

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18350087

研究課題名（和文）人工高分子レセプターナノ粒子を用いたタンパク質のセンシング

研究課題名（英文）Protein Sensing Using Synthetic Polymer Receptors

研究代表者

竹内 俊文（TAKEUCHI TOSHIFUMI）

神戸大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70179612

研究成果の概要：

タンパク質に対する人工高分子レセプターをモレキュラーインプリンティングの手法を用いて合成し、表面プラズモン共鳴センサーによるタンパク質のセンシングに応用した。また、蛍光性の重合可能な金属錯体モノマーを用いて情報発信型タンパク質インプリントポリマーを合成し、蛍光変化でタンパク質の結合イベントが読み出せることを示した。さらに、異なるタンパク質を認識するインプリントポリマーを用いてアレイフォーマットでタンパク質を検出したところ、多変量解析を用いることで明快に認識できることがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：モレキュラーインプリンティング；タンパク質；分子認識；センサー；アレイ

1. 研究開始当初の背景

従来、タンパク質は、抗原抗体免疫反応を用いて検出してきた。これは特異性および感度の高い方法であるが、反面、抗体や標識のための酵素が、生物由来であるがゆえに、安定性、保存性、コストなどに難があり、そのため用途や適用範囲に限られるという問題がある。そこで本研究では、生物由来の抗体材料に代わる人工高分子レセプターを開発する。本研究により、従来の抗体を用いる手法と比べて、極めて容易にタンパク質認識材料が合成可能となり、半永久的に保存でき、

低コストのセンサーの構築が期待できる。

2. 研究の目的

モレキュラーインプリンティング技術を用いて、タンパク質人工高分子レセプターを作製する。標的タンパク質が結合すると、表面プラズモン共鳴（SPR）現象の変化を生じるタンパク質認識人工高分子レセプター基板を作成し、タンパク質センサーチップを作成する。このタンパク質センサーチップを用いて、表面プラズモン共鳴センサーを構築する。

また、蛍光で情報を発信する情報発信型タ

ンパク質インプリントポリマーを合成し、タンパク質の結合情報の読み出しが可能かどうか検討する。

さらに、異なる標的タンパク質を認識する人工高分子レセプターを合成し、人工高分子レセプターアレイフォーマットによりタンパク質の認識が行えるかどうか検討する。さらに、多数の結合情報を処理して、どのようなタンパク質が含まれるかを推定するための新しい多変量情報処理法を開発する。

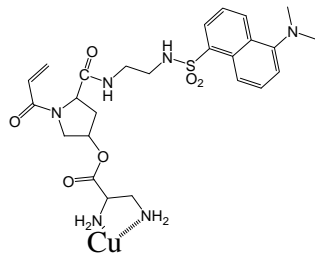
3. 研究の方法

①タンパク質インプリント SPR センサー

モデルタンパク質としてリゾチーム、機能性モノマーにはアクリル酸を用いて合成したインプリントポリマーセンサーチップを作成するための最適化を行い、機能性モノマー量、緩衝液 pH、緩衝液種類、塩濃度、タンパク質濃度の最適条件を見出す。最終的に表面プラズモン共鳴 (SPR) タンパク質センサーの構築を行う。

②情報発信型タンパク質インプリントポリマー

本研究では、タンパク質のリガンドとなる蛍光発色団と金属錯体を有する機能性モノマーを合成し、これを用いたタンパク質インプリントポリマーを調製する。



③タンパク質インプリントポリマーアレイ

機能性モノマーとしてアクリル酸 (AA) あるいはジメチルアミノエチルメタクリレート (DMA)、非特異的吸着を抑えるための親水性コモノマー、および親水性架橋剤を用いて、シトクローム C、リボヌクレアーゼ A、ラクトアルブミンを鋳型分子に用いたインプリントポリマーおよびタンパク質を加えないブランクポリマーの計 4 種類のポリマーを合成する。

4. 研究成果

①タンパク質インプリント SPR センサー

テンプレートにはモデルタンパク質としてリゾチームを、機能性モノマーにはカルボキシル基を有するアクリル酸を選択し、インプリントポリマーの合成を行った。このとき、タンパク質と機能性モノマーは静電的相互作用で結合するため、ポリマー表面の電荷量が結合に重要な役割を果たすのではないかと考え、機能性モノマーであるアクリル酸の割合を変化させたインプリントポリマーを合成し、機能評価を行った。その結果、機能性モノマーを 5 当量添加した場合に最高の

特異性を示し、目的のインプリントポリマーが合成可能であることが示された。結合特異性を高めるためには、適切な機能性モノマーの割合を選択することが重要であることを明らかにした。

