

令和元年6月19日現在

機関番号：35408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18300

研究課題名(和文) 多段階化学修飾による疎水性化合物認識情報発信型人工高分子レセプターの創製

研究課題名(英文) Signaling synthetic polymer receptors prepared by molecular imprinting and multi-step post-imprinting modifications

研究代表者

砂山 博文 (Sunayama, Hirobumi)

安田女子大学・薬学部・助教

研究者番号：60706464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子インプリンティングによって作製される人工高分子レセプター(MIP)に対して部位特異的に化学修飾を行うポストインプリンティング修飾法(PIM)を駆使することによって、標的分子に対して高い親和性及び選択性を有する材料の開発を行った。PIMによりMIPの機能が格段に向上することが示されたことから、天然の抗体に替わる機能性材料創製の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体や酵素と呼ばれる生体ベースの材料は高い分子認識特性を有しており、病気の診断や治療等多くの分野で利用されているが、高価で不安定であるという課題がある。本研究で開発した分子認識材料(MIP)は抗体に匹敵する機能を実現できる可能性を示し、また本材料は人工材料ベースであることから量産化が可能となる。このことから安定・安価な抗体に替わる材料創製が可能となり、上記分野のコストダウン等大きな社会貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, synthetic polymer receptors capable of specific molecular recognition were prepared by molecular imprinting and post-imprinting modifications. Multi-step post-imprinting modifications were carried out to introduce capping agents into low affinity cavity and interacting groups into high affinity cavity, resulting in MIP with high affinity and selectivity toward target molecule.

研究分野：分子認識化学

キーワード：分子インプリンティング 高分子レセプター ポストインプリンティング修飾 バイオセンシング 分子認識

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体機能の解明や病気の診断・治療、環境分析、食品分析において抗体や酵素を用いた分析手法は強力なツールである。これらは抗体や酵素が持つ優れた親和性・選択性を利用しているが、それらの獲得には煩雑な操作と期間を要するため高価である。また、その貯蔵・輸送には冷蔵・冷凍設備が欠かせない。標的分子によってはその特性(免疫原性が無い、有毒、難溶性)のために抗体の作製が困難という場合もある。加えて、高価な測定装置を用いない限り結合情報可視化のための標識が必要であることも課題であり、そのような標的分子の分析には専門知識が必要な HPLC 分析や質量分析に頼る他なかった。従って抗体に替わる安定・安価な材料として、生体材料と同等の感度と選択性をもち、結合情報可視化のためのレポーター分子を組み込んだ情報発信型の人工高分子レセプターの開発が望まれている。

鋳型重合法の一つである分子インプリンティングは、人工高分子レセプター(分子インプリントポリマー, MIP)の簡便な作製手法として注目されている技術である。我々は本手法において可逆結合などの修飾可能部位を組み込んだモノマーを用いて MIP を作製し、作製後の MIP 中の修飾可能部位を利用して相互作用部位や蛍光レポーター分子を導入することで、MIP に機能を追加・調整する技術、ポストインプリンティング修飾法の開発に成功している(Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 13023)。

2. 研究の目的

分子インプリンティングと多段階ポストインプリンティング修飾(PIM)法を組合わせた分子認識材料創製法を駆使することにより、これまで抗体が作製できなかった化合物群に対して特異的に蛍光シグナルを発する分子インプリントポリマーを開発する。PIM として、「低アフィニティ結合部位の無効化」および「高アフィニティ結合空間のみに結合情報を可視化する蛍光レポーター分子の導入」を可能とするために、標的分子を可逆結合部位を有する新たなリンカー分子を介して基板上に配向を揃えた状態で固定化して分子インプリンティングを行うことで、これまで報告のされなかったことのない高感度で高選択的な情報発信型人工高分子レセプターの実現を目指す。

3. 研究の方法

本研究ではモデル標的分子として Lysozyme (Lyso)、Ovalbumin (OVA)、および前立腺特異抗原 (PSA) を用いて (1) PIM による低親和性結合空間の無効化、(2) 可逆結合を利用した配向固定化、(3) PIM による選択的機能性分子導入について検討を行った。

