

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750193

研究課題名(和文)モノクローナルプラスチック抗体調製法の確立

研究課題名(英文)Development of procedures to prepare monoclonal plastic antibodies

研究代表者

星野 友(Hoshino, Yu)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40554689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子量・分子量分布・分子構造が限りなく均一なペプチド結合性の多官能性高分子(モノクローナルプラスチック抗体)を調製する方法を確立する事を目的とした。始めにリビングラジカル重合法により多官能性の高分子ライブラリーを調製し、標的ペプチドであるメリチンと相互作用する為に最低限必要な官能基の数および種類を特定した。次にアフィニティー精製法によりメリチンと強く結合する構造を有する高分子のみを分離できる事を明らかにした。最後に、ブロック共重合体ライブラリーを調製し、メリチンと強く結合する配列を有する高分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to establish procedures to prepare uniform polymer ligands that interact with target peptide. We first identified the minimum number and combination of functional group on the polymer ligands to capture target peptide melittin. We next showed that polymers with strong affinity to melittin can be isolated by affinity purification procedure. As a final step, library of block copolymers were prepared and optimum sequence to capture melittin was assigned.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学

キーワード：生体認識 機能化学 生体機能材料

1. 研究開始当初の背景

(1) 分子認識高分子材料の開発

抗体と同等の標的分子認識能を有する合成ナノ材料を調製することができれば、安価で安定な新規の分指標的材料として様々な応用が期待される。合成高分子から成る分子認識材料開発の歴史は古く、1970年代には低分子化合物を鑄型として高分子材料内に標的認識サイトを埋め込む分子インプリント重合法が提案されている。2000年代に入るといくつかのグループが分子インプリント法のターゲットを低分子化合物からペプチド等の生体高分子に拡張した。一方、分子インプリント重合を行わなくても機能性モノマーの組合せと含量比を最適化する事でターゲット分子を多点認識する多官能性の水溶性高分子やハイドロゲルを合成できる事も示されている。

(2) プラスチック抗体の開発と医薬応用

我々は近年、モノマー最適化法をナノサイズの高分子微粒子に適用し、特定の生体高分子(毒ペプチド;メリチン)を大容量で吸着する材料を開発した。このナノ粒子は、沢山のペプチド結合サイトを持つが、それぞれの結合サイトのペプチドとの結合力がそれほど強くないという課題があった。そこで申請者は、モノマー最適化法と分子インプリント法を組合せる事で抗体同様の結合容量と結合強度を併持したナノ粒子“プラスチック抗体”を合成した。このプラスチック抗体は抗体と同等のサイズで水中で安定なため、動物に静脈注射可能であり動物体内でも標的ペプチドを認識、結合し、その機能を中和できる事を見いだした。

(3) ナノ粒子のアフィニティー精製

ペプチド認識ナノ粒子の重合に用いられたフリーラジカル重合法は簡便な一工程反応で、安価に大量の材料を合成できる。しかし、開始、成長、停止反応が溶液内で同時に起こるため、合成される高分子の分子量や分子構造を制御するのが難しい。よって、ナノ粒子は様々な分子量、構造の混合物で、ペプチド認識サイトの結合定数も不均一である。多様な結合能を持つナノ粒子の中から均一な結合力を持つナノ粒子を単離するために、筆者は、タンパク質のアフィニティー精製法を合成ナノ粒子に適用できる事を見いだした。

2. 研究の目的

以上の様に、モノマー最適化法、分子インプリント法とアフィニティー精製法の組合せで医薬応用可能なナノ粒子を合成できる。

しかし、アフィニティー精製で単離したナノ粒子も、フリーラジカル法で重合される限り、分子量や分子構造が不均一であった。そこで本研究は、フリーラジカル法からリビングラジカル法へ重合法を変更して、分子量/分布・分子構造と分子認識能限りなく均一なモノクロナルプラスチック抗体を調製する方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リビング重合ライブラリー合成と評価
リビング重合法により多官能性の高分子ライブラリーを調製し、標的ペプチドであるメリチンとの相互作用を解析する。

(2) 多官能性高分子の最小化

標的ペプチドと相互作用する為に最小限必要な官能基の種類、官能基数および分子量を特定する。

(3) ブロック共重合ライブラリー合成と評価
リビング重合法によりメリチンとの結合に最小限必要な官能基および分子量を有する高分子をブロック共重合し、メリチンとの相互作用を解析する。

(4) 多官能性高分子のアフィニティー精製
メリチンと相互作用する高分子をアフィニティー精製し、分子量、配列、分子認識能ができる限り均一な高分子を単離する。

4. 研究成果

(1) 初年度

メリチンと結合する合成高分子ナノ粒子の設計法を再検討し、負電荷を有するアクリル酸(AAc)と疎水性を有するt-ブチルアクリルアミド(TBAm)を共重合したN-イソプロピルアクリルアミド(NIPAm)ナノ粒子がメリチンを静電的および疎水性相互作用により多点で結合することを証明した。さらに、両モノマーの共重合比を変化させたナノ粒子ライブラリーを調製し、モノマーの含有量とメリチンの結合容量および結合定数の相関を明らかにした。

