

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：17201
 研究種目：基盤研究(C)（一般）
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K05527
 研究課題名（和文）人工抗体を被覆した酵素含有材料の開発と食品成分の新規比色・蛍光分析法創製への応用

 研究課題名（英文）Development of enzyme-containing material coated with artificial antibody and its application to creation of new colorimetric/fluorescent analysis method of food components

 研究代表者
 宗 伸明（SOH, Nobuaki）

 佐賀大学・農学部・教授

 研究者番号：90336008
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、無機ナノシートを用いた酵素含有材料の表面を、分子インプリント法で作製した人工抗体で被覆した材料を開発し、これを用いて食品成分の新規な比色・蛍光分析法を構築することを試みた。西洋ワサビペルオキシダーゼとチタン酸ナノシートから成る複合体の表面を、ポリフェノールの一種であるケルセチンをテンプレートとして作製した分子インプリントポリマー膜で被覆した材料を作製し、検討を行った結果、この材料がケルセチンの比色分析系の構築に有用であることが示された。また、本分析法のケルセチン蛍光分析系への拡張性、並びに他の食品成分の分析系構築における有用性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 分析法は科学技術の発展に必要な基盤的技術として重要である。近年、食品の機能性や安全性に対する関心は高まりを見せており、故に食品分析の重要性も増している。本研究は、酵素/無機ナノシート複合体の表面を分子インプリント法により作製した人工抗体で被覆した新しい材料を開発し、これを食品成分の比色・蛍光分析に応用したものであり、酵素と無機ナノシートを基盤とした複合材料の新たな応用を開拓した点で、大きな学術的意義があると考えられる。また、本手法は、様々な食品成分の分析法構築にも資することが期待でき、上述した食品分析の重要性から、社会的にも重要な意義を持つものと言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, the enzyme-containing material utilizing inorganic nanosheets, in which the surface of the material was coated with artificial antibody prepared by molecular imprinting technique, was developed, and the material was applied to the construction of new colorimetric and fluorescent methods for the analysis of food components. The complex material composed of horseradish peroxidase and titanate nanosheets was prepared, and the surface of the material was then coated by molecularly imprinted polymer membrane, which was synthesized by utilizing a template quercetin that is one of the polyphenols. The new material was successfully applied to the colorimetric assay of quercetin. Furthermore, the expandability of the method for fluorescent assay of quercetin, and the usefulness of the method to construct assay system for other food components, were suggested.

研究分野：分析化学、生体高分子化学

キーワード：比色分析 分子インプリントポリマー 西洋ワサビペルオキシダーゼ 無機ナノシート 蛍光分析 ケルセチン

1. 研究開始当初の背景

有用な新規分析法の開発は、科学技術の発展において重要である。酵素は、分析化学におけるシグナル増幅分子としても有用であり、人工材料と融合することで、酵素単独では困難な魅力的な機能を発現することも期待できる。これまで、有機高分子や多孔質ガラスを固相担体として用いた酵素固定化材料が数多く開発され、分析系の構築にも応用されてきた。しかし、二次元物質である無機ナノシートを固相担体として用いた酵素固定化材料に関しては、分析化学分野への応用がまだ少なく、研究の進展が強く望まれていた。

2. 研究の目的

上述した背景から、本研究では無機ナノシートを用いた酵素含有材料と人工抗体を併用した食品成分の新規比色・蛍光分析法の構築を目的とした。より具体的には、酵素と無機ナノシートから形成される複合材料の表面を、分子インプリント法により作製した人工抗体で被覆することにより新規な材料を創り出し、これを用いることで、食品成分を検出対象とした新たな比色・蛍光分析法を開発することを目指した。分子インプリント法は、人工抗体として機能する分子認識材料を構築する有用な手法であり、安価で安定性の高い分子認識材料を作製することが可能な手法である。なお、本研究では、分子インプリント法によるポリマー膜の作製において、近年注目されているドーパミンの自己重合反応を利用することにした。

