研究論文

ガラス表面へのヘモグロビン初期吸着過程の Langmuir 吸着等温式を用いた検討

吉田貴充*, 浅野 肇*, ホセ サントス**, 祁 志美**, 孫 立賢**,*^{***},
高津章子***, 加藤健次***, 松田直樹**

*筑波大学 工学研究科 (〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

**産業技術総合研究所 界面ナノアーキテクニクス研究センター (〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1)

***産業技術総合研究所 計測標準研究部門 (〒305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1)

****中国科学院大连化学物理研究所 (116023 中国大連市中山路 457 号)

Studies on Initial Adsorption Process of Hemoglobin onto the Glass Surfaces by Using Langmuir Adsorption Isotherm

Takamitsu YOSHIDA*, Hajime Asano*, Jose H. SANTOS**, Zhi-mei QI**, Li-Xian SUN**,*^{***},
Akiko TAKATSU***, Kenji KATO*** and Naoki MATSUDA**

*Institute of Materials Science, University of Tsukuba (1-1-1, Tennoudai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577)

**Nanoarchitectonics Research Center, AIST (1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8565)

***National Metrology Laboratory, AIST (1-1-1, Umezono, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8563)

****Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences
(457, Zhongshun Road, Dalian City, 116023, Peoples Republic of China)

The adsorption process of hemoglobin onto glass surfaces having different hydrophobicities was studied using slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy. Non-treated glass was employed as a hydrophilic surface. Hydrophobic glass surfaces were treated by octyltrichlorosilane (OTS) in toluene. Two distinct stages of adsorption process were observed with hydrophobic surface. The rapid attainment of the steady-state (up to 2 minutes) of the absorbance value was also noticeable when using a hydrophilic surface. The adsorption data obtained for hemoglobin on both hydrophilic and hydrophobic surfaces were examined using the Langmuir's adsorption isotherm at extremely short time (up to 12 seconds). Results showed that the first stage of adsorption process followed the Langmuir's adsorption isotherm.

Key Words: Slab Optical Waveguide (SOWG), Hemoglobin, Hydrophilic Surface, Hydrophobic Surface, Langmuir's Adsorption Isotherm

1. 緒 言

近年のナノテクノロジーの進歩により物質の表面への吸着は、さまざまな分野において重要な現象として注目が集まっている^{1),2)}。そのためさまざまな手法により表面・界面における現象の解明が行われているが、その中でも光を用いた測定方法は微量試料に対しても高感度であるため大変有効な方法として利用されている。我々の研究室ではスラブ光導波路 (slab optical waveguide: SOWG) 分光法を用いてさまざまな固液界面の吸着現象について研究を行っている。一般に SOWG は屈折率の異なる複数の薄膜から成る多層構造をもつ平板型の光導波路の一種³⁾で、SOWG には石英やガラス薄膜が主に用いられている。SOWG のコアに光を伝播させたときに表面に生じるエバネッセント波が表面付近の物質と選択的に相互作用することの特徴としている。また SOWG はコア内を光が伝播する際に多重反射を利用しているために

非常に高感度である⁴⁾。我々の開発した SOWG 分光法は、幅広い波長範囲の光を同時に伝播させることが可能で、界面に極微量だけ吸着した物質の吸収スペクトルのその場測定を行うのに特に適している^{5)~12)}。

ヘモグロビンは生体内で呼吸機能を担う代表的なタンパク質分子の一つであり、ナノメートルオーダーの大きさを有している。そのためヘモグロビンの機能の応用が期待されている。本来、生体内の物質であるタンパク質分子を生体外で利用するためには表面に固定化する必要がある。ガラスは安価で加工しやすく電極などを付加しやすいことから多くの分野で使用されており、生体内からとりだしたタンパク質分子をガラス表面に固定化することによりタンパク質分子の性質の基礎的検討やその機能を応用したセンサーなどの実現が期待される。しかしタンパク質分子の表面への吸着過程は未だ解明されていない点も多い。これまでにタンパク質分子の表面への吸着過程について検討された報告では、表面に吸着した

