

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18681018

研究課題名 (和文) バイオ分子実装基板の精密設計

研究課題名 (英文) Well-defined design of biofunctional surfaces

研究代表者

岩崎泰彦 (IWASAKI YASUHIKO)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：90280990

研究成果の概要：

当該研究ではバイオ計測に有効な新たなマテリアル表面の設計を指向し、非得意的な生体分子および細胞の付着（バイオフィウリング）を抑制でき、特定のアナライトを効率良く認識するためのバイオ分子を高密度に集積することを可能にする表面の構築について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料

キーワード：リン脂質ポリマー、高密度ポリマーブラシ、リビングラジカル重合、ナノフィラメント、表面改質、抗体フラグメント、集積基板、ファウリング

1. 研究開始当初の背景

我が国では急速に高齢化社会を迎えつつあり、人の健康、医療に対する関心がますます強くなり、QOL の向上を指向するためにもバイオ計測の役割が重要である。

この分野に用いられるマテリアルに要求される一つの課題は複雑な生体の反応に対応できる界面を提供することであるが、高度に進歩したマテリアルサイエンスをもってしてもこのような界面をつくることは依然として困難である。

生体反応をマテリアルとの界面で制御するためには、まず制御不能なタンパク質吸着

などの生体との非特異的な相互作用を回避できるマテリアル表面を設計することが必要であるが、その形態はこれまでに特定されておらず、バイオ技術で産生される有用タンパク質を構造変化させることなく 100% の効率で分離精製できるメンブレンマテリアルすら存在しないのが現状である。この理由として、表面設計において生体の構造が十分に考慮されてこなかったことと、マテリアルの表面構造を正確に把握し精密に制御できなかったことが挙げられる。

バイオ計測機器の小型化、高機能化が進められるなかで、高い感度と信頼性を確保するために生体界面でターゲット分子を選択的

かつ高感度に検出するためには、新たな基板創製技術がきわめて重要になると確信し、本研究課題を企画した。

2. 研究の目的

生体内に存在する特定の疾病マーカーを高感度に定量するために最適な生体機能界面（バイオインターフェイス）設計を分子レベルで行うことを目的とした。具体的には、ホスホリルコリン基をもつポリマーをグラフトした高密度ブロックポリマーブラシを調製し、これをプラットフォームとして抗体や糖鎖などのバイオ分子を高さ方向に集積した。

3. 研究の方法

3-1. リン脂質ポリマーブラシ表面の調製とファウリング抑制

リビングラジカル重合開始剤として 3-(2-ブロモイソブチリル)プロピルジメチルクロロシラン (BDCS) を合成した。BDCS を溶解したトルエン中に洗浄したシリコンウエハを浸漬し室温で 18 時間静置した。Cu(I)Br、2,2'-Dipyridyl (bpy) を溶解した溶媒（水：メタノール/1：4 混合溶液）にフリーの重合開始剤としてエチル 2-ブロモイソブチレートを加えた。ここに BDCS を修飾したウエハを浸し、MPC (0.4 M) を加えアルゴン雰囲気下で所定時間放置した。試料の表面解析は水の動的接触角測定、X 線光電子分光計 (XPS) 解析、エリプソメトリー解析により行った。また BDCS を修飾したウエハに選択的に紫外線 ($\lambda=185\text{nm}$) を照射し、その後 MPC の重合反応にかけた。この試料を FITC でラベルした牛血清アルブミン溶液 (0.45g/dL) に 30 分間接触させ、蛍光顕微鏡を用いて観察した。またこの試料上でマウス繊維芽細胞 (L-929) を 20 時間培養、染色後蛍光顕微鏡を用いて観察した。

3-2. ブロックポリマーブラシの調製と抗体フラグメントの固定化

Cu(I)Br、bpy をメチルエチルケトン：エタノール/7：3 の混合溶媒に溶解し、ここに遊離の重合開始剤としてエチル-2-ブロモイソブチレートを加えた。この溶液に、上記と同様な条件で MPC をグラフトしたシリコンウエハを浸漬し、GMA (0.4 M) を加えアルゴン雰囲気下で所定時間静置した。

