

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14093

研究課題名(和文) 配列相同性の高いタンパク質ファミリーを高度に識別可能な分子認識ナノ空間の創製

研究課題名(英文) Synthesis of molecular recognition nanocavities capable of high discrimination for protein families with high sequence homology

研究代表者

香門 悠里 (Kamon, Yuri)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：90773218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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で作製される人工高分子レセプター(MIP)に標的タンパク質・リガンド間の特異的な分子認識能を付与することで、アミノ酸配列の相同性が高い(87%)タンパク質を識別する人工高分子材料の開発を行った。リガンドによる標的タンパク質のリガンド結合ドメイン認識能と、分子インプリンティングによるサイズ・形状識別能を組み合わせることでMIPの親和性・選択性が格段に向上し、天然の抗体に替わる分子認識材料の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

酵素や抗体など生体由来のレセプターは分子認識能が高いため、血液検査などの病気の診断を始め幅広く利用されているが、高価で壊れやすいといった課題がある。本研究で開発した人工高分子レセプターは、配列相同性の高いタンパク質に対しても抗体に匹敵する分子認識の実現可能性を示した。またこのレセプターは、生命機能に重要な配列相同性の高いタンパク質・リガンド相互作用の探索など生命機能の解明に資することが期待され、学術的に意義がある。さらに本手法は、様々なタンパク質・リガンドのペアに応用可能であり、抗体に替わる人工材料を低コストで量産できる可能性があることから産業分野への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, synthetic polymer receptors capable of discrimination for homologous proteins (87%) were prepared by molecular imprinting using a target protein-ligand specific interaction.

The combination of the ligand domain recognition ability provided by the ligand and the ability of size/shape discrimination provided by molecular imprinting was able to significantly improve the binding abilities of the MIP. The method described here is promising for discrimination of homologous proteins, and is expected to produce alternatives to natural antibodies.

研究分野：タンパク質認識高分子材料の開発、分子認識化学

キーワード：分子インプリンティング 高配列相同性タンパク質 タンパク質認識 タンパク質 リガンド相互作用
表面開始ATRP 血管内皮細胞増殖因子 ヘパリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

標的分子を選択的に結合する分子認識材料は、夾雑物の中から目的の分子を容易に識別できることから、分離材、バイオセンサー、治療材料など環境・ライフサイエンス分野において大きな注目を浴びている。標的分子を認識する材料として、抗体や酵素など生体由来のレセプターは、標的分子に対する結合親和性・選択性が高いため幅広く利用されている。しかしながら、生体由来であるため高価であり変性しやすいことが課題である。そこで最近では、生体に頼らず人工的に分子認識材料を創製する取り組みが行われ、生体由来のレセプターに替わる新規材料として盛んに研究が行われている。中でも、分子インプリンティングは、標的分子に対して特異的に結合する分子認識空間を高分子内に構築する技術として注目されており、これまでに低分子化合物からペプチド、タンパク質まで様々な分子を認識する高分子材料が報告されている。分子インプリンティングは鑄型重合法の一つであり、標的分子と相互作用させた機能性モノマーを、モノマーおよび架橋剤と共重合し、得られた架橋高分子から標的分子を除去することで、標的分子のサイズ・形状を記憶した分子認識空間を構築した人工高分子レセプター(分子インプリントポリマー; MIP)を創製することができる。比較的簡便な操作で合成が可能であるものの、タンパク質のような複雑な構造を持つ標的分子に対しては、アミノ酸配列や立体構造の微細な違いを識別する分子認識空間を創製するのは容易ではない。つまり、高い分子認識能を獲得するためには、標的タンパク質のアミノ酸配列、等電点、特定ドメインの有無、サイズを理解し、誤認識の生じない分子認識空間を構築する新たな戦略が求められている。

