

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16342

研究課題名(和文)人工高分子レセプターによる光反応場の創製

研究課題名(英文)the regulation of photo-induced reaction by synthetic polymer receptors

研究代表者

砂山 博文(Sunayama, Hirobumi)

神戸大学・工学研究科・特命准教授

研究者番号：60706464

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)：分子インプリンティングによる反応場構築とポストインプリンティング修飾による空間選択的な官能基導入による機能制御について提案した。benzamidinium部位を有するモノマーを設計・合成し、これを用いて分子インプリントポリマー(MIP)を作製した。このMIP存在下でのアントラセンカルボン酸の光二量化反応について検討を行った。分子インプリンティングにおいて官能基の配置を制御することで、反応生成物の組成を制御可能であることが示唆された。また、結合空間の親和性の差を利用したポストインプリンティング修飾によって空間選択的に官能基を導入できる技術を開発し、それにより結合能を制御可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で行われる精緻で高効率な物質変換を産業応用することが望まれているが、応用できる例に限られることや、大量生産が困難等、非常にハードルが高い。テラメード分子認識材料作製法である分子インプリンティングに着目し、官能基の配置を巧みに制御することで反応収率を制御可能な本技術は、現在有機合成的に作製されるのが困難である医薬品や農薬等の分野の課題を解決する一つの足掛かりになる画期的な基盤的研究と位置付けられる。

研究成果の概要(英文)：Construction of synthetic polymer-based reaction field prepared by molecularly imprinted polymers and the regulation of binding activity of molecularly imprinted polymers (MIP) by cavity-selective post-imprinting introduction of functional groups were proposed. MIP was prepared using a functional monomer bearing a benzamidinium group, which can interact with carboxy group. Photo-dimerization reaction of 2-anthracene carboxylic acid with or without MIP was investigated and found that the reaction yield was changed by addition of MIP. It indicated that selective reaction field was created in MIP matrix. And also, regulation of binding activity of MIP was demonstrated by cavity-selective post-imprinting modification, which utilized the difference of binding affinity between the imprinted cavities.

研究分野：分子認識化学

キーワード：分子インプリンティング 人工高分子レセプター ポストインプリンティング修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子や天然化合物の多くは不斉炭素を有していることから鏡像異性体が存在するが、多くはその一方のみが重要な役割を担っている。これらは医薬品や農薬などにおいても同様で、鏡像異性体で効果が異なることはよく知られている。このことから医療・工業製品においても純粋な構造異性体を効率よく合成することが必要である。しかし、単純に有機合成的に作製したのでは収率は50%以下で、なおかつその分離には時間とコストを要することが知られている。これまでにキラル補助基や不斉触媒を用いる熱的な不斉合成反応について詳細な検討が重ねられており、有用な化合物が多数合成され利用されてきた。一方で光を利用した化学反応は、熱の影響を受けずに反応が進行することから、熱化学合成反応には期待できない特異な骨格を有する化合物を、一段階で得られることが期待される。これまでにシクロデキストリンやカリックスアレーンなどの包摂化合物や金属酸化物、アルブミンなどを反応系中に共存させ、その特異な空孔を反応場として用いることで、構造異性体の制御が可能であり、一部では高い収率で反応制御ができることが報告されている。しかし、これらはあらかじめサイズの規定された空間を利用していることから、適用できる反応・分子種には制限がある。

そこで本研究では、標的分子に対して特異的な分子結合空間を創り出すことが可能な分子インプリンティング技術に着目した。分子インプリンティングは標的分子存在下で重合反応を行い、反応後に標的分子部分を洗い出すことにより、人工高分子内に標的分子のサイズ、形状を反映した空間を創り出す技術である。共重合の際に、標的分子と相互作用可能なモノマー(機能性モノマー)を用いることにより、標的分子の官能基に対応する位置に相互作用可能な官能基を配置させることができることから、精緻な分子認識空間創製にはこの機能性モノマーの設計が肝要である。本技術で作製される高分子レセプターは、分子インプリントポリマー(MIP)と呼ばれる。また、申請者が独自に開発した分子インプリント空間を後天的に修飾するポストインプリンティング修飾(PIM)を駆使することでより選択的な反応場構築が期待される。PIMは機能性モノマーにあらかじめジスルフィド結合やイミン結合などの可逆結合部位やアミノ基やヒドロキシ基などの化学反応の可能な部位を導入しておき、MIP作製後に機能性モノマー残基に対して化学修飾を行うことで、機能の付与・変換・調整を行う技術である。PIMにより空間選択的な機能性分子導入によるMIP機能調整により、選択的な反応場調整の足掛かりになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではMIPが光反応場として効果的に機能することを実証するために、機能性モノマーの検討を始めとするポリマー組成の最適化及びPIMによる低親和性結合空間の無効化等の基盤技術確立を目指す。更にPIMによって導入する官能基の種類・配置を適切に選択することで光反応を制御する技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では2-アントラセンカルボン酸(AC)の光二量化反応をモデルとして検討を行った。まず、カルボン酸と相互作用することが知られているBenzamidine部位を有する機能性モノマーを設計、合成した。このモノマーとACとの相互作用について¹H-NMR測定から検討を行った。本モノマーをあらかじめACと複合体を形成させ、これと架橋剤としてethylenglycol dimethacrylateをメタノール中で30、24時間反応させることでポリマーを合成した。このポリマーを酢酸/MeOH(=1/9, v/v)中に浸漬させることで、結合しているACを取り除きMIPを作製した。このポリマーの吸着特性についてのMIPをMeCN/water(4/1, v/v)溶液中に分散させ、そこに各濃度に調製したACを加え、20分室温で攪拌し、その後フィルトレーションで上澄みを回収した。この上澄み液中のACをUPLCを用いて定量した。UPLC条件はカラム(C18 2.1 mm×50 mm)、温度40 °C、インジェクション量: 10 µL 流量: 0.2 mL/min、検出: UV@254 nmで行った。また、構造類似体としてAnthracene及び2-amino anthracene, 9-anthracene carboxylic acidを用いて、選択性を検討した。