PMPC ブラシ、PGMA ブラシ、また MPC と GMA のブロックポリマーブラシ (PMPC-b-PGMA ブラシ) をジチオスレイトール (DTT) 溶液 (2.86 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.1 M 炭酸水素カリウ

ム pH 8.5) に浸漬し、室温下で一晩反応させた。洗浄、乾燥後の試料を 2,2-ジチオピリジン (2PDS)、2-チオピリドン (2TP) 溶液 (90 mM 2PDS, 23 mM 2TP, 50 mM 炭酸水素ナトリウム, 45 %エタノール) に浸漬し、室温下で 1 時間反応させた。試料の表面解析は、水の動的接触角測定、X 線光電子分光計 (XPS) 解析、エリプソメトリー解析により行った。

この試料に抗体フラグメントである F(ab') フラグメント (FITC 標識されたもの) の水溶液を接触させ、一晩湿潤下で反応させた。洗浄、乾燥後、マルチラベルカウンタにより蛍光強度を測定した。コントロールとして、エポキシ基を有したシランの単分子膜 (エポキシシラン単分子膜) を用いた。

3-3. 有機シランナノフィラメント利用した抗体フラグメントの集積化

シリコンウエハを洗浄した後、湿度制御しながらトリクロロメチルシラン (MeSiCl_3) を溶解したトルエン溶液に浸漬することで、ナノフィラメントを形成した。このウエハを 120°C のオーブンで 3 時間アニーリングした。その後、表面に酸素プラズマを 30 分間照射した。直ちに、ウエハを BDCS を溶解したトルエン中に浸し、表面に重合開始基を導入した。

ガラス容器中で十分にアルゴン脱気したメタノールに所定量の臭化銅(I)、ピピリジン、エチル-2-ブロモイソブチレートを溶解した。この容器にウエハを入れ、続いてメタノールに溶解した MPC と GMA を添加した。重合反応はアルゴン雰囲気下、室温で行なった。同様な方法で平滑なシリコンウエハ表面にもポリマーブラシを調製した。ブラシ側鎖のエポキシ基をピリジルジスルフィド化し、抗体フラグメント (F(ab')) を部位特異的に修飾した。

4. 研究成果

4-1. リン脂質ポリマーブラシ表面の調製とファウリング抑制

BDCS 反応後の接触角の上昇 ($\theta_w/\theta_r=72/62^\circ$)、また XPS 解析より臭素のピークが検出されたことから BDCS の薄膜がシリコン表面に形成されていることが分かった。

重合反応後の XPS 解析では、MPC ユニット由来のリン及び窒素のピークが検出された。これに対し、BDCS 薄膜を形成させないシリコンウエハではリン、窒素のピークは検出されなかった。また、BDCS 薄膜を形成させたウエハの接触角は著しく低下した。重合時間の増加に伴い膜厚、フリーポリマーの分子量および XPS 解析から算出した P/Si の値は増加し、

時間により重合を制御出来たことが明らかとなった。またグラフト密度を算出した所、 $0.16\text{chain}/\text{nm}^2$ であった。図1にタンパク質吸着実験及び細胞粘着実験の結果を示す。UVが照射された部分にはMPCがグラフトされずタンパク質や細胞の吸着・粘着が見られた。一方MPCがグラフトされた部分ではタンパク質吸着また細胞粘着は抑制された。グラフトされたポリマーブラシの膜厚が約5nmになるとこの効果が現れることが明らかとなった。

4-2. ブロックポリマーブラシの調製と抗体フラグメントの固定化

図2にGMAのATRP反応における、重合時間に対するモノマー濃度の片対数プロットを示す。モノマー濃度の片対数プロットは直線的に上昇し、重合反応中ポリマーラジカル濃度が一定であることが確認された。

PGMAブラシの膜厚は、重合時間の増加とともに増加した。XPS解析からC/O比を算出したところ、PMPCブラシのC/O比はMPC分子の比(C/O=1.8)と類似しているのに対し、PMPC-b-PGMAブラシのC/O比は重合時間が増加するとともにGMA分子の比(C/O=2.3)に近づいた。これらの結果から、GMAがPMPCブラシ末端から重合していることが明らかとなった。PMPC-b-PGMAブラシの水の接触角はPGMAブラシと比較して低い値であった。PMPC-b-PGMAブラシとPGMAブラシの水の接触角における違いは、PGMAブラシの根元の構造またはPGMAブラシの密度によるものと考えられる。

