

平成 30 年 4 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01310

研究課題名(和文) 表面間相互作用から観るタンパク質吸着

研究課題名(英文) Protein adsorption analyzed from a viewpoint of surface interaction

研究代表者

井上 祐貴 (Inoue, Yuuki)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：40402789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質吸着はマテリアル表面で最初に誘起され、その後の様々な生体応答を決定づける重要な生体応答である。本研究では、マテリアル表面で働く分子間相互作用の観点から、タンパク質吸着を理解することを目的とした。具体的には、様々な特性を有する一連のポリマーブラシ表面を用いて、タンパク質が吸着層を構築するまでに受ける分子間相互作用を解析した。分子間相互作用はタンパク質をマテリアル表面に引き付ける駆動力として働くのではなく、マテリアル表面に接触したタンパク質の離脱を防ぐために働くことがわかった。同時に、分子間相互作用が大きいほど、吸着したタンパク質の高次構造が変化し、多層吸着を誘起することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Protein adsorption is initially induced at the surface of the material and is an important biological response that determines subsequent biological responses. In this research, we aimed to understand protein adsorption from the viewpoint of intermolecular interaction working on the material surface. Specifically, we analyzed the intermolecular interactions that a protein takes to construct an adsorption layer using a series of well-defined polymer brush surfaces composed of various chemical structures. It was found that the intermolecular interaction works not to act as a driving force to attract the protein to the materials surface, but to prevent the detachment of the protein contacting the materials surface. It was also found that as the intermolecular interaction is larger, the higher order structure of the adsorbed protein changes, leading to the multilayer adsorption.

研究分野：バイオコロイド工学

キーワード：分子間相互作用 タンパク質吸着 原子間力顕微鏡 ポリマーブラシ表面

1. 研究開始当初の背景

マテリアル表面は、生体環境下において生体分子と直接相互作用を行い、多くの生体応答を誘起する重要な反応場である。これらの生体応答はマテリアル表面における吸着タンパク質層によって誘起されるため、高度な生体応答の制御には、マテリアル表面におけるタンパク質吸着を正確に理解することが必要である。タンパク質吸着は、タンパク質がマテリアル表面と接する初期段階に進行する生体応答であることから、マテリアル表面の物理化学的特性に直接影響を受ける。このことからこれまで、吸着量や高次構造などに代表される吸着タンパク質層の特性が、マテリアル表面の特性によりどのように決定されるかに研究の重点が置かれてきた。しかしながら、マテリアル表面の特性は、タンパク質吸着を誘起する直接的な駆動力ではない。タンパク質吸着を誘起する直接的な駆動力は、タンパク質 マテリアル表面間もしくはタンパク質同士に働く分子間相互作用である。このため、分子間相互作用の観点からの解析が、タンパク質吸着挙動の理解には極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

マテリアル表面で働く分子間相互作用の観点から、タンパク質吸着挙動を理解することを目的とする。タンパク質吸着挙動を理解することにより、高い機能を最大限発揮できるバイオマテリアル表面の分子設計が可能となる。

3. 研究の方法

分子間相互作用の解析には、原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定を用いた。つまり、カンチレバーがマテリアル表面に接近、接触、離脱する際のフォースカーブにより、二つの物質間に間接的に働く長距離力や直接的に働く相互作用力を分析した。また、カンチレバー表面にタンパク質またはポリマー層を固定することで、種々の組み合わせで分子間相互作用を解析した。マテリアル表面の構造や特性と分子間相互作用の関係、さらに、タンパク質吸着挙動と分子間相互作用の関係を適切に議論するためには、分子サイズで構造明確な表面が必要不可欠である。これを実現するため、表面開始型リビングラジカル重合により、図1に示す構造明確なポリマーブラシ表面を構築した。つまり、双性イオン性モノマーとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) (ホスホベタイン基)を、カチオン性モノマーとして、2-trimethylammoniumethyl methacrylate chloride (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 potassium salt (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)を用いた。

特に、静電的相互作用および疎水性相互作用を制御するため、MPC/BMA および TMAEMA/SPMA の組み合わせで、ランダム型のコポリマー (PMB および PTS) ブラシ表面を構築した。

