

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20246109

研究課題名（和文）

物理化学的プロテオミクスによるたんぱく不活性表面の構築

研究課題名（英文）

Fabrication of passive surface to protein by physicochemical proteomics approach

研究代表者

高井 治 (TAKAI OSAMU)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：40110712

研究成果の概要（和文）：たんぱく質の吸着挙動を評価するために、アミノ酸の種類や配列を変えたモデル的なペプチド化合物を合成し、各種表面の官能基を制御した自己組織化単分子膜表面への吸着挙動を表面プラズモン共鳴分光法等により測定し、データベース化することで、アミノ酸の種類や配列の違いによる自己組織化単分子膜表面への吸着挙動を評価した。このような吸着挙動の評価から、疎水部を多くもつペプチド化合物は疎水性表面に選択的に吸着し、荷電した親水性官能基は、静電的な力で吸着していることが明かとなった。

研究成果の概要（英文）：We evaluated absorption behaviors of peptides to the surfaces. The model peptides which have different kinds and alignments of amino acids were synthesized. The functional groups of surfaces were controlled by self-assemble monolayers(SAMs). The absorption behaviors were measured by surface plasmon resonance. From results, it was found that the peptide which has hydrophobic groups absorb to hydrophobic surface and the peptide which has charge absorbs to the surface by electrostatic attractive force.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	25,500,000	7,650,000	33,150,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：表面工学、プラズマ工学、材料工学

科研費の分科・細目：材料加工・処理

キーワード：ナノバイオ、たんぱく質、自己組織化単分子膜

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴い医療への期待はますます高まっており、医療機器の高機能化や安全の確保は重要な課題となっている。医療機器への生体物質の付着・吸着は、材料の機能性を著しく低下させるばかりでなく、ときに患者の生命を危険にさらす場合がある。そのため医療機器の開発においては、いかに「汚れ」の付着しない表面を構築するかが重要である。

固体表面へのたんぱく質の吸着状態は、溶液中のpH、固体表面の誘電率や電荷等の物理化学的因子によるたんぱく質のコンフォメーション変化に応じて異なる。たんぱく質の構成要素であるアミノ酸の種類や配列は、材料表面へのたんぱく質の吸着状態に大きな影響を与える。そのため、材料表面とたんぱく質の物理化学的性質の関係を調査し、アミノ酸の種類や配列の異なるたんぱく質の材料表面への吸着状態を明らかにすることが

重要となっている。

2. 研究の目的

本研究では、生体由来の汚れとしてたんぱく質に着目し、たんぱく質の吸着反応に対し、不活性な表面の構築を目指す。たんぱく質の吸着に関しては、多くの研究が進められているが、たんぱく質それ自体は種々の官能基を有する複雑かつ巨大な高分子であり、また様々なコンフォメーションを持つことから、材料表面の吸着挙動について、十分に体系化された知見を得ることは難しかった。

そこで、我々は(1)様々なたんぱく質の合成を行い、得られたたんぱく質のアミノ酸配列と物理化学的特性(ゼータ電位、会合係数、水への溶解度、吸着平衡定数など)との相関関係を明らかにする。これにより、たんぱく質の一次構造からその特性を予測できるようにする。(2) (1)で得られた構造-物性相関マップを利用して、たんぱく質不活性表面の構築を行う。材料表面の表面自由エネルギーの効果と表面形状の効果を検討する。本研究によりたんぱく質吸着の原理原則を解明し、普遍的な生体物質不活性表面の構築を実現する。

3. 研究の方法

ライブラリを構築するためにたんぱく質のモデル化合物として配列の異なる合成ペプチドを、ペプチド合成装置を用いて作成した。

合成したペプチドの固体表面への吸着挙動を、その場観察による表面プラズモン共鳴分光法 (SPR) を用いた。表面プラズモン共鳴は、光(電磁波)と表面プラズモンの共鳴によって起こる物理現象である。表面プラズモン共鳴を用いることで、試料表面の誘電率の変化から吸着量を測定することができる。また、水晶振動子マイクロバランス法 (QCM-D) を用いて測定し、データの相関性について解析を進めた。

