〔原著論文〕

卵白タンパク質ナノ粒子の作製と細胞接着制御への応用

和久 友則^{*1}・金丸 佳央理^{*1}・廣山 慶是^{*1}
佐々木 るりほ^{*1}・森本 直也^{*1}・田中 直毅^{*1}

(受付 2017 年 9 月 11 日・審査終了 2017 年 10 月 20 日)

(早期公開 2017 年 12 月 12 日・DOI:10.1295/koron.2017-0070)

要 旨 培養に用いる器材表面への細胞の接着・非接着を簡便に制御する表面改質技術の開発が求められている。本研究では、オボアルブミン (OVA) とオボトランスフェリン (OTF) を主成分とする卵白タンパク質ナノ粒子を表面改質剤として用いることによる、ポリマー器材表面への細胞接着の制御について検討した。また比較として、OVA の代わりに N 末端領域の欠損したトランケート型 OVA (pOVA) を用いたナノ粒子の調製についても検討し、その物性および表面改質剤としての機能を評価した。OVA と OTF もしくは pOVA と OTF の混合溶液を熱処理することで粒径 40–80 nm の卵白タンパク質ナノ粒子を作製した。二種類のタンパク質の仕込み混合比は、得られるナノ粒子の ζ -電位に大きく影響した。ANS 蛍光アッセイより両ナノ粒子はともに疎水性表面をもつことが示唆された。また、これらのナノ粒子によりポリスチレン基板をコーティングすることで、表面が親水化されることがわかった。さらに、ナノ粒子をコーティングしたポリスチレン基板上での HepG2 細胞の培養を検討したところ、OVA-OTF ナノ粒子をコーティングした場合には、ナノ粒子の組成にかかわらず基板表面への細胞接着は促進された。これに対して、pOVA-OTF ナノ粒子をコーティングした場合には、ナノ粒子の組成により基板への細胞接着性が大きく異なることが明らかになった。以上より、卵白タンパク質ナノ粒子によるコーティングは、基板表面への細胞の接着・非接着を制御するための表面改質法として有用であることが期待される。

1 緒 言

細胞培養技術は、生命現象や疾患発症の解明を目的とする基礎研究のみならず、創薬開発における薬剤の有効性や毒性の *in vitro* での評価や再生医療研究など、幅広い分野で利用されている。近年ではとくに、生体内での組織をできるだけ忠実に再現した環境での細胞培養が、精密な薬剤スクリーニングや再生医療の実現のために必要であると考えられている^{1),2)}。生体内では、細胞は周囲の細胞や細胞外基質と密接に相互作用している。このような生体内環境を再現する試みとして、スフェロイド培養やマイクロ流体デバイスを用いた培養などが研究されている^{2)~5)}。細胞がもつ本来の機能をより引き出すことができる培養技術を確立するためには、培養に用いる器材表面への細胞の接着・非接着を簡便に制御する表面

改質技術が必要でありその開発が求められている^{3),6)}。

本報では、卵白タンパク質ナノ粒子のコーティングによる、細胞接着制御について報告する。卵白中には、オボアルブミン (OVA)、オボトランスフェリン (OTF)、オボムコイド、オボムチンおよびリゾチームなどのタンパク質が含まれる。最も含有量の多いタンパク質である OVA は、45,000 の分子量をもち、その等電点は 4.5 である。OVA の水溶液を変性温度以上で加熱するとゲル化することは広く知られている。とくに食品加工分野を中心に、ゲルの形成メカニズムの解明や物性制御にかかわる研究が多くなされてきた^{7),8)}。pH や塩濃度などの調製条件は得られるゲルの強度に影響を与えることが広く知られている。一方で、OVA の N 末端領域のわずか 22 残基を欠損させた場合にも、そのゲル化挙動が大きく変わることが報告されている⁹⁾。このトランケート型タンパク質は、酸性条件下で OVA をペプシン処理した際に起こる、His-22 と Ala-23 との間での特異的な加水分解により得られ、pOVA と呼ばれる⁹⁾。全長 385 残基のうちの

^{*1} 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科分子化学系
(〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所街道町)

