

牽引力により分子吸着特性が制御されるナノ繊維材料の創製

A novel nanofiber with controlled molecular adsorption properties by traction

福井大学テニュアトラック推進本部 講師 坂元博昭
Tenuretrack Headquarters, University of Fukui, Hiroaki Sakamoto

要旨

ポリウレタン(PU)は、ソフトセグメント・ハードセグメントから構成される相分離構造をとることが知られている。これまでに、我々はエレクトロスピンニング法によって作製されたPUナノファイバーは、フィルム形状にはみられない独自の相分離構造が表面に形成されることを原子間力顕微鏡(AFM)により明らかにしてきた。本研究では、本来タンパク質吸着を抑制するPUを、牽引力を受けたナノファイバー形状にすることで、相分離構造の変化にとともに、PUの表面特性が変化するのではないかと考えた。そこで、PUナノファイバー表面へのタンパク質吸着挙動を評価し、その機序を明らかにすることを目的とした。PUナノファイバー表面へのタンパク質の吸着量は、表面電荷の異なるBSA・Lyzどちらも0 rpmでは小さく、牽引力を受けて径が細くなるにつれて、増加した。これは、ハードセグメント配置の直線性が高まることにより、タンパク質が吸着しやすい表面特性に変化したためだと考えられる。以上の結果から、ポリウレタンナノ繊維への牽引力により表面構造が変化し、分子吸着挙動が変化することが示唆された。

1. はじめに

ナノファイバーは1本の太さが髪の毛の200分の1程度の極細繊維である。従来のマイクロファイバーに比べると分子が繊維長さ方向に配列するようになるため強度、電気伝導性、熱伝導性が高くなるといわれている⁽¹⁾。

高分子ナノファイバーの作製方法としてエレクトロスピンニング法⁽²⁾⁻⁽⁵⁾が知られている(Fig. 1)。この方法は、ポリマー溶液が一定の速度で押し出される。ノズルには電圧が加えられ、電気引力がポリマー溶液の表面張力を超えるとき、ポリマー溶液が霧状になって噴射する。ポリマー溶液の溶媒は徐々に揮発し、コレクターに達する際には、ナノサイズのファイバー形状になる。また、紡糸過程においてコレクターを高速回転させることでファイバーが強い牽引力を受け、ファイバーの向きや太さが制御されるだけでなく、ファイバーを構成する分子の配向が変化することが知られている⁽¹⁾。

本研究ではポリウレタンに注目した。ポリウレタン中には、芳香族環、ウレタン結合からなるハードセグメントと、ポリエステル、

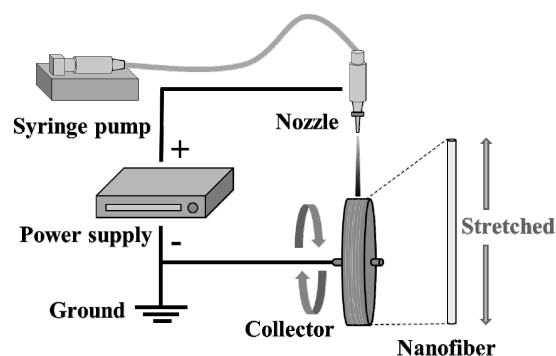


Fig. 1 エレクトロスピンニング法によるナノファイバー作製

ポリエーテルからなるソフトセグメントが存在し相分離構造を形成している。これまでに我々は、ポリウレタンナノファイバー(PUナノファイバー)の表面構造を原子間力顕微鏡(AFM)により解析を行ってきた⁽⁶⁾。AFM高さ像においては、ファイバー作製の過程で牽引力を受けていないPUナノファイバーと牽引力を受けたPUナノファイバーどちらもファイバー表面は凹凸がないことが確認された。一方、AFM位相像においては、位相の異なる分布が観察された。Fig. 2の明るい部分の大きさがPUのハードセグメントの大きさ(20~30 nm)と一致したため、明るい部分

はハードセグメント、暗い部分はソフトセグメントを示していると考えた。牽引力を受けていないPUナノファイバーでは、ハードセグメントとソフトセグメントが混在していた(Fig. 2-A1)が、牽引力を受けたPUナノファイバーでは、ハードセグメントがファイバーの長さ方向に直線的に並んでいた(Fig. 2-B1)。よって、ファイバーに牽引力がかかることで、ハードセグメントがファイバーの長さ方向に直線的に並ぶようになることが考えられる。