タンパク質-リガンド相互作用は、リガンドがタンパク質内のリガンド結合ドメイン(LBD)という規定されたアミノ酸配列から成る部分構造に結合する、特異性の高い相互作用であることが知られている。従って、リガンドは標的タンパク質を認識するのに優れた相互作用部位として機能し、分子インプリンティングの技術と組み合わせることで高い分子認識能を示すタンパク質認識高分子材料の創製が期待できる。我々はこれまでに、リガンドのみを相互作用部位としたMIPを創製し、LBDをもつタンパク質を識別することに成功している[*Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4764.]。

本研究では、タンパク質-リガンド相互作用を取り入れた分子インプリンティングをさらに発展させて、LBDだけでなくアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質を識別する高度なMIPの創製を指向した。その標的タンパク質として、癌の増殖・転移に重要な血管新生の誘導に大きく寄与している血管内皮細胞増殖因子のファミリーA(VEGF-A)に着目した。VEGF-Aには、代表的なアイソフォーム(VEGF165、VEGF189、VEGF121)が存在する。中でも、VEGF165とVEGF189は、ヘパリンというリガンドが結合するドメイン(HBD)を持っているが、VEGF121には存在しない。また、VEGF165とVEGF189のアミノ酸配列相同性が87%と非常に高い。このような特徴的な構造を持つVEGFアイソフォームの優性発現性は、癌の種類や進行度によって異なることが知られている[*BMC Cancer* **2005**, *5*, 128.]。従って、VEGFアイソフォームの識別材料は癌の診断に有益である。これまでに、ヘパリンのみを相互作用部位とした高分子材料により、HBDを持つVEGF165とHBDを持たないVEGF121を識別することができたものの、アミノ酸配列相同性が高いVEGF165とVEGF189の有意な識別には至っていない。

2. 研究の目的

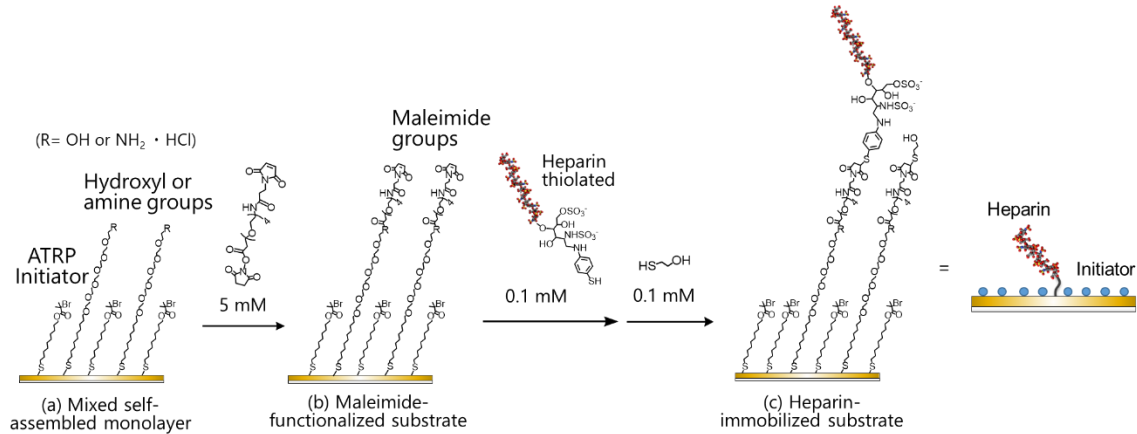
アミノ酸配列相同性が87%と非常に高いVEGF165とVEGF189を高度に識別するためには、HBDだけでなくそれぞれの細かなアミノ酸配列の違いも考慮したタンパク質認識ナノ空間の構築が求められる。そこで本研究では、HBD以外の塩基性アミノ酸残基(特にリシン残基)がVEGF165で7個、VEGF189で16個それぞれ有し、HBDに対してそれらの塩基性アミノ酸残基の立体配置が異なることに着目した。HBDに加えて塩基性アミノ酸残基の位置も精密に識別可能な分子認識ナノ空間を構築することで、VEGF165とVEGF189を有意に識別するMIPの創製を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヘパリン分子の検討

