

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310062

研究課題名（和文） エンドトキシンを選択的に吸着する分子インプリントゲルビーズの調製

研究課題名（英文） Preparation of molecularly imprinted gel beads that selectively adsorb endotoxin

研究代表者

箕浦 憲彦 (MINOURA NORIHIKO)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：10358111

研究成果の概要（和文）：水からエンドトキシンを除去するため、エンドトキシンを選択的に吸着する高分子ヒドロゲルの開発を目的とした。ゲルの調製には分子インプリント技術を応用し、機能性モノマーとしてアミノ酸誘導体、トリペプチド誘導体などを用いた界面鋳型重合により、エンドトキシン結合部位をもつゲルを調製する技術の確立に成功した。得られたゲルは、他の物質が共存する環境下においてもエンドトキシンを選択的に吸着すること、さらに吸着した後は酸・アルカリ洗浄により再利用することも可能であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To remove endotoxin from water, we plan to develop polymer hydrogels that selectively adsorb endotoxin. We successfully prepared polymer hydrogels with endotoxin-binding sites by applying a molecular imprinting technique and using amino acid derivatives or tripeptide derivatives as functional monomers. The hydrogels obtained selectively adsorbed endotoxin even in a coexistence of the other substances, and after adsorption of endotoxin to the hydrogels was completed the hydrogels could be regenerated by washing with acidic and basic solutions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：高分子合成、分子認識、表面・界面物性、有害化学物質

1. 研究開始当初の背景

エンドトキシンとは、グラム陰性菌の細胞壁を構成するリポ多糖(LPS)で、リポAと呼ばれる脂質と多糖鎖が2-ケト-3-デオキシオクトン酸(KDO)を介して結合した物質である。エンドトキシンは、血中に入ると発熱を引き起こすほか、ショック、血管内凝固、リンパ球活性化など、多くの生物活性を有す

るため、特に、注射液、輸液、透析液等を取り扱う医療現場では、その除去に細心の注意が払われる。除去方法として従来、高温・高圧処理または酸、アルカリを使う分解法、活性炭やイオン交換体に吸着させ除去する方法、膜やメンブレンフィルター等を使い濾過する方法が知られている。これらは、分解条件が過酷すぎて共存する他の生体成分に影響

響を与える、また特異性が低くエンドトキシン以外の成分も共に除かれてしまうなどの問題があった。

2. 研究の目的

現在使用されている除去方法よりも簡便・安価で、エンドトキシンのみを選択的に吸着・捕捉する機能をもつゲルビーズを分子インプリント法により調製する技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

分子インプリント法はMosbachによって開発された鋳型重合法の一つであり、1990年代より、臨床分析、薬理診断、環境分析、DDSへの有用性が注目され、研究がなされてきた。

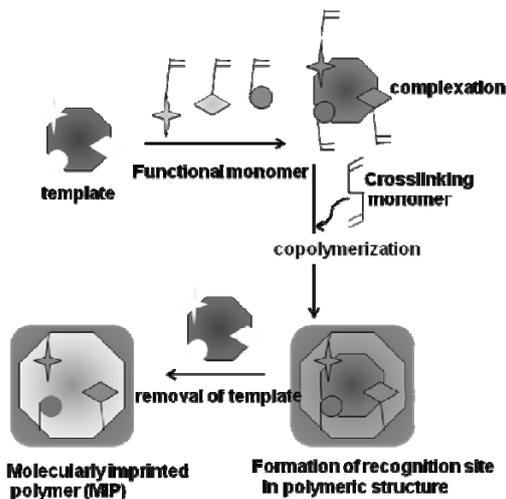


図1 分子インプリントポリマーの調製原理

分子インプリントポリマー(MIP)の作製は以下のように行なわれる(図1)。まず始めに機能性モノマー(Functional monomer)と鋳型分子(Template)を非共有結合によって、複合体(Complex)を形成させる。次に架橋性モノマー(Crosslinking monomer)、重合開始剤を加えて共重合(Copolymerization)し、ポリマーを作成する。その後、鋳型分子をポリマーから取り除くと、ポリマー中に鋳型分子と相補的な空孔が形成される。この空孔の分子認識能、選択的吸着特性が分子インプリントポリマーの主な特徴である。また、分子インプリントポリマーは簡単かつ安価に生産でき、物理的・化学的安定性が高いことも大きな特徴である。

研究代表者らはこれまで、鋳型分子としてペプチド、タンパク質、遺伝子DNAなどの生理活性物質を対象に研究してきた。本研究のエンドトキシンは、長い多糖構造をもつ親水部と長鎖アルキル構造をもつ疎水部を合わせもつ両親媒性の巨大分子であるため、鋳型

