

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05526

研究課題名(和文) 生体分子のリガンド結合部位をモデルとした吸着剤の合成とそのカビ毒分析への応用

研究課題名(英文) Synthesis of the adsorbent imitated from the binding site of biomolecules and its application to mycotoxin analysis

研究代表者

山本 敦 (Yamamoto, Atsushi)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60360806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド、リュープロレリン(以下Leu)の均一系でのカビ毒、オクラトキシンA(以下OTA)との結合定数は、アセトニトリル中0℃で約10,000/Mなのに対し、Leuをグリシジル基を介して固定化した吸着剤では、100,000,000/Mを超す大きな値をとった。これはOTA抗体にも匹敵する値で、おそらく近接した二つのLeu官能基が一つのOTA分子を協働して包摂しているためであろうと推察している。ペプチドを二分子競合可能な配置で固定化すれば抗体に匹敵する特異的吸着を発現することを初めて明らかとした。同等の協働吸着の可能性をより小さな分子官能基で追求した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特異的吸着現象の代名詞として使われているのが「抗体」である。生成には生体の防御反応を利用せざるを得ず、動物愛護の見地からは決して望ましいものではない。これと同等の吸着特性を有する化学合成品として高分子アブタマが知られているが、より小さな分子が協働で作用することでも可能であることを見出したのは世界初である。また、今回のコロナ禍においてワクチン開発技術が脚光を浴びているが、ワクチン投与によって生体内で抗体を誘導するのではなく、治療薬としての人工抗体の開発にも応用可能な技術となりうる。

研究成果の概要(英文)：The binding constant of the peptide, leuprorelin to mycotoxin, ochratoxin A in acetonitrile was about 10,000/M at 0 degree Celsius. However, its value of the leuprorelin immobilized resin to ochratoxin was exceeding 100,000,000/M. This value is comparable to that of ochratoxin A antibody, and it is speculated that two leuprorelin functional groups in close proximity include one ochratoxin A molecule in cooperation. We have shown for the first time that immobilization of a peptide in a bimolecular competitive arrangement produces specific adsorption comparable to that of an antibody. We pursued the possibility of equivalent collaborative adsorption with smaller molecular functional groups.

研究分野：衛生分析化学

キーワード：環境負荷因子 ハサミ型吸着剤 リュープロレリン

1. 研究開始当初の背景

抗体を使った分析技術には、イムノクロマト法による簡易スクリーニングからイムノアフィニティカラムによる精密測定用の精製法が存在する。抗体が高価であるため、何れも高価な素材となっている。我々は、抗体に代わる吸着素材として、薬物輸送タンパク質として知られている血清アルブミンを選択した。安価なウシ血清アルブミン(BSA)とカビ毒、OTA との結合定数は $10^6 M^{-1}$ 程度と大きくはないが、固定化量を増やした BSA 固定化樹脂で OTA が捕捉できることを見出した (R. Yamamoto, *et al.*, *Sep. Sci. Plus*, **1**, 196, 2018)。しかし、BSA は抗体と同じタンパク質であり、耐有機溶媒性に劣る。BSA 固定化樹脂を水系で使用すると、巨大なタンパク質のみならず担体樹脂表面に対する夾雑成分の非特異的吸着が無視できなくなる。目的成分に対する結合定数が大きく、かつ有機溶媒中で使用可能な吸着素材の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

特異性の高い吸着剤としてアプタマが知られている。ペプチドアプタマは、正に抗体を模倣した吸着素材であるが、大量生産に向いていない。もう一つの核酸アプタマは、PCR 装置によって安易に合成可能であるが、塩基の種類に限られていて特異性の発現に限界がある。食品汚染の著しいカビ毒、OTA に限って言えば、結合定数が $10^7 M^{-1}$ にも達する核酸アプタマが報告されている (N. Prabhakar, *et al.*, *Biosens. Bioelectro.*, **26**, 4006, 2011, A.V. Samokhvalov, *et al.*, *Anal. Chem.*, **90**, 9189, 2018)。これらも有機溶媒中での使用は不可で、蛍光ラベル化したアプタセンサーとしての応用が主である。そこで本研究では、BSA を模倣した耐有機溶媒性に優れた OTA 用のペプチド型吸着剤構築を目標とする。本来は抗体を模倣したいのであるが、抗体は作成者の所有物であり、情報の開示は皆無といっている。それに対し、BSA の吸着サイトの構造は開示されており、OTA 吸着サイトのアミノ酸配列まで明らかとなっている (J. L. Perry, *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 16960, 2004)。それによると、吸着に重要な役割を果たしているアミノ酸はアルギニン、トリプトファン、ヒスチジンである。これらのアミノ酸を含む市販のペプチドを探索した結果、子宮内膜症治療薬の Leu が適合した。このペプチドを固定化した吸着剤の OTA に対する選択性を検討した。Leu と OTA の構造式は図 1 に示す。