また、たんぱく質不活性表面の構築を行うために、材料表面の表面エネルギーの効果と基板の表面形状の検討を行った。

表面の状態を変化させるために、官能基の異なる自己組織化単分子膜 (SAM) を基板表面に付与して、表面エネルギーを変化させた。

自己組織化単分子膜は真空紫外光 (VUV) によって、表面に付着した有機物等を除去した後各種末端官能基を有するアルカンチオール溶液に含浸させ自己組織化単分子膜を作製した。作製した膜はよく洗浄し使用した。

この表面形状の影響を検討するために、フラクタル形状・ナノインプリントリソグラフィ法の開発を行った。まず、マイクロ波 CVD 法により作製したフラクタル(次元 1.5 程度) ナノ凹凸表面を作製し、Ni 電鍍法により金型作製を行った。Ni 電鍍時にも剥離することがないプロセスを確立した。

4. 研究成果

吸着分析を行うために以下のアミノ酸配列のペプチドを合成した。ここでは、リシン (Lys, K)、イソロイシン (Ile, I) を用いて、以下の 4 種類のタンパク質配列を持つペプチドを合成した。すべて疎水性官能基を持つ IIIIII, すべてアミノ基をもつ KKKKKK、それらリシンとイソロイシンに共重合物であり、末端と配列を変えた KIIIIK および IIKKII である。

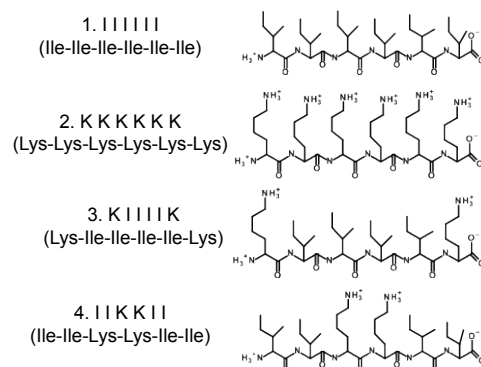


図 1 合成したペプチド化合物

基板に対して、自己組織化単分子膜 (SAM) を作製した。SAM 原料として、以下の 4 点を用いた。それぞれの官能基によって表面の状態が変化する。

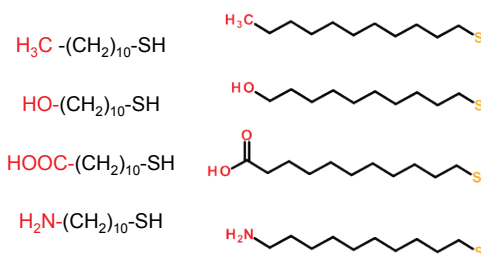


図 2 各種末端基を有するアルカンチオール

金基板にこれらの自己組織化単分子膜を付与した結果、水滴接触角は、(1) 109°, (2) 41°, (3) 66.2°, (4) 35.7°, 未処理 21° となった。メチル基の場合には水滴接触角の大きさが大きく、表面が疎水性になっているのに対して、カルボキシル基や水酸基やアミノ基を有する SAM 表面は親水性となった。カルボキシル基を有する SAM 表面は未処理のものよりも大きかった。

これら作製した基板と合成したペプチドを用いて、吸着実験を行った。ペプチドとして IIIIII を用いた場合の各種 SAM 基板に帯する表面吸着挙動を図 3(a) に示す。図 3(a) に示すように、表面が CH_3 末端表面の場合、その他の OH 末端、COOH 末端、 NH_2 末端表面の場合よりも強度変化が大きかった。これは、IIIIII

が CH₃ 末端の SAM 表面に対して、他の SAM 表面よりも多く吸着していることを意味している。IIIIII は疎水性ペプチドであり、CH₃ 末端 SAM 表面も水滴接触角の結果からも疎水性であることが分かっているため、IIIIII が CH₃ 末端の SAM 表面に多く吸着する理由は、他の親水性の表面よりも疎水性相互作用が大きく働いたためであると考えられる。一方で KKKKKK をペプチドとして用いた場合には、CH₃ 末端の SAM 表面の場合にはむしろ強度が小さく、他の官能基の SAM 表面と比較して小さかった。これは、KKKKKK が親水性のペプチドであり、疎水性表面へ吸着するよりも水中に存在する方が安定に存在するためであると考えられる。そのため、親水性表面よりも吸着量が小さくなったと考えられる。