前項で作製しMIP存在下でのAC二量化反応について検討した。5 mM AC THF溶液(3 mL)にMIPを分散させ、320 nm以上の光を2時間照射した。光源との距離は40 cmに設定した。反応後の溶液について、フィルトレーションによりポリマーを取り除いた。この上澄み溶液をUPLCで分析し、MIP非存在下での場合と比較した。

ACの光二量化反応ではカルボン酸部位がHead-to-Tail(HT)型に配置したものとHead-to-Head(HH)型に配置したものが得られる。ACの光二量化反応で得られる異性体のうちHH型に対する反応場創製のために、Benzamidineを空間内に配置した分子インプリンティングについても検討を行った。

また、ポストインプリンティング修飾による空間選択的な官能基導入について、これまで実績のあるタンパク質のMIPを用いて検討を行った。PIM部位としてジスルフィド結合を有する機能

性モノマー、{[2-(2-Methacrylamido)-ethylthio]-ethylcarbamoyl}-methoxy acetic acid (MDTA)を用いて、acrylamide および N,N'-methylenebisacrylamide と共重合させることで Lysozyme に対する MIP を作製した。この MIP に対して Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) での還元処理により MDTA 由来の残基のジスルフィド結合をチオール基に変換した後、濃度の異なる Lysozyme を添加し、結合空間を保護した。その後、低親和性の空間に導入するキャッピング剤としてポリエチレングリコール鎖とチオール基に反応活性を持つ Pyridyldisulfide 部位を持つ化合物をジスルフィド交換を利用して反応させることで、保護した空間以外の MDTA 残基由来の官能基を変換した。その後保護に用いたタンパク質を洗浄除去し、露出した結合空間内の官能基に相互作用部位を導入した。これらの結合特性について標的分子と同程度のサイズで等電点の異なるもの(lactalbumin, myoglobin, ribonuclease A)を用いて評価した。

4. 研究成果

¹H-NMR 測定から Benzamidine 部位を有する機能性モノマーが AC と相互作用することを確認した。その結果から、 $K_a=10$ の 3 乗オーダーの相互作用が確認された。これを用いて作製した MIP は選択的に AC を認識することが確認された。得られた吸着等温線から Scatchard 解析により結合定数(K_a)を算出したところ、 10^5 の 5 乗オーダー とモノマーと比較して高い値を示した。これは分子インプリンティングによりポリマー内に相補的な結合空間が形成されていることが示唆される。また、構造類似体を用いた選択性実験から作製した MIP が AC を最も吸着することを確認した。また、参照として AC を含まずに作製したポリマー(NIP)について選択性を確認したところ、AC と同程度の参照化合物の吸着が確認された。このことから benzamidine 部位を有するモノマーを用いて分子インプリンティングを行うことで AC を選択的に認識できる結合空間を創製できることを明らかにした。

上記 MIP の存在下および非存在下での AC 光二量化反応について検討したところ、MIP 存在下では HT 型の生成が増加することが示された。これは MIP 形成時に HT 型もしくはそれに近い状態でポリマーに取り込まれることを示唆している。これらのことから MIP が AC の光二量化反応を制御できる反応場になりえることが示唆された。

上記検討から、HT 型の反応場が形成可能であることが示された。これは官能基の立体配置から考えた場合、最も障害の少ない状態であることも要因の一つと考えられる。一方で HH 型は立体的な反発からか、HT 型に比べて生成量が少ない。HT 型に加え HH 型についても制御できれば MIP の応用範囲が拡大する。そこで HH 型に対する MIP を作製した。AC のカルボン酸部位が同方向を向くように Benzamidine 部位を配置させるように設計した。この MIP の AC 結合特性を調べたところ、前項で検討した構造類似体と比較して AC を最も吸着したことから、この MIP 内に AC 結合空間が形成されていることが示唆された。この MIP 存在下で AC 二量化反応を行ったところ、相対的に HT 型の生成が減少し、有意に HH 型が増加することが確認された。このことから、分子インプリンティングにより周到に界面設計を行うことで、反応制御可能な空間を構築出来ることが示唆された。