3. 研究の方法

本研究においては、食品成分の中でも、近年、抗酸化性等の健康増進作用が注目されているポリフェノール類であるケルセチンを主要な検出ターゲットに位置づけて検討を行った。まず、酵素として西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、無機ナノシートとしてチタン酸ナノシート(TiO_x)を用い、HRP/TiO_x複合体を作製した。次に、テンプレートとしてケルセチンを用い、HRP/TiO_x複合体の存在下、ドーパミンの自己重合反応を行うことにより、分子インプリントポリマー(MIP)膜を被覆したHRP/TiO_x複合体の作製を行った。この際、予備的な検討として、まず、アントシアニン的一种であるシアニジン-3-*O*-グルコシド(C3G)をテンプレートとして合成したMIP膜を被覆した蛍光性粒子を作製し、ドーパミン自己重合によるMIP膜作製に関する基礎的知見を得た。続いて、ケルセチンをテンプレートとして作製したMIP膜被覆HRP/TiO_x複合体を用い、ケルセチンの比色分析系を構築することを試みた。より具体的には、MIP膜被覆HRP/TiO_x複合体のケルセチン吸着能に関する検討、並びにMIP膜被覆HRP/TiO_x複合体により触媒される発色反応を用いた比色分析系におけるケルセチン検出能と選択性に関する検討を行った。なお、本分析系の拡張に関する検討として、ケルセチン比色分析系からケルセチン蛍光分析系への拡張、及び検出ターゲットのケルセチンから卵白タンパク質への拡張についても検討した。

4. 研究成果

(1) MIP膜被覆HRP/TiO_x複合体の作製

まず、水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液に対し、チタンイソプロポキシドを加え、加熱・振盪した後、限外濾過を行うことにより、TiO_xを作製した。次に、酢酸緩衝液(pH 4)中においてTiO_xとHRPを混合し、静電相互作用に基づき両者を複合させた後、遠心分離に基づく洗浄操作を行うことで、HRP/TiO_x複合体を得た。続いて、ドーパミン自己重合に基づくHRP/TiO_x複合体表面へのMIP膜形成について検討した。まず、予備的な検討として、アントシアニン的一种であるC3Gをテンプレートとして用い、蛍光性粒子の表面をMIP膜で被覆することを試みた。Tris緩衝溶液中、蛍光性粒子にC3Gを加えて振盪後、ドーパミンを加えて重合反応を行い、洗浄操作によりC3G及び未反応のドーパミン等を除去することで、MIP被覆粒子を作製した。一方、テンプレートであるC3Gを加えずに重合反応を行うことで、非インプリントポリマー(NIP)被覆粒子も同様に作成した。MIP被覆粒子、NIP被覆粒子にC3Gを添加して蛍光測定を行ったところ、MIP被覆粒子においては、NIP被覆粒子と比較してより大きな蛍光強度の減少が観測されたことから、C3GがMIP被覆粒子表面のMIP膜に効率的に吸着していると考えられた。そこで、ここで得られた知見を基礎とし、Tris緩衝溶液中、HRP/TiO_x複合体の存在下、テンプレートとしてケルセチンを用い、ドーパミンの自己重合反応を行った。反応後、遠心分離に基づく洗浄操作(洗浄液としてエタノール-水混合液を使用)を繰り返し行った。図1

