

表面力測定による蛋白質吸着現象の解析

羽藤 正勝・村田 正己*

物質工学工業技術研究所 分子集合体物性/表面力グループ ㊞ 305 茨城県つくば市東 1-1

*中外製薬製剤研究所 ㊞ 115 東京都北区浮間 5-5-1

(1997 年 4 月 28 日受理)

Protein Adsorption as Observed by Surface Force Measurements

Masakatsu HATO and Masami MURATA*

Molecular Assembly and Surface Forces Group, National Institute of Materials and Chemical Research
1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305*Formulation Technology Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
5-5-1 Ukima, Kita-ku, Tokyo 115

(Received April 28, 1997)

Recent progress in surface forces measurements allow us to measure forces between protein adsorbed mica surfaces directly. The force curves can be divided into two regimes due to the surface separation, a "longer distance" regime and an "adsorbed layer" regime. In a "longer distance" regime, the forces are largely due to an electrostatic double-layer force originating from the charges on the adsorbed protein layers. In the "adsorbed layer" regime, forces of steric origin owing to overlap of adsorbed layers dominate. From the analysis of the forces in an "adsorbed layer" regime, conformations of the adsorbed protein molecules can be estimated.

1. はじめに

蛋白質はアミノ酸配列の偏りや溶液環境 (pH やイオン強度) によって、分子内に正負の電荷を持つ親水性ドメインと疎水性ドメインを形成する。このため界面活性能を持つ。界面における蛋白質の挙動は数多くの工学的な観点から重要である。例えば、抗血液凝固表面等医用材料、バイオセンサ、バイオプロセスにおける機材表面汚染、細胞やバクテリアの接着、蛋白質製剤等数多くの分野で蛋白質の吸着や界面物性が研究されている¹⁾。

これまで、様々な方法で吸着現象が研究されてきたが、蛋白質間の相互作用は NMR, X 線結晶学等の静的状態の構造解析を除き、間接的な方法でしか測定されてこなかった。近年表面力測定法が進歩し^{2~4)}、マイカ表面に吸着した蛋白質間の相互作用力の距離依存性が直接測定できるようになった。この方法は相互作用力のみならず、表面間力が表面間の媒体の構造に敏感であることを利用して、表面近傍 nm 領域の情報、例えば蛋白質分子のコンフォメーション等を知ることができる。本稿では、免

疫分析や免疫センサ等の分野で良く知られているプロテイン A を例として、表面力測定からどんなことがわかるか概説する。

2. プロテイン A

プロテイン A は *Staphylococcus aureus* の細胞壁上に存在する一本のペプチド鎖からなる水溶性蛋白質で抗体の Fc 部に対して特異的な結合能を持つため、免疫分析、イムノセンサの構築等様々な分野で利用されている。構造の模式図を Fig. 1 に示した⁵⁾。Fc 結合能を持つ相同性の高い 5 個のユニット (E, D, A, B, C) と細胞壁結合ユニット (Xc) から構成されている。現在、B ユニット以外の正確な三次元構造はわかっていない。B ユニットの X 線構造解析の結果から B ユニットの形態は、直径約 2.5 nm 長さ約 4.5 nm のシリンダー状と近似できる⁶⁾。他の Fc 結合ユニット (E, D, A, C) も B ユニットと一次および二次構造が良く似ていることから、B ユニットとほぼ同じ形を持つと考えられている。各 Fc 結合ユニットの両端はフレキシブルなペプチド鎖で他の

Fcユニットと結合されているので、プロテインAは第一近似として、 $2.5\text{ nm} \times 4.5\text{ nm}$ のシリンダ5個がフレキシブルな結合で繋がったロッド状の分子とモデル化することができよう。一方、流体力学的性質から、プロテインA分子が球状蛋白質ではなく、水中で非常に広がった形態を採っているとされているが⁷⁾、正確な形態や吸着時のコンフォメーションはわかっていない。このように必ずしも分子の形などがはっきりしているわけではないが、免疫センサの分子デザイン等の観点から固体表面での吸着状態は大変興味深い。表面力測定からどんな姿