わずに22残基を欠損しているにすぎないにもかかわらず、ゲル化挙動が大きく変化する点が大変興味深い。筆者らのグループにおいても、OVAおよびpOVAの構造や物性について詳細な解析を行い、N末端領域22残基の欠損は、二次構造や熱的安定性には影響を与えないが、加熱により得られるゲルの力学的物性には大きく影響を与えることを明らかにした¹⁰⁾。また共同研究により、OVAもしくはpOVAが形成するゲルの構造を中性子散乱測定により解析することで、両者の水中での分散性や熱凝集挙動の違いについて明らかにした¹¹⁾。

近年では、このようなゲルの物性制御に関する基礎的な研究に加えて、OVAを主成分とするゲル、フィルムやナノ粒子(ナノゲル)を生医学材料として利用する研究が報告され始めている^{12)~18)}。その中で、Yuらのグループでは、OVAとさまざまなカチオン性成分を混合し加熱することにより、さまざまなタイプのナノ粒子を作製できることを報告している^{16)~18)}。カチオン性成分としては、リゾチーム(等電点11.2)やキトサンなどが用いられている。熱変性卵白タンパク質から成るナノ粒子はポリスチレンなどのプラスチック表面に高い吸着性を示すことが期待される。そこで筆者らは、Yuらのグループが報告している、OVAとOTF(等電点6.8)から成るナノ粒子をポリスチレン基板のコーティング剤として選択した¹⁸⁾。OVAとOTFはともに卵白タンパク質の主成分であることより安価で入手が容易である。また、両タンパク質の仕込み混合比を変えることで、表面電荷や組成の制御が可能である。さらに、ナノ粒子水分散液を基板にマウントするだけで、有機溶媒や特別な装置を用いることなく簡便に表面を改質することができる。

本研究では、OVAとOTFもしくはpOVAとOTFの仕込み混合比を種々変化させてナノ粒子を作製し、その形態、粒子径、 ζ -電位および表面疎水性を評価した。得られたナノ粒子をコーティングしたポリスチレン基板の濡れ性を評価するとともに、この基板上でのHepG2細胞の培養を検討し、ナノ粒子コーティングが細胞接着や細胞凝集塊形成にどのような影響を与えるかについて評価した。

2 実 験

2.1 試薬

ニワトリ卵白由来アルブミン、ニワトリ卵白由来コンアルブミン、ダルベッコ改変イーグル培地-低グルコース、ペプシンはシグマ-アルドリッチ社より購入した。ウシ胎児血清(FBS)はバイオウエスト社より購入した。フルオレセイン5-イソチオシアネートは(株)同仁化学研究所より購入した。

2.2 pOVAの調製

pOVAは既報の文献を参考に調製した⁸⁾。OVAおよび

ペプシンを、それぞれ12.5 mg/mLおよび3 mg/mLの濃度で0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)に溶解させた。このOVA溶液とペプシン溶液を体積比4:1で混合した後、37°Cでインキュベートした。17時間後、反応液のpHを1 Nの水酸化ナトリウム水溶液を用いて7.0に合わせることで、酵素反応を停止させた。その後、反応溶液を0.5 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に対して透析した(分子量分画: 3500)。pOVAの生成は、電気泳動により確認した。

2.3 OVA-OTF ナノ粒子の作製

OVA-OTF ナノ粒子は既報の文献に従って作製した¹⁸⁾。両タンパク質の総濃度が1.5 mg/mLとなるように、OVAとOTFを種々の混合比([OTF]/[OVA]=3, 2, 1, 0.5, 0.33 (w/w))で0.5 mMリン酸ナトリウム緩衝液に溶解した。混合液をゆっくりと振とうした後、80°Cで30分間加熱した。pOVA-OTF ナノ粒子も、同様の方法で作製した。

2.4 疎水性蛍光プローブを用いたナノ粒子の表面疎水性評価

ナノ粒子の表面疎水性は、蛍光プローブ1,8-アニリノナフタレンスルホン酸(ANS)を用いて評価した。ANSを終濃度100 μ Mとなるように、ナノ粒子分散液(0.5 mMリン酸緩衝液)に溶解させた。37°Cで15分間静置した後、350 nmで励起したときの蛍光スペクトルを測定した。pOVA-OTF ナノ粒子の表面疎水性についても同様に評価した。

