ポリマー微粒子の表面修飾と 生化学分野への応用

川 口 春 馬*

Surface Modification of Polymer Particles and Bio-Medical Applications of Modified Particles

Haruma KAWAGUCHI (Faculty of Science and Technology, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Yokohama 223-8522 JAPAN)

Modification of polymer particle surfaces generates a great deal of values, especially in bio-functional applications. Polymer particles have to be modified in appropriate manner in order to get high performance in terms of bio-specific activity. Bio-inert microspheres were preferentially employed as the parent particle. Several bio-functional molecules were immobilized onto the particles through suitable spaces. "Affinity particles" thus obtained are used as bio-separators, bio-reactors and diagnostic reagents, such as DNA-carrying particles for the separation of transcription factors, enzyme-immobilized particles having temperature-dependent reactivity, drug-carrying particles to detect drug's receptor, etc.

Key Words : Affinity latex, Nonspecific adsorption, Bioseparation, Spacer, DNA diagnosis

1. は じ め に

——ポリマー微粒子/変幻自在の大きな顔した働き者

微粒子は、大きな比表面積(表面積/重量)をもつ材料である。微粒子はまた、分散液の中で大きな運動性を持ち、さらに可逆的に回収・再分散され得る。加えて、微粒子がポリマーからなる場合には、そのソフトな表面の構造・性質を幅広く変化させることが可能である。つまり、ポリマー微粒子は「小者なのに、変幻自在の大きな顔した働き者」ということができる。こうした特性のゆえ、ポリマー微粒子は、ナノテクノロジーの時代に欠かせない高機能材料のひとつとなっている。とりわけ、バイオメディカルな分野へのポリマー微粒子の応用の広がりはめざましい。ここでは、表面改質・表面修飾を通してポリマー微粒子をバイオセパレーション・バイオアッセイの実践的ツールに仕立てる研究について、筆者らの成果を中心に紹介する。

2. ポリマー微粒子の表面修飾

ポリマー微粒子の表面改質は、A. 表面の物性の変更、B. 表面への官能基の導入、C. 表面への機能物質の導入、などをめざして行われる。Aの事例として、親疎水性の変化や表面硬さの変化、他の材料への接着性の変化などが挙げられる。Bは、他の材料に粒子を固定するためとかCの準備として行われる。本稿では、Cのケース、特に生体機能物質の導入とその実用的意義に焦点をあてる。

ポリマー微粒子の表面に生体機能を持たせようとするとき、その微粒子の表面自体はむしろ生体に不活性であることが望ましい。例えば特定のタンパク質のみを吸着する微粒子を欲しいとき、微粒子自体にたんぱく質の非特異吸着が起こってしまってはどうにもならない。まず、生体不活性の粒子を調製し、その表面を修飾して特異的な生体活性をもたせることが微粒子機能化のためのオーソドックスな方式といってよい。生体不活性なポリマーを与えるモノマーとして、MPC¹⁾ やメトキシエチルアクリレート²⁾ があるが、筆者らはグリシジルメタクリレート(GMA)を好んで用いてきた。GMAとスチレン(St)をソーブフリー乳化共重合し、さらに少量のGMAを後添加重合することにより、表面がGMAユニットおよびそれから生じたグリセロールメタクリレート(GLM)ユニットで覆われた微粒子(SG粒子)が得られる(Figure 1)。SG粒子はタンパク質等の非特異吸着を起こしにくいことを確認した³⁾。その特性は、①中庸に結合した水分子を保有していること、②親水性の大きなGLMを含むポリマー鎖が作る散漫層をもつこ

*慶應義塾大学理工学部(〒223-8522 横浜市港北区日吉3-14-1)教授、工博。昭和48年、慶應義塾大学大学院博士課程単位取得退学。高分子化学、特に機能性高分子。

(Styrene + Glycidyl methacrylate) / water

Figure 1 Preparation of SG particle and its colloidal characteristics

Figure 2 Preparation of sequence-specific DNA-carrying affinity particle for separation of transcription factor