(1) PIM による低親和性結合空間の無効化

①機能性モノマーの合成・MIP 作製

PIM のための修飾部位としてジスルフィド結合を有する機能性モノマーの合成を行った(図 1)。Cystamine を出発物質とし、一方のアミノ基を Boc 基で保護した後、メタクリル酸を縮合剤を用いたカップリング反応で導入した。脱保護の後、無水グリコール酸と反応させることで目的物を得た。

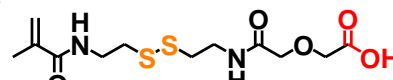


図 1. 合成したジスルフィド結合を有する機能性モノマー

重合官能基を修飾した金コートガラス基板上に、合成した機能性モノマー、コモノマーとして acrylamide、

親水性架橋剤として

N,N'-methyl enebisacrylamide (MBAA) を用い、モデル標的分子である Lyso 存在下で、4°C、2 分間 LED ライト (365 nm) を照射することで

ポリマー薄膜を作製し

た。1 M NaCl 水溶液及び、0.5 wt% SDS 水溶液で洗浄することで Lyso-IP を得た。

②PIM による官能基変換

Lyso-IP を還元剤 TCEP で処理することでポリマー内のジスルフィド結合を還元し、チオール基へと変換した。ここに 2-pyridyldithioethylamine 等 pyridyldisulfide 部位を有し末端に各種官能基(アミノ基、カルボキシ基、スルホン酸、エチレングリコール鎖)を有する化合物を反応させ種々の官能基を導入した。

③多段階 PIM による低親和性結合空間のカッピング(図 3)

TCEP で還元後のポリマーに 100 nM の Lyso を添加し高親和性の結合空間の保護を行った。そ

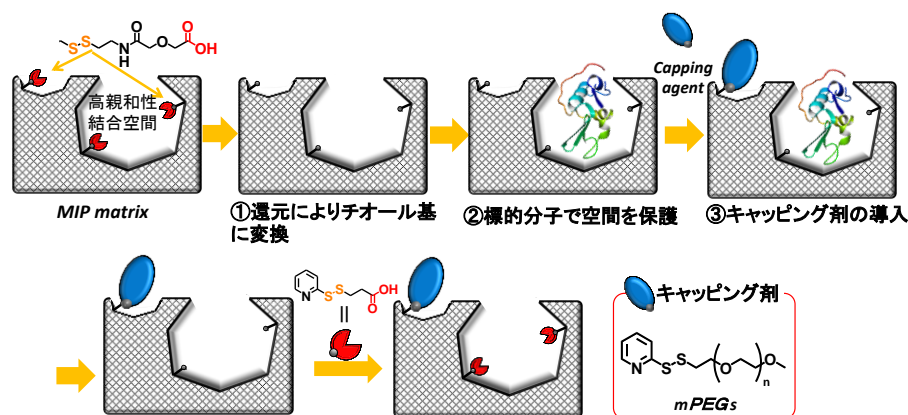


図 2. カッピング処理による低親和性結合空間の無効化の概要図

ここに 2.5 mM の分子量 800 のエチレングリコール鎖を有する pyridyldisulfide 誘導体を反応させた (4°C 4h)。反応後、NaCl 及び SDS で洗浄し、結合していた Lyso を洗浄し、高親和性の結合空間を再生した。その後、3-pyridyldithio propionic acid を反応させて相互作用部位を導入し、capped-MIP を作製した。

得られた材料のタンパク質認識特性を表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた分子間相互作用解析装置により行った。測定条件は、流速：20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、サンプルインジェクション：40 μL 、ランニング緩衝液：10 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) で行い、また、参照タンパク質として Lactalbumin (Lact), Myoglobin (Myo), Ribonuclease A (RNase) を用いた。

(2) 可逆結合を利用した配向固定化

① フェニルボロン酸を利用した配向固定化基板の作製

洗浄した金コートガラス基板に bis[2-(2-bromoisobutyryloxy)undecyl]disulfide および amino-EG6-undecanthiol を用いて、1:1 混合自己組織化単分子膜 (SAM) を作製した。続いて、基板上的のアミノ基に対し、糖鎖状ジエステル結合形成する 4-carboxy-3-fluorophenylboronic acid (CFPBA) をアミンカップリングにて導入した。この基板上にモデル標的分子として OVA を添加することで糖鎖部位が下を向いて配向固定化される。

