

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700475

研究課題名(和文) 極低タンパク質吸着表面にて作用する表面相互作用力

研究課題名(英文) Surface interaction force working at polymeric surface with ultra high repellency of protein adsorption

研究代表者

井上 祐貴 (Inoue, Yuuki)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・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、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で使用される医療機器を設計する際には、材料表面へのタンパク質などの生体成分の吸着が問題となる。このタンパク質吸着を完全に抑制する表面を構築するため、本研究ではタンパク質と材料の間に働く微細な力に基づいてタンパク質吸着現象を理解することを目的とした。タンパク質吸着を抑制するためには、タンパク質に含まれる官能基レベルでの相互作用をなくすことが重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In a case of a design for a medical device used in vivo in a medical field, the adsorption of living body components such as proteins on the materials surface becomes one of the big problems. The purpose of this study is to understand a protein adsorption phenomenon based on minute surface interaction forces working between proteins and materials to construct the materials surface with an ultra high repellency of protein adsorption. As results, it was suggested that it would be important to suppress the interactions between the functional groups between proteins and materials surface for eliminate the protein adsorption on a materials surface.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：表面相互作用 ポリマーブラシ表面 タンパク質吸着

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。高い機能を有するバイオマテリアルを創製するためには、非特異的な生体応答を排除するマテリアル表面設計が必要不可欠である。マテリアル表面へのタンパク質吸着はごく初期に進行する生体応答であり、その吸着層の特性はその後の生体応答を決定づける。つまり、マテリアル表面における非特異的な生体応答を排除するためには、タンパク質吸着を最大限に抑制する表面設計が必要不可欠であるといえる。

これまでなされてきたタンパク質吸着挙動解析は、多くの場合、タンパク質吸着を促す表面が対象であり、同時に画一的な表面分析手法で評価されるに留まっている。このことにより、タンパク質吸着の抑制に関わる決定的な要因を明確にするに至っていないのが現状である。

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、マテリアル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。

2. 研究の目的

タンパク質吸着を究極的に抑制する分子レベルの表面設計指針の提示に向けて、極低タンパク質吸着特性を有するポリマーブラシ表面で作用する表面相互作用力を定量的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

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、様々な組み合わせの二表面間にナニュートンオーダーで働く相互作用力を原子間力顕微鏡(Atomic force microscopy, AFM)のフォースカーブ測定により定量する。特に、微細な分子間相互作用を定量的かつ高感度に分析する必要があるため、マテリアル表面には分子鎖のナノオーダーの配置まで明確なポリマーブラシ層を構築した。二表面間の組み合わせとして、タンパク質層 - ポリマーブラシ表面、種々の官能基末端を有する自己組織化単分子表面 - ポリマーブラシ表面、およびポリマーブラシ表面 - ポリマーブラシ表面などを採用した(図1)。また、表面開始型

ATRP (SI-ATRP)法を用いて、図2に示すポリマーブラシ層を構築した。つまり、双性イオン性モノマーとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) (ホスホベタイン型)を、カチオン性モノマーとして、trimethylammoniummethyl 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。

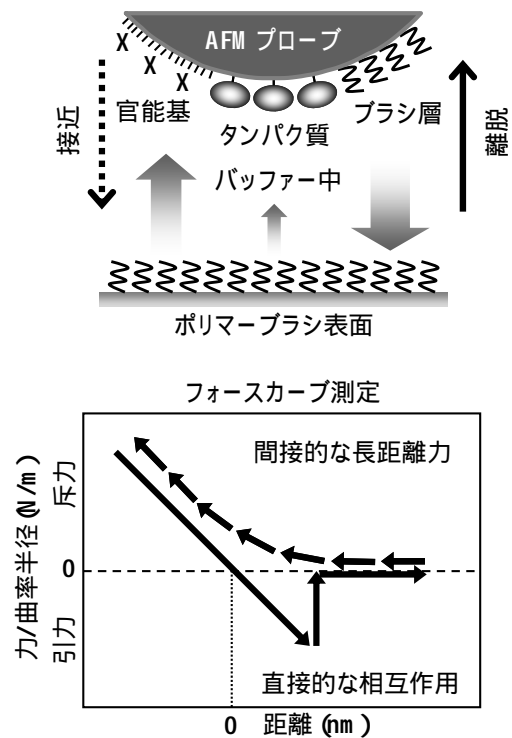


図1. 原子間力顕微鏡を利用した分子間力相互作用の解析方法。

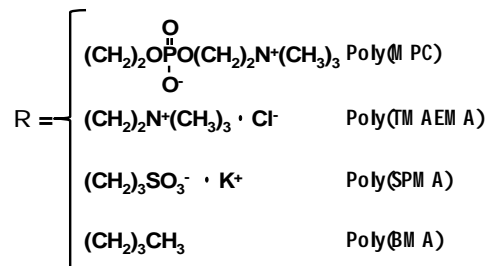
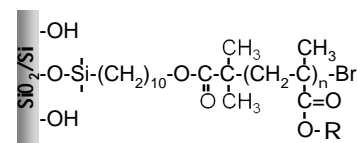


図2. 作製されたポリマーブラシ層の化学構造。

4. 研究成果

4-1. 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、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。

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 ^a (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.