標的とするヘパリン結合性 VEGF165 と VEGF189 は、ヘパリンの分子鎖長によって結合親和性が異なることが知られている[*Structure* **1998**, *6*, 637.]。本研究では、分子量が 665、~1800、1800-7500、10000-12000 のヘパリンを用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)法により各 VEGF の結合性を調べた。まず、マレイミド基を修飾した SPR センサチップにマイケル付加反応でヘパリンを化学修飾するために、ヘパリンの片末端にチオール基を導入する反応条件を検討した。具体的には、ヘパリンの片末端が還元性を示すことに着目して *p*-aminothiophenol を borane-2-methylpyridine complex(還元剤)存在下で 10 v% 酢酸メタノール水溶液(methanol/water = 1/1 v%)中にて室温で 2 日間、あるいは 40°C で一晚攪拌して、還元的アミノ化反応を行ってチオール基を導入した。得られた化合物の ¹H NMR 測定および ESI-MS 測定により、化学構造を同定した。また、チオール導入率(x)は ¹H NMR (x_1)あるいはエルマンアッセイ(x_2)にて算出した(式(1)、(2))。MW 1800-7500、10000-12000 のヘパリンについてはチオール導入前後で円偏光二色性(CD)スペクトル測定を行うことで二次構造が保持されているか確認した。Scheme 1 に従って SPR センサチップ上にヘパリンを修飾し、SPR 測定により各 VEGF の結合親和性を評価した(SPR 測定条件は(3)に記載)。この時、SPR センサチップへの混合自己組織化単分子膜の形成(Scheme 1a)については X 線光電子分光(XPS)測定による表面分析を行うことで解析した。

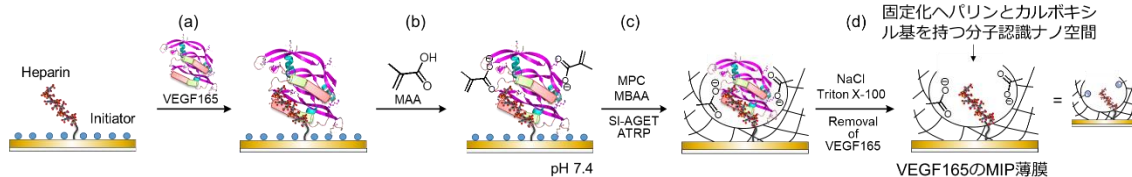
$$x_1 = \frac{I_{6.5-7.3 \text{ ppm(measurement)}}/I_{5.2 \text{ ppm}}}{I_{6.5-7.3 \text{ ppm(theoretical)}}/I_{5.2 \text{ ppm}}} \times 100 [\%] \quad (1), \quad x_2 = \frac{A_{\text{thiolated heparin}}}{A_{p\text{-aminothiophenol}}} \times 100 [\%] \quad (2)$$



Scheme 1. 各ヘパリン固定化基板の作製手順

(2) VEGF165 と VEGF189 を識別する MIP 薄膜の作製

まず、VEGF165 を標的とし、(1)で VEGF165 の最大結合量が最も大きかった MW10000–12000 のヘパリンを用いて VEGF165 の MIP の創製を試みた。Scheme 1 に従ってヘパリン固定化基板を調製し、10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)中で VEGF165 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)を相互作用させた(Scheme 2a)。ここにメタクリル酸(MMA、1 mM)を加えて、基板上的 VEGF165 のフリーの塩基性アミノ酸残基に静電的相互作用させて MAA を配置した(Scheme 2b)。親水性モノマーとして 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC、180 mM)、親水性架橋剤として *N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAA、20 mM)を用いて表面開始原子移動ラジカル重合(SI-AGET ATRP)を 10 mM tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)中 25°Cで 4h 行った(Scheme 2c)。2M の NaCl 水溶液と 0.5 w% の Triton X-100 水溶液を用いて固定した VEGF を除去し、固定化ヘパリンおよび MAA 由来のカルボニル基を持つ分子認識ナノ空間が形成された MIP 薄膜を得た(Scheme 2d)。MIP 薄膜の形成は XPS 測定による表面分析で解析し、MIP の乾燥状態の膜厚は X 線反射率(XRR)測定から見積もった。上述のような分子認識ナノ空間が構築されたことによって VEGF165 の結合性に与える効果を確認するために、3 つのリファレンスポリマーを同様の手順で作製した。一つ目は、重合中に MAA を入れずに重合した MIP without MAA、二つ目は VEGF165 および MAA を加えずに重合した NIP、3 つ目はヘパリンを固定していない基板上で VEGF および MAA を加えずに重合した NIP without heparin immobilized である。