インプリントポリマーを用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーの構築を行った。機能性モノマー量、緩衝液 pH、緩衝液種類、塩濃度、タンパク質濃度の最適化を行い、インプリントポリマーで高い選択性を実現した。弱い静電的な相互作用による非特異的吸着の低減を目指し、塩濃度を変化させることによるインプリントポリマーのタンパク質吸着能の変化を検討した。さまざまな濃度の塩溶液中でポリマー合成を行った。SPR 装置により合成したポリマーのスクリーニングをさまざまな濃度の塩溶液中で行った。その結果、インプリントポリマー合成時に塩を加えることで結合特異性を向上させることがわかった。さらに、再結合実験時に塩を加えることで選択性が向上した。これはインプリントポリマーの合成時に塩強度をかけることにより、リゾチームとアクリル酸の結合のうち、不安定な弱い結合が阻害され、この結果得られた安定な結合サイトのみが形成されることにより、結合特異性が向上したと考えられる。また、再結合実験の緩衝液中で塩強度をかけることにより、インプリントポリマーへのタンパク質の弱い結合や非特異的吸着が抑制され、特異的結合が顕在化したと考えられる。これらの結果より、SPR 装置でタンパク質の検出が可能となり、直接かつリアルタイムに結合量を測定することが可能となった。簡便、かつ短時間で測定が可能なバイオセンサーへと応用が期待される。

タンパク質結晶を鋳型とするインプリントポリマーの合成を行った。これまでタンパク質のモレキュラーインプリンティング法の試みはいくつかなされておられ、結合特異性を持ったインプリントポリマーが合成されている。しかし、その結合特異性は低く、抗体の代替となるような人工系を確立するためには、インプリントポリマーの結合特異性を向上させることが大きな課題である。本研究では、従来のバルク水溶液系における溶液重合の手法に代わり、タンパク質結晶をテンプレートとする結晶インプリント法を提案した。自由度が大きな溶液中と異なり、結晶状態では個々のタンパク質分子の分子運動が抑制されているため、モレキュラーインプリンティングにより正確な鋳型が取れ、結合特異性が向上できると期待される。結晶インプリントのためのテンプレートとしてリゾチーム結晶を選択した。まずリゾチームの結晶化条件を検討し、再現性よく効率的にリゾチーム結晶を得る手法を確立した。次に、得られたリゾチーム結晶をテンプレートとして

インプリントポリマー薄膜を作製した。セルロース膜上に析出させたリゾチーム結晶とセンサーチップとの間に、機能性モノマーおよび架橋剤を含む水溶液を挟んで重合することで目的のポリマー薄膜を得た。この結晶インプリントポリマーとタンパク質との結合量を SPR 装置により測定し、結合特異性を評価した結果、水溶液中の自由度の高い状態のリゾチームをインプリントしたインプリントポリマーに比べ、結晶インプリントポリマーではリゾチームに対する結合特異性が向上した。このことから結晶インプリント法により、目的タンパク質に対する高い親和性と特異性が獲得できることが示された。以上の知見より、タンパク質のインプリントポリマーにおいては、テンプレートの鑄型を正確に取ることで、およびインプリントによりポリマーに形成された結合部位の損傷を抑えることが結合特異性向上に重要であることを明らかにした。

②情報発信型タンパク質インプリントポリマー

リボヌクレアーゼをモデル標的分子として、新規蛍光性金属錯体モノマーを用いてモレキュラーインプリンティングを行った。

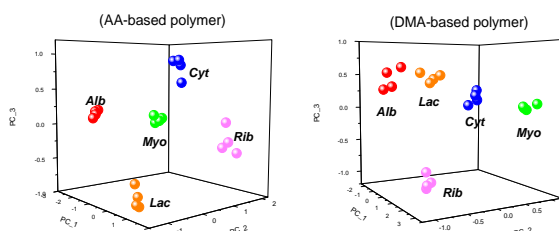
まず、合成した金属錯体モノマーを用いて、SPR センサーチップ上にリボヌクレアーゼインプリントポリマーを合成した。このインプリントポリマー被覆 SPR センシングチップを用いて SPR シグナルを測定したところ、リボヌクレアーゼに対してより高い親和性と選択性を示した。結合の際、塩強度を増加させると急激に吸着能が減少したことから、モノマーなしでは結合能がなかったことから、タンパク質は疎水性相互作用で非特異的に吸着しているのではなく、モノマー由来の金属錯体と相互作用していることが示唆された。

蛍光色素としてダンシル基を導入した重合性官能基をもつ金属錯体モノマーとリボヌクレアーゼで滴定実験を行ったところ、リボヌクレアーゼに対し波長変化を伴いながら蛍光変化を示した。このモノマーを用いてリボヌクレアーゼ、リゾチーム、トリプシンのインプリンティングを行ったところ、それぞれのインプリントポリマーは対応する鑄型タンパク質に対しより蛍光強度が増加した。このように、標的タンパク質に応答するインプリントポリマーアレイが構築可能であることが示唆された。