さらにここで得られた情報を基に、AACとTBAmをNIPAmと共に共重合した分子量分散の小さい高分子の合成法を検討し、連鎖移動剤を用いた紫外線開始重合により分子量分散が比較的小さい共重合を得ることが出来ることを明らかにした。本重合法によりポリNIPAmを主原料とした分子量分散の狭い多官能性高分子のライブラリーを調製した。初めに1000merと300merのライブラリーを構築し、メリチンを標的分子として、多官能性高分子と

の相互作用をスクリーニングしたところ、疎水性の強いTBAmと負電荷を有するAAcの両方を有する高分子だけがメリチンと相互作用することが明らかになった。また、メリチンの相対的結合容量は、分子量に依らず機能性モノマーの共重合比に依存することがわかった。この結果は、ナノ粒子の結果と一致した。しかし、高分子の単位質量あたりの結合容量はナノ粒子の結合容量よりも大きいことがわかった。これはナノ粒子に比べ高分子鎖内の立体障害が少ないためだと考えられた。

(2) 二年度

メリチンと相互作用する事が明らかとなった300merの多官能性高分子溶液の中には、メリチンと強く結合する高分子と結合しない高分子が存在する事を予想し、メリチン固定化樹脂を用いた多官能性高分子のアフィニティークロマトグラフィーを行った。バッチ法による精製の結果、精製前的高分子よりも遥かに相互作用が強い高分子を単離する事に成功した。また、環境に応じて蛍光スペクトルが変化するダンシル基を導入した多官能性高分子をアフィニティークロマトグラフィー精製し、精製前と精製後で相転移温度やメリチンとの相互作用に伴った高分子構造変化の挙動が異なる事を明らかにした。

次に、可逆的不可解鎖連鎖移動重合法(RAFT重合法)により30merと15merの高分子ライブラリーを調製し、メリチンとの相互作用を調べた。その結果、1000merや300merの結果と同様に疎水性の強いTBAmと負電荷を有するAAcの両方を有する高分子だけがメリチンと相互作用することが明らかになった。しかし、1000merや300merの結果と異なりモノマーの共重合比ではなく、導入数がメリチン結合挙動に大きな影響を与えるということが明らかになった。また、分子量や官能基数が小さくなるに従ってメリチンとの結合の強さが劇的に低下し、メリチンとの相互作用をするためには、最低30merの高分子量を有し、アクリル酸を3mer、TBAmを6mer有している必要があることがわかった。

(3) 三年度

メリチンと相互作用する事が明らかとなった30merの多官能性高分子溶液の中には、メリチンと強く結合する高分子と結合しない高分子が存在する事を予想し、メリチン固定化樹脂を用いた多官能性高分子のアフィニティークロマトグラフィーを行った。中圧クロマトグラフィーによる精製の結果、温度変化をトリガーとすると再現性よくメリチン高結合性的高分子を溶出できる事が明らかになった。また、精製前後の高分子をNMRにより分析したところ精製前後で高分子の分子量や官能基組

成に変化がないことを明らかにした。以上の結果から、アフィニティークロマトグラフィーにより30merのランダム共重合体の中からメリチンと強く相互作用する配列や立体構造を有する高分子を単離できたことがわかった。

次に、多官能性高分子が有する配列の多様性を低減する為に、RAFT重合法によりブロック共重合体のライブラリーを作成した。官能基組成としては30merのランダム共重合体の分析で明らかになったメリチンと相互作用するために必要な最小限の官能基数(アクリル酸3mer、TBAm6mer)を導入した。ブロック共重合体とランダム共重合体のメリチン結合能を比較したところ、アクリル酸3merのブロックあるいはTBAm6merのブロックを有する高分子であれば分子量が9merと小さくてもメリチンと強く相互作用することがわかった。また、アクリル酸ブロックやTBAmブロック、NIPAmブロックの順を変えるとメリチンとの相互作用の強さは変化する事が明らかになった。以上よりアクリル酸3mer、TBAm6merを有する9merのジブロック共重合体がメリチンと強く相互作用し配列がほぼ均一な高分子リガンドとして同定された。

