タンパク質吸着に及ぼす材料界面の水分子構造

—和周波発生分光法による解析から—

高井まどか¹・長澤大樹¹・東 倫之¹・野口秀典²・魚崎浩平²¹東京大学大学院工学系研究科 ☎ 113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1²物質・材料研究機構 (NIMS) ☎ 305-0044 茨城県つくば市並木 1-1

(2014 年 6 月 9 日受付; 2014 年 7 月 29 日掲載決定)

Water Molecule Structure on Material Interface Related to Protein Adsorption
Study on Sum-Frequency Generation Spectroscopy (SFG)Madoka TAKAI¹, Daiki NAGASAWA¹, Tomoyuki AZUMA¹, Hidenori NOGUCHI² and Kohei UOSAKI²¹The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656²National Institute of Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tukuba, Ibaraki 305-0044

(Received June 9, 2014; Accepted July 29, 2014)

Adsorbed proteins initiate the undesirable phenomena like blood coagulation and immune response, and lead to the negative effects on human body and function of biodevices. Thus, the suppression of protein adsorption is essential property for biomaterials. Therefore, interfacial water molecules may play a key role on protein adsorption. In this study, various types of surface; hydrophobic, hydrophilic, anionic, cationic and zwitterionic were prepared by high-density polymer brush having different molecular structure. The amount of adsorbed negatively and positively charged protein was analyzed by quartz crystal microbalance (QCM) method to investigate the protein adsorption on polymer brush surfaces quantitatively. Structure of interfacial water at the interface between polymer brush and water media was investigated using sum-frequency generation (SFG) spectroscopy. From the quantitative comparison with protein adsorption and structure of interfacial water molecule of each polymer brush, it is concluded that the interfacial water molecules, which form strong hydrogen bonding is a strong relation to the suppression of protein adsorption.

KEYWORDS : protein adsorption, water molecule, material interface, sum-frequency generation spectroscopy

1. は じ め に

バイオマテリアルとは、一般に医療やバイオテクノロジー分野に用いられる材料の総称であり、生体の構成要素である生体物質、細胞、組織などと接触させ、診断や治療あるいは生体の損傷部の補助や置換を行うために用いられる材料のことを指す。バイオマテリアルは大きく3種に分類され、(1)治療の際に使用される医療用具・機器の素材、(2)疾患の診断に使用される機器や薬品の素材、(3)生体機能の代替・補助を目的とする人工臓器の素材があげられる。バイオマテリアルには様々な用途があり、人工血管、人工肺、人工関節、人工骨、眼内レ

ンズ、人工透析器などの生体の内外で使用される人工臓器、輸血バックやカテーテル、ステントなどの手術で使用される機器、注射針や注射筒、血液などの検査装置、コンタクトレンズといった使用頻度が高く身近なものまで様々である。これらバイオマテリアルにはその使用用途に応じた条件があり、様々な材料特性が求められる。要求される性質を Table 1 にまとめた。これら多くの要求特性の中でも、バイオマテリアルに特徴的かつ必須な特性は生体親和性 (biocompatibility) であるといえる。生体親和性とは生体組織や生体成分に対して悪影響を与えず、生体になじみ生体から異物と認識されず、生体を損傷しない性質である¹⁾。

たとえば人工血管などの生体内に埋め込んで血液と接触する医療デバイスでは、血液凝固反応や免疫反応とい

Table 1. Requirement function of biomaterials.

