

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300180

研究課題名(和文)分子インプリント高分子を使った神経システム内D-アミノ酸挙動解析ツールの開発

研究課題名(英文)Development of tools for analysis of role of D-amino acids using molecularly imprinted polymer

研究代表者

吉見 靖男 (Yoshimi, Yasuo)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：30267421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経系内のD-アミノ酸の挙動をモニタリングするためには、純水溶媒中でキラル特異的にアミノ酸を検出する分子インプリント高分子固定電極の開発が必要であった。本研究において、親水性の架橋性モノマーと疎水性の架橋性モノマーをブレンドすることによって水系でもキラル特異的センシングが実現できることを見出した。またD-アミノ酸添加による神経挙動を観察するには、膜電位イメージングによって複数の神経の活動電位を検出する方法を確立する必要がある。本研究において、神経を膜電位感受色素で染色し、テトラエチルアンモニウムで処理することによって、味覚刺激に対する膜電位応答の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Development of chiral specific sensor is needed for analysis of the role of D-amino acids in central nervous system, however chiral specificity of an electrode grafted with molecularly imprinted polymer (MIP) is declined in aqueous system. During the supported term, chiral specific sensing with MIP of an amino acid can be performed by blending hydrophilic and hydrophobic crosslinking monomers.

Voltage sensitive dye (VSD) imaging technique is needed to analyze dependency of neural network on D-amino acids. However VSD imaging is yet to be established for Aplysia central nervous system. We developed new VSD imaging method by using di-4-ANEPPS and tetraethyl ammonium cation. The method successfully detect action potential responding to taste stimulation on the mouth of Aplysia. Those established method is feasible for analysis of the role of D-amino acids in central nervous system which is suspected to be important factor of nervous deceases.

研究分野：医用化学工学

キーワード：Molecular imprinting sensor imaging chirality nano particles D-amino acids neuron Aplysia

1. 研究開始当初の背景

生命活動に関与しないと長らく考えられてきた D-アミノ酸が、脳や神経節に豊富に含まれており、神経活動において何らか重要な役割を演じていることが、最近の研究成果において示唆されている。しかし、D-アミノ酸と神経活動の関係を解析するには、必要な研究ツールが十分に開発されていない。本研究の目的は、D-アミノ酸の生体内での濃度変化をモニタリングするセンサと、任意の D-アミノ酸を一時的に除去するツールを開発し、その有用性を実証することにある。代表者は最近、アミノ酸に対して高いキラル識別能を有する分子インプリント高分子 (Molecularly Imprinted Polymer) を開発した。本研究では、該高分子の薄膜を利用して、微小な D-アミノ酸センサを開発し、さらにこのセンサを利用して、活動中の中枢神経系の D-アミノ酸の濃度変化をモニタリングする手法を開発する。一方で、該高分子で任意の D-アミノ酸を回収するナノ粒子を開発し、該粒子が神経間のシグナル伝達に与える影響を観察する。これらの研究を通し、D-アミノ酸が神経活動に与える影響について解析する手法を確立していく。

2. 研究の目的

(1) 水中でキラル識別能を有する MIP 固定電極の開発

MIP は低極性溶媒の中では高いキラル特異性を示すものの、高極性溶媒中ではキラル特異性は極端に低くなる。神経細胞内の D-アミノ酸を検出するには、水溶媒中においてアミノ酸をキラル選択性高くセンシングする MIP 固定電極を開発せねばならない。そこで本研究では、まず水中でもキラル選択的にアミノ酸に応答する MIP の開発を試みた。具体的には親水性の架橋性モノマーと親水性のそれをブレンドすることにより、ゲート効果のキラル特異性が高まるかを観察した。

(2) アメフラシ神経節内の D-アミノ酸の同定

今回の研究では、実験動物には、神経細胞が大きく、扱いやすいアメフラシを選んだ。このアメフラシの口球神経節の中に含まれる D-アミノ酸の同定と定量を試みた。

(3) 微小 MIP 電極の開発

神経組織内の D-アミノ酸の挙動を観察するためには、微小なセンサを組織に穿刺して、D-アミノ酸を検出する方法が有効である。しかし、ゲート効果を発現する MIP 電極の基盤電極には ITO が最適と考えられているが、この微細化には成功していない。そこで、引き伸ばしたガラス棒の表面に導電 ITO 層をゾル・ゲル法で形成し、その表面に MIP をグラフトすることで、MIP 微小電極の開発を試みた。