② 表面開始原子移動ラジカル重合によるポリマー薄膜合成

OVA と相互作用可能な機能性モノマー pyrrolidyl acrylate (PyA)、高い生体適合性を有する 2-methacryloxyethyl phosphorylcholine (MPC)、親水性架橋剤として MBAA を用い、2,2'-bipyridyl、CuBr₂、ascorbic acid を加えて重合を開始し、40°C、60 min 表面開始原始移動ラジカル重合を行った。重合後の基板を 0.5 wt% SDS 水溶液及び 3 M guanidine/HCl 溶液で洗浄することで OVA を洗浄・除去した。

③ タンパク質結合能評価

SPR を用いて評価を行い、選択性の参照タンパク質として HSA、Avidin、Lyso、Conalbumin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いた。また、卵白実サンプル中の OVA 検出についても検討を行った。測定条件は、流速：20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、サンプルインジェクション：20 μL 、ランニング緩衝液：20 mM リン酸緩衝液 (含 150 mM NaCl, pH 7.4)

(3) PIM による選択的蛍光導入

① PSA 配向固定化基板の作製

(2)-①と同様の手法で重合開始基及びフェニルボロン酸が導入された金コート基板を作製した。この基板に PSA を固定化し、配向固定化基板を得た。

② PSA インプリントポリマー薄膜の作製

PIM 可能な機能性モノマーとして 4-[2-(Nmethacrylamido)ethylaminomethyl]benzoic acid (MABA) (図 2) を合成した。これは相互作用部位として安息香酸、PIM 部位として 2 級アミンを有する構造となっている。これと MPC、MBAA を (2)-②と同様に表面開始原子移動ラジカル重合にて 40°C、1h 重合反応を行った。その後、基板を 10 mM glycine/HCl 緩衝液 (pH 2.5)、NaCl 水溶液、SDS 水溶液で洗浄することにより、PSA を除去して、認識空間を作製した。

③ 多段階 PIM によるキャッピング及び蛍光分子導入

作製した基板に 3 nM の PSA を添加し、高親和性の結合空間の保護を行った。そこにキャッピング剤として 1 mM NHS-PEG₁₂-Me を反応させた。保護に使用した PSA を洗浄除去し、capped-MIP を作製した。さらにこの capped-MIP に蛍光分子 ATTO647-NHS (500 μM) を 1h 反応させ、蛍光シグナリング能の付与を行った。

④ 結合実験

SPR にて検討を行った。測定条件は流速：20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、サンプルインジェクション：20 μL 、ランニング緩衝液：10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)

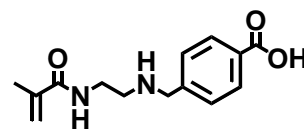


図 3. 合成した機能性モノマー (MABA)

4. 研究成果

(1) PIM による低親和性結合空間の無効化

① Lyso-IPs のタンパク質結合能

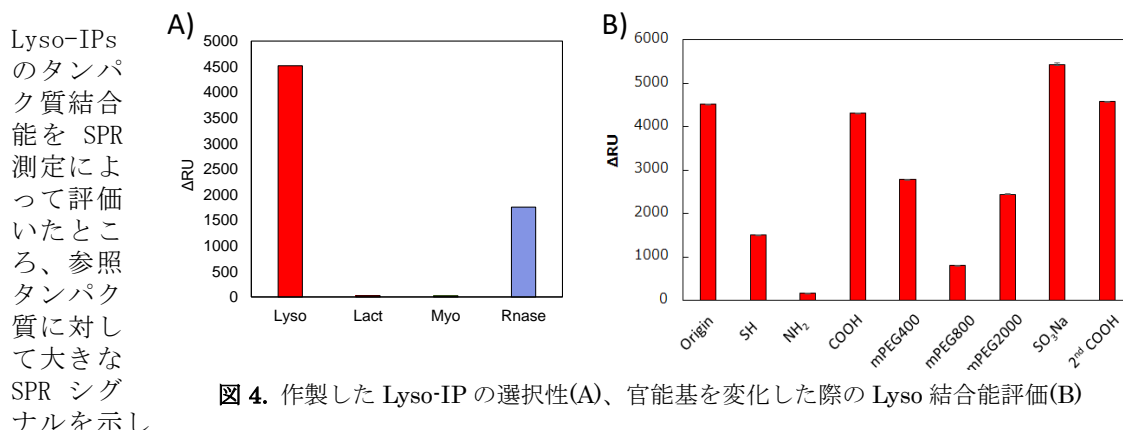


図 4. 作製した Lyso-IP の選択性 (A)、官能基を変化させた際の Lyso 結合能評価 (B)