• Mechanical property (e.g. strength of materials, hardness, toughness, coefficient of elasticity)
• High manufacturing capability/processing accuracy
• Resistance properties to sterilization (e.g. autoclaved sterilization)
• Stability on chemical-physical properties
• Biocompatibility (e.g. lack toxicity to biological body, blood compatibility, tissue compatibility)

った反応を抑制することが求められる。生体親和性はバイオマテリアルに必須の特性であるが、完全に生体親和性を獲得しているといえる材料は未だ存在しない。完全な生体親和性マテリアルの創製のためには、材料と生体とが相互作用し反応を起こす界面に着目し解析を行うことが重要である。

バイオマテリアルと生体との反応は、マテリアル表面へのタンパク質吸着および吸着により誘起されるタンパク質の構造変化が、連動する様々な生体の応答反応を活性化することで起こる。したがって、生体とマテリアルとの相互作用を制御し望ましくない反応を抑制する生体親和性マテリアルの創製のためには、マテリアル表面へのタンパク質の非特異的吸着を抑制することが重要となる。また、バイオセンシング分野において、タンパク質の非特異的吸着は検出の際のノイズの原因やセンシング分子の阻害の原因となり検出能の低下を招く。したがってバイオセンシング分野においても、バイオマテリアル表面へのタンパク質非特異的吸着を抑制することは非常に重要である。

マテリアル表面へのタンパク質吸着は、マテリアル表面の濡れ性、表面電位、ミクロな表面構造など様々な表面の性質により影響を受けることが知られている²⁾。しかし、これらの要因が、それぞれタンパク質吸着とどのような関連をもっているかについて明確な議論はされていない。これは、タンパク質とマテリアル表面との間には疎水性相互作用や静電的相互作用、水素結合などの様々な相互作用がはたらくため、非常に複雑となり理解が困難であることによる。しかし、これらマテリアルとタンパク質との相互作用は水を媒体としてはたらくため、界面に存在する水分子が非常に重要な役割を果たしていると考えられる^{3,4)}。そこで、本研究では異なる性質を有する材料表面を作製し、界面水分子の構造の評価およびタンパク質吸着試験を行うことで、材料表面でのタンパク質吸着抑制メカニズムを解明することを目的とした。

これまでもタンパク質吸着と水分子に関して、熱分析 (DSC)^{5,6)}、赤外分光法 (IR)⁷⁾などの解析手法を用いて研究が行われてきたが未だ系統的な理解は達せられていない。これは水分子の測定手法の界面選択性が低く界

面水分子の直接解析になっていないことにある。また、SFG 分光法を用いた界面水分子の研究もいくつか報告されているが、解析対象とする材料種が限られているために各論にとどまっている^{8,9)}。そこで、これらの課題を解決するため、和周波発生 (SFG) 分光法を用いて界面水分子を解析する、様々な物理化学的性質を有する表面を高密度かつ精密構造をもつポリマーブラシより作製する、水晶振動子マイクロバランス (QCM-D) を用いてタンパク質吸着量を定量するという研究戦略のもと本研究を行った。SFG 分光法は界面選択的な振動分光法であるため、界面のみの情報を抽出した解析を行うことができる。高密度なポリマーブラシの作製により分子構造の異なる均一な高分子表面を構築できる。QCM-D は非常に高感度な測定法で ng/cm^2 オーダーのタンパク質吸着量を定量できる。ポリマーブラシ/水界面の界面水分子の解析を行い、それぞれの表面へのタンパク質吸着量と比較することで、タンパク質吸着と界面水分子の関連を解明することを目的とした。

2. SFG 分光法の原理と解析

SFG は二つの周波数の異なる光を入射すると和の周波数をもつ光が発生するという二次非線形光学現象である。二次非線形現象は反転対称性をもつ媒質中では不活性という特徴をもつため、反転対称性が崩れる界面でのみ活性となる。SFG の強度 I_{SFG} は二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ の絶対値の二乗 $|\chi^{(2)}|^2$ に比例する。入射光の一つに赤外光を用いた場合に $\chi^{(2)}$ は以下の式で表される¹⁰⁾。

$$\chi^{(2)} = \chi_{\text{NR}}^{(2)} + \sum_q \frac{A_q}{\omega_{\text{IR}} - \omega_q + i\Gamma_q}$$

$\chi^{(2)}_{\text{NR}}$ は非線形感受率の非共鳴項、 ω_{IR} は入射赤外光の周波数、 A_q 、 ω_q 、 Γ_q はそれぞれ q 番目の振動モードの強度、共振周波数、ダンピング定数を表す。この式からわかるように SFG 強度は入射光の周波数と振動モードの共振周波数が一致するときに増大する。よって入射光の振動数を掃引することで界面分子の振動スペクトルを得ることができる。得られた SFG スペクトルに対し、ローレンツ関数を用いてフィッティングを行うことで A_q 、 ω_q 、 Γ_q の値を得ることができる。

入射光に波長固定の可視光と波長可変の赤外光を用い

Fig. 1. (color online). System of sum-frequency generation spectroscopy.