タンパク質分子は形態変化が起こり不可逆な吸着挙動を示すという複雑な吸着過程が用いられている^{13),14)}。一方、初期吸着過程に限定すると可逆な吸着過程を示す可能性も示唆されている¹⁵⁾。これまでの我々の研究からヘモグロビンの SOWG 表面への吸着は測定開始直後に吸光度が大きく変化し、その後の吸着過程は表面の状態によって違いがでることを確認している¹⁶⁾。このことからヘモグロビンの SOWG 表面への吸着は主に初期吸着過程で行われると考えている。そのためヘモグロビンの表面への初期吸着過程を理解することは、吸着過程全体を理解する上でも非常に重要であると考えられる。

本研究では SOWG 分光法を用い、親水性と疎水性のガラス表面へのヘモグロビンの吸着過程について研究を行った。特に測定開始直後におけるヘモグロビンのガラス表面への初期吸着過程についてより詳細な知見を得るために時間分解測定を行い、その結果を基に Langmuir 吸着等温式による解釈が可能かどうか検討を行った。

2. 実験方法

SOWG 分光装置に関しては以下に簡単に説明する^{3)~12)}。光源にはキセノンランプを用い、光ファイバーを用いて光学系まで導いた。光ファイバーを出た光は Qi¹⁷⁾らが開発した新規のカップリング方法により SOWG に導入し、SOWG を透過した光は対物レンズを通り再び光ファイバーへ入り、光ファイバーにつながれた分光器を経て最終的に CCD により検出される。中央部分を切り抜いたテフロン製のセルを SOWG 上に置き、そこに試料溶液を保持させた。SOWG には 50 μm の厚さのガラス薄膜 (26 mm $\times$ 50 mm, 松浪ガラス工業製) を使用した。ガラス薄膜は Octyltrichlorosilane (OTS, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{Cl}_3\text{Si}$; MW 247.67, Fulka 製) で表面処理していないもの、1 分間処理したもの、1 時間処理したものの 3 種類を使用した。SOWG の表面処理は次のように行った。はじめにガラス薄膜を 0.1 M の HCl で洗浄後、純水、エタノールで洗い流し 100°C の乾燥器で約 1 時間乾燥を行った。次に乾燥したガラス薄膜を、約 10% (v/v) に調整した OTS 溶液に 1 分間または 1 時間浸し表面処理を行った。溶媒には脱水トルエン (和光純薬工業製) を使用した。表面処理後、脱水トルエン、エタノールで洗浄し約一晚、100°C で乾燥した。以下、表面処理をしていないものを Bare-SOWG, OTS で 1 分間処理したものを OTS-SOWG-1 M, 1 時間処理したものを OTS-SOWG-1 H と記す。作製した SOWG は、測定前にそれぞれ接触角を測定した。吸収スペクトルの記録は PMA-11 (浜松ホトニクス製) を用いて行った。測定には溶媒に純水を用いて調整した 1 μM ヘモグロビン溶液を用いた。実際の測定ではテフロン製セル内に溶媒 (純水) を入れたときと試料溶液を入れたときのそれぞれの透過スペクトルを測定し、各波長ごとの透過光の強度比の対数から吸収スペクトルを得た。吸収スペクトルの測定条件は、はじめに時間分解測定を照射時間 50 ms で 250 回記録を行い、続けて照射時間 50 ms で 20 回平均した値を 5 秒おきに 120 回記録を行った。時間分解測定により得られた結果は Langmuir 吸着等温式を用いて検討を行った。