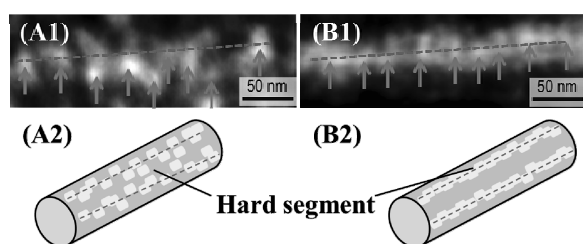


Fig. 2 PU ナノ繊維表面のAFM 位相像 (A)未延伸繊維 (B)延伸繊維

PU は本来、相分離構造を形成しておりタンパク質吸着を抑制することが知られている⁽⁷⁾。AFM の観察結果より、牽引力を受けたPUナノファイバーの相分離構造の変化が明らかになったことから、PU のタンパク質吸着を抑制する性質に影響をもたらすのではないかと考えた。

本研究では、牽引力を受けていないPUナノファイバーと牽引力を受けたPUナノファイバーのタンパク質吸着挙動を評価し、PUナノファイバーの表面構造とタンパク質吸着特性との関係を検討した。また、PUナノファイバー表面とタンパク質との相互作用のメカニズムを解析した。

2. 実験方法

2.1 エレクトロスピンニング法によるPUナノファイバーの作製

テトラヒドロフラン(THF Wako Inc.): N,N-ジメチルホルムアルデヒド(DMF Wako)= 95:5 (体積比) を溶媒とする 10%PU 溶液を調製した。レーザー加工機(Universal Laser Systems Inc.: Universal Laser Systems)を用いて厚さ 1 mm のアクリル板を加工した。真中の穴は、紡糸するPUナノファイバーを橋掛け状態にするためにある。

10%PU 溶液を用いて、エレクトロスピンニング(MECC Inc.)法によりアクリル基板上にPUナノファイバーを作製した。

10 ml シリンジ(HENKE SASS WOLF Inc.)にPU溶液を採取し、金属製の27Gニードル(TERUMO NEEDLE Inc.)を取り付けた。アクリル基板は、70%エタノール(Wako)で10 min 超音波(HONDA Inc.)洗浄した後、超純水中で10 min 超音波洗浄後、コレクター(MECC Inc.: SD-02)に取り付けた。PU溶液の射出速度はシリンジポンプ(ULVAC Inc.: DA-30D)を用いて制御した。PUナノファイバー作製条件は表1に示す。作製したPUナノファイバーはデシケーター(ASONE Inc.)内で一晩減圧乾燥させた。

Table. 1 Preparation conditions of polyurethane nanofiber.

流量	1.0 ml/h
印加電圧	25 kV
コレクター回転数	0, 50, 2000 rpm
紡糸時間	3~10 s

2.2 PUナノファイバーの径の定量

イオンコーター(HITACHI Inc.: E-1030)を用いて観察試料の表面をPt/Pdでコーティングした。この試料を、走査型電子顕微鏡(SEM) (HITACHI: S-2600HS)を用いて観察した。SEM観察画像は、フリーソフトのImageJを用いて解析し、ファイバーの径を測定した。

2.3 タンパク質の吸着評価

吸着させるモデルタンパク質には、フルオレセインイソチオシアネート標識ウシ血清アルブミン(FITC-BSA) (SIGMA Inc.) (ex:488 nm, em:530 nm) (pKa 4.7)とフルオレセインイソチオシアネート標識リゾチーム(FITC-LZM) (NANOCS Inc.) (pKa 11)を用いた。PUナノファイバーを1 mg/ml FITC-BSA 溶液 1 ml、0.1 mg/ml FITC-LZM 溶液 1 ml に浸漬させ、37 °Cで一晩静置した。その後、PUナノファイバーを100 mM PBSに浸漬させて洗浄した。

FITC-BSAを吸着させたPUナノファイバーを蛍光顕微鏡(OLYMPUS Inc.)で観察した。各PUナノファイバーの明視野観察画像と、蛍光観察画像を撮影した。ImageJを用いて蛍光観察画像を解析し、PUナノファイバーの蛍光強度を数値化した。

3. 結果および考察

3.1 エレクトロスピンニング法による PU ナノファイバーの作製

コレクター回転数 0 rpm と 2000 rpm で作製した PU ナノファイバーの SEM 画像を Fig. 3 に示す。牽引力を受けていない PU ナノファイバー(Fig. 3-A)では向きがランダムな状態だが、牽引力を受けた PU ナノファイバー(Fig. 3-B)では向きが揃うことが観察された。

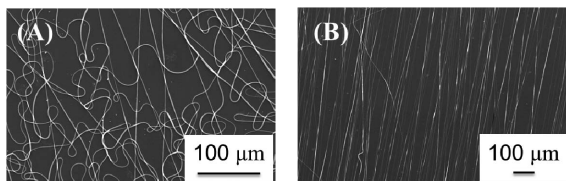


Fig. 3 ポリウレタンナノ繊維の SEM 画像 (A): 0 rpm, (B): 2000 rpm.

