材料表面上の吸着タンパク質の組成・構造分析

Identification of adsorbed proteins on artificial material using MALDI-ToF-MS

東京工業大学[1], 理研[2] ○(M2)廣原 周[1], (M2)前川 達洋[1],
(D1)丹生 隆[1], (D2)関根 泰斗[1], 林 智広[1,2]
Tokyo Institute of Technology[1], RIKEN[2] ○Makoto Hirohhara[1],
Tatsuhiro Maekawa[1], Takashi Nyu[1], Taito Sekine[1], Tomohiro Hayashi[1,2]
E-mail: hirohara.m.aa@m.titech.ac.jp, hayashi@echem.titech.ac.jp

人工血管、心臓弁、人工関節など人体内に埋設して使用するデバイスは今後の超高齢化社会において重要な役割を担う。これらのデバイスが体内に導入された際には、まず、体液中のタンパク質が吸着し、デバイスと細胞・組織をつなぐインターフェースとなる。細胞・生体組織の初期応答にはこの吸着タンパク質層が重要な役割を果たしており、巨視的な生体適合性にも深く関わっていることが提唱されてきた。しかし、タンパク質層を形成するタンパク質の組成、量、配向、構造変化などを包括的に解析する研究は報告されていない。特にタンパク質の組成の解析に関しては、1. 吸着タンパク質の量が極端に少なく(100~500 ng/cm^2)、完全な回収が困難である。2. 血清には数 100 種類のタンパク質が含まれており、その同定が困難であること、などの理由から、今までに組成分析の報告は皆無である。本発表では上記 2 つの技術的問題を解決し、自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayers: SAMs)上に形成される吸着タンパク質層内に存在するタンパク質の組成分析の成果について発表する。

タンパク質が吸着する表面として、構造・物理化学的性質が明確な金-チオール系の SAM を用いた。親水性・疎水性、水中での表面電荷等が制御された、異なる末端基を有する 9 種類のチオール分子を用いて SAMs を作製した。タンパク質の同定にはペプチドマスフィンガープリント法を採用した。特にタンパク質の回収、溶液交換などのプロセス中に起こる、容器への吸着などによるペプチドの組成の変化を防ぐために、変性、還元、アルキル化、トリプシンによる消化までの一連の作業を基板上で行った。マススペクトルの取得はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry: MALDI-ToF-MS)を用いた。スペクトルには約 500 のピークが含まれるが、ピーク位置の補正、データベース(ExPASy)との照合、タンパク質の同定を自動で行うソフトウェアを開発し、吸着タンパク質層内のタンパク質の組成分析を行った。また、血清から吸着したタンパク質の吸着量、構造変化は水晶発振子マイクロバランス法を用いて解析を行った。

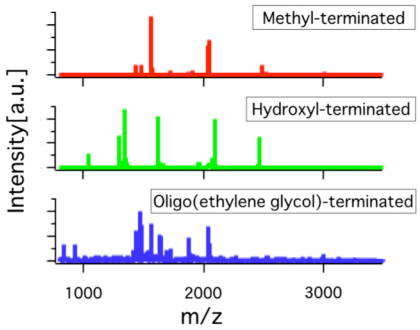

Figure 1. Mass spectra of proteins on SAMs adsorbed from serum.

MALDI-ToF-MS のスペクトル解析から、吸着タンパク質の組成は末端基により、大きく異なることが明らかとなった。この結果は血清中のタンパク質の競争的・交換吸着(Vroman effect)が表面の物理化学的特性によって大きく左右されることを示している。また、タンパク質の構造変化解析、細胞接着実験の結果と組み合わせることにより、細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞)接着には吸着タンパク質の組成(Fibronectin, Vitronectin などの接着性タンパク質の有無)、タンパク質の変性が深く関与しているということが明確になった。

© 2017年 応用物理学会