

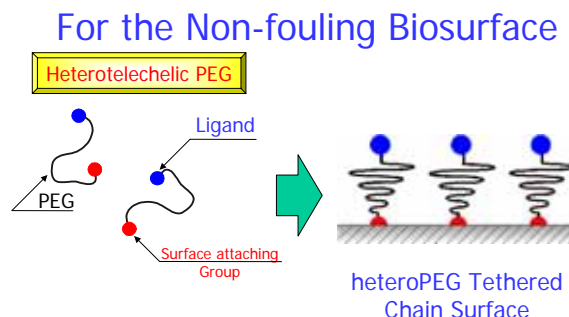
バイオに向けての精密高分子界面設計
筑波大学 TIMS 長崎幸夫

【緒言】

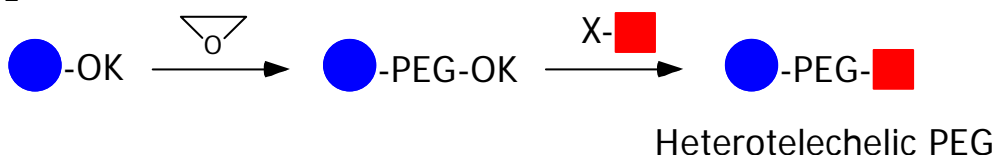
近年、ナノとバイオを融合したナノバイオテクノロジーの新領域が生まれつつあり、ナノテクノロジーの技術に応用した生体反応・情報制御技術、バイオ素子・システム等の創製に関する研究が盛んになってきている。このような微細なシステムをバイオ関連技術に適用するときには、生体分子や組織と接触する機材界面の最適化が最も重要な観点の一つである。特にマイクロチップ等の集積デバイスを利用する場合、集積化が進めば進むほど、界面の影響が大きくなり、バイオインターフェースの役割がますます重要になってくる。

我々は生体に高い親和性を有するポリエチレングリコール(PEG)を基盤材料として様々なバイオインターフェースの設計に関して検討を行ってきた。このようなバイオナノインターフェースは、近年注目をあつめるLab-on-Chipや μ TASさらにはプロテインチップなど微細化、ハイスループット化を目指すバイオ関連分野にも役立つ基本技術とみなすことができる。我々の行ってきたこれらの研究に関してまとめる。

Scheme 1.



Scheme 2



【ナノバイオマテリアル創製のためのヘテロ2官能性ポリエチレングリコールの分子設計】

PEG は生体親和性が良く、バイオ関連材料として広く用いられている。一般に用いられる PEG はしかしながら両末端あるいは片末端に水酸基を有する化合物であり、様々な機材表面処理を行う目的としては適していない。我々はスキーム 2 に示すように血液や組織と接触するバイオインターフェースに於いて高度に親和性を向上させるため、PEG ポリマーブラシの設計を進めているだけでなく、その自由末端に第二の機能を導入するために、ヘテロ 2 官能性 PEG の合成を行ってきた。このような材料を定量的且つ選択的に合成することはこれらのインターフェース設計に極めて重要である。この目的にアプローチするために、我々は官能基を有する開始剤を用い、エチレンオキシドを重合させることによって定量的な合成を行った。

【ヘテロ 2 官能性 PEG を利用した機能性ナノバイオインターフェースの構築】

Design of high-performance Bionanointerface

Yukio Nagasaki (Tsukuba Research Center for Interdisciplinary Materials Science, University of Tsukuba, 1-1-1 Tenn-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan, Tel: 029-853-5749. Fax: 029-853-5749, e-mail: nagasaki@nagalabo.jp)

Key Word: PEG tethered chain surface/DNA chip/ PEG:DNA coimmobilized surface / non-fouling surface

Abstract: By using our original hetero- and semi-telechelic poly(ethylene glycol) (PEG), a PEG tethered chain surface was constructed on several kinds of substrate. Formation of a short, filler layer of PEG (2kDa) in the preconstructed longer PEG-brushed layer (5kDa) (Mixed PEG tethered chain surface) showed almost complete prevention of nonspecific protein adsorption. PEG/oligoDNA mixed tethered chain surface was constructed by a similar manner as stated above. With the decreasing pre-constructed PEG chain density, the amount of immobilized oligoDNA increased. Under suitable conditions, the amount of immobilized oligoDNA was much higher than that on the bare gold surface. The PEG/oligoDNA mixed tethered chain surface thus prepared showed a much higher complementary DNA sensing, which was analyzed by a surface plasmon resonance (SPR) analyzer. It is interesting to note that the hybridization signal of the mismatch DNA was much lower than that of the other oligonucleotide immobilized surface.