3. 結果および考察

本研究で用いた Bare-SOWG, OTS-SOWG-1 M, OTS-SOWG-1 H の表面の状態を判断するために接触角の測定を行った。その結果を図 1 に示す。Bare-SOWG, OTS-SOWG-1 M, OTS-SOWG-1 H の接触角はそれぞれ 67°, 95°, 100°であった。OTS で表面処理をすることによって、表面の状態は親水性から疎水性になり、さらに表面処理時間の増加によって疎水性の傾向が増していることを確認した。

ヘモグロビン溶液の Bare-SOWG, OTS-SOWG-1 M, OTS-SOWG-1 H 表面への吸着過程を調べるため吸収スペクトルの測定を行った。吸収スペクトルの測定は試料溶液添加約 20 秒後から 5 秒間隔で 120 回行った。その結果を図 2 に示す。図中には測定開始から 10 分経過後の吸収スペクトルを示した。いずれの場合も吸収ピークは 410 nm 付近に現れており文献値¹⁸⁾とも良く一致した。吸収ピークの位置は OTS で表面処理したもののほうがわずかに (1~2 nm) に高波長側に現れる傾向があった。また疎水性が増すと吸収スペクトルの形状はよりブロードになる傾向が観察された。疎水性表面よりも親水性の表面の方が高い吸光度を示したが、疎水性表面同士 (OTS-SOWG-1 M, OTS-SOWG-1 H) では接触角と吸光度に相関性はみられなかった。図中右上に 410 nm 付近の吸収ピークの吸光度を測定時間に対してプロットした結果を示した。Bare-SOWG は測定時間に対してほぼ一定の吸光度を示した。一方、OTS-SOWG-1 M と OTS-SOWG-1 H では測定時間の増加とともに吸光度も増加していった。

以上の結果からヘモグロビンの SOWG 表面への吸着過程は、親水性表面では短時間 (~2 分) で吸着が終了しその後ほとんど吸光度は変化しない吸着過程を示した。一方疎水性表面では短時間 (~2 分) で吸光度が大きく増加し、その後も少しずつ吸光度は増加し吸着の終了には長時間 (10 分以上) を

Fig. 1 Relationship between contact angle and surface treatment of slab optical waveguide (SOWG): (a) Bare-SOWG; (b) SOWG coated by octyltrichlorosilane (OTS) solution for 1 minute (OTS-SOWG-1 M); (c) SOWG coated by OTS solution for 1 hour (OTS-SOWG-1 H).

Fig. 2 Absorption spectra of adsorbed hemoglobin from $1\mu\text{M}$ solution obtained using slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy : (a) Bare-SOWG ; (b) SOWG coated by octyltrichlorosilane (OTS) solution for 1 minute (OTS-SOWG-1M) ; (c) SOWG coated by OTS solution for 1 hour (OTS-SOWG-1H). Inset : time dependent change in absorbance at 410 nm upon introduction of $1\mu\text{M}$ hemoglobin solution in water. Spectroscopic data were gathered at 50-ms exposure time, averaged 20 times and measured at a time interval of 5 s for 10 min.

要するような2段階から成る吸着過程を示した。これは他の報告¹²⁾とも良く一致している。

表面の状態がヘモグロビンの表面への吸着過程に大きな影響を及ぼしているが、吸光度の増加に注目すると親水性、疎水性表面によらず大きく吸光度が増加しているのは測定開始直後であった。そのため測定開始直後の吸光度の変化に注目しより詳細な検討を行った。

測定開始直後の短時間の吸光度の変化を観察するために時間分解測定を行った。時間分解測定は、露光時間 50 ms で 250 回測定を行った。図 3 に $1\mu\text{M}$ ヘモグロビン溶液を用いた時の時間分解測定の結果を示す。親水性、疎水性表面のいずれでも測定開始直後に吸光度が大きく増加している様子を観察することができた。本研究では測定開始から約 10 分間の吸着過程を観察したが、図 3 の結果から測定開始直後 (~12 秒) に少なくとも半分程度の吸着過程が行われていると考えられる。