Scheme 2. ヘパリンおよび ATRP 開始基を固定した基板上に VEGF165 の MIP 薄膜を作製する手順

(3) VEGF の結合実験

すべてのタンパク質結合実験は SPR 測定により行った。VEGF の 3 つのアイソフォーム (VEGF165、VEGF189、VEGF121)に加えて、血液検査を指向して血中タンパク質の約 60%を占めるヒト血清アルブミンと、 γ グロブリンも参照タンパク質として選択した。10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)を用いて各タンパク質溶液を準備した。SPR 測定は、流速 $20 \mu\text{L min}^{-1}$ 、インジェクション量 $20 \mu\text{L}$ 、25°Cにて行い、インジェクションが終了してから 150 秒後のレゾナンスユニット (RU) 値を検出し、インジェクション前のベースラインの RU 値を差し引くことで各タンパク質の結合量 $\Delta\text{RU}[\text{pg mm}^{-2}]$ 値を算出した。得られた ΔRU 値をタンパク質のインジェクション濃度に対してプロットした吸着等温線について、非線形最小二乗法によるカーブフィッティング解析を行うことで解離定数 ($K_d[\text{M}^{-1}]$)および最大結合量 ($\Delta\text{RU}_{\text{max}}[\text{pg mm}^{-2}]$)を見積もった。結合選択性については、 100 ng mL^{-1} における VEGF165 の ΔRU 値に対する各タンパク質の ΔRU 値の比を選択性因子 (SF 値)として求めることで評価した(式(3))。

$$\text{SF} = \frac{\Delta\text{RU}_{\text{reference protein}}}{\Delta\text{RU}_{\text{VEGF165}}} \quad (3)$$

4. 研究成果

(1)ヘパリン分子の検討

¹H NMR 測定の結果から、チオール化したすべてのヘパリンから、*p*-aminothiophenol のベンゼン環由来のプロトンのシグナルが 7.3–6.5 ppm に観測された。チオールの導入率は、MW 665 が $x_1=64\%$ 、MW~1800 が $x_1=35\%$ 、MW 1800–7500 が $x_1\sim 100\%$ 、MW 10000–12000 が $x_1=46\%$ 、 $x_2=47\%$ であった。また、MW 1800–7500 と MW 10000–12000 のヘパリンについてチオール導入前後での CD スペクトル測定を行ったところ、210 nm に見られる極小ピークがチオール導入前後で大きく変化しなかった。このことから、この還元的アミノ化反応でヘパリンの二次構造は大きく変わらず、ヘリックス構造が保持されていることが示された。以上のことから、各ヘパリンについて片末端にチオール基を導入することに成功した。

XPS 測定にて表面分析を行った結果、Scheme 1 に従って調製した自己組織化単分子膜 (Scemela)の基板表面から Br 3d 軌道に由来するピークと、C=O 結合や C-O 結合の C 1s 軌道に由来するピークが新たに観測されたことから、ATRP の開始基 2-ブロモイソブチル基とヘパリンを結合するヒドロキシ基を有する混合自己組織化単分子膜の形成が示された。ヒドロキシ基の代わりにアミノ基を用いた場合も同様にして SPR センサチップ上に混合自己組織化単分子膜を調製した。このヒドロキシ基(あるいはアミノ基)との縮合反応によりマレイミド基を末端に導入し、マイケル付加反応によりチオール化ヘパリンを導入して各ヘパリン固定化基板を調製した。ここで、MW 1800–7500 および MW 10000–12000 のヘパリンはヒドロキシ基をもつ混合自己組織化単分子膜上に、それ以外はアミノ基を持つ混合自己組織化単分子膜上に固定した。

