

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460050

研究課題名(和文) 生体関連化合物に対する新規分子インプリント法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of novel preparation method of molecularly imprinted polymer for bio-related compounds and its application

研究代表者

萩中 淳(HAGINAKA, Jun)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20164759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：クロロゲン酸(CGA)に対する分子インプリントポリマー(MIP)をメタクリル酸を機能性モノマー、ジビニルベンゼンを架橋剤、メタノールを共溶媒として用いて、修正沈殿重合法により調製した。調製したMIPは、粒子径均一なポリマーであった。MIPにおけるCGAの吸着量をスキッチャード解析した結果、MIPには2種類の結合部位が存在することが分かった。MIPはCGAを特異的に認識可能であり、コーヒー酸、没食子酸、プロトカテキ酸、バニリン酸のような他の関連物質は、全く認識されなかった。得られたMIPを杜仲葉中のCGAの選択的抽出に適用した結果、MIPによるCGAの選択抽出が可能であった。

研究成果の概要(英文)：Molecularly imprinted polymers (MIPs) for chlorogenic acid (CGA) were prepared by modified precipitation polymerization using methacrylic acid as a functional monomer, divinylbenzene as a crosslinker and methanol as a co-solvent. The prepared MIPs were microspheres with a narrow particle size distribution. Binding experiments and Scatchard analyses revealed that two classes of binding sites, high and low affinity sites, were formed on the MIP. In addition to shape recognition, hydrophilic interactions seem to work for the recognition of CGA on the MIP. The MIP had a specific molecular-recognition ability for CGA, while other related compounds, such as caffeic acid, gallic acid, protocatechuic acid and vanillic acid, could not be recognized by the MIP. Furthermore, the MIP for CGA was successfully applied for extraction of CGA in the leaves of *Eucommia ulmoides*.

研究分野：分析科学

キーワード：分子認識 分析科学 薬学 分子インプリントポリマー

1. 研究開始当初の背景

(1) 分子インプリント法は、テンプレート分子の存在下、それと相補的に相互作用するモノマーを重合させることにより、テンプレート分子に対する特異的認識部位を得る方法である。MIP は人工レセプター、人工抗体とも呼ばれ、目的物質の特異的認識に利用されている。しかし、従来の MIP は塊状重合法等により調製されるため、1) 得られたポリマーはサイズおよび形状が不均一なポリマーである、2) 非水系での認識能は優れているが、水系での認識能は劣る、3) 親水性の生体関連化合物、生体高分子化合物に対する MIP の調製が難しいなどの欠点を有していた。これらの欠点を解決した MIP、殊に、親水性の生体関連化合物、生体高分子化合物に対する MIP の調製法を開発することは、MIP のライフサイエンス分野への適用の促進に不可避である。

(2) 我々は多段階膨潤重合法 (Uniformly sized molecularly imprinted polymer for (S)-nicotinic acid. Comparison of chiral recognition ability with HPLC chiral stationary phases based on a protein, Q. Fu, J. Haginaka et al., Anal. Chem., 75, 191-198 (2003)) により、水系で優れた分子認識能を有する、粒子径の均一な MIP を調製する方法を開発した。一方、多段階膨潤重合法では、疎水性の高い化合物に対する MIP の調製が可能であったが、疎水性の低い化合物に対する MIP の調製が難しかった。そこで、疎水性の低い化合物に対しては沈殿重合法 (Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization, H. Sambe, J. Haginaka et al., J. Chromatogr. A, 1134, 88-94 (2006)) により、水系で優れた分子認識能を有する、粒子径の均一な MIP の調製を行ってきた。さらに、親水性モノマーを用いて MIP 表面を in situ で選択的に親水化することにより、生体試料の直接注入による薬物の選択的濃縮分析、並びに環境試料中の超微量の物質の濃縮分析に応用できることを明らかにした。