タンパク質分子の表面への吸着過程についてはすでに幾つかの報告がなされており^{13,14)}、そのメカニズムは2つのステップから成る不可逆な吸着脱離を示すと考えられている。まず吸着過程の初期においてタンパク質分子は可逆的に表面に吸着する。その後、吸着したタンパク質分子はより安定な状態へと形態変化が起こるため不可逆な吸着脱離を示すモデルが提案されている。Krisdhasima ら¹⁴⁾は長い測定時間 (~480 分) を対象として、疎水性表面へのタンパク質分子の吸着過程を2つのステップから成る複雑な吸着過程で考察し

Fig. 3 Absorption spectra of adsorbed hemoglobin from $1\mu\text{M}$ solution obtained using slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy : (a) Bare-SOWG ; (b) SOWG coated by octyltrichlorosilane (OTS) solution for 1 minute (OTS-SOWG-1M) ; (c) SOWG coated by OTS solution for 1 hour (OTS-SOWG-1H). Spectroscopic data are gathered at a 50-ms time interval for about 12 s.

ている。一方 Walton ら¹⁵⁾の報告では吸着直後に限定するとタンパク質分子は可逆に吸着し、その吸着過程は Langmuir 吸着等温式に従うと示唆している。Langmuir 吸着等温式では表面に吸着した分子が単分子層を越えない、吸着分子間には相互作用が働かないと仮定している¹⁹⁾。

これまでの結果から親水性表面では短時間 (~2 分) で一定の吸光度を示すことから、初期吸着過程が吸着過程全体に大きく影響していると考えられる。また疎水性表面における2段階の吸着過程は、測定開始直後の急激な吸光度の増加を示す初期吸着過程とその後続く緩やかな吸光度の増加を示す吸

着過程に分けられると考えられる。

そこで本研究では図3から得られた結果をもとに、親水性、疎水性表面いずれの場合でも測定開始直後の吸光度が急激に増加する部分とその後続く部分は吸着過程が異なるものとし、測定開始直後の初期吸着過程はLangmuir吸着等温式に従うかどうか検討を行った。この場合測定開始から12秒以内に吸着が平衡に達し、その吸着過程はLangmuir吸着等温式に従い、吸着した分子は単分子層を越えず相互作用も起こらないと仮定した。

OkahataらによればQCM上に固定化したホスト単分子層に水素結合によりゲスト分子が吸着する吸着平衡が以下の式のように書ける時、

ある時間 t における分子の表面への被覆率 Γ_t は次のように表すことができる^{20)~22)}。

$$\Gamma_t = [host/guest]_t = [host/guest]_e (1 - e^{-t/\tau}) \quad (2)$$

$$\Gamma_t = \Gamma_e (1 - e^{-t/\tau}) \quad \cdots \cdots (3)$$

$$\tau^{-1} = k_1 [guest] + k_2 \quad \cdots \cdots (4)$$

ここで平衡に達した時の被覆率を Γ_e 、吸着の速度定数を k_1 、脱離の速度定数を k_2 、溶液の濃度を $[guest]$ とする。

また式(3)は以下のように書き換えることができる。

$$t/\tau = \ln[\Gamma_e/(\Gamma_e - \Gamma_t)] \quad \cdots \cdots (5)$$

本研究は、ガラス表面へのヘモグロビンの吸着過程について検討しており、上記のような一般的なホスト-ゲスト反応を用いて説明することは困難であると考えられる。しかしこれまでの実験結果からタンパク質分子のガラス表面への吸着は、それぞれの表面の持つ電荷のバランスの関係からガラス表面の単位面積あたりに吸着できるタンパク質分子の量が決定されるのではないかと考えている。そのためホストであるガラス表面にゲストであるヘモグロビンが均一に吸着するものと仮定して、Langmuir吸着等温式による検討を行った。