(4) MIP ナノ粒子の開発

神経細胞から D-アミノ酸を特異的に回収させることを目的として、MIP ナノ粒子の開発を試みた。

(5) 膜電位イメージングによるアメフラシの神経の解析

D-アミノ酸の添加や回収が神経ネットワークに与える影響を観察するためには、複数の神経細胞膜電位のシグナルを同時に観察する必要がある。その目的のためには、神経細胞を膜電位感受性色素で染色し、蛍光強度の変化分布を顕微鏡観察する膜電位イメージングが有効と考えられる。しかしアメフラシの膜電位イメージング法は未だに確立されていない。そこで、本研究は膜電位イメージングによるアメフラシ口球神経の味覚応答の検出法を確立し、膜電位イメージングの有効性を証明した。

3. 研究の方法

(1) 水中でキラル識別能を有する MIP 固定電極の開発

①電極表面への開始剤固定

インジウム・スズ酸化物薄膜 (ITO) を担持したガラス板を、アミノプロピトリメトキシシランで処理し、表面にアミノ基を導入した。このアミノ基を、4-クロロメチル安息香酸とカルボジイミドで反応させ、ITO 表面にクロロメチルベンジル基を導入した。さらに、このクロロベンジル基をジメチルジチオカルバミン酸ナトリウムと反応させ、ITO 表面に光ラジカル重合開始剤であるジメチルジチオカルバミルベンジル基を導入した。

②電極への MIP グラフト

鋳型として L-または D-フェニルアラニン (Phe) と機能性モノマーとしてメタクリル酸 (MAA) およびジエチルアミノエチルメタクリレート (DEAEM) を蒸留水に溶解した。また架橋性モノマーのメチレンビスアクリルアミド (MBAA) およびエチレングリコールジメタクリレート (EDMA) をジメチルホルムアミドに溶解した。この時の各成分のモル比は、Phe: MAA: DEAEM: MBAA+EDMA=1:3:3:30 とした。両溶液の混合液に、開始剤を導入した ITO を浸し、殺菌灯で紫外線照射してグラフト重合した。鋳型除去のために、この ITO を 10 vol%酢酸水溶液で超音波洗浄して MIP 固定電極を得た。

③ MIP 固定電極のキラル識別能の評価

MIP 固定電極を作用極として、フェロシアン化カリウムのサイクリックボルタメトリーを行った。0.5 mM の D-または L-Phe によるピーク酸化電流の変化の大きさと、グラフト重合の際の、MBAA と EDMA の仕込み比の関係を観察した。

(2) アメフラシ神経節内の D-アミノ酸の同定 アメフラシの神経節の食道神経節をホモ

ゲナイズし、中のアミノ酸を NBD-F で蛍光誘導体化し、キラル分割用高速液体クロマトグラフィーで分析し、内部の D-アミノ酸の同定を試みた。

アメフラシ神経の食道神経節にパルス電位を与えて D-アミノ酸オキシダーゼを加え、中枢パターン発生器 (CPG) 出力の変動を観察した。

(3) 微小 MIP 電極の開発

直径 1.0mm のマイクロガラスロッド(富士理工業：大阪)を、水酸化カリウムの飽和メタノール溶液で洗浄した。膜電位測定用微小ガラス管電極作製器 PN-3 (成茂科学器械研究所：東京)で、加熱しながら引き延ばし、針状にした。このガラス針を、ITO 微粒子トルエン分散液 (巴製作所：大阪)に浸した後、小型電気炉 mini-I で 60 min 加熱し (500°C)、導電性を持たせた。これに光ラジカル重合開始剤であるジメチルジチオカルバミドベンジル基を導入した。この開始剤固定ガラス針を、セロトニン、メタクリル酸、アクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドの混合溶液に浸し、キセノンランプ光を照射して、セロトニンを鑄型とした MIP を固定した。この電極でサイクリックボルタメトリーを行い、電流に対するセロトニンの影響を観察した。

