

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651261

研究課題名(和文) タンパク質認識空間のみに結合情報発信分子を配置した蛍光性ポリマーアレイチップ

研究課題名(英文) Signaling protein-imprinted polymer array having a fluorescent dye located within the imprinted cavity as a reporter molecule for the binding events

研究代表者

竹内 俊文 (Takeuchi, Toshifumi)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70179612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)： 固定化タンパク質の分子インプリンティングにおいて、鑄型タンパク質を安定に固定化し、かつ形成された分子インプリント空間に結合情報を発信するための蛍光分子を導入する部位を持たせるために重要となるジスルフィド結合を有するリンカー分子の合成及びその評価を行った。標的タンパク質固定化基板上に作製した分子インプリントポリマーのポリマー膜厚が分子認識能に与える影響について検討を行い最適なポリマー膜厚(10-20 nm)を明らかにした。ポストインプリンティング修飾による低親和性部位をキャッピングする方法を開発し、S/N比を向上させることができた。

研究成果の概要(英文)： A linker molecule comprised of a disulfide linkage to immobilize proteins for the preparation of signaling protein-imprinted polymers on substrates was designed and synthesized. The proteins coupled with the linker molecule maintained their secondary structure, and the molecular imprinting process properly proceeded. After the polymerization, the immobilized proteins were easily removed by the reduction of the disulfide moiety to leave the imprinted cavities capable of introducing thiol-reactive fluorescent dyes for signal transduction of binding events. Thickness of the protein imprinted polymer thin layer on the substrate was examined and, it is revealed that 10 to 20 nm thickness was suitable for the molecular recognition. Post-imprinting modification technique was developed to reduce the number of low affinity binding cavities, resulting in the improvement of S/N ratio.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：分子インプリンティング 分子認識 タンパク質 生体分子計測

## 1. 研究開始当初の背景

生体機能の解明や特定の疾患に対するバイオマーカーの開発においてプロテオミクスは強力なツールである。その研究の中で、タンパク質認識については、抗体などの生体由来材料が主に利用されているが、その取得には複雑な操作と長期の作製期間を要するうえに、高価かつ不安定であることが課題である。また、高価なラベルフリー計測装置を用いない限り、結合挙動可視化のための標識が必ず必要であることから、煩雑な操作と標識反応による損失や失活も大きな問題である。人工ポリマーレセプターは、生体材料と比較して安定性、再現性、コストの点でより有利で、その実用化は強く要望されている。これまでに、結合情報可視化のためのレポーター分子が前もって組込まれた人工ポリマーレセプターは、低分子化合物に対しては報告されているが、タンパク質に対する情報発信型の人工ポリマーレセプターの報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

分子インプリンティングとポストインプリンティング修飾を組み合わせた新しいタンパク質認識材料合成法により、標的タンパク質認識空間のみに結合情報レポーター分子を配置した低バックグラウンド蛍光性センシング材料を基板上に成膜して、これまでにない高選択性蛍光検出機能が埋め込まれた人工プロテインチップを構築する。鋳型タンパク質を新規開発のジスルフィドリンカーにより基板上に固定化し、その場で分子インプリンティングを行う。還元によりジスルフィドを開裂して鋳型タンパク質を除去してタンパク質インプリント空間を形成させ、その空間内に残る遊離チオール基にマレイミド化蛍光物質をポストインプリンティング修飾することで、認識空間のみに蛍光レポーター分子を導入する。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の項目に関して平成 24 年度及び 25 年度の 2 年間で検討を行い、タンパク質認識材料の開発を行った。

- (1) 新規ジスルフィドリンカーの設計と合成
- (2) リンカーの基板への固定化
- (3) 標的タンパク質の基板へのリンカーを介した固定化
- (4) 分子インプリンティング条件の検討
- (5) ポストインプリンティング修飾による蛍光レポーター分子の導入
- (6) 高感度蛍光センシングの感度と選択性の検証

## 4. 研究成果

- (1) 新規ジスルフィドリンカーの設計と合成  
本研究で標的タンパク質を基板に固定化する

るために用いるリンカー分子は次の条件を満たす必要がある。

1. カルボキシ基、マレイミド基等のタンパク質と反応可能な官能基をもつ。
  2. ガラス基板に固定化するためのシランカップリング可能な官能基をもつ。
  3. インプリントポリマー作製後に還元反応により切断可能なジスルフィド部位をもつ。
- これらの条件を満たす化合物として以下の化合物を設計し合成した(図 1)。