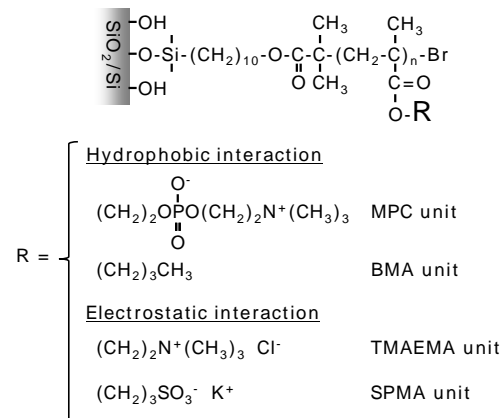


図1. ポリマーブラシ層の化学構造。

4. 研究成果

作製した PMB および PTS ブラシ表面におけるグラフト密度は、モノマーユニット組成によらず、それぞれ 0.3 および 0.5 chains/nm² 程度であった。この結果から、作製し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。XPS 測定により、表面近傍のモノマーユニット組成は、グラフト層内のモノマーユニット組成とほぼ同等であることがわかった。つまり、ものまの仕込み比により、表面近傍のモノマーユニット組成を制御することがわかった。PMB ブラシ表面の水中における気泡の接触角は、MPC ユニット組成の増加に伴って、70° から 10° へ減少した。一方、ゼータ電位は MPC ユニット組成が 20 mol% より大きい PMB ブラシ表面でほとんどゼロであった。これらの結果から、PMB ブラシ表面により、静電的相互作用がほとんど働かず、疎水性相互作用のみを制御できる表面を構築できたことがわかった。PTS ブラシ表面の水環境下での気泡の接触角は、モノマーユニット組成を変えても塩の濃度によらず 10° から 40° の間の値であり、超親水性を示した。一方、ゼータ電位はカチオン性の TMAEMA ユニット組成の増加に伴い、-40 mV から 20 mV に増加した。これらの結果から、PTS ブラシ表面により、疎水性相互作用がほとんど働かず、静電的相互作用のみを制御できる表面を構築できたことがわかった。

図2に、モノマーユニット組成の異なる PMB ブラシ表面へのフィブリノーゲン吸着量とフィブリノーゲンとの相互作用力の関係を示す。吸着量および相互作用力は、それぞれ表面プラズモン共鳴 (SPR) 法およびフォースカーブ測定により定量した。図2から、相互作用力が大きいほど、吸着量が高くなることがわかった。フィブリノーゲンの理論単層吸着量は、side-on 吸着を仮定すると、180 ng/cm² 程度である。このことから、相互作用

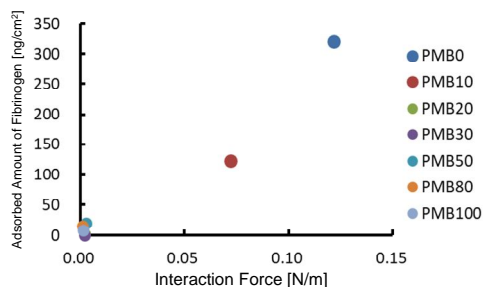


図2. 組成の異なる PMB ブラシ表面におけるフィブリノーゲンの吸着量と相互作用力の関係。

力が大きいほど、フィブリノーゲンが多層に吸着したことがわかった。フィブリノーゲンは血液の凝固に関わるタンパク質であり、互いに相互作用して凝集する性質を有する。互いに相互作用する際には、フィブリノーゲンの構造変化が重要である。多層のフィブリノーゲン吸着層が形成する場合、強い相互作用引力で表面に吸着したフィブリノーゲンが構造変化を起こすことで、液中のフィブリノーゲンと相互作用したと考えられる。単層程度の吸着層が形成する表面では、相互作用力により表面にフィブリノーゲンを吸着させることはできても、構造変化を促すほどの大きさではなかったと考えられる。