(4) MIP ナノ粒子の開発

3- (2-アミノエチル) アミノプロピルシランでアミノ化したガラスビーズ表面に D-フェニルアラニンペプチド結合で固定した。これにメタクリル酸およびエチレングリコールジメタクリレート、開始剤、連鎖移動剤のジクロロメタン溶液を加え、窒素吹送で流動させながら、紫外線照射した。ジクロロメタンで洗浄した後、ジメチルホルムアミドで抽出し、MIP のコロイド粒子を回収した。この分散液を透析して、ジクロロメタンに分散媒を交換した。5 mM の D-または L-フェニルアラニンアニリドの添加による粒子の直径分布の変化を動的光散乱法で観察した。

(5) 膜電位イメージングによるアメフラシの神経の解析

① 行動実験によるアメフラシの味覚の嗜好性の確認

米国産アメフラシ (*A. californica*) のに、海藻 (ノリ *Porphy.*、ワカメ *Unda.*、マクサ *Geli.*) を人工海水に懸濁した液、アミノ酸 (L-アスパラギン L-Asn または L-アスパラギン酸 L-Asp) の 5 mM 人工海水に溶解した液、または蒸留水を、アメフラシの口内に注入し、応答を確認した。

② 味覚嗜好性の膜電位イメージングによる観察

アメフラシの口球の運動を司る口球神経節を、神経繊維により口球との接続を維持したまま、図 1 のように口球神経節との間に仕

切り板を隔てて固定した。口球神経節のみテトラエチルアンモニウム (TEA) を 100 mM 含む人工海水 (ASW) に 1.5 h 浸漬した。続いて、TEA を 100 mM 含む膜電位感受性色素 (Di-4-ANEPPS) の溶液に 30 min 浸して染色した。

味覚応答を、口球の歯舌部位に投与した。各アミノ酸投与に対する口球神経節内 S クラスターの蛍光強度変化を、図 1 のように蛍光顕微鏡により検出した。

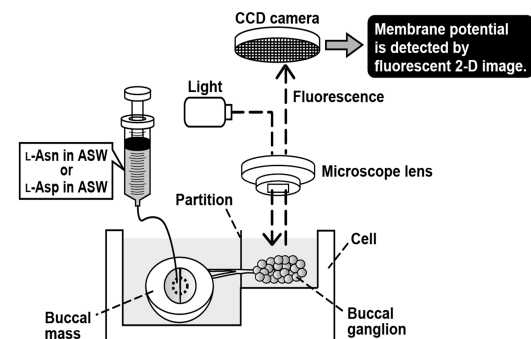


図 1: 膜電位イメージング法による神経節の味覚応答解析法

4. 研究成果

0.5mM の L-または D-Phe による相対的な電流変化と、グラフト重合時における MBAA と EDMA の仕込み比の関係を示す。すべての電極において、Phe の存在によって電流が増加した。架橋性モノマーに MBAA のみ、または EDMA のみを用いた場合は、L-Phe による変化と、D-Phe による変化との間に差が無かった。しかし、EDMA の両架橋性モノマー中の割合を 50 mol% または 67 mol% にブレンドした場合は、各 MIP 固定電極の鑄型のエナンチオマーに対する変化よりも、鑄型に対する変化の方が著しく大きな値を示した (図 2)。親疎水性の異なる 2 種類の架橋性モノマーをブレンドすることにより、キラル識別能が上がった理由を説明することは、現段階では難しい。目的分子を厳密に識別し、それに伴ってレドックス分子の電極へのアクセシビリティを変化させる MIP を作製するには、適切な柔軟性を MIP に付与する必要がある。疎水性の EDMA と親水性の MBAA を共重合させることにより、MIP 層が適度な含水率を有するようになり、鑄型に対する特異吸着能と、それに伴う開孔率の変化能を獲得したと考えられる。