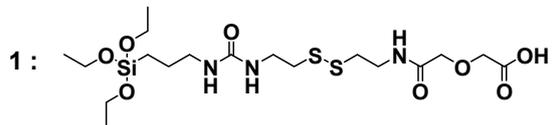


図 1. タンパク質固定化用リンカー分子(1)の構造

Cystamine dihydrochloride を出発物質とし、まず、アミノ基の 1 つを Boc 保護した。未保護アミノ基に diglycolic anhydride を反応させることによりカルボキシ基の導入を行った。HCl/Dioxane にて脱保護した後、3-isocyanatopropyltriethoxysilane と反応させることにより、カルボキシ基を有するリンカー分子を得た(総収率 8.13%)。各ステップにおいて <sup>1</sup>H-NMR にて生成物の確認を行った。

### (2) リンカーの基板への固定化

ガラス基板に導入されたジスルフィド結合を確認する方法の検討を行った。モデルとして洗浄したガラス基板に 3-アミノプロピルトリエトキシシランを修飾し、表面にアミノ基を導入した。そこに、*O*-(2-Carboxyethyl)-*O'*-(2-pyridyldithioethyl) heptaethylene glycol を修飾した後、2-aminoethanethiol と反応させることにより基板上にジスルフィド結合を介してアミノ基を導入した。得られた基板を FITC と反応させることで蛍光修飾ガラス基板を得た。この基板を蛍光顕微鏡で観察したところ、FITC に由来する蛍光が観察された。さらに、基板を還元剤(TCEP)にて還元処理を行ったところ、蛍光強度の減少が観察された。このことから、蛍光分子を利用することによりジスルフィド結合を有するリンカー分子の基板上への導入が確認できることが分かった。

### (3) 標的タンパク質の基板へのリンカーを介した固定化

基板に化学修飾で固定化した標的タンパク質を用いて分子インプリンティングを行う場合、化学修飾でタンパク質の構造が変化してしまうと正確な鋳型がとれない。そこでリンカー分子と類似構造を有する化合物を合成し、タンパク質と複合体を形成させた時の二次構造に与える影響を円二色性(CD)スペクトル測定から確認した。



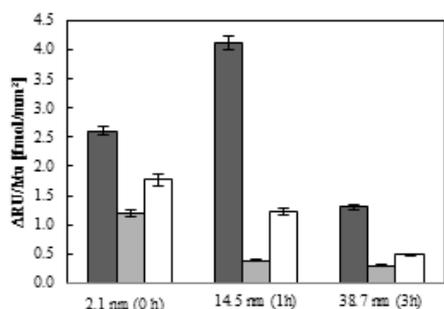


図 5. GST- $\pi$  インプリントポリマー結合実験、GST- $\pi$ (dark gray), HSA(gray), fibrinogen (white)

### (5) ポストインプリンティング修飾による蛍光レポーター分子の導入

化合物 3 と Cyt c の複合体を用いて作製したインプリントポリマー薄膜を 10 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) 溶液に浸漬させジスルフィド結合の還元を行った。得られたポリマー薄膜にポストインプリンティング修飾によって蛍光特性を付与するために N-(9-acridylnyl)maleimide, DBD-F, Cy5 maleimide を反応させ、蛍光分子が導入されたポリマー薄膜を得た。基板を蛍光分光光度計にて測定したところ、導入した蛍光分子に対応した蛍光ピークを確認したことから蛍光物質の導入を確認した。

それぞれの基板に Cyt c を加え、蛍光強度の相対変化を観察したところ 3 種の蛍光物質の中で DBD-F が最も大きな蛍光変化を示したことから、Cyt c の蛍光検出において DBD-F が有用であることが示唆された(図 6)。

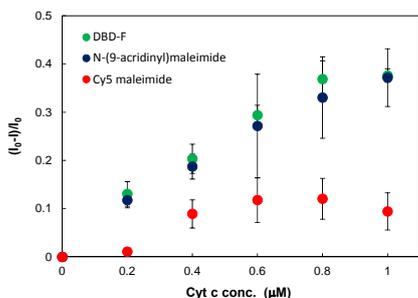


図 6. 各種蛍光分子導入 Cyt c インプリントポリマー結合実験

また参照ポリマーとして、末端にカルボキシ基を有するモノマーを合成し、それを用いて非共有結合型 Cyt c インプリントポリマーを作製し、DBD-F をポストインプリンティング修飾した。得られたポリマー(comp-MIP)に対して Cyt c を添加した時の相対蛍光強度変化は、化合物 3 とタンパク質の複合体を用いた場合より小さい変化を示した(図 7)。これはポリマー作製時にタンパク質との複合体形成が共有結合を介しているか、非共有結合を介して形成しているかの違いに由来すると考えられる。非共有結合を利用した複合体を用いてポリマーを作製した場合、モノマーが一