上述のようにして合成したヘテロ2官能性PEGを用い、バイオナノインターフェースの基板となるPEG ブラシ表面を構築した。用いた機材としては金表面を用い、表面プラズモンセンサーを利用して解析した。PEG ブラシ表面を構築する際、ブラシ密度が低いとブラシの隙間にタンパク質の非特異吸着が起こる原因となる。そこで分子量の異なる acetal-PEG-SH を用い、様々な条件下で金表面へのポリマー固定化を行った。

表1に示すように表面におけるPEGの相対密度は分子量が増すにつれて減少した。一方でこのように構築したPEG ブラシ表面へのBSAの非特異吸着は2k 10k 5kの順に減少し、最適値が存在することが確認された。

次にPEG化した金センサーチップ表面における非特異的吸着抑制と分子認識能の検討を行った。図2に示すように通常の水溶性高分子をゲル状にコーティングした場合にはサイズの大きなタンパク質の吸着は抑えられるものの、サイズが小さくなると非特異吸着が避けられない。PEG5k ブラシを用いた場合にはサイズの大きな

タンパク質の非特異吸着はほぼ完全に抑制され、ゲルよりも効果的である。しかしながらサイズが小さくなるとデキストランゲルと同様の傾向が認められた。一方、PEG5k処理後に2kを担持させた表面では分子量数百のペプチドの吸着もほぼ完全に抑制された。このブラシ表面の厚さは5nm程度であり、極めて高性能なナノバイオインターフェースが構築された。

【様々なPEG ブラシ表面の構築】

金やガラス上にPEG/ポリカチオンを固定化後、オリゴDNAの固定を試みた。我々のアイディアは表層のカチオンチャージによって、負電荷を有するプローブDNAの表層への固定化率を向上させるだけでなく、PEG ブラシによってDNAの配向性を制御し、スキーム3に示すように高いハイブリ能を有するDNA固定表面を作ることにある。そこでまず、金表面に対してPEG/ポリカチオンのカチオン鎖長を変化させた時のブロックポリマーの固定化量をSPRセンサーで定量したところ、カチオン鎖長が長くなるごとにPEG ブラシ密度が低下することが確認された(データ省略)。これは金表面へ配位するポリカチオンセグメントの鎖長が長くなるごとにその専有面積が大きくなるためと考察される。

このようにして構築したブロックポリマー表面に対してメルカプト末端オリゴDNAの固定を行った。この結果図3に示すように、アミノ基が6個のPEG/オリゴカチオン(N6-PEG)の場合、殆どDNAが固定されていないものの、カチオンセグメント鎖長が長くなるとともにオリゴDNAの固定量が増加した。これはN6-PEGがタンパク質の非特異吸着をほぼ完全に抑制するほど高密度ブラシが形成しているのに対し、オリゴカ