とによると考えられる。

3. アフィニティラテックスの誕生

ラテックスは、サブミクロンの大きさの高分子微粒子の分散液をいう。この微粒子に生体特異物質を固定し、その物質と強い親和性(アフィニティ)を持つ生体物質を選択的に微粒子にひきつけるようにしたラテックスをアフィニティラテックスと呼ぶ。アフィニティラテックスの歴史を遡ってみる。1956年 Singer らは高分子微粒子に抗体を物理固定し、そのアフィニティ粒子の分散液を検体と混合し、抗原-抗体凝集反応の有無から抗原の検定をした⁴⁾。これが、いわゆるラテックス診断薬の原点である。このときは、他のタンパク質の非特異吸着を防ぐため、露出するラテックス粒子表面を親水性タンパク質でマスクしている。1970年代、Rembaum らは、ラテックス粒子に抗体を化学固定し、それを用いて細胞表面の抗原の所在を明らかにする手法を提案した⁵⁾。Ugelstad は、磁性体を含むミクロンオーダーの高分子ビーズに癌細胞を認識する抗体を化学固定し、癌細胞膜中の抗原を介して粒子を細胞に結合させ、磁力で細胞/粒子結合体を回収し、癌細胞を選択的に除く方法を開発した⁶⁾。これらのケースでは、ポリマー微粒子表面に抗体ないし抗原が固定される。抗体は異方性分子であり、微粒子に固定する際に、抗原結合部位(Fab)が水相側に露呈するように固定方法を考慮しなければならない。物理固定では方向選択的固定が難しく、抗体の結合部位をFc(抗体分子中Fabに蝶番で繋がっている部分)部分に限定した化学固定が望ましい。FabとFcとで官能基の分布や電位が異なることを利用して部位選択的な固定が行われる⁷⁾。

4. アフィニティラテックスの軌跡

Uhlen らはポリマービーズにDNAを固定し相補的なRNAの捕捉を行う系を提案した⁸⁾。われわれはそれらを拡張して、アフィニティラテックスを用いたバイオセパレーションシステムやバイオアッセイ系を提案した⁹⁾。この

とき担体粒子として非特異吸着を起こしにくいポリGMAの粒子を用いた。ただし、粒子が不揃いで分散安定性に難があるため、その後、単体粒子をSG粒子に乗り換えた。ポリGMA粒子やSG粒子の表面のエポキシ基は生体分子の化学固定のための結合部位として利用される。そこに適切な様式で生体機能物質が固定されアフィニティラテックスができあがる。表面修飾の観点からここに取り上げる意義があると判断できるいくつかを紹介する。

4.1 転写因子分離精製のためのアフィニティラテックス

Figure 2 に示すように、転写因子 ATF/E4TF3 は特異的塩基配列 5'-AAGTGACGTAACGT-3'/5'-ACGT-TACGTCACCTT-3' をもつ DNA と選択的に結合できる。従って、上記 DNA を固定した微粒子は、DNA の混合物から転写因子 ATF/E4TF3 を分離精製するアフィニティ粒子になると期待される。この粒子を調製するにあたり、まず、DNA の固定法を検討した。上記 DNA をタンデムにつなげた二本鎖 DNA オリゴマーに突出一本鎖部分をもたせ、これを SG 粒子と作用させたところ、突出部のフリーの塩基のアミノ基と粒子のエポキシ基との間の反応で DNA を粒子に固定できた。突出部の長さを -5 塩基から +30 塩基まで変えて、DNA 固定量の突出部長さ依存性を検討した研究で、15 塩基程度の突出部をもつ DNA が固定に適することが明らかになった¹⁰⁾。こうして得られたアフィニティラテックスを核の抽出液と混合し、その後粒子を回収することにより、E4TF3 ファミリーが高純度で分離できた。粒子から外されたあとの転写因子が本来の転写活性をもつことも確認した¹⁰⁾。粒子に結合させた DNA は、特異塩基配列 DNA をタンデムに連結したオリゴマーであると述べたが、転写因子の捕捉に寄与するのは水中に張り出した分子鎖先端部分であり、オリゴマー鎖中の粒子近傍の部分はスペーサーとして先端部分のアフィニティ発現を助ける役割を担っている。

Figure 3 RGDS-immobilized affinity particle for GP II b/III a purification and for cell activation