部ランダムにポリマーマトリックス内部に組み込まれる。これにより蛍光分子も一部ランダムに導入されることから、蛍光バックグラウンドが上昇し、相対変化量が小さくなったと考えられる。このことから、タンパク質とジスルフィド結合を有するリンカー分子で結合させた複合体を用い、分子インプリンティング後のポストインプリンティング修飾をすることで、タンパク質インプリント空間のみ蛍光分子が導入されることから低バックグラウンドの蛍光センシング材料の実現が可能であることが示唆された。

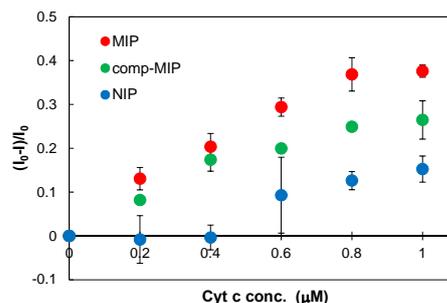


図 7. 共有結合型及び非共有結合型複合体を用いた Cyt c インプリントポリマー結合実験

### (6) 蛍光センシングの感度と選択性の検証

ポストインプリンティング修飾による結合空間への蛍光分子の選択的導入に関して検討を行った。インプリントポリマーの結合空間の親和性は一様ではなく不均一であることが知られており、それが選択性低下の要因の一つであると考えられている。そこで、標的タンパク質を加えることで高親和性の結合空間を保護した後、親水性のキャッピング剤を加えることにより保護されていない低親和性の結合部位を無効化し、その後高親和性の結合空間のみに蛍光分子を導入することを検討した。

モデル系として Lysozyme(Lyso)を鋳型としたインプリントポリマーを 4-[2-(N-methacrylamido)ethylaminomethyl] benzoic acid(MABA)を機能性モノマーとして用いて作製した。親水性キャッピング剤は、*p*-isothiocyanatophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside (MITC)を用いた(図 8)。

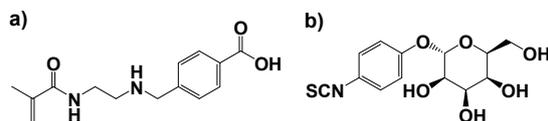


図 8. a)MABA 及び b)MITC の構造

Lyso を鋳型とし、MABA を機能性モノマー、AAm をコモノマー、MBAA を架橋剤として用いて Lyso インプリントポリマーを合成した。得られたポリマーに 0.75  $\mu\text{M}$ (ポリマー作製時の約 1000 倍希釈)の Lyso を加えた。そこに MITC を加え低親和性の結合空間及びポリマー内にランダムに存在する MABA 残基のア

ミノ基を無効化した。Lyso を洗浄・除去し結合空間を再生させた後、蛍光分子として FITC を反応させ、蛍光性インプリントポリマーを得た。

得られたポリマーに 0.5  $\mu\text{M}$  の HSA, Hemoglobin (Hb), Ribonuclease (RNase), Cyt c, Lyso 溶液を加えた時の蛍光強度変化率を selectivity factor (Lyso の変化量を 1 としたときの相対変化量) として算出した (図 9)。得られた結果より特に Cyt c についてはシグナルが約 63% 抑制されることが示された。これはキャッピング剤で処理することにより、高親和性の結合空間のみに選択的に蛍光分子が導入され、その結果、特異的結合のみが蛍光シグナルとして検出されたと考えられる。

これらの結果から、蛍光分子のポストインプリンティング修飾にキャッピング処理を組み合わせることにより、選択性の向上が確認され、より特異的なタンパク質の蛍光検出の可能性が示された。