3.2 PU ナノファイバーへの FITC-BSA 吸着挙動の評価

PU ナノファイバー作製時の牽引力の有無による PU ナノファイバーへの FITC-BSA 吸着量の違いを評価するために、コレクター回転数 0 rpm(牽引力無し), 2000 rpm(牽引力有り)で作製した。また、同じ条件で PU ナノファイバーを作製してもすべての PU ナノファイバーに均一に牽引力がかからないことが考えられたため、それぞれ各回転数で作製したナノファイバー1本ずつの太さを計測し、太さとタンパク質吸着量の間を評価した。牽引力を受けていない PU ナノファイバー(Fig. 4-B1)では蛍光が観察されず、牽引力を受けた PU ナノファイバー(Fig. 4-B2)では蛍光が観察された。このことから、牽引力を受けた PU ナノファイバーの方が、タンパク質吸着量が多いことが示された。

Fig. 5 では、牽引力を受けていない PU ナノファイバーは蛍光強度が小さいところに多く分布し、牽引力を受けた PU ナノファイバーは蛍光強度が大きいところに多く分布することが観察された。蛍光強度が大きいほど、タンパク質が多く吸着していることを表す。よって、PU ナノファイバーが牽引力を受けることでタンパク質が多く吸着するようになると考えられる。

1 項で示したように、牽引力を受けた PU

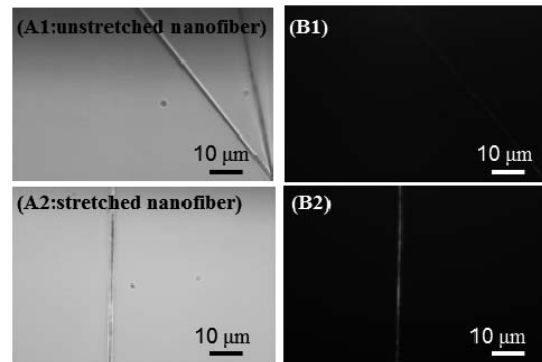


Fig. 4 蛍光顕微鏡によるナノ繊維の観察 (A)明視野(B).蛍光画像

ナノファイバーでは、相分離構造が変化して、ハードセグメントがファイバーの長さ方向に直線的に並ぶようになることを AFM により観察した。またタンパク質吸着実験の結果より、PU ナノファイバーが牽引力を受けることで多くのタンパク質が吸着するようになることが分かった。よって、PU ナノファイバー作製時の牽引力により、PU 中に存在するハードセグメントがファイバーの長さ方向に直線的に配置するようになることが、タンパク質吸着に影響をもたらすと考えられる。

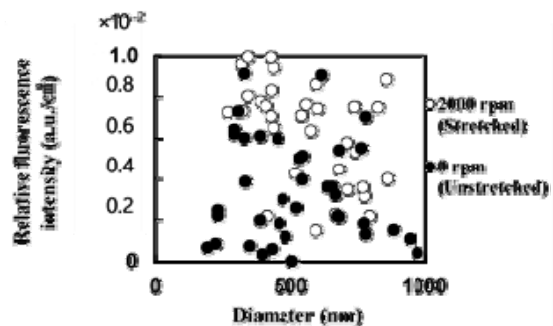


Fig. 5 繊維直径とタンパク質吸着の関係

3.3 ポリウレタンナノファイバーへのタンパク質吸着のメカニズムの解析

タンパク質が高分子材料表面に吸着する際には、一般的に、静電相互作用⁽⁸⁾、疎水性相互作用⁽⁹⁾、材料表面の細孔構造等の要因があげられる。1 項より、PU ナノファイバー表面は凹凸がないことが AFM 観察結果より明らかになったため、本研究では疎水性相互作用と静電相互作用についての評価を行った。

FITC-LZM の吸着を FITC-BSA と同様の条件で行うと、コレクター回転数 0 rpm の PU

ナノファイバーでは蛍光は観察されず、2000 rpm の PU ナノファイバーでは蛍光は観察された。この結果は FITC-BSA を吸着させた場合と同様になった。FITC-BSA(pKa4.7)は PBS(pH 7.4)中で負に荷電する。一方、FITC-LZM(pKa11)は PBS(pH 7.4)中で正に荷電する。負に荷電するタンパク質と正に荷電するタンパク質どちらも、PU ナノファイバーへの吸着が観察された。さらに、同様の吸着挙動を示した。よって、PU ナノファイバーへのタンパク質の吸着は、吸着させるタンパク質の荷電に影響されないため、静電相互作用による吸着の可能性は低いことが考えられる。

