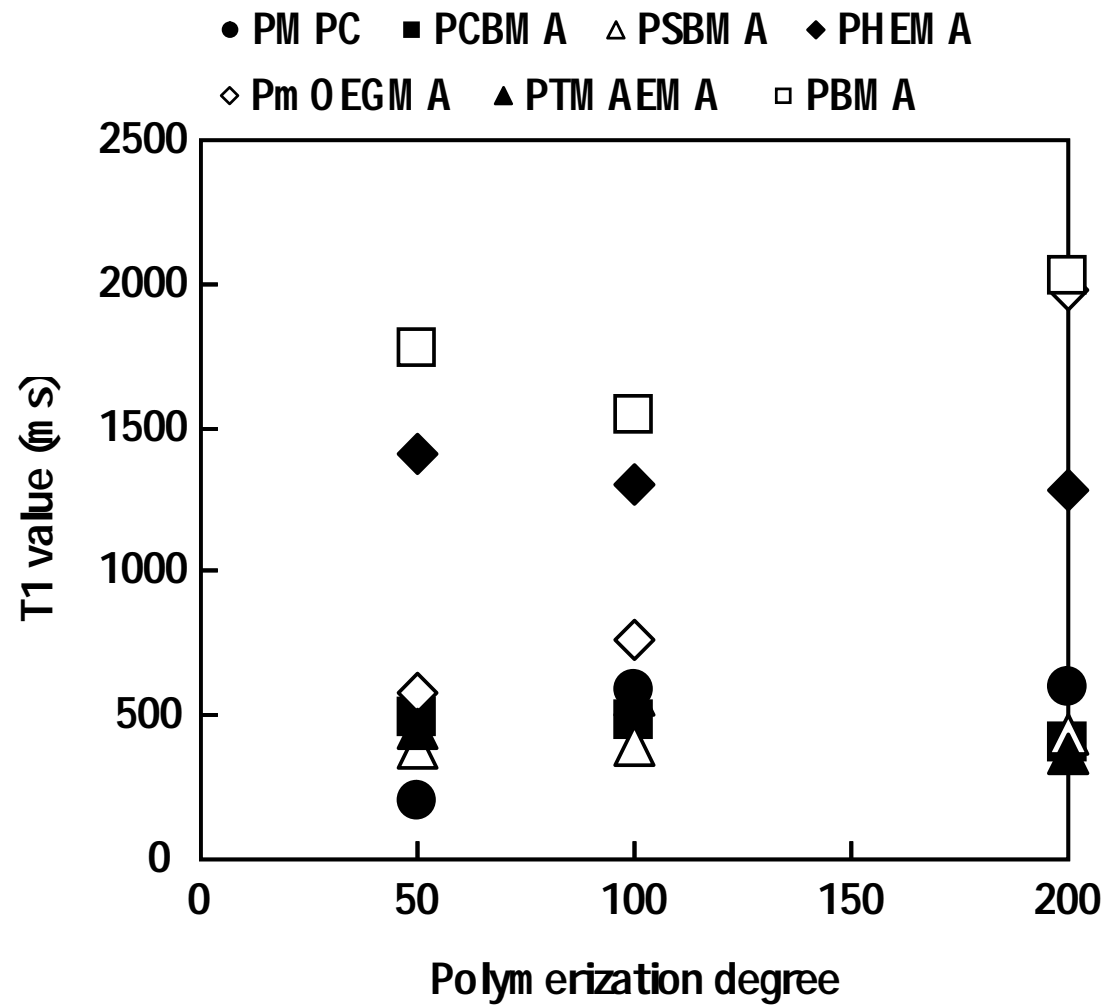


図3. ポリマーブラシ層で覆われたシリカ粒子間の水分子のT1値の重合度依存性.