た SFG 測定では Fig. 1 に示すような測定システムで測定を行った。可視光を発生するパルスレーザーにより光増幅システムを励起し、増幅光を AgGaS₂ 結晶中で混合し、差周波過程により波長が可変の赤外光を発生させた。発生した赤外光とパルスレーザーの可視光を試料表面に集光し、発生した SFG を入射光と空間的に分解して検出した。

3. 各種ポリマーブラシの物性と界面水分子の SFG による解析⁽¹⁾

3.1 ポリマーブラシの物性

グラフト密度が高く、ある程度の鎖長をもち、原子間力顕微鏡 (AFM) での評価から均質な表面形態のポリマーブラシは、タンパク質の吸着量が少なくなることが報告されている^(12,13)。そこで、本研究ではポリマーの表面形態がタンパク質吸着量に与える影響を排除する目的でグラフト鎖密度が高く、ポリマーブラシを作製することを目的とした。Fig. 2 に示すようなポリマーを SiO₂/Si 表面から表面開始型リビングラジカル重合 (SI-ATRP) 法により構築した。このときモノマーと開始剤の比を 100/1 とした。接触角 (SCA) および表面ゼータ電位とそれぞれのポリマーブラシのグラフト密度 (chains/nm²) を Table 2 にまとめた。

ポリマーブラシのグラフト密度に関しては、モノマーと開始剤のモル比 $[M]/[I] = 20, 50, 100, 150$ で重合した各ポリマー基板について膜厚を測定した。¹H-NMR 測定により求めたポリマー転化率から生成したポリマーの平均分子量を算出し、以下の式を用いて各ポリマーブラシのグラフト密度を算出した。算出の際には、分子量とポリマーブラシの厚さとの関係を直線近似し、その傾きを用いた。

$$\sigma = -\frac{\rho \times h \times N_A}{M \times n}$$

Fig. 2. (color online). Chemical structures of each polymer brush.

Table 2. Surface and polymer properties of each polymer brush.

Polymer	SCA [degree]	Zeta potential [mV]	Chain density [chains/nm ²]
Poly (BMA)	84±4	-28±6	0.49
Poly (HEMA)	49±2	-18±4	0.76
Poly (mOEGMA)	50±1	-6±4	0.39
Poly (MEA)	64±1	1±4	0.67
Poly (MPS)	10±1	-56±4	0.40
Poly (AEMA)	60±5	79±1	0.32
Poly (CBMA)	17±4	-3±1	0.67
Poly (MPC)	8±2	-1±3	0.26

ρ : ポリマー密度 (g/cm³), h : 膜厚, N_A : アボガドロ定数, M : モノマー分子量, n : 重合度

($\rho = 1.3$ for poly(CBMA), poly(MPC), $\rho = 1.13$ for poly(AEMA), $\rho = 1.15$ for poly(HEMA), $\rho = 1.2$ for poly(MPS), poly(mOEGMA), $\rho = 1.1$ for poly(BMA))

これらの結果より、親水性、疎水性、アニオン性、カチオン性、双性イオン性の様々な物性を有する高密度 (0.1 chains/nm² 以上) が作製できた。つまりタンパク質吸着量に及ぼすポリマーブラシの構造の影響を排除でき、ポリマーの側鎖の官能基の違いを主たるタンパク質吸着の要因と考えることができる。