DTT及び2PDSと反応させた試料のXPS解析を行ったところ、硫黄のシグナルが検出された。GMAを重合していないPMPCブラシを同様に反応させたが、硫黄のシグナルは検出されなかった。また分子内に窒素原子を含まないPGMAブラシにおいて、反応後ピリジン環由来の窒素のシグナルが検出されたことから、エポキシ基を介してジスルフィド結合が導入されたことが確認された。またPGMAの膜厚の増加に伴い硫黄のシグナルの強度も増

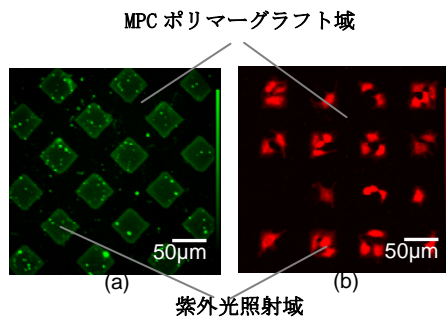


図1 パターン化リン脂質ポリマーブラシ表面におけるタンパク質吸着 (a) と細胞粘着 (b) 制御

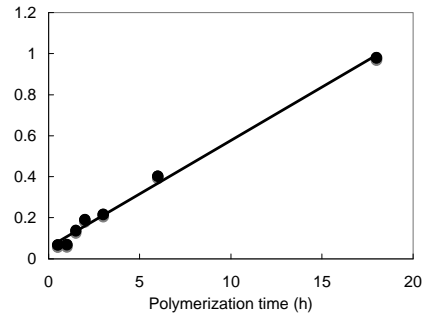


図2 GMAの重合に関する一次プロット

加した。今後、反応条件を確立するとともにジスルフィド結合を介し、チオール基を持つタンパク質の固定化を試みる。このように本研究で得られた表面は、生体の非特異的な反応を抑制するPMPCをプラットフォームとし、特定の生体分子を固定化可能な部位を有しており、バイオインターフェイスの構築のみならず医療デバイスやバイオセンサーの開発に極めて有効と考えられる。

図3に各表面のグラフト密度、F(ab')₂フラグメントと反応可能な部位の比較として単位体積あたりのGMAユニット数とF(ab')₂の固定化量を示す。

ブロックコポリマーブラシでは、ブラシ密度が同程度であるPMPC7.2-b-PGMA4.5とPMPC8.2-b-PGMA8.2を比較すると、膜厚の増加に伴いF(ab')₂フラグメントの固定化量も増加した。密度、膜厚共に低いPMPC8.7-b-PGMA2.2はF(ab')₂フラグメントの固定化量も低かった。GMAのみから成るPGMA8.5と、二層目のPGMAが厚いPMPC8.2-b-PGMA8.2は、単位面積あたりのGMAユニット数は同程度であるが、PGMA8.5により多くのF(ab')₂フラグメントが固定された。以上より、ポリマーブラシの膜厚、また密度を変化させることにより、F(ab')₂の固定化量を調節できることがわかった。GMAユニット数と抗体固定化量に比例関係は見られなかったが、ブラシ構造や密度、また非特異的な吸着が影響しているものと考えられる。

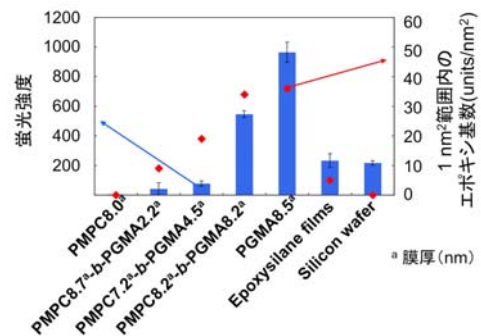


図3 GMAの密度と抗体フラグメントの固定化量

4-3. 有機シランナノフィラメント利用した抗体フラグメントの集積化

図4にMeSiCl₃を反応させたシリコンウエハ表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を示す。表面に数十ナノメートル幅のフィラメントが一様に形成していることが認められた。この表面の前進(θ_f)および後退接触角(θ_r)はいずれも160°を超え、著しく疎水性の高い表面が得られた。この表面を酸素プラズマで処理することにより、表面にシラノール基が生成され、水は表面で完全に広がり親水性の高い表面へと変化した。ここにBDCSを修飾することにより、再び接触角は高くなり、重合開始基の導入を確認した。