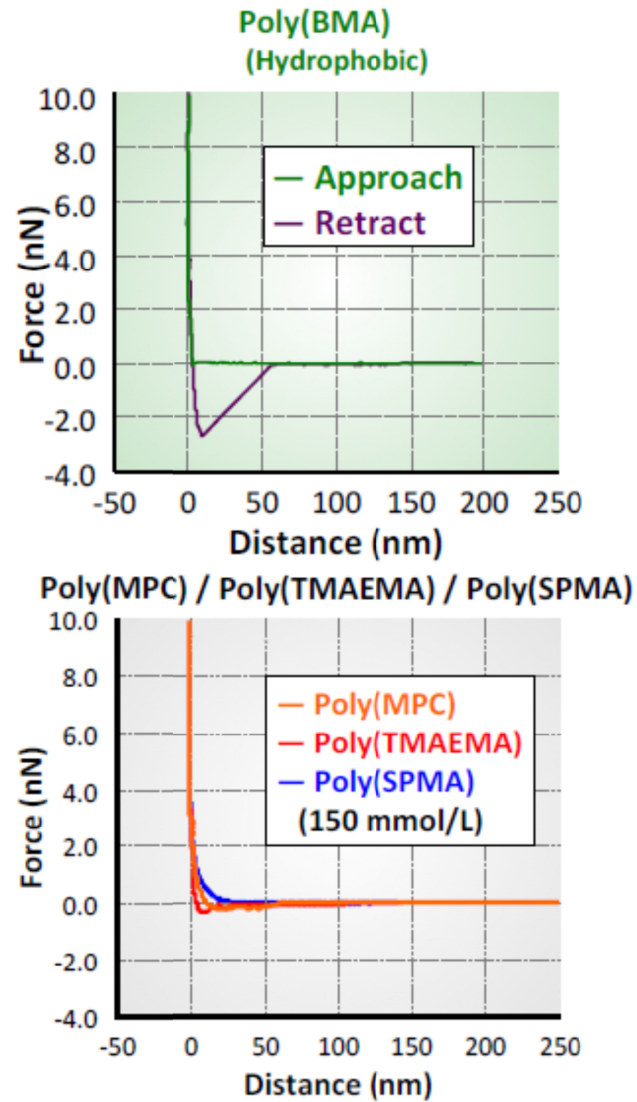


図4. ポリマーブラシ層同士の離脱時のフォースカーブ.

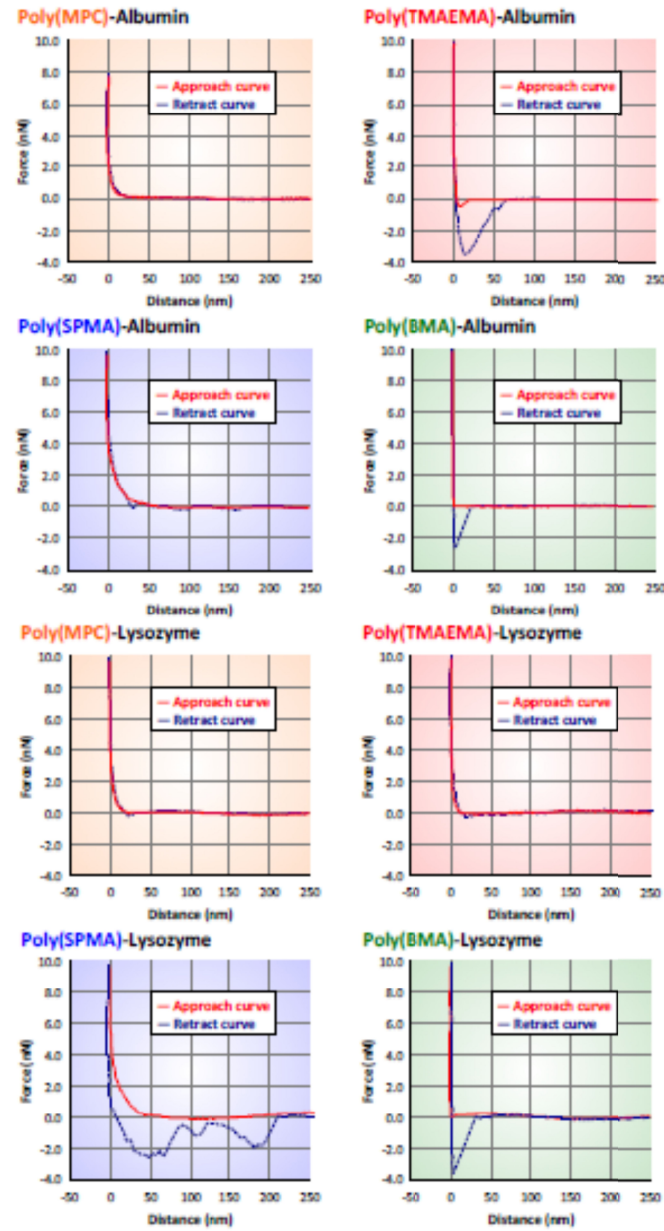


図5. 各ポリマーブラシ層とタンパク質との間のフォースカーブ.