3.2 タンパク質吸着実験

ポリマーブラシ表面へのタンパク質吸着量を QCM-D により測定した。1 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA) (66 kDa, pI 4.7) およびリゾチーム (14.3 kDa, pI 11.5) をリン酸バッファー (PBS) 中 37°C で一時間吸着させ、リンス後の吸着量を測定した。QCM-D の共振周波数変化 Δf と吸着物質の質量 Δm との関係は Sauerbrey の式 (1) で表される。

Fig. 3. (color online). Amount of protein adsorption on each polymer brush ($n = 3$).

$$\Delta m = -\frac{C}{n} \Delta f_n \quad (1)$$

(1) 式の n は共振周波数の倍音の次数, C は水晶振動子の基本共振周波数で決まる定数である。5 MHz の QCM センサーでは $C = 17.7 \text{ ng/cm}^2$ である。Sauerbrey の式を用いて共振周波数変化から算出した BSA およびリゾチームの吸着量を Fig. 3 に示す。2 種類の双性イオン性ポリマーブラシ表面へのタンパク質吸着量は非常に少なかった。このうち Poly(MPC) の BSA 吸着時の Δf の値は正の値を示したが、これは吸着量が検出限界以下であったと考えられるため、吸着量はゼロとした。親水性ポリマーブラシ Poly(HEMA), Poly(mOEGMA) はいずれも少ない吸着量を示し、疎水性の Poly(BMA) の吸着量は多かった。電荷を有する Poly(MPS) および Poly(AEMA) はそれぞれリゾチーム, BSA の吸着量が非常に多かった。これは中性 PBS 中ではリゾチームは正に, BSA は負に帯電するため、それぞれ反対符号の表面電荷を有するポリマーブラシ表面へ静電相互作用によって吸着したためだと考えられる。

3.3 SFG 分光法による界面水分子解析

半円筒型石英プリズム上にポリマーブラシを作製し、修飾表面と水とを接触させた界面の SFG スペクトルを測定した (Fig. 4)。溶液には水分子の分子内カップリングの影響を除くため、 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 1/4$ (v/v) の同位体希釈水を用いた¹⁴⁾。OH 伸縮振動領域 ($3000 \sim 3800 \text{ cm}^{-1}$) で SFG 測定を行い界面水分子の解析を行った。得られたスペクトルのフィッティングを行い、ピークの解析を行った。それぞれのポリマーブラシ/水界面の代表的な SFG スペクトルを Fig. 5 に示す。OH 伸縮振動領

Fig. 4. (color online). Cell system of SFG measurement.

Fig. 5. (color online). SFG spectrum on water molecule between polymer brush and water interface.

域には一つのブロードなピークが見られた。材料によりスペクトルの形状に違いが見られた。

SFG スペクトルのフィッティングによりピークを中心波数を算出した (Fig. 6)。OH 伸縮振動の中心波数は水分子の水素結合の強さを反映し、中心波数が低波数側であるほど界面水分子は強い水素結合を形成していると考えられる¹⁵⁾。双性イオン性の Poly(CBMA) と Poly(MPC) は中心波数が非常に小さい値を示した。このことから界面水分子は強い水素結合を形成していることがわかった。Poly(AEMA) の中心波数は高波数側であり、水分子の水素結合は弱いことがわかった。

3.4 界面水分子とタンパク質吸着

SFG スペクトルのピーク中心波数と BSA の吸着量と

Fig. 6. (color online). Peak center position of SFG spectrum ($n = 3$).

Fig. 7. (color online). Relation between peak center position and amount of protein adsorption (upper: BSA, under: Lysozyme).