2.5 フルオレセインイソチオシアネート(FITC) 標識化OVAの調製

OVAを濃度110 μ Mで、ホウ酸緩衝液(pH 8.5)に溶解した。この溶液900 μ Lに、FITCのDMSO溶液(1.9 mM)を100 μ L加えて、25°Cで2時間反応させた。得られた反応液をゲルろ過(NAP-10; Sephadex G-25)により精製して、FITC標識化OVAを得た。488 nmにおける吸光度より求めたFITC濃度を、ブラッドフォード法により求めたOVA濃度で除することにより標識化率を求めたところ、その値は43%であった。

2.6 蛍光標識化OVA-OTF ナノ粒子の作製

上述で調製した蛍光標識化OVAと未標識のOVAを混合することで蛍光標識化率10%のOVA溶液を作製した。この蛍光標識化OVAとOTFを種々の比、0.5 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中で混合し、80°Cで30分間加熱した。蛍光標識化pOVA-OTF ナノ粒子も同様の手法により調製した。

2.7 ナノ粒子を吸着させたポリスチレン基板表面の全反射顕微鏡観察

15 mm丸型カバーガラスの両面を2分間ずつUV-O₃洗浄した後、ポリスチレンのトルエン溶液(2 wt%)を30 μ L滴下し、3000 rpmで30秒間スピンコートした後、一晚

乾燥させることでポリスチレン基板を作製した。このポリスチレン基板表面に、蛍光標識化 OVA-OTF ナノ粒子分散液を 100 μ L 滴下し、室温において静置した。ナノ粒子分散液を除去した後、PBS で一回洗浄した。この基板を全反射顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-E, (株) ニコン製) により観察した。pOVA-OTF ナノ粒子を吸着させたポリスチレン基板の作製およびその観察も同様に行った。

2.8 細胞培養

HepG2 細胞は、10%FBS を含むダルベッコ改変イーグル培地を用いて 37°C, 5%CO₂ 大気下で培養した。

2.9 ナノ粒子を吸着させたポリスチレン基板上での HepG2 細胞の培養

上述の方法により、UV-O₃ 洗浄した 15 mm 丸型カバーガラス基板上にポリスチレンをスピコートした。この基板を 24 ウェルプレートのウェル内に固定した後、基板上に OVA-OTF ナノ粒子分散液を 300 μ L 滴下し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、ナノ粒子分散液を除去し、PBS で 1 回洗浄した。ここへ 1.5×10^4 cells/mL の細胞懸濁液を 1 mL 添加し、3 日間培養した。各ナノ粒子コーティング基板への細胞接着挙動の違いを表す指標として、孤立して存在している細胞数に占める、伸展している細胞数の割合を位相差顕微鏡観察画像より算出した。各ナノ粒子コーティング基板につき、ランダムに選択した五つの視野で同様の検討を行い、その平均値を伸展率とした。

2.10 機器測定

ナノ粒子の形態は、サンプルを 0.1% リンタングステン酸溶液 (pH 7.0) を用いて染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200 EX II, 日本電子 (株) 製) により観察した (加速電圧 80 kV)。粒子径は動的光散乱測定 (DLS-7000, 大塚電子 (株) 製) により評価した。光源には波長 630 nm の He-Ne レーザーを用い、検出器の角度は 90° に設定した。 ζ -電位は顕微鏡電気泳動方式ゼータ電位測定装置 (Model 502, 日本ルフト (株) 製) により測定した。ナノ粒子を吸着させたポリスチレン基板の接触角は自動接触角計 (DMe-200/201, 協和界面科学 (株) 製) により評価した。各基板 3 か所の接触角測定を行い、平均値を算出した。