4.2 細胞接着因子精製と細胞機能制御のためのアフィニティラテックス

ペプチド [アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-(セリン)(RGDS)] は細胞接着因子であり、細胞膜上のタンパク GP II b/III a に選択的に結合できる。膜タンパクの混合物の中から GP II b/III a を分離精製する目的で RGDS 固定アフィニティラテックスを調製した。親水性スペーサー GG(グリシルグリシン)を介して SG 粒子に RGDS を固定し、これを血小板膜抽出液に加えたところ、上記タンパク質を精製できた¹¹⁾ (Figure 3)。アフィニティラテックスにつり上げられた GP II b/III a は、フリーの RGDS を系に加えることにより粒子から外された。また、EDTA の添加によっても粒子から外され GP II b/III a と RGDS の結合が二価カチオン依存性であることが示された。一方、アスパラギン酸部分をグルタミン酸に変えただけの RGES を固定したラテックスは GP II b/III a を全く回収できなかった。このことから RGDS 固定粒子の優れたアフィニティ特性が裏付けられた。

RGDS 固定微粒子を血小板とインキュベートしたところ、単なる微粒子と混合したときと異なり凝集が促進された。また、RGDS 固定粒子を白血球浮遊液に加えたところ、白血球の貪食能は変化しなかったが殺菌系(酸素代謝系)は活性化された¹²⁾。この作用は、RGDS 固定粒子が GP II b/III a を介して細胞機能制御因子として利用できることを示す(Figure 3)。これらの現象はフリーの RGDS では認められず、担体粒子の意義が確認できた。いずれの場合もスペーサー GG を介して RGDS を粒子に固定すると、直接 RGDS を固定するよりはるかに効率が良いことを特記しておきたい。

4.3 遺伝子診断のためのアフィニティラテックス

一本鎖 DNA をその先端部分だけで微粒子に固定するのは容易ではない。次の方法ではそれが簡単に

Figure 4 Tests of detection of point mismatch DNA using ssDNA-immobilized affinity particle

実現できる。一方だけに突出鎖をもつ二本鎖 DNA を用意し、これを 4.2 で述べた方法で粒子に固定し、次に系を融解条件に移して突出鎖でない方の DNA を粒子から外す方法である。こうして得られた一本鎖 DNA 固定粒子は、相補的な DNA や RNA の精製に利用できる¹³⁾。

粒子に G_{10} -CCTACGCCACCAGCTCCAAC-3' を固定した。ここで G_{10} は DNA と粒子の間に距離を持たせるスペーサーである。この粒子を相補鎖 3'-GGATGCGGTGGTCGAGGTTG-5、点ミスマッチ鎖 3'-GGATGCGGTCTGTCGAGGTTG-5 と混合したときのハイブリッド量を求めた。実験は相補鎖と点ミスマッチ鎖を別々に DNA 固定粒子とインキュベートした系、および両者を混合して DNA 固定粒子とインキュベートした系で行った(Figure 4)。別々にインキュベートした系では、相補鎖とミスマッチ鎖とで粒子上の DNA との結合の速度が大きく異なり(Figure 5 左)、また混合してインキュベートした系では、相補鎖の結合は自身より 100 倍多く存在するミスマッチ鎖の影響を受けなかった(Figure 5 右)¹⁴⁾。このように粒子に固定された DNA が相補鎖を選択的に捕捉する現象はフリーの DNA 系では見られないもので、これは、担体に固定された DNA 鎖がコンフォメーションの自由度を減少させられ、ミスマッチ鎖と整合するフレキシビリティをもたないためと推論した¹⁵⁾。

Figure 5 Detection of point mismatch DNA using ssDNA-immobilized affinity particle in individual and mixed systems

Figure 6 Preparation and characteristics of thermo-sensitive micro-bio-reactor

Figure 7 Cisplatin/DNA (CDDP-DNA) complex-carrying affinity particle to identify the proteins specific to CDDP-DNA

4.4 酵素固定粒子

酵素反応は基質特異性が特徴である。従って、その表面上で特異的反応が展開される酵素固定粒子も、アフィニティラテックスの一種といえる。粒子に固定された酵素の反応性は担体粒子の構造・性質に依存する。Figure 6 に示した反応により粒子表面にグラフトされた温度応答性高分子鎖の一部の端にトリプシンを固定した粒子の酵素活性は、ユニークな温度応答性を示した。具体的には、比較的大きな分子を基質とするケースで、酵素の加水分解効率は30℃以上の温度で低下した。それは自由末端をもつグラフト鎖とトリプシンを固定したグラフト鎖の転移温度が異なるためである¹⁶⁾。すなわち、32℃まで系の温度を高めると、自由末端をもつグラフト鎖のみが収縮し、別のグラフト鎖の末端に付いた酵素が媒体に向けてむき出しになり、基質との遭遇が容易になり反応速度が増す。これを低温に戻すと、自由末端をもつグラフト鎖が再び水和して膨らみ反応速度が低下する。

