タンパク質の分子インプリンティング

竹内俊文

神戸大学大学院 工学研究科 応用化学専攻
〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

Molecular Imprinting for Proteins

Toshihumi Takeuchi

Graduate School of Engineering, Kobe University
1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

This review describes recent progress in molecular imprinting for proteins. Molecular imprinting is one of the available template polymerization techniques and has emerged as a method for the preparation of synthetic receptors mimicking naturally occurring molecular recognition phenomena. This technique may offer a means of creating binding sites bearing bio-like functions and substitutes of natural receptors, enzymes and antibodies. Proteomics is an important technology in medicine and biotechnology. Protein-imprinted polymers could be a new tool for protein analysis in this area.

Key words : molecular imprinting / molecular recognition / proteins / bio-functional synthetic polymers

1. はじめに

最近, 分子認識化学や生体模倣化学, 超分子化学などの領域で, 分子インプリンティング¹⁾という手法が注目されている。これは, 鋳型重合の一種で, 認識したい分子 (鋳型分子) の存在下, 架橋性のポリマーをラジカル重合により合成し, そのポリマーから鋳型分子を洗い出すことによりポリマー内に鋳型分子と相補的な結合部位を構築する技術 (Fig. 1) である。特別な分子設計が必要なく, 極めて簡便な操作で, 高い選択性と親和性をもつ架橋ポリマーが合成できることから, 1970年代から年間に数報であった分子インプリンティングに関する発表論文数は加速度的に増加し, この分野の急速な発展を物語っている。また, 本誌34巻第4号にも分子インプリント膜の総説²⁾が掲載されており合わせて参照されたい。

高い分子認識機能を得るためには, いかに標的分子に対して高い選択性を有する標的分子結合部位をポリマー内に構築できるかがポイントであり, 鋳型分子と機能性モノマーの相互作用様式的设计がこれに大きな影響を及ぼす。一般的には, この様式は非共有結合型と共有結合型に大別され, 前者は水素結合や静電的相互作用などの非共有結合を利用して, 重合反応溶液中に鋳型分子と機能性モノマーの複合体を生成させてそのまま架橋剤とともに重合する方法であり, 後者は, あらかじめ複合体を合成・単離し, それを鋳型分子として用い架橋剤とともに重合する方法である。この二つの方法は, 標的分子の化学的性質によって, より有効な効果がでるように使い分けられている。

タンパク質発現の系統的, 網羅的な解析であるプロテオミクスは, 人の病態や加齢に伴う変化や癌化に関連して重要である。プロテオミクス研究のためには, タンパクの発現量, 機能や構造の変化などの解析が必要不可欠であることから, タンパク質認識材料の開発が興味をもたれている。その流れで, 分

Fig. 1 Schematic Illustration of Molecular Imprinting.

子インプリンティングの興味も、従来の低分子からタンパク質へと移行してきた。タンパク質の分子インプリンティングを行う場合、タンパク質は熱やpH変化でその構造が壊れてしまうので、できるだけ穏和な条件で鋳型分子-機能性モノマー複合体の形成およびインプリントポリマー重合を行う必要がある。