(3) 親水性の生体関連化合物 (アミノ酸、ペプチド、単糖、オリゴ糖など) や生体高分子化合物 (タンパク質、複合糖質) に対する MIP は、多段階膨潤重合法あるいは沈殿重合法により調製できなかった。申請者は、親水性化合物であるクレアチニンに対する MIP の調製過程で、水と混ざり合う有機溶媒 (アセトニトリル) と水と混ざり合わない有機溶媒 (トルエン) を用いる混合溶媒系で、水に溶解したテンプレート分子 (クレアチニン) を用いて重合を行うこと (Monodispersed molecularly imprinted polymer for creatinine by modified precipitation polymerization, Jun Haginaka et al., Anal. Sci., 28, 315-317

(2012)) により、親水性化合物であるクレアチニンに対して、優れた分子認識能をもつ、MIP の調製に成功した。この方法を、修正沈殿重合法と命名した。また、最適化の余地は残されているものの修正沈殿重合法によるアミノ酸に対する MIP の調製にも予備実験的に成功している。

(3) 修正沈殿重合法により調製される MIP は、粒子径が均一である、水系で優れた分子認識能をもつ、親水性の生体関連化合物の認識が可能である、生体高分子化合物の部分構造 (ペプチド鎖あるいは糖鎖) の認識が可能であるなどの特徴を有している。そこで、申請者は、新たに開発した修正沈殿重合法を親水性の生体関連化合物 (アミノ酸、ペプチド、単糖、オリゴ糖)、生体高分子化合物 (タンパク質、複合糖質) の分子認識に適用するという本研究の着想を得た。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 市販の安価な機能性モノマーおよび架橋剤を用いる、親水性の生体関連化合物に対する修正沈殿重合法を開発する、(2) 生体関連化合物 (アミノ酸、ペプチド、単糖、オリゴ糖) に対する MIP の調製に適用する、(3) 得られた MIP を生体関連化合物の認識に適用する、(4) さらに、ヒト血清アルブミンの N-あるいは C-末端ペプチド鎖およびシリアル Le^a の部分構造に対する MIP を調製し、タンパク質あるいは複合糖質などの生体高分子化合物の認識への適用を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 親水性の生体関連化合物 (アミノ酸、ペプチド、単糖、オリゴ糖、配糖体) に対する修正沈殿重合法の確立

従来、親水性化合物の MIP の調製には、新たな機能性モノマーを合成するあるいは新たな架橋剤を合成することにより行われていた。しかし、本研究では、汎用性を考慮して、市販の安価な機能性モノマー (メタクリル酸、2-(トリフルオロメチル)アクリル酸、4-ビニルピリジン、2-ビニルピリジン、1-イミダゾールなど) および市販の安価な架橋剤 (エチレングリコールジメタクリレート、グリセロールジメタクリレート、ジビニルベンゼンなど) を用いて検討を行う。

アミノ酸、ペプチド、単糖、オリゴ糖を水、メタノール、ホルムアミド等の親水性溶媒 (溶解用溶媒) に溶解し、機能性モノマー、架橋剤、重合開始剤を水と混ざり合う有機溶媒 (アセトニトリルなど) および水と混ざり合わない有機溶媒 (トルエンなど) の混合溶媒に溶解し、重合を行う、の調製過程において、MIP が得られるかどうか検討を行う、テンプレート分子に対して有用な機能性モノマーおよび架橋剤の検討、これらモノマーおよび重合開始剤の種類と量、混合溶媒

系の種類と量の検討を行うことにより、親水性の生体関連化合物に対する MIP の調製法（修正沈殿重合法）を確立する。

(2) 親水性の生体関連化合物（アミノ酸、ペプチド、単糖、オリゴ糖）に対する MIP の調製と分子認識能の評価

確立した条件で、アミノ酸、ペプチド、単糖、オリゴ糖に対する MIP を調製し、調製法の最適化を行うとともに分子認識能の評価を行う。

アミノ酸、ペプチドに対する MIP の調製法の最適化

アミノ酸（Trp, Tyr あるいは Phe など）に対する MIP を、選択された溶解用溶媒、機能性モノマー、架橋剤、重合開始剤および混合溶媒を用いて調製する。さらに、得られた MIP を HPLC カラムに充填し、その特異性を液体クロマトグラフィーにより評価し、溶解用溶媒、機能性モノマー、架橋剤、混合溶媒、重合開始剤、重合温度、重合時間などの条件を最適化する。アミノ酸の場合と同様に、アミノ酸配列の異なるペプチド（トリペプチド（例えば、Trp-Tyr-Phe および配列の異なるトリペプチド））に対する MIP を調製し、調製法を最適化する。