欠陥DNAを捕捉する酵素 MutS を固定した粒子をその場診断薬として用いるケースを紹介する。MutS は本来DNA修復酵素である。MutS はDNAを捉え、ミスマッチやバルジなど欠陥の有無を調べて、完全相補なものを放免し欠陥を持つものを保持する。従って、MutS 固定粒子は、欠陥DNA検出のためのアフィニティラテックスである。MutS の活性を損なわないよう固定するためには、His タグを用いると良い。粒子上に適度な密度で固定された MutS に、トシルクロライドを用いてアントラキノン固定した。アントラキノンは紫外光照射により近傍のDNA

Figure 8 Comparison of affinity performance between affinity latex and affinity gel beads

を切断する。こうして、欠陥DNAだけが系から消されていく。残りのDNA量を蛍光法で測定することにより欠陥DNAの量を推測できる。微粒子が100nmをきるサイズであれば、微粒子が光学系に影響を及ぼさないため、微粒子を分散液から分ける必要がなくその場でDNA診断ができる¹⁷⁾。

4.5 薬剤固定粒子

東工大半田宏教授が率いるプロジェクト、「微粒子利用型生体結合物質等創製技術」は、SG粒子に薬物を固定し、それを用いて薬物のレセプターを釣り上げて、高いハイブリッド化能を持つ薬物の創製にチャレンジした¹⁸⁾。分子量の小さな薬物は粒子に固定されると、粒子から大きな立体障害をこうむる。それを低減させるためにスペーサーの利用が必須である。エチレングリコールグリシジルエーテル(EGDE)は、分子鎖の長さや親水性においてきわめて有効なスペーサーである。EGDEは、SG粒子にアンモニアを作用させることにより先端に生じたアミノ基と結合される。

シスプラチンはDNAと特異的に結合して癌を抑える機能を持つが、このとき特殊なタンパクがシスプラチンとDNAの複合体形成に関わっていることが知られている。このタンパクを捕捉するのに、シスプラチン/DNA複合体を固定したアフィニティ粒子に用いた(Figure 7)。その結果、膜タンパクの中から、シスプラチン/DNA複合体に

高い結合性を示すタンパク群を効率よく濃縮できた¹⁹⁾。

免疫抑制剤FK506に対する特異的な生体レセプターの探索も、先の例と同様に、まずFK506を粒子に固定し、細胞抽出液をサンプルとして直接アフィニティ分離を行った²⁰⁾。このときは薬剤の粒子への固定部位の選択が結果を大きく左右した。この研究では、アフィニティラテックス法がアフィニティカラムクロマトグラフィより圧倒的に好ましいバイオセパレーション法であることが確認された (Figure 8)。これは「大きな顔した働き者」であるアフィニティラテックス粒子の本領が発揮された結果である。粒子に固定した薬物が吊り上げられたたんぱく質にとってもっとも高いアフィニティを持つものとは限らない。そこで、逆にタンパク質を粒子に固定し、構造の近いいくつかの薬剤をアフィニティ分離する試みも行われ、効果的な薬剤探索の手法が示された²¹⁾。

5. ま と め

ポリマー微粒子に生体機能分子を固定し、バイオアフィニティに由来する特異的結合を導きバイオセパレーションや診断に利用するいくつかの最近の事例について紹介した。担体粒子自体とターゲット分子との相互作用を排しプローブとターゲット分子の親和力を最大限に発揮させる上で、粒子の材質に加え、プローブ固定の様式・固定部位・固定密度などが重要であることを示した。機能化を目指した表面修飾には、依然として試行錯誤のプロセスが残されているとはいえ、次第に合理的な指針が提示されて来つつある。今、インターディシプリナリーな分野に注目が集まる時代である。高分子化学・コロイド化学・有機合成化学・生化学などの合作といえるアフィニティ粒子に一層の期待が寄せられる。

