高分子プローブとしてのモレキュラーインプリントポリマー

竹 内 俊 文

モレキュラーインプリンティングは鋳型重合の一種で、分子認識高分子を簡便に合成できる手法である。最近、分子認識のみならず、標的分子の結合イベントを二次的情報として発信するインプリントポリマーの合成が報告されている。本稿ではその事例として、蛍光性標的分子の蛍光をシフトさせるインプリント蛍光シフト試薬およびジアステレオ選択的蛍光変化を示す金属ポルフィリン含有インプリントポリマーについて概説する。

すべての生物における生体機能の発現の引き金は、特定の分子がその受け皿を見つけて相互作用する、すなわち「分子認識」から始まる。生体高分子が、特定の分子（標的分子）を高度に認識する機能を発現するためには、生体高分子が折れ曲がり、標的分子が結合するのに都合のよい三次元空間を創り出すという「場」の効果と、その三次元空間において、結合に必要な官能基が標的分子と相互作用するのに都合のよい位置に配置される「分子のアセンブリ」が重要である。構成成分が同じでも、意図をもって折りたたみ、集合させた組織構造が構築されない限り、機能を発揮することはない。標的分子と相互作用可能な官能基が、生体高分子と同じように三次元空間内に適切に配置されれば、原理的には生体高分子が発揮する機能を人工的に再現することができる。ご存知のように、生体高分子はアミノ酸が連なってできており、いわばアミノ酸の「ひも」がうまくお互いに相互作用しながらヘリックスやターン構造をとり、標的分子を認識するための場を構築する。アミノ酸配列の違いによって、できる構造体と機能は異なるため、生体高分子のアミノ酸配列と発現する機能との関係が完全に解明されれば、生体と同様な機能をもつ材料を、人工的にアミノ酸を用いて再現することができる。このあたりの研究領域は、ライフサイエンスの中でもっとも注目されている領域である。

一方、アミノ酸とはまったく異なる材料で、生体の戦略とはまったく異なる方法を用いて、生体機能を人工的に再

現する試みがなされている。モレキュラーインプリンティング^{1)~6)}という手法で、「分子の鋳型を取る」とか「分子の物理的・化学的性質を記憶させる」技術と言われている。石膏のギブスや金型を想像してもわかるが、ある形の物体を混入させて材料を固めてつくり、後からそれを抜くと、抜いた後にはその形に見合った空洞ができる。モレキュラーインプリンティングは、これを分子レベルで行う技術である（図1）。この技術を用いて分子の鋳型を取ると、生体高分子のように結合に都合のよい三次元空間が人工材料の中に構築され「分子認識」機能が発現するので、生体高分子の機能を人工的に再現することが可能であると考えられる。

モレキュラーインプリントポリマーは、これまでクロマトグラフィーの固定相にしばしば用いられ、光学異性体をはじめとする各種化合物の分離に関する報告が多かった²⁾。しかし、現在の HPLC 用固定相が、試料と固定相間の弱い相互作用を多段に用いることで高効率な分離を達成しているのに比べ、あまりにも結合力が強く、また結合部位の不均一性などの問題のあり、カラム効率があがらず、最近では HPLC 用の分離剤よりはむしろ、アフィニティー分離剤としておもに固相抽出用担体に好んで用いられる。しかし、このような分離剤としての応用は、必ずしもモレキュラーインプリントポリマーのポテンシャルをうまく活

図1 モレキュラーインプリンティングの概略

TAKEUCHI, Toshifumi 神戸大学大学院自然科学研究科/科技団戦略創造 (657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1)・教授、薬学博士。1984年 富山医科薬科大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。専門は生体機能関連化学、機能性分子化学。

Molecular Imprinted Polymers as Signaling Materials

用した応用例とはいいいがたい。やはり、インプリントポリマー特有のテラーメイド分子認識能という特質を活かす応用が期待される。最近、インプリントポリマーの分子認識能に、さらなる機能を付与することを目的とした研究が展開されており、そのひとつに、標的分子が結合するとそれに見合った二次的な情報を発信するようなインプリントポリマーの設計が試みられている。本稿では、そのような研究の事例として、標的分子の結合により標的分子自身の蛍光スペクトルがシフトするようなモレキュラーインプリントシフト試薬と、標的分子の結合によるポリマーマトリックスの分光学的変化を生じる情報発信型モレキュラーインプリントポリマーについて紹介する。