Lyso-IPs のタンパク質結合能を SPR 測定によって評価したところ、参照タンパク質に対して大きな SPR シグナルを示し

たことから、作製した Lyso-IP には Lyso を選択的に認識する結合空間が形成されていることが示唆された(図 4A)。しかし、等電点の異なる Lact、Myo の吸着はほぼ無いが、Lyso と同じ塩基性のタンパク質である RNase については Lyso に対して 4 割程度の吸着を示すことが確認された。

②PIM による官能基変換による結合能への影響

PIM によってポリマー内の官能基を (SH) → (NH₂) → (COOH) → (mPEG400) → (mPEG800) → (mPEG2000) → (SO₃Na) → (COOH) と変換したところ、それに伴って Lyso 結合量の大きな変化が観察された(図 4B)。しかし(origin)、(COOH)、(COOH) (2 回目)の結合量が同程度となっており、このことから PIM によるジスルフィド結合の還元・再形成の過程でポリマーの骨格すなわち結合空間の大枠には影響を与えないことが明らかとなった。また導入した各官能基について、(NH₂)での大きな結合量の減少は静電的反発によると考えられ、また mPEGs ではオリゴエチレングリコール鎖がタンパク質の吸着を抑制するためと考えられる。一般的には鎖長の増加に伴ってタンパク質吸着抑制効果が増加する傾向にあるが、本研究では mPEG2000 で結合量がそのほかに比べて増加することが観察された。これは PEG 鎖が長くなるにつれて末端の pyridyldisulfide 部位とポリマー内のチオール基との反応性が低下するためだと考えられる。得られた結果より mPEG800 が最も Lyso の結合を抑制したことから、キャッピング剤としては mPEG800 が有効であることが示唆された。

③キャッピング処理の効果

キャッピングの有無でのタンパク質結合特性を検討した。評価には Selectivity factor として各タンパク質の結合量(ΔRU)を Lyso の結合量(ΔRU)で割ったもの、すなわち Lyso に対する相対的な結合量を指標として使用した。キャッピングした MIP(capped-MIP)では、Lact、Myo の吸着は低いまま、RNase の吸着を効果的に抑制できていることが示された。相対値基準で約 70%の改善が確認された(図 5A)。また、吸着量自体は半分程度まで減少するが、速度論的解析から結合親和性(K_a)は 7.3×10⁸ M⁻¹(uncapped-MIP)及び 1.2×10⁹ M⁻¹(capped-MIP)と算出されたことから、キャッピングによって高親和性の結合空間が保護されていることが示唆された(図 5B)。このことからキャッピング処理によって高親和性の結合空間を保護しつつ、選択性を改善できる材料が調整できたことが明らかとなった。

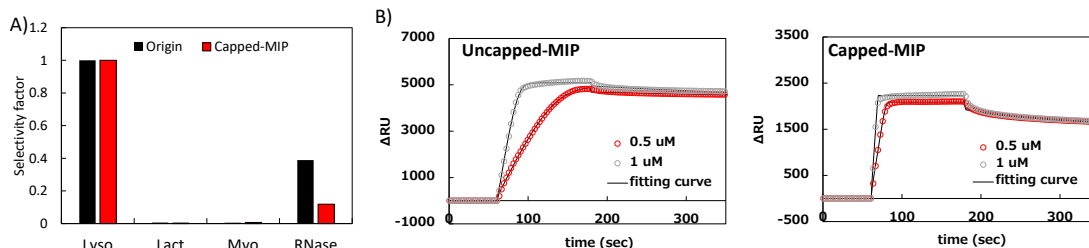


図 5. Capped-MIP の選択性(A)、uncapped-MIP 及び capped-MIP の Lyso 結合のセンサグラム及び、速度論解析によるフィッティングカーブ(B)