分子としてエンドトキシシンを用いる場合と、すべてのエンドトキシシンに共通にみられ、生物活性の中心であるリポドAを用いる場合とに分けて、エンドトキシシンを特異的吸着・除去するポリマーゲルビーズの調製を試みた(図2)。

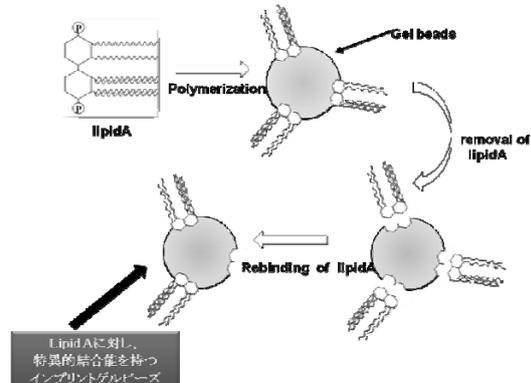


図2 エンドトキシシン特異的認識インプリントゲルビーズ

エンドトキシシンと結合するタンパク質の結合部位の共通構造には、(塩基性アミノ酸+芳香族アミノ酸+塩基性アミノ酸)のシーケンスをもつことが明らかになっている。そこでこの知見を参考にして、本研究では機能性モノマーとして、(1)塩基性・芳香族アミノ酸誘導体、(2)トリペプチド誘導体、(3)アミノトリアジン誘導体の3種類についてゲルの調製方法を検討し、得られたインプリントゲルのエンドトキシシン結合能評価を行った。

さらに、実用的観点から、インプリントゲルからなるビーズ(粒子径50-100 μ m)の調製方法の確立、共存物質含有水溶液からのエンドトキシシン選択的吸着能の評価、エンドトキシシン吸着後のゲルの再生利用方法などについても検討した。

4. 研究成果

エンドトキシシン認識能の高いインプリントゲルの効率的な調製には、ポリマー合成の際に水相・油相界面を用いることが重要であることを見出した。以下に、個別具体的に述べる。

(1)塩基性・芳香族アミノ酸誘導体、すなわち、アクリロイルリジンとアクリロイルフェニルアラニンを機能性モノマーとして用いた場合：

化学合成法により、これらのアミノ酸を側鎖にもつ機能性モノマーを合成する技術を確立した。これらの誘導体を用いてリポドAをテンプレートとしたインプリントゲルを調製する最適条件と、得られたインプリントゲルのエンドトキシシンとの結合能を検討し

た。その結果、一方の機能性モノマーだけで調製したゲルではエンドトキシンに対する高い吸着量が見られず、モノマーのモル比が2:1で調製したゲルで高い吸着量とインプリント効果が見出されたことから、エンドトキシンとの結合が静電的相互作用と疎水的相互作用の両者が必要であることが明らかになった。また、pH 7.5で調製したゲルでは、pH 3.0 および pH 12.0でエンドトキシンを吸着しないことから、pH 変化によるゲルの変形、すなわち認識場の崩れにより説明でき、このことは逆に認識場が形成されていることを証明するものである。ゲルへのエンドトキシンの吸着等温線はラングミュア型であり、結合定数は $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、飽和結合容量は $1.0 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ であった。大腸菌由来のエンドトキシンに対する認識部位をもつゲルは、それと類似の化学構造をもつエンドトキシンとの競合吸着実験結果から、吸着選択性が高いことが明らかになった。さらに、得られたゲルの再利用については、ゲルを酸性・アルカリ性水溶液による洗浄処理を行うと吸着能力は低下したが、ゼロになることはなかった。

(2) トリペプチド誘導体、すなわち、トリペプチド (Lys-Phe-Lys, Lys-Trp-Lys, Lys-Ala-Lys, Lys-Lys-Lys) をアクリルアミドの側鎖に結合させた誘導体を機能性モノマーとして用いた場合:

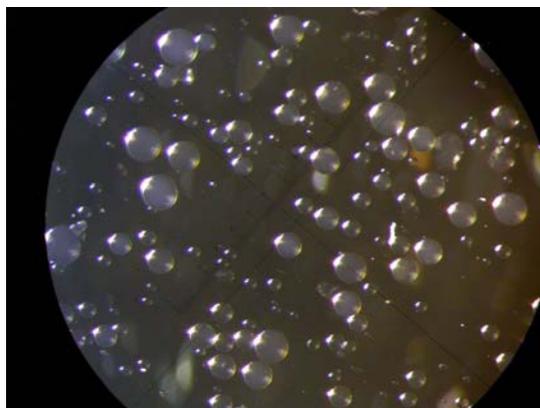
化学合成法により、これらの機能性モノマーを合成する技術を確立した。これらの誘導体を用いてリポドAをテンプレートとしたインプリントゲルを調製する最適条件と、得られたインプリントゲルのエンドトキシンとの結合能を検討した。その結果、これらの誘導体の中で、(Lys-Phe-Lys) をアクリルアミドの側鎖に結合させた誘導体を機能性モノマーとして用いて調製したゲルがもっとも高い吸着量を示した。さらに、前に検討したアミノ酸を側鎖にもつ誘導体を機能性モノマーとして用いた場合と比べて、このトリペプチドを側鎖にもつ誘導体ではエンドトキシンの吸着能が向上し、結合定数も増加することが明らかになった。また、このゲルでは、エンドトキシンの吸着と洗浄による再生の操作を繰り返しても、認識能力の低下は少なく、さらに、化学構造が類似した毒性の低いエンドトキシンとの吸着選択性も高く、実用面で有望であることがわかった。

(3) アミノトリアジン誘導体を機能性モノマーとして用いた場合:

実用的観点から、トリアジン誘導体を機能性モノマーとして用いて逆相懸濁重合によりエンドトキシンをインプリントしたゲルビーズを調製する最適条件を明らかにした。

得られたゲルビーズの平均直径は、 $76 \mu\text{m}$ であった (図3)。

タンパク質の一種であるアルブミンはゲルビーズに吸着しないことが確認できたので、共存してもエンドトキシン認識結合能に影響を及ぼさないと考えられる。



200 μm

図3 インプリントゲルビーズの顕微鏡写真

まとめとして、エンドトキシンあるいは、その活性中心であるリポドAを鑄型分子として用いて分子インプリント法によりゲル表面にエンドトキシン認識場を形成させる技術を確立した。この認識場は、物理的・化学的安定性も高いこと、さらにこのゲルを簡単かつ安価に製造できることから、実用的に有望である。

本研究の成果は、環境水中からのエンドトキシンの選択的吸着除去だけでなく、医療・医薬用のタンパク質を含む水溶液からのエンドトキシンの選択的除去、あるいは微生物を用いたタンパク質製剤の生産において混在するエンドトキシンの除去などにも、本研究で開発したインプリントゲルが活用できる可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

① Keiichi Ogawa, Masumi Hyuga, Tomoko Okada, Norihiko Minoura, Development of lipid A-imprinted polymer hydrogels that selectively recognize lipopolysaccharides, Biosensors and Bioelectronics, 査読有、in press, 2012

〔学会発表〕(計6件)

① 小川桂一、日向麻須美、岡田朋子、箕浦憲彦、大腸菌LPSを選択的に認識するlipid A-インプリントヒドロゲルの調製、日

本膜学会・膜シンポジウム 2011、2011年11月19日、健康文化村 カルチャーリゾート フェストーネ（沖縄県）

② 小木曾真佐代、相羽誠一、箕浦憲彦、エンドトキシン捕捉能を有する分子インプリントゲルビーズの調製、日本化学会・第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12日、つくば国際会議場「エポカルつくば」（茨城県）

③ 井上浩輝、日向麻須美、岡田朋子、箕浦憲彦、リポ多糖認識能をもつポリペプチドの創製と親和性評価、日本化学会第91春季年会、2011年3月26日、神奈川大学（神奈川県）

④ Keiichi Ogawa, Masumi Hyuga, Tomoko Okada, Norihiko Minoura, Development of lipopolysaccharide(LPS)-imprinted gel, 2010 環太平洋国際化学会議 (Pacifichem 2010), 2010年12月17日, Hawaii (USA)

⑤ 井上浩輝、日向麻須美、岡田朋子、箕浦憲彦、リポ多糖認識能をもつペプチドの創製と親和性評価、日本化学会第90春季年会、2010年3月28日、近畿大学（大阪府）

⑥ 小川桂一、日向麻須美、岡田朋子、箕浦憲彦、Lipopolysaccharide(LPS)に対する特異的認識能をもつインプリントゲルの作製、日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、近畿大学（大阪府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箕浦 憲彦 (MINOURA NORIHIKO)
東京工科大学・応用生物学部・教授
研究者番号：10358111

(2) 研究分担者

相羽 誠一 (AIBA SEIICHI)
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：50344156

(3) 連携研究者

()

研究者番号：