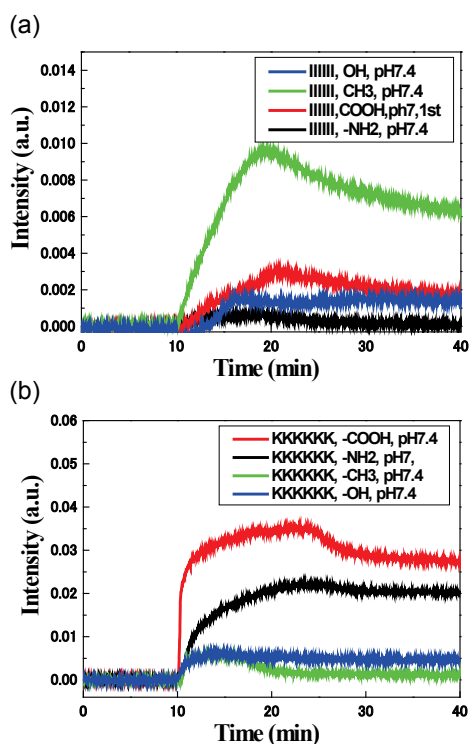


図3 SPRにより測定した各種SAM表面への合成ペプチドの吸着挙動

次に IIKKII, KIIIIK の吸着実験を行った結果を示す。基板は CH₃ 末端 SAM 表面および OH 末端 SAM 表面を用いた。ここでは CH₃ 末端 SAM 表面の結果を図4に示す。IIKKII および KIIIIK は OH 末端表面よりも CH₃ 末端表面の方が強度が大きく吸着量が多かった。また、CH₃ 末端 SAM 表面における IIKKII と KIIIIK の CH₃ 末端表面への吸着挙動を比較すると、IIKKII よりも KIIIIK の方が吸着量は多かった。これは、疎水性側鎖を持つアミノ酸はペプチド分子中の末端よりも中央にある場合の方がより疎水的になるためであると考えられる。

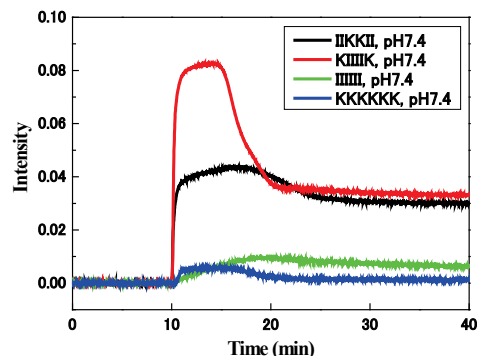


図4 各種ペプチドの吸着量の変化

また、pHの違いによる吸着挙動の変化を調べた結果を図5に示す。図5に示すように、pH10のアルカリ溶液の時最も吸着量が多くなり、続いて pH4, pH7.4の時の順で吸着量が多かった。このような結果になった理由として、アルカリ溶液の時には、KKKKKK ペプチドのアミノ基が中性状態となり電荷を持たないのに対して、酸性にするとプロトンが付加して電荷を持つために、疎水性表面への吸着は起こりにくくなったと考えられる。

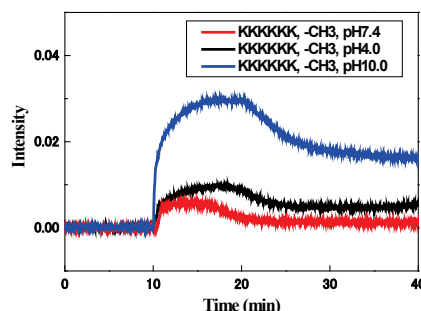


図5 pHの違いによる KKKKKK ペプチドの CH₃ 末端 SAM 表面への吸着挙動

また、CH₃ 末端 SAM 表面に対する IIIIII の pH 変化による吸着挙動の変化を調べたところ、pHの違いによる吸着挙動の変化は小さかった。IIIIII の場合においても末端はカルボキシル基やアミノ基を有しており、pHの影響を受けて物性が変化しうるが、その影響は小さかった。