③タンパク質インプリントポリマーアレイ

複数のタンパク質インプリントポリマーの結合情報から、タンパク質の識別が可能かどうか検討した。アクリル酸 (AA) あるいはジメチルアミノエチルメタクリレート (DMA) を機能性モノマーに用い、シトクローム C、リボヌクレアーゼ A、ラクトアルブミンを鑄型分子に用いたインプリントポリマーおよ

びタンパク質を加えないブランクポリマーを合成し、それぞれのポリマーについて、シトクローム C (Cyt)、ミオグロビン (Myo)、リボヌクレアーゼ A (Rib)、ラクトアルブミン (Lac)、アルブミン (Alb) の 5 種類のタンパク質の吸着量をみたところ、それぞれのポリマーは、鑄型タンパク質に対し最も吸着量が多く、インプリント効果が認められた。このデータを多変量解析のひとつである主成分分析により解析し、結果を三次元プロットした。その結果、それぞれのタンパク質が、三次元グラフ上できれいに分割できることが分かった。これらのインプリントポリマーをアレイ化して、同様のデータ処理をすることで、人工材料を用いた新しいコンセプトの



プロテインチップが出来る可能性が示唆された。

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 7 件)

- ① Shinmori, H., Furukawa, H., Fujimoto, K., Shimizu, H., Inouye, M., Takeuchi, T. Characteristic Fluorescence Behavior of Dialkynylpyrene Derivatives in Hydrophobic Cavity of Protein, Chem. Lett. 2009, 38, 84-85. Refereed
- ② Takeuchi, T., Hishiya, T. Molecular Imprinting of Proteins Emerging as a Tool for Protein Recognition, Org. Biomol. Chem. 2008, 6, 2459-2467. Refereed
- ③ Matsunaga, T., Hishiya, T., Takeuchi, T., Optimization of Functional Monomer Content in Protein- Imprinted Polymers, Anal. Lett. 2007, 40, 2633-2640. Refereed
- ④ Matsunaga, T., Hishiya, T., Takeuchi, T., Surface Plasmon Resonance Sensor for Lysozyme Based on Molecularly Imprinted Thin Films, Anal. Chim. Acta 2007, 591, 63-67. Refereed
- ⑤ Takeuchi, T., Goto, D., Shinmori, H., Protein Profiling by Protein Imprinted Polymer Array, Analyst 2007, 132, 101-103. Refereed
- ⑥ Matsunaga, T., Takeuchi, T. Crystallized Protein-imprinted Polymer Chips, Chem. Lett. 2006, 35, 1030-1031. Refereed

- ⑦ Takeuchi, T., Murase, N., Maki, H., Mukawa, T., Shinmori, H. Dopamine Selective Molecularly Imprinted Polymers via Post-imprinting Modification, *Org. Biomol. Chem.* 2006, 4, 565-568. Refereed

〔学会発表〕 (計 21 件)

【国際会議】

- ① Hishiya, T., Ohmori, K., Kuwahara, A., Ooya, T., Takeuchi, T., "Reparation of Protein-imprinted Polymers by Using Fluorophore-Conjugated Metal Complexes as a Functional Monomer", 5th International Workshop on Molecularly Imprinting (Kobe, Japan, Sep. 10, 2008).
- ② Takano, E., Ohkubo, Y., Ooya, T., Takeuchi, T. "Preparation of Molecularly Imprinted Microspheres Using a Micro-fluidic Device", 5th International Workshop on Molecularly Imprinting (Kobe, Japan, Sep. 10, 2008).
- ③ Saisho, R., Shimizu, M., Matsuoka, M., Ooya, T., Takeuchi, T. "Development of Molecular Imprinting for Protein with Water-soluble Porphyrin Derivatives", 5th International Workshop on Molecularly Imprinting (Kobe, Japan, Sep. 10, 2008).
- ④ Suga, T., Takeuchi, T. "Molecular Imprinting of Protein Immobilized Natural Capsule", 5th International Workshop on Molecularly Imprinting (Kobe, Japan, Sep. 8, 2008).
- ⑤ Takeuchi, T., "Protein-imprinted Polymers Prepared with Organic and Inorganic Materials" 4th International Workshop on Molecularly Imprinting (Cardiff, UK, Sep. 12, 2006).
- ⑥ Matsunaga, T., Takeuchi, T., "Molecularly Imprinted SPR Ssensor Chips for Protein Sensing", 4th International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers (Cardiff, UK, Sep. 11, 2006).
- ⑦ Hishiya, T., Takeuchi, T., "Molecular Imprinting Using Metal Complexes for Recognition of Proteins", 4th International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers (Cardiff, UK, Sep. 11, 2006).
- ⑧ Takeuchi, T., Goto, D., Shimizu, K. D., "Protein Imprinted Polymer-Based Sensor Array", *Biosensors 2006* (Toronto, Canada, May 12, 2006).