3 結果と考察

3.1 OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子の調製

OVA と OTF とを、総タンパク質濃度を一定 (1.5 mg/mL) にして、種々の比で 0.5 mM リン酸緩衝液中 (pH 7.0) において混合し、80°C で 30 分間加熱した。OVA に対する OTF の混合比 r ([OTF]/[OVA]) を、0.33 から 3.0 の範囲で種々変化させた。得られた会合体の形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した (Figure 1)。

Figure 1. Negatively stained TEM images of (a) OVA-OTF and (b) pOVA-OTF nanoparticles prepared by heat treatment at 80°C for 30 min in 0.5 mM phosphate buffer (pH 7.0). r and r' represents the mixing ratio of [OTF]/[OVA] and [OTF]/[pOVA], respectively. Scale bars represent 500 nm.

その結果、 r が 0.33 から 3.0 の範囲でナノ粒子の形成が認められた。その粒子径は r の値が 0.33 から 2 の範囲では約 50–60 nm でほぼ一定であり、 r の値が 3 のときには約 80 nm であった (Table 1)。また同様に、OVA の代わりに pOVA を用いて、OTF との複合化によるナノ粒子形成についても検討した。OVA-OTF の系と共通して、pOVA に対する OTF の混合比 r' ([OTF]/[pOVA]) の値が 0.33 から 3.0 の範囲でナノ粒子の形成が認められた。粒子径は、 r' の値が 2 もしくは 3 のときにやや大きいものの約 45–55 nm でほぼ一定であった (Table 1)。仕込み混合比が同じときの粒子径を比較すると、いずれの混合比においても OVA-OTF ナノ粒子は pOVA-OTF ナノ粒子よりも大きい値を示した。OVA の N 末端領域 22 残基を削除すると、1–22 残基部分に覆われていた疎水性領域が分子表面に露出し、分子表面の疎水性が増加する。このため、pOVA は水中においてクラスターを形成するととも

Table 1. Diameter of OVA-OTF and pOVA-OTF nanoparticles prepared at various ratios^{a)}

weight ratio	0.33	0.5	1	2	3
OTA-OTF	56 ± 7 nm	53 ± 5 nm	57 ± 11 nm	59 ± 9 nm	83 ± 16 nm
pOVA-OTF	46 ± 6 nm	44 ± 6 nm	47 ± 7 nm	52 ± 8 nm	58 ± 9 nm

^{a)} The diameter was estimated from the TEM images.

Figure 2. Zeta potentials of OVA-OTF and pOVA-OTF nanoparticles in water at pH 7.0. (closed circle: OVA-OTF nanoparticles, open circle: pOVA-OTF nanoparticles)

に、OVA とまったく異なる熱凝集挙動を示すことを、先行研究において DLS および SANS 測定より明らかにしている¹¹⁾。OVA-OTF 系と pOVA-OTF 系とでナノ粒子の粒子径が異なったことは、ナノ粒子の形成過程における OVA と pOVA の熱凝集挙動の違いが、得られるナノ粒子の物性に影響を与えることを示唆している。

得られたナノ粒子の ζ -電位を r もしくは r' を横軸にとりプロットしたグラフを Figure 2 に示す。OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子の ζ -電位は、ともに r および r' の増加に伴って負の値から正の値の方向に変化した。OVA の仕込み比の増加に伴って、ナノ粒子表面の負電荷が大きくなるのは、OVA の等電点が OTF よりも低いことによるものと考えられる。また、OVA-OTF ナノ粒子の ζ -電位はいずれの r においても負の値を示したのに対して、pOVA-OTF ナノ粒子の ζ -電位は、 $0.33 < r' < 1.0$ の範囲では負の値を示し、 $r' = 2, 3$ においては、正の値を示した。さらに、両ナノ粒子の ζ -電位の比較より、いずれの混合比においても OVA-OTF ナノ粒子のほうがより負に帯電した表面をもつことが示唆された。OVA と pOVA の中性条件下におけるネットチャージは同じであることから、この ζ -電位の差は、一次構造の違いからは説明ができない。先述のように、pOVA は OVA とは異なり水中でクラスターを形成する。ナノ粒子形成過程において、OVA は OTF と分子レベルで相互作用するのに対して、pOVA を用いた場合には pOVA クラスターと OTF が相互作用すると考えられる。このような違いにより、ナノ粒子内の両タンパク質の分布の違いが

Figure 3. Fluorescence spectrum of ANS in the presence of (a) OVA-OTF and (b) pOVA-OTF nanoparticles.