図3に、モノマーユニット組成の異なるPTSブラシ表面へのフィブリノーゲン吸着量とフィブリノーゲンとの相互作用力の関係を示す。図3より、PTS表面でもPMB表面と同様に、相互作用力の大きい表面で、フィブリノーゲンの吸着量が高くなることがわかった。PTS表面では特に、カチオン性のTMAEMAユニットとアニオン性のSPMAユニットがほぼ同等の表面(PTS50ブラシ表面)で、相互作用力および吸着量とも極めて小さくなった。PTS50表面は、水環境下で超親水性であり、電気的に中性であった。これはPMB100ブラシ表面、つまりpoly(MPC)ブラシ表面と同等の特性であった。このような特性を有する表面でタンパク質との相互作用も吸着量もゼロに近いという結果から、表面電荷がゼロで超親水性の表面を構築することが、タンパク質吸着を抑制する上で極めて重要であるということが定量的に示された。

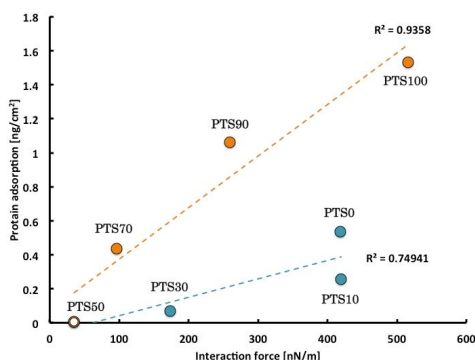


図3. 組成の異なるPTSブラシ表面におけるフィブリノーゲンの吸着量と相互作用力の関係。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Yuuki Inoue, Yuya Onodera, Kazuhiko Ishihara, "Initial Cell Adhesion onto a Phospholipid Polymer Surface Modified with a Terminal Cell Adhesion Peptide", ACS Applied Materials & Interfaces, in press, 2018. DOI: 10.1021/acsami.8b01906 (査読あり)

Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Precise Control of Surface Electrostatic Forces on Polymer Brush Layers with Opposite Charges for Resistance to Protein Adsorption", Biomaterials, 105, 102-108, 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.043 (査読あり)

Yuuki Inoue, Yuya Onodera, Kazuhiko Ishihara, "Preparation of a thick polymer brush layer composed of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) by surface-initiated atom transfer radical polymerization and analysis of protein adsorption resistance", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 141, 507-512, 2016. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.015 (査読あり)

[学会発表](計10件)

井上祐貴・石原一彦、「構造明確な表面を用いた分子間相互作用解析によるタンパク質吸着挙動の理解」, 日本MRS年次大会(招待講演), 2017年.

Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Intermolecular interaction forces operating at zwitterionic polymer brush surface with excellent repellency of protein adsorption, International Conference on Bioinspired and Zwitterionic Materials (ICBZM), 2017.

井上祐貴・石原一彦、「タンパク質吸着層の形成過程に關与する分子間相互作用力の定量的解析」, 第66回高分子討論会, 2017年.

Yuuki Inoue, Sho Sakata, Kazuhiko Ishihara, "Understanding of nano-ordered interaction force leads to protein adsorption behavior on the polymer brush surfaces, The 11th SPSJ International Polymer Congress, 2016.

井上祐貴、石原一彦、「分子間相互作用力解析を基盤としたタンパク質非認識表面の構築」, 第89回日本生化学会大会(招待講演), 2016年.

井上祐貴、坂田翔、石原一彦、「吸着タンパク質層の形成に關与する分子間相互作用力

の定量的解析」第 45 回医用高分子シンポジウム、2016 年。

Yuuki Inoue, Sho Sakata, Kazuhiko Ishihara, “Nano-ordered and direct analysis of molecular interactions in protein adsorption process on polymer brush surfaces, 10th World Biomaterials Congress, 2016.

Yuuki Inoue, Sho Sakata, Kazuhiko Ishihara, “Nano-force Analysis during Protein Adsorption at Biocompatible Polymer Brush Surface, Ludwig-Maximilians-Universitat Munchen (LMU)-University of Tokyo Symposium, 2015.

Yuuki Inoue, Sho Sakata, Kazuhiko Ishihara, “Protein Adsorption at Well-characterized Polymer Brush Surfaces Based on Molecular Interactions”, Pacificchem2015, 2015.

坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着を阻止する新規ヘテロ荷電コポリマーブラシ表面の創製」第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、2015 年。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 祐貴 (INOUE, Yuuki)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：40402789

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

該当者なし