【国内学会】

- ① 古川、新森、藤本、清水、井上、竹内「フェニルアセチレン結合型水溶性ピレン誘導体を用いたタンパク質の検出」日本化学会第 88 春季年会 (平成 20 年 3 月 29 日、立教大学).

- ② 税所、菱谷、竹内「ポルフィリン誘導体を用いたタンパク質の認識」日本化学会第 88 春季年会 (平成 20 年 3 月 28 日、立教大学).
- ③ 菅、雀部、菱谷、竹内「タンパク質の転写型モレキュラーインプリンティング」第 22 回生体機能関連化学シンポジウム (平成 19 年 9 月 28 日、東北大学).
- ④ 菱谷、竹内「インプリントポリマーを用いたタンパク質センシング」日本ケミカルバイオロジー研究会 第 2 回年会 (平成 19 年 5 月 9 日、京都大学).
- ⑤ 菱谷、新森、竹内「金属配位型機能性モノマーを用いたタンパク質インプリントポリマーの合成」日本化学会第 87 春季年会 (平成 19 年 3 月 28 日、関西大学).
- ⑥ 竹内、後藤、菱谷、新森「タンパク質認識のためのタンパク質インプリントポリマーアレイ」日本化学会第 87 春季年会 (平成 19 年 3 月 26 日、関西大学).
- ⑦ 雀部、菱谷、新森、竹内「固定化テンプレートを用いた転写型タンパク質インプリンティング」日本化学会第 87 春季年会 (平成 19 年 3 月 26 日、関西大学).
- ⑧ 松永、菱谷、新森、竹内「タンパク質インプリントポリマーの分子認識能における塩強度の影響」日本化学会第 87 春季年会 (平成 19 年 3 月 26 日、関西大学).
- ⑨ 菱谷、竹内「分子インプリント薄膜によるタンパク質の認識」第 21 回バイオ関連化学合同シンポジウム (平成 18 年 9 月 30 日、京都大学).
- ⑩ 松永、竹内「タンパク質結晶インプリントポリマー」第 21 回バイオ関連化学合同シンポジウム (平成 18 年 9 月 30 日、京都大学).
- ⑪ 竹内「タンパク質の新規モレキュラーインプリント材料」バイオ関連化学合同シンポジウム (平成 18 年 9 月 28 日、京都大学).
- ⑫ 菱谷、竹内「金属錯体を用いたタンパク質インプリントポリマーの構築とその機能」第 55 回高分子討論会 (平成 18 年 9 月 21 日富山大学).
- ⑬ 竹内「モレキュラーインプリントポリマーアレイによるタンパク質の認識」日本ケミカルバイオロジー研究会第 1 回年会 (平成 18 年 5 月 8 日、学術総合センター、東京)

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 竹内俊文「モレキュラーインプリンティングによるタンパク質認識材料の創製」*Electrochemistry* (電気化学および工業物理化学) 2007, 75, 986-991.
- ② 竹内俊文、新森英之「分子インプリントポリマーを用いたセンシング」*バイオセ*

ンサ・ケミカルセンサ事典，軽部征夫編
(テクノシステム) 2007, pp264-271.

- ③ 竹内俊文，菱谷隆行，松井淳「分子インプリント材料を分子素子として用いたセンサー」バイオセンサーの先端科学技術と応用，民谷栄一監修（シーエムシー出版）2007, pp77-91.

[産業財産権]

○出願状況（計2件）

①名称：標的分子のセンシングチップの
作成方法

発明者：竹内俊文、菱谷隆行

権利者：神戸大学

種類：特開

番号：2009-025085

出願年月日：H19. 7. 18

国内外の別：国内

②名称：分子インプリント微粒子を用いた
試料中の標的分子検出方法

発明者：竹内俊文

権利者：神戸大学

種類：特開

番号：2009-047507

出願年月日：H19. 8. 17

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmc.scitec.kobe-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 俊文 (TAKEUCHI TOSHIFUMI)

神戸大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70179612

(2) 研究分担者

新森 英之 (SHINMORI HIDEYUKI)

神戸大学・大学院工学研究科・助教授

研究者番号：40311740

菱谷 隆行 (HISHIYA TAKAYUKI)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・助教

研究者番号：40444567

(3) 連携研究者

なし