生じ、その結果として ζ -電位が両ナノ粒子で異なったのではないかと現在のところ考えている。

次に OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子の表面疎水性を、極性プローブである 1,8-アニリノナフタレンスルホン酸 (ANS) を用いて評価した (Figure 3)。ANS は水中ではわずかな蛍光しか示さないが、ポリペプチドの疎水性領域に結合した時には短波長シフトし、その蛍光強度は顕著に増加することが知られている¹⁹⁾。ナノ粒子分散液 (0.5 mM リン酸緩衝液) に、濃度 100 μ M の ANS を添加し、350 nm で励起させたときの蛍光スペクトルを測定した。その結果、いずれのナノ粒子共存下においても、ANS の蛍光波長は短波長シフトするとともに、その強度は増加することが確認された。この結果より、OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子は表面に疎水性領域をもつことが示唆された。また、両

Figure 4. (Color online) TIRF images of polystyrene substrates coated with (a) OVA-OTF and (b) pOVA-OTF nanoparticles. r and r' represents the mixing ratio of [OTF]/[OVA] and [OTF]/[pOVA], respectively. Scale bars represent 10 μ m.

ナノ粒子ともに、 $r=2, 3$ のときにより顕著な蛍光強度の増加がみられた。ANS測定を行ったpH条件では、OVA ($pI=4.8$)が負に帯電しているのに対して、OTF ($pI=6.8$)はほぼ電的に中性である。そのため、OTFの含率が大きいほど、ANS蛍光の強度が増大したと考えられる。

3.2 OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子のポリスチレン基板への吸着

ポリスチレン基板表面に、蛍光標識化 OVA-OTF ナノ粒子あるいは pOVA-OTF ナノ粒子分散液を 100 μ L マウントし、室温において一時間静置した後、PBS により洗浄した。この基板を全反射顕微鏡により観察したところ、基板全体より蛍光が認められたことからナノ粒子の吸着を確認した (Figure 4)。また、 r の値が小さいときには均一にナノ粒子が吸着しているのに対して、 r の値が大きいときにはナノ粒子が凝集し、不均一に吸着している様子がうかがえる。これは、OTF の等電点が 6.8 であ

Figure 5. Contact angles of polystyrene substrates coated with OVA-OTF and pOVA-OTF nanoparticles. (closed circle: OVA-OTF nanoparticles, open circle: pOVA-OTF nanoparticles)

ることから、OTF リッチなナノ粒子は中性条件下でより凝集しやすいためであると考えられる。

次に、種々の OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子を吸着させた基板の接触角を測定した (Figure 5)。いずれのナノ粒子を吸着させた基板の接触角も、ナノ粒子を吸着させていないポリスチレン基板の接触角 (90°) よりも、小さな値を示した。このことから、OVA-OTF ナノ粒子もしくは pOVA-OTF ナノ粒子の吸着により PSt 基板表面が親水化されていることがわかった。

また、いずれの粒子においても、 r の値が小さいほど接触角はより小さな値を示したことから、ナノ粒子中の OTF の含率が低いほど基板をより親水化させることがわかった。これは、OTF 含率が低いほど親水性が高く (Figure 3)、ナノ粒子が均一に吸着しているためだと考えられる (Figure 4)。さらに、両ナノ粒子間で比較すると、pOVA-OTF ナノ粒子を吸着させたほうがより小さな接触角を示した。ζ電位は、pOVA-OTF よりも OVA-OTF ナノ粒子のほうが負の値を示していることから、吸着量が両ナノ粒子で同じであれば、OVA-OTF ナノ粒子のほうが PSt 基板をより親水化すると考えられる。実験結果はこの予測に反していることから、コーティング表面の濡れ性の違いは、基板への吸着量が両ナノ粒子で異なっているためではないかと現在のところ考えている。