単糖、オリゴ糖に対する MIP の調製法の最適化

単糖（グルコース、シアル酸（N-アセチルノイラミン酸）およびオリゴ糖（スクロース、シアリルガラクトース））に対する MIP を、選択された溶解用溶媒、機能性モノマー、架橋剤および混合溶媒を用いて調製し、同様の手法で最適化する。

(3) ヒト血清アルブミンに対する MIP の調製と認識

タンパク質の認識をタンパク質の部分構造（ペプチド鎖）に対する MIP を調製することにより行う。

ペプチド鎖に対する MIP の調製

ヒト血清アルブミンの N-末端のアミノ酸配列は、MKWVTFISLL である。そこで、MKWVT、MKWVTFIS などに対する MIP を最適化した方法により調製する。MIP の調製には、ヒト血清アルブミンの認識への応用を考慮して、粒子表面に分子認識サイトを形成するように、コア・シェル型の MIP を調製する。次に、得られた結果を、MIP の調製法の最適化（テンプレート分子、機能性モノマー、架橋剤、重合開始剤、重合温度、重合時間などの条件についての検討）にフィードバックする。さらに、ヒト血清アルブミンの C-末端のアミノ酸配列の部分構造である AALGL、SQAALGL などに対する MIP を上記と同様に調製し、その分子認識能を評価するとともに、調製法の最適化を行う。

ヒト血清アルブミンの分子認識

ヒト血清アルブミンの N-末端あるいは C-末端に対する MIP のヒト血清アルブミンの

認識への適用を検討する。N-末端あるいは C-末端を認識可能な MIP のうちから、優れた分子認識能を有する MIP の選択を行う。

ヒト血清アルブミンに対する MIP の応用

ヒト血清アルブミンは、プロテオーム解析において多量に存在する妨害タンパク質である。そこで、ヒト血清アルブミンに対する MIP をヒト血清アルブミン除去用のトラップカラムとしての有用性を、LC-MS/MS を用いて検討する。本研究で調製された MIP のオフラインあるいはオンラインでの適用を検討する。

(4) 複合糖質に対する MIP の調製と認識

複合糖質の認識を複合糖質の糖鎖部分に対する MIP を調製することにより行う。

複合糖質の糖鎖部分に対する MIP の調製が関連糖鎖抗原であるシリアル Le^a は、シアル酸（N-アセチルノイラミン酸）、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、フコースが結合している NeuAca2→3Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→R、さらに GlcNAc に Fuc が α1→4 結合している。（ただし、R はタンパク質）。そこで、シリアル Le^a の部分構造である NeuAca2→3Galβ1→3GlcNAc、NeuAca2→3Galβ1→3GlcNAc などに Fuc が α1→4 結合した糖鎖に対する MIP を最適化した方法により調製する。MIP の調製には、複合糖質の認識への応用を考慮して、粒子表面に分子認識サイトを形成するように、コア・シェル型の MIP を調製する。

シリアル Le^a の分子認識と応用

シリアル Le^a に対して優れた分子認識能を有する MIP を選択する。得られた MIP を血清中のシリアル Le^a の認識に適用するために、親水性モノマーを用いて MIP 表面を *in situ* で選択的に親水化を行う。マスキングへの適用を考慮して、多検体同時分析への適用も検討する。