初期の研究として、Mosbachらは糖タンパクであるトランスフェリンを鋳型分子とし、ボロン酸と糖鎖部分との相互作用を利用してトランスフェリン質認識インプリントポリマーを合成した³⁾。箕浦らはグルコースオキシダーゼを鋳型分子とし、静電的相互作用を期待して機能性モノマーに負電荷をもつアクリル酸や正電荷を持つジメチルアミノプロピルアクリルアミドなどを用いてシリカゲル表面上にインプリントポリマーを合成した。シリカゲルは機械的強度を増すためとインプリントポリマーの表面積拡大のために用いられた。グルコースオキシダーゼは、その表面電荷値と符号が逆で絶対値がほぼ同じ表面電荷値を持つインプリントポリマーに対し高い結合能をもった^{4,5)}。このことは、静電的相互作用により結合するインプリントポリマーでは、ポリマーの電荷が結合能に重要であることを示唆している。金属配位結合を利用したインプリントポリマーも報告されており⁶⁾、これは、金属キレートモノマーであるN-(4-ビニル)-ベンジルイミノジ酢酸-銅(II)錯体とタンパク質のヒスチジン残基の配位結合を利用してリボヌクレアーゼAと複合体を形成し、架橋剤を加えシリカゲル表面上で重合しインプリントポリマーを合成したものである。このインプリントポリマーを用いてリボヌクレアーゼAとリゾチームの分離に成功した。Ratnerらは、高周波グロー放電プラズマ法を用い、二糖分子で被覆したタンパク質の周囲に薄膜を形成することでタンパク質の分子インプリンティングを行った⁷⁾。鋳型タンパク質を除いた後の空孔内には二糖分子が残存するので、あたかも多糖で覆われた環境の空孔となっている。この空孔は、鋳型としたアルブミン、免疫グロブリンG、リゾチーム、リボヌクレアーゼ、ストレプトアビジンなどを認識した。このようにタンパク質のモレ

キュラーインプリンティングはいくつか報告されているが、抗体の代替となるためには、特異性の向上が課題であり、さらなる研究が必要である。次に、最近のタンパク質の分子インプリンティングの研究動向について紹介する。

2. タンパク質インプリントポリマーアレイ

嗅覚受容体は匂いに対する吸着特性が異なり、そのことが多様な匂いに対しても、それぞれの匂い物質に対する特定の吸着パターンを生み出すことを可能にし、受容体の数以上の匂いを識別できる。このパターン認識はタンパク質の識別にも適用可能である⁸⁾。すなわち、複数のタンパク質インプリントポリマーに対する標的タンパク質の結合パターン情報から、そのタンパク質の識別が行われた。機能性モノマーとしてアクリル酸(AA)を用い、親水性架橋剤としてメチレンビスアクリルアミドを用いて、シトクロームC、リボヌクレアーゼA、ラクトアルブミンを鋳型分子に用いたインプリントポリマーおよびタンパク質を加えないブランクポリマーの計4種類のポリマーを合成した。また機能性モノマーに塩基性の2-ジメチルアミノエチルメタクリレート(DMA)を用いたインプリントポリマーも同様に8種類調製した。この8種類のポリマーについて、シトクロームC、リボヌクレアーゼA、ラクトアルブミン、鋳型分子として用いなかったミオグロビン、アルブミンの計5種類のタンパク質に対する吸着量をみた。Fig. 2に5つのタンパク質が8種類のポリマーに対してどの程度結合するかを相対的に表したグラフを示す。それぞれのポリマーは、鋳型タンパク質に対し最も吸着量が多く、ブランクポリマーは三者とは違う吸着パターンを示した。この吸着パターンはタンパク質によって異なり、タンパク質を識別可能なある種のフィンガープリントといえる。さらに、これらのデータを多変量解析のひとつである主成分分析で解析して結果をプロットしたところ、それぞれのタンパク質が、三次元グラフ上できれいに分割できることが分かった(Fig. 2)。また、AAを用いた酸性インプリントポ

Fig. 2 (A) Fingerprints of five proteins tested based upon AA-based and DMA-based polymers. The total amount bound of each protein for the four polymers corresponds to 100 %; (B) Principal component analysis score plots showing the discrimination of four trials of five different proteins based upon to the bound amounts of AA-based and DMA-based polymers.