3.3 OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子をコートしたポリスチレン基板上での HepG2 細胞の培養

種々の OVA-OTF ナノ粒子および pOVA-OTF ナノ粒子を吸着させた基板上で、ヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞の培養を行い、播種三日後の細胞の形態を観察した (Figure 6)。いずれの画像においても、孤立した細胞に加えて細胞凝集塊がみられた。細胞凝集塊が多く存在することから、位相差顕微鏡画像より基板への細

Figure 6. (Color online) Phase contrast microscope image of HepG2 cells cultured for 3 days on the polystyrene surface coated with OVA-OTF nanoparticles (a) and pOVA-OTF nanoparticles (b), and on the bare polystyrene substrates (c). r and r' represents the mixing ratio of [OTF]/[OVA] and [OTF]/[pOVA], respectively. Scale bar represents 200 μm .

胞接着数を見積もることは困難である。そこで、各ナノ粒子コーティング基板への細胞接着挙動の違いを表す指標として、孤立して存在している細胞数に占める、伸展している細胞数の割合(伸展率)を位相差顕微鏡観察画像より算出した。

OVA-OTF ナノ粒子をコートした場合、すべての OTF/OVA 比において、非コーティングのポリスチレン基板よりも高い細胞伸展率を示した (Figure 7a)。このことより、OVA-OTF ナノ粒子のコーティングにより細胞接着が促されていることが示唆された。一般的に基板の濡れ性は細胞接着に影響を与えることが知られている²⁰⁾。上述のように、ポリスチレン基板の接触角は 90° であったのに対して、OVA-OTF ナノ粒子をコートした基板の接触角は、 30° から 50° 程度であった。OVA-OTF

Figure 7. The ratio of stretched cells of HepG2 cells cultured for 3 days on the polystyrene surface coated with OVA-OTF nanoparticles (a) and pOVA-OTF nanoparticles (b). * $p < 0.05$ to the PSt substrates, ** $p < 0.01$ to the PSt substrates.

ナノ粒子コーティングによって疎水性のポリスチレン基板が適度に親水化されたことで細胞が接着しやすくなったと考えられる。また、Figure 6a に示すように、OVA-OTF ナノ粒子コーティング基板上では、伸展した細胞の上に細胞凝集塊が吸着している様子が観察された。これは、細胞播種後に一部の細胞が基板表面に接着して伸展する一方で、基板表面に接着できなかった細胞が細胞間どうしの接着により細胞凝集塊を形成し、この細胞凝集塊が伸展細胞に接着したものと考えられる。

一方、pOVA-OTF ナノ粒子をコートした場合では、興味深いことにナノ粒子の組成によって異なる細胞接着挙動を示した (Figure 7b)。 r の値が 3 のときには、PSt 表面と比較して高い伸展率を示した。これは、 $r=3$ のナノ粒子はカチオン性表面をもつために、細胞接着にかかわるタンパク質が基板により吸着しやすくなったことによると考えられる。また、伸展細胞は基板に一樣ではなく局所的に観察された。これは、全反射顕微鏡で観察されたようにナノ粒子の吸着が不均一であることによると考えられる。一方、 r の値がより小さい場合には、PSt 表面と比較して低い伸展率を示した。これは、OTF の含率が小さいナノ粒子は、より負電荷を帯びた表面をもち、

より均一に PSt 基板に吸着することと関連していると考えられる。

以上のように、OVA-OTF 系と pOVA-OTF 系で違いが生じた理由としては以下のことが考えられる。上述のように、OVA と pOVA では、水中における分散状態や熱凝集挙動が異なる。この違いが、ナノ粒子を構成する OVA/OTF (pOVA/OTF) の組成比、会合分子数、ナノ粒子内での両タンパク質の分布などに影響を与え、その結果として、粒子径、 ζ -電位および分散性の異なるナノ粒子が得られたものと考えられる。さらに、このようなナノ粒子の物性の違いは PSt 基板表面への吸着性にも影響を与えることから、コーティング表面の接触角やコーティング表面への細胞接着挙動に違いが生じたと考えられる。