吸光度は皮膜量に依存するので Γ_t 、 Γ_e は吸光度 A_t 、 A_e としてそれぞれ表すことができる。

$$t/\tau = \ln[A_e/(A_e - A_t)] \quad \cdots \cdots (6)$$

吸光度の値は350 nmと450 nmの各点を結んで得られる直線をベースラインとして実測値を補正した。また測定時間 $t=0$ の時に吸光度 $A=0$ となるように補正した。さらに測定時間内(～12秒)における吸光度の最大値を平衡に達した時の吸光度と仮定すると式(6)の右辺が発散してしまうため、計算の都合上それよりもわずかに大きい値(1×10^{-7})を足した値を吸光度 A_e とした。実際の計算は、はじめに各測定時間における吸光度 A_t を式(6)に代入して各測定時間における τ を求め、式(6)から得られた τ と吸光度 A_t から吸光度 A_e の計算値を求めた。次に各測定時間 t 、各測定時間における τ 、吸光度 A_e の計算値を式(6)に代入して吸光度 A_t の計算値を求めた。最後に吸光度 A_t の実測値の合計から吸光度 A_t の計算値の合計を引いた値が最も小さくなるような τ の値を決定した。

図4に測定時間に対する吸光度 A_t の実測値とLangmuir吸着等温式から得られた曲線を示す。吸光度 A_t の実測値は点で、Langmuir吸着等温式から得られた曲線は実線で示した。その結果、Bare-SOWG、OTS-SOWG-1 M、OTS-

Fig. 4 Plots of absorbance of the sample at 410 nm versus time elapsed within the first 12 s after the start of measurement obtained using slab optical waveguide (SOWG) spectroscopy. The sample is $1 \mu\text{M}$ hemoglobin solution : (a) Bare-SOWG ; (b) SOWG coated by octyltri-chlorosilane (OTS) solution for 1 minute (OTS-SOWG-1 M) ; (c) SOWG coated by OTS solution for 1 hour (OTS-SOWG-1 H). Dotted lines are the experimental data while the solid lines are the results of curve fitting using the Langmuir's adsorption isotherm.

SOWG-1 HともにLangmuir吸着等温式とよく一致する結果が得られた。また吸着量の一番大きかったBare-SOWGの測定終了後、試料溶液を取り出し透過法により吸光度を測定した。試料溶液の濃度減少分をすべてSOWG表面への吸着とするとヘモグロビン分子の吸着量はほぼ単分子層程度であった。

これらの結果から測定開始直後(～12秒)における $1 \mu\text{M}$ ヘモグロビン溶液の表面への初期吸着過程は親水性、疎水性表面によらずLangmuir吸着等温式に従うこと、および吸着した分子は単分子層を越えず相互作用が働いていないことが示唆された。

親水性表面では短時間(～2分)で吸光度はほぼ一定の値を示すことから、測定開始直後(～12秒)で吸着がほとんど終了していると考えられる。そのため親水性表面における1

μM ヘモグロビン溶液の初期吸着過程は Krisdhasima らの用いた複雑な吸着過程ではなく、Langmuir 吸着等温式に従う吸着過程を示すと考えられる。

一方、疎水性表面では長時間(10 分以上)の測定を行うと 2 段階の吸着過程を示すことから、吸着が平衡に達するまでの吸着過程を十分に考慮するためには分子の形態変化や吸着分子層の複合化の影響も考慮に入れた複雑な吸着モデルを検討する必要があると考えられる。

4. 結 言

SOWG を用いて親水性表面、疎水性表面へのヘモグロビンの吸着過程について検討した結果、以下のことが明らかになった。

親水性表面へのヘモグロビンの吸着は短時間(～2 分)で終了しその後はほぼ一定の値を示した。一方、疎水性表面へのヘモグロビンの吸着過程は測定開始直後(～12 秒)に大きく吸光度が増加し、その後も吸光度は長時間(10 分以上)経過後も増加し続けたことから 2 段階の吸着過程から成ると考えられる。