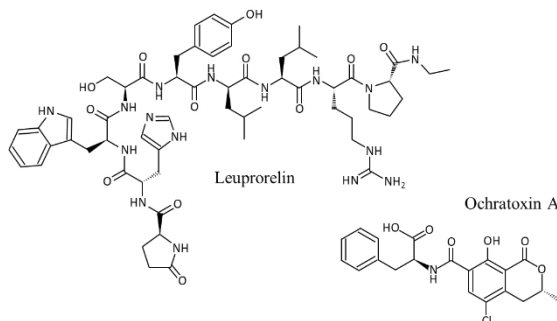


図1. リュープロレリンとオクラトキシンの構造式

3. 研究の方法

1. ペプチド固定化樹脂の評価

官能基モノマ、グリシジルメタクリレートと架橋性モノマ、エチレングリコールジメタクリレートから成る EG40 というポリマーゲルを懸濁重合で作成した。洗浄後、約 $70 \mu m$ 程度に分球し、これに Leu を導入した。得られた Leu 吸着剤は、洗浄・乾燥後窒素元素分析によって Leu 導入量を確定した。

EG40 上のグリシジル基と Leu のどのアミノ酸がリンカーとなっているかを、Leu 吸着剤をメタンサルホン酸で加水分解し、得られたアミノ酸を蛍光誘導体化 HPLC で測定した。

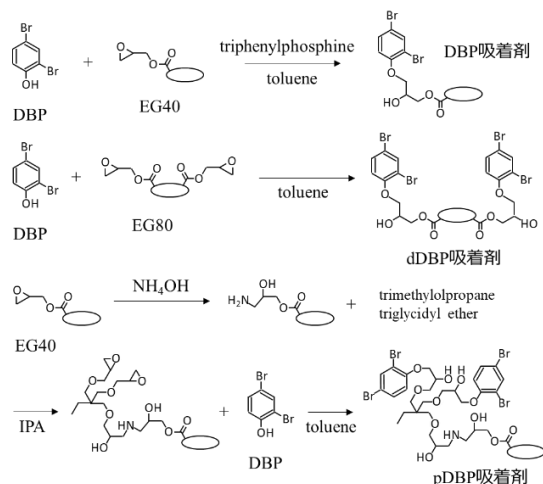


図2. 各種 DBP 吸着剤の合成スキーム

吸着等温線は、 10 mg 程度の Leu 樹脂をマイクロチューブに秤量し、既知濃度の OTA 溶液を添加して一定時間放置した後、平衡 OTA 濃度を HPLC-FL で測定して作成した。すなわち、OTA 濃度変化量を液量を使って絶対量とし、用いた Leu 樹脂量を分母とすることで吸着量とした。得られた結果を Langmuir 式を使って解析し、結合定数と最大吸着量を算出した。

2. ジブロモフェノキシ基導入樹脂の評価

先と同様の EG40 に対してジブロモフェノールを直接導入した DBP 吸着剤と、グリシジルメタクリレートモノマの比率を倍にした EG80 に導入した dDBP 吸着剤を合成した。一方、EG40 をアミノ開環し、トリメチロールプロパントリグリシジルエーテルを導入後にジブロモフェノールを導入した pDBP 吸着剤の 3 種類を用意した。

これらも先と同様、臭素の元素分析によってジブロモフェノール導入量を算出した。これらの合成スキームは図2に示す。

これら吸着剤の評価は、これも同様に 2,4,6-トリブロモフェノール (TBP) を使って吸着等温線の作成を行い、各種係数を求めた。

4. 研究成果

1-1. Leu 吸着剤の合成

EG40 0.6 g に対して 25 mg (19.7 μmol) のペプチドを導入した。窒素元素の結果、20 $\mu\text{mol/g}$ の Leu が導入されていた。約 6 割のペプチドが導入されたことになる。

この吸着剤のメタンスルホン酸による加水分解液を、*o*-フタルアルデヒド誘導体化蛍光 HPLC でアミノ酸分析をしたところ、Leu 構成アミノ酸のうちチロシンとプロリン以外は全て検出された。プロリンは第二級アミンを有しており、*o*-フタルアルデヒドとは反応しないため、EG40 上のグリシジル基とチロシンのフェノール性水酸基が反応したものと推察された。