リマーとDMAを用いた塩基性のインプリントポリマーではその吸着特性が異なり、主成分分析のスコアプロットも両者で大きく異なった。すなわち、タンパク質インプリントポリマーをアレイフォーマットにしてその吸着パターンを多変量解析すれば、鋳型タンパク質はもとより鋳型を取っていないタンパク質でも認識可能ことが示された。従って、多数のタンパク質インプリントポリマーを用いることにより、人工材料を用いた新しいタンパク質のフィンガープリントやプロテインチップの実現可能性が示唆された。

3. LPD 法による有機・無機ハイブリッドタンパク質インプリント材料

ナノテクノロジーの分野で、無機材料は様々な粒子、薄膜、チップ、その他の構造体に頻りに用いられている。その硬い構造と安定性から、分子認識の分野でも興味を持たれている。金属酸化物薄膜はナノテクノロジー分野でよく使われている材料で、一般的には、蒸着法、スパッタ法などの物理的手法や化学気相成長法などの化学的手法などの気相法で調

製される。気相法は、高エネルギーや熱処理が必要なので、残念ながらタンパク質の分子インプリンティングには使用できない。一方、金属酸化物薄膜は、常温・常圧、水溶液中で行う液相法によっても調製できる。ソフトプロセスである液相法は、タンパク質に対しても比較的ダメージが少ないのでタンパク質インプリント材料の合成法として期待される。例えば、最近ゾルゲル法でヒト血清アルブミンのインプリント膜を水晶振動子センサ上に作成したと報告されている⁹⁾。また、溶液内平衡反応を用いた金属酸化物薄膜の調製法である液相析出 (LPD) 法によるタンパク質インプリンティングも報告された¹⁰⁾。ゾルゲル法とは全く異なる凝集系反応である LPD 法は、基板追従性がよく、大面積化も容易であり、用いる LPD 溶液組成を変えることで薄膜材料の組成制御が簡単に行えるなどの利点を有している。LPD 法は、金属のフッ化物イオンの加水分解反応 (析出反応) が基本で、生成するフッ素イオンをホウ酸で捕捉 (析出駆動反応) することにより、析出反応の平衡をずらし金属酸化物を析出させる方法で、基板などをこの反応系に入れておくと、基板に金属酸化物が徐々に析出して薄膜を形成する¹¹⁾。

モデルタンパク質としてペプシン、金属酸化物には酸化チタンを用い、ペプシンと静電的な相互作用が期待できるポリリジンペプシンのバインダーとして薄膜中に複合化した酸化チタンの薄膜を表面プラズモン共鳴 (SPR) センシングチップ上に製膜した。ペプシンを添加しないで調製したポリリジン複合 TiO_2 薄膜 BF (PL) とペプシンを共存させて調製したペプシンインプリントポリリジン複合 TiO_2 薄膜 IF (Pep-PL) の結合特性を比較したところ、IF (Pep-PL) はペプシンに対して高い選択性を示した (Fig. 3)。これは、標的分子のペプシンが合成時にポリリジンと複合体を形成し、これが酸化チタン膜に複合化され、ペプシンに対して相補的に相互作用する表面が形成されて鋳型効果が発現したためと考えられる。LPD法を用いるタンパク質の分子インプリンティングは、混合するポリイオン化合物を変えることで簡便に異なる有機・無機ハイブリッド膜が調製でき、様々なタンパク質とポリイオンの組み合わせから多様なタンパク質認識材料が合成可能であると思われる、化学センサ素子の新しいテーラーメイド的な構築法として期待される。

4. タンパク質結晶インプリンティング

水溶液中でタンパク質は分子運動のため構造が微妙に揺らぐので、鋳型を正確に取ることができず、その結果、選択的な結合部位を構築することが困難である場合がある。これを解決するためには、鋳型分子を担体上に固定し、その分子運動を抑えてインプリントポリマー合成を行う固定化テンプレート法が適していると思われる。しかし、担体や基板上にタンパク質を固定化すると、タンパク質の高次構造が変化してしまうおそれがある。したがってタンパク質の固定化テンプレート法をおこなう場合、穏和な条件で鋳型分子の固定化を行う必要がある。そこでタンパク質結晶を利用することが検討された¹²⁾。結晶中の分子は周囲の分子と相互作用して、3次元的に固定化されているといえる。結晶では個々のタンパク質の分子運動が抑制されており、結晶表面の鋳型を正確に取ることができれば、結合特異性の向上が期待できる。

結晶インプリント法のための鋳型分子としてリゾチーム結晶を選択し、SPRセンサチップ上に結晶タ

Fig. 3 Binding behaviors of proteins on the prepared LPD thin films. BF(PL): prepared with PL; IF (Pep-PL): prepared with Pep and PL.