SPR 測定により、VEGF の結合挙動はヘパリンの分子量に応じて異なることが分かった(Figure 1)。各 VEGF のインジェクション濃度が 0–200 nM の範囲で飽和曲線が得られたものに関して K_d および ΔRU_{max} を見積もった。VEGF165 について、分子量が一番小さい MW 665 のヘパリンでは $K_d=15$ nM および $\Delta RU_{max}=112$ pg mm⁻²、MW~1800 では $K_d=20$ nM および $\Delta RU_{max}=192$ pg mm⁻²、最も大きい MW10000-12000 では $K_d=72$ nM および $\Delta RU_{max}=2560$ pg mm⁻² となり、ヘパリンの分子量の増加に従って結合親和性は少し小さくなるが最大結合量は劇的に大きくなることが分かった。反対に、VEGF189 では、MW665 のヘパリンの場合 $K_d=320$ nM および $\Delta RU_{max}=9180$ pg mm⁻²、MW~1800 の場合 $K_d=83$ nM および $\Delta RU_{max}=2950$ pg mm⁻² となり、分子量の増加に従って結合親和性が大きくなるが最大結合量は小さくなり、VEGF165 と反対の傾向が観測された。このように、各 VEGF のヘパリンへの結合親和性はヘパリンの分子量に大きく影響されることが分かった。各 VEGF の MIP 創製には、結合親和性の大きさと固定化量の双方を考慮すると、VEGF165 には MW1000–12000、VEGF189 には MW~1800 が適していると考えた。

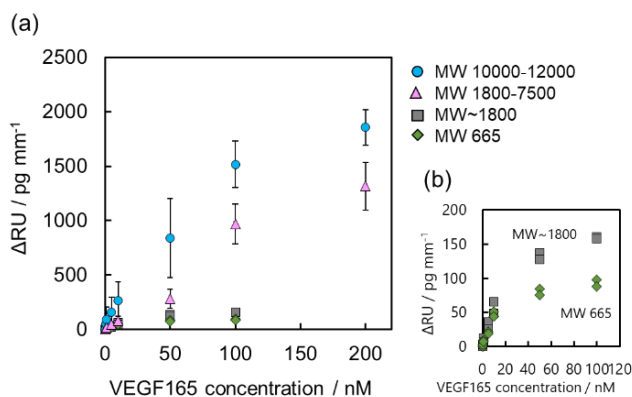


Figure 1. VEGF165 の各ヘパリンに対する結合親和性実験(10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)、25 °C)

(2) VEGF165 と VEGF189 を識別する MIP 薄膜の作製

Scheme 2 に従って作製した VEGF165 の MIP について XPS 測定を行ったところ、重合前には存在しない P 2p 軌道に由来するピークが新たに観測されたことから、MPC を含むポリマー層が基板表面に形成されていることが明らかとなった。また、リファレンス基板からも、同様の P 2p 軌道に基づくピークが重合後に観測されたことから、VEGF165 の有無に関係なく SI-AGET ATRP によりポリマー薄膜を合成することに成功した。また、得られた MIP の乾燥膜厚は XRR 測定により約 7.1 nm であることが分かった。この膜厚は、VEGF165 が単層に結合した場合の理論膜厚 (6.4 nm) にほぼ一致している。このことから、得られた MIP は、ポリマー薄膜の表層に VEGF165 の大きさに適したサイズのナノ空間が構築されていることが示唆された。