1-2. Leu と OTA の溶液中での錯生成定数

Leu と OTA のアセトニトリル中での錯生成定数を Benesi-Hildebrand 改変法によって測定した。OTA は発光性の化合物である。これが Leu と会合することによって溶媒と環境が変化し、蛍光強度も変化する。OTA 濃度一定条件における Leu 濃度と蛍光強度の間には一定の関係が存在し、それを解くことによって錯生成定数を求めた。図3に OTA の蛍光スペクトル変化を示す。これより求まる 20°C での錯生成定数は、 $1.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であった。

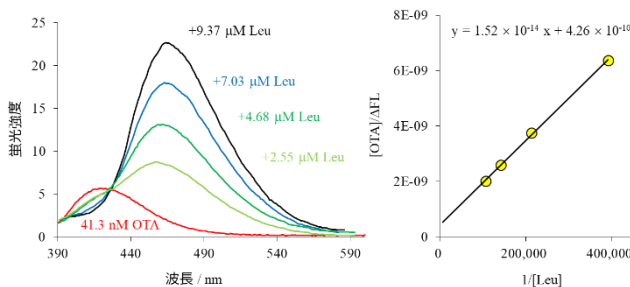


図3. アセトニトリル中での OTA 蛍光強度の変化と 470 nm での Benesi-Hildebrand プロット

ここでの値を Hill plot することで、Leu と OTA は 1:1 の会合体を形成していることが明らかとなった。Leu と OTA による蛍光強度変化は、水系およびメタノール中では認められなかったことより、錯生成はアセトニトリル中のみでの現象であると推定された。

1-3. Leu 吸着剤と OTA との錯生成定数

20°C における吸着等温線を図4の●プロットで示す。単純な Langmuir 式で説明できなかったことより、Leu 吸着剤には複数の吸着サイトが存在するものと思われた。そこで、ベースゲルである EG40 に対する Leu の非特異的吸着量を求め(□)、さらに元素分析で得られた 20 $\mu\text{mol/g}$ の Leu 官能基が $K=1.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ で 1:1 の OTA 捕捉するものと仮定した吸着線を差し引くと、最大吸着量 0.226 $\mu\text{mol/g}$ 、 $K=7.59 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の吸着サイトが形成されていることが明らかとなった。Leu を官能基として導入することで生成定数が三桁以上上昇すること、および最大吸着量が導入量の 1/100 程度に減少したことは、近接した位置に導入された二つの Leu 分子が OTA を協働して捕捉した結果であると考えている。

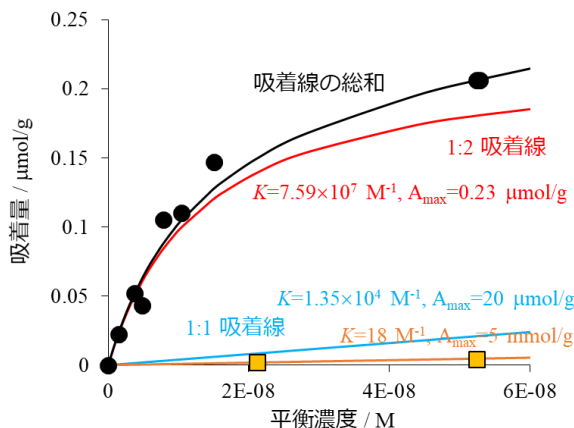


図4. 20°CにおけるLeu吸着剤へのOTA吸着等温線

2-1. DBP 吸着剤による TBP 分子の特異的捕捉

0°C における吸着等温線を、先と同様に図5の●と□で示す。臭素の元素分析結果より、DBP 吸着剤では 0.84 $\mu\text{mol/g}$ 、dDBP 吸着剤では 2.1 $\mu\text{mol/g}$ の官能基が導入されていることが判明している。DBP 官能基と TBP 溶質が 1:1 の会合体を形成した場合の最大吸着量を官能基導入量と仮定して Langmuir 式を解くと、Leu 吸着剤の時と同様に最大吸着量は官能基導入量に比べてかなり小さいものの、生成定数が四桁大きな吸着サイトが存在することが見えてくる。近接した位置に導入された二つの DBP 官能基による協働捕捉と考えられる。ところが、官能基密度を倍以上にした dDBP 吸着剤では、生成定数に変化はなかったが逆に最大吸着量が減少した。二つの官能基の近接度合いは、近すぎると DBP 同士が会合して溶質分子との相互作用が小さくなる。すなわち、二分子の DBP 官能基は溶質分子を挟み込むことで捕捉している。そのためには官能基同士が会合できない適度な距離が必要になってくると考えられた。そこで、EG40 のグリシジル基

