

学位論文題名

# Evaluation of protein adsorption to carbon nanotubes for biological use

(バイオ応用に向けたカーボンナノチューブのタンパク質吸着特性の解析)

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

カーボンナノチューブ(CNTs)とは炭素六員環から構成されるグラフェンシートが同軸管状の構造をとる代表的なナノマテリアルであり、機械的・化学的・物理的に優れ、生体親和性を有することから生体材料への応用が期待されている。生体適合性や細胞の分化・増殖には材料表面へのタンパク質の吸着が重要な働きをしていることは広く知られている。骨芽細胞様細胞を CNTs 上に播種した場合、細胞の付着伸展性と ALP 活性の増加を示すことから、タンパク質と CNTs に親和性が存在することが示唆される。本研究では、液体クロマトグラフィー法を用いタンパク質の CNTs への吸着特性を調べ、更に CNTs の形態や純度、処理方法の違いが及ぼす影響について評価することを目的とした。

### 【材料と方法】

#### 1. CNTs 試料と各種前処理

試料にはいずれも多層 CNT で、小径・低純度 CNTs(以下 N2:  $\phi$  20nm, 曲状, 85%, Nano Lab.Inc), 中径・低純度 CNTs(以下 C4:  $\phi$  40nm, 曲状, 70%, CNT Co., Ltd), および大径・高純度 CNTs(以下 H7P:  $\phi$  70nm, 線状, >99.5%, 保土谷化学工業)の3種類を用いた。各 CNTs に対し熱処理(500℃, 90 分), 或は酸処理(12N HCl, 60℃, 2 時間, C4 に対しては室温下で 6 時間)を行った後、走査型電子顕微鏡(SEM: S4000, Hitachi)にて形態と不純物の変化を観察した。C4 は各処理段階における重量変化測定とエネルギー分散型元素分析(EDS)を、酸処理 H7P はゼータ電位測定(Delsa nano HC, Beckman Coulter)を併せて行い、処理が CNTs に与える変化を評価した。

#### 2. タンパク質の吸着挙動

未処理、或は処理後の CNTs を担体とし、体積  $1.6\phi \times 5.0\text{cm}^3$  となるようカラム内に充填した。その後液体クロマトグラフィー測定を行い、酸性タンパク質のアルブミン(pI 値:

4.9), 塩基性タンパク質のリゾチーム (pI 値; 10.8), および血清の CNTs への吸着挙動を調べた. 分出液は紫外吸収モニター(AC-5100, Atto Co.,)を用い波長 254nm 下で検出した. 測定は PBS から NaOH 濃度を 25mM まで徐々に上昇させる linear gradient 法と, イオン強度の低い緩衝液から強いものへと切替える step wise 法を用いて行った.

### 3. 血清中のタンパク質の同定

未処理, 各処理後の H7P に血清を流した際のピーク時分出液を透析・凍結乾燥し, 得られた試料を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離した. さらに, 酸処理 H7P で添加後速やかに分出した試料に対し, タンパク質配列分析, 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(MALDI TOF-MS)を行った. 得られた分子量より UniProtKB タンパク質配列データベースでタンパク質を検索した.

## 【結果】

### 1. SEM-EDS 観察

純度の低い CNTs の N2, C4 では SEM にて, アモルファスカーボンと思われる不定形物質が CNT 集合体の繊維間に観察されたが, 熱・酸処理を組み合わせる行うことにより減少した. また EDS 元素分析を行うと, 未処理 C4 では触媒の鉄を多く含有していたが, 熱・酸処理後は鉄が減少し, 炭素の含有率の上昇が明らかになった. 純度の高い H7P では, 繊維集合体の間隙に塊状の不定形物質を認めたが, 処理により減少した.

### 2. CNTs の分散性

大径・高純度の未処理 H7P は蒸留水に分散性を示さなかったが, 酸処理後, 熱・酸処理後とも分散性は向上した. ゼータ電位測定からそれぞれの表面電荷は-35.27mV, -48mV であった. それに対し小径・低純度の N2 では, 処理に関わらず蒸留水に対し分散性を示した.

### 3. 液体クロマトグラフィー測定

#### (1) C4 (中径・曲状・低純度 CNTs)

熱処理または酸処理のみを行った C4 では, 緩衝液のイオン強度を塩酸まで強めても分出せず, アルブミン, リゾチームともに強い吸着を示した. 熱・酸処理を加えると, アルブミンは緩衝液を NaOH に, リゾチームでは 2M 尿素・NaOH に替えた後分出し, 吸着が弱くなった.