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 12 件)

- ① T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, "Correlation of Cell Adhesive Behaviors on Superhydrophobic, Superhydrophilic, and Micropatterned Superhydrophobic/Superhydrophilic

- Surfaces to Their Surface Chemistry", *Langmuir*, **26(11)**, 8147-8154(2010), 査読有, DOI: 10.1021/la904447c.
- ② 高井治, "バイオミメティック材料プロセスの開発", まてりあ, 日本金属学会会報, **48**, 査読無, 174-178 (2009).
- ③ S.H.Lee, 齋藤永宏, 高井治, "Highly reproducible technique for three-dimensional nanostructure fabrication via anodization scanning probe lithography", *Appl.Surf.Sci.*, **255**, 7302-7306 (2009), 査読有, DOI: 10.1016/j.apsusc.2009.03.087.
- ④ S.H.Lee, 齋藤永宏, 高井治, "Self-assembly of human plasma fibrinogens on binary organosilane monolayers with micro domains", *Appl.Surf.Sci.*, **255**, 7912-7917 (2009), 査読有, DOI: 10.1016/j.apsusc.2009.04.201.
- ⑤ 藤間卓也, 松野正幸, 齋藤永宏, 高井治, "平板型高分子電解質ブラシ表面におけるフィブリノゲン捕捉挙動", 表面技術, **60**, 795-799 (2009), 査読有, DOI: dx.doi.org/10.4139/sj.60.795.
- ⑥ 藤間卓也, 齋藤永宏, 高井治, "バイオミメティック超撥水・超親水性表面(特集 先端産業分野における表面処理および界面技術)", *ファインケミカル*, 査読有, **38**, 48-56 (2009).
- ⑦ Y.Miyahara, K.Mitamura, 齋藤永宏, 高井治, "Fabrication of microtemplates for the control of bacterial immobilization", *J.Vac.Sci.Technol.*, **27**, 1183-1187 (2009).
- ⑧ 齋藤永宏, 石崎貴裕, 高井治, "自己組織化の構造と機能", *日本接着学会誌*, **44**, 査読有, 363-370 (2008).
- ⑨ SH. Lee, T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, "Surface Characterization on Binary Nano/Micro-domain Composed of Alkyl- and Amino-terminated Self-Assembled Monolayer", *Appl. Sur. Sci.*, **254**, 7453-7458 (2008), 査読有, DOI: 10.1016/j.apsusc.2008.06.001.
- ⑩ SH. Lee, T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, "Effect of Reaction Temperature on Growth of Organosilane Self-Assembled Monolayers", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **47**, 6442-6447 (2008), 査読有, DOI: 10.1143/JJAP.47.6442.
- ⑪ SH. Lee, T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, "Effects of Humidity and Solution Age on Growth of Organosilane Self-Assembled Monolayers", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **47**, 6416-6421 (2008), 査読有 DOI: 10.1143/JJAP.47.6416.
- ⑫ T. Ishizaki, H. Sakurai, N. Saito, O. Takai, "Control of site-selective Adsorption Reaction on a Biomimetic Super-hydrophilic/Super-hydrophobic Micropatterned Template", *Surf. coat. technol.*, **202**, 5535-5348 (2008), 査読有, DOI: 10.1016/j.surfcoat.2008.06.124.
- [学会発表] (計 31 件)
- ① F. Watarai, T. Ueno, N. Zettsu, C. Terashima, N. Saito, O. Takai: "Influence of Amino Acid Sequence and Surface Functional Group on Peptide Adsorption", Twelfth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-12), (20120124, Nagoaya, Japan)
- ② 渡会冬樹, 上野智永, 是津信行, 寺島千晶, 齋藤永宏, 高井治, "表面官能基の異なる SAM 表面におけるペプチド吸着挙動", 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム, (20111223, 横浜市開港記念会館, 横浜).
- ③ 渡会冬樹, 上野智永, 是津信行, 寺島千晶, 齋藤永宏, 高井治, "ペプチド吸着におけるアミノ酸配列と表面官能基の影響", 平成 23 年度表面技術若手研究者・技術社研究交流発表会, (20111128, 名古屋市工業研究所, 名古屋)
- ④ F. Watarai, T. Ueno, N. Zettsu, C. Terashima, N. Saito, O. Takai, "Effect of Surface Functional Groups and pH Condition on Peptide Adsorption", International Symposium on EcoTopia Science'11, Effect of Surface Functional Groups and pH Condition on Peptide Adsorption, Nagoya Univ.-Tsinghua Univ.-Toyota Motor Corp.-Hokkaido Univ.-Univ. Electron. Sci. Tech. China Joint Symposium, (20111122, Chengdu, China.)
- ⑤ F. Watarai, T. Ueno, N. Zettsu, C. Terashima, N. Saito, O. Takai, "Effect of Surface Wettability and Surface Functional Groups on Peptide Adsorption", 15th International Conference on Thin Films. (20111109, 京都テルサ, 京都).
- ⑥ 渡会冬樹, 上野智永, 是津信行, 寺島千晶, 齋藤永宏, 高井治, "ペプチド吸着における表面の濡れ性及び表面官能基の影響", 第 60 回高分子討論会, (20110929, Okayama University, Okayama)
- ⑦ 渡会冬樹, 上野智永, 是津信行, 寺島千晶, 齋藤永宏, 高井治: "機能性表面におけるペプチド吸着挙動の分析", 表面技術協会第 124 回講演大会, (20110921, Nagoya, Aichi)