が浮かび上がるか検討してみよう。

3. 電解質水溶液中でのマイカ間に働く表面力

蛋白質吸着膜間に観測される表面力を考える前に電解質水溶液中のマイカ間に観測される表面力について簡単に触れておこう。Fig. 2には全イオン強度を1 mMに保ち、pHを変化させた場合の表面力の距離依存性を示した。遠距離では指数関数的に増加する斥力（マイカ表面の負電荷に起因する電気二重層力）が支配的であるが、Jと記した距離に達するとファンデルワールス力により、両表面はジャンプして原子レベルで接触（アトミックコンタクト）する。本稿では、この原子レベルで接触した状態を距離ゼロ ($D=0$) として表面間距離を定義した。実線（表面電荷一定条件）と点線（表面ポテンシャル一定条件）は、電気二重層力を非線形 Poisson-Boltzmann 式の厳密な数値解析によって求め、ファンデルワールス引力をマイカ-水-マイカ系の Hamaker 定数 $A=2.2 \times 10^{-20}\text{ J}$ を用いて計算した DLVO 理論による計算値である。OHP (outer Helmholtz plane) はマイカ表面と仮定した。実測値は電荷調節のため二条件の予測の中間に位置する⁴⁾。表面電位は、 -135 mV (pH 8), -105 mV (pH 5), -30 mV (pH 3.5) と pH の低下とともに低下する。酸性条件で、マイカ表面の負電荷を中和していたカリウムイオンがプロトンとイオン交換して表面電

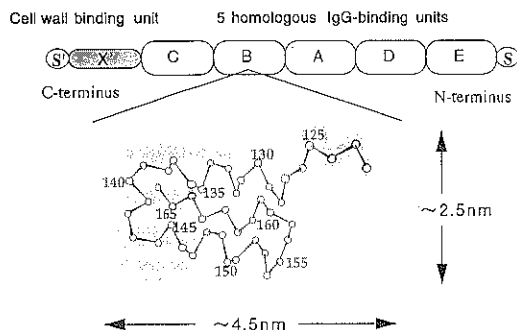


Fig. 1 Schematics of the structure of recombinant protein A and of the three-dimensional structure of the fragment B with the C α chain folding model overlaid adapted from reference⁶⁾.

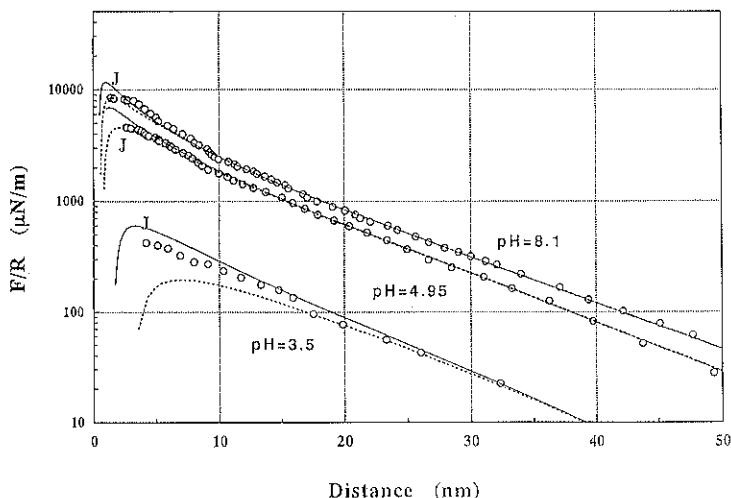


Fig. 2 Surface forces (normalized by the radius of curvature) measured between pair of mica surfaces in aqueous NaCl at varying pH. The solid lines and the dotted lines are the theoretical prediction based on DLVO theory under constant potential and constant charge conditions, respectively. The parameters employed are, pH=3.5; $\psi_0=30\text{ mV}$, $\kappa^{-1}=9.3\text{ nm}$, ($\sigma_0=1\text{ charge}/66\text{ nm}^2$) pH=5.0; $\psi_0=105\text{ mV}$, $\kappa^{-1}=9.5\text{ nm}$, ($\sigma_0=1\text{ charge}/11\text{ nm}^2$) pH=8.10; $\psi_0=135\text{ mV}$, $\kappa^{-1}=10\text{ nm}$, ($\sigma_0=1\text{ charge}/6.4\text{ nm}^2$)