図5に重合時間に対する一次プロットとGMA組成を示す。プロットが直線であることから3時間の重合ではラジカルの濃度が一定であり、また、ポリマーの組成は仕込み組成とほぼ等しく、変化しないことがわかった。X線光電子分光分析より、MPCユニット由来のリンおよび窒素のシグナルが確認でき、ブラシの形成を確認することができた。平滑な表面に同様な条件でポリマーブラシを調製し、膜厚と分子量の結果からブラシの密度は0.35 chains/nm²と算出され、同条件で調製したGMAの単独ポリマーブラシの密度よりも低く、PMPCの単独ポリマーブラシとほぼ同等の値となった。

図6にFITCでラベルしたF(ab')₂を固定した表面の単位面積当たりの蛍光強度を示す。平滑なブラシ表面に比べ、ナノフィラメント上に形成したポリマーブラシには多くのF(ab')₂が固定されていることがわかった。

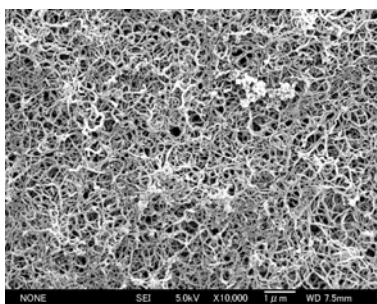


図4 有機シランナノフィラメントのSEM像

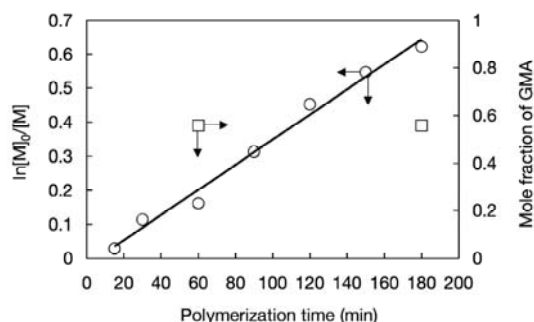


図5 ランダムコポリマーブラシの重合

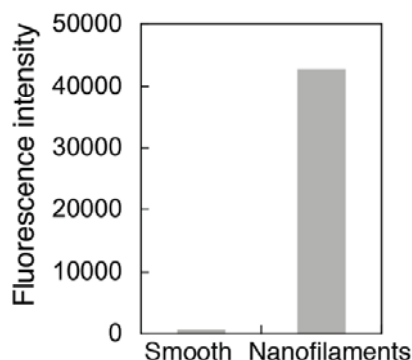


図6 抗体フラグメントの固定化量

ピリジルジスルフィド基を導入しないポリマーブラシ表面では、F(ab')₂の吸着量は少なく、ジスルフィド結合の交換反応によりF(ab')₂が有意に固定できることも明らかになった。

トリクロロメチルシランを用いたナノフィラメントはシリコンウエハのみならずあらゆる基板表面に調製でき、ポリマーブラシと組み合わせることにより、プローブ分子を集積することが可能になることから、計測基板の表面設計に有効な修飾法になると思われる。

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6件)

- ①. Iwasaki Y, Takami U, Sawada S, Akiyoshi K. Interfacing biomembrane mimetic polymer surfaces with living cells -Surface modification for reliable bioartificial liver-. *Appl Surf Sci*, 255, 523-528 (2008). 査読あり
- ②. Iwasaki Y, Omichi Y, Iwata R. Site-specific dense immobilization of antibody fragments on polymer brushes supported by silicone nanofilaments. *Langmuir* 2008;24:8427-8430. 査読あり
- ③. Iwata R, Sato R, Iwasaki Y, Akiyoshi K. Covalent immobilization of antibody fragments on well-defined polymer brushes via site-directed method. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 2008; 62:288-298. 査読あり