(3) VEGF の結合実験

VEGF165 の結合親和性について SPR 測定結果を解析したところ、MIP に対しては VEGF165 の濃度が 10 nM になるまでに吸着飽和に達していることが分かった(Figure 2a)。解離定数は 3.4 nM となり、一般的な抗体と同程度の結合親和性を示した。一方、MIP without MAA は、ヘパリン固定化基板と同じように直線的に増加し、見かけの解離定数は 40 nM と MIP に比べて 10 倍以上大きく結合親和性が低いことが分かった(Figure 2b,2c)。つまり、MIP はナノ空間形成による

サイズ・形状認識と、形成されたナノ空間内で固定化ヘパリンによる HBD 認識能および MAA 由来のカルボキシル基による塩基性アミノ酸残基認識能の相乗効果が働いたことにより、VEGF165 に対して高い親和性を示したと考えられる。さらに、MIP without MAA の解離定数 40 nM はヘパリン固定化基板の 72 nM に比べて 1.8 倍小さくなった。このことから、MPC を含む親水性ポリマー層の構築により、VEGF165 の疎水性相互作用による非特異的な吸着が抑制されたことが推察される。また、NIP にはほとんど VEGF165 が結合せず、NIP without heparin とほぼ同じ吸着挙動を示した(Figure 2d,2e)。このことから、NIP では、固定化ヘパリンが MPC からなる親水性ポリマー層によって埋没して VEGF165 が近づけなくなっている可能性がある。以上のことから、固定化ヘパリン周囲のポリマー層の親水性も、VEGF165 がヘパリンに結合するのに影響を及ぼすことが分かった。

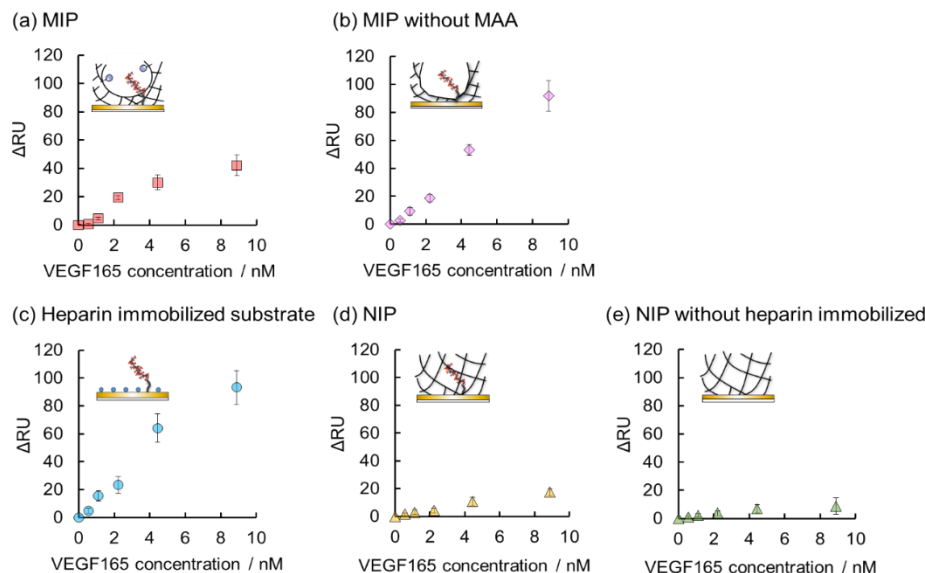


Figure 2. 各基板に対する VEGF165 の結合親和性実験(10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4、25°C)