- ⑧ O. Takai, "Progress in Biomimetic Materials Processing", International Bionic Engineering Conference 2011. (20110918, Boston, USA)
- ⑨ 高井治, "夢の超はっ水技術", 第2回二本電磁波エネルギー応用学会講演会. (20110527, 上智大学, 東京)
- ⑩ 立松裕規, 金淑眞, 稗田純子, 齋藤永宏, 高井治, "ポリスチレンスルホン酸ブラシへのタンパク質吸着における対イオンと解離基の効果", 2010年春季第57回応用物理学関係連合講演会. (20100317, 東海大学, 神奈川)
- ⑪ 渡会冬樹, 金淑眞, 稗田純子, 齋藤永宏, 高井治, "親水・疎水性表面へのペプチドの吸着挙動" 2010年春季第57回応用物理学関係連合講演会. (20100317, 東海大学, 神奈川)
- ⑫ 立松裕規, 金淑眞, 藤間卓也, 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治, "高分子電解質ブラシのタンパク質吸着挙動に対する対イオンの影響" (社)表面技術協会第121回講演大会. (20100315, 成蹊大学, 東京)
- ⑬ 高井治, "Progress in Biomimetic Materials Processing" Tenth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-10). (20100126, Nagoya University, Japan)
- ⑭ 立松裕規, T.Fujima, 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治, "Effect of the dissociable-group on protein adsorption onto a polyelectrolyte brush" 9th Academic Symposium of MRS-Japan 2009. (20091209, Yokohama, Japan 横浜市開港記念会館)
- ⑮ 渡会冬樹, 齋藤永宏, 高井治: "Effect of Amino Acid Sequence on Peptide Adsorption at a Solid Surface" 9th Academic Symposium of MRS-Japan 2009. (20091209, Yokohama, Japan 横浜市開港記念会館)
- ⑯ 高井治, "Biomimetic Materials Processing" International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics. (20091001, Tokyo, Japan 産業技術総合研究所)
- ⑰ 渡会冬樹, 遠藤洋史, 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治, "固体表面へのペプチド吸着に及ぼすアミノ酸配列の影響", 第120回講演大会 表面技術協会. (20090917, 幕張メッセ, 千葉)
- ⑱ 立松裕規, 遠藤洋史, 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治, "イオン強度の異なる溶液中での高分子電解質ブラシ表面へのタンパク質の吸着挙動", 第120回講演大会 表面技術協会. (20090917, 幕張メッセ, 千葉)
- ⑲ 立松裕規, 遠藤洋史, 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治, "ポリスチレンスルホン酸ナトリウムブラシ上へのタンパク質吸着に及ぼすスルホ基導入率の効果" 2009年秋季第70回応用物理学学会学術講演会. (20090909, 富山大学)
- ⑳ 渡会冬樹, 遠藤洋史, 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治: "固体表面上におけるペプチド吸着状態の解析", 2009年秋季第70回応用物理学学会学術講演会. (20090908, 富山大学)
- ㉑ 高井治, "Design and preparation of nanostructured thin films for biomimetic surfaces" PIE Optics+Photonics 2009. (20090806, San Diego, USA).
- ㉒ 立松裕規, 野口陽平, 稗田純子, 趙星彪, 高井治, "バイオミメティックプロセッシングによる環境調和材料の開発" 第4回3大学3研究所連携プロジェクト公開討論会. (20090804, 東京工業大学, 東京)
- ㉓ M.Kawaguchi, T.Murakami, Y.Ishiguro, A.Shimokawara, 齋藤永宏, 高井治: "Ultra-water repellent modification of biological soft-materials using atmospheric plasma and self-assembled monolayer" International Symposium on Plasma Chemistry 19 (ISPC 19). (20090728, Bochum, Germany).
- ㉔ 遠藤洋史, S.Fujita, Y.Miyahara, 齋藤永宏, 高井治, "Creation of Multi-Functional Biointerface Using by Plasma-Processing", International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2009), International Union of Materials Research Societies-International Conference in Asia 2009 (IUMRS-ICA 2009), (20090702, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Centre, Singapore)
- ㉕ 齋藤永宏, "Nanostructure and Surface Function for Biomaterials" 3rd International Conference on Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC3). (20090617, Yokohama, Japan).
- ㉖ A. Higuchi, H. Tatematsu, T. Fuiima, N. Saito, O. Takai, "Adsorption of Protein on Polyelectrolyte Brush Surface" Spring 2009 National Meeting & Exposition. (20090323, Salt Lake City, USA).
- ㉗ N. Saito, J. Hieda, O. Takai, "Chemical Dynamics of Protein Adsorption and Desorption on Regulated Surfaces in Aqueous Solutions", Spring 2009 National Meeting & Exposition. (20090322, Salt Lake City, USA)
- ㉘ T. Fujima, M. Matsuno, M. A. Bratescu, N. Saito, O. Takai, "Added Salt Effect on a