#### (2) H7P (大径・直線状・高純度 CNTs)

未処理または酸処理後の H7P には全てのタンパク質が, 添加後速やかに分出し, 弱い吸着を示した. それに対し, 熱・酸処理後では, PBS, NaOH 下でも大きなピークは認めず, 吸着は強くなった.

#### (3) N2 (小径・曲状・低純度 CNTs)

いずれの条件においても, PBS 下でピークは認めず, NaOH で分出し, 強い吸着を示した.

## 2. 電気泳動

コントロールである希釈血清では、アルブミンの分子量の 66kDa 付近に明瞭なバンドが認められたのに対し、未処理 H7P からの分出液では 50kDa 付近に明瞭なバンドを認めた。また酸処理後の CNTs で、PBS 下で速やかに分出したタンパク質では 50kDa よりも高分子量の、NaOH 分出下では 50kDa より低分子量の位置に複数のバンドが現れた。熱・酸処理後では、PBS 下で分出したタンパク質で 50kDa 付近に明瞭なバンドを認めたが、NaOH 分出下では明らかなバンドは確認されなかった。

## 4. タンパク質配列分析, MALDI TOF-MS

酸処理後 H7P に対し PBS で速やかに分出したタンパク質群は、タンパク質配列分析より N 末端から D (アスパラギン酸), T (トレオニン), H (ヒスチジン), K (リシン), S (セリン) であると判明し、主たるタンパク質はアルブミンであることが示された。また TOF-MS より検出した分子量からアルブミンの他に  $\alpha$ 2- macroglobulin(167.6kDa), transferrin (77.8kDa), plasminogen (91.2kDa) の各種グロブリンの存在の可能性が示唆された。

### 【考察】

#### (1) CNTs の種類の影響

大径・直線状・高純度の H7P が弱い吸着を示したのに対し、小径・屈曲性に富む低純度の C4, N2 では強い吸着を示した。

#### (2) CNTs の処理条件の依存性と吸着メカニズム

低純度の C4 では、処理により吸着が弱くなる傾向を認め、同時に SEM, EDS より不純物の減少を認めた。これらの結果より、低純度 CNTs の吸着にはアモルファスカーボンの影響が大きいと考えられた。また、大径・直線状・高純度の H7P は処理により吸着が増大する傾向にあった。ゼータ電位測定から、H7P には酸処理後、表面に負電荷を帯電していること示されたが、各タンパク質はいずれも 4.9, 10.8 と対照的な pI 値を有するにも関わらず、類似する吸着挙動を示した。従って H7P の吸着は、酸処理によるカルボキシル基や水酸基の修飾、或は分子間力や水素結合などの弱い結合が関与していることが示唆された。

#### (2) タンパク質種類の影響

N2, C4, H7P のいずれに CNTs においても、同処理条件下ではタンパク質の吸着挙動は類似した傾向を示し、タンパク質の種類への強い依存性は認められなかった。

また電気泳動において、コントロールとなる希釈血清では 66kDa 付近にアルブミンの明瞭なバンドを認めたのに対して、クロマトグラフィーの分出液では、アルブミンの出現位置が 50kDa に現れた。この結果より、CNTs による血清中のタンパク質分解酵素の活性化、或は CNTs 自体の触媒作用により、アルブミンが分解され、分子量が小さくなる可能性が示唆された。

## 【結論】

CNTs へのタンパク質の吸着には CNTs の径や形態、そして純度と処理方法が影響することが明らかになった。タンパク質吸着特性の解明は、CNTs のバイオ応用の際の細胞増殖・分化のコントロールや生体材料応用への最も基礎的な知見であると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

|     |      |         |
|-----|------|---------|
| 主 査 | 特任教授 | 亘 理 文 夫 |
| 副 査 | 教 授  | 網 塚 憲 生 |
| 副 査 | 教 授  | 田 村 正 人 |

## 学 位 論 文 題 名

### Evaluation of protein adsorption to carbon nanotubes for biological use

(バイオ応用に向けたカーボンナノチューブのタンパク質吸着特性の解析)

#### 論文要旨

【目的】カーボンナノチューブ(CNTs)とは炭素六員環から構成されるグラフェンシートが同軸管状の構造をとる代表的なナノマテリアルであり、機械的・化学的・物理的に優れ、生体親和性を有することから生体材料への応用が期待されている。骨芽細胞様細胞を CNTs 上に播種した場合、細胞の付着伸展性と ALP 活性の増加を示すことから、タンパク質と CNTs に親和性が存在することが示唆される。本研究では、液体クロマトグラフィー法を用い、各種タンパク質の CNTs への吸着特性を調べ、更に CNTs の形態や純度、処理方法の違いが及ぼす影響について評価した。