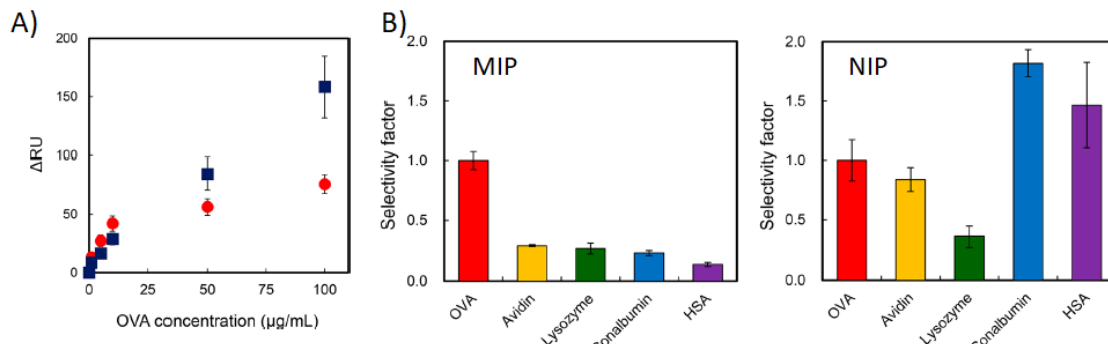
(2) 可逆結合を利用した配向固定化

①OVA インプリントポリマー

OVA インプリントポリマーに対して各濃度の OVA を添加したところ濃度依存的に SPR シグナルの増加が確認されたことから、作製したポリマー内に OVA 結合空間が形成されていることが示唆された。参照として作製した NIP(OVA を固定化せずに作製したポリマー)については OVA 濃度に対して直線的にシグナルが増加したことから、ポリマーに非特異的に吸着していることが示唆された。これらについて、カーブフィッティング(デルタグラフ使用)によりそれぞれの結合定数(K_a)を算出したところ、4.7×10⁶ M⁻¹(MIP)及び 6.9×10⁵ M⁻¹(NIP)であったことから、MIP が OVA に対して高い親和性を有していることが確認された(図 6A)。これはこれ以下部位として利用したフェニルボロン酸及び機能性モノマーPyA 残基が協同的に寄与しているためであると考えられる。また、選択性についても検討を行ったところ、MIP は OVA に対して最も大きなシグナルを示したのに対し、NIP では Conalbumin や HSA に対して大きなシグナルを示したことから、MIP に OVA 選択的な結合空間が形成されていることが示唆された(図 6B)。

②重合時間の検討

作製したポリマーの膜厚を X 線反射率測定から算出したところ、約 12 nm であった。これは OVA の高さ約 5 nm からすると高すぎると考えられる。SAM 層の高さが約 2 nm であることから、理想的な膜厚は 7 nm 程度であると考えられる。そこで重合時間を 45 分として MIP を作製したところ、結合親和性は 5.8×10⁸ M⁻¹、と約 100 倍向上し、選択性についても改善されることが示された(図 7AB)。このことから、MIP の膜厚制御は非常に重要な要素であることが明らかとなった。



③実サンプル測定

市販の卵から卵白成分を取り出し、それをリン酸緩衝液で希釈したものについて検討を行ったところ、緩衝液中と同様に OVA を検出できることが示された。よって本材料が実サンプル中でも標的分子を選択的に認識できることが確認された(図 7C)。

図 6. MIP と NIP の OVA 結合特性(A)、選択性(B)