PIM による空間選択的な機能性分子修飾について検討を行ったところ、空間保護に用いる標的分子の濃度に依存して、分子結合能を制御できることを明らかにした。本研究で用いるような非共有結合型分子インプリンティングでは、静電的相互作用の様な非共有結合を用いた材料設計がなされるが、非常に簡単に材料作製ができる反面、ポリマー内に形成される認識空間の親和性、選択性は不均一となることが知られている。本研究では濃度の異なる標的分子を予め MIP に結合させることで MIP 内の添加した濃度に対して機能する結合空間を保護した。この状態でキャッピング剤を未保護の空間に反応させることで低親和性の結合空間にポリエチレングリコール(PEG)鎖を導入した。導入する PEG 鎖長について異なる分子量のもの(400, 800, 2000)を用いて検討したところ 800 のものが最も高い吸着抑制効果を示すことが確認された。作製した各 MIP のタンパク質結合特性について検討したところ、キャッピング剤の導入後に吸着量の減少が確認されたが、親和性は増加することが確認された。このことから本手法により高親和性の結合空間を保護できていることが示唆された。また、選択性についても同様のサイズを持つタンパク質を参照として用いたところ、その結合を約 70%抑制できることが示された。また、保護に用いる標的分子の濃度が増加するにつれ、参照タンパク質の結合も増加することが確認された。このことから、保護に用いる標的分子の濃度を調整することにより、空間選択的な分子導入が可能であることが示唆された。すなわち本研究で検討した PIM 技術を用いることにより、目的とする親和性・選択性の空間のみ利用することが可能となる。これは反応場構築を始めとした高分子材料を基盤とした、選択的結合空間の創製・応用に大きな貢献が期待される。

以上、本研究では分子インプリンティングおよびポストインプリンティング修飾を基盤とした反応場創製にかかる基盤的要素の確立に成功した。分子インプリンティング技術は多様な標的分子に対して適用可能であり、PIM 技術も多様な化学修飾を利用することができる非常に応用範囲の広い基盤技術である。本研究で得られた知見は人工高分子を基盤とした多様な反応場構築に関連することから、多くの化学反応が用いられその収率制御が機能や製造コストに直結する材料・薬学・農学等の諸分野への貢献が期待される。

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 0件）

1. 著者名 Sunayama Hirobumi, Takamiya Kazuhiro, Takano Eri, Horikawa Ryo, Kitayama Yukiya, Takeuchi Toshifumi	4. 巻 94
2. 論文標題 Simultaneous Detection of Two Tumor Marker Proteins Using Dual-Colored Signaling Molecularly Imprinted Polymers Prepared via Multi-Step Post-Imprinting Modifications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 525 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200254	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 Sunayama Hirobumi, Takeuchi Toshifumi	4. 巻 413
2. 論文標題 Protein-imprinted polymer films prepared via cavity-selective multi-step post-imprinting modifications for highly selective protein recognition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-021-03386-5	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 SUNAYAMA Hirobumi, TAKEUCHI Toshifumi	4. 巻 42
2. 論文標題 Multi-Functional Nanocavities Fabricated Using Molecular Imprinting and Post-Imprinting Modifications for Efficient Biomarker Detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 73-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2021.011	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9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂山博文、竹内俊文
2. 発表標題 2級アミンモノマーを用いたタンパク質センシング材料の開発
3. 学会等名 分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂山博文
2. 発表標題 ポストインプリンティング修飾による高感度分子インプリントセンシング材料の開発
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂山博文、佐伯哲郎、高野恵里、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 分子インプリントナノ空間選択的多段階化学修飾による高感度バイオマーカーセンシング材料の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂山博文、竹内俊文
2. 発表標題 ポストインプリンティング修飾法による高機能化分子インプリント材料の創製及びタンパク質センシングへの応用
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂山博文、竹内俊文
2. 発表標題 分子インプリンティング/ポストインプリンティング修飾によるバイオマーカーセンシングナノ空間の構築
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高宮和寛、砂山博文、高野恵里、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 空間選択的ポストインプリンティング修飾による腫瘍マーカータンパク質蛍光センシング材料の創製
3. 学会等名 分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂山博文、竹内俊文
2. 発表標題 動的保護と多段階ポストインプリンティング修飾による高機能タンパク質インプリント空間の創製
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯哲郎、砂山博文、高野恵里、北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 糖タンパク質高感度検出のためのポストインプリンティング修飾多点認識分子インプリント空間の創製
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂山博文、竹内俊文
2. 発表標題 Molecularly imprinted materials for high-sensitive sensing of tumor-maker protein prepared by molecular imprinting and post-imprinting modifications
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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