【方法】三種類の異なる径(20, 40, 70nm)、形態(曲状、線状)、純度(70, 85, 90%)を有する多層 CNTs に対し熱処理、或は酸処理を行った。その後 SEM, EDS 分析を行い、処理によるアモルファスカーボンや金属触媒の減少を確認した。クロマトグラフィー測定ではウシ胎児血清(FBS)、ウシ血清アルブミン(Alb)、ニワトリ卵白由来リゾチーム(Lys)の各 CNTs への吸着を調べ、さらに電気泳動と飛行時間型質量分析にてタンパク質の同定を行った。

【結果・考察】小径 CNTs は大径より強い吸着を示したが、共に処理により吸着が強くなる傾向にあった。それに対し低純度 CNTs では、処理により吸着が弱くなる傾向を示した。低純度 CNTs の吸着にはアモルファスカーボンが、また大径・高純度の CNTs には熱・酸処理による CNTs 表面への水酸基・カルボキシル基等の付与が寄与していると考えられた。FBS のピーク時分出液の電気泳動から、分子量 66kDa である主要成分のアルブミンのバンドの 54kDa への遷移が認められた。アルブミンやグロブリン群を含む高分子量のタンパク質に比べ、54kDa 以下のタンパク質はより強い吸着を示した。以上より、今回の条件下ではタンパク質の酸性、塩基性への依存性は弱く、タンパク質の吸着は CNTs の純度や径、処理方法に影響されることが示された。

#### 審査の内容

1. 酸性タンパク質を選択した理由。

対照的な等電点(pI 値)を有する酸性タンパク質のアルブミン、塩基性タンパク質のリゾチームを使用することで、吸着に電氣的な結合が関与しているか調べるため。

2. クロマトグラフィー測定のパッファーに尿素を使用した理由。

尿素はアミノ酸の水素結合を切断、タンパク質の立体構造を崩し変性する。NaOH 下で分出されないタンパク質を分出するため使用した。

3. 前処理の意義と熱処理を 500℃に設定した理由。

生成時の CNTs はアモルファスカーボンや Fe, Al などの金属触媒を含む。CNTs を分解せずアモルファスカーボンのみを除去するのに適切な 500℃で熱処理を行い、また金属触媒を除去する為、酸処理を行った。

4. CNTs の分散性向上には何が影響しているか。

前処理を行うとゼータ電位測定から、CNTs は負に帯電することが示され、表面に OH 基や-COOH 基が誘導されることにより、蒸留水に対する分散性が向上したと考えられる。また曲状・小径の未処理 CNTs が分散性を示したのは、線状・大径 CNTs に比べ結晶性が低く、より多く含有される構造欠陥部位に極性分子の水が結合した為と推測される。

5. 細胞培養時、培地内のタンパク質の活性への影響。

骨芽細胞様細胞を CNTs 上で培養した場合、細胞増殖、仮足伸展および ALP 活性の増加が認められており、タンパク質吸着の影響と考えられる。一方、過度のタンパク質吸着は細胞増殖に関与する部位の活性を阻害し、細胞増殖や分化が低下する可能性も考えられる。

6. 単一のタンパク質が二つの分かれたピークを示した理由。

可能性の一つとして、Alb の純度は $\geq 98\%$ 、Lys は $\geq 90\%$ であり、異なる分子量成分に分出したことが考えられる。

7. 酸性条件下でのタンパク質の吸着について。

中径、低純度 CNTs に対するイオン強度の強い HCl をパッファーとしたクロマトグラフィー測定では、PBS や NaOH 下と同様の吸着挙動を示した。従って、酸性条件下においても今回と同様の吸着挙動を示すと予想される。

従来、CNTs のバイオ応用にはタンパク質の吸着が重要であることが一般的に示されてきた。今回、具体的なタンパク質や CNTs の種類や処理条件の依存性について調べ、CNTs へのタンパク質の吸着特性の評価を行った。本研究は、CNTs とタンパク質の相互作用の解明に寄与するとともに、CNTs の細胞培養応用や組織再生応用、細菌吸着・殺菌のバイオ応用や癌治療のための重要な基礎的な知見となる。

上記他の質問に対し、学位申請者は明解に答え、また関連分野の十分な知識と解決能力を有することが認められた。よって博士(歯学)の学位授与にふさわしいものと判定した。