(5) 配糖体に対する MIP の調製

コーヒー酸の配糖体であるクロロゲン酸（CGA）に対する MIP の調製の最適化を行い、生薬（杜仲葉）中の CGA の選択的抽出に適用する。

4. 研究成果

(1) アミノ酸、ペプチドおよび単糖、オリゴ糖に対する MIP の調製

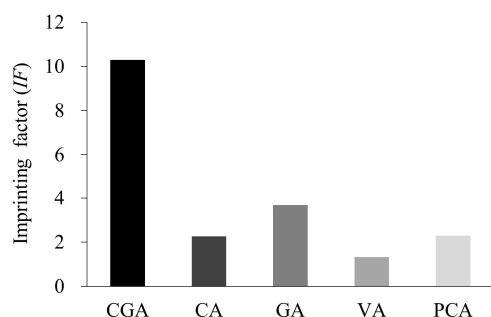
アミノ酸、ジペプチドおよびトリペプチド、単糖、二糖および三糖に対する MIP を修正沈殿重合法により調製可能であった。しかし、得られた MIP は、テンプレート分子を特異的に認識できなかった。アミノ酸、ペプチドおよび単糖、オリゴ糖の認識のためのテンプレート分子の最適化を試みる目的で、配糖体に対する MIP の調製を試みた。

(2) 配糖体に対する MIP の調製

MIP の調製は沈殿重合法により行った。テンプレート分子に少量のメタノールあるいはジメチルスルフォキシドに溶解させた CGA、機能性モノマーにメタクリル酸、架橋剤にジビニルベンゼン、重合開始剤に 2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)を用いた。これらをアセトニトリル/トルエン溶液に溶解し、ゆっくりと攪拌させ 60 °C で 16 時間重合を行った。また、比較のためにテンプレート分子を用いないで同一条件下で重合したノンインプリントポリマー (NIP) も調製した。調製した 0.01 g の MIP および NIP に 0.01-0.10 mmol/L CGA のメタノール溶液 1 mL を加え、6 時間振とう混和を行った。その後、遠心分離により上澄みをろ過したものを試料とし、移動相に 20 mM リン酸塩緩衝液とメタノールの混合液、カラムに ODS カラムを用いて CGA の吸着量を評価した。

調製した MIP および NIP は、粒子径均一なポリマーであった。MIP は、図 1 に示すように、CGA を特異的に認識可能であった。

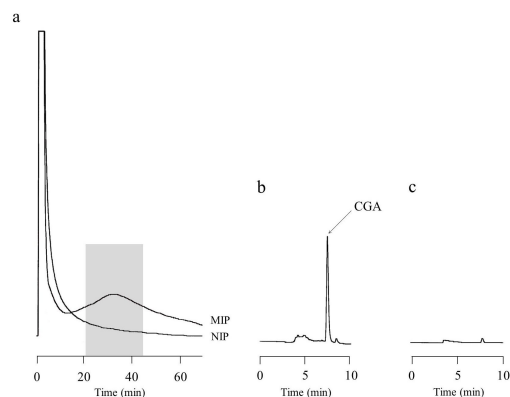
図 1 MIP の分子認識能



CA, caffeic acid; GA, gallic acid; VA, vanillic acid; PCA, protocatechuic acid.

MIP および NIP における CGA の吸着量を評価した結果、MIP ではクロロゲン酸濃度が高くなるとともに吸着量は増加したが、NIP では顕著な増加は見られなかった。また、スキャッチャード解析を行った結果、MIP には 2 種類の結合部位が存在することが分かった。

図 2 MIP による CGA の選択的抽出



さらに、得られた MIP を杜仲葉中の CGA の選択的抽出に適用した結果、図 2 に

示すように、MIP による CGA の選択抽出が可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Chitose Miura, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymer for caffeic acid by precipitation polymerization and its application to extraction of caffeic acid and chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves, J. Pharm. Biomed. Anal., in press, 査読有 DOI: 10.1016/j.jpba.2015.12.052

Yukari Nakamura, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Preparation of molecularly imprinted polymers for strychnine by precipitation polymerization and multi-step swelling and polymerization and their application for selective extraction of strychnine from *nux-vomica* extract powder, J. Sep. Sci., 39, 1542-1550 (2016), 査読有 DOI: 10.1002/jssc.201600027

Noriko Funaya, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for cyclobarbitol and its application to the assay of phenobarbital in human serum, Chromatography, 36, 39-44 (2015), 査読有 DOI: 10.15583/jpchrom.2015.015

Chitose Miura, Hui Li, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymer for chlorogenic acid by modified precipitation polymerization and its application to extraction of chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves, J. Pharm. Biomed. Anal., 114, 139-144 (2015), 査読有 DOI: 10.1016/j.jpba.2015.04.038