Fibrinogen Immobilization Kinetics at a Polyelectrolyte Brush" Ninth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-9), (20090121, Nagoya, Japan).

- ②⑨ H. Tatematsu, T. Fujima, N. Saito, O. Takai, "Evaluation of Polyelectrolyte Brush Surface" IUMRS-ICA 2008, (20081211, Nagoya, Japan).
- ③⑩ T. Fujima, M. Matsuno, M. A. Bratescu, N. Saito, O. Takai, "Added Salt Effect on a Fibrinogen Adsorption Kinetics at a Planer strong Polyelectrolyte Brush", IUMRS-ICA 2008., (20081211, Nagoya, Japan)
- ③⑪ H. Tatematsu, T. Fujima, N. Saito, O. Takai, "Kinetic study of Protein Adsorption on Polyelectrolyte Brush Surface", AVS 55th International Symposium and Exhibition (20081021, Boston, USA)

[図書] (計 2 件)

- ① T.Ishizaki, K. Teshima, S.H. Lee, Y. Masuda, N.Saito, O.Takai, "Biomimetic Nanotechnology : Biomimetic and Bioinspired Nanomaterials", Wiley. 303-341 (2010).
- ② 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治: "撥水・撥油の技術と材料" 株式会社シーエムシー出版. 311 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 治 (TAKAI OSAMU)
名古屋大学・工学研究科・教授
研究者番号：40110712

(2) 研究分担者

齋藤 永宏 (SAITO NAGAIHIRO)
名古屋大学・グリーンモビリティ連携研究センター・教授
研究者番号：00329096

(3) 連携研究者なし