(2) アメフラシ神経節内の D-アミノ酸の同定

アメフラシ口球神経節に CPG 出力を発生させながら、D-アミノ酸オキシダーゼを投与したところ、有意な変化は見られなかった。この結果から、口球神経節には D-アミノ酸オキシダーゼの基質となる中性または塩基性 D-アミノ酸が存在しないことが解った。次に、神経節のホモゲナイズを L-アミノ酸オキシダーゼで処理して L-アミノ酸を除去した上で、キラル分割クロマトグラフィーで分析したと

ころ、D-アスパラギン酸が高濃度で含まれていることが確認された。

そこでCPG出力を発生させながらD-アスパラギン酸を投与すると、電気刺激の慣れによると思われるCPG出力の発生頻度の低下が防がれることが分かった。

この結果は、D-アスパラギン酸が、慣れによる神経の不感化を妨げる働きがあることを示している。このアプローチによって、記憶とD-アスパラギン酸に相関が有る可能性を導けるとと思われる。

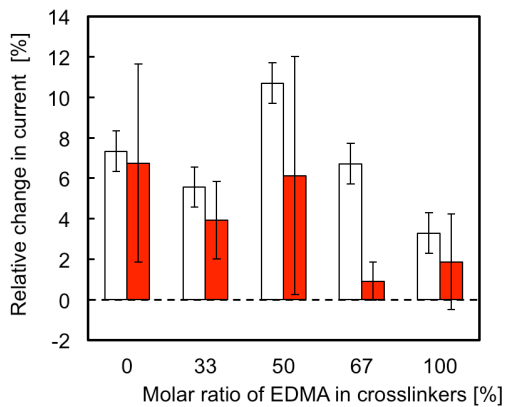


図 2: L-フェニルアラニンを鋳型とした電極における酸化電流の、0.5 mM のフェニルアラニン (白抜き L 体、塗りつぶし: D 体) に対する相対変化

(3) MIP 微小電極の作製

セロトニンを鋳型とした MIP を固定した微小電極を用いて、5 mM フェロシアン化カリウムのボルタメトリーを行った。鋳型であるセロトニン濃度を試験液に加えると、電流値はそれに伴って増大するのに対し、セロトニンと構造が類似する L-トリプトファンに対しては変化を見せなかった。したがってゾルゲル法で作られた ITO を被覆した微小針状ガラス電極を基盤電極に用いても、鋳型に特異反応して酸化還元電流を変化させる MIP 電極を作製できることが判明した。

(4) MIP ナノ粒子の開発

D-フェニルアラニンを鋳型とした MIP コロイド粒子の直径は、鋳型の誘導体である D-フェニルアラニンアニリドの添加によって3倍以上に増大した。一方、L-フェニルアラニンアニリドの添加によって1.3倍程度に増大した (図 3)。MIP との鋳型のキラル特異的相互作用によって、著しく粒子径が増大したことが窺われる。MIP コロイド粒子の粒径変化は、MIP 電極における酸化電流が鋳型との特異相互作用によって溶媒含浸率が変化することで生じると考えられる。

このコロイド粒子は収率が非常に小さいため (数 ppm)、神経細胞中のアミノ酸を回収

するのは難しい。しかしこの粒子を親水性のものにして、蛍光官能基を導入すれば、鋳型との特異反応によって蛍光強度を変化させる、イメージング用プローブとなりうる。鋳型に各種 D-アミノ酸を用いることで、有効な D-アミノ酸の放出パターン解析用ツールになり得る可能性がある。

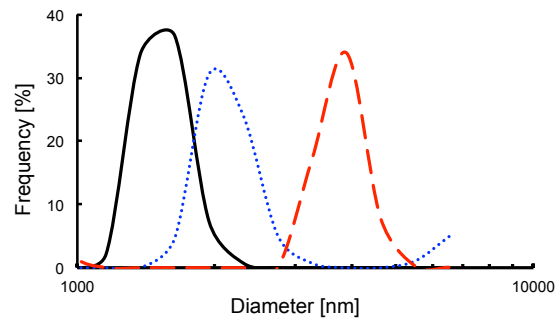


図 3: D-フェニルアラニンを鋳型とした MIP コロイド粒子の粒直径分布 (実線: アミノ酸誘導体なし、破線: 鋳型存在下、点線: 鋳型の光学異性体存在下)