4-2. 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 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。

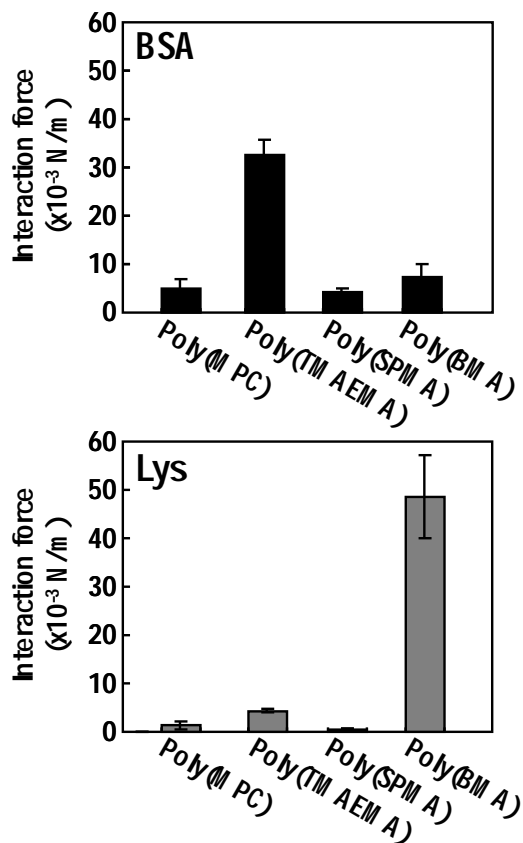


図 3. ポリマーブラシ表面に対するタンパク質の相互作用.

4-3. 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

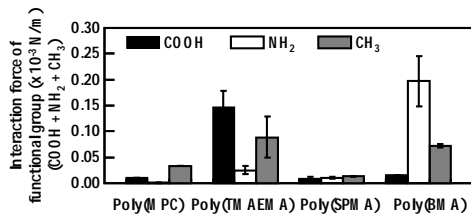


図 4. ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用。

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気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、

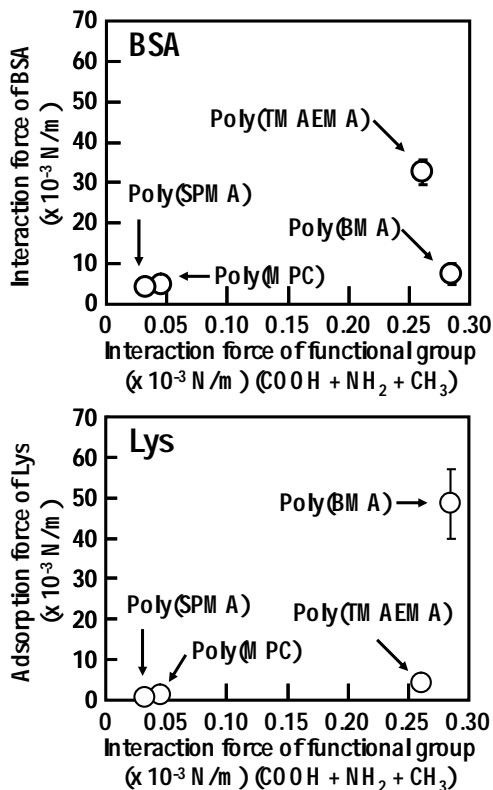


図 5. 各ポリマーブラシ表面におけるタンパク質との相互作用と官能基との相互作用の関係。

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。

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(NH₃⁺)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。

4-4. 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

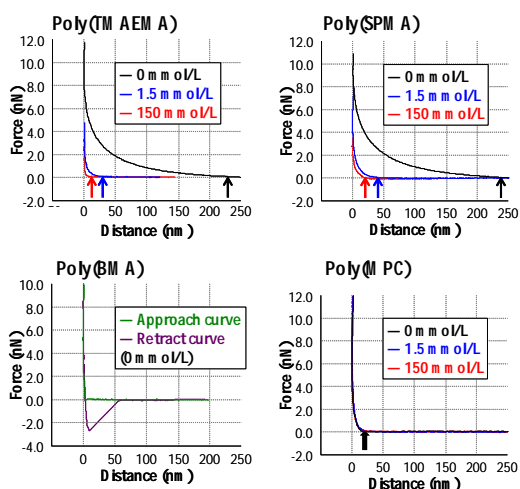


図6. 様々なポリマーブラシ表面に働く力と表面間距離の関係.

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。

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1件)

Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Quantitative Evaluation of Interaction Force between Functional Groups in Protein and Polymer Brush Surfaces", *Langmuir* 30, 2745-2751 (2014) (dx.doi.org/10.1021/la404981k) (査読あり).

[学会発表](計11件)

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.

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.

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.

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的解析」, 第62回高分子討論会、金沢、2013/9/11-13.

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.

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、「ポリマーブラシ表面へのタンパク質吸着過程を支配する相互作用力の解析」, 第61回高分子討論会、名古屋、2012/9/19-21.

井上祐貴、石原一彦、「タンパク質との直接的な相互作用を抑制するポリマーブラシ表面の動的特性」, 第61回高分子討論会、名古屋、2012/9/19-21.

Yuuki Inoue and Kazuhiko Ishihara, "Nano-scaled analysis of protein adsorption behavior based on molecular mobility around biocompatible polymer brush surface", 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 2012/6/1-5.

坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「ポリマーブラシ表面にタンパク質吸着を誘引する相互作用力の定量的解析」, 第61回高分子学会年次大会、横浜、2012/5/29-31

Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Interaction Forces Related to Protein Adsorption on Polymer Brush Surfaces", Society for Biomaterials (SFB), Boston, USA, 2013/4/10-13

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：