$1\mu\text{M}$ のヘモグロビン溶液を用いた測定開始直後(～12 秒)における表面への初期吸着過程は Langmuir 吸着等温式に従うものと仮定して検討を行ったところ、表面の状態によらずヘモグロビンの SOWG 表面への初期吸着過程は Langmuir 吸着等温式によく一致した。このことから $1\mu\text{M}$ のヘモグロビン溶液の測定開始直後(～12 秒)における SOWG 表面への初期吸着過程は Langmuir 吸着等温式に従い、吸着した分子は単分子層を越えず相互作用も起こらないことが示唆された。しかし吸着が平衡に達するまでの吸着過程を考慮するには、本研究で用いた Langmuir 吸着等温式だけで説明するには困難だと考えられる。測定開始から数分経過後の吸着過程は表面の状態により異なることから、タンパク質分子の吸着過程と表面状態の相関についてさらに詳細な検討を行う必要があると考えられる。

(Received August 5, 2002 ; Accepted February 20, 2003)

文 献

1) 阿布力孜, 伊米提, 伊藤公紀, 村林眞行; *Electrochemistry*, 69,

863 (2001)

2) 福岡智司, 浦野博水, 小池国彦, 高橋和宏, 永田員也; 表面技術, 53, 341 (2002)

3) 加藤健次; ふんせき, 1995, 133 (1995)

4) 加藤健次; 物質工学工業技術研究所報告, 8, (3), 95 (2000)

5) K. Kato, A. Takatsu, N. Matsuda, R. Azumi and M. Matsumoto; *Chem. Lett.*, 1995, 437 (1995)

6) N. Matsuda, A. Takatsu and K. Kato; *Chem. Lett.*, 1996, 105 (1996)

7) K. Kato, A. Takatsu, N. Matsuda and Y. Sugitani; *Chem. Lett.*, 1997, 583 (1997)

8) N. Matsuda, A. Takatsu, K. Kato and Y. Shigesato; *Chem. Lett.*, 1998, 125 (1998)

9) K. Kato and A. Takatsu, N. Matsuda; *Chem. Lett.*, 1999, 31 (1999)

10) Z.-M. Qi, A. Yimit, K. Itoh, M. Murabayashi, N. Matsuda, A. Takatsu and K. Kato; *Opt. Lett.*, 26, 629 (2001)

11) 松田直樹, 祁志美, ホセサントス, 孫立賢, 高津章子, 加藤健次; 信学技報, 111, (575), 17 (2002)

12) J. H. Santos, N. Matsuda, Z.-M. Qi, A. Takatsu and K. Kato; *IEICE Trans. Electron.*, E 85-C, 1275 (2002)

13) V. Krisdhasima, J. McGuire and R. Sproull; *J. Colloid Interface Sci.*, 154, 337 (1992)

14) I. Lundström; *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 70, 76 (1985)

15) A. G. Walton and M. E. Soderquist; *Croat. Chem. Acta.*, 53, 363 (1980)

16) 吉田貴充, 浅野 肇, ホセ サントス, 祁志美, 高津章子, 加藤健次, 松田直樹; *IEICE Trans. Electron.*, J 85-C, 1070 (2002)

17) Z.-M. Qi, N. Matsuda, T. Yoshida, H. Asano, A. Takatsu and K. Kato; *Opt. Lett.*, 27, 2001 (2002)

18) 日本生化学会; 生化学データブック I, p. 121 (東京化学同人, 1979)

19) 化学大辞典編集委員会; 化学大辞典 9, p. 565 (共立出版, 1962)

20) Y. Ebara, K. Itakura and Y. Okahata; *Langmuir*, 12, 5165 (1996)

21) Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa and Y. Ebara; *Anal. Chem.*, 70, 1288 (1998)

22) K. Matsuura, Y. Ebara and Y. Okahata; *Thin Solid Films*, 273, 61 (1996)