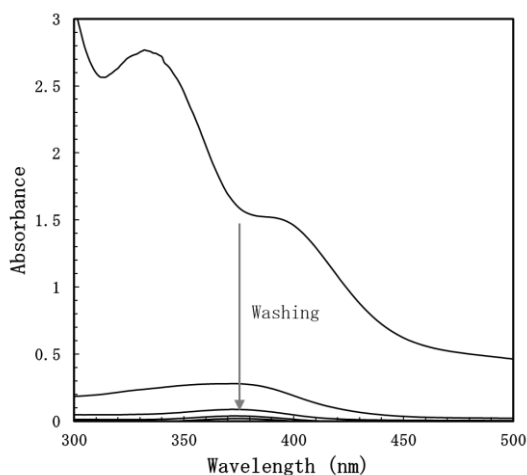


図1 洗浄操作において得られた上清の吸収スペクトルの測定結果

は洗浄操作において得られた上清の吸収スペクトル測定の結果を示している。ここに示すように、洗浄操作を繰り返すことで、ケルセチンに由来する 375 nm 付近の吸収ピークの減少が観測され、テンプレートとしたケルセチンが洗浄操作により洗浄されている様子が確認できた。ケルセチンの溶出がなくなるまで洗浄操作を続けることで、目的とした MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体を得た。走査型電子顕微鏡 (SEM) 測定の結果から、得られた MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体において、HRP/TiO_x 複合体の表面にポリドーパミン膜が形成されていることが示唆された。なお、テンプレートであるケルセチンの非存在下においてドーパミンの重合反応を行うことで、対照となる NIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体の作製も同様に行った。

(2) MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体を用いたケルセチン比色分析系の構築

作製した MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体のケルセチン吸着能に関する検討を行った。酢酸緩衝液中、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対してケルセチンを添加してインキュベートした後、溶液をシリンジフィルターにより濾過し、複合体を溶液から濾別した。得られた濾液の吸収測定を行うことで、濾液に含まれるケルセチン濃度を計算した。また、比較のため、NIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体についても同様の検討を行った。得られた結果を基に、複合体に関する吸着容量 (mg/g) を算出した。その結果、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体の吸着容量は、NIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体の吸着容量と比較して 3 倍程度大きく、ケルセチン認識用の表面を有する MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体が高効率にケルセチンを吸着することが確認できた (図 2)。

一方、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体によるグアイアコールの酸化反応の触媒活性についても検討を行った。HRP は過酸化水素の存在下、グアイアコールの酸化反応を触媒し、茶色の発色体を形成する。酢酸緩衝液中において、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対してグアイアコールと過酸化水素を加え、吸光度増加量 (Δ Abs) の経時変化を測定した結果を図 3 に示す。図 3 に示すように、時間経過に伴い 400 ~ 500 nm 付近における Δ Abs が増大し、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体がグアイアコールの酸化反応を触媒し、発色体を形成することが確認できた。一方で、NIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体を用いた場合は、時間経過に伴う Δ Abs の増大は大きく抑制された。このことは、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体においては、MIP 膜に存在するケルセチン認識用の空孔を介して基質が膜を通過して HRP に触媒される発色反応が進行し、一方で、ケルセチン認識用の空孔を有さない NIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体においては、基質が膜を効率的に通過できず、HRP に触媒される発色反応の進行が大きく妨げられることを示唆していると考えられる。

次に、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体を分析材料としたケルセチン比色分析について検討を行った。上述したように、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体においては、MIP 膜に存在するケルセチン認識用の空孔を介して、基質が一定量通過するものと考えられる。従って、もし MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対してケルセチンを添加し、MIP 膜へケルセチンを吸着させた後に発色反応を行った場合、ケルセチンの MIP 膜への吸着量に依存して、発色反応の進行度が変化すると考えられる。言い換えれば、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対して、添加するケルセチン濃度が高ければ、MIP 膜へのケルセチン吸着量が増大し、発色反応に伴う吸光度増加量は小さくなり、逆に、添加するケルセチン濃度が低ければ、MIP 膜へのケルセチン吸着量は減少し、発色反応に伴う吸光度増加量は大きくなると考えられる。図 4 (a) は、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対し、種々濃度のケルセチンを添加してインキュベート後、グアイアコールと過酸化水素を添加した時の 470 nm における吸光度増加量 (Δ Abs (470 nm)) の経時変化を示している。図 4 (a) に示すように、予想した通り、添加するケルセチン濃度の増大に伴い、 Δ Abs (470 nm) の値が減少することが確認できた。図 4 (b) は発色反応開始 30 分後における Δ Abs (470 nm) の値とケルセチン濃度の関係を示している。図 4 (b) に示すように、