References

- 1) Ye, S. H., Watanabe, J., Takai, M., Iwasaki, T., Ishihara, K.: *Biomaterials*, **26**, 5032 (2005)
- 2) Haris, P., Tanaka, M.: *Biomed. Mater. Eng.*, **14**, 427 (2004)
- 3) Inomata, Y., Wada, T., Handa, H., Fujimoto, K., Kawaguchi, H.: *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **5**, 293 (1994)

- 4) Singer, J. M., Plotz, C. M.: *Am. J. Med.*, **21**, 888 (1956)
- 5) Rembaum, A., Yen, S. P. S., Volksen, W.: *Chemtech*, **March**, 182 (1978)
- 6) Ugelstad, J., Berge, A., Ellingsen, T., Schmid, R., Nilsen, T., Mørk, P. C., Stenstad, P., Hornes, E., Olsvik, Ø.: *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 87 (1992)
- 7) Kawaguchi, H., Sakamoto, K., Ohtsuka, Y., Ohtake, T., Sekiguchi, H., Iri, H.: *Biomaterials*, **10**, 225 (1989)
- 8) Uhlen, M.: *Nature*, **340**, 733 (1989)
- 9) Kawaguchi, H., Asai, A., Ohtsuka, Y., Watanabe, H., Wada, T., Handa, H.: *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6229 (1989)
- 10) Inomata, Y., Kawaguchi, H., Hiramoto, M., Wada, T., Handa, H.: *Anal. Biochem.*, **206**, 109 (1993)
- 11) Inomata, Y., Kasuya, Y., Fujimoto, K., Handa, H., Kawaguchi, H.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **4**, 231 (1995)
- 12) Kasuya, Y., Fujimoto, K., Miyamoto, M., Kawaguchi, H.: *J. Biomed. Mat. Res.*, **28**, 397 (1994)
- 13) Kawaguchi, H., Hatakeyama, M., Iwato, S., Fujimoto, K., Handa, H.: In "Advances in polymeric biomaterials science", Akaike, T., Okano, T., Akashi, M., Terano, M., Yui, N., Eds., CMC, Tokyo, p.355 (1997)
- 14) Hatakeyama, M., Iwato, S., Fujimoto, K., Handa, H., Kawaguchi, H.: *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, **10**, 161 (1998)
- 15) Hatakeyama, M., Iwato, S., Hanashita, H., Nakamura, K., Fujimoto, K., Kawaguchi, H.: *Colloids and Surfaces A*, **153**, 445 (1999)
- 16) Yasui, M., Shiroya, T., Fujimoto, K., Kawaguchi, H.: *Colloids & Surfaces B. Biointerfaces*, **8**, 311 (1997)
- 17) Oba, S., Hatakeyama, M., Handa, H., Kawaguchi, H.: *Bioconjugate Chem.*, **16**, 551 (2005)
- 18) "Heisei 14nendo Biryushi Riyougata Seitaketsugou Bussitsutou Sosei gizyutsu", Biotechnology Kaihatsu gizyutsu Kenkyu-Kumiai Ed., (2003)
- 19) Tomohiro, T., Sawada, J., Sawa, C., Nakura, H., Yoshida, S., Kodaka, M., Hatakeyama, M., Kawaguchi, H., Handa, H., Okuno, H.: *Bioconjugate Chem.*, **13**, 163 (2002)
- 20) Shimizu, N., Sugimoto, K., Tang, J., Nishi, T., Sato, I., Hiramoto, M., Aizawa, S., Hatakeyama, M., Ohba, R., Hatori, H., Yoshikawa, T., Suzuki, F., Oomori, A., Tanaka, H., Kawaguchi, H., Watanabe, H., Handa, H.: *Nature Biotech.*, **18**, 877 (2000)
- 21) Ohtsu, Y., Ohba, R., Imamura, Y., Kobayashi, M., Hatori, H., Zenkoh, T., Hatakeyama, M., Manabe, T., Hino, M., Yamaguchi, Y., Kataoka, K., Kawaguchi, H., Watanabe, H., Handa, H.: *Anal. Biochem.*, **338**, 245 (2005)

日本語表記参考文献

- 18) バイオテクノロジー開発技術研究組合「平成14年度 微粒子利用型生体結合物質等創製技術」成果報告書, 2003年3月

*

*

*

*

*