位が低下するためである⁹⁾。実験的に求められた表面力曲線の減衰長はイオン濃度から理論的に予測されるデバイ長と良く一致し、遠距離領域の斥力が電気二重層力であることを示している。

4. プロテイン A 吸着マイカ間の表面力

実験結果の詳細に入る前に蛋白質存在下の表面力曲線の概要をまとめておく。

全ての表面力曲線は、二つの領域、吸着蛋白質の固定電荷による電気二重層力が支配的な“遠距離領域”と、吸着した蛋白質間の重なりによる“立体力”が支配的になる“近距離領域”にわけて考えることができる。

“遠距離領域”の表面力曲線は、蛋白質の吸着していないマイカの場合と同じ DLVO タイプの式

$$F(D)/R = A \exp(-\kappa D)$$

に従う。ここに、 R 、 κ^{-1} 、 A は表面の曲率半径、デバイ長、定数である。一方、“近距離領域”の表面力には蛋白質の個性が強く反映され、複雑ではあるが貴重な情報が多く含まれている。

Fig. 3-Fig. 5 にプロテイン A 濃度を 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm を含む 1 mM NaCl (pH=5: 等電点) 溶液中でマイカ表面間に働く表面力を測定した結果を示した⁹⁾。10 ppm の場合、吸着量が少なく、8 nm 以上の遠距離領域

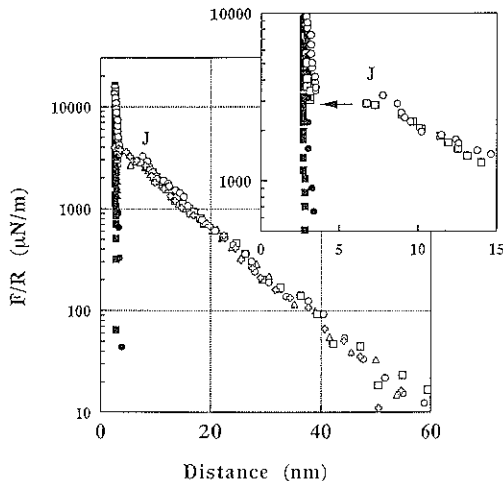


Fig. 3 Surface forces in the presence and absence of 10 ppm rPA at pH=4.95±0.05. The total ionic strength was kept at 1.0 mM (NaCl+HCl). (○): in the pure medium, (○●): 6 h of incubation, (□): 12 h of incubation, (△): 18 h of incubation. Detailed force-distance curves at short separations are shown in the inset. J indicates the force maximum from which rPA adsorbed mica surfaces jump into adhesive contact. Open and filled symbols represent forces measured on approach and on separation, respectively.

では蛋白質が存在しない場合と同じ表面力曲線が得られる。蛋白質の効果は 8 nm 以下で初めて明らかになる。つまり、表面は、蛋白質の存在しない場合 (2.3 nm) より遠方の 8 nm から 3 nm までジャンプする。さらに両表面を強制的に接近させても、吸着蛋白質のため 2.5 nm 以下に近づけることはできなかった。30 ppm になると、表面力曲線自体が蛋白質の存在しない場合と比較して 6 nm 程度遠距離方向にシフトし、20 nm 付近から 13 nm までジャンプインする。この吸着層は柔らかく、さらに圧縮可能で最終的に 6 nm まで圧縮できるが、それ以下の距離では“堅い壁 (hard wall)”となる。100 ppm では、吸着層が 10 nm 程度の厚さになり、20 nm 付近から吸着層同士の接触がはじまるため、20 nm 以下で、“遠距離領域”の振る舞いから急激な正方向へのずれが現われる。表面力曲線のシフトも 10 nm と大きくなる。吸着層は、最終的に 10-12 nm 付近の“堅い壁 (hard wall)”まで圧縮できる。ちなみにそれ以上強く圧縮すると、表