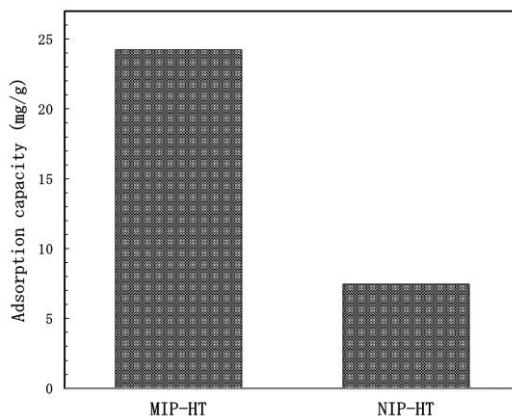


図 2 MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体 (MIP-HT) と NIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体 (NIP-HT) のケルセチン吸着容量

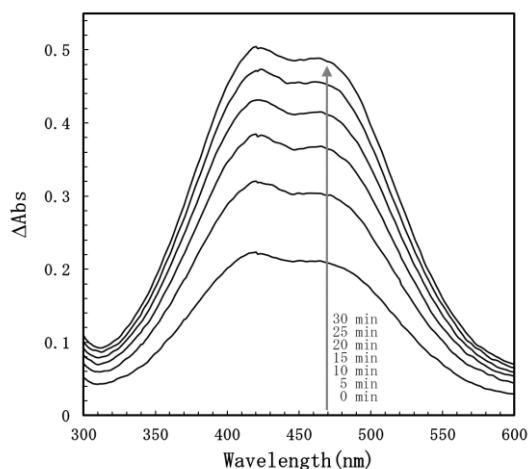


図 3 MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対し、グアイアコールと過酸化水素を加えたときの吸光度増加量 (Δ Abs) の経時変化

Δ Abs (470 nm) の値とケルセチン濃度 (0~10 μ g/mL) の間には良好な直線性が成り立ち、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体がケルセチン検出能を有することが確認できた。なお、グアイアコール以外の発色基質である *o*-フェニレンジアミン (OPD)、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ) についても検討を行ったが、検討の結果、本分析系の構築においてはグアイアコールが最適な発色基質であると考えられた。

続いて、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体を用いたケルセチン比色分析における選択性について検討を行った。MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対し、ケルセチンあるいは他の生体関連分子 (グルコース、セリン、アルギニン、レンズ豆レクチン、ルテオリン、ナリングニン、カテキン、あるいはルチン) (20 μ g/mL) を添加してインキュベート後、グアイアコールと過酸化水素を加えて、発色反応を行った。図 5 は、発色反応開始 30 分後における吸収変化 (Δ Abs (470 nm) / Δ Abs (470 nm, control)) の値を示している。ここに示すように、グルコース、セリン、アルギニン、レンズ豆レクチンの添加は、発色反応に基づく吸収変化に殆ど影響を与えないことが確認できた。一方、ケルセチンと類似した構造を有するルテオリン、ナリングニン、カテキン、ルチンを添加した場合は、発色反応に基づく吸収変化に影響が見られたが、その大きさは検出ターゲットとしたケルセチンと比較すると小さなものであり、ケルセチンを含めた 5 つのフラボノイド類において、発色反応に基づく吸収変化に与える影響の大きさは、ケルセチン > カテキン > ルテオリン > ナリングニン > ルチンであった。従って、MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体は基本的なケルセチン選択性を有していると考えられる。