表1 PEG鎖の金表面への固定化量

分子量	結合量($\Delta\theta$)	相対密度(-)
10000	0.18	1
5000	0.24	2.7
2000	0.36	10.0

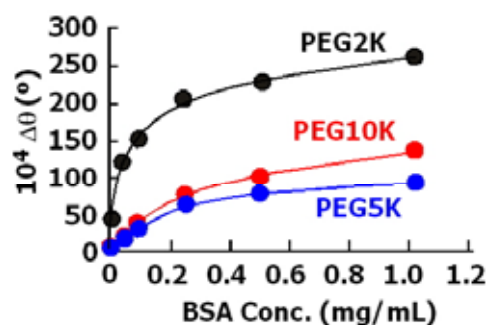


Fig.1 Relation between PEG chain length and BSA non-specific adsorption

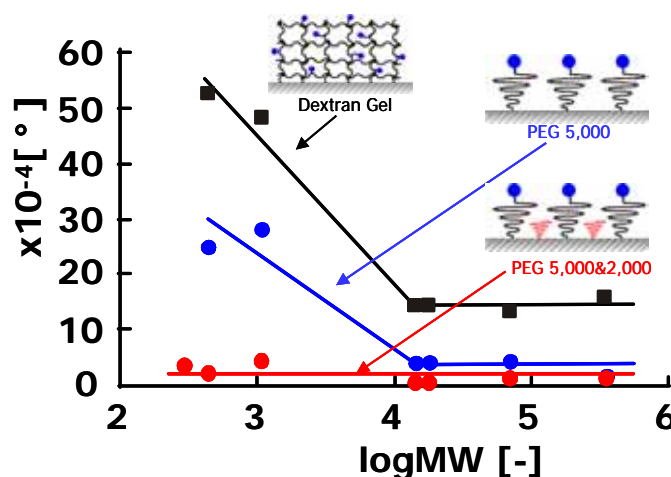
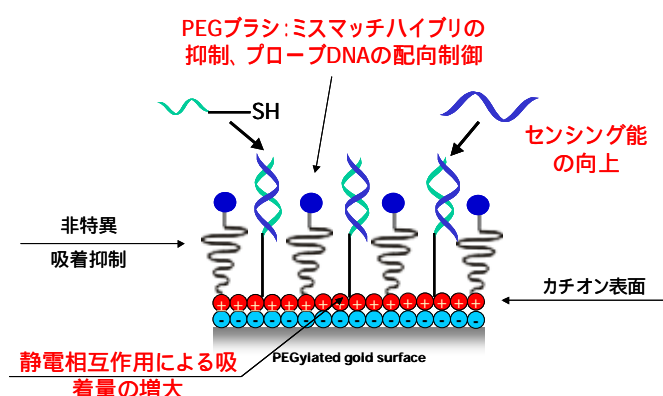


Fig.2 Non-specific protein adsorption as a function of protein sizes

PEG/DNA共固定ブラシの構築



チオン鎖長が増すごとに PEG 鎖密度が低下し、オリゴ DNA が固定される隙間が広がるということで説明できる。

このようにして構築した PEG/DNA 共固定ブラシに対するターゲット DNA 及びミスマッチ DNA とのハイブリ能を検討した。図 4.には未処理金表面へのプローブ DNA 固定と PEG/DNA 共固定表面へのセンシング能の比較を示す。プローブの固定量をあわせた両表面に対してターゲット DNA のハイブリダイゼーション能は明らかに PEG/DNA 共固定界面の方が高い。これは期待したように、PEG ブラシによって固定した DNA が表面に寝た配位構造をとりにくく、スキーム 3 に示したような基板に垂直な配位構造をとっているためと考察される。一方でミスマッチ DNA の場合、金表面に比べて PEG/DNA 共固定ブラシの方が抑制されており、これはプローブ DNA 鎖の周りに存在する DNA ブラシがミスマッチハイブリダイゼーションに対して影響を与えるためと考えられる。結果として DNA センシングの S/N 比は大きく向上することが確認された。

DNA の代わりに抗体を固定し、鎖長の異なる PEG ブラシを固定した場合、非特異吸着が抑制されるだけでなく、抗体の感度が向上することが確認された。(データ省略)これは ELISA 等の診断表面への展開が期待される。

【PEG ハイドロゲルのパタンニングによるパタン化細胞培養表面】

両末端にメタクリロイル基を有する PEG と光開始剤を混合し、フォトリソグラフィーの技術を用いて、生体適合性材料であるポリエチレングリコールの微小ゲルパターン表面を構築した。ゲルパターン構築の工程において、修飾液の溶媒にメタノール又は水/メタノールの混合溶媒を用いる場合でのゲルの性質に違いが現れた。メタノール溶媒で作製したパタンではガラス上に内皮細胞が接着してパタンを形成したものの、水/メタノール混合溶媒でパタンを作製した場合、ゲル表面に内皮細胞が接着することがわかった。このように全く同じ材料から作製したパタンでネガ及びポジ型型の細胞アレイが構築されることは非常に興味深い現象である。