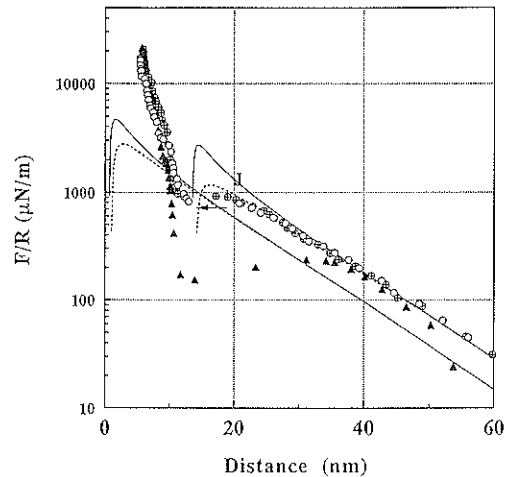


Fig. 4 Surface forces after 6 h of incubation in 30 ppm rPA at pH=4.95±0.05. The total ionic strength was kept at 0.886 mM (NaCl+HCl). (○): 1st approach, (▲): 1st separation, (⊕): 2nd approach. J indicates the force maximum from which rPA adsorbed mica surfaces jump into adhesive contact. The force curve for the pure medium is represented by the best fit theoretical curve (a lower solid line for the constant charge condition and a lower dotted line for the constant potential condition; $\psi_0=90$ mV, $\kappa^{-1}=10.7$ nm, $\sigma_0=1$ charge/17 nm², $A=2.2 \times 10^{-20}$ J). Theoretical prediction for the force curve in the presence of 30 ppm rPA is represented by the solid line (constant charge condition) and the dotted line (under constant potential condition). The OHP is located at 6.5 nm from the mica/mica contact. The parameters employed are, $\psi_0=60$ mV, $\kappa^{-1}=10.7$ nm ($\sigma_0=1$ charge/32 nm²), $A=1 \times 10^{-20}$ J.

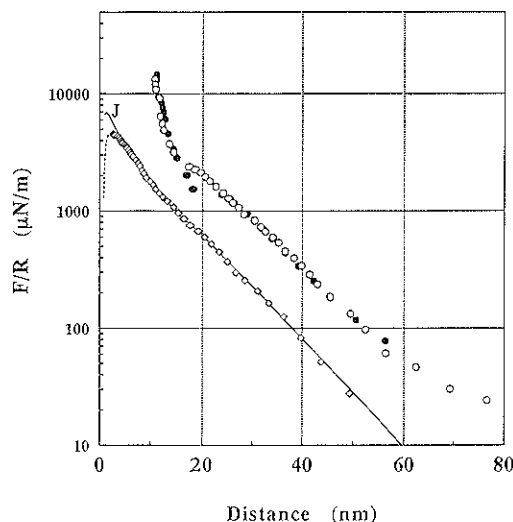


Fig. 5 Surface forces in the presence and absence of 100 ppm rPA at $\text{pH}=4.95 \pm 0.05$. The total ionic strength was kept at 1.0 mM (NaCl+HCl). (○): in the pure medium (the identical curve to that in Fig. 2), (●): in the presence of 100 ppm rPA. Open and filled symbols represent the forces measured on approach and on separation, respectively.

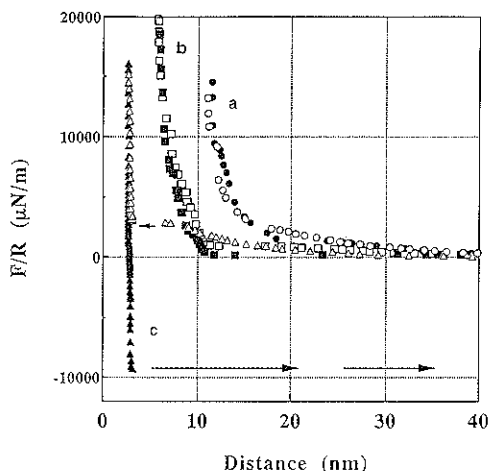


Fig. 6 Effects of rPA concentration on the force curves at $\text{pH}=4.95 \pm 0.05$. Total ionic strength was 1 mM (NaCl+HCl). a. (○●): in the presence of 100 ppm rPA, b. (□■): in the presence of 30 ppm rPA, c. (△▲): in the presence of 10 ppm rPA. Open and filled symbols represent the forces measured on approach and on separation, respectively. Arrows indicate "jump-in" or "jump-apart" motion of the surfaces.