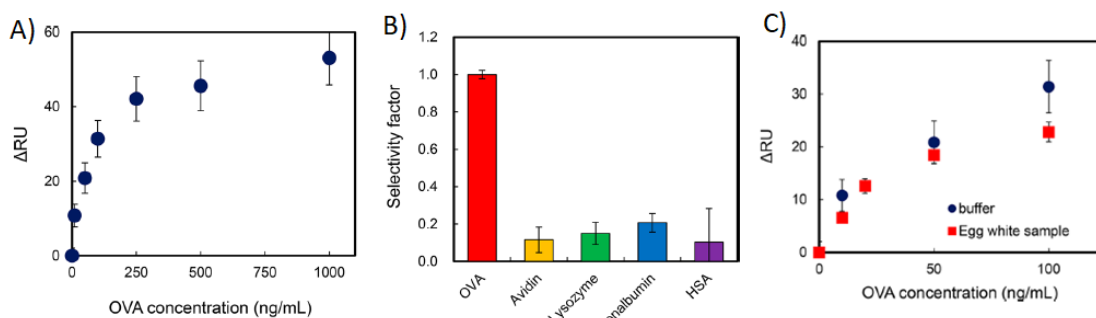


図 7. MIP(重合時間 45 分)の OVA 結合特性(A)、選択性(B)、実サンプル(希釈卵白)中での OVA 検出

(3) PIM による選択的機能性分子導入

①PSA インプリントポリマーの作製

作製した MIP の結合能評価を行ったところ、PSA の濃度依存的な SPR シグナルが観察され、これについてカーブフィッティングにより結合定数(K_a)を算出したところ、 $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ と抗体に匹敵する高い親和性を有していることが示された。また HSA 及び IgG を用いて選択性について検討を行ったところ、PSA に対して最も大きなシグナルを示したことから、PSA 選択的な結合空間が存在することが示唆された(図 8A)。しかしながら、参照のタンパク質についても PSA の吸着量に対して約 40%吸着していることから、キャッピングによる選択性の改善を試みた。

②キャッピングによる効果

高親和性の結合空間を低濃度(3 nM)の PSA で保護した後、NHS-PEG₁₂-Me を反応させることでキャッピングを行ったところ、この場合でも吸着量の減少は観察されたが、選択性は HSA で 47%、IgG で 96% と大きく改善されることが確認された(図 8B)。

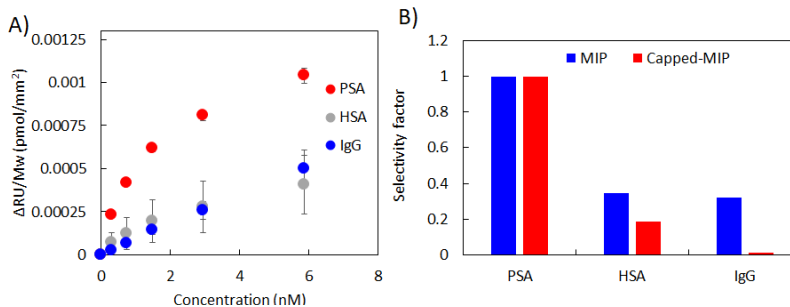


図 8. MIP のタンパク質結合特性(A)、キャッピング有無での選択性(B)、

本研究では、分子インプリンティングに多段階ポストインプリンティング修飾を組み合わせることにより、抗体に匹敵する親和性・選択性を有する材料創製の可能性を示す貴重な知見が得られた。本来の目的としていた疎水性化合物認識材料への展開までには至らなかったが、キャッピングによる高選択性を有する材料創製の方法論を概ね確立することができた。キャッピングなどの処理は機械等による工程の自動化が容易であることから産業化への障壁は低いと考えられる。本手法によって作製される材料は、プロテオミクスなどの基礎研究から、疾病の早期発見のための診断技術への応用・環境分析など広い範囲で、学術的にも産業的にも大きな波及効果がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. H. Matsumoto, H. Sunayama, Y. Kitayama, E. Takano, T. Takeuchi, Site-Specific Post-Imprinting Modification of Molecularly Imprinted Polymer Nanocavities with a Modifiable Functional Monomer for Prostate Cancer Biomarker Recognition, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2019, 20, 305-312. (DOI:10.1080/14686996.2019.1583495) 査読有