1% SDS 溶液による吸着タンパク質の脱離評価を行うと、1% SDS 溶液での洗浄後の PU ナノファイバーの蛍光は、BSA と LZM どちらも著しく減少した。よって、タンパク質の疎水部位と SDS の疎水基が相互作用することでタンパク質が脱離したものと考えられる。

また、0.05% Tween 20 溶液での洗浄後でも BSA と LZM どちらも蛍光は著しく減少した。(Fig. 6) よって、SDS 溶液での洗浄の結果と同様に、吸着タンパク質が脱離したものと考えられる。Tween 20 は非イオン性界面活性剤である。そのため、Tween 20 と相互作用したタンパク質への帯電の影響はない。よって、静電反発による吸着タンパク質の脱離は考えられない。

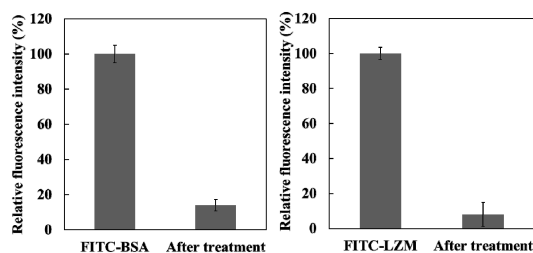


Fig. 6 Tween20 により処理をした PU ナノ繊維のタンパク質吸着量変化

SDS、Tween 20 による吸着タンパク質の脱離評価の結果から、PU ナノファイバー表面へのタンパク質の吸着は疎水性相互作用による可能性が高いと考えられる。

PU 中に存在するハードセグメントは、ソフトセグメントと比較して疎水的な部位である。PU ナノファイバー作製時の牽引力に

より、ハードセグメントがファイバーの長さ方向に直線的に配置することはつまり、疎水的な部位が PU ナノファイバーの長さ方向に直線的に配置し、密集することで、PU ナノファイバー表面に面積の広い疎水領域が生じ、疎水性相互作用によるタンパク質の吸着が観察されたと考えられる。

4. 結論

本研究では、本来タンパク質の吸着を抑制する PU が、エレクトロスピンニング法によりナノファイバー形状になり、また牽引力を受けることで、タンパク質吸着能が発現することを明らかにした。これは、ファイバー作製時の牽引力によりハードセグメントが配向し、広い疎水領域が生じることで、疎水性相互作用を強めたと考えられる。

今回得られた知見により、特定の機能を有した分子やナノ粒子をハードセグメント上に付与することで、高機能材料へ繋がること期待される。また、回転数(牽引力)を制御することで、機能性分子の吸着量を制御可能なナノファイバー創出へ繋がることも期待される。

謝辞

本研究を支援していただいた公益財団法人京都技術科学センターに感謝申し上げます。

文献

1. G. H. Reneker, I. Chun, *Nanotechnology*, **7**, 216-223 (1996).
2. F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, *Biomaterials*, **26**, 2603-2610 (2005).
3. A. Wang, H. Singh, T. A. Hatton, G. C. Rutledge, *Polymer*, **45**, 5505-5514 (2004).
4. J. Wang, H.-B. Yao, D. He, C.-L. Zhang and S.-H. Yu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **4**, 1963-1971 (2012).
5. D. Aussawasathen, J. H. Dong, L. Dai, *Synthetic. Metals*, **154**, 37-40 (2005).
6. H. Sakamoto, H. Asakawa, T. Fukuma, S. Fujita, S. Suye, *Scl. Technol. Adv. Mater*, **15**, 15008-150014 (2014).
7. C. Ma, Y. Hou, S. Liu, G. Zhang, *Langmuir*, **25**, 9467-9472 (2009).
8. H. Zhang, C. Bian, J. K. Jackson, F. Khademolhosseini, H. M. Burt, M. Chiao, *Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 9126-9133

- (2014).
9. S. T. Moerz, P. Huber, *Langmuir*, **30**, 2729-2737 (2014)

研究成果発表

1. “ポリウレタンナノファイバー表面へのタンパク質吸着挙動の解析とその構造および活性変化の評価”, 森田裕子, 坂元博昭, 末信一郎, 第 69 回日本生物工学会大会 (2017)
2. “Protein adsorption behavior onto a polyurethane electrospun nanofiber surface”, Y. Morita, H. Sakamoto, S. Suye, 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (2017)
3. “吸着タンパク質の 2 次構造/活性が保持されたポリウレタンナノファイバー基材”, 森田祐子, 坂元博昭, 末信一郎, 第 27 回インテリジェント材料/システムシンポジウム (2018)