面が大きく変形し、吸着層が大きく乱されることが確認できる。

10 ppm で、一旦“堅い壁(hard wall)”まで圧縮した後、表面間を広げてゆくと、表面力距離曲線は大きなヒステリシスを示し、 -10 mN/m の大きな接着力が観測された。しかし、30 ppm と 100 ppm では接着力は非常に小さく、ヒステリシスはほとんど観測されなくなった (Fig. 6 参照)。

5. 吸着蛋白質のコンフォメーション予測

蛋白質の固液界面への吸着は蛋白質濃度に依存する¹⁾。プロテイン A が Fig. 1 のようなロッド状の分子だと仮定して、吸着様式が蛋白質濃度で如何に変化するか推論してみよう。ここで蛋白質とマイカ間には強い引力が働くが蛋白質間には働かないと仮定する。

蛋白質濃度が十分希薄な場合、表面には十分な吸着可能面積があるので、蛋白質は Fig. 7 a に示すような“フラット”吸着が優勢となる。蛋白質濃度が増すと、“フラット”吸着分子数の増加とともに、吸着サイトが減少し、蛋白質分子の一部だけがマイカ表面に吸着、残りの部分は溶液部に存在する型のコンフォメーションが優勢になり、“ブラッシュ”状の吸着層へと移行すると予測される。極端な場合は、分子の末端のみが吸着するいわゆる“エンド-オン”吸着になるが、表面力から推定した、吸着層厚さ (約 10 nm) が分子長 (20–30 nm) の半

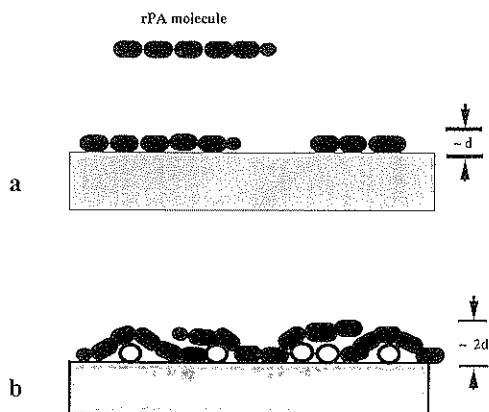


Fig. 7 A schematic illustration of possible structure of adsorbed rPA layer at a low ionic strength ($I=1 \text{ mM}$). Filled ovals, rPA molecule; open circles, already adsorbed IgG binding unit. d is a diameter of a IgG binding unit. The illustrated configurations correspond to those at a surface separation of $2 D_{hw}$. a: At low rPA concentrations, rPA molecules are adsorbed "side-on" parallel to the surface. b: At higher rPA concentrations, rPA molecules adopt "pseudo double-layer" conformations.

分程度であることからこの可能性は少ない。以上を考慮したコンフォメーションの模式図を Fig. 7b に示した。表面が強く押しつけられると“ブラッシュ”部分は表面に吸着している部分に押しつけられ“二分子層”に近い状態(“擬二分子層”; 表面間には4分子層が存在する)⁹⁾を採ると予測される。

さて、このモデルによれば、表面力測定における“強い壁”の厚さ $2D_{hw}$ と分子の直径 d ($=2.5$ nm) との間には以下の関係が予測される。全ての蛋白質が“フラット”吸着をし、吸着密度が十分小さい場合には、両表面間の蛋白質分子は互いに入れ子状態になり、結果として両表面間に蛋白質一分子層が挟まれることになろう。この場合、

$$2D_{hw} \approx d \approx 2.5 \text{ nm} \quad (1)$$

吸着密度が大きくなり、表面が“フラット”吸着をした蛋白質分子で密に覆われるようになれば、両表面間には各表面に吸着した単分子層同士が接触し、両表面間には蛋白質二分子層が存在することになろう。この場合、

$$2D_{hw} \approx 2d \approx 5 \text{ nm} \quad (2)$$

一方さらに濃度が増し、“擬二分子層”状態に吸着すれば、両表面間には四分子層が存在する。したがって、

$$2D_{hw} \approx 4d \approx 10 \text{ nm} \quad (3)$$

となることが予測される。

先の関係は、実際 10, 30, 100 ppm における実験値 $2D_{hw}$ に対応しているように思われる。すなわち、10 ppm $2D_{hw}=2.5$ nm は、式 (1) の場合に、30 ppm と 100 ppm の $2D_{hw}$ は式 (2) と (3) に当てはまるように見える。