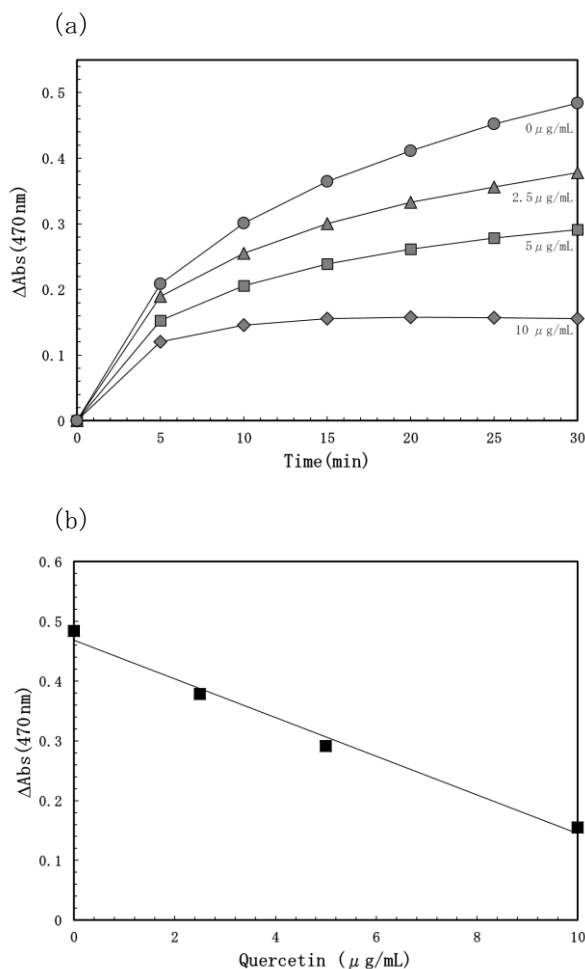


図 4 MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体を用いたケルセチン比色分析
(a) 種々濃度のケルセチンをインキュベート後、発色反応を行ったときの 470 nm における吸光度増加量 (Δ Abs (470 nm)) の経時変化
(b) 発色反応開始 30 分後における Δ Abs (470 nm) の値とケルセチン濃度の関係

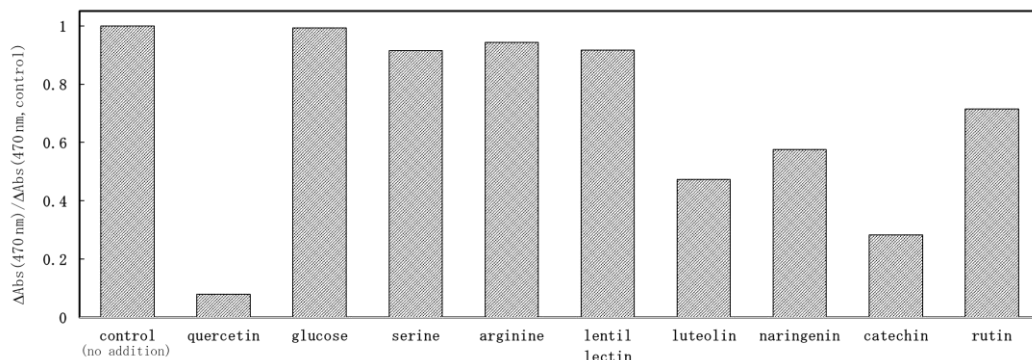


図 5 発色反応開始 30 分後における吸収変化 (Δ Abs (470 nm) / Δ Abs (470 nm, control))

(3) 本分析系の拡張に関する検討

MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体を用いたケルセチン分析系において、発色基質の代わりに蛍光基質を用いることで、本分析系の比色分析系から蛍光分析系への拡張について検討を行った。MIP 膜被覆 HRP/TiO_x 複合体に対して種々濃度のケルセチンをインキュベートした後、蛍光基質と過酸化水素を添加して蛍光測定を行った。その結果、ケルセチン濃度に依存した蛍光強度の変化が観測され、本分析系が比色分析系から蛍光分析系に拡張可能であることが示された。一方、ケル