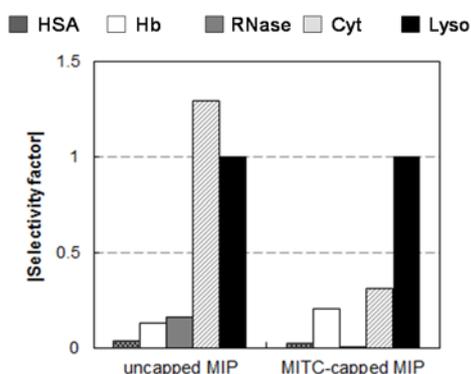


図 9. キャッピング未処理(uncapped MIP)と処理(MITC-capped MIP)の各種タンパク質に対する選択性

本研究を以下に総括する。

- ・タンパク質を基板に固定化するためのリンカー分子の合成に成功した。
- ・リンカー分子と類似構造を有するモノマーを合成し、タンパク質と複合体を形成させた。CD スペクトル測定からそれらのタンパク質の 2 次構造は概ね保たれていることが示唆された。
- ・ATRP 法を用い、タンパク質を基板表面に固定化した状態でのインプリンティング条件について検討を行い、最も高い選択性を示す膜厚(重合時間)を明らかにした。
- ・リンカー分子と類似構造を有するモノマーとタンパク質複合体を用いてインプリントポリマーの合成を行い、ポストインプリント修飾により蛍光分子を導入した。各種蛍光分子から蛍光検出に最適な蛍光分子を明らかにし、また、ジスルフィド結合を有するリンカー分子を使用することにより蛍光分子を結合空間のみに導入できることが示唆された。
- ・蛍光分子のポストインプリンティング修飾にキャッピング処理を組み合わせることにより、選択性の向上が確認されたことからより

特異的なタンパク質蛍光検出材料の実現が示唆された。

今後は、実際に基板上に合成したリンカー分子を用いて様々なタンパク質を固定化し、分子インプリントポリマーアレイを作製し、人工プロテインチップ実現のための研究を促進させる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ①Kamon, Y., Matsuura, R., Kitayama, Y., Ooya, T., Takeuchi, T. Precisely controlled molecular imprinting of glutathione-s-transferase by orientated template immobilization using specific interaction with an anchored ligand on a gold substrate, *Polym. Chem.* 2014, in press DOI: 10.1039/C4PY00350K. 査読有
- ② Sunayama, H., Ooya, T., Takeuchi, T. Fluorescent protein-imprinted polymers capable of signal transduction of specific binding events prepared by site-directed two-step post-imprinting modification, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 1347-1349. (DOI: 10.1039/C3CC47759B) 査読有
- ③Inoue, N., Ooya, T., Takeuchi, T. Hydrophilic Molecularly Imprinted Polymers for Bisphenol A Prepared in Aqueous Solution, *Microchim. Acta* 2013, 180, 15, 1387-1392. (DOI: 10.1007/s00604-013-0996-5) 査読有
- ④Suga, Y., Sunayama, H., Ooya, T., Takeuchi, T. Molecularly Imprinted Polymers Prepared Using Protein-Conjugated Cleavable Monomers Followed by Site-Specific Post-Imprinting Introduction of Fluorescent Reporter Molecules, *Chem. Commun.* 2013, 49, 8450-8452. (DOI: 10.1039/C3CC40484F) 査読有
- ⑤Inoue, Y., Kuwahara, A., Ohmori, K., Sunayama, H., Ooya, T., Takeuchi, T. Fluorescent Molecularly Imprinted Polymer Thin Films for Specific Protein Detection Prepared with Dansyl Ethylenediamine-Conjugated O-Acryloyl L-Hydroxyproline, *Biosens. Bioelectron.* 2013, 48, 113-119. (DOI: 10.1016/j.bios.2013.03.005) 査読有

〔学会発表〕(計 22 件)

- ①桑田貴博, 砂山博文, 高野恵里, 北山雄己哉, 大谷亨, 竹内俊文 タンパク質を選択的に蛍光検出可能な転写型インプリントポリマーアレイの開発、日本化学会第 93 春季年会, 2014 年 3 月 27 日、名古屋市
- ②堀川諒, 砂山博文, 北山雄己哉, 大谷亨, 竹内俊文 ポストインプリンティング修飾によるタンパク質認識空間内官能基変換、第 7 回バイオ関連シンポジウム, 2013 年 9 月 21 日、名古屋市
- ③香門悠里, 北山雄己哉, 大谷亨, 竹内俊文 リガンド-タンパク質間の特異的相互作用を利用したタンパク質の精密分子インプリンテ