近年、細胞接着には表面の物理化学的性質に加えて、基板表面の力学的特性やトポロジーが大きく影響を与えることが知られている²¹⁾。したがって、ナノ粒子をコーティングした基板への細胞接着挙動をより深く理解するためには、ナノ粒子のコーティング量や均一性、表面形状や力学的強度などをより多角的に解析することも必要であると考えられる。

4 結 論

本研究では、OVA と OTF もしくは pOVA と OTF の混合溶液を熱処理することで卵白タンパク質ナノ粒子を作製した。両タンパク質の仕込み混合比を種々変化させたところ、OVA もしくは pOVA の仕込み比率が増加するにつれて、 ζ -電位はより大きな負の値を示した。同一仕込み比において、OVA-OTF ナノ粒子と pOVA-OTF ナノ粒子とを比較すると、OVA-OTF ナノ粒子のほうが粒子径はより小さく、 ζ -電位はより負の値を示すことがわかった。ANS 蛍光プローブを用いた解析より、両ナノ粒子はともに疎水性表面をもつことが示された。また、ナノ粒子をポリスチレン基板にコーティングすることで、基板表面が親水化されることがわかった。基板の接触角は、OVA もしくは pOVA の仕込み比率が大きいほど小さな値であり、また OVA-OTF ナノ粒子よりも pOVA-OTF ナノ粒子をコーティングした場合により小さな値であった。さらに、ナノ粒子をコーティングしたポリスチレン基板上での HepG2 細胞の培養を検討したところ、OVA-OTF ナノ粒子をコーティングした場合には、ナノ粒子の組成にかかわらず基板への細胞接着は促進されることがわかった。一方、pOVA-OTF ナノ粒子をコーティングした場合には、ナノ粒子の組成によって、基板への細胞接着性が大きく変化することがわかった。以上より、卵白タンパク質ナノ粒子によるコーティングは、細胞の接着・非接着を制御するための表面改質法として有用であることが期待される。現在、細胞接着を抑

制するためのコーティング剤としては 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーが²²⁾、促進するためのコーティング剤としてはコラーゲン²³⁾やポリリジン²⁴⁾などが用いられている。今後、ナノ粒子の PSt に対する親和性や脱着性を定量的に評価することで、ポリマー系のコーティング剤としての性能を比較する。これに加えて、ナノ粒子の組成をより最適化することで、表面改質剤としての性能の向上を試みるとともに、ナノ粒子が細胞接着を促進もしくは抑制するメカニズムについても詳細な解析を行う。

文 献

- 1) A. Ito, H. Jitsunobu, Y. Kawabe, and M. Kamihara, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 371 (2007).
- 2) S. R. Khetani and S. N. Bhatia, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 120 (2008).
- 3) K. Yoshimoto, M. Ichino, and Y. Nagasaki, *Lab Chip*, **9**, 1286 (2009).
- 4) P. Chetprayoon, M. Matsusaki, U. Yokoyama, T. Teijima, Y. Ichikawa, and M. Akashi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **55**, 4461 (2016).
- 5) K. Matsuura, I. Sugimoto, Y. Kuroda, K. Kadowaki, M. Matsusaki, and M. Akashi, *Anal. Sci.*, **32**, 1171 (2016).
- 6) T. Y. Chang, V. G. Yadav, S. De Leo, A. Mohedas, B. Rajalingam, C. L. Chen, S. Selvarasah, M. R. Dokmeci, and A. Khademhosseini, *Langmuir*, **23**, 11718 (2007).
- 7) T. Nicolai and D. Durand, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **18**, 249 (2013).
- 8) E. Doi, T. Koseki, and N. Kitabatake, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1697 (1987).
- 9) N. Tanaka, Y. Morimoto, Y. Noguchi, T. Tada, T. Waku, S. Kunugi, T. Morii, Y.-F. Lee, T. Konno, and N. Takahashi, *J. Biol. Chem.*, **286**, 5884 (2011).
- 10) Y. Kawachi, R. Kameyama, A. Handa, N. Takahashi, and N. Tanaka, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 8668 (2013).
- 11) T. Hiroi, Y. Okazumi, K. C. Littrell, Y. Narita, N. Tanaka, and M. Shibayama, *Polymer*, **93**, 152 (2016).
- 12) A. Jerez, P. Partal, I. Martinez, C. Gallegos, and A. Guerrero, *J. Food Eng.*, **82**, 608 (2007).
- 13) G. Farrar, J. Barone, and A. Morgan, *J. Tissue Eng.*, **2010**, 1 (2010).
- 14) S. Wongsasulak, M. Patapeejumruswong, J. Weiss, P. Supaphol, and T. Yoovidhya, *J. Food Eng.*, **98**, 370 (2010).
- 15) C. Kojima, R. Kameyama, M. Yamada, M. Ichikawa, T. Waku, A. Handa, and N. Tanaka, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 1804 (2015).
- 16) S. Yu, J. Hu, X. Pan, P. Yao, and M. Jiang, *Langmuir*, **22**, 2754 (2006).
- 17) S. Yu, P. Yao, S. M. Jiang, and G. Zhang, *Biopolymers*, **83**, 148 (2006).
- 18) J. Hu, S. Yu, and P. Yao, *Langmuir*, **23**, 6358 (2007).
- 19) G. V. Semisotnov, N. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas, and R. I. Gilmanshin, *Biopolymers*, **31**, 119 (1991).
- 20) E. A. Vogler, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **74**, 69 (1998).