の関係を Fig. 7 にまとめた。吸着量が比較的すくない領域において、ピークの中心波数が低波数側であるほどタンパク質吸着量が少ないという傾向が見られた。この結

果から、界面水分子の水素結合が強いほどタンパク質吸着が抑制されることがわかった。Fig. 7 に示す傾向から外れているプロットは、Poly(AEMA) の表面で BSA の吸着量が多く、Poly(MPS) の表面ではリゾチームの吸着が多い点である。これはタンパク質吸着の項で考察したように、材料表面とタンパク質が反対符号の電荷を有するため強い静電相互作用により吸着したためだと考えられる。タンパク質の吸着は反対符号の電荷間ではたらく静電相互作用により促進されることが示唆されここで測定した SFG による界面水分子の性質以外の因子による吸着を示唆している。しかしながら、タンパク質と材料表面の電荷が同一符号であるである場合には、SFG ピークが低波数側であるほどタンパク質吸着量が少ないという傾向を示した。界面水分子とタンパク質吸着量との関係から、ポリマーと界面水分子が親和性を有し、強い水素結合を形成する界面水分子がタンパク質吸着を抑制することが示唆された。

4. 総 括

SI-ATRP 法により物理化学的性質の異なる高密度なポリマーブラシを作製し、材料界面の水分子とタンパク質吸着量について、SFG 分光法と QCM を用いてその関係を解析した。SFG スペクトルのピークの中心波数位置から界面水分子の水素結合の強さを解析すると、双性イオン性ポリマーの界面水分子は強い水素結合を形成することがわかった。タンパク質と材料表面の電荷が同一符号である場合、タンパク質吸着量と SFG ピークの中心波数との関係から、界面水分子が形成する水素結合が強いほどタンパク質吸着量が減少する傾向が見られた。このように SFG 分光法により強い水素結合を形成する界面水分子がタンパク質吸着を抑制することが示唆された。ただし、この解析手法のみですべて材料へのタンパク質吸着現象を説明できないこともわかり、タンパク質の吸着現象を界面水分子の水和量等を含めさらなる検討が必要である。

謝 辞

本研究は、文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究“ソフトインターフェースの分子科学”および基盤研究 A “タンパク質の精密ナノ凝集制御界面での細胞の接着と機能”により実施した。

文 献

- 1) B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen and J.E. Lemons: "Biomaterials Science, Third Edition: An Introduction to Materials in Medicine" (Elsevier Academic

- Press, 2013), p. 809.
- 2) M. Rabe, D. Verdes and S. Seeger : *Adv. Colloid Interface Sci.* **162**, 87 (2011).
 - 3) T. Tsuruta : *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **21**, 1831 (2010).
 - 4) D.R. Lu, S.J. Lee and K. Park : *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **3**, 127 (1991).
 - 5) M. Tanaka, T. Hayashi and S. Morita : *Polym. J.* **45**, 701 (2013).
 - 6) T. Morisaku, J. Watanabe, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara : *Polymer* **49**, 4652 (2008).
 - 7) M. Ide, T. Mori, K. Ichikawa, H. Kitano, M. Tanaka, A. Mochizuki, H. Oshiyama and W. Mizuno : *Langmuir* **19**, 429 (2003).
 - 8) H. Kitano and M. Gemmei-Ide : *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **21**, 1877 (2010).
 - 9) T. Kondo, M. Gemmei-Ide, H. Kitano, K. Ohno, H. Noguchi and K. Uosaki : *Colloids Surf., B* **91**, 215 (2012).
 - 10) Y.R. Shen and V. Ostroverkhov : *Chem. Rev.* **106**, 1140 (2006).
 - 11) D. Nagasawa, H. Noguchi, K. Uosaki and M. Takai : Submitted to JACS.
 - 12) W. Feng, J.L. Brash and S. Zhu : *Biomaterials* **27**, 847 (2006).
 - 13) J. Sibarani, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara : *Nano LIFE*, **2(4)**, 1242003 (2012).
 - 14) M. Sovago, R.K. Campen, G.W.H. Wurpel, M. Muller, H.J. Bakker and M. Bonn : *Phys. Rev. Lett.* **100**, 173901 (2008).
 - 15) M. Sovago, R.K. Campen, H.J. Bakker and M. Bonn : *Chem. Phys. Lett.* **470**, 7 (2009).