ィング、第7回バイオ関連シンポジウム、2013年9月21日、名古屋市

④井ノ上裕輝，砂山博文，北山雄己哉，大谷亨，竹内俊文

Pyrrolidine 骨格を有する機能性モノマーを用いたタンパク質インプリンティング、第7回バイオ関連シンポジウム、2013年9月21日、名古屋市

⑤砂山博文，北山雄己哉，大谷亨，竹内俊文 可逆結合を利用した蛍光性タンパク質インプリント空間の構築、第61回高分子討論会、2013年9月12日、金沢市

⑥菅優介，砂山博文，北山雄己哉，大谷亨，竹内俊文

部位特異的に蛍光分子を導入したタンパク質インプリント空間の構築、第20回クロマトグラフィシンポジウム、2013年6月6-7日、神戸市

⑦香門悠里，北山雄己哉，大谷亨，竹内俊文 表面にタンパク質認識空間を有する分子インプリントポリマー薄膜の精密構築、第20回クロマトグラフィシンポジウム、2013年6月6-7日、神戸市

⑧砂山博文，大谷亨，竹内俊文 高親和性タンパク質インプリント空間への選択的蛍光レポーター分子の導入、第20回クロマトグラフィシンポジウム、2013年6月6-7日、神戸市

⑨桑田貴博，北山雄己哉，大谷亨，竹内俊文 転写型インプリントポリマーによるタンパク質の選択的蛍光検出、第62回高分子学会年次大会、2013年5月29日、京都市

⑩香門悠里，北山雄己哉，大谷亨，竹内俊文 表面開始 AGET ATRP によるタンパク質インプリンティング、日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、草津市

⑪菅優介，砂山博文，北山雄己哉，大谷亨，竹内俊文

ポストインプリント処理による特異的蛍光性認識空間を有するタンパク質インプリントポリマーの創製、日本化学会第93春季年会、2013年3月23日、草津市

⑫Kuwata, T., Kitayama, Y., Ooya, T., Takeuchi, T. Construction of transcription-type imprinted polymers using immobilized proteins for selective fluorescence detection of target proteins, The Pittsburgh Conference on Analytical, Chemistry and Applied Spectroscopy 2014、2013年03月3日、Chicago, USA

⑬井ノ上裕輝，桑原惇，砂山博文，大谷亨，竹内俊文

分子インプリント蛍光性ポリマー薄膜によるタンパク質センシング 第23回クロマトグラフィ学会議、2012年11月15日、岐阜市

⑭菅優介，砂山博文，大谷亨，竹内俊文 ポストインプリンティング修飾によるタンパク質インプリントナノ空間への蛍光プローブの選択的導入、第61回高分子討論会、2012年9月20日、名古屋市

⑮香門悠里，大谷亨，竹内俊文

タンパク質固定化自己組織化単分子膜上での分子インプリンティング、第61回高分子討論会、2012年9月20日、名古屋市

⑯竹内俊文

分光センシング分子インプリントポリマーの創製、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月8日、札幌市

⑰ Sunayama, H., Ooya, T., Takeuchi, T. Preparation of Protein-Imprinted Polymers Bearing Tunable Domains, The 7th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2012)、2012年8月27日、Paris, France

⑱ Suga, Y., Sunayama, H., Ooya, T., Takeuchi, T. Protein-recognizing polymer by post-imprinting introduction of fluorescent dye using a cleavable functional monomer, The 7th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2012)、2012年8月27日、Paris, France

⑲ Takeuchi, T. Molecularly imprinted polymers for spectroscopic sensing, The 7th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2012)、2012年8月27日、Paris, France

⑳ Kuwahara A., Ohta T., Sunayama, H., Ooya, T., Takeuchi, T. Site-specific introduction of a fluorescent molecule by post-imprinting modification The 7th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2012)、2012年8月27日、Paris, France

㉑ Kamon Y., Ooya, T., Takeuchi, T. Protein imprinting by living radical polymerization The 7th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2012)、2012年8月27日、Paris, France

㉒ Sunayama, H., Ooya, T., Takeuchi, T. Post-imprinting treatment of molecularly imprinted polymers for proteins to enhance specific binding signals, Biosensors 2012、2012年5月18日、Cancun, Mexico

〔図書〕(計1件)

① Takeuchi, T. Protein-sensing using organic/inorganic hybrid materials prepared by liquid-phase deposition-based molecular imprinting, In: Lee, S-W, Kunitake T. *Handbook of Molecular Imprinting* 2013, pp. 487-497, Pan Stanford Publishing Pte Led. (Singapore).

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔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