ンパク質インプリントポリマー薄膜を調製した。この結晶インプリントポリマーに対するタンパク質の結合量をSPRセンサにより測定し、結合特異性を評価した。セルロースエステル膜上にリゾチーム結晶を生成させスライドガラスに乗せ、機能性モノマーとしてアクリル酸、非特異的吸着を抑えるための親水性コモノマーとして2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、親水性架橋剤としてメチレンビスアクリルアミド、沈殿剤としてポリエチレングリコール3500を含む50 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) を滴下した。この上にアクリロイル基を導入したSPRセンサチップ、さらにはスライドガラスを順にのせ重合し、その後リゾチーム結晶を洗浄することで結晶インプリントポリマー薄膜SPRセンサチップを得た (Lys-CIP)。対照薄膜として、溶液に溶けたリゾチームを用いた溶液インプリントポリマー薄膜 (Lys-MIP)、およびリゾチーム非存在下で合成したブランクポリマー薄膜 (NIP) も作製した。各薄膜に対するリゾチーム、チトクロムc、リボヌクレアーゼA、トリプシン、キモトリプシン、ミオグロビン、ラクトアルブミンの相互作用をSPRセンサにより評価した。Lys-CIPは、NIPに比べてリゾチームに対する選択性が高くインプリント効果が確認された。また、Lys-CIPは溶液に溶けたフリーのリゾチームをインプリントしたLys-MIPよりも選択性が高いことから、リゾチーム結晶を用いることで、リゾチーム分子の分子運動を抑制することができ、正確に鋳型がとれたため、結合特異性が向上したと思われる。最近、有機溶媒中でタンパク質結晶インプリンティング¹³⁾が報告され興味深い。ただし、タンパク質結晶は有機溶媒中で溶解することはないが、水溶液中とは異なる相互作用によって機能性モノマーと相互作用し

Fig. 4 Preparation of protein crystal-imprinted polymers.

ながらインプリンティングが行われ、認識は水系で行われることから、簡便ではあるが注意深い適用が必要である。

5. 終わりに

タンパク質を認識する目的で、抗体などの生体材料が主に利用されているが、動物を用いるため煩雑な操作と長期の作製期間を要する。そのため、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な人工レセプターの開発が望まれており、タンパク質インプリンティングは、その可能性に期待が集まる。最近、タンパク質の一部を鋳型分子として用いるエピトープ（通常、抗体が認識する抗原の一部分のことを言う）インプリンティング¹⁴⁾が報告された。Sheaらは標的タンパク質のC末端9残基をこのタンパク質のエピトープとしてインプリンティングしたところ、これらのポリマー膜は対応する標的タンパク質に対し高い選択性を示し、C末端9残基のインプリンティングでタンパク質全体を見分けるインプリントポリマーが出来ることがわかった。これは、例えば塩基配列さえわかれば、タンパク質がなくてもそのタンパク質を認識する材料を得ることが出来ることを意味し興味深い。また、面白い例として、ほとんど架橋されておらず厳密には鋳型を取る分子インプリンティングとはいえないが、糖結合タンパク質のレクチンと抗体を機能性モノマーのようにして使い、癌のマーカーであるグリコプロテインを認識するゲルが報告されている。このゲルは、グリコプロテインを結合すると収縮し、この収縮は、グリコプロテインの糖鎖と抗原決定基が、結合部位内のレクチンと抗体の両方に結合したときに初めて