(5) 膜電位イメージングによるアメフラシの神経の解析

アメフラシの口球に、L-アスパラギン、ノリ抽出液、ワカメ抽出液を投与すると、アメフラシは積極的な摂食行動を見せた。これに対して、L-アスパラギン酸、マクサ抽出液、蒸留水を口球に投与すると、頭部を収縮し、明確な拒絶反応を示した。

次に図 1 の実験系において、切開した口球に上記の味覚刺激剤を与えると、いずれの場合も、染色した神経節の感覚神経が集中する部位 (S-クラスター) にスパイク状の蛍光強度変化が確認された (図 4)。この蛍光強度変化は、活動電位発生に対応し、神経細胞の興奮を示すものである。摂食を示す物質を投与してから、活動電位の発生までかかる時間は約 4 s であった。一方、拒絶を示す液投与に対する応答にかかる時間は約 2 s であった (図 5)。

この結果は、摂取に不適な物は、咀嚼せずに即座に吐き出す必要がある事実と整合性がある。一方、この膜電位イメージングにより算出した応答タイムラグは、微小電極法 (従来法) によって得られた値と変わらなかった。膜電位イメージングに必要な化学処理は、神経細胞の味覚応答速度には影響を与えないことが示された。この味覚に対するレスポンスと D-アミノ酸の口球神経への投与との関係を解析すれば、摂食行動と D-アミノ酸の関係が明確になるかもしれない。