- ④. Iwasaki Y, Takami U, Shinohara U, Kurita K, Akiyoshi K. Selective biorecognition and preserving cell function on carbohydrates-immobilized phosphorylcholine polymers. *Biomacromolecules* 2007;8:2788-2794. 査読あり
- ⑤. Hoven VP, Srinanthakul M, Iwasaki Y, Iwata R, Kiatkamjornwong S. Polymer brushes in nanopores surrounded by silicon-supported tris(trimethylsilyloxy)silyl monolayers. *J Colloid Interface Sci* 2007;314:446-459. 査読あり
- ⑥. Iwasaki Y, Takamiya M, Iwata R, Yusa S, Akiyoshi K. Surface modification with well-defined biocompatible triblock copolymers -Improvement of biointerfacial phenomena on a poly(dimethylsiloxane) surface-. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 2007;57:226-236. 査読あり

[学会発表] (計13件)

- ①. 中井康介、岩崎泰彦、高密度ポリマーブラシに支持されたリン脂質吸着。膜の調製と解析、高分子討論会、2008年9月24-26日、大阪市立大学
- ②. Nakai K., Iwasaki Y. Biomembrane-mimetic surfaces generated n well-defined polymer brushes, The Thai-Japan Joint Symposium on "Advanced in Materials Science and Environmental Technology" 2008年8月19, 20日、チュラロンコン大学・バンコク
- ③. 中井康介、岩崎泰彦、ポリマーブラシを用いたリン脂質二分子膜アレイの調製、第54回高分子研究発表会(神戸)、2008年7月18日、兵庫県中央労働センター
- ④. 岩田綾子、岩崎泰彦、秋吉一成、精密設計されたポリマーブラシ表面における生体分子の機能誘導、第29回日本バイオマテリアル学会大会、平成19年11月26日、千里ライフサイエンスセンター
- ⑤. Iwasaki Y, Interfacing biomembrane-mimetic polymer surfaces with living cells, 1st International Symposium on Surface and Interface of Biom

aterials、平成19年10月5日、成都交通大学

- ⑥. 岩田綾子、秋吉一成、岩崎泰彦、ポリマーブラシを用いた高感度分子認識界面の創製-ブラシ構造と抗体集積化の関係、第56回高分子討論会、平成19年9月19日、名古屋工業大学
- ⑦. Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K、Site-directed immobilization of antibodies on well-defined polymer brushes、*Biosurf VII*、平成19年8月28日、チューリッヒ大学
- ⑧. Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K、Oriented immobilization of antibody fragments on polymer brushes for highly sensitive biorecognition、234th ACS National Meeting、平成19年8月23日、ボストン
- ⑨. 岩崎泰彦、生体に倣ったポリマーバイオマテリアルの設計、生体機能関連化学若手の会サマースクール、平成19年8月6日、八王子
- ⑩. 岩田綾子、岩崎泰彦、秋吉一成、抗体フラグメントを集積したポリマーブラシによる高感度分子認識界面の構築、第56回高分子年次大会、平成19年5月30日、京都国際会議場
- ⑪. Iwata R, Iwasaki Y, Akiyoshi K. Protein Immobilized Block Copolymer Brushes for Well-defined Biointerface. The Annual Hamburg Macromolecular Symposium、2006年10月3日、ハンブルグ
- ⑫. 岩崎泰彦、篠原由里香、栗田公夫、秋吉一成。生体膜糖鎖インスパイアード界面の設計と機能。第55回高分子学会年次大会、名古屋、2006年5月25日
- ⑬. 岩田綾子、岩崎泰彦、秋吉一成。精密ブロックポリマーブラシの調製とバイオ認識界面創製に向けた機能化。第55回高分子学会年次大会、名古屋、2006年5月24日
- [図書] (計3件)
- ①. 岩崎泰彦、高密度ポリマーブラシ界面、次世代医療のための高分子材料工学(秋吉一成、岸田晶夫 編)、シーエムシー出

版、227-242、2008

- ②. 岩崎泰彦、PC サーフェイステクノロジ
ー、透析会誌、41、359-362、
2008
- ③. 岩崎泰彦、秋吉一成、MPC グラフト表面
とバイオインターフェイス構築、機能物
質の集積膜と応用展開 (関隆弘 編)、シ
ーエムシー出版、227-242、20
06

[その他]

ホームページ

<http://www2.ipcku.kansai-u.ac.jp/~t0700>

53

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 泰彦 (IWASAKI YASUHIKO)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：90280990