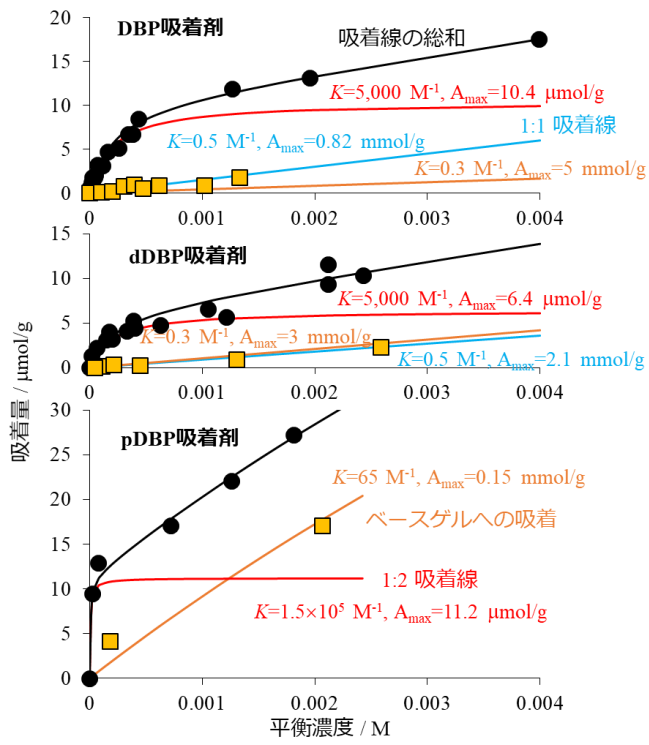


図5. 0°Cにおける各種DBP吸着剤へのTBP吸着等温線

に直接 DBP を導入するのではなく、トリメチロールプロパントリグリシジルエーテルを介して DBP を導入した pDBP 吸着剤を評価した。その結果、 $K=10^5 \text{ M}^{-1}$ を越える強い吸着剤の構築に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masanori Yamamoto, Miyuki Obara, Keisuke Ochi, Atsushi Yamamoto, KatsuhikoTakenaka, Tsunehiro Tanaka, Kazunori Sato	4. 巻 83
2. 論文標題 Probing the Entropic Effect in Molecular Noncovalent Interactions between Resin-Bound Polybrominated Arenes and Small Substrates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemPlusChem	6. 最初と最後の頁 820-824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cplu.201800304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kikukawa Koji, Fukui Miki, Oka Ayano, Yamamoto Ryohei, Yamamoto Atsushi, Uchigashima Mikiko, Kono Takeshi, Kozaki Daisuke, Kodama Shuji	4. 巻 346
2. 論文標題 A label-free, direct solid-phase fluorimetric analysis of ochratoxin A in agricultural products with monoclonal antibody-immobilized monolith	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 128736 - 128736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2020.128736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小久保翠月、小出高羅、山本良平、山本 敦、三輪俊夫、林 義貴
2. 発表標題 ハロゲン化フェノール類の特異的吸着剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Yamato, Atsumi Nagaya, Ryohei Yamamoto, Atsushi Yamamoto, Naoya Kasai
2. 発表標題 A simple and rapid pretreatment of coffee beans with serum albumin for ochratoxin A HPLC analysis
3. 学会等名 Association for the Science and Information on Coffee（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大和直樹、富澤千明、山本良平、山本 敦、小玉修嗣
2. 発表標題 血清アルブミンのリガンド結合能を利用したカビ毒ochratoxin Aのワンポット精製法とその分析への応用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小出高羅、菊川浩史、中島花奈、山本良平、山本敦
2. 発表標題 分子間作用型吸着剤を用いたジチオカルバメート系農薬の分析法
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小出高羅、菊川浩史、山口瑛紀、山本良平、山本敦
2. 発表標題 ジチオカルバメート系農薬分析法の問題点とその解決策
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小久保翠月、山本敦
2. 発表標題 吸着剤官能基の導入密度と捕捉特性に関する考察
3. 学会等名 第20回高山フォーラム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小玉 修嗣 (Kodama Shuji) (70360807)	東海大学・理学部・教授 (32644)	
研究 分担者	山本 雅納 (Yamamoto Masanori) (70802966)	東北大学・多元物質科学研究所・助教 (11301)	2020年度より研究分担者より外れる

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------