2. T. Morishige, E. Takano, H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Takeuchi, Post-imprinting-modified molecularly imprinted nanocavities with two synergetic, orthogonal, glycoprotein-binding sites to transduce binding events into fluorescence changes, *ChemNanoMat*, 2019, 5, 224-229. (DOI: 10.1002/cnma.201800519) 査読有
3. T. Saeki, H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Takeuchi, Orientationally Fabricated Zwitterionic Molecularly Imprinted Nanocavities for Highly Sensitive Glycoprotein Recognition, *Langmuir*, 2019, 35, 1320-1326. (DOI:10.1021/acs.langmuir.8b01215) 査読有
4. T. Takeuchi, H. Sunayama, Beyond natural antibodies, a new generation of synthetic antibodies created by post-imprinting modification of molecularly imprinted polymer, *Chem. Commun.*, 2018, 54, 6243-6251. (DOI: 10.1039/c8cc02923g) 査読有
5. H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Takeuchi. Regulation of Protein Binding Activities of Molecularly Imprinted Polymers via Post-imprinting Modifications to Exchange Functional Groups within the Imprinted Cavity, *J. Mol. Recognit.*, 2018, 31, e2633. (DOI: 10.1002/jmr.2633) 査読有
6. 砂山博文、竹内俊文、分子インプリンティングによる高感度分子認識素子の開発とその応用, *ファルマシア*, 2019, 55, 150-154. (DOI: 10.14894/faruawpsj.55.2_150)

[学会発表] (計 17 件)

1. 高宮和寛、砂山博文、高野恵里、北山雄己哉、竹内俊文、多段階ポストインプリンティング修飾による腫瘍マーカータンパク質高感度センシング材料、日本薬学会第 139 年会、2019
2. H. Sunayama, T. Takeuchi, Regulation of protein binding activities of molecularly imprinted polymer by single or multi-step post-imprinting modification, MIP2018, 2018
3. T. Saeki, H. Sunayama, E. Takano, Y. Kamon, Y. Kitayama, T. Takeuchi, Sensitive detection of prostate specific antigen by molecularly imprinted polymers prepared via post-imprinting modifications, MIP2018, 2018
4. 高宮和寛、砂山博文、高野恵里、北山雄己哉、竹内俊文、多段階ポストインプリンティング修飾を利用した高感度バイオマーカーセンシング、第 29 回クロマトグラフィー科学会議、2018
5. 林知彦、砂山博文、香門悠里、北山雄己哉、竹内俊文、ポストインプリンティング修飾及び配向固定化によるバイオマーカータンパク質認識空間の創製、第 78 回分析化学討論会、2018
6. 林知彦、砂山博文、香門悠里、北山雄己哉、竹内俊文、配向固定化及びポストインプリンティング修飾法による糖タンパク質認識ナノ空間の創製、第 25 回クロマトグラフィーシンポジウム、2018
7. 砂山博文、高宮和寛、高野恵里、北山雄己哉、竹内俊文、多段階ポストインプリンティング修飾を駆使したバイオマーカー認識空間の構築、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018
8. H. Sunayama, T. Takeuchi, Programmable In-Cavity Modifications in Molecularly Imprinted Polymers via Multi-Step Post-Imprinting Modifications, *Affinity* 2017, 2017
9. 松本大樹、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文、前立腺特異抗原を選択的に認識する分子インプリントポリマー薄膜の創製、第 24 回クロマトグラフィーシンポジウム、2017
10. 佐伯哲郎、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文、アレルゲン糖タンパク質を認識可能な配向性分子インプリント空間の構築、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会
11. 佐伯哲郎、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文、標的糖タンパク質を選択的に検出可能な配向性分子インプリントポリマー薄膜の創製、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017
12. 砂山博文、竹内俊文、多段階ポストインプリンティング修飾によるタンパク質結合空間の機能制御、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017
13. 佐伯哲郎、砂山博文、北山雄己哉、竹内俊文、標的糖タンパク質を選択的に認識する配向性分子インプリントポリマー薄膜の創製、第 66 回高分子学会年次大会、2017
14. 砂山博文、堀川諒、北山雄己哉、竹内俊文、バイオマーカータンパク質の高感度センシングを目指した多段階ポストインプリンティング修飾による分子インプリントポリマー、日本薬学会第 137 年会、2017
15. 砂山博文、竹内俊文、部位特異的ポストインプリンティング修飾によるタンパク質インプリント空間の機能調節、日本化学会第 97 年会、2017
16. 松本大樹、砂山博文、高野恵里、北山雄己哉、竹内俊文、前立腺特異抗原検出のための分子インプリントポリマーナノ薄膜の創製、日本分析化学会第 64 年会、2016
17. H. Sunayama, T. Takeuchi, Post-imprinting modification on molecularly imprinted polymers for regulation of molecular binding activity, MIP2016, 2016