おこり、その度合いは濃度に従った¹⁵⁾。このように、タンパク質のモレキュラーインプリンティングとその周辺技術は急速に発展しつつあり、今後、実用化に向けた取り組みに移行していくことが期待される。

文 献

- (a) Bartsch RA, Maeda M, Eds. : ACS Symp Ser, 703 : Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers; American Chemical Society, Washington, DC (1997); (b) Sellaergren B, Ed. : Molecularly Imprinted Polymers, Elsevier, Amsterdam (2001); (c) Komiyama M, Takeuchi T, Mukawa T, Asanuma H : Molecular Imprinting, ILEY-VCH, Weinheim (2002); (d) Wulff G : *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 1812 (1995); (e) Takeuchi T, Haginaka J : *J. Chromatogr.*, **B**, 728, 1 (1999); (f) Haupt K, Mosbach K : *Chem. Rev.*, **100**, 2495 (2000); (g) Zimmerman SC, Lemcoff NG : *Chem. Commun.*, 5 (2004) ; (h) Wei S, Jakusch M, Mizaikoff B : *Anal. Chim. Acta*, **578**, 50 (2006); (i) Turner NW, Jeans CW, Brain KR, Allender CJ, Hlady V, Britt DW : *Biotechnol. Prog.*, **22**, 1474 (2006); (j) Bossi A, Bonini F, Turner APF, Piletsky SA : *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1131 (2007); (k) Hansen DE : *Biomaterials*, **28**, 29, 4178 (2007); (l) Takeuchi T, Hishiya T : *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 2459 (2008)
- 吉川正和 : *Membrane*, **34**, 186-194 (2009)
- Glad M, Norrlöw O, Sellaergren B, Siegbahn N, Mosbach K : *J. Chromatogr.*, **347**, 11-23 (1985)
- Bürow M, Minoura N : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227**, 419 (1996)
- Hirayama K, Bürow M, Morikawa Y, Minoura N : *Chem. Lett.*, 731 (1998)
- Kempe M, Glad M, Mosbach K : *J. Molec. Recogn.*, **8**, 3539 (1995)
- Shi HQ, Tsai WB, Garrison MD, Ferrari S, Ratner BD : *Nature*, **398**, 593 (1999)

- 8) Takeuchi T, Goto D, Shinmori H : *Analyst*, **132**, 101 (2007)
- 9) Zhang Z, Long Y, Nie L, Yao S : *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1244 (2006)
- 10) Tatemichi M, Sakamoto M, Mizuhata M, Deki S, Takeuchi T : *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 10906 (2007)
- 11) 出来成人, 水畑 稔 : 「実験化学講座」第5版27巻, p.398 (2006)
- 12) Matsunaga T, Takeuchi T : *Chem. Lett.*, **35**, 1030 (2006)
- 13) Hayden O, Haderspoeck C, Krassnig S, Chen X, Dickert FL : *Analyst*, **131**, 1044 (2006)
- 14) Nishino H, Huang CS, Shea KJ : *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 2392 (2006)
- 15) Miyata T, Jige M, Nakaminami T, Urugami T : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 1190 (2006)

(Received 4 October 2009 ;

Accepted 8 October 2009)

著者略歴

竹内 俊文 (たけうち としふみ)

1984年 富山医科薬科大学大学院薬学研究科医療薬科学専攻博士後期課程修了 (薬学博士)

同年 日本大学理工学部薬学科 助手

1988年 米国デラウェア大学・ハワイ大学マノア校 博士研究員

1991年 東京大学先端科学技術研究センター海洋バイオテクノロジー寄付研究部門 助教授

1994年 広島市立大学情報科学部情報機械システム工学科 教授

2001年 神戸大学大学院自然科学研究科分子集合科学専攻 教授

2002年 (独) 科学技術振興機構さきがけ 研究員 併任 (2005年まで)

2003年 神戸大学大学院自然科学研究科分子物質科学専攻 教授 (改組)

2006年 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻 教授 (改組)

現在に至る