さて、蛋白質 A が $2.5 \text{ nm} \times 25 \text{ nm}$ のロッド状分子と仮定すると、表面が単分子状の“フラット”吸着分子で密に覆われた時には、分子密度 (Γ) が 1 cm^2 当たり $1-2 \times 10^{12}$ 個のオーダーとなると予想される。一方、表面力測定装置により表面間の媒体の屈折率 n_m から、蛋白質の吸着密度 Γ を推定すると¹⁰⁾、30 ppm の場合 $\Gamma \sim 2.5 \times 10^{12}$ 分子/ cm^2 、100 ppm では Γ は $5-6 \times 10^{12}$ 分子/ cm^2 となり、30 ppm の場合の約2倍の値となる。かなり大雑把な推論であるが、“擬二分子層”吸着モデルと矛盾しない。

6. 接着力

以上の吸着モデルを仮定すると、先に述べた最も吸着量が少ない 10 ppm で接着力が一番大きくなることが説明できる。10 ppm では吸着蛋白質が入れ子になるため両表面が離れる時、両表面が蛋白質を介して結合される、いわゆる“ブリッジング”によって大きな接着力が観測されたと考えられる。30 ppm あるいは 100 ppm では、表面が既に蛋白質で密に覆われているため、“ブリッ

ング”は起こらず、蛋白質-蛋白質間で剥離が生じると考えられる。これが濃度が増すと接着力が急激に小さくなる原因であろう。

7. 最後 に

今回、“近距離領域”の表面力から、吸着蛋白質 A のコンフォメーションが、濃度の増加とともに“フラット”吸着から“擬二分子層”吸着へとシフトすることを推論した。最近の AFM 観察も“フラット”吸着から“擬二分子層”吸着へと結論と矛盾しない¹²⁾。バイオセンサの分野等で、パンケーキ状として描かれることが多かった吸着蛋白質 A のイメージは、実体とはかけ離れたモデルと考えるべきであろう。

最後に、本稿では触れることができなかったが、対称性の良い形を持つ蛋白質が、溶液中で何らかの規則構造を作る場合、表面力に分子サイズを反映した振動が現われる¹³⁾。これから溶液中の蛋白質の形やサイズを知ることできる。蛋白質吸着系の表面力測定全般に関しては最近の総説¹⁴⁾を参照されたい。

文 献

- 1) a: W. Norde: "Adhesion and Adsorption of Polymers" ed. by L.-H. Lee (Plenum Press, New York, 1980) p.801; b: C.A. Haynes and W. Norde: *Colloids Surfaces B* **25**, 17 (1994); c: W. Norde: *Adv. Colloid Interface Sci.* **25**, 267 (1986).
- 2) D. Tabor and R.H.S. Winterton: *Proc. R. Soc. Lond. A* **312**, 435 (1969).
- 3) J.N. Israelachvili: *J. Colloid Interface Sci.* **44**, 259 (1973).
- 4) J.N. Israelachvili and G. Adams: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **4**, 975 (1978).
- 5) J. Sjodahl: *Eur. J. Biochem.* **73**, 343 (1977).
- 6) J. Deisenhofer, T.A. Jones, R. Huber, J. Sjodahl and J. Sjoquist: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 975 (1978).
- 7) I. Bjork, B.-A. Petersson and J. Sjoquist: *Eur. J. Biochem.* **29**, 579 (1972).
- 8) R.M. Pashley: *J. Colloid Interface Sci.* **83**, 531 (1981).
- 9) M. Hato, M. Murata and T. Yoshida: *Colloid Surf.* **109**, 345 (1996).
- 10) N. Kawanishi, H.K. Christenson and B.W. Ninham: *J. Phys. Chem.* **94**, 4611 (1990).
- 11) K. Tanaka and N. Yamagata: *Hitachi Scientific Instrument News* **34**, 12 (1991).
- 12) S. Ohnishi, M. Murata and M. Hato: 投稿中
- 13) P. Kekicheff, W.A. Ducker, B.W. Ninham and M.P. Pileni: *Langmuir* **6**, 1704 (1990).
- 14) P.M. Claesson, E. Blomberg, J.C. Froberg, T. Nylander and T. Arnebrant: *Adv. Colloid Interface Sci.* **57**, 161 (1995).