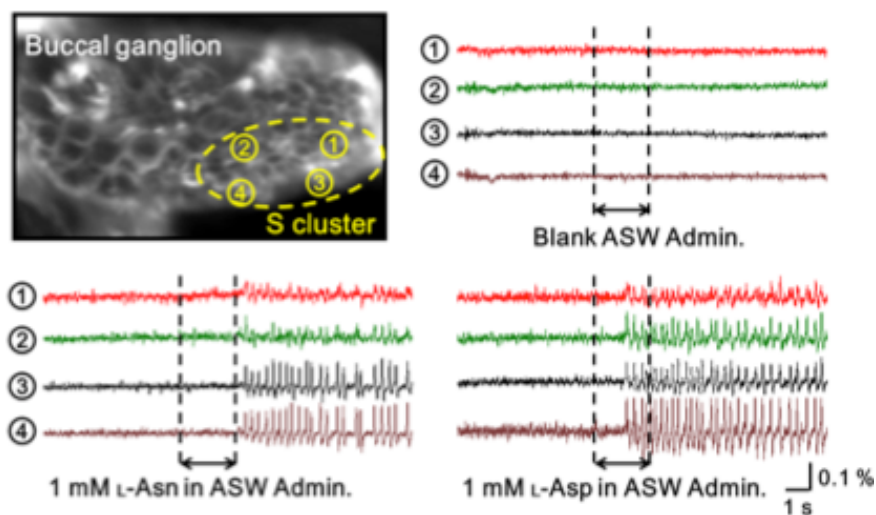


図 4：人工海水 (ASW)、L-アスパラギン (Asn)、L-アスパラギン酸 (Asp) の口球投与に対する S-クラスター部の蛍光応答

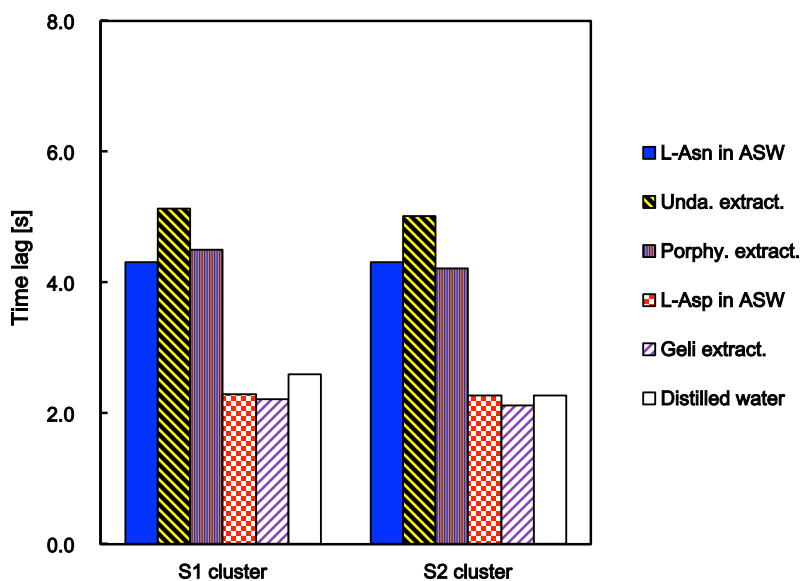


図 5：人工海水 (ASW)、L-アスパラギン (Asn)、L-アスパラギン酸 (Asp)、ワカメ (Unda.)、ノリ (Porphy.)、蒸留水の口球投与から S-クラスター部の活動電位発生まで要する時間

5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Improved gate effect enantioselectivity of phenylalanine-imprinted polymers in water by blending crosslinkers. Y. Yoshimi, N. Ishii. Anal. Chim. Acta, 査読有, 862, 77-85, 2015

〔学会発表〕 (計 11 件)

Design of voltage sensitive dye imaging for analysis of taste-recognition neural network in Aplysia buccal ganglion, Y. Miyake, Y. Yoshimi, T. Nagahama, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2014 年 11 月, Washington

DC

ゾル・ゲル法でインジウム・スズ酸化薄膜を形成した分子インプリント高分子固定微小電極, 吉見 靖男, 電気化学会秋季大会, 2014年9月, 札幌

分子インプリント高分子のゲート効果の選択性と界面構造の関係, 吉見靖男, 第63回高分子討論会, 2014年9月, 長崎

分子インプリント高分子グラフト層のゲート効果と表面形状の関係, 吉見靖男, 石井則行, 日本膜学会 36 年会, 2014 年 5 月, 東京

分子インプリント高分子のコロイド粒子の形状に鋳型との特異反応が与える影響, 吉見 靖男, 橋本 省三, S. Piletsky, E. Moczko, 日本膜学会第 36 年会, 2014 年 5 月, 東京,

味覚に関わる神経ネットワークの膜電位イメージング法による観察, 吉見 靖男, 三宅祐輝, 木村亮介, 長濱辰文, 化学工学会 79 年会, 2014 年 3 月, 岐阜

中枢神経機能における D-アミノ酸の役割の解析, 吉見 靖男, 木村亮介, 長濱辰文, 化学工学会 79 年会, 2014 年 3 月, 岐阜

Enantioselective amino acid sensor using molecularly imprinted sensor grafted on electrode, Y. Yoshimi, N, Ishii The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research, 2014年9月, 宇都宮

Analysis of roles of D-serine and D-aspartic acid at central pattern

generator in buccal ganglion of *Aplysia californica*, R. Kimura, Y. Yoshimi, T. Nagahama, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2014年11月, San Diego

Possible neural network involved in taste recognition in *Aplysia* buccal ganglion by voltage sensitive dye imaging, Y. Miyake, R. Kimura, Y. Yoshimi, T. Nagahama, 日本神経科学学会年会, 2013年7月, 京都

Analysis of the role of D-amino acids in central pattern generator of *Aplysia* buccal ganglion, R. Kimura, Y. Yoshimi, T. Nagahama, 日本神経科学学会年会, 2013年7月, 京都

[図書] (計1件)

Molecularly imprinted polymers applicable for biomimetic catalysts in sensors, Y. Yoshimi in *Molecularly Imprinted Catalyst*, Elsevier, Amsterdam, pp. 113-128, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉見靖男 (芝浦工業大学工学部・教授)

研究者番号: 30267421

(2) 研究分担者

長濱辰文 (東邦大学薬学部・教授)

研究者番号: 70145001

(3) 連携研究者

丹羽修 (産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門・主幹研究員)

研究者番号: 70392644