Chitose Miura, Noriko Funaya, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Monodisperse molecularly imprinted polymer for creatinine by modified precipitation polymerization and its application to the assays of creatinine in human serum and urine, J. Pharm. Biomed. Anal., 85, 288-294 (2013), 査読有 DOI: 10.1016/j.jpba.2013.07.038

Tomoko Kitabatake, Hiromi Tabo, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Preparation of monodisperse curcumin-imprinted polymer by precipitation polymerization and its application for the extraction of curcuminoids from *Curcuma longa L.*, Anal. Bioanal. Chem., 455, 6555-6561 (2013), 査読有 DOI: 10.1007/s00216-013-7088-6

Yuma Hiratsuka, Noriko Funaya, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka,

Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for bisphenol A and its analogues and their application to the assay of bisphenol A in river water, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 75, 180-185 (2013), 査読有
DOI: 10.1016/j.jpba.2012.11.030

〔学会発表〕(計 18 件)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、安息香酸およびその置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価：置換基が分子認識能に与える影響、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日 (パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市)

升本 志津香、中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、カフェイン酸フェネチルエステルに対する分子インプリントポリマーの調製と応用、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日 (パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市)

Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers as affinity media for sample preparation, 2nd International Symposium on Pharmaceutical Analysis, 2015 年 9 月 24 日 (瀋陽、中国)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、安息香酸およびその塩素置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9 日 (九州大学、福岡県、博多市)

萩中 淳、アフィニティーを利用した分子認識基材の開発と応用、第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015 年 8 月 22 日 (長崎大学、長崎県、長崎市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、ワルファリンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日 (神戸学院大学、兵庫県、神戸市)

升本 志津香、中村 有加里、土井 美奈穂、松永 久美、萩中 淳、ケルセチンに対する分子インプリントポリマーの調製と応用、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日 (神戸学院大学、兵庫県、神戸市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、多段階重合法によるワルファリンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価、第 25 回クロマトグラフィー科学会議、2014 年 12 月 12 日 (京都大学、京都、京都市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、還元型グルタチオンに対する分子インプリントポリマーの調製と応用、日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 19 日 (広島大学、広島県、東広島市)

⑩ Jun Haginaka, Preparation of molecularly imprinted polymers for hydrophilic compounds by modified precipitation polymerization, *Drug Analysis 2014*, 2014 年 6 月 25 日 (リエージュ、ベルギー)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、沈殿重合法による還元型グルタチオンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日 (熊本大学、熊本県、熊本市)

中村 有加里、三浦 ちとせ、松永 久美、萩中 淳、ストリキニーネに対する分子インプリントポリマーの調製：沈殿重合法と多段階膨潤重合法の比較、第 24 回クロマトグラフィー科学会議、2013 年 11 月 12 日 (東京大学、東京都、文京区)

三浦 ちとせ、松永 久美、萩中 淳、カフェイン酸に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、第 24 回クロマトグラフィー科学会議、2013 年 11 月 12 日 (東京大学、東京都、文京区)

Jun Haginaka, Monodisperse molecularly imprinted polymers for bioanalysis and environmental analysis, *BCEIA 2013*, 2013 年 10 月 24 日 (北京、中国)

Jun Haginaka, Preparation of monodisperse molecularly imprinted polymers by precipitation polymerization, *DICP Symposium (XXXV)*, 2013 年 10 月 22 日 (大連、中国)

Jun Haginaka, Monodisperse molecularly imprinted polymers for pharmaceutical and biomedical analysis, *The First International Symposium on Pharmaceutical Analysis*, 2013 年 9 月 29 日 (瀋陽、中国)

中村 有加里、三浦 ちとせ、松永 久美、萩中 淳、ストリキニーネに対する分子インプリントポリマーの調製とその応用、日本分析化学会第 62 年会、2013 年 9 月 12 日 (近畿大学、大阪府、東大阪市)

Jun Haginaka, Monodisperse molecularly imprinted polymers for bioanalysis, *PBA2013*, 2013 年 7 月 2 日 (ボローニャ、イタリア)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/research/labo/chemistry/03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩中 淳 (HAGINAKA, Jun)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20164759