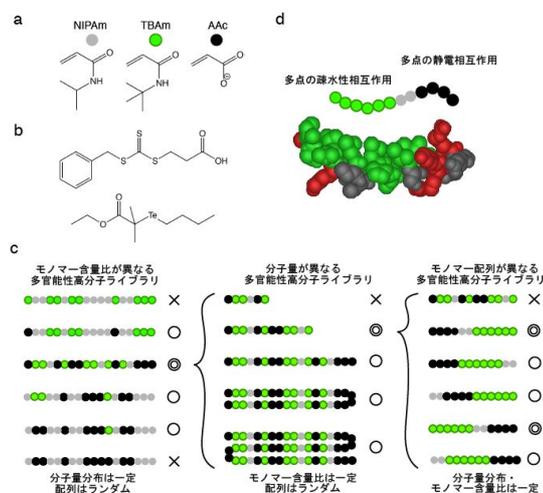


図1 a.本研究で用いたモノマー。b.本研究で用いた連鎖移動剤。c.本研究で合成した多官能性高分子ライブラリーの模式図。d.最終的に得られたメリチン結合性高分子とメリチンとの相互作用模式図。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計14件)

M. Nakamoto, Y. Hoshino*, Y. Miura. "Effect of Physical Properties of Nanogel Particles on the Kinetic Constants of Multipoint Protein Recognition Process" *Biomacromolecules*, 15, 541- (2014). 査読有,

K. Yoshimatsu, T. Yamazaki, Y. Hoshino, P. E. Rose, L. F. Epstein, L. P. Miranda, K. J. Shea. "Epitope Discovery for a Synthetic Polymer

Nanoparticle: A New Strategy for Developing a Tag” *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 1194-, (2014). 査読有,

Y. Hoshino*, H. Lee, Y. Miura. “Interaction between synthetic particles and biomacromolecules: Fundamental study of nonspecific interaction and design of nanoparticles that recognize target molecules” *Polymer Journal*, in press, (2014). 査読有,

星野友*、共重合体ライブラリーからの高分子アプタマーの作成、高分子、10月号、in press, (2014). 査読有,

Y. Yonamine, K. Yoshimatsu, S.-J. Lee, Y. Hoshino, Y. Okahata, K. J. Shea, Kenneth. “Polymer Nanoparticle-Protein Interface. Evaluation of the Contribution of Positively Charged Functional Groups to Protein Affinity” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5, 374-, (2013). 査読有,

Y. Hoshino*, M. Nakamoto, Y. Miura. “Control of Protein-Binding Kinetics on Synthetic Polymer Nanoparticles by Tuning Flexibility and Inducing Conformation Changes of Polymer Chains” *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 15209-, (2012). 査読有,

Y. Hoshino*, K. Imamura, M. Yue, G. Inoue, Y. Miura. “Reversible Absorption of CO₂ Triggered by Phase Transition of Amine-Containing Micro- and Nanogel Particles” *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 18177-, (2012). 査読有,

S.-H. Lee, Y. Hoshino, A. Randall, Z. Zeng, P. Baldi, R.-a. Doong, K. J. Shea. “Engineered Synthetic Polymer Nanoparticles as IgG Affinity Ligands” *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 15765-, (2012). 査読有,

Y. Yonamine, Y. Hoshino, K. J. Shea “An ELISA-mimic screen for synthetic polymer nanoparticles with high affinity to target proteins” *Biomacromolecules*, 13, 2952-, (2012). 査読有,

K. Yoshimatsu, B. K. Lesel, Y. Yonamine, J. M. Beierle, Y. Hoshino, K. J. Shea. “Temperature-Responsive Catch and Release of Proteins by Multifunctional Polymer Nanoparticles” *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 2405-, (2012). 査読有,

星野友*、タンパク質やペプチドを認識する合成ナノ粒子“プラスチック抗体”の開発 *BIO INDUSTRY*, 29, 53-, (2012). 査読有,

星野友*、生体分子認識能を有する高分子ナノ粒子“プラスチック抗体”の設計、化学工学会バイオ部会ニュースレター, 31, 11-, (2012), 査読有,

Y. Hoshino*, H. Koide, K. Furuya, W. W. Haberaecker III, T. Kodama, N. Oku, K. J. Shea. “The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 33-, (2010). 査読有,

〔学会発表〕(計 24 件)

和田悠佑、星野友、三浦佳子 “RAFT重合によるプラスチック抗体の合成と単離” **第49回化学関連支部合同九州大会**, 2012年6月30日、北九州

和田悠佑、Lee Haejoo、星野友、三浦佳子 “アフィニティー精製を用いたペプチド結合性リビングポリマーリガンドの精製” **日本化学会西日本大会**, 2012年11月10日、佐賀大学

Lee Haejoo、和田悠佑、星野友、三浦佳子 “Minimization of polymer ligands that interact with target peptide” **SIMS2013**, 2013年3月14日、福岡

Lee Haejoo、和田悠佑、星野友、三浦佳子 “メリチン結合性高分子リガンドの最適化” **第62回高分子学会年次大会**, 2013年5月29-31日、京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：タンパク質アフィニティー分離剤
発明者：矢野勝彦、山崎亜希、星野友、三浦佳子
権利者：三菱化学、九州大学
種類：特許出願
番号：特願 2013-37389
出願年月日：2013年2月27日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 友 (Hoshino Yu)

研究者番号：40554689

九州大学 大学院工学研究院化学工学部門
准教授