次に、SPR 測定より得られた結果から VEGF アイソフォーム(VEGF165、VEGF189、VEGF121)の選択性ファクター(SF 値)について評価した(Figure 3)。ここでは、SF 値が小さいほど VEGF165 に対する選択性が大きいと評価することができる。MIP と MIP without MAA の VEGF121 に対する SF 値は、0.05 (p 値 < 0.0005)、0.07 (p 値 < 0.05) と非常に小さく同程度の値となった(Figure 3a, 3b)。これは、VEGF121 には HBD が存在しないため、双方の分子認識空間内のヘパリンによる HBD 識別能が働いた結果であると考えられる。一方、VEGF189 に対しては、MIP の SF 値は 0.54 (p 値 < 0.05) と有意な差が見られたが、MIP without MAA では選択性は見られなかった。MIP で選択性が見られたのは、MIP の分子認識空間内において MAA 由来のカルボキシル基が VEGF165 の塩基性アミノ酸残基に対して相補的な位置に存在するため、VEGF165 をより認識しやすくなったためだと考えられる。一方、ヘパリン固定化基板と NIP では、VEGF 結合選択性に有意差が見られなかった(Figure 3c, 3d)。さらに、MIP は血中タンパク質のヒト血清アルブミンやγ-グロブリンに対しても SF 値が 0.097 (p 値 < 0.0005)、0.20 (p 値 < 0.0005) と小さい値となった。このことから、MIP は血液中においても VEGF165 に対する結合選択性を示す可能性が示唆された。

以上の結果から、固定化ヘパリンと MAA を適切に配置した親水性の分子認識ナノ空間を構築することが、VEGF アイソフォームを識別するのに重要であることが明らかになった。

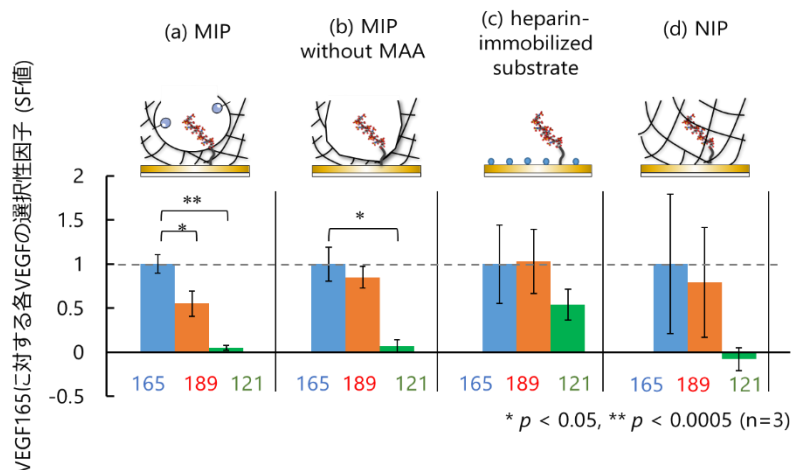


Figure 3. VEGF アイソフォームの各基板に対する結合選択性実験(10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4、25°C、100 ng/mL)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 香門悠里、竹内俊文	4. 巻 3
2. 論文標題 Molecularly imprinted nanocavities capable of ligand-binding domain and size/shape recognition for selective discrimination of vascular endothelial growth factor isoforms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS sensors	6. 最初と最後の頁 580-586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssensors.7b00622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 サイズとリガンド結合ドメイン認識能を併せ持つ分子インプリントナノ空間
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 Molecularly Imprinted Cavities Bearing Specific Ligands for Target Proteins Capable of Recognition towards Protein Families with High Homology
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 高配列相同性タンパク質識別のための分子インプリント空間デザイン
3. 学会等名 第77回分析化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 リガンド結合ドメインとサイズ双方を識別するタンパク質認識ナノ空間の創製
3. 学会等名 日本分析化学会 第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 リガンド結合ドメイン認識およびサイズ認識が可能なタンパク質認識場の構築
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuri Kamon
2. 発表標題 Molecularly imprinted cavities prepared using specific ligands for high selective recognition of target proteins
3. 学会等名 9th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 リガンド結合ドメインと形状識別能による構造類似性タンパク質認識ナノ空間の創製
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 Molecularly imprinted nanocavities for angiogenesis factor proteins capable of protein-ligand interaction-based recognition with size/shape selectivity
3. 学会等名 第27回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 Molecularly imprinted nano-cavities capable of size, shape and ligand binding domain recognition for proteins bearing high homologous amino acid sequences and sizes
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 香門悠里
2. 発表標題 標的タンパク質を高精度に識別可能なプラスチック抗体の設計と合成
3. 学会等名 第77回分析化学討論会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----