セチン以外の食品成分として、卵アレルギーの原因物質である卵白タンパク質に着目し、これをテンプレートとして新たなMIP膜被覆HRP/TiO_x複合体を作製した。検討の結果、このMIP膜被覆HRP/TiO_x複合体は卵白タンパク質の分析用材料として応用できる可能性を有しており、本分析手法がケルセチン以外の食品成分の分析システムを構築する目的においても有用であることが示唆された。

(4) まとめ

本研究では、HRP/TiO_x複合体の表面を人工抗体として機能するMIPにより被覆した材料を開発し、食品成分の新規な比色・蛍光分析法を構築することを試みた。MIP膜の作製においては、Tris緩衝液中におけるドーパミンの自己重合反応を利用した。まず、ケルセチンをテンプレートとして作製したMIP膜を被覆したHRP/TiO_x複合体を作製し、ケルセチンの比色分析系の構築を試みた。その結果、MIP膜被覆HRP/TiO_x複合体がケルセチンの分析用材料として有用であり、これを基盤としたケルセチン比色分析系が構築可能であることが明らかとなった。また、発色基質の代わりに蛍光基質を用いることで、本分析系を比色分析系から蛍光分析系へ拡張できることも示された。一方、テンプレートとして卵白タンパク質を用いて作製したMIP膜被覆HRP/TiO_x複合体に関する検討から、本分析手法が他の食品成分の分析システムを構築する上でも有用であることが示唆された。本分析法は、汎用性に優れた比色・蛍光を用いた分析法であり、分析操作も簡便である。本研究は、酵素と無機ナノシートを基盤とした複合材料の新たな応用を開拓した点で大きな学術的意義があると考えられる。また、本研究は、近年重要性が増している食品分析研究に寄与するものである。今後、本研究で開発した手法が、様々な食品成分に対する新規分析法の構築に資することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 鹿狹美春, 南川朋花, 上田敏久, 鎌田 海, 宗 伸明	4. 巻 71
2. 論文標題 酵素と無機ナノシート並びに磁気ビーズから成る共役酵素反応を行う複合体材料の開発とグルコース検出への応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 159 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.71.159	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 Katori Miharuru, Watanabe Mizuki, Tanaka Hideaki, Yakushiji Seika, Ueda Toshihisa, Kamada Kai, Soh Nobuaki	4. 巻 38
2. 論文標題 Development of enzyme/titanate nanosheet complex coated with molecularly imprinted polydopamine for colorimetric quercetin assay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 777 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-022-00094-7	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 -

1. 著者名 宗 伸明, 鎌田 海	4. 巻 70
2. 論文標題 タンパク質と無機ナノシートから成るハイブリッド材料の開発と分析化学的応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 83 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.70.83	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宗 伸明
2. 発表標題 色が変わると食品がわかる！？ - 色と光を利用した食品分析法 -
3. 学会等名 第31回西日本食品産業創造展「機能性食品特別セミナー」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宗 伸明
2. 発表標題 バイオセンシングに資する材料の開発 - 生体・食品分析のための新たなツールの創出を目指して -
3. 学会等名 日本分析化学会中部支部北陸地区講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 薬師寺星香・田中瑛晶・上田敏久・鎌田 海・宗 伸明
2. 発表標題 人工抗体膜を被覆した無機ナノシート/酵素複合体を用いたポリフェノール比色分析システムの開発
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 山室麻由子・上田敏久・鎌田 海・宗 伸明
2. 発表標題 シアニジン - 3 - グルコシド計測用蛍光性粒子の開発
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山室麻由子・上田敏久・宗 伸明
2. 発表標題 分子インプリント法を利用したアントシアニン計測用蛍光センサーの開発
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山室麻由子・上田敏久・鎌田 海・宗 伸明
2. 発表標題 人工抗体膜を被覆した機能性粒子を用いるアントシアニンの蛍光分析
3. 学会等名 第37回九州分析化学若手の会夏季セミナー
4. 発表年 2019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	鎌田 海 (KAMADA Kai) (90315284)	長崎大学・工学研究科・准教授 (17301)	

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
---------	---------