

## 論文内容の要旨

### Abstract of Dissertation

#### **Regulation of protein interaction at the bio-interfaces prepared by well-defined phospholipid polymer**

(精密リン脂質ポリマーインターフェイスの設計を通じたタンパク質の相互作用の制御)

徐知勲 (SEO JI-HUN)

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合でつながっている生体高分子であり水を除いた生体構成要素の 80%を構成している。タンパク質の表面にはそれぞれのアミノ酸の残基に由来した多くの疎水性と親水性残基が混在しており、これらの表面残基は水素結合や疎水的相互作用など分子内あるいは分子間と複雑な相互作用を起こす原因となる。このようなタンパク質表面の性質は、多くの生体材料の設計において重要な考慮事項となる。例えば、人工材料が生体環境で使用される際、タンパク質と人工材料表面との間に相互作用がはたらき表面吸着が起こる。その結果、血栓形成や異物反応などの生体反応を引き起こすこととなる。このようなタンパク質・材料間の相互作用は“非特異的な相互作用”と呼ばれる。一方、タンパク質の独特な折り畳み構造は、代謝活動や免疫反応など様々な生体反応で特異的に関与することとなる。このようなタンパク質固有の機能性に由来した相互作用はタンパク質の“特異的な相互作用”と呼ばれる。

非特異的な相互作用によるタンパク質の吸着は、異物反応による免疫システム活性化の観点からは抑制すべき問題点であるが、生体内埋め込み材料においては組織再生を促すために必要な性質でもある。したがって、タンパク質と材料表面間の非特異的な相互作用の精密制御技術は組織工学を基にした医療デバイスの設計において極めて重要な課題となっている。一方、機能性タンパク質の固定化によって形成されたインターフェイスは、タンパク質の特異的な相互作用を促す表面となり、バイオセンサー及びバイオフィルターなど様々な医療デバイスの開発に応用されている。しかし、タンパク質は熱や光など外部の刺激により変性されやすいため、タンパク質の特異的な機能性を長時間維持するための新規バイオインターフェイスの開発が必要とされている。

本研究では 分子レベルでの表面構造を精密制御し、非特異的な相互作用に基づくタンパク質吸着制御可能な新規バイオインターフェイスの創製を目標とする。また、特異的な機能性の向上のためのタンパク質の安定化技術を確認することを目標とする。そのため主に疎水性相互作用に由来したタンパク質の非特異的な相互作用の抑制及び分子間相互作用によるタンパク質の変性の防止に優れた効果を有している細胞膜リン脂質由来の 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーを利用した新規バイオインターフェイスの構築を行い、タンパク質相互作用の制御を試みた。

## 1. 非特異的な相互作用制御に向けた新規バイオインターフェイスの創製

タンパク質の非特異的な相互作用の制御に向けた新規バイオインターフェイスの創製を行うため MPC ポリマーを用いた表面修飾方法を次の三つのカテゴリに分けて研究を進めた。

- a. PMPC 共重合のコーティング表面による非特異的なタンパク質吸着抑制が可能なインターフェイスの創製
- b. PMPC 共重合の相分離構造を用いた非特異的なタンパク質吸着抑制および細胞接着制御が可能なインターフェイスの創製
- c. 膨潤 - 収縮挙動を用いた表面修飾法による非特異的なタンパク質吸着抑制が可能なインターフェイスの創製

a. 本研究では poly(dimethylsiloxane) (PDMS) の表面上での非特異的な相互作用の抑制技術を研究目標とした。PDMS は 成形性がよく透明でかつ弾性力や酸素透過性が優れていることからマイクロ流路をはじめとしたバイオチップやコンタクトレンズなど生体材料として幅広く応用されている材料である。しかし、一般的に疎水性表面はタンパク質の非特異的な吸着を起し、ノイズの増加、または生体内埋め込み材料としての炎症反応を誘発する短所がある。特に PDMS の場合、表面の疎水性が親水性表面処理剤の溶解性と大きく離れていることから濡れ性の問題などが生じ、均一な表面処理が難しい。そのため、現在報告されている多くの研究は表面開始重合や化学架橋による親水性ポリマーの表面固定化方法である。しかし、これらの表面処理法は反応、精製の段階を含んだ多数の工程を必要とし、さらに残留モノマーやラジカルによる副反応の恐れもあり生体材料の工学的な作製における効率性や安定性の問題が存在している。本研究では PDMS との相互作用向上のため dimethylsiloxane (DMS) ユニットを有するモノマーを MPC と共重合させブロック及びランダム共重合体の分子設計を通じて PDMS の表面を容易に処理できる最適化された分子構造を調べた。その結果 DMS の組成が 70% 以上のランダム型ポリマーが最も安定に固定化できることを明らかにした。またコーティング時間や濃度の調節により、PDMS 表面でタンパク質の非特異的な吸着の抑制が可能な表面処理技術を確立した。

b. 細胞—材料表面間相互作用の接着抑制技術は再生医療や細胞分化ツールの開発など医療デバイスの開発において必要とされる技術である。しかし細胞—材料間相互作用の制御は複雑な表面作製が必要とされるためより簡単な方法で細胞—材料間相互作用を制御できる技術を確立することが重要である。本研究では細胞と材料間相互作用の制御技術として MPC ブロック共重合体の相分離構造を利用した新規バイオインターフェ

イスモデルを提案する。PMPC によって形成されるポリマー表面は高い水和度を維持するためタンパク質の吸着に由来した細胞の接着が起こりにくい表面である。したがってタンパク質の吸着が起こりやすい疎水性の PDMS ユニットとブロック共重合体を作製し、自己組織化による相分離構造を形成させることで親水性でありながらもタンパク質の選択的な吸着が可能な表面を作製する。その結果、表面と細胞間の接着力及び増殖率をナノドメインサイズの制御だけで簡単に制御できると期待される。選択的なタンパク質の吸着を誘発させるため種々の組成の PMPC と PDMS のブロック共重合体を重合し、キャスト法により相分離構造を作製した。その後、タンパク質吸着実験後の透過型電子顕微鏡観察や定量分析した結果、疎水性ドメインのサイズが増加することによりタンパク質の吸着量も増え、疎水性ナノドメインでのタンパク質の選択的な吸着が起こっていることを明らかとした。細胞の接着実験の結果、疎水性ドメインが増えていくことにより細胞の接着及び増殖の制御が可能であることを明らかとした。

c. 細胞培養環境での機械的な刺激は細胞の形状や分化誘導において重要な変数となる。例えば細胞培養中のストレッチングは細胞の整列が可能とさせ、神経及び筋細胞の培養に有用な環境を提供できる。また細胞培養表面の硬さは心筋細胞など特定細胞への分化に大きな影響を与えると知られ、機械的な環境が制御可能な細胞培養ツールの開発は重要な研究課題となっている。さらに培養組織に損傷を与えずに回収できる技術の確保も求められている。本研究では機械的な特性が簡単に制御可能な PDMS を利用しタンパク質の可逆的な吸着を誘導できる新規バイオインターフェイスの創製を通じ、機械的な刺激及び可逆的な細胞の培養・回収が可能で新規培養ツールの開発を目標とした。PDMS の膨潤—凝縮特性を利用し、PMPC—PDMS のブロック共重合体を PDMS の中に浸透させ、水中での拡散効果を応用することで PMPC セグメントの表面拡散を誘導し、親水性表面への転換が可能な PDMS 表面を作製した。拡散時間によって表面の親水性の増加やそれに伴ったタンパク質の吸着量低下が見られ、拡散時間による可逆的なタンパク質の吸着表面の作製が可能であることを明らかとした。また親水性の増加によって細胞の接着も大きく低下し、細胞の接着及び増殖の制御可能性を示した。この表面修飾法と架橋度を変えることで硬さ等の機械的な性質を変えた PDMS 基材とを組み合わせることにより新規培養ツールの開発へつながると期待される。

## **2. タンパク質の特異的な機能性の保持安定化に向けた新規バイオインターフェイスの創製**

抗体及び酵素などの機能性タンパク質の固定化表面はバイオチップを中心とした医療診断分野や生理活性システムを模倣したバイオリアクターなど幅広い分野で応用されているバイオインターフェイスである。これらの分野はタンパク質が有している独自の特異的な機能性をそのまま生かし体外環境での応用を目指す分野であり、タンパク質

機能性の高効率発現及び長期安定化が可能なインターフェイスの開発が重要である。タンパク質の特異的な機能性は主にタンパク質の二次、三次構造から由来するものであり、この構造は外部の環境、主に熱によって変性されやすいため、機能性タンパク質の応用においてタンパク質の安定性確保は極めて重要な課題となる。したがって、本研究ではタンパク質の安定性保持に向けた新規リン脂質ポリマーインターフェイスの構築を目指して研究を行った。MPC ポリマーは他の親水性ポリマーに比べ、高いレベルの水和度を維持するため、タンパク質とのコンジュゲーションは、タンパク質周辺に厚い水和層を形成させることで、分子内部の非特異的な疎水性相互作用による変性を効果的に抑制できると期待される。ここでは、MPC ポリマーとタンパク質の精密コンジュゲーション技術の確立とタンパク質の安定性向上を目的とした。その結果、MPC ポリマーとコンジュゲートされたタンパク質の場合、天然状態に比べ熱に対する構造安定性が大きく改善されることを明らかにした。また、コンジュゲートポリマーの疎水性を変数とし、タンパク質の安定化に及ぼす影響を調べた結果、コンジュゲートポリマーの親水度がタンパク質の安定化において重要な変数であることを明らかにした。今後、この変数は、機能性タンパク質の安定な応用において材料設計の重要な基準になると考えられる。