【謝辞】

ヘテロ 2 官能性 PEG の合成と表面設計は片岡一則教授(現東京大学マテリアル)とともに始めたものである。ヘテロ PEG の合成と PEG 表面設計に関しては飯島道弘博士(現小山高専講師)、大塚英典博士(現物材機構)、内田勝美博士(現東京理科大学助手)、平瀬 匠君(筑波大大学院)、市野正洋君(筑波大大学院)及び長崎研究室学生諸氏を中心に行われました。心から感謝いたします。

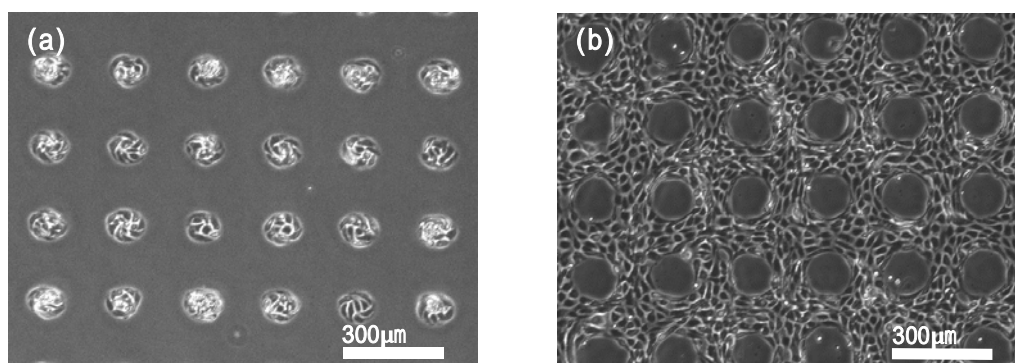


Figure 5 Patterned coculture of endothelial cells(BAECs). a) PEG gel pattern was prepared by water/methanol cosolvent, b) PEG gel pattern was prepared by methanol cosolvent

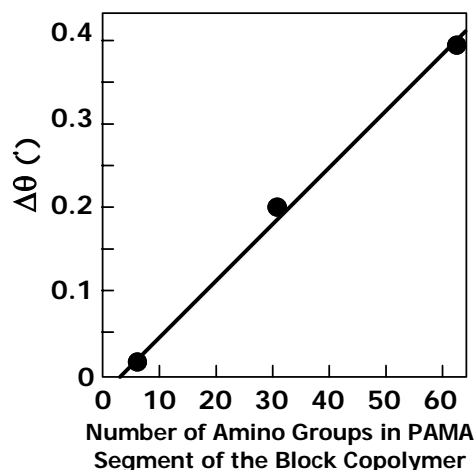


Figure 3. Plots of the SPR angle shift as a function of the number of amino groups on the oligocationic segment in the PEG/oligocation block copolymers.

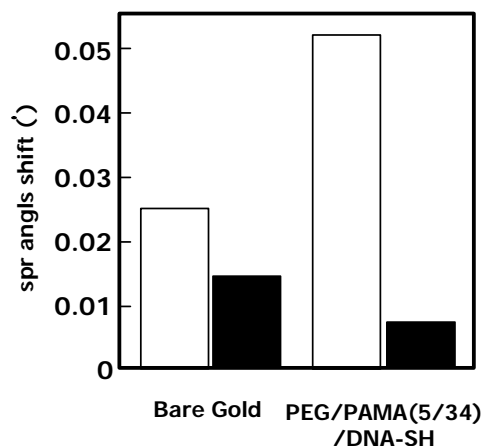


Figure 4. Complementary DNA (open bar) hybridization and mismatch adsorption (closed bar) on the bare gold and PEG/DNA mixed surface