- 21) S. P. Garland, C. T. McKee, Y. R. Chang, V. K. Raghunathan, P. Russell, and C. J. Murphy, *Langmuir*, **30**, 2101 (2014).
- 22) K. M. Defife, J. K. Yun, A. Azeez, S. Stack, K. Ishihara, N. Nakabayashi, E. Colton, and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 431 (1995).
- 23) J. Yang and S. Nandi, *Int. Rev. Cytology*, **81**, 249 (1983).
- 24) E. Yavin and Z. Yavin, *J. Cell Biol.*, **62**, 540 (1974).

[Original Papers]

Preparation of Nanoparticles Composed of Egg White Protein and their Application for Cell Adhesion Control

Tomonori WAKU^{*1}, Kaori KANAMARU^{*1}, Yoshinori HIROYAMA^{*1}, Ruriho SASAKI^{*1}, Naoya MORIMOTO^{*1}, and Naoki TANAKA^{*1}

^{*1}*Faculty of Molecular Chemistry and Engineering, Kyoto Institute of Technology (Gosyokaido-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan)*

In this study, we addressed the control of cell adhesion to polymer substrates, using nanoparticles composed of ovalbumin (OVA) and ovotransferrin (OTF) as a surface modifier. In addition to OVA and OTF, the nanoparticles consisting of pOVA and OTF were prepared and their physical properties and functions were also investigated, where pOVA is a large OVA fragment lacking in N-terminal 22 residues. The mixed aqueous solutions containing OVA and OTF, or pOVA and OTF, were heated to form nanoparticles with a diameter of 40–80 nm. The feed ratio of the two kinds of proteins affected the ζ -potentials of obtained nanoparticles. ANS fluorescence assay revealed that both OVA-OTF and pOVA-OTF nanoparticles possessed hydrophobic surfaces. Coating poly(styrene) substrates with the nanoparticles increased the hydrophilicity of their surfaces. In addition, HepG2 cells were cultured on the nanoparticles-coated poly(styrene) substrates. When coated with OVA-OTF nanoparticles, the cell adhesion to the substrate was promoted regardless of the OTF/OVA ratio of nanoparticles. On the other hand, when pOVA-OTF nanoparticles were coated, the cell adhesion was promoted or suppressed depending on the OTF/pOVA composition. Thus, coating polymeric substrates with the nanoparticles composed of egg white proteins may be a useful method for the control of cell adhesion.

KEY WORDS Cell Adhesion / Cell Culture / Nanoparticle / Ovalbumin / Spheroid /

(Received September 11, 2017; Accepted October 20, 2017; Advance Publication December 12, 2017)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **75**, 61—68 (2018)]

©2018, The Society of Polymer Science, Japan