蛍光性標的分子の蛍光シフトをひき起こす モレキュラーインプリントシフト試薬⁷⁾

シンコナアルカロイドの一種であるシンコニジンは、プロトン化されるとその蛍光スペクトルが変化する。そこで、比較的酸性度の高いトリフルオロメチルアクリル酸 (TFMAA) を機能性モノマーとしてシンコニジンインプリントポリマーを合成し、種々の濃度のシンコニジンを含むクロロホルム-アセトニトリル (17:83, v/v) 溶液にポリマーを懸濁し、一定時間後にその懸濁液の蛍光スペクトルを測定したところ、スペクトルは短波長側にシフトした (図2)。

これは以下のように解釈できる。低いシンコニジン濃度、すなわち遊離シンコニジンに比べて結合シンコニジンの比率が多い条件下では 400 nm 付近にピークを示す。一方、高いシンコニジン濃度、すなわち結合しきれなくなった遊離のシンコニジンが系中に多くなる条件下では 360 nm 付近にピークがシフトしていく。ポリマーがない場合、シンコニジンは 360 nm 付近に蛍光のピークを示す。シンコニジンがプロトン化された場合はその蛍光スペクトルは長波長側にシフトすることが知られているので、シンコニジンが水素結合でポリマーに結合する際、シンコニジ

ンはトリフルオロメチルアクリル酸残基からプロトンを供与される傾向にあり、その結果、結合部位に結合するとプロトン化シンコニジン由来の蛍光に基づくシフトが観察されると考えられる。すなわち 400 nm 付近の蛍光ピークは、結合したシンコニジンによるもので、シンコニジン濃度が高くなると未結合のシンコニジンの濃度が増大するために、ピークが見かけ上 360 nm 付近にシフトしてくる。この現象を利用すれば、蛍光スペクトルのシフトを測定することによって、結合と未結合のシンコニジンの分離作業なしに結合シンコニジン量を見積もることができることを意味し、たいへん興味深い。このような変化はメタクリル酸のような弱酸性の機能性モノマーを用いたインプリントポリマーでは見られず、TFMAA の高いプロトン供与性によるものである。結合選択性も示すことから、適当な機能性モノマーを選択することにより、インプリントポリマーを分子認識能をもつシフト試薬に应用できることがわかった。

亜鉛ポルフィリンとメタクリル酸を認識部位に 有するシンコニジンインプリントポリマー⁸⁾

前述の無蛍光のインプリントポリマーを蛍光シフト試薬のように使う方法は、標的分子が蛍光をもつ場合に有効であるが、標的分子が無蛍光の場合は、インプリントポリマー側に蛍光モノマーを用いることで、標的分子の結合イベントを蛍光変化という形で読み出すことが可能である。そのような蛍光性インプリントポリマーの例を紹介する。

亜鉛 (II) ポルフィリンの蛍光は、ピリジンのような塩基性の軸性配位子の配位により消光することが知られている。したがって、前項で用いたシンコニジンのような塩基性化合物を標的分子として用いて、亜鉛 (II) ポルフィリンを機能性モノマーとして用いたモレキュラーインプリンティングを行えば、シンコニジンの結合イベントを亜鉛 (II) ポルフィリンの蛍光変化で読み出せるはずである。そこで、ビニル基を有する亜鉛ポルフィリン錯体を合成し、これを機能性モノマーとして用いた。さらに、シンコニジンはそのキノリン骨格が亜鉛 (II) ポルフィリンと軸性配位結合するのに加えて、側鎖にヒドロキシル基やアミノ基などの水素結合性の官能基をもつので、水素結合性機能性モノマーであるメタクリル酸も併用してモレキュラーインプリンティングを行った (図3)。

亜鉛 (II) ポルフィリンを用いるインプリントポリマーの分子認識能と結合能を評価するため、ポリマーの粒径を 30 μm 程度にそろえ、ステンレスチューブに充填し、溶離液をクロロホルム-メタノール-酢酸混液 (91:6:3, v/v/v) として保持係数を求めた (表1)。亜鉛 (II) ポルフィリンモノマーとメタクリル酸の両方を用いて合成したインプリントポリマー (IP_{PM}) のシンコニジンに対する保持係数はポ

図2 シンコニジン存在下でのシンコニジンインプリントポリマーのクロロホルム-アセトニトリル懸濁液 (17:83, v/v) の蛍光スペクトル
a: 0, b: 0.005, c: 0.02, d: 0.05, e: 0.10, f: 0.15, g: 0.25, h: 0.50 mM

図3 金属ポルフィリンとメタクリル酸を用いたシンコニジンの分子インプリンティング

表1 亜鉛(II)ポルフィリンとメタクリル酸を用いたCD-インプリントポリマーの保持係数と分離係数

CD-インプリント ポリマー	保持係数 k'		分離係数 (k_{CN}/k_{CD})
	CD	CN	
IP _{PM}	12.86	6.37	2.02
BP _{PM}	0.03	0.08	0.36
IP _P	0.11	0.11	1.00
BP _P	0.00	0.00	—
IP _M	2.56	0.85	3.03
BP _M	0.00	0.00	—

保持係数 $k' = (t_R - t_0)/t_0$, (t_R は試料の保持時間, t_0 はボイドマーカの保持時間). CD はシンコニジン, CN はそのジアステレオマーであるシンコニンを表す. IP はインプリントポリマー, BP はシンコニジンを加えないで重合したブランクポリマーを表す. 添字の P は亜鉛(II)ポルフィリン, M はメタクリル酸, PM は両方を用いて合成したポリマーであることを表す.

ルフィリンモノマーのみ(IP_P),あるいはメタクリル酸のみ(IP_M)で合成したインプリントポリマーに比べてより大きかった。また、シンコニジンは、シンコニジンのジアステレオマーであるシンコニンよりも保持が強く、ジアステレオ選択性が発現した。メタクリル酸のみでつくったインプリントポリマーも保持は弱くなるがジアステレオ選択性を示すのに対し、ポルフィリンのみのポリマーは保持が弱くジアステレオ選択性もまったく示さなかった。これらのことから、2種類の機能性モノマーを使うことにより、シンコニジンに対するインプリント効果が増大すると同時に、インプリントポリマー結合部位内のメタクリル酸残基によってシンコニジンの立体構造を認識していることがわかる。また、シンコニジンを加えないで合成したブランクポリマーはシンコニジン、シンコニンともほとんど保持せず、シンコニジンがテンプレートとして結合部位を構築するために有効に働いていることがわかる。

次に、シンコニジンがポリマーに結合することにより、亜鉛(II)ポルフィリンの蛍光がどのように変化するかを調べた(図4)。IP_{PM}とIP_Pの2つのポリマーをジクロロメタンに懸濁し、種々の濃度のシンコニジンの共存下、404 nmで励起して、604 nmの蛍光を測定した。どちらのポリマーも、加えたシンコニジンの量が増えるにつれ、蛍光の消光の度合いが増している。シンコニジンの濃度が低い領域での消光の度合いが強く、濃度が増すにつれ消光が飽

図4 シンコニジン共存下でのシンコニジンインプリントポリマー懸濁液の蛍光強度 IP_{PM}(●)とIP_P(▲)の蛍光を励起波長404 nm, 蛍光波長604 nmで計測 [CD]_{inc}はシンコニジン初期濃度, I は各濃度における蛍光強度, I_0 はシンコニジンなしのときの蛍光強度

和していく。非直線的な関係は、蛍光の消光が単なる亜鉛ポルフィリンへのシンコニジンの非特異的な吸着によるものではなく、亜鉛ポルフィリンをもつ特異的な結合部位にシンコニジンが結合していることを示している。また、インキュベートしたシンコニジンの濃度の対数に対して相対蛍光強度をプロットすると直線になる。このことは、亜鉛(II)ポルフィリンを機能性モノマーとしたインプリントポリマーが、シンコニジンを定量できる蛍光センサになりうることを示している。IP_{PM}の懸濁液中にシンコニジンのジアステレオマー、シンコニンを共存させた場合は、消光がほとんど見られなかったことから、この消光現象は、ポリマーのジアステレオ選択的な結合情報を読み出していることになる(図5)。また、ジアステレオ選択性の発現には、亜鉛(II)ポルフィリンは関与せず、メタクリル酸残基が必要なことは前に示したが、亜鉛(II)ポルフィリンの消光現象がジアステレオ選択的なことを考え合わせると、ひとつの結合部位中に亜鉛(II)ポルフィリンとメタクリル酸の両方が存在し、亜鉛(II)ポルフィリンは情報発信性モノマー、メタクリル酸はジアステレオ選択性モノマーとして協同的に機能していることがわかる。

このように、金属ポルフィリンのような蛍光性の機能性モノマーを用いることで、標的分子の結合を分光学的変化で読み出すことができる材料の可能性が示唆された。シンコニジンの代わりに核酸関連物質である9-エチルアデニ

図5 シンコニジン(■)とシンコニン(□)によるIP_{PM}のジアステレオ選択的消光
励起波長 404 nm, 蛍光波長 604 nm で測定。I は各濃度における蛍光強度, I₀ はシンコニジンなしのときの蛍光強度

ンをインプリントしたポリマー^{9), 10)}でも、同様な結果が得られ、亜鉛ポルフィリンを結合部位にもつインプリントポリマーは、亜鉛に配位可能な塩基性物質全般に対し、蛍光センサとして用いることができると考えられる。金属ポルフィリンは一般的有機化合物が吸収や蛍光を示さない長波長領域に吸収や蛍光を有する化合物であるため、分析対象物に妨害されることなくスペクトルの測定が可能になる点も見逃せない。結合部位から情報を発信できるようなインプリントポリマーの報告はまだ多くなく、今後、有力なセンシング材料としての応用が増えていくものと期待される。ポルフィリンは多くの金属イオンと錯体を形成することが可能であり、中心金属を変えることにより、さらにさまざまな機能をもった材料へ展開することが可能であると思われる。

おわりに

モレキュラーインプリンティングは簡便な操作で高い認識能を有するポリマーが合成可能で、テーラーメイド的に分子認識材料をつくることができるところが特徴である。本稿で述べたようなモレキュラーインプリント分子認識材

料の高分子プローブとしての利用はまだその緒についたばかりであるが、従来の精密な分子設計と多段階の煩雑な合成手法によって得られてきた人工レセプターとは大きく異なるこの手法は、さまざまなモノマーと鋳型となる分子の組み合わせで自己集散的に結合部位を構築可能なことから、機能性高分子合成法として合理性があり無限の可能性があると思われる。また、インプリントポリマーを合成した後に、結合部位の官能基をさらに改変するポストインプリント処理¹¹⁾などの手法も開発されている一方で、コンピュータ支援自動合成評価システムを用いたインプリントポリマーの平行合成^{12), 13)}とコンビナトリアルライブラリの構築なども始められており、今後の発展に期待するところ大である。

文 献

- 1) M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma: "Molecular Imprinting," WILEY-VCH, Weinheim, 2002
- 2) "Molecularly Imprinted Polymers," B. Sellergrén, Ed., Elsevier, Amsterdam, 2001
- 3) "Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers," R. A. Bartsch, M. Maeda, Eds., ACS Symp. Ser. 703, American Chemical Society, Washington, D.C., 1998.
- 4) G. Wulff: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 1812 (1995)
- 5) T. Takeuchi, J. Haginaka: *J. Chromatogr. B*, **728**, 1 (1999)
- 6) K. Haupt, K. Mosbach: *Chem. Rev.*, **100**, 2495 (2000)
- 7) J. Matsui, H. Kubo, T. Takeuchi: *Anal. Chem.*, **72**, 3286 (2000)
- 8) T. Takeuchi, T. Mukawa, J. Matsui, M. Higashi, K. D. Shimizu: *Anal. Chem.*, **73**, 3869 (2001)
- 9) J. Matsui, Y. Tachibana, T. Takeuchi: *Anal. Commun.*, **35**, 225 (1998)
- 10) J. Matsui, M. Higashi, T. Takeuchi: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5218 (2000)
- 11) T. Mukawa, T. Goto, T. Takeuchi: *Analyst*, **127**, 1407 (2002)
- 12) T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui: *Anal. Chem.*, **71**, 285 (1999)
- 13) T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui, T